第70回（平成30年）

日本生物工学会大会

講演要旨集

会　期　2018年9月5日（水）～7日（金）

会　場　関西大学　千里山キャンパス

公益社団法人　日本生物工学会

第70回
日本生物工学会大会プログラム
（2018）

一般講演・シンポジウム

会　期　2018年9月5日（水）～7日（金）
会　場　関西大学　千里山キャンパス（吹田市山手町3丁目3番35号）

授賞式典・受賞講演

日　時　2018年9月5日（水）9：00～11：30
会　場　関西大学　千里山キャンパス　第2学舎4号館1階BIGホール100（A会場）
（生物工学奨励賞・アジア若手賞の講演日程については大会日程表をご覧下さい）

懇 親 会

日　時　2018年9月5日（水）18：00～20：00
会　場　関西大学　千里山キャンパス　100周年記念会館ホール

ランチョンセミナー

期　間　2018年9月5日（水）～7日（金）
会　場　関西大学　千里山キャンパス　第4学舎2号館･4号館（LS1, LS2, LS3会場）

展 示 会

期　間　2018年9月5日（水）～7日（金）
会　場　関西大学　千里山キャンパス　第4学舎4号館3階

ワークショップ

日　時　2018年9月6日（木）16：40～17：40
会　場　関西大学　千里山キャンパス　第4学舎3号館1階　D会場

生物工学若手研究者の集い（若手会）総会・交流会／ものづくり交流サロン

日　時　2018年9月6日（木）17:00～20:00
会　場　関西大学　千里山キャンパス　凜風館2階食堂・ディノア

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）

一般講演座長一覧……（5）

実行委員会担当者表……（6）

会場案内図……（7）

受賞者一覧……（11）

各種講演番号の見方……（12）

プログラム

第1日目　授賞式・受賞講演，一般講演，ランチョンセミナー ……（13）

第2日目　受賞講演，一般講演，ランチョンセミナー，ワークショップ，
ものづくり交流サロン ……（31）

第3日目　招待講演・シンポジウム，一般講演，ランチョンセミナー ……（53）

要旨

第1日目　受賞講演 ……（77）

一般講演……（79）

第2日目　受賞講演 ……（139）

一般講演　午前の部……（141）

一般講演　午後の部……（175）

第3日目　招待講演・シンポジウム（午前の部） ……（209）

シンポジウム（午後の部　13:00–15:00）……（211）

招待講演・シンポジウム（午後の部　15:20–17:20/17:50）……（235）

一般講演……（263）

人名索引……（291）

キーワード索引……（305）

ランチョンセミナープログラム……（317）

ランチョンセミナー要旨……（319）

ワークショップ要旨……（328）

ものづくり交流サロン要旨……（329）

2018年8月22日（水）～11月6日（火）まで
大会HP（https://www.sbj.or.jp/2018/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5日（水）			
	午　前	昼	午　後	
	9:00-11:30	11:45-12:45	13:30-17:30	18:00-20:00
A会場（第2学舎4号館1階）	授賞式・受賞講演（功労賞，生物工学賞，功績賞，技術賞）			
C会場（第4学舎3号館2階）			脂質工学/食品科学，食品工学	
D会場（第4学舎3号館1階）			抗体工学	
E会場（第4学舎2号館1階）			ペプチド工学/核酸工学/植物細胞工学，組織培養，育種工学	
F会場（第4学舎2号館1階）			生物化学工学/培養工学/バイオプロセス	
G会場（第4学舎2号館2階）			遺伝子工学	
H会場（第4学舎2号館2階）			バイオマス，資源，エネルギー工学	
I会場（第4学舎2号館3階）			タンパク質工学	
J会場（第4学舎2号館3階）			発酵生理学，発酵工学/代謝工学/オミクス解析	
K会場（第4学舎2号館3階）			発酵生理学，発酵工学/代謝工学/オミクス解析	
L会場（第4学舎2号館3階）			バイオセンシング，分析化学/センサー，計測工学	
M会場（第4学舎2号館3階）			酵素学，酵素工学	
N会場（第4学舎2号館4階）			分類，系統，遺伝学/環境浄化，修復，保全技術/環境工学，廃水処理技術	
O会場（第4学舎2号館4階）			生体医用工学/セル＆ティッシュエンジニアリング	
LS1会場（第4学舎4号館2階）		[L]株式会社島津製作所		
LS2会場（第4学舎4号館2階）		[L]エッペンドルフ株式会社		
LS3会場（第4学舎2号館5階）		[L]ノバ・バイオメディカル株式会社		
100周年記念会館				懇親会

会場	9月6日（木）					
	午　前	昼	午　後			
	9:00-11:36	11:45-12:45	13:30-13:50	14:06-16:30	16:40-20:00	
B会場（第4学舎3号館4階）		代議員会 (11:50-13:00)				
C会場（第4学舎3号館2階）	食品科学，食品工学		受賞講演（江田賞）	醸造学，醸造工学		
D会場（第4学舎3号館1階）	醸造学，醸造工学				[W]生物工学系の研究・開発の安全のために（16:40-17:40）	
E会場（第4学舎2号館1階）				生物化学工学/培養工学/バイオプロセス		
F会場（第4学舎2号館1階）	生物化学工学/培養工学/バイオプロセス		受賞講演（照井賞）	生物化学工学/培養工学/バイオプロセス		
G会場（第4学舎2号館2階）	遺伝子工学			遺伝子工学		
H会場（第4学舎2号館2階）	バイオマス，資源，エネルギー工学		受賞講演（アジア若手賞）	バイオマス，資源，エネルギー工学		
I会場（第４学舎2号館3階）	タンパク質工学			タンパク質工学/生体情報工学，バイオインフォマティクス/システムバイオロジー		
J会場（第４学舎2号館3階）	発酵生理学，発酵工学/代謝工学/オミクス解析			発酵生理学，発酵工学/代謝工学/オミクス解析		

K会場 （第４学舎2号館3階）	発酵生理学，発酵工学/代謝工学/オミクス解析			発酵生理学，発酵工学/代謝工学/オミクス解析		
L会場 （第4学舎2号館3階）	糖鎖工学/生合成，天然物化学			酵素学，酵素工学		
M会場 （第4学舎2号館3階）	酵素学，酵素工学		受賞講演 （斎藤賞）	酵素学，酵素工学		
N会場 （第4学舎2号館4階）	環境浄化，修復，保全技術/環境工学，廃水処理技術			環境浄化，修復，保全技術/環境工学，廃水処理技術		
O会場 （第4学舎2号館4階）	セル＆ティッシュエンジニアリング			セル＆ティッシュエンジニアリング		
LS1会場 （第4学舎4号館2階）		[L]タカラバイオ株式会社				
LS2会場 （第4学舎4号館2階）		[L]三洋貿易株式会社				
LS3会場 （第４学舎2号館5階）		[L]宇宙航空研究開発機構 (JAXA)				
凛風館2階ディノア						若手会総会・交流会 ものづくり交流サロン (17:00-20:00)

会場	9月7日（金）			
	午　前	昼 11:35-12:35	午　後	
	9:00-11:24		13:00-15:00	15:20-17:20/17:50
B会場 （第4学舎3号館4階）			[S]1細胞解析に向けた刺激応答性分子ツールの創製と応用展開	[S]構造と機能デザインによる有用人工酵素の創製と応用展開　※シンポジウムに先立ち，KSBB招待講演を開催（Prof. Tae-Joon Jeon (Inha University)）
C会場 （第4学舎3号館2階）	醸造学，醸造工学		[S]SDGsに資する環境共生微生物を活用したアグリバイオ工学研究の新展開	[S]資源作物生産から発酵生産までをトータルシステムとして俯瞰する
D会場 （第4学舎3号館1階）	[S]新しい農業と未来の食料のための生物工学《国際シンポジウム》【本部企画】　※シンポジウムに先立ち，KSBB招待講演を開催（Prof. Si Wouk Kim (Chosun Univ.)）		[S]発酵食品の機能性を考える～一次機能から三次機能まで【本部企画】	[S]黒麹菌・白麹菌の研究からつなげる産業振興
E会場 （第4学舎2号館1階）	生物化学工学/培養工学/バイオプロセス		[S]エネルギーを使う，捨てる光合成の再最適化―光合成生物工学にむけた未踏研究―	[S]生物系研究者のための電気化学入門～その実験大丈夫？～
F会場 （第4学舎2号館1階）	生物化学工学/培養工学/バイオプロセス		[S]半金属元素のバイオテクノロジー	[S]環境は持続可能か？―地球規模の物質循環を生物工学から考える―
G会場 （第4学舎2号館2階）	バイオマス，資源，エネルギー工学		[S]スマートセル開発のためのバイオ技術とデジタル技術の革新と融合　バイオ生産に資する DBTLサイクルの構築に向けて	[S]タンパク質と材料界面の相互作用の本質に迫る ※シンポジウムに先立ち，KSBB招待講演を開催（Prof. Jeong Hyun Seo (Yeungnam Univ.)）
H会場 （第4学舎2号館2階）	バイオマス，資源，エネルギー工学		[S]新時代の物質生産宿主開発の方法論：ゲノムを大規模に編集する。代謝計測から設計図を書く	[S]スマートバイオデザイン：ナノからマクロスケールまでの様々な階層レベルにおけるバイオ関連機能と構造の合理的創出を目指して　※シンポジウムに先立ち，KSBB招待講演を開催（Prof. Jong Wook Hong (Hanyang Univ.)）
I会場 （第4学舎2号館3階）	生体情報工学，バイオインフォマティクス/システムバイオロジー			
K会場 （第４学舎2号館3階）	発酵生理学，発酵工学/代謝工学/オミクス解析		[S]地域から世界へ，グローカルバイオテクノロジーで創る新しい価値	[S]ASEANにおける生物資源の社会実装を目指した研究ネットワーキング《国際シンポジウム》
L会場 （第４学舎2号館3階）	酵素学，酵素工学		[S]複雑組織製造に必要な基盤技術を考える―どこまで出来て，何が足らないのか？―	[S]工学が見出すエッセンシャル細胞培養　～動物細胞培養の根本に工学はどう立ち向かうか～【本部企画】
M会場 （第4学舎2号館3階）	酵素学，酵素工学		[S]真核微生物におけるシグナル伝達と代謝の接点を探る―発酵調節の根源的な理解に向けて―	[S]糖鎖工学技術がもたらすバイオ医薬品の新潮流
N会場 （第4学舎2号館4階）	環境工学，廃水処理技術/環境浄化，修復，保全技術			
O会場 （第4学舎2号館4階）	セル＆ティッシュエンジニアリング			
LS1会場 （第4学舎4号館2階）		[L]ヒューマンメタボロームテクノロジーズ株式会社		
LS2会場 （第4学舎4号館2階）		[L]東ソー株式会社		
LS3会場 （第4学舎2号館5階）		[L]P&Gイノベーション合同会社		

S：シンポジウム　L：ランチョンセミナー　W：ワークショップ

座長一覧

一般講演

9月5日（水）

13:30–17:30

会場	講演番号	時間	座長	
C	1Cp01–06	13:30–14:42	橋本　雅仁	田代　陽介
	1Cp07–12	14:54–16:06	福田伊津子	川﨑　浩子
	1Cp13–18	16:18–17:30	藤田　憲一	松崎　弘美
D	1Dp01–06	13:30–14:42	中野　秀雄	田丸　浩
	1Dp07–12	14:54–16:06	一二三恵美	金山　直樹
E	1Ep01–06	13:30–14:42	本多　裕之	池野　慎也
	1Ep07–12	14:54–16:06	加藤　晃	浅野竜太郎
	1Ep13–17	16:18–17:18	梶浦　裕之	福島　エリ　オデット
F	1Fp01–06	13:30–14:42	田中　剛	花井　泰三
	1Fp07–12	14:54–16:06	Prihardi Kahar	小島　基
	1Fp13–18	16:18–17:30	星野　一宏	田島　誉久
G	1Gp01–06	13:30–14:42	鈴木　宏和	栗原　達夫
	1Gp07–12	14:54–16:06	金井　保	秀瀬　涼太
	1Gp13–18	16:18–17:30	中島田　豊	吹谷　智
H	1Hp01–06	13:30–14:42	佐藤　伸	佐々木千鶴
	1Hp07–12	14:54–16:06	平井　浩文	炭谷　順一
	1Hp13–18	16:18–17:30	黒田　真史	久保　幹
I	1Ip01–06	13:30–14:42	朴　龍洙	加藤　竜也
	1Ip07–12	14:54–16:06	二見淳一郎	田中　瑞己
	1Ip13–18	16:18–17:30	石川　聖人	上田　宏
J	1Jp01–06	13:30–14:42	児玉　浩明	向山　正治
	1Jp07–12	14:54–16:06	原　清敬	清水　浩
	1Jp13–18	16:18–17:30	廣田　隆一	豊島　正和
K	1Kp01–06	13:30–14:42	志田　洋介	佐々木大介
	1Kp07–12	14:54–16:06	中山　泰宗	丸山　潤一
	1Kp13–18	16:18–17:30	渡邉　研志	岡橋　伸幸
L	1Lp01–06	13:30–14:42	新間　秀一	馬場　健史
	1Lp07–12	14:54–16:06	竹山　春子	舟橋　久景
	1Lp13–17	16:18–17:18	福﨑英一郎	岡澤　敦司
M	1Mp01–06	13:30–14:42	野田　尚宏	佐藤　喬章
	1Mp07–12	14:54–16:06	三宅　英雄	阿部　勝正
	1Mp13–18	16:18–17:30	中山　亨	蒲池　利章
N	1Np01–06	13:30–14:42	山崎　敦史	新谷　政己
	1Np07–12	14:54–16:06	井口　博之	田中　裕也
	1Np13–18	16:18–17:30	武尾　正弘	遠山　忠
O	1Op01–06	13:30–14:42	森　英樹	髙木　睦
	1Op07–12	14:54–16:06	蟹江　慧	井藤　彰
	1Op13–18	16:18–17:30	岩井　良輔	大貫　喜嗣

9月7日（木）

9:00–11:24

会場	講演番号	時間	座長	
C	3Ca01–06	9:00–10:12	二神　泰基	山形　洋平
	3Ca07–11	10:24–11:24	明石　貴裕	吉田　聡
E	3Ea01–06	9:00–10:12	多賀　直彦	竹原　宗範
	3Ea07–11	10:24–11:24	青柳　秀紀	倉田　淳志
F	3Fa01–06	9:00–10:12	岡村　好子	堀　克敏
	3Fa07–09	10:24–11:00	中谷　肇	
G	3Ga01–06	9:00–10:12	常盤　豊	麻生　祐司
H	3Ha01–06	9:00–10:12	田口　精一	藤森　一浩
	3Ha07–11	10:24–11:24	蓮沼　誠久	片倉　啓雄
I	3Ia01–06	9:00–10:12	堀之内貴明	兒島　孝明
	3Ia07–11	10:24–11:24	滝口　昇	青木　航
K	3Ka01–06	9:00–10:12	由里本博也	石井　純
	3Ka07–11	10:24–11:24	和田　大	吉田　信行
L	3La01–06	9:00–10:12	柘植　丈治	里村　武範
	3La07–11	10:24–11:24	河原崎泰昌	古屋　俊樹
M	3Ma01–06	9:00–10:12	有馬　二朗	古賀　雄一
	3Ma07–11	10:24–11:24	西矢　芳昭	稲垣　賢二
N	3Na01–06	9:00–10:12	杉山　友康	諸星　知広
	3Na07–10	10:24–11:12	山下　光雄	森川　正章
O	3Oa01–06	9:00–10:12	河原　正浩	山野　範子
	3Oa07–10	10:24–11:12	金岡　英徳	河邉　佳典

9月6日（木）

9:00–11:36

会場	講演番号	時間	座長	
C	2Ca01–06	9:00–10:12	西野　智彦	村中　俊哉
	2Ca07–12	10:24–11:36	Putri Sastia	荻田　亮
D	2Da07–12	10:24–11:36	栗林　喬	五島　徹也
F	2Fa01–06	9:00–10:12	中島　一紀	阿部　敬悦
	2Fa07–12	10:24–11:36	鬼塚　正義	横田　早希
G	2Ga01–06	9:00–10:12	原田　尚志	藤原　伸介
	2Ga07–12	10:24–11:36	松岡　正佳	熊谷　孝則
H	2Ha01–06	9:00–10:12	仲山　英樹	井沢　真吾
	2Ha07–12	10:24–11:36	二又　裕之	阿野　貴司
I	2Ia01–06	9:00–10:12	新井　亮一	座古　保
	2Ia07–12	10:24–11:36	木賀　大介	梅津　光央
J	2Ja01–06	9:00–10:12	根来　誠司	折田　和泉
	2Ja07–11	10:24–11:24	安藤　晃規	菊地　淳
K	2Ka01–06	9:00–10:12	菅野　学	北出　幸広
	2Ka07–12	10:24–11:36	尾島　由紘	渡辺　大輔
L	2La01–06	9:00–10:12	松川　哲也	大橋　貴生
	2La07–12	10:24–11:36	一瀬　博文	吉田　磨仁
M	2Ma01–06	9:00–10:12	五味　勝也	志水　元亨
	2Ma07–11	10:24–11:24	跡見　晴幸	櫻庭　春彦
N	2Na01–06	9:00–10:12	鈴木　市郎	井上　大介
	2Na07–11	10:24–11:24	荒木希和子	酒井　謙二
O	1Op01–06	13:30–14:42	長森　英二	山田　真澄
	1Op07–12	14:54–16:06	秋山　佳丈	立花　亮

14:06–16:30

会場	講演番号	時間	座長	
C	2Cp01–06	14:06–15:18	倉橋　敦	尾関　健二
	2Cp07–11	15:30–16:30	小西　正朗	吉﨑由美子
E	2Ep01–06	14:06–15:18	堀内　淳一	石井　伸佳
	2Ep07–11	15:30–16:30	芦内　誠	石井　正治
F	2Fp01–06	14:06–15:18	熊田　陽一	田代　康介
	2Fp07–11	15:30–16:30	大河内美奈	志田　洋介
G	2Gp01–06	14:06–15:18	内山　進	杉山　峰崇
	2Gp07–11	15:30–16:30	横尾　岳彦	笹野　佑
H	2Hp01–06	14:06–15:18	荻野　千秋	中澤　昌美
	2Hp07–11	15:30–16:30	三﨑　亮	渡邉　研志
I	2Ip01–06	14:06–15:18	今中　洋行	伊藤　伸哉
	2Ip07–11	15:30–16:30	相馬　悠希	荒木　通啓
J	2Jp01–06	14:06–15:18	阿野　嘉孝	根本　理子
	2Jp07–11	15:30–16:30	山崎　思乃	山本　恵理
K	2Kp01–06	14:06–15:18	東　雅之	高野　真希
	2Kp07–11	15:30–16:30	富永　大介	岡野　憲司
L	2Lp01–06	14:06–15:18	吉田　豊和	松村　洋寿
	2Lp07–11	15:30–16:30	梅野　太輔	關　光
M	2Mp01–06	14:06–15:18	大城　隆	杉森　大助
	2Mp07–11	15:30–16:30	森本　兼司	桐村光太郎
N	2Np01–06	14:06–15:18	徳本　勇人	金原　和秀
O	2Op01–06	14:06–15:18	中村　史	村松　和明
	2Op07–11	15:30–16:30	堀江　正信	西島　謙一

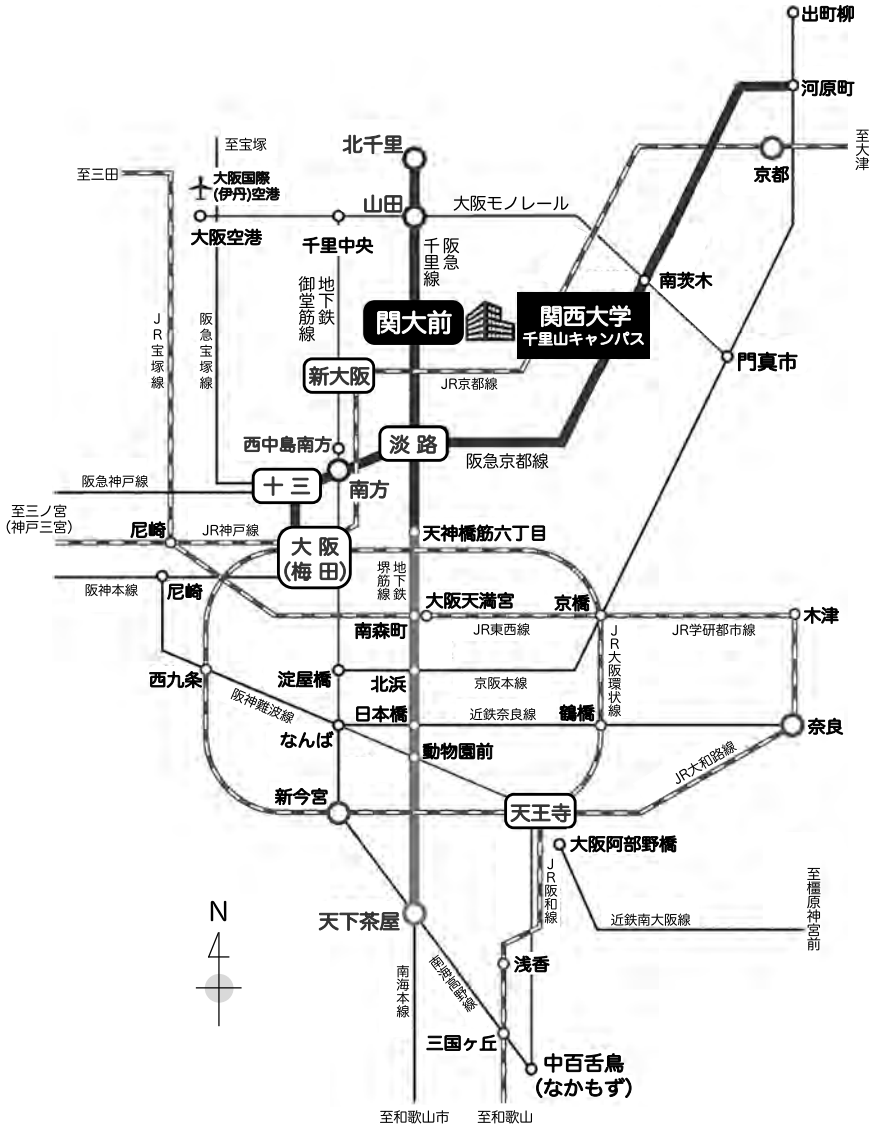
第70回日本生物工学会大会（2018）

実行委員会・業務分担（○：責任者）

実行委員長	片倉 啓雄
実行副委員長	高木 博史・大政 健史
総務	○岩木 宏明・河原 秀久・松浦 友亮・阪本 龍司・三﨑 亮・山中 一也・東 雅之・山崎 思乃
会計	○紀ノ岡 正博・黒田 浩一
広報	○高木 博史・加藤 晃・渡辺 大輔
プログラム	○藤原 伸介・岡澤 敦司・青木 航・赤坂 直紀・大橋 貴生・岡野 憲司・梶浦 裕之・梶山 慎一郎・金 美海・黒田 真史・古賀 雄一・駒 大輔・新間 秀一・秀瀬 涼太・藤田 聡史・松田 史生・三﨑 亮
会場	○松浦 友亮・阪本 龍司・山出 和弘・市橋 伯一・伊藤 洋一郎・猪熊 健太郎・上田 光宏・加藤 泰彦・川口 秀夫・岸田 正夫・岸野 重信・木谷 茂・清水 義宏・張 斯来・戸谷 吉博・中村 泰之・藤原 大佑・三浦 夏子・若井 暁
シンポジウム	○清水 浩・大政 健史・片倉 啓雄
ランチョンセミナー	○福﨑 英一郎・本田 孝祐・河原 秀久
受付・クローク	○長谷川 喜衛・炭谷 順一・關 光・立花 亮・永尾 寿浩・西岡 求・山本 佳宏
授賞式	○藤山 和仁・老川 典夫
展示	○河原 秀久・岩木 宏明
懇親会	○松村 吉信・高木 博史・坊垣 隆之・堤 浩子・畠中 治代
若手交流会	○原田 和生・岩木 宏明
ものづくり交流サロン	○根来 宏明・玉田 佳大
託児ルーム	○山崎 思乃・中澤 昌美

会場への交通案内

アクセス概要図



関西大学 千里山キャンパスへのアクセス

【大阪（伊丹）空港からのアクセス】

大阪モノレール「大阪空港」駅から「門真市（かどまし）」行で「山田」駅下車，阪急電鉄に乗り換え「関大前」駅下車（この間約30分）

【新幹線「新大阪」駅からのアクセス】

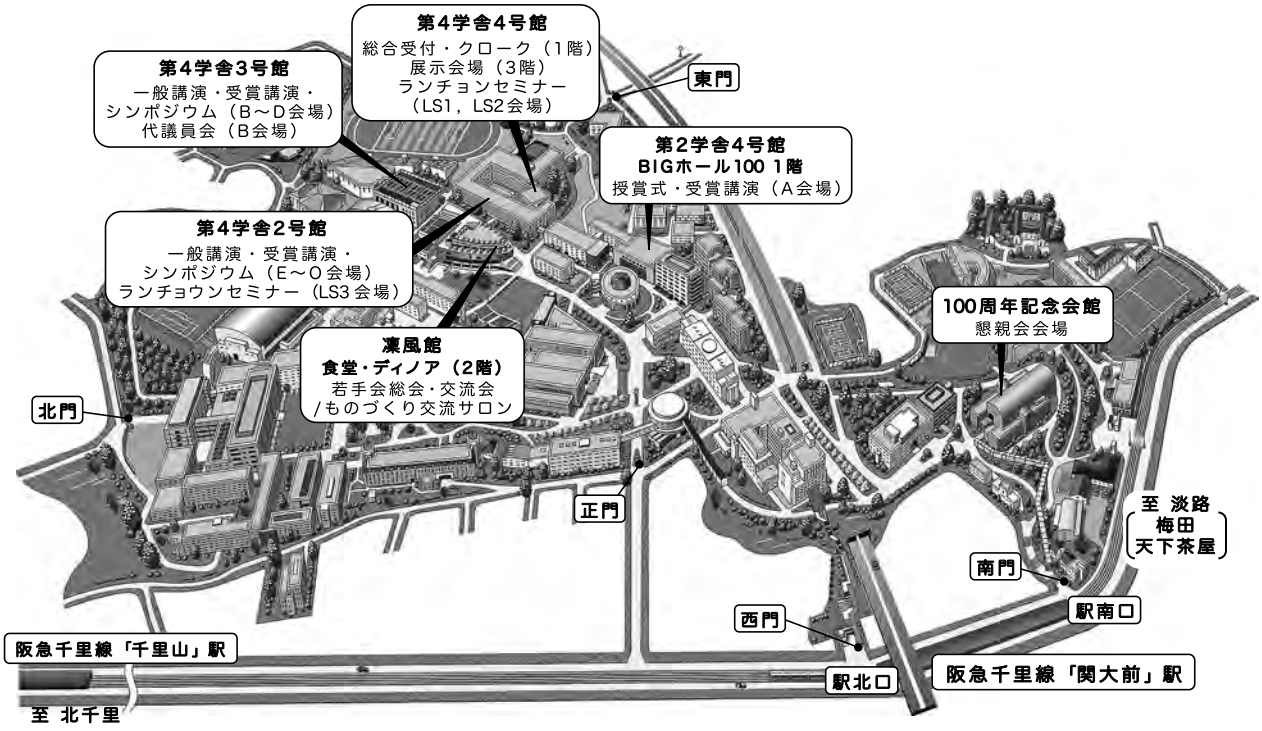
JR「新大阪」駅から地下鉄御堂筋線梅田方面行で「西中島南方」駅下車，阪急電鉄に乗り換え「南方（みなみかた）」駅から「北千里」行で「関大前」駅下車（この間約30分）．または「南方」駅から京都「河原町」行で「淡路」駅下車，「北千里」行に乗り換えて「関大前」駅下車.

【大阪（梅田）からのアクセス】

阪急電鉄「梅田」駅から，千里線「北千里」行で「関大前」駅下車（この間約20分）．または京都「河原町」行（通勤特急を除く）で「淡路」駅下車，「北千里」行に乗り換えて「関大前」駅下車.

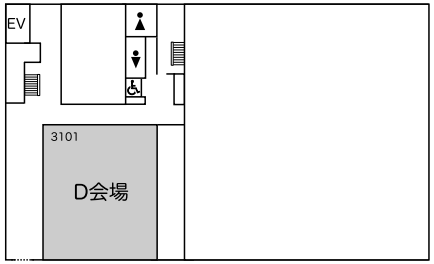
会場案内

関西大学千里山キャンパス会場案内図

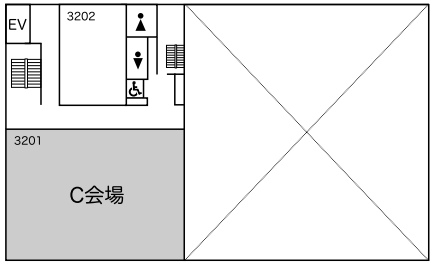


第４学舎会場案内図

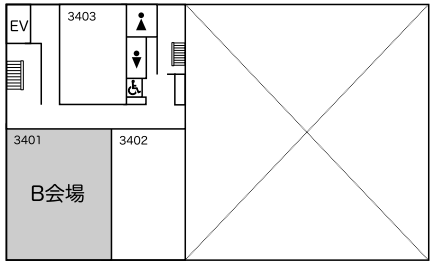
3号館 1階



3号館 2階



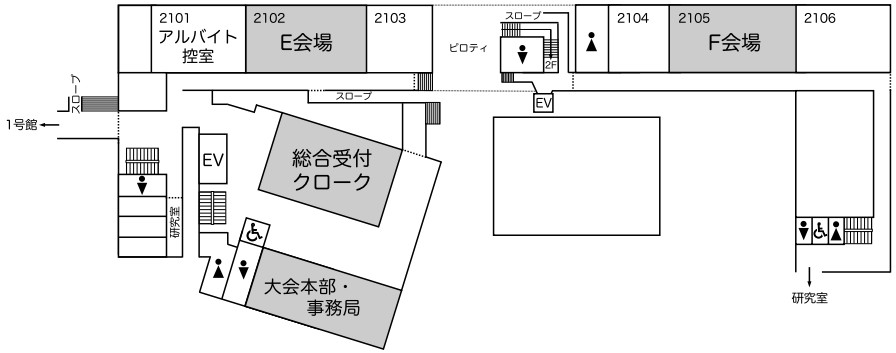
3号館 4階



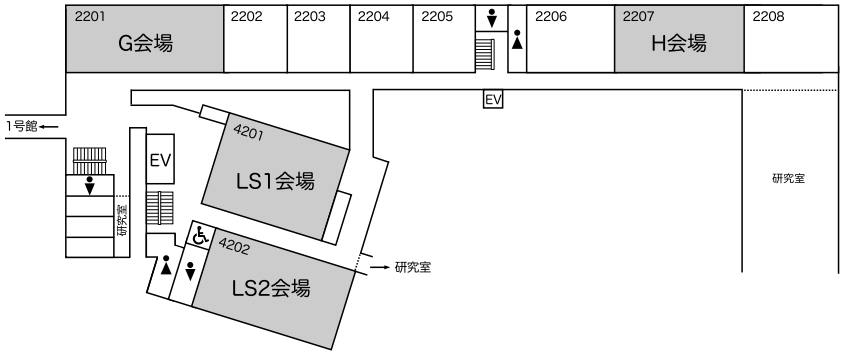
2号館

3号館

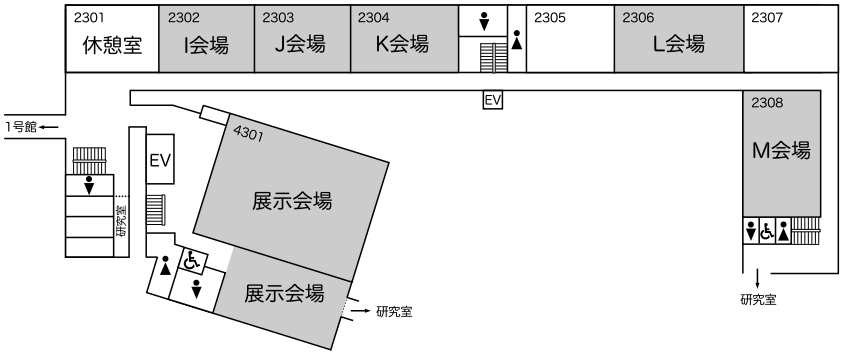
2号館・4号館 1階



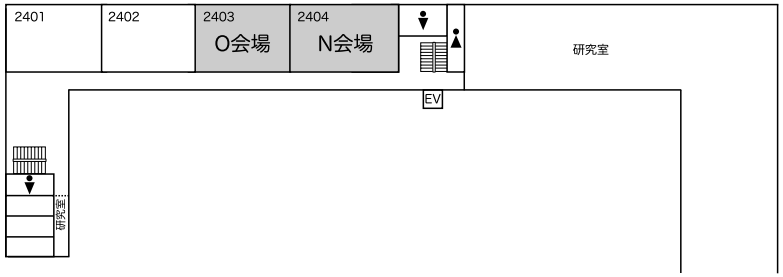
2号館・4号館 2階



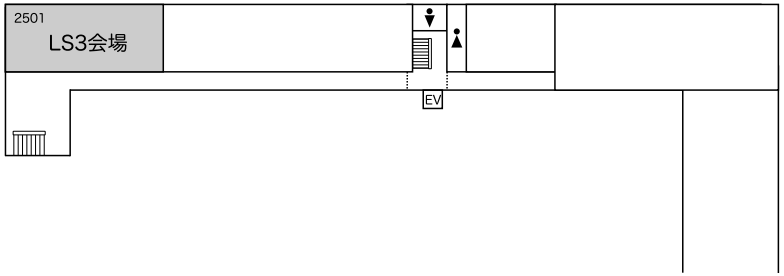
2号館・4号館 3階



2号館 4階



2号館 5階



日本生物工学会　2018年度　受賞者

去る5月24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37回　生物工学賞　浅野　泰久（富山県立大学工学部・教授）
「微生物から動植物へと展開する酵素利用技術とその基盤開拓」

■第12回　生物工学功績賞　清水　　浩（大阪大学大学院情報科学研究科・教授）
「計算機工学に基づく代謝設計とその有効性の実証に関する研究」

■第12回　生物工学功労賞　滝澤　　昇（岡山理科大学工学部・教授）
「生物工学および関連分野のJABEE認定審査への多大な貢献」

■第51回　生物工学奨励賞（江田賞）　浅野　　静（アサヒビール（株）酒類技術研究所・主任研究員）
「ビール醸造における微生物検査法の迅速化に関する研究」

■第54回　生物工学奨励賞（斎藤賞）　本田　孝祐（大阪大学大学院工学研究科・准教授）
「好熱性酵素を用いた細胞外人工代謝経路の構築と利用に関する先駆的研究」

■第41回　生物工学奨励賞（照井賞）　井藤　　彰（九州大学大学院工学研究院・准教授）
「機能性磁性ナノ粒子の開発と医療技術への応用に関する生物工学的研究」

■第27回　生物工学技術賞　佐藤　俊輔[1]・有川　尚志[1]・小林　新吾[1]・藤木　哲也[1]・松本　圭司[2]
（[1]（株）カネカ・[2]大阪大学大学院工学研究科）
「微生物による生分解性ポリマーPHBH製造法の開発」

■第15回　生物工学アジア若手賞（Young Asian Biotechnologist Prize）　Verawat Champreda
（Director, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand）
「Exploration of lignocellulose degrading enzymes from hidden bioresource for biorefinery and green industries」

■第7回　生物工学アジア若手研究奨励賞（The DaSilva Award）　Pau-Loke Show
（Associate Professor, The University of Nottingham, Malaysia）
「Converting wastewater to bioenergy and bio-products using microalgae technology」

■第26回　生物工学論文賞

1）**和田　圭介*・戸谷　吉博・坂野　聡美**・吉川　勝徳***・松田　史生・清水　　浩**
（大阪大学，*現，産業技術総合研究所，**現，神戸大学，***現，積水化学）
^{13}C-metabolic flux analysis for mevalonate-producing strain of *Escherichia coli*

2）**張　　斯来[1]*・伴　　暁彦[1]**・江原　直樹[1]***・水谷　　治[2]****・田中　瑞己[1]*****・新谷　尚弘[1]・五味　勝也[1]**
（[1]東北大学，[2]酒類総合研究所，*現，神戸大学，**現，中外製薬，***現，味の素，****現，琉球大学，*****現，静岡県立大学）
Self-excising Cre/mutant *lox* marker recycling system for multiple gene integrations and consecutive gene deletions in *Aspergillus oryzae*

3）**青井　議輝[1]・金子　裕司[2]*・常田　　聡[2]**
（[1]広島大学，[2]早稲田大学，*現，キリン株式会社）
pH-gradient ion-exchange microbial cell chromatography as a simple method for microbial separation

4）**加藤　晃代[1,2]*・永井　里美[1]*・中野　秀雄[1]**
（[1]名古屋大学，[2]知の拠点あいち，*現，iBody株式会社/名古屋大学）
N-terminal SKIK peptide tag markedly improves expression of difficult-to-express proteins in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*

5）**Le Gao*・秀瀬　涼太**・藤原　伸介**
（関西学院大学，*現，Changchun University of Science and Technology，**現，神戸大学）
Function of a thermophilic archaeal chaperonin is enhanced by electrostatic interactions with its targets

6）**藤谷　将也[1]・Noor Saika Huddin[2]*・河合　　駿[1]**・蟹江　　慧[1]・清田泰次郎[2]・清水　一憲[1]・本多　裕之[1]・加藤　竜司[1]**
（[1]名古屋大学，[2]株式会社ニコン，*現，Google Malaysia，**現，大日本住友製薬株式会社）
Morphology-based non-invasive quantitative prediction of the differentiation status of neural stem cells

7）**Suman C. Nath*・堀江　正信**・長森　英二***・紀ノ岡正博**
（大阪大学，*現，University of Calgary，**現，京都大学，***現，大阪工業大学）
Size- and time-dependent growth properties of human induced pluripotent stem cells in the culture of single aggregate

■第7回　生物工学学生優秀賞（飛翔賞）

1）**上原　千央**（東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻）
「酵母のストレス応答に関わる陽イオン輸送体の機能解析」

2）**小川　雅人**（早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻）
「網羅的シングルセルゲノム解析フローの構築に向けた高精度シングルセルゲノム解析ツールの開発」

3）**竹村　謙信**（静岡大学大学院自然科学系教育部バイオサイエンス専攻）
「金ナノ粒子－量子ドット間で誘起される局在表面プラズモン共鳴効果による迅速・高感度ウイルス検出に関する研究」

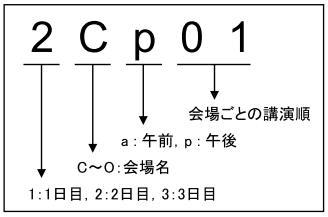
4）**上野　大心**（奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス領域）
「mRNAの内部切断に関わる配列的特徴の解明」

5）**堀　　采音**（広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻）
「免疫グロブリン製剤による新たな免疫抑制作用の発見と次世代抗体医薬設計への応用」

6）**眞榮田麻友美**（琉球大学大学院農学研究科亜熱帯農学専攻，現，鹿児島大学）
「黒麹菌*Aspergillus luchuensis*由来フェノール酸脱炭酸酵素に関する研究」

各種講演番号の見方

一般講演　最初の数字は発表日，次の大文字のアルファベットは会場，次の小文字のアルファベットは午前（a）または午後（p）次の数字はその会場での講演の順番を示します．（たとえば，2Cp01は，大会2日目，C会場，午後の部，1番目の講演です）．



一般講演の開始時間は，次の通りです（★印は「PC接続確認時間」）．

9月5日（水）p [pm]（午後）

★　13：18	01.　13：30	02.　13：42	03.　13：54	04.　14：06	05.　14：18	06.　14：30
★　14：42	07.　14：54	08.　15：06	09.　15：18	10.　15：30	11.　15：42	12.　15：54
★　16：06	13.　16：18	14.　16：30	15.　16：42	16.　16：54	17.　17：06	18.　17：18

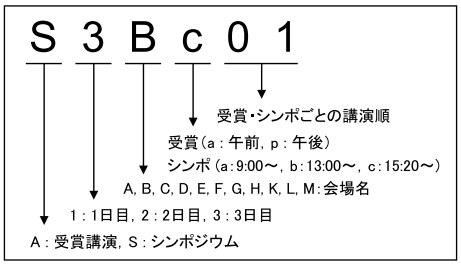
9月6日（木）a [am]（午前）および9月7日(金) a [am]（午前）

★　8：48	01.　9：00	02.　9：12	03.　9：24	04.　9：36	05.　9：48	06.　10：00
★　10：12	07.　10：24	08.　10：36	09.　10：48	10.　11：00	11.　11：12	12.　11：24

9月6日（木）p [pm]（午後）

★　13：54	01.　14：06	02.　14：18	03.　14：30	04.　14：42	05.　14：54	06.　15：06
★　15：18	07.　15：30	08.　15：42	09.　15：54	10.　16：06	11.　16：18	

受賞講演・シンポジウム　最初のアルファベットは受賞講演（A）またはシンポジウム（S），次の数字は発表日，次の大文字のアルファベットは会場，次の小文字のアルファベットは午前（a）または午後（p）（以上，受賞講演の場合），あるいは，9：00開始（a），13：00開始（b），または15：20開始（c）（以上、シンポジウムの場合），次の数字はその会場での講演の順番を示します（たとえば，S3Bc01は，大会3日目，B会場，15：20開始のシンポジウム，1番目の講演です）．



ランチョンセミナー　最初の数字は開催日，次のLS1，LS2，またはLS3は会場を示します（たとえば，2LS1は，大会2日目，LS1会場のランチョンセミナーです）．

第 1 日（9 月 5 日）

太字の一般講演は今年度の生物工学学生優秀賞（飛翔賞）受賞者の発表です.

開始時間	講演番号	演　　題	発表者氏名（所属） ○印は講演者を示す

授賞式・
受賞講演（生物工学功労賞，生物工学賞，生物工学功績賞，生物工学技術賞）

A 会場　BIG ホール 100，第 2 学舎 4 号館 1 階（9:00〜11:30）

授賞式

9:00　会長挨拶

9:05　韓国生物工学会（KSBB）会長挨拶

9:10　功労会員推戴

9:20　各賞授賞

9:55　A1Aa01　**〈生物工学功労賞〉**
第 12 回日本生物工学会功労賞受賞にあたって
…… ○滝澤 昇（岡山理大・工）

10:05　A1Aa02　**〈生物工学賞〉**　座長：**木野 邦器**
微生物から動植物へと展開する酵素利用技術とその基盤開拓
…… ○浅野 泰久（富山県大・工）

10:40　A1Aa03　**〈生物工学功績賞〉**　座長：**高木 昌宏**
計算機工学に基づく代謝設計とその有効性の実証に関する研究
…… ○清水 浩（阪大院・情報）

11:10　A1Aa04　**〈生物工学技術賞〉**　座長：**今井 泰彦**
微生物による生分解性ポリマー PHBH 製造法の開発
…… 佐藤 俊輔[1], 有川 尚志[1], 小林 新吾[1], 藤木 哲也[2], ○松本 圭司[3]
（[1]（株）カネカ バイオテクノロジー研究所, [2]（株）カネカ R&D 企画部,
[3]大阪大学 大学院工学研究科）

一般講演

C 会場　第 4 学舎 3 号館 2 階（13:30〜17:30）

【脂質工学／食品科学，食品工学】

13:30　1Cp01　ストレス状態モデル膜と低刺激性界面活性剤の相互作用
…… ○高橋 祐菜, 辻野 義雄, 高木 昌宏, 下川 直史（北陸先端大・マテリアル）

13:42　1Cp02　低刺激性界面活性剤による生体模倣膜への作用機構の解析
…… ○佐々木 陽介, 辻野 義雄, 下川 直史, 高木 昌宏（北陸先端大・マテリアル）

13:54 1Cp03 膜小胞高分泌細菌が形成する多層膜小胞の特性解析
……○高木 航太郎[1], 長谷川 雄将[1], 田原 悠平[3], 新谷 政己[1], 大熊 盛也[4], 宮田 真人[3], 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, [3]阪市大院・理, [4]理研・バイオリソースセ)

14:06 1Cp04 大腸菌の細胞表層改変による外膜小胞大量分泌株の構築
……○澤邊 朋美, 児波 克哉, 尾島 由紘, 東 雅之（阪市大院・工）

14:18 1Cp05 酢酸菌由来外膜小胞の収量改善の検討
……○橋本 雅仁, 松元 太一, 中村 佳祐, 大薗 まみ, 橋口 周平（鹿児島大・理工）

14:30 1Cp06 *Lactobacillus sakei* 由来メンブランベシクルを介する IgA 産生促進作用の解析
……○三好 柚紀[1], 山崎 思乃[2], 中山 知哉[2], 國澤 純[3], 片倉 啓雄[2]
([1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工, [3]医薬基盤・健康・栄養研)

14:54 1Cp07 Culturomics によるヒト腸内細菌の網羅的な分離方法の検討
……○山副 敦司, 島村 麻美子, 三浦 隆匡, 古川 雅崇, 内野 佳仁, 川﨑 浩子
(NITE・NBRC)

15:06 1Cp08 グリコシルセラミドの腸内細菌への影響解析
……○北島 悠花[1], 佐藤 友哉[1], 宮川 幸[1], 阪本 真由子[1], 許 志豪[1], 中山 二郎[2], 北垣 浩志[1]
([1]佐賀大・農, [2]九大院・農)

15:18 1Cp09 腸内細菌と食物繊維の接着現象の解析
……○谷口 茉莉亜[1], 倉光 香奈[1], 山崎 思乃[2], 片倉 啓雄[2]
([1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工)

15:30 1Cp10 腸内細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* による食物繊維の資化性に関する研究
……篠原 涼平[1], 古根 隆広[2], ○生田 直子[1], 佐々木 大介[3], 佐々木 建吾[3], 福田 伊津子[4], 大澤 朗[4], 坂本 憲広[1]
([1]神戸大院・医, [2]シクロケムバイオ, [3]神戸大院・科技イノベ, [4]神戸大院・農)

15:42 1Cp11 *in vitro* 培養系ヒト腸内細菌叢モデル（KUHIMM）を用いた難消化性食物繊維の影響評価
……○佐々木 大介[1], 佐々木 建吾[1], 生田 直子[2], 福田 伊津子[3], 近藤 昭彦[1], 大澤 朗[3]
([1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大院・医, [3]神戸大院・農)

15:54 1Cp12 *In vitro* 培養系ヒト腸内細菌叢モデルによる潰瘍性大腸炎患者の代謝プロファイル異常の検出
……○佐々木 建吾[1], 井上 潤[2], 星 奈美子[2], 佐々木 大介[1], 福田 伊津子[3], 近藤 昭彦[1], 大澤 朗[3]
([1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大院・医, [3]神戸大院・農)

16:18 1Cp13 *Lactobacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシン生合成関連遺伝子の解析
……○河原 あい[1], 善藤 威史[2], 松崎 弘美[1,3]
([1]熊本県大院・環境共生, [2]九大院・農, [3]熊本県大・環境共生)

16:30 1Cp14 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YM41 株の保持するキラー遺伝子の取得 ~第二報~
……○三木 健夫, 篠笥 光慶（山梨大院・医工総）

16:42 1Cp15 梨幼果抽出液添加による出芽酵母の寿命延長に関与する遺伝子
……○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], 村田 和加惠[1]
([1]米子高専・物質, [2]阪市大院・理, [3]阪市大・健康研セ)

16:54 1Cp16 リンゴ細胞壁可溶化とセラミド濃縮
……○笠井 尚哉[1], 是常 友紀[1], 向井 克之[2], 松山 彰収[2]
([1]阪府大院・生環科, [2]株式会社 ダイセル)

17:06 1Cp17 コーヒー豆におけるアラビノガラクタンプロテイン分解酵素とセルラーゼの併用効果
……○柴田 晃, 松野 善治, 山田 みなみ, 笠井 尚哉（阪府大院・生環科）

17:18 1Cp18 茶殻における細胞内顆粒組織の酵素分解
……○中嶋 優里, 花崎 麻由, 笠井 尚哉（阪府大院・生環科）

D 会場　第 4 学舎 3 号館 1 階（13:30〜16:06）

【抗体工学】

13:30 1Dp01 N 末端 SKIK ペプチドによるモノクローナル抗体生産量増大と機構解明
……○加藤 晃代[1,3], 田村 廣人[2], 中野 秀雄[1,3]
（[1] iBody（株）, [2] 名城大院・農, [3] 名大院・生命農学）

13:42 1Dp02 Ecobody 法によるウサギモノクローナル抗体迅速取得法の開発
……○新海 佑介, 森下 しおみ, 加藤 晃代, 兒島 孝明, 中野 秀雄（名大院・生命農学）

13:54 1Dp03 Ecobody 法によるヒトモノクローナル抗体の迅速取得と大腸菌による生産
……○小森 有華, 内田 由乃, 加藤 晃代, 兒島 孝明, 中野 秀雄（名大院・生命農学）

14:06 1Dp04 核酸分解能を示すヒト型抗体軽鎖クローン
……○清水 美里[1], 宇田 泰三[2], 一二三 恵美[3]
（[1] 大分大院・工, [2] 九州先端科学技術研究所, [3] 大分大・全学研究推進）

14:18 1Dp05 生体内タンパク質を標的にした新規立体構造認識モノクローナル抗体の作製とそのリガンド作用
……○磯﨑 勇志, 湊元 幹太, 冨田 昌弘（三重大院・工）

14:30 1Dp06 キンギョ由来抗体遺伝子の多様性解析と抗原特異的 scFv 断片の取得
……岡﨑 文美[1,2,3], 額田 夏生[1], 百瀬 直樹[1], ○田丸 浩[1,2,3]
（[1] 三重大院・生資・生物圏生命, [2] 三重大・先端科学研支セ・バイオインフォ,
[3] 三重大・スマートセルイノベ研セ）

14:54 1Dp07 スプライシング因子の過剰発現及び標的遺伝子配列の操作によるニワトリ B 細胞株における遺伝子変異の増強
……○金山 直樹, 太田 愛美, 西山 由美子, 岡 知里, 曲 正樹, 徳光 浩
（岡山大院・ヘルスシステム・細胞機能）

15:06 1Dp08 ホタルルシフェラーゼ生物発光活性制御におけるアルパカ抗体の利用
……○鶴田 篤弘[1], 加藤 太一郎[1], 有馬 一成[1], 伊東 祐二[1], 赤澤 陽子[2], 中島 芳浩[2]
（[1] 鹿児島大院・理工, [2] 産総研）

15:18 1Dp09 ラクダ科動物由来重鎖抗体を用いた蛍光免疫センサー mini Q-body の構築
……○上田 宏[1], 山田 映未[2], 井上 暁人[3], 大室 有紀[1], 北口 哲也[1]
（[1] 東工大・研究院・化生研, [2] 東工大院・生命理工, [3] 東工大・生命理工）

15:30 1Dp10 ヒト型抗体酵素 #7 シリーズの生化学的性質と酵素活性サイト
……○宇田 泰三[1], 田口 博明[2], 一二三 恵美[3]
（[1] 九州先端科学技術研究所, [2] 鈴鹿医療大・薬, [3] 大分大・全学研究推進）

15:42 1Dp11 ヒト型抗体軽鎖 Subgroup I における酵素活性に関する検討
……○渡辺 万由子[1], 秋吉 裕子[2], 田口 博明[3], 宇田 泰三[4], 一二三 恵美[2]
（[1] 大分大院・工, [2] 大分大・全学研究推進, [3] 鈴鹿医療大・薬, [4] 九州先端科学技術研究所）

15:54 1Dp12 **免疫グロブリン製剤による新たな免疫抑制作用の発見**
……○堀 采音, 藤村 孝志, 河本 正次（広島大院・先端物質）

E 会場　第 4 学舎 2 号館 1 階（13:30〜17:18）

【ペプチド工学／核酸工学／植物細胞工学，組織培養，育種工学】

13:30 1Ep01 納豆抽出物に含まれるカチオン性ペプチドは LPS 中和活性と血管新生促進活性を発揮する
……○相田 涼介, 斉藤 寿槻, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之（新潟大・自然研）

13:42 1Ep02 コメ糠タンパク質由来多機能型カチオン性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）

13:54 1Ep03 Screening of exosome-binding peptides from EWI-2 protein
……○Thanawat Suwatthanarak, Masayoshi Tanaka, Mina Okochi
（Dept. Chem. Sci. Eng., Sch. Mat. Chem. Technol., Tokyo Tech）

14:06 1Ep04 多孔性シリカゲルを用いた機能性ペプチドの腸デリバリーに適したペプチドの in silico 設計と評価
……○今井 健人[1], 清水 一憲[1], 上村 光浩[2], 小川 光輝[2], 本多 裕之[1,3]
（[1]名大院・工, [2]富士シリシア化学, [3]名大院・予防早期医療創成セ）

14:18 1Ep05 焼成多孔性シリカゲルを用いた苦味ペプチドの選択的除去手法の開発
……池田 彩[1], 今井 健人[1], 清水 一憲[1], 上村 光浩[2], 小川 光輝[2], ○本多 裕之[1,3]
（[1]名大院・工, [2]富士シリシア化学, [3]名大・予防早期医療創成セ）

14:30 1Ep06 LEA ペプチドの発現による大腸菌の紫外線耐性の向上
……○池野 慎也[1], フワイジ アラー[2], パサック ニシット[1], シャヒル アミル[2]
（[1]九工大院・生体工, [2]マレーシアプトラ大・生物工）

14:54 1Ep07 新規ラッソペプチド vesicusin A および B の異宿主生産
……○不破 啓貴, 小谷 真也（静大・創科技院）

15:06 1Ep08 蛍光発光アプタマー Spinach に対する変異導入とその蛍光への影響評価
……○上野 絹子[1], 塚越 かおり[1], Porchetta Alessandro[2], Ricci Francesco[2], 池袋 一典[1]
（[1]農工大院・工, [2]Dept. Chemist., Univ. Rome Tor Vergata）

15:18 1Ep09 Bevacizumab に対する抗イディオタイプアプタマーの結合特性の改良
……池袋 一典[1], ○清水 裕[1], 齊藤 太郎[1], 塚越 かおり[1], 山田 朋宏[2], 轟木 堅一郎[2]
（[1]農工大院・工, [2]静県大院・薬食生命）

15:30 1Ep10 水耕栽培によるミヤコグサのベツリン酸生産能の増強
……○鈴木 隼人, 福島 エリ オデット, 村中 俊哉（阪大院・工）

15:42 1Ep11 UV-B LED 照射によるポリフェノールの増産
……○鶴本 智大[1], 藤川 康夫[1], 泉田 智史[2], 三島 俊介[3], 太田 大策[4], 岡澤 敦司[4]
（[1]日亜化学工業, [2]ヒューマンチップス, [3]大塚電子, [4]阪府大院・生環科）

15:54 1Ep12 マイクロセンサーを用いたイネの葉のガスフィルムの解析
……○ターナー ピーター[1], 井上 貴行[1], Dalsgaard Tage[2], Pedersen Ole[3]
（[1]セントラル科学貿易, [2]Unisense, Denmark, [3]Univ. of Copenhagen, Denmark）

16:18 1Ep13 Unraveling *N*-glycan patterns of glycoproteins extracted from intra- and extracellular fractions of *Nicotiana benthamiana* suspension cell culture and the effect of kifunensine treatment.
……○Yayon Pamula Mukti, Takao Ohashi, Ryo Misaki, Kazuhito Fujiyama
（ICBiotech, Osaka Univ.）

16:30 1Ep14 Production and *N*-glycan analysis of recombinant β-glucocerebrosidase in *Nicotiana benthamiana* root culture
……○Naphatsamon Uthailak[1,2], Takao Ohashi[1,2], Ryo Misaki[1,2], Kazuhito Fujiyama[1,2]
（[1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.）

16:42 1Ep15 マーカーフリー RDR6 ノックダウン株における外来遺伝子の導入効率および発現効率
……○下川 麻優子[1], 三上 達也[2], 梅山 幸子[3], 児玉 浩明[1]
（[1]千葉大院・園芸, [2]千葉大院・融合, [3]千葉大・園芸）

16:54 1Ep16 **mRNA の内部切断に関わる配列的特徴の解明**
……○上野 大心, 山崎 将太朗, 出村 拓, 加藤 晃（奈良先端大・バイオ）

17:06 1Ep17 イネの大粒変異の次世代シーケンス解析
……○富田 因則, 土屋 智顕（静大・グリーン研）

F 会場　第 4 学舎 2 号館 1 階（13:30〜17:30）

【生物化学工学／培養工学／バイオプロセス】

13:30 1Fp01 Enhanced activity and stability of lipase in deep eutectic solvents
……○Yujin Oh, Sung Hee Kim, Sang Hyun Lee
（Dept. Bioeng., Konkuk Univ., South Korea）

13:42 1Fp02 Optimization on biodiesel synthesis from palm oil mill effluent (POME) by integrated strategy with lipase-catalyzed ethanolysis
……○Nova Rachmadona [1], Jerome Amoah [1], Shinji Hama [2], Ayumi Yoshida [2], Akihiko Kondo [3], Chiaki Ogino [1]
（[1] Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2] Bio-energy Corp., Japan, [3] Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.）

13:54 1Fp03 The enhancement of culture conditions for high cell and lipid production of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyii* D35
……○Rezky Lastinov Amza [1], Prihardi Kahar [1], Ario Betha Juanssilfero [1,2], Hiromi Otsuka [1], Chie Kihira [1], Chiaki Ogino [1], Akihiko Kondo [3]
（[1] Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2] LIPI, [3] Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.）

14:06 1Fp04 Selection of oleaginous yeast capable of high lipid accumulating during challenges from inhibitory chemical complexes
……○Ario Betha Juanssilfero [1,2], Prihardi Kahar [1], Rezky Lastinov Amza [1], Yopi Yopi [2], Chiaki Ogino [1], Bambang Prasetya [3], Akihiko Kondo [4]
（[1] Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2] LIPI, Indonesia, [3] BSN, Indonesia, [4] Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.）

14:18 1Fp05 海洋珪藻 *Fistulifera solaris* の代謝改変による高付加価値脂肪酸の効率的生産
……○嶋田 礼迪 [1], 松本 光史 [2], 野島 大佑 [1], 前田 義昌 [1], 吉野 知子 [1], 田中 剛 [1]
（[1] 農工大院・工, [2] 電源開発）

14:30 1Fp06 Improvement of mass mixing by Max-Blend and anchor shape impeller in the high-solid state scarification of kraft pulp
……○Deddy Triyono Nugroho Adi [1], Chiaki Ogino [1], Akihiko Kondo [2]
（[1] Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2] Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.）

14:54 1Fp07 遺伝子組換えシアノバクテリアを用いた 1,3-プロパンジオールの高効率連続生産
……○武田 真由子 [1], 端 瞭太 [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）

15:06 1Fp08 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], 内山 友香 [2], 細田 晃文 [2], 田村 廣人 [2]
（[1] 名城大・理工, [2] 名城大院・農）

15:18 1Fp09 気相培養による気生微細藻類 *Coelastrella* sp. KGU-Y002 のカロテノイドのエステル化
……○恩田 岳英, 油井 信弘, 菅原 康里, 今村 保忠, 阿部 克也（工学院大・先進工・生化）

15:30 1Fp10 植物 P450 発現大腸菌を用いたモノテルペノイド変換条件最適化
……○小島 基, 小森 彩, 鈴木 宗典, 中村 克哉（神戸天然物化学(株)）

15:42 1Fp11 組換えコリネ型細菌を用いた 3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸の発酵生産における酸素制限による促進作用
……○川口 秀夫 [1,2], 宮崎 翔子 [2,3], 荻野 千秋 [2,3], 大西 康夫 [2,4], 近藤 昭彦 [1,3]
（[1] 神戸大院・科技イノベ, [2] JST・CREST, [3] 神戸大院・工, [4] 東大院・農生科）

15:54 1Fp12 遺伝子組換え乳酸菌によるコーンコブを原料とした高収率 D-乳酸生産
……○内藤 秋花 [1], 堀内 淳一 [1], 熊田 陽一 [1], 岡野 憲司 [2], 近藤 昭彦 [3], 田中 勉 [3]
（[1] 京工繊大院・工芸科学, [2] 阪大院・工, [3] 神戸大院・工）

16:18 1Fp13 Single cell protein (SCP) production using waste milk as a substrate by flower yeasts
……○ Khin Thandar Myint, Mitsuo Otsuka, Toshiaki Nakajima - Kambe
（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Tsukuba Univ.）

16:30 1Fp14 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・キシリトール生産
……○井上 順允, 堀内 淳一, 熊田 陽一（京工繊大院・工芸科学）

16:42 1Fp15 白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41 株による好気的水素産生経路の解析
……○髙橋 沙綾[1], 曽我 亜由美[1], 森 智夫[2], 河岸 洋和[2,3,4], 平井 浩文[2,3]
（[1]静大院・総合農, [2]静大農・応生科, [3]静大・グリーン研, [4]静大院・創造）

16:54 1Fp16 低温菌を活用したシンプル酵素触媒によるジカルボン酸の効率的生産
……○中野 翔, 羅 宮臨風, 田島 誉久, 加藤 純一（広島大院・先端物質）

17:06 1Fp17 子嚢菌 *Talaromyces trachyspermus* による多価カルボン酸含有バイオサーファクタントの効率的生産
……○林 真人, 高野 真希, 星野 一宏（富山大院・理工・生命工）

17:18 1Fp18 Extracellular pigment production from *Talaromyces purpurogenus* and their applications
……○Sharad Bhatnagar[1], Takashi Ueno[2], Hideki Aoyagi[1]
（[1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Dept. Mater. Environ. Eng., Hakodate Natl. Coll.Tech.）

G 会場　第 4 学舎 2 号館 2 階（13:30〜17:30）

【遺伝子工学】

13:30 1Gp01 大腸菌発現システムを用いた医薬中間体，(*R*)-2-クロロマンデル酸の新規産生方法
……○山村 栄虎, 北 伸二（協和ファーマケミカル）

13:42 1Gp02 エチレン生成酵素の方向付け進化による耐熱化のためのコハク酸要求性 *Thermus thermophilus* 変異体の解析
……○魚住 昇平, 中山 泰宗, 長濱 一弘, 松岡 正佳（崇城大・生物生命）

13:54 1Gp03 超好熱性アーキア *Pyrococcus chitonophagus* における遺伝子組換え系の構築
……山田 将大, 中田 菜月, Aslam Mehwish, ○金井 保, 跡見 晴幸（京大院・工）

14:06 1Gp04 メタン酸化細菌 *Methylococcus capsulatus* (Bath)の効率的なカウンターセレクション法の開発
……○石川 聖人[1], 横江 奨[1], 加藤 創一郎[2], 堀 克敏[1]
（[1]名大院・工, [2]産総研・生物プロセス）

14:18 1Gp05 酢酸菌を宿主とした異種タンパク質生産の試み
……○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], 福田 青郎[1], 藤原 伸介[1]
（[1]関西学院大院・理工, [2]マルカン酢）

14:30 1Gp06 低温菌 *Pseudoalteromonas* sp. Sq02 株を宿主とした タンパク質低温分泌生産システムの構築
……○河合 総一郎, Puti Wanguyun Aken, 川本 純, 小川 拓哉, 栗原 達夫（京大・化研）

14:54 1Gp07 タンパク質高生産株を選別する遺伝子直列配置型蛍光レポーター法の提案
……○鈴木 宏和[1], 大谷 千晶[1], 奥村 友太[2], 大城 隆[1]
（[1]鳥取大院・工, [2]鳥取大院・持社創生）

15:06 1Gp08 *Geobacillus* 属で機能する高発現プロモーターを網羅的転写解析で探索する
……○奥村 友太[1], 坂口 由希菜[2], 倉敷 凌太[2], 大城 隆[2], 鈴木 宏和[2]
（[1]鳥取大院・持社創生・工, [2]鳥取大・工）

15:18 1Gp09 100 kb を超える枯草菌染色体 DNA セグメントの簡便迅速な接合伝達
……○吉田 健一[1], 宮野 恵[1], 石川 周[1], Miguel-Arribas Andres[2], Meijer Wilfried J. J.[2]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]マドリード自治大）

15:30 1Gp10 枯草菌スポアの発芽レセプターコンポーネントの機能解析
……○坂元 仁[1], 古田 雅一[1,2,3], 土戸 哲明[1]
（[1]大阪府大・微制研, [2]大阪府大・放研セ, [3]大阪府大院・工・量子）

15:42 1Gp11 プラスミドの保持に「非感受性」を示す宿主を利用した新規宿主ベクター系開発の可能性
……○上田 朋美, 河野 響, 水口 千穂, 岡田 憲典, 野尻 秀昭（東大・生物工学セ）

15:54 1Gp12 有用嫌気性菌の遺伝子導入・破壊の効率的検出システム構築
……○深谷 愛衣[1], 水口 千穂[1], 岡田 憲典[1], 井上 謙吾[2], 野尻 秀昭[1]
（[1]東大・生物工学セ, [2]宮崎大・農・応生科）

16:18 1Gp13 Visualization of ecdysteroid activities using genetically encoded reporter gene in *Daphnia magna*
……○Nikko Adhitama, Yasuhiko Kato, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe
（Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.）

16:30 1Gp14 チョウザメ由来ナイーブ抗体の応用に向けた抗体遺伝子の配列解析
……○近藤 秀裕[1], 安本 玖太郎[1], 小祝 敬一郎[1], 平岡 潔[2], 廣野 育生[1]
（[1]東京海洋大学, [2]フジキン）

16:42 1Gp15 マウス腸内への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
……○久保 勇貴[1], 中島 森[1], 中川路 伸吾[1], 阪中 幹祥[2], 小椋 義俊[3], 吉本 真[4], 吉田 圭佑[4], 清水 （肖）金忠[4], 小田巻 俊孝[4], 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, [4]森永乳業・基礎研）

16:54 1Gp16 環状 RNA を用いた miRNA とその前駆体の阻害
……○地白 和樹, 立花 亮（阪市大院・工）

17:06 1Gp17 複合系中の標的 mRNA 直接検出法の開発
……○堀尾 京平[1], 大川内 雅彦[1], 高橋 宏和[1], 小堀 俊郎[2], 秋 庸裕[1], 松村 幸彦[3], 中島田 豊[1], 岡村 好子[1]
（[1]広島大院・先端物質, [2]農研機構, [3]広島大院・工）

17:18 1Gp18 環状 RNA にコードしたペプチド生成に関与する要因
……○浅野 悠太（阪工大院・工）

H 会場　第 4 学舎 2 号館 2 階（13:30〜17:30）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

13:30 1Hp01 Dilute maleic acid pretreatment of sugarcane bagasse and oil palm empty fruit bunch fiber for enhanced enzymatic digestibility
……○Lucky Risanto[1,2], Deddy Triyono Nugroho Adi[1,2], Triyani[2], Hiroshi Teramura[1], Euis Hermiati[2], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[1,3]
（[1]Grad. Sch. of Eng., Kobe Univ., Japan, [2]Res. Center for Biomaterials, Indonesian Inst. Sci., Indonesia, [3]Grad. Sch. Sci., Technol. and Innov, Kobe Univ., Japan）

13:42 1Hp02 高活性水蒸気処理と粉砕処理を併用したバイオリファイナリーシステムの開発
……○鈴木 昭浩[1], 淺田 元子[2], 佐々木 千鶴[2], 中村 嘉利[2]
（[1]徳島大院・先端技科, [2]徳島大学・生物資源産業学部）

13:54 1Hp03 高活性水蒸気処理を用いたセルロースナノファイバーの製造とバイオマスコンポジットへの応用
……○橋本 和紀[1], 淺田 元子[2], 佐々木 千鶴[2], 中村 嘉利[2]
（[1]徳島大院・先端技科, [2]徳島大学・生物資源産業学部）

14:06 1Hp04 最少量の低毒性イオン液体を用いたバイオマスからバイオ燃料への High-loading ワンポット変換
……○杉野 雄規[1], 柘植 陽太[2], 荻野 千秋[3], 髙橋 憲司[1], 仁宮 一章[2]
（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術, [3]神戸大院・工・応化）

14:18 1Hp05 最少量の低毒性イオン液体を用いた前処理に基づく木質系バイオマスリファイナリー
……○仁宮 一章[1], Amaliyah Rohsari Indah Utami[2], 柘植 陽太[1], 荻野 千秋[3], 髙橋 憲司[2]
([1]金沢大・新学術, [2]金沢大院・自科, [3]神戸大院・工)

14:30 1Hp06 イオン液体前処理と酵素糖化により得られる残渣リグニンの特性評価
……○江口 真央[1], 杉野 雄規[1], 柘植 陽太[2], 髙橋 憲司[1], 仁宮 一章[2]
([1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術)

14:54 1Hp07 木材腐朽菌による加硫天然ゴムの分解
……○佐藤 伸（公立鳥取環境大学・環境学部）

15:06 1Hp08 白色腐朽菌が有するアルコール発酵能の生理学的役割の解明
……○増田 茜[1], 森 智夫[2], 河岸 洋和[2,3,4], 平井 浩文[2,3]
([1]静大院・総合農, [2]静大・農, [3]静大・グリーン研, [4]静大・創科技院)

15:18 1Hp09 生きた植物からの非破壊糖取出し方法の検討
……○米倉 円佳[1], 青木 直大[2], 廣瀬 竜郎[3], 近藤 聡[1], 大音 徳[4]
([1]トヨタ自動車・アグリバイオ事業部, [2]東大院・農生科, [3]農研機構・中央農研,
[4]トヨタ自動車・T-フロンティア部)

15:30 1Hp10 イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* 由来セロビオース脱水素酵素と新規ヘム含有膜タンパク質の解析
……○本間 陽名[1], 土居 友梨子[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]秋田大院・理工, [2]東大院・農生科)

15:42 1Hp11 *Aspergillus aculeatus* 由来キシラナーゼの天然バイオマス分解に対する効果
……○梶本 真由, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司（阪府大院・生環科）

15:54 1Hp12 磁気細胞アレイ技術を用いたペクチン分解活性評価法の開発
……○吉川 真広[1], 石原 真以[2], 清水 一憲[1], 鈴木 宏昭[2], 本多 裕之[1,3]
([1]名大院・工, [2]トヨタ紡織, [3]予防早期医療創生セ)

16:18 1Hp13 異なるストレス条件下における *Aquitalea magnusonii* H3 のコウキクサ成長促進効果に関する検討
……○多田 三菜美[1], 石澤 秀紘[1], 黒田 真史[1], 井上 大介[1], 森川 正章[2], 池 道彦[1]
([1]阪大院・工, [2]北大院・地環科)

16:30 1Hp14 ウキクサバイオマスの増産へ向けた植物成長促進細菌と阻害細菌との競争関係の解析
……○石澤 秀紘[1], 黒田 真史[1], 井上 加奈子[2], 井上 大介[1], 森川 正章[3], 池 道彦[1]
([1]阪大院・工, [2]阪大・超高圧電顕セ, [3]北大院・地環科)

16:42 1Hp15 好熱菌発酵産物から単離されたエンドファイトが植物の生長に与える影響
……○金子 由喜[1], 渡邉 凌[2], 井藤 俊行[3], 宮本 浩邦[1,4,5], 児玉 浩明[1]
([1]千葉大院・園芸, [2]千葉大院・融合, [3]京葉プラントエンジニアリング, [4]サーマス, [5]理研・IMS)

16:54 1Hp16 森林バイオマスの新規利用 -土壌改良効果の検討-
……○連 綾香[1], 荒木 希和子[2], 久保 幹[2]（[1]立命館大院・生命科学, [2]立命館大・生命科学）

17:06 1Hp17 土壌細菌バイオマス量と地温の関係解析
……○宇野 貴裕[1], 荒木 希和子[2], 久保 幹[2]（[1]立命館大院・生命科学, [2]立命館大・生命科学）

17:18 1Hp18 土壌環境および植物栽培が土壌微生物叢に及ぼす影響解析
……○前田 憲慶[1], 荒木 希和子[2], 久保 幹[2]（[1]立命館大院・生命科学, [2]立命館大・生命科学）

I 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（13:30〜17:30）

【タンパク質工学】

13:30 1Ip01 REIC/Dkk-3 タンパク質の相互作用分子解析と抗がん免疫活性化の分子機構解明
……○羽田 彩夏[1], 中川 そらみ[1], 木下 理恵[2], 二見 淳一郎[1]
（[1]岡山大院・自科, [2]岡山大院・医歯薬）

13:42 1Ip02 抗腫瘍関連抗原抗体をバイオマーカーとした高感度測定系の開発
……○吉岡 実咲[1], 本荘 知子[1], 木下 理恵[2], 二見 淳一郎[1]
（[1]岡山大院・ヘルスシステム統合科学（工）・蛋白質医用工学, [2]岡山大・医・細胞生物）

13:54 1Ip03 複合免疫療法に向けたがんの抗原性向上に関する基礎検討
……○勝河 祐希[1], 丸山 悠[2], Ahmadi Hannaneh[3], 本荘 知子[1], 二見 淳一郎[1,2,3]
（[1]岡山大院・ヘルスシステム, [2]岡山大・工・化学生命, [3]岡山大院・自然科学）

14:06 1Ip04 変性タンパク質への部位特異的 biotin 化条件の最適化と neoantigen スクリーニングへの応用
……○峯苫 智晴[1], 垣見 和宏[2], 二見 淳一郎[1]
（[1]岡山大学院・ヘルスシステム, [2]東大病院・免疫細胞治療）

14:18 1Ip05 （講演中止）

14:30 1Ip06 カイコによるマラリア原虫のメロゾイト表面タンパク質の発現とヒト血清との結合
……○林谷 美貴子[1], 稲垣 裕[1], Murhandarwati Elsa Heridiana[2], Widya Asmara[2], Vipin Kumar Deo[3], 朴 龍洙[1,4]
（[1]静大院・農・応生化,
[2]Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Universitas Gadjah Mada, Indonesia,
[3]静大・国際連携推進機構, [4]静大・グリーン科技研）

14:54 1Ip07 *Neospora caninum* antigens displaying-virus-like particles as a vaccine candidate against neosporosis
……○Jian Xu[1], Rikito Hiramatsu[2], Hamizah Suhaimi[3], Tatsuya Kato[1,2,3], Mayuko Kabayashi[4], Akari Fujimoto[4], Kazunori Ike[4], Enoch Y. Park[1,2,3]
（[1]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Integr. Sci. Technol., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [4]Lab. Veter. Parasit., Nippon Veter. Life Sci. Univ.）

15:06 1Ip08 Gag protein displaying different rHA mutants in silkworm
……○Muzajjad Gozal Goffar[1], Vipin Kumar Deo[2], Tatsuya Kato[1,3], Y.Enoch Park[1,3]
（[1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Office Int'l Collab., Shizuoka Univ.,
[3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.）

15:18 1Ip09 Study on efficient purification of recombinant protein from the silkworm larval haemolymph targeting pharmaceutical grade
……○Robert Minkner[1], Enoch Y. Park[1,2,3]
（[1]Dept. of Biosci., Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ.,
[2]Coll. of Agric., Grad. Sch. of Integr. Sci. and Technol. Shizuoka Univ.,
[3]Green Chem. Res. Div., Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ.）

15:30 1Ip10 シリカ粒子形成促進タンパク質「グラシン」の特徴的な領域構造とシリカ形成能
……○西 美智佳[1], 小林 大起[1], 美藤 友博[2], 有馬 二朗[2], 清水 克彦[3]
（[1]鳥取大院・農, [2]鳥取大・農, [3]鳥取大・CoRE）

15:42 1Ip11 イネディフェンシンの *Candida albicans* に対するアポトーシス誘導効果の解析
……○小川 広大[1], 落合 秋人[1], 福田 美南海[1], 田中 孝明[1], 提箸 祥幸[2], 谷口 正之[1]
（[1]新潟大・自然研, [2]農研機構・北農研）

15:54 1Ip12 北海道白糠町産植物からの Aβ 凝集阻害物質の探索と機能性評価
……○渡邉 輝[1], 久保 研二[1], 杉村 康司[2], 大場 慶司[3], 上井 幸司[1], 徳樂 清孝[1]
（[1]室工大院・工, [2]熊大院・薬, [3]東北大院・薬）

16:18 1Ip13 麹菌界面活性タンパク質 RolA の固体表面への吸着過程解析
……○寺内 裕貴[1], 永山 恵美[1], 田中 拓未[1], 田邊 弘毅[1], 高橋 徹[1], 藪 浩[3], 有田 稔彦[3], 樋口 剛志[3], 阿部 敬悦[1,2]
（[1]東北大院・農, [2]東北大・未来研, [3]東北大・多元研）

16:30 1Ip14 高接着性蛋白質 AtaA の反復配列を利用した部分欠損体の構築と機能ドメイン探索
……○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）

16:42 1Ip15 シアノバクテリアの分子シャペロンパラログの生化学的解析
……○仲本 準, 山口 湧己（埼玉大院・理工・分子）

16:54 1Ip16 Effect of pH change on the function of a transcriptional regulator in acetic acid bacteria
……○Afi Candra Trinugraha[1], Yuri Ishii[1], Yuki Shige[1], Naoki Akasaka[2], Wakao Fukuda[1], Shinsuke Fujiwara[1]
（[1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Marukan Vinegar Co., Ltd.）

17:06 1Ip17 複数発現でのみ機能発現する走化性センサータンパク質の特性化
……○堀 雄一, 緋田 安希子, チュンチャイ マッタナ, 田島 誉久, 加藤 純一（広島大院・先端物質）

17:18 1Ip18 カルボキシソーム外殻タンパク質 CcmO の機能解析
……○中村 隆太郎[1], 中口 雄貴[2], 三木 智寛[2], 松村 洋寿[1], 福谷 洋介[2], 野口 恵一[2], 養王田 正文[2], 尾高 雅文[1,2]
（[1]秋田大院・理工, [2]農工大院・工）

J 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（13:30〜17:30）

【発酵生理学，発酵工学／代謝工学／オミクス解析】

13:30 1Jp01 好熱菌発酵産物の給与が *Sod1* ノックアウトマウスに与える影響
……○鷺 陽香[1], 戸田 年彦[2], 小澤 裕介[2], 加藤 完[3], 中西 裕美子[3], 大野 博司[3], 宮本 浩邦[1,3,4], 清水 孝彦[2], 児玉 浩明[1]
（[1]千葉大院・園芸, [2]千葉大院・医, [3]IMS 理研, [4]サーマス）

13:42 1Jp02 吉草酸を産生するブタ排泄糞由来の乳酸資化菌 *Megasphaera elsdenii* Y2 株の有機酸代謝の特徴
……○荒岡 亮祐[1], 吉川 翔太[2], 井藤 俊行[3], 宮本 浩邦[1,4,5], 児玉 浩明[1]
（[1]千葉大院・園芸, [2]千葉大院・融合, [3]京葉プラントエンジニアリング, [4]理研・IMS, [5]サーマス）

13:54 1Jp03 好熱菌発酵産物の給与がブタ腸内の乳酸資化菌 *Megasphaera elsdenii* の多様性に与える影響
……○板谷 かえで[1], 吉川 翔太[2], 新名 俊仁[3], 宮本 浩邦[2,4,5], 児玉 浩明[1,2]
（[1]千葉大・園芸, [2]千葉大院・融合, [3]京葉プラントエンジニアリング, [4]サーマス, [5]理研・IMS）

14:06 1Jp04 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[3], 近藤 昭彦[3]
（[1]日本触媒, [2]神戸大院・工, [3]神戸大院・科技イノベ）

14:18 1Jp05 Influence of pH controllers on alginate beads containing co-immobilized Clostridia during acetic acid fermentation
……Siew Thing Phang, ○Harifara Rabemanolontsoa, Shiro Saka
（Dept. Socio-environment Energy Sci., Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ.）

14:54 1Jp07 光駆動 ATP 再生系による Vmax 細胞の創製
……弘埜 陽子[1], 戸谷 吉博[2], 叶 暁亭[3], 石井 純[3], 柘植 謙爾[3], 松田 史生[2], ○原 清敬[1]
（[1]静県大院・食栄環・環境科学, [2]阪大院・情報・バイオ情報, [3]神戸大院・イノベ）

15:06 1Jp08 ロドプシンを利用した大腸菌における光駆動 ATP 再生
……○鎌田 健太郎[1], 戸谷 吉博[1], 弘埜 陽子[2], 原 清敬[2], 松田 史生[1], 清水 浩[1]
（[1]阪大院・情報・バイオ情報, [2]静岡県大院・食品栄養環境・環境科学）

15:18 1Jp09 代謝動態制御を介して菌体集団規模を制御する Quorum Sensing 型遺伝子回路の構築とメタボローム解析による機能評価
…… ○相馬 悠希[1,2], 篠原 玉樹[2], 藤原 由梨[2], 角田 一真[2], 秦 康祐[2], 和泉 自泰[1,2], 馬場 健史[1,2]
（[1]九大・生医研, [2]九大院・シス生科）

15:30 1Jp10 チロシンの水酸化反応を最適化することによるベンジルアルカロイド生産大腸菌プラットフォーム株の改良
…… ○中川 明, 松村 栄太郎, 八島 悠里乃, 高尾 美月, 南 博道（石川県大・生物資源研）

15:42 1Jp11 大腸菌による L-theanine の発酵生産法の開発
…… ○大野 翔登, 林 幹朗, 田畑 和彦（協和発酵バイオ・リサーチ＆イノベーションセンター）

15:54 1Jp12 Metabolic engineering of Escherichia coli for production of shikimate pathway derivatives
…… ○Ryosuke Fujiwara[1], Shuhei Noda[2], Tsutomu Tanaka[1], Akihiko Kondo[1,2,3]
（[1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]BMEP, RIKEN, [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.）

16:18 1Jp13 海水培養が可能なシアノバクテリアへの亜リン酸資化能の付与
……○堀川 凌平[1], 本村 圭[1,2], 神原 亮大[1], 戸田 成美[1], 池田 丈[1],
石田 丈典[1], 舟橋 久景[1], 黒田 章夫[1,2], 廣田 隆一[1,2]
（[1]広島大院・先端物質, [2]JST・ALCA）

16:30 1Jp14 亜リン酸依存性を利用したシアノバクテリアのバイオセーフティ技術
……○佐野 公亮[1], 本村 圭[1,2], 神原 亮大[1], 渡辺 智[2,3], 池田 丈[1],
石田 丈典[1], 舟橋 久景[1], 黒田 章夫[1,2], 廣田 隆一[1,2]
（[1]広島大院・先端物質, [2]JST・ALCA, [3]東農大院・農）

16:42 1Jp15 藍藻由来亜リン酸デヒドロゲナーゼの酵素学的諸性質と選択培養技術への応用
…… ○本村 圭[1,2], 神原 亮大[1], 堀川 凌平[1], 池田 丈[1],
石田 丈典[1], 舟橋 久景[1], 黒田 章夫[1,2], 廣田 隆一[1,2]
（[1]広島大院・先端物質, [2]JST-ALCA）

16:54 1Jp16 ラン藻窒素代謝メカニズムの解明と物質生産への応用
…… ○見市 絢香, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦（神戸大院・科技イノベ）

17:06 1Jp17 動的代謝モデルアンサンブルを用いたエタノール生産シアノバクテリアの代謝工学
…… ○西口 大貴, 永井 暉, 松田 史生, 清水 浩（阪大院・情報）

17:18 1Jp18 シアノバクテリア中心炭素代謝における光量変化時の短期応答の解析
…… ○丸山 正晴, 西口 大貴, 豊島 正和, 松田 史生, 清水 浩（阪大院・情報）

K 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（13:30〜17:30）

【発酵生理学，発酵工学／代謝工学／オミクス解析】

13:30 1Kp01 油脂生産酵母 *Rhodosporidium toruloides* の炭素源応答解析
……○岩本 孝信[1], 高見沢 健留[1], Pham Khanh Dung[1], 志田 洋介[1],
荒 学志[2], 山崎 晴丈[2], 高久 洋暁[2], 小笠原 渉[1]
（[1]長岡技科大, [2]新潟薬大・応生命）

13:42 1Kp02 バイオエタノール生産に向けた耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* の特性解析及び糖資化能
……○阿部 拓哉[1], 廣田 潤哉[1], 星田 尚司[1,2,3], 赤田 倫治[1,2,3]
（[1]山口大院・創成科学・化学系, [2]山口大・中高温微生物セ, [3]山口大・生命医工セ）

13:54 1Kp03 酵母を利用した S-アリル-L-システイン生成可能性検討
…… ○辻 史忠, 山本 英樹, 山岸 一雄, 菅原 誠吾, 小寺 智博（味の素株式会社）

14:06 1Kp04 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* D35 株の 繰り返し発酵による脂肪酸組成変化解析
……○宮本 捺央[1], Kahar Prihardi[2], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[2]
（[1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ）

14:18 1Kp05 組換え出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるキシロースからのグルタチオン生産
…… ○小林 淳平, 佐々木 大介, 番場 崇弘, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦（神戸大院・科技イノベ）

14:30 1Kp06 *Moniliella megachiliensis* を用いた廃グリセリンからのエリスリトール発酵生産 ～バイオベース C4 ケミカルズ生産プラットフォーム構築への試み～
…… ○村上 紀里子[1], 東田 英毅[1], 岩田 悠志[2], 渡邉 泰祐[2,3], 荻原 淳[2,3], 春見 隆文[2,3], 新井 隆[4]
（[1]ちとせ研究所, [2]日大生資科・生命化, [3]日大院生資研究科・生資利用, [4]ダイセル）

14:54 1Kp07 CRISPR-Cas9 システムによるラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属の脂質生産性の改変
…… ○畑 浩介[1], 青井 真人[1], 渡邉 研志[1], 北堀 智希[1], 高橋 宏和[1], 岡村 好子[1], 松山 恵介[2], 黛 新造[3], 秋 庸裕[1]
（[1]広島大院・先端物質, [2]長瀬産業, [3]出光興産）

15:06 1Kp08 Growth, lipid and metabolite profile analysis of *Aurantiochytrium limacinum* SR21 grown on acetate-based medium for biotechnological applications
……○Charose Marie Ting Perez, Ran Hirotani, Kenshi Watanabe, Yoshiko Okamura, Yutaka Nakashimada, Tsunehiro Aki
（Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.）

15:18 1Kp09 界面バイオプロセスを用いた香気性ラクトンの生産
…… ○大澤 果穂[1], 杉本 恭子[2], 寺西 綾香[2], 小田 忍[2]
（[1]金工大院・工, [2]金工大・ゲノム研）

15:30 1Kp10 乳酸高生産性黄麹菌における乳酸生産フラックス強化による乳酸生産性の向上
……○張 斯来[1], 若井 暁[1], 荻野 千秋[2], 堤 浩子[3], 秦 洋二[3], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大院・工, [3]月桂冠・総研）

15:42 1Kp11 脱デンプン小麦フスマ培養における麹菌ヘミセルラーゼの生産
…… ○和田 竜之介, 山形 雄一郎, 高橋 奈津美, 卜部 喬史, 尾関 健二（金工大・ゲノム研）

15:54 1Kp12 gSELEX 法による糸状菌の分化に関与する転写因子の DNA 結合配列の同定
……藤井 陽平[1], 岡 大椰[2], 片山 琢也[1], 兒島 孝明[2], 中野 秀雄[2], ○丸山 潤一[1]
（[1]東大院・農生科・応生工, [2]名大院・生命農学）

16:18 1Kp13 イメージング質量分析を用いたショウジョウバエ体内におけるイミダクロプリド可視化手法の確立
…… ○大津 誠太郎[1], 山口 政光[2], 福﨑 英一郎[1], 新間 秀一[1]
（[1]阪大院・工, [2]京工繊大・工芸科学）

16:30 1Kp14 イメージング質量分析を用いたショウジョウバエ幼虫体内の神経伝達物質の可視化法の開発
…… ○榎本 陽介[1], 山口 政光[2], 福﨑 英一郎[1], 新間 秀一[1]
（[1]阪大院・工, [2]京工繊大・工芸科学）

16:42 1Kp15 バルブスイッチング LC-MS/MS に基づくキラルアミノ酸の多検体分析
…… ○中野 洋介, 馬越 泰, 福﨑 英一郎（阪大院・工）

16:54 1Kp16 ガスクロマトグラフィー負化学イオン化質量分析法を用いた糖リン酸新規分析法の構築と ^{13}C 代謝フラックス解析への応用
……○岡橋 伸幸[1], 前田 昂亮[1], 川名 修一[2], 飯田 順子[2,3], 清水 浩[1], 松田 史生[1]
（[1]阪大院・情報, [2]島津製作所, [3]阪大院・工）

17:06 1Kp17 質量分析のダイナミックレンジ拡張技術の開発とメタボロミクスへの応用
…… ○中山 泰宗[1], 和泉 自泰[2], 長濱 一弘[1], 松岡 正佳[1], 馬場 健史[2]
（[1]崇城大院・工, [2]九大・生医研）

17:18 1Kp18 Automated data processing for quality monitoring of biotherapeutics by multiple attribute methods (MAMs)
…… ○Naohiko Heida（Genedata KK）

L 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（13:30〜17:18）

【バイオセンシング，分析化学／センサー，計測工学】

13:30 1Lp01 金ナノ粒子―量子ドットのプラズモン共鳴現象を用いたノロウイルス RNA 検出法
……○森田 真広[1], Jaewook Lee[2], Oluwasesan Adegoke[2], 朴 龍洙[1,2]
（[1]静大院・総科研・農, [2]静大・グリーン科技研）

13:42 1Lp02 A label free sensing system for the detection of Dengue virus serotype
……○Ankan Dutta Chowdhury[1], Nasrin Fahmida[2], Kenshin Takemura[2], Indra M. Khoris[3], Jaewook Lee[1], Enoch Y. Park[1,2]
（[1]Lab. Biotech., Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ, [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [3]Dept. Agriculture, Grad. Sch. Integrat. Sci. Technol.）

13:54 1Lp03 Silver-enhanced colorimetric detection of norovirus-like particles using peroxidase-like activity of nanozyme
……○Indra M. Khoris[1], Kenshin Takemura[2], Jaewook Lee[3], Vipin Kumar Deo[4], Tetsurou Suzuki[5], Enoch Y. Park[1,2,3]
（[1]Dept. Agriculture, Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Dept. Biosci., Grad. Sch. Biosci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [4]Office Inter'l Collab., Shizuoka Univ,, [5]Dept. Infect. Dis., Hamamatsu Univ. Sch. Med.）

14:06 1Lp04 Magnetofluoro-immunosensing system by using plasmonic/magnetic graphene for virus detection
……○Jaewook Lee[1], Kenshin Takemura[2], Enoch Y. Park[1,2]
（[1]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ.）

14:18 1Lp05 **磁気分離免疫蛍光ナノバイオセンサーを用いた糞便中からのノロウイルス高感度・迅速検出**
……○竹村 謙信[1], 李 在郁[2], Vipin Kumar Deo[3], 鈴木 哲朗[4], 朴 龍洙[1,2]
（[1]静大・創科技院, [2]静大・グリーン科技研, [3]静大・国際連携推進機構, [4]浜医大・医・医学科）

14:30 1Lp06 Highly sensitive detection of norovirus-like particles using LSPR behavior of CdSeTeS QDs and AuNPs
……○Fahmida Nasrin[1], Ankan Dutta Chowdhury[2], Kenshin Takemura[1], Jaewook Lee[2], Oluwasesan Adegoke[2], Vipin Kumar Deo[3], Tetsuro Suzuki[4], Enoch Y. Park[1,2]
（[1]Lab. Biotech., Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Lab. Biotech., Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Office Inter'l Collab., Shizuoka Univ, [4]Dept. Infect. Dis., Hamamatsu Univ. Sch. Medicine）

14:54 1Lp07 Gel-based cell manipulation 法に基づく環境微生物の単一細胞解析技術の開発
……○茅 逸皓, 根岸 諒, 田中 剛, 吉野 知子（農工大院・工）

15:06 1Lp08 （講演中止）

15:18 1Lp09 バイオナノカプセル整列固定化技術による DNA アプタマーセンサーの高感度化
……○山田 裕紀[1], 飯嶋 益巳[1,2], 黒田 俊一[1]（[1]阪大・産研, [2]東農大・応生科）

15:30 1Lp10 DNA ナノ構造体修飾ビーズを用いた標的核酸のイメージング検出
……○吉田 知哲, 池田 丈, 石田 丈典, 廣田 隆一, 黒田 章夫, 舟橋 久景（広島大院・先端物質）

15:42 1Lp11 段階的な酵素反応に基づいた抗体結合タンパク質含有ポリマーの固相基板上での調製技術の開発
……宮尾 寛樹[1], 上村 侑太郎[1], ○末田 慎二[1,2]（[1]九工大院・情報工・生命情報, [2]九工大・RCBT）

15:54 1Lp12 酵母細胞における生理活性物質メラトニンをモニタリングするための G タンパク質共役型受容体（GPCR）を用いたメタボライトセンサの開発
……○田畑 琢也, 中村 泰之, 加藤 寛子, 近藤 昭彦, 石井 純（神戸大院・科技イノベ）

16:18 1Lp13 A potentiometric plant condition monitoring method
……○Tae Hang Yoon[1], Hak Jin Song[1], Kwang Jin Kim[2], Yong-Keun Choi[1], Wu-Young Jeong[1], Ji Eun Kim[1], Sang Hyun Lee[1], Yung-Hun Yang[1], Hyung Joo Kim[1]
（[1] Dept. Biological eng., Konkuk Univ., [2] Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration.）

16:30 1Lp14 高性能バイオデバイスを目指したカーボンナノチューブ配向電極の開発
……○藤原 郁也[1], 大池 智明[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）

16:42 1Lp15 緩和時間プロファイリングとデータ駆動型アプローチによる魚肉特性評価
……○伊達 康博[1,2], 魏 菲菲[1], 坪井 裕理[1], 清水 智子[1], 坂田 研二[1], 菊地 淳[1,2,3]
（[1] 理研・CSRS, [2] 横市院・生医, [3] 名大院・生命農）

16:54 1Lp16 血漿メタボロミクスに資する固相誘導体化法を用いた GC/MS 分析法の開発
……○新川 翔也[1], 佐々野 僚一[2], 古野 正浩[1], 福﨑 英一郎[1]
（[1] 阪大院・工, [2] アイスティサイエンス）

17:06 1Lp17 光切断性ペプチドアレイと質量分析計を組み合わせた新規アッセイ法による，2 種プロテアーゼ間の切断同等性評価
……○栗本 昌樹[1], 久保 智里[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 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（13:30〜17:30）

【酵素学，酵素工学】

13:30 1Mp01 亜硝酸酸化細菌における Toxin-Antitoxin 機構の生理学的意義の考察
……○葵 理恵[1,2], 宮本 龍樹[1,2], 横田 亜紀子[2], 大田 悠里[1,2], 常田 聡[1], 野田 尚宏[1,2]
（[1] 早大院・先進理工, [2] 産総研・バイオメディカル）

13:42 1Mp02 *Streptomyces* sp. NT1 株由来 L-グルタミン酸オキシダーゼのフルコンセンサス設計による耐熱性の向上
……○齋藤 貴広[1], 久保田 瞳[1], 林 優花[2], 中野 祥吾[3], 伊藤 創平[3], 浅野 泰久[4], 酒瀬川 信一[5], 杉森 大助[1,2]
（[1] 福島大・共生システム理工, [2] 福島大院・理工, [3] 静県大・食栄, [4] 富山県大・生工研セ, [5] 旭化成ファーマ）

13:54 1Mp03 リンゴ酸デヒドロゲナーセの Closed 構造不安定化による比活性の向上および低温適性化
……○下澤 勇弥, 西矢 芳昭（摂南大院・理工）

14:06 1Mp04 メカノエンザイム・ダイナミン GTPase によるアクチン線維束化機構の解析
……○山田 浩司[1], 阿部 匡史[1], 竹田 哲也[1], 高島 英造[2], 森田 将之[2], 竹居 孝二[1]
（[1] 岡山大院・医歯薬, [2] 愛媛大・プロテオサイエンスセンター）

14:18 1Mp05 イオン液体を用いた標識酵素を含む各種酵素に対する長期安定性・高温耐熱性の評価
……○金子 恒太郎, 河合 功治（ミヨシ油脂）

14:30 1Mp06 Chamaemelum nobile および Durio zibethinus 由来のアルコールアシルトランスフェラーゼの精製と酵素化学的諸性質の解明
……○大島 遼太郎[1], 吉川 千晶[1], 森 利明[1], 加藤 康夫[1], 七田 沙耶香[1,2], 礒部 公安[1,2], 元島 史博[1,2], 石田 裕幸[1,2], 浅野 泰久[1,2]
（[1] 富山県大・工, [2] JST, ERATO）

14:54 1Mp07 ハロアルキル有機リン酸トリエステル加水分解酵素中のシグナル様ペプチドの機能解析
……○今野 聖矢, 今井 俊宏, 阿部 勝正, 高橋 祥司, 解良 芳夫（長岡技科大）

15:06 1Mp08 変異型ハロアルキル有機リン酸トリエステル加水分解酵素の大腸菌発現系の構築と諸特性解析
……○阿部 勝正, 田中 成美, 高橋 祥司, 解良 芳夫（長岡技科大）

15:18 1Mp09 イノシトール遊離能をもつフィターゼ Phy9-3B の触媒機構の解析
……○武生 みのり[1], 佐々木 海[1], 尾瀬 農之[2], 阿部 歩[1], 曾根 輝雄[1]
（[1]北大院・農, [2]北大院・生命科学）

15:30 1Mp10 シトクロム P450BM3 と酵素活性化分子を利用した大腸菌内でのベンゼンの直接酸化
……○唐澤 昌之[1], 柳澤 颯太[1], 荘司 長三[1,2], 渡辺 芳人[3]
（[1]名大院・理, [2]JST CREST, [3]名大・物国セ）

15:42 1Mp11 ゴマ由来セサミノール配糖体特異的な新規配糖体化酵素の機能解析
……○及川 大樹[1], 和氣 駿之[1], 小埜 栄一郎[2], 村田 純[3], 白石 慧[3], 堀川 学[3], 中山 亨[1]
（[1]東北大院・工, [2]サントリーグローバルイノベーションセンター, [3]サントリー生命科学財団）

15:54 1Mp12 The additional N-terminal domain of the beta-propeller phytase of *Pseudomonas* sp. FB15 serves to increase low-temperature activity and catalytic efficiency
……○WonJe Jang, Hae Dae Park, Yu Bin Choi, In-Soo Kong
（Dept. Biotechnol., Pukyong Natl. Univ., Busan, Republic of Korea）

16:18 1Mp13 *Methylobacterium extorquens* AM1 のランタノイド依存型メタノールデヒドロゲナーゼの解析
……吉川 友理[1], 北村 純一[1], 矢野 嵩典[1], 中川 智行[2], 谷 明生[3], ○三井 亮司[1]
（[1]岡山理大・理, [2]岐阜大・応生科, [3]岡山大・資源植物科研）

16:30 1Mp14 光化学系 II 再構成メタンモノオキシゲナーゼ膜画分を用いたメタン酸化反応
……近藤 龍一, 森 史也, 伊藤 栄紘, ○蒲池 利章（東工大院・生命理工）

16:42 1Mp15 *Clostridium cellulovorans* 743B 由来エンドグルカナーゼＥの酵素学的諸性質
……○幸崎 涼, 三宅 英雄（三重大院・生資）

16:54 1Mp16 バイオマス分解酵素の大規模スクリーニングで見出した希少放線菌
……○竹中 武藏[1], Lee Jae Min[2], Pamella Apriliana[2], 柏木 紀賢[1], Prihardi Kahar[1], 荻野 千秋[2], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大院・工）

17:06 1Mp17 リン酸化合物加水分解酵素フィターゼの活性に重要なループ領域の変異解析
……○和田 愛未, 林 勇樹, 新井 宗仁（東大院・総合文化）

17:18 1Mp18 海藻多糖由来の新しい希少糖であるアルギン酸デオキシ糖の製造方法
……○三宅 英雄[1], 村瀬 祥光[1], 濱地 野乃香[2], モリ テツシ[3], 田中 礼士[1], 植田 充美[4], 柴田 敏行[1]
（[1]三重大院・生資, [2]三重大・生資, [3]農工大院・工, [4]京大院・農）

N 会場　第 4 学舎 2 号館 4 階（13:30〜17:30）

【分類，系統，遺伝学／環境浄化，修復，保全技術／環境工学，廃水処理技術】

13:30 1Np01 運動性乳酸菌の選択分離法の構築
……○田中 悠二, 柳田 藤寿, 乙黒 美彩（山梨大生・ワイン研）

13:42 1Np02 低温菌シンプル酵素触媒の宿主とその培養に関する基盤的解析
……○鴨木 明子[1], 田島 誉久[1], 小西 正朗[2], 八久保 晶弘[2], 坂上 寛敏[2], 南 尚嗣[2], 山下 聡[2], 中島田 豊[1], 加藤 純一[1]
（[1]広島大院・先端物質, [2]北見工大）

13:54 1Np03 コリネ型細菌におけるトキシン/アンチトキシン系の解析
……○田中 裕也[1], 前田 智也[2], 乾 将行[1,3]
（[1]RITE, [2]理研・生命システム, [3]奈良先端大・バイオ）

14:06 1Np04 コリネ型細菌におけるトレハロース - 6 - リン酸合成酵素のフィードバック阻害
……○生出 伸一[1], 乾 将行[1,2]（[1]RITE, [2]奈良先端大・バイオ）

14:18 1Np05 コリネ型細菌における ECF シグマ因子の認識プロモーター配列の解析
……○豊田 晃一[1], 乾 将行[1,2]（[1]RITE, [2]奈良先端大・バイオ）

14:30 1Np06 光照射により誘導される葉面細菌の色素生産
……○井口 博之, 金ヶ崎 三千翔, 石井 沙弥, 田口 和真（京都学園大・バイオ）

14:54 1Np07 Lipomycetaceae 科酵母の国内各地における種分布及び新種について
……○山崎 敦史（NITE・NBRC）

15:06 1Np08 白神こだま酵母における経時寿命の制御メカニズムの解析
……○中沢 伸重[1], 高橋 慶太郎[2]（[1]秋田県大・生資, [2]秋田総食研）

15:18 1Np09 糸状菌の鉄恒常性維持に関与する転写因子 HapX の C-末端ドメインの機能解析
……○辻上 誠也, 山下 美春, 村田 俊輔, 志水 元亨, 加藤 雅士（名城大院・農）

15:30 1Np10 ジャンボファージ RSP13 の特殊なゲノム DNA の解析
……○川崎 健, Meslhi Alaaeldin, 山田 隆（広島大院・先端物質）

15:42 1Np11 宿主染色体上のプロファージの有無によるプラスミド保持株の fitness 変化
……○Pham Thi Kim Dung[1], Le Thi Thanh Thu[1], 森内 良太[2], 道羅 英夫[2], 金原 和秀[1], 新谷 政己[1]
（[1]静大院・総合科技, [2]静大グリーン研）

15:54 1Np12 好気・微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性の比較
……○越智 健太郎[1], 柳谷 洸輔[1], 大熊 盛也[2], 金原 和秀[1], 新谷 政己[1,2]
（[1]静大・工, [2]理研・BRC-JCM）

16:18 1Np13 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株の合成化合物分解における不安定化要因の探索
……○村上 将和[1], 村澤 友紀恵[1], 松村 吉信[1,2]（[1]関西大・生命生物工, [2]関西大・ORDIST）

16:30 1Np14 *Pseudomonas* sp. KU-51 株のニトロフェノール分解系遺伝子の解析
……○劉 雅軒, 岩木 宏明, 長谷川 喜衛（関西大・化生工）

16:42 1Np15 ビスフェノール A を特異的に吸着する微生物を用いた排水処理系の機能強化
……○青木 好辰, 市村 栄諭, 遠山 忠, 田中 靖浩, 森 一博（山梨大院・医工総）

16:54 1Np16 *Pseudomonas* sp. TB-98 株によるテレフタル酸からのプロトカテク酸の生産
……○金森 拓[1], 中島 鈴佳[1], 岡村 匡浩[2], 内堀 孝博[3], 中島 敏明[1]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大, [3]パナック工業）

17:06 1Np17 Indoor airborne toluene removal activity of *Pseudomonas putida* with plant, *Solanum lycopersicum*
……○Hak Jin Song[1], Wu-Young Jeong[1], Tae Hang Yoon[1], Ji Eun Kim[1], Kwang Jin Kim[2],
Sang Hyun Lee[1], Yung-Hun Yang[1], Hyung Joo Kim[1]
（[1]Dept. Biological Eng., Konkuk Univ., [2]Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration）

17:18 1Np18 ノニルフェノール酸化酵素遺伝子を用いたビスフェノール S の完全無機化の取り組み
……○武尾 正弘, 近成 直斗, 栗岡 純平, 猪野 椋太, 根来 誠司（兵県大院・工・応化）

O 会場　第 4 学舎 2 号館 4 階（13:30〜17:30）

【生体医用工学／セル＆ティッシュエンジニアリング】

13:30 1Op01 多糖高分子を用いたペプチドハイブリッド足場材料の構築と評価
……○王 悦[1], 蟹江 慧[1], 金子 喬士郎[1], 緒方 藍歌[2], 成田 裕司[2], 竹澤 俊明[3], 加藤 竜司[1]
（[1]名大院・創薬, [2]名大院・医, [3]農研機構）

13:42 1Op02 放射線架橋ポリビニルアルコールゲル上で培養した神経幹細胞／前駆細胞の接着関連分子の発現解析
……○森 英樹, 中村 泰斗, 原 正之（阪大院・理）

13:54 1Op03 光増感色素固定化培養基材を用いて培養したラット間葉系幹細胞の生存・分化の解析
……○八木 秀郁, 森 英樹, 原 正之（阪府大院・理）

14:06 1Op04 ヒトリンパ球への高効率遺伝子導入に向けたシリコンナノニードル表面における核酸の吸脱着制御
……○本多 裕基[1], 山岸 彩奈[2], 金 賢徹[1,2], 中村 史[1,2]
（[1]農工大院・工, [2]産総研・バイオメディカル）

14:18 1Op05 ディッシュと不織布で増殖した間葉系幹細胞の細胞外マトリックス量の比較
……○傅 博, 藤原 政司, 高木 睦（北大院・工）

14:30 1Op06 Polycaprolactone nanoparticles for evaluation of the collagen synthesis
……○David Wu-Young Jeong[1], Hak Jin Song[1], Woo Sung Lee[2], Sok Young Shim[2], Hyeon Jin Jeon[2], Tae Hang Yoon[1], Ji Eun Kim[1], Sang Hyun Lee[1], Yung-Hun Yang[1], Hyung Joo Kim[1]
（[1]Dept. Biological Eng., Konkuk Univ., [2]Roselab）

14:54 1Op07 毛細血管様構造を有するスフェロイドをバイオ 3D プリンターにより積層した三次元組織の生・死細胞ならびに毛細血管様構造の分布の解析
……○稲垣 慶一[1], 高橋 憲司[2], 仁宮 一章[2]（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術）

15:06 1Op08 がん細胞を含む多細胞スフェロイドをバイオ 3D プリンターにより配置した三次元組織の作製
……○谷内 達彦[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）

15:18 1Op09 脂肪由来間葉系幹細胞のスフェロイドをバイオ 3D プリンターにより積層した三次元組織の作製とその分化
……○神並 美華[1], 高橋 憲司[1], 仁宮 一章[2]（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大学 新学術創成研究機構）

15:30 1Op10 接着細胞の自己集合化誘導剤を用いた幹細胞凝集塊の新規作製法の開発と評価
……草加 直幸[1,2], 浅見 優月[1,2], 安部 菜月[3], 広井 佳臣[4], 西野 泰斗[3], ○岩井 良輔[1]
（[1]岡山理大・技科研, [2]岡山理大・工, [3]日産化学工業（株）・生物科学研, [4]日産化学工業（株）・工・材料科学研）

15:42 1Op11 肝細胞スフェロイドに短期間で細胞極性を付与する方法の開発
……○小島 伸彦[1], 田尾 文哉[1], 青木 茂久[2]（[1]横市大院・生命ナノシステム, [2]佐賀大・医）

15:54 1Op12 培養デバイス TASCL による神経細胞スフェロイドの構築
……○宮本 義孝, 池内 真志（東大・先端研）

16:18 1Op13 胚様体形成期間中の CHIR99021 処理濃度がヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導に与える影響
……○依田 聖未, 大貫 喜嗣, 黒澤 尋（山梨大院・統合応生）

16:30 1Op14 iPS 細胞由来運動神経を利用した神経筋接合を有する三次元筋組織の構築
……○吉岡 貫太郎, 井藤 彰, 河邉 佳典, 上平 正道（九大院・工）

16:42 1Op15 毛包を有する皮膚組織の作製
……○楯 芳樹, 景山 達斗, 福田 淳二（横国大院・工）

16:54 1Op16 不飽和カルボニル化合物が血管構成細胞に及ぼす影響の解明
……○東 恒仁, 眞井 洋輔, 真崎 雄一（北大院・医・細胞薬理）

17:06 1Op17 培養骨格筋組織の形状および機能の維持に適した FBS 濃度の探索
……○長谷 洸輝[1], 堀江 正信[2], 藤田 英明[3], 長森 英二[4]
（[1]阪工大・工・生命, [2]京大・RIRC, [3]早大・WABIOS, [4]阪工大院・工）

17:18 1Op18 過酸化水素が培養骨格筋細胞の構造と機能に影響を与える濃度域の検証
……○前 佳佑[1], 堀江 正信[2], 藤田 英明[3], 長森 英二[4]
（[1]阪工大・工・生命, [2]京大・RIRC, [3]早大・WABIOS, [4]阪工大院・工）

ランチョンセミナー

1LS1 株式会社島津製作所

LS1 会場　第 4 学舎　4 号館 2 階（11:45〜12:45）

1LS2 エッペンドルフ株式会社

LS2 会場　第 4 学舎　4 号館 2 階（11:45〜12:45）

1LS3 ノバ・バイオメディカル株式会社

LS3 会場　第 4 学舎　2 号館 5 階（11:45〜12:45）

第 2 日（9 月 6 日）

太字の一般講演は今年度の生物工学学生優秀賞（飛翔賞）受賞者の発表です.

開始時間	講演番号	演　　題	発表者氏名（所属） ○印は講演者を示す

受賞講演（生物工学奨励賞（江田賞・斎藤賞・照井賞），生物工学アジア若手賞）

C 会場　第 4 学舎　3 号館 2 階（13:30〜13:50）

13:30　A2Cp01　**〈生物工学奨励賞（江田賞）〉**　座長：**吉田 聡**

ビール醸造における微生物検査法の迅速化に関する研究

……○浅野 静（アサヒビール）

M 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（13:30〜13:50）

13:30　A2Mp01　**〈生物工学奨励賞（斎藤賞）〉**　座長：**高木 博史**

好熱性酵素を用いた細胞外人工代謝経路の構築と利用に関する先駆的研究

……○本田 孝祐（阪大院・工）

F 会場　第 4 学舎 2 号館 1 階（13:30〜13:50）

13:30　A2Fp01　**〈生物工学奨励賞（照井賞）〉**　座長：**田口 精一**

機能性磁性ナノ粒子の開発と医療技術への応用に関する生物工学的研究

……○井藤 彰（九大院・工）

H 会場　第 4 学舎 2 号館 2 階（13:30〜13:50）

13:30　A2Hp01　**〈生物工学アジア若手賞〉**　座長：**跡見 晴幸**

Exploration of lignocellulose degrading enzymes from hidden bioresource for biorefinery and green industries

……○Verawat Champreda

（Natl. Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand）

一般講演（午前の部）

C 会場　第 4 学舎 3 号館 2 階（9:00〜11:36）

【食品科学，食品工学】

9:00 2Ca01 LC/ESI-MS/MS を用いた玄米米糠麹 (FBRA) 中ポリアミンの定量と製造過程における含有変動解析
…… ○堀江 裕紀子[1,3], 後藤 綺花[2], 伊藤 麻里[3], 津吹 澄[2], 池川 繁男[4], 小川 祥二郎[1,2], 東 達也[1,2]
（[1]東理大院・薬, [2]東理大・薬, [3]コーケン, [4]玄米酵素）

9:12 2Ca02 トランスクリプトミクスによるキトサン処理時のバナナ果実における網羅的遺伝子発現解析
……○山本 佳奈[1,2], Putri Sastia[1,2], Dwivany Fenny[2], 福﨑 英一郎[1]
（[1]阪大院・工, [2]バンドン工科大学院・生命科）

9:24 2Ca03 Metabolic Profiling of Cavendish Banana (*Musa acuminata* cv AAA) to understand its color changes
…… ○Anjaritha Aulia Rizky Parijadi[1], Fenny Martha Dwivany[2], Sastia Prama Putri[1,2], Eiichiro Fukusaki[1]
（[1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ,
[2]Dept. Biology., Sch. of Life Sci. and Technol., Inst. Technol. Bandung）

9:36 2Ca04 Quality prediction and authentication of Indonesian specialty coffee using GC/MS-based metabolomics approach
…… ○Sastia Putri[1], Tomoya Irifune[1], Yusianto[2], Ucu Sumirat[2], Eiichiro Fukusaki[1]
（[1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Indonesian Coffee and Cocoa Research Institute）

9:48 2Ca05 GC-MS-based metabolomics for the classification of tempe along to different regions and production processes in Indonesia
…… ○Adinda Darwati Kadar[1], Pingkan Aditiawati[2], Made Astawan[3], Sastia Prama Putri[1,2], Eiichiro Fukusaki[1]
（[1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Biotechnol., Institut Teknologi Bandung,
[3]Dept. Food Sci. Technol., Bogor Agric. Univ.）

10:00 2Ca06 Non-targeted metabolomics-based prediction of sensory value of *Litopenaeus vannamei* (white leg shrimp)
……○Safira Latifa Erlangga Putri[1], Felicia Irene Saputra[2], Gede Suantika[2], Sastia Prama Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1]
（[1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.,
[2]Dept. Microbiol., Sch. of Life Sci. and Technol., Inst. Technol. Bandung）

10:24 2Ca07 Evaluation of in-vivo skin-whitening activity of 8-methoxydaidzein coupled with 3'-hydroxygenistein
…… An-Ni Ke[1], Jiumn-Yih Wu[2], ○Te-Sheng Chang[1]
（[1]Dept. Biological Sci. & Technol., National Uni. Tainan, Taiwan,
[2]Dept Food Sci., National Quemoy Uni., Taiwan）

10:36 2Ca08 梅干しの脂質代謝改善効果
…… ○芦田 久[1], 伊藤 あずさ[1], 大東 夏海[1], 吉原 侑希[1], 米野 雅大[1], 永井 宏平[1], 石島 智子[2], 阿部 啓子[2], 岡田 晋治[2], 鈴木 利雄[3]
（[1]近大・生理工, [2]東大院・農生科, [3]阪市大院・工）

10:48 2Ca09 熱処理によっておこるポリ-γ-グルタミン酸の低分子量化に対するキレート剤の影響
……○岩本 七虹[1], 山口 良弘[1,2], 荻田 亮[1,3], 田中 俊雄[1], 藤田 憲一[1]
（[1]阪市大院・理, [2]阪市大・複合先端, [3]阪市大・健康研セ）

11:00 2Ca10 植物発酵エキスにおける抗酸化成分の分析
…… ○高木 康裕[1], 石井 もも子[2], 吉川 秀一[2], 柘植 圭介[3], 北垣 浩志[1]
（[1]佐賀大・農, [2]小林製薬, [3]佐賀工技セ）

11:12 2Ca11 サワードウの継代過程における化学成分変化と微生物叢変化の関連性
…… ○大城 麦人[1,2], 百田 理恵[1], 田中 優[1], 中山 二郎[1]
（[1]九大院・農, [2]山崎製パン・中央研）

11:24 2Ca12 ミドリムシの有用脂質の構造と有用性の解析
……○宮川 幸[1], 藤川 彩美[1], 阪本 真由子[1], 小濱 可奈絵[1], 柘植 圭介[2], 鈴木 健吾[3], 中島 綾香[3], 杉本 良太[3], 北垣 浩志[1]
([1]佐賀大・農, [2]佐賀県工技セ, [3]株式会社ユーグレナ)

D 会場　第 4 学舎 3 号館 1 階（10:24〜11:36）

【醸造学，醸造工学】

10:24 2Da07 ハイビスカス花から採取した酵母の特性と泡盛醸造への応用
……○阿部 峻之[1], 渡辺 大輔[2], 高木 博史[2], 塚原 正俊[1]
([1]バイオジェット, [2]奈良先端大・バイオ)

10:36 2Da08 ハイビスカス酵母の変異株におけるロイシン高蓄積機構の解析
……○豊川 洋一[1], 杉本 幸子[1], 那須野 亮[1], 渡辺 大輔[1], 阿部 峻之[2], 塚原 正俊[2], 高木 博史[1]
([1]奈良先端大・バイオ, [2]バイオジェット)

10:48 2Da09 清酒酵母の機能性アミノ酸蓄積変異株の分離と醸造特性の解析
……○大橋 正孝[1], 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）

11:00 2Da10 カプリル酸高生産酵母の醸造特性
……○畠山 明[1], 遣水 潤[2], 栗林 喬[3], 原 崇[4], 城 斗志夫[4], 有本 圭吾[1]
([1]吉乃川, [2]中越酵母工業, [3]新潟県醸造試, [4]新潟大・農)

11:12 2Da11 *Saccharomyces arboricola* と醸造酵母の交配株の作成とその醸造特性の解析
……○山本 裕貴[1], 藤丸 裕貴[1], ワイナンス マシュー[2], 五島 徹也[3], 赤尾 健[3], 北垣 浩志[1]
([1]佐賀大・農, [2]ウエストバージニア大学・生科, [3]酒総研)

11:24 2Da12 Bafilomycin A1 耐性を指標として育種した高発酵性酵母の諸性質解析
……○中瀬 舞, 山内 隆寛, 窪寺 隆文, 明石 貴裕（白鶴酒造）

F 会場　第 4 学舎 2 号館 1 階（9:00〜11:36）

【生物化学工学／培養工学／バイオプロセス】

9:00 2Fa01 酵母脂肪滴蓄積に及ぼすゴム粒子タンパク質発現の影響
……○横田 早希, 後藤 猛（秋田大院・理工）

9:12 2Fa02 Introduction of late embryogenesis abundant peptide co-expression system for adequate expression of insecticidal crystal proteins in *Bacillus thuringiensis*
……○Mahmuda Akhtar[1], Mizuta Kazuhiro[1], Shimokawa Tomoko[2], Maeda Minoru[2], Ikeno Shinya[1]
([1]Kyushu Inst. Technol., [2]Kyushu Medical Co., Ltd.)

9:24 2Fa03 海綿由来シリカ重合酵素の可溶性発現と凝集コントロール
……○中島 一紀, 小栗 秀俊, 岡本 淳之介, 川﨑 了（北大院・工）

9:36 2Fa04 麹菌内で同調的発現挙動を示すプロモーターを用いたタンパク質生産挙動の解析
……○片山 周平[1], 張 斯来[2], 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・科技イノベ, [3]月桂冠・総研)

9:48 2Fa05 麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体培養における菌糸完全分散株の作製とその酵素生産への応用
……○宮澤 拳[1], 吉見 啓[2], 古明地 敬介[1], 田畑 風華[1], 佐野 元昭[3], 阿部 敬悦[1,2]
([1]東北大院・農, [2]東北大・未来研, [3]金工大・ゲノム研)

10:00 2Fa06 麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸完全分散変異株の液体培養における酵素高生産性の評価
……○古明地 敬介[1], 宮澤 拳[1], 吉見 啓[2], 市川 暉[3], 佐野 元昭[4], 阿部 敬悦[1,2]
([1]東北大院・農, [2]東北大・未来研, [3]東北大・農, [4]金工大・ゲノム研)

10:24 2Fa07 エクソソームのアフィニティ分離が可能な単鎖抗体固定化担体の開発
……○小林 巧[1], 新 裕太[1], 片山 淳子[2], 的場 一隆[2], 堀内 淳一[1], 熊田 陽一[1]
([1]京工繊大院・工芸科学, [2]日産化学)

10:36 2Fa08 単鎖抗体固定化ラテックスの調製と高感度ラテックス凝集検査への応用
……○中尾 貴一[1], 谷端 玲奈[1], 高橋 浩一[2], 小笠原 真也[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)

10:48 2Fa09 改変型型糖鎖をもつ抗体医薬品生産を目指した細胞外糖鎖修飾反応の開発
……○鬼塚 正義[1,2], 嶋津 敦子[2], 天羽 宏枝[2] ([1]徳島大院・社会産理工, [2]MAB)

11:00 2Fa10 昆虫細胞における 2A ペプチドを用いた抗体生産
……溝手 結[1], ○増見 恭子[1,2], 勝田 知尚[1,2], 山地 秀樹[1,2]
([1]神戸大院・工, [2]MAB 組合)

11:12 2Fa11 組換え大腸菌を用いた流加培養による種々の単鎖抗体の菌体外生産特性
…… ○坂本 祐一朗, 井嶋 浩一朗, 李 歓, 熊田 陽一, 堀内 淳一（京工繊大院・工芸科学）

11:24 2Fa12 Monoclonal antibody production in a novel bioreactor using high cell-density mammalian cells
……○Chi-Hsien Liu, Yi-Xin Liu
（Chang Gung University, Taiwan）

G 会場　第 4 学舎 2 号館 2 階（9:00〜11:36）

【遺伝子工学】

9:00 2Ga01 選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* が産生する脂質関連代謝物 ceriporic acid の生合成候補遺伝子の探索と解析
……○渡邊 崇人[1], 秋好 陽香梨[1], 森田 暁人[1], 二神 泰基[2], 木村 信忠[3], 後藤 正利[4], 渡辺 隆司[1]
([1]京大・生存研, [2]鹿児島大院・連農, [3]産総研・生物プロセス, [4]佐賀大・農)

9:12 2Ga02 *Streptomyces achromogenes* subsp. *streptozoticus* のゲノムおよび二次代謝の解析
…… 山本 美也子, 中村 和音, 黒田 照夫, 森田 大地, 杉山 政則, ○熊谷 孝則
（広大院・医歯薬保健学）

9:24 2Ga03 ナノポアシーケンサを用いた遺伝子組換え麹菌ゲノム上の長鎖タンデムリピート構造の解析
…… ○若井 暁[1], 荻野 千秋[2], 堤 浩子[3], 秦 洋二[3], 近藤 昭彦[1]
([1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大院・工, [3]月桂冠・総研)

9:36 2Ga04 麹菌における環境ストレス応答性 MAP キナーゼ経路の *glaB* 遺伝子発現への関与
…… ○荒井 啓, 田中 瑞己, 吉村 緑, 新谷 尚弘, 五味 勝也（東北大院・農）

9:48 2Ga05 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* におけるアミラーゼ遺伝子の発現制御機構解析
……○橋本 渉[1], 荒井 啓[1], 水谷 治[2], 山田 修[3], 新谷 尚弘[1], 五味 勝也[1]
([1]東北大院・農, [2]琉球大・農, [3]酒総研)

10:00 2Ga06 ジペプチド取り込み能を有する麹菌のトランスポーターの同定
…… ○田中 瑞己[1], 伊藤 圭祐[1], 河原崎 泰昌[1], 五味 勝也[2]
([1]静県大・食栄, [2]東北大院・農)

10:24 2Ga07 海洋性珪藻類におけるエピソーム導入型多重遺伝子改変システムの開発
…… 北川 諒治, ○原田 尚志（鳥取大・工）

10:36 2Ga08 珪藻殻への有用タンパク質提示発現による機能性材料開発
…… ○大西 菜月[1], 中島 健介[2], 辻 敬典[1], 松田 祐介[1]
([1]関西学院大・理工, [2]バイオパレット)

10:48 2Ga09 珪藻固定化酵素を利用した効率的アグマチン産生
…… ○片山 翔太, 福田 青郎, 松田 祐介, 藤原 伸介（関西学院大・理工）

11:00 2Ga10 オオミジンコを用いた GAL4 ツーハイブリッドシステムによる内分泌撹乱物質検出法の開発
…… ○加藤 泰彦, 山崎 勇人, 松浦 友亮, 渡邉 肇（阪大院・工）

11:12 2Ga11 野生型及びキメラ蛍光タンパク質を用いた蛍光色を決定する配列の解析
……○鈴木 寛人[1], 星田 尚司[1,2,3], 赤田 倫治[1,2,3]
（[1]山口大院・創成科学・化学系, [2]山口大・中高温セ, [3]山口大・生命医工セ）

11:24 2Ga12 耐熱性 D1/D2 ヘテロダイマーをシアノバクテリア光化学系 II 複合体に組み込むための D1 ポリペプチド C 末端プロセシングの最適化
…… 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）

H 会場　第 4 学舎 2 号館 2 階（9:00〜11:36）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

9:00 2Ha01 竹粉の田面施用が土壌の細菌叢と窒素固定活性に及ぼす影響
…… ○前田 勇, 嵐田 遥, 飯郷 雅之, 平井 英明（宇都宮大・農）

9:12 2Ha02 好塩性細菌 *Halomonas elongata* を用いた高塩廃バイオマス由来の炭素源及び窒素源からの GABA 生産システムの開発
…… ○仲山 英樹, 鄒 子燕, 小川 純平（長崎大院・水産環境）

9:24 2Ha03 リグニン由来フェノール類を唯一の炭素源とした *cis,cis*-ムコン酸生産の効率化に関わる培養要素の同定
…… ○杉田 晴佳[1,3], 栗本 祐樹[1,3], 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）

9:36 2Ha04 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 3
…… ○江邉 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司（近畿大院・生物理工・生物工）

9:48 2Ha05 高濃度バニリンによる翻訳抑制下でも優先的に翻訳される新規酵母遺伝子 *VFH1* の解析とそのプロモーターの活用
……Nguyen Trinh, ○井沢 真吾（京工繊大院・工芸科学）

10:00 2Ha06 廃菌床由来バイオエタノールの発酵生産
……○小林 洋介[1], 藤森 一浩[2], 西島 拓人[1], 杉本 直久[1], 藤野 尚人[1], 今井 史規[3], 金松 雅俊[3], 山田 憲治[3], 荒井 進[3], 吉田 浩爾[1], 佐賀 清崇[1], 泉 可也[1]
（[1]Biomaterial in Tokyo, [2]産総研・生物プロセス, [3]三友プラントサービス）

10:24 2Ha07 ミミズが土壌微生物燃料電池に及ぼす効果
…… ○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）

10:36 2Ha08 微生物発電に伴う有用物質生産の試み
…… ○福本 悠地, 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・生物工）

10:48 2Ha09 種々の遺伝子改変の組み合わせが微生物燃料電池の出力に与える影響
……○川口 太一[1], 菊池 亮太[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）

11:00 2Ha10 *Desulfovibrio* 属細菌由来の蓄電性バイオミネラルの特性に寄与する関連遺伝子の比較解析
…… ○工藤 優輝[1], 安藤 翔太[1], 分部 友紀[2], 安池 一貴[2], 田代 陽介[1,3], 二又 裕之[1,3,4]
（[1]静大院・総科技, [2]静大・工, [3]静大創造大学院, [4]静大・グリーン研）

11:12 2Ha11 *Desulfovibrio* sp. HK-II 株の細胞外電子伝達と硫酸呼吸が及ぼす影響
……○安藤 翔太[1], 工藤 優輝[1], 分部 友紀[2], 安池 一貴[2], 田代 陽介[1,3], 二又 裕之[1,3,4]
([1]静大院・工, [2]静大・工, [3]静大・創造大学院, [4]静大・グリーン研)

11:24 2Ha12 下水汚泥のメタン発酵におけるハザードケミカルの影響
……○星子 裕貴, 藤江 秀斗, ムスタファ ヌルル・アシファ, 前田 憲成（九工大院・生体工）

I 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（9:00〜11:36）

【タンパク質工学】

9:00 2Ia01 高性能な蛍光バイオセンサー構築のための抗体結合プローブの開発
……○高橋 昌樹[1], 児島 智樹[2], 北口 哲也[3], 上田 宏[3]
([1]東工大院・生命理工, [2]東大院・工・化生, [3]東工大・化生研)

9:12 2Ia02 細胞内のアセチル化能を感知するセンサの開発
……○渡邉 荘爾, 小林 一幾, 木村 友紀, 河合 繁子, 斎藤 恭一, 梅野 太輔
（千葉大院・融合）

9:24 2Ia03 デノボタンパク質ナノブロック ePN-Blocks による自己集合超分子ナノ構造の創製と解析
……小林 直也[1,2], 稲野 紘一[1], 笹原 健嗣[1], 佐藤 高彰[1], 宮澤 佳甫[3],
福間 剛士[3], Hecht Michael[4], 宋 致宖[5], 村田 和義[5], ○新井 亮一[1,6]
([1]信州大・繊維, [2]自然科研機構・生命創成探究セ, [3]金沢大院・自科, [4]プリンストン大・化学, [5]生理研,
[6]信州大・菌類微生物セ)

9:36 2Ia04 様々なタンパク質のアミロイド凝集形成に対するポリアミン由来 8 員環化合物の影響評価
……○國富 理紗子[1], 福永 隼大[1], Pradipta Ambara R.[2], 田中 克典[2], 座古 保[1]
([1]愛媛大院・理工, [2]理研)

9:48 2Ia05 Aβ のアミロイド凝集体が NLRP3 インフラマソーム活性化に及ぼす影響
……○中西 文香[1], 金子 直恵[2], 増本 純也[2], 座古 保[1]
([1]愛媛大院・理工, [2]愛媛大学院医学)

10:00 2Ia06 耐熱性 Encapsulin ナノカプセルの内包系の構築
……○野中 衛, 松村 洋寿, 小川 信明, 尾高 雅文（秋田大院・理工）

10:24 2Ia07 コドン指定があいまいになった遺伝暗号表が進化を促進させる
……○榎本 利彦, 鮎川 翔太朗, 木賀 大介（早大・先進理工）

10:36 2Ia08 遺伝子発現と共役するゲノム DNA 複製系を *in vitro* で確立する
……○酒谷 佳寛[1], 松田 史生[1], 市橋 伯一[1,2]（[1]阪大院・情報, [2]阪大院・生命機能）

10:48 2Ia09 両端を β ドメインで終端した Coiled-Coil をベースとするランタニド結合タンパク質の設計
……○鈴木 淳巨, 北原 知恵, 堀 克敏（名大院・工）

11:00 2Ia10 CBH 触媒モジュール高発現型人工セルロソームの設計
……○中澤 光[1], 石垣 友理[1], 張 鈺爽[1], 山田 浩之[2], 坪井 宏和[2], 幸田 明生[2], 梅津 光央[1]
([1]東北大院・工, [2]大関株式会社)

11:12 2Ia11 AI はタンパク質進化を導くか？：機械学習支援による GFP の YFP 化検証
……○及川 未早来[1], 齋藤 裕[2], 亀田 倫史[2], 中澤 光[1], 二井手 哲平[1], 津田 宏治[3,4], 梅津 光央[1,4]
([1]東北大院・工, [2]産総研・人工知能研究セ, [3]東大院・新領域, [4]理研・革新知能統合研究セ)

11:24 2Ia12 抗体データベースを利用した熱安定性向上と発現量向上に向けた大規模変異導入プロセスの開発
……○服部 修平[1,2], 本田 亜由美[1], 二井手 哲平[1], 中澤 光[1], 梅津 光央[1]
([1]東北大院・工, [2](独) 日本学術振興会特別研究員 DC)

J 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（9:00〜11:24）

【発酵生理学，発酵工学／代謝工学／オミクス解析】

9:00　2Ja01　遺伝子破壊による *Citrobacter* 属細菌のキトサン様バイオ凝集剤高生産株の育種
……○金尾 圭太[1], 柏 雅美[1], 木村 和幸[1,2], 宮本 弘毅[1], 山口 翔太[1], バランワル プリヤンカ[1], 根来 誠司[1], 武尾 正弘[1]
（[1]兵県大・工・応化, [2]（株）兵庫分析センター）

9:12　2Ja02　Identification and functional analysis of genes involved in polymerization and secretion in the production of a chitosan-like polysaccharide in *Citrobacter* spp.
……○Priyanka Baranwal[1], Keita Kanao[1], Shin Odagaki[1], Kazuyuki Kimura[1,2], Seiji Negoro[1], Masahiro Takeo[1]
（[1]Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, [2]Hyogo Analysis Center Co., Ltd.）

9:24　2Ja03　高い汚泥凝集能を持つポリグルタミン酸の生産性改善に向けた菌株育種と培養工学的な検討
……○小林 誠治, 劉 涛, 尾島 由紘, 東 雅之（阪市大院・工）

9:36　2Ja04　Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for production of 2-propanol from sugars
……○Dyah Candra Hapsari Subagyo, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui
（Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech）

9:48　2Ja05　メタノールを原料にした共重合ポリヒドロキシアルカン酸生合成のための *Methylobacterium extorquens* の代謝改変と培養条件の検討
……○折田 和泉, 海野 源人, 加藤 りさ, 中村 聡, 福居 俊昭（東工大院・生命理工）

10:00　2Ja06　遺伝子組換え水素酸化細菌による CO_2 からの共重合ポリエステルの生合成と C_6 ユニットモル分率の変化
……○鈴木 尚幸[1], 森 瞬也[1], 折田 和泉[2], 福居 俊昭[2], 田中 賢二[1]
（[1]近大・産理工, [2]東工大院・生命理工）

10:24　2Ja07　アンモニア化成と硝酸化成に有用な微生物の探索ならびに硝化微生物コンソーシアの構築
……○安藤 晃規[1,2], 岡田 若子[1], Sakuntala Saijai[1], Tsai You-Shan[1], 宮本 憲二[3], 加藤 康夫[4], 篠原 信[5], 小川 順[1,2]
（[1]京大院・農, [2]京大・生理化学, [3]慶大・理工, [4]富山県大・生工研セ, [5]農研機構）

10:36　2Ja08　Identification of proteins related to tooth mineralization in *Cryptochiton stelleri* by integrated transcriptomic and proteomic analysis
……○Michiko Nemoto[1], Dongni Ren[2], Steven Herrera[2], Takashi Tamura[1], Kenji Inagaki[1], David Kisailus[2]
（[1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okyama Univ., [2]Dept. Chem. Environ. Eng., Univ. California Riverside）

10:48　2Ja09　サンゴ養殖により得られた温度耐性株に共在する細菌叢の環境応答
……○伊藤 遼[1,2], 安田 直子[3], 藤村 弘行[3], 中野 義勝[4], 金城 浩二[5], 竹山 春子[1,2,6]
（[1]早大・先進理工, [2]産総研・早大 CBBD-OIL, [3]琉球大・理, [4]琉大・熱生研, [5]有限会社海の種, [6]早大・ナノライフ創研）

11:00　2Ja10　データサイエンスに基づくウナギ幼生飼料開発のための重要因子抽出
……○朝倉 大河[1], 坂田 研二[1], 伊達 康博[1], 長井 敏[2], 黒木 洋明[2], 長谷川 大介[2], 菊地 淳[1,3,4]
（[1]理研 CSRS, [2]水産研究・教育機構, [3]横市院・生命医, [4]名大院・生命農学）

11:12　2Ja11　クロマグロ稚魚の入出力代謝応答に基づく飼料候補物質の探索技術高度化
……○坂田 研二[1], 朝倉 大河[1], 相馬 智史[2], 馬久地 みゆき[2], 伊達 康博[1,3], 横山 佐一郎[4], 菊地 淳[1,3,5]
（[1]理研 CSRS, [2]水産教育機構, [3]横市院・生命医, [4]鹿児島大学・水産, [5]名大院・生命農学）

K 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（9:00〜11:36）

【発酵生理学，発酵工学／代謝工学／オミクス解析】

9:00　2Ka01
ロングリード RNA-seq が明らかとするバクテリアオペロンの発現実態 〜二次代謝産物生合成遺伝子群のオペロンバリアントを捉える〜
……○菅野 学[1], 三谷 恭雄[1], 野田 尚宏[2], 木村 信忠[1], 田村 具博[1]
（[1]産総研・生物プロセス, [2]産総研・バイオメディカル）

9:12　2Ka02
糖からの直接発酵を目指したエルゴチオネイン高生産放線菌の開発
……○仲谷 豪, 嘉悦 佳子, 仲島 菜々実, 山田 佑樹, 野口 祐司, 曽田 匡洋, 劉 暁麗
（長瀬産業）

9:24　2Ka03
Metabolic engineering of *Actinosynnema pretiosum* for hyper-production of antitumor ansamitocin P-3
……○Jian-Jiang Zhong, Zhi-Qiang Du
（State Key Lab. Microb. Metab., Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ.）

9:36　2Ka04
放線菌 *Streptomyces coelicolor* 株のメタボローム分析における分析対象代謝物範囲の拡大
……○新田 克章[1], Putri Sastia[1], Takano Eriko[2], 福﨑 英一郎[1]
（[1]阪大院・工, [2]Fac. of Sci. and Eng., Univ. of Manchester）

9:48　2Ka05
代謝改変コリネ型細菌による 4-ヒドロキシ安息香酸の高生産
……○北出 幸広[1,2], 橋本 龍馬[1,2], 須田 雅子[1,2], 平賀 和三[1,2], 乾 将行[1,2,3]
（[1]RITE, [2]グリーンケミカルズ(株), [3]奈良先端大・バイオ）

10:00　2Ka06
ナイロンオリゴマー分解菌 *Arthrobacter* の 2 種類の 6-アミノヘキサン酸アミノトランスフェラーゼ NylD1・NylD2 の機能解析
……○藤井 翼, 竹原 一起, 橋本 悠, 武尾 正弘, 根来 誠司（兵庫県大院・工）

10:24　2Ka07
釜石はまゆり酵母の系統解析と発酵力の強化
……○齊藤 隆行[1], 井上 諭宜[2], 赤尾 健[3], 山田 美和[1], 下飯 仁[1]
（[1]岩手大院・農, [2]釜石市, [3]酒総研）

10:36　2Ka08
Saccharomyces cerevisiae 由来の乳化およびマクロファージ活性化に 関与する細胞表層タンパク質の同定と解析
……○上田 茉奈, 齋藤 大輝, 尾島 由紘, 東 雅之（阪市大院・工）

10:48　2Ka09
出芽酵母におけるマルチストレス耐性優性変異株の分離と解析
……○小林 日花梨, 中川 洋史, 山村 英樹, 早川 正幸（山梨大院・総研部）

11:00　2Ka10
酵母のストレス応答に関わる陽イオン輸送体の機能解析
……○上原 千央[1], 浜本 晋[1], 星 直美[1], 笠原 紳[2], 魚住 信之[1]
（[1]東北大院・工, [2]宮城大・環境科学）

11:12　2Ka11
酵母非遺伝的因子[*GAR*$^{+}$]がアルコール発酵と遺伝子発現に及ぼす効果
……○渡辺 大輔, 熊野 舞香, 杉本 幸子, 高木 博史（奈良先端大・バイオ）

11:24　2Ka12
パン酵母の冷凍保存後の発酵力に重要なプロテアソーム関連遺伝子の発現
……○高木 博史[1], 渡辺 大輔[1], 関口 拓史[2], 杉本 幸子[1], 長澤 淳[2], 喜田 直孝[2]
（[1]奈良先端大・バイオ, [2]テーブルマーク）

L 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（9:00〜11:36）

【糖鎖工学／生合成，天然物化学】

9:00　2La01　ササユリ（*Lilium japonicum*）系統間および類縁種間の花香組成を指標とした化学分類の試み
……○藤澤 瑞希[1], 松川 哲也[1], 瀧川 義浩[5], 荒井 滋[2], 秋野 順治[3], 柳川 綾[4], 梶山 慎一郎[1]
（[1]近畿大院・生物理工・生物工, [2]大神神社, [3]京都工繊大・CBFS, [4]京都大学・RISH, [5]近畿大学先端研）

9:12　2La02　ショウガ由来のデヒドロジンゲロンが出芽酵母の薬剤耐性に及ぼす影響
……○尾山 昌弘[1], 山脇 千佳[1], 山口 良弘[1,2], 荻田 亮[1,3], 田中 俊雄[1], 藤田 憲一[1]
（[1]阪市大院・理, [2]阪市大・複合先端, [3]阪市大・健康研セ）

9:24　2La03　黄ニラ抽出物が示す赤血球凝集素の阻害効果と阻害物質の単離
……○大西 優[1], 中島 凌[2], Eltigani Sara[3], 鈴木 菜月[2], 美藤 友博[2], 清水 克彦[4], 畑中 唯史[5], 有馬 二朗[2]
（[1]鳥取大院・農, [2]鳥取大・農, [3]鳥取大院・連農, [4]鳥取大・CoRE, [5]岡山県生科総研）

9:36　2La04　チューリッポシド/チューリッパリン類の抗細菌活性の精査
……○加藤 康夫[1,2], 中川 恵蔵[2], 近堂 菜月[2], 北岡 直樹[1,2], 野村 泰治[1,2]
（[1]富山県大・生工研セ, [2]富山県大工・生物工）

9:48　2La05　組換え分裂酵母を用いたナリンゲニン二糖配糖体の生産
……○大橋 貴生, 窪村 有紗, 長谷川 友香, 三﨑 亮, 藤山 和仁（阪大・生工国際セ）

10:00　2La06　気生微細藻類由来の抗菌活性を有する新規クロロフィル類の単離とその産生株の探索
……○三田 一至, 油井 信弘, 菅原 康里, 今村 保忠, 阿部 克也（工学院大・先進工・生化）

10:24　2La07　赤潮プランウトン *Heterocapsa circularisquama* から分離された光依存性溶血毒素の多彩な生物活性
……○小田 達也, 李 文成, 山口 健一（長崎大院・水産環境）

10:36　2La08　糸状性細菌 *Sphaerotilus montanus* が形成するマイクロチューブの化学構造と伸長パターン
……○藤原 篤男[1], 柏原 大輔[1], 河﨑 雄太[1], 近藤 敬子[2], 川村 出[1], 佐藤 道夫[3], 新田見 匡[1], 鈴木 市郎[1], 片平 正人[2], 武田 穣[1]
（[1]横国大院・工, [2]京大・エネルギー理工学研究所, [3]明治大・農）

10:48　2La09　糸状菌シトクロム P450 の機能多様性とテルペノイドのコンビナトリアル生合成
……○大園 昂貴[1], 筌場 将太[1], 北岡 卓也[2], 一瀬 博文[2]
（[1]九大院・生資環, [2]九大院・農）

11:00　2La10　*Pseudmonas fluorescens* 由来のピラジン生合成機構の解明
……○津田 佑介, 生井 智仁, 桝尾 俊介, 高谷 直樹（筑波大院・生命環境）

11:12　2La11　放線菌由来揮発性有機化合物が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）

11:24　2La12　卵菌による長鎖多価不飽和脂肪酸生産能の比較
……○吉田 磨仁[1], 永峰 賢[2], 松下 貴子[1], 田中 淳和[3], 松浦 昌平[4], 東條 元昭[3]
（[1]北大院・地環科, [2]ロム, [3]阪府大院・生環科, [4]広島県・農技セ）

M 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（9:00〜11:24）

【酵素学，酵素工学】

9:00 2Ma01 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の class 3 に属するシトクロム P450 CYP505D6 の機能解析
……○ワイズ 里沙[1], 酒井 優[1], 酒井 杏匠[1], 神藤 定生[2], 志水 元亨[1], 加藤 雅士[1]
（[1]名城大院・農, [2]名城大・理工）

9:12 2Ma02 酸素ラジカル処理がセルロース分解に及ぼす影響
……○糀谷 紗季[1], 酒井 杏匠[1], 上條 順也[1], 前林 正弘[1], 伊藤 昌文[2], 呉 準席[2], 堀 勝[3], 志水 元亨[1], 加藤 雅士[1]
（[1]名城大院・農, [2]名城大・理工, [3]名大院・工）

9:24 2Ma03 糸状菌 *Aspergillus nidulans* が種々の多糖応答的に生産する細胞外酵素の網羅的解析
……○山口 愛彩[1], 酒井 杏匠[1], 糀谷 紗季[1], 木島 尚輝[1], 大堀 紗貴子[1], 小栗 莉奈[1], 高須賀 太一[2], 堀 千明[3], 志水 元亨[1], 加藤 雅士[1]
（[1]名城大院・農, [2]北大院・農, [3]北大院・工）

9:36 2Ma04 *Aspergillus glaucus* MA0196 由来ハイマンノース型アスパルティックプロテアーゼの遺伝子クローニングと異種発現
……○林 理希[1], 土居 幹治[2], 竹中 慎治[1]（[1]神戸大院・農, [2]マルトモ）

9:48 2Ma05 *Aspergillus oryzae* で高発現させたタンナーゼ AoTanBO の酵素学的諸性質
……○市川 響太郎[1], 佐々木 克仁[1], 塩野 義人[1], 新谷 智子[2], 渡部 昭[2], 五味 勝也[2], 小関 卓也[1]
（[1]山形大農, [2]東北大院・農）

10:00 2Ma06 *Talaromyces cellulolyticus* 由来新規 GH30 エンドキシラナーゼの同定
……○中道 優介, 藤井 達也, 松鹿 昭則, 井上 宏之（産総研・機能化学）

10:24 2Ma07 好熱性アーキア由来色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素のアーキアを宿主としたタンパク質発現系の構築と発現タンパク質の酵素化学的性質の解析
……○里村 武範[1,2], 江本 慎[1], 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・工, [2]福井大・ライフ, [3]創価大, [4]香川大・農, [5]阪工大院・工）

10:36 2Ma08 *Sulfolobus tokodaii* 由来色素依存性 L-乳酸脱水素酵素の性質の解明
……○宇野 紘平[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]阪工大院・工）

10:48 2Ma09 好熱好酸性アーキアのマルチプル分子シャペロニンの機能解析
……○魚住 奎太, 山田 芽生, Putri Azalea, 福田 青郎, 藤原 伸介（関西大院・理工）

11:00 2Ma10 超好熱性アーキアにおけるユビキチン様タンパク質の機能解析
……○榊原 早津季[1], 秀瀬 涼太[2], 福田 青郎[1], 藤原 伸介[1]
（[1]関西学院大・理工, [2]神戸大院・科技イノベ）

11:12 2Ma11 超好熱菌における NAD^+ 熱分解産物の再利用代謝機構の解明
……○佐藤 喬章[1,2], 蜂須賀 真一[1,2], 跡見 晴幸[1,2]（[1]京大院・工, [2]JST・CREST）

N 会場　第 4 学舎 2 号館 4 階（9:00〜11:36）

【環境浄化，修復，保全技術／環境工学，廃水処理技術】

9:00 2Na01 ナイロン-6 分解候補株の取得のためのスクリーニング法の検討及び分解能の評価
……○上江田 真衣[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）

9:12 2Na02 スルファニル酸分解微生物への亜硫酸イオンの影響
……○東山 明広, 喜多 晃久, 中川 克彦, 早瀬 伸樹（新居浜高専）

9:24 2Na03 排水中の有機共存物質が *Pseudonocardia* sp. N23 株の 1,4-ジオキサン分解に与える影響の評価
……○大久保 忠相[1], 井上 大介[1], 山本 哲史[2], 黒田 真史[1], 池 道彦[1]
([1]阪大院・工, [2]大成建設)

9:36 2Na04 担子菌バイオリアクターによるトリクロサンの除去
……○山口 和真, 本間 裕人, 数岡 孝幸, 舘 博, 藤本 尚志, 徳田 宏晴
(東農大・醸造)

9:48 2Na05 塩素化エチレン類の加温による浄化促進における細菌群集の動態解析
……○鈴木 市郎[1,2], 田 小維[2], 川村 美帆[1], 北村 岳[3], 山﨑 祐二[3], 小林 剛[2,4]
([1]横国大院・理工, [2]横国大・リスク共生セ, [3]竹中工務店, [4]横国大院・環)

10:00 2Na06 ポリ塩化ビフェニル類汚染地区に棲息する嫌気性微生物に関する調査
……髙塚 由美子[1], ○原 富次郎[1], 平野 竜行[2] ([1]京大エネ研, [2]竹中工務店)

10:24 2Na07 水田土壌における生物的環境の解析
……○荒木 希和子[1], Aziz Amin ABD[2], 久保 幹[1] ([1]立命館大・生命科学, [2]立命館大院・生命科学)

10:36 2Na08 農薬が土地微生物へ及ぼす影響解析
……○中村 明日香[1], 森田 涼斗[1], 荒木 希和子[2], 久保 幹[2]
([1]立命館大院・生命科学, [2]立命館大・生命科学)

10:48 2Na09 ATAD プロセスにおける未培養主要好熱細菌の分離および FISH 法による直接観察
……○新井 智博, Tu Phuong Trang, 藤本 遼, 田代 幸寛, 酒井 謙二 (九大院・生資環)

11:00 2Na10 白色腐朽菌-細菌共培養系におけるアセタミプリドの分解
……○大野 遥[1], 森 智夫[2], 河岸 洋和[2,3,4], 平井 浩文[2,3]
([1]静大院・総合農, [2]静大・農, [3]静大・グリーン研, [4]静大・創科技院)

11:12 2Na11 回転型スラリーバイオリアクタを用いた高濃度 A 重油汚染土壌の浄化
……○三好 佑奈[1], 浦田 智宇[1], 岡田 丈[2], 新谷 政己[1], 金原 和秀[1]
([1]静大院・総合科技, [2]静大・工)

11:24 2Na12 下水処理施設におけるバルキング関連糸状性細菌 *Kouleothrix* の季節変動とその影響因子
……○鈴木 康太[1], 新田見 匡[1], 小林 稔真[1], 笠倉 理紗[1], 武田 穣[1],
小柴 佑介[1], 福田 淳二[1], 鈴木 市郎[1], 飛野 智宏[2]
([1]横国大院・工, [2]東大院・工)

O 会場　第 4 学舎 2 号館 4 階（9:00〜11:36）

【セル＆ティッシュエンジニアリング】

9:00 2Oa01 iPS 細胞の分化能に対するフローサイトメトリー法の考察
……○藤本 舜, 岡野 健太郎, 金 美海, 紀ノ岡 正博 (阪大院・工)

9:12 2Oa02 タッピング剥離操作におけるヒト iPS 細胞の応答評価
……○山本 航平[1], 澤川 史明[2], 堀口 一樹[1], 越田 一朗[2], 紀ノ岡 正博[1]
([1]阪大院・工, [2]澁谷工業)

9:24 2Oa03 インクジェット技術による超瞬間細胞凍結保存法の hiPS 細胞への応用
……○渡部 広機[1], 瀧澤 秀世[1], 山田 茂[2], 諫田 康成[2], 秋山 佳丈[1]
([1]信州大・繊維, [2]国立医薬食衛研)

9:36 2Oa04 希少細胞の連続的化学処理を可能とする多段階溶液交換プロセッサーの開発
……○穆 廷林, 豊田 一, 山田 真澄, 関 実 (千葉大院・融合)

9:48 2Oa05 低温処理が脂肪代謝およびベージュ脂肪細胞への分化に及ぼす影響
……○塩見 尚史, 冨士原 由貴, 渡邊 桂子 (神戸女学院大・人間科学)

10:00 2Oa06 骨格筋細胞ゲルアクチュエータの量産に向けた電気刺激培養システムの構築
……○中野 翔太, 瀧澤 秀世, 秋山 佳丈 (信州大・繊維)

10:24 2Oa07 形態的逸脱 iPS コロニーの生物学的プロファイル解析
……○吉田 啓[1], 長坂 理紗子[1], 館野 浩章[2], 小沼 泰子[2], 伊藤 弓弦[2], 蟹江 慧[1], 加藤 竜司[1]
([1]名大院・創薬, [2]産総研)

10:36 2Oa08 画像情報解析を用いた iPS 細胞製造機械化における振動ストレスの評価
……○酒井 徹平, 今井 祐太, 吉田 啓, 蟹江 慧, 加藤 竜司（名大院・創薬）

10:48 2Oa09 細胞形態情報解析による培養面コーティング剤のプロファイリング
……○藤谷 将也, 蟹江 慧, 加藤 竜司（名大院・創薬）

11:00 2Oa10 画像情報解析技術を用いた 3D 培養がん細胞におけるヘテロ性解析
……○渋田 真結[1], 加藤 寛人[1], 田村 磨聖[2,3], 日下部 涼子[4], 蟹江 慧[1],
松井 裕史[4], 金森 敏幸[3], 柳沢 真澄[5], 杉浦 慎治[3], 加藤 竜司[1]
([1]名大院・創薬, [2]阪大・核物理研, [3]産総研, [4]筑波大, [5]エンジニアリングシステム)

11:12 2Oa11 画像情報解析を用いたスフェロイド培養環境プロファイリング
……○山本 涼平, 渋田 真結, 蟹江 慧, 加藤 竜司（名大院・創薬）

11:24 2Oa12 3 次元構造体 Stroid を用いた細胞挙動の研究
……○犬伏 祐作[1], 伊田 寛之[2], 立花 亮[1]（[1]阪市大院・工, [2]新田ゼラチン株式会社・総合研究所）

一般講演（午後の部）

C 会場　第 4 学舎 3 号館 2 階（14:06〜16:30）

【醸造学，醸造工学】

14:06 2Cp01 脱脂粉乳と豆乳で培養した乳酸菌の増殖と酸耐性の比較
……○オウ カン, 西野 智彦（東京工科大院・バイオニクス）

14:18 2Cp02 凍結耐性を有する醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* を用いたパンの物性調査
……○森本 一輝, 小西 正朗（北見工大）

14:30 2Cp03 日本酒の高圧発酵制御技術の確立に向けた清酒酵母の高圧不活性化挙動の解析
……○野村 一樹, 片岡 ちひろ, 氏家 沙織里, 井口 晃徳, 重松 亨（新潟薬大・応生命）

14:42 2Cp04 紅麹品質における水浸漬工程の影響
……○曾 伝濤[1], 吉﨑 由美子[2], 奥津 果優[2], 二神 泰基[2], 玉置 尚徳[2], 髙峯 和則[2]
([1]鹿児島大院・連農, [2]鹿児島大・農)

14:54 2Cp05 小曲米酒の製造における固体糖化工程の意義
……○Yin Xuan[1], 吉﨑 由美子[2], 池永 誠[2], 奥津 果優[2], 二神 泰基[2], 玉置 尚徳[2], 髙峯 和則[2]
([1]鹿児島大院・連農, [2]鹿児島大・農)

15:06 2Cp06 南極産菌類を利用した日本酒の醸造の試み
……○辻 雅晴[1], 星野 保[2]（[1]国立極地研究所, [2]産総研・生物プロセス）

15:30 2Cp07 京都伝統野菜「桂瓜」の奈良漬粕における米貯蔵タンパク質の解析
……○沼本 穂, 中村 貴子, 増村 威宏（京府大院・生命環境）

15:42 2Cp08 α-EG 発酵物の美容食品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[2], 横田 大輝[2], 風 友稀[2], 徳田 耕二[3],
塩谷 侑子[3], 町田 雅之[1], 大箸 信一[1], 尾関 健二[1]
([1]金工大・ゲノム研, [2]金沢工大・バイオ・化学・応用バイオ, [3]車多酒造)

15:54 2Cp09 吟醸粕焼酎発酵物中の機能性物質の研究
……○高橋 雅弥[1], 横山 春花[1], 吉田 知華[1], 徳田 耕二[2], 尾関 健二[1]
([1]金工大・ゲノム研, [2]車多酒造)

16:06 2Cp10 健常成人女性における米糀甘酒摂取による皮膚バリア機能改善効果の検討
……○植田 愛美[1], 北川 学[1], 伊藤 成輝[1], 山本 哲郎[2], 近藤 澄夫[3]
([1]マルコメ, [2]TTC, [3]医療法人健昌会福島健康管理セ)

16:18 2Cp11 麹甘酒の過剰摂取による安全性評価
……○倉橋 敦[1], 米井 嘉一[2]（[1]八海醸造・研究開発, [2]同志社大院・生命医科学）

E 会場　第 4 学舎 2 号館 1 階（14:06〜16:30）

【生物化学工学／培養工学／バイオプロセス】

14:06 2Ep01 微生物を用いた液体培養におけるフラスコ気相環境の解析
……○高橋 将人, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

14:18 2Ep02 好気性微生物培養におけるウルトラファインバブルの効果
……○小西 正朗[1], 川﨑 はるか[1], 江田 智一[2], 清水 友佑[2], 熊谷 和晃[2]
([1]北見工大, [2]ノリタケカンパニーリミテド)

14:30 2Ep03 DO-stat 流加培養による組換え大腸菌を用いた単鎖抗体の高濃度菌体外生産
……○井嶋 浩一朗, 坂本 祐一朗, 熊田 陽一, 堀内 淳一（京工繊大院・工芸科学）

14:42 2Ep04 培養槽用 OTR シミュレータの開発
……○石井 伸佳（長瀬産業）

14:54 2Ep05 粘度測定による微生物由来生体高分子の分子間力および濃度の推算（予備的考察）
……○古瀬 久幹[2], 石井 正治[1], 戸田 清[2]（[1]東大院・農生科, [2]東大・分生研）

15:06 2Ep06 *Streptococcus zooepidemicus* によるヒアルロン酸生産の最適化
……○小川 愛未[1], 小野 聡子[2], 成田 琴美[3], 武内 章[3], 山崎 思乃[2], 片倉 啓雄[2]
([1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工, [3]キユーピー)

15:30 2Ep07 新規殺菌剤過硝酸を用いたノロウイルスモデルの不活化
……○小豆澤 友希[1], 井川 聡[2], 北野 勝久[3], 座古 保[1]
([1]愛媛大院・理工, [2]大阪府立産技総研, [3]阪大院・工)

15:42 2Ep08 ナノバブルと超音波と組み合わせた効率的な殺菌手法の開発
……○細井 啓貴[1], 廣部 綾乃[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)

15:54 2Ep09 ABC 光半導体の暗所での殺菌作用における遮光後放電による影響の可能性
……○辻塚 誠一郎[1], 宮本 樹里[1], 俗多 秀美[1], 伊東 謙吾[2], 田中 賢二[1]
([1]近大・産理工, [2]伊都研)

16:06 2Ep10 マイクロ波（非熱効果）が微生物の生理活性に及ぼす影響の解析
……○松田 将典[1], 堀越 智[2], 青柳 秀紀[1]（[1]筑波大院・生命環境, [2]上智大・理工）

16:18 2Ep11 抗菌素材“ＰＧＡＩＣ”の生成機構分析とオンサイトコーティングへの応用
……○白米 優一[1], 中山 沢水[2], 東内 遥菜[2], 芦内 誠[1,2]
([1]愛媛大院・連合農, [2]高知大・農)

F 会場　第 4 学舎 2 号館 1 階（14:06〜16:30）

【生物化学工学／培養工学／バイオプロセス】

14:06　2Fp01　低分子化抗体精製用アフィニティクロマトグラフィー担体の応用・改良研究
……○西八條 正克[1,2], 村田 大[1,2], 鴻池 史憲[1,2], 吉田 慎一[1,2], 水口 和信[1,2]
（[1]カネカ, [2]次世代バイオ医薬品製造技術研究組合）

14:18　2Fp02　治療用酵素ヒト-Kynureninase の高効率分離プロセスの開発
……○杉山 友亮, 堀内 淳一, 熊田 陽一（京工繊大・工芸科学）

14:30　2Fp03　B 型肝炎ウイルス様粒子(HBsAg-VLP)の効率的なクロマトグラフィ精製手法の確立
……○小木戸 謙, 丸田 秀平, 青木 裕史（昭和電工）

14:42　2Fp04　バイオマス発酵プロセス向け低ファウリング膜の開発
……○志村 芙美, 小岩 雅和, 畠平 智子, 木村 将弘（東レ）

14:54　2Fp05　ポリアミンによる荷電脂質膜の相分離
……○引地 啓太, 山本 耀吾, 下川 直史, 高木 昌宏（北陸先端大・マテリアル）

15:06　2Fp06　エマルションドロップレットを用いた土壌微生物の培養
……○村井 雄大[1], 川島 万凜[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）

15:30　2Fp07　water-in-oil エマルションを用いた微生物の培養および検出技術の構築
……○大田 悠里[1,2], 斉藤 加奈子[1,2], 松倉 智子[2], 髙木 妙子[2], 森田 雅宗[2], 常田 聡[1], 野田 尚宏[1,2]
（[1]早大院・先進理工, [2]産総研・バイオメディカル）

15:42　2Fp08　エマルション培養法を用いた微生物由来ペプチダーゼスクリーニング系基盤構築に向けて
……○本間 宣行[1], 中村 彰宏[1], 鈴木 義之[1], 志田 洋介[1], 野田 尚宏[2], 小笠原 渉[1]
（[1]長岡技科大, [2]産総研・バイオメディカル）

15:54　2Fp09　脂質膜被覆球形粒子を用いた曲率認識タンパク質スクリーニング手法の開発
……○田中 祐圭, 矢内 健太郎, 大河内 美奈（東工大）

16:06　2Fp10　GP64 融合ビオチンリガーゼによる近接依存反応を利用した Sf9 昆虫細胞表面 GP64 結合レセプターの探索
……○岡本 園子[1], 横田 早希[1], 鈴木 健裕[2], 堂前 直[2], 後藤 猛[1]
（[1]秋田大院・理工, [2]理研・CSRS）

16:18　2Fp11　pH 変動培養法を活用した耐酸性微生物や好酸性微生物の高効率なスクリーニング系の開発
……○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）

G 会場　第 4 学舎 2 号館 2 階（14:06〜16:30）

【遺伝子工学】

14:06　2Gp01　メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* の *PER1*，*GUP1*，*CWH43* 遺伝子は細胞壁の強度維持に関与する
……胥 欣欣[1,2], 小松崎 亜紀子[1], 千葉 靖典[1], 高 暁冬[2], ○横尾 岳彦[1]
（[1]産総研・創薬基盤, [2]江南大（中国））

14:18　2Gp02　Multi-step 細胞融合による多倍体酵母の創製
……○福田 展雄, 本田 真也（産総研・バイオメディカル）

14:30　2Gp03　DNA 切断型抗生物質を用いたカロテノイド高生産酵母変異株の取得
……○渡部 裕介, 阿部 勝正, 解良 芳夫, 高橋 祥司（長岡技科大院）

14:42 2Gp04 出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析
……○松崎 浩明, 藤原 祐気, 平島 宗一郎, 宮本 昭弘, 柳本 敏彰, 秦野 琢之
（福山大・生命工）

14:54 2Gp05 新奇染色体工学技術を用いた多様なゲノム組成を持つ出芽酵母菌株ライブラリーの構築と菌株育種
……○笹野 佑, 生田 宗一郎, 高木 佑希子, 高田 和真, 井出口 浩迪, 田口 久貴
（崇城大・生物生命）

15:06 2Gp06 CRISPR/Cas9 による担子菌系酵母 *Pseudozyma antarctica* の高効率相同組換え
……○田中 拓未[1], 國武 絵美[1,2], 鎗水 透[1], 遠藤 亮[1], 加藤 悦子[1], 北本 宏子[1]
（[1]農研機構, [2]三重大院・生資）

15:30 2Gp07 担子菌酵母 *Pseudozyma antarctica* による組換え酵素生産に有用なプロモーターの探索と利用
……○鎗水 透[1], 小池 英明[2], 森田 友岳[3], 田中 拓未[1], 北本 宏子[1]
（[1]農研機構・農業環境セ, [2]産総研・生物プロセス, [3]産総研・機能科学）

15:42 2Gp08 韓国伝統的麹 *Nuruk* から単離された酵母 *Pichia kudriavzevii* N77-4 の機能解析
……○杉山 峰崇[1], 松下 青葉[2], 高島 匠平[2], 宮下 夏美[2], 村山 亮太[1], 石田 圭[1],
深谷 健[1], 内山 進[1], Baek Seong Yeol[3], Mun Ji-Young[3], Kim Soyoung[3], Yeo Soo-Hwan[3]
（[1]阪大院・工, [2]阪大・工, [3]Dept. Agrofood Resources・NIAS・RDA）

15:54 2Gp09 遺伝子組換え効率向上に向けた DNA リガーゼ IV 欠損 *Pichia pastoris* 株の開発
……○伊藤 洋一郎[1], 渡邉 徹[2], 藍川 晋平[1], 西 輝之[2], 西山 陶三[2],
中村 泰之[1], 蓮沼 誠久[1], 八十原 良彦[2], 石井 純[1], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]カネカ）

16:06 2Gp10 *Pichia pastoris* におけるセントロメア DNA 配列を用いた自律複製型プラスミドベクターの開発
……○中村 泰之[1], 西 輝之[1,2], 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）

16:18 2Gp11 *Pichia pastoris* における自律複製型ベクターを用いた効率的な DNA マルチアセンブル法
……○西 輝之[1,2], 西山 陶三[2], 山路 大樹[3], 玉井 雅也[3], 渡邉 徹[2],
中村 泰之[1], 伊藤 洋一郎[1], 石井 純[1], 近藤 昭彦[1], 八十原 良彦[2]
（[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）

H 会場　第 4 学舎 2 号館 2 階（14:06〜16:30）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

14:06 2Hp01 海洋性紅色光合成細菌の形質転換系の開発と窒素固定能の評価
……○樋口 美栄子, 森崎 久美子, 沼田 圭司（理研 CSRS・バイオ高分子）

14:18 2Hp02 ユーグレナ低酸素下ワックスエステル合成におけるミトコンドリア電子伝達系の機能解明
……○西本 歩紗[1], 中澤 昌美[1], 石川 孝博[2], 乾 博[3], 上田 光宏[1], 阪本 龍司[1]
（[1]阪府大院・生環科, [2]島根大・生物資源, [3]阪府大院・栄養）

14:30 2Hp03 セルフクローニングを反復利用した代謝工学による単細胞性緑藻 *Coccomyxa* 属の脂質生産性改良
……○笠井 由紀, 塚原 拓也, 池田 富貴子, 井出 曜子, 原山 重明（中央大・理工）

14:42 2Hp04 屋外培養可能な新奇微細藻類による有用油脂の生産
……○佐々木 美月[1], 福田 寛史[1], 佐々木 智子[2], 佐々木 大作[2], 朝山 宗彦[1]
（[1]茨城大院・農, [2]Biox 化学工業）

14:54 2Hp05 Effect of immobilized *Chlorella Sorokiniana* culture on lipid accumulation and CO_2 sequestration.
……○Daniel Alejandro Alfaro Sayes [1], Jerome Amoah [1], Shinji Hama [3], Ayumi Yoshida [3], Akihiko Kondo [2], Chiaki Ogino [1]
（[1] Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2] Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3] Bioenergy Corp, Res. Dev. Lab.）

15:06 2Hp06 排水中の細菌群集による微細藻類の増殖促進
……○遠山 忠 [1], 糟谷 まり [2], 田中 靖浩 [1], 森川 正章 [3], 森 一博 [1]
（[1] 山梨大院・総研部, [2] 山梨大院・医工農, [3] 北大院・環境）

15:30 2Hp07 *Nitratireductor* sp. OM-1 の軽油生産におけるアンモニウムの影響
……○登 祐介 [1], 高橋 宏和 [1], 秋 庸裕 [1], 中島田 豊 [1], 松村 幸彦 [2], 岡村 好子 [1]
（[1] 広島大院・先端物質, [2] 広島大院・工）

15:42 2Hp08 海洋性菌叢を用いた塩環境下でのアルギン酸からの高効率揮発性脂肪酸生産
……○喜多 晃久 [1,4], 三浦 豊和 [2,4], 越智 匠 [1], 早瀬 伸樹 [1], 岡村 好子 [2,4], 秋 庸裕 [2,4], 松村 幸彦 [3,4], 加藤 節 [2], 田島 誉久 [2,4], 加藤 純一 [2], 中島田 豊 [2,4]
（[1] 新居浜高専, [2] 広島大院・先端物質, [3] 広島大院・工・エネ環, [4] JST・CREST）

15:54 2Hp09 気相培養における気生微細藻類 *Coccomyxa* sp. KGU-D001 の脂質蓄積と細胞内 CN 比
……○川島 成貴, 油井 信弘, 菅原 康里, 今村 保忠, 阿部 克也（工学院大・先進工・生化）

16:06 2Hp10 Enhanced oleic acid production by overexpressing delta 9-fatty acid desaturase gene in oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides for designed biodiesel production.
……○Yung-Yu Tsai [1], Takao Ohashi [1], Chih-Chan Wu [1], Bataa Dolgormaa [1], Ryo Misaki [1], Savitree Limtong [2], Kazuhito Fujiyama [1]
（[1] ICBiotech, Osaka Univ., [2] Fac. Sci., Kasetsart Univ.）

16:18 2Hp11 Multiple stress tolerances in a thermotolerant L1-1 isolated from oleaginous yeast *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] Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol., [2] Fac. Sci., Kasetsart Univ., Thailand）

I 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（14:06〜16:30）

【タンパク質工学／生体情報工学，バイオインフォマティクス／システムバイオロジー】

14:06 2Ip01 ドライとウェットの両側面からの抗体に代わる分子標的足場タンパク質の検討
……○伊藤 智之 [1], 西 羽美 [2], 亀田 倫史 [3], 二井手 哲平 [1], 中澤 光 [1], 梅津 光央 [1]
（[1] 東北大院・工, [2] 東北大院・情, [3] 産総研・人工知能研究セ）

14:18 2Ip02 抗体移植を意識した β-ヘアピン構造足場を利用した分子標的ペプチド取得
……○菊地 真裕 [1], 二井手 哲平 [1], 中澤 光 [1], 今中 洋行 [2], 梅津 光央 [1]
（[1] 東北大院・工, [2] 岡山大院・自科）

14:30 2Ip03 高度機能的分子認識素子の創出を志向した，クッション性足場タンパク質としての多価 CutA1 の開発
……○東 秀隆, 石田 尚之, 今村 維克, 今中 洋行（岡山大院・自科）

14:42 2Ip04 超好熱菌由来酵素の基質結合に関するドメインに基づいた新規標的結合分子の開発
……○来住 秀憲, 大政 健史, 山野 範子, 古賀 雄一（阪大院・工）

14:54 2Ip05 配列情報を利用した SUMO2 変異体ライブラリからの TNF-α 親和性選択
……○牧野 祥嗣, 角岡 良亮, 伊藤 伸哉（富山県大・工）

15:06 2Ip06 モノクローナル抗体のペプチドレベルでのエピトープ解析に基づく人工抗体のデザイン
……○初野 優花[1], 足立 遥華[2], 中村 匠汰[2], 熊澤 皆[2], 田中 眞人[2]
（[1]電機大 ・理工, [2]電機大院 ・理工）

15:30 2Ip07 様々な波長の光照射下におけるシアノバクテリアの解析
……○豊島 正和, 阪田 真澄, 戸谷 吉博, 松田 史生, 清水 浩（阪大院・情報）

15:42 2Ip08 微生物による有用物質生産に資する代謝モデルの実験データを用いた妥当性検証と予測精度の改善
……○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）

15:54 2Ip09 有用物質を生産・増産する準最適な代謝流束均衡モデルのデザイン
……○田村 武幸（京大・化研）

16:06 2Ip10 代謝情報基盤整備のための多様な微生物資源の活用の可能性
……○寺尾 拓馬[1], 細山 哲[1], 土金 恵子[1], 宮澤 せいは[1], 鋤先 まゆ子[1], 白井 智量[2], 川﨑 浩子[1]
（[1]NITE・NBRC, [2]理研・CSRS）

16:18 2Ip11 機械学習を用いた酵素の EC number 予測
……○渡邉 直暉[1], 村田 昌浩[2], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[1,2], 荒木 通啓[2,3]
（[1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]京都大院・医）

J 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（14:06〜16:30）

【発酵生理学，発酵工学／代謝工学／オミクス解析】

14:06 2Jp01 遺伝子発現データを用いた代謝制御因子の同定 〜包括的転写制御による効率的物質生産〜
……○竹屋 壮浩, 小山内 崇（明治大院・農）

14:18 2Jp02 *Euglena gracilis* におけるアミノ酸生産時の培養条件検討
……○冨田 結芙子[1], 小山内 崇[1], 鈴木 健吾[2]（[1]明治大院・農, [2]ユーグレナ）

14:30 2Jp03 Widely targeted metabolomics-based improvement of *Synechococcus elongatus* 1-butanol-producing strain
……○Artnice Mega Fathima[1], Sastia Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1], James Liao[2], Derrick Chuang[2]
（[1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA）

14:42 2Jp04 Bacterial consolidated bioprocessing of paper sludge for acetic acid production
……○Eka Triwahyuni, Harifara Rabemanolontsoa, Shiro Saka
（Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ.）

14:54 2Jp05 *Acidomonas* 属酢酸菌によるグリセロールの酸化変換
……○西江 百加, 宇都宮 大貴, 阿野 嘉孝（愛媛大院・農）

15:06 2Jp06 好熱性ホモ酢酸 *Moorella thermoacetica* 代謝改変株によるエタノール生産
……○竹村 海生[1], 岩崎 裕樹[1], 喜多 晃久[2], 中島田 豊[1]
（[1]広島大院・先端物質, [2]新居浜高専）

15:30 2Jp07 スクロースを糖源とした乳酸菌培養による乳酸生産抑制
……○佐野 杏奈[1], 河合 美桜[1], 土屋 麻美[2], 依田 伸生[2], 山崎 思乃[3], 片倉 啓雄[3]
（[1]関西大院・理工, [2]（株） 明治, [3]関西大・化生工・生命生工）

15:42 2Jp08 グルコースリプレッションを回避した流加培養による乳酸菌の乳酸生産抑制
……○河合 美桜[1], 土屋 麻美[2], 依田 伸生[2], 山崎 思乃[3], 片倉 啓雄[3]
（[1]関西大院・理工, [2]（株）明治, [3]関西大・化生工）

15:54 2Jp09 梅の花由来乳酸菌 *Enterococcus faecalis* の機能性の探索
……○平野 美佳子[1], 草場 裕貴[1], 中野 雄揮[2], 柘植 圭介[3], 北垣 浩志[1]
（[1]佐賀大院・農, [2]インパクト（株）, [3]佐賀工技セ）

16:06 2Jp10 *Gluconobacter* 属酢酸菌の 5-ケトグルコン酸資化系の制御に関与する転写因子
……○和田 征太郎, 阿野 嘉孝（愛媛大院・農）

16:18 2Jp11 培地の乳糖分解が LB81 スターターの増殖性に及ぼす影響の解析
……○山本 恵理, 渡部 玲子, 市村 武文, 木村 勝紀（株式会社 明治）

K 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（14:06〜16:30）

【発酵生理学，発酵工学／代謝工学／オミクス解析】

14:06 2Kp01 *Aspergillus oryzae* 由来転写因子 XlnR による遺伝子発現制御システムの網羅的解析
……○岡 大椰[1], 兒島 孝明[1], 井原 邦夫[2], 小林 哲夫[1], 中野 秀雄[1]
（[1]名大院・生命農学, [2]名大・遺伝子実験施設）

14:18 2Kp02 接合菌 *Mucor circinelloides* の二形成変化における分子生物学的解析
……○高野 真希, 岩倉 遼, 星野 一宏（富山大院・理工・生命工）

14:30 2Kp03 土壌環境中での糸状菌の呼吸活性の調節
……○宮崎 つぐみ[1], 大泉 太於[2], 中澤 奈美[2], 高谷 直樹[2]
（[1]筑波大, [2]筑波大院・生命環境）

14:42 2Kp04 固／液界面培養法の菌株スクリーニングへの応用：培養条件の最適化
……○椎名 一樹[1], 小田 忍[2]（[1]金工大院・工, [2]金工大・ゲノム研）

14:54 2Kp05 乳化を指標とした細胞壁に作用する抗真菌性化合物の探索
……○谷畑 友基, 根路銘 伸介, 尾島 由紘, 東 雅之（阪市大院・工）

15:06 2Kp06 Free fatty acids as antibacterial compounds found in soybean tempe
……○Dewi Kusumah[1], Isamu Maeda[1,2]
（[1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Fac. Agric., Utsunomiya Univ.）

15:30 2Kp07 二次代謝系の動的特性解析における大過剰化合物測定の有無の影響の数理解析
……○富永 大介[1], 川口 秀夫[2], 堀 良美[2], 蓮沼 誠久[2], 荻野 千秋[3], 油谷 幸代[1]
（[1]産総研・生体ビッグデータラボ, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]神戸大院・工）

15:42 2Kp08 Metabolic profiling of three terminal alkene producing *Jeotgalicoccus* spp. during different growth phase
……○Filemon Jalu N Putra, Sastia Prama Putri, Eiichiro Fukusaki
（Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.）

15:54 2Kp09 Global metabolite changes during laboratory evolution of 1-butanol producing *Escherichia coli* grown in minimal media
……○Sana Subhan Memon Sakurai[1], Sammy Pontrelli[2], Sastia Prama Putri[1], James C. Liao[2], Eiichiro Fukusaki[1]
（[1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ, [2]Dept. Chem and Biomol Eng., UCLA）

16:06 2Kp10 メタノールをメチル基供与体とした *S*-アデノシルメチオニン再生経路の構築
……○岡野 憲司[1], 永田 悠[1], 井上 翔太[2], 本田 孝祐[1]
（[1]阪大院・工, [2]阪大・工）

16:18 2Kp11 高温域での NAD^+濃度の安定化と耐熱性酵素を用いた物質生産反応への寄与
……○谷口 博範, 岡野 憲司, 本田 孝祐（阪大院・工）

L 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（14:06〜16:30）

【酵素学，酵素工学】

14:06 2Lp01 部位特異的変異導入により改変したサリチル酸脱炭酸酵素によるメチルサリチル酸の生成
……○石原 真奈, 荒木 優大, 石井 義孝, 桐村 光太郎（早大・先進理工）

14:18 2Lp02 ニトリルヒドラターゼの触媒反応機構解析－シリアルフェムト秒結晶構造解析に向けて
……○林 英輝[1], 北條 晴佳[1], 松村 洋寿[1], 小川 信明[1], 野村 高志[2], 當舎 武彦[2], 城 宜嗣[3], 野口 恵一[4], 養王田 正文[4], 尾高 雅文[1]
（[1]秋田大院・理工, [2]理研・SPring-8, [3]兵庫県大院・生命理, [4]農工大院・工）

14:30 2Lp03 INTMSAlign_Angler を用いたニトリラーゼのインシリコスクリーニング
……○井上 梨沙[1], 中野 祥吾[2], 篠田 優[1], 浅野 泰久[1]
（[1]富山県大・生工研セ, [2]静県大・食栄）

14:42 2Lp04 二置換プロパンジオールの *S* 体選択的酸化を触媒する微生物の探索
……○清水 慈[1], 菊川 寛史[2], 八十原 良彦[3], 伊藤 紀幸[3], 満倉 浩一[2], 吉田 豊和[2]
（[1]岐阜大院・自科技, [2]岐阜大・工, [3]（株）カネカ）

14:54 2Lp05 没食子酸脱炭酸酵素によるピロガロールの合成
……○大江 史花[1], 岡村 佳樹[1], 菊川 寛史[2], 満倉 浩一[2], 吉田 豊和[2]
（[1]岐阜大院・工, [2]岐阜大・工）

15:06 2Lp06 微生物酵素によるα置換マロン酸ジエステルの立体選択的加水分解
……○菊川 寛史[1], 鵜飼 文広[2], 村上 陽亮[2], 川端 潤[3,4], 三宅 良磨[3], 満倉 浩一[1], 吉田 豊和[1]
（[1]岐阜大・工, [2]岐阜大院・工・生命工学, [3]三菱ケミカル株式会社, [4]株式会社エーピーアイコーポレーション）

15:30 2Lp07 ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の酵素フマラーゼ(FumC)の生化学解析及び機能改変
……○片山 徳賢, 小山内 崇（明治大・農）

15:42 2Lp08 ボトリオコッセン生合成経路のプロダクト特異性改変
……○多田 和樹, 坂本 康二, 河合 繁子, 斎藤 恭一, 梅野 太輔（千葉大院・融合）

15:54 2Lp09 変異解析によるラン藻由来アルカン合成関連酵素の機能発現に重要な部位の同定
……○工藤 恒, 野村 匡志, 林 勇樹, 新井 宗仁（東大院・総合文化）

16:06 2Lp10 細胞内酵素活性の可視化を利用したアシル ACP 還元酵素の高活性変異体のハイスループットスクリーニング
……○林 勇樹, 新井 宗仁（東大院・総合文化）

16:18 2Lp11 Identification of key residue determining product regioselectivity of *Medicago truncatula* beta-amyrin C30-oxidase
……○Much Zaenal Fanani[1], Ery Odette Fukushima[1], Satoru Sawai[2], Kiyoshi Ohyama[2,3], Hikaru Seki[1], Kazuki Saito[2,4], Toshiya Muranaka[1]
（[1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]RIKEN CSRS., [3]Dept. Chem. Mat. Sci., TITECH., [4]Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ.）

M 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（14:06～16:30）

【酵素学，酵素工学】

14:06 2Mp01 *Luteolibacter algae* SW 由来フコイダナーゼ遺伝子のクローニングと異種発現
……○荒井 良仁[1], 長尾 達彦[2,4], 藤原 卓人[3], 八木 寿梓[3], 鈴木 宏和[3], 大城 隆[3]
（[1]鳥取大院・持社創生・工, [2]鳥取大院・工, [3]鳥取大・工, [4]日本ジッコウ）

14:18 2Mp02 グルコマンナン分解細菌の探索および *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KT13 株からのマンナナーゼ精製
……瀧上 和也[1], ○林 秀謙[1,2]（[1]前橋工大院・工, [2]前橋工大・工）

14:30 2Mp03 メタゲノム由来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, 戸田 弘, 伊藤 伸哉（富山県大・工）

14:42 2Mp04 コリン型リゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の基質認識における Phe211 および Tyr258 の役割

……○河原 光希[1], 小山 貴之[2], 酒瀬川 信一[3], 村山 和隆[4], 杉森 大助[1,2]

（[1]福島大・共生システム理工, [2]福島大院・理工, [3]旭化成ファーマ, [4]東北大院・医工）

14:54 2Mp05 超深海性ヨコエビ，カイコウオオソコエビの糖質分解酵素遺伝子の解析

……○小林 英城[1], 長濱 統彦[2], 荒井 渉[1], 笹川 洋平[3], 梅田 茉奈[3], 林 哲太郎[3], 二階堂 愛[3], 渡部 裕美[1], 小栗 一将[1], 北里 洋[1], 藤岡 勘太郎[4], 木戸 ゆかり[1], 高見 英人[1]

（[1]海洋研究開発機構, [2]ノートルダム清心大・食品栄養, [3]理研・生命機能, [4]神奈川大・工）

15:06 2Mp06 黄麹菌が生産する難消化性澱粉分解酵素の探索 第 2 報

……○伊藤 俊彦, 笹渕 優衣, 藤田 直子, 橋爪 克己（秋田県大・生資）

15:30 2Mp07 *Shinella* sp. NN-6 が有する 2 種のケトース 3-エピメラーゼ遺伝子のクローニングと発現した酵素の諸性質

……○鈴木 琢磨[1], 池田 光[1], 堀 玄澄[1], 森本 兼司[2]

（[1]香川大・農, [2]国際希少糖研究教育機構）

15:42 2Mp08 納豆菌 B1 由来の L-ラムノースイソメラーゼの諸性質の検討および固定化酵素を用いた D-プシコースから D-アロースの生産

……○後閑 俊哉[1], 池田 光[1], 鈴木 琢磨[1], 森本 兼司[2]

（[1]香川大・農, [2]国際希少糖研究教育機構）

15:54 2Mp09 *Pseudomonas* 属細菌におけるアコニット酸イソメラーゼの構成的生産

……○滝口 有沙, 小田 祐之亮, 吉岡 育哲, 桐村 光太郎（早大・先進理工）

16:06 2Mp10 *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来のグルコース転移酵素を利用した alkyl α-glucosides の選択的生産

……○渡邉 理沙, 恩田 裕, 中里 美穂, 石井 義孝, 桐村 光太郎（早大・先進理工）

16:18 2Mp11 FAD 依存型グルコース脱水素酵素変異体の速度論解析

……○白井 裕貴[1], 西矢 芳昭[2], 中嶋 義隆[2]（[1]摂南大院・理工, [2]摂南大・理工・生命科学）

N 会場　第 4 学舎 2 号館 4 階（14:06～15:18）

【環境浄化，修復，保全技術／環境工学，廃水処理技術】

14:06 2Np01 微生物と線虫を用いた ^{137}Cs 汚染土壌に対する新規除染技術の構築

……○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）

14:18 2Np02 重金属吸収後の植物バイオマスに対する微生物と線虫を利用した重金属分離回収法の構築

……○岡野 凌一[1], 濵野 樹[2], 倉橋 健介[3], 吉原 静恵[2], 徳本 勇人[2]

（[1]阪府大院・工, [2]阪府大院・理, [3]阪府大高専）

14:30 2Np03 自然界からの希土類元素分離を可能とするリン酸基修飾酵母の開発

……○木原 摩耶, 奥村 一仁, 尾島 由紘, 東 雅之（阪市大院・工）

14:42 2Np04 *Lactobacillus casei* JCM1134 の二価金属イオンの吸着傾向の解析

……○遠藤 輪, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

14:54 2Np05 Development of method for the estimation of phosphate accumulation in microbes

……○Ajeeta Anand, Hideki Aoyagi

（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ.Tsukuba）

15:06 2Np06 Comparative study on adsorption of metal ion in dead *Saccharomyces cerevisiae*

……Tu Dang[1], Kazuki Honda[2], Tuan Anh Do[1], ○Masao Kishida[2], Masakazu Furuta[1]

（[1]Dept. Quant. Rad. Eng. Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ.,

[2]Dept. Appl. Life Sci. Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.）

O 会場　第 4 学舎 2 号館 4 階（14:06〜16:30）

【セル＆ティッシュエンジニアリング】

14:06 2Op01 Visualization of methylation index in human colon cancer tissues using imaging mass spectrometry
…… ○Nathanael Steven[1,2], Keiichi Okano[3], Masahiro Aoki[4], Yasushi Kojima[4], Marselina I. Tan[2], Eiichiro Fukusaki[1], Tomoyoshi Soga[5], Shuichi Shimma[1]
（[1] Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2] Dept. Biotechnol., Bandung Inst. Technol., [3] Dept. Gastroenterological Surgery, Kagawa Univ. Hosp., [4] Aichi Cancer Center, [5] Inst. Adv. Biosci., Keio Univ.）

14:18 2Op02 原子間力顕微鏡を用いた B 型肝炎感染機構の解明
…… ○西田 真一朗[1], 竹中 武藏[2], 西村 勇哉[2], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[2]
（[1] 神戸大院・工, [2] 神戸大院・科技イノベ）

14:30 2Op03 自公転遊星式撹拌技術を活用した組織培養の有用性
…… ○小田 彰恭[1], 吉田 春菜[1], 関口 はつ美[1], 柳田 湧太[1], 金子 凜[1], 高宮 良太[1], 野辺 善仁[2], 村松 和明[1]
（[1] 電機大院 ・理工, [2] (株)大洋技研）

14:42 2Op04 がん種の異なる細胞間での中心代謝における ^{13}C 代謝フラックス解析
…… ○上原 ひかる[1], 荒木 千絵[1], 前田 昂亮[1], 岡橋 伸幸[1,2], 松田 史生[1], 髙橋 智聡[3], 清水 浩[1]
（[1] 阪大院・情報, [2] 理研, [3] 金沢大・がん進展制御研）

14:54 2Op05 公共データベースを利用した脱分化脂肪細胞における肝細胞分化制御因子の探索
…… ○萩原 玲子, 沖 嘉尚, 加野 浩一郎（日大院・生資科）

15:06 2Op06 アガロース精密鋳造法と幹細胞分化パターン分析
…… ○田中 信行[1], 山下 忠紘[2], 佐藤 麻子[1], Vogel Viola[3], 田中 陽[1]
（[1] 理研・生命機能科学, [2] 慶応大, [3] ETH Zurich）

15:30 2Op07 慢性血液透析療法における心筋細胞拍動能の数理解析
…… ○濱田 浩幸[1,2,3]（[1] 九大院・農, [2] 九大院・生資環, [3] 九大院・シス生科）

15:42 2Op08 マウス乳癌細胞の転移性と細胞弾性に起因するネスチンのテール領域の機能解析
…… ○水澤 愛衣[1], 須崎 萌[2], 山岸 彩奈[3], 中村 史[1,2,3]
（[1] 農工大, [2] 農工大院・工, [3] 産総研・バイオメディカル）

15:54 2Op09 ヒト三次元筋萎縮モデルを搭載した 96 ウェルプレートフォーマット収縮力評価系の開発
…… ○大隅 早紀[1], 清水 一憲[1], 吉原 賢[2], 本多 裕之[1,3]
（[1] 名大院・工, [2] 塩野義製薬・創薬疾患研, [3] 名大・予防早期医療創成セ）

16:06 2Op10 mRNA サイレンシングを用いた過酸化チタンナノ粒子の放射線増感機序解明
…… ○大取 靖秀[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・科技イノベ）

16:18 2Op11 感染防御に関わるニワトリムチンの解析
…… 森脇 脩一郎[1], 吉田 琢哉[1], 原 駿平[1], 飯島 信司[1,2], 金岡 英徳[1], ○西島 謙一[1]
（[1] 名大院・工, [2] 現愛工大・工・応化）

ランチョンセミナー

2LS1 タカラバイオ株式会社

LS1 会場　第 4 学舎　4 号館 2 階（11:45〜12:45）

2LS2 三洋貿易株式会社

LS2 会場　第 4 学舎　4 号館 2 階（11:45〜12:45）

2LS3 宇宙航空研究開発機構（JAXA）

LS3 会場　第 4 学舎　2 号館 5 階（11:45〜12:45）

ワークショップ

生物工学系の研究・開発の安全のために　－基本的な考え方と実践例－

D 会場　第 4 学舎　3 号館 1 階（16:40〜17:40）

講師：片倉 啓雄（関西大学 化学生命工学部 教授）
主催：生物工学教育委員会
協力：株式会社 化学同人

安全は研究・開発において全てに優先する事項です．また，安全は特定の部署や担当者が担うものではなく，組織の構成員全員が能動的に参加して実現するものです．生物工学教育委員会では，大学・高専・企業等の研究における安全のために「バイオ実験を安全に行うために(仮)」の編集に協力しましたが，本書をより有効にお使い頂くため，安全・安心を実現するための基本的な考え方と安全教育の実践例を紹介します．学生実験や社員教育で安全指導を担当される方々をはじめ，安全な研究・開発に関心をお持ちの方は，是非ご参加下さい．

生物工学若手研究者の集い（若手会）

ものづくり交流サロン　〜学生・若手研究者×企業・公設試〜

凛風館 2 階ディノア（17:00〜20:00）

主催：日本生物工学会関西支部若手企画委員会
共催：生物工学若手研究者の集い（若手会）

「若い世代の研究者・学生と実学に携わる技術者との交流」と「生物工学の知識やものづくりの心の発展的な継承」を目的とした，サロン風のポスターセッションです．企業や公設試験研究機関が開発した技術や製品について，開発者のやりがい，こだわり，苦労話をじかに聞くことができる貴重な機会ですので，お気軽にご参加ください．

出展企業・機関，参加費などの情報は大会ホームページ（https://www.sbj.or.jp/2018/）に掲載しますので，是非ご覧ください．

第 3 日（9 月 7 日）

太字の一般講演は今年度の生物工学学生優秀賞（飛翔賞）受賞者の発表です.

開始時間	講演番号	演　　題	発表者氏名（所属） ○印は講演者を示す

招待講演・シンポジウム（午前の部）

D 会場　第 4 学舎 3 号館 1 階（9:00〜11:24）

Bioengineering for Sustainable Agriculture and Food Production for the Future
「新しい農業と未来の食料のための生物工学」【本部企画】＜国際シンポジウム＞

9:00　はじめに
……今井 泰彦

9:02　S3Da01　**〈招待講演（韓国生物工学会）〉**　座長：**髙木 忍**
Effects of several growth factors on the biomass and total lipid production of microalgae under different culture modes
……○Si Wouk Kim, Geun Ho Gim
（Dept. Environ. Eng, Chosun Univ.）

座長：**髙木 忍**

9:29　S3Da02　土壌をゼロからデザインする〜有機質肥料活用型養液栽培から派生した新技術〜
……○篠原 信（農業・食品産業技術総合研究機構）

座長：**田口 精一**

9:56　S3Da03　植物成長を促進する新しい遺伝子・化合物の単離を目指す植物ケミカルバイオロジー研究
……○中野 雄司[1], 山上 あゆみ[1], 長田 裕之[1], 篠崎 一雄[1], 浅見 忠男[2]
（[1]理研・環境資源科学センター, [2]東大院・農生科）

10:23　休憩

座長：**児島 宏之**

10:28　S3Da04　Novel sustainable plant-based protein: Scientific evidence of health and nutrition benefits in humans
……○Ron Salpeter[1], Iris Shai[2]
（[1]Hinoman Ltd, Israel, [2]Dep. of Public Health, Faculty of Health Sciences , Ben Gurion Univ., Israel）

座長：**安原 貴臣**

10:55　S3Da05　持続可能な農業がもたらす新たなビジネスチャンス〜エネルギー消費型農業からエネルギー創造・利用型農業への転換〜
……○齊藤 三希子（NTT データ経営研究所 ライフ・バリュー・クリエイションユニット）

11:22　おわりに
……安原 貴臣

シンポジウム（午後の部　13:00〜15:00）

B 会場　第 4 学舎 3 号館 4 階（13:00〜15:00）

1 細胞解析に向けた刺激応答性分子ツールの創製と応用展開

13:00　はじめに
……山口 哲志

座長：**山口 哲志**

13:05　S3Bb01　細胞機能をタンパク質分解能で解析・制御するための分子技術
……○浜地 格（京大院・工）

13:45　S3Bb02　光応答性ゲルを用いた単一がん細胞の分離と核酸解析への応用
……○吉野 知子（農工大院・工）

座長：**吉野 知子**

14:10　S3Bb03　細胞内ドラッグデリバリーシステムを基盤とする光細胞工学
……○村上 達也[1,2]（[1]富山県大・工, [2]京大・高等研究院・iCeMS）

14:35　S3Bb04　光分解性ゲル包埋培養系からの癌生細胞分離装置の開発
……○杉浦 慎治[1], 田村 磨聖[1], 山平 真也[1], 進 和美[1], 佐藤 琢[1], 高木 俊之[1], 金森 敏幸[1], 渋田 真結[2], 蟹江 慧[2], 加藤 竜司[2], 柳沢 真澄[3], 松井 裕史[4]
（[1]産総研・創薬基盤, [2]名大院・創薬, [3]エンジニアリングシステム（株）, [4]筑大・医）

C 会場　第 4 学舎 3 号館 2 階（13:00〜15:00）

SDGs に資する環境共生微生物を活用したアグリバイオ工学研究の新展開

座長：**菊地 淳**

13:00　S3Cb01　家畜・家禽類の腸内機能を制御する環境微生物
……○宮本 浩邦[1,2,3], 大野 博司[2], 児玉 浩明[1,3,4]
（[1]千葉大院・融合, [2]理研・生命医科学, [3]サーマス, [4]千葉大・園芸）

13:25　S3Cb02　フィールドアグリオミクスにより有機農業を科学する
……○市橋 泰範[1,2]（[1]理研・バイオリソース研究セ, [2]科学技術振興機構・さきがけ）

13:50　S3Cb03　自吸式通気撹拌と槽内共棲細菌によるし尿のユニークな自家熱型高温好気消化
……○酒井 謙二, 田代 幸寛（九大院・農）

座長：**宮本 浩邦**

14:15　S3Cb04　三菱ケミカルが取り組む KAITEKI 実現（SDG ｓ）への取組み
……○水無 渉（三菱ケミカル（株））

14:40　S3Cb05　魚類腸内環境と水環境のエコインフォマティクス
……○菊地 淳[1,2,3]（[1]理研・環境資源, [2]名大院・生命農, [3]横市院・生命医）

D 会場　第 4 学舎 3 号館 1 階（13:00〜15:00）

発酵食品の機能性を考える〜一次機能から三次機能まで〜【本部企画】

13:00　はじめに
…… 髙瀬 良和

座長：**髙瀬 良和**

13:02　S3Db01　味噌の多様化における麹菌の可能性
…… ○今野 宏（秋田今野商店）

13:31　S3Db02　鹿児島の壺造り黒酢の発酵と機能性
…… ○長野 正信（坂元醸造）

座長：**堤 浩子**

14:00　S3Db03　樽酒が食品の味わいに与える影響
…… ○高尾 佳史（菊正宗酒造）

14:29　S3Db04　生活者のすこやかな暮らしに貢献する味噌と米糀甘酒の可能性
…… ○北川 学（マルコメ）

14:58　おわりに
…… 堤 浩子

E 会場　第 4 学舎 2 号館 1 階（13:00〜15:00）

エネルギーを使う，捨てる光合成の再最適化－合成生物工学にむけた未踏研究－

13:00　はじめに
…… 清水 浩

座長：**魚住 信之**

13:05　S3Eb01　プロトン駆動力による光合成のフィードバック制御
…… ○皆川 純（基生研・環境光生物）

13:35　S3Eb02　代謝工学による光合成の統合解析と工学応用
…… 豊島 正和, 戸谷 吉博, 松田 史生, ○清水 浩（阪大院・情報）

座長：**清水 浩**

14:00　S3Eb03　中枢代謝を利用した物質生産と光合成能の改変
…… ○小俣 達男[1], 高谷 信之[1], 池田 和貴[2], 愛知 真木子[3], 西山 佳孝[4]
（[1]名大院・生命農学, [2]理研・統合生命医科学研究セ, [3]中部大・応生, [4]埼大院・理工学）

14:35　S3Eb04　駆動力形成を担うイオン輸送による光合成調節
…… ○魚住 信之, 辻井 雅, 狩野 文香, 解良 康太, 浜本 晋, 斉藤 俊也
（東北大院・工）

14:55　おわりに
…… 魚住 信之

F 会場　第 4 学舎 2 号館 1 階（13:00〜15:00）

半金属元素のバイオテクノロジー

13:00 はじめに
…… 池 道彦

座長：**池 道彦**

13:10 S3Fb01 ケイ素を胞子表面に蓄積する *Bacillus* 属細菌の解析と界面バイオテクノロジーへの応用
…… ○池田 丈, 廣田 隆一, 黒田 章夫（広島大院・先端物質）

13:35 S3Fb02 微生物を用いた土壌からのヒ素可溶化：知られざる発酵細菌の重要性
…… ○天知 誠吾[1], 堀 知行[2], 山村 茂樹[3]
（[1]千葉大・園芸, [2]産総研, [3]国環研）

座長：**山下 光雄**

14:00 S3Fb03 *Pseudomonas* 属細菌のセレン・テルル代謝の解析と半導体ナノ粒子合成への応用
…… ○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）

14:25 S3Fb04 アンチモン酸還元細菌を用いた水中からのアンチモン除去・回収
…… ○山村 茂樹[1], 飯田 千里[2], 小林 弥生[1], 天知 誠吾[2]
（[1]国立環境研, [2]千葉大院・園芸）

14:50 おわりに
…… 山下 光雄

G 会場　第 4 学舎 2 号館 2 階（13:00〜15:00）

スマートセル開発のためのバイオ技術とデジタル技術の革新と融合
バイオ生産に資する DBTL サイクルの構築に向けて

座長：**向山 正治**

13:00 S3Gb01 デジタルとの融合による新たなバイオ戦略の取組み
…… ○水無 渉（三菱ケミカル株式会社）

13:15 S3Gb02 分子動力学シミュレーションを用いたタンパク質高機能化法の開発
…… ○亀田 倫史, 池部 仁善（産総研・人工知能）

13:40 S3Gb03 DNA 分子バーコード法を利用した長鎖 DNA 合成
…… ○谷内江 望（東大・先端研）

座長：**近藤 昭彦**

14:05 S3Gb04 スマートセル創出プラットフォームに資するメタボローム解析技術の開発
…… ○蓮沼 誠久（神戸大院・科技イノベ）

14:30 S3Gb05 スマートセル開発を加速する AI の開発に向けた取組み
…… ○武田 志津[1], 伊藤 潔人[1], 荒木 通啓[2]（[1]日立・研究開発, [2]京大院・医）

14:55 おわりに
…… 近藤 昭彦

H 会場　第 4 学舎 2 号館 2 階（13:00〜15:00）

新時代の物質生産宿主開発の方法論：ゲノムを大規模に編集する．代謝計測から設計図を書く．

座長：**丸山 潤一**

13:00 S3Hb01 物質生産宿主・麹菌で自在にかつ無限に遺伝子を改変する〜ゲノム編集技術の進展
……○丸山 潤一（東大院・農生科・応生工）

13:24 S3Hb02 大規模な代謝経路をデザインすることへの挑戦
……○柘植 謙爾（神戸大院・科技イノベ）

13:48 S3Hb03 芳香族化合物合成プラットホームの開発〜芳香族モノマー合成に理想的な大腸菌代謝デザイン〜
……○野田 修平, 白井 智量, 近藤 昭彦（理研・環境資源）

14:12 S3Hb04 物質生産宿主としての酵母の代謝経路改変とゲノム改変に向けた合成生物工学的手法開発
……○石井 純（神戸大院・科技イノベ）

14:36 S3Hb05 大腸菌中心炭素代謝システムの動力学モデル開発と有用物質生産の合理的設計
……○倉田 博之（九工大）

K 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（13:00〜15:00）

地域から世界へ，グローカルバイオテクノロジーで創る新しい価値

13:00 はじめに
……古賀 雄一

座長：**仲嶋 翼**

13:05 S3Kb01 バイオテクノロジーが拓くバイオエコノミーー新たなバイオ戦略についてー
……○上村 昌博（経済産業省生物化学産業課）

座長：**古賀 雄一**

13:30 S3Kb02 生物工学を通じたイノベーションの創出と地域貢献の可能性
……○仲嶋 翼（三菱 UFJ リサーチ&コンサルティング）

13:55 休憩

座長：**古賀 雄一**

14:00 S3Kb03 さまざまな生物資源から単離された微生物の活用
……○櫻谷 英治（徳島大・生物資源）

座長：**河原崎 泰昌**

14:25 S3Kb04 地域発！世界へはばたく事業の創出〜科学技術の「種」を地域で育てる〜
……○髙橋 修一郎（リバネス）

14:50 おわりに
……河原崎 泰昌

L 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（13:00〜15:00）

複雑組織製造に必要な基盤技術を考える－どこまで出来て，何が足らないのか？－

13:00 はじめに
……長森 英二

座長：**長森 英二**

13:05 S3Lb01 細胞シートを基盤とした機能的立体組織構築の現状と展望
……○清水 達也（東京女子医科大学 先端生命医科学研究所）

座長：**境 慎司**

13:30 S3Lb02 3 次元組織モデルの足りていること，足りていないこと
……○松崎 典弥[1,2]（[1]阪大院・工, [2]JST-さきがけ）

13:50 S3Lb03 細胞製造性について考える
……○紀ノ岡 正博（阪工大院・工）

座長：**藤田 聡史**

14:15 S3Lb04 血管を含む立体組織をつくるアプローチ
……○福田 淳二（横国大院・工）

14:35 S3Lb05 3D バイオプリンティング
……○境 慎司（阪大院・基礎工）

14:55 おわりに
……長森 英二

M 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（13:00〜15:00）

真核微生物におけるシグナル伝達と代謝の接点を探る－発酵調節の根源的な理解に向けて－

13:00 はじめに
……水沼 正樹

座長：**渡辺 大輔**

13:01 S3Mb01 ストレス耐性や寿命延長におけるメチオニン代謝の役割
……○水沼 正樹（広島大院・先端物質）

座長：**水沼 正樹**

13:15 S3Mb02 細胞表層の傷による出芽酵母の運命決定
……○河野 恵子, 森山 陽介（沖縄科技大院・膜生物）

座長：**渡辺 大輔**

13:30 S3Mb03 糸状菌の菌糸生長の分子機構
……○竹下 典男（筑波大院・生命環境）

座長：**水沼 正樹**

13:45 S3Mb04 グルコースによる麹菌アミラーゼ生産の抑制機構
……○田中 瑞己（静県大・食栄）

座長：**渡辺 大輔**

14:00 S3Mb05 清酒酵母のリンゴ酸高生産株に見出した遺伝子変異と代謝変化
……○根来 宏明, 小高 敦史, 松村 憲吾, 堤 浩子, 秦 洋二（月桂冠・総研）

座長：**水沼 正樹**

14:15 S3Mb06 NAD^+-依存性デアセチラーゼ欠損を中心とした解糖系の代謝リプログラミング
……○増本 博司[1], 松山 茂[2]（[1]長崎大・医, [2]筑波大院・生命環境）

座長：**渡辺 大輔**

14:30 S3Mb07 酵母栄養源飢餓ストレスと発酵制御
……○善本 裕之（キリン・酒類研）

座長：**水沼 正樹**

14:45 S3Mb08 酵母は何を感知してアルコール発酵を調節しているのか？
……○渡辺 大輔, 高木 博史（奈良先端大・バイオ）

14:59 おわりに
…… 渡辺 大輔

招待講演・シンポジウム（午後の部　15:20〜17:20／17:50）

B 会場　第 4 学舎 3 号館 4 階（15:20〜17:50）

構造と機能デザインによる有用人工酵素の創製と応用展開

15:20 はじめに
…… 大島 敏久

15:25 S3Bc01 **〈招待講演（韓国生物工学会）〉** 座長：**大島 敏久**
Biomimetic membrane technology and its engineered applications
……〇Tae-Joon Jeon
（Dept. Biol. Eng., Inha Univ., Korea）

座長：**神谷 典穂**

15:55 S3Bc02 耐熱性酸性コラゲナコーゼ Kumamorisin-As：構造機能解析と反応最適 pH の変換
…… 〇中山 亨（東北大院・工）

16:15 S3Bc03 モロニーマウス白血病ウイルス（MMLV）逆転写酵素の熱安定性の向上と新しい核酸増幅法の開発
…… 〇滝田 禎亮, 馬場 美聡, 片野 裕太, 岡野 啓志, 兒島 憲二, 保川 清
（京大院・農）

16:35 休憩

座長：**中山 亨**

16:45 S3Bc04 D-アミノ酸脱水素酵素の構造情報に基づく基質特異性の改変
…… 〇櫻庭 春彦[1], 林 順司[2], 秋田 紘長[3], 大森 勇門[4], 大島 敏久[4]
（[1]香川大・農, [2]立命館大・生命科学, [3]産総研, [4]大阪工大・工）

17:05 S3Bc05 人工補酵素-ギ酸脱水素酵素系による炭酸ガスからのギ酸合成
…… 〇天尾 豊（大阪市大・複合先端研）

座長：**櫻庭 春彦**

17:25 S3Bc06 架橋触媒機能を有する微生物由来トランスグルタミナーゼ前駆体の設計
……〇神谷 典穂[1,2], 松崎 隆[1], 林 浩之輔[1], 南畑 孝介[1,3]
（[1]九大院・工, [2]九大・未来化セ, [3]KAICO）

17:45 おわりに
…… 大島 敏久

C 会場　第 4 学舎 3 号館 2 階（15:20〜17:50）

資源作物生産から発酵生産までをトータルシステムとして俯瞰する

15:20 はじめに
…… 酒井 謙二

座長：**伊藤 幸博**

15:25 S3Cc01 木質バイオマスの質と量：オーダーメイド改変に向けて
…… 〇出村 拓（奈良先端大・先端科学技術）

座長：**酒井 謙二**

15:45 S3Cc02 食糧・バイオリファイナリー共用イネの開発を目指した稲わらの糖化性向上
……○伊藤 幸博（東北大院・農）

16:05 S3Cc03 培地・基質及びダウンストリームから考える発酵生産
……○園元 謙二（九大院・農）

16:25 休憩

座長：**酒井 謙二**

16:35 S3Cc04 発酵微生物のスクリーニングを考える
……○青柳 秀紀[1], 高橋 将人[1], 松﨑 大典[2], 長谷川 智弘[1]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生物資源）

座長：**青柳 秀紀**

16:55 S3Cc05 複合微生物系から考える発酵生産
……○田代 幸寛[1], 宮本 浩邦[2,3], 酒井 謙二[1]
（[1]九大院・農, [2]（株）サーマス, [3]千葉大・園芸）

17:15 S3Cc06 発酵生産のための人工代謝経路デザインの合理化と制約
……○本田 孝祐（阪大院・工）

17:35 おわりに
……青柳 秀紀

D 会場　第 4 学舎 3 号館 1 階（15:20〜17:20）

黒麹菌・白麹菌の研究からつなげる産業振興

15:20 はじめに
……外山 博英

座長：**外山 博英**

15:25 S3Dc01 黒麹菌の学名は *Aspergillus luchuensis* です
……○山田 修（酒総研）

15:45 S3Dc02 全ゲノム情報を用いた泡盛黒麹菌を含む *Aspergillus luchuensis* の系統解析
……○塚原 正俊（バイオジェット）

16:05 S3Dc03 *Aspergillus luchuensis* の遺伝子破壊株の造成方法と応用
……○水谷 治[1], 渡嘉敷 直杏[2], 高橋 徹[3], 山田 修[3], 外山 博英[1]
（[1]琉球大・農, [2]鹿児島大院・連農, [3]酒総研）

16:25 休憩

座長：**塚原 正俊**

16:30 S3Dc04 黒麹菌による泡盛古酒香バニリン前駆体の生成〜古酒と老麹〜
……眞榮田 麻友美[1], 渡嘉敷 正司[2], 渡嘉敷 みどり[2], 後藤 正利[3], 伊藤 進[1], 上地 敬子[1], ○平良 東紀[1]
（[1]琉球大・農, [2]石川種麹店, [3]佐賀大・農）

16:50 S3Dc05 白麹菌のクエン酸高分泌生産機構に関する研究〜トランスクリプトームを手掛かりとしてわかってきたこと〜
……○二神 泰基[1], 門岡 千尋[1], 後藤 正利[2], 玉置 尚徳[1]
（[1]鹿児島大院・連農, [2]佐賀大・農）

17:10 おわりに
……塚原 正俊

E 会場　第 4 学舎 2 号館 1 階（15:20〜17:20）

生物系研究者のための電気化学入門〜その実験大丈夫？〜

15:20 はじめに
…… 若井 暁

座長：**若井 暁**

15:25 S3Ec01 環境の酸化還元電位，水溶液や付着物の電気抵抗，電気的中性条件について考慮しましたか？
…… ○伊藤 公夫（新日鐵住金・先端研）

15:50 S3Ec02 微生物鉄腐食研究が与える異分野融合のチャンス
…… ○岡本 章玄（物材研・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点）

16:15 S3Ec03 医療用金属材料開発における電気化学の基礎と応用
…… ○堤 祐介（医科歯科大・生材研・金属）

16:40 S3Ec04 光合成を電気化学で測る，操る
…… ○中西 周次[1,2]（[1]阪大・太陽エネ化学研究セ, [2]阪大院・基礎工）

17:05 パネルディスカッション
…… 全員

F 会場　第 4 学舎 2 号館 1 階（15:20〜17:20）

環境は持続可能か？－地球規模の物質循環を生物工学から考える－

15:20 はじめに
…… 加藤 純一

座長：**新谷 政己**

15:25 S3Fc01 工学システムの進展から見る窒素マネジメントの現状と課題
…… ○寺田 昭彦（農工大院・工）

15:55 S3Fc02 硫化カルボニルの生物地球化学循環と安定同位体比を用いた動態解析
…… ○服部 祥平[1], 亀崎 和輝[1], 小川 貴弘[2], 片山 葉子[2], 吉田 尚弘[1]
([1]東工大, [2]農工大)

座長：**金原 和秀**

16:20 S3Fc03 結晶性酸化鉄の微生物還元とその地球炭素循環との関わり
…… ○堀 知行（産総研）

16:45 S3Fc04 リン最前線－Ｐイノベーションとリン循環産業ビジョン－
…… ○大竹 久夫[1], 常田 聡[2]（[1]早大・総合研究機構, [2]早大・先進理工）

17:15 おわりに
…… 寺田 昭彦

G 会場　第 4 学舎 2 号館 2 階（15:20〜17:50）

タンパク質と材料界面の相互作用の本質に迫る

15:20 はじめに
…… 黒田 章夫

15:25 S3Gc01 **〈招待講演（韓国生物工学会）〉** 座長：**黒田 章夫**

Analysis of carbohydrate-protein interaction

……○Jeong Hyun Seo

（Sch. Chem. Eng., Yeungnam Univ., Republic of Korea）

座長：**黒田 章夫**

15:50 S3Gc02 進化工学からみた材料結合性ペプチド・タンパク質の雰囲気

……○梅津 光央（東北大院・工）

16:10 S3Gc03 水中強接着性細菌タンパク質 AtaA の非特異的相互作用の謎に迫る

……○堀 克敏（名大院・工）

座長：**堀 克敏**

16:30 S3Gc04 タンパク質の天然変性領域が関与する材料との相互作用

……○黒田 章夫, 池田 丈（広島大院・先端物質）

16:50 休憩

座長：**堀 克敏**

16:55 S3Gc05 フラグメント分子軌道(FMO)法のナノバイオ系への応用事例

……○望月 祐志[1,2], 加藤 幸一郎[3], 福澤 薫[2,4]

（[1]立教大・理, [2]東大・生産研, [3]みずほ情報総研, [4]星薬科大・薬）

17:25 S3Gc06 材料のナノ構造が誘起するタンパク質吸着および細胞接着

……○高井 まどか[1], 平口 侑香里[1], 荒木 保幸[2], 和田 健彦[2]

（[1]東大院・工, [2]東北大・多元研）

17:50 おわりに

……堀 克敏

H 会場　第 4 学舎 2 号館 2 階（15:20〜17:50）

スマートバイオデザイン：ナノからマクロスケールまでの様々な階層レベルにおける バイオ関連機能と構造の合理的創出を目指して

15:20 S3Hc01 **〈招待講演（韓国生物工学会）〉** 座長：**新井 亮一**

Nanometer scale biological particle separation with flow controls and electrical field controls

……○Jong Wook Hong[1,2]

（[1]Grad. Sch. Dept. Bionano Technol., Hanyang Univ., Korea,
[2]Grad. Sch. Dept. Bionano Eng., Hanyang Univ., Korea）

15:50 はじめに

……新井 亮一

座長：**新井 亮一**

15:53 S3Hc02 耐熱性を保ったまま好熱菌酵素の触媒特性を常温菌型に変える

……○赤沼 哲史（早大・人科）

16:16 S3Hc03 人工知能を用いたタンパク質高機能化

……○亀田 倫史[1], 齋藤 裕[1], 津田 宏治[2], 梅津 光央[3]

（[1]産総研・人工知能, [2]東大院・新領域, [3]東北大院・工）

座長：**座古 保**

16:39 S3Hc04 バイオ分子の自己集合化に潜む機能

……○池添 泰弘（日工大・基幹工・応化）

17:02 S3Hc05 クモ糸の階層構造の解明と人工的再構築

……○沼田 圭司（理研）

座長：**梅津 光央**

17:25 S3Hc06 オリゴ DNA の腸管送達系の構築と経口用素材への展開
……○下里 剛士（信州大・菌類微生物セ）

17:48 おわりに
……座古 保

K 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（15:20〜17:20）

Networking of Researches Toward Social Implementation of Bioresources Rich in ASEAN「ASEAN における生物資源の社会実装を目指した研究ネットワーキング」＜国際シンポジウム＞

15:20 はじめに
……藤山 和仁

座長：**藤山 和仁**

15:23 S3Kc01 生物資源管理に関する世界動向を踏まえた ASEAN と日本の連携によるバイオ科学技術の発展を目指して
……○川﨑 浩子（製品評価技術基盤機構・NBRC）

座長：**川﨑 浩子**

15:47 S3Kc02 ASEAN Network for microbial utilization (ANmicro): A step forward to the global ASEAN
……○Lily Eurwilaichitr
（TBRC, BIOTEC, Thailand）

16:10 休憩

座長：**Lily Eurwilaichitr**

16:15 S3Kc03 The role of PSM in enhancing academe-industry partnership for the utilization of indigenous bioresources in the Philippines
……○Leslie Michelle Dalmacio
（Dept. Biochem. Mol. Bio., Coll. Med., Univ. of the Philippines Manila）

座長：**Leslie Michelle Dalmacio**

16:35 S3Kc04 A case study on cooperative development on utilization of microbial bioresource between Vietnam and Japan
……○Duong Van Hop, Nu Nguyen Kim Nu
（Inst. Microbiol. Biotechnol., Vietnam National Univ., Hanoi）

座長：**Duong Van Hop**

16:55 S3Kc05 Indonesian bioresource utilization for health and beauty
……○Irmanida Batubara
（Trop BRC IPB, Indonesia）

17:15 おわりに
……福﨑 英一郎

L 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（15:20〜17:50）

工学が見出すエッセンシャル細胞培養 〜動物細胞培養の根本に工学はどう立ち向かうか〜【本部企画】

15:20 はじめに
……加藤 竜司

座長：**児島 宏之**

15:23 S3Lc01 動物細胞培養の産業応用の変遷 －テクノロジーからエンジニアリングへ－
……○大政 健史[1,2]（[1]阪大院・工, [2]MAB 組合）

15:48 S3Lc02 新規 CHO 細胞による抗体医薬品生産 － 5 g/L/6days の高いポテンシャルと工業化への課題 －
……○堀内 貴之（株式会社ちとせ研究所）

座長：**河原 正浩**

16:08 S3Lc03 DNA バーコードとゲノム編集による分子・細胞動態計測
……○谷内江 望（東大・先端研）

16:28 S3Lc04 塩基編集技術 Target-AID の工学的応用
……○西田 敬二（神戸大院・科技イノベ）

座長：**加藤 竜司**

16:48 S3Lc05 細胞培養における代謝解析ツールとしてのメタボロミクス
……○馬場 健史, 和泉 自泰（九大・生医研）

17:08 S3Lc06 受容体ライブラリーによる機能性細胞の創製
……○河原 正浩（東大院・工）

座長：**河原 正浩**

17:28 S3Lc07 細胞形態計測による細胞フェノミクス解析
……○加藤 竜司（名大院・創薬）

17:48 おわりに
……河原 正浩

M 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（15:20～17:50）

糖鎖工学技術がもたらすバイオ医薬品の新潮流

座長：**三﨑 亮**

15:20 S3Mc01 糖転移酵素を用いた糖ペプチド合成と糖鎖創薬への応用展開
……○千葉 靖典[1], 吉村 弥生[1,2], 高橋 佳江[1], 横尾 岳彦[1], 清水 弘樹[3]
（[1]産総研・創薬基盤, [2]バイオインダストリー協会, [3]産総研・生物プロセス）

15:35 S3Mc02 糖タンパク質の精密化学合成
……○梶原 康宏（阪大院・理）

座長：**千葉 靖典**

16:00 S3Mc03 糖タンパク質合成の制御とバイオ医薬品への機能付与
……○朝井 洋明（糖鎖工学研究所）

16:25 S3Mc04 糖アナログを利用した糖鎖機能の追跡と改変
……○木塚 康彦（岐阜大・G-CHAIN）

座長：**加藤 紀彦**

16:50 S3Mc05 バイオ医薬品開発を指向した化学合成糖鎖からのアプローチ
……○松崎 祐二（東京化成工業 糖鎖技術部）

17:15 S3Mc06 エンドグリコシダーゼと機能性合成 N 型糖鎖を利用するネオ糖タンパク質医薬品の開発を目指して
……○伊藤 孝司[1,6], 西岡 宗一郎[1,6], 小林 功[2,6], 笠嶋 めぐみ[2,6], 立松 謙一郎[2,6], 瀬筒 秀樹[2,6], 松崎 祐二[3], 飯野 健太[3], 木下 崇司[4], 堂崎 雅仁[4], 灘中 里美[5], 北川 裕之[5]
（[1]徳島大院・医歯薬学研・創薬生命工, [2]農研機構・カイコ機能改変技術開発ユニット, [3]東京化成工業, [4]伏見製薬所, [5]神戸薬科大・生化学, [6]SERIREVO）

17:40 おわりに
……三﨑 亮

一般講演

C 会場　第 4 学舎 3 号館 2 階（9:00〜11:24）

【醸造学，醸造工学】

9:00 3Ca01 白麹菌における推定 RNA 結合タンパク質 NrdA の機能解析
……○門岡 千尋[1], 泉津 弘佑[2], 浅井 禎吾[3], 奥津 果優[1], 吉﨑 由美子[1], 髙峯 和則[1], 後藤 正利[4], 玉置 尚徳[1], 二神 泰基[1]
（[1]鹿児島大・農, [2]滋賀県立大・環境科学, [3]東大院・総合文化, [4]佐賀大・農）

9:12 3Ca02 プロテアーゼを高生産する黒麹菌の育種と芋焼酎醸造試験による評価
……○瀬戸口 翔[1,2], 益留 綾菜[2], 一谷 勝之[3], 橋本 文雄[3], 吉田 理一郎[3], 岡本 繁久[3], 内海 俊樹[4], 尾上 昌平[5], 岩井 謙一[2], 髙瀬 良和[2], 二神 泰基[3], 玉置 尚徳[3]
（[1]鹿児島大院・連農, [2]霧島酒造, [3]鹿児島大・農, [4]鹿児島大院・理工, [5]鹿児島大・RI）

9:24 3Ca03 黒麹菌における 1-octen-3-ol 生合成遺伝子の解析
……○片岡 涼輔[1], 植松 千暁[2], 長谷川 泰子[2], 渡邉 泰祐[1,2], 荻原 淳[1,2]
（[1]日大院・生資科, [2]日大・生資科）

9:36 3Ca04 泡盛黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の系統解析と毒素関連遺伝子の解析
……阿部 峻之[1], 東 春奈[1], 外山 博英[2], 水谷 治[2], 山田 修[3], ○塚原 正俊[1]
（[1]バイオジェット, [2]琉球大・農, [3]酒総研）

9:48 3Ca05 ***Aspergillus luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素の各種米麹中の発現量と泡盛もろみおよび蒸留液中の 4-VG 量の相関**
……○眞榮田 麻友美[1], 渡嘉敷 正司[2], 渡嘉敷 みどり[2], 上地 敬子[1], 平良 東紀[1]
（[1]琉球大・農, [2]石川種麹店）

10:00 3Ca06 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるペプチダーゼ遺伝子の転写に窒素源が与える影響
……○白石 敦士, 前田 浩, 山形 洋平（農工大院・農）

10:24 3Ca07 Visualizing metabolites in rice koji using MALDI imaging mass spectrometry
……○ Adinda Putri Wisman[1], Yoshihiro Tamada[2], Takahiro Akashi[2], Katsuya Gomi[3], Eiichiro Fukusaki[1], Shuichi Shimma[1]
（[1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd., [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.）

10:36 3Ca08 イメージング質量分析を用いた清酒における麹米品種の特性解析
……○玉田 佳大[1], Wisman Adinda Putri[2], 窪寺 隆文[1], 明石 貴裕[1], 福﨑 英一郎[2], 新間 秀一[2]
（[1]白鶴酒造, [2]阪大院・工）

10:48 3Ca09 生もと系酒母製造工程において各種微生物が呈味成分に与える影響
……○高橋 正之, 喜多 靖子, 向井 伸彦（酒総研）

11:00 3Ca10 清酒酵母のアルギニン取込能の差に起因するタンパク質解析
……○清野 珠美, 和田 潤, 廣岡 青央（京産技研）

11:12 3Ca11 濃縮果汁を用いたワイン発酵における発酵遅延の原因成分の同定と改善法の開発
……○菊地 のぞみ[1], 稲留 弘乃[2], 高橋 沙織[2], 篠原 裕之[3], 鈴木 克彦[1], 吉田 聡[1], 高田 良二[1]
（[1]キリン・ワイン技術研, [2]キリン・酒類技術研, [3]キリン・基盤技術研）

E 会場　第 4 学舎 2 号館 1 階（9:00〜11:24）

【生物化学工学／培養工学／バイオプロセス】

9:00 3Ea01 抗菌性物質が皮膚常在菌の生理活性に及ぼす影響の解析
……○菊田 実花, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

9:12 3Ea02 抗菌性食品添加物が腸内細菌の生理活性に及ぼす影響の解析
……○箱田 優奈, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

9:24 3Ea03 皮膚常在菌の増殖に対する化粧品添加の影響
……○多賀 直彦, 今村 香乃, 大場 輝, 川上 茅咲（東海大・農）

9:36 3Ea04 増殖の速い微生物が環境試料からの微生物の培養化に及ぼす影響の解析と利用
……長谷川 智弘[1], ○原田 玲奈[2], 青柳 秀紀[1,2]（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生物資源）

9:48 3Ea05 植物試料の凍結前処理が培養微生物群集に与える影響の解析
……○小林 和輝, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

10:00 3Ea06 模擬微小重力培養が腸内細菌の生理活性に及ぼす影響の解析(第 3 報)
……長谷川 文香[1], ○増田 亜理沙[2], 青柳 秀紀[1,2]（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生物資源）

10:24 3Ea07 放線菌由来の新規塩基性ポリアミノ酸： Poly(diaminopropanoic acid) の単離とキャラクタリゼーション
……○加藤 芳尚, 稲葉 悠, 室 尚吾, 竹原 宗範（滋県大院・工・材料科学）

10:36 3Ea08 *Streptomyces* 属放線菌由来の Poly(ε-L-lysine) が示す抗真菌作用機構の解析
……○松井 旺大[1], 星山 貴文[1], 永田 智[1], 竹原 宗範[1], 野村 亘[2], 井上 善晴[2]
（[1]滋県大院・工・材料科学, [2]京大院・農・応用生命）

10:48 3Ea09 Poly(ε-L-lysine) の生分解可能なカチオン性分散剤への利用研究
……○武内 正輝, 竹原 宗範（滋県大院・工・材料科学）

11:00 3Ea10 好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* の培養特性解析
……○三原 笑[1], 竹中 武藏[2], 柏木 紀賢[2], 曽田 匡洋[3], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[2]
（[1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]長瀬産業）

11:12 3Ea11 深海細菌 *Aneurinibacillus* sp.YR247 の抗真菌ペプチドの特性の解明
……○福井 瑞季[1], 山浦 由登[1], 倉田 淳志[2], 岸本 憲明[2], 上垣 浩一[2]
（[1]近畿大院・農, [2]近畿大・農）

F 会場　第 4 学舎 2 号館 1 階（9:00〜11:00）

【生物化学工学／培養工学／バイオプロセス】

9:00 3Fa01 海洋性細菌が形成する CdS ナノ粒子のキャラクタリゼーション
……○佐坂 文武, 高橋 宏和, 富永 依里子, 岡村 好子（広島大院・先端物質）

9:12 3Fa02 バイオミネラリゼーションによるシリカナノシートの構築
……○畠中 孝彰, 大橋 雅卓, 石田 亘広（豊田中研）

9:24 3Fa03 外膜表層に金属結合ペプチドを提示した微生物の無機固体表面に対する選択的な吸着特性
……○岩田 至叡, 中島 一紀, 川﨑 了（北大院・工）

9:36 3Fa04 気生微細藻類と窒素固定菌の共生系を利用した壁面培養法
……○塚越 崇之, 油井 信弘, 菅原 康里, 今村 保忠, 阿部 克也（工学院大・先進工・生化）

9:48 3Fa05 Preparation and characterisation of robust whole cell biocatalyst from *Aspergillus oryzae* expressing *Fusarium heterosporum* lipase immobilized onto activated carbon for biodiesel synthesis
……○Emmanuel Quayson [1], Jerome Amoah [1], Akihiko Kondo [2], Shinji Hama [3], Ayumi Yoshida [3], Chiaki Ogino [1]
（[1] Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2] Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3] Res. Dev. Lab., Bioenergy Corpo.）

10:00 3Fa06 ナノファイバータンパク質 AtaA の塩濃度依存的な接着性を利用した細菌の可逆的固定化
……○吉本 将悟 [1,2], 小原 優季 [1], 中谷 肇 [1], 堀 克敏 [1]
（[1] 名大院・工, [2] 名大・VBL）

10:24 3Fa07 *Acinetobacter* sp. Tol 5 の難付着材料に対する付着性の評価
……○川尻 彩音 [1], 飯尾 魁 [1], 吉本 将悟 [1,2], 堀 克敏 [1]
（[1] 名大院・工, [2] 名大・VBL）

10:36 3Fa08 固定化細胞培養法を活用した生物細胞の選択的取得法の開発
……○吉田 真梨, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

10:48 3Fa09 培地成分が大腸菌フロック形成に与える影響
……○本間 裕章, 大塚 未音, 尾島 由紘, 東 雅之（阪市大院・工）

G 会場　第 4 学舎 2 号館 2 階（9:00〜10:12）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

9:00 3Ga01 生分解性プラスチックの海水，河川水での生分解
……○中山 敦好, 川崎 典起, 山野 尚子（産総研・バイオメディカル）

9:12 3Ga02 発酵(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸と α-ヒドロキシ酸の共重合体の化学合成と生分解
……○常盤 豊 [1,4], 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, [4] トロピカルテクノプラス）

9:24 3Ga03 (*R*)-3-ヒドロキシ酪酸生産菌の代謝制御に関わる無機塩類
……○世嘉良 宏斗 [1], 花城 隆二 [1], 合田 雅浩 [1], 常盤 豊 [2,3]
（[1] 沖縄県工技セ, [2] トロピカルテクノプラス, [3] 産総研）

9:36 3Ga04 酸性溶液による変性 PET の加水分解と分子量変化
……○廣田 泰志 [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）

9:48 3Ga05 Thiol-ene 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発
……○佐野 芽生 [1], 黒田 ひかり [1], 小原 仁実 [1], 安藤 寛 [2], 松本 圭司 [2], 麻生 祐司 [1]
（[1] 京都工繊大院・工芸科学, [2] (株)カネカ・R&D 企画部）

10:00 3Ga06 Heck 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発
……○矢田 椋己 [1], 佐野 芽生 [1], 小原 仁実 [1], 安藤 寛 [2], 松本 圭司 [2], 麻生 祐司 [1]
（[1] 京工繊大院・工芸科学, [2] カネカ・R&D 企画部）

H 会場　第 4 学舎 2 号館 2 階（9:00〜11:24）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

9:00 3Ha01 Bio-alcohol production in engineered Bacillus subtilis through restoration of nutritional depletion stress
……Kim Eunjoo [1], Seo Dahee [1], Yang Yung-Hun [2], ○Choi Kwon-Young [1]
（[1] Dept. Environ. Eng. Ajou University, [2] Dept. Microbial Eng. Konkuk University）

9:12 3Ha02 酵素の生産・放出を行う大腸菌と物質生産を行う大腸菌の共培養による有用物質生産
……○岩崎 建史朗[1], 本庄 宏[2], 相馬 悠希[3], 盧 鎮栄[2], 鶴野 圭悟[2], 濱田 浩幸[1], 花井 泰三[1]
([1]九大院・生資環, [2]九大院・シス生科, [3]九大・生医研)

9:24 3Ha03 グルコース／キシロース切替え流加法による乳酸ベースポリマー生産組換え大腸菌の高密度培養
……山崎 貴史[1], Ribordy Greg[2], 堀 千明[1,3], ○松本 謙一郎[1,3], 大井 俊彦[1,3], Zinn Manfred[2], 田口 精一[3,4]
([1]北大院・工, [2]Hes-SO Walais Wallis, [3]JST・CREST, [4]t 東農大・生命科学)

9:36 3Ha04 *Clostridium beijerinckii* を宿主としたタンパク質発現系の開発 ―プロモーターの検討―
……○須江 夏希, 平松 愛子, 三宅 英雄（三重大院・生資）

9:48 3Ha05 発酵阻害物質耐性酵母 KS47-1 株の特徴づけと 1 倍体の取得
……○竹内 健人[1], 加藤 勇太[1], 荒川 知子[1], 堀内 淳一[2], 小西 正朗[1]
([1]北見工大, [2]京工繊大院・工芸科学)

10:00 3Ha06 キシロートランスポーター GAL2 の脱ユビキチン化によるグルコース・キシロース同時消費酵母の作成
……○藤森 一浩[1], 小林 洋介[1,2], 佐原 健彦[1], 扇谷 悟[1], 鎌形 洋一[1]
([1]産総研・生物プロセス, [2]Biomaterial in Tokyo)

10:24 3Ha07 酵母 *Scheffersomyces stipitis* を宿主とした新規細胞表層提示システムの開発
……○猪熊 健太郎, 小林 優真, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦（神戸大院・科技イノベ）

10:36 3Ha08 接合型変換を利用したセルラーゼ群表層提示酵母の糖化活性及び発酵阻害物耐性向上
……○北田 雄基, 猪熊 健太郎, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦（神戸大院・科技イノベ）

10:48 3Ha09 Repeated ethanol fermentation from membrane-concentrated sweet sorghum juice by flocculating yeast Saccharomyces cerevisiae
……○Hans Wijaya[1,2], Kengo Sasaki[3], Prihardi Kahar[1], Yopi[2], Chiaki Ogino[1], Bambang Prasetya[4], Akihiko Kondo[3]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]LIPI, [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [4]BSN)

11:00 3Ha10 人工知能や統計的手法による天然培地成分からの発酵生産量予測
……○渡辺 一樹[1], 小西 正朗[2]（[1]北見工大院・工・バイオ環境, [2]北見工大）

11:12 3Ha11 潜性形質に注目したレアメーティングによる非遺伝子組換え酵母の育種
……○海道 直生[1], 金子 嘉信[2], 山崎 思乃[3], 片倉 啓雄[3]
([1]関西大院・理工, [2]阪大院・工, [3]関西大・化生工)

I 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（9:00〜11:24）

【生体情報工学，バイオインフォマティクス／システムバイオロジー】

9:00 3Ia01 バイアスドランダム化と DNA バーコード付加によるプロモーター変異体のハイスループット解析
……○青木 航[1,2], 古村 崚[1], 元根 啓佑[1,3], 植田 充美[1]
([1]京大院・農, [2]JST さきがけ, [3]日本学術振興会)

9:12 3Ia02 サンゴ共在細菌の機能予測に向けた環境因子応答 *Endozoicomonas* 属の系統解析
……○井手 圭吾[1,4], 伊藤 通浩[2], 藤村 弘行[3], 須田 彰一郎[3], 中野 義勝[2], 細川 正人[5,6], 竹山 春子[1,4,5]
([1]早大・先進理工, [2]琉球大・熱生研, [3]琉球大・理, [4]産総研・早大 CBBD-OIL, [5]早大ナノライフ創研, [6]JST・さきがけ)

9:24 3Ia03 **環境中難培養微生物のゲノム解析に向けた高精度シングルセルゲノムアセンブリツールの開発**
……○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]早大ナノライフ創研, [4]JST・さきがけ)

9:36 3Ia04 DNA 塩基配列の人工知能による生物分類・進化・機能の解析
……○三宅 淳[1], 馬場 俊輔[1], 山本 修也[2], 島林 真人[2], 田川 聖一[3], 新岡 宏彦[4]
（[1]阪大国際医工情報センター, [2]阪大院・基礎工, [3]阪大先導的学際研究機構, [4]阪大データビリティーフロンティア機構）

9:48 3Ia05 大規模実験室進化を用いた転写因子の破壊による大腸菌の薬剤耐性化の制御
……○堀之内 貴明[1], 前田 智也[1], 小谷 葉月[1], 酒井 亜希[1], 古澤 力[1,2]
（[1]理研・生命機能, [2]東大院・理）

10:24 3Ia07 機械学習を用いた機能性ペプチド探索手法の開発
……○山下 春来[1], 藤谷 将也[2], 清水 一憲[1], 蟹江 慧[2], 加藤 竜司[2], 本多 裕之[1,3]
（[1]名大院・工, [2]名大院・創薬, [3]名大予防早期医療創成セ）

10:36 3Ia08 細胞形態情報解析における情報コンテントの重要性
……○加藤 寛之, 藤谷 将也, 蟹江 慧, 加藤 竜司（名大院・創薬）

10:48 3Ia09 細胞形態情報解析を応用した神経系細胞の非侵襲的評価
……○今井 祐太, 藤谷 将也, 寺澤 摩周, 岡田 真衣, 蟹江 慧, 加藤 竜司
（名大院・創薬）

11:00 3Ia10 ファンクショナルセロミクスによる神経ネットワークのハイスループットアノテーション
……○山内 悠至[1], 松倉 秀典[1], 青木 航[1,2], 植田 充美[1]
（[1]京大院・農, [2]JST・さきがけ）

11:12 3Ia11 マウスのにおい学習実験における引き返し行動とおよび自発的不正解選択の関係
……○滝口 昇[1,2], 矢野 達也[3]（[1]金沢大・理工, [2]金沢大院・自科, [3]松本工業高等学校）

K 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（9:00～11:24）

【発酵生理学，発酵工学／代謝工学／オミクス解析】

9:00 3Ka01 メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* 合成生物学によるグルカル酸の高発酵生産
……○幅田 亜香莉[1], 由里本 博也[1], 山本 恭士[2], 湯村 秀一[2], 阪井 康能[1]
（[1]京大院・農, [2]三菱ケミカル）

9:12 3Ka02 Combinatorial biosynthesis in engineered yeast of morolic acid: a promising lead compound for anti-HIV drug development
……○Pisanee Srisawat, Ery Odette Fukushima, Shuhei Yasumoto, Hikaru Seki, Toshiya Muranaka
（Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.）

9:24 3Ka03 脂質生産酵母 *Lipomyces* を利用した再生可能資源からのバイオディーゼル用脂質生産における実験上の問題点とその解決
……○柳場 まな, 松本 美穂, 長沼 孝文（山梨大院・医工総）

9:36 3Ka04 鉄硫黄タンパク質高活性化に基づくキシロースからの 1,2,4-ブタントリオール生産技術の開発
……○湯川 貴弘, 番場 崇弘, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦（神戸大院・科技イノベ）

9:48 3Ka05 酵母 *Scheffersomyces stipitis* を用いたレスベラトロール生産プロセスの開発
……○小林 優真, 猪熊 健太郎, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦（神戸大院・科技イノベ）

10:00 3Ka06 出芽酵母 2,3-ブタンジオール生産に向けた不活性型 Cas9 によるエタノール生合成経路の抑制
……○森田 啓介[1], 松田 史生[1], 石井 純[2], 近藤 昭彦[2], 清水 浩[1]
（[1]阪大院・情報, [2]神戸大院・科技イノベ）

10:24 3Ka07 T7 発現系を応用したプラスミドフリーで誘導剤が不要なフェニルアラニン高生産菌の開発
……○岸田 隆寛[1], 駒 大輔[2], 大橋 博之[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）

10:36 3Ka08 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 NDH-II 過剰発現が中枢代謝に与える影響
…… ○濱田 和宏, 瀬島 祐大, 吹谷 智, 和田 大, 横田 篤（北大院・農）

10:48 3Ka09 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の低栄養生育に関与する推定トランスポーター遺伝子の機能解析
…… ○松岡 友洋, 吉田 信行（静大院・総合科技）

11:00 3Ka10 フェノールが大腸菌の中枢代謝に及ぼす影響の解析
…… ○北村 さや香, 戸谷 吉博, 清水 浩（阪大院・情報）

11:12 3Ka11 大腸菌の ArcA による酸素消費速度の感知システム
…… 後野 直哉, ○戸谷 吉博, 清水 浩（阪大院・情報）

L 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（9:00〜11:24）

【酵素学，酵素工学】

9:00 3La01 PET 分解酵素クチナーゼの Ca^{2+}結合に伴う熱安定性及び構造機能解析
…… 山上 由莉[1], 千賀 明香音[1], 沼本 修孝[2], 織田 昌幸[1], ○河合 富佐子[3]
（[1]京府大院・生命環境, [2]医科歯科大・難研, [3]京都工繊大・繊科セ）

9:12 3La02 PHA 重合酵素への親水化タグ付与がポリマー重合能へ与える影響
…… ○原田 憲, 柘植 丈治（東工大・物質理工）

9:24 3La03 *Citrobacter* sp. S-77 由来の新規[NiFe]ヒドロゲナーゼの構造遺伝子と水素活性化機構
……○尹 基石[1,2,3], 小江 誠司[1,2,3]
（[1]九大・WPI-I2CNER, [2]九大院・工・応化, [3]九大・小分子エネルギーセ）

9:36 3La04 ケッチェンブラックを用いた高性能バイオ電池の構築
…… ○渡邉 好一[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・ライフセ, [4]香川大・農, [5]阪工大）

9:48 3La05 分子揺動性を考慮した耐熱性酵素の配向固定による高性能バイオアノードの構築
……○鈴木 治人[1], 高村 映一郎[2], 坂元 博昭[1,3], 里村 武範[3,4], 櫻庭 春彦[5], 大島 敏久[6], 末 信一朗[1,3,4]
（[1]福井大院・工・繊維, [2]福井大院・工・総合, [3]福井大学・ライフセ, [4]福井大学院・工・生物応用化, [5]香川大・農, [6]大阪工大）

10:00 3La06 電極－酵素界面における異種間電子移動の距離依存性解析
…… ○高村 映一郎[1], 鈴木 治人[2], 中村 卓登[2], 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・ライフセ, [5]香川大・農, [6]大阪工大）

10:24 3La07 GFP を融合したシリカ重合酵素の機能解析
…… ○竹田 雄大, 小栗 秀俊, 中島 一紀, 川﨑 了（北大院・工）

10:36 3La08 Development of cellulose hydrogel microsphere for lipase immobilization
…… ○Soyeon Jo, Sae Rom Park, Sang Hyun Lee
（Dept. Biol. Engn., Konkuk Univ., South Korea）

10:48 3La09 Preparation of biopolymer-based hybrid hydrogel beads for enzyme immobilization
…… ○Saerom Park, Sang Hyun Lee
（Dept. Biol. Engn., Konkuk Univ.）

11:00 3La10 大腸菌包括菌体によるバニリンの効率的生産プロセスの開発
…… ○齋藤 翼[1], 青野 陸[1], 古屋 俊樹[2], 木野 邦器[1,2]
（[1]早大院・先進理工・応化, [2]早大・理工総研）

11:12 3La11 ポリニュートラルレッド修飾電極を用いたリンゴ酸酵素による CO_2 固定化システムの構築
……○大田 竹留[1], 坂元 博昭[1,2], 里村 武範[1,2], 末 信一朗[1,2]
([1]福井大院・工, [2]福井大学ライフイノベセ)

M 会場　第 4 学舎 2 号館 3 階（9:00〜11:24）

【酵素学，酵素工学】

9:00 3Ma01 エリンギ由来セリンアミノペプチダーゼの基質取り込み経路の酸化が及ぼすペプチド結合形成反応への影響
……○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・CoRE)

9:12 3Ma02 D-アミノ酸含有ジペプチドの汎用的な酵素合成法の開発
……○賀野 壮一朗[1], 鈴木 伸[1], 原 良太郎[2], 木野 邦器[1,2]
([1]早大・先進理工, [2]早大・理工総研)

9:24 3Ma03 菌体反応系によるイミダゾールジペプチドの効率的生産法の開発
……○駒林 卓磨[1], 倉本 歩[2,3], 木野 邦器[1,2]
([1]早大院・先進理工・応化, [2]早大・理工総研, [3]東海物産)

9:36 3Ma04 アミノペプチダーゼによるアレルゲンペプチドの分解
……○畑中 唯史[1], 万 クン[2], 裏地 美杉[3], 東海 彰太[1], 中東 良太[4]
([1]岡山生物研, [2]中国西南大学, [3]神戸大院・科技イノベ, [4]ナガセケムテックス(株))

9:48 3Ma05 Split intein の protein *trans*-splicing を利用した耐熱性プロテアーゼ再構成の検討
……○巽 祐介, 足立 航平, 山野 範子, 大政 健史, 古賀 雄一（阪大院・工）

10:00 3Ma06 Tk-subtilisin の有機溶媒耐性の解析
……○宮田 大暉, 大政 健史, 山野 範子, 古賀 雄一（阪大院・工）

10:24 3Ma07 環状イミノ酸に対する反応性が向上したサルコシンオキシダーゼ変異体
……○黒部 督惠, 西矢 芳昭（摂南大院・理工）

10:36 3Ma08 *Chloroflexus aurantiacus* 由来のサルコシンオキシダーゼの N-メチルアミノ酸に対する反応性
……○松本 美徳, 西矢 芳昭（摂南大院・理工）

10:48 3Ma09 *Pyrococcus horikoshii* 由来馬尿酸加水分解酵素の機能改変
……○今井 皐[1], 名越 健太郎[1], 新木 翔太[1], 馬場 利明[2], 西矢 芳昭[1]
([1]摂南大院・理工, [2]ニプロ 総研 第三研究開発)

11:00 3Ma10 高基質特異性 L-アミノ酸オキシダーゼの 1 種 L-リシン α-オキシダーゼから部位特異的変異により作成した 新規な芳香族アミノ酸オキシターゼの性質
……○松本 侑也[1], 北川 雄輝[2], 今田 勝巳[2], 根本 理子[1], 田村 隆[1], 日下部 均[3], 稲垣 賢二[1]
([1]岡山大院・環境生命, [2]阪府大院・理, [3]エンザイムセンサ)

11:12 3Ma11 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株由来アセチルコリンエステラーゼによるアミノ酸のアセチル化反応
……○井上 尚[1], 美藤 友博[2], 清水 克彦[3], 有馬 二朗[2]
([1]鳥取大院・農, [2]鳥取大・農, [3]鳥取大・CoRE)

N 会場　第 4 学舎 2 号館 4 階（9:00〜11:12）

【環境浄化，修復，保全技術／環境工学，廃水処理技術】

9:00　3Na01　六価クロム還元細菌 *Flexivirga alba* ST13 株のフラグメント解析を利用した追跡法
……○桶田 凜, 池上 健仁, 杉山 友康（東京工科大院・バイオニクス）

9:12　3Na02　メタン発酵消化液中のリンの再資源化方法の検討
……○下出 崇樹[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）

9:24　3Na03　*Pseudomonas stutzeri* NT-I による水相からのテルルの揮発化除去と回収
……○黒田 真史, 畠中 玄彦, 井上 大介, 池 道彦（阪工大院・工）

9:36　3Na04　水中からアンチモンを除去する微生物集積系の特徴付け
……○細川 久顕[1], 森 健太朗[1], 黒田 真史[1], 惣田 訓[2], 井上 大介[1], 池 道彦[1]
（[1]阪大院・工, [2]立命館大・理工）

9:48　3Na05　セレン酸還元細菌内包ポリマーカプセルによる新たなセレン廃水の浄化と資源化
……○平谷 朋之[1], 小竹 史哉[1], 永 直文[1], 大塚 治[2], 山下 光雄[1,2]
（[1]芝工大院・理工・応化, [2]芝工大・SIT 総研）

10:00　3Na06　バイオレメディエーションによるセレン汚染土壌浄化
……○山下 光雄[1], 小竹 史哉[1], 大塚 治[2], 西里 亮[3], 奥野 稔[3], 武藤 宏行[3]
（[1]芝浦工大院・理工・応化, [2]芝浦工大・総研, [3]ケー・エフ・シー）

10:24　3Na07　Visualization of metabolites in *Pseudomonas putida* biofilms using imaging mass spectrometry
……○Pitchapa Rattanaburi, Eiichiro Fukusaki, Shuichi Shimma
（Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.）

10:36　3Na08　淡水域におけるバイオフィルム形成を介した生分解性プラスチック分解機構の解析
……○大井 太士郎[1], 佐藤 俊輔[2], 諸星 知広[1]（[1]宇都宮大院・工, [2](株)カネカ）

10:48　3Na09　工場冷却水由来 *Sphingopyxis* 属細菌によるアシル化ホモセリンラクトン分解機構の解析
……○佐藤 新菜[1], 上村 哉生樹[1], 飯泉 太郎[2], 諸星 知広[1]
（[1]宇都宮大・工, [2]栗田工業(株)）

11:00　3Na10　*Sphingopyxis* 属細菌おけるアシル化ホモセリンラクトン分解遺伝子の多様性解析
……○上村 哉生樹[1], 佐藤 新菜[1], 飯泉 太郎[2], 諸星 知広[1]
（[1]宇都宮大院・工, [2]栗田工業(株)）

O 会場　第 4 学舎 2 号館 4 階（9:00〜11:12）

【セル＆ティッシュエンジニアリング】

9:00　3Oa01　CRISPR/Cas9 システムによる eGFP ノックインニワトリの作製
……萩原 遥太[1], 奥嵜 雄也[1], 飯島 信司[1,2], ○金岡 英徳[1], 西島 謙一[1]
（[1]名大院・工, [2]現愛工大・工・応化）

9:12　3Oa02　受容体モチーフライブラリのスクリーニングによる効率的な細胞増殖誘導の実現
……○梅根 輝来人, 河原 正浩（東大院・工）

9:24　3Oa03　時計遺伝子 *Per2* 発現の再振動とグルコース添加条件との関係
……深浦 恵梨[1], ○藤原 政司[1], 西出 真也[2], 本間 さと[2], 本間 研一[2], 高木 睦[1]
（[1]北大院・工, [2]北大院・医）

9:36　3Oa04　長期的に安定な組換えタンパク質高生産株の構築に向けた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], 古賀 雄一[1], 大政 健史[1,2]
（[1]阪大院・工, [2]MAB 組合）

9:48 3Oa05 ミニサークル DNA ベクターを用いた CHO 細胞への逐次遺伝子組込み
……○河邉 佳典[1,2], 汪 雪[1], 羽田 毅[1], 井藤 彰[1], 上平 正道[1,2]
（[1]九大院・工, [2]次世代バイオ医薬品製造技術研究組合）

10:24 3Oa07 レトロトランスポゾンベクターにおけるレトロ転位のための構成要素の解析
……○村上 舞[1], 高橋 真美加[2], 河邉 佳典[2], 井藤 彰[2], 上平 正道[1,2]
（[1]九大院・シス生科, [2]九大院・工）

10:36 3Oa08 M2 型腫瘍随伴マクロファージ標的化バイオナノカプセルの開発
……○李 昊[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）

10:48 3Oa09 網羅的匂い分子解析のリアルタイム定量化を目指したヒト嗅覚受容体発現細胞の樹立
……○中村 実世[1], 立松 健司[1], 山﨑 智子[2], 黒田 俊一[1,2]
（[1]阪大産研, [2]香味醗酵）

11:00 3Oa10 免疫クリアランスを回避する生体膜由来ドラッグデリバリーキャリアの開発
……○赤嶺 藍[1], 西村 勇哉[2], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[2]
（[1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ）

ランチョンセミナー

3LS1 ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社

LS1 会場　第 4 学舎　4 号館 2 階（11:35〜12:35）

3LS2 東ソー株式会社

LS2 会場　第 4 学舎　4 号館 2 階（11:35〜12:35）

3LS3 P&G イノベーション合同会社

LS3 会場　第 4 学舎　2 号館 5 階（11:35〜12:35）

9月5日（水）

授賞式・受賞講演（9:00 ～ 11:30）

A 会場 BIG ホール 100 第 2 学舎 4 号館 1 階

授賞式（会長挨拶，KSBB 会長挨拶，功労会員推戴，各賞授賞）

〈生物工学功労賞〉

受賞者　滝澤 昇（岡山理大・工）

第 12 回日本生物工学会功労賞受賞にあたって　A1Aa01　p. 77

〈生物工学賞〉

受賞者　浅野 泰久（富山県大・工）

微生物から動植物へと展開する酵素利用技術とその基盤開拓　A1Aa02　p. 77

〈生物工学功績賞〉

受賞者　清水 浩（阪大院・情報）

計算機工学に基づく代謝設計とその有効性の実証に関する研究　A1Aa03　p. 78

〈生物工技術賞〉

受賞者　佐藤 俊輔[1]，有川 尚志[1]，小林 新吾[1]，藤木 哲也[2]，〇松本 圭司[3]
（[1] カネカ バイオテクノロジー研究所，[2] カネカ R&D 企画部，[3] 阪大院・工）

微生物による生分解性ポリマー PHBH 製造法の開発　A1Aa04　p. 78

一般講演　（13:30 ～ 17:30）

脂質工学／食品科学，食品工学	C 会場	p. 79
抗体工学	D 会場	p. 83
ペプチド工学／核酸工学／植物細胞工学，組織培養，育種工学	E 会場	p. 86
生物化学工学／培養工学／バイオプロセス	F 会場	p. 90
遺伝子工学	G 会場	p. 95
バイオマス，資源，エネルギー工学	H 会場	p. 99
タンパク質工学	I 会場	p. 104
発酵生理学，発酵工学／代謝工学／オミクス解析	J 会場，K 会場	p. 108
バイオセンシング，分析化学／センサー，計測工学	L 会場	p. 117
酵素学，酵素工学	M 会場	p. 121
分類，系統，遺伝学／環境浄化，修復，保全技術／環境工学，廃水処理技術	N 会場	p. 126
生体医用工学／セル＆ティッシュエンジニアリング	O 会場	p. 130

A1Aa01 第 12 回日本生物工学会功労賞受賞にあたって

○滝澤 昇
（岡山理大・工）
takizawan@dac.ous.ac.jp

この度，小職の「生物工学および関連分野の JABEE 認定審査への多大な貢献」に対しまして，第 12 回生物工学功労賞を頂くこととなり，身に余る光栄と存じます．大学が社会に対して果たす役割として，教育・研究・社会貢献が 3 本の柱ではありますが，概して教育活動は研究活動と対等に評価されない傾向にあります．大学は学校教育法に定められた教育機関であり，こと工学系学科においては，高等技術者を育成するという責務を負っており，教育は第一義に位置づけられるべきものと考えます．この度の受賞では，教育面での活動に対して高く評価頂いた本学会の懐の深さに敬意を表しますと共に，ご関係の諸先生に厚く御礼申し上げます．

さて JABEE（Japan Accreditation Board for Engineering Education）についてはご存じの方も多いこととは思いますが，大学・高等専門学校の技術者教育プログラムの審査認定を行う非営利団体であり，1999 年に発足しています．審査認定を通して教育の改善を促し，教育プログラムの国際的通用性を担保することを意図し，社会の要求水準や技術者に必要な知識と能力，それを支援する教育体制などの観点から審査が行われます．JABEE はワシントン協定（Washington Accord）他に加盟していることから，認定を受けた技術者教育プログラムは国際的同等性が認められ，プログラム修了者は世界に通用する教育を受けた技術者であると認められます．また国内的には技術士の 1 次試験が免除され，4 年以上の実務経験により 2 次試験を受験することができます．技術士は国家資格であり，海外ではサイエンスにおける Ph. D に並ぶものとして認識されています．

JABEE のプログラム認定は 2001 年度から始まり，JABEE ホームページによれば，2016 年度までの認定プログラムの累計は 501，認定プログラム修了生数の累計は約 26 万人に至っているとのことです．米国の ABET(Accreditation Board for Engineering and Technology)では，ハーバードや MIT 等の著名な大学をはじめとして 776 大学において 3800 を越えるプログラムが認定を受けていますが，国内では，まだ有力大学の認定受審が多くなく，企業側の認知度も決して高いものとは言えない状況にあり，認定プログラムの数は伸び悩んでいる状況にあります．しかしながら，近年，技術士合格者に JABEE 認定プログラムを修了した若手が大きく増大しているという効果が表れてきており，高等技術者の育成に寄与していることが認められます．

JABEE の審査は，JABEE 会員である専門学協会より推薦された大学・高等専門学校の教員や技術士，企業技術者等で構成される審査チームにより実施されます．各審査員（オブザーバーを含む）は，受審校が作成した膨大な自己点検書と，その裏付け資料やデータを事前に精査し，審査項目ごとにあらかじめ認定基準を満たしているかどうかチェックを済ませたのち，実地審査において学生や教員との面談，施設や授業の視察，成績原簿や試験答案・レポート等の根拠資料の確認などを行い，JABEE の認定基準を満たしているかどうかを判断して審査結果を報告します．最終的には，この報告に基づいて JABEE において審議・認定が行われます．近年は複数プログラムの同日一斉審査がおこなわれることも多く，その場合は，複数分野の審査チーム間の審査意見の調整・判定の統一，分野を越えて共通する部分の審査，受審校との対応等を行うために，審査チームを取りまとめる団長・副団長が置かれます．時には 20 人余りの審査団が構成されることもあります．

小職は 2011 年度に生物工学分野のオブザーバーとしての参加以来，今年度に至るまで，本学会が担当する生物工学領域での審査員および審査長として 3 プログラムの審査に携りました．更に，本学会の推薦および JABEE 本部からの依頼により一斉審査の団長および副団長を 4 度務めましたが，いずれの審査においても，受審に際しての多大な労苦をいとわない受審校の技術者教育への熱意には心動かされます．審査員の活動はボランティアではありますが，審査に際しては受審校の教育プログラムや教育システムについて微に入り細に至るまで視察し教育に対する考えを伺うことができ，得られた知見や情報を本務校での教育システムやプログラム改善の糧とすることができます．これは審査員としての最高の報酬であり，多くの方に審査に携わって頂きたい所以です．

現在，大学は機関レベルで認証評価を受けることが義務化されていますが，個別の教育プログラムの認証にまでは至っていません．今後益々グローバル化が進む社会において，我が国の高等教育機関が国際的に認知されるためには，国際基準の認定を受けた教育プログラムを実践し，国際的に通用する技術者を育成，輩出していかなければなりません．ここ数年，アジア諸国において高等教育機関での技術者教育認証制度の整備が進められつつあること鑑みると，技術立国を詠う日本においても JABEE 等による教育プログラムの認証は不可欠となると考えられます．今回の受賞を励みに，微力ながら JABEE 審査活動を通して国際的に通用する優れた技術者の育成，特に生物工学分野で活躍する技術者の育成に貢献を続けていきたいと意を新たにする次第です．

Acceptance speech-Meritorious Service Award

○Noboru Takizawa
(Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

Key words engineering education, accreditation, JABEE

A1Aa02 微生物から動植物へと展開する酵素利用技術とその基盤開拓

○浅野 泰久
（富山県大・工）
asano@pu-toyama.ac.jp

我々は，微生物のみならず植物や節足動物において「アルドキシムーニトリル経路」の存在を明らかにし，それらの構造と機能の関係を解明して物質生産に利用して来た．また酵素タンパク質の構造に関する情報を，酵素遺伝子の探索から酵素の改変に至るまで積極的に取り入れ，新規酵素や機能改変酵素を用いて有用物質の合成反応を構築し，酵素の有効利用法を拡大した．このように，新しく見出した酵素群の代謝における重要性を明らかにするとともに，酵素タンパク質の構造と機能に関する知見およびその応用に関する成果を蓄積して来た．

第一に，従来，酵素の探索は，ほとんどが微生物を対象として行われてきたが，植物や節足動物（ヤスデ）に酵素探索の範囲を拡大し，特に植物および動物の「アルドキシムーニトリル経路」について遺伝子および酵素レベルで詳細に調べ，細菌との違いを明らかにした．研究開始時には，植物のニトリル代謝経路は一部解明されていたが不明な点も多く，動物のニトリル代謝経路は全く未解明であった．動植物の経路では，P450 の酵素群によってアミノ酸からニトリルあるいはシアノヒドリンが生合成されることを明らかにした．さらに，植物のみならず動物（ヤスデ）から一次構造を大きく異にする多数の新規なヒドロキシニトリルリアーゼ(HNL)類を見出し，それらの酵素化学的諸性質，立体構造および反応機構を明らかにした．特にヤスデ由来の酵素は，応用酵素一般としても著しく高い比活性（7,500U/mg）を有し，データベースからの類推もできない新しい構造であることを発見した．そして，これらの酵素が有用な(*R*)-および(*S*)-シアノヒドリン合成に有用であることを示した．このような広範囲の動植物からの酵素の発見を通して，植物および動物が今後有用酵素の新たな探索源になることを示した．

第二に，酵素の産業利用をさらに拡大するための基盤整備を目的として，新規反応の探索，タンパク質工学による産業上有用な酵素の開発，酵素的結晶変換法による物質生産技術の開発などを行った．新規反応の探索では，微生物由来のアルドキシム脱水酵素を用いて，シアン化物を使用しないエナンチオ選択的ニトリル合成反応を可能にし，同酵素が新規酵素反応として Kemp 脱離反応を触媒することを見出した．また α-アミノ ε-カプロラクタムラセマーゼにアミノ酸アミドラセミ化活性を見出し，アミノ酸アミドやアミノニトリルを原料とするダイナミックな光学分割法によって，光学活性アミノ酸の効率的な合成を可能にした．有用酵素の開発では，これまでに自然界から発見されていない酵素を，タンパク質工学を用いて作ることに挑戦し，ブタ腎臓由来の D-アミノ酸酸化酵素の変異によって，未だ自然界にその存在が認められていない，*R*-アミン酸化酵素を創製した．本変異型酵素を還元剤の共存下，ラセミ体アミンを原料にしてデラセミ化反応を行い，各種の光学活性アミンを合成した．そして本変異型酵素は，酸化的シアン化反応も触媒することから，さらに変異型酵素の X 線結晶構造解析により反応機構を明らかにして，基質特異性を拡大させる合理的変異を行った．また，ω-アミノラウリン酸，ルミクロムなど溶解度の低い化合物の酵素的結晶変換法を開発した．大環状エノンの不斉還元を可能にした．

第三に，バイオインフォマティックスの手法を，酵素の可溶性発現や酵素の探索などの研究に融合させた．現在，遺伝子組換え技術は，酵素を安価に生産することを可能にし，酵素の産業利用のために極めて重要な技術の一つとなっている．しかし，現在の技術では，封入体が形成されるなどの障害があり，しばしば酵素の実用化の律速となっている．そこで，まず，Blast 検索の結果から多数回のアライメントと解析を行うプログラムを開発した．また，植物酵素 HNL の遺伝子は大腸菌において不溶性タンパク質として発現されるが，遺伝子変異によって可溶性タンパク質として発現できることを発見した．そこで，この変異による可溶化の概念を拡張し，異種宿主で活性を持つ酵素タンパク質として発現させる一般性の高い二つの手法を見出した．第一の方法は，α-ヘリックス上のアミノ酸残基の親水性および疎水性に着目した変異導入法(α-ヘリックス法)であり，第二の方法は，アミノ酸の疎水性インデックスを加味した HiSol 値を用いてホットスポットを見出し，予想したアミノ酸に置換する手法(INTMSAlign-HiSol 法)である．これらの合理的なアミノ酸置換法による異種タンパク質の可溶性発現は，従来封入体などの形成で遅れていた酵素タンパク質の開発研究の進展を加速する技術として期待されている．また，バイオインフォマティックスの手法を用いて，ゲノム情報から α-アミノ ε-カプロラクタムラセマーゼなどを探索し，本方法で目的酵素が極めて効率的に見出せることを明らかにした．

Development of microbial, plant and animal enzymes and their basis for application

○Yasuhisa Asano
(Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

Key words aldoxime-nitrile pathway, aggregation, enzymatic conversion, bioinformatics

A1Aa03 計算機工学に基づく代謝設計とその有効性の実証に関する研究

○清水 浩
（阪大院・情報）
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

この度，栄誉ある 2018 年度生物工学功績賞を頂くこととなりました．これまで，ご指導いただいた先生方，研究室の教職員，学生諸氏に心よりお礼申し上げます．対象となりました研究概要を以下に示します．

多くの生物のゲノム情報が明らかになるとともに，生命の営みを遺伝子，タンパク質，代謝の各階層で解析する技術，遺伝子を効率よく操作する技術が急速に発展してきている．生物機能を利用した物質生産において，利用可能な資源や生産可能な物質の範囲拡大，生産収率や生産速度の向上のための育種を合理的に行う生物工学手法の確立の重要である．演者は，物質収支や反応速度論に立脚した生物化学工学の概念を細胞内代謝の解析と設計に導入し，「計算機工学に基づく代謝工学」分野の開拓を行ってきた．すなわち，微生物生産において代謝を合理的に設計する方法を開発し，その有効性を実証する代謝工学の研究を一貫して行ってきた．その研究内容は，1）代謝フラックスバランス解析による代謝設計（生産収率の最適化），2）^{13}C 代謝フラックス解析による細胞評価，3）代謝鍵反応の同定（生産性の向上）に大別することができる．

1）代謝フラックスバランス解析による代謝設計（生産収率の最適化）：細胞の代謝を多段階反応プロセスとして捉え，細胞内の代謝の流れ（フラックス）を統一的に計算機で扱えるよう情報を整理し，目的物質を高収率で生産可能な代謝経路を設計する方法を開発した．コリネ型細菌やシアノバクテリアといった重要な微生物のゲノムスケールの代謝反応モデルを構築した．このモデルを用いて，代謝フラックスバランス解析法（FBA）により環境変化，遺伝子導入・削除によってもたらされる代謝フラックスが精度よく予測できるようになった．また，大腸菌において目的物質生産収率を最大にするための多重遺伝子破壊セットの探索方法の開発を行った．さらに，従来困難であった 10 を超える多重遺伝子破壊の探索，多種の異種遺伝子の導入による生産化合物生成経路の自動設計，増殖停止期に目的物質生産を最大化する代謝設計が確立した．これらの方法は，大腸菌による 3 ヒドロキシプロピオン酸，メバロン酸，コハク酸などの生産，シアノバクテリアのエタノール生産などにおいて高生産菌を代謝設計に用いられた．また，その設計に基づいて育種された株の生産性の向上が実験的に確認された．
2）^{13}C 代謝フラックス解析による細胞評価：実際に細胞内で起こっている代謝フラックスを精度よく捉えることを目的として解析法の基盤開発を行った．この方法は，培養中に安定同位体 ^{13}C を含む栄養を細胞に取り込ませて，その同位体標識の代謝物質への蓄積量を質量分析によって解析し，微生物の代謝フラックスを解析する方法である．この方法を利用する研究者が容易に行えるようにするために安定同位体の物質収支の情報を用いたモデルの自動構築，代謝フラックス解析，統計学的評価を行えるソフト上ウェア OpenMebius が開発され，ホームページで公開されている．OpenMebius は，非定常の同位体標識データを利用することも可能となり，光合成微生物の光独立条件における代謝解析を行うことが可能となった．この方法によって，コリネ型細菌，大腸菌，シアノバクテリアなどの代謝の様態が実験的に解明されており，グルタミン酸，メバロン酸，イソプロピルアルコール，S-アデノシルメチオニン生産など，代謝解析とそれに基づく代謝改良政略立案に応用され，生産性の向上を実現することで，有効性が実証されている．また，上述の FBA 代謝設計法と組み合わせることで，有用微生物の設計と細胞評価のサイクルの加速化が実現された．
3)生産性を向上させるため代謝鍵反応の同定：目的物質の生産収率の最適化に加えて最大の生産速度をもたらす代謝系を持つ微生物の設計は非常に重要である．多数の反応が関わる代謝系では，どの反応が生産性向上をもたらす鍵反応かを同定することが容易ではない．酵素量を増減させた際に目的物質を最も感度の高く変化させる，そのような反応の同定法の理論構築，遺伝子や酵素の発現量を変動させた際の代謝フラックス解析を行って重要反応を同定する実験解析法を開発し，リジン発酵，グルタミン酸発酵の代謝制御メカニズム解析などに応用された．また，FBA で得られた代謝改変株の予測と実際の生産量の差を解消するため，実験室進化により得られた高生産変異株と親株との比較ゲノム解析により必要な変異，代謝律速点を同定，解消することで生産性向上が認められた．

微生物を育種する技術や細胞内を解析する技術の革新は目覚ましいものがあり，今後，育種のスピードや利用する遺伝子の探索範囲は加速，拡大すると考えられる．また，分析技術の革新により生命現象によりもたらされるデータも膨大なものとなるであろう．あらゆる産業分野において情報処理技術によるビッグデータの利用が注目される中，計算機工学を基盤とする育種や解析法の発展と，生物を利用した物質生産のための育種，プロセス開発への応用が期待される．

In silico Metabolic Pathway Design and Flux Analysis for Bio-Production

○Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words metabolic engineering, genome scale model (GMM), ^{13}C metabolic flux analysis, metabolic control analysis

A1Aa04 微生物による生分解性ポリマー PHBH 製造法の開発

佐藤 俊輔 [1], 有川 尚志 [1], 小林 新吾 [1], 藤木 哲也 [2], ○松本 圭司 [3]
（[1]（株）カネカ バイオテクノロジー研究所, [2]（株）カネカ R&D 企画部, [3]大阪大学 大学院工学研究科）
Keiji.Matsumoto@kaneka.co.jp

1900 年代に石油由来のプラスチックが実用化されたことによって，人々の生活は飛躍的に便利になった．例えばレジ袋，飲料ボトル，電子機器の筐体，車のパーツなどに利用され，日々，その恩恵を受け取っている．プラスチックの生産量は年々増加しており，2017 年は 3 億トン以上に達している．近年，増大する石油資源の利用に伴い，地球規模での持続可能性，気候変動抑制が問われているが，プラスチックの使用に関する規制についても活発に議論されている．株式会社カネカは，再生可能資源から，微生物発酵によってバイオポリマーを生産することで，プラスチック産業が持つ課題を解決することを目的として，研究開発を実施した．
今から 27 年も前，1991 年に，カネカ高砂工業所の土壌より，柔軟な物性を有するポリヒドロキシアルカン酸を生産する微生物を発見したことから，本研究が開始された．このポリヒドロキシカン酸は炭素数 4 のモノマーである 3-ヒドロキシブタン酸（3HB）と炭素数 6 のモノマーである 3-ヒドロキシヘキサン酸(3HHx)からなる共重合ポリエステル（PHBH）であることを明らかにし，物質特許を取得した．
現在は多くの遺伝子工学手法，ツールが開発され，研究速度は著しく向上したが，研究開発当初は今ほど遺伝子工学技術，ツールなどが発達しておらず，理化学研究所との共同研究，NEDO からの資金提供によるオープンイノベーションによる技術導入を進め，当時としては先進的な取り組みとして PHBH 生産微生物の分子育種研究を進めた．
PHBH 生産宿主としては，PHB 高蓄積菌として知られていた *Cupriavidus necator* H16 株を選択した．研究開発では迅速な分子育種が求められることから，工業生産に利用可能な安定遺伝子導入技術開発を行った．その結果，同属別種の細菌由来のプラスミド複製領域，並びに安定化因子（*par* 遺伝子群）を導入した新規プラスミドベクターの開発に成功した．本ベクターは，薬剤選択圧がなくても安定に保持されるため，各種遺伝子の機能などを迅速かつ正確に評価でき，育種速度が大きく加速された．
次に，PHBH 社会実装最大の課題であった，プラスチックとしての実用性（物性，加工性）を高めるための育種研究を実施した．プラスチックの物性はその一次構造と分子量に大きく依存する．PHBH の場合，一次構造は共重合比率（3HHx 比率）を指す．PHBH は 3HHx 比率が高くなるにつれ結晶性が低下し，柔軟な性質を示すようになる．特に，軟質性が特徴である PHBH にとっては，3HHx 比率を自在に制御する技術開発が求められた．また，樹脂強度は分子量が高くなるにつれ向上するため，成型加工後の品質を満たすことができるように PHBH 発酵終了時の分子量を高くすることも重要であった．
3HHx 組成制御技術に関しては，細胞内の代謝制御による 3HHx モノマー供給経路の強化と PHBH 重合酵素の改良の両方向から取組んだ．両技術開発ならびにそれらを組み合わせることで，各種製品に要求される柔軟性に応じた PHBH を自在に発酵生産できる菌株の育種に成功した．
分子量に関しては，PHBH 発酵工程における経時的な分子量変化に着目した．詳細検討により，細胞内での PHBH 発酵過程では PHBH が重合されるだけでなく分解も同時に起こっていることが強く示唆された．*C. necator*H16 株は 7 種類の PHA デポリメラーゼ遺伝子と 2 種類の PHA オリゴマーハイドロラーゼ遺伝子を保有している．その多くは機能未知であったため，各遺伝子を 1 つずつ破壊した株を作製し，それぞれの酵素が細胞内に蓄積された PHBH の分子量に与える影響を解析した．その結果，*phaZ6* 遺伝子破壊株においてのみ，分子量向上効果があることが明らかとなった．本検討の結果より，*phaZ6* 遺伝子が細胞内の PHBH の分子量制御において中心的な役割を果たしていることが明らかとなった．
以上のような様々な分子育種により，プラスチック材料としての実用性（物性，加工性）を満たす PHBH 発酵技術を開発したことで，実用に耐えうるバイオポリマーを工業的に，且つ，市場に受け入れられる価格にて生産することが可能となった．
当社は，JST の支援を受け，実証プラント（1,000 トン／年規模）の建設を行い，2011 年より当社高砂工業所にて PHBH（商標：カネカ生分解性ポリマー PHBH™）の製造，販売を行っている．既に多くの企業にて製品開発が進められており，複数の製品が社会実装されている．特に欧州においては，PHBH が再生可能原料から製造されることや高い生分解性を有することが高く評価され，コンポストバッグや野菜/果物袋用途などでの使用が拡大している．
更に，PHBH は元来微生物が生産する天然高分子であり，土壌やコンポスト環境のみならず，高い海洋分解性を有することが分かってきている．近年，プラスチックが断片化したマイクロプラスチックが海洋に大量に蓄積していという多数の研究報告，実地調査結果が報告され，海洋生物，海鳥などへの影響が危惧されている．PHBH は海洋で分解するプラスチック素材として，社会にソリューション提供ができると期待している．

Development of microbial production process for Biodegrable Polymer PHBH

Shunsuke Sato[1], Hisashi Arikawa[1], Shingo Kobayashi[1], Tetsuya Fujiki[2], ○Keiji Matsumoto[3]
([1]Biotechnol. Lab., KANEKA CORP., [2]Corporate R&D Planning Depertment, KANEKA CORP., [3]Grad. Sch. Eng., OSAKA Univ.)

Key words biodegradable plastic

1Cp01 ストレス状態モデル膜と低刺激性界面活性剤の相互作用

○高橋 祐菜, 辻野 義雄, 高木 昌宏, 下川 直史
（北陸先端大・マテリアル）
takagi@jaist.ac.jp

【背景・目的】低刺激性界面活性剤は化粧品などに含まれており，その細胞への刺激性を定量評価することが望まれている．生体膜と類似した組成・構造を示すリポソームを用いた先行研究によって，界面活性剤を滴下することで膜ダイナミクスを生じることや，界面活性剤の種類や濃度によって異なる膜ダイナミクスを示すことがわかっている．また，細胞は常にストレスに晒されており，代表的なストレスとして紫外線による光老化がある．そのため，通常の細胞とストレス状態の細胞では界面活性剤の刺激に対して異なる応答を示す可能性がある．よって，本研究では UV 照射したリポソーム(ストレス状態モデル膜)と UV 未処理のリポソームにおける膜ダイナミクスを比較し，低刺激性界面活性剤の見かけ上の刺激性変化を考察する．

【方法】不飽和脂質である DOPC の単分子膜を静置水和法で作成した．UV 照射には，UV-B に位置する波長 302nm を用いた．リポソーム溶液を観察用特殊チャンバーに封入し，界面活性剤を滴下して膜ダイナミクスの観察を行った．膜ダイナミクスは各 UV 処理時間・各界面活性剤において 5 回以上の観察を行い，代表的な膜ダイナミクスを決定した．

【結果・考察】UV 処理については，1～5h の処理を 1h ごとで行い，蛍光やレーザーを照射し，観察を行った結果，4,5 時間の処理を行うと揺らいでいるリポソームの増加が見られた．この膜変形は界面活性剤による変形と誤認する恐れがあるため，リポソームが変形を起こさない 1～3h の照射にすることとした．ストレス状態リポソームに低刺激性界面活性剤である Tween20 や Tween80 を滴下したところ，UV 未処理のリポソームとは異なる膜ダイナミクスが観察された．それらの変化は，紫外線によって脂質の過酸化が促進され，界面活性剤と脂質，および脂質同士の相互作用の関係性が UV 未処理のリポソームと異なると考えられる．

Deformation dynamics of stressed model biomembranes by low irritating surfactants

○Yuna Takahashi, Yoshio Tsujino, Masahiro Takagi, Naohumi Shimokawa
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

Key words liposome, UV irritation, sarfactant, peroxide

1Cp02 低刺激性界面活性剤による生体模倣膜への作用機構の解析

○佐々木 陽介, 辻野 義雄, 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】界面活性剤の応用において，人体への刺激性評価は必須である．従来，ウサギに点眼するドレイズ試験法がとられているが，動物愛護の観点，さらに動物の個体差や目視判定による差異等が問題となっている．我々は，細胞模倣膜(リポソーム)を用いた，刺激評価法の開発を行っており，高刺激性界面活性剤は，リポソームが膨張し，低刺激性界面活性剤では，リポソームが収縮する事を明らかにした．しかし，界面活性剤の構造と刺激性の関係は，解明されていない．そこで，界面活性剤が膜に与える影響について，頭部と尾部の分子量を考慮した解析を行った．
【方法】不飽和脂質 DOPC からなるリポソームを用いて，頭部と尾部の組み合わせの異なる界面活性剤ポリオキシエチレンアルキルエーテル CH3(CH2)x (OCH2CH2)y OH (x , y) = (15 , 20), (17 , 20), (21 , 5), (21 , 10), (21 , 20), (21 , 30) （x:疎水部）（y:親水部）を添加し，ダイナミクスを共焦点顕微鏡により観察し，画像処理を用いてリポソームの膨張・収縮速度の測定を行った．
【結果と考察】濃度 10 mM では，どの界面活性剤でもリポソームが破裂した．濃度 1 mM では親水部が小分子量の (x , y) = (21 , 5), (21 , 10) において，リポソームが膨張し続ける，刺激性のダイナミクスが多く観察された．(x , y) = (15 , 20), (17 , 20) においては，低刺激性ダイナミクスである収縮の後，リポソームの破裂が観察され，(x , y) = (21 , 20), (21 , 30) においては，リポソームが収縮し続けた．つまり，親水部の構造が小さいほど，刺激性が高く，尾部の構造が長いほど，刺激が弱くなると考えられた．発表では，リポソームを形成する脂質と界面活性剤の相互作用について，さらに詳細な考察を加える．

Analysis of mechanism of action on biomimetic membrane by low irritant surfactants

○Yousuke Sasaki, Yoshio Tsujino, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

Key words membrane lipids, lipid vesicle, surfactant, irritation

1Cp03 膜小胞高分泌細菌が形成する多層膜小胞の特性解析

○高木 航太郎[1], 長谷川 雄将[1], 田原 悠平[3], 新谷 政己[1],
大熊 盛也[4], 宮田 真人[3], 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, [3]阪市大院・理, [4]理研・バイオリソースセ）
tashiro.yosuke@shizuoka.ac.jp

【緒言】細菌は自身の細胞膜からリポソーム様の構造体である Membrane vesicles (MVs)を分泌している．MVs は細胞間のコミュニケーションツールや毒素の輸送体としての役割を有することから，ドラックデリバリーシステムの媒体やワクチンなどの応用が期待されている．しかしながら MVs の生産量や内包物質の封入の制御など，上記の技術的応用に向けた課題は多く残されている．我々はこれまでに高い MVs 生産能を有する非病原性細菌 *Buttiauxella agrestis* CUETM77-167 において，ペリプラズム局在タンパク質 TolB の欠失により MVs 生産量が増加することを確認した．本研究では *B. agrestis* Δ*tolB* 由来の MVs の特性ならびに物質輸送媒体としての機能の解析を行った．
【方法・結果】*B. agrestis* Δ*tolB* 培養上清より回収した MVs (Δ*tolB*-MVs)の電子顕微鏡観察を行ったところ，粒径 50 nm 程度の粒子と粒径 100-300 nm 程度で内腔に複雑な多層構造を有した特徴的な球状構造体が多く確認された．また Δ*tolB*-MVs を超遠心分離 (100,000 × *g*, 4 ℃, 120 min)により沈降させると，形質の異なる 2 層のペレットに分離された．上層の半透明でゼラチン質のペレット，下層の白色で固体状のペレットをそれぞれ t-MVs, w-MVs とし，動的光散乱法による粒径測定を行った．その結果 t-MVs は 50-80 nm 程度の粒径であったのに対し w-MVs は粒径 120 nm 前後であったことから，電子顕微鏡観察で見られた 50 nm 程度の粒子が t-MVs であり，100-300 nm 程度の多層構造を有するものが w-MVs であるものと考えられた．多層構造を有する w-MVs には内膜ならびに細胞質成分が封入されていると推察されたため，PicoGreen により各 MVs における二本鎖 DNA の含有量を測定したところ，w-MVs に高濃度の DNA が検出された．以上のことから，Δ*tolB* は野生株とは異なり細胞質成分を多く含む多層構造の MVs を形成することが示された．

Characterization of multi-lamellar membrane vesicles produced by a hyper vesicle-secreting bacterium

○Kotaro Takaki[1], Yusuke Hasegawa[1], Yuhei Tahara[3], Masaki Shintani[1],
Moriya Ohkuma[4], Makoto Miyata[3], Hiroyuki Futamata[1,2], Yosuke Tashiro[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [4]BRC, RIKEN)

Key words membrane vesicles, multilamellar vesicles, *tolB*

1Cp04 大腸菌の細胞表層改変による外膜小胞大量分泌株の構築

○澤邊 朋美, 児波 克哉, 尾島 由紘, 東 雅之
（阪市大院・工）
ojima@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

【背景と目的】大腸菌の外膜小胞(OMVs)は外膜の一部が隆起することで遊離する細胞外小胞で，近年ナノキャリアやワクチンなど，その利用法が盛んに研究されている．我々は，OMVs がペリプラズム内の成分を包んで遊離する特性に注目し，タンパク質の新たな分泌生産ツールとしての利用を検討している．さらにモデル生産系として，外膜タンパク質 OmpW と GFP を融合発現し，内部に組換えタンパク質を包括した状態で OMVs を産出させたが，分泌量は少なく，実用化に向けた障害となっていた．本研究では，OMVs の産生量が向上した株を構築することで，タンパク質の分泌生産量を増加させることを目的とした．
【方法と結果】現在，欠損により OMVs 産生量が向上する細胞表層関連遺伝子が幾つか知られている．本研究では，P1 ファージを用いた形質導入法 1)を用い，*nlpI*, *degP*, *yrbE*, *vacJ* の欠損を組み合わせた二重欠損株を作製した．OMVs は，100 mL の LB 培地で培養後，フィルター濾過した上清を超遠心分離(109,000 ×*g*, 1 h)することにより回収した．OMVs 産生量は，SDS-PAGE 後の OMVs に多く含まれる外膜タンパク質 OmpA (35 kDa)と OmpC/F (37 kDa)のバンド強度から定量的に評価した．タンパク質生産は，ウエスタンブロットでの OmpW と GFP の融合タンパク質のバンド強度から評価した．複数の二重欠損株を評価した結果，OMVs 産出量は *nlpI* と *yrbE* を欠損させた株が最も高く，WT の約 30 倍となり，単独欠損株と比べても大幅に増加した．また，構築した遺伝子組換え株に OmpW と GFP を融合発現させたところ，OMVs 産生量と同様に，*nlpI* と *yrbE* の二重欠損株が最も多くの融合タンパク質を分泌し，約 3.3 mg/L となった．
1) Daisuke K., *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol., 93, 815-829 (2012).

Construction of the hyper-vesiculation strains by modifying the cell surface of *Escherichia coli*

○Tomomi Sawabe, Katsuya Konami, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words *Escherichia coli*, outer membrane vesicles, secretory expression, protein production

1Cp05 酢酸菌由来外膜小胞の収量改善の検討

○橋本 雅仁, 松元 太一, 中村 佳祐, 大薗 まみ, 橋口 周平
（鹿児島大・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，酢酸菌が OMV を分泌し，それが免疫系を刺激しうることを明らかにした．しかしその収量は少なく，詳細な免疫学的性質の解析が困難であった．そこで，OMV 収量の増加を目指して培養条件や分離方法について検討した．まず酢酸菌の培養条件を検討した．従来使用していた 804 培地にエタノールまたはマイトマイシンを添加して培養したところ，後者の場合に OMV の分泌量が大きく増加することがわかった．またこの際は，菌表面が大きく損傷しており，バクテリオファージ様の構造体も観察されているため，溶菌による影響であると考えられた．ついで OMV の分離・精製法として，硫安沈殿法とゲル濾過について検討した．まず硫酸アンモニウムの濃度について検討したところ，60%以上の濃度で OMV が効率よく沈殿することがわかった．しかし，70%では多くの夾雑物が共沈することから 60%が最適であることがわかった．ついで，ゲル濾過カラムについて検討したところ，Sephacryl S-500 カラムにて精製が可能であることがわかった．以上の検討の結果，従来の分離法に比べて数倍の収量で OMV を得ることが可能となった．

Improvement of outer membrane vesicles production from acetic acid bacteria

○Masahito Hashimoto, Taichi Matsumoto, Keisuke Nakamura, Mami Ozono, Shuhei Hashiguchi
(Sci. & Eng. Area, Kagoshima Univ.)

Key words acetic acid, outer membrane vesicles, lipopolysaccharide

1Cp06 *Lactobacillus sakei* 由来メンブランベシクルを介する IgA 産生促進作用の解析

○三好 柚紀[1], 山崎 思乃[2], 中山 知哉[2], 國澤 純[3], 片倉 啓雄[2]
（[1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工, [3]医薬基盤・健康・栄養研）
shino.ya@kansai-u.ac.jp

【背景と目的】細菌が産生するメンブランベシクル（MV）と呼ばれる膜小胞は，タンパク質や核酸，細胞壁成分，シグナル物質などを含み，病原因子の送達やクオラムセンシングに関わるほか，宿主の免疫調節機能に影響することが報告されている．しかし，MV 研究はグラム陰性菌や病原性のグラム陽性菌に関するものが多く，プロバイオティクスである乳酸菌の MV 産生については未知の部分が多い．そこで本研究では，免疫調節作用を有する乳酸菌 *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* NBRC 15893 からの MV 産生を検証すると共に，MV の IgA 産生促進作用を解析した．
【方法】 *L. sakei* NBRC 15893 は MRS 培地で静置培養した．遠心分離（8,500×*g*, 5 min, 4℃）で菌体を除去した上清を 0.45 μm 孔フィルターでろ過し，超遠心分離（100,000×*g*, 1 h, 4℃）により難沈降性画分を回収した．さらに，OptiPrep を用いた密度勾配超遠心分離（100,000×*g*, 6 h, 4℃）を行い，生じた茶色のバンドを MV 画分として回収した．IgA 産生促進作用は，マウスパイエル板細胞に各画分を添加して 4 日間培養した後，上清中の IgA 産生量を ELISA 法で定量し評価した．
【結果と考察】MV 画分を透過型電子顕微鏡で観察したところ，直径 70～300 nm の球状構造物が確認され，本菌株が MV を産生することが示された．また，MV 画分はマウスパイエル板細胞からの IgA 産生を有意に増加させた．乳酸菌の免疫調節作用の多くは，グラム陽性菌の細胞壁成分をリガンドとする Toll 様受容体（TLR）2 を介してもたらされることから，MV による IgA 産生促進に対する抗 TLR2 抗体の影響を検証した．その結果，MV の添加による IgA 産生量の増加は，抗 TLR2 抗体により完全に抑制された．以上より，*L. sakei* NBRC 15893 は IgA 産生促進作用を有する MV を産生し，MV による IgA 産生は MV 中に含まれる細胞壁成分によってもたらされる可能性が示された．

Analysis of IgA-enhancing effect via membrane vesicles derived from *Lactobacillus sakei*

○Yuki Miyoshi[1], Shino Yamasaki-Yashiki[2], Tomoya Nakayama[2], Jun Kunisawa[3], Yoshio Katakura[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [3]NIBIOHN)

Key words lactic acid bacteria, membrane vesicle, IgA-enhancing effect, *Lactobacillus sakei*

1Cp07 Culturomics によるヒト腸内細菌の網羅的な分離方法の検討

○山副 敦司, 島村 麻美子, 三浦 隆匡, 古川 雅崇, 内野 佳仁, 川﨑 浩子
（NITE・NBRC）
yamazoe-atsushi@nite.go.jp

【背景と目的】近年，ヒトマイクロバイオームのヘルスケア産業への活用が関心を集めている．産業化に向けて腸内細菌と人の健康との因果関係を特定することが必要であるが，腸内細菌の大部分は未分離または未整備であることが課題である．そこで，NITE・NBRC では腸内細菌の収集提供に向け，様々な培養方法を用いた網羅的な腸内細菌の分離法（Culturomics）について検討した．
【方法】ヒト糞便から腸内細菌の分離は，変法 GAM や BHI 等の複数培地の使用，抗生物質や胆汁酸等の添加および加熱処理等を組み合わせた条件で集積培養を行った後に，希釈平板培養によりコロニーを分離した．分離株の同定は MALDI-TOF MS および 16S rRNA 遺伝子配列の解析により行った．
【結果および考察】25 通りの条件で集積培養を行い，新種候補株を含む 26 属 35 種に同定される 1100 株以上の細菌を分離した．*Eggerthella lenta*, *Bacteroides uniformis*, および *Hungatella hathewayi* については複数の培養条件から高頻度に単離された．一方で，ヒト腸内での優先種（*Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Collinsella aerofaciens*, *Coprococcus comes*）を含むほとんどの種は限られた条件でしか分離されなかった．各培養条件により分離される腸内細菌は異なることから，網羅的な分離を行うには複数の培養条件を用いる必要があるが，変法 GAM を培地として抗生物質の添加等による集積培養を組み合わせることで，腸内細菌を効率的に分離できることが明らかになった．本発表では，各培養条件における分離結果に加え，効率的に腸内細菌を分離する方法について紹介する．なお，本研究で分離した菌株は，NBRC より提供を行う予定である．

Culturomics for extensively culturing anaerobes from human feces

○Atsushi Yamazoe, Mamiko Shimamura, Takamasa Miura, Masataka Furukawa, Yoshihito Uchino, Hiroko Kawasaki
(NBRC, NITE)

Key words Culturomics, gut microbiome, MALDI-TOF MS, isolation

1Cp08 グリコシルセラミドの腸内細菌への影響解析

○北島 悠花[1], 佐藤 友哉[1], 宮川 幸[1], 阪本 真由子[1], 許 志豪[1], 中山 二郎[2], 北垣 浩志[1]
（[1]佐賀大・農, [2]九大院・農）
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

伝統発酵食品には整腸効果があると考えられているが，その機構はわかっていなかった．当研究室では，みそや甘酒など日本伝統の発酵食品に広く用いられる麹に着目し，麹中にセラミドと糖が結合した構造を持つグリコシルセラミド（以下 GC）が他の食品に比べ高濃度に含まれること，更にその GC が大腸に到達し腸内改善効果を発揮することを発見した[1]．しかし，GC が腸内細菌に与える影響に関しては，まだほとんど明らかになっていない．一方で，西洋型の高脂肪な食事により分泌が増加する胆汁酸は腸内細菌叢へダメージを与えることが報告されている．そこで本研究では胆汁酸の腸内細菌へのダメージを GC が緩和するとの仮説を立て，代表的な植物 GC である大豆 GC が腸内細菌に胆汁酸耐性を賦与するかを検証し，GC の腸内細菌への新たな機能性を解明することを試みた．
【方法】コール酸 Na 濃度 0～15 mM に調製した 702 培地に *Sphingobacterium spiritivorum*, *Sphingobacterium composti*, *Sphingobacterium feacium*, *Sphingobium japonicum*, *Sphingomonas asaccharolytica* を接種し，初期菌体濃度を OD_{600} = 0.05 に調整後，30℃で培養し，24 時間後の OD_{600} を測定した．コール酸濃度 0mM の OD 値を基準に，生育が 50%となる濃度をコール酸 Na の IC_{50} とした．次に，上記と同条件に調製した培地に，大豆 GC を 20μg/mL または 40μg/mL になるように加えて培養し，IC_{50} の推移を比較した．
【結果・考察】 大豆 GC を加えて培養したところ，*S.asaccharolytica* の大豆 GC 濃度 20 μg/mL 群において，Ctrl 群と比較して有意に生育が向上した(p=0.03)．他の菌体では，差は有意ではなかったが，生育が向上する傾向が観察された．以上の結果は，GC が腸内細菌の胆汁酸ストレスを緩和する可能性を示し，大豆や麹を含む発酵伝統食品が腸内環境維持に寄与することを示唆した．
1)SpringerPlus, 5, 1321 (201)

Influence of Glycosylceramide on the intestinal bacteria

○Yuka Kitajima[1], Tomoya Satou[1], Miyuki Miyagawa[1], Mayuko Sakamoto[1], Chihhao Hsu[1], Jiro Nakayama[2], Hiroshi Kitagaki[1]
([1]Fac. Agric., Saga Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words Glycosylceramide, Bile acid, microorganisms

1Cp09 腸内細菌と食物繊維の接着現象の解析

○谷口 茉莉亜[1], 倉光 香奈[1], 山崎 思乃[2], 片倉 啓雄[2]
（[1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工）
katakura@kansai-u.ac.jp

【背景と目的】腸内細菌は，腸管を覆うムチンの糖鎖などを認識して接着・定着すると考えられている．しかし，腸内には食物繊維も存在しており，これまで当研究室では乳酸菌の表層タンパク質がマンナンなどの食物繊維にも接着することを明らかにしている．これは，乳酸菌が食物繊維に接着すれば蠕動運動により体外に排出される可能性を示すことから，微生物の腸管への接着機構を明らかにするには，食物繊維を含めた 3 者の相互作用を考える必要がある．そこでまず，腸内に存在する乳酸菌，ビフィズス菌，大腸菌の食物繊維に対する接着率を評価するとともに，接着率に対する pH とイオン強度の影響を検討した．
【方法】乳酸菌およびビフィズス菌は MRS 培地，大腸菌は LB 培地を用いて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）およびキチンパウダー（Wako）を pH 7.0 および 5.0 の 0.15 M NaCl 含有クエン酸リン酸緩衝液で 30 mg/ml に懸濁し，菌体懸濁液と 6 rpm，10 分間，37℃で混合した．500×*g*，10 秒の遠心後，5 分間静置し，懸濁液上部の OD_{660} を測定することで，腸内細菌の食物繊維に対する接着率を算出した．
【結果と考察】16 種の細菌の食物繊維に対する接着率を調べた結果，セルロースおよびキチンの両方，セルロースのみ，キチンのみに接着する株，セルロースおよびキチンのいずれにも接着しない株に分類された（各 7, 2, 4, 3 菌株）．また，ほとんどの菌株において pH 5.0 の方が接着率は高くなった．さらに，食物繊維に対する接着率がイオン強度にも影響されたことから，接着には疎水性相互作用と静電的作用の関与が示唆された．現在，腸内細菌と食物繊維の接着機構を明らかにするため，接着因子となる菌体表層タンパク質等の同定を進めている．

Analysis of adhesion of intestinal bacteria to dietary fibers

○Maria Taniguchi[1], Kana Kuramitsu[1], Shino Yamasaki-Yashiki[2], Yoshio Katakura[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words intestinal bacteria, adhesion, cellulose, chitin

1Cp10 腸内細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* による食物繊維の資化性に関する研究

篠原 涼平[1], 古根 隆広[2], ○生田 直子[1], 佐々木 大介[3], 佐々木 建吾[3], 福田 伊津子[4], 大澤 朗[4], 坂本 憲広[1]
（[1]神戸大院・医, [2]シクロケムバイオ, [3]神戸大院・科技イノベ, [4]神戸大院・農）
naoko.ikuta@people.kobe-u.ac.jp

【目的】我々はこれまでに培養系ヒト腸内細菌叢モデル(Kobe University Human Intestinal Microbiota Model [KUHIMM])を利用した *in vitro* 試験および健常人におけるヒト介入試験を行い，種々の食物繊維が腸内の細菌叢およびその代謝プロファイルに及ぼす影響を評価してきた．これらの先行研究において食物繊維は個人ごとに異なる Bacteroidetes 門細菌を増加させたが，その詳しいメカニズムについては明らかになっていない．そこで本研究では，ヒトの腸内における最優勢菌のひとつである *B. thetaiotaomicron* を使用して，単菌による種々の食物繊維の資化性について評価した．
【方法】糖を含まない液体培地で培養した *B. thetaiotaomicron* に，糖源としてグルコース，難消化性デキストリン，α-シクロデキストリン，デキストランを 0.5%添加して嫌気培養し，24 時間後まで経時的に培養液の濁度を測定した．また，24 時間培養後の菌数および培養液中の短鎖脂肪酸濃度を測定した．
【結果】24 時間後の濁度はグルコース添加時が最も高く，次いでデキストラン，α-シクロデキストリン，難消化性デキストリンの順であった．一方，菌数は，難消化性デキストリン，α-シクロデキストリン，グルコース，デキストランの順で多かった．また，短鎖脂肪酸などの有機酸（SCFAs；酢酸，コハク酸，プロピオン酸，酪酸，乳酸）分析の結果，添加した食物繊維の種類によって，培養液中の SCFAs 濃度が異なることが分かった．これらの実験結果から，食物繊維の種類によって *B. thetaiotaomicron* の資化性が異なることが示唆された．さらに，培養液中の食物繊維の残存量を測定し，食物繊維の構造と関連付けて資化性を評価したのでそれらについても併せて報告する．

Effect of dietary fibers on the production and utilization of short chain fatty acids by *B. thetaiotaomicron*

Ryohei Shinohara[1], Takahiro Furune[2], ○Naoko Ikuta[1], Daisuke Sasaki[3], Kengo Sasaki[3], Itsuko Fukuda[4], Ro Osawa[4], Norihiro Sakamoto[1]
([1]Grad. Sch. Med., Kobe Univ., [2]Cyclochem Bio Co., Ltd., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [4]Grad. Sch. Agric., Kobe Univ)

Key words microbial flora, dietary fiber, Bacteroides, intestinal microbiota

1Cp11 *in vitro* 培養系ヒト腸内細菌叢モデル（KUHIMM）を用いた難消化性食物繊維の影響評価

○佐々木 大介[1], 佐々木 建吾[1], 生田 直子[2], 福田 伊津子[3], 近藤 昭彦[1], 大澤 朗[3]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大院・医, [3]神戸大院・農）
daisuke@port.kobe-u.ac.jp

【目的】難消化性食物繊維は，胃や小腸で分解・吸収されずに大腸まで届き，腸内細菌による分解を受けることで宿主への様々な健康効果が期待されている．これまでの各種食物繊維の機能性評価は，多量摂取による動物給餌試験やヒト介入試験が行われており，現実的な影響との齟齬が指摘されていた．この問題を解消すべく，我々は *in vitro* 培養系ヒト腸内細菌叢モデル(Kobe University Human Intestinal Microbiota Model [KUHIMM])と呼ばれる大腸細菌群の菌数・菌種の保持および短鎖脂肪酸(SCFAs)濃度のバランスを再現できるシステムを構築し，成果を報告している．本研究は，実際に無理のない摂取量を 6 g/日(1 日 3-L の食物摂取と仮定すると 0.2%に相当)とし，種々の食物繊維の摂取による菌叢および代謝プロファイルへの影響評価を目的とした．
【方法】健常人の便検体を接種源とし，構造の異なる食物繊維を 0.2%添加・非添加でそれぞれ 30 時間の培養を行い，SCFAs を測定するとともにメタ 16S 解析を行った．さらに KUHIMM の結果をヒト介入試験(6 g/日摂取)の結果と比較するため，便中の菌叢構造を解析した．
【結果】食物繊維の種類よって培養後期に特異的な pH の低下が観察され，難消化成分の分解を示すと予測された．菌叢を非添加時と比較したところ，被験者全体の統計解析からは有意に増加する菌種は検出されなかった．またヒト介入試験においても，1 週間の難消化成分の摂取では腸内細菌叢に大きな変化は起きなかった．しかしながら KUHIMM では，SCFAs の中でも特に酢酸とプロピオン酸濃度に有意な上昇が検出された．したがって 6 g/日という無理のない摂取量は，腸内細菌叢を劇的に変化させるには至らないが，代謝の活性化による SCFAs の増産が起こることを示唆した．KUHIMM は，機能性食品が持つヒトの健康に対する影響予測，つまりプレ評価技術としての有用性を示した．

Effects of Indigestible Dietary Fibers on Human Colonic Microbiota Simulated in a Single-Batch Fermentation System

○Daisuke Sasaki[1], Kengo Sasaki[1], Naoko Ikuta[2], Itsuko Fukuda[3], Akihiko Kondo[1], Ro Osawa[3]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Med., Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Agric., Kobe Univ.)

Key words microflora, indigestible dietary fiber, human colon, *in vitro* model

1Cp12 *In vitro* 培養系ヒト腸内細菌叢モデルによる潰瘍性大腸炎患者の代謝プロファイル異常の検出

○佐々木 建吾[1], 井上 潤[2], 星 奈美子[2], 佐々木 大介[1], 福田 伊津子[3], 近藤 昭彦[1], 大澤 朗[3]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大院・医, [3]神戸大院・農）
sikengo@people.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】潰瘍性大腸炎は大腸の粘膜に炎症ができる病気であり，欧米のみならず日本でも患者数が増加してきているが，根治的治療法は確立されていない．発症には環境要因や遺伝的要因が関わっているとされているが，腸内細菌叢の乱れが関連している事が近年，注目されてきている．一方，腸内細菌叢に関する評価は動物給餌試験やヒト介入試験による *in vivo* 系で行われてきたが，コストや倫理的制限の問題点が存在する．そこで我々は *in vitro* 培養系ヒト腸内細菌叢モデル(Kobe University Human Intestinal Microbiota Model [KUHIMM])を構築して，1000 種に及ぶ細菌種の保持や臨床検体（ヒト糞便）中の酢酸・プロピオン酸・酪酸の組成すなわち代謝プロファイルの近似を可能とし，既知のプレバイオティクスへの *Bifidobacterium* 属の応答を評価できる事を報告している[1]．しかし，潰瘍性大腸炎患者の代謝プロファイルの再現は困難とされていた．そこで，本研究では KUHIMM にて潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢を模した上でその代謝プロファイルについて検証する事を目的とした．
【方法・結果】KUHIMM に潰瘍性大腸炎患者および健常人の，それぞれ 13 人ずつの臨床検体を投入して 37℃で培養した．培養開始後 24 時間以降には菌量や細菌種の構成は定常に達しつつあったために，培養時間は 30 時間を採用した．．臨床検体および培養液中より DNA を抽出し，メタ 16S 解析を行った結果，943～1143 種の細菌配列が得られた．また，臨床検体および培養液中においてα多様性について差は認められず，細菌種数や多様性については再現できたと考えられた. 興味深い事に, 潰瘍性大腸炎患者では健常人と比べて KUHIMM での酪酸生成濃度が減少していた．本発表では，本モデルの潰瘍性大腸炎患者の腸内環境の評価ツールとしての可能性について論じる．
1) 2016 年度日本生物工学会

Abnormal metabolic profile of ulcerative colitis patients ascertained in *in vitro* human colonic microbiota model

○Kengo Sasaki[1], Jun Inoue[2], Namiko Hoshi[2], Daisuke Sasaki[1], Itsuko Fukuda[3], Akihiko Kondou[1], Rou Osawa[3]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Med., Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Agric., Kobe Univ.)

Key words microbial flora, ulcerative colitis, human colon, *in vitro* model

1Cp13 *Lactobacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシン生合成関連遺伝子の解析

○河原 あい [1], 善藤 威史 [2], 松崎 弘美 [1,3]
（[1]熊本県大院・環境共生, [2]九大院・農, [3]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，その安全性の高さから天然の食品保存料として期待されている．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構造遺伝子を含む生合成関連遺伝子の同定と解析を行うことを目的とした．【方法および結果】*L. plantarum* PUK6 の培養液上清から硫安沈殿，透析，Sep-Pak Plus tC_{18} および逆相 HPLC を行ってバクテリオシンを精製した．HPLC で抗菌活性を示すピークのアミノ酸配分析を行った結果，既知のバクテリオシンである 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．その結果，plantaricin A, NC8 および EF の構造遺伝子を見出し，*plnNC8βα, 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生合成関連遺伝子は，*L. plantarum* の一部の株と同様の遺伝子クラスターを有していると考えられた [1]．そこで，これらのゲノム情報を参考に複数のプライマーを設計し, PUK6 株ゲノム DNA の PCR クローニングおよび primer walking により，PUK6 株の plantaricin 生合成関連遺伝子群 *pln* locus（約 17 kb）の全塩基配列を決定した．現在，生合成関連遺伝子について機能解析を進めている．

1) Tsapieva, A. et al., Benef. Microbes, 2, 255-261 (2011)

Identification and analysis of the biosynthesis genes of the multiple bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* PUK6

○Ai Kawahara[1], Takeshi Zendo[2], Hiromi Matsusaki[1,3]
([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Agric., Kyushu Univ., [3]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

Key words bacteriocin, *Lactobacillus plantarum*, lactic acid bacteria

1Cp14 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YM41 株の保持するキラー遺伝子の取得 ~第二報~

○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．これらのうち 2.0 k b p 断片の塩基配列を基にゲノムウォーキングを行い，KP41 遺伝子のオープンリーディングフレームの存在について調査した．

Second report: 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

1Cp15 梨幼果抽出液添加による出芽酵母の寿命延長に関与する遺伝子

○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], 村田 和加恵 [1]
（[1]米子高専・物質, [2]阪市大院・理, [3]阪市大・健康研セ）
murata@yonago-k.ac.jp

近年，日本社会の高齢化や健康ブームなどと相まって，寿命を延ばしたいという意識が高まりつつある．昨今の研究において，寿命の決定機構はヒトから酵母まで共通性があると指摘されている．寿命に関する研究は多岐に渡り，そのひとつに寿命延長物質の付与がある．本研究では，細胞レベルでの寿命・老化研究に適したモデル生物である出芽酵母を用いて，梨幼果抽出液添加による寿命延長，特に経時寿命に着目して研究を行った．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，具体的な実験手法として，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. また，梨成分が酵母のどの遺伝子を活性化させているのか調べるため RT-PCR も行った．実験の結果，寿命延長効果の観察において，梨成熟果抽出液を与えた酵母と無添加の酵母の間で生存率に差は見られなかったが，梨幼果抽出液を与えた酵母は与えていないものと比べ生存率が高いという結果が得られた．RT-PCR において，9 つの遺伝子を用いて実験を行ったところ，*VHR1* において未処理の酵母に比べ梨幼果抽出液を添加した酵母では mRNA の転写量の増加が観察された．この *VHR1* は欠失株において寿命の短縮が報告されている遺伝子である. 以上の結果から, 梨幼果抽出液による寿命延長には *VHR1* が関与しているのではないかと考えられる．

Some genes involving lifespan elongation of budding yeast to which young asian pear fruit extract was added.

○Marina Hasegawa[1], Seiru Sakasegawa[1], Akira Ogita[2,3], Ken-ichi Fujita[2], Toshio Tanaka[2], Wakae Murata[1]
([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

1Cp16 リンゴ細胞壁可溶化とセラミド濃縮

○笠井 尚哉 [1], 是常 友紀 [1], 向井 克之 [2], 松山 彰収 [2]
（[1]阪府大院・生環科, [2]株式会社 ダイセル）
kasai@biochem.osakafu-u.ac.jp

[目的] リンゴは世界中で食される重要な果物である．その多くは果実，リンゴ果汁・シダーあるいはリンゴジャムとして，またリンゴ果汁よりはその香気とペクチンがエタノールで抽出・分別沈殿されて食品産業で広範囲に利用されている．しかしながら，その残渣物であるリンゴ粕は，リンゴ細胞壁は，その酵素分解が難しいとされ，その有効利用も難しいとされており，その大半がリンゴパルプとして飼料として利用される あるいは廃棄されるほかは有効利用されていない．しかし，その一方でリンゴは一般的な植物に比較して当該細胞壁にリンゴ-グルコシルセラミド（A-GC）が豊富に存在するとされ，約 2 倍強程度含有されると報告され，その展開が期待される．リンゴ細胞壁の可溶化は困難とされ，しかもその A-GC の存在場所や形態は細胞壁全体なのか否かなどについて明らかにされていない．

[方法と結果] そこでリンゴ粕の効果的な高度可溶化を検討し，また，各可溶化物において A-GC の有無・所在や形態を明らかにすると共に，その効果的な製造法を以下検討した．リンゴ細胞壁の一次細胞壁，二次細胞壁の可溶化を顕微鏡で観察しながら酵素分解・処理法の検討を行ない，A-GC 酵素分解の可能性，A-GC の各可溶化物中における存在確認は既報の TLC を用い，標品はトウモロコシ・小麦由来グルコシルセラミドと比較した．また GC 同定は TLC 及び MS にて同定した．本方法により濃縮物として約 50 倍程度の A-GC 濃縮が可能であり，リンゴ果汁粕の高度酵素可溶化と A-GC の簡易な調製とこれらの利用が期待される．

Apple pomace high-digestion and isolation of the glycosyl-ceramide

○Naoya Kasai[1], Yuki Koretsune[1], Katsuyuki Mukai[2], Akinobu Matsuyama[2]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Daicel Corporation)

Key words apple, ceramide, cell wall degradation, cellulase

1Cp17 コーヒー豆におけるアラビノガラクタンプロテイン分解酵素とセルラーゼの併用効果

○柴田 晃, 松野 善治, 山田 みなみ, 笠井 尚哉
（阪府大院・生環科）
kasai@biochem.osakafu-u.ac.jp

[目的] コーヒー豆はコーヒーとして世界的に飲用されている重要な嗜好飲用原料である．コーヒー豆はガラクトマンナン(GM)のほかに主としてアラビノガラクタンプロテイン(AGP)，セルロースから構成されるが，非常に堅く酵素分解が困難な豆である．またコーヒー豆の直接焙煎が一般的な方法であるが，容易な糖化が可能であれば，新しい焙煎法や食品加工などへの展開も考えられる．本研究グループにおいては，現在までに選抜セルラーゼにおける GM によく作用するマンナナーゼやグルカナーゼを見いだし，当該酵素分解においては AGP がセルラーゼ類を妨害している主因と考え，AGP 低分子化酵素さえあれば容易に酵素分解できると考え，AGP 低分子化酵素についても研究してきた．今回の発表では，この AGP 低分子化分解酵素とセルラーゼ併用によるコーヒー豆の高度分解可溶化と本結果を用いたコーヒー酸（CA），カフェイン(CF)の定量化改善やボディ可溶化についても検討した．
[方法と結果] コーヒー豆はブラジル産サントスを用いた．AGP 分解低分子化酵素は，別途，脱脂粉砕コーヒー豆からアルカリ処理とセルラーゼ処理によりコーヒー AGP を調製し，これを用いた AGP 低分子化酵素を培養上清として得た．コーヒー豆の酵素分解においては，生豆を熱水処理し，ポリフェノールオキシダーゼを失活させてから，コーヒー豆切片に AGP 低分子化酵素を作用させ，その AGP 分解をヤリプ試薬染色陰性化にて確認した．また，セルラーゼとの併用による酵素選抜並びに，両酵素組み合わせによる一段階酵素処理法による最適化検討を行い，酢酸緩衝液 pH 5.8，30℃においてコーヒー切片可溶化をした．その結果，数種の有効な組み合わせが得られた．また，コーヒー豆酵素可溶化による CA，CF の抽出定量化改善は認められなかった．

Effective co-digestion of arabinogalactan-protein degrading enzyme and cellulases of coffee beans

○Akira Shibata, Yoshiharu Mastuno, Minami Yamada, Naoya Kasai
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words coffee, protease, cellulase, cell wall degradation

1Cp18 茶殻における細胞内顆粒組織の酵素分解

○中嶋 優里, 花崎 麻由, 笠井 尚哉
（阪府大院・生環科）
kasai@biochem.osakafu-u.ac.jp

[目的] 茶葉は緑茶や紅茶として世界的に飲用されている．我が国においても特に昨今では緑茶飲用の増大に伴い，その残渣，すなわち茶殻が副産物として大きな食品残渣となりつつある．茶殻の処理においては，ほとんど行われておらず，キノコ菌床への利用が試み，あるいは，バイオガス化なども試みられているが，未だ十分ではなく，その有効利用は，ほとんど知られていない．またその酵素分解においても充分検討されていない．これらの一因としては，茶葉の組織構造の検討や組織ごとの可溶化酵素が充分に検討されていないためと考えられる．特に，茶葉においても醤油粕や他植物同様に細胞壁組織のほかに細胞内顆粒が多く含まれることが問題と考えられる．
そこで，茶葉のセルラーゼ可溶化処理で残る残渣のうち，茶葉葉脈以外の組織について，その分離と構成物同定及び酵素分解に有効なプロテアーゼについて検討した．

[方法と結果] 茶葉を常法通り，95℃熱湯で抽出し，緑茶成分を除去したのち，残渣を回収し，乾燥させて試料とした．セルラーゼ処理においては，オートクレーブ処理，処理濃度について検討した．セルラーゼ処理物においては市販キッチン用不織布にて葉脈部分を濾別したのち，通過分を回収し顕微鏡観察した．またこの残渣について染色，構成成分について検討を行い，各種プロテアーゼとダイズ構造体可溶化選抜麹菌培養上清を用いて酵素分解を試みた．その結果，濾過物は細胞内顆粒と考えられ，Asp. niger 由来プロテアーゼ処理により分解細分化とアミノ基の増加が認められた．

Investigation and the enzymatic digestion of inner cell body of tea leaf residues

○Yuri Nakajima, Mayu Hanasaki, Naoya Kasai
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words cellulase, protease, waste, tea leaf

1Dp01 N 末端 SKIK ペプチドによるモノクローナル抗体生産量増大と機構解明

○加藤 晃代 [1,3], 田村 廣人 [2], 中野 秀雄 [1,3]
（[1]iBody（株）, [2]名城大院・農, [3]名大院・生命農学）
kato.teruyo@ibody.co.jp

【【背景と目的】
モノクローナル抗体(mAb)は，ライフサイエンス研究・産業に必須なツールであり需要が拡大している．そのため，大腸菌や酵母で mAb を低コストで生産するための技術開発は重要である．我々のグループでは，難発現タンパク質の N 末端に 4 アミノ酸から成る SKIK ペプチドタグ配列を付加することにより，タンパク質発現量を増大可能であることを見出し，応用技術を開発してきた．そこで，本講演では，1) IgG の生産， 2) 小麦無細胞タンパク質合成系における SKIK ペプチドタグの影響，および 3) SKIK ペプチドタグの転写・翻訳に与える影響解析について，これまでに得られた結果を発表する．
【方法・結果】
1) IgG の生産
ペプチドタグの有無でマウス由来の IgG 遺伝子を大腸菌無細胞タンパク質合成系で発現させた．その結果，タグ無しでは発現量が少なく，ELISA による抗体活性が認められなかった．一方，タグを付加した IgG では優位に発現量が高く，結合活性を有していた．
2) 小麦胚芽無細胞タンパク質合成系における SKIK ペプチドタグの影響
マウス由来 IgG およびウサギ mAb 遺伝子を用い，植物の翻訳系である小麦胚芽抽出液におけるタグの効果を検討した．タグの有無に加え，翻訳促進効果が報告されている 2 種類の非翻訳領域配列を挿入した，6 パターンの mRNA を作製し，翻訳反応を行った．その結果，いずれの非翻訳領域の配列を用いた場合でも，タグの有無による発現量への影響は見られなかった．
3) SKIK ペプチドタグの転写・翻訳に与える影響解析
ウサギ mAb 遺伝子を用い，大腸菌無細胞タンパク質合成系において転写と翻訳反応をそれぞれ行った．その結果，転写産物の量はタグの有無により変化がなかった．一方で，等量の mRNA を用いた翻訳反応を行ったところ，タグを有する mAb のタンパク質合成量は，タグがない mRNA より有意に大きかった．

Improved production of IgG with N-terminal SKIK peptide tag and it's mechanism

○Teruyo Ojima-Kato[1,3], Hiroto Tamura[2], Hideo Nakano[1,3]
([1]iBody Inc., [2]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., [3]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words antibody, *Escherichia coli*, cell-free protein synthesis, translation

1Dp02 Ecobody 法によるウサギモノクローナル抗体迅速取得法の開発

○新海 佑介, 森下 しおみ, 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

【背景・目的】ウサギモノクローナル抗体（rmAb）は抗原決定部位のバリエーションが豊富であり，かつ免疫化や採血がマウスに比べ容易であるため，マウスやラットに代わる抗体探索源として有望である．我々の研究グループでは，動物の末梢血から B 細胞を単離し，1 細胞逆転写反応と PCR により得られた L 鎖と H 鎖の DNA フラグメントから，無細胞タンパク質合成系を用いて改変 Fab(fragment of antigen binding)として発現させ評価する，迅速なモノクローナル抗体取得法（Ecobody 法）を開発した．本研究では，Ecobody 法により，従来取得が困難である膜受容体タンパク質(例として Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR)に対する rmAb の取得法確立を目指した．
【方法と結果】はじめに EGFR の細胞外ドメインを大腸菌により発現させ，不溶画分からの精製とリフォールディングを行った．これを抗原としてウサギ(New Zealand White Rabbit)に免疫後，その血清を取得し，大腸菌死菌体，および EGFR 非発現のヒト不死化 B 細胞（HEV0011）とインキュベートし，これらに結合する抗体を除去した血清を得た．得られた血清と HiLyte Fluor で標識した Anti-Rabbit IgG を，EGFR 過剰発現株であるヒト細胞 A431 と HEK293 に塗布して蛍光顕微鏡で観察したところ，A431 の蛍光強度が有意に高かった．このことから，細胞表面のネイティブな EGFR に結合する抗体がこのウサギ血清中に存在していることが示唆された．次に，本ウサギ血清から B 細胞を単離し，Ecobody 法により EGFR に対する rmAb の取得を試みた．得られた候補クローンを改変 Fab として無細胞タンパク質合成系にて合成し，ELISA による抗原結合能評価を行ったところ，それらは EGFR のネイティブ構造を認識する可能性が示唆された．

Generation of rabbit monoclonal antibodies from single B cells by Ecobody technology

○Yusuke Shinkai, Shiomi Morishita, Teruyo Ojima-Kato, Takaaki Kojima, Hideo Nakano
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words monoclonal antibody, Rabbit, Cell free expression system

1Dp03 Ecobody 法によるヒトモノクローナル抗体の迅速取得と大腸菌による生産

○小森 有華, 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

【背景と目的】
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，ハイブリドーマ法やファージディスプレイ法等の従来法では，新規 mAbs の取得に長い時間を要し，迅速性に欠けることが課題となっている．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 1 個から，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 [1]．ここでは，ヒト不死化 B 細胞株から抗インフルエンザワクチン mAbs を取得し，大腸菌を用いた抗体大量発現系の検討と，得られた抗体の結合特異性の解析を目的とした．
【方法・結果】
Ecobody 法により，ヒトの不死化 B 細胞からインフルエンザワクチンに対するヒト mAb 遺伝子を 5 種類取得した．そのうち，抗原に対する高い結合活性を示したクローンを用い，大腸菌による発現系構築を試みた．マウス mAbs 遺伝子を使用した先行研究において Fab へのロイシンジッパー(LZ)付加が，大腸菌内での活性型 Fab 可溶性発現に効果的であったことから，LZ 融合 Fab(FabLZ)の大腸菌中での可溶発現を試みた．大腸菌由来プロピルシストランスイソメラーゼである FkpA と FabLZ との細胞質内共発現を行い，SDS-PAGE で解析したところ，可溶画分に目的タンパク質の発現が確認できた．この可溶画分をポリヒスチジンタグによって精製することで 1 L の培養液あたり約 1.4 mg の FabLZ を回収できた．現在，無細胞タンパク質合成系を用いて合成した FabLZ と大腸菌生体により発現させた FabLZ について，結合特異性の詳細な解析を行っている．

1)加藤 中野 化学と生物 55, 490-495，2017

Generation and production of human monoclonal antibodies from single B cells by Ecobody technology

○Yuka Komori, Yoshino Uchida, Teruyo Ojima-Kato, Takaaki Kojima, Hideo Nakano
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words *Escherichia coli*, human monoclonal antibody, cell-free protein synthesis

1Dp04 核酸分解能を示すヒト型抗体軽鎖クローン

○清水 美里 [1], 宇田 泰三 [2], 一二三 恵美 [3]
([1]大分大院・工, [2]九州先端科学技術研究所, [3]大分大・全学研究推進)
e-hifumi@oita-u.ac.jp

【背景】我々は，酵素活性を有する抗体鎖を Antigenase と名付け，ヒト κ 型軽鎖ライブラリーからスクリーニングにより酵素活性を有するクローンの抽出を進めてきた．核酸分解型 Antigenase はその一つである．
【方法】κ 型軽鎖ライブラリーは，ヒト末梢血の白血球分画より抽出した RNA を用いて作製した．polyA primer により合成した cDNA を用いて κ 型軽鎖 Subgroup II 遺伝子を選択的に PCR 増幅し，pET20b(+)ベクターに挿入後，大腸菌 DH5α に組み込んでライブラリー化した．発現には大腸菌 BL21(DE3)pLysS を用い，Ni-NTA カラムクロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィー(TSKgel sp-5PW カラム,TOSOH)により精製した．核酸分解能は，主に pUC18 plasmid を基質とする DNA 分解実験により調べた．
【結果】核酸分解能を示す完全抗体型抗体酵素は，古くから報告がある [1,2]．これらは Mg^{2+}要求性で中性条件において核酸分解能を示すものであり，当研究室で見出した軽鎖型 Antigenase も同様の性質を示した．その中で T99 クローンは，中性条件では DNA を分解せず，酸性条件下でのみ分解能を示し，Mg^{2+}非要求性であった．このクローンは，Rodkey らの完全抗体型抗体酵素 BV04-01 [2] で活性部位を構築するとされる H27d, Y32 を有しており，分子モデリング等の結果から，これらを含めた数残基が核酸と相互作用すると推定された．

1)G.Gabibov et al., *Science* 256, pp665 (1992)
2)L.S.Rodkey et al., *Mol. Immunol.*, 34, pp1083 (1997)

Clones of human antibody light chain showing decomposition ability for a nucleic acid

○Misato Shimizu[1], Taizo Uda[2], Emi Hifumi[3]
([1]Grad. Sch. Eng., Oita Univ., [2]Div. Nanotech., ISIT, [3]Res. Prom. Inst., Oita Univ.)

Key words catalytic antibody, Subgroup II, antigenase

1Dp05 生体内タンパク質を標的にした新規立体構造認識モノクローナル抗体の作製とそのリガンド作用

○磯﨑 勇志, 湊元 幹太, 冨田 昌弘
（三重大院・工）
tomita@chem.mie-u.ac.jp

生体内で機能しているすべてのタンパク質は，立体構造を有している．特に，GPCR (G タンパク質共役受容体) のような複数回膜貫通タンパク質は複雑な構造を有しており，GPCR に対する立体構造認識モノクローナル抗体の作製は極めて難しいとされている．そこで，本研究では，GPCR のひとつである huCRHR1 (ヒト Corticotropin-releasing hormone receptor 1) に着目し，その立体構造認識モノクローナル抗体の作製に取り組んだ．
本研究室で開発された「立体構造特異的モノクローナル抗体作製 (SST) 法」に基づき，立体構造認識モノクローナル抗体の作製を行った．
DNA 免疫によって感作されたマウスから脾臓を取り出し，目的感作 B 細胞を含む脾細胞懸濁液を調製した．懸濁液中の目的の B 細胞の選択には huCRHR1 発現ミエローマ細胞を用いた．その原理は，細胞表面上で高次構造を保持した状態で発現されている huCRHR1 と目的感作 B 細胞の BCR (B 細胞受容体) との抗原抗体反応に基づいている．その後，B 細胞-ミエローマ細胞複合体を電気パルスによって選択的に融合して，抗体産生ハイブリドーマを作製した．
SST 法を用いて細胞融合を行った結果，多数のハイブリドーマを獲得でき，限界希釈法によってクローニングを行った．Cell-ELISA 法および ELISA 法によってハイブリドーマ上清の抗体価およびサブクラスを決定した．その結果，huCRHR1 発現 CHO 細胞に対する特異的な結合を確認し，IgG2a タイプのモノクローナル抗体であることが明らかになった．さらに，免疫蛍光染色を用いて評価を行ったところ，huCRHR1 発現 CHO 細胞の膜表面への立体構造認識モノクローナル抗体の特異的結合が確認できた．リガンド分子を用いた競合アッセイでは，リガンド分子存在下でわずかにモノクローナル抗体の選択的結合が促進された．
今後は，更なる評価を行うとともに分子標的治療薬としての応用を目指す．

Selective generation of stereospecific monoclonal antibodies against intact proteins and their functional analyses

○Yushi Isozaki, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita
(Grad. Sch. Eng., Mie Univ.)

Key words B-cell receptor, GPCR, Hybridoma technology, Stereospecific monoclonal antibody

1Dp06 キンギョ由来抗体遺伝子の多様性解析と抗原特異的 scFv 断片の取得

岡﨑 文美 [1,2,3], 額田 夏生 [1], 百瀬 直樹 [1], ○田丸 浩 [1,2,3]
([1]三重大院・生資・生物圏生命, [2]三重大・先端科学研支セ・バイオインフォ, [3]三重大・スマートセルイノベ研セ)
ytamaru@bio.mie-u.ac.jp

【目的】抗体は抗体医薬をはじめ，検査診断薬や分析試薬，最近では CAR-T 細胞治療など幅広く利用される生体分子であるが，マウスやウサギなどの哺乳動物ではしばしば免疫寛容によって有用な抗体が作製できない場合があった．このような問題を克服するために，脊椎動物の源流に位置しており，自然免疫系に加えて獲得免疫系を保有する硬骨魚類を用いた抗体生産系の開発に着手した．本研究では，スイホウガン（水泡眼）という眼下に角膜が肥大化した水泡を有するキンギョを免疫動物として用い，免疫前後の抗体遺伝子の網羅的な塩基配列解析ならびに抗原特異的な scFv 断片の取得を試みた．
【方法】蛍光タンパク質（EGFP）を抗原としてスイホウガン水泡液中に免疫し，免疫前後の水泡液から total RNA を抽出した．これを鋳型として goldfish Immunoglobulin M（gIgM）遺伝子に対する cDNA を合成し，次世代シークエンサーを用いて塩基配列を決定した後，CLC Genomics Workbench を用いて解析した．さらに，得られた gIgM の cDNA から VH および VL の各領域から scFv 断片を合成し，in vitro パッケージングしたファージディスプレイ法を用いて EGFP に対してバイオパニングを行った．
【結果】免疫前後の水泡液中の gIgM を ELISA 法で測定したところ，いずれの免疫個体も EGFP に対するポリクローナル抗体が検出された．さらに，gIgM 遺伝子を網羅的に解析した結果，免疫前後で明らかな塩基配列の変化が認められ，さらに免疫回数を重ねると塩基配列が収束することがわかった．免疫後の個体から調製した gIgM 遺伝子から作製した scFv 断片のファージライブラリを用いて EGFP に対するバイオパニングを行なったところ特異的に結合するクローンの取得に成功した．

Analysis of gene diversity on goldfish IgM and acquisition of antigen-specific scFv fragment

Fumiyoshi Okazaki[1,2,3], Natsuki Nukada[1], Naoki Momose[1], ○Yutaka Tamaru[1,2,3]
([1]Dept. Life Sci., Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [2]Sec. Bioinform., ASRC, Mie Univ., [3]Res. Cent. Smart Cell Innovation, Mie Univ.)

Key words antibody, goldfish, scFv

1Dp07 スプライシング因子の過剰発現及び標的遺伝子配列の操作によるニワトリ B 細胞株における遺伝子変異の増強

○金山 直樹, 太田 愛美, 西山 由美子, 岡 知里, 曲 正樹, 徳光 浩
（岡山大院・ヘルスシステム・細胞機能）
nkanayam@okayama-u.ac.jp

我々は抗体遺伝子への体細胞突然変異の導入を任意に 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．DT40 細胞の変異能力の改良は抗体遺伝子のレパートリーの多様化を促進する上で重要な課題である．最近，我々はスプライシング因子 SRSF1 のアイソフォーム SRSF1-3 が抗体遺伝子への変異導入に重要な役割を果たしていることを見いだした．本研究では，SRSF1-3 の過剰発現による DT40 細胞の変異能力の改良を検討した．SRSF1-3 を安定に過剰発現させた DT40-SW 細胞では，野生型細胞に比べて抗体可変部遺伝子への変異導入能力が上昇した．同様の実験系において，抗体可変部遺伝子を外来抗体可変部遺伝子 (anti-Her2, anti-EGFR) や非抗体遺伝子 (mCherry) に置換した DT40 細胞においても，SRSF1-3 を過剰発現させることによって SRSF1-3 を過剰発現させない場合の 3 倍程度に変異導入効率が向上した．一方，抗体遺伝子上において，変異導入の hot spot 配列(WRC) が鋳型鎖と非鋳型鎖で重複している overlapping hot spot (OHS; WGCW)では，高度に変異が導入されるとの報告があったことから，OHS 配列を既存の抗体可変部遺伝子 (anti-Her2)や非抗体遺伝子(mCherry)の配列上に追加した人工遺伝子を設計し，DT40 細胞の抗体可変部遺伝子と置換して変異導入効率の上昇を試みた．OHS を追加した人工遺伝子を導入した DT40 細胞では，オリジナルの標的遺伝子を導入した細胞と比べて標的遺伝子への変異導入効率が 1.5～2 倍程度上昇した．SRSF1-3 過剰発現と OHS 追加の両方を組み合わせた際の変異頻度についても相乗的な効果が見られた．SRSF1-3 の過剰発現や標的遺伝子配列への OHS の追加は，DT40 細胞における標的遺伝子の変異導入頻度の向上と変異体ライブラリーの作製に有効であると考えられる．

Enhancement of immunoglobulin hypermutation in the chicken B cell line by over-expressing a splicing factor and optimizing specific DNA sequences

○Naoki Kanayama, Manami Ohta, Yumiko Nishiyama, Chisato Oka, Masaki Magari, Hiroshi Tokumitsu
(Appl. Cell Biol., Grad. Sch. Health Syst., Okayama Univ.)

Key words antibody, DT40 cells, somatic hypermutation

1Dp08 ホタルルシフェラーゼ生物発光活性制御におけるアルパカ抗体の利用

○鶴田 篤弘[1], 加藤 太一郎[1], 有馬 一成[1], 伊東 祐二[1], 赤澤 陽子[2], 中島 芳浩[2]
（[1]鹿児島大院・理工, [2]産総研）
kato@sci.kagoshima-u.ac.jp

【研究目的】 ホタル生物発光は酵素ホタルルシフェラーゼの触媒活性により基質 D-ルシフェリンが励起状態のオキシルシフェリンへと変換されることで生じる．本反応は ATP の定量や in vivo イメージング時のバイオマーカーとしてライフサイエンス分野にて幅広く利用されている．バイオマーカーとして利用する際に細胞内で発光活性を制御する一般的な方法は，遺伝子レベルで酵素タンパク質の発現量を調節することである．しかし私は，このような既存の方法とは異なる，タンパク質レベルでの酵素機能制御方法を確立したいと考え，この活性制御にアルパカ由来の VHH 抗体を用いることを計画した．つまり，発現している酵素タンパク質の量は一定でありながら，抗体によってその機能を制御することができれば，既存の方法とは異なる作用機序の発光活性制御方法を提案できると考えた．よって本研究では，ホタルルシフェラーゼに特異的に結合し，かつその発光触媒活性を阻害する抗体の探索を試みた．
【研究材料と方法】 M13 ファージに VHH 抗体を提示したファージディスプレイライブラリを構築し，3 ラウンドのバイオパンニングを行い，ヒカリコメツキムシ由来ルシフェラーゼ(E-luc)に特異的に結合するファージの濃縮を行った．ELISA 分析によって標的ルシフェラーゼへの特異的かつ強い結合が確認された抗体 9 種を大腸菌 HB2151 株にて発現・精製し，精製タンパク質を用いて E-luc に対する発光阻害実験を行った．
【結果と考察】 抗体タンパク質を用いた発光阻害実験の結果，E-luc の発光量を 20%以下にまで抑える P14F が得られた．Biacore による解析の結果，抗体が E-luc に対して高い結合力を持つことも確認できた．現在，阻害効果の向上を目指し，異なる部位に結合する VHH 抗体を用いたヘテロ二量体の作成等を行っている．

Utilization of alpaca VHH antibody for controlling the bioluminescent activity of firefly luciferase

○Atsuhiro Tsuruta[1], Dai-ichiro Kato[1], Kazunari Arima[1], Yuji Ito[1], Yoko Akazawa[2], Yoshihiro Nkajima[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ., [2]AIST)

Key words firefly luciferase, bioluminescence, alpaca VHH antibody, phage display

1Dp09 ラクダ科動物由来重鎖抗体を用いた蛍光免疫センサー mini Q-body の構築

○上田 宏[1], 山田 映未[2], 井上 暁人[3], 大室 有紀[1], 北口 哲也[1]
（[1]東工大・研究院・化生研, [2]東工大院・生命理工, [3]東工大・生命理工）
ueda@res.titech.ac.jp

【目的】 Q-body は抗体断片に部位特異的に修飾した蛍光色素がクエンチする現象を利用したバイオセンサーであり，迅速高感度に抗原を検出できることから各種の診断・検出系への応用が期待されている．Q-body 化できる抗体断片としてはこれまで Fab, scFv, そして V_H が知られている．一方，ラクダ科動物由来重鎖抗体 V_{HH} は，小さく安定な認識素子として近年その応用が盛んである．そこで今回，がん細胞検出への応用を念頭に上皮成長因子受容体（EGFR）に対する V_{HH} を生体透過性の高い近赤外蛍光を出す色素を用いて Q-body (mini Q-body)化できないか試みた．

【方法】 抗 EGFR V_{HH} としてラマ由来の VHH122 を用い，これを Q-body 化するため，N 末/C 末に修飾用の Cys つきタグを付加したタンパク質を大腸菌 SHuffle T7 express lysY を用いて大量発現させ，金属アフィニティークロマトグラフィー精製後に 蛍光色素修飾と Flag 精製を行った．そして変性剤添加時の蛍光強度増大から抗原不在時のクエンチ度を評価し，次いで抗原を添加した時の蛍光応答を評価した．

【結果と考察】 ATTO655-および ATTO680-maleimide を用いて，色素の数とリンカー長が異なる 4 種類の ATTO680 修飾 Q-body を作製した．なかでもクエンチの大きかったダブルラベルリンカーあり Q-body と N 末ラベルリンカーあり Q-body の抗原応答を確認したところ，ダブルラベルリンカーあり Q-body が 4.8 倍，N 末ラベルリンカーあり Q-body が 12 倍の応答を示した．ダブルラベル Q-body では色素間相互作用が強すぎ，抗原を添加してもクエンチが十分に解除されなかったことが考えられる．以上より，scFv では構築が難しかった近赤外蛍光 Q-body の V_{HH} を用いた構築に成功した．現在，がん細胞検出への応用を試みている．

Reference: Gottlin E.B. et al., *J. Biomol. Screen.* **14**, 77-85 (2009).

Construction of mini Q-body using Dromedary VHH antibody

○Hiroshi Ueda[1], Emi Yamada[2], Akihito Inoue[3], Yuki Ohmuro[1], Tetsuya Kitaguchi[1]
([1]CLS, IIR, Tokyo Tech., [2]Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech, [3]Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech.)

Key words antibody, fluorescence spectra, fluorescent microscopy, Quenchbody

1Dp10 ヒト型抗体酵素 #7 シリーズの生化学的性質と酵素活性サイト

○宇田 泰三[1], 田口 博明[2], 一二三 恵美[3]
（[1]九州先端科学技術研究所, [2]鈴鹿医療大・薬, [3]大分大・全学研究推進）
uda@isit.or.jp

【背景と目的】 演者らはこれまでにマウス型およびヒト型スーパー抗体酵素を作製してきた．ヒト型については抗体軽鎖バンクの作製を進めており，これまでに同タンパク質として数百種類を発現・精製し，保存している．この抗体バンクの中から，生理活性を有するペプチドやタンパク質をターゲットに抗体酵素としてのスクリーニングを進めており，最近，興味ある結果を得たので報告する．
【方法】ヒト型抗体軽鎖遺伝子は pET20b (+)に組み込んだ後，大腸菌に形質転換し IPTG で発現誘導した．培養上清の可溶性画分を回収後，Ni-NTA クロマト等で精製した．この時，銅を添加して抗体軽鎖に mono-form structure を取らせるようにした 1)．酵素活性は beta-amyloid やその FRET 基質および合成基質を用いて測定した．
【結果と考察】ヒト型抗体軽鎖バンクの中からランダムに 61 種類を選び，認知症の原因物質である beta-amyloid に対してスクリーニングを実施した．その結果，数種類抗体軽鎖が同 FRET 基質を分解した．その中で高活性な#7TR クローンは beta-amyloid(1-40)に対しても分解能力を示し，His14-Gln15 間で切断されていた．一方で，#7wt クローンは#7TR と非常によく似たアミノ酸配列を有するにも拘わらず，ほとんど分解活性を示さなかった．アミノ酸配列および構造モデリングから，#7TR の 30th に存在するアルギニンが酵素活性の発現に大きく関与しおり，Asp1, Ser27a, His27d とは異なる Arg30 を中心とする新しい酵素活性サイトを形成していると推測された．

1) E. Hifumi et al., FASEB J., 30, 895-908(2016)

Biochemical features and the catalytic site for #7-series of human antibody light chain

○Taizo Uda[1], Hiroaki Taguchi[2], Emi Hifumi[3]
([1]Div. Nanotech., ISIT, [2]Dept. Pharm., Suzuka Med. Univ., [3]Res. Prom., Inst. Oita Univ.)

Key words catalytic antibody, amyloid, triad

1Dp11 ヒト型抗体軽鎖 Subgroup I における酵素活性に関する検討

○渡辺 万由子[1], 秋吉 裕子[2], 田口 博明[3], 宇田 泰三[4], 一二三 恵美[2]
（[1]大分大院・工, [2]大分大・全学研究推進, [3]鈴鹿医療大・薬, [4]九州先端科学技術研究所）
e-hifumi@oita-u.ac.jp

【背景】我々は，酵素活性を有する抗体鎖を Antigenase と名付け，各種 Antigenase の作製を進めてきた．Antigenase は Serine protease 様の活性サイトを持つと推定されたことから，ヒト型では Asp1, Ser27a, His93（あるいはその類似配列）を潜在的に持つ kappa 鎖 Subgroup II を取り扱ってきた．今回，上術の配列を持たない Subgroup I に属する軽鎖クローンについて，新たに酵素活性を有するクローンを見出した．
【方法】kappa 鎖 Subgroup I 遺伝子は，ヒト末梢血の白血球分画より RNA を抽出し，polyA primer により cDNA を合成後，PCR 増幅させた．これを，pET20b(+) ベクターに組み，大腸菌 BL21(DE3)pLysS により発現させて可溶性画分を調製した．一次精製として Ni-NTA（QIAGEN）カラムクロマトグラフィー，二次精製として TSKgel SP-5PW カラム（TOSOH）を用いるイオン交換クロマトグラフィー，または HiLoad 16/60, Superdex200 カラム（GE Healthcare）を用いるサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した．酵素活性試験では，tau タンパク部分ペプチドおよび pNA 合成基質（ペプチド研究所）を用い，37℃で反応させた．
【結果】tau タンパク部分ペプチドを用いるスクリーニングにより，このペプチドを分解する H34 クローンを見出した．続いて実施した 5 種類の pNA 基質に対する分解試験では，Subgroup II クローンとは異なる分解パターンを示した．本クローンの配列や構造予測，ならびに他のクローンとの活性比較から活性サイトを推定し，特徴を議論したい．

Study on the enzymatic activity in human antibody light chain of Subgroup I

○Mayuko Watanabe[1], Yuko Akiyoshi[2], Hiroaki Taguchi[3], Taizo Uda[4], Emi Hifumi[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Oita Univ., [2]Res. Prom. Inst., Oita Univ., [3]Dept. Pharm., Suzuka Med. Univ., [4]Div. Nanotech., ISIT)

Key words catalytic antibody, Subgroup I, antigenase

1Dp12 免疫グロブリン製剤による新たな免疫抑制作用の発見

○堀 采音, 藤村 孝志, 河本 正次
（広島大院・先端物質）
d183513@hiroshima-u.ac.jp

【目的】 難治性炎症疾患の治療法として，献血健常者由来の IgG 画分を主成分とする免疫グロブリン製剤 (IVIg) を大量投与する免疫グロブリン療法が行われている．本治療法は著明な治療効果を示すにもかかわらず，未だその正確な奏効機序の解明には至っていない．そこで本研究では，IVIg の標的細胞サブセットを再定義すると共に，その免疫抑制機構を解明することを目的とした．
【方法及び結果】マウス由来脾細胞に対する増殖抑制を指標とした IVIg の免疫抑制効果を検討したところ，本分子が未刺激脾細胞の恒常性増殖を抑制することがわかった．そこで本増殖抑制効果を規定する IVIg の標的細胞を検索したところ，本分子は未刺激 B 細胞を標的として凝集塊形成を促すと共に，その恒常性増殖を著明に抑制することが判明した．本作用は既知の IVIg 標的分子（低親和性 Fcγ 受容体）や B 細胞接着分子（integrin β2）を介することなく発揮されており，IVIg が定常状態 B 細胞に未知の機構で直接的に作用し，その恒常性増殖を負に制御しうることが示唆された．一方で，IVIg は定常状態 B 細胞のみならず，T 細胞に対しても直接的に作用してその増殖活性化を抑制しうること，また本分子による T 細胞増殖抑制効果は G_1 細胞周期アレストの誘導を基調とすることが明らかとなった．以上の結果から，IVIg が活性化ステータスの異なる複数のリンパ球サブセットを直接の標的細胞として多彩な免疫抑制活性を発揮していることが示唆された．

Discovery of novel immunosuppressive actions of intravenous immunoglobulin (IVIg)

○Ayane Hori, Takashi Fujimura, Seiji Kawamoto
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words intravenous immunoglobulin, B cells, T cells, immunosuppression

1Ep01 納豆抽出物に含まれるカチオン性ペプチドは LPS 中和活性と血管新生促進活性を発揮する

○相田 涼介, 斉藤 寿槻, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
（新潟大・自然研）
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】 これまでに当研究室では，米や大豆などの食品タンパク質酵素加水分解物に含まれるカチオン性ペプチドを同定し，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． また，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，画分に含まれるペプチドを同定した．そこで本研究では，納豆抽出物から同定したペプチドを化学合成して，それらの抗菌活性，LPS 中和活性，および血管新生促進活性について検討した．
【実験方法】 本研究では, 納豆抽出物から調製したサンプルを，等電点電気泳動によって 20 の画分に分画した後，カチオン性画分に含まれるペプチドを逆相クロマトグラフィーによって精製した．次に，得られた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．同定したペプチドを化学合成し，それらの生理活性を測定した．すなわち，ヒト病原微生物に対する抗菌活性を測定した．また，リムルステストを用いて LPS 中和活性を測定し，さらにヒト臍帯静脈血管内皮細胞を用いて血管新生促進活性を測定した．
【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．No.19 と No.20 の画分からペプチドを精製し，同定した結果，10 種類以上のカチオン性ペプチドを同定できた．そこで，同定したペプチドのうち，正味の電荷がプラスであり，等電点が高い 7 種類のペプチドを選択し，それらを化学合成した．7 種類のペプチドは，すべて抗菌活性を示さなかったが，一方，すべてのペプチドは LPS 中和活性を発揮し，また 6 種類のペプチドは血管新生促進活性を示した．

Cationic peptides identified from natto extract exhibit LPS-neutralizing and angiogenic activities

○Ryousuke Aida, Kazuki Saito, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words natto extract, cationic peptide, LPS-neutralizing activity, angiogenic activity

1Ep02 コメ糠タンパク質由来多機能型カチオン性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作用を，血管新生促進活性と細胞遊走促進活性を測定することによって検討した．また，作用機構を解明するために，特異的な阻害剤を用いて活性を測定した．
【実験方法】本研究では，創傷治癒作用を評価するために，血管新生促進試験を，次のようにして行った．予め 96 ウェルプレートに Matrigel を添加し，人工基底膜を作製し，その上にヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）と各ペプチドをそれぞれ添加した．一定時間培養した後に，顕微鏡で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，その効果を定量化した．細胞遊走促進試験（スクラッチ試験）では，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の創傷を作製した．その直後に各ペプチドをそれぞれ添加して，創傷の面積を 24 時間ごとに測定し，創傷閉鎖率を求めた．
【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，創傷閉鎖が促進された．今後，特異的な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).

Wound healing activity and mechanism of action of multifunctional cationic peptides derived from rice bran proteins.

○Kazuki Saito, Toshiki Namae, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words cationic peptide, wound healing, angiogenesis, cell migration promotion

1Ep03 Screening of exosome-binding peptides from EWI-2 protein

〇Thanawat Suwatthanarak, Masayoshi Tanaka, Mina Okochi
(Dept. Chem. Sci. Eng., Sch. Mat. Chem. Technol., Tokyo Tech)
okochi@chemeng.titech.ac.jp

Exosomes are 30-150 nm cell-derived vesicles, secreted by various cell types into extracellular fluids and containing bio-functional molecules (lipids, proteins, DNA and RNA) as the original cells. In cancer research, tumor-derived exosomes are useful not only to predict metastasis at an early stage but also to treat cancerous disease. However, exosomes have been difficult to collect and probe due to their nanosize. Interestingly, peptide is much smaller, more stable, and easier for synthesis compared to antibody, widely used to collect and probe exosomes, and still remains high sensitivity and specificity to the targets. Here, to improve collection and probe techniques for exosomes, we screened 8-mer peptides from EWI-2 protein, which likely interacts with exosome surface markers such as CD9 and CD81 proteins, using peptide array. Fluorescence-labelled exosomes from MDA-MB-231 cell culture media were applied to binding assay with peptide arrays, constructed from EWI-2 sequence. After the binding assay, fluorescence image and intensity suggested that some peptides from EWI-2 sequence could strongly bind with exosomes from human breast cancer cell line, MDA-MB 231. Moreover, notable exosome-binding peptides usually consisted of positive and hydrophobic amino acids implying that the binding interaction depended on charge and hydrophobicity. These short exosome-binding peptides could be further employed to nanodevices to enhance exosome collecting ability and to lower limit of detection in exosome probe system.

Screening of exosome-binding peptides from EWI-2 protein

〇Thanawat Suwatthanarak, Masayoshi Tanaka, Mina Okochi
(Dept. Chem. Sci. Eng., Sch. Mat. Chem. Technol., Tokyo Tech)

Key words peptide, peptide array, exosome, cancer cell

1Ep04 多孔性シリカゲルを用いた機能性ペプチドの腸デリバリーに適したペプチドの in silico 設計と評価

〇今井 健人[1], 清水 一憲[1], 上村 光浩[2], 小川 光輝[2], 本多 裕之[1,3]
([1]名大院・工, [2]富士シリシア化学, [3]名大院・予防早期医療創成セ)
honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景】
健康長寿に資する「機能性ペプチド」は，健康食品や機能性食品の有効成分として注目されている．しかし，機能性ペプチドは，そのまま経口摂取すると胃の消化酵素によって容易に分解され，腸まで機能性を保持したまま届けることができないという問題がある．この問題を解決するため，これまでに我々は「多孔性シリカゲル」を用いた分解抵抗性経口投与法の開発に成功しており，疎水性かつ負電荷性のペプチドを，特に効率よく腸輸送できることを発見した．そこで既報の「コレステロール吸収抑制ペプチド」をモデルに，機能性を保持したまま，腸輸送効率を向上させる検討を進めた．今回はその検討結果を報告する．
【方法】
我々の前報の 11 種類のコレステロール吸収抑制ペプチドを選び，その一残基置換配列を候補ペプチドとした．この候補ペプチドの中からシリカゲルで腸輸送しやすい配列を in silico で選抜し，選抜方法の妥当性を検証するために，得られたペプチドを，in vitro で評価した．胆汁酸結合活性が高いペプチドは，胆汁酸ミセル崩壊活性を示し，コレステロールの吸収を抑制する．このため，ペプチドアレイ上にペプチドを合成し，胆汁酸との結合度を測定することで，コレステロール吸収抑制活性を評価した．
【結果】
in silico 選抜によって，1265 種類の候補ペプチドのうち 78 種類を選抜した．これらのペプチドの腸輸送値と胆汁酸結合活性を in vitro 評価したところ，78 種類中 6 種類が既報のペプチドとほぼ同等の胆汁酸結合活性を示した．またそのうちの 5 種類は腸輸送値を既報のペプチドの 1.5 倍以上に向上させられている可能性が示された．これらの結果から，ペプチドの機能性を保持したまま，腸輸送値を向上させられる設計指針を作成できたと考えられる．また，この方法は他の機能性ペプチドにも適応可能であると期待される．

In silico design and evaluation of appropriate functional peptides for intestinal delivery with porous silica gel

〇Kento Imai[1], Kazunori Shimizu[1], Mitsuhiro Kamimura[2], Mitsuteru Ogawa[2], Hiroyuki Honda[1,3]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Fuji Silysia Chemical LTD., [3]PME, Nagoya Univ.)

Key words functional food, peptide, bile acid, in siloco screening

1Ep05 焼成多孔性シリカゲルを用いた苦味ペプチドの選択的除去手法の開発

池田 彩[1], 今井 健人[1], 清水 一憲[1], 上村 光浩[2], 小川 光輝[2],
〇本多 裕之[1,3]
([1]名大院・工, [2]富士シリシア化学, [3]名大・予防早期医療創成セ)
honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

【目的】
タンパク質加水分解物は，低アレルゲン化食品や経腸栄養食などとして利用されている．しかし，加水分解の過程で苦味ペプチドを生じるため，不快な味を呈してしまう．従来開発されている苦味除去技術には，逆相系樹脂への吸着やエキソ型プロテアーゼによるペプチドの切断などが存在するが，苦味ペプチドの除去効率が悪い，風味が変化するといった問題がある．当研究室ではこれまでに高温焼成した多孔性シリカゲルに対するペプチドの吸脱着特性を明らかにしてきた．本研究では，高温焼成したシリカゲルが苦味ペプチドの除去担体として利用可能かどうかの検討を行った．
【方法】
既報の苦味ペプチド 19 種類と旨味ペプチド 34 種類をペプチドアレイを用いて合成し，焼成シリカゲルへのペプチドの吸着量を評価した．また同様の実験を市販の吸着剤に対しても行った．次に，苦味ペプチドと旨味ペプチドの両方を含む混合液を用いて吸着実験を行い，選択性を評価した．最後に，タンパク質加水分解物を多孔性シリカゲルで前処理することで苦みが低減するかどうかを官能試験によって評価した．
【結果】
苦味ペプチドと旨味ペプチドの吸着量を評価したところ，焼成シリカゲルは，旨味ペプチドに比べ苦味ペプチドの吸着量が高かった．また，市販の吸着剤と比較して選択性が高く，苦みペプチドと旨味ペプチドの混合溶液中でも，苦味ペプチドを選択的に吸着した．さらに，タンパク質加水分解物をシリカゲルで前処理，官能試験で比較したところ，苦味が有意に低減されることが示された．これらの結果から，今回我々が作製した焼成シリカゲルは，苦味ペプチドの選択的除去特性が高い担体であることが示唆された．

Development of the selective elimination methods for bitter peptides with porous silica gel

Aya Ikeda[1], Kento Imai[1], Kazunori Shimizu[1], Mitsuhiro Kamimura[2], Mitsuteru Ogawa[2], 〇Hiroyuki Honda[1,3]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Fuji Silysia Chemical LTD., [3]PME, Nagoya Univ.)

Key words silica gel, bitter peptide, protein hydrolysates, taste

1Ep06 LEA ペプチドの発現による大腸菌の紫外線耐性の向上

〇池野 慎也[1], フワイジ アラー[2], パサック ニシット[1],
シャヒル アミル[2]
([1]九工大院・生体工, [2]マレーシアプトラ大・生物工)
ikeno@life.kyutech.ac.jp

【背景と目的】
LEA(Late Embryogenesis Abundant) タンパク質は植物の種子や一部の動物から発見された天然変性タンパク質であり，細胞内のタンパク質等を保護する機能を有している．当研究室ではこの LEA タンパク質内の繰り返し配列をモチーフとして LEA ペプチドを設計し，大腸菌内で目的タンパク質と共発現させると目的タンパク質の発現量が増大することを報告してきた．その一方，LEA タンパクは元来，様々なストレス耐性に関わるタンパク質である．LEA タンパクの発現により塩・熱ストレス耐性が向上する報告があることから，LEA ペプチドも同様に耐性を向上させるのではないかと仮説をたて実験・検証を行ったところ，LEA ペプチド発現の増大に伴い塩・熱ストレス耐性が向上することを見出した．本研究では，様々紫外線ストレスに対して LEA ペプチドの細胞保護機能を検証することを目的する．
【実験方法と結果】
pET 系の発現ベクターに LEA ペプチド遺伝子を導入し，発現ベクターを構築した．その形質転換大腸菌に発現誘導剤（IPTG）を添加し，細胞内に LEA ペプチドを発現させた．4 時間培養した形質転換大腸菌を LB 寒天培地に播種し，紫外線照射環境下で培養後，コロニーカウント法により UV 耐性評価を行った．その結果，LEA ペプチド発現の増大に伴いコロニー数が増加し，LEA ペプチドの発現による紫外線ストレス耐性の向上を確認した．また，殺菌用途に活用される UV-C の照射条件においてもコロニーの増殖を確認した．本結果より，LEA ペプチドが塩，熱ストレスのみならず，紫外線ストレスにも耐性を強化し，様々な細胞ストレスに対して耐性を向上させることを示した．現在，その耐性が向上するメカニズムの解明を研究している．
参考論文 N.Pathak, S.Ikeno, Biochem. Biophys. Res. Commun., 492 (3), 386-390, 2017

In vivo* expression of LEA peptide for enhancing UV stress tolerance in *Escherichia coli

〇Shinya Ikeno[1], Alaa Huwaidi[2], Nishit Pathak[1], Amir Syahir[2]
([1]Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol., [2]Fac. Biotech. Biomol. Sci., Univ. Putra Malaysia)

Key words *Escherichia coli*, abiotech stress, LEA peptide, UV-radiation

1Ep07 新規ラッソペプチド vesicusin A および B の異宿主生産

○不破 啓貴, 小谷 真也
（静大・創科技院）
kodani.shinya@shizuoka.ac.jp

ラッソペプチドはN末端にマクロラクタム環を含む投げ輪構造をとり，C末端の直鎖ペプチド部がN末端のリングにトラップされたユニークな化合物である．ラッソペプチドはプロテアーゼによる分解を受けにくく，抗菌剤，受容体阻害剤および酵素阻害剤などへの応用が期待されている．プロテオバクテリアに多数のラッソペプチド生合成遺伝子クラスターが見出されており，その構造的多様性から未発見の生理活性が期待できる．大腸菌を用いた異宿主生産が報告されているが，通常の培養条件でラッソペプチドの生産量は少ない．そこで，*Sphingomonas* 属用に開発した発現用シャトルベクター pHSG396Sp を用い，*Sphingomonas subterranea* を宿主としてゲノムマイニングによって発見された新規ラッソペプチドを生産することを試みた．ゲノムマイニングによって見出した *Brevundimonas vesicularis* NBRC12165 の新規ラッソペプチドの生合成遺伝子クラスター（2.7kb）を PCR で増幅した．この遺伝子クラスターには構造遺伝子二つと修飾酵素群を含む．この遺伝子領域を大腸菌-*Sphingomonas* のシャトルベクター pHSG396Sp に組み込み，大腸菌へ形質転換することで pHSG396Sp-12165L を得た．この pHSG396Sp-12165L をエレクトロポレーション法で *S. subterranea* NBRC16086 に導入後，MBM 液体培地で培養し，培養物をメタノールで抽出した．得られた抽出液を HPLC と ESI-MS を用いて分析したところ，導入した遺伝子クラスター由来の 2 種類のラッソペプチド（vesicusin A および B）を発現生産したことを確認した．以上のように，ゲノムマイニングによって発見した新規ラッソペプチドを，シャトルベクターを用いて *Sphingomonas* 属細菌で発現させることに成功した．

Heterologous production of vesicusins A and B

○Hiroki Fuwa, Shinya Kodani
(Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words lasso peptide, shuttle vector, heterologous production, *Brevundimonas vesicularis*

1Ep08 蛍光発光アプタマー Spinach に対する変異導入とその蛍光への影響評価

○上野 絹子 [1], 塚越 かおり [1], Porchetta Alessandro [2], Ricci Francesco [2], 池袋 一典 [1]
（[1]農工大院・工, [2]Dept. Chemist., Univ. Rome Tor Vergata）
ikebu@cc.tuat.ac.jp

アプタマーとは標的分子に対して特異的に結合することが可能な核酸であり，その中でも Spinach アプタマーを含む複数の蛍光発光アプタマーは低分子リガンドである DFHBI を認識し，蛍光を発するアプタマーとして報告されている．これらのアプタマーを細胞内で転写させることで生体内における特定の転写産物や代謝産物の挙動を観察することが可能であるが，細胞内におけるより詳細な解析を行うためにこれらのアプタマーの蛍光強度の増強が求められている．
これまでに，Spinach アプタマーがグアニン四重鎖構造 (G4) を有することが結晶構造解析より明らかとなっている．G4 は 4 つのグアニンから形成される G-カルテット構造が積み重なった状態であり，Spinach アプタマーや Baby Spinach アプタマー，Broccoli アプタマーといった，DFHBI に結合し蛍光を発するアプタマーは共通して G4 を有することが報告されている．さらに，Broccoli アプタマーの G4 配列に変異導入を行うことで蛍光強度の増強を行った報告もなされており，DFHBI の認識およびアプタマーの蛍光発光では G4 構造が重要であると考えられる．
そこで本研究では，Baby Spinach アプタマーが持つ G4 形成配列に対して一塩基変異導入を行い，その蛍光強度の評価を行った．各変異体を評価した結果，複数の変異体において変異導入前の配列と比較し高い蛍光強度が観察された．特に Baby Spinach アプタマーの塩基配列において 11 番目に存在するアデニンをシトシンに置換した場合には，変異導入前の 2.5 倍の蛍光強度となった．一方で，37 番目のアデニンあるいは 39 番目のウラシルに対して変異導入を行った場合には蛍光発光を観察できなかった．これより，G4 構造のループ配列が蛍光発光に重要であると考えられた．また，Baby Spinach アプタマーの G4 形成配列を最適化することで蛍光発光強度を増強できる可能性が示唆された．

Mutational analysis of its fluorescence of Baby Spinach focusing on its G-quadruplex structure

○Kinuko Ueno[1], Kaori Tsukakoshi[1], Alessandro Porchetta[2], Francesco Ricci[2], Kazunori Ikebukuro[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Dept. Chemist., Univ. Rome Tor Vergata)

Key words aptamer, fluorescent aptamer, G-quadruplex, mutational analysis

1Ep09 Bevacizumab に対する抗イディオタイプアプタマーの結合特性の改良

池袋 一典 [1], ○清水 裕 [1], 齊藤 太郎 [1], 塚越 かおり [1], 山田 朋宏 [2], 轟木 堅一郎 [2]
（[1]農工大院・工, [2]静県大院・薬食生命）
ikebu@cc.tuat.ac.jp

現在，低分子医薬品と並んで抗体医薬品が広く利用され，その開発が進められている．医薬品の開発を行う際には血中薬物濃度測定を行い，その薬物動態を解析する必要があるが，抗体医薬品は患者由来の抗体と構造が似ているために特異的な検出が難しい．これまでに抗原や抗イディオタイプ抗体などをリガンドに用いた検出が行われているが，これらのリガンドは製造コストが高く，また製造ロットの間で結合能にばらつきがある場合が多いため，抗体医薬品に対して高い特異性を持つ新規リガンドが求められている．
本研究では抗体医薬品に結合可能な新規リガンドとして DNA アプタマーに注目した．DNA アプタマーは，標的分子を特異的に認識できる核酸リガンドであり，安価に化学合成することが可能である．当研究室では過去に抗体医薬品である Bevacizumab に対する抗イディオタイプアプタマーである A14#1 を獲得している．A14#1 は抗体間での特異性を持つことから，Bevacizumab の相補性決定領域と相互作用すると考えられている．本研究では，A14#1 の Bevacizumab に対する結合能の向上を目的とし，その結合特性の解析を行った．
A14#1 と Bevacizumab の相補性決定領域の等電点から，酸性条件下で分子間の相互作用が増強されると予想し，異なる pH での A14#1 の Bevacizumab に対する結合能の評価を行った．その結果，pH 7.4 の条件と比較して，pH 4.7 で A14#1 の Bevacizumab に対する結合能が 100 倍程度向上することが示された．また，A14#1 は pH 4.7 の条件で，解離定数が 1 nM 以下である可能性が示された．

Improvement in binding property of the anti-idiotype aptamer against Bevacizumab

Kazunori Ikebukuro[1], ○Yutaka Shimizu[1], Taro Saito[1], Kaori Tukakoshi[1], Tomohiro Yamada[2], Kenichiro Todoroki[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka)

Key words DNA, aptamer, antibody drug, anti-idiotype

1Ep10 水耕栽培によるミヤコグサのベツリン酸生産能の増強

○鈴木 隼人, 福島 エリ オデット, 村中 俊哉
（阪大院・工）
muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】 トリテルペノイドは多様な構造と薬理活性を持ち，医薬品やそのリード化合物として重要な植物二次（特化）代謝産物である．その生産のほとんどは天然の植物からの抽出に依存しており，環境破壊や供給の不安定化が危惧されている．合成生物学的手法による代替生産が盛んに研究されているが，依然として収量が低いことが問題となっている．
一方，ダイズを湛水条件で栽培することで有用トリテルペノイドの一種であるベツリン酸の生合成遺伝子の発現が誘導されることが報告されている．また，マメ科薬用植物カンゾウの液体培養組織でも生合成遺伝子の高発現とベツリン酸蓄積が報告されている．そのため，マメ科植物を水リッチな環境で栽培することでトリテルペノイドの生産に応用できるのではないかと考えた．加えて，発表者らはマメ科モデル植物ミヤコグサ *Lotus japonicus* が通常の栽培条件でも多くのベツリン酸を根に蓄積することを明らかにしている．本研究ではミヤコグサを材料に用いてベツリン酸をより多く生産する栽培／培養条件の検討を行った．
【結果と考察】 土壌栽培，不定根培養，水耕栽培物，それぞれに含まれる各種トリテルペノイドを GC-MS により定量し比較した．その結果，水耕栽培体の根は土壌栽培体の根の 10 倍以上のベツリン酸を蓄積し，その蓄積量は乾燥重量当たり 6.5%に達することが判明した．さらに，根をクロロホルムに数十秒間浸すだけで，類縁夾雑物をほとんど含まないベツリン酸（GC-MS 分析の結果 96%以上の純度であった）を回収することができた．このことは細胞の破砕や精製などの手間を削減できるという点で大きな利点である．今後，遺伝子導入やゲノム編集による代謝改変を行うことで，ミヤコグサを任意のトリテルペノイドの生産ホストとして利用することが可能になると期待される．

Enhanced betulinic acid production in *Lotus japonicus* hydroponic culture

○Hayato Suzuki, Ery Odette Fukushima, Toshiya Muranaka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Triterpenoid, hydroponics, legume, *Lotus japonicus*

1Ep11 UV-B LED 照射によるポリフェノールの増産

○鶴本 智大[1], 藤川 康夫[1], 泉田 智史[2], 三島 俊介[3], 太田 大策[4], 岡澤 敦司[4]
（[1]日亜化学工業, [2]ヒューマンチップス, [3]大塚電子, [4]阪府大院・生環科）
okazawa@plant.osakafu-u.ac.jp

【背景と目的】紫外光を使うと植物体内でフェノール性化合物を生成できるが，DNA 等に損傷を与えるなど生育には有害であるため，フェノール性化合物の生産手段として実用化が進展していない．従来は幅の広い紫外光スペクトルをもつ光源を使用していたが，そのスペクトルの中でフェノール性化合物の生成に寄与している波長を特定できれば，それ以外の波長の照射は不要となり，損傷を極端に抑えてフェノール性化合物の生産が可能になると考えた．本研究では，波長域が狭く鋭いピークを持つ LED を光源に使用し，フェノール性化合物の含有量を増加できるか検討した．
【方法】①シロイヌナズナを MS 培地に播種して 14 日間，長日条件（明期 16 時間/暗期 8 時間；照度 200 μmol/m^2/s）下で育成した後，②2.5 μmol/m^2/s の照度でピーク波長 280 nm，又は 310 nm の LED 光を照射し，③HPLC 分析にて生成されるフェノール性化合物量を未照射のものと比較した．更に，④網羅的な遺伝子発現の比較を行った．加えて，スダチの実，チャノキの葉に対して，5 μmol/m^2/s の照度でピーク波長 280 nm の LED 光を照射し，同様の評価を行った．
【結果と考察】シロイヌナズナでは，波長 280 nm の短時間照射でポリフェノールであるアントシアニンの検出量が顕著に増加したが，波長 310 nm では増加は見られなかった．遺伝子発現では，波長 280 nm の照射でアントシアニンの生合成制御を担う転写因子 MYB75 の発現が特異的に増加した．また，実用植物であるスダチの実，チャノキの葉でも，波長 280 nm にて数種のフェノール性化合物の増加が確認できた．以上の結果より，植物のポリフェノール量の増産には UV-B 光のうち 280 nm 付近の光が効果的であった．
【謝辞】本研究を進めるに当たりご協力いただいたアグリバイオフォトニクス産業化研究会（ABPI 研）の皆様に感謝の意を表します．

Increase in production of polyphenols by UV-B LED irradiation

○Tomohiro Tsurumoto[1], Yasuo Fujikawa[1], Satoshi Izuta[2], Shunsuke Mishima[3], Daisaku Ohta[4], Atsushi Okazawa[4]
([1]Nichia Co., Ltd., [2]HumanChips Inc., [3]Otsuka Electronics Co., Ltd., [4]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words anthocyanin, LED, polyphenol, UV-B

1Ep12 マイクロセンサーを用いたイネの葉のガスフィルムの解析

○ターナー ピーター[1], 井上 貴行[1], Dalsgaard Tage[2], Pedersen Ole[3]
（[1]セントラル科学貿易, [2]Unisense, Denmark, [3]Univ. of Copenhagen, Denmark）
turner@cscjp.co.jp

目的: 水稲の葉と根の酸素摂取量における葉のガスフィルムの影響を理解する．
方法： 本研究では，光合成，二酸化炭素，酸素等をパラメーターとして分析した．完全冠水時の明と暗の状態で，イネの根の pO_2 を，酸素マイクロセンサーを用い，実験室内と野外の両方で調査した．さらに，ガスフィルムを界面活性剤によって取り除き，葉のガスフィルムの影響を調べた．
結果： 葉のガスフィルムと根の pO_2 の増加において正の相関が見られた．実験室内と野外での測定を組合せたことで，冠水時において，葉のガスフィルムがどのようにしてイネの生存の助けとなっているか理解が深まった．

Analyzing leaf gas films of rice plants using microsensors

○Peter Turner[1], Takayuki Inoue[1], Tage Dalsgaard[2], Ole Pedersen[3]
([1]Central Scientific Commerce, Inc., Tokyo, [2]Unisense, Denmark, [3]Univ. of Copenhagen, Denmark)

Key words microsensor, rice, gas film, oxygen

1Ep13 Unraveling *N*-glycan patterns of glycoproteins extracted from intra- and extracellular fractions of *Nicotiana benthamiana* suspension cell culture and the effect of kifunensine treatment.

○Yayon Pamula Mukti, Takao Ohashi, Ryo Misaki, Kazuhito Fujiyama
(ICBiotech, Osaka Univ.)
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

Nicotiana benthamiana suspension cell culture offer various advantages for fast development cycle, relatively less spacious and be able to perform eukaryotic post-translational modification such as *N*-glycosylation. Terminal mannose residues of several recombinant proteins and vaccines were proofed to play essential roles in the targeting to macrophages and internalization via mannose receptor. Here, we looked over the effect of kifunensine, an α-mannosidase I inhibitor treatment in *N. benthamiana* suspension cell culture. The *N*-glycan structures of glycoproteins in intra- and extracellular fractions of *N. benthamiana* suspension cell cultures with or without kifunensine (Kif) treatment were analyzed. Hydrazinolysis was used to liberate *N*-glycans, and the oligosaccharides resulted were labeled with 2-aminopyridine (PA). Reverse-phase HPLC was used to purify the PA-glycans. The structures of the PA-glycans were distinguished by elution time comparison of PA-glucose oligomer standard and liquid chromatography-tandem mass spectrophotometry (LC-MS/MS). Plant specific-type *N*-glycan structures were dominating in intracellular (64.9%) and extracellular (70.6%) fractions of suspension cell culture. Nevertheless, the addition of kifunensine in *N. benthamiana* suspension cell culture medium showed relatively increased the amount of high mannose-type *N*-glycans in intra- (78.8%) and extracellular (65.5%), compared to wild type

Unraveling *N*-glycan patterns of glycoproteins extracted from intra- and extracellular fractions of *Nicotiana benthamiana* suspension cell culture and the effect of kifunensine treatment.

○Yayon Pamula Mukti, Takao Ohashi, Ryo Misaki, Kazuhito Fujiyama
(ICBiotech, Osaka Univ.)

Key words *N*-glycan, *Nicotiana benthamiana*, suspension cell culture, kifunensine

1Ep14 Production and *N*-glycan analysis of recombinant β-glucocerebrosidase in *Nicotiana benthamiana* root culture

○Naphatsamon Uthailak[1,2], Takao Ohashi[1,2], Ryo Misaki[1,2], Kazuhito Fujiyama[1,2]
([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

Gaucher disease is a lysosomal storage disorder caused by the lack of the enzyme β-glucocerebrosidase (GCase). The enzyme replacement therapy has been used as the most effective treatment for Gaucher disease type I and the commercial recombinant GCase mostly used is produced in mammalian cells. Compared to mammalian cells, plants provide many advantages on the pharmaceutical protein production including the low cost for large-scale production and no risk of the contamination by human pathogens. This study aimed to produce and purified the recombinant GCase as an active enzyme in a *Nicotiana benthamiana* root culture. Root of transgenic GCase-producing plants were induced and cultured in liquid medium supplement with indole-3-acetic acid (1 mg/L). The recombinant GCase was successfully produced in root culture with the enzyme activity about 81.40 ± 17.99 Units/mg total protein. The GCase was extracted and purified using two purification steps, concanavalin A and phenyl 650C chromatographies. After protein concentration, the productivity of purified GCase was approximately 1 μg/g of root. The *N*-glycan structure of purified GCase was also analyzed using a nano LC/MS. The typical structure with two plant-specific residue, $Man_3XylFucGlcNAc_2$ was found in purified GCase. This research provides the alternative plant system for the production of recombinant GCase. The application of this system on the other recombinant proteins production could be studied in the future.

Production and *N*-glycan analysis of recombinant β-glucocerebrosidase in *Nicotiana benthamiana* root culture

○Naphatsamon Uthailak[1,2], Takao Ohashi[1,2], Ryo Misaki[1,2], Kazuhito Fujiyama[1,2]
([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Human glucocerebrosidase, *Nicotiana benthamiana*, Root culture, Plant-made pharmaceuticals

1Ep15 マーカーフリー RDR6 ノックダウン株における外来遺伝子の導入効率および発現効率

○下川 麻優子 [1], 三上 達也 [2], 梅山 幸子 [3], 児玉 浩明 [1]
（[1]千葉大院・園芸, [2]千葉大院・融合, [3]千葉大・園芸）
kodama@faculty.chiba-u.jp

【背景・目的】
RDR6 (RNA-dependent RNA polymerase 6) は一本鎖 RNA から二本鎖 RNA を合成する．二本鎖 RNA は RNA サイレンシングの起点となるため，RDR6 は RdDM (RNA-directed DNA methylation) や，PTGS (post-transcriptional gene silencing) 経路において重要な因子である．RDR6 の機能を失った *Arabidopsis rdr6* 変異体では，*Agrobacterium tumefaciens* による遺伝子導入効率が上昇した報告もある[1]．そこで本研究では，形質転換効率の向上を狙い *NtRDR6* 遺伝子の発現を抑制した *NtRDR6* ノックダウン株を作出し，これに過剰発現コンストラクトを再導入して，遺伝子導入効率および導入遺伝子の発現効率を調べることを目的とした．
【方法・結果】
MAT ベクター[2]を用いることで，コンストラクトの導入に伴う選抜マーカー遺伝子が残存していない，マーカーフリー *NtRDR6* ノックダウンタバコ株を作出した．この形質転換株とタバコ野生株において，毛状根を誘導する Ri プラスミドと過剰発現コンストラクトを同時に *A. tumefaciens* を用いて導入し，毛状根の形成数の測定と各毛状根での導入遺伝子の発現レベルを測定した．その結果，タバコ野生株と比べて *NtRDR6* ノックダウン株では，アグロバクテリウム法による形質転換効率は上昇したが，導入した遺伝子の発現量には変化はなかった．

[1] Dunoyer et al. (2006) Nat Genet. 38:258-263
[2] Ebinuma and Komamine (20+01) In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant 37:103-113

Effects of knockdown of the *RDR6* gene on transformation efficiency and expression level of the transgene

○Mayuko Shimokawa[1], Tatsuya Mikami[2], Yukiko Umeyama[3], Hiroaki Kodama[1]
([1]Grad. Sch. Horticul., Chiba Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., [3]Fac. Horticul., Chiba Univ.)

Key words RDR6, gene silencing, *Nicotiana tabacum*

1Ep16 mRNA の内部切断に関わる配列的特徴の解明

○上野 大心, 山崎 将太朗, 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 の蓄積量は重要である．この蓄積量を制御する機構のひとつとして，mRNA の分解機構が挙げられる．この分解機構は，ポリ A 鎖の短縮，もしくはエンドヌクレアーゼ等による mRNA 内部配列の切断に依存する分解機構に大別することができる．ポリ A 鎖の短縮に依存する分解機構に関しては，酵母等において詳細な解析が行われているが，内部配列の切断に依存する分解機構に関しては，酵母を含め動植物を問わず詳細は不明である．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がいくつか報告されているが，これらの手法は同一 mRNA 上に存在する複数の切断部位を正確に同定できないことや，検出される切断部位が 3'末端側に偏るなど，実験手法上に問題がある．従って，これらの情報から各切断部位の切断のされやすさを正確に数値化することができず，結果としてその切断に関わる機構や配列的特徴は不明であった．そこで本研究では，これらの問題点を改良し，次世代シーケンサーにより網羅的に切断部位を同定した．この新たな手法では，検出される切断部位が 3'末端側へ偏ることを大幅に軽減した．また，mRNA の各切断部位の切断率を基に解析を行ったところ，切断部位の周辺には顕著な塩基の偏りが観察された．加えて，遺伝子内における切断部位の分布に着目すると，開始，終止コドンの近傍に切断部位が多く検出され，コード領域内において 3 塩基単位の周期性が観察された．これらの傾向は，リボソームの停止，停滞パターンと一致していることから，翻訳過程も mRNA の切断に関与することを示唆している．これらの解析により切断に関わる配列的特徴を明らかにすることができれば，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など，導入遺伝子の効率的発現に寄与すると考えられる．

Elucidation of sequence of internal cleavage sites in mRNA

○Daishin Ueno, Shotaro Yamasaki, Taku Demura, Ko Kato
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words cleavage sites, comprehensive analysis, mRNA degradation, *Arabidopsis thaliana*

1Ep17 イネの大粒変異の次世代シーケンス解析

○富田 因則, 土屋 智顕
（静大・グリーン研）
tomita.motonori@shizuoka.ac.jp

コシヒカリを大粒化して低コスト・多収化したスーパーコシヒカリを開発するため，品種「いのちの壱」の大粒性に着目し，コシヒカリといのちの壱との F_2 で分離した大粒型個体を一回親にして，コシヒカリを反復親とする連続戻し交雑を行い，大粒性に関する遺伝分析，SNP マーカーとの連鎖解析，NGS による全ゲノム解析を行った．コシヒカリへの戻し交雑 BC_3F_2，BC_4F_2 で分離した大粒遺伝子 *Gg* のホモ型個体（粒面積 24.1～25.0 mm^2）を用いて SNP マーカーとの連鎖解析を行った結果，第 2 染色体の J521（短腕末端から 7.6 Mb），RM3390（7.7 Mb），J527（8.2 Mb）アリルにおいていずれもいのちの壱ホモ型を示し，*Gg* との強い連鎖が検出された．一方，これらより下流にある，J536（9.1 Mb），RM6375（9.6 Mb），J543（10.2 Mb）アリルでは，BC_3F_2 ではいのちの壱ホモ型が大方で，一部ヘテロ型だったのに対して，BC_4F_2 では全てコシヒカリホモ型に換わり，4 回目の戻し交雑によって 9.1 Mb より下流の領域がコシヒカリゲノムに置換されていた．以上のように，4 回の戻し交雑を経て，第 2 染色体短腕末端から 7.6～8.2 Mb の DNA 領域が *Gg* とともに遺伝していることが分かった．大粒遺伝子 *Gg* のホモ型個体の全ゲノム解読を行うため，Nextera トランスポソームでゲノム DNA をタグ付けしつつ断片化し，PCR で両末端にアダプターを合成後，磁性ビーズで DNA 断片をサイズ選択して定性・定量分析し，DNA ライブリーを作製した．HiSeq4000 で解読されたリード配列を，本研究室で作製したコシヒカリの仮想ゲノムを参照配列としてマッピングした結果，カバー率が 99.24%で，平均 depth が 12.68 となった．第 2 染色体の 8.1 Mb 地点にある糖転移酵素様配列を挟む 5'側，3'側の 2 か所に SNP が検出された．

Next-generation sequencing analysis for large-grain mutant in rice

○Motonori Tomita, Tomoaki Tsuchiya
(Green Biol. Div., Res. Inst. Green Sci. & Technol., Shizuoka Univ.)

Key words rice, grain, gene

1Fp01 Enhanced activity and stability of lipase in deep eutectic solvents

○Yujin Oh, Sung Hee Kim, Sang Hyun Lee
(Dept. Bioeng., Konkuk Univ., South Korea)
so01068@naver.com

DESs (Deep eutectic solvents) are low transition temperature mixtures consisting of at least one hydrogen bond donor and one hydrogen bond acceptor. DESs have the advantages of non-volatility, biocompatibility, and biodegradability, compared with conventional organic solvents. In this work, various choline chloride ([Ch][Cl])-based DESs were used as cosolvents and anhydrous media for the lipase-catalyzed reactions. Lipase showed enhanced activity and stability for the hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in aqueous DES mixtures. The activity of lipase in an aqueous solution of [Ch][Cl]:urea:glycerol (1:1:1) was 155% higher than that in buffer. The half-life time of lipase at 40℃ in an aqueous solution of [Ch]Cl:glycerol (1:2) was enhanced by 9.2 times. The activity and stability of lipase in the transesterification of benzyl alcohol using anhydrous DESs as reaction media were also higher than those in ionic liquid and organic solvent which have similar dipolarity/polarizability. The activity of lipase in anhydrous [Ch][Cl]:urea:formamide (1:1:1) was 11.7 and 1.7 times higher than those in acetone and [Bmim][BF4]. In particular, the lipase in anhydrous [Ch][Cl]:glycerol (1:2) retained 90% of initial activity after 95 h incubation at 40℃. When the solvatochromic parameters of DESs were correlated with the stability of lipase, it was found that stability of lipase was associated with the hydrogen bond acidity of DESs. This study showed the potential possibility of DESs as reaction media for biocatalysis.

Enhanced activity and stability of lipase in deep eutectic solvents

○Yujin Oh, Sung Hee Kim, Sang Hyun Lee
(Dept. Bioeng., Konkuk Univ., South Korea)

Key words deep eutectic solvents, solvatochromic parameters, lipase, stability

1Fp02 Optimization on biodiesel synthesis from palm oil mill effluent (POME) by integrated strategy with lipase-catalyzed ethanolysis

○Nova Rachmadona[1], Jerome Amoah[1], Shinji Hama[2], Ayumi Yoshida[2], Akihiko Kondo[3], Chiaki Ogino[1]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Bio-energy Corp., Japan, [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

Biodiesel has provided an environmental friendly solution to fuel crisis, as it is typically derived from renewable lipid sources such as vegetable oil through enzymatic transesterification. However, food versus fuel is a dilemma on the risk of transferring agricultural land or crops for biodiesel production to the detriment of food supply. Palm oil mill effluent (POME), the waste from palm oil industry, presents as an alternative source for biodiesel without interfering food supply. POME contains a high amount of organic matter, oil and grease, total solids and suspended solids. This study attempted to produce biodiesel from POME with an integrated lipase catalyzed ethanolysis. *Thermomyces lanuginosus* lipase is observed as a robust lipase catalyst that exhibited over 90% conversion by using aqueous ethanol (15 - 99.5% w/w). In this optimization study, the effects of enzyme concentration, water content and temperature condition were considered in the transesterification reaction. The optimal conditions were 45% ethanol concentration, 0.3% lipase, 4:1 ethanol to oil molar ratio, 4.7% excess water, 40°C reaction temperature, and under 24 hours. The maximum Fatty Acid Ethyl Ester (FAEE) yield reached 98.39%±0.93% under this best condition. Therefore, POME is a promising substrate that can be used for biodiesel synthesis without distracting food supply chain.

Optimization on biodiesel synthesis from palm oil mill effluent (POME) by integrated strategy with lipase-catalyzed ethanolysis

○Nova Rachmadona[1], Jerome Amoah[1], Shinji Hama[2], Ayumi Yoshida[2], Akihiko Kondo[3], Chiaki Ogino[1]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Bio-energy Corp., Japan, [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words palm oil mill effluent, *Thermomyces lanuginosus*, biodiesel fuel, enzymatic transesterification

1Fp03 The enhancement of culture conditions for high cell and lipid production of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyii* D35

○Rezky Lastinov Amza[1], Prihardi Kahar[1], Ario Betha Juanssilfero[1,2], Hiromi Otsuka[1], Chie Kihira[1], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[3]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]LIPI, [3]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)
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 starkeyii* D35 (LsD35) is one of promising oleaginous yeasts 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 by using jar fermentor. The strategy is to achieve high cell production prior to the high lipid production. The evaluation of high cell and lipid production were performed both in batch and fed-batch fermentation with low initial carbon/nitrogen (C/N) ratio at 17.9 and initial agitation speed at 150 rpm. The optimum pH was approached by conducting fermentation at various pH condition in batch fermentation. It becomes apparent that the optimum pH for high cell production is at pH 5 (32.303 g/L of cells only with 39.88 g/L of dry cell weight and 19 % total lipid) respectively. Fed-batch fermentation was carried out with two conditions: feeding with both single carbon source and ammonium sulfate as nitrogen source and feeding with single carbon source (glucose and/or xylose) only. The best condition in high cell production is the feeding with single carbon source only which gave 67.25 g/L and 62.51 g/L of dry cell weight for both single glucose and xylose as carbon source respectively.

The enhancement of culture conditions for high cell and lipid production of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyii* D35

○Rezky Lastinov Amza[1], Prihardi Kahar[1], Ario Betha Juanssilfero[1,2], Hiromi Otsuka[1], Chie Kihira[1], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[3]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]LIPI, [3]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)

Key words Oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyii* D35, High cell density culture, Cell and lipid production

1Fp04 Selection of oleaginous yeast capable of high lipid accumulating during challenges from inhibitory chemical complexes

○Ario Betha Juanssilfero[1,2], Prihardi Kahar[1], Rezky Lastinov Amza[1], Yopi Yopi[2], Chiaki Ogino[1], Bambang Prasetya[3], Akihiko Kondo[4]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]LIPI, Indonesia, [3]BSN, Indonesia, [4]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)
ochaiki@port.kobe-u.ac.jp

A two-stage selection process was applied to eight oleaginous yeast strains from the *Lipomyces* genera. In the primary selection stage, a nitrogen-limited mineral medium (NMM) that contained a mixture of glucose and xylose as a carbon source was used to evaluate the lipid-accumulating abilities of the yeast strains. The strains *L. doorenjongii*, *L. orientalis*, and *L. starkeyi* were selected as the potential strains in the primary selection. These three strains exhibited a remarkable ability to simultaneously assimilate glucose and xylose and achieved a cell biomass of more than 30 g/L. The values for lipid content in the selected strains were 57.89±1.92, 56.38±1.93, and 77.14±1.55% for *L. doorenjongii, L. orientalis*, and *L. starkeyi,* respectively. In the secondary selection, when the NMM medium contained an inhibitory chemical compound (ICC), the selected strains showed a different tolerance level against each of the typical inhibitor compounds. However, *L. starkeyi* accumulated the highest lipid content and yield at 68.24±2.48% and 0.19±0.00 (w/w), respectively. *L. starkeyi* accumulated high levels of intracellular lipid and tolerated the ICC. The composition of fatty acid methyl esters (FAMEs) was unaltered by the presence of ICC and the major FAMEs consisted of oleic, palmitic, stearic, palmitoleic and linoleic acids.

Selection of oleaginous yeast capable of high lipid accumulating during challenges from inhibitory chemical complexes

○Ario Betha Juanssilfero[1,2], Prihardi Kahar[1], Rezky Lastinov Amza[1], Yopi Yopi[2], Chiaki Ogino[1], Bambang Prasetya[3], Akihiko Kondo[4]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]LIPI, Indonesia, [3]BSN, Indonesia, [4]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)

Key words Oleaginous yeast, *Lipomyces*, Inhibitory Chemical Complexes, Lipid yield

1Fp05 海洋珪藻 *Fistulifera solaris* の代謝改変による高付加価値脂肪酸の効率的生産

○嶋田 礼迪[1], 松本 光史[2], 野島 大佑[1], 前田 義昌[1], 吉野 知子[1], 田中 剛[1]
（[1]農工大院・工, [2]電源開発）
tsuyo@cc.tuat.ac.jp

【目的】長鎖不飽和脂肪酸及び中鎖脂肪酸は，医薬品や健康食品などの原料として需要が高い．これらの高負付加価値脂肪酸は主に魚油やアブラヤシ，ココナッツなどから供給されているが，より生産性が高い供給源として微細藻類が注目されている．近年，微細藻類の遺伝子組換え技術の発展から，代謝改変による脂肪酸生産性の更なる向上が可能になりつつある．そこで本研究では，遺伝子組み換え可能なオイル高蓄積海洋珪藻 *Fistulifera solaris* に注目し，長鎖不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 （EPA），及び中鎖脂肪酸であるミリスチン酸の生産性を評価した．
【方法及び結果】EPA 合成を触媒する内在性 ω3 desaturase，及び中鎖脂肪酸をアシルキャリアタンパク質（ACP）から遊離させる *Cinnamomum camphora*（クスノキ）由来 acyl-ACP thioesterase を強発現させるプラスミドをそれぞれ調製し，パーティクルガン法にて *F. solaris* に導入した．獲得した ω3 desaturase 高発現株における EPA 生産性は野生株と比較して，3.3 倍に向上した．一方，acyl-ACP thioesterase 高発現株におけるミリスチン酸生産性は野生株の 2.2 倍に向上した．これらのことから，長鎖，中鎖のいずれの脂肪酸生産においても，*F. solaris* の遺伝子組み換えによる代謝改変が有効であることが示された．EPA の生産については *F. solaris* 野生株の培養条件を検討し，これまでに報告されている微細藻類の光独立栄養培養法による EPA 生産性の約 3 倍にあたる 135.7 mg/(l・day)を達成している．今後，ω3 desaturase 高発現株の培養条件を最適化することで EPA 生産性は更に向上すると期待される．以上より，*F. solaris* は高付加価値脂肪酸生産において有用な生産ホストであることが示めされた．

Efficient production of valuable fatty acids by metabolic engineering of the marine diatom *Fistulifera solaris*

○Hirofumi Shimada[1], Mitsufumi Matsumoto[2], Daisuke Nojima[1], Yoshiaki Maeda[1], Tomoko Yoshino[1], Tsuyoshi Tanaka[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]J-POWER)

Key words diatom, long chain fatty acids, medium chain fatty acids, metabolic engineering

1Fp06 Improvement of mass mixing by Max-Blend and anchor shape impeller in the high-solid state scarification of kraft pulp

○Deddy Triyono Nugroho Adi[1], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

Mass transfer limitation during the enzymatic scarification in high solid biomass concentration was one of the major challenges in the bio-refinery. The development of mixing methodology to provide the optimum distribution of biomass, enzyme, solvents, produced sugar and side products during the hydrolysis by selection the impeller is important. In this study, two different types of impeller, Max-Blend and anchor shape were evaluated during the hydrolysis of kraft-pulp. The hydrolysis was studied on 3 different types of kraft pulp, the unbleached pulp (LUKP), ozone-bleached pulp (LOKP) and bleached pulp (LBKP). The hydrolysis experiment was conducted in a 2-liter fermentor, using 10-20% solid loading and 5 FPU/g-$_{biomass}$ enzyme loading for 120 hours. The temperature 50℃ and pH 4.8 by citric/citrate buffer were performed during the experiment to provide the optimum environment for hydrolysis of pulp. The energy consumption, cellulose to glucose conversion was measured and evaluated during the experiment to obtain the optimum strategies of mixing and hydrolysis of pulp in high solid state situation proposed.

Improvement of mass mixing by Max-Blend and anchor shape impeller in the high-solid state scarification of kraft pulp

○Deddy Triyono Nugroho Adi[1], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words Max-Blend, anchor shape, kraft pulp, high solid state scarification

1Fp07 遺伝子組換えシアノバクテリアを用いた 1,3-プロパンジオールの高効率連続生産

○武田 真由子[1], 端 瞭太[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】現在地球温暖化や資源の枯渇が危惧されている．そこで炭酸ガスから物質生産を行う第三世代型バイオリファイナリー研究が進められている．これまで光合成細菌シアノバクテリア（藍藻）に遺伝子組換え技術を用いて 1,3-プロパンジオール(1,3-PDO)合成代謝経路を導入し，光合成により炭酸ガスから直接 1,3-PDO を生産する研究を進めてきた．1) 本研究では 1,3-PDO の生産性を更に向上させるため，種々の培養条件を最適化し，エアリフト型バイオリアクターを用いた 1,3-PDO の連続生産について検討を行った．
【方法】菌株には *Synechococcus elongatus* PCC7942 に 1,3-PDO 合成代謝経路を導入した TA2984 株を使用した．培地には抗生物質と誘導物質を添加した BG-11 培地を用い，その成分を種々に変化させた．2.0 L 容量のエアリフト型バイオリアクターを用いた連続培養では光源に蛍光灯を用い，炭酸ガスを供給し pH を制御する pH-stat システムを導入した．
【結果・考察】1,3-PDO 生産に適した培地組成を検討した結果，K_2HPO_4 濃度を増加させると 1,3-PDO 生産が促進された．次に光強度の影響を検討を行ったところ，220 ±10 μE/m^{2}s が最適となった．さらに pH-stat システムを用いて 1,3-PDO 生産に最適な pH 条件の検討を行ったところ，pH=8.0 において最も良好な 1,3-PDO 生産が得られることが明らかとなった．これらの結果に基づきエアリフト型バイオリアクターを用いて連続培養を行ったところ，約 60 日間の安定した運転と 1,3-PDO 生産を行うことができ，最大 1,3-PDO 濃度 2.45 mM，1,3-PDO 生産性 0.227 mM/day が得られ，生産性は回分培養の約 2.3 倍に向上させることができた．

1)端瞭太ら, 第 69 回日本生物工学会大会, 3P-N187, 2018

Effective 1,3-PDO production by genetically engineered cyanobacteria

○Mayuko Takeda[1], 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, 1, 3-PDO, airlift bioreactor

1Fp08 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], 内山 友香[2], 細田 晃文[2], 田村 廣人[2]
（[1]名城大・理工, [2]名城大院・農）
sjindou@meijo-u.ac.jp

エチレンはプラスチックなどの石油化学製品を製造する初発物質として極めて重要な工業用原料ガスである．我々は CO_2 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，新規なエチレン製造法の基盤技術を確立した．
具体的には，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)を複合体化(SOC2)させ，これをシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 へ導入し SOC2 株とした．結果，当該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，酵素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(Jindou et al., ACS Synth. Biol., 2014).
いっぽう，さらなるバイオエチレン生産効率の向上を目的として，酵素複合体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，SOC2 を構成する ACS および ACO の複合体内モル比が 1：2 となるよう，これに対応するキメラ骨格タンパク質 Cip3B を保持する SOC3B 株を構築した．結果，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．また，メチルチオアデノシン(MTA)による ACS の活性阻害を回避させるため MTA ヌクレオシダーゼ(MTAN)を既存の SOC2 株へ組み込んだ SOC3D2 株を構築した．結果，既存の SOC2 株と比較して，1.9 倍高いバイオエチレン生産量増加を観察した．
以上で得られた，酵素の組成変更によるバイオエチレン生産効率の上昇理論値より，ACS:ACO:MTAN=1:2:1 の各酵素モル比を持つ酵素複合体は SOC2 株比 3.2 倍のバイオエチレンを生産可能と考えられた．そこで，これを検討する事を目的として，本研究では新規の SOC4 株を構築し，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を GC で定量したので，この詳細を報告する．

Improved “ethylenome” composition for higher bio-ethylene production by a cyanobacterium.

○Sadanari Jindou[1], Yuka Uchiyama[2], Akifumi Hosoda[2], Hiroto Tamura[2]
([1]Faculty of Sci. and Technol., Meijo Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ.)

Key words cellulosome, ethylene, cyanobacteria, dockerin

1Fp09 気相培養による気生微細藻類 *Coelastrella* sp. KGU-Y002 のカロテノイドのエステル化

○恩田 岳英, 油井 信弘, 菅原 康里, 今村 保忠, 阿部 克也
（工学院大・先進工・生化）
bt13347@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】カロテノイドの中でもキサントフィル類は，その水酸基にアシル基が結合してエステル化することで，より高い抗酸化活性と生理活性を発現することが知られている．様々なエステル型カロテノイドを生合成できる気生微細藻類 *Coelastrella* sp. KGU-Y002 は，K^+添加培養によるアブシシン酸合成の応答が高等植物に類似していた．おそらく，KGU-Y002 株は気相条件下において，CO_2 を固定し，カロテノイドのエステル化反応を効率的に進行できると考えられた．本報告では，気相培養による KGU-Y002 株のカロテノイドエステル化反応について検討する．
【方法】BB 培地において前培養した KGU-Y002 株の藻体をフィルター上に集め，細胞フィルムを作製した．シャーレの中に滅菌水 12.5 mL を含ませた脱脂綿を敷き，その上に細胞フィルムを乗せた．暗所下または明所下（40，100，または 200 μmol photons m^{-2} s^{-1}），温度 25℃の条件で 7 日間気相培養を行った．培養後の藻体を回収し，そのカロテノイド，クロロフィル，または脂肪酸の含有量を HPLC，分光光度計，または GC を用いて測定した．
【結果・考察】明所下の気相培養により KGU-Y002 は，バイオマス量を 3 倍程増加させたが，暗所下では変化しなかった．また，培養初日と比べ光強度が強くなるに従いクロロフィル含有量は半分以下になり，強光下での気相培養では光合成活性が減少した．総カロテノイド含有量は 5~6 倍程度増加し，その中でエステル体は光強度 40 μmol photons m^{-2} s^{-1} で最大となった．各光条件において脂肪酸含有量とエステル体の蓄積とが相関していたため，脂肪酸の生合成がカロテノイドのエステル化に影響していたと考えられる．今後は，カロテノイドのエステル化反応を促進させるために，気相条件における K^+添加培養を検討する．

Carotenoid esterification in the aerial microalga *Coelastrella* sp. KGU-Y002 under aerial culture condition

○Takahide Onda, Nobuhiro Aburai, Yasusato Sugahara, Yasutada Imamura, Katuya Abe
(Dept.Chem.Life Sci.,Sch.Adv.Eng.,Kogakuin Univ)

Key words aerial microalgae, aerial culture condition, esterification, carotenoids

1Fp10 植物 P450 発現大腸菌を用いたモノテルペノイド変換条件最適化

○小島 基, 小森 彩, 鈴木 宗典, 中村 克哉
（神戸天然物化学(株)）
m_kojima@kncweb.co.jp

シトクローム P450(P450)は多くの生物に存在する酸化酵素の一群である．P450 はテルペノイドをはじめとする揮発性物質を基質とするものも多く知られており，テルペノイドの化学構造に多様性を付与する重要な役割を担っていると言える．弊社では P450 発現大腸菌を用いた微生物変換系を有しているが，揮発性物質の変換は物性などの諸問題から評価や大スケールへの展開が難しかった．そこで，モノテルペノイドを揮発性物質のモデル化合物とし，植物 P450 発現大腸菌を用いたモノテルペノイド変換法の確立ならびに変換効率に影響を及ぼす諸条件について検討を行ったので報告する．
最初に，モノテルペノイドの揮発性を考慮し正確な収率を求めるため，各種反応系によるモノテルペノイド回収率の検討をおこなった．密封系を用いた評価法を確立した後，微生物変換によるモノテルペノイド変換の最適化について検討を行った．一般に植物由来 P450 は膜結合タンパク質であることから，大腸菌での効率的な機能発現を可能とするために N 末端側の膜結合領域の改変検討を行った．その結果，膜結合領域の段階的な削除ならびに可溶性配列の付与により，改変前と比べて反応生成物量は約 1.7 倍に増加した．さらに，反応条件や P450 発現誘導条件等の最適化を検討した．温度や pH 等の反応基礎条件に加えて，基質添加方法等を最適化することにより，初期条件に比べて約 90 倍の反応生成物量向上を達成した．特に，P450 酸化反応に必須である酸素分子の供給を改良することにより，反応生成物量向上が認められたことから，密封系評価法において酸素分子供給の重要性が示唆された．これら結果は大スケール展開時の基礎知見ならびに揮発性物質酸化 P450 のスクリーニング等への応用が期待される．
本研究は，NEDO 委託事業『植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発』の一部として実施した．

Optimization of monoterpenoid oxidation with *E. coli* expressed plant-derived P450

○Motoki Kojima, Aya Komori, Munenori Suzuki, Katsuya Nakamura
(KNC Laboratories Co., Ltd.)

Key words cytochrome P450, monoterpenoid, bioconversion

1Fp11 組換えコリネ型細菌を用いた 3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸の発酵生産における酸素制限による促進作用

○川口 秀夫 [1,2], 宮崎 翔子 [2,3], 荻野 千秋 [2,3], 大西 康夫 [2,4], 近藤 昭彦 [1,3]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]JST・CREST, [3]神戸大院・工, [4]東大院・農生科）
kawaguchi_h@port.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】芳香族ポリマーであるポリベンズイミダゾール（PBI）は，高い耐熱性と機械的強度を示すスーパーエンプラであるが，既存の生産体系は化石資源に依存している．そこで我々は PBI 系ポリマーを再生可能資源であるバイオマスから製造するために，PBI 系ポリマーの原料となる 3-amino-4-hydroxybenzoic acid (3,4-AHBA)の発酵法による生産を研究している．遺伝子組換えコリネ型細菌による 3,4-AHBA 発酵生産は酸素制限により顕著に促進することを明らかにしたので，本発表でその詳細を報告する．
【方法】放線菌 *Streptomyces griseus* 由来の 3,4-AHBA 合成酵素をコードする 2 遺伝子（*griH*, *griI*)を発現させた組換えコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* を作製した．作製した組換えコリネ型細菌は，Jar を用いて溶存酸素濃度（DO）を制御条件下で培養し，グルコースからの 3,4-AHBA 発酵生産を比較した．
【結果と考察】3,4-AHBA 生産は，DO >2.66 ppm では一定レベルであったが（約 0.4 g/L），酸素制限（DO <1.5 ppm）によりその終濃度は 1.3 g/L まで増加した．DO >2.66 ppm では主要な副生物であるアミノ酸の種類と濃度が同程度であったのに対し，酸素制限下ではアミノ酸の総生産量が低下し，また生成するアミノ酸の種類が顕著に変化した．以上の結果より，酸素制限はコリネ型細菌によるアミノ酸生成を抑制し，炭素と窒素の余剰が生じることで 3,4-AHBA 生産を促進している可能性が示唆された．
【謝辞】本研究は，CREST「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」および，文部科学省「先端融合領域イノベーション創出拠点形成」プログラム（iBioK）の支援を受けて実施した．

Enhanced production of 3-amino-4-hydroxybenzoic acid from glucose by a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* under oxygen limitations

○Hideo Kawaguchi[1,2], Shoko Miyazaki[2,3], Chiaki Ogino[2,3], Yasuo Ohnishi[2,4], Akihiko Kondo[1,3]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]CREST, JST, [3]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [4]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, metabolic engineering, oxygen limitation, 3-amino-4-hydroxybenzoic acid

1Fp12 遺伝子組換え乳酸菌によるコーンコブを原料とした高収率 D-乳酸生産

○内藤 秋花 [1], 堀内 淳一 [1], 熊田 陽一 [1], 岡野 憲司 [2], 近藤 昭彦 [3], 田中 勉 [3]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]阪大院・工, [3]神戸大院・工）
horiuchi@kit.ac.jp

【背景と目的】当研究室ではこれまでバイオマス中のセルロース成分を主原料とした L/D-乳酸の生産を検討してきたが，バイオマス中のヘミセルロース成分も活用できればバイオマスに対する乳酸収率を大幅に向上できる．本研究ではキシロース資化能を付与した D-乳酸生産菌(1)を活用し，コーンコブ（とうもろこしの穂軸）を処理して得られるグルコース・キシロースをともに利用する高収率 D-乳酸生産プロセスの開発を目指した．
【方法】*Lactobacillus plantarum NCIMB 8826 Δldh1::PxylAB-xpk1::tkt-Δxpk2::PxylAB* を用いた．コーンコブを 1.5 %希硫酸中で処理し，ヘミセルロース成分をキシロースに酸加水分解し，その後メイセラーゼを添加しセルロース成分をグルコースに糖化した．この処理により 100g/L のコーンコブからグルコース約 25g/L，キシロース約 22g/L を含有する加水分解液が得られる．この加水分解液に MRS 培地成分を添加し回分培養を行った．また，効率化のため酸加水分解処理のみを行ったコーンコブを原料とした同時糖化発酵による D-乳酸生産も検討した．
【結果と考察】本菌を用いてコーンコブ加水分解液を原料とした回分培養を行ったところ 43.5g/L の D-乳酸(光学純度 96%)が得られ，本菌を用いてコーンコブ中のキシロース及びグルコースを利用した D-乳酸生産が可能なことが明らかとなった．次にプロセスの効率化のため同時糖化発酵を検討したところ，46.8g/L の D-乳酸が得られ，生産性が大幅に向上した．更にコーンコブ濃度を増加させ，D-乳酸の高濃度化を目指したが生産物阻害が観察されたことから，炭酸カルシウムを用いた pH 調整をおこなったところ，生産物阻害が緩和され，250g/L のコーンコブから 99.2g/L の D-乳酸生産を達成した．
1)Kenji Okano et al. , Applied and Environmental Microbiology (2009) 7858-7861

Efficient D-lactic acid production from corn cobs by genetically engineered lactic acid bacteria.

○Shuka Naito[1], Jun-ichi Horiuchi[1], Youichi Kumada[1], Kenji Okano[2], Akihiko Kondo[3], Tsutomu Tanaka[3]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [3]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words biomass, D-lactic acid, *Lactobacillus plantarum*, corn cob

1Fp13 Single cell protein (SCP) production using waste milk as a substrate by flower yeasts

○Khin Thandar Myint, Mitsuo Otsuka, Toshiaki Nakajima - Kambe
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Tsukuba Univ.)
nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

The amount of dairy milk production fluctuates depending on weather. When production exceeds demand, milk become industrial waste resulting in water pollution. Thus, an environmentally friendly method of effective use of excessively produced milk is necessary. One of the effective methods is liquid feed. Because of its high moisture content and susceptible to corruption, there is a portability problem. In this study, we aimed to reduce waste and disposal cost by producing single cell protein (SCP) using milk as substrate by flower yeast. The final aim is to commercialize yeast in anticipation of industrial use with milk, recovering cells and commercializing SCP as feed additive. Yeast was newly isolated from flowers and growth in milk was examined. Strain showing excellent growth from Camellia was obtained. To verify usefulness, 18S rRNA base sequence was determined and taxon group attribution was estimated. It was identified as *Kluyveromyces lactis* and is a Generally Recognized As Safe (GRAS) yeast with lactose assimilation ability. *Kluyveromyces marxianus* and *Rhodotorula glutinis* were isolated from Nemophila and Kinmokusei and identified by 26S rRNA D1 / D2 base sequence . *Kluyveromyces marxianus* is thermo-tolerant SCP producing yeast. *Rhodotorula glutinis* is red fat accumulating single cell oil producing yeast. Currently, we narrow down SCP production stocks and investigate the combination of flower yeasts with high productivity and wastewater treatment capacity.Nutritional analysis of cells is also carried out.

Single cell protein (SCP) production using waste milk as a substrate by flower yeasts

○Khin Thandar Myint, Mitsuo Otsuka, Toshiaki Nakajima - Kambe
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Tsukuba Univ.)

Key words single cell protein, flower yeast, milk, waste water treatment

1Fp14 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・キシリトール生産

○井上 順允, 堀内 淳一, 熊田 陽一
（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から得られるグルコース及びキシロースをともに活用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ともに資化することができ，細胞内にアスタキサンチンを，細胞外にキシリトールを分泌する能力を持つ．本研究ではこの *X. dendrorhous* を用い，未利用バイオマスであるコーンコブを原料としたアスタキサンチン及びキシリトール生産を試みた．
【方法】菌株は *Xanthophyllomyces dendrorhous* (JCM 9680・9681・9682・9683・9684・19184)を用いた．培地はグルコース及びキシロースを 25 g/L を含有する合成培地及びコーンコブ加水分解液を用いた．コーンコブ加水分解液は，コーンコブを酸加水分解及び酵素糖化後，活性炭処理(白鷺 M)を行い，培地とした．有効容量 5 L のジャーファーメンターを用い，pH 5.0，通気量 1 vvm，温度 22 ℃とし，撹拌速度を 500～700 rpm に制御し，回分培養を行った．
【結果・考察】合成培地を用いて各菌株の培養特性を比較したところ，いずれの菌株でもグルコース及びキシロースが速やかに資化され，その中でも JCM 9680 及び 9683 はアスタキサンチンを 2.91，3.96 mg/L 生産するとともに，キシリトールを 10.15，16.34 g/L 生産した．そこでコーンコブ加水分解液を用いて JCM 9680 を培養したところ，菌体増殖が促進され，3.1 mg/L のアスタキサンチンを生産したが，キシリトールはほとんど蓄積されなかった．このキシリトール生産の減少は，コーンコブ加水分解液に含まれる高濃度のミネラル成分の影響によるものと考えられた．また本発表ではコーンコブ加水分解液を用いた JCM 9683・9684 の培養についても報告する．
本研究は科研費基盤研究(C)(No.16K0687) 及び 財)発酵研究所の支援を得た．

Production of astaxanthin and xylitol from renewable resources by *Xanthophyllomyces dendrorhous*

○Kazumasa Inoue, Jun-ichi Horiuchi, Yoichi Kumada
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words *Xanthophyllomyces dendrorhous*, astaxanthin, xylitol

1Fp15 白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41 株による好気的水素産生経路の解析

○髙橋 沙綾[1], 曽我 亜由美[1], 森 智夫[2], 河岸 洋和[2,3,4], 平井 浩文[2,3]
（[1]静大院・総合農, [2]静大農・応生科, [3]静大・グリーン研, [4]静大院・創造）
hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】
近年，従来利用されてきた化石燃料の代替となるエネルギーとして，水素が注目されている．現在の製造法には二酸化炭素の排出といった問題点があり，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技術の構築が必須である．これまでに当研究室では自然界より木質バイオマスから好気的に水素を産生可能な白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41 株の選抜に成功している．本研究では本菌の好気的水素産生経路について解析を行った．
【方法・結果】
T. versicolor K-41 株が有するヒドロゲナーゼ遺伝子（*TvK41hyd*）を組換えた大腸菌を作出し，微好気条件下での水素産生量を測定した結果，大幅な水素産生量の増加が確認され，*TvK41hyd* の水素産生への関与が示された．また，還元型メチルビオロゲンを電子供与体として，酸素濃度 0%あるいは 10%条件下で TvK41HYD 活性試験を行った結果，両条件で同等の水素産生活性が認められたことから，*T. versicolor* K-41 株が酸素耐性ヒドロゲナーゼを有している可能性が示唆された．
白色腐朽菌は菌体外にシュウ酸を産生することが知られており，シュウ酸代謝にはシュウ酸デカルボキシラーゼ及びギ酸デヒドロゲナーゼが関与することが知られている．また一般的な生物学的水素産生経路においてギ酸デヒドロゲナーゼの関与も報告されている．そこで，本菌の有するギ酸デヒドロゲナーゼ（*TvK41fdh*）を大腸菌に導入し，水素産生能を調査した結果，*TvK41fdh* の導入により大幅な水素産生が認められた．以上の結果より，*TvK41fdh* の水素産生への関与が考えられたため，現在，*TvK41hyd* 及び *TvK41fdh* の水素産生における関連性を詳細に調査中である．

Analysis of aerobic hydrogen production pathway in white-rot fungus *Trametes versicolor* K-41

○Saaya Takahashi[1], Ayumi Soga[1], Toshio Mori[2], Hirokazu Kawagishi[2,3,4], Hirofumi Hirai[2,3]
([1]Graduate School of Agriculture, Shizuoka Univ., [2]Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ.)

Key words white-rot fungi, aerobic hydrogen production, hydrogenase, formate dehydrogenase

1Fp16 低温菌を活用したシンプル酵素触媒によるジカルボン酸の効率的生産

○中野 翔, 羅 宮臨風, 田島 誉久, 加藤 純一
（広島大院・先端物質）
ttajima@hiroshima-u.ac.jp

【目的】低温菌シンプル酵素触媒は，中温性酵素を発現させた低温菌を熱処理することで，宿主の代謝酵素失活による副産物生成抑制と基質の膜透過性向上により効率的な変換が可能である．ジカルボン酸の一種であり，合成繊維等の原料として利用されるイタコン酸は，現在真菌の発酵により生産されるが，生産コストが高い．そこで，シンプル酵素触媒を用いることにより，低コストで効率的な生産が期待される．本研究では，低温菌 *Shewanella frigidimarina* を用いた効率的な生産プロセスの構築を目的とした．
【方法・結果】*Aspergillus* 属由来のアコニターゼと *cis*-アコニット酸デカルボキシラーゼ(CAD)の低温菌発現株を用いることにより，高収率でイタコン酸が生産された．しかし，菌体を回収して再度反応を行ったところ，酵素が反応液中に漏出するため繰り返し反応は困難であった．そこで，シンプル酵素触媒の包括的固定化を行った．一般的な固定化担体であるアルギン酸ナトリウムは，基質であるクエン酸が 2 価陽イオンをキレートするためそもそも固定化できない．そのため，κ-カラギーナン，ポリビニルアルコール，ケイ酸エチル(TEOS)による固定化法を試みた．その結果，TEOS による固定化触媒が最も酵素活性が高いことが明らかとなった．次に，TEOS 固定化触媒を用いた繰り返し反応を行ったところ，2 回目の反応によるイタコン酸生産量は，1 回目の反応の 1/3 程度に低下した．その原因として，TEOS 固定化することでアコニターゼの漏出は防ぐことができたものの，分子量の小さい CAD が漏出したことが考えられた．よって，現在は CAD が漏れない新たな固定化担体の検討と，アコニターゼと CAD を連結させたフュージョンタンパク質の構築による高分子化を行っている．

Efficient production of Dicarboxylic acid by psychrophile-based simple biocatalyst

○Sho Nakano, Gonglinfeng Lou, Takahisa Tajima, Junichi Kato
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words enzyme production, immobilization, fusion protein, psychrotroph

1Fp17 子嚢菌 *Talaromyces trachyspermus* による多価カルボン酸含有バイオサーファクタントの効率的生産

○林 真人, 高野 真希, 星野 一宏
（富山大院・理工・生命工）
khoshino@sus.u-toyama.ac.jp

【目的】近年，高い生分解性や低い CMC，環境負荷低減の観点からバイオサーファクタントが注目されている．さらに，生理活性作用などの特性も有しており，新規バイオマテリアルとしての活用が期待されている．例えば，*B.subtilis* が生産する Surfactin は，皮膚への低刺激性や抗菌性，高い界面活性作用を有し，化粧品等に使用されている．さらに，*P.spiculisporum* が生産する Spiculisporic acid (SA)は 1 個のラクトン環と 2 個のカルボキシル基を有する特異な構造を有しており，これらカルボキシル基を介し薬剤などの有用物質を修飾できる可能性を有している．我々は，昨年，この *P.spiculisporum* のテレオモルフである子嚢菌 *Talaromyces trachyspermus* が SA を生産することを新規に見出した．そこで本研究では，本子嚢菌の培養条件を改善することにより SA を効率的に生産させることを検討した．【方法・結果】本研究では，*P.spiculisporum* のテレオモルフである *T.trachyspermus* 10 株を使用した．対象として，SA の工業的生産に用いられる *P.spiculisporum* を用いた．炭素源として 100 g/L Glucose を使用し，培養初期 pH は 2.0 に設定した．培養は 500 mL 三角フラスコに培地 100 mL を入れ，28°C，7 日間振盪した．培養液中の Spiculisporic acid 量は，培養液中の固形分を Ethanol で溶解させ，再析出させた精製物の重量より求めた．*P.spiculisporum* の場合，7 日間の振盪培養により SA を 4.2 g/L 生産した．一方，*T.trachyspermus* の全ての菌株においても SA の生産を確認でき，特に NBRC 32238 株では，11.3 g/L も生産できることが判明した．さらに実験計画法 (DOE) による培地成分の改善により，SA の生産を 30.2 g/L まで向上させることができた．現在，Fed-batch 法による SA 生産性の向上を検討中である．

Effective production of biosurfactant with multivalent carboxyl groups by Ascomysota *Talaromyces trachyspermus*

○Makoto Hayashi, Maki Takano, Kazuhiro Hoshino
(Grad. Sch. Sci. Eng., Univ. Toyama)

Key words *Talaromyces trachyspermus*, biosurfactant, Spiculisporic acid

1Fp18 Extracellular pigment production from *Talaromyces purpurogenus* and their applications

○Sharad Bhatnagar[1], Takashi Ueno[2], Hideki Aoyagi[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Dept. Mater. Environ. Eng., Hakodate Natl. Coll.Tech.)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

Fungal pigment production offers an interesting alternative to chemical pigment production thrust owing to their natural and environmentally friendly production. But intracellular production and water insolvent pigments often limit their use in some potential applications. Ascomycota *Talaromyces purpurogenus*, previously known as *Penicillium purpurogenum* has been touted as a potential producer of various Monascus like pigments. In our research, we have attempted to realize this potential by utilizing submerged fermentation process for efficient production of water soluble extracellular pigments. The quantity of produced pigment as well as pigment composition was found to be dependent on concentration of carbon and nitrogen sources. Best yields were obtained using sucrose and peptone. Salts such as magnesium sulfate and dipotassium phosphate influenced the productivity positively. Initial pigment yields were found to be around 5~8 g/L. Using statistical designs, we have tried to optimize the media for pigment production, in terms of effect of carbon, nitrogen sources and other co-factors. The pigment produced was found to be thermally, chemically and photoprotective in nature. The pigment also exhibits antibacterial activity against gram-positive bacterium and oxidation-reduction capacity. Development of potential applications by harnessing these properties such as UV-protective agent and generation of metallic nanoparticles has been attempted.

Extracellular pigment production from *Talaromyces purpurogenus* and their applications

○Sharad Bhatnagar[1], Takashi Ueno[2], Hideki Aoyagi[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Dept. Mater. Environ. Eng., Hakodate Natl. Coll.Tech.)

Key words pigment, statistical design, *Talaromyces purpurogenus*, nanoparticles

1Gp01 大腸菌発現システムを用いた医薬中間体，(*R*)-2-クロロマンデル酸の新規産生方法

○山村 栄虎, 北 伸二
（協和ファーマケミカル）
eitora.yamamura@kyowa-kirin.co.jp

【背景と目的】(*R*)-2-クロロマンデル酸 ((*R*)-2-CM) は，血小板凝集阻害剤や抗血栓剤として高い有用性が期待されるクロピドグレルなどの合成に使用される医薬中間体の 1 つである．バイオコンバージョンで (*R*)-2-CM を取得することを目的とし本研究を行った．
【方法と結果】ラセミ体の 2-クロロマンデル酸メチルエステル (2-CMM) を不斉加水分解して(*R*)-2-CM を産生するスキームを描き，菌株スクリーニング，酵素精製，遺伝子の単離，そして遺伝子組換え株を作製し，2-CMM から(*R*)-2-CM を産生した．(1) 不斉加水分解酵素の探索：1095 株の菌をスクリーニングした結果，70% ee 以上の *R* 選択性を示す菌が 11 株あった．その菌のうち，*Exophiala dermatitidis* NBRC 6857 (Former name: *Exophiala jeanselmei* until August 2009)が高活性であった． (2) *E. dermatitidis* NBRC 6857 からの酵素精製：菌を培養したあと超音波で菌体破壊し，酵素精製した．収率 8%，精製倍率約 80%で単一に精製できた．(3) 精製酵素のキャラクタライゼーション：分子量; 42 kDa，Subunit; Monomer，至適 pH; pH7.5，至適温度; 45℃であった．リシルエンドペプチターゼで精製酵素を切断し，内部配列を決定した．(4)遺伝子の単離：精製酵素の内部配列から遺伝子配列を推定し，*E. dermatitidis* NBRC 6857 の cDNA から遺伝子取得した．β-ラクタマーゼの活性部位モチーフやセリンプロテアーゼの活性部位モチーフがある新規加水分解酵素(*EstC*)であった．(5): 遺伝子組換え菌の作製：大腸菌発現プラスミド pQE-70 を使用し組換え大腸菌を作製した．IPTG 誘導株の場合は 21 U/ml-culture の活性で，IPTG 非誘導株は 12 U/ml-culture の活性であった．IPTG 非誘導株を使用し 10%の 2-CMM を加水分解したところ，50% 加水分解し，その光学純度は 95% ee であった．

A novel method for producing a pharmaceutical intermediate, (*R*)-2-Chloromandelic acid, using *Escherichia coli* expression systems

○Ei-Tora Yamamura, Shinji Kita
(Kyowa Pharma Chemical Co., Ltd.)

Key words protein, gene expression, *Escherichia coli*

1Gp02 エチレン生成酵素の方向付け進化による耐熱化のためのコハク酸要求性 *Thermus thermophilus* 変異体の解析

○魚住 昇平, 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

【目的】微生物由来のエチレン生成酵素(EFE)は，植物の酵素と異なり，2－オキソグルタル酸(2OG)と L-アルギニンからエチレンとコハク酸を生成する反応を 2：1 の割合で触媒する．*Pseudomonas syringae* 由来 EFE を他の微生物で発現させ，エチレンを様々な炭素源から生産する研究を行ってきた．しかし，EFE の熱安定性は低く，高温でのエチレン生産は不可能である．この研究では好熱菌 *Thermus thermophilus* を宿主として，EFE の熱安定化を方向付け進化によって達成することを目的とした．そのために，EFE のもつコハク酸生成反応を利用し，高温でコハク酸要求性 *T. thermophilus* を相補できるような突然変異体を選択する．
【方法および結果】コハク酸供給経路を削除するため，2OG から脱炭酸反応で生成するコハク酸セミアルデヒドを介してコハク酸を生成するコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(*ssd*)遺伝子を耐熱性カナマイシン耐性遺伝子で破壊した．*T. thermophilus* KT8(*pyrE leuBD*)株の *ssd* 遺伝子を破壊して得られた S1 株は，ウラシル要求性をもつため，2OG 脱水素酵素(OGDH)のサブユニットをコードする *sucA* 遺伝子 ORF を *pyrE* ORF で置換した *sucA::pyrE* 破壊プラスミド，pMOSBlue2.2 を作成した．直線状にした pMOSBlue-2.2 を用いて S1 株を形質転換した結果，ウラシルを含まず 10mM コハク酸を含む最少培地上でコロニーが得られた．これらの形質転換体の PCR 分析の結果，*sucA::pyrE* 遺伝子と野生型 *sucA* 遺伝子がヘテロな状態であった．さらに 10mM コハク酸培地で植え継ぐことにより，*sucA* 完全破壊株を取得している．

Analysis of succinate-requiring mutants from *Thermus thermophilus* to develop thermostable ethylene-forming enzyme by directed evolution

○Shiyouhei Uozumi, Yasumune Nakayama, Kazuhiro Nagahama, Masayoshi Matsuoka
(Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words thermophile, thermostable enzyme, ethylene

1Gp03 超好熱性アーキア *Pyrococcus chitonophagus* における遺伝子組換え系の構築

山田 将大, 中田 菜月, Aslam Mehwish, ○金井 保, 跡見 晴幸
（京大院・工）
atomi@sbchem.kyoto-u.ac.jp

超好熱性アーキア *Pyrococcus chitonophagus*（以前の名称は *Thermococcus chitonophagus*）はキチンを主な有機物源とした培地により生育可能であり，3 つのキチナーゼ遺伝子をもつ．本研究では，キチン分解における各キチナーゼの分子機構の解明を目指して，*P. chitonophagus* の遺伝子組換え系の構築および各キチナーゼ遺伝子破壊株の作製を目標とした．まずは 5-fluoroorotic acid (5-FOA)耐性を指標として，*P. chitonophagus* の *pyrE* 破壊株の単離を試みた．その結果，ウラシル要求性と 5-FOA 耐性を示す CHU1 株が得られ，本菌において *pyrE* の大部分が欠損している一方で，*pyrF* には変異が無いことを確認した．次に CHU1 株をホスト株として用いて，各キチナーゼ遺伝子破壊株の作製を試みた．3 種のキチナーゼ遺伝子（*chiA*, *chiC*, *chiD*）に対して *pyrE* を含む遺伝子破壊ベクターをそれぞれ構築し，これらを用いてシングルクロスオーバー相同組換え（pop-in）と相同組換えによる *pyrE* の除去（pop-out）による遺伝子破壊を進めた．その結果，*chiC* と *chiD* の破壊ベクター（30μg）を添加した場合にウラシルを含まない培地での生育が確認され，遺伝子破壊ベクターのゲノム内への導入が示唆された．続いて，0.1%（w/v）5-FOA を含む液体培地で複数回継代培養することで，*chiC* と *chiD* の遺伝子破壊株が培地中で濃縮されていることを確認した．その後，固体培地を用いて，*chiC* 破壊株（CHDC1 株）と *chiD* 破壊株（CHDD1 株）をそれぞれ単離することに成功した．

Construction of a genetic system of the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus chitonophagus*

Masahiro Yamada, Natsuki Nakada, Mehwish Aslam, ○Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi
(Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ.)

Key words chitin, gene knockout, hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus chitonophagus*

1Gp04 メタン酸化細菌 *Methylococcus capsulatus* (Bath)の効率的なカウンターセレクション法の開発

○石川 聖人[1], 横江 奨[1], 加藤 創一郎[2], 堀 克敏[1]
（[1]名大院・工, [2]産総研・生物プロセス）
khori@chembio.nagoya-u.ac.jp

【目的】メタン酸化細菌はメタンを分解する微生物としてだけではなく，有用物質に変換する微生物宿主としても注目されている．しかし，遺伝子操作ツールが限定されていることが大きな足枷となり，メタン酸化細菌を宿主とした代謝工学の多くが実現されていない．*Methylococcus capsulatus* (Bath)は *sacB* 遺伝子を対立遺伝子マーカーとしたカウンターセレクションがわずかに報告されている．我々は，既報に従いカウンターセレクションを実施したが，変異株を取得できなかった．本研究では，*sacB* 遺伝子に替わる対立遺伝子マーカーを構築し，効率的な変異株の取得を目指した．
【方法】*sacB* 遺伝子を含む自殺プラスミドは pJQ200sk を使用した．*sacB* 遺伝子の代替マーカーとして変異 *pheS* 遺伝子を人工遺伝子合成により取得し，pJQ200sk の *sacB* 遺伝子と置換した．標的遺伝子の上下流配列をクローニングし，接合伝達を介して Bath 細胞に導入した．カウンターセレクションの効率は寒天培地での生育状態によって評価し，標的遺伝子の変異については PCR にて確認した．
【結果と考察】*sacB* 遺伝子の導入されたグラム陰性菌はスクロースを含む培地で致死となる．しかし，グラム陰性菌であっても Bath 株では *sacB* 遺伝子が十分に機能せず，スクロースを含む培地でも生育することを見出した．一方，変異 *pheS* 遺伝子の導入された Bath 株は *p*-chlorophenylalanine を含む培地に対して致死性を示した．この結果に基づき，変異 *pheS* 遺伝子を対立遺伝子マーカーとしたカウンターセレクションを試みたところ，標的遺伝子の変異株を効率良く取得できた．本研究の成果は，メタン酸化細菌を宿主とした代謝工学に大いに貢献すると考えられる．

Development of an efficient counterselection for *Methylococcus capsulatus* (Bath), a methanotrophic bacterium

○Masahito Ishikawa[1], Sho Yokoe[1], Souichiro Kato[2], Katsutoshi Hori[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]BRI. AIST)

Key words methanotroph, counterselection, *pheS*

1Gp05 酢酸菌を宿主とした異種タンパク質生産の試み

○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], 福田 青郎[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 *Komagataeibacter europaeus* は長く食酢製造に用いられ，安全な微生物として認知されている．本菌の菌体収量は高生産される酢酸により雑菌の汚染も防止されるが，細胞内の pH は他の酢酸菌ほど低くない（1）．また *K. europaeus* には 3 種の内在性プラスミドが存在し，遺伝子操作系も確立されている．これらの特徴から本菌は物質生産系の宿主としての利用が期待される（2）．そこで本研究では，*K. europaeus* で実際に外来遺伝子を発現させ，宿主としての有用性を検証した．また超好熱菌の耐熱性分子シャペロニンを共発現させ，その安定化効果についても調べた．
【結果と考察】外来遺伝子として大腸菌由来のβガラクトシダーゼ（β-Gal）および好酸性超好熱菌 *Sulfolobus solfataricus* の有機リン分解酵素 *Sso*Pox（*S. solfataricus* paraoxonase）を用いた．まずβ-ラクタマーゼ遺伝子プロモーター（P_{bla}）の直下にβ-Gal 遺伝子（*lacZ*）を導入したプラスミドを構築し，*K. europaeus* に導入した．*K. europaeus* 中でβ-Gal は発現し，酵素活性は確認されたが，細胞の増殖が定常期に入ると低下した．これは細胞内の pH が低下したことに起因すると考えられる．そこでラクトースオペロンプロモーター（P_{lacUV5}）に *Thermococcus kodakarensis* 由来分子シャペロニン遺伝子（*cpkB*）を導入したプラスミドを構築し，β-Gal，CpkB 共発現株を構築した．共発現株では，β-Gal 活性は定常期においても維持された．次に有機リン加水分解酵素である *Ssopox* 遺伝子を P_{bla} の直下に導入したプラスミドを構築し，*K. europaeus* に導入したところ，活性は確認されたが微弱であった．現在，遺伝子の発現量を調節可能（高発現可能）なプロモーター，その制御領域の探索を試みている．

(1) 繁ら 2017 年度生物工学会
(2) Akasaka, N., et al., J. Biosci. Bioeng., 119 (6) : 661-668 (2015)

Trial of heterogeneous gene expression in acetic acid bacteria

○Yuki Shige[1], Haruka Higashikubo[1], Yuri Ishi[1], Naoki Akasaka[2], Hisao Sakoda[2], Ryota Hidese[1], Wakao Fukuda[1], Shinsuke Fujiwara[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Marukan Vinegar Co., Ltd.)

Key words Acetic acid bacteria, *Komagataeibacter europaeus*, expression system, bio-production

1Gp06 低温菌 *Pseudoalteromonas* sp. Sq02 株を宿主とした タンパク質低温分泌生産システムの構築

○河合 総一郎, Puti Wanguyun Aken, 川本 純, 小川 拓哉, 栗原 達夫
（京大・化研）
kurihara@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp

【目的】低温菌を宿主としたタンパク質生産系は熱安定性の低いタンパク質などの生産に適している．一方，タンパク質の分泌生産は目的タンパク質の分離精製の簡便性という観点から有用である．本研究では，ハマチ（*Seriola quinqueradiata*）腸管由来の低温適応グラム陰性細菌 *Pseudoalteromonas* sp. Sq02 を宿主としたタンパク質分泌生産システムの開発に取り組んだ．
【方法と結果】ハマチの腸管から 4 °C での生育速度と分泌タンパク質生産能に秀でた低温菌 *Pseudoalteromonas* sp. Sq02 を単離した．本菌は 4 °C から 18 °C で良好に生育し，培養上清に機能未知タンパク質 P320 を分泌することが見いだされた．P320 遺伝子のプロモーターとその下流にβ-ラクタマーゼまたは好冷菌 *Desulfotalea psychrophila* DSM12343 由来の PepF，LAP，PepQ，BglA のいずれかの遺伝子を組み込んだ広宿主域プラスミド pJRD215 を *Pseudoalteromonas* sp. Sq02 に導入した．P320 プロモーターの制御下で発現したβ-ラクタマーゼの比活性は，18 °C で 0.93 U/mg，4 °C で 0.62 U/mg であり，既存の低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 を宿主とするタンパク質低温生産系と比較して，18 °C で 1.8 倍，4 °C で 2 倍高い比活性を示した．PepF，LAP，PepQ，BglA については，18 °C ではそれぞれ 1.0 倍，5.2 倍，1.2 倍，3.2 倍，4 °C ではそれぞれ 5.3 倍，4.1 倍，7.1 倍，10.3 倍の生産量を示し，既存の生産系に対する優位性が認められた．分泌タンパク質である P320 の C 末端にβ-ラクタマーゼを融合したタンパク質の遺伝子を組み込んだプラスミドを導入した *Pseudoalteromonas* sp. Sq02 では，培養液上清に融合タンパク質が分泌されることが見いだされた．この結果は，本菌による P320 の分泌能を利用することで，低温における異種タンパク質の分泌生産が可能であることを示している．

Secretory production of recombinant proteins at low temperatures by using a psychrotrophic bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. Sq02

○Soichiro Kawai, Aken Puti Wanguyun, Jun Kawamoto, Takuya Ogawa, Tatsuo Kurihara
(Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

Key words cold-adapted microorganism, promoter, protein expression, secreted protein

1Gp07 タンパク質高生産株を選別する遺伝子直列配置型蛍光レポーター法の提案

○鈴木 宏和[1], 大谷 千晶[1], 奥村 友太[2], 大城 隆[1]
（[1]鳥取大院・工, [2]鳥取大院・持社創生）
hirokazusuzuki@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．本手法の有効性は，複数のモデル実験によって証明されており，例えば枯草菌の核酸合成酵素（BSpyrFA）からは，半数変性温度が 10°C ほど向上した変異体（BSpyrFV）が得られた．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蛍光レポーター直列法の有用性について検証した．
【実験と結果】本法では，対象酵素遺伝子を上流に，黄色蛍光タンパク質（Venus）の遺伝子を下流に配置し，好熱菌内で発現させる．さらに上流遺伝子の終始コドン直前に *venus* とはフレームがずれた開始コドンを挿入する．これにより上流遺伝子からの連続的翻訳が正確に Venus 蛍光に反映されると期待した．BSpyrFA と BSpyrFV の遺伝子を用いて本方法を評価したところ，残念ながら上流遺伝子産物の耐熱性と産生される蛍光タンパク質量の間に相関性は見られなかった．しかし同プラスミドを大腸菌に導入し，大腸菌内で産生されるモデル酵素量と大腸菌細胞蛍光強度を調べたところ，その間に強い相関がみられた．（相関係数，0.82）．本結果は，蛍光レポーター直列法改が，遺伝子高発現株のスクリーニングに利用できることを示唆している．より詳細な解析が必要であるが，本手法は酵素研究分野や酵素産業分野における①酵素高生産株の選別，②酵素高生産条件の探索，および③高生産性変異体のスクリーニング，などに利用できるかもしれない．

Expression level of a target gene may be readily analyzed using a fluorescence reporter gene arranged in tandem

○Hirokazu Suzuki[1], Chiaki Ohtani[1], Yuta Okumura[2], Takashi Ohshiro[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tottori Univ., [2]Grad. Sch. Sust. Sci, Tottori Univ.)

Key words *Geobacillus*, expression system, screening, thermostability

1Gp08 *Geobacillus* 属で機能する高発現プロモーターを網羅的転写解析で探索する

○奥村 友太[1], 坂口 由希菜[2], 倉敷 凌太[2], 大城 隆[2], 鈴木 宏和[2]
（[1]鳥取大院・持社創生・工, [2]鳥取大・工）
hirokazusuzuki@bio.tottori-u.ac.jp

【目的】我々は，*Geobacillus* 属好熱菌を宿主とした遺伝子発現ツールの開発を進めており，これまでに推定マルトース代謝遺伝子群のプロモーター（P_{gk704}）が本好熱菌内における遺伝子発現に有用であることを見出した．P_{gk704} はマルトースで誘導できるが，利用できる培地に制限があり，また基底発現レベルが高い．さらに P_{gk704} は大腸菌内でも高度に機能するため，その下流にクローニングできない遺伝子も多く見いだされる．そこで本研究では，*Geobacillus* 属好熱菌で高発現する新規かつ汎用的なプロモーターを，網羅的転写解析を利用しながら探索した．
【方法】*G. kaustophilus* HTA426 株を LB 培地中 60℃で液体培養し，増殖期中期の細胞を回収した．その細胞から total RNA を抽出し，次世代シークエンサーを用いた網羅的転写解析に供した. 転写量が高い遺伝子 5 個の推定プロモーター領域を PCR で増幅し，蛍光タンパク質遺伝子（*venus*）上流にクローニングした．本カセットを常法に従い HTA426 株の染色体上に挿入した．得られた変異株を用いたレポーターアッセイにより各プロモーターの発現特性を検討した．
【結果と考察】詳細に解析した 5 つのプロモーターのうち，2 つの有用プロモーターが見出された．1 つ目は *GK1356* プロモーター（P_{gk1356}）で，これは培地や培養時間に依存することなく発現した．その発現レベルは，P_{gk704} よりもはるかに強く，P_{gk1356} は培養条件に影響しにくいプロモーターとして有用と考えられる．ただし，P_{gk1356} は大腸菌でも機能しやすかったため，毒性遺伝子の発現には不向きかもしれない．もう 1 つは *GK2215* プロモーターで，LB 培地特異的に高発現した．その発現レベルは，定常期において上昇し，大腸菌における機能性が相対的に低いという長所もあった．現在，これらプロモーターを配置した新たな発現用プラスミドの構築と評価を行っている．

Transcriptome-based identification of robust promoters that enable protein overproduction in *Geobacillus* spp.

○Yuta Okumura[1], Yukina Sakaguchi[2], Ryota Kurashiki[2], Takashi Oshiro[2], Hirokazu Suzuki[2]
([1]Dept. Eng., Grad. Sch. Sust. Sci, Tottori Univ., [2]Fac. Eng., Tottori Univ.)

Key words *Geobacillus*, RNA-Seq, promoter, *venus*

1Gp09 100 kb を超える枯草菌染色体 DNA セグメントの簡便迅速な接合伝達

○吉田 健一[1], 宮野 恵[1], 石川 周[1], Miguel-Arribas Andres[2], Meijer Wilfried J. J.[2]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]マドリード自治大）
kenyoshi@kobe-u.ac.jp

納豆菌に由来する接合伝達プラスミド pLS20cat は，供与細胞と受容細胞を液体培地中で短時間混合するだけで接合伝達される高効率な伝達能力を有する．さらに，pLS20cat はヘルパープラスミドとしても機能することができ，pLS20cat 自身に加えて同一細胞内に共存する oriT 配列（oriT-LS20）を含む他の可動プラスミドの伝達を媒介することもできる．一方，pLS20cat は自身を含まない受容細胞にのみ DNA を接合伝達するので，pLS20cat を一旦受け取った受容細胞は再び pLS20cat の機能により DNA の接合伝達を受けることができない．そこで，pLS20cat を改変して oriT-LS20 を削除した．この改変により得られた pLS20catΔoriT は自身の接合伝達を完全に消失したが，共存する可動プラスミドを高効率に伝達するヘルパープラスミド機能を依然として保持していた．従って，pLS20catΔoriT を保有する供与細胞から受容細胞へ，何度も繰り返して自身以外の DNA を接合伝達することが可能となった．そこで，枯草菌の染色体に oriTLS20 を挿入し，これを起点として染色体 DNA を pLS20catΔoriT のヘルパープラスミド機能によって伝達することができるか否か検討した．その結果，少なくとも 113 kb に及ぶ巨大 DNA セグメントを迅速に接合伝達することができた．昨今，長大な DNA を人工的にデザイン構築する“ゲノム合成”が次世代の生物工学を切り拓く技術として注目されている．我々が開発した pLS20catΔoriT による染色体 DNA の接合伝達は，100 kb を超える DNA セグメントを簡便迅速，且つ繰り返して受容細胞へと伝達して集積することを可能とするので，ゲノム合成を加速する新たなツールとして利用価値が見込まれる．
参考文献：Miyano et al. (2018) Microb Cell Fact. 17(1):13

Rapid conjugative mobilization of a 100 kb segment of *Bacillus subtilis* chromosomal DNA is mediated by a helper plasmid with no ability for self-transfer

○Ken-ichi Yoshida[1], Megumi Miyano[1], Shu Ishikawa[1], Andres Miguel-Arribas[2], Wilfried J. J. Meijer[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Universidad Autonoma, Madrid)

Key words *Bacillus subtilis*, bacterial conjugation, synthetic genomics

1Gp10 枯草菌スポアの発芽レセプターコンポーネントの機能解析

○坂元 仁[1], 古田 雅一[1,2,3], 土戸 哲明[1]
（[1]大阪府大・微制研, [2]大阪府大・放研セ, [3]大阪府大院・工・量子）
sakamoto.jj@gmail.com

〔背景〕細菌スポアは加熱・薬剤に非常に耐性が高く，食品や環境分野での殺菌で問題となっている．この発芽システムを解明できれば，その制圧に応用できる可能性がある．枯草菌スポアでは L-アラニンによる発芽に関与する GerA 系と，L-アスパラギン・グルコース・フルクトース・KCl による発芽に関与する GerB GerK 系が報告され，発芽の最終段階ではスポアの細胞壁コルテックスを 2 種類の主要コルテックス分解酵素 CwlJ と SleB が分解する．この発芽レセプターからコルテックス分解酵素の活性化の経路として，スポアコアの保護物質とされるジピコリン酸（DPA）のコア外への漏洩による CwlJ の活性化モデルが Setlow らにより提唱されているが，詳細は不明である．我々は発芽初期の未解明のブラックボックス”どこから水が入るのか，どこから DPA が放出されるのか”についての解明を試みた．
〔方法と結果〕我々はコルテックス分解酵素ホモログ *cwlJ sleB ydhD yaaH* の 4 重欠損株に対して発芽レセプター遺伝子 *gerA*(*gerAA gerAB gerAC*)，*gerB*(*gerBA gerBB gerBC*)，*gerK*(*gerKA gerKC gerKB*)の 3 オペロンの単独，二重，三重セット欠損のスポアを構築し，初期発芽の光学密度連続測定により，コルテックス分解酵素非依存性の胞子の光学密度の低下現象を見出した．さらに DPA の細胞外漏洩も検出され，この現象もコルテックス分解酵素非依存性でも起こることが明らかとなった．各発芽レセプターのコンポーネントを A/B/C としてアミノ酸配列から機能検索を試みたところ，A コンポーネントは DPA 取込みポンプ SpoVAF と共通保存配列があり，B コンポーネントはアミノ酸トランスポーターと低い相同性が検出された．そこで発芽レセプター遺伝子のコンポーネントそのものに水浸入と DPA 排出の役割があるのではないかと考え，各コンポーネントの個別遺伝子破壊株を構築し，この仮説の検証を試みた．

Characterization of compornents of germination receptors in *Bacillus subtilis* spores

○Jin Sakamoto[1], Masamazu Furuta[1,2,3], Tetsuaki Tsuchido[1]
([1]Microorganism control CRes. Osaka Pref. Univ., [2]Rad. CRes. Osaka Pref. Univ., [3]Dept. Quantum, Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ.)

Key words *Bacillus subtilis*, receptor, spore, germination

1Gp11 プラスミドの保持に「非感受性」を示す宿主を利用した新規宿主ベクター系開発の可能性

○上田 朋美, 河野 響, 水口 千穂, 岡田 憲典, 野尻 秀昭
（東大・生物工学セ）
anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

【背景・目的】プラスミドは宿主に新規形質を付与する一方，非選択条件下ではその保持が生育負荷となりプラスミド保持株が集団から消失する場合が多く，微生物を用いた物質生産ではプラスミド由来の負荷を回避すべく抗生物質添加などの選択圧が必須とされてきた．しかし当グループは，実環境中で難分解性物質分解プラスミド pCAR1 を保持していた *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株が，自然界から単離された特徴の異なる 8 種のプラスミドをそれぞれ保持させた際に非選択条件下でプラスミド保持株が集団から消失しない，いわばプラスミド保持に「非感受性」であることを明らかにした．この性質を物質生産に応用すべく，本研究では外来遺伝子発現用に設計された汎用人工ベクターの保持が CA10dm4 株に及ぼす負荷（細胞内でのベクター安定性／ベクター保持株の生残性）を評価した.【方法・結果】異なるプラスミド由来の複製起点を持つ広宿主域ベクター pBBR1MCS-5 および pSEVA251 を CA10dm4 株および *P. putida* KT2440 株に保持させた．非選択条件下でベクター保持株を単独培養した際の細胞内でのベクターの安定性，また非保持株と競合培養した際の保持株の生残性をそれぞれ評価した．その結果，単独培養時にはいずれのベクターも両宿主で安定に保持された．一方で非保持株との競合培養では，培養開始時に 50%程度存在した保持株の比率が KT2440 株ではいずれのベクターの場合も大きく低下したのに対し，CA10dm4 株では低下せず生残性が高いことが示された．ベクターから lac プロモーター下で GFP を発現させた際も同様の結果が得られた．今後はさらに薬剤耐性遺伝子など別の遺伝子を用いた際の評価も行う予定である．発表ではこれらの結果から，CA10dm4 株を非選択条件下でベクターを安定に利用できる宿主として用いた新規宿主ベクター系開発の可能性について議論する．

The possibility of constructing a novel host-vector system with bacteria showing “insensitivity” to plasmids

○Tomomi Ueda, Hibiki Kawano, Chiho Suzuki-Minakuchi, Kazunori Okada, Hideaki Nojiri
(Biotechnol. Res. Center, Univ. Tokyo)

Key words *Pseudomonas*, plasmid, vector, fitness cost

1Gp12 有用嫌気性菌の遺伝子導入・破壊の効率的検出システム構築

○深谷 愛衣[1], 水口 千穂[1], 岡田 憲典[1], 井上 謙吾[2], 野尻 秀昭[1]
（[1]東大・生物工学セ, [2]宮崎大・農・応生科）
anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

【背景と目的】近年，生物に有害な物質が土壌や地下水から高頻度で検出され問題となっている．環境中の有害物質を除去する方法として，微生物の汚染物質分解能力を活用したバイオレメディエーション技術が注目され，これに用いられる嫌気性細菌の遺伝子レベルでの機能解析が求められている．しかし多くの嫌気性細菌はコロニーの単離や培養に多大な時間と労力を要し，解析に必要な遺伝子導入・破壊系といった遺伝子工学ツール開発が進んでいない場合が多い．遺伝子導入・破壊系の開発には，遺伝子改変が起こった細胞を他の細胞と見分けるシステムが必要であるため，本研究では，有用嫌気性細菌を対象に一細胞レベルで改変を検出することで，培養を行わずに改変の起こった細胞を検出できるシステムの構築を目的とした．
【方法と結果】遺伝子導入・破壊系開発の報告がある偏性嫌気性細菌 *Geobacter sulfurreducens* PCA と通性嫌気性細菌の大腸菌 DH5α をモデルとし，嫌気条件でも発光する蛍光タンパク質 evoglow と，一細胞レベルで細胞を分画できるフローサイトメーター (FCM) を用い，蛍光の有無により遺伝子改変を検出できるシステムの構築を試みた．まず，大腸菌に *evoglow* 遺伝子を持つプラスミドを導入し，これを好気条件下 LB 培地で培養した．緩衝液で洗浄した細胞を好気条件下の FCM で蛍光を確認したところ，evoglow は蛍光の有無により細胞を分画できる程度は発現することが明らかになった．これを受けて，*G. sulfurreducens* に *evoglow* 遺伝子配列を持つプラスミドをエレクトロポレーション法により導入した株 (遺伝子導入株) と相同組換えを利用して *evoglow* 遺伝子を染色体上に挿入した株 (遺伝子導入・破壊株) を作製し，その培養液を用いて好気または嫌気条件の FCM で evoglow 発現量の評価を試みているので，この結果についても報告する．

Development of effective detection system for recombination of useful anaerobic bacteria

○Ai Fukaya[1], Chiho Suzuki-Minakuchi[1], Kazunori Okada[1], Kengo Inoue[2], Hideaki Nojiri[1]
([1]Biotechnol. Res. Center, Univ. Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol., Fac. Agric., Univ. Miyazaki)

Key words anaerobes, bioremediation, flow cytometry, flavoprotein

1Gp13 Visualization of ecdysteroid activities using genetically encoded reporter gene in *Daphnia magna*

○Nikko Adhitama, Yasuhiko Kato, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
watanabe@bio.eng.osaka-u.ac.jp

A transgenic animal to visualize hormonal activity is a useful tool for understanding its endocrine system and also for detecting endocrine disrupting chemicals in its surroundings. In crustacean, despite their pivotal role in aquatic ecosystem, roles and mechanisms of the steroid hormone ecdysteroid remain under-studied. *Daphnia magna* is one of freshwater crustaceans, which has long served as a model in ecology and ecotoxicology. Recently, with its genomic sequence publicly available and genome editing methods have been developed, *D. magna* become a newly emerging genetic model organism. Here we report generation of transgenic *D. magna* to detect the spatio-temporal activity of ecdysteroid. We constructed a reporter gene containing four tandem repeats of *Drosophila hsp27* ecdysteroid response element and *mCherry* red fluorescent gene. CRISPR-Cas genome editing method, followed by Non-Homologous End Joining pathway was used to integrate the DNA construct into *D. magna* genome. A transgenic containing one copy of reporter gene was obtained. mCherry signal was detected in embryos as early as 12 hours after ovulation (HAO). mCherry signal migration was observed originated from posterior toward anterior section of embryo which may suggest novel roles of ecdysteroid activity in embryonic posterior growth regulatory signaling. Furthermore, when transgenic embryos were exposed to ecdysteroid, there was enhanced expression of mCherry signal, suggesting this system may also be used for environmental ecdysteroid biosensor.

Visualization of ecdysteroid activities using genetically encoded reporter gene in *Daphnia magna*

○Nikko Adhitama, Yasuhiko Kato, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words ecdysteroid, *Daphnia magna*, genome integration, biosensor

1Gp14 チョウザメ由来ナイーブ抗体の応用に向けた抗体遺伝子の配列解析

○近藤 秀裕[1], 安本 玖太郎[1], 小祝 敬一郎[1], 平岡 潔[2], 廣野 育生[1]
（[1]東京海洋大学, [2]フジキン）
h-kondo@kaiyodai.ac.jp

抗体遺伝子は進化の過程で有顎類魚類が出現した際生じたと考えられ，軟骨魚類よりも後に出現した脊椎動物では生体防御において重要な役割をもつ．当研究室では，軟質亜綱のベステルチョウザメ *Huso huso*×*Acipenser ruthenus* の血清中に含まれる抗体の性状を解析し，本種が免疫していない個体であっても様々な抗原に特異的に結合する抗体を有していることを示した．さらに，このような抗体の特徴は成長に伴い獲得したものであることも明らかとした．本種の抗体は免疫を必要とせず様々な抗原と特異的に結合可能であることから，その抗体遺伝子を様々な抗原に対する特異的な人工抗体の鋳型として利用できないかと考えた．そこで本研究は，ベステルチョウザメの抗体（Ig）重鎖および軽鎖遺伝子の配列を決定し，各組織における抗体遺伝子の抗原結合領域における多用度を次世代シークエンサーを用いて解析することを目的とした．まず，本種の抗体重鎖および軽鎖遺伝子の配列を予備的に行ったトランスクリプトームデータより検索し，1 つの Ig 重鎖遺伝子および 3 つの Ig 軽鎖遺伝子を同定した．Ig 重鎖遺伝子および 1 つの Ig 軽鎖遺伝子は既報のチョウザメ類の Ig 各遺伝子の配列と高いアミノ酸同一率を示したものの，2 種類の Ig 軽鎖遺伝子は新規のものであった．現在，各 Ig 遺伝子の発現組織，および多様性決定領域の配列多様性について解析を行っている．

Characterization of immunoglobulin genes in the sturgen for application of the naive antibody

○Hidehiro Kondo[1], Kyutaro Yasumoto[1], Keiichiro Koiwai[1], Kiyoshi Hiraoka[2], Ikuo Hirono[1]
([1]Tokyo Univ. Mar. Sci. Technol., [2]Fujikin)

Key words antibody, sturgeon, natural antibody

1Gp15 マウス腸内への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

○久保 勇貴[1], 中島 森[1], 中川路 伸吾[1], 阪中 幹祥[2], 小椋 義俊[3], 吉本 真[4], 吉田 圭佑[4], 清水 （肖）金忠[4], 小田巻 俊孝[4], 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, [4]森永乳業・基礎研）
s-fukiya@chem.agr.hokudai.ac.jp

【背景・目的】ビフィズス菌は整腸作用などの有用効果を示す偏性嫌気性細菌であるが，胆汁酸や他の腸内細菌との競合といった環境ストレスに打ち勝ち，腸内に定着するメカニズムについては未だ不明な点が多い．そこで，転移因子 *Himar1*C9 を用いた INSeq (insertion-sequencing) 法をビフィズス菌に応用し，腸内定着に寄与する遺伝子の網羅的な同定を目指した．INSeq 法では，①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各遺伝子変異株の数の増減を測定することで，「腸内定着に寄与する候補遺伝子」を網羅的に同定することが出来る．さらに，②*in vitro* でも培養を行い，「*in vitro* での生育に寄与する遺伝子」の同定を行う．最後に，③ ①と②の遺伝子を比較することで，「腸内定着に寄与する遺伝子」を同定することが可能である．
【方法・結果】まず，前述のトランスポゾン変異導入系を用いて *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A（以下 105-A 株）の約 48,000 株の変異株ライブラリーを作製した．これを投与前サンプルとしてゲノム DNA を抽出後，トランスポゾン挿入部位の配列を含むように INSeq サンプルを調製した．解析の結果，105-A 株の全 ORF の 76.2 %が変異していることが示唆された．次に，変異株ライブラリーを定常期まで培養したサンプルについて，同様の解析を行い，投与前サンプルの解析結果と比較することで，「*in vitro* での生育に寄与する遺伝子」の同定を行った．結果として，*in vitro* での生育に寄与する遺伝子を 49 個同定することができた．これらの中には鉄輸送や酸化ストレス耐性に寄与する遺伝子などが含まれていた．現在，無菌マウス投与後のサンプルにおける各変異株の特定と数の計測を進めており，今回の *in vitro* の結果と比較することで「腸内定着に寄与する遺伝子」の同定を行う予定である．

Establishment of INSeq system aiming for comprehensive identification of bifidobacterial genes that contribute to colonization in the gastrointestinal tract of mice

○Yuki Kubo[1], Shin Nakajima[1], Shingo Nakakawaji[1], Mikiyasu Sakanaka[2], Yoshitoshi Ogura[3], Shin Yoshimoto[4], Keisuke Yoshida[4], Jin-Zhong Xiao[4], Odamaki Toshitaka[4], Hayashi Tetsutya[3], Atsushi Yokota[1], Fukiya Satoru[1]
([1]Res. Fac. Agric., Hokkaido Univ., [2]Fac. Bioresour. Environ. Sci., Ishikawa Pref. Univ., [3]Grad. Sch. Med. Sci., Kyushu Univ., [4]Next Gen. Sci. Inst., Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

Key words bifidobacteria, insertion-sequencing, transposon mutagenesis, intestinal colonization

1Gp16 環状 RNA を用いた miRNA とその前駆体の阻害

○地白 和樹, 立花 亮
（阪市大院・工）
tatibana@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

microRNA (miRNA)は RISC を形成し，相補的な配列を持つ mRNA の翻訳を抑制する．miRNA の中には，oncomiR と呼ばれるがん細胞中で過剰に発現し，がんの発生や悪性化に関わっているものがある．oncomiR を阻害すると，がん細胞の増殖が抑制されることが報告されている．環状 RNA (circRNA) は直鎖状 RNA に比べて高い安定性を示し，tRNA のスプライシングの際に産生されることが知られている．今回の研究では，上記の circRNA を産生する系を用いて，細胞中で circRNA として発現する miRNA 阻害剤を作製した．この miRNA 阻害剤は，miRNA の guide 鎖に相補的な配列をもつことにより，RISC による翻訳抑制を競合的に阻害する．また，pri-miRNA のループ部分にも相補的な配列をもつことにより，pri-miRNA と結合しその構造を壊すことで pri-miRNA から成熟二本鎖 miRNA へのプロセシングも阻害するよう設計されている．このような miRNA 阻害剤を，pri-miRNA を標的とする「RNA inhibitor for gene transcripts」の意味で「pRING」と名付けた．
pRING の活性を評価するため，レポータージーンアッセイを行った．miR-21 のターゲットサイトを組み込んだ DsRed2 発現ベクターと pri-miR-21 発現ベクター，及び pRING 発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションし，DsRed2 の赤色蛍光を測定することで pRING の活性を評価した．その結果，pRING はコントロールに比べて有意に大きい DsRed2 の蛍光強度を示した．このことより，pRING は miRNA 阻害剤としての活性をもつことが分かった．また，pRING が pRINGguideON (miR-21 の guide 鎖にのみ相補的な配列をもつ pRING) よりも高い活性を示したことより，pRING は pri-miRNA から成熟二本鎖 miRNA へのプロセシングも阻害していると考えられる．

Inhibition of miRNA and its precursor by circular RNA

○Kazuki Chishiro, Akira Tachibana
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words circular RNA, microRNA, oncomiR, pRING

1Gp17 複合系中の標的 mRNA 直接検出法の開発

○堀尾 京平[1], 大川内 雅彦[1], 高橋 宏和[1], 小堀 俊郎[2], 秋 庸裕[1], 松村 幸彦[3], 中島田 豊[1], 岡村 好子[1]
（[1]広島大院・先端物質, [2]農研機構, [3]広島大院・工）
okamuray@hiroshima-u.ac.jp

【目的】Rolling Circle Amplification (RCA)法が生体分子の検出方法として近年注目を集めている．RCA 法は Padlock probe と phi29 DNA polymerase を用いて標的配列を増幅することで検出を行う方法であり，高い特異性を有している．しかし，これまでに開発されてきた RCA 法による RNA 検出法は 3'末端のみをターゲットとしているため，検出可能な RNA は限られており，汎用性に乏しい．そこで本研究では，RNase H により RCA 法の反応を効率的に進め，任意の配列をターゲットとすることができる汎用性の高い RNase H-assisted RCA（RHa-RCA）法を開発することを目的とした．
【方法・結果】まず，GFP mRNA の内部配列を認識するよう設計した Padlock probe, DNA/RNA ハイブリッド鎖の DNA を特異的にライゲーションする SplintR ligase，RNase H を用いて，非ターゲットの RNA 中に混合した，in vitro 転写した GFP mRNA の検出を行ったところ，特異的増幅に成功し，検出感度は 5-10 fmol-GFP mRNA であった．次に，菌体から抽出した total RNA を用いて RCA 反応を行った結果，total RNA 中の GFP mRNA からの特異的増幅に成功した．この時の検出限界は 10 ng-total RNA であった．現在，本方法を細胞に応用し，*in situ* での増幅を行うための検討を進めている．
【考察】*in situ* RHa-RCA により細胞内で cDNA の合成なしに mRNA からの増幅を行うことができれば，増幅した鎖を Fluorescence *in situ* hybridization（FISH）で検出することで細胞のラベリングを行うことが可能になると考えられる．

Development of direct-detection method for mRNA in complex mixture

○Kyohei Horio[1], Masahiko Ohkawachi[1], Hirokazu Takahashi[1], Toshiro Kobori[2], Tsunehiro Aki[1], Yukihiko Matsumura[3], Yutaka Nakashimada[1], Yoshiko Okamura[1]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]NARO, [3]Div. Ener. Environ. Inst. Eng. Hiroshima Univ.)

Key words mRNA, detection

1Gp18 環状 RNA にコードしたペプチド生成に関与する要因

○浅野 悠太
（阪工大院・工）
tatibana@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

背景
2015 年，合成環状 RNA からペプチド生成が報告された．また細胞内において環状 RNA が存在し，タンパク質に翻訳されることが報告された．本研究では，人工的に細胞内で環状 RNA を産生させ，ペプチドの作製を検討した．環状 RNA は pre-mRNA の back splicing により生成する場合と tRNA のイントロンが環状化し，生成する場合がある．本研究では，この 2 種類の環状 RNA に機能性ペプチドをコードし，その生成に関与する要因を検討した．
方法と結果
ペプチドの発現は splitGFP 技術を応用し，GFP11tag（16 a.a.）が GFP1-10 と結合し，再構成した GFP の緑色蛍光によった．2 種類の環状 RNA（back splicing 型，tRNA 型）に GFP11tag の配列をコードしたベクターと GFP1-10 発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションした．3 日後に蛍光強度を測定した．
back splicing 型よりも tRNA 型の方がペプチドの生成効率が高かった．環状 RNA の生成効率によるものだと考えた．プロテアソーム阻害剤 MG132 添加はペプチドに基づく蛍光強度を増大させた．また，エクソソーム産生促進剤 D609 添加によってペプチド生成効率は低下した．エクソソームは環状 RNA を細胞外へ排出することが知られており，細胞質における環状 RNA 量が低下したためだと考えた．現在，環状 RNA からのペプチド生成に関与するその他の要因を検討している．

Peptide production corded on circRNA

○Yuta Asano
(Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol.)

Key words circRNA, peptide, exosome, splitGFP

1Hp01 Dilute maleic acid pretreatment of sugarcane bagasse and oil palm empty fruit bunch fiber for enhanced enzymatic digestibility

○Lucky Risanto[1,2], Deddy Triyono Nugroho Adi[1,2], Triyani[2], Hiroshi Teramura[1], Euis Hermiati[2], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[1,3]
([1]Grad. Sch. of Eng., Kobe Univ., Japan, [2]Res. Center for Biomaterials, Indonesian Inst. Sci., Indonesia, [3]Grad. Sch. Sci., Technol. and Innov, Kobe Univ., Japan)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

Lignocellulose is resistant to degradation and requires pretreatment to improve cellulose accessibility for hydrolytic enzymes to release fermentable sugars. Sulfuric acid has been widely used for biomass pretreatment, but high amount of degradation products usually occurred when using this method. In addition, sulfuric acid leads to large amounts of problematical gypsum when neutralized with low-priced calcium hydroxide. The performance of several diluted organic acid pretreatments in sugarcane bagasse and oil palm empty fruit bunch fiber to enhance cellulose accessibility was studied as considered a green technology and environmental friendly. Result revealed that maleic acid gave highest xylose and glucose release among other organic acids. The effect of concentration, duration of heating and heating temperature was further studied. Dilute maleic acid pretreatment at 180 °C and 1% (w/w) can be a key substitute for sulfuric acid. Moreover, furfural and 5-HMF formation in liquid hydrolysate after pretreatment does not seem to be highly promoted by maleic acid.

Dilute maleic acid pretreatment of sugarcane bagasse and oil palm empty fruit bunch fiber for enhanced enzymatic digestibility

○Lucky Risanto[1,2], Deddy Triyono Nugroho Adi[1,2], Triyani[2], Hiroshi Teramura[1], Euis Hermiati[2], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[1,3]
([1]Grad. Sch. of Eng., Kobe Univ., Japan, [2]Res. Center for Biomaterials, Indonesian Inst. Sci., Indonesia, [3]Grad. Sch. Sci., Technol. and Innov, Kobe Univ., Japan)

Key words maleic acid, oil palm empty fruit bunch, saccharification, sugarcane bagasse

1Hp02 高活性水蒸気処理と粉砕処理を併用したバイオリファイナリーシステムの開発

○鈴木 昭浩[1], 淺田 元子[2], 佐々木 千鶴[2], 中村 嘉利[2]
([1]徳島大院・先端技科, [2]徳島大学・生物資源産業学部)
ynakamu@tokushima-u.ac.jp

【背景と目的】現在，石油などの化石資源の枯渇が危惧されている．そこで，食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマスに私は注目した．今回は成長速度が速いタケを利用し，有効利用法の開発を目指す．今回は，高活性水蒸気蒸煮処理とミルによる粉砕処理を併用した前処理を利用する．使用するのは水蒸気のみなので，環境低負荷な処理方法である．この処理によりリグニンやセルロースなどの成分は低分子量化され，利用しやすくなる．本研究では，これらを利用した総合的有効利用法の開発を目的とした実験を行う．
【実験】タケを水蒸気爆砕機にて蒸煮処理を行った．蒸煮温度（気圧）183℃（10atm）～243℃（35atm）で 5min 処理を行い，サンプルを回収した．回収したサンプルに粉砕処理を行った．これに，水抽出，アセトン抽出，亜塩素酸ナトリウム（漂白）処理を連続して行い，水抽出成分，アセトン抽出成分，漂白処理残渣（ホロセルロース）を回収した．得られた水抽出成分は DPPH ラジカル消去能活性試験にて抗酸化活性を測定した．アセトン抽出成分は主に低分子量化されたリグニンであり，このリグニンにエピクロロヒドリンを用いてエポキシ基を付加させ，リグニンエポキシ樹脂を合成した．硬化剤には同条件で処理し，得られたアセトン抽出成分（リグニン）を使用し，硬化させ，リグニンエポキシ樹脂硬化物を作成した．漂白処理残渣から得られたホロセルロースにグラインダー処理を施し，セルロースナノファイバー（CNF）を作成した．作製した CNF はシート状に成型し，引張強度試験を行った．
【結果・考察】蒸煮処理したタケから高い抗酸化能を持つ水抽出成分が得られ，アセトン抽出成分からはリグニンエポキシ樹脂硬化物を得ることができた．CNF は蒸煮前処理条件の違いによる顕著な引張強度の変化が見られる結果が得られた．

Development of biorefinery system combining high active steam treatment and milling treatment

○Akihiro Suzuki[1], Chikako Asada[2], Sasaki Chizuru[2], Nakamura Yoshitoshi[2]
([1]Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Tokushima Univ., [2]Grad. Sch. Biosci. Bioind., Tokushima Univ.)

Key words biomass, cellulose, lignin

1Hp03 高活性水蒸気処理を用いたセルロースナノファイバーの製造とバイオマスコンポジットへの応用

○橋本 和紀[1], 淺田 元子[2], 佐々木 千鶴[2], 中村 嘉利[2]
([1]徳島大院・先端技科, [2]徳島大学・生物資源産業学部)
ynakamu@bio.tokushima-u.ac.jp

【背景と目的】セルロースナノファイバー(CNF)は植物細胞壁の基本骨格であり，鋼鉄の 5~8 倍ほどの引張強度で，ガラスファイバー(GF：比重 2.5)やカーボンファイバー(CF：比重 1.8)に比べて低比重(比重 1.5)であることが知られている．近年，軽量化のため，自動車部材の樹脂化が進められている．現在，自動車部材として使われているのは GF と樹脂の複合体である．しかしながら，GF は作製時に化石燃料を使用することや，廃棄時に燃やした際に GF が残ってしまう問題がある．そこで，GF の代替として再生可能資源である CNF の利用が期待されている．CNF の原料は，食料と競合しないリグノセルロース系バイオマスの利用が進められている．しかしながら，リグニンにより細胞壁が強固な構造となっており，セルロースを取り出すために脱リグニン前処理が必要となっている．そこで，本研究では脱リグニン前処理として高活性水蒸気処理を利用した．高活性水蒸気処理は，水のみの利用で選択的にリグニンを加水分解し，低分子化させることが可能な前処理法である．本実験の目的は，蒸煮条件，粉砕処理時間の異なる CNF を作製し，樹脂との複合体作製に最適な製造条件を決定することである．
【実験方法・結果】タケに 10 , 15 , 20 , 25 atm それぞれ 5min の条件で高活性水蒸気処理を行った後に，粉砕処理をそれぞれ 1min 行った．水，アセトン抽出，漂白処理を行いリグニン等の不純物を取り除きホロセルロースを回収した．得られたホロセルロースはグラインダー処理を 2 回行い，ナノサイズまで解繊することで CNF を製造した．CNF の評価に SEM（走査型電子顕微鏡分析）と分子量測定を行った．また，CNF とポリ乳酸を混ぜ合わせ 50wt%コンポジットを作製し，機械特性の評価として引張試験を行った．成分分析と引張試験の結果から，複合体作製に最適な CNF の蒸煮条件は 15 atm であった．

Production of cellulose nanofiber using high activity steam treatment and its application to biomass composite

○Kazuki Hashimoto[1], Chikako Asada[2], Chizuru Sasaki[2], Yoshitoshi Nakamura[2]
([1]Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Tokushima Univ.,
[2]Grad.Sch.Biosci.Bioind.,Tokushima Univ)

Key words cellulose nanofiber, composite

1Hp04 最少量の低毒性イオン液体を用いたバイオマスからバイオ燃料への High-loading ワンポット変換

○杉野 雄規[1], 柘植 陽太[2], 荻野 千秋[3], 髙橋 憲司[1], 仁宮 一章[2]
([1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術, [3]神戸大院・工・応化)
ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】近年，食物との競合がない木質バイオマスを酵素糖化・発酵することによる，バイオ燃料の生産が期待されている．しかし，木質バイオマスはセルロース，ヘミセルロース，リグニンが複雑に結合した構造であるため，酵素糖化に用いるためには，高効率な糖化前処理が必要である．本研究では，糖化前処理に低エネルギーで高効率に糖化を可能にするイオン液体を用いた．しかし，イオン液体は毒性があるため，糖化前処理後に洗浄が必要であり，ワンポットにおける反応が困難であった．そこで本研究では，最小量の低毒性イオン液体を用いることで，バイオマスからバイオ燃料へのワンポット変換を目指した．
【方法および結果】従来のイミダゾリウム系イオン液体よりも酵素や微生物に対して低毒性であるコリン酢酸を用いた．前処理にはバイオマスの 1.5 倍量のイオン液体を最少量として用いた．バイオマスを 110℃，16 h イオン液体前処理を行い，純水と酵素を加え酵素糖化を行った．酵素糖化においては，純水量・酵素の組み合わせの条件検討を行い，最も効率の良い糖化条件を求めた．その後，糖化済バイオマスに酵母，抗生物質を加え，30℃で 48 h 発酵を行った．発酵において，サンプリングを行いグルコース，キシロース，エタノールそれぞれの濃度を測定した．酵素糖化では，純水量 10 mL の条件において糖濃度が最も大きく，この条件を今後の実験に採用した．また，酵素の組み合わせの条件検討を行った結果，Ctec2 と Htec2 の組み合わせによる酵素糖化がグルコース，キシロースいずれにおいても糖濃度，糖化率が最も大きくなった．また，発酵では Ctec2 と Htec2 の組み合わせにおいて，エタノール収率 88.8%の発酵が行われた．以上，最少量の低毒性のイオン液体を用いた，バイオマスからバイオ燃料へのワンポット変換に成功した．

One-pot conversion from biomass to biofuel using minimum amount of biocompatible ionic liquid

○Yuki Sugino[1], Yota Tsuge[2], Chiaki Ogino[3], Kenji Takahashi[1], Kazuaki Ninomiya[2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ., [3]Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

Key words lignocellulosic biomass, ionic liquid, one-pot conversion

1Hp05 最少量の低毒性イオン液体を用いた前処理に基づく木質系バイオマスリファイナリー

○仁宮 一章[1], Amaliyah Rohsari Indah Utami[2], 柘植 陽太[1], 荻野 千秋[3], 髙橋 憲司[2]
([1]金沢大・新学術, [2]金沢大院・自科, [3]神戸大院・工)
ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】近年，カーボンニュートラルな資源である木質系バイオマス由来の糖を原料とした燃料や化成品の製造が期待されている．木質系バイオマスに対して効率的に糖化を行なうには，セルロースの非結晶化が必要である．近年，イオン液体を用いたバイオマスの糖化前処理法が提案されている．そこで本研究では，イオン液体を木質系バイオマスの前処理溶媒として用い，またバイオマス由来の糖だけでなくリグニンも活用する木質系バイオマスのトータルリファイナリーを行う．
【方法および結果】従来のイミダゾリウム系イオン液体よりも酵素や微生物に対して低毒性であるコリン酢酸を用いた．前処理にはバイオマスの 1.5 倍量のイオン液体を最少量として用いた．イオン液体による前処理で得られた前処理バイオマスは，希硫酸前処理の際に起こるヘミセルロースの消失は見られないうえに，セルロースの結晶構造の緩和が XRD 分析により確認された．前処理バイオマスを酵素糖化し，糖液を調整した．前処理バイオマスのセルロースおよびヘミセルロースについての糖化率は，それぞれ 96%および 73%であった．得られた糖濃度はグルコース 40 g/L およびキシロース 20 g/L であった．キシロース資化能を付与した酵母株 YPF499/(XR-XDH)株でエタノール発酵を行ったところ，48 時間までに，グルコースはすべて，キシロースも 83%が資化された．また得られたグルコース・キシロース混合糖液から得られたエタノール濃度は 21g/L であった．糖化残渣リグニンについては，アルカリ酸化分解を行ったところ，リグニンモノマー収率は 48%となり，この値は，希硫酸前処理を行った場合の・酵素糖化残渣リグニンやアルカリ蒸解リグニンの場合と比較して高かった．イオン液体を回収率約 97%で回収でき，回収したイオン液体のバイオマスの前処理能力には問題なかった．

Lignocellulosic biomass refinery based on pretreatment using minimum and biocompatible ionic liquid

○Kazuaki NINOMIYA[1], Amaliyah Rohsari Indah Utami[2], Yota TSUGE[1], Chiaki OGINO[3], Kenji TAKAHASHI[2]
([1]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [3]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words lignocellulosic materials, ionic liquid, biorefinery

1Hp06 イオン液体前処理と酵素糖化により得られる残渣リグニンの特性評価

○江口 真央[1], 杉野 雄規[1], 柘植 陽太[2], 髙橋 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】現在，温暖化や石油資源枯渇が深刻な問題となっており，石油資源の代替資源として木質系バイオマスが期待されている．木質系バイオマス中のリグニンは複雑な構造のため，有効な利用法が開発されていない．そのため，酵素糖化残渣として得られるリグニンの利用が関心を集めている．本研究では，イオン液体(IL)前処理と酵素糖化により得られる「IL 前処理-酵素糖化残渣リグニン」の特性評価を目的として，アルカリ酸化分解により得られるリグニンモノマーである phenolic aldehyde（バニリン＋シリンガアルデヒド）の収率，ならびに，溶媒分画により得られるリグニンオリゴマーの収率・分子量・水酸基当量を評価した．比較として，「希硫酸(DA)前処理-酵素糖化残渣リグニン」についても同様の試験を行い，その結果を比較することで，「IL 前処理-酵素糖化残渣リグニン」の特徴を浮き彫りにした．
【方法および結果】イオン液体(IL)前処理は，110℃で 16 h，希硫酸(DA)前処理においては，180℃で 30 min にて前処理を行った．その後，それぞれ酵素糖化を行うことにより，糖化残渣リグニン「IL 前処理-酵素糖化残渣リグニン」と「DA 前処理-酵素糖化残渣リグニン」を作製した．リグニンのアルカリ酸化分解試験における phenolic aldehyde 収率は，「IL 前処理-酵素糖化残渣リグニン」と「DA 前処理-酵素糖化残渣リグニン」の場合でそれぞれ 48.0%と 39.5%となり，「IL 前処理-酵素糖化残渣リグニン」の方が高い結果となった．アセトン/メタノール分画で得られるリグニンオリゴマーの収率と水酸基当量については，「IL 前処理-酵素糖化残渣リグニン」の場合のほうが「DA 前処理-酵素糖化残渣リグニン」の場合より高い結果が得られた．以上の結果は，IL 前処理は DA 前処理と比較し温和な条件で反応が進むため，リグニンの縮合・変性が少ないためと考えられる．

Characterization of enzymatic saccharification residue lignin after ionic liquid pretreatment

○Mao Eguchi[1], 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, ionic liquid, enzymatic residue

1Hp07 木材腐朽菌による加硫天然ゴムの分解

○佐藤 伸
（公立鳥取環境大学・環境学部）
s-sato@kankyo-u.ac.jp

天然ゴムを分解する微生物は土壌放線菌を中心に研究されており，天然ゴムのポリマー主鎖を酸化的に切断してポリマーの低分子化を引き起こすことが知られている．放線菌の分泌する酸化酵素が直接作用して天然ゴム成分を分解することが研究で明らかとなっている．一方で，カーボンブラックなどゴム以外の成分を含む加硫天然ゴム製品は一般に微生物分解を受けにくい．我々はこれまでにきのこの仲間である木材腐朽菌が加硫天然ゴムを分解することを明らかにしたが，この菌は日本では未同定の菌株であり，国産の腐朽菌の中で加硫ゴム分解能を持つ菌を見つけられていなかった．加硫天然ゴムのリサイクルを国内で行うことを考えると，日本国内で分離できる菌株を使うメリットは大きい．このことから本研究では国産の加硫ゴム分解木材腐朽菌の探索を行うこととした．
本研究ではまず，鳥取県東部で野生のきのこ子実体を採取し，胞子から分離した木材腐朽菌による市販の加硫天然ゴムシートの分解を検討した．その結果，分離したいくつかの菌株で加硫ゴムシートへの影響が認められた．培養 3 ヶ月間の菌処理によって，加硫ゴムシートの重量減少とシート表面の損傷，内部架橋密度の低下が示唆され，引張試験の結果から菌処理による物性低下を確認した．鳥取で分離したこれらの菌株の分解力は，我々がすでに報告した海外菌株のものより高い分解力を示した．現在，鳥取県内で見つけた加硫天然ゴム分解菌株がゴム分解中に分泌する酵素などの代謝物を中心にし，その機能を調べながら分解メカニズムの解明に向けて研究を進めている．

Degradation of vulcanized natural rubber by wood rotting fungi

○Shin Sato
(Dept. Environment, Tottori University of Environmental Studies)

Key words vulcanized natural rubber, biodegradation, Wood rotting fungi

1Hp08 白色腐朽菌が有するアルコール発酵能の生理学的役割の解明

○増田 茜[1], 森 智夫[2], 河岸 洋和[2,3,4], 平井 浩文[2,3]
（[1]静大院・総合農, [2]静大・農, [3]静大・グリーン研, [4]静大・創科技院）
mori.toshio@shizuoka.ac.jp

白色腐朽菌はリグニン分解・糖化・発酵すべての能力を有する唯一の微生物であり，木質バイオリファイナリーに最も適した微生物であると考えられる．白色腐朽菌を用いたアルコール発酵研究は多数存在しているが，多くの場合培養する際に栄養源が豊富な液体培地を加えるなど条件が整えられており，木材腐朽時におけるエタノール発酵の生理学的意義に関する知見は極めて乏しい．そこで本研究では，白色腐朽菌が持つアルコール発酵能の生理学的意義を解明すべく，木粉と水のみでエタノール発酵可能な白色腐朽菌を選抜し，木粉上でのエタノール産生挙動を調査した．前培養した供試菌（25 菌株）をブナ木粉上に接種し，20 日間の好気培養による脱リグニン処理の後に，密栓して半嫌気培養を 10 日間行い，培養終了後にヘッドスペースの残存酸素濃度およびエタノール産生量測定を行った．密栓時に培地を添加し，腐朽木材を炭素源とした発酵液体培地による半嫌気培養では，供試菌 25 菌株中 15 菌株でエタノール産生が確認されたのに対し，発酵液体培地を添加せず木粉のみの場合では 4 菌株のみでエタノール産生が観察された．この結果から，エタノール産生能を持つ菌であっても自然界で木材腐朽時にエタノール発酵を行っている白色腐朽菌は極めて限定的であることが示唆された．また，木粉のみの培養において最もエタノール産生をしていた *Phanerochaete sordida* YK-624 株の発酵特性を調査したところ，木粉上でのエタノール産生とリグニン分解率に相関がなかったものの，半嫌気培養期間中の遊離糖の濃度変化も見られなかったため，糖化がエタノール発酵におけるボトルネックであると予想された．現在，セルロース分解に関与する各種酵素遺伝子導入株を用いて木粉上でのエタノール発酵におけるセルロース分解の影響について調査している．

Clarification of physiological role of alcohol fermentation in white-rot fungi

○Akane Masuda[1], Toshio Mori[2], Hirokazu Kawagishi[2,3,4], Hirofumi Hirai[2,3]
([1]Grad. Sch. Agric., Shizuoka Univ., [2]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words white-rot fungi, ethanol fermentation, wood decay, cellulose degradation

1Hp09 生きた植物からの非破壊糖取出し方法の検討

○米倉 円佳[1], 青木 直大[2], 廣瀬 竜郎[3], 近藤 聡[1], 大音 徳[4]
（[1]トヨタ自動車・アグリバイオ事業部, [2]東大院・農生科, [3]農研機構・中央農研, [4]トヨタ自動車・T-フロンティア部）
madoka_yonekura@mail.toyota.co.jp

【背景と目的】
植物から光合成産物である糖を非破壊で連続的に取り出せれば，バイオ製品のコスト削減に繋がると考えられる．既報において，SWEET として知られる糖トランスポーターを用いて，①葉組織内の糖を細胞外（アポプラスト）に放出させ，それを②葉の排水現象を利用してアポプラストから植物体外に排出させることで，非破壊糖取り出しに成功した（生物工学会誌 96 (3), 2018）．モデル植物シロイヌナズナでは CladeI から IV に分類される全 17 種類の *AtSWEET* 遺伝子が知られるが，中でも CladeIII に属する *AtSWEET12* を，カリフラワーモザイクウイルス(CaMV) 35S プロモーター制御下で過剰発現すると，最も高濃度の糖（単糖当量で平均 6 mM）を含む排水液が得られた．ただし本過剰発現体では顕著な生育の抑制が見られた．
そこで *AtSWEET12* 遺伝子を発現する最適プロモーターの検討を行った．

【方法】
発現部位や時期，発現量が異なると考えられる，*AtSIG1*，*AtSUC4*，*CAB1*，*HSP18.2* のプロモーターを用いて *AtSWEET12* の過剰発現体を作出し，それらの排水液中の糖（ショ糖，グルコース，フルクトース）を HPLC で定量分析した．

【結果】
供試したプロモーターのうち，*CAB1* プロモーターの場合に単糖当量で平均 6.7 mM の高糖濃度の排水液が得られ，その生育は野生型より若干遅延したものの，ほぼ同等の生育を示した．このことから，プロモーターの最適化により，生育の抑制や遅延を回避しつつ，非破壊で植物から糖を取り出すことが可能であることが示された．

Investigation of the non-destructive sugar extracting method from living plants

○Madoka Yonekura[1], Naohiro Aoki[2], Tatsuro Hirose[3], Satoshi Kondo[1], Chikara Ohto[4]
([1]Agric. Biotech. Business Div., Toyota Mortor Corp., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [3]NARO/ARC, [4]T-Frontier Div., Toyota Motor Corp.)

Key words bioproducts, SWEET, biofuel, sugar extraction

1Hp10 イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* 由来セロビオース脱水素酵素と新規ヘム含有膜タンパク質の解析

○本間 陽名[1], 土居 友梨子[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]秋田大院・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，セルラーゼなどの加水分解酵素に加えて酸化還元酵素の役割が注目されている．セロビオース脱水素酵素（CDH）や，溶解性多糖モノオキシゲナーゼは，植物細胞壁の主成分であるセルロースの分解においてセルラーゼと協調的に働いていると予想されている．CDH はフラビンドメインとヘムドメインからなるフラボヘムタンパク質である．CDH の酵素活性には電子伝達反応が必須であるが，電子伝達パートナーに関しては未だ不明な点が多く，その生理的な役割の詳細については明らかになっていない．本研究では，セルロース分解におけるイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* 内での CDH の機能解明を目指し，*M. oryzae* ゲノムデータベースにより CDH ホモログ及び CDH の電子伝達パートナー候補の探索を行った．また，メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いたタンパク質発現系を構築し，タンパク質機能解析を行った．
【結果及び考察】*M. oryzae* のゲノムデータベースにおいて CDH ホモログ遺伝子を探索した結果，高い相同性を示す 2 つの遺伝子 MGG13809 と MGG11036 を発見した．2 種の CDH ホモログを *P. pastoris* を用いて発現させ，酵素活性を測定したところ，セロビオース酸化活性が確認された．同様に，CDH の電子伝達パートナー候補を探索し，N 末端側が CDH のヘムドメインと，C 末端がシトクロム 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（MGG01225）を発見した．MGG01225 を発現させた *P. pastoris* 菌体はヘムタンパク質に特徴的な赤い色を示しており，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付近にバンドが確認された．また，UV-vis スペクトル測定を行った結果，ヘム由来の吸収ピークが観測された．

Expression of cellobiose dehydrogenases and a novel heme-containing membrane protein from rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*

○Haruna Honma[1], Yuriko Doi[1], Hirotoshi Matsumura[1], Masahiro Samejima[2], Kiyohiko Igarashi[2], Nobuaki Ogawa[1], Hideaki Itoh[1], Masafumi Odaka[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Key words biomass, rice blast fungus, cellobiose dehydrogenase, heme containing membrane protein

1Hp11 *Aspergillus aculeatus* 由来キシラナーゼの天然バイオマス分解に対する効果

○梶本 真由, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司
（阪府大院・生環科）
takashi@biochem.osakafu-u.ac.jp

【背景と目的】高いヘミセルラーゼ活性を有する *Aspergillus aculeatus* No. F-50 株は 3 種のキシラナーゼ FIa-Xyn，FIb-Xyn，FIII-Xyn を生産する．FIa-Xyn と FIII-Xyn は GH10 に，FIb-Xyn は GH11 に属し，3 種のうち FIII-Xyn のみ CBM1 を保持する．GH10 に属するキシラナーゼは，主鎖分解において側鎖の影響を受けにくいことが知られている．また，CBM は不溶性基質の分解を促進し，中でも CBM1 はセルロースに結合することが知られている．そこで，CBM1 を有する GH10 キシラナーゼの天然バイオマス分解に対する効果を検討することを目的に，FIa-Xyn と FIII-Xyn，さらに CBM1 を付加した FIa-XynCBM1 と CD のみを保持する FIII-XynCD を作製し，セルラーゼ剤に対する添加効果を比較した．
【方法と結果】5%アルカリ処理バガスに対して 0.1 mg/g dry biomass の FIa-Xyn，FIII-Xyn，FIII-XynCD を 50℃で 3 日間作用させ，反応後の上清中に含まれる還元糖量を定量することで評価した．精製酵素単独使用時の還元糖生成量は，FIII-Xyn で FIII-XynCD の 2.9 倍の値を示した．FIa-Xyn については低い値を示したが，これは反応温度 50℃での安定性が要因だと考えられた．また，2 mg/g dry biomass のセルラーゼ剤と併用時の還元糖生成量は，0.1 mg/g dry biomass の FIa-Xyn，FIII-Xyn，FIII-XynCD を添加することでセルラーゼ剤単独使用時の 1.4 倍，2.6 倍，1.7 倍の値を示し，FIII-Xyn がセルラーゼ剤と最も高い相乗効果を示した．このときの分解産物を HPAEC-PAD で分析すると，FIII-Xyn とセルラーゼ剤との相乗効果により，2.8 倍のキシロースに加え，セルラーゼ剤の量に変化はないにも関わらず 1.5 倍のグルコースの存在が確認された．以上の結果から，CBM1 を有する FIII-Xyn は天然バイオマス分解に効果的であることが示された．現在，FIa-XynCBM1 について調製中であり，併せて報告する予定である．

Effects of xylanases from *Aspergillus aculeatus* on biomass degradation.

○Mayu Kajimoto, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words xylanase, *Aspergillus aculeatus*, biomass, CBM

1Hp12 磁気細胞アレイ技術を用いたペクチン分解活性評価法の開発

○吉川 真広[1], 石原 真以[2], 清水 一憲[1], 鈴木 宏昭[2], 本多 裕之[1,3]
（[1]名大院・工, [2]トヨタ紡織, [3]予防早期医療創生セ）
honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】
自動車部品の植物材料化が進む中，ケナフが注目されている．ケナフは生長が早く，二酸化炭素吸収能力が高い 1 年草の植物であり，その繊維は木材の代替として基材に使用されている．ケナフの繊維化は繊維同士を架橋するペクチンを微生物で分解する工程を要するため，高ペクチン分解能を有する微生物の取得が望まれる．我々は，これまでに磁性微粒子と磁力を用いて 1 細胞ずつ培養可能な磁気細胞アレイ培養技術を開発してきた．本研究では，独自に見出した冷却によるペクチン白濁現象を磁気細胞アレイ技術に応用し，効率的な微生物のペクチン分解活性評価法の開発を行った．
【方法】
ペクチン分解モデル微生物として *Bacillus halodurans* C-125 株(*B.halodurans*)を使用した．磁性ビーズを用いて菌体を磁気ラベル化し，磁気細胞アレイ技術を用いてパターニングを行った後，ペクチンを主な炭素源とした厚さ 200 μm の寒天薄膜を被せ培養した．培養後は，4℃で冷却し，ペクチン分解により形成されるハローを顕微鏡を用いて観察した．
【結果と考察】
菌体の磁気ラベル化は，*B.halodurans* や環境微生物を含む 4 種類の菌体で成功した．次に，磁気ラベル化した *B.halodurans* を磁気細胞アレイ技術によりパターニングし，ペクチンを含む寒天薄膜を被せ培養した．その結果，18 時間後にはパターニングを維持したまま増殖し，コロニーを形成している様子が目視可能であった．これを 4℃で冷却したところ，コロニー周辺にハローが形成された．さらに顕微鏡を用いて撮影した画像を輝度の差で 2 値化を行うことで，ハローの識別が可能であった．今後はこのハローの面積を計算することで，微生物によるペクチン分解活性の定量的評価を目指す．

Development of pectinolytic activity evaluation method using magnetic cell array technology

○Masahiro Kikkawa[1], Mai Ishihara[2], Kazunori Shimizu[1], Hiroaki Suzuki[2], Hiroyuki Honda[1,3]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Toyota boshoku Corp., [3]PME, Nagoya Univ.)

Key words pectinolytic, microbial cell array, magnetic patterning, halo assay

1Hp13 異なるストレス条件下における *Aquitalea magnusonii* H3 のコウキクサ成長促進効果に関する検討

○多田 三菜美[1], 石澤 秀紘[1], 黒田 真史[1], 井上 大介[1], 森川 正章[2], 池 道彦[1]
（[1]阪大院・工, [2]北大院・地環科）
ike@see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】ウキクサ亜科植物は成長の速さ，バイオマス組成，栽培，収穫の容易さから有望なバイオマスと考えられており，排水中で栽培することで水質浄化と資源生産を両立するシステムが提案されている．このシステムの生産性を向上させる手法として植物成長促進細菌(PGPB)の利用が注目されており，いくつかの菌株がウキクサ亜科植物の成長を顕著に促進することが報告されている．ここで，現在報告されているウキクサ亜科植物の PGPB はこれまでの研究において植物の生育に好適な環境で試験されてきたため，様々なストレス要因が存在しうる実環境中において同様に成長促進効果を発揮できるかについては明らかになっていない．そこで本研究では，植物の受けるストレス要因の違いが PGPB の成長促進効果にどのような影響を与えるかについて検討を行った．
【方法・結果】ウキクサ亜科植物の栽培において想定される 7 種類のストレス要因をそれぞれ付与した条件で，コウキクサの PGPB である *Aquitalea magnusonii* H3 株による成長促進効果を評価した．その結果，コウキクサの生育が銅イオン，亜鉛イオン，低温，弱光によって制限される条件下では H3 株の添加により生育が改善され，特に銅イオンと亜鉛イオンの存在下ではストレスの無い場合よりも大きな成長促進効果を示した．一方，塩ストレス条件下では促進効果は見られなくなり，貧栄養，低 pH ストレス条件下では反対に成長が阻害された．このことから，PGPB の成長促進効果はストレス要因の種類によって大きく変化することが示され，適用する環境条件を考慮することでより高い効果が得られることが示唆された．
本研究は，科学技術振興機構（JST）先端的低炭素技術開発（ALCA）「共生微生物を活用した水生バイオマスの効率生産」の一環として実施した．

Evaluation of duckweed growth promotion by *Aquitalea magnusonii* H3 under different stress conditions.

○Minami Tada[1], Hidehiro Ishizawa[1], Masashi Kuroda[1], Daisuke Inoue[1], Masaaki Morikawa[2], Michihiko Ike[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Environ. Sci., Hokkaido Univ.)

Key words duckweed, Plant Growth-Promoting Bacteria, stress factor

1Hp14 ウキクサバイオマスの増産へ向けた植物成長促進細菌と阻害細菌との競争関係の解析

○石澤 秀紘[1], 黒田 真史[1], 井上 加奈子[2], 井上 大介[1], 森川 正章[3], 池 道彦[1]
（[1]阪大院・工, [2]阪大・超高圧電顕セ, [3]北大院・地環科）
ike@see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】ウキクサ亜科植物は個体重のほぼ全てを光合成器官に投資した特殊な形態を持つ水生植物であり，好適な環境では植物界で最大級の増殖速度を示す．また，そのバイオマスはデンプンを多く含有し，バイオ燃料への変換の妨げになるリグニンが少ないことから，燃料用作物として期待されている．近年，ウキクサ亜科植物と共生する細菌に宿主の成長を促進するものが発見され，こうした菌株を導入することで栽培を効率化する技術が提案された．一方，多様な細菌の存在する環境中において，目的の菌株を植物に定着させる方法は確立されていない．そこで本研究では，以前の研究で単離された植物成長促進細菌および成長阻害細菌の競争関係を解析することで，有益な菌株を定着させる方法について考察した．

【方法・結果】成長促進細菌 *Aquitalea magnusonii* H3，成長阻害細菌 *Acinetobacter ursingii* M3，*Asticcacaulis excentricus* M6 の 3 株をそれぞれ単独でコウキクサに接種すると，接種量の多寡によらず 1～3 日で一定の付着密度に達し，以後安定した．これらのうち 2 種を用いた競争付着実験では，H3 株は M3 株の付着を著しく制限し，M6 株とは概ね 1:1 の比率で共存した．こうした傾向は異なる接種比率や接種する順序によらず一貫して認められたことから，細菌種によるウキクサ亜科植物へ定着には，接種方法よりも用いる菌株の性質が重要であることが示された．また，H3 株は僅かな接種量でも比較的高い割合で付着し，生育を改善したことから，非滅菌環境での応用に適した菌株であることが示唆された．

本研究は，科学技術振興機構先端的低炭素技術開発(ALCA)「共生微生物を活用した水生バイオマスの効率生産」の一環として実施した．本研究の一部は，「文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業微細構造解析プラットフォーム」の支援を受けて実施した．

Analysis of competitive relationships between plant growth-promoting and -inhibiting bacteria for the improvement of duckweed biomass production

○Hidehiro Ishizawa[1], Masashi Kuroda[1], Kanako Inoue[2], Daisuke Inoue[1], Masaaki Morikawa[3], Michihiko Ike[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Res. Cent. Ultra-High Voltage Electron Microsc., Osaka Univ., [3]Grad. Sch. Environ. Sci., Hokkaido Univ.)

Key words plant growth-promoting bacteria, duckweed, biomass

1Hp15 好熱菌発酵産物から単離されたエンドファイトが植物の生長に与える影響

○金子 由喜[1], 渡邉 凌[2], 井藤 俊行[3], 宮本 浩邦[1,4,5], 児玉 浩明[1]
（[1]千葉大院・園芸, [2]千葉大院・融合, [3]京葉プラントエンジニアリング, [4]サーマス, [5]理研・IMS）
kodama@faculty.chiba-u.jp

【背景・目的】当研究室では未利用海産資源等を原料として高温で発酵させた資材（好熱菌発酵産物）の研究を行っている．当該産物の施肥によって作物の収量が増加したり，病害菌や病害虫による被害が低減することが農家より報告されている．一般的に，植物―微生物間では様々な相互作用が起こっており，当研究室では，好熱菌発酵産物による植物への有益な効果もまた，植物に直接的に作用する，いわゆる PGPB（plant growth promoting bacteria）が関与すると仮説を立てている．そこで，当該産物を施肥して育てた植物から単離された細菌について，PGPB としての機能を果たすのか否か，その特徴について調べた．
【方法・結果】当該産物を施肥した植物から単離された *Paenibacillus barcinonensis* No.40 株及び *Paenibacillus cucumis* No.41 株について，PGPB としての生化学的特徴と植物成長促進効果の解析評価を行った．その結果，*P. barcinonensis* No.40 株，及び *P.cucumis* No.41 株はインドール酢酸産生能，不溶性リン酸の可溶化能を有しており，加えて *P. barcinonensis* No.40 株はシデロフォアの産生能も有することが確認された．また，これらの菌の懸濁液をアラビドプシスに継続投与して育てたところ，*P.cucumis* No.41 株投与区において対照区と比較し，成長が促進される傾向が見られたが，*P. barcinonensis* No.40 株投与区では成長促進効果は認められなかった．*P. barcinonensis* No.40 株，及び *P.cucumis* No.41 株はどちらも植物の生育制御に関わる特徴を有するが，No.40 株はシデロフォアの産生能に特徴があり，No.41 株は，特に植物の成長促進効果があることが明らかになった．

The effect of endophytes isolated from thermophilic-fermented compost on plant growth

○Yuki Kaneko[1], Ryo Watanabe[2], Toshiyuki Ito[3], Hirokuni Miyamoto[1,4,5], Hiroaki Kodama[1]
([1]Grad.Sch.Fac.Horticul.,Chiba Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., [3]Keiyo Plant Eng., [4]Sermas, [5]IMS, RIKEN)

Key words compost, PGPB, *Paenibacillus*, auxin

1Hp16 森林バイオマスの新規利用 -土壌改良効果の検討-

○連 綾香[1], 荒木 希和子[2], 久保 幹[2]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]立命館大・生命科学）
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】近年，森林資源の利用価値の低下や人手不足による森林の管理放棄に伴う，森林の持つ機能および健全性の低下が課題となっている．森林機能を回復するには，産出される森林資源の持続的な利用を通じて，森林の管理を促していく必要がある．一方，日本の農地土壌における有機物の低下で微生物を含む土壌生物の減少により，農作物の収量や品質が低下している．そこで，森林資源の土壌改良材としての利用が期待されている．本研究では，森林資源の利用価値の向上および土壌環境の改善に向けて，木質資材による土壌改善効果と，改良土壌の植物成長への影響を明らかにすることを目的とした．
【方法】2 種類の木質繊維 (以下，木質 1，2) について，成分分析を行った．次に，木質繊維を用いた土壌，木質繊維を混合していない土壌 (以下，未混合) について，土壌肥沃度指標 (SOFIX) に基づいて有機資材を用いて調整し，ワグネルポットに 1.0 kg 分取して植物育成室内に 14 日間静置し，土壌総細菌数を eDNA 法により測定した．また，16S rRNA を標的とした PCR-DGGE 法による菌叢解析を行った．
【結果】成分分析の結果，木質繊維は全炭素量 340,000 - 384,000 mg/kg に対し，全窒素量，全リン量，全カリウム量は低い値を示した．木質繊維を用いた土壌の総細菌数は，未混合土壌と比較して 1.1 - 1.5 倍向上した．また，木質 1 および木質 2 の混合土壌では異なる PCR-DGGE のバンドパターンが確認された．木質繊維の観察から，資材の物理性の違いが菌叢に影響を与えていることが示唆された．木質 2 を用いた改良土壌，市販の培養土を用いたコマツナの栽培実験においても，木質 2 を混合した土壌は培養土に遜色ない成長が見られた．以上より，木質繊維は土壌への炭素供給源として機能に加え，物理性の改良効果が認められ，それらに伴う細菌数の増加に寄与することが期待できる．

A new method for utilization of forest biomass - study on soil improvement by mixing forest biomass -

○Ayaka Muraji[1], Kiwako S. Araki[2], Kubo Motoki[2]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words forest biomass, soil microbe, soil amendment

1Hp17 土壌細菌バイオマス量と地温の関係解析

○宇野 貴裕[1], 荒木 希和子[2], 久保 幹[2]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]立命館大・生命科学）
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】土壌中の有機物は微生物によって無機物へと分解され，微生物はその分解過程で得たエネルギーにより成長，増殖する．微生物はこの有機物の分解に伴い，熱を発生させている．このことから，微生物量の多い土壌ほど土壌内の温度 (以下：「地温」) が高くなると考えられる．地温は，種子の発芽率，水分・養分の吸収速度，作物の収量など，農業を行う上で重要な要因の 1 つである．しかし，土壌中の物質の分解過程における微生物と熱エネルギーの関係やその熱エネルギーによる地温への影響は不明確である．本研究では，土壌微生物量と地温の関係を調べることを目的とした．
【方法・結果】微生物の発酵熱による地温への影響調べる為に，滋賀県の有機および化学栽培を行っているハウス内の地温と土壌細菌バイオマス量 (slow stirring 法) を測定した．その結果，有機，化学ハウスの細菌数は前者の方が多かった．また，外気温の変動に伴い地温も上下していたが，前者の方が地温の振れ幅は小さかった．このことから，土壌細菌が地温の安定性に関与していると考えられた．次に，土壌細菌バイオマス量の違いによる地温差を調べる為に，有機土壌を用いて，未滅菌土壌 1，2 と滅菌土壌 3 を作製した．各ポットを 25℃に設定したインキュベーター内に静置し，7 日間地温と土壌細菌バイオマス量を測定した．地温測定 0 日目における土壌 1，2 の細菌数は 0.3×10^8 cells/g-soil であったが，7 日目において，土壌 1 では 3.8×10^8 cells/g-soil，土壌 2 では 6.8×10^8 cells/g-soil に増加していた．土壌 3 から細菌は検出されなかった．土壌 1，2 は土壌 3 よりも約 0.5℃地温が高く，土壌 2 は土壌 1 よりも約 0.1～0.2℃地温が高かった．土壌細菌バイオマス量と地温の高さには相関が見られたことから，これらの地温差は土壌微細菌バイオマス量の違いによるものと考えられた．

Relationship between bacterial biomass and temperature in soil

○Takahiro Uno[1], Kiwako S. Araki[2], Motoki Kubo[2]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words soil bacteria, organic soil, soil temperature, soil water content

1Hp18 土壌環境および植物栽培が土壌微生物叢に及ぼす影響解析

○前田 憲慶[1], 荒木 希和子[2], 久保 幹[2]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]立命館大・生命科学）
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景と目的】植物の栽培方法には化学栽培と有機栽培の 2 通りがある．植物に対する無機成分を化学肥料により施肥している農地では，微生物の栄養源である有機物量が少なくなり，微生物数や種の多様性が低くなる．一方，様々な成分を含む有機肥料を施肥した場合，微生物の生育源となる有機物質が土壌中に供給されるため，微生物の代謝や増殖が促進され，微生物数や種の多様性が高くなる．その結果，土壌中の菌数や菌種の増加によって，植物病原菌に対する拮抗菌が増加するため，植物病害の抑制につながると考えられている．また，植物は根から有機物を分泌しており，分泌物は植物種や植物の生育段階ごとに組成や量が異なる．植物の根から分泌される物質には，特定の微生物が集まる傾向があり，同一作物の連作によって，微生物叢が単純化することが推測される．本研究では，有機物と植物栽培が土壌微生物叢に与える影響を明らかにすることを目的とした．
【方法】ベース土壌に，有機施肥（有機土壌）および化学肥料の施肥（化学土壌）を行い，コマツナ，クローバー，シュンギクの苗を定植し，植物育成室で 4 週間の栽培を行った．栽培前，栽培 2 週目，栽培 4 週目の土壌について細菌数（slow stirring 法）および細菌叢（PCR-DGGE 法）を測定した．
【結果】化学土壌の総細菌数は実験開始から終了まで検出限界（6.6×10^6 cells/g-soil）以下であったのに対し，有機土壌では，いずれの菌数も 6.0×10^8 cells/g-soil 以上となっており，有機土壌の方が明らかに高かった．栽培前の土壌細菌叢を確認したところ，化学および有機施肥で PCR-DGGE 泳動後のバンド数に大きな差がみられ，有機施肥の方が菌叢の多様性が高かった．また，植物栽培後の土壌においては，有機土壌では大きな菌叢変化は認められなかったが，化学土壌では菌叢変化が著しかった．

Analysis of microflora influence by soil environment and plant cultivation

○Kazuyoshi Maeda[1], Kiwako S. Araki[2], Motoki Kubo[2]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words soil environment, bacterial microflora, plant growth, organic cultivation

1Ip01 REIC/Dkk-3 タンパク質の相互作用分子解析と抗がん免疫活性化の分子機構解明

○羽田 彩夏[1], 中川 そらみ[1], 木下 理恵[2], 二見 淳一郎[1]
（[1]岡山大院・自科, [2]岡山大院・医歯薬）
futamij@okayama-u.ac.jp

がん免疫治療では腫瘍局所の免疫抑制状態の解除と，がんの抗原性向上が重要なポイントである．分泌タンパク質の REIC/Dkk3 は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．がん細胞に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）がん細胞内で小胞体ストレスに起因するアポトーシス誘導と，（2）分泌した REIC タンパク質による抗がん免疫活性の活性化が誘導され「がん抗原の露出」と「抗がん免疫の活性化」が同時に誘導できる．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では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が高く，REIC と相互作用する分子間は低親和性で結合す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 細胞で共発現させると 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る．また一部の細胞では，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．この TGFβ の抑制活性は免疫系の細胞に対して特に効果的に誘導されることから，腫瘍局所で免疫抑制状態を誘導する TGFβ の活性を REIC タンパク質により阻害し，その結果として腫瘍免疫応答が活性化している可能性が示唆された．

Analysis of REIC / Dkk-3 binding protein and molecular mechanism for activation of tumor immunity

○Ayaka Hada[1], Sorami Nakagawa[1], Rie Kinoshita[2], Junichiro Futami[1]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okyama Univ., [2]Grad. Sch. Med. Dent. Pharm, Sci., Okayama Univ.)

Key words cancer immunotherapy, TGF beta, protein engineering

1Ip02 抗腫瘍関連抗原抗体をバイオマーカーとした高感度測定系の開発

○吉岡 実咲[1], 本荘 知子[1], 木下 理恵[2], 二見 淳一郎[1]
（[1]岡山大院・ヘルスシステム統合科学（工）・蛋白質医用工学, [2]岡山大・医・細胞生物）
futamij@okayama-u.ac.jp

がん免疫治療では,がん細胞内に含まれる異常タンパク質である「がん抗原」が目印となり免疫応答が活性化し,細胞性免疫と同時に液性免疫も誘導され,抗がん抗原抗体が血中で上昇する.後者の抗体価を定量的に評価すれば有益な Pharmacodynamic(PD)バイオマーカーとなることが期待される.がん検出に用いられている腫瘍マーカーも健常人の血中には存在しないタンパク質であり,がん抗原として機能する可能性が示唆されている.本研究は PD バイオマーカー探索の一環として肝がん,肺がんに関連するがん抗原のリソース整備を行った.さらに悪性中皮腫と肝がんの患者の検体を用いて抗体価測定の予備検討を行った.
腫瘍関連抗原をコードする cDNA 断片を PCR 法で取得し,Hek293 細胞での一過的な高発現が可能な SGE ベクター又は大腸菌で発現可能な pET28 ベクターにクローニングし,FreeStyle293F 細胞又は大腸菌を宿主としてタンパク質を生産した.Native 構造の抗原に加え Cys 残基特異的な S-カチオン化修飾を施した変性・可溶化抗原も調製した.一部の抗原は Multiplex 磁気ビーズに固定化する MUSCAT-Assay(Multiple S-cationized antigen beads array assay)法により抗体価の測定に用いた.
腫瘍関連抗原の生産系は 16 種類の構築が完了した.CA125 抗原に対する抗体価測定で Native の構造エピトープではなく変性抗原の配列エピトープを強く認識する抗体価が有意に上昇する例が確認された.近年,抗がん抗原抗体は生体内で MHC クラス 1 エピトープを含むがん抗原と免疫複合体を形成し,樹状細胞上の FCγRII を介して取り込まれた後,細胞性免疫応答を増強する機構が提唱されている.この機構から推定すると,多様ながん抗原に対する抗体価が上昇する Antigen-Spreading は腫瘍関連抗原のみならず体細胞変異に由来する Neo-antigen を免疫系に提示するメディエーターとして機能している可能性が示唆された.

Sensitive detection of anti-tumor-associated antigen antibody as immune-oncological biomarker

○Misaki Yoshioka[1], Tomoko Honjo[1], Rie Kinoshita[2], Junichiro Futami[1]
([1]Grad. Sch. Interdiscip. Sci. Eng. Hel. Syst., Okayama Univ., [2]Dept. cell biol. Med., Okayama Univ.)

Key words protein engineering, tumor associated antigen, antibody, cancer biomarker

1Ip03 複合免疫療法に向けたがんの抗原性向上に関する基礎検討

○勝河 祐希[1], 丸山 悠[2], Ahmadi Hannaneh[3], 本荘 知子[1], 二見 淳一郎[1,2,3]
（[1]岡山大院・ヘルスシステム, [2]岡山大・工・化学生命, [3]岡山大院・自然科学）
futamij@okayama-u.ac.jp

腫瘍免疫応答の活性化に伴うバイオマーカーとして，各種の抗がん抗原抗体価が上昇する．我々はがん免疫治療のコンパニオン診断薬として，高感度かつ網羅的な抗体検査診断薬を開発中であるが，がんの「抗原性」が高ければ免疫治療が奏功しやすいとの側面が見えてきた．がん細胞は発がんの過程で DNA 高メチル化などのエピジェネティック異常が蓄積している．この異常を制御するエピゲノム薬には，がん抗原の発現を向上させる効果もあり，免疫チェックポイント阻害剤等との併用が期待されている．本研究ではエピゲノム薬により発現が変動しやすい抗原の検討を行い，がん複合免疫療法に向けた基礎検討を実施した．
抗体検査薬として整備中の共通がん抗原である Cancer-Testis(CT)抗原を中心に，メチル基転移酵素阻害剤の decitabine 処理に伴う遺伝子・タンパク質レベルでの発現変動を解析した．ヒト卵巣がん細胞株では，細胞増殖レベルにほぼ影響がない decitabine 処理条件で，複数のがん抗原の発現が亢進する例が mRNA レベルおよびタンパク質レベルで確認された．同条件で培養されたヒト正常繊維芽細胞では遺伝子発現変化は確認されなかった．これは体細胞変異が蓄積したがん細胞のゲノム不安定性と強く相関していることが示唆された．同様に，マウスメラノーマおよび線維芽細胞株でも評価をしたが，マウスでは decitabine 処理に伴う発現変動はほとんど確認されなかった．
以上の結果より，エピゲノム薬処理により発現誘導されやすいがん抗原を特定し，対応する抗体検査診断薬を準備しておけば，腫瘍免疫応答の活性化をより高精細にモニタリングできる可能性が示唆された．

Study on enhanced tumor antigenicity for combination therapy

○Yuki Katsukawa[1], Haruka Maruyama[2], Hannaneh Ahmadi[3], Tomoko Honjyo[1], Jyunichiro Futami[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Interdiscip. Sci. Eng. Hel. Syst., Okayama Univ., [2]Dept. Appl. Chem. Biotech. Okayama Univ., [3]Grad Sch. Natl. Sci. Tech. Okayama Univ.)

Key words protein engineering, antibody, immunotherapy, epigenetics

1Ip04 変性タンパク質への部位特異的 biotin 化条件の最適化と neoantigen スクリーニングへの応用

○峯苫 智晴[1], 垣見 和宏[2], 二見 淳一郎[1]
（[1]岡山大学院・ヘルスシステム, [2]東大病院・免疫細胞治療）
futamij@okayama-u.ac.jp

【背景】がん細胞表面では体細胞変異に由来するペプチド断片（neoantigen）が MHC-class I 上に抗原提示されており，neoantigen は個別化医療の重要なターゲットであるため迅速なスクリーニング法の開発が必要だ．MHC-class I は抗原ペプチドと複合体を形成して refolding する特徴と，多量体を形成させると低親和性の T 細胞受容体との結合が検出できる特徴があり，これを neoantigen スクリーニングに利用する．大腸菌由来 biotin ligase（BirA）は AviTag 配列を付加したタンパク質に部位特異的に biotin 化することができる．本研究では AviTag 付加 MHC-class I タンパク質を変性状態のまま biotin 化する条件を最適化し，neoantigen スクリーニングの迅速化を進めた．
【方法】BirA は GST 融合タンパク質として生産・精製し，AviTag 付加型の変性タンパク質の NY-ESO-1 をモデルとして biotin 化条件の最適化を行った． 多型性の MHC class I の α 鎖の細胞外ドメインのうちモデル 4 種（ヒト hA2，hA24）と（マウス mH-2Db， mH-2Kb）を biotin 化タンパク質として生産した後 β 鎖と UV 開裂するペプチドとともに refolding・精製し，streptavidin を用いて四量体を形成して安定化させ，UV ペプチド交換により抗原ペプチドを提示させ，T 細胞への結合能も確認した．
【結果】インクルージョンボディを形成する AviTag 付加タンパク質は 8M 尿素で溶解後，2M まで希釈し BirA と ATP や D-biotin を含む試薬と混合して室温で 1 時間静置することで biotin 化できることを確認した．MHC Class I のテトラマーアッセイでは mH-2Db の refolding と精製，UV 照射によるペプチド交換及び CTL の活性化が確認された．本研究により変性状態のタンパク質の高度利用法の開発や，ハイスループットな Neo-antigen スクリーニング法の開発に繋がる基盤が固まった．

Site-specific biotinylation technology for denatured protein for neoantigen screening

○Chiharu Minetoma[1], Kazuhiro Kakimi[2], Junichiro Futami[1]
([1]Grad. Sch. Interdiscip. Sci. Eng. Hel. Syst., Okayama Univ., [2]Dept.Immunother., Tokyo Univ. Hosp.)

Key words protein engineering, antigen, major hitocompatibility complex, biotinylation

1Ip05 （講演中止）

1Ip06 カイコによるマラリア原虫のメロゾイト表面タンパク質の発現とヒト血清との結合

○林谷 美貴子[1], 稲垣 裕[1], Murhandarwati Elsa Heridiana[2], Widya Asmara[2], Vipin Kumar Deo[3], 朴 龍洙[1,4]
（[1]静大院・農・応生化, [2]Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Universitas Gadjah Mada, Indonesia, [3]静大・国際連携推進機構, [4]静大・グリーン科技研）
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景と目的】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し，ヒトの免疫系を回避する．そのため効果的なワクチン開発が困難であるが，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ことが期待される．本研究では，マラリア原虫の形態の一つであるのメロゾイト表面タンパク質である Merozoite surface protein 3 (MSP3)と Merozoite surface protein 1 の C 末端断片 19kDa である MSP1-19 をカイコで発現及び精製を行い，マラリア原虫に感染したヒト血清との結合能を調べた．
【方法および結果】*Plasmodium falciparum* 3D7 株の MSP3 (PfMSP3) 遺伝子を，カイコで発現可能な *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) バクミドに挿入することで組換え BmNPV バクミドを構築した．*P. falciparum* および *P. vivax* の MSP1-19 (PfMSP1-19，PvMSP1-19)についてもそれぞれ発現用 BmNPV バクミドを構築した．それぞれの組換えタンパク質を FLAG タグや 6×His タグと融合させることで，カイコ幼虫で発現させたところ，カイコ体液への分泌が確認された．それぞれのタンパク質を硫安沈殿やポリエチレングリコール沈殿，およびアフィニティークロマトグラフィーにより，カイコ体液から部分精製を行った．得られた各組換え抗原タンパク質は，インドネシア Sumba Tengah と Banjarmasin で採取したマラリア原虫に感染したヒト血清との結合をドットブロット法で確認した．このことから，カイコから精製した各組換え抗原タンパク質は，マラリアワクチンの候補となりうることが示唆された．

Sero diagnostics of *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins expressed in silkworm

○Mikiko Hayashidani[1], Yu Inagaki[1], Elsa Heridiana Murhandarwati[2], Asmara Widya[2], Deo Kumar[3], Enoch Y. Park[1,4]
([1]Dept. Agriculture, Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Universitas Gadjah Mada, Indonesia, [3]Office Int'l Collab., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ)

Key words Maralia, Merozoite surface protein 3, Merozoite surface protein 1-19

1Ip07 *Neospora caninum* antigens displaying-virus-like particles as a vaccine candidate against neosporosis

○Jian Xu[1], Rikito Hiramatsu[2], Hamizah Suhaimi[3], Tatsuya Kato[1,2,3], Mayuko Kabayashi[4], Akari Fujimoto[4], Kazunori Ike[4], Enoch Y. Park[1,2,3]
([1]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Integr. Sci. Technol., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [4]Lab. Veter. Parasit., Nippon Veter. Life Sci. Univ.)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

Neospora caninum, one of the coccidian parasites, is the causative and transmissible agent of dog and bovine neosporosis. The reproductive failures including abortion, neonatal mortality, and congenital infection in cattle lead to significant economic losses worldwide. Currently, however, there is no satisfactory treatment or vaccine available against this neosporosis. Thus, the development of sufficient vaccines to manage its infection and transmission is desired urgently. In this study, we expressed Rous sarcoma virus-like particles (RS-VLP) displaying antigens of *N. caninum* in the silkworm-baculovirus expression system. The antigen candidates are further modified by adding a transmembrane domain of GP64 protein from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) to the C-terminus of surface antigen 1 (NcSAG1) and SAG1-related sequence 2 (NcSRS2) proteins. Through a co-infection method in silkworm larvae, we successfully expressed and purified RS-VLPs displaying SRS2 alone or SAG1/SRS2 together by the sucrose density gradient centrifugation. These VLPs were then utilized for immunizations in gerbils, *Meriones unguiculatus*, to evaluate the anti-*N. caninum* effects. We demonstrate that antigen displaying RS-VLPs-immunized gerbils have a relatively higher survival rate post infection of parasites, suggesting that silkworm-expressed VLP vaccines are potentially promising candidates against *N. caninum* infections.

***Neospora caninum* antigens displaying-virus-like particles as a vaccine candidate against neosporosis**

○Jian Xu[1], Rikito Hiramatsu[2], Hamizah Suhaimi[3], Tatsuya Kato[1,2,3], Mayuko Kabayashi[4], Akari Fujimoto[4], Kazunori Ike[4], Enoch Y. Park[1,2,3]
([1]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Integr. Sci. Technol., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [4]Lab. Veter. Parasit., Nippon Veter. Life Sci. Univ.)

Key words Neospora caninum, virus-like particle, silkworm, baculovirus

1Ip08 Gag protein displaying different rHA mutants in silkworm

○Muzajjad Gozal Goffar[1], Vipin Kumar Deo[2], Tatsuya Kato[1,3], Y.Enoch Park[1,3]
([1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Office Int'l Collab., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
ozzagozal@gmail.com

Virus-like Particle (VLP) is well-known platform for display of antigen protein for vaccine candidate. However, different antigen affects the VLPs size and shape, even though using the same VLPs. Our focus in this study is to examine the structural changes of gag-577 protein after displaying different type of recombinant hemagglutinin (rHA) H5N1 (A/duck/Hunan/795/2002) mutants. We used glycoprotein-64 transmembrane (GP64) from Bombyx mori nucleopolyhedrovirus to display each HA mutant. Two rHA Hunan with the different mutation (A160T and D128S) were co-expressed one by one with gag protein in the silkworm. Examination of injection virus ratio of rHA and gag was performed by quantitative PCR result and adjusted to 1:1 titer ratio. Collected hemolymph 5 days post-co-injection was purified sucrose step gradient centrifugation and by fetuin agarose column in a 2 step purification protocol followed by confirmation by western blotting, rHA and gag-577 respectively. We purified 736 µg of A160T rHA-gag sample from 30 silkworms, and purified 672 µg of D128S rHA-gag sample from 30 silkworms. VLPs diameter size was measured by dynamic light scattering and morphological properties by transmission electron microscope. Different rHA mutant-displaying gag protein showed a shifting on dynamic light scattering distribution size peak and different size as transmission electron microscope picture concurs.

Gag protein displaying different rHA mutants in silkworm

○Muzajjad Gozal Goffar[1], Vipin Kumar Deo[2], Tatsuya Kato[1,3], Y.Enoch Park[1,3]
([1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Office Int'l Collab., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words Virus-like particles, Hemagglutinin, gag protein, Co-expression

1Ip09 Study on efficient purification of recombinant protein from the silkworm larval haemolymph targeting pharmaceutical grade

○Robert Minkner[1], Enoch Y. Park[1,2,3]
([1]Dept. of Biosci., Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]Coll. of Agric., Grad. Sch. of Integr. Sci. and Technol. Shizuoka Univ., [3]Green Chem. Res. Div., Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

The silkworm *Bombyx mori* is a promising bioreactor for the production of recombinant proteins. Widely used *Escherichia coli*-based expression system provides an advantages of the relatively low production cost and easily handling, yet post-translational modifications are limited. On the opposite the silkworm as an insect system can execute these post-translational modifications. However, the purification of the haemolymph is challenging because of a high amount of host proteins. Mostly purifications are done with a tag or with sucrose gradient centrifugations, but there is no systematically approach to purify from the haemolymph up to date. We have tried to purify GFP fusion protein GFP_{uv}-β1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase 2 from the haemolymph as a model recombinant protein using only up scalable methods. To reduce the amount of impurities before using chromatography, different kind of pre-treatments were investigated. A centrifugation force with 500 g, 5 min was chosen, the supernatant then subjected to a 2.5 % PEG precipitation and the precipitate was used in the following chromatography steps. Anion exchange chromatography showed an insufficient separation, but hydrophobic interaction chromatography could separate a major part of the host proteins. Further, a ceramic hydroxyapatite column was investigated for the intermediate purification step. After proofing this purification principle, it was applied for the purification of enveloped virus-like particles expressed in silkworm and the results are discussed.

Study on efficient purification of recombinant protein from the silkworm larval haemolymph targeting pharmaceutical grade

○Robert Minkner[1], Enoch Y. Park[1,2,3]
([1]Dept. of Biosci., Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]Coll. of Agric., Grad. Sch. of Integr. Sci. and Technol. Shizuoka Univ., [3]Green Chem. Res. Div., Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

Key words silkworm haemolymph, purification, chromatography, separation

1Ip10 シリカ粒子形成促進タンパク質「グラシン」の特徴的な領域構造とシリカ形成能

○西 美智佳[1], 小林 大起[1], 美藤 友博[2], 有馬 二朗[2], 清水 克彦[3]
（[1]鳥取大院・農, [2]鳥取大・農, [3]鳥取大・CoRE）
arima@muses.tottori-u.ac.jp

【目的】海綿動物門六放海綿綱カイロウドウケツのシリカ骨格中より発見されたタンパク質「グラシン」は，常温・中性条件下において，ケイ酸を添加すると，速やかにシリカ粒子を形成する．この現象から，グラシンはカイロウドウケツのシリカバイオミネラリゼーションに関与していると考えられている．一方でグラシンは，ヒスチジンとアスパラギン酸に富む HD 領域，プロリンに富む P 領域，ヒスチジンとスレオニンに富む HT 領域がスペーサーを挟んで 2 回繰り返されるタンデムリピート構造を取っており，既知のタンパク質と配列類似性がない．その特徴的な構造とシリカ形成能との相関は明らかではないため，本研究ではグラシン各領域のシリカ形成能を評価した．
【方法と結果】グラシン(全長)，グラシンの C 末端側のリピート構造（R2），C 末端側の各領域(HD2，P2，HT2)とグルタチオン S トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質を構築した．続いて GST 部分をプロテアーゼで切断し，切断後のサンプルに対しケイ酸を添加して得られたシリカ量を定量することで，グラシン各領域のシリカ形成能の強さを比較した．その結果，全長グラシンが最も高いシリカ形成能を示し，次に R2 が高く，HD2 からは低いシリカ形成能が確認された．一方で，P2 や HT2 からはシリカ形成能が見られず，グラシンのシリカ形成能を発揮する主領域は HD 領域であることが考えられた．ヒスチジンとアスパラギン酸を交互に配置したポリペプチドでは電子リレー効果によってシラノール基の脱水縮合が促進されることが知られている．グラシンの HD 領域にも似たような配列が見られることから，同様の現象が起きているのではないかと考えられた．

Identification of the region for silica formation in silica particle formation promoting protein "glassin"

○Michika Nishi[1], Hiroki Kobayashi[1], Tomohiro Bito[2], Jiro Arima[2], Katsuhiko Shimizu[3]
([1]Grad. Sch. Agric. Tottori Univ., [2]Fac. Agric., Tottori Univ., [3]CoRE. Tottori Univ.)

Key words *Euplectella*, silica particle formation, histidine rich protein, biomineralization

1Ip11 イネディフェンシンの *Candida albicans* に対するアポトーシス誘導効果の解析

○小川 広大[1], 落合 秋人[1], 福田 美南海[1], 田中 孝明[1], 提箸 祥幸[2], 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，生体防御に関わる先天性免疫物質として様々な生物種に存在する抗菌タンパク質である．当研究室では，長い食経験を持つイネから口腔内ヒト病原性真菌 *Candida albicans* に対して抗菌活性を示し，熱やプロテアーゼに対して高い安定性を示すディフェンシン OsAFP1 を見出した．植物ディフェンシンの多くは細胞膜損傷作用またはアポトーシス誘導により抗真菌活性を示すことが報告されている．これまでの研究により，OsAFP1 を処理したターゲット細胞においてアポトーシスが誘導されることを見出している．本研究では，殺菌活性試験と二重染色による蛍光観察法を用いて，OsAFP1 がアポトーシスを誘導することにより *C. albicans* を殺菌することを明らかにする．
【方法と結果】OsAFP1，は大腸菌発現系を用いて組換えタンパク質として大量調製した．殺菌活性試験は，*C. albicans* 細胞（OD_{650} = 0.0125）を終濃度 16 µM の OsAFP1 を用いて 0~4 時間処理し，生菌数（CFU）を計測することにより行った．その結果，OsAFP1 の処理時間に伴い生菌数は減少したことから，OsAFP1 はターゲット細胞に殺菌的に作用することがわかった．また，同様に処理した *C. albicans* 細胞にアポトーシス検出マーカーである FITC-AnnexinV と死細胞を検出する Propidium Iodide を処理し，蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察した．細胞膜周辺の FITC 蛍光の蓄積から，OsAFP1 の処理後 0.5 時間においてほぼ全ての細胞に初期アポトーシスが誘導されたことがわかった．また，いずれの処理時間においてもネクローシス細胞は観察されなかったことから，OsAFP1 はアポトーシス誘導により *C. albicans* に対して殺菌作用を示すことが示唆された．現在，ターゲット細胞におけるカスパーゼ経路の活性化や DNA の断片化などを解析し，アポトーシス誘導効果の詳細な検証を進めている．

Analysis of apotosis induction of rice defensin against *Candida albicans*

○Kodai Ogawa[1], Akihito Ochiai[1], Minami Fukuda[1], Takaaki Tanaka[1], Yoshiyuki Sagehashi[2], Masayukii Taniguchi[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]NARO/HARC)

Key words OaAFP1, antifungal activity, apoptosis, *Candida albicans*

1Ip12 北海道白糠町産植物からの Aβ 凝集阻害物質の探索と機能性評価

○渡邉 輝[1], 久保 研二[1], 杉村 康司[2], 大場 慶司[3], 上井 幸司[1], 徳樂 清孝[1]
（[1]室工大院・工, [2]熊大院・薬, [3]東北大院・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 発症の原因として，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．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 162 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．また，特に活性が高い植物種については，活性本体の探索を行った．
【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 162 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)と ThT 法により評価し，EC50(50%効果濃度)として数値を算出した．Aβ 細胞毒性緩和能評価は MTT アッセイにより評価した．
【結果と考察】
白糠町産アイヌ伝承有用植物を含む植物種 162 種類の Aβ 凝集阻害活性評価をしたところ，全 31 目中 7 目，全 55 科中 12 科，全 162 種中 42 種が EC50 値 0.1 mg/ml 以下の高い活性を有していることが明らかとなった．42 種中 9 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(EC50=0.018 mg/ml)（Ishigaki ら，2013）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．今回の発表では，植物の部位，採集時期，採集場所による活性の違い，Aβ 細胞毒性緩和能の評価結果についても報告する．

Screening of inhibitory substances for Amyloid-β aggregation from plants found in the Shiranuka area of eastern Hokkaido and the functional assessment

○Hikaru Watanabe[1], Kenji Kubo[1], Koji Sugimura[2], Keji Oba[3], Koji Uwai[1], Kiyotaka Tokuraku[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Muroran Inst. Technol., [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kumamoto Univ., [3]Grad. Sch. Pharm. Sci., Touhoku Univ)

Key words Alzheimer's disease, Amyloid-beta, Qdot, Shiranuka

1Ip13 麹菌界面活性タンパク質 RolA の固体表面への吸着過程解析

○寺内 裕貴[1], 永山 恵美[1], 田中 拓未[1], 田邊 弘毅[1], 高橋 徹[1], 藪 浩[3], 有田 稔彦[3], 樋口 剛志[3], 阿部 敬悦[1,2]
（[1]東北大院・農, [2]東北大・未来研, [3]東北大・多元研）
yuki.terauchi@gmail.com

Aspergillus oryzae の分泌する界面活性タンパク質であるハイドロフォビン RolA は，固体表面に吸着し，β-アミロイド様の棒状自己組織化構造 rodlet を形成する．また，RolA は生分解性ポリエステル PBSA に吸着し，その後 PBSA 分解能を持つ酵素クチナーゼ CutL1 と相互作用して CutL1 を PBSA 表面に濃縮することで，PBSA 分解効率を上昇させる．ハイドロフォビンが固体表面吸着後に作る構造や示す機能は研究されてきているが，一方で，様々な特性を有する固体表面とハイドロフォビンとの相互作用機構や，吸着の速度論的性質の詳細は不明である．
本報告では，固体表面に対する RolA の吸着過程と形成される構造に着目し，様々な性質を持った固体表面に対する RolA の吸着機構を解明することを目的とした．吸着速度論的解析に用いる Quartz Crystal Microbalance (QCM)の電極表面を疎水性，正荷電性，負荷電性の性質を有する Self-assembled Monolayer (SAM)化試薬で修飾し，液滴の接触角測定及び原子間力顕微鏡(AFM)で QCM 電極表面の改質の均一性を確認した．次に，これらの SAM 化表面に対して異なる pH の緩衝液中で RolA を吸着させ，QCM を用いて吸着過程を解析した．さらに，SAM 化表面に形成された RolA 吸着構造を AFM で観察した．その結果，すべての性質の固体表面に対し，pH = 4 で吸着速度が非常に早くなり，自己組織化構造が観察された．RolA の予測等電点が pI = 4.78 であることから，RolA は pI 付近において固体表面に吸着力が増し自己組織化構造を形成することが示唆された．

Analysis of adsorption process of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA to various solid surfaces.

○Yuki Terauchi[1], Megumi Nagayama[1], Takumi Tanaka[1], Hiroki Tanabe[1], Toru Takahashi[1], Hiroshi Yabu[3], Toshihiko Arita[3], Takeshi Higuchi[3], Keietsu Abe[1,2]
([1]Grad. Sch. Agric. Sci, [2]NICHe., Tohoku Univ, [3]IMRAM.,Tohoku Univ)

Key words hydrophobin, Quartz Crystal Microbalance, Atomic force microscopy, Self-assembed monolayer

1Ip14 高接着性蛋白質 AtaA の反復配列を利用した部分欠損体の構築と機能ドメイン探索

○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】
Acinetobacter 属細菌 Tol 5 は，細胞表面に存在するファイバー蛋白質 AtaA を介して様々なマテリアル表面に対して非特異的かつ高い接着性を示す．そのため AtaA はバイオプロセスにおける微生物触媒の新規固定化技術として期待されている．AtaA は 3,630 アミノ酸残基から成る巨大蛋白質で，多種多様なドメインで構成されている．それゆえに，AtaA は単一のドメインで接着するのか，あるいは複数のドメインがそれぞれ別の表面に対して接着性をもつことで分子全体として非特異接着性を示しているのかはわかっていない．各ドメインの接着への寄与を明らかにすることは，AtaA の非特異接着メカニズム解明に不可欠である．そこで本研究は，AtaA の部分欠損変異体を作製し，接着ドメインの特定を目指した．
【方法】
AtaA の各ドメインを部分欠損した変異株(IFD)を構築し，ポリスチレンやガラスに対する接着性を AtaA 全長と比較することで，欠損したドメインの接着への寄与をみた．ただし，蛋白質の部分欠損体は常に構構造が崩れる懸念がつきまとう．そこで，本研究では AtaA の各ドメインの間に存在するコイルドコイル構造の周期性を利用して欠損領域をつなぐことで，AtaA 本来の三量体構造を崩さない IFD の設計を行った．さらに，完成した IFD はフローサイトメトリーや電子顕微鏡によって表層提示量やファイバー形成を確認した．
【結果と考察】
完成した IFD はその全てがフローサイトメトリー，電子顕微鏡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．これは本研究の IFD の設計によって，ファイバー形成が阻害されていないことを示している．よって，各 IFD の接着性の評価は適切にできていると考えられる．さらに，IFD の接着試験によって，AtaA の接着に寄与するドメインを初めて明らかにした．

Construction of in-frame deletion mutants using repeat sequence and elucidation of functional domain of highly adhesive protein AtaA.

○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* , adhesion, outer membrane protein

1Ip15 シアノバクテリアの分子シャペロンパラログの生化学的解析

○仲本 準, 山口 湧己
（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，折り畳みの介助，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．少なくともバクテリアに関する限り，このような textbook knowledge は，大腸菌を実験材料にした研究によって得られてきた．大腸菌には 1 種類の GroEL や ClpB しか存在しないのに対して，シアノバクテリアには，複数種の GroEL や ClpB パラログが存在する．興味深いことに，シアノバクテリアの GroEL1 は，発現調節，必須性や生化学的性質などにおいて，大腸菌と類似しているが，GroEL2 は著しく異なっていることを我々は明らかにしてきた（Nakamoto H, Kojima K. Physiol Plant. 2017）．本研究では，シアノバクテリアの ClpB パラログの生化学的解析を行った．
【方法】シアノバクテリア（Synechococcus elongatus）の ClpBI と ClpBII を高度に精製した．オリゴマー構造はゲル沪過カラムクロマトグラフィー等で解析した．ATPase 活性（ADP の生成速度）の測定は分光学的に行った．熱変性あるいは尿素変性処理したリンゴ酸あるいは乳酸脱水素酵素を基質にして折りたたみ反応を解析した．
【結果と考察】我々の比較生化学的解析結果とスウェーデンの Clarke らの clpB 変異株を用いた研究結果から，ClpBI は大腸菌型であるが，ClpBII は今までに報告されたことがないものであることが示唆された．これらの知見に基づき，シアノバクテリアの GroEL や ClpB をコードする（複数）遺伝子は，遺伝子重複後，片方がもともと担っていた機能を維持する一方で，もう片方の遺伝子が新規機能を獲得（neofunctionalization）したものではないかと考えた．

Biochemical analysis of paralogs of molecular chaperones in cyanobacteria

○Hitoshi Nakamoto, Yuhki Yamaguchi
(Dept. of Biochem. Mol. Biol., Grad. Sch. Sci. Eng. Saitama Univ.)

Key words heat shock protein, molecular evolution, molecular chaperone, cyanobacteria

1Ip16 Effect of pH change on the function of a transcriptional regulator in acetic acid bacteria

○Afi Candra Trinugraha[1], Yuri Ishii[1], Yuki Shige[1], Naoki Akasaka[2], Wakao Fukuda[1], Shinsuke Fujiwara[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Marukan Vinegar Co., Ltd.)
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

pH change in cytoplasm seems to affect the function of transcriptional regulator *in vivo*. The intracellular pH in acetic acid bacterium *Komagataeibacter europaeus* decreased from pH 6.3 to 4.7 depending on cell growth phase by produced acetic acid (1). In contrast, intracellular pH in *Eschericia coli* was maintained at pH 7.2 to 7.8 during all growth phases. In the present study, we focused on leucine responsive-regulator of *K. europaeus* (*Ke*Lrp) (2) and examined an effect of pH change on *Ke*Lrp function in comparison with that of *E. coli* (*Ec*Lrp).
Histidine-tagged *Ec*Lrp and *Ke*Lrp were obtained as a recombinant form. To evaluate DNA binding property, operator regions of *ilvIH* were respectively isolated from *K. europaeus* and *E. coli* and labeled with IRD700. The DNA probe containing each operator displayed a typical band shift with increasing concentrations of *Ke*Lrp or *Ec*Lrp. Binding efficiency at different pH conditions (from pH 4.0 to 8.0) were evaluated. The series of gel-shift assays indicated that *Ec*Lrp binds to its operator DNA with higher affinity at pH 7.0 and pH 8.0 than at pH 4.0 to 6.0. In contrast, *Ke*Lrp binds to its operator DNA with higher affinity at pH 4.0 and 5.0 than at pH 6.0 to 8.0, suggesting that respective Lrps function optimally at their cytoplasmic pHs. Structural analyses with CD spectrum between EcLrp and KeLrp at various pH conditions are in progress for understanding their structure-function relationship.
(1) Shige et al., Abstracts of the 69th Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, September 11-14, 2018, (2) Ishii et al., J. Biosci. Bioeng.125, 67-75 (2018)

Effect of pH change on the function of a transcriptional regulator in acetic acid bacteria

○Afi Candra Trinugraha[1], Yuri Ishii[1], Yuki Shige[1], Naoki Akasaka[2], Wakao Fukuda[1], Shinsuke Fujiwara[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Marukan Vinegar Co., Ltd.)

Key words leucine-responsive regulatory protein, intracellular pH, acetic acid bacteria, acidophiles

1Ip17 複数発現でのみ機能発現する走化性センサータンパク質の特性化

○堀 雄一, 緋田 安希子, チュンチャイ マッタナ, 田島 誉久, 加藤 純一
（広島大院・先端物質）
jun@hiroshima-u.ac.jp

【目的】走化性とは，運動性細菌がセンサータンパク質（MCP）により化合物を感知して移動する行動である．細菌はそれぞれ複数の MCP を有し，本研究の解析対象である青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は 22 種類の MCP を保有する．当研究室はこれまでの解析で，本菌の 22 MCP 全破壊株に各 MCP をそれぞれ単独で発現させると，一部の MCP は機能しないという現象を発見した．このような報告は他になく，青枯病菌には未知の走化性機構が存在する可能性が示唆された．そこで本研究では，青枯病菌の単独では機能しない D-リンゴ酸センサー McpT およびクエン酸センサー McpC をモデルとして，MCP 機能発現メカニズムの解明を試みた．
【方法・結果】MCP は膜貫通タンパク質であり，ペリプラズム領域でリガンド化合物を感知し，細胞質領域でそのシグナルを下流へと伝達する．単独発現時における McpT／McpC の機能不全が，いずれの機能不全に起因するのか解析を試みた．まず，各 MCP のリガンド結合能について解析した．MCP のリガンド結合領域（LBD）のみを大腸菌で発現し精製したものを解析に供した．化合物と結合することでタンパク質の熱変性温度（Tm 値）が上昇するという現象を利用して，精製した各 Mcp LBD の機能を評価した．温度変化に伴う円二色性変化より各々 Tm 値を算出したところ，リガンド添加による各 Mcp LBD の Tm 値の上昇は見られなかった．また，円二色性スペクトルから推定された各 Mcp LBD の α-ヘリックス含量は，いずれも理論値と比較してかなり低い値であった．これらの結果から，McpT／McpC は単独では構造が不安定であり，リガンド化合物と正しく結合できない可能性が示唆された．この可能性についてさらに詳細に解析するために，単独では機能しない MCP（McpC／McpT）と単独でも機能する MCP の LBD とシグナル伝達領域をそれぞれ入れ替えた「キメラ MCP」を構築中である．

Characterization of unfunctional chemosensory proteins in absence of others

○Yuichi Hori, Akiko Hida, Mattana Tunchai, Takahisa Tajima, Junichi Kato
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words chemotaxis, chemosensory protein, Circular Dichroism, chimeric receptor

1Ip18 カルボキシソーム外殻タンパク質 CcmO の機能解析

○中村 隆太郎[1], 中口 雄貴[2], 三木 智寛[2], 松村 洋寿[1], 福谷 洋介[2], 野口 恵一[2], 養王田 正文[2], 尾高 雅文[1,2]
（[1]秋田大院・理工, [2]農工大院・工）
modaka@gipc.akita-u.ac.jp

カルボキシソームは藍藻類が有する直径 150nm 程のタンパク質コンパートメントであり，RubisCO を内包している．我々はカルボキシソームをナノリアクターなどに利用する技術開発を目指し，研究を進めている．遺伝子欠損体の電子顕微鏡観察から，7 種類の外殻タンパク質のうち CcmK2，CcmL，CcmO の 3 種がコンパートメント形成に必須と考えられている．本研究では，この中で唯一立体構造の報告されていない CcmO に着目し，機能解析を行なった．
大腸菌発現系により，CcmO 組換え体を作製し，動的光散乱法，透過型電子顕微鏡により形態観察したところ，CcmO がコンパートメント様構造やシート様構造の重合体を形成することが明らかになった．これまで，カルボキシソーム外殻タンパク質によるコンパートメント様構造や重合体の形成は報告されておらず，CcmO がカルボキシソームのコンパートメント形成において重要な役割を担っている可能性が示唆された．
アミノ酸一次配列比較と高次構造予測により，CcmO の C 末端に disorder していると予想される 40 残基程のアミノ酸配列が存在することがわかった．現在，C 末端アミノ酸配列を欠損させた CcmO を作製し，解析を行なっている．また，コンパートメント形成に必須とされている CcmK2 と CcmL 共存下での重合体形成についての解析も進めている．

Functional Analysis Of Carboxysome Shell Protein, CcmO

○Ryutaro Nakamura[1], Yuki Nakaguchi[2], Tomohiro Miki[2], Hirotoshi Matsumura[1], Yohsuke Fukutani[2], Keiichi Noguchi[2], Masafumi Yohda[2], Masafumi Odaka[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words protein

1Jp01 好熱菌発酵産物の給与が *Sod1* ノックアウトマウスに与える影響

○鷺 陽香[1], 戸田 年彦[2], 小澤 裕介[2], 加藤 完[3], 中西 裕美子[3], 大野 博司[3], 宮本 浩邦[1,3,4], 清水 孝彦[2], 児玉 浩明[1]
（[1]千葉大院・園芸, [2]千葉大院・医, [3]IMS理研, [4]サーマス）
kodama@faculty.chiba-u.jp

【背景と目的】未利用の海産資源を 70℃～80℃の高温下で発酵させた発酵産物(以下，好熱菌発酵産物)は，家畜・家禽類の混合飼料として利用されている．モデル動物を用いた実験では肝臓や筋肉における過酸化脂質の蓄積抑制効果や抗酸化能の向上効果が確認されている．そこで，本研究では，好熱菌発酵産物の給与による抗酸化機能の分子機序を解析することを目的とした．そのために，抗酸化酵素である Superoxide dismutase 1 (SOD1) を欠損し，活性酸素による酸化ストレスを除去できない *Sod1* ノックアウトマウスに対して，腸内細菌叢の変化ならびに盲腸糞，肝臓，腓腹筋における代謝産物の変化について解析した．
【方法と結果】Wild type (WT) 群 (*Sod1*$^{+/+}$), Knockout (KO) 群 (*Sod1*$^{-/-}$), 好熱菌発酵産物給与群 (*Sod1*$^{-/-}$ + compost)の 3 群 (各 9 匹) について，4 週齢から 15 週齢の約 2 か月間飼育した．15 週齢時に盲腸糞，肝臓，腓腹筋を採取し，次世代シークエンスを用いた盲腸糞中の菌叢の解析，および GC-MS を用いた盲腸糞，肝臓，腓腹筋のメタボローム解析を行った．その結果，有意差はないものの，好熱菌発酵産物給与群で Bacteroidetes 門と Proteobacteria 門の増加傾向，Firmicutes 門と Actinobacteria 門の減少傾向が見られた．これらの菌叢の変化は WT のマウスに好熱菌発酵産物を給与した場合と同様の傾向であった．またメタボローム解析の結果，アミノ酸や解糖系および TCA 回路に関わる分子に変化が見られた．このように好熱菌発酵産物の給与により腸内細菌叢や代謝産物に変化が生じたが，*Sod1*$^{-/-}$マウスの表現型には顕著な変化が確認できなかった．以上の結果から，好熱菌発酵産物の給与による抗酸化機能の向上において *Sod1* が重要な役割を果たしている可能性が期待された．

Effects of thermophile-fermented compost on the intestinal microbiota and liver metabolites of *Sod1* knockout mouse

○Haruka Sagi[1], Toshihiko Toda[2], Yusuke Ozawa[2], Tamotsu Kato[3], Yumiko Nakanishi[3], Hiroshi Ohno[3], Hirokuni Miyamoto[1,3,4], Takahiko Shimizu[2], Hiroaki Kodama[1]
([1]Grad. Sch.Horticul.,Chiba Univ., [2]Grad. Sch.Med.,Chiba Univ., [3]IMS,RIKEN, [4]Sermas)

Key words SOD, intestinal microbiota, metabolic analysis

1Jp02 吉草酸を産生するブタ排泄糞由来の乳酸資化菌 *Megasphaera elsdenii* Y2 株の有機酸代謝の特徴

○荒岡 亮祐[1], 吉川 翔太[2], 井藤 俊行[3], 宮本 浩邦[1,4,5], 児玉 浩明[1]
（[1]千葉大院・園芸, [2]千葉大院・融合, [3]京葉プラントエンジニアリング, [4]理研・IMS, [5]サーマス）
Kodama@faculty.chiba-u.jp

【背景と目的】乳酸菌はプロバイオティクスとして用いられることが多いが，一方で乳酸菌の産生した乳酸は宿主動物の腸管でほとんど吸収されないため，乳酸を代謝し，短鎖脂肪酸（SCFA）を産生する乳酸資化菌は宿主動物にとって重要な働きをすると考えられる．当研究室では乳酸資化菌の *Megasphaera elsdenii* に注目し研究を行い，これまでに，ブタ排泄糞より 7 種類の *M. elsdenii* を単離している(1)．これらの菌株の，乳酸を基質とした有機酸代謝を *M. elsdenii* JCM 1772^T 株（標準菌株）と比較したところ，標準菌株が酢酸，プロピオン酸を産生するのに対し，単離菌株はいずれも吉草酸を最も多く産生した．本研究では，ブタ排泄糞から単離された *M. elsdenii* の乳酸資化に関わる代謝の特徴を調べ，さらに，乳酸を利用した吉草酸の工業的な生産の可能性について検討を行った．
【方法と結果】7 種類の単離菌株を代表して，Y2 株を研究に使用した．まず，基質にグルコースと乳酸を含む GAM+乳酸培地を用いて，標準菌株と Y2 株の有機酸産生を調べた．標準菌株では時間経過に伴って，酢酸，プロピオン酸に次いで，酪酸，吉草酸を産生した．それに対して，Y2 株は培養初期に酢酸，プロピオン酸を産生し，その後はそれらを消費しつつ吉草酸，酪酸を産生した．その一方で，グルコースのみを基質とした場合には，Y2 株は酪酸を主に産生した．Y2 株による吉草酸の産生における酢酸，プロピオン酸の必要性について調べるために，基質として酢酸とプロピオン酸のみを加えた培地で培養試験を行うと，Y2 株は吉草酸を産生した．現在，吉草酸の産生量が増加する条件の検討を行っている．

(1) Yoshikawa et al. (2018) J. Biosci. Bioeng. 125. 519-524

Lactate metabolism and valerate production by *Megasphaera elsdenii* Y2 strain isolated from pig feces

○Ryosuke Araoka[1], Syota Yoshikawa[2], Toshiyuki Ito[3], Hirokuni Miyamoto[1,4,5], Hiroaki Kodama[1]
([1]Grad. Fac. Horticul., Chiba Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., [3]Keiyo Plant Eng., [4]RIKEN IMS, [5]Sermas)

Key words *Megasphaera elsdenii*, lactate-utilizing bacteria, short-chain fatty acids, valetate

1Jp03 好熱菌発酵産物の給与がブタ腸内の乳酸資化菌 *Megasphaera elsdenii* の多様性に与える影響

○板谷 かえで[1], 吉川 翔太[2], 新名 俊仁[3], 宮本 浩邦[2,4,5], 児玉 浩明[1,2]
（[1]千葉大・園芸, [2]千葉大院・融合, [3]京葉プラントエンジニアリング, [4]サーマス, [5]理研・IMS）
kodama@faculty.chiba-u.jp

【背景と目的】海産資源を 70~80℃の高温下で発酵させた飼料(以下，好熱菌発酵産物)をブタに給与すると，死産率の低下，成長促進，筋肉中の余分な脂肪分の減少など様々な生理作用が認められる．この時，ブタの排泄糞では糞中の乳酸含量が低下することから，乳酸代謝に関わる腸内細菌叢の変化が示唆された．実際に菌叢を解析すると，好熱菌発酵産物給与区では乳酸から短鎖脂肪酸を産生する乳酸資化菌である *Megasphaera elsdenii* が有意に増加していた．本研究では，好熱菌発酵産物の給与区・非給与区のブタ排泄糞から当該菌種を単離し，遺伝子型により分類するとともに，その乳酸代謝に関する特性を明らかにすることを目的とした．【方法と結果】好熱菌発酵産物の給与区・非給与区から各 4 頭の豚の排泄糞を回収した．当該糞サンプルを選択培地に塗布した結果，*M. elsdenii* 候補菌群として給与区から 41 コロニー，非給与区から 54 コロニーを単離した．単離菌群について，*M. elsdenii* に特異的なプライマーを用いて菌種を簡易同定するとともに，ERIC-rep-PCR で遺伝子型を基にグループ分けしたところ，給与区は 12 グループ, 非給与区は 7 グループに分けることができた．このことから，好熱菌発酵産物の供与によって *M. elsdenii* の多様性が増す可能性が示唆された．給与区・非給与区において，最も多く単離されたグループの遺伝子型は共通であったが，2 番目以降のグループの遺伝子型は異なっていた．そこで，給与区・非給与区で，ともに最も多く単離されたグループから 1 株，また 2 番目と 3 番目に多く単離されたグループから，それぞれ代表株を選抜した．代表菌株(計 5 株)について 16S rRNA 遺伝子配列を決定したところ，*M. elsdenii* の 16S rRNA 遺伝子配列と高い相同性(99%以上)を示した．さらに，各代表菌株の有機酸産生能を調べたので，その結果を報告する．

Diversity of lactic acid-utilizing bacterium *Megasphaera elsdenii* in the intestine of pigs fed with a thermophile-fermented compost

○Kaede Itaya[1], Shota Yoshikawa[2], Toshihito Shinmyo[3], Hirokuni Miyamoto[2,4,5], Hiroaki Kodama[1,2]
([1]Fac. Horticul., Chiba Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., [3]Keiyo Plant Eng., [4]Sermas, [5]RIKEN IMS)

Key words *Megasphaera elsdnii*, lactate-utilizing bacteria, compost, gut microbiota

1Jp04 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[3], 近藤 昭彦[3]
（[1]日本触媒, [2]神戸大院・工, [3]神戸大院・科技イノベ）
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[1)]を利用して菌株構築を進めている．pta の破壊と PTB1 の P148S，V251I，A219T，G155R の改変ができたことを 2017 年度日本生物工学会大会において報告した．[2)] 今回は，PTB1 の改変を重ねることで ptb1 の機能を破壊しブタノール高収率株を作成した結果． さらにアセトン生成に関わる ctfB の改変によってアセトンを生成しない株を得た結果について報告する．
【方法】*C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC27021*Δ*pta 株（Target-AID による pta 破壊株）に対して PTB1 の P148，G155，V251 を改変しブタノール収率向上に効果があった改変点を組み合わせることでブタノール高収率株を作成した．また CTFB に対して P85，P121，P112，P112 を改変するプラスミドを処理し得られた株のアセトン生成を評価した．
【結果】pta 破壊株に対して PTB1 の P148L，G155R，G155E を改変した株は有意にブタノール収率が向上し，その傾向は P148S>G155R>G155E>V251I であった．P148S と G155R の改変を重ねることで GroupII イントロンで作成した ΔptaΔptb1 株と同等の高いブタノール収率を示す株が得られた． また上記の株の CTFB を P121L に改変することによってアセトン生成がなくなり Target-AID を用いたホモブタノール発酵菌株を得ることができた．

1)Nishida et al. Science 2016:Vol. 353, Issue 6305, aaf8729
2)向山，市毛，田中，西田，近藤 2018 年度日本生物工学会大会要旨集

Breeding of high yield butanol fermentative Clostridia by genome editing with Target-AID

○Masaharu Mukoyama[1], Eita Ichige[1], Tsutomu Tanaka[2], Keiji Nishida[3], Akihiko Kondo[3]
([1]Nippoon Shokubai Co., Ltd., [2]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words butanol, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, Target-AID, Genome editing

1Jp05 Influence of pH controllers on alginate beads containing co-immobilized Clostridia during acetic acid fermentation

Siew Thing Phang, ○Harifara Rabemanolontsoa, Shiro Saka
(Dept. Socio-environment Energy Sci., Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ.)
rabemanolontsoa.harifara.5c@kyoto-u.ac.jp

An important aspect of biorefinery is the conversion of biomass to organic acids as platform chemicals. Acetic acid has an extensive range of applications in polymer, textile, food and energy industries. For bioproduction of acetic acid, co-immobilized Moorella thermoacetica (Clostridium thermoaceticum) and Clostridium thermocellum in calcium alginate beads were used under pH-controlled fed-batch fermentation. This study evaluates the effects of Na(OH) and $Ca(OH)_2$ aqueous solutions as pH controllers on acetic acid yield and on the integrity of alginate beads containing the immobilized microorganisms using glucose and cellobiose as substrates. It was found that acetic acid yields were comparable for Na(OH) and $Ca(OH)_2$. However, Na(OH) solubilized the beads after 6 days of fermentation. To explain this phenomenon, we propose a mechanism showing the dissolution of calcium alginate by sodium ions. $Ca(OH)_2$, on the other hand, contributed to maintain alginate beads in solid form even after 20 days of fermentation. Conclusively, $Ca(OH)_2$ is recommended as pH controller for longer fermentation time, and would also facilitate separation and reusability of the biocatalysts so that bioprocessing cost would be reduced.

Influence of pH controllers on alginate beads containing co-immobilized Clostridia during acetic acid fermentation

Siew Thing Phang, ○Harifara Rabemanolontsoa, Shiro Saka
(Dept. Socio-environment Energy Sci., Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ.)

Key words acetic acid, immobilized bacteria, alginate, *Clostridium*

1Jp07 光駆動 ATP 再生系による Vmax 細胞の創製

弘埜 陽子[1], 戸谷 吉博[2], 叶 暁亭[3], 石井 純[3], 柘植 謙爾[3],
松田 史生[2], ○原 清敬[1]
（[1]静県大院・食栄環・環境科学, [2]阪大院・情報・バイオ情報, [3]神戸大院・イノベ）
k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp

大腸菌や出芽酵母などの微生物に代謝工学的な改良を施し，医薬品や食品，化粧品，燃料，ポリマー原料等の様々な有用物質の発酵生産性を向上させる研究が行われている．しかし，目的物質の生産性が向上するにつれ，微生物が細胞内エネルギー不足に陥り，生育の低下や目的物質の生産性の頭打ちに直面することが少なくない．これは，発酵そのものが，インプットである炭素源を，「細胞自身の材料（Cell mass）」，「目的生産物」，「細胞内エネルギー」の 3 つのアウトプットに振り分けるプロセスであり，これらがトレードオフの関係にあることに，根本的な原因が存在すると考えられる．そこで我々は，この三つ巴の状態にある発酵プロセスから「細胞内エネルギー」を切り離すべく，本来は光エネルギーを利用できない微生物に，光リン酸化能を賦与することで，光エネルギーを利用可能にする新しい光駆動エネルギー再生型有用物質生産宿主（Vmax 細胞）の開発を目指している．
具体的には，高度好塩菌 *Haloterrigena turkmenica* が有する光駆動プロトンポンプであるデルタロドプシンを，大腸菌の細胞膜に発現させた．生化学的手法および生物物理化学的手法により，デルタロドプシンが大腸菌の細胞膜で機能していることを確認した．また，デルタロドプシンを出芽酵母のミトコンドリアに発現させた．その結果，細胞内の ATP 濃度が光依存的に高まった．さらに，生合成に ATP の加水分解エネルギーを要する物質の濃度が，光依存的に高まった．本発表では，我々の Vmax 細胞の開発過程で得られた知見について報告する．

Development of photo-energetic cell factory

Yoko Hirono[1], Yoshihiro Toya[2], Ye Xiaoting[3], Jun Ishii[3], Kenji Tsuge[3],
Fumio Matsuda[2], ○Kiyotaka Hara[1]
([1]Dept. Environ. Sci., Gra. Sch. Nutri. Environ. Sci, Univ. Shizuoka, [2]Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [3]Gra. Sch. Sci., Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words smart cell, rhodopsin, ATP, synthetic biology

1Jp08 ロドプシンを利用した大腸菌における光駆動 ATP 再生

○鎌田 健太郎[1], 戸谷 吉博[1], 弘埜 陽子[2], 原 清敬[2], 松田 史生[1],
清水 浩[1]
（[1]阪大院・情報・バイオ情報, [2]静岡県大院・食品栄養環境・環境科学）
shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】
大腸菌などの微生物を用いた物質生産は，環境への負荷が少ない反面，収率が低いという問題点がある．これは，微生物が物質生産に必要な ATP を，呼吸を介して再生しているからだと考えられる．そこで，ロドプシンを用いた ATP 再生システムに着目した．ロドプシンは，光の照射によりプロトンの細胞外への輸送を促すため，ロドプシンを大腸菌細胞膜で発現させれば，呼吸を介さずに ATP を再生できる．本研究では，ロドプシンを用いた光駆動 ATP 再生システムを構築し，ロドプシンの機能を解析した．
【方法と結果】
高度好塩菌 *Haloterrigena turkmenica* 由来のデルタロドプシンを導入した大腸菌株を構築した．培養は 4 g/ L グルコース含む M9 培地を用いて，好気条件下で回分培養を行った．培地中の代謝物濃度は HPLC，菌体濁度は吸光光度計を用いて測定した．比増殖速度およびグルコース比消費速度は光照射条件・暗所条件間で差が見られなかった．培養中の菌体を集菌後，非緩衝溶液に懸濁し，光の点灯・消灯を繰り返すことによる細胞外 pH の変化を観察したところ，光照射時にのみ pH が減少した．この結果から，デルタロドプシンが大腸菌細胞膜で機能的に発現していることが確認された．

Light-driven ATP regeneration by rhodopsin in *Escherichia coli*

○Kentaro Kamata[1], Yoshihiro Toya[1], Yoko Hirono[2], Kiyotaka Hara[2],
Fumio Matsuda[1], Hiroshi Shimizu[1]
([1]Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Dept. Environ. Sci., Gra. Sch. Food Nutr. Environ. Sci., Shizuoka Univ.)

Key words *Escherichia coli*, rhodopsin, ATP regeneration, metabolic engineering

1Jp09 代謝動態制御を介して菌体集団規模を制御する Quorum Sensing 型遺伝子回路の構築とメタボローム解析による機能評価

○相馬 悠希[1,2], 篠原 玉樹[2], 藤原 由梨[2], 角田 一真[2], 秦 康祐[2],
和泉 自泰[1,2], 馬場 健史[1,2]
（[1]九大・生医研, [2]九大院・シス生科）
y-soma@bioreg.kyushu-u.ac.jp

【背景】 合成生物学では，様々な生命現象を担う生物学的システムの設計原理の解明を目指して，生体分子をビルディング・ブロックとした新規生体分子や生体分子ネットワークの設計・再構築が行われてきた．その結果，近年では医学・工学・農学などの幅広い分野において応用が期待される生物工学ツールの創出へと発展している．人工遺伝子回路やバイオセンサーは，遺伝子発現の設計依存的制御を可能とするツールとして，細胞の表現型・応答・行動の再設計への活用が期待されている．本研究では，大腸菌の代謝制御を介した菌体増殖・菌体集団規模の制御を目的とする人工遺伝子回路を構築し，メタボローム解析による回路機能評価に取り組んだ．
【方法・結果】 Quorum Sensing (QS) は，真正細菌が菌体密度を感知して集団で遺伝子発現を制御するための細胞間シグナル伝達機構である．*Vibrio fischeri* 由来の QS である *lux* 系を大腸菌内で再構成し，その制御下に TCA 回路の初発反応を担う酵素遺伝子 (*gltA*) を置くことで，菌体密度が高まると TCA 回路を遮断して好気的増殖を抑制する合成 *lux* 系を構築した．この様な自己抑制的な QS 機能は，競合相手が存在する環境下で自己集団の優位を確立するための障害となり，進化過程において淘汰され易いと考えられる．一方で，資源の枯渇を免れるために協調して集団規模を調整する機能を有するため，競合相手不在の閉鎖的空間に達すれば，自己集団の持続的発展に不可欠な戦略でもある．この人工遺伝子回路を実装した大腸菌に対して，継代培養による実験室進化を実施することで，協調的かつ自己抑制的な集団規模調整機能の微生物集団の進化過程における安定性を評価した．この際，メタボローム解析を用いた高精度定量表現型解析を実施することで進化に伴う表現型の変遷を詳細に追跡し，回路機能の安定性との相関を明らかにした．

Construction of a Quorum Sensing-type genetic circuits that control the cell population size via dynamic metabolic flux control and functional evaluation by metabolome analysis

○Yuki Soma[1,2], Tamaki Shinohara[2], Yuri Fujiwara[2], Kazuma Sumida[2],
Kosuke Hata[2], Yoshihiro Izumi[1,2], Takeshi Bamba[1,2]
([1]Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ.)

Key words synthetic biology, metabolic engineering, genetic circuit, metabolic analysis

1Jp10 チロシンの水酸化反応を最適化することによるベンジルアルカロイド生産大腸菌プラットフォーム株の改良

○中川 明, 松村 栄太郎, 八島 悠里乃, 高尾 美月, 南 博道
（石川県大・生物資源研）
minami@ishikawa-pu.ac.jp

ベンジルイソキノリンアルカロイド(BIA)は植物の 2 次代謝産物であり，2500 種以上が知られている．その多くは強い生理活性を持つと考えられ，モルヒネ，コデイン，ベルベリンといった実際に医薬品または医薬品原料として利用されているものもある．しかし，BIA はその複雑な分子構造から，化学合成が難しく，その生産は植物からの抽出により行われてる．植物からの抽出は，広大な土地や栽培の手間等，コストがかかり，実際，BIA 派生医薬品は比較的高価である．BIA の殆どは(*S*)-reticuline を中間体とするため，安価な(*S*)-reticuline 生産系の構築は様々な BIA 生産に応用可能である．そこで，安価な BIA 実用生産系の構築を目的とし，我々は，大腸菌を用いた(*S*)-reticuline 生産菌，すなわち，BIA 生産プラットフォームを構築してきた．しかし，その生産量は，まだ実用レベルには程遠く，更なる改良が必要であった．
単純な炭素源からの(*S*)-reticuline 生産においては，基質としてチロシンが生成され，チロシンは水酸化反応を経て，DOPA に転換される．しかし，生産培養後の培地中には mM レベルのチロシンが余っていることから，チロシンの水酸化反応が弱いことが，生産量が少ない一因になっていることが考えられた．そこで，今回，チロシンの水酸化反応を複数の生物種由来のチロシナーゼ，チロシンヒドロキシラーゼ，4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-酸素添加酵素を用いて，我々の構築したプラットフォーム株に最も適したチロシン水酸化反応を選抜した．その結果，1 mM 近い(*S*)-reticuline の生産量を示し，初めて発表した生産量の 7 倍もの改良に成功した．
本発表では，多段階反応系による物質生産についてその研究の進め方や酵素選抜の重要性について議論したい．

Improvement of *Escherichia coli* platform for benzylisoquinoline alkaloid production by optimization of tyrosine hydroxylation

○Akira Nakagawa, Eitaro Matsumura, Yurino Yashima, Miduki Takao,
Hiromichi Minami
(Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ.)

Key words *Escherichia coli*, hydroxylation, enzyme reaction

1Jp11 大腸菌による L-theanine の発酵生産法の開発

○大野 翔登, 林 幹朗, 田畑 和彦
（協和発酵バイオ・リサーチ＆イノベーションセンター）
mikiro.hayashi@kyowa-kirin.co.jp

L-theanine は緑茶の旨味成分として知られるグルタミン酸誘導体の一種である．集中力向上効果やリラックス効果，快眠効果等の作用が報告されており，国内外で健康食品素材として使用されている．茶葉における L-theanine の生合成経路の詳細は未解明であるが，L-theanine の製法としては茶葉からの抽出法やエチルアミン，グルタミンを原料とした酵素法がこれまでに開発されている．しかしながら，酵素法にて添加するエチルアミンは引火性のある危険な化合物であり，工業原料として用いるには特殊な設備を必要とするため製造コストが高い．エチルアミンを生合成で供給できれば問題を回避できるが，そのような報告はなかった．そこでアセトアルデヒドを基質としてエチルアミンを生成するアミノトランスフェラーゼを探索した結果，新規の酵素を見出した．本酵素を利用してエチルアミンを供給し，さらに生成したエチルアミンとグルタミン酸から L-theanine を合成する人工合成経路を設計し，*in vitro* 酵素反応で実証した．基質となるアセトアルデヒド，アラニン，グルタミン酸は生物に広く存在する生化学物質である．そこで，大腸菌 K-12 株を宿主としてこれらの基質供給の強化を実施し，L-theanine の人工合成経路を導入した．結果，グルコースとアンモニアを原料として L-theanine を大量に発酵生産することに成功した．

Development of the fermentative production process of L-theanine by *Escherichia coli*

○Shoto Ohno, Mikiro Hayashi, Kazuhiko Tabata
(KYOWA HAKKO BIO CO., Ltd. Research and Innovation Center)

Key words L-theanine, aminotransferase, direct fermentation, *Escherichia coli*

1Jp12 Metabolic engineering of Escherichia coli for production of shikimate pathway derivatives

○Ryosuke Fujiwara[1], Shuhei Noda[2], Tsutomu Tanaka[1], Akihiko Kondo[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]BMEP, RIKEN, [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

Shikimate pathway is one of the most important metabolic pathways in bacteria for synthesizing various aromatic compounds including aromatic amino acid. Intermediates of the shikimate pathway including chorismate are candidates for starting compounds in the bio-production of various chemicals (e.g. aromatic compounds, dicarboxylic acids, and aniline derivatives).
Previous our study, we designed the metabolic pathway of Escherichia coli to enhance shikimate pathway by accumulating the intracellular PEP concentration and to produce chorismate derivatives in high yields. In order to avoid consuming PEP when uptake of glucose, we have generated a recombinant strain with replacing the endogenous phosphotransferase system (PTS) with GalP/Glk system (GGS) (PTS- GGS+ strain). In order to prevent leakage of carbon flux to the TCA cycle, we also disrupted two genes encoding pyruvate kinase (pykA, pykF), from PTS- GGS+ strain1.
In this study, we aimed to further enhancement and optimization of shikimate pathway. We tried two approaches, upstream optimization and downstream optimization. In upstream optimization, the effect of disruption of several genes was investigated in order to further accumulation of PEP. In downstream optimization, we tested the fusion protein approach. In order to prevent carbon flux leakage to other chorismate derivatives from chorismate, chorismate synthase and another enzyme that catalyzes the reaction to convert chorismate to the next metabolite were expressed as one protein.

Metabolic engineering of Escherichia coli for production of shikimate pathway derivatives

○Ryosuke Fujiwara[1], Shuhei Noda[2], Tsutomu Tanaka[1], Akihiko Kondo[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]BMEP, RIKEN, [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Escherichia coli*, metabolic engineering, aromatic ring compound, production

1Jp13 海水培養が可能なシアノバクテリアへの亜リン酸資化能の付与

○堀川 凌平[1], 本村 圭[1,2], 神原 亮大[1], 戸田 成美[1], 池田 丈[1], 石田 丈典[1], 舟橋 久景[1], 黒田 章夫[1,2], 廣田 隆一[1,2]
（[1]広島大院・先端物質, [2]JST・ALCA）
hirota@hiroshima-u.ac.jp

【目的】 有用微細藻類を利用した物質生産は，光合成により二酸化炭素を吸収して行えるため，グリーンバイオテクノロジーの中心的技術の一つとして注目されている．有用微細藻類の実用化は，コストが低く，管理が容易であるオープンポンドの様な屋外開放系での培養が望まれる．しかし，屋外での培養は雑菌のコンタミネーションにより生産性を維持することが難しいという課題がある．当研究室では，通常の生物が利用できない亜リン酸（HPO_3^{2-}）に対する資化能を宿主生物に付与し，亜リン酸をリン源として供給することで目的生物だけを選択的に増殖させることができる技術を開発した．これまでに淡水性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 に本手法が適用可能であることを示した．しかし，実用的な培養における水資源利用の観点から，海水の使用が望まれる場合も想定される．そこで本研究では，海水を使用した培養が可能なシアノバクテリアへの本手法の適用を試みた．
【方法・結果】 海洋性シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC 7002 に *Anabaena* sp. PCC 7120 の亜リン酸輸送体（PtxABC）及び亜リン酸デヒドロゲナーゼ（PtxD）を導入し，亜リン酸資化能を付与した．その結果，PCC 7120 の Ptx 遺伝子を導入した株では，亜リン酸をリン源とした MA2 培地における増殖速度がリン酸使用時に比べやや劣るものの最終菌体濃度は同等の値を示した．しかし，亜リン酸使用時では，クロロフィル量が低下していることが示唆された．また，耐塩性を有する淡水性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 に対しても同様に亜リン酸資化能を付与した他，由来が異なる複数種の PtxD 遺伝子を導入した株を作製した．現在，これらの株の人工海水培地における増殖を調べている．

Application of phosphite oxidizing system to cyanobacteria that can grow under seawater condition

○Ryohei Horikawa[1], Kei Motomura[1,2], Akihiro Kanbara[1], Narumi Toda[1], Takeshi Ikeda[1], Takenori Ishida[1], Hisakage Funabashi[1], Akio Kuroda[1,2], Ryuichi Hirota[1,2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]ALCA, JST)

Key words phosphite, contamination, cyanobacteria, seawater

1Jp14 亜リン酸依存性を利用したシアノバクテリアのバイオセーフティ技術

○佐野 公亮[1], 本村 圭[1,2], 神原 亮大[1], 渡辺 智[2,3], 池田 丈[1], 石田 丈典[1], 舟橋 久景[1], 黒田 章夫[1,2], 廣田 隆一[1,2]
（[1]広島大院・先端物質, [2]JST・ALCA, [3]東農大院・農）
hirota@hiroshima-u.ac.jp

【目的】現在，高度な遺伝子組換え技術によって，様々な物質を合成できる有用微細藻類の作出が可能になっている．しかし，組換え藻類の開放系での使用はカルタヘナ法により制限されており，オープンポンドのような開放条件での培養に適用する事は困難である．当研究室では，通常の生物が利用できないリン源である亜リン酸に生育を依存するように代謝を改変する技術を開発している．亜リン酸は環境中にはほとんど存在しないため，本手法は組換え体の拡散を防ぐ生物学的封じ込め手法として利用できる．そこで本研究では亜リン酸依存性を利用した生物学的封じ込め手法をシアノバクテリアに適用することを目的とした
【方法・結果】実験のモデルとして *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株を用いた．亜リン酸依存性を与えるためには，①亜リン酸酸化酵素 PtxD の発現による亜リン酸資化能の付与，②リン酸を取り込まない亜リン酸特異的輸送体 HtxBCDE の機能的発現，③内在性リン酸輸送体遺伝子の同定と破壊が必要となる．亜リン酸資化能の付与は *Ralstonia* 由来の *ptxD* を導入することにより成功した．HtxBCDE の機能的発現は，HtxB のシグナルペプチドを *Anabaena* sp. PCC 7120 由来のシグナルペプチドに置換することにより可能であった．次に，この亜リン酸資化能導入株における内在性リン酸輸送体の破壊を試みた．PCC 7942 でアノテーションされている 2 種類のリン酸輸送体遺伝子(*pit*，*sphX-pstSCAB*) を HtxBCDE-PtxD 発現株において破壊した結果，得られた株は完全な亜リン酸依存性を示した．

An engineered phosphite metabolic pathway for a biosafety system of cyanobacteria

○Kosuke Sano[1], Kei Motomura[1,2], Akihiro Kanbara[1], Satoru Watanabe[2,3], Takeshi Ikeda[1], Takenori Ishida[1], Hisakage Funabashi[1], Akio Kuroda[1,2], Ryuichi Hirota[1,2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]ALCA, JST, [3]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric.)

Key words biosafety, cyanobacteria, phosphite, biological containment

1Jp15 藍藻由来亜リン酸デヒドロゲナーゼの酵素学的諸性質と選択培養技術への応用

○本村 圭[1,2], 神原 亮大[1], 堀川 凌平[1], 池田 丈[1], 石田 丈典[1], 舟橋 久景[1], 黒田 章夫[1,2], 廣田 隆一[1,2]
（[1]広島大院・先端物質, [2]JST-ALCA）
kmotomura@hiroshima-u.ac.jp

【背景と目的】亜リン酸デヒドロゲナーゼ（PtxD）は，還元型リン化合物の一種である亜リン酸（HPO_3^{2-}）からリン酸（PO_4^{3-}）への酸化反応を触媒する酵素である．リン酸がほぼ全ての生物のリン源として利用されている一方で，亜リン酸は環境中にほとんど存在せず，PtxD を持つ一部の生物にしかリン源として利用されない．当研究室ではこの特性を利用して，亜リン酸資化能を持たない生物に PtxD を導入し，亜リン酸を唯一のリン源とする培地を用いることで，当該生物のみを選択的に培養する技術を開発してきた．これまでの研究で，PtxD の発現量が亜リン酸培養の重要な要素であることがわかっているが，導入した PtxD の酵素学的性質の違いによる影響についてはほとんど調べられていない．そこで本研究では，物質生産宿主として注目されている微細藻類の亜リン酸選択培養を想定し，適合性が高いと考えられる藻類由来 PtxD の酵素学的諸性質および亜リン酸資化能への影響を解析した．
【方法と結果】種々の細菌由来 PtxD のアミノ酸配列を使った系統解析の結果，藍藻由来の PtxD は独立したグループを形成したことから，それらが類似の性質を有している可能性が示唆された．そこで，複数の藍藻からクローニングした *ptxD* を組換えタンパク質として発現・精製し，得られた各種 PtxD の酵素学的諸性質を解析した．その結果，これまでに報告された PtxD と比較して，NADP に対する補酵素選択性の高さが共通の性質として認められた．現在，土壌細菌由来の野生型 PtxD およびアミノ酸置換によって NADP 選択性を高めた改変型 PtxD を比較対象として，藍藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株に導入した際の亜リン酸資化能の違いについて解析を進めている．

Enzymatic properties of phosphite dehydrogenase from cyanobacteria and its application as a dominant selection marker

○Kei Motomura[1,2], Akihiro Kanbara[1], Ryohei Horikawa[1], Takeshi Ikeda[1], Takenori Ishida[1], Hisakage Funabashi[1], Akio Kuroda[1,2], Ryuichi Hirota[1,2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]JST-ALCA)

Key words phosphite, phosphate metabolism, cyanobacteria, selective cultivation

1Jp16 ラン藻窒素代謝メカニズムの解明と物質生産への応用

○見市 絢香, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦
（神戸大院・科技イノベ）
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

【背景】窒素は生体構成元素のうちでは水素，酸素，炭素に次いで多く，生命に不可欠の存在である．藻類の中には独立栄養下での増殖能力が高い系統が多く，有用物質を CO_2 から直接生産できることから，持続可能な物質生産への展開が期待されているが，藻類の窒素代謝や細胞内の窒素原子の動態は詳しくわかっていない．そこで本研究では，ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803（*Synechocystis*）のメタボローム解析を行い，独立栄養下における含窒素代謝物の細胞内蓄積量を網羅的に測定することとした．*Synechocystis* は窒素原子をアンモニア態か硝酸態として細胞に取り込むことが知られているため，安定同位体窒素標識を施した $Na^{15}NO_3$ 及び $^{15}NH_4Cl$ を単一窒素源として，含窒素化合物の同位体標識率を経時的に測定する ^{15}N 動的メタボローム解析法を構築し，窒素原子の同化経路を詳細に調べることとした．
【方法】5 mM の $NaNO_3$ 及び NH_4Cl を用いて 1 % (*v/v*) CO_2，100 μmol photons m^{-2} s^{-1} の光独立栄養条件で培養し，細胞密度及び窒素源濃度の経時変化を調べた．その際，回収した藻体から代謝物を抽出し，細胞内の蓄積量を調べた．次に，5 mM の $Na^{15}NO_3$ 及び $^{15}NH_4Cl$ を用いて *in vivo* 標識を行い，培養開始 24 時間後までの含窒素代謝物の ^{15}N 標識率経時変化を測定した．
【結果と考察】窒素源として NH_4Cl を用いると，$NaNO_3$ と比較して高い細胞密度を示し，水溶性一時代謝産物の蓄積量が高い傾向にあった．^{15}N 標識率は，グルタミンやグルタミン酸をはじめとする多くの含窒素代謝物質において NH_4Cl を窒素源とした場合に高い傾向が見られ，窒素源による窒素同化速度の違いを観測することに成功した．また，NH_4Cl を窒素源とすると有機酸生産量が増加する結果が示されており，増産のメカニズムを検討している．

Analysis of cyanobacterial nitrogen metabolism and its application to material production

○Ayaka Miichi, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words nitrogen metabolism, metabolism, cyanobacteria, metabolic engineering

1Jp17 動的代謝モデルアンサンブルを用いたエタノール生産シアノバクテリアの代謝工学

○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】シアノバクテリア *Synechocystis sp.* PCC 6803 (以下 PCC6803) の光合成能力を活用した有用物質生産が試みられている．生産能のさらなる向上には CO2 固定を担う暗反応を含めた合理的な代謝改変が求められる．そこで本研究では，ランダムに生成した酵素反応パラメーターを持つ動的代謝モデルを多数作成し（アンサンブルモデリング, Tran *et al*., 2006），エタノール生産能向上に有効な反応を特定し，その効果を実験的に検証した．
【実験方法】PCC6803 を BG11 培地 (100 mL) で培養し，代謝物質を抽出した．LC-MS/MS と GC-MS で各代謝物の非標識体と[U-^{13}C]標識体をそれぞれ別に測定し，そのピーク面積比から代謝物濃度を求めた．酵素発現量は nanoLC-MS/MS の MRM モードで定量し，代謝フラックス値は先行研究のものを利用した（Nakajima *et al*., 2017）．アンサンブルモデリングは Python2.7 上で自作スクリプトにより行った．
【結果】PCC6803 の中心代謝 33 反応及び，主要な光化学系反応 6 反応の反応速度式を作成した．光独立条件下の代謝物濃度，酵素発現量，代謝フラックス実測値を再現可能なミカエリス定数および反応速度定数をランダムに生成し，1,000,000 個の動的代謝モデルを作成した．ついで，混合条件下の代謝フラックスおよび代謝物濃度を予測し，予測力の高いモデルを 100 個選抜した．このモデルアンサンブルを用いて代謝コントロール解析を行った．得られた結果を見ると，PYK に加え，PGK と PRK の 3 反応がエタノール生合成前駆体のピルビン酸を供給するピルビン酸キナーゼ（PYK）反応のフラックスを正にコントロールしていると予想された．そこで，エタノール生産株に，これらの酵素を追加で過剰発現した株を作成したところ，PGK の過剰発現株ではエタノール生産量が 1.4 倍に向上していた．

Rational metabolic engineering of ethanol-producing cyanobacteria using kinetic model ensemble.

○Hiroki Nishiguchi, Hikaru Nagai, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Synechocystis sp.* PCC 6803, ethanol production, absolute quantitation, kinetic model

1Jp18 シアノバクテリア中心炭素代謝における光量変化時の短期応答の解析

○丸山 正晴, 西口 大貴, 豊島 正和, 松田 史生, 清水 浩
（阪大院・情報）
fmatsuda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】シアノバクテリアでは，光量の短期的変化に伴う光化学系からの NADPH 供給量の増減に，中心代謝が応答していると考えられる．その解析は光変化ストレスに強い物質生産株の育種や，中心炭素代謝の制御メカニズムの理解につながる．そこで本研究では *Synechocystis* sp. PCC 6803 (PCC 6803) の野生株及び，グルコース-6-リン酸脱水素酵素遺伝子 (*zwf*) 破壊株の中心代謝の中間体含量を定量し，明条件から暗条件へ移行したときの変化を解析した．
【方法】 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の野生株と遺伝子破壊株を 100 ml の BG11 培地でフラスコ培養した．培養は 34℃, 150 rpm で行った．光の照射のオン (明条件：40 μE/m2 sec) とオフ（暗条件）を 12 時間ごとに切り替えながら培養した．代謝物抽出はフィルター法とメタノール・クロロホルム・水抽出法で行った．GC-MS 用の誘導体化として，オキシム化とトリメチルシリル化を行った．代謝物はイオンペア LC-MS/MS (SCIEX API 3200) および GC-MS (島津製作所 GCMS-2010) で定量した．
【結果と考察】PCC 6803 野生株では，暗条件移行 1 分で Ru5P 含量が 2.2 倍に増加し，RuBP 含量は 0.27 倍に減少した．これは炭素固定回路のホスホリブロキナーゼ活性の低下を反映していると推測された．一方，6PG 含量は 3.9 倍に増加していたことから，，酸化的ペントースリン酸（OPP）経路が活性化し，NADPH 再生の低下を補っていることが示唆された．そこで OPP 経路の初発酵素遺伝子 (*zwf*)破壊株で同様の実験を行った．暗条件移行 10 分で TCA サイクルの Mal 含量が 5.1 倍，αKG 含量が 1.5 倍に増加したことから，OPP 経路の欠損を TCA サイクルの NADPH 再生反応で補うことが示唆された．以上の結果から，光量が短期的に変化する条件では NADPH の恒常性維持に向けた代謝機構が重要な役割を持つと推定された．

Short term metabolic response of *Synechocystis* sp. PCC 6803 during light/dark transition

○Masaharu Maruyama, Hiroki Nishiguchi, Masakazu Toyoshima, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Synechocystis* sp. PCC 6803, metabolic response, light/dark transition, Calvin cycle

1Kp01 油脂生産酵母 *Rhodosporidium toruloides* の炭素源応答解析

○岩本 孝信[1], 高見沢 健留[1], Pham Khanh Dung[1], 志田 洋介[1], 荒 学志[2], 山崎 晴丈[2], 高久 洋暁[2], 小笠原 渉[1]
（[1]長岡技科大, [2]新潟薬大・応生命）
s163355@stn.nagaokaut.ac.jp

日本の食用油自給率はカロリーベースで 3% と極めて低い．そこで近年，油糧植物に代わり，気候の影響を受けず狭い土地で連続的に油脂を生産できる油糧微生物が注目を集めている．特に，油脂生産酵母 *Rhodosporidium toruloides* は乾燥菌体重量当たり 70% もの多量の油脂を蓄積する．この油脂の脂肪酸組成は植物油のものと類似していることから，食用油の供給源としての応用が期待されている．さらに，抗酸化作用を有するカロテノイドも生合成することから，カロテノイド含有の高機能性油脂の生産も可能である．しかし，産業的利用には至っていない原因の一つとして原材料の糖の価値が高いことが挙げられる．そこで，木質系バイオマスを糖化して得られた糖化液を炭素源として培養に用い，油脂を生産するプロセスの構築が検討されている．本研究では，バイオマス由来の糖が *R. toluroides* の表現型に及ぼす影響を調査し，糖の代謝および油脂・カロテノイド生合成機構に関する知見の獲得を目的とした．
通常の培養に用いるグルコースに加え，植物細胞壁の糖化によって得られると予測されるキシロース，ガラクトース，セロビオースを炭素源として培養を行った結果，セロビオースを除く 3 種の糖で生育が観察された．このことから，本菌は二糖を資化できず，一方で五炭糖は資化可能であることが示された．また，油脂生産量測定および顕微鏡観察の結果から，グルコース以外の糖からでも多量の油脂を生合成し，蓄積することが確認された．興味深いことに，培養に用いた炭素源に応じて菌体の色が変化しており，生合成されたカロテノイドの組成が変化していることが示唆された．現在，油脂の脂肪酸組成および網羅的な全遺伝子の発現解析を行っており，表現型が変化した原因の解明を目指している．

Analysis of response to some kinds of sugar in oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides*

○Takanobu Iwamoto[1], Takeru Takamizawa[1], Khanh Dung Pham[1], Yosuke Shida[1], Satoshi Ara[2], Harutake Yamazaki[2], Hiroaki Takaku[2], Wataru Ogasawara[1]
([1]Nagaoka Univ. Technol., [2]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

Key words *Rhodosporidium toruloides*, lipid, carotenoid, carbon source

1Kp02 バイオエタノール生産に向けた耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* の特性解析及び糖資化能

○阿部 拓哉[1], 廣田 潤哉[1], 星田 尚司[1,2,3], 赤田 倫治[1,2,3]
（[1]山口大院・創成科学・化学系, [2]山口大・中高温微生物セ, [3]山口大・生命医工セ）
hoshida@yamaguchi-u.ac.jp

【背景と目的】地球温暖化や化石燃料枯渇の問題を解決する手段の一つとしてバイオエタノールがある．酵母 *Kluyveromyces marxianus* は高温でエタノール発酵が行えるだけでなく，セロビオースやラクトースなど様々な糖を資化することが可能であり，広範囲なバイオマスを原料にした低コストでのエタノール生産が期待できる．本研究では，主にカルチャーコレクションから得た 20 株の *K. marxianus* のエタノール生産に関する性質及び糖資化性を比較した．
【結果】バイオエタノール生産に求められる性質である，耐熱性，高糖濃度耐性，エタノール耐性，糖資化能について評価した．同時にブラジルのエタノールに使われていた NCYC3233 株とも比較した．それぞれの特性に対していくつかの条件を調べた後，耐熱性は 45℃での増殖，エタノール耐性は 8%エタノール存在下での増殖と酵母生存率，糖耐性は 20%グルコース培地での増殖を調べた．その結果，*K. marxianus* のほとんどの株が耐熱性を持っており，NCYC3233 株との大きな違いであった．エタノール耐性は NCYC3233 株よりも優れた株があり，糖耐性は同程度であった．糖資化能ではラクトース及びセロビオース培地での増殖を調べた．NCYC1429 はラクトースでの増殖が高く，一方セロビオース培地では NCYC2791 が特に高かった．そこで増殖の差を利用して，*K. marxianus* のラクトース及びセロビオース資化能に重要な遺伝子を探索した．まず，これら二糖を単糖に分解するそれぞれの酵素の活性が原因ではない事がわかった．そこで，糖の取り込みに違いがあると考え，増殖の高い株の *K. marxianus* の 14 個の糖輸送体遺伝子候補を増殖の低い株で過剰発現させた．その結果，*LAC12* 遺伝子を導入した形質転換体ではラクトース資化能が向上した．

Characterization of the thermotolerant-yeast *Kluyveromyces marxianus* strains for bioethanol production.

○Takuya Abe[1], Junya Hirota[1], Hisashi Hoshida[1,2,3], Rinji Akada[1,2,3]
([1]Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Yamaguchi Univ., [2]YURCTMR, [3]YUBEC)

Key words *Kluyveromyces marxianus*, ethanol, lactose, cellobiose

1Kp03 酵母を利用した S-アリル-L-システイン生成可能性検討

○辻 史忠, 山本 英樹, 山岸 一雄, 菅原 誠吾, 小寺 智博
（味の素株式会社）
fumitada_tsuji@ajinomoto.com

【背景・目的】
S-アリル-L-システイン（ALC）はニンニクなどの *Allium* 属植物に含まれるアミノ酸誘導体であり，アリインの前駆体として知られている．今回，我々は微生物系での ALC 生成について検討するため，酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）を利用した L-セリンおよびアリルメルカプタンからの ALC 生成可能性について検討した．
【方法】
酵母のシステイン生合成経路より cystathionine beta-synthase (Cys4, EC 4.2.1.22) が L-セリンとアリルメルカプタンを縮合する酵素であると推測し，*cys4Δ* 変異株の ALC 生成能を野生株と比較した．また，酵母 Cys4-His-tag 過剰発現株を作成し，その破砕液から Cys4-His-tag をアフィニティー精製した．得られた Cys4-His-tag と L-セリン，アリルメルカプタンを用いた酵素反応により，ALC 生成能を LC/MS で解析した．
【結果・考察】
cys4Δ 変異株は野生株に比べ ALC 生成能が顕著に低下した．また，精製 Cys4-His-tag を用いた酵素反応により ALC 生成がみられたことから，Cys4 利用により L-セリンとアリルメルカプタンから ALC が生成可能であることが示された．Cys4 高発現酵母を用いた ALC 生成可能性については現在検討中である．

Production method of S-Allyl-L-cysteine by *Saccharomyces cerevisiae*

○Fumitada Tsuji, Hideki Yamamoto, Kazuo Yamagishi, Seigo Sugawara, Tomohiro Kodera
(AJINOMOTO CO., INC.)

Key words S-Allyl-L-cysteine, Cystathiine beta-synthase, *Saccharomyces cerevisiae*, garlic

1Kp04 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* D35 株の 繰り返し発酵による脂肪酸組成変化解析

○宮本 捺央[1], Kahar Prihardi[2], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[2]
（[1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ）
185t456t@stu.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】近年，C^{20} 以上の長鎖長脂肪酸は，アルツハイマー病・がんの予防に繋がる報告が数多くされており，需要が高まっている．そこで，再生可能資源であるバイオマスを用いた大量生産が注目されている．本研究で使用した油脂酵母 *L. starkeyi* D35 は，DCW 中の 70 %以上の油脂を溜めることができ，油脂貯蓄能が高い．また，C^{11}～C^{24} まで幅広い炭素数の脂肪酸を合成することができる．以上の特徴から，長鎖長脂肪酸の生産での利用が期待されている．本研究では繰り返し発酵による脂肪酸組成の変化の解析を試みた．
【方法】三角フラスコを用いて YMG 培地で前培養を行い，本培養では Glucose のみ，Glucose と Xylose の混合糖，Xylose のみを加えた-NMM 培地を三種類用意して発酵させ，その後菌体を全て回収して新たな培地に移した．これを計 4 回繰り返して発酵させた．脂肪酸組成は質量分析(GC-MS)を用いて測定し，脂肪酸組成は C8:0 のピークを基準としたモル比で比較した．
【結果と考察】Glucose のみ，Glucose と Xylose の混合糖の場合は 4 回の繰り返し発酵によって C24:0 にそれぞれ増加傾向が見られたが，C20:0 や C20:5 では一回目発酵において顕著に増加し，それ以降の増加傾向は見られなかった．Xylose のみの場合，他二つの条件と比べて繰り返しの回数を多くすることで長鎖長脂肪酸の増加が期待できる結果となった．C24:0 では，Glucose と Xylose の混合糖の増加が最も顕著であることから，Glucose と Xylose の糖消費を調節することでさらなる長鎖長脂肪酸の増加が期待できる．しかし，油脂酵母が合成する C16:0 や C18:1 cis といった主成分のモル比は 40 %以上を示すのに対し，長鎖長脂肪酸の場合は，1.5 %未満でかなり微量であった．以上から，長鎖長脂肪酸の生産量をさらに向上させるためには，繰り返し発酵だけでは不十分であり，遺伝子組み換えが必要であると考える．

Analysis of fatty acid composition changes during repeated fermentation of oleaginous *Lipomyces starkeyi* D35

○Nao Miyamoto[1], Prihardi Kahar[2], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Lipomyces starkeyi*, oleaginous yeasts, long chain fatty acids, repeated fermentation

1Kp05 組換え出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるキシロースからのグルタチオン生産

○小林 淳平, 佐々木 大介, 番場 崇弘, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦
（神戸大院・科技イノベ）
jyumpei.kobayashi@people.kobe-u.ac.jp

我々は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるグルタチオン生産を研究している．グルタチオンの発酵生産では多くの場合にグルコースを炭素源にするが，グルコースを利用すると可食バイオマスとの競合が問題になる．そのため，木質バイオマス処理物に多く含まれるキシロースからグルタチオンを生産することを目的とした．まず，以前に構築した高グルタチオン生産株の *S. cerevisiae* GCI 株に，メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* 由来のキシロースレダクターゼ，キシリトールデヒドロゲナーゼ遺伝子と，*S. cerevisiae* 由来のキシルロキナーゼ遺伝子を高発現させた *S. cerevisiae* GCI(Xs)株を構築した．次に，この GCI(Xs)株とコントロール株をグルコースとキシロースから構成される培地で培養し，細胞内のグルタチオン濃度と培地中のグルコースおよびキシロース濃度を測定した．その結果，コントロール株はキシロースを全く消費できなかったのに対して，GCI (Xs)株は 5 日間の培養でほとんどのキシロースを消費した．また GCI(Xs)株はコントロール株よりも，細胞内にグルタチオンを蓄積し，菌体量も増加した．そのため，GCI(Xs)株の培地体積当たりのグルタチオン収率は，コントロール株の約 1.4 倍になった．また，グルコース，キシロース，フルフラール，ギ酸，酢酸等から構成される，硫酸で処理をした木質バイオマスを再現した培地を作成し，同様に培養した．その結果，GCI (Xs)株の細胞内グルタチオン含量はコントロール株とほぼ同等であったが，細胞濃度が増加したため，培地当たりのグルタチオン濃度はコントロール株に比べて約 1.4 倍に増加した．

Glutathione production from xylose by recombinat budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○Jyumpei Kobayashi, Daisuke Sasaki, Takahiro Bamba, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, xylose, glutathione

1Kp06 *Moniliella megachiliensis* を用いた廃グリセリンからのエリスリトール発酵生産 ～バイオベース C4 ケミカルズ生産プラットフォーム構築への試み～

○村上 紀里子 [1], 東田 英毅 [1], 岩田 悠志 [2], 渡邉 泰祐 [2,3], 荻原 淳 [2,3], 春見 隆文 [2,3], 新井 隆 [4]
（[1]ちとせ研究所, [2]日大生資科・生命化, [3]日大院生資研究科・生資利用, [4]ダイセル）
kiriko.murakami@chitose-bio.com

シェールガスの台頭によりナフサ由来の化学製品の不足が懸念されている．特にナフサを原料とする C4 化成品はシェールガスからは変換されない．そのため代替法として持続的な製造が可能な微生物を用いた C4 化成品製造法の開発が進められている．これまでにバイオコハク酸の商業化が実現しており，フマル酸やリンゴ酸等の商業化も追って期待されている．
我々は，エリスリトールの工業生産菌であり，非常に高い浸透圧耐性を持つ酵母である *Moniliella megachiliensis* を用いて未利用バイオマスである廃グリセリン（C3）からエリスリトール（C4）の生産を試みている．ゼロカロリー甘味料として知られるエリスリトールは，グルコースを原料に発酵法で工業生産されている C4 の糖アルコールであり，現時点で 30,000 トン程度の需要が推定される．我々のゴールは，エリスリトール発酵生産の経済性をさらに高め，これを精製・化学触媒により変換し，ブタンジオール等の化学品を経済的に得るための複合的な一連のプロセスを確立することである．
初めに，原料をグルコースからグリセリンへ変更することで著しく低下した生産性を改良するため，培養条件の最適化を行った．その結果，200 g/L/week 以上の生産が可能な培養評価系を構築した．現在は，構築した培養評価系を用いて育種株の取得を進めている．我々は，実生産に向けて課題と考えられる生産速度の向上や培養工程の簡略化を目指して，培養初期に生じるラグタイムの短縮やさらに高い浸透圧への適応をターゲットとした育種を進めている．本報告では，これらの取得した株の性能について発表する．
本研究の一部は，戦略的創造研究推進事業 ALCA の助成を受けておこなわれた．

Fermentative production of erythritol using *Moniliella megachiliensis* from waste glycerol - as a C4 building-block chemical.

○Kiriko Murakami[1], Hideki Tohda[1], Hisashi Iwata[2], Taisuke Watanabe[2,3], Jun Ogihara[2,3], Takafumi Kasumi[2,3], Takashi Arai[4]
([1]Chitose Laboratory Corp., [2]Dept. Chem. Life. Sci., Nihon Univ., [3]Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ., [4]Daicel Corp.)

Key words C4 chemicals, Erythritol, Strain development, Waste glycerol

1Kp07 CRISPR-Cas9 システムによるラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属の脂質生産性の改変

○畑 浩介 [1], 青井 真人 [1], 渡邉 研志 [1], 北堀 智希 [1], 高橋 宏和 [1], 岡村 好子 [1], 松山 恵介 [2], 黛 新造 [3], 秋 庸裕 [1]
（[1]広島大院・先端物質, [2]長瀬産業, [3]出光興産）
aki@hiroshima-u.ac.jp

【背景】ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム（*Aurantiochytrium*）属は高い生理活性を持つ高度不飽和脂肪酸やカロテノイド，化成品原料となる長鎖脂肪酸や炭化水素類など，多様な分野で有用な脂質類を蓄積する．また，増殖性も高いため，各脂質の従来の供給源である魚油などの天然物からの抽出あるいは藻類による発酵生産や化学合成法などに替わる新たな供給源となることが期待される．本研究では本微生物の脂質生産性の向上及び生産脂質の多様化を目的として，CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集の適用を試みた．
【方法・結果】カロテノイド生産性のオーランチオキトリウム属 RH-7A 株において，無色のゲラニルゲラニルピロリン酸から黄色の β-カロテンを合成する酵素 CrtIBY の遺伝子（*crtIBY*）を標的として，CRISPR-Cas9 によるノックアウトの成否をコロニーの色調の変化で判別することとした．まず，RH-7A 株に *Streptococcus pyogenes* 由来 Cas9 遺伝子を導入した Cas9 発現株 RH-7A-CH 株に対して，*crtIBY* の複数部位を標的とする guide RNA を導入し，細胞内で CRISPR-Cas9 を誘導した．その結果，親株と比較してコロニーの色が白く変化した 2 株を取得した．また，guide RNA と Cas9 の複合体を細胞外で調製して RH-7A 株に導入し，コロニーが白色を呈する 1 株を取得した．得られた色素生産性喪失株のゲノム DNA 上の *crtIBY* の塩基配列を解析したところ，どの株においても標的部位付近の塩基の欠失が認められ，いずれも Cas9 認識配列（PAM 配列）の 3 塩基上流で生じた二本鎖切断に起因することが示唆された．オーランチオキトリウム属で初めてのゲノム編集技術として CRISPR-Cas9 システムの導入に成功したので，現在，高生産株の育種への適用を試みている．

Improvement of lipid productivity in *Aurantiochytrium* strains using CRISPR-Cas9-mediated genome editing

○Kosuke Hata[1], Masato Aoi[1], Kenshi Watanabe[1], Tomoki Kitahori[1], Hirokazu Takahashi[1], Yoshiko Okamura[1], Keisuke Matsuyama[2], Shinzo Mayuzumi[3], Tsunehiro Aki[1]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]NAGASE & CO., LTD., [3]Idemitsu Kosan Co. Ltd.)

Key words *Aurantiochytrium*, CRISPR-Cas9, lipid production, carotenoid

1Kp08 Growth, lipid and metabolite profile analysis of *Aurantiochytrium limacinum* SR21 grown on acetate-based medium for biotechnological applications

○Charose Marie Ting Perez, Ran Hirotani, Kenshi Watanabe, Yoshiko Okamura, Yutaka Nakashimada, Tsunehiro Aki
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)
aki@hiroshima-u.ac.jp

Thraustochytrids, a group of marine protists, are continuously gaining attention due to their capability in producing lipids for various biotechnological applications towards foods, medicines, chemicals and biofuels. Although glucose is the most common carbon source for this microalga, it is desirable to produce lipids from cheaper and more diversified substrate to expand their application range. We are developing two stage lipid production system consisting of the conversion of various unutilized biomass and emission gas to simpler sugars or organic acids and the assimilation of them by *Aurantiochytrium* strains for lipid fermentation. In this study, we aimed to examine the ability of acetate, which can be easily converted from various resources by acetogenic microorganisms, as a substrate of *A. limacinum* SR21. As a result of flask-scale analysis, specific growth rates (μ) of the strain SR21 grown in 3% acetate- or glucose-based medium were 0.55 and 0.98 h-1, respectively. The maximum yield of total fatty acid in acetate medium was 4.8 g/L at 48 h while that in glucose medium was 6.8 g/L at 30 h, indicating that acetate has potential as substrate. In the aim of constructing a good biorefinery system, lipid productivity needs to be enhanced and metabolic engineering is one promising approach, thus suitable method for metabolic fingerprinting is being constructed in order to comprehensively elucidate characteristic metabolic fluctuation caused by acetate assimilation and identify targets for optimization.

Growth, lipid and metabolite profile analysis of *Aurantiochytrium limacinum* SR21 grown on acetate-based medium for biotechnological applications

○Charose Marie Ting Perez, Ran Hirotani, Kenshi Watanabe, Yoshiko Okamura, Yutaka Nakashimada, Tsunehiro Aki
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words Thraustochytrid, Lipid production, Acetate

1Kp09 界面バイオプロセスを用いた香気性ラクトンの生産

○大澤 果穂[1], 杉本 恭子[2], 寺西 綾香[2], 小田 忍[2]
（[1]金工大院・工, [2]金工大・ゲノム研）
odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【背景と目的】 6-Pentyl-alpha-pyrone(6PP)等の香気性ラクトン類は，化粧品や食品業界において重要であるが，これらは化粧品や食品に添加されるため，酵素や微生物を使って生産される天然香料としての要求が強い．そこで本研究では6PP を効率的に生産できるバイオプロセスの開発を目的とした．
【方法】 12 穴ディッシュに調整した修正サブロー寒天の中央に，供試カビを一点植菌した．その上に低粘性ジメチルシリコンオイル(KF-96L-1CS，信越化学)を重層して 2 週間培養し，この有機層をガスクロで分析した．ヒット株 KIT-F0325 について培養条件の最適化を図った．炭素源の異なる 14 種類の修正サブロー培地とマイクロスフェアー(Advancel HB-2051，積水化学)を混和し，それに本株シード液を植菌した．3 日間の前培養後に，KF-96L-1CS を重層して 2 週間培養後，有機層をガスクロで分析した．その他，窒素源，C/N 比等の最適化や突然変異による KIT-0325 株の育種改良も図った．
【結果と考察】 493 株からの界面スクリーニングの結果，*Trichoderma* sp. KIT-F0325 株が 2 週間培養で 1.81 g/L の 6PP を生成した．本株の培養条件の最適化を図ったところ，炭素源に glucose，窒素源に peptone を使用した培地を用いることにより，2.75 g/L の 6PP が得られた．マイクロスフェアーとしては MFL-81GTA が最適であったが，培養時間の伸長に伴い生成した 6PP が分解されることが判明した．この結果より，6PP 分解酵素の遺伝子をノックアウトした変異株の創出にも取り組んだ．

Production of aroma lactone, 6-pentyl-alpha-pyrone, in an extractive liquid-surface immobilization system

○Kaho Osawa[1], Kyoko Sugimoto[2], Ayaka Teranishi[2], Shinobu Oda[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Kanazawa Inst. Technol., [2]Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words interface cultivation, 6-pentyl-alpha-pyrone, *Trichoderma* sp.

1Kp10 乳酸高生産性黄麹菌における乳酸生産フラックス強化による乳酸生産性の向上

○張 斯来[1], 若井 暁[1], 荻野 千秋[2], 堤 浩子[3], 秦 洋二[3], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大院・工, [3]月桂冠・総研）
zhangsilai@people.kobe-u.ac.jp

黄麹菌（*Aspergillus oryzae*）は細胞外に様々な糖化酵素を大量に分泌することが可能であり，植物バイオマスから有用物質を生産する宿主微生物として期待されている．我々は，従来のプラスチックの代替品となるポリエステル系のプラスチックであるポリ乳酸の原料となる物質である乳酸の生産に着目した．乳酸は解糖系の終点であり TCA 回路，エタノールやアミノ酸生産への分岐点となるピルビン酸から生産されるので，効率的な生産のためにはピルビン酸代謝を意識した代謝改変が必要である．
現在までに，牛 (*Bos taurus*) 由来 lactate dehydrogenase をコードする遺伝子 (*bldh*) を導入し，エタノール生合成経路での pyruvate decarboxylase をコードする遺伝子を破壊，ピルビン酸の TCA 回路への流れを抑制するためにミトコンドリア・ピルビン酸キャリアタンパク質 （MPC） を欠損させた乳酸高生産性黄麹菌の創成に成功している（張ら，日本農芸化学会 2018）．この株では，乳酸生産量が向上した一方で，MPC 非破壊株よりも培地中にピルビン酸が 20 倍以上漏れ出していた．本研究では，ピルビン酸を効率的に変換させるため，生化学的に異なる特徴を持つ LDH の導入による乳酸生産フラックス強化を試みた．
これまでは酵母で高い乳酸生産性が確認されている bLDH を麹菌に導入していた．別途行っていた LDH スクリーニング試験より，乳酸菌 (*Lactococcus lactis*) 由来の LDH（LlLDH）を発現させた麹菌において bLDH 導入株よりも高い生産量が確認できており，MPC 破壊株に Lldh を導入した．その結果，100 g/L グルコースからの乳酸生産量は約 92 g/L に向上し，培地中のピルビン酸濃度も著しく低下した．この結果から，MPC 欠損による細胞質に蓄積したピルビン酸が基質親和性の高い LILDH により効率的に変換されていると言える．

Improvement of lactate production by enhancing lactate producing pathway in genetically engineered lactate producing *Aspergillus oryzae*

○Silai Zhang[1], Satoshi Wakai[1], Chiaki Ogino[2], Hiroko Tsutsumi[3], Yoji Hata[3], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [3]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

Key words *Aspergillus oryzae*, mitochondrial pyruvate carrier protein, lactate dehydrogenase, metabolic flux

1Kp11 脱デンプン小麦フスマ培養における麹菌ヘミセルラーゼの生産

○和田 竜之介, 山形 雄一郎, 高橋 奈津美, 卜部 喬史, 尾関 健二
（金工大・ゲノム研）
ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【背景・目的】精麦時に排出する小麦フスマ（WB）は年間 50 万トン以上であり，そのごく一部が利用されているがほとんどが産業廃棄物である．また食品加工用のヘミセルラーゼ剤の種類は少なく，小麦フスマには 3 割程度のヘミセルロースを含有し，市販の食品加工用各種酵素剤とヘミセルラーゼ剤を併用しても血糖値上昇抑制などの機能性糖である，D-キシロース，L-アラビノース，アラビノキシロオリゴ糖までほとんど可溶化できない．我々は小麦フスマをクエン酸溶液でオートクレーブ処理することにより，デンプン質だけ酸加水分解できることを報告した．この処理での脱デンプン小麦フスマ（SFWB）で麹菌（*Aspergillus oryzae* RIB40）を生育，酵素抽出液は，アミラーゼ系酵素の生産はほとんどなく，β-キシラナーゼ，β-キシロシダーゼなどが高生産し，従来のヘミセルラーゼ剤とは酵素組成が全く異なっていた．しかしながら麹菌の生育は炭素源が限定されていたため，悪いものであった．今回炭素源以外の栄養源を戻すことにより，生育環境を改善し，ヘミセルラーゼ系酵素生産と性質について焼酎麹菌（*A. kawachii* SH34）も含めて検討した．
【方法・結果・考察】SFWB に酵母エキスと硫酸アンモニウムを加えることで 2 種類の麹菌の生育は大いに改善できた．また SFWB に炭素源としてグルコースを添加した麹菌培養と上記の培養では抽出タンパク量は同程度であり，アミラーゼ系酵素の生産を抑えた環境では上記の条件が最大であることが分かった．β-キシラナーゼ活性は RIB40 の至適 pH は 5 で至適温度が 65℃，SH34 の至適 pH は 3 で至適温度は 65℃であり，焼酎麹菌はこの環境では β-キシラナーゼの生産量も多く，耐酸性の β-キシラナーゼが高生産であることが分かった．β-キシロシダーゼでは RIB40 が生産量も多く，耐酸性，耐熱性もある酵素であることが分かった．

Production of hemicellulose from *Aspergillus oryzae* and *A. kawachii* using starch-free wheat bran.

○Ryunosuke Wada, Yuichiro Yamagata, Natsumi Takahashi, Takafumi Urabe, Kenji Ozeki
(Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words *Aspergillus oryzae*, *A.kawachii*, hemicellulose, starch-free wheat bran

1Kp12 gSELEX 法による糸状菌の分化に関与する転写因子の DNA 結合配列の同定

藤井 陽平[1], 岡 大椰[2], 片山 琢也[1], 兒島 孝明[2], 中野 秀雄[2],
○丸山 潤一[1]
（[1]東大院・農生科・応生工, [2]名大院・生命農学）
amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

【背景と目的】 糸状菌の分化には一般に有性生活環と無性生活環があるが，一部の糸状菌では菌糸が凝集・接着して形成する菌核への無性的な分化が起こる．菌核は耐久性の休眠構造であるが，その内部に有性生殖器官を形成することから，菌核形成は有性生殖と形態的に関連することが示されている．我々は最近，麹菌 *Aspergillus oryzae* において，菌核形成に必要な Zn(II)2-Cys6 型の転写因子 TrsA および TrsB を新たに見いだし，さらに，*Aspergillus nidulans* におけるこれらのオーソログが有性生殖に関与することを明らかにした[1)]．糸状菌の分化に関与する転写因子はこれまでに数多く報告されているが，これらが直接制御する遺伝子の同定はほとんど行われていない．本研究では，糸状菌の分化における転写制御ネットワークを解明することを目的として，これらの転写因子の DNA 結合配列の同定を試みた．
【方法と結果】 TrsA および TrsB の全長について，それぞれマルトース結合タンパク質 MalE と融合して大腸菌で発現させた．そして，精製した融合タンパク質を用いて，gSELEX (genomic systematic evolution of ligands by exponential enrichment)法[2)]による DNA 結合配列の特定を試みた．*A. oryzae* のゲノムライブラリーから転写因子と *in vitro* で結合する DNA 配列を選択・濃縮し，これを高速 DNA シーケンスにより解析した．その結果，TrsB について推定結合モチーフを抽出することに成功し，また，多くの遺伝子のプロモーター領域が TrsB との結合活性を有することがわかった．現在，*trsB* 遺伝子破壊株を用いた DNA マイクロアレイ解析において転写産物量が変動した遺伝子と比較することにより，TrsB が直接制御する遺伝子候補について糸状菌の分化での機能と関連して検討している．

1) 藤井ら，日本農芸化学会 2018 年度大会 2A05a02.
2) Kojima *et al.* (2016) PLoS ONE, 11, e0159011.

gSELEX-mediated identification of DNA-binding sequence of the transcription factor involved in filamentous fungal development

Youhei Fujii[1], Hiroya Oka[2], Takuya Katayama[1], Takaaki Kojima[2], Hideo Nakano[2], ○Jun-ichi Maruyama[1]
([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words gSELEX, transcription factor, filamentous fungi, *Aspergillus oryzae*

1Kp13 イメージング質量分析を用いたショウジョウバエ体内におけるイミダクロプリド可視化手法の確立

○大津 誠太郎[1], 山口 政光[2], 福崎 英一郎[1], 新間 秀一[1]
（[1]阪大院・工, [2]京工繊大・工芸科学）
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

イミダクロプリド（1-（6-クロロ-3-ピリジルメチル）-N-ニトロイミダゾリジン-2-イリデンアミン）は，世界中で広く使用されているネオニコチノイド系殺虫剤の一つであり，ニコチン性アセチルコリン受容体作動薬として知られている．しかしながら，イミダクロプリドが昆虫体内でどのような器官に作用しているのか，局在情報に関する研究は存在しない．そこで本研究では，イメージング質量分析法（IMS）を用いて，モデル生物であるショウジョウバエ体内におけるイミダクロプリド局在情報取得を試みた．IMS では測定試料を薄く切片化する必要がある．しかし，ショウジョウバエは体長約 2 mm と非常に小さく，また組織が不均一であるため，形態を保った切片作製が困難であった．そこで，切片作製に用いる包埋剤として 10%ゼラチンを選択し，前処理としてショウジョウバエを 70%エタノールに浸すことで，包埋剤とショウジョウバエ表面との間隙を減少させることに成功した．また液体窒素による急速凍結を行うことで，氷晶による組織へのダメージが減少し，形態を保った切片作製が可能となった．続いてこの切片作製法を用いて，イミダクロプリドの分布情報取得を試みた．イミダクロプリド標準品をマトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI），エレクトロスプレーイオン化法（ESI）のそれぞれで測定してみると，MALDI のレーザー照射によりイミダクロプリドがグアニジン化し，グアニジンイミダクロプリドとなることが明らかとなった．さらに，LC-MSMS を用いてショウジョウバエ体内でのイミダクロプリド代謝を測定してみたところ，グアニジンイミダクロプリドは検出されなかった．そこで，標的ピークをグアニジンイミダクロプリドとし，ショウジョウバエ体内におけるイミダクロプリドの局在情報の取得に成功した．

Development of *in situ* imidacloprid visualization procedure in *Drosophila melanogaster* using imaging mass spectrometry

○Seitaro Ohtsu[1], Masamitsu Yamaguchi[2], Eiichiro Fukusaki[1], Shuichi Shimma[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words MALDI-Imaging Mass Spectrometry, Insecticide, Imidacloprid, *Drosophila melanogaster*

1Kp14 イメージング質量分析を用いたショウジョウバエ幼虫体内の神経伝達物質の可視化法の開発

○榎本 陽介[1], 山口 政光[2], 福崎 英一郎[1], 新間 秀一[1]
（[1]阪大院・工, [2]京工繊大・工芸科学）
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

γ-アミノ酪酸（GABA），ドーパミン，グルタミン酸，セロトニンといった神経伝達物質は記憶や睡眠などの多くの生物学的行動に関与するだけでなく，筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの神経変性疾患に関与していると言われている．ショウジョウバエはライフサイクルが短いこと，コストがかからないこと，倫理面の制約が少ないなどの特徴を持ち，神経変性疾患のモデル生物として用いられている．特にショウジョウバエの幼虫は神経筋接合部を用いた神経伝達機構やシナプス形成に関する研究が多く行われている．神経伝達機構の研究において，これまでの知見に加えてショウジョウバエ幼虫体内で神経伝達物質がどこでどのように作用しているのかという空間情報が求められている．近年神経伝達物質の空間情報を得る手法として，マトリックス支援レーザー脱離イオン化イメージング質量分析法（MALDI-IMS）が注目されている．MALDI-IMS は蛍光イメージングや免疫組織化学といった他の分子イメージング手法と異なり，分子を直接可視化する手法であることから，神経伝達機構の研究において有用であると考えられる．そこで本研究では，MALDI-IMS を用いたショウジョウバエ幼虫体内の神経伝達物質の可視化法の開発を目的とした．本目的を達成するにあたり，切片作製法とマトリックス供給法を検討した．また，神経伝達物質のイオン化効率を向上させるために組織上誘導体化を適用することにより，GABA，ドーパミン，グルタミン酸，セロトニンの 4 種類の神経伝達物質の可視化に成功した．

Establish the method to visualize neurotransmitters in *Drosophila melanogaster* larvae using imaging mass spectrometry

○Yosuke Enomoto[1], Masamitsu Yamaguchi[2], Eiichiro Fukusaki[1], Shuichi Shimma[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words *Drosophila melanogaster*, imaging mass spectrometry, neurotransmitter

1Kp15 バルブスイッチング LC-MS/MS に基づくキラルアミノ酸の多検体分析

○中野 洋介, 馬越 泰, 福崎 英一郎
（阪大院・工）
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

D-アミノ酸は L-アミノ酸とは異なる生物学的機能を担うため，近年では医薬，臨床，食品業界を初めとして様々な分野で大きな注目を集めている．D-アミノ酸と L-アミノ酸は物理化学的性質がほぼ等しく，通常の手法ではそれらの分離・分析が困難であり，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などの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．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かつハイスループット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．しかしながら，当該手法を用いて多検体分析する際は，使用する 2 本のカラム（CROWNPAK CR-I(+)および(-)）を手動で切り替えることで分析間において大きな誤差が生じ，得られた結果の信頼性が保証されないという問題があった．そこで，我々は自動流路変換バルブを LC 部に導入した新規キラルアミノ酸分析システムの開発を行った．そのシステムの構築にあたり，CROWNPAK CR-I(+)でターゲット化合物を分析した後，すぐに自動で流路を切り替えると同時に試料注入を行い，連続的に CROWNPAK CR-I(-)で同様に分析するプログラムを作成した．この新規分析法と従来の手動で切り替える手法を実際に多検体分析に応用したところ，新規法では分析間の誤差が非常に小さく，良好な値を示した．これらの結果は，多検体を対象とした新規キラルアミノ酸マーカー探索をハイスループットかつ堅牢に行うための手法として当該分析システムが大きな可能性を有することを示した．

Valve switching-based LC-MS/MS method for large scaled-analysis of chiral amino acids

○Yosuke Nakano, Yutaka Umakoshi, Eiichiro Fukusaki
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words D-amino acid, enantioseparation, LC-MS/MS

1Kp16 ガスクロマトグラフィー負化学イオン化質量分析法を用いた糖リン酸新規分析法の構築と ^{13}C 代謝フラックス解析への応用

○岡橋 伸幸[1], 前田 昂亮[1], 川名 修一[2], 飯田 順子[2,3], 清水 浩[1], 松田 史生[1]
（[1]阪大院・情報, [2]島津製作所, [3]阪大院・工）
fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

[背景・目的] 糖リン酸は中心炭素代謝経路の大半を占める重要な代謝物であるが，従来法では異性体の十分な分離分析が達成されていない．このため，糖リン酸の正確な ^{13}C 標識割合が計測できず，細胞増殖や物質生産に必要な前駆体，補酵素等がどの代謝経路で供給されるのかを評価する ^{13}C 代謝フラックス解析法の適用が難しかった．そこで，本研究では，糖リン酸を高分離，高感度に分析できる手法を構築し，糖リン酸の ^{13}C 標識割合を直接計測し，^{13}C 代謝フラックス解析に用いることで解析精度の向上を目指した．
[方法・結果] 糖リン酸標準品を *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) oxime 化および trimethylsilyl 化し，ガスクロマトグラフィー負化学イオン化質量分析法（GC-NCI-MS）で検出する分析法を構築した．GC での昇温条件を最適化することで従来困難であった糖リン酸の構造異性体をベースライン分離することができた．また，高感度分析が可能な NCI を用いたことで検出限界 10 nM での分析が可能となった．続いて，[1-^{13}C]glucose を炭素源として培養したヒト乳がん細胞株 MCF-7 の細胞内糖リン酸の ^{13}C 標識割合を構築した手法を用いて分析し，^{13}C 代謝フラックス解析に用いた．従来の ^{13}C 代謝フラックス解析に利用されてきたクエン酸等の有機酸に加えて，糖リン酸の ^{13}C 標識情報を利用したところ，フラックスの推定精度が解糖系の反応で平均 12%，ペントースリン酸経路で平均 72%向上した．さらに，糖リン酸の ^{13}C 標識情報を利用することで，従来推定が困難であった可逆反応のフラックスを精度よく推定できた．これらの結果から，核酸合成に必要な前駆体リボースは酸化的 PP 経路のみでなく，非酸化的 PP 経路の逆反応でも産生されていることが示唆された．

Development of novel analytical method for sugar phosphates by GC-NCI-MS and its application to ^{13}C-metabolic flux analysis.

○Nobuyuki Okahashi[1], Kousuke Maeda[1], Shuichi Kawana[2], Junko Iida[2,3], Hiroshi Shimizu[1], Fumio Matsuda[1]
([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Shimadzu Corp., [3]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words ^{13}C-metabolic flux analysis, sugar phosphate, GC-MS, negative chemical ionization

1Kp17 質量分析のダイナミックレンジ拡張技術の開発とメタボロミクスへの応用

○中山 泰宗[1], 和泉 自泰[2], 長濱 一弘[1], 松岡 正佳[1], 馬場 健史[2]
（[1]崇城大院・工, [2]九大・生医研）
ynaka@bio.sojo-u.ac.jp

代謝物総体解析”メタボロミクス”は，代謝と関連する生理現象の解明に利用されている．分析は主に質量分析装置（MS）を検出器として用いるが，一般的にダイナミックレンジ（分析対象化合物の濃度により検出器の強度が変化する範囲）が細胞内外の代謝物の濃度範囲より小さい．そのため実際の”総体”解析は困難である．そこで本研究ではデジタルカメラの写真解析技術である”High dynamic range imaging”(HDR)の概念を応用した新規 MS 解析技術の開発を行った．HDR は低感度と高感度両方のデータを同時に取得し合成することで，擬似的にダイナミックレンジを向上させる技術である．本研究ではこの HDR を MS に応用した”HDR-MS”解析技術の開発を行った．
検出には三連四重極型（QqQ）を用い，各分析対象化合物の分析パラメータはフラグメント化のコリジョンエナジーを最適値及び高エネルギーの 2 種類に設定して分析を行った．2 種類の分析データを HDR 処理するためのシステムを R language を用いて開発した．HDR 合成の結果，ダイナミックレンジが向上し標準品化合物の分析ではダイナミックレンジが約 2 桁上昇する化合物も得られた．性能確認のために，実サンプルとして，酵母培養の天然培地である YPD 培地の時間経過による成分変化を分析した．天然培地には種々の成分が様々な濃度で含まれており，通常すべての濃度範囲をダイナミックレンジ内に収めるのは困難なためである．しかし，HDR-MS の結果，一度の分析で，高濃度から低濃度までの範囲をカバーすることが可能であった．本技術により，化合物濃度範囲が広いサンプルのメタボローム分析が正確になり，代謝研究や疾患診断等に応用されると期待される．

Development of High-Dynamic Range Mass Spectrometry and Its Application

○Yasumune Nakayama[1], Yoshihiro Izumi[2], Nagahama Kazuhiro[1], Masayoshi Matsuoka[1], Takeshi Bamba[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Sojo Univ., [2]Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ.)

Key words mass spectrometry, liquid chromatography, metabolomics, yeast

1Kp18 Automated data processing for quality monitoring of biotherapeutics by multiple attribute methods (MAMs)

○Naohiko Heida
(Genedata KK)
naohiko.heida@genedata.com

Multiple attribute methods (MAMs) can generate significant operational savings by replacing traditional assays while at the same time enabling a true QbD approach for the development and production of biotherapeutics. Genedata Expressionist® offers a scalable enterprise software solution for the implementation of MAMs. From discovery to production, the software enables the end-to-end MAM process, from product attribute identification to automated CQA monitoring and detection of unknowns. It facilitates communication across organizations, harmonizes MAM methods across labs, enables complete automation, and supports deployment in regulated environments.

Automated data processing for quality monitoring of biotherapeutics by multiple attribute methods (MAMs)

○Naohiko Heida
(Genedata KK)

Key words Biotherapeutics, multiple attribute methods, Mass spectrometry, Critical Quality Attributes

1Lp01 金ナノ粒子―量子ドットのプラズモン共鳴現象を用いたノロウイルス RNA 検出法

○森田 真広[1], Jaewook Lee[2], Oluwasesan Adegoke[2], 朴 龍洙[1,2]
（[1]静大院・総科研・農, [2]静大・グリーン科技研）
Park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景と目的】感染性胃腸炎を引き起こすノロウイルスの診断は，イムノクロマト法によるが，低感度，診断誤差や特異性に問題があり，高感度で迅速なノロウイルスの検出法の開発が急務である．金ナノ粒子はバルク金属にはない性質を有することから近年注目を集めている．量子ドットは既存の有機色素に比べ高い蛍光特性を有している．金ナノ粒子は量子ドットとの相互作用によるプラズモン共鳴効果によって蛍光を増強することが知られている．本研究では，これら二つの粒子を利用して，より高感度で DNA を検出する検出法を開発し，その成果を報告する．
【方法と結果】 金ナノ粒子は layer by layer 法によってスライドガラス状に固定した後，チオール基を修飾した DNA を結合させた．同様に量子ドットも DNA を修飾し，プローブとした．プローブ DNA-量子ドットを検出用の DNA と反応させた後，基板上にスポットし，基板上の DNA とハイブリダイゼーションさせた．検出用の DNA は，ノロウイルスの RNA のうち 25 塩基を，二つのプローブ DNA は，検出用 DNA と互いに異なる部分で相補的な 10 塩基を用いた．プローブの DNA と検出用 DNA は，二本鎖を形成するように設計しているため，基板上の金ナノ粒子の DNA を通して金ナノ粒子と量子ドットが繋がり，両粒子間距離が近づく．そこで両粒子間プラズモン共鳴現象が起き，量子ドットの蛍光が増強される．蛍光は，蛍光顕微鏡で観察し，検出用 DNA の検出を行った．本検出系は，検出用 DNA の濃度依存的に蛍光の増強が確認でき，また非相補的な DNA に対して高い選択性を有していることが確認できた．本検出系の検出限界は 52 fM であり，既存の検出系に比べて高い感度を有していた．本結果から，本検出系は高感度，高選択的なノロウイルスの検出が可能であり，また用いる DNA の配列を変えることで，他の DNA や RNA の検出にも広く応用できると考えられる．

Detection of Norovirus RNA using plasmon resonance effect between quantum dots and gold nanoparticles

○Masahiro Morita[1], Jaewook Lee[2], Oluwasesan Adegoke[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 Norovirus RNA detection, Plasmon resonance, quantum dot, gold nanoparticle

1Lp02 A label free sensing system for the detection of Dengue virus serotype

○Ankan Dutta Chowdhury[1], Nasrin Fahmida[2], Kenshin Takemura[2], Indra M. Khoris[3], Jaewook Lee[1], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Lab. Biotech., Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ, [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [3]Dept. Agriculture, Grad. Sch. Integrat. Sci. Technol.)
park.enoch@shizuoka.ac.in

Dengue fever, which affects a significant and ever-increasing portion of the world's population every year, needs to detect precisely and rapidly. Detection of the Dengue trusts only on RT-PCR type methodologies for confirmation of dengue virus serotypes till date. In this research, we are trying to develop detection method for Dengue (DENV) serotype identification along with DNA quantification by using a new class of LSPR based methodology using gold nanoparticles (AuNP) and fluorometric CdSe QDs. The distance dependency between the QDs and AuNP has been used for serotype detection as well as quantification of the DNA. The complementary structured hairpin assemblies have been employed as nanoprobe for the identification of the serotypes, creating the desired distance for successive quenching as well as fluorescence enhancement, as mentioned in the scheme. Results obtained in this study, clearly demonstrate that the developed system can efficiently detect the four serotypes of DENV DNA individually without any modification of the analyte DNA prior to analysis which is the strong advantages over the other PCR based methodologies. To our best knowledge, this is the first report on the Dengue serotype detection along with DNA quantification by simple fluorometric technique to get reliable results. We hope this simple and reliable method can pave an avenue for the development of sensitive and robust sensing probes in biomedical applications in near future.

A label free sensing system for the detection of Dengue virus serotype

○Ankan Dutta Chowdhury[1], Nasrin Fahmida[2], Kenshin Takemura[2], Indra M. Khoris[3], Jaewook Lee[1], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Lab. Biotech., Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ, [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [3]Dept. Agriculture, Grad. Sch. Integrat. Sci. Technol.)

Key words AuNP, dengue virus detection, fluorometric biosensor, LSPR

1Lp03 Silver-enhanced colorimetric detection of norovirus-like particles using peroxidase-like activity of nanozyme

○Indra M. Khoris[1], Kenshin Takemura[2], Jaewook Lee[3], Vipin Kumar Deo[4], Tetsurou Suzuki[5], Enoch Y. Park[1,2,3]
([1]Dept. Agriculture, Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Dept. Biosci., Grad. Sch. Biosci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [4]Office Inter'l Collab., Shizuoka Univ,, [5]Dept. Infect. Dis., Hamamatsu Univ. Sch. Med.)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

Gastroenteritis was caused by norovirus which is known to be infectious even if a low dose of minimum infection. Available ELISA for norovirus has low detection limit (LoD) at nanogram level due to the catalytic activity of used peroxidase, resulting a necessity to develop a reliably ultrasensitive bioassay. In this study, we apply peroxidase-like activity of gold nanoparticles (AuNPs) on colorimetric bioassay for detecting norovirus-like particles (NoV-LPs). In its application, however, antibody conjugation on gold nanoparticles tends to reduce its performance and loss its superiority catalytic activity. To overcome this issue, we improved peroxidase (HRP)-like activity of gold nanoparticles by silver staining. In this colorimetric bioassay, NoV-LPs were bounded to antibodies that were immobilized on the surface of 96-wells microtiter plate. Then, antibodies-conjugated AuNPs (Ab-AuNPs) were added and formed sandwich structure, Ab-NoV-LPs-Ab-AuNPs. Afterward, $AgNO_3$ solution containing hydroquinone was added to form gold@silver nanohybrid. H_2O_2/TMB solution was added to the wells to develop blue colour by oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). 10% H_2SO_4 was added to stop the reaction and the colour was turned to yellow, and the absorbance at 450 nm was measured. This developed bioassay shows NoV-LPs concentration-dependent with limit of detection of 10.8 pg/ml, which is 100 times lower than HRP-based ELISA, and 1.5 times lower than only AuNPs with superior colour intensity.

Silver-enhanced colorimetric detection of norovirus-like particles using peroxidase-like activity of nanozyme

○Indra M. Khoris[1], Kenshin Takemura[2], Jaewook Lee[3], Vipin Kumar Deo[4], Tetsurou Suzuki[5], Enoch Y. Park[1,2,3]
([1]Dept. Agriculture, Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Dept. Biosci., Grad. Sch. Biosci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [4]Office Inter'l Collab., Shizuoka Univ,, [5]Dept. Infect. Dis., Hamamatsu Univ. Sch. Med.)

Key words Colorimetric bioassay, norovirus-like particles, peroxidase-like activity, gold@silver nanohybrids

1Lp04 Magnetofluoro-immunosensing system by using plasmonic/magnetic graphene for virus detection

○Jaewook Lee[1], Kenshin Takemura[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

A multi-functional hybrid nanomaterials have been spotlighted due to their synergic and unique properties. In this study, binary nanoparticles (NPs) decorated graphene was prepared as a multi-functional hybrid graphene that has amazing properties such as plasmonic and magnetic property and high electrical conductivity. This plasmonic/magnetic graphene (PMGRP) was consisted with Au NP, magnetic NP (MNP) and graphene, and it was prepared via two steps in D.I water at room temperature in order to utilize for magnetic separation and plasmonic substrate in a magnetofluoro-immunosensing (MFIS) platform. In this case, PMGRP was modified with influenza virus antibody (Ab) to detect H1N1 virus, and MFIS was conducted under two steps with a human serum/virus mixture; the PMGRP captured virus was separated from impurity by magnetic force, and FIS was performed with QD. In this case, limit of detection was estimated around 6.07 pg/ml, so PMGRP-based MFIS platform is a as potential detection system for complex biological sample.

Magnetofluoro-immunosensing system by using plasmonic/magnetic graphene for virus detection

○Jaewook Lee[1], Kenshin Takemura[2], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words Magnetofluoro immunosensing, Plasmonic-magnetic graphene, sensor, Virus separation and detection

1Lp05 磁気分離免疫蛍光ナノバイオセンサーを用いた糞便中からのノロウイルス高感度・迅速検出

○竹村 謙信[1], 李 在郁[2], Vipin Kumar Deo[3], 鈴木 哲朗[4], 朴 龍洙[1,2]
([1]静大・創科技院, [2]静大・グリーン科技研, [3]静大・国際連携推進機構, [4]浜医大・医・医学科)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】ノロウイルスの検出には PCR などの遺伝子検出技術が用いられているが，設備や技術，長時間を必要とする為，早期診断には向いていない．ウイルスの拡散を防止するため，糞便中や吐しゃ物などからの直接ウイルスを迅速にかつ簡便に検出する必要がある．本研究ではナノ粒子間で生じる局所プラズモン共鳴（LSPR）による蛍光増強効果と磁気分離による検体からウイルスを簡便な分離機能を合わせ持った磁気分離型 LSPR 免疫蛍光検出系を構築した．本研究では複合体合成法最適化及び本検出系を用いて行った糞便中からのノロウイルス様粒子（NoV-LP）検出について得られた結果を報告する．
【方法・結果】蛍光性半導体量子ドット CdSeTeS quantum dot（QD）は，当研究室で作製したものを用いた．AuNP/MNP は室温条件下で磁性ナノ粒子溶液に金イオン及び還元剤を加え一定時間還元反応で作製した．還元速度と温度条件の変更により反応をコントロールすることで AuNP のサイズや表面形状が異なる 5 種類の複合体を形成し，LSPR 誘起効率の高い複合体を選定した．QD と最適化 AuNP/MNP にノロウイルスの特異的抗体を化学修飾し，混合して検出液を作製した．検出液に NoV-LP を加え，10 分間室温で静置した後に検出液から AuNP/MNP を分離，洗浄した．洗浄済の粒子を超純水中に分散させ，蛍光強度を測定した（励起光 450 nm，蛍光 636 nm）．表面に形成される AuNP は金平糖型かつ 40 nm 程度の粒径が最も強く蛍光増強効果を誘起した．また，最適化した複合体を用いて行った NoV-LP の検出限界は純水中の検体では 0.24 pg/ml，糞便中の検体の場合 0.46 pg/ml であり，既存の ELISA などのウイルス粒子検出技術と比べ 100 倍以上の感度であった．

Ultrasensitive and rapid detection of Noro virus from feces using magnetic separation immunofluorescence nano bio sensor

○Kenshin Takemura[1], Jaewook Lee[2], Kumar Deo Vipin[3], Tetsuro Suzuki[4], Enoch Y Park[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., [3]Office Inter'l Collab., Shizuoka Univ, [4]Hamamatsu Medical Univ.)

Key words Noro virus, detection, quantum dot, AuNP/MNP

1Lp06 Highly sensitive detection of norovirus-like particles using LSPR behavior of CdSeTeS QDs and AuNPs

○Fahmida Nasrin[1], Ankan Dutta Chowdhury[2], Kenshin Takemura[1], Jaewook Lee[2], Oluwasesan Adegoke[2], Vipin Kumar Deo[3], Tetsuro Suzuki[4], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Lab. Biotech., Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Lab. Biotech., Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Office Inter'l Collab., Shizuoka Univ, [4]Dept. Infect. Dis., Hamamatsu Univ. Sch. Medicine)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

Norovirus is mostly common and extremely contagious virus which causes acute gastroenteritis in a vast population every year where fewer than twenty virus particles can cause severe infection. Due to its severity and challenges, there is an utmost need for highly sensitive rapid detection technique for norovirus. In this study, a sensitive, rapid and specific detection method has been developed using localized surface plasmon resonance (LSPR)-induced immunofluorescence based on a gold nanoparticles (AuNPs) induced CdSeTeS quantum dots (QDs) fluorescent signal. Quaternary alloyed CdSeTeS QDs were capped with L-cysteine and conjugated with norovirus antibody. AuNPs were synthesized in citrate and thiolated with 11-mercaptoundecanoic acid. The concept of the biosensor involves the interaction between conjugated CdSeTeS QDs and thiolated AuNPs which induces a quenching of CdSeTeS fluorescence. However, the fluorescence signal shows a significant enhancement in the presence of norovirus-like particles (NoV-LPs) due to a steric hindrance. The enhancement efficiency is directly related to the virus concentration and the intermolecular distance between the QDs and AuNPs. A linear range of 10^{-5} to 10 ng mL^{-1} NoV-LPs with a detection limit of 8.2 fg mL^{-1} was obtained. The results of the proposed biosensor were used to implement a simple and fast method to determine the presence of norovirus even in human serum which can open a new avenue for the biomedical application in near future.

Highly sensitive detection of norovirus-like particles using LSPR behavior of CdSeTeS QDs and AuNPs

○Fahmida Nasrin[1], Ankan Dutta Chowdhury[2], Kenshin Takemura[1], Jaewook Lee[2], Oluwasesan Adegoke[2], Vipin Kumar Deo[3], Tetsuro Suzuki[4], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Lab. Biotech., Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Lab. Biotech., Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Office Inter'l Collab., Shizuoka Univ, [4]Dept. Infect. Dis., Hamamatsu Univ. Sch. Medicine)

Key words quantum dots, localized surface plasmon resonance, biosensor, norovirus detection

1Lp07 Gel-based cell manipulation 法に基づく環境微生物の単一細胞解析技術の開発

○茅 逸皓, 根岸 諒, 田中 剛, 吉野 知子
（農工大院・工）
y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

【目的】環境中に存在する大多数の微生物は未培養であると考えられているが，新規有用物質の探索対象として期待されている．近年，微生物の培養工程を経ずに，有用物質生産に関連する遺伝子探索を可能とする単一細胞の核酸解析が注目されている．当研究室ではがん細胞の単一細胞解析を目的として，細胞集積が可能な Microcavity array (MCA)法と，任意の単一細胞を光硬化性ハイドロゲルに包埋し，目視観察での確実な分離を可能とする Gel-based cell manipulation (GCM)法を開発し，希少な細胞を対象とした単一細胞の分離技術を確立してきた．そこで本研究では MCA 法および GCM 法による環境微生物の集積化と単一細胞解析への応用を試みた．
【方法及び結果】孔径が 3 μm の微細貫通孔を多数有する PET 製の MCA を設計した (孔数：4×10^3)．細胞のサイズ・形状の異なる微生物として珪藻 *Fisturifela solaris*，*Thalassiosira pseudonana*，*Phaeodactylum tricomutum*，緑藻 *Haematococcas lacustris* を用い，MCA 上への細胞の回収効率を評価した．その結果，細胞サイズが 5 μm 以上の微生物においては，細胞懸濁液から 90%以上の効率で細胞回収が可能であった．さらに微生物を集積した MCA 上に光硬化性のハイドロゲルである poly(ethylene glycol) diacrylate を添加した．標的微生物に対して光照射を行いハイドロゲルにより細胞を包埋し，単一細胞の分離を行った．続いて，本手法により分離した単一微生物から全ゲノム増幅を行い，標的遺伝子の解析を行った．その結果，ゲノム解析が可能な十分量の増幅産物が得られ，18S rDNA 解析により目的の微生物由来のものであることを確認した．本技術は，微生物アレイの光学観察と標的微生物のゲノム解析が可能な技術であり，環境サンプルへの適応も可能であった．

Development of techniques for single cell analysis of environmental microorganisms using Gel-based cell manipulation

○Yihao Mao, Ryo Negishi, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words single-cell analysis, environmental microorganisms, whole genome amplification

1Lp08 （講演中止）

1Lp09 バイオナノカプセル整列固定化技術による DNA アプタマーセンサーの高感度化

○山田 裕紀 [1], 飯嶋 益巳 [1,2], 黒田 俊一 [1]
（[1]阪大・産研, [2]東農大・応生科）
skuroda@sanken.osaka-u.ac.jp

【目的】 我々は，バイオセンサー表面で IgG-Fc 領域を固定し Fv 領域を放射状に提示できる足場ナノ粒子「Protein A 由来 Fc 結合 Z ドメイン提示型バイオナノカプセル（ZZ-BNC）」を用いて，IgG 及び Fc 融合受容体のクラスター化と精密整列化に成功し[飯嶋ら，Biosens. Bioelectron. 89, 810-821 (2017)]，センシング分子の最小化と抗原及びリガンド検出の高感度化を同時に達成してきた．しかし，本技術は Fc 領域を有する分子に限定されることから，幅広いセンシング分子への適用拡大が課題であった．本研究では，ZZ-BNC の ZZ ドメインを特異的 DNA 配列結合領域（single-chain Cro（scCro）[Jana ら，Biochem. 37, 6446-6455 (1998)]）に置換した scCro-BNC を作製し，DNA アプタマーの精密整列固定化によるリガンド検出の高感度化を目指した．
【方法】 ZZ-BNC 同様に出芽酵母を用いて scCro-BNC を発現・精製し，透過型電子顕微鏡（TEM），原子間力顕微鏡（AFM）及び動的光散乱法（DLS）を用いて性状解析を行った．さらに水晶発振子微量天秤法（QCM）のセンサー表面に，トロンビン特異的結合 DNA アプタマーを直接または scCro-BNC を介して固定し，トロンビン結合能を測定した．
【結果】 scCro-BNC は，TEM，AFM 及び DLS の解析から直径約 30 nm のナノ粒子と判明した．次に QCM において，scCro-BNC を介するとトロンビン結合量が約 1.7 倍に上昇し，DNA アプタマー 1 分子に結合するトロンビン分子数が約 2.5 倍増加した事から，scCro-BNC は DNA アプタマーのクラスター化及び精密整列化が可能な足場分子である事が示された．今後は様々な DNA アプタマーを用いて scCro-BNC の使用条件の最適化を行い，広範なリガンドを高感度に定量化できる DNA アプタマーセンサーの創製を行いたい．

Bio-nanocapsule-based scaffold for oriented immobilization of DNA aptamers

○Yuki Yamada[1], Masumi Iijima[1,2], Shun'ichi Kuroda[1]
([1]ISIR, Osaka Univ., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agr.)

Key words biosensor, bio-nanocapsule, DNA aptamer, oriented immobilization

1Lp10 DNA ナノ構造体修飾ビーズを用いた標的核酸のイメージング検出

○吉田 知哲, 池田 丈, 石田 丈典, 廣田 隆一, 黒田 章夫, 舟橋 久景
（広島大院・先端物質）
hisafuna@hiroshima-u.ac.jp

[目的] 当研究室では，標的核酸を認識すると蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）シグナルやペルオキシダーゼ活性を示す DNA ナノピンセット構造体（DNA-NT）の開発に成功している．本研究では，DNA-NT を用いたマルチ標的の簡易計測法開発を目指し，ビーズを利用した標的核酸のイメージング検出法について検討した．
[方法] 本研究で用いた DNA-NT は，標的核酸認識配列をもつ 2 本の合成オリゴヌクレオチド（O1, O2）と，両端に蛍光色素 Cy3 と Cy5，中央部分にビオチンを修飾した合成オリゴヌクレオチド（O3）を自己集積させることによって作製した．この構造体は標的核酸認識に伴う構造変化によって Cy3 と Cy5 が近接し，FRET シグナルを発する．この DNA-NT を，ビオチン-アビジン結合を利用してストレプトアビジン修飾磁性ビーズに修飾した．蛍光顕微鏡を用いたイメージングによって FRET シグナルを解析し，DNA-NT 修飾ビーズを用いた標的核酸検出の可能性を検討した．
[結果および考察] DNA-NT 修飾ビーズは標的核酸を加えた場合 FRET シグナルを発したことから，DNA-NT はビーズに固定された状態でも標的核酸認識能を有することが示された．その際ビーズを洗浄しても FRET シグナルを発し続けたことから，DNA-NT 修飾ビーズを用いて標的の濃縮が可能であることが示された．また，磁性ビーズを用いたことにより，ビーズを観察平面上に整列させることが容易になり，ビーズの大きさが判別が可能になった．そこで異なる標的核酸を認識する 2 種類の DNA-NT を大きさの異なる 2 種類のビーズに修飾し，片方の標的核酸のみ加えて蛍光イメージング解析を行った．その結果，加えた標的核酸に対応する DNA-NT を修飾した大きさのビーズのみ FRET シグナルを発した．以上の結果から，大きさの異なるビーズを用いた蛍光イメージングによって，複数の標的核酸の同時検出が可能であることが示された．

Detection of targeted nucleic acids by imaging analysis using DNA-nanostructure modified beads

○Chisato Yoshida, Takeshi Ikeda, Takenori Ishida, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Hisakage Funabashi
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat. Hiroshima Univ.)

Key words biosensor, imaging analysis, DNA sensor

1Lp11 段階的な酵素反応に基づいた抗体結合タンパク質含有ポリマーの固相基板上での調製技術の開発

宮尾 寛樹 [1], 上村 侑太郎 [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】抗原-抗体反応を利用したイムノセンシング技術は，その汎用性の高さから様々な化合物の検出に利用されている．一般に高感度な検出系を構築するには抗体を固相基板上に固定化する必要があり，その抗体の固定化が検出感度に大きな影響を及ぼすことが知られている．これまでに，抗原結合活性を維持した状態で抗体を固定化することを目的として，抗体結合タンパク質を利用した，様々な抗体固定化技術が提案されている．しかしこれまで提案されている技術では，主として抗体結合タンパク質は固相基板上に一層だけ固定化さてお り，抗体の捕捉量が限定的なものとなっている．そこで本研究では，固相基板上で抗体結合タンパク質をポリマー化させ，抗体を三次元的に捕捉・固定化できる技術の開発を試みた．
【実験方法及び結果】上記目的のために *Sulfolobus tokodaii* 由来のビオチン化酵素反応を利用した．*S. tokodaii* 由来の同酵素反応系は，酵素であるビオチンリガーゼ（BPL）が，その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]．本研究では，Protein A の抗体結合ドメインの 1 つである Z-ドメインを，同酵素反応系を利用してポリマー化することを試みた．具体的には，Z-ドメインの両端に BCCP を連結した融合タンパク質と，BPL 二分子を架橋した BPL ダイマーを調製した．これら両タンパク質を，BPL を固定化した固相基板上に段階的に添加することにより，ビオチン化反応を介して，Z-ドメインを含むポリマーが固相基板上に形成されるものと考えた．本研究では，この反応を表面プラズモン共鳴法のセンサーチップ上で行い，本技術の実行可能性を評価した．
【参考文献】1) S. Sueda et al., *Anal. Biochem.* (2009) **393**, 189

Preparation of the polymer containing the antibody-binding protein based on the stepwise enzyme reaction

Hiroki Miyao[1], Yutaro Uemura[1], ○Shinji Sueda[1,2]
([1]Dept. Biosci. Bioinf, Kyushu Inst. Technol., [2]RCBT, Kyushu Inst. Technol.)

Key words immunosensor, antibody-binding protein, biotin ligase, immobilization

1Lp12 酵母細胞における生理活性物質メラトニンをモニタリングするための G タンパク質共役型受容体（GPCR）を用いたメタボライトセンサの開発

○田畑 琢也, 中村 泰之, 加藤 寛子, 近藤 昭彦, 石井 純
（神戸大院・科技イノベ）
junjun@port.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】
近年，代謝工学により微生物が本来作らない化合物を大量生産する研究が進められている．これらの研究では従来，クロマトグラフィ等で 1 菌株ごとに生産性を定量するため，評価できる遺伝子組換え体数は限られていた．そこで，作出した菌株の生産性をハイスループットに評価できるメタボライトセンサが注目を集めている．本研究では，G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) を利用して代謝工学に応用できるメタボライトセンサを開発することを目的とした．モデルとして GPCR の一種であるヒト由来メラトニン受容体を選択し，発現量やメラトニンに対する親和性を改変することで感度調節し，様々な濃度のメラトニンを検出できるシステムの構築を目指した．
【実験方法・結果】
GPCR のシグナル伝達検出には，リガンド刺激に応答すると緑色蛍光蛋白質が発現するようにゲノムを改変した酵母株を用いた．GPCR としてヒト由来メラトニン受容体をベースとし，出芽酵母にコドン最適化した配列や受容体の 1 アミノ酸変異体をコードする配列などを恒常発現型プロモーター制御下で発現させるプラスミドを構築した．これらの形質転換体を様々なメラトニン濃度に調製した培地で培養後，フローサイトメーターにより緑色蛍光強度測定を行った．その結果，受容体やプロモーターの種類に応じ，メラトニン濃度に依存したレポーター発現強度の違いが見られ，様々な検出感度を持ったメラトニンセンサの開発に成功した．また，添加するリガンドをメラトニンからメラトニン生合成経路の中間物質に変更したところ，受容体の変異体においてメラトニンを特異的に検知可能なメタボライトセンサの開発に成功した．今後，本研究で開発したメタボライトセンサを応用し，代謝工学や進化工学と組み合わせることでメラトニン高生産株を迅速に育種することへ展開していく．

Development of G-protein-coupled receptor (GPCR)-based metabolite sensor for monitoring physiological chemical melatonin in yeast cells

○Takuya Tabata, Yasuyuki Nakamura, Hiroko Kato, Akihiko Kondo, Jun Ishii
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, metabolite sensor, G-protein-coupled receptor, signal transduction

1Lp13 A potentiometric plant condition monitoring method

○Tae Hang Yoon[1], Hak Jin Song[1], Kwang Jin Kim[2], Yong-Keun Choi[1], Wu-Young Jeong[1], Ji Eun Kim[1], Sang Hyun Lee[1], Yung-Hun Yang[1], Hyung Joo Kim[1]
([1]Dept. Biological eng., Konkuk Univ., [2]Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration.)
odoosan12345@naver.com

A plant condition monitoring method based on microbial fuel cell technique was investigated. The reducing action of plant exudates on the rhizobacteria was used as the basis of a potentiometric monitoring system. The potential development (OCV, open circuit potential) were found to be dependent on the plant conditions and cultivation environments such as vitality, water feeding, addition of fertilizer, etc. In a plant pot, graphite felt was used as electrode (15 × 15 × 0.2 cm). *Ardisia pusilla* was used as experimental plant. When the plants were grown in a normal condition (i.e. periodical water feeding and under normal lighting condition), the OCV from the plants were maintained at the range of 0.25 to 0.41 V. However, in the absence of plant, no significant increases in OCV were observed from the system. When the experimental plant was heated by a hot air, a rapid decrease in potential development was monitored. These results indicates that the OCV from the system is closely related plant vital conditions. In the presence of live plant, rhizobacteria could generate the potentiometric signal and a correlation between OCV variations and the cultivation conditions were established. A range of plant cultivation conditions (e.g. water, fertilizer, light, temperature, etc.) was examined, and it was founded that the method could be used successfully for monitoring of plant viability conditions. A mechanistic model including the electrochemically active bacteria (EAB) is presented to account for this finding.

A potentiometric plant condition monitoring method

○Tae Hang Yoon[1], Hak Jin Song[1], Kwang Jin Kim[2], Yong-Keun Choi[1], Wu-Young Jeong[1], Ji Eun Kim[1], Sang Hyun Lee[1], Yung-Hun Yang[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, rhizobacteria, open circuit voltage, plant monitoring system

1Lp14 高性能バイオデバイスを目指したカーボンナノチューブ配向電極の開発

○藤原 郁也 [1], 大池 智明 [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は(Carbon nanotube, CNT)は，直径が 100nm 以下であり，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を構成する電極材料としての応用が期待されている．しかし，単に CNT を成膜した電極では，ファンデルワールス力により CNT 同士が凝集する傾向があり電気的抵抗が生じてしまうため CNT の特性を最大限生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高性能バイオデバイスの構築を目的とした．
【方法】10% EVA 溶液に CNT 100 mg 加え一晩撹拌し，超音波処理を行う事により CNT を分散させた．エレクトロスピニング法により CNT 含有 EVA ナノファイバーを Au 基板表面へ紡糸した．EVA/CNT ファイバー作製後，電気炉内 400℃で加熱する事で EVA ナノファイバーのみを熱分解させることで，消出したナノファイバーに沿って CNT が配向した Au 基板を得た．作製後，物性や形態を観察し，配向 CNT 表面へ PQQ-GDH(pyrroloquinolinequinone-dependent glucose dehydrogenase)を修飾させ電気化学特性評価を行った．
【結果と考察】EVA と CNT 混合溶液からエレクトロスピニング法により，太さ約 820 nm の CNT 含有 EVA ナノファイバーを得た．紡糸した EVA/CNT ナノファイバーを熱分解すると，ナノファイバーに沿って CNT が配列していることが観察された．燃焼後の基板上に PQQ-GDH を修飾し電気化学評価を行った結果，CNT を配向した電極の方が無配向 CNT 電極に比べ，約 2 倍近い酵素触媒電流を得た．
以上の結果から，本技術は CNT を精密に配列させることが可能であり，さらにその CNT 配向電極は高性能バイオデバイスの構築を可能とすることが示唆された．

Development of carbon nanotube arranged electrode aiming for high performance biodevice

○Ikuya Fujiwara[1], Tomoaki Oike[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 carbon nanotube, biodevices, electrospinning, one-dimensional alignment

1Lp15 緩和時間プロファイリングとデータ駆動型アプローチによる魚肉特性評価

○伊達 康博[1,2], 魏 菲菲[1], 坪井 裕理[1], 清水 智子[1], 坂田 研二[1], 菊地 淳[1,2,3]
（[1]理研・CSRS, [2]横市院・生医, [3]名大院・生命農）
yasuhiro.date@riken.jp

近年の深層学習・機械学習の爆発的な進展により，多様な分野・産業において技術革新が起きつつあり，生物工学分野への波及効果も計り知れないものと推測される．生物系のビッグデータを扱う研究分野の一つであるメタボロミクスでは，NMR 計測等によって得られた多数のデータから有用な情報を取得するデータマイニング技術が急速に進展しており，我々もこれまでに，メタボロミクス研究へと適用可能な機械学習・深層学習アルゴリズムを開発し，生体および環境サンプルへと応用してきた【1-4】．本研究では，NMR 計測によって得られる代謝物の構造情報のみならず緩和時間に関する情報にも着目し，緩和減衰曲線の解析に機械学習の各種手法を導入することにより，産地判別技術や環境評価技術として応用可能な緩和時間プロファイリング技術の構築を行った．構築した本手法を用いて多様な魚類筋肉の緩和減衰曲線を解析したところ，緩和時間プロファイルから魚類の種や生息地域に関する特徴を捉えることが可能であった．また，データ駆動型アプローチと緩和時間プロファイリングを組み合わせることにより，魚類の特性（回遊性等）や生息環境（根魚，底層魚等）の違い等の特徴を捉えることも可能であった．

【参考文献】
[1] Date, Y. and Kikuchi, J., Anal. Chem., 90, 1805－1810, (2018); [2] Asakura, T., Date, Y. and Kikuchi, J., Anal. Chim. Acta, (in press.); [3] Shiokawa, Y., Date, Y. and Kikuchi, J., Sci. Rep., 8, 3426, (2018); [4] Oita, A., Tsuboi, Y., Date, Y., Oshima, T., Sakata, K., Yokoyama, A., Moriya, S. and Kikuchi, J., Sci. Total Environ., 636, 12－19, (2018).

Characterization of intact fish muscles based on relaxation profiling with data-driven approach

○Yasuhiro Date[1,2], Feifei Wei[1], Yuuri Tsuboi[1], Tomoko Shimizu[1], Kenji Sakata[1], Jun Kikuchi[1,2,3]
([1]RIKEN CSRS, [2]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [3]Grad. Sch. BioAgriSci., Nagoya Univ.)

Key words machine learning, relaxation time, metabolomics, benchtop NMR

1Lp16 血漿メタボロミクスに資する固相誘導体化法を用いた GC/MS 分析法の開発

○新川 翔也[1], 佐々野 僚一[2], 古野 正浩[1], 福﨑 英一郎[1]
（[1]阪大院・工, [2]アイスティサイエンス）
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

ガスクロマトグラフィー質量分析法（GC/MS）によるメタボロミクス分析においては，誘導体化（トリメチルシリル化）が必要不可欠である．しかしこれらの誘導体化物は不安定であり，オートサンプラーでの待機時間中に他の化合物へと変化するため，GC/MS を用いた多検体分析において大きな問題となっている．それに加えて，サンプル抽出→遠心濃縮→凍結乾燥→誘導体化といった煩雑な前処理工程を行う必要があり，各工程で誤差が蓄積されるため，作業者の技量がデータの質に大きく反映される．この課題を解決するために，我々は固相誘導体化法を用いたオンライン GC/MS システムを提案している．本発表では当システムの概要に加え，前処理としての従来法と固相誘導体化法を比較した当該メソッドの有用性について報告する．
固相誘導体化法を用いた前処理手順は以下のとおりである．サンプルとしてヒト血漿を用いた．はじめに血漿サンプルに抽出溶媒（水およびアセトニトリル）を加え，その抽出溶液を陽イオン・陰イオン交換複合固相担体に注入し，有機酸・アミノ酸・糖類などを保持させた．50％水/アセトニトリル溶液で糖類を除去した後，残存水をアセトニトリルで除去した．その後，誘導体化試薬を含浸させ，固相上で誘導体化反応を行った．最後にトルエンで溶出した液を胃袋型インサートへ直接注入し GC/MS 分析を行った．当手法におけるサンプル抽出後から GC/MS 分析開始までの前処理時間は約 10 分であった．これは従来法での処理時間（10 時間以上）と比較して非常に短い処理時間であった．前処理時間の短縮により GC/MS のバッチ分析中に誘導体化を行うことが可能となり，誘導体化後の待機時間をゼロに統一することができる．また，本分析法は従来法と比較して少量・低濃度のサンプルを高感度に分析することが可能である．

Development of GC/MS analytical method by using solid phase derivatization for plasma metabolomics

○Shoya Arakawa[1], Ryoichi Sasano[2], Masahiro Furuno[1], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Aisti Sci.)

Key words metabolic analysis, pretreatment, GC/MS, plasma

1Lp17 光切断性ペプチドアレイと質量分析計を組み合わせた新規アッセイ法による，2 種プロテアーゼ間の切断同等性評価

○栗本 昌樹[1], 久保 智里[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おり，酵素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，食品加工に用いられる産業用酵素は多種多様な活性を有しており，その切断特異性が明らかになっていないものは多い．本研究では光切断性ペプチドアレイと質量分析計を併用し，配列網羅的に酵素切断部位を同定する技術を開発した．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．本発表では 2 酵素間の切断比較について，既存の分析技術では困難であった配列レベルでの定量的同等性評価結果を示し，製品品質向上を目的とした既存酵素代替スクリーニングへの応用可能性を報告する．
【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．酵素溶液中でアレイを加水分解処理し，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・回収したペプチド断片の質量を分析し，分析結果をもとに酵素の切断部位を特定した．
【結果】カゼインを原料とした，ブタおよびウシ膵臓由来のパンクレアチン加水分解物は，HPLC を用いた分子量分画により同等性の高い分子量分布を描くことができる．一方，カゼインのアミノ酸配列をターゲットに，本技術を用いて各由来の 2 種パンクレアチンを切断評価したところ，酵素毎の特有の切断パターンを特定することができたと同時に，切断パターンの一致率が 90%を超える結果を得た．本技術は分子量分布のような定性的な同等性だけでなく，配列レベルでの定量的な情報を示すことができるため，今後の製品開発において幅広い応用が期待できる．

Evaluation of cleavage equivalence between two proteases by a novel assay technique that combines photo-cleavable peptide array and mass spectrometer

○Masaki Kurimoto[1], Chisato Kubo[1], Kazunori Shimizu[2], Hiroshi Ochi[1], Fumiaki Abe[1], Hiroyuki Honda[2,3]
([1]Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [2]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [3]PME, Nagoya Univ.)

Key words photo-cleavable peptide array, LC/MS, protease, cleavage equivalence

1Mp01 亜硝酸酸化細菌における Toxin-Antitoxin 機構の生理学的意義の考察

○葵 理恵[1,2], 宮本 龍樹[1,2], 横田 亜紀子[2], 大田 悠里[1,2], 常田 聡[1], 野田 尚宏[1,2]
（[1]早大院・先進理工, [2]産総研・バイオメディカル）
noda-naohiro@aist.go.jp

亜硝酸酸化細菌は窒素循環や排水処理における硝化反応の第 2 反応を担う細菌で，地球科学的にも生物工学的にも重要な役割を果たす．しかしながら，増殖速度が遅いことや特定の環境下で休眠状態に容易に移行することから本微生物の培養は困難であり，その生理・生化学的知見は不足している．望ましくない環境下において自身の転写翻訳を制御し，増殖を抑制することは微生物の生存戦略のひとつであることが近年明らかとなってきたが，その代表的な機構として Toxin-Antitoxin 機構が挙げられる．とりわけ MazEF 機構は，MazF 分子による細胞内 RNA の配列特異的な切断を介して翻訳を包括的に制御し増殖抑制を行う．このことから，MazF の基質特異性を明らかにすることで，亜硝酸酸化細菌が増殖制御を行う分子機構を解明できるのではないかと考えた．
本研究では，MazF タンパク質を形質転換体より回収してカラムクロマトグラフィーを用いて精製した．配列既知の基質 RNA を MazF によって切断させた後，切断箇所である 5’末端にバーコード配列として短鎖 RNA を付加してシーケンシングを行い，バーコード配列を含むリードのみを元の基質 RNA 配列と照らし合わせることで，MazF の切断配列候補を選定した．さらに，この候補配列を含む蛍光修飾プローブを使用し，MazF と反応させた際の蛍光強度の経時的な変化を測定することで，シーケンシングで推定された配列を MazF が実際に切断することを確認した．また，宿主である亜硝酸酸化細菌のゲノム上におけるこの切断配列の出現頻度を MazF 発現時における各遺伝子が受ける翻訳阻害度の指標とし，本微生物が MazEF 機構を保持する生理学的意義を考察した．

Characterization of MazF-mediated RNA Cleavage in *Nitrospira*

○Rie Aoi[1,2], Tatsuki Miyamoto[1,2], Akiko Yokota[2], Yuri Ota[1,2], Satoshi Tsuneda[1], Naohiro Noda[1,2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words Toxin-Antitoxin, MazF, Sequence-specific cleavage, Nitrifying bacteria

1Mp02 *Streptomyces* sp. NT1 株由来 L-グルタミン酸オキシダーゼのフルコンセンサス設計による耐熱性の向上

○齋藤 貴広[1], 久保田 瞳[1], 林 優花[2], 中野 祥吾[3], 伊藤 創平[3], 浅野 泰久[4], 酒瀬川 信一[5], 杉森 大助[1,2]
（[1]福島大・共生システム理工, [2]福島大院・理工, [3]静県大・食栄, [4]富山県大・生工研セ, [5]旭化成ファーマ）
sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp

【背景・目的】
我々は，高い比活性を有する *Streptomyces* sp. NT1 株由来 L-グルタミン酸オキシダーゼ ($LGOX_{NT1}$) の耐熱性向上を目指し，温度因子を指標に部位特異的変異導入を行ってきた．これまでに，大腸菌発現 $LGOX_{NT1}$ (rWT) の点変異により，その耐熱性を 55℃から 60℃まで向上させることに成功したが，実用化に向けて更に高い耐熱性が要求される．そこで，人工タンパク質設計法によりフルコンセンサス型 LGOX (Fc_LGOX) を設計し，さらなる耐熱性向上を目指した．本発表では，耐熱性向上，酵素生産性，変異体の精製，諸特性解析について報告する．
【方法・結果と考察】
BLAST サーチにより $LGOX_{NT1}$ の類似配列 4919 配列を入手し，$LGOX_{NT1}$ と非相同アミノ酸残基（aa）を *in silico* 解析により同定した．非相同 aa のうち耐熱化が予想される 104 ヵ所の aa を相同 aa に置換することで，コンセンサス配列を有した Fc_LGOX を設計・遺伝子全合成し，Fc_LGOX 遺伝子を pET24a/*E. coli* BL21 (DE3) により発現させた．その結果，Fc_LGOX 発現株 cfe 中の LGOX 活性は 22.3 U/mL，比活性 2.52 U/mg-protein となり，rWT に比べ各々約 2.5 倍酵素生産性が向上した．さらに，Fc_LGOX は 65℃，30 min 活性を 100%維持し，rWT に比べ 10℃も耐熱性が向上した．また，Fc_LGOX について詳細な諸特性解析を行うために DEAE カラム精製を行った結果，LGOX 活性 31.8 U/mL，比活性 25.0 U/mg-protein の高純度活性画分を得た．現在，精製 Fc_LGOX の諸特性解析や，目的酵素の精製を簡略化するため pMAL-c5x vector を用いて MBP-tag 付加を進めるとともに，さらなる耐熱性向上を目指して独自の多重変異体設計と祖先型設計による $LGOX_{NT1}$ の改良を試みている．

Thermostability enhancement of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. NT1 by the full consensus design

○Takahiro Saito[1], Hitomi Kubota[1], Yuka Hayasi[2], Syogo Nakano[3], Sohei Ito[3], Yasuhisa Asano[4], Shin-iti Sakasegawa[5], Daisuke Sugimori[1,2]
([1]Fac. Symbio. Syst. Sci., Fukushima Univ., [2]Grad. Sch. Symbio. Syst. Sci., Fukushima Univ., [3]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., [4]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [5]Asahi Kasei Pharma Corp.)

Key words L-glutamate oxidase, full consensus design, artificial protein design, thermostability enhancement

1Mp03 リンゴ酸デヒドロゲナーセの Closed 構造不安定化による比活性の向上および低温適性化

○下澤 勇弥, 西矢 芳昭
（摂南大院・理工）
nisiya@lif.setsunan.ac.jp

【目的】リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（MDH）は TCA サイクルにおいてニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）依存的にリンゴ酸からオキサロ酢酸（OAA）を生成する酸化還元酵素である．また，AST 測定や重炭酸イオン測定等の臨床検査薬用酵素として既に応用されており，その他にも免疫検査用標識酵素やバイオセンサーへの応用が期待されている非常に用途の広い酵素である．*Geobacillus stearothermophilus* 由来 MDH（gs-MDH）は基質親和性が非常に高く熱安定性にも優れているため，他の MDH と比べ臨床検査薬用酵素として有用性が高い．しかし，好熱性細菌由来で至適温度が 70℃と高く，臨床検査基準法の反応温度（30℃）では最大活性の 13%しか発揮できない．そこで我々は gs-MDH の立体構造を基に活性発現メカニズムを考察し，活性部位周辺に部位特異的変異を導入することで，30℃における反応速度の向上（低温適性化）を試みた．
【方法・結果】gs-MDH の変異デザインのため，活性部位の可動ループが開いた Open 構造と基質の結合により可動ループが閉じた Closed 構造の 2 つのコンホメーションをホモロジーモデリングにより予測した．その結果 Open 構造は多くのイオン結合により非常に安定化されている一方で，Closed 構造では OAA が安定化された構造に変化していた．このことから，Open 構造と Closed 構造のコンホメーション変化が，gs-MDH の反応速度や基質親和性に重要であることが推察された．そこで，Closed 構造における可動ループ周辺の Gly を側鎖の大きい Phe 等に置換し意図的に Closed 構造を不安定化させることで，ターンオーバーの上昇を試みた．その結果，30℃付近の低温における反応速度が野生型と比べ 2.2～2.9 倍向上した．また，変異体の活性化エネルギーは野生型の約 50%程度まで低下した．

Improved specific activity and at low temperature by destabilization of Malate dehydrogenase closed form

○yuya Shimozawa, Yoshiaki Nishiya
(Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

Key words malate dehydrogenase, protein engineering, destabilization, low temperature optimization

1Mp04 メカノエンザイム・ダイナミン GTPase によるアクチン線維束化機構の解析

○山田 浩司[1], 阿部 匡史[1], 竹田 哲也[1], 高島 英造[2], 森田 将之[2], 竹居 孝二[1]
（[1]岡山大院・医歯薬, [2]愛媛大・プロテオサイエンスセンター）
hiroyama@md.okayama-u.ac.jp

ほ乳類のダイナミンは，分子量約 85-100kDa の GTPase である．また，ダイナミンは，細胞膜やアクチン線維上で重合し，自身の GTPase 活性と共役して構造をダイナミックに変化させ，細胞膜やアクチン線維に対して，機械的に「曲げる」「絞る」「切る」「束ねる」作用を持つ，いわゆるメカノエンザイムとして知られている．生理的には，エンドサイトーシス，小胞輸送，オルガネラの分裂や細胞移動に必須な分子である．
我々は，これまでに，ダイナミンがメカニカルにアクチン線維を束ねる現象を発見してきた．今回，GTPase とその構造機能相関を解析するため，ダイナミンの疾患変異体のアクチン動態への影響を調べた．細胞に対する効果では，K562E 変異体は，細胞内のストレスファイバーを減少させ，異常なアクチン線維の凝集を促進した．さらに，コムギ無細胞タンパク発現系を用いてダイナミンタンパクを調製し in vitro で解析する系を構築した．この系を用いて精製したダイナミンとアクチン線維を反応させたところ，ダイナミン重合体が，スペーサーとなり数本のアクチン線維をまとめていることが新たに判明した．今後，GTPase との連関を詳細に調べる予定である．

Actin bundling mechanism by dynamin GTPase

○Hiroshi Yamada[1], Tadashi Abe[1], Tetsuya Takeda[1], Eizo Takashima[2], Masayuki Morita[2], Kohji Takei[1]
([1]Grad. Sch. Med. Dent. Pharm, Sci., Okayama Univ., [2]Proteo-Science Center, Ehime Univ.)

Key words actin, cytoskeleton, GTPase

1Mp05 イオン液体を用いた標識酵素を含む各種酵素に対する長期安定性・高温耐熱性の評価

○金子 恒太郎, 河合 功治
（ミヨシ油脂）
KANEKOK@so.miyoshi-yushi.co.jp

【背景・目的】
酵素は食品や医薬品分野の他，様々な分野において不可欠な材料であるが，非生理的環境下では容易に変性し，その優れた活性を失ってしまう場合が多く，酵素の安定化技術の探索が以前より行われてきた．これまでに我々は，4 級アンモニウム塩型イオン液体に着目し，中でも，特定官能基を導入したイオン液体が酵素に対する長期安定性，耐熱性を付与することを見出した．
今回の発表では，本イオン液体の酵素安定化剤への応用を目指して，イオン液体濃度（高濃度から低濃度）と酵素安定化との相関，工業分野で必要とされる～60℃の高温条件下での安定化効果，免疫染色や ELISA に使用される標識酵素として需要の高いペルオキシダーゼの長期安定性，耐熱性について検討した．

【方法・結果】
イオン液体の 1～86%水溶液に酸化還元，加水分解酵素をそれぞれ溶解し，25～60℃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，保存温度においても，リファレンス（アルブミン等の各種安定化剤）より高い酵素活性を示した．
さらに，イオン液体水溶液を用いてペルオキシダーゼの安定化を試みた．溶液・室温保存が困難なペルオキシダーゼは，リファレンス（アルブミン等の各種安定化剤）の系では安定化効果が低かったが，イオン液体溶液においては，高い活性保持性を示した．
以上の結果より，本イオン液体が，高温下，いずれの濃度においても各酵素の安定化効果に優れ，特に，安定性の低いペルオキシダーゼに対しても安定化効果を示すことが明らかとなった．
これらの結果は，本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始めとする生体高分子の安定化剤への有用性が高いことが示唆された．

Long-term stability and thermo stability of various enzymes including labeling enzyme by ionic liquids

○Kotaro Kaneko, koji Kawai
(Miyoshi Oil & Fat Co. Ltd.)

Key words ionic liquid, enzyme, long-term stability, thermo stability

1Mp06 Chamaemelum nobile および Durio zibethinus 由来のアルコールアシルトランスフェラーゼの精製と酵素化学的諸性質の解明

○大島 遼太郎[1], 吉川 千晶[1], 森 利明[1], 加藤 康夫[1],
七田 沙耶香[1,2], 礒部 公安[1,2], 元島 史博[1,2], 石田 裕幸[1,2],
浅野 泰久[1,2]
（[1]富山県大・工, [2]JST, ERATO）
asano@pu-toyama.ac.jp

【背景と目的】植物は多種多様な芳香成分を合成し，その中でアルコールアシルトランスフェラーゼ（AAT）は，エステル化合物の合成を触媒する酵素である．AAT はアシル CoA の CoA をアルコールで置換しエステル化する触媒作用を持つ．AAT を用いて，メタクリリル CoA（Met-CoA）とアルコールから ME を合成する研究は，グリーンケミストリーの観点からも意義がある．
【方法と結果】ME を香気成分中に含む植物をスクリーニングし，複数の植物に AAT 活性を確認した．次に，カモミール（Chamaemelum nobile）およびドリアン（Durio zibethinus）が Met-CoA に対して高い AAT 活性を有することを確認した．ドリアンから AAT を精製し，DzibAAT 遺伝子のクローニングを行った．ドリアンおよびカモミール由来 AAT を大腸菌で発現させ，抽出精製を行った．本酵素の活性は，反応によって生じるエステル化合物を抽出し，ガスクロマトグラフィーによって定量することで測定した．本酵素はいずれも分子量 53,000 のモノマー酵素であり，至適 pH は 8.0 付近である．本酵素はいずれも主に短鎖のアルコールに対して基質特異性が高く，またドリアン由来の AAT はアセチル CoA，カモミール由来の AAT はメタクリリル CoA に対して基質特異性が高いことが確認された．本報告では，これらの実験の経緯を踏まえ，主として両酵素の酵素化学的諸性質を比較して報告する．

Purification and characterization of alcohol acyltransferases from Chamaemelum nobile and Durio zibethinus

○Ryotaro Ohshima[1], Chiaki Yoshikawa[1], Tomoaki Mori[1], Yasuo Kato[1],
Sayaka Shichida[1,2], Isobe Kimiyasu[1,2], Fumihiro Motojima[1,2], Yuko Ishida[1,2],
Yasuhisa Asano[1,2]
([1]Fac. Eng., Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

Key words Methyl methacrylate, Alcohol acyltransferase, Green chemistry

1Mp07 ハロアルキル有機リン酸トリエステル加水分解酵素中のシグナル様ペプチドの機能解析

○今野 聖矢, 今井 俊宏, 阿部 勝正, 高橋 祥司, 解良 芳夫
（長岡技科大）
katsuabe@vos.nagaokaut.ac.jp

【目的】ハロアルキル有機リン酸トリエステル類の一つである tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP)はプラスチックの可塑剤や難燃剤として広く利用されてきたが,近年,発がん性, 難分解性,変異原性が報告されたことから,本化合物の生態系への影響が懸念されている.当研究では野外試料から TCEP 分解能を有する *Sphingobium* sp. TCM1 株を単離し，その初発分解酵素であるハロアルキル有機リン酸トリエステル加水分解酵素（HAD）の精製，諸特性解析を行ってきた．その結果，本酵素は一般的なシグナルペプチドとは全く異なる非常に長いシグナル様配列を有する可能性が示唆された．本研究では TCM1 株における本シグナル様ペプチドの機能解析を目的として，本領域欠損 HAD を発現する TCM1 変異株を構築し，種々の解析を行った．【方法及び結果】変異型 *had* 遺伝子をマーカーレス遺伝子欠失用ベクターである pAK405 を用い，野生型 *had* 遺伝子と置き換えるように相同組み換えで TCM1 株ゲノム中に挿入した．構築した TCM1 株変異体についてはコロニー PCR 解析によって確認を行った．野生型 TCM1 株および変異株を *had* 遺伝子発現条件下（無機リン酸制限下）で培養し，得られた菌体を用いて TCEP 分解活性を測定したところ，野生株のみその分解活性を示し，変異株は TCEP を全く分解しなかった．また，両菌株の生育特性についても解析した結果, 無機リン酸存在下では生育速度に違いは見られなかったのに対し，TCEP を唯一のリン源とした条件下では野生株のみ生育し，変異株については全く生育しなかった．以上の結果より，本シグナル様配列は HAD の発現または活性に必須であることが明らかとなった．

Investigation of the role of signal-like sequence of haloalkylphosphorus hydrolase

○Seiya Konno, Toshihiro Imai, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi, Yoshio Kera
(Nagaoka Univ. Technol.)

Key words signal peptide, organophosphorus hydrolase

1Mp08 変異型ハロアルキル有機リン酸トリエステル加水分解酵素の大腸菌発現系の構築と諸特性解析

○阿部 勝正, 田中 成美, 高橋 祥司, 解良 芳夫
（長岡技科大）
katsuabe@vos.nagaokaut.ac.jp

【目的】Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP)は難燃剤等に使用されるハロアルキル有機リン酸トリエステル類の一種で，発ガン性や神経毒性を有することから生態系への影響が懸念されている．これまで我々は TDCPP 分解菌 *Sphingomonas* sp. TDK1 株，*Sphingobium* sp. TCM1 株由来のハロアルキル有機リン酸トリエステル加水分解酵素 (Sm-HAD，Sb-HAD)に関する種々の諸特性解析をおこない，両酵素は約 90%のアミノ酸配列の同一性を示すにも関わらず，酵素活性や金属キレート剤への感受性など特性の違いを示すことを明らかにしている．これらの特性の違いはそれぞれの酵素特有の配列に起因するものと考えられるがその詳細は明らかではない．本研究では，Sb-HAD 特有の配列を挿入した変異型 Sm-HAD の諸特性解析を行うことで，それぞれの HAD の構造・機能に関する知見を得ることを目的とした．
【方法及び結果】HN タグを C 末端に融合させた Sm-HAD-HN，Sb-HAD-HN，変異型 Sm-HAD-HN の大腸菌発現系を構築した．上記三種のタグ融合 HAD は大腸菌 BL21(DE3)において活性型酵素として発現することが示されたことから，本酵素を金属アフィニティーカラムで精製した後，至適温度・pH や補因子等の酵素学的諸特性について解析を行った．野生型酵素及び変異型酵素の活性測定の結果，変異型酵素は Sm-HAD-HN の 1/3 程度の活性しか示さず，Sb-HAD の高酵素活性という特徴には本特有配列は関与していない可能性が示された．また，他の諸特性解析の結果からは，この特有配列は至適温度と金属キレート剤に対する感受性に影響を与えず，pH 感受性や金属嗜好性へ関与している可能性が示された．上記の結果より，本研究で用いた Sb-HAD 特有配列は両酵素間で見られる大きな諸特性の違いに関与しておらず，Sm-HAD 特有配列または他のアミノ酸残基がそれらに関与していることが考えられた．

Expression and characterization of a mutated form of the haloalkylphosphorus hydrolase

○Katsumasa Abe, Narumi Tanaka, Shouji Takahashi, Yoshio Kera
(Nagaoka Univ. Technol.)

Key words *Sphingomonas*, hydrolase, Organophosphorus compounds

1Mp09 イノシトール遊離能をもつフィターゼ Phy9-3B の触媒機構の解析

○武生 みのり[1], 佐々木 海[1], 尾瀬 農之[2], 阿部 歩[1], 曾根 輝雄[1]
（[1]北大院・農, [2]北大院・生命科学）
sonet@chem.agr.hokudai.ac.jp

【研究背景】 フィチン酸（IP_6）は，麦や大豆などの植物種子中における主要なリン酸貯蔵形態である．IP_6 から無機リン酸を段階的に遊離させる酵素であるフィターゼは単位動物の栄養効率を改善するために飼料に添加されているが，その多くは IP_6 のリン酸基全てを加水分解することはできない．当研究室で得た *Klebsiella pneumoniae* 9-3B 株由来のフィターゼ Phy9-3B は IP_6 を完全分解することができる．そこで本研究では Phy9-3B の触媒機構の解明を目的とした．
【方法と結果】 Phy9-3B を組換え生産・精製し，X 線構造解析により立体構造を決定した．Phy9-3B とイノシトール遊離能を持たないことが報告されている *Eschelichia coli* ATCC12435 株由来のフィターゼ AppA 間の立体構造比較を行ったところ，基質結合部位におけるイノシトール 1 リン酸（IP_1）との相互作用に Tyr238 が関わっていることが予想された．Phy9-3B の Tyr238 はイノシトールの遊離に必須のアミノ酸残基であると仮定し，本アミノ残基とこれに対応する AppA 上のアミノ酸残基 Phe254 を交換した 1 アミノ酸残基置換体 Phy9-3B^{Y238F} 及び AppA^{F254Y} をそれぞれ大腸菌に発現させ，純度 95%以上の酵素サンプルを獲得した．次に，これら 4 種のフィターゼについて，IP_6 と IP_1 の 2 つの基質に対するフィターゼ活性試験を行い，それぞれの比活性を求めた．その結果，両酵素において基質結合部位におけるアミノ酸残基が Tyr の場合，Phe の場合に比べて IP_6 に対する比活性が高かった．さらに，フィチン酸触媒活性あたりのイノシトール遊離活性 (IP_1 活性 / IP_6 活性) を算出した結果，1 アミノ酸置換により IP_6 活性が大きく変化したために Phy9-3B ではこの値が増加し，AppA では低下したことがわかった．これらより，Phy9-3B の基質結合部位における Tyr238 はイノシトール遊離活性よりもむしろフィチン酸触媒活性に寄与していたことが示唆された．

Analysis of catalytic mechanism of phytase Phy9-3B with inositol liberating activity

○Minori Takyu[1], Kai Sasaki[1], Toyoyuki Ose[2], Ayumi Abe[1], Teruo Sone[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ.)

Key words phytase, inositol, phosphatase, phytic acid

1Mp10 シトクロム P450BM3 と酵素活性化分子を利用した大腸菌内でのベンゼンの直接酸化

○唐澤 昌之[1], 柳澤 颯太[1], 荘司 長三[1,2], 渡辺 芳人[3]
([1]名大院・理, [2]JST CREST, [3]名大・物国セ)
shoji.osami@a.mbox.nagoya-u.ac.jp

シトクロム P450BM3 (P450BM3)はヘム(鉄ポルフィリン錯体)を活性中心とする金属酵素で，長鎖脂肪酸の亜末端を水酸化する．P450BM3 は長鎖脂肪酸の水酸化に適した活性部位を持つため，ベンゼンやプロパンのような有機小分子に対する活性は極めて低い．我々は，長鎖脂肪酸を模した擬似基質(デコイ分子)を用いて，変異導入することなく P450BM3 の酵素機能を改変する「基質誤認識システム」を報告している．デコイ分子は基質と誤認識されて P450BM3 内部へ取り込まれ，酸化活性種の生成を誘起する．また，デコイ分子は鎖長が短く設計されており，ヘム上部に新しい反応空間を作り出す．このため，生成した酸化活性種によって非天然基質の水酸化反応が効率的に進行する．
我々は，パーフルオロカルボン酸(PFC)がベンゼンやプロパンの水酸化を促進することを報告し，PFC にアミノ酸修飾を施したデコイ分子がより高い活性を示すことを明らかとしている．さらに近年，フッ素を含まないカルボン酸にアミノ酸を修飾したデコイ分子が，ベンゼンの水酸化を著しく促進することを報告している．
しかし，P450BM3 の反応で消費される補酵素 NADPH は極めて高価であるため，*in vitro* での酵素反応系は実用性に乏しいことが課題である．そこで本研究では，基質誤認識システムと菌体内の補酵素再生系を組み合わせた新しい反応システムを開発し，P450BM3 を過剰発現させた大腸菌内でベンゼンからフェノールへの直接変換に挑戦した．

Direct Hydroxylation of Benzene to Phenol Utilizing Cytochrome P450BM3 and Enzyme Activators in *Escherichia coli* Whole-Cell Biocatalyst

○Masayuki Karasawa[1], Sota Yanagisawa[1], Osami Shoji[1,2], Yoshihito Watanabe[3]
([1]Dept. Chem., Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ, [2]JST CREST, [3]Res. Cent. Mat. Sci., Nagoya Univ)

Key words P450, *Escherichia coli*, hydroxylation, benzene

1Mp11 ゴマ由来セサミノール配糖体特異的な新規配糖体化酵素の機能解析

○及川 大樹[1], 和氣 駿之[1], 小埜 栄一郎[2], 村田 純[3], 白石 慧[3], 堀川 学[3], 中山 亨[1]
([1]東北大院・工, [2]サントリーグローバルイノベーションセンター, [3]サントリー生命科学財団)
nakayama@seika.che.tohoku.ac.jp

【緒言】ゴマ（*Sesamum indicum* L.）中に含まれるリグナンは抗酸化活性を有し，その健康機能性から産業的に広く用いられている．セサミノールはゴマリグナンの一つであり，ゴマ種子中においては三糖が付加したセサミノールトリグルコシド（STG）として存在している．STG は β(1→6) および β(1→2) グルコシド結合による糖鎖構造を持ち，これまでにセサミノール配糖体の 6’位のグルコース付加を触媒する UGT94D1 が報告されたが[1]，2’位のグルコース付加を触媒する酵素は同定されていなかった．本研究では，STG の生合成経路の解明のため，ゴマの *Glycoside-specific glycosyltransferases*（*GGTs*）の探索とその詳細な酵素機能解析を行った．
【方法と結果】ゴマ種子を 6 つの成熟ステージに分類し，RNA-seq 解析を行った．UGT94D1 と共発現する 3 つの GGT 遺伝子を選抜し，選抜した *20601*, *21646*, *21842* の各酵素遺伝子を大腸菌発現ベクター pET15b に導入した．このベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3) 株を形質転換し，各酵素遺伝子を His_6-tag 融合タンパク質として異種発現させ，ニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより精製した．その後，セサミノールやセサミノール配糖体，フラボノイド類を糖受容体，UDP-グルコースを糖供与体として酵素反応を行い，反応生成物を HPLC により解析した．その結果，まず，20601 は，4 種類のセサミノール光学異性体のうち，2-エピセサミノールに対してのみ弱い活性を示すことが確認された．一方，21842，21646 は，セサミノール配糖体に対して高い活性を示し，それぞれ 2’位，6’位へのグルコース付加を触媒することが明らかとなった．また，21842，21646 の触媒効率はそれぞれ基質の種類に因らず同程度の値であり，この触媒効率は UGT94D1 とも同程度であることが示された．
【参考文献】[1] Noguchi, A., *et al*, *Plant J.*(2008)

Functional analysis of novel sesaminol glycoside-specific glucosylation enzymes from sesame (*Sesamum indicum* L.)

○Daiki Oikawa[1], Toshiyuki Waki[1], Eiichiro Ono[2], Jun Murata[3], Akira Shiraishi[3], Manabu Horikawa[3], Toru Nakayama[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Suntory Global Innovation Center (SIC), [3]Suntory Fdn. Life Sci. (SUNBOR))

Key words *Sesamum indicum*, Lignan, Sesaminol, Glucosyltransferase

1Mp12 The additional N-terminal domain of the beta-propeller phytase of *Pseudomonas* sp. FB15 serves to increase low-temperature activity and catalytic efficiency

○WonJe Jang, Hae Dae Park, Yu Bin Choi, In-Soo Kong
(Dept. Biotechnol., Pukyong Natl. Univ., Busan, Republic of Korea)
iskong@pknu.ac.kr

Pseudomonas sp. FB15 producing phytase with a high activity at low temperature was isolated from foreshore soil. The phytase gene was cloned and sequenced. Molecular modeling predictions using its amino acid sequence indicated that it belongs to the group of beta-propeller phytases (BPPs). However, it differs from the conventional structure of BPPs in the number of propeller-shaped domains. Most BPPs have a propeller with six blades that consist of four or five beta-sheets. However, the BPP from the isolated strain contained a C-terminal domain containing a conserved BPP sequence and also an N-terminal domain consisting of an additional 275 amino acids. The characterization of recombinant BPP from *Pseudomonas* sp. FB15 (PSphy) revealed the highest activity to be at pH 6 and 40°C. Additionally, it showed that more than 80% of optimal activity was retained at a relatively low temperature of 25°C. In addition, $CaCl_2$ was required for activity, and the optimal concentration of $CaCl_2$ was 4mM. The activity at low temperature was reduced in a recombinant protein from which the N-terminal domain was removed, as was catalytic efficiency. These results suggest that the N-terminal domain is required for the low temperature activity and high catalytic efficiency of PSphy.

The additional N-terminal domain of the beta-propeller phytase of *Pseudomonas* sp. FB15 serves to increase low-temperature activity and catalytic efficiency

○WonJe Jang, Hae Dae Park, Yu Bin Choi, In-Soo Kong
(Dept. Biotechnol., Pukyong Natl. Univ., Busan, Republic of Korea)

Key words beta-propeller phytase, alkaline phytase, phytate, *Pseudomonas* sp.

1Mp13 *Methylobacterium extorquens* AM1 のランタノイド依存型メタノールデヒドロゲナーゼの解析

吉川 友理[1], 北村 純一[1], 矢野 嵩典[1], 中川 智行[2], 谷 明生[3], ○三井 亮司[1]
([1]岡山理大・理, [2]岐阜大・応生科, [3]岡山大・資源植物科研)
rmitsui@dbc.ous.ac.jp

【目的】植物に共生するメチロトローフ細菌である *Methylobacterium* 属は複数のメタノールデヒドロゲナーゼ(MDH)を保持し，ランタノイドの有無や炭素源に応答して発現をコントロールしている．これらのそれぞれの役割は明らかになっていないが，*Methylobacterium* が植物葉上で共生する過程において重要な役割を担っているのではないかと推定している．本研究で用いた *M. extorquens* AM1 は，PQQ を補酵素とする MxaFI, XoxF1, XoxF2 の少なくとも 3 つの MDH を有している．また，MxaFI は Ca^{2+}を補因子として用いるのに対し，XoxF1, XoxF2 は La^{3+}などの軽ランタノイドを補因子としてだけでなく，発現調節にも関与することを明らかにしてきた．今回，ランタノイド依存型の XoxF1 と XoxF2 に着目し，解析用に各種の組換え株を作製して XoxF1, XoxF2 の解析とレポーター遺伝子を用いた発現解析を行った．
【方法・結果】XoxF1 と XoxF2 に His-tag を融合させて *M. extorquens* AM1 の各 MDH 遺伝子破壊株に導入することで XoxF1 または XoxF2 単独で発現する株を作製した．Ni アフィニティーカラムを用いて精製を行い，SDS-PAGE にて確認した結果，XoxF1, XoxF2 のバンドとともに 20kDa の位置にバンドが確認された．このバンドを PMF 解析およびエドマン分解によるプロテインシーケンスを行ったところ，Formaldehyde activating enzyme(Fae)であることが明らかになった．Fae はメタノール代謝において MDH によるメタノールの酸化で生じたホルムアルデヒドと C_1 キャリアーである H_4MPT との結合を触媒することから，ホルムアルデヒドの速やかな毒性回避に関与するための代謝酵素複合体である可能性が考えられた．XoxF1 と XoxF2 はエドマン分解による N 末端解析よりシグナル配列をもつペリプラズム酵素であると考えられ，Fae の局在に関してもさらなる検討が必要であると考えている．

Analyses of lanthanides-dependent methanol dehydrogenase in *M. extorquens* AM1

Yuri Yoshikawa[1], Junichi Kitamura[1], Takanori Yano[1], Tomoyuki Nakagawa[2], Akio Tani[3], ○Ryoji Mitsui[1]
([1]Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., [2]Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [3]IPSR., Okayama Univ.)

Key words Plant symbiotic bacteria, methylotroph, *Methylobacterium*, Lanthanides

1Mp14 光化学系 II 再構成メタンモノオキシゲナーゼ膜画分を用いたメタン酸化反応

近藤 龍一, 森 史也, 伊藤 栄紘, ○蒲池 利章
（東工大院・生命理工）
tkamachi@bio.titech.ac.jp

天然ガス主成分であるメタンの有効利用に向け，メタンのメタノールへの選択的酸化反応が注目されている．メタン資化細菌由来メタンモノオキシゲナーゼは常温常圧下，一段階でメタン/メタノールの変換を触媒する．この反応には電子供与体が必要である．そこで，本研究では，メタンモノオキシゲナーゼと好熱性シアノバクテリア由来光化学系 II を組み合わせて，光駆動型酸化反応系を構築した．光化学系 II は光照射下，水から電子を受容し，キノンを還元することができる．この光化学系 II をメタン資化細菌の膜画分に再構成し，光照射することで，水から得た電子が膜中のキノンを介してメタンモノオキシゲナーゼへ伝達され，酸化反応が進行することが分かった．本研究により，無尽蔵な光エネルギーを利用した低エネルギーのメタノール生産が期待できる．

Photoinduced methane oxidation of by the PSII reconstituted membrane containing methane monooxygenase

Ryuichi Kondo, Fumiya Mori, Hidehiro Ito, ○Toshiaki Kamachi
(Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words methane monooxygenase, photosystem II

1Mp15 *Clostridium cellulovorans* 743B 由来エンドグルカナーゼ E の酵素学的諸性質

○幸崎 涼, 三宅 英雄
（三重大院・生資）
miyake@bio.mie-u.ac.jp

【目的】エンドグルカナーゼ E（EngE）は嫌気性細菌 *Clostridium cellulovorans* が生産する糖質分解酵素である．この酵素は触媒ドメイン，糖質結合モジュール，ドックリンドメイン，そして 3 つの Surface layer homology ドメインと多くのドメインから構成され，糖質分解酵素の中でもユニークな酵素の 1 つである．本研究では EngE の特性を明らかにすることを目的とし，基質特異性の評価と反応速度論的解析を行った．
【方法・結果】組換え体 EngE を作製し，様々な多糖と反応させ，その生成物を TLC により分析した．その結果，CMC と PASC を基質とした場合は主に 2 糖と 3 糖を生成したが，微結晶セルロースでは生成物が検出されなかった．これより，EngE は結晶度の低いセルロースを好んで分解するセルラーゼであると分かった．また glucomannan や lichenan，beta-glucan では生成物を検出した一方で，xylan では検出されなかった．glucomannan，lichenan，beta-glucan の主鎖にはセルロースと同じグルコース残基が含まれるため，EngE はそれらの beta-1,4 グリコシド結合を加水分解したと考えられる．次に CMC を基質として反応速度論的解析を行った．その結果，基質濃度が 3 mg/mL 以上になるとミカエリスメンテンモデルから逸脱し，反応初速度が低下する現象が見られた．そこで得られたデータに複数の基質阻害モデルを充て，解析したところ，酵素に 2 つの基質が結合した ESS 複合体からも生成物を生産するモデルに適合した．さらに ESS 複合体の形成において，基質の結合に順序はなく，基質は酵素の結合サイトにランダムに結合し得ることが明らかとなった．

Characterization of Endoglucanase E from *Clostridium cellulovorans* 743B

○Ryo Kozaki, Hideo Miyake
(Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

Key words *Clostridium cellulovorans*, endoglucanase, kinetics, cellulase

1Mp16 バイオマス分解酵素の大規模スクリーニングで見出した希少放線菌

○竹中 武蔵[1], Lee Jae Min[2], Pamella Apriliana[2], 柏木 紀賢[1], Prihardi Kahar[1], 荻野 千秋[2], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大院・工）
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

放線菌は約 2200 種からなる多様性を有するバクテリアであり，自然環境の様々な場所から単離される．そして，自然環境中においては植物バイオマスや動物バイオマスなどを分解して炭素源を獲得している．そこで，本研究では植物バイオマスからのバイオリファイナリーを志向して，高分解能を有する酵素製剤の探索を実施した．
具体的には，NBRC 株 850 種をスクリーニングにかけて段階的に選抜を実施した．本研究では，モデルバイオマスとして希硫酸前処理ソルガムバガスを取り上げて，酸性条件下でのスクリーニングを実施した．数種の放線菌がモデルバイオマスを高分解する酵素製剤を分泌していることを見出した．その中で最も高性能であった Nonomuraea fastidiosa についてさらなる解析を実施した．多くの放線菌でセルラーゼがバイオマスによって誘導されていることを示唆する結果と，Nonomuraea fastidiosa がアクセサリー酵素を豊富に分泌していることを示唆する結果を得た．本研究の成果により，放線菌を用いたバイオリファイナリーの促進と，未利用放線菌の開拓が期待できる．

Large-scale screening of Actinobacteria for biomass degrading enzyme cocktail with higher titer

○Takenaka Musashi[1], Jae Min Lee[2], Pamella Apriliana[2], Norimasa Kashiwagi[1], Prihardi Kahar[1], Chiaki Ogino[2], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words actinomycetes, Biomass degrading enzyme, cellulase, Accessary enzyme

1Mp17 リン酸化合物加水分解酵素フィターゼの活性に重要なループ領域の変異解析

○和田 愛未, 林 勇樹, 新井 宗仁
（東大院・総合文化）
arai@bio.c.u-tokyo.ac.jp

【背景】リン酸化合物であるフィチン酸は，植物の種子に多く含まれるリン貯蔵物質である．しかし，ブタなどの単胃動物ではフィチン酸は分解されないため，家畜飼料から栄養素としてのリンを吸収することが困難である．そのため，フィチン酸から無機リンを放出できる酵素フィターゼが家畜飼料の添加剤として用いられている．本研究では，フィターゼの中でも特に活性の高い大腸菌由来のフィターゼ AppA に着目した．AppA の基質結合ポケットの前を横切るループには活性残基が含まれており，そのループの動きが基質進入や触媒効率を左右すると考えられている．しかし，ループ中の各残基が酵素の機能発現に果たす役割は未解明である．そこで本研究では，AppA の活性部位を含むループ領域（11 残基）の各残基の活性への寄与を明らかにするため，各残基を Ala と Gly に置換した 19 個の変異体を構築した．【手法】各変異プラスミドで大腸菌を形質転換し，液体培養を行った．菌体破砕上清を用いて酵素反応を行い，フィチン酸塩分解活性を求めた．菌体破砕上清を SDS-PAGE に供し，AppA のバンド強度で活性の規格化を行った．【結果・考察】活性残基である H17，基質結合残基である R16 の Ala, Gly 変異体において，活性の完全な消失がみられた．5 つの保存残基の Ala, Gly 変異体では，電荷をもつ残基では活性が失われた一方，電荷をもたない残基では活性の部分的な減少に留まった．これは，電荷をもたない保存残基は構造保持に関与しており，AppA の触媒反応に直接的には関わっていないためと考えられる．以上の結果から，ループ上の各残基が機能発現に果たす役割が明らかになった．また，本研究の成果は，高活性化 AppA 変異体を作製し，家畜のリン吸収効率を向上させる上で有用と期待される．

Mutational analysis of the loop region essential for the activity of phytase, a phosphate compound-hydrolyzing enzyme

○Manami WADA, Yuuki HAYASHI, Munehito ARAI
(Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo)

Key words phosphate compound, hydrolase, phytase, site-directed mutagenesis

1Mp18 海藻多糖由来の新しい希少糖であるアルギン酸デオキシ糖の製造方法

○三宅 英雄[1], 村瀬 祥光[1], 濱地 野乃香[2], モリ テツシ[3],
田中 礼士[1], 植田 充美[4], 柴田 敏行[1]
（[1]三重大院・生資, [2]三重大・生資, [3]農工大院・工, [4]京大院・農）
miyake@bio.mie-u.ac.jp

【目的】アルギン酸資化性微生物は，エンド型とエキソ型のアルギン酸リアーゼによってアルギン酸を単糖である不飽和ウロン酸にまで分解し，そのピラノース環が開裂した 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) を生成する．その後，DEH は DEH reductase (DehR) により 2-keto-3-deoxy-D-gluconate (KDG) に還元され，最終的にピルビン酸にまで変換される．DEH と KDG は中間代謝物であり，単離することは困難なため希少性が極めて高い単糖である．我々は，褐藻類を資化する微生物を対象としたスクリーニングを行い，*Falsirhodobacter* sp. alg1 からエンド型アルギン酸リアーゼ (AlyFRA) とエキソ型アルギン酸リアーゼ (AlyFRB) を報告した．さらに *Formosa haliotis* strain MA1 から DehR の存在を明らかにした．そこで本研究では，これらの酵素を用いることで海藻多糖由来の希少糖である DEH と KDG の製造方法を検討した．
【方法・結果】AlyFRA，AlyFRB，DehR の組換えタンパク質を作製した．アルギン酸ナトリウムを AlyFRA のみ，AlyFRB のみ，AlyFRA と AlyFRB の 3 通りで反応させ，反応液を TLC に供した結果，AlyFRB のみと AlyFRA と AlyFRB の両方では 1 つのスポットを検出した．さらに LC/MS で分析した結果，生成物は DEH であった．収率を検討した結果，最大 86.8 %の DEH を得ることに成功した．得られた DEH を NADH 存在下で DehR と反応させたところ，時間の経過とともに NADH の減少を観測した．次に反応液を TLC に供した結果，DEH のスポットは消失し，より低い位置に新しいスポットを検出した．さらに LC/MS で分析した結果，生成物は KDG であった．これら 3 種の酵素を用いることで簡便かつ高い収率で DEH と KDG を得ることに成功し，機能性食品としての利用や海藻から新素材や燃料の製造への応用が期待される．

Method for producing new rare sugars: alginate deoxy sugars derived from seaweed polysaccharide

○Hideo Miyake[1], Yoshihiro Murase[1], Nonoka Hamaji[2], Tetsushi Mori[3],
Reiji Tanaka[1], Mitsuyoshi Ueda[4], Toshiyuki Shibata[1]
([1]Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [2]Fac. Bioresour., Mie Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [4]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words alginate, rare sugar, reductase, alginate lyase

1Np01 運動性乳酸菌の選択分離法の構築

○田中 悠二, 柳田 藤寿, 乙黒 美彩
（山梨大生・ワイン研）
motoguro@yamanashi.ac.jp

【目的】
乳酸菌は一般的に非運動性であるが，近年 *Lactobacillus* 属のいくつかの種で運動性が報告されている．しかし，運動性乳酸菌の既知種が少ないため，その運動性の機能において未解明な点が多い．そこで，本研究では運動性乳酸菌の選択分離法を構築し，自然界及び発酵食品中からこれらの菌群を効率的に分離することを目的とした．また，ワイン発酵もろみにおける運動性乳酸菌の分布を調査した．

【方法・結果】
本研究では選択分離法の基盤に毛細管捕集法を起用し，誘引剤として 7 種類のアミノ酸水溶液と酵母エキス水溶液を用い，運動性乳酸菌の既知種 8 株について誘引剤の評価試験を実施した．運動性を発現させるため，菌体をリン酸緩衝液で懸濁し，30℃，1 時間培養した．培養液をアクリル樹脂製のチェンバー容器に充填し，4 つのレーンそれぞれに誘引剤を充填したキャピラリーを設置した．30℃，1 時間静置した後，キャピラリー内に誘引された運動性細胞を回収し，MRS 寒天培地に接種することで，出現したコロニー数をカウントした．その結果，ロイシン，セリン，アスパラギン，酵母エキスの各水溶液における回収率が高かったため，以上を誘引剤として，ワイン醸造中の発酵もろみから運動性乳酸菌の分離を試みた．発酵もろみを抗生物質添加 MRS ブロス，トマトジュース液体培地でそれぞれ培養した後，評価試験と同様の操作で得られたコロニーから，214 株の乳酸菌を分離した．MRS 軟寒天培養において 34 株で運動性が確認できた．また，MALDI-TOF MS による同定を行った結果，34 株の内 *L. brevis* が 17 株，*L. pentosus/plantarum* が 1 株，未同定株が 16 株であった．現在，未同定の運動性株 16 株については 16S rRNA 塩基配列から種の同定を行っている．今後，フラジェリン遺伝子に着目し，PCR によって分離株の運動性遺伝子の有無を確認する予定である．

Development of selective isolation method of motile lactic acid bacteria

○Yuji Tanaka, Fujitoshi Yanagida, Misa Otoguro
(Inst. Enol. Vitic., Univ. Yamanashi)

Key words lactic acid bacteria, lactic acid bacterial diversity, chemotaxis, motility

1Np02 低温菌シンプル酵素触媒の宿主とその培養に関する基盤的解析

○鴨木 明子[1], 田島 誉久[1], 小西 正朗[2], 八久保 晶弘[2], 坂上 寛敏[2],
南 尚嗣[2], 山下 聡[2], 中島田 豊[1], 加藤 純一[1]
（[1]広島大院・先端物質, [2]北見工大）
ttajima@hiroshima-u.ac.jp

【目的】我々はシンプル酵素触媒の宿主として低温菌を用いた有用物質の効率的な物質変換触媒の構築を進めている．しかし，低温性 *Shewanella* 属細菌は増殖が遅く，菌体収量が低いことが工業化における大きな課題である．そこで，その問題点を解決するために，本研究では培養条件の最適化と新たな菌株の探索を試みることで，培養時間の短縮と菌体収量の向上を目的とした．
【方法・結果】まず，これまで低温菌シンプル酵素触媒に用いてきた *Shewanella* 属細菌の培養条件を検討した．マリン培地を用いた増殖評価の結果，酸素供給量の増加に伴い増殖が大幅に向上した．さらに，複合培地にカザミノ酸を添加することで増殖に正の効果が見られた．カザミノ酸は各種アミノ酸を含んでいるが，そのうち含有量の少ないスレオニンをさらに添加することで増殖が向上し，マリン培地の約 8 倍(33×10^9cfu/mL)の収量であった．次に，増殖速度の高い菌株の探索を試みた．北海道道東沖より取得した海底泥を反復回分培養することで，新たな低温菌株を得られた．これらは 16S rRNA 解析により，*Pseudoalteromonas* 属，*Vibrio* 属であった．そのうち，*Pseudoalteromonas* sp. AK17 株は比増殖速度が最も高く(μ=0.80 h^{-1})，*Shewanella* 属細菌の約 2 倍であった．以上より，培養時間の短縮と菌体収量の向上に成功した．現在，培地にビタミンを添加することで比対数増殖後期での増殖停滞の改善を図っている．さらに，AK17 株を宿主とした異種遺伝子発現用プラスミドの導入を検討している．

Basic analysis on the host and its culture for psychrophile-based simple biocatalyst

○Akiko Kamogi[1], Takahisa Tajima[1], Masaaki Konishi[2], Akihiro Hachikubo[2],
Hirotoshi Sakagami[2], Hirotsugu Minami[2], Satoshi Yamashita[2],
Yutaka Nakashimada[1], Junichi Kato[1]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Kitami Inst. Technol.)

Key words psychrophile, Pseudoalteromonas, 16S rRNA, amino acid

1Np03 コリネ型細菌におけるトキシン/アンチトキシン系の解析

○田中 裕也[1], 前田 智也[2], 乾 将行[1,3]
（[1]RITE, [2]理研・生命システム, [3]奈良先端大・バイオ）
tanakayu@rite.or.jp

【目的】我々は有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* を用いて様々な物質生産に取り組んでいる．物質生産を効率的に行うには菌の生育を適切にコントロールする必要がある．細菌は環境ストレス下において DNA 複製や遺伝子発現を抑制し，増殖を抑制する機構，トキシン/アンチトキシンシステム(TA システム)を持っている．TA システムは大腸菌等で制御機構，作用機構が調べられているが *C. glutamicum* での報告は無い．今回我々は *C. glutamicum* の TA システムを見出し，制御機構について解析したので報告する．
【方法と結果】*C. glutamicum* の GrtA，GrtB，GrtC はグルタミンリッチな低分子タンパクである．それぞれの機能を調べるため遺伝子発現強化したところ *C. glutamicum* の生育が遅延した．この時に *grtA* のアンチセンス RNA である AsgR を同時に発現させると生育は回復した．AsgR の転写を抑制した状態では *grtA*，*grtB*，*grtC* mRNA の半減期が増大すること，RNase III をコードする *rnc* 遺伝子の破壊により *grtA*，*grtB*，*grtC* mRNA が安定化すること，RNase III の切断部位が *grtA* 3'-UTR に存在することをプライマー伸長法により確認したことから AsgR を介した RNase III による切断制御機構の存在が示唆された．さらに *grtA*，*grtB*，*grtC* の発現がペニシリン G 等のストレスで誘導されること，*grtA*，*grtB*，*grtC* 遺伝子同時破壊でペニシリン G 等のストレスに対する耐性が低下することも観察した．以上の結果は GrtA，GrtB，GrtC および AsgR が *C. glutamicum の TA システムとして働くことを示している.*

Glutamine-rich proteins with antisense RNA constitute a toxin-antitoxin system in *Corynebacterium glutamicum*

○Yuya Tanaka[1], Tomoya Maeda[2], Masayuki Inui[1,3]
([1]RITE, [2]QBiC, RIKEN, [3]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, toxin-antitoxin, sRNA, RNase III

1Np04 コリネ型細菌におけるトレハロース - 6 - リン酸合成酵素のフィードバック阻害

○生出 伸一 [1], 乾 将行 [1,2]
（[1]RITE, [2]奈良先端大・バイオ）
mmg@rite.or.jp

【目的】産業レベルの物質生産において生産菌は多様なストレスにさらされるため，生産菌のストレス耐性は生産性を決定する一因となる．先行研究において，我々は自然変異を利用した手法を用い，アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* の高温ストレス耐性株の育種に成功した．耐性株ゲノムの解析により高温耐性に寄与する 3 変異が同定され，うち 1 つが trehalose-6-phosphate synthase （TPS）の構造遺伝子 *otsA* 上に生じていることが判明した．本研究は当該変異による高温耐性改善機構の解明を目的とする．【方法と結果】我々はまず高温耐性株と親株のトレハロース生成について定量解析を行い，前者における菌体内外のトレハロース蓄積量が後者と比較して増大していることを明らかにした．耐性株において変異型 *otsA* を野生型と置換した復帰株では高温耐性の低下に加えトレハロース蓄積量の減少が観察されたが，本株に近縁種由来のトレハロース輸送タンパク質を導入すると，菌体内トレハロース蓄積量ならびに高温耐性が耐性株と同等に回復した．つぎに，大腸菌発現系を用いて組換えタンパク質を調整し，野生型および変異型 TPS の酵素活性を解析した．その結果，変異型 TPS について基質の 1 つである uridine-5’-diphosphoglucose（UDPG）に対する親和性の低下が示唆されたほか，野生型 TPS に対しトレハロースが UDPG 競合阻害剤として作用すること，また変異型 TPS がトレハロースによるフィードバック阻害に対し耐性を有することが明らかになった．ホモロジーモデリングにより予測された野生型 TPS の立体構造はこれらの結果と合致し，トレハロースと UDPG による結合部位の競合を示唆した．【結論】一連の結果から，当該変異に起因する TPS の阻害耐性獲得により，耐性株において菌体内トレハロース蓄積量が増大しトレハロース依存の高温耐性機構が強化されたと推測される．

Trehalose acts as a uridine-5'-diphosphoglucose-competitive inhibitor of trehalose-6-phosphate synthase in *Corynebacterium glutamicum*

○Shinichi Oide[1], Masayuki Inui[1,2]
([1]RITE, [2]Grad. Sch. Sci. Technol., Nara Inst. Sci. Technol.)

Key words trehalose, *Corynebacterium glutamicum*, trehalose-6-phosphate synthase, feedback

1Np05 コリネ型細菌における ECF シグマ因子の認識プロモーター配列の解析

○豊田 晃一 [1], 乾 将行 [1,2]
（[1]RITE, [2]奈良先端大・バイオ）
mmg-lab@rite.or.jp

【目的】シグマ因子は RNA ポリメラーゼホロ酵素におけるプロモーター認識を行うサブユニットである．細菌ゲノム上には複数のシグマ因子がコードされ，各因子は異なるプロモーター配列を認識する．RNA ポリメラーゼがどのシグマ因子とホロ酵素を形成するか，そしてそのシグマ因子の認識プロモーターを有しているかによって転写される遺伝子が決定される．extracytoplasmic function (ECF)シグマ因子ファミリーに属する因子は，様々な環境ストレス応答に関与することが知られている．ストレス条件下において特定のシグマ因子が誘導もしくは活性化され，認識プロモーターを有する遺伝子を発現させることにより，細胞のストレス応答，環境適応が行われる．アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* のゲノム上には 5 つの ECF シグマ因子 SigC，SigD，SigE，SigH，SigM がコードされており，各シグマ因子の認識プロモーター，標的遺伝子（レギュロン）およびそれらの生理学的機能が明らかにされてきた．各シグマ因子の認識プロモーター配列は 2 つの保存配列，－35 及び－10 領域から構成される．これら認識プロモーター配列にはゆらぎが存在するとともに配列間に類似性が見られ，因子特異性をもたらす要素の詳細は明らかにされていない．本研究では SigD の認識プロモーター配列に着目し，その認識に重要な要素の決定を目的とした．
【方法と結果】SigD の認識プロモーター配列の構成要素は－35 領域(5′-GTAAC-3′)，－10 領域(5′-CGAT-3′)である．－10 領域について変異を導入し，*lacZ* 遺伝子を用いたレポーターアッセイによってプロモーター活性を解析した結果，特に中央の GA 配列が認識に重要であることが示された．さらに周辺配列についての特徴を抽出し，変異導入を行いプロモーター活性への影響を検証中である．本研究の一部は JSPS 科研費 17K15256 の助成により実施した．

A study on the ECF sigma factor-specific promoter sequence in *Corynebacterium glutamicum*

○Koichi Toyoda[1], Masayuki Inui[1,2]
([1]RITE, [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, promoter, sigma factor, consensus motif

1Np06 光照射により誘導される葉面細菌の色素生産

○井口 博之, 金ヶ崎 三千翔, 石井 沙弥, 田口 和真
（京都学園大・バイオ）
iguchih@kyotogakuen.ac.jp

【背景】 植物葉の表面は，微生物にとって過酷な生息環境である．温度や水分量の変化，紫外線の照射が規則的あるいは不規則的に生じ，利用可能な栄養物質も限られている．このため，葉面細菌は高い環境適応能力を持っていると推察される．葉面に直接的に降り注ぐ光は，前述のストレスの原因となる一方，昼夜を始めとした環境状態を知らせるシグナルともなる．しかし，葉面細菌の光に対する応答はほとんど知られていない．そこで本研究では，葉面細菌の明所で培養したときの挙動を分析した．
【結果】 植物葉を採取して滅菌水に懸濁し，これを R2A 寒天培地または TSB 寒天培地に塗布し，生育したコロニーを回収した．これを改めて寒天培地に塗布し，明所（白色蛍光灯）／暗所のもとで培養した．目視で差異を探した結果，明所で色素生産が誘導された菌を 7 株見つけた．16S rRNA 遺伝子シークエンスの結果，R2A 培地からの 2 株はいずれも *Massilia* 属であり，TSB 培地からの 5 株は *Gordonia* 属など *Actinobacteria* 門に属する細菌であった．菌体から溶媒抽出した色素のスペクトルにより，生産誘導される色素はカロテノイドであることが示唆された．
Massilia sp. ST22 株は，明所で黄色色素が生産誘導されるが，この色素の植物上での生育における役割を調べるため，NTG 変異により色素非生産変異株を作製した．野生株と変異株の，シロイヌナズナ上での生育を測定したが，差は見られなかった．明所／暗所培養での紫外線耐性を調べたところ，暗所培養では変異株の耐性が野生株より減少していた一方，明所培養では両株とも耐性が高く誘導された．本結果より，暗所では若干量生産する色素がストレス耐性に寄与する一方，明所ではストレス耐性の別の機構が働き色素による保護の寄与は少しであると考えられた．

Light-induced pigment production in the leaf surface bacteria

○Hiroyuki IGUCHI, Michihiro KANAGASAKI, Saya ISHII, Kazuma TAGUCHI
(Fac. Bioenviron. Sci., Kyoto Gakuen Univ.)

Key words leaf bacteria, light response, pigment, stress response

1Np07 Lipomycetaceae 科酵母の国内各地における種分布及び新種について

○山崎 敦史
（NITE・NBRC）
yamazaki-atsushi@nite.go.jp

【背景と目的】Lipomycetaceae 科酵母は，Saccharomycetales 目に属する子のう菌酵母であり，油脂酵母 *Lipomyces* 属，*Myxozyma* 属及び *Dipodascopsis* 属の 3 属を含む．*Lipomyces* 属が大量に生産する油脂はバイオ燃料等の原料に利用できるとして期待されている．主な生息域は土壌であるが，生態や種分布について不明な点が多い．
本研究では，国内各地の土壌から Lipomycetaceae 科酵母の分離を行い，得られた各酵母種の分離頻度について集計することで種分布について考察した．また，この取り組みの中で本科に属する新種が合計 14 種得られたため，記載予定としてこれらの分類学的諸性質を報告する．

【方法と結果】土壌試料から無窒素培地（NDM）を用いて形成したムコイド状コロニーを釣菌，純化した．取得した酵母コロニーは，26S rRNA D1/D2 領域の塩基配列を用いた分子系統解析により同定を行った．取得した酵母各種を地域間で比較したところ，鹿児島県以北の日本列島の各地では 60-90%が *Lipomyces starkeyi* となり大部分を占めたが，沖縄県西表島では *L. starkeyi* が全く分離されず *Lipomyces yarrowii* が 64.0%と多数を占めた．
新種候補となる酵母種については，東京大学北海道演習林（北海道富良野市）の土壌から *Dipodascopsis anomala* に近縁な *Dipodascopsis* 属の新種候補 2 種が得られた．東京大学千葉演習林（千葉県鴨川市）からは，*Myxozyma* 属を多く含む多系統クレード（以下「*Myxozyma* 属クレード」）に属する新種候補 5 種が得られた．また，沖縄県西表島では，*Myxozyma* 属クレードに属する新種候補 7 種が得られた．これらの新種候補株に対し分類学的手法に基づく生理・性状試験を実施したため，試験結果を報告する．また，北海道産 *Dipodascopsis* 属の 1 新種において偽菌糸体内に子嚢胞子様の球状の細胞体を多数形成するというユニークな特徴が認められたため併せて報告する．

Species distribution and novel species of Lipomycetaceous yeasts in Japanese several locations

○Atsushi Yamazaki
(NBRC, NITE)

Key words Lipomycetaceae, taxonomy, Dipodascopsis, Myxozyma

1Np08 白神こだま酵母における経時寿命の制御メカニズムの解析

○中沢 伸重[1], 高橋 慶太郎[2]
（[1]秋田県大・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，パン酵母として商品化されている白神こだま酵母（以下白神）は，冷凍，乾燥および浸透圧ストレスに高い耐性を有することが既に報告されている．種々のストレスに高い耐性を示す株は長寿であるとの知見に基づき，本研究では白神の寿命メカニズムの解析を試みた．
先ず白神の経時的寿命を調べたところ，Day6 まで増殖を続け実験室株の寿命より 1.5 倍長かった．静止期の細胞は酸化ストレス耐性を示し，トレハロースやグリコーゲンを細胞内に蓄積することから，Day1 および Day3 の活性酸素種（ROS: reactive oxygen spices）レベル，トレハロースおよびグリコーゲンの含有量を測定した．白神の ROS レベルは実験室株のそれの約半分であり，白神は高い ROS 除去能を示した．白神のトレハロースとグリコーゲン含量は，実験室株のそれと比較すると，それぞれ 38 および 20 倍であった．これらの結果から，白神ではトレハロースとグリコーゲンの合成系が活性化していることが分かった．*lacZ* レポーター遺伝子を使って，カタラーゼをコードする *CTT1* 遺伝子，トレハロース合成酵素をコードする *TPS1* 遺伝子およびグリコーゲン合成酵素をコードする *GSY2* 遺伝子の発現を調べた．Day1 の *CTT1* 遺伝子の発現が実験室株のそれの約 3 倍と高かった．予想に反して，*TPS1* 遺伝子の発現は両株において差がなく，白神の *GSY2* 遺伝子の発現は実験室株のそれの約 3 分の 1 であった．AMP 活性化タンパク質リン酸化酵素である Snf1 は，Gsy1/Gsy2 の翻訳後制御に関与している．そこで，Snf1 が活性化すると発現が上昇する *ADH2* 遺伝子の発現を，*lacZ* レポーター遺伝子を使って調べた．Day3 の白神の *ADH2* 遺伝子の発現は実験室株のそれの約 8 倍であったことから，白神の Snf1 が活性化していることが示唆された．

Mechanism of regulation for chronological life span in Shirakami kodama yeast, *Saccharomyces cerevisiae*

○Nobushige Nakazawa[1], Keitaro Takahashi[2]
([1]Biore., Akita Pref. Univ., [2]ARIF)

Key words Shirakami kodama yeast, longevity, Snf1, *Saccharomyces cerevisiae*

1Np09 糸状菌の鉄恒常性維持に関与する転写因子 HapX の C-末端ドメインの機能解析

○辻上 誠也, 山下 美春, 村田 俊輔, 志水 元亨, 加藤 雅士
（名城大院・農）
mkato@meijo-u.ac.jp

【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な bZip 型転写因子である. HapX は鉄欠乏時に鉄関連遺伝子群の転写を制御することで，鉄恒常性維持の中心的な役割を担うことが知られている．しかし，HapX による鉄感知を介した転写制御の分子機構は明らかとなっていない．我々は，HapX の C-末端側ドメインにオルソログ間で保存されたシステイン残基に富む 4 つの Cysteine-rich motif (CrmA-D) が存在を見出し，このドメインが鉄硫黄クラスターを保持することを見出した．本研究では，この C-末端側ドメインと鉄感知を介した転写制御との関係を明らかにするため，糸状菌 *Aspergillus nidulans* の HapX における CrmA-D について解析を行なった．
【結果と考察】*hapX* 遺伝子破壊株 (*ΔhapX* 株) および C-末端側欠損株 (*hapX*^{Nt} 株) を作製し，野生株との生育および HapX に抑制される遺伝子の転写量を比較した．鉄制限下での生育の比較では，*ΔhapX* 株，*hapX*^{Nt} 株の両方で生育が低下した．また，転写量の比較では *ΔhapX* 株，*hapX*^{Nt} 株両方で転写抑制されていなかった．以上より C-末端側ドメインが鉄感知を介した転写制御に重要であることが示された．次に，CrmA-D に変異を導入したリコンビナント HapX および変異導入株 を作製し，鉄硫黄クラスターの保持に及ぼす影響を解析した．変異を導入したリコンビナント HapX の紫外吸光スペクトルを測定した結果，CrmC への変異は鉄硫黄クラスターを示すピークを顕著に低下させ，CrmA,B,C への変異はピークの完全な消失をもたらした．また，生育の比較では CrmB に変異を加えた株は鉄制限条件下にて *ΔhapX* 株と同程度生育が低下した．以上より，HapX は鉄硫黄クラスターを複数保持し，鉄制限下での生育に CrmB が重要であることが示された．

Functional analysis of the C-terminal domain of HapX, the master regulator of iron homeostasis in filamentous fungi

○Masaya Tsujikami, Miharu Yamashita, Shunsuke Murata, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato
(Grad. Sch. Agric., Meijo Univ.)

Key words *Aspergillus nidulans*, iron homeostasis, transcriptional factor, iron sulfur cluster

1Np10 ジャンボファージ RSP13 の特殊なゲノム DNA の解析

○川崎 健, Meslhi Alaaeldin, 山田 隆
（広島大院・先端物質）
takeru@hiroshima-u.ac.jp

メタゲノミクスの確立によって難培養性微生物のゲノム情報が解読・利用可能となって久しい．今回，一般的なシークエンシング法では塩基配列を取得できない特殊なゲノムを有するファージ RSP13 を発見した，これを報告する．
青枯病菌に感染するジャンボファージ（ゲノムサイズが 200kbp を超える巨大ファージ）RSP13 は，電子顕微鏡による形態観察からヘッドテイル構造を有する Myovirus であることが判明している．ファージ粒子に界面活性剤と proteinase K を加え加温静置後，フェノール抽出を行うと容易にゲノムが得られる．このゲノムは RNase や S1 nuclease に耐性であること，DNase I による分解が確認できる（ただし分解速度は λDNA の 1/100 倍程度）こと，およびファージ粒子構造から直鎖状 dsDNA と予想される．一方，このファージのゲノムは異常な電気泳動速度の遅れを示し，GS FLX+ (Roche 社)，MiSeq (illumina 社)，PacBio RS II (Pacific Biosciences 社)による塩基配列解析ではいかなるデータも出力されなかった．また，ゲノム増幅試薬（GenomiPhi，REPLI-g）による増幅も確認できなかった．これらのことから，このファージの持つゲノム DNA は，何らかの修飾がなされているものと予想された．そこで，感染後の宿主から mRNA を抽出し，RNAseq を行い，RSP13 ファージゲノムの部分配列を得た．得られた配列に対する primer を作製し，RSP13 ゲノムを複製可能な方法について探索中である．
当研究室では，現在までに 14 株のジャンボファージを単離しているが，6 株については塩基配列データが取得できていない．このことから，一部の巨大ファージのゲノム DNA は一般的な DNAP による複製が困難であると予想される．
環境中には難読性ゲノムを持つ巨大ファージが，高頻度で存在すると思われる．

Analysis of odd genomic DNA from jumbo phage RSP13.

○Takeru Kawasaki, Alaaeldin Meslhi, Takashi Yamada
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words phage, metagenomic libraries, jumbo phage

1Np11 宿主染色体上のプロファージの有無によるプラスミド保持株の fitness 変化

○Pham Thi Kim Dung[1], Le Thi Thanh Thu[1], 森内 良太[2], 道羅 英夫[2], 金原 和秀[1], 新谷 政己[1]
（[1]静大院・総合科技, [2]静大グリーン研）
kimbara.kazuhide@shizuoka.ac.jp

【背景と目的】プラスミドを持つ宿主の fitness（適応度）は，その宿主とプラスミドを持たない細胞とを共培養し，どの程度生き残るかを調べて算出され（競合試験），多くの場合低下する．我々は，Pseudomonas putida PpY101 株を，pBP136 または pCAR1 の宿主とすると，その fitness が上昇する現象を見出した．一方，PpY101 株と同一菌株に由来する KT2440 株を宿主とした場合にはこの現象が認められなかった．双方の宿主について，ゲノム・トランスクリプトームレベルで比較したところ，PpY101 株では，KT2440 株の染色体上に存在する 4 つのプロファージ（P1－P4）のうち，P1 が欠落しており，また PpY101 株ではプラスミドの有無にかかわらず，P4 上の遺伝子群の発現量が増大することが明らかになった．そこで本研究では，プロファージの有無によるプラスミドの宿主の fitness 変化を調べ，プロファージとプラスミドの関係を明らかにすることを目的とした．
【方法・結果・考察】KT2440 株からプロファージを欠落させた ΔP1 株，ΔP2 株，ΔP3 株，または ΔP4 株を pBP136 または pCAR1 の宿主とした場合に生じる fitness の変化を競合試験で比較した．その結果，いずれのプロファージを欠落させた場合についても pCAR1 の宿主の fitness は上昇した．一方，pBP136 では，ΔP4 株を宿主とした場合に fitness が上昇したのに対し，ΔP2 株及び ΔP3 株では fitness が低下し，ΔP1 株を宿主としても fitness は変化しなかった．この結果から，各プロファージとプラスミドが宿主内で影響を及ぼしあって fitness に変化をもたらすことが示唆された．また， P4 を欠落させたいずれの宿主の fitness も上昇したため，P4 上に fitness を低下させる因子が存在すると示唆された．現在，P4 上のどの遺伝子産物が fitness を変化させるかについて調べている．

Fitness alterations of plasmid host in the absence or presence of prophage in its chromosome

○Dung Pham Thi Kim[1], Thu Le Thi Thanh[1], Ryota Moriuchi[2], Hideo Dohra[2], Kazuhide Kimbara[1], Masaki Shintani[1]
([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ, [2]RIGST. Shizuoka Univ)

Key words plasmid, fitness, prophage

1Np12 好気・微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性の比較

○越智 健太郎[1], 柳谷 洸輔[1], 大熊 盛也[2], 金原 和秀[1], 新谷 政己[1,2]
（[1]静大・工, [2]理研・BRC-JCM）
kimbara.kazuhide@shizuoka.ac.jp

【背景と目的】プラスミドは，供与菌から受容菌へと接合伝達する遺伝因子で，多くの場合，好気条件下の接合伝達性について研究が進められてきた．一方，環境中に多く分布する微好気・嫌気条件の接合伝達性や宿主域については，ほとんど解明されていない．本研究では，異なる種類のプラスミドや供与菌・受容菌を用い，酸素濃度の違いによってそれらの接合伝達性に変化が生じるかを検証した．
【方法】供与菌には絶対好気性細菌の *Pseudomonas putida* KT2440 の派生株である SMDBS と，通性嫌気性細菌の *P. stutzeri* JCM 5965 を用い，プラスミドには pBP136（IncP-1 群）と pCAR1（IncP-7 群）を使用した．受容菌には 3 種類の通性嫌気性細菌を用いた．好気条件で培養した供与菌・受容菌を，嫌気チャンバー内（酸素濃度 100 ppm 以下）で，接合させた場合を微好気条件，嫌気条件で培養した菌株を嫌気チャンバー内で接合させた場合を嫌気条件下の接合実験とした．いずれの条件についても接合後の懸濁液を選択培地に塗布し，嫌気チャンバー内でコロニーの出現を認めた後，酸素に短時間曝露し，GFP に由来する蛍光を示すかどうかを指標にして接合完了体の検出を行った．得られた完了体数を接合後の供与菌数で割ったものを伝達頻度として算出し，各条件下で比較した．
【結果と考察】双方のプラスミドについて，いずれの条件下でも接合完了体が認められ，接合時に酸素が必須でないことが示された．また，供与菌あたりの接合伝達頻度は微好気・嫌気条件下において好気条件下よりも 1/101～1/104 に低下し，酸素の有無は，接合伝達の効率に影響することが示唆された．その伝達頻度の変化は，供与菌と受容菌の組み合わせによって異なり，酸素濃度によって伝達しやすい菌株の種類が変わることが示唆された．現在酸素濃度を変えた場合の宿主域の変化についても調査中である．

Conjugation frequency of plasmids altered under aerobic, microaerobic and anaerobic conditions

○Kentaro Ochi[1], Kosuke Yanagiya[1], Moriya Ohkua[2], Kazuhide Kimbara[1], Masaki Shintani[1,2]
([1]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [2]RIKEN BRC-JCM)

Key words gene transfer, anaerobic condition, plasmid

1Np13 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株の合成化合物分解における不安定化要因の探索

○村上 将和[1], 村澤 友紀恵[1], 松村 吉信[1,2]
（[1]関西大・生命生物工, [2]関西大・ORDIST）
ymatsu@kansai-u.ac.jp

[背景] ビスフェノール A (BPA) はポリカーボネート樹脂などの原料として利用される物質で，発がん作用や内分泌撹乱作用を示すことが確認されている．そこで当研究室では，BPA 汚染環境の修復に利用可能な BPA 分解菌の探索を試み，BPA を約 6 時間で分解できる *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株を単離した．本株はビフェニル類化合物等も分解でき，合成化合物全般の環境浄化に利用できるものと考えている．さらに，AO1 株は Chromosome 1,2，Plasmid 1-4 で構成され，Plasmid 3（pBAR1）に BPA 分解遺伝子を多数コードしていることも明らかとなった．一方，本株は一時的な増殖能低下や BPA 分解能低下が観察されたり，BPA 非分解菌 (AO1L 等) が単離されたり，遺伝子機能の不安定性が実用化への問題点となっている．そこで本研究では培養条件が AO1 株の増殖に及ぼす影響や AO1L 株のゲノム変異部位の確認，これらがゲノム不安定化に及ぼす影響を調査した．
[方法と結果] 保存期間が異なる AO1 株を L 培地や L-BPA (115 μg/mL) 培地で培養すると，L-BPA 培地で増殖能が低下した株が出現した．そこで，BPA 抵抗性を上げるため低濃度 BPA(50 μg/mL)-L 培地で馴化培養したが，増殖能は改善しなかった．さらに馴化培養後に細胞を L 培地洗浄した結果，増殖能は L-BPA (115 μg/mL) 培地で部分的に回復した．この結果は本株の BPA 代謝産物に増殖阻害の原因物質が含まれている可能性を示唆した．次に，AO1L 株のゲノム配列を解読した結果，pBAR1 で 3 ヶ所，Plasmid 4 に 1 ヶ所の欠失が確認され，点変異や挿入変異は確認されなかった．トランスクリプトーム解析の結果，欠失領域にコードされているトランスポゾン遺伝子の一部が AO1 株で高発現であり，この高発現が欠失の要因かもしれない．今後は BPA 培地での増殖が低下した AO1 変異株のゲノム変異も調査する予定である．

Exploration of the destabilization factors on the degradation of synthetic compounds in *Sphingomonas bisphenolicum* AO1

○Masakazu Murakami[1], Yukie Murasawa[1], Yoshinobu Matsumura[1,2]
([1]Dept. Life science & Biotech., Kansai Univ., [2]ORDIST. Kansai Univ.)

Key words bisphenol A, *Sphingomonas*, biodegradation, cell diversity

1Np14 *Pseudomonas* sp. KU-51 株のニトロフェノール分解系遺伝子の解析

○劉 雅軒, 岩木 宏明, 長谷川 喜衛
（関西大・化生工）
iwaki@kansai-u.ac.jp

【目的】ニトロフェノール (NP) は化学工業的に重要な化合物であり，広く用いられている．一方，強い毒性を有することから，生態系への影響が懸念されており，微生物分解について精力的に研究がなされてきた．本研究では，3 種の NP 異性体（*o, m, p*-NP）全ての資化性を有する菌株を土壌から分離し，分解系遺伝子の解析を試みた．
【方法・結果】*m*-NP を唯一の窒素源とする無機塩培地で集積培養後，寒天培地に塗布し，コロニーを単離した．単離した菌株の NP に対する資化性を調べ，*o, m, p*-NP 全てに資化性を有する菌株を 1 株（KU-51 株）選択した．KU-51 株の 16S rRNA 遺伝子配列を解析した結果，*Pseudomonas umsongensis, P. mohnii, P. jessenii, P. vancouverensis* のものと 99.0-99.8%一致していたことから，本菌株を *Pseudomonas* sp. とした．KU-51 株の NP 分解性を分子レベルで検討するため，既知の NP 分解経路において，それぞれ初発反応を触媒する酵素である 2-NP モノオキシゲナーゼ，3-NP ニトロレダクターゼ，4-NP モノオキシゲナーゼの配列をもとにプライマーを設計し，PCR による遺伝子領域の増幅を試みた．その結果，3 つ全ての遺伝子が検出され，既知の菌株と類似の分解系遺伝子を有することが示唆された．そこで，インバース PCR でそれぞれの PCR 増幅断片の周辺を増幅し，遺伝子全域の塩基配列を決定した．次に pET システムを用い，それぞれの酵素遺伝子の異種発現系を構築し，遺伝子産物の活性を調べた結果，標的の活性を有することが明らかとなった．現在，分解系の全容を明らかにするため，各遺伝子周辺領域の解析を試みている．

Characterization of nitrophenol degradation genes in *Pseudomonas* sp. strain KU-51

○Yaxuan Liu, Hiroaki Iwaki, Yoshie Hasegawa
(Dept. Life Sci. Biotechnol., Kansai Univ.)

Key words *Pseudomonas*, nitrophenol, degradation

1Np15 ビスフェノール A を特異的に吸着する微生物を用いた排水処理系の機能強化

○青木 好辰, 市村 栄論, 遠山 忠, 田中 靖浩, 森 一博
（山梨大院・医工総）
mori@yamanashi.ac.jp

【背景と目的】ビスフェノール A（BPA）はポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料として広く産業に利用されているが，内分泌かく乱作用が疑われるなど生態系への影響が懸念されている．さらに，生分解性が良くないことなどから効率的な排水処理方法の開発が求められる．これまでに本研究室では BPA を分解する細菌とともに，本物質を特異的に吸着する作用をもつ菌株の分離にも成功している．そこで，本研究では分解菌や馴養活性汚泥と共に吸着菌を併用することによる浄化能力の向上を検討した．
【方法と結果】供試菌株には，環境試料より分離した BPA を特異的に吸着する作用をもつ菌株（吸着菌），高い BPA 分解能力をもつ菌株（分解菌），および長期間 BPA で馴養した活性汚泥（馴養活性汚泥）を用いた．浄化試験では，前培養した吸着菌を，分解菌あるいは馴養活性汚泥と 50mM リン酸バッファー中で混合し，濃度を適宜調整した BPA を添加した後，経時的に液中の BPA の濃度を測定した．同時に，回収菌体を洗浄し回収された BPA 量の測定も行った．吸着菌と分解菌を用いた試験の結果，吸着菌または分解菌を単独で用いた場合および両者の効果の積算値よりも優れた効果が両者の混合系で観察され，液中 BPA の減少速度並びに処理系内の全 BPA の分解速度が共に向上することを確認した．続いて，馴養活性汚泥に吸着菌を組み合わせた実験においても同様の傾向が示された．以上の結果から，有機化学物質を含有する生物学的排水処理系において分解菌と共に吸着菌を併用することで処理能力が強化される可能性が示された．

Enhancement of wastewater treatment system using microorganisms that specifically adsorb bisphenol A

○Yoshitatsu Aoki, Eiyu Ichimura, Tadashi Toyama, Yasuhiro Tanaka, Kazuhiro Mori
(Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

Key words bisphenol A, activated sludge, biosorption

1Np16 *Pseudomonas* sp. TB-98 株によるテレフタル酸からのプロトカテク酸の生産

○金森 拓[1], 中島 鈴佳[1], 岡村 匡浩[2], 内堀 孝博[3], 中島 敏明[1]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大, [3]パナック工業）
nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

【背景と目的】
スマートフォンの保護フィルム等で使用される PET フィルムは PET の基板にコーティングを塗布してできている．これの製造過程で生じた端材や不良品はコーティングを剥離し，PET 基板をリサイクルしている．この際アルカリ処理が施されるが PET の一部も加水分解し，テレフタル酸（TPA)とエチレングリコールが生じる．活性汚泥法によるアルカリ廃液処理では，TPA が汚泥中に残存してしまうためその処理が問題となっている．TPA は市場価格が安く，精製や再利用は採算が合わないため，現状ではコストをかけて焼却処理している．一方，TPA の代謝産物であるプロトカテク酸（PCA)は種々の化成品の前駆体として用途があり付加価値が高い．これまで，当研究室において TPA を効率よく分解する菌株が得られているが，PCA に対する耐性が極めて低く，PCA 生産には不適であった．そこで本研究では，フィルム処理工場の活性汚泥から TPA 分解能，PCA 生産能，PCA 耐性を備えた菌株の取得を目的とした．
【方法と結果】
活性汚泥を TPA 基本培地に添加後，振盪培養し 3, 4 日ごとに 2 回植え継いだ．TLC を用いた簡易測定で TPA 分解がみられた汚泥培養液を TPA 寒天培地にプレーティングし，各コロニーでの TPA 分解を確認した結果，TPA 分解菌の取得に成功した．16S rDNA の解析結果から，*Psedomonas* 属と同定した．鉄含有培地での培養において培地が赤色を呈したため培養液上清を LC/MS で測定したところ，48 時間で約 10 g/L の TPA 分解と約 2 g/L の PCA 生産を確認した．また，PCA 基本培地においての振盪培養では 10 g/L の PCA まで生育可能であることが分かり，取得した TPA 分解菌は PCA 生産菌としての活躍が期待できると考える．

Production of protocatechuic acid from terephthalic acid by *Pseudomonas* sp. TB-98 strain.

○Taku Kanamori[1], Suzuka Nakajima[1], Masahiro Okamura[2], Takahiro Uchibori[3], Toshiaki Nakajima[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Univ. Tsukuba, [3]Panac ind,inc.)

Key words terephthalic acid, protocatechuic acid, activated sludge, *Pseudomonas*

1Np17 Indoor airborne toluene removal activity of *Pseudomonas putida* with plant, *Solanum lycopersicum*

○Hak Jin Song[1], Wu-Young Jeong[1], Tae Hang Yoon[1], Ji Eun Kim[1], Kwang Jin Kim[2], Sang Hyun Lee[1], Yung-Hun Yang[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 toluene degrading bacterial species isolated from plant rhizospheres was investigated for the relief of indoor air pollution. Using a conventional enrichment technique, a series of concentration of toluene was mixed with samples collected from various plant rhizosphere. Among the samples, a bacterial strain which showed the highest growth rate with toluene removal activity was isolated and identified as *Pseudomonas putida*. The bacteria showed high growth rate with toluene removal activity in the presence of 200 ppm of toluene. For the application of this bacterium for the indoor air quality control, active *P. putida* (1 x 10^6 CFU/ml) suspensions were added to freshly germinated *Solanum lycopersicum* in Hoagland solution agar bottle. Then toluene (final concentration: 100 ppm) was injected to the bottle and the change of toluene concentration was monitored using a gas chromatography. In the presence of the bacteria (ca. 1.3μg・m^{-3} per plant) with the plant, complete depletion of toluene was monitored within 3 hours. However, without the addition of bacteria, relatively slow decrease in toluene concentration was observed. When the samples collected from the rhizosphere of the examined plants were examined with the *P. putida* specific FISH (fluorescent in situ hybridization), the bacteria were successfully grown in the rhizosphere of the plant. These results showed that the plant with specific strain of bacteria has great potential applicability for the indoor air quality control.

Indoor airborne toluene removal activity of *Pseudomonas putida* with plant, *Solanum lycopersicum*

○Hak Jin Song[1], Wu-Young Jeong[1], Tae Hang Yoon[1], Ji Eun Kim[1], Kwang Jin Kim[2], Sang Hyun Lee[1], Yung-Hun Yang[1], Hyung Joo Kim[1]
([1]Dept. Biological Eng., Konkuk Univ., [2]Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration)

Key words *Pseudomonas putida*, *Solanum lycopersicum*, air quality control, toluene

1Np18 ノニルフェノール酸化酵素遺伝子を用いたビスフェノール S の完全無機化の取り組み

○武尾 正弘, 近成 直斗, 栗岡 純平, 猪野 椋太, 根来 誠司
（兵県大院・工・応化）
takeo@eng.u-hyogo.ac.jp

ビスフェノール S（BPS）は，耐熱性エンジニアリングプラスティックの合成材料として大量に使用されている重要な化学物質であるが，ビスフェノール A と同様に環境ホルモン作用が指摘されている．本物質の微生物分解に関する知見は乏しく，分解性が極めて悪いことのみが知られている．我々は，これまでに *Sphingomonas* 属細菌の有するノニルフェノール酸化酵素が BPS をその NIH シフト化合物（NIH-BPS），ハイドロキノン（HQ）及びフェノールスルホン酸（PS）に分解することを明らかにしてきた．また，NIH-BPS も同酵素により，HQ とハイドロキノンスルホン酸(HQS）に分解されることがわかった．そこで，本研究では，新たにノニルフェノール酸化酵素の遺伝子 *nmoA* を HQ 分解菌あるいは PS 分解菌に導入して組換え菌株を構築し，その菌株を用いて BPS の分解・無機化の可能性を検討した．
nmoA を広宿主域ベクター pBBR1MCS-2 にクローン化した組換えプラスミド pBNMOA-F（6.7kb)を HQ 分解菌 *Pseudomonas putida*TSN1 株に導入した．本組換え菌株の菌体懸濁液を用いた分解試験では BPS が効率よく分解されるばかりでなく，多くの BPS 誘導体やビスフェノール化合物が分解されることがわかった．また，本菌株は，*nmoA* の導入により BPS を単一炭素源として増殖できるようになった．一方，BPS の分解中に予想通り PS あるいは HQS の蓄積が確認された．そこで，蓄積するこれらの化合物も分解させ，微生物処理だけで BPS の完全無機化を達成するために，新たに PS 並びに HQS の分解菌の分離を試み，PS 分解菌の取得に成功した．さらに，PS 分解菌を用いた同様の検討を進めている．

Trial for complete mineralization of bisphenol S using a nonylphenol monooxygenase gene

○Masahiro Takeo, Naoto Chikanari, Junpei Kurioka, Ryota Ino, Seiji Negoro
(Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo)

Key words Nonylphenol monooxygenase, biodegradation, endocrine disrupting chemicals, bisphenol S

1Op01 多糖高分子を用いたペプチドハイブリッド足場材料の構築と評価

○王 悦[1], 蟹江 慧[1], 金子 喬士郎[1], 緒方 藍歌[2], 成田 裕司[2], 竹澤 俊明[3], 加藤 竜司[1]
（[1]名大院・創薬, [2]名大院・医, [3]農研機構）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

生体内への移植を視野にいれた細胞足場材料には，治療効果をもたらす細胞の培養性能および機能性を引き出す効果と共に，患部での生体親和性や機能補助のための物性や特性が求められる．足場基材としての合成高分子は，極めて高度な機能設計が可能であり，強度や分解性を自在にデザインできる柔軟性を有する半面，生体由来分子に比べて細胞との親和性や生体機能性が付与しにくく，安全性と設計性との調節が難しい面などが考えられる．逆に，タンパク質などの生体由来高分子は，高い生体機能性を付与することが容易だが，強度や分解性の自在な設計は難しく，工業的な生産においてもコストが高い．
ペプチドなどの生体由来低分子は，工業的生産コストは低いが，多くの高分子が持つ成形マテリアルとしての物性（強度や弾性など）にペプチド単体では限界がある．即ち，移植用再生医療促進素材には，化学合成可能な高分子の利点と生体高分子の利点とをハイブリッドした足場材料の開発が求められている．我々はこれまで，細胞接着ペプチドをはじめとした細胞機能を制御する生体由来短鎖ペプチドの探索を行い，目的細胞と目的外の細胞のバランスを制御するような細胞選択的ペプチドなどを報告してきている．本研究では，多糖ゲルを基材とした高分子材料の構築と，ペプチドの機能付加手法を組み合わせた，ハイブリッド材料の構築と機能性の評価を行ったので報告する．

Construction and evaluation of peptide hybrid scaffold materials using polysaccharide polymers

○Yue Wang[1], Kei Kanie[1], Kyoshiro Kaneko[1], Aika Ogata[2], Yuji Narita[2], Toshiaki Takezawa[3], Ryuji Kato[1]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Med. Nagoya Univ, [3]NARO)

Key words peptide, polysaccharide, polymer

1Op02 放射線架橋ポリビニルアルコールゲル上で培養した神経幹細胞／前駆細胞の接着関連分子の発現解析

○森 英樹, 中村 泰斗, 原 正之
（阪大院・理）
morihide@b.s.osakafu-u.ac.jp

【背景と目的】ニューロンやグリア細胞への多分化能と増殖能を有する神経幹細胞/前駆細胞（NSPC）を，無血清培地下で高密度に接着培養できる足場の開発は，中枢神経発生モデルや移植用担体の構築に重要である．我々は放射線架橋ポリビニルアルコール（PVA）ゲル上に NSPC が接着し，増殖できることを既に報告している．しかし，NSPC が PVA ゲルへどのように接着し，増殖を維持しているかについては解っていなかった．そこで本研究では，放射線架橋 PVA ゲル上で培養した NSPC における接着関連分子の発現を解析し，NSPC の PVA ゲルへの接着機構に関する理解を深めることを目的とした．
【方法】PVA 水溶液にガンマ線を照射し，硬さの異なる三種類の放射線架橋 PVA ゲル（3.75%(w/v) PVA/10 kGy（ヤング率：E = 1 kPa），7.5%(w/v) PVA/20 kGy（E = 10 kPa），15%(w/v) PVA/40 kGy（E = 22 kPa））を作製した．マウス胎仔脳由来 NSPC を各々の PVA ゲル上に播種し，無血清培地下で培養した．1 週間培養後の細胞から RNA を抽出し，定量的 RT-PCR 法でインテグリン，フィブロネクチン，テネイシンなどの接着関連分子の遺伝子発現を調べた．また，遺伝子発現の変化が顕著であったテネイシンに関してはウェスタンブロットでタンパク質の発現量も比較した．ニューロスフェア法で培養した NSPC を対照群とした．
【結果と考察】PVA ゲル上で培養した NSPC は対処群に比べて神経幹細胞マーカーであるネスチンの発現が高く，PVA ゲルが軟らかい方がよりネスチンの発現が高かった．インテグリンの発現は α4，αv が PVA ゲルが軟らかい方が発現が上がる傾向を示した．また，細胞外マトリクスであるテネイシン C は遺伝子の発現と同様にタンパク質の発現も軟らかい PVA ゲルの方が高くなるという結果を得た．NSPC は PVA ゲルの足場の硬さに応じて自らテネイシン C を発現し，接着していることが考えられる．

Expression analysis of cell adhesion-related molecules in neural stem/progenitor cells cultured on radiation-crosslinked poly(vinyl alcohol) gels

○Hideki Mori, Taito Nakamura, Masayuki Hara
(Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

Key words neural stem cell, PVA, extracellular matrix, stiffness

1Op03 光増感色素固定化培養基材を用いて培養したラット間葉系幹細胞の生存・分化の解析

○八木 秀郁, 森 英樹, 原 正之
（阪府大院・理）
hara@b.s.osakafu-u.ac.jp

【背景】活性酸素種（ROS）は細胞傷害性を有する一方で，近年ではシグナル分子として成体幹細胞の細胞死誘導，増殖，分化などの調節にも関わることが解ってきた．成体幹細胞の内外で ROS 発生を制御し，増殖や分化などを誘導する条件を見出だせれば，幹細胞培養の調節技術への応用が期待できる．本研究では光増感剤固定化培養基材を開発し，光増感反応により可視光照射下で培養基材表面から生じる ROS 刺激を間葉系幹細胞に負荷して生理状態変化を解析した．
【実験】アミノ基が付加されたスライドグラス表面に，カルボジイミド（EDC）とスクシンイミド（NHS）の反応を用いて光増感色素のヘマトポルフィリン（HP）を固定した．HP 固定化スライドグラス基材に細胞培養のためにチャンバーを取り付け，基材上でラット間葉系幹細胞（rMSC）を培養した．平面照射型白色 LED 光を基材下面から照射し，細胞の接着した基材表面に ROS を発生させた．光照射後の細胞の生死や形態を解析した．また細胞生存条件で光照射後の細胞の分化傾向を知るために定量的 RT-PCR 法を用いて分化マーカー遺伝子の発現を調べた．
【結果と考察】rMSC は HP を固定化したスライドグラス上に接着した．長時間の光照射や HP 固定化量の増加に応じて ROS 発生量は増加し，rMSC に細胞死が誘導された．また，HP 固定化量と光照射時間の長さにより細胞死の様子が異なり，ROS の発生量に応じて基材表面からの剥がれ方に違いが生じたためと考えられた．ROS 発生量が比較的少ない条件では細胞は生存し，骨分化や脂肪分化に関わる転写因子の発現に変化が見られたが，発現変化が少ないマーカー遺伝子も見られた．以上より，基材表面からの比較的多い ROS 発生条件では細胞死を誘導できたが，細胞が生存できる比較的少ない ROS 発生条件に関しては，さらに分化誘導条件などの検討が必要である．

Analysis on viability and differentiation of rat mesenchymal stem cells cultured on photosensitizer-conjugated culture vessels

○Hidefumi Yagi, Hideki Mori, Masayuki Hara
(Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, reactive oxygen species, photodynamic reaction, differentiation

1Op04 ヒトリンパ球への高効率遺伝子導入に向けたシリコンナノニードル表面における核酸の吸脱着制御

○本多 裕基[1], 山岸 彩奈[2], 金 賢徹[1,2], 中村 史[1,2]
（[1]農工大院・工, [2]産総研・バイオメディカル）
chikashi-nakamura@aist.go.jp

リンパ球などの特定の細胞では，外来遺伝子の導入効率が低いという問題がある．一方で，我々は直径 200 nm のナノニードルが 3 mm 角のシリコンウェハ上に数万本配列したナノニードルアレイ(NNA)を用いて細胞に核酸を直接導入する手法を開発してきた．シリコンからなる NNA の表面は酸化膜が形成されており，表面のシラノール基が塩基性条件下で脱プロトン化し，DNA のリン酸基が Mg^{2+} を介して配位結合すると考えている．そこで本研究では，高濃度の Mg^{2+} 存在下で核酸を NNA に吸着させ，Mg^{2+} 濃度の低い細胞内に挿入することで，核酸が NNA から脱離する制御放出による核酸導入を目的とした．
導入する外来遺伝子として蛍光タンパク質 Venus 発現プラスミドを使用し，10 mM $MgCl_2$ を含むホウ酸緩衝液(pH 10)と混合した．酸素プラズマ灰化装置により NNA 表面の酸化処理を行った後，このプラスミド溶液に 10 分間浸漬しプラスミドを吸着させた．細胞内へのプラスミド導入は，ディッシュ上に固定したヒトリンパ球 JM 細胞にアレイ動作装置を用いてプラスミド吸着 NNA を挿入し，加振 10 秒，静置 10 分の後に NNA を抜去することで行った．RPMI 培地では NNA を浸漬し，1 分後に NNA 上のプラスミドが脱離することが判明したため，まず NNA を細胞に挿入するまで，プラスミドを NNA 表面に安定に保持する溶液を検討した．$MgCl_2$ と浸透圧調整のための各種濃度のグルコースを含む溶液でプラスミド保持条件を検討した．その結果，2.5%グルコースを含む 10 mM $MgCl_2$ 溶液で NNA 表面に最も安定してプラスミドが保持されることを確認した．この溶液を用いて細胞内にプラスミドを導入し，蛍光顕微鏡観察により Venus 発現細胞を計数することでプラスミド導入効率を算出した結果，リポフェクションによる導入効率が 0.2%であるのに対して，NNA を用いた場合は，0.7%と 3 倍以上の導入効率が得られた．

Controlled release of nucleic acid from silicon nanoneedle surface for high efficiency gene transfer to human lymphocyte

○Yuki Honda[1], Ayana Yamagishi[2], Hyonchol Kim[1,2], Chikashi Nakamura[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words gene transfer, nanoneedle array, controlled release, human lymphocyte

1Op05 ディッシュと不織布で増殖した間葉系幹細胞の細胞外マトリックス量の比較

○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：Mesenchymal stem cell）は，分化能と活発な増殖能を有することから再生医療用の細胞ソースとして注目されている．本研究室では，ポリエステル不織布（NWF: Nonwoven fabric）をスキャフォールドとして利用した MSC の増殖培養における播種方法の改良法を示した．また，NWF 中で増殖した MSC はディッシュで増殖した MSC に比べて，より高い分化能と CD90 陽性率を有していた．一方，細胞周辺の ECM が多分化能の維持に重要との報告がある．そこで，NWF で増殖した MSC とディッシュで増殖した MSC の各 ECM 量を比較することを目的とした．
【方法】
24 穴プレートに入れた NWF(旭化成製 Y-15050，厚さ約 0.1 mm，繊維直径約 20 μm)を用いてヒト骨髄 MSC を 3 週間培養した．この後，0.5% TritonX-100 での処理により細胞を融解し，残った ECM を 0.001%トリプシンや 1%SDS を用いた処理により回収した．回収した ECM のタンパク量を BCA 法で定量した．
【結果と考察】
TritonX-100 処理により，ディッシュと NWF で培養した細胞をほぼ完全に除去できることを確認した．次に，トリプシン処理及び SDS 処理により，ディッシュや NWF にコーティングした I 型コラーゲンをほぼ 90%以上回収できることを確認した．そこで，NWF（播種密度 0.025×10^4 cells/cm^2）とディッシュ（播種密度 0.01×10^4 cells/cm^2）で培養した細胞周囲の ECM を上記の方法で定量した結果，特に培養の 1，2 週間目，NWF で増殖した MSC の細胞当たりの ECM 量はディッシュより顕著に高かった．以上から，NWF において多かった ECM 量が MSC の高い多分化能や CD90 陽性率に関係している可能性が考えられた．

Comparison of amount of extracellular matrix around mesenchymal stem cells grown on dish and non-woven fabric

○Fu Bo, Masashi Fujiwara, Mutsumi Takagi
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, non-woven fabric, extracellular matrix, CD90

1Op06 Polycaprolactone nanoparticles for evaluation of the collagen synthesis

○David Wu-Young Jeong[1], Hak Jin Song[1], Woo Sung Lee[2], Sok Young Shim[2], Hyeon Jin Jeon[2], Tae Hang Yoon[1], Ji Eun Kim[1], Sang Hyun Lee[1], Yung-Hun Yang[1], Hyung Joo Kim[1]
([1]Dept. Biological Eng., Konkuk Univ., [2]Roselab)
hyungkim@konkuk.ac.kr

To evaluate the collagen synthesis activity, polycaprolactone (PCL) nanoparticles were prepared by the ring-opening polymerization of ε-caprolactone. The morphology and size were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and particle size analyzer. The chemical structure was analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). Prepared PCL nanoparticles presented a spherical shape and a size of 240 nm. In animal study, 32 rats were divided into three groups. The control groups are injected with saline (n=8) and E product (n=12). The experimental group was injected with PCL nanoparticles (n=12). For hematologic test, CBC, OT/PT, BUN/Cr tests were performed and showed no significant differences between the groups. To confirm organ infiltration and collagen formation, hematoxylin-eosin and Masson trichrome staining methods were performed. In hematoxylin-eosin staining, the PCL nanoparticles were not shown in liver and kidney. In the case of Masson trichrome staining, formation of collagen was observed. This study demonstrated that PCL nanoparticles are able to form the collagen in vivo.

Polycaprolactone nanoparticles for evaluation of the collagen synthesis

○David Wu-Young Jeong[1], Hak Jin Song[1], Woo Sung Lee[2], Sok Young Shim[2], Hyeon Jin Jeon[2], Tae Hang Yoon[1], Ji Eun Kim[1], Sang Hyun Lee[1], Yung-Hun Yang[1], Hyung Joo Kim[1]
([1]Dept. Biological Eng., Konkuk Univ., [2]Roselab)

Key words Polycaprolactone, PCL nanoparticle, Collagen synthesis stimulation

1Op07 毛細血管様構造を有するスフェロイドをバイオ 3D プリンターにより積層した三次元組織の生・死細胞ならびに毛細血管様構造の分布の解析

○稲垣 慶一[1], 高橋 憲司[2], 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】ヒト細胞のみから作製される三次元組織においては，組織内部に毛細血管様構造がない場合，酸素や栄養の供給不足による組織の深部での細胞死が懸念されている．これまで，ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)などを混合した三次元組織とすることで，組織内部に毛細血管構造が構築され，細胞生存率が改善されたという報告がされている．しかしながら，既往の研究では，作製した三次元組織の切片を用いた二次元的な評価手法が一般的であったため，組織内部の毛細血管構造の三次元的な分布について把握した例はほとんどなかった．そこで本研究では，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バイオ 3D プリンターで三次元組織を作製し，その三次元組織の内部の生・死細胞及び毛細血管構造を空間的に捉え，その局在を評価することを目的とした．
【実験方法】解析対象には「ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)と HUVEC を 8:2 で混合し作製した，毛細血管構造を持つ直径 500 μm のスフェロイド」及び，「そのスフェロイド 27 個を 3×3×3 の構造となるようバイオ 3D プリンターで積層し作製した毛細血管構造を持つ約 1.5 mm の立方体状 3 次元組織」を用いた．そして，それぞれのサンプル作製後，培養 1～7 日における，サンプル内部の生・死細胞分布及び毛細血管構造を調べた．サンプル内部の死細胞および全細胞の染色には，それぞれ膜不透過性核染色試薬の PI および DAPI を用いた．また，サンプル内部の毛細血管構造の検出には，CD31 抗体を用いたホールマウント免疫染色を行った．染色後，SeeDB2G 法を用いてサンプルの透明化を行い，多光子走査型レーザー顕微鏡で深部観察し，サンプルの 3 次元画像を取得した．そして 3D 画像解析ソフトを用いて生・死細胞数の分布と毛細血管構造の分布の定量化を行った．

Analysis of distribution of viable cells, dead cells, and capillary structure inside micro-vascularized 3D tissue prepared by bio-3D printer

○Keiichi Inagaki[1], Kenji Takahashi[2], Kazuaki Ninomiya[2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words tissue engineering, micro vascular structure, 3D image analysis

1Op08 がん細胞を含む多細胞スフェロイドをバイオ 3D プリンターにより配置した三次元組織の作製

○谷内 達彦[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】現在，薬剤評価系として，培養細胞や動物個体が用いられている．しかし，細胞と動物では代謝や細胞間の相互作用の有無などの違いから薬剤評価の結果に大きな差が生まれることが知られている．そのような評価の差を補完するための，細胞と動物の中間にあたる薬剤評価系として，培養細胞から作製される三次元組織の利用が注目されている．一方，バイオ 3D プリンターはビルディングブロックである多細胞スフェロイドを所定の位置に配置することが可能であり，要望に応じた三次元組織を作製することが可能である．そこで，本研究では，正常な細胞のみからなるスフェロイドとがん細胞を含んだスフェロイドを配置した三次元組織の作製を行った．
【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)，GFP 発現ヒト乳腺がん細胞株(MCF-7/GFP Cell Line)の 3 種の細胞を用いて，種々の播種数と混合比のスフェロイドを作製し，バイオ 3D プリンターによる三次元組織の作製に適するがん細胞を含むスフェロイドの作製条件を検討した．また，スフェロイド内部の血管構造や死細胞数を切片化・染色を行うことで評価した．次に，9 個のスフェロイドをバイオ 3D プリンターにより配置した (3×1×3)の三次元組織の作製を行った．ここで，中心にはがん細胞を含むスフェロイドを，それ以外にはがん細胞を含まないスフェロイドを配置した．作成した三次元組織について培養中の観察を行ったところ，組織作製から 24 h 後にはすべてのスフェロイドが融合するとともに，GFP 発現がん細胞の 3 次元組織全体に広がっていく挙動が確認できた．

Production of 3D tissue with spheroids containing cancer cells by bio 3D printer

○Tatsuhiko Taniuchi[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, cancer cells, 3D tissue

1Op09 脂肪由来間葉系幹細胞のスフェロイドをバイオ 3D プリンターにより積層した三次元組織の作製とその分化

○神並 美華[1], 高橋 憲司[1], 仁宮 一章[2]
（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大学 新学術創成研究機構）
ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】現在，再生医療において，細胞凝集塊である多細胞スフェロイドをビルディングブロックとした三次元組織の構築が注目されている．これは従来の細胞シートを用いた方法に比べ，より大きな組織を作ることが容易となるためである．一方，脂肪由来間葉系幹細胞は安全に採取することができ，骨，軟骨，脂肪に加え神経細胞へ分化することが報告されており，今後の再生医療の重要な細胞ソースの一つである．そこで，本研究では，脂肪由来間葉系幹細胞の多細胞スフェロイドをビルディングブロックとしてバイオ 3D プリンターを用いて三次元組織の作製を行った．また作製した脂肪由来間葉系幹細胞からなる 3 次元組織について神経系の細胞へ分化誘導を行った．
【方法および結果】本研究ではヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (hADSC)を用いて 15,000 cells からなるスフェロイドを作製した．比較として，ヒト神経幹細胞(hNSC)についても同様に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)の形状に三次元組織を作製し，EGF および bFGF を含むもしくは含まない神経幹細胞用培地で培養した．培養後，組織を剣山から抜き取り固定化したあと，切片化を経て神経幹/前駆細胞マーカーである Nestin，神経細胞マーカーである Tu ｊ 1，グリア細胞マーカーである GFAP と用いた免疫蛍光染色を行った．免疫染色した切片について，共焦点顕微鏡を用いて画像撮影を行い，内部の神経系細胞への分化挙動について評価した結果について報告する．

Preparation of three-dimensional tissue by bio-3D printer using adipose-derived mesenchymal stem cell spheroids and their differentiation

○KANNAMI Mika[1], TAKAHASHI Kenji[1], NINOMIYA Kazuaki[2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words bio-3D printer, adipose-derived stem cells, 3D tissue

1Op10 接着細胞の自己集合化誘導剤を用いた幹細胞凝集塊の新規作製法の開発と評価

草加 直幸[1,2], 浅見 優月[1,2], 安部 菜月[3], 広井 佳臣[4], 西野 泰斗[3], ○岩井 良輔[1]
（[1]岡山理大・技科研, [2]岡山理大・工, [3]日産化学工業（株）・生物科学研, [4]日産化学工業（株）・工・材料科学研）
iwai@rit.ous.ac.jp

【目的】我々の研究グループは，接着細胞の自発的な集合（自己集合化）を誘導する表面コーティング剤（CAT）を開発した．本研究では，CAT を用いた細胞凝集化法の再生医療への応用を目指して，CAT と液滴スポッターを組み合わせることで，任意のサイズの幹細胞凝集塊（スフェロイド）を 1 回の細胞播種操作にて任意の数だけ均一に作製する方法を開発するとともに，形成したスフェロイドの多分化能の評価を行うことを目的とした．
【方法と結果】ナノリットル液滴スポッターを用いて CAT 液を細胞の非接着性培養皿の表面にドット状に滴下し（液量: 40～640 nL, スポット数: 100 以上）乾燥させた後，ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞を 3.0×10^5 cells/cm^2 以上の密度で播種した．播種 1 時間以内に細胞は CAT のドット固着表面にのみ接着してコンフルエント単層を形成した後，約 6～8 時間の間に一体凝集化することでスフェロイドが形成した．CAT の液滴量（固着面積）に比例して直径約 150～500 μm のサイズのスフェロイドが形成し，そのサイズ誤差はいずれも平均直径に対して 10%以内と高いサイズ均一性を有していることが分かった．一方で，これらのスフェロイドを脂肪，骨及び軟骨分化誘導培地にて 3 週間培養することで，それぞれの分化マーカーである脂肪滴，カルシウム及び II 型コラーゲンの顕著な蓄積を認める成熟化した組織が得られた．
【結論】細胞の自己集合化誘導剤である CAT と液滴スポッターを組み合わせることで，任意のサイズを有する均一なスフェロイドを 1 回の播種操作で任意の数だけ得ることができた．これらのスフェロイドは，脂肪，骨及び軟骨組織に分化させることが可能であることが確かめられたことから，本法は再生医療や創薬試験の高効率化に対して高い応用可能性を有していると考えている．

Development and evaluation of novel preparation method of multicellular shperoids generated from adhered cells using cell self-aggregation inducible reagent

Naoyuki Kusaka[1,2], Yuzuki Asami[1,2], Natsuki Abe[3], Yoshiomi Hiroi[4], Taito Nishino[3], ○Ryosuke Iwai[1]
([1]Res. Inst. Tech., Okayama Univ. Sci., [2]Fac. Eng., Okayama Univ. Sci., [3]Biol. Res. Lab., Nissan Chemical Industries, LTD., [4]Materials Res. Lab., Nissan Chemical Industries, LTD.)

Key words tissue engineering, regenerative medicine, spheroid

1Op11 肝細胞スフェロイドに短期間で細胞極性を付与する方法の開発

○小島 伸彦[1], 田尾 文哉[1], 青木 茂久[2]
（[1]横市大院・生命ナノシステム, [2]佐賀大・医）
nobuhiko@yokohama-cu.ac.jp

＜背景と目的＞肝細胞をいわゆるスフェロイド状態として培養すると，平面培養よりも生体に近い機能発現が期待できる．しかし，一般的なスフェロイドは細胞が無秩序に集合しており，特に細胞極性に関する機能評価を短期間のうちに実施することは困難であった．本研究ではスフェロイド構築時に細胞外マトリクス成分を添加し，短期間のうちに細胞極性を構築する方法の開発を目的とした．
＜方法＞肝細胞として Hep G2 と HuH-7 を，細胞外マトリクス成分としてマトリゲルを使用した．マトリゲルを数十倍程度に希釈した通常培地に細胞を懸濁し，2×10^6 cells/ml とした．シャーレに分注した 3%メチルセルロース培地に細胞懸濁液を 1 μl 吐出して，細胞とマトリゲルとを凝集・濃縮させ，マトリゲルを含有したスフェロイドを作製した．そのままメチルセルロース培地で 2 日間培養してから各種の解析を行った．
＜結果＞スフェロイドのパラフィン切片を HE 染色して観察したところ，マトリゲルを添加したスフェロイドはコントロール条件と形態的に大きな変化は見受けられなかった．一方，マトリゲルを薄膜充填したスフェロイドでは，培地中へのアルブミン分泌活性が 2 倍程度まで向上しており，マトリゲルがスフェロイド内に薄膜状に充填されていることが伺えた．極性形成に関するタンパク質について免疫染色をおこなったところ，ZO-1，Ezrin などが細胞―細胞間に局在していた．薬剤排泄に関わる MRP-2 の局在も亢進しており，胆汁酸モデル化合物の排泄も確認できた．電子顕微鏡による観察では，毛細胆管様構造の形成が観察された．
＜結論＞メチルセルロース培地を用いた細胞・細胞外マトリクスの凝集・濃縮によって，2 日間という短期間で細胞極性・毛細胆管様構造の構築を可能とする手法を開発できた．

Method to add cell polarity to hepatic multicellular spheroid in a short period of time

○Nobuhiko Kojima[1], Fumiya Tao[1], Shigehisa Aoki[2]
([1]Grad. Sch. Nanobiosci., Yokohama City Univ., [2]Fac. Med., Saga Univ.)

Key words hepatocyte, tissue engineering

1Op12 培養デバイス TASCL による神経細胞スフェロイドの構築

○宮本 義孝, 池内 真志
（東大・先端研）
myoshi1230@gmail.com

3D 培養を用いた細胞・組織構築物（スフェロイド）の創製，細胞レベルから組織・臓器レベルへの試みが，近年数多く報告されている．我々も，これまで，TASCL (Tapered Stencil for Cluster Culture) Device を用いて，肝臓や脂肪様組織構築物などを構築してきた．本デバイスは，PDMS（ポリジメチルシロキサン）シート上に所定の形状の貫通孔を多数配置して，貫通孔の壁面は上部から下部に向かうテーパーとしている．デバイス表面は，水平面は全く存在せず，親水化処理を施し，細胞を播種すると，必ずいずれかの貫通孔の底面に向かって沈降する．すなわち，一度の播種操作で，培養基材上で制御された細胞数及び密度条件下でのスフェロイドを大量に生産することができる．これまでに，我々は，細胞播種数に比例して，球状のスフェロイドは大きくなり（φ100-300μm），個々のスフェロイドの大きさも均一かつ高い形成率を示すことを報告している（Miyamoto Y, Ikeuchi M et al. Cell Medicine. 2015.ほか）．神経幹細胞の培養として，浮遊培養中で単一の神経幹細胞から細胞塊（ニューロスフェア）を形成させる手法が一般的に知られている．そこで，本研究では，3D 培養神経モデルとして，ラット副腎褐色細胞腫（PC12）やヒト神経芽細胞腫（NB-1）などを用いて，TASCL Device による神経細胞様スフェロイドの構築について報告する．

Construction of nerve cell spheroids using TASCL device

○Yoshitaka Miyamoto, Masashi Ikeuchi
(RCAST, Univ. Tokyo)

Key words nerve cells, 3D culture, medical device, spheroid

1Op13 胚様体形成期間中の CHIR99021 処理濃度がヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導に与える影響

○依田 聖未, 大貫 喜嗣, 黒澤 尋
（山梨大院・統合応生）
kurohiro@yamanashi.ac.jp

【背景・目的】CHIR99021（以下 CHIR）はヒト iPS 細胞の樹立や心筋の分化誘導などに使用される GSK-3β 阻害剤の 1 つである．本研究室では未分化維持培養 2 日目から高濃度で CHIR 処理を行うことで初期中胚葉分化関連遺伝子の発現が向上することを明らかにした．我々はこの方法によりヒト iPS 細胞から中胚葉系細胞である心筋細胞へ効率的に分化誘導できると考えた．本研究では，96-well 非接着型 U 底 plate を用いた胚様体（以下 EB）形成期間中の CHIR 処理濃度がヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導に与える影響を検討した．
【方法】NutriStem® hESC XF （Biological Industries Ltd.）にて feeder-free 条件下で培養したヒト iPS 細胞 （201B7, 253G1, RIKEN BRC）を Accutase™ によりシングルセルに分散し，3000 cells/well で Lipdure-coated plate A-U96 上に播種した．播種後は毎日 10 μM の Y-27632 を含む NutriStem® hESC XF で半量の培地交換を行い 4 日間浮遊培養して EB 形成を行った．CHIR 処理は 4 日間の EB 形成期間のうち後半 2 日間で行い，処理濃度を 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μM とした．形成した EB は PSC Cardiomyocyte differentiation kit（Thermo Fisher Scientific Inc.）の Medium B で 2 日間浮遊培養した．さらに，gelatin コートした 24-well plate 上で同 kit の Maintenance medium で 8 日間接着培養した．
【結果・考察】4 及び 8 μM CHIR 処理条件下で形成された EB は Medium B での浮遊培養中に嚢胞化が確認された．その後，EB を接着培養に移行したところ，4 μM CHIR で処理した EB において拍動性心筋細胞が確認された．以上の結果から，EB 形成期間中に 4 μM CHIR で処理を行うとヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導が促進されることが示唆された．

Effect of the concentration of glycogen synthase kinase-3β inhibitor (CHIR99021) during embryoid body formation on cardiomyocyte differentiation from human iPS cells

○Kiyomi Yoda, Yoshitsugu Ohnuki, Hiroshi Kurosawa
(Grad. Sch. Int. Appl. Life Sci., Univ. Yamanashi)

Key words cardiomyocyte differentiation, CHIR99021, human iPS cells, embryoid body

1Op14 iPS 細胞由来運動神経を利用した神経筋接合を有する三次元筋組織の構築

○吉岡 貫太郎, 井藤 彰, 河邉 佳典, 上平 正道
（九大院・工）
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

[目的]
近年，iPS 細胞を利用した薬剤スクリーニングが注目されている．iPS 細胞由来運動神経を用いた例では，筋委縮性側索硬化症 (ALS)などの患者由来の細胞から iPS 細胞を作製し，運動神経細胞へと分化誘導を行い，薬剤スクリーニングへの応用が試みられた．しかし，既存の方法では運動神経細胞の生存率や遺伝子発現解析による成熟度を指標に薬剤を評価しており，運動神経細胞が本来有している筋肉を収縮させる働きについては調べられていない．本研究では，運動神経細胞の筋肉を収縮させる働きを調べるために，マウス iPS 細胞由来運動神経とマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を混合した複合三次元筋組織により，神経筋接合を介して運動神経細胞からのシグナル伝達による筋収縮モデルの作製を試みた．
[結果と考察]
初めに，iPS 細胞由来運動神経が筋管と神経筋接合を形成するかを調べるため，マウス iPS 細胞由来運動神経と C2C12 細胞の平面共培養を行った．共培養 7 日目に神経伝達物質であるグルタミン酸を添加すると，筋管の収縮が見られたことから，iPS 細胞由来運動神経が筋管と神経筋接合を形成していることが分かった．さらに iPS 細胞由来運動神経と C2C12 細胞の複合三次元筋組織を作製し，筋管上に存在するアセチルコリン受容体の蛍光染色を行ったところ，運動神経細胞と接している領域の筋管上で，神経筋接合が形成されている時に見られるアセチルコリン受容体の集積が観察された．複合三次元筋組織において，グルタミン酸添加により筋組織の収縮力の上昇が認められた．これらのことから三次元筋組織において神経筋接合が形成できたものと考えられ，収縮力を指標とした iPS 細胞を用いた新たな神経筋接合モデルとして薬剤スクリーニングなどへの利用が期待できる．

Construction of three-dimensional muscle tissues with neuromuscular junction using iPS cell-derived motor neuron

○Kantaro Yoshioka, Akira Ito, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira
(Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words Skeletal muscle tissue engineering, iPS cell, Motor neuron, Neuromuscular junction

1Op15 毛包を有する皮膚組織の作製

○楯 芳樹, 景山 達斗, 福田 淳二
（横国大院・工）
fukuda@ynu.ac.jp

【目的】創薬分野において，培養皮膚は培養細胞を用いた試験で実現できなかった薬物の透過性や刺激などを簡潔に予測できるツールとして期待されている．しかし，既存の培養皮膚は，皮膚に存在すべき皮膚附属器をもたないために，スクリーニングの予測精度や評価できる項目が少ないことが課題である．我々は，これまでに皮膚附属器の 1 つである毛包の原基を大量調製する技術を開発し，これを移植することで毛周期を繰り返す毛髪が再生できることを示してきた（T.Kageyama et al. Biomaterials, 154, 291-300, 2018）．本研究では，この毛包原基を培養皮膚に組み込むことで，皮膚附属器を備えた皮膚組織の構築を目指した．
【方法・結果】マウス皮膚から採取した上皮系細胞と間葉系細胞を 1×10^4 cells ずつ 1:1 の比率で混合し，細胞非接着丸底ウェル培養器に播種した．2 種類の細胞は，1 つの凝集体を形成した後，3 日間の培養中に自発的に分離することで，毛包原基を形成した．この毛包原基 50 個を，表皮角化細胞と真皮線維芽細胞を含む細胞懸濁液に混合し，セルカルチャーインサートに播種し，1 日培養することでシート状組織を作製した．続いて，皮膚附属器を備えた皮膚を再生できるかを評価するために，チャンバーモデルマウスへの移植を行った．すなわち，ヌードマウスの背部皮膚を丸く切りとり，シリコーン製の円筒チャンバー（直径 7.0 mm，高さ 7.5 mm）を取り付けることで移植床を形成させ，そこに作製した培養皮膚を移植した．移植 4 週後の移植皮膚切片の組織染色の結果より，再生した皮膚内に毛包の形成が観察され，毛幹が表皮を貫通している様子も確認された．再生した毛幹を走査型電子顕微鏡で観察すると，生体の毛幹と同様に特徴的なキューティクル構造を有していた．

Fabrication of skin constructs with hair follicle

○Yoshiki Tate, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda
(Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ.)

Key words skin tissue engineering, hair follicle, chamber assay

1Op16 不飽和カルボニル化合物が血管構成細胞に及ぼす影響の解明

○東 恒仁, 眞井 洋輔, 真崎 雄一
（北大院・医・細胞薬理）
thigashi@med.hokudai.ac.jp

【背景と目的】アクロレインやメチルビニルケトンに代表される不飽和カルボニル化合物は，有機物が燃焼した際の煙や高温に熱せられた食物油等に含まれる他，工業材料としても用いられており，ヒトが容易に暴露されうる環境化学物質である．不飽和カルボニル化合物は，高い細胞毒性を有することが報告されているが，毒性メカニズムについては殆ど分かっていない．血管構成細胞は，肺でのガス交換を介して血中に移行するガス性の物質に暴露されやすいことが知られており，不飽和カルボニル化合物の代表的な標的ではないかと考えられる．そこで本研究では，不飽和カルボニル化合物が血管構成細胞に及ぼす影響とその分子機構を調べることを目的とした．
【方法】細胞の生残率は MTS 還元活性測定法で評価した．プロテインキナーゼ（PKC）活性は *in vitro* キナーゼアッセイで測定した．PKC の局在が GFP 融合法で調べた．
【結果と考察】アクロレインやメチルビニルケトンは，血管平滑筋細胞の細胞死を引き起こした．不飽和カルボニル化合物による血管平滑筋細胞の細胞死は，PKC 依存的であった．アクロレインは，血管平滑筋細胞において PKC 活性を上昇させた．血管平滑筋細胞で発現している PKC は PKCalpha・PKCdelta・PKCepsilon・PKCiota の 4 種類であった．不飽和カルボニル化合物により活性化される PKC を調べたところ，PKCalpha と PKCdelta であることが判明した．以上の結果から，詳細なメカニズムはまだ不明であるものの，不飽和カルボニル化合物は PKC の活性化依存的に血管平滑筋細胞を傷害することが示唆された．

Effects of unsaturated carbonyl compounds on vascular cells

○Tsunehito Higashi, Yosuke Mai, Yuichi Mazaki
(Dept. Cell. Pharm., Grad. Sch. Med., Hokkaido Univ)

Key words toxicity, unsaturated carbonyl compounds, protein kinase C

1Op17 培養骨格筋組織の形状および機能の維持に適した FBS 濃度の探索

○長谷 洸輝 [1], 堀江 正信 [2], 藤田 英明 [3], 長森 英二 [4]
（[1]阪工大・工・生命, [2]京大・RIRC, [3]早大・WABIOS, [4]阪工大院・工）
eiji.nagamori@oit.ac.jp

[背景と目的]
以前に，培養骨格筋細胞-短冊型コラーゲン薄膜の複合体を用いた活性張力評価技術を報告した．電気パルス刺激培養において組織肥大や活性張力の増大が観察されたが，肥大した組織の剥離・凝集が張力値に誤差を生むことが課題であった．平面培養においては，例えば 1 %の FBS を含有する DMEM にて分化培養するのが定法であるが，細胞が密集した組織状態において細胞接着を維持し，機能的な培養を可能とする FBS 濃度はより高いと予想し検討した．
[方法]
まず，可視性に優れた板状組織である積層細胞シートを用い，組織維持と筋分化に適した FBS 濃度を探索した．マウス骨格筋筋芽細胞 C2C12 を積層，1～6 %の FBS を含む DMEM 培地で分化誘導を行った．経時的な組織形状観察の後，120 h にホルムアルデヒド固定し，α アクチニンと核の蛍光染色像から筋分化率を算出した.次に，C2C12 を幅 700 μm に切断したコラーゲン薄膜に播種後，上述の培地で分化培養を 120 h 行ない，さらにパルス幅 20ms，1Hz の電気パルスを周期的に印加し活性張力を測定した．
[結果と考察]
積層組織の形状は 2 %以上の FBS 濃度で剥離がなく，維持された．筋分化率は FBS 濃度と共に上昇し 3 %以上で一定となった．一方，周期的な収縮運動を伴うコラーゲン薄膜上では 3 %でも組織の剥離が観察され，活性張力は 5 %で最大となった．培養筋細胞の平面培養，積層培養，力学的ストレスを伴う組織的培養において，至適な FBS 濃度は異なることが明らかになった．

Exploration of fetal bovine serum concentration suitable for maintaining the shape and function of cultured skeletal muscle cells

○Hiroki Nagatani[1], Masanobu Horie[2], Hideaki Fujita[3], Eiji Nagamori[4]
([1]Dept. Biomed. Eng., Osaka Inst. Technol., [2]RIRC, Kyoto Univ., [3]WABIOS, Waseda Univ., [4]Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol.)

Key words Skeletal muscle, Tissue culture, Fetal bovine serum

1Op18 過酸化水素が培養骨格筋細胞の構造と機能に影響を与える濃度域の検証

○前 佳佑[1], 堀江 正信[2], 藤田 英明[3], 長森 英二[4]
（[1]阪工大・工・生命, [2]京大・RIRC, [3]早大・WABIOS, [4]阪工大院・工）
eiji.nagamori@oit.ac.jp

[背景と目的]
以前に，培養骨格筋細胞-短冊型コラーゲン薄膜の複合体を用いた張力評価技術を開発し，この技術を核として，電気パルス刺激培養における組織肥大や活性張力の増大，刺激停止による筋委縮様現象の初期ステップ（サルコメア構造崩壊とタンパク質分解促進）を観察すると共に，創薬支援等に用いる評価技術としての有用性を説いた．今回，タンパク質分解促進を伴う筋萎縮に関与するとされる酸化ストレスが，培養骨格筋の構造と機能のそれぞれの維持に及ぼす濃度域を検証することで，評価系としての再考察を行った．
[方法]
マウス骨格筋筋芽細胞 C2C12 を 10 %FBS 含有 DMEM 培地で増殖後，2 %HS 含有 DMEM 培地で分化誘導した．分化誘導 5 日目に電気パルス刺激（パルス幅 20ms，1Hz）培養を開始し，発達型培養筋を得た．ここで，酸化ストレスの代表として 0～2 mM の過酸化水素を添加し，サルコメア構造維持率，活性張力維持率，タンパク質含有濃度の維持率，あるいは細胞死滅率に影響を引き起こす 50 %阻害濃度（IC50）を算出した．サルコメア構造の維持率はαアクチニンの蛍光免疫染色によりサルコメアを含む筋管数/総筋管数で求めた．活性張力は既報の培養骨格筋細胞-短冊型コラーゲン薄膜複合体を用いる方法を用いた．
[結果と考察]
過酸化水素の添加によってサルコメア構造の消失，活性張力の低下，タンパク質含有濃度の低下，細胞死が濃度依存的に起こることが確認された．各項目に対応する IC50 は，それぞれ，0.62 mM，0.94 mM，1.0 mM，1.3 mM，であった．サルコメア構造維持率という新しい指標は，複雑なセットアップを必要とする張力測定法を若干高感度に代替可能な評価指標と成り得ることが明らかになった．

Effect of hydrogen peroxide concentration on structure and function of cultured skeletal muscle cells

○Keisuke Mae[1], Masanobu Horie[2], Hideaki Fujita[3], Eiji Nagamori[4]
([1]Dept. Biomed. Eng., Osaka Inst. Technol., [2]RIRC, Kyoto Univ, [3]WABIOS, Waseda Univ., [4]Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol.)

Key words Skeletal muscle, C2C12, oxidative stress

9月6日（木）

受賞講演（13:30 ～ 13:50）

〈生物工学奨励賞（江田賞）〉

受賞者　浅野 静（アサヒビール）

ビール醸造における微生物検査法の迅速化に関する研究

C 会場　A2Cp01　p. 139

〈生物工学奨励賞（斎藤賞）〉

受賞者　本田 孝祐（阪大院・工）

好熱性酵素を用いた細胞外人工代謝経路の構築と利用に関する先駆的研究

M 会場　A2Mp01　p. 139

〈生物工学奨励賞（照井賞）〉

受賞者　井藤 彰（九大院・工）

機能性磁性ナノ粒子の開発と医療技術への応用に関する生物工学的研究

F 会場　A2Fp01　p. 140

〈生物工学アジア若手賞〉

受賞者　Verawat Champreda
(Natl. Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand)

Exploration of lignocellulose degrading enzymes from hidden bioresource for biorefinery and green industries

H 会場　A2Hp01　p. 140

一般講演（9:00 ～ 11:36）

食品科学，食品工学	C 会場	p. 141
醸造学，醸造工学	D 会場	p. 144
生物化学工学／培養工学／バイオプロセス	F 会場	p. 145
遺伝子工学	G 会場	p. 148
バイオマス，資源，エネルギー工学	H 会場	p. 151
タンパク質工学	I 会場	p. 154
発酵生理学，発酵工学／代謝工学／オミクス解析	J 会場，K 会場	p. 157
糖鎖工学／生合成，天然物化学	L 会場	p. 163
酵素学，酵素工学	M 会場	p. 166
環境浄化，修復，保全技術／環境工学，廃水処理技術	N 会場	p. 169
セル＆ティッシュエンジニアリング	O 会場	p. 172

一般講演　（14:06 ～ 16:30）

醸造学，醸造工学	C 会場	p. 175
生物化学工学／培養工学／バイオプロセス	E 会場，F 会場	p. 177
遺伝子工学	G 会場	p. 183
バイオマス，資源，エネルギー工学	H 会場	p. 186
タンパク質工学／生体情報工学，バイオインフォマティクス／システムバイオロジー	I 会場	p. 188
発酵生理学，発酵工学／代謝工学／オミクス解析	J 会場，K 会場	p. 191
酵素学，酵素工学	L 会場，M 会場	p. 197
環境浄化，修復，保全技術／環境工学，廃水処理技術	N 会場	p. 202
セル＆ティッシュエンジニアリング	O 会場	p. 204

A2Cp01 ビール醸造における微生物検査法の迅速化に関する研究

○浅野 静
（アサヒビール）
shizuka.asano@asahibeer.co.jp

ビールは，栄養源が少ないこと，炭酸ガスを含み酸素をほとんど含んでいないこと，pH が低いこと，およびアルコールを含むことから，大半の微生物は混入しても増殖することができない．しかしながら，一部の酵母と細菌は増殖することができ，ビールに混濁や異臭をもたらすことが知られている．その中でも乳酸菌をはじめとするビール混濁性細菌は，菌種レベルの解析をしないとビール中での増殖能が判別できない点と，一般的な検査培地に生育しにくいため培養法での検出に時間がかかる点が，ビール醸造の品質管理において大きな問題となっていた．そこで演者らは以下の検査法の開発および迅速化に関する研究を行った．

1.マルチプレックス PCR 法を用いたビール混濁性細菌の包括的な菌種同定検出法の開発
食品業界における微生物検査において多用され，確実で迅速な検査法のひとつが菌種特異的 PCR 法である．一菌種ごとに増幅反応を確認するようなシンプレックス PCR 法が一般的ではあるが，近年の新菌種提案の増加に伴いビール混濁性細菌の菌種も増加傾向にあることから，本方法による検出菌同定は実用上困難になりつつあった．そこで，強いビール混濁性細菌として報告されている 12 菌種を対象としたマルチプレックス PCR 法を構築し性能評価を行ったところ，実用水準を満たした検出感度，特異性，および同種異株に対する反応性を有していることが示され，簡単で迅速な網羅的検査法を構築することができた．さらに，ラムダ DNA 配列と対象ビール混濁性細菌の遺伝子配列を組み合わせた人工陽性対照 DNA 溶液の作製法を開発した．本 DNA 溶液を使用することにより，微生物試験環境にビール混濁性菌の DNA 溶液を持ち込むことなく，1 反応系ですべてのプライマーの反応性を確認することが可能となった．
2，ビール馴化が乳酸菌に及ぼす影響の解析
生ビール製造工程の微生物管理において，一般的に除菌フィルターは最後の砦とも言える重要な工程である．しかしながら，これまでビールの除菌フィルターの性能評価試験で用いる微生物種と培養条件について検討した報告例はほとんどない．一方，ビール環境に生息するビール混濁性乳酸菌が，実験室で通常見られる生態とは異なる可能性については以前から危惧されていた．演者らは，除菌フィルター性能を実情に近い状態で評価する目的で，供試菌とその培養条件について検討を行った．その結果，ビール環境に順応しているビール混濁性乳酸菌は通常の実験室株よりもフィルターを通過しやすくなっていることが明らかとなり，その要因の一つが矮小化であることが示唆された．そこで，強いビール混濁性を示す *Lactobacillus lindneri* ならびに *L. paracollinoides* について，さらに高度にビール馴化を行い性状調査を行ったところ，植え継ぎ回数が増加するに従って，*L. lindneri* DSM 20692 株および *L. paracollinoides* JCM 11969^{T} 株は徐々に MRS 培地での生育性が低下するのが観察された．さらに，ビールで 40 回から 70 回程度の植え継ぎを行った株，および 30 回植え継いだ後ヒートショックを施した株では，MPN 法や蛍光活性染色法では一定数の生菌数が確認できるのに対して，MRS 培地で全く検出できなくなる現象が観察され，ビールへの高度な馴化，ならびに加熱によるストレスなどによって難培養化が引き起こされることが示唆された．このように，ビールに極度に馴化した乳酸菌株は，培地で検出されることなく品質事故を引き起こす可能性があることが明らかとなり，ビール馴化株を用いた微生物管理の重要性が示された．
3，マイクロコロニー法を用いたビール混濁性乳酸菌の迅速検出法の開発
ビール混濁性乳酸菌はごくわずかな菌数でも製品ビールで増殖することから，ビールの微生物検査には確実な検出力を持つ培養法が用いられてきた．一方，培養法で結果を得るまでには 1-2 週間と長い時間がかかるため，製品の出荷可否を判定するには不向きであった．そこで演者らは，前述のビール馴化株も含めて包括的にビール混濁性乳酸菌を検出できる ABD 培地と，蛍光染色法を組み合わせた新規検査系の開発を行い，ビール混濁性乳酸菌を 3 日以内に検出する方法を確立した．本法では第一ステップとして，ABD 培地上での短時間培養によりビール混濁菌を特異的に増殖させ，第二ステップとして，自動検出できる蛍光顕微鏡にて蛍光染色された微小マイクロコロニーを高感度で検出する．この方法における検出感度および特異性を調査したところ，数 cells/検体レベルの混入混濁菌を検出できる感度を有し，さらにビール混濁性を持たない環境菌に対して擬陽性反応を示さないことが確認された．また，検出されたマイクロコロニーに対して，ビール混濁性乳酸菌の rRNA 遺伝子と相補する配列を持つ蛍光プローブを用いて蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）を行うことにより菌種特異的な検出も可能となった．

Studies on rapid detection of beer-spoilage bacteria

○Shizuka Asano
(Asahi Breweries, Ltd.)

Key words lactic acid bacteria, PCR, beer-spoilage, detection

A2Mp01 好熱性酵素を用いた細胞外人工代謝経路の構築と利用に関する先駆的研究

○本田 孝祐
（阪大院・工）
honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

有用代謝産物の発酵製造に資する微生物株育種のため，代謝工学は欠かすことのできない重要な技術体系へと成熟しつつある．しかし残念ながら，代謝工学に基づく育種が期待どおりの生産性向上に結び付かない事例も少なくない．これは，我々が商業目的で微生物に「作ってほしい代謝物」と，微生物が自身の生存のために「作りたい代謝物」とが必ずしも合致しないジレンマに起因する．例えば，高蓄積により細胞に毒性を示す代謝物が発酵生産の対象とはなりづらいことは容易に想像できよう．各種オミクス解析により得られる情報と計算科学を駆使した代謝シミュレーションにより，このジレンマに折り合いをつけようという試みが近年の代謝工学分野における主要なトレンドのひとつとなっている．これに対し演者らのグループでは，生きた微生物の代謝経路を改変するのではなく，代謝反応を担う酵素だけを細胞外で組み合わせ，微生物の生命活動とは独立した（すなわち物質生産に特化した）人工代謝経路を *in vitro* で構築・起動することにより，上記のジレンマを解消することを目論んでいる．この際，（超）好熱菌に由来する耐熱性酵素を用いることで，これらを発現させた中温性微生物（大腸菌など）の熱処理のみによる簡便な酵素調製と，酵素失活による長時間反応への不適合性の回避を実現している．生きた細胞を用いない本法では，宿主微生物の生理活性に依存しない物質生産が可能であるだけでなく，用いる酵素の組み合わせ次第で，原理上，あらゆる代謝物を選択的かつオンデマンドに製造することができる．*In vitro* 代謝工学と命名した本法により，演者らはこれまでに，グルコースやグリセロール，コロイド状キチンを原料に，L-乳酸，L-リンゴ酸，1-ブタノールなどのワンポット生産を実証している [1-5]．また，これらの取り組みで用いられた *in vitro* 代謝経路は，単に天然の代謝経路を「コピー&ペースト」しただけのものでなく，補酵素類（ATP/ADP，NAD^{+}/NADH など）の消費/再生をバランスさせ，これらの消費量を最小化するなどの工夫が施されたものとなっている．このほかにも演者らは，*in vitro* 代謝工学の実用性を高めるための各種要素技術開発にも取り組んでいる．その成果としてこれまでに，(i) 多数の酵素のワンステップ調製を目的とした耐熱性酵素遺伝子群（最大 9 つ）の人工オペロンへの集積と共発現 [6]，(ii) NAD(H)の安定化のための *in vitro* サルベージ合成法の開発 [7]，(iii) 人工代謝経路構築のための酵素濃度比の最適化プログラム構築などに成功している．また，経路構築作業の過程で実施した各種耐熱性酵素の探索・評価試験の一部は，好熱菌がそのユニークな生態を示すにあたって，これらの酵素が果たす生理的機能の解明にもつながっている [8]．本講演では，これらの研究成果について概説するとともに，*in vitro* 代謝工学による有用代謝物生産の実用化に向けて現在進行中の取り組みについても紹介したい．

[1] Ye X et al (2012) Microbial Cell Fact, 11, 120; [2] Ye X et al (2013) J Biotechnol, 164, 34-40; [3] Krutsakorn B et al (2013) Metab Eng, 20, 84-91; [4] Jaturapaktrarak C et al (2014) Bioresour Bioprocess, 1, 18; [5] Honda et al (2017) J Biosci Bioeng, 124, 296-301; [6] Ninh PH (2015) Biotechnol Bioeng, 112, 189-196; [7] Honda et al (2016) Metab Eng, 114-120; [8] Taniguchi et al (2017) J Bacteriol, 119, e00359-17

Construction and implementation of *in vitro* synthetic pathway using thermophilic enzyme

○Kohsuke Honda
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words synthetic bioengineering, thermophile, *in vitro* metabolic engineering

A2Fp01 機能性磁性ナノ粒子の開発と医療技術への応用に関する生物工学的研究

○井藤 彰
（九大院・工）
akira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

現在，ガンは不治の病ではなくなってきたが，未だ有効な治療法が少なく，新しい治療法の開発が望まれる．磁性ナノ粒子は交流磁場中で発熱する性質をもつことから，磁性ナノ粒子を腫瘍部位に選択的に集めることができれば，患者の外部から交流磁場を照射することでガン特異的な加温によるガン温熱療法が可能となる．我々は，磁性ナノ粒子を腫瘍に選択的に送達するために，リポソームで包埋してガン特異的な抗体などを結合させた種々の腫瘍標的型磁性ナノ粒子を開発し，これらを用いた温熱療法によって，様々な動物や癌で腫瘍の完全退縮に成功した．また，興味深いことに，磁性ナノ粒子を用いて温熱療法を施すと，抗腫瘍免疫が誘導されることを世界で初めて見いだした．これは，熱でガンを殺す治療法と見なされてきた温熱療法からは全く予想できなかった生体反応であり，原発癌を治療すれば転移癌をも免疫によって殺傷できる可能性を秘めている．この腫瘍免疫を誘導するガン温熱療法について，前臨床研究において，動物モデルの腫瘍で 90%以上の非常に高い完全退縮率を達成した．さらに，ヒトへの臨床応用として，札幌医科大学皮膚科における臨床研究に資する機能性磁性ナノ粒子を開発した．

近年，京都大学の山中教授らによる iPS 細胞樹立法の確立により，我が国における再生医療の実用化が強く望まれているが，細胞および組織培養プロセスにおける工学的課題は多い．磁性ナノ粒子は磁石に引き寄せられる性質があることから，標的細胞の表面に磁性ナノ粒子を結合して磁気標識することで，外部磁場によって磁気誘導による細胞操作を行うことが可能である．我々は，再生医療における各プロセスに磁力を利用することで，磁力を用いた再生医療技術の開発を行ってきた．これまでに，抗体結合型磁性ナノ粒子を用いたヒト骨髄からの間葉系幹細胞の磁気分離，磁性ナノ粒子を用いた遺伝子導入技術の開発および微小パターン化磁石を作製して，血管内皮細胞の磁気パターニングに成功している．特筆すべきは磁力を用いた三次元組織構築プロセスで，特に磁力で筋芽細胞を積層していくことで，細胞が密で配向した骨格筋組織を作製することに成功し，電気刺激に応答して収縮力を発揮する筋肉組織を試験管内で作製することに成功した．このティッシュエンジニアリングを用いて作製した骨格筋組織は，収縮力を指標とした薬剤スクリーニング分野への応用が期待される．現在，筋ジストロフィ患者由来 iPS 細胞から骨格筋分化を誘導することで，筋疾患に対する薬剤スクリーニング法の開発を行っている．これら一連の成果から，再生医療という次世代のバイオプロセス分野に磁気細胞操作という新しい方法論を創出したと考えている．再生医療の各工程について，磁力を巧みに利用することでそれぞれのプロセスの効率化に成功したことから，将来的には自動培養装置への導入も期待できると考えられる．

本講演では，機能性磁性ナノ粒子の開発と医療技術への応用に関する生物工学的研究と題し，我々がこれまでに行ってきた機能性磁性ナノ粒子を用いたガン温熱療法および再生医療プロセスの開発について発表する．

Medical technology using functional magnetic nanoparticles

○Akira Ito
(Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words magnetic nanoparticle, tissue engineering, hyperthermia

A2Hp01 Exploration of lignocellulose degrading enzymes from hidden bioresource for biorefinery and green industries

○Verawat Champreda
(Natl. Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand)
verawat@biotec.or.th

The world is now stepping towards the age of bioeconomy. Bio-resources are being explored as the renewable starting materials for conversion to biofuels, chemicals, and biomaterials and on another side, as a valuable genetic resource for searching potent microbes and enzymes for industries. The research activities at the Enzyme Technology Laboratory, BIOTEC aim to understand the complex cooperative microbial processes on plant biomass degradation in nature and translate the knowledge into efficient enzymes for greener industries. Our works span from searching potent lignocellulose-degrading enzymes from the rich microbial bio-resource of the country, developing synergistic enzyme systems for lignocellulose hydrolysis and modification as well as on biocatalyst fabrication in various immobilization designs, to optimizing bio-processes for enzyme prototype production. The culture-independent metagenomic technique has been applied as an effective tool to explore the world of uncultured microbes, which represents up to 99% of the total biodiversity. A collection of environmental metagenomes from ecosystems active in lignocellulose degradation e.g. peatswamp forest, termite gut, and bagasse collection site has been explored using combination of activity-based screening and next-generation sequencing with the use of advanced bioinformatics tools for gene mining and in-depth analysis of the dataset. This provides an insight into the diversity and dynamics of lignocellulolytic microbial communities and genes encoding for biomass-degrading enzymes, contributing to our capability to understand biochemical processes on plant biomass decomposition in nature. Together with culture-dependent screening from the Thailand Bioresource Research Center, our “Enzyme library” which is a collection of crude multi-activity and recombinant single-activity cellulases, hemicellulases, and ligninases as well as auxiliary components (e.g. expansins and AA9 lytic polysaccharide monooxygenases) derived from cultured and uncultured microbes has been established. These enzymes have been applied on degradation and modification of lignocellulosic plant fibers aiming to development of greener production processes through closed collaboration with local and international partners. Target applications include chemical and energy saving in pulp and textile industries, increasing nutrient uptake from animal feed, sugar platform biomass conversion, and high-value specialty enzymes in healthcare products. In addition, translational research on multi-disciplinary biomass conversion technology has been initiated on developing low-energy hydrothermal and organosolv fractionation processes for local biomass, creating efficient synergistic enzyme systems for lignocellulose saccharification, and designing of catalysts and biocatalysts for sugar conversion to fuels and chemicals. Through closed collaboration with leading local and international companies in relevant industries, our research will lead to efficient utilisation of the country’s bio-resources for developing bio-based industry with multi-disciplinary technology.

Exploration of lignocellulose degrading enzymes from hidden bioresource for biorefinery and green industries

○Verawat Champreda
(Natl. Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand)

Key words bioresources, biomass, enzyme, metagenomic libraries

2Ca01 LC/ESI-MS/MS を用いた玄米米糠麹 (FBRA) 中ポリアミンの定量と製造過程における含有変動解析

○堀江 裕紀子 [1,3], 後藤 綺花 [2], 伊藤 麻里 [3], 津吹 澄 [2], 池川 繁男 [4], 小川 祥二郎 [1,2], 東 達也 [1,2]
（[1]東理大院・薬, [2]東理大・薬, [3]コーケン, [4]玄米酵素）
horie@genmaikoso.co.jp

【背景と目的】ポリアミンにはアンチエイジンク，抗酸化，抗炎症などの作用が報告されており，その摂取によって健康増進が期待される．ポリアミンは納豆をはじめ，発酵食品に多く含まれることが報告されている．玄米米糠麹 (FBRA) は，玄米と米糠を麹菌によって発酵させた健康食品であり，FBRA もポリアミン含量が多いことが期待される．そこで本研究では，FBRA，未発酵原料及び発酵途中試料中のポリアミン [プトレシン (PUT)，スペルミジン (SPD)，スペルミン (SPM)] の定量法を構築し，その含量を明らかとした．
【手法】FBRA，未発酵原料及び発酵途中試料について，その 25 mg に 0.1 M の塩酸を加え，超音波処理によってポリアミンを抽出した．このうち 250 μg の試料に相当する抽出液を DBD-F で誘導体化し，LC/ESI-MS/MS に付した．本法は，日内・日間変動係数が 9.5％以下，添加回収率が 94.5－101.8％と，満足しうる精度・正確度を有していた．
【結果・考察】FBRA (n = 18) を分析したところ，PUT の含量は 14－52 μg/g，SPD のそれは 81－183 μg/g，SPM のそれは 43－91 μg/g であり，FBRA はポリアミンを多く含有している食品であることが示された．さらに，製造工程が進むにつれて PUT 及び SPM の含量は減少し，SPD の含量は増加することが明らかになった．SPD の含量は PUT のそれとミラーイメージの挙動を示し，特に麹菌が対数的に増殖することが知られている発酵開始 24 時間後から FBRA 完成までの間に増加した．このため，SPD は麹菌によって PUT から合成されたものと考えられる．現在，菌体量とポリアミン含量との相関について調査している．

Changes of the polyamine contents during industrial fermentation of brown rice and rice bran with *Aspergillus oryzae*.

○Yukiko Horie[1,3], Ayaka Goto[2], Mari Itoh[3], Sumi Tsubuku[2], Shigeo Ikegawa[4], Shoujiro Ogawa[1,2], Tatsuya Higashi[1,2]
([1]Drad. Sch. Pharm. Sci., Tokyo Univ. Sci., [2]Fac. Pharm. Sci., Tokyo Univ. Sci., [3]Koken Co., Ltd., [4]Gemai Koso Co., Ltd.)

Key words brown rice, fermentation, polyamine, *Aspergillus oryzae*

2Ca02 トランスクリプトミクスによるキトサン処理時のバナナ果実における網羅的遺伝子発現解析

○山本 佳奈 [1,2], Putri Sastia [1,2], Dwivany Fenny [2], 福崎 英一郎 [1]
（[1]阪大院・工, [2]バンドン工科大学院・生命科）
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

バナナなどの果実は収穫後も呼吸により成熟が進み，トランスクリプトーム解析により収穫後の貯蔵期間に遺伝子発現が変化することが明らかにされている．本研究では鮮度保持剤であるキトサンが果実表面に被膜処理された際に遺伝子発現に及ぼす効果を検討するために，トランスクリプトーム解析を実施した．キトサンは，被膜処理により植物組織への酸素の浸透を阻害し呼吸を抑制することで，果実の成熟を遅らせることができる．しかし，キトサンが遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析した報告はなく，果実のキトサン被膜処理に対する応答についての詳細は不明である．本研究では，通常状態で成熟させたバナナとキトサン処理を施し成熟させたバナナの 2 群間での遺伝子発現状況の比較を行い，キトサン処理が遺伝子発現に与える影響について網羅的に調査した．これらのサンプルから抽出した RNA を RNA-seq を用いて配列を解析し，全転写産物の定量を行った．発現遺伝子について 2 群間の発現量の平均の差を検出し，t 検定により 2 群間で発現が変動している遺伝子（differentially expressed genes, DEGs）を同定した．結果，早期の成熟段階でより多くの遺伝子発現が 2 群間で変動していることが明らかになった．さらにキトサンが多くの遺伝子の発現を制御していることが示され，成熟に重要な代謝経路などへの関与が示唆された．

Comprehensive gene expression analysis of chitosan-coated banana by transcriptomics-based approach

○Kana Yamamoto[1,2], Sastia Putri[1,2], Fenny Dwivany[2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]School of Life Sci. and Technol., Inst.Technol. Bandung)

Key words transcriptome, gene expression, chitosan, banana

2Ca03 Metabolic Profiling of Cavendish Banana (*Musa acuminata* cv AAA) to understand its color changes

○Anjaritha Aulia Rizky Parijadi[1], Fenny Martha Dwivany[2], Sastia Prama Putri[1,2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ, [2]Dept. Biology., Sch. of Life Sci. and Technol., Inst. Technol. Bandung)
fukusaki@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. Color changes is a common parameter used for fruit ripening process. Banana is a climacteric fruit where the color changes due to ethylene burst around the fruit. GC/MS analysis in combination with multivariate analysis of banana from sixteen observation days were performed. We first categorized banana samples based on its color changes, and established parameter of ripening. Gas chromatography/mass spectrometry analysis results showed small hydrophilic metabolites were profiled from non-ripened to over-ripened (day 0 to 16). These metabolites were then correlated with color changes to verify their involvement in banana ripening process. The results from this study suggests several metabolites are indicated to play a role in banana ripening process.

Metabolic Profiling of Cavendish Banana (*Musa acuminata* cv AAA) to understand its color changes

○Anjaritha Aulia Rizky Parijadi[1], Fenny Martha Dwivany[2], Sastia Prama Putri[1,2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ, [2]Dept. Biology., Sch. of Life Sci. and Technol., Inst. Technol. Bandung)

Key words Banana, *Musa acuminata* cv. AAA, Metabolic profiling, Color changes

2Ca04 Quality prediction and authentication of Indonesian specialty coffee using GC/MS-based metabolomics approach

○Sastia Putri[1], Tomoya Irifune[1], Yusianto[2], Ucu Sumirat[2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Indonesian Coffee and Cocoa Research Institute)
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Quality evaluation is commonly assessed on the basis of human sensory perception, particularly for agricultural crops such as coffee and tea. In recent years, metabolomics approach has been used as a powerful tool for quality prediction of various food commodities. In addition, 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. In addition, a PLS-based prediction model to predict cupping score of Indonesian specialty coffee was constructed and important metabolites that correlate significantly with coffee quality was identified. The result from this study demonstrate that the species and origins can be rapidly discriminated by evaluating the major metabolites of green coffee beans and cupping score of coffee can be predicted with high accuracy.

Quality prediction and authentication of Indonesian specialty coffee using GC/MS-based metabolomics approach

○Sastia Putri[1], Tomoya Irifune[1], Yusianto[2], Ucu Sumirat[2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Indonesian Coffee and Cocoa Research Institute)

Key words Metabolomics, Specialty coffee, GC/MS

2Ca05 GC-MS-based metabolomics for the classification of tempe along to different regions and production processes in Indonesia

○Adinda Darwati Kadar[1], Pingkan Aditiawati[2], Made Astawan[3], Sastia Prama Putri[1,2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Biotechnol., Institut Teknologi Bandung, [3]Dept. Food Sci. Technol., Bogor Agric. Univ.)
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Tempe, a fermented soybean originally from Indonesia, is a meat-substitute protein source with high nutritional quality. Differences in the production process and unique fermentation condition result in varieties of tempe. To date, there are very few studies on the characterization of tempe based on the differences of production process and geographical origin. Metabolomics is a powerful tool for the analysis of food quality, food safety, and determination of origin and varietal differences. In this study, metabolomics is applied for the study of Indonesian tempe obtained from various regions and production processes. Seventeen samples were collected from 6 different cities in Java Island, which were produced by home-scale traditional tempe maker, semi-modern industry and modern industry. Untargeted metabolomics by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) was applied to discriminate various kinds of tempe and identify metabolites that are associated with these differences. Results showed that tempe produced in different places clustered together according to the cities and their production category. Sugars and amino acids groups were found to be discriminant metabolites that contributed to this clustering. This is the first report that reveals metabolic differences between different varieties of tempe from different regions and production processes. The knowledge from this study is important for future improvement of tempe production.

GC-MS-based metabolomics for the classification of tempe along to different regions and production processes in Indonesia

○Adinda Darwati Kadar[1], Pingkan Aditiawati[2], Made Astawan[3], Sastia Prama Putri[1,2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Biotechnol., Institut Teknologi Bandung, [3]Dept. Food Sci. Technol., Bogor Agric. Univ.)

Key words Metabolomics, Indonesian tempe, Metabolite profile, Untargeted metabolomics

2Ca06 Non-targeted metabolomics-based prediction of sensory value of *Litopenaeus vannamei* (white leg shrimp)

○Safira Latifa Erlangga Putri[1], Felicia Irene Saputra[2], Gede Suantika[2], Sastia Prama Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Microbiol., Sch. of Life Sci. and Technol., Inst. Technol. Bandung)
safira_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Shrimp is one of the important commodities in fish industry and its worldwide demand is expected to growth continuously for years to come. Japan as the world's top seafood consuming country has become increasingly dependent on imports for seafood product particularly aquaculture shrimp. At present, the quality of aquaculture product in Japan mainly focuses on the compliance with food safety regulation. Meanwhile, shrimp appearance and size are more important for the industries as the price increases proportionally with size. As such, the present quality evaluation standards for shrimp lacks taste evaluation method, which is crucial for consumer acceptance. This research aims to utilize metabolomic for the development of a quality evaluation method for the most important shrimp species in aquaculture industry, *Litopenaeus vannamei* or white leg shrimp. To achieve this objective, non-targeted GC/MS-based analysis and sensory evaluation were combined to construct a Projection to Latent Structure (PLS) model. In this study, we optimized the extraction method for shrimp metabolomics analysis and carried out sensory evaluation using semi-trained panelist. The constructed PLS model then allowed the identification of key metabolites that are correlated to sensory attributes. Overall this study may provide useful information for a development of novel evaluation method for the taste quality of white leg shrimp in order to improve quality through feedback to the aquaculture industry

Non-targeted metabolomics-based prediction of sensory value of *Litopenaeus vannamei* (white leg shrimp)

○Safira Latifa Erlangga Putri[1], Felicia Irene Saputra[2], Gede Suantika[2], Sastia Prama Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Microbiol., Sch. of Life Sci. and Technol., Inst. Technol. Bandung)

Key words *Litopenaeus vannamei*, metabolomics, GC/MS, sensory evaluation

2Ca07 Evaluation of in-vivo skin-whitening activity of 8-methoxydaidzein coupled with 3'-hydroxygenistein

An-Ni Ke[1], Jiumn-Yih Wu[2], ○Te-Sheng Chang[1]
([1]Dept. Biological Sci. & Technol., National Uni. Tainan, Taiwan, [2]Dept Food Sci., National Quemoy Uni., Taiwan)
mozyme2001@gmail.com

In our previous studies, two isoflavone derivatives, 3'-hydroxygenistien and 8-methoxydaidzein, were identified with potent inhibitory activity on melanogenesis in cultured mouse B16 melanoma cells. In the present study, both zebrafish and mice were used as in-vivo animal models to evaluate skin-whitening activity of the two isoflavone derivatives. The results showed that 0.1 mM of 8-methoxydaidzein inhibited melanogenesis of zebrafish larvae to 74.3% of control, and the larvae survival was not affected by the treatment. Moreover, the two isoflavone derivatives exhibited synergetic effects. However, 3'-hydroxygenistien, itself alone, did not show significant inhibition on melanogenesis under non-toxic concentrations in the zebrafish model. In the advanced mice assay, creams containing 0.5% of 3'-hydroxygenistien, 8-methoxydaidzein, or the combination of the two isoflavones were applied to the skin of the tested mice for 28 days, and the skin-whitening value (L value) were determined during the assay. The results showed that neither 3'-hydroxygenistien, 8-methoxydaidzein nor the combination of the two isoflavones showed significant skin-whitening activity in the mice skin, while the positive control with 0.5% of hydroquinone in the cream significantly increase the skin-whitening values. The results of the present study highlighted the important role of mice model in the evaluating in-vivo skin-whitening activity of developing skin-whitening agents.

Evaluation of in-vivo skin-whitening activity of 8-methoxydaidzein coupled with 3'-hydroxygenistein

An-Ni Ke[1], Jiumn-Yih Wu[2], ○Te-Sheng Chang[1]
([1]Dept. Biological Sci. & Technol., National Uni. Tainan, Taiwan, [2]Dept Food Sci., National Quemoy Uni., Taiwan)

Key words 8-methoxydaidzein, skin-whitening, zebrafish, 3'-hydroxygenistein

2Ca08 梅干しの脂質代謝改善効果

○芦田 久[1], 伊藤 あずさ[1], 大東 夏海[1], 吉原 侑希[1], 米野 雅大[1], 永井 宏平[1], 石島 智子[2], 阿部 啓子[2], 岡田 晋治[2], 鈴木 利雄[3]
([1]近大・生理工, [2]東大院・農生科, [3]阪市大院・工)
ashida@waka.kindai.ac.jp

【目的】梅干しには，食欲促進効果，抗疲労効果，抗菌効果などのさまざまな機能が知られている．本研究では，梅干しの経口摂取による腸内細菌叢，肝臓における遺伝子発現，および脂質代謝への影響を評価することを目的として，マウスを用いた試験を実施した．
【方法】白干し梅（南高梅）は和歌山県みなべ町より供与していただき，果肉部分を凍結乾燥し粉末化した．C57BL/6J♂および♀マウスを 3 群に分け，標準食(AIN-93M)，高脂肪食(HFD-60)，2%白干し梅粉末を含む高脂肪食をそれぞれ自由摂取させ，5 週間飼育した．体重と餌摂取量を経時的に測定し，最終日に解剖して肝臓，盲腸，血液を採取した．盲腸内容物は T-RFLP 法による細菌叢解析に，肝臓はマイクロアレイによる遺伝子発現解析に供した．
【結果】白干し梅群は，高脂肪食群と比較して，♀において体重増加の有意な抑制効果，♂♀において血清中の中性脂肪の有意な低下が見られた．腸内細菌では，ビフィズス菌のわずかではあるが有意な増加，*Prevotella* 属の有意な増加が見られ，高脂肪食により誘導された高い Clostridia/Bacteroidia 比の肥満型フローラが改善される傾向が認められた．高脂肪食群では，肝臓における炎症関連遺伝子の発現上昇傾向と脂質代謝関連遺伝子の発現抑制傾向が見られたが，白干し梅群ではこれらの多くの遺伝子発現を回復させる効果が示された．

Effect of Japanese pickled apricots on lipid metabolism in mice

○Hisashi Ashida[1], Azusa Ito[1], Natsumi Ohigashi[1], Yuki Yoshihara[1], Masahiro Komeno[1], Kohei Nagai[1], Tomoko Ishijima[2], Keiko Abe[2], Shinji Okada[2], Toshio Suzuki[3]
([1]Fac. Biology-Oriented Sci. Technol., Kinki Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [3]Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words lipid, triglyceride, microbial flora, metabolism

2Ca09 熱処理によっておこるポリ-γ-グルタミン酸の低分子量化に対するキレート剤の影響

○岩本 七虹[1], 山口 良弘[1,2], 荻田 亮[1,3], 田中 俊雄[1], 藤田 憲一[1]
([1]阪市大院・理, [2]阪市大・複合先端, [3]阪市大・健康研セ)
kfujita@sci.osaka-cu.ac.jp

納豆の粘性成分の一つであるポリ -γ- グルタミン酸 (PGA) は，長期保存中に粘性・分子量が低下し，品質の保持が問題となっている．PGA の低分子量化は100℃の熱処理によって加速される．先行研究から，熱処理による低分子量化はEDTA やクエン酸などのキレート剤の共存によって抑制されることがわかっている．そこで，金属イオンとの選択性が異なる各種キレート剤が PGA の低分子量化に与える影響について調べた．その結果，低分子量化の抑制は EGTA でも観察された．加えて，より Ca^{2+} に選択性の高いキレート剤 BAPTA では EDTA や EGTA 処理より，効果は若干弱まったが，低分子量化の抑制は認められた．しかしながら，Fe^{2+}に選択性の高い BPDS には抑制効果が見られなかった．次いで，低分子量化の抑制が，PGA に含まれる Ca^{2+} など二価金属イオンをキレートしたことによるものなのか，あるいは，キレート剤が PGA と相互作用した結果によるものなのかを以下のように検討した．PGA 溶液にグルタミン酸のモル比 1:1 で各種キレート剤を添加して 25℃30 分インキュベーションした後，透析を一晩行い，その後，100℃の熱処理を行った．本発表では各種キレート剤処理による PGA の低分子量化抑制効果について報告する．

The effect of chelating agents on decrease in molecular mass of poly-γ-glutamic acid during heat treatment.

○Nanako Iwamoto[1], Yoshihiro Yamaguchi[1,2], Akira Ogita[1,3], Toshio Tanaka[1], Kenichi Fujita[1]
([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]OCARINA, Osaka City Univ., [3]Res. Center. Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

Key words *Bacillus subtilis*, Polymer, poly-gamma-glutamic acid

2Ca10 植物発酵エキスにおける抗酸化成分の分析

○高木 康裕[1], 石井 もも子[2], 吉川 秀一[2], 柘植 圭介[3], 北垣 浩志[1]
([1]佐賀大・農, [2]小林製薬, [3]佐賀工技セ)
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

[目的]
植物発酵エキス(FPE)は多種多様の野菜や果物を乳酸菌や酵母により発酵・濃糖抽出することで製造される発酵食品である．植物性発酵食品の市場は拡大しており，その健康機能性に関する研究が進んでいる．近年では DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスへの FPE の投与により潰瘍性大腸炎抑制効果を示すことが明らかになった[1)]．しかし FPE において発酵における成分変化の報告は多くなく，健康をもたらすメカニズムは未だ解明されていない．一方，発酵に関与する乳酸菌はアントシアニンを分解し，腸管で吸収されやすいアントシアニジンを生成することが知られている．アントシアニジンはポリフェノールの一種であり，抗酸化成分を有する機能性成分である．そこで本研究では，機能性食品開発研究所(株)の FPE，及び森川健康堂(株)の植物発酵エキス商品 RIPE-100 に存在する抗酸化成分について，アントシアニンを中心としたポリフェノール成分に着目し調査を行った．
【方法・結果】
FPE は Sep-pak C18 を用いた固相抽出により夾雑物を除去した後に，吸着画分をメタノールで濃縮することで精製した．精製した FPE において TLC-DPPH 及び LC-ESI-MS 分析を行った．TLC-DPPH の結果，機能性食品開発研究所(株)の FPE，及び森川健康堂(株)の RIPE-100 において数種の抗酸化成分の存在が確認された．また機能性食品開発研究所(株)の FPE における LC-ESI-MS 分析の結果，Pelargonidin(Pg) に相当する m/z 271，Pg 3-glc に相当する m/z 433，Cyanidin(Cy)に相当する m/z 287，Cy 3-glc に相当する m/z 449 を持つ成分が検出された．FPE に含まれているアントシアニジン類が植物性発酵食品の健康機能性に寄与している可能性が示唆されたので，その抗酸化活性や総ポリフェノール量，未同定の抗酸化成分について現在解析している．

1）山本ら，日本農芸化学大会講演要旨集 2B10p07 （2017）

Analysis of antioxidant components in fermented beverage of plant extracts

○Yasuhiro Takaki[1], Momoko Ishii[2], Shuichi Yosikawa[2], Keisuke Tsuge[3], Hiroshi Kitagaki[1]
([1]Fac. Agric., Saga Univ., [2]Kobayashi Pharm. Corp, [3]Industrial technology Center of Saga)

Key words antioxidant, anthocyanin, anthocyanidin, fermented plant extract

2Ca11 サワードウの継代過程における化学成分変化と微生物叢変化の関連性

○大城 麦人[1,2], 百田 理恵[1], 田中 優[1], 中山 二郎[1]
([1]九大院・農, [2]山崎製パン・中央研)
nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】サワードウ（Sourdough）とは小麦粉やライ麦粉と水を混ぜ合わせたものが乳酸菌や酵母によって自然発酵したパン種の一種であり，サワードウを使ったパンは日本を含む世界各国で一定の人気を持っている．サワードウは，古くなったサワードウに小麦粉やライ麦粉と水を新たに加えて発酵させこれを繰り返して継代する過程で，化学成分と微生物叢が変化していく．先行研究[1, 2]によって，継代を開始してからの最初の 10 日間に化学成分と微生物叢が著しく変化することが明らかになったが，継代 10 日以降の両変化の詳細は不明な点が多い．そこで本研究では，サワードウを 60 日間継代する過程の化学成分変化と微生物叢変化を追跡し，両変化の関連性の解明を試みた．【方法】フランス産，北米産，日本産の小麦産地が異なる小麦粉を使ってサワードウを作成した．それぞれを 60 日間継代（継代回数は 32 回）する中で経時的にサンプリングを行い，pH および発酵関連成分の理化学分析，培養法による乳酸菌数および酵母菌数測定，分離株の菌種同定，MiSeq を用いたメタ 16S 解析を行った．【結果と考察】サワードウを継代する過程において，サワードウ中のエタノール変化が酵母 *S. cerevisiae* または偏性ヘテロ発酵型乳酸菌 *Lb. fermentum* により引き起こされたと考えられた．また，継代過程で乳酸菌種の変遷が継続したサワードウは，乳酸量が徐々に増加する傾向を示した．継代過程における乳酸菌種の出現時期に着目すると，メタ 16S 解析で検出した乳酸菌種を 3 グループに大別できた．

[1] R. V. der Meulen et al., *Appl. Environ. Microbiol.* , 73, 4741-4750, 2007
[2] S. Weckx et al., *Food Microbiol.* , 27, 1000-1008, 2010

Tracking of biochemical and microbial dynamics in spontaneous wheat sourdough during two-month propagation

○Mugihito Oshiro[1,2], Rie Momoda[1], Masaru Tanaka[1], Jiro Nakayama[1]
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Central Laboratory, Yamazaki Baking Co., Ltd.)

Key words fermentation, metabolism, flour, food microbiology

2Ca12 ミドリムシの有用脂質の構造と有用性の解析

○宮川 幸[1], 藤川 彩美[1], 阪本 真由子[1], 小濱 可奈絵[1], 柘植 圭介[2], 鈴木 健吾[3], 中島 綾香[3], 杉本 良太[3], 北垣 浩志[1]
([1]佐賀大・農, [2]佐賀県工技セ, [3]株式会社ユーグレナ)
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

【目的】ミドリムシの市場規模は 100 億円以上と拡大傾向にあり近年その機能性の高さが注目されている．これまでに，アトピー性皮膚炎の症状緩和や血糖値の上昇抑制など多岐にわたる機能性が明らかになっているが，その効能の作用機序などは未知のものもある．一方，スフィンゴ脂質やリン脂質は保湿成分として知られており，化粧品など広く用いられている．そこで本研究では，ミドリムシ脂質成分を解析することで，その応用可能性について検討を行った．
【方法・結果】ミドリムシ(Euglena gracilis) 粉末からクロロホルム・メタノールを用いて脂質抽出を行ったところ，スフィンゴ脂質とリン脂質と考えられるバンドが検出された．ワカメ・ヒジキ粉末からも同様に脂質を抽出し，TLC 解析にて他の藻類との脂質含量の比較を行った．TLC の結果，ミドリムシには他の藻類に比べて多くの脂質が含まれていることが明らかになった．次に，スフィンゴ脂質と考えられる脂質を酸加水分解しニンヒドリン染色を行ったところ，スフィンゴイド塩基が検出された．これより，スフィンゴイド塩基を骨格に持つスフィンゴ脂質であることが判明した．さらに，LC/ESI-MS を用いて脂質の構造解析を行ったところ，m/z=839.2 より，N-2'-hydroxytetracosanoyl-l-O-β-D-glucopyranosyl-9-methyl-4,8,10-sphingatrienine (d19:3/C24:0h)であると推測された．また，Phosphatidylethanolamine (m/z=768，727，755)，Phosphatidylglycerol(m/z=740)と一致したスペクトルが確認され，リン脂質が含まれているということが示唆された．
以上の結果から，ミドリムシには生体にとって有用と考えられる脂質が含まれており，化粧品・健康食品に有効な機能性素材であると考えられた．
本大会ではこれらの脂質の肌細胞への効果も併せて報告したい．

Analysis of the structure and utility of Euglena lipid

○Miyuki Miyagawa[1], Ayami Fujikawa[1], Mayuko Sakamoto[1], Kanae Kohama[1], Keisuke Tsuge[2], Kengo Suzuki[3], Ayaka Nakashima[3], Ryota Sugimoto[3], Hiroshi Kitagaki[1]
([1]Fac. Agric., Saga Univ., [2]Industrial Technology Center of Saga Prefecture, [3]euglena Co.,Ltd.)

Key words sphingolipid, phospholipid, Euglena gracillis

2Da07 ハイビスカス花から採取した酵母の特性と泡盛醸造への応用

○阿部 峻之[1], 渡辺 大輔[2], 高木 博史[2], 塚原 正俊[1]
（[1]バイオジェット, [2]奈良先端大・バイオ）
tsuka@biojet.jp

沖縄県の泡盛は，600 年を超える日本最古の蒸留酒である．我々は，泡盛風味のバラエティー化を目指した取り組みとして新たな泡盛酵母の確立を目指している．今回，南国イメージを有する「ハイビスカス」を分離源として，新たな酵母の取得と泡盛醸造への適性を評価した．沖縄県内の複数地域からハイビスカスの花を収集し，常法に従って酵母を含む微生物の集積培養を行った．これらの試料について，増殖速度，コロニー形態，アルコール生産性，泡盛小仕込み試験などによるスクリーニングを行った．その結果，泡盛醸造に応用可能と考えられる菌株を複数得た．これらの菌株について，小仕込み試験による醸造特性を詳細に評価することで，優良菌株 HC02-5-2 を取得することができた．次に，分子生物学的見地から HC02-5-2 株の特性評価を行った．NGS による全ゲノム解析を実施し，既知酵母との比較ゲノム解析を進めることで，HC02-5-2 株は *Saccharomyces cerevisiae* であることが分かった．詳細な系統解析を行ったところ，泡盛で常用されている 101 号酵母は清酒や焼酎で用いられるグループに含まれるのに対して，HC02-5-2 株はワイン醸造に用いられるグループに含まれた．HC02-5-2 株を用いて小仕込みを行った泡盛の成分を網羅的に解析したところ，従来の酵母と比較して複数かつ特定の果実様香気成分を多く含んでいた．さらに，官能評価によって従来の酵母と官能的に明らかな差異が感知された．以上の結果から，ハイビスカス花から採取した酵母 HC02-5-2 株が新たな風味の泡盛開発に貢献できることが明らかとなった．これまでに，本菌を用いて醸造した泡盛の商品化に成功しており，さらに本菌から取得した変異株（C14 株）を用いて醸造した泡盛も製品化された．

Characteristics of yeast collected from hibiscus and its application to awamori brewing

○Takayuki Abe[1], Daisuke Watanabe[2], Hiroshi Takagi[2], Masatoshi Tsukahara[1]
([1]Biojet, [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Awamori, liquor

2Da08 ハイビスカス酵母の変異株におけるロイシン高蓄積機構の解析

○豊川 洋一[1], 杉本 幸子[1], 那須野 亮[1], 渡辺 大輔[1], 阿部 峻之[2], 塚原 正俊[2], 高木 博史[1]
（[1]奈良先端大・バイオ, [2]バイオジェット）
hiro@bs.naist.jp

【背景・目的】沖縄の伝統的蒸留酒である泡盛は，黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* と酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて醸造される．我々は，泡盛の更なる酒質の多様化を目的として，沖縄県内に自生するハイビスカスの花から分離した酵母を用いた泡盛醸造を検討し，商品化に成功している．今回，このハイビスカスから分離した酵母を親株として，新たな特性を有する菌株の育種に取り組み，ロイシンの毒性アナログである 5',5',5'-トリフルオロロイシン（TFL）耐性変異株（T25 株）を取得した．T25 株は，ロイシン代謝に関連し，吟醸香の主要成分である酢酸イソアミルやイソアミルアルコールの生産量が高いことから，親株（HB 株）と比べてロイシン生産能が優れているものと考えられた．そこで，本研究では T25 株におけるロイシン高生産メカニズムを明らかにすることを目的とした．
【方法・結果】HB 株および T25 株の細胞内アミノ酸含量を測定した結果，T25 株のロイシン含量は HB 株に対し，約 3.4 倍に増加していた．さらに両株の細胞抽出液を調製し，ロイシン合成の鍵酵素 α-isopropylmalate synthase（Leu4）の活性を測定した．その結果，HB 株の Leu4 活性は 10mM ロイシン添加により活性が著しく低下し，フィードバック阻害感受性を示したのに対し，T25 株の Leu4 はロイシン存在下においても活性の低下が認められなかった．以上のことから，T25 株の Leu4 はロイシンによるフィードバック阻害感受性が低下していることが明らかになった．そこで，T25 株の *LEU4* 遺伝子の塩基配列を決定したところ，アミノ酸置換（Gly516Ser）を伴うヘテロ変異が存在することが明らかとなった．さらに，Leu4 の分子モデリングを行った結果，Gly516 は Leu4 のアロステリック調節を受けるドメイン内に存在し，Ser への置換によりロイシン結合ポケットに立体障害が生じていることが示唆された．

Analysis of L-leucine accumuration mechamism of a Hibiscus yeast mutant

○Yoichi Toyokawa[1], Yukiko Sugimoto[1], Ryo Nasuno[1], Daisuke Watanabe[1], Takayuki Abe[2], Masatoshi Tsukahara[2], Hiroshi Takagi[1]
([1]Div. of Biol. Sci., NAIST, [2]Biojet)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, alpha-isopropylmalate synthase, L-Leucine, 5', 5', 5'-trifluoro-DL-leucine resistance

2Da09 清酒酵母の機能性アミノ酸蓄積変異株の分離と醸造特性の解析

○大橋 正孝[1], 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】我々は清酒の消費低迷を打破するために，従来の清酒酵母との差別化が可能な菌株の開発を目指している．これまでの研究で，遺伝子組換え技術を用いずに，アルコール性疲労の抑制や肝機能の促進などの機能性を有するオルニチンを細胞内に高蓄積する変異株（オルニチン蓄積酵母）の取得に成功している．その変異株を用いた醸造によって，オルニチン添加で生じるコスト負荷を伴わずに，オルニチンを多く含む清酒や酒粕を製造できると考えられる．オルニチン蓄積酵母で醸造した清酒は，協会酵母で醸造した清酒よりも，オルニチンを約 6 倍多く含んでいるが（約 14 mg/180 mL），市販のオルニチン含有飲料には，1 本あたり 100～400 mg のオルニチンが添加されていることから，清酒 180 mL（1 合）に含まれるオルニチン量をさらに高めることが必要である．そこで，本研究では，ウラシルアナログをスクリーニングに使用し，オルニチン蓄積酵母から細胞内オルニチン含量が向上した変異株の分離を試みた．得られた変異株を用いて清酒の小仕込み試験を行い，醸造特性を解析するとともに，清酒中のオルニチン量を測定した．
【方法及び結果】オルニチン蓄積酵母を EMS 変異原処理後，ウラシルアナログ（5-フルオロウラシル）及びプロリンアナログ（アゼチジン-2-カルボン酸）を含有する最少（SD）寒天培地で生育できる株を分離した．次に，各株を SD 液体培地で 30℃，2 日間培養後，細胞内のオルニチン含量を LC/MS アミノ酸分析システムで測定した．その結果，親株よりも細胞内オルニチン含量が 1.4 倍に増加した株を分離した．この変異株を用いて，総米 46g の小仕込み試験を行ったところ，変異株で醸造した清酒中のエタノール含量は親株に対して若干減少し，オルニチン量は約 1/3 に減少していた．現在，清酒中の香気成分，有機酸組成などを測定している．

Isolation of Japanese sake yeast mutants that accumulate a functional amino acid and analysis of their fermentation profiles

○Masataka Ohashi[1], Daisuke Watanabe[2], Hiroshi Takagi[2]
([1]Nara Pref. Inst. Ind. Dev., [2]Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST)

Key words Japanese sake yeast, A functional amino acid accumulation

2Da10 カプリル酸高生産酵母の醸造特性

○畠山 明[1], 遣水 潤[2], 栗林 喬[3], 原 崇[4], 城 斗志夫[4], 有本 圭吾[1]
（[1]吉乃川, [2]中越酵母工業, [3]新潟県醸造試, [4]新潟大・農）
h.aki.1130@gmail.com

【目的】清酒の高品質化において，香気（吟醸香）は重要な役割を担っており，その成分として，カプロン酸エチル，カプリル酸エチル，酢酸イソアミル等が知られている．現在，高級酒製造用として脂肪酸合成酵素（FAS）に *FAS2-G1250S* 変異を有し，カプロン酸エチルの前駆物質であるカプロン酸を高生産する酵母が広く使用されている．近年，*FAS2-F1279Y* 変異を有する酵母菌株がカプリル酸エチルの前駆物質であるカプリル酸を高生産することが明らかにされた．[1)] 本研究では，醸造特性の低下が懸念される変異処理を行うことなく，カプリル酸高生産株 K901C8 を取得し，醸造試験により K901C8 の醸造特性の確認を行ったので報告する．
【方法および結果】きょうかい酵母 K901 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，*FAS2-F1279Y* 変異を有するカプリル酸高生産株 K901C8 株を取得した．K901C8 株を用いた醸造試験において，親株である K901 株と比較して約 3 倍量のカプリル酸エチルを含む，良好な製成酒が得られた．また，カプリル酸エチル以外の香気成分やアルコール度数，日本酒度，酸度，アミノ酸度は親株と同程度であったことから，K901C8 株が優れた醸造特性を維持していることを確認した．
1)新潟県：*FAS2* タンパク質, *FAS2* 遺伝子, カプリル酸高生産酵母, 遊離脂肪酸高生産性酵母の取得方法及び飲食品（特開 2015-228849 号）
2)新潟県：酵母の取得方法（特許第 5963123 号）

Fermentation properties of a sake yeast with high productivity of caprylic acid

○Akira Hatakeyama[1], Jun Yarimizu[2], Takashi Kuribayashi[3], Takashi Hara[4], Toshio Joh[4], Keigo Arimoto[1]
([1]Yoshinogawa Co., Ltd., [2]Chuuetukoubokougyou Co., Ltd., [3]Niigata Pref. Inst. Brewing, [4]Fac. Agric., Niigata Univ)

Key words caprylic acid, *FAS2*, sake yeast

2Da11 *Saccharomyces arboricola* と醸造酵母の交配株の作成とその醸造特性の解析

○山本 裕貴[1], 藤丸 裕貴[1], ワイナンス マシュー[2], 五島 徹也[3], 赤尾 健[3], 北垣 浩志[1]
（[1]佐賀大・農, [2]ウエストバージニア大学・生科, [3]酒総研）
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

【背景と目的】アルコール飲料の製造で主に利用されてきたのは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* だが，*S. cerevisiae* と *Saccharomyces* 属の他の出芽酵母が種間交雑を行うことで，親より優れた特性を持つ株が現れることがある．例えばビール下面発酵酵母は *S. cerevisiae* が *S. eubayanus* と交配した株であること[1]が報告されている．これは種間交雑時のゲノムの再編成により，優性遺伝子が劣性遺伝子を抑えて子に優良な形質が現れる雑種強勢が原因として考えられている．本研究では近年自然界で発見された *Saccharomyces arboricola*[2]において，雑種強勢を利用した酵母育種への利用の可能性を探るため，*S. arboricola* と *S. cerevisiae* の清酒酵母を交配させて得られた交配株を用いて清酒を仕込み，交配後の醸造特性の変化を調べた．
【方法】選抜マーカーとして薬剤耐性プラスミドの *natMX* を *S. arboricola 350* に，*pGS39* を清酒酵母 K7 一倍体 868 (K7868h)にそれぞれ導入し交配試験に用いた．取得した交配株とその親株である *S. arboricola 350*, K7868h を用いて清酒の小仕込み試験を行い，回収した清酒を GC-FID による成分分析に供した．得られた 26 個の化合物データを変数として PCA を行った．
【結果と考察】PCA の結果，PC2（寄与率 12.4%）軸上で交配株とその親株 K7868h, *S. arboricola 350* が分離した．PC2 軸においてミトコンドリアで代謝されるクエン酸，ピルビン酸が負に寄与した．交配株は PC2 軸と親株よりも高い正の相関を示しており，交配株を用いて仕込んだ清酒醪中にはピルビン酸，クエン酸の残存が親株よりも少ないことが考えられた．この結果より，種間交雑によりミトコンドリアの代謝活性が向上したことが示唆された．

1) *Yeast* 32.1 : 17-27 (2015).
2) *Trends in Genetics* 29.5 : 309-317 (2013).

Outbreeding of *Saccharomyces arboricola* and brewery yeasts and analysis of their brewing characteristics

○Yuki Yamamoto[1], Yuki Fujimaru[1], Matthew Winans[2], Tetsuya Goto[3], Takeshi Akao[3], Hiroshi Kitagaki[1]
([1]Fac. Agric., Saga Univ., [2]Fac. Lifesci., West Virginia Univ., [3]NRIB)

Key words *Saccharomyces arboricola*, interspecific cross, hybrid vigor, PCA

2Da12 Bafilomycin A1 耐性を指標として育種した高発酵性酵母の諸性質解析

○中瀬 舞, 山内 隆寛, 窪寺 隆文, 明石 貴裕
（白鶴酒造）
mai-nakase@hakutsuru.co.jp

我々はこれまでに清酒酵母（*S. cerevisiae*）のクロトリマゾール（CTZ）耐性株から，高確率でアルコール高発酵性株を取得できることを見出した[1]．しかし，CTZ 耐性株で醸造した清酒は，酸度が上昇する傾向がある．そこで，酸度に影響しない高発酵性株の育種法を検討した．CTZ 耐性株は，ATP binding cassette (ABC)トランスポーターの高発現による細胞内の ATP 量の低下が解糖系を亢進して，アルコール発酵性が向上したと推測している[2]．また，ABC トランスポーターは細胞内物質を非特異的に排出するため，酸度上昇の原因は細胞内の有機酸排出である可能性が示唆された．そこで，細胞膜局在 ABC トランスポーターではなく，液胞膜局在 ATPase(V-ATPase)の活性化により細胞内の ATP 量を低下させることで，酸度に悪影響を及ぼさない高発酵性酵母の育種を試みた[3]．
UV 照射で変異誘導した清酒酵母から V-ATPase 活性阻害剤である Bafilomycin A1 に対して耐性を示す突然変異株を選抜した．選抜株を総米 400 g の小仕込み試験に供したところ，高発酵性の供与と共に，酸度は親株と同程度で，アミノ酸度は親株より低下し，さらに選抜株は醪後半でも発酵が旺盛であり，生菌率が親株よりも顕著に高いことを確認した．
本育種法のターゲットである V-ATPase は，ATP を用いて液胞内に H^+を取り込む機能がある．そこで，V-ATPase の活性を測定するために，液胞内 pH を測定し，間接的に V-ATPase の活性を測定したところ，選抜株の液胞内 pH は親株と比較して低い傾向であることがわかった．この結果から，選抜株の V-ATPase が活性化していることが示唆された．
現在，選抜株の高発酵性および醪末期ストレス耐性のメカニズムの解明に取り組んでいる．

1. 広畑ら (1994) 生物工学, 72, 283.
2. Watanabe et.al. (2000) J. Biosci. Bioeng. 89, 577-581.
3. 中瀬ら 2018 年度日本農芸化学会大会 2A08a06

Characterization of high fermentative activity mutants bred by screening method based on resistant to Bafilomycin A1

○Mai Nakase, Takahiro Yamauchi, Takafumi Kubodera, Takahiro Akashi
(Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, sake, sake yeast

2Fa01 酵母脂肪滴蓄積に及ぼすゴム粒子タンパク質発現の影響

○横田 早希, 後藤 猛
（秋田大院・理工）
tgotoh@gipc.akita-u.ac.jp

【目的】天然ゴムはパラゴムノキ（*Hevea brasiliensis*，Hb）のラテックスから生産され，合成ゴムでは達成できない優れた物性を持つ．ラテックス中のゴム粒子には複数のタンパク質が存在するが，特に豊富に含まれる Rubber elongation factor (REF)とそのホモログである Small rubber particle protein (SRPP)はゴム粒子の安定化に寄与し，ゴム生合成に重要な働きを持つと考えられている．我々はこれまでに，日本で生育でき，ラテックス状でゴムを生産するイチジク（*Ficus carica*，Fc）に着目し，イチジクラテックスより 2 種類の REF/SRPP 遺伝子（FcREF/SRPP-1, -2）をクローニングした．本研究では微生物によるゴム生産を視野に，酵母脂肪滴をゴム粒子モデルとし，これらのタンパク質を出芽酵母に発現させ，脂肪滴の蓄積に及ぼす影響を調べた．
【方法と結果】FLAG タグ融合 REF/SRPP (HbREF，FcREF/SRPP-1，-2) 発現プラスミドを作製し，出芽酵母 SNY9 にそれぞれ導入した．これらの組換え出芽酵母および空ベクターで作製した Mock を培養し，FLAG タグの免疫蛍光染色および，BODIPY 493/503 による脂肪滴染色を行った後，共焦点レーザー顕微鏡により観察した．その結果，組換えタンパク質 HbREF，FcREF/SRPP-1，-2 は脂肪滴で発現していることが確認され，これらのタンパク質の発現は脂肪滴の大きさに影響することが分かった．さらに， BODIPY 493/503 で脂肪滴を染色した各組換え体の蛍光強度をフローサイトメーターで分析し，細胞に蓄積された脂肪滴量の比較を行った．

Effect on lipid droplet accumulation by expression of rubber particle proteins

○Saki Yokota, Takeshi Gotoh
(Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ.)

Key words Natural rubber, Rubber particle protein, *Saccharomyces cerevisiae*, Lipid droplet

2Fa02 Introduction of late embryogenesis abundant peptide co-expression system for adequate expression of insecticidal crystal proteins in *Bacillus thuringiensis*

○Mahmuda Akhtar[1], Mizuta Kazuhiro[1], Shimokawa Tomoko[2], Maeda Minoru[2], Ikeno Shinya[1]
([1]Kyushu Inst. Technol., [2]Kyushu Medical Co., Ltd.)
ikeno@life.kyutech.ac.jp

Bacterial expression system always remains as the preferred choice for the production of many recombinant proteins. Efficient protein expression by bacteria incorporate with the colossal yield of functional biological proteins with excluding all sorts of interruption and impediment, is the most expected pathway in the domain of bio-industry domain.Considering from this stand point, we may confer that short peptide co-expression system have been developed to enhance protein expression level in host cell. The short peptide was designed from late embryogenesis abundant (LEA) protein that are expressed for anhydrobiosis both in plant and in animals.
Purpose of this study to enhance the efficient expression of insecticidal crystal (Cry) proteins in *Bacillus thuringiensis* (BT) by the employment of LEA peptide co-expression system. As well as focusing on efficient expression of Cry proteins in order to improve the pathogenicity toward the insecticidal larvae, especially mosquito. In connection with, we constructed three different types of LEA peptide (LEA-I, LEA-II and LEA-K) expression plasmids. To pursue the adequate expression of insecticidal Cry proteins we are now trying to proper implementation of three LEA peptides in BT by using the plasmid of pHT01 as well as to alluring the expression by induction of IPTG on the basis of different time interval in regards to different concentration. It is noteworthy that Cry proteins expression by dint of LEA peptide expression is three times higher than wild type.

Introduction of late embryogenesis abundant peptide co-expression system for adequate expression of insecticidal crystal proteins in *Bacillus thuringiensis*

○Mahmuda Akhtar[1], Mizuta Kazuhiro[1], Shimokawa Tomoko[2], Maeda Minoru[2], Ikeno Shinya[1]
([1]Kyushu Inst. Technol., [2]Kyushu Medical Co., Ltd.)

Key words *Bacillus thuringiensis*, Crystal protein, Late Embryogenesis Abundant, peptide

2Fa03 海綿由来シリカ重合酵素の可溶性発現と凝集コントロール

○中島 一紀, 小栗 秀俊, 岡本 淳之介, 川﨑 了
（北大院・工）
nakashima@geo-er.eng.hokudai.ac.jp

【背景と目的】 海綿 *Suberites domuncula* 由来シリカテインはシリカの重合反応を触媒する酵素であり，この反応は常温・中性 pH で進行するため，化学プロセス，医薬品，バイオセンサー，環境修復技術など様々な分野への応用が期待される．しかし，シリカテインは非常に凝集性が高いタンパク質であり，その取り扱いが難しいという欠点がある．本研究では，タンパク質融合によりシリカテインの可溶性を向上させ，凝集性をコントロールすることを目的とした．
【方法】 pCold-ProS2 ベクター（タカラバイオ（株））に *S. domuncula* 由来シリカテイン遺伝子を挿入した発現ベクターを作製した．この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（15℃）により，ProS2 とシリカテインの融合タンパク質（ProS2-Sil）を発現した．菌体破砕後，沈殿画分の封入体を回収し，透析（4℃，24h）により ProS2-Sil のリフォールディングを行った．HRV 3C Protease により ProS2-Sil 間を部位特異的に切断し，その凝集性を目視および透過型電子顕微鏡（TEM）により観察した．
【結果】 低温発現した ProS2-Sil は封入体として得られたものの，リフォールディングにより可溶化し，その後は凝集することなく非常に安定に可溶化した状態で存在することが明らかとなった．一方，可溶性の ProS2-Sil にプロテアーゼを添加することにより，ProS2 と Sil の切断を確認し（SDS-PAGE），ProS2 の切断・除去とともに徐々に溶液が白濁していった．この懸濁液の TEM 観察により，シリカテインが再凝集していく様子が確認された．また，可溶化した ProS2-Sil はシリカテインと同等のシリカ重合活性を示すことが明らかとなった．

Soluble expression and aggregation control of silica-polymering enzyme from marine sponge

○Kazunori Nakashima, Hidetoshi Oguri, Junnosuke Okamoto, Satoru Kawasaki
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words biosilica, fusion protein, self assembly, soluble expression

2Fa04 麹菌内で同調的発現挙動を示すプロモーターを用いたタンパク質生産挙動の解析

○片山 周平[1], 張 斯来[2], 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・科技イノベ, [3]月桂冠・総研）
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

麹菌（*Aspergillus oryzae*）は，微生物の中でも高いタンパク質分泌生産能力を有するため，酵素生産の宿主として工業的に利用されている．これまで，麹菌を宿主とした有用異種タンパク質生産について盛んに研究されてきたが，複数種のサブユニットにより構成されたマルチサブユニットタンパク質生産に着目した報告はされていない．そこで本研究では，麹菌によるマルチサブユニットタンパク質の生産を目指している．標的タンパク質として再生医療分野の研究で欠かせないラミニン（ヘテロ三量体）を選択した．
麹菌でマルチサブユニットタンパク質を生産するためには，各サブユニットの遺伝子を同時に同程度で高発現する，すなわち同調的に発現する必要がある．なぜなら，各サブユニットの発現タイミングが異なれば，各サブユニットが会合せずに分泌もしくは分解され，マルチサブユニットタンパク質として期待する生産量が得られない可能性があるからだ．これまでに，種々の培養条件で麹菌を培養し，既報の高発現プロモーターについて同調性を調べ，プロモーターセットを選抜している．
本研究では，レポーターアッセイによりタンパク質の生産性を評価した．決定したプロモーターの制御下でセロビオハイドロラーゼ（CBHI）を生産し，その酵素活性を経時的に比較した結果，（1）基質：Glucose，培養温度：25℃，（2）基質：Xylose，培養温度：30℃の二培養条件において，*Padh1*，*PgpdA*，あるいは *Pgapdh* をプロモーターとした形質転換体が CBHI を同調的に高生産していた．この結果から，このプロモーターセットを用いることで 3 つのサブユニットから成るタンパク質の生産が可能と判断した．現在，これらのプロモーターをラミニンの各サブユニットの遺伝子上流に配置したプラスミドを作製し，麹菌への導入を進めている．

Analysis of protein production using synchronous expression promoters in *Aspergillus oryzae*

○Shuhei Katayama[1], Silai Zhang[2], 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. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

Key words *Aspergillus oryzae*, laminin, multi-subunit protein, synchronous expression

2Fa05 麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体培養における菌糸完全分散株の作製とその酵素生産への応用

○宮澤 拳[1], 吉見 啓[2], 古明地 敬介[1], 田畑 風華[1], 佐野 元昭[3], 阿部 敬悦[1,2]
（[1]東北大院・農, [2]東北大・未来研, [3]金工大・ゲノム研）
kabe@niche.tohoku.ac.jp

糸状菌は多様な物質を生産するが，一般的に液体培養では菌糸が接着して塊を形成するため高密度培養が出来ず，また菌糸塊中心部が嫌気的となり物質生産が制限される．以前我々は，モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁多糖 α-1,3-glucan（AG）欠損株の菌糸が液体培地中に完全分散する形質を発見し，AG が菌糸接着因子であることを明らかにした[1]．一方，麹菌 *Aspergillus oryzae* の AG 欠損株は野生株に比べると小さな菌糸塊を形成し，菌糸は完全分散しなかった[2]．このことは，麹菌が AG 以外の菌糸接着因子を有することを示唆している．本研究では，麹菌の未知の菌糸接着因子の同定を目的とした．Galactosaminogalactan（GAG）は病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の宿主感染因子として知られる分泌多糖である[3]．我々は GAG が麹菌の第二の菌糸接着因子であると推論し，麹菌 AG 欠損株より GAG 生合成遺伝子破壊株を作製した（AG-GAG 欠損株）．AG-GAG 欠損株は液体培養において菌糸が完全分散し，全く菌糸塊を形成しなかった．次に，野生株, AG 欠損株, AG-GAG 欠損株を親株として生産モデル酵素クチナーゼの遺伝子 *cutL1* を 1 コピー導入した株を作製し，各株の酵素生産性をフラスコ液体培養で比較した．その結果，AG-GAG 欠損株の酵素生産性は野生株や AG 欠損株の生産性より有意に高く，AG-GAG 欠損株が酵素生産に好適な宿主株であることが明らかとなった．

1) Yoshimi et al., *PLoS ONE* (2013) 8:e54893
2) Miyazawa et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2016) 80:1853-1863
3) Fontaine et al., *PLoS Pathog.*(2011) 7:e1002372.

Construction of *Aspergillus oryzae* mutant of which hyphae fully disperse under liquid culture conditions and its application to enzyme production

○Ken Miyazawa[1], Akira Yoshimi[2], Keisuke Komeiji[1], Fuka Tabata[1], Motoaki Sano[3], Keietsu Abe[1,2]
([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NICHe, Tohoku Univ., [3]Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words *Aspergillus oryzae*, enzyme production, cell wall, filamentous fungi

2Fa06 麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸完全分散変異株の液体培養における酵素高生産性の評価

○古明地 敬介[1], 宮澤 拳[1], 吉見 啓[2], 市川 暉[3], 佐野 元昭[4], 阿部 敬悦[1,2]
（[1]東北大院・農, [2]東北大・未来研, [3]東北大・農, [4]金工大・ゲノム研）
kabe@niche.tohoku.ac.jp

【背景及び目的】糸状菌の液体培養では，菌糸同士が接着集合することで菌糸塊を形成するために高密度培養ができないことが課題である．我々は，産業糸状菌の麹菌において，細胞壁多糖 α-1,3-glucan（AG）の欠損に加えて細胞外多糖 galactosaminogalactan（GAG）を欠損させた AG-GAG 二重欠損株で，菌糸が完全分散することを発見した[1]．これまでに，フラスコ培養において AG-GAG 二重欠損株が野生株および AG 欠損株に比べて高い酵素生産性を示すことを確認した[1]．本研究では，5 L ジャー型発酵槽を用いて通気量や攪拌を制御し，工業培養での使用が見込まれる複数の培養条件における AG-GAG 二重欠損株の酵素生産性を評価することを目的とした．
【方法及び結果】麹菌の野生株，AG 欠損株および AG-GAG 二重欠損株の各株で，生産モデル酵素クチナーゼ の遺伝子 *cutL1* をゲノム上の *niaD* 部位に 1 コピー導入した．これらの株を用いて 5 L ジャー型発酵槽で 30ºC, 72 時間培養を行った．酵素生産性は，培地中に分泌された CutL1 量を SDS-PAGE で定量することで評価した．また，攪拌により菌糸が剪断を受け，生育制限が生じると想定されたことから，剪断菌糸から培地中に放出される活性酸素種も定量した．まず，野生株と AG-GAG 二重欠損株の培養特性を比較したところ，AG-GAG 二重欠損株では野生株に比べて活性酸素種の放出量が増加しているにも関わらず，野生株よりも生育菌体量は増加する傾向が認められた．さらに CutL1 生産量は培養 48 時間目以降，野生株比で約 2 倍に増加した．以上の結果から，AG-GAG 二重欠損株は攪拌回転により剪断ストレスを受けつつも旺盛に生育し，高い酵素生産性を維持していることが明らかとなった．発表では，各株の培養時の表現型と酵素生産性の関係を考察する．

1) 阿部ら, 特願 2017-91734

Evaluation of enhanced enzyme productivity of *Aspergillus oryzae* mutant of which hyphae fully disperse under liquid culture conditions.

○Keisuke Komeiji[1], Ken Miyazawa[1], Akira Yoshimi[2], Hikaru Ichikawa[3], Motoaki Sano[4], Keietsu Abe[1,2]
([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NICHe, Tohoku Univ., [3]Fac. Agric., Tohoku Univ., [4]Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words cell wall, *Aspergillus oryzae*, enzyme production, filamentous fungi

2Fa07 エクソソームのアフィニティ分離が可能な単鎖抗体固定化担体の開発

○小林 巧[1], 新 裕太[1], 片山 淳子[2], 的場 一隆[2], 堀内 淳一[1], 熊田 陽一[1]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]日産化学）
kumada@kit.ac.jp

【背景と目的】エクソソームなどに代表される細胞外小胞は，次世代バイオマーカーとしての利用が期待されており，疾患エクソソームの特異的分離方法の開発が必要となっている．本研究では，単鎖抗体（ｓｃＦｖ）を用いる安価かつ高効率なエクソソームのアフィニティ分離技術の開発を目的とし，ｓｃＦｖの生産，材料親和性ペプチドタグを利用したプラスチック担体への配向固定，さらには，エクソソームの濃縮効果について検討した．
【方法】エクソソーム膜上の CD9 を標的抗原とし，これに特異的に結合可能なｓｃＦｖをファージディスプレイ法によって単離した．ｓｃ Fv は C 末端部に PMMA-tag を導入した状態で組換え大腸菌によって大量生産し，Ni-NTA カラムを用いて精製した．透析法によってリフォールディング後，固定化状態における抗原結合活性の評価とエクソソーム回収率について評価した．
【結果と考察】単離されたｓｃＦｖの CD9 に対する結合性を SPR センサーならびに ELISA によって確認し，これを用いたエクソソーム分離手法の開発を行った．担体に固定化されたｓｃＦｖの抗原結合活性を高く維持するために，材料親和性ペプチドを C 末端に導入したｓｃ Fv を設計し，リフォールディングによって可溶化することに成功した．現在，材料親和性ペプチドタグによる配向固定の効果を検討中である．さらに，発表では，本担体を用いるエクソソームの濃縮効果についても発表する．

Specific separation of Exosomal vesicles using single-chain Fv-immobilized support

○Takumi Kobayashi[1], Yuta Atarashi[1], Junko Katayama[2], Kazutaka Matoba[2], Jun-ichi Horiuchi[1], Yoichi Kumada[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Nissan chem)

Key words Exosome, scFv, specific isolation, PMMA-tag

2Fa08 単鎖抗体固定化ラテックスの調製と高感度ラテックス凝集検査への応用

○中尾 貴一[1], 谷端 玲奈[1], 高橋 浩一[2], 小笠原 真也[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] 抗体固定化ラテックスを用いるラテックス凝集検査は，様々なバイオマーカーの迅速な定量が可能であり，臨床検査分野で広く用いられている．本研究では，従来よりも安価かつ高感度なラテックス凝集検査法の開発を目的として，単鎖抗体固定化ラテックスが調製可能かを検討した．さらに，分散条件ならびに反応条件を最適化することで，ラテックス凝集検査の高感度化を目指した．

[実験] C 反応性タンパク質（CRP）をターゲットとし，ファージディスプレイ法を用いてウサギ抗 CRP scFv を単離した．組換え大腸菌を用いて scFv を培養上清中に生産し，Ni-NTA カラムを用いて精製した．これらの scFv をラテックスビーズ上に固定化し，BSA でブロッキング後，pH の異なる緩衝液中に分散した．最後に，scFv 固定化ラテックスと CRP との反応性を自動分析装置を用いて評価した．

[結果と考察] 組換え大腸菌のフラスコ培養によって等電点の異なる 3 種類のウサギ scFv を生産したところ，いずれも培養上清中から Ni-NTA レジンによって回収可能であった．これらをラテックス粒子上に固定化後，pH 6.0 ~ pH 8.5 の緩衝液中に分散したところ，分散可能な pH 範囲は scFv の等電点によって大きく異なっていた．さらに，抗原添加時の scFv 固定化ラテックスの凝集反応性も scFv の等電点の影響を大きく受けることが明らかとなった．これらの結果を踏まえて scFv 固定化ラテックスの分散 pH ならびに反応 pH を最適化したところ，ラテックス凝集検査の高感度化が可能であった．

Preparation of scFv-immobilized latex beads for sensitive latex turbidimetric assay

○Kiichi Nakao[1], Reina Tanibata[1], Koichi Takahashi[2], Shinya Ogasawara[2], Fumio Gondaira[3], Jun-ichi Horiuti[1], Yoichi Kumada[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Denka, [3]Denka Seiken)

Key words scFv, latex, latex turbidimertic, CRP

2Fa09 改変型型糖鎖をもつ抗体医薬品生産を目指した細胞外糖鎖修飾反応の開発

○鬼塚 正義[1,2], 嶋津 敦子[2], 天羽 宏枝[2]
（[1]徳島大院・社会産理工, [2]MAB）
onitsuka@tokushima-u.ac.jp

抗体医薬品の N 型糖鎖構造の不均一性は ADCC 活性ならびに CDC 活性に大きな影響を与えることが知られている．そこで均一な糖鎖構造をもつ抗体医薬品の生産を目指して，生産宿主細胞のゲノム改変法や糖タンパク質の完全化学合成法が開発されてきた．これに続く第 3 の方法として，我々は細胞培養液中における糖鎖修飾反応，即ち細胞外糖鎖修飾反応法の開発を試みている．この方法の特徴は既存の抗体生産細胞にすぐに適用でき，製造における生産培養で簡便に適用できることである．本発表では細胞外糖鎖修飾反応の概念を実証するために進めている実験を報告する．具体的には均一な活性向上型糖鎖への改変を目的として，N 型糖鎖のコアフコースの除去反応ならびに末端ガラクトースの付加反応を対象とした．ヒト由来の糖鎖修飾酵素として 2 種類のフコシダーゼ（FUCA1，FUCA2）ならびに 3 種類のガラクトシルトランスフェラーゼ（B4GALT1，B4GALT2，B4GALT3）の発現プラスミドを調製した．プラスミド調製においては各酵素に分泌シグナル配列を付加し，同時に膜貫通領域を除去した．各発現プラスミドを CHO 細胞一過性発現システムに遺伝子導入し，培養上清を用いて SDS-PAGE，キャピラリー電気泳動，活性測定を行った．SDS-PAGE，キャピラリー電気泳動の結果，3 種類の糖鎖修飾酵素 FUCA1，B4GALT1，B4GALT2 で多量の分泌発現が確認され，特に B4GALT1 では分泌量が培養上清中の総タンパク質量の 50%以上に至った．さらに培養上清を用いた活性測定においてフコース残基切断活性，ガラクトース残基転移活性を確認した．現在，CHO 細胞発現系で調製した IgG1 抗体含有培養上清（>1g/L IgG1）に対して，一過性発現系で調製した糖鎖修飾酵素の培養上清を添加し細胞外糖鎖修飾反応を検討している．発表ではその結果も合わせて報告する．

The challenge of *ex vivo* glycosylation reaction for the production of theraputic antibodies with improved glycosyaltion

○Masayoshi Onitsuka[1,2], Atsuko Shimazu[2], Hiroe Amou[2]
([1]Grad. Sch. Biosci. Bioind, Tokushima Univ., [2]MAB)

Key words antibody glycosylation, CHO cells, *ex vivo* glycosylation, transient expression system

2Fa10 昆虫細胞における 2A ペプチドを用いた抗体生産

溝手 結[1], ○増見 恭子[1,2], 勝田 知尚[1,2], 山地 秀樹[1,2]
（[1]神戸大院・工, [2]MAB組合）
yamaji@kobe-u.ac.jp

【背景と目的】抗体は抗原に対して高い特異性や親和性を示すことから，治療薬や診断薬として広く利用されている．我々は昆虫細胞を宿主として用いた抗体生産について検討している．IgG や Fab フラグメントは，一般に H 鎖 (Hc) および L 鎖 (Lc) の遺伝子をそれぞれ挿入した二種類のプラスミドベクターを同一細胞内に導入し共発現させることで生産される．本研究では，DNA 翻訳時に自己切断する 2A ペプチドの DNA を Hc と Lc の遺伝子の間に挿入して作製した DNA 断片を単一のプラスミドベクターに組み込み，昆虫細胞に導入することにより，Fab フラグメントの生産を試みた．
【方法】抗 RNase A 抗体の Fab フラグメントを構成する Hc および Lc の遺伝子の間に porcine teschovirus-1 由来の 2A ペプチドの DNA を挿入した DNA 断片を作製した．また，furin による開裂部位の DNA を付加した DNA 断片や GSG リンカーを付加した断片も構築し，それぞれプラスミドベクター pIHAneo に挿入した．作製した各プラスミドを昆虫細胞 *Trichoplusia ni* BTI-TN-5B1-4 (High Five) にトランスフェクションし，72 h 静置培養後，培養上清を western blotting および酵素免疫測定法 (ELISA) により分析した．
【結果と考察】2A ペプチドを用いた場合でも，western blotting により Fab フラグメントの分泌発現を確認できた．また，ELISA により培養上清における抗原結合活性を評価したところ，Hc および Lc の遺伝子を二種類のプラスミドベクターを用いてコトランスフェクションした場合と同程度の抗原結合活性が確認された．他の DNA 断片を用いた結果についても報告する．

Production of antibody Fab fragment using 2A peptide in insect cells.

Yu Mizote[1], ○Kyoko Masumi-Koizumi[1,2], Tomohisa Katsuda[1,2], Hideki Yamaji[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]MAB)

Key words insect cell, Fab fragment, 2A peptide

2Fa11 組換え大腸菌を用いた流加培養による種々の単鎖抗体の菌体外生産特性

○坂本 祐一朗, 井嶋 浩一朗, 李 歓, 熊田 陽一, 堀内 淳一
（京工繊大院・工芸科学）
horiuchi@kit.ac.jp

【背景と目的】組換え大腸菌を用いて活性型タンパク質の菌体外生産が可能になれば，大腸菌による組換えタンパク質生産コストを大幅に低減できる．これまでに，ペリプラズム分泌シグナル(PelB leader)を導入した組換え大腸菌を用いてDO-stat 流加培養を行うことにより，単鎖抗体(scFv)を菌体外に高濃度に分泌生産できることを報告した 1)．この結果を踏まえ，本研究では scFv の種類及び材料親和性ペプチドタグの付加が scFv の菌体外分泌生産に及ぼす影響を検討した．
【方法】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His タグを導入した Anti-CRP scFv，Anti-human IgG scFv など 3 種の scFv をモデルタンパクとし，pET-22 発現ベクターを用いて Rosseta2(DE3)を形質転換した．この組換え大腸菌を用いて 2L 容 Jar-fermenter により DO-stat に基づく流加培養を行った．
【結果と考察】scFv の種類が菌体外分泌生産に及ぼす影響を検討するため，3 種の異なる scFv 生産株を用いて DO=40%の条件で約 100 時間の流加培養を行った．その結果，anti-CRP scFv 4.9g/L，anti-human IgG scFv 4.4g/L，No.3 scFv 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，scFv の種類に関係なく scFv の菌体外生産が可能なことが明らかになった．次に，生産された scFv の担体への高密度配向固定を目指して，scFv の C 末端側に 3 種の材料親和性ペプチドタグを導入した組換え株を構築した．これらの菌株を用いて同様の実験を行ったところ，菌体外への scFv 分泌量が大幅に減少した．これは導入したペプチドタグが大腸菌の細胞膜に親和性を持つことから，scFv が細胞膜表面に吸着し，菌体外への分泌が抑制された可能性が考えられた．
1)坂本祐一朗 他，組換え大腸菌を用いた流加培養による単鎖抗体の高濃度菌体外生産，第 69 回日本生物工学会，NO.4P-G044 (2017)

Extracellular production of various single-chain variable fragments (scFvs) using recombinant E.coli by DO-stat fed-batch culture

○Yuichiro Sakamoto, Koichiro Ijima, Huan Li, Yoichi Kumada, Jun-Ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words *Escherichia coli*, fed-batch culture, scFv, DO-stat

2Fa12 Monoclonal antibody production in a novel bioreactor using high cell-density mammalian cells

○Chi-Hsien Liu, Yi-Xin Liu
(Chang Gung University, Taiwan)
chl@mail.cgu.edu.tw

The successful development of a low-cost culture environment could contribute to a reduction in the experimental variation, enhance cell productivity, and facilitate biopharmaceuticals production using an animal cell culture. How can the composition of the medium and culture bioprocess be adjusted to support the specific cell's metabolism and recombinant protein production? This article uses statistical strategies to optimize the serum-free medium and high cell-density culture. A statistical design is adopted to optimize the medium composition for the hybridoma cell in a serum-free condition. In addition, the operation optimization of hollow fiber bioreactor (HFB) for hybridoma growth and monoclonal antibody production has been investigated under the serum-free condition. The operation variables such as culture temperature and the medium circulating rate in HFB were optimized for the antibody production. Several monitoring parameters including glucose, lactate, ammonia, conductivity, pH, redox potential, and dissolved oxygen were related to the cell metabolism and antibody production in the high cell-density culture. Under the mildly hypothermic condition of 36 ℃ and perfusion rate of 182.5 mL/min, the hybridoma had the maximal antibody titer of 60.75 μg/mL. We established a facile bioreactor platform that could support the high-density viable cells and maintain their antibody productivity under the serum-free condition.

Monoclonal antibody production in a novel bioreactor using high cell-density mammalian cells

○Chi-Hsien Liu, Yi-Xin Liu
(Chang Gung University, Taiwan)

Key words bioreactor, antibody

2Ga01 選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* が産生する脂質関連代謝物 ceriporic acid の生合成候補遺伝子の探索と解析

○渡邊 崇人[1], 秋好 陽香梨[1], 森田 暁人[1], 二神 泰基[2], 木村 信忠[3], 後藤 正利[4], 渡辺 隆司[1]
（[1]京大・生存研, [2]鹿児島大院・連農, [3]産総研・生物プロセス, [4]佐賀大・農）
takahito@rish.kyoto-u.ac.jp

【目的】白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* は，セルロース等の木材細胞壁多糖を極力壊さずにリグニンを選択的に分解する．また，本菌は，イタコン酸骨格を有する長鎖のアルキル（アルケニル）鎖が付加したジカルボン酸（主に ceriporic acids A, B, C）を菌体外に産生する．特に，ceriporic acid B は，セルロースの分解の原因となる水酸化ラジカルの発生を抑制する機能を有する．さらに，木粉やリグニン分解生成物であるバニリン存在下では，ceriporic acids の産生量が増加する．しかしながら，ceriporic acids の生合成系については，クエン酸の生合成に類似したアシル CoA とオキサロ酢酸の縮合から始まるモデルが提唱されているものの詳細な解析はされていない[1]．今回は，その生合成に関与する候補となる遺伝子の探索と単離，そして，異種発現を試みた．
【方法・結果】 *Aspergillus* 菌のクエン酸及びイタコン酸の生合成に関与するクエン酸合成酵素，アコニット酸ヒドラターゼ，*cis*-アコニット酸デカルボキシラーゼ等と相同性のある酵素遺伝子が *C. subvermispora* のゲノム上に存在するかどうかを BLAST 解析等で検索した．その結果，合計 10 個の候補となる遺伝子が見つかった．その内 6 個の候補遺伝子について cDNA を取得した．また，これらの遺伝子の転写はバニリン存在下で誘導されていた．さらに，*Rhodococcus* 属細菌での発現を試みたところ，全て可溶化発現させることができた．現在，発現した酵素の精製及び活性の有無を確認している．
1) Gutierrez, A. *et al*. *Appl. Environ. Microbiol*. 68, 1344-1350 (2002).

Screening of candidate genes involved in the biosynthesis of ceriporic acids in a white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*

○Takahito Watanabe[1], Hikari Akiyoshi[1], Akito Morita[1], Taiki Futagami[2], Nobutaba Kimura[3], Masatoshi Goto[4], Takashi Watanabe[1]
([1]RISH, Kyoto Univ., [2]United. Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [3]BRI. AIST, [4]Fac. Agric., Saga Univ.)

Key words *Ceriporiopsis subvermispora*, white-rot fungus, lignin, *Rhodococcus*

2Ga02 *Streptomyces achromogenes* subsp. *streptozoticus* のゲノムおよび二次代謝の解析

山本 美也子, 中村 和音, 黒田 照夫, 森田 大地, 杉山 政則,
○熊谷 孝則
（広大院・医歯薬保健学）
tkuma@hiroshima-u.ac.jp

【目的】 ストレプトゾトシン（STZ）は抗菌活性を保有する抗生物質であるが, 最近では, 膵・消化管神経内分泌腫瘍の治療薬として使用されている．本研究では, STZ 生合成遺伝子を明らかにすることを主たる目的として, STZ 生産菌である *Streptomyces achromogenes* subsp. *streptozoticus* NBRC14001 のゲノム解析を行った．その結果, STZ 生合成に関与すると推定される遺伝子を見出すとともに, NBRC14001 株が抗真菌化合物を産生することを発見したので報告する．

【方法および結果】 PacBio RSII によるシークエンシング, および, アッセンブリの結果, NBRC14001 株のゲノムは線状約 8.9 Mb であることが判明した．続いて, アノテーションを行ったところ, ゲノム上には, 8,014 CDS, 88 tRNA, 18 (6 オペロン) rRNA をコードする遺伝子の存在が明らかになった．BLAST P による詳細な解析の結果, STZ の N-N 結合の形成, および, メチル化に関与するのではないかと推測される遺伝子が近接して存在する locus を見出した．現在, 遺伝子破壊により, これらの遺伝子が STZ の生合成に関与するかを調査している．一方, antiSMASH による解析を行ったところ, 本株にはピマリシンの生合成遺伝子クラスター（BGC）と 63%の相同性を示す BGC が存在していた．そこで, 本株菌体・培養液の抽出物について, *Candida albicans* を被検菌としたバイオアッセイを行った結果, 本株は抗真菌化合物を産生することが明らかになった．今後, 抗真菌化合物の単離・精製を進めるとともに, 構造決定を行う予定である．

Analysis of genome and secondary metabolism in *Streptomyces achromogenes* subsp. *streptozoticus*

Miyako Yamamoto, Kazune Nakamura, Teruo Kuroda, Daichi Morita, Masanori Sugiyama, ○Takanori Kumagai
(Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ.)

Key words streptozotocin, genome analysis, genome mining, secondary metabolism

2Ga03 ナノポアシーケンサを用いた遺伝子組換え麹菌ゲノム上の長鎖タンデムリピート構造の解析

○若井 暁[1], 荻野 千秋[2], 堤 浩子[3], 秦 洋二[3], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大院・工, [3]月桂冠・総研）
wakaists@pegasus.kobe-u.ac.jp

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は酵素分泌生産能が非常に高く，古くからの発酵食品分野での利用に加えて，産業用酵素生産の分野においても有用な微生物である．加えて，本菌に外来遺伝子を導入し，有用な遺伝子組換え体も数多く構築されている．この黄麹菌の遺伝子組換え技術の一つとして，co-transformation という手法があり，この方法ではマーカー遺伝子を載せたプラスミド DNA の他に直鎖状の DNA 断片を染色体上にマルチコピーで導入することが可能である．この技術は古くから使われてきたが，非相同末端結合が関与すること以外の分子メカニズムが明らかにされていない．
我々は，この co-transformation を用いることで黄麹菌に多くの能力を付与することに成功してきたが，ゲノム上のどの位置にどのような形で挿入されているのか明らかにできていなかった．中でも，長鎖 DNA 断片がタンデムに並んで挿入されている場合，サザンブロット解析やショートリード解析用の次世代シーケンサ（例えば MiSeq）を用いた解析でタンデムリピート構造や導入位置を同定することはほぼ不可能である．
今回，我々が保有する約 10 kb の鎖長を持つ三種セルラーゼ遺伝子発現カセット断片が複数挿入された黄麹菌のゲノム配列をナノポアシーケンサ MinION により解析し，この長鎖 DNA 断片が三つ以上タンデムリピートの形で導入されていることを明らかにした．これは，co-transformation 時に非相同末端結合を担う分子装置による導入断片同士の ligation 反応によると考えられる．本発表では，この長鎖 DNA 断片のタンデムリピート構造に加えて，ゲノム上での挿入位置についても言及し，MinION を用いたゲノムリシーケンス解析についてのノウハウについても紹介する．

Analysis of long tandem repeat DNA on the genome of genetically engineered *Aspergillus oryzae* using nanopore sequence

○Satoshi Wakai[1], Chiaki Ogino[2], Hiroko Tsutsumi[3], Yoji Hata[3], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [3]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

Key words *Aspergillus oryzae*, MinION, genome, long tandem repeat

2Ga04 麹菌における環境ストレス応答性 MAP キナーゼ経路の *glaB* 遺伝子発現への関与

○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

我々は, 麹菌の固体培養特異的に生産される酵素の中で, 清酒醸造において重要な酵素であるグルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* の発現を制御する因子として C_2H_2 型転写因子 FlbC を見出した．FlbC は *glaB* のみならず, 固体培養で発現が大幅に上昇するプロテアーゼ遺伝子や酸性カルボキシペプチダーゼの発現にも関与することを明らかにしてきた．本報告では, 固体培養での環境ストレスに着目し, 多くの生物で浸透圧ストレスへの応答として知られる HOG/MAPK 経路と FlbC を介した *glaB* の発現との関係について解析した結果を報告する．*glaB* はプレート培養上で低水分活性と菌糸成長阻害ストレスの両条件により誘導されることが知られている．どちらの条件が *glaB* の発現に重要であるか定量 PCR により調べたところ, *flbC* の発現に関わらず *glaB* は両条件が揃わないと発現量が上昇しなかった．麹菌の MAPK 遺伝子 5 種類それぞれの破壊株を用いて, メンブレンを敷いたプレート培養上で GlaB の生産を調べた結果, 低水分活性の条件で Δ*hogA* と Δ*mpkC* 株において GlaB 生産の上昇が認められた．同様の条件において *mpkC* と *flbC* の二重破壊株では GlaB の生産が大幅に減少した．このことから, MpkC が FlbC を介して *glaB* の発現を制御していることが示唆された．また低水分活性の条件を 50 mM の NaCl や $CaCl_2$ を加えた条件に変更したところ，野生株では GlaB の生産が見られない一方で Δ*mpkC* 株において GlaB の生産が認められたことから, 高濃度の無機イオンによる環境刺激が GlaB 生産に関与していることが示唆された．また, HogA および MpkC の活性化に関与する MAPKKK および MAPKK である *sskB* および *pbsB* を単独で破壊した株ではメンブレン上の菌糸成長阻害ストレス条件で著しい生育の悪化が観察された．興味深いことに, これらの遺伝子と *flbC* の二重破壊株ではその生育の悪化が回復した．

Involvement of the stress-responsive MAP kinase pathway in the *glaB* gene expression in *Aspergillus oryzae.*

○Hiraku Arai, Mizuki Tanaka, Midori Yohimura, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, Solid-state culture, FlbC, *glaB*

2Ga05 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* におけるアミラーゼ遺伝子の発現制御機構解析

○橋本 渉[1], 荒井 啓[1], 水谷 治[2], 山田 修[3], 新谷 尚弘[1], 五味 勝也[1]
（[1]東北大院・農, [2]琉球大・農, [3]酒総研）
katsuya.gomi.a6@tohoku.ac.jp

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* は泡盛をはじめとするわが国の伝統的な焼酎醸造に用いられる産業微生物であり，非耐酸性 α-アミラーゼ遺伝子 *amyA* と固体培養特異的に発現する耐酸性 α-アミラーゼ遺伝子 *asaA* を有している．アミラーゼ遺伝子の発現制御機構は麹菌 *Aspergillus oryzae* において解析が進んでおり，アミラーゼ遺伝子の発現を正に制御する転写因子 AmyR や負に制御する転写因子 CreA，マルトース資化クラスター内の転写因子 MalR などの関与が知られている．黒麹菌では麹菌とは異なるアミラーゼ生産性を示すが，その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．そこで，本研究ではアミラーゼ遺伝子を直接制御する AmyR と CreA の二つの転写因子に着目し，黒麹菌における二種類の α-アミラーゼの発現制御機構について解析を行うことで，アスペルギルス属菌におけるアミラーゼ生産制御機構の多様性の解明を目的とした．*amyR*，*creA* の破壊株において小麦ふすまを基質とした固体培養条件下で培養し，アミラーゼ活性を測定した結果，AsaA の活性は *amyR* 破壊株において活性が著しく減少し，*creA* 破壊株では活性が増加した．一方で AmyA の活性はどちらの破壊株においても大きな影響は見られなかった．さらに同条件下でノーザンブロット解析を行った結果，活性測定と同様の傾向を示したことから，AmyA は AmyR とは別の未知の転写因子によって制御されていることが示唆された．また，種々の炭素源を用いた液体培養では，AmyA を主体とするアミラーゼが構成的に生産されていることが示唆された．現在は麹菌において固体培養特異的に発現するグルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* などを制御する転写因子として当研究室が見出した FlbC のアミラーゼ遺伝子発現への関与について解析するとともに，AmyR の細胞内局在解析や MalR ホモログの機能解析を進めている．

Expression analysis of amylolytic genes in the black *koji*-mold *Aspergillus luchuensis*

○Wataru Hashimoto[1], Hiraku Arai[1], Osamu Mizutani[2], Osamu Yamada[3], Takahiro Shintani[1], Katsuya Gomi[1]
([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Fac. Agric., Univ. Ryukyus, [3]NRIB)

Key words *Aspergillus luchuensis*, amylase gene, transcriptional regulator gene, transcriptional regulation

2Ga06 ジペプチド取り込み能を有する麹菌のトランスポーターの同定

○田中 瑞己[1], 伊藤 圭祐[1], 河原崎 泰昌[1], 五味 勝也[2]
（[1]静県大・食栄, [2]東北大院・農）
mizuki.tanaka@u-shizuoka-ken.ac.jp

麹菌(*Aspergillus oryzae*)は 130 個以上のプロテアーゼ遺伝子を有しており，これらが清酒・味噌・醤油などの醸造において重要な役割を担っている．麹菌のプロテアーゼ遺伝子の発現は，大豆ペプチドなどにより誘導されることが知られている．出芽酵母においては，proton-dependent oligopeptide transporter (POT) である Ptr2p によってジ・トリペプチドが取り込まれる．一方，麹菌のゲノム配列中には Ptr2p と高い相同性を有するトランスポーター遺伝子が 15 個存在するが，いずれも機能が明らかとされていない．本研究では，麹菌においてジペプチド取り込み能を有するトランスポーターを同定することを目的に解析を行った．
15 個のトランスポーター遺伝子の発現を RT-PCR により調べた結果，大豆ペプチド存在下で強く発現している 2 遺伝子を見出した．これらのトランスポーター遺伝子を，ヒスチジンおよびロイシン要求性を示す出芽酵母 BY4742 株を親株とした *ptr2* 破壊株で発現させた．His-Leu ジペプチドを添加したヒスチジンおよびロイシン欠乏培地における生育を調べた結果，いずれのトランスポーター遺伝子を発現させた場合にも生育が回復した．そこで，これらの遺伝子を *potA* および *potB* とそれぞれ命名し，麹菌における発現量を定量 PCR により調べた．その結果，Ptr2p と最も相同性の高いトランスポーター遺伝子である *potA* は，最小培地を用いた前培養時にはほとんど発現しておらず，大豆ペプチド添加培地で 6 時間培養することで約 35 倍に発現量が増加した．一方，*potB* は前培養の時点で既に高い発現量を示したことから，構成的に発現していることが示唆された．以上の結果から，麹菌においては PotA と PotB がジペプチド取り込み能を有しており，これらは異なる発現制御機構によって遺伝子発現が制御されていることが示唆された．

Identification of *Aspergillus oryzae* transporters that mediate dipeptide uptake

○Mizuki Tanaka[1], Keisuke Ito[1], Yasuaki Kawarasaki[1], Katsuya Gomi[2]
([1]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, dipeptide, transporter, *Saccharomyces cerevisiae*

2Ga07 海洋性珪藻類におけるエピソーム導入型多重遺伝子改変システムの開発

北川 諒治, ○原田 尚志
（鳥取大・工）
harada@tottori-u.ac.jp

【背景と目的】海洋性珪藻類は地球全体の 25%にも達する高い一次生産能を持つことから，工業原料や医薬品原料等の生産に応用できる可能性を秘めている．近年，微生物を利用した有用物質生産は，バイオマスを利用した循環型・環境調和型の生産技術が求められており，珪藻を含む光合成生物は，これらを両立する究極のエコファクトリーと成り得ることが期待される．珪藻類の遺伝子操作技術は飛躍的に進歩し，分子ボンバードメント法による染色体ゲノムへの遺伝子導入に基づいた遺伝子高発現化，RNAi，ゲノム編集技術が開発されてきた．本研究では，ごく最近開発された珪藻エピソームを利用した遺伝子導入法を用い，マーカーリサイクル系構築による多重遺伝子改変技術の開発を目指した．
【結果・考察】ゲノム上に接合伝達因子を持ち，且つ可動化遺伝子発現プラスミドを保持する大腸菌株を用い，接合伝達により珪藻へのエピソーム導入を行った．その結果，目的とする発現プラスミドを珪藻株に導入，保持させることに成功した．得られたクローンについてキュアリング条件の検討を行った結果，約 20%の効率でプラスミドを保持しない株を取得した．さらに，一回目のエピソーム導入時と同等の効率で，キュアリング株への再導入が可能であった．以上の結果より本実験系は，ゲノム編集による多重遺伝子改変に有効である可能性が示唆された．そこで次に，珪藻用 TALEN ベクター構築によるゲノム編集を試みた．ウラシル合成関連遺伝子 *Ptumps* をターゲットとした遺伝子ノックアウトの結果，ウラシル要求性を示す複数のクローンを取得することができた．現在，取得したクローンを用いて多重遺伝子改変条件を検討している．

Development of multigene engineering system by episome transfer in marine diatoms

Ryoji Kitagawa, ○Hisashi Harada
(Fac. Eng., Tottori Univ.)

Key words marine microalgae, genome engineering

2Ga08 珪藻殻への有用タンパク質提示発現による機能性材料開発

○大西 菜月 [1], 中島 健介 [2], 辻 敬典 [1], 松田 祐介 [1]
（[1]関西学院大・理工, [2]バイオパレット）
yusuke@kwansei.ac.jp

珪藻はナノメートルオーダーまで微細化されたフラクタルな幾何学構造の被殻 (frustule) を，二酸化ケイ素の自己組織化によって作り出す生物である．この被殻形成因子に，silica affinity protein (Silaffin) ペプチドがあり，任意のタンパク質に付加することで，人為的に所望するタンパク質を温和な条件下で被殻に提示発現が可能である．本研究では，海洋性珪藻 *Thalassiosira pseudonana* の被殻形成機構を利用し，抗菌作用を有する Protamine を被殻に提示発現させ，固定化酵素の物理化学的性質を調べることを目的とした．
protamine 遺伝子を *T. pseudonana* 由来の Silaffin の被殻への移行シグナル直下に連結したベクター (*TpSil3::flag::protamine*)，及び緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*egfp*) を *protamine* 遺伝子の 5'末端或いは 3'末端に連結したベクター (各々 *TpSil3::flag::egfp::protamine*；*TpSil3::flag::protamine::egfp*) を作製し，野生型 *T. pseudonana* に導入した．GFP 標識した Protamine の局在解析の結果，TpSil3:FLAG:Protamine:EGFP は細胞質に，TpSil3:FLAG:EGFP:Protamine は被殻に局在していた．よって，移行シグナルと極端な正電荷を帯びた Protamine の距離が被殻移行に重要であることが示唆された．また，各 Protamine 発現株の抗菌活性は確認できなかった．これは，ケイ酸固体への提示発現による Protamine の不活性化或いは Protamine の発現量が低い可能性が考えられた．現在，固定化酵素の発現量解析及び，安定性の評価を行っている．

Development of functional material by expressing useful proteins to frustules of a marine diatom.

○Natsuki Onishi[1], Kensuke Nakajima[2], Yoshinori Tsuji[1], Yusuke Matsuda[1]
([1]Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Bio Palette Co., Ltd.)

Key words diatom, silica, protamine, immobilization

2Ga09 珪藻固定化酵素を利用した効率的アグマチン産生

○片山 翔太, 福田 青郎, 松田 祐介, 藤原 伸介
（関西学院大・理工）
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

アグマチン(Agm)は活性型アルギニン(Arg)とも称され，健康補助効果が注目されている．Agm は Arg に比べ高価であり，効率的な合成法の開発が期待されている．Arg 脱炭酸酵素は Arg から Agm の合成を触媒する酵素であり，特に超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来の Arg 脱炭酸酵素（*Tk*-PdaD）は，100℃でも機能する (1)．本研究では本酵素を海洋性珪藻の殻に発現させ，多孔質性の固定化触媒としての利用性を検証することを目的とした．特に珪藻殻を担体として固定化することにより，酵素機能の安定化や回収・再利用が容易になると期待される．また，珪藻自体が炭酸固定を行いながら自己増殖するため，環境に対する負荷も低いと考えられる．本研究では海洋性珪藻 *Thalassiosira pseudonana* に注目し，*Tk*-PdaD を silaffin と共発現，固定化を試みた．
まず珪藻のシリカ被殻表層に *Tk*-PdaD を発現させるためのプラスミド pSil-*Tk-pdaD*-Flagtag を作製し，パーティクルガンによる珪藻の形質転換を行った．形質転換により得られた候補株のうち，4 株について生育特性解析を行ったが，野生型と比較して顕著な差は見られず良好な増殖を示した．次に増殖した珪藻を 80℃で処理し，完全に死滅させたのち，Arg 脱炭酸活性（Agm 合成活性）の測定を行った．その結果，形質転換体 4 株中 No.4，No.8，No.21 の 3 株において Agm の合成活性が確認された．このときそれぞれの形質転換体において合成される Agm 量に差が見られ，特に No.21 で大きな活性が確認された．活性の差はシリカ被殻表層に存在する酵素量や酵素の固定化状態に起因していると考えられる．また酵素活性検出された No.21 珪藻殻を回収し，洗浄後，再度 Agm 合成反応を行ったところ，良好な Agm 合成活性が確認された．現在，珪藻殻固定化酵素の安定性，再利用性の評価を行なっている．
(1) Fukuda et al., FEMS Lett., 287, 113-120 (2008)

Efficient production of agmatine by using enzyme immobilized on diatom surface.

○Shota Katayama, Wakao Fukuda, Yusuke Matsuda, Shinsuke Fujiwara
(Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ.)

Key words *Thermococcus kodakarensis*, *Thalassiosira pseudonana*, agmatine, immobilization

2Ga10 オオミジンコを用いた GAL4 ツーハイブリッドシステムによる内分泌撹乱物質検出法の開発

○加藤 泰彦, 山崎 勇人, 松浦 友亮, 渡邉 肇
（阪大院・工）
watanabe@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】 内分泌撹乱物質はホルモン受容体に結合し，転写を調節するコファクターと受容体の相互作用を引き起こすことで，ホルモン依存的な遺伝子発現を撹乱する．この作用機構を利用して内分泌撹乱物質を検出する方法に，タンパク質-タンパク質間相互作用をレポーター遺伝子の発現を指標として検出する GAL4 ツーハイブリッドシステムがある．これまでに本システムを導入した培養細胞や遺伝子組み換え魚類が作出され，内分泌撹乱作用を持つ化学物質の in vivo スクリーニングに用いられてきた．オオミジンコは，長い間化学物質の毒性試験に用いられ，サイズが小さい，飼育が容易，世代時間が短いなど，試験のコスト，スループットの両面で優れている．しかしながらこれまでヒトの遺伝子を導入し，内分泌撹乱物質を検出するシステムは開発されていない．そこで本研究では，オオミジンコにヒト核内受容体，コファクター，レポーター遺伝子を導入し，GAL4 ツーハイブリッドシステムにより内分泌撹乱物質を検出可能か調べることを目的とした．
【方法と結果】 プロモーターに GAL4 が結合する UAS を 5 つ有する eGFP 発現プラスミドを構築した．このプラスミドに CRISPR/Cas の切断部位を導入後，Cas9 タンパク質，ガイド RNA と共に卵に注入し，プラスミドがゲノムに導入された UAS-GFP 系統を作出した．エストロゲンを検出するために，GAL4 の DNA 結合ドメインとヒトエストゲン受容体（hER）のリガンド結合ドメインを融合した GAL4-hER，コファクター NCoA2 と VP16 の転写活性化ドメインを融合した VP16-NCoA2 の両タンパク質をバイシストロニックに発現するプラスミドを構築した．そして UAS-GFP 系統に注入し合成エストロゲンであるジエチルスチルベストロールを曝露すると胚が緑色蛍光を発した．

Establishment of the GAL4 two-hybrid system in *Daphnia magna* for detecting endocrine disrupting chemicals

○Yasuhiko Kato, Yuuto Yamazaki, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Two-Hybrid System, *Daphnia magna*, genome integration, endocrine disrupting chemicals

2Ga11 野生型及びキメラ蛍光タンパク質を用いた蛍光色を決定する配列の解析

○鈴木 寛人[1], 星田 尚司[1,2,3], 赤田 倫治[1,2,3]
（[1]山口大院・創成科学・化学系, [2]山口大・中高温セ, [3]山口大・生命医工セ）
i032vf@yamaguchi-u.ac.jp

[目的] 蛍光タンパク質は生細胞で目的タンパク質を観察するために不可欠なツールである．蛍光タンパク質の発色団やその周辺の配列に変異を加えることにより蛍光色が変わることから様々な蛍光タンパク質が作られている．このことから，変異アミノ酸と蛍光色との相関性が示唆される．変異体の多くは Aequorea victoria の GFP などを基本としているが野生型の蛍光タンパク質はあまり用いられていない．そこで，自然界に存在する赤色蛍光タンパク質と相同性を持つ遺伝子では何色を示すのかを調べた．さらにそれらを組み合わせることによって蛍光色を決定する仕組みの解析を試みた．
[方法と結果] サンゴ *Acropora millepora* (Am と略す)，*Echinopora forskaliana* (Ef)，*Monstastraea cavernosa* (Mc)やイソギンチャク *Corynactis california* (Cc)，*Entacmaea quadricolor* (Eq)のゲノムには赤色蛍光タンパク質(EmRFP)と相同性の高いタンパク質が存在した．これらのアミノ酸配列から大腸菌コドンに最適化した DNA 配列を設計し，eAmRFP(e は大腸菌コドン)のように名付けた．各 DNA 配列を 60 塩基程度のオリゴ DNA として合成し，ベクタープラスミドと混合して酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に導入し，遺伝子を全合成した．eAmRFP，eEqRFP はピンク色，eEfRFP は赤色のコロニーとなり，eCcRFP，eMcRFP はコロニーがそれぞれオレンジと黄色となった．RFP と相同性の高い配列であるが，赤色を示さなかったので相同性で蛍光色が決まらないことが示された．次に，赤色を示す eEmRFP と eAmRFP の相同性を利用してキメラタンパク質を発現させると，特定の領域で組換えを行った場合のみ蛍光を示した．これらの蛍光は RFP よりも GFP の蛍光が強かったことから，赤色の配列の組み合わせから別の色を作れることが示された．以上より，蛍光色はタンパク質全体の構造が関与していることが示唆される．

Gene synthesis and analysis of wild-type and chimeric fluorescent proteins in *Saccharomyces cerevisiae*.

○Hiroto suzuki[1], Hisashi Hoshida[1,2,3], Rinnji Akada[1,2,3]
([1]Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., YamaguchiUniv., [2]YURC-TMR., [3]YUBEC.)

Key words fluorescent protein, *Saccharomyces cerevisiae*, RFP, GFP

2Ga12 耐熱性 D1/D2 ヘテロダイマーをシアノバクテリア光化学系 II 複合体に組み込むための D1 ポリペプチド C 末端プロセシングの最適化

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

【目的】D1/D2 ヘテロダイマーは光化学系 II(PSII)複合体の中心に位置し，水からプラストキノンへの電子伝達を触媒する．私達は好熱性シアノバクテリア由来の D1/D2 ヘテロダイマーを発現する中温性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 の組換え体を作成し，その PSII 複合体から熱安定性の差を利用して D1/D2 ヘテロダイマーを精製する目的で実験を行ってきた．その過程で耐熱性 D1 タンパク質の C 末端が中温性宿主内でプロセシングされないために速やかに分解されることが推定された．ここでは耐熱性 D1 タンパク質の C 末端プロセシングが可能となるように最適化を行った．
【方法および結果】*S. elongatus* PCC7942 の最も発現している *psbA1*(D1),*psbD1*(D2)遺伝子を *Thermosynechococcus vulcanus* 由来の遺伝子で置換した組み換え株 GRPS971 では，耐熱性 D2 タンパク質は PSII 複合体に組み込まれていたが，耐熱性 D1 タンパク質は前駆体がチラコイド膜にわずかに検出された以外，分解を受けていた．これは D1 の C 末端 16 アミノ酸配列の差が原因と考えられた．そこで *T. vulcanus* 由来の D1 プロセシングプロテアーゼをコードする *ctpA* 遺伝子をシャトルベクターにクローン化し，GRPS971 株に導入した結果，28℃では耐熱性 D1 の発現は見られず，高温では組換え体は生育しなかった．CtpA の導入はストレスを与えることが分かったので，耐熱性 D1 の C 末端 16 アミノ酸配列を中温性 D1 の配列に置換した組換え体を作成し，宿主自体のもつ CtpA によるプロセシングを可能とした系での耐熱性 D1 の成熟と PSII への組み込みを試みている．

Optimization of C-terminal processing of D1 polypeptide for assembling thermostable D1/D2 heterodimer into the cyanobacterial photosystem II complex

Ken-ichi Shioya, Kaisei Tsuruda, Norihisa Haraguchi, Yasumune Nakayama, Kazuhiro Nagahama, ○Masayoshi Matsuoka
(Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words photosystem II, thermostability, protein expression, cyanobacteria

2Ha01 竹粉の田面施用が土壌の細菌叢と窒素固定活性に及ぼす影響

○前田 勇, 嵐田 遥, 飯郷 雅之, 平井 英明
（宇都宮大・農）
i-maeda@cc.utsunomiya-u.ac.jp

窒素ガスをアンモニアに変換する生物学的窒素固定反応は，特定の細菌種により行われる．しかしながら，窒素固定が持続するためには細菌に炭素源が供給され窒素固定反応を支えるエネルギーが生成され続ける必要がある．非共生型窒素固定細菌は，特定植物種との共生関係に依存することなく植物体への窒素源供給が可能である．このような利点を持つ非共生型窒素固定細菌による土壌中の窒素固定活性を高めるために，高 C/N 資材である竹粉施用による耕作地土壌への炭素源の人為的供給を検討した．大学附属農場の水田にて化学肥料施用区と竹粉・牛糞堆肥施用区を設定し，収穫後の秋耕前に土壌試料の採取を行った．なお，土壌は黒ぼく土を使用した．土壌の窒素固定活性の測定では，アセチレン還元法にて生成したエチレンを GC-FID で定量することで土壌試料のニトロゲナーゼ活性を測定した．その結果，化学肥料施用土壌に比べて竹粉・牛糞堆肥施用土壌で高いニトロゲナーゼ活性が認められた．また，非共生型窒素固定細菌の単離用平板培地にて土壌から回収した細菌を培養したところ，化学肥料施用土壌と比較し竹粉・牛糞堆肥施用土壌においてより多くのコロニーが形成された．これらの結果は，竹粉・牛糞堆肥施用により土壌細菌への炭素源供給が向上し，窒素固定細菌数に関して土壌中生菌数が増加したことを示唆するものである．また，土壌から抽出した DNA を鋳型として 16S rRNA 遺伝子の部分配列を PCR で増幅しアンプリコンシーケンス解析を行うことで土壌の菌叢解析を行った．その結果，化学肥料施用土壌と比較し竹粉・牛糞堆肥施用土壌では菌叢の偏りが認められ特定の細菌に数が集約化する傾向が認められた．このことから，竹粉・牛糞堆肥施用により土壌菌叢形成においてより高い選択圧がかかったことが示唆された．

Effects of application of bamboo powder to paddy field on bacterial flora and nitrogen fixation activity in soil

○Isamu Maeda, Haruka Arashida, Masayuki Iigo, Hideaki Hirai
(Fac. Agric., Utsunomiya Univ.)

Key words nitrogen fixation, soil bacteria

2Ha02 好塩性細菌 *Halomonas elongata* を用いた高塩廃バイオマス由来の炭素源及び窒素源からの GABA 生産システムの開発

○仲山 英樹, 鄒 子燕, 小川 純平
（長崎大院・水産環境）
nakayamah@nagasaki-u.ac.jp

【目的】本研究では，塩分を多く含む醤油搾りかすや，バイオエタノールの副産物グリセリン，及び畜産排水などの高塩廃バイオマス由来の炭素源並びに窒素源の利活用技術の開発を目標とし，中度好塩性細菌 *Halomonas elongata* を細胞工場とした高効率 GABA 生産システムの開発を目的とした．
【方法】*H. elongata* OUT30018 株ゲノム上のエクトイン(Ect)生合成オペロン(*ectABC*)を欠失させた *H. elongata* KA1 株を親株とし，高塩ストレス条件下での馴化培養による自然突然変異により，Ect を蓄積しない代わりに，L-グルタミン酸（Glu）を適合溶質として高濃度蓄積する突然変異株 *H. elongata* GOP（Glutamate Over Producing）株を取得した．さらに本研究では，広範囲の pH 条件下で活性を示す変異型グルタミン酸脱炭酸酵素を生産させるため，*H. elongata* 発現用にコドンを最適化した人工遺伝子(*HeGadBmut*)を設計した．そして，GOP 株に *HeGadBmut* 遺伝子を導入した組換え *H. elongata* GABA 株を創製した．
【結果と考察】3-12% NaCl の様々な塩濃度条件下で培養試験を行った結果，8% NaCl 条件下で GOP 株は塩感受性を示すのに対し，GABA 株では GABA が *de novo* 合成されると同時に塩感受性が抑制された．本結果により，適合溶質として Glu を細胞内に高濃度蓄積する GOP 株では，酸性アミノ酸である Glu の蓄積量増加による酸ストレスのため，6% NaCl を超える条件下では細胞内の浸透圧調節に必要な量の Glu を蓄積できずに塩感受性を示すと推察された．一方，GABA 株は Glu を GABA に変換して細胞内を中和できるため，細胞内に GABA を浸透圧調節物質として高濃度蓄積し，高 NaCl 濃度条件下での塩感受性が抑制されたと考えられる．
【展望】今後は，高塩廃バイオマスを原料として生産した GABA を家畜用飼料添加剤などに再資源化することにより，循環型社会の創成に資する環境バイオ技術の開発を目指す．

Development of GABA production system from salty waste-biomass-derived carbon and nitrogen sources using the moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*

○Hideki Nakayama, Ziyan Zou, Junpei Ogawa
(Grad. Sch. Fish. Environ. Sci., Nagasaki Univ.)

Key words GABA, *Halomonas elongata*, biosynthesis, L-glutamate

2Ha03 リグニン由来フェノール類を唯一の炭素源とした *cis,cis*-ムコン酸生産の効率化に関わる培養要素の同定

○杉田 晴佳 [1,3], 栗本 祐樹 [1,3], 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

【目的】我々はこれまでに，*Pseudomonas putida* KT2440 株がリグニン由来のフェノール類を炭素源として増殖できる性質を利用して，バイオ生産の炭素源として多用される糖質を用いることなく，針葉樹を化学処理して得られるリグニン由来フェノール類だけを炭素源として，多様なポリマー原料へと展開できる基幹化合物である *cis,cis*-ムコン酸 (ccMA) を生産できる微生物株の作出に取り組んできた [1]．本検討では ccMA 収率を向上させる培養要素の同定に取り組んだ．
【方法と結果】ccMA 収率の向上には，プロトカテク酸 (PCA) を 3-carboxymuconic acid へと変換する酸化的な PCA 3,4-dioxygenase (PcaHG) 反応を抑制して増殖やエネルギー源への PCA の分配を減らし，非酸化的な PCA decarboxylase (AroY) 反応による PCA の catechol への変換を経て ccMA へと分配できる方法を明らかにすることが必要である．*pcaHG* と ccMA cycloisomerase 遺伝子を欠損させ，同一プロモーター配列の制御下に *aroY* と *pcaHG* を連結したプラスミドを導入した *P. putida* KT2440 株の組換え体を用いた休止菌体反応から，PCA からの ccMA 収率には溶存酸素濃度 (DO) または通気量が影響することが示唆された．そこでミニジャーファーメンターを用いて DO と通気量の ccMA 収率に対する効果を評価した．その結果，DO を 0.38—0.75 ppm O_2 に制御することで，リグニン由来のフェノール類モデル (バニリン酸と *p*-ヒドロキシ安息香酸の混合物) から 30 wt%以上の収率で ccMA を生産できることを明らかにした．この収率はグルコースを唯一の炭素源とした ccMA 生産と同等以上であった．
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] 園木ら, 第 69 回日本生物工学会大会 (2017) .

Effective factors on sugar-free *cis,cis*-muconic acid production from lignin-related phenols.

○Haruka Sugita[1,3], Yuki Kurimoto[1,3], 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 *cis, cis*-muconic acid, *Pseudomonas putida*, lignin, bio-based monomer

2Ha04 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 3

○江邉 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司
（近畿大院・生物理工・生物工）
ebe.microbiotech@gmail.com

イネの籾殻を焼成することで作られる燻炭は，作物の収量増加をもたらす土壌改良材として利用されてきた．我々は燻炭の役割が土壌の改良だけでなく，土壌中に存在する植物生長に関わる有用微生物の増殖を促進しているのではないかと考えた．そこでこれまでの研究において燻炭存在下で増殖が促進される有用微生物の探索を行い，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 株の単離に成功した．さらに燻炭を IA 株の液体培養に添加することで増殖・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 IA 株の増殖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．そのため焼成後の燻炭の構成成分のうち約 50%を二酸化ケイ素が占める．このことから二酸化ケイ素を添加した培地を用いて IA 株の培養を行った．その結果，IA 株の増殖と胞子化は何も添加せずに培養を行ったものよりは促進されたが，燻炭を添加して培養を行った時と比較するとその促進効果は微弱であった．燻炭を蒸留水に懸濁し高温高圧処理を行うと，透き通った茶褐色を呈する水溶性成分が抽出される．この水溶性成分にも増殖促進効果が存在するか調べた．燻炭抽出液を用いて培地を調製し IA 株の培養を行った結果，二酸化ケイ素と同様に微弱な増殖促進効果が認められ，燻炭から抽出される成分が増殖促進に関わっていることが示された．そこで二酸化ケイ素と燻炭抽出液を組み合わせた培地を作製し IA 株の培養を行ったところ，燻炭を添加した時と同様の活性促進効果が認められた．以上の結果から，燻炭による IA 株の増殖促進には燻炭中に含まれる二酸化ケイ素と燻炭から抽出される成分が重要であることが示された．

Mechanisms of growth enhancement of *Bacillus* sp. IA in the presence of rice husk biochar 3

○Shohei Ebe, Tatsuya Ohike, Masahiro Okanami, Takashi Ano
(Grad. Sch. BOST, Kindai Univ.)

Key words *Bacillus*, rice husk biochar, silicon dioxide, bacterial growth enhancement

2Ha05 高濃度バニリンによる翻訳抑制下でも優先的に翻訳される新規酵母遺伝子 *VFH1* の解析とそのプロモーターの活用

Nguyen Trinh, ○井沢 真吾
（京工繊大院・工芸科学）
thioredoxin@kit.ac.jp

リグノセルロース系バイオマスの糖化前処理で副産物として生じるバニリンやフルフラール，5-hydroxymethylfurfural (HMF)は，酵母の生育や翻訳を抑制する発酵阻害物質である．我々はこれまでに，高濃度バニリンによる翻訳抑制下でも優先的に翻訳され，発現が誘導される遺伝子として *ADH7* と *BDH2* を，また，高濃度エタノールによる翻訳抑制下で優先的に翻訳される遺伝子として *BTN2* を同定している．興味深いことに，このような優先的翻訳は mRNA の配列ではなく，プロモーターの DNA 配列に依存したものである．そのため，*ADH7* のプロモーターを用いることで，任意の遺伝子の発現を高濃度バニリン存在下でも誘導することが可能である．今回，高濃度バニリン存在下で優先的に翻訳される他の遺伝子を探索し，新たに *VFH1* (*YLL056C*)を同定した．*VFH1* の発現は，高濃度のバニリンやフルフラールによる翻訳抑制下で転写が活性化されるとともに，*ADH7* や *BDH2* よりも高い効率で優先的に翻訳された．一方，熱ショックや過酸化水素，酢酸などでは *VFH1* の発現は誘導されなかった．また，*VFH1* プロモーターを使うことで *VFH1* 以外の遺伝子の発現を発酵阻害物質存在下で誘導することが可能であり，アルデヒド脱水素酵素をコードする *ALD6* の発現を誘導することで発酵阻害物質に対する耐性が改善された．単なる *ALD6* の構成的な過剰発現では非ストレス条件下の生育を抑制してしまうが，*VFH1* プロモーターを用いた場合には高濃度の発酵阻害物質が存在する時にのみ転写・翻訳が活性化されるため，発酵阻害物質を解毒したのちに不必要な負担を酵母細胞にかけずにすむ利点があると考えられた．

The *VFH1* (*YLL056C*) promoter is vanillin-inducible and enables mRNA translation despite pronounced translation repression caused by severe vanillin stress in *Saccharomyces cerevisiae*

Trinh Nguyen, ○Shingo Izawa
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words yeast, vanillin, furfural, bioethanol

2Ha06 廃菌床由来バイオエタノールの発酵生産

○小林 洋介 [1], 藤森 一浩 [2], 西島 拓人 [1], 杉本 直久 [1], 藤野 尚人 [1], 今井 史規 [3], 金松 雅俊 [3], 山田 憲治 [3], 荒井 進 [3], 吉田 浩爾 [1], 佐賀 清崇 [1], 泉 可也 [1]
（[1]Biomaterial in Tokyo, [2]産総研・生物プロセス, [3]三友プラントサービス）
kobayashi.y@biomt.onmicrosoft.com

【背景】食用キノコの栽培に用いられた菌床（廃菌床）は，現在，残渣として処理されているが，バイオ燃料へ転換可能な未利用バイオマスの一つである．しかし，廃菌床は糖化および発酵効率に影響する阻害物を多く含むため，その利用に関してこれまで十分な研究が進んでいなかった．また，廃菌床は他のバイオマスに比べて Xylose の含有率が高いため, 高い Ethanol 収率を得るには Xylose を Ethanol に変換可能な発酵微生物が必要不可欠である．本研究では，廃菌床から Ethanol を生産する技術の確立を目指し，糖化・発酵条件の検討を行った．
【方法・結果】
連続水蒸気爆砕装置を用いて廃菌床を爆砕し，糖化後の糖濃度が 120 g/L 以上になるように pH5.0, 50℃の条件で糖化反応を行った．この糖化液に対して，Xylose を資化しない非組換え酵母の培養液を 1/10 量加えて発酵を試みたが，Glucose ですら資化できず，Ethanol をほとんど生産することができなかった．その理由として，発酵期間中の pH の低下が考えられたため，発酵開始時の pH を検討したところ，pH5.5 以上では Ethanol 生産が可能であることが分かった．しかし，変換効効率は 65%程度であった．廃菌床に含まれる Xylose からの Ethanol 生産を検討するために，Xylose 代謝遺伝子が挿入された C5C6 糖同時発酵遺伝子組換え酵母 (第 69 回日本生物工学会大会 藤森ら) を用いて発酵試験を行った．その結果，Glucose 及び Xylose のほとんどを 72 h 以内に消費し，全糖から Ethanol への変換効効率は 90%以上に到達した．本研究結果により，廃菌床はセルロース系エタノール生産に適した基質であることをはじめて明らかにした．
本研究はバイオマスエネルギー技術研究開発/セルロース系エタノール生産システム総合開発実証事業/パルプを用いた水蒸気爆砕法によるバイオエタノール生産に関する技術開発および事業性評価(NEDO) による成果である．

Ethanol production from waste mushroom bed biomass

○Yosuke Kobayashi[1], Kazuhiro E. Fujimori[2], Hiroto Nishijima[1], Naohisa Sugimoto[1], Naoto Fujino[1], Fuminori Imai[3], Masatoshi Kanematsu[3], Kenji Yamada[3], Susumu Arai[3], Kouji Yoshida[1], Kiyotaka Saga[1], Yoshiya Izumi[1]
([1]Biomaterial in Tokyo Co., Ltd., [2]BRI. AIST, [3]Sanyu Plant Service Co., Ltd.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol production, fermentation, saccharification

2Ha07 ミミズが土壌微生物燃料電池に及ぼす効果

○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

近年，石油，石炭などの化石燃料を用いた発電は CO_2 排出により地球温暖化を促進するため，再生可能であり持続可能な発電が注目を集めている．微生物燃料電池（microbial fuel cell; MFC）は微生物が有機物を分解した際に生じる還元力を電子として取り出すことで発電できる再生可能かつ持続可能な発電装置である．その MFC の一つに土壌と電極だけで発電することができる土壌型微生物燃料電池（soil MFC; SMFC）がある．SMFC は液体培地や培養液を用いた MFC とは異なり，陽イオン交換膜を必要とせず，土壌中にアノードを，土壌表面上にカソードを設置するだけで作製することができる．しかし，SMFC には獲得できる電力が低いといった問題がある．その問題の解決のために，土壌中に炭素粉末を混ぜ込むこと，電極素材や設置距離の最適化など SMFC の構成や素材などの検討による電力の向上が報告されている．我々は土壌には本来土壌動物と微生物の共生関係があり，土壌生態系があることに着目した．土壌動物の中でも特に環形動物であるミミズは昔から良い土の指標とされており大地の腸，自然の鍬と呼ばれ，微生物活性を促進することで植物リターの分解などに貢献している．さらに，ミミズを加えることで植物の生長を促進することや，ミミズ由来の微生物から植物病原菌を抑制する微生物が得られたといった報告もある．これらのことから，我々は SMFC にミミズを加えることで，土壌の肥沃度や微生物活性が高まるなどの土壌改良が行われ，それが SMFC の性能向上につながるのではないかと考え実験を行った．その結果ミミズを SMFC に加えると得られる電圧が上昇した．さらに，ミミズを加えた SMFC の性能を測定したところ，Control と比べて最大電力密度は 800％上昇し，内部抵抗は 90％の減少が認められた．

Effect of earthworm on the performance of soil microbial fuel cell

○Hiroshi Yukimoto, Shohei Ebe, Tatsuya Ohike, Masahiro Okanami, Takashi Ano
(Grad. Sch. BOST, Kindai Univ.)

Key words microbial fuel cell, soil ecosystem, earthworm, generate electricity

2Ha08 微生物発電に伴う有用物質生産の試み

○福本 悠地, 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・生物工）
tano@waka.kindai.ac.jp

微生物燃料電池（Microbial Fuel Cell：MFC）は，微生物が有機物を分解する際に生じる電子を電極で回収する事で電力生産を行う装置である．Geobacter 属，Shewanella 属細菌をはじめ多くの微生物が土壌から単離され，MFC に利用できる事が報告されている．
そこで，土壌中に広く分布している根菌微生物である Bacillus subtilis に着目した．B. subtilis は 2009 年に MFC を用いた電力生産が報告されており，胞子，バイオフィルムを形成する事で，生育に不利な環境に耐性があると報告されている．また，B. subtilis は植物病原菌に対する抗真菌活性物質を生産する事が示されている．本研究では，B. subtilis のバイオフィルム形成による環境ストレスに対する耐久性を活かし，高濃度な培地での生育を検討した．高濃度培地条件での生育は培養スペースを抑え，コンタミネーションのリスクも下げる事が期待できる．本研究では，MFC を用いた B. subtilis における電力生産と抗真菌活性物質生産を同時に行う事を試みた．
Polypepton-S 濃度が 10%，20%，30%，40%，50%の溶液を培地に用いた．菌株には，研究室保有株 Bacillus subtilis RB14 株を用いて，各濃度におけるバイオフィルムの重量の比較とバイオフィルム及び培養液を用いた抗真菌活性試験を行った．次に，B. subtilis RB14 株を植菌した一槽式の MFC の電圧値，抗真菌活性試験の経時変化を測定した．その結果，B. subtilis RB14 株は電力生産と抗真菌活性物質生産を同時に行う事が示された．また，培地濃度に応じてバイオフィルム重量に差が認められた．これ等の性質を利用し，さらなる抗真菌活性物質生産量の増加を目的として検討中である．

Production of useful substances by the microbial fuel cell of *Bacillus subtilis*

○Yuji Fukumoto, Hiroshi Yukimoto, Shohei Ebe, Tatsuya Ohike,
Masahiro Okanami, Takashi Ano
(Grad. Sch. BOST, Kindai Univ)

Key words *Bacillus subtilis*, biofilm, antibiotics, microbial fuel cell

2Ha09 種々の遺伝子改変の組み合わせが微生物燃料電池の出力に与える影響

○川口 太一[1], 菊池 亮太[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

有機物の分解により生じた電子を利用する微生物燃料電池（MFC）は，再生可能なバイオマスを原料に電気エネルギーを生み出す技術である．バイオマスが豊富でインフラが未整備な地域における電源の 1 つとしてその応用が期待されるが，その出力はまだ低く，改善が求められている．我々は触媒に大腸菌を用い，遺伝子改変と出力や燃費（クーロン効率）の関係から触媒能の改善を進めてきた．本研究では，2017 年度の本大会で報告した内容をベースに，出力やクーロン効率の上昇に有効と考えられる遺伝子改変を組み合わせ，さらなる改善を進めた．
燃料はグルコースとし，各電極液量が 7.5 mL の 2 槽型セルを用いた．出力は 18 時間の電流と電圧の測定から評価し，燃費（クーロン効率）は負極槽のグルコース消費の測定から評価した．また，ピルビン酸等の代謝産物量を測定し，代謝の変化を評価した．触媒については，染色体上で遺伝子改変を行い，それらを組み合わせた大腸菌を構築した．具体的には，TCA サイクルで多くの NADH を得ることが重要と考え，TCA サイクルに関わるフマル酸還元酵素遺伝子(*frdA*)やピルビン酸デヒドロゲナーゼのリプレッサー遺伝子(*pdhR*)，解糖系から乳酸，酢酸，アセトアルデヒド合成への分岐反応に関与する遺伝子(*ldhA*，*pta*，*adhE*)の欠損を重ねた 5 重欠損株を作製した．本株では，18 時間の総出力は野生株に比べ 1.5 倍，クーロン効率は 2.5 倍まで改善された．しかし，本株ではピルビン酸の蓄積が見られることから，この株をベースに改変を重ね，さらなる改善を進めている．また，電子伝達系および細胞表層での電子伝達に関する検討も進めており，これらの遺伝子改変の組み合わせが触媒能力に与える影響を報告する．

Effects of combinations of various genetic modifications on the power of microbial fuel cells using *Escherichia coli*

○Taichi Kawaguchi[1], Ryouta Kikuchi[1], Daisuke Koma[2], Takashi Ohmoto[2], Yoshihiro Ojima[1], Masayuki Azuma[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ., [2]Osaka Research Institute of Industrial Science and Technology)

Key words microbial fuel cell, MFC, metabolism, *Escherichia coli*

2Ha10 *Desulfovibrio* 属細菌由来の蓄電性バイオミネラルの特性に寄与する関連遺伝子の比較解析

○工藤 優輝[1], 安藤 翔太[1], 分部 友紀[2], 安池 一貴[2], 田代 陽介[1,3], 二又 裕之[1,3,4]
（[1]静大院・総科技, [2]静大・工, [3]静大創造大学院, [4]静大・グリーン研）
futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

グリーンエネルギーの生産および貯蔵は低炭素社会に向けて必須の技術であり，多面的な取り組みが必要不可欠である．当研究室では，微生物燃料電池から分離した *Desulfovibrio* sp. HK-II 株および HK-IV 株が，Fe^{3+}存在および硫酸呼吸時において，蓄電ミネラル（Mackinawite）を生産することを明らかにした．両菌株は系統学的に極めて近縁であるにも関わらず，HK-IV 株の蓄電鉱物の充放電容量は HK-II 株の約 2 倍であった．そこで本研究では，蓄電能の違いを生み出す微生物の特性を明らかにすることを目的としてゲノム比較を実施した．
HK-II 株および HK-IV 株のゲノムサイズはそれぞれ，3.92 Mbp および 3.97 Mbp であり，Average Nucleotide Identity （ANI） 解析の結果，ゲノム間の相同性は 99.91％であった．微生物由来の Mackinawite は数日掛けて生成されるのに対し，化学合成では一瞬にして生成され形態および充放電容量も異なった．そのため，蓄電ミネラル生成速度が影響していると推察し，まず硫酸還元に関わる代謝プロセスを遺伝的に特定した．その結果，両菌株とも電子伝達鎖，硫酸還元経路，亜硫酸還元経路と既存の硫酸還元プロセスを有していた．遺伝子 *sat*, *aprAB*, *qmoABC*, *dsrAB*, *tplc3*, *qrcABCD*, *dsrMKJOP* とそれらの周辺領域，さらに制御タンパク遺伝子 *rex* が 100％一致していた．しかし，HK-IV 株に特有の遺伝子領域が少なくとも 4 ヶ所見出された．その内の 1 つに亜硫酸排出に関わるタンパク TauE をコードする遺伝子が見出され，ゲノム全体としては HK-II 株および HK-IV 株にそれぞれ 10 および 11 の遺伝子と多様性が確認され，硫化水素生成速度の差が影響していることが示唆された．現在，上記関連遺伝子の発現量比較を進めている．

Characterization of rechargeable bio-mineral produced by *Desulfovibrio* spp. strains and comparison of genes related to production of the mineral

○Yuki Kudo[1], Shota Ando[1], Yuki Wakebe[2], kazuki Yasuike[2], Yosuke Tashiro[1,3], Hiroyuki Futamata[1,3,4]
([1]Grad. Sch. Eng., Shizuoka Univ., [2]Dept. Eng., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [4]Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

Key words Rechargeable bio-mineral, Sulfate-reducing bacteria, electron, metabolism

2Ha11 *Desulfovibrio* sp. HK-II 株の細胞外電子伝達と硫酸呼吸が及ぼす影響

○安藤 翔太[1], 工藤 優輝[1], 分部 友紀[2], 安池 一貴[2], 田代 陽介[1,3], 二又 裕之[1,3,4]
（[1]静大院・工, [2]静大・工, [3]静大・創造大学院, [4]静大・グリーン研）
futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

クリーンエネルギーの効率的生産は低炭素社会構築に向けて必須の課題である．その一つとして, 廃棄物処理とエネルギー生産を一石二鳥的に行える微生物燃料電池（MFC）が着目されている．MFC の効率化を図る一環として, 細胞外電子授受機構の制御が必要であるが, 特定の微生物に関する知見が集積しつつ有り, 他の嫌気微生物については未解明な部分が多い．そこで本研究室では, MFC から分離した蓄電性バイオミネラルを生産する硫酸還元細菌に着目し, その細胞外電子伝達（EET）機構の解明を目的とした．
供試菌株 *Desulfovibrio* sp. HK-II 株を硫酸還元条件下で前培養し, 菌体を集菌洗浄後 MFC に接種した．乳酸を電子供与体, 電極を電子受容体として培養した結果, 乳酸の減少に伴い, 菌体量の増加と微弱な電流が生産され EET が確認された．SDS-PAGE の結果, 外膜に特異的なタンパクの発現が確認された．HK-II 株は硫酸還元条件下で乳酸を酢酸に変換する不完全酸化型の代謝を行うが, MFC では酢酸集積が確認されず代謝変換が示唆された．MFC に硫酸を添加した結果, 乳酸および硫酸の減少に伴い急激な発電量の増加と酢酸の蓄積が確認された．硫酸添加に伴う発電量の増加が細胞外電子伝達系の活性化であれば, 酢酸の蓄積は矛盾する．そこで, より厳密な解析を実施する為, 負極電位を 0 から 0.1 V 間隔で 0.5 V まで設定した条件で運転した．全ての条件下で乳酸および硫酸の消費が確認された一方, 電流生産は+0.2 V 以上で観察された．開回路条件と比較すると, 発生した H_2S 量は約 40%減少しており負極を EDX 解析した結果, 硫黄の付着が確認された．その為, 硫酸添加時に生じる急激な電流生産は H_2S を介した化学的反応に因ると推察された．ゲノム解析の結果, 細胞外電子伝達タンパクをコードする遺伝子も複数確認されており, 現在これらの関与について解析を進めている．

Effects of sulfate-reducing metabolism on the extracellular electron transfer of *Desulfovibrio* sp. HK-II

○Shota Ando[1], Yuki Kudo[1], Yuki Wakebe[2], Kazuki Yasuike[2], Yosuke Tashiro[1,3], Hiroyuki Futamata[1,3,4]
([1]Grad. Sch. Eng., Shizuoka Univ., [2]Dept. Eng., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [4]Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

Key words extracellular electron transfer, sulfate-reducing bacteria, sulfate-respiration

2Ha12 下水汚泥のメタン発酵におけるハザードケミカルの影響

○星子 裕貴, 藤江 秀斗, ムスタファ ヌルル・アシファ, 前田 憲成
（九工大院・生体工）
toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp

【背景と目的】下水汚泥は，古くからメタン発酵の原料として資源化されてきたが，近年，下水処理場に流入する排水中には，病気治療や予防等で用いられる医療系高生理活性物質や工業廃水に含まれる工業系内分泌かく乱物質が含まれているという報告がある．これらのハザードケミカルの中には，毒性と有害性を持つものを知られているため，これらの性質により，下水汚泥中の菌叢を変え，メタン発酵に影響を与える可能性があるが，その詳細な影響を調査した報告はない．そこで本研究では，これらのハザードケミカルの存在下において，下水汚泥のメタン発酵がどのような影響を受けるのかを検証することを目的とした．
【方法】，北九州市の下水処理場から採取した下水汚泥は，滅菌水により 50%にしたのち，この汚泥（3 g）を 50 mL の発酵バイアルに入れ，さらに環境汚染物質を 50 mg/L となるように滅菌水を用いて調製した．その後，窒素ガスにて嫌気条件下にして，37℃，120 rpm，20 日間発酵処理を行い，メタンの生成量を 4 日毎にガスクロマトグラフィーにて測定した．また，実験終了時に，検知管を用いて，発生した硫化水素の濃度も測定した．今回，使用した環境汚染物質は，抗がん剤フルオロウラシルと内分泌かく乱物質ビスフェノール類（ビスフェノール A，ビスフェノール F，ビスフェノール S）とした．
【結果】20 日後，ビスフェノール F においては，メタン発酵はあまり阻害されなかったが，フルオロウラシル，ビスフェノール A，ビスフェノール S の順にメタン生成が阻害されていた．一方，顕著にメタン生成が抑制されたフルオロウラシルを添加した汚泥では，硫化水素濃度が増加していた．本学会では，これらのメタン生成および硫化水素生成の結果を報告すると共に，ハザードケミカルによるメタン生成抑制と硫化水素生成促進のメカニズムについても報告する．

Effect of hazardous chemicals on methane fermentation using sewage sludge.

○Yuki Hoshiko, Shuto Fujie, Nurul Asyifah Mustapha, Toshinari Maeda
(Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.)

Key words methane fermentation, hazardous chemical, sewage sludge, microbial community

2Ia01 高性能な蛍光バイオセンサー構築のための抗体結合プローブの開発

○高橋 昌樹[1], 児島 智樹[2], 北口 哲也[3], 上田 宏[3]
（[1]東工大院・生命理工, [2]東大院・工・化生, [3]東工大・化生研）
ueda@res.titech.ac.jp

【背景と目的】微量分子の簡便かつ正確な測定を行うための技術の一つとして Quenchbody(Q-body)を使用した方法がある．Q-body は抗体に部位特異的に蛍光色素を修飾した免疫測定素子である．Trp 残基による蛍光の消光を利用した Q-body は迅速・簡便・高感度な測定ができるため様々な応用が期待される一方，新規抗体の Q-body 化には多くの時間と労力を要することが課題である．本研究では，抗体結合タンパク質である Protein A および Protein G の抗体結合ドメインをペプチドリンカーで繋ぎ，蛍光色素を修飾した PAxPG probe を作製し，プローブ添加による抗体 Fab 断片の簡便な Q-body 化を試みた．
【実験方法】ドメイン間のリンカーとして α ヘリックス構造をとりやすい $(EAAAK)_4$ と柔軟な $(DDAKK)_4$ を使用した．また Protein A と色素標識部位間のリンカーとして剛直なポリプロリン $(Pro)_{12}$ と柔軟な $(GGGS)_5$ を使用した．これらの PAxPG probe を大腸菌を用いて発現精製した後, N 末端側の標識用配列(Cys tag)に対し蛍光色素(Tetramethylrhodamine, TAMRA)を修飾，更に精製した．一定濃度の PAxPG probe を各濃度の抗オステオカルシン(BGP)抗体 Fab 断片と混合し，蛍光強度を測定(Ex: 544 nm Em: 580 nm)する事でクエンチ効率を調べた．さらに，クエンチ効率が最大となる Fab 濃度条件で各濃度の抗原ペプチド(BGP-C7)を添加し，蛍光強度を測定することで脱クエンチ効率を調べた．
【結果と考察】 種々の PAxPG probe で測定した結果，最も高性能な Probe はドメイン間のリンカーとして $(EAAAK)_4$，色素標識部位リンカーとしてポリプロリンを使用したものであり，最大クエンチ効率は 47%となった．またクエンチが最大の濃度において，抗原を加えた際の最大脱クエンチ効率は 38%となった．Probe を構成するリンカーは剛直である方が，クエンチ状態がより安定化し高い性能を示すものと考えられた．

Development of antibody binding probes for the construction of high performance fluorescent biosensors

○Masaki Takahashi[1], Tomoki Kojima[2], Tetsuya Kitaguchi[3], Hiroshi Ueda[3]
([1]Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech, [2]Dept. Chem. Biotechnol., Univ. Tokyo, [3]Lab. Chem. Life Sci., Tokyo Tech)

Key words biosensor, antigen, synthetic biology, fluorescence

2Ia02 細胞内のアセチル化能を感知するセンサの開発

○渡邉 荘爾, 小林 一幾, 木村 友紀, 河合 繁子, 斎藤 恭一, 梅野 太輔
（千葉大院・融合）
umeno@faculty.chiba-u.jp

【背景と目的】 タンパク質の翻訳後修飾の一つとして知られるアセチル化の大部分は，表面リジン残基とアセチルリン酸との間に起こる非酵素的反応の産物である．近年，細胞内の多くのタンパク質が非酵素的にアセチル化されること，そのアセチル化が，酵素活性や細胞内の代謝状態を積極的に制御していることが明らかになりつつある．
本研究では，転写因子に，アセチル化依存的に機能変化を示す性質を賦与し，細胞内のアセチル化能を感知・レポートするセンサを開発することを目的とした．そこでまず，標的タンパク質へアセチル化されうるリジン残基を導入し，アセチル化依存的に機能変化を示すタンパク質の作製を試みた．
【方法】アラビノース応答性転写調節タンパク質 AraC の表面にリジン残基を複数導入した．導入個所として，AraC を構成する 292 アミノ酸のうち，表面に存在し，かつ，グルタミンに置換した場合の安定性がリジンへ置換した場合よりも顕著に安定と計算された 10 残基を選んだ．これらを全てリジン残基に置換し，その遺伝子全域に EP-PCR 法を用いてランダム変異を導入した．得られた AraC ライブラリの中から，AraC プロモータ下流に配置した蛍光タンパク質(GFP) 遺伝子の発現量を，グルコース添加によって高めるものを選抜した．
【実験と結果】 グルコース添加に応答して蛍光強度をあげる変異体の多くは，培地に酢酸ナトリウムを添加した場合でも蛍光強度が増加した．いずれの添加も，細胞内のアセチルリン酸レベルを高める効果を持つ．リジンのアセチル化によって表面近傍の電荷変化が，読み出し可能な機能・構造変化を引き起こしたものと思われる．

Evolutionary design of sensors for the cellular capacity of protein acetylation

○Soji Watanabe, Ikki Kobayashi, Yuki Kimura, Shigeko Kawai, Kyoichi Saito, Daisuke Umeno
(Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ.)

Key words acetylation, post-tlanslational modification, biosensor, acetylome

2Ia03 デノボタンパク質ナノブロック ePN-Blocks による自己集合超分子ナノ構造の創製と解析

小林 直也[1,2], 稲野 紘一[1], 笹原 健嗣[1], 佐藤 高彰[1], 宮澤 佳甫[3], 福間 剛士[3], Hecht Michael[4], 宋 致宏[5], 村田 和義[5], ○新井 亮一[1,6]
（[1]信州大・繊維, [2]自然科研機構・生命創成探究セ, [3]金沢大院・自科, [4]プリンストン大・化学, [5]生理研, [6]信州大・菌類微生物セ）
rarai@shinshu-u.ac.jp

これまでに，ドメインスワップ二量体形成 4 本ヘリックスバンドル新規人工タンパク質（デノボタンパク質）WA20 の特徴的構造を活かしたタンパク質ナノブロックを設計開発し，対称構造を幾何学的に組み合わせることで，多様な超分子ナノ構造複合体を創出してきた(Kobayashi *et al., JACS*, 2015)．本研究では，WA20 をタンデムに連結した新たなタンパク質ナノブロック extender Protein Nanobuilding Blocks (ePN-Blocks)を設計開発し，自己集合ナノ構造複合体を創製することを目的とした．2 つの WA20 ドメイン間のリンカー配列には，ヘリックスリンカー $(EAAAK)_4$ またはフレキシブルリンカー$(GGGGS)_4$ を用いた．これらの人工タンパク質を大腸菌で発現，精製し，Native PAGE を行ったところ，ラダー状のバンドパターンが見られ，自己集合により様々な会合体を形成することが示唆された．これらをサイズ排除クロマトグラフィーにより分画し，多角度光散乱による分子量測定や X 線小角散乱による解析，電子顕微鏡による観察等を行ったところ，2～5 量体のホモ多量体の形成が明らかとなった．次に，WA20 (sPN-Block) と混合して変性及びリフォールディングしたところ，2 種類のタンパク質ナノブロックを再構成したヘテロ複合体(esPN-Block)の構築に成功し，直鎖状フォームへのダイナミックな構造変換が示唆された．さらに，このタンパク質ナノブロック複合体に金属イオンを添加して基板上で超分子ナノ構造体を構築し，原子間力顕微鏡で観察した．以上の結果は，タンパク質ナノブロックの組み合わせによる自己集合超分子ナノ構造創製に成功したことを示す成果であり，次世代タンパク質工学の一端として今後の発展も期待できる．(Kobayashi *et al., ACS Synth. Biol.* 2018)

Self-assembling supramolecular nanostructures constructed from *de novo* extender protein nanobuilding blocks

Naoya Kobayashi[1,2], Kouichi Inano[1], Kenji Sasahara[1], Takaaki Sato[1], Keisuke Miyazawa[3], Takeshi Fukuma[3], Michael H. Hecht[4], Chihong Song[5], Kazuyoshi Murata[5], ○Ryoichi Arai[1,6]
([1]Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ., [2]ExCELLS, Natl. Inst. Nat. Sci., [3]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [4]Dept. Chem., Princeton Univ., [5]Natl. Inst. Physiol. Sci., [6]CFMD, Shinshu Univ.)

Key words protein engineering, supramolecular complex, nanostructure, protein nanobuilding block

2Ia04 様々なタンパク質のアミロイド凝集形成に対するポリアミン由来 8 員環化合物の影響評価

○國富 理紗子[1], 福永 隼大[1], Pradipta Ambara R.[2], 田中 克典[2], 座古 保[1]
（[1]愛媛大院・理工, [2]理研）
zako.tamotsu.us@ehime-u.ac.jp

【背景・目的】 多くのタンパク質が自己集合することによって，可溶性オリゴマーや不溶性の線維状フィブリル，いわゆるアミロイド凝集を形成することが知られている．アミロイド凝集は細胞毒性を有するため，組織に沈着することで様々な疾病が発症すると考えられている．近年，我々のグループでは，ポリアミンであるスペルミンやスペルミジンと高い細胞毒性を有する不飽和アルデヒドであるアクロレインから生成される 8 員環化合物が，アルツハイマー病の原因とされているアミロイド β40 (Aβ40) の凝集を抑制することを発見した (Tsutsui *et al. Adv. Sci.* (2016))．しかしながら，この 8 員環化合物が他のアミロイド凝集形成タンパク質に与える影響は未だ明らかではない．本研究では，スペルミン由来 8 員環化合物 (cSPM) が Aβ 以外のアミロイド凝集形成タンパク質に与える影響を評価した．凝集タンパク質にはヒトの疾病に関係していることからアミリンおよびトランスサイレチン (TTR) 変異体 L55P を用いた．
【方法】 45 μM アミリン，15 μM TTR をそれぞれ様々な濃度の cSPM 存在下において 37℃でインキュベートしたあと，Thioflavin T (ThT) assay による評価を行った．
【結果・考察】 ThT assay の結果により，cSPM 存在下でのアミリンおよび TTR の凝集量は cSPM 非存在下のときと比較して同程度であることが示された．したがって，cSPM はアミリンおよび TTR L55P の凝集形成には影響を与えないことが示唆された．cSPM は Aβ の凝集のみを抑制することから cSPM による凝集抑制効果は Aβ 特異的である可能性が示唆された．

Influences of eight-membered polyamine-acrolein heterocycle on aggregation of amyloidgenic proteins

○Risako Kunitomi[1], Jyunta Fukunaga[1], Ambara R. Pradipta[2], Katsunori Tanaka[2], Tamotsu Zako[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Ehime Univ., [2]RIKEN)

Key words amyloid, amyloidgenic proteins, polyamine, acrolein

2Ia05 Aβ のアミロイド凝集体が NLRP3 インフラマソーム活性化に及ぼす影響

○中西 文香[1], 金子 直恵[2], 増本 純也[2], 座古 保[1]
（[1]愛媛大院・理工, [2]愛媛大学院医学）
zako.tamotsu.us@ehime-u.ac.jp

【背景と目的】

細胞内シグナル伝達複合体インフラマソームは Nod-like receptor（NLR），連結因子 ASC，カスパーゼ 1 の 3 つのタンパク質分子で構成される．NLR の 1 種である NLRP3 はトリガー因子と相互作用することで ASC と会合し，ASC を介してカスパーゼ 1 と会合することで NLRP3 インフラマソームを形成し活性化させる．これによって，炎症性サイトカインである IL-1β の分泌を制御し，生体防御反応を働かせている一方で，IL-1β の異常制御は 2 型糖尿病などの疾患に関与していると考えられている．

また，アミロイドβ（Aβ）のアミロイド凝集体（Aβ 凝集体）はアルツハイマー病の原因物質とされている．Aβ 凝集体には可溶性 Oligomer と不溶性 Fibril の 2 種類が存在し，構造状態，細胞毒性などの性質が異なる．近年，Aβ Oligomer によって活性化されたミクログリアが NLRP3 インフラマソーム活性化に関与することが報告された（Parajuli B et.al Cell Death Dis. 4, e975 (2013)）．しかし，Aβ が NLRP3 インフラマソーム活性化に与える直接的な影響は未解明である．そこで，本研究では Aβ 凝集体（Oligomer，Fibril）が NLRP3 インフラマソーム活性化へ与える直接的な影響を評価することを目的とした．

【方法及び結果】

Aβ 凝集体をそれぞれ作成した後，構造状態を評価することで 2 種類のアミロイド凝集体（Oligomer，Fibril）をそれぞれ作成できていることを確認した．次に，Aβ 凝集体が NLRP3，さらには NLRP3 インフラマソーム活性化に与える影響を化学増幅型ルミネッセンス プロキシミティホモジニアスアッセイ（ALPHA）を用いて評価した．その結果，Aβ Oligomer，Aβ Fibril 共に NLRP3 と直接相互作用し，NLRP3 インフラマソームを活性化することが示された．

The affect to NLRP3 inflammasome activation by Aβ amyloid aggregation

○Ayaka Nakanishi[1], Naoe Kaneko[2], Junya Masumoto[2], Tamotsu Zako[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Ehime Univ., [2]PROS, Sch. Med., Ehime Univ.)

Key words amyloid, inflammasome, Alzheimer's diseases, Amyloid-beta

2Ia06 耐熱性 Encapsulin ナノカプセルの内包系の構築

○野中 衛, 松村 洋寿, 小川 信明, 尾高 雅文
（秋田大院・理工）
modaka@gipc.akita-u.ac.jp

Encapsulin（Enc）は，粒径約 24 nm の中空ナノカプセル構造を形成するタンパク質であり，Enc 認識アミノ酸配列を有するペルオキシダーゼやフェリチン様タンパク質などを内包することで酸化ストレス耐性に関与していると考えられている．好熱性細菌 *Thermotoga maritim*a 由来 Enc (*Tm*Enc)の結晶構造が 2008 年に報告され，分子量約 30 kDa のサブユニットのホモ 60 量体で正二十面体構造をとることが明らかにされた．これまでに当研究室では，Enc の機能性ナノ粒子としての利用を目指し，外来タンパク質の C 末端に Enc 認識アミノ酸配列を付加することで，外来タンパク質を常温菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 由来 Enc の内腔への導入に成功しており，この結果は Enc がナノケージとして高い有用性をもつことを示唆している．また，Enc の工学的な利用を目指し，好熱菌由来であり構造的な安定性が期待できる *Tm*Enc の大腸菌発現系構築を行い，リコンビナント *Tm*Enc が 90 °C の熱処理後においても，ナノカプセル構造を維持していることを明らかにしている．
外来タンパク質の Enc 内腔への導入には，Enc 認識アミノ酸配列の付加が必要であるが，外来タンパク質が複合体を形成する場合等，立体構造上 Enc 認識アミノ酸配列の付加が困難なことがある．そこで本研究は，Enc のナノカプセル構造が，酸性 pH 条件下で単量体へした後，中性 pH で再構成できる性質を利用した Enc 認識アミノ酸配列を用いない外来タンパク質の導入法について検討した．

Development of protein encapsulation system by hyperthermophilic Encapsulin

○Mamoru Nonaka, Hirotoshi Matsumura, Nobuaki Ogawa, Masafumi Odaka
(Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ.)

Key words encapsulation, nanocapsules, hyperthermophilic

2Ia07 コドン指定があいまいになった遺伝暗号表が進化を促進させる

○榎本 利彦, 鮎川 翔太朗, 木賀 大介
（早大・先進理工）
kiga@waseda.jp

合成生物学の分野では遺伝暗号表を人為的に改変することで，様々な翻訳系を構築し，工学分野で有用性を示してきた．ここで，本研究では無細胞翻訳系と変異体 tRNA 使用することでコドンの指定があいまいになった翻訳系を構築し，この新規暗号表を用いた分子進化に関する研究結果を発表する．私たちは変異体 tRNA を加えることによって，1 コドンに対して 2 つのアミノ酸が対応する(Thr コドンに対して Thr だけでなく Ser が挿入されることもある)ような新しい遺伝暗号表を試験管内で構築することを行った．この翻訳系で得られるタンパク質は近傍アミノ酸配列のヘテロ集団となり，活性はヘテロタンパク質集団の平均をとることになる．このような活性の平均をとる性質に由来して，本研究ではこの新規遺伝暗号表を「移動平均遺伝暗号表」と名付けた．
タンパク質の特性を向上させるためには，一般に複数の変異が必要であるが，変異蓄積の順序によっては活性が低下することがあり，進化には変異蓄積の順序の制約が生じることが知られていた．一方，本研究で構築した移動平均暗号表を使用した際の翻訳産物は類似配列を持つ変異体群の活性平均をとるため，この制約が緩和されることが予想される．そこで実証例として，複数の変異によって耐熱性が上昇することが既知である GFP について，種々の変異の組み合わせを持つ変異体群の耐熱性を解析した．結果的に，普遍暗号表では活性が低下し使用できない変異蓄積の順序が，移動平均暗号では使用可能なことが確認できた．本実験で構築した移動平均暗号表は，今までの進化の過程において生じていた組み合わせの制約を緩和するという特徴をもつことで，普遍遺伝暗号表よりも効率よくタンパク質を進化させることができる有用性をもっていると考えている．

The genetic codes with ambigous reassginment promote moleculat evolution.

〇Toshihiko Enomoto, Syotaro Ayukawa, Daisuke Kiga
(Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words genetic code, evolution, synthetic biology

2Ia08 遺伝子発現と共役するゲノム DNA 複製系を *in vitro* で確立する

○酒谷 佳寛 [1], 松田 史生 [1], 市橋 伯一 [1,2]
（[1]阪大院・情報, [2]阪大院・生命機能）
ichihashi@ist.osaka-u.ac.jp

有用物質生産に向けた新技術として，試験管の中で既知の分子から細胞の機能を人工的に再現した「人工細胞」を構成する試みが，注目を集めている．人工細胞は，全ての構成要素が既知であるため，ブラックボックスのある天然の細胞よりデザインしやすいはずである．また，細胞毒性のある物質や，非天然アミノ酸など，天然の細胞では扱えなかった物質を扱えるようになるだろう．これまでに，細胞分裂や遺伝子発現といった機能を再現した人工細胞が構築されてきたが，ゲノム DNA の複製系を持つ人工細胞は実現されていない．人工細胞が遺伝子発現に加えてゲノム DNA 複製できるようになれば，物質生産や育種の効率化につながるはずである．
本研究では，phi29DNA ポリメラーゼ遺伝子と Cre リコンビナーゼを組み合わせることで，ゲノム DNA 複製系を達成することを計画した．phi29DNA ポリメラーゼは環状 DNA を鋳型として直鎖状 DNA を合成し，Cre リコンビナーゼは直鎖状 DNA を環状 DNA へ組換える．したがって，phi29DNA ポリメラーゼ遺伝子をコードした環状ゲノム DNA を，Cre リコンビナーゼを含む無細胞転写翻訳系中で反応させれば，「遺伝子発現と共役するゲノム DNA 複製系」を構成できると考えた．ただし，Cre リコンビナーゼは phi29DNA ポリメラーゼの DNA 合成反応を阻害するので，最初にこの問題を進化工学的に解決した．
我々は，phi29DNA ポリメラーゼ遺伝子をコードした DNA への変異導入と，Cre リコンビナーゼ存在下での DNA 合成能力が高い変異体の選択を約 50 回繰り返した．すると，Cre リコンビナーゼの存在下で野生型の約 100 倍の直鎖状 DNA を合成する進化型 DNA が得られた．この進化型 DNA を，無細胞翻訳系と Cre リコンビナーゼと反応させると，環状ゲノム DNA が複製されたことを示唆する結果を得た．つまり，「遺伝子発現と共役するゲノム DNA 複製系」を確立できたと考えられる．

***in vitro* constitution of a genomic DNA replication system with gene expression**

〇Yoshihiro Sakatani[1], Fumio Matsuda[1], Norikazu Ichihashi[1,2]
([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)

Key words *in vitro* coupled transcription/translation, replication, DNA polymerase, *in vitro* molecular evolutionary engineering

2Ia09 両端を β ドメインで終端した Coiled-Coil をベースとするランタニド結合タンパク質の設計

○鈴木 淳巨, 北原 知恵, 堀 克敏
（名大院・工）
asuzuki@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】3 本または 4 本の α ヘリックスの束から成る Coiled-Coil の中心の疎水性のコアを形成するアミノ酸の一部を金属配位子となるアミノ酸に置換して，金属結合サイトを形成する研究が報告されている．窒素や硫黄を配位子とする Cu や Z n のような金属では，親水性が高くない Cys や His を中心コアに導入するが，荷電酸素を配位子とするランタニドでは，Coiled-Coil の安定性を大きく低下させる電荷をもったアミノ酸 Asp や Glu の導入が必要で，例えば人工ペプチドから成る Coiled-Coil の例では，金属イオン存在下でも一部は unfold していることが報告されている．そこで，本研究では，Coiled-Coil の unfold を避けるため，Coiled-Coil の両端が β 構造ドメインで終端された天然タンパク質をベースに，ランタニドの 1 つであるテルビウム（Tb）と結合するタンパク質の設計を試みた．
【方法】グラム陰性細菌表層のタンパク質，Trimeric autotransporter adhesin（TAA）を設計ベースに用いた．TAA は，分子中に β ドメインに挟まれた多数の平行 3 本鎖 Coiled-Coil 領域を持ち，中には Asn や Asp を Coiled-Coil の中心に持つ領域がある．これらの領域は他より安定と考え，変異を加えて，2 種類の Tb 結合タンパク質を設計した．
【結果と考察】大腸菌で発現，精製後，CD スペクトルを測定したところ，両タンパク質とも Tb の有無にかかわらず，天然タンパク質と同じ折りたたみ構造をとっていた．また，Tb イオンの解離定数は，1.3μM と 0.32μM となり，既報の人工ペプチド Coiled-Coil より 8 倍，34 倍小さかった．さらに結晶解析から，Coiled-Coil の構造は天然型とほぼ同じだが，Tb 結合サイト付近で各 α ヘリックスが約 0.5 Å 外側に膨らみ，金属配位として新たに導入した親水性アミノ酸とその隣の疎水性アミノ酸の間に空洞が生じるなど，今後の金属サイト設計に有用な情報が得られた．

Design of lanthanide binding protein based on coiled-coil terminating at both ends with β domain

〇Atsuo Suzuki,, Chie Kitahara, Hori Katsutoshi
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words Coiled-Coil, Terbium binding protein, Trimeric autotransporter adhesin, crystallographic study

2Ia10 CBH 触媒モジュール高発現型人工セルロソームの設計

○中澤 光 [1], 石垣 友理 [1], 張 鈺爽 [1], 山田 浩之 [2], 坪井 宏和 [2], 幸田 明生 [2], 梅津 光央 [1]
（[1]東北大院・工, [2]大関株式会社）
mitsuo@tohoku.ac.jp

非可食系植物バイオマスからのバイオエタノール製造へ糖化酵素（セルラーゼ）を利用するには，糖化能力を数十倍は向上させる必要がある．我々は，一般的なセルラーゼが触媒ドメイン(CD)とセルロース結合ドメイン(CBD)からなるモジュール構造であることに着目し，セルラーゼ（エンドグルカナーゼ）をモジュールライブラリーとして分割調製し，それらをナノ粒子表面で 3 次元的に再編成させることによって糖化能力を十数倍向上させたハイブリットナノセルロソームを報告している．この人工セルロソームのコストダウンのためにはモジュールライブラリーを大量生産することが望まれている．
本研究では，大腸菌にて難発現であることが報告されているセロビオハイドロラーゼ（CBH）を，麹菌を宿主として g/L オーダーで発現させ，金属ナノ粒子上にクラスター化を行った．クラスター化の方法は CBH の C 末端にポリヒスチジンタグを融合させ，ポリヒスチジンタグと金属粒子との配位結合を利用して行った.その結果，構築した人工セルロソームは，CBH モジュールのみに比較して 2 倍程度活性が向上した．さらに 2 種のクラスター化 CBH を混合し，糖化反応における生成還元糖量を測定したところ，単独の場合に比較して還元糖量の増加が見られ，相乗効果を示していることが観測された．このことは CBH モジュールが粒子上で酵素の機能を十分発揮していることを示しており，現在，メカニズムの詳細な解析を進めている．

A design of artificial cellulosome with high expression of CBH catalytic module

〇Hikaru Nakazawa[1], Yuri Ishigaki[1], Yushuang Zhang[1], Hiroyuki Yamada[2], Hirokazu Tsuboi[2], Akio Kouda[2], Mitsuo Umetsu[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Ozeki corporation)

Key words *Aspergillus oryzae*, cellulose-binding domain, cellobiohydrolase, Nanoparticle

2Ia11 AI はタンパク質進化を導くか？：機械学習支援による GFP の YFP 化検証

○及川 未早来[1], 齋藤 裕[2], 亀田 倫史[2], 中澤 光[1], 二井手 哲平[1], 津田 宏治[3,4], 梅津 光央[1,4]
（[1]東北大院・工, [2]産総研・人工知能研究セ, [3]東大院・新領域, [4]理研・革新知能統合研究セ）
mitsuo@tohoku.ac.jp

大規模な変異体ライブラリーの作製技術やスクリーニング操作の発展は，変異研究の黎明期では隔世の感がある確率でタンパク質の機能改変を可能としている．しかし，目的変異体の迅速・確実な開発にはそれなりの設備と資金を必要とすることが多く，有機合成に対抗しえる機能性分子の創出には，よりスマートな方法論が必要である．そこで本研究では，変異体ライブラリーの作製に機械学習による機能性予測を導入し，目的変異体が含まれる確率を飛躍的に向上させたスマートホットライブラリーを構築する技術を開発することで，設備と資金の規模を必要としない高機能性分子の創出法を提案する．
本研究では，緑色蛍光タンパク質(GFP)を出発点とした，高輝度黄色蛍光タンパク質(YFP)の創出を目指した．まず，GFP の YFP 化に重要な 4 残基を対象に，効率的に飽和変異を導入できる 22c-trick 法を応用して，4 残基を同時にランダム変異させた GFP 変異体群 96 穴プレートにて微量培養することで，配列解析とプレートリーダによる機能評価を同時並行で行える系を構築した．そして，このプロセスを用いて取得した 155 のデータを用いてベイズ法を用いた機械学習プログラムにより学習し，全 16 万種の変異体について機能性予測を行った．その結果，推測された上位 100 程度の変異体について再度調製し機能評価したところ，それら変異体の多くが学習前と比べて蛍光波長が黄色化し，かつ蛍光強度が向上していた．その中には，既知の YFP を越える黄色度・輝度を示すものも存在したことから，機械学習支援によるスマートホットライブラリーを用いた高機能性分子創出技術の有効性が示唆された．

Can AI guide protein in desired evolution? : Machine-learning -guided evolution from GFP to YFP?

○Misaki Oikawa[1], Yutaka Saito[2], Tomoshi Kameda[2], Hikaru Nakazawa[1], Teppei Niide[1], Koji Tsuda[3,4], Mitsuo Umetsu[1,4]
([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Comp. Omics Res. AIRC, AIST, [3]Dep. Comp. Biol. Med. Sci., Grad. Sch. Frontier Sci., Tokyo Univ., [4]Adv. Intell. Pro., RIKEN)

Key words artificial intelligence, green fluorescent protein, process engineering, evolution

2Ia12 抗体データベースを利用した熱安定性向上と発現量向上に向けた大規模変異導入プロセスの開発

○服部 修平[1,2], 本田 亜由美[1], 二井手 哲平[1], 中澤 光[1], 梅津 光央[1]
（[1]東北大院・工, [2](独) 日本学術振興会特別研究員DC）
mitsuo@tohoku.ac.jp

抗体医薬品は，低分子医薬品に比べ標的特異性が高いため副作用の少ないバイオ医薬品として利用されている．さらに，標的認識能を持つ抗体の可変領域(Fv)から設計された低分子抗体を利用した医薬品開発も行われている．しかし，低分子抗体の安定性が低いことが医薬品開発のボトルネックとなっている．その大きな要因の一つに，免疫による抗体取得の際におこる体細胞変異があり，その際に変異導入された箇所が要因となり安定性の低下が引き起こされる．そこで本研究では，天然でよく使用されているアミノ酸配列はフォールディングを容易に組みやすく安定であるという仮説をたて抗体データベースを利用し，抗体断片に大規模な変異導入を行い安定性の向上を試みた．
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変性中点(Tm)が発現量の増加とともに向上した一方，結合親和性が 10 倍低下していた．この結果から，発現量と安定性は相関がとれると考え，結合力と発現量の観点から結合能を保持したまま安定性を向上した変異体の取得を行う．段階的に野生型か使用頻度の高いアミノ酸かを選択するライブラリーを作製し，新規変異体の取得を行ったところ，微量培養スクリーニングにおいて 2 倍程度発現量が向上した変異体の取得に成功した．

Simultaneous improvent on the themal stability and expression of antibody fragment by means of database-dependent mutagenesis process

○Shuhei Hattori[1,2], Ayumi Honda[1], Teppei Niide[1], Hikaru Nakazawa[1], Mitsuo Umetsu[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]JSPS Research Fellow)

Key words antibody, database, mutagenesis, thermal stability

2Ja01 遺伝子破壊による *Citrobacter* 属細菌のキトサン様バイオ凝集剤高生産株の育種

○金尾 圭太[1], 柏 雅美[1], 木村 和幸[1,2], 宮本 弘毅[1], 山口 翔太[1], バランワル プリヤンカ[1], 根来 誠司[1], 武尾 正弘[1]
（[1]兵県大・工・応化, [2]（株）兵庫分析センター）
takeo@eng.u-hyogo.ac.jp

Citrobacter 属細菌の多くの菌株は，酢酸を基質にキトサン様多糖を培地に分泌生産する．この多糖は水中の懸濁質に対して優れた凝集作用を示すことから，バイオ凝集剤として水処理での活用が期待されている．本研究室では，凝集剤の生合成経路や生産菌のゲノム配列の情報に基づいて遺伝子破壊や遺伝子組換えを実施し，高生産株の育種を行なっている．これまでの研究により，凝集剤生産菌 *C. freundii* IFO 13545 において，ホスホフルクトキナーゼ遺伝子(*pfkA*)とグルコサミン-6-リン酸デアミナーゼ遺伝子(*nagB*)あるいはグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*g6pd*)の 2 遺伝子の破壊の組み合わせで高い凝集活性を示す菌株が得られた．本研究では，野生株レベルでより高い凝集活性を示す *C. youngae* GTC 01314 を用いて同様の遺伝子破壊を実施し，その効果を確かめた．
GTC 01314 株に遺伝子破壊用直鎖 DNA 断片を直接エレクトロポレーションで導入し，相同組換えを起こさせる定法にて，一重破壊株（*pfkA* 欠損），二重破壊株（*pfkAnagB* 欠損），三重破壊株（*pfkAnagBg6pd* 欠損）を構築した．次いで，これらの凝集活性をカオリン法で評価したところ，野生株に比べ，一重破壊株は 1.4 倍，二重破壊株は 2.2 倍，三重破壊株は 3.2 倍高い凝集活性を示し，これらの遺伝子の有用性が示唆された．さらに，以前に得た，多糖化と膜分泌に関わると推定した遺伝子群 *bfpABCD* を市販大腸菌発現ベクターに繋いでこれらの破壊株に導入したところ，さらに活性の増加が認められた．

Molecular breeding of chitosan-like bioflocculant-producing *Citrobacter* strains by gene disruption

○Keita Kanao[1], Masami Kashiwa[1], Kazuyuki Kimura[1,2], Koki Miyamoto[1], Shota Yamaguchi[1], Priyanka Baranwal[1], Seiji Negoro[1], Masahiro Takeo[1]
([1]Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, [2]Hyogo Analysis Center Co., Ltd.)

Key words *Citrobacter*, gene disruption, chitosan, production

2Ja02 Identification and functional analysis of genes involved in polymerization and secretion in the production of a chitosan-like polysaccharide in *Citrobacter* spp.

○Priyanka Baranwal[1], Keita Kanao[1], Shin Odagaki[1], Kazuyuki Kimura[1,2], Seiji Negoro[1], Masahiro Takeo[1]
([1]Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, [2]Hyogo Analysis Center Co., Ltd.)
takeo@eng.u-hyogo.ac.jp

Chitosan is a biopolymer consisting of glucosamine (and partially *N*-acetylglucosamine) with beta-1,4 glycosidic bonds and industrially produced from the exoskeletons of crabs and shrimps. We found that some *Citrobacter* spp. excrete a chitosan-like biopolymer (CB) in the culture media, which can be used as a flocculant in water treatment.
In this study, to investigate the mechanisms of the polymerization and secretion in the CB production, genes encoding a glycosyltransferase related to polysaccharide production were selected from the genome sequence of a CB-producing strain, *C. freundii* IFO 13545, and disrupted one by one in IFO 13545 by homologous recombination. When a glycosyltransferase gene (named *bfpC*) in a gene cluster consisting of 4 genes (named *bfpABCD*) was disrupted, the gene disruptant completely lost the CB-producing ability. The gene cluster was very similar in nucleotide sequence to the *pgaABCD* gene cluster of *E. coli* MG1655 involved in the production of one constituent of biofilm, poly-beta-1,6-*N*-acetylglucosamine. From the homologies with *pgaABCD*, *bfpB* was expected to encode a deacetylase to deacetylate the precursor biopolymer of the CB. To prove the function of *bfpB* (2.0kb), it was cloned into an expression vector and overexpressed in *E. coli*. The expressed protein was purified as a histidine-tagged protein (His-BfpB). The enzymatic activity of the His-BfpB was evaluated by analyzing free amino groups in the CB or acetic acid released from the CB.

Identification and functional analysis of genes involved in polymerization and secretion in the production of a chitosan-like polysaccharide in *Citrobacter* spp.

○Priyanka Baranwal[1], Keita Kanao[1], Shin Odagaki[1], Kazuyuki Kimura[1,2], Seiji Negoro[1], Masahiro Takeo[1]
([1]Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, [2]Hyogo Analysis Center Co., Ltd.)

Key words chitosan, *Citrobacter*, gene disruption, secretion

2Ja03 高い汚泥凝集能を持つポリグルタミン酸の生産性改善に向けた菌株育種と培養工学的な検討

○小林 誠治, 劉 涛, 尾島 由紘, 東 雅之
（阪市大院・工）
azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

ポリ-γ-グルタミン酸（以下 γ-PGA）はグルタミン酸を構成単位とするポリマーで，*Bacillus* 属細菌などによる生産が報告されている．γ-PGA は，生体適合性に優れかつ増粘性や保湿性を有することから，食品や化粧品に応用されている．また，粒子凝集能も有しており凝集剤としても利用されている．我々は，以前に農村集落の生活排水処理に適した生分解性凝集剤を探索し，*Bacillus licheniformis* RK14-46 株が生産する高分子量の γ-PGA がそれに適しており，キトサンとの併用が有効であることを明らかにしてきた[1,2]．また，その生産はフラスコレベルの培養で最大 21 g/ L に達した．しかし，*B. Subtilis* の遺伝子組み換え株による γ-PGA の生産では 40 g/L を超える例も報告されている．そこで，本研究では RK14-46 株の遺伝子改変により γ-PGA の生産性改善を試みた．*B. subtilis* では，培養後半に栄養がなくなると，γ-PGA 分解酵素を分泌して自ら生産した γ-PGA を分解し, 栄養源として細胞内に取り込むことが知られている．RK14-46 株でも培養後半に γ-PGA の分子量が小さくなる傾向が見られたため，γ-PGA 分解酵素欠損株を作製し，その影響を調べた．結果として，構築した 1 つの株でその分子量の低下が抑制され，最大 30 g/ L の γ-PGA を生産することが分かった．また，培養液はかなりの粘性を有し，酸素供給が難しい状況であるため，培養工学的な検討も開始しており，それらの結果も報告する．

1) T. Liu et al., J. Chem. Eng. Japan, 50(3), 201-6 (2017).
2) T. Liu et al., J. Chem. Eng. Japan, 51(5), 1-7 (2018).

Strain breeding and culture engineering study for improving productivity of polyglutamic acid with high sludge flocculation ability

○Joji Kobyashi, Tao Liu, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words *Bacillus licheniformis*, Poly-gamma-glutamic acid, Flocculant

2Ja04 Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for production of 2-propanol from sugars

○Dyah Candra Hapsari Subagyo, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui
(Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)
tfukui@bio.titech.ac.jp

【Background】Biofuels, produced by living organisms from renewable biomass, are increasingly important as a promising alternative to petroleum-based fuels. A facultative chemolithoautotrophic bacterium *Ralstonia eutropha* has been shown to be useful for production of various useful compounds including polyhydroxyalkanoates. This study focused on production of 2-propanol by engineered *R. eutropha*.
【Methods and Results】Codon-optimized genes of acetoacetate decarboxylase and alcohol dehydrogenase from *Clostridium* spp. were introduced into a glucose-utilizable and PHA-negative *R. eutropha* strain lacking NADPH-acetoacetyl-CoA reductase gene *phaB1* and *phaB3* and PHA synthase gene *phaC*. The resulting strain produced 2-propanol from glucose with the highest titer of 11.95 mmol/L. As our previous results clarified that two kinds of NADH-dependent (*S*)-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenases were functional in *R. eutropha*, further engineering is examining to increase the metabolic flux from acetoacetyl-CoA to 2-propanol by deleting the two dehydrogenase genes.

Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for production of 2-propanol from sugars

○Dyah Candra Hapsari Subagyo, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui
(Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words 2-propanol, biofuel, *Ralstonia eutropha*

2Ja05 メタノールを原料にした共重合ポリヒドロキシアルカン酸生合成のための *Methylobacterium extorquens* の代謝改変と培養条件の検討

○折田 和泉, 海野 源人, 加藤 りさ, 中村 聡, 福居 俊昭
（東工大院・生命理工）
iorita@bio.titech.ac.jp

【目的】*Methylobacterium extorquens* AM1 は安価かつ持続供給可能な次世代資源であるメタノールを単一炭素源にして生育しながら貯蔵物質として生分解性ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）のポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)]を蓄積する．本菌は PHA 重合酵素の置換のみでメタノールからポリ((*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するが 3HV，3HHx ユニット分率，PHA 蓄積率ともに低かった．本研究では，メタノール代謝の過程で生じる CoA チオエステルを効率的に 3HV，3HHx ユニットに導くことを目的として，人工代謝経路を構築と培養条件の検討を行った．
【方法と結果】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（EMC）経路上に存在する 3HV，3HHx ユニットの前駆体，プロピオニル-CoA とブチリル-CoA の供給量を強化するために，EMC 経路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．その結果，生育速度が顕著に低下し予想通り EMC 経路が逆行していることが推測されたが PHA 組成は変化せず，前駆体をモノマーユニットに導く経路が十分機能していない可能性が考えられた．次に，モノマーユニット合成経路として逆向き β-酸化経路を構築した結果，3HV，3HHx ユニット分率が導入前の 3 倍程度増加したが，生育速度とメタノール消費能がさらに低下した．そこで，メタノール酸化反応を強化するために培地中にランタンを添加した結果，3HV，3HHx ユニット分率を低下させずにメタノール生育能を回復させることに成功した．

Metabolic engineering and examination of culture condition of *Methylobacterium extorquens* for production of polyhydroxyalkanoate copolymer from methanol

○Izumi Orita, Gento Unno, Risa Kato, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui
(Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words polyhydroxyalkanoate, methanol, methylotroph, PHA

2Ja06 遺伝子組換え水素酸化細菌による CO_2 からの共重合ポリエステルの生合成と C_6 ユニットモル分率の変化

○鈴木 尚幸[1], 森 瞬也[1], 折田 和泉[2], 福居 俊昭[2], 田中 賢二[1]
（[1]近大・産理工, [2]東工大院・生命理工）
tanaka@fuk.kindai.ac.jp

【緒言】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)の共重合ポリエステル（ポリヒドロキシアルカン酸, PHA)は，ホモポリエステル P(3HB)に較べ生分解性プラスチックとしての物性に優れている．福居らが作成した水素酸化細菌 *Ralstonia eutropha* の遺伝子組換え株は，従属栄養条件下でフルクトースから 3-ヒドロキシヘキサン酸(3HHx)を高含有率で含む P(3HB-*co*-3HHx)を生合成し，化学合成独立栄養条件下でも良好に CO_2 から P(3HB-*co*-3HHx)を生合成する[1]．今回，組換えや培地・培養条件によって PHA 生合成がどう変化するか検証した．
【実験・結果】4 種類の組換え株を，無機塩合成培地を用いて $H_2/O_2/CO_2$ = 8：1：1 の混合ガスを基質としてフラスコによる振とう培養試験を行った．窒素源として硫安 1.0g/L を用いた場合，4 種の組換え株のうち，MF01/JAc 株は菌体濃度が最も高く（OD_{600}=67），P(3HB-$_{co}$-3HHx)蓄積率も最も高かった（74.2wt%）．MF01ΔB1/J4a 株は，40mol%を超える驚異的な 3HHx モル分率を示した．一方，短鎖長(*R*)-3HA-CoA に高活性を示す($_{R)}$-エノイル-CoA ヒドラターゼ遺伝子を導入した MF01ΔB1/JAc 株では，3HHx モル分率はポリエステル物性上の最適値に近い 8.5mol%に抑えられた．窒素源に塩安を用いた場合，組換え株では硫安に較べて菌体濃度が低くなる傾向が見られた．また，閉鎖循環ガス発酵を用いて pH 制御による回分培養試験を行ったところ，菌体濃度とポリエステル蓄積率ともに増加した．各組換え株から抽出・精製した P(3HB-*co*-3HHx)の GPC による分子量測定も行った．

Biosynthesis of copolyester from CO_2 and change in molar ratio of C_6 unit by the engineered strain of hydrogen-oxidizing bacterium

○Naoyuki Suzuki[1], Shunya Mori[1], Izumi Orita[2], Toshiaki Fukui[2], Kenji Tanaka[1]
([1]Fac. Humanity-Oriented. Sci. Eng., Kinki Univ., [2]Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words *Ralstonia eutropha*, PHA, hydrogen-oxidizing bacteria, CO_2 fixation

2Ja07 アンモニア化成と硝酸化成に有用な微生物の探索ならびに硝化微生物コンソーシアの構築

○安藤 晃規[1,2], 岡田 若子[1], Sakuntala Saijai[1], Tsai You-Shan[1], 宮本 憲二[3], 加藤 康夫[4], 篠原 信[5], 小川 順[1,2]
([1]京大院・農, [2]京大・生理化学, [3]慶大・理工, [4]富山県大・生工研セ, [5]農研機構)
aando@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景】
これまでに有機物の効率的なアンモニア化成と硝酸化成を実現する土壌微生物群の集積化に成功し，集積菌群を活用することで，再現性のよい窒素動態が観察できる硝化反応を，繰り返し実施することができることを明らかにしている．また，硝化反応中の菌叢の推移を DGGE 解析にて観察した結果，土壌に比べ比較的単純な菌叢に収斂していることを明らかにしている．本研究では，アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌，ならびに，任意の従属栄養細菌の 3 菌種での効率的な硝化を実現する硝化微生物コンソーシア（アンモニア化成，硝酸化成）の構築を検討したので報告する．
【方法・結果】
Nitrosomonas europaea NBRC14298，*Nitrobacter winogradskyi* NBRC 14297，任意の従属栄養細菌を，有機態窒素含有栄養培地を用い好気条件下にて共培養し，三態窒素（アンモニウムイオン，亜硝酸イオン，硝酸イオン）の推移を指標に，硝化を実現できる従属栄養細菌のスクリーニングを行った．結果，いくつかの従属栄養細菌と硝化菌群を共培養した際に，効率的な硝化が実現できることを明らかにした．特に *Bacillus badius* NBRC 15713 と共培養した際に pH7-10，C/N 比 10-50，有機物濃度 0.2%以下の条件下において，種々の有機態窒素の効率的な硝化が可能であることを明らかにした．また，3 菌による硝化反応終了後，菌を回収し再度硝化反応に供したところ，より速やかな硝化反応が観察できた．硝化後に 0.1%の濃度で有機物を添加したところ硝化反応に伴う硝酸イオンの増加と，硝化菌の増殖が観察できた．本知見は，難培養性硝化菌の大量培養への展開が期待できる有用な知見である．

Screening of heterotrophic bacteria and construction of nitrifying microbial consortia useful for ammonification and nitrification

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

Key words nitrification, nitrifying bacteria

2Ja08 Identification of proteins related to tooth mineralization in *Cryptochiton stelleri* by integrated transcriptomic and proteomic analysis

○Michiko Nemoto[1], Dongni Ren[2], Steven Herrera[2], Takashi Tamura[1], Kenji Inagaki[1], David Kisailus[2]
([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okyama Univ., [2]Dept. Chem. Environ. Eng., Univ. California Riverside)
mnemoto@okayama-u.ac.jp

The chitons have been known to deposit magnetite (Fe_3O_4) on their mineralized radular teeth. Recently, much attention has been paid to the superior mechanical property of radular teeth in chitons which is a promising model for the development of a novel abrasion resistant materials. We have studied radular teeth biomineralization using the world largest species of chitons, *Cryptochiton stelleri*. In this study, to reveal the proteins involved in the mineralization of radular teeth, transcriptome and proteome analysis of *C. stelleri* was conducted.
First, total RNA was extracted from radular tissue including radular teeth and epithelial cells. RNA-seq was conducted on the extracted RNA using illumina Hiseq. The obtained reads were then de novo assembled to build a transcriptome data. To identify highly expressed transcripts in mineralized and non-mineralized teeth regions, each set of reads from two regions were aligned to the assembled transcriptome. Furthermore, the radular teeth proteins were identified from MS/MS spectra by searching them against the transcriptome data.
Transcriptome analysis revealed that the most expressed transcripts in non-mineralized teeth region include ferritin genes, while those in mineralized teeth region include a number of mitochondrial respiratory chain enzymes. Proteome analysis identified 22 mineralized teeth specific proteins including a novel protein which are good candidates for future research on biomineralization of radular teeth.

Identification of proteins related to tooth mineralization in *Cryptochiton stelleri* by integrated transcriptomic and proteomic analysis

○Michiko Nemoto[1], Dongni Ren[2], Steven Herrera[2], Takashi Tamura[1], Kenji Inagaki[1], David Kisailus[2]
([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okyama Univ., [2]Dept. Chem. Environ. Eng., Univ. California Riverside)

Key words chiton, biomineralization, RNA-seq

2Ja09 サンゴ養殖により得られた温度耐性株に共在する細菌叢の環境応答

○伊藤 遼[1,2], 安田 直子[3], 藤村 弘行[3], 中野 義勝[4], 金城 浩二[5], 竹山 春子[1,2,6]
([1]早大・先進理工, [2]産総研・早大CBBD-OIL, [3]琉球大・理, [4]琉大・熱生研, [5]有限会社海の種, [6]早大・ナノライフ創研)
haruko-takeyama@waseda.jp

造礁サンゴ類は極めて高い生物多様性を示す熱帯・亜熱帯の沿岸生態系の基盤であるにも関わらず，近年の地球環境変動の影響から，その生存に欠かせない共生藻類を喪失する白化現象と呼ばれるサンゴの危機的状態が世界的に広がっている．これに対し，近年の研究ではサンゴが示す白化などの環境ストレス応答には，サンゴと共生藻類に加え，サンゴの生体に共在する微生物も関わっていることが示唆されている．そこで本研究では，温度耐性を持つサンゴに共在する細菌に着目し，水槽実験および野外移植実験により，生育環境に応じたサンゴの共在細菌叢の変化から，サンゴの環境応答に関与する細菌叢を検出し，また，これらの経時変化を明らかにすることを目的とした．
実験は沖縄県・読谷村のサンゴ養殖場で行った．造礁サンゴの一種であるウスエダミドリイシ(Acropora tenuis)の養殖によって得られた温度耐性株の遺伝的なクローンを(1)海水温，(2)塩濃度，(3)光量の異なる環境で飼育し，共在する細菌叢の経時的な変化を追った．サンゴ共在細菌叢は採取したサンゴ枝からメタゲノムを抽出し，16S 配列を対象とするアンプリコンシーケンスによってメタ 16S データを取得した．
サンゴ共在細菌の飼育環境間比較を行ったところ，特定の環境下において特徴的な細菌叢が検出された事から，これらの細菌叢はサンゴの恒常性維持および環境応答に関わっていることが示唆された．さらに経時変化を比較すると群体によって菌叢の変化度合いに差異が見られたことから，サンゴの環境応答にも群体間差異があることが考察できる．総合すると環境変化に伴うサンゴの共在細菌叢の変化がサンゴの環境適応に繋がる可能性が示唆された．

Environmental adaptation of microbial communities in thermally tolerant coral strain obtained by coral culture

○Haruka Ito[1,2], Naoko Yasuda[3], Hiroyuki Fujimura[3], Yoshikatsu Nakano[4], Koji Kinjo[5], Haruko Takeyama[1,2,6]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST., [3]Fac. Sci., Univ. Ryukyus, [4]Tropical Biosphere Res. Center, Univ. Ryukyus, [5]Sea seed Co., Ltd., [6]Res. Org. for Nano & Life Innov., Waseda Univ.)

Key words 16S rDNA, Coral, microbial community

2Ja10 データサイエンスに基づくウナギ幼生飼料開発のための重要因子抽出

○朝倉 大河[1], 坂田 研二[1], 伊達 康博[1], 長井 敏[2], 黒木 洋明[2], 長谷川 大介[2], 菊地 淳[1,3,4]
([1]理研 CSRS, [2]水産研究・教育機構, [3]横市院・生命医, [4]名大院・生命農学)
jun.kikuchi@riken.jp

日本国内でのウナギの消費量は数万トンと言われ，重要な食用魚の一種であり，国立研究開発法人水産研究・教育機構によって卵からの人工シラスウナギの生育，人工親魚からの卵を孵化させる「完全養殖」に成功している．しかし量産化のための飼育システムには課題が残り，孵化幼生（レプトセファルス）の適正な環境の構築や餌料のさらなる最適化が必要とされる．本研究の一部は農水技会の核心的技術開発・緊急展開事業「水産物の国際競争に打ち勝つ横断的育種技術と新発想飼料の開発」によって遂行され，太平洋のウナギの天然幼生の採集及び周囲の海水の大量ろ過を行い，養殖幼生及び餌料を加え，天然ウナギ幼生が利用している成分の探索を目的とした．
採集した幼生の筋組織と腸内容物，人工餌料は凍結乾燥および粉末化処理を行い，海水ろ過物は超音波処理によって粉末を回収し，KPi/D_2O を加え熱・振とう処理によって抽出後，NMR による計測を行った．
シグナルの強度比較及び主成分分析の結果，ウナギ幼生の種類や天然・人工幼生の特徴を捉えることが可能であった．また，ウナギ目幼生のサイズに依存する代謝物を，機械学習によって判別し，分岐鎖アミノ酸などが成長に応じて増加することを明らかにした．腸内容物については低分子成分について特徴的なスペクトルを得ることに成功し，天然幼生の摂食物が示唆された．腸内容物の低分子成分は，海水ろ過物とは異なる点が多く，むしろ現在最適化されている餌料に比較的似ていた．さらに腸内微生物組成についても，同様にサイズに依存した微生物を機械学習により情報抽出した．これらの技術及び結果は人工ウナギ幼生の餌料開発及び量産化技術に貢献し得ると期待される．

Feed development for larvae of *Anguilla japonica* utilizing omics analysis

○Taiga Asakura[1], Kenji Sakata[1], Yasuhiro Date[1], Satoshi Nagai[2], Hiroaki Kuroki[2], Daisuke Hasegawa[2], Jun Kikuchi[1,3,4]
([1]CSRS, RIKEN, [2]FRA, [3]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [4]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words NMR, Japanese eel, marine snow, feed development

2Ja11 クロマグロ稚魚の入出力代謝応答に基づく飼料候補物質の探索技術高度化

○坂田 研二[1], 朝倉 大河[1], 相馬 智史[2], 馬久地 みゆき[2], 伊達 康博[1,3], 横山 佐一郎[4], 菊地 淳[1,3,5]
（[1]理研CSRS, [2]水産教育機構, [3]横市院・生命医, [4]鹿児島大学・水産, [5]名大院・生命農学）
jun.kikuchi@riken.jp

【背景と目的】
近年, 太平洋クロマグロの資源量は顕著な減少を辿り, 国際自然保護連合 (IUCN) により絶滅危惧種に指定された．そこで我々はこの豊かな生物海洋資源の維持に加え，持続的水産業への貢献を目指し，非侵襲的魚類代謝評価法[1]と組織代謝プロファイリング法[2]の利用，機械学習による重要因子探索法[3]，および ^{13}C 安定同位体追跡技術法[4]を援用することにより，完全養殖技術の実用化に向けてボトルネックとなっているクロマグロ稚魚の飼料吸収消化特性の評価を，水産庁事業「クロマグロ養殖高機能・高効率餌料」の一部支援を受けて遂行した．
【方法】人工飼料にアミノ酸，^{13}C アミノ酸混合物等を添加した飼料を作製し，クロマグロ稚魚に給餌した．糞便サンプリングは毎日行い，試験最終日に稚魚を採集し，各試料を NMR 計測した．得られた NMR スペクトルは数値化し，データ駆動型の多変量解析や機械学習により，クロマグロ稚魚における成長重要因子(栄養素)の探索を行った．
【結果】クロマグロ稚魚の入力源飼料，出力としての糞便 NMR スペクトルを用いたノンターゲット解析から，消化吸収に関係する特徴的な成分が抽出された．筋組織中に含まれる水溶性成分の評価では，アミノ酸添加群とコントロール群を比較すると，添加したアミノ酸のシグナル強度が高い傾向があったことから，飼料中に添加したアミノ酸は筋肉中に取り込まれたことが示唆された．更に ^{13}C アミノ酸混合物群では多くのアミノ酸が筋肉中に吸収される直接的証拠データが得られ，また時系列データから ^{13}C ラベル率が増加する重要栄養素も情報抽出された．

Ref. [1] Asakura, T., et al. (2014) *PeerJ*, 2, e550, [2] Yoshida, S., et al. (2014) *Sci. Rep*., 4, 7005. [3] Date & Kikuchi (2018) *Anal. Chem*. 90, 1805. [4] Tokuda G., et al. (2014) *Proc. R. Soc*. B 281: 20140990.

Advancement of exploring the feed candidate substances based on input-output metabolic analysis of juvenile Bluefin Tuna

○Kenji Sakata[1], Taiga Asakura[1], Satoshi Soma[2], Mekuchi Miyuki[2], Yasuhiro Date[1,3], Saichiro Yokoyama[4], Jun Kikuchi[1,3,5]
([1]Riken CSRS, [2]FRA, [3]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [4]Kagoshima Univ., [5]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words NMR, Metabolic profiling, ^{13}C-Isotope labeling, Machine learning

2Ka01 ロングリード RNA-seq が明らかとするバクテリアオペロンの発現実態 ～二次代謝産物生合成遺伝子群のオペロンバリアントを捉える～

○菅野 学[1], 三谷 恭雄[1], 野田 尚宏[2], 木村 信忠[1], 田村 具博[1]
（[1]産総研・生物プロセス, [2]産総研・バイオメディカル）
manabu-kanno@aist.go.jp

有用物質の高効率なバイオものづくりを実現するうえで，その生合成遺伝子群の発現挙動の理解は極めて重要である．バクテリアの RNA の大半は複数の遺伝子からなるポリシストロン転写単位として存在し，二次代謝産物生合成遺伝子群は一般に数 kb から数十 kb の複数のオペロンから構成される．しかし，既存の RNA-seq 解析で汎用されるイルミナ社の次世代シーケンサー（NGS）では，1 リード長が数百 bp と短いために，数 kb を超える転写産物の全長をありのままに解析することが出来ない．すなわち，二次代謝産物生合成遺伝子群における各ポリシストロニック mRNA の発現単位のばらつき（転写開始位置や転写終結位置の不均一性）を，1 分子レベルで捉えることは不可能であった．
そこで本研究では，長鎖 mRNA の発現情報取得に優れた解析手法の確立を目的に，二次代謝産物の生産能に優れる放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)株の菌体を用いて，(1)RNA 抽出工程の検討，(2)cDNA 調製手法の改良，(3)NGS 機種間の解析データの比較に取り組んだ．その結果，通常手法と比較して長鎖 cDNA 調製に優れる逆転写メソッドを開発し，ナノポア社 MinION や PacBio を用いた解析によって 10kb を超えるトランスクリプトを 1 リードとして検出することに成功した．興味深いことに，転写開始／終結位置は厳密に制御されておらず，当菌株の二次代謝産物生合成遺伝子群は多様なオペロンバリアントで構成されている可能性が示唆された．本解析技術の広範な適用によって，真核生物 mRNA のスプライシングバリアントを想起させるこの不均一なバクテリアオペロンの発現実態が，今後明らかになるものと期待される．
本研究は，NEDO スマートセルプロジェクトの支援を受けて行われました．

Log-read RNA-seq using single-molecule real-time sequencer reveals operon complexity of secondary metabolite biosynthetic genes in bacteria

○Manabu Kanno[1], Yasuo Mitani[1], Naohiro Noda[2], Nobutada Kimura[1], Tomohiro Tamura[1]
([1]BRI. AIST, [2]Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words transcriptome, full-length cDNA synthesis, MinION nanopore sequencing, *Streptomyces coelicolor* A3(2)

2Ka02 糖からの直接発酵を目指したエルゴチオネイン高生産放線菌の開発

○仲谷 豪, 嘉悦 佳子, 仲島 菜々実, 山田 佑樹, 野口 祐司, 曽田 匡洋, 劉 暁麗
（長瀬産業）
takeshi.nakatani@nagase.co.jp

【背景・目的】
エルゴチオネイン（EGT）は，一部の微生物のみが生合成可能な含硫アミノ酸である．近年，ヒトにおける EGT 特異的な取り込み輸送体や，脳における神経新生の誘導効果等が発見され，その生理活性が注目されている．当社では放線菌の一種，*Streptomyces* 属細菌を用いた物質生産プラットフォーム N-STePP®を開発しており，本属細菌が元来保有する EGT 生合成系を強化することで，従来の製法より安価に製造可能な微生物発酵法の開発に取り組んできた．これまでに，主要前駆体となるヒスチジン（His）を培地添加し EGT を生産させるバイオコンバージョン法開発に関する報告は，大腸菌等において複数存在する．しかし，より安価な糖から His を生産させ EGT へと変換する，直接発酵法に関する報告はない．本研究では，放線菌を用いた「糖からの EGT 直接発酵法」の開発を目指し，生産菌の育種を行った．
【結果と考察】
ホストである *S. lividans* TK64 へ，同菌の EGT 合成遺伝子クラスター *egtABCD* を高コピーベクターにより導入し，EGT 生産株を取得した．EGT 生産株における合成遺伝子のプロモーター検討，及び EGT 合成の硫黄源の検討を行うことで，EGT 生産性を元株の 10 倍以上に向上させた．次に，培地への His 無添加条件での EGT 生産を検討した結果，興味深いことに本菌は同条件下でも数百 mg/L オーダーと高い EGT 生産性を示した．また，産生された EGT の約 80％が培養液中に蓄積しており，本菌が高い EGT 排出能をもつことが明らかとなった．さらに，上記菌株に自然変異による実験室進化手法を適応することで，His 合成制御系の解除変異株を取得することに成功した．
（本研究は NEDO スマートセルプロジェクトの支援を受けて行われました．）

Development of ergothioneine high producing Actinomycetes aimed at direct fermentation from sugar

○Takeshi Nakatani, Keiko Kaetsu, Nanami Nakashima, Yuuki Yamada, Yuji Noguchi, Masahiro Sota, Xiaoli Liu
(Nagase & Co., Ltd)

Key words *Streptomyces*, ergothioneine, histidine, metabolic engineering

2Ka03 Metabolic engineering of *Actinosynnema pretiosum* for hyper-production of antitumor ansamitocin P-3

○Jian-Jiang Zhong, Zhi-Qiang Du
(State Key Lab. Microb. Metab., Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ.)
jjzhong@sjtu.edu.cn

Cancer is a major threat to human health and the drug R&D for cancer treatment has been attracting great attention. Ansamitocin P-3 (AP-3), produced by Actinosynnema pretiosum, is used as a “war-head” for antibody-drug conjugates for cancer treatment. However, the low production titer of AP-3 greatly restricts its wide commercial application. In this work, we report precursor pathway engineering and bioprocess engineering strategy for enhancing the AP-3 production.
AP-3 biosynthesis involves: 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) as its starter unit, subsequently condensed with methoxymalonyl-acyl carrier protein (ACP), malonyl-CoA (MA) and methylmalonyl-CoA (MMA) to give proansamitocin, followed by post-modifications to finally lead to AP-3.
Here, the asmUdpg gene (UDP-glucose pyrophosphorylase) was overexpressed to enhance the supply of AHBA in A. pretiosum. Supply of the unusual glycolate unit in AP-3 biosynthesis was improved by overexpressing asm13-17. Furthermore, co-expression of asmUdpg and asm13-17 was done, enhancing the AP-3 titer to 680.5 mg/L in shake flask, which is higher than other groups' reports.
Finally, the engineered strain Oasm13-17:asmUdpg was applied to 10-L bioreactor. By pulse feeding fructose in bioreactor, an AP-3 titer of 757.7 mg/L was achieved, 135% higher than that of batch bioreactor.
The work also provided useful information for AP-3 production from gene transcription analysis and metabolite intermediate detection to further understand the mechanism of AP-3 high production.

Metabolic engineering of *Actinosynnema pretiosum* for hyper-production of antitumor ansamitocin P-3

○Jian-Jiang Zhong, Zhi-Qiang Du
(State Key Lab. Microb. Metab., Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ.)

Key words antibiotics, actinomycetes, fermentation, metabolic engineering

2Ka04 放線菌 *Streptomyces coelicolor* 株のメタボローム分析における分析対象代謝物範囲の拡大

○新田 克章[1], Putri Sastia[1], Takano Eriko[2], 福﨑 英一郎[1]
（[1]阪大院・工, [2]Fac. of Sci. and Eng., Univ. of Manchester）
fukusaki@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り有用物質の生産量向上を目指す代謝工学分野である．代謝工学における目的物質は一次代謝物と二次代謝物に分けられるが，適用例は一次代謝物の生産に大きく偏っている．本研究では二次代謝物を生産する菌株のメタボローム分析の適用範囲を広げるべく，放線菌 *Streptomyces coelicolor* 株における抗生物質生産へのメタボローム分析適用に注目した．放線菌のメタボローム分析における問題点としては，検出可能な代謝物が少ないことや(過去の研究では約 30 代謝物のみが検出)，培地成分により，分析装置のイオン源が汚れることによる分析の不安定性が観測されることであった．本研究では菌体回収法を従来のコールドメタノール法から吸引ろ過およびフィルターを用いた回収に変え，洗浄溶媒での培地除去を行った．洗浄溶媒には 2.63%の塩化ナトリウム溶液と同濃度の炭酸水素ナトリウム溶液を洗浄溶媒として選出し，洗浄を行ったのちイオンペア LC-MS/MS を用いて代謝物を分析し，評価を行った．結果として，炭酸水素ナトリウム溶液による洗浄が良好な結果を示した．その後，抽出溶媒の選考検討を行った．本研究では 100%メタノールおよび Bligh & Dyer 法 (メタノール：水：クロロホルム＝ 5：2：2 v/v/v)を用いて検討を行った．結果として，Bligh & Dyer 法がより良好な RSD 値を示した．放線菌サンプルにこれらの前処理法を適用した後，イオンペア LC-MS/MS および PFPP カラムを用いた LC-MS/MS によるターゲット分析および GC/MS によるノンターゲット分析を用いて分析することで計 137 の代謝物同定に成功した

Expansion of metabolite analysis targets for metabolome analysis of *Streptomyces coelicolor*

○Nitta Katsuaki[1], Sastia Putri[1], Eriko Takano[2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Fac. of Sci. and Eng., Univ. of Manchester)

Key words metabolic engineering, metabolic analysis, *Streptomyces*, Pre-treatment optimization

2Ka05 代謝改変コリネ型細菌による 4-ヒドロキシ安息香酸の高生産

○北出 幸広[1,2], 橋本 龍馬[1,2], 須田 雅子[1,2], 平賀 和三[1,2], 乾 将行[1,2,3]
（[1]RITE, [2]グリーンケミカルズ(株), [3]奈良先端大・バイオ）
mmg-lab@rite.or.jp

【目的】4-ヒドロキシ安息香酸(4-HBA)は，液晶ポリマーやパラベンの原料として用いられる有用な芳香族化合物であり，数十年にわたり石油由来のフェノールから化学プロセスにより工業的に生産されてきた．近年，再生可能なバイオマスを原料としたバイオプロセスによる代替生産法が注目されているが，これまで細胞毒性が高いことや生産濃度と対糖収率が低いことから工業化には至っていない．そこで本研究では，工業微生物として知られるコリネ型細菌の代謝改変と増殖非依存型バイオプロセスの適用によって 4-HBA を高生産することを目的とした．
【方法と結果】コリネ型細菌の生産宿主としての優位性を比較評価するため，既報の 4-HBA 生産宿主とコリネ型細菌(野生株)について，各種 4-HBA 濃度条件下での増殖試験を行った．その結果，コリネ型細菌のみが 300 mM の高濃度条件で増殖可能であり，比較した中では最も高い 4-HBA 耐性を有することが示された．また，コリネ型細菌は 4-HBA 生合成経路の最終反応酵素を持たないため，複数種の微生物からコリスミ酸ピルビン酸リアーゼ(UbiC)のスクリーニングを行った．その結果，4-HBA 高阻害耐性を示すタイプの酵素が最も生産に適していることが明らかになった．さらに，上記 ubiC が導入され，かつシキミ酸経路を順次強化した株を構築し，これらのうちフラスコ培養で高い生産濃度を示した株については，ジャーファーメンターを用いた増殖非依存型バイオプロセスにおいて，グルコースから 4-HBA への生産性を評価した．
Kitade et al., Appl. Environ. Microbiol. 84(6): e02587-17(2018).

Overproduction of 4-hydroxybenzoic acid using metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*

○Yukihiro Kitade[1,2], Ryoma Hashimoto[1,2], Masako Suda[1,2], Kazumi Hiraga[1,2], Masayuki Inui[1,2,3]
([1]RITE, [2]Green Chemicals Co., Ltd., [3]NAIST)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, aromatic compound, 4-hydroxybenzoate, UbiC

2Ka06 ナイロンオリゴマー分解菌 *Arthrobacter* の 2 種類の 6-アミノヘキサン酸アミノトランスフェラーゼ NylD1・NylD2 の機能解析

○藤井 翼, 竹原 一起, 橋本 悠, 武尾 正弘, 根来 誠司
（兵庫県大院・工）
f.tbs-t6y5k@iris.eonet.ne.jp

<目的>
環境負荷低減化の観点から，ポリマーの再資源化やモノマーのバイオ生産が重要視されている．*Arthrobacter* sp. KI72 株はナイロンオリゴマー分解酵素 NylA/NylB/NylC により，6-アミノヘキサン酸(Ahx)オリゴマーをモノマーの Ahx まで分解する．最近，i）Ahx はアミノトランスフェラーゼ(NylD)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(NylE)によりアジピン酸へと代謝されること，ii）NylD については 2 種，NylE については 20 種の相同遺伝子が認められること，iii）NylD1,NylE1 を共役させた反応系により，Ahx は約 90%の変換率でアジピン酸へ変換されることを明らかにした(*Appl. Microbiol. Biotechnol.*102,801-814,2018)．本研究では，アミノトランスフェラーゼ NylD1，NylD2 の触媒機能の比較，類縁酵素の立体構造を基盤とした基質結合部位の推定と活性との関連性について検討した．
<方法および結果>
nylD1,nylD2 遺伝子を，各々，大腸菌発現ベクター pColdI に組み込み，高発現させ，超音波破砕後，His-Tag 精製を行った．NylD 活性は，反応基質として，アミノ基供与体（Ahx，または，4 アミノ酪酸（GABA)），アミノ基受容体（α-ケトグルタル酸等），補酵素（NADP+,PLP），および，NylD 活性に対して過剰量の NylE を添加した共役系を構築し，340nm の吸光度の変化からアミノトランスフェラーゼ活性を測定した．その結果，NylD1 に比べて NylD2 は，Ahx では約 17 倍，GABA では約 2.5 倍高い活性が確認できた．*Arthrobacter aurescens* の 4 アミノ酪酸アミノトランスフェラーゼは立体構造が解明されており，NylD1, NylD2 に対して，各々 95%，49%のアミノ酸配列相同性を示す．活性中心近傍の構造比較を行ったところ，PLP 結合部位（Lys295）周辺のアミノ酸残基が保存されていた．立体構造とアミノ酸残基の保存性に基づき，触媒機構について考察する．

Functional analysis of 6-aminohexanoate aminotransferase NylD1,NylD2 from *Arthrobacter*

○Tsubasa Fujii, Ikki Takehara, Yuu Hashimoto, Masahiro Takeo, Seiji Negoro
(Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo)

Key words 6-aminohexanoate, *Arthrobacter*, metabolism, aminotransferase

2Ka07 釜石はまゆり酵母の系統解析と発酵力の強化

○齊藤 隆行[1], 井上 諭宜[2], 赤尾 健[3], 山田 美和[1], 下飯 仁[1]
（[1]岩手大院・農, [2]釜石市, [3]酒総研）
simoi@iwate-u.ac.jp

【目的】釜石はまゆり酵母は岩手県釜石市のはまゆりから取得された酵母群であり，そのうち KS5 及び KS6 の 2 株が清酒醸造用酵母としての適性を持っていた[1)]．しかし，釜石はまゆり酵母の今後の利活用のためには，本酵母が他の酵母と異なる独自の遺伝子資源であることを確立し，更に発酵力も強化する必要がある．本研究では，次世代シーケンサーを用いて KS5 及び KS6 のゲノム DNA を解析し，他の醸造用酵母と比較して系統学的な位置の解明を試みた．また，KS6 からストレス感受性変異株を取得することで発酵力の強化を目指した．
【方法及び結果】
①系統解析 KS5 及び KS6 からゲノム DNA を抽出し，次世代シーケンサー（イルミナ）で塩基配列を解析した．得られた塩基配列データを DDBJ の Read Anotation Pipeline で処理し，清酒酵母きょうかい 7 号（K7）ゲノムを基準とした SNP データを抽出した．染色体上の SNP 分布図を作成して比較した結果，KS5 及び KS6 は類似しているものの異なる菌株であり，K7 とは全く異なる SNP パターンを示すことがわかった．また，KS5 及び KS6 と他の産業用酵母のホモ SNP データから距離行列を算出し近隣接合法を用いて系統樹を作成した．その結果，KS5 及び KS6 は清酒酵母の系統に含まれているが，他の清酒酵母菌株とは独立した系統であることが判明した．
②発酵力の強化 我々は以前の研究で，ストレス感受性変異株の中には発酵力が向上した菌株が含まれることを報告した[2)]．そこで，高発酵力の変異株を取得するために，KS6 を紫外線処理して得られた約 6000 コロニーの中から 55℃30 分の熱処理で死滅しやすくなった変異株を選抜した．得られたストレス感受性株 28 株について清酒小仕込試験を行った結果，K7 と同等以上の高い発酵力を示した変異株を取得した．
(1) 齊藤隆行ら，第 69 回日本生物工学会大会(2017)
(2) 前田岳彦ら，日本農芸化学会 2017 年度大会

Phylogenetic analysis of Kamaishi Hamayuri yeast and improvement of its fermentation activity

○Takayuki Saito[1], Yuki Inoue[2], Takeshi Akao[3], Miwa Yamada[1], Hitoshi Shimoi[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Iwate Univ., [2]Kamaishi city, [3]NRIB)

Key words yeast, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, phylogenetic analysis

2Ka08 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の乳化およびマクロファージ活性化に 関与する細胞表層タンパク質の同定と解析

○上田 茉奈, 齋藤 大輝, 尾島 由紘, 東 雅之
（阪市大院・工）
azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

我々は，免疫担当細胞であるマクロファージとの細胞同士の接触により，マクロファージを強く活性化できるパン酵母の変異株を見いだし，それら変異株の細胞表層構造の解析を進めてきた[1,2]．その解析過程で，マクロファージ活性化株の細胞懸濁液と油を混合した時に，野生株と比べ顕著に乳化が生じる現象を見いだした．さらに，酵母の細胞表層には乳化およびマクロファージ活性化に関与するタンパク質が存在すると予想し，それらの取得と同定を進めてきた．2017 年度の本大会では，GPI アンカーのリモデリングに関与する GUP1 遺伝子の欠損株が培養上清に分泌するタンパク質の解析を行い，酵母の細胞表層に局在する GPI アンカー型タンパク質である Gas1 を培養上清から精製し，精製標品はマクロファージ活性化能と乳化能の両方の活性を併せ持つことを報告した．本研究では，Gas1 タンパク質の構造と乳化やマクロファージ活性化の関係を明らかにするため，Gas1 の類似タンパク質や変異タンパク質を調製し，それらの乳化能やマクロファージ活性化能の評価を進めている．また，これまでにマクロファージ活性化酵母を浸透圧保護下で培養し得られた菌体を PBS に懸濁した時に，細胞から乳化タンパク質が遊離することを明らかにしてきた．現在，乳化を指標にして PBS 懸濁液から乳化タンパク質の精製を進めており，乳化タンパク質は複数存在し，その中の 1 つに注目し精製とその同定を進めている，本発表ではそれらの成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.

Identification and analyses of cell surface proteins involved in emulsification and macrophage activation from *Saccharomyces cerevisiae*

○Mana Ueda, Daiki Saito, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, biosurfactant, Macrophage, emulsification

2Ka09 出芽酵母におけるマルチストレス耐性優性変異株の分離と解析

○小林 日花梨, 中川 洋史, 山村 英樹, 早川 正幸
（山梨大院・総研部）
youji@yamanashi.ac.jp

【背景・目的】パン酵母は製パン過程において冷凍や高糖濃度等の多様なストレス，すなわちマルチストレスによって障害を受けるため，マルチストレス耐性を持つパン酵母の開発が望まれている．本研究室では酵母からマルチストレス耐性変異株を効率的に取得できる致死的濃度過酸化水素法 (LCH 法) を開発している．しかし，LCH 法によって取得されるマルチストレス耐性変異株の原因変異遺伝子に関する知見は少ない．そこで本研究では，遺伝学的解析の容易な実験室酵母から，LCH 法により自然発生的に取得されるマルチストレス耐性変異株を分離し，原因変異遺伝子の同定に向けた解析を行うことを目的とした．
【方法・結果】野生型株である実験室酵母株を 10 mM の過酸化水素含有 YPDA 平板培地にプレーティングし，生育コロニーを分離・純化後，スポット試験を行うことによって過酸化水素耐性変異株である S-5-7-1 株，S-6-1-1 株の 2 株を取得することに成功した．これらの株について優性劣性試験を行ったところ，2 株とも過酸化水素に対して優性のストレス耐性変異遺伝子を持っていることが判明した．そこで，これらの株のマルチストレス耐性能を検討するために，エタノール，高ショ糖濃度，乾燥，高温，冷凍に対するストレス耐性をスポット試験により調べた．その結果，S-6-1-1 株は高ショ糖濃度，乾燥，高温，冷凍に対して優性のストレス耐性変異遺伝子を持っていることが明らかになった．そこで四分子解析を行ったところ，S-6-1-1 株の持つマルチストレス耐性変異は二遺伝子変異である可能性が考えられた．現在，マルチストレス耐性を示す四分子分離体株の次世代シーケンス解析を進めている．

Isolation and analysis of multistress-tolerant dominant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*

○Hikari Kobayashi, Youji Nakagawa, Hideki Yamamura, Masayuki Hayakawa
(Grad. Fac. Interdisc. Res., Univ. Yamanashi)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, mutant, muiltistress tolerance, hydrogen peroxide

2Ka10 酵母のストレス応答に関わる陽イオン輸送体の機能解析

○上原 千央[1], 浜本 晋[1], 星 直美[1], 笠原 紳[2], 魚住 信之[1]
（[1]東北大院・工, [2]宮城大・環境科学）
uozumi@biophy.che.tohoku.ac.jp

【背景と目的】出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）は，発酵などの食品製造プロセスに用いられる産業用微生物である．出芽酵母のストレス応答において，浸透圧の変化や熱などの刺激によって細胞質のカルシウム（Ca^{2+}）濃度が一過的に上昇して行われる Ca^{2+} シグナリングが重要である．細胞内の Ca^{2+}濃度は細胞膜と細胞内小器官の膜に発現する Ca^{2+} 輸送体によって制御されるが，未知の Ca^{2+}輸送体の存在が示唆されている．本研究では新規 Ca^{2+} 輸送体の同定をめざし，植物の Ca^{2+}輸送体と相同性を示す Spo75，Csc1，Rsn1，Phm7 の 4 つの機能解析を行った．
【方法と結果】発表者はこれまでに Csc1 が液胞膜，Rsn1 と Phm7 が細胞膜に存在することを明らかにした．Spo75 の細胞内局在性を明らかにするために，Spo75 と GFP 融合タンパク質を発現させた出芽酵母に細胞膜とオルガネラ膜をそれぞれ標識して共焦点顕微鏡で GFP 蛍光を観察した．その結果，Spo75 が小胞体膜に存在することが明らかになった．*spo75* と *rsn1* の欠損株がそれぞれ細胞壁合成阻害剤に対して感受性を示すため，細胞壁分解酵素への耐性を検討した．その結果，*spo75* 欠損株の細胞壁分解酵素への耐性が低く，細胞壁合成に関わることが示唆された．さらに, 低浸透圧処理を行った各遺伝子欠損株の生存率を測定した結果，*spo75* 欠損株の生存率が野生株と比較して五割程度に低下した．多くの Ca^{2+}輸送体が Ca^{2+}以外にもカリウムイオン（K^+）などの陽イオンを輸送するため，低 K^+感受性大腸菌変異株に Ca^{2+}輸送体候補遺伝子を発現させて K^+取り込み量を測定した．その結果，Spo75，Rsn1 と Phm7 が K^+を輸送することが示された．以上より，本研究において Spo75，Rsn1，Phm7 が陽イオン輸送活性を示し，spo75 の欠損により細胞壁に異常が生じることで浸透圧ストレスに感受性を示すことが明らかとなった．

Functional Analysis of Cation Transporters Involved in Stress Responses in *Saccharomyces cerevisiae*

○Chihiro Uehara[1], Shin Hamamoto[1], Naomi Hoshi[1], Shin Kasahara[2], Nobuyuki Uozumi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Dept. Env. Sci., Miyagi Univ)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, transporter, stress response, cell wall

2Ka11 酵母非遺伝的因子[*GAR*$^+$]がアルコール発酵と遺伝子発現に及ぼす効果

○渡辺 大輔, 熊野 舞香, 杉本 幸子, 高木 博史
（奈良先端大・バイオ）
d-watanabe@bs.naist.jp

酵母とバクテリアの共培養により，プリオン様非遺伝的因子[*GAR*$^+$]の酵母内での形成が促進され，アルコール発酵の抑制につながることが報告されている．我々は以前に，伝統的な清酒醸造法である生酛造りに用いられる乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* や *Lactobacillus sakei* が酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における[*GAR*$^+$]形成促進能を有することを明らかにした．本研究では，[*GAR*$^+$]の形成が，アルコール発酵と遺伝子発現に及ぼす効果について，実験室酵母を用いて解析を行った．実験室酵母の元株（[*gar*$^-$]株）および[*GAR*$^+$]形成株を用いた発酵試験を実施したところ，グルコースのみを炭素源とした培地では[*GAR*$^+$]により発酵速度が顕著に低下したのに対し，グルコースとスクロースを混合した場合には[*GAR*$^+$]による影響が抑圧された．次に，グルコースによる遺伝子発現の変化に対して[*GAR*$^+$]が及ぼす影響を明らかにするために，グルコースアナログであるグルコサミン添加前後の酵母を用いて RNA-seq 解析を実施した．その結果，まず，スクロースの資化に必要なインベルターゼをコードする *SUC2* 遺伝子の発現量が[*GAR*$^+$]株において高いことを見出した．*SUC2* 遺伝子の発現はグルコース抑制を受けることから，[*GAR*$^+$]株ではグルコース抑制が解除されており，グルコースと非グルコース炭素源の両方を含む環境でのアルコール発酵に有利となる可能性が示唆された．また，[*GAR*$^+$]株では，高浸透圧ストレス応答において中心的な役割を果たす HOG シグナル伝達経路の標的遺伝子の発現が恒常的に低いことも見出され，アルコール発酵の抑制と関連していることが推測された．以上の結果を考え合わせると，バクテリアにより形成が促進される[*GAR*$^+$]は，酵母による急激なグルコース消費を抑えることで酵母とバクテリアが共存しやすい環境の維持に貢献しているのかもしれない．

Effects of yeast non-genetic factor [*GAR*$^+$] on alcoholic fermentation and gene expression

○Daisuke Watanabe, Maika Kumano, Yukiko Sugimoto, Hiroshi Takagi
(Div. Biol. Sci., NAIST)

Key words yeast, [*GAR*$^+$], alcoholic fermentation, glucose repression

2Ka12 パン酵母の冷凍保存後の発酵力に重要なプロテアソーム関連遺伝子の発現

○高木 博史[1], 渡辺 大輔[1], 関口 拓史[2], 杉本 幸子[1], 長澤 淳[2], 喜田 直孝[2]
（[1]奈良先端大・バイオ, [2]テーブルマーク）
hiro@bs.naist.jp

パン酵母が発酵力を保持したまま冷凍状態で流通することができれば，製パン産業において有用な技術になると期待される．ところが，実際にパン酵母を2週間冷凍保存した後，高ショ糖生地を模倣した液体培地で発酵速度を測定したところ，発酵力が低下する株が存在することが明らかとなった．そこで本研究では，まずパン酵母の冷凍保存が，発酵中の細胞の遺伝子発現に及ぼす影響をDNA マイクロアレイ解析により調べた．その結果，冷凍保存後の発酵力が低下した株では，細胞内でタンパク質分解を行うプロテアソーム複合体に関連する遺伝子のほとんどが低い発現レベルを示していた．また，ユビキチン化タンパク質の解析の結果，ストレスにより変性したタンパク質が分解されずに蓄積していることも判明した．次に，プロテアソームの機能低下を引き起こす原因を明らかにするために，冷凍保存後に発酵力が低下した株の全ゲノム解析を実施した．その結果，プロテアソーム関連遺伝子の発現を引き起こす転写因子 Rpn4 の上流で機能する転写因子 Pdr3 にアミノ酸置換（Ala148Thr/Ala229Val/His336Arg/Leu541Pro）を伴う変異が見出された．この変異はドミナントネガティブ型であり，パン酵母においてこの変異アレルを欠失させたところ，冷凍保存後の発酵力や生存率の低下が抑圧された．以上の結果から，冷凍保存後のパン酵母が冷凍ストレスを克服し，高い発酵力を維持する鍵が，Pdr3 と Rpn4 を介したプロテアソーム関連遺伝子の発現にあると結論づけられた．また，プロテアソームによる変性タンパク質の分解を強化することでパン酵母の冷凍耐性や発酵力が向上する可能性が示された．本研究で得られた知見は，冷凍ストレス耐性パン酵母の育種技術への応用や，細胞が冷凍ストレスに応答し，生命機能を保持するメカニズムの理解に繋がる有用なものであると考えられる．

Importance of proteasome gene expression during model dough fermentation after preservation of baker's yeast cells by freezing

○Hiroshi Takagi[1], Daisuke Watanabe[1], Hiroshi Sekiguchi[2], Yukiko Sugimoto[1], Atsushi Nagasawa[2], Naotaka Kida[2]
([1]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, [2]TableMark Co., Ltd.)

Key words baker's yeast, dough fermentation, freeze-thaw stress, proteasome

2La01 ササユリ（*Lilium japonicum*）系統間および類縁種間の花香組成を指標とした化学分類の試み

○藤澤 瑞希[1], 松川 哲也[1], 瀧川 義浩[5], 荒井 滋[2], 秋野 順治[3], 柳川 綾[4], 梶山 慎一郎[1]
（[1]近畿大院・生物理工・生物工, [2]大神神社, [3]京都工繊大・CBFS, [4]京都大学・RISH, [5]近畿大学先端研）
kajiyama@waka.kindai.ac.jp

【背景および目的】ササユリ（*Lilium japonicum*）はユリ科ユリ属に属する日本固有の植物種であり，西日本に広く分布する球根植物である．本植物は古くから観賞用，薬用，食用として利用されてきた．また，1300 年前から神事に使用され，その花を持ち帰ると疫病除けになると言い伝えがあるなど，その代謝産物が生理活性を有する可能性が指摘されている．しかし，本植物種は獣害や乱獲，さらには開花に播種後約 6 年を要するなど独自の生活環をもつことから，絶滅の危機に瀕しており，本植物の生物有機化学および分子生物学的知見は乏しい．また，ササユリは極めて多様性の高い植物種であり，主として形態による分類が行われているが，自生地により異なる形質を示すことが知られている．そこで本研究では，ササユリの多様性を化学的視点から解析することを目的として，異なる自生地から採取されたササユリの香気成分を網羅的に分析し，比較を行った．また，ヤマユリを主とした他の類縁種についても同様の分析を行い，ササユリの化学的形質の特徴について解析を行った．
【方法および結果】植物材料は大神神社で管理・栽培されている中部地方から中国地方で採集されたササユリ，および類縁の在来ユリを用いた．植物体長，葉身長および葉身幅を記録するとともに，活性炭と ODS から構成される吸着材を環状に組み合わせ，ササユリの花弁内の生殖器官に引っ掛け一晩吸着させることにより香気成分を捕集した．吸着材を内部標準を添加したジクロロメタン 2 mL で溶出し，GC/MS 分析に供した．MS スペクトルおよび標品との比較により香気成分を同定し，分析結果を多変量解析に供した．また，ササユリ以外の品種も同様に分析を行い，ササユリと他の類縁種との比較も進めている．

Chemotaxonomic analysis of floral scent composition in *Lilium japonicum* populations and related species

○Mizuki Fujisawa[1], Tetsuya Matsukawa[1], Yoshihiro Takikawa[5], Shigeru Arai[2], Yoshiharu Akino[3], Aya Yanagawa[4], Shin'ichiro Kajiyama[1]
([1]BOST, Bioeng, Kindai Univ, [2]Omiwa shrine, [3]CBFS, Kyoto Inst., Technol., [4]RISH, Kyoto Univ., [5]Plant Cnter, Kindai Univ)

Key words *Lilium japonicum*, GC/MS, floral, chemotaxonomy

2La02 ショウガ由来のデヒドロジンゲロンが出芽酵母の薬剤耐性に及ぼす影響

○尾山 昌弘[1], 山脇 千佳[1], 山口 良弘[1,2], 荻田 亮[1,3], 田中 俊雄[1], 藤田 憲一[1]
（[1]阪市大院・理, [2]阪市大・複合先端, [3]阪市大・健康研セ）
kfujita@sci.osaka-cu.ac.jp

【背景および目的】ウコンの根茎に含まれるクルクミンは脂溶性のポリフェノールであり，*in vitro* において抗酸化，抗がん，脂質代謝改善など多くの生理活性が報告されている．抗菌活性についても古くから報告されているが，その活性は微弱である．加えて，クルクミンは動物培養細胞や真菌の薬剤排出ポンプを阻害し，他の薬剤と組み合わせた場合，相乗効果を発揮する．しかしながら，クルクミンは水溶性が低いため，薬剤としての実用化は困難である．そこで，今回は，クルクミンの 1/2 の構造を持つデヒドロジンゲロンに着目し，真菌の薬剤耐性への影響をモデル生物である出芽酵母を用いて検討した．なお，本物質はショウガに含まれる水溶性のフェノール類である．
【方法および結果】デヒドロジンゲロンは出芽酵母の生育にはほとんど影響を与えなかったが，薬剤耐性のため一過性の殺菌作用を示すドデカノールと組み合わせた場合，持続的かつ相乗的な抗真菌作用を発揮することが明らかになった．加えて，本物質は，薬剤排出ポンプによって排出される蛍光物質 rhodamine 6G の排出を抑制することがわかった．さらに，本物質は，薬剤耐性の原因の一つである多剤耐性薬剤排出ポンプ *PDR5* の遺伝子発現を抑制した．以上の結果より，デヒドロジンゲロンは薬剤排出を抑制することで相乗的な抗真菌作用を発揮する可能性が示唆された．

Effect of dehydrozingerone, a constituent in the rhizomes of ginger, on drug-resistance of budding yeast

○Masahiro Oyama[1], Chika Yamawaki[1], Yoshihiro Yamaguchi[1,2], Akira Ogita[1,3], Toshio Tanaka[1], Ken-ichi Fujita[1]
([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]OCARINA, Osaka City Univ., [3]Res. Center. Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, dehydrozingerone, *n*-dodecanol, drug resistance

2La03 黄ニラ抽出物が示す赤血球凝集素の阻害効果と阻害物質の単離

○大西 優[1], 中島 凌[2], Eltigani Sara[3], 鈴木 菜月[2], 美藤 友博[2], 清水 克彦[4], 畑中 唯史[5], 有馬 二朗[2]
（[1]鳥取大院・農, [2]鳥取大・農, [3]鳥取大院・連農, [4]鳥取大・CoRE, [5]岡山県生科総研）
arima@muses.tottori-u.ac.jp

【背景・目的】*Porphyromonas gingivalis* は，主な歯周病原菌として知られる偏性嫌気性グラム陰性細菌で，糖を資化できず，ヘムやペプチド，アミノ酸を栄養源として取得する．そのため，様々なペプチダーゼや赤血球凝集素を産生することが知られ，これらの阻害は，菌の生育や歯周組織・赤血球破壊の抑制につながる．黄ニラは青ニラを遮光軟化栽培したものであり，青ニラとは成分が大きく異なる．我々はこれまでに，歯周病原因子の一つである *P. gingivalis* による赤血球凝集の阻害活性を，黄ニラ抽出物から見出した．本研究では，黄ニラ抽出物に存在する赤血球凝集抑制物質の単離と同定を目的とした．
【方法・結果】5 品種の黄ニラと青ニラ（計 6 サンプル）の水抽出物を調製し，それぞれについて *P. gingivalis* の溶血，赤血球凝集，及びペプチダーゼ活性における阻害を評価した結果，いずれも青ニラより黄ニラが強い阻害活性を示した．特に黄ニラ品種の 1 つであるミラクルグリーンベルトで，赤血球凝集に対する強い阻害活性が確認された．一方で，過熱や凍結乾燥，透析を行うと凝集阻害活性は減少した．また，単離工程の検討において，逆相クロマトグラムで複数の画分から阻害活性が見られたため，阻害に関与している物質が複数存在していることが示唆された．最も強い凝集阻害活性を示す物質の同定を目的として，ミラクルグリーンベルトの水抽出物に対し，溶媒抽出，順相カラムクロマトグラフィー，Sep-Pak C18 に供した結果，水抽出物（MIC：29.8 μg/mL）よりも 87.8 倍高い活性を持つ画分（MIC：0.36 μg/mL）が得られた．しかし TLC 分析において，分画後のサンプルにはアルデヒド，ケトン基やベンゼン環を持つ化合物が複数混在していることが示唆されたため，単離にはまだ工程が必要であることが分かった．

Water-extract of yellow chive exhibit hemagglutinin inhibitory activity

○Yu Onishi[1], Ryo Nakashima[2], Sara Eltigani[3], Natsuki Suzuki[2], Tomohiro Bito[2], Katsuhiko Simizu[4], Tadashi Hatanaka[5], Jiro Arima[2]
([1]Grad. Sch. Agric., Tottori Univ., [2]Fac. Agric, Tottori Univ., [3]United. Grad. Sch. Agric. Sci., Tottori Univ., [4]CoRE., Tottori Univ., [5]RIBS., Okayama)

Key words *Porphyromonas gingivalis*, Periodontal disease, Hemagglutinin, Yellow chive

2La04 チューリッポシド/チューリッパリン類の抗細菌活性の精査

○加藤 康夫[1,2], 中川 恵蔵[2], 近堂 菜月[2], 北岡 直樹[1,2], 野村 泰治[1,2]
（[1]富山県大・生工研セ, [2]富山県大工・生物工）
ykato@pu-toyama.ac.jp

【目的】チューリップ組織中には糖エステルであるチューリッポシド (Pos) 類 (PosA，B) が二次代謝産物として著量蓄積している．一方で，Pos 類のアグリコンのラクトン化体であるチューリッパリン (Pa) 類 (PaA，B) も微量ながら存在している．チューリップ組織中において Pos 類は貯蔵物質であり，新規カルボキシルエステラーゼである Pos 変換酵素によって抗菌等の生理活性を示す Pa 類へと変換される．しかしながら，Pa 類の各種細菌に対する IC_{50} 値は百 μM～mM オーダーであり，その活性は抗菌物質というには低い．今回演者らは，Pos/Pa 類の抗細菌活性を再精査し，評価したので報告する．
【方法及び結果】抗細菌活性の測定は，被検菌として枯草菌，大腸菌，肺炎桿菌，緑膿菌，黄色ブドウ球菌を用い，比濁法 (ISO 20776-1 に準拠；18 hr 培養) にて行った．抗菌活性測定中における Pos/Pa 類の安定性をみるため，培養後の培地中の Pos/Pa を定量したところ，ISO が推奨する Mueller-Hinton (MH) 培地中では PosA，PaA は 18 hr 以上安定であったのに対し，PosB，PaB は化学的に極めて不安定（半減期 1 hr 以内）であり，MH 培地中では正しい抗菌活性が求められていないことが分かった．MH 培地に含まれる肉汁やカゼイン分解物に由来するペプチド成分が PosB，PaB の安定性に影響を及ぼすと考えて培地成分を検討し，M9 培地に酵母エキスを 0.2%とビタミン混液を添加した改変 M9 培地 (mM9-0.2 培地) を設定した．mM9-0.2 培地中での Pos/Pa 類の安定性を確認したところ，MH 培地と比べて PosB，PaB の半減期は大きく伸びていた．同培地を用いて再度比濁法にて抗細菌活性測定を行い先の結果と比較したところ，PosA，PaA の IC_{50} 値はほぼ変化がなかったのに対し，PosB，PaB ともに大きく抗細菌活性が向上し，特に PaB は kanamycin と同等の数～数十 μM の IC_{50} 値を示すことが分かった．

Evaluation of an antibacterial activity of tuliposides and tulipalins

○Yasuo KATO[1,2], Keizo NAKAGAWA[2], Natsuki KONDO[2], Naoki KITAOKA[1,2], Taiji NOMURA[1,2]
([1]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]Dep. Biotechnol., Toyama Pref. Univ.)

Key words tuliposide, tulipalin, antimicrobial activity

2La05 組換え分裂酵母を用いたナリンゲニン二糖配糖体の生産

○大橋 貴生, 窪村 有紗, 長谷川 友香, 三﨑 亮, 藤山 和仁
（阪大・生工国際セ）
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

【背景】フラボノイドは主要な植物二次代謝産物の一つであり，単糖および糖鎖が付加した配糖体として存在している．これらの糖鎖構造は多様であり，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柑橘類に豊富に存在し，糖鎖としてラムノース（Rha）α1,2-グルコース（Glc）構造を持ったナリンゲニン二糖配糖体であり，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，これらの糖鎖合成を担う糖転移酵素群を分裂酵母に導入し，アグリコンであるナリンゲニンを基質とした連続的糖転移による *in vivo* ナリンゲニン二糖配糖体生産を行った．
【方法】分裂酵母にシロイヌナズナ由来ナリンゲニン-7-O-Glc 転移酵素（*AtGT2*），ブンタン由来 α1,2-Rha 転移酵素（*Cm1,2RhaT*），およびシロイヌナズナ由来 UDP-Rha 合成酵素遺伝子を導入し，分裂酵母形質転換体を得た．形質転換体を用いた静止菌体法によるナリンギンの *in vivo* 生産を行い，逆相 HPLC により生成物を解析した．
【結果と考察】逆相 HPLC 解析の結果，3 つの酵素遺伝子を導入した酵母形質転換体は，ナリンゲニンからナリンギンを *in vivo* 生産することを確認した．次に，二糖目の糖転移に関与する Cm1,2RhaT をジャガイモ由来 Glc 転移酵素（StGT）に替えることで，非天然型のナリンゲニン二糖配糖体が *in vivo* 生産できるかを検討した．その結果，*AtGT2* および *StGT* 遺伝子を導入した酵母形質転換体を用いることで，基質ナリンゲニンから非天然型グルコシル化フラボノイド配糖体の *in vivo* 生産に初めて成功した．

Production of diglycoside naringenin using recombinant fission yeast

○Takao Ohashi, Arisa Kubomura, Yuka Hasegawa, Ryo Misaki, Kazuhito Fujiyama
(ICBiotech, Osaka Univ.)

Key words Flavonoid, glycosyltransferase, *Schizosaccharomyces pombe*, UDP-rhamnose

2La06 気生微細藻類由来の抗菌活性を有する新規クロロフィル類の単離とその産生株の探索

○三田 一至, 油井 信弘, 菅原 康里, 今村 保忠, 阿部 克也
（工学院大・先進工・生化）
bt13347@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】陸上の基物表面上で生活している気生微細藻類のなかには，機能性脂質を蓄積する種が存在することが分かってきた．さらに，様々な生理活性物質を産生している可能性がある．抗菌活性を指標に抽出物を分離したところ，新規クロロフィル類と考えられる画分が得られた．しかし，微量なため構造推定や機能評価が困難などの課題があった．そこで本報告では，気生微細藻類のコロニーからの抗菌活性を有するクロロフィル類の単離とその産生株の探索について述べる．
【方法】気生微細藻類のビロード状のコロニーは奥多摩地区檜原村の下元郷と数馬にある擁壁から採集し，そこから希釈平板法およびマイクロピペット法で 6 種の藻株を単離した．コロニーについては緑化処理を施した後，クロロホルム/メタノールを用いて粗抽出物を得た．シリカゲルカラムクロマトグラフィー，TLC，HPLC で得た活性画分は，LC-MS または抗菌活性評価(ペーパーディスク法)により特徴づけを行った．抗菌活性評価の試験菌には，*Kocuria rhizophila* を使用した．
【結果と考察】気生微細藻類のコロニーの粗抽出物から各種クロマトグラフィー法を用いて活性画分を 5 画分得た．そのなかで，緑色画分 B-3-2 は，最大の阻止円(直径 15.2 mm)が認められた．抗菌活性を示す 5 画分は，いずれもクロロフィル b の吸収スペクトルに類似していたが，質量数が異なっており，新規のクロロフィルが含まれていると考えられる．一方，6 種の培養株の粗抽出物から得た画分では，*Trentepohlia* sp.を含む 3 種の藻体において抗菌活性が示された．培養株の活性画分の吸収スペクトルは一致せず，気生微細藻類はそれぞれ独自の抗菌活性を有するクロロフィル類を産生していると考えられる．今後，構造および作用機構を解明すると共に，コロニーに存在する新規クロロフィル類産生株を特定する．

Isolation of antibacterial chlorophylls and screening of their producing aerial microalgae

○Kazushi Mita, Nobuhiro Aburai, Yasusato Sugahara, Yasutada Imamura, Katsuya Abe
(Dept. Chem. Life Sci., Sch. Adv. Eng., Kogakuin Univ.)

Key words aerial microalgae, antibacterial chlorophylls

2La07 赤潮プランウトン *Heterocapsa circularisquama* から分離された光依存性溶血毒素の多彩な生物活性

○小田 達也, 李 文成, 山口 健一
（長崎大院・水産環境）
t-oda@nagasaki-u.ac.jp

日本近海で発生する赤潮の原因微細藻類である渦鞭毛藻類 *Heterocapsa circularisquam* は，カキやアコヤガイなどの二枚貝類に強い毒性を示す一方，魚類やその他の海洋生物に対する毒性はあまり示さない事が知られている．これまでの研究で本種は少なくとも 2 種類の溶血毒素を有していることを見出している．その 1 つは細胞表層に存在し，二枚貝類との直接接触により毒性を発現すると推定されている．本毒素は比較的高分子で，物理化学的に不安定であることからその精製は難しく，実態解明には至っていない．一方，他の溶血毒素は細胞内に局在し，細胞破壊に伴い細胞外に放出される事，さらにアルコール抽出で分離可能であることが見出されている．アルコール抽出によって得られた毒素の精製により，本毒素は光依存性の溶血活性を示すポルフィリン誘導体である事を見出している．
本研究では，このポルフィリン誘導体の生理活性解明を目的として抗菌作用について解析した．本ポルフィリン誘導体は光依存的抗菌作用を濃度及び光照射時間依存的に示した．特にグラム陽性菌である *S. aureus* 及び *B. subtilis* により強い作用を示した．その抗菌スペクトルは市販の抗菌ポルフィリン誘導体とは異なっていた．光照射溶液中では時間と共に一重項酸素濃度が上昇した．その検出値は一重項酸素の特異的消去剤 histidine 添加により低下し，その抗菌作用も histidine により抑制された．以上より，*H. circularisquama* から得られた毒素は光依存性抗菌作用を示す新規ポルフィリン誘導体であり，その作用には光活性化による一重項酸素産生が関与すると推定された．

Photo-active hemolytic toxin isolated from red tide phytoplankton *Heterocapsa circularisquama*

○Tatsuya Oda, Wencheng Li, Kenichi Yamaguchi
(Grad. Sch. Fish. Sci. Environ. Stud., Nagasaki Univ.)

Key words pigment, plant cell culture, marine, microorganisms

2La08 糸状性細菌 *Sphaerotilus montanus* が形成するマイクロチューブの化学構造と伸長パターン

○藤原 篤男[1], 柏原 大輔[1], 河﨑 雄太[1], 近藤 敬子[2], 川村 出[1], 佐藤 道夫[3], 新田見 匡[1], 鈴木 市郎[1], 片平 正人[2], 武田 穣[1]
（[1]横国大院・工, [2]京大・エネルギー理工学研究所, [3]明治大・農）
takeda-minoru-bd@ynu.ac.jp

【背景と目的】*Sphaerotilus montanus* は活性汚泥常在の糸状性細菌である *S. natans* に当初は包括されたが，2011 年に類縁種として独立した．*Sphaerotilus* 属の糸状化は，非連結性の桿状細胞列がマイクロチューブに内包されることによってもたらされる．内包される細胞の連携によって形成されるマイクロチューブは菌体外高分子による特異な微細造形物とみなせる．なぜなら，大半の菌体外高分子は個々の細胞に粘質層や莢膜をもたらすに過ぎないからである．斬新な微細造形技術への手がかりを得るべく，我々はマイクロチューブの化学的実体と伸長機構の解明に注力している．今回は *S. natans* との対比を念頭に *S. montanus* 型マイクロチューブの特徴づけを試みた．
【結果と考察】*S. montanus* からのマイクロチューブの調製を，以前に *S. natans* に対して確立したものと同じ手順で行ったところ，反復熱処理過程でマイクロチューブの崩壊が認められた．*S. natans* 型マイクロチューブ（システイニルグリシンと多糖の複合体）との耐熱性の差異を念頭に，熱処理を一回とすることで本来の形状を持つマイクロチューブを得た．マイクロチューブの固体 NMR スペクトルと糖組成は *S. natans* とほぼ同じだったもののシステインは検出されず，熱感受性は S-S 架橋の欠如によると思われた．*N*-アセチル化を施すとマイクロチューブを可溶させることができたので溶液 NMR に供した．スペクトル解析の結果，多糖部分の構造は *S. natans* と同じながらアミノ酸は含まれず，アミノ酸残基は安定化には寄与するものの形態形成の必須要素ではないと判明した．また，形態形成への遊離アミノ基の関与が示された．生菌に *N*-ビオチン化を施して培養した後，蛍光標識化した抗ビオチン抗体を作用させたところマイクロチューブの中央部のみが蛍光を放ち，*S. natans* と同じく末端伸長することが明らかとなった．

Chemical structure and elongation pattern of the microtube formed by a filamentous bacterium, *Sphaerotilus montanus*

○Atsuo Fujiwara[1], daisuke Kashiwabara[1], Yuta Kawasaki[1], Keiko Kondo[2], Izuru Kawamura[1], Michio Sato[3], Tadashi Nittami[1], Ichiro Suzuki[1], Masato Katahira[2], Minoru Takeda[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., [2]Inst. Adv. Ener., Kyoto Univ., [3]Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words microtube, structural analysis, elongation, *Sphaerotilus montanus*

2La09 糸状菌シトクロム P450 の機能多様性とテルペノイドのコンビナトリアル生合成

○大園 昂貴[1], 筌場 将太[1], 北岡 卓也[2], 一瀬 博文[2]
（[1]九大院・生資環, [2]九大院・農）
ichinose@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】テルペノイドは植物や微生物の二次代謝産物として自然界に広く存在し，創薬シード化合物の探索資源としても興味が持たれている．その生合成では，テルペン骨格の形成を担うテルペン合成酵素と，骨格化合物への酸化修飾を施すシトクロム P450（P450）が重要な役割を果たしている．本研究では，木材腐朽担子菌および麹菌に由来する 425 種類の P450 を酵母細胞内においてテルペン合成酵素と共発現させ，多種多様なセスキテルペノイド（STP）およびトリテルペノイド（TTP）のコンビナトリアル生合成を試みた．
【方法】ビサボレン（STP）およびルペオール（TTP）誘導体の合成を試みた．ビサボレン合成酵素およびルペオール合成酵素を発現する酵母（Saccharomyces cerevisiae）を得た後，糸状菌 P450 の発現プラスミドを形質転換してテルペン合成酵素と P450 を共発現させた．形質転換酵母が産生する代謝物を GC-MS 分析に供し，ビサボレンおよびルペオールに活性を示す P450 を同定した．
【結果と考察】ビサボレン合成酵素と P450 を共発現する 425 種類の形質転換酵母を作製した．培養液中に蓄積する代謝物を分析したところ，P450 反応に依存した 7 種類のビサボレン水酸化体が得られた．糸状菌 P450 機能の大規模スクリーニングにより，セスキテルペノイドの戦略的合成を可能とする生合成マシナリーが発掘可能であることを示している．また，ルペオール合成酵素と P450 を共発現させたところ，5 種の糸状菌 P450 がルペオールに対して活性を持つことが示され，3 種類の代謝物が得られた．糸状菌がルペオール合成能を有さないにもかかわらず，ルペオール変換活性を示す P450 が見出されたことは大変興味深い．本結果より，糸状菌 P450 を活用することで様々なトリテルペノイドの生産が可能になると期待された．

Combinatorial biosynthesis of terpenoids using fungal cytochrome P450 monooxygenases.

○Koki Ozono[1], Shota Ukeba[1], Takuya Kitaoka[2], Hirofumi Ichinose[2]
([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words terpenoid, cytochrome P450, filamentous fungi

2La10 *Pseudmonas fluorescens* 由来のピラジン生合成機構の解明

○津田 佑介, 生井 智仁, 桝尾 俊介, 高谷 直樹
（筑波大院・生命環境）
takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【背景および目的】ピラジン化合物は香料や化成品の原料などとして広く利用される．また，抗菌活性や抗ガン活性など様々な生理活性を有する化合物も知られており，医薬・農薬原料としても重要な化合物である．産業利用されるピラジン化合物の多くは化学合成されたものであるが，ある種の植物や微生物は二次代謝産物として多様なピラジン化合物を生産することが知られている．しかしながら，これら天然のピラジン化合物の生合成機構はほとんど明らかになっていない．近年，我々は *Pseudomonas fluorescens* SBW25 株の *papABCDEF* 遺伝子クラスターが，新規なピラジン化合物である 2,5-ジメチル-3,6-ビス(4-アミノベンジル)ピラジン (DMBAP) の生合成に関与することを見出した．本クラスターは 4-アミノフェニルアラニン (4APhe) の生合成に必要な *papABC* とピラジン環の形成に関与すると予想される *papDEF* からなる．本研究は，*papDEF* の機能を明らかにし，DMBAP の生合成機構の全貌を解明することを目的とする．
【結果および考察】*papABCDEF* を導入した大腸菌を培養した後，培養液の上清を HPLC に供し分析したところ，4APhe，DMBAP，3-アミノ-4-(4-アミノフェニル)-2-ブタノン (APB) の生産が確認された．APB の減少に伴って DMBAP の量が増加していること，また，その構造から APB は DMBAP の中間体であると考えられた．また，PapD，PapE，PapF の各酵素をそれぞれ精製し，各種分析を行なったところ，PapD は 4APhe にアセチル CoA のアセチル基を転移し APB を生じる反応を触媒するアセチル基転移酵素，PapE は DMBAP にメチル基を転移しメチル化 DMBAP を生じる反応を触媒するメチル基転移酵素，PapF は 2 分子の APB が縮合して生じたジヒドロピラジンを酸化し DMBAP を生じる反応を触媒する FAD 依存酸化酵素であることが明らかになった．

Mechanism for pyrazine biosynthesis by *Pseudmonas fluorescens*

○Yusuke Tsuda, Tomohito Namai, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words *Pseudomonas fluorescens*, pyrazine, biosynthesis

2La11 放線菌由来揮発性有機化合物が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】世界人口の増加に伴い食糧問題が深刻化する昨今では，農業において更なる生産性の向上が求められている．特に農作物に悪影響を及ぼす植物病原菌の防除は，安定した作物生産には必要不可欠である．現在，その手段としては化学農薬が主流であるが，より複合的な効果を持つ微生物農薬にも注目が集まっている．微生物農薬の候補株として，当研究室では複数の植物病原菌に対し抗菌活性を持つ放線菌の単離に成功している．これらの放線菌は培地上での抗菌活性のほか，気体状の抗菌活性物質を生産することが判明している．今回は放線菌由来の揮発性有機化合物(VOCs; Volatile Organic Compounds)について知見を得るべく，植物を用いた感染防除試験にて防除効果がみられた放線菌 AR3, AR4 および AR10 株由来の揮発性抗菌活性物質に着目し調査を行った．
【方法と結果】まず各放線菌由来の VOCs が植物病原菌の菌糸生育に与える影響を調べた．放線菌胞子懸濁液（10^7 CFU/mL）100 μL を PDA 培地に全面塗布し，室温にて 3 日間培養した．その後，植物病原菌の寒天片を置いた PDA 培地と上下で組み合わせ，数日間培養し植物病原菌の生育面積を観察した．放線菌を植菌していないコントロール区と比較して抑制率を求め，それぞれの植物病原菌に対する抗菌活性を調査した．その結果，放線菌処理区では植物病原菌の生育が抑制された．また，放線菌由来の VOCs を回収し，GC-MS 分析に供した．先の試験と同様に放線菌を全面塗布したシャーレの内部に吸着材（Mono Trap DCC18）を置き，さらに 3 日間静置培養し VOCs を吸着させた．吸着材を回収しジクロロメタンで抽出後，GC-MS 分析に供した．その結果，AR3 および AR4 株ではごく近似したピークが検出された．AR10 株由来 VOCs の分析も含めて，現在同定を試みている．

Effects of volatile organic compounds derived from actinomycetes on phytopathogens

○Minori Maeda, Tatsuya Ohike, Masahiro Okanami, Tetsuya Matsukawa, Shin'ichiro Kajiyama, Takashi Ano
(Grad. Sch. BOST, Kindai Univ.)

Key words actinomycetes, antimicrobial substances, phytopathogens

2La12 卵菌による長鎖多価不飽和脂肪酸生産能の比較

○吉田 磨仁[1], 永峰 賢[2], 松下 貴子[1], 田中 淳和[3], 松浦 昌平[4], 東條 元昭[3]
（[1]北大院・地環科, [2]ロム, [3]阪府大院・生環科, [4]広島県・農技セ）
majin@ees.hokudai.ac.jp

エイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)などの長鎖多価不飽和脂肪酸はヒトの必須脂肪酸であり，動脈硬化や心筋梗塞，脳梗塞などへの予防効果があるとされる．特に，EPA は抗脂血症薬などの医薬品としての需要が高い．EPA や DHA の供給源は主に魚油であるが，漁獲高の不安定化や減少，食生活の変化などにより，EPA や DHA の摂取量は年々減少しいる．原生生物に属する卵菌(*Pythium*)のいくつかの種は EPA を作ることが知られている．そこで，魚油に代わる供給源として，*Pythium* を使って EPA を商業生産できないか検討している．
Pythium は，水中や土壌に生息する腐性菌として熱帯から寒帯にかけて広く分布する微生物である．これまでに 150 種以上が知られているが，脂肪酸の組成が調べられたのはわずか数種に限られており，EPA 生産の研究も 2，3 種についてのみである．そこで，EPA を合成する *Pythium* が他にも存在しないか，そして，EPA の商業生産に利用可能な種はいないかについて調べた．
まず，*Pythium* 16 種 29 系統について EPA 産生の有無を調べた．その結果，7 種 18 系統が EPA を産生していることがわかった．この 7 種のうち，3 種については，EPA を産生していることが今回初めて確認された．また，EPA 産生種である *P. myriotylum* について，様々な由来を持つ 12 系統でその EPA 含有量を比較したところ，系統間で大きな変異のあることがわかった．商業生産に適する系統を選抜するうえでの指標のひとつである増殖速度を EPA 生産株 18 系統で測定した．その結果，増殖速度は系統間で大きく異なることがわかり，その差は 3 倍近くに達した．菌体密度が低いことなどの課題はあるが，測定された最も大きな増殖速度を基に試算すると，商業生産への利用も可能ではないかと考えられる．

Production of polyunsaturated fatty acids by *Pythium*

○Kiyohito Yoshida[1], Tadashi Nagamine[2], Takako Matsushita[1], Yoshikazu Tanaka[3], Shohei Matsuura[4], Motoaki Tojo[3]
([1]Grad. Sch. Environ. Sci., Hokkaido Univ., [2]ROM, [3]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [4]Hiroshima Pref. Agri. Res. Cent.)

Key words polyunsaturated fatty acid, eicosapentaenoic acid, *Pythium*, filamentous fungi

2Ma01 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の class 3 に属するシトクロム P450 CYP505D6 の機能解析

○ワイズ 里沙[1], 酒井 優[1], 酒井 杏匠[1], 神藤 定生[2], 志水 元亨[1], 加藤 雅士[1]
（[1]名城大院・農, [2]名城大・理工）
mkato@meijo-u.ac.jp

【目的】白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* はゲノム中に少なくとも 154 の P450 遺伝子を有しており，その中で class 3 に属するシトクロム P450 と P450 レダクターゼの融合タンパク質が 7 種存在していた．これまで，class 3 P450 の機能については，糸状菌 *Fuzarium oxysporium* 由来の P450foxy や，枯草菌の P450BM3 について詳細に研究がなされ，飽和脂肪酸の ω-1 ~ ω-3 位を水酸化することが明らかになっている．しかしながら，*P. chrysosporium* の class 3 P450 の機能については明らかとなっていない．本研究では，*P. chrysosporium* 由来の class 3 P450 である CYP505D6 の機能解析を行った．
【方法および結果】炭素鎖長 12 の脂肪アルコール（1- ドデカノール）及び脂肪酸（ラウリン酸）を CYP505D6 と反応させた．1- ドデカノールは ω-1 ~ ω-7 位，ラウリン酸は ω-1 ~ ω-6 位が水酸化された．また，炭素鎖長 9 から 18 の飽和脂肪酸を基質として反応させたところ，炭素鎖長 9 から 15 までの飽和脂肪酸については ω-1 ~ ω-6 位，16 から 18 までの飽和脂肪酸については ω-1 ~ ω-4 位が水酸化された．さらに，CYP505D6 はナフタレン及び 1- ナフトールを水酸化した．以上のことから，P450foxy や P450BM3 と比較して，CYP505D6 は広い基質特異性を有していることが明らかになった．現在，その理由について変異型酵素を調製し検討している．

Biochemical characterization of a self-sufficient cytochrome P450 CYP505D6 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

○Lisa Wise[1], Yu Sakai[1], Kiyota Sakai[1], Sadanari Jindou[2], Motoyuki Shimizu[1], Masashi Kato[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., [2]Sci. Tecknol., Meijo Univ.)

Key words self-sufficient P450, *Phanerochaete chrysosporium*, CYP505D6

2Ma02 酸素ラジカル処理がセルロース分解に及ぼす影響

○糀谷 紗季[1], 酒井 杏匠[1], 上條 順也[1], 前林 正弘[1], 伊藤 昌文[2], 呉 準席[2], 堀 勝[3], 志水 元亨[1], 加藤 雅士[1]
（[1]名城大院・農, [2]名城大・理工, [3]名大院・工）
mkato@meijo-u.ac.jp

【目的】
セルロース分解の効率化は，バイオリファイナリーにおいて重要である．酸およびアルカリ前処理のような化学的方法は難分解性リグノセルロース構造を破壊するのに有効であることが実証されている．しかし，これらの方法は環境に悪影響を与えるため，新しい方法の確立が期待される．本研究では，プラズマによって生成する酸素ラジカルの反応性に着目し，酸素ラジカル処理がカルボキシメチルセルロース (CMC)，および，麦わらの酵素分解に及ぼす影響について検討した．
【方法・結果】
酸素ラジカル処理または酸素ガス処理（コントロール）した CMC 溶液の粘度を測定したところ，酸素ラジカル処理によって，CMC 溶液の粘度が低下した．従って，セルロース鎖が開裂し，低分子化していることが示された．さらに，酸素ラジカル処理した CMC を *Phanerochaete chrysosporium* の培養上清と反応させ，反応溶液中の還元糖量を測定したところ，酸素ラジカル処理によって反応溶液中の還元糖量が 2.0 倍増加した．*P. chrysosporium* 培養上清中の細胞外タンパク質のプロテオーム解析を行ったところ，Glycoside hydrolase 7 (GH7) family に属するセロビオヒドロラーゼ I (CDH I) および GH6 family に属するセロビオヒドロラーゼ II (CDH II) が主なセルロース分解酵素として検出された．市販の CDH I および CDH II と，酸素ラジカル処理した CMC を反応させたところ，コントロールに比べて還元糖量が 1.7 倍増加した．また，酸素ラジカル処理した麦わらを *P. chrysosporium* 培養上清と反応させたところ，還元糖量が 1.8 倍増加した．これらのことから，酸素ラジカル処理はセルラーゼによるセルロース分解を促進することが明らかになった．以上のことから，植物バイオマスの酸素ラジカル処理は，リグノセルロースの分解効率を向上させることが示唆された．

Effect of oxygen-radical pretreatment on cellulose degradation

○Saki Kojiya[1], Kiyota Sakai[1], Junya Kamijo[1], Masahiro Maebayashi[1], Masafumi Ito[2], Jun-Seok Oh[2], Masaru Hori[3], Motoyuki Shimizu[1], Masashi Kato[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., [2]Fac. Sci. Technol., Meijo Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words atmospheric pressure plasma, biorefinery, cellulose, oxygen-radical pretreatment

2Ma03 糸状菌 *Aspergillus nidulans* が種々の多糖応答的に生産する細胞外酵素の網羅的解析

○山口 愛彩[1], 酒井 杏匠[1], 糀谷 紗季[1], 木島 尚輝[1], 大堀 紗貴子[1], 小栗 莉奈[1], 高須賀 太一[2], 堀 千明[3], 志水 元亨[1], 加藤 雅士[1]
（[1]名城大院・農, [2]北大院・農, [3]北大院・工）
mkato@meijo-u.ac.jp

【目的】糸状菌 *Aspergillus nidulans* はデンプン，セルロース，ヘミセルロースの分解能を有していることから，それら多糖類の分解に関わる細胞外酵素およびそれらの転写制御についての研究が盛んに行われている．本研究では，種々の多糖類（結晶性セルロース (MCC)，カルボキシメチルセルロース (CMC)，キチン，キシラン，グルコマンナン，ガラクトマンナン）をそれぞれ唯一の炭素源として生育させた際に，*A. nidulans* が細胞外に分泌するタンパク質を網羅的に同定するため，セクレトーム解析を行った．また，同定されたタンパク質のうち，機能が既知のタンパク質とはアミノ酸配列の相同性がない Hypothetical Protein (HP) を選抜し，機能を明らかにすること目的とした．
【方法および結果】種々の多糖類 (MCC，CMC，キチン，キシラン，グルコマンナン，ガラクトマンナン) をそれぞれ唯一の炭素源として生育させた *A. nidulans* の培養ろ液から TCA/アセトン沈殿によりタンパク質を回収した．トリプシン処理後，LC-MS/MS にてセクレトーム解析したところ，MCC，CMC，キチンを炭素源にして生育させたものと比較して，キシラン，グルコマンナン，ガラクトマンナンを炭素源にした場合，より多種類のタンパク質が生産されていた．CMC，キチンではセルロース加水分解酵素である GH5 や AA9 に属する lytic polysaccharide monooxygenase が発現していた．GH26 と GH134 はβ-マンナンに特異的に発現していた．同定されたのべ 578 種類のタンパク質の中で，82 種が HP であった．現在，いくつかの HP に関して大腸菌およびメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いて異種発現，機能解析を進めている．

Secretome analysis of *Aspergillus nidulans* in response to various polysaccharides

○Aya Yamaguchi[1], Kiyota Sakai[1], Saki Kojiya[1], Naoki Kijima[1], Sakiko Ohori[1], Rina Oguri[1], Taichi Takasuka[2], Chiaki Hori[3], Motoyuki Simizu[1], Masashi Kato[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words *Aspergillus nidulans*, hypothetical proteins, secretome

2Ma04 *Aspergillus glaucus* MA0196 由来ハイマンノース型アスパルティックプロテアーゼの遺伝子クローニングと異種発現

○林 理希[1], 土居 幹治[2], 竹中 慎治[1]
（[1]神戸大院・農, [2]マルトモ）
stakenaka@people.kobe-u.ac.jp

【目的】
我々は，かつお節かび付けに伴う色相変化の機構を明らかにすることを目的とし，かび付けに用いられる *Aspergillus* 属糸状菌の生成する脱色因子の特性解析を行い，アスパルティックプロテアーゼが脱色に関与していることを明らかにした[1,2]．分離株の中で *A. glaucus* MA0196 株は，MY20 培地で培養するとハイマンノース型の糖鎖を有するアスパルティックプロテアーゼ (PepA_MA0196) を分泌することがわかっているが，同酵素の一次構造の詳細や糖鎖の生理学的意義は明らかではない．そこで，遺伝子クローニングと *Pichia pastoris* による組換え酵素および変異酵素の異種発現を行ったので報告する．
【方法・結果】
精製酵素を PNGase F および Endo H で処理して糖鎖を切断し，SDS-PAGE に供すると，約 40 kDa のバンドが見られた．精製酵素をトリプシン消化した後，HPLC に供し，ペプチドマッピングを行った．分取したペプチドのアミノ酸配列の解析を行ったところ，既報の *Aspergillus* 属糸状菌由来のアスパルティックプロテアーゼと高い類似性を示した．内部アミノ酸配列を基にプライマーを設計し，プロテアーゼ遺伝子のクローニングを行った．同酵素遺伝子の ORF は 1,367 bp で，4 つのエキソンと 3 つのイントロンから構成されていた．cDNA から推測される PepA_MA0196 のアミノ酸配列は，20 アミノ酸残基からなるシグナル配列を含む 396 アミノ酸残基からなると推定した．また，推定アミノ酸配列中には N 結合型糖鎖の付加に必要とされているコンセンサス配列 (Asn-X-Ser/Thr) が 2 カ所見られた．つづいて，親株酵素と，コンセンサス配列中の Asn を Gln に置換した一重および二重変異酵素を *P. pastoris*-pPICZαA 発現系にて分泌生産させ，いずれも N 型糖鎖修飾された活性体を得ることができた．
1) J. Sci. Food Agric. 93:1349-1355, 2013; 2) J. Sci. Food Agric. 97:95-101, 2017

Cloning and heterologous expression of aspartic protease with high-mannose oligosaccharides from *Aspergillus glaucus* MA0196

○Lihui Lim[1], Mikiharu Doi[2], Shinji Takenaka[1]
([1]Grad.Sch.Agric.,Kobe Univ., [2]Marutomo Co., Ltd.)

Key words *Aspergillus glaucus*, aspartic protease, glycosylation, *Pichia pastoris*

2Ma05 *Aspergillus oryzae* で高発現させたタンナーゼ AoTanBO の酵素学的諸性質

○市川 響太郎[1], 佐々木 克仁[1], 塩野 義人[1], 新谷 智子[2], 渡部 昭[2], 五味 勝也[2], 小関 卓也[1]
（[1]山形大農, [2]東北大院・農）
tkoseki@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

［背景・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し，茶飲料やワインの清澄等の食品産業や，生理機能を有する没食子酸の回収に利用されている. 本研究では酵素製剤作製に向け, *Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼ遺伝子 *AotanB*（AO090023000047）を *A.oryzae* で発現させ，その酵素学的諸性質を解析した．また，*Pichia pastoris* で発現させた *AotanB* を AoTanBP，*A.oryzae* で発現させた *AotanB* を AoTanBO と名付け，それぞれの諸性質の差異を明らかにすることを目的とした．
[方法・結果] AoTanBO は高発現用 *glaA142* プロモーターの制御下で *AotanB* を形質転換した *A.oryzae* を，マルトースを含む液体培養で誘導し，発現させた．AoTanBP は *AotanB* を形質転換した *P.pastoris* GS115 株を，メタノールを含む液体培養で誘導し，発現させた. AoTanB の生産性は *A.oryzae* を宿主した AoTanBO が顕著に優れていた．陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーで精製した AoTanBO は SDS-PAGE において 80-100kDa 付近，一方 AoTanBP では 90-120kDa 付近にスメアなバンドを示したことから，両酵素は糖鎖付加様式が異なることが示唆された．AoTanBO は AoTanBP と同様に最適 pH6.0，最適温度 30-35℃を示した．また，AoTanBO は 60℃(＞85%)まで安定で，40℃(＞80%)までの AoTanBP との差異が見られた．なお，特許で報告されている *A.oryzae* を宿主として精製された AoTanB(P4370395)は，最適 pH7.0，最適温度 70℃，熱安定性 65℃(＞80%)と，AoTanBO とは特に，最適温度で異なる結果が得られ，アッセイ方法の違いが考えられた．現在，基質特異性解析を進めている．

Enzymatic properties of recombinant tannase, AoTanBO, highly expressed in *Aspergillus oryzae*

○Kyotaro Ichikawa[1], Katsuto Sasaki[1], Yoshihito Shiono[1], Tomoko Shintani[2], Akira Watanabe[2], Katsuya Gomi[2], Takuya Koseki[1]
([1]Fac. Agric., Yamagata Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, tannase

2Ma06 *Talaromyces cellulolyticus* 由来新規 GH30 エンドキシラナーゼの同定

○中道 優介, 藤井 達也, 松鹿 昭則, 井上 宏之
（産総研・機能化学）
nakamichi-y@aist.go.jp

CAZy データベースでファミリー GH30 に分類されるキシラナーゼとして，4-*O*-メチルグルクロン酸側鎖を認識してキシラン主鎖を分解する細菌由来のグルクロノキシラナーゼが知られている．近年，リグノセルロースを分解する糸状菌においても GH30 タンパク質の分泌生産が報告されているが，その機能はほとんど明らかにされていない．また，糸状菌由来の GH30 キシラナーゼは，細菌由来酵素において保存されている 4-*O*-メチルグルクロン酸側鎖を認識するアミノ酸残基が保存されておらず，基質キシランに対して異なる分解特性を示すものも報告されている．本研究では，リグノセルロース糖化酵素を高生産する糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* (旧 *Acremonium cellulolyticus*) に由来する GH30 キシラナーゼを新たに同定し，その諸性質を明らかにした．
炭素源としてセルロースを含む培地中で培養した *T. cellulolyticus* の培養上清について，セクレトーム解析を行ったところ，GH30 に属するタンパク質が見出された．本タンパク質は，一次構造から，ファミリー GH30 の触媒ドメインとセルロース結合モジュール (CBM) ドメインを有することが示唆された．本菌のホモロガス発現系を用いて，本酵素を大量発現させ，精製後に酵素化学的諸性質を決定した．本酵素は，アラビノキシランとグルクロノキシランの両方に対して高いキシラナーゼ活性を示したことから，グルクロノキシラナーゼではなく，新規のエンド β-1,4-キシラナーゼであることが分かった．また，本酵素はキシロースをほとんど生成せず，主として重合度が 2 以上のキシロオリゴ糖を生成した．

Identification of a novel GH30 endo-xylanase from *Talaromyces cellulolyticus*

○Yusuke Nakamichi, Tatsuya Fujii, Akinori Matsushika, Hiroyuki Inoue
(Inst. Sustain. Chem., AIST)

Key words *Talaromyces cellulolyticus*, glucuronoxylanase, Glycoside hydrolase family 30, xylooligosaccharide

2Ma07 好熱性アーキア由来色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素のアーキアを宿主としたタンパク質発現系の構築と発現タンパク質の酵素化学的性質の解析

○里村 武範[1,2], 江本 慎[1], 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・工, [2]福井大・ライフ, [3]創価大, [4]香川大・農, [5]阪工大院・工）
satomura@u-fukui.ac.jp

[緒言]
色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素（Dye-DADH）は FAD を補酵素として含み 2,6-ジクロロインドフェノール(DCIP)のような人工酸化還元色素存在下で様々な D-アミノ酸の酸化反応を触媒する一群の酵素である．我々は好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* に既存の Dye-DADH と 40%程度の相同性を示す Dye-DADH ホモログを見出した．本研究では *S. tokodaii* に存在する Dye-DADH ホモログの機能同定と酵素化学的性質の解析を行うことを目的として研究を行った．
[方法・結果]
S. tokodaii ゲノム情報から見出した Dye-DADH ホモログ遺伝子の大腸菌を宿主としたタンパク質発現の構築を行った．その結果，大腸菌で発現させた組換えタンパク質は封入体を形成しており酵素の機能同定ができなかった．そこで，好熱好酸性アーキア *S. acidocaldarius* を宿主としたタンパク質発現系の構築を行った．*S. acidocaldarius* 細胞内で組換えタンパク質の発現を行った結果，可溶化酵素として発現することに成功した．本ホモログタンパク質を精製し酵素の機能同定を行ったところ，疎水性 D-アミノ酸に高い反応性を示す Dye-DADH であることが明らかとなった．これまでに，バクテリア，アーキアで Dye-DADH は見出されているが，疎水性 D-アミノ酸に高い反応性を示す Dye-DADH の報告例は無く新規酵素であることが明らかとなった．現在，本酵素のさらに詳細な酵素化学的性質の解析を行っている．

A novel dye-linked D-amino acid dehydrogenase from thermophilic archaea: purification, characterization and expression in archaea.

○Takenori Satomura[1,2], Shin Emoto[1], Norio Kurosawa[3], Haruhiko Sakuraba[4], Toshihisa Ohshima[5], Shin-ichiro Suye[1,2]
([1]Grad. Sch Eng., Univ, [2]Life Sci., Univ Fukui, [3]Souka Univ., [4]Fac. Agric., Kagawa Univ., [5]Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol.)

Key words flavoprotein, thermostable enzyme, D-amino acid, dye-linkd dehydrogenase

2Ma08 *Sulfolobus tokodaii* 由来色素依存性 L-乳酸脱水素酵素の性質の解明

○宇野 紘平[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]阪工大院・工）
satomura@u-fukui.ac.jp

[背景と目的] 色素依存性 L-乳酸脱水素酵素（Dye-LLDH）は FAD を補酵素とし人工酸化還元色素存在下で 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．我々は，好熱性アーキア *S. tokodaii* のゲノム情報から Dye-LLDH をコードしていると予測される遺伝子を見出した．Dye-LLDH をコードしていると考えられる遺伝子は本遺伝子の他に 3 つの機能未知遺伝子とクラスターを形成していた．このことから，これら 3 つの機能未知遺伝子は本酵素の機能に関与していることが示唆された．そこで，好熱性アーキア *S. acidocaldarius* を宿主としたタンパク質発現系を作成し，本遺伝子クラスターの発現を行った．その結果，この遺伝子クラスターの発現産物から Dye-LLDH 活性を検出することができた．そこで，本研究では *S. acidocaldarius* を宿主としたタンパク質発現系で発現した Dye-LLDH の詳細な機能解析を行った．
[方法] *dye-lldh* 遺伝子を含む遺伝子クラスターを導入した *Sulfolobus* 用発現ベクターを用いて *S. acidocaldarius* の形質転換を行った．得られた形質転換株を培養し，Ni キレーティングクロマトグラフィー，陰イオン交換クロマトグラフィーにより目的タンパク質の精製を行った．次に，精製酵素について酵素化学的性質の測定を行った．
[結果と考察] 2 段階の精製方法により *S. acidocaldarius* 形質転換株より Dye-LLDH を生成することに成功した．精製酵素を SDS-PAGE で確認したところ Dye-LLDH タンパク質の他にもう一つ，別のタンパク質を確認することができた．このことから，本酵素は異なるサブユニットから構成されるヘテロサブユニット構造を有していることが明らかとなった．さらに，精製酵素の酵素化学的性質の測定を行った結果，本酵素の基本的性質の測定に成功した．現在，本酵素のさらに詳細な解析を進めている．

Characterization of dye-linked L-lactate dehydrogenase from *Sulfolobus tokodaii*

○Kohei Uno[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]Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol.)

Key words flavoprotein, thermostable enzyme, L-lactic acid, dye-linked dehydrogenase

2Ma09 好熱好酸性アーキアのマルチプル分子シャペロニンの機能解析

○魚住 奎太, 山田 芽生, Putri Azalea, 福田 青郎, 藤原 伸介
（関西大院・理工）
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

【背景と目的】分子シャペロニンはタンパク質の凝集を防ぎ，可溶化を促進する．好熱好酸性アーキア *Sulfolobus* 属は複数の分子シャペロニンサブユニット(α，β，γ)を有し，これらは温度環境の変化で組成変化を起こすことが明らかにされている．*Sulfolobus acidocaldarius* は，3 種類の分子シャペロニンサブユニット α(Saci_1401)，β(Saci_0666)，γ(Saci_1203)を持つ．本研究ではこれら 3 つの分子シャペロニンに注目し，温度変化に加え pH ストレス環境下での発現動態を調べた．また遺伝子の破壊を試み，環境応答の変化からそれぞれのサブユニットの生理的意義の解明を目指した．
【結果と考察】培養温度，pH を変化させて各分子シャペロニン遺伝子の転写産物量の変動を解析した．高温ストレス下(82℃)では，至適温度条件(75℃)と比較して α 遺伝子と β 遺伝子の転写量が増加し，低温ストレス下(60℃)では 3 種類すべての転写量が増加した．次にそれぞれを組換え体として取得し，ATPase 活性を調べた．ホモ α とホモ β 分子シャペロニンは 85℃以上でも活性の上昇が認められたが，ホモ γ は 65℃以上では活性が低下した．以上の結果から，高温ストレス下では α や β サブユニットが，低温ストレス下では 3 種の全てが機能していると予想された．この特徴は他の *Sulfolobus* 属と同様である．一方，生育至適温度下で pH ストレスを与えたところ，pH2 では，3 種類とも転写量が減少し，pH4 では β 遺伝子の高発現が維持された．β 遺伝子は温度ストレスに加え，pH ストレスに対しても応答，機能していると示唆される．次にシャペロニンの遺伝子破壊株の作成を試みたところ，γ 遺伝子破壊株のみ得られた．この株の生育を野生株と比較したところ，すべての温度，pH 条件でわずかな生育遅延が見られた．以上の結果は，γ サブユニットは生育に関与はしているものの必須ではないことを示している．

The functional analysis of multiple chaperonins from thermoachidophilic archaeon

○Keita Uozumi, Mei Yamada, Azalea Putri, Fukuda Wakao, Fujiwara Shinsuke
(Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ.)

Key words chaperonin, archaea, thermoachidophiles, *Sulfolobus acidocaldarius*

2Ma10 超好熱性アーキアにおけるユビキチン様タンパク質の機能解析

○榊原 早津季[1], 秀瀬 涼太[2], 福田 青郎[1], 藤原 伸介[1]
（[1]関西学院大・理工, [2]神戸大院・科技イノベ）
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

【目的】あらゆる生物において，モリブドプテリン（MPT）など含硫補因子や tRNA のチオ化修飾は生命維持に寄与している．常温生物ではユビキチン様タンパク質（ULP）が硫黄転移のキャリアーとして，MPT の生合成や tRNA のチオ化修飾に関与している．しかし，初期生命の形質を強く残す超好熱性アーキアにおいて，ULP の全容は不明である．超好熱性アーキア *Thermokoccus kodakarensis* は 3 つの ULP をもつ．本研究ではこれら ULP の生理機能を解明することを目的とした．
【結果と考察】*T. kodakarensis* の 3 種の ULP（TK1065, TK1093, TK2118）遺伝子を相同組換えによりそれぞれ破壊した．得られた破壊株のマルトオリゴ糖含有栄養培地（85℃）での生育特性解析を行った．本菌はマルトオリゴ糖を資化でき，その経路には MPT 含有酵素が関与する．TK1093 や TK1065 破壊株はマルトオリゴ糖含有栄養培地で野生株と同等に生育した一方，TK2118 破壊株は生育しなかった．TK2118 遺伝子破壊により MPT 含有酵素の活性が著しく減少したことから，TK2118 が MPT 合成に関与すると考えられた．次に，元素硫黄含有栄養培地において高温ストレス環境下(93℃)でそれぞれの破壊株を培養したところ，野生株と比べて TK1093 破壊株のみ生育遅延を示した．好熱菌において tRNA のチオ化修飾は高温での生育に重要であるため，TK1093 は tRNA のチオ化修飾に関与すると予想された．*T. kodakarensis* 由来無細胞タンパク質生合成システムの至適反応温度は，本菌の生育至適温度（85℃）に比べて極めて低い（65℃）ことが問題となっている 1)．TK1093 が関わる tRNA の修飾機構は，高温下での効率的無細胞タンパク質合成技術開発への寄与が期待される．現在，TK1093 破壊株の HPLC による tRNA のヌクレオチド残基のチオ化の有無の検証している．1) Endoh et al., J Biotechnol., 1,126, 186-95 (2006)

Physiological role of ubiquitin-like protein in a hyperthermophilic archaeon

○Satsuki Sakakibara[1], Ryota Hidese[2], Wakao Fukuda[1], Shinsuke Fujiwara[1]
([1]Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words archaea, ubiquitin-like, thermophile, sulfur transfer

2Ma11 超好熱菌における NAD^+熱分解産物の再利用代謝機構の解明

○佐藤 喬章[1,2], 蜂須賀 真一[1,2], 跡見 晴幸[1,2]
（[1]京大院・工, [2]JST・CREST）
takaakisato@sbchem.kyoto-u.ac.jp

超好熱菌とは至適生育温度が 80℃以上の微生物の総称である．超好熱菌由来タンパク質はほぼ全て高い耐熱性を有しており，工業的利用の面からも注目される．一方，超好熱菌が利用している小分子に目を向けると，意外と熱に弱い化合物もある．例えば nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form: NAD^+)は，超好熱菌を含め多くの生物にとって酵素による酸化反応における重要な補酵素であるが，85℃で ADP-ribose と nicotinamide に分解してしまうことが分かっている．NAD^+を利用する酸化酵素を工業的に扱う可能性も踏まえて，我々は超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* が NAD^+の熱分解産物をどのように代謝しているのかを明らかにすることを目的として研究を進めてきた．ADP-ribose に関しては 2016 年度大会において，一般的な経路で代謝され得る ribose 5-phosphate および AMP に分解していることを報告した．Nicotinamide については一般的に 4-step 経路（deamination→phosphoribosylation→adenylylation→amidation）か 2-step 経路（phosphoribosylation→adenylylation）と呼ばれる経路によって NAD^+に再生されることが知られている．しかし，本菌においてどちらの経路で代謝されるのかは不明であった．そこで，本菌において phosphoribosylation を触媒すると予測される TK1676 タンパク質の生化学的解析および 4-step 経路で機能する nicotinamide deamidase (TK1650)の遺伝子破壊株の作製・解析を行った．その結果，本菌は 4-step 経路により nicotinamide を NAD^+に再生していることを明らかにできた．つまり nicotinamide は一度脱アミド化されてから，ホスホリボシル化およびアデニリル化され，その後再度アミド化される．なぜこのような一見無駄と思われる経路を利用しているのかについても議論したい．

Identification of a metabolic pathway salvaging thermal degradation product from NAD^+ in hyperthermophiles

○Takaaki Sato[1,2], Shin-ichi Hachisuka[1,2], Haruyuki Atomi[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ., [2]CREST, JST)

Key words NAD(P)H, hyperthermophile, archaea

2Na01 ナイロン-6 分解候補株の取得のためのスクリーニング法の検討及び分解能の評価

○上江田 真衣[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】 プラスチックは優れた特徴から広く利用されている．一方で，焼却や埋め立て，リサイクルなど使用後の処理方法については，解決すべき課題を多く抱えている．そこで現在注目されているのが微生物分解処理である．しかし，本研究で着目したナイロン-6 についてこれまでに報告されている分解菌の種類は非常に少ない．そこで，我々の研究室ではポリエチレンテレフタレートや生分解性ポリエステル，ナイロン-6 などのプラスチックをモデルに酸やアルカリを用いた前処理を施し，プラスチックの表面構造を変化させ，プラスチック分解能を有する微生物を簡便に取得できるスクリーニング方法を考案している．本研究の目的はスクリーニングにより取得したナイロン-6 分解候補株の分解能の解析を行い，将来的にナイロン-6 の微生物処理を実現することである．
【方法】1×1 cm のナイロン-6 片を 60%ギ酸水溶液に 10 分間浸し，前処理を施した．次に炭素源を含まない培地 10 ml に前処理を施したナイロン-6 片と埋立地より採取した土壌 1 g を加え，30℃で 1 週間培養を行った．ナイロン片上に付着生育していた株をナイロン-6 分解候補株として寒天培地にて単離を行い，16S rRNA 解析により同定を行った．その後，候補株を用いて同様の培地条件で分解実験を行い，培地成分の分析，ナイロン-6 片の重量や粘度変化を測定することにより分解能力を評価した．
【結果・考察】ナイロン-6 に前処理を施したものは，施していないものよりも寒天培地上に生育したコロニーの種類・数が多いことが分かった．スクリーニングの結果，Pantoea agglomerans および Arthrobacter uratoxydans の 2 種をナイロン-6 分解候補株として単離した．両株ともに分解実験前後のナイロン-6 表面構造に特徴的な変化が見られた．

Evaluation of nylon-6 degrading bacteria screened by the efficient screening method from the environment

○Mai Ueta[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 nylon-6, plastic degrading bacteria, screening

2Na02 スルファニル酸分解微生物への亜硫酸イオンの影響

○東山 明広, 喜多 晃久, 中川 克彦, 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，現在最も利用されている染料である．これまでの研究により，水溶性アゾ染料は，微生物により比較的容易に分解しスルホン化芳香族アミン化合物を生成することが明らかになっている．このスルホン化芳香族アミン化合物は染料と同様に難分解性で環境に悪影響を与える原因の一つになっている．本研究では，アゾ染料の一種である OrangeII を分解することによって生成するスルホン化芳香族アミン化合物であるスルファニル酸をモデルとして，微生物による分解，無毒化の検討を行った．
【方法・結果】本研究室でスルファニル酸を唯一の炭素源として長期間継代培養している集積培養液より，スルファニル酸分解微生物である 11A 株を新たに単離した．16SrRNA の塩基配列解析により 11A 株は *Aminobacter* sp.と同定された．スルファニル酸を単一炭素源とした無機塩液体培地に 11A 株を植菌し，振とう培養を行いスルファニル酸の分解試験を行ったところ，10 日間の培養で 5.5mM のスルファニル酸を完全に分解した．また，培養上清の亜硫酸イオン濃度，硫酸イオン濃度の測定を行ったところ，スルファニル酸の分解にともない硫酸イオンが蓄積した．これまでに分離しているスルファニル酸分解菌 624S 株と比較して，11A 株では顕著な亜硫酸の蓄積は観察されず，11A 株にはスルファニル酸を分解し，同時に生成する亜硫酸イオンを酸化する能力がある可能性が示唆された．現在，スルファニル酸分解菌である 11A 株及び 624S 株の亜硫酸イオンの酸化能力について検討を行っている．

Effect of sulfite ion on sulufanilic acid degrading microorganisms

○Akihiro Higashiyama, Akihisa Kita, Katsuhiko Nakagawa, Nobuki Hayase
(Niihama Natl. Coll. Technol.)

Key words sulfanilic acid, biodegradation, sulfite ion

2Na03 排水中の有機共存物質が *Pseudonocardia* sp. N23 株の 1,4-ジオキサン分解に与える影響の評価

○大久保 忠相[1], 井上 大介[1], 山本 哲史[2], 黒田 真史[1], 池 道彦[1]
（[1]阪大院・工, [2]大成建設）
ike@see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】 1,4-ジオキサン (DOX) は，難分解性であり，また，発がん性の疑いがあることから，水環境中に放出されることによる環境リスクが懸念されている．近年，複数の DOX 分解菌が分離されているが，中でも *Pseudonocardia* sp. N23 株は，高い DOX 分解能力を有し，酸性条件下でも高い分解活性を維持出来ることから [1]，実排水処理に有望な DOX 分解菌とみなされている．本研究では，N23 株の工場排水処理への適用に向けた検討として，DOX 含有排水中に含まれているアルコール類，アルデヒド類，有機酸，環状エーテル類，アセトンの共存が N23 株による DOX 分解に及ぼす影響を評価した．
【方法】DOX 50 mg-C/L と，各有機共存物質 50 または 500 mg-C/L を添加し，pH5.0 または pH7.0 に調整した 200 mL の無機塩培地を 500 mL 容三角フラスコに加え，MGY 培地で前培養した N23 株の菌体を 50 mg/L の濃度で植種し，28℃，120 rpm で 3 日培養し，分解試験を行った．
【結果】DOX 濃度の経時変化と 3 日間の菌体増加量を調べた結果，pH5.0 では，アルデヒド類や一部の有機酸の共存による DOX 分解の顕著な阻害が見られたが，それ以外の物質の共存では分解に大きな影響は見られなかった．他方，pH7.0 では，試験した殆どの物質において，DOX 分解への顕著な影響は見られなかった．いずれの pH 条件でも顕著な DOX 分解阻害を示したのは，2-クロロメチル 1,3-ジオキソラン，500 mg-C/L の酢酸及びエタノールであった．これらの阻害物質を前処理で除去することにより，N23 株による良好な DOX 除去が可能であると示唆された．
【参考文献】1) Yamamoto *et al*. (2018) *J. Biosci. Bioeng*. (印刷中)

Evaluation of 1,4-dioxane degradation ability of *Pseudonocardia* sp. N23 in the presence of co-existing organic substances

○Tadasuke Ookubo[1], Daisuke Inoue[1], Norifumi Yamamoto[2], Masashi Kuroda[1], Michihiko Ike[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Taisei Corp.)

Key words 1, 4-dioxane, bacteria, biodegradation, wastewater treatment

2Na04 担子菌バイオリアクターによるトリクロサンの除去

○山口 和真, 本間 裕人, 数岡 孝幸, 舘 博, 藤本 尚志, 徳田 宏晴
（東農大・醸造）
44617017@nodai.ac.jp

【目的】トリクロサン（TCS）は，石鹸や化粧品等の殺菌剤として広く利用されてきた．しかし，水生生物への毒性や健康への悪影響に対する懸念から 2016 年に FDA（米国食品医薬品局）により使用が禁止され，わが国でも代替品への転換措置がとられるに至った．本研究は，担子菌利用による TCS 除去を目的に，優良菌株の検索，取得菌の TCS 除去特性の解明，ならびに TCS 除去用バイオリアクターの構築を試みたものである．【実験方法】（1）優良菌株の検索：当研究室保存菌（計 152 株）の培養液（PDB 培地を用い 30℃で 14 日間振盪培養）と TCS 溶液とを混合（混合後の TCS 濃度 1ppm）して穏やかに撹拌しながら 30℃で 24 時間保持し，液中の TCS 濃度の低下により優良菌を選抜した．（2）TCS 除去処理条件の検討：TCS 濃度，使用菌体量，処理温度・時間などを検討した．（3）TCS の定量：HPLC（カラム：Wakosil II 5C18HG，カラム温度：50℃，移動相＝メタノール：20mM リン酸溶液＝ 75：25，流量 0.8mL/min，検出器：SPD-6AV（λ ＝ 230nm）島津）によった．【結果】TCS 除去率が 90%以上となった菌株は 3 株（ベッコウタケ SKB015，タマチョレイタケ SKB020 および NBRC31332）であり，10ppm-TCS(水溶解度に相当)の除去も可能であった．TCS 除去の主たる要因を探索すると共に，不織布を担体として気相生育法※）により調製した固定化担子菌を用いる TCS の繰り返し回分除去を試みたところ，繰り返し 12 回，延べ 288 時間以上にわたり安定した TCS 除去を行うことができた．
【参考文献】※）Tokuda.*et al*.,*Food Preservation Science*, 44(2) 71-77 (2018).

Biological removal of triclosan using basidiomycetes

○Kazuma Yamaguchi, Hiroto Honma, Takayuki Kazuoka, Hiroshi Tachi, Naoshi Fujimoto, Hiroharu Tokuda
(Dept. of Ferment. Sci. Tokyo Univ. of Agric.)

Key words Triclosan, basidiomycetes, bioreactor

2Na05 塩素化エチレン類の加温による浄化促進における細菌群集の動態解析

○鈴木 市郎[1,2], 田 小維[2], 川村 美帆[1], 北村 岳[3], 山﨑 祐二[3], 小林 剛[2,4]
（[1]横国大院・理工, [2]横国大・リスク共生セ, [3]竹中工務店, [4]横国大院・環）
suzuki-ichiro-db@ynu.ac.jp

【緒言】塩素化エチレン類による地下水汚染等の生物学的浄化では，加温により微生物の生育や汚染物質の土壌からの脱離を促進することで浄化期間の短縮が期待できる．トリクロロエチレン(TCE)やシス 1,2-ジクロロエチレン(cDCE)を添加した培地に *Dehalococcoides* 属を含む集積培養系を植種し 15℃～35℃で培養した結果，TCE の脱塩素化速度定数は 30℃が最大であったのに対し，反応で生じたクロロエチレン(VC)の脱塩素化は 25℃で最大値を示した(1)．そこで，各温度における細菌叢の動態の違いを次世代シーケンスにより解析した．
【方法】培地に TCE または cDCE を添加した脱塩素化実験で経時的に採取したサンプルより DNA を抽出し，16S rRNA 遺伝子の V4 領域を含む約 250 bp を PCR で増幅し，Illumina MiSeq で塩基配列を解読した．Qiime で操作的分類単位(OTU)に振り分けたのち，優占度上位の OTU 群の割合の経時変化（動態）を Horn 指数を用いて比較し，類似した動態を示す OTU を階層的クラスタリングで分けてその動態をグラフ化した．
【結果】TCE，cDCE を用いた培養で検出された細菌群の OTUs のうち，優占度の上位を占める 821 OTUs をクラスタリングし，15 クラスターに分割した．25℃で増殖が極大を示したクラスターは 1 つで，その中に TCE から VC まで脱塩素化が可能な *Dehalococcoides* が含まれていた．一方，25-30℃で高い増殖を示した 2 つのクラスターには TCE の脱塩素化が報告されている *Deslfovivrio* の近縁種が含まれていた．これらの傾向は TCE，cDCE で大差なく，細菌叢の動態には添加した塩素化エチレンの種類よりも加温による影響が大きいことが判明した．

(1)Tian *et al*., Water and Environ. Technol. Conf. 2016 (WET2016), 3A-08 (2016).

Population changes of bacterial communities on thermally-enhanced biodechlorination of chlorinated ethenes.

○Ichiro Suzuki[1,2], Xiaowei Tian[2], Miho Kawamura[1], Gaku Kitamura[3], Yuji Yamazaki[3], Takeshi Kobayashi[2,4]
([1]Grad. Sch. Eng. Sci., Yokohama Natl. Univ., [2]CCSSR, Yokohama Natl. Univ., [3]Takenaka Corp., [4]Grad. Sch. Environ., Yokohama Natl. Univ.)

Key words bioremediation, volatile organic compound, *Dehalococcoides*, next generation sequencing

2Na06 ポリ塩化ビフェニル類汚染地区に棲息する嫌気性微生物に関する調査

髙塚 由美子[1], ○原 富次郎[1], 平野 竜行[2]
（[1]京大エネ研, [2]竹中工務店）
t-hara@iae.kyoto-u.ac.jp

ポリ塩化ビフェニル類 (PCBs) は，深刻な環境汚染を引き起こす難分解性の有機塩素化合物の一つである．我々は，大阪市内の PCBs 汚染原位置とその周辺域の自然浄化の一要因として，そこに棲息する微生物種を調査・解析し，PCBs の科学的自然減衰モデルの構築を最終目標に研究を進めている．本講演では，とりわけて PCBs を脱塩素化すると報告のある嫌気性微生物の集積について調査したので報告する．実験は，まず原位置とその周辺域に設けられた 4 本の井戸 （No.1，No.2，No.3，ピット外） から，微量な砂礫を含んだ揚水を，月 1 回，合計 6 回採取した．次に，採取した試料に PCBs 脱塩素化微生物が含まれることを確認するため，16S リボソーム遺伝子による系統分類解析を試みた．さらに，微生物による PCBs 脱塩素化反応は，テトラクロロエチレン (PCE) から塩素を離脱させる *Dehalococcoides* 属や *Dehalobacter* 属，*Desulfitobacterium* 属の細菌に認められることから，これらを取得するため，先の解析によってこれら細菌を含むと予断した試料へ，PCE や炭素源，電子供与体を添加した集積培養を試みた．以上の結果，系統分類解析から，*Dehalococcoides* 属は No.1 とピット外，*Dehalobacter* 属は No.1～No.3，*Desulfitobacterium* 属は 4 本全ての揚水井に棲息すると推定した．一方，集積培養の結果，No.1～No.3 の揚水井から *Desulfitobacterium* 属が増殖したことを，遺伝子レベルで確認した．本要旨の投稿時において，これら細菌種の低い増殖性の影響から，純粋培養までに至っていない．細菌を単離した後は，PCBs から塩素を離脱させるかどうか確認したい．

The investigation for anaerobic bacteria in sand-laden water from Polychlorinated biphenyls-contaminated sites.

Yumiko Takatsuka[1], ○Tomijiro Hara[1], Tatsuyuki Hirano[2]
([1]IAE, Kyoto Univ., [2]Takenaka Corp.)

Key words Polychlorinated biphenyls, Monitored Natural Attenuation, anaerobic bioremediation, dehalogenation

2Na07 水田土壌における生物的環境の解析

○荒木 希和子[1], Aziz Amin ABD[2], 久保 幹[1]
（[1]立命館大・生命科学, [2]立命館大院・生命科学）
kiwakosa@fc.ritsumei.ac.jp

【背景と目的】土壌環境には，その土の性質に加え，土地の利用方法が大きく影響する．継続的な管理が行われる耕作地では，人為的な管理体制の影響が大きい．耕作地の一つである水田では，耕作期に土壌を冠水させるため，一年を通じて土壌中の環境条件（水分量や好気・嫌気性）が変化する．一方，様々な作物に合わせた管理がなされる畑作地に対し，イネのみを繰り返し栽培する水田では，イネに特化した施肥管理が行われる．さらに，化学肥料や有機肥料，農薬といった使用する資材の違いも土壌環境に変化をもたらすと考えられる．本研究では，水田の土壌環境の特性を把握し，有機農法による適切な管理体系を確立することを目的とし，日本の水田土壌を解析し，畑土壌およびアジア諸国の土壌との比較解析を行った．
【結果と考察】日本各地の水田より採取した土壌を調べたところ，土壌中の炭素量は平均 15,100 mg/kg，窒素量は 1,050 mg/kg，細菌数は 3.1×10^{7}～4.0×10^{9} cells/g であった．畑土壌と比較して，炭素量と窒素量が少なく，微生物量が多いことがわかった．特に土壌が冠水されている時期に総細菌数が高かった．これは水田では資材投入量が少なく管理されていることが考えられる．また冠水することで，土壌細菌叢が調整され，窒素固定菌など嫌気性細菌を含む多様な微生物が維持されていることが示唆される．さらに窒素量が高いほど総細菌数が増加し，C/N 比のバランスが崩れると総細菌数と窒素循環活性 (硝化細菌の働き) が減少する傾向があった．一方，アジア諸国の水田土壌は炭素量が低いもしくは高い土壌に二分され，いずれの土壌でも総細菌数が低かった．このことから，水田では冠水環境で生育する微生物に適した有機施肥を行うことが，イネの有機栽培に重要であると考えられる．

Characterization of biological environments of paddy fields

○Kiwako S. Araki[1], ABD Amin Aziz[2], Motoki Kubo[1]
([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words soil bacteria, organic matter, paddy field, soil environment

2Na08 農薬が土地微生物へ及ぼす影響解析

○中村 明日香[1], 森田 涼斗[1], 荒木 希和子[2], 久保 幹[2]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]立命館大・生命科学）
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景と目的】単一の作物を栽培する畑土壌では，土壌中の微生物叢に偏りが生じやすく，作物に病害を与える病原菌や病害虫が増殖することがある．病原菌への対処法として，土壌を燻蒸するという方法が用いられている．土壌燻蒸法には，熱を用いる方法と燻蒸剤を用いる方法がある．燻蒸剤の継続的な使用は，土壌中の複雑な微生物群集に影響を及ぼし，生物多様性をより低下させることが懸念される．また，農薬の成分が土壌中で分解され，その過程で生じる中間分解産物が周辺の環境に影響を及ぼす可能性も考えられる．本研究では農薬が微生物に与える影響を調べるとともに，農薬に耐性のある微生物の分離・同定を目的とした．
【方法】30 年以上にわたり燻蒸剤が使用されていた土壌中の細菌数の測定を，スローステアリング法を用いて行った．次に農薬が細菌に与える影響を調べるため，3 種の農薬（クロルピクリン，DD 剤，ネマトリンエース）を 4 段階の濃度で，*Escherichia coli* JM109 と *Bacillus subtilis* (natto) TAKAHASHI を植菌した液体培地に添加し，培養した．培養後，寒天培地に培養液を塗布し生育を観察した．次に，農薬耐性菌株を単離するため，30 年以上にわたり土壌燻蒸が使用されていた土壌から微生物を単離し，DNA シークエンス解析を行い菌株の同定を行った．
【結果】農薬を長期的に使用した土壌中の細菌量は検出限界（6.0×10^{6} cells/g）以下であった．3 種の農薬の内，クロルピクリンと DD 剤を添加すると *E. coli* と *B. subtilis* 共に減少した．農薬の種類により単一菌株に対する影響は異なり，同一の燻蒸剤の場合でも細菌の種類により影響は異なることが考えられた．農薬耐性菌株を同定したところ，*Bacillus* 属細菌であることが明らかになった．この菌は，今後農薬のバイオレメディエーションに活用できる可能性がある．

Impact of long-term use of chemical substances on agricultural soil environment

○Asuka Nakamura[1], Ryo-to Morita[1], Kiwako S. Araki[2], Motoki Kubo[2]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words Agrochemicals, soil, microorganisms

2Na09 ATAD プロセスにおける未培養主要好熱細菌の分離および FISH 法による直接観察

○新井 智博, Tu Phuong Trang, 藤本 遼, 田代 幸寛, 酒井 謙二
（九大院・生資環）
kensak@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】 自家発熱型高温好気消化(ATAD)は，微生物群による有機物の好気的分解熱を利用して高温下で汚泥・し尿等を液肥に変換するプロセスである．理化学特性・微生物群集構造解析の変化追跡により，福岡県築上町で稼働する本プロセスはユニークな 3 段階で進行することを報告している(Tashiro et al., AEM, 2018)．特に，消化終期には，*Heliorestis baculata*^{T} に 84%と低い相同性を示す未培養細菌が主要菌となることが明らかとなったが，本菌の性状・機能は不明である．そこで本研究では，本細菌の分離および蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)法による直接観察を行い，その形状を明らかにした．
【方法】消化中・終期の液肥より調製した固体培地を用いて，消化終期の ATAD 試料から主要細菌の分離を 57°C で試みた．16S rRNA 遺伝子情報を基に目的細菌及び近縁種に特異的な FITC 蛍光プローブを設計した．FISH 法により染色した ATAD 試料をフローサイトメトリーで検出し，目的細菌の形状を蛍光顕微鏡で観察した．
【結果・考察】 固体培地では，消化中期の主要菌である *Geobacillus stearothermophilus* 類縁菌が分離できたが, 消化終期の目的細菌は分離されなかった．FISH 法により染色した消化終期の ATAD 試料をフローサイトメトリーに供した結果, FITC 由来の高強度蛍光ピークが検出され, 同時に, 高 FSC（forward scatter）および高 SSC（side scatter）を示した．さらに，蛍光顕微鏡観察により，ATAD 試料中のフロックから強い蛍光が観察された．以上の結果，設計したプローブは有効であり，目的細菌がフロックを形成して存在していると考えられた．現在，顕微蛍光マニピュレータを用いてフロックの液系分離を検討している．

Isolation of unculturable thermophilic bacteria in ATAD process and their detection by FISH method

○Tomohiro Arai, Phuong Trang Tu, Ryo Fujimoto, Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai
(Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

Key words autothermal thermophilic aerobic digestion, closest species to *Heliorestis baculata*^{T}, FISH, isolation

2Na10 白色腐朽菌-細菌共培養系におけるアセタミプリドの分解

○大野 遥[1], 森 智夫[2], 河岸 洋和[2,3,4], 平井 浩文[2,3]
（[1]静大院・総合農, [2]静大・農, [3]静大・グリーン研, [4]静大・創科技院）
hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp

世界で広く使用されている殺虫剤の一つであるネオニコチノイド系殺虫剤（NEOs）は，1990 年代に開発された比較的新しい農薬である．NEOs はニコチン性アセチルコリン受容体のアゴニストであり，昆虫の中枢神経系を撹乱することによって選択的な生物学的毒性を発揮する．最近では，その残効性や植物浸透移行性に由来する環境に対する悪影響やヒトへの影響が懸念されており，すでに EU では NEOs に対する規制が実施されている．そのため NEOs 汚染環境の浄化・無毒化技術の開発は喫緊の課題である．
我々はこれまでに白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株によって，種々の NEOs が分解可能であり，その分解反応にシトクロム P450（CYP）が関与していることを報告している．一方で，同属の *P. chrysosporium* も ACE を 6-chloro-3-pyridinemethanol（IM 0）へと分解可能であり，*P. chrysosporium* 由来 CYP 酵母異種発現機能スクリーニングシステムにより，この分解反応には CYP5147A3 が関与していることを明らかにした．以上の様に，白色腐朽菌は NEOs の側鎖構造の変換には優れているものの，完全分解を考えた場合，NEOs の複素環構造を分解可能な細菌との共培養系の確立が必要となってくる．そこで，*P. chrysosporium* による ACE の完全分解を目的に，自然界より IM 0 を単一炭素源として生育可能な細菌を単離し，*P. chrysosporium* と共培養を行った結果，ACE 分解を促進あるいは抑制する細菌が得られた．現在，ACE 分解を促進する機構について解析中である．

Degradation of acetamiprid by co-culture of white-rot fungi and bacteria

○Haruka Ono[1], Toshio Mori[2], Hirokazu Kawagishi[2,3,4], Hirofumi Hirai[2,3]
([1]Grad. Sch. Agric., Shizuoka Univ., [2]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words white-rot fungi, bioremediation, coculture, neonicotinoid

2Na11 回転型スラリーバイオリアクタを用いた高濃度 A 重油汚染土壌の浄化

○三好 佑奈[1], 浦田 智宇[1], 岡田 丈[2], 新谷 政己[1], 金原 和秀[1]
（[1]静大院・総合科技, [2]静大・工）
kimbara.kazuhide@shizuoka.ac.jp

【背景と目的】油類の流出による土壌汚染は，近年大きな問題として取り上げられ，その解決方法として，分解微生物を投入するバイオオーグメンテーションがある．本手法は，低コスト，低環境負荷とされている一方，浄化に必要な期間が予測できないなど確実性が低いとされている．我々は，燃料油の一種である A 重油で汚染された土壌の効率的浄化法の開発を行っており，*Rhodococcus erythropolis* に属する 2 種の油分解菌，菌株 A，C（「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」適合確認済）を用い汚染土壌中の A 重油分解を報告している．本研究では，高濃度の A 重油で汚染された実汚染土壌の高速処理を目指し，回転型スラリーバイオリアクタを用いた浄化法の開発を行った．
【方法】ドラム型リアクタを用い，赤玉土 180 g，芝目砂 120 g，無機培地 200 mL を混合したモデルスラリーを調製した．そこに菌株 A，C を約 3.0×10^{8} cells/g-slurry となるよう接種し，A 重油を終濃度 2500，5000 mg/kg-slurry で加え，15°C の低温条件下で分解試験を行い，2 日毎に A 重油残存濃度および菌数の測定を行った．また，分解菌を接種せずに回転させた試料や，分解菌を接種して回転させない試料を準備して対照実験を行った．並行して使用したモデル土や水などから土着の A 重油分解菌の単離を試みた．
【結果と考察】A 重油濃度 2500 ならびに 5000 mg/kg とした試料において，分解菌を接種し，リアクタを回転させることで，それぞれ 96 h までに約 98%，144 h までに約 91%の A 重油が分解された．対照実験の結果と比べると，分解菌の接種と，リアクタの回転によって，A 重油分解の速度・効率が促進したことが示された．なお分解菌を接種しない条件でも 6 日後に分解が認められた．使用したモデル土・水から A 重油分解菌が単離されたことから，土着の分解菌が A 重油分解に寄与したと考えられた．

Remediation of contaminated soil by high concentration A-fuel-oil with rotated slurry bioreactor

○Yuna Miyoshi[1], Tomotaka Urata[1], Joh Okada[2], Masaki Shintani[1], Kazuhide Kimbara[1]
([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Fac. Eng., Shizuoka Univ.)

Key words rotated slurry bioreactor, bioaugmentation, A-fuel-oil, oil degrading bacteria

2Na12 下水処理施設におけるバルキング関連糸状性細菌 *Kouleothrix* の季節変動とその影響因子

○鈴木 康太[1], 新田見 匡[1], 小林 稔真[1], 笠倉 理紗[1], 武田 穣[1], 小柴 佑介[1], 福田 淳二[1], 鈴木 市郎[1], 飛野 智宏[2]
（[1]横国大院・工, [2]東大院・工）
nittami@ynu.ac.jp

【背景と目的】糸状性細菌により誘引される活性汚泥のバルキングは，廃水処理施設の運転管理における未解決問題の一つである．我々の先行研究において，横浜市の複数の下水処理施設では，夏季に糸状性細菌 *Kouleothrix* の存在量と活性汚泥の沈降性との間に正の相関がみられ，*Kouleothrix* がバルキングの原因となっている可能性が示唆された．本研究では両者の関係を年間を通して確認するとともに，下水処理施設の水質・運転管理データを解析し，*Kouleothrix* の増減に影響を与える因子を探索することを目的とした．
【方法】横浜市内の都市下水処理施設 A において，処理方式の異なる 2 系列（系列 1, 2）より活性汚泥試料を採取した．各試料 1 mL から DNA を抽出し，既報の real-time PCR 法により *Kouleothrix* の 16S rRNA gene のコピー数を定量した．得られた *Kouleothrix* のコピー数のデータを下水処理施設の水質・運転管理データとともに偏相関分析に供した．
【結果と考察】系列 1 では年間を通して遺伝子コピー数と活性汚泥の沈降・濃縮性指標である SVI に大きな変化はなく，両者の関係は不明瞭であった．一方系列 2 においては遺伝子コピー数と SVI が類似した増減挙動を示した．両系列のコピー数と SVI との関係について季節ごとに分けて相関分析を行ったところ，系列 2 の夏季から秋季において両者に強い正の相関があることを確認した．系列 2 では *Kouleothrix* の増殖に影響を与えていた因子を特定するため, *Kouleothrix* の遺伝子コピー数，および下水処理施設の水質・運転管理データを用いて偏相関分析を行った．その結果，遺伝子コピー数は生物反応槽の汚泥滞留時間および最初沈殿池越流水中の浮遊物質量と強い正の相関を示した．

Seasonal variation of bulking-causing filamentous bacteria *Kouleothrix* in a municipal wastewater treatment plant and its influential factors

○Kota Suzuki[1], Tadashi Nittami[1], Toshimasa Kobayashi[1], Risa Kasakura[1], Minoru Takeda[1], Yusuke Koshiba[1], Junji Fukuda[1], Ichiro Suzuki[1], Tomohiro Tobino[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words activated sludge, bulking, filamentous bacteria, *Kouleothrix*

2Oa01 iPS 細胞の分化能に対するフローサイトメトリー法の考察

○藤本 舜, 岡野 健太郎, 金 美海, 紀ノ岡 正博
（阪大院・工）
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】iPS 細胞の創薬支援や細胞治療への応用に向けて，より多くの均質な細胞を得る培養手法の開発が必要である．培養手法の開発と平行して，培養中の細胞の状態を評価する手法を構築することが重要である．フローサイトメトリー（FCM）はヘテロな細胞集団をシングルセルで解析することが可能な点から一般的な評価方法である．しかし，機器の感度設定や蛍光補正，対象とする細胞集団のゲーティングといった測定者の主観に依存した誤差が存在することや抗体反応を用いるため目的細胞を分離できる反応条件を検討する必要があることが課題となっている．本研究では FCM の性能及び限界に着目し，iPS 細胞の未分化性と分化能の評価における有用性を考察する．
【方法と結果】ヒト iPS 細胞を StemFit 培地とラミニン 511-E8 フラグメントでコートした培養面上で培養を行い，未分化マーカー（SSEA4, TRA-1-60, OCT3/4）の発現を FCM にて解析した．FCM 分析のヒストグラムでの解析を行う際，非特異性な吸着によるバックグラウンドを除くために，陰性コントロール（アイソタイプコントロール）を用いるが，OCT3/4 においては陰性コントロールのヒストグラムと完全に分離できなかった．このことから，より精度の高い測定を行うため，反応条件（抗体濃度，温度，時間など）の最適化を行い，目的細胞の蛍光の感度を調節する必要があることが分かった．一方，分化誘導培養における細胞集団の定量評価のためには，未分化性と分化能を特徴づける細胞表面マーカーと細胞内マーカーの組み合わせによる表現型を同定する必要があるため，細胞表面マーカーと細胞内マーカーの特徴（細胞内での位置，他の分子との関係，安定性）を考慮し，FCM にて解析する必要があると考えられた．今後は，細胞培養工程にて，培養特性と細胞特性の変動による未分化性と分化能への影響を検討する．

Consideration of the flow cytometry analysis for the differentiation potential of induced pluripotent stem cells

○Shun Fujimoto, Kentaro Okano, Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words human induced pluripotent stem cell, flow cytometry, differentiation potential

2Oa02 タッピング剥離操作におけるヒト iPS 細胞の応答評価

○山本 航平 [1], 澤川 史明 [2], 堀口 一樹 [1], 越田 一朗 [2], 紀ノ岡 正博 [1]
（[1]阪大院・工, [2]澁谷工業）
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景及び目的】ヒト iPS 細胞を用いた再生医療の産業化において，品質にばらつきのない細胞製品を安定して製造することは重要である．そのためには，再現性の高い培養工程の設計・最適化が求められるが，iPS 細胞の培養は主に手作業で行われており，再現性に乏しい．そこで，本研究では継代工程における剥離操作に着目し，機械的に物理的衝撃を与える装置を用いて培養容器に再現性よく衝撃加速度を加え，細胞を慣性力によって剥離する系を設計した．この装置を用いて様々な衝撃加速度・衝撃回数でタッピングして細胞を剥離し，細胞回収率および回収された細胞の活性を評価した．
【方法及び結果・考察】ラミニン 511 フラグメント (iMatrix-511) コート上で継代培養したヒト iPS 細胞 (1383D2 株) を，ROCK 阻害剤 (Y-27632) を含む EDTA およびトリプシン様酵素 (TrypLE select) を用いて酵素処理した．その後，衝撃装置を用いて容器を打撃することで細胞を剥離し，浮遊した細胞を回収した．その後，細胞を iMatrix-511 コート上に再播種して 96 h まで培養し，播種してから 24 h における細胞接着率および 24 h から 96 h までの比増殖速度を算出した．その結果，細胞に加える慣性力および回数を増加させることで，剥離された細胞数は増加し，再播種後の細胞接着率は増加したが，比増殖速度には影響しないことが明らかとなった．以上から，タッピングによる慣性力を用いた剥離法は，細胞の接着能力を維持しつつ，細胞を効率よく剥離回収できる手法であることが示唆された．

Evaluation of cell response in tapping procedure during passaging

○Kohei Yamamoto[1], Fumiaki Sawakawa[2], Ikki Horiguchi[1], Ichiro Koshida[2], Masahiro Kino-oka[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Shibuya Corp.)

Key words human induced pluripotent stem cell, dissociation, tapping, inertial force

2Oa03 インクジェット技術による超瞬間細胞凍結保存法の hiPS 細胞への応用

○渡部 広機 [1], 瀧澤 秀世 [1], 山田 茂 [2], 諫田 康成 [2], 秋山 佳丈 [1]
（[1]信州大・繊維, [2]国立医薬食衛研）
aki@shinshu-u.ac.jp

細胞生物学研究において，細胞凍結は必要不可欠な技術である．従来の細胞凍結法では，DMSO やグリセロール等の凍結保護剤の添加が必須であった．しかし，これらの凍結保護剤は，一般に細胞毒性を有しており，操作者の熟練度によっては多くの細胞が死滅する可能性もある．特に，ヒト人工多能性幹細胞（hiPS 細胞）を含む幹細胞においては，DMSO が分化因子として作用してしまう問題も存在している．これまでに，我々は，インクジェット技術を用いて細胞をこれまでになく高速で冷却することで，超瞬間的に凍結できる装置を開発した．本装置では，インクジェットにより細胞を微小液滴中に内包し，液体窒素で冷却した基板に吐出する．これにより，冷却速度を飛躍的に向上させ，凍結保護剤を用いることなく，細胞に損傷を与える氷晶の生成・成長を抑制することができる．そして，本装置により，マウス繊維芽細胞 NIH-3T3 を凍結保護剤無しで凍結後融解したところ，80%以上の生存率が得られている．本研究では，凍結保護剤無添加での hiPS 細胞凍結保存手法確立に向けて，超瞬間凍結法の適用可能性について検討した．hiPS 細胞の懸濁液をインクジェットヘッドにより約 40pL の液滴として，液体窒素で冷却したガラス基板に吐出し凍結した．この細胞を融解し，Calcein および PI 染色により生存率を求めたところ，約 20%であった．以上から，生存率は十分でないものの，hiPS 細胞を凍結保護剤フリーで凍結保存できる可能性を見出せた．今後，液滴の微小化による冷却速度の向上や ROCK 阻害剤によるアポトーシスの抑制などによりに生存率の向上を目指したい．

Attempt of hiPS cell cryopreservation by ultra-flash freezing method based on inkjet printing

○Hiroki Watanabe[1], Hideyo Takizawa[1], Shigeru Yamada[2], Yasunari Kanda[2], Yoshitake Akiyama[1]
([1]Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ., [2]Natl. Inst. Health. Sci.)

Key words Cryopreservation, Ink jet printing, hiPS cells

2Oa04 希少細胞の連続的化学処理を可能とする多段階溶液交換プロセッサーの開発

○穆 廷林, 豊田 一, 山田 真澄, 関 実
（千葉大院・融合）
m-yamada@faculty.chiba-u.jp

【背景と目的】末梢血幹細胞や血中循環がん細胞のような生体内の希少細胞の性質を解析することは，病態の解明や新たな治療法の開発などにつながると期待されている．細胞の性質を解析するためには，細胞内部の特定の分子や器官を特異的に染色することが必須となる．通常，遠心分離によって溶液交換操作を繰り返すことで，複数種の溶液による多段階の化学処理が行われている．しかしながら，溶液交換操作を繰り返すうちに細胞回収率が徐々に低下してしまうため，希少な細胞を効率的に処理する上で問題があった．そこで本研究では，マイクロ流路層流系を利用して，複数回の細胞処理液の交換を連続的に行うことで，細胞をロスすることなく高効率に処理する新規システムの開発を目的とした．
【方法】ソフトリソグラフィーおよびレプリカモールディングを用いて，PDMS-ガラス製のマイクロ流体デバイスを作製した．デバイス内における細胞処理のモデルとして，phalloidin および Hoechst33342 を染色剤として用いた細胞骨格および細胞核の二重染色を行なった．JM 細胞（T 細胞株・非接着性）の懸濁液，固定剤，透過処理剤，染色剤，および洗浄液をそれぞれシリンジポンプによって導入し，流路内で 4 回溶液交換し，連続的に細胞処理を行なった後，主流路の下流出口から得られた溶液中に含まれる細胞数をカウントし，蛍光顕微鏡観察を用いて細胞を観察した．
【結果と考察】送液終了後に主流路の下流出口から回収された細胞を観察したところ，細胞骨格および細胞核が染色されていることが確認された．また，細胞回収率は 99±17%（n=3）であり，導入した細胞のほぼ全てを回収することができた．本研究で開発したマイクロ流体システムは，高効率な細胞処理を可能とするため，基礎医学研究や臨床検査などにおいて有用なツールとなることが期待される．

Development of multistep fluid-exchange processors for continuous chemical treatment of rare cells

○Tinglin Mu, Hajime Toyoda, Yamada Masumi, Seki Minoru
(Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ.)

Key words microfluidic device, hydrodynamic filtration, cell processing

2Oa05 低温処理が脂肪代謝およびベージュ脂肪細胞への分化に及ぼす影響

○塩見 尚史, 冨士原 由貴, 渡邊 桂子
（神戸女学院大・人間科学）
n-shiomi@mail.kobe-c.ac.jp

【目的】褐色脂肪細胞は，糖や脂肪の分解が非常に早く，これらの細胞へ分化誘導を行うことが，2 型糖尿病の有効な治療手段として期待されている．その分化誘導の手段のひとつが低温処理で，低温環境下では，脳からノルアドレナリンが分泌され，褐色脂肪細胞への分化誘導が促進すると考えられている．しかし，その詳細はよくわかっておらず，低温刺激が細胞に及ぼす影響については，ほとんど明らかにされていない．そこで，本研究では直接的な低温刺激が褐色およびブライト脂肪細胞への分化に及ぼす影響について調べた．
【結果および考察】マウス筋芽細胞 C2C12 を，4℃，16℃にしておいた培地と素早く交換し，その温度で培養することで低温刺激を与えた．その後，即座にm RNA を精製し，リアルタイム PCR により遺伝子発現を調べた．その結果，1 時間の低温刺激により，PRDM16，UCP1 などの褐色脂肪細胞に分化誘導を促す遺伝子が誘導され，その値はノルアドレナリンによる刺激よりも高かった．そして，糖代謝関連遺伝子やミトコンドリアの量も増加した．さらに，この低温刺激を繰り返すことにより褐色脂肪細胞へ分化することを試みたが，UCP1 が発現せず，褐色脂肪細胞へは分化しなかった．一方，白色脂肪細胞 3T3-L24 を 4℃，1 時間で低温処理した場合も，同様に褐色脂肪細胞に分化誘導を促す遺伝子が誘導された．この低温刺激を繰り返し，ベージュ脂肪細胞へ分化することを試みた結果，UCP1 が発現したブライト脂肪細胞が得られた．以上のことから，低温環境下では，細胞は緊急措置として自らが熱を発生して細胞を守る機構が備わっていること，脂肪細胞が低温刺激によりベージュ脂肪細胞に分化することを見いだした．

Effects of cold temperature on elimination of fat and differentiation to beige adipocytes

○Naofumi Shiomi, Yuki Fujiwara, Keiko Watanebe
(Dept. Hum. Sci., Kobe Coll.)

Key words beige adipocytes, low temparature, UCP1

2Oa06 骨格筋細胞ゲルアクチュエータの量産に向けた電気刺激培養システムの構築

○中野 翔太, 瀧澤 秀世, 秋山 佳丈
（信州大・繊維）
aki@shinshu-u.ac.jp

近年，マイクロマシニング技術の発展により，マイクロマシンの開発が進んでいる．マイクロマシンの省エネルギー，省スペースを達成するためには駆動要素であるアクチュエータの高エネルギー効率化，小型化の必要がある．そこで我々は筋細胞や筋組織に着目し，これらをバイオアクチュエータとして活用するために研究を進めている．バイオアクチュエータの一つとして骨格筋ゲルアクチュエータがあるが，一般に骨格筋ゲルの収縮力は，数十 μN と微小なデバイスの駆動源としても不十分である．より大きい収縮力を出せるようにするためには筋芽細胞をより分化させる必要がある．これまでに，培養中の筋芽細胞は電気刺激を与えることにより分化が促進されることが報告されている．本研究では，より大きい収縮力をもった骨格筋ゲルアクチュエータを量産するために電気刺激培養システムを開発する．電気刺激は，LabVIEW（ナショナルインスツルメンツ社）を用いてアナログ波形を生成し，それをアンプにて増幅することで行った．これにより，任意のパルス幅と電圧のバイポーラーパルスを印加することができた．培地交換は，培地交換システム（高砂電気工業株式会社）にて行った．骨格筋ゲルは，マウス筋芽細胞 C2C12 を，マトリゲルを含むコラーゲン typeI のゲルに懸濁することで得た．分化培地には DMEM + 7 %ウマ血清を用いた．本装置を用いて骨格筋ゲルアクチュエータを長期間培養し，その収縮力を評価した．今後，この装置を用いて，より収縮力の大きい骨格筋ゲルアクチュエータの製作に適した電気刺激条件の決定に向けて，研究を進めて行きたい．

Electrical stimulation culture system toward masss production of skeletal muslce gel actuators

○Shota Nakano, Hideyo Takizawa, Yoshitake Akiyama
(Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ.)

Key words tissue engineering, bioactuator, bioMEMS

2Oa07 形態的逸脱 iPS コロニーの生物学的プロファイル解析

○吉田 啓 [1], 長坂 理紗子 [1], 館野 浩章 [2], 小沼 泰子 [2], 伊藤 弓弦 [2], 蟹江 慧 [1], 加藤 竜司 [1]
（[1]名大院・創薬, [2]産総研）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

iPS 細胞は，再生医療や創薬研究において幅広い可能性を秘めた有用なツールとして期待されている．近年では，iPS 細胞の産業応用に向けて，最先端の工学的技術を導入し，iPS 細胞を効率的かつ高い再現性をもって拡大培養するための細胞製造技術の開発が進んでいる．これまでに我々のグループでは，細胞の位相差顕微鏡画像から得られる iPS コロニーの形態情報を用いて，情報解析と組み合わせることによって，iPS 細胞の製造プロセスを最適化するための技術開発を行ってきた．長期にわたり iPS コロニーの形態は，未分化状態から分化状態への移行などの細胞の生物学的変化を反映する重要な指標であると考えられていたが，その評価は人間の判断に依存するものであった．今回我々は，iPS コロニー形態の詳細な定量分析によって，技術的な培養の結果として増加する可能性のある「通常状態を僅かに脱した iPS コロニー（逸脱 iPS コロニー）」を見出すことに成功した．本研究は，画像ベースのスクリーニングとクローニングを用いて日常の培養で生じうる逸脱クローンのプロファイルを定義し，画像評価による全コロニーのモニタリングの重要性を示唆するものである．

Characterization of morphologically irregular iPS colonies

○Kei Yoshida[1], Risako Nagasaka[1], Hiroaki Tateno[2], Yasuko Onuma[2], Yuzuru Ito[2], Kei Kanie[1], Ryuji Kato[1]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]AIST)

Key words human induced pluripotent stem cell, cloning, deviated cell state, colony morphological analysis

2Oa08 画像情報解析を用いた iPS 細胞製造機械化における振動ストレスの評価

○酒井 徹平, 今井 祐太, 吉田 啓, 蟹江 慧, 加藤 竜司
（名大院・創薬）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

近年の再生医療における産業化の加速と共に，細胞製品としてヒト細胞を大量製造する細胞製造加工技術の重要性が高まっている．医療に用いられる細胞製品において，その品質管理は治療の安全性および有効性を左右する重要な課題であるが，現在まだ培養工程において細胞品質に影響を与える因子はまだ未解明なものが多く，工学的な影響因子の定量と理解が望まれている．
細胞製品の産業的な安定製造の実現に向けて，培養の機械化・自動化技術の導入に期待が集まっている．細胞培養の機械化では，従来人間が行っていた培養操作を機械的操作に置き換えていくことが望まれるが，どのようにパラメータや条件を設定するか明確な基準が無い．これは，人間が行っていた作業そのものの影響力の大きさが定量化来なかったためであり，「どれだけ繰り返してよいか」「ストレスとして閾値を超えていないか」などが理解されていないためである．我々はこれまで，リアルタイムに得られる顕微鏡画像を解析することで induced pluripotent stem (iPS) 細胞の大量製造における「環境因子の影響」を評価することが可能なことを示してきている．本研究では，培養機械化によって細胞に伝わる「振動」のストレスを，自動操作キャリブレータを用いて定量化し，その細胞への経時的な影響を画像情報解析により定量的に評価を行ったのでこれを報告する．

Image-based assessment of vibration stress in mechanization of iPS cell culture

○Teppei Sakai, Yuta Imai, Kei Yoshida, Kei Kanie, Ryuji Kato
(Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

Key words cell morphology, iPS cell, image-based assesment, quality control

2Oa09 細胞形態情報解析による培養面コーティング剤のプロファイリング

○藤谷 将也, 蟹江 慧, 加藤 竜司
（名大院・創薬）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

再生医療用の細胞培養において，培養容器表面の機能性分子によるコーティングは，培養細胞の接着向上だけでなく，未分化・分化性能の維持や制御のために極めて有効である．しかし同時に，コーティング剤は高価であることが多いため最適な利用量・方法の検討は安定な培養に重要である．しかし，自らの細胞培養において，最適化や標準化，動物性由来分子の排除，コストダウンなどをしたいと考えたとき，培養面コーティング条件の網羅的最適化は極めて難しい．まず，コーティングのための分子にはあまりにも多種多様なものが存在しており，比較すべき条件が多すぎる．また，例え同じタンパク質由来の分子や同一タンパク質を含む試薬であっても，分子量の均一性・精製度・由来組織の違いなどの差が存在し，時にそれは培養性能に大きく影響する．さらに，コーティング対象である培養容器は，同じポリスチレン素材の細胞培養用容器であったとしても，各社表面性状は僅かに異なり，その差異は数量的に特定・比較が困難であるため，容器との相性までを含めると最適化には膨大なコストと労力を要してしまう．筆者達はこれまで顕微鏡画像中の細胞形態の変化を情報として，培養環境や培養性能の定量的比較を行う手法を開発している．本発表では細胞形態プロファイルを用いた，簡便・安価かつ高速なコーティング性能の定量的評価方法を開発したのでこれを報告する．

Morphology-based profiling of culture condition for optimization of stem cell culture

○Masaya Fujitani, Kei Kanie, Ryuji Kato
(Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

Key words image-based evaluation, cell morphology, mesenchymal stem cell, transcriptome

2Oa10 画像情報解析技術を用いた 3D 培養がん細胞におけるヘテロ性解析

○渋田 真結 [1], 加藤 寛人 [1], 田村 磨聖 [2,3], 日下部 涼子 [4], 蟹江 慧 [1], 松井 裕史 [4], 金森 敏幸 [3], 柳沢 真澄 [5], 杉浦 慎治 [3], 加藤 竜司 [1]
（[1]名大院・創薬, [2]阪大・核物理研, [3]産総研, [4]筑波大, [5]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腫瘍内の未知な細胞を検出・分類・評価することは難しく，腫瘍ヘテロ性やがんの特性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，細胞アッセイで見られた薬効が in vivo 評価や臨床現場における治療効果を反映しにくいという問題もあった．近年の研究にて，生体内組織の機能性を in vitro で再現できる 3 次元培養法が着目され，三次元培養凝集塊（スフェロイド）の形態と細胞増殖性や薬剤感受性との関連が報告されるなど，診断技術としても着目された．しかし，高いスループット性を維持しながら非侵襲的に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，細胞画像情報解析技術を用いて，形態情報に基づくがん細胞分類法を考案し，表現型による未知の細胞集団の分類を試みた．本研究では，このような 3 次元培養された細胞塊におけるヘテロ性や機能解析を，細胞が生きた状態で定量評価し，これらをクローニングすることでより詳細なメカニズム解明を行うツールの一つとして，3 次元細胞集塊の画像解析技術の有効性について検証した．

Image-based evaluation of heterogeneity in 3D cultured cancer cells

○Mayu Shibuta[1], Hirohito Kato[1], Masato Tamura[2,3], Ryoko Kusakabe[4], Kei Kanie[1], Hirohumi Matsui[4], Toshiyuki Kanamori[3], Masumi Yanagisawa[5], Shinji Sugiura[3], Ryuji Kato[1]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]RCNP, Osaka Univ., [3]AIST, [4]Univ. Tsukuba, [5]ESCO)

Key words Cancer heterogeneity, Image analysis, 3D culture, Spheroid morphology

2Oa11 画像情報解析を用いたスフェロイド培養環境プロファイリング

○山本 涼平, 渋田 真結, 蟹江 慧, 加藤 竜司
（名大院・創薬）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

近年，再生医療における組織構築や創薬探索の現場において，生体内の立体構造や機能性を模倣した培養方法として三次元培養法が着目されている．三次元培養法には浮遊培養やハイドロゲル，高分子化合物などの足場材料を用いた培養系，液滴内培養系など多様な培養方法が研究されている．しかし，三次元培養により構築された細胞凝集塊(スフェロイド)は，その培養方法や製作者，培養中の品質管理方法などの違いによりその機能性（品質）が異なることが指摘されている．よって同品質なスフェロイドを大量生産し，細胞治療や研究モデルとして安定して利用するためには，個々のスフェロイド品質を安定化させる培養環境を非侵襲的に評価する必要があるが，これまで有効な非破壊的評価法はまだ少なかった．
我々は，非侵襲的なスフェロイド評価技術として細胞画像情報解析技術に着目し，画像情報を利用した非破壊的な品質評価法の開発を目指した．本研究では，治療や組織構築におけるスフェロイド製造を想定し，細胞製造などで検証が必要になると考えられる培養条件を比較し，その増殖性・遺伝子発現などの生物学的な評価と画像情報解析により取得したスフェロイドの形態情報と関連付けることで，スフェロイド安定形成のための培養環境評価の開発を行ったのでこれを報告する．

Image-based profiling of spheroid culture conditions

○Ryohei Yamamoto, Mayu Shibuta, Kei Kanie, Ryuji Kato
(Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

Key words 3D culture, spheroid, cell quality control, image analysis

2Oa12 3 次元構造体 Stroid を用いた細胞挙動の研究

○犬伏 祐作 [1], 伊田 寛之 [2], 立花 亮 [1]
（[1]阪市大院・工, [2]新田ゼラチン株式会社・総合研究所）
tatibana@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

[背景]生体組織，臓器は 3 次元構造体である．それらは多数かつ多種類の細胞や物質が集まって構成されており，また，細胞群は絶妙に配置されている．細胞同士は同種異種を問わず，細胞間コミュニケーションを行っており，その結果，3 次元構造体全体として機能が発揮されている．今まで細胞に対する物質の影響は平面培養を用いて研究が行われてきた．しかし，生体内では本来細胞は 3 次元に配置され，様々な物質と相互作用を行っていることを考えると平面培養では十分ではないと考えられる．3 次元培養を行うことで，細胞の本来の機能が発揮されることも知られている．近年，3 次元構造体として，オルガノイドを形成させる系での研究や細胞シートの積層させる方法が考案されてきた．そこで，今回我々は 3 次元細胞環境における細胞挙動を研究するための単純簡便な方法を考案した．
[方法と結果]内径 500 μm のシリコンチューブにゼラチン含有細胞懸濁液を入れた．その後，シリコンチューブから細胞塊を押し出すことによって，3 次元構造体を作製した．この時，縫合糸を共存させておき，構造体作製後に除去すると，その部分に貫通した穴ができた．すなわち，ストロー状の 3 次元細胞構造体 Stroid(straw + spheroid）を得た．また，Stroid の中空部に別種の細胞や様々な物質を導入することもできた．Stroid など 3 次元細胞構造体は非接着プレート上で構造を保ったまま培養が可能であった．この方法の応用例として，がん細胞の Stroid の内部に脂肪細胞を導入し，3 次元細胞間コミュニケーションを観察した．結果，脂肪細胞を導入したものではがん細胞 Stroid の崩壊が見られた．以上より，3 次元構造体 Stroid を用いて細胞挙動の研究が行えるようになった．

Fabrication of 3D structure ‘’straw-like spheroids” for cell behavior research

○Yusaku Inubushi[1], Hiroyuki Ida[2], Akira Tachibana[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ., [2]Res. Development Center Nitta Gelatin Inc.)

Key words spheroid, 3D culture, gelatin, cell-cell interactions

2Cp01 脱脂粉乳と豆乳で培養した乳酸菌の増殖と酸耐性の比較

○オウ カン, 西野 智彦
（東京工科大院・バイオニクス）
nishino@stf.teu.ac.jp

【背景と目的】
現在，市場に流通しているヨーグルトは一般的に脱脂粉乳を発酵させて作られている．しかし，近年は豆乳を発酵させて作られたものも流通している．脱脂粉乳と豆乳は成分が大きく異なるため，これらを栄養源として増殖する乳酸菌は，異なる性質を持つのではないかと考えられる．
本研究では，乳酸菌が「プロバイオティクス」として効果を発揮するために必要な酸耐性を脱脂粉乳で培養した乳酸菌と豆乳で培養した乳酸菌間で比較した．
【方法】
Lactobacillus casei NBRC15883 を用いて作成したヨーグルト（培養温度 30℃）のｐＨ，滴定酸度，生菌数と酸耐性を測定した．培地 pH が約 4 となった時点で培養を終了し，人工胃液（pH1.2）に 37℃，30 分間処理した後の生残菌数を測定することで酸耐性を評価した．
【結果と考察】
豆乳で培養した乳酸菌は脱脂粉乳で培養した時より増殖が速かった．酸耐性は豆乳で培養した乳酸菌のほうが 30 分処理時では 10 倍以上高い生残菌数を示した．このように，豆乳で培養した乳酸菌のほうが増殖，酸耐性が優れていたことから，脱脂粉乳に豆乳を混合した条件で検討を行った．その結果，豆乳を脱脂粉乳に 10%混合するだけで酸耐性が高くなることが分かった．現在，豆乳に含まれるタンパク質，脂質，糖質などの成分を脱脂粉乳培地に添加することで，有用な成分の特定を試みている．

Growth and acid resistance of Lactic acid bacteria grown in the skim milk and the soy milk.

○Han Wang, Tomohiko Nishino
(Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol.)

Key words lactic acid bacteria, acid tolerance

2Cp02 凍結耐性を有する醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* を用いたパンの物性調査

○森本 一輝, 小西 正朗
（北見工大）
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

背景:冷凍生地製パン法は製パン時の作業の軽減化や少量多品種生産に向いているため,利用が進んでいるが,生地の凍結により酵母が凍結障害を受け損傷・死滅し,パンの風味や食感の低下,発酵不足になる場合がある．より安定した冷凍パン法による製造には凍結に強い酵母が求められる．我々が環境中から分離した醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* SRT88 株は食経験があり,通常のパン酵母の 12 倍の凍結耐性を持つことが分かっている．SRT88 株の凍結生地製パン法への適用性を評価するため,凍結前後での発酵量の評価ならびに,焼成後のパンの硬さ,揮発成分の変化について評価した．
方法:比較対象として,市販のドライイーストを用いた．パン生地は,ホームベーカリーで調製し,混錬後,1 時間 1 次発酵した．1 次発酵後の生地を-30 ℃で 1~2 週間保存した．冷蔵庫で一晩解凍後,二次発酵量を体積変化で評価した．焼成サンプルは 1 時間の二次発酵後に焼成した．焼成後,パンの高さ・硬さを測定した．硬さの測定方法は,AACC 法を用いた．揮発成分は固相マイクロ抽出法を用いた GC-MS により分析した．
結果・考察:凍結前後の発酵量は,凍結 2 週間後ドライイーストの場合,未凍結と比べて 70.1％減少したのに対して,SRT88 株の発酵量は 6.4％減少した．SRT88 株はパン生地内でも高い凍結耐性を示した．パンの硬さは,ドライイーストを用いた場合,1 週間の凍結で CFV 値が 0.875N から 1.68N まで増加したが，2 週間で 1.44N まで減少した．ドライイーストは発酵力が強いため,凍結しない場合,柔らかいが,凍結により硬化し,長期間の凍結では細胞内成分の溶出による軟化が認められた．一方 SRT88 の場合,発酵力の弱さから,当初の CFV 値は 1.17N であったのに対して,2 週間の凍結で徐々に硬化する傾向が認められた．揮発成分分析では,SRT88 株を用いた場合,ドライイーストとよりアルコール類が少ないことがわかった．

Evaluation of bread using freeze tolerant yeast, *Zygosaccharomyces rouxii*

○Kazuki Morimoto, Masaaki Konishi
(Kitami Inst. Technol.)

Key words yeast, stress resistance, freeze tolerant

2Cp03 日本酒の高圧発酵制御技術の確立に向けた清酒酵母の高圧不活性化挙動の解析

○野村 一樹, 片岡 ちひろ, 氏家 沙織里, 井口 晃徳, 重松 亨
（新潟薬大・応生命）
nomura@nupals.ac.jp

【背景と目的】 高圧技術とは，1,000 気圧 (100 MPa) 以上の非常に高い圧力により，非熱的に微生物を殺菌 (不活性化) する食品加工技術の一つである．我々は，高圧技術を応用した日本酒の新しい発酵制御 Pressure Regulated Fermentation (PReF) 技術の確立を目指している．しかし，高圧処理にかかるコストが処理圧力レベルに比例して増加するため，高圧発酵制御の報告は皆無である．本研究では，日本酒醸造工程への PReF 技術の適用可能性を評価するために清酒酵母の高圧不活性化挙動を評価した．
【方法】 清酒酵母株として *Saccharomyces cerevisiae* Sake yeast Kyokai No. 7 株 (K7 株)，圧力感受性清酒酵母株として *S. cerevisiae* KE45 株，対照株として *S. cerevisiae* BY4743 株を用い，YPD 培地，15-30°C，48 h の条件で培養した．200 MPa，室温，1-10 min の条件で高圧処理し，生菌数を算出して不活性化挙動を評価した．
【結果と考察】 30°C で培養し，1 min の条件で高圧処理した結果，KE45 株の生菌数が有意に減少したが，K7 株および BY4743 株の生菌数の減少は認められなかった．その一方で，15°C にて培養した結果，KE45 株だけでなく K7 株においても生菌数が有意に減少した．10 min の条件で高圧処理した結果，K7 株が最も生菌数が減少した．これらの結果から，清酒酵母の高圧不活性化挙動に培養温度が寄与することが明らかとなり，低温条件で発酵させる日本酒醸造工程への PReF 技術の適用が可能となった．本研究は，生研支援センターの「革新的技術開発・緊急展開事業 (地域戦略プロジェクト)」により実施した．

High pressure inactivation behavior of *sake* yeast for pressure regulated fermentation technology of *sake*

○Kazuki Nomura, Chihiro Kataoka, Saori Ujiie, Akinori Iguchi, Toru Shigematsu
(Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, *sake* yeast, high pressure, fermentation control

2Cp04 紅麹品質における水浸漬工程の影響

○曾 伝濤 [1], 吉﨑 由美子 [2], 奥津 果優 [2], 二神 泰基 [2], 玉置 尚徳 [2], 髙峯 和則 [2]
（[1]鹿児島大院・連農, [2]鹿児島大・農）
k7814020@kadai.jp

【目的】紅麹は，Monascus sp. で造られる麹の一つであり，中国の南部や台湾，日本の一部の発酵食品の製造に用いられる．中国の紅麹製麹には特徴的な工程があり，製麹途中で麹を水に 1～数回浸漬する．しかしながら，水浸漬工程がもつ意義は不明である．本研究では，この製麹途中における水浸漬の効果と最適な浸漬条件を検討した．
【方法】種麹は，（株）秋田今野商店から購入した Monascus anka を用いた．米を一般的な方法で蒸煮した後，米重量の 1% (w/w) の種麹を植菌した．植菌後，35℃の恒温恒湿器にて約 48 時間静置した．その後，麹を二等分し，一方はそのまま製麹を続け，もう一方は滅菌水に 1 分間浸漬後，20 分間水切りを行った後に恒温恒湿器に移し，製麹を継続した．製麹は約 96 時間で終了した．両麹について各段階で麹をサンプリングし，水分，酸度，酵素活性，菌体量および色素生成量を測定した．浸漬時間試験では，製麹 48 時間で麹を二等分し，それぞれ 1 分間または 10 分間水浸漬を行った．培養温度試験では，水浸漬工程を行った後，四等分し，25℃，30℃，35℃，40℃で製麹を行った．
【結果】製麹 72 時間後からすべての分析項目において著しい増加が確認された．また水浸漬ありで作製した麹の方が酵素活性および菌体量は約 1.1～1.8 倍高かった．最も顕著に異なる項目は色素量であり，水浸漬ありで作製した麹が水浸漬なしと比べて約 6 倍多かった．浸漬時間を検討した結果，1 分浸漬で製麹した紅麹は糖化力が高くなり，一方，10 分浸漬で製麹した紅麹は菌体量および色素含有量が高くなった．水浸漬後の培養温度の実験では，温度が高くなるにつれて，糖化力および菌体量は増加したが，色素量は 40℃で著しく低下した．これらの結果から水浸漬工程は，紅麹の品質を左右する重要な工程であることが明らかになった．

The effect of water soaking in red koji making

○Chuantao Zeng[1], Yumiko Yoshizaki[2], Kayu Okutu[2], Taiki Futagami[2], Hisanori Tamaki[2], Kazunori Takamine[2]
([1]United. Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [2]Agric., Kagoshima Univ.)

Key words *monascus anka*, pigment, water soaking

2Cp05 小曲米酒の製造における固体糖化工程の意義

○Yin Xuan [1], 吉﨑 由美子 [2], 池永 誠 [2], 奥津 果優 [2], 二神 泰基 [2], 玉置 尚徳 [2], 髙峯 和則 [2]
（[1]鹿児島大院・連農, [2]鹿児島大・農）
k7814020@kadai.jp

【背景と目的】小曲米酒とは，米と小曲から造られる中国の蒸留酒の一種である．小曲は，糸状菌や酵母を穀物に接種・培養することで調製され，醸造用酵素と酵母の供給源として使用される．小曲米酒の製造は，蒸米と 1%（w/w）小曲を混合して室温で約 24 時間置く固体糖化工程から始まる．本研究では，小曲米酒の特徴的製造方法である固体糖化工程の意義を明らかにすることを目的とした．
【方法】小曲は中国で市販されている「安琪」を使用した．固体糖化前後のサンプルの真菌数，酵素活性および有機酸量を分析した．糖化時の温度を 25～40℃に設定し，糖化後のグルコースと還元糖を測定した．糖化時に 8 時間おきに採取したサンプルより DNA を抽出した．LNA-オリゴヌクレオチドによる PCR 技術を用いて米由来の DNA 増幅を抑え，真菌の ITS 領域全長を選択的に増幅した．次いで，gITS7/ITS4 のプライマーセットを用いて ITS2 領域を nested PCR 増幅し，次世代シーケンサーにより真菌叢解析を行った．
【結果と考察】固体糖化前後で，真菌数は約 50 倍に増え，α-アミラーゼ，グルコアミラーゼおよびプロテアーゼ活性は約 5～50 倍高くなった．乳酸は約 3000 倍増加した．固体糖化時の温度の影響を調べると，最も高い糖化効率を示す温度は 30-35℃であった．次世代シーケンスの結果より，スターターである小曲は *Rhizopus* sp. と *Saccharomyces* sp. が主たる真菌であったが，糖化時に増殖するのは *Rhizopus* sp.であることが明らかになった．また小曲より単離した *Rhizopus* sp. に乳酸生成能が認められた．固体糖化工程で増加した乳酸は発酵時の雑菌汚染防止に，増加した酵素活性は迅速な発酵の遂行に寄与すると考えられる．従って，固体糖化工程は，単に糖化だけではなく，*Rhisopus* sp. の培養と，それに伴う乳酸と酵素の生産のためという，新たな意義が明らかになった．

The significance of solid-state saccharification process in *Xiaoqu-Mijiu* production

○Xuan Yin[1], Yumiko Yoshizaki[2], Makoto Ikenaga[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*, Chinese spirits, Solid-state saccharification, *Rhizopus* sp.

2Cp06 南極産菌類を利用した日本酒の醸造の試み

○辻 雅晴 [1], 星野 保 [2]
（[1]国立極地研究所, [2]産総研・生物プロセス）
spindletuber@gmail.com

担子菌酵母の *Mrakia* 属菌は大陸性南極から報告されている菌類の中で，唯一エタノール発酵が可能な菌類として知られている．*Mrakia* 属菌のエタノール発酵については，低温では一般的な酵母 *Saccharomyce cerevisiae* より発酵効率が良いと報告もあるが，南極の雪などから分離した *Mrakia* 属菌でビールを作った結果，2 %(v/v)以上のエタノールを作ることは出来なかったという報告もある．しかし，*Mrakia* 属菌のエタノール発酵については，この 2 報しか存在しなかったことから，この菌のエタノール発酵については，ほとんど分かっていなかった．まず，南極のスカルブスネス露岩域から分離した *Mrakia* 属菌のエタノール発酵能について調べてみることにした．その結果，*Mrakia* 属菌のエタノール発酵能はエタノール耐性と相関があることが分かった．また，最もエタノール生産能が高い *Mrakia blollopis* SK-4 株は pH が 4.0～10.0 の範囲で効率良く発酵が可能であり，最大で 5% (v/v)以上のエタノールを生産することが可能という野生株としては，高いエタノールを生産する能力を持っている事がわかった．そこで，この SK-4 株を利用して日本酒の醸造を試みることにした．SK-4 株単独では，もろみ中に大量のグルコースが蓄積しており，日本酒の醸造は出来なかったが，SK-4 株と協会酵母を共発酵させる事で，日本酒を醸造できることが判明した．SK-4 株を添加した条件では，清酒酵母のもろみ末期死滅が抑制され，わずかながら発酵力が向上したことが判明した．また，SK-4 株を添加して醸造した日本酒ではメロンのような果実臭である酢酸イソアミルの含有量が協会酵母単独で醸造した日本酒より 1.25 倍向上した．これらのことから，南極産菌類と協会酵母を共発酵することにより，協会酵母単独で醸造した日本酒と遜色のない日本酒が醸造可能であることが確認できた．

Japanese sake co-brewed by Antarctic Basidiomycetous yeast and sake yeast

○Masaharu TSUJI[1], Tamotsu HOSHINO[2]
([1]NIPR, [2]BRI. AIST)

Key words yeast, fermentation, sake

2Cp07 京都伝統野菜「桂瓜」の奈良漬粕における米貯蔵タンパク質の解析

○沼本 穂, 中村 貴子, 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には，清酒の香味を形成する重要な役割がある．米貯蔵タンパク質の内，グロブリン，グルテリンはプロテインボディタイプ II(PB-II)に蓄積しており，全貯蔵タンパク質の 70%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り，醸造工程において消化される．一方，プロラミンは PB-I に蓄積しており，全貯蔵タンパク質の 20%程度存在するが，難消化性のため，醸造工程において麹菌や酵母は利用できず，圧搾後の酒粕内に多く残存する．本研究は，京都の伝統野菜である桂瓜を原材料として用い，醸造後の酒粕に漬け込んで作られた「桂瓜奈良漬」における奈良漬粕に存在する米貯蔵タンパク質について解析を行った．
【方法・結果】 清酒原料米，酒粕，桂瓜奈良漬粕（以下，奈良漬粕）からそれぞれタンパク質を抽出し，SDS-PAGE を行った．その結果，酒粕中のグルテリン，グロブリンの割合は，原料米と比較して減少していたが，プロラミンの割合は多かった．奈良漬粕では，グルテリン，グロブリンはほとんど存在しなかったが，プロラミンは残存していた．各プロラミン分子種の特異的抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ，16, 13 kDa プロラミンは酒粕と奈良漬粕で変化がない一方，10 kDa プロラミンの割合は酒粕と比べ，奈良漬粕では減少していた．そこで，プロラミンが蓄積している PB-I の形態観察を行ったところ，興味深いことに原料米，酒粕では球状を示す PB-I が一部楕円状に変形していた．これらのことから，奈良漬の工程においてプロラミンを分解する機構が存在することが示唆された．本研究は，京都府立大学地域貢献型特別研究（府大 ACTR）で実施された．

Analysis of rice storage proteins in bed of sake lees for Narazuke

○Minori Numamoto, Takako Nakamura, Takehiro Masumura
(Grad. Sch., Life Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ.)

Key words storage protein, sake lees, prolamin, Narazuke

2Cp08 α-EG 発酵物の美容食品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 [2], 横田 大輝 [2], 風 友稀 [2], 徳田 耕二 [3], 塩谷 侑子 [3], 町田 雅之 [1], 大箸 信一 [1], 尾関 健二 [1]
（[1]金工大・ゲノム研, [2]金沢工大・バイオ・化学・応用バイオ, [3]車多酒造）
ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的】これまでに α-EG が飲用でも塗布でもヒトのコラーゲン密度を高めることを報告した．前回の飲用試験では，1.1%α-EG 純米酒（α-EG 濃度：550 mg/日）を 6 日間 50 ml 飲用で，コラーゲン上昇の効果を確認した．そこで本研究では，前回より低濃度の α-EG 純米酒と酒粕甘酒のヒト飲用試験によるコラーゲンスコアへの効果があるかを検証した．加えて，酒粕甘酒飲用試験では，角質水分量への効果も検証した．
【方法】0.8 %α-EG 純米酒を毎晩 40 mL（α-EG 濃度：320 mg/日）を 2 週間飲用し，週間単位で両前腕のコラーゲンスコアを測定（Derma Lab）した（女性 8 名, 年齢 20-60 代）．酒粕甘酒を毎朝・晩コップ 1 杯分（300 mL：酒粕, 50 g×2 回=α-EG 濃度：600 mg/日）を 1 週間飲用し週間単位で両前腕のコラーゲンスコア，角質水分量を測定（Corneometer）した（女性 4 名, 年齢 40-50 代）．
【結果・考察】純米酒飲用試験において，0 週目と比較して 2 週目で平均 1.5 ポイント，3 週目で平均 1.3 ポイント，4 週目で平均 2.2 ポイント有意に上昇し，コラーゲンの上昇の継続性が見られた．酒粕甘酒飲用試験では，コラーゲンスコアは 0 週目と比較して 1 週目から平均 4.0 ポイント上昇の速効性の効果，2 週目で平均 8.5 ポイント上昇の効果が認められた．角質水分量は，1 週目で 3.0%上昇し，2 週目では 8.0%上昇した．これらの結果より，酒粕 50 g を 2 週間継続摂取すればコラーゲンスコアが高まることが推測できる．

Effect of collagen score on alpha-EG fermentations as internal beauty material

○Masaki Mitsui[1], Kasumi Endo[2], Daiki Yokota[2], Tomoki Kaze[2], Koji Tokuda[3], Yuko Shiotani[3], Masayuki Machida[1], Shinichi Ohashi[1], Kenji Ozeki[1]
([1]Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol., [2]Dept. Appl. Biosci.,KIT, [3]Shata Syuzo)

Key words alpha-EG, collagen score, beauty materials

2Cp09 吟醸粕焼酎発酵物中の機能性物質の研究

○高橋 雅弥[1], 横山 春花[1], 吉田 知華[1], 徳田 耕二[2], 尾関 健二[1]
（[1]金工大・ゲノム研, [2]車多酒造）
ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【背景・目的】米の難消化性タンパク質であるレジスタントプロテイン（RP）はプロラミン画分として 10-15％程度含有している．日本酒の並行複発酵方式では，麹のプロテアーゼによる分解を受けずに酒粕中に RP として残存する．液化仕込による酒粕を再発酵させると RP が多くなり，便通改善，コレステロール低減などに効果が高いサプリメントとして市販されている．しかし，酒粕焼酎発酵における RP などの機能性物質の研究はなく，蒸留残渣の有効活用の技術開発については重要な課題の 1 つである．吟醸酒粕の再発酵物を蒸留して米焼酎を製造している．この焼酎発酵時に醸造副産物の白ヌカと α-グルコシダーゼ剤の添加，発酵温度の工夫で，蒸留した焼酎には品質的に問題はないか，蒸留残渣に RP，α-EG の各種機能性成分がどの程度含有した素材になるかを検討した．
【方法・結果・考察】蒸留残渣は凍結乾燥を行い，RP はタンパク質を抽出後，SDS-PAGE により，サプリメントの 13 kDa のプロラミン量から定量した．α-EG は HPLC で定量した．酒粕を再発酵した醪（前者）を蒸留した焼酎と，白ヌカを液化して酒粕に加え，α-グルコシダーゼ剤を添加し，温度を 20℃とした醪（後者）を蒸留した焼酎とは品質的に同等であった．前者の蒸留残渣の RP は 2.2mg/g 乾物に対して後者の白ヌカを添加したものは 129-149mg/g 乾物と 70 倍程度高いことが分かり，RP のヒトでの有効量（113mg/日）が乾物 1g で超える量であった．α-EG は前者の醪は 0 に対して後者の醪で 2％を生産し，蒸留残渣中に全量回収された．今回の乾燥物中の α-EG は，2.4mg/g 乾物であった．この量は蒸留残渣の圧搾の仕方により有効量（550mg/日；6 日間摂取で 1-5 週間のコラーゲン密度の増加）を含有させることができる．従って，これまで廃棄処理していた蒸留残渣に各種機能性を付与した全活用の技術開発に目途が立った．

Study of it functionality in shochu brewing from ginjyo cake.

○Masaya Takahashi[1], Haruka Yokoyama[1], Tika Yoshida[1], koji Tokuda[2], Kenji Ozeki[1]
([1]Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol., [2]Shata Shuzo)

Key words Resistantprotein, Prolamine, ethyl alpha-D-glucoside (alpha-EG)

2Cp10 健常成人女性における米糀甘酒摂取による皮膚バリア機能改善効果の検討

○植田 愛美[1], 北川 学[1], 伊藤 成輝[1], 山本 哲郎[2], 近藤 澄夫[3]
（[1]マルコメ, [2]TTC, [3]医療法人健昌会福島健康管理セ）
manami_ueda@marukome.co.jp

【背景・目的】
米糀甘酒は米糀を原料として作られる日本の伝統的な発酵食品であり，ビタミン B 群や必須アミノ酸，オリゴ糖等の栄養成分を含み，栄養価が高い食品として古くから認知されている．米や米糀に含まれるスフィンゴ糖脂質であるグルコシルセラミドは，肌の保湿改善作用や肌バリア機能の改善効果が報告されている．また，米糀に含まれる *N*-アセチルグルコサミンも，肌の保湿改善作用が報告されていることから, 米糀甘酒の飲用による肌の保湿効果について検討した．
【方法】
肌の乾燥を自覚している 20～64 歳の健常女性 203 名のうち，角層水分量の低い者から 64 名を選択した．32 名ずつの 2 群に分け，米糀甘酒（A 群）またはプラセボ（P 群）をそれぞれ 8 週間にわたり，1 日 125ml 摂取させた（無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験）．摂取前および摂取中（4，8 週）に，左上腕および左頬の角層水分量と経表皮水分蒸散量（TEWL）の測定，肌状態自覚アンケートを実施した．
【結果】
40 歳以上かつ TEWL が中央値（14.7g/hm2）以上の被験者 19 名を対象に解析を行った．左上腕の角層水分量において，4 週目の摂取前からの変化量は，A 群で有意に増加し，改善が認められた．また 8 週目の摂取前からの変化量は，A 群で改善傾向であった．左頬の TEWL においては，4 週目の摂取前からの変化量は，A 群で有意に低下し，改善が認められた．また 8 週目の摂取前からの変化量は，A 群で改善傾向であった．以上の結果から，米糀甘酒が肌保湿効果および肌のバリア機能改善効果を有する健康食品として利用できる可能性が見出された．

Effect of intake of amazake on skin barrier functions in healthy adult women subjects

○Manami Ueda[1], Manabu Kitagawa[1], Seiki Itou[1], Yamamoto Tetsuro[2], Sumio Kondo[3]
([1]Marukome Co.,Ltd., [2]TTC Co.,Ltd., [3]Medical Corporation Kensho-kai, Fukushima Healthcare Center)

Key words rice koji, amazake, skin condition, skin barrier function

2Cp11 麹甘酒の過剰摂取による安全性評価

○倉橋 敦[1], 米井 嘉一[2]
（[1]八海醸造・研究開発, [2]同志社大院・生命医科学）
a.kurahashi@hakkaisan.jp

【目的】 麹甘酒は，米麹（又は米と）を糖化させてつくられる日本の伝統甘味飲料である．古来より飲用され，江戸時代には夏を乗り切るための栄養補給飲料として好まれた．近年，麹甘酒の魅力が再認識され，その含有成分や機能性に大変注目が集まっている．著者らは，これまでに麹甘酒に含まれる成分のメタボローム解析について報告している[1]．一方で，麹甘酒の主成分はグルコースであることから，血糖値への影響や体重増加が懸念されている．しかしながら，科学的根拠に基づいた検証はなされていない．そこで，著者らは麹甘酒の過剰摂取による安全性を検討したので報告する．
【方法】 本試験はオリエンタル上野健診センター倫理審査委員会における倫理審査委員会の承認の元に実施した．事前検査によって選抜した空腹時血糖が正常高値（100 mg/dL 以上 110 mg/dL 未満）もしくは境界域（110 mg/dL 以上 126 mg/dL 未満）の 20 歳以上 65 歳以下の男女計 24 名に，麹甘酒 118 g（八海醸造製）を 1 日あたり 3 本，4 週間連続摂取してもらった．摂取前，摂取 2 週後，摂取 4 週後，摂取期間を終え非摂取 2 週後の血圧/脈拍，体重/体脂肪率/BMI，血液生化学的検査，尿一般検査，医師による問診から有害事象の判定を行った．
【結果】 被験者都合による試験中止 1 名を除く，23 名による評価を行った．試験において 15 件の有害事象が観察されたが，医師によっていずれも本試験と因果関係なしと結論付けられた．また，全ての評価項目について変化なし又は軽微な変化にとどまった．以上より，麹甘酒を適切に摂取する場合は安全であると評価した．
【利益相反】 本麹甘酒は，八海醸造(株)により提供された．また，本試験は八海醸造(株)より(株)TES ホールディングスに委託し，医療法人社団成守会 成守会クリニックにて実施した．
1) Oguro *et al*., *J. Biosci. Bioeng*., 124, 178-183 (2017)

The verification study for safety evaluation of *koji amazake* overdose in humans

○Atsushi Kurahashi[1], Yoshikazu Yonei[2]
([1]R&D Dept. Hakkaisan Brewery Co., Ltd., [2]Grad. Life Med. Sci., Doshisha Univ.)

Key words *koji*, *amazake*, safety evaluation

2Ep01 微生物を用いた液体培養におけるフラスコ気相環境の解析

○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（手作業のサンプリングに伴う短時間［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）を見出した[1]．新奇な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[2]．本研究では，CDMSS を用いて，様々な液体培養時のフラスコ気相部の CO_2 と O_2 濃度をモニタリングし，サンプリングをおこなう際に付随する種々の操作がフラスコ気相部に及ぼす影響の定量的解析を試みた．
【方法と結果】 *Saccharomyces cerevisiae* の液体培養中，CDMSS を用いて，気相部内の様々な高さにおける CO_2 と O_2 濃度を測定した結果，循環バイパス速度が遅い場合に，フラスコ気相部にガス濃度勾配が形成された（速い場合には形成されなかった）．特に CO_2 の鉛直分布は顕著であった．気相部内を混合した測定条件で，*Escherichia coli* を振盪フラスコ培養した結果，フラスコ気相部と培養液中に CO_2 濃度が一時的に高濃度に蓄積した．そこで，CDMSS の気相部の循環バイパス部分に CO_2 吸着カラムを挿入し，振盪フラスコ培養した結果，フラスコ気相部の CO_2 濃度の上昇を抑えると伴に，溶存 CO_2 濃度を低く維持でき，*E. coli* の増殖が向上した．また，サンプリング操作に含まれる培養栓の開封や火炎殺菌がフラスコ気相部に及ぼす影響を定量的に解析した結果，CO_2 濃度が大きく変化することが初めて明らかとなった．
1）*J Biosci Bioeng*, doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.01.009.
2）*AMB express*, 7, 163 (2017).

Analysis of the headspace environment in flasks during liquid culture with microorganisms

○Masato Takahashi, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words carbon dioxide, headspace, liquid culture, monitoring device

2Ep02 好気性微生物培養におけるウルトラファインバブルの効果

○小西 正朗[1], 川﨑 はるか[1], 江田 智一[2], 清水 友佑[2], 熊谷 和晃[2]
([1]北見工大, [2]ノリタケカンパニーリミテド)
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

【背景・目的】好気発酵プロセスや廃水処理における活性汚泥法では，低エネルギーかつ効率的な酸素供給方法が求められている．水中では気液界面積が酸素供給の律速段階と成っているため，気液界面積を増加させることで通気効率を改善できる．本研究ではアルミナ多孔体を用いたウルトラファインバブル（FB）発生器を用いた培養方法について評価した．【方法】水中における k_La の推定には亜硫酸 Na 法を用いた．培養中の k_La ならびに微生物増殖への影響を調べるため，絶対好気性菌の *Pseudozyma hubeiensis* を指標菌とし，2L 通気攪拌槽ならびにエアリフト型リアクターで培養した．培地は YPD 改変培地を用い，28℃，200 rpm，0.5 vvm に設定した．菌体量の測定には濁度法，k_La の推定には排ガス法を用いた．FB 発生器はアルミナ多孔体ならびに SPG(Shirasu Porous Glass)を用いた．
【結果】アルミナ多孔体(細孔径 1.3～10 μm)を使用したエアリフト型リアクターにおける亜硫酸 Na 法による k_La は発生直後に FB が会合しているため 50 h^{-1} 程度であり，細孔径に依存しなかった．一方で界面張力が低い YPD 改変培地を用いた場合，FB が会合しないため，3 μm 以上の領域で細孔径に依存して大きく k_La が増加した．3 μm の細孔径を持つ FB 発生器を用いることで攪拌槽(200 rpm)とエアリフトの場合の k_La は約 100 h^{-1} に達した．通常の通気攪拌槽の 525 rpm の通気効率に相当した．指標菌の菌体増殖は通気効率に比例して良好な結果が得られた．アルミナ多孔体は構造的に空気の漏れが少なく同孔径の SPG 膜より通気効率が高かった．

Effect of ultrafine babble on oxygen transfer and the growth of aerobes in aerobic cultivation

○Masaaki Konishi[1], Haruka Kawasaki[1], Tomokazu Eda[2], Yusuke Shimizu[2], Kazuaki Kumagai[2]
([1]Kitami Inst. Technol., [2]Noritake Co. Ltd.)

Key words ultrafine babble, oxygen transfer performance, yeast

2Ep03 DO-stat 流加培養による組換え大腸菌を用いた単鎖抗体の高濃度菌体外生産

○井嶋 浩一朗, 坂本 祐一朗, 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】 これまでの研究でペリプラズム分泌シグナル(PelB leader)を導入した組換え大腸菌を用い DO-stat 流加培養を行うことにより，単鎖抗体(scFv)を菌体外に高濃度に分泌生産できることを報告した[1)]．この結果に基づき，本研究では，酸素供給速度及び DO 条件が scFv の菌体外分泌生産に及ぼす影響を検討した．
【方法】 モデルタンパクとして anti-CRP scFv を用い，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 His タグを導入した anti-CRP scFv 遺伝子を pET-22b(+)発現ベクターを用いて大腸菌 Rosseta2(DE3)を形質転換した．この組換え大腸菌を用い，2L 容 Jar-fermenter にて PID 制御に基づき DO 値が一定となるようグルコースを流加する流加培養を行い，酸素供給速度(OTR)及び DO 値を変化させ，その影響を検討した．
【結果と考察】 酸素供給速度の影響を検討するため，OTR=35.8 mM/hour (500 rpm, DO=3.30 mg/L)及び OTR=86.8 mM/hour (800 rpm, DO=3.30 mg/L)の条件で流加培養を行ったところ，OTR=86.8 mM/hour では菌体外に 2.90 g/L の活性型 scFv が分泌されたが，OTR=35.8 mM/hour では 0.67 g/L に減少した．これは，OTR が小さい場合 DO-stat ではグルコース流加速度が低下し，その結果菌体増殖が抑制されたためと考えられ，scFv の菌体外生産のためには酸素供給速度を大きく設定し，グルコース供給速度を高く維持することが重要と考えられた．次に，DO を 3.30 mg/L(飽和値の 40 %), 4.96 mg/L(同 60%), 6.61 mg/L(同 80 %)に変化させ，その影響を検討した．その結果，DO=3.30 mg/L から 6.61 mg/L の条件で 2.85 g/L から 3.18 g/L の scFv が生産され，この範囲では DO レベルは scFv の可溶化率及び菌体外生産濃度に大きな影響を与えないことが明らかになった．

1)坂本祐一朗, 他, 第 69 回日本生物工学大会要旨集, 講演番号 4P-G044, p.283 (2017)

Extracellular production of concentrated soluble single chain antibodies using recombinant *E. coli* with DO-stat fed-batch culture

○Koichiro Ijima, Yuichiro Sakamoto, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words *Escherichia coli*, scFv, fed-batch culture, DO-stat

2Ep04 培養槽用 OTR シミュレータの開発

○石井 伸佳
（長瀬産業）
nobuyoshi.ishii@nagase.co.jp

好気的な培養では，培養槽内の気相から液相への酸素移動速度（Oxygen Transfer Rate; OTR）が目的物質の生産性と高く相関することが多い．このため，好気培養のスケールアップにおいては，OTR を定めるパラメータの一つである酸素移動容量係数（k_La）が指標としてよく用いられる．しかし例えば，ラボスケールのジャー検討の段階で，所定の生産性を得るのに非常に高い k_La が必要と判明することがある．このとき，もし現場実機で通気撹拌能力不足のためにその k_La を再現できなければ，k_La を基準とする限りスケールアップは断念せざるを得ない．このような状況であっても，現場実機でコンタミ防止等の目的で加圧が行われ，かつ大きな液深による静水圧が加わるならば，飽和溶存酸素濃度の増加に伴う OTR の増大が見込めるので，OTR を一致させる方法によってスケールアップを行える可能性がある．すなわち，OTR 自体を指標とする方が，k_La を用いる方法よりも実用上，適切な場合がある．
OTR に着目したスケールアップの可否について，実機試験や実生産の事前に判断するためには，所与の条件における OTR の予測計算が必要となる．しかし，従来法では，計算に必要な一部のパラメータ（溶存酸素濃度, 飽和溶存酸素濃度）として仮定値を用いての簡易計算が行われてきた（溶存酸素濃度は 0 あるいは臨界溶存酸素濃度等，飽和溶存酸素濃度は通気気体の酸素分圧より計算）．このため，OTR として過大な値が算出されてしまうことがあり，実際にスケールアップを行ってみると実機に適合する条件が得られない場合も少なくなかった．そこで，OTR を従来よりも厳密な手順で求めるシミュレータを開発したので報告する．

Development of an OTR simulator for fermentors

○Nobuyoshi Ishii
(Nagase & Co., Ltd)

Key words oxygen transfer rate, fermentor, simulation, scale-up

2Ep05 粘度測定による微生物由来生体高分子の分子間力および濃度の推算（予備的考察）

○古瀬 久幹[2], 石井 正治[1], 戸田 清[2]
（[1]東大院・農生科, [2]東大・分生研）
hi-to.furuse@nifty.ne.jp

【背景と目的】多くの微生物は培養過程において菌体外に多糖類などの高分子を生成し，培養液は粘稠となる．生体高分子は食物の食感，また微生物凝集塊の形成にかかわると考えられる．多様な特性を有する各種微生物の培養条件によりもたらされる生成量の相違などに関して，あらかじめ様々な角度から検討することは実際的に必要不可欠な事柄といえる．溶液の粘度特性は液中に溶解する高分子の特性，たとえば分子同士に働く分子間力，高分子量，濃度などに密接にかかわる．比較的容易と考えられる粘度の測定から，微生物培養液に溶解する高分子の分子間力や，濃度を推算し，微生物の培養条件との相関について検討することを目的とする．
【方法】従来高分子の溶液に関しては，その粘度特性を説明する多くの試みがなされている．本報はせん断流動下において高分子同士が絡み合い，流動に抗して働く力が溶解分散する高分子を介して伝達することを基礎として解析した．得られた粘度式を既往の測定結果に適用して粘度式の妥当性を確認する．また，式中にはせん断流動下で絡み合う高分子間に作用する分子間力や濃度に関する項を含んでいる．測定結果に対する粘度式によるシミュレーションからこれら分子間力などの値を推算可能と考えられる．
【結果と考察】バクテリア *Xanthomonas campestris* が生成する xanthan の水溶液について粘度のせん断速度依存性，および濃度依存性に関して粘度式の適用を試みた．測定されている既往の粘度特性に対して良くシミュレーション可能なことが確かめられた．導いた粘度式は一般的に多糖類などの高分子を溶解する各種微生物の培養液に適用可能と考えられる．いろいろな培養条件下，粘度測定により微生物が生成する高分子の分子間力や濃度などの特性について比較検討が可能と考えられる．

Estimations of force between solute bio-polymers and concentration originated from microbes by viscosity measurement (preliminary consideration)

○Hisamoto Furuse[2], Masaharu Ishii[1], Kiyoshi Toda[2]
([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Inst. Molecu. and Cellu. Bio-Sci., Univ. Tokyo)

Key words bio-polymer, culture fluid, traveling force, viscosity measurement

2Ep06 *Streptococcus zooepidemicus* によるヒアルロン酸生産の最適化

○小川 愛未[1], 小野 聡子[2], 成田 琴美[3], 武内 章[3], 山崎 思乃[2], 片倉 啓雄[2]
（[1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工, [3]キユーピー）
katakura@kansai-u.ac.jp

【背景と目的】ヒアルロン酸は保水力を持ち，眼球治療や関節治療などに利用されている．また，ヒアルロン酸は加齢とともに減少することが分かっており，近年では，アンチエイジングへの関心から，化粧品やサプリメントへの需要も高まっている．ヒアルロン酸は従来，動物組織より抽出されていたが，経済性の観点から近年では微生物による生産が主流となっている．しかし，微生物生産で得られるヒアルロン酸は，動物由来のものと比較すると分子量が低いことが課題となっており，収率の改善も望まれている．ヒアルロン酸合成は炭素源において菌体増殖と競合するため，基質あたりの収率を高めるには菌体増殖を抑制する必要があるとされている．そこで本研究では，アミノ酸を培養途中で枯渇させることで菌体増殖を抑制できるか検討した．
【方法】*Streptococcus zooepidemicus* KK-21 をヒアルロン酸生産菌とした．炭酸カルシウムを添加して，19 種のアミノ酸，5 種の核酸，14 種のビタミン，8 種の無機塩および微量元素，スクロースから成る合成培地 15 mL に対して 0.006 OD unit の菌体を植菌し，36℃，200 spm で振盪培養した．水酸化ナトリウムで pH 制御を行いながら培養し，OD_{660}，ヒアルロン酸の濃度および分子量を測定した．
【結果と考察】培地中のフェニルアラニン濃度が 0.14 g/L である場合，OD_{660} は 3.9 に達したのに対して，0.012 g/L とした場合，OD_{660} は 1.4 に制限できた．増殖停止以降のヒアルロン酸増加速度はそれぞれ，0.10 および 0.28 g・g-cell^{-1}・h^{-1} となり，菌体濃度を制限することによってヒアルロン酸の比生産速度が増加することが分かった．今後，ヒアルロン酸濃度が高まっても十分に撹拌できるようにジャーファーメンターを改良するとともに，その酸素供給能力に合わせて菌体濃度を制限することで，ヒアルロン酸の高効率生産を検討していく．

Optimization of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*

○Ami Ogawa[1], Satoko Ono[2], Kotomi Narita[3], Akira Takeuchi[3], Shino Yamasaki-Yashiki[2], Yoshio Katakura[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [3]Kewpie Co.)

Key words *Streptococcus zooepidemicus*, hyaluronic acid, specific production rate, phenylalanine

2Ep07 新規殺菌剤過硝酸を用いたノロウイルスモデルの不活化

○小豆澤 友希[1], 井川 聡[2], 北野 勝久[3], 座古 保[1]
（[1]愛媛大院・理工, [2]大阪府立産技総研, [3]阪大院・工）
zako.tamotsu.us@ehime-u.ac.jp

【背景と目的】
ノロウイルスは食中毒の原因の約半数を占め，その制御は食中毒対策上の重要な課題である．ノロウイルスはエンベロープを持たないウイルスであるため，薬剤の耐性が強く，不活化が困難である．そのため有用な薬剤の開発が求められている．
我々はこれまでに，大気圧低温プラズマを水に照射したプラズマ処理水を用いた殺菌実験を進め，殺菌有効成分が過硝酸（HOONO2，PNA: peroxynitric acid）であることを明らかにし，PNA による殺菌という世界初の技術の開発に至った．150 μM の PNA にて大腸菌の殺菌実験を行ったところ，30 秒で菌数を 10-6 以下にできるなど，PNA は非常に高い殺菌力を有していることが明らかになっている．また，生体への安全性も動物実験による検証が進んでいる．そこで本研究では，PNA がノロウイルスに対しても有効かを，ノロウイルスのモデルとして一般的に用いられるネコカリシウイルス(FCV)を用いて評価した．
【方法および結果】
酸性条件下において過酸化水素と亜硝酸より PNA を合成した．PNA の半減時間および反応速度（殺菌力）は温度と pH に依存するため，FCV を不活化する際の溶液は 25℃，pH3.0 に固定した．またウイルス液から PNA を取り除くのは困難であるため，一定時間経過後，高濃度のタンパク質を含む培地と混合することで PNA を瞬時に失活させ，不活化効果を停止させた．FCV の感染価は，50％の細胞が FCV 感染による形態変化を起こすウイルス濃度を求める 50% Tissue Culture Infectious Dose 法にて算出した．合成した PNA の原液（1M）を 1 万倍希釈した 100 μM の溶液で FCV を不活化処理したところ，10 秒間で感染価を 4 桁減少させることができた．今後，様々な角度から有用性の検討を行っていく予定である．

Inactivation of Norovirus model using novel disinfectant, Peroxynitric acid

○Tomoki Azukizawa[1], Satoshi Ikawa[2], Katsuhisa Kitano[3], Tamotsu Zako[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Ehime Univ., [2]Tech. Res. Inst. Osaka Pref., [3]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Peroxynitric acid, Disinfectant, Feline calicivirus, Norovirus model

2Ep08 ナノバブルと超音波と組み合わせた効率的な殺菌手法の開発

○細井 啓貴[1], 廣部 綾乃[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】超音波を液中に照射すると，液中の気体分子に正・負の圧力が交互にかかり，気泡が数 μm～100 μm 程度に圧縮・膨張を繰り返すなかで，圧縮時の高い圧力の限界でマイクロバブル気泡がはじけ，「衝撃波」や「局所的な高温高圧場」が生じる．これを超音波キャビテーションという．この際「衝撃波による物理的作用」，「局所的な高温高圧場における水の熱分解で生じる OH ラジカルによる化学的作用」が生じる．一方，近年，10～100 nm サイズの微細な気泡であるナノバブルが注目を集めている．この「ナノバブル」は，1 μm サイズ以上のマイクロバブルと異なり，水中で準安定的に存在する．このナノバブルが，超音波キャビテーション発生の核になるのではないかという作業仮説を立てた．そこで，ナノバブルと超音波の組み合わせにより，超音波キャビテーションの際の「衝撃波による物理的作用」，「局所的な高温高圧場における水の熱分解で生じる OH ラジカルによる化学的作用」を相乗的に増大させることで，環境負荷のない効率的な水質浄化を行う手法の開発を行った．
【方法および結果】「操作変数」は，A)超音波照射条件（周波数 38 もしくは 1600 kHz，強度）および B)ナノバブル濃度とした．「評価項目」として，ナノバブル粒径分布・濃度，OH ラジカル，大腸菌生存率の経時変化を評価した．超音波照射はソノリアクターを用い，照射強度については，カロリメトリ法を用いて評価・設定した．ナノバブル水調整は，旋回液流出式ナノバブル製造装置を用い，ナノバブルの粒径分布および濃度は，Nano Tracking Analysis 法により測定した．OH ラジカルは Aminophenyl Fluorescein を用いて検出した．殺菌試験は，大腸菌のコロニーカウントを行った．ナノバブルと超音波の組み合わせにより，OH ラジカルの生成や殺菌効率は相乗的に向上する現象が見出された．

Disinfection process by combined use of nanobubble and ultrasound

○Hiroki Hosoi[1], Ayano Hirobe[1], Kenji Takahashi[1], kazuaki Ninomiya[2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words disinfection, nanobubble, ultrasound

2Ep09 ABC 光半導体の暗所での殺菌作用における遮光後放電による影響の可能性

○辻塚 誠一郎[1], 宮本 樹里[1], 俗多 秀美[1], 伊東 謙吾[2], 田中 賢二[1]
（[1]近大・産理工, [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 （AgNPL），ボロン樹脂(B)，クレイ(C)で構成される ABC 光半導体は，可視光や近赤外光照射により起電力を生じる．また，有機溶媒中での分散と安定性に優れ，物体表面への塗布による薄膜化が容易である．ABC 光半導体は，これらの光照射下で細菌やカビ胞子に強い抗菌作用を示す．また，いわゆる光触媒とは異なり，暗所でも抗菌作用を示す．暗所での抗菌は，銀成分である AgNPL の抗菌力に由来すると考えられてきたが，他の B，C 成分を無くすと抗菌力が顕著に低下することや，暗所での抗菌力は試験前操作における照明の影響を強く受けることがその後明らかになった[1]．このため，本光半導体では，光照射で発生した電気が蓄積されその後放電されることによる殺菌が起きているのではないかと考え，抗菌試験実施前の本半導体への光照射の影響について検証した．
【実験】ABC 光半導体の希薄液を PET フィルムに塗布・固定化させて試験片を作成し，これに大腸菌の菌液をマウントし，素の PET フィルムを被せ 30℃で 8 時間放置することにより抗菌処理した．試験片上の菌液を回収し平板培地で培養しコロニー数を比較することで抗菌活性を評価した．コロニー計数以外の操作は全て暗所で実施した．
【結果】抗菌処理前に暗所で長時間保存した試験片と白色 LED（1000lx）を照射した試験片について抗菌活性を比較したところ，暗所保存したものでの活性は非常に弱かったが，光を 30 分間事前照射した試験片ではある程度の活性増加が見られた．さらに 24 時間の事前照射では高い抗菌活性が認められた．この結果は，ABC 光半導体では遮光後もしばらくの間は放電が続くこととも一致する．
参考文献 1）辻塚ら．第 69 回日本生物工学会大会講演要旨集 P241，2017 年

Investigation on antimicrobial effect of an electric discharge from novel paintable ABC photoconductor after shading visible light

○Seichiro Tsujitsuka[1], Juri Miyamoto[1], Hidemi Muta[1], Kengo Ito[2], Kenji Tanaka[1]
([1]Fac. Humanity-Oriented. Sci. Eng., Kinki Univ., [2]Ito Lab.)

Key words antibacterial, photoconducter, silver nanoplate

2Ep10 マイクロ波（非熱効果）が微生物の生理活性に及ぼす影響の解析

○松田 将典[1], 堀越 智[2], 青柳 秀紀[1]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]上智大・理工）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】 過去 50 年間にマイクロ波が微生物，酵素，タンパク質，遺伝子などに及ぼす影響が検討され，様々な現象が報告されてきた．しかしながら，マイクロ波が照射された試料の温度測定や管理が適切になされていなかったため，これまで報告されてきた現象が，(1) 試料の加熱により生じたのか？，(2) マイクロ波の特異的効果により生じたのか？，あるいは，(3) 両者の相乗効果により生じたのか？，という点については未解明である．この現状を踏まえ，本研究では，適切な温度管理の下で実験をおこない，マイクロ波（非熱効果）が微生物の生理活性に及ぼす影響を解析した．
【方法と結果】 マイクロ波照射中の試料の温度は，常に光ファイバー温度計でモニターし，温度の上下に応じてマイクロ波の出力を調整し，一定に維持した．マイクロ波（非熱効果）が *Escherichia coli* K12 に及ぼす影響を種々検討した結果，適切な条件でマイクロ波（周波数：2.45 GHz，出力：約 50～65 W で 30℃を維持）を照射しながら液体培養をおこなった場合，*E. coli* K12 の比増殖速度はコントロールと比べて 1.3 倍増加し，最終菌体濃度も 1.2 倍に向上することが明らかとなった．同様の実験を土壌試料懸濁液でおこない，PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法で解析した結果，培養微生物叢に変化はみられなかった．しかしながら，孔径 0.8 μm のフィルターを用いてサイズの大きな微生物を除去した土壌試料では，マイクロ波（非熱効果）により培養化される微生物叢が，コントロールと異なった．以上の結果より，マイクロ波（非熱効果）により，培養化が促進（あるいは抑制）する微生物の存在が示唆された．

Influence of microwave (non-thermal effect) on the physiological activities of microbes

○Masanori Matsuda[1], Satoshi Horikoshi[2], Hideki Aoyagi[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Sch. Technol. Sophia Univ.)

Key words *Escherichia coli*, microwave, non-thermal effect, PCR-DGGE

2Ep11 抗菌素材“ＰＧＡＩＣ”の生成機構分析とオンサイトコーティングへの応用

○白米 優一[1], 中山 沢水[2], 東内 遥菜[2], 芦内 誠[1,2]
（[1]愛媛大院・連合農, [2]高知大・農）
yuichi.haku@gmail.com

【背景】感染・食中毒を防止する目的から，コーティング機能を備えた抗菌性ポリマーの需要が高まっている．実際，微生物に侵された材料表面は重大な媒介要因になること，特に抵抗力が低下した患者への影響は甚大とされる．第 4 級アンモニウム化合物（QA）は，化粧品の保存剤から一般公衆衛生の目的に適う除菌剤まで様々な社会領域で利用されている．QA には，広域抗菌スペクトル・ｐＨ耐性・低毒性・無臭性等，多くの利点がある．ただし，QA 主体の被膜面は不安定，抗菌機能を維持するのも困難であり，これは「両親媒性」に起因する．そのため，水ばかりか，アルコール類をはじめとする有機溶媒に触れた場合でも材料表面から簡単に剥がれ落ちる．かかる課題の克服を目指し，ポリγグルタミン酸イオンコンプレックス（PGAIC）が開発された．続いて，二頭型 QA（キノリニウムタイプ）を利用することで，PGAIC に優れた耐熱性・化学耐久性が付与できることも示された．ただし，PGAIC 形成機構については不明な部分が多く，他方では超耐久性 PGAIC（PGA/DEQ 等）をコーティング基材として用いるための方法論について手付かずの状態で残されていた．今回，現状打破に繋がるブレークスルーを探ったので報告する．
【方法・結果】PGA/DEQ の NMR 分析は，これが PGA の全カルボキシル基と DEQ のキノリニウム部位が結合してなる複合体であることを示した．本生成反応と既知の吸着（結合）モデルを照らして解析を進めた結果，NICA モデルに従うことが判明した．先例多数のラングミュラモデルにはそぐわなかったことから，ここに協奏的な分子メカニズムが働いていることが明らかになった．PGAIC の「“材質不問，かかる表面に自発接着後，被膜化する”多用途性コーティング能」を組み合わせることで，PGA/DEQ の薄層を材料上で直接（オンサイト）合成する簡便技術を導くことができた．

Engineering and *on site* coating of poly-γ-glutamate-based antimicrobial materials

○Yuichi Hakumai[1], Sawami Nakayama[2], Haruna Higashiuchi[2], Makoto Ashiuchi[1,2]
([1]United. Grad. Sch. Agric. Sci., Ehime Univ., [2]Fac. Agric. Agric. Sci. Prog., Kochi Univ.)

Key words poly-gamma-glutamate, *on site* coating, antimicrobial materials

2Fp01 低分子化抗体精製用アフィニティクロマトグラフィー担体の応用・改良研究

○西八條 正克[1,2], 村田 大[1,2], 鴻池 史憲[1,2], 吉田 慎一[1,2], 水口 和信[1,2]
（[1]カネカ, [2]次世代バイオ医薬品製造技術研究組合）
Dai.Murata@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（SpG）および抗体結合スペクトルの広い改変型プロテイン L（PpL）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．本報告では，これらの担体の基本性能の紹介と共に，簡略化された低分子化抗体精製プラットフォームプロセスの提案を行う．
【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 SpG 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．KANEKA KanCap™ L も，市販の PpL 担体と比較して，高い Fab 結合容量を示した．評価した Fab のうち一種については市販品では動的結合容量が 3 mg/mL に対して，25 mg/mL と約 8 倍高い結合容量となり，汎用性の高さを示した．また，KANEKA KanCap™ L は，Diabody に対しても Fab と同様に高い結合容量を示した．さらに，KANEKA KanCap™ G および L の実用性能向上を目的としたリガンドの改良研究も継続的に実施しており，低分子化抗体精製プラットフォームプロセスの提案とあわせて報告する．

Application/improvement study of affinity chromatography resins for purification of antibody fragments

○Masakatsu Nishihachijo[1,2], Dai Murata[1,2], Fuminori Konoike[1,2], Shinichi Yoshida[1,2], Kazunobu Minakuchi[1,2]
([1]Kaneka Corp., [2]Manufacturing Technology Association of Biologics)

Key words affinity chromatography, antibody fragments, Protein G, Protein L

2Fp02 治療用酵素ヒト-Kynureninase の高効率分離プロセスの開発

○杉山 友亮, 堀内 淳一, 熊田 陽一
（京工繊大・工芸科学）
kumada@kit.ac.jp

【背景と目的】Kynureninase (KYNase)は，血中の L-Kynurenine (KYN)濃度を低下させ，免疫系の機能を向上させることから，バイオ医薬品としての利用が期待されている．本研究では，組換え大腸菌におけるヒト KYNase の大量生産プロセスの構築を目的とし，特に，菌体破砕液からの KYNase の少ステップかつ高効率な精製プロセスの開発を行った．すなわち，KYNase のクロマトグラフィ分離における最適な分離担体の選定を行うとともに，担体への吸着における pH 依存性や構造安定性を評価した．
【方法】N 末端に 6xHis-tag を融合した KYNase をモデルとし，発現ベクターで形質転換された大腸菌 C43(DE3)株を得た．得られた形質転換体を用いてフラスコ培養を行い，菌体内可溶性画分に活性型の KYNase を得た．さらに，Ni-NTA カラムを用いて KYNase を精製後，種々の実験に用いた．KYNase の吸着分離担体として，これまでの研究で実績の高かったヒドロキシアパタイトを用いた．各 pH における KYNase の吸着性，安定性，ならびに触媒活性を評価した．
【結果】組換え大腸菌を用いてヒト KYNase を生産したところ，39 mg/L の濃度で菌体内可溶性画分に局在していた．アフィニティ精製後の KYNase の触媒活性における反応 pH の影響を調べたところ，pH 8.5 において最大の反応速度が得られた．現在，KYNase の pH 安定性を調査中であるが，弱アルカリ pH において触媒活性を高く維持できることから，ヒドロキシアパタイト（HA）への吸着と大腸菌細胞内タンパク質との群特異的アフィニティ分離を行う予定である．特に，HA 担体への KYNase の吸着における pH 依存性や溶出挙動の最適化に関する結果についても発表する予定である．

Development of efficient separation process for therapeutic enzyme, human-Kynureninase

○Yusuke Sugiyama, Jun-ichi Horiuchi, Yoichi Kumada
(Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words Kynureninase, kinetics, Hydroxyapatite, purification

2Fp03 B 型肝炎ウイルス様粒子(HBsAg-VLP)の効率的なクロマトグラフィ精製手法の確立

○小木戸 謙, 丸田 秀平, 青木 裕史
（昭和電工）
kokido.yuzuru.xhflx@showadenko.com

【背景と目的】 近年，ウイルス様粒子(VLP)をワクチン・ウイルスベクター・ドラッグデリバリー担体として利用する応用研究が盛んに進められており，それらの効率的な精製・分析技術が求められている．本研究は，高速・低背圧で運用可能なバイオナノ粒子領域に適性をもつポリマーモノリスカラムと，VLP 領域に最適化したポアサイズと基材設計を持つ当社試作ゲル濾過カラムを組み合わせることにより，従来の超遠心精製法や既存のクロマトグラフィ精製法より生産性高く，効率的に B 型肝炎ウイルス VLP (HBsAg-VLP) を精製することを目的とした．
【方法】 B 型肝炎ウイルス VLP (HBsAg-VLP) を含む粗抽出液は，組換え酵母系を用い，破砕抽出により調製した．得られた粗抽出液を BIA separtaions 社製モノリス強陽イオン交換カラム(CIMmultus SO3-1)に 5CV/min で通液し，塩化ナトリウムのグラジエントによる濃縮画分を調製した．さらに，濃縮画分を当社試作ゲル濾過カラムに供試した．各溶出画分に含まれる HBsAg-VLP のサイズを粒度分布により，純度をタンパク質量当たりの ELISA 価および SDS-PAGE により，また，形態を電子顕微鏡観察により評価した．
【結果と考察】 初段に CIMmultus SO3-1 を適用することにより，宿主由来の DNA ほか夾雑物の吸着を抑え，高速かつ効率的に HBsAg-VLP を精製・濃縮することができた．また，当社試作ゲル濾過カラムは，不定形の HBsAg-VLP とサイズ均一性の高い球状 HBsAg-VLP とを分離することができ，さらに各画分の ELISA 価にも違いが見られた．本手法は，医薬品としての品質要求を満たす高度な VLP 精製技術の確立に貢献できると考える．

Establishment of efficient chromatographic purification method of hepatitis B surface antigen virus-like particles (HBsAg-VLPs).

○Yuzuru Kokido, Shuhei Maruta, Hirobumi Aoki
(Showa Denko.K.K.)

Key words chromatography, monolith, virus-like particles, HBsAg

2Fp04 バイオマス発酵プロセス向け低ファウリング膜の開発

○志村 芙美, 小岩 雅和, 畠平 智子, 木村 将弘
（東レ）
Satoko_Hatahira@nts.toray.co.jp

［背景・目的］当社は長年培ってきた高分子技術，独自のナノテクノロジーにより，逆浸透（RO）膜，ナノろ過（NF）膜，限外ろ過（UF）膜，精密ろ過（MF）膜を水処理用途向けに開発してきた．これらの各種高分子膜について，バイオマス変換用途への新規展開を目指しており，その一つとして，分離膜を用いた連続発酵法「膜利用連続発酵プロセス」の開発を進めている．これは発酵液中の菌体を膜分離により濃縮する技術であり，これまでに本プロセスを適用した実例として，D-乳酸連続発酵において 700 時間以上の長期安定運転を実現しており，バッチ発酵法に対して 7.5 倍の生産速度を得ている．一方で，長期運転時の膜ファウリングは依然課題であり，膜間差圧の上昇を抑制しながら連続発酵を可能とする膜の開発が求められている．そこで，発酵液のろ過用途における新規低ファウリング膜の開発を目的とし，検討を行った．
［実験方法］まず，発酵液ろ過におけるファウラントを同定するため，特定の発酵液をろ過して得られた閉塞膜について，飛行時間型二次イオン質量分析法を用いて付着物解析を行った．併せて，ろ過途中の膜に対して各種酵素を作用させることで，ファウラントの半同定を実施した．ファウラントの同定結果に基づき，低ファウリングポリマーのスクリーニングを実施した．最後に，選定されたポリマーを発酵液ろ過膜に適用し，実発酵液での評価に供した．
［結果と考察］付着物解析の結果，膜閉塞時にはタンパク質及び β グルカンが主要ファウラントであることが示唆された．解析結果に基づきスクリーニングされた低ファウリングポリマーをろ過膜に適用し，実発酵液のろ過を行った結果，弊社従来膜に比べてろ過量が 3 倍向上することを確認した．本分離膜を適用した発酵プロセスは各種バイオプロセス，食品・飲料製造分野等に展開可能性があると考える．

Development of low fouling membrane for membrane integrated continuous fermentation process

○Fumi Shimura, Masakazu Koiwa, Satoko Hatahira, Masahiro Kimura
(Toray Industries, Inc.)

Key words membrane reactor, continuous culture, fouling, glucan

2Fp05 ポリアミンによる荷電脂質膜の相分離

○引地 啓太, 山本 耀吾, 下川 直史, 高木 昌宏
（北陸先端大・マテリアル）
takagi@jaist.ac.jp

【背景】両親媒性分子であるリン脂質は，水中で自発的に二重膜構造を形成する．二重膜が球状に閉じた構造はリポソームと呼ばれ，細胞膜のモデル系として用いられている．多成分のリン脂質からなる二重膜では，低温で相分離が観察される．相分離に関する研究に関して，我々は，荷電脂質の役割や荷電脂質とカチオンの相互作用に興味がある．本研究では，多価イオンであるポリアミンをはじめ，様々な塩を添加した際の荷電脂質膜の相分離を観察した．
【材料・方法】脂質は中性飽和脂質 DPPC，負電荷不飽和脂質 DOPS，コレステロール(Chol)を用い，脂質組成は DOPS/DPPC/Chol=40:40:20 に固定した．蛍光試薬としてローダミン DHPE を用いた．リポソームは静置水和法で作成した．また，水和の際にカチオンとしてポリアミン(プトレシン(+2)，スペルミジン(+3)，スペルミン(+4)，N4-bis(aminopropyl)spermidine (+5))を添加した．また比較のため，NaCl(+1)，MgCl2(+2)，CaCl2(+2)，ヘキサメチレンジアミン(+2)も用いた．相分離は蛍光顕微鏡を用い，さらにゼータ電位測定も行った．
【結果・考察】DPPC,DOPS,コレステロールのみからなるリポソームの場合，室温で相分離は観察されないが，いずれの塩を添加した場合においても相分離が観察された．これは DOPS 間の静電反発が添加塩により遮蔽されたためと考えられた．価数依存性を見ると，価数が大きいほど，より低濃度で相分離が観察された．価数が同じ場合には基本的にカチオンサイズが小さい塩ほど低濃度で相分離が観察された．カチオンが膜面に吸着した際，小さいカチオンほどカチオン間の立体斥力が小さいため，より多くのカチオンが吸着できるためであると考えられた．

Phase separation induced by addition of polyamine in charged lipid membranes

○Keita Hikichi, Yougo Yamamoto, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

Key words lipid vesicle

2Fp06 エマルションドロップレットを用いた土壌微生物の培養

○村井 雄大[1], 川島 万凜[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）
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，そのうち単離，培養ができる微生物は 1％未満とされる．難培養である原因として，生育の早い他の微生物による淘汰や環境中の未知の生育因子への依存等が考えられる．本研究では，エマルションドロップレットを用いた土壌微生物培養を検討した．難培養性微生物の発見および，その単離・培養が本研究の最終的な目標である．
【実験】 ドロップレットジェネレータを用いて，直径 40-50 μm の土壌微生物を封入したエマルションドロップレットを作製した．その後，土壌微生物の生育と微生物叢のダイナミクスを，次世代シーケンシングによる 16S rRNA 遺伝子解析によって評価した．また，ドロップレット培養と従来の培養法（液体培養法・平板培養法）の比較を行い，ドロップレット培養の特性を評価した．
【結果および考察】 土壌微生物を封入した各ドロップレットにおいて，菌体の増殖を確認し，土壌微生物におけるドロップレット培養の可能性を示した．また，経時的な DNA 量の変化より，ドロップレット培養は従来の液体培養，平板培養に比べて，緩やかな増殖を示すことが明らかとなった．さらに，16S 解析の結果から，ドロップレット培養は，従来の培養法と比較して特徴的な微生物叢のパターンを示し，有意に微生物種が保存されていることが明らかとなった．今後，本培養システムを用いた，難培養性微生物の培養が期待される．

Culture of soil micro-organisms by emulsion droplet

○Yuta Murai[1], Marin Kawashima[1], Naoki Morita[1], Katsumi Doi[2], Satoru Kuhara[1], Kosuke Tashiro[1]
([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words microorganisms, uncultured bacteria, microfluidic device, emulsion droplet

2Fp07 water-in-oil エマルションを用いた微生物の培養および検出技術の構築

○大田 悠里[1,2], 斉藤 加奈子[1,2], 松倉 智子[2], 髙木 妙子[2], 森田 雅宗[2], 常田 聡[1], 野田 尚宏[1,2]
（[1]早大院・先進理工, [2]産総研・バイオメディカル）
noda-naohiro@aist.go.jp

【背景と目的】環境中には様々な微生物が生息しており，寒天平板法，限界希釈法といった手法により，種々の微生物が単離されてきた．しかしながら，これまでに培養されてきた微生物は環境中に生息すると推定される微生物のうち 1% にも満たない．近年，water-in-oil エマルションを用いた微生物培養技術が注目されつつある．マイクロ流体デバイスを使用することで一度に大量の均一サイズを有するドロップレットを作製でき，ハイスループットな培養場を提供できるため，難培養微生物の培養技術として期待されている．本手法の構築においてはドロップレット内で微生物を培養した後に微生物が増殖したドロップレットを検出し，選択的に回収するという過程が必要となる．そこで，本研究では微生物をドロップレットに封入して培養し，セルソーターを用いたドロップレットの蛍光検出により，微生物増殖ドロップレットを検出する技術を構築した．
【方法】水相には培地を使用し，オイル相にはフッ素系オイルおよび界面活性剤を使用して，直径約 130 µm 程度のドロップレットを作製した．モデル微生物として大腸菌，枯草菌，放線菌，根粒菌を選択し，空のドロップレットが 90% 程度，微生物封入ドロップレットが 10%程度となるようにモデル微生物をドロップレットへ封入した．封入直後と一定時間培養後にドロップレットの顕微鏡観察を行い，同時にチップ式セルソーターを用いてドロップレットの蛍光強度を測定した．
【結果と考察】各モデル微生物がドロップレット内で増殖することが確認された．また微生物種によって増殖形態が異なる様子も観察された．微生物が増殖したドロップレットでは蛍光強度が上昇しており，セルソーターによるドロップレットの蛍光強度測定により，微生物増殖ドロップレットを検出することができた．

Development of droplet-based bacterial cultivation and detection techniques

○Yuri Ota[1,2], Kanako Saito[1,2], Satoko Matsukura[2], Taeko Takagi[2], Masamune Morita[2], Satoshi Tsuneda[1], Naohiro Noda[1,2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words droplet microfluidics, emulsion, bacterial cultivation, bacterial detection

2Fp08 エマルション培養法を用いた微生物由来ペプチダーゼスクリーニング系基盤構築に向けて

○本間 宣行[1], 中村 彰宏[1], 鈴木 義之[1], 志田 洋介[1], 野田 尚宏[2], 小笠原 渉[1]
（[1]長岡技科大, [2]産総研・バイオメディカル）
owataru@vos.nagaokaut.ac.jp

地球上には無数の微生物が存在するが，既存の技術で培養可能な微生物は 1% にも満たない．しかし，人類はその一部の培養可能な微生物の機能を利用し，多大な恩恵を受けている．そのため，新規微生物の単離培養および微生物資源の利用は，さらなる産業の発展につながる．我々は油中液滴 (ドロップレット) の分散系である「エマルション」を用いた微生物培養法に着目した．微小培養器であるドロップレットは 1 時間未満で 100 万という高速生産が可能である．このことから，エマルション培養により膨大な環境微生物をハイスループットに培養，スクリーニングすることで新規微生物の単離が期待される．
当研究室では糖非発酵性グラム陰性菌 *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 を単離した(Ogasawara *et al.*, 1996)．これまでに我々は本菌が保持するペプチド分解機構について解明を行ってきた．そこで本菌を，環境中から微生物由来ペプチダーゼのスクリーニング系を構築する上でのモデル微生物とした．
本研究ではエマルションにおける種々の検討および通性嫌気性細菌 *Escherichia coli* と好気性細菌 *P. mexicana* WO24 を用いた培養の条件検討を行った．ドロップレットジェネレーターを用いて様々な圧力条件下でエマルションの作成を行った．その結果，直径 90 µm-360 µm のドロップレットの作成に成功し，作成したドロップレットは少なくとも 7 日間安定だった．さらに，*E. coli* および *P. mexicana* WO24 のエマルション培養を行った結果，6 時間程度でドロップレット内部全域に菌体の増殖が観察され，7 日間安定的に培養が可能であることを確認した．また，エマルション培養を用いて各菌体のエンドペプチダーゼ活性に基づいたスクリーニングに成功した．今後は，菌体エキソペプチダーゼ活性に基づいたスクリーニング系の構築を目指す．

Toward the construction of microbial peptidase screening method employing emulsion cultivation

○Nobuyuki Honma[1], Akihiro Nakamura[1], Yoshiyuki Suzuki[1], Yosuke Shida[1], Naohiro Noda[2], Wataru Ogasawara[1]
([1]Nagaoka Univ. Technol., [2]Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words emulsion, peptidase, cultivation

2Fp09 脂質膜被覆球形粒子を用いた曲率認識タンパク質スクリーニング手法の開発

○田中 祐圭, 矢内 健太郎, 大河内 美奈
（東工大）
okochi@chemeng.titech.ac.jp

【背景】
生体膜小胞形成は，細胞機能やがんなどの疾病に関与するバイオプロセスであり，様々なタンパク質により制御される．特に，平面生体膜から小胞構造を形作る上で，生体膜の曲率を認識するタンパク質が重要な役割を果たす．一方で，生体内で形成される小胞の多様性を既存の曲率認識タンパク質だけでは説明できないため，未知の曲率タンパク質の存在が示唆されている．そこで本研究では，生体膜で被覆した粒径の異なる球形材料を利用した，新たな曲率認識タンパク質を同定するための基盤技術を創出に向けた研究開発を実施する．
【方法】
粒径が 100 nm，1 µm の SiO_2 粒子を調製し，単層 liposome と混合することで粒子に脂質膜を修飾し，特定の異なる曲率をもつ生体膜模倣材料を作製した．また，すでに曲率認識能をもつことが知られる Amphiphysin をモデルタンパク質とし，GST との融合タンパク質を大腸菌により発現させた．大腸菌破砕液と脂質膜修飾粒子を混合し，遠心分離により粒子に結合した GST-Amphiphysin を回収し，得られたタンパク質を SDS-PAGE によって分析した．
【結果・考察】
サイズの異なる SiO_2 粒子に対して生体膜が被覆されていることを示し，これに対する曲率認識モデルタンパク質 Amphiphysin との相互作用解析から，曲率の異なる生体膜に対して異なる親和性を示すことが確認された．またこれまでに同定されていない曲率認識能をもつタンパク質の存在が示唆された．今後は混合するタンパク質サンプルや脂質成分を検討することで，新規な曲率認識タンパク質が同定されることが期待される．

Screening technique development of membrane curvature-sensing protein using lipid membrane-coated spherical particles

○Masayoshi Tanaka, Kentaro Yanai, Mina Okochi
(Tokyo Tech)

Key words membrane lipids, screening, membrane curvature-sensing protein

2Fp10 GP64 融合ビオチンリガーゼによる近接依存反応を利用した Sf9 昆虫細胞表面 GP64 結合レセプターの探索

○岡本 園子[1], 横田 早希[1], 鈴木 健裕[2], 堂前 直[2], 後藤 猛[1]
（[1]秋田大院・理工, [2]理研・CSRS）
tgotoh@gipc.akita-u.ac.jp

【背景と目的】バキュロウイルスは鱗翅目などの昆虫に特異的に感染するウイルスであり，翻訳後修飾された哺乳動物タンパク質の昆虫細胞による高効率生産のためのベクターとして広く利用されている．バキュロウイルスの昆虫細胞への侵入は，ウイルスエンベロープ表面の 3 量体を形成した糖タンパク質 GP64 が昆虫細胞表面のレセプタータンパク質に結合することから始まると考えられているが，このレセプターは未だ同定されていない．本研究では GP64 融合ビオチンリガーゼを有する組換えバキュロウイルスを用いてレセプター候補タンパク質を探索することを目的とした．
【方法と結果】ビオチンリガーゼ変異体（BirA）融合 GP64 の cDNA を導入した組換えバキュロウイルス(vBirA-GP64)を調製した．これを Sf9 昆虫細胞に MOI 10 pfu/cell で感染させて 24 h 後のタンパク質を SDS-PAGE により分離し，GP64 抗体を用いた Western blot により分析したところ，BirA が融合した GP64 の 3 量体の形成が認められた．続いて vBirA-GP64 感染 Sf9 細胞の膜画分のタンパク質を SDS-PAGE により分離し，ストレプトアビジン-AP を用いた Western blot によりビオチン化タンパク質を Mock 感染培養の結果と比較したところ，約 52 kDa のタンパク質が特異的にビオチン化されていた．これは Sf9 細胞表面レセプターがウイルス表面の BirA 融合 GP64 と結合して近接した BirA によりビオチン化されたためと考えられた．そこでこの約 52 kDa のタンパク質をレセプター候補とし，vBirA-GP64 感染 Sf9 細胞の膜画分から陰イオン交換クロマトグラフィーにより粗精製した後，二次元電気泳動を行った．候補タンパク質領域のゲルを切り出してトリプシン消化し，LC-MS/MS によりペプチド解析を行って NCBI の動物（Metazoa）タンパク質データベースに対して検索したところ，3 つのレセプター候補タンパク質が見い出された．

Explorative study of a GP64 receptor on the surface of Sf9 insect cells using proximity-dependent reaction by GP64-fused biotin ligase

○Sonoko Okamoto[1], Saki Yokota[1], Takehiro Suzuki[2], Naoshi Dohmae[2], Takeshi Gotoh[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ., [2]RIKEN CSRS)

Key words baculovirus, Sf9 cell, receptor protein, GP64

2Fp11 pH 変動培養法を活用した耐酸性微生物や好酸性微生物の高効率なスクリーニング系の開発

○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】 強酸性，高温などの特殊環境に存在する微生物は特殊な酵素や機構などを有するため，学術面，産業面で重要性が高い．微生物の単離培養には寒天平板培養法が広く用いられているが，強酸性条件下では寒天が加水分解するため，使用が困難となる．我々はこれまで，強酸性条件下で安定して使用可能な，Specialized Cellulose Film (SCF) 法を用いた微生物の単離培養系を構築してきた[1]．本研究では，自然界の強酸性環境に生育する好酸性微生物や，中性環境で生育し強酸性条件下で生存可能な耐酸性微生物に焦点を当て，効率的な単離培養系の構築を試みた．

【方法と結果】 強酸性環境（pH 1.7-1.9）で採取した種々の試料を，pH 1 の液体培地で振盪培養 (200 rpm, 30℃,14 d) し，SCF 培地に植菌して培養を行った結果，複数の微生物を単離培養できた．耐酸性微生物の単離培養のため，SCF 法を用いて培地の pH を 7→1→7 と変動させる pH 変動培養法[1]の諸条件（A: pH 1 の培地と強酸希釈液の使用，B: 変動前後の培養時間， C: 強酸性条件下での培養時間）を，培養菌叢の比較に基づき，最適化した．pH 1 の培地で 48 h 培養した場合と，100 倍希釈硫酸を用いた場合を比較した結果，両者の培養菌叢が大きく異なった．それぞれの菌種を同定，比較した結果，前者では Bacillus 属が優占したが，後者ではほとんど検出されず，Clostridium 属が検出された．変動前後の培養時間を種々検討した結果，変動前後に 48 h ずつ培養した場合に培養菌叢が大きく変化した．強酸性条件下での培養時間を種々検討した結果，48 h の変動培養で，耐酸性を持たない菌体の排除が可能であることが示された．現在，変動培養により得られる微生物種の傾向や未培養微生物の培養化について検討中である．

1) H29 日本生物工学会要旨 p. 161

Development of efficient screening system for acid tolerant and acidophilic microbes by taking advantage of pH shift culture

○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, pH slide culture, specialized cellulose film

2Gp01 メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* の *PER1, GUP1, CWH43* 遺伝子は細胞壁の強度維持に関与する

胥 欣欣[1,2], 小松崎 亜紀子[1], 千葉 靖典[1], 高 暁冬[2], ○横尾 岳彦[1]
（[1]産総研・創薬基盤, [2]江南大（中国））
t.yoko-o@aist.go.jp

グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）は糖脂質の一種であり，膜タンパク質の一部は GPI を介して細胞膜に結合している．GPI は小胞体で合成され，ポリペプチドに付加して GPI アンカー型タンパク質となり，ゴルジ体を経由して細胞表層に輸送される．*Ogataea minuta* は，異種タンパク質の大量生産に適したメタノール資化性酵母である．本種における GPI の生合成系の解析を試みた．出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において GPI の脂質リモデリングに関与する遺伝子 *PER1*，*GUP1*，*CWH43* の相同遺伝子がゲノム上に存在していたため，これらのクローニングを行い，その機能が出芽酵母の遺伝子と互換性を保っていることを明らかにした．*O. minuta* における *gup1* あるいは *cwh43* 遺伝子破壊株は高温感受性を示し，これらの表現型は培地に浸透圧調整剤を添加することで抑圧された．また，*gup1* 破壊株は Calcofluor White および SDS に超感受性を示した．これらの表現型より，細胞壁の強度維持に欠損を生じていることが示唆された．*O. minuta* の *per1* 破壊株においては同様だがさらに顕著な表現型を示し，増殖により重要であることが示された．Gas1 タンパク質は酵母における代表的な GPI アンカー型タンパク質であるが，*O. minuta* には 2 コピーの *GAS1* 遺伝子が存在することを見出し，それぞれ *GAS1A*，*GAS1B* と命名した．*per1* あるいは *gup1* 遺伝子破壊株では Gas1A および Gas1B タンパク質の局在が異常になったことから，脂質リモデリングは *O. minuta* においても GPI アンカー型タンパク質が正しく局在するために必須であることが明らかになった．

***PER1*, *GUP1* and *CWH43* of methylotrophic yeast *Ogataea minuta* are involved in cell wall integrity**

Xin-Xin Xu[1,2], Akiko Komatsuzaki[1], Yasunori Chiba[1], Xiao-Dong Gao[2],
○Takehiko Yoko-o[1]
([1]BRD, AIST, [2]Jiangnan Univ. (China))

Key words GPI anchor, methylotrophic yeast, *Ogataea minuta*, lipid remodeling

2Gp02 Multi-step 細胞融合による多倍体酵母の創製

○福田 展雄, 本田 真也
（産総研・バイオメディカル）
nob-fukuda@aist.go.jp

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は，最も理解された生命システムの 1 つであり，数多くの有用化合物の生産に利用されてきた．有性生殖に基づく酵母株の創製・改良方法では，各親株から一部の遺伝情報が継承され，次世代には多様な特性を有する酵母細胞群が生み出される可能性がある．しかしながら，次世代の各細胞に注目すれば，親株から継承できずに失われる配列情報が必ず存在し，望みの表現型を有する酵母株を合理的に創製することは困難であった．一方，プロトプラスト融合を用いた多倍体の創製法では，一過的には両親株の遺伝情報を統合することが可能であるが，その安定性に問題がある．
そこで本研究では，接合型遺伝子座特異的エンドヌクレアーゼ Ho を用いた多倍体酵母の創製法を確立した．酵母の接合型遺伝子には a 型と α 型が存在し，有性生殖の一環として a 型と α 型の酵母が融合して a/α 型の酵母を形成する．酵母の細胞内で Ho を発現すると双方向の接合型変換が生じるが，S288C 株由来の実験室酵母は一塩基変異を有しており，a 型から α 型への変換が殆ど発生しない．すなわち，a/α 型酵母に Ho を発現させれば，全ての接合遺伝子座が a 型となった酵母のみを得ることができ，これを α 型酵母と融合することで多倍体化が可能となる．さらに得られた酵母に Ho を発現させることで，再び a 型酵母を生み出すことができる．
本研究において，緑色・赤色蛍光タンパク質や転写因子など異なる遺伝子を有する α 型酵母を用いて細胞融合を行ったところ，創製した酵母株が想定の蛍光特性を発現することが確認された（*ACS Synth. Biol.*, in press）．S288C 派生株は実験室酵母として広く利用されており，本手法は既存の酵母株にも利用することが可能であるため，豊富なリソースを活用した多倍体酵母の創製が促進されるものと期待する．

Polyploid generation by multi-step mating of *Saccharomyces cerevisiae*

○Nobuo Fukuda, Shinya Honda
(Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words yeast, endonuclease, mating

2Gp03 DNA 切断型抗生物質を用いたカロテノイド高生産酵母変異株の取得

○渡部 裕介, 阿部 勝正, 解良 芳夫, 高橋 祥司
（長岡技科大院）
shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp

【背景と目的】カロテノイドは機能性素材として，食品，動物飼料や化粧品などの製品に添加されている．この様な状況から，カロテノイドの効率的な生産技術の開発が求められている．酵母 Rhodotorula gracilis は細胞乾燥重量の約 75％のカロテノイドを生産することが知られていることから，本酵母を用いたカロテノイド生産が注目されている．しかし，本酵母を用いたカロテノイドの商業生産には，さらなる生産量の増加が求められている．本酵母を DNA 切断型抗生物質を含む寒天培地に塗布したところ，カロテノイド由来の赤色強度が増加した株の生育が観察された．このことから，DNA 切断型抗生物質によるゲノム変異導入によりカロテノイド生産能が増強された変異株の取得が可能であると考えた．これまでに，DNA 切断型抗生物質を用いたゲノム変異導入法は報告されていないことから，新規の変異株取得方法としてカロテノイド高生産変異株の取得を検討した．
【方法と結果】R. gracilis ATCC 26217 株を用いて DNA 切断型抗生物質によるカロテノイド高生産株変異株のスクリーニング条件を検討した．YPD 液体培地で培養した本酵母細胞をプレートあたりの細胞数が 1.0×107 cells になるようゼオシン（0 - 3 μg/ml）またはフレオマイシン（0 - 0.7 μg/ml）を含む YPD 寒天培地に塗布し，生育した株の赤色強度を野生株と比較した．その結果，1.0 μg/ml ゼオシンもしくは 0.3 μg/ml フレオマイシン含む寒天培地において赤色強度が増加した株の割合は 0 - 3%だったが，ゼオシンおよびフレオマイシンをそれぞれ 2.0 μg/ml と 0.5 μg/ml に増加させた培地では 5 - 10%と増加し，最も高い割合となった．したがって，これら抗生物質濃度をカロテノイド高生産変異株取得の最適条件とした．現在，得られた変異株のカロテノイド生産能の評価を行っている．

Mutagenesis and selection of carotenoid hyper-producing mutants using DNA-cleaving antibiotics

○Yusuke Watabe, Katsumasa Abe, Yosio Kera, shouji Takahashi
(Nagaoka Univ. Technol.)

Key words Rhodotorula gracilis, carotenoids, antibiotics

2Gp04 出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析

○松崎 浩明, 藤原 祐気, 平島 宗一郎, 宮本 昭弘, 柳本 敏彰, 秦野 琢之
（福山大・生命工）
matsuzak@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のセントロメアはポイントセントロメアであり，動物細胞や分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の多数の繰り返し配列からなるセントロメアとは異なる．我々は，*S. cerevisiae* において pSR1 プラスミドの R-RS 部位特異的組換え系を利用して染色体からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を誘導するシステムを構築した．セントロメア DNA の切り出しは，一倍体細胞の第 IV 番染色体のセントロメア DNA の両側に組換え標的部位 (RS) を同じ方向に挿入し，ガラクトースにより R レコンビナーゼの発現を誘導して行う．レコンビナーゼの発現により生存率が大きく低下し，細胞死を誘導できた(生存率：1.4×10^{-5})．しかし，僅かな数の生存細胞が生じたので，生存細胞が出現するメカニズムを解析した．51 クローンの生存細胞のセントロメア DNA 近傍の PCR 解析や RS 領域のシークエンス解析から，主な出現メカニズムは，染色体から RS が 1 個欠失し，切り出しが起こらなかったことが示唆された(38 クローン)．また，生存細胞の中には，セントロメア DNA が切り出された細胞が低い割合で出現した(3 クローン)．これら 3 クローンの生存細胞について解析した．生存細胞の増殖速度は，切り出し前の株と顕著な差は認められなかった．パルスフィールドゲル電気泳動による染色体パターンの解析で生存細胞の第 IV 番染色体は少し短くなっている可能性が生じた．サザン解析から *CEN4* DNA は第 IV 番染色体から消失しているが，左腕テロメア近傍の *PHO13* 遺伝子と右腕テロメア近傍の *HSP31* 遺伝子は第 IV 番染色体に存在することが分かった．第 IV 番染色体が新たにセントロメア DNA を獲得した可能性があるので，生存細胞の第 IV 番染色体上のセントロメア DNA の位置や配列を解析し，出現メカニズムについて検討しようとしている．

Analysis for surviving cells appeared with induction of excision of centromeric DNA from a chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*

○Hiroaki Matsuzaki, Yuki Fujiwara, Soichiro Hirashima, Akihiro Miyamoto, Toshiaki Yanamoto, Takushi Hatano
(Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ.)

Key words cell death, centromere, site-specific recombination, *Saccharomyces cerevisiae*

2Gp05 新奇染色体工学技術を用いた多様なゲノム組成を持つ出芽酵母菌株ライブラリーの構築と菌株育種

○笹野 佑, 生田 宗一郎, 高木 佑希子, 高田 和真, 井出口 浩迪, 田口 久貴
（崇城大・生物生命）
sasano@bio.sojo-u.ac.jp

【背景と目的】 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，ゲノムスケールで操作を行うことにより多数の遺伝子を一挙に操作することが可能である．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，我々は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を対象として，多彩な染色体操作技術を開発してきた．なかでも CRISPR-PCD 法と CRISPR-PCDup 法は一度の操作で複数の染色体領域をそれぞれ欠失・重複する技術である．そこでこれらの新奇染色体工学技術を用いて，多様なゲノム組成を持つ菌株ライブラリーを創り出し，有用な菌株を選抜育種することを試みた．
【結果と考察】 出芽酵母の 17 箇所の染色体末端領域が様々な組み合わせで複数箇所欠失した菌株ライブラリーを CRISPR-PCD 法により得た．得られた菌株ライブラリーからギ酸やフルフラール等の様々な発酵阻害物質に対して耐性を示す酵母菌株をスクリーニングし，得られた菌株での欠失領域を解析した．その結果，11 番と 15 番染色体の右末端が同時に欠失した株は，35 mM ギ酸及び 80 mM 酢酸に対して耐性を示すことが明らかとなった．さらにギ酸含有培地での発酵試験を行ったところ，エタノール生産量に変化は無かったものの，野生株よりも増殖の立ち上がりが早くなり，エタノール生産性が向上した．また，4 番染色体左末端と右末端が同時に欠失した株はフルフラールとヒドロキシメチルフルフラールに耐性を示した．以上のように，新奇染色体工学技術の菌株育種における有用性が示された．現在，CRISPR-PCDup 法を用いた複数領域同時重複株ライブラリーの作製と有用菌株の選抜を行っている．

Construction of a strain library with genomic diversities by the novel chromosome engineering technology and its application for strain breeding in the budding yeast

○Yu Sasano, Soichiro Ikura, Yukiko Takaki, Kazuma Takata, Hiromichi Ideguchi, Hisataka Taguchi
(Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Chromosome engineering, CRISPR-PCD, Synthetic biology

2Gp06 CRISPR/Cas9 による担子菌系酵母 *Pseudozyma antarctica* の高効率相同組換え

○田中 拓未 [1], 國武 絵美 [1,2], 鎗水 透 [1], 遠藤 亮 [1], 加藤 悦子 [1], 北本 宏子 [1]
（[1]農研機構, [2]三重大院・生資）
kitamoto@affrc.go.jp

イネ常在性の担子菌系酵母 *Pseudozyma antarctica* は，強力な生分解性プラスチック（生プラ）分解酵素 PaE，リパーゼ CALB 等の酵素や，化粧品材料に用いられる糖脂質 MEL を生産する，産業上有用な微生物である [1]．本菌は遺伝子操作が難しく，その能力の向上や生物学的解析は進んでいない．我々は以前，薬剤耐性遺伝子をマーカーとし，*P. antarctica* を宿主として PaE を大量生産する方法を示した [2]．また，栄養要求性遺伝子をマーカーとした相同組換え技術も構築した [3]．しかし相同組換え効率は 3~13%程度と低く，選抜に労力を要するため，高効率な相同組換え法の構築が望まれる．本報告では，高効率なゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 を利用した相同組換えを試みた．
宿主には *P. antarctica* ウラシル要求性株（Pa*ura3*）を選択した．PaE 遺伝子である Pa*CLE1* 部位に対し Pa*URA3* を相同組換えした場合，ウラシル要求性が相補されると共に生プラ分解活性が失われることを，形質転換と相同組換えの成否の指標に用い，実験を進めることとした．Pa*CLE1* に設計したガイド RNA と精製 Cas9 を混合して複合体を形成させた．Pa*URA3* の両端に Pa*CLE1* の上流・下流配列を連結した DNA 断片を混合した後，プロトプラストに対して形質転換を行った．
条件検討の結果，CRISPR/Cas9 により *P. antarctica* の形質転換体を得ることができ，その相同組換え効率は 70%程度と，従来法より顕著に高かった．また，100bp 未満の短い相同領域を持つ DNA 断片を導入した場合でも相同組換え株が得られた．以上から，*P. antarctica* を容易に相同組換えすることが可能となった．
（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
3) Yarimizu T et al. *Yeast* (2017) 34:483

Efficient homologous recombination in basidiomycetous yeast *Pseudozyma antarctica* by CRISPR/Cas9

○Takumi Tanaka[1], Emi Kunitake[1,2], Tohru Yarimizu[1], Akira Endoh[1], Etsuko Katoh[1], Hiroko Kitamoto[1]
([1]NARO, [2]Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

Key words basidiomycetes, *Pseudozyma antarctica*, Homologous recombination, CRISPR/Cas9

2Gp07 担子菌酵母 *Pseudozyma antarctica* による組換え酵素生産に有用なプロモーターの探索と利用

○鎗水 透 [1], 小池 英明 [2], 森田 友岳 [3], 田中 拓未 [1], 北本 宏子 [1]
（[1]農研機構・農業環境セ, [2]産総研・生物プロセス, [3]産総研・機能科学）
kitamoto@affrc.go.jp

プラスチックは社会の様々な場面で利用されるが，自然環境中にごみとして拡散し，蓄積されていることが世界的な問題である．これに対して環境微生物が代謝できる素材で作られた生分解性プラスチック（生プラ）の利用が進められているが，分解の制御が困難であるなど，課題が多い．
植物から単離された担子菌酵母 *Pseudozyma antarctica* は，農業用の資材に用いられる生プラを分解するエステラーゼ（PaE）を生産する．我々は PaE を大量生産する技術の開発を進め，本菌がキシロース誘導的に PaE を分泌生産することを明らかにした(1)．さらに，キシロース存在下で働く強力なプロモーターの制御下で PaE を大量生産できる *P. antarctica* の組換え体を取得することに成功した(2)．今回は，キシロースよりも安価な糖から PaE を生産することを目標に，グルコース存在下で働く強力なプロモーター配列を探索して利用することに着手した．
まず，グルコース存在下で培養された *P. antarctica* の転写産物をマイクロアレイによって解析した．この解析から転写量の多いことが示された 13 種の遺伝子に注目し，これらのプロモーター配列の活性を調べた．レポーターアッセイには，ルシフェラーゼを用いた．ルシフェラーゼはセレンテラジンをセレンテラミドに変換する酵素であるが，反応の過程で発生した光の強度から遺伝子の発現量が評価できる．我々は，各プロモーター遺伝子の下流にルシフェラーゼ遺伝子を接続して *P. antarctica* に導入し，形質転換体のルシフェラーゼ活性を比較した．今回調べた中で特に高発現であったものを用いて PaE を発現させることで，グルコース存在下での PaE の生産を可能とした．（本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 25017AB で実施した．）
(1) Watanabe et al., J Biosci Bioeng., 2013.
(2) Watanabe et al., Appl Microbiol Biotechnol., 2016.

Isolation of the effective promotor sequences for recombinant gene expression in basidiomycetous yeast *Pseudozyma antarctica*

○Tohru Yarimizu[1], Koike Hideaki[2], Tomotake Morita[3], Takumi Tanaka[1], Hiroko Kitamoto[1]
([1]Institute for Agro-Environmental Sciences., [2]BRI. AIST, [3]AIST)

Key words *Pseudozyma antarctica*, gene expression analysis, promoter, protein expression

2Gp08 韓国伝統的麹 *Nuruk* から単離された酵母 *Pichia kudriavzevii* N77-4 の機能解析

○杉山 峰崇[1], 松下 青葉[2], 高島 匠平[2], 宮下 夏美[2], 村山 亮太[1], 石田 圭[1], 深谷 健[1], 内山 進[1], Baek Seong Yeol[3], Mun Ji-Young[3], Kim Soyoung[3], Yeo Soo-Hwan[3]
（[1]阪大院・工, [2]阪大・工, [3]Dept. Agrofood Resources・NIAS・RDA）
sugi2@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Pichia kudriavzevii N77-4 株は韓国の伝統的麹である *Nuruk* から単離された揮発性成分を高生産する酵母である．本研究では，*P. kudriavzevii* N77-4 の特徴解析とストレス耐性能力や発酵能力の改良を目指して機能解析を行った．発酵試験を行ったところ，2%グルコース培地では良好な生育を示し，7.4 g/L のエタノールを生産した．しかし，25%グルコース培地では，エタノールを 14 g/L 程度生産した辺りから増殖が抑えられエタノール生産収率も低下した．エタノール耐性を調べたところ，2%グルコース条件下では，1%エタノール添加から感受性を示し，25%グルコース条件下では，9%エタノール添加で生存率が極端に低下した．従って，比較的低い濃度からエタノールストレスを受けることがわかった．倍数性を解析したところ，N77-4 は 2 倍体であり，相同組換えによる遺伝的改変が可能であることがわかった．全く明らかとなっていない本酵母のエタノールストレス適応機構を探るためその転写応答を調べたところ，*Saccharomyces cerevisiae* において様々なストレス適応に必須となる転写因子遺伝子 *MSN2* のオーソログである *PkMSN2* などがエタノールストレスに応じて発現誘導を受けることを見出した．しかし，*S. cerevisiae* のエタノール耐性に必要でありイノシトール合成の律速酵素をコードする *INO1* のオーソログである *PkINO1* の発現は低下することを見出した．そこで，*PkINO1* を過剰発現させたところ N77-4 のエタノール耐性は向上し，イノシトールの添加によっても耐性が向上することがわかった．*PkINO1* の発現低下が強いエタノール感受性の一因である可能性が示唆された．

Functional analysis of *Pichia Kudriavzevii* N77-4 isolated from the Korean traditional fermentation starter *Nuruk*

○Minetaka Sugiyama[1], Aoba Matsushita[2], Shohei Takashima[2], Natsumi Miyashita[2], Ryota Murayama[1], Kei Ishida[1], Takeru Fukaya[1], Susumu Uchiyama[1], Seong Yeol Baek[3], Ji-Young Mun[3], Soyoung Kim[3], Soo-Hwan Yeo[3]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Faculty of Eng., Osaka Univ., [3]Dept. Agrofood Resources・NIAS・RDA)

Key words *Pichia kudriavzevii*, yeast, ethanol stress

2Gp09 遺伝子組換え効率向上に向けた DNA リガーゼ IV 欠損 *Pichia pastoris* 株の開発

○伊藤 洋一郎[1], 渡邉 徹[2], 藍川 晋平[1], 西 輝之[2], 西山 陶三[2], 中村 泰之[1], 蓮沼 誠久[1], 八十原 良彦[2], 石井 純[1], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]カネカ）
junjun@port.kobe-u.ac.jp

メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris*（*Komagataella phaffii*）は，高密度培養が可能であり，タンパク質の分泌生産能に優れていることから，組換えタンパク質生産のための宿主として利用されている．しかし，非相同性組み換え機構が強いことから，正しい部位への遺伝子組換え効率（ターゲット効率）が低いことが知られている．そこで本研究では，*P. pastoris* の非相同組換え機構の一つ DNA リガーゼ IV（Dnl4p）に着目し，その遺伝子を破壊することで，ターゲット効率への影響を調べた．具体的には，Dnl4p 及び，先行研究にてターゲット効率が増加することが知られている非相同組換え機構に関するタンパク質の一つである，Ku70p をコードする遺伝子（*DNL4* 及び *KU70*）をそれぞれ破壊した株を作製した．なお破壊株の作製には，遺伝子破壊後に選択マーカーを取り除く 2 つのマーカーリサイクリング技術を用いた．これらの破壊株及び野生株を用いて，ダブルクロスオーバー相同組換えのモデル実験を行なった結果，*DNL4* 破壊株のターゲット効率は 70～80%と，野生型（～10%）及び *KU70* 破壊株（20～30%）と比較して増加していた．またこれらの二重破壊株では，さらにターゲット効率が 75～85%へと増加した．本発表では，*DNL4* 破壊株を用いた応用研究に関しても議論したい．

Deletion of DNA ligase IV homolog confers higher gene targeting efficiency on homologous recombination in *Pichia pastoris*

○Yoichiro Ito[1], Toru Watanabe[2], Shimpei Aikawa[1], Teruyuki Nishi[2], Tozo Nishiyama[2], Yasuyuki Nakamura[1], Tomohisa Hasunuma[1], Yoshihiko Yasohara[2], Jun Ishii[1], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Kaneka Corp.)

Key words *Pichia pastoris*, homologous recombination, DNA ligase IV, marker recycling

2Gp10 *Pichia pastoris* におけるセントロメア DNA 配列を用いた自律複製型プラスミドベクターの開発

○中村 泰之[1], 西 輝之[1,2], 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）
junjun@port.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．次に同定したセントロメア DNA 配列全長（Cen2）を含むプラスミドを構築した結果，その形質転換体は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．また，qPCR によりプラスミドコピー数を測定した結果，Cen2 ベクターはシングルコピー型ベクターであることが示唆される．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, autonomously replicating plasmid vector containing *Pichia pastoris* centromeric DNA

○Yasuyuki Nakamura[1], Teruyuki Nishi[1,2], 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, autonomously replicating plasmid, plasmid retention

2Gp11 *Pichia pastoris* における自律複製型ベクターを用いた効率的な DNA マルチアセンブル法

○西 輝之[1,2], 西山 陶三[2], 山路 大樹[3], 玉井 雅也[3], 渡邉 徹[2], 中村 泰之[1], 伊藤 洋一郎[1], 石井 純[1], 近藤 昭彦[1], 八十原 良彦[2]
（[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）
Teruyuki.Nishi@kaneka.co.jp

バイオ医薬品の製造実績があるメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* における高安定性自律複製型ベクター開発には，セントロメア DNA 配列が必須である．我々は，*P. pastoris* の 4 本の染色体ゲノム配列情報解析から，約 0.9～1.4 kbp の領域を挟んだ両側に約 2～2.7 kbp もの長い逆向き繰り返し配列を有するセントロメア DNA 配列を同定し，本セントロメア DNA を含む，高い安定性を有する自律複製型プラスミドベクターを開発している（WO2016/088824）．
本発表では，直鎖状にした自律複製型プラスミドベクターと，本ベクターとの相同領域を有する DNA 断片を同時に形質転換し，*P. pastoris* 内において高効率かつ正確に連結・環状化させる *in vivo* アセンブル法を紹介する．本手法により，合計約 24 kbp からなる独立した 8 本の DNA 断片の連結においても，90%以上の高効率で正確な配列を有する環状プラスミドベクターを取得することが出来た．これは，*P. pastoris* 内において複数の DNA 断片を高効率に連結させて数十 kbp もの長鎖ベクターを構築させた初めての報告例である．

A simple and efficient DNA multi-assemble method using episomal vector in *Pichia pastoris*

○Teruyuki Nishi[1,2], Tozo Nishiyama[2], Taiki Yamaji[3], Masaya Tamai[3], Toru Watanabe[2], Yasuyuki Nakamura[1], Yoichiro Ito[1], Jun Ishii[1], Akihiko Kondo[1], Yoshihiko Yasohara[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Kaneka Corp., [3]TRAHED)

Key words *Pichia pastoris*, Autonomously replicating plasmid, DNA assemble, Synthetic biology

2Hp01 海洋性紅色光合成細菌の形質転換系の開発と窒素固定能の評価

○樋口 美栄子, 森崎 久美子, 沼田 圭司
（理研CSRS・バイオ高分子）
keiji.numata@riken.jp

非酸素発生型光合成細菌は，水のかわりに有機物などを電子供与体として用いることから，有機性廃棄物の処理への利用が可能であり，また大気中の窒素を用いた窒素固定能を有する種類が存在することから，クリーンで持続可能な生産技術としての利用が期待できる有用な生物である．我々は海洋性の紅色光合成細菌に注目し，人工海水を用いた培養でバイオプラスチックの 1 つであるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）合成が可能であること，高分子量の PHA を合成できるなどの応用展開に有利な性質を報告している．光合成細菌に外来遺伝子を導入する手段としては，主に接合法が用いられている．しかし接合法では，汎用的なベクターなどを直接用いることができず，簡便な手法の開発が望まれている．そこで，カナマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドの導入を複数の海洋性紅色光合成細菌を用いて検証した．その結果，光合成細菌を塩化カルシウムで処理することにより作成したコンピテントセルを形質転換に用いたところ，カナマイシン耐性のコロニーが得られ，プラスミド DNA の光合成細菌への導入が確認できた．次に，紅色光合成細菌の持つ窒素固定能について検証した．窒素源を窒素ガスのみとした培地における生育を複数の細菌株について観察した結果，数株の紅色光合成細菌については生育が認められた．窒素のアンモニアへの変換を触媒するニトロゲナーゼの活性をアセチレン還元アッセイにより評価した結果，窒素ガス環境下でよい生育を示した株は，高いニトロゲナーゼ活性を示していた．これらの結果から，紅色光合成細菌は，ニトロゲナーゼによる窒素固定により窒素ガスを単独の窒素源として生育できることが示唆された．

Development of transformation method and evaluation of nitrogen fixation ability using marine purple photosynthetic bacteria

○Mieko Higuchi, Kumiko Morisaki, Keiji Numata
(RIKEN CSRS, Biomacromolecules)

Key words transformation, nitrogen fixation, photosynthetic bacteria

2Hp02 ユーグレナ低酸素下ワックスエステル合成におけるミトコンドリア電子伝達系の機能解明

○西本 歩紗 [1], 中澤 昌美 [1], 石川 孝博 [2], 乾 博 [3], 上田 光宏 [1], 阪本 龍司 [1]
（[1]阪府大院・生環科, [2]島根大・生物資源, [3]阪府大院・栄養）
mami@biochem.osakafu-u.ac.jp

微細藻類ユーグレナは好気状態で貯蔵多糖パラミロンを細胞内に蓄積する．パラミロンは低酸素曝露により速やかに分解され，ワックスエステル (WE) へと変換される．WE の主成分はミリスチン酸ミリスチルであり，バイオディーゼル燃料やバイオジェット燃料の原料としての利用が期待されている．ユーグレナの WE 蓄積量は細胞乾燥重の約 30%に達するが，実用化にはさらなる生産量向上が望まれている．その達成には，未だ不明な点が多い WE 合成メカニズムの解明が必須である．当研究グループでは，低酸素状態での WE 合成量がミトコンドリア電子伝達系複合体 I 阻害剤の存在下で大幅に減少することを明らかにしてきた．しかし，WE 合成における電子伝達系の具体的な機能は不明である．本研究では，ユーグレナのミトコンドリア電子伝達系の構成要素である電子伝達タンパク質 (ETF) と ETF 酸化還元酵素 (ETFOR) の発現抑制を行い，低酸素状態での WE 合成に及ぼす影響を調べた．さらに，脱共役剤による電子伝達系調節が WE 合成に及ぼす影響を調べた．
ETF，ETFOR の各発現抑制群ではコントロール群と比べ WE 合成量が約 20%まで減少した．このことから，低酸素状態のユーグレナは，ミトコンドリア電子伝達系で生じた還元力を，WE 合成に繋がるミトコンドリア脂肪酸合成系で利用していることが示唆された．またこのとき，各発現抑制群でもパラミロンが分解されていたことから，各発現抑制群においてパラミロン由来の炭素が WE 合成以外の経路で代謝されていることが示唆された．最後に，ミトコンドリア膜内外のプロトン勾配を解消することで電子伝達を促進することが知られている脱共役剤 CCCP を作用させたところ，低酸素状態でパラミロンはほぼ完全に分解され，同時に WE 合成量が 2 倍以上に増加した．このことから，電子伝達の促進により WE 生産の向上が可能であることが示唆された．

Contribution of mitochondrial anaerobic respiration in wax ester production under hypoxia in *Euglena*

○Ayusa Nishimoto[1], Masami Nakazawa[1], Takahiro Ishikawa[2], Hiroshi Inui[3], Mitsuhiro Ueda[1], Tatsuji Sakamoto[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [3]Dep. Nutri., Osaka Pref. Univ.)

Key words *Euglena*, wax ester fermentation, anaerobic respiration, electron transfer flavoprotein

2Hp03 セルフクローニングを反復利用した代謝工学による単細胞性緑藻 *Coccomyxa* 属の脂質生産性改良

○笠井 由紀, 塚原 拓也, 池田 富貴子, 井出 曜子, 原山 重明
（中央大・理工）
ykasai@kc.chuo-u.ac.jp

近年，単細胞性緑藻を利用したバイオ燃料の生産が注目を集めている．我々はバイオ燃料生産性の改良を目指して，より実用化への障壁が少ないセルフクローニング技術を利用した分子育種に取り組んでいる．現在 *Coccomyxa* 属のセルフクローニングに利用可能な選択マーカーはウラシル合成遺伝子（*UMPS*）のみで，同一株に複数の遺伝子を個々に導入する事ができない．この問題を解決するために，Cre/*loxP* system を利用して選択マーカー遺伝子の繰り返し使用を可能にする方法を開発した．ウラシル要求突然変異（Ura^-）株に *loxP* 配列で挟まれた *UMPS* 発現カセット（*loxP_UMPS_loxP*）を導入し，ウラシル要求性を回復した形質転換体（Ura^+）を選抜した．精製した Cre タンパク質を Ura^+形質転換株に導入したところ，*loxP_UMPS_loxP* が切り出されて再度 Ura^-になったため，*UMPS* の再利用が可能になった．
本方法を使い，脂質合成に関与する acyl-(acyl-carrier-protein) thioesterase 遺伝子（*FAT1*）および type-2 diacylglycerol acyltransferase 遺伝子（*DGAT2d*）を逐次導入した脂質高生産株の作製を試みた．初めに Ura^-株に *loxP_UMPS_loxP* と *FAT1* 発現カセットを共導入し，脂質生産性が野生株の 1.1 倍に増加した形質転換株を作製した．この株から *loxP_UMPS_loxP* を Cre タンパク質で切り出して Ura^-株を分離した後，*loxP_UMPS_loxP* と *DGAT2d* 発現カセットを共導入した．その結果，脂質生産性が野生株の 1.4 倍に増加した形質転換株が得られた．本方法は他の微細藻類にも適用可能で，選択マーカー等外来遺伝子の除去に有用である．

Metabolic engineering using iterative self-cloning to improve lipid productivity in *Coccomyxa*

○Yuki Kasai, Takuya Tsukahara, Fukiko Ikeda, Yoko Ide, Shigeaki Harayama
(Fac. Sci. Eng., Chuo Univ.)

Key words Cre/LoxP system, *Coccomyxa*, self-cloning, triglyceride

2Hp04 屋外培養可能な新奇微細藻類による有用油脂の生産

○佐々木 美月 [1], 福田 寛史 [1], 佐々木 智子 [2], 佐々木 大作 [2], 朝山 宗彦 [1]
（[1]茨城大院・農, [2]Biox化学工業）
munehiko.asayama.777@vc.ibaraki.ac.jp

【目的】 通年を通して屋外培養可能な新奇天然藻を単離し，この株を用いてバイオ燃料や飲食品向け有用油脂生産に資する基盤研究を行なった．
【方法】 天然水ベースの培養液から微細藻類を混釈法により寒天培地上で単離した．本株の 18S rDNA 配列を決定し，分子進化系統樹を作成して分類した．BX1.5 株を 1.5 から 10 トン規模で屋外培養をして，バイオマス量を測定した．回収した菌体から油脂を抽出し，薄層クロマトグラフィー (TLC) やガスクロマトグラフィー/水素炎イオン化検出器 (GC/FID) により組成分析した．
【結果と考察】 18S rDNA 配列などの分析結果より，本株はトレボウクシア藻綱パラクロレラ属に分類される新種 (或いは亜種) 株であり，これを BX1.5 と命名した．本株は本州域でも通年培養が可能であり，培養液 1 トンあたり乾燥重量で 100 グラム以上のバイオマスが得られた．屋外培養由来の BX1.5 株を，さらに窒素源欠乏やリン源欠乏培地で培養すると，数日のうちに細胞内に大量の油滴を蓄積することが明らかとなった．この様子を光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察すると，油滴蓄積とともに細胞の肥大が確認された．また細胞内に蓄積した油脂の組成を分析した結果，培地の栄養源欠乏条件に依存して，脂質の成分や生産量に変化が見られた．特に，窒素・リン源欠乏で培養した場合には，バイオ燃料や飲食品向け油脂の増産・蓄積が顕著に観察され，本株の有用性が明らかとなった．

Production of useful lipid by the novel microalga from outdoor culture

○Mitsuki Sasaki[1], Hirofumi Fukuda[1], Satoko Sasaki[2], Daisaku Sasaki[2], Munehiko Asayama[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Ibaraki Univ., [2]Biox Chemical Industries Co. Ltd.)

Key words biofuel, lipid, microalgae, outdoor cultivation

2Hp05 Effect of immobilized *Chlorella Sorokiniana* culture on lipid accumulation and CO_2 sequestration.

○Daniel Alejandro Alfaro Sayes[1], Jerome Amoah[1], Shinji Hama[3], Ayumi Yoshida[3], Akihiko Kondo[2], Chiaki Ogino[1]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Bioenergy Corp, Res. Dev. Lab.)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

Immobilized cells entrapped within a polymer matrix have advantages over free cell culture, easier harvesting of biomass, enhanced water treatment and enriched bioproduct generation, so far this method has been used mostly with the purpose of removal of nutrients and biosensors.
On this study the effects of immobilized culture on cell growth, lipid productivity and CO_2 sequestration of green microalgae *Chlorella Sorokiniana* were investigated, to this end the microalgae strain was cultured both in free and in immobilized conditions under optimal autotrophic growth parameters in Bold 3N medium in 500 ml batch reactors for a period of 10 days. The immobilization method chosen for this study was cell entrapment inside alginate beads. The CO_2 sequestration between the two types of culture was similar between the two types of culture but there were notable differences between the light transmittance, biomass and lipid productivity. The light transmittance in the immobilized culture was 5 times higher than in the free cell culture, the highest amount of biomass obtained for free cell culture was 2.639±0.050 g/L compared to 6.280±0.063g/L in immobilized culture and the amount of lipid for free cell culture was 0.416±0.087 g/L compared to 1.464±0.095 g/L in immobilized culture, the biomass and lipids produced by the immobilized culture were over 2 times the amounts obtained by the free cell culture, this shows that the immobilized culture has a favorable effect on the growth and lipid accumulation of the microalgae.

Effect of immobilized *Chlorella Sorokiniana* culture on lipid accumulation and CO_2 sequestration.

○Daniel Alejandro Alfaro Sayes[1], Jerome Amoah[1], Shinji Hama[3], Ayumi Yoshida[3], Akihiko Kondo[2], Chiaki Ogino[1]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Bioenergy Corp, Res. Dev. Lab.)

Key words *Chlorella sorokiniana*, marine microalgae, immobilized cell, Alginate beads

2Hp06 排水中の細菌群集による微細藻類の増殖促進

○遠山 忠[1], 糟谷 まり[2], 田中 靖浩[1], 森川 正章[3], 森 一博[1]
([1]山梨大院・総研部, [2]山梨大院・医工農, [3]北大院・環境)
ttohyama@yamanashi.ac.jp

【目的】経済的かつ持続可能な微細藻類燃料生産を目指し，排水を利用した微細藻類培養が注目されている．排水中の細菌群は微細藻類の増殖に大きな影響を及ぼすものと考えられるが，その詳細は分かっていない．本研究では，排水中の細菌群が 3 種類の微細藻類（*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Euglena gracilis*）の増殖に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした．
【方法および結果】3 種類の排水処理施設から採取した排水をオートクレーブにて滅菌処理したものと，オートクレーブ処理せずに生菌を残したものとに分け，合計 6 種類の排水を用いて 3 種類の微細藻類を培養した．その結果，排水中の細菌群が微細藻類の増殖を有意に促進することが観察され，その増殖促進は 3 種類の排水および 3 種類の微細藻類に共通していた．この結果から，排水中には微細藻類増殖促進細菌（microalgae growth-promoting bacteria: MGPB）が広く分布していることが示唆された．微細藻類に共生する細菌を 80 株以上分離して系統解析したところ，そのほとんどが *Alphaproteobacteria* 綱に属していた．また，分離株の 7 割程度が宿主微細藻類の増殖を促進したものの，1 割程度の分離菌株は宿主微細藻類の増殖を阻害した．このことから，排水中において微細藻類は MGPB と共生関係を築いているものの，増殖阻害細菌もその共生細菌群に含まれていることが示唆された．今後，優秀な MGPB を選抜し，微細藻類培養のプロバイオティクス材料として応用することが期待できる．

Growth promotion of microalgae by indigenous bacteria in wastewater effluent

○Tadashi Toyama[1], Mari Kasuya[2], Yasuhiro Tanaka[1], Masaaki Morikawa[3], Kazuhiro Mori[1]
([1]Grad. Fac. Interdisc. Res., Univ. Yamanashi, [2]Sch. Med. Eng. AGR., Univ. Yamanashi, [3]Grad. Sch. Environ. Sci., Hokkaido Univ.)

Key words microalgae, biomass, microalgae growth-promoting bacteria

2Hp07 *Nitratireductor* sp. OM-1 の軽油生産におけるアンモニウムの影響

○登 祐介[1], 高橋 宏和[1], 秋 庸裕[1], 中島田 豊[1], 松村 幸彦[2], 岡村 好子[1]
([1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・工)
okamuray@hiroshima-u.ac.jp

【目的】我々は，バイオマスから 2 段階培養によって遺伝子組み換えを行わずにバイオ燃料を生産する研究を行ってきた．当研究室では，ギ酸から吉草酸までの低級有機酸をバイオディーゼルに変換することができる *Nitratireductor* sp. OM-1 株を取得している．OM-1 株は，窒素飢餓条件下で細胞あたり約 90%のバイオディーゼルを蓄積することができる．しかし，有機酸廃液及びバイオマス発酵液中には，高濃度の NH_4^+が含まれており，高効率にバイオディーゼルを生産するには，液中の NH_4^+を減少させることが課題である．そこで，本研究では，OM-1 株のバイオディーゼル生産における廃液中の NH_4^+の影響を調べ，電気化学的に NH_4^+を除去することを検討した．
【方法及び結果】実発酵廃液中での OM-1 株の軽油生産に対する NH_4^+の影響を調べるために，実発酵廃液組成を合成培地で再現した．NH_4^+なしの時，252.2 mg/g-DCW で NH_4^+ありの条件より約 4.4 倍の油脂生産が確認され，NH_4^+による油脂生産の阻害が証明された．次に，NH_4^+を電気化学的に誘引除去するために次のリアクターを設計した．本実験で用いたリアクターは，2 つのチャンバーの間に陽イオン交換膜を挟み，陽極槽に窒素源として NH_4Cl 1.0 g/L を含むモデル培地を，陰極槽に PBS をそれぞれ加えた．3V の電圧印加では，24 時間以内に約 90%の NH_4^+除去に成功したが，培養液中の Cl^-の酸化も生じ，OM-1 株の生育が阻害された．また，0.8 V の電圧印加では，48 時間後，NH_4^+は 321.5 mg/L から 147.0 mg/L の減少にとどまったが，Cl^-の酸化は生じず，有機酸濃度の減少もあまり見られず，OM-1 株の生育が可能であった．今後はリアクターの稼働条件をさらに検討し，NH_4^+の完全除去を試みる．

The effect of ammonium on biodiesel production in *Nitratireductor* sp. OM - 1

○Yusuke Noboru[1], Hirokazu Takahasi[1], Tsunehiro Aki[1], Yutaka Nakasimada[1], Yukihiko Matumura[2], Yoshiko Okamura[1]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Inst. Eng., Hiroshima Univ.)

Key words biodiesel fuel, biomass, volatile fatty acids

2Hp08 海洋性菌叢を用いた塩環境下でのアルギン酸からの高効率揮発性脂肪酸生産

○喜多 晃久[1,4], 三浦 豊和[2,4], 越智 匠[1], 早瀬 伸樹[1], 岡村 好子[2,4], 秋 庸裕[2,4], 松村 幸彦[3,4], 加藤 節[2], 田島 誉久[2,4], 加藤 純一[2], 中島田 豊[2,4]
([1]新居浜高専, [2]広島大院・先端物質, [3]広島大院・工・エネ環, [4]JST・CREST)
kita@chem.niihama-nct.ac.jp

【背景と目的】 アルギン酸は褐藻類由来の有望な炭素源である．しかし，大腸菌などの工業的に利用されている微生物では，遺伝子組換え無しにアルギン酸を資化することができない．そのような中で，我々は遺伝子組換えを伴わずにアルギン酸を効率的に嫌気分解し，揮発性脂肪酸（VFAs）を生産することができる海洋性菌叢の取得に成功した．VFAs はバイオプラスチックやバイオガス，バイオディーゼル生産などへ広く応用できる．これまで VFAs の商業生産は主に化学合成によって行われてきたが，石油価格の高騰などにより，生物学的生産への関心が高まっている．そこで，本研究ではバイオリアクターを用いて，海洋性菌叢による塩環境下でのアルギン酸からの高効率 VFAs 生産を試みた．
【方法と結果】50 g/l のアルギン酸ナトリウムを単独炭素源とし，バイオリアクターにより pH を 7~7.5 に制御して 3%塩環境下で海洋性菌叢を培養したところ，培養 36 時間で約 15.6g/l の total VFAs を生産することができた．主な VFAs は酢酸，プロピオン酸，コハク酸であった．さらに，その最大生産速度は約 26.2g/l/d であり，既報の遺伝子組換えされた *Sphingomonas* によるアルギン酸ナトリウムからのピルビン酸およびエタノール生産の速度と比較しても顕著に高かった．また，我々の研究グループでは，アルギン酸ナトリウムから生産された VFAs を用いた二段階培養により，バイオディーゼルの原料となる有用脂質を生産することにも成功している（喜多ら，2017 年生物工学会大会）．従って本研究の結果から，微生物共生系および二段階培養システムを応用することによって，単菌よりも高効率に，遺伝子組換えを伴わないアルギン酸からの高機能性化学品生産システムを構築することができる可能性が示された．

High-rate fermentation of alginate to volatile fatty acids under saline condition by marine bacterial consortium

○Akihisa Kita[1,4], Toyokazu Miura[2,4], Takumi Ochi[1], Nobuki Hayase[1], Yoshiko Okamura[2,4], Tsunehiro Aki[2,4], Yukihiko Matsumura[3,4], Setsu Kato[2], Takahisa Tajima[2,4], Junichi Kato[2], Yutaka Nakashimada[2,4]
([1]Niihama Natl. Coll. Technol., [2]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [3]Div. Ener. Environ., Inst. Eng. Hiroshima Univ, [4]CREST, JST)

Key words alginate, bacterial consortium, volatile fatty acids, symbiosis

2Hp09 気相培養における気生微細藻類 *Coccomyxa* sp. KGU-D001 の脂質蓄積と細胞内 CN 比

○川島 成貴, 油井 信弘, 菅原 康里, 今村 保忠, 阿部 克也
（工学院大・先進工・生化）
bt13347@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】大気中の CO_2 を効率的に供給できる気相培養は，培養装置を省スペース化でき，脱水や回収も容易にする．気生微細藻類 *Coccomyxa* sp. KGU-D001 (*Coccomyxa* sp.)は，気相培養により，油滴形成に伴う脂質蓄積量の増加が引き起こされることがわかってきた．細胞内外の窒素源は脂質合成に影響を与えるため，細胞増殖と油滴形成の同時進行は困難である．炭素源と窒素源の割合が脂質蓄積に関与していることから，本研究では，気相培養における *Coccomyxa* sp.の脂質蓄積と細胞内 CN 比について検討した結果を述べる．
【方法】トレボクシア藻綱 *Coccomyxa* sp. KGU-D001 を，BB 培地を用いて対数増殖期となる 10 日目まで液相培養した．その後，藻体をメンブレンフィルターに吸着させ，*Coccomyxa* sp.の細胞フィルムを作製した（厚さ：17μm）．純水を含ませた綿上に細胞フィルムを置き，温度 25℃，光強度 40 μmol photons m^{-2} s^{-1}，7 日間シャーレ内で気相培養した．細胞フィルムの脂肪酸含有量は GC により，全有機炭素量（TOC）および全窒素量（TN）は TOC-TN 計により，それぞれ測定した．
【結果・考察】*Coccomyxa* sp.の細胞フィルムを 7 日間気相培養すると，細胞内 CN 比の増加に伴い脂肪酸含有量は 2.4 倍増加した．培養 2 日目では，細胞内 TN が約半分，細胞数が約 2 倍となり，細胞は一度分裂したことが分かった．さらに，オレイン酸含有量は約 7 倍増加したことから，対数増殖期にある藻細胞は，液相から気相条件に切り替わると，細胞内の窒素源を用いて細胞分裂し，それと同時に油滴形成を開始することが示された．おそらく気相培養により CO_2 の供給量が増え，細胞内 CN 比が増大したためと考えられる．今後は気相条件における藻細胞の脂質代謝を明らかにするため，窒素源の供給を検討するとともに，細胞分裂前後と油滴形成時の細胞内全糖と光合成活性について分析する．

Lipid accumulation and carbon/nitrogen ratio in the aerial microalga *Coccomyxa* sp. KGU-D001 biofilm

○Naritaka Kawashima, Nobuhiro Aburai, Yasusato Sugahara, Yasutada Imamura, Katsuya Abe
(Dept. Chem. Life Sci., Sch. Adv Eng., Kogakuin Univ.)

Key words aerial microalgae, biofilm, lipid accumulation, carbon/nitrogen ratio

2Hp10 Enhanced oleic acid production by overexpressing delta 9-fatty acid desaturase gene in oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides for designed biodiesel production.

○Yung-Yu Tsai[1], Takao Ohashi[1], Chih-Chan Wu[1], Bataa Dolgormaa[1], Ryo Misaki[1], Savitree Limtong[2], Kazuhito Fujiyama[1]
([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Fac. Sci., Kasetsart Univ.)
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

Rhodosporidium toruloides, a potential microbial-based platform for lipid production, yet the limited understanding of genetic manipulation has confined its further study and application. Previous studies have suggested that the enrichment of oleic acid (OA) by over 60% of proportion in the biodiesel providing improved fuel properties such as stability and emission after use. In order to genetically operate R. toruloides strains for the designed lipid content towards the preferable fuel performance, a lithium acetate based transformation system was developed.
Saccharomyces cerevisiae OLE1 (ScOLE1) gene encodes stearoyl-CoA desaturase to catalyze palmitic acid and stearic acid for yielding palmitoleic acid and oleic acid. However, the function of Δ9-fatty acid desaturase (RtΔ9-FAD) gene from R. toruloides NP11, a homologous gene of ScOLE1 has yet be determined. Thereby, RtΔ9-FAD was complementary tested to rescue the survival of ole1 disrupted S. cerevisiae strain. For the further OA-enriched lipid production, ScOLE1 and RtΔ9-FAD gene were then individually introduced in R. toruloides strains (DMKU3-TK16 and NP11). While, successful overexpression of ScOLE1 and RtΔ9-FAD in transformants enabled gaining higher OA content by the proportion over 60% in total lipid. Moreover, the transformants also provided higher lipid productivity compared with wild type. Overall, the overexpression of ScOLE1 and RtΔ9-FAD in R. toruloides strains could supply OA-enriched lipid as a suitable source of designed biodiesel.

Enhanced oleic acid production by overexpressing delta 9-fatty acid desaturase gene in oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides for designed biodiesel production.

○Yung-Yu Tsai[1], Takao Ohashi[1], Chih-Chan Wu[1], Bataa Dolgormaa[1], Ryo Misaki[1], Savitree Limtong[2], Kazuhito Fujiyama[1]
([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Fac. Sci., Kasetsart Univ.)

Key words *Rhodosporidium toruloides*, biodiesel, oleic acid

2Hp11 Multiple stress tolerances in a thermotolerant L1-1 isolated from oleaginous yeast *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]Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol., [2]Fac. Sci., Kasetsart Univ., Thailand)
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

Oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* has recently drawn considerable attention as a great producer for lipid-related chemicals feedstocks and fuels because of its high lipogenesis capability. *R. toruloides* DMKU3-TK16 (TK16), which was isolated from Thailand, produces high oleic acid-containing lipids. In our previous study, we isolated one thermotolerant mutant L1-1 from TK16 which exhibits better thermotolerance and greater oleic acid-producing ability at 37°C. In this study, we assessed the stress-resistant ability of the mutant strain against other stresses such as osmotic, oxidative, salt stress, organic acid, and alcohol stress. The thermotolerant mutant revealed significantly greater growth in the medium containing ethanol and hydrogen peroxide in comparison than those in wild-type TK16. In the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*, high concentration of ethanol and hydrogen peroxide influence the membrane fluidity and become toxic to membrane proteins, resulting in the cell growth inhibition and even death. The studies of *S. cerevisiae* also indicated that ethanol and oxidative stress induced the similar responses to heat-induced cell death. Although further evidence is indispensable to unravel the protective machinery against those stresses behind, our work indicated the thermotolerant mutant L1-1 had better resistant to ethanol and oxidative stress. The work also implied the enhanced thermotolerance may be connected to the greater ethanol and hydrogen peroxide resistance.

Multiple stress tolerances in a thermotolerant L1-1 isolated from oleaginous yeast *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]Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol., [2]Fac. Sci., Kasetsart Univ., Thailand)

Key words stress tolerance, thermotolerant mutant, oxidative stress, *Rhodosporidium toruloides*

2Ip01 ドライとウェットの両側面からの抗体に代わる分子標的足場タンパク質の検討

○伊藤 智之[1], 西 羽美[2], 亀田 倫史[3], 二井手 哲平[1], 中澤 光[1], 梅津 光央[1]
（[1]東北大院・工, [2]東北大院・情, [3]産総研・人工知能研究セ）
mitsuo@tohoku.ac.jp

抗体分子は生体の免疫機構を利用した手法があるため，バイオ医薬品や分子認識プローブとして確固たる地位を築いてきた．一方近年では遺伝子工学の発展により，免疫系を使わずとも大規模な変異体群を微生物で作製することが可能となったことや，生体外選択法によって最適機能を持つクローンを変異体群から選出できるようになったことで，様々な抗体様分子が提案されている．抗体様分子は，構造的に最小単位のタンパク質を足場構造として用いることで，抗体の構造に囚われない新たな分子認識薬のデザインを可能とする．そこで本研究では，生物情報科学を用いた足場タンパク質群の抽出と，それらの物性評価からフォーマット候補の絞り込みを試みた．
最適フォーマット群の構築に向けてまず，プロテインデータバンク（PDB）に登録されているタンパク質から，安定な低分子であること，多様性のあるフォーマット群を作製すること，分子認識部位を持つことを念頭に網羅的な必要条件抽出を行い，複数のフォーマット群候補を選定した．そして，これらを大腸菌で発現させ，精製後に収量と変性温度を測定することで高発現かつ安定なフォーマットを特定した．続いてループ状のランダム変異への寛容さをループのフォールディング速度とアミノ酸残基保存度の観点から推測した後，実際に培養してその発現率を調査することで，さらにフォーマット候補を絞り込むことに成功した．さらに生体外選択手法を用いた操作で標的タンパク質への分子認識能を付与したフォーマットの取得を試みたため，合わせて報告する．

A novel antibody mimic reaserch by the combination of dry wet techniques

○Tomoyuki Ito[1], Hafumi Nishi[2], Tomoshi Kameda[3], Teppei Niide[1], Hikaru Nakazawa[1], Mitsuo Umetsu[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. information Sci., Tohoku Univ., [3]Comp. Omics Res. AIRC, AIST)

Key words protein engineering, antibody mimetics, protein data bank, phage display

2Ip02 抗体移植を意識した β-ヘアピン構造足場を利用した分子標的ペプチド取得

○菊地 真裕[1], 二井手 哲平[1], 中澤 光[1], 今中 洋行[2], 梅津 光央[1]
（[1]東北大院・工, [2]岡山大院・自科）
mitsuo@tohoku.ac.jp

コドン変異を利用した大規模なライブラリーの作製が可能であるペプチドは，有機低分子化合物と比較して高い標的特異性創出が期待できる．しかし，ペプチドは標的分子と結合できる面積が小さいため，標的分子の構造によっては高い標的親和性を創出できないときがある．そこで我々は，抗体の相補性決定領域（CDR）へ移植が可能な構造フォーマットをもつペプチドを開発することによって，高い標的親和性をより創出しやすい抗体への展開も可能なペプチドと抗体の同時開発プロセスの構築を試みた．
まず，ラクダ抗体断片（VHH）の抗原認識部位である相補性決定領域（CDR）が二本の β-シート構造をループでつないだ β-ヘアピン構造を形成していることに着目し，この構造を模倣したペプチドを用いることで VHH の CDR への移植が可能になると発想した．そこで β-ヘアピン構造を形成するペプチドとして，トリプトファンジッパー(Wzip)を形成するペプチド間を 7 残基で繋げた Wzip ループを用い，そのループ領域 7 残基をランダム化した Wzip ループを T7 ファージに提示し，β-ヘアピン構造ペプチドライブラリーを作製した．選択操作によって標的分子へ結合を示すペプチドの取得に成功したのち，アラニンスキャンニング法によって結合に関与する残基を特定した．その後，結合に関与する残基以外を再びランダム化したライブラリーを作製し，同様に選択操作を行ったところ，結合力の向上に成功した．さらに，取得したペプチドのループ配列を VHH の CDR へ移植した変異体を大腸菌発現系によって作製したところ，VHH の構造保持しつつ標的分子に対して結合を示した．これより，β-ヘアピン構造間の配列移植が有効であることがわかった．

Molecular recognition peptide on β-hairpin structure with the potential of grafting into antibody

○Masahiro Kikuchi[1], Teppei Niide[1], Hikaru Nakazawa[1], Hiroyuki Imanaka[2], Mitsuo Umetsu[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okyama Univ.)

Key words beta hairpin peptide, VHH, phage display, protein engineering

2Ip03 高度機能的分子認識素子の創出を志向した，クッション性足場タンパク質としての多価 CutA1 の開発

○東 秀隆, 石田 尚之, 今村 維克, 今中 洋行
（岡山大院・自科）
imanaka@okayama-u.ac.jp

生体分子間相互作用は生命活動の厳密な制御に寄与する中心的な現象であるが，これを細胞内外で再現・検出する技術は，ライフサイエンス分野において，生命現象の解明のみならず，創薬，医療診断，環境分析など幅広い領域への応用に役立つ．生体分子間相互作用検出技術を確立し，応用する際，抗体や抗体様分子に代表される分子認識素子の開発，改良は非常に重要で，構造安定性，細胞透過性や生産効率などの課題を克服すべく，研究が進められている．
我々のグループでは，これまでに超好熱菌由来タンパク質 CutA1 をリガンド分子の足場とした，生体分子間相互作用精密制御技術の開発を進めてきた．CutA1 はホモ三量体を形成し，非常に高い構造安定性（Tm は約 150℃）を有し，低分子量（13 kDa）で，大腸菌を用いた迅速・大量生産が可能である．CutA1 が本質的に有する構造安定性は，分子内部へのペプチドやタンパク質の挿入を許容し，リガンド分子の提示とアフィニティタグを介した配向固定化を通じ，従来法に比べて極めて感度良く相互作用を検出できることを示してきた．
本研究では，CutA1 の多価化を目的とし，新たなリガンド分子挿入サイトの探索ならびに分子デザインの可能性について調査した．推定二次構造形成領域周辺で，分子内あるいはサブユニット間相互作用への寄与などを考慮し，設定した複数の候補サイトへのリガンド分子挿入を試みた．その結果，可溶化発現が可能な新たなサイトを見出した．三量体の野生型 CutA1 では同一のリガンド分子を 3 カ所で提示できるが，挿入サイトを新たに決定したことで，足場分子（CutA1）における提示数は最大 6 となる．すなわち，多価化による分子デザインの多様化を通じ，CutA1 が，標的分子の高度特異的認識を可能とする分子認識素子の創出に資するプラットフォームとなり得ると考えられた．

Development of multivalent proteinaceous cushion scaffold, CutA1, for the creation of highly functional molecular recognition element

○Hidetaka Azuma, Naoyuki Ishida, Koreyoshi Imamura, Hiroyuki Imanaka
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okyama Univ.)

Key words scaffold, biosensing, CutA1, immobilization

2Ip04 超好熱菌由来酵素の基質結合に関するドメインに基づいた新規標的結合分子の開発

○来住 秀憲, 大政 健史, 山野 範子, 古賀 雄一
（阪大院・工）
kogay@mls.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】
Scaffold タンパク質に基づいて設計された標的結合分子は，一般的に低分子量や高い熱安定性を有し，ジスルフィド結合を有さないことから還元条件や高温条件下での診断薬や研究ツールへの応用が期待されている．設計された標的結合分子の多くは，抗体の CDR と同様のループ構造を有しており，その構造で標的分子を認識している．本研究では，ラクダ抗体の VHH との構造相同性が高く，分子表面の一方に複数のループ構造を有することから超好熱菌由来酵素 Islandisin の β-sandwich domain 1(SD1)と超好熱古細菌（始原菌）由来酵素 Tk-SP の β-jelly roll domain(BJR)を新規 scaffold タンパク質として見出した．SD1 は 21 残基の長いループにより標的分子内の隠れたエピトープを認識可能な新たな標的結合分子の開発を目指し，BJR は変性剤や界面活性剤条件下で機能を維持する酵素のドメインであることから高い安定性を有する新たな標的結合分子の開発を目指した．
【方法・結果】
SD1 及び BJR に対して天然の scaffold タンパク質であるラクダ抗体 VHH との構造相同性を評価した結果，RMSD 値が 1.542 Å 及び 1.998 Å であり，高い構造相同性を示した．この結果からラクダ抗体の CDR と類似の改変可能なループ構造を SD1 及び BJR 各々に見出した．さらに単ドメインでのフォールディングや熱安定性を評価するため，大腸菌での発現系を構築した後，CD 測定によりフォールディング及び熱安定性を評価した．その結果，SD1 及び BJR ともに β シートリッチな構造を形成していることが示唆され，SD1 は 77.5℃，BJR は 85℃の変性温度を有したことから高い熱安定性が確認できた．これらの結果から SD1 及び BJR は scaffold タンパク質となりうる可能性が示唆された．現在，ファージライブラリーを構築した後，TNF-α や Her2 に対する親和性選択を行っており，その結果についても報告する．

Development of novel target-specific binding proteins based on putative substrate-binding domains of enzymes derived from hyperthermophile

○Hidekazu Kishi, Takeshi Omasa, Noriko Yamano, Yuichi Koga
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words scaffold protein, molecular design, phage display, affinity selection

2Ip05 配列情報を利用した SUMO2 変異体ライブラリからの TNF-α 親和性選択

○牧野 祥嗣, 角岡 良亮, 伊藤 伸哉
（富山県大・工）
makino@pu-toyama.ac.jp

【目的】レミケードなどの腫瘍壊死因子-α(TNF-α)に高親和な抗体医薬は，関節リウマチに対し劇的な治療効果を発揮する．しかし薬価が高く，患者および医療財政への負担となる．そこで，抗体ではないがその機能を代替可能な蛋白質を創出し，微生物を用いて安価に生産し利用する試みが進められている．本研究では，大腸菌を発現系として生産可能な，TNF-α への結合活性を代替する非抗体タンパク質の創出を目指した．
【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，TNF-α，BSA などの各種リガンドと本ライブラリを混合し，親和性選択を行った．次に，各親和性条件の下で選択されたライブラリに含まれる SUMO2 変異体遺伝子の塩基配列を，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や，他のコントロールリガンドでのパニング後と比較して高頻度に見いだされたクローンの遺伝子を再構築し，組換えタンパク質を調製して，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，TNF-α 存在下での親和性選択時に特異的に高頻度で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 10 種類，Lib2 から 6 種類選び，組換えタンパク質を調製した．ELISA による親和性解析を行ったところ，複数のクローンで TNF-α への親和性を示すシグナルが認められた．これらのクローンの特異性は十分ではなかったが，いくつかのクローンは非特異的結合と比較して有意に高いシグナルを示した．Biacore を用いて測定したところ，最も親和性の高いクローンでサブ μM の Kd が認められた．

Selection of SUMO2 mutants with TNF-α affinity using amplicon sequencing

○Makino Yoshihide, Ryosuke Tsunooka, Nobuya Itoh
(Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

Key words phage display, affinity selection, TNFalpha, next generation sequencing

2Ip06 モノクローナル抗体のペプチドレベルでのエピトープ解析に基づく人工抗体のデザイン

○初野 優花[1], 足立 遥華[2], 中村 匠汰[2], 熊澤 皆[2], 田中 眞人[2]
（[1]電機大 ・理工, [2]電機大院 ・理工）
mtanaka@mail.dendai.ac.jp

【背景と目的】ゲノム科学の進展により，多くの生物の遺伝子配列が明らかになったが，今後の機能解析には，すべてのタンパク質に対する抗体供給が必要である．すべての抗体産生 B 細胞のハイブリドーマが単離されて，それぞれの抗体の抗原認識の構造，エピトープが最小ペプチド配列まで同定されれば，必要な抗体をそのハイブリドーマの中から選び，利用することが可能となり，植物や細菌，昆虫など抗体資源のほとんどない分野へ抗体試薬を一挙に供給できる．本研究では，抗ヒト DNA トポイソメラーゼ II 抗体を例としてエピトープ解析を詳細に進め，人工抗体のデザインが可能か否かを検討した．
【方法】抗ヒト DNA トポイソメラーゼ II 抗体 (4E12b 抗体) のエピトープ解析を短鎖ペプチドレベルまで行い，さらにこのペプチドに隣接するアミノ酸残基の影響を調べるために N 端側，C 端側のアミノ酸残基を変更して抗原性に与える影響を調べた．その配列の網羅的な BLAST 検索から，これらの配列を含むタンパク質を検索し，由来する生物種の抽出物の 4E12b 抗体を用いたイムノブロッティングを行った．また 4E12b 抗体 L 鎖，H 鎖の cDNA クローニングを行い，動物細胞での発現を実施した．得られた組換え抗体が 4E12b 抗体と同じ特異性を示し，トリプシン分解ペプチドマッピング解析でも，cDNA から予想される L 鎖，H 鎖のアミノ酸配列と一致することを確認した．この cDNA の超可変領域のアミノ酸を様々なアミノ酸に置換した組換え抗体を作製し，本来のエピトープへの結合解析を行った．
【結果および考察】ほとんどの置換は特異性に大きな変化を与えなかったが，ある種の置換は結合性を失わせた．また，いくつかの組換え抗体は本来の結合性を失い新たな結合特異性を獲得する例を見出した．抗体の新規デザインが可能なことを示していると思われる．

Fine epitope mapping of monoclonal antibody specific to human DNA topoisomerase II and design of the antibody with a different epitope.

○Yuka Hatsuno[1], Haruka Adachi[2], Shota Nakamura[2], Kai Kumazawa[2], Masato Tanaka[2]
([1]Dept Sci. Eng. Tokyo Denki Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Eng. Tokyo Denki Univ.)

Key words monoclonal antibody, epitope mapping, recombinant antibody, Designed antibody

2Ip07 様々な波長の光照射下におけるシアノバクテリアの解析

○豊島 正和, 阪田 真澄, 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と二酸化炭素を使い，様々な物質を生産している．その生産性向上のためには，強い光の照射や光エネルギーの利用効率を上げる必要がある．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，光合成生物は光エネルギーの利用効率を下げるなどの生育環境に対する順化を行っている．また，その生育環境により有効利用できる光の波長が異なるため，クロロフィルやフィコシアニンなどの光合成色素を進化の過程で獲得し，環境に適応してきた．そのため，光環境に対する光合成生物の適応メカニズムを理解することが過剰な光環境下での光エネルギーの利用効率を向上し，光合成生物の生産性向上に繋がる．本研究では，光合成生物のシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて，様々な波長の光照射下における応答反応を明らかにする．白色 LED とピーク波長が 460nm（青色），530nm（緑色），590nm（黄色），640nm（赤色 1），680nm（赤色 2）の LED を用いて培養した *Synechocystis* sp. PCC 6803 の増殖速度や光合成活性，吸収スペクトルの変化など生理学解析と光合成装置や代謝酵素の定量解析を行った．その結果，赤色 2，黄色，白色，赤色 1，緑色，青色の順に比増殖速度が高かった．また，光合成活性も赤色 2 照射下の細胞が最も高かった．さらに赤色 2 や黄色では他の色に比べてクロロフィルに対するフィコシアニンの吸収が高かった．これらの結果とフラックスバランス解析による代謝シミュレーションによる結果から，赤色 2 照射下では光エネルギーを有効に吸収し，光化学系の循環的電子伝達経路を活用して細胞が生育していることが示唆された．また，定量プロテオーム解析による各色照射下のタンパク質の量的変化についても報告する．

Study of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 grown under different spectral lights

○Masakazu Toyoshima, Masumi Sakata, Yoshihiro Toya, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words cyanobacteria, photosynthesis

2Ip08 微生物による有用物質生産に資する代謝モデルの実験データを用いた妥当性検証と予測精度の改善

○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，代謝モデルを用いた Flux balance analysis (FBA)などによる *in silico* での解析・設計が有用なことが示唆されており，その予測精度の改善が求められている．また，培養プロファイルだけでなく，種々のオミクスデータも比較的ハイスループットに取得可能になってきている．そのため，*in silico* での解析・設計の妥当性検証と予測精度の改善に種々のオミクスデータを含めた実験データの利用は非常に有用と考えられた．そこで，本研究では，実験データの利用による代謝モデルの妥当性検証とそれを用いた解析・設計の予測精度の改善を目的とした．
【方法・結果】ケーススタディとして，大腸菌をホストとして選択した．代謝モデルは，以前，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，不足反応の追加，不要反応の削除，可逆性・補酵素関係の修正などの処理を施した大腸菌の代謝モデルを使用した．そして，構築した代謝モデルの妥当性検証のために，文献より得られた培養データと ^{13}C を利用したフラックス分布のデータを用い，実験値と FBA によるシミュレーション値とを比較した．構築した代謝モデルは，炭素源がグルコース，酢酸，コハク酸の場合比較的予測精度が高かった．一方で，グリセロール，乳酸が炭素源の場合は，予測精度が高くなかった．また実験により得られた細胞内フラックス分布と比較すると，構築した代謝モデルによる結果は解糖系と PPP への分配が実験値と大きく異なっていた．なお，検証した条件については代謝モデルの修正を施したところ，概ね予測精度の改善が見られた．このように，実験データの利用は代謝モデルを用いた解析・設計の予測精度の改善に大いに寄与することが示唆された．

Validation and prediction accuracy improvement with experimental data on metabolic model that contributes to the production of valuable chemicals in microorganisms

○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 metabolic model, flux balance analysis, model validation, data integration

2Ip09 有用物質を生産・増産する準最適な代謝流束均衡モデルのデザイン

○田村 武幸
（京大・化研）
tamura@kuicr.kyoto-u.ac.jp

制約モデルの代謝流束均衡解析は，微生物等を用いた有用化合物の生産シミュレーションにおいて有用である．近年の DNA 合成技術の発達に伴い，有用化合物を生産・増産する最適な代謝ネットワークのデザインの計算が近い将来重要になるかもしれない．そこで本研究では，細胞の成長率と目的化合物の生産率に関する制約を小さなグリッドを用いて表し，グリッドごとに最小の代謝流束分布を計算して，準最適な代謝ネットワークのデザインを見つける手法 GridProd を開発した．流束変動解析(FVA)に基づく時間制限を伴う計算機実験の結果，FastPros や IdealKnock 等の既存手法では，全目的化合物の 50%以下しか生成できなかったが，GridProd は 90%以上の化合物を生成に成功した．

Design of semi-optimal metabolic flux models for production of valuable compounds

○Takeyuki Tamura
(Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

Key words metabolic flux analysis, bioinformatics, metabolic engineering

2Ip10 代謝情報基盤整備のための多様な微生物資源の活用の可能性

○寺尾 拓馬 [1], 細山 哲 [1], 土金 恵子 [1], 宮澤 せいは [1], 鋤先 まゆ子 [1], 白井 智量 [2], 川﨑 浩子 [1]
（[1]NITE・NBRC, [2]理研・CSRS）
terao-takuma@nite.go.jp

【背景と目的】“Bioeconomy”推進を目的として，微生物等が持つ物質生産能力を人工的に最大限引き出した「スマートセル」を構築し，化学合成では生産困難な有用物質の創製，または従来法を凌駕する生産技術開発のための基盤情報整備が進められている．基盤となる生物情報（ゲノム配列，酵素，代謝）を基に，人工代謝経路を設計することで，スマートセルの効率的な構築が可能になるとされる．人工代謝経路の予測精度の向上と多様化を図るためには，基盤情報の拡充が必要不可欠である．しかしながら，研究が進んでいる生物資源は限られていることを考慮すると，未知の代謝経路が自然界に数多く存在することが予想される．そこで本研究では，NBRC が保有する多様な微生物を対象に，工業原料となり得る有用な汎用化合物の生産能を評価し，未知の代謝経路の存在について可能性調査を行った．
【方法】NBRC 保有の微生物約 700 株を対象に，密栓したバイアル瓶を用いて数日間静置培養した後，ヘッドスペース GC-MS により，78 種類の化合物を標的として気相成分の一斉分析を行った．得られたクロマトグラムのピーク面積から培地成分由来のピーク面積を差し引くことにより，各微生物における化合物生産能を評価した．生産性が確認された微生物については，ゲノム配列上の各化合物の合成に関与するとされる酵素遺伝子の有無を，KEGG 等のデータベースと照合することで，代謝経路の新規性を調査した．
【結果と考察】工業原料物質を中心に十数種類の化合物において，未知とされる代謝経路の存在が示唆された．本結果から，スマートセル構築において，人工代謝経路の高度化および精度向上を図る上で，スクリーニング源としてカルチャーコレクションに眠る微生物資源の有効活用が期待される．

Potential use of microbial collections in infrastructure development of metabolic pathway information for valuable chemicals

○Takuma Terao[1], Akira Hosoyama[1], Keiko Tsuchikane[1], Seiha Miyazawa[1], Mayuko Sukisaki[1], Tomokazu Shirai[2], Hiroko Kawasaki[1]
([1]NBRC, NITE, [2]CSRS, RIKEN)

Key words biosynthetic pathway, headspace GC-MS, culture collection, screening

2Ip11 機械学習を用いた酵素の EC number 予測

○渡邉 直暉 [1], 村田 昌浩 [2], 荻野 千秋 [1], 近藤 昭彦 [1,2], 荒木 通啓 [2,3]
（[1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]京都大院・医）
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

[背景と目的]分子生物学データベースには数百万の遺伝子・タンパク質が登録されている．それらの機能は主に実験やタンパク質のアミノ酸配列の相同性によって決定されている．しかし，機能が未知であるものも数多く存在する．そのため，機能未知の遺伝子・タンパク質にアノテーションを付与するために，それらの機能を予測することができるシステムの開発が必要とされる．本研究では，機械学習を用いて酵素の EC number の予測システムの開発を行った．
[方法]EC number1 桁目が既知の酵素情報を学習させたモデルと，酵素に基質・生成物の化学構造情報を加えたモデルを SVM を用いて作成し，EC number1 桁目の予測を行った．その際，酵素のアミノ酸配列を PROFEAT を用いて 1437 次元，基質・生成物情報を DRAGON を用いてそれぞれ 1387 次元のベクトルで表現し，EC number1 桁目をラベルとして学習させた．そして，それぞれのモデルの予測精度を比較するために交差検定や EC number が既知の Escherichia coli K-12 の酵素をモデルで検定することによって評価した．
[結果と考察]交差検定においてそれぞれのモデルの EC number1 桁目の正答率と精度評価のため AUC を比較したところ，酵素のみのモデルよりも基質・生成物を加えたモデルのほうがの正答率と機械学習の精度評価パラメータの AUC が高くなった．さらに，E.coli K-12 テストにおいても後者のモデルのほうが高い結果となり予測精度は高いことが考えられる．また，基質-酵素-生成物モデルの酵素の EC number を約 92 %判別することができた．これらの結果より，酵素情報にさらに基質・生成物の化学構造情報を加えることによってモデルの精度が大幅に向上した．

Machine Learning Prediction of Enzyme EC Numbers

○Naoki Watanabe[1], Masahiro Murata[2], Tiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[1,2], Michihiro Araki[2,3]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Med, Kobe Univ.)

Key words bioinformatics, enzyme, machine learning, svm

2Jp01 遺伝子発現データを用いた代謝制御因子の同定 ～包括的転写制御による効率的物質生産～

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

【背景と目的】
微細藻類は，CO_2 から直接的にバイオ燃料やバイオプラスチックの原料を合成できるため，石油資源を代替する資源として注目されている．我々は，微細藻類を利用したプラスチック原料（乳酸やコハク酸）の生産に取り組んでいる．目的物質を増産するために，代謝経路を構成する複数の酵素遺伝子を過剰発現することは，一般的な手法である．しかしこの手法は，局所的な代謝経路の活性化しか出来ず，各遺伝子の発現バランスを制御するのが困難である．一方で，代謝経路の酵素遺伝子を制御する転写因子を改変する手法は，代謝経路を包括的かつ効果的に活性化できることが知られている．だがこの手法は，代謝活性化転写因子を実験的に同定する必要がある．そこで我々は，遺伝子発現データから代謝活性化に重要な転写因子を推測した．
【実験方法】
Synechocystis sp. PCC 6803 の 117 セットのマイクロアレイ発現量データを正規化した．強化したい代謝経路を構成する酵素遺伝子群の発現量をクラスター解析に供し，同調的に発現制御を受けている遺伝子群を抽出した．抽出された遺伝子群の発現量と転写因子の発現量のあいだで相関係数を算出し，相関係数の和が高いものを代謝活性化転写因子と推測した．
【結果と考察】
遺伝子発現解析は，SigE と Rre9 という制御因子が，コハク酸生産経路を活性化すると推測した．Rre9 過剰発現株を作製し，コハク酸生産経路に関与する 44 遺伝子の発現量を RT-PCR で測定したところ，包括的に上昇していた．ゲルシフトアッセイは，Rre9 がエノラーゼやピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体遺伝子を制御することを明らかにした．SigE/Rre9 共過剰発現株において，コハク酸，乳酸，酢酸の生産量が約 3～4 倍になった．

Metabolic engineering with metabolic transcription regulator identified by co-expression analysis: improvement of succinate production in cyanobacteria

○Masahiro Takeya, Takashi Osanai
(Grad. Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words cyanobacteria, metabolic engineering, transcriptional regulator gene, bioinformatics

2Jp02 *Euglena gracilis* におけるアミノ酸生産時の培養条件検討

○冨田 結芙子 [1], 小山内 崇 [1], 鈴木 健吾 [2]
（[1]明治大院・農, [2]ユーグレナ）
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．植物と同様に光合成をする一方で，鞭毛による運動性を示すなど，動物的な側面も併せ持つ．近年，*E.gracilis* を用いた物質生産として，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などの細胞内の代謝産物が注目されている．しかし，細胞外での代謝産物についての研究は乏しく，本研究では，細胞外アミノ酸に着目し，排出条件について検討を試みた．
【方法・結果】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 日間培養を行った．嫌気培養後の培養上清中のアミノ酸量を HPLC にて測定したところ，様々なアミノ酸が細胞外に排出されていることが分かった．また，条件検討として，暗・嫌気培養中の培地の窒素源の量を変化させたところ，細胞外アミノ酸量が変動した．その中でも，グルタミン酸については，興味深い挙動を示した．培地の窒素源として，$(NH_4)_2HPO_4$ を使用していたため，アンモニアの影響とリン酸の影響を調べたところ，どちらの影響も受けていないことが分かった．そこで，リン酸アンモニウム添加による pH の変動による影響を調べるために，緩衝液を用いた培養を行ったところ，嫌気培養時の pH がグルタミン酸の排出に寄与している可能性が示唆された．アミノ酸を増産させる方法として pH という無機物が有効であるということは，糖類や植物由来の有機物を必要としないという利点となる．ユーグレナは光独立栄養的に増殖するため，固定した CO_2 を発酵時に細胞外に放出したアミノ酸を，今後は飼料や食糧としての活用をすることを目指している．ユーグレナの自己発酵能を利用し，温室効果ガスの低減によって，持続可能な循環型社会への寄与が期待できる．

Investigation of culture conditions during amino acid production in *Euglena gracilis*

○Yuko Tomita[1], Takashi Osanai[1], Kengo Suzuki[2]
([1]Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., [2]Euglena Co., Ltd.)

Key words fermentation, amino acid, glutamate fermentation

2Jp03 Widely targeted metabolomics-based improvement of *Synechococcus elongatus* 1-butanol-producing strain

○Artnice Mega Fathima[1], Sastia Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1], James Liao[2], Derrick Chuang[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

In recent years, metabolomics approach for strain improvement is being widely employed in various field of life sciences. By means of rapid detection of relevant metabolic perturbations, metabolomics can identify specific targets for strain improvement. These may include identification of rate limiting steps in a production pathway or metabolite or product toxicity. The highest 1-butanol titer is reported to be as high as 317 mg/L in *Syenchococcus elongatus* (BUOHSE strain) with modified CoA-dependent pathway. In order to further improve production titer, widely targeted metabolomics approach using ion-pair LCMS was carried out to find rate-limitng steps, and its result has been addressed to modify the strains through metabolic engineering work. Two higher 1-butanol producing strains, so called DC7 and DC11, were obtained from this study. Strain DC7 showed a 33% increase in 1-butanol production compared to the BUOHSE strain. In addition, DC11 strain was able to reach a production titer of 418.7 mg/L in 6 days, compared to DC7 that can reach a similar titer in 12 days. In this study, the iterative cycle of genetic modification based on insights from metabolomics successfully resulted in shorter production time and higher 1-butanol titer for transgenic *Synechococcus elongatus*.

Widely targeted metabolomics-based improvement of *Synechococcus elongatus* 1-butanol-producing strain

○Artnice Mega Fathima[1], Sastia Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1], James Liao[2], Derrick Chuang[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)

Key words cyanobacteria, butanol, metabolic analysis, metabolic engineering

2Jp04 Bacterial consolidated bioprocessing of paper sludge for acetic acid production

○Eka Triwahyuni, Harifara Rabemanolontsoa, Shiro Saka
(Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ.)
saka@energy.kyoto-u.ac.jp

Around 3 million tons of paper sludge (PS) are available annually in Japan as a waste without further valorization. PS is a cellulose-rich waste stream from pulp and paper mills and could be a good candidate for biorefinery applications by consolidated bioprocessing (CBP). Acetic acid is an important biorefinery product used as reagent and precursor in chemical industries. Several studies were conducted on acetic acid production from model compounds, food products, or lignocellulosic hydrolyzates but CBP of solid biomass to acetic acid has not been reported yet. Therefore, this work explores the direct fermentation of PS provided by a company in Fuji city to acetic acid by free cells of cellulolytic (*Clostridium thermocellum*), hemicellulolytic (*Clostridium clariflavum*), and acetogenic bacteria (*Moorella thermoacetica*) in co-culture. Variation in the volumetric ratio of these microorganisms was conducted in this study. As a result, fermentation of 10 g/L PS in 500-mL fermenter by *C. thermocellum*, *C. clariflavum*, *M. thermoacetica* added in same volumetric ratio provided the highest total products concentration of 5.4 g/L including 4.0 g/L of acetic acid and 1.4 g/L of ethanol, with a conversion efficiency of 69.3% after 7 days. Higher conversion efficiency of 91.1% to total products was obtained in 5-L fermenter with longer treatment time. These results indicate the possibility to directly convert PS to acetic acid without using expensive enzymes and can be a major breakthrough to reduce biomass conversion cost.

Bacterial consolidated bioprocessing of paper sludge for acetic acid production

○Eka Triwahyuni, Harifara Rabemanolontsoa, Shiro Saka
(Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ.)

Key words acetic acid bacteria, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium clariflavum*, *Moorella thermoacetica*

2Jp05 *Acidomonas* 属酢酸菌によるグリセロールの酸化変換

○西江 百加, 宇都宮 大貴, 阿野 嘉孝
（愛媛大院・農）
anoy@agr.ehime-u.ac.jp

【目的】バイオディーゼル燃料の副生物である廃グリセリンの処理問題の深刻化が懸念されている．酢酸菌は，グリセロールをジヒドロキシアセトン（DHA）やグリセリン酸（GA）などの有用物質に酸化変換できることから，廃グリセリンの資源化触媒としての応用が期待されている．本研究で着目している *Acidomonas* 属酢酸菌は，廃グリセリンの夾雑物であるメタノールに強く，メタノール含有培地でも良好なグリセロール酸化能を示す．これまでに酢酸菌では，細胞膜に局在するキノプロテイングリセロール脱水素酵素（PQQ-GLDH）で DHA を，キノプロテインアルコール脱水素酵素（PQQ-ADH）で GA を生成することが報告されているが，本菌は DHA を生成するにも関わらず，ゲノム上に PQQ-GLDH 遺伝子を持たないことから，他の酢酸菌とは異なるグリセロール酸化系を有していると考えられる．本研究では廃グリセリンの資源化技術の構築を目指して，本菌のグリセロール酸化系を明らかにすることを目的とした．
【結果】本菌の細胞膜画分に DHA 生成能力があることを確認し，本菌の細胞膜画分からグリセロール酸化酵素の可溶化・精製を行った．グリセロール酸化活性に加え，エタノール酸化活性を追跡したところ，両活性は同じ画分で確認された．精製酵素は PQQ-ADH と同じ性質を示し，ウエスタンブロッティングでも PQQ-ADH 抗体に良い反応性を示した．精製酵素の酸化反応物を調査すると GA ではなく，DHA であることが明らかとなった．一方，PQQ-ADH 遺伝子破壊株を用いた休止菌体反応において，DHA が生成能を失い GA が良好に生産されたことから，本菌の PQQ-ADH は GA ではなく DHA 生成に関与することが明らかになった．以上より，*Acidomonas* 属酢酸菌の PQQ-ADH は他の酢酸菌酵素とは異なる性質を持つことが示唆された．現在，これらの情報に元づいた廃グリセリンの資源化技術を構築中である．

Oxidative bioconversion of glycerol by *Acidomonas methanolica*

○Momoka Nishie, Daiki Utsunomiya, Yoshitaka Ano
(Grad. Sch. Agric., Ehime Univ)

Key words acetic acid bacteria, waste glycerol, *Acidomonas methanolica*

2Jp06 好熱性ホモ酢酸 *Moorella thermoacetica* 代謝改変株によるエタノール生産

○竹村 海生 [1], 岩崎 裕樹 [1], 喜多 晃久 [2], 中島田 豊 [1]
（[1]広島大院・先端物質, [2]新居浜高専）
nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

【目的】
現在，化石資源を利用した物質生産が中心となっているが，枯渇や地球温暖化の促進が懸念される．そこで近年，代替物質として再生可能な生物由来の有機資源であるバイオマスの利用が積極的に行われている．バイオマスは主に糖に変換され，微生物発酵に利用されるが，合成ガス (H_2+CO_2+CO) に変換する事で糖化困難なリグニンを含む全ての有機物を基質として利用できる．そこで，当研究室では合成ガスを資化できる *Moorella* 属を宿主として物質生産を目指している．現在までにホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* ATCC39073 株の遺伝子組み換え技術を開発した．この技術を用いて，酢酸及び ATP 生産に関わる遺伝子を破壊し，エタノール生産に関わる遺伝子を導入することでエタノール生産株を作成した．この変異株はフルクトース培養時にはエタノールを生産した．しかし，H_2+CO_2 ガス培養時には生育せず，ギ酸の蓄積が確認された．ギ酸はガス資化経路中の代謝中間物質であり，ATP 加水分解と共役し，Acetyl-CoA を合成，その後，最終産物を生産する．そのため，遺伝子改変によるギ酸消費反応への ATP 供給の減少がギ酸の蓄積の原因と考え，培養工学的手法を用いて ATP 供給を増加させ，合成ガスからのエタノール生産を実現する事が本実験の目的である．

【方法及び結果】
休止菌体によるエタノール生産
休止菌体を用いる事で増殖に使用する ATP をギ酸消費反応に供給でき，合成ガスからエタノール生産が可能となると考えた．対数増殖期の菌体を集菌後，リン酸緩衝液に懸濁し，休止菌体を作成した．培養は H_2+CO_2 で行ない，CO_2 を利用できない N_2+CO_2 をネガティブコントロールとした．その結果，H_2+CO_2 でエタノール，酢酸，ギ酸が検出され，N_2+CO_2 で酢酸が検出された．

Ethanol production by genetically enginerred thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*

○Kaisei Takemura[1], Yuki Iwasaki[1], Akihisa Kita[2], Yutaka Nakashimada[1]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Niihama Natl. Coll. Technol.)

Key words metabolic engineering, carbon dioxide, ethanol production

2Jp07 スクロースを糖源とした乳酸菌培養による乳酸生産抑制

○佐野 杏奈[1], 河合 美桜[1], 土屋 麻美[2], 依田 伸生[2], 山崎 思乃[3], 片倉 啓雄[3]
（[1]関西大院・理工, [2]（株） 明治, [3]関西大・化生工・生命生工）
katakura@kansai-u.ac.jp

【背景と目的】乳酸菌は消費した糖の 50%以上を乳酸に変える微生物と定義されており，解糖系で ATP を獲得する際に消費される NAD$^+$を乳酸脱水素酵素(LDH)によって再生するために乳酸が生産される．増殖に伴って乳酸が蓄積すると，例えば pH を調整しても増殖や代謝が阻害されるため，乳酸菌の高効率の培養や物質生産は困難である．解糖系以外で ATP を得る経路はいくつか報告されているが，それらはグルコースで抑制される．また，膜結合型のオキシダーゼなどのように LDH 以外で NAD$^+$を再生する経路も知られている．そこで本研究では，スクロースを糖源とし，さらに好気環境で酸素を電子受容体にすることで，乳酸生産が抑制できるかを検討した．
【方法】グルコースまたはスクロースを 6 g/L を含む合成培地 20 mL に対して 20 OD unit の菌体を植菌し，各菌株の至適温度で静置または振盪(200 spm)して培養した．乳酸の比生産速度を比増殖速度で除して菌体増加量あたりの乳酸生産量 Y を求めた．
【結果と考察】*Lactobacillus reuteri* JCM 1112 と *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NBRC 100496 において，グルコースを糖源とした静置培養における Y はそれぞれ 5.6 と 7.8 g-lactate/g-cell であったのに対して，振盪した場合は 4.8 と 4.0 に，糖源をスクロースとして静置培養すると 3.7 と 3.0 に低下し，さらに，振盪培養した場合は 2.5 と 2.2 に低下した．即ち，糖源をグルコースとした静置培養に比べて，糖源をスクロースに代えて振盪培養すると Y は 45%，29%に低下した．代謝産物の分析と炭素の物質収支から，*Lb. reuteri* ではアルギニン消費による ATP 獲得とマンニトール生産による NAD$^+$再生が起こり，乳酸生産が抑制されたと考えられた．*Leu. mesenteroides* では物質収支が 42%と低かったことから，他の代謝物による ATP 獲得または NAD$^+$再生が行われていると考えられた．

Repression of lactic acid production by lactic acid bacteria culture using sucrose as a sugar source

○Anna Sano[1], Mio Kawai[1], Asami Tsuchiya[2], Nobuo Yoda[2], Shino Yamasaki-Yashiki[3], Yoshio Katakura[3]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Meiji Co., Ltd., [3]Fac. Chem. Master. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words lactic acid bacteria, sucrose, metabolism, NAD/NADH balance

2Jp08 グルコースリプレッションを回避した流加培養による乳酸菌の乳酸生産抑制

○河合 美桜[1], 土屋 麻美[2], 依田 伸生[2], 山崎 思乃[3], 片倉 啓雄[3]
（[1]関西大院・理工, [2]（株）明治, [3]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．増殖に伴い生産される乳酸は増殖阻害を引き起こすため，乳酸菌の高密度培養は困難とされている．LDH 以外の経路で NAD$^+$を再生するか，NAD$^+$の消費を伴う解糖系以外の方法で ATP を獲得できれば乳酸の生産は抑えられるが，これらの経路はグルコースによって抑制されてしまう．本研究では，グルコース以外の糖源を炭素源とした流加培養によって，グルコースリプレッションを回避するとともに解糖系のフラックスを少なくすることで，エネルギー代謝に占める LDH の寄与を相対的に下げ，乳酸生産を抑制できるか検証した．
【方法】
グルコース，スクロース，ガラクトースを糖源とする MRS 培地を用い，回分培養および流加培養を行った．各培養における乳酸の比生産速度を比増殖速度で除すことによって菌体増加量あたりの乳酸生産量 $Y_{L/X}$ を算出した．
【結果と考察】
ゲノム配列が既知かつスクロースを糖源として増殖できる *Lactobacillus reuteri* JCM1112, *Lb. plantarum* NCIMB8826, *Lb. gasseri* NCIMB11718, *Lb. casei* ATCC334, *Lactococcus lactis* l JCM7638 の 5 菌株全てにおいてスクロース流加培養により菌体増加量当たりの乳酸生産量が，グルコース回分培養の約 1/4～3/4 に抑制された．スクロースの代謝が遅い *Lb. rhamnosus* ATCC53103 については，ガラクトース流加培養によって菌体増加量当たりの乳酸生産量がグルコース回分培養の約 1/3 に抑制された．菌株に適したグルコース以外の糖源を選択し，さらに流加培養を行うことによって，通常グルコースで抑制されてしまう NAD$^+$再生系や ATP 生産経路の寄与が相対的に高まり，乳酸生産の抑制につながったと考察された．

Suppression of lactic acid production by lactic acid bacteria using fed-batch culture for avoiding glucose repression

○Mio Kawai[1], Asami Tsuchiya[2], Nobuo Yoda[2], Shino Yamasaki-Yashiki[3], Yoshio Katakura[3]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Meiji Co., Ltd., [3]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words lactic acid bacteria, glucose repression, fed-batch culture, NAD$^+$/NADH balance

2Jp09 梅の花由来乳酸菌 *Enterococcus faecalis* の機能性の探索

○平野 美佳子[1], 草場 裕貴[1], 中野 雄揮[2], 柘植 圭介[3], 北垣 浩志[1]
（[1]佐賀大院・農, [2]インパクト（株）, [3]佐賀工技セ）
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

【目的】近年日本人にはアレルギー患者が激増しており，その要因としてヘルパー T 細胞の分化が Th2 に傾いていることが指摘されている．ヘルパー T 細胞の分化を Th1 に傾けるアプローチとして，腸管を通じた乳酸菌の摂取とそれによる腸管免疫の活性化がある．乳酸菌が腸管免疫組織に接触すると，その細胞壁構成成分がマクロファージ表面の TLR2 に結合し NF-κB が活性化され，一酸化窒素（NO）や腫瘍壊死因子 α（TNF-α）が産生されることが知られている．NO は NK 細胞を活性化させ，TNF-α は T 細胞や B 細胞の増殖に関与することで，ガン細胞や病原体への攻撃活性を持つようになり，Th1 に媒介される細胞性免疫を賦活化する．これまで発酵乳食品などから乳酸菌は分離されてきたが，梅の花から分離した研究は非常に少なかった．そこで我々は，大分県の梅の花から乳酸菌 *Enterococcus faecalis* を単離した．今回の研究で梅の花由来乳酸菌の健康に寄与する免疫活性が明らかとなれば梅の花を活用した新たな免疫調整作用のある素材となりうる．そこでマクロファージ RAW264.7 細胞を使って梅の花乳酸菌の活性化能を調べた．
【方法・結果】梅の花から単離した乳酸菌 *Enterococcus faecalis* を MRS 液体培地で 30℃で静置培養を行い，10^6, 10^7, 10^8 cells/mL に調整した不活化菌体を RAW264.7 細胞株に添加した． Griess 反応を用いて NO 産生量を，ELISA 法を用いて TNF-α 産生量を測定したところ，両者に濃度依存的な増加が確認された（最大添加区は NO 量約 9 倍，TNF-α 量約 5 倍）．一方生細胞率の結果より，細胞傷害性が無いことが分かった．これらの結果は梅の花由来乳酸菌がマクロファージ細胞内の NF-κB を活性化，NO や TNF-α を増強させ，免疫機能の向上に貢献することを示唆している．また，本大会では梅の花由来 *Enterococcus faecalis* の代謝物をメタボローム解析した結果も併せて報告したい．

Exploring the functionality of *Enterococcus faecalis* isolated from Plum flower

○Mikako Hirano[1], Yuki Kusaba[1], Yuki Nakano[2], Keisuke Tsuge[3], Hiroshi Kitagaki[1]
([1]Fac.Agric., Saga Univ., [2]Impact Co., [3]Industrial Technology Center of Saga)

Key words lactic acid bacteria, TNF-alpha, metabolome

2Jp10 *Gluconobacter* 属酢酸菌の 5-ケトグルコン酸資化系の制御に関与する転写因子

○和田 征太郎, 阿野 嘉孝
（愛媛大院・農）
anoy@agr.ehime-u.ac.jp

【目的】 5-ケトグルコン酸（5KGA）は，酒石酸やビタミン C，キシリトール，生分解性プラスチック等の合成中間体となる汎用性の高い化学素材であり，5KGA の工業生産系の確立が期待されている．これまで *Gluconobacter* 属酢酸菌は，細胞表層でグルコースを 5KGA まで酸化変換した後，5KGA を細胞外に安定に蓄積するとされていたが，最近，一部の菌株において細胞内で 5KGA を資化し再増殖することが確認された．我々はこれまでに 5KGA の細胞内代謝にはグルコン酸輸送体 GntP と 5KGA 還元酵素 5KGR が関与していることを明らかにしており，その発現調節の解明を目指している．本研究では，5KGA 資化の誘導に関与する転写因子の特定とその機能を明らかにすることを目的とした．
【方法・結果】 *Gluconobacter* の *gntP*，*5KGR* はゲノム上で隣接しており，その周辺に転写因子は存在しなかった．そこで，これらの発現調節においても，グルコン酸代謝関連遺伝子の発現調節を担う GntR が関与していると仮定し，*G. thailandicus* NBRC3255 のゲノム情報を調査したところ，複数の *gntR* ホモログが存在していた．5KGA 生産条件における *gntR* 遺伝子群の発現誘導を調査したところ，特に *gntR4* と名付けた遺伝子の発現が強く誘導された．そこで，*gntR4* 破壊株を作製し，野生株との比較解析を行った．その結果，破壊株では野生株に比べて 5KGA 資化速度の低下がみられ，5KGA の取り込み活性，5KGR 活性にも低下をもたらしていた．これらのことから，*gntR4* が 5KGA 資化の誘導に関与することが示唆された．以上の結果から，安定な 5KGA 生産には *gntR4* を制御することが重要であると考えられ，現在，本因子の機能解析を進めている．

Transcriptional regulator involved in assimilation of 5-keto-D-gluconate in *Gluconobacter*

○Seitaro Wada, Yoshitaka Ano
(Grad. Sch. Agric., Ehime Univ.)

Key words *Gluconobacter*, 5-keto-D-gluconate, tanscriptional regulator

2Jp11 培地の乳糖分解が LB81 スターターの増殖性に及ぼす影響の解析

○山本 恵理, 渡部 玲子, 市村 武文, 木村 勝紀
（株式会社 明治）
eri.yamamoto@meiji.com

【背景と目的】一般に，ヨーグルトは 2 種類の乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*（*L. bulgaricus*）と *Streptococcus thermophilus*（*S. thermophilus*）の共生発酵によって作られる．通常，脱脂粉乳培地で 2 種の乳酸菌を共生発酵させると，発酵終了時の *L. bulgaricus* の菌数は *S. thermophilus* の菌数の 1/5～1/10 倍となる．一方，予めラクトースをグルコースとガラクトースに分解した乳糖分解培地を用いると，*S. thermophilus* の菌数は大きく変わらないものの，*L. bulgaricus* の菌数が大幅に高まり，*S. thermophilus* の菌数の 1～1/2 倍となる．本現象のメカニズムを解析するため，自社ヨーグルトスターターである LB81 スターター（*S. thermophilus* 1131，*L. bulgaricus* 2038）をモデル菌株とし，各種検討を実施した．
【結果】まず，乳糖分解培地における培地成分が，直接的に *L. bulgaricus* の増殖性を高める可能性を検証するため，*L. bulgaricus* 2038 を単独で発酵させた．しかし，培地の乳糖分解の有無で *L. bulgaricus* 2038 の増殖性に差は見られず，*S. thermophilus* との共生関係が重要であることが示唆された．そこで，*S. thermophilus* 1131 についても同様の検討を行った結果，乳糖分解培地では，非分解培地に比べて溶存酸素除去速度が速く，*L. bulgaricus* の増殖促進物質であるギ酸の産生濃度が高いことが分かった．現在マイクロアレイによる遺伝子発現解析を実施中であり，その結果についても併せて報告する予定である．

Analysis of the effect of lactose degradation of the medium on the growth of LB81 starter

○Eri Yamamoto, Reiko Watanabe, Takefumi Ichimura, Katsunori Kimura
(Meiji Co.,Ltd)

Key words *Lactobacillus bulgaricus*, *streptococcus thermophilus*, lactic acid fermentation, oxidase

2Kp01 *Aspergillus oryzae* 由来転写因子 XlnR による遺伝子発現制御システムの網羅的解析

○岡 大椰[1], 兒島 孝明[1], 井原 邦夫[2], 小林 哲夫[1], 中野 秀雄[1]
（[1]名大院・生命農学, [2]名大・遺伝子実験施設）
kojimat@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp

【目的】
転写因子のゲノム上における結合配列及び制御遺伝子を同定することは遺伝子発現システムを理解する上で非常に重要である．Genomic SELEX-Seq (gSELEX-Seq)は，ゲノム上の標的転写因子が *in vitro* で結合する配列情報を高感度に出力する手法である．本研究では，Aspergillus oryzae におけるキシラン及びセルロース代謝に関与する転写因子 AoXlnR をターゲットとし，gSELEX-Seq 法とマイクロアレイ法より取得した情報を統合することにより，AoXlnR によって発現制御される遺伝子をゲノムワイドに同定し，AoXlnR 制御転写ネットワークを網羅的解析する．
【方法・結果】
A.oryzae ゲノミックライブラリーと AoXlnR を用いた gSELEX を実施し，高速 DNA シークエンサーによって各選択プールの配列を取得した．これによって得られた配列データの解析を行い，AoXlnR 結合活性を示す 5′-UTR 及びその下流に位置する遺伝子を同定した．この候補制御遺伝子とマイクロアレイによって同定された発現変動遺伝子（DEGs）72 種類と照合したところ，51 遺伝子において重複が確認された．5′-UTR に結合部位を有し，かつ発現変動を受けるこれらの遺伝子は AoXlnR によって直接的に発現制御される遺伝子であると推定された．さらに，上記 DEG の 5′-UTR における AoXlnR 結合モチーフ数と発現変動レベルとの相関解析を行ったところ，AoX1nR 結合モチーフが下流の遺伝子の発現変動に密接に関与していることが明らかとなった．
本研究で得られた知見は，*A. oryzae* における AoXlnR を介したキシラン，セルロース代謝制御ネットワークの解明に大きく寄与することができる．

Comprehensive investigation of the gene expression system regulated by an *Aspergillus oryzae* transcription factor XlnR using integrated mining of gSELEX-Seq and microarray data

○Hiroya Oka[1], Takaaki Kojima[1], Kunio Ihara[2], Tetuo Kobayashi[1], Hideo Nakano[1]
([1]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., [2]Center for Gene Research. Nagoya Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, transcriptome, bioinformatics, gSELEX-Seq

2Kp02 接合菌 *Mucor circinelloides* の二形成変化における分子生物学的解析

○高野 真希, 岩倉 遼, 星野 一宏
（富山大院・理工・生命工）
khoshino@sus.u-toyama.ac.jp

【目的】二形性真菌とは pH，温度，CO_2，窒素源といった外的要因により糸状体と酵母体に形態を可逆的に変化させる真菌である．本研究室で開発した *Mucor circinelloides* 4572J 株は好気条件で糸状体，CO_2 存在嫌気条件で酵母体へと形態変化し，両条件下ともにエタノール発酵が可能な非病原性の菌株である．二形性変化は二形性真菌症による皮膚感染症治療のために以前より研究されているが，これに伴う細胞内シグナルの詳細は不明である．そこで本研究では，好気・嫌気条件下における二形性変化に関わる遺伝子発現を解析し，*M.circinelloides* の形態変化メカニズムを分子生物学的に検討した．【方法・結果】*M.circinelloides* 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．まず，CO_2 細胞内取り込みに関する Carbonic anhydrase (CA)遺伝子 *Nce103* は糸状体と酵母体の間で発現量の違いは認められなかった．CA の下流に存在する GTPase 遺伝子の *Ras1* 発現量は培養 6 h から 24 h で糸状体では 2.8 倍増加し，酵母体では 0.03 倍にまで減少した．また，二形性変化は細胞内 cAMP 含量が影響するとの報告があり，cAMP 生合成に関する Adenylyl cyclase (*AC*)および Phosphodiesterase (*PDE*)の遺伝子発現量を解析した．酵母体の *AC* および *PDE* 発現量は培養 6，24 h においてそれぞれ糸状態の 2 倍であった．さらに，菌糸伸長因子 *Efg1* 発現は糸状体の場合，培養 6 h において酵母体より 8.5 倍高く発現した．一方，細胞骨格に関する *Tubulin4* の遺伝子発現量は酵母体の方が低いことが判明した．実際，Tubulin 重合阻害剤 Griseofulvin の添加により菌糸成長が抑制され，酵母体が維持された．以上の結果より，細胞内 cAMP 蓄積が下流の *Efg1* 発現を低下させ，さらに細胞骨格成分の重合が抑制されることで菌糸が伸長せず酵母体が維持できることが示唆された．

Molecular elucidation of dimorphic-changing mechanism on zygomycota *Mucor circinelloides* sp.

○Maki Takano, Ryo Iwakura, Kazuhiro Hoshino
(Grad. Sch. Sci. Eng., Univ. Toyama)

Key words *Mucor circinelloides*, dimorphism, cAMP, tubulin

2Kp03 土壌環境中での糸状菌の呼吸活性の調節

○宮崎 つぐみ[1], 大泉 太於[2], 中澤 奈美[2], 高谷 直樹[2]
（[1]筑波大, [2]筑波大院・生命環境）
takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【背景と目的】フミン酸（Humic acid, HA）は土壌の腐植の構成成分であり，化学構造が特定されない難分解性の芳香族高分子化合物である．肥沃な土壌に普遍的に含まれることから，土壌微生物は HA と相互作用しながら生息していると予想されるが，この詳細は不明である．本研究では，土壌糸状菌による HA の代謝と HA による土壌糸状菌の代謝調節を明らかにすることによって，土壌環境中での HA の生理的機能と環境中の微生物による腐植の恒常性の維持機構を解明することを目的とした．
【結果と考察】HA が糸状菌 *Aspergillus nidulans* の代謝に与える影響を調べるために，一般的な呼吸酵素であるシトクロム *c* オキシダーゼ（Cytochrome *c* oxidase, COX）に依存した呼吸とシアン耐性呼吸（Alternative oxidase, AOX）に対する HA の効果を検証した．液体振とう培養させた菌体を回収し，酸素電極を用いて溶存酸素濃度を測定することによって，それぞれの呼吸活性を定量した．HA を添加した培養によって得られた菌体では，HA 未添加のそれに比べて全呼吸活性に占める AOX 活性の割合が高かった．この呼吸活性の変化は，*A. nidulans* 以外の 15 種の糸状菌においても観察された．また，HA の添加によって細胞内の活性酸素種の蓄積が減少したことから，HA は AOX 活性を亢進することで活性酸素の生産を抑制することが推察された．滅菌土壌を添加して培養した際にも AOX 活性の割合が増加し，このときの COX 活性は，HA と滅菌土壌のいずれも添加しない場合と比べて著しく低かった．このことから，HA および土壌が *A. nidulans* の呼吸代謝に影響を与えることが明らかとなった．本研究は，土壌成分が糸状菌の代謝調節に関与することを初めて示したものであり，環境中での糸状菌の代謝に関する新たな知見を与えるものである．

Regulation of respiratory activity of filamentous fungi in soil environment

○Tsugumi Miyazaki[1], Tao Oizumi[2], Nami Nakazawa[2], Naoki Takaya[2]
([1]Univ. Tsukuba, [2]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words *Aspergillus nidulans*, humic acid, respiration, alternative oxidaze

2Kp04 固／液界面培養法の菌株スクリーニングへの応用：培養条件の最適化

○椎名 一樹[1], 小田 忍[2]
（[1]金工大院・工, [2]金工大・ゲノム研）
odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的】新規な二次代謝物生産システムとして，抽出液面固定化システム（Ext-LSI）が報告されている．Ext-LSI では，中空マイクロスフェアー（MS）の液面浮上性を利用することで液体培地の液面にカビマットを形成させ，その上に有機溶媒を重層することでカビが生産する脂溶性二次代謝物を自動的に抽出することができる．しかし，Ext-LSI には増殖の遅いカビを適用すると，カビ-MS 複合マットが容易に崩壊してしまうという問題がある．一方，寒天平板／疎水性有機溶媒の固／液界面培養法（S/L-IC）がある．この培養系では寒天平板上にカビマットを安定に形成させることができる．本研究では S/L-IC による二次代謝物生産カビのスクリーニング法について，様々な因子を標準化し，プロトコル化を図ることを目的とした．
【方法・結果】寒天平板に標準カビを 1 点植えで植菌し，数日の静置培養を通じて培地上にカビマットを形成させた．その後，低沸点ジメチルシリコンオイル（KF-96L-1CS or 0.65CS, 信越化学）をカビマット上に重層し，所定の日数培養を行った．培養後有機層を回収し，HPLC-PDA で二次代謝物の解析を行った．本培養系について，培地種や有機溶媒種，培養期間等の標準化を図った．また，低酸素下における培養との比較も行った．
標準化した培地種，培養期間はそれぞれ Potato dextrose broth 培地，14 日間(前培養 3 日間，本培養 11 日間)であった．有機溶媒種では，KF-96L-1CS でカビマットの胞子形成が活発になり，二次代謝物が多く生産される傾向があった．シリコンオイルは，他の溶媒に比べて酸素を取り込みやすい，水酸化を受けにくい，微生物毒性が低い等といった特徴がある．一方，低酸素条件における培養では，二次代謝活性と胞子形成の抑制が確認された．

Application of a solid-liquid interface cultivation to the screening of microorganisms : Optimization of cultivation conditions

○Kazuki Shiina[1], Shinobu Oda[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Kanazawa Inst. Technol., [2]Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words fermentation, solid-liquid interface, secondary metabolite

2Kp05 乳化を指標とした細胞壁に作用する抗真菌性化合物の探索

○谷畑 友基, 根路銘 伸介, 尾島 由紘, 東 雅之
（阪市大院・工）
azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

真菌症の治療に使用されている抗真菌薬は，種類が少ない上に副作用や耐性菌の出現が問題となっている．医療現場から新たな抗真菌薬の開発が求められているが，ヒトと真菌で細胞構造が類似しているため，薬剤ターゲットは限られている．我々はヒトにはない真菌特有の構造体である細胞壁をその標的として注目し，新たなスクリーニング法の開発を進めてきた．2017 年度の本大会において，モデル生物である *Saccharomyces cerevisiae* や病原性酵母 *Candida albicans* を用い，浸透圧保護下で β-1,3-グルカン合成阻害薬 Micafungin を添加した培地でこれら酵母を培養すると，その培養液と油を混合した時に強い乳化が生じる現象を報告した．細胞壁構造の変化に伴い細胞表層の乳化物質が細胞から遊離したと考えられ，この結果から昨年度は乳化を指標とした細胞壁に作用する化合物の新規スクリーニング法を提案した．
本研究では，提案したスクリーニング法の有用性を証明するために，乳化を指標とした細胞壁に作用する新規化合物のスクリーニングに取り組んだ．具体的には，浸透圧保護剤と供試化合物を含む培地で *C. albicans* を培養し，得られた培養液に油を添加し撹拌した後に目視で乳化を評価する非常に簡単な方法でスクリーニングを進めた．結果として，約 500 種類の化合物ライブラリーから，5 種類の化合物で乳化が検出された．次に，5 種類の化合物について，浸透圧保護がない時の供試化合物の増殖抑制作用と細胞形態への影響を評価した．その結果，1 つの化合物では弱い増殖阻害，別の 1 つの化合物では細胞形態変化が見られ，それら化合物が細胞壁に作用する可能性が示唆された．上記の試験から，乳化を指標としたスクリーニングが有用であると判断し，現在は微生物の培養液ライブラリーからのスクリーニングに取り組んでいる．

Screening for antifungal compounds acting on fungal cell walls using emulsification as an index

○Yuuki Tanibata, Shinsuke Nerome, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words *Candida albicans*, antifungal agents, screening, emulsification

2Kp06 Free fatty acids as antibacterial compounds found in soybean tempe

○Dewi Kusumah[1], Isamu Maeda[1,2]
([1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Fac. Agric., Utsunomiya Univ.)
kusumahdewi0402@yahoo.com

Tempe is known as a fermented soybean food that includes beneficial compounds such as antibacterial compound. The goal of this study is to identify antibacterial compounds and clarify a production process of the compounds in tempe.
Tempe was produced after fermentation by *Rhizopus oligosporus* for 72 hours. Antibacterial compounds were extracted from the tempe using ethanol at 4℃ for 8 hours with vigorous shaking. Antibacterial compounds were purified by HPLC equipped with an ODS column. The compounds were identified by HPLC, GC-MS, and NMR. Growth inhibition by the antibacterial compounds was shown in Gram positive bacteria (*Bacillus subtilis* subsp. *natto* and *Staphylococcus aureus*) but not in Gram negative bacterium (*Escherichia coli*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). The main antibacterial compounds were linoleic acid and linolenic acid, which are fatty acids originally found in soybean as the form of triglyceride. It is known that fatty acids show unique properties, in which their antibacterial activities are affected depending on their chain length, number and position of double bond(s), cis-trans isomerism, kinds of functional group, and carboxyl group modification. Therefore, it is suggested that lipase produced by *R. oligosporus* might release free fatty acids from triglycerides included in soybean during a fermentation period of tempe, and linoleic acid and linolenic acid among the free fatty acids showed strong antibacterial activities in tempe extract.

Free fatty acids as antibacterial compounds found in soybean tempe

○Dewi Kusumah[1], Isamu Maeda[1,2]
([1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Fac. Agric., Utsunomiya Univ.)

Key words antibacterial, fermentation, fatty acid, functional property

2Kp07 二次代謝系の動的特性解析における大過剰化合物測定の有無の影響の数理解析

○富永 大介[1], 川口 秀夫[2], 堀 良美[2], 蓮沼 誠久[2], 荻野 千秋[3], 油谷 幸代[1]
（[1]産総研・生体ビッグデータラボ, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]神戸大院・工）
tominaga-daisuke@aist.go.jp

微生物の工業利用における有用物質生産の最適化などを目的として，その生物における目的物質生産に関わる二次代謝系の解析が行われることがある．多くの場合収量の最大化を目的として，グルコースなど微生物に与える基質 1 分子から，得られる目的物質の分子数の理論的最大値と実際の終了を比較するなどといったことが行われるが，この際に，最終的な収量に加えて生成速度も重視したいことがある．それには微分方程式モデルなどを使った解析が行われるが，モデルが大規模になると解析が困難になることがあるため，モデルに組み込む代謝物質の数を抑えるため，共役反応に関わる物質を省いて数理モデルを作ることがある．これは，ＡＴＰやＮＡＤなどは分子数が豊富であり（大過剰），それらが関わる反応が進んでも大きな濃度変化はない，という仮定に基づく．これにより実験観測のコストも抑えることができる．
しかし近年メタボローム測定の大規模化，システム化が進んでおり，コストの問題は解決されつつあることを踏まえ，著者らは大腸菌の酪酸代謝に関わる代謝物とエネルギー分子を 131 種選び，対数増殖期における濃度変化を観測し，そのうちの二十種程度について速度モデルにおける大過剰分子の有無の妥当性を検証した．データ点数は 10 点であり，速度モデルには S-system 形式を用いた．その結果，大過剰分子を取り入れたモデルは精度が高く，また取り入れない場合は無視できない誤差が生じ得ることが示された．

Mathematical analysis for consideration of excessive metabolites on dynamical analysis of secondary metabolic pathways

○Daisuke Tominaga[1], Hideo Kawaguchi[2], Yoshimi Hori[2], Tomohisa Hasunuma[2], Chiaki Ogino[3], Sachiyo Aburatani[1]
([1]CBBD-OIL, AIST, [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words dynamical analysis, S-system, *Escherichia coli*, mathematical model

2Kp08 Metabolic profiling of three terminal alkene producing *Jeotgalicoccus* spp. during different growth phase

○Filemon Jalu N Putra, Sastia Prama Putri, Eiichiro Fukusaki
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

The demand for terminal alkene has increased due to their application as chemical feedstock in commercial industries. However, terminal alkene is mainly produced by chemical synthesis from non-renewable sources. *Jeotgalicoccus* genus has been reported to be able to produce terminal alkene by using a unique cytochrome P450 fatty acid decarboxylase enzyme named OleTJE, which directly decarboxylates free fatty acids into terminal alkenes *via* CYP catalyzed oxidation. LC-MS/MS analysis was performed to monitor central carbon metabolism of *Jeotgalicoccus halotolerans* JCM 5429, *Jeotgalicoccus huakuii* JCM 8176, and *Jeotgalicoccus psychrophilus* JCM 5429 at logarithmic and stationary phases. Production profile of terminal alkene was measured by GC/MS splitless injection mode. In this study, *J. halotolerans* and *J. psychrophilus* showed higher terminal alkene production compared to *J. huakuii*. Terminal alkene showed highest production at logarithmic phase and therefore, detailed PCA analysis of the metabolite profiles of the three species were performed for the logarithmic phase. This is the first study on metabolite profiling of *Jeotgalicoccus* spp. in different growth phases. The results might provide a better understanding of terminal alkene production in *Jeotgalicoccus* spp. at the metabolome level.

Metabolic profiling of three terminal alkene producing *Jeotgalicoccus* spp. during different growth phase

○Filemon Jalu N Putra, Sastia Prama Putri, Eiichiro Fukusaki
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *Jeotgalicoccus*, terminal alkene, metabolomics

2Kp09 Global metabolite changes during laboratory evolution of 1-butanol producing *Escherichia coli* grown in minimal media

○Sana Subhan Memon Sakurai[1], Sammy Pontrelli[2],
Sastia Prama Putri[1], James C. Liao[2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ, [2]Dept. Chem and Biomol Eng., UCLA)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Adaptive laboratory evolution (ALE) has become a widely used tool in metabolic engineering to allow for fast strain development and/or improvement. ALE results in accumulation of beneficial mutations, the effect of which results in fitness improvement of the strain. The metabolome of a cell is thought to reflect the effect of genomic interventions or implementations. Therefore, the effect of the mutations, that arose during ALE, on the phenotype can be most closely studied using metabolomics. In this study, we demonstrate the utility of metabolomics for understanding the improved growth and 1-butanol production in minimal media, acquired as a result of ALE, using an engineered *Escherichia coli* strain. Comparative metabolic profiling of the parental and evolved *E. coli* strain was carried out using widely-targeted IP-RP-LC/QqQ-MS analysis. Relative intensity of several metabolites, including CoA compounds, central carbon metabolites, nucleosides and its phosphate derivatives, were different among the two strains. Overall 44 of the 64 annotated metabolites were significantly perturbed suggesting that laboratory evolution of *E. coli* with heterologous expression of 1-butanol pathway enzymes resulted in global metabolic changes that allowed for better glucose consumption, growth and production in minimal media.

Global metabolite changes during laboratory evolution of 1-butanol producing *Escherichia coli* grown in minimal media

○Sana Subhan Memon Sakurai[1], Sammy Pontrelli[2], Sastia Prama Putri[1],
James C. Liao[2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ, [2]Dept. Chem and Biomol Eng., UCLA)

Key words *Escherichia coli*, metabolomics, adaptive laboratory evolution, minimal media

2Kp10 メタノールをメチル基供与体とした *S*-アデノシルメチオニン再生経路の構築

○岡野 憲司[1], 永田 悠[1], 井上 翔太[2], 本田 孝祐[1]
（[1]阪大院・工, [2]阪大・工）
okano@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】
S-アデノシルメチオニン（SAM）は生物に普遍的に存在するメチル基供与体である．SAM 依存性メチラーゼを利用した反応には，複雑骨格を有した機能性分子の生合成，修飾に関与するものも多く含まれ，多様な機能性分子の創出が期待されるが，産業応用された事例は未だない．これは，生体内における SAM の再生効率の低さに起因する．SAM の再生には他のメチル基供与体を必要とするが，生体内において炭素源の大半は一次代謝に利用されるため，SAM の再生に利用される炭素は少量となる．そこで本研究では，メタノールに由来するメチル基を化学量論的に SAM の再生に利用できる組換え大腸菌の創製に向けて，メタノールデヒドロゲナーゼ（MDH）と *O*-メチルトランスフェラーゼ（OMT）の共発現株の作成を行った．本株では，MDH と大腸菌内在性酵素の作用により，メタノールに由来するメチル基が逐次的に転移し，SAM 再生とメチル化反応に利用できると期待できる．
【実験手法・結果】
Cupriavidus necator N-1 由来の MDH，および *Streptomyces avermitilis* MA-4680 由来の OMT を，温度誘導型の発現ベクターである pRCI に導入した．構築した共発現プラスミドを *Escherichia coli* BW25113 株に導入し，エスクレチンのスコポレチンとイソスコポレチンへのメチル化反応を行った．20 mg-wet cell/mL の菌体，0.2 mM エスクレチン，1 M メタノール，1 mM ATP を混合し，37℃で 16 h 反応を行った結果，0.16 mM のメチル化物の生産が確認できた．OMT のみを発現した株では，メチル化物の生産量が 3 分の 1 程度であったことから，メタノールをメチル基供与体とした SAM 再生経路が機能していることが示唆された．また ATP の代わりに 10 mM のグルコースを添加した場合でもメチル化反応が可能であり，メタノール存在下でもグルコースを用いた ATP 生産が行われていることが示唆された．

Construction of a *S*-adenosylmethionine regeneration pathway using methanol as a methyl donor

○Kenji Okano[1], Haruka Nagata[1], Shota Inoue[2], Kohsuke Honda[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *S*-adenosylmethionine, methanol, methylation reaction, *Escherichia coli*

2Kp11 高温域での NAD^+濃度の安定化と耐熱性酵素を用いた物質生産反応への寄与

○谷口 博範, 岡野 憲司, 本田 孝祐
（阪大院・工）
honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

好熱菌が有する耐熱性酵素は高い安定性をもち高温域でも長時間活性を保つため，これらの酵素を用いた高温域での物質変換は反応速度や冷却コストの面での利点を有する．一方で，多くの酵素反応に必須な NAD^+は高温域で安定性が低く，高温で長時間にわたる変換を行う際には，高価な NAD^+を随時添加する必要がある．
そこで我々は，好熱菌由来の耐熱性酵素群を用いて，NAD^+の熱分解産物であるニコチンアミドと ADP リボースから，NAD^+を再合成するサルベージ経路を *in vitro* で構築し，高温で NAD^+濃度を一定に保つ方法を提示した[1]．これをさらに発展させ，NAD^+の再合成経路に必要な 6 つの酵素を共発現する実用性の高いモジュール株を設計・構築した．今回，構築した株から得られた酵素群と NAD^+/NADH 依存型の耐熱性酵素による物質生産反応とを組み合わせ，当該モジュール株の有用性を実証する実験を行ったので報告する．

酵素は，各菌体を超音波破砕し，上清を熱処理した後の可溶性画分を回収することで調製した．NAD^+/NADH 依存型のモデル反応として，ピルビン酸から乳酸への変換を触媒する乳酸デヒドロゲナーゼ及びグルコースからグルコノラクトンへの変換を触媒するグルコースデヒドロゲナーゼをカップリングした反応を用いた．ピルビン酸とグルコースの初発濃度を 100 mM として変換を行った結果，NAD^+を外部から全く添加しない場合でも，モジュールを加えたときにのみ，24 時間以内にピルビン酸を乳酸に完全に変換することができた（100 mM ±0.4 mM）．一方，モジュールを加えなかった場合では，変換速度が時間とともに減少し，24 時間での乳酸への変換は 22.3 mM±0.3 mM にとどまった．
現在は多段階の NAD^+/NADH 依存型カスケード反応と組み合わせることでモジュール株の有用性に関するさらなる検証を行っている．

[1] Honda K et al, (2016) Metab Eng, 35: 114-120

Stabilization of NAD^+ concentration at high temperatures and its contribution to bioconversion with thermophilic enzymes

○Hironori Taniguchi, Kenji Okano, Kohsuke Honda
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *in vitro* metabolic engineering, NAD^+ salvage synthesis, thermostable enzyme, L-lactic acid

2Lp01 部位特異的変異導入により改変したサリチル酸脱炭酸酵素によるメチルサリチル酸の生成

○石原 真奈, 荒木 優大, 石井 義孝, 桐村 光太郎
（早大・先進理工）
kkohtaro@waseda.jp

【目的】*Trichosporon moniliiforme* WU-0401 由来 salicylate decarboxylase (EC:4. 1. 1. 91, Sdc) は，常温常圧下の水系反応でサリチル酸の脱炭酸およびフェノールへの炭酸固定を可能にする可逆的な脱炭酸酵素である[1]．演者らは Sdc の活性中心付近の残基への変異導入により F195Y-Sdc や Y64T-F195Y-Sdc を作製し，*p*-アミノサリチル酸の高収量生産(21.4 g L^{-1}) を達成している[1, 2]．本研究では，変異体 K23A-Sdc を創製し，メチルサリチル酸の生成について検討した．
【方法および結果】演者らは X 線構造解析をもとに推定された Sdc の立体構造により基質の流入口を見出した．そこで，流入口付近のアミノ酸残基の中でも嵩高い 23 番目の Lys を Ala に置換し，流入口を拡大した変異体 K23A-Sdc を創製した．K23A-Sdc では，Sdc では検出されない *o*-クレゾールから 3-メチルサリチル酸および *m*-クレゾールから 4-メチルサリチル酸への炭酸固定活性が検出された．一方，Sdc のメチルサリチル酸に対する活性は微弱なため，サリチル酸とフェノールを基質として，Lineweaver-Burk plot を用いて動力学定数を算出した．サリチル酸の脱炭酸反応では Sdc と比較して K23A-Sdc の k_{cat}, k_{cat}/K_m がそれぞれ 1.17 倍, 1.13 倍に増大し，フェノールへの炭酸固定反応ではそれぞれ 1.34 倍, 1.44 倍に増大した．以上より，K23A-Sdc では基質の流入口を拡大した変異によって基質の活性中心への進入が容易になり，速度定数(k_{cat}) および触媒定数(k_{cat}/K_m) が増大し，脱炭酸反応と炭酸固定反応の両者に関して Sdc と比較して触媒効率が向上したものと考えられる．

[1] K. Kirimura and Y. Ishii, Future Directions in Biocatalysis, 2nd ed. (T. Matsuda, ed.), p. 135-147, Elsevier, London (2017).
[2] S. Ienaga, et al, Bull. Chem. Soc. Jpn., 86, 628-634(2013).

Methylsalicylic Acid Production by Salicylate Decarboxylase Improved through Site-directed Mutagenesis

○Mana Ishihara, Masahiro Araki, Yoshitaka Ishii, Kohtaro Kirimura
(Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words reversible decarboxylase, salicylate decarboxylase, *Trichosporon moniliiforme*

2Lp02 ニトリルヒドラターゼの触媒反応機構解析－シリアルフェムト秒結晶構造解析に向けて

○林 英輝 [1], 北條 晴佳 [1], 松村 洋寿 [1], 小川 信明 [1], 野村 高志 [2], 當舎 武彦 [2], 城 宜嗣 [3], 野口 恵一 [4], 養王田 正文 [4], 尾高 雅文 [1]
（[1]秋田大院・理工, [2]理研・SPring-8, [3]兵庫県大院・生命理, [4]農工大院・工）
modaka@gipc.akita-u.ac.jp

【背景と目的】ニトリルヒドラターゼ (NHase)はニトリル化合物を水和してアミドを合成する反応を触媒する酵素である．NHase はバイオ法によるアクリルアミドの工業生産に利用され，世界のアクリルアミド総生産量の約 1/2 を占めている．また，近年シアン系廃液のバイオレメディエーションでも注目されている，産業的に極めて重要な酵素である．NHase はシステインスルフェン酸(Cys-SO-)とシステインスルフィン酸(Cys-SO2-)を配位子に含む特異な非コリンコバルトまたは非ヘム鉄を反応中心とすることから，触媒機構は未だ明らかにされていない．また，鉄型 NHase は暗条件下ではニトロシル化で不活性化し，NO を光解離させることで瞬時に再活性化する性質を持っている．我々はこの光応答性を利用し，触媒反応速度を遅くした変異体で時間分割 X 線結晶構造解析を行うことによって，環状の反応中間体の結晶構造を捉えた．しかし，従来法の時間分割構造解析では時間分解能に限界がある．そこで，我々は，X 線自由電子レーザーによる NHase のシリアルフェムト秒結晶構造解析（SFX）を目指して，研究を進めている．
【実験・結果・考察】NHase を発現している Rhodoccous sp. N771 に暗条件で NO 発生試薬を加えて不活性化(NO-NHase)した後，陰イオン交換並びに疎水性相互作用クロマトグラフィーにより単離精製した．精製 NO-NHase を暗条件下でハンギングドロップ法，バッチ法により結晶化した．これまで，部分的に NO が解離し，Cys-SO-配位子が酸化された構造が得られていたが，NO 発生試薬による不活性化条件を改良することで再現性良く NO-NHase の結晶構造を得られるようになった．また，SFX に用いる大量の微結晶の作成条件をバッチ法により確立した．今後，微結晶による X 線照射実験と SFX 用マトリクス条件の検討を行う．講演では，得られた最新のデータを含めて紹介する．

Analysis of Reaction Mechanism for Nitrile Hydratase Serial Femtosecond Crystallography

○Hideki Hayashi[1], Haruka Hojo[1], Hirotoshi Matsumura[1], Nobuaki Ogawa[1], Kushi Nomura[2], Takehiko Tosha[2], Noritugu Jou[3], Keiichi Noguchi[4], Masafumi Yohda[4], Masafumi Odaka[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ., [2]RIKEN Spring-8 Center, [3]Grad. Sch. Life Sci., Univ. Hyogo., [4]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words SFX, nitrile hydratase, Cys-SO-

2Lp03 INTMSAlign_Angler を用いたニトリラーゼのインシリコスクリーニング

○井上 梨沙 [1], 中野 祥吾 [2], 篠田 優 [1], 浅野 泰久 [1]
（[1]富山県大・生工研セ, [2]静県大・食栄）
asano@pu-toyama.ac.jp

【目的】近年，膨大な遺伝子情報がデータベースに登録されるようになり，その中から有用な遺伝子情報を探索するための新たな方法が求められている．本研究ではデータベース上から有用酵素を探索することを目的として作成されたプログラムの一つである INTMSAlign_Angler[1] を用いて，産業酵素ニトリラーゼを探索した．
【方法・結果】本研究では，α-ヒドロキシニトリルやアミノニトリルから医薬品原料となるカルボン酸を生成するニトリラーゼ AY487533[2] に着目し，相同性が低いが，同様の酵素活性を有する新規なニトリラーゼのスクリーニングを行った．先ず，INTMSAlign_Angler を用いて，本酵素の一次構造を基にデータベースからニトリラーゼ候補を抽出し，その中からニトリラーゼ AY487533 のアミノ酸配列と 40%~50%の相同性を持ち，かつニトリラーゼとして登録されていない 8 種類のニトリラーゼ候補（細菌由来 5 種類，糸状菌由来 3 種類）を選出した．各ニトリラーゼ候補のアミノ酸配列情報より DNA を合成し，大腸菌で発現させたところ，6 種類は可溶性に発現したが，糸状菌由来の 2 種類は不溶性であった．可溶性発現したニトリラーゼ候補にマンデロニトリルを基質として反応させたところ，全ての細菌由来の候補においてマンデル酸を生成する酵素活性を有することを確認した．さらにフェニルグリシノニトリルを基質として反応を行ったところ，全ての細菌由来の候補でフェニルグリシンの生成が確認できた．L-アルギニン酸化酵素 [1]，L-スレオニン脱水素酵素 [1] の例と今回の探索結果を併せて，INTMSAlign_Angler を用いることにより，元の配列より相同性が低くとも目的の活性を有する酵素を効率的に取得できることが分かった．

1. 中野祥吾ら，日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨集 講演番号 3J34p04
2. N. Kawahara, *et al*, *Green Chem*., 19, 418-424 (2017).

***in silico* screening of nitrilase by INTMSAlign_Angler**

○Risa Inoue[1], Shogo Nakano[2], Suguru Shinoda[1], Yasuhisa Asano[1]
([1]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka.)

Key words nitrile, nitrilase, *in silico* screening, INTMSAlign_Angler

2Lp04 二置換プロパンジオールの *S* 体選択的酸化を触媒する微生物の探索

○清水 慈 [1], 菊川 寛史 [2], 八十原 良彦 [3], 伊藤 紀幸 [3], 満倉 浩一 [2], 吉田 豊和 [2]
（[1]岐阜大院・自科技, [2]岐阜大・工, [3]（株）カネカ）
toyosida@gifu-u.ac.jp

【背景と目的】
光学活性ヒドロキシカルボン酸は，医薬品，ポリマーの原料として有用な化合物である．プロキラルジオールを酸化して，光学活性ヒドロキシカルボン酸を合成する場合，化学選択性と立体選択性の両方を制御する必要がある．これまでに我々は，一置換プロパンジオールの不斉酸化を触媒する微生物を見出しており，高い光学純度で *S* 体と *R* 体のヒドロキシカルボン酸の合成を達成している．一方，二置換プロパンジオールを用いた酵素活性スクリーニングでは，*R* 体を選択的に生産する微生物を発見している．本研究では，二置換プロパンジオールを *S* 体選択的に酸化する微生物の取得を試みた．
【方法と結果】
プロキラルな二置換プロパンジオールである 2-エチル-2-メチル-1,3-プロパンジオール（EMPD）を含んだ培地を用いて，不斉酸化を触媒する微生物を土壌サンプルから探索した．単離した微生物の培養液上清を TLC 分析したところ，76 株が EMPD 酸化活性を示した．次に，一方のヒドロキシメチル基のみに作用し，カルボン酸を生成した 8 菌株を選択した．生成した 2-ヒドロキシメチル-2-メチルブタン酸（HMMBA）をキラル HPLC 分析した結果，E2 株では光学純度は 32.5%ee と低いものの *S* 体の HMMBA を優先的に生成した．16S rDNA 遺伝子解析により，E2 株を *Agromyces* sp. E2 と同定した．*Agromyces* sp. E2 の培養菌体を用いて基質特異性を調べたところ，EMPD の他に 2-メチル-2 プロピル-1,3-プロパンジオールに対して良く作用した．培養条件検討で，E2 のジオール酸化酵素は誘導酵素であると判明した．菌体を用いた反応では pH 8.0，35℃で最大活性を示した．調製した E2 株の無細胞抽出液で SDS-PAGE を行った結果，酸化反応を触媒する酵素は約 30 kDa のタンパク質であることが示唆された．

Screening of microorganisms catalyzing *S*-selective oxidation of 2, 2 - Disubstituted propanediols

○Shigeru Shimizu[1], Hiroshi Kikukawa[2], Yoshihiko Yasohara[3], Noriyuki Ito[3], Koichi Mitsukura[2], Toyokazu Yoshida[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Gifu Univ., [2]Fac. Eng., Gifu Univ., [3]Kaneka corp.)

Key words Asymmetric oxidation, Alkanediols, *Agromyces* sp., 2-Ethyl-2-methyl-1, 3-propanediol

2Lp05 没食子酸脱炭酸酵素によるピロガロールの合成

○大江 史花[1], 岡村 佳樹[1], 菊川 寛史[2], 満倉 浩一[2], 吉田 豊和[2]
（[1]岐阜大院・工, [2]岐阜大・工）
toyosida@gifu-u.ac.jp

【目的】ピロガロールは医薬品合成中間体などに幅広く用いられている．ピロガロールの合成法として，再生可能資源であるタンニン酸を出発原料に用いた，(1)加水分解による没食子酸の生成，(2)没食子酸の脱炭酸が知られている．酵素合成法では，(1)の反応にタンナーゼ，(2)の反応に没食子酸脱炭酸酵素の利用が考えられる．しかし，これまでに報告されている没食子酸脱炭酸酵素は，酸素感受性が強く失活しやすい欠点がある．我々は高活性な没食子酸脱炭酸酵素活性を示す微生物を探索し，高活性菌 *Rahnella* sp. Y77 を見出してきた．近年，乳酸菌由来の没食子酸脱炭酸酵素遺伝子(*lpdC*）の組換え体が報告されたが，活性が低いという問題がある．そこで，Y77 株を用いて没食子酸からのピロガロール合成を検討した．また，没食子酸脱炭酸酵素遺伝子を導入した組換え体の作製とピロガロールの高効率合成を進めた．
【方法と結果】Y77 株の無細胞抽出液を調製し，没食子酸脱炭酸酵素の安定性を評価した．4℃で 6 日間の保存後においても細胞破砕直後の活性と同程度の活性を示し，酸素感受性が低く安定な酵素であると判断した．Y77 株の休止菌体によるピロガロール合成の反応条件を検討したところ，最適温度および pH は 50℃，pH 4.8 であった．リン酸緩衝液中で 250 mM 没食子酸を用いて菌体反応を行った結果，30 分後に変換率 100%で，31.5 g/L のピロガロールが蓄積した．Y77 株の全ゲノム解析データを利用したホモロジー検索により，*lpdC* と 56%の相同性を示す遺伝子を見出した．組換え体を作製後，休止菌体で活性を評価したところ，微弱な没食子酸脱炭酸酵素活性を示した．そこで，没食子酸脱炭酸酵素遺伝子の近傍に存在する ORF も導入した組換え体を作製したところ，活性が著しく向上した．

Synthesis of pyrogallol using gallic acid decarboxylase

○Fumika Oe[1], Yoshiki Okamura[1], Hiroshi Kikukawa[2], Koichi Mitsukura[2], Toyokazu Yoshida[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Gifu Univ., [2]Fac. Eng., Gifu Univ.)

Key words pyrogallol, gallic acid, decarboxylase, *Rahnella* sp.

2Lp06 微生物酵素による α 置換マロン酸ジエステルの立体選択的加水分解

○菊川 寛史[1], 鵜飼 文広[2], 村上 陽亮[2], 川端 潤[3,4], 三宅 良磨[3], 満倉 浩一[1], 吉田 豊和[1]
（[1]岐阜大・工, [2]岐阜大院・工・生命工学, [3]三菱ケミカル株式会社, [4]株式会社エーピーアイコーポレーション）
kikukawa@gifu-u.ac.jp

【背景】α,α-二置換マロン酸モノエステルは，四級炭素の合成ブロックとして有用であり，医薬品合成などに利用される．光学活性マロン酸モノエステルの酵素合成法として，ブタ肝臓由来エステラーゼによる不斉加水分解が報告されているが，アイソザイムが存在するため，反応性や立体選択性が不安定になるという課題がある．本研究では，汎用性の高い立体選択的な微生物エステラーゼの発見と，光学活性マロン酸誘導体の酵素合成法の開発を目指した微生物酵素の特徴解析を行った．
【方法・結果】立体障害の大きな置換基をもつ α 置換マロン酸類を炭素源として集積培養を行い，土壌サンプルから計 42 株のエステラーゼ活性菌を単離した．なかでも，ジエチルマロン酸ジエチル（DEDEM）を資化する *Rhodococcus* sp. D32 は，プロキラルマロン酸エステル類に対しても活性を示した．D32 株の最適培養条件を決定した後，調製した休止菌体を用いて 10 mM DEDEM 及び 10 mM ベンジルマロン酸ジエチル（DEBM）の加水分解を経時的に観察した．その結果，96 時間の反応では，DEDEM に対してモル変換率 36.4%である一方，DEBM に対しては 12 時間の反応で 100%の変換率を示した．D32 株は 2-エチル-2-メチルマロン酸ジエチル（DEMM）に対する反応性が高いことから，DEMM を基質として用いて酵素活性を評価した．D32 株の無細胞抽出液を硫安分画，各種カラムクロマトグラフィーに供した結果，収率 57%で D32 株由来エステラーゼを単離精製した．ゲルろ過クロマトグラフィーにより，本酵素は分子質量 36 kDa のモノマー酵素であることが明らかとなった．精製酵素を用いて特徴解析し，基質特異性を調べた結果，α 位にメチル基；エチル基；イソプロピル基をもつ一置換ジエステルに対して高い活性を示した．また，DEMM の加水分解生成物をキラル HPLC 分析したところ，＞99 % ee と高い光学純度を示した．

Stereoselective hydrolysis of diethyl malonates by microbial enzyme

○Hiroshi Kikukawa[1], Fumihiro Ukai[2], Yosuke Murakami[2], Hiroshi Kawabata[3,4], Ryoma Miyake[3], Koichi Mitsukura[1], Toyokazu Yoshida[1]
([1]Fac. Eng., Gifu Univ., [2]Dept. Biomol. Sci., Grad.sch.Eng.,Gifu Univ., [3]Mitsubishi Chemical Corp., [4]API Corp.)

Key words asymmetric hydrolysis, hydrolase, Diester, *Rhodococcus*

2Lp07 ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の酵素フマラーゼ(FumC)の生化学解析及び機能改変

○片山 徳賢, 小山内 崇
（明治大・農）
tosanai@meiji.ac.jp

【背景と目的】フマラーゼは，回路内のリンゴ酸とフマル酸の相互変換反応を触媒する酵素である．酸化的に還元力を生成する経路である TCA 回路ではフマル酸からリンゴ酸が生成されるが，還元的反応ではリンゴ酸からフマル酸が生成される．モデルラン藻である *Synechocystis* sp. PCC 6803 のフマラーゼ（以後 *Sy*FumC と表記）の生化学的特徴については報告がない．そこで，本研究では，*Sy*FumC の生化学解析とアミノ酸残基の改変による機能改変を試みた．
【方法】GST タグを付加した *Sy*FumC を *Escherichia coli* を用いて発現させ，回収した E. coli の細胞破砕液からアフィニティークロマトグラフィーによって *Sy*FumC の精製を行った．分光光度計(UV-1850, 島津製作所)を用いて，フマル酸の波長 250 nm における吸収の減少及び増加を測定することで，酵素活性を測定した．他のシアノバクテリアとの FumC のアミノ酸配列の比較から，活性部位周辺において特徴的なアミノ酸残基を決定し，この 314 番目のアラニンを変換したタンパク質である *Sy*FumC_A314E を作製し，同様に酵素活性を測定した．
【結果と考察】*Sy*FumC の生化学解析から至適温度及び至適 pH は 30℃，pH 7.5 であるとわかった．また，酸化的方向及び還元的方向の K_m はそれぞれ 0.306 mM，0.928 mM となり，還元的方向の基質親和性が低いということが分かった．また，k_{cat}/K_m はそれぞれ 195.1，38.5 s^{-1} mM^{-1} となった．*Sy*FumC_A314E では至適温度及び至適 pH は違いがほとんど見られなかったが，酸化的方向および還元的方向の km においてそれぞれ 0.203 mM と 0.359 mM となり，還元的方向で基質親和性がおよそ 2.6 倍に上昇したことが分かった．しかし，各 k_{cat}/K_m は 118.8 と 25.6 s^{-1} mM^{-1} となり，k_{cat} が低下したことが分かった．
以上より，今回改変した活性部位近傍部位のアミノ酸残基は基質親和性に重要な残基であると考察される．

Biochemical characterisation Fumarase C properties from a unicellular cyanobacterium demonstrates substrate specificity altered by an amino acid substitution.

○Noriaki Katayama, Takashi Osanai
(Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words cyanobacteria, fumarase, *Synechocystis*, enzyme activity

2Lp08 ボトリオコッセン生合成経路のプロダクト特異性改変

○多田 和樹, 坂本 康二, 河合 繁子, 斎藤 恭一, 梅野 太輔
（千葉大院・融合）
umeno@faculty.chiba-u.jp

【背景と目的】微細藻類 *Botryococcus braunii* の蓄積するボトリオコッセン (Bo) は石油代替燃料や保湿剤，特殊潤滑油の前駆体として注目を集めている．これらの生合成酵素は，スクアレン合成酵素（SQS）やカロテノイド合成酵素（CrtM, CrtB）と同一の祖先から分岐したと推察される．これら近縁酵素がそれぞれどのようにして似た化合物を作り分けているのかを明らかにできれば，鎖長や局所構造にさまざまなバリエーションをもつ炭化水素分子群を，自由に作ることができると期待される．
ボトリオコッセンは，ファルネシル二リン酸 (FPP) の 2 分子縮合反応による presqualene diphosphate (PSPP)合成を経る，二酵素反応により得られる．以前我々は，PSPP→Bo を触媒する酵素，SSL3 に多数の遺伝子変異を導入し，単独で二つのステップを触媒する能力を賦与することに成功した．本研究では，B. braunii 由来のボトリオコッセン合成酵素を実験室内で漸進的に「進化」させ，SQS, CrtM, CrtB 同様の機能を持つ酵素へと作りかえることを試みた．
【方法】単独でスクアレン合成ができる SSL3 変異体（Squalane Synthase-Like SSL3, SSLSSL3）にランダム変異を導入し, フィトエンデサチュラーゼ(CrtI)の共発現下，色素を蓄積するクローンを探索した．得られた変異体を単離し，遺伝型および細胞機能を解析した．
【実験と結果】第一反応を回復した「2 ステップ型」SSL3 変異体は，Bo を合成せず，Sq のみを与える．この SSLSSL3 を親としてランダム変異の導入→スクリーニングを行ったところ，カロテノイド前駆体型のプロダクト（phytoene, diapo-phytoene）を合成できる変異体が得られた．本発表では，得られた CrtB-Like SSL3（CBLSSL3），CrtM-Like SSL3（CMLSSL3）変異体の性質に加え，第 1 反応(FPP→PSPP)を担う SSL1 について行った同様の試みについても報告する．

Directed evolution of botryococcene biosynthetic pathways for altered product specificity

○Kazuki Tada, Kouji Sakamoto, Shigeko Kawai, Kyoichi Saito, Daisuke Umeno
(Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ.)

Key words isoprenoid, triterpenoid, synthetic biology, bioenergy

2Lp09 変異解析によるラン藻由来アルカン合成関連酵素の機能発現に重要な部位の同定

○工藤 恒, 野村 匡志, 林 勇樹, 新井 宗仁
（東大院・総合文化）
arai@bio.c.u-tokyo.ac.jp

ラン藻はアシル ACP 還元酵素（AAR）とアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ（ADO）によって，主に軽油に相当する炭化水素（C15, C17）を合成できる．AAR はアシル ACP（Cn）をアルデヒド（Cn）に還元し，ADO はアルデヒドを炭化水素（Cn-1）に変換する．AAR，ADO を大腸菌内で共発現させると炭化水素を合成できることから，AAR，ADO は炭化水素合成に必須である．しかし活性が非常に低いため，産業に利用するには AAR，ADO の高活性化が重要である．AAR は立体構造が未知であり，機能発現に重要なアミノ酸部位などについて未解明な部分が多い．そこで本研究では，変異解析により AAR の活性などに重要な部位の同定を目指した．触媒活性部位である C294 での飽和変異は全て活性を喪失した．また，NADPH 結合部位と推測される GXXGXXG モチーフのグリシンをアラニンに置換すると活性が大幅に低下した．これらの残基は AAR の活性に必須と考えられる．一方，C294 以外の 6 つのシステイン残基を全て別のアミノ酸に置換すると活性は 8 割ほど保持したが，構造が不安定化した．次に，様々なラン藻由来 AAR の活性を比較した以前の我々の結果を利用し，ラン藻 PCC7336 由来 AAR（低活性型，C16 アルデヒドを多く合成）のアミノ酸配列をラン藻 PCC7942 由来 AAR（高活性型，C18 アルデヒドを多く合成）のアミノ酸配列に近づけるように，非保存部位 40 箇所において 1 アミノ酸置換変異を導入した．その結果，7336 AAR の活性と可溶性発現量をそれぞれ向上させうる部位を同定できた．さらに，これら変異の同時多重導入により，基質特異性を保ったまま C16 アルデヒド合成量を著しく増加させた 7336 AAR 変異体の創出に成功した．この AAR 変異体を ADO と同時に用いれば C15 アルカンを多く合成できるため，用途に応じた炭素数の異なるバイオ燃料生産に応用可能である．

Identification of residues essential for the function of a cyanobacterial enzyme related to alkane biosynthesis

○Hisashi Kudo, Masashi Nomura, Yuuki Hayashi, Munehito Arai
(Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo)

Key words acyl-ACP reductase, cyanobacteria, alkane biosynthesis, enzyme engineering

2Lp10 細胞内酵素活性の可視化を利用したアシル ACP 還元酵素の高活性変異体のハイスループットスクリーニング

○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燃料の 1 つとして注目されている．2010 年に，ラン藻のアルカン合成に関わる 2 つの酵素，アシル ACP 還元酵素（AAR）とアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ（ADO）が同定され，遺伝子組換え微生物を利用したアルカン合成が可能となった．AAR は脂肪酸合成経路の中間産物であるアシル ACP を基質としてアルデヒドを生成し，ADO はこれをアルカンへと変換する．しかし，AAR の活性は非常に弱いため，微生物を利用したアルカン生産を実用化するには，AAR の高活性化が必要不可欠である．AAR の活性を調べるためには，大腸菌内で AAR を発現し，AAR により精製したアルデヒドを菌体と培養液から抽出し，ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）により定量という多段階プロセスを要する．そのため，多数の変異体 AAR の活性を評価するには，多くの時間と労力を要した．そこで，発表者は大腸菌内での AAR によるアルデヒド生成量（AAR の活性）に応じて発光する大腸菌を開発した．この活性評価法は，変異体 AAR を発現した大腸菌をコロニー（もしくは液体培地）の状態で培養し，外部からその発光量をモニターすることで，変異体 AAR のアルデヒド生成量を非侵襲的に，かつリアルタイムに，多検体同時に評価できる画期的な方法である（昨年の大会で報告）．本研究では，多数の変異体 AAR ライブラリを有する大腸菌を調製し，その中から，この評価法を用いて高発光大腸菌をハイスループットで選択することにより，高活性変異体 AAR の取得を目指した．大会では得られた高活性な変異体 AAR について報告する．

High-throughput screening of highly active mutants of acyl-ACP reductase by visualizing *in vivo* enzyme activity

○Yuuki Hayashi, Munehito Arai
(Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo)

Key words alkane biosynthesis, directed evolution, high-throughput screening, bioluminescence

2Lp11 Identification of key residue determining product regioselectivity of *Medicago truncatula* beta-amyrin C30-oxidase

○Much Zaenal Fanani[1], Ery Odette Fukushima[1], Satoru Sawai[2], Kiyoshi Ohyama[2,3], Hikaru Seki[1], Kazuki Saito[2,4], Toshiya Muranaka[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]RIKEN CSRS., [3]Dept. Chem. Mat. Sci., TITECH., [4]Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ.)
muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Triterpenes are a large structural diverse group of specialized metabolites with wide range of application. Cytochrome P450 monooxygenases (CYPs) are believed to be essential for producing triterpene chemodiversity. Beta-amyrin C30-oxidase was previously identified from *Glycyrrhiza uralensis* as an important enzyme in glycyrrhizin aglycone biosynthesis. Increase of glycyrrhizin aglycone production in engineered yeast was achieved by using beta-amyrin C30-oxidase homolog from *Medicago truncatula*. Still, the underlying mechanism of its product regioselectivity is poorly understood. Here, we identified amino acid residues responsible for product regioselectivity of beta-amyrin C30-oxidase. In *M. truncatula*, C30-oxidase gene is found in a cluster with other homologs on chromosome. We selected six amino acid residue candidates located in putative substrate recognition sites of these clustered genes. Site-directed mutagenesis analysis showed that, two residues, 149 and 398 are important for product regioselectivity. Further investigation in beta-amyrin C30-oxidase natural variants revealed that combination of amino acid residues Leu/Ile149 and Leu398 is more favorable in producing beta-amyrin C30-oxides. This study revealed key amino acid residues in determining beta-amyrin C30-oxidase product regioselectivity useful in production of valuable triterpene compounds.

Identification of key residue determining product regioselectivity of *Medicago truncatula* beta-amyrin C30-oxidase

○Much Zaenal Fanani[1], Ery Odette Fukushima[1], Satoru Sawai[2], Kiyoshi Ohyama[2,3], Hikaru Seki[1], Kazuki Saito[2,4], Toshiya Muranaka[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]RIKEN CSRS., [3]Dept. Chem. Mat. Sci., TITECH., [4]Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ.)

Key words triterpene, product regioselectivity, cytochrome p450 monooxygenase, *Medicago truncatula*

2Mp01 *Luteolibacter algae* SW 由来フコイダナーゼ遺伝子のクローニングと異種発現

○荒井 良仁[1], 長尾 達彦[2,4], 藤原 卓人[3], 八木 寿梓[3], 鈴木 宏和[3], 大城 隆[3]
（[1]鳥取大院・持社創生・工, [2]鳥取大院・工, [3]鳥取大・工, [4]日本ジッコウ）
ohshiro@bio.tottori-u.ac.jp

【目的】フコイダンとは昆布やワカメなどの褐藻のヌメリ成分に含まれる硫酸化多糖の一種であり，L-フコースが数千個も繋がった化合物で，平均分子量は約 200,000 とされている．フコイダンは血中コレステロール低下作用などの生理活性を持つことが示されており，健康食品分野で現在注目を集めている．
当研究室では，オキナワモズク由来フコイダンにおける生理活性と構造との関連の解明を目的とした研究を行っている．活性と構造の関連解明には，フコイダン低分子化酵素（フコイダナーゼ）の利用が有効であると考え，既にオキナワモズク由来フコイダン資化性菌 *Luteolibacter algae* H18 からフコイダナーゼ遺伝子を同定し，異種発現に成功している．今回，そのアミノ酸配列情報を基に，H18 株同様オキナワモズク由来フコイダン資化性菌であり，ドラフトゲノム情報が明らかになっている *Luteolibacter algae* SW からフコイダナーゼ遺伝子を探索し，発現検討を行った．

【方法・結果】SW 株のドラフトゲノム情報に対して，H18 株のフコイダナーゼ (Fct114，MW: 111,720) をコードする遺伝子と相同性の高い領域の検索を行ったところ，Fct114 と 40%の相同性を示す ORF が一つ見いだされ，その遺伝子産物の分子量は 92,963 であった．本遺伝子をクローニングし，大腸菌で異種発現させ，組換え株の無細胞抽出液を調製した．それを用いてオキナワモズク由来フコイダンを基質として酵素反応を行ったところ，明らかな低分子化が認められ，目的の酵素活性を持つことが示唆された．
現在，遺伝子が明らかになっているフコイダナーゼは 4 例知られており，それらは全て GH ファミリー 107 に属している．しかし本酵素はそれらと有意な相同性は見られなかったため，GH ファミリー 107 には属さないフコイダナーゼであると考えられた．

Cloning and expression of fucoidanase gene from *Luteolibacter algae* SW

○Arai Yoshihito[1], Nagao Tatsuhiko[2,4], Fujiwara Takuto[3], Yagi Hisashi[3], Suzuki Hirokazu[3], Ohshiro Takashi[3]
([1]Dept. Eng., Grad. Sch. Sust. Sci., Tottori Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Tottori Univ., [3]Fac. Eng., Tottori Univ., [4]NipponJikkou Co.)

Key words fucoidan, polysaccharide-degrading enzyme, algae

2Mp02 グルコマンナン分解細菌の探索および *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KT13 株からのマンナナーゼ精製

瀧上 和也[1], ○林 秀謙[1,2]
（[1]前橋工大院・工, [2]前橋工大・工）
h-hayashi@maebashi-it.ac.jp

【背景と目的】 コンニャクの主成分，グルコマンナンの分解生産物であるマンノオリゴ糖はヒトが消化することができないオリゴ糖であり，食物繊維やプロバイオティクスとしての機能を有する可能性がある．本研究ではマンノオリゴ糖生産に利用できる新規酵素の取得を目指し，グルコマンナン分解菌の探索を行った．さらに，単離した KT13 株よりマンナナーゼの部分精製を行ったので合わせて報告を行う．
【方法】 採取した土壌サンプルをコンニャク片を含む培地に添加し，嫌気または好気条件で集積培養を行った．集積培養後，菌株の単離を行った．単離した菌株は再度，コンニャク片の分解を確認した後，16S rRNA 遺伝子配列の決定を行い，菌株の同定を行った．さらに，NBRC の RD 株（83 株）もコンニャク片を分解する菌株のスクリーニングに使用した．最もコンニャク片の分解が早かった菌株についてはコンニャク粉を炭素源とした培地で培養後，培養上清の回収を行い，マンナーゼの精製を行った．
【結果及び考察】 嫌気または好気条件の集積培養より 481 菌株を単離した．RD 株を含め 564 菌株のコンニャク片の分解活性を確認したところ，52 株よりンニャク片の分解活性が認められた．これらの菌株のコンニャク片の分解の強さを分解時間で比較したところ，KT13 株のコンニャク片を最も早く分解した．KT13 株を同定したところ，*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* であった．コンニャク粉を炭素源として KT13 株の培養を行い，培養上清よりマンナナーゼの精製を行ったところ，複数のマンナナーゼからなる複合体を形成している可能性が示唆された．

Screening of glucomannan degrading bacteria, and purification of mannanase from *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KT13.

Kazuya Takigami[1], ○Hidenori Hayashi[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Maebashi Inst. Technol., [2]Eng., Maebashi Inst. Technol.)

Key words *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, mannanase

2Mp03 メタゲノム由来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, 戸田 弘, 伊藤 伸哉
（富山県大・工）
nbito@pu-toyama.ac.jp

【目的】各種光学活性アルコールは医薬品合成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，各種ケトンを光学活性なアルコールへと還元すると同時に，2-プロパノールを水素供与体として補酵素 NADH を再生可能な有用酵素である．本酵素に加え，様々な機能を持つ酵素遺伝子を取得するため，メタゲノムに注目した．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 of 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]．ターゲットとする化合物は医薬品前駆体となる嵩高い置換基を持つケトンであり，従来の酵素では立体選択的な還元が困難であった．本研究では同法を用いて，嵩高い置換基を持つケトン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/reductase)のアラインメント情報を基に相同性の高い領域を選択し，*hladh* 遺伝子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 を鋳型として PCR を行い，目的遺伝子の増幅を試みた．増幅産物を In-Fusion 法により発現ベクターと融合させ，*E.coli* JM109 へ形質転換しライブラリーを作製した．コレステロール吸収阻害剤であるエゼチミブの前駆体をターゲット化合物としてスクリーニングを行った結果，本化合物に対して立体選択的に還元活性を示す酵素を複数取得した．この内，より高い立体選択性と変換率を示したクローンについて酵素精製及び各種ケトンに対する基質特異性や至適温度，至適 pH を検討した．

1) N. Itoh, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 2014, *80*, 6280/Erratum 2016, *82*, 61.

Isolation and characterization of alcohol dehydrogenase genes from metagenomes to develop asymmetric reduction of bulky ketones

○Akinari Awatani, Hiroshi Toda, Nobuya Itoh
(Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

Key words metagenome, alcohol dehydrogenase, bulky ketone reduction, chiral alcohol

2Mp04 コリン型リゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の基質認識における Phe211 および Tyr258 の役割

○河原 光希[1], 小山 貴之[2], 酒瀬川 信一[3], 村山 和隆[4], 杉森 大助[1,2]
（[1]福島大・共生システム理工, [2]福島大院・理工, [3]旭化成ファーマ, [4]東北大院・医工）
sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp

【緒言】プラズマローゲン（Pls）は *sn*-1 位にアルケニルエーテル結合を持つリン脂質で，軽度認知症や冠動脈疾患（心筋梗塞等）の早期発見バイオマーカーとなることが近年報告されている．我々は，これまでにコリン型リゾプラズマローゲン（LyPlsCho）特異的ホスホリパーゼ D（LyPlsCho-PLD）を見出し，Pls の酵素定量法を確立した．LyPlsCho-PLD はホスファチジルコリンのようなジアシル型リン脂質には全く作用しないことから，その基質認識メカニズムに関心が持たれた．そこで演者らは，基質認識メカニズム解明を目指し，部位特異的変異解析を進めてきた．本発表では，基質結合部位に位置し，基質認識に関与すると予想された芳香族アミノ酸残基 F211, Y258 の点変異体に関する速度論解析の結果を報告する．
【方法】LyPlsCho-PLD の立体構造モデルおよび基質類似化合物とのドッキングシミュレーション解析の結果より，基質ヘッドグループあるいは *sn*-1 位アルケニルエーテル鎖と相互作用する可能性が予想された F211, Y258 に着目し，部位特異的変異導入とそれら点変異体の速度論解析を行った．F211 と Y258 変異体を pET-24a/BL21(DE3)を用いて組換え発現させた．得られた変異体についてはカラム精製を行い，LyPlsCho，リゾ型血小板因子（Lyso-PAF）に対する基質特異性試験および速度論解析を行った．
【結果と考察】F211 変異体については，Wild Type が本来基質とする LyPlsCho に対する活性が顕著に低下し，Lyso-PAF に対する活性が増大した．速度論解析の結果，基質特異性を決定づける要因は K_m（基質 *sn*-1 位エーテル鎖の認識）よりむしろ k_{cat}（反応生成物の解離過程）に関与すると結論づけた．現在，Y258 変異体については詳細な速度論解析を進めており，発表では得られた知見について報告する予定である．

Role of Phe211 and Tyr258 in substrate recognition of choline lysoplasmalogen-specific phospholipase D

○Koki Kawahara[1], Takayuki Oyama[2], Shin-ichi Sakasegawa[3], Kazutaka Murayama[4], Daisuke Sugimori[1,2]
([1]Fac. Symbio. Syst. Sci., Fukushima Univ., [2]Grad. Sch. Symbio. Syst. Sci., Fukushima Univ., [3]Asahi Kasei Pharma Corp., [4]Grad. Sch. Biomed. Eng., Tohoku Univ.)

Key words phospholipase D, substrate specificity, LysoPlasmalogen

2Mp05 超深海性ヨコエビ，カイコウオオソコエビの糖質分解酵素遺伝子の解析

○小林 英城[1], 長濱 統彦[2], 荒井 渉[1], 笹川 洋平[3], 梅田 茉奈[3], 林 哲太郎[3], 二階堂 愛[3], 渡部 裕美[1], 小栗 一将[1], 北里 洋[1], 藤岡 勘太郎[4], 木戸 ゆかり[1], 高見 英人[1]
（[1]海洋研究開発機構, [2]ノートルダム清心大・食品栄養, [3]理研・生命機能, [4]神奈川大・工）
hidekik@jamstec.go.jp

【目的】カイコウオオソコエビは，マリアナ海溝チャレンジャー海淵や伊豆・小笠原海溝，日本海溝の最深部に生息する超深海性ヨコエビである．これまで我々は，カイコウオオソコエビがセルラーゼを始めとする多糖分解酵素を保持し，深海で沈降植物片を栄養源としていることを報告した [1]．特にセルラーゼは，セルロースからグルコースとセロビオースを生産する新規酵素であり，天然セルロースの糖化酵素として有用であると考えられた．そこで，本研究では本セルラーゼを含むカイコウオオソコエビの多糖分解酵素のクローニングのため，その遺伝子情報を得ることを目的とした．
【実験方法】伊豆・小笠原海溝深部海底 (32°12.5766N, 142°08.0411E, depth: 9,450 m)よりベイトトラップにて採取したカイコウオオソコエビを用い，多糖分解酵素の活性を測定した．また，凍結ヨコエビ個体をビーズ式破砕機で破砕後，RNeasy lipid tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて，RNA 抽出を行った．抽出した RNA について，Hiseq 2500 (Illumina) を用いて mRNA シーケンスを決定した．得られた mRNA シーケンスデータから，多糖分解酵素を Blast 検索し，相同性から多糖分解酵素遺伝子の情報を得た．
【結果】伊豆小笠原海溝海底よりカイコウオオソコエビ個体は 500 個体以上採取できた．しかし，300 個体以上から RNA の抽出を試みたが，ほとんどの個体で RNA が完全に分解されていた．RNA が比較的良好に保存されていた個体は 2,3 個体だった．これらの RNA 試料を用い，RNA シーケンスを行った結果，162,388 本の contig が得られた．また Blast 検索を行った結果，多糖分解酵素遺伝子として 6 contig が検出された．アミラーゼ，β-1, 3 グルカナーゼ，セロビオヒドラーゼがそれぞれ 2contig ずつ存在していた．

1) Kobayashi et al. PloS one 7.8 (2012): e42727

Analysis of polysaccharide hydrolase genes of the hadal zone amphipods *Hirondellea gigas*

○Hideki Kobayashi[1], Takahiko Nagahama[2], Wataru Arai[1], Yohei Sasagawa[3], Mina Umeda[3], Tetsutaro Hayashi[3], Itoshi Nikaido[3], Hiromi Watanabe[1], Kazumasa Oguri[1], Hiroshi Kitazato[1], Kantaro Fujioka[4], Yukari Kido[1], Hideto Takami[1]
([1]JAMSTEC, [2]Dept. Foods, Human Nutr. Notre Dame Seishin Univ., [3]Adv. Centr. Comp. Comm, RIKEN, [4]Faculty Tech, Kanagawa Univ.)

Key words polysaccharide-degrading enzyme, cellulase, marine, deep-sea organism

2Mp06 黄麹菌が生産する難消化性澱粉分解酵素の探索 第 2 報

○伊藤 俊彦, 笹渕 優衣, 藤田 直子, 橋爪 克己
（秋田県大・生資）
toito@akita-pu.ac.jp

[目的]
演者らはこれまでに高温登熟障害米の消化補助酵素の開発を目的とし，強い難消化性を示す変異体米（澱粉合成酵素及び澱粉分枝酵素の二重欠損変異体米：以下#4019 と表記）を基質に用いた難消化性澱粉分解酵素活性測定法を構築した．この難消化性澱粉分解酵素活性を指標とし，焼酎用白麹菌 (*Aspergillus luchuensis*)が生産する耐酸性グルコアミラーゼ，及び#4019 を麹米とし，清酒麹菌 (*A. oryzae*) で製麹した麹に含まれる α-アミラーゼとグルコアミラーゼの混合酵素に強い難消化性澱粉分解活性を見出し報告した．今回新たに難消化性澱粉分解に α-グルコシダーゼの強い関与が認められたので報告する．
[方法]
#4019 及び日本晴を 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した．酵素活性は難消化性澱粉分解活性測定法及び糖化力分別定量キット（キッコーマンバイオケミファ）により測定した．酵素精製は陰イオン交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) を用いた．
[結果]
日本晴を原料米とした麹酵素と#4019 を原料米とした麹酵素を比較すると#4019 を原料米とした麹酵素において顕著な α-グルコシダーゼ活性の上昇が認められ，両麹酵素を用いた蒸米消化試験では#4019 を原料米とした麹酵素で高い難消化性澱粉分解活性と共に，顕著なイソマルトースの生成が認められた．

Resistant starch digestive enzyme investigation form *Aspergillus oryzae*. Second Report

○Toshihiko Ito, Yui Sasabuchi, Naoko Fujita, Katsumi Hashizume
(Dept. Bioresour. Sci., Akita Pref. Univ.)

Key words resistant starch, alpha-glucosidase

2Mp07 *Shinella* sp. NN-6 が有する 2 種のケトース 3-エピメラーゼ遺伝子のクローニングと発現した酵素の諸性質

○鈴木 琢磨 [1], 池田 光 [1], 堀 玄澄 [1], 森本 兼司 [2]
（[1]香川大・農, [2]国際希少糖研究教育機構）
morimoto@ag.kagawa-u.ac.jp

[背景と目的]
希少糖 D-プシコースは食後血糖値上昇抑制作用を示すことが報告されており世界的に注目されている．当研究室ではこれらを微生物由来のケトース 3-エピメラーゼ(K-3E)を用いて生産している．K-3E については世界中で多くの報告がなされているが，より希少糖生産に適した K-3E の探索はいまだに続けられている．当研究室が所有する微生物 *Shinella*. sp NN-6 はカーボンカタボライト抑制を受けない K-3E を実用レベルで発現する唯一の微生物である．NN-6 株は報告されている K-3E と類似した遺伝配列を複数有することが分かっており，本研究では 2 種の K-3E 類似遺伝子を大腸菌で発現させ，その諸性質を検討比較することを目的とした．
[方法]
NN-6 株のゲノム配列から, 既知の K-3E に類似する 2 種の遺伝子(それぞれ K-3E, K-3Eβ 遺伝子とする)を大腸菌で発現させるために合成 DNA を作製した．この合成 DNA を pQE-60 ベクターに連結し *Escherichia coli* JM109 を形質転換させた．この組換え大腸菌から常法によりそれぞれのタンパク質を調製した．菌体を超音波で破砕したのち，その上清に金属，熱処理を施したのち，硫安分画により粗精製タンパク質を得た．粗精製タンパク質をさらに種々のカラム処理を施すことにより精製し，両者の諸性質を検討した．
[結果と展望]
K-3E, K-3Eβ はともに D-プシコースに対して K-3E 活性を示すことを確認した．精製酵素の SDS-PAGE から単量体の分子量はともに約 38 kDa であること，ゲルろ過クロマトグラフィーにより多量体の分子量もともに 75 kDa であることが分かり，これらの酵素はいずれも二量体を形成することが明らかとなった．本研究より NN-6 株は複数の K-3E を同時に発現する可能性が示唆された．このような微生物は今までに例がなく，今後さらに詳細な検討を行うことにより本菌における K-3E ファミリーの発現機構の解析を進める必要がある．

Cloning and characterizatin of two ketose 3-epimerase genes from *Shinella* sp. NN-6

○Takuma Suzuki[1], Hikaru Ikeda[1], Gencho Hori[1], Kenji Morimoto[2]
([1]Fac. Agric., Kagawa Univ., [2]International Institute Rare sugar Res. Educ.)

Key words *Shinella* sp. NN-6, ketose 3-epimerase

2Mp08 納豆菌 B1 由来の L-ラムノースイソメラーゼの諸性質の検討および固定化酵素を用いた D-プシコースから D-アロースの生産

○後閑 俊哉 [1], 池田 光 [1], 鈴木 琢磨 [1], 森本 兼司 [2]
（[1]香川大・農, [2]国際希少糖研究教育機構）
morimoto@ag.kagawa-u.ac.jp

【背景と目的】枯草菌（*Bacillus subtilis*）は L-ラムノースイソメラーゼ（L-RhI）を発現することが報告されているが，類縁菌である納豆菌（*B. subtilis* natto）においては未だ詳細な報告はない．そこで納豆菌由来の L-RhI が枯草菌由来の酵素と違いがあるのか，また希少糖生産に応用できるかについて検討することを本研究の目的とした．
【方法】市販の納豆菌株を購入し，そこから当研究室で納豆菌 B1 株を単離した．本菌を 1%L-ラムノースを含む LB 培地で培養した．回収した菌体から超音波処理により粗酵素を抽出し，硫安分画により粗精製した後，L-RhI 活性画分を常法により L-RhI を精製した．本酵素を SDS-PAGE およびゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供して分子量を測定した．精製酵素を用いて至適 pH，至適温度，熱安定性，基質特異性を測定した．また，ポリエチレングリコール 6,000 により部分精製した L-RhI を陰イオン交換樹脂 HPA25L に結合させ，得られた固定化酵素を 1%の D-プシコース溶液と反応させ，反応液を HPLC で分析した．
【結果と考察】精製酵素は比活性 49.2 U/mg，精製度 150 倍，収率 0.06%で得られた．ゲル濾過カラムクロマトグラフィーの結果から本酵素の分子量は約 86,000 であることが分かった．SDS-PAGE による本酵素の単量体の分子量は約 45,000 であったことから本酵素はホモ 2 量体であると推測された．報告されている枯草菌由来の L-RhI はホモ 4 量体であるため，納豆菌由来の本酵素とはサブユニット構造が異なることがわかった．本酵素の至適 pH はトリス-塩酸緩衝液 pH 8.5，至適温度は 60℃であった．L-ラムノースへの活性を 100%としたとき L-リキソース，D-リボース，L-マンノース，D-アロースに対してそれぞれ 24.7%，5.9%，3.3%，2.5%の相対活性であった．固定化酵素を用いて D-プシコースから D-アロースが生産され，その平衡比は 66：34 であった．

Characterization of L-rhamnose isomerase from *Bacillus subtilis* natto B1 and its application of D-allose production from D-psicose

○Toshiya Gokan[1], Hikaru Ikeda[1], Takuma Suzuki[1], Kenji Morimoto[2]
([1]Fac. Agric., Kagawa Univ., [2]International Institute Rare sugar Res. Educ)

Key words *Bacillus subtilis* natto, L-rhamnose isomerase

2Mp09 *Pseudomonas* 属細菌におけるアコニット酸イソメラーゼの構成的生産

○滝口 有沙, 小田 祐之亮, 吉岡 育哲, 桐村 光太郎
（早大・先進理工）
kkohtaro@waseda.jp

【背景・目的】アコニット酸イソメラーゼ (EC 5.3.3.7；以下 AI) はトリカルボン酸回路中間体である *cis*-アコニット酸と *trans*-アコニット酸 (*t*AA) を異性化する酵素である．AI 活性は一部の植物や *Pseudomonas* 属細菌に検出されているが，その酵素的諸性質に関する知見は乏しかった．そこで，演者らは，*t*AA 資化性菌 *Pseudomonas* sp. WU-0701 由来 AI (PwAI) の精製により酵素的諸性質を明らかにし，さらにその遺伝子を同定した[1]．また，AI 遺伝子を高発現させた大腸菌細胞を生体触媒として利用し，クエン酸から *t*AA を生産することに成功している[2]．本研究では，AI 活性を示す *Pseudomonas* 属細菌における増殖と AI 活性の関連性について考察した．
【方法・結果】*Pseudomonas* sp. WU-0701 は *t*AA 資化性菌として土壌より取得され，当該菌株は AI 活性を示す[1]．PwAI のアミノ酸配列との相同性検索を行ったところ，一部の推定 ABC 輸送体基質結合タンパクと高い相同性が認められ，とくに *Pseudomonas oryzihabitans* NBRC 102199 由来の推定上遺伝子産物 (WP_027599585.1) に 90% の相同性が見出された[1]．そこで，WP_027599585.1 をコードする遺伝子を大腸菌で発現させて活性試験を行い，AI 活性を示すことを明らかにした．また，NBRC 102199 株は，*t*AA を唯一の炭素源とする培地で増殖が認められた(40 時間で OD_{660} ＞ 1.8)．さらに，WU-0701 株および NBRC102199 株をグルコース，クエン酸，および *t*AA を炭素源として培養し AI 活性を測定したところ，炭素源や培養時間に関わらず AI 活性が細胞内に検出された．以上より，WU-0701 株や NBRC 102199 株では AI は構成的に生産される酵素であることを明らかにした．

[1] K. Yuhara, et al., FEBS J., 282, 4257-4267 (2015). (Editor’s choice.)
[2] K. Koboyashi, et al., Chemistry Select, 6, 1467-1471 (2016).

Constitutive Production of Aconitate Isomerases in the Bacteria Belonging to the Genus *Pseudomonas*

○Arisa Takiguchi, Yunosuke Oda, Isato Yoshioka, Kohtaro Kirimura
(Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words aconitate isomerase, *trans*-aconitic acid, *Pseudomonas*

2Mp10 *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来のグルコース転移酵素を利用した alkyl α-glucosides の選択的生産

○渡邉 理沙, 恩田 裕, 中里 美穂, 石井 義孝, 桐村 光太郎
（早大・先進理工）
kkohtaro@waseda.jp

【目的】*Xanthomonas campestris* WU-9701 由来のグルコース転移酵素(XgtA)は α-glucosidase (EC 3.2.1.20)に分類され，マルトースを糖供与体として，アルコール性やフェノール性-OH 基にグルコースを転移し，マルトオリゴ糖の副生なく目的の α-glucoside を選択的に合成可能である[1,2]．演者らは，XgtA について酵素的性質を明らかにし，遺伝子クローニングと大腸菌における高発現にも成功している[3]．一方，ethyl α-glucoside (α-EG)は日本酒に約 4g/L 含有され，整肌作用や保湿作用を有し化粧品素材としての用途がある．しかし，酵素的合成法ではオリゴ糖などの副生があり，既往の方法では選択的生産は困難であった．本研究では，α-EG を含む alkyl α-glucosides の XgtA を利用した選択的生産について検討した．
【結果】精製 XgtA を用い，マルトースを糖供与体，ethanol を糖受容体とした反応による α-EG 生産では，1-batch, 60 h の反応で 42.1 g/L の α-EG 生産に成功した．また，反応で遊離するグルコースによるグルコース転移反応の阻害を見出したため，glucose isomerase (GI)を添加しグルコース濃度を低下させた反応条件を設定した．当該反応条件では，1-batch, 100 h の反応で 61.4 g/L の α-EG 生産を達成した．さらに，本反応系を用いた C3-C8 の直鎖のアルコール(propanol から octanol)を糖受容体とした反応においても alkyl α-glucosides の生成を TLC 分析により確認した．

[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, 20-27 (2012).

Selective Production of Alkyl α-Glucosides by α-Glucosyl Transfer Enzyme of *Xanthomonas campestris* WU-9701

○Risa Watanabe, Yutaka Onda, Miho Nakazato, Yoshitaka Ishii, Kohtaro Kirimura (Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words alkyl alpha-glucoside, alpha-glucosidase, *Xanthomonas campestris* WU-9701

2Mp11 FAD 依存型グルコース脱水素酵素変異体の速度論解析

○白井 裕貴[1], 西矢 芳昭[2], 中嶋 義隆[2]
（[1]摂南大院・理工, [2]摂南大・理工・生命科学）
nakaji@lif.setsunan.ac.jp

血糖値の測定などに利用される *A .oryzae* 由来グルコース脱水素酵素（GDH , EC 1.1.99.10）は，グルコース・メタノール・コリン（GMC）酸化還元酵素ファミリに属し，およそ 62000 のサブユニット分子量を有する 572 残基から構成される単量体酵素として知られている．GDH は，FAD 依存的に β-D-グルコースから δ-グルコノラクトンへの酸化反応を触媒する．このとき還元された FAD は，ジクロロフェノールインドフェノールといった電子受容体によって再酸化される．一方，同じファミリに属するグルコース酸化酵素（GOX , EC 1.1.3.4）は，同一の還元的半反応を触媒するにもかかわらず，酸素によって FAD が再酸化され，両者は酸化的半反応が異なる．我々は，2 つの酵素の酸素応答性の違い興味を持ち，その分子構造と速度論解析からそのメカニズムを明らかにすることを目的に研究行ってきた．これまでの研究から，pH 6.5 と pH 8.5 条件下での還元型 GDH の結晶構造において，触媒塩基と考えられる His506 が，それぞれ異なるコンホメーションを取ることを見出した．このことから，GDH の至適 pH の 6.5 では，His506 は自身のプロトン化に伴って，FAD のイソアロキサジン環から遠ざかるようにコンホメーションを変化すると考えられる．今回，pH 6.5 における還元型 GDH の His506 周辺に存在するアミノ酸残基である Leu550 に PCR 法を用いて変異を導入し，L550A と L550V 変異体を作製した．大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株による大量発現から，組換えタンパク質を調製した．精製サンプルを用いた反応速度論解析を行い，その結果について報告する

Kinetic analysis of FAD-dependent glucose dehydrogenase mutants

○Yuki Shirai[1], Yoshiaki Nishiya[2], Yoshitaka Nakajima[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ, [2]Dept. Life Sci. Fuc. Sci. Eng., Setsunan Univ)

Key words glucose dehydrogenase, flavoprotein

2Np01 微生物と線虫を用いた ^{137}Cs 汚染土壌に対する新規除染技術の構築

○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

【背景・目的】福島第一原発事故で拡散した放射性物質は，森林や山地などの居住範囲外では未だ残存している．費用対効果の高い微生物による除染方法が注目されているが，微生物を低コストで回収することは難しい．そこで，^{137}Cs を吸収した微生物を線虫に捕食させ，光や熱を避ける習性を利用して土壌から線虫を回収できれば，新たな除染技術の構築に繋がると着想した．本研究では，寒天培地及び滅菌土壌において，微生物から線虫体内への Cs の移行について検討を行った．
【方法・結果】本実験では，線虫に *Caenorhabditis elegans*（*C. elegans*），^{137}Cs 吸収菌に *Rhodococcus erythropolis* CS98 株（*R. erythropolis*）を用いた．まず，^{137}Cs 濃度が 1000 Bq/mL となるように調整した培養液中で，^{137}Cs を吸収させた *R. erythropolis* を *C. elegans* に給餌し，20℃で 9 日間静置培養した．培養後，ガンマカウンターを用いて，回収した *C. elegans* から放出されるガンマ線を計測した．その結果，回収した線虫から放出されるガンマ線の検出に成功した．このことから，一度のバッチプロセスにも関わらず，^{137}Cs が *R. erythropolis* から *C. elegans* 体内へ移行したと考えられる．プロセス設計のモデル実験として，*C. elegans* 及び CsCl を吸収させた *R. erythropolis* を寒天培地で 9 日間静置培養した．その結果，*R. erythropolis* から *C. elegans* 体内へ 20.1%の CsCl の移行が確認できた．さらに，滅菌土壌で同様に培養したところ，寒天培地より *C. elegans* の回収効率が低下する土壌であっても，*R. erythropolis* から *C. elegans* 体内へ 3.0%の CsCl の移行が確認できた．以上より，初期線虫数や処理回数などの操作因子を最適化することで，Cs 回収量を向上できるのではないかと考えている．

Construction of new decontamination technique for ^{137}Cs contaminated soil using bacteria and Nematodes

○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, Cesium, bioremediation

2Np02 重金属吸収後の植物バイオマスに対する微生物と線虫を利用した重金属分離回収法の構築

○岡野 凌一[1], 濵野 樹[2], 倉橋 健介[3], 吉原 静恵[2], 徳本 勇人[2]
（[1]阪府大院・工, [2]阪府大院・理, [3]阪府大高専）
tokumoto@chemeng.osakafu-u.ac.jp

【背景・目的】植物を用いるファイトレメディエーションは，低濃度の汚染地域を対象に広範囲な除染に適している．しかし，重金属を吸収した大量の植物バイオマスが廃棄物として発生する．そこで，この植物バイオマスを微生物によって分解し，増殖した微生物が重金属を吸着・吸収し，この微生物を線虫による捕食で回収することができれば，生物濃縮を利用したバイオレメディエーション技術の構築に繋がると考えた．本研究では，嫌気発酵汚泥に重金属を添加して培養し，植物バイオマスの分解挙動，微生物への重金属移行量を解析した．さらに，汚泥の構成菌叢をメタゲノム解析するとともに，線虫 *Caenorhabditis elegans* を使用し，汚泥中の微生物が吸収した重金属の回収試験も行った．
【方法・結果】除染対象の重金属にはカドミウム(Cd)を用いた．嫌気発酵汚泥にでんぷんを植物バイオマスとして加え，さらに Cd を任意の濃度になるようにバイアル瓶に封入し，嫌気条件下で静置培養を行った．培養期間中のバイオガス生成量および，そのときの発酵汚泥に，Cd の有無による変化が見られなかったため，汚泥中の微生物が Cd 耐性を有し，植物バイオマスを良好に分解していることが分かった．続いて，汚泥中の微生物が吸収・吸着した重金属量を逐次抽出法により分画化し，ICP-MS を用いて分析した結果，投与した Cd のうち約 99%が微生物に吸収，もしくは強固に吸着されることが判明し，Cd は微生物に固定化されていることが分かった．最後に，Cd が移行した汚泥中の微生物を餌として線虫を培養し，線虫が吸収した Cd 量を測定した．その結果，投与線虫数が少ない初期検討ながら，8%の Cd が線虫に回収されていた．今後は，初期線虫数や処理回数を増加させれば，Cd 回収量を増加させることが可能ではないかと考えられる．

Construction of heavy metal separatiom recovery method using microorganisms and nematodes in heavy metal-containing phytomass.

○Ryoichi Okano[1], Itsuki Hamano[2], Kurahashi Kurahashi[3], Shizue Yoshihara[2], Hayato Tokumoto[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]Osaka Pref. Univ. Coll. Technol.)

Key words anaerobic bioremediation, heavy metal pollution, microbial community, nematodes

2Np03 自然界からの希土類元素分離を可能とするリン酸基修飾酵母の開発

○木原 摩耶, 奥村 一仁, 尾島 由紘, 東 雅之
（阪市大院・工）
azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

【緒言】 希土類元素の需要は年々増加しているが，資源の偏在性から安定供給が難しいという課題を抱えている．海底や温泉水にも希土類元素が含まれているが，その回収は実用には至っていない．我々は，優れた回収方法の開発が課題解決に繋がると考え，微生物を用いた金属吸着剤に注目し研究を進めてきた．中でも酵母は自然沈降による分離が容易で，安全性が確保されている等，吸着剤に適した特徴を持つ．この酵母を吸着材料として捉え，リン酸基修飾を加えた酵母の開発を進めている．2014 年度の本大会では，リン酸基の導入により重金属や希土類元素に対してイオン交換樹脂と同程度の吸着が可能となり，さらに酸性溶液で脱離できることを報告した．また，メッキ廃液からの金属回収も可能であること等も報告してきた．本研究では，リン酸基修飾酵母のより詳細な性能を明らかにするため検討を進めた．
【実験方法】 リン酸基修飾酵母は，市販のドライイーストをアルカリ条件下で $Na_3P_3O_{10}$ と 20 時間撹拌することにより作製した．また金属吸着試験は，リン酸基修飾酵母を金属イオン溶液に懸濁した後 10 分間振とうし，その上清を ICP-OES で測定することにより行った．
【結果と考察】 吸着能を正確に評価するため，吸着等温式から飽和吸着量を求めた．Langmuir の吸着等温式に対して高い相関が見られ，Cu^{2+}に対して 1.23 mmol/g dw と算出された飽和吸着量からは，微生物吸着剤としてかなり高い能力であることが示された．また，リン酸基修飾酵母は価数の高い希土類元素を優先的に吸着できる傾向が見られた．そこで Na^{+}や Mg^{2+}等の多くの夾雑物を含む海水を模した溶液から，Dy^{3+}を中心とした希土類元素の選択的な回収について検討した．結果として選択回収が可能であることが分かったため，報告する．

Development of phosphorylated yeast enabling separation of rare earth elements from natural environment

○Maya Kihara, Kazuhito Okumura, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words yeast, biosorption, rare earth, metal recovery

2Np04 *Lactobacillus casei* JCM1134 の二価金属イオンの吸着傾向の解析

○遠藤 輪, 青柳 秀紀
（筑波大院・生命環境）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】
生命活動には多種類の金属が関与しており，その摂取は必須であるが，その一方で摂取する金属の量や種類によっては生物に有害な作用を及ぼす．近年，腸内細菌を用いて，消化管内で有害な金属イオンを吸着除去するコンセプトが登場してきた．しかしながら，腸内環境は土壌や湖沼等の環境と比較すると多くの夾雑物が存在し，これらが拮抗的に働くことで金属イオンの吸着が阻害される可能性がある．従って，腸内細菌の金属イオンの吸着能の有無だけでなく，どのような金属イオンを吸着しやすいのかを明らかにする必要がある．本研究では乳酸菌 *Latobacillus casei* JCM1134 による 7 種類の 2 価の金属イオンに対する吸着能を比較して，金属イオンに対する吸着親和性を解析した．
【方法と結果】
金属イオンの吸着量は金属イオンを添加した緩衝液に任意の条件で培養した *L. casei*JCM1134 を懸濁させ，懸濁前後の緩衝液中の金属濃度を測定することにより求めた．7 種類の金属イオンのうち，Sr^{2+}や Ba^{2+}の吸着量は *L. casei* JCM1134 の莢膜多糖量と正の相関を示し，吸着部位として莢膜多糖が関与している可能性が示唆された．また，培養 9 h の *L. casei* JCM1134 が示す最大吸着量を各金属イオン間で比較すると，$Cu^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+} > Ni^{2+}$の順となり，殺菌作用を示した Cu^{2+}を除外するとイオン半径が大きな金属イオンほど吸着されやすいことが明らかになった．この傾向から，*L. casei* JCM1134 による金属イオンの吸着にはイオン交換メカニズムが大きく寄与していることが推測された．

Adsorption preference for divalent metal ions by *Lactobacillus casei* JCM1134

○Rin Endo, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words bioremediation, biosorption, ion characteristics, lactic acid bacteria

2Np05 Development of method for the estimation of phosphate accumulation in microbes

○Ajeeta Anand, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ.Tsukuba)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

Phosphate removing agents have been implemented to address the issues of hyperphosphatemia. Here, we employed a microbial approach for phosphate removal. Screening of phosphate accumulation microbes revealed the 11th strain (L11) and 8th strain (B8) of *Lactobacillus casei* JCM 1134 and *Bifidobacterium adolescentis* JCM 1275, respectively as potential phosphate accumulators. However, current methods for measuring microbial phosphate accumulation capacities demand amendments in specificity, cost, and simplicity. The presented method analyzes broth supernatant to indirectly assess the phosphate accumulation capability of cells. Phosphate-deficient cells were constructed, and phosphate accumulation capabilities were subsequently assayed by reactions with toluidine blue O. Interfering agents and other metabolic molecules were negated by taking supernatants from phosphate-containing cells as blanks. In contrast to previous studies, shifts in the first peak of absorbance scans were inversely related to phosphate concentrations. Validation results were significant (p value<0.05). The minimum detectable phosphate concentration for the L11 isolate of *L. casei* JCM 1134 and B8 isolate of *B. adolescentis* JCM 1275 were 1 and 0.3 mg/L, respectively. The presented method is safer, cheaper, more accurate and rapid than the conventional methods. This method can also be applied for phosphate estimation in waste water streams, chemical and biological samples with some modifications.

Development of method for the estimation of phosphate accumulation in microbes

○Ajeeta Anand, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ.Tsukuba)

Key words hyperphosphatemia, intestinal bacteria, phosphate estimation, toluidine blue o

2Np06 Comparative study on adsorption of metal ion in dead *Saccharomyces cerevisiae*

Tu Dang[1], Kazuki Honda[2], Tuan Anh Do[1], ○Masao Kishida[2], Masakazu Furuta[1]
([1]Dept. Quant. Rad. Eng. Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]Dept. Appl. Life Sci. Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)
masyksd@biochem.osakafu-u.ac.jp

Metals absorption by dead biomass of *Saccharomyces cerevisiae* has been studied as an ideal candidate for the metal treatment in waste waters due to its safety and high efficiency. As the metal absorption process in dead cells is unaffected by nutrient supply or toxicity of pollutants, it might be more applicable than living biomass in the practical approach to remove different types of toxic metal contaminated in water. In this research, we examined the absorbing ability for various metals of lived and dead yeast cells of *S. cerevisiae*, treated with under toxic level (less than 10 mM) of metals. The test also carry out at the yeast strains *S. cerevisiae* BY4741 and IM3, bred from BY4741, which can grow up in very high concentration of Mn (15mM) and over 4 times more accumulate Mn than BY4741. Dead cell of BY4741 and IM3 was obtained by autoclaving, drying in oven, or irradiating UV and gamma ray. Dead cells were put in 1 ml of solution containing Ca^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Cr^{3+}, or Fe^{2+}. Metal absorbance amount was recorded with reference to the appropriate standard, showing the effect of different killing conditions to the absorption ability of dead cells. Results from this experiment show that the highest absorption of Mn by both strains can be obtained by autoclaving at 110°C in 5 min. This result also provides the information for the optimization condition of metal contact and killing procedure. And this study reconfirmed the passive uptake mechanism also known as surface absorption of metals in dead yeast cells.

Comparative study on adsorption of metal ion in dead *Saccharomyces cerevisiae*

Tu Dang[1], Kazuki Honda[2], Tuan Anh Do[1], ○Masao Kishida[2], Masakazu Furuta[1]
([1]Dept. Quant. Rad. Eng. Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]Dept. Appl. Life Sci. Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, metal absorption, bioremediation, manganese

2Op01 Visualization of methylation index in human colon cancer tissues using imaging mass spectrometry

○Nathanael Steven[1,2], Keiichi Okano[3], Masahiro Aoki[4], Yasushi Kojima[4], Marselina I. Tan[2], Eiichiro Fukusaki[1], Tomoyoshi Soga[5], Shuichi Shimma[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Biotechnol., Bandung Inst. Technol., [3]Dept. Gastroenterological Surgery, Kagawa Univ. Hosp., [4]Aichi Cancer Center, [5]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ.)
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

S-adenosylmethionine (SAM) and S-adenosylhomocystein (SAH) are two important metabolites related to methylation process in living cell, particularly in global genome methylation of eukaryotic cells. In cancer cells, less genome methylation occurs as compared to normal cells. Information of SAM and SAH distribution and its correlation to tissue structure and components can provide insights into methylation process in cancer cells. We have visualized distributions of SAM and SAH in human colon cancer tissue from three different patients, each with different stages, using iMScope TRIO (Shimadzu, Kyoto, Japan). α-CHCA matrix application was done using manual spraying method. Imaging mass spectrometry (IMS) results showed that SAM was found to be accumulated specifically in cancer region, whereas SAH was found to be distributed evenly in cancer and normal region. Therefore, methylation index (SAM/SAH) of cancer region was found to be higher compared to normal regions. Together with hematoxylin-eosin staining, this information can give better understanding of cancer genome methylation and also the progression of human colon cancers.

Visualization of methylation index in human colon cancer tissues using imaging mass spectrometry

○Nathanael Steven[1,2], Keiichi Okano[3], Masahiro Aoki[4], Yasushi Kojima[4], Marselina I. Tan[2], Eiichiro Fukusaki[1], Tomoyoshi Soga[5], Shuichi Shimma[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Biotechnol., Bandung Inst. Technol., [3]Dept. Gastroenterological Surgery, Kagawa Univ. Hosp., [4]Aichi Cancer Center, [5]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ.)

Key words S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, methylation index, imaging mass spectrometry

2Op02 原子間力顕微鏡を用いた B 型肝炎感染機構の解明

○西田 真一朗[1], 竹中 武藏[2], 西村 勇哉[2], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[2]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】B 型肝炎の感染は，B 型肝炎ウイルス(HBV)が肝細胞表層のタンパク質と結合することで引き起こされるが，感染に関与するタンパク質は特定されていない．過去の研究では HBV 側の感染に関与するタンパク質として，L タンパク質中の PreS1 領域が報告されている．また細胞側の候補として，ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）やナトリウムタウロコール酸共輸送体（NTCP）が報告されている．従来の研究では細胞内の取り込み後の評価が行われており，細胞へ結合する瞬間の評価は行われていない．そこで本研究では，分子間相互作用の測定が可能な原子間力顕微鏡（AFM）を用いて，細胞とウイルスの結合に焦点を当て，感染機構の解明を目指した．AFM を用いることで，細胞表層に対しナノスケールでのアプローチが可能となり，細胞表層タンパク質との相互作用を定量的に評価することが可能となる．本研究では PreS1 ドメインを AFM の探針に修飾し，肝細胞表層タンパク質との相互作用を測定することで，感染機構の解明を目指した．
【実験操作】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，その後 PreS1S2GFP の発現確認を行った．PreS1S2GFP の肝細胞認識能力を確認するため，フローサイトメトリー(FACS)を用いて細胞の蛍光強度の解析をおこなった．その後，AFM を用いて相互作用測定を行った．測定系の構築を確認後，受容体候補である HSPG に焦点を当て，感染機構の評価を行った．
【結果と考察】FACS を用いた解析では PreS1S2GFP の肝癌細胞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，HepG2 表面でより大きな相互作用が観測された．これらの結果から肝細胞表面受容体検出系の構築を確認することができた．またこの系を用いて HSPG を評価し，感染機構に関与する可能性を示唆する結果が得られた．

Elucidation of hepatitis B infection mechanism by Atomic force microscopy

○Shinichiro Nishida[1], Musashi Takenaka[2], Yuya Nishimura[2], Tiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words Atomic Force Microscopy(AFM), Hepatitis B virus(HBV)

2Op03 自公転遊星式撹拌技術を活用した組織培養の有用性

○小田 彰恭[1], 吉田 春菜[1], 関口 はつ美[1], 柳田 湧太[1], 金子 凜[1], 高宮 良太[1], 野辺 善仁[2], 村松 和明[1]
([1]電機大院 ・理工, [2](株)大洋技研)
k-muramatsu@mail.dendai.ac.jp

【背景・目的】自家培養軟骨細胞移植術など自家細胞を原料とした再生医療等製品の製造では，限定された採取組織からより多くの細胞を効率よく単離することが求められる．生体組織から細胞を単離するプロセスは，酵素消化を伴い，このとき撹拌・振とう法の違いが細胞の回収効率に大きな影響を及ぼす．そこで本研究では，検体中の粒子に及ぼす物理的ダメージが少ないとされる，撹拌効率の高い自公転遊星式撹拌技術が，軟骨組織工学において細胞の単離プロセスに有効であるか検討した．
【方法】ラット肋軟骨を約 1mm 片に細断後，37℃条件下にて約 0.4g 相当量の軟骨組織を 0.1 mg/mL リベラーゼ THR（Roche）10mL で 4 時間消化した．このとき，酵素消化のプロセスは 2 群の 50mL 遠沈管で行い（各 n=3），一方は自公転式遊星式撹拌機にて，他方は通常の旋回振とう機にて行った（各 120 rpm）．組織の消化効率は，消化前後の軟骨組織の質重量測定から算出し，単離された生細胞数を比較した．また，それら細胞を初代培養し，細胞の特性を増殖性（DNA 定量）と遺伝子発現解析（RT-PCR 法）にて評価した．
【結果・考察】軟骨組織の消化効率および細胞回収効率（「得られた生細胞数」/「消化組織の湿重量」）は，自公転遊星式撹拌群の方がいずれも優れていた．また，自公転遊星式撹拌で単離された軟骨細胞は，増殖性やマーカー分子（SOX9, ACAN, COLII,等）の発現レベルにおいて旋回振とう法と同等以上であり，一般的手法で単離された細胞の特性との違いは全く確認されなかった．以上の結果より，細胞に与える物理的ダメージが少ないとされる自公転遊星式撹拌技術がもたらす高い撹拌性は，酵素消化において同一量の組織からより多くの正常細胞を単離することに繋がることが実証された．

Utility of a rotation/revolution type agitator for the process of primary culture

○Akinori Oda[1], Haruna Yoshida[1], Hatsumi Sekiguchi[1], Yuta Yanagita[1], Rin Kaneko[1], Ryouta Takamiya[1], Yoshihito Nobe[2], Kazuaki Muramatsu[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng. Tokyo Denki Univ., [2]Taiyo Giken Co.,Ltd.)

Key words chondrocytes, isolation

2Op04 がん種の異なる細胞間での中心代謝における ^{13}C 代謝フラックス解析

○上原 ひかる[1], 荒木 千絵[1], 前田 昂亮[1], 岡橋 伸幸[1,2], 松田 史生[1], 髙橋 智聡[3], 清水 浩[1]
([1]阪大院・情報, [2]理研, [3]金沢大・がん進展制御研)
shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

［背景・目的］^{13}C 代謝フラックス解析は細胞内中心代謝経路の活性や，補酵素の再生消費バランスを推定できる．そこで本研究では，これまで微生物中心代謝の解析に利用されてきた ^{13}C 代謝フラックス解析用いてヒトがん細胞 3 株の代謝フラックス分布を推定することを試みた．がん細胞は，代謝リプログラミングにより正常細胞と異なる特異的な代謝状態を持ち，がんの悪性化や転移に寄与すると考えられている．がん特異的の解明は創薬に有益な情報となることが期待される．そこで，ヒトがん細胞 3 株の代謝フラックス分布を推定し，がん種間での共通性や特異性を代謝フラックスレベルで明らかにすることを目指した．
［結果］ MCF7（ヒト乳がん由来細胞株），HeLa（ヒト子宮頸がん細胞株），HepG2（ヒト肝がん由来細胞株）を[1-^{13}C]グルコースを含む DMEM 培地で培養し，培地中代謝物濃度を液体クロマトグラフィーで定量した．また細胞内代謝物の ^{13}C 標識割合を GC-MS で測定した．いずれの株でも ^{13}C 代謝フラックス解析の適用に必要な代謝定常と同位体定常状態を取ることを確認した．そこで，実測した比速度と細胞内代謝物の ^{13}C 標識割合から，細胞内代謝フラックス分布を推定することに成功した．3 株の代謝フラックス分布を比較すると，解糖系とペントースリン酸経路の分岐比はおよそ 9：1 と 3 株間で大きな差はなかった．一方，TCA サイクルに流入するピルビン酸デヒドロゲナーゼの反応の代謝フラックスは MCF7，HeLa，HepG2 で各 32, 12, 40 mol/100 mol-glucose と株間で大きく異なっていた．また，推定したフラックス分布から NADPH の再生・消費速度を算出したところ，3 株ともにリンゴ酸 NADP+オキシダーゼが触媒する反応が NADPH の主な供給源であることが推測された．

Comparison of central metabolic fluxes of cancer cell lines

○Hikaru Uehara[1], Chie Araki[1], Kousuke Maeda[1], Nobuyuki Okahashi[1,2], Fumio Matsuda[1], Chiaki Takahashi[3], Hiroshi Shimizu[1]
([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]RIKEN, [3]Cancer Res. Inst., Kanazawa Univ.)

Key words ^{13}C-metabolic flux analysis, Cancer metabolism

2Op05 公共データベースを利用した脱分化脂肪細胞における肝細胞分化制御因子の探索

○萩原 玲子, 沖 嘉尚, 加野 浩一郎
（日大院・生資科）
kano.kouichirou@nihon-u.ac.jp

我々は，成熟脂肪細胞を体外培養すると自発的に脱分化し，線維芽細胞様の脱分化脂肪細胞(DFAT)になることを明らかにしている．また，DFAT は骨芽細胞や骨格筋細胞など間葉系の細胞へと分化するだけでなく，外胚葉に由来する神経細胞へ分化することも明らかにしている．しかし，間葉系幹細胞と類似した特性をもつ DFAT を内胚葉系細胞へ分化させた報告はなく，サイトカインや増殖因子を用いた分化誘導法ではそれらの分化細胞を取得するのは困難であると考えられている．本研究では，網羅的遺伝子発現解析によって DFAT が肝細胞に分化するために必要な核内転写因子を抽出し，肝細胞分化制御因子を同定する目的で行った．マウスの皮下脂肪組織から酵素処理によって単離した脂肪細胞(AC)および DFAT から全 RNA を抽出し，Affymetrix 社の GeneChip を用いてマイクロアレイ解析を行った．肝細胞(HC)および肝臓由来幹細胞(RLSC)のマイクロアレイデータは，NCBI の遺伝子発現データベース(GEO)から取得し，統計処理ソフトウェア「R」を用いて正規化を行った．マイクロアレイデータから核内転写因子を絞り込むために，PANTHER データベースから取得した”transcription factor”のアノテーション情報を付加したのち，Absolute call によって遺伝子発現の有無を解析した．さらに，TIBCO Spotfire を用いて発現差のある転写因子を抽出した．その結果，AC および DFAT と比較して，HC および RLSC で高く発現している 3 つの核内転写因子が抽出され，これらが肝細胞分化制御因子であると推定された．レトロウイルスベクターによって抽出された核内転写因子を DFAT へ遺伝子導入し，肝細胞分化誘導すると，アルブミンおよびグリコーゲンの合成が認められた．以上の結果から，網羅的遺伝子発現解析により抽出された核内転写因子は DFAT における肝細胞分化制御因子であることが示唆された．

Identification of master regulator genes for hepatocyte differentiation in de-differentiated fat cells

○Reiko Hagiwara, Yoshinao Oki, Koichiro Kano
(Grad. Sch. Coll. Bioresour. Sci., Nihon Univ.)

Key words de-differentiated fat cells, hepatocyte, gene expression analysis

2Op06 アガロース精密鋳造法と幹細胞分化パターン分析

○田中 信行 [1], 山下 忠紘 [2], 佐藤 麻子 [1], Vogel Viola [3], 田中 陽 [1]
（[1]理研・生命機能科学, [2]慶応大, [3]ETH Zurich）
nobuyuki.tanaka@riken.jp

幹細胞は細胞分裂によって元の細胞と同じ細胞を作る自己複製能と別の種類の細胞に分化する能力を有し，特に複数の種類の細胞に分化できる場合を多分化能と呼ぶ．幹細胞の分化は，単に生化学的な作用だけに依存しているだけでなく，硬さなどの細胞周囲の物理的環境にも大きく影響を受けることが知られている[Engler et al., Cell, Vol. 126, pp. 677-689, 2006]．近年，細胞集団の形状に応じて，幹細胞分化の方向性が空間的なパターンをもつことが示されている[Ruiz et al., Stem Cells, Vol. 26, pp. 2921-2927, 2008]．本研究では，このような細胞集団の形状に対する幹細胞分化の空間パターンを簡便に解析することを目的として，アガロースの精密鋳造法を活用した細胞培養用微小構造体を開発している[Nobuyuki Tanaka, Tadahiro Yamashita, et al., PLoS ONE, Vol. 12, e0173647]．本発表では，アガロース微小構造体を利用した間葉系幹細胞の解析について紹介する．本研究は，日本学術振興会二国間交流事業の支援を受けて実施されたものである．

High-precision agarose micro-casting and pattern analysis of stem cell differentiation

○Nobuyuki Tanaka[1], Tadahiro Yamashita[2], Asako Sato[1], Viola Vogel[3], Yo Tanaka[1]
([1]BDR, RIKEN, [2]Keio Univ., [3]ETH Zurich)

Key words microfluidic device, differentiation, agarose, mechanobiology

2Op07 慢性血液透析療法における心筋細胞拍動能の数理解析

○濱田 浩幸 [1,2,3]
（[1]九大院・農, [2]九大院・生資環, [3]九大院・シス生科）
hamada@brs.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】 慢性血液透析療法（HD）において，「低 Ca^{2+}濃度透析液の使用」と「血清と透析液の間の Ca^{2+}濃度の大きな較差」は突然の心停止のリスクを高めることが報告されている（Pun, 2013）．そして，心筋細胞の拍動リズムは細胞内 Ca^{2+}循環動態（Calcium clock: Lakatta, 2009）に，収縮力は細胞質 Ca^{2+}濃度（E-C coupling: Bers, 2002）に支配されることが明らかになっている．これらの知見に基づくと，治療中の血清 Ca^{2+}濃度の低下が心負荷の要因の 1 つであると考えられる．本研究では，電気生理学的数理解析を用いて，HD における血清および間質液の電解質濃度の変動と心筋細胞拍動能の関係を精査し，治療中の Ca^{2+}動態が拍動能におよぼす影響を検討した．
【方法】 HD の数理モデル（Gotch, 2010）と電気生理学に基づく心筋細胞の拍動および興奮収縮連関の数理モデル（Hamada, 2012, Rudy, 2011）を統合し，透析液 - 血清 - 間質液 - 細胞内液から構成される HD 中の心筋細胞拍動能を表現する数理モデルを構築した．そして，催不整脈評価試験 CiPA initiative: *in silico* analysis（Colatsky, 2016）に基づいて，この数理モデルを適用し，本邦で実施されている治療における Ca^{2+}動態および拍動能（拍動リズムおよび収縮力）の推移を評価した．
【結果と考察】 HD において, Ca^{2+}濃度 2.5mEq/L の透析液を用いる治療は 3.0mEq/L の透析液を用いる治療に比して血清および間質液 Ca^{2+}濃度を低下させ，治療中の心筋細胞拍動能を低下させた．そして，Ca^{2+}濃度 2.5mEq/L の透析液を用いる治療において Ca^{2+}濃度 3.5mEq/L の補充液 10mL/min を返血に注液すると，血清および間質液 Ca^{2+}濃度の低下が穏やかとなり，拍動数および収縮力の低下が半減した．以上より，治療中の血清および間質液 Ca^{2+}濃度の低下の抑制が治療中の心負荷軽減に貢献する可能性が示された．

Mathematical analysis of cardiomyocyte beating on chronic hemodialysis treatment

○Hiroyuki Hamada[1,2,3]
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [3]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ.)

Key words Cardiomyocyte beating, Hemodialysis, Electrophysiology, Mathematical analysis

2Op08 マウス乳癌細胞の転移性と細胞弾性に起因するネスチンのテール領域の機能解析

○水澤 愛衣 [1], 須崎 萌 [2], 山岸 彩奈 [3], 中村 史 [1,2,3]
（[1]農工大, [2]農工大院・工, [3]産総研・バイオメディカル）
chikashi-nakamura@aist.go.jp

中間径フィラメントの一種であるネスチンは，癌細胞の転移性に関与すると考えられている．これまでに我々は，高転移性マウス乳癌細胞株 FP10SC2 を用いてネスチン欠損株を作製し，同タンパク質の機能解析を行ってきた．その結果，野生株と比較してネスチン欠損株では細胞弾性率が上昇することが確認されている．中間径フィラメントはヘッド，ロッド，テールの 3 つの領域で構成されており，ロッド領域の束化により繊維を形成する．ネスチンは 160 kDa もの巨大なテール領域を持ち，単独で繊維形成出来ないため，本株ではビメンチンと共重合している．ビメンチンはテール領域でアクチンと結合し細胞骨格のネットワークを形成するが，ネスチンと共重合した場合にはテール領域が隣接することでアクチンとの結合が阻害され，これによって細胞骨格の柔軟性が上昇すると我々は推察している．
本研究では，ネスチン欠損株に対してネスチン発現ベクターを導入し，細胞弾性を評価することで，ネスチンの細胞柔軟化機能の回復を検証した．円柱型 AFM 探針で細胞を圧入し，得られたフォースカーブを Hertz モデルでフィッティングすることで弾性率を算出した．弾性測定後，抗ネスチン抗体を用いた免疫染色を行い，蛍光強度解析によりネスチン発現量を評価した結果，ネスチン発現量と弾性率に負の相関が確認され，ネスチンが細胞柔軟化に寄与することが明らかとなった．現在，テール領域を欠失した発現ベクターを用いて，ネスチンの細胞柔軟化機能におけるテール領域の寄与について調査を行っており，この結果についても併せて報告する．

Functional analysis of tail domain of intermediate filament nestin attributing to metastaticity and stiffness of mouse breast cancer cell

○Mei Mizusawa[1], Moe Susaki[2], Ayana Yamagishi[3], Chikashi Nakamura[1,2,3]
([1]Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words intermediate filament, cell stiffness, AFM, cancer metastasis

2Op09 ヒト三次元筋萎縮モデルを搭載した 96 ウェルプレートフォーマット収縮力評価系の開発

○大隅 早紀 [1], 清水 一憲 [1], 吉原 賢 [2], 本多 裕之 [1,3]
([1]名大院・工, [2]塩野義製薬・創薬疾患研, [3]名大・予防早期医療創成セ)
honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】
筋萎縮とは，筋肉がやせ細ることで筋力が低下し，運動機能が損なわれる疾患である．超高齢社会を迎え，筋萎縮の予防薬や治療薬の開発が求められている．抗筋萎縮薬開発のための *in vitro* 試験では，筋細胞の太さや筋タンパク量の変化を個別に評価するだけでなく，それらの影響が総合的に反映された表現型である収縮力を評価することが望ましい．我々はこれまでに，収縮力測定マイクロデバイス上でマウス筋芽細胞 C2C12 を用いた三次元筋萎縮モデルを構築してきた[1]．本研究では，より実用的な筋収縮力評価系の構築を目指し，ヒト初代骨格筋細胞を搭載した 96 ウェルプレートフォーマットの収縮力評価系の開発を行った．
【方法と結果】
収縮力測定マイクロデバイスは，ポリジメチルシロキサン(PDMS)製で，収縮力測定機構として 2 本の柱を持つ．構築した筋組織が電気刺激に応答して収縮することで柱が動き，その変位から収縮力を算出することが可能である．96 ウェルプレートの 1 ウェルに収まるように，従来デバイス[1]を 65%縮小した．柱の太さなどが異なるデバイスを複数作製し，最適デバイス形状を得た．さらに 96 ウェルプレート用 8 連電極を開発したことで，ハイスループットな筋組織収縮力測定が可能となった．その測定系で，ヒト骨格筋細胞の三次元培養を行い，収縮力の測定に成功した．デキサメタゾンを加えたところ，有意に収縮力が低下したことから，ヒト筋萎縮モデルの構築として利用できることを実証した．

[1] Shimizu, K., Genma, R., Goto, Y., Nagasaka, S., Honda, H.: Bioengineering, 4(2): 56 (2017)

Human skeletal muscle atrophy models using 96 well-plate format contractile force measuring systems.

○Saki Ohsumi[1], Kazunori Shimizu[1], Ken Yoshihara[2], Hiroyuki Honda[1,3]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Shionogi & Co., Ltd., [3]PME, Nagoya Univ.)

Key words 96 well plate format, high-throughput screening, human skeletal muscle cells, atrophy

2Op10 mRNA サイレンシングを用いた過酸化チタンナノ粒子の放射線増感機序解明

○大取 靖秀 [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・科技イノベ)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】 すい臓がんに代表される生体深部に発生する難治性がんは，未だ効果的な治療法が確立されていない．そこで当研究室では，二酸化チタンを過酸化水素で機能化した過酸化チタンナノ粒子(PAA-TiOx NPs)と放射線を併用した，新たながん放射線治療法を開発してきた．現在まで，PAA-TiOx NPs を腫瘍に局所注射した後に放射線照射を行うことで，放射線の治療効果が顕著に増大することを，マウスを用いた *in vivo* 実験によって見出している．また，PAA-TiOx NPs は過酸化水素（H_2O_2）を徐放することで腫瘍細胞の放射線感受性を向上していることが示唆された．しかし，PAA-TiOx NPs が放射線の抗腫瘍効果を増大する作用機序は，細胞生物学的レベルではまだ解明されていない．そこで本研究では，ナノ粒子から放出される H_2O_2 が放射線治療効果を増大しているという仮定の下，いくつかの活性酸素除去機構をノックダウンしたすい臓がん細胞株を作製し，それが放射線治療効果に与える変化を *in vitro* 毒性試験によって調べた．
【方法・結果】 スーパーオキシドアニオンを酸素と過酸化水素へと不均化するスーパーオキシドディスムターゼ(SOD2)，過酸化水素を水と酸素へと不均化するカタラーゼ(CAT)を発現する遺伝子を shRNA のトランスフェクションによってそれぞれノックダウンした BxPC3 株の作製に成功した．ノックダウンは PCR とウェスタンブロッティングにて確認された．作製した SOD2 または CAT ノックダウン BxPC3 株に H_2O_2(200 μM)もしくは PAA-TiOx (1mg/ml) を投与し，直ちに放射線照射 (1.5, 3, 5 Gy)を行った．この操作による細胞毒性を，コロニーアッセイ法を用いて評価した．その結果，通常 BxPC3 株と作製したノックダウン BxPC3 株の間に放射線と PAA-TiOx の相乗効果による細胞毒性の有意な差が見られた．

Investigation for radiosensitizing mechanism of titanium peroxide nanoparticles with gene-silencing technique

○Seishu Otori[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. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words pancreatic cancer, nano particle, hydrogen peroxide, superoxide dismutase

2Op11 感染防御に関わるニワトリムチンの解析

森脇 脩一郎 [1], 吉田 琢哉 [1], 原 駿平 [1], 飯島 信司 [1,2], 金岡 英徳 [1], ○西島 謙一 [1]
([1]名大院・工, [2]現愛工大・工・応化)
nishijima@chembio.nagoya-u.ac.jp

[背景と目的] 鳥インフルエンザは世界中で蔓延し続けている．スペイン風邪と呼ばれた 1918 年のウイルスを始め，解析可能なパンデミックウイルスはすべてトリ由来であることが知られており，トリでのインフルエンザ蔓延を防ぐことは畜産業のみならず公衆防疫の観点からも重要である．しかし，インフルエンザウイルスは変異が多いため，特異抗体により免疫を長期間持続するのは困難である．そこで，粘膜表面を覆うタンパク質であり，初期防御に関わるムチンに着目した．ニワトリムチンについては解析例がほとんど無い．本発表ではニワトリムチンの基礎解析結果を報告する．
[方法および結果] NCBI データベースに登録されていたニワトリムチンの候補配列の多くは分泌シグナルと推定される配列を含んでいなかった．データベース上で分泌配列を持つと判断された遺伝子の発現を定量 RT-PCR 法により測定した．その結果 Muc13 が鳥類におけるインフルエンザ感染に重要な臓器の一つである腸での発現が高いことが示唆された．そこで，Muc13 の cDNA をクローン化し発現ベクターを作製した．ニワトリ細胞株に強制発現させたところ，アミノ酸配列から計算される 67kD よりはるかに大きな 100kDa 以上であったことから，O 型糖鎖が附加されているものと考えられた．次に細胞内での局在を調べた．遺伝子導入した細胞を蛍光染色したところ，N 末に付加した抗 FLAG 抗体による染色では，細胞全体と核周囲で蛍光が観察されたことから，Muc13 は細胞質もしくはタンパク質輸送経路の細胞内小器官に多く局在していることが示唆された．一部は細胞膜上での発現が確認された．今後，ウイルス感染能に対する影響を検討する予定である．

Analysis of chicken mucin

Shuichiro Moriwaki[1], Takuya Yoshida[1], Shunpei Hara[1], Shinji Iijima[1,2], Hidenori Kaneoka[1], ○Ken-ichi Nishijima[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Fuculty Eng., Aichi Inst. Tech.)

Key words chicken, mucin, expression

9月7日（金）

招待講演・シンポジウム（9:00 ～ 11:24）

〈招待講演（韓国生物工学会）〉 D 会場 (S3Da01) p. 209

Bioengineering for Sustainable Agriculture and Food Production for the Future
「新しい農業と未来の食料のための生物工学」**【本部企画】**
〈国際シンポジウム〉 D 会場 p. 209

シンポジウム（13:00 ～ 15:00）

1 細胞解析に向けた刺激応答性分子ツールの創製と応用展開 B 会場 p. 211

SDGs に資する環境共生微生物を活用したアグリバイオ工学研究の新展開 C 会場 p. 213

発酵食品の機能性を考える
～一次機能から三次機能まで～ **【本部企画】** D 会場 p. 216

エネルギーを使う，捨てる光合成の再最適化
―合成生物工学にむけた未踏研究― E 会場 p. 218

半金属元素のバイオテクノロジー F 会場 p. 220

スマートセル開発のためのバイオ技術とデジタル技術の革新と融合
バイオ生産に資する DBTL サイクルの構築に向けて G 会場 p. 222

新時代の物質生産宿主開発の方法論：
ゲノムを大規模に編集する．代謝計測から設計図を書く． H 会場 p. 224

地域から世界へ，グローカルバイオテクノロジーで創る新しい価値 K 会場 p. 227

複雑組織製造に必要な基盤技術を考える
―どこまで出来て，何が足らないのか？― L 会場 p. 229

真核微生物におけるシグナル伝達と代謝の接点を探る
―発酵調節の根源的な理解に向けて― M 会場 p. 231

招待講演・シンポジウム（15:20 ～ 17:20/17:50）

〈招待講演（韓国生物工学会）〉 B, G, H 会場 (S3Bc01, S3Gc01, S3Hc01) p. 235, 248, 251

構造と機能デザインによる有用人工酵素の創製と応用展開（～ 17：50） B 会場 p. 235

資源作物生産から発酵生産までをトータルシステムとして俯瞰する
（～ 17：50） C 会場 p. 238

黒麹菌・白麹菌の研究からつなげる産業振興 D 会場 p. 241

生物系研究者のための電気化学入門～その実験大丈夫？～ E 会場 p. 244

環境は持続可能か？
―地球規模の物質循環を生物工学から考える― F 会場 p. 246

タンパク質と材料界面の相互作用の本質に迫る（～ 17：50） G 会場 p. 248

スマートバイオデザイン：ナノからマクロスケールまでの様々な階層レベルに
おけるバイオ関連機能と構造の合理的創出を目指して（～ 17：50） H 会場 p. 251

Networking of Researches
Toward Social Implementation of Bioresources Rich in ASEAN
「ASEAN における生物資源の社会実装を目指した研究ネットワーキング」
〈国際シンポジウム〉 K 会場 p. 254

工学が見出すエッセンシャル細胞培養
～動物細胞培養の根本に工学はどう立ち向かうか～ **【本部企画】**
（～ 17：50） L 会場 p. 256

糖鎖工学技術がもたらすバイオ医薬品の新潮流（～ 17：50） M 会場 p. 260

一般講演 （9:00 ～ 11:24）

醸造学，醸造工学 C 会場 p. 263

生物化学工学／培養工学／バイオプロセス E 会場，F 会場 p. 265

バイオマス，資源，エネルギー工学 G 会場，H 会場 p. 270

生体情報工学，バイオインフォマティクス／システムバイオロジー I 会場 p. 275

発酵生理学，発酵工学／代謝工学／オミクス解析 K 会場 p. 277

酵素学，酵素工学 L 会場，M 会場 p. 280

環境浄化，修復，保全技術／環境工学，廃水処理技術 N 会場 p. 285

セル＆ティッシュエンジニアリング O 会場 p. 288

S3Da01 〈招待講演（韓国生物工学会）〉

Effects of several growth factors on the biomass and total lipid production of microalgae under different culture modes

○Si Wouk Kim, Geun Ho Gim
(Dept. Environ. Eng, Chosun Univ.)
swkim@chosun.ac.kr

We attempted to enhance the growth and total lipid production of three microalgal species, *Isochrysis galbana* LB987, *Nannochloropsis oculata* CCAP849/1, and *Dunaliella salina*, which are capable of accumulating high content of lipid in cells. Low nitrogen concentration under photoautotrophic conditions stimulated total lipid production, but a decreasing total lipid content and an increasing biomass were observed with increasing nitrogen concentration. Among the different carbon sources tested for heterotrophic cultivation, glucose improved the growth of all three strains. The optimal glucose concentration for growth of *I. galbana* LB987 and *N. oculata* CCAP849/1 was 0.02 M, and that of *D. salina* was 0.05 M. Enhanced growth occurred when they were cultivated under heterotrophic or mixotrophic conditions compared with photoautotrophic conditions. Meanwhile, high total lipid accumulation in cells occurred when they were cultivated under photoautotrophic or mixotrophic conditions. During mixotrophic cultivation, biomass production was not affected significantly by light intensity; however, both chlorophyll concentration and total lipid content increased dramatically with increasing light intensity up to 150 μmol/m^2/s. The amount and composition ratio of saturated and unsaturated fatty acids in cells were different from each other depending on both species and light intensity. The highest accumulation of total fatty acid (C16-C18) among the three strains was found from cells of *N. oculata* CCAP849/1, which indicates that this species can be used as a source for production of biodiesel.

Effects of several growth factors on the biomass and total lipid production of microalgae under different culture modes
○Si Wouk Kim, Geun Ho Gim
(Dept. Environ. Eng, Chosun Univ.)

Key words biomass, lipid, microalgae, culture condition

S3Da02 土壌をゼロからデザインする～有機質肥料活用型養液栽培から派生した新技術～

○篠原 信
（農業・食品産業技術総合研究機構）
shsh@affrc.go.jp

土壌は，食糧生産のほとんどを担う，人類生存に不可欠な媒体である．植物が育つのは，土壌が動植物の老廃物などの有機物を適切に分解し，無機養分を生成するからである．しかし有機物を無機養分に適切に分解できる媒体は，土壌以外に存在しない．ロックウールなどの人工媒体中では，有機物は腐敗し，植物も育たない．「都合のよい微生物分解」を発酵と定義するならば，土壌は有機物を無機養分に分解できる唯一の発酵槽である．

植物の生育に適した無機養分とは，端的には硝酸態窒素である．有機物に含まれる有機態窒素は，土壌以外の媒体でも容易にアンモニア態窒素にまで分解（アンモニア化成）が進む．しかし次の硝酸化成（アンモニア態窒素が硝酸態窒素に変換される過程）は，土壌以外の媒体では進まない．この過程を担う硝化細菌が，有機物の曝露に極めて弱く，活性を失ってしまうためである．有機物を加えて硝酸態窒素を生成する微生物生態系を人工媒体で形成できるならば，人工的に土壌を創出することが可能だが，硝化細菌が有機物の曝露を受けて不活性化するという技術的問題を，長らく克服することができなかった．このため，土壌を人工的に創出する技術は，これまで存在しなかった．

ブレークスルーとなったのが，有機質肥料活用型養液栽培である．水耕栽培では不可能とされていた，有機質肥料の活用を実現した栽培技術である．これは，本来土壌中でしか働かなかった，硝化菌を含む土壌微生物を，水中でも活動できる培養方法（並行複式無機化法）を発見し，有機物を硝酸態窒素にまで分解することができたためである．養液栽培で有機質肥料を活用することは，生産者だけでなく研究者にとっても待望の技術であったため，現場でも普及が進みつつある．

この有機質肥料活用型養液栽培により，人工土壌の創出が可能になった．ロックウールやウレタンなど，人工媒体に微生物群を固定化し，土壌機能（有機物を分解し植物に好適な無機養分（硝酸態窒素など）を供給する機能）を付与することが可能になった．これにより，適切な媒体を選抜・加工することにより，土壌の物理性・化学性を自在にデザインすることができるようになった．これは土壌学として画期的なことである．土壌機能を有するのはこれまで自然土壌だけだったため，客土をしてもそれには微生物が定着しておらず，微生物生態系が構築されるまで相当の時間を要し，そのために食糧生産に適した「土づくり」には，時に 10 年もの歳月が必要だとされてきた．しかし，並行複式無機化法で培養した微生物群を人工媒体に定着させれば，希望する物理性・化学性をデザインした人工土壌を創出することが可能になる．これまで不可能であった，「土壌のデザイン」が可能になるわけである．

次に課題になるのが，微生物の種類である．土壌学では，土壌を物理性・化学性・生物性の三つの観点から研究を行う．上述のように，希望する媒体を土壌化（土壌機能を付与すること）することができるようになったため，物理性・化学性はデザインできるようになった．しかし生物性においては，並行複式無機化法では，自然土壌を微生物源として利用するため，活動する微生物種は 1 万種類以上と非常に多様で，目的の微生物を活性化するなどのコントロールはできなかった．

そこで京都大学，名古屋大学，慶應義塾大学，富山県立大学などと協力して，数種類の培養可能な微生物だけで土壌機能を再現する試みを行った．種々の検討の結果，硝酸化成を担う 2 種類の細菌（アンモニア酸化細菌，亜硝酸酸化細菌）にもう一菌株，アンモニア化成を担う微生物を加えれば，土壌機能を再現できることが分かった．我々は，わずか 3 菌株だけで土壌機能を再現できる共培養系を「エレメンタル土壌微生物」と呼んでいる．これにより，無数と表現するにふさわしいほど多様な微生物で構成されていた土壌微生物の世界を，わずかな菌種の微生物だけで土壌機能を再現できる，モデル系を構築できることが明らかとなった．

次なる課題は，このエレメンタル土壌微生物に，食糧生産に有利な諸性質を付与（デザイン）することができるかどうかである．その性質の一つとして，病原菌の増殖抑制を研究している．病原菌の生育や感染を妨害する微生物を拮抗菌という．この拮抗菌をエレメンタル土壌微生物と組み合わせようという発想である．

しかしこれまでの拮抗菌研究から，単独では拮抗作用を示しても，他の微生物と共培養すると作用を示さなくなる，あるいは生態系から排除され，検出限界以下にまで数を減らすなどの現象が起きることが知られている．

そこで有機質肥料活用型養液栽培の微生物群から，拮抗菌の候補を分離し検討したところ，単独では病原菌を抑えることはできないが，2 菌株のペア，あるいはさらに多くの微生物と混合培養すると拮抗作用を示す，「創発性」を示す拮抗菌カクテルが見出された．

これをエレメンタル土壌微生物と組み合わせ，植物病原菌をその培養液に接種したところ，病原菌の増殖を抑えることに成功した．これは人工的抑止土壌の開発につながる画期的な成果である．

以上のように，「土壌をゼロからデザインする」技術は，農業生産を根本的に革新する可能性がある．

Artificial design of soil - a novel technology derived from hydroponics using organic fertilizer (organic hydroponics) -
○Makoto Shinohara
(NARO)

Key words biofilm, soil bacteria, nitrification, antimicrobial

S3Da03 植物成長を促進する新しい遺伝子・化合物の単離を目指す植物ケミカルバイオロジー研究

○中野 雄司[1], 山上 あゆみ[1], 長田 裕之[1], 篠崎 一雄[1], 浅見 忠男[2]
([1]理研・環境資源科学センター, [2]東大院・農生科)
tnakano@riken.jp

ケミカルバイオロジーは，ケミカルと生物の関わりに着目して，その解明を目指す新しい研究領域であり，微生物由来の天然化合物，医薬品のリード化合物としての合成化合物など，主にヒトや動物の健康や医療への貢献をアウトプットとして研究領域が展開してきている．一方，光合成によって二酸化炭素と水から，酸素と炭素化合物を作り出植物は，自らの成長をコントロールするためにも植物自身が作った化合物（ケミカル）を活用している．そのひとつとして「植物ホルモン」と呼称される一群の生理活性化合物が知られるが，この植物ホルモンの研究史が示すように新しいケミカルの発見は，その生理活性の発現機構の解析から，生合成経路やシグナル伝達経路の解明などを進める起点となり，植物科学の発展の重要な起点となってきた．我々は，このようなケミカルと植物の関係性を明らかにする基礎科学研究的側面と，植物成長に有用な形質をもたらす新しい遺伝子，ケミカルを探索する応用科学的側面の両輪の推進を目指す植物ケミカルバイオロジー研究を進めてきた．

植物ホルモンの一種類であるブラシノステロイド（BR）は，発芽，栄養成長，生殖成長など植物生理サイクルの様々な局面において，重要な役割を果たすことが知られている．遺伝子レベルでは，BR の生合成経路はほぼ全貌が明らかにされているが，BR 情報伝達経路については未解明の部分が多く残されている．このような状況下において，我々は，BR 生合成阻害剤 Brz に対して耐性を示す実験植物アラビドプシスの突然変異体をスクリーニングするケミカルバイオロジー研究を進め，新規な BR 情報伝達因子群の単離，及び，その植物形態形成における機能について解明を進めて来た．その中でも特に強い Brz 耐性胚軸徒長形質を示す bil7 変異体は，最終的な花茎長が野生型の 1.5 倍程度になる．この BIL7 タンパク質は，通常条件下では細胞膜近傍に局在し，BR 処理によって細胞膜から核内に移行する過程において，マスター転写因子 BIL1/BZR1 を核に連行する機能を持つ事が明らかにされている． また，*BIL7* 高発現アラビドプシスでは，花茎の伸長化に応じて鞘数，種子数も増大することが明らかとなっている．*BIL7* 遺伝子のイネでの相同性遺伝子 *OsBIL7* について，イネにおいて形質転換を行なったところ，生育伸長が認められ，種子収量が 130%の増加することが明らかとなった．さらに，サトウキビに形質転換した結果，T1 世代の複数系統において，茎長が 200%に増大し，茎乾燥重は 300%に増大する，という結果が得られた．これらの結果より，*BIL7* は，植物種を越えた収量増産遺伝子として，今後の展開が期待される．

理化学研究所 NPDepo ケミカルライブラリーから，植物に胚軸伸長阻害様活性を付与するケミカルとして単離した FPX は，発芽後の植物を FPX 存在下でさらに育成させると，低濃度で根端に，高濃度で茎長に，共に植物初期化細胞塊であるカルスを誘導する活性を持つことが明らかとなった．さらに，FPX によるカルス誘導活性は，既存技術であるオーキシンとサイトカイニンによる最適カルス誘導条件における誘導活性よりも高いことが確認された．さらに，誘導されたカルスからの植物葉（シュート）や根の再分化は植物種によって未だに困難であること場合が多々あるが，FPX により誘導されたカルスからはシュートが再分化され得ること，この再分化効率は，オーキシン/サイトカイニン系によって誘導されたカルスからのシュート再分化効率よりも高いことが明らかになった．一方，この植物カルス細胞へのアグロバクテリウム感染という組み合わせは，現在も多くの植物の遺伝子組み換え法に用いられる．この FPX により誘導されたカルスは，オーキシン/サイトカイニン系によって誘導されたカルスに対するアグロバクテリウムの感染効率よりも高いことが明らかとなった．すなわち，FPX は，植物遺伝子組み換え技術に重要な「カルス誘導」「カルスへのアグロバクテリウム感染」「カルスからのシュート再分化」の 3 ステップにおいて，従来のオーキシン/サイトカイニン系よりも高い活性を持つことが明らかとなった．実用化植物においては，これらの 3 ステップのいずれかが困難であるために，形質転換が困難な植物種がまだ多く残されている．FPX は，植物分化のメカニズムを解明するための基礎科学的ツールとして重要であると期待されると共に，遺伝子導入が可能な植物種を拡大し得る新しいバイオテクノロジーのツールとして実用化研究においても重要な技術になり得ると期待される．

現在，FPX は，植物体内で CPX と PPG の 2 種のケミカルに代謝されること，カルス誘導の主活性は CPX によって行われ，PPG は CPX によるカルス形成を促進させる活性を持つことが明らかとなっている．さらに，この PPG の植物個体への生理活性を解析したところ，植物体に異常形態を生じさせることなく，葉の面積，茎の分枝，根の側根数，を増加させる活性を持つことも明らかとなった．この PPG の生理活性についても，紹介したい．

Plant chemical biology research to identify novel genes and compounds that promote plat growth

○Takeshi Nakano[1], Ayumi Yamagami[1], Hiroyuki Osada[1], Kazuo Shinozaki[1], Tadao Asami[2]
([1]Center for Sustainable Resource Science, RIKEN, [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Key words plant chemical biology, phytohormone, plant growth regulator, biomass

S3Da04 Novel sustainable plant-based protein: Scientific evidence of health and nutrition benefits in humans

○Ron Salpeter[1], Iris Shai[2]
([1]Hinoman Ltd, Israel, [2]Dep. of Public Health, Faculty of Health Sciences , Ben Gurion Univ., Israel)
ron@hinoman.com

Mankai, a cultivated strain of *Wolffia* is an aquatic plant, the smallest higher-plant on earth (0.7mm). Mankai is rich in all essential amino acids (more than 45% protein, dry matter), dietary fibers, omega 3, polyphenols, minerals (as iron, zinc, folic acid) and vitamins (as vitamins A, E and, and surprisingly B12). There is a long history of *Wolffia* as food in Southeast Asia, where it has been traditionally considered as “water eggs” or “meat for the poor”. Given its tiny size, this non-GMO veggie can be embedded “as is” into the fabric of numerous daily foods, enhancing their nutritional value without affecting their taste or smell. This will enable people to eat healthier - without substantially changing their way of eating, often a critical obstacle for most people when wanting to eat more responsibly. Mankai is grown using proprietary cultivation algorithm in a highly monitored system, preserving its distinguished nutritional wholesomeness. Given its highly clean production technology process and its neutral taste and smell, Mankai could also be consumed as a fresh green shake. Moving from composition to bioavailability and bioactivity, we will present preliminary results from large-scale long-term and acute clinical trials in human and from animals experiments, which suggest that Mankai, as a clinically-tested food, is beneficial in terms of essential amino acids, B12, and iron bioavailability and in further clinical parameters related to obesity, glycemic control, inflammation, cardiometabolic and iron state.

Novel sustainable plant-based protein: Scientific evidence of health and nutrition benefits in humans

○Ron Salpeter[1], Iris Shai[2]
([1]Hinoman Ltd, Israel, [2]Dep. of Public Health, Faculty of Health Sciences , Ben Gurion Univ., Israel)

Key words *Wolffia*, randomized controlled trials, glycemic control, amino acids

S3Da05 持続可能な農業がもたらす新たなビジネスチャンス～エネルギー消費型農業からエネルギー創造・利用型農業への転換～

○齊藤 三希子
（NTTデータ経営研究所 ライフ・バリュー・クリエイションユニット）
saitom@keieiken.co.jp

気候変動による農業への影響は，諸外国の問題などと，もう他人事ではいられない状況である．気候変動は，世界の食料システムに対する脅威となっている．近年の異常気象などの気候変動により，世界的な食料生産に大きな影響を受けている昨今，誰もがバランスの取れた食事をするためには持続可能な農業の実現を推進することが，かつてなく重要になっている．
気候変動は，国内農業に大きな影響を及ぼしており，昨年夏に九州北部などで発生した豪雨災害による農業被害額は全国で約 208 億円，昨年 10 月の台風によるに被害額は約 1,300 億円に上る．
また，昨年 10 月の大型台風及び昨秋の長雨など気候変動の影響を受け，今冬の野菜は平年の 1.5 倍～2.7 倍と軒並み高騰しており，我々の食生活に大きな影響を及ぼしている．カルビーは，異常気象の影響で北海道産ジャガイモが不足し，昨年 4 月にポテトチップスが販売休止に追い込まれたことより，3 ヶ月で約 57 億円の減収となった．近年の異常気象や干ばつなどの気候変動は，消費者だけではなく企業の経営活動にも大きな影響をもたらしている．
「緑の革命」以降，化学肥料や農薬の開発，潅漑施設・農業機械の進展など，さまざまな技術革新が起こり，食糧生産量が画期的に向上した．しかし，FAO（国際連合食糧農業機関）は，2050 年の世界人口 100 億人を養うためには，食料生産全体を現在よりも 1.7 倍引き上げる必要があると提言している．
本稿では，世界の食料安定供給を図るため，国内外の現状及び欧米で注目を集めているフェイクフードや培養肉などの食品代替策等に関して概説し，日本の「食料安全保障」のためには，まずは，過剰な鮮度を求める日本の消費文化から大きく変えていく必要があることに関して言及する．

New business opportunities brought by sustainable agriculture

○Mikiko Saito
(NTT DATA INSTITUTE OF MANAGEMENT CONSULTING, Inc.)

Key words agricultural waste, sustainable

S3Bb01 細胞機能をタンパク質分解能で解析・制御するための分子技術

○浜地 格
（京大院・工）
ihamachi@sbchem.kyoto-u.ac.jp

2014 年に JST は「統合一細胞解析のための基盤技術」という研究課題で，CREST とさきがけプロジェクトを同時に開始した．当時ゲノムやトランスクリプトーム解析が，1 細胞レベルの解像度で可能になりつつあり，同じ細胞株間での heterogeneity が実験データとして明らかにされるとともに，遺伝子以外の生体成分の精密解析への広がりや，1 細胞レベルの分解能から見えてくる新しい生物学や生物工学など，様々な研究展開や応用が期待されたからであろう．浜地は，この中のさきがけ研究（通称「1 細胞さきがけ」）を領域総括としてお世話することになった．ここでは，そのプロジェクトの内容を一部紹介させていただきながら，自分自身の研究に関しても少し議論させて頂きたい．
「1 細胞さきがけ」領域は，2014 年から 2016 年までの 3 年間，研究提案を募集した．最初の 2 年間は，200 件を超える研究提案が寄せられ，3 年目でも 150 件以上の応募があった．この分野が，若手研究者にとって注目される研究領域であることを端的に示すものと思われる．その中から，12 名の領域アドバイザーの先生方の多大なご協力のもの，書類審査とヒアリングを行い，3 年間で総勢 39 名（14 名／14 名／11 名）のさきがけ研究者を選考した．募集から選考段階までで特に意識したのは，できるだけ広い分野から，異なるバックグラウンドをもち，かつ 1 細胞研究にチャレンジしようとする優れた若手研究者を集める，ということであった．1 細胞研究自体は，とても大きな領域であり，さきがけ研究者 1 名で全てをカバーすることは不可能であるので，特定の分野や技術やアイデアが尖った（さきがけらしい）ユニークな若手を選考し，いろいろな方向から 1 細胞へ挑戦を促す狙いである．お陰様で，生命科学だけでなく化学，材料科学，光科学，生物工学，ナノ・マイクロテクノロジー，計算科学，神経科学，発生学など幅広い分野の研究者が集うユニークな集団ができたと自負している．1 年に 2 度泊まり込みで実施する領域会議では，自由な Discussion のもと，それぞれの専門分野をまたいだ共同研究が研究者主導で幾つも始まっており，個々の成果も着実に出てきている．特にイメージング技術においては，1 細胞レベルで特定の生体機能物質を選択的に可視化できる分子プローブの開発，組織深部まで高解像度で観察可能な独自の顕微鏡システム，電気化学応答性のナノ顕微鏡や超高速イメージングサイトメトリー装置，など特徴的な成果が得られてきた．一方，遺伝子解析においては，バーコードやマイクロ流体を制御したシステムを使って，体内細菌叢の解析や免疫細胞の分類・分析，細胞系譜の同定技術などが進んでいる．現在，本領域は 2 期生，3 期生の研究活動が本格化してきており，今後とも注目頂くとともに，ご支援を賜りたい．
さて浜地研では，主として哺乳類細胞での特定のタンパク質の構造と機能解析を可能とする分子技術の開発をめざした研究を進めている．タンパク質の発現や機能の異常は，生体システムの恒常性の破綻を招き，ガンやアルツハイマーなど様々な疾病の原因となる．そのため，細胞に内在する標的タンパク質を選択的に解析することは，基礎研究として興味深いだけでなく，疾病診断や制御（創薬開発）のための分子ツールを提供することにも繋がる．これまでに我々は，生細胞夾雑系で狙った特定タンパク質の解析のために，様々なイメージングプローブをラベル化する分子技術：リガンド指向性化学を開発してきた．特に最近，膜タンパク質に広く適応できるリガンド指向性アシルイミダゾール化学（LDAI）法を開発し，これを使ってがん細胞表層のバイオマーカータンパク質のイメージングや，脳神経系で主要な神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体タンパク質の培養細胞系や脳組織切片での可視化や動態解析に成功している．また，タンパク質工学と小分子錯体とを組み合わせた配位ケミカルジェネティックス法を開発して，特定の神経細胞におけるグルタミン酸受容体の活性化を鍵とした神経細胞 1 細胞レベルでの活性化にも成功している．本講演では，このような最近の我々の成果に関しても紹介し，議論させて頂きたい．

Reference

(a) Takaoka. Y.; Ojida, A.; Hamachi, I. Angew. Chem. Int Ed., 52, (review) 4088-4106 (2013). (b) Tsukiji, S.; Miyagawa, M.; Takaoka, Y.; Tamura, T.; Hamachi, I. Nature ChemBio., 5, 341-343 (2009) (c) Takaoka, Y.; Sakamoto, T.; Hamachi, I. et.al., Nature Chem., 1, 557-561 (2009). (d) Kiyonaka, S.; Kubota, R.; Hamachi, I. et.al., Nature Chem., 8, 958-967 (2016). (e) Yamaura, K.; Kiyonaka, S.; Hamachi, I. et.al., Nature ChemBio., 12, 822-830 (2016). (f) Miki, T.; Hamachi, I. et.al., Nature Methods, 13, 931-937 (2016). (g) Kiyonaka, S.; Hamachi, I. et.al., Nature Commun., 8, 14850 (2017). (h) Tamura, T.; Hamachi, I. et.al., Nature Commun., 9, in press (2018).

Molecualr technologies for analyzing and regulating live cells with protein molecule resolution

○Itaru Hamachi
(Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ.)

Key words protein labeling, chemical biology, bioimaging

S3Bb02 光応答性ゲルを用いた単一がん細胞の分離と核酸解析への応用

○吉野 知子
（農工大院・工）
y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

次世代シーケンサーの技術革新をはじめ，単一細胞解析技術の飛躍的な進展により，細胞集団の不均質性の解明や希少細胞集団の解析が現実のものとなっている．特に，腫瘍における細胞集団は，ゲノムの異なる複数のクローンが存在し，腫瘍内の不均質性があるため，治療抵抗性の要因にもなることが考えられている．このように，今後のがん診断や治療においては，細胞集団の不均質性を理解することが重要となることが予想される．がん患者血液中に存在する血中循環腫瘍細胞(Circulating tumor cell: CTC) は，がん組織から血管内に侵入し，血流に乗り全身を循環するがん細胞であり，転移に関与することから，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．一方で，CTC は血液 1 ml 中に含まれる約 50 億の血球細胞に対し，僅か数個から数十個程度しか存在しない非常に希少な細胞であるため，既存の細胞解析技術による検出が困難であることが課題である．そのため，末梢血からロス無く CTC を回収し，核酸解析までを実施可能な技術の開発が求められている．
本発表では，当研究グループで構築した CTC をはじめとする様々な希少細胞の単一細胞レベルでのゲノム解析，トランスクリプトーム解析を可能とする核酸解析のプラットフォームに関して紹介する．本プラットフォームは，細胞サイズと変形能の差を利用して CTC と血球細胞を分離する“Microcavity array (MCA)”法[1]，及び MCA 上に補足された単一の CTC を光硬化性のハイドロゲルで包埋し，確実に分離・核酸増幅を可能とする“Gel-based cell manipulation (GCM)”法[2] から構成される．MCA 法による CTC 回収は，孔径 8 μm の金属製フィルターである MCA を介して吸引捕捉した．MCA 上の細胞に対し，細胞染色を行った後，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た．続いて顕微鏡観察により同定された CTC 候補細胞に対して光照射を行い，単一細胞をハイドロゲルで包埋した．CTC は直径数十 μm 程度であり，観察には顕微鏡での観察が必須となるが，細胞に肉眼で視認可能な目印であるハイドロゲルをつけることで，目視観察下で細胞分離が可能となった．また，ハイドロゲルで包埋した単一細胞を全ゲノム増幅または全トランスクリプトーム増幅反応に供することが可能であった．さらにトランスクリプトーム解析においては，MCA を用いて細胞を分離後，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できた．本手法を用いて，がん・感染症センター 都立駒込病院の協力の下，臨床試験を実施し，CTC のトランスクリプトーム解析を進めている．このような核酸解析プラットフォームは CTC のみならず，接着細胞や微生物など様々な細胞に対しても適用できることが示されており，生命科学分野における革新的な研究支援ツールとしての汎用化を目指している．

[1] Hosokawa, M., et al., *Anal. Chem.*, 85(12):5692-8 (2013)
[2] Yoshino, T., et al., *Anal. Chem.*, 88(14):7230-7 (2016)

Techniqus for isolation of single-cancer cells using visualization of hydrogel encapsulation and its application towards genome and transcriptome analysis

○Tomoko Yoshino
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words single-cell analysis, circulating tumor cell, hydrogel

S3Bb03 細胞内ドラッグデリバリーシステムを基盤とする光細胞工学

○村上 達也 [1,2]
（[1]富山県大・工, [2]京大・高等研究院・iCeMS）
murakami@pu-toyama.ac.jp

ドラッグデリバリーシステム(DDS)は，薬剤と添加物を混合することにより，その体内での動きを制御することを目的としている．これにより薬剤を疾患部位へ安全かつ高効率に輸送することができる．近年，この薬剤を再定義し，DDS の応用範囲を拡大しようとする動きがある(DDS 学会誌 2017 年 1 月号)．具体的には，何らかの活性を有する物質すべてを薬剤ととらえ，基礎生物医学研究に役立つ技術を積極的に開発することである．
我々がドラッグキャリア（医薬品添加物）として研究を進めてきた脂質／脂質結合タンパク質複合体は再構成可能な血清成分であり，高い生体適合性(ポリエチレングリコール修飾不要)，小さなサイズ(~10 nm)，豊富な改変手法，抗動脈硬化作用，といった特徴がある．昨年，薬剤を内包させた本複合体は，加齢黄斑変性マウスモデルに対して点眼投与で著効を示すことを報告したところである(J. Control. Release, 2017)．一方で，本複合体は多様な金属ナノ粒子の表面修飾剤としても機能することを我々は見出している(ACS Nano, 2014)．具体的には，近赤外光を吸収して発熱する金ナノロッド(AuNR)を，細胞膜透過ペプチドを結合させた本複合体で被覆すると，AuNR のコロイド安定性，生体適合性，がん細胞取込みが同時に達成される．さらにその後光照射すると，細胞内 AuNR の発熱によりがん細胞は死滅する．すなわちここで薬剤は AuNR ととらえることができ，安全な細胞内輸送という DDS の概念は，AuNR の表面化学の制御を介して達成されている．
本講演では，表面修飾 AuNR を用いる神経細胞に発現する熱感受性イオンチャネル(TRPV1)の光活性化(Angew. Chem. Int. Ed., 2015)と，プラスミド DNA の細胞内輸送と光転写活性化(Sci. Rep., 2017)について紹介する．さらにこれらの詳細な作動メカニズムについても議論したい．

Optical Cell Engineering Using Subcellular Drug Delivery Systems

○Tatsuya Murakami[1,2]
([1]Fac. Eng., Toyama Pref. Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ. Inst. Adv. Study)

Key words drug delivery system, surfactant, gold colloid, gene expression

S3Bb04 光分解性ゲル包埋培養系からの癌生細胞分離装置の開発

○杉浦 慎治[1], 田村 磨聖[1], 山平 真也[1], 進 和美[1], 佐藤 琢[1], 高木 俊之[1], 金森 敏幸[1], 渋田 真結[2], 蟹江 慧[2], 加藤 竜司[2], 柳沢 真澄[3], 松井 裕史[4]
（[1]産総研・創薬基盤, [2]名大院・創薬, [3]エンジニアリングシステム（株）, [4]筑大・医）
shinji.sugiura@aist.go.jp

がん細胞は 3 次元培養によってはじめてその本来の性質 (増殖能，浸潤性，転移能など)を発現することが知られており，その増殖に伴い様々な形態のコロニーを形成する．我々は，3 次元培養環境下の関心細胞を局所光照射により分離・培養可能な光分解性ゲルの開発を行い，細胞培養，撮像，光照射による細胞回収の一連の操作を自動化した装置を開発してきた．本講演では，この光分解性ゲルと自動化細胞分離装置について紹介する．
我々はこれまでに，ゼラチン等のアミノ基を有するバイオマテリアルのアミノ基と反応し，光照射に応じて分解する活性エステル型の光開裂性架橋剤を合成している．一方，この活性エステル型光開裂性架橋剤を用いて細胞を包埋すると，高濃度条件において細胞毒性があることが確認されている．そこで我々は，アジド修飾ゼラチンとジベンゾシクロオクチル基を末端に有する光開裂性架橋剤（DBCO-PC-4armPEG）からなるクリック架橋型光分解性ゼラチンゲル（PD ゼラチン）を開発した． PD ゼラチンは，マトリゲル等の生理活性タンパク質を含むプレゲル溶液を用いて調製することもでき，調製されたゲル内で癌細胞の形態変化を確認することができた．また，得られた PD-ゼラチンゲルにマイクロパターン光（365nm，156mW / cm 2，30 秒）を投影したところ，光照射のパターンに応じた分解を確認した．
PD ゼラチンゲルの表面または内部でがん細胞を培養し，光の照射によってゲルを溶解させることで，特定の細胞のみを単離することができる．例えば，マニュアル操作での形態別の細胞単離に成功している．我々は，細胞培養，撮像，光照射による細胞回収の一連の操作を自動化した装置を開発した．現在，細胞形状識別アルゴリズムを実装して，蛍光標識モデル細胞を対象として実証試験を実施している．

Development of automated cancer cell separation system from photodegradable hydrogel

○Shinji Sugiura[1], Masato Tamura[1], Shinya Yamahira[1], Kazumi Shin[1], Taku Satoh[1], Toshiyuki Takagi[1], Toshiyuki Kanamori[1], Mayu Shibuta[2], Kei Kanie[2], Ryuji Katoh[2], Masumi Yanagisawa[3], Hirofumi Matsui[4]
([1]AIST BRID, [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [3]ESCO, [4]Dept. Med. Tsukuba Univ.)

Key words cell sorter, three dimension, hydrogel

S3Cb01 家畜・家禽類の腸内機能を制御する環境微生物

○宮本 浩邦[1,2,3], 大野 博司[2], 児玉 浩明[1,3,4]
（[1]千葉大院・融合, [2]理研・生命医科学, [3]サーマス, [4]千葉大・園芸）
hirokuni.miyamoto@riken.jp

常温，あるいは常圧でない条件下において生息可能な微生物は，極限環境微生物と呼ばれている．なかでも，至適生育温度 45℃以上，生育限界温度 55℃以上の高い温度帯に耐えられる好熱性・耐熱性微生物は，なかなか死滅しにくい特性があることから我々の生活圏に深く入り込んでいる．しかしながら，好熱性・耐熱性微生物が動植物の生理機能に与える影響に関する研究成果は意外にも少ない．
一方，千葉大学を中心とした産学連携グループでは，バシラス科を主体とした好熱菌群によって海産資源を 75℃前後の高温下で発酵した産物（以下，好熱菌発酵産物）が，動植物に与える影響に関して研究を推進している．飼料として好熱菌発酵産物を活用した場合，養殖ヒラメ，採卵鶏，豚において，死魚率，消耗率，死産率などを減少させ生産性を向上させる（JGAM 56,61-5,2010; Res Vet Sci 93,137-42,2012; JBB 121,659-664,2016）．モデル動物（ラット・マウス）を用いた実験を行った結果，腸管免疫系の賦活化に寄与する遺伝子発現が高まり，特に分泌型 IgA の糞中濃度を増加させる（JBB 114,500-5,2012）．また，肝臓，並びに筋肉中において，抗酸化活性が高まった結果，過酸化脂質を減少させる傾向があることが明らかになっている（JBB 116,203-208,2013; JBB 121,530-535,2016）．そこで，無菌動物を用いた実験系において，好熱菌発酵産物中の機能性候補微生物群の単離を試みたところ，腸内生着性のある好熱菌としてヤシ酒の発酵菌である *Bacillus thermoamylovorans* の近縁種などが同定された．これらの菌株をコンベンショナル条件下で飼育したマウスに経口投与すると腸内で分泌型 IgA の産生を誘導した．さらに，飼料エネルギーの利用効率を調節するとともに，特に低濃度では飼料摂取量当たりの体重増加率を改善させる性質があることが示唆され（JAM 114,1147-57,2013），併せて排泄糞中の未消化な飼料成分による環境負荷の低減効果も確認された．これらの性質から，畜産向けのプロバイオティクスとしての利用価値があるため，NITE に国際寄託され，米国，EU，中国，日本などで国際特許として登録されている．その後，DNA-DNA ハイブリダイゼーションや全ゲノム解析などの結果から，新菌種として *Bacillus hisashii* と命名された（IJSEM 65,3944-3949,2016）．当該好熱菌株は，宿主の腸内フローラとの相互作用が確認されており，マウス，鶏，豚では，肥満制御に関与する乳酸菌群や一部の *Clostridium* 属菌などの腸内におけるポピレーションを制御するとともに，腸内の短鎖脂肪酸の産生をともなって，脂肪蓄積軽減効果や成長促進効果などをもたらすことが確認されている．また，豚においては，乳酸菌が産生する乳酸を短鎖脂肪酸に変換する乳酸資化菌が増加する傾向が確認され，乳酸資化菌の一つである *Megasphaera* sp.を分離することに成功している（Anaerobe 48, 160-164, 2017; JBB 125, 519-524, 2018）．
これらの結果から，一つの仮説として，当該好熱菌 *B. hisashii* は宿主腸内の乳酸菌と乳酸資化菌の機能バランスを制御する役割があるのではないかと推察している．実際，有胞子性の耐熱性乳酸菌として，ヒトの食品用を中心に長年市販されている *B. coagulans* (商品名ラクリス:三菱ケミカルフーズ)と併用して，肉用鶏に給与した結果，飼料要求率が従来よりも改善し，筋肉中の過酸化脂質マロンジアルデヒドの減少傾向が増強することが明らかになっている．当該 *B. coagulans* は，そもそも緑麦芽から単離した耐熱菌であり，山梨大学名誉教授の中山大樹博士と世界的な発酵醸造研究の権威で「酒の博士」として知られる東京大学・名誉教授(のちに理化学研究所・副理事長)である坂口謹一郎博士(いずれも故人)が戦後まもなく発見した環境微生物として社会に役立ってきた．異なるフィールドから採取された環境微生物群が腸内で相互作用を果たし，動物の健康的な飼育に貢献しうるという現象は極めて興味深い．
環境微生物と動物との間の相互作用は，食品科学，農学，畜産学，環境学，並びに医学などの幅広い視点で捉えるべき研究対象である．本研究の視点は，今後，最新の解析技術を活用していくことによって，さらに人類に貢献しうる持続可能な社会構築のための SDGs 技術のツールを見出すことにもつながっていくものと期待される．

謝辞
本研究は，早稲田大学大学院創造理工学研究科 教授・理化学研究所 IMS チームリーダー 服部正平先生，理化学研究所 IMS 研究員 須田亙先生，慶應義塾大学先端生命科学研究所 准教授・福田真嗣先生の御協力の上で成り立っております．ここに深謝致します．

Environmental microbes to modulate the gut function of livestock and poultry animals.

○Hirokuni Miyamoto[1,2,3], Hiroshi Ohno[2], Hiroaki Kodama[1,3,4]
([1]Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., [2]IMS,RIKEN, [3]Sermas co. ltd., [4]Fac. Horticul., Chiba Univ.)

Key words thermophile, Livestock, poultry, gut

S3Cb02 フィールドアグリオミクスにより有機農業を科学する

○市橋 泰範[1,2]
（[1]理研・バイオリソース研究セ, [2]科学技術振興機構・さきがけ）
yasunori.ichihashi@riken.jp

近年，有機農業は世界的な食料および環境問題解決に関して注目されている．有機農法の一つである太陽熱処理は，土壌中の植物病原体を防除する方法として開発されたが，主要な植物病原体がいない場合でも植物の成長を促進する効果が知られている．その成長促進効果のメカニズムを明らかにするため，私たちは同じ圃場内において異なる農法（化成肥料もしくは有機堆肥を施肥して太陽熱処理有無の試験区を設置）でコマツナを栽培し，全代謝物解析および微生物プロファイル解析によるフィールドアグリオミクス研究を行った．
本研究の太陽熱処理は，日積算温度 1000℃を超える 5 週間の期間で行った．その結果，太陽熱処理が農作物の収量（乾燥重量）をおよそ 1.7 倍に増加させることが明らかになり，一方で農作物の他の形質（植物地上部の全代謝物，葉の形，光合成活性，糖度，酸度，葉の色素，病害，食味）に有意な違いは検出されなかったため，太陽熱処理は同等の品質を維持した上でコマツナの収量を増加させることが明らかになった．また翌年でも太陽熱処理による成長促進効果を確認することができた．
その成長促進効果のメカニズムを明らかにするため，作付け前および収穫時の土壌について NMR による代謝プロファイリングを遂行した．検出できた代謝物データを用いて主成分分析を行なった結果，試験区間で明確な違いが検出されたため，物理的に異なった場所に設置した試験区であっても，異なる処理による土壌特性を反映していることを示す．しかし，無機態窒素（アンモニア態および硝酸態）は太陽熱処理間で有意な違いはなく，現在の農学分野で主流である「植物は無機物で栄養を吸収する」というリービッヒの無機栄養説では今回の太陽熱処理による成長促進効果を説明できないことがわかった．
次世代シーケンサーを利用して土壌および根圏のおける微生物プロファイル解析を行った結果，太陽熱処理は土壌全体の微生物でなく，コマツナの根圏に生息する微生物の種類に大きく影響することがわかった．門レベルでの大きな影響が確認され，デイノコックス・テルムス門やフィルミクテス門が太陽熱処理をした根圏で多くなること，特に植物の成長促進に関与する根圏バクテリアとしてパエニバシラス属とシュードモナス属が太陽熱処理により多くなることがわかった．これらの結果から，自然の物質循環である有機物と根圏微生物叢の相互作用が太陽熱処理による成長促進効果に関与していることが示唆される．
そこで太陽熱処理による成長促進効果の重要な因子を抽出するために，コマツナの形質や土壌の代謝物，根圏微生物など全てのデータを統合したネットワーク解析を行うと，個別の比較解析では明らかにできなかった収量に強く相関した有機態窒素（アミノ酸など）および根圏微生物が明らかになった．そのため，ここで検出された有機態窒素が太陽熱処理によって誘導された有機物と根圏微生物叢の相互作用の最終産物として植物の成長を促進させているという仮説を立てた．これを検証するために，コマツナの無菌培養系を確立して有機態窒素の添加実験を行うと，特定の有機態窒素が栄養源や生理活性物質として収量を増加させることを明らかにした．特にダブルラベルしたアミノ酸を使うことで，コマツナが直接アミノ酸を吸収していることを証明した．
現在の慣行農法はリービッヒの無機栄養説をもとに確立されているが，本研究の結果は，従来の研究ではその複雑さゆえに十分に解析されていなかった，自然の物質循環である有機物と根圏微生物叢の相互作用がもたらす農作物への効果を強く示唆する．過去の研究で実験室レベルでは有機態窒素が植物に吸収されることは実証されているが，本研究により初めて圃場レベルで有機態窒素が農作物の生育促進に関与していることを実証した．本研究の発見から，有機態窒素を利用した新規農法の技術開発につながることが期待される．

Field agri-omics dissects organic agriculture

○Yasunori Ichihashi[1,2]
([1]BRC, RIKEN, [2]PRESTO, JST)

Key words field omics

S3Cb03 自吸式通気撹拌と槽内共棲細菌によるし尿のユニークな自家熱型高温好気消化

○酒井 謙二, 田代 幸寛
（九大院・農）
kensak@agr.kyushu-u.ac.jp

自家熱型高温好気消化（Autothermal Thermophilic Aerobic Digestion, ATAD）は，有機物の好気分解で発生する自家発熱により高温状態を維持し，高濃度有機廃水を短期間で安定な有機液肥に変換する．
我々は福岡県築上町で稼働している屎尿の ATAD プロセスと循環システムに注目してきた．ここでは自給式通気撹拌装置を装着したバッチ式のバイオリアクターを用いて，収集屎尿を 3 週間程度処理し町内農地で有機液肥として循環利用している．本プロセスは温度や溶存酸素濃度，細菌群集構造で区別される 3 段階のフェーズを経て進行することが明らかになっている．それは既知の ATAD 法や活性汚泥法とは全く異なる，ダイナミック且つユニークな細菌群集構造の遷移を見せる[1]．即ち，
（1）市販酵素粉末（EP, 300PPM)を添加した貯留し尿を処理槽に導入し曝気を開始すると，1-2 日の急激な酸素消費による溶存酸素濃度（DO)，酸化還元電位（ORP)の低下，有機酸の分解消失と p H 上昇を引き起こす（初期）．その後，DO， ORP の漸次回復とともに温度上昇速度も徐々に減衰するが一週間以内に品温は 50 度 C を超える（中期）．その後高い DO と高温は一週間以上安定に維持される(後期)．
（2）消化初期では *Proteobacteria* 門の特定細菌種が活発に増殖して優占し，有機酸の分解に関わっていると考えられる．本菌は中期に向かって急速に死滅するが，この際グラム陰性細菌に対して特異的な溶菌活性が上昇している[2]．消化中期では *Bacteroidetes* 門細菌が台頭し遷移的細菌叢が形成される．後期においては *Actinomycetes* 門および *Firmicutes* 門の OTU(Operational Taxonomic Unit) が優占するが，これらはいずれも既知の近縁菌と分子系統学的に遠く離れた未分離菌である．
（3）本プロセスでは活性汚泥法などで観察される硝化反応が進行せず硝酸が蓄積しない．従ってある種の *Proteobacteria* が好気条件下で行う脱窒反応も観察されない．COD は低下するが弱アルカリ条件下でアンモニア濃度は維持され，液系の窒素肥効成分のロスは少ない．これらは 16S ｒ RNA アンプリコン解析による細菌群集構造変化と共に，各消化期試料のメタゲノム解析からも支持された．
我々はこのような類例を見ない ATAD プロセスが進行する理由について明らかにするために，1．5L 容の自吸式通気撹拌装置を備えたリアクターを設計して，通気撹拌の効果，EP の添加効果，および実機槽内に共棲する細菌群の効果について検討した．その結果，強い通気撹拌と温度上昇が初期における細菌群集構造遷移に重要であり，EP の効果は低いこと，消化後期の特徴的な細菌群集構造形成と迅速な安定化には消化槽共棲細菌群が大きく関わっていると考えられた．本シンポジウムでは，槽内に共棲し消化後期に優占する未分離好熱菌とともに，興味深い複合微生物系の形成に関係するシステム, 有機液肥が水田土壌細菌叢に及ぼす影響についても議論をしたい．

1) Tashiro Y. et al., Appl. Environ. Microbiol., 84(6):e02537-17(2018)
2) Cheng H. et al., J. Biosci. Bioeng. (2018) In press

A unique autothermal thermophilic aerobic digestion system with concern to self-inducing aeration and inhabiting bacterial community

○Kenji Sakai, Yukihiro Tashiro
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words autothermal aerobic digestion, bacterial consortium, human excreta, liquid fertilizer

S3Cb04 三菱ケミカルが取り組む KAITEKI 実現（SDG ｓ）への取組み

○水無 渉
（三菱ケミカル（株））
mizunashi.wataru.mv@m-chemical.co.jp

国連は，2015 年に開催した「国連持続可能な開発サミット」において，持続可能な開発目標（SDG ｓ）を掲げた．これは，「極度の貧困解消」と「持続可能な社会」の実現の二本柱であり，全ての国が達成する目標としている．SDG ｓで設定されている 17 の達成目標において，バイオテクノロジーやバイオ素材利活用などは一つの有力な手段であり，どのように取り組むかが本開発目標の達成のみならず，事業化促進や経済成長のためにも重要と思われる．
目標 2（飢餓をゼロに），目標 3（すべての人に健康と福祉を）においては，スマート農業等による革新的な食糧増産及び高品位・高機能な食品の生産や食を通した健康増進への取組み．目標 6（安全な水とトイレを世界中に），目標 11（住み続けられるまちづくりを）などは，生物機能を用いた廃水・廃棄物処理技術この高度化や農業・工業との連携などによる安全な水環境・地環境の維持への取組み．目標 7（エネルギーをみんなに そしてクリーンに），目標 9（産業と技術革新の基盤をつくろう），目標 12（つくる責任 つかう責任）などは，バイオベース素材の有効な活用や人工光合成も含めた光エネルギーの利活用を通したモノ作り改革などへバイオは有効な手段の一つである．その他の目標についても上記の目標達成の過程を通して大きく貢献するものと考えられる．いずれにしても SDG ｓの目標達成に向けて多くの手段を連携させて，社会システムの革新に繋がる取り組みが重要である．
本シンポジウムでは，三菱ケミカルが取り組んでいる環境負荷軽減について，広い観点から紹介して SDG ｓ目標達成を通した「持続可能な社会」の実現への議論をさせていただければと考えている．
(1)植物由来バイオプラスチック
(2)環境調和型生産技術
(3)植物工場を用いた高機能品
(4)MBR（Membrane Bio Reactor）による高度廃水処理
(5)機能性食品素材
(6)機能設計に関する技術開発 など
日本企業の取組みも当初の認知度は高くはなかったものの，最近では急速に認知が進んで，積極的に取り組む姿勢が増えているように思われる．目標 17（パートナーシップで目標を達成しよう）に示されているように国内外含めた各企業やアカデミアとの強力な連携により，持続可能な社会の実現という目標の達成を目指したい．
最後に弊社のコーポレートビジョンを紹介する．
『三菱ケミカルホールディングス（MCHC）グループは，環境・社会課題の解決に貢献し，持続可能な社会を皆さまと一緒に築くこと，すなわち「KAITEKI 実現」をビジョンに掲げている．「KAITEKI」とは，「時を越え，世代を超え，人と社会，そして地球の心地よさが続く状態」を表し，環境・社会課題の解決にとどまらず，社会そして地球の持続可能な発展に取り組むことを提案した MCHC グループオリジナルのコンセプトです．MCHC グループは，その実現をビジョンに掲げ，化学を基盤とした，機能商品，素材，ヘルスケア分野で，グループ総合力による製品・技術・サービスの提供を通じた企業活動を展開しています.』
弊社ホームページより．

For the susutainable society ~ action to SDGs in Mitsubishi Chemical

○Wataru Mizunashi
(Mitsubishi Chemical Corporation)

Key words SDGs, bio-base plastics, wastewater treatment, plant factry system

S3Cb05 魚類腸内環境と水環境のエコインフォマティクス

○菊地 淳 [1,2,3]
（[1]理研・環境資源, [2]名大院・生命農, [3]横市院・生命医）
jun.kikuchi@riken.jp

今世紀に進行する第 4 次産業革命では，IoT/ビッグデータ/AI 関連技術の進展により，1 次産業にデジタル化および将来予測化とフィードバック制御を導入し得る．しかし AI 関連技術が発展する一方[1]，その学習データ取得のために試料数(N)を多くすると分析コストが高くなるため，「予測科学」領域において多因子数(P)データを産出するオミクス手法の導入は鈍い（新 NP 問題）．そこで我々は，日本各地の環境水[3,4]，底泥[5]，天然海藻[6,7]，や天然魚類[8-11]を対象とし，試料数 N が因子数 P より多い場合，あるいは試料数 N が因子数 P より少ない場合について，それぞれ環境評価法と将来予測法の開発を試みてきた．一方で，世界随一の生物多様性ホットスポットたる日本近海には優れた生物資源が埋もれている．豊かな日本の「海を耕し」世界へ輸出するためには，MSC/ASC の国際認証をクリアし得る環境低負荷型水産が必須である．従って生態系評価技術や，海外輸入の魚粉に頼らない飼料開発が必要とされる[12]．ここで「海を耕す」とは言え，陸上養殖にも高い期待が寄せられており，残餌や糞便の飼育水汚濁が問題になり得ることから[13]，やはり排水・廃棄物処理能力の高い環境微生物叢の評価技術が期待される[14, 15]．我々が着手してきた評価手法は，環境試料の各種分析情報の分類，関係性，マーカー情報の同定を可能にし得る[16]．これらの手法を用いて，養殖場付近の生態系の恒常性維持に関わるルールと重要な鍵因子の抽出も可能となり得る[17]．また一連の環境予測技術を用いて，鍵因子の変動から生態系のバランスが崩れる前に，環境の変動を予測・早期警告をすることが期待できる．当該研究は理研 CSRS/名大院生命農/横市院生命の研究室員，ならびに水産研究・教育機構の共同研究者らと共に遂行された．

＜参考文献＞

[1] Date & Kikuchi, *Anal. Chem*. 90, 1805 (2018); [2] Asakura et al. *Anal. Chim. Acta* (in press); [3] Ogawa et al. *PLoS One* 9, e110723 (2014) ; [4] Oita et al. *Sci. Total Environ.* 636, 12 (2018); [5] Asakura et al., *Anal. Chem.* 86, 5425 (2014); [6] Ito et al., (*Anal. Chem.* 86, 1098 (2014); [7] Wei et al., *Anal. Chem.* 87, 2819 (2015): [8] Yoshida et al., *Sci. Rep*. 4, 7005 (2014); [9] Misawa et al., *Anal. Chem.* 88, 6130 (2016); [10] Wei et al., *Sci. Rep*. 8, 3478 (2018); [11] Asakura et al., *Anal. Method* 17, 16 (2018); [12] Mekuchi et al., *Sci. Rep*. 7, 9372 (2017); [13] Mekuchi et al., *PLoS One* (in press); [14] Yamazawa et al. *Molecules* 18, 9021 (2013); [15] Yamazawa et al. *Metabolites* 4, 36 (2014); [16] Kikuchi & Yamada, *Analyst* 142, 4161 (2017); [17] Kikuchi et al., *Prog. NMR Spectrosc.* 104, 56 (2018).

Ecoinformatics approach of fish gut and aqueous ecosystem

○Jun Kikuchi[1,2,3]
([1]RIKEN CSRS, [2]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ.)

Key words microbial flora, fish diversity, environmental analysis, data science

S3Db01 味噌の多様化における麹菌の可能性

○今野 宏
（秋田今野商店）
h-konno@akita-konno.co.jp

弊社では秋田県総合食品研究センターとの共同研究で味噌の高付加価値化を目指し，α グルコシダーゼ高生産麹菌を用いた米味噌のイソマルトース増加効果や「抗変異原性」の高い麹菌の開発を行ってきた．ここでは，その開発の一端を紹介する．

（抗変異原性を指標とした麹菌株の探索）味噌には様々な生理機能性があることが報告されている．その中でも発癌と密接な関係がある抗変異原物質は味噌に複数見出されている．脂肪酸エステル，不飽和脂肪酸，イソフラボン類がそれである．これらの抗変異原物質の生成や構造変化には麹菌の生成する酵素が密接に関与する．しかし，麹菌の菌株の違いにより味噌の生理機能性の違いを調べた例は少ない．そこで味噌の抗変異原性を増強できる可能性のある麹菌株の探索を行った．味噌の試醸には Aspergillus oryzae 21 株を用いた．味噌の抗変異原性は Salmonella typhimurium TA98 を用い，Ams 試験のプレインキュベーション法により測定した．味噌の抽出液の抗変異原性は AOK139 が 97％と対照の味噌用種麹菌より高かった．対照の IC50 は抽出液量の 1/3 程度であり有意な差が確認された．抗変異原性について味噌の脂質が関与している可能性が高いものと考え，脂肪酸エチルエステル及び遊離脂肪酸を分析したところ，遊離脂肪酸は対照味噌と比較して 3.5 倍高かった．そこで脂質分解に関与すると考えられる米麹のリパーゼ活性を比較したところ，対照区よりも 2.1 倍高かった．AOK139 株はリパーゼのみならずセルラーゼ，ヘミセルラーゼ，ペクチンリアーゼ活性も全て対照よりも高かった．以上の結果から脂質分解関連の酵素力価が高く，味噌の遊離脂肪酸を多く生産する AOK139 株は味噌の抗変異原性向上に有望な菌株として選択された．従来から脂肪酸エチルエステルの増加により味噌の香気を増強する方法としてリパーゼ製剤の添加が行われている．AOK139 株を使用した味噌では対照の味噌用種麹にリパーゼ製剤 0.3U/g 添加した際と同等の脂肪酸エチルエステル含量を示した．官能評価では AOK139 味噌は特徴的な華やかな香りを有していて，かつ抗変異原性が高い味噌として高い評価を得た．

イソフラボン類にも抗変異原性は認められている．大豆イソフラボンには官能基の違いによってダイゼイン，グリシテイン，ゲニステインとそれぞれの配糖体ダイジン，グリシチン，ゲニスチンが知られている．分子内に OH 基が 2 個以上含まれていて，金属をキレートする作用を有し，いろいろの生理機能を持っている．これら大豆イソフラボノイド化合物は動物のホルモンであるエストロゲンと類似の構造部分を有するためのホルモン様の生理作用を示す．乳癌発生率は西洋諸国が東洋諸国よりも高いことが病学的調査から明らかになり，それは遺伝的なものではなく，菜食主義者や大豆を多く食べる人々は植物由来のエストロゲンの尿中濃度が高く乳癌罹患率が低く環境，食物が関与していることが明らかになっている．非発酵大豆（生大豆，豆乳，豆腐，おから）や発酵大豆（納豆，醤油）では抗変異原活性が低く，同じ発酵大豆（味噌，テンペ）では高い傾向が認められている．一方 HPLC の測定によると発酵大豆食品には大豆イソフラボン含量が多く，非発酵大豆食品には少ない傾向が見られることから大豆食品における抗変異原性の発現には大豆イソフラボンが関与していることが推察された．さらにイソフラボンの形態について見ると，この作用には配糖体では弱く，アグリコン型になると強いことが明らかになっており，発酵食品にこの作用が強いのは，発酵中に麹菌の産生する β-グルコシターゼにより配糖体がアグリコンに変化するからで，発酵食品でも β-グルコシターゼの活性が異なり，納豆ではこの作用が弱いため，また醤油では一度生成したアグリコンがさらに変化しているものと考えられる．

（α グルコシダーゼ高生産麹菌を用いた米味噌のイソマルトース増加効果）米味噌の糖類はグルコースが大部分を占め，他にイソマルトース，フルクトース，ガラクトース，マンノースなどが知られている．イソマルトースの甘味度は砂糖の半分程度で，まろやかな甘味を有することから，その含有量が味噌の甘味に影響すると考えられている．麹菌の違いにより味噌中のグルコース量とイソマルトース量の比（1M/G 比）が味噌で大きく異なり，それは使用麹菌の違いによる．デンプンからグルコースに分解される過程でマルトースを生成し，マルトースへの α グルコシダーゼの転移作用によりイソマルトース等のオリゴ糖が生成される．このイソマルトースの生成には α グルコシダーゼの転移活性が重要であり，またマルトースの生成に寄与する α アミラーゼ等のアミラーゼ活性も重要であると考えられる．前述した AOK139 株は対照の味噌用種こうじより α グルコシダーゼ活性が 2.6 倍高く，イソマルトースの生成に影響を与えている．AOK139 株を用いた味噌の官能評価は色，味，総合について有意に評価が高く，味については「マイルド」「はちみつ様な味」香りについては「砂糖醤油のような香り」「みたらし団子の様な香り」とコメントが得られた．味については AOK139 株を用いた味噌中イソマルトース量の増加がプラスに働いたもの要因と考えられた．

Possibility of koji fungus in diversification of Miso

○Hiroshi Konno
(Akita Konno Co., Ltd.)

Key words *Aspergillus oryzae*, Anti - mutagenicity, lipase, isomaltose

S3Db02 鹿児島の壺造り黒酢の発酵と機能性

○長野 正信
（坂元醸造）
nagano@kurozu.co.jp

鹿児島の壺造り黒酢（以下黒酢）は約 200 年前から鹿児島県霧島市福山町に伝わる米だけを原料とした伝統的な米酢であり，野天に並べた壺で発酵・熟成を行う世界でも珍しい製法で製造されている．霧島市福山町は錦江湾（鹿児島湾）の北端に位置し，三方を山に囲まれ南側は海に面しており，冬は暖かく 夏は海風で気温がそれほど高くならないので微生物による発酵に適した土地柄である．また三方を囲む山は約 25000 年前にできた姶良カルデラであり，中腹から出る豊富な湧き水は薩摩藩時代「廻(めぐり)の水」と呼ばれ藩内随一の水として折紙つきのものであった．更に霧島市福山町は薩摩藩時代には原料となる米が宮崎県都城盆地や大隅半島から集まり，鹿児島城下に上納米を搬送する港町として栄え，黒酢の製造に欠くことができない米と薩摩焼の壺を容易に入手することができたのである．これら黒酢造りに必要な米，地下水，壺そして発酵に適した気候であったことが江戸時代にマニファクチャーとして酢の製造が始まった大きな理由と考えられる．黒酢は陶製の壺（胴径 43 ｃｍ，高さ 62 ｃｍ，内容量 54L）に蒸し米・米麹・地下水を加え，水面を覆うように米麹を粒一層の厚さで振り撒き（振り麹），屋外で発酵を 3～6 ヶ月，熟成に 6 ヶ月以上かけるので仕込みから収穫まで 1 年以上の時間をかけて製造される．使用される麹は黄麹菌であり，一般の醸造酢は，原料を糖化・アルコール発酵した後，種酢を加えて酢酸発酵を行い製造されるが，黒酢は酵母・酢酸菌の添加が一切行われない伝統的な製法で製造される．特筆すべき点は振り麹が発酵の前期（糖化・アルコール発酵）では蓋となり外界からの微生物の侵入を防ぎ，後期（酢酸発酵）ではこれが液中に沈み，空気が必要な酢酸菌の菌膜が水面に張ることができる状況を作り出すことである．この結果，黒酢の製法は糖化・アルコール発酵・酢酸発酵が一つの壺で連続して行われる世界でも稀なものになっている．なお，仕込みは春仕込み（4 月～6 月）と秋仕込み（9 月～10 月）の 2 シーズンに行なわれる．仕込み直後より発酵過程を解析すると，麹菌による糖化が始まると生成したブドウ糖を乳酸菌が乳酸発酵する．そして発酵液の pH は乳酸濃度の上昇により急激に低下する．このため，多くの有害微生物の生育が抑えられ，壺を屋外に設置していても発酵が安定的に進行し得ると考えられる．エタノール濃度は発酵開始 7 日目で 5.5％となり，その後徐々に減少していき，エタノール濃度の減少に対応するように酢酸濃度が直線的に増加する．最終的な酢酸濃度は 6％程度に達する．このことから，壺の中で糖化，乳酸発酵，アルコール発酵，酢酸発酵が順に生じていることが確認される．微生物叢の変遷を微生物を単離することなく壺から直接微生物の DNA を抽出し同定する DGGE 法（denaturing gradient gel electrophoresis,変性剤濃度勾配ゲル電気泳動）で 16SrRNA 遺伝子を調べると，発酵開始直後は *Lactobacillus fermentum*，*Lactococcus lactis*，*Pediococcus acidilactici* が検出され，乳酸菌が主要になっている．その後乳酸菌は自分自身が産生する乳酸の酸性により死滅していくが，唯一耐酸性の乳酸菌である *Lactobacillus acetotolerans* だけが熟成期まで生存し続けていることが判明している．酢酸菌については *Acetobacter pasteurianus* が検出され，酢酸濃度が直線的に上昇し始める時期と検出時期が重なっており，酢酸生成に主として寄与していると考えられる．また，黒酢製造に関わる微生物の由来について解析すると，発酵初期で主要な *Lactobacillus fermentum*，*Lactococcus lactis*，*Pediococcus acidilactici* は米麹から検出され，また，アルコール発酵酵母 *Saccharomyces cerevisiae* も米麹から検出される．しかしながら耐酸性乳酸菌 *Lactobacillus acetotolerans* と酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* は醸造に使用する壺の内壁から検出されるので壺がバイオリアクターとして働いている．食酢に含有されている酢酸の機能性として静菌・殺菌作用，食欲増進作用，減塩効果，疲労回復効果などが知られているが，これらの作用以外に黒酢は ○赤血球変形能改善作用 ○脂質代謝改善作用 ○抗酸化作用 ○血圧調節作用 ○血糖値改善作用 ○肝機能改善作用 ○免疫力増強作用 ○潰瘍性大腸炎抑制作用などの機能性が確認されている．これらの機能性が主成分である酢酸の効果ではなく，乳酸菌を含む複雑な微生物の働きによって産生された機能性物質の効果であることが証明されてきており，黒酢の独特な製造法が大きく関与していることは非常に興味深いものである．様々な作用を有する黒酢はメタボリック・シンドローム対策に有効な食品であることは間違いないと確信しているが，最近になり美容アミノ酸である D-アミノ酸が食品としては豊富に含有されていることが判明し注目を浴びるだけでなく，新しい効果として痴呆や長寿遺伝子にも良い影響を与えることが報告されている．

Fermentation and Functionality of Kagoshima Jar-fermented Amber Rice Vinegar

○Masanobu Nagano
(Sakamoto Kurozu,Inc.)

Key words vinegar fermentation, DGGE, functionality

S3Db03 樽酒が食品の味わいに与える影響

○高尾 佳史
（菊正宗酒造）
y-takao@kikumasamune.co.jp

1. 背景・目的
樽酒は清酒の一種であり，杉（*Cryptomeria japonica*）でできた樽に貯蔵することで付与される杉のさわやかな香りを特徴としている．清酒がビンやパックに詰められて流通している現在では，お祝いの席での鏡開きぐらいしか杉樽を見ることはないため，杉樽にわざわざ清酒を貯蔵することが不思議に思われるかもしれないが，昭和のはじめに一升瓶が普及し始めるまではほとんどの清酒が杉樽に詰められて輸送されていたため，結果的にほとんどの清酒が樽酒であったことになる．
前述のとおり，樽酒の最大の特徴は杉樽由来のさわやかな香りであり，これまでに樽酒に含まれる杉由来の香気成分としてセスキテルペンアルコール類などが報告されている．一方，樽酒はそのさわやかな香りのためか，多くの酒造業者がうなぎなどの油っこい食品との相性が良いとしてきたが，これは科学的根拠に基づいたものではなかった．そこで，樽酒と油脂を多く含む食品との関係について調べるとともに，清酒と合わせることが多い和食にとって重要な要素の一つである旨味に樽酒が与える影響についても検討した．
2. 樽酒が油脂を多く含む食品に与える影響
樽酒と油脂を多く含む食品との関係を調べるために，まずは官能評価を行った．清酒サンプルとして，アルコール度数 15%の本醸造酒（以下，対照酒）とこれを杉樽に貯蔵した樽酒を，食品サンプルとしてマヨネーズを用いた．マヨネーズを口にした 30 秒後に清酒を飲んでもらい，清酒飲用 30 秒後の感覚強度を 5 段階で評価してもらったところ，対照酒に比べて樽酒では「マヨネーズの味」や「油が残っている感じ」が低減する傾向にあることが明らかになった．樽酒で口中の油感が低減したのは，対照酒に比べて樽酒は油脂との親和性が高いために，油脂が口中から洗い流されやすい状態になっていたためではないかと考え，清酒と油脂の間の界面張力を調べた．その結果，試験に用いたすべての食用油，精製魚油において，対照酒に比べて樽酒では有意に界面張力が低下していた．この結果から，樽酒は対照酒に比べて油脂との間の親和性が高いために口中の油脂を洗い流しやすく，このために油っこい料理をさっぱりと食べさせる効果があると考えられた．
3. 樽酒が食品の旨味に与える影響
樽酒と食品の旨味の関係について調べるため，これまで同様の清酒サンプルと，旨味が強く感じられる食品としてあさりの酒蒸しの汁を用いて官能評価を行った．あさりの酒蒸しの汁を口にして 5 秒後に清酒を飲み，清酒飲用後 0，5，10 秒での旨味強度を 5 段階で評価してもらったところ，樽酒では，5，10 秒後で対照酒に比べて有意に旨味が強くなっていた．この結果から，樽酒には食品の旨味を強く，長く感じさせる効果があると考えられた．この効果について，さらに様々な食品を対象とした検討を行うために，味認識装置（インテリジェントセンサーテクノロジー社製 SA-402B）を用いた試験を行った．試験は旨味センサーを食品サンプルに浸したのちに清酒中で洗浄し，その後に残った旨味を測定することで行った．あさりの酒蒸しの汁を用いて試験を行ったところ，官能評価の結果と同様に，樽酒では対照酒に比べて旨味が強かった．さらに様々な食品を用いて試験を行ったところ，そばつゆ，うなぎのかば焼き，まぐろの刺身はあさりの酒蒸し同様に樽酒で旨味が強くなっていたが，一方で醤油や牛ステーキでは樽酒と対照酒の間に差が見られなかった．これらの結果から，樽酒には魚介類由来の旨味を増す働きがあると考えられた．さらに，樽酒中に含まれる旨味を強くする成分についても検討を行ったところ，杉樽由来の比較的極性が高く，揮発性が低い成分が寄与していることが示唆された．

Effect of *taru*-sake on tastes of foods

○Yoshifumi Takao
(Kiku-Masamune Sake Brewing Co., Ltd.)

Key words sake, *taru*, *Cryptomeria japonica*, food pairing

S3Db04 生活者のすこやかな暮らしに貢献する味噌と米糀甘酒の可能性

○北川 学
（マルコメ）
manabu_kitagawa@marukome.co.jp

1.背景・目的
日本に古くから伝わる麹菌を利用した発酵食品は，味噌，醤油，清酒，甘酒，塩糀などバラエティーに富んでいる．古来より発酵食品は生活必需品であるが，現代ではすこやかな身体を育むエネルギーとして，その価値が再認識されている．和食という世界が認めた価値を発酵食品という魅力を通じて世界トップレベルの長寿県・長野から国内外に発信するため，当社の研究開発について，今回は味噌，米糀甘酒を中心に紹介したい．
2.味噌摂取が血圧に与える影響
ユネスコ無形文化遺産に登録された和食は一汁三菜が基本型である．その一汁を担うのが味噌汁である．日本の食文化に深く溶け込み，毎日の食事にはなくてはならない食材となっている．しかし，味噌，味噌汁には食塩が含まれるため，その健康への効果が過小評価される傾向にある．そこで，成分分析，動物試験やヒト試験を実施した結果，「味噌が血圧を上げる」という一説は事実とは異なっている可能性を報告する．
まず，味噌・味噌汁は「塩分が多く，血圧が上がりそう」と思われているが，実際，味噌汁 1 杯の食塩量は約 1.5～1.9g と他の食品と比較して食塩は多くない．更に，味噌には降圧物質が複数存在することが報告されている．低分子領域のアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性成分の他，分子量 3～5kDa にも降圧特性の異なる複数の物質の存在が報告されている．当社では ACE 阻害活性の測定と LCMS による成分分析を実施したところ，味噌には ACE 阻害活性があり，血圧上昇抑制効果のあるペプチドや未同定の新規降圧成分が含まれていることを確認した．
また，当社では味噌製造工程を変更し ACE 阻害活性を高めた新規開発味噌の製造に成功している．
味噌の降圧特性を検討するため，高血圧自然発症ラット(SHRsp/Izm)を用いて一般味噌と新規開発味噌の比較検討を実施した．対照群には味噌水と同濃度の食塩水を与えた．餌は通常食を自由摂取させた．いずれの味噌摂取群でも対照群と比較して，1 週目から全期間中，血圧上昇を有意に抑制した．2，3 週目では新規開発味噌群の血圧が一般味噌群の血圧よりも低くなったことから，一般味噌よりも強い降圧効果を示した．
これまで長期の味噌摂取がヒトの血圧に与える影響は，疫学調査を除き検討されていない．そこで，長期の味噌摂取がヒトの血圧に与える影響について明らかにするため，正常血圧からステージⅠ高血圧者を対象に二重盲検並行群間比較試験を実施した．試験食は，一般味噌または新規開発味噌を用いた．対象者 39 名を一般味噌群と新規開発味噌群との 2 群に分け，1 日 2 杯の味噌汁（味噌 32g/日，食塩量 3.8g/日に相当）を普段の食事に加えて，12 週間毎日摂取させ，この間の血圧に及ぼす影響を調べた．全被験者でみると，摂取前と比較し，新規開発味噌では 8 週目に収縮期血圧が低下傾向，一般味噌では 12 週目に拡張期血圧が有意に低下した．一般味噌では hANP が正常範囲内で有意に増加した．この hANP の増加は味噌摂取時のナトリウム・水利尿作用の少なくとも一部に関与する可能性が考えられる．新規開発味噌は ACE 阻害活性を指標に開発されたことから，レニン・アンジオテンシン系および交感神経活性に依存する血圧調節への作用が期待される．全被験者を，正常～正常高値（正常群）とステージⅠ高血圧（高血圧群）の 2 群に層別化した解析結果でも血圧上昇はなかった．以上より，味噌摂取により血圧は低下または不変と食塩増の影響を受けなかった．正常血圧のみならずⅠ度高血圧者においても 1 日 2 杯程度の味噌汁摂取の安全性は実証された．
以上の結果より，これまで最も懸念されていた味噌摂取と血圧上昇との関連性が本研究により否定され，通常の味噌摂取の安全性が示された．今後は，味噌の健康機能性を実証するさらなる研究の進展が期待される．
3.米糀甘酒摂取による皮膚バリア機能改善効果
これまでに，当社ではヒトの味噌摂取による肌状態への影響を確認している．味噌汁を 2 週間毎日摂取することで肌の保湿状態が改善された．そのメカニズムの一端は味噌に含まれる成分(大豆，米糀または発酵物)による角層セラミドの増加作用が考えられた．今回，味噌の原料である米糀に着目し，米糀甘酒摂取による肌水分量およびバリア機能への影響を検討するため，肌の乾燥を自覚し，角層水分量の低い健常女性 64 名を対象に無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を実施した．試験食は，米糀甘酒または米糀を含まないプラセボ飲料とし，8 週間摂取させた．40 歳以上で皮膚バリア機能が低下している 19 名を対象に解析した結果，米糀甘酒摂取による水分蒸散抑制効果（保湿効果）が認められた．本研究により，肌のバリア機能改善が示唆されたことから，米糀甘酒は，肌保湿効果を有する健康食品としての利用が期待される．
4.日本古来の発酵技術を通じて生活者のすこやかな暮らしに貢献する
いつまでもすこやかで美しくありたいという人々の思いが発酵食品の未来を変えようとしている．これまでの研究により，味噌，米糀甘酒のもつ健康機能性が解明されつつある．今後は更に詳細な検討を進め，発酵食品を通じて人々の暮らしに貢献したい．

Potential of Miso and Amazake contributing to healthy lifestyle

○Manabu Kitagawa
(Marukome Co.,Ltd.)

Key words miso, amazake, blood pressure, skin condition

S3Eb01 プロトン駆動力による光合成のフィードバック制御

○皆川 純
（基生研・環境光生物）
minagawa@nibb.ac.jp

光合成反応は駆動に光エネルギーを必要とする以上，その光エネルギーを消化しきれない場合に反応の場に傷害（光阻害）が起こることは不可避である．この光阻害に備える防御機構は光合成生物の生存にことさら重要であり，広く保存されている．一連の光合成反応の中でもその根幹となる光化学反応を担う部分は，今から 30 億年近く前にはすでに完成されていたとされるが，その後の光合成生物の進化は，おもにこうした光阻害への防御機構など環境適応機構の進化にあったと言っても過言ではない．しかし，現在の栽培環境の作物などは必ずしも光合成と光防御のバランスが最適化された状態にあるとは限らない．なぜなら，それらの植物は，進化した環境とは異なる環境で人為的に育てられているからである．というわけで，現存する植物の光合成機能を向上させようとする場合，その環境ごとの光エネルギーの「利用」と「散逸」を再調節し，光合成と光防御のバランスを再最適化することが重要である．
平成 28 年度より，新学術領域「新光合成・光エネルギー変換システムの再最適化」が発足した．この新学術領域は，植物生理学，生化学，遺伝学，構造生物学，電気生理学などの専門家が，光合成を再最適化するために力をあわせ，葉緑体チラコイド膜を介したプロトン駆動力（膜電位およびプロトン濃度勾配）がいかに制御されているか，そしてその制御によって，光エネルギーの「利用」と「散逸」のバランスがいかに最適化されうるのか解明に取り組んでいる．本講演では，新学術領域「新光合成」の理念 [1]とともに，我々の研究グループが近年迫りつつある過剰エネルギー散逸の仕組み，特に緑藻におけるエネルギー散逸に必要な LHCSR3 タンパク質の発現誘導機構 [2]，LHCSR3 タンパク質が実際にエネルギー散逸を引き起こす分子メカニズム [3,4]，LHCSR1 タンパク質によるエネルギー散逸機構 [5] について解説する．

1) 皆川純 (2016)「光合成を自在に最適化する」実験医学 34: 2747.
2) Petroutsos et al. (2016) Nature 537: 563-566.
3) Tokutsu, R. and Minagawa, J. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110: 10016-10021.
4) Kim et al. (2017) J. Biol. Chem., 292: 18951-18960.
5) Kosuge et al. (2018) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 115: 3722-3727.

Feedback regulation of photosynthesis by proton motive force

○Jun Minagawa
(Div. Env. Photobiol., NIBB)

Key words photosystem II, light harvesting

S3Eb02 代謝工学による光合成の統合解析と工学応用

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

循環型社会の創成に向けて，藻類の利用は生物工学において重要なテーマである．最近の光合成研究の進展によりの光合成生物は，局所環境に適応し，「光エネルギーの効率的利用」と「過剰光からの防御」のバランスを調節していることが分かってきた(Nature 2016)．二酸化炭素と光エネルギーからバイオマスや物質生産を行う方法の開発は次世代生物生産の重要な技術になると期待されているが，2 つの機能のバランスとその変化が中枢代謝に及ぼす影響など，システムとしての理解は十分ではない．
我々の研究グループでは，これまでに，生物工学で用いる様々な微生物に適用可能なゲノムスケール代謝モデル（GMM）を用いたシミュレーション法を用いて代謝を統一的に解析する方法を開発してきた．また，細胞を培養系において，^{13}C 標識炭素源を栄養源として取り込ませ，その標識炭素がどの代謝物質に含まれているかを質量分析法を用いて定量分析することで，中枢代謝の反応速度（代謝フラックス）を定量解析する ^{13}C 代謝フラックス解析システムを開発し，代謝状態を実験的に解析，評価する手法を同時に開発してきた(BioMed Res Int. 2014)．本研究では，これらの代謝工学手法を光合成シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803（GT）株（以下，Syn 株）に展開し，光化学系と中枢代謝を統一的に扱うことで，システムとしての理解を深めることを目的とし研究を行った．ゲノムスケールの代謝モデル（GMM）を開発し(Appl Microb Biotechnol.2011)，シミュレーションによって異なる栄養条件での光化学系の活性と中枢代謝の状態をとらえることに成功した．また，^{13}C 代謝フラックス解析システムを用いて実際の代謝状態を決定し，シミュレーションによって代謝状態を予測可能であることを示した．
このゲノムスケールモデルを利用して，エタノール合成経路を付与した *Syn* 株において，エタノー生成を増加させることが可能な遺伝子破壊をシミュレーションにより網羅的に探索したところ，*ndh* を破壊することでエタノール生産量増加につながることが見いだされ，実際に *ndhF1* 破壊株においてエタノール生成を確認したところ生成量が増加することが確認された(Bioprocess Biosystems Eng 2017)．そこで，より詳細に光化学系の電子伝達フローを解析することを目的として光化学系の反応を素反応レベルに分解し，それぞれの素反応の電子伝達，NADPH や ATP 生成フラックスを議論できるレベルのモデルとして再構築した．この詳細なモデルのより各光受容体で受け取った光エネルギーと電子伝達，PSII，PSI への電子フラックスの分配，サイクリックエレクトロンフロー，非光化学的消光（NPQ）などと細胞の増殖の関連を議論することが可能となってきている．また，各波長の光の利用の仕方についてもシミュレーションができるモデルとして改良している．
さらに，光強度など，環境状態が変化した際の光化学系，代謝系のタンパク質量と代謝状態を定量的に解析することを目的として，定量プロテオーム解析，定量メタボローム解析，同位体標識培養実験を行った際の代謝物内の標識量の解析のシステムを開発した．開発した手法を用いて，光条件，窒素源濃度などの環境条件，細胞をグローバルに制御する転写制御因子の発現量が異なる株の光化学系と代謝の状態を解析し環境変動と各代謝経路の活性化状態をとらえることが可能となった(J Biosci Bioeng 2018，Plant Cell Phsiol 2017)．これらの実験で得られた知見とゲノムスケールモデルによる包括的代謝シミュレーションを基盤として議論し，光合成を新たに最適化していく戦略を提案していきたいと考えている．

Systems Analysis and Metabolic Engineering of Photosynthetic Organisms

Masakazu Toyoshima, Yoshihiro Toya, Fumio Matsuda, ○Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Synechocystis* sp. PCC6803, genome scale model (GMM), ^{13}C metabolic flux analysis, metabolic engineering

S3Eb03 中枢代謝を利用した物質生産と光合成能の改変

○小俣 達男[1], 高谷 信之[1], 池田 和貴[2], 愛知 真木子[3], 西山 佳孝[4]
([1]名大院・生命農学, [2]理研・統合生命医科学研究セ, [3]中部大・応生, [4]埼大院・理工学)
omata@agr.nagoya-u.ac.jp

1. 研究の背景

人類は古くから食糧・食品としてだけでなく，薬品，燃料，建築・工業素材の主たる供給源として植物を利用してきた．近代に入ってエネルギーと化学工業分野で化石燃料への依存を強めたが，今日，化石燃料の消費削減のため，再び光合成による物質生産の活用を図っている状況である．しかし，今日の課題は，(1)以前に比べて桁違いに増大したエネルギー需要に対し，(2)農業生産や食糧需給に干渉することなく，(3)生態系への影響を最小限に抑制しつつ対応することであり，その達成は容易でない．2,000 年代に実用化された植物由来バイオエタノールは(2)の要件を満たせず，2,000 年代後半からは微細藻類を用いたバイオ燃料生産の研究が進められているが，今日に至るまで実用化の目処が立っていない．本講演ではこの原因を検討し，光合成微生物を用いたバイオ燃料生産の実用化のための新たな方策を提案する．

2. 問題点とその解決のための方策

真核微細藻類は，栄養欠乏時にトリアシルグリセリド（TAG）を細胞内に蓄積し，その量は乾燥重量の 50%にも達する（生産物/細胞比＝1）ので，バイオ燃料生産の研究に広く用いられている．しかし，TAG の効率的抽出のためには細胞を乾燥させる必要があり，そのための熱エネルギーを考慮するとエネルギー収支比(EPR, 燃料のエネルギーをその生産に要したエネルギーで割った比)が 1 に達しない[1]．さらに，TAG を完全に抽出してもこれと等量の細胞残渣が発生するので，化石燃料消費（年間 100 億トン C 相当）の 10%を TAG 由来のバイオ燃料で代替すると年間約 10 億トンの細胞残渣が生じることとなり，上記(3)の要件を満たすのはむずかしい．これらの問題を包括的に解決する唯一の方法として，我々は光合成産物を細胞外に放出させることを提案している．生産物/細胞比＝1 程度であっても，細胞を乾燥せずにすべての油脂を抽出できれば EPR = 1.3 と推計されるので[1]，細胞と当量の脂質を細胞外に放出させればこの値を達成できる．さらに生産物/細胞比を 4 まで上げることができれば，実用的な燃料のもつべき EPR 値とされる 5 にも迫ることが可能である．光合成微生物の細胞は本来，光合成産物を外に漏らすことはない．一方，植物の葉肉細胞は光合成産物のほとんどを細胞外へ排出する．本来は自身の細胞分裂に利用する有機物質を細胞外へと導く点で，我々が提案するアプローチは，光合成微生物の光合成を「植物型」の光合成に変換するものと位置づけることができる．

3. 研究の現状と将来の見通し

光合成微生物の中枢代謝経路からは，様々な物質を取り出すことが理論的に可能である．実際，ラン藻を用いた代謝工学的研究によって糖・アルコール，アルデヒド，有機酸，炭化水素など多種多様の物質の生産が報告されている．これらの物質の多くは細胞外に放出されるので，いずれの物質をターゲットとしても大量生産系実現の可能性があるが，屋外の開放系での大量生産を考えた場合には引火性，毒性，揮発性を持たないことが重要なので，我々は遊離脂肪酸（FFA）の生産系の改良に取り組んでいる．*Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いたラン藻での FFA 生産の最初の報告[2]では生産物/細胞比は 0.13 と低く，また生産速度も 0.44 mg L^{-1} h^{-1} で TAG 生産系の数分の一程度であった．我々は，まず *Synechococcus elongatus* PCC 7942 がきわめて高い潜在的 FFA 生産能力をもつことを見出し，この株を材料として用いることとした．ただし，この株から初めに作製した生産株は細胞内に FFA を過剰蓄積し，光に対して超感受性を示した結果，生産性がきわめて低かった．そこで，細胞外への FFA の能動的排出能力の強化[3]，FFA の受動的放出の強化[4]，培地からの FFA の速やかな除去[5]によって増殖を安定化し生産性を向上させた．さらに，細胞当たり生産量を増やすために細胞の増殖を制限することにより，当初の生産物/細胞比 0.1，生産速度 0.35 mg L^{-1} h^{-1}，FFA 収量 0.08 g L^{-1} の数値をそれぞれ，0.9，1.8 mg L^{-1} h^{-1}，0.43 g L^{-1} に高めることに成功した（Kato et al. 投稿準備中）．ラン藻を含めて光合成微生物は一般的に弱光条件を好む傾向があり，太陽光下では光阻害を受けやすいため，我々も現在は屋外光の数分の一以下の光条件で研究を行っている．今後は，より強い光の下で，より多くの光エネルギーを FFA 生産に結びつけることが，さらなる生産性向上の鍵となると考えて研究を進めている．

引用文献

1) Lardon et al. (2009) *Environ. Sci. Technol.* 43: 6475-6481
2) Liu et al. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 6899-6904
3) Kato et al. (2015) *Plant Cell Physiol.* 56: 2467-2477
4) Kato et al. (2016) *Biotechnol. Biofuels* 9: 91
5) Kato et al. (2017) *Biotechnol. Biofuels* 10: 141

Secretion of the product is essential for exploitation of the central metabolic pathway of photosynthetic microorganisms for sustainable production of biofuels

○Tatsuo Omata[1], Nobuyuki Takatani[1], Kazutaka Ikeda[2], Makiko Archie[3], Yoshitaka Nishiyama[4]
([1]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., [2]IMS, RIKEN, [3]Coll. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ., [4]Grad. School. Sci. Eng., Saitama Univ.)

Key words biodiesel fuel, *Synechococcus*, fatty acid, photosynthesis

S3Eb04 駆動力形成を担うイオン輸送による光合成調節

○魚住 信之, 辻井 雅, 狩野 文香, 解良 康太, 浜本 晋, 斉藤 俊也
（東北大院・工）
uozumi@biophy.che.tohoku.ac.jp

光合成明反応は，光エネルギーをチラコイド膜に電気化学的ポテンシャルとして蓄える反応である．これにより，チラコイド膜にプロトン駆動力(PMF)が形成される．プロトン駆動力はチラコイド膜を隔てた H^+濃度差（ΔpH）と膜電位（Δψ）の二つの成分で構成される．チラコイド膜の H^+輸送体は電子伝達系の膜タンパク質であり，光合成伝達系の本体は H^+輸送体である．一方，チラコイド膜の膜電位を形成するイオン輸送体の情報は限られている．膜電位を決定する主要な成分の一つは K^+輸送である．これまでに，シロイヌナズナの葉緑体や藍藻のチラコイド膜，葉緑体包膜や藍藻の K^+輸送体が同定されている．藍藻や植物の葉緑体は強光を受けると光リン酸化反応によりチラコイドルーメン側に過剰に H^+が蓄積する．炭素同化反応に利用されない過剰のエネルギーは光阻害を引き起こす．

ストロマの K^+濃度の調節に関わる輸送体

チラコイド膜の膜電位は，ストロマ側とルーメン側のイオンによって決定される．藍藻の細胞膜には，Ktr(Trk/Ktr/HKT 系)と Kdp の 2 種類の K^+トランスポーターが機能している．この 2 つのトランスポーターは原核・真核生物に広く存在する．藍藻 *Synechocystis* sp. PCC680 の KtrABE は，Na^+で活性化される K^+取込み系であり，HCO_3^-を細胞内に取込む SbtA トランスポーターの活性に必要である(JBC 2005, J Bacteriol 2006, 2010)．また，Kdp は，低濃度の K^+環境になると二成分系によって誘導され，細胞内 K^+の恒常性の維持を担う(J Bacteriol 2015)．Ktr と Kdp の発現は概日性を示し，光合成に合わせるように日が昇る時期に発現量は上昇する．一方，水チャネル AqpZ と機械受容性チャネル MscL は宵の口に発現が上昇する(JBC 2011，J Bacteriol 2012, Channels 2013)．光合成産物の増減にともなって変動すると考えられている．

葉緑体・藍藻のチラコイド膜の陽イオン/H^+対向輸送体

シロイヌナズナ KEA3 はチラコイド内からストロマに H^+を輸送することによって，過剰な PMF を抑制すると複数のグループから報告されている．KEA1-KEA6 の輸送活性を直接に実測した報告なく，K^+/H^+アンチポーター活性の証明はない．我々は 6 つの KEA1-KEA6 を発現した大腸菌から反転膜を調製後，アンチポーター活性測定を行ったが，KEA1-KEA6 のアンチポーター輸送活性は検出できなかった．KEA3 のスプライスバリアントや Na^+/K^+選択性に関与するアミノ酸の置換体においても，野生型と比べてアンチポーター活性に変化は見られなかった．一方，KEA1-KEA6 で K^+の内向き輸送活性は検出された．また，K^+の排出輸送活性もいくつかで検出された．上記の結果は，KEA1-KEA6 は K^+輸送体として機能することを示している．

葉緑体の先祖の藍藻は葉緑体の機能や光合成機能の解明と考察にとって重要である．*Synechocystis* sp. PCC680 には KEA3 のホモログ蛋白質の NhaS1-NhaS6 がある．その中でも NhaS3 は KEA3 と最も相同性が高い．NhaS3 は Na^+/H^+アンチポーター活性をもつ(JBC 2009)．一方，K^+/H^+アンチポーター活性はみられない．抗体を作製して局在性を調べると，チラコイド膜に強いシグナルが現れ，原形質膜にも弱いシグナルが検出された．これを確認するため，GFP を付与した NhaS3 を藍藻に発現させて，フレンチプレス破砕，ショ糖密度勾配遠心分離法による原形質膜とチラコイド膜の分画後，Western Blotting 法により NhaS3 の局在性を解析した．この結果，NhaS3 はチラコイド膜に局在することが確認された．*nhaS3* は null 変異株を取得できないことから NhaS3 は生存に必須の機能を持つことが予想される．knock-down 株では，塩感受性を示すことから耐塩性に必要であることが分かっているが，光合成への関与は明らかではない．

気孔開閉の調節を担う輸送体を調節する Ca^{2+}センサー蛋白質と細胞膜移行

光合成に必要な二酸化炭素は気孔を通って供給される．気孔開閉はイオン輸送体によって調節されている．数々の輸送体は，連動して気孔開閉に向けて活性化または不活化する必要があるが，それを統御する因子は細胞内調節因子である．植物には水溶性 Ca^{2+}センサータンパク質の Calcium-dependent protein kinase (CPK) と Calcineurin B-like protein (CBL)が輸送体の調節を担っていることが知られている．気孔閉鎖時には孔辺細胞はしぼむ必要があり，陰イオンの排出が盛んになる．SLAC1 陰イオンチャネルは，CPK6 によってリン酸化を受けて活性化する．陰イオンは陽イオンと同様に膜電位調節に関与する．CPK6 は細胞膜に移行して SLAC1 に近づく必要がある．CPK6 は 2 種類の脂肪酸修飾を細胞質（ミリストイル化）とゴルジ体（パルミトイル化）で受けて原形質膜への移行が可能となる．また，CBL5 と CIPK11（CBL-interacting protein kinase）は相互作用する．CBL5 にも 2 種類の脂肪酸修飾部位が存在しており細胞膜に移行する．CBL5 はリン酸化酵素の CIPK11 を細胞膜へ引き連れて SLAC1 をリン酸化する．輸送体を調節する Ca^{2+}センサータンパク質も *N*-ミリストイルトランスフェラーゼ（NMT）やパルミトイル化を触媒する酵素であるプロテインアシルトランスフェラーゼ（PAT）により調節される（New Phytol 2018）．膜輸送体と細胞内因子によって協奏的に調節されている．

Photosynthesis regulation by ion transport system responsible for proton motive force formation

○Nobuyuki Uozumi, Masaru Tsujii, Ayaka Kano, Kota Kera, Shin Hamamoto, Shunya Saito
(Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words membrane potential, transporter

S3Fb01 ケイ素を胞子表面に蓄積する *Bacillus* 属細菌の解析と界面バイオテクノロジーへの応用

○池田 丈, 廣田 隆一, 黒田 章夫
（広島大院・先端物質）
ikedatakeshi@hiroshima-u.ac.jp

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．特に，単体のケイ素は主要な半導体材料であり，現在の情報化社会を支える基盤となっている．多くの生物にとっては関わりの薄い元素だと言えるが，一部の真核生物（珪藻や放散虫，一部の海綿や一部の高等植物など）は可溶性のケイ酸（$Si[OH]_4$）の形でケイ素を積極的に取り込み，その重合体である固体のシリカ（SiO_2）を骨格や殻などとして利用することが古くから知られている．その一方で，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．多様な代謝系を有する原核生物の中には，環境中に豊富に存在するケイ素を積極的に利用するものもいるのではないか，という考えのもと，当研究室ではケイ素を利用する細菌の探索を行った．培地に添加したケイ酸の取り込みを指標にスクリーニングを行ったところ，土壌より単離した 240 株のうち約 1 割という意外なほどの高頻度でケイ酸の取り込みが認められた．16S rRNA 配列に基づく系統解析の結果，ケイ酸の取り込みを示した株は全て *Bacillus* 属に属し，特に *B. cereus* に近縁なものが多かった．*B. cereus* をモデルとして解析を行った結果，本菌が胞子を形成する時期にケイ酸が細胞内に取り込まれ，細胞内で重合されてシリカとして胞子表面に蓄積されることを発見した．蓄積されたシリカは，胞子殻（spore coat）と呼ばれる多数のタンパク質で構成される層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となった．胞子を酸処理に供して有機物を分解した後，残存するシリカを電子顕微鏡で観察したところ，胞子サイズの殻状の構造体が認められた．これらのことから，胞子を覆う形でコーティングしているシリカ層が，酸に対する防壁として機能していることが示唆された．ケイ素を利用することで酸性条件下における自身の生存率を高めるという独自の生存戦略だと考えられる．

本菌のシリカ蓄積メカニズムを解析する過程で，胞子殻に存在するタンパク質のひとつである CotB1 がシリカ蓄積に関与していることを発見した．また，本タンパク質の機能領域がシリカに対する親和性を発揮することを見出し，この配列を基に新規のシリカ結合ペプチドを開発した．本ペプチドをタグ配列として遺伝子工学的に融合することで，シリカに対する結合能を任意のタンパク質に付与することができる．本技術を利用することで，可溶性の生体分子であるタンパク質と無機固体であるシリカ（および半導体である単体のケイ素）という異種材料を融合した新たなテクノロジー開発が可能となる．実際に，半導体デバイスをベースとしたバイオセンサーの開発や，安価なシリカ粒子を担体としたタンパク質のアフィニティー精製法の開発などを進めており，本発表ではこれらの応用展開についても紹介したい．

Silicon accumulation on the spore of *Bacillus* species and its application to silicon-based biotechnology

○Takeshi Ikeda, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Bacillus cereus*, biomineralization, semiconductor, silica

S3Fb02 微生物を用いた土壌からのヒ素可溶化：知られざる発酵細菌の重要性

○天知 誠吾 [1], 堀 知行 [2], 山村 茂樹 [3]
（[1]千葉大・園芸, [2]産総研, [3]国環研）
amachi@faculty.chiba-u.jp

ヒ素汚染には，東南アジアの地下水汚染に代表される自然作用によるものと，工場跡地の土壌汚染など人為由来のものがある．我が国においても，ヒ素は検出頻度の高い汚染物質の 1 つであり，土壌汚染対策法の基準超過事例数に占める割合も高い．現在，ヒ素汚染土壌の処理法として封じ込めや掘削除去が一般的だが，高コストのため処理に至らず，低・未利用地となる問題も生じている．これに対し近年，微生物のヒ素酸化還元能や，ヒ素高度蓄積植物（モエジマシダ）を用いたヒ素汚染修復法が注目されている．
土壌中のヒ酸 As(V)を異化的に還元する細菌（異化的ヒ酸還元細菌）は，鉄やアルミニウム鉱物に吸着しているヒ酸を，吸着性の低い亜ヒ酸 As(III)に還元し液相に溶出させる性質を持つため，土壌中ヒ素の可溶化・除去技術への応用が期待されている．このような細菌は，ゲノム中に異化的ヒ酸還元遺伝子（*arrAB*）を有しており，ヒ素の存在下でその発現が顕著に上昇する．また解毒的ヒ酸還元酵素遺伝子（*arsC*）を中心とする遺伝子群も存在し，ゲノム上でヒ素代謝酵素遺伝子群（arsenic island）を形成する．転写解析や発現タンパクの質量分析により，ヒ素存在下ではこれらヒ素代謝酵素のみならず，抗酸化酵素，ストレス応答タンパク，folding 関連タンパク，分子シャペロンなどが協調的に発現上昇し，ヒ素耐性を獲得することがわかってきた．一方これまでに，ゲノム上に *arrAB* を有していない異化的ヒ酸還元細菌も複数分離されているが，これら細菌におけるヒ酸還元メカニズムの解明も興味深い課題である．
最近我々は，ヒ素汚染土壌の biostimulation を念頭に，ヒ素汚染土壌またはヒ酸と鉱物の共沈殿物から土壌微生物群がヒ素を溶出できるか調査を進めている．その過程で，乳酸が炭素源として適当であること，リボフラビンのような電子シャトル物質の存在下でヒ素溶出が促進されることが明らかになってきた．また Miseq を用いた 16S rRNA 遺伝子増幅産物のシークエンス解析により，ヒ素溶出には Firmicutes 門に属する細菌群集が重要な役割を演じる可能性が示唆されている．この中には，既知の異化的ヒ酸還元細菌と近縁な *Desulfitobacterium* 属細菌のみならず，これまでヒ酸還元能に関する報告のない *Sporomusaceae* 科の嫌気性発酵細菌も含まれていた．本講演では，新たに分離された *Sporomusaceae* 科細菌のヒ酸還元能について，培養試験とドラフトゲノム解析から見えてきた予想メカニズムも含めて紹介する．

Soil microbial community involved in reductive dissolution of arsenic from arsenate-laden minerals

○Seigo Amachi[1], Tomoyuki Hori[2], Shigeki Yamamura[3]
([1]Fac. Horticul., Chiba Univ., [2]AIST, [3]NIES)

Key words arsenic reduction, bioremediation, soil bacteria, microbial community

S3Fb03 *Pseudomonas* 属細菌のセレン・テルル代謝の解析と半導体ナノ粒子合成への応用

○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）
kuroda@see.eng.osaka-u.ac.jp

セレン・テルル等の第 16 族元素（カルコゲン）は，様々な金属と半導体性を示す化合物（カルコゲナイド半導体）を形成する性質を持つ．さらに，カルコゲナイド半導体はナノ粒子化することにより粒径に応じて異なる特性を示すため，カルコゲナイド半導体ナノ粒子を活用した高性能な太陽電池（$CuIn_xGa_{(1-x)}Se_2$, CdTe 等），量子ドット（CdSe 等），熱電素子（Bi_2Se_3，Bi_2Te_3 等）等の開発が進められている．しかし，これら材料の化学的な合成には，高温・高圧条件や有害な溶媒の利用が必須であり，製造時の環境負荷が高いという課題を抱えている．

一方，セレンは水相では主にセレン酸（SeO_4^{2-}）や亜セレン酸（SeO_3^{2-}）として存在しているが，これらは高い毒性を持つことから水環境の汚染物質としても知られており，我々の研究グループでは，細菌の代謝を活用してセレンを水相から除去・回収する技術の開発を進めてきた．この過程で我々が単離した細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I は，異化的・同化的代謝により，水相のセレンを水に不溶な元素態セレンや揮発性のセレン化メチル化合物にまで還元し，水から除去する高いセレン代謝活性を持つ．この NT-I 株の培養過程において，亜セレン酸およびニトリロ三酢酸によりキレート化したビスマス（III）イオンを共存させると，セレンとビスマス（III）は同調的に水相から除去されることを新たに見出した．沈殿物を透過型電子顕微鏡（TEM）により観察すると，細胞の周囲に粒径 10-50 nm の粒子が形成されており，エネルギー分散型 X 線分析（EDX）により，これらの粒子は Bi_2Se_3 に近似した元素組成を持つことが示されたことから，NT-I 株は Bi_2Se_3 ナノ粒子の合成に利用可能であることが明らかとなった．また，細菌代謝を利用した CdSe の合成を目指し，土壌から亜セレン酸とカドミウム（II）を含む培地を用いて集積培養することにより単離した細菌 *P. aeruginosa* RB は，NT-I 株と同様の高いセレン代謝活性に加えてカドミウム（II）耐性を持ち，亜セレン酸およびニトリロ三酢酸によりキレート化したカドミウム（II）を含む培地中で，セレンとカドミウム（II）を同調的に水相から除去した．SEM 観察により，細胞の表面または内部には粒径 10-20 nm の粒子，細胞外部には粒径約 100 nm の粒子が生成しており，EDX により，それらは CdSe であることが確認された．

これら細菌による半導体ナノ粒子合成は，環境負荷の低い新たな合成技術となり得ると期待される．本発表では，上記の取り組みに加えて，ナノ粒子の合成に関わると考えられる *Pseudomonas* 属細菌のセレン代謝機構についても紹介する．また，明らかになりつつある *Pseudomonas* 属細菌のテルル代謝についても紹介し，経験的に生物学的合成がより難しいテルル系半導体ナノ粒子合成の可能性についても論じたい．

Selenium and tellurium metabolism of *Pseudomonas* spp. and its application to semicondustor nanoparticle synthesis

○Masashi Kuroda[1], Satoshi Soda[2], Michihiko Ike[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Coll. Sci. Eng., Ritsumeikan Univ.)

Key words *Pseudomonas* sp., selenium, tellurium, semiconductor nanoparticle

S3Fb04 アンチモン酸還元細菌を用いた水中からのアンチモン除去・回収

○山村 茂樹[1], 飯田 千里[2], 小林 弥生[1], 天知 誠吾[2]
（[1]国立環境研, [2]千葉大院・園芸）
yshige@nies.go.jp

アンチモン(Sb)は，周期表上でヒ素と同じく 15 属に位置する半金属元素であり，レアメタルの 1 つとしても知られている．各種プラスチック・ゴムなどの難燃助剤として，OA 機器や家電，自動車など，数多くの身近な製品に利用されている他，ポリエステルの重合触媒，ガラス清澄剤など，幅広い産業分野で用いられている．また近年では，そのユニークな光電子化学的性質から，半導体やナノ電子機器材料としても注目されている．一方で，急性・慢性毒性を有する有害物質であることから，WHO の飲料水質ガイドラインで基準値（0.01 mg L^{-1}）が定められており，わが国でも水質環境基準の要監視項目として指針値（0.02 mg L^{-1}）が示されている．また，世界最大の Sb 産出国である中国では，鉱山や製錬所周辺の土壌や河川・湖沼の底泥より高濃度で検出されるなど，Sb による環境汚染も大きな問題となりつつある．さらに，北極圏やヒマラヤ氷床コア中の Sb 濃度が 1970 年代頃から急上昇しており，近年の人為利用によって，Sb が地球規模で拡散しているという指摘もある．現在，産業活動に伴って生じた Sb 廃水は，凝集沈殿法や吸着法などの物理化学的手法により処理されているが，概して高コストであり，また Sb に対する特異性も低い．特に Sb のほとんどを輸入に頼っている我が国では，低コストかつレアメタル資源として回収可能な廃水処理技術の開発が，喫緊の課題であると言える．

自然環境中での Sb の動態は不明な部分が多いが，ヒ素と同様に 5 価および 3 価の無機態[アンチモン酸：Sb(V)，亜アンチモン酸：Sb(III)]が主な存在形態であると考えられている．また，その形態変化には微生物の関わりが指摘されており，Sb(III)酸化細菌は，プロテオバクテリアを中心にこれまで 65 種程度が報告されている．一方，廃水処理という観点から，近年では，Sb(V)還元細菌に注目が集まりつつあり，これまでに 2 種が報告されている．これらの Sb(V)還元細菌は，水溶性の Sb(V)を還元し Sb_2O_3 様の沈殿を生成することが報告されているが，Sb_2O_3 は工業的需要の大部分を占めていることから，資源回収面からも有用と考えられている．しかし，単離例の少なさから，詳細な Sb 代謝並びに沈殿形成機構は，ほとんど明らかとなっていない．

本講演では，Sb(V)還元細菌に関する演者らの研究成果を紹介し，新たな資源回収型廃水処理技術の開発に向けた知見・情報を提供する．演者らの研究グループは最近，新たな Sb(V)還元細菌 SbR 株の単離に成功した．SbR 株は，5mM の Sb(V)を 4 日間でほぼ液相から除去するという，これまで報告されている 2 種に比べ，高い Sb(V)還元能力を持つことが明らかとなっている．還元に伴い，白色沈殿の生成が確認され，初期には Sb と O を主成分とするアモルファス様の沈殿物が見られたが，培養 14 日後にはほぼ全てが結晶化し，斜方晶の Sb_2O_3 鉱物であるバレンチナイトが形成された．また，SbR 株は，Sb(V)を嫌気呼吸の最終電子受容体として利用する異化的 Sb(V)還元細菌であることが強く示唆されている．ドラフトゲノム解析の結果からは，ヒ素耐性に関連する *ars* 遺伝子群は保持しているが，異化的 As(V)還元酵素遺伝子(*arr*)は確認されず，Sb(V)に特異的な未知の還元酵素の存在が示唆されている．

Removal and recovery of antimony from aqueous phase using a Sb(V)-reducing bacterium

○Shigeki Yamamura[1], Chisato Iida[2], Yayoi Kobayashi[1], Seigo Amachi[2]
([1]NIES, [2]Grad. Sch. Horticul., Chiba Univ.)

Key words antimonate reduction, antimony trioxide, anaerobic respiration, wastewater treatment

S3Gb01 デジタルとの融合による新たなバイオ戦略の取組み

○水無 渉
（三菱ケミカル株式会社）
mizunashi.wataru.mv@m-chemical.co.jp

国連は，2015 年に開催した「国連持続可能な開発サミット」において，持続可能な開発目標（SDGs）を掲げた．これは，「極度の貧困解消」と「持続可能な社会」の実現の二本柱であり，全ての国が達成する目標としている．
また，日本政府も第 5 期科学技術基本計画で，目指すべき国の姿として，①持続的な成長と地域社会の自律的発展，②国及び国民の安全・安心の確保と豊かで質の高い生活の実現，③地球規模課題への対応と世界の発展への貢献，④知の資産の持続的創出を上げている．そして，その実現のために新しい価値やサービスが次々と創出される「超スマート社会」を世界に先駆けて実現するための一連の取組みをさらに深化させつつ「Society5.0」として強力に推進するとしている．さらに，未来投資戦略 2017 では，健康寿命の延伸をはじめとした具体的な戦略分野を設定している．
このような目指すべき姿や戦略分野の中で，『循環型社会の実現』や『快適健康社会の実現（QOL の向上）』という社会的課題に対して，バイオテクノロジーは有効な解決手段の一つとなり得る．さらにこのような社会課題への取り組みは，国連が目標とする持続可能な開発目標（SDGs）の多くに合致するものである．
我が国は，伝統的な醸造・発酵技術を強みとして，医薬品事業（抗生物質，バイオ医薬品），食品関連事業（アミノ酸，有機酸）などで世界をリードしてきた．しかし，近年は，圧倒的な研究開発資金を投入する米国や国際規格等の仕組みで攻める欧米などに押されている状況が続いている．OECD は，2030 年の世界のバイオ市場は，GDP の 2.7%（約 200 兆円）に成長すると予測しており，この市場で競争力優位に立つことが，産業振興や雇用創出の観点からも重要である．
さらに，近年，著しい量のバイオ関連データが蓄積してきている．これは，遺伝子配列などのバイオデータを解析する次世代シーケンサー（遺伝子配列を高速で読み取る装置）などの技術革新により格段に解析コスト等が下がったことによる．しかしながらこれらのデータは分散・偏在化していたり，データ品質が不明確であったりするために十分使いこなされているとは言えない状況である．
現有する莫大なデータ及びこれから発生してくる膨大なデータ（ドライ：サイバー）とバイオテクノロジー（ウエット：フィジカル）を有効に繋ぐことにより，化学品，食品やその他の新機能材創出が，これまでにない期間，コスト，性能で開発できることが期待される．
この点について，単に技術論のみならず，産業化への仕組み（規制緩和，規制化，国際規格化，標準化，促進政策など）の観点から課題を整理して具体的な施策を提言・実行していくことが重要である．このような視点から産業競争力懇談会（COCN）の推進テーマとして，デジタルを融合したバイオ産業戦略を立上げ，化学，食品，電機，建設など様々な業界から 30 社を超える民間企業，多くの国研・大学に参集いただき，バイオとデジタルを融合したバイオ産業戦略の議論を行い，提言としてまとめた．
2017 年度報告書 http://www.cocn.jp/theme104-L.pdf
本シンポジウムでは，推進テーマでの議論や政策提言について紹介するとともに，具体的にバイオ素材及びバイオテクノロジーを用いて成長が期待される産業分野・領域を攻める方策について，課題とともに紹介して，議論をさせていただけたらと考えている．

Strategy of Bio-industry through the integration of digital technology

○Wataru Mizunashi
(Mitsubishi Chemical Corporation)

Key words biotechnology, big data, synthetic biology

S3Gb02 分子動力学シミュレーションを用いたタンパク質高機能化法の開発

○亀田 倫史, 池部 仁善
（産総研・人工知能）
kameda-tomoshi@aist.go.jp

蛋白質や核酸の機能を立体構造の観点から理解することは，理学としてのみならず，工学の観点からも重要である．X 線結晶解析，NMR，電子顕微鏡などの手法によって，生体高分子の立体構造が解かれており，それを元にした機能の理解が進んできた．一方で，それらの立体構造を元にした，分子シミュレーションを用いた研究は，あまり進んでこなかった．厳密にいえば，理学的な意味での生体高分子の機能解明に用いられる例はあっても，応用面，例えば，酵素と基質の相互作用様式の解明，酵素の機能改変，耐熱性設計など，蛋白質の高機能化に用いられることは，少なかったと思われる．
その原因は，これまでのスーパーコンピューターでは，計算機資源が乏しいため，分子の動きを調べるために十分な時間を取ることができず，多数の変異体の計算などを行うことができなかったことが大きいと考えられる．また，計算に用いるエネルギー関数の精度に問題がある可能性が指摘されてきた．
しかし，最新の研究によると，エネルギー関数の精度は十分高いことを示している．David Shaw らは，Anton という世界最速の計算機を開発し，それを用いて，12 個の蛋白質を変性構造から天然構造に巻き戻せることに成功しているし[1]，蛋白質と薬物分子を混ぜた状態からシミュレーションを行ったところ，正しい位置に薬物分子が結合することを示した[2]．つまり，エネルギー関数の精度には問題がなく，あとは計算資源さえ確保できれば，生体高分子の機能をシミュレーションから予言できる可能性を示したわけである．それを受けて，我々は，RNA 二重らせん構造の熱安定性（ΔG）をシミュレーションから求めたところ，計算値と実験値との相関が 0.98，絶対誤差が~0.55kcal/mol と，計算で得られる値は，実験で得られる値とほぼ同等の精度を持つことを示している[3]
本発表では，まずシミュレーションに関して，その手法と現状を概観する．その後に，これまで，我々が取り組んできた分子動力学シミュレーションを用いた研究を紹介する．最後に，現在取り組んでいる蛋白質の高機能化法の開発について紹介する．

[1] Kresten Lindorff-Larsen et al., Science 28 Oct 2011:334, 6055,517-520
[2]Shan Y et al., J.Am.Chem.Soc., 2011, 133 (24), pp 9181-9183
[3]Sakuraba S et al., J Phys Chem Lett (2015) Nov 5;6(21):4348-51

improvement of protein by molecular dynamics simulation

○Tomoshi Kameda, Jinzen Ikebe
(AIRC, AIST)

Key words molecular dynamics simulation, protein

S3Gb03 DNA 分子バーコード法を利用した長鎖 DNA 合成

○谷内江 望
（東大・先端研）
yachie@synbiol.rcast.u-tokyo.ac.jp

染色体のような巨大 DNA の合成を考える場合，DNA の化学合成には限界がある．合成長に従って累乗的にエラー蓄積されるため，どのように高度な精製過程を経たとしても，合成反応産物からの目的産物の単離はある DNA 長を超えた時点で不可能となる．したがって，化学合成された短鎖 DNA のアセンブリが鍵となり，これまでに試験管内アセンブリをはじめとして，大腸菌や酵母，枯草菌をもちいた様々な優れた手法が開発されてきた．より高性能の DNA アセンブリ手法の開発が重要である一方で，どのような DNA アセンブリ手法においても避けることができず，工程のボトルネックとなっているのが，アセンブリ産物のクローン化と評価である．DNA アセンブリ反応は当然完全でないため，アセンブリ反応産物中には，目的の分子とそうでないものが混在する．このため，通常はこれを大腸菌などの細胞に導入し，細胞クローンを得ることで各アセンブリ反応産物由来の DNA を複数単離し，それぞれを DNA シークエンシングなどによって評価することによって，目的のクローンを得るというプロセスが必要となる．長鎖 DNA やリピート配列などアセンブリ効率の高くない反応については，特に多くのクローンの単離と評価が求められる．これまでに我々の研究チームでは，高効率に DNA をアセンブリする手法，アセンブリ反応産物のクローン化を経ずに目的の DNA アセンブリ産物を得る手法を DNA 分子バーコード法，長鎖 DNA シークエンシングとゲノム編集を組み合わせて開発してきた．本会ではこれらの成果について紹介する．

Long DNA synthesis using DNA barcodes

○Nozomu Yachie
(RCAST, Univ. Tokyo)

Key words DNA barcode, DNA synthesis, genome editing

S3Gb04 スマートセル創出プラットフォームに資するメタボローム解析技術の開発

○蓮沼 誠久
（神戸大院・科技イノベ）
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

次世代シーケンサーの開発，分析装置の高解像度・高感度化，遺伝子・タンパク質配列解析等の情報解析技術の進展により，バイオ関連データ（ゲノム配列情報，遺伝子発現情報，タンパク質情報，代謝物情報，生体機能に関わる各種情報等）が爆発的に増加している．他方，ゲノム編集や DNA 合成に代表される遺伝子工学ツールに革新が起こり，バイオ操作を自動で行うラボオートメーションが実装されつつある．そこで，ビッグデータから抽出した有用情報を活用し，先端的な遺伝子工学で生物代謝を改変する「Engineering Biology」の社会実装が世界的に進んでいる．

我が国では，サイバー空間とフィジカル空間が高度に融合した「超スマート社会」を未来の姿として共有し，これを世界に先駆けて実現するための取り組みを「Society 5.0」として強力な推進をかけている．バイオモノづくり分野では爆発的に増加するバイオデータ（サイバー）とバイオテクノロジー（フィジカル）を有効に繋ぐことにより，化学品，食品，その他の新機能材の創出がこれまでにない期間，コスト，性能で開発できることが期待されている．このような背景の下，2016 年度から NEDO「植物等を用いた高機能品生産技術の開発（スマートセルプロジェクト）」が実施されている．「高度に機能がデザインされ，機能の発現が制御された生物細胞」をスマートセルと定義し，スマートセルを用いた次世代産業「スマートセルインダストリー」の構築が推進されている．

微生物は代謝系の中で多くの化合物を作り出すことができることから，その機能を最大限活用することで，高効率な物質製造プロセスを構築することができる．しかしながら，細胞の代謝システムは複雑に制御されており，従来の手法では生産性の向上に限界があった．代謝フラックスを改変する意図をもって代謝系酵素の遺伝子導入を試みても，内性の調節機構に阻まれ，目論見通りに代謝改変を実現できる例は多くない．代謝工学では，過去の知見に基づいて，遺伝子の発現量を変化させて代謝経路を改変するが，研究者の知識は効果的な代謝改変の戦略構築に必ずしも十分でなく，成功例は限定的である．すわなち，試行錯誤の要素が大きく，物質生産技術の開発に時間がかかり，期待する生産を実現できないケースも多かった．

スマートセルプロジェクトでは生産性の高い微生物を短期間で育種するための高度な情報解析技術や計測技術と先進バイオ技術の統合，最適な自動化を目指し，これまでに開発してきたエッジ要素技術（バイオインフォマティクスによる代謝経路設計技術・分子動力学シミュレーション・遺伝子発現ネットワーク解析技術・遺伝子配列設計技術，長鎖 DNA 合成技術，マルチターゲットゲノム編集技術，動的メタボローム解析，定量ターゲットプロテオーム解析等）を有機的に連携させた独自の Design/Build/Test/Learn（DBTL）システムとして「スマートセル創出プラットフォーム」の開発に取り組んでいる．

Test では，メタボロミクスを中心に，多様な微生物に対して大量のオミクスデータセットを精度良く，高い再現性で提供する計測技術の開発に取り組んでいる．メタボロミクスは，細胞内の代謝物蓄積量をスナップショット的に俯瞰できる技術として有効であるが，安定同位体炭素を用いた *in vivo* ^{13}C 標識技術を組合せることにより，化合物のターンオーバーも観測することが可能となり，代謝物の蓄積量と動的変動（時間変化）を同時に俯瞰することが可能になる．これにより，細胞内における炭素原子の分配が分かり，代謝経路中のボトルネック反応の特定が進んでいる．

一方，高度な情報解析技術を有効に活用するためには，大規模で多様性に富んだデータセットを体系的に取得する必要がある．しかしながら，現状のメタボローム解析は必ずしもハイスループットとは言えない．また，スループットを優先してデータの精度を落とすこともできない．高精度かつハイスループットなメタボローム解析技術の開発は，微生物育種戦略の立案に要する時間を短縮し，代謝メカニズムを反映した現実性の高いスマートセルの設計図の構築に寄与することが期待されている．本講演ではスマートセル創出プラットフォームに資するメタボローム解析の課題と展望について述べたい．

Development of metabolome analysis technology contributing to smart cell creation platform

○Tomohisa Hasunuma
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words metabolic analysis, microorganisms, metabolic engineering

S3Gb05 スマートセル開発を加速する AI の開発に向けた取組み

○武田 志津[1], 伊藤 潔人[1], 荒木 通啓[2]
（[1]日立・研究開発, [2]京大院・医）
shizu.takeda.me@hitachi.com

スマートセルの開発は，医療，食品，環境，エネルギー等の分野における物質生産に変革をもたらし，バイオエコノミーの活性化や地球規模で懸念される各種課題を解決可能な技術として注目されている．特に，バイオ計測技術の飛躍的な発展にともなうゲノム情報の解読やオミックス解析により膨大なデータが蓄積してきているが，これらのバイオビッグデータを活用して革新的な物質生産技術を確立する動きが活発化している．こうしたバイオビッグデータの更なる活用によりスマートセルの開発を加速するため，近年急速に進歩した人工知能（AI）技術に期待が寄せられている．

従来，合成バイオ分野の研究者は自らの実験により取得したデータと，論文や各種データベースなどの外部情報を統合的に解釈し，物質生産に資する遺伝子組み換え生物を設計してきた．生物学として一般的な情報取得・解析には，バイオインフォマティクスツールが活用できるが，スマートセル開発においては特有の課題とニーズに応える AI の開発が望まれる．すなわち，生物のゲノム改変とそれにともなう物質生産性の関係性を示すデータを収集し，それを基に生物ゲノムの設計を高効率で最適化する AI の開発が，合成バイオ分野では求められる．スマートセル開発の将来像においては，研究者の知識や経験だけに依存せず，AI が有用なデータを網羅的に集約して知識基盤として体系化し，それを活用して研究者がスマートセルを効率的に設計する，または，設計自体を AI が行うことが望まれる．これによりスマートセルの開発がこれまで以上に加速され低コスト化することが期待できる．

しかし，現状のスマートセル開発においては，AI 技術が十分に浸透しているとは言い難い．その理由として，これまで整理・蓄積されたデータは，バイオ研究者向けのデータが中心であり，AI 技術のために適切に整理されているとは言えないからである．AI の主要な構成要素である機械学習は，与えられた入力に対し，適切な出力を返すように，事例毎に集められた大量のデータを用いて学習させる必要がある．一方，バイオ分野では，一見して文献等で大量のデータが蓄積されているようにみられるが，その実態としては少数データの事例の集合体である．そのため，AI 技術一般に直接的には適用し難い状況にある．

更に，実課題において AI 技術を活用するためには，「コンディション(条件のデータ)」「アクション(制御可能なデータ)」「アウトカム（目的のデータ）」という 3 種類のデータを人間が定義することが重要である．すなわち，AI は，接続されたシステム(細胞内の代謝系などから生産プロセス全体まで，広義のシステム）に対して，アウトカムを高めるため，コンディションにあわせ，どんなアクションをとればよいか，自動的に判断するアルゴリズムといえる．スマートセルの創製においては，アウトカムは物質生産量最大化であるが，そのためのコンディションやアクションのデータとしては，菌株，人工遺伝子，遺伝子発現情報，菌体密度などの実験結果，培地組成や温度などの培養条件など多岐に渡る．コンディション・アクションは，それぞれが膨大な自由度を持つことに加え，それらの組み合わせは無数に考えられる．したがって，これらのデータを適切に整理して AI 技術を適用しなければ，有意なアウトカムを達成することは困難である．

こうした点を踏まえると，スマートセル開発において AI 技術を活用するために，バイオとデジタルの融合領域の重要性がますます高まると考えられる．すなわち，スマートセル開発における DBTL(設計: Design－合成: Build－計測: Test－学習: Learn）サイクル全体を俯瞰しながら，適切にアクション・コンディションを見極めて AI 技術を適用する必要がある．個々のデータの本質を理解したうえで，バイオビッグデータを適切に整理，活用することにより，所望の物質を高効率に合成するスマートセルを，AI による自律的な最適化で設計し開発することが期待される．

本講演では，バイオとデジタルを高度に融合させスマートセル開発を飛躍的に加速することをめざし，スマートセル開発に資する AI 基盤技術について述べる．特に，合成バイオに特有のデータ活用などの観点からその必要とする機能等を中心に議論する．

Towards the development of AI to accelerate smart cell development

○Shizu Takeda[1], Kiyoto Ito[1], Michihiro Araki[2]
([1]R&D Gr., Hitachi, [2]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

Key words biosynthesis, smart cell, AI

S3Hb01 物質生産宿主・麹菌で自在にかつ無限に遺伝子を改変する～ゲノム編集技術の進展

○丸山 潤一
（東大院・農生科・応生工）
amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の伝統的醸造産業に使用されてきた糸状菌であり，酵素生産や組換えによる異種有用タンパク質生産に用いられている．最近になり，麹菌は天然物，特に糸状菌由来の 2 次代謝産物の異種生産に利用されるようになってきている．この利点として，宿主である麹菌が 2 次代謝産物をほとんど生産しないため，異種 2 次代謝産物の生産が検出されやすく，しかも生産性が高いことが挙げられる．

一方で，産業的に必要とされる生産性を実現するには複数の遺伝子の機能を改変する必要がある．たとえば，生産する 2 次代謝産物の種類に応じて宿主の代謝フラックスを設計し，複数の経路を同一の株で改変するのはもちろんのこと，糸状菌では有性生殖や無性生殖のような分化についても代謝に大きく影響するものとして考慮する必要がある．しかし，使用可能な形質転換マーカーを増やすのは限界があり，他に生産能が優れた株が存在した場合に，これを対象に多重の遺伝子改変を行うのは容易ではない．

我々は，麹菌を用いた物質生産での自由自在な遺伝子改変を可能とするため，CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術を確立した[1)]．CRISPR/Cas9 システムはヌクレアーゼである Cas9 とガイド RNA を利用して，ゲノム上の任意の部位に対し変異を導入する方法である．ゲノム編集のなかでも，低コストで簡便な技術として特に注目され，動物・植物など多くの生物において劇的な遺伝子改変効率の改善をもたらすことで次世代の育種技術として注目を集めている．我々はゲノム編集用プラスミドを自律複製型にすることにより，麹菌の様々な株において 50~100%の高い変異導入効率を得ることに成功した[2)]．そして，多重遺伝子改変を同一の株を繰り返し行うことを目的として，自律複製型ゲノム編集用プラスミドのリサイクリング技術を確立した[2)]．具体的には，一度形質転換したゲノム編集用プラスミドを脱落させるため，過剰発現により生育阻害を示す転写因子 AoAce2 を使用し，誘導性のプロモーター制御下で発現するようにした．その結果，ゲノム編集用プラスミドの脱落に成功し，このプラスミドの導入・脱落の操作を繰り返すことにより多重変異導入を可能とした．

さらに，ゲノム編集用プラスミドとともにドナー DNA を同時に導入することで，標的の遺伝子を破壊するノックアウト，標的とする遺伝子座に DNA 断片を導入するノックインをほぼ 100%の効率で行うことに成功した．ここで標的とする遺伝子座には形質転換マーカーを導入しないノックアウト・ノックインであるため，ゲノム編集用プラスミドをリサイクリングすることにより，遺伝子破壊や遺伝子導入を繰り返すことが可能になった．

以上のように，ゲノム編集技術を発展させることで，麹菌の様々な株を対象として自由自在な遺伝子改変が効率よくかつ無限にできるようになった．これまで遺伝的に扱いやすい大腸菌や酵母を中心に代謝経路の大規模な改変が行われてきたが，今後は，高効率のゲノム編集技術により麹菌においても代謝工学が異種 2 次代謝産物の高生産に適用されることが期待される．

1) Katayama *et al.* (2016) Biotechnol. Lett. 38, 637-642.
2) 片山琢也ら，2017 年日本農芸化学会大会，2C18p06.

Genome editing technology enables a versatile gene modification in *Aspergillus oryzae* as a microbial production host

○Jun-ichi Maruyama
(Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

Key words *Aspergillus oryzae*, genome editing, microbial production, natural product

S3Hb02 大規模な代謝経路をデザインすることへの挑戦

○柘植 謙爾
（神戸大院・科技イノベ）
ktsuge@port.kobe-u.ac.jp

ゲノム DNA をデザインすることで，有用物質の生産を環境負荷が少なく低コストに行う，あるいは今まで生産することが困難な物質や新規物質の生産を行うことは，遺伝子工学，あるいは代謝工学の究極の目標と言える．90 年代に始まるゲノムプロジェクトにより，ゲノム中に存在する遺伝子（そしてその裏返しとして，存在しない遺伝子）が明確に定義されることにより，生物の代謝経路を成り立たせるのに必要な遺伝子回路の全体像を俯瞰できるようになった．これにより，有用物質生産に対して宿主生物が持ち合わせていない遺伝子回路を足すということや，生産量増大に対しインパクトの大きい遺伝子（いわゆる鍵遺伝子）を破壊あるいは増強するといった，ピンポイントの改変が可能となった．特に近年の次世代シーケンサー，メタボローム，プロテオームといったいわゆるオミクス解析技術の急速な発達により，全体を俯瞰しピンポイントに改変する手法は広く一般に行われるところとなっており，現時点では最も現実的な方法と言える．一方，この手法で到達される結果に満足せず，さらなる効率的な生産を目指す将来技術を考えた場合，ゲノムレベルの大規模な遺伝子回路のデザインし構築することは主要な方向性であることは間違いないであろう．
00 年代後半により米国ベンター研究所で行われたマイコプラズマを題材とした一連のゲノム合成実験，即ち化学合成ゲノムからの複製可能な生物の創生，それに続く最小のゲノムを持つ生物の人工的な創出は，ゲノム DNA が遺伝子回路として完全な形にプログラムされているのであれば，それを人工的に構築し，起動させることが可能であることを示した．この例では，細胞分裂ができるかどうかと，そのスピード（すなわち増殖速度）に主眼が置かれており，物質生産という観点では議論されていないが，ここで得られた知見が物質生産に応用されることは間違いない．
このような世界情勢の中，演者らはゲノムレベルの大規模な遺伝子回路デザインによる物質生産の重要性を早期に認識し，まずこれを実現するために不可欠な長鎖 DNA を自在に構築する技術の開発を行ってきた．枯草菌のプラスミド形質転換系を利用した多数遺伝子断片の集積技術である OGAB 法は，一度に 15 個程度の遺伝子断片を指定した順序や向きに連結することが可能で，これにより長鎖 DNA 構築に道を開いた．さらにこれを高度化した第二世代 OGAB 法により，50 個以上の DNA 断片を一度連結することを可能とし，100 kb までの長鎖 DNA を自在に構築する技術を開発した．さらにこれを自動的に行うトータルシステムを開発し，長鎖 DNA をハイスループットに構築する環境を整えた．本システムを利用することで，多様な遺伝子回路構築可能となった．初めは，抗生物質生産遺伝子群，色素生産遺伝子群などといった，二次代謝経路の遺伝子回路をデザインし構築した．その後一次代謝経路遺伝子群についても遺伝子回路をデザインし構築した．特に，ここでは，多数の遺伝子を協調的に働かせる仕組みとして人工オペロンをデザインした．これらの代謝経路ごとに設計した人工オペロンを組み合わせることにより，数十個の遺伝子からなる大規模な遺伝子回路をデザインし，大腸菌に導入すること増殖速度や生産量を指標にこれらのオペロンのパフォーマンスを評価してきた．当日は，演者らの大規模代謝経路のデザインと構築技術の現状について紹介し，本技術の今後の活用方法について議論したい．

An attempt of designing for large-scale metabolic pathway

○Kenji Tsuge
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words genome design, metabolic engineering, synthetic biology

S3Hb03 芳香族化合物合成プラットホームの開発～芳香族モノマー合成に理想的な大腸菌代謝デザイン～

○野田 修平, 白井 智量, 近藤 昭彦
（理研・環境資源）
shuhei.noda@riken.jp

近年，地球温暖化や化石資源の枯渇への対策など，持続可能な社会の構築に向けて取り組むべき様々な事柄が社会問題となっている．2015 年に COP21 で締結されたパリ協定では，2030 年度までに空気中の二酸化炭素の 26%（2013 年度比）を削減することが求められており，低炭素循環型社会の構築はこれまで以上にその必要性が求められている．化石資源への依存から脱し，環境負荷の少ない社会を構築するため，バイオマスや二酸化炭素などの再生可能資源を原料に用いた微生物プロセスの開発は重点的に取り組むべき研究分野であるといえる．ブタノール等の燃料生産，生分解性プラスチック原料生産に関する研究が行われている一方，発表者らのグループは現状その生産を石油資源に依存している芳香族化合物やその誘導体の生産に注目した．そして，様々な芳香族化合物やその誘導体を高生産量，高収率で生産可能な汎用性のあるプラットホーム株の創製を試みた．
微生物で芳香族化合物を生産する際，いくつかの芳香族化合物が生成する最終反応においてピルビン酸の放出を伴う．本プラットホームにおいては大腸菌を宿主に用い，芳香族化合物生産の最終反応においてピルビン酸を放出するという特徴を最大限生かすための代謝改変を行った．7 種類の化合物において，単純に経路を導入した株と比較して生産量，収率をそれぞれ 5～50 倍程度，大幅に引き上げることに成功した[1]．また，このプラットホームで生産可能な化合物である 3－ヒドロキシ安息香酸を起点とし，放線菌の芳香環形成経路と芳香族化合物分解菌の芳香環分解経路を組み合わせることにより，これまで微生物を用いての生産報告の例がないマレイン酸の微生物生産に成功した[2]．

1) Noda S, et al., *Metab Eng*, 2016. 33,119-29.
2) Noda S, et al., *Nat Commun*, 2017. 8, 1153-1165.

Microbial platform to produce aromatic chemicals and the derivatives

○Shuhei Noda, Tomokazu Shirai, Akihiko Kondo
(CSRS, RIKEN)

Key words *Escherichia coli*, aromatic chemicals, dicarboxylic acids, pyruvate

S3Hb04 物質生産宿主としての酵母の代謝経路改変とゲノム改変に向けた合成生物工学的手法開発

○石井 純
（神戸大院・科技イノベ）
junjun@port.kobe-u.ac.jp

酵母は，生物学のモデルとして生化学，遺伝学，分子生物学，システム生物学など多岐にわたる学問分野の発展に大きく貢献してきた．また，古くはルイ・パストゥール氏によるアルコール発酵菌としての発見から始まり，ビールやワインなどの醸造やバイオエタノール生産など産業界においても広く研究が行われている．さらに，酵母は Yeast Two-Hybrid（Y2H）法による蛋白質間相互作用解析や遺伝子発現解析などのゲノムワイドな解析データに加え，遺伝子破壊株・過剰発現株などのライブラリーセットを用いた網羅的な表現型解析データも豊富で，遺伝子・蛋白質レベルでのダイナミクスや制御ネットワークの解明をめざすシステム生物学も盛んに行われている．こうしたモデル生物としての研究を背景として，酵母は遺伝情報を操作するための様々なツールが開発されてきた．たとえば，アミノ酸や核酸の生合成を利用した選択マーカーが充実しており，自律複製型のプラスミドを利用できるため遺伝子発現を容易に行うことができる．さらに，相同組換え能が高いことから遺伝子破壊や遺伝子挿入等のゲノムの書き換えも自在に行うことが可能である．このように，酵母は大腸菌などの微生物とともに複雑な遺伝子組換えが可能な宿主の 1 つであり，とりわけ真核生物の中では生育が早く最も扱いに優れた宿主である．
近年の代謝工学の発展により，エタノール以外にもプラスチックや繊維などの生産に必要となるモノマー原料を微生物で大量に生産させるための代謝改変の研究が活発化しており，こうした代謝工学の研究は大腸菌などの原核生物を宿主とした研究が盛んである．しかし，商業化に向けた大規模スケールでの発酵生産では様々な障壁が存在し，なかなか実用化にまで至らないのが現状である．そのため，pH 耐性が強い（コンタミネーションに強い），ストレス耐性に強い（バイオマス加水分解物に含まれる発酵阻害物などに強い），溶菌しにくく繰返し発酵が容易，バイオエタノール生産におけるプラントやノウハウが転用可能，などの利点をもつ酵母の利用が産業応用上，大きく期待されている．こうした背景から，我々はエタノール以外の化学品原料を酵母で生産させることを目的として，工学的な観点から細胞代謝のエンジニアリングや大規模遺伝子改変に向けた手法，合成生物学的なツールなどの開発を行っており，その取組みを紹介する．

Metabolic pathway engineering of yeast as a chemical production host and developing synthetic bioengineering approaches for genome modifications

○Jun Ishii
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words synthetic biology, metabolic engineering, *Saccharomyces cerevisiae*, chemical production

S3Hb05 大腸菌中心炭素代謝システムの動力学モデル開発と有用物質生産の合理的設計

○倉田 博之
（九工大）
kurata@bio.kyutech.ac.jp

バイオ燃料や医薬品の代謝中間体を含む有用物質を効率的に生産する微生物細胞の合理的設計（細胞工場，スマートセル）が注目されている．増殖が速く，遺伝子組換が容易な大腸菌は，細胞工場の最も有望な微生物である．一般に，有用物質生産は，酸素制限下で行われることから，（1）目的物質の生産能力を遺伝子レベルから合理的に設計するために，遺伝子組換株の代謝変化を予測できる数学モデル，（2）溶存酸素濃度の変化が細胞代謝に与える影響を理解し，発酵性能を評価することができる数学モデルが必要である．そのような観点から，我々は，細胞全代謝モデルの構築を目指し，大腸菌の中心炭素代謝ネットワークの動力学モデルを開発している．
最初に，大腸菌の中心炭素代謝反応系ネットワークマップを構築した．解糖系，ペントースリン酸経路，TCA 回路，糖新生経路，補充反応，グリオキシル酸回路，呼吸鎖を含む大規模なシステムである．細胞の比増殖速度は ATP 比生成速度の関数として表した．溶存酸素（ＤＯ）濃度やグルコース等の基質濃度変化に応答し，代謝酵素活性を調節する ArcA/B，Fnr，Crp， Cra を含む 6 種類の転写因子を導入した．回分培養と連続培養のモデルを構築した．微分方程式で記述した数学モデルの動力学パラメータは，制約条件付遺伝的アルゴリズムを用いて推定した．シミュレーションは，東京大学ヒューマンゲノムセンターのスーパコンピュータを用いて行った．
動力学モデルが遺伝子組換え株の実験データを再現できることを調べるために，野生株，*pykF* ノックアウト突然変異株（Δ*pykF*），*pgi* ノックアウト突然変異株（Δ*pgi*），*ppc* ノックアウト突然変異株（Δ*ppc*）の回分培養におけるシミュレーション結果を，細胞濃度，細胞外グルコース濃度，酢酸濃度に関する実験データと比較した．Pyk は解糖系の最終ステップで PEP を PYR に変換し，Pgi は解糖系の最初のステップで G6P を F6P に変換し，Ppc は PEP を OAA に変換する補充反応を触媒する．細胞内の代謝物濃度，酵素濃度，代謝流束（酵素の反応速度）の時間変化をシミュレーションした結果，動力学モデルは，回分培養における *pgi* 欠損株， *ppc* 欠損株， *pyk* 欠損株の代謝流束分布，連続培養における 18 の遺伝子欠損株の代謝流束分布を正確に再現した．
開発した数学モデルを用いて，DO 濃度が変化した場合の野生株の発酵生成物パターンの変化をシミュレーションした．DO 濃度が高い好気条件のとき，酢酸が主な生成物であった．オーバーフローよばれるこの代謝変化は，増殖速度の速い大腸菌においてよく見られる．DO 濃度が減少する微好気条件においては，ギ酸，乳酸，エタノール，コハク酸濃度が増加した．嫌気条件では乳酸濃度が減少した．好気，微好気，嫌気培養条件のシミュレーション結果は，実験データと一致した．数学モデルは，遺伝子変異株 *arcA* 欠損株，*fnr* 欠損株の発酵物質生産の DO による変化を正確に再現した．最後に，好気条件と嫌気条件を組合せた 2 段培養において，乳酸生産を最大化する遺伝子組換株を設計した．代謝調節メカニズムを組み込んだ中心炭素代謝反応モデルは，細胞工場設計のコアモデルとして，細胞を遺伝子レベルから合理的に設計する基盤を与える．大腸菌の中心代謝システムの動力学モデルは，特殊な個別モデルではなく，ほかの細菌，酵母，マウス，ヒト等へ拡張できる標準モデル，あるいはテンプレートモデルである．中心代謝は，炭素，酸素，窒素，リンなどの基質を取込み，エネルギーと物質の変換を行う主たるシステムであり，すべての生物間で非常によく保存されている．代謝標準モデルの開発は，医薬品中間代謝物の生産性向上，病原菌を含む微生物間の共生関係の研究，ヒトの代謝に係る疾病研究に貢献する．
バイオインフォマティクス，システム生物学，合成生物学の発展によって，数学モデリングは生物学の方法論として確立しつつある．細胞内で起こる複雑な反応系の仕組みや機能を思考実験（頭の中でイメージすること）で理解することには限界がある．振動系や双安定性を頭の中で正確にシミュレーションできる研究者はほとんどいないであろう．研究者ごとに思考実験結果が異なることはしばしばである．数学モデリングは，生体分子ネットワークを正確に定義し，シミュレーション結果を視覚化することによって，複雑な生物のメカニズムや機能に関して研究者間で共通の理解を与えることができる．コンピュータシミュレーションによって，環境条件や遺伝的条件の変化に対するシステム挙動の変化を予測できれば，仮説を作ったり，生物実験を計画したりする作業を効率化できる．

Development of the kinetic model of *Escherichia coli* central carbon metabolism toward rational design of microbial cell factories

○Hiroyuki Kurata
(Kyushu Inst. Technol.)

Key words kinetics, mathematical model, metabolic engineering

S3Kb01 バイオテクノロジーが拓くバイオエコノミー－新たなバイオ戦略について－

○上村 昌博
（経済産業省生物化学産業課）
uemura-masahiro@meti.go.jp

バイオテクノロジーは，健康医療の分野はもとより，環境・エネルギー，ものづくり，食品など，様々なバイオ産業分野で利用されている．経済協力開発機構(OECD)の報告によれば，2030 年には，OECD 加盟国におけるバイオ関連産業の市場規模が約 1.6 兆ドルに達すると予測しており，その内訳は，健康関連分野が 25%，工業関連分野が 39%，農業関連分野が 36%を占めるとしている．OECD では，このバイオテクノロジーが貢献する市場（産業群）に対して“バイオエコノミー”という概念を提唱しており，炭素循環社会の実現を含めた持続可能な開発目標（SDGs）の達成に向けて，世界的にバイオエコノミーの潮流への期待が醸成されつつある．

近年，DNA シークエンシグ技術やゲノム編集技術等，バイオ分野の基盤技術の革新が進み，極めて簡便かつ低コスト，短時間で生物のゲノムを解読し，またそのゲノムを編集することが可能になってきた．実際に，2005 年以降のわずか 7 年間で，単位解読塩基長当たりの DNA 解読コストは 1 万分の 1 に低下している．今日では，ヒトのゲノムがわずか 1 日，1000 ドルで解読できるほどで，生物に由来するゲノム配列等の塩基配列情報が短時間で大量に取得することが可能となり，そのデジタル化された生物情報が急速に蓄積されつつある．また，生物情報解析にディープラーニング等の AI 技術を積極的に活用する試みもなされてきており，蓄積された膨大なバイオビッグデータ等を解析するための情報解析技術も成熟しつつある．さらに，ゲノム編集技術においても，CRISPR-Cas9 による次世代ゲノム編集技術が開発されたことで，従来技術の 1/100 以下のコストで短時間に狙ったゲノム部位を標的とした正確なゲノム編集が可能となった．また，細胞に新たな機能を付与する上で必要な安価でハイスループットな長鎖 DNA 合成技術の開発も急速に進んでいる．

こうした技術革新を受けて，現在，我が国では，バイオとデジタル技術の融合により「スマートセルインダストリー」の実現に向けた取組みを推進している．スマートセルとは，特定の機能や性質を高度に発揮するようデザインされた“賢い”生物細胞のことであり，これを，(1) 生物の情報を網羅的に取得，(2) 取得した情報を解析し，自在に生物機能をデザイン，(3) 設計した生物機能をゲノム改変等により発現させるといった一連の合成生物学的アプローチにより創成することが可能になりつつある．またこのプロセスを繰り返し，生物機能をファインチューニングすることにより，得たい機能を発現する上で最適な生物細胞を，これまでにないスピードで改変，取得することも可能になってきている．また，他の生物種が持つ有用機能を栽培，培養が容易な生物種に導入し，有用物質等を容易に生産できるポテンシャルも示されている．これらの技術革新の波及効果が及ぶ範囲は，医療・健康，物質生産，エネルギー・環境，農畜水産分野など多岐にわたり，バイオとデジタルの融合による技術革新は，今後ものづくり産業の構造を大きく変える可能を秘めている．

欧米各国は，既にバイオエコノミーに関する戦略を検討，発表し，重点的な取り組みを開始している．昨年，我が国でも，政府の成長戦略である「未来投資戦略 2017」（2017 年 6 月 9 日に閣議決定）において，「バイオ・マテリアル革命」として，「生物を活用した機能性物質生産のための産学官による技術開発を推進するとともに，革新的なバイオ素材等による炭素循環型社会や食による健康増進・未病社会の実現等に向け，本年度中を目途に我が国のバイオ産業の新たな市場形成を目指した戦略を策定し，制度整備も含めた総合的な施策を推進する.」ことが盛り込まれた．これを受け，同年 10 月 12 日に，内閣府の総合科学技術・イノベーション会議において， 政策討議「バイオ戦略策定に向けて」（バイオテクロジーによるイノベーションを促進する上での課題及び戦略策定について）が開催され，バイオ戦略検討ワーキンググループが設置される等，内閣府の下，民間有識者らや関係省庁が一丸となって新たな戦略策定に向けた検討が鋭意進められている．バイオテクノロジーによるイノベーションがもたらす新たな経済社会像（ビジョン）とバイオ産業の在り方， そのビジョンを実現するための研究開発促進のための環境整備（産学官連携，人材育成，ベンチャー振興， 知的財産， 国際協力等）， 各分野で重点的に取り組むべき研究開発課題， 産業化促進のための課題を提示する新たなバイオ戦略を，今後取り纏めていくこととしている．

本講演では，バイオ技術とデジタル技術の融合によって実現される「スマートセル」による新たな産業創出の可能性や，その実現の加速に向けた新バイオ戦略の検討状況ならびに今後の政策展開についてお話したい．

New Biotechnology Policy for a Sustainable Bioeconomy

○Masahiro Uemura
(Director of Bio-Industry Division, Ministry of Economy, Trade and Industry (METI))

Key words Bioeconomy, Biotechnology, Bio-digital, Smart cell industry

S3Kb02 生物工学を通じたイノベーションの創出と地域貢献の可能性

○仲嶋 翼
（三菱UFJリサーチ&コンサルティング）
tsubasa.nakajima@murc.jp

バイオテクノロジーの進展により，生物資源の機能をこれまでよりも自由にデザインできる時代が訪れている．既に実験室では当たり前となったこの変化も，今後は社会への実装に向けて加速していくものと考えられる．バイオ分野のこのような大きな変化は，産業構造を大きく変える契機となることも予想され，実際に，社会におけるバイオ分野の捉え方が近年大きく変わってきている．欧米では 2000 年代よりバイオ分野の経済産業的広がりを「バイオエコノミー」として考える動きがみられ，以来，バイオ分野の取組を政策的に推進する気運は高まりを保っている．各国ではバイオ分野における国家戦略等を策定し，自国産業の振興と持続可能な社会構築を見据えて戦略的な取組を進めているところである．我が国においても，成長戦略（未来投資戦略 2017）にて，バイオ産業の新たな市場形成を目指す戦略を策定することが示され，現在，省庁横断的な議論を経て取りまとめ作業が進められているものと思われる（2018 年 4 月現在）．今後は我が国でも，政府を挙げてバイオ分野の取組を活性化し，技術開発の深化や，制度の整備等も伴いながら技術の社会実装が推進されていくものと期待される．

一方，近年我が国の政策では「地方創生」が重要なキーワードとなっている．地方創生とは，総人口の減少と首都圏への人口一極集中が進むなかで，「地方」を活性化し多様な地域からなる我が国の活力を維持していくことを目指す取組である．2014 年より安部政権により重要課題として掲げられ，「まち」，「ひと」，「しごと」の観点から地域の活性化を目指す施策パッケージが積極的に推進されてきた．そのなかで，地域の稼ぐ力の向上を目指して，ローカル・イノベーションを後押しし産業を振興する施策が展開されている．先に述べたバイオ産業の変化は，このような地域の取組とも親和性が高く，地方創生に対しても貢献するポテンシャルが大きいものと考えられる．

我が国は周囲を海に囲まれた島国であり，多様な気候・風土に恵まれた土地柄から，各地に様々な生物資源が存在している．このような地域固有の生物資源を活用することや，地域産業の歴史的経緯を基にして，地域の様々なステークホルダーが協働してバイオ産業の振興に取り組む事例が見られるようになっている．例えば，作物が持つ機能性の検証，作物・製品の品質・供給量の安定化，育種・改良による高機能化，有用物質の生産，環境浄化・資源回収，廃棄物の有効利用などを目指す取組が多数進められているが，これらは地域の課題を解決しつつ新たな事業・産業として育成が図られうるものである．各地で進められている事業は，産学連携による研究プロジェクト，地域への技術の実証・実装事業や，産業集積を目指す産業クラスターの形成事業など，様々な形態・規模感で取組が進められている．また，明確に地方創生の取組として，国からの交付金も活用してバイオ関連プロジェクトを推進する地方自治体も多くみられる．しかしながら，バイオ産業が多様な産業分野を包含していることや，省庁間をまたぐ政策分野であることもあり，これまでの地域での取組について，全体を俯瞰した整理は十分になされていない．

今後，さらに地域におけるバイオ分野の取組が活発化すると考えられるなか，これまでの各地での取組内容や，その成否のポイント，課題点を整理しておくことは有用と考えられる．バイオ産業は地域に根差す一次産業や製造業，消費者等多様な関係者が関わるものである．新しい技術についての正確な理解をもとに，より価値のある事業を構想し，制度面の対応や社会とのコミュニケーションも進めながら事業が進められるべきものであろう．本発表では，これまでの取組を整理し直すことで，付加価値の高い地域発の事業・産業を創出するためのポイントや，今後どのような展開が期待されるかについてご紹介したい．

Potential of regional contribution through innovations with biotechnology

○Tsubasa Nakajima
(Mitsubishi UFJ Research and Consulting)

Key words bioindustry, bioeconomy, industrial development

S3Kb03 さまざまな生物資源から単離された微生物の活用

○櫻谷 英治
（徳島大・生物資源）
sakuradani.eiji@tokushima-u.ac.jp

我々は，さまざまな生物資源から微生物を単離し，カルチャーストックとしてだけでなく，微生物スクリーニングへと利用している．土壌や河川だから単離するだけでなく，キノコ，植物病原菌，海洋性微生物，海洋生物共生菌なども収集した．ここでは，主に「廃グリセロールを利用した微生物油脂生産の可能性」と「徳島大学ブランドのクラフトビール開発」について紹介する．
廃グリセロールは，バイオディーゼル燃料（脂肪酸メチルエステル）の製造過程で副産物として廃油の 10-20％程度生成される．副産物としての廃グリセロールには，グリセロールだけでなく，メタノールやアルカリ触媒塩，廃植物油由来の脂肪酸などが含まれる．多くのバイオディーゼル燃料施設では副産物としての廃グリセロールを産業廃棄物として処理しており，焼却による二酸化炭素の発生が問題となっている．一方，この初期廃グリセロールを堆肥に混ぜることで発酵熱を上げ植物病原菌や雑草種の殺菌に利用した例が報告されている．また，廃グリセロールを微生物培養の炭素源として，1,3-プロパンジオールやバクテリアセルロースの生産に応用した例も報告されている．初期廃グリセロールには微生物の生育阻害物質が含まれているため，多くの微生物は生育することができない．我々は，京都市廃食用油燃料化施設より分譲された初期廃グリセロールで生育可能な糸状菌を単離し，微生物油脂生産への研究を行ってきた．4％の初期廃グリセロールを含む培地で単離株を培養すると培養 4 日目にはグリセロールが完全に消費される．これら微生物油脂は一般的な植物油脂と同様の脂肪酸組成を示し，オレイン酸やリノール酸が多く含まれている．また，単離株の中には，水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸を生産するものも見いだしている．これら脂肪酸誘導体は，ポリマー原料へと変換される可能性が期待される．
日本でもクラフトビールの人気は高く，多種多様な味わい・香りのクラフトビールがつくられている．200 社程度のクラフトビールメーカーが独自の商品を販売している．一般的に飲まれているラガービールではなく，エールビールが多くつくられているのも特徴といえる．多くのクラフトビールメーカーは市販のビール酵母を利用して醸造を行っている．そこで，我々は，徳島県の花や果実の生物資源から酵母を単離し，エタノール生産性，凝集性，同定などにより候補株を選抜し，試験醸造することで特徴的な味わいのあるビールの製造を行ったので紹介する．

Utilization of microorganisms isolated from various biological resources

○Eiji Sakuradani
(Fac. Biosci. Bioind., Tokushima Univ.)

Key words microorganisms, crude glycerol, craft beer

S3Kb04 地域発！世界へはばたく事業の創出～科学技術の「種」を地域で育てる～

○髙橋 修一郎
（リバネス）
takahashi@lne.st

株式会社リバネスは，理科離れやポスドク問題を背景に 2002 年に理系大学院生 15 名によって設立された．現在では，修士号または博士号を取得した社員 76 名で構成されており，その半分以上が博士号取得者である．
科学教育により次世代の科学人材を育成する教育応援事業から，民間企業による研究費の設立を行うなどの研究応援事業，企業・大学で研修の企画や人材獲得の支援を行う人材応援事業，そして研究成果の社会実装を支援する創業応援事業を展開している．
研究成果の事業化を狙う創業応援事業では，2013 年より研究成果を社会に還元したいという意欲的な個人・ベンチャー企業の発掘から育成までを行う TECH PLANTER（テックプランター）と呼ばれる取り組みを実施している．IT 分野のようにオンライン上で完結せず，事業化まで時間のかかるものづくり要素のある課題解決型の技術シーズに対しては，企業支援環境が乏しいのが現状である．そこでテックプランターでは，ビジネスプランコンテスト形式のイベントを開催し，イベントの前後でリバネスのコミュニケータによるプランのブラッシュアップやプレゼンテーションのサポートだけでなく，実用化目線での共同研究の提案や投資の機会創出，事業会社とのパートナーシップ締結なども行っている．対象となる技術領域は，ものづくりの要素が介在し，かつ，社会課題の解決の原動力となるような領域とし，テックプランター本大会として「ものづくり」「アグリ」「バイオ」「海洋」といった 4 つの分野のグランプリを東京で開催している．
一方，新産業の種を見つけてそれを育成することは，大都市に限らず日本国内外の地域にとっても重要である．リバネスでは地方大学に眠る技術シーズを発掘し，自治体，地方銀行，産業界などが一体となってネットワークを形成し，これを支援することでチャンスを見出そうとしている．2016 年から熊本，滋賀，徳島でテックプランターを開催し，2017 年には熊本，滋賀，徳島に加えて沖縄，茨城，宮崎でも地域テックプランターに取り組んできた．最も取り組みの進んでいる熊本テックプランターでは，2016 年 2 月に熊本県と肥後銀行，熊本産業連合会と共に熊本県における次世代ベンチャーの発掘と育成に向けた連携協定を締結し，コンソーシアムを構築してエントリーチームへの創業支援を行ってきた．2 年間の取り組みを通じて，合計 55 チーム（企業 22 チーム，研究者・学生 33 チーム）のエントリーがあり，この中から熊大発ベンチャー 3 社を含むベンチャー 6 社の起業，8 社が委託事業や出資・融資などを通じて合計 3 億 4271 万円の資金調達を実現している．
今回の講演では，これらの地域での取り組みを紹介し，地域に眠る技術シーズをいかにして育て，地方発の事業として社会実装を行い，世界へ広げるのかをご紹介いたします．地方の事業創出に向けて，どのような事業エコシステムが成り立っていくのか，闊達な議論につながれば幸いです．

Creation of a new business for the world - development of "seeds" of science and technology in local region -

○Shuichirou Takahashi
(Leave a nest Co., Ltd.)

Key words marine technology, biotechnology, manufacturing technology, agricultural technology

S3Lb01 細胞シートを基盤とした機能的立体組織構築の現状と展望

○清水 達也
（東京女子医科大学 先端生命医科学研究所）
shimizu.tatsuya@twmu.ac.jp

ティッシュエンジニアリングの技術を用いて生体外で細胞から構築した組織を基礎研究あるいは創薬モデルとして使用したり，病変部に移植する再生医療が追究されている．世界的には細胞の足場として生体吸収性の高分子を用い，その生体吸収性支持体に細胞を播種・培養して 3 次元組織を構築する技術が一般に用いられている．さらに，3 Dプリンターの技術を利用し，細胞を少量のマトリクス成分とともにひとつずつ設計通りに並べて組織を作ろうとする試みも盛んに行われている（バイオプリンティング）．一方，当研究所では 2 次元の細胞集団である「細胞シート」を積層化し 3 次元的な組織を作製するという独自の手法を展開してきた．細胞シートの回収には「温度応答性培養皿」を用い，温度降下処理（32℃以下）により細胞が培養皿表面からシート状が脱着する．既に細胞シート治療を実現すると共に，細胞シートを積層化することで高細胞密度の三次元組織の作製が可能である．このように様々の技術により 3 次元組織の構築は可能となるなか，より複雑で機能的な組織の構築においては十分な血管網の付与による酸素・栄養の供給，老廃物の除去，さらに生体外における培養環境をどこまで生体内の環境に近づけることができるかが課題となっている．我々は血管構成細胞との共培養，細胞シートの段階的積層化さらに生体同様の環境を実現する種々のバイオリアクターの開発により生体外において培地灌流可能な血管網を有した収縮弛緩可能な立体心筋組織の構築を実現してきた．機能的立体組織構築のこれまでの研究成果を紹介するとともに組織から臓器作製に向けた研究開発を展望する．

Recent advances in cell sheet-based functional tissue and organ engineering.

○Tatsuya Shimizu
(Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University)

Key words cell sheet, heart, vascularization, organ engineering

S3Lb02 3 次元組織モデルの足りていること，足りていないこと

○松崎 典弥 [1,2]
（[1]阪大院・工, [2]JST-さきがけ）
m-matsus@chem.eng.osaka-u.ac.jp

医療・創薬研究において，動物愛護や 3R（Replacement（代替），Reduction（削減），Refinement（改善））の観点から実験動物代替法が盛んに研究されている．期待されているのが，ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から分化誘導して得られる様々な正常および疾患細胞である．特に，患者由来 iPS 細胞から分化誘導した疾患細胞は，ヒトと動物の種差の課題を解決し，候補化合物の薬効や毒性を評価できると期待されている．しかし，生体組織は複数種類の細胞で構成され，種々の細胞が相互作用することで組織としての機能を発現しているため，細胞単体では生体組織と同じ薬剤応答が得られない場合がある．そこで，生体組織を構成する様々な細胞とタンパク質を 3 次元で統合し，生体組織類似の機能を有する 3 次元組織を構築できれば，生体組織に近い薬効・毒性応答が得られると期待される．
3 次元組織構築に関する国際競争は激化している．米国では，国防高等研究計画局（DARPA）と国立衛生研究所（NIH）の巨額の研究費が投じられ，動物実験に代わるヒト細胞の「Organ on a chip」を用いた医薬品評価を実現するプロジェクトが進行している．また，欧州連合（EU）では，第 7 次フレームワークプログラム（FP7）にて「The Body-on-a-chip」プロジェクトが開始されている．iPS 細胞で優位に立った日本がそのリードを維持して激しい国際競争に勝つためには，普遍性の高い 3 次元組織モデルの開発が急務である．
これまで，スフェロイドに代表される様々な in vitro3 次元組織モデルが報告されてきた．それぞれ多種多様であるが，共通して言えることは，モデルとして完全に満足いくものはできていないことである．本講演では，何が足りていて何が足りないのか議論し，3 次元組織モデルの今後の方向性を考えたい．

Satisfaction and Unsatisfaction of 3D-Tissue Models

○Michiya Matsusaki[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]JST-PRESTO)

Key words tissue engineering, 3D culture, animal alternative, toxicity

S3Lb03 細胞製造性について考える

○紀ノ岡 正博
（阪工大院・工）
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

再生医療に資する細胞製造において，製品を安価に安定して製造することが必須であり，大量の製品を製造する技術（スケールアップ）と患者固有の製品を製造する技術（スケールアウト）の概念構築が，製造安定性につながるものと考えている．特に，スケールアップにおいては，細胞増幅させる上工程技術の重要性はもちろんのこと，細胞を分離・精製，梱包・凍結する下工程技術が律速段階であることが明らかとなってきた．一方，スケールアウト技術においては，3D プリンティングなど一品ものつくりに欠かせない技術が発展してきている．本講では，細胞製造を行うにあたって，我々は，細胞製造性(Cell manufacturability)を提唱している．細胞製造性は，「最低限のコストと最大限の信頼性にて比較的簡易に製造がおこなわれること」を意味する．ここで，「信頼性」は，前もって設計されたプロダクトの品質レベルに達するように細胞加工の安全性や安定性を含んでいる．ここでは，細胞特性を加味した，スケールアップにおける問題点，コストに対する考え方，スケールアウトの技術動向について，最新の情報を取り入れながら紹介し，今後の展開について示したい．

Cell Manufacturability

○Masahiro Kino-oka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol.)

Key words cell manufacurability, cell proecssing, automation, regenerative medicine

S3Lb04 血管を含む立体組織をつくるアプローチ

○福田 淳二
（横国大院・工）
fukuda@ynu.ac.jp

複雑な構造を有する組織・臓器を生体外で構築するために，これまで様々なアプローチが報告されてきたが，有望な方法の 1 つは，細胞の自己組織化を利用するオルガノイド培養法である．複数の細胞種や培養液，細胞外マトリックスの組成などを適切に設定することで，生体の発生プロセスを部分的に模倣し，少なくとも発生初期の立体的な構造を作り出すことに成功している．例えば，iPS 細胞由来の肝前駆細胞と血管内皮細胞，間葉系幹細胞をゲル中に包埋すると血管ネットワークを備えた肝原基が作製できることが報告されている (T. Takebe, et al., Nature, 2013)．肝以外にも，幹細胞を適切な成長因子を含むゲルに包埋することで，肺，腎，脳，眼杯，腸オルガノイドの誘導も実現されている (T. Takebe, et al., Cell Stem Cell, 2015)．さらには，患者由来の腫瘍組織からがんオルガノイドを作り出し，抗がん剤の創薬スクリーニングに利用するアプローチも考案されている (J. Kondo, et al., PNAS, 2011)．ただし，これらの組織は生体に類似した複雑な構造を部分的に有しているものの，生体の組織・臓器が cm スケールであるのに対して，それよりも 1，2 桁小さいサイズに留まっており，さらなる工夫が必要である．

我々の研究グループでは，単純なスフェロイドの培養から細胞の自己組織化を利用した組織構築，さらにスケールアップのための血管構造の導入技術の開発に取り組んできた．特に，作製する組織のサイズ，培養器内での酸素濃度分布，組織形成に要する時間などが構成細胞の遺伝子発現や機能に重大な影響を及ぼすと考え，微細加工技術などを用いてこれらを制御できる組織培養デバイスを開発してきた．具体的には，酸素透過性の高いシリコーンゴム（PDMS）を利用してマイクロウェルアレイ培養器を作製した．この培養器では，肝細胞や膵 β 細胞が粒径の均一なスフェロイドを形成し，細胞間相互作用，細胞の立体的な構造に加え，酸素供給の改善により高い代謝機能を発現することを示した (T. Anada, et al., Biomaterials, 2012)．さらに，同様のマイクロウェルアレイ培養器を用いて，毛髪の再生医療にも取り組んでいる．毛髪を生み出す毛包は，発生期に毛包原基と呼ばれる特殊な構造を形成し，形態形成が進行する．毛包原基は，上皮系細胞と間葉系細胞の集合体が結合した構造を有し，異種および同種細胞間の相互作用により形態形成のスイッチが入ると考えられている．我々は，上皮系細胞と間葉系細胞を混合した細胞懸濁液をスフェロイド培養器に播種すると，培養 1 日目は 2 種類の細胞がランダムに分布したスフェロイドを形成するものの，培養 3 日目までにそれぞれの細胞が自発的に分離し，毛包原基様の構造を形成する現象を発見した (T. Kageyama, et al., Biomaterials, 2018)．この毛包原基は，ヌードマウスに移植すると効率的に毛包を再生し，毛幹が伸長した．また，規則的な毛周期も観察された．ここにさらに血管内皮細胞を混合したところ，間葉系細胞の集塊内に血管ネットワーク構造が自発的に形成されること，マウスに移植すると再生される毛幹の本数が血管内皮細胞を加えない場合と比較して多くなることが示された．このことは，血管内皮細胞を加えることで，移植後に生体の血管との結合により生着率が向上し，毛包形成が促進されたことを示唆しており，自己組織化を利用した組織再生法と考えている．

さらに大きな肝組織，膵組織，毛包を含む皮膚組織を生体外で構築するためには，組織全体に酸素・栄養素を供給することが不可欠であり，ポンプに接続できるような血管構造を導入した組織構築法が必要である．しかも，酸素枯渇の生じる数十分の時間内で血管構造を構築し送液を開始する方法が必要である．我々は，電気化学的に素早く細胞を培養表面から脱離させる方法を考案し，これを血管構造の構築に応用してきた（T. Osaki, et al., PLoS ONE, 2015, Y. Kang, et al., Acta Biomaterialia, 2015）．すなわち，金電極表面にオリゴペプチド分子層を形成し，これを介して細胞を接着させ，電気化学反応によってこのオリゴペプチド層を脱離させることで細胞も脱離させるという方法である．これをニードル表面に応用することで，血管内皮細胞に覆われた流路構造を素早くかつ規則的に導入する手法を考案した．この血管構造の周囲に iPS 細胞由来の肝細胞スフェロイドを導入しておくことで，血管構造を有する肝組織が作製できる可能性を示した．細胞源，分化誘導の方法，生体との接続など，未だに解決すべき課題は多くあるものの，送液可能な血管構造を備えた複雑組織の作製法として有用であると思われる．

Engineering vascularized three-dimensional thick tissues

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

Key words tissue engineering

S3Lb05 3D バイオプリンティング

○境 慎司
（阪大院・基礎工）
sakai@cheng.es.osaka-u.ac.jp

3D バイオプリンティングは，細胞そのものや，生体材料などから，最終的には創薬や再生医療に利用可能な生体の組織と類似の機能を持った組織体を作り出すことを目的とする技術である．近年，急速に発展を続けている一方で，チャレンジされなければならない課題も多く存在する．本講演では，3D バイオプリンティングを用いた複雑組織製造に必要な課題などを自身の研究を絡めながら紹介し，今後の当該技術の可能性や方向性を議論したい．

3D bioprinting

○Shinji Sakai
(Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

Key words tissue engineering

S3Mb01 ストレス耐性や寿命延長におけるメチオニン代謝の役割

○水沼 正樹
（広島大院・先端物質）
mmizu49120@hiroshima-u.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いて，健康的に老いる“健康寿命”の延長は喫緊の課題である．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．カロリー制限は生活習慣病など老化に伴う疾患の予防や遅延効果のみならずモデル生物では寿命延長も認められ，科学的根拠に基づいたアンチエイジング法である．モデル生物で保存された寿命制御経路として，TORC1(Target of Rapamycin Complex 1)や AMP 依存性プロテインキナーゼ(AMPK)経路が著名である．

また，加齢に伴う生体機能調節機構の低下-とりわけ代謝恒常性維持の破綻は，生活習慣病など多様な病態発現を惹起する．近年，α-ケトグルタル酸や硫化水素(H_2S)などの代謝産物が TORC1 を阻害し寿命が延長したことから，代謝産物が関与する寿命制御機構が注目されている．

私達は，Ca^{2+}恒常性維持機構の解明のため，出芽酵母を用いて解析を行なってきた．その過程で，メチオニン代謝系酵素の *S*-アデノシルホモシステイン(SAH)水解酵素をコードしている *SAH1*(必須遺伝子)における変異株を取得した．興味深いことに，*sah1* 変異株は顕著に短命となり，かつテロメア長の短縮も観察された．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，野生株よりも寿命が延長した変異株の取得に成功した(優性変異株を *SSG1* と命名)．*SSG1* 変異は *sah1* 変異株が示すテロメア長の短縮も抑圧した．そこで，*SSG1* 変異株の長寿メカニズムを解析したところ，*SSG1* 変異株では *S*-アデノシルメチオニン(SAM)合成が促進され，酵母 AMPK である Snf1 の高活性が観察された．また，SAM 合成酵素過剰発現株においても Snf1 が活性化され，*SSG1* 変異株と同様，寿命延長には Snf1 が重要であった．以上のように，SAM 合成促進及び関連するシグナル伝達経路の活性が寿命延長を導く重要な発見をした．

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．最近の研究から，清酒酵母では，*SSG1* が SAM 高蓄積の一要因であることが判明した．また，実験室酵母では *SSG1* 変異を持つと酸化ストレスや高温ストレスに対して耐性を獲得したことから，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．即ち，メチオニン代謝は寿命やストレス応答制御に重要な役割を果たすことが示唆された．そこで，このメカニズムを詳細に明らかにすることを目的に，*SSG1* の機能解明に取り組んだ．

本シンポジウムでは，メチオニン代謝及び関連するシグナル伝達による寿命やストレス耐性メカニズム，さらには *SSG1* 自身の機能について紹介したい．また，酵母の生き様(基礎的研究)の解析から，清酒酵母の SAM 高蓄積の意義及びアルコール生産能力向上などの応用研究への展開についても議論したい．

Role of methionine metabolism in stress tolerance and lifespan extension

○Masaki Mizunuma
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words yeast, metabolism, stress response

S3Mb02 細胞表層の傷による出芽酵母の運命決定

○河野 恵子, 森山 陽介
（沖縄科技大院・膜生物）
keiko.kono@oist.jp

酵母は醸造を始めとする様々なプロセスの中で環境ストレスを受け，その結果として細胞膜や細胞壁に微小な傷を受ける．このような傷を修復する細胞創傷治癒は進化的に保存された機構だが，その全貌を俯瞰するには至っていない．本研究では出芽酵母実験室株を用いて細胞創傷治癒機構に関与する遺伝子の網羅的同定を行った．その結果，これらの遺伝子群は(1)損傷直後に緊急避難的修復を行う因子，(2)細胞周期停止を誘導する因子，(3)細胞周期停止後に本格的修復を行う因子，(4)修復完了後に増殖を再開させる因子，に分類できた．このような解析の過程で，酵母は傷の程度に応じて増殖の可逆的停止，不可逆的停止，死といった異なる運命をたどることが明らかになってきた．これらの分子機構に関する最新の知見を報告するとともに，「傷の程度」という連続的な変化が「酵母の運命決定」という all-or-none の事象に変換されるしくみを考察する．

Cell surface damage determines yeast's cell fate

○Keiko Kono, Yohsuke Moriyama
(Membranology Unit, OIST)

Key words stress response, *Saccharomyces cerevisiae*, membrane lipids, cell wall

S3Mb03 糸状菌の菌糸生長の分子機構

○竹下 典男
（筑波大院・生命環境）
takeshita.norio.gf@u.tsukuba.ac.jp

糸状菌は，菌糸と呼ばれる管状の細胞の先端を伸ばして生育する．菌糸の先端を伸ばす際に，多種多様な分解酵素を菌体外に分泌することで環境中の有機物を分解し，栄養を吸収し増殖する．分解者として重要な役割を果たし，生態系の物質循環に必要である．古くからコウジカビのように伝統的な醗酵食品の生産に利用され，近年では有用酵素生産などバイオ産業で利用されている．一方で，動植物細胞に侵入し病原性を示すものもおり，医学・農業分野で大きな問題となっている．このような糸状菌の有用性と病原性は，菌糸による生長様式と密接に関連している．糸状菌を特徴付ける菌糸生長の分子機構が，最新の蛍光イメージング技術により明らかになってきたので，紹介したい．

菌糸の先端生長に必要な膜とタンパク質は，分泌小胞の輸送とエキソサイトーシス（分泌小胞と形質膜との融合）により菌糸先端に供給される．分泌小胞の輸送には，微小管とアクチン細胞骨格，そしてそれらに対応したモータータンパク質が，中心的な役割を担っている．微小管は，その配置から菌糸後方から先端に向かう長距離の輸送に利用され，対照的にアクチンケーブルは菌糸先端の形質膜近傍にのみ局在し，菌糸先端でのエキソサイトーシスに関わる．また，極性マーカーと呼ばれるタンパク質が，菌糸先端に局在し，菌糸の伸長方向を制御する．糸状菌が真っ直ぐに伸長する微小管の特性を利用して，位置情報を菌糸先端の極性マーカーに伝達し，菌糸の伸長方向を制御するという機構が示されている．

糸状菌の高い酵素分泌能は，菌糸先端での活発なエキソサイトーシスに依存する．エキソサイトーシスによって菌糸先端の形質膜に新たな膜が大量に供給されるにもかかわらず，膜結合性の極性マーカーが拡散せずに極性部位に維持される機構を，超解像顕微鏡を用いた解析で見出した．その結果，約 2 マイクロメートルの幅の菌糸先端で，極性マーカーの一時的な集合（120 ナノメートル）と形質膜上での拡散, それに伴う形質膜の局所的な伸長が観察された．この結果は，微小管に依存した極性マーカーの集合 （極性部位の確立）と，アクチンケーブルに依存したエキソサイトーシスが交互に繰り返して起こる機構を示唆している．

実際に，菌糸の生長速度が一定ではなく，早い時と遅い時を繰り返していることが判明した．そして，菌糸が先端を伸ばす際，菌糸先端でのアクチンの重合・脱重合とエキソサイトーシス活性が周期的（約 20-30 秒間隔）に変化することが明らかになった．さらに，細胞内への Ca^{2+}の流入も周期的に変化し，これらを同調させて制御していることが示唆された．このような時空間的に制御された細胞生長の生物学的意義として，環境シグナルに素早く応答し，菌糸生長の速度や方向を制御することで，糸状菌にとってより良い環境を選択し生長するという利点が考えられる．

Molecular mechanism of hyphal tip growth in filamentous fungi

○Norio Takeshita
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words fungus, calcium, cell membrane, cell morphology

S3Mb04 グルコースによる麹菌アミラーゼ生産の抑制機構

○田中 瑞己
（静県大・食栄）
mizuki.tanaka@u-shizuoka-ken.ac.jp

麹菌 *Aspergillus oryzae* は，アミラーゼを高生産する糸状菌であり，日本酒・醤油・味噌などの醸造に用いられている．麹菌のアミラーゼの生産は，マルトースが菌体内に取り込まれることで誘導されるが，グルコースが存在するとカーボンカタボライト抑制（CCR）によりアミラーゼ遺伝子の発現が強く抑制される．糸状菌の CCR は転写因子 CreA によって制御されるが，他の制御因子としてユビキチンプロテアーゼ複合体を形成する CreB と CreC，そしてユビキチンリガーゼのアダプターとして機能すると推定される CreD が同定されている．麹菌の *creA* と *creB* を二重破壊することでアミラーゼやキシラナーゼの生産量が野生株の 5 倍以上に増加することから (1, 2)，CCR の解除は酵素タンパク質の生産量増加の手段として非常に有効である．しかし，糸状菌における CCR 制御の詳細な分子機構についてはほとんど明らかとなっていないのが現状である．本発表では，我々が最近明らかとした局在変化に伴う CreA の分解機構とグルコース誘導性のマルトーストランスポーターの分解機構，そして，それらにおける CreB, CreC, CreD の関与について紹介する．

1. 局在変化に伴う CreA の分解機構

モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において，CCR の制御因子としてユビキチン化および脱ユビキチン化に関わると推定される因子が同定されたことから，ユビキチン化依存的な CreA 分解機構の存在が長年提唱されていた．しかし，CreA の分解についてはこれまでほとんど解析がされておらず，積極的な CreA 分解機構の有無は明らかとなっていなかった．また，出芽酵母においては，CCR を制御する転写因子 Mig1 がグルコース存在下では核内に局在し，グルコース欠乏条件では核内から細胞質に排出される．そこで我々は，麹菌において炭素源が CreA の細胞内局在と安定性に与える影響について解析を行った (3)．麹菌において GFP 融合 CreA の細胞内局在を調べた結果，グルコース存在条件では核内に局在したのに対し，マルトース存在条件下では核内の蛍光が消失した．さらに，CreA タンパク質の安定性を調べたところ，グルコース存在条件下と比較してマルトース存在条件下では半減期が著しく短くなっており，CreA が不安定化することが示された．また，CreA の核外への排出を阻害することで CreA が安定化したことから，CCR 非誘導条件では CreA が核内から細胞質に排出されて速やかに分解されることが示唆された．さらに，C 末端近傍の 20 アミノ酸を欠失させることで CreA が著しく安定化したことから，この領域が CreA の分解に重要であることが示唆された．また，*creB* や *creC* を破壊することで細胞内の CreA 存在量が著しく減少したことから，CreB と CreC が直接的あるいは間接的に細胞内 CreA 存在量の制御に関わっていることが示唆された．一方で，*creD* を破壊しても CreA の安定性は変化しなかったことから，CreD は CreA の分解に関与していないことが示唆された．

2. グルコース誘導性のマルトーストランスポーター分解機構

トランスポーターをはじめとする細胞膜上のタンパク質は，外部環境の変化に応じて発現量が厳密に制御されている．麹菌においては，CCR を誘導するグルコースやマンノースが存在すると，アミラーゼ遺伝子の発現誘導基質であるマルトースを取り込むトランスポーター (MalP) がエンドサイトーシス依存的に細胞膜から液胞に輸送されて分解されることが明らかになった (4)．この MalP の分解が，ユビキチンリガーゼ HulA（出芽酵母 Rsp5 のオーソログ）の発現抑制と *creD* の破壊により抑制され，HulA と CreD が相互作用していたことから，CreD は MalP と HulA のアダプターとして働くことで MalP のエンドサイトーシスに関与していることが示された (5)．また，CreD は CCR 誘導条件で速やかに脱リン酸化されることが明らかになったが，CreD への脱リン酸化変異および擬リン酸化変異導入は HulA との相互作用と MalP のエンドサイトーシスに大きな影響は与えなかった．一方で，*creB* を破壊すると CCR が解除されるが，*creB* 破壊株において *creD* の破壊または擬リン酸化変異導入を行うと CCR の解除が抑制されることが明らかになった．さらに，*creB* 破壊株に CreD の非リン酸化変異を導入したところ，アミラーゼの生産が促進された (5)．以上の結果から，CreD は MalP エンドシトーシスと CCR の両方の制御に関与しており，CreD の非リン酸化変異導入と他の CCR 制御因子の破壊を組み合わせることで酵素タンパク質の高生産化が可能となることが示された．

(1) Ichinose, Tanaka et al. 2014, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
(2) Ichinose et al. 2018, *J. Biosci. Bioeng.*
(3) Tanaka et al. Conditional acceptance, *Mol. Microbiol.*
(4) Hiramoto, Tanaka et al. 2015, *Fungal Genet. Biol.*
(5) Tanaka et al. 2017, *Appl. Environ. Microbiol.*

Glucose repression of *Aspergillus oryzae* amylase production

○Mizuki Tanaka
(Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka.)

Key words *Aspergillus oryzae*, gene expression, amylase gene, transporter

S3Mb05 清酒酵母のリンゴ酸高生産株に見出した遺伝子変異と代謝変化

○根来 宏明, 小高 敦史, 松村 憲吾, 堤 浩子, 秦 洋二
（月桂冠・総研）
negoro@gekkeikan.co.jp

1 リンゴ酸を高生産する清酒酵母

清酒の香味には，アルコール，糖，有機酸，アミノ酸，エステルといった非常に多くの成分が関与している．このうち，味わいに影響する有機酸としてコハク酸，リンゴ酸，乳酸，クエン酸などが挙げられる．中でもリンゴ酸はさわやかな酸味を持ち，酸味に特徴をもたせた清酒を造る場合はリンゴ酸含有量を高くすると好ましい味となるため，これまでにリンゴ酸を高生産する清酒酵母が数多く育種・利用されてきた．一方で，高生産する機構については未解明な点が残されており，表現型に寄与する変異遺伝子は同定されていなかった．そのため，リンゴ酸高生産酵母を新たに取得したい場合には，生化学的な機構を把握しないまま，表現型のみを指標として育種を行っているのが現状であった．そこで，いくつかのリンゴ酸高生産酵母について変異遺伝子の同定を試み，どのような代謝の変化が起こっているか解析を行った．

2 GID 複合体関連遺伝子の変異によるリンゴ酸生産能の上昇

きょうかい酵母 K-901 を親株として，リンゴ酸高生産株 K-901H を取得した．全ゲノム比較解析により原因となる遺伝子の特定に取り組んだ結果，*VID24* 遺伝子のヘテロ接合型ミスセンス変異が K-901H のリンゴ酸高生産に寄与していることが分かった．Vid24 は GID（Glucose Induced degradation Deficient）複合体の構成要素であり，GID 複合体はグルコースの存在に応答して糖新生酵素を分解する役割を持つ．糖新生酵素が代謝の変化に影響していると推察して検討を進めると，Mdh2（細胞質局在リンゴ酸デヒドロゲナーゼ）がリンゴ酸高生産に関与することが明らかになった．これより，K-901H は Vid24 機能欠損のため Mdh2 が細胞質に蓄積し，オキサロ酢酸をリンゴ酸に変換する経路が促進されたと推察した．

3 ペルオキシン関連遺伝子の変異によるリンゴ酸生産能の上昇

きょうかい酵母 K-701 を親株として，リンゴ酸高生産株 F-701H を取得した．先と同様に全ゲノム比較解析による解析を行うと，F-701H では *PEX22* 遺伝子にホモ接合型ナンセンス変異が導入されたため，リンゴ酸高生産となったと判明した．Pex22 はペルオキシソームの恒常性に関与するペルオキシンの一つである．Pex22 を含む数種のペルオキシンは，ペルオキシソーム内へタンパク質を輸送する役割を持つ．この輸送システムを担うペルオキシンの欠損株を用いるといずれの株でもリンゴ酸生産能が上昇したことから，ペルオキシソーム局在タンパク質の関与が示唆された．解析を進めると，F-701H 株では Mdh3（ペルオキシソーム局在リンゴ酸デヒドロゲナーゼ）がペルオキシソームへ輸送されなくなり，細胞質へ局在が変化することでリンゴ酸高生産となったことが分かった．

4 清酒もろみにおけるリンゴ酸の生成

清酒醸造においてリンゴ酸デヒドロゲナーゼがリンゴ酸生産に関わることは過去の報告からも示唆されていたが，本研究はリンゴ酸デヒドロゲナーゼ制御因子の変異が高生産に寄与するという機構を初めて明らかにした．嫌気的な環境である清酒もろみにおいては，リンゴ酸は酵母の細胞質でオキサロ酢酸からの還元的経路により生成すると報告されており，我々の提唱する機構と合致している．具体的な変異遺伝子を同定したことで，酵母の有機酸生成に対する理解をより深めることができたであろう．

また，得られた知見を利用して，*VID24* 変異の接合型を指標とする新たなリンゴ酸高生産酵母の育種法を構築した．非遺伝子組換えによってリンゴ酸生産能が更に上昇した株を取得し，実際の生産現場にて清酒の酸味をコントロールするための有効なツールとして役立っている．ゲノム解析を元に産まれた酵母が発酵タンクの中で活動していると思うと，少し不思議な感覚である．

The identification of gene mutations and its effect on metabolism in high malate-producing sake yeasts

○Hiroaki Negoro, Atsushi Kotaka, Kengo Matsumura, Hiroko Tsutsumi, Yoji Hata
(Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, malic acid, GID complex, peroxin

S3Mb06 NAD$^+$-依存性デアセチラーゼ欠損を中心とした解糖系の代謝リプログラミング

○増本 博司[1], 松山 茂[2]
（[1]長崎大・医, [2]筑波大院・生命環境）
himasumo@nagasaki-u.ac.jp

解糖系は糖代謝の中心に位置し，その代謝中間産物はクエン酸回路，発酵経路，ペントースリン酸経路などの二次代謝経路に供給され，細胞内エネルギー通貨であるアデノシン三リン酸(ATP)，核酸，アミノ酸，脂質の合成に利用される．細胞／生体の生命維持に必須である解糖系は，炭素源の供給量あるいはその種類の変化に柔軟に対応し，中間代謝産物の供給量を一定に保っている．解糖系の制御機構を人工的にコントロールすることは，解糖系およびその二次代謝経路の代謝産物量を制御できることを意味している．
出芽酵母はその優れた発酵能力により古来より様々な発酵食品の製造に利用されてきた．また遺伝子改変が容易であることから，真核単細胞生物のモデル生物として細胞周期制御機構，DNA 損傷修復や染色体 DNA 複製などの核機能機構の研究などの基礎研究へ貢献するだけでなく，発酵経路を含め解糖系の活性が高いことから代謝物の生産プラットフォームとして，製薬やバイオエネルギーの産生生物としても利用されている．
NAD$^+$ -依存性デアセチラーゼ （通称サーテュイン） は原核生物から真核生物にいたるまで広く保存されている．その細胞内機能は，エネルギー代謝，DNA 損傷修復，クロマチン構造形成，遺伝子サイレンシングおよび細胞の寿命と幅広く関与している．クロマチンタンパクであるヒストン分子を中心としたタンパクの脱アセチル化反応に関与し，その脱アセチル化反応には NAD$^+$を補酵素として利用する．出芽酵母内には老化制御因子として知られる Sir2 と，Sir2 のホモログである Hst1/2/3/4 の計 5 種類のサーテュインが知られている．出芽酵母サーテュインのうち Sir2, Hst3 および Hst4 の三種類はエネルギー代謝に関与している．相補的に機能する Hst3 および Hst4 は解糖系に関与しており，その二重遺伝子欠損は解糖系のほぼ逆反応である糖新生経路の亢進を引き起こし，解糖系の代謝産物量を著しく増加させる．sir2 遺伝子欠損も糖新生経路の亢進を引き起こすことが知られている．
我々はサーテュイン欠損 (*hst3 hst4 sir2*)による糖新生経路の異常な活性化が，既に活性化されている解糖系とコンフリクションを起こした結果，解糖系代謝物の蓄積を起こすのではないかと予想した．従って，糖新生経路を遮断すれば，蓄積された解糖系代謝産物を二次代謝経路に流入させるように代謝 flux が変化し，様々な二次代謝産物の増産へと結びつけられないかと考えた．この仮説を実証するために糖新生経路が亢進する hst3 hst4 sir2 欠損株に fbp1 遺伝子を欠損させることで，糖代謝系への影響を調べた．Fructose 1,6-bisphosphatase をコードする FBP1 遺伝子は糖新生経路のみに関与し，その遺伝子欠損によって糖新生経路の遮断が起こる．*hst3 hst4 sir2 fbp1* 欠損株はグルコース消費量の増加，発酵代謝物であるエタノールの生産能力の上昇を示すにも関わらず，細胞増殖が早い段階で停止してしまう．次に Capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOF/MS)を用いて細胞内の代謝産物を網羅的に定量・比較した．野生株では解糖系代謝物や糖新生経路の代謝産物(核酸類)は少なく，逆にアミノ酸類が多く蓄積していた．サーテュイン欠損 (*hst3 hst4 sir2*)株では，逆に解糖系代謝物，核酸類が蓄積し，アミノ酸代謝物は減少した．*hst3 hst4 sir2 fbp1* 欠損株では *hst3 hst4 sir2* 欠損株と比較して，アミノ酸量は低いままであるが，解糖系代謝物および核酸の蓄積量の更なる増加に加え，クエン酸回路の代謝物も増加していた．核酸の増加が解糖系からペントースリン酸経路への代謝 flux の増加に依存するのか調べるために，安定同位体を使った代謝 flux 解析を行なった．その結果，*hst3 hst4 sir2 fbp1* 欠損株では解糖系からペントースリン酸経路へとつながる代謝経路のうちメジャーおよびマイナーな経路を問わず解糖系からペントースリン酸経路へ流れる flux のみが検出された．このように *hst3 hst4 sir2 fbp1* 欠損株では解糖系からアミノ酸代謝を除くいくつかの二次代謝経路（ペントースリン酸経路，発酵回路，TCA 回路など）への代謝 flux の増加と代謝物生産が増加していることがわかった．これらの結果はサーテュイン欠損と他の代謝酵素遺伝子の欠損の組み合せは，解糖系の代謝リプログラミングを起こし，特定の二次代謝経路産物の増産を起こすことを示唆している．

・参考文献：Masumoto, H. and Mastuyama, S., The combination of NAD$^+$-dependent deacetylase gene deletion and the interruption of gluconeogenesis causes increased glucose metabolism in budding yeast. PLoS One (2018) (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194942)
・特許：遺伝子欠損エタノール生産菌，特願 2014-051675

The gene deletions of NAD$^+$-dependent deacetylases can trigger the metabolic reprogramming of grycolysis

○Hiroshi Masumoto[1], Shigeru Matsuyama[2]
([1]Sch. Med., Nagasaki Univ., [2]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, metabolic engineering, metabolic flux analysis, gene disruption

S3Mb07 酵母栄養源飢餓ストレスと発酵制御

○善本 裕之
（キリン・酒類研）
hyoshimoto@kirin.co.jp

ビールは，麦芽とホップを主な原料として，酵母の働きにより造られる．自然の力を最大限引き出すことで，美味しいビールが生まれるが，その美味しさは，発酵工程で主役となる“酵母”の活躍で決まる．その働きが適度であれば人に好ましい香りや味が生まれるが，酵母の働きの中には，人にとって好ましくない味やオフフレーバーを生じるものもある．そのバランスが難しい．安定して高品質のおいしいビールをつくり続けるためには，酵母による発酵制御が大切となる．発泡酒や新ジャンルの製造では，麦芽使用比率が少ないために液糖で糖源を補う．そのために，糖類と糖類以外の栄養源のバランスがビールと異なる．糖類以外の栄養源が少ない中で，酵母が栄養飢餓ストレスを受けて発酵を続けることになり，ビール製造では想定できなかった発酵遅延やオフフレーバー等の課題が発生した．そこで，酵母が正常な発酵制御を行なうために，糖類と糖類以外の栄養源のバランスが及ぼす影響について，研究を行った．酵母では，栄養源のバランスを崩すと細胞死することが知られている．YPD10(1% 酵母エキス，2% ペプトン，10% グルコース)，10%グルコース，酵母エキス，ペプトンの培地で，それぞれ下面発酵酵母 KBY011 を 20℃で発酵させると，酵母エキス，ペプトンの培地では発酵が進まないが，YPD10 とグルコース培地で炭酸ガスを発生し，発酵が進んだ．しかしながら，酵母は YPD10 培地で死滅しないが，グルコース培地では死滅した．栄養源をグルコースだけにして発酵させると酵母は死滅した．この現象は，Granot らにより SICD (Sugar-Induced Cell Death)，つまり，糖誘導による細胞死(= 糖以外の栄養源欠乏による死滅率増大)と報告されている [1]．次に，糖類濃度を一定として，糖類以外の栄養源(アミノ酸等)濃度を段階的に減少させた培地を作製し，酵母の死滅への影響を調べた．その結果，糖類以外の栄養源濃度が段階的に減少するにつれて，酵母の死滅率は増大した．つまり，正常な発酵を行うためには，糖類以外の栄養源の濃度が重要であることを示唆された [2]．一方，Lin らにより，糖類以外の栄養源を一定として，糖類(グルコース)濃度を 2%から 0.5%に減少させて酵母を培養した場合(カロリー制限)，寿命を約 30%も延ばせることが報告されている [3]．糖類と糖類以外の栄養源のバランスは，酵母の細胞死や寿命を決定していることが示唆される．健全な発酵のためには，栄養源のバランスを考えて発酵を制御することが重要である．ヒトの場合，適度なカロリー制限，バランスの取れた食事，食べ過ぎないことにより，動脈硬化や高血糖の抑制，糖尿病の予防，ガンの抑制等の老化要因を抑えることができる．同じように，酵母においても，糖類以外の栄養源の濃度が少ない場合，酵母活性が低下して，発酵不良を発生する．糖類以外の栄養源が多い場合には，酵母活性が高い状態を維持され，健全な発酵を行なうことができる．つまり，ヒトも酵母も糖類と糖類以外の栄養源のバランスをしっかりと取ることが，それぞれ健全な発酵や生活習慣病を防止することに繋がることが示唆されている [4]．発酵工程における酵母の営みが自然の一部であることを念頭において，様々な機能や働き(栄養源飢餓ストレス対応等)を理解するためにブラックボックスの解明を行いつつ，お客様に酵母の魅力を感じて頂ける，美味しいビールの製造に繋げて行きたい．

1) Granot D., Levine A. and Dor-Hefetz E. (2003). Sugar-induced apoptosis in yeast cells. FEMS Yeast Research. 4:7-13.
2) Yoshida, S. and Yoshimoto, H. (2015) Nutrient stress responses of the bottom-fermenting yeast, *in* "Stress Biology of Yeasts and Fungi: Applications for Industrial Brewing and Fermentation" *ed. by* H. Takagi and H. Kitagaki, Springer. pp 123-136.
3) Lin S. J., Kaeberlein, M., Andalis, A. A., Sturtz, L. A., Defossez P. A., Culotta, V. C., Fink, G. R., Guarente, L. (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. Nature. 418(6895):344-348.
4) Rockenfeller, P., and Madeo, F. (2010) Ageing and eating, Biochim. Biophys. Acta. 1803(4):499-506.

Nutrient starvation stress responses in yeast and fermentation control

○Hiroyuki Yoshimoto
(Res. Lab. for Alcoholic Beverage Technol., Kirin Co., Ltd.)

Key words yeast, *Saccharomyces*, nutrient starvation stress, sugar-induced cell death

S3Mb08 酵母は何を感知してアルコール発酵を調節しているのか？

○渡辺 大輔, 高木 博史
（奈良先端大・バイオ）
d-watanabe@bs.naist.jp

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるアルコール発酵は，最も古くから人類に活用されてきた重要な微生物機能の一つであり，微生物学および生化学の黎明期から研究が進められてきた．現在，アルコール発酵の全ての代謝ステップが解明されており，それぞれに関わる酵素・遺伝子が解析され尽くしている．しかしながら，そのような酵素・遺伝子の改変だけではアルコール発酵力を自在に操ることは困難である．そのため，現代に至っても，目的のアルコール発酵力を有する菌株を得るためには，その菌株に由来する変異株などを用いて発酵試験を繰り返し，最適な菌株を探索し続けなければならない．このような現状を打破するためには，アルコール発酵のマシーナリーを統率しているマスターレギュレーターの解明と，その改変による「発酵デザイン技術」の開発が望まれる．

演者らは，現在までに，*S. cerevisiae* の中でもきわめて高いアルコール発酵力を有する清酒酵母と呼ばれる菌株群に着目し，その原因のゲノムワイドな探索を進めてきた．その結果，代表的な清酒酵母として知られるきょうかい 7 号や近縁な菌株では，真核生物に広く保存された Greatwall ファミリープロテインキナーゼ Rim15p が欠損しており，そのことが高いアルコール発酵力を生み出す一因であることを明らかにした．つまり，Rim15p は，アルコール発酵のブレーキとして機能していると考えられるのだが，細胞内外の何を感知し，どのような機能を果たすことでアルコール発酵を調節しているのだろうか？その謎に迫るため，Rim15p の既知の上流因子のうち，栄養シグナリングの鍵因子として知られるプロテインキナーゼ複合体 TORC1 に着目し，アルコール発酵における影響を解析した．まず，発酵過程における酵母の TORC1 活性の解析を行ったところ，アルコール発酵力が高い菌株や時期において，高い TORC1 活性が認められた．一方，TORC1 活性を改変するための変異を実験室酵母に導入して発酵試験に供した結果，TORC1 活性と連動してアルコール発酵力が変化した．以上の結果から，酵母は，環境中の栄養源を感知し TORC1 を活性化させることで，高いアルコール発酵力を発揮できるようになると考えられる．

TORC1 の下流では，Rim15p などの Greatwall ファミリープロテインキナーゼが，プロテインフォスファターゼ 2A の一種である $PP2A^{B55\delta}$ の阻害を介して細胞周期の調節に関与することが，近年報告された．演者らは，この高度に保存されたシグナル伝達経路が酵母のアルコール発酵の調節にも関与しており，$PP2A^{B55\delta}$ がアルコール発酵にとっての主要なエンジンであることを新たに見出した．したがって，$PP2A^{B55\delta}$ は，細胞周期の進行とアルコール発酵の両方を正に制御することで，酵母がエネルギーを獲得しながら効率良く増殖するための中心的な役割を担っていると考えられる．今後，$PP2A^{B55\delta}$ による脱リン酸化の標的因子を解析することで，さらに詳細なアルコール発酵調節メカニズムを理解していきたい．一方，TORC1 は，Rim15p 経路とは独立して，細胞内のアミノ酸レベルの調節にも関与している．そこで，酵母細胞内での主要なアミノ酸の一つであるグルタミン酸の合成や取込みに関連する遺伝子を改変し，細胞内のグルタミン酸レベルを低下させたところ，アルコール発酵力が上昇することを明らかにした．このことから，アルコール発酵がアミノ酸によって制御されるという，新規な炭素-窒素代謝クロストーク制御の存在が示唆された．以上の研究を通して，TORC1 が Rim15p-$PP2A^{B55\delta}$ 経路と細胞内アミノ酸レベルの両方の調節を介してアルコール発酵を促進する全体像が垣間見えてきた．

話は変わるが，近年，酵母とバクテリアの共培養により，酵母内に[GAR^+]という推定上のプリオンが形成され，その結果アルコール発酵が抑制される，という興味深い報告がなされた．伝統的な清酒醸造法である生酛（きもと）造りにおいては，酵母のアルコール発酵に先立って乳酸菌による乳酸発酵が行われ，酒母の中で酵母と乳酸菌が共存する．演者らの研究により，生酛造りに用いられる乳酸菌の *Leuconostoc mesenteroides* や *Lactobacillus sakei* が，清酒酵母における[GAR^+]プリオンの形成促進能を有することを示唆する結果が得られた．従来，生酛造りにおける乳酸菌の意義として，(1)乳酸の生産により醸造環境を酸性に保ち，雑菌の繁殖を防ぐことや，(2)乳酸菌が生産する D-アミノ酸などの成分により，独特の風味を付与すること，などが考えられてきたが，もし生酛造りの酒母において[GAR^+]プリオンが形成されるとすれば，(3)急激なアルコール発酵の進行に伴う酵母の死滅を防ぐ，という新たな意義を提唱することも可能になるだろう．

いずれも詳細なメカニズムについては今後の解析が待たれるが，酵母は，環境中の栄養源に加え他の微生物の存在までも感知しながら，アルコール発酵を緻密に制御し，自らにとってのエネルギー生産と他者にとっての生育環境のバランスを最適化しているのかもしれない．このように，酵母が何を感知してアルコール発酵を調節するのかについては未だに多くの謎が残されており，アルコール発酵の研究が新たな局面を迎えつつあると感じる．

What do yeast cells sense for the control of alcoholic fermentation?

○Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi
(Div. Biol. Sci., NAIST)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, alcoholic fermentation, sake yeast, TORC1

S3Bc01 〈招待講演（韓国生物工学会）〉

Biomimetic membrane technology and its engineered applications

○Tae-Joon Jeon
(Dept. Biol. Eng., Inha Univ., Korea)
tjjeon@inha.ac.kr

Biomimetic membranes and their analogs are used in a variety of scientific and engineered applications and have also been explored as a platform for highly sensitive and rapid single molecule sensing. Furthermore, a number of functional membrane proteins and ion channels incorporated into such biomimetic membrane have provided many applications and potential uses including water purification, biosensors, drug screening, and biophysical studies. However, these uses are inhibited by the fragility and short lifetime of the membrane that supports the functional proteins and biomimetic membrane technologies have historically been the purview of experts. In order to address those shortcomings, we are developing an easy-to-use, robust, and inexpensive technological platform for membrane formation and membrane protein based technology. In this presentation, with our biomimetic membranes, I will present two representative technologies including aquaporin based water purification system and biosensing application. Membrane based water purification technologies have played a most important role in water purification to date. However, conventional technologies reached their performance limit and further enhancement in performance is needed by developing new materials for their membranes. Of particular interest, an aquaporin embedded biomimetic membranes are considered as an alternative to replace the conventional membranes. Our work shows biomimetic membrane platforms for water purification and improved performance of the membranes by employing a novel substrate and chemical conjugation techniques. The other application with biomimetic membrane for biosensing applications will be also shown as a potential use as biosensors with rapid and accurate detection of biomolecules.

Biomimetic membrane technology and its engineered applications

○Tae-Joon Jeon
(Dept. Biol. Eng., Inha Univ., Korea)

Key words biomimetic membrane, membrane prtotein, nanobiotechnology, biosensor

S3Bc02 耐熱性酸性コラゲナコーゼ Kumamorisin-As：構造機能解析と反応最適 pH の変換

○中山 亨
（東北大院・工）
nakayama@seika.che.tohoku.ac.jp

好熱好酸性細菌 *Alicyclobacillus sendaiensis* NTAP-1 株の生産する耐熱性コラゲナーゼ Kumamolisin-As（kuma-As）は MEROPS S53 ファミリーに属するセリンプロテアーゼであり，pH 4.0 付近で最も高い酵素活性を示す．同酵素の主な触媒装置は，Ser278/Glu78/Asp82 からなる触媒トライアドと，遷移状態（オキシアニオン）の安定化に関わる Asp164 である．これらの触媒装置は，中性～弱アルカリ性領域において最大活性を示す subtilisin（MEROPS S8）の触媒トライアド（Ser221/His64/Asp32）ならびにオキシアニオンホール形成アミノ酸 Asn155 にそれぞれ対応している．kuma-As と sutilisin の反応最適 pH の違いを触媒装置の違いに基づいて説明できるか否かを確かめるため，kuma-As の触媒装置 Subtilisin のものに模した二重変異体 Glu78His/Asp164Asn を調製し，その立体構造と酵素活性の pH 依存性を野生型のものと比較した．同変異体の X 線結晶構造解析の結果，同変異体の触媒装置近傍の構造は野生型のものとは異なり，Ser278, Glu78, Asp82 を介する水素結合ネットワークは存在しないことがわかった．同変異体はきわめて微弱な酵素活性（相対 kcat，野生型酵素の値の 0.0001%）を示し，この活性は pH 8 以上で最大となった．また同変異体の自己触媒的プロセッシングの最適 pH も野生型の pH 4.0 から pH 7.0-7.5 付近にシフトした．これらの結果は，酸性アミノ酸残基（Asp164）によるオキシアニオンの安定化と Glu78 を介する触媒トライアドが酵素活性の好酸性に重要な役割を果たしていることを支持している．得られた知見をベースにして，別のセリンヒドロラーゼであるエステラーゼについて同様な解析を行った結果についても紹介する．

Thermostable acid collagenase kumamolisin-As: structure, function, and protein engineering to alter its pH optima

○Toru Nakayama
(Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words serine protease, serine enzyme, acidphilic activity, catalytic triad

S3Bc03 モロニーマウス白血病ウイルス（MMLV）逆転写酵素の熱安定性の向上と新しい核酸増幅法の開発

○滝田 禎亮, 馬場 美聡, 片野 裕太, 岡野 啓志, 兒島 憲二, 保川 清
（京大院・農）
takita@kais.kyoto-u.ac.jp

モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素（Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, MMLV RT）は DNA ポリメラーゼ活性とリボヌクレアーゼ H（RNase H）活性をもつ．MMLV RT（Thr24-Leu671）は cDNA 合成酵素として分子生物学的研究や臨床診断に広く用いられている．cDNA 合成反応の効率は，RNA の二次構造が解消すると上がる．RNA の二次構造を解消させるために，高温（約 65℃）での反応が望まれるが，逆転写酵素の耐熱性が低いため，高温で反応を行えない．我々は下記の 2 種類のタンパク質工学的手法を用いて，MMLV RT の熱安定性の向上を試みた．

部位特異的変異導入法：鋳型プライマー（template-primer, T/P）はリン酸基を有するため負電荷を帯びている．我々は，MMLV RT 分子内で T/P と結合する領域に部位特異的変異により正電荷を有する残基を導入すると，MMLV RT の T/P との親和性が高くなり，熱安定性が向上すると考えた．12 残基をそれぞれ Lys，Arg，Ala に置換した単変異型酵素 36 種を作製し，熱安定性を評価した．そして，熱安定性を上げた 3 種類の変異を組み合わせた 3 重変異型酵素 MM3（E286R/E302K/L435R）およびこれにさらに RNase H 活性を消失させる変異（D524→A）を組み合わせた 4 重変異型酵素 MM4 を作製した．モデル RNA を用いた RT-PCR において，野生型酵素（WT）では cDNA 合成の反応温度の上限は 54℃であったが，MM3 では 58℃，MM4 では 60℃であった [1]．我々はさらに，分子表面の電荷の増加，疎水性コアの安定化，塩橋の導入あるいは分子間ジスルフィド結合の回避を意図した単変異型酵素 29 種を作製した．そして，熱安定性を上げた 6 種類の変異のうち 1～4 個を MM3 に導入した結果，最終的に MM3 よりも熱安定性が向上した MM3.14（A32V/L72R/E286R/E302K/W388R/L435R）を作製した [2]．

ランダム変異導入法：全アミノ酸スキャニング変異導入法と無細胞タンパク質合成系を用いて MMLV RT の耐熱化を試みた．MMLV RT をコードする遺伝子が挿入された発現プラスミドを鋳型として，Ala70 から Arg469 までの 400 アミノ酸残基の各々のアミノ酸残基のコドンを他の 19 種類のアミノ酸残基のコドンに置換したライブラリーを作製した．これを無細胞タンパク質合成反応により発現させた．この反応液を一定温度で熱処理後，モデル RNA を用いた RT-PCR を行い，熱安定性を評価した．768 クローンをスクリーニングした結果，耐熱型変異体 D200C を得た [3]．

One-step RT-PCR は RNA を迅速に検出する手法であり，two-step RT-PCR と比較して DNA のコンタミリスクが低いという長所を持つ．我々は，MM4 および Leu329→Ala により RT 活性を獲得した好熱性細菌 *Thermotoga petrophila* K4 株由来ファミリー A DNA ポリメラーゼ変異体（$K4pol_{L329A}$）を用いた one-step RT-PCR の構築を試みた．$MgCl_2$ と $Mn(OCOCH_3)_2$ の至適濃度条件の組み合わせはそれぞれ 3 mM，0.5 mM であった．最適化された one-step RT-PCR は，MMLV RT による cDNA 合成反応と *Taq* ポリメラーゼを用いた PCR 反応を組み合わせた two-step RT-PCR と同程度の検出感度を有した [4]．我々はさらに，$K4pol_{L329A}$ だけを用いた one-step RT-PCR の構築を試みた．酵素濃度，$MgCl_2$ 濃度および $Mn(OCOCH_3)_2$ 濃度を最適化した結果，上記と同程度の検出感度を達成した [5]．

1. K. Yasukawa et al. *J. Biotechnol.* **150**, 299-306 (2010)
2. M. Baba et al. *Protein Eng. Des. Sel.* **30**, 551-557 (2017)
3. Y. Katano et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**, 2339-2345 (2017)
4. H. Okano et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **487**, 128-133 (2017)
5. H. Okano et al. *J. Biosci. Bioeng.* **125**, 275-281 (2018)

Increase in the thermostability of Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase and development novel nucleic acid amplification

○Teisuke Takita, Misato Baba, Yuta Katano, Hiroyuki Okano, Kenji Kojima, Kiyoshi Yasukawa
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words thermostability, moloney murine leukemia virus, nucleic acid amplification, reverse transcriptase

S3Bc04 D-アミノ酸脱水素酵素の構造情報に基づく基質特異性の改変

○櫻庭 春彦[1], 林 順司[2], 秋田 紘長[3], 大森 勇門[4], 大島 敏久[4]
（[1]香川大・農, [2]立命館大・生命科学, [3]産総研, [4]大阪工大・工）
sakuraba@ag.kagawa-u.ac.jp

近年，D-アミノ酸の重要な生理機能が明らかになるとともに医薬品や抗生剤，農薬などへの新たな利用が進められている．D-アミノ酸の酵素合成法としては，D-ヒダントイナーゼ，D-N-カルバモイラーゼやD-アミノアシラーゼなどを利用した方法が知られているが，合成工程が複雑で合成可能なD-アミノ酸が限られるなどの問題があり，より有用性の高い酵素生産法の開発が望まれている．*meso*-ジアミノピメリン酸脱水素酵素（DAPDH）は，NADP依存的に*meso*-ジアミノピメリン酸（*meso*-DAP）の酸化的脱アミノ反応を触媒し，L-2-アミノ-6-オキソピメリン酸を生成する．この生成物は非酵素的に分子内脱水環化するため試験管中では逆反応が進まないが，生体内での反応は可逆的で，*Bacillus sphaericus* や *Corynebacterium glutamicum* ではL-リジンの生合成系において機能する．本酵素は，D-アミノ酸のNAD(P)依存性の脱アミノ反応を触媒する唯一の脱水素酵素として知られており，各種オキソ酸とアンモニアからのD-アミノ酸一段階合成への利用が期待される．しかしDAPDHは一般に基質特異性が高く*meso*-DAPに特異的に作用するため，その応用開発が阻まれてきた．そのなかで，*C. glutamicum* 由来のDAPDHに部位特異的変異を加えて基質特異性を低めたD-アミノ酸脱水素酵素（DAADH）が調製されたが，常温菌由来の変異酵素であるため安定性が低いという問題があった．大島らは，好熱菌 *Ureibacillus thermosphaericus* に60℃，30分間の処理でも失活しないNADP依存性DAPDHを見出し，これに同様の変異を加えて耐熱性DAADHの調製に成功している．このDAADHは，本来の基質である*meso*-DAPには活性を示さず，新たにD-シクロヘキシルアラニン，D-イソロイシン，D-リジンなどに活性を示した．また常温菌由来DAADHに比べ高い耐熱性を示した． *U. thermosphaericus* DAPDHの結晶構造解析を行ったところ，C-末端にHis-tagが存在するとC-末端領域のイオンペア相互作用が形成されず，酵素活性に影響することが示唆された[1)]．そこでHis-tagを付加しないDAADHを調製したところ，正逆両反応で活性の大幅な上昇が認められた．このDAADHを出発材料の親酵素として構造解析を行い，活性中心の構造情報に基づき，基質特異性の異なる新たなDAADHの作製を試みた．

基質結合ポケットを形成するアミノ酸残基の中で，Tyr224およびAsp94はD-アミノ酸センター近傍に存在しており，基質結合部位の一部を形成する可能性が示された．しかし，これまでこの二つのアミノ酸残基は変異実験の対象とはされていなかった．変異実験の結果，Tyr224をフェニルアラニンに置換したY224Fは基質特異性の大きな変化は無く全体的に活性が低下した．一方興味深いことに，Asp94をアラニンに変異させたD94Aは基質特異性が劇的に変化し，親酵素のDAADHと比較してD-フェニルアラニンに対する反応性が約50倍と大きく上昇した．逆反応では，フェニルピルビン酸に対して極めて高い触媒活性（92.5 μmol/min/mg）が認められ，医薬品原料として需要の高いD-フェニルアラニンの1段階合成への有用性が示された．またD-2-アミノオクタン酸，D-ノルロイシンやD-メチオニンについても高い合成活性を示した．次にD-リジンに対して非常に低い反応性を示すD94A/Y224Fダブルミュータントを用いて，D-リジンとNADPの存在下で結晶化を行い，NADP・酵素の二者複合体とNADPH・2-keto-6-aminocapronic acid（KACA，リジンのケト酸）・酵素の三者複合体の構造解析に成功した．構造比較の結果，KACAの結合に伴い活性中心近傍のループの位置が大きく変化し基質結合部位を形成することが明らかとなった．KACAの構造に基づきフェニルピルビン酸の結合モデルを作成したところ，D94Aの変異によって基質結合ポケットが拡張され立体障害が消失し，さらに基質側鎖周辺の疎水性が増大したことが，かさ高い側鎖を持つD-フェニルアラニンなどの疎水性アミノ酸に対する反応性を増加させた要因であることが示唆された2).

1)H. Akita et al.: Structural insight into the thermostable NADP+-dependent meso-diaminopimelate dehydrogenase from Ureibacillus thermosphaericus. Acta. Cryst. D71, 1136-1146 (2015)
2)J. Hayashi et al.: Structure-based engineering of an artificially generated NADP+-dependent D-amino acid dehydrogenase. Appl. Env. Microbiol., 83, e00491-17 (2017)

Structure-based modification of substrate specificity of D-amino acid dehydrogenase

○Haruhiko Sakuraba[1], Junji Hayashi[2], Hironaga Akita[3], Taketo Ohmori[4], Toshihisa Ohshima[4]
([1]Fac. Agric., Kagawa Univ., [2]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [3]AIST, [4]Eng., Osaka Inst. Technol.)

Key words D-amino acid, enzymatic synthesis, dehydrogenase, crystal structure

S3Bc05 人工補酵素-ギ酸脱水素酵素系による炭酸ガスからのギ酸合成

○天尾 豊
（大阪市大・複合先端研）
amao@ocarina.osaka-cu.ac.jp

二酸化炭素を原料として様々な有機分子に変換するための触媒として反応基質特異性に優れている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に着目し，従来光レドックス系等で単なる電子メディエータとしか見られてこなかったビオローゲン構造を基本骨格とした人工補酵素を用いたギ酸脱水素酵素の二酸化炭素還元活性の制御について紹介する．ギ酸脱水素酵素を二酸化炭素の還元触媒として用いた系において，ビオローゲンの化学構造を工夫することにより，天然補酵素NADHでは達成し得えなかった必要な反応のみをギ酸脱水素酵素の構造を改変せず制御でき，二酸化炭素還元触媒効率化が達成できた．まず,ビオローゲン誘導体の中で最も広く用いられている，メチルビオローゲンとギ酸脱水素酵素との相互作用に付いて調べた．具体的には，還元剤であるジチオン酸ナトリウムを用いてメチルビオローゲン一電子還元体を調製し，二酸化炭素を飽和させたピロリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）中，ギ酸脱水素酵素存在下で反応させ，ギ酸生成初速度とメチルビオローゲン一電子還元体濃度との関係を調べた結果，ギ酸脱水素酵素との親和性を表すミカエリス定数(K_m)を比較してみるとメチルビオローゲン一電子還元体よりもNADHの方が約10倍大きいことがわかる．これはNADHを用いてギ酸脱水素酵素の二酸化炭素還元触媒機能を利用するためには，メチルビオローゲン一電子還元体（K_m=213 μM）よりも約10倍のNADH（Km=2087 μM）が必要となることを示している．また，見かけの触媒定数（k_{cat}：1分間での触媒回転数）を比較しても，メチルビオローゲン一電子還元体の1.02 min^{-1}に対してNADHは0.39 min^{-1}であり，さらに触媒反応効率 k_{cat}/K_m（見かけの触媒定数をミカエリス定数で除算した値）を比較してもメチルビオローゲン一電子還元体の方がNADHよりも約25倍も大きいことがわかった． メチルビオローゲン一電子還元体を用いることでギ酸脱水素酵素の二酸化炭素還元触媒機能を有効利用が可能となった．さらにビオローゲンに様々なイオン性置換基を導入した人工補酵素によりギ酸脱水素酵素の二酸化炭素還元触媒活性を制御することが可能となることが期待される． ビオローゲンに陽イオン性置換基であるアミノ基を導入した人工補酵素を設計・合成し，これらの一電子還元体によるギ酸脱水素酵素の二酸化炭素還元触媒活性の制御について，酵素反応速度論に基づき解析した．その結果，2つのアミノ基を導入したビオローゲンの一電子還元体を用いることで，ギ酸脱水素酵素の二酸化炭素還元触媒活性が飛躍的に向上した．アミノ基，メチル基を1つずつ導入したビオローゲンの一電子還元体を用いても，ギ酸脱水素酵素の二酸化炭素還元触媒活性はNADHと比較して大きく向上することを見出した．以上のことからビオローゲンに簡単な置換基導入だけで，ギ酸脱水素酵素の二酸化炭素還元触媒活性を自在に変化させることが可能となる．特にアミノ基を2つ導入しただけのビオローゲンの一電子還元体を補酵素として用いると，NADHを用いた場合に比べ，ギ酸脱水素酵素の二酸化炭素還元触媒活性効率（k_{cat}/K_m）を560倍も向上させることができており，おそらくは遺伝工学的にギ酸脱水素酵素の触媒活性中心を変えてもこのような劇的な触媒活性向上はできないであろう．

CO_2 reduction to formate with artificial co-enzyme and formate dehydrogenase

○Yutaka Amao
(Adv. Res. Inst. Nat. Sci. Technol., Osaka City Univ.)

Key words CO_2 fixation, formate dehydrogenase, viologen, coenzyme

S3Bc06 架橋触媒機能を有する微生物由来トランスグルタミナーゼ前駆体の設計

○神谷 典穂 [1,2], 松崎 隆 [1], 林 浩之輔 [1], 南畑 孝介 [1,3]
（[1]九大院・工, [2]九大・未来化セ, [3]KAICO）
kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

タンパク質の特定部位を外来分子で修飾する技術は，被修飾タンパク質に新たな機能性を付与し，その応用範囲を格段に拡げることが可能なことから，新たな方法論の探索が続いている．なかでも酵素反応を用いるタンパク質修飾法は，用いる酵素の触媒特性に応じた部位特異性を担保できることから，多様な技術ツールが提案されている [1]．微生物由来トランスグルタミナーゼ (microbial transglutaminase, MTG) は，Gln 残基と Lys 残基の側鎖間架橋を通してタンパク質を連結する酵素として食品分野で広く活用されてきた産業用酵素 [2] であるが，そのハンドリングの容易さと強力な架橋活性から，多様なバイオコンジュゲートの調製のための触媒として，生物工学分野においても広くその利用が検討されてきた [3]．特に近年，薬理活性を有するタンパク質と合成高分子とのコンジュゲートや antibody drug conjugates (ADCs) の調製における有用性が報告され，新たな展開の兆しが見える．しかしながら，MTG の基質特異性は比較的広く，厳密な反応選択性・部位特異性が要求される系への応用に対しては改善の余地があるとされ，大手製薬企業による新たな微生物由来トランスグルタミナーゼの探索も試みられている [4]．このような背景の下，本研究では，MTG の前駆体に着目することで，新たな架橋触媒の設計を試みた．
MTG は，プロペプチドが付加した前駆体として発現した後，限定分解を経て，活性を有する成熟型酵素となる．この際，プロペプチドは分子内シャペロンとして機能することから，微生物宿主において組換えタンパク質として可溶性発現する際に必須の部分構造となる．一方，活性型酵素の取得に際しては，プロペプチド部位の限定分解の過程を単離精製プロセスに組み込む必要がある．そこで，プロペプチド部位に変異を導入することで，限定分解を必要としない活性型 MTG 前駆体の取得を試みることとした．まず，MTG 前駆体立体構造の解析情報 [5] に基づき，活性部位と強く相互作用している Tyr 残基（Y12）を選択し，これを Ala 残基へ置換した変異体を調製した．また，基礎検討の過程において，MTG によって認識されることが明らかとなった Lys 残基（K10）を幾つかの異なるアミノ酸に置換した K10X/Y12A 二重変異体を作製し，触媒活性の評価に供した．MTG の標準アッセイ法として汎用されている Z-QG とヒドロキシルアミンを用いた評価において，ほとんど全ての前駆体は架橋活性を示さなかったが，二重変異体の中には僅かながら架橋活性を示すものが存在した．興味深いことに，反応性の高い基質ペプチド配列と小分子基質を用いた架橋反応による評価においては，全ての二重変異体が活性を示すことが明らかとなり，プロペプチド部位への適切な変異の導入が MTG 前駆体の活性化に寄与することが強く示唆された．以上のことから，MTG をモデル酵素として，その前駆体のタンパク質工学を通した新規活性型変異体の設計と取得に成功した．

References
[1] E. M. Milczek, Chem. Rev., 2018, 118, 119-141.
[2] K. Yokoyama et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, 64, 447-454.
[3] M. Takahara et al., Bioconj. Chem., 2017, 28, 2954-2961.
[4] W. Steffen et al., J. Biol. Chem., 2017, 292, 15622-15635.
[5] M.-T. Yang et al., J. Biol. Chem., 2011, 286, 7301-7307.

Molecular design of engineered active zymogen of microbial transglutaminase

○Noriho Kamiya[1,2], Takashi Matsuzaki[1], Kounosuke Hayashi[1], Kosuke Minamihata[1,3]
([1]Fac. Eng., Kyushu Univ., [2]CFC, Kyushu Univ., [3]KAICO Ltd.)

Key words enzyme reaction, cross-linking, zymogen, bioconjugate

S3Cc01 木質バイオマスの質と量：オーダーメイド改変に向けて

○出村 拓
（奈良先端大・先端科学技術）
demura@bs.naist.jp

木質バイオマスとは木本植物（樹木）の材（木材）を由来とするバイオマスの総称である．木材は，セルロースやヘミセルロースなどの多糖とフェノール性ポリマーであるリグニンからなる厚い細胞壁（二次細胞壁）をもつ木質細胞（道管，仮道管，繊維細胞）の複合組織であり，木質バイオマスの質と量を変えるためには，二次細胞壁の形成メカニズムの理解が必要である．私たちはかつてから，通水細胞である道管の二次細胞壁形成について，多角的な研究を進めてきた．とくに，モデル植物であるシロイヌナズナを用いた研究から，二次細胞壁形成のマスター調節因子として NAC 型転写因子である VNS ファミリー（VND1～VND7，SND1，他）や MYB 転写因子群（MYB46，MYB83，他）を見いだし，これらの発見をもとに，二次細胞壁形成の詳細メカニズムの解明に取り組んできた．これらマスター調節因子のなかで，VND7 は最も高い二次細胞壁形成の誘導能をもっており，ヘルペスウィルスの転写活性化ドメイン VP16 とラットのグルココルチコイド受容体 GR との融合タンパク質として，シロイヌナズナやポプラ，タバコ培養細胞 BY-2，シロイヌナズナ培養細胞 T-87 などで人為的に転写活性化を誘導することで，高頻度（培養細胞では約 80%）で二次細胞壁形成を引き起こすことが可能となった．これまでに，これらの二次細胞壁形成誘導系を用いて，オミクス解析（トランスクリプトーム，プロテオーム，メタボローム）や分子遺伝学解析，ケミカルスクリーニングなどを行うことで，二次細胞壁の質と量の改変につながるいくつかの重要な因子の同定に成功している．私たちは，こうして得た知見を，実際の木質バイオマス植物の改変につなげたいと考え，早生広葉樹であるポプラ（Populus）をモデルとして用いた研究にも取り組んでいる．木質バイオマスの増産に向けては，乾燥などの環境ストレスに耐性を付与することが考えられる．そこで，シロイヌナズナにおいて乾燥・塩耐性に寄与することが示されている AtSRK2C と AtGolS2 を導入したポプラを作出した．これらの形質転換ポプラでは野生型ポプラと比較して高い乾燥・塩耐性が付与されたことから，ポプラにおいても環境ストレス耐性の付与による木質バイオマス増産の可能性が示された．現在，これら遺伝子組換えポプラについて，南京林業大学（中国）との国際共同研究として，南京市近郊の野外試験場でのフィールド試験を行っている．さらに，筑波大学との共同研究で，筑波大学の隔離圃場でのテストにも着手した．一方で，木質バイオマスの質の改変に向けては，マスター調節因子（MYB46，SND1，VND7）と VP16 の融合タンパク質をポプラで発現させることで，一部の遺伝子組換えポプラで劇的な二次細胞壁形成の亢進が起こることを示した．本講演ではこれらの結果をもとに，木本植物における木質バイオマスの量と質の改変の可能性について議論したい．

Toward castom-made modification of quality and quantity of wood biomass

○Taku Demura
(Grad. Sch. Sci. Technol., NAIST)

Key words *Populus* spp, seconday cell wall, VND transcription factors, field test

S3Cc02 食糧・バイオリファイナリー共用イネの開発を目指した稲わらの糖化性向上

○伊藤 幸博
（東北大院・農）
yukito@tohoku.ac.jp

コメは人類の最も重要な食糧であり，毎年大量に生産されている．それに伴い稲わらも大量に生産されているが，その多くは有効利用されていない．そこで，稲わらをバイオリファイナリーの有用な原料とすることを目的に，稲わらの糖化性を高める技術の開発を行っている．それにより，コメは食糧として利用し，残った未利用稲わらをバイオリファイナリーの有用な原料として利用できる「dual-use rice」の開発を目指している．
私たちは 2 つの手法を用いて稲わらの糖化性の向上を目指している．1 つは遺伝子工学的方法である．この方法では，イネにセルラーゼ遺伝子を導入し，イネの生育中にセルラーゼを発現させることにより予め細胞壁に「ひび」を導入し，収穫後の糖化反応時に酵素が作用しやすくなるのを狙った方法である．これまでに恒常的にエキソグルカナーゼを発現させると稲わらの糖化性が向上するが不稔になること（Nigorikawa et al 2012），老化誘導プロモーターを用いて発現させると不稔を回避しながら糖化性を向上させることができることを示してきた（Furukawa et al 2013）．もう 1 つの手法は，稲わらの糖化性を決める遺伝子の同定とその利用である．これまでに稲わらの糖化性には品種間差があり，カサラス（分子遺伝学実験によく用いられるインディカ品種）の糖化性は高くコシヒカリの糖化性は低いことを見出した（Abe et al 2016）．現在，カサラスとコシヒカリの糖化性の差をもたらす遺伝子の同定を目指し，遺伝子マッピングを進めている．この遺伝子が同定されれば，市場価値の高い品種（例えばコシヒカリ）に高糖化性遺伝子を交配により導入することができ，コメの味はそのままで，稲わらは利用しやすくなったイネ品種が作出可能になると期待される．これらの研究を行う過程で，稲わらの糖化性はその部位（葉身，葉鞘，茎）や生育ステージによって大きく異なり，茎の糖化性は高く，葉身の糖化性は低いことがわかった（Abe et al 2016）．また，葉身，葉鞘，茎のいずれにおいても出穂後に糖化性が大きく低下することもわかった．実際のバイオマス利用では，このような特徴を持った植物バイオマスが利用されるはずである．これらのことから考えられるのは，稲わらやその他の植物バイオマスを用いた発酵実験を行う場合，品種，部位，生育ステージなどを揃えないと，再現性のある安定したデータを得るのが困難であり，発酵微生物や発酵手法の正確な評価が困難であるということである．この問題の解決には植物研究者の協力が有用であろう．また，私たちが行う糖化性試験は，乾燥，粉砕した稲わらに市販のセルラーゼを作用させて，反応液中に遊離される還元糖の濃度を測定することによって行っている．しかし，実際の稲わらの利用では発酵微生物が使われることを考えると，酵素糖化性だけでなく発酵微生物の特性や発酵能を考慮する必要もある．これは，応用微生物・発酵工学の研究者の協力なしには，なし得ないことである．応用微生物学・発酵工学を専門とする研究者と植物育種学を専門とする研究者が連携し，全体を俯瞰した研究を進めることが，今後のこの分野の発展の鍵となろう．
本講演では，稲わらの糖化性の向上に関する発表をするが，このような観点を念頭に置いた議論ができればと思う．

Enhancement of saccharification yields from rice straw toward breeding of food-biorefinery dual-use rice plants

○Yukihiro Ito
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words saccharification, cellulase, plant breeding, rice

S3Cc03 培地・基質及びダウンストリームから考える発酵生産

○園元 謙二
（九大院・農）
sonomoto@agr.kyushu-u.ac.jp

バイオマスからの効率的な発酵生産では，発酵プロセスそのものを中心に置くと，その上流プロセスは発酵原料の調達・加工（資源作物デザイン・生産，バイオマスの前処理・糖化など），優れた微生物の獲得・育種，などで構成されている．一方，下流プロセスは目的物の低コスト・効率的な分離・精製が求められ，さらには目的物を発酵生産と同時に分離できれば生産物阻害の軽減などで発酵プロセスの向上にも繋がる．バイオマスから発酵を通して有価物を得るためには，構成される各フローを俯瞰し，ボトルネックを生じさせず，かつ相乗効果を生むようなトータルシステムを組み立てるプロセス研究戦略が求められる．また，各フローを理解し，かつトータルシステムとして俯瞰できる視点・感性を持つ人材の育成が望まれている．

我々は，優れた発酵微生物の能力を最大限発揮させるために，微生物に適した基質をバイオマスから調製するデザインドバイオマス研究を展開してきた．すなわち，それらデザインドバイオマスを用いて，バイオマス由来基質を利用する際の様々な共通課題（1. 原料となるバイオマスの選択と前処理，2. 糖化阻害，3. 発酵阻害，4. 発酵生産性，5. 省エネ・省工程・低コストの発酵と生産物の分離，など）に対処できる適応型発酵プロセスを構築してきた（1）．具体的には，中間代謝物の有機酸を用いたブタノールのサルベージ合成（1），混合糖利用の際のカタボライト抑制（CCR）を回避したブタノール（1）や光学活性乳酸（1,2）の発酵生産などである．

本講演では，これまでのモデル糖を用いたデザインドバイオマス研究を実バイオマスで検証した研究，下流プロセスを考慮した生産性向上研究，上流―発酵―下流の 3 つのプロセスを俯瞰した統合研究について，次の新たなパラメーターを提示しながら最新の研究成果の概要を紹介したい．

『プロセスを跨ぐ評価パラメーター（New parameters for comprehensive evaluation across the processes composing total system of production）』
A) バイオマス糖化酵素当たりの最終目的産物の収率（g/U-enzyme）；Product yield to enzyme loading
B) プロセスを跨ぐ（overall）最終目的産物の生産性（g/L/h-overall process）；Overall productivity
C) 使用培地当たりの最終目的産物の収率（g/L-broth）；Total product concentration

1．上流プロセス（バイオマスの前処理・糖化）と発酵プロセスを考える
【糖化酵素の低負荷による Semi-hydrolysis が費用対効果の高いブタノール発酵をもたらす】（3）
◆ソフトバイオマスの稲ワラからの高効率ブタノール生産
◆稲ワラの Semi-hydrolysate は従来の glucose-oriented hydrolysis で生じる CCR を回避
◆Semi-hydrolysis を可能とする糖化酵素の繰り返し使用は，酵素当たりのブタノール収率や overall ブタノール生産性を高めた

2．下流プロセス（目的物の低コスト・効率的な分離）と発酵プロセスを考える
【酸耐性乳酸菌が非解離乳酸の費用対効果の高い *in situ* 発酵・抽出回収を可能にする】（4）
◆酸耐性乳酸菌は中和剤なしで非解離型の乳酸を生産できる
◆*in situ* 乳酸抽出流加発酵はより経済的で環境に優しい乳酸回収プロセス
◆使用培地あたりの乳酸収率が向上

【大量抽出剤・限定量培地は優れたブタノール抽出発酵を導く】
◆生成するブタノールとアセトンを同時に生産菌から遠ざけ，毒性効果を和らげる
◆大量抽出剤と制限された栄養培地で高ブタノール生産を確立
◆使用培地あたりのブタノール収率が向上

3．上流―発酵―下流の 3 つのプロセスを俯瞰するスマート発酵工学
【デザインドバルブを用いたスマートブタノール発酵プロセスは優れたトータルシステムである】
◆繰り返し加水分解とブタノール発酵を組み合わせた新プロセス（NSSF）の提唱 − *N*on-isothermal *S*imultaneous *S*accharification and *F*ermention with *in situ* extraction −
◆NSSF は糖化酵素や菌体，培地の利用性を向上
◆NSSF は糖化処理によって生成したオリゴ糖や発酵で残存する有機酸の利用性を向上
◆バルブあたりのブタノール収率だけでなく，酵素当たりのブタノール収率，overall ブタノール生産性，使用培地あたりのブタノール収率が向上

(1) 園元, 生物工学, 95, 2-13, 2017; (2) Tan et al., RSC Adv., 7, 24233-24241, 2017; (3) Zhao et al., Bioresour. Technol., accepted, 2018; (4) Singhvi et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., in press, 2018.

Fermentation production: Designed biomass study and subsequent downstream process

○Kenji Sonomoto
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words designed biomass, downstream process, semi-hydrolysis, *in situ* extractive fermentation

S3Cc04 発酵微生物のスクリーニングを考える

○青柳 秀紀[1], 高橋 将人[1], 松﨑 大典[2], 長谷川 智弘[1]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生物資源）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【はじめに】 約 100 年前にバスツールやコッホ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．しかしながら近年，従来の微生物培養法の問題点や限界が指摘され，微生物の集積，分離，培養に関連した新たな方法論や培養法の開発が，様々な微生物関連分野（学術，産業面）で強く求められている．また，従来の法では培養化できていない，自然界に残された 99%の未培養微生物（微生物ダークマター）の利活用が国内外で期待されている [本学会でも未培養微生物（微生物ダークマター）資源工学研究部会*が活動中である]．この様な状況は,「発酵微生物のスクリーニング」においても共通性があると思われる．この現状を踏まえ演者は，新たな方法論や培養法の開発にあたり，国内外で広く一般的に使用されている「振盪フラスコ培養法」と「寒天平板培養法」の実態を知り，それを踏まえ，見直すことで，新たな培養法や方法論が提案できるのではないかと考え，研究を推進している．以上の点を踏まえ，本講演では，演者の研究室で実施してきた研究を中心に紹介する．
*https://www.sbj.or.jp/division/division_mdarkmatter.html

[振盪フラスコ培養法 [1-4]] 振盪フラスコ培養法は約 85 年前に考案され，回分式の液体培養法として，現在も国内外で広く微生物の培養に使用されている．しかしながら振盪フラスコ培養法は，現在に至るまでほとんど変化していない面もある（あまり進歩していない？）．また，振盪フラスコ培養の詳細は十分に明らかにされているとは言い難い．例えば，(A) サンプリング操作はフラスコ内の培養環境や微生物の培養にどのような影響を及ぼすのだろうか？，(B) 三角フラスコと坂口フラスコは広く使用されているが，両者の特性の違いは？，といった点については不明瞭な部分が多い．演者は，“振盪フラスコ培養中の短時間の間歇的な培養栓の開封が集積される培養微生物群集に影響を及ぼす”という新奇な現象を実験の過程で独自に見出した．そこで，培養栓の開封操作の再現性の向上と煩雑さを解消するために，間歇的な通気が可能な Automatic Aeration Flask System（AAFS）を開発した．AAFS を用い，培養期間中に任意の条件で間歇的に空気を通気した（培養栓の開封を模倣）結果，異なる培養微生物群集が形成された．さらに，演者は，フラスコ振盪培養中の気相部と液相部（培養液）の CO_2 と O_2 濃度をリアルタイムにモニタリングできる Circulation Direct Monitoring and Sampling System（CDMSS：フラスコの振盪を中断することなく培養液と気相部の CO_2 と O_2 濃度の測定やサンプリングが可能）を開発した．CDMSS を用いることで，大腸菌やパン酵母などの振盪フラスコ培養における CO_2 と O_2 の経時的な濃度変化を解析し，上述の(A), (B)の疑問を明らかにした．以上の結果を統合することにより新規な微生物スクリーニング法が提案できる．

1. Takahashi *et al. AMB express*, 7, 163 (2017).
2. Takahashi, Aoyagi. *J B B*, doi:10.1016/j.jbiosc.2018.01.009.
3. Takahashi, Aoyagi. *AMB*, doi:10.1007/s00253-018-8922-8. (2018).
4. Takahashi, Aoyagi. Monitoring of CO_2 and O_2 concentrations in the headspace of Sakaguchi flasks during liquid culture of microorganism.*AMB*, in press (2018).

[寒天平板培養法] 約 100 年にわたり，自然界から微生物を単離培養する際，国内外で寒天平板培養法が広く用いられている．しかしながら寒天平板培養法は現在に至るまでほとんど変化していない（あまり進歩していない？）．近年，従来の寒天平板培養法では自然界に存在する全微生物の 1%程度しか培養できないことが明らかとなり，限界が指摘されている．この現状を打破するために，演者は，Specialized Cellulose Film を用いた培養法（SCF 法）を開発した．また演者は，培養初期に優占化する微生物が様々な面で他の微生物の生育を阻害していることを見出し，試料中や培養系からあらかじめ増殖の速い微生物を排除する方法を考案した．さらに，種々の試料前処理法や従来法の問題点を排除した培養法についても研究中である．以上の方法は未培養微生物の培養化に有効であることが示唆されている．

謝辞：本研究の一部は科研費，（公財）住友電工グループ社会貢献基金，科研費特別研究員奨励費 16J00800 の助成を受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．

Considerations for the screening of microbes involved in fermentation

○Hideki Aoyagi[1], Masato Takahashi[1], Daisuke Matsuzaki[2], Tomohiro Hasegawa[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Coll. Agro-bio. Resour. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words Agar plate culture, Erlenmeyer flask, headspace, Sakaguchi flask

S3Cc05 複合微生物系から考える発酵生産

○田代 幸寛[1], 宮本 浩邦[2,3], 酒井 謙二[1]
（[1]九大院・農, [2]（株）サーマス, [3]千葉大・園芸）
tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp

再生可能資源を原料とした発酵による有価物生産プロセスは資源の循環利用性・持続性などを有している．本プロセスは，前処理（資源作物の改変・創製を含む），糖化，発酵，精製に大別されており，各プロセスの要素研究が広範な領域で精力的に展開されている．しかし，本シンポジウムの趣旨に述べられているように，異なる領域研究者の連携は不可欠であり，各領域の非専門性を補完しながら専門性を推進するのが喫緊の課題である．例えば，植物育種研究者は糖化され易い資源作物や発酵微生物の基質利用能力に適した資源作物をデザインする必要がある．一方，発酵工学研究者や合成生物学研究者は前処理・糖化処理で得られた原料を効率的に有価物に変換する発酵法を開発したり，最大限に有価物を生産できる微生物を育種したりする必要がある．さらに，発酵液から高収率に有価物を回収できる精製法も考慮しなければならない．
従来では，19 世紀にコッホが確立した純粋培養法による単一微生物を用いた発酵研究が中心であった．近年，我々は複合微生物系による有価物生産のための発酵法として『メタ発酵』を提唱している [1]．単一微生物が資化できない複合基質（廃棄物など）を複合微生物系では資化できる，殺菌が不要，雑菌混入に対して強い，設備やエネルギーコストが低いなどがメリットに挙げられる．一方，デメリットとしては，単一基質の変換が非効率（基質の奪い合いが生じる），生成物が複雑（ヘテロ発酵となりやすい），微生物解析が複雑，発酵制御が困難，などがある．単一微生物を対象とする多数の発酵プロセスにおける種々のファクター（pH，温度，炭素源，溶存酸素，酸化還元電位，電子キャリヤー物質など）の最適化に関する知見は長年の研究成果により蓄積されている．一方，複合微生物系によるメタ発酵プロセスでも，それらのファクターが生産物挙動にも微生物群集構造にも劇的に変化させるという知見が得られつつあるが，まだ学問分野における理論体系の構築は端緒についたばかりである．しかしながら，複合微生物系を制御できれば，単一微生物のみでは利用できない原料から単一微生物が生産できない有価物に変換することも可能であり，前処理・糖化処理の簡略・省略も期待できる．本講演では，グリーンケミカルとして注目されている L-乳酸・酪酸のメタ発酵プロセスに関する演者らの研究成果を紹介し, 複合微生物系からトータルシステムとしての発酵生産プロセスを議論したい．
[1] 温度による主生産物の制御 [2]
発酵温度に着目し，糖化・殺菌標準生ゴミ培地およびコンポストを用いて，pH を 24 h 毎に 7.0 に振動制御しながら，温度 30℃-65℃でメタ発酵を行った．30℃と 37℃では，酪酸生産が主となる一方，45℃-55℃では，L-乳酸生産が主となった．特に，温度 50℃では，光学純度 100%で L-乳酸生産にメタ発酵で初めて成功し，*Bacillus coagulans* が優占菌であった．本成果は，発酵温度が微生物群集構造を変化させる重要因子であり，温度により有価物を選択できる可能性を示唆した．
[2] 新規 pH 制御法による L-乳酸生産の効率化 [3]
糖化・未殺菌標準生ゴミ培地および[1]と同じ複合種菌を用いて，温度 50℃で，pH7.0 における制御法を検討した．発酵初期より一定制御した場合，発酵終了時間は約 3 分の 1 に短縮されたが，L-乳酸蓄積濃度および選択性は大幅に減少し，優占菌が *Bacillus thermoamylovorans* へ変化した．一方，発酵初期に pH を振動制御後，24 h 以降に一定制御してメタ発酵を行ったところ，発酵時間をさらに短縮でき，高い L-乳酸蓄積濃度，選択性，生産性，光学純度を得た．本成果は，単一微生物とは異なる pH 制御法で L-乳酸生産を効率化および制御できる一例である．
[3]未糖化原料からの L-乳酸生産
未糖化標準生ゴミ培地および[1]と同じ複合種菌を用いて，pH を 24 h 毎に 7.0 に振動制御しながら，温度 50℃でメタ発酵を行ったところ，糖化標準生ゴミ培地と同等の L-乳酸が蓄積された．さらに，細菌群集構造を解析した結果，乳酸生産菌である *B. coagulans* に加えて，*Bacillus hisashii* 類縁菌が優占種であり，生ゴミ中の多糖類の分解に寄与することが示唆された．さらに，体系的フィードバック分離法 [4]により分離した 3 種 14 株の細菌を用いてメタ発酵を検討した結果，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．

1) 田代，酒井，バイオインダストリー, 72, 486-487, 2014. (2) Tashiro et al., Bioresour. Technol., 146, 672-681, 2013. (3) Tashiro et al., Bioresour. Technol., 122, 606-612, 2016. (4) Poudel et al., J. Biosci. Bioeng., 123, 63-70, 2017.

Fermentative productions by mixed culture systems

○Yukihiro Tashiro[1], Hirokuni Miyamoto[2,3], Kenji Sakai[1]
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Sermas, [3]Fac. Horticul., Chiba Univ.)

Key words mixed culture, meta-fermentation, L-lactic acid, control process

S3Cc06 発酵生産のための人工代謝経路デザインの合理化と制約

○本田 孝祐
（阪大院・工）
honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

デンプンやショ糖を原料とした第 1 世代バイオ燃料生産が一定の成熟期を迎え，当該分野における技術開発の焦点は，非可食バイオマスや食品残さなどを原料とした第 2 世代バイオ燃料，あるいは光合成生物等を利用した炭酸ガスからの第 3 世代バイオ燃料生産へとシフトしている．また，燃料性物質だけでなく，機能性化学品や医薬品（およびその合成前駆体）などの高付加価値物質の製造に発酵生産技術を適用させようという試みも活発化している．このように対象となる原料・生産物のレパートリーが拡大するにつれ，発酵生産の分野ではより多様な生産株をより短期間に育種することが求められつつある．
演者らは細胞外に取り出した複数の酵素を組みあわせ，代謝反応を模したカスケード反応を *in vitro* で構築する「*in vitro* 代謝工学」を用いた有用化学品生産に取り組んできた．生きた細胞を用いない本法では，原理上，あらゆる酵素を任意の量比で組み合わせた人工代謝経路の構築が可能となる．この特性により，*in vitro* 代謝工学は，有用化学品生産のためのプラットフォームとして直接的に利用可能なだけでなく，一般的な（= 生きた細胞を用いる）発酵生産における生産株育種のための代謝経路最適化ツールとしても有益である．例えば，Jewett らは，目的の代謝経路を構成する酵素遺伝子群を様々な組み合わせで無細胞翻訳システムに投入することで，バラエティに富んだ *in vitro* 代謝経路ライブラリーを創出する技術を開発している（Karim & Jewett, 2016, Metab Eng, 36: 116-126）．本技術により得られた代謝経路ライブラリーから，所望の変換反応を最も高速で触媒可能なものをスクリーニングすることにより，経路構築に最適な酵素セットを短期間で選定することが可能である．一方，演者らのグループでは，ターゲットとする化学品の生産速度（= *in vitro* 代謝経路のフラックス）を最大化させることを目的に，経路を構成する各酵素の添加量比を最適化する方法論の開発に努めてきた．本法ではまず，それぞれの酵素反応を基質・酵素・補酵素濃度を変化させた条件下で測定し，フィッティングにより適切な速度式を導き出す．これらの速度式を用いることで各酵素の添加量を入力値として目的の化学品の生産速度が算出可能な連立方程式が得られる．ランダムに発生させた酵素添加量のデータセットをこの連立方程式に導入，共益勾配法などの最適化計算プログラムで処理することで，最適酵素濃度比を合理的に求めることができる．グルコースからの L-システイン生産経路を対象とした最適化試験では，上記のプログラムで予測された生産プロファイルと実験的に求めたプロファイルが高い一致性を示すことが確認されており，開発した方法が期待どおりに機能することが示されている（花谷ら, 2017 年度日本生物工学会大会, 3P-E045）．また本法は，一連の代謝反応における律速段階を同定し，律速解消に必要となる酵素の特性を明らかにする上でも有益である．
講演では，代謝デザインの合理化に向けた上述の取り組みを演者らの成果を中心に解説する．また，これらの取り組みを通じて現在顕在化しつつある課題とその解消に向けた展望についても述べたい．

Rational optimization of artificial synthetic pathway using *in vitro* metabolic engineering technology -its impact and limitation-

○Kohsuke Honda
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words syntetic biology, pathway design, optimiztion, *in vitro* metabolic engineering

S3Dc01 黒麹菌の学名は *Aspergillus luchuensis* です

○山田 修
（酒総研）
yamada@nrib.go.jp

黒麹菌やそのアルビノ変異株の白麹菌は，泡盛や焼酎の製造に利用されている有用糸状菌＝国菌です．黄麹菌と同じように原料穀物のでんぷん質を分解する酵素の供給源ですが，大きな特徴として製麹中に大量のクエン酸を生産することが知られています．このクエン酸により泡盛や焼酎もろみは酸性に保たれ，暖かい沖縄や九州での醸造に適しているとされています．九州でも始めは黄麹菌を利用した焼酎製造が行われていましたが，沖縄から黒麹菌が導入されると「其の製品は俗に『ハイカラ』焼酎なる名称の下に市場に歓迎せられ」と広く使われるようになりました．その後，黒い色が嫌われたためかアルビノ変異株である白麹菌が焼酎製造では広く使われていましたが，最近では，黒麹菌も再び使われるようになり「黒なんとか」の製品名で販売されています．
黒麹菌は，1901 年乾により *Aspergillus luchuensis* として初めて報告されました．ところが，10 年後には中澤が泡盛麹から分離した糸状菌を乾の株とは別種の *Aspergillus awamori* と報告するなど，初期からその分類に混乱が見られていました．また，海外では黒麹菌は，欧州でクエン酸生産に利用されている *Aspergillus niger* の 1 種とされていました．そこで，当研究所保存の 37 株，醸造現場由来黒麹菌などについて塩基配列による系統解析を行ったところ，黒麹菌は，*A. niger* とは別のクラスタを形成し，黒麹菌は *A. niger* とは違う生物種であるが示されました．現在では，黒麹菌の学名は *A. luchueinsis* がふさわしいと国際的に認められています．
2016 年，黄麹菌から遅れること 11 年，黒麹菌ゲノム解析の論文が公開されました．これにより，黒麹菌と *A. niger* とのゲノムレベルでの相同性は 89%と推定され，黒麹菌と *A. niger* とが別々の生物種であることが確認されました．また，*A. niger* が生産するとされている 2 種類のカビ毒，オクラトキシン A とフモニシン B2 も黒麹菌ゲノム配列中には生合成クラスタが確認されず，黒麹菌はこれらのカビ毒を非生産性であることが示されています．
黒麹菌は，有性世代の見つかっていない不完全菌とされています．ところが黒麹菌ゲノムを解析したところ，黒麹菌はヘテロタリック株であることが示唆されました．そこで，黒麹菌の有性生殖の可能性について，現在解析を行っているところです．

1) Hong, S. *et al.*, *PLOS ONE*, **8**, e63769 (2013)
2) Yamada, O. *et al.*, *DNA Research*, **23**, p507-515 (2016)

Black koji mold is *Aspergillus luchuensis*

○Osamu Yamada
(NRIB)

Key words *Aspergillus luchuenss*, Black koji mold, genome

S3Dc02 全ゲノム情報を用いた泡盛黒麹菌を含む *Aspergillus luchuensis* の系統解析

○塚原 正俊
（バイオジェット）
tsuka@biojet.jp

沖縄県の伝統的酒類「泡盛」の醸造に用いられている黒麹菌は，分生子が黒色を呈する *Aspergillus* 属の糸状菌である．この黒麹菌の定義や学名については，形態や生化学的な特性などから多くの整理が試みられてきたものの，規定することができない時期が長く続いていた．その後，山田氏らの分子生物学的手法を用いた取り組みにより，黒麹菌は *Aspergillus luchuensis* として再定義された．さらに，*A. luchuensis* NBRC4314 株の全ゲノム解析結果から，全長は約 34.7 Mb，約 12,000 の遺伝子をコードしていること，および機能性に関連した各遺伝子群の様態や他の種との違いなどが明らかとなっている．
一方，黒麹菌の個々の株は異なる産業特性を有することが知られており，一般的な泡盛醸造では異なる 2 株を混合した複菌麹が用いられている．これらのことから，A. luchuensis における種内の系統解析の情報を得ることは，学術的のみならず産業的に重要な情報となり得ると共に，沖縄県の歴史や文化を理解する上で大きな意義がある．そこで我々は，複数の A. luchuensis およびその近縁種を対象とした全ゲノム情報を用いた詳細な系統解析を行った．
次世代シーケンサーを用いて複数の黒麹菌および近縁種の全ゲノム情報を取得した．解析には，菌株寄託機関から入手した株あるいは沖縄県内の自然界より採取した株から得られた情報，およびデータベース上の公開情報を用いた．まず，得られた各株の配列情報から，各株における約 31 kb のミトコンドリア DNA（mtDNA）全長の配列を取得し系統解析を行ったところ *A. luchuensis* 種内の差異は数塩基であり，目的とする種内の系統解析には不十分であった．次に，対象領域を広げるために参照配列である *A. luchuensis* NBRC4314 へのマッピングを行い，その結果から得られた変異情報のうち，Single Nucleotide Variants (SNV) を抽出した．各株の SNV データを用いて系統樹を作成したところ，*A. luchuensis* と *A. tubingensis*，A. niger とが明確に分離することが確認された．また, *A. luchuensis* と *A. tubingensis* の距離と比較して, *A. tubingensis* と *A. luchuensis* は大きく離れているなど相対的な種間距離の詳細が明らかになった．これまでのゲノム解析では，*A. luchuensis* および *A. tubingensis* の差異は必ずしも明瞭でなかったものの，今回の全ゲノム領域を用いた解析結果から *A. luchuensis* および *A. tubingensis* は共に種として明確に独立していることを示す結果が得られた．さらに，*A. luchuensis* の種内系統解析を行ったところ，多くの泡盛酒造所で用いられている泡盛黒麹菌株である ISH1（アワモリ株）を含むグループ（A グループ），および ISH2（サイトイ株）および白麹（カワチ株）を含むグループ（SK グループ）の 2 つに大別できることがわかった． 現在，これらの *A. luchuensis* の詳細な系統解析結果を用いて，商業的に用いられている実用株と離れた系統的位置の株を候補株として特性解析を進めている．
さらに，これら詳細な系統解析の結果を用いて *A. luchuensis* の分岐年代の推定を試みた．本解析に用いた菌株のうち *A. luchuensis* mut. kawathii RIB SC60 は分離年が明確（1918 年）であり，白色という顕著な形態的特徴を有することから，本株は分離された 1918 年に極めて近い時期に確立した株であると推測される．このことから，本株が有する変異を 100 年間の進化の指標とした．その結果，*A. luchuensis* と *A. tubingensis* の共通祖先は約 15,000 年前に分岐し，*A. luchuensis* の 2 グループへは約 400 年前に分岐したと推定された．泡盛醸造は 600 年以上の歴史があるという史実と今回の結果を合わせて考えると，泡盛醸造が数百年間に渡り繰り返される中で黒麹菌が積極的に選抜されることで多数の *A. luchuensis* の系統が分化したと考えられた．これまでの結果では，明確な *A. luchuensis* のグループには海外由来の株が含まれていなかったこと，沖縄からは，*A. niger*，*A. tubingensis*，*A. luchuensis* の全ての種および多数の *A. luchuensis* が確認されたことなどから，黒麹菌は沖縄県，特に泡盛酒造所に源流を有する微生物であると考えられる結果が得られた．

Detailed phylogeny of Aspergillus luchuensis with whole genome comparison

○Masatoshi Tsukahara
(Biojet)

Key words *Aspergillus luchuensis*, phylogenetic analysis, Next generation sequencer, *Awamori*

S3Dc03 *Aspergillus luchuensis* の遺伝子破壊株の造成方法と応用

○水谷 治[1], 渡嘉敷 直杏[2], 高橋 徹[3], 山田 修[3], 外山 博英[1]
（[1]琉球大・農, [2]鹿児島大院・連農, [3]酒総研）
mizutani@agr.u-ryukyu.ac.jp

黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) は，沖縄の伝統的な蒸留酒である泡盛醸造に必要な産業微生物である．*A. luchuensis* は，醤油や味噌，清酒の製造で用いられる黄麹菌 *Aspergillus oryzae* と共に，日本醸造協会より国菌として認定されている．しかしながら，黒麹菌は黄麹菌と比較して分子生物学を含む多くの研究が遅れている．その背景には，ゲノム解析の遅れや研究者数の少なさもあるが，黒麹菌では市販されている細胞壁溶解酵素によるプロトプラスト化が困難であり，*Aspergillus* 属で一般的に用いられているプロトプラスト-PEG 法による形質転換が行えず，遺伝子機能解析が困難な点も大きな理由の一つになっていると思われる．本シンポジウムでは，プロトプラスト-PEG 法による代替え法として，アグロバクテリウムを介した形質転換法 (Agrobacterium-mediated transformation : AMT) の紹介，この手法を利用した破壊株の造成，及び細胞壁 α-1,3-グルカンに着目した黒麹菌のプロトプラスト作製とそれを利用した形質転換について紹介したい．
AMT は，土壌細菌であるアグロバクテリウムが持つプラスミドの一部を植物細胞に入れ，自身が感染しやすいように植物細胞の DNA を組換える働きを応用して，目的の遺伝子を導入する形質転換法である．植物のみならず，*Aspergillus* 属を含む糸状菌においてもアグロバクテリウムが DNA を導入することが明らかとなり，*Aspergillus* 属でも形質転換法の一つとして，利用されている [(1)]．黒麹菌での AMT 法は，まずアグロバクテリウムと大腸菌とで保持できるバイナリーベクターに目的の遺伝子を搭載させた後，そのプラスミドをアグロバクテリウムに保持させる．その後，アセトシリンゴンを含む感染誘導液体培地でアグロバクテリウムを培養し，宿主となる黒麹菌分生子と混合後，メンブランをひいた感染誘導培地プレートに播種し，20 ~ 25℃ で 2, 3 日間培養する．続いて，選択圧をかけた糸状菌用のプレートにメンブランを移し，コロニーが形成されるまで培養する [(2)]．我々は，本手法を用いて非相同末端結合反応に関与する *ligD* 遺伝子の破壊を試みた．本遺伝子の破壊は，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ており，黒麹菌でも同様に相同組換え効率が上昇することを確認した [(3)]．本シンポジウムでは，この *ligD* 破壊株を宿主に，黒麹菌のメタノール低減化に関与する遺伝子破壊株株の造成についても報告する．また，AMT 法は，プロトプラスト-PEG 法と比較して，形質転換体が得られるまで時間が掛かるが，基本的に分生子とアグロバクテリウムを混合するのみで，操作としては簡便であり，多検体の遺伝子破壊等に向いていると言える．そこで我々は，AMT 法を用いて主要転写因子破壊ライブラリの造成を行っており，その進捗状況についてもお話したい．
一方，AMT 法のデメリットとして，セルフクリーニングとして受け入れられづらいことや，マルチに遺伝子を導入すること，Cre 酵素や Cas9 及び guide RNA の細胞内直接導入による Cre-*loxP* システムや CRISPR/Cas9 の利用 [(4, 5)] ができない点が挙げられる．そのため，黒麹菌のプロトプラスト化問題の解決も，必要な状態のままであった．そこで，我々はプロトプラスト化の前培養条件及び細胞壁溶解酵素の検討を行い，プロトプラスト化が可能な条件検討を行った．その結果，貧栄養培地及び静置培養で得られた菌糸に対して，市販細胞壁溶解酵素 Yatalase に加え，α-1,3-glucanase を使用することで，プロトプラストが得られることを発見した．α-1,3-glucanase の効果が認められたので，その基質となる細胞壁 α-1,3-glucan 合成酵素を欠損させれば，Yatalase のみで高収量なプロトプラストが得られるのではと考えられた．そこで，黒麹菌ゲノム上にコードされている 5 つの α-1,3-glucan 合成酵素遺伝子のうち，*Aspergillus 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 *agsE* をアグロバクテリウム法によって欠損させた黒麹菌 *ΔagsE* 株を造成し，Yatalase を用いてプロトプラスト化を行った．その結果，*ΔagsE* 株において黄麹菌と同程度のプロトプラスト化が可能であった．また，これらプロトプラストを用いてプロトプラスト-PEG 法による形質転換を行った所，問題なく形質転換が可能であることを確認した．以上のように，プロトプラスト形成が難しいと思われていた黒麹菌において，*agsE* 遺伝子を破壊することで，*Aspergillus* 属において一般的な形質転換法が利用可能となった．今後は，AMT 法，プロトプラスト-PEG 法の良い点を活用しつつ，黒麹菌の遺伝子機能解析を行っていきたい．

【参考文献】

(1) Michielse CB. et al., J. Bacteriol. (2004), (2) Michielse CB. et al., Nat. Protoc. (2008), (3) Takahashi T. et al., J. Biosci. Bioeng. (2011), (4) Mizutani O. et al., Appl Environ Microbiol (2012), (5) Pohl C. et al., ACS Synth. Biol. (2016)

Construction and application of gene disruptant in *Aspergillus luchuensis*

○Osamu Mizutani[1], Jikian Tokashiki[2], Toru Takahashi[3], Osamau Yamada[3], Toyama Hirohide[1]
([1]Fac. Agric., Univ. Ryukyus, [2]United. Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [3]NRIB)

Key words *Aspergillus luchuensis*, transformation, protoplast, alpha-1, 3-glucan

S3Dc04 黒麹菌による泡盛古酒香バニリン前駆体の生成～古酒と老麹～

眞榮田 麻友美[1], 渡嘉敷 正司[2], 渡嘉敷 みどり[2], 後藤 正利[3], 伊藤 進[1], 上地 敬子[1], ○平良 東紀[1]
（[1]琉球大・農, [2]石川種麹店, [3]佐賀大・農）
tokey@agr.u-ryukyu.ac.jp

泡盛とは，蒸米に黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* を生やして造った麹を唯一の原料とし，そこに水と酵母を添加し発酵させ，得られたもろみを蒸留して製造される沖縄の伝統的な蒸留酒である．泡盛の最大の特徴は黒麹菌を用いた全麹仕込みである．そして，もう 1 つの大きな特徴は 3 年以上熟成させると芳醇な香味を持った古酒になるところである．

泡盛古酒の香味成分の中でも最も特徴的なのがバニリンである．バニリンは，原料米中の細胞壁多糖にエステル結合しているフェルラ酸（FA）に由来する．黒麹菌の有するフェルラ酸エステラーゼによって米細胞壁多糖より遊離された FA が脱炭酸され，4-ビニルグアヤコール（4-VG）に変換され，貯蔵中に非酵素的酸化によってバニリンになると考えられている． FA の脱炭酸反応による 4-VG への変換がどのように起こっているのかは様々な議論がある．Koseki ら（J Ferment Bioeng, 1996）は，もろみ発酵中の酸と蒸留の熱によって FA が 4-VG へ変換されるとしている. Mukai ら（J Biosci Bioeng, 2010）は, 酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）中のフェニルアクリル酸脱炭酸酵素（Phenylacrylic Acid Decarboxylase：PAD1）とフェルラ酸脱炭酸酵素（Ferulic acid decarboxylase：FDC）が共同して FA を脱炭酸し 4-VG に変換すると報告している．その他，フェノール酸脱炭酸酵素（Phenolic acid decarboxylase：Pad）を有する細菌類が発酵中のもろみに混入し，FA を 4-VG へ変換している可能性が示唆されている．このように，バニリン生成に重要な FA の脱炭酸反応による 4-VG への変換が化学反応もしくは，どの微生物のどの酵素によって行われているのかは明らかではなかった．

本研究室においても，泡盛醸造工程における 4-VG 生成についてその要因を検討して来たが，酵母やもろみから分離される細菌類の寄与は低くかった．そこで，我々は *A. luchuensis* のゲノム配列中の細菌類の Pad と相同性を有する配列「*A. luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素候補遺伝子（*Alpad*）」が主要因であるという仮説を立てた．本研究では，*Alpad* 候補遺伝子が実際に発現し，フェノール酸脱炭酸酵素（AlPad）として泡盛醸造中の FA を 4-VG に変換する活性（Ferulic Acid Decarboxylation：FAD 活性）に寄与しているのかを明らかにすることを目的とした．

本研究には，実用菌株である *A. luchuensis* var. awamori ISH1 株を用いた．ISH1 株より得られた *AlPad* cDNA を大腸菌で発現させ，得られたリコンビナント体はホモダイマー（SDS-PAGE で 19.4 kDa，ゲルろ過で 35.6 kDa）であり，明確な FAD 活性を示した．最適温度は 40℃付近，最適 pH は pH 5.7 付近であり，泡盛醸造中の温度や黒麹菌の細胞内 pH で活性があることを明らかにした．FA を含む液体培地で培養した *A. luchuensis* を用いた静止菌体反応により，AlPad は FA により誘導される菌体内酵素であることが分かった．製麹中に AlPad が発現しているかどうかを調べた．製麹時間の異なる麹から得られた無細胞抽出液の FAD 活性量（菌体量を揃えて測定）と，ウエスタンブロッティングによる AlPad の検出量には強い相関があった．また，AlPad の発現量は製麹時間が長くなるにつれて増大することが分かった．これらの結果から，泡盛醸造中の FA から 4-VG の変換の主体は黒麹菌の生産する AlPad であることが示唆された（Maeda et al., J Biosci Bioeng, 2018）．麹中での AlPad の発現量と，もろみおよび蒸留液中の 4-VG 量に正の相関があることも確かめられた（眞榮田ら，第 70 回日本生物工学会大会, 2018）．

多くの泡盛酒造所では古酒用の泡盛原酒を造る際，経験上製麹時間の長い麹（老麹）を用いており，このことは製麹時間が長いほどＡｌＰａｄ量が増大し 4-VG 量が増大するという我々の研究成果と良く一致する．これらのことから，本研究で得られた成果は，バニリン香に富む付加価値の高い古酒の製造技術の確立に貢献することが期待される．清酒や焼酎などにおいては 4-VG はオフ・フレーバーとなるため，本研究成果は 4-VG を減らす技術開発への寄与も期待される．現在，各種オミックス解析により，バニリンだけではなく，麹菌による他の香味成分の生成過程やメカニズムに関係するデータ収集・解析を行っている．これらの研究によって得られる成果は米麹を用いる酒類，その他の醸造食品の品質管理や新製品の開発に繋がることが期待される．

黄麹菌が清酒だけでは無く，味噌，醤油，甘酒，麹漬け等様々な食品に使用されている一方で，黒麹・白麹菌の焼酎・泡盛以外での用途は極めて少ない．発表者らは，地元企業との共同研究により，黒麹を主とする酒種を用いたパンや泡盛蒸留粕より得られる「もろみ酢」を原料とした乳酸発酵飲料などを商品化した．また沖縄県内唯一の種麹店である石川種麹店は全麹仕込みで作った「黒麹玄米ドリンク」を発売している．これらの商品のブラッシュアップや今後の黒麹・白麹を用いた新商品の開発に我々の基礎研究の成果を役に立てて行きたい．また，これらを推進するために，黒麹・白麹研究者によるネットワークを造って共同研究を行い，*Aspergillus luchuensis* の研究を世界に発信するとともに，地域の産業振興に繋げて行きたいと考えている．

Production of a precursor of vanillin, a specific flavor of old awamori '*kusu*', by *Aspergillus luchuensis*

Mayumi Maeda[1], Masashi Tokashiki[2], Midori Tokashiki[2], Masatoshi Goto[3], Susumu Ito[1], Keiko Uechi[1], ○Toki Taira[1]
([1]Fac. Agric., Univ. Ryukyus, [2]Ishikawa Tanekouji, [3]Fac. Agric., Saga Univ.)

Key words *Aspergillus luchuensis*, phenolic acid decarboxylase, awamori, 4-vinylguaiacol

S3Dc05 白麹菌のクエン酸高分泌生産機構に関する研究～トランスクリプトームを手掛かりとしてわかってきたこと～

○二神 泰基[1], 門岡 千尋[1], 後藤 正利[2], 玉置 尚徳[1]
（[1]鹿児島大院・連農, [2]佐賀大・農）
futagami@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

白麹菌（*Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*）は黒麹菌（*Aspergillus luchuensis*）の白色変異株であり，主に焼酎の製造に用いられている．その性質として，白麹菌は黒麹菌と同様に，クエン酸を高度に分泌生産するという特徴をもつ．クエン酸には，もろみの pH を低く保つことで雑菌の増殖を防ぐという重要な役割があり，温暖な気候での安定した焼酎造りを可能にしている．演者らは，麹の製造過程における白麹菌のトランスクリプトームを手掛かりとしてクエン酸生産機構の解明に取り組んでおり，現在までに分かってきたことについて紹介する．

1. 麹の温度管理の意味

焼酎用の麹造りでは，発酵熱により上昇する温度を強制的に下げることが行われており，温度を下げた後にクエン酸生産が活発化する．この温度管理が白麹菌の遺伝子発現にどのような影響をもたらしているのかを捉えるためにマイクロアレイにより解析した[1]．その結果，温度を下げた際に発現上昇する 566 遺伝子と発現減少する 548 遺伝子を同定した．温度を上げた状態では，解糖系から分岐するグリセロール合成経路，トレハロース合成経路，ペントースリン酸経路の関連遺伝子の発現が上昇しており，クエン酸が生じる TCA 回路へのカーボンフローが抑制されているためにクエン酸を高生産できないことが示唆された．また，温度を下げることにより分子シャペロンの発現が減少しており，一方で，アミノ酸，有機酸輸送体などの輸送体関連遺伝子が高発現していたことから，白麹菌が高温ストレスから解放されることによってクエン酸の高生産がはじまることが示唆された．

2. ミトコンドリア局在クエン酸輸送体

クエン酸がミトコンドリアから，細胞質，菌体外へと効率よく排出されることが長年，クエン酸高生産のために重要だと考えられてきた．マイクロアレイの結果，クエン酸の高生産がはじまる麹の温度低下によりミトコンドリア局在型の推定クエン酸輸送体をコードする *ctpA* と *yhmA* の遺伝子発現が上昇していた．白麹菌から CtpA と YhmA を精製し，これらにクエン酸輸送体活性があることを確認した．また，*ctpA* と *yhmA* のそれぞれを単独破壊すると，菌体あたりのクエン酸生産量が減少した．以上のことから，CtpA と YhmA が白麹菌のクエン酸生産に重要なクエン酸輸送体であることが明らかになった．さらに，*ctpA* と *yhmA* の役割を調べるために二重破壊株の構築を試みたが取得できなかったため，Tet-On システムにより *ctpA* を発現制御できる株において，*yhmA* を破壊した．同株を解析した結果，*ctpA* と *yhmA* の機能不全により最小培地でリジン要求性となることが明らかになった．このことから CtpA と YhmA によりミトコンドリアから細胞質に排出されるクエン酸の一部はリジン合成の前駆体として生育に必須な役割をもつ可能性があると考えている．

3. クエン酸生産を制御する転写制御因子

麹造りにおける白麹菌の遺伝子の発現変動を制御する因子として転写制御因子に着目したところ，クエン酸の高生産がはじまる温度低下時に推定転写制御因子をコードする *nosA* と *rosA* の遺伝子発現が上昇していた．*nosA* と *rosA* は，モデル糸状菌 Aspergillus nidulans では有性生殖に関与することが報告されていたが[2,3]，白麹菌には有性世代が見出されていない．遺伝子破壊株，過剰発現株を解析した結果，野生株と比較して *nosA* 破壊株のクエン酸生産量は約 2 倍に上昇し，*nosA* 過剰発現株では 0.2 倍に減少した．このことから，白麹菌において，推定転写制御因子である *nosA* はクエン酸高生産に関与することが明らかになった．

(1) Futagami, T., et al. Appl. Environ. Microbiol. 81:1353-1363, 2015; (2) Vienken, K., et al. Genetics. 169:619-630, 2005; (3) Vienken, K., Fisher, R. Mol. Microbiol. 61:544-554, 2006.

Studies on high citric acid production mechanism of white koji fungus - What has been learned from the transcriptome data of white koji -

○Taiki Futagami[1], Chihiro Kadooka[1], Masatoshi Goto[2], Hisanori Tamaki[1]
([1]United. Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [2]Fac. Agric., Saga Univ.)

Key words *Aspergillus kawachii*, transcriptome, transporter, transcriptional regulation

S3Ec01 環境の酸化還元電位，水溶液や付着物の電気抵抗，電気的中性条件について考慮しましたか？

○伊藤 公夫
（新日鐵住金・先端研）
ito.9t6.kimio@jp.nssmc.com

鉄の腐食は電気化学現象であり，微生物腐食も例外ではない．鉄が Fe^{2+}にイオン化して溶出する部位では鉄から外向きに電流が流れる．この電流をアノード電流という．アノード電流を測れば鉄の腐食速度がわかる．オームの法則から電流に影響を及ぼすのは電位差と電気抵抗であるので，以下，電位，電気抵抗の順に概説する．

1.平衡電位

鉄の酸化反応（アノード反応） $Fe \rightarrow Fe^{2+} + 2e^-$ の 25℃における平衡電位 E を Nernst の式により求めてみる．

$E = E^0 + RT/2F \ln [Fe^{2+}]/[Fe] = E^0 + 0.0295 \log [Fe^{2+}]$ に標準電極電位 E0 = −0.44V，$[Fe^{2+}]=10^{-6}$mol/L を代入すると，E = −0.62V となる．25℃，pH7 における酸素の還元反応（カソード反応）$O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^-$ の平衡電位は，E = +0.81V，水素発生反応（カソード反応）$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$ の平衡電位は，E = −0.41V となる．平衡電位は微生物反応も含めた酸化還元反応が起きるか否かの目安になる．嫌気性の水中で金属鉄が腐食すればカソード反応で水素が発生するが，負電荷の電子は−0.62V の金属鉄の酸化反応から−0.41V の水素発生反応へと，より正の電位の反応へ移動する．25℃，pH7 における硫酸塩還元反応の平衡電位は −0.22V，メタン生成反応の平衡電位は −0.24V であり，水素を電子供与体として用いるよりも，金属鉄を電子供与体として用いた方がエネルギー的に有利なことがわかる．鉄腐食性の硫酸塩還元細菌やメタン生成古細菌を見つけるために，電子供与体として水素でなく金属鉄を用いることは理にかなった方法と考えられる．実環境で酸化還元電位は金電極や白金電極を用いて測定される．微生物が棲息している周囲の水や土壌の酸化還元電位を測定することで，どのような酸化還元反応が微生物と周囲の環境の間で起こり得るか，ある程度予想できる．水中での金属の化学形態は電位と pH の影響を強く受ける．電位−pH 状態図として Pourbaix Diagram が利用でき，参考になる．

2.水溶液や付着物の電気抵抗

電流は回路を形成する．鉄の腐食の場合，Fe^{2+} の溶出で流れるアノード電流と，アノード，カソード間の鉄外部を流れる電流と，酸素や水素イオンが金属鉄表面で電子を受容するカソード電流と，カソード，アノード間の金属鉄内部を流れる電流は，等しい電流量になる．この電流を腐食電流とも呼ぶ．金属外部の電気抵抗が大きければ腐食電流は大きくなれず腐食は進まない．水溶液の電気伝導はイオンが担う．モル伝導率の値が大きい H^+ や OH^-，海水では Na^+ や Cl^- が電気伝導を担うと考えられる．水溶液の電気伝導率は電気伝導率計により測定できる．付着物の電気抵抗も考慮する必要がある．淡水でもバイオフィルムが付着することで金属外部を流れる電流量が増加することが報告されている．鉄腐食生成物の Fe_3O_4，Fe_nS_m，FeS_2 なども電気伝導性があり，電流経路になる可能性がある．

3.電気的中性条件

電気的中性条件（電気的中性の原理，電気的中性の法則ともいわれる．）は，ある程度の空間を占める電解質水溶液の正電荷と負電荷の量は等しいとするものである．ある程度の空間とは曖昧であるが，細胞膜に囲まれた細胞内液を例に説明する．細胞膜の電気抵抗率は 10^6～10^9Ωm であり，電気を通しにくい．細胞膜は大部分がリン脂質二重膜で構成されており，細胞膜を貫通する膜蛋白質のイオンポンプやイオンチャネルを H^+，K^+などのイオンが移動することにより電流が流れる．植物細胞の細胞膜の膜電位は膜の外側に対する内側の電位が−100mV 程度である．微生物では例えば大腸菌の膜電位が外液 pH5.0 で−85mV，外液 pH8.0 で−142mV と報告されている．細胞膜の厚さを 7nm，膜電位を−100mV と仮定して細胞膜にかかる電界を計算すると，細胞膜の外側から内側に向かって 14 万 V/cm もの強電界がかかっている．植物細胞膜に存在する起電性 H^+ポンプは ATP を加水分解して得られるエネルギーを使って，上記電界（正確には H^+の電気化学ポテンシャルの勾配）に逆らって，H^+を細胞外に排出する．電気的中性条件により，H^+排出と同時に交換で K^+がイオンチャンネルを通して細胞内に吸収される．K^+は植物に必須なイオンであり，細胞の浸透圧調節や生長の駆動力に用いられる．起電性 H^+ポンプは植物，カビ，原生生物，原核生物などで確認されている．植物細胞について説明したが，微生物の電気化学現象においても，電気的中性条件に留意する必要がある．

4.結言

実環境ではさまざまな酸化還元反応，さまざまな微生物が混在しており，微生物に起因する電気化学現象と非生物的におこる電気化学現象を明確に分けて解析することが難しい．電気化学現象（例えば微生物腐食）に関わる微生物を単離して（複数種類の微生物の単離が必要な場合もある），微生物がいる条件と，無生物条件で必ず比較しながら，電気化学現象を解析することが基本であると考える．

Did you check oxidation-reduction potential of environments, electrical resistance of solution and adherents and principle of electric neutrality in solution ?

○Kimio Ito
(Adv.Tech.Res.Labs.,Nippon Steel & Sumitomo Metal Corp.)

Key words corrosion, iron, steel, mic

S3Ec02 微生物鉄腐食研究が与える異分野融合のチャンス

○岡本 章玄
（物材研・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点）
okamoto.akihiro@nims.go.jp

細菌による嫌気鉄腐食はパイプライン事故などに繋がる重大な問題であり，その損害は米国内だけでも年間 300~500 億ドルとも言われています．これまで嫌気鉄腐食は硫酸還元細菌がつくる腐食性の硫化水素によって進行・悪化すると考えられてきましたが，近年，固体表面から直接電子を引き抜く「電気細菌」の存在が提案されており，古典的な腐食電気化学と微生物学，分子生物学，生化学などの知識が横断的に必要となる「微生物腐食学」とでも言うような新融合領域が創造されつつあります．本講演では，現在微生物腐食学に身を置く講演者のこれまでの経験や苦労話をご紹介しつつ，どのように異分野へ参入しながら，自分の研究を展開するかと言った重要な問題に対して考えを深めていきたいと思います．

Biological iron corrosion fuses electrochemistry and microbiology

○akihiro okamoto
(NIMS, MANA)

Key words iron respiration, sulfate-reducing bacteria, outer membrane protein, extracellular electron transport

S3Ec03 医療用金属材料開発における電気化学の基礎と応用

○堤 祐介
（医科歯科大・生材研・金属）
tsutsumi.met@tmd.ac.jp

【緒言】生体材料は一般の工業材料と同様に，金属材料，有機材料，無機材料の3種類に分類され，それぞれの特性を活用した医療デバイスに応用され，またその開発が進められてきた．金属材料の最大の利点は，高い強度と大きな延性とのバランスによる優れた靱性にあり，力学的信頼性が高いことから，耐荷重が必要な体内埋入型のデバイスにおいて，特に非常に重要な役割を担っている．一方，金属は化合物やイオン，有機錯体を除外すると，単体では生体中には存在しない物質であるため本来生体機能性に乏しく，有機材料や無機材料のように，生体内物質を模倣あるいは再現することで生体機能を獲得することは不可能である．体内に埋入された材料と生体との相互反応は，常にその界面で生じることを考えると，表面処理により金属材料と生体との界面に生体機能を示す層を形成することが，優れた機械的性質と生体機能性の両立を可能とする，合理的な手段となる．講演者はこれまでに，電気化学的な手法により，医療用金属材料の表面を改質し，さまざまな生体機能性を付与するための研究に取り組んできた．本講演では，これら医療用金属生体材料の表面改質に関する動向や医療デバイスへの実用化例について，また，生体材料を取り扱う上で，必要とされる電気化学の基礎的な知識と，生物学系の研究者と工学系の研究者の差異やそれにより生じる問題等，研究以外の面においてもレビューする．

【方法】金属材料の表面改質は大気中あるいは真空中で行うドライプロセスと水溶液や有機溶媒あるいはこれらの混合物で行うウェットプロセスに大別される．著者らはウェットプロセスの中でも電源に接続して通電を行う電気化学的表面処理に着目して研究を行ってきた．電気化学的処理は単純な構成ながら通電条件，溶液の選定の組み合わせにより自在に表面の制御が可能となっている．例えば，生体機能分子に特定の官能基を修飾し，水溶液中に溶解し通電することで，通常の非特異的吸着よりもはるかに強固な固定化が可能となる．また，陽極酸化では金属材料そのものを，生体機能性をもった酸化物や独特な表面構造を有する層に変質させ，表面を被覆することが可能である．

【結果】ポリエチレングリコール(PEG)，I型コラーゲン，リン脂質極性基を有するポリマー(MPCポリマー)にアミノ基を修飾することで，水溶液中での電着処理が可能であることを確認した．チタン表面にこれらの分子をカソード処理により固定化した試料は，タンパク質吸着抑制，血小板粘着抑制，抗菌性や硬組織適合性を示すことが確認された．一方，チタンやジルコニウムに対して放電反応が生じる程度の電位域にてアノード処理を施すことで，表面に多孔質な酸化皮膜を容易に形成することができ，硬組織適合性の向上や抗菌性の付与に有用であることが確認された．これらの結果から，電気化学的表面処理は，次世代の医療デバイス開発に有益な手法であるといえる．

Basics and applications of electrochemistry for development of metallic biomaterials

○Yusuke Tsutsumi
(Inst. Biomater. Bioeng., Tokyo Med. Dent. Univ. (TMDU))

Key words metallic biomaterials, electrochemistry, surface treatment, biofunctional property

S3Ec04 光合成を電気化学で測る，操る

○中西 周次[1,2]
（[1]阪大・太陽エネ化学研究セ, [2]阪大院・基礎工）
nakanishi@chem.es.osaka-u.ac.jp

光合成では，可視光エネルギーにより，水を電子源として二酸化炭素が還元固定化される．現在，私たちが暮らす大気圏環境を光合成が形成してきたことを考えると，光合成における光エネルギー変換プロセスは，環境エネルギー問題の解決法を考える上で大変参考になる．実際，化学の分野では，こうした光合成機能の人工化を目指した，いわゆる人工光合成研究が活発に行われている．一方，天然の光合成には，もう一つの特筆すべき機能として，変動する太陽光エネルギーに対するレドックス恒常性が備わっている．変動する太陽光への適応は，光合成生物がその生命を支える上で本質的に重要である．こうした光適応が全ての光合成生物に備わることを考えると，その光適応能の理解と制御は光合成を利用した生物工学プロセスを考える際にも重要であると言える．
自然界における太陽光強度は，地球の自転に伴って24時間周期で変化する．一方，太陽光強度は，雲や木の葉の動きにより，短周期かつ予測不可能なかたちでも変化する．こうした規則的あるいは不規則的な太陽光強度の変化に適応するためには，光強度の強弱を検知する仕組みが必要であり，多くの場合，細胞内レドックス状態がその役割を担っている．例えば強光条件下では，系外への電子排出（還元反応）に比べ，系内への電子の流入（酸化反応）が速く，細胞内は過剰な還元状態となる．過剰還元状態で生成する活性酸素種は細胞にダメージを与え得るので，強光条件では，新しい電子排出経路の開設や電子排出フラックスの増強などが起こり，細胞内レドックスの恒常性が保たれる．
我々の研究グループでは，電気化学的手法が「分子集合系の酸化・還元反応を操るのに長けている」ことに着目し，光合成のレドックス恒常性の起源と機構，およびそれがミクロ生態系に及ぼす影響に興味を持って研究を進めてきた．これまでに，光合成細菌の細胞内レドックスを電気化学的に制御および検出する方法を開発している．これらの手法を駆使し，最近は特に，外的要因によるレドックス変動と内因性の自発的なレドックス変動との間の相互関係に注目した研究を展開している．光強度を変化させながら，シアノバクテリア *Synechococcus elongates* PCC7942を含む培地の開回路電位（OCP）を測定した結果，光強度の増大と共にOCPは負にシフトするが認められた．一方，一定の光強度条件（恒明条件）においてもOCPが24時間周期で自発振動することも見出された．時計遺伝子のノックアウト変異株ではこうしたOCPの振動（リズム）は得られなかったことから，このOCP振動が内因性の概日時計により誘起されていることが明らかになった．重要なことに，シアノバクテリアの内因性のレドックス変動は，環境の明暗変化による外因性レドックス変動に匹敵するレベルで変化していた．
このように，電気化学的手法を駆使することで，これまでに知られていなかった内因性レドックスリズムの存在，およびその外因性レドックス変動との定量的相関を把握することができた．この手法は，他の遺伝子操作等の手法との干渉が少なく，実際，レドックスリズムと遺伝子導入に基づく生物発光リズムとの同時検出も可能であることが示されている．これらの結果は，電気化学的手法の有用性を示す一つの例と言えよう．一方で，現状では，OCPが細胞内のどのレドックス種に関する情報を反映しているのかは明確になっていない．また，OCPには電気化学セル内で並行して進む他の非生物学的プロセスの影響も反映されうる．これらの問題の中には電気化学的手法の原理的な限界に基づくものも含まれる．本講演では，上記の我々の取り組みを例に，生物工学的プロセス観点から電気化学的手法の可能性と限界について議論したい．

Electrochemical detection and regulation of intracellular redox of photosynthetic microbes

○Shuji Nakanishi[1,2]
([1]RCSEC, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

Key words electrochemical cultivation, photosynthetic bacteria, cyanobacteria

S3Fc01 工学システムの進展から見る窒素マネジメントの現状と課題

○寺田 昭彦
（農工大院・工）
akte@cc.tuat.ac.jp

産業革命以後の爆発的な人口増加に伴う食糧生産需要の増大に対応するため，ハーバー・ボッシュ法による不活性窒素化合物である窒素ガスの固定化が行われてきた．ハーバー・ボッシュ法の発明・実用化により，肥料の効率的な大量生産が可能となり，食糧生産量を飛躍的に向上させた．一方で，過剰に投与された肥料により，反応性窒素が自然環境に残存し，地球環境には窒素が過多に存在することになった．このような状況により，沿岸部における富栄養化や貧酸素水塊，地下水の硝酸性窒素汚染などの水環境問題が顕在化した．2100 年に地球環境に存在する反応性窒素は 2010 年と比較して約 30%増大することが予想されており（Fowler et al. 2015 Atoms. Chem. Phys. 15(24):13849-13893），窒素は 21 世紀における大きな地球環境問題として立ちはだかっている．

窒素のよる地球環境・水環境汚染問題を論じる際，常にトレードオフが存在する．上述した地表に存在する窒素化合物には，食糧生産と環境問題のトレードオフが生じる．排水処理などの工学システムにおける窒素除去にもトレードオフが存在する．排水中の窒素除去には生物学的窒素除去である硝化・脱窒法が用いられているものの，運転コストが高く，窒素除去と運転コストのトレードオフが生じる．このトレードオフの解消のため，嫌気性アンモニア酸化（アナモックス）細菌を利用した，硝化・脱窒法よりも低コスト・省エネで運転可能な部分硝化－アナモックス法が開発され，実用化が世界各地で急激に進んでいる．一方で，部分硝化では温室効果ガスおよびオゾン層破壊物質として知られる亜酸化窒素（N_2O）の生成量増大を引き起こす．ここに窒素除去の低コスト化と高い温室効果能を有する N_2O 排出という，別のトレードオフが生じる．

窒素問題を議論する上で生じるトレードオフを解決する革新的技術開発が今後必要となる．上述した省エネ化と N_2O 排出のトレードオフは，供給する酸素を窒素化合物と対抗する方向から供給する対抗拡散型バイオフィルムの利用が効果的である．講演者らは，ガス透過膜を用いた対抗拡散型バイオフィルム法による窒素除去法を提案している（Kinh et al. 2017 Water Res. 124:363-371）．ガス透過膜を介する精密な酸素供給と，バイオフィルム内の好気部位がバイオフィルムの底部に形成されるユニークな構造により，N_2O を窒素ガスに変換する細菌群の活性を高めることが可能である．さらに，ガス透過膜を酸供給素材として用いることにより，曝気コストが削減可能であり，省エネ化と N_2O の排出抑制の双方を達成できるシステムとして，実用化が期待されている．

窒素除去と運転コストのトレードオフは，排水中に存在する窒素化合物を資源として見立てることにより，解決できる可能性がある．水素酸化細菌やメタン酸化細菌の一部は，有機態窒素を取り込んで高密度な微生物タンパク質を細胞内に蓄積することが可能である（Matassa et al. 2016 Water Res. 101:137-146）．これらの細菌群の機能は，窒素化合物を「処理」の対象から「回収」の対象へと発想の転換を可能にする．キーとなる細菌群の包括的な生理生態解析による最適な条件の解明と，システム開発が今後の課題といえる．

工学システムにおける新規細菌群の機能特性の解明と，それらを用いた利用可能技術の開発といった，双方の進展が，過多に存在する窒素化合物の適切なマネジメントにつながることを期待したい．

Current status and challenges of nitrogen management: Lessons from advancements of engineered systems

○Akihiko Terada
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words nitrogen removal, nitrification, denitrification, nitrous oxide

S3Fc02 硫化カルボニルの生物地球化学循環と安定同位体比を用いた動態解析

○服部 祥平[1], 亀崎 和輝[1], 小川 貴弘[2], 片山 葉子[2], 吉田 尚弘[1]
（[1]東工大, [2]農工大）
hattori.s.ab@m.titech.ac.jp

地球温暖化は人類が直面している喫緊な課題である．地球温暖化の将来予測を行うためには，温室効果ガスによる地球を温暖化する効果だけでなく地球を冷却する効果を正確に見積もることが重要である．硫酸エアロゾルは自身が太陽光の散乱によって冷却効果を有するだけでなく，雲核として働くことで水滴(雲)を形成することで間接的な冷却効果を有する．エアロゾルは気候変動に大きな影響を及ぼすにも関わらず，その科学的理解度は低く，Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)の報告書でも信頼度が低い(L)要素として報告されている[IPCC AR5, 2013]．このため，硫酸エアロゾルの起源や生成過程を理解することは重要である．

硫化カルボニル(COS または OCS)は清浄大気中で最も多く存在する硫黄化合物である(約 500 ppt) [Chin, M. and Davis, D. D., 1995 JGR.]．COS は対流圏において安定であるため，成層圏へ輸送され光化学反応によって成層圏硫酸エアロゾルを形成する[Crutzen, 1976 GRL.]．この成層圏硫酸エアロゾルは地球の放射収支に負の影響を与え，オゾン層破壊に関与するが，その動態に不確実性が高い．このため，成層圏硫酸エアロゾルの主たる前駆体である COS の環境動態の詳細な理解は地球の気候変動を理解・予測する上で重要である．それにも関わらず，COS の研究例は CO2, CO2, CH4, N2O などの温室効果ガスに比べ少なく，生成および消失過程に不明点が多い．

土壌を含む生物圏は COS の主要な消失源の一つである．気温や水分量に対する応答から，土壌における COS の分解は土壌微生物によるものだと考えられている．事実，土壌から COS 分解能をもつ微生物が単離されている[Kato et al., 2008 Microbiology]．しかし，その大気中 COS への微生物の寄与や微生物による COS の分解メカニズムは不明である．そこで，発表者が開発した COS の硫黄同位体組成測定装置[Hattori et al., 2015 Anal. Chem.]を用いて微生物による COS 分解時の硫黄同位体分別係数の決定と COS 分解酵素と微生物の同位体分別係数をから微生物が COS を分解する際のメカニズムの解析を行ってきた．これまで，試験管内に作成した寒天培地に土壌から単離した微生物を Mycobacterium spp. Williamsia sp. 及び Cupriavidus spp. 培養し，微生物が COS を分解する際の濃度と硫黄同位体組成の変動を観測した．さらに，活性汚泥から単離された Thiobacillus thioparus THI115 と THI115 から抽出・精製された酵素 COSase についても COS 分解時の濃度と硫黄同位体組成の変動を観測した．

得られた結果は全ての微生物において OC32S の取り込みが OC33S および OC34S の取り込みよりも速いく，同位体分別係数は－2 から－4‰であった．微生物による COS 分解時における硫黄同位体分別係数は COS の分解速度が異なるにも関わらず微生物の属ごとに同じ値をとった．このことから微生物による COS 分解時の同位体分別係数は分解速度でなく，微生物の構造に依存することがわかった．そこで，微生物と酵素による同位体分別係数の違いから微生物による COS 分解メカニズムの推定を行った．Thiobacillus thioparus THI115 と THI115 から抽出された硫化カルボニル分解酵素 COSase による同位体分別係数はそれぞれ－3.7 から－2.2‰であった．THI115 が COS を分解する際の同位体分別係数-3.7‰は生体膜を拡散する COS の同位体分別係数に等しく，微生物が COS を取り込む際の律速段階は生体膜の通過であり酵素による COS の分解は早いことが示唆された．

COS は成層圏硫酸エアロゾルの前駆体としてだけでなく，一次生産量のトレーサーとして有用であることが知られている [Campbell et al., 2008 Science]．このように生物は COS の動態に密接に関わっており，生物は COS を通じて間接的に大気環境に影響を与えている．このため，発表者のグループは大気中の 500ppt の COS を濃縮し，同位体計測を大気観測レベルで可能にする大容量大気濃縮捕集装置を近年開発した(Kamezaki et al. in prep)．発表では，この可能性と同位体を用いた COS の生物地球化学循環研究，特に生物の寄与を明らかにする研究の方向性に関して議論する．

引用文献

・Chin, M.; Davis, D. D. J. Geophys. Res. 1995, 100 (D5), 8993－9005.
・Crutzen, P. J. Geophys. Res. Lett. 1976, 3 (2), 73－76.
・Kato, H.; Saito, M.; Nagahata, Y.; Katayama, Y. Microbiology 2008, 154, 249－255.
・Hattori, S.; Toyoda, A.; Toyoda, S.; Ishino, S.; Ueno, Y.; Yoshida, N. Anal. Chem. 2015, 87 (1), 477－484.
・Campbell, J. E.; Carmichael, G. R.; Chai, T; Mena-Carrasco, M.; Tang, Y.; Blake, D. R.; Blake, N. J.; Vay, S. A.; Collatz, G. J.; Baker, I.; Berry, J. A.; Montzka, S. A.; Sweeney, C.; Schnoor, J. L.; Stanier, C. O. 2008. Science 322: 1085-1088.

Biogeochemical cycle of carbonyl sulfide elucidated by stable isotopic analysis

○Shohei Hattori[1], Kamezaki Kazuki[1], Ogawa Takahiro[2], Katayama Yoko[2], Yoshida Naohiro[1]
([1]Tokyo Tech, [2]Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words carbon dioxide, carbonyl sulfide, sulfate aerosol

S3Fc03 結晶性酸化鉄の微生物還元とその地球炭素循環との関わり

○堀 知行
（産総研）
hori-tomo@aist.go.jp

鉄は，地球上第四位の構成元素であり，その多くは結晶性鉄鉱物として陸上土壌圏および海底地下圏に広く分布している．鉱物などの配位化合物を形成する際，鉄は二価または三価の陽イオンの形態をとっており，両者の安定性の差は極めて小さい．この事は，鉄原子が電子を他から受け取りやすく，かつ他へ渡しやすいという重要な性質を生み出している．鉄化合物は，生物学的および化学的な酸化還元を受ける事で二価と三価の形態を行き来し，それにより地球上の炭素・エネルギー循環に重要な役割を担っている．我々は，嫌気有機物分解の中心中間代謝産物である酢酸が，嫌気土壌においてメタン生成菌に利用されるだけでなく，結晶性酸化鉄の存在依存的に新規な鉄還元菌に取り込まれることを明らかにした [1]．これまでに難利用性と考えられてきた結晶性酸化鉄の微生物還元を示した初めての事例である．結晶性酸化鉄の還元はメタン生成と並行して僅かに起こるマイナーな反応であるものの，地球上における嫌気土壌圏の広がりと鉄の膨大な存在量を考えると，その総和は極めて大きいことが予想される．そこで，鉄還元菌の実体を探るべく，様々な自然環境試料（水田土壌，森林土壌，湿地土壌，用水路底泥，海底コア堆積物）を微生物接種源に用い，結晶性酸化鉄（Goethite, Lepidocrocite, Hematite, Magnetite）と酢酸を基質として長期培養を行った [2]．16S rRNA 遺伝子を標的とした次世代シークエンスにより培養系の構成種を綿密に解析した結果，Deltaproteobacteria 綱細菌群が優占化するものの多種多様な微生物の集積が観察され，分類群ごとに鉄利用性が異なることが示された．加えて，電子受容体を溶解性 Fe(III)に置き換える二段目培養に供することで，*Geobacter* 属細菌 5 種，*Pelobacter* 属細菌 1 種の新規な鉄還元菌の分離培養に成功し，そのうち 1 種は既知の鉄還元菌に比べて高い結晶性酸化鉄の還元活性を示した．これにより，結晶性酸化鉄の還元を担う多種多様な微生物が自然環境中で普遍的に存在していることが見出され，それぞれユニークな代謝様式を有していることが強く示唆された．さらに，鉄鉱物が豊富な海底地下圏における鉄還元菌を探索すべく，国際深海掘削計画（IODP）第 337 次研究航海「下北八戸沖石炭層生命圏探査」に参加した．海底下約 2.5km までの地球深部で有機物が微生物群により分解され，さらにメタン生成が最終電子受容プロセスである証拠が複数示されているが [3]，ある特定の深度において生物学的鉄還元が起こっているという地球化学的データが近年報告された [4]．我々は，深度の異なる 15 の海底コア堆積物試料を微生物接種源に用い，結晶性酸化鉄と酢酸を基質とした長期集積培養過程を次世代シークエンスにより網羅的に明らかにするとともに，上述の二段培養法を用いることで鉄還元が見込まれる深度付近から Firmicutes 門に属する 2 種の鉄還元菌の分離培養に成功した．これらの事は，海底下深部の炭素循環に鉄還元菌が密接に関与していることを強く示唆するものである．現在，鉄還元のより直接的な証拠を得るため，海底コア堆積物自体に ^{13}C-酢酸と結晶性酸化鉄を投入し，内在する微生物群による ^{13}C 取り込みの高感度検出を試みている．一方で我々は，酢酸に加え，メタンを電子供与体とした培養系を構築しており，その中で ANME-2d や Nitrospirae 門に属する新規微生物群の高度集積化を確認している．結晶性酸化鉄の還元と地球炭素循環の関わりは，まだほんの一端しか分かっていないが，未知微生物の分離培養や機能解明，地球化学との融合を通して，その全貌が明らかにされていくと考えられる．

1) Hori *et al.*, ISME J, 4:267-278, 2010
2) Hori *et al.*, Front Microbiol, 6:386, 2015
3) Inagaki *et al.*, Science, 349:420-424, 2015
4) Phillips *et al.*, Geochem Geophy Geosy, 18:2076-2098, 2017

Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides and its impact on global carbon cycle

○Tomoyuki Hori
(AIST)

Key words Fe(III) reduction, deep biosphere, isolation, high-throughput sequencing

S3Fc04 リン最前線－Ｐイノベーションとリン循環産業ビジョン－

○大竹 久夫 [1], 常田 聡 [2]
（[1]早大・総合研究機構, [2]早大・先進理工）
hohtake@bio.eng.osaka-u.ac.jp

人体を構成する 6 つの多量元素(重量比率 1%以上)の中で，リンだけが日本に資源がない．健康な人は一日に約 1 グラムのリンを必要とするから，約 1.27 億人の日本人が生きるには毎年約 4.6 万トンものリンを必要とする．「リンのない」日本は，国民の生命を維持するためだけでも，毎年少なくとも約 4.6 万トンのリンを海外から輸入し続けなければならない．経済的にみても，海外から持ち込まれるリンがなければ，年間約 80 兆円の飲食料の最終消費が成り立たないばかりか，300 兆円近いわが国の工業生産にも影響を及ぼす．経済はともかく国民の生命を維持するためだけでも，少なくとも毎年約 4.6 万トンのリンを海外から入手し続けなければならないという事実は，日本にとりリンの確保がいかに根源的で避けて通れない問題であるかを物語る．今日，人間はほとんどのリンを，地下資源のリン鉱石から得ている．自然界でリン鉱石が生成するには何千万年もの長い年月が必要であるから，人間のライフスパンからみれば，リン鉱石は枯渇する天然資源と言わざるをえない．地球が 46 億年という悠久の時間をかけて育んできたリン鉱石を，いま人間はたった 450 年(残り 270 年)ほどで使い尽くそうとしている．かって世界最大のリン鉱石輸出国であった米国は 1995 年より輸入国に転落し，中国のリン鉱石輸出力もすでに最盛期の約 1/20 まで低下している．さらに厄介なことには，世界の約 75%の埋蔵量を誇るモロッコのリン鉱石が，カドミウムやウランなどの有害物質を多く含んでいることがある．日本同様に「リンのない」欧州は，有害物質を多く含むモロッコのリン鉱石への輸入依存から抜け出すため，欧州内で二次リン資源(リン含有廃棄物や副産物)のリサイクルを促進する EU 肥料法の大改正を行っている．リンはまた多くの製造業分野で使われており，「産業の栄養素」とも呼ぶべき重要な役割をになっている．高純度のリン素材は，半導体，液晶パネル，高機能性レンズ，自動車，二次電池，医薬品，食品(ハム，チーズ，サラダ油，ポテトチップスなど)や難燃性プラスチックスなどの広範な製造分野で使われている．リンほど工業用素材としての重要性が理解されてこなかった元素は珍しい．「リン＝肥料」といった短絡的な見方は改めなければならない．高純度リン素材は，リン元素の単体である黄リンから製造される．黄リンは自然界には存在せず，リン鉱石を高温(1,400 度 C)の電気炉内で炭素熱還元して製造される．1 トンの黄リンの生産には約 14,000 kWh もの電力が必要となるため，世界で約 80 万トンの黄リンを生産するだけで年間約 112 億 kWh (電気自動車約 650 万台分)の電力を消費している．加えて，リン鉱石に含まれる天然放射性物質による環境汚染の問題もあり，世界の黄リン生産はいま存続の危機にある．日本の黄リン生産はすでに第二次オイルショックの時代に終焉し，現在年間約 2 万トンの黄リンのすべてを海外から輸入している．黄リンの世界の需給バランスが崩れる可能性は，リン鉱石よりも遥かに高い．「リンのない」日本は世界屈指(第 7 位)のリン消費大国であり，年間約 52 万トンものリンが持ち込まれている．この内，食飼料や鉄鉱石などに含まれて国内に持ち込まれるリンが約 29 万トン，肥料を含むリン製品として輸入されるリンが約 23 万トンある．日本国内で発生する二次リン資源には，製鋼スラグ，食品廃棄物，畜産廃棄物や下水汚泥などがある．家畜ふん尿がほぼ全量農業に利用されていると信じれば，国内におけるリンリサイクル率は約 23%になる．リンを全面的に海外からの輸入に頼ってきた日本には，持続可能なリンのバリューチェーンは存在しない．日本がリンの過度な輸入依存から脱却するには，(1)国内の二次リン資源から効率よくリンを回収し，(2)回収リンから省電力で黄リンを製造して，(3)黄リンを出発原料に高機能性リン化合物を製造できる技術イノベーション(P イノベーションと呼ぶ)が必要である．P イノベーションは，二次リン資源からのリン回収事業に経済的なインセンティブを与え，わが国におけるリン循環産業の振興に貢献することが期待される．深刻なリン資源問題が突如発生した時に，いまの日本ではなすすべがないことは，2008 年のリンショック(供給不足による争奪戦の激化)の経験から明らかである．欧州ではリンショック以降，持続的なリン利用の実現が重要な政策課題の一つとなり，リン鉱石と黄リンが EU の戦略物資に指定され，多様な利害関係者による分野を越えた総合的な取組みが行われている．しかし日本では，リンショックの教訓はほとんど活かされておらず，未だにリン問題を俯瞰して総合的に政策を立案している国の部署もなければ，リンの科学と技術について専門的に研究している公的な機関もない．リン問題については，リンに関するあらゆる情報を収集し「知のイノベーション」の先頭に立つことのできる専門機関が必要である．早稲田大学リンアトラス研究所は，リンに関するわが国唯一のシンクタンクとして，この「知の空白」を埋める作業に取組んでいる．

The cutting edge of P management − P innovation and circular industry vision

○Hisao Ohtake[1], Satoshi Tsuneda[2]
([1]Comp. Res. Org., Waseda Univ., [2]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words phosphate, innovation, circular industry

S3Gc01 〈招待講演（韓国生物工学会）〉

Analysis of carbohydrate-protein interaction

○Jeong Hyun Seo
(Sch. Chem. Eng., Yeungnam Univ., Republic of Korea)
jhseo78@yu.ac.kr

Understanding of the molecular relationships in carbohydrate-protein interaction is able to provide useful information about biological processes in living organisms and also helpful for development of potent biomedical agents. Herein, we developed facile and rapid carbohydrate modification methods to immobilize various carbohydrate types on substrates, in which carbohydrates were coupled with amine(NH2-) or thiol(SH-) group and modified carbohydrates were immobilized directly and as oriented formation on glass or gold surface, respectively. The interaction for Vibrio cholera toxin protein-GM1 pentasaccharide was investigated through various nano-bio analytical tools, such as atomic force microscopy (AFM), electrochemical (EC) detection system, surface plasmon resonance (SPR), and carbohydrate microarray. We evaluated and compared the interactions of toxin proteins with GM1 and its analogues (asialo GM1, GM3, Lsta, Lstb, and lactose). We had different information from each tool, briefly, effects of structural and binding position differences from AFM unbinding force, sensitivity from EC potential shift, and relative kinetics from SPR evaluation. In addition, we investigated role of ctxA toxin subunit and concluded that complexation of ctxAB (whole toxin) enhanced binding affinity and specificity. Collectively, in these studies, we measured the interaction unbinding force, electrochemical signal, and kinetic constants, and these evaluations made it possible to obtain contribution of each sugar moiety and broaden the interactive mechanism during the interaction.

Analysis of carbohydrate-protein interaction
○Jeong Hyun Seo
(Sch. Chem. Eng., Yeungnam Univ., Republic of Korea)

Key words carbohydrate-protein interaction, atomic force microscopy, electrochemical detection, Vibrio cholera toxin

S3Gc02 進化工学からみた材料結合性ペプチド・タンパク質の雰囲気

○梅津 光央
（東北大院・工）
mitsuo@tohoku.ac.jp

20 種類のアミノ酸で表現されるタンパク質は，酵素や抗体に代表されるように他の分子では難しい高い分子特異性と親和性をもつ分子認識機能を設計できる分子である．そして，現在では，自然界で行われてきた「圧倒的な規模の核酸群から，環境外圧によって特定の核酸情報群が選択される」という進化を試験管の中で模倣した進化工学的操作を用いて，有機分子やタンパク質などの「分子」を標的対象とせず，プラスチックスの分子集合体や無機材料表面などの非分子系材料をも分子認識対象としたペプチドや抗体分子が取得され始めている．無機材料に結合するバイオ分子として，2000 年に材料表面に結合するペプチドが報告がされている．こういうペプチドはおおむねアミノ酸 10 残基くらいの長さで機能をうみだすことができる．我々も様々な無機材料表面に親和性をもつペプチドを取得してきたが，興味深いことに無機材料表面と同じような等電点をもつペプチドが取得されることが多い．単純に考えると，標的材料と反対の電荷をもつ方が結合に優位なように思われるが，そうなるのはまれであった．また，ペリレンのような芳香族系の平面構造をもち水に溶けにくい有機分子が水中で形成する分子結晶粒子の表面に結合するペプチドにつも取得しているが，意外にも疎水的なペプチドではなく水に可溶な特性をもっていた．計算化学的な手法とアラニンスキャン法で結合に関与する相互作用を解析したところ，このペプチドは，σ-π 相互作用のような静電的相互作用をもちいて結合していることが示唆され，分子特異性を出すためには，静電的相互作用を用いる必要があるのではないかと推察している．

ペプチドは様々な利点はあるが，低分子であるがゆえ結合する力を強くすることが困難な時がある．また，いろいろな材料の表面の違いをどこまで認識できるかという可能性もある．そこで，我々は，ペプチドと比較し，標的を認識する表面積が大きい抗体を使って無機材料表面を認識して結合できる分子を創出することを行ってきた．抗体をつくるに際しては，ラクダ由来の抗体分子から抗原を認識するドメインだけを使っている．ラクダ抗体はヒト抗体と違い単量体で認識機能をもつ．ラクダ抗体では CDR1～3 の 3 つのループ構造が，抗原をキャッチするために使われるアミノ酸配列の部分であるが，この 1 つの部分（CDR1）を材料に結合するペプチドの配列に変える．そうすると，ペプチドと同じレベルの結合力をもつ抗体をつくることができる．その後に，結合に使われている他の部分（CDR3）のアミノ酸配列をランダム化して，その中で材料により強く結合するものをとってくると，2 つの指で材料に結合することになるので，より強く結合することができる．そのような方法を提案し，実際にこれを使っていろいろ材料に結合する抗体をつくってきた．

興味深いことに，CDR3 をランダム化して標的材料へ親和性をもつ配列を取得するのではなく，CDR1 に移植した配列を CDR3 に移植した場合は，CDR3 へ移植前の抗体から親和性はまったく向上しなかった．これは，移植したペプチド配列が原子組成を認識しているのではなく，何かしらの表面構造を認識し，その構造は表面に均一に存在しているのではないことを示す．また，CDR3 のランダムライブラリーから選択されてくる配列をみると，材料によってヒスチジンが多く選択されてくる系とアルギニンが選択されてくる系が存在することも分かった．この系に分かれる理由は不明であるが，無機材料に対する表面構造に関して何かしら新しい知見を与える可能性があると考えている．

こういった抗体の結合メカニズムについては，熱力学的な解析も行っている．いろいろな温度で解離平衡定数を測定することによって自由エネルギー変化を評価した結果，基本的にはエンタルピーの寄与で結合していることがわかった．エンタルピー寄与とは何かというと，静電的な相互作用で，エントロピーは疎水的な相互作用の寄与といわれている．したがって，エンタルピーの寄与であるということは，水素結合やイオン結合，配位結合のような積極的な静電的な結合で表面を認識していることがわかる．この抗体は疎水的相互作用のような非特異的に吸着するのではなく，積極的に材料表面に存在している OH 基や酸化亜鉛などを認識して結合しているのではないかと考えている．

What property of material surface artificial material-binding peptide/ protein emerges

○Mitsuo Umetsu
(Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words antibody, molecular evolution, peptide

S3Gc03 水中強接着性細菌タンパク質 AtaA の非特異的相互作用の謎に迫る

○堀 克敏
（名大院・工）
khori@chembio.nagoya-u.ac.jp

動物細胞であれ微生物細胞であれ，細胞接着は，生理活性，増殖，分化，感染，情報伝達など様々な細胞機能を決定づける重要なプロセスである．いずれの場合も，細胞表層に存在する分子，特にタンパク質が接着の役割を担っている．細胞接着の典型的な相手として，同種・異種の細胞（細胞間接着），ECM，人工材料表面が考えられる．
細胞間接着の例として，動物細胞のカドヘリンは同じ分子同士で結合し細胞集合体を形成する．大腸菌やサルモネラ菌のピリ先端に存在するレクチンサブユニットは細胞表層の糖鎖に結合し，宿主への感染を媒介する．ECM への接着に関しては，動物細胞のインテグリンがフィブロネクチンの RDG 配列を特異的に認識して結合する例が有名である．近年，認識機構は様々であるが，感染のためにフィブロネクチンをターゲットとする沢山のタンパク質（FnBPs）が様々なバクテリアから見つかってきている．人工材料表面に対しては，動物細胞の接着分子は，血栓など厄介な非特異的吸着を引き起こすこともあるが，一般に吸着力は弱く，足場依存性細胞の培養では，通常，培養器表面を ECM でコーティングすることが行われる．しかし，微生物細胞に目を転じると，*Candida albicans* の Als や *Enterobacteriaceae* の Curli，多くの病原菌のピリやべん毛が比較的強く材料表面に接着し，その後のバイオフィルム形成に働く．
このように，細胞はその表層に様々な接着性タンパク質を有するが，接着メカニズムは多様であり，特異性も厳密なものから，非常に幅広くて非特異的吸着に近いものまで存在する．タンパク質の接着機構の解明は，これを制御して再生医療や感染制御に応用するためにも，細胞生物学の重要課題である．しかし，「鍵と鍵穴」に例えられる生体分子同士の特異的相互作用と比べると，人工材料表面に対するタンパク質の非特異接着機構に関しては不明なところが多い．非特異的ながら強固に接着する場合もあり，次のようなメカニズムが提唱されてきた．①多点吸着による弱い相互作用の積算，②各ドメインが異なる対象に特異的に結合，③やわらかい分子構造で様々な表面にフィットする．
グラム陰性病原性細菌が感染に使う三量体型オートトランスポーターアドヘシン（TAA）は，細胞間接着，ECM への結合，人工材料表面への結合の全てを一つのタンパク質で担う興味深い接着タンパク質である．ECM への接着に関しては，インテグリンと異なり配列認識ではなく，構造上の特徴を認識しており，タンパク質とリガンドとの通常の相互作用の概念とは異なる．また，カドヘリンのように同種タンパク質同士の分子間結合による細胞自己凝集も引き起こす一方で，人工材料表面にも非特異的に接着しバイオフィルム形成に働くとの報告もある．TAA はホモ三量体を形成し，細胞表層に提示される N 末端側パッセンジャードメインと，その分泌と膜アンカリングに必要な C 末端膜貫通ドメインから成り，接着機能はパッセンジャードメインが担う．
我々は以前に，疎水性のプラスチックやポリウレタン，親水性のガラス，さらには金属など様々な非生物表面に対し高い接着性を有する *Acinetobacter* 属細菌の TAA を発見し，AtaA と名付けた．AtaA は，3630 アミノ酸からなるポリペプチド鎖で構成される TAA の中でも大きいタンパク質である．本発表では，まず，AtaA が一般にタンパク質が吸着しにくい材料表面にも接着するなど，他の TAA とは異なる接着性を示す興味深いタンパク質であることを示す．そしてそのユニークな接着機構の解明のため，AtaA の接着部位を特定し，その結晶構造を決定した．AtaA のパッセンジャードメインは多種類のドメインの反復構造から成り，これらの多数のドメインを介する多点吸着が，AtaA の様々な表面に対する強い接着性をもたらすと推測された．しかし，本研究により，AtaA のユニークな接着性は N 末の head domain 上に存在するループ領域のみが担うこと，このループがファイバーの軸にしっかりと固定された硬い構造であることがわかった．したがって，その接着様式は，上述したタンパク質の非特異接着様式では説明できない新たな接着機構に基づくものである．

Approaching the puzzle of nonspecific interaction of strongly adhesive bacterial protein AtaA in water

○Katsutoshi Hori
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words *Acinetobacter* , adhesion, protein, autotransporter

S3Gc04 タンパク質の天然変性領域が関与する材料との相互作用

○黒田 章夫, 池田 丈
（広島大院・先端物質）
akuroda@hiroshima-u.ac.jp

半導体デバイスをバイオセンサーとして利用するためには標的物質を特異的に認識して捕捉する生体分子（レセプター）を表面上に固定化する必要がある．半導体デバイスの表面は，絶縁膜として熱酸化による酸化膜(SiO_2 膜)の形成や，CVD (chemical vapor deposition)法による窒化膜(Si_3N_4 膜)の形成が行われている．我々は，天然のタンパク質より，シリコン表面の酸化膜やシリカに強固（解離定数は 10^{-10}M 程度）に結合するタンパク質を選抜し，「Si-tag」と命名した．タンパク質の同定を行ったところ，細菌由来のリボソームタンパク質 L2 であることが判明した [1]．
273 残基の L2 のうち N 末端 60 残基と C 末端 71 残基が特にシリカとの結合に関わっていた [1]．ちょうどこれらの N 末端，C 末端領域を除いた中央ドメインの結晶構造は決定されているものの，全長の L2 は結晶化できなかったという過去の報告から，これらの領域は特定の立体構造をとらないと予想された．アミノ酸配列を詳細に解析したところ，予想通りこれらの領域は溶液中で特定の立体構造をとらない「天然変性（あるいは不定形）」と呼ばれる領域であることが判明した [2]．事実，タンパク質変性剤（8 M 尿素）存在下においても Si-tag とシリカの結合は阻害されないことから，ポリペプチド鎖がほどけた状態で存在していることこそが結合に重要であることが示された．

Si-tag がシリコン酸化膜やシリカに強く結合する理由：一般的な球状タンパク質は，固体表面に吸着後，固体表面との相互作用によって立体構造が一部崩壊（変性）する．この変性過程で固体表面との相互作用が強まり，より強固な結合状態に移行することが知られている．もともと熱で変性させたタンパク質が固体表面上に付着しやすいことが知られている．Si-tag の N 末端，C 末端領域は最初から変性したような「柔らかい」状態であるため，吸着の際に表面の形状に合わせて自身の形状を柔軟に変形することで，相互作用が最適化され速やかに強固な結合状態に遷移するのではないかと予想できる．さらにこの変性領域は，正に帯電するアルギニン・リジン残基が特に集中しているため，シリカ表面のシラノール基と多点で結合していることがシミュレーションで示された [3]．実際，結合時の Si-tag の構造はシリカの表面状態によって異なる形状を示したことから，固体表面に合わせて自身の形状を変化させることで相互作用を強めているというモデルが支持された．一方で，Si-tag の結合強度は強いものの結合選択性は低く，シリカの他にも窒化ケイ素（Si_3N_4）や多くの金属酸化物（シリカと同様に溶液中では表面に—OH 基が存在する）にも強く結合することが分かっている．これについても Si-tag が固体表面に合わせて変形するという性質に起因すると考えられる．Si-tag による固定化技術は，分子内にもともと持つとても柔らかい領域（変性領域）を起点として配向性よく固定化する技術と言える．
この Si-tag を遺伝子レベルで付加することで，任意のタンパク質をシリコンデバイス上に固定できる．また，ProteinA との融合タンパク質を使えば，抗体を容易に固定化することができる．Si-tag を利用したタンパク質固定化法は，固体表面の化学的前処理を必要とせず，迅速・簡便かつ安定なタンパク質固定化を実現できた．Si-tag を使った半導体センサーが開発されている [4]．

1) Taniguchi, K. et al.: The Si-tag for immobilizing proteins on a silica surface, Biotechnol. Bioeng., 96, 1023-1029 (2007)
2) Ikeda, T. and Kuroda, A.: Why does the silica-binding protein Si-tag bind strongly to silica surfaces?, Colloids Surf. B: Biointerfaces, 86, 359-363 (2011)
3) Tosaka, R. et al.: Adsorption mechanism of ribosomal protein L2 onto a silica surface: a molecular dynamics simulation study, Langmuir, 26, 9950-9955 (2010)
4) Taniguchi T. et al.: Detection of antibody-antigen reaction by silicon nitride slot-ring biosensors using protein G, Opt. Commun. 365, 16-23 (2016)

The interaction of disordered proteins to material surfaces

○Akio Kuroda, Takeshi Ikeda
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words disordered protein, immobilization, biosensor, silicon

S3Gc05 フラグメント分子軌道(FMO)法のナノバイオ系への応用事例

○望月 祐志[1,2], 加藤 幸一郎[3], 福澤 薫[2,4]
（[1]立教大・理, [2]東大・生産研, [3]みずほ情報総研, [4]星薬科大・薬）
fullmoon@rikkyo.ac.jp

【序】 フラグメント分子軌道(FMO)法[1-3]は，タンパク質などの巨大分子系を適当なフラグメント単位に分割し，環境静電ポテンシャル印加の下で並列処理を駆使して電子状態計算を実用的に行える手法です．FMO 計算からはフラグメント間相互作用エネルギー(IFIE)などの解析に有用な情報が得られるので，タンパク質とリガンドの複合系などを対象に創薬や生物物理のバイオ系の分野で使われてきました．しかし，ナノバイオ系でも FMO 法が利用されつつあります[2,3]．私たちのグループでは独自の FMO プログラム ABINIT-MP を開発し，先導的な応用計算を多数行ってきました[3]．今回の講演では，ABINIT-MP による FMO 計算の概要と IFIE の有用性をお示しした後，固体表面と人造ペプチドを組み合わせたナノバイオ系への適用事例として，シリカ表面[4]と RKLPDA，ヒドロキシアパタイトと ESQES[5]のケースなどをご紹介します．

【FMO プログラム ABINIT-MP の特徴】 FMO 計算のためのプログラムとしては, GAMESS-US[2]や PAICS[6]と共に ABINIT-MP[3]が使われています. ABINIT-MP は，MPI 並列と OpenMP/MPI 混成並列により，PC クラスターから「京」のようなスパコン/HPCI 資源にまで広く対応しています．実用的には，クラスター型のサーバでも数十コアあれば，標準的な 2 体フラグメント展開で 2 次摂動論レベルの FMO2-MP2 の FMO 計算が数百残基のタンパク質に対してもルーチン的に行えます．
現在，ABINIT-MP の研究開発・整備は文科省ポスト「京」プロジェクト-重点課題 6 の中で続けられています(取り纏め役は望月)[7]. ライブラリとしては「京」などに納品している他，個別にバイナリ形態での提供も行っています．特に，「京」の産業利用枠を利用した「FMO 創薬コンソーシアム」(リーダーは福澤)[8]の活動では，ABINIT-MP を用いて創薬ターゲットとなるタンパク質とリガンドの膨大な IFIE データが蓄積されつつあり，昨今のビッグデータ・AI ベースの創薬の文脈からも注目を集めています．

【シリカと RKLPDA の FMO4 計算】 ABINIT-MP[3]ではフラグメント展開を 4 体まで含めた FMO4 計算が行えるため，（有バンドギャップの）固体を含めた，表面/生体関係分子から成るナノバイオ系をモデル化することが出来ます．初めての適用事例としたのは，RKLPDA ペプチド[9]のシリカ表面への特異的吸着です[4]．実験的[9]には，荷電した R と D が表面側と静電的に相互作用することが鍵とされていましたが，詳細は不明のままでした．私達は，シリカ側を 257 個の Si 原子を含むクラスターで構成し，85 個のフラグメントに分割しました．また，ペプチド側を主鎖と側鎖に分けて 11 個のフラグメントとし，吸着サイト周囲の水分子も含めて FMO4-MP2 計算を行いました(単一構造での解析)．その結果，R と D と表面側との静電相互作用が重要であることが確認されましたが，相互作用によって誘起されたシリカ側の分極，さらにシリカ-ペプチド-水の間での電荷移動も無視し得ない寄与を持つことが示されました．

【ヒドロキシアパタイトと EQSES の FMO4 計算】 次に，骨や歯の成分としても重要なヒドロキシアパタイトと ESQES ペプチド[10]について FMO4 解析を行いました[5]．その際，水中でのペプチド構造のゆらぎを考慮するため 30 個のサンプルを用いました(分子動力学シミュレーションで生成)．また，結晶側は 4x4x2 の超格子とし，総原子数は 1408 個に達しました．FMO4 計算の結果，末端の S が吸着に対して最も重要な役割を担い，最近接のリン酸ユニットから-OH 部への電荷移動が効いていることが分かりました．また，2 個の E はカルシウムイオンとの静電相互作用によって安定化に寄与していることも見てとれました．シリカの場合と同様ですが，電荷移動と随伴する分極の効果を取り込める点は，量子計算手法である FMO 法の強みと言えます．現在，アパタイト同様にイオン性の高い結晶であるカルサイトの吸着系についても同様の FMO 解析を進めており，講演では結果をお見せ出来るはずです．

【謝辞】 ABINIT-MP プログラムの研究開発と応用計算は，東京大学の生産技術研究所における複数の文科省プロジェクト(リーダー：加藤千幸先生)，JST-CREST プロジェクト(リーダー：田中成典先生/神戸大学)などのご支援の下で長年行われ，現在では東京大学工学部を拠点とするポスト「京」プロジェクト重点課題 6(リーダー：吉村忍先生)で推進されています．カルサイトの応用計算は科研費(16H04635：望月)の関係で実施しています．

【文献】 [1] "The Fragment Molecular Orbital Method: Practical Applications to Large Molecular Systems", (2009, CRC). [2] D. G. Fedorov et al., Phys. Chem. Chem. Phys. 14 (2012) 7562. [3] S. Tanaka et al., Phys. Chem. Chem. Phys. 16 (2014) 10310. [4] Y. Okiyama et al., Chem. Phys. Lett. 566 (2013) 25. [5] K. Kato et al., Chem. Phys. Lett. 629 (2015) 58. [6] T. Ishikawa et al., J. Comp. Chem. 30 (2009) 2594. [7] http://www.cenav.org/abinit-mp-open_ver-1-rev-10/ [8] http://eniac.scitec.kobe-u.ac.jp/fmodd/ [9] K. Sano et al., J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 14234. [10] G. He et al., Nature Mat. 2 (2003) 552.

Applications of fragment molecular orbital (FMO) method to nano-bio systems

○Yuji Mochizuki[1,2], Koichiro Kato[3], Kaori Fukuzawa[2,4]
([1]Faculty of Science, Rikkyo Univ., [2]IIS, Univ. of Tokyo, [3]MHIR, [4]Faculuty of Pharm. Sci., Hoshi Univ.)

Key words Fragment molecular orbital, FMO, Interaction analysis, Nano-bio system

S3Gc06 材料のナノ構造が誘起するタンパク質吸着および細胞接着

○高井 まどか[1], 平口 侑香里[1], 荒木 保幸[2], 和田 健彦[2]
（[1]東大院・工, [2]東北大・多元研）

Y. Hiraguchi, K. Kushiro, M. Takai, Acta Biomaterial, 10, 2988-95(2014).

医療用デバイスの開発において，生体とデバイスを構成する材料との界面に，適合性を付与することが重要な課題となる．我々は，ナノスケールで精密に制御したナノ構造を材料表面に構築し，ナノ構造がタンパク質吸着，さらに細胞接着との相関を研究している．しかし，ナノ/マイクロ構造がタンパク質吸着にどのように影響を与えているか，巨視的な解析しか行われておらず，タンパク質のサイズに合わせたナノスケールでの解析が必要である．ここでは，ポリマーブラシをナノ構造界面として創製し，そのナノ構造がタンパク質吸着，細胞接着に及ぼす効果について，また，ナノ構造体がタンパク質吸着，引き続き起こる細胞接着にどのように影響を与えるか検討を行った結果について紹介する．

1. ポリマーブラシへのタンパク質吸着 [1)]

材料界面へのタンパク質吸着は，濡れ性，表面電位，ミクロな表面構造など様々な表面の性質により影響を受けることが知られている．しかしこれらの要因が，それぞれタンパク質吸着とどのような関連をもっているかについて明確な議論はされていない．これは，タンパク質とマテリアル表面との間には疎水性相互作用や静電的相互作用，水素結合などの様々な相互作用がはたらくため，非常に複雑となり理解が困難であることによる．しかし，これらマテリアルとタンパク質との相互作用は水を媒体としてはたらくため，界面に存在する水分子が非常に重要な役割を果たしていると考えられる．そこで，まず化学的性質の異なるポリマーブラシを作製し，界面水分子の構造の評価およびタンパク質吸着量の評価を行うことで，タンパク質吸着メカニズムを解明することを，和周波発生(SFG)分光法と水晶振動子マイクロバランス(QCM-D)を用いて行った．SFG 分光法により双性イオン性ポリマーブラシは強い水素結合を形成することわかり，タンパク質吸着量の実験結果をあわせて考察すると，この強い水素結合ネットワークをもつ界面水分子が存在することでタンパク質吸着を抑制することが示唆された．

2. ナノ相分離構造体表面へのタンパク質吸着・細胞接着 [2,3)]

これまでに Spatz らは，Au ナノ粒子上に固定化した RGD ペプチドの距離により細胞の接着性が異なるという報告をしており，ナノスケールでのタンパク質の吸着分布状態は細胞接着に影響を与えることを示唆している．しかし，ナノスケールでタンパク質の吸着を精密に制御することや吸着したタンパク質の構造解析が困難であるため，細胞接着との関係が未だに明らかにさていない．本研究では，親水性部位に poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (MPC)，疎水性部位に poly(3-(methacryloyloxy)propyltris(trimethylsilyloxy)silane) (PMPTSSi)をほぼ等しい組成比(PMPC/PMPTSSi = 7/3)で有する両親媒性ブロックコポリマー poly(MPTSSi-block-MPC) と poly(MPTSSi-block-MPC-block-MPTSSi)をそれぞれ可逆的付加開裂連鎖移動重合によって合成し，海島構造を有する相分離構造表面を作製し，この表面上でのタンパク質吸着と細胞接着挙動について検討を行った．海島のドットサイズを変えるため，鎖長の異なる poly(MPTSSi-block-MPC-block-MPTSSi)を 4 種類作製した．以下 poly(MPTSSi-block-MPC)を BP1，poly(MPTSSi-block-MPC-block-MPTSSi)の鎖長の短いポリマーから順に BP2，BP3，BP4，BP5 と表す．
ドット状の直径が，BP1 から BP5 で，23nm, 10nm, 19nm, 27nm, 52nm と鎖長が長くなると，大きくなることが確かめられた．BP1 と BP4 では親疎水領域が反転した相反転構造が形成されていることが TEM から確かめられた．この両者のパターンが異なる表面でのタンパク質の吸着状態と細胞接着の解析を，RGD モチーフの露出量を QCM により測定したフィブロネクチン吸着量で割ることにより，一分子当たりの構造変化度を算出した．BP1，BP4 に比べ PMPTSSi のホモポリマー表面では構造変化が小さい傾向にあり，ナノ相分離構造によってフィブロネクチンの構造変化がより誘起されたことがわかった．現在，フィブロネクチンの構造，特に細胞接着因子となる RGD ペプチド露出量と，吸着タンパク質の変性状態を，円偏光二色性スペクトル等を用いて解析を行っている．
一方細胞に関しては，L929 マウス線維芽細胞 (3.0×10^4 cells/mL)を無血清培地で播種し，播種後 1，2，3 h の接着形態を観察した．播種 1~2 時間後から BP1 では異方性な伸展が見られたが，BP4 では等方的に接着していた．BP4 では十分に RGD ペプチドが露出しているため，細胞のインテグリンとの結合により細胞接着が誘起された．しかし，ナノ相分離構造によりインテグリンの凝集が阻害され，強い焦点接着の形成ができなかったと考えられる．ナノ相分離構造上では，一様に均質な表面とは異なる細胞接着挙動が観察されたが，これはタンパク質の吸着状態に起因していると考察している．

1)D. Nagasawa, T. Azuma, H. Noguchi, K. Uosaki, M. Takai, J. Phys. Chem. C, 119, 17193(2015)
2)

Protein adsorption and cell Adhesion induced by nanostructure of polymeric Materials

○Madoka Takai[1], Yukari Hiraguchi[1], Yasuyuki Araki[2], Takehiko Wada[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, [2]IMRAM, Tohoku Univ.)

Key words Y. Hiraguchi, K. Kushiro, M. Takai, Polymer, 99, 166-172(2016).
3)

S3Hc01 〈招待講演（韓国生物工学会）〉

Nanometer scale biological particle separation with flow controls and electrical field controls

○Jong Wook Hong[1,2]
([1]Grad. Sch. Dept. Bionano Technol., Hanyang Univ., Korea, [2]Grad. Sch. Dept. Bionano Eng., Hanyang Univ., Korea)
jwh@hanyang.ac.kr

Nanometer scale particles especially for biological particles are getting great attention because of their importance in personalized medicine and future medicine as well as bioprocess applications. In this lecture, in addition to separation of nanometer scale biological particles with pneumatically driven flow in microsystems, electrical control and separation of nanometer scale particles with ion concentration polarization or ICP will be introduced. ICP is a phenomenon that uses an electric field and a cation channel to separate ions inside the electrolyte and forms an ion depletion region that pushes particles having a surface charge by an electrical force due to the separated ions. In this depletion region, only solvent passes through and the particles having a surface charge can not pass through by the electric force. Since the particles are stopped at the equilibrium state of the solvent movement by the electric force and the electric osmosis, the position where the particles are stopped is determined by the amount of charge on the surface and the size of the particles. Using this ion concentration polarization, we separated nanoscale polymer particles and liposomes for the first time. It is expected that ICP can be applied to separate exosomes with different sizes in similar contents and removal of impurities in solutions

S3Hc02 耐熱性を保ったまま好熱菌酵素の触媒特性を常温菌型に変える

○赤沼 哲史
（早大・人科）
akanuma@waseda.jp

好熱菌酵素は優れた耐熱性を持ち，高温で高い触媒活性を示すが，常温では著しく活性が低下する．我々は，進化分子工学手法により多くの好熱菌由来イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素（以下 IPMDH）の低温高活性化変異体を獲得した．しかし，どの変異体の 25℃の比活性も，常温生物が持つ IPMDH と比べるとまだまだ小さかった．複数のアミノ酸置換を導入した多重アミノ酸置換体も作製したが，低温活性の更なる改善は見られなかった．一方で，私たちは古代生物が有したと思われる遺伝子を復元し，その遺伝子から古代タンパク質を合成，その性質を調べた．その結果，祖先生物は超好熱菌であり，現存の常温生物，好冷生物は，地球の表面温度の低下に伴い，低い温度に適応した生物へと進化したことを連想させた．したがって，好熱菌酵素に効率的な低温高活性化は，天然の低温適応進化に倣うべきであると考えた．そこで，好熱菌 IPMDH に常温菌型のアミノ酸をアミノ酸置換によって導入した 29 変異体を作製し，解析したところ，約半分の変異体の 25℃の比活性が向上した．さらに，アミノ酸置換の組み合わせを検討したところ，3 アミノ酸置換によって，25℃の比活性が好熱菌野生型 IPMDH の 14 倍に向上した変異体が得られた．反応速度論解析および熱力学解析から，変異体は常温菌 IPMDH と類似した触媒特性を示した．一方，変異体の変性温度は好熱菌野生型酵素からわずかに 2℃低下しただけであった．したがって，この変異体では天然酵素に見られる低温活性と耐熱性のトレードオフを伴うことなく，低温高活性化が達成されたことが明らかとなった．さらに，変異部位の元のアミノ酸と共通祖先アミノ残基を比較したところ，共通祖先配列のアミノ酸と一致する好熱菌酵素のアミノ酸を置換した場合，25℃の比活性が 2 倍以上向上する確率が高かった．本研究で得られた実証データは，今後の好熱菌酵素の低温高活性化のための理論化につながる可能性がある．

Nanometer scale biological particle separation with flow controls and electrical field controls

○Jong Wook Hong[1,2]
([1]Grad. Sch. Dept. Bionano Technol., Hanyang Univ., Korea, [2]Grad. Sch. Dept. Bionano Eng., Hanyang Univ., Korea)

Key words nanometer scale particles, esoxomes, ICP, pneumatic

Establishment of mesophilic-like catalytic property on a thermophilic enzyme without loss of thermostability

○Satoshi Akanuma
(Sch. Hum. Sci., Waseda Univ.)

Key words enzyme activity, thermostable enzyme, mutagenesis

S3Hc03 人工知能を用いたタンパク質高機能化

○亀田 倫史[1], 齋藤 裕[1], 津田 宏治[2], 梅津 光央[3]
（[1]産総研・人工知能, [2]東大院・新領域, [3]東北大院・工）
kameda-tomoshi@aist.go.jp

我々は，人工知能（機械学習）と分子進化を組み合わせた手法を用いて，蛋白質の高機能化を行っている．最近，この手法を GFP の改変（緑色→黄色発色に変更）に適用した．改変は 4 か所のアミノ酸置換からなり，全変異体は 20^4=16 万通り存在するが，ランダムに生成した 150 変異体（ライブラリーサイズの約 0.09%）の実験結果に基づき，機械学習を行い，78 候補を選出し改めて実験を行ったところ，波長変化，発色強度ともに良好な変異体を得ることに成功した（論文投稿中，論文本文は[1]から取得できる）．本講演では，用いた人工知能の手法について概説した後に，研究内容を紹介する．
参考までに，投稿論文の abstract を引用する．
Molecular evolution based on mutagenesis is widely used in protein engineering. However, optimal proteins are often difficult to obtain due to a large sequence space that requires high costs for screening experiments. Here, we propose a novel approach that combines molecular evolution with machine learning. In this approach, we conduct two rounds of mutagenesis where an initial library of protein variants is used to train a machine-learning model to guide mutagenesis for the second-round library. This enables to prepare a small library suited for screening experiments with high enrichment of functional proteins. We demonstrated a proof-of-concept of our approach by altering the reference green fluorescent protein (GFP) so that its fluorescence is changed to yellow while improving its fluorescence intensity. Using 155 and 78 variants for the initial and the second-round libraries, respectively, we successfully obtained a number of proteins showing yellow fluorescence, 12 of which had better fluorescence performance than the reference yellow fluorescent protein (YFP). These results show the potential of our approach as a powerful platform for accelerated discovery of functional proteins.

[1]https://www.biorxiv.org/content/early/2018/03/16/282996

improvement of protein by artificial intelligence

○Tomoshi Kameda[1], Yutaka Saito[1], Koji Tsuda[2], Mitsuo Umetsu[3]
([1]AIRC, AIST, [2]Grad. Sch. Frontier Sci., Univ of Tokyo, [3]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words bioinformatics, protein, machine learing, molecular evolution

S3Hc04 バイオ分子の自己集合化に潜む機能

○池添 泰弘
（日工大・基幹工・応化）
y.ikezoe@nit.ac.jp

【緒言】
ウイルスやタンパク質分子のような生体物質が，特定の物質に対する優れた選択性や特定の機能を有する理由は，これらがアミノ酸のような小さな分子の高精度な集合体から形成されていることにある．したがって，このような分子集合体の構造や機能の解析，形成機構の解明は，新しい原理に基づいたデバイスや医薬品の開発へつながると期待できる．ここでは，主に 2 種類の生体関連物質を用いて，1）分子集合体の形成手法と，そこから得られた構造や機能，また，2）分子集合体を破壊することで改めて認識できる集合体の潜在能力，さらに，3）分子集合体形成の機構の理解のための装置開発，について議論し，これまでの分子集合体に関する包括的な研究を紹介する．
【分子集合体の形成手法の開発と構造解析】
金属などの微粒子の配列構造（集合体）は，極微細な電子・光応答素子への応用が期待されるが，10 nm 程度のスケールで微細構造を作るには，電子ビームリソグラフィーのような高価な装置を用いて長時間かけて作製する必要があり，多大なコストを必要とする．そこで，低コスト化を実現する方法の一つとして，ナノ粒子の自己集合能力を活用して Si 基板上にナノ構造を作製する手法が挙げられる．我々は，金属ナノ粒子を内包するタンパク質として知られるフェリチン分子を用い，分子集合体を形成するための新手法を開発した．ここでは，Si 基板上に形成したフェリチン水溶液滴の縁に相当する三相接触線上において分子集合体の核が発生し，集合体は結晶のような周期性を保って，液体表面上で三相接触線に対して垂直に成長する．我々の方法の利点は，核が発生する場所を決められることと，集合体の成長方向が決まっていることである．このことが，電子顕微鏡による構造解析の際に，1 分子レベルでの集合体成長過程の解析を可能とし，ドメインの融合や成長機構を明らかにした．また，インジウムナノ粒子を内包した分子と内包していない分子を混ぜて集合体を作ると，結晶のような規則構造を保持しながら，両者が乱雑に配置されたような不思議な集合体が形成され，ナノ乱数発生装置となることが見いだされた．[1]
【分子集合体の破壊】
金属イオンと，それに配位した有機分子が秩序正しく三次元的につながった結晶性の多孔性物質である有機金属錯体（Metal Organic Frameworks, MOF）は，その特徴的な構造から，物質の貯蔵や分離，反応，触媒などの様々な分野での応用が期待されている．我々は，MOF と自己集合性の強いペプチドであるジフェニルアラニン(Diphenylalanine, DPA) の複合体を作製し，その複合体が水面で運動する様子を解析したところ，非常にエネルギー変換効率の高い化学モーターとなりうることを見出した．複合体の運動は表面張力の不均衡（マランゴニ効果）によって説明でき，そこに目新しさはない．しかし，複合体が運動している時間が異常に長い．ここでは，DPA 分子がバラバラの状態（エネルギーが高い状態）で MOF 細孔中に存在していたが，水面に放出されて集合体（エネルギーがより低い状態）を形成し，その余剰エネルギーを利用して複合体は運動を持続していることが明らかになった．この能力を利用してマイクロ発電機を作製したところ，小型医療機器にも応用できるレベルの発電能力を有することも明らかになった．さらに，水面で走行中に，水中に固定された PbSe 粉末を発見し，直上の水面で静止する性質（走化性）を与えることにも成功した．従来，走化性または自律運動のどちらかを示す化学物質の研究は数多く行われているが，今回，我々が開発した系は，相反する二つの性質，すなわち自律運動と走化性を同時に有するもので，まさに生体の運動を模倣した系となっており，将来的にはドラッグデリバリーシステムへの応用も期待される．[2]
【分子集合体の形成メカニズム】
分子集合体は，電子顕微鏡（SEM）や原子間力顕微鏡（AFM）等で観察できるが，SEM や AFM で水面のナノ構造をリアルタイムで観測することは不可能である．我々は，液体表面からのレーザー散乱光を計測して表面張力を算出できる準弾性レーザー散乱法を応用し，水溶液中にあるタンパク質分子が水面に徐々に吸着する過程をリアルタイムで計測できる装置を作製した．その結果，タンパク質分子の水面への吸着に伴う表面張力の低下を観測できた．また，同じ装置で同時に計測できる表面の粘性については，分子が吸着し始めた直後は一旦上昇し，しばらくすると下降に転ずることがわかった．水面に吸着した分子を TEM グリッドに転写して透過型電子顕微鏡で観察したところ，粘性がピークを迎え後では分子の集合体が観察された．この結果は，レーザー散乱光を追跡するだけで，水面での分子集合体形成への相転移を検知できる可能性を示唆する非常に興味深い結果であり，現在，メカニズムの詳細を解析中である．
[1] Y. Ikezoe et al., Langmuir (2008 & 2009), J. Nanosci. Nanotech. (2012)
[2] Y. Ikezoe et al., Nature Mater. (2012), Adv. Mater. (2015), Nano Lett. (2015)

Underlying Functions behind the Self-assemblies of Biomolecules

○Yasuhiro Ikezoe
(Dept. Appl. Chem., Nippon Inst. Tech.)

Key words self-assembly, peptide, MOF, surface

S3Hc05 クモ糸の階層構造の解明と人工的再構築

○沼田 圭司
（理研）
Keiji.Numata@riken.jp

クモなどの一部の生物種が生産するシルクと呼ばれる構造タンパク質は，ベータシート構造を周期的に形成することで，特異的な物性を達成することに成功している．このクモ糸に代表される構造タンパク質を，構造材料として利用しようという試みは，古くから行われてきた．しかしながら，その合成手法や加工技術の欠落により，人工的なクモ糸の商業化には成功していない．水系の環境で紡糸されるクモ糸は，自由水と結合水を上手く局在させることで，特異的な物性を達成していると考えられている．一方で，その紡糸機構は未だ明らかになっておらず，シルクを人工的に紡糸する技術が効率的に開発されない要因の一つに挙げられている．我々は，クモの牽引糸の紡糸過程における，シルクタンパク質の構造変化を高分子科学のアプローチから明らかにすることで，クモ糸の紡糸機構を解明することを目指している．
現在，クモの大瓶状腺内のシルク（紡糸前のシルク）の構造は，液晶だという説と高濃度ミセル溶液であるという説が提唱されている．高分子構造の観点から，この論争に結論を出すと共に，シルクの紡糸機構を解明し，構造タンパク質の成型加工に関する新たな技術を確立することは，構造タンパク質の材料設計において非常に重要である．本研究では，ジョロウグモの紡糸機構を，顕微鏡観察を中心とした形態観察，および複屈折測定，X 線散乱を用いた構造解析から，高濃度ミセルを介して紡糸されるという機構は否定された．一方で，液晶状態を経由して紡糸されている可能性が高く，その液晶性を発現する因子はタンパク質ベースのグラニュールであることが示唆された．大瓶状線において形成されたグラニュール構造が，紡糸された牽引糸内部においても主成分として確認された点は特筆すべき発見である．この現象は，グラニュールを基本骨格として紡糸が為されていることを示す，はじめての報告であった．牽引糸において確認されたグラニュール構造が，繊維の機械的物性へ与える影響を評価するために，延伸過程におけるグラニュールの評価を行った．20%延伸した牽引糸の内部を AFM により観察した結果，グラニュール構造およびミクロフィブリル構造が延伸されることが確認できた．また，局所的に観察された螺旋状のグラニュール構造が延伸されていることも確認された．延伸過程の複屈折測定からも，グラニュールの変形に対応した配向が認められた．以上の結果を総合的に判断すると，構成成分であるグラニュールが繊維の変形過程に寄与していると考えられる．同時に，グラニュールを利用した紡糸過程が，クモ糸の特殊な機械的特性を実現している可能性が示唆された．グラニュール内部の分子機構についても，新たな知見が判明してきており，人工紡糸システムと共に，併せて報告する．

Hierarchical structure of spider silk fibers is necessary for artificial silk fiber development

○Keiji Numata
(RIKEN)

Key words silk

S3Hc06 オリゴ DNA の腸管送達系の構築と経口用素材への展開

○下里 剛士
（信州大・菌類微生物セ）
shimot@shinshu-u.ac.jp

微生物由来のゲノム DNA や，その配列に基づき化学合成されたオリゴ DNA（ODN）は，感染症・ガン・アレルギー・炎症性疾患の予防や治療を目的とする機能性核酸分子として研究が進められてきた．私は，乳酸菌やビフィズス菌に代表されるプロバイオティクスの腸管免疫調節作用に注目し，プロバイオティクス由来のイムノジェニクス（immunogenics, 免疫調節因子）の化学構造や免疫活性発現機序の解明を目指し，研究を行ってきた（1）．とくに，プロバイオティクス由来のゲノム DNA や，DNA 断片の化学合成配列を用いた免疫活性試験により，免疫増強効果を有する ODN の同定に成功している（1）．また，ODN 特有の免疫活性や，その活性阻害配列の探索を行うことで，優れた免疫機能を有する ODN の構造に興味深い知見を得ている（1）．
ODN は，これまでに様々な動物試験を経て，多くの知見が積み上げられてきた．一部，臨床試験にまで進んでいる ODN も存在する．マウスの系における ODN の投与方法として，腹腔内投与，皮内・筋注投与，静脈投与など，注射器を用いる手法が一般的である．しかしながら，ODN は，経口的に摂取すると，胃液や消化酵素の影響により分解されてしまうという弱点があり，経口投与による実績はほとんど無い．一部，大容量での経口投与例は存在するが，コストの面から，ODN を有効成分とする経口機能性素材としての価値を見出せずにいた．
2011 年，私の研究グループは，注射に頼らない「食べる ODN」の実現を目指し，研究に着手した．そして 2015 年，Chowndhury らの開発した炭酸アパタイト粒子を用いた細胞への遺伝子導入手法を，in vivo スケールに改良した手法を確立し，ODN を包摂・包埋した「DNA ナノカプセル」の開発に成功した（2）．DNA ナノカプセルとは，ODN をカルシウムイオンに吸着させ，ナノサイズにまで成長させたものである．さらに，DNA ナノカプセルは，人工胃液，DNA 分解酵素に対して，優れた DNA 保護作用を示した．とくに，胃液を想定した強酸による人工胃液耐性試験では，完全に分解が進んだフリーの ODN と比較して，DNA ナノカプセルでは ODN の存在を示す強いシグナルが検出された．このことは，DNA ナノカプセルは胃液による消化に耐え，十二指腸，小腸へと到達する可能性が高まったことを示している．その後の研究により，DNA ナノカプセルが，細胞培養系における試験において，免疫機能性を有することが証明された．
私の研究グループでは，乳酸菌 *Streptococcus thermophilus* ゲノム配列中より同定した CpG-ODN（MsST と命名）が，マウスの脾臓細胞培養系において IFNγ および IL-33 を強く誘導することを発見している．そこで，アレルゲン感作マウスへの MsST カプセルの投与試験を実施し，腸管パイエル板における局在性，免疫賦活作用，さらに採取した脾臓および脾臓細胞を用いて全身免疫への影響を調べた．その結果，MsST カプセルは，胃酸による消化に耐え，小腸粘膜に到達し，パイエル板に取り込まれることが明らかとなった．また，パイエル板組織において IFNγ を誘導したことから，免疫機能性を保持していることが示された．さらに，4 週間にわたる連続投与試験を実施した結果，脾臓が著しく肥大し，脾臓細胞における IL-33 陽性細胞の上昇も見られた．すなわち，経口投与した MsST カプセルは腸管粘膜を介して，全身免疫系における IL-33 産生を誘導していると考えられる．以上のことから DNA ナノカプセルは，パイエル板上皮に到達後，すみやかに濾胞内部に取り込まれ，免疫細胞を刺激・活性化することで，免疫機能性を発揮することが証明された．さらに免疫抑制型 ODN を有効成分とする DNA ナノカプセルの経口投与により，マウスにおけるアトピー性皮膚炎の発症を予防することを発見した（2）．以上のことは，腸管に到達した ODN により，全身免疫系が活性化されたことを初めて示したものである．
粘膜免疫システムを介した抗原の経口投与は，粘膜局所のみならず，全身の免疫応答を誘導できる．さらに，注射投与に比べて簡単で，安全性および経済的にも優れている．しかし，ワクチンやアジュバント分子の，腸管粘膜上皮および免疫細胞における作用機序の解明と，腸管送達系の構築が課題となっている．DNA ナノカプセルを応用し，ODN が胃や腸管など消化管を介して安定的に腸管粘膜に届けられれば，様々な疾病の予防・軽減に寄与する機能性サプリメントなどの創製が期待できる．また，ヒト腸内に豊富に存在する乳酸菌やビフィズス菌など，プロバイオティクスに由来する ODN を用いれば，消費者意識に配慮した新素材として提案できる可能性が高い．本研究は，ODN の腸管送達系の構築により，農学分野から健康維持・増進のための新たなワクチンアジュバントや機能性食品・家畜飼料素材の創製を目指す基礎研究として位置づけられる．

1.Shimosato and Kitazawa, Probiotics: Immunobiotics and Immunobiotics, Immunogenics: Immunostimulatory oligodeoxynucleotides from probiotics, *CRC Press*, 336-353 (2013)
2.Wang *et al*, *Mol Ther*., 23, 297-309 (2015)

Oral delivery of oligodeoxynucleotides and future perspectives

○Takeshi Shimosato
(CFMD, Shinshu Univ.)

Key words oral delivery, oligodeoxynucleotides, DNanocap

S3Kc01 生物資源管理に関する世界動向を踏まえた ASEAN と日本の連携によるバイオ科学技術の発展を目指して

○川﨑 浩子
（製品評価技術基盤機構・NBRC）
kawasaki-hiroko@nite.go.jp

NITE バイオテクノロジーセンター（NBRC）は，微生物約 9 万株を管理する微生物保存機関（BRC）である．また，各種法令に基づく微生物管理に関する行政支援を実施し，特許法に基づき指定された国内唯一の特許生物寄託センターであり，生物多様性条約に関連するカルタヘナ法の支援事業，ABS 指針に基づく国内取得書の発給業務を実施している．加えて，微生物の利用促進に向けて，微生物情報収集と，アジア諸国とのネットワーク構築を行っている．本講演では，特に微生物の管理に注目し，国際及び国内規制，安全管理，生物の多様性，国際標準化，情報管理の世界動向を踏まえて，バイオ関連の先端技術の発展のための ASEAN と日本の連携について, NBRC の活動を通じた話題提供をしたい．

1．国際・国内ルール

生物資源管理に関する国際ルールとして，ここでは，生物多様性条約とブタペスト条約があげられる．生物多様性条約には，バイオセーフティに関するカルタヘナ議定書と遺伝資源の取得の機会及びその利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分（ABS）に関する名古屋議定書で，それぞれに対応して国内では，遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法），遺伝資源の取得の機会及びその利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分に関する指針（ABS 指針）が公布されている．すべてが国内で完結する場合を除き，条約の遵守は不可欠であり，関係国との連携なくしては目的を達することはできない．

国内ルールでは，例えば安全という視点で考えてみると，海外の生物資源を国内に持ち込む場合は，感染症法，家畜伝染予防法，カルタヘナ法，外国為替及び外国貿易法植物防疫法，植物防疫法などの遵守が必要である．また，海外へ持ち出す場合は，相手国法令にも注意が必要である．微生物・病原体をその危険度に応じて 4 段階（BSL1～BSL4）に分類できるが，微生物学名と BSL の対応は各種法令，機関や各国の見解によって差違があるのも事実である．共同研究を実施する ASEAN と日本の共通した基準があることが望ましい．

2．生物学的多様性の魅力

地球上の微生物は，その 99%が未知と言われていたが，最近の研究ではその割合はさらに高いという報告もある．そ生物学的に多様な微生物資源は魅力的なのか？さらに言えば他国の生物資源に魅力はあるのか？多様な微生物資源は確実に学術上の魅力は高い．新規微生物は新規機能を有する．ASEAN には生物多様性に富んでおり，新規生物の発見は今後も期待されるところである．一方で，利用しやすさという点での魅力も考えなければいけない．1．の国際・国内ルールの中で，利用しやすい形になることが望ましく，そのためには関係国の協力は不可欠である．

多様な微生物と比較するからこそ，特定の生物集団の法則も見いだすことができる．例えば，最近注目されているヒトマイクロバイオームは，海外と比較することで，日本人の微生物叢の特徴を認識することができる．情報の共有も不可欠であり，こちらは研究者間の研究協力の推進が必要であろう．現在，微生物の分類学的基準株のゲノム情報整備について国際プロジェクトが動きつつあり，利用しやすい形での公開に向けて働きかけているところである．

3．国際・国内ルールの中で，多様な生物資源を利用する方策

生物資源を扱う中で，国際・国内ルールは遵守しなければならない．ルールの把握だけでも負担と思う研究者は少なくないはずだ．一つの方策として，多様な生物資源を保存・管理している生物資源保存機関の利用がある．多様な生物資源がそこにあり，利用に関するルールもあらかじめ決まっていて，面倒な交渉無く利用できる．NITE・NBRC は ASEAN 諸国の微生物コレクションの利用促進に協力しており，アジア地域における微生物資源管理に関するアジア・コンソーシアム(ACM)や，インドネシアでの国際標準に合わせた微生物保存機関の設立にも携わってきた．これら ASEAN 諸国の微生物保存の情報は，国際微生物データセンター(WDCM)から入手することができる．

4．特許戦略と標準化戦略

バイオ科学技術の発展を考えた時，特許戦略と標準化戦略がある．後者は，日本をはじめアジアではあまり得意としていない戦略であろう．演者は，ISO/TC276 Biotechnology に Expert として国際標準化議論に参加する中で，国際標準戦略の重要性を実感しているところである．長年の ASEAN と日本のバイオテクノロジー研究協力の中で見いだされた分析技術，機器開発，生産プロセス開発等，数多くの新技術を国際標準化することにより，さらなる発展が期待できる．国際標準規格である ISO 規格には，参加国が 1 票を有しており，議論を重ねた上で，数回の投票によって規格化が成立する．ASEAN 諸国と日本のバイオ技術の発展にも関係国の協力は不可欠であることは言うまでもない．特許戦略と標準化戦略の両刀使いで，バイオ科学技術の発展を目指していただきたいし，NITE・NBRC もそのための支援に努めて参りたい．

Aiming towards the development of bioscience and biotechnology through collaboration between ASEAN and Japan based on world trends on biological resource management

○Hiroko Kawasaki
(NBRC, NITE)

Key words bioresources, microorganisms, international cooperation, BRC

S3Kc02 ASEAN Network for microbial utilization (ANmicro): A step forward to the global ASEAN

○Lily Eurwilaichitr
(TBRC, BIOTEC, Thailand)
lily@biotec.or.th

With more insights into the microbial world and the increase knowledge of benefits from microbes, the exploitation of microorganisms has been increasingly achieved in several areas, including health and medicine, industrial and environment and food and agriculture. Southeast Asia abounds with rich and diverse microorganisms that serve as biotechnological resources for industries related to drugs/medicines, food, and industrial bioproducts. Recognizing the potential application of microorganisms, every ASEAN member country is engaging in research into microbial utilization in various degree.

To strengthen ASEAN research community towards sustainable use of microbial resources, the ASEAN Network on Microbial Utilization (AnMicro) has been established since 2014. AnMicro aims to serve as a platform for knowledge sharing of the efficient management of microbial resources and research on microbial utilization among the ASEAN research community. At present, AnMicro consists of members from 15 research and academic institutes across six countries, namely Indonesia, Malaysia, Myanmar, the Philippines, Thailand and Vietnam, with Thailand's BIOTEC serving as the secretariat of the network. AnMicro empowers ASEAN research institutions and their members by promoting capacity building on bioresource utilization and management through international conferences, workshops and training courses. The ASEAN Microbial Biotechnology Conference (AMBC), organized by AnMicro members, is a biennial event that has been successfully assembling participants from the world of science and industry for discussions on microbial utilization since its inaugural meeting in Bangkok in 2014. Moreover, more than ten joint workshops and training courses have been organized by AnMicro members to further establish research cooperation and intensify scientific exchange among microbiologists in ASEAN.

One of our highlight activities, marked as an important milestone, is the collaborative project with ASEAN Center for Biodiversity (ACB), supported by the ASEAN Science, Technology and Innovation Fund (ASTIF). The project entitled "Establishment and Maintenance of an ASEAN Microbial Database" aimed to raise awareness of the existence of microbial resources in the region and improve the availability and accessibility of information resources, thereby facilitating their study and potential application from both academics and bioindustry.

Beyond the accessibility of microbial resource, networking of researchers from academic and research institutions will also help increase their capability in converting microbiological resources into economically significant innovations. Each AnMicro member also acts as an "AnMicro collaborating center" to connect with local and international partners through existing networks of research laboratories and centers of excellence in microbiology. Through these various efforts, AnMicro has been building "a network of networks", regionally and internationally, fostering cooperation and access to knowledge and expertise and in turn, enhancing of physical, institutional and people-to-people connectivity within ASEAN and between ASEAN and other regions across the globe, leading to the "Global ASEAN" in biotechnology and bioeconomy.

ASEAN Network for microbial utilization (ANmicro): A step forward to the global ASEAN

○Lily Eurwilaichitr
(TBRC, BIOTEC, Thailand)

Key words AnMicro, ASEAN, microbial biotechnology

S3Kc03 The role of PSM in enhancing academe-industry partnership for the utilization of indigenous bioresources in the Philippines

○Leslie Michelle Dalmacio
(Dept. Biochem. Mol. Bio., Coll. Med., Univ. of the Philippines Manila)
lmdalmacio@up.edu.ph

The Philippine Society for Microbiology (PSM) has been in existence for almost half a century now. Its membership spans the academe, research institutions and industry. Since its establishment, the society has annually brought together the three sectors for dissemination and discourse of researches in microbiology and biotechnology. The PSM has formed partnerships with industry to be able to facilitate the annual dissemination and discourse of researches involving microbial resources and to promote the value of microbiology in every day life. The society also provides financial support to undergraduate and graduate theses of its members and awards grants to young researchers with excellent research. Although varied in approaches and applications, the researches of PSM members and affiliates focus on the utilization of microorganisms in food, agriculture, medical applications, and environmental sustainability. PSM supports and works with Philippine institutions with microbial culture collections to inform the public of microbial bioresource availability. The sources of microorganisms in the biorepositories are indigenous plants, food, healthy and ill individuals, and the natural environment. Philippine plant and animal diversity and geography provide a rich source of materials and microorganisms for medical, industrial and environmental use. Philippine plant diversity has provided an array of herbal medicine and various fermented foods. A number of indigenous microbial isolates come from Philippine fermented foods. Bacteria from these foods have been studied for probiotic and antibiotic properties. Functional foods are being developed using these bacterial bioresource. Philippine fungal biodiversity also provides a rich source of natural products and bioactive compounds. Microbial isolates from unique and extreme environments are being studied for bioremediation and as sources of industrially important enzymes. New technologies in genomics and metabolomics have enabled Philippine microbiologists to better elucidate genetic varieties of bioresources, as well as microbial diversity and function in various environments and conditions. The Philippine medicinal plants are being studied for their components and effect on the microbiome and certain pathogens. Elucidating the biofunctional activities of these medicinal plants warrant their cultivation in agriculture farms to meet the demand of the local herbal industry. Since Philippine universities and research institutions have the capability to do the lab scale and pilot scale processing of bioresources, PSM provides a network and venue for stakeholders to meet and develop or form collaborations to translate the aforementioned basic researches to what will be useful to society.

The role of PSM in enhancing academe-industry partnership for the utilization of indigenous bioresources in the Philippines
○Leslie Michelle Dalmacio
(Dept. Biochem. Mol. Bio., Coll. Med., Univ. of the Philippines Manila)

Key words bioresources, microorganisms, Philippines

S3Kc04 A case study on cooperative development on utilization of microbial bioresource between Vietnam and Japan

○Duong Van Hop, Nu Nguyen Kim Nu
(Inst. Microbiol. Biotechnol., Vietnam National Univ., Hanoi)
hopdv@vnu.edu.vn

ACM: The Asian Consortium for the Conservation and Sustainable Use of Microbial Resources is a collaborations among mBRCs were established in 2004 by representatives of 12 Asian countries. One of main task force is establishment of international standards for biological material transfer and benefit-sharing and increase the capacities of ACM members in mBRC management, manpower development and biotechnology. Collaboration project on taxonomic and ecological studies of microbes in Vietnam and utilization between Institute of Microbiology& Biotechnology (IMBT), Vietnam National University, Hanoi (VNU) and Japan National Institute of Technology and Evaluation (NITE) in the period 2004-2015- as a case study on cooperative development on Bioresource in ACM members. After implementation period, the project was fruitful for both parties. The benefits to the IMBT from the collaboration included a great improvement in the capacity to study and manage microbial resources. This is illustrated by the following points: (i) The VTCC is a national mBRC, holding ~10,000 microbial cultures, and 3,600 strains are available from an online catalogue (http://vtcc.imbt.vnu.edu.vn/). (ii) Technology transfer and the training of young Vietnamese scientists (iii) Improved capacity of the VTCC. By implementing the project, the capacity of the VTCC is much improved. Now, the VTCC can extend it activities beyond preservation to the identification and taxonomic study of microbial isolates.The benefits to NITE from the collaboration were as follows: (i) NITE scientists gained a better understanding of the diversity of tropical microorganisms and their roles in diverse fermented food processes in Vietnam. (ii) by implementing the Network of International Exchange of Microbes under ACM mechanisms, NITE enriched it stored isolates with tropical microbes from Vietnam, which are potential genetic sources for R & D and third party accession.
In this presentation, some information relating to new Vietnamese act No59 on biodiversity and the regulations for International collaboration, access and benefit sharing genetic resources from Vietnam under the CBD and Nagoya Protocols on ABS is mentioned also.

A case study on cooperative development on utilization of microbial bioresource between Vietnam and Japan
○Duong Van Hop, Nu Nguyen Kim Nu
(Inst. Microbiol. Biotechnol., Vietnam National Univ., Hanoi)

Key words collaboration, benefit, diversity, tropical microbes

S3Kc05 Indonesian bioresource utilization for health and beauty

○Irmanida Batubara
(Trop BRC IPB, Indonesia)
ime@apps.ipb.ac.id

Indonesia is mega-diversity country that has many bio-resources. Among this only limited number had been utilized for human health and beauty. Screening the Indonesian bio-resources such as from plant especially Indonesian medicinal plant had been conducted. Indonesian traditional medicine that used bio-resources known as Jamu. This paper introduce the utilization of Indonesian bio-resources especially the jamu ingredient as antibacterial, antioxidant, anti-glycation, and inhibitor of some enzyme such as α-glucosidase, tyrosinase, and lipase. Sappan wood (*Caesalpinia sappan*), Merbau (*Intsia palembanica*), *Xylocarpus granatum*, turmeric (*Curcuma longa*), temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*), salam (*Syzygium polyanthum*), and *Stelechocarpus burahol* and their responsible active component are discuss in this paper.

Indonesian bioresource utilization for health and beauty
○Irmanida Batubara
(Trop BRC IPB, Indonesia)

Key words Jamu, antibacterial, active components, enzyme inhibitors

S3Lc01 動物細胞培養の産業応用の変遷 －テクノロジーからエンジニアリングへ－

○大政 健史[1,2]
（[1]阪大院・工, [2]MAB組合）
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

今でこそ当たり前に用いられている動物細胞培養技術であるが，細胞培養の黎明期においては，生体外において細胞を培養するということ自体が，特別な技術として取り扱われていた．講演者が初めて細胞培養技術に触れたのは，今を去ること 30 年以上前の 1987 年のことになる．博士課程に進学するにあたって，アミノ酸発酵の培養工学のテーマから，動物細胞を対象とした培養工学にテーマを変更したわけであるが，当時は，動物細胞の培養技術については，どちらかというと職人芸的なテクノロジーであり，まだまだ工学的に体系化された領域とはお世辞にも言えない状態であった．当時はモノクローナル抗体の産業利用への大きな期待が高まっており，さらには，当時実施されていた通産省の次世代産業基盤技術開発において，細胞大量培養がとりあげられ，研究開発が進められており，研究分野全体のすそ野が広がり，様々な企業・アカデミアにおいても細胞培養研究が盛んに行われていた．特に，この時期に発達したのが無血清培地の開発である．この開発は，G.H.Sato による血清の主要な機能は成長因子(growth factor)の供給にあるという考えに基づいて，長足の進歩をとげた．特に本分野での研究を推進したのは，浮遊細胞であるハイブリドーマの培養をモデル系とした無血清培養の発達である．培地の発達に伴って，細胞培養技術が一般化し，細胞培養そのもののエンジニアリングも，同時期に大きな発展があった．細胞培養によるワクチン生産という特別な例は存在してはいたが，基本的には，実験室内での研究者個々人の創意工夫，経験と勘で行われていたテクノロジーがエンジニアリングの一歩を踏み出したと言える．勿論，これらの背景には，微生物で培われた生物化学「工学」の考え方が導入され，微生物の完全混合槽での深部培養（攪拌培養）としての取り扱いが動物細胞培養において応用され，体系化されるようになってきたことも大きい．
現在は，10g/L を超える抗体生産が普通に報告されるようになってきたが，この様な技術発展に欠かせないもう一つの点は，1990 年代から 2000 年代にかけての組換えチャイニーズハムスター卵巣由来細胞（CHO 細胞）による抗体生産の隆盛である．残念ながら我が国における研究開発は，先ほど述べた次世代産業基盤技術開発の後，動物細胞を対象としたプロジェクトが継続されず，それにあいまって，企業での持続的な研究もあまりなされず，1990 年代には大きな停滞期を迎えたが，一方，欧米においては，実用化されていた CHO 細胞を用いたエリスロポエチンや，G-CSF に引き続き，抗体医薬生産をターゲットとして，培養のスケールアップ・スケールダウンやダウンストリーム工程において，様々な技術的集積が積み重ねられていった．一方，これらの研究開発は産業界主導で行われ，アカデミア側において研究が盛り上がることがあまり無かったのも実情である．
21 世紀もしばらく過ぎた現在，世界の医薬品の売上ベスト 10 のうち，6 品目が動物細胞にて生産されており，欧米で発売されているバイオ医薬品の品目数にして 30%を超えるものが CHO 細胞を用いて生産されている．また，動物細胞そのものを利用する分野も 1990 年代から飛躍的な発展を遂げており，その用途は治療用細胞や，細胞を用いた評価系など，幅広い分野での応用が期待されている．しかし，特に複雑な高等生物から構築された細胞株を用いる生産系そのものの解明は依然として明確にはなされてはいない．望むべき生産系を自在に構築して目的物を自在に生産するためには，この複雑な生物そのものとも呼べる細胞株の解明と制御が必要である．ある意味ではこれは人工生命を構築し，利用することに等しく，簡単に解決できる問題ではない．さらに，バイオ医薬品製造プロセスは細胞株構築・培養・精製・レギュレーション等といった様々な分野の高度な科学技術を総合して初めて可能となるプロセスであり，これら各ステップやその複雑な相互関係の解析と利用は基盤的技術として必要とされる．そこで，本講演では，動物細胞培養の産業応用に関わる歴史的経緯を踏まえ，今後の新しい展開についても考察したい．

Mammalian cell cultivation - from laboratory to industry: from technology to engineering

○Takeshi Omasa[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]MAB)

Key words mammalian cell, biologics, regenerative medicine, therapeutic protein

S3Lc02 新規 CHO 細胞による抗体医薬品生産 － 5 g/L/6days の高いポテンシャルと工業化への課題 －

○堀内 貴之
（株式会社ちとせ研究所）
takayuki.horiuchi@chitose-bio.com

抗体医薬品は，遺伝子組換え技術などを応用し，細胞がタンパク質を作る力を利用して製造されている．我々は，生産細胞であるチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞の育種改良および培養プロセスの最適化によって，わずか 6 日間の培養で 5 g/L 以上の抗体を産生する超高発現細胞株の樹立システムを完成した．本講演では，開発の詳細について述べるとともに，細胞の能力を最大に引き出すための培養プロセス上の課題について言及したい．なお本研究は，次世代バイオ医薬品製造技術研究組合において，第一三共株式会社をはじめとする組合員企業，組合員研究機関との協力のもとに行われた．

抗体医薬品は，副作用の少ない効果的な治療薬として期待されている．その一方で薬価の高騰が課題ともなっている．薬価高騰の一因は，その高い製造コストにある．抗体医薬品は生産細胞の培養等のアップストリーム工程および精製分離等のダウンストリーム工程からなる多段階プロセスを経て製造されるため，洗練された高い技術が必要であり，どうしても高いコストが要求されてしまう．したがって製造コストを削減して薬価抑制の一助とするためには，アップストリーム・ダウンストリーム工程の効率化ならびに簡略化を求める更なるイノベーティブな技術開発が鍵となる．我々は，抗体医薬品製造の根幹ともいえる生産細胞の高機能化ならびに高機能化した細胞の能力を最大に引き出すことを可能とする培養プロセスの開発にターゲットを置いて技術開発を進めている．
抗体医薬品の主要な生産細胞は，CHO 細胞である．現在広く用いられている CHO 細胞は，およそ 60 年前に米国コロラド大学の T. Puck 博士らが学術的な研究目的のために樹立した細胞株を起源としている．その後，主に欧米の製薬企業やバイオ製造企業において細胞育種を含めた培養プロセスの開発が重ねられ，抗体医薬品の工業製造に利用されてきた．我々は，生産細胞としての CHO 細胞の更なるポテンシャルを引き出すことを目的として，チャイニーズハムスター卵巣の初代培養まで遡り，新規の CHO 細胞を樹立し，無限増殖化の当初から工業用途目的で育種を施すことを試みている．
これまでに，チャイニーズハムスター卵巣の初代培養から無限増殖化した上皮様細胞を樹立することに成功し，CHO-MK と命名した．独立の 8 個体から 8 系統の無限増殖化細胞を樹立し，いずれも 200 日間以上継代培養可能であることを確認している．その後，無血清培地における浮遊培養条件を確立し，完全無血清化／浮遊化後の特定の PDL （Population Doubling Level） においてホストセルバンクを作製した．現在，ICH ガイドライン Q5A/D に準じて純度試験などの各種特性解析試験の実施を進めている．これまでに実施した試験においては，タンパク医薬品製造用の細胞基材として用いるうえで問題となるような結果は得られていない．
CHO-MK 細胞は，既存の CHO 細胞（CHO-K1，CHO DG44 など）と比較して非常に高い代謝活性を有している．とくに増殖性に優れており，浮遊継代培養時の増殖速度は既存の CHO 細胞の 2 倍以上に達し，倍加時間は 10 時間よりも短いことが大きな特長の一つである．さらに，不均衡変異導入法（ちとせ研究所の独自の細胞育種技術）による細胞育種によって，高い増殖特性を維持したまま，細胞あたりの生産性を 10 倍以上に向上することに成功した．細胞育種によって増殖性・生産性が飛躍的に向上した CHO-MK 細胞のホストセルバンクを作製し，抗体発現クローンの樹立システムを完成した．CHO-MK 細胞に抗体発現ベクターをランダム導入して高発現クローンを選別した後，高い生産性と増殖性を引き出すための流加培養プロセスの最適化，生産培地の選定を行うことで，わずか 6 日間の培養で 5 g/L 以上の抗体を産生することができる．また，抗体産物の凝集体，断片化，電荷異性体などの分子変化体および糖鎖構造について，とくに問題になるような逸脱した結果は得られていない．なお，CHO-MK 細胞は医薬品生産への適用実績がない新規の生産細胞として取り扱う必要がある．そのため，規制対応として，卵巣の初代培養から発現クローン取得までの細胞取扱履歴（細胞選択の経緯，樹立方法等の情報），使用した原材料に関する CoA/CoO を含む関連資料の完備も徹底的に行っている．
我々の最終的な目標は，新規 CHO 細胞の高いポテンシャルを活用した培養プロセスを開発し，抗体医薬品をはじめとするタンパク医薬品の製造コストの削減に貢献することである．これまでに，スモールスケールの培養系においては上述したとおりの高い生産性を達成できているが，今後あるいは目下の課題は，いかにして高い生産性を維持したまま大きな培養系にスケールアップできるかということにある．我々は，CHO-MK 細胞という極めて生産能力の高い細胞を創出することに成功した．次は，その細胞がもてるポテンシャルを最大限に引き出すための培養プロセスを完成することである．そのためには，本シンポジウムのテーマがうたうそのままに，高度な培養を実現する工学的飛躍がまさに求められているのだ．

Nobel CHO cells produce more than 5 g/L antibody within 6 days

○Takayuki HORIUCHI
(Chitose Laboratory Corp.)

Key words CHO cells, antibody, biopharmaceutical

S3Lc03 DNA バーコードとゲノム編集による分子・細胞動態計測

○谷内江 望
（東大・先端研）
yachie@synbiol.rcast.u-tokyo.ac.jp

超並列 DNA シークエンシングはゲノム，エピゲノム，トランスクリプトーム計測の他に，DNA バーコードという考え方によって様々な実験の超多重並列化を実現した．今回の発表の前半では，最近の高速スクリーニングにおける DNA バーコードの様々な利用に触れた後，タンパク質間相互作用等の複数の因子が関わる細胞形質の計測を高速化するために私達が開発した Barcode Fusion Genetics (BFG)法を紹介する．BFG 法を酵母ツーハイブリッド (Y2H) 法と組み合わせることによって (BFG-Y2H)，最低でも 250 万のタンパク質ペアについてタンパク質間相互作用ネットワークを一人の研究者が 2-3 週間程度で計測することが可能になった．後半では，DNA バーコードとゲノム編集を利用して細胞分化，発生に関わる哺乳動物の細胞系譜を丸ごと同定するプロジェクトについて紹介する．

Chasing molecular and cellular dynamics using DNA barcodes and genome editing

○Nozomu Yachie
(RCAST, Univ. Tokyo)

Key words protein interaction, development, dna barcode, genome editing

S3Lc04 塩基編集技術 Target-AID の工学的応用

○西田 敬二
（神戸大院・科技イノベ）
keiji_nishida@people.kobe-u.ac.jp

ゲノム編集技術としてこれまで ZFN，TALEN，CRISPR などのプログラム可能なヌクレアーゼによる DNA 切断が主流であり，基本的には標的部位において DNA 二重鎖切断を引き起こした後に宿主細胞が修復する過程で配列の変換を期待するものである．これまで遺伝子操作が困難であった材料においても非常に有効であること，また外来 DNA 断片を残さないために遺伝子組み換えの規制が適用されない可能性があることから，医療分野から農業分野に至る応用化に向けて急速に導入が進められている．一方，課題として，改変配列あるいは相同組み換えの不確実性や，また細胞毒性によって適用が困難な細胞もあった．
ヌクレアーゼに代わるエフェクターを用いることによってより多様なアプリケーションの開発も進んでおり転写制御やエピゲノム操作なども開発されてきたが，特にゲノム配列の改変においてヌクレアーゼの課題を補完しうる，DNA 脱アミノ化反応を触媒するデアミナーゼ等を用いる Base editing（塩基編集）の技術開発と応用展開が広がってきている．
現状，塩基編集は主にヌクレアーゼ失活型の CRISPR/Cas9 に脱アミノ化酵素を結合させることで DNA 塩基の変換反応を行い点変異を実現する．これによってこれまで DNA 切断に関わる不確実性や毒性を回避することができ，またドナー DNA の挿入なしに精密な配列改変が可能となるため，遺伝子治療から細胞工学用途にまでの幅広い応用可能性が期待されている．また変換できる塩基の種類や，標的とできる領域の幅などについての制約を克服すべく技術開発が競われている状況になっている．本講演では塩基変換技術について，開発の過程や動作原理を解説しつつ，直近の技術進歩や派生技術，また様々な応用展開とその可能性について概説したい．

Base editing technology Target-AID and its application

○Keiji Nishida
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words genome engineering

S3Lc05 細胞培養における代謝解析ツールとしてのメタボロミクス

○馬場 健史, 和泉 自泰
（九大・生医研）
bamba@bioreg.kyushu-u.ac.jp

代謝物の包括的な解析を行うメタボロミクス（メタボローム解析）は，俯瞰的視点から代謝とそれに関連する生体分子を広く見出せることから，近年様々な分野において利用されるようになってきている．生体内の複数の代謝物の量比バランスを組み合わせたプロファイルは，高解像度の表現型として用いることができことから，病気の診断や病態発症メカニズムの解析，医薬品の薬効・毒性評価のほか，植物，微生物，動物などの種々の生物における代謝解析，食品や生薬の品質評価など，幅広い分野でメタボロミクスの有用性が示されている．
メタボロミクスは多岐にわたる分野から構成される学際領域研究であるために，それぞれの技術を理解し総合的に運用することは容易ではない．これが，当初メタボロミクスが一般的な技術として定着しなかった要因の一つである．また，様々な技術が開発されメタボロミクスの認知度が高くなった現在においても，その技術に関する十分な理解がないために実際の運用において種々の問題が生じ，結果としてメタボロミクスの有用性が認知されていないところがある．
サンプル調製，機器分析，データ解析がメタボロミクスにおける重要工程であるが，解析対象の代謝物が多岐にわたる多成分の一斉分析であるために，その技術は複雑なものとなっている．メタボロミクスを有効活用し，信頼性の高い解析を行うためには，メタボロミクスのそれぞれの技術の特性を十分に理解し，目的やサンプルにあわせて好適な手法を選択する必要がある．本シンポジウムの主役である細胞培養においても，成長過程における細胞内の代謝の変化やそれに伴う培地成分の変動など代謝解析の必要性からメタボロミクスの適用が試みられているが，実際にメタボロミクスを実施するためには，同様に検討が必要である．培養細胞サンプルの分析を行う際にどのように培地成分のコンタミを防ぐか，培地サンプルの分析を行う際に培地中に大量に存在する塩などの影響をいかに少なくするかなど，試料調製，分析方法における様々な課題を抱えており，それらの解決に向けた技術開発が必要な状況にある．
そこで，本講演では，細胞培養のメタボロミクスに利用可能な最新の技術やその応用例について紹介し，細胞培養における代謝解析ツールとしてメタボロミクスの有用性をご理解いただくとともに，メタボロミクスをどのように利用したら良いか，また，メタボロミクスの有効活用に向けた課題についても議論したい．

Metabolomics in cell culture

○Takeshi Bamba, Yoshihiro Izumi
(Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ.)

Key words Metabolomics, Metabolome, Chromatography, , Mass spectrometry

S3Lc06 受容体ライブラリーによる機能性細胞の創製

○河原 正浩
（東大院・工）
kawahara@chembio.t.u-tokyo.ac.jp

再生医療の産業応用においては，目的細胞をいかに均質に，再現性よく，安価かつ大量に調製するかが大きなボトルネックであり，種々の機能性細胞を自在に創製するための技術革新が必要とされている．
演者らは，細胞運命を制御するサイトカイン受容体に着目し，その機能を蛋白質工学的に改変することで，機能性細胞創製のためのプラットフォーム技術の開発を目指している．受容体は大きく分けてリガンド認識ドメインとシグナル伝達ドメインからなるが，この双方を改変すれば，望みのリガンドを認識し，望みのシグナル伝達特性を有する人工受容体が創製できる可能性がある．このような人工受容体のライブラリーを用意しておき，目的細胞に応じてその運命に誘導できる受容体を選んで利用すれば，機能性細胞創製技術として有用であると考えられる．
これまでに，リガンド認識ドメインとして抗体可変領域や合成小分子認識蛋白質を組み込んだ人工受容体の構築に成功した．また，シグナル伝達ドメインとして，天然型受容体のみならず，シグナル伝達分子の結合特性に関わるチロシンモチーフ配列をボトムアップ的に配置し，天然にないシグナル伝達特性を持つ人工受容体を創製することにも成功した．さらに，チロシンモチーフ配列自体をランダム化し，様々なシグナル伝達特性を持つ人工受容体ライブラリーも構築できた．本発表ではこれらの技術による細胞運命制御の実例を紹介し，種々の機能性細胞創製への応用可能性について議論したい．

Creation of functional cells using receptor libraries

○Masahiro Kawahara
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words synthetic receptor, cell fate control, protein engineering

S3Lc07 細胞形態計測による細胞フェノミクス解析

○加藤 竜司
（名大院・創薬）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

細胞培養テクノロジーの発展に伴い，細胞を利用して製造されるバイオ医薬品は「次世代の医薬」として革新的な成果と新しい市場を拡大しつつある．特に国内においては，細胞そのものを医薬品として取り扱う再生医療等製品という新しい枠組みや法改正に牽引され，細胞加工物の医薬品レベルでの製造を通じた新しい産業発展への期待が大きくなりつつある．しかし，製造業として細胞や細胞を利用した製品を製造するには，そこにはまだ細胞培養の歴史的に定量的・理論的に理解しきれていなかった現象がまだ数多く存在しており，「完全に同一な製品」として扱うことができない細胞独特の複雑性と難しさが実際の製造現場では課題となっている．
特に細胞を生きたままで「治療用の製品として」製造することを考えるとき，その品質管理は極めて重要な課題の一つである．細胞培養は，極めて複雑かつ長時間におよぶ工程であるが，工程における途中過程を定量的かつ経時的に計測する技術として，まだ有効な技術が少ない．現在の医療用細胞の培養工程においてこれを担うのは，熟練者による細胞形態の顕微鏡観察と，その観察結果に対する目利きである．様々な工業製品製造の現場においても，熟練者の視覚情報に基づく経験的判断は極めて高度な判断をしているケースは多いが，細胞培養工程のインプロセス計測の対象として細胞の画像情報は有用な情報源の一つであると考えられる．
近年，このような考えのもとで細胞の培養状態を数量化すべく様々なイメージング装置や解析ソフトウェアなどが開発されつつある．筆者らのグループもこれまで細胞培養途中の画像解析による「形態情報解析」の有効性を示しつつある．このような細胞の形が与える情報は「表現型（フェノタイプ）」として細胞応答の結果でもあり，我々の解析においても培養下の細胞を定量評価可能な様々な情報を有していることがわかりつつある．しかし，言い換えれば「最終結果でしかない細胞の見た目」を，どれほどの情報量で取得することが必要なのか，どこまでのバイオロジーを評価・表現することが可能なのか，実際に工程改善に活用することが可能なのかを議論しているものは少ない．本講演では，細胞形態情報を用いたフェノミクス評価の可能性と共に，製造プロセスそのものの理解や定量化の可能性についてご紹介すると共に，その課題についても議論したい．

Cellular Phenomics Analysis based on Morphology-based In-process Measurement

○Ryuji Kato
(Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

Key words image-based analysis, cell morphology, in-process measurement, quality control

S3Mc01 糖転移酵素を用いた糖ペプチド合成と糖鎖創薬への応用展開

○千葉 靖典[1], 吉村 弥生[1,2], 高橋 佳江[1], 横尾 岳彦[1], 清水 弘樹[3]
（[1]産総研・創薬基盤, [2]バイオインダストリー協会, [3]産総研・生物プロセス）
y-chiba@aist.go.jp

はじめに

今般，抗体医薬，ペプチド医薬，核酸医薬といったバイオ医薬品の技術開発が盛んに行われている．糖鎖は生命における重要な構成成分の一つであるが，糖鎖を活用したバイオ医薬品の開発が近年進んできた．糖タンパク質性のバイオ医薬品において糖鎖構造が重要であることは，エリスロポエチンの体内動態や，抗体医薬品の抗体依存性細胞傷害活性に影響することで既に示されている．またシアル酸の構造を模倣したインフルエンザ治療薬や，シアリルルイス X 構造を模倣した鎌形赤血球症に伴う血管閉塞性発作の治療薬などが糖鎖ミメティクスとして創薬に利用されてきた．近年ではさらに，血中の糖タンパク質をマーカーとして肝線維化の進行度を測定する診断薬も開発され，糖鎖のみならず，糖鎖とタンパク質の複合体を創薬開発に利用しようという試みが行われている．このような開発のためには，候補となる疾患特異的な糖タンパク質分子を精密に合成する必要がある．その方法として，一つには様々な宿主の糖鎖関連遺伝子を欠損，または過剰発現させ，目的の組換えタンパク質を発現することで特徴的な糖鎖構造を有する糖タンパク質を合成する方法がある．また *N*-型糖鎖については，酵素的に糖鎖を変換するトランスグリコシレーション法に関する一連の技術が開発され，抗体糖鎖を均一化した例が報告されている．これらの方法とは別に，糖鎖が付加したアミノ酸（糖アミノ酸）を材料とし，化学法により糖ペプチドを合成，ケミカルライゲーション法を用いてペプチドを連結し糖タンパク質を調製する方法が開発されている．この方法は最も効率よく均一な糖鎖構造を有する糖タンパク質を作製できると考えられるが，原料の糖アミノ酸として特に *O*-型糖鎖の種類が不足している．今回我々は糖転移酵素を利用して，特にがん抗原として知られている様々な *O*-型糖鎖を有する糖ペプチドの合成法を検討したので報告する．

酵母による糖転移酵素の発現と基質特異性解析

産総研が民間企業と開発したメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* 株，または出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 株を用いて，43 種類のヒト糖転移酵素を発現した．これまでに最も高い発現量を示した糖転移酵素は α2,3 シアル酸転移酵素（ST3Gal1）であり，1 L の培養液中に約 40 mg 程度の発現を確認している．一方，酵素によってはサブミリグラムオーダーの場合もあるが，発現量の向上について検討した結果について報告する．

さらに今回，特に *O*-型糖鎖のコア 2 構造（GlcNAcβ1,6[Galβ1,3]GalNAcα1-*O*-Ser/Thr）やコア 3 構造（GlcNAcβ1,3GalNAcα1-*O*-Ser/Thr)），がん抗原として知られている Tn 抗原（GalNAcα1-*O*-Ser/Thr），STn 抗原（NeuAcα2,6GalNAcα1-*O*-Ser/Thr），T 抗原（コア 1 構造：Galβ1,3GalNAcα1-*O*-Ser/Thr），ST 抗原（NeuAcα2,3Galβ1,3GalNAcα1-*O*-Ser/Thr）などを合成する糖転移酵素群について発現を行ない，その基質特異性を解析した．糖アミノ酸である GalNAcα1-*O*-Ser/Thr を基質とした場合，コア 1 合成酵素（*Drosophila* 属由来 C1GalT）はアミノ酸残基として Ser を好み，Thr は 1/20 程度の反応性であった．一方，糖ペプチドとして，5 つの Ser/Thr 残基の側鎖のそれぞれに GalNAc を有する 5 種類の糖ペプチドを化学合成により準備し，C1GalT を反応させたところ，特定の Ser 残基への転移反応効率が明らかに低いことが確認された．よって，C1GalT はアミノ酸側鎖の構造だけでなく，アミノ酸配列および周辺構造を認識してガラクトース残基を転移していることが示唆された．また同じ糖ペプチドに対し，α2,6 シアル酸転移酵素（ST6GalNAc1）を作用させ STn 構造を合成させた場合，Thr 残基の側鎖に付加した GalNAc にシアル酸を転移するものの，Ser 残基の側鎖上への GalNAc 転移効率はほとんど確認できなかった．一方，コア 1 構造を有する同じペプチドを基質とした場合には，Ser 残基の側鎖上の GalNAc へシアル酸を転移した．このことから，ST6GalNAc1 は GalNAcα1-*O*-Ser よりもコア 1 構造（Galβ1,3GalNAcα1-*O*-Ser）を好むことが確認された．このような基質特異性が，生体内において不均一で複雑な糖タンパク質を合成する原因と考えられた．

糖鎖創薬への応用展開

生産した糖転移酵素を利用し，各種糖ペプチドの合成を行った．前述の 5 つの Ser/Thr 残基の側鎖のそれぞれに GalNAc を有する 5 種類の糖ペプチドに対し，糖転移酵素を作用させ，STn 抗原，T 抗原，ST 抗原の構造等を有する糖ペプチドを 20 種類以上作製した．また隣り合った Ser/Thr 残基にジシアリルコア 1 構造（NeuAcα2,6[NeuAcα2,3Galβ1,3]GalNAcα1-*O*-）を連続して有する糖ペプチドの合成にも成功している．これらの糖ペプチドの利用法としては，ペプチド薬の安定化や，ケミカルライゲーション法を用いた糖タンパク質調製によるバイオ医薬品への展開が期待される．また最近では糖鎖とペプチドの両部分をエピトープとする新規抗体が取得されており，このような特殊な抗体を取得するための免疫原としても利用可能と考えている．

Glycopeptide synthesis with glycosyltransferase reactions and its application for glycan-based drug discovery

○Yasunori Chiba[1], Yayoi Yoshimura[1,2], Yoshie Takahashi[1], Takehiko Yoko-o[1], Hiroki Shimizu[3]
([1]BRD, AIST, [2]JBA, [3]BRI. AIST)

Key words glycosyltransferase, glycopeptide synthesis, biologics, yeast

S3Mc02 糖タンパク質の精密化学合成

○梶原 康宏
（阪大院・理）
kajihara@chem.sci.osaka-u.ac.jp

近年，糖鎖が結合したタンパク質，すなわち糖タンパク質が薬として広く利用されるようになった．しかし，タンパク質上の糖鎖は常に不均一で，どのような構造の糖鎖がタンパク質の活性を高めることができるのか理解は進んでいない．

糖タンパク質の生合成は，小胞体で開始される．リボソームから生産されるペプチドにグルコースが 3 つ，マンノースが 9 つ結合したハイマンノース型糖鎖が付加し，そしてこの糖鎖が多数の酵素，シャペロンにより構成される糖タンパク質品質管理機構のタグとして利用されることで，タンパク質部分が正しくフォールディングする．

この過程で，正しくフォールディングした糖タンパク質は，ゴルジ体に送られ，ハイマンノース型糖鎖のプロセッシングおよび酸性のシアリル糖鎖への再構築を経て完成品となり，細胞膜や細胞外へと分泌されていく．特に，糖タンパク質が，酸性のシアリル糖鎖を持つことで，血中に分泌された後，その水溶性の向上や糖タンパク質の凝集の防止，血中寿命，抗原性が制御される．

しかしながら，糖鎖構造が，糖タンパク質の生合成経路ならびに生理活性発現に与える影響を化学的視点で緻密に調べることは困難であった．これは，糖タンパク質分子がバイオテクノロジー法でしか調製できなかったことと，その際，糖鎖構造を自在に制御して，任意の糖鎖を持つ糖タンパク質を得ることができなかったことが原因である．

我々は，アミノ酸 166 残基からなるエリスロポエチン（EPO）を選び，ハイマンノース型糖鎖が小胞体での糖タンパク質の品質管理機構においてどのように利用されているのか，さらにはシアリル糖鎖が血中で EPO の赤血球増殖活性をどのように制御しているのか，糖タンパク質の精密化学合成を利用して糖タンパク質の糖鎖の機能を包括的に理解することを検討してきた．

本発表では，これら成果ならびに糖タンパク質の化学合成を用いる創薬等へ応用について紹介する．

Chemical Synthesis of Glycoproteins

○Yasuhiro Kajihara
(Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

Key words protein, protein folding, oligosaccharide, glycosylated peptide

S3Mc03 糖タンパク質合成の制御とバイオ医薬品への機能付与

○朝井 洋明
（糖鎖工学研究所）
hiroaki-asai@glytech.jp

バイオ医薬品は，低分子医薬品では対応できない病態へ適応できる分子も多く，医療用医薬品で重要な役割を果たすことが期待されている．そのため研究開発も盛んに行われている．一方でバイオ医薬品は，高分子量で構造も複雑であるので，低分子医薬品に比べて取り扱いや管理が難しい．複雑な構造を持つバイオ医薬品では，原薬の明確な品質規格の分子構造による規定が困難である．従って純度・含量の規定も極めて困難である．特に糖タンパク質性医薬品は，複雑で不安定な分子である場合が多く，製品の品質制御や精密な含量測定等には高度な技術やノウハウが必要となる．更に糖タンパク質性医薬品原薬は，動物細胞でしか生産できず，品質管理の煩雑さ，生産ロット間差の問題，製造コストの高さなどの多くの課題も抱えている．これら課題は，動物細胞の低生産性や細胞培養管理の困難さに起因する．
バイオ医薬品の中の糖タンパク質性医薬品は，抗体医薬の IgG 型抗体や腎性貧血症治療薬のエリスロポエチン（EPO）などのサイトカイン系医薬品や，ゴーシュ病治療薬のイミグルセラーゼなどの酵素補充療法用医薬に多い．糖タンパクの糖鎖の役割は，まだ解明途上であるが，その重要性はいくつかの例で既に明らかになっている．第二世代 EPO であるアラネスプ ™ は，ネイティブな EPO に 3 本しかない N 型糖鎖をアミノ酸改変により 2 本増やして 5 本にすることで血中半減期を 3 倍に延ばすことが出来た．また酵素補充療法に使われている糖タンパク酵素も含糖鎖構造に生体内活性が依存していることが明らかになっている．この様に，糖タンパク中の糖鎖構造や糖鎖本数が生体内活性に大きな影響を与えることより，糖鎖構造の制御や品質管理がさらに重要になると思われる．遺伝子工学の進展によりタンパク部分のアミノ酸配列構造の制御は，正確で日々効率化され，同時にバイオ医薬品も大きく発展してきた．しかしながら，動物細胞による糖タンパク発現において，タンパク上の糖鎖合成は，翻訳後修飾の過程で行われるので，糖鎖制御を高度に行うことは現在も困難である．
梶原らは，これらの課題を解決したヒト N - 結合型糖鎖の調製技術を見出しヒト型糖鎖ライブラリーの大量合成を可能にした．我々は，梶原らが開発した糖鎖調製技術を基に，工業レベルでかつ医薬品原料として使用可能な純度で，50 種類以上の糖鎖ライブラリーを構築した．
我々は，バイオ医薬品として大きな市場を形成しているヒトインターフェロンβ（ｈＩＦＮ-β）の全化学合成に挑戦し，このｈＩＦＮ−βの全化学合成と言う試みは完全に成功した．全化学合成されたｈＩＦＮ-βは，既に上市されているものと比較して薬効，動態，品質に関して同等以上であることが確認された．また，糖鎖構造も含めて高純度な均一構造を有する糖タンパクであった．
更に我々は，EPO とアラネスプの様にｈＩＦＮ-βの高機能化にも挑戦した．糖タンパク合成法により，糖鎖の付加位置，糖鎖の本数，それぞれの糖鎖構造を任意に設計された通りの糖タンパクを合成した．我々は 100 種類以上の糖タンパクを化学合成し，高機能化ｈＩＦＮ-βを創生するに至った．近年脚光を浴びている中分子医薬品のペプチド医薬においても糖鎖利用した創薬を行っているので代表的事例を紹介する．

New functional biopharmaceuticals via organic synthetic structural control

○Hiroaki Asai
(GlyTech,Inc.)

Key words glycosylated peptide, glycosylation, protein, chemical modification

S3Mc04 糖アナログを利用した糖鎖機能の追跡と改変

○木塚 康彦
（岐阜大・G-CHAIN）
kizuka@gifu-u.ac.jp

糖鎖は最も豊富な翻訳後修飾であり，糖鎖の変化が糖タンパク質の機能調節や疾患に深く関わることは言うまでもない．実際にがんなどにおいては，特異的な糖鎖変化がバイオマーカーとして臨床の場で使われている．さらに，これまでの糖鎖合成酵素のノックアウトマウスの解析などから，特定の糖鎖が特定の疾患の創薬ターゲットになる可能性が多く指摘されている．
一方で，そうした基礎研究による糖鎖生物学的知見の多くはまだ臨床応用されていないのが現状である．その理由の一つとして，扱いの容易な化合物ツールの不足が挙げられる．糖鎖の解析や医療応用においては，糖鎖の挙動を特異的に検出し，またその機能を自在に変化させる化合物の存在が重要となってくる．ところが現在では，糖鎖の検出においてはレクチンが，機能改変については糖鎖合成酵素の遺伝子の制御が主流であり，簡便さや応用という点においてはまだ不十分である．すなわち，こうした目的にかなう扱いの容易な低分子化合物の開発が重要である．
そうした中，糖のアナログが糖鎖の追跡や機能改変に有用であることがわかってきた．Bertozzi らの先駆的な研究を皮切りに，糖のアナログ（アジド体やアルキン体）をクリックケミストリーと組み合わせることで糖鎖の検出プローブとして使えることが明らかになった．また，天然の糖との構造類似性から，糖アナログは糖鎖合成酵素などの阻害剤として機能するケースが報告されている．これらの背景をふまえ，本発表では，著者らが最近行った二つのフコースアナログを用いた糖鎖研究を紹介したい．
フコースは糖鎖の末端に位置する糖で，特徴的な糖鎖構造エピトープの一部となっていることが多く，糖鎖-糖鎖認識分子間の結合にしばしば直接関わる．また，がん・炎症などの疾患から，発生，免疫などの生体機能，腸内細菌との共生など，様々な場で必須の役割を果たす糖鎖の一部となっている糖である．これらのことから，フコースの存在を検出して追跡できるプローブや，特定のフコシル化糖鎖の合成阻害剤などの開発は，さらなる糖鎖機能の解明と医療応用において重要である．実際これまで，いくつかのフコースアナログがプローブや阻害剤として有効である報告がなされていたが，一方その感度・特異性・毒性などの点においてはまだ改良すべ点が多く残されているのが現状である．
そこで著者らは，有機化学者との共同により，新たなフコースアナログの合成を行った．アジドフコースが原因不明の細胞毒性を示すことから，置換基の長さを改変したアルキン型フコースアナログを数種合成し，糖鎖プローブとしての適性を検証した．まず，フコース転移酵素の基質としての適性を in vitro の酵素アッセイによって調べたところ，新たに合成した 7-アルキニルフコースと呼ばれる化合物が，これまで作られたフコースアナログの中で最も良い基質となることがわかった．このことから，7-アルキニルフコースはこれまでのアナログよりも糖鎖中に取り込まれやすく，感度の高いプローブとなることが示唆された．実際に，この糖アナログを細胞に添加し，取込まれた糖鎖をクリックケミストリーによって検出したところ，従来のフコースアナログよりも高感度に糖鎖を検出できることがわかった．さらにグライコミクス解析により，7-アルキニルフコースは，コアフコースと呼ばれる N 型糖鎖の根元の位置にほとんど取り込まれることもわかった．また，アジドフコースのような顕著な細胞毒性は示さなかった．これらのことから，新たに合成した 7-アルキニルフコースは，高感度なフコシル化糖鎖のプローブとなることが示された(Kizuka et al., *Cell Chem. Biol.*, 2016).
一方，置換基の炭素鎖が 1 つ短い 6-アルキニルフコースを細胞に添加すると，プローブとしてよりも，むしろ内在性のフコシル化糖鎖を激減させる効果があることがわかった．代わりにフコシル化されていない糖鎖が増加していたことから，この化合物はフコシル化を阻害していることがわかった．またその阻害効果は，既存のフコシル化阻害剤である 2-フルオロフコースよりも著しく高いことが明らかになった．6-アルキニルフコースによる阻害のメカニズムを明らかにするため，糖ヌクレオチドに着目した解析を行ったところ，この化合物の添加によって，内在性の GDP-フコースがほぼなくなり，その代わりに前駆体である GDP-マンノースが貯留することがわかった．このことから，6-アルキニルフコースは GDP-フコースの生合成を阻害している可能性が強く示唆された．実際に酵素アッセイに化合物を添加したところ，GDP-フコース生合成酵素の一つである，FX (TSTA3)の活性が特異的に阻害されることがわかった．さらに，肝がん細胞に 6-アルキニルフコースを添加したところ，細胞増殖は影響を受けなかったが，浸潤は強く抑制された．以上のことから，6-アルキニルフコースは，GDP-フコース合成酵素をブロックしてフコシル化を阻害し，それはがん転移抑制などの効果を有することがわかった(Kizuka et al., *Cell Chem. Biol.*, 2017).

Tracing and functional modulation of glycans using sugar analogs

○Yasuhiko Kizuka
(G-CHAIN, Gifu Univ.)

Key words glycosylation, glycosyltransferase, sugar analog, click chemistry

S3Mc05 バイオ医薬品開発を指向した化学合成糖鎖からのアプローチ

○松崎 祐二
（東京化成工業 糖鎖技術部）
Yuji.Matsuzaki@TCIchemicals.com

東京化成工業は試薬メーカーとして有機合成化学・材料科学・ライフサイエンス・糖鎖・分析化学など28000品目を超える研究用試薬をラインナップしており，1/3は独自の製品として製造販売している．またその一部はバルク品として大量製造を行い ton レベルで供給している．
我々は，糖鎖科学のダイナミックな進展には安価な糖鎖の安定供給が必要であるとの想いから，有機化学試薬で培った量産化技術や大型製造設備を活用した有機化学的な手法による糖鎖合成を進めている．また天然物抽出のヒト型糖鎖，糖鎖転移酵素，レクチン，および抗糖鎖抗体などの関連試薬についても実用的に使用可能なスケールでの製造を目指している（下記 URL 参照）．

バイオ医薬品は環境の変化に敏感な生物の生合成過程を経てつくられるため，製造工程において多様な影響を受けるなどバイオ医薬品製造におけるハードルは高い．大きな影響を受ける要因の1つとしてタンパク質であるバイオ医薬品が受ける遺伝子翻訳後の糖鎖修飾が挙げられる．医薬品規制に関する ICH（医薬品規制調和国際会議）ガイドラインにおいても糖鎖に関する記述があるように，現状ではバイオ医薬品の製造工程を厳密に管理することで糖鎖構造およびプロファイルが大きく変化しないように調整しているといえる．一定品質の糖タンパク質の製造には，タンパク質の特定の部位に特定の糖鎖を発現する技術開発が必要とされるが未だこの技術は確立されていない．
翻訳後修飾によって付加される糖鎖の不均一性は必然であり，糖タンパク質を分離精製することも極めて困難であることから，微細な糖鎖構造の違いによる機能の解析は実現されていない．遺伝子工学技術により改変された異種細胞から入手される糖タンパク質の糖鎖を，厳密に構造が制御された均一糖鎖に[後から載せ替える]糖鎖工学が確立されれば，遺伝子工学やタンパク質工学だけでは解決されないことが可能となり相補的に有効な方法といえる．ここでは，抗体 Fc 領域などに存在する代表的なN型糖鎖の系統的合成，と糖タンパク質の糖鎖を[後から載せ替える]糖鎖改変について紹介する．

N型糖鎖の化学合成
糖鎖の化学合成は，位置及び立体選択的に制御が可能な単糖～3糖程度のビルディングブロックを予め準備することで合成に要する全工程の約80%が軽減できる．我々は多様な糖鎖構造に対応できるブロック原料について数百 L 規模の反応設備での合成を実現し，数 Kg レベルでの合成を可能としている．また，これらの合成は殆どの工程でカラムクロマト精製を必要としないことから更なる大規模製造も可能となっている．ここでは，ブロック原料を用いて天然からは極微量にしか得られない alpha1-3Gal や NeuGc を含む異種抗原糖鎖や，G1 と呼ばれる分子量や化学組成が同一の位置異性体など抗体医薬品に含まれる代表的なN型糖鎖の合成を行った．得られた糖鎖は HPLC，キャピラリー電気泳動(CE)，および MS での分析スタンダードとして還元末端を還元アミノ化法により 2-アミノベンズアミド(2AB)で標識した糖鎖を優先して合成した．

糖タンパク質の糖鎖を[後から載せ替える]糖鎖改変
山本らの開発したエンドグリコシダーゼ(Endo-M, Endo-M-N175Q)は，N型糖鎖の GlcNAc-GlcNAc 部分を切断して「糖鎖をまるごと他の化合物に付加できる」酵素である．我々は，抗体医薬品の Fc 領域に存在する不均一な糖鎖を Endo-M で切断して GlcNAc を露出させた後に，構造の明確な糖鎖を Endo-M-N175Q により位置選択的に導入することで，糖鎖の均一化された IgG 抗体を入手する事ができた．糖鎖改変反応は CE および TOF-MS で追跡し，糖鎖ドナーとしてキトビオースタイプを用いることで，タンパク質中アミノ基への非特異的な糖鎖付加も回避された．また抗体薬物複合体(Antibody-Drug Conjugate:ADC)開発への応用も想定し，薬物の連結可能な糖鎖を合成し IgG 抗体に導入を行った．糖鎖の改変技術は，目的に応じた構造の糖鎖を後から導入することで，既存の糖タンパク質に新たな機能を付与できる方法である．現状では糖鎖構造の違いにより転移効率が十分でない場合もあることから，効率性を補完する目的でレクチンを用いた糖鎖構造の違いによる糖タンパク質の精製法を検討している．また，保有する異種抗原糖鎖を活用し，alpha1-3Gal や NeuGc を含む異種抗原糖鎖を検出可能な抗糖鎖抗体も作製したのであわせて紹介する．
このような技術開発は，多くのアカデミアの協力を得て進められたものである．基礎研究から医薬，医療研究の実用的な展開の一助となれば幸いである．
（ http://www.tcichemicals.com/ja/jp/support-download/brochure/categorized_pamphlets_4.html）

2AB 標識化糖鎖の一部は，経済産業省・国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の支援による次世代バイオ医薬品製造技術研究組合の組合員として，産業技術実用化開発事業費補助金・委託事業「国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術」により行われた．

Approaches of Chemical Synthetic Oligosaccharide Aiming for Biopharmaceutical Development

○Yuji Matsuzaki
(Dept. Glycotechnol., TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.)

Key words glycoprotein, glycosylation, endoglycosidase, antibody

S3Mc06 エンドグリコシダーゼと機能性合成 N 型糖鎖を利用するネオ糖タンパク質医薬品の開発を目指して

○伊藤 孝司[1,6], 西岡 宗一郎[1,6], 小林 功[2,6], 笠嶋 めぐみ[2,6], 立松 謙一郎[2,6], 瀬筒 秀樹[2,6], 松崎 祐二[3], 飯野 健太[3], 木下 崇司[4], 堂崎 雅仁[4], 灘中 里美[5], 北川 裕之[5]
（[1]徳島大院・医歯薬学研・創薬生命工, [2]農研機構・カイコ機能改変技術開発ユニット, [3]東京化成工業, [4]伏見製薬所, [5]神戸薬科大・生化学, [6]SERIREVO）
kitoh@tokushima-u.ac.jp

近年，アスパラギン(N)結合型糖鎖の還元末端キトビオース構造を加水分解（切断）する，微生物由来エンドグリコシダーゼ（endo-M 及び endo-CC 等）は，N型糖鎖転移（トランスグリコシレーション）活性を併せもつことが，山本憲二や竹川薫博士らにより解明された．また糖鎖転移活性が増強されたアミノ酸置換型変異体 endo-M(N175Q)及び endo-CC(N180H)が開発され，各々東京化成工業（株）及び（株）伏見製薬所により製造・販売されている．さらに，これらのグライコシンターゼと機能性糖鎖ドナー誘導体を利用し，アクセプター糖タンパク質に付加された N 型糖鎖を機能性糖鎖と挿げ替えるという，日本発の糖鎖改変技術に基く，新規の糖タンパク質医薬品（ネオグライコバイオロジクス）開発への応用が期待されている．
リソソーム病（ライソゾーム病）は，リソソーム酵素の遺伝的欠損に基づき，本来リソソーム内で分解されるべき基質の過剰蓄積と多様な全身症状を伴って発症する，一群の先天性代謝異常症（40 種余り存在）である．近年，正常なヒトリソソーム酵素遺伝子を導入した哺乳類培養細胞株（CHO や HT1080）により製造する組換えヒト酵素の，患者への補充療法が開発され，現在 10 種の疾患に対する酵素製剤が臨床応用されている．しかし哺乳類培養細胞株で製造される酵素製剤は高コストで，患者一人（40kg 体重）に対し，年間必要な酵素製剤（約 1g）を用いた治療にかかる医療費は 3 千万円以上/年といわれ，一回有効投与量や投与回数を低減できることが望まれている．哺乳類細胞内では，他の N 型糖タンパク質とは異なり，リソソームマトリクス酵素には，末端マンノース 6-リン酸（M6P）含有 N 型糖鎖が付加されることが生理的な特徴で，この特殊な末端 M6P 含有糖鎖構造が，ゴルジ体とエンドソーム間のシャトルとして働く細胞内カチオン依存性 M6P レセプター（CD-M6PR）と結合した後，細胞内に取り込まれ，リソソーム内に輸送される．一方，細胞膜表面にも，この末端 M6P 含有糖鎖を認識して結合するカチオン非依存性 M6P レセプター（CI-M6PR）が存在するため，細胞外から末端 M6P 含有糖鎖をもつ組換えリソソーム酵素が投与されると，CI-M6PR との結合後，エンドサイトーシスにより取り込まれ，リソソームへと輸送され，蓄積基質を分解するという治療効果が現れる．
我々は，組換えヒト酵素原薬を低コストで大量生産するための新規生産基材として組換え（TG）カイコに着目し，農研機構・カイコ機能改変技術開発ユニットとの共同で，ヒト alpha-イズロニダーゼ（IDUA）やカテプシン A(CTSA)遺伝子を絹糸腺で高発現する TG カイコ系統を樹立し，摘出絹糸腺または繭から，酵素活性や生物機能を保持した組換え IDUA や CTSA 前駆体タンパク質を簡便に抽出・精製することに成功してきた．また絹糸腺/繭由来の精製ヒト酵素に付加された N 型糖鎖は，昆虫特異的な糖残基を含まず，ヒト N 型糖鎖の部分構造をもつことが明らかになり，患者に対する糖鎖抗原性は低いと考えられる．しかしカイコ絹糸腺内で発現したヒト酵素には，末端 M6P 含有糖鎖は付加されなかった．従って精製酵素をそのまま患者体内に投与しても，CI-M6PR との結合を介した患者細胞内への取り込みとリソソームへの輸送は期待できなかった．
そこで我々は，東京化成工業（株）に，末端 M6P 含有高マンノース型糖鎖ドナー誘導体の合成を委託し，同社の改変型 endo-M(N175Q)を用い，アクセプターとしての TG カイコ絹糸腺/繭由来の精製 IDUA（分子量 78kDa, 6 本の付加 N 型糖鎖をもつ）に対し，液相反応系で，末端 M6P 含有糖鎖への挿げ替えを試みた．末端 M6P 含有糖鎖ドナーと IDUA の分子比は 1,000：1 で行い，過剰な合成糖鎖ドナーが必要であるという改善すべき課題はあるものの，6 本存在する N 型糖鎖のうち，少なくとも 1 本を末端 M6P 含有糖鎖に挿げ替えることに成功した．また得られたネオグライコ IDUA を，IDUA 欠損症（ムコ多糖症 1 型）患者由来培養線維芽細胞の培養系に投与したところ，CI-M6PR を介して取り込まれ，リソソームまで輸送され，欠損酵素活性を正常値以上に回復させるとともに，蓄積基質であるヘパラン硫酸等を減少させるという有効性を示し，人工的な IDUA の高機能化が期待された．
さらに我々は，（株）伏見製薬所との共同で，同社の endo-CC(N180H)とシアリルグライコペプチド（SGP）誘導体をドナー糖鎖として用い，アクセプター N 型糖タンパク質としての TG カイコ由来精製 IDUA への SG 転移反応条件を検討した．興味深いことに，endo-CC(N180H)による，SGP からの IDUA への SG 転移反応は，酸性 pH 条件でも進行することが明らかになった．酸性 pH で安定に活性を示すリソソーム酵素に対し，失活を抑制しながら糖鎖転移反応を *in vitro* で実施できる可能性が示唆された．
本講演では，まだ実施例が少ない，エンドグリコシダーゼ（グライコシンターゼ）による比較的高分子量の有用糖タンパク質の糖鎖改変技術に関して，TG カイコで生産したヒトリソソーム酵素の例を紹介し，endo-M(N175Q）や endo-CC(N180H)を用いる，ネオ N 型糖タンパク質の創製と医薬品開発への応用の可能性について議論したい．

Development of “Neoglycobiologics” produced by endoglycosidases with transglycosylating activity and biofunctional synthetic N-glycans

○Kohji Itoh[1,6], So-ichiro Nishioka[1,6], Isao Kobayashi[2,6], Megumi Kasashima[2,6], Ken-ichiro Tatematsu[2,6], Hideki Sezutsu[2,6], Yuji Matsuzaki[3], Kenta Iino[3], Takashi Kinoshita[4], Masahito Dozaki[4], Satomi Nadanaka[5], Hiroshi Kitagawa[5]
([1]Grad. Sch. Biomed. Sci., Tokushima Univ., [2]Inst. Agribiol. Sci, Naro., [3]Tokyo Chem. Indust., Co. Ltd., [4]Fushimi Pharmaceut., Co. Ltd., [5]Dept. Biochem., Kobe Pharmaceut. Univ., [6]SERIREVO)

Key words endoglycosidases, transglycosylation, lysosomal diseases, transgenic silkworm

3Ca01 白麹菌における推定 RNA 結合タンパク質 NrdA の機能解析

○門岡 千尋[1], 泉津 弘佑[2], 浅井 禎吾[3], 奥津 果優[1], 吉﨑 由美子[1], 髙峯 和則[1], 後藤 正利[4], 玉置 尚徳[1], 二神 泰基[1]
([1]鹿児島大・農, [2]滋賀県立大・環境科学, [3]東大院・総合文化, [4]佐賀大・農)
futagami@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

【目的】白麹菌 *Aspergillus luchuensis mut. kawachii* は焼酎製造に用いられる麹菌であり，菌体外に多量のクエン酸を分泌生産する特徴をもつ．本研究では，クエン酸合成酵素遺伝子 *citA* の上流に高度に保存された推定 RNA 結合タンパク質をコードする *nrdA* 遺伝子に着目し，クエン酸高生産機構との関連を明らかにすることを目的として行った．
【方法・結果】まず，*nrdA* 遺伝子の破壊株の構築を試みたが，破壊株を取得できなかったため，Tet-On システムにより *nrdA* の発現を制御できる株を構築した．この Tet-*nrdA* 株は *nrdA* の発現誘導時のみコロニーを形成したことから，白麹菌において *nrdA* は必須遺伝子であることが示唆された．Tet-*nrdA* 株は *nrdA* の発現誘導時においても，最小培地上で野生株と比較して生育が遅延し，菌糸に茶色い色素の沈着がみられた．また，菌体量あたりのクエン酸生産量を測定したところ，野生株と比較して約 10%に低下した．次に，N 末端に GFP を融合した GFP-NrdA の局在観察を行ったところ，GFP-NrdA は核に局在することが示唆された．以上の結果より，NrdA は白麹菌において生育に必須であるだけでなく，クエン酸生産や色素合成などをグローバルに制御する因子であることが示唆された．出芽酵母と分裂酵母におけるホモログである Nrd1 および Seb1 を Tet-*nrdA* 株において発現させたが，*nrdA* の発現非誘導時ではコロニーを形成できなかったため，Nrd1 および Seb1 は NrdA の機能を相補できないことが示唆された．

Characterization of putative RNA binding protein NrdA in *Aspergillus kawachii.*

○Chihiro Kadooka[1], Kosuke Izumitsu[2], Teigo Asai[3], Kayu Okutsu[1], Yumiko Yoshizaki[1], Kazunori Takamine[1], Masatoshi Goto[4], Hisanori Tamaki[1], Taiki Futagami[1]
([1]Fac. Agric., Kagoshima Univ., [2]Grad. Sch. of Env. Sci., Univ. of Shiga Pref.,, [3]Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo, [4]Fac. Agric., Saga Univ.)

Key words *Aspergillus kawachii*, citric acid, RNA binding protein, gene regulation

3Ca02 プロテアーゼを高生産する黒麹菌の育種と芋焼酎醸造試験による評価

○瀬戸口 翔[1,2], 益留 綾菜[2], 一谷 勝之[3], 橋本 文雄[3], 吉田 理一郎[3], 岡本 繁久[3], 内海 俊樹[4], 尾上 昌平[5], 岩井 謙一[2], 髙瀬 良和[2], 二神 泰基[3], 玉置 尚徳[3]
([1]鹿児島大院・連農, [2]霧島酒造, [3]鹿児島大・農, [4]鹿児島大院・理工, [5]鹿児島大・RI)
s-setoguti@kirishima.co.jp

【背景・目的】
我々は以前，黒麹菌のプロテアーゼ遺伝子 *pepA* 破壊株および高発現株を用いて芋焼酎醸造試験を行い，プロテアーゼ活性と芋焼酎の香気成分（高級アルコール類・エステル類）に相関があることを報告している．以上の結果から，プロテアーゼ活性は焼酎麹菌の育種指標として有望と考えられたため，本研究では遺伝子組換えを用いない方法でプロテアーゼ高生産黒麹菌を取得し，芋焼酎醸造試験により育種株の醸造特性を評価した．
【方法・結果】
黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* J7-2 株に日本原子力研究開発機構 高崎量子応用研究所イオンビーム照射研究施設（TIARA）に設置されている AVF サイクロトロンの深度制御種子照射装置によって 220 MeV 炭素イオンビーム（12C5+）を照射し，1%カゼインを含む CD 培地でハローの大きさを指標に選抜した．次に，ハローが最も大きかった CSH-1 株を用いて米麹を作製し，酵素活性を測定した．その結果，酸性プロテアーゼ活性が親株の 4.8 倍，酸性カルボキシペプチダーゼ活性が親株の 2.5 倍と高かったが，β-グルコシダーゼ活性は親株の 4 分の 1 と低かった．最後に得られた米麹を用いて芋焼酎の醸造試験を行った．二次もろみ中のアミノ酸濃度は親株のものと比較して 2 倍程度高くなった．また，親株製の焼酎と比較して高級アルコール類やエステル類が減少する傾向が確認され，この結果は以前の *pepA* 高発現株を用いた試験結果と一致した．さらに，CSH-1 株を用いた二次もろみはアルコール濃度が高く，原料あたりのアルコール収得量も高くなった．
【謝辞】
本研究は原子力機構施設利用共同研究制度の支援を受けて行われた．

Breeding of black koji mold which produces high levels of protease and evaluation by sweet potato *shochu* brewing test

○Sho Setoguchi[1,2], Ayana Masudome[2], Katsuyuki Ichitani[3], Fumio Hashimoto[3], Riichiro Yoshida[3], Shigehisa Okamoto[3], Toshiki Uchiumi[4], Masahira Onoue[5], kenichi Iwai[2], Yoshikazu Takase[2], Taiki Futagami[3], Hisanori Tamaki[3]
([1]United. Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [2]Kirishima Shuzo, [3]Fac. Agric., Kagoshima Univ., [4]Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ., [5]RI., Kagoshima Univ.)

Key words *Aspergillus luchuensis*, protease, sweet potato *shochu*

3Ca03 黒麹菌における 1-octen-3-ol 生合成遺伝子の解析

○片岡 涼輔[1], 植松 千暁[2], 長谷川 泰子[2], 渡邉 泰祐[1,2], 荻原 淳[1,2]
([1]日大院・生資科, [2]日大・生資科)
j-ogihara@brs.nihon-u.ac.jp

【背景と目的】沖縄県を代表する蒸留酒である泡盛に含まれる代表的な香気物質の 1 つとして 1-octen-3-ol が知られている．本化合物は不飽和アルコールの一種であり，*Aspergillus* 属糸状菌を含む真菌による生成に関する報告があるが，その生合成経路については明らかではない．泡盛醸造に使用される黒麹菌は *Aspergillus* 属に属していることから，泡盛中に含まれる 1-octen-3-ol は黒麹菌によって生産されていると考えられる．そこで本研究では，黒麹菌において 1-octen-3-ol 生合成に関与すると予想される脂肪酸オキシゲナーゼ *ppoC* の遺伝子破壊株を取得した．さらに，SPME-GCMS 法により，この遺伝子破壊株を用いて調製した麹における 1-octen-3-ol 生産性を確認した．
【方法および結果】*Aspergillus luchuensis* のゲノムデータベース上に，*Aspergillus nidulans* において 1-octen-3-ol の生合成に関与すると予想されている *ppoC* 遺伝子と相同性が高い遺伝子を見出した．得られた配列情報に基づいてドメイン解析を行った結果，本遺伝子は *A. nidulans* の *ppoC* 遺伝子と同様に N 末端にヘムペルオキシダーゼドメイン，C 末端側にシトクロム P450 ドメインを有することが明らかとなった．一方，形質転換の選択マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を選抜し，その両側に上記候補遺伝子の上流および下流域を 1.5 kb ずつ連結した *ppoC* 遺伝子破壊用カセットを構築した．プロトプラスト-PEG 法による形質転換を実施し，得られた形質転換体について，ゲノム PCR により遺伝子破壊を確認した．また，得られた遺伝子破壊株を用いて調製した麹について，SPME-GCMS 法による香気物質の分析を行った．その結果，*ppoC* 破壊株で製麹した麹に含まれる 1-octen-3-ol 量は，親株の麹と比較して明らかに低下していたことから，本遺伝子が *A. luchuensis* の 1-octen-3-ol 生合成に関与していることが示された．

Analysis of 1-octen-3-ol biosynthetic gene in *Aspergillus luchuensis*

○Ryousuke Kataoka[1], Chiaki Uematsu[2], Taiko Hasegawa[2], Taisuke Watanabe[1,2], Jun Ogihara[1,2]
([1]Dept. Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ., [2]Coll. Bioresour. Sci., Nihon Univ.)

Key words *Aspergillus luchuensis*, 1-octen-3-ol, volatile, SPME-GCMS

3Ca04 泡盛黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の系統解析と毒素関連遺伝子の解析

阿部 峻之[1], 東 春奈[1], 外山 博英[2], 水谷 治[2], 山田 修[3], ○塚原 正俊[1]
([1]バイオジェット, [2]琉球大・農, [3]酒総研)
tsuka@biojet.jp

黒麹菌は，沖縄県の伝統的酒類である「泡盛」の醸造に用いられる麹菌である．黒麹菌は，複数の遺伝子配列を対象とした系統解析により，系統学的に独立した群を形成していることが確認されたことから *Aspergillus luchuensis* として再定義された．一方，泡盛醸造には異なる *A. luchuensis* 株を混合した複菌麹が用いられており，個々の株が異なる特性を有することが経験的に知られると共に，それぞれの株の特性を効果的に活用している．本研究では，*A. luchuensis* を含む多数の系統を対象として遺伝子情報を取得し，近縁種間の系統関係，あるいは *A. luchuensis* での種内系統関係を明らかにすることを目的とした．解析対象の菌株は，琉球大学に保存されている沖縄由来の株（酒造所あるいは自然環境から採取）および公共機関・研究所の供託菌株を用いた．各株のゲノム情報を次世代シーケンサー Miseq により取得し，*A. luchuensis* NBRC4314 にマッピングすることで得られた変異情報を比較することで系統解析を行った．その結果，解析に供した黒アスペルギルス全体は，大きく 3 つの群 *A. luchuensis*，*A. tubingensis*，*A. niger* に分かれた．さらに，今回の手法によりそれぞれの種間の詳細な距離や種内の相互関係など詳細な情報が得られることがわかった．一方，*A. luchuensis* の種内の系統解析結果から，*A. luchuensis* は大別して 2 グループに分かれること，およびこれらのグループの分岐は約 400 年前と推定された．さらに，シーケンスによって得られたリードの情報から，カビ毒関連遺伝子（オクラトキシン，フミノシン）が完全に欠落していること，種によりその欠落様式が異なることが明らかになった．

Detailed phylogeny of *Aspergillus luchuensis* with whole genome comparison

Takayuki Abe[1], Haruna Azuma[1], Hirohide Toyama[2], Osamu Mizutani[2], Osamu Yamada[3], ○Masatoshi Tsukahara[1]
([1]Biojet, [2]Fac. Agric., Univ. Ryukyus, [3]NRIB)

Key words *Aspergillus luchuensis*, *Awamori*, phylogenetic analysis, Next generation sequencer

3Ca05 *Aspergillus luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素の各種米麹中の発現量と泡盛もろみおよび蒸留液中の 4-VG 量の相関

○眞榮田 麻友美 [1], 渡嘉敷 正司 [2], 渡嘉敷 みどり [2], 上地 敬子 [1], 平良 東紀 [1]
（[1]琉球大・農, [2]石川種麹店）
tokey@agr.u-ryukyu.ac.jp

【目的】泡盛とは，米を原料として *Aspergillus luchuensis* を用いて造った麹を酵母によって発酵させ，得られたもろみを蒸留し製造される沖縄の伝統的な蒸留酒である．3 年以上貯蔵された泡盛は古酒と呼ばれる．泡盛古酒の特徴香の 1 つであるバニリンは，米から遊離されたフェルラ酸（FA）が醸造中に 4-ビニルグアヤコール（4-VG）へ変換され，貯蔵中に非酵素的酸化によって生成されると考えられている．我々は，これまでに *A. luchuensis* var. awamori ISH1 株由来フェノール酸脱炭酸酵素（AlPAD）が FA を 4-VG に変換する活性（FAD 活性）を有し，製麹中に発現していることを確認している．本研究では，製麹時間及び原料米の違いによる麹中の FAD 活性と AlPAD の発現量を調べると共に，これらの量ともろみ及び蒸留液中の 4-VG 量に相関があるかどうかを検討した．
【方法及び結果】ジャポニカ米の精白米（JW），ジャポニカ米の二分搗き玄米（JB）またはインディカ米の精白米（IW）を用いて製麹を行い，一定時間毎にサンプリングを行った．製麹時間の異なる麹の無細胞抽出液の FAD 活性測定と，ウエスタンブロッティングによる AlPAD の発現量を定量した．その結果，どの原料米においても製麹時間が長い程，FAD 活性と AlPAD の発現量が増大することが分かった．その中でも，JB の FAD 活性と AlPAD の発現量が最も高かった．製麹時間の異なる麹を仕込み，もろみ中の FA と 4-VG を定量した結果，製麹時間が長くなると FA は減少し，4-VG は増大していることが確認された．蒸留液中の 4-VG 濃度はもろみ中の濃度と正の相関があり，その濃度は JB が最も高く，次に IW が高かった．以上の結果より，麹中の AlPAD の発現量と，もろみ及び蒸留液中の 4-VG 量には正の相関があることから，麹中での AlPAD の発現量を増やすことによって，バニリン香に富む泡盛古酒の原酒の製造が可能となることが示唆された．

Correlation between the amounts of *Aspergillus luchuensis* phenolic acid decarboxylase in several rice koji and the amounts of 4-vinylguaiacol in Awamori moromi and distillate

○Mayumi Maeda[1], Masashi Tokashiki[2], Midori Tokashiki[2], Keiko Uechi[1], Toki Taira[1]
([1]Fac. Agric., Univ. Ryukyus, [2]Ishikawa Tanekouji)

Key words *Aspergillus luchuensis*, phenolic acid decarboxylase, Awamori, 4-vinylguaiacol

3Ca06 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるペプチダーゼ遺伝子の転写に窒素源が与える影響

○白石 敦士, 前田 浩, 山形 洋平
（農工大院・農）
y-yama@cc.tuat.ac.jp

【背景と目的】黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は，硝酸イオンやアミノ酸など様々な窒素源を利用して生育することができる．菌体外に分泌されるジペプチジルペプチダーゼをコードする遺伝子 *dppB* の転写がタンパク質基質によって誘導され，無機窒素源の添加で抑制されることなどから，周囲の窒素源の状態に応答してペプチダーゼ遺伝子が制御されている可能性が示唆された [1]．そこで *A. oryzae* における窒素源に対するペプチダーゼ遺伝子の転写応答制御機構を解明することが本研究の目的である．
【方法と結果】 *A. oryzae* RIB40 株を硝酸ナトリウムを窒素源として 48 時間培養した後，窒素源を切り替えて 4 時間培養した．切り替え後の窒素源として硝酸ナトリウム，硫酸アンモニウムなどの無機化合物，L- グルタミン酸，L- ロイシン，L- アルギニン などのアミノ酸，牛血清アルブミン，大豆タンパクなどのタンパク質をそれぞれ用いた．この条件下でペプチダーゼ遺伝子の転写量を定量 PCR によって調べたところ，ほとんどのペプチダーゼ遺伝子の転写は硝酸ナトリウムからアンモニアや L-グルタミン酸，L- アルギニンに切り替えた場合には大きな変動が見られなかった．一方，タンパク質を窒素源とした場合には多くのペプチダーゼ遺伝子の転写量が上昇し，L-ロイシンでも同様な転写量の変化がみられた．以上のことから麹菌でのペプチダーゼ遺伝子の転写はアミノ酸の種類やタンパク質の種類によって異なっていることが明らかになった．その他のアミノ酸によるペプチダーゼ遺伝子の転写変動についても報告する予定である．

1)Maeda H, *et al*., *App. Microbiol. Biotech*., 100 (11), 4947-4958 (2016)

Effect of nitrogen sorce on peptidase gene transcription in *Aspergillus oryzae*

○Atsushi Shiraishi, Hiroshi Maeda, Yohei Yamagata
(Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words *Aspergillus oryzae*, nitrogen metabolism, transcriptome

3Ca07 Visualizing metabolites in rice koji using MALDI imaging mass spectrometry

○Adinda Putri Wisman[1], Yoshihiro Tamada[2], Takahiro Akashi[2], Katsuya Gomi[3], Eiichiro Fukusaki[1], Shuichi Shimma[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd., [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Rice koji, which is made by inoculating *Aspergillus oryzae* on steamed rice, is one of the most important materials for Japanese sake. As the first step in production, koji condition is thought to considerably influence sake quality. Koji quality check during sake production is usually done by experienced sake brewers through observation of *hazekomi*, or how the mold penetrate the steamed rice. Visualization of compound distribution inside rice koji is required to understand the correlation between koji quality and its physical properties. Matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry (MALDI-IMS) is considered to be a powerful technique for directly observing target compounds without labeling, making it suitable to investigate the properties of rice koji.
In our study, we first developed a method to section rice koji, as it is fragile and hard to maintain the morphology during sectioning process. We also considered the choice of matrix application method to obtain comprehensible compound distribution information. The optimized sectioning and matrix application method were then applied to analyze rice koji and several compounds with interesting distribution were found. A specially developed rice koji inoculated with *Aspergillus oryzae* strain inserted with green fluorescence protein (GFP) was used to map the mycelia growth inside rice koji, making it possible to link between compound distribution and physical properties of rice koji affected by the penetration of the mold.

Visualizing metabolites in rice koji using MALDI imaging mass spectrometry

○Adinda Putri Wisman[1], Yoshihiro Tamada[2], Takahiro Akashi[2], Katsuya Gomi[3], Eiichiro Fukusaki[1], Shuichi Shimma[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd., [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words rice koji, imaging mass spectrometry, MALDI-IMS

3Ca08 イメージング質量分析を用いた清酒における麹米品種の特性解析

○玉田 佳大 [1], Wisman Adinda Putri [2], 窪寺 隆文 [1], 明石 貴裕 [1], 福﨑 英一郎 [2], 新間 秀一 [2]
（[1]白鶴酒造, [2]阪大院・工）
yoshihiro-tamada@hakutsuru.co.jp

【背景と目的】白鶴錦は，山田穂と渡船 2 号を交配・育種した山田錦の兄弟酒米品種である．我々はこれまでに，精米歩合 38%の大吟醸酒において，白鶴錦製成酒は山田錦とは異なる官能特性を持ち，グリセロール，エリスリトールといった糖アルコール量の多さがその一因である可能性を明らかにした [1]．また，この成分的特性は白鶴錦の麹米としての特性に由来することを確認した [2]．麹菌は固体培養において，低水分活性時に糖アルコールを多く生成することが報告されている [3]．米麹内の水分活性の分布はグルコース濃度の分布と逆相関すると考えられる [4]ことから，両品種では米麹中のグルコース分布に違いがあると推察した．そこで本研究では，イメージング質量分析を用いて両品種の米麹中のグルコース分布を比較し，麹米品種としての特性の違いの解析を試みた．
【方法と結果】精米歩合 38%の浸漬米の電子顕微鏡観察により，白鶴錦は山田錦とは異なる米粒構造を有しており，米の外側が軟質である傾向を確認した．また，主要酵素活性が揃った米麹の電子顕微鏡観察の結果，白鶴錦の方が米の外側がよく分解されている傾向があった．続いて，イメージング質量分析を行い，麹菌の破精込みが集中していると考えられる外周部において，白鶴錦の方がグルコース濃度が高い傾向を確認した．本研究により，麹米品種による米粒構造の違いと麹菌代謝物，ひいては清酒成分の違いを紐付けることができた．これまでに，米粒構造と清酒の酒質の関連性の詳細な解析を試みた報告はなく，こうした知見は酒米品種の特性を活かした醸造方法の開発に繋がると期待される．

1) 玉田ら：日本醸造協会誌，112，827-835 (2017)
2) 玉田ら：日本醸造協会誌，110，786 (2015)
3) Ruijter G. J. *et al*.: *Microbiology*.，150，1095-101 (2004)
4) 小林：日本醸造協会誌，104，726-742 (2009)

Characteristic analysis of rice varieties in koji making using imaging mass spectrometry

○Yoshihiro Tamada[1], Adinda Putri Wisman[2], Takafumi Kubodera[1], Takahiro Akashi[1], Eiichiro Fukusaki[2], Shuichi Shimma[2]
([1]Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words sake, rice koji, imaging mass spectrometry

3Ca09 生もと系酒母製造工程において各種微生物が呈味成分に与える影響

○高橋 正之, 喜多 靖子, 向井 伸彦
（酒総研）
m.takahashi@nrib.go.jp

【目的】生もとや山廃酒母造り（以下,「生もと系酒母」）では，乳酸菌の生育誘導により低 pH 環境を作り，好ましくない微生物の生育を抑制することで清酒醸造に適した醸造環境を造り出している．一方で，製造場毎に初期の細菌叢は多様性があり，乳酸菌が生育誘導されるまでのプロセスも異なることから，その製造工程において多くの微生物が関与していると考えられており，その成分変化も多様である可能性が高い．本研究では複数の製造場の生もと系酒母の製造工程における成分変化を解析し，製造場間で違いのあった成分について差異の原因となる細菌を特定することを目的とした．
【方法】東日本から 2 場，西日本から 3 場の計 5 場の清酒製造場から提供を受けた生もと系酒母の経時サンプルを解析した．細菌叢は，酒母試料からリン酸緩衝生理食塩水で菌体を回収し，ハイスループットシーケンサー及び定量 PCR 法を用いて網羅的に定量した．成分については，有機酸，アミノ酸，アミン及び糖類を対象とし，液体クロマトグラフで定量した．
【結果と考察】今回定量した多くの成分で製造場毎に違いが見られたが，特にアルギニンで含有量に大きな差があった．アルギニンを基質とした代謝物としてはアグマチンかシトルリン及びオルニチンが考えられたため，それらの定量結果と比較したところ，原料米から溶出したアルギニンはオルニチンあるいはアグマチンに変換されていることが示唆された．これらの代謝を行っている細菌を推定したところ，オルニチンへの変換には *Lactobacillus* 属細菌などが，アグマチンへの変換には *Pantoea* 属などいくつかの細菌が関与していることが示唆された．したがって，生もと系酒母では生育する細菌叢の違いが，味の多様性の一因になっていると考えられた．

Effect of microbiota on taste components composition during kimoto starter culture making.

○Masayuki Takahashi, Yasuko Kita, Nobuhiko Mukai
(NRIB)

Key words *kimoto*, bacterial diversity, arginine, ornithine

3Ca10 清酒酵母のアルギニン取込能の差に起因するタンパク質解析

○清野 珠美, 和田 潤, 廣岡 青央
（京産技研）
kiyono@tc-kyoto.or.jp

【背景・目的】きょうかい酵母を麹汁培地で培養した時の，アミノ酸取込能を調べたところ，酵母によってアルギニンの取込能に差があることを見出した[1]．アルギニンは清酒の苦味に大きく寄与するアミノ酸であるため，酵母のアルギニン取込能の差の原因を解明し，この機能を制御することができれば，清酒の苦味の制御につながることが期待できる．そこで，窒素源をアルギニンのみにした合成培地で清酒酵母を培養した時の，酵母のタンパク質発現解析を行い，アルギニン取込能の差との関連を調べることを試みた．
【方法】5%グルコース-500 ppm アルギニン-YNB 培地（硫酸アンモニウム，アミノ酸不含）を用いて，きょうかい酵母 701 号と 901 号を，15℃，5 日間培養した．培養 2 日目から 5 日目までの濁度と培地アルギニン濃度を分析し，同時に酵母菌体のタンパク質発現解析を，二次元電気泳動法を用いて行った．
【結果】培養中の濁度は両酵母で大きな差はなかった．培地アルギニン濃度は培養 3 日目から 701 号よりも 901 号の方がより減少し始めたことから，901 号の方がよりアルギニンを取り込んでいることが示唆された．タンパク質解析の結果，特徴あるタンパク質として，901 号の方が発現量が大きい Spot 1，2 が見出され，PMF 解析によりタンパク質を同定した．
1) 清野ら，第 68 回日本生物工学会大会要旨集, p.187 (2016)

Protein analysis of sake yeast for difference of arginine uptake

○Tamami Kiyono, Jun Wada, Kiyoo Hirooka
(KITC)

Key words sake yeast, 2D electrophoresis, arginine uptake

3Ca11 濃縮果汁を用いたワイン発酵における発酵遅延の原因成分の同定と改善法の開発

○菊地 のぞみ[1], 稲留 弘乃[2], 高橋 沙織[2], 篠原 裕之[3], 鈴木 克彦[1], 吉田 聡[1], 高田 良二[1]
（[1]キリン・ワイン技術研, [2]キリン・酒類技術研, [3]キリン・基盤技術研）
Nozomi_Kikuchi@kirin.co.jp

【目的】わが国では，濃縮還元果汁をワイン用原料として使用するケースがある．しかしながら，これらの濃縮果汁は製造時に使用するブドウの品種，ブドウの産地，サプライヤーなどの違いによって品質が異なり，使用する果汁によっては発酵が遅延する場合もみられる．本発表では，これらの中で特に白ワイン醸造における発酵遅延に注目し，発酵遅延に影響を及ぼす成分の同定と発酵遅延改善を検討した結果について報告する．
【方法】産地やサプライヤーの異なる数種類の白濃縮果汁について網羅的な成分分析を行った．分析結果から発酵遅延の原因になっていると推察された成分を同定し，それらを発酵時に追加添加することで発酵改善がみられるか検証した．最後に，発酵改善に効果のみられた成分についてはその成分を多く含む発酵助成剤を探索し，添加効果を検証した．
【結果】今回調査した白濃縮果汁の成分分析から，発酵性の良い果汁と悪い果汁の間には特にビタミン B 類の含有量に差があることが明らかとなった．そこで，各種ビタミン B 類の添加試験，オミッション試験を行ったところ，ニコチン酸が顕著な発酵改善効果を示した．続いて発酵助成剤の中でニコチン酸含量の高い助成剤を探索し，添加，発酵試験を行った結果，ニコチン酸を添加した際と同様に発酵が改善された．以上のことから，今回の白濃縮果汁の発酵遅延の原因の一つはニコチン酸含有量であることが示された．
【考察】ニコチン酸は NAD や NADP のような補酵素の前駆体であり，発酵中の代謝で重要な役割を担う成分である．本研究において，栄養成分が不足しがちな濃縮果汁に関しては，ニコチン酸の不足が発酵遅延を引き起こすファクターとなっていることが考えられた．

Investigation and improvement of fermentation delay in wine making from concentrated juice

○Nozomi Kikuchi[1], Hironori Inadome[2], Saori Takahashi[2], Hiroyuki Shinohara[3], Katsuhiko Suzuki[1], Satoshi Yoshida[1], Ryoji Takata[1]
([1]Res. Lab. Wine Technol., Kirin Co., Ltd., [2]Res. Lab. Alc. Bev. Technol., Kirin Co., Ltd., [3]Cent. Lab. Key Technol., Kirin Co., Ltd.)

Key words fermentation, Concentrated juice, wine, Nicotinic acid

3Ea01 抗菌性物質が皮膚常在菌の生理活性に及ぼす影響の解析

○菊田 実花, 青柳 秀紀
（筑波大院・生命環境）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

[目的] 私たちの皮膚は日常的に，抗菌性物質（防腐剤，抗菌剤，抗生物質等）と接触する機会が数多くある．品質管理などの観点から製品中の微生物の防除（静菌や殺菌など）を目的に抗菌性物質が使用されているが，これらの抗菌性物質が皮膚常在菌に及ぼす影響は十分に解析されているとは言い難い．皮膚常在菌は，侵入する微生物から肌を守るバリア機能や肌の保湿などの様々な役割を果たしている．そのため，抗菌性物質が皮膚常在菌に与える影響の解析は，抗菌性物質を安全に使用するために必要である．抗菌剤であるトリクロサンは，数多くの製品に使用されている．しかし，近年では EU や USA を始め，日本でもその安全性が疑問視されている．本研究では，抗菌性物質のモデルとしてトリクロサンを対象に，皮膚常在菌の生理活性に及ぼす影響の解析を試みた．
[方法と結果] 任意の濃度のトリクロサンを添加した培地を用いて，皮膚常在菌（*Staphylococcus epidermidis* や *Staphylococcus aureus*）を培養したところ，トリクロサン濃度が高くなると，両菌の誘導期の時間が長くなる現象が見られた．日常的なトリクロサンの使用を模倣した系として，任意の濃度のトリクロサンを添加した新鮮培地を用いて，両菌を継代培養したところ，誘導期の時間が約 24 h から 3 h に大幅に短縮した．種々検討した結果，皮膚常在菌がトリクロサンに耐性を示すようになった可能性が示唆された．さらに，トリクロサン耐性の獲得により，増殖の挙動や抗生物質に対する応答の変化が認められた．以上の結果から，トリクロサンの使用にあたっては皮膚常在菌への影響を配慮する必要性が示唆された．現在，トリクロサン耐性を獲得した皮膚常在菌の生理活性の変化，他の皮膚常在菌や抗菌性物質の系についても検討中である．

Influence of antibacterial substances on the physiological activities of indigenous skin bacteria

○Mika Kikuta, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words antibacterial substances, indigenous skin bacteria, resistance, triclosan

3Ea02 抗菌性食品添加物が腸内細菌の生理活性に及ぼす影響の解析

○箱田 優奈, 青柳 秀紀
（筑波大院・生命環境）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

[目的] 抗生物質の摂取は，耐性菌の出現やヒト腸内細菌叢の変化を生じさせると共に，その影響が肥満やアレルギー及び自閉症等の現代病と関連がある可能性が示唆されている．しかし，食を通じて日常的に摂取される保存料などの抗菌性食品添加物が腸内細菌の生理活性に及ぼす影響は十分に検討されておらず，未解明である．本研究では，抗菌性食品添加物が腸内細菌の生理活性に及ぼす影響の解析を試みた．
[方法と結果] モデル腸内細菌として，乳酸菌（*Lactobacillus gasseri* JCM1130）と大腸菌（*Escherichia coli* K12）を，抗菌性食品添加物のモデルとして安息香酸（BeA）とソルビン酸（SoA）を実験に用いた．BeA と SoA をそれぞれ添加した培地と両菌を用いて種々，比較培養をおこなった．*L. gasseri* に対して BeA と SoA は同様に高い抗菌性を示した一方，*E. coli* に対し，BeA は *L. gasseri* と比べて抗菌性が低く，SoA の方が BeA に比べて高い抗菌性を示した（*L. gasseri* と *E. coli* で BeA と SoA に対する感受性が異なった）．BeA あるいは SoA を添加した培地で *L. gasseri* を継代培養した結果，いずれも増殖速度に変化は認められなかった．同様に *E. coli* を継代培養した結果，SoA 添加培地では増殖速度に変化は認められなかったが，BeA 添加培地では比増殖速度が継代前の約 0.78 倍に低下した．また，LAL 固定化ビーズ法 [1,2] を用いて，BeA 添加培地で培養した *E. coli* の，菌体内と培養液中のエンドトキシン（ET）濃度を測定した結果，コントロールに比べて ET 量が変化した．現在，他の食品添加物や腸内細菌などについても検討中である． 1, 2) H29 日本生物工学会大会要旨集 p. 242, 243

Analysis of influence of antimicrobial food additives on the physiological activities of intestinal bacteria

○Yuna Hakoda, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words endotoxin, *Escherichia coli*, food additives, *Lactobacillus gasseri*

3Ea03 皮膚常在菌の増殖に対する化粧品添加の影響

○多賀 直彦, 今村 香乃, 大場 輝, 川上 茅咲
（東海大・農）
ntaga@agri.u-tokai.ac.jp

【目的】ヒトの皮膚には，皮膚腺や汗腺などに一定の細菌群が定着しており，これらの皮膚常在菌は，皮脂，pH，および温度などの影響を受けつつ常に皮膚上に存在している．皮膚常在菌は，宿主と共生状態にあり，外来性の微生物の侵入や定着を防御し感染を防ぐ役割をしている．本研究は，皮膚常在菌に化粧品が与える影響を調べるため，皮膚常在菌 3 菌株について，培養特性，培養における市販化粧水添加の影響および混合培養について検討した．
【方法】使用菌株は，*Staphylococcus epidermidis* NBRC 100911，*Staphylococcus aureus* NBRC 102135,および *Corynebacterium amycolatum* NBRC 15207 を用いた．使用培地は，702 液体培地を用いた．培養分析は，検鏡，培養液 pH，培養液濁度，および CFU と全菌数を分析した．
【結果】培養試験により 3 菌株それぞれの培養特性が得られ，最大培養液濁度はほぼ同じだったが生菌数に違いがあった．化粧水添加での増殖は，*S. epidermidis* は増殖阻害，*S. aureus* は増殖亢進，*C. amycolatum* は影響無しだった．化粧品添加濃度により培養液 pH の変化が異なった．*S. epidermidis* と *S. aureus* の混合培養の結果，培養液濁度はそれぞれの単独培養より高く，CFU は *S. epidermidis* の方が *S. aureus* よりも高かった．培養液濁度および CFU は最大値に到達した後にともに減少したが，培養終了時の CFU は *S. aureus* の方が *S. epidermidis* より高くなった．混合培養での増殖期による 2 菌種の増殖の違いが示された．

Effect of cosmetic addition on the proliferation of skin indigenous bacteria

○Naohiko Taga, Yoshino Imamura, Hikaru Ooba, Chisa Kawakami
(Sch. Agric., Tokai Univ.)

Key words cosmetic, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*

3Ea04 増殖の速い微生物が環境試料からの微生物の培養化に及ぼす影響の解析と利用

長谷川 智弘 [1], ○原田 玲奈 [2], 青柳 秀紀 [1,2]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生物資源）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】 寒天平板培養法は微生物の単離培養に広く用いられてきたが，これまでに単離培養された微生物は自然界に存在する微生物の 1％程度であり，その限界が指摘されている．現在，残された 99％の未培養微生物（microbial dark matter）の培養化，利用が国内外の学術，産業界で求められている．我々は，未培養微生物の培養化を目指し検討する中で，環境試料に含まれるサイズが大きい微生物を除去すると，培養化する微生物の多様性が拡大することを見出した．
本研究では，更なる未培養微生物の培養化を目指し，これまでの知見に加え，増殖の速い微生物に着目し，検討をおこなった．
【方法と結果】 フィルター濾過した土壌試料を，R2A 寒天培地で培養し，増殖の速い微生物による培地成分（グルコース）の消費挙動を調べた結果，培養開始から数日で寒天培地上のグルコースを広範囲で枯渇させることが明らかとなった．さらに，種々検討した結果，培養初期に優占化する微生物が他の微生物の生育を阻害（増殖の速い微生物の代謝産物が他の微生物の培養化を阻害）している可能性が示唆された．増殖の速い微生物を排除して培養をおこなうために，コロニー切除法を考案，開発した．環境試料からサイズが大きい微生物を排除し，コロニー切除法を適切に使用することで，特異的に培養化する微生物が見られた．以上の結果より，増殖の速い微生物を排除することは未培養微生物の培養化に有効であることが示唆された．

Influence of fast-growing microbes on culturing microbes in environmental samples and it's application

Tomohiro Hasegawa[1], ○Reina Harada[2], Hideki Aoyagi[1,2]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Coll. Agro-bio. Resour. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words agar plate, microbial dark matter, pretreatment, fast-growing microbes

3Ea05 植物試料の凍結前処理が培養微生物群集に与える影響の解析

○小林 和輝, 青柳 秀紀
（筑波大院・生命環境）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【緒言】 一般的に植物から微生物を分離培養する際，破砕などの物理的前処理が行われることが多い．しかしながら，植物細胞の損傷により，ファイトアレキシン，活性酸素種（ROS），揮発性抗菌物質などが急速に生成されることが知られている．我々は植物の防御反応が微生物を分離培養する際に影響を与えている可能性を考え，凍結処理などの適切な前処理により，植物の防御反応を停止し，その影響を排除すれば，従来とは異なる新規微生物を分離培養できるのではないかと発案した．本研究では，植物試料の凍結前処理が培養微生物群集に与える影響の解析とその利用について検討をおこなった．
【方法と結果】 モデル植物試料としてニチニチ草の葉を用いて実験を行った．試料の前処理として，(1): 液体窒素による試料の凍結，(2): ROS の除去を目的とし，カタラーゼ溶液中で試料を液体窒素で凍結，(3): (1) と (2)で試料を凍結しない条件，を設定した．それぞれの前処理後，葉を破砕し，R2A 培地で 1 週間培養し，CFU の計数と，変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法による培養微生物群集の比較解析を行った．各条件において，液体窒素を用いた凍結により CFU の減少が認められ，凍結によりダメージを受ける微生物の存在が示唆された．一方，DGGE 法による解析の結果，凍結処理を行った条件で特異的に培養化する微生物の存在が示唆された（特に，(2) の条件で多数認められた）．クロマツの葉を用い同様の実験をおこなった結果，(2)の条件で特異的に培養化する微生物（*Acidobacteria* 門と推定）の存在が示唆された．現在，凍結により微生物が受ける影響の解析，カタラーゼ以外の抗酸化剤の利用，等について検討中である．

Effect of freezing pretreatment of plant samples on cultured microbial community

○Kazuki Kobayashi, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words liquid nitrogen, microbial community, PCR-DGGE, plant sample

3Ea06 模擬微小重力培養が腸内細菌の生理活性に及ぼす影響の解析(第 3 報)

長谷川 文香 [1], ○増田 亜理沙 [2], 青柳 秀紀 [1,2]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生物資源）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

[緒言] 従来法で培養可能な微生物は，自然界に存在する微生物の 1%前後であることが示唆され，新たな培養法が求められている．我々は微小重力場を形成し，優れた拡散や低剪断力環境を有する模擬微小重力（LSMMG）培養に着目し，ヒトと綿密な相互作用がある種々の腸内細菌の生理活性に及ぼす影響を解析した．その結果，通常重力（NG）培養とは異なる挙動が認められた [1]．今回は，LSMMG が乳酸菌の増殖，耐酸性，諸特性に及ぼす影響について解析を試みた．
[方法と解析] HARV bioreactor を用いて，LSMMG が種々の乳酸菌の増殖（$U.O.D._{680}$）に及ぼす影響を比較した結果，NG 培養に比べて，LSMMG 培養では *Lactobacillus acidophilus* JCM 1028 は 2.2 倍高い値を示し，増殖の促進が認められた（菌株により LSMMG に対する応答性は異なった）．*L. acidophilus* は，NG 培養と比較して LSMMG 培養で培養液の pH が低下し，培養液中の乳酸は約 2.2 倍高い値を示した（NG と LSMMG 培養の単位菌体あたりの乳酸量はほぼ同等であった）．*L. acidophilus* の耐酸性を種々検討した結果，(A) NG 培養に比べて LSMMG 培養した *L. acidophilus* の方が耐酸性を示す傾向がみられた，(B) NG と LSMMG の条件で耐酸性評価を実施したところ，LSMMG 条件で高い生存率を示した（現象の普遍性は検討中），が明らかとなった．現在，LSMMG が乳酸菌等の微生物の諸特性に及ぼす影響について検討中である．

1）H28 日本生物工学会要旨集 p. 315

Analysis of the effect of low shear and modeled-microgravity culture on the physiological activities of enteric bacteria (part 3)

Fumika Hasegawa[1], ○Arisa Masuda[2], Hideki Aoyagi[1,2]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Coll. Agro-bio. Resour. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words acid tolerance, lactic acid bacteria, *Lactobacillus acidophilus*, low shear and modeled-microgravity culture

3Ea07 放線菌由来の新規塩基性ポリアミノ酸：Poly(diaminopropanoic acid) の単離とキャラクタリゼーション

○加藤 芳尚, 稲葉 悠, 室 尚吾, 竹原 宗範
（滋県大院・工・材料科学）
takehara@mat.usp.ac.jp

【背景と目的】塩基性ポリアミノ酸である Poly(ε-L-lysine)（ε-PL）は *Streptomyces* 属放線菌により二次代謝産物として分泌生産され，幅広い抗菌スペクトルを示すことから，天然の食品保存剤として利用されている．当研究室では，いくつかの ε-PL 生産株が Poly(γ-L-diaminobutanoic acid) を併産することを見出し，ε-PL と類似の機能を有することを示してきた．さらに，*Streptomyces* sp. USE-33 株が ε-PL とともに新規な塩基性ポリアミノ酸を生産していることを発見した．そこで，本研究ではこの塩基性ポリアミノ酸の構造解析とその機能解析を試みた．
【方法】放線菌 *Streptomyces* sp. USE-33 の培養ろ液から有機溶媒沈殿法により塩基性ポリアミノ酸を精製した．当該ポリアミノ酸の酸加水分解物について，HPLC を用いたアミノ酸分析と NMR 分光法による帰属を行った．また，MALDI-TOF MS によりポリアミノ酸の重合度を解析した．さらに，二次元 NMR 測定によりペプチドの結合様式を決定するとともに，^{1}H NMR 滴定によりポリアミノ酸の pK_a 値を決定した．種々の真正細菌および真菌類に対する抗菌活性を IC_{50} で評価した．
【結果と考察】分離精製したポリアミノ酸は，Diaminopropanoic acid（DAP）を唯一の構成アミノ酸とする Poly(diaminopropanoic acid)（PAP）であることが明らかとなった．PAP は 6-16 個の DAP 単位から構成され，また DAP の α 位のカルボキシル基と β 位のアミノ基がイソペプチド結合により主鎖を形成し，それぞれの側鎖に対し DAP が一つずつグラフト化した構造であることがわかった．PAP の α 位と β 位のアンモニウムイオン基の pK_a はそれぞれ 4.8 と 8.7 を示した．PAP はいくつかの真正細菌に抗菌性を示すだけでなく，酵母に対しても抗真菌作用（IC_{50} = 0.30 mg/mL）を有した．

Novel basic poly(amino acid) derived from a strain of Streptomyces sp.: isolation and characterization of poly(diaminopropanoic acid)

○Yoshinao Kato, Haruka Inaba, Shogo Muro, Munenori Takehara
(Dept. Mater. Sci., Grad. Sch. Eng., Univ. Shiga Pref.)

Key words *Streptomyces*, poly(epsilon-L-lysine), poly(diaminopropanoic acid), antimicrobial activity

3Ea08 *Streptomyces* 属放線菌由来の Poly(ε-L-lysine) が示す抗真菌作用機構の解析

○松井 旺大 [1], 星山 貴文 [1], 永田 智 [1], 竹原 宗範 [1], 野村 亘 [2], 井上 善晴 [2]
（[1]滋県大院・工・材料科学, [2]京大院・農・応用生命）
takehara@mat.usp.ac.jp

【背景と目的】*Streptomyces* 属放線菌が生産するカチオン性ポリマー Poly(ε-L-lysine) (ε-PL) は，グラム陰性菌，グラム陽性菌や真菌など，幅広い抗菌スペクトルを有しながらヒトに毒性を示さないことから，天然の食品保存料や抗菌剤として利用されている．また我々は，低重合度 ε-PL (n=5-20) が中重合度体 (n=22-36) より *Saccharomyces cerevisiae* に対し高い抗真菌活性を示すことを見出した．ε-PL の抗真菌作用機構の解明を目指し，本研究では，ε-PL が *S. cerevisiae* の細胞壁合成と維持に関わる cell wall integrity (CWI) 経路，および細胞表層に与える影響を検討した．
【方法】*S. cerevisiae* BY4741 株の野生型 (WT) および CWI 経路を構成する遺伝子欠損株 (*mpk1*Δ, *cnc1*Δ, *rlm1*Δ, *chs3*Δ, *swi6*Δ) を所定量の中重合度および低重合度 ε-PL を含む YPD 培地またはリン酸バッファー中 (pH 5.0-8.0) でインキュベートした．1 時間後，回収・洗浄した菌体について CFU (/mL) を計測し生存率を求めた．また，リン酸バッファー中で同様に ε-PL 処理した BY4741 (WT) および *Escherichia coli* NBRC3301 株についてクリスタルバイオレット (CV) 取込み試験および ζ-電位測定を行い，細胞表層への影響を検討した．
【結果と考察】中重合度および低重合度体にかかわらず ε-PL に暴露した *S. cerevisiae* の CWI 経路に関わる各欠損株は，野生株と比べいずれも耐性を示した．ε-PL が Pkc1-Mpk1 経路の過剰な活性化を介して細胞死を引き起こしていることが考えられた．ε-PL 処理後の *E. coli* では，CV の取込みの上昇と ζ-電位の中性シフトが見られ膜構造の破壊が示唆された．一方，*S. cerevisiae* では，CV の取込みおよび ζ-電位とも有意な変化が見られず，異なる作用機構の関与が考えられた．

Analysis of antifungal action of poly(ε-L-lysine) derived from *Streptomyces* spp.

○Akihiro Matsui[1], Takafumi Hoshiyama[1], Satoshi Nagata[1], Munenori Takehara[1], Wataru Nomura[2], Yoshiharu Inoue[2]
([1]Dept. Mater. Sci., Grad. Sch. Eng., Univ. Shiga Pref., [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words poly(epsilon-L-lysine), antifungal activity, cell wall integrity, cell membrane

3Ea09 Poly(ε-L-lysine) の生分解可能なカチオン性分散剤への利用研究

○武内 正輝, 竹原 宗範
（滋県大院・工・材料科学）
takehara@mat.usp.ac.jp

【背景と目的】広範な産業分野で利用されている分散剤の多くは非生分解性であり，環境負荷や生成微粒子表面の汚染といった問題を克服するため，生分解性の分散剤の開発が望まれている．*Streptomyces* 属放線菌が生産する Poly(ε-L-lysine) (ε-PL) は抗菌活性，生体適合性，凝集活性等を示す多機能の生分解性ポリマーである．ポリカチオンである ε-PL は静電反発力により分散能を示す可能性が考えられる．そこで本研究では，ε-PL の生分解可能なカチオン性分散剤への利用を目指し，塗料や接着剤，化粧品にも利用されるカオリン粒子に対する分散能を評価した．
【方法】カオリン (結晶質の含水ケイ酸アルミニウムを主成分とする天然粘土鉱物) 懸濁液に所定の濃度になるよう中重合度 ε-PL (M-ε-PL, n = 22-36) または低重合度 ε-PL (S-ε-PL, n = 5-20) を加え，遠心分離した上層の残留濁度 (550 nm) を測定し $OD_{\varepsilon\text{-PL}}$ とした．ε-PL 無添加区を OD_{blank} とし，ε-PL の分散活性 ($OD_{\varepsilon\text{-PL}} - OD_{blank}$) / OD_{blank} を算出した．また，粒子の荷電の状態の指標となるゼータ電位を測定し (大塚電子 ELSZ-2000ZS)，粒子の分散安定性を評価した．
【結果と考察】M-ε-PL 濃度の増大に伴い懸濁液の残留濁度が上昇し，分散が確認された．この時，ゼータ電位の符号が負から正に転じ，その絶対値は微粒子の分散安定化の基準となる 30 mV を上回ったことから，M-ε-PL が粒子に吸着し静電反発力を増大させることで粒子を分散させたことが示された．この分散安定化の効果は，懸濁液の pH が中性-酸性域で顕著になった．また，M-ε-PL よりも S-ε-PL の方が分散安定化した．主鎖の長い中重合度体の立体障害による寄与より，静電反発力の方が分散に支配的に影響したことが確認できた．また，市販の界面活性剤とも分散能の比較を行った．

Investigation on the application of poly(ε-L-lysine) as a biodegradable cationic dispersant

○Masateru Takeuchi, Munenori Takehara
(Dept. Mater. Sci., Grad. Sch. Eng., Univ. Shiga Pref.)

Key words poly(epsilon-L-lysine), biodegradable dispersant, kaolin, zeta potential

3Ea10 好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* の培養特性解析

○三原 笑[1], 竹中 武藏[2], 柏木 紀賢[2], 曽田 匡洋[3], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[2]
（[1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]長瀬産業）
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

放線菌は様々な二次代謝物や酵素を合成・分泌することが特徴であるが，一方で放線菌はそれらを工業生産する宿主としても着目されている．好熱性放線菌は耐熱性酵素を生産することから産業への応用が期待されるが，雑菌繁殖防止や化学反応の効率化などの観点から化成品の物質生産宿主として応用利用が見込める可能性もある．本研究では，好熱性放線菌の一種である *Streptomyces thermoviolaceus* (*S. thermoviolaceus*) に着目し，培養特性解析を行い，外来遺伝子導入による物質生産への応用を試みた．
培養特性解析にあたり，第一に，様々な温度で *S. thermoviolaceus* の培養を行い，OD_{600} を測定することで生育最適温度の探索を行った．その結果，28～55℃の幅広い温度で生育可能で，増殖最適温度は 45℃であることを見出した．また，*S. thermoviolaceus* の増殖速度を知るために，45℃培養時の比増殖速度を算出し，この数値を研究対象としてよく用いられる放線菌 *Streptomyces lividans* や *Streptomyces albus* と比較した．その結果，それぞれ比増殖速度は 1.82 [h-1], 0.277 [h-1]，0.299 [h-1]であり，*S. thermoviolaceus* は *Streptomyces* 宿主の中では増殖速度が速いということが確認できた．一般的に *Streptomyces* 宿主は，大腸菌や分裂酵母と比較すると増殖速度が遅いことが欠点とされているため，これは，化成品の物質生産において有利な特性であるといえる．第二に，資化可能な糖の探索を行い，グルコース，グリセロール，キシロースやスクロースを資化することを確認した．その後，プロトプラスト法と接合伝達法によって様々な放線菌ベクターの導入を試みることで遺伝子組み換え法の確立を行い，外来遺伝子導入に成功した．現在はこれらの知見を踏まえ，外来遺伝子を導入することにより，有用化成品の生産を検討している．

Culture characteristics of thermophilic actinomycete, *Streptomyces thermoviolaceus*

○Emi Mihara[1], Musashi Takenaka[2], Norimasa Kashiwagi[2], Masahiro Sota[3], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Nagase & Co., Ltd)

Key words *Streptomyces*, Thermophilic actinomycetes, *Streptomyces thermoviolaceus*

3Ea11 深海細菌 *Aneurinibacillus* sp.YR247 の抗真菌ペプチドの特性の解明

○福井 瑞季[1], 山浦 由登[1], 倉田 淳志[2], 岸本 憲明[2], 上垣 浩一[2]
（[1]近畿大院・農, [2]近畿大・農）
kurata090401@nara.kindai.ac.jp

【背景と目的】*Aspergillus* 属真菌による汚染を抑制するため多くの手法が用いられており，微生物によって生産される抗真菌剤は生物防除剤として注目されている．深海環境は，生物防除剤を生産する微生物の探索源として期待できる．しかし抗真菌活性を示す深海由来の微生物はほとんど知られていない．本研究では，日本海溝（深度 5352m）と相模トラフ（深度 1171m）の深海底泥から抗真菌物質生産菌を探索し，抗真菌物質の特性の解明を目的とした．
【方法】日本海溝と相模トラフのシロウリガイ群集地帯深海底泥を用いて，抗真菌物質生産菌の探索を試みた．さらに菌体抽出画分から抗真菌物質の精製を行い，性質の解明を試みた．
【結果と考察】日本海溝から *Bacillus* sp. WS-147，相模トラフから *Aneurinibacillus* sp.YR247 を見いだし，YR247 株の菌体抽出画分において抗真菌活性を検出した．また，YR247 株は培養液上清中にベシクル様構造体を生産した．YR247 株由来の抗真菌物質は，4-70℃で安定であり，pH 2.0-12.0 で抗真菌活性を示した．プロテイナーゼ K 処理により，抗真菌活性を検出できなかったことから，本抗真菌物質は分子量 1167.9 のペプチド性化合物であることが示唆された．本抗真菌物質は，*Aspergillus brasiliensis* NBRC9455，*Saccharomyces cerevisiae* NBRC1014，*Staphylococcus aureus* NBRC12732T，*Bacillus subtilis* NBRC3134，*Escherichia coli* NBRC3301T に対して抗菌活性を示した．しかし，*Candida albicans* NBRC1594 には抗菌活性を示さなかった．近縁種の細菌によって生産される gramicidin 類や tyrocidine 類と同様に，本抗菌物質はグラム陽性・陰性細菌に作用した．さらに YR247 株由来の抗菌物質は，糸状菌に作用した．分子量が異なったことから，本菌株の抗菌物質は gramicidin 類や tyrocidine 類とは異なる化合物であることが示唆された．

Characterization of an antifungal peptidic compound from the deep-sea bacterium *Aneurinibacillus* sp. YR247

○Miuki Fukui[1], Yuto Yamaura[1], Atsushi Kurata[2], Noriaki Kishimoto[2], Ko-ichi Uegaki[2]
([1]Grad. Sch. Agric. Kinki Univ., [2]Fac. Agric., Kinki Univ.)

Key words Deep sea bacterium *Aneurinibacillus* sp. YR247, Antifungal activity, Peptidic compound, *Calyptogena* community

3Fa01 海洋性細菌が形成する CdS ナノ粒子のキャラクタリゼーション

○佐坂 文武, 高橋 宏和, 富永 依里子, 岡村 好子
（広島大院・先端物質）
okamuray@hiroshima-u.ac.jp

【背景と目的】CdS，CdTe は II 族元素と VI 族元素を用いた半導体である．CdS は太陽電池や街路灯の自動点滅制御に用いられており，CdTe は太陽電池デバイスとして有名である．これらの II-VI 族化合物半導体太陽電池は，光電変換効率の高さ，製造コストの低さ，耐久性の良さなどが挙げられる．しかし重金属で毒性の強いカドミウムやレアメタルの一種であるテルルを原料としているため原料金属のリサイクルが課題となっている．テルルについては，当研究室では既に Te(0)結晶を形成する光合成細菌を分離しテルルを高効率回収できることを報告している．そこで本研究では，カドミウムを回収する海洋性細菌をスクリーニングし，形成された CdS のキャラクタリゼーションを行った．
【方法】海洋サンプルを RCVBN 培地に接種し，Cd^{2+}を終濃度 500 μM になるように添加して集積を行い，外観が鉱物の色調と一致する菌叢を得た．金属回収能を ICP，鉱物の観察および元素分析を TEM/EDS，鉱物の結晶面を XRD により測定した．
【結果と考察】CdS の鉱物色である黄色沈殿を形成する菌叢を得た．単菌分離を目的として寒天平板で培養したが，コロニーを形成することはできなかった．しかしほぼ単菌であることが示唆された．Cd^{2+}イオンは集菌画分に取り込まれていることが ICP 測定によって示され，TEM 観察の結果からも細胞外で CdS を形成していることがわかった．またそのサイズは約 7 nm の球状粒子であり，結晶格子がはっきりと見られた．立方晶系を示す（1,1,1），（2,2,0）の他に(2,0,2)，(3,0,5)も観察され，無機結晶とは異なる結晶面を持つことから球状形態に特有の結晶面であることが示唆された．

Characterization of CdS nanoparticles formed by marine bacteria

○Fumitake Sasaka, Hirokazu Takahashi, Yoriko Tominaga, Yoshiko Okamura
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words bioremediation, biomineralization, heavy metals

3Fa02 バイオミネラリゼーションによるシリカナノシートの構築

○畠中 孝彰, 大橋 雅卓, 石田 亘広
（豊田中研）
n-ishida@mosk.tytlabs.co.jp

【背景と目的】
生物は環境中の金属・金属化合物を利用して，様々な物質を造る．本反応はバイオミネラリゼーションと呼ばれ，常温常圧の低エネルギー下で進むことから新たな材料創製技術として注目されている．我々も，レアアースをターゲットとしたバイオミネラリゼーションについて先に報告しており(1)，また現在，シリカ（SiO2）を標的にした研究も進めている．
シリカは地球上で最も豊富に存在する材料であり加工性も高いことから，半導体や樹脂など様々な用途に使用される我々の生活に欠かせない材料である．微細三次元構造を持つシリカを容易に造ることが可能となれば，極小の三次元半導体やメタマテリアルなどへと用途はさらに広がるが，現在の加工技術では大きなエネルギーを必要とする．本発表では，ペプチドによるバイオミネラリゼーションをベースとした低エネルギーでのシリカ構造体の形成とそのメカニズムについて議論したい(2).
【方法】
ファージディスプレイシステムを利用して，シリコンナノシート（SiN）に結合するペプチドを単離した．得られたペプチドを化学合成し，各種シリコン材料への結合を確認するとともに，テトラメチルケイ素酸（TMOS）と反応させ，鉱物化能力を評価した．得られた鉱物は，電子顕微鏡，原子間力顕微鏡でその構造を評価した．
【結果と考察】
ペプチドライブラリを用いたスクリーニングにより，5 種類のペプチドを得た．これらの内塩基性の高いペプチドは，TMOS と反応してシリカを生成する能力を有していた．また，得られるシリカの構造は，反応条件により異なり，球状，シート状の物質が得られた．反応系中のペプチドの局在や反応速度が，生成物の構造に影響していると考えられる．

1)Hatanaka et.al, Nature Communications, 8:15670, 2017.
2)Hatanaka et.al, Biomaterials Science, submitted.

Construction of silica nanosheet based on biomineralization.

○Takaaki Hatanaka, Masataka Ohashi, Nobuhiro Ishida
(Toyota Cent. R&D Labs. Inc.)

Key words biomineralization, peptide, silica

3Fa03 外膜表層に金属結合ペプチドを提示した微生物の無機固体表面に対する選択的な吸着特性

○岩田 至叡, 中島 一紀, 川﨑 了
（北大院・工）
nakashima@geo-er.eng.hokudai.ac.jp

【背景と目的】
バクテリアを無機固体表面に選択的に固定化することができれば，汚染水浄化やレアメタルの回収等，地球資源への応用が期待できる．そこで本研究では，微生物表面にチタン結合ペプチドを表層提示することにより，チタンに選択的に結合する微生物を作製し，その吸着特性を検討した．
【方法】
E.coli の Outer membrane protein A（OmpA）の膜外突出部分（Loop1，および Loop1+Loop3）に 12 残基からなるチタン結合ペプチドをそれぞれ組み込んだ融合遺伝子を作製した．また，ペリプラズム部分を欠損させた OmpA をベースとして同様の融合遺伝子を構築した．これらの遺伝子を pET-22b(+)ベクターに挿入し，大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換した．融合タンパク質を発現した大腸菌を用いて金属プレート（チタン，銅）への吸着実験を行った．固定化処理を施した後，SEM 観察を行い，菌体数をカウントすることにより吸着能を評価した．また，同様の吸着実験を pH および塩濃度を変更して行い，その影響を調査した．
【結果】
SDS-PAGE により，各融合タンパク質の発現が確認された．金属プレートへの吸着実験では，チタンプレートにより選択的に吸着することが明らかとなった．また，OmpA とチタン結合ペプチドの融合形式により吸着能に変化が見られ，OmpA のペリプラズム部分を欠損させたものの吸着能が強くなる傾向が見られた．また，塩濃度を変更した吸着実験では，塩濃度の上昇に伴い吸着能が低下した．

Adsorption properties of microorganisms bearing metal-binding peptides to inorganic solid surfaces

○Yoshiaki Iwata, Kazunori Nakashima, Satoru Kawasaki
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words transformation, peptide, cell surface display, biosorption

3Fa04 気生微細藻類と窒素固定菌の共生系を利用した壁面培養法

○塚越 崇之, 油井 信弘, 菅原 康里, 今村 保忠, 阿部 克也
（工学院大・先進工・生化）
bt13347@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】市街地などのスチール看板上において光合成微生物の緑色コロニーがよく見られ，当研究室では，その様な基物表面上から気生微細藻類と窒素固定菌を単離した．その場所では，これらの微生物が炭素源や窒素源を固定し，共に生活していると考えられる．このような限られた栄養下での共生系を模した新規壁面培養法の開発を目指すため，本報告では，液相および気相条件における気生微細藻類と窒素固定菌の炭素源および窒素源の供給について検討した．
【方法】気生微細藻類は八王子キャンパス内のスチール看板から単離した *Coelastrella* sp. KGU-HN001 を，窒素固定菌は *Rhodobacter sphaeroides* (NBRC 12203)を用いた．両微生物は，C・N フリー BB 培地において光照射下で通気し，扁平フラスコ内で共培養を行った(液相条件)．また，両微生物をメンブレンフィルターに吸着させ，C・N フリー BB 培地を含ませた綿上に静置し，シャーレ内で共培養を行った(気相条件)．気相条件における細胞懸濁液は，フィルター上の細胞を滅菌水に懸濁させて得た．細胞懸濁液と細胞を除いたろ液の全有機炭素量(TOC)と全窒素量(TN)は TOC・TN 計で測定した．気生微細藻類の細胞数は血球計算盤を用いて測定した．
【結果・考察】液相条件において気生微細藻類と窒素固定菌を共培養すると，培養 5 日間で細胞の TOC は 2.9 倍，TN は 1.1 倍，藻細胞の数は 1.3 倍増加した．一方，気相条件において，培養 5 日間で細胞の TOC は 3.5 倍，TN は 1.9 倍，藻細胞の数は 2.5 倍増加した．これらの結果から，気相条件では，より効率的に窒素固定が行われ，気生微細藻類が生育することが分かった．すなわち，栄養制限下の共培養において，炭素固定および窒素固定が行われ，不足する栄養源を微生物は互いに供給していることが示唆された．今後は，気相条件における基物材料および効率的なガスの取り込みについて検討する．

Wall biotechnology for mass culture applied by symbiosis of aerial microalgae and nitrogen-fixing bacteria

○Takayuki Tsukagoshi, Nobuhiro Aburai, Yasusato Sugahara, Yasutada Imamura, Katsuya Abe
(Dept. Chem. Life Sci., Sch. Adv. Eng., Kogakuin Univ.)

Key words aerial microalgae, nitrogen-fixing bacteria, symbiosis, wall biotechnology

3Fa05 Preparation and characterisation of robust whole cell biocatalyst from *Aspergillus oryzae* expressing *Fusarium heterosporum* lipase immobilized onto activated carbon for biodiesel synthesis

○Emmanuel Quayson[1], Jerome Amoah[1], Akihiko Kondo[2], Shinji Hama[3], Ayumi Yoshida[3], Chiaki Ogino[1]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Res. Dev. Lab., Bioenergy Corpo.)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

The cost of lipase in enzymatic biodiesel production hinders its pluses of environmental friendliness and lower operating conditions for large scale applications. Activated carbon from the stream of agricultural and forestry wastes presents a tremendous potential for its use as a matrix for the immobilization of enzymes. Recombinant whole cell lipases are however preferred in enzymatic biodiesel production due to their versatility and reusability. It is of interest to study whether physical adsorption and deposition of whole cell lipases can occur on support matrices without protein cross-linkers. Thus, in this study, we present a cost-effective immobilization strategy to produce robust *Aspergillus oryzae* expressing *Fusarium heterosporum* lipase on activated carbon (rFHL@IAC) with high affinity and stability for use in biodiesel synthesis from sustainable next generational feedstocks. The produced fatty acid methyl ester yield (FAME) of 98±0.8% from our engineered lipase surpasses ASTM and EN requirements even at mild temperatures and minimum lipase requirement (3.75%). A substantial value drive from this rFHL@IAC is that, it does not require cross-linking regents, thereby, ensuring lower toxicity in biodiesel waste streams. At the centre of this study is the characterization of the produced biocatalyst with XPS, FE-SEM and FT-IR analysis to inform on the functional groups and the chemo-biological changes for prospective development into economically viable and sustainable bio-refineries.

Preparation and characterisation of robust whole cell biocatalyst from *Aspergillus oryzae* expressing *Fusarium heterosporum* lipase immobilized onto activated carbon for biodiesel synthesis

○Emmanuel Quayson[1], Jerome Amoah[1], Akihiko Kondo[2], Shinji Hama[3], Ayumi Yoshida[3], Chiaki Ogino[1]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Res. Dev. Lab., Bioenergy Corpo.)

Key words whole cell biocatalyst, *Aspergillus oryzae*, activated carbon, biodiesel fuel

3Fa06 ナノファイバータンパク質 AtaA の塩濃度依存的な接着性を利用した細菌の可逆的固定化

○吉本 将悟[1,2], 小原 優季[1], 中谷 肇[1], 堀 克敏[1]
（[1]名大院・工, [2]名大・VBL）
khori@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景・目的】
微生物細胞の担体への固定化は，生産物の容易な分離，生体触媒濃度の向上，繰り返しまたは連続的な生体触媒反応を可能にするため，微生物細胞を全細胞触媒として効率的に利用するうえで重要な戦略である．しかし固定化した全細胞触媒が失活した際には，多くの場合担体ごと廃棄しなければならなかった．我々はこれまでに，アシネトバクター属細菌 Tol 5 由来のナノファイバータンパク質 AtaA を用いた新しい菌体固定化方法を確立し，物質生産に応用できることを示した．本研究では AtaA の接着性が塩濃度に依存するという知見に基づき，担体への菌体の可逆的な固定化と，担体の再利用を試みた．
【方法】
菌体の接着性は Tol 5 株とその Δ*ataA* 株，さらにアシネトバクター属細菌 ADP1 株に *ataA* 遺伝子を導入し接着性を付与した ADP1(pAtaA)株について調べた．培養した菌株を塩溶液に懸濁して増殖のできない休止菌体とし，96 ウェルプレートに加えて 2 時間静置した後クリスタルバイオレット染色により接着した菌体量を定量化した．また担体の再利用性については，ポリウレタン担体に菌体を固定化してエステラーゼ反応を行った後担体を純水洗浄し，そこに別種の菌体を固定化しインディゴ生産量を定量することで評価した．
【結果】
AtaA を細胞表層に有する菌体は塩溶液中で高い接着性を示したが，純水中ではどの表面に対してもほとんど接着しなかった．一度接着した菌体は純水ですすぐことにより表面から剥離し，剥離した菌体は再度塩溶液に懸濁すると接着性を取り戻した．さらに，ポリウレタン担体に固定した菌体も純水洗浄により剥離することができ，その担体に別の菌体を固定化することで担体を異なる反応に用いることができた．本研究で示された菌体の可逆的固定化は，固定化全細胞触媒を用いたプロセスの効率および生産性を高めるために役立つだろう．

Reversible bacterial immobilization based on the salt-dependent adhesion of the bacterionanofiber protein AtaA

○Shogo Yoshimoto[1,2], Yuki Ohara[1], Hajime Nakatani[1], Katsutoshi Hori[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]VBL, Nagoya Univ.)

Key words immobilization, *Acinetobacter* , adhesion

3Fa07 *Acinetobacter* sp. Tol 5 の難付着材料に対する付着性の評価

○川尻 彩音 [1], 飯尾 魁 [1], 吉本 将悟 [1,2], 堀 克敏 [1]
（[1]名大院・工, [2]名大・VBL）
katsutoshihori@gmail.com

【背景と目的】
Acinetobacter sp. Tol 5 は疎水性のプラスチックから親水性のガラス，さらには金属といった様々な材料表面に対し高い付着性を示す．この付着性は細胞表層に存在する三量体型オートトランスポーターアドヘシン (TAA) ファミリーに属するタンパク質 AtaA を介してもたらされる．Tol 5 はどのような材料に対しても非特異的に付着すると考えられていたが，生体分子が付着しにくい表面に対しても付着できるかどうかは調べられていなかった．そこで本研究では，平坦な表面を有するマイカや表面自由エネルギーの低いポリテトラフルオロエチレンといった難付着材料に対する Tol 5 の付着性を評価した．
【方法】
Tol 5，Tol 5 Δ*ataA*，TAA を有し材料表面に対し付着性を示すことが報告されている *Bartonella henselae* Marseille と *Yersinia enterocolitica*，その他に *Escherichia coli*，*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 の 6 種の菌株を用いて，それぞれの材料表面への付着を評価した．様々な材料表面への付着性を調べるため，ポリ塩化ビニルテープを 4 枚重ねてパンチで穴を開けたものを対象材料表面に貼り付けることでウェルを作製した．ウェルに OD_{660}=0.5 に調整した休止菌体の懸濁液を添加し，120 分間静置した後菌液を取り除き無機塩バッファーで洗浄した．風乾後，ウェルに付着した菌体をクリスタルバイオレットで染色し，エタノールで溶出した際の吸光度を測定することで菌体の付着量を評価した．
【結果と考察】
Tol 5 は難付着材料に対しても付着性を示すことが明らかになった．その付着量は他の付着性が報告されている菌と比較して高いものであった．この結果から Tol 5 は他の菌とは全く異なるメカニズムで材料非特異的な付着を達成していることが示唆された．

Adhesion of *Acinetobacter* sp. Tol 5 onto anti-adhesive materials.

○Ayane Kawashiri[1], Kai Iio[1], Shogo Yoshimoto[1,2], Katsutoshi Hori[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]VBL, Nagoya Univ.)

Key words *Acinetobacter*, adhesion, Autotransporter

3Fa08 固定化細胞培養法を活用した生物細胞の選択的取得法の開発

○吉田 真梨, 青柳 秀紀
（筑波大院・生命環境）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【緒言】 アルギン酸ゲル等で細胞を包括して培養する固定化細胞培養法は，(a) 固定化担体（ゲル）内に細胞を高密度で培養できる，(b) 固定化細胞と培養液の分離が容易で，培地の交換や供給を簡便に実施できる，など優れた特徴があり，有用物質の効率的な生産に利用されている．しかしながら，培養の進行に伴い，固定化担体内で細胞が増殖し，担体から漏出し，培養液中で細胞が増殖すると，上述のメリットが消失してしまう．
本研究では培養に伴い細胞が固定化担体より漏出する現象に着目し，この現象を活用した生物細胞の選択的取得法の開発を試みた．
【方法と結果】 モデル微生物として酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）や酢酸菌（*Acetobacter pasteurianus*）を固定化した 2% (w/v)アルギン酸カルシウムゲルビーズを作成し，三角フラスコを用いて振盪培養し，経時的にゲルビーズから漏出した菌の挙動を解析したところ，コントロール（液体懸濁培養）と比べて増殖活性が高いことが示唆された．モデル植物細胞としてニチニチ草（*Catharanthus roseus*）培養細胞を用い，2% (w/v)アルギン酸カルシウムゲルビーズで固定化して培養した結果，ゲルビーズから単細胞や 2~5 の細胞で構成された小細胞集塊が漏出し，培養液中で活発に増殖した（マセレーション酵素などを使用しないで，増殖活性が高い単細胞や小細胞集塊を取得できた）．以上の結果から，固定化細胞培養法は生物細胞の選択的取得に活用できることが示唆された．現在，取得した細胞の特性の解析や他の選択的な細胞取得系について検討中である．

Selective acquisition of cells using immobilized cell culture

○Mari Yoshida, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words alginate, callus, immobilized cell culture, leakage

3Fa09 培地成分が大腸菌フロック形成に与える影響

○本間 裕章, 大塚 未音, 尾島 由紘, 東 雅之
（阪市大院・工）
ojima@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

【背景と目的】環境中の微生物の中には，自身が産生する細胞外ポリマーとの共凝集により，フロックと呼ばれる浮遊性の塊を形成するものが存在する．本研究グループは，通常フロックを形成しない大腸菌が，セルロース生合成に関連する遺伝子である *bcsB* を過剰発現，またはペリプラズムに局在するプロテアーゼの遺伝子 *degP* を欠損させた変異株ではフロックを形成することを報告している．本研究では，培養中の培地の組成がこれらの変異株によるフロック形成に与える影響について検討した．
【方法】グリセロールを最大 1.5 M まで加えた LB 培地で *bcsB* 過剰発現株，*degP* 欠損株を培養し，フロックを形成させた(以下，(+)*bcsB* フロックと Δ*degP* フロックと表記)．フロック形成量は，生理食塩水で洗浄したフロックに含まれるタンパク質を BCA 法で定量することにより評価した．また，培地に粘性を与えるカルボキシメチルセルロース(CMC)やポリオール類であるエチレングリコールを LB 培地に添加し，フロック形成に与える影響を評価した．
【結果と考察】(+)*bcsB* フロックではグリセロール添加の影響は見られなかったが，Δ*degP* フロックではグリセロール濃度と形成量の間で正の相関が見られ，その量はグリセロール濃度が 1.5 M のときに最大となった．CMC をグリセロール 1.5 M 添加時と同じ粘度になるように添加した培地では，形成量の増加は見られなかった．一方，エチレングリコールを添加した培地ではグリセロール添加と同様に形成量が増加した．以上の結果から，大腸菌の Δ*degP* 株では，ポリオールの作用により凝集能が向上し，フロック形成を促進することが分かった．これらの作用の解析から，微生物のフロック形成の理解が進むことが強く期待される．

Effect of medium components on the floc formation of *Escherichia coli*

○Hiroaki Honma, Mio Otsuka, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words floc formation, glycerol, *Escherichia coli*

3Ga01 生分解性プラスチックの海水，河川水での生分解

○中山 敦好, 川崎 典起, 山野 尚子
（産総研・バイオメディカル）
a.nakayama@aist.go.jp

（はじめに）
マイクロプラスチックの海洋汚染が指摘される中で生分解性プラスチックの活用が期待されているが，その分解性について活性汚泥や土壌分解については多くの報告があるが水環境での報告例は少なく，その有効性が疑問視されている．そこでどのような生分解性プラスチックが水環境で良好な生分解性を示すかについて調べた．
（実験）
生分解試験は主として各地の水試料を採取し，密閉型撹拌容器に環境水と樹脂粉末を入れたラボ試験にて行い，遮光下 27℃で連続撹拌し，生分解に伴う酸素消費量の測定により評価した．
（結果と考察）
海水は大阪湾内複数箇所で採取したものを用いた．その結果，合成系樹脂では PCL が良好な生分解性を示し，PBSA は採取する海水によってばらつきが出た．4 週間の試験では PBS や PBAT，PLA は明確な生分解性が認められなかった．生合成系樹脂では PHB やそのコポリマーは良好な生分解性を示した．海に直接樹脂フィルムを浸漬させる実環境試験では PBSA も確実に生分解された．ラボ試験より実環境試験の方が生分解速度は速いが，これはラボ試験では微生物分解のみを観測しているのに対し，実環境では多様な生物，物理・化学的因子が関与しているためと考えられる．大阪湾につながる大和川では下流域では海水中よりも大きな生分解活性を示したが，上流では生分解は遅かった．この生分解活性の違いは試験水の汚濁度と関係があると思われる．

Biodegradation of aliphatic polyesters in sea water and fresh water

○Atsuyoshi Nakayama, Norioki Kawasaki, Naoko Yamano
(Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words biodegradation, biodegradable plastic, poly(3-hydroxybutyrate), polyester

3Ga02 発酵(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸と α-ヒドロキシ酸の共重合体の化学合成と生分解

○常盤 豊 [1,4], 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, [4]トロピカルテクノプラス)
y.tokiwa@aist.go.jp

【背景】最近，マイクロプラスチック汚染が海洋生態系への脅威だとして注目されている．微生物が作るポリ-3-ヒドロキシ酪酸（PHB）は，海洋でも分解しやすい生分解性プラスチックとして知られている．しかし，微生物が作る PHB やその共重合体は，微生物由来の不純物を含むなどの問題があり，未だ広く普及していない．
私たちは，*Halomonas* sp. OITC1261 株 [1)]が菌体外に生産する(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸（R3HB）を用いて，すでに，グリコール酸および L-乳酸との共重合体を化学合成して，その生分解性について解明してきた．今回，R3HB を用いて，L-マンデル酸，L-フェニル乳酸，インドール-3-乳酸等の α-ヒドロキシ酸との共重合体の化学合成を行い，それらの特性と生分解性について検討した．
【方法】光学純度 99％ee の発酵 R3HB と種々の α-ヒドロキシ酸を p-トルエンスルホン酸を触媒に用いて，トルエン中で脱水重合することにより重合体を得た．重合体の生分解性は，*Streptomyces* sp. MG 株の PHB 分解酵素 [2)]，プロテインネース K および BOD テスターを用いて海水により評価した．
【結果】R3HB と L-マンデル酸をモル仕込み比 90:10 で反応させた場合，組成比 95.2：4.8，分子量 *M*w 8610 の共重合体が得られた．R3HB と L-フェニル乳酸，R3HB とインドール-3-乳酸を同様に反応させた場合，*M*w がそれぞれ 3600，2880 の共重合体が得られた．PHB 分解酵素は，モル仕込み比 90:10 のそれぞれの共重合体に対して，高い分解性を示した．しかし，プロテインネース K は，共重合体をほとんど分解しなかった．さらに，海水による分解性試験では，R3HB と L-マンデル酸の共重合体は，ポリカプロラクトンと同等の生分解性を示した．

1. H. Yokaryo et. al, *Biotechnol. J.* 13(2). Doi: 10.1002/biot.20170343 (2018)
2. B.P. Calabia and Y. Tokiwa, *Biotechnol. Lett.*, 28, 383-388 (2006).

Chemical synthesis and biodegradation of copolymers of fermented (*R*)-3-hydroxybutyric acid and α-hydroxy acid

○Yutaka Tokiwa[1,4], 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, [4]Tropical Technology Plus)

Key words hydroxybutylic acid, biodegradable plastic, mandelic acid, microplastic

3Ga03 (*R*)-3-ヒドロキシ酪酸生産菌の代謝制御に関わる無機塩類

○世嘉良 宏斗 [1], 花城 隆二 [1], 合田 雅浩 [1], 常盤 豊 [2,3]
([1]沖縄県工技セ, [2]トロピカルテクノプラス, [3]産総研)
yokryouh@pref.okinawa.lg.jp

(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸（R3HB）は微生物による発酵生産が可能な光学活性有機酸で，生分解性樹脂等の原料として注目されている．また，ヒトの体内で脳や筋肉の効率的なエネルギー源として生産・利用されていることから，食品素材としての機能も注目されている．我々はこれまでに沖縄で分離された *Halomonas* sp. OITC1261 を用いてパイロットスケールで R3HB の発酵生産を行い，生産効率の優位性を示した（第 69 回日本生物工学会大会講演要旨集，2P-J197，2017）．さらに，発酵液中から高純度結晶として精製した R3HB は，共同研究機関と連携しながら，樹脂や食品等の開発のために利用されている．
R3HB の発酵生産では，菌体内に蓄積させた R3HB の重合体（ポリ-(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸，PHB）を加水分解して得る方法が一般的だが，OITC1261 株は PHB 分解しなくても R3HB を菌体外へ生産する．OITC1261 株の好気的 R3HB 合成経路はまだ明らかではないが，好気条件下で PHB を蓄積・維持したまま R3HB を菌体外へ生産することから，R3HB は PHB 分解とは異なる経路で生産されていると推定される．これらの代謝経路を制御できれば，R3HB と PHB の生産性を調節できる可能性がある．そこで本研究では，R3HB と PHB の生産が培地中の無機塩類によってどのような影響を受けるのか調べた．
発酵試験では，無機塩類の培地中濃度を変えて生産量を比較した．基本培地での生産量（R3HB：43 g/L，PHB：35 g/L）と比較して，K_2HPO_4 強化培地では R3HB が減少（14 g/L）して PHB が増加（49 g/L）した．K_2SO_4 強化培地では R3HB と PHB の割合は基本培地のときと比べてほとんど変化しなかったが，$FeSO_4$ を同時に強化すると R3HB は増加（77 g/L）して PHB は減少（28 g/L）した．今回の結果から，好気条件下における R3HB と PHB の生産量は培地中の無機塩類による影響で変化し，その比率を制御できることが示唆された．

Some minerals affect the metabolism of (*R*)-3-hydroxybutyric acid and its polymer by *Halomonas* sp. OITC1261

○Hiroto Yokaryo[1], Ryuji Hanashiro[1], Masahiro Goda[1], Yutaka Tokiwa[2,3]
([1]Okinawa pref. Ind. Tech. Cent., [2]Tropical Technology Plus, [3]AIST)

Key words 3-hydroxybutyric acid, PHB, *Halomonas*, mineral

3Ga04 酸性溶液による変性 PET の加水分解と分子量変化

○廣田 泰志 [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】日本には，黒ボク土などの酸性土壌が広く存在する．APEXA®はポリエチレンテレフタラート (PET) に類似した物性を持つ共重合ポリエステルで，アルカリ性堆肥下における生分解が確認されている．その一方で，酸性条件下での加水分解挙動および分子量変化についてはほとんど知られていない．本実験では，酸性溶液中における APEXA®の加水分解挙動を確認した．
【実験方法】繊維状の APEXA®4027 を 1 g 秤量し，30 mL の希硫酸 (pH 3.0) に含浸させた．比較として，0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.4)，0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 10.5)，蒸留水を用いた．インキュベーターを使用して，試料を加水分解 (80°C, 160 rpm, 4 weeks) した．反応後の溶液は，加水分解から生じたモノマー量を知るため，HPLC 分析に供した．反応後の樹脂試料は，0.1% (v/v) Triton X-100 溶液で洗浄 (37°C, 30 min) し，乾燥 (50°C, 3 days) させた．樹脂の分子量を知るため，JIS (K 7367-5) に則って，希薄ポリマー溶液の粘度数を測定した．試料をフェノール/テトラクロロエタン (60/40) 溶液に溶解させ，25°C における流下時間をウベローデ粘度計によって測定し，分子量を算出した．SEM 観察は，試料を金パラジウム合金でスパッタした後，FE-SEM (S-4500, 日立) を使用して行った．
【結果と考察】モノマー生成量はアルカリ性の炭酸緩衝液より小さかったものの，分子量は酸性の希硫酸において著しく低下し，1 週間で反応前の 22.9%まで低下した．SEM 観察では，希硫酸サンプルにおいて繊維の断裂が確認された．蒸留水サンプルでは，加水分解によって生じたテレフタル酸が酸性触媒として働き，結果として希硫酸サンプルと類似した分解挙動を示した．酸性溶液中の加水分解によって APEXA®の物性は大きく低下しているといえ，酸性土壌下で速やかに生分解する可能性が示唆された．

Hydrolysis of modified PET with acidic solution and molecular weight change

○Yasushi Hirota[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 biodegradable plastic, hydrolysis, molecular weight

3Ga05 Thiol-ene 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発

○佐野 芽生 [1], 黒田 ひかり [1], 小原 仁実 [1], 安藤 寛 [2], 松本 圭司 [2], 麻生 祐司 [1]
([1]京都工繊大院・工芸科学, [2](株)カネカ・R&D企画部)
d6861001@edu.kit.ac.jp

【背景・目的】微生物はイタコン酸(IA)などのビニル化合物を生産する．これらは再生可能なポリビニル原料として有用であるが，自然界からビニル化合物生産菌を選択的に分離する方法はない．そこで本研究では，チオールのアルケンへの付加反応である Thiol-ene 反応に基づく生産菌分離技術の開発を行った．原理は次の通りである．まず，抗菌性を示す α-チオグリセロール(TG)とラジカル開始剤 VA-044(VA)を含む寒天培地に生産菌を含む分離源を塗布する．培養中に生産菌由来のビニル化合物が TG と反応し TG の濃度が低下することで生産菌はコロニーを優先的に形成することができる．
【方法・結果】5 mM VA，50 mM TG，100 mM IA を窒素下で 30℃，120 h，Thiol-ene 反応に供し，Ellman 試薬を用いて残存 TG 濃度を測定した結果，反応率は約 40%であった．また，LC-MS 解析より TG と IA の反応物が確認されたことから，Thiol-ene 反応の進行が確認された．また，種々の微生物に対する TG および TG と IA の反応物の最小生育阻止濃度を調べたところ，それぞれ TG では 12.5-100 mM，反応物では 200 mM 以上であった．よって，Thiol-ene 反応により TG の抗菌性失活が確認された．次に，VA と TG を含むポテトデキストロース寒天培地にて *Aspergillus terreus* NBRC 6123(IA 生産菌)，*Aspergillus niger* NBRC 33023，*Aspergillus oryzae* NBRC 30113(両株とも IA 非生産菌)を培養した結果，NBRC 6123 は優先的にコロニーを形成した．さらに，同寒天培地にて NBRC 6123 の胞子を含む土壌を塗布培養し同株の再分離を試みたところ，約 100%の効率で土壌から再分離できた．よって，本手法はビニル化合物生産菌の分離に有効であることが示唆された．

Development of the method for screening of microbes producing vinyl compounds using thiol-ene reaction

○Mei Sano[1], Hikari Kuroda[1], Hitomi Ohara[1], Hiroshi Ando[2], Keiji Matsumoto[2], Yuji Aso[1]
([1]Kyoto Inst. Tech, [2]Kaneka Corp.)

Key words *Aspergillus terreus*, screening, Thiol-ene reaction, vinyl compounds

3Ga06 Heck 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発

○矢田 椋己[1], 佐野 芽生[1], 小原 仁実[1], 安藤 寛[2], 松本 圭司[2], 麻生 祐司[1]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]カネカ・R&D企画部）
aso@kit.jp

【目的】ある種の微生物はビニル化合物を生産する．それらは炭素-炭素二重結合を持ち容易にポリマー化する．よって，新たなビニル化合物生産菌が分離できればバイオプラスチック開発に有用である．しかし，ビニル化合物生産菌を自然界からハイスループットで選択的に分離するための手法はなく，これまでに報告されているビニル化合物は Aspergillus terreus によって生産されるイタコン酸など数種類にとどまる．そこで本研究では，イタコン酸をビニル化合物のモデルとして利用し，
アルケンとハロゲン化アルキルの付加反応である Heck 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発を行うとともに，土壌からイタコン酸生産菌の分離を試みた．
【方法・結果】イタコン酸水溶液に Pd(OAc)2，K2CO2，ヨードベンゼンを加えて 80°C で 1 h 撹拌し Heck 反応を行った．HPLC 解析によりイタコン酸とヨードベンゼンの付加反応物の生成を確認した．反応液に濃 HCl を添加し反応を停止させた後，亜硝酸ナトリウム水溶液と可溶性デンプン水溶液を加えた．Heck 反応により生じたヨウ素イオンをヨウ素デンプン反応により検出することで Heck 反応の進行を確認することができた．次に，グルコース無機塩培地を用いて土壌より分離した 500 株を培養し培養液を用いて同条件で Heck 反応を行った．その結果，ビニル化合物を生産すると思われる 1 株を得た．LC-MS 解析の結果，反応物の分子量は 206.058，化学式は C11H10O4 であった．これらはイタコン酸とヨードベンゼンの付加反応物であるベンジリデンコハク酸のそれらと一致した．よって，分離株はイタコン酸生産菌であることが示された．以上の結果から，本手法はビニル化合物生産菌を自然界からハイスループットで選択的に分離するために有効な手法であることが示された．

Development of the method for screening of microbes producing vinyl compounds using Heck reaction

○Ryoki Yada[1], Mei Sano[1], Hitomi Ohara[1], Hiroshi Ando[2], Keiji Matsumoto[2], Yuji Aso[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Kaneka Corp.)

Key words Heck reaction, itaconic acid, screening, vinyl compounds

3Ha01 Bio-alcohol production in engineered Bacillus subtilis through restoration of nutritional depletion stress

Kim Eunjoo[1], Seo Dahee[1], Yang Yung-Hun[2], ○Choi Kwon-Young[1]
([1]Dept. Environ. Eng. Ajou University, [2]Dept. Microbial Eng. Konkuk University)
kychoi@ajou.ac.kr

The chemical composition of biomass is an important factor in the biochemical productivity of the biorefinery processes. The demand for sustainable biomass is based on securing a homogeneous biomass composition. Recently we have reported consolidated conversion of proteolytic biomass into bio-alcohols by engineering Bacillus subtilis strain. Here, we report that one of the most affecting factors on proteolytic waste conversion is nutritional stress resulted from the amino acids depletion consumed in the early phase of incubation, which caused severe low productivity. In order to overcome this nutritional stress, the critical amino acids in proteolytic biomass conversion process were identified and three overcoming strategies of Nisin treatment, which was known as a sporulation inhibitor, introduction of sporulation deficiency by inactivating SpoA0 regulator, and nutritional stress restoration by inactivating RelA regulatory protein, were attempted. Amongst, engineered B. subtilis KY11 ΔcodYΔbkdBΔrelA mutant showed the highest bio-alcohol yields of 1.83 ± 0.16 g/L and approximately 54.82 mg/L/hr of highest productivity.

Bio-alcohol production in engineered Bacillus subtilis through restoration of nutritional depletion stress

Kim Eunjoo[1], Seo Dahee[1], Yang Yung-Hun[2], ○Choi Kwon-Young[1]
([1]Dept. Environ. Eng. Ajou University, [2]Dept. Microbial Eng. Konkuk University)

Key words Protein Conversion, Bacillus subtilis, RelA, Spo0A

3Ha02 酵素の生産・放出を行う大腸菌と物質生産を行う大腸菌の共培養による有用物質生産

○岩崎 建史朗[1], 本庄 宏[2], 相馬 悠希[3], 盧 鎮栄[2], 鶴野 圭悟[2], 濱田 浩幸[1], 花井 泰三[1]
（[1]九大院・生資環, [2]九大院・シス生科, [3]九大・生医研）
taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】
合成生物学的な手法により構築した二種類の大腸菌を用いて，セロビオースからモデル有用物質である Isopropanol（IPA）の直接生産を行った．大腸菌は，セロビオースを直接利用できないので，セロビオースを糖化酵素によってグルコースに分解する必要がある．そこで，設定した菌体密度に到達すると溶菌し，糖化酵素を放出する人工遺伝子回路を導入した大腸菌（糖化・溶菌株）と，グルコースから IPA 生産を行う合成代謝経路を組み込んだ大腸菌（生産株）を，共培養することによってセロビオースから IPA の直接生産を試みた．
【方法・結果】
E.coli BW25113 を，ホスト株として使用し，糖化・溶菌株と生産株を構築した．糖化・溶菌株は，クオラムセンシングシステムを用いて，菌体密度をセンシングできるように設計した．また，クオラムセンシングのプロモータを改良し，IPTG 添加量に応じて，センシングの感度を変更できるようにした．溶菌遺伝子には *T4 phage* 由来のものを用いた．一方，生産株にはアセチル CoA を起点とした IPA 生産合成代謝経路を導入した．まず，糖化・溶菌株を用いて，セロビオースの分解を試みた．その結果，IPTG の添加量を変更することで，任意のタイミングで大腸菌を溶菌させて，セルビオースが分解されることが，確認できた．次に，糖化・溶菌株と生産株の共培養を行い，セロビオースから IPA を直接生産する実験を行った．その結果，糖化・溶菌株の溶菌とそれに伴うセルビオースの急激な減少，グルコースの急激な増加が観察された．培養開始 24 時間後，培地中のグルコースは消費され，最大約 12mM の IPA 生産が確認された．

IPA production from cellobiose by engineered *Escherichia coli* strains with synthetic genetic circuit and synthetic metabolic pathway.

○Kenshiro Iwasaki[1], Hiroshi Honjo[2], Yuki Soma[3], Jinyeoung Rho[2], Keigo Tsuruno[2], Hiroyuki Hamada[1], Taizo Hanai[1]
([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., [3]Medical Institute of Bioregulation , Kyushu Univ.)

Key words cellobiose, coculture, production, *Escherichia coli*

3Ha03 グルコース／キシロース切替え流加法による乳酸ベースポリマー生産組換え大腸菌の高密度培養

山崎 貴史[1], Ribordy Greg[2], 堀 千明[1,3], ○松本 謙一郎[1,3], 大井 俊彦[1,3], Zinn Manfred[2], 田口 精一[3,4]
（[1]北大院・工, [2]Hes-SO Walais Wallis, [3]JST・CREST, [4]t東農大・生命科学）
mken@eng.hokudai.ac.jp

【背景】
Poly(lactate-*co*-3-hydroxybutyrate) は乳酸重合酵素を発現する組換え大腸菌によって生合成可能なバイオベースポリマーである．本菌のフラスコ培養実験により，リグノセルロースの第二主要構成糖であるキシロースを炭素源とすることにより，グルコースの場合と比較して良好なポリマー生産性及び乳酸分率が得られることが示されていた．本研究では，本生産系を，ジャーファーメンターを利用した流加培養法により高密度化することを目的とした．
【実験方法】
ポリマー合成系遺伝子群が lac プロモーターの下流に挿入されたプラスミドを導入した組換え大腸菌を用いた．2 L のジャーファーメンターに，2%グルコースまたはキシロースを含む合成培地（MR）を調整し，12 時間の前培養を行った組換え大腸菌を 1%（v/v）植菌し，培養温度 30℃で通気撹拌培養を開始した．培養開始 24 時間後から糖の流加を開始し，培地中の糖濃度が 40 g/L を超えない範囲で流加速度を段階的に増加させた．
【結果と考察】
グルコースのみを炭素源とした場合，61 g/L の良好な菌体生育が確認されたがポリマーの蓄積率は 7%であった．一方でキシロースのみを炭素源とした場合，ポリマーの蓄積率が 21%と高くなったが，菌体の成長は 30 g/L と低くなった．この成長阻害を取り除き，ポリマー生産量を増加させるため，グルコースを初発糖として菌体増殖させた後，キシロースを流加してポリマー生産させる方法を試みた．その結果，各単糖を流加した条件と比べ菌体量（67 g/L）及びポリマー量（25 g/L）共に増加した．これは，糖の切り替えによってポリマー生産遺伝子群の発現が上昇したと推測された．

Efficient Production of P(lactate-*co*-3-hydroxybutyrate) using dual carbon sourses with fed-batch fermentation

Takashi Yamazaki[1], Greg Ribordy[2], Chiaki Hori[1,3], ○Ken'ichiro Matsumoto[1,3], Toshihiko Ooi[1,3], Manfred Zinn[2], Seiichi Taguchi[3,4]
([1]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [2]Hes-SO Walais Wallis, [3]CREST, JST, [4]Dept. Life Sci., Tokyo Univ. Agric)

Key words biodegradable plastic, biomass, fed-batch culture, xylose

3Ha04 *Clostridium beijerinckii* を宿主としたタンパク質発現系の開発 —プロモーターの検討—

○須江 夏希, 平松 愛子, 三宅 英雄
（三重大院・生資）
miyake@bio.mie-u.ac.jp

【背景と目的】*Clostridium beijerinckii* はアミラーゼを分泌することでデンプンを加水分解し，ブタノールを生産する．これまで *C. beijerinckii* を宿主とした異種タンパク質発現についていくつか報告はあるが，いずれも発現量が少なく，目的遺伝子によって発現量も異なるためプロモーターの選択は重要である．本研究では *Clostridium* 属由来の 4 つのプロモーターを用いた *C. beijerinckii* を宿主としたタンパク質発現系を構築することを目的とした．
【方法・結果】*C. acetobutylicum* 由来の *thiolase* 遺伝子，*C. beijerinckii* 由来の *amylase* 遺伝子，*C. cellulovorans* 由来の *cellulose binding protein A* 遺伝子，*C. saccharobutylicum* 由来の *endglucanase A* 遺伝子のプロモーターとターミネーター領域をそれぞれクローニングした．プロモーターの下流にレポーター遺伝子として *C. cellulovorans* 由来のセルラーゼである *endoglucanase O* (*engO*) を連結し，*E. coli-Clostridium* のシャトルベクターである pMTL500E に導入することで *engO* 発現プラスミドを構築した．これらのプラスミドを嫌気条件下において，エレクトロポレーション法を用いて *C. beijerinckii* に形質転換した．得られた形質転換体を 1 %カルボキシメチルセルロースを含む寒天培地に植菌し，嫌気条件下で培養した．その後，このプレートについてコンゴーレッド染色を行った結果，*thiolase* プロモーター以外の 3 つについてセルラーゼ活性が観測された．このことから 3 つのプロモーターを用いたタンパク質発現系を構築することができた．

Development of protein expression system in *Clostridium beijerinckii* - Investigation of promoter-

○Natsuki Sue, Aiko Hiramatsu, Hideo Miyake
(Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

Key words *Clostridium beijerinckii*, protein expression, cellulase, promoter

3Ha05 発酵阻害物質耐性酵母 KS47-1 株の特徴づけと 1 倍体の取得

○竹内 健人 [1], 加藤 勇太 [1], 荒川 知子 [1], 堀内 淳一 [2], 小西 正朗 [1]
（[1]北見工大, [2]京工繊大院・工芸科学）
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

【背景と目的】木質バイオマス中の発酵阻害物質（furfural (FL), 5-hydroxymethylfurfural(5-HMF), vanillin (VA), ギ酸,酢酸など）はバイオエタノール生産やバイオリファイナリープロセスに使用する微生物の増殖を阻害するとこが知られている．それぞれの物質に対応する微生物の耐性機構は複数存在し,多数の関連遺伝子が存在するため,既知の出芽酵母などを遺伝子改変して耐性を付与することは難しい．そこで,我々は発酵阻害物質に強い耐性を持つ次世代酵母ホストの候補として,通常の酵母が増殖できないトウモロコシの芯(corncob)糖化液中で良好に増殖する酵母 *Pichia membranifaciens* KS47-1 株を分離した．本菌株を組換え宿主として利用するため,この酵母の詳細な性格付けと栄養要求性 1 倍体の獲得を試みた．
【方法】単一の阻害物質に対する増殖特性を観察するため,VA,酢酸,FL,5-HMF,ギ酸,レブリン酸を含む最少寒天培地に段階希釈した培養液を 10 µl 播種し,28℃で 3 日間培養した．1 倍体を取得するため,YM 培地で 10 日間以上培養し胞子を形成させた細胞に Lysing Enzymes 処理を施し,再度 YM 培地に播種した．1 倍体候補を阻害物質含有培地で同様に耐性試験した．
【結果と考察】2 倍体と思われる野性株は 200 mM 酢酸,10 mM ギ酸,10 mM FL, 10 mM 5-HMF, 5 mM VA 存在下でも良好な増殖を示した．近縁種は酢酸,ギ酸,VA に対して感受性を示した．酢酸に対して高い耐性が認められたため,酢酸耐性酵母として知られる *Zygosaccharomyces bailii* と耐性を比較したところ,酢酸への耐性は同等であった．*Z. bailii* は酢酸やギ酸,5-HMF に十分な耐性を示したものの FL と VA に感受性を示した．1 倍体を分離したところ元株が持つ茶色の色素合成能力が消失したが,高い阻害物質耐性は保持された．さらに,薬剤突然変異法による栄養要求性株の取得を試みたところウラシル要求性株を取得した．

Characterization of an inhibitor tolerant yeast, Pichia membranifaciens KS47-1, and preparation its haploid as a host cell for gene manupulation.

○Kento Takeuchi[1], Yuta Kato[1], Tomoko Arakawa[1], Junichi Horiuchi[2], Masaaki Konishi[1]
([1]Kitami Inst. Technol., [2]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words biorefinery, inhibitor, *Pichia membranifaciens*, yeast

3Ha06 キシローストランスポーター GAL2 の脱ユビキチン化によるグルコース・キシロース同時消費酵母の作成

○藤森 一浩 [1], 小林 洋介 [1,2], 佐原 健彦 [1], 扇谷 悟 [1], 鎌形 洋一 [1]
（[1]産総研・生物プロセス, [2]Biomaterial in Tokyo）
k-fujimori@aist.go.jp

【背景】
セルロース系エタノール生産の実用化には，Xylose の消費速度を向上するとともに，発酵期間の短縮が重要な課題となっている．しかし，カタボライト抑制によって Xylose 消費は Glucose 消費よりも遅れて開始するため，発酵に無駄な時間を要することになっていた．出芽酵母では，Xylose を取り込む能力がある内在性 Hexose transporter として *HXT4*, *HXT7*, *GAL2* 等が報告されている（Hamacher et al., 2002）．また，Glucose 取込み速度が低下し Xylose 取込み速度が向上する変異として，Hxt7p(N370S)や Gal2p(N376F)が発見された（Farwick et al., 2014）．しかし，これらの変異体は Xylose 単独で生育可能になるものの，Glucose/Xylose 共存在下でのエタノール発酵性能に及ぼす効果については，これまで十分調べられていなかった．
【方法・結果】
我々は，Glucose/Xylose の同時消費を実現するためには，上記変異に加えて，Xylose transporter の細胞膜における安定性を改善する必要があると考え，Hexose transporter のユビキチン化に着目した．Gal2p は，12 回膜貫通型の内在性 Hexose transporter で，N 末, 4 番目の細胞内ドメイン，C 末の 3 か所がユビキチン化される可能性が示唆された．そこで，ユビキチン化候補サイトを単独あるいは複数組み合わせで破壊した GAL2 変異体をそれぞれ作成し，導入した株の自然発酵法によるエタノール発酵試験を行った．培地の糖濃度は，実バイオマス糖化液を想定し D-glucose 85 g/L, D-xylose 35 g/L を用いた．その結果，Xylose 消費速度は，48 h から 24 h と約半分に短縮され，Glucose よりも先に全量の Xylose を資化しうる性能を持つことが明らかになった．
※本研究は，バイオマスエネルギー技術研究開発/バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業/有用微生物を用いた発酵生産技術の研究開発/C5C6 糖同時発酵微生物の開発 (NEDO)において行った．

Development of glucose/xylose co-fermentable yeast strains by deubiquitination of xylose transporter GAL2.

○Kazuhiro E. Fujimori[1], Yosuke Kobayashi[1,2], Takehiko Sahara[1], Satoru Ohgiya[1], Youichi Kamagata[1]
([1]BRI. AIST, [2]Biomaterial in Tokyo Co., Ltd.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, xylose, transporter, deubiquitination

3Ha07 酵母 *Scheffersomyces stipitis* を宿主とした新規細胞表層提示システムの開発

○猪熊 健太郎, 小林 優真, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦
（神戸大院・科技イノベ）
akondo@kobe-u.ac.jp

【目的】近年，低炭素循環型社会実現の観点から，再生可能なバイオマス資源から微生物を用いて燃料や化学品を製造する技術の導入が望まれている．そのための微生物育種に有効なのが，GPI アンカーと呼ばれる構造を介して酵母の細胞表層に酵素などを提示する細胞表層工学技術である．我々はこれまで，主に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主としてセルラーゼなどの酵素を細胞表層に提示しバイオマス分解能を付与する研究を進めてきた．一方，近年では物質生産に有益な特性を持つ *S. cerevisiae* 以外の酵母も報告されており，その中でも *Scheffersomyces* (*Pichia*) *stipitis* は，セルロースの構成単糖であるグルコースに加えて，ヘミセルロースの構成単糖であるキシロースやキチンの構成単糖である *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）に対しても高い資化能力を持つことから，様々な未利用資源からの物質生産を可能にする酵母として期待されている．しかしながら，これまで *S. stipitis* の細胞表層に酵素を提示した報告は無い．本研究では，*S. stipitis* の細胞表層に酵素を安定的に提示する技術の開発を試みた．
【結果】*S. stipitis* の細胞表層に酵素を提示するために，*S. stipitis* 自身の細胞壁タンパク質の一種である Spi1 をコードする遺伝子（*SsSPI1*）に由来するプロモーター，分泌シグナル，GPI アンカーリング領域，およびターミネーターの配列を用いて新規表層提示用遺伝子カセットを構築した．そして，この遺伝子カセットを用いてセルラーゼの一種である β-グルコシダーゼ（BGL）を発現させた *S. stipitis* を培養し，細胞表層の BGL 活性を測定した．その結果，この酵母は培養開始から 24 時間で 544 U/g dry cells，96 時間で 729 U/g dry cells の BGL 活性を示し，今回開発した表層提示用遺伝子カセットを用いることで *S. stipitis* に酵素を安定的に提示できることが示された．

Development of novel yeast cell-surface display system for *Scheffersomyces stipitis*

○Kentaro Inokuma, Yuma Kobayashi, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words cell surface display, yeast, *Scheffersomyces stipitis*, *Pichia*

3Ha08 接合型変換を利用したセルラーゼ群表層提示酵母の糖化活性及び発酵阻害物耐性向上

○北田 雄基, 猪熊 健太郎, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦
（神戸大院・科技イノベ）
akondo@kobe-u.ac.jp

【背景・目的】 リグノセルロース系バイオマスからの燃料生産は，環境負荷の軽減などの理由から近年注目されているが，多段階のプロセスの為の高い設備費や添加する酵素剤の費用が実用化の妨げになっている．この問題の解決策として我々は，細胞表層にセルラーゼを提示した酵母（セルラーゼ表層提示酵母）を用いてセルラーゼの生産，バイオマスの糖化，発酵を同時に行う「統合型バイオプロセス」の開発を行っている．セルラーゼ表層提示酵母を用いたリグノセルロース系バイオマス前処理物からのエタノール生産においては，酵母のセルロース分解能力のみならず，発酵阻害物耐性の向上も不可欠である．そこで本研究では，この酵母の発酵阻害物存在下での増殖能力，エタノール生産能力の強化を試みた．
【方法・結果】 4 種類のセルラーゼ（BGL, EG, CBH1, CBH2）を提示した a 型の一倍体セルラーゼ表層提示酵母に *HO* 遺伝子を導入することで α 型への接合型変換を誘導し，その後 a 型と α 型のセルラーゼ表層提示酵母同士の接合によって二倍体セルラーゼ表層提示酵母を作製した．発酵阻害物である酢酸とギ酸を各々濃度 15 mM になるように添加した条件下でグルコースを基質とした発酵試験を行ったところ，発酵開始 4 時間時点で二倍体酵母のエタノール生産速度は一倍体酵母に比べ 30%向上した．さらに，各発酵阻害物存在下において，二倍体酵母と一倍体酵母の菌体増殖の評価を行ったところ，酢酸 40 mM 存在下において非増殖速度が 16%向上した．ギ酸 40 mM において誘導期が約 2.5 時間減少すると共に非増殖速度が 17%向上した．ヒドロキシメチルフルフラール 20 mM 存在下において誘導期が約 6 時間減 少すると共に非増殖速度が 19%向上した．現在，酵母の細胞壁に関与する遺伝子の組換えによる細胞表層セルラーゼ活性の向上を目指し，ゲノム編集技術を用いた代謝改変を行っている．

Improvement of saccharification ability and fermentation inhibitor tolerance of cellulase-displaying yeast using mating-type switching

○Yuki Kitada, Kentaro Inokuma, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, cell surface display, diploidization, fermentation inhibitor

3Ha09 Repeated ethanol fermentation from membrane-concentrated sweet sorghum juice by flocculating yeast Saccharomyces cerevisiae

○Hans Wijaya[1,2], Kengo Sasaki[3], Prihardi Kahar[1], Yopi[2], Chiaki Ogino[1], Bambang Prasetya[4], Akihiko Kondo[3]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]LIPI, [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [4]BSN)
hanswijayalipi2014@gmail.com

The sorghum accumulates the sugar-containing juice in the stalks and the juice can be used for biofuel production. Membrane separation technology can concentrate the sugars and amino acids in the juice, to increase biofuel production. However, the problem is high osmotic stress in the concentrated juice, due to high sugar concentration. To overcome this, we utilize the flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain F118 in this experiment. The aim of this study was to construct the cost-effective method of repeated bioethanol production from the membrane (ultrafiltration permeation and nanofiltration concentration)-concentrated sweet sorghum juice by using strain F118. With low initial dry cell concentrations at around 0.28-0.35 g L^{-1}, the strain F118 provided higher ethanol titer of 88.1 g L^{-1} (theoretical ethanol yield of 70.77%) than non-flocculent *S. cerevisiae* strain BY4741 strain that of 36.1 g L^{-1} after 24 h fermentation, indicating that strain F118 possesses high tolerance against osmotic stress. This result was correlated with higher gene expressions regarding sucrose-hydrolyzing enzyme, invertase, sugar phosphorylation, pyruvate to ethanol pathways in strain F118 compared to strain BY4741. Sequential fed-batch fermentation was conducted and strain F118 was easily separated from the fermentation broth by forming flocs and sediment. At 5th cycle of fermentation by strain F118, ethanol concentration reached to 100.4 g L^{-1}.

Repeated ethanol fermentation from membrane-concentrated sweet sorghum juice by flocculating yeast Saccharomyces cerevisiae

○Hans Wijaya[1,2], Kengo Sasaki[3], Prihardi Kahar[1], Yopi[2], Chiaki Ogino[1], Bambang Prasetya[4], Akihiko Kondo[3]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]LIPI, [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [4]BSN)

Key words Sweet sorghum juice, membrane technology, flocculent Saccharomyces cerevisiae, gene expression

3Ha10 人工知能や統計的手法による天然培地成分からの発酵生産量予測

○渡辺 一樹 [1], 小西 正朗 [2]
（[1]北見工大院・工・バイオ環境, [2]北見工大）
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

工業規模の微生物培養において，費用対効果の観点から，食品廃棄物等を活用した天然培地を用いることが多い．しかし，天然物は無数の成分を含み，原料間の成分変動も大きく，収率を不安定化させる．これに対し普遍的な解決策は無く，収率の安定化に貢献するための新しいバイオプロセス管理技術が求められている．そこで，当研究室では，人工知能や統計的手法による培地成分情報からの培養結果予測システムを考案した．本報告では，スイートコーン残渣からの糖化液を用いた酵母によるエタノール生産系をモデルとして，予測した．
3 種のコーンコブ(中国・ベトナム・インドネシア産)と，自家製スイートコーンのストーバーを 60 g ずつ取り，1-3%希硫酸溶液を 300 ml 加え，121℃，60 分加熱した．一部は活性炭吸着処理した．次に 0.6 g のメイセラーゼ(明治製菓ファルマ製)を加え，40℃，100 rpm で 3 日間振盪し，pH5.00 に調整後フィルター滅菌し，糖化液とした．次に，*Saccharomyces cerevisiae* S288C 株を YM 培地で 2 日間前培養し，滅菌済み 500 ml 容量フラスコに 50 ml の糖化液を加え，前培養液を 1 ml 植菌し，70 rpm，30℃で 72 h 本培養した．菌体濁度は分光光度計で，エタノール濃度を HPLC で測定した．更に，糖化液中の揮発性成分をジクロロメタン抽出し，GC-MS で分析した．得られた培養結果を従属変数，糖化液の成分情報を独立変数としたデータマトリクスを作成し，部分最小二乗回帰(PLS-R)と，ニューラルネットワーク(ANN)への学習を行い，それぞれ増殖，エタノール生産の予測モデルを作成した．その結果，一部解析で PLS-R における Q^2 値は 0.8 を超え，ANN における総平方和は最低で 0.35 程度と，高精度の予測が可能であった．更に，予測に対する各種独立変数の重要度を比較することで，培養に強く影響する成分情報の抽出に成功した．

Application of Artificial Neural Network(ANN) and Partial Least-Squares Regression(PLS-R) to predict the bioethanol production from corncob hydrolysates

○Kazuki Watanabe[1], Masaaki Konishi[2]
([1]Kitami Inst. Technol., Grad. Sch. Eng. Biotech. Environ. Chem., [2]Kitami Inst. Technol.)

Key words artificial neural network, statistical analysis, biomass, ethanol fermentation

3Ha11 潜性形質に注目したレアメーティングによる非遺伝子組換え酵母の育種

○海道 直生 [1], 金子 嘉信 [2], 山崎 思乃 [3], 片倉 啓雄 [3]
（[1]関西大院・理工, [2]阪大院・工, [3]関西大・化生工）
katakura@kansai-u.ac.jp

【緒言】
Saccharomyces cerevisiae には性があり，2 倍体は減数分裂して胞子を形成するが，実用株の多くは胞子を形成しないため，交雑による育種は難しい．しかし，2 倍体は 10^{-6}～10^{-7} 程度の低頻度でホモ接合の接合型になり，異なる接合型の 1 倍体と接合（レアメーティング）することが知られているので，交配する 1 倍体が正常な胞子形成能を保持していれば，このレアメーティング法での育種が可能となる．さらに，3 倍体より 4 倍体の方が胞子生存率が高いので，レアメーティングを 2 回行えば，減数分裂を経て潜性形質をもつ株の育種も効率よく行える．本研究では，*rim15* 欠損により高いエタノール濃度までエタノール生産が抑制されなくなる形質に注目し，この性質と耐熱性を合わせ持つバイオエタノール生産に適した酵母の育種を行った．
【方法と結果】
研究室保有菌株 141 株から，耐熱性株として 42℃で生育する PS28 株，エタノール耐性株として高濃度のエタノール存在下で比生産速度が最も高い協会 6 号（K6 株）をそれぞれ選択した．まず，PS28 株から胞子を単離し，40℃で生育する 1 倍体を選抜した．これと，エチジウムブロマイド含有 YPD 培地で培養して呼吸欠損とした K6 株を 1：10 の割合で YPD 培地に植菌し，一晩静置培養した後，グリセリンを炭素源とする YPG 培地で継代して 3 倍体株を濃縮・単離した．この 3 倍体にさらに耐熱性の 1 倍体を交配して 4 倍体を取得し，胞子を形成させて多様な遺伝子型をもつ 2 倍体を得た．この 2 倍体から *rim15* をホモ接合でもち，かつ，高い耐熱性をもつ株を選択し，育種に用いた親株である K6 株と PS28 株を対照として，得られた 2 倍体のエタノール耐性及び耐熱性を評価している．

Non-recombinant breeding of yeast by rare mating focusing on recessive trait

○Naoki Kaido[1], Yoshinobu Kaneko[2], Shino Yamasaki[3], Yoshio Katakura[3]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [3]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, rare mating, *RIM15*, Non-recombinant breeding

3Ia01 バイアスドランダム化と DNA バーコード付加によるプロモーター変異体のハイスループット解析

○青木 航[1,2], 古村 崚[1], 元根 啓佑[1,3], 植田 充美[1]
（[1]京大院・農, [2]JSTさきがけ, [3]日本学術振興会）
miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景】
タンパク質の生産や遺伝子回路のデザインにおいて，遺伝子発現レベルを精密にコントロールすることが重要である．しかし，既存のプロモーターやエンハンサーなどのシスエレメント（cis-regulatory element, CRE）だけでは，目的の遺伝子発現プロファイルを実現できないことも多い．そこで本研究では，ある特定の CRE に対し，バイアスドランダム化と DNA バーコード付加を用いて，さまざまな転写プロファイルを示す変異体を高速に取得する方法論の確立を試みた．
【内容】
本論文では，研究対象として遺伝子発現制御ツールとして頻用される T7 プロモーターを選択した．まず，T7 プロモーターのそれぞれの塩基が一定の確率で置換されるように変異を導入した．同時に，それぞれの変異体に DNA バーコードを付与し，T7 DNA ライブラリを取得した．このライブラリに対して *in vitro* transcription assay を行い，T7 mRNA ライブラリを取得した．次に，DNA ライブラリと mRNA ライブラリを NGS で解析し，それぞれの T7 変異体の転写プロファイルを評価した．本手法により，104 以上の変異体を一度に評価し，野生型の T7 プロモーターに対して同程度から 1/1000 程度までの発現強度を持つ T7 プロモーター群を網羅的に作製することに成功した（1）．この成果は，合成生物学においてスマートセルファクトリーの構築に貢献すると期待される．

High-throughput evaluation of promoter variants using biased randomization and DNA barcoding

○Wataru Aoki[1,2], Ryo Komura[1], Keisuke Motone[1,3], Mitsuyoshi Ueda[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]JST PREST, [3]Japan Soc. Prom. Sci.)

Key words NGS, DNA barcode, biased-randomization, synthetic biology

3Ia02 サンゴ共在細菌の機能予測に向けた環境因子応答 *Endozoicomonas* 属の系統解析

○井手 圭吾[1,4], 伊藤 通浩[2], 藤村 弘行[3], 須田 彰一郎[3], 中野 義勝[2], 細川 正人[5,6], 竹山 春子[1,4,5]
（[1]早大・先進理工, [2]琉球大・熱生研, [3]琉球大・理, [4]産総研・早大CBBD-OIL, [5]早大ナノライフ創研, [6]JST・さきがけ）
haruko-takeyama@waseda.jp

近年，サンゴ礁の白化が世界的な問題となっており，サンゴ共在微生物の働きが注目されている．特にサンゴ共在細菌叢の大部分を占める *Endozoicomonas* 属はサンゴの生存において重要な働きをすることが報告されている．本研究では，サンゴ共在 *Endozoicomonas* 属の環境因子に対する応答とサンゴに対する関連を明らかにするために，情報解析を適用し *Endozoicomonas* 属の系統ごとの環境への応答の解析を行った．
沖縄県瀬底島の特定サンゴ群体から，定期的に採取したサンゴ（*Acropora tenuis*）の枝よりサンゴ組織を採取し，メタゲノム抽出を行った．また，8 種の環境因子を経時的に計測した．メタゲノム抽出物に対して微生物の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を対象としたアンプリコンシーケンスおよびデジタルドロップレット PCR を行い，共在細菌叢の定量データを獲得した．得られた共在細菌叢データに対し共相関ネットワーク解析を適用し，サンプル間で同様の挙動を示すモジュールを推定した．推定したモジュール中で *Endozoicomonas* 属が有意に優占し，かつ，環境因子と関連の深いモジュールの抽出および *Endozoicomonas* 属の系統の関連を統合的に解析した．
共相関ネットワーク解析の結果，30 個のモジュールが推定された．そのうち，*Endozoicomonas* 属が優占したモジュールは 7 個であり，これらのモジュールは pH および溶存酸素に関連するモジュールと海水温に関連するモジュールに分けられた．また，これらのモジュールに含まれる *Endozoicomonas* 属の系統と環境因子で分けられたモジュールが強く関連していることが示唆された．
先行研究により，*Endozoicomonas* 属は海水温と関連して増減することが報告されていたが，他の環境因子と関連して増減する系統が存在することが示唆された．また，どのような環境因子に対して反応するかは系統特異的に獲得した機能であることが示唆された．

Phylogenetic analysis of genus *Endozoicomonas* in response to environmental factors for function prediction of coral co-localized bacteria

○Keigo Ide[1,4], Michihiro Ito[2], Hiroyuki Fujimura[3], Shoichiro Suda[3], Yoshikatsu Nakano[2], Masahito Hosokawa[5,6], Haruko Takeyama[1,4,5]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Tropical. Biosphere. Res. Ctr., Univ. Ryukyus, [3]Fac. Sci., Univ. Ryukyus, [4]CBBD-OIL, AIST., [5]Res. Org. for Nano & Life Innovation, Waseda Univ., [6]PRESTO, JST)

Key words system biology, marine microbiology, coral, symbiotic bacteria

3Ia03 環境中難培養微生物のゲノム解析に向けた高精度シングルセルゲノムアセンブリツールの開発

○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]早大ナノライフ創研, [4]JST・さきがけ）
haruko-takeyama@waseda.jp

培養手法が確立されていない環境中の難培養微生物を研究する上で，シングルセルゲノム解析は有用な手法となっている．しかしシングルセル解析には，多数のデータを取得するための実験のスループットや, MDA (Multiple Displacement Amplification)法を主とするゲノム増幅時のエラーに起因する取得配列情報の低質化，といった問題が存在する．
そこで当研究室では，ピコリットル容量の微小液滴に単一細胞を封入して，各液滴内で超並列的にシングルセルゲノムを増幅する技術，sd-MDA (single droplet MDA)を開発してきた(Scientific Reports, 2017)．当技術では，秒間 1000 個と高速生成される液滴を用いることによるシングルセルゲノム増幅のスループットの改善，および，極小空間でのゲノム増幅によるコンタミネーションの少ないゲノム増幅が達成された．しかし本技術を用いても，MDA で生じたキメラ配列に起因するゲノム情報の低質化が起こってしまう．そこで本研究では，複数のシングルセル情報の比較によるエラー配列除去を伴うゲノムアセンブリツール ccSAG を開発し，より高精度なゲノム配列の取得を目指した(Scientific Reports, 2018).
まず初めに，枯草菌シングルセル情報をモデルとして ccSAG 解析の評価を行ったところ，エラー配列の減少に伴ってゲノムアセンブリの向上が見られた．さらに 8 サンプル以上のシングルセル情報を用いて，培養菌体を用いた従来のゲノム解析手法と同等以上の高質なゲノム情報が取得された．続いて，実際に sd-MDA を用いてマウス腸内細菌シングルセル情報を取得し，ccSAG 解析を行うことで，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．ccSAG と sd-MDA を組み合わせることで，細菌叢の網羅的なシングルセルゲノム解析への応用が期待される．

Co-assembly of single bacterial genomic data to acquire accurate draft sequences

○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, bioinformatics, microfluidic device

3Ia04 DNA 塩基配列の人工知能による生物分類・進化・機能の解析

○三宅 淳[1], 馬場 俊輔[1], 山本 修也[2], 島林 真人[2], 田川 聖一[3], 新岡 宏彦[4]
（[1]阪大国際医工情報センター, [2]阪大院・基礎工, [3]阪大先導的学際研究機構, [4]阪大データビリティーフロンティア機構）
jun_miyake@bpe.es.osaka-u.ac.jp

DNA シークエンスの意味と情報の構造について検討した．DNA は構造遺伝子としてだけでなく，遺伝子の所属，進化上の位置づけなどについても記していると考えられる（シークエンスの上位階層にかかわる情報）．これらの情報がどのように DNA に書き込まれているか，完全には把握されていない．一般には SNP を用いて分類されるが，SNP が自然分類ではないことに留意すべきである．我々は，自然分類に近い方法として，DNA シークエンスをディープラーニングを用いて解析し，高次な階層における構造について調べた．
DNA は NCBI など各種のデータベースより用い，一つの生物種について数百例の DNA を用いて解析した．各種生物のミトコンドリア DNA，ウイルス DNA/RNA，細菌の DNA のシークエンスについて Stacked Autoencoder を用いて圧縮し，2 次元もしくは 3 次元プロットを行った．その結果，いずれの生物に於いても，属の中のサブクラス毎のカテゴリーがクラスターとして明瞭に認識された．例えば，フラビウイルス属のジカウイルスや日本脳炎ウイルスなどが，独立のクラスターとして描写された．これは，ディープラーニングによって，DNA シークエンスに内在されている情報が顕在化されたためと考えられる．また，クラスターの空間位置関係は進化にかかわる情報を提示していることも示された．
DNA においては高度な編集によってシークエンス上の特定の位置に限定せず進化・分類などの情報を記していると考えられる．統計に基づいて学習された決定木的分類ではなく，自然分類的な情報が提示されたことの意味は大きい．カテゴリー形成による「認識」が，人間の知的機能を介してではなく，分子上に記されている情報から自動的に形成可能であることは，新たな生命解釈を与えるものになると考えられる．

DNA sequence analysis by artificial intelligence

○Jun Miyake[1], Shunsuke Baba[1], Shuya Yamamoto[2], Masato Shimabayashi[2], Seiichi Tagawa[3], Hirohiko Niioka[4]
([1]MEI Center, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., [3]OTRI, Osaka Univ., [4]Inst. Datability Sci., Osaka Univ.)

Key words artificial inteligence, deeplearning, autoencoder, DNA sequence

3Ia05 大規模実験室進化を用いた転写因子の破壊による大腸菌の薬剤耐性化の制御

○堀之内 貴明[1], 前田 智也[1], 小谷 葉月[1], 酒井 亜希[1], 古澤 力[1,2]
（[1]理研・生命機能, [2]東大院・理）
takaaki_horinouchi@riken.jp

生物システムは厳しい環境条件に対しても長期間かけて適応進化する能力を有することが知られている．生物工学分野ではこれを進化工学として利用し，有用微生物の育種などに適用している一方で，近年社会問題化している薬剤耐性菌の出現は，抗菌剤に対する細菌の適応進化とみなすことができる．生物システムの適応進化を自在に制御できれば，こうした生物工学や医学分野の諸問題に大きく貢献することができる．

実験室内で長い世代を経させる実験室進化は，次世代シーケンサーなどの解析技術と組み合わせることで，適応進化過程の直接的な解析を可能とする手法として近年注目を浴びている．我々の研究グループではこれまでに，こうした実験室進化を全自動で大規模に実施できる全自動培養装置を開発してきた(Ref.).
本研究ではこのシステムを用い，細胞への様々な摂動が適応進化過程にどのような影響を及ぼすのかを解析するために，大腸菌の一遺伝子破壊株（Keio collection）を用いて抗菌剤存在下における実験室進化を行った．大腸菌の主要な転写因子約 170 遺伝子を題材とし，各破壊株を抗菌剤の存在下で継代培養し，それぞれの株の薬剤耐性化過程を観察したところ，薬剤耐性化が阻害される株を多数スクリーニングすることに成功した．さらなる解析により，薬剤耐性化が阻害される原因の一端として，薬剤耐性化因子（多剤排出ポンプなど）と他の遺伝子との間の負の相互作用が関係していることが示唆された．現在，そのメカニズムの詳細な解析を進めており，本発表ではその内容について報告する．

(Ref.) Horinouchi *et al*., Sci. Rep., 7, 14009, 2017.

Control of *Escherichia coli* antibacterial resistance by deletion of transcription factor using high-throughput experimental evolution

○Takaaki Horinouchi[1], Tomoya Maeda[1], Hazuki Kotani[1], Aki Sakai[1], Chikara Furusawa[1,2]
([1]BDR, RIKEN, [2]Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)

Key words evolutionary engeneering, antibacterial, Keio collection, *Escherichia coli*

3Ia07 機械学習を用いた機能性ペプチド探索手法の開発

○山下 春来[1], 藤谷 将也[2], 清水 一憲[1], 蟹江 慧[2], 加藤 竜司[2], 本多 裕之[1,3]
（[1]名大院・工, [2]名大院・創薬, [3]名大予防早期医療創成セ）
honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景・目的】
ペプチドは機能性食品，医薬品などの有効成分として注目されている．しかし，20 種類の天然アミノ酸の組み合わせから成るペプチドは，例えば 8 残基で 20^8 ＝ 256 億種類と莫大な多様性を持つため，網羅探索が非常に難しい．このため，機能性を持つペプチドを効率よく探索できる方法論の確立が強く求められている．本研究では，ペプチド中のアミノ酸の特徴量(電荷，疎水度など)を変数とする機械学習を用いて機能性ペプチドの探索手法の開発を試みた．
【方法】
本研究では，アミラーゼ・グルコシダーゼの両方を阻害する「食後高血糖改善ペプチド:GHWYYRCW」を対象とした．このペプチドの 1 残基置換体 153 種のアミラーゼ・グルコシダーゼ阻害活性を教師データとして，24 種のアミノ酸物性値(電荷，疎水度など)と 5 つのペプチド物性値を合わせた 120 の変数を用いた機械学習を行った．その後，10108 種類の GHWYYRYW2 残基置換ペプチドの中で高活性と予測された配列，ランダムに抽出した配列各 30 個を「ペプチドアレイ技術」を用いて合成し，アミラーゼ・グルコシダーゼ阻害活性を評価した．
【結果】
両酵素の活性が，GHWYYRYW 添加よりも有意に低下する（0.8 倍以下）ペプチドを高活性配列と定義した．ランダム抽出では高活性ペプチドが 1 つしか得られなかった．それに対して，機械学習で高活性ペプチドを予測した場合では 29 個の高活性ペプチドを取得することに成功し，その精度は 97%（=29/30）に達した．よって，アミノ酸物性値を変数とした機械学習を用いる今回の方法は，高活性ペプチドの探索に非常に有効である．

Development of functional peptide search method using machine learning

○Haruki Yamashita[1], Masaya Fujitani[2], Kazunori Shimizu[1], Kei Kanie[2], Ryuji Kato[2], Hiroyuki Honda[1,3]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [3]PME. Nagoya Univ.)

Key words peptide, amino acid, bioinformatics

3Ia08 細胞形態情報解析における情報コンテントの重要性

○加藤 寛之, 藤谷 将也, 蟹江 慧, 加藤 竜司
（名大院・創薬）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

創薬研究において，化合物ライブラリから標的分子に効果がありそうな化合物を選別し，リード化合物を探索する過程を創薬スクリーニングと呼ぶ．近年，スクリーニング系の中で，細胞の表現型に着目した Phenotype-based screening が非常に注目されている．Phenotype-based screening は細胞の挙動に基づいて化合物を評価することで生体内に近い情報が得られ，これまでに画期的な新薬が数多く得られている．しかし，こうした手法の多くは簡易なアッセイ法から得られる情報が用いられていることや，細胞破壊的評価から得られる情報を用いるため，遅延毒性や長期の薬剤効果といった化合物の経時的効果を検出できないといった課題があった．
本研究室では，位相差画像を用いて経時的に撮影を行うことで，非破壊的かつリアルタイムに細胞形態情報を取得し，そこから得られる高次元形態情報を用いて，抗がん剤の作用機序をプロファイリングする技術を開発してきた．創薬探索の評価において，手法としての堅牢性の獲得は重要であるが，これまで細胞画像から得られる「形態情報」がどれだけの情報量を有しており，どれだけの情報コンテントを有しているかを定量的に評価した例は少ない．本研究では，様々な撮影条件などで変化する細胞形態情報の情報コンテントについて分析を行い，より堅牢な薬剤評価を行うための細胞形態情報の活用方法について報告を行う．

Analysis of information content of cellular morphological information

○Hiroyuki Kato, Masaya Fujitani, Kei Knie, Ryuji Kato
(Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

Key words information content, cell morphology, phenotype-based screening, image analysis

3Ia09 細胞形態情報解析を応用した神経系細胞の非侵襲的評価

○今井 祐太, 藤谷 将也, 寺澤 摩周, 岡田 真衣, 蟹江 慧, 加藤 竜司
（名大院・創薬）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

近年の細胞培養技術の発展から，様々なヒト細胞が創薬開発の現場で広く応用されるようになってきている．特に創薬探索において，ヒト細胞の表現型に着目したスクリーニング法は，標的などの分子のみに着目したスクリーニング法に比べて First-in-class の医薬品開発成功率が高いとされ，注目を集めている．また創薬開発の対象としてアルツハイマー病などに代表される神経疾患は，アンメット・メディカル・ニーズの重要な対象の一つであり，神経系の細胞を用いた有効な評価系の構築が求められている．
神経系の細胞は培養環境にデリケートであり，集団内のヘテロ性が高く集団全体の分化効率が低い．即ち，細胞集団としての薬剤応答にバラツキが大きく，集団全体のバルク評価結果を用いては薬剤感受性などの評価が難しいという課題がある．また，神経疾患の治療薬における副作用の評価などには，長期曝露における応答性評価が重要であるが，マーカー染色などによる侵襲的なエンドポイントアッセイでは，その評価が一面的になってしまうという課題もあった．これまで我々のグループでは，細胞形態の経時変化情報を顕微鏡画像から抽出し，高次元のリアルタイム計測データとして情報解析することで，リアルタイムかつ早期に薬剤応答性を評価できる非侵襲的細胞評価技術を提案してきている．画像解析では，ヘテロ性の高い集団内の「特徴的な形態を示す細胞」などの部分的集団の定量評価や，長期間の経時的応答の数値化を行えることが強みである．本研究では，この細胞画像情報解析技術を応用し，神経系細胞の保護機能を持つ天然物由来化合物分子の評価を行い，細胞形態情報からヘテロ性の高い細胞集団の評価を行う手法の開発を行ったのでこれを報告する．

Morphology-based non-invasive analysis for neural cell-based assays

○Yuta Imai, Masaya Fujitani, Mashu Terasawa, Mai Okada, Kei Kanie, Ryuji Kato
(Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

Key words amyloid, drug delivery system, neural stem cell, high-throughput screening

3Ia10 ファンクショナルセロミクスによる神経ネットワークのハイスループットアノテーション

○山内 悠至 [1], 松倉 秀典 [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

記憶や学習といった生物の高次生命現象は，神経ネットワークによって生み出されており，そのメカニズムの解明と応用へのチャレンジが必要である．
オプトジェネティクスにより神経活動と高次生命現象との関連性を検証することは可能になったが，解析対象となるニューロンを予め決定しなければならず，実験に仮説を必要とし，完全に新規な発見が得られにくいという欠点がある．また，仮説毎に異なる変異体も作成しなければならないためロースループットであるという問題も存在する．
そこで我々は，従来のオプトジェネティクスとは相補的な Functional cellomics の開発を行った．本新規手法では，仮説を必要とせず，ハイスループットで神経ネットワークの機能解析を行うことができるという利点がある．重要な点は，神経ネットワークを構成する各シングルセルのニューロンにおいて，オプシンを確率的に発現させることである．具体的には，Cre/lox システムを応用することで，おプシンの発現パターンがランダム化された線虫 *Caenorhabditis elegans* の生物集団を取得できる．この集団に対して光操作を行うことで一度に様々な表現型を示す個体が得られる．特徴的な表現型を示した個体に対し，どのニューロンがオプシンでラベリングされていたかどうかを後から調べることで，表現型とニューロンの関係を網羅的に探索することができる[1].
そこで，線虫 *C. elegans* に，オプシンをまずランダムに発現させ，更に，ランダム化集団を用いて，産卵行動を司るニューロンとされている HSN ニューロンの機能をハイスループットに同定することに成功したので，それらをまとめて報告する．

[1] Aoki *et.al* submitted

High-throughput annotation of neural networks by development of functional cellomics

○Yuji Yamauchi[1], Hidenori Matsukura[1], Wataru Aoki[1,2], Mitsuyoshi Ueda[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]PRESTO, JST)

Key words *Caenorhabditis elegans*, neural network, single-cell analysis, Optogrnrtics

3Ia11 マウスのにおい学習実験における引き返し行動とおよび自発的不正解選択の関係

○滝口 昇 [1,2], 矢野 達也 [3]
（[1]金沢大・理工, [2]金沢大院・自科, [3]松本工業高等学校）
tackey@se.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】Y 字迷路を用いたマウスのにおい学習・識別行動の解析から，難易度の高い課題ほど識別能に多様性が表出する事がわかってきており，これまで人工的なノイズとして解析から除外される傾向にあった個体差が，単なるノイズと考えるべきではないことが示唆されている．本研究では，マウスのにおい学習行動のビデオイメージング解析をおこない，引き返しおよび自発的な不正解選択行動が，においの学習効率に与える影響について検討を試みた．
【実験方法】におい学習データとして，Y-maze Assay による Isoamyl Acetate（以下 IA）の学習時データを用いた．オペラント条件付けの実験手続きにより，23 時間絶水条件下で，水を報酬として IA のにおいを学習させた．学習中のマウスの行動はビデオカメラで撮影し，自家製の解析ソフト(Image Processing Creator) を用いて 1/30 sec 間隔でマウスの位置を取得し，引き返しおよび自発的と思われる不正解選択についてパラメータを抽出した．
【結果と考察】連続した 24 試行からなるセッションを 1 日 1 回行ったところ，正答率は徐々に向上し，マウスは約 3 週間で 80%以上の正答率を示すようになった．第 1,5,10,17,20 セッション（S）のビデオデータを用いて引き返し回数をカウントしたところ，5S から 17S にかけて，引き返し回数が 1S の 2 倍以上になった．一方，学習が完了した 20S では 1S よりも低下していた．各セッションにおける”引き返して正解”と”引き返して不正解”の割合を見てみると，5S まではほぼ同数であったが，10S 以降”引き返して正解”が多くなっていった．以上の結果から，マウスは学習が進むに従って自発的に不正解を選択する傾向があること，また，このことが学習効率を向上させている可能性が示唆された．

本研究は H29 年度 JST グローバルサイエンスキャンパス事業の支援により実施されました．

Effects of the return behavior and the intentional selection of incorrect answer on the odor learning of mice

○Noboru Takiguchi[1,2], Tatsuya Yano[3]
([1]Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [3]Matsumoto Technical High School)

Key words olfactory processing, odor learning, learning efficiency, mouse

3Ka01 メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* 合成生物学によるグルカル酸の高発酵生産

○幅田 亜香莉 [1], 由里本 博也 [1], 山本 恭士 [2], 湯村 秀一 [2], 阪井 康能 [1]
（[1]京大院・農, [2]三菱ケミカル）
ysakai@kais.kyoto-u.ac.jp

【目的】グルカル酸は果物や野菜に含まれている酸性糖質であり，機能性食品素材として利用されるだけでなく，2004 年には米国エネルギー省によってバイオリファイナリー基幹物質に定められ，新規ポリマー原料や化成品中間体としての大型用途が期待される化合物である．本研究では，酸耐性を有するメタノール資化性酵母 *Candida boidinii myo*-イノシトール高生産性変異株による合成生物学的手法によるグルカル酸のグルコースからの直接発酵生産を目的とした．
【方法・結果】*myo*-イノシトールからグルカル酸への変換反応を触媒する 2 種の酵素，*myo*-イノシトールオキシゲナーゼ（MIOX）およびウロン酸デヒドロゲナーゼ（Udh）をそれぞれ His タグを付加して *C. boidinii* で発現させたところ，Udh 活性は認められたものの，MIOX 活性は検出できず，ウエスタンブロット解析により MIOX が不溶化していることが示唆された．MIOX の可溶性発現のために，MIOX を Udh との融合タンパク質として発現させることにより，融合タンパク質の可溶性発現に成功した．MIOX-Udh 発現株をグルコース培養したところ，培養上清中に著量のグルカル酸生産を確認した．グルカル酸生産能の高い形質転換株を選抜するため，His タグを付加していない Udh-MIOX 融合タンパク質の発現株について培地中グルカル酸量を定量し，特に高いグルカル酸生産能を示す株を取得し，さらにこれを親株としてゲノムへのランダム挿入変異を導入し，グルカル酸高生産株（AHC006-16 株）を取得した．AHC006-16 株を用いたミニジャー培養により，グルコースを原料としたグルカル酸の数 g/L レベルでの高生産に成功した．

High-level production of glucaric acid by synthetic biology in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*

○Akari Habata[1], Hiroya Yurimoto[1], Yasuhito Yamamoto[2], Shuichi Yunomura[2], Yasuyoshi Sakai[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Mitsubishi Chemical)

Key words methylotrophic yeast, heterologous production, metabolic engineering, *Candida boidinii*

3Ka02 Combinatorial biosynthesis in engineered yeast of morolic acid: a promising lead compound for anti-HIV drug development

○Pisanee Srisawat, Ery Odette Fukushima, Shuhei Yasumoto, Hikaru Seki, Toshiya Muranaka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Morolic acid derivatives show promising anti-HIV activities. Large amount of morolic acid is required for further drug development, however, chemical synthesis of morolic acid requires 11 steps from betulin, a plant-derived triterpenoid, with a total yield of 24%. Recently, morolic acid biosynthesis was reported in apple (*Malus domestica*). Oxidosqualene cyclase (OSC) MdOSC4 produces germanicol, which is oxidized by C-28 oxidase CYP716A175 to produce morolic acid. MdOSC4 is a multifunctional OSC that besides germanicol produces β-amyrin and lupeol at a ratio of 82:14:4. When MdOSC4 is co-expressed with CYP716A175 in a heterologous system, they produced small amount of morolic acid and several side-products. Therefore, a specific germanicol synthase may enhance morolic acid production in heterologous systems. We found that *Bauhinia forficata* (Brazillian orchid tree) accumulates germanicol and morolic acid in its leaves. We cloned several *B. forficata OSCs*, and found that BfOSC2 produced germanicol and β-amyrin at a ratio of 95:5. We co-expressed BfOSC2 with sugar beet CYP716A49, a previously identified C-28 oxidase with high catalytic activity, in engineered yeast and successfully produced morolic acid. These results strongly suggest that morolic acid can be simply produced by combinatorial biosynthesis in engineered yeast. This production method would facilitate further development of morolic acid based anti-HIV drugs.

Combinatorial biosynthesis in engineered yeast of morolic acid: a promising lead compound for anti-HIV drug development

○Pisanee Srisawat, Ery Odette Fukushima, Shuhei Yasumoto, Hikaru Seki, Toshiya Muranaka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Combinatorial biosynthesis, Morolic acid, Oxidosqualene cyclase, Engineered yeast

3Ka03 脂質生産酵母 *Lipomyces* を利用した再生可能資源からのバイオディーゼル用脂質生産における実験上の問題点とその解決

○柳場 まな, 松本 美穂, 長沼 孝文
（山梨大院・医工総）
tnaganuma@yamanashi.ac.jp

【背景と目的】 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があり，その脂質は二酸化炭素の蓄積抑制が可能なバイオディーゼルの原料として利用できる．我々は再生可能資源を用いて本酵母による燃料用脂質の実用生産を目指して，以下のテーマを設定して研究を開始した．「再生可能資源に対応した脂質高蓄積能力株の取得，液体培養法で脂質高蓄積能力が発揮できる培養条件の確立，菌体内脂肪球中の脂質が効率良く回収できる方法の開発」
本報告では，実験を行っていく際に発生した問題点とその解決について検討した結果を発表する．
【結果と考察】再生可能資源と菌株数および培養温度を組み合わせると約 15,000 通りのスクリーニング系列となった．そのため，脂質蓄積能力を効率良く判定したり，それ用の培養方法についての開発が必要であった．今回利用した顕微鏡写真による脂肪球の大きさを測定する方法は，低コストで簡便に脂質蓄積能力を判定することができた．また，プレート培養法は 1 プレート当たり 6 菌株が小スペース下で培養できる良い方法であったが，大量培養のための液体培養法に移行するには培地成分濃度の変更が必要であることが分かった．
再生可能資源として想定したものは，入手困難や培地化に問題があった．デンプンを含むものでは，糊化が液体培地化を困難にしたがデンプン変性と滅菌状態について詳細に検討することで培地化が可能になった．
菌体内脂肪球中の脂質回収においては，脂肪球直径が 10μm 程度しかないこと，膜が強固であること，抽出有機溶媒量を低減することなどを考慮することが要求された．顕微鏡下で観察された大型脂肪球からは，簡単な圧力で脂質が漏出し易い現象をもとに新たな脂質漏出回収法について検討を行っている．

Examination of method and material for lipid accumulation of yeast *Lipomyces*

○Mana Yanagiba, Miho Matsumoto, Takafumi Naganuma
(Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

Key words *Lipomyces*, screening method, lipid accumulation, renewable resource

3Ka04 鉄硫黄タンパク質高活性化に基づくキシロースからの 1,2,4-ブタントリオール生産技術の開発

○湯川 貴弘, 番場 崇弘, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦
（神戸大院・科技イノベ）
akondo@kobe-u.ac.jp

1,2,4-ブタントリオール (BT) は，様々な医薬品や化成品の原料として利用できる．また，BT をニトロ化することで得られる 1,2,4-ブタントリオールトリナイトレートは，ロケットの推進剤としての利用や，ニトログリセリンの代替品として利用することができる．本研究では酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて BT 生産を試みた．*S. cerevisiae* は，細胞構造が頑強で種々の発酵ストレスに対する耐性が高く，工業スケールでの物質生産に適していると考えられる．
BT はキシロースから 5 段階の反応によって変換され，我々は既に BT 生産経路を *S. cerevisiae* に導入することにより，BT を生産できること確認している．しかしながら，*S. cerevisiae* における BT 生産の大きな課題として，中間生成物であるキシロネートが多量に蓄積することが挙げられる．原因として，キシロネートを BT 生産経路の次の化合物 2-ケト-3-デオキシ-キシロネートへと変換する酵素であるバクテリア *Caulobacter crescentus* 由来の鉄硫黄タンパク質 XylD の活性が十分でないことが考えられる．酵母内ではバクテリア由来の鉄硫黄タンパク質の多くは活性が非常に低いことが報告されている．本研究では酵母の鉄硫黄クラスターの合成，および鉄の取り込みや代謝に関わる遺伝子の破壊や過剰発現を行うことで，XylD の活性強化を試みた．その結果，鉄硫黄クラスターを小胞体の表層に隔離するタンパク質である Tyw1，あるいは鉄の取り込みを制御するタンパク質である Bol2 が XylD の活性に大きく関わっていることが明らかとなった．特に *BOL2* を破壊した株では，破壊する前の株と比較して XylD の活性は 2.6 倍に向上し，10 g/L のキシロースから 1.71 g/L の BT を生産することに成功した（対糖収率 24.1 %）．また，この株を用いて稲わらの水熱処理物を原料に同時糖化発酵を行ったところ，BT を 1.27 g/L 生産することに成功した．

Development of a 1,2,4-butanetriol production process from xylose based on improvement of an iron-sulfur protein

○Takahiro Yukawa, Takahiro Bamba, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Iron-sulfur protein, 1, 2, 4-Butanetriol, D-xylose

3Ka05 酵母 *Scheffersomyces stipitis* を用いたレスベラトロール生産プロセスの開発

○小林 優真, 猪熊 健太郎, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦
（神戸大院・科技イノベ）
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

【背景および目的】レスベラトロールはポリフェノールの一種で，高い抗酸化力や細胞の老化抑制効果をもち，サプリメントや食品添加物として利用されている．現在，その生産は植物からの抽出に依存しているが，近年の需要拡大に伴い，収量の不安定な植物資源に依存しないより安価で安定した生産方法として，組換え大腸菌や組換え酵母 *Saccharomyces cerevisiae* などの微生物を用いてレスベラトロールを生産する研究が報告されている．我々はレスベラトロール生産の新たな宿主として酵母 *Scheffersomyces* (*Pichia*) *stipitis* に着目した．この酵母は，幅広い糖類に対する資化能を持ち，*S. cerevisiae* が利用できないキシロースや *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）を炭素源として利用できる．キシロースや GlcNAc は未利用資源である木質系バイオマスやキチン系廃棄物の構成成分で，その有用な利用方法の開発が求められている．本研究では，これら未利用資源の新規価値創造を目指した *S. stipitis* による未利用資源由来単糖からのレスベラトロール生産プロセスの開発を行った．
【方法および結果】*S. stipitis* にレスベラトロール生産能を付与するため，*Herpetosiphon aurantiacus* 由来 Tyrosine ammonia-lyase，*Arabidopsis thaliana* 由来 4-coumaroyl-CoA ligase，*Vitis vinifera* 由来 resveratrol synthase をコードする遺伝子を *S. stipitis* NBRC10063 *URA5* 欠損株に導入した Ss003 株を構築した．Ss003 株を用いて 50 g/L グルコースを単一炭素源とし，30℃にて微好気発酵をおこなったところ，96 時間後に 42 mg/L のレスベラトロールを生産した．次に 50 g/L GlcNAc を単一炭素源とし，30℃にて微好気発酵を行ったところ，48 時間後に 6 mg/L 検出されたレスベラトロールは 96 時間後には検出されなかった．炭素源の違いがレスベラトロール生産に影響を及ぼすことを明らかにした．

Development of resveratrol production process using a recombinant *Scheffersomyces stipitis* strain

○Yuma Kobayashi, Kentaro Inokuma, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words yeast, Aromatic compound, Resveratrol, *Scheffersomyces* (*Pichia*) *stipitis*

3Ka06 出芽酵母 2,3-ブタンジオール生産に向けた不活性型 Cas9 によるエタノール生合成経路の抑制

○森田 啓介[1], 松田 史生[1], 石井 純[2], 近藤 昭彦[2], 清水 浩[1]
（[1]阪大院・情報, [2]神戸大院・科技イノベ）
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の代謝を改変し，様々な有用物質を高効率に生産するには，活発なエタノール発酵を抑制する必要がある．しかし，エタノール生合成経路のアルコール脱水素酵素遺伝子やピルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) 遺伝子を多重破壊した株では，増殖能とグルコース資化能が低下する課題がある．そこで本研究では，不活性型 Cas9 (dCas9) を用いた *PDC1* 遺伝子の発現抑制系を構築し，エタノール発酵の抑制と，2,3 ブタンジオール (23BD) 生産能力向上を目指した．
【方法】形質転換体は出芽酵母 BY4742 野生株および YPH499 株の *PDC5*，*PDC6* の 2 重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 20 g/L グルコース SD 培地で行い，培溶液中の 23BD 濃度をガスクロマトグラフィーで測定して発酵能を評価した．
【結果】出芽酵母のアルコール発酵に関わる *PDC1* の発現を dCas9 によって阻害する遺伝子発現系の構築を試みた．まずは *PDC1* プロモーター (P_{PDC1}) 上への dCas9 の最適な結合箇所を特定するため，P_{PDC1} と赤色蛍光タンパク (RFP) 遺伝子を組み合わせた発現カセットを構築し，出芽酵母 BY4742 株に導入した．dCas9 と 9 種類のガイド RNA をそれぞれ発現させた株の RFP 蛍光強度を比較した結果，開始コドンから 300bp 付近に dCas9 を結合させた株で RFP 蛍光強度が最も減少した．そこで，3 つの PDC 遺伝子 (*PDC1*，*PDC5*，*PDC6*) のうち *PDC5* および *PDC6* を欠損させた出芽酵母 YPH499 株にこの遺伝子発現カセットと，23BD 生産経路関連遺伝子を導入した株を構築した．発酵性試験の結果，dCas9 の発現系を導入していないコントロール株では 23BD をほとんど生産しなかったのに対し，発現系を導入した株では 197.4±14.7 mg/L の 23BD 生産を達成した．

Regulation of ethanol biosynthetic pathway in yeast for 2,3-butandiol production by inactive Cas9 system

○Keisuke Morita[1], Fumio Matsuda[1], Jun Ishii[2], Akihiko Kondo[2], Hiroshi Shimizu[1]
([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol production, 2, 3-butanediol, inactive Cas9 system

3Ka07 T7 発現系を応用したプラスミドフリーで誘導剤が不要なフェニルアラニン高生産菌の開発

○岸田 隆寛[1], 駒 大輔[2], 大橋 博之[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】代謝工学や合成生物学を基盤とする菌株育種では，プラスミドにより宿主に遺伝子を導入して高発現させる手法がよく用いられる．しかし，プラスミド維持に使われる抗生物質は培養コスト増加の原因となる．そこで，遺伝子を染色体 DNA に直接導入して高発現させることに取り組んできた（プラスミドフリー化）．染色体への遺伝子導入では，プラスミドと比較してコピー数が少ないために，高活性な T7 発現系を利用してきた．しかし，発現誘導剤として用いられるイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) は非常に高価であり，実生産での使用には適していない．そこで，本研究では IPTG を必要としない T7 発現系を構築した．さらに構築した発現系を応用し，IPTG 誘導型のフェニルアラニン（Phe）高生産菌を IPTG を必要としない Phe 高生産菌へと改変することを試みた．
【方法および結果】構成性の *tyrR* プロモーターに T7RNA ポリメラーゼ（T7RP）遺伝子を連結し，大腸菌 BW25113 株 (*lacZ* 欠失株) の染色体 DNA に導入することで，構成的に T7RP を発現する菌株を作製した．つぎに，T7lac プロモーターに連結した *lacZ* を染色体に導入し，さらに *lacI* 遺伝子を欠失させたところ，構成的な *lacZ* 遺伝子の高発現が確認された．
大腸菌 MG1655 株を宿主として作製した Phe 高生産菌 M-PAR-116 株（IPTG 誘導下でシキミ酸経路の 8 種類の遺伝子を高発現する株）に構築した発現系を応用したところ，IPTG 無添加条件でも Phe が高生産された．リアルタイム PCR による転写解析の結果から，8 種類の遺伝子は IPTG 無添加条件でも MG1655 株の数十倍転写されていた．また，Phe の収率および比生産速度は IPTG 誘導型の M-PAR-116 株よりも高かった．

Generation of plasmid-free and inducer-free phenylalanine producing *Escherichia coli* by application of T7 expression system

○Takahiro Kishida[1], Daisuke Koma[2], Hiroyuki Ohashi[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 plasmid, IPTG, phenylalanine, T7

3Ka08 大腸菌の NADH 脱水素酵素 I とシトクロム *bo₃* オキシダーゼ両欠損株における NDH-II 過剰発現が中枢代謝に与える影響

○濱田 和宏, 瀬島 祐大, 吹谷 智, 和田 大, 横田 篤
（北大院・農）
wada@chem.agr.hokudai.ac.jp

【研究背景】大腸菌の呼吸鎖は酸化的リン酸化による ATP の合成や NADH の再酸化に関与し，細胞内のエネルギーレベル（ATP/ADP）や酸化還元バランス（NAD^+/NADH）を通じて中枢代謝に影響を与えている．しかし，呼吸鎖と中枢代謝の相互関係は不明な部分が多く，発酵生産菌育種のための基盤知見として更なる理解が求められている．当研究室では，呼吸鎖酵素のうちプロトン駆動力形成能が高い NADH 脱水素酵素 I（NDH-I）とシトクロム bo_3 オキシダーゼ（Cyt*bo*）の二重欠損株（ΔΔ 株）を用いて ATP 形成効率の低下が中枢代謝に与える影響を調べた．その結果，エネルギーレベルの低下と NADH の蓄積による菌体内の還元化が観察され，50 g/L のグルコースを含む無機塩発酵培地で，7 g/L ものグルタミン酸（Glu）が生成していた．この Glu の生成に関するメカニズムは未だ明らかとなっていない．そこで，本研究では酸化還元バランスに着目し，その変化による Glu 生成などの代謝変化を解析して，呼吸鎖と中枢代謝の関連についての基盤知見の獲得を目的とした．
【方法と結果】 NADH 酸化能を強化するため，プロトン駆動力形成能をもたない NDH-II のプラスミドによる過剰発現株（NDH+株）を構築した．*Escherichia coli* W1485（野生株）と ΔΔ 株，NDH+株についてジャーファーメンターによるバッチ培養を行った． IPTG を添加し，NDH-II の発現を誘導した NDH+株は IPTG 無添加に比べて生育と糖消費が増加した．細胞外代謝産物ではピルビン酸や酢酸の生成量が減少し，2-オキソグルタル酸の生成量が増加した．一方で，Glu の生成は変わらず見られたため，Glu 生成には NAD^+/NADH だけでなく，別の要因も影響していると考えられた．今後は IPTG 添加のタイミングや濃度を変えて比較することで，呼吸鎖や酸化還元バランスと中枢代謝の関係についてさらに詳細に検討する予定である．

Effects of NADH dehydrogenase-II overexpression on central metabolism in an *Escherichia coli* mutant ΔNDH-IΔCyt*bo* defective in both NADH dehydrogenase-I and cytochrome *bo₃* oxidase

○Kazuhiro Hamada, Yudai Sejima, Satoru Fukiya, Masaru Wada, Atsushi Yokota
(Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words central metabolism, respiratory chain, redox balance, NADH dehydrogenase-II overexpression

3Ka09 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の低栄養生育に関与する推定トランスポーター遺伝子の機能解析

○松岡 友洋, 吉田 信行
（静大院・総合科技）
yoshida.nobuyuki@shizuoka.ac.jp

【緒言】*Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株(以下，N9T-4)は，炭素源無添加の無機塩固体培地(BM 培地)上でも良好な生育を示す超低栄養性細菌である．本菌は生育に大気中の CO_2 を要求し，その際に光などの特別なエネルギーの添加を必要としないという非常にユニークな性質を持っている．CO_2 固定経路およびエネルギー獲得機構については有効な手がかりが見つかっておらず，未だ詳細の解明には至っていない．培地成分や光をエネルギーとしないことは明らかであるため，我々は，本菌が低栄養条件下において，培養環境中に微量に存在している化合物からエネルギーを獲得していると予想した．本研究では，本菌のゲノム上に存在する機能未知の推定トランスポーター遺伝子の機能解析を行った．
【方法と結果】N9T-4 を低栄養条件(BM 培地)で培養した際，3 つの推定糖 ABC トランスポーター遺伝子が低栄養条件で特異的に高発現することが分かっている．そこで，それぞれの基質結合タンパク質をコードする遺伝子(*sbp1*，*sbp2*，*sbp3*)の欠損株を作製し，BM 培地を用いて，親株と遺伝子欠損株の生育試験を行った結果，1 つの遺伝子欠損株(*Δsbp1*)で，親株と比較して顕著な生育の低下が認められた．この結果から，*sbp1* は本菌の低栄養条件下での生育に重要な遺伝子であることが示唆された．さらに，それぞれの欠損株の細胞内トレハロース含量，トレハロース資化性の検討から，これらのトランスポーターはいずれもトレハロースの輸送に関与している可能性が示された．*Mycobacterium* 属細菌 においては，トレハロースは細胞質で生合成された細胞膜の構成成分を細胞外に放出する際のキャリアとして機能し，このとき細胞外に放出されるトレハロースのリサイクルシステムとしてトランスポーターが機能すると報告されており， N9T-4 においても同様の機構を持つことが示唆された．

Functional analysis of putative transporter genes involved in oligotrophic growth of *Rhodococcus erythropolis* N9T-4

○Tomohiro Matsuoka, Nobuyuki Yoshida
(Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words *Rhodococcus*, oligotroph, transporter, trehalose

3Ka10 フェノールが大腸菌の中枢代謝に及ぼす影響の解析

○北村 さや香, 戸谷 吉博, 清水 浩
（阪大院・情報）
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】フェノールは樹脂等の原料に利用される有用化合物であり，微生物による発酵生産が望まれる．しかし，大腸菌などの汎用宿主微生物ではフェノールの毒性により細胞増殖が抑制されるため生産性が低いという課題がある．また，フェノールは有害な環境汚染物質であり，微生物を利用した環境浄化が注目されている．フェノール生産微生物創製や環境浄化に向けた微生物利用においても，耐性能の強化は重要な課題である．本研究ではモデル微生物の大腸菌について，フェノールが代謝に及ぼす影響を解析し，増殖抑制の原因を調べた．
【方法】大腸菌野生株 BW25113 を[1-^{13}C]グルコースを炭素源とする合成培地を用いて回分培養した．培養液には 0%, 0.1%, 0.15%のフェノールを添加した．培養液の代謝物濃度とアミノ酸の ^{13}C 濃縮度は HPLC と GC/MS を用いて測定した．代謝経路の数理モデルを用いて，実測した ^{13}C 濃縮度を説明するフラックスを推定した．
【結果と考察】大腸菌野生株を異なるフェノール濃度で培養したところ，比増殖速度は 0.1%と 0.15%フェノール存在下において，各々 22%と 42%低下した．フェノール濃度の増加につれて，酢酸合成フラックスが増加し，0.15%フェノール添加時は無添加時の約 1.8 倍であった．一方，0.15%フェノール添加時の TCA 回路のフラックスは無添加時の約 3 割に低下した．フェノール添加時にエタノールや乳酸が生産されなかったことから，フェノール存在時にも呼吸は働いていると考えられた．また，酢酸合成経路の遺伝子を破壊したところ，フェノール濃度 0.15%で増殖できないことが確認された．これらの結果から，フェノールはアセチル CoA から α ケトグルタル酸の間の反応を阻害し，余剰なアセチル CoA が酢酸として排出されたと推察された．

Effect of phenol on the central carbon metabolism in *Escherichia coli*

○Sayaka Kitamura, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Escherichia coli*, phenol, ^{13}C-Metabolic Flux Analysis, TCA cycle

3Ka11 大腸菌の ArcA による酸素消費速度の感知システム

後野 直哉, ○戸谷 吉博, 清水 浩
（阪大院・情報）
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】
酸素は微生物における様々な有用物質の生産性に影響を与える要因である．大腸菌は酸素レベルを二成分制御系の ArcA/ArcB や Fnr を介して感知し，多数の酵素の発現量を調節する．培養液の溶存酸素濃度が同じでも，細胞の酸素消費速度は，気泡からの酸素移動速度によって左右される．このような状況において，細胞が検知する酸素レベルは同じであろうか？本研究では，ArcA に着目し，酸素消費速度と ArcA 活性の関係を評価した．
【方法】
大腸菌 BW25113 株を使用した．ArcA による発現制御を受ける icd 遺伝子のプロモーター下流に GFP 遺伝子を挿入し，プロモーター活性 ArcA(+) を測定するためのプラスミドを構築した．また，icd プロモーターの ArcA 結合部位に変異を導入し，ArcA が結合しない場合のプロモーター活性 ArcA(-) を測定し，ArcA(+) と ArcA(-)の比から転写因子活性を求めた．上記プラスミドを導入した大腸菌株を様々な酸素供給条件において連続培養し，溶存酸素濃度や酸素供給速度と ArcA 活性の関係を調べた．GFP 生産量は励起波長 485 nm，蛍光波長 535 nm における蛍光強度として測定した．
【結果と考察】
酸素供給速度の異なる連続培養の結果から，ArcA 活性と溶存酸素濃度には相関がなかったが，ArcA 活性と酸素供給速度の間に強い負の相関が見られた．ArcA のリン酸化は ArcB のリン酸化によって調節され，ArcB のリン酸化はキノンによって阻害される．すなわち，酸素消費速度に応じてキノン濃度が変化し，それを ArcA 活性に反映させることで，大腸菌は酸素消費速度を感知していると考えられる．ArcA 活性と酸素供給速度の関係は，転写制御を考慮した代謝システムのモデリングの有益な知見となるであろう．

Sensing system of oxygen consumption rate in *Escherichia coli* by ArcA

Naoya Nochino, ○Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Escherichia coli*, oxygen sensing, transcriptional regulation

3La01 PET 分解酵素クチナーゼの Ca^{2+}結合に伴う熱安定性及び構造機能解析

山上 由莉 [1], 千賀 明香音 [1], 沼本 修孝 [2], 織田 昌幸 [1],
○河合 富佐子 [3]
（[1]京府大院・生命環境, [2]医科歯科大・難研, [3]京都工繊大・繊科セ）
fkawai@kit.ac.jp

【背景と目的】 PET はプラスチック全体の 80％以上を占める汎用プラスチックの一角を占め，環境プラスチックゴミの主要因の一つである．酵素分解はゴミ処理及びリサイクルのための省エネルギー技術として期待される．*Saccharomonospora viridis* AHK190 よりクローン化したクチナーゼ Cut190_S226/R228S (Cut190*)は amorphous PET film を 65 度で分解可能であるが，さらなる耐熱性が効率的な分解には望ましい．
【方法】 Cut190*を鋳型として Ca^{2+} 結合部位変異体を作成し，大腸菌発現系により発現精製した．酵素活性は polyethylene succinate-*co*-adipate (PBSA)を基質として測定した．熱安定性は円偏光二色性(CD)スペクトル及び蛍光分析により，変性中点温度(T_m)を算出した．また，Cut190*及び変異体を用いて各種 PET film の分解を確認した．
【結果と考察】Cut190*の結晶構造(PDB ID: 5ZNO)で 3 つの Ca^{2+}結合の認められた部位をそれぞれ sites 1-3 とした．これらの Ca^{2+}結合に関与するアミノ酸変異体の解析により，活性化及び熱安定性との関連性を結論づけた．また，site2 への S-S 結合は顕著な T_m 増加をもたらした．他方，deamination による不安定化の原因になる Gln 及び Asn を Glu, Asp, His に変異することで T_m が増加した．これらの変異を組み合わせた Cut190*M は 70 度でも数日間安定で各種 PET film を効率的に分解した．

Thermostability and structural analysis of PET-hydrolyzing enzyme Cut190 induced upon Ca^{2+}binding

Yuri Yamagami[1], Akane Senga[1], Nobutaka Numoto[2], Masayuki Oda[1],
○Fusako Kawai[3]
([1]Grad. Sch., Life Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ., [2]Med. Res. Inst., Tokyo Med. Dent. Univ., [3]Center Fiber Textile Sci., Kyoto Inst. Technol.)

Key words PET-hydolyzing cutinase, Ca^{2+}-binding sites, thermostabilization

3La02 PHA 重合酵素への親水化タグ付与がポリマー重合能へ与える影響

○原田 憲, 柘植 丈治
（東工大・物質理工）
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

【背景と目的】
近年，石油から合成されるプラスチックに代わり，糖や植物油などのバイオマス資源から微生物によって生合成が可能なプラスチックである，ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）に注目が集まっている．PHA は熱可塑性のほか，生分解性および生体適合性といった性質を備えており，環境調和型材料または医療用材料として利用することができる．PHA 重合酵素（PhaC）により触媒される重合機構の理解は，PHA の高効率生産のみならず，高性能な重合触媒の開発に関して示唆に富んだ情報となり得る．本研究では PHA 生合成の鍵酵素である PhaC に関して，親水化タグを付与することによりポリマー重合能にどのような影響を与えるのかについて検証した．

【手法】
本研究では，*Ralstonia eutropha* 由来 PHA 重合酵素（$PhaC_{Re}$）に親水化タグ（GST タグ）を付与し，遺伝子組換え大腸菌を用いた発現系及びアフィニティークロマトグラフィーにより GST-$PhaC_{Re}$ を調製した．化学合成した基質（*R*-3-ヒドロキシブチル CoA）と精製した酵素を用いた細胞外（*in vitro*）の解析と，大腸菌に GST-$PhaC_{Re}$ 遺伝子と PHA モノマー供給遺伝子を導入して PHA 合成を行う細胞内（*in vivo*）の解析を行ない，親水化タグが $PhaC_{Re}$ に与える影響を多角的に評価した．

【結果と考察】
In vitro 解析から，GST-$PhaC_{Re}$ は長い誘導期の後に，通常の $PhaC_{Re}$ と同等の重合活性を示すことが分かった．また，*in vivo* 実験においては，$PhaC_{Re}$ に GST を付加しても PHA 合成量および分子量に差異は見られなかった．これらの結果から $PhaC_{Re}$ への親水化タグの付与は，重合反応の初期に存在する PhaC サブユニットの二量体形成にのみ影響すると考えられる．

Polymerization ability of GST-tagged polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase

○Ken Harada, Takeharu Tsuge
(Dept. of Materials Sci. and Eng.,TokyoTech)

Key words PHA synthase, GST-tag, dimerization

3La03 *Citrobacter* sp. S-77 由来の新規[NiFe]ヒドロゲナーゼの構造遺伝子と水素活性化機構

○尹 基石 [1,2,3], 小江 誠司 [1,2,3]
（[1]九大・WPI-I2CNER, [2]九大院・工・応化, [3]九大・小分子エネルギーセ）
yoon@i2cner.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】 ヒドロゲナーゼは，水素分子をプロトンと電子への分解反応とその逆反応の水素生成を触媒する金属酵素であり，その優れた触媒反応は燃料電池の水素極触媒等として応用が期待される．しかし，「標準型 NiFe ヒドロゲナーゼ」は高い活性を示すが，酸素に不安定である．一方で，「酸素耐性型[NiFe]ヒドロゲナーゼ」は高い酸素安定性を示すが酵素活性が低い欠点がある．発表者らは，阿蘇くじゅう国立公園から *Citrobacter* sp. S-77 を単離し，高い水素酸化活性と酸素安定性を示す新規ヒドロゲナーゼ（[NiFe]S77）を精製し，その特性解析を行っている．本研究では，[NiFe]S77 の水素活性化機構とその新規電子伝達系の解明を目指した．
【方法と結果】 *Citrobacter* sp. S-77 株から高い触媒活性と酸素耐性を示す[NiFe]S77 を精製し，その特性解析を行った．本酵素は，酸素耐性酵素として研究されている HYD1 と類似した生化学的な特性を示す．しかし，ゲノム解析の結果，本酵素は酸素感受性の HYD2 と同様な 4 量体の構造遺伝子（HybC と HybO に HybB と HydA）によって構成されている．我々は，これまでにヘテロ 2 量体酵素（NiFe 活性大サブユニットと電子伝達の小サブユニット）のタンパク質結晶化に成功し，その詳細な X―線構造解析と触媒反応機構の解明を進めている．本発表では，これまでに得られた知見を基に，生物の進化的な観点からヒドロゲナーゼの水素活性化機構を考察する．

Structural genes and hydrogen activation of [NiFe]hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77

○Ki-Seok Yoon[1,2,3], Seiji Ogo[1,2,3]
([1]1WPI-I2CNER, Kyushu Univ., [2]Dept. Chem. Biochem., Grd. Sch. Eng., Kyushu Univ., [3]sMol, Kyushu Univ.)

Key words [NiFe]hydrogenase, hydrogen activation, hydrogenase structural genes, phylogenetic analysis

3La04 ケッチェンブラックを用いた高性能バイオ電池の構築

○渡邉 好一[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・ライフセ, [4]香川大・農, [5]阪工大)
suyeb10@u-fukui.ac.jp

[緒言]酵素の触媒反応により有機資源から電気エネルギーを得るバイオ電池は，バイオマスの有用な利用法として注目されているが，実用化に向けて出力の向上が求められている．バイオ電池の出力向上のためには，電極上の酵素修飾量の増加を達成できる電極表面積の増加が必要とされている．本研究では，高い比表面積を有するカーボンナノ材料を用いた高性能バイオ電池の構築を目指した．カーボンナノ材料の中でも高い比表面積を有するケッチェンブラック (KB) に着目し，カソードに超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来のマルチ銅オキシターゼ (McoP)，アノードに超好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* 由来 L-proline 脱水素酵素 (LPDH)を用いてバイオ電池を作製し，電気化学特性の評価を行った．
[方法]LPDH および McoP をコードするプラスミドを用いて，大腸菌を形質転換し，組み換えタンパク質を得た．
カーボンペーパーにポリフッ化ビニリデン溶液に懸濁した KB を塗り，70℃で 20 時間乾燥後，プラズマ処理により親水化した後 LPDH 溶液を 100 μl 滴下し，室温にて 2 時間静置し，50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.5)で洗浄し，KB と LPDH を固定化したアノードを作製した．同様にカソードを McoP を用いて作製した．作製した電極を用いて，サイクリックボルタンメトリー (CV)およびリニアスイープボルタンメトリー (LSV)にて電気化学的特性を評価した．
[結果]アノード，カソード両者について酵素電気化学反応を行い CV を検討したところ，アノードではメディエータであるフェロセンカルボン酸の酸化還元波が+0.28 V 付近に確認され，ピーク電流密度は 1.13 mA/cm^2，カソードでは 0 V で酸素の還元波が確認され，ピーク電流密度は-0.360 mA/cm^2 であった．両デバイスを用いて電池を構築し LSV を検討したところ，開回路電位 0.28 V，最大出力 4.6 μW/cm^2 であった．

Construction of high performance biofuel cell using ketjenblack

○Koichi Watanabe[1], Hiroaki Sakamoto[1,3], Takenori Satomura[2,3], Haruhiko Sakuraba[4], Toshihisa Ohshima[5], Shin-ichiro Suye[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Eng. Fib. Fukui Univ., [2]Bio. Fukui Univ, [3]Grad. Sch. Eng. Bio. Fukui Univ., [4]Fac. Agric., Kagawa Univ., [5]Osaka Inst. Technol.)

Key words biofuel cell, carbon nanomaterial

3La05 分子揺動性を考慮した耐熱性酵素の配向固定による高性能バイオアノードの構築

○鈴木 治人[1], 高村 映一郎[2], 坂元 博昭[1,3], 里村 武範[3,4], 櫻庭 春彦[5], 大島 敏久[6], 末 信一朗[1,3,4]
([1]福井大院・工・繊維, [2]福井大院・工・総合, [3]福井大学・ライフセ, [4]福井大学院・工・生物応用化, [5]香川大・農, [6]大阪工大)
suyeb@u-fukui.ac.jp

[緒言]
酵素を触媒とするバイオ電池は環境負荷が小さい等の利点から，バイオマスの有用な利用法として注目されている．しかし，酵素の長期安定性や出力密度の問題から，実用化には至っていない．本研究室では，長期安定性を有する超高熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来の PQQ 依存性グルコース脱水素酵素（PQQ-GDH）に着目してアノード電極を作製してきた．これまでに N 末端に His-tag を付加した PQQ-GDH を用いて，酵素反応に伴う電子伝達が酵素分子内で円滑となる様に本酵素を配向固定することで無配向固定電極の 90 倍の電流密度を得ることに成功している．本研究ではさらにデバイス上での酵素の揺動に着目し，His-tag の N 末端側に Cys 残基を導入（PQQ-GDH Cys）して金電極へ酵素分子を配向固定しつつ酵素を揺動させ，デバイス上の酵素と基質との接触性を高めることで電子伝達の向上を目指した．
[方法]
Inverse PCR により His-tag の末端にシステインを導入したプラスミドを構築し，大腸菌を形質転換し，組み換えタンパク質を得た．
金電極を PQQ-GDH Cys 溶液に浸漬し，24 時間静置することで，PQQ-GDH Cys 配向固定化電極を作製した．作製した電極の評価は，3 電極方式にてサイクリックボルタンメトリー(CV)にて行った．
[結果]
PQQ-GDH 固定化電極の CV 測定を行ったところ，酵素を物理吸着させた電極では基質存在下でのメディエータであるフェロセンカルボン酸由来のピーク電流の増大は 0.0845 μA/cm^2 であったが，PQQ-GDH Cys 電極では 2.04 μA/cm^2 の増大が確認された．これは SH 基と金電極間の Au-S 結合により，金電極上に直接 PQQ-GDH を配向固定化することで酵素の触媒活性部位が基質との反応に有利な位置に配位し，さらにペプチドタグを介して酵素が電極上で揺動することで基質との接触性が高まったためと考えられる．

Construction of high performance bioanode by orientated immobilization of thermostable enzyme in consideration of molecular fluctuation

○Haruto Suzuki[1], Eiichiro Takamura[2], Hiroaki Sakamoto[1,3], Takenori Satomura[3,4], Haruhiko Sakuraba[5], Toshihisa Ohsima[6], Shin-ichiro Suye[1,3,4]
([1]Dept. Front. Fib. Tech. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [2]Dept. Syn., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [3]Life Sci. Innov., Fukui Univ., [4]Dept. Appl. Chem. Biotech., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [5]Fac. Agric., Kagawa Univ., [6]Osaka Inst. Tech.)

Key words biofuel cell, hyperthermophilic archaeon, fluctuation, oriented immobilization

3La06 電極－酵素界面における異種間電子移動の距離依存性解析

○高村 映一郎[1], 鈴木 治人[2], 中村 卓登[2], 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・ライフセ, [5]香川大・農, [6]大阪工大)
suyeb10@u-fukui.ac.jp

酵素をエネルギー変換素子とするバイオ電池（Biofuel cell:BFC）は再生可能エネルギーの一つとして注目されている．しかし，酵素の長期安定性や電池電圧が低く，未だ実用化には至っていない．電池電圧が低いことの原因として，酵素の酸化還元部位と電極間の電子移動効率の低さに起因する過電圧が挙げられる．電子移動効率の向上には酵素の酸化還元部位と電極間距離の短縮が必要である．本研究では長期安定性を有する超好熱菌 *Pyrobaculum aerophilum* 由来マルチ銅オキシダーゼ (McoP) をカソード触媒として用いた．これまでに，McoP の酸化還元部位（T1Cu）に近い C 末端へ導入した His-tag（McoP His）と電極に修飾したニトリロ三酢酸に配位させた Ni（NTA-Ni）との親和性を利用して McoP を配向固定することで，N 末端 His-tag で固定化した電極よりも過電圧が減少するという結果を得ている．本研究では，McoP His の C 末端へ導入した Cys 残基（McoP Cys）と金との Au-S 結合を利用し，McoP を電極上に直接配向固定することで NTA-Ni を用いた際より T1Cu - 電極間の距離が近い電極を作製し，電子移動効率の向上による過電圧の減少について評価した．
[方法]McoP の His-tag 末端に Cys を導入した McoP（Cys）は組換体より精製した．金電極上に McoP（Cys）溶液を滴下し，室温で 1 時間静置し，McoP（Cys）配向固定電極を作製した．各 McoP 修飾電極について，3 電極方式でサイクリックボルタンメトリー（CV）を行い電気化学特性を評価した．
[結果・考察]McoP His 及び McoP Cys を各方法で固定化した McoP 修飾電極の CV 測定を行ったところ，McoP Cys 電極では McoP His 電極に比べて酸素還元開始電位が[5]+0.1 V シフトした．これは McoP Cys を金電極に直接配向固定し NTA-Ni が不要になることで，T1Cu - 電極間の距離がより縮まり，電子移動効率が向上したためだと考えられる．

Distance dependence analysis of electron transfer between an electrode and enzyme

○Eiichiro Takamura[1], Haruto Suzuki[2], Takuto Nakamura[2], 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 cell, direct electron transfer, multicopper oxidase, oriented immobilization

3La07 GFP を融合したシリカ重合酵素の機能解析

○竹田 雄大, 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．この反応は温和な条件（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ており，機構の解明が急務である．本研究では，シリカテインの挙動を可視化し，生成シリカを追跡するために，GFP と *Suberites domuncula* 由来シリカテインの融合タンパク質（GFP-Sil）遺伝子を作製し，大腸菌を用いた異種発現を試みた．また，作製した GFP-Sil の可溶性とモリブデンブルー法による活性評価を検討した．
【方法】
GFP-Sil 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（15°C）により，発現を行った．菌体破砕を行い，緑色蛍光を帯びた封入体を回収した．変性条件下で His タグ精製を行った後，透析法（4℃，24h）により，GFP-Sil のリフォールディングを行った．精製 GFP-Sil をシリカ前駆体のテトラエトキシシラン（TEOS）と接触させ，20℃で 24h 振盪することでシリカの重合を行った．回収・凍結乾燥したシリカに，1M NaOH を添加し，ケイ酸に加水分解した後，濃度をモリブデンブルー法で測定することで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，GFP-Sil の大部分は不溶性の封入体として発現していることが分かった．変性条件下での His タグ精製及び透析法によるリフォールディングを行ったところ，GFP-Sil は可溶性画分に得られ，また水溶液中で安定に存在することが確認された．精製した GFP-Sil と TEOS を混合し，重合反応を行ったところ，薄緑色の沈殿が確認され，GFP-Sil がシリカ重合活性を有することが示唆された．生成した沈殿をモリブデンブルー法により測定したところシリカの存在が確認され，リフォールディング後の GFP-Sil はシリカ重合活性を有していることが分かった．

Function analysis of silica polymerizing enzyme fused with green fluorescent protein

○Yudai Takeda, Hidetoshi Oguri, Kazunori Nakashima, Satoru Kawasaki
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words biosilica, biomineralization, molybdenum blue method, Genetic Modification

3La08 Development of cellulose hydrogel microsphere for lipase immobilization

○Soyeon Jo, Sae Rom Park, Sang Hyun Lee
(Dept. Biol. Engn., Konkuk Univ., South Korea)
josoyeon12@naver.com

Hydrogel microspheres are micro-sized hydrogels that have high specific surface area, so they are efficient to immobilize enzymes. In this study, cellulose hydrogel microspheres were prepared by sol-gel transition method using ionic liquid as a solvent to dissolve cellulose. Prepared microspheres were used to immobilize Candida rugosa lipase by physical adsorption. To optimize the condition of microsphere formation, protein loading and specific activity of immobilized lipase were studied. Size distribution, shape regularity, and surface morphology of microspheres were characterized by optical microscopy and SEM. In order to investigate the efficiency of microsphere as enzyme support, microcrystalline cellulose powder and millimeter-sized hydrogel bead were also used for comparison. The lipase immobilized on microsphere showed the highest immobilization yield and specific activity. The kinetic constants of immobilized lipases were obtained to understand the high efficiency of microsphere. In particular, the lipase immobilized on microsphere showed significantly enhanced thermal and pH stability, compared with free lipase. To increase the reusability of microsphere as an enzyme support, cellulose/Fe3O4 hydrogel microsphere was also prepared. The lipase immobilized on cellulose/Fe3O4 microsphere could retain 70% of initial activity after 5 times reuse by the separation with magnet. This study suggests that cellulose hydrogel microspheres would have many potential applications in the biomedical, biocatalytic fields.

Development of cellulose hydrogel microsphere for lipase immobilization

○Soyeon Jo, Sae Rom Park, Sang Hyun Lee
(Dept. Biol. Engn., Konkuk Univ., South Korea)

Key words cellulose, microsphere, lipase, immobilization

3La09 Preparation of biopolymer-based hybrid hydrogel beads for enzyme immobilization

○Saerom Park, Sang Hyun Lee
(Dept. Biol. Engn., Konkuk Univ.)
sanghlee@konkuk.ac.kr

Biopolymers-based materials have inexhaustible potential in biological, environmental, and pharmaceutical fields, due to their biodegradability and biocompatibility. In this work, ionic liquid was used as a solvent for the co-dissolution of biopolymers including cellulose, chitosan, carrageenan, lignin, xylan and starch. Millimeter- and micro-sized biopolymer-based hybrid hydrogel beads were prepared by sol-gel transition. Lipase was immobilized on various millimeter-sized hydrogel beads prepared by extrusion method. The immobilized lipase showed significantly enhanced thermal and pH stability, compared with free lipase. In particular, the lipase entrapped in cellulose/xylan/lignin beads showed higher stability than the lipase adsorbed on the beads. The cellulose/biopolymer/Fe_3O_4 hydrogel microbeads were also prepared by emulsion-based method. Average diameters of microbeads were ranging from 30 to 50 μm. Lipase could be successfully immobilized on various biopolymer microbeads with higher protein loading and immobilization yield than millimeter-sized beads. Immobilization yields were ranging from 110% to 140%. Especially, the lipase immobilized on cellulose/starch/ Fe_3O_4 showed 56-folds enhanced half-life time during incubation at 50℃, compared with free lipase. Moreover, the lipase immobilized on microbeads could be easily collected by using magnet and reused with high residual activity. The biopolymer-based beads can be used to various biotechnological fields, owing to their controllable properties.

Preparation of biopolymer-based hybrid hydrogel beads for enzyme immobilization

○Saerom Park, Sang Hyun Lee
(Dept. Biol. Engn., Konkuk Univ.)

Key words ionic liquid, biopolymer, hybrid hydrogel bead, enzyme immobilization

3La10 大腸菌包括菌体によるバニリンの効率的生産プロセスの開発

○齋藤 翼[1], 青野 陸[1], 古屋 俊樹[2], 木野 邦器[1,2]
（[1]早大院・先進理工・応化, [2]早大・理工総研）
kkino@waseda.jp

【目的】バニリンは産業上有用な香料化合物であり，バニラビーンズからの抽出法と化石資源からの化学合成法により専ら生産されているが，香料製品の規格であるナチュラルステータスを獲得する工業的生産法として，バイオマスを原料とするバイオプロセスの開発が期待されている．我々はこれまでに補酵素非依存型の新規酸化酵素 Cso2 を見出し，4-vinylguaiacol (4VG) を原料として当該酵素の酸化反応によるバニリン生産を報告している[1]．本研究では，Cso2 高発現大腸菌を利用したバニリンの効率的生産プロセスの開発を目指し検討を行った．
【方法・結果】これまでの検討で Cso2 の不安定性が律速であることが示されている．諸条件検討中に，精製酵素反応系にカタラーゼを添加するとバニリン合成量が向上することを見出した．過酸化水素を分解するカタラーゼの添加効果は，酸化反応で生成する活性酸素種による Cso2 への悪影響を示唆する結果と考えた．一方，Cso2 発現大腸菌の細胞破砕液を用いたバニリン合成において，カタラーゼを添加しても大きな変化は見られなかった．これは大腸菌に内在するカタラーゼが機能しているためと考え，Cso2 を利用するバニリンの生産には菌体反応系が適していると判断した．また，Cso2 発現大腸菌の繰り返し利用や連続生産系を想定して，アルギン酸カルシウムゲルによる包括菌体の利用を考えた．その結果，包括菌体系では活性がより安定的に維持され，繰り返し利用によるバニリン生産も高活性を維持することができた．さらに，当該包括菌体を用いて，反応系内を均一に維持できる連続生産プロセスを検討したところ，大幅な生産性向上の可能性を確認した．
[1] T. Furuya, *et al.*, *N. Biotechnol.*, 32, 335-339 (2015).

Development of efficient vanillin production system using the entrapped whole cells of the recombinant *Escherichia coli*

○Tsubasa Saito[1], Riku Aono[1], Toshiki Furuya[2], Kuniki Kino[1,2]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words vanillin, coenzyme-independent dioxygenase, whole cell reaction, calcium alginate beads

3La11 ポリニュートラルレッド修飾電極を用いたリンゴ酸酵素による CO_2 固定化システムの構築

○大田 竹留[1], 坂元 博昭[1,2], 里村 武範[1,2], 末 信一朗[1,2]
（[1]福井大院・工, [2]福井大学ライフイノベセ）
suyeb10@u-fukui.ac.jp

【目的】CO_2 固定化システムに用いられる酵素として，CO_2 をギ酸に変換する NAD^+ 依存型ギ酸脱水素酵素（*Cb*FDH）やリンゴ酸酵素が挙げられる．これらの酵素反応では NADH が補酵素として必須であり，反応を効率よく進行させるためには NADH の循環再生系を同時に組み込む必要がある．NADH の再生には，電気化学的方法，酵素反応を用いる方法などが報告されている．しかし，酵素反応では高価な犠牲基質を必要とする等の問題がある．一方，電気化学的方法ではメディエータを反応系内に閉じ込める必要や電子伝達の効率等の問題がある．そこで，本研究ではニュートラルレッドを電解重合したポリニュートラルレッド (Poly-NR)修飾電極をメディエータとして NADH を循環再生させながらリンゴ酸酵素反応の逆反応を行うことで CO_2 の固定化を検討した．
【方法】CO_2 固定化システムのための *Brevundimonas diminuta* 由来 NAD(P)依存型リンゴ酸酵素の精製をし，CO_2 固定化反応システムに用いた．さらに，電解重合によってカーボンペーパー (CP)電極上に Poly-NR を電析させた．その後，作製した電極を CO_2 固定化用反応液に浸漬し，-0.6 V (vs. Ag/AgCl）の印可電圧で NADH の再生をしながら CO_2 固定化反応を 24 時間行った．HPLC によって生成した L-リンゴ酸を定量した．
【結果・考察】-0.6 V(vs. Ag/AgCl)で NADH の再生を行いながら CO_2 固定化反応を行った結果，基質であるピルビン酸から約 17 mM のリンゴ酸の生成が見られ，等量の CO_2 の固定化が確認された．Poly-NR 修飾電極を用いることで，メディエータを系内に閉じ込めた電気化学的補酵素再生による CO_2 固定化が可能となった．現在，高分子化 NAD^+ を併用した反応系について検討を行っている．

Construction of CO_2 immobilization system with malic enzyme using poly-neutral red modified electrode

○Takeru Ota[1], Hiroaki Sakamoto[1,2], Takenori Satomura[1,2], Shin-ichiro Suye[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., [2]Life Sci. Innov. Center, Univ. Fukui)

Key words CO_2 fixation, mediator, malic enzyme

3Ma01 エリンギ由来セリンアミノペプチダーゼの基質取り込み経路の酸化が及ぼすペプチド結合形成反応への影響

○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・CoRE）
arima@muses.tottori-u.ac.jp

【目的】エリンギから見出されたセリンアミノペプチダーゼは，加水分解と拮抗してペプチド結合を形成するアミノリシス反応を触媒し，酸化処理により基質特異性が変化する性質を持つ．これまでの研究により，本酵素の基質の取り込み経路を形成する Met 残基の酸化が，基質認識に大きく影響することが予測された．このような基質認識の変化は，アミノリシス反応にどのような効果をもたらすかは未解明である．本研究では，本酵素の基質認識機構の解明と特異性の制御を目指し，酸化に伴うアミノリシス活性への影響を評価した．
【方法及び結果】本酵素の pNA 遊離活性は，酸化により，芳香族アミノ酸-pNA に対して維持されるが，その他のアミノ酸-pNA に対して大きく低下する．そこで，酸化処理した本酵素を使用し，L-Phe-OMe 及び L-Leu-OMe それぞれを基質とした酵素反応液を調製した後，アミノリシス反応で生じた生成物（L-Phe-L-Phe-OMe 及び L-Leu-L-Leu-OMe）を ESI-MS で解析した．その結果，未処理の酵素よりも酸化処理後の酵素でジペプチド誘導体生産の増加が確認された．一方で，その反応速度は，L-Phe-L-Phe-OMe 合成では上昇したのに対して，L-Leu-L-Leu-OMe 合成では低下した．以上の結果から，本酵素は酸化されることで，水よりもアミノ酸誘導体を認識するように基質特異性が変化し，基質に対する反応性は芳香族アミノ酸誘導体に対して厳格になったと考えられる．続いて，酸化処理した本酵素を使用して L-Tyr-NH_2 と L-Arg-OMe を材料として鎮痛ジペプチド L-Tyr-L-Arg-OMe の生産を評価すると，当該ジペプチドの生産量の増加も観察された．これらの結果から，本酵素の基質取り込み経路の改変が，生成ペプチドへの加水分解を抑える一つの手段になりうる可能性が示された．

Effect of oxidation of substrate pathway of serine aminopeptidase from *Pleurotus eryngii* on its peptide bond formation

○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]CoRE, Tottori Univ.)

Key words aminopeptidase, oxidation, substrate specificity, peptide bond formation

3Ma02 D-アミノ酸含有ジペプチドの汎用的な酵素合成法の開発

○賀野 壮一朗[1], 鈴木 伸[1], 原 良太郎[2], 木野 邦器[1,2]
（[1]早大・先進理工, [2]早大・理工総研）
kkino@waseda.jp

【目的】D-アミノ酸含有ペプチドでは，L-アミノ酸のみで構成されるペプチドに比べ，活性増強や新規活性を発現する可能性が示されているが，効率的な合成法は開発されていない．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）によるアミノ酸のアデニル化と，それに続く求核置換反応により，多様なジペプチドの合成が可能であることを報告している[1]．本方法では，ジペプチドの N 末端側基質は A ドメインの基質特異性による制限を受けるが，C 末端側は求核活性を有する任意のアミノ酸が導入可能になる．本研究では，合成可能なジペプチドの種類の拡張を目的とし，とくに N 末端側に D-アミノ酸を含有する新規ジペプチド合成法の開発を検討した．
【方法・結果】我々は，*Brevibacillus parabrevis* IAM1031 由来 tyrocidine synthetase A の A ドメイン（TycA-A）が N 末端側基質となるアミノ酸として，L-体だけでなく D-体も認識することを明らかにしており，C 末端側を Pro とした DD-, DL-, LD-, LL-のキメラジペプチドの合成を報告した[2]．そこで TycA-A の N 末端基質を D-Trp とした場合の C 末端側基質となるアミノ酸を検証した．20 種類の D-アミノ酸を求核剤として酵素反応を行ったところ，D-Trp-D-Ala など予想されるジペプチドの合成を確認することができた．そこで，キメラジペプチドの汎用的な酵素合成法の開発を目指して，TycA-A と同様に D-アミノ酸も基質とする A ドメインの探索を検討したところ，*Bacillus licheniformis* NBRC 12199 由来 bacitracin synthetase を構成する BacB2-A を見出した．N 末端側基質を D-Lys とし同様に酵素反応を行ったところ，D-Lys-D-Xaa（Xaa:任意のアミノ酸）の合成を確認することができた．

1) R.Hara, *et al.*, Scientific Reports, 8:2950 (2018).
2) 賀野ら, 日本生物工学会 2017 年度大会講演要旨集, 2P-G038.

Development of an enzymatic method for production of D-amino acid-containing dipeptides

○Soichiro Kano[1], Shin 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

3Ma03 菌体反応系によるイミダゾールジペプチドの効率的生産法の開発

○駒林 卓磨[1], 倉本 歩[2,3], 木野 邦器[1,2]
（[1]早大院・先進理工・応化, [2]早大・理工総研, [3]東海物産）
kkino@waseda.jp

【目的】イミダゾールジペプチドは，抗酸化作用や抗疲労効果等の多様な生理機能を有する化合物として注目されている．現在は鶏肉などからの抽出による生産が主流であるが，低収率，高コストなどの点から新たな生産法の開発が求められている．我々は L-アミノ酸リガーゼに着目し，その改変酵素によるイミダゾールジペプチドの高収率生産を報告している[1]．但し，本酵素反応では等モルの ATP が必要なため，その削減が課題となっている．本研究では，糖代謝系による ATP 再生が期待できる菌体反応系でのイミダゾールジペプチドの効率的生産法の開発を目指し，ペプチダーゼの影響も考慮しつつ検討を行った．
【方法・結果】菌体反応系でのイミダゾールジペプチド分解に関与すると推測したペプチダーゼを欠損させた大腸菌 *E. coli* BL21(DE3)を作製し，ジペプチドの分解性を野生株と比較した．その結果，カルノシンやアンセリンは野生株においても分解活性は低く，*pepD* 欠損株においてさらに分解が抑制されることが判明した．このことはイミダゾールジペプチドの発酵生産の可能性を示唆する結果である．そこで，糖代謝による ATP 再生系を期待してグルコース添加による菌体反応系でのイミダゾールジペプチドの生産を検討した．予想通り，ATP 無添加系でもカルノシンおよびアンセリンの高収率合成が可能であった．最適反応条件を検討中であるが，イミダゾールジペプチドの発酵生産への可能性を強く示唆する結果であり，安価なイミダゾールジペプチドの提供による健康社会増進への貢献が期待できる．

1) 駒林ら, 日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨集, 2C26p08.

Efficient production of imidazole dipeptides by whole cell reaction

○Takuma Komabayashi[1], Ayumu Kuramoto[2,3], Kuniki Kino[1,2]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [3]Tokai bussan Co., Ltd.)

Key words imidazole dipeptide, L-amino acid ligase, whole cell reaction, peptidase

3Ma04 アミノペプチダーゼによるアレルゲンペプチドの分解

○畑中 唯史[1], 万 クン[2], 裏地 美杉[3], 東海 彰太[1], 中東 良太[4]
（[1]岡山生物研, [2]中国西南大学, [3]神戸大院・科技イノベ, [4]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．我々は，従来から放線菌由来ペプチダーゼの研究を行っており，ホスホリパーゼ D やアミノペプチダーゼなどの有用酵素を分泌する放線菌 *Streptomyces cinnamonues* TH-2 株を独自に取得している．これまで，TH-2 株由来 M28 ファミリーアミノペプチダーゼ（M28AP）の解析に取り組んだところ，カゼイン由来アレルゲンペプチドに対して，分解能力が低いことが示された．そこで，本発表では，TH-2 株由来 M28 アミノペプチダーゼと，放線菌由来 M24 ファミリーアミノペプチダーゼ（M24AP, ナガセケムテックス(株)製, デナチーム XPO DUET）を組み合わせ，アレルゲンペプチドに対する分解能力を評価した結果について報告する．
【方法および結果】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アレルゲンペプチド（VLPVPQK, FFVAPFPEVFGK, VAPFPEVFGK, APFPEVFGK, PEVFGK, VFGK）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，XPO DUET は，いずれのペプチドに対しても，分解能を示し，VFGK に対しては，M28AP と組み合わせることで，分解が促進された．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 ペプチド特異的に作用し，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が，今回のアレルゲンペプチドを用いた解析によって，幅広い基質特異性をもつことが示唆された．

Enzymatic degradation of allergen peptides from bovine casein by combination of aminopeptidases

○Tadashi Hatanaka[1], Kun Wan[2], Misugi Uraji[3], Shota Tokai[1], Ryota Nakahigasi[4]
([1]RIBS, Okayama, [2]Dept. Food Sci., College of Animal Sci., Southwest Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [4]NagaseChemtex. Co.)

Key words aminopeptidase, *Streptomyces*

3Ma05 Split intein の protein *trans*-splicing を利用した耐熱性プロテアーゼ再構成の検討

○巽 祐介, 足立 航平, 山野 範子, 大政 健史, 古賀 雄一
（阪大院・工）
kogay@mls.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】Tk-SP は超好熱古細菌 (始原菌) *T. kodakarensis* KOD1 のゲノム上にコードされた至適温度 100℃, 100℃における半減期が 100 分の耐熱性が非常に優れた subtilisin-like serine protease である. この酵素は通常の酵素が変性, 失活してしまう条件下で安定性を維持できるため, 医療用酵素洗浄剤などへの応用が期待されている. しかし, Tk-SP を大腸菌で発現させると, そのタンパク質分解活性により増殖が妨げられ, 大量調製が困難である. そこで, 2 つのポリペプチド鎖を 1 つにつなげる, protein *trans*-splicing (PTS) を触媒する split intein を用いた発現系を構築した. Tk-SP を二つに分割して, 一方に N-intein, もう一方に C-intein を付与したベクターを構築し, 発現後, それらの断片を混ぜ合わせることで split intein の PTS を誘導して Tk-SP を生産することを目的とした.
【実験方法・結果】*Nostoc punctiforme* 由来の *Npu*-PCC73102 DnaE intein は, 極めて高い PTS 効率と反応速度 ($t_{1/2}$ = 60 sec at 37℃) を持つ split intein である. また挿入するアミノ酸配列の前後三つのアミノ酸残基 (隣接配列) によってスプライシング効率が変化することが知られている. Tk-SP の立体構造から, N 末端側タンパク質, C 末端側タンパク質で分割して発現するときにフォールディングがうまく行われるように, 表面のループ部分にある Y239 を *Npu* DnaE intein の挿入箇所として設定してベクター構築を行った. その後, 発現を行ったところ増殖阻害が起こることなく, N 末端側と C 末端側の断片のどちらも可溶性発現した. Y239 が *Npu* DnaE intein を利用した PTS に適した位置である可能性がある. これらの断片について on-column PTS によって確認を行ったところ, PTS は完全には進行しなかったが, *Npu* DnaE intein の相互作用は確認できた. 本発表では, on-column PTS について報告する.

The reconstruction of a highly thermostable enzyme by the using protein *trans*-splicing of split intein

○Yusuke Tatsumi, Kohei Adachi, Noriko Yamano, Takeshi Omasa, Yuichi Koga
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words split intein, subtilisin, thermostable enzyme

3Ma06 Tk-subtilisin の有機溶媒耐性の解析

○宮田 大暉, 大政 健史, 山野 範子, 古賀 雄一
（阪大院・工）
kogay@mls.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】Tk-subtilisin は超好熱古細菌（始原菌）*Thermococcus kodakarensis* 由来サチライシン様セリンプロテアーゼである．Tk-subtilisin は極めて高い熱安定性を示し，化学変性剤に対しても安定であるという特徴を有する．Subtilisin には有機溶媒中で加水分解逆反応を触媒することも報告されており，本酵素に於いてもその可能性が期待されている．Tk-subtilisin に有機溶媒に対する耐性があるかどうかは解明されていないため，本研究では Tk-subtilisin の有機溶媒による変性に関する基本的な知見を得ることを目的とした．
【方法・結果】 Tk-subtilisin は Pro 配列と活性ドメイン（成熟化ドメイン）から構成される．大腸菌発現系から成熟化前の Pro 配列を保持した Pro 体 Tk-subtilisin（複合体）として Tk-subtilisin を調製した．Pro 体は 80℃30 分の加熱により活性型 Tk-subtilisin に成熟化する．本研究では，Pro 体（複合体）と活性型 Tk-subtilisin それぞれについて，有機溶媒中での酵素活性を測定し，各溶媒に対する耐性の比較を行った．有機溶媒は 2-プロパノール，t-ブタノール，1,4-ジオキサン，エチレングリコール，DMF，DMSO，エタノール，メタノールを選択した．成熟化及び酵素反応温度は各有機溶媒の沸点を考慮し，エタノールは 70℃，メタノールは 60℃，他の 6 種類は 80℃に設定した．
Pro 体（複合体）については，50%濃度のすべての有機溶媒に対して 60%以上の残存活性を示した．分子内シャペロン活性を持つ Pro 配列の存在により一度有機溶媒で変性した構造が巻き戻ったと考えられる．活性型 Tk-subtilisin は，2-プロパノールや t-ブタノールなどに対して残存活性は 40%以下となり，一方でエチレングリコールは，約 80%の残留活性を示し，耐性があることが示唆された．
本発表では Tk-subtilisin の溶媒中での安定性の詳細と，逆反応活性について報告する．

Analysis of organic solvent tolerance of Tk-subtilisin

○Hiroki Miyata, Takeshi Omasa, Noriko Yamano, Yuichi Koga
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words subtilisin, organic solvent, thermostable enzyme

3Ma07 環状イミノ酸に対する反応性が向上したサルコシンオキシダーゼ変異体

○黒部 督惠, 西矢 芳昭
（摂南大院・理工）
nishiya@lif.setsunan.ac.jp

【背景および目的】 サルコシンオキシダーゼ（Sox; EC 1.5.3.1）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．当研究室では，Sox の立体構造に基づく酵素機能の改変，特に基質特異性に関与する残基の特定を進めている．今回，合理的な変異デザインにより，環状イミノ酸に対する反応性が向上した Sox 変異体を作成することに成功した．さらに，その変異酵素のさまざまな環状イミノ酸に対する反応性を詳細に調べたので報告したい．
【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 の活性中心近傍を構成するアミノ酸のうち Y254 が環状イミノ酸との反応性に関与していると推察した．そこで，Y254 をより小さいアミノ酸へと置換することで環状イミノ酸に対する反応性が向上すると予測し，実験的に検証したところ，Y254A と Y254G がサルコシンよりも環状イミノ酸に対して高い反応性を示した．各種環状イミノ酸，特に D-プロリンに対し Y254G ではサルコシンの約 15 倍，Y254A では約 4.3 倍の比活性が，L-ピペコリン酸に対し Y254G ではサルコシンの約 2.0 倍，Y254A では約 0.39 倍の比活性を示した. よって, 変異体の構造と基質特異性との相関について考察を行った.
【結論】 ドッキングシュミレーションにより，環状イミノ酸と反応性の高い Sox 変異体を予測し，そのことを実験的に確認した．本酵素の構造と基質特異性との相関について，引き続き検討したい.

Mutants of Sarcosine oxidase with high reactivities for cyclic imino acid

○Masae Kurobe, Yoshiaki Nishiya
(Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

Key words sarcosine oxidase, substrate specificity, cyclic imino acid, proline

3Ma08 *Chloroflexus aurantiacus* 由来のサルコシンオキシダーゼの N-メチルアミノ酸に対する反応性

○松本 美徳, 西矢 芳昭
（摂南大院・理工）
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)は腎機能の評価マーカーであるクレアチニンの酵素法測定に使われる追随酵素の 1 つである．当研究室では，好熱性光合成細菌 *Chloroflexus aurantiacus* 由来サルコシンオキシダーゼ（SoxCa）が他起源の Sox より高基質親和性を有していることを見出し，構造比較より SoxCa に存在する Q255 が影響していると予想した．そこで，Q255 変異体を作成し基質親和性を見たところ，変異体側鎖が小さくなるほど K_m 値が大きくなった．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重要な残基であることが分かった．今回はサルコシンの類似物質である N-メチルアミノ酸，特に N-メチル-L-ノルロイシン（NMLN）に対する反応性を野生型と Q255 変異体で比較し，興味深い知見を得たので報告する．
[実験方法]野生型および変異体は His-tag 融合タンパク質として発現させアフィニティー精製を行った．構造的考察を行うため，ソフトウェア MOE により立体構造が既知である SoxB を基にホモロジーモデリングを行い，構造モデルを構築した．
[結果および考察] 各種の N-メチルアミノ酸に対する反応性を見たところ，SoxCa は NMLN に最も高い反応性を示すことが分かった．そこで Q255 変異体の NMLN への反応性を見たところ，側鎖を小さくすると K_m 値が小さくなり，さらに欠失させたものは野生型に比べ最も基質親和性が高くなった．Q255 は NMLN では結合を阻害していると考えられる．すなわち，Q255 は本酵素において基質特異性にも重要な残基であると思われる．基質構造のフィッティング解析から，Q255 が存在することでサルコシンは活性部位にフィットしやすいが，側鎖の大きい NMLN はフィットしづらくなると予想された．

Reactivity of the sarcosine oxidase from *Chloroflexus aurantiacus* to N-methyl amino acids.

○Minori Matsumoto, Yoshiaki Nishiya
(Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

Key words sarcosine oxidase, substrate affinity, active site structure, N-methyl amino asid

3Ma09 *Pyrococcus horikoshii* 由来馬尿酸加水分解酵素の機能改変

○今井 皐[1], 名越 健太郎[1], 新木 翔太[1], 馬場 利明[2], 西矢 芳昭[1]
（[1]摂南大院・理工, [2]ニプロ 総研 第三研究開発）
nishiya@life.setsunan.ac.jp

【背景および目的】有機溶剤であるトルエンやキシレンは塗装業などで大量に取扱われており，これらの体内への蓄積は肝機能障害を引き起こすとされている．このような健康被害を未然に防ぐため，有機溶剤取扱い作業者には，尿中の有機溶剤代謝物量の測定などを含む特殊健康診断の受診が義務付けられている．現在の診断では HPLC を用いた測定が行われているが，操作が煩雑で時間がかかり，さらには高額であるといった欠点がある．酵素的測定法が開発できれば，有機溶剤代謝物量の簡便かつ多検体迅速測定が可能となる．
そこで我々は，トルエンとキシレンの代謝産物である馬尿酸とメチル馬尿酸の総濃度測定法に供するための酵素を探索し，タンパク質工学的改良を試みた．
【結果および考察】馬尿酸およびメチル馬尿酸に反応する酵素をスクリーニングした結果，Pyrococcus horikoshii 由来の馬尿酸とメチル馬尿酸を加水分解するアミノアシラーゼを見出した．しかしながら，本酵素は超好熱菌由来のため，通常の分析温度（37℃）では極めて低活性であった．そこで，タンパク質工学的手法を用いて本酵素の 37℃における活性向上を試みた．本酵素と配列相同性の高い加水分解酵素をベースに立体構造モデルを作成し，フレキシブルな領域を中心に変異箇所を決めてサチュレーションミュータジェネシスを行った．
変異体スクリーニングの結果，K193，P200，N307 をより小さなアミノ酸残基とした変異酵素で 37℃における活性向上が確認された．N307 は触媒ドメイン，K193，P200 はサテライトドメインのアミノ酸残基であり，側鎖を小さくすることで酵素のフレキシビリティが高まったと考えられる．
今後は，反応性向上が確認された変異を組み合わせた多重変異体を作成し，相加効果を確認する．

Protein engineering of a hippurate hydrolase from *Pyrococcus horikoshii*

○Satsuki Imai[1], Kentaro Nagoshi[1], Shota Shinki[1], Toshiaki Baba[2], Yoshiaki Nishiya[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ., [2]NIPRO R&D Lab.)

Key words toluene, xylene, hippuric acid, aminoacylase

3Ma10 高基質特異性 L-アミノ酸オキシダーゼの 1 種 L-リシン α-オキシダーゼから部位特異的変異により作成した 新規な芳香族アミノ酸オキシターゼの性質

○松本 侑也[1], 北川 雄輝[2], 今田 勝巳[2], 根本 理子[1], 田村 隆[1], 日下部 均[3], 稲垣 賢二[1]
（[1]岡山大院・環境生命, [2]阪府大院・理, [3]エンザイムセンサ）
kinagaki@okayama-u.ac.jp

【目的】L-リシン α-オキシダーゼ（LysOX）は L-Lys の酸化的脱アミノ化反応を触媒する L-アミノ酸オキシダーゼ（LAO）の一種である．本酵素は基質特異性が厳格な為 L-Lys の微量定量に有用で，強力な抗腫瘍性も有する為がん治療への応用も期待されている．我々はこれまでに LysOX の大腸菌による異種発現系構築および X 線結晶構造解析に成功しており，基質と相互作用している残基(Asp212 及び Asp315)を明らかにしている．今回は LysOX の基質認識機構解析を目的として上記の 2 残基に部位特異的突然変異を導入した変異酵素が芳香族アミノ酸への特異性を示した為，均一精製を行って変異酵素の性質を解析を進めた．
【方法】部位特異的突然変異導入は，発現ベクター pColdIV-LysOX を鋳型として Asp212 および Asp315 を置換した変異導入プライマーを用いてクイックチェンジ法で行った．酵素精製は菌体破砕後，熱処理，硫安分画，疎水性カラムと陰イオン交換カラムクロマトを用いて行った．活性測定は反応産物 H_2O_2 の定量によって測定した．
【結果】Asp212 および Asp315 両残基を Ala に置換した二重変異酵素は元の LysOX と比較して顕著に活性や k_{cat}/K_m 値が減少し，元酵素と異なり芳香族や疎水性のアミノ酸にも反応する低基質特異性化が認められた．また，Asp212 残基を Arg に置換した D212R 変異体においても同様に芳香族アミノ酸を主な基質とするように変化した．これらの結果から Asp212，Asp315 両残基は LysOX の基質認識に密接に関与していると言え，突然変異導入により LysOX の基質特異性を改変出来ると示唆された．また，速度論等の解析結果から二重変異酵素は新規芳香族アミノ酸オキシターゼとしての性質を有していると言え，新規 LAO 開発に新たな知見をもたらした．現在は基質特異性が変化した理由を明らかにする為，均一精製した変異酵素を用いて結晶構造解析等を進めている．

Characterization of novel aromatic amino acid oxidase made from L-lysine oxidase with high substrate soecificity

○Yuya Matsumoto[1], Yuki Kitagawa[2], Katsumi Imada[2], Michiko Nemoto[1], Takashi Tamura[1], Hitoshi Kusakabe[3], Kenji Inagaki[1]
([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okyama Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]Enzyme Sensor Co., Ltd.)

Key words aromatic amino acid, L-lysine alpha oxidase, substrate specificity, site-directed mutagenesis

3Ma11 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株由来アセチルコリンエステラーゼによるアミノ酸のアセチル化反応

○井上 尚[1], 美藤 友博[2], 清水 克彦[3], 有馬 二朗[2]
（[1]鳥取大院・農, [2]鳥取大・農, [3]鳥取大・CoRE）
arima@muses.tottori-u.ac.jp

【目的】アセチルコリンエステラーゼ（AChE）は Ser を活性中心に持ち，アセチルコリンをコリンと酢酸に加水分解する反応を触媒する．我々はこれまで，*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株由来の AChE（Pa-AChE）の利用に向けた検討を行ってきた．組換え Pa-AChE は酢酸エチルに対する加水分解活性を持ち，副反応としてアミノ基や水酸基のアセチル化反応も触媒することが明らかとなった．本研究では，本酵素でアセチル化が可能なアミノ酸やアミノ酸誘導体の探索を行うと共に，Pa-AChE の性質や光学異性の認識について評価した．
【方法】Pa-AChE を使用したアミノ酸のアセチル化反応は，酢酸エチル（終濃度 0.2M）をアセチル供与体として使用し，pH 9.0（Tris-HCl 緩衝液），TritonX-100 の存在下で行った．アセチル化された化合物は，TLC もしくは LC/MS を用いて解析した．
【結果】L-アミノ酸と L-アミノ酸-メチルエステル（-OMe）を対象にアセチル化反応を行うと，L-アミノ酸ではアセチル化反応が確認されなかったが，L-アミノ酸-OMe ではいくつかの疎水性アミノ酸（L-Leu-OMe，L-Phe-OMe，L-Pro-OMe，etc）や塩基性アミノ酸（L-Lys-OMe，L-Arg-OMe）でアセチル化生成物が見られた．しかし，同じ疎水性アミノ酸や塩基性アミノ酸でも L-Ala-OMe や L-His-OMe ではアセチル化反応が確認されなかったため，Pa-AChE は物性に加えて大きさや構造も識別してアセチル受容体に利用していることが考えられた．続いて Pa-AChE の反応によってアセチル化が確認された L-アミノ酸-OMe の D 体に対してアセチル化反応が進むかどうかを評価した結果，D 体ではアセチル化反応が確認されなかった．従って，本酵素は光学異性体を認識してアセチル受容体として利用することが明らかとなった．

Acetylation reaction against amino acids using acetylcholine esterase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

○Hisashi Inoue[1], Tomohiro Bito[2], Katsuhiko Shimizu[3], Jiro Arima[2]
([1]Grad. Sch. Agric., Tottori Univ., [2]Fac. Agric, Tottori Univ., [3]CoRE., Tottori Univ.)

Key words *Pseudomonas aeruginosa*, acetylcholine esterase, amino acid methyl ester, acetylation

3Na01 六価クロム還元細菌 *Flexivirga alba* ST13 株のフラグメント解析を利用した追跡法

○桶田 凜, 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

【背景と目的】六価クロムは発癌性がある．そこでこの六価クロムよる土壌汚染を安価で安全に除去する方法が必要とされている．一方我々が発見した新属新種の放線菌 *Flexivirga alba* ST13 株は六価クロムを還元して無害な三価クロムにする性質が存在した．この菌を用いたバイオレメディエーションには菌の追跡法が必要である．我々は PCR 解析法である RISA (Ribosomal intergenic spacer analysis) を応用して ST13 株を特定する方法には成功したが，PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) を必要とし，操作性に課題があった．そこで本研究ではキャピラリーシーケンサーのフラグメント解析を応用して RISA-PCR 解析する方法の開発を目的とした．さらに ST13 株は pH の高い環境では増殖できないことを利用して，pH の違う環境で培養した ST13 株の検出の定量性を検討した．
【方法と結果】ST13 株の DNA 抽出には破砕法である ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン社製) を使用し，土を混ぜずに DNA 抽出を行い，鋳型 DNA (0.0044 pg/μl~44 pg/μl) の RISA-PCR を行った．RISA-PCR のプライマーは 1392f/23Sr (forward/reverse) 使用して PCR 条件を 94 ℃,5 min 35 cycle (94 ℃,1 min 52 ℃,1 min 72 ℃,2 min) 4 ℃,∞に設定して行った．フラグメント解析の結果，鋳型 DNA 濃度が濃いサンプルほどピークが大きく，濃度が薄いサンプルほどピークが小さく現れた．加えてすべてのピークが 675 bp 付近に現れたことから鋳型 DNA の濃度に相関した結果が現れたと判断した．現在は pH を変えていない培地と pH10 と pH13 の培地で培養した複数の ST13 株のサンプルの DNA 抽出と RISA-PCR を行い，それらの増幅される DNA をキャピラリーシーケンサーのフラグメント解析で確認を行っている．

Tracking *Flexivirga alba* ST13 using RISA-PCR DNA fragment analysis

○Rin Oketa, Kento Ikegami, Tomoyasu Sugiyama
(Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol.)

Key words *Flexivirga alba* ST13, RISA-PCR, DNA fragment analysis, hexavalent chromium

3Na02 メタン発酵消化液中のリンの再資源化方法の検討

○下出 崇樹[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】リンは肥料，半導体製造等で必須とされる物質だが，近年リンの需要増加に伴い，原料であるリン鉱石の枯渇が懸念されている．特に，リン資源のほとんどを輸入に依存する日本は国内でのリン資源の確保は重要な課題である．そこで，国内リン資源の 1 つとして検討されているのが，下水処理の行程で発生するメタン発酵消化液である．メタン発酵消化液を含む下水中のリン回収方法としては MAP 法，HAP 法などが有効な手段とされているが，これらは pH，濃度の操作によるプロセスの複雑化や薬品の添加が避けられない．一方，吸着法は簡単な操作で目的物質を回収できる．そこで，本研究ではハイドロタルサイトを用いた吸着法によるメタン発酵消化液中のリン酸の回収方法について検討することを目的とした．
【方法】ハイドロタルサイトを用いてメタン発酵消化液から直接リン酸の回収が可能か検討するため，以下の方法で実験を行った．まず，電気炉を用いてハイドロタルサイトを 250℃で 2 時間焼成した．メタン発酵消化液 500 mL あたり 1 g になるように焼成したハイドロタルサイトを加え，120 rpm で 1 時間振盪撹拌し，リン酸を吸着した．その後，ハイドロタルサイトをカラムに充填し，ペリスタポンプを用いて純水を 5 分（洗浄），0.5 M NaOH 水溶液（脱着）を 10 分，再度純水を 5 分（洗浄）流入させた．流速は全て 10 mL/分に設定した．流出液は 1 分毎に 10 mL ずつ採取し，リン酸濃度を測定した．なお，このサイクルを 3 回繰り返し行った．
【結果と考察】3 サイクル繰り返した場合でもハイドロタルサイトのリン酸吸着量は約 3 mol-PO_4/g-ads，脱着率は約 70～80％と吸脱着能力の大きな減少は見られなかった．また，0.5 M NaOH 水溶液流入後は開始 10 分でほとんどのリン酸の脱着が完了していた．このことから，吸着したリン酸を容易に濃縮した状態で回収することが期待できる．

Study on phosphorus recycling from anaerobic digested liquor by hydrotalcite

○Takaki Shimode[1], Takuya Kawanisi[1,2], noboru Takiguchi[1,2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ.)

Key words phosphate, wastewater, adsorption

3Na03 *Pseudomonas stutzeri* NT-I による水相からのテルルの揮発化除去と回収

○黒田 真史, 畠中 玄彦, 井上 大介, 池 道彦
（阪工大院・工）
kuroda@see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】原子番号 52 の元素であるテルル(Te)は，太陽電池等に用いられる半導体の原料となるレアメタルであり，近年の需要の高まりから将来的な資源枯渇が懸念されている．一方，Te の水相での主な形態である亜テルル酸（Te(IV)）は毒性が高く，Te の産業利用に伴う水環境汚染の発生が危惧されている．本研究では，テルルの同族元素であるセレンを揮発性のセレン化メチル化合物に変換する極めて活発なセレン代謝活性を持つ細菌である *Pseudomonas stutzeri* NT-I を用い，水相からの Te の除去と回収を同時に達成しうる生物学的プロセスの構築を目指し，NT-I 株の Te 揮発化特性を評価した．
【結果・考察】1 L 容ジャーファーメンターに 0.1 mM の Te (IV)を含む TSB 培地を添加し，好気的に培養した．排気をガス洗浄瓶中の濃硝酸トラップに通気し，Te の回収を試みた．培養開始 4 時間後より水相の Te 量が急激に減少し，14 時間でほぼ全量が水相から消失した．同時に，固相および濃硝酸トラップ中の Te 量が増加した．また，固相中の Te は培養開始 24 時間以降に減少し始め，168 時間にかけてほぼ全量が消失した．168 時間の培養によって，初期添加量の 57%に相当する Te が濃硝酸中に回収された．これまでに報告されている Te 揮発化微生物の中で最も優れたものでも初期添加量の数%が揮発するのみであり，本研究で見いだされた NT-I 株の Te 揮発化能力は極めて優れたものであると言える．

Removal and recovery of tellurium from water phase through biovolatilazation by *Pseudomonas stutzeri* NT-I

○Masashi Kuroda, Haruhiko Hatanaka, Daisuke Inoue, Michihiko Ike
(Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol.)

Key words *Pseudomonas stutzeri*, tellurium, biovolatilization, resource recovery

3Na04 水中からアンチモンを除去する微生物集積系の特徴付け

○細川 久顕[1], 森 健太朗[1], 黒田 真史[1], 惣田 訓[2], 井上 大介[1], 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，半導体材料や難燃助剤など産業に広く用いられている一方で，生体への毒性を有するレアメタルである．その毒性から，日本では水質環境基準の要監視項目として指針値が 20 μg/L に設定されていることから，廃水からの除去技術の確立が求められている．本研究では，生物学的 Sb 除去技術の確立を目指して，Sb 除去が可能な微生物集積系を構築し，その特性を評価した．
【実験方法・結果】十三干潟(大阪)から採取した底質土壌 1 g-wet を，1 mM の $K[Sb(OH)_6]$，2 mM の $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，5 mM の乳酸を含む無機塩培地に加え，嫌気条件下で回転振盪培養(28 ° C，120 rpm)した．橙色の沈殿物(Sb_2S_3)の生成を確認したあと，新たな無機塩培地へ 1%容量の継代を繰り返すことで Sb 除去微生物集積系を構築した．Terminal fragment length polymorphism (T-RFLP)解析により，112 バッチ目以降，集積系に含まれる微生物群集の組成が安定したことが確認された．SO_4^{2-}の有無による集積系の挙動の変化を分析すると，SO_4^{2-}の存在下ではほぼ全ての Sb を還元・除去できたが，SO_4^{2-}を添加しなかった実験系では Sb 還元・除去量が著しく低下した．また，16S rRNA 遺伝子の V4 領域を標的としたアンプリコンシーケンス解析の結果から，集積系内では硫酸還元菌である *Desulfovibrionaceae* 科細菌が最も優占しており(75%)，また，Sb と同族元素の As の酸化・還元能が確認されている *Sedimentibacter* 属細菌も確認された(5%)．これらより，本集積系では，硫酸還元菌によって生成された S^{2-}による Sb(V)の化学的還元と，Sb(V)還元細菌による生物学的還元の 2 種の還元機構が Sb_2S_3 生成に関わっているものと推測された．

Charactarization of enrichment culture removing antimony from water phase.

○Hisaaki Hosokawa[1], Kentaro Mori[1], Masashi Kuroda[1], Satoshi Souda[2], Daisuke Inoue[1], Michihiko Ike[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Sci. Eng., Ritsumeikan Univ.)

Key words antimony, enrichment culture, sulfate reduction, wastewater treatment

3Na05 セレン酸還元細菌内包ポリマーカプセルによる新たなセレン廃水の浄化と資源化

○平谷 朋之[1], 小竹 史哉[1], 永 直文[1], 大塚 治[2], 山下 光雄[1,2]
（[1]芝工大院・理工・応化, [2]芝工大・SIT総研）
mc18028@shibaura-it.ac.jp

[背景と目的] セレンは水中ではセレン酸や亜セレン酸の形状で毒性を示すことから排水基準を満たねばならない．そこで新たにセレン酸を無害な元素態セレンに還元できる *Pseudomonas stutzeri*NT-I 株によるセレン汚染廃水浄化技術を開発してきた．実用化を目指して微生物の反応効率や強度の安定化を目的として固定化生体触媒を試行している．固定化用ポリマーとしては，アルギン酸塩を用いたが，強度が弱く，排水中に分解されてしまった．そこで，本研究では二重構造のヒドロゲルカプセルを作製し，強度問題の解決を試みた．内層に NT-I 株と培地を封じ込めたアルギン酸ビーズを作製し，外層に単一のポリアクリルアミドからなる二層構造カプセルを複数種合成した．NT-I 株を固定化した多様な合成ポリマーカプセルを用いてセレン模擬廃水の浄化を検討した．
[実験方法] NT-I 株含有 TSB 培養液に sodium alginate(SA)を加え SA 溶液を調製後，$CaCl_2$ 水溶液中に滴下した．生成した NT-I 含有担体を Alginate beads（AB）とした．次に，アクリルアミドモノマーのうちのいずれか 1 種類, 架橋剤, 光ラジカル開始剤, SA, AB, TSB 培地を混合し，$CaCl_2$ 水溶液中に滴下した．その後，UV 光を室温で照射し，合成終了した．合成した担体をすべて Polyacrylamide capsule (PAC)と称した．これをセレン模擬廃水に加えセレン濃度を ICP-AES を用いて定量化した．
[結果] [3-acrylamidopropyl] trimethylammonium chloride (APTAC)-PAC, *N*-2-hydroxyethylacrylamide (HEAA)-PAC をセレン模擬廃水に添加したところ，一週間後それぞれ約 75wt％,97wt％セレン濃度が減少した．HEAA-PAC の外側に全還元量の 73wt%の元素態セレンが確認され，APTAC-PAC の外側に元素態セレンが確認されなかった．以上より APTAC-PAC はセレン酸廃水処理への新たな浄化・資源化方法として期待される．

Purification and recycling of selenium waste using polyacrylamide capsule containing selenate-reducing bacterium

○Tomoyuki Hiratani[1], Fumiya Kotake[1], Naofumi Naga[1], Osamu Otsuka[2], Mitsuo Yamashita[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng. Sci. Shibaura Inst. Technol., [2]R.O.A.E. Shibaura Inst. Technol)

Key words selenium, *Pseudomonas stutzeri* NT-I, immobilized carrier, polyacrylamide capsule

3Na06 バイオレメディエーションによるセレン汚染土壌浄化

○山下 光雄[1], 小竹 史哉[1], 大塚 治[2], 西里 亮[3], 奥野 稔[3], 武藤 宏行[3]
（[1]芝浦工大院・理工・応化, [2]芝浦工大・総研, [3]ケー・エフ・シー）
yamashi@sic.shibaura-it.ac.jp

[目的] セレン（Se）は高濃度で局所的に産出する鉱物が存在せず，低濃度で自然中に広く分布している．土壌中での Se は毒性の高い可溶性のセレン酸や亜セレン酸として混在しているので，Se は排水基準値や土壌汚染対策法に基づき，環境省告示第 18 号により土壌溶出量 0.01 mg/L，環境省告示第 19 号（含有量基準）により 150mg/kg 以下の厳しい基準が定められている．改正土壌汚染対策法により，自然由来の Se 汚染であっても浄化処理が必要である．亜セレン酸汚染土壌は鉄系薬剤を混合して不溶化処理が行われているが，セレン酸は鉄系薬剤との反応性が低いため，不溶化処理による浄化は困難である．そこで新たなセレン酸汚染浄化が望まれている．セレン酸化物を不溶性の元素態セレンに還元する *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株が単離された．本研究では NT-I 株を利用したセレン酸汚染土壌での環境基準値達成を目指し，新たな不溶化処理方法の開発を目的とした．
[実験方法] 一般的な土壌にセレン酸または亜セレン酸を添加した模擬汚染土壌を作製した．模擬汚染土壌に滅菌済みの培地もしくは OD600=1.0 に調製した NT-I 株培養液を添加し，適温で静置培養した．NT-I 株培養液添加 0 時間目から適宜土壌の一部をサンプリングした．サンプリング土を 50℃の恒温器にて 2 時間乾燥した．乾燥した土壌を定法通りに検液を調製した．検液中の可溶性全 Se 濃度を ICP-AES にて定量分析した．
[結果] NT-I 株培養液を添加した模擬セレン酸，亜セレン酸汚染土壌の各々の初期値 159 mg/kg
と 165 mg/kg は 24h 後 70 mg/kg と 95 mg/kg になった．NT-I 株培養液を添加することで土壌含有量基準値を達成した．模擬セレン酸汚染土壌に NT-I 株を添加した場合，Se 土壌溶出量は 72h 後で 0.01 mg/L 以下になった．以上の結果から NT-I 株による汚染土壌中のセレンの浄化に有効であることが示された．

Selenium contaminated soil treatment through bioremediation

○Mitsuo Yamashita[1], Fumiya Kotake[1], Osamu Otsuka[2], Ryo Nishizato[3], Minoru Okuno[3], Hiroyuki Mutou[3]
([1]Grad. Sch. Eng.Sci. Shibaura Inst. Technol, [2]R.O.A.E. Shibaura Inst. Technol., [3]KFC Ltd.)

Key words selenium, bioremediation, biomineralization

3Na07 Visualization of metabolites in *Pseudomonas putida* biofilms using imaging mass spectrometry

○Pitchapa Rattanaburi, Eiichiro Fukusaki, Shuichi Shimma
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Biofilms are multicellular microbial communities controlled by changes of heterogeneous cell-to-cell signaling metabolites known in the event of quorum sensing. Understanding the heterogeneity of quorum sensing metabolites in biofilms is important as many infections caused by biofilms arising from pathogens. Generally, the presence of quorum sensing metabolites is indicated by phenotypic assays. However, imaging mass spectrometry (IMS) now allows researchers to directly visualize the existence of metabolites from microbial biofilms. In this study, matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-IMS was conducted for observation of the metabolites distribution in *Pseudomonas putida* biofilms. We present the optimization of cell cultivation and biofilm formation to process the biofilms for agar-based microbial MALDI-IMS. Using sublimation with 2,5-dihydroxybenzoic acid solution for matrix application of freeze dried samples, the distributions of acyl homoserine lactones quorum sensing metabolites were firstly visualized from *P. putida* biofilms. This approach provides a homogeneous, relatively dry coating on hydrated samples, and is easily adapted for imaging a range of agar-based biofilms.

Visualization of metabolites in *Pseudomonas putida* biofilms using imaging mass spectrometry

○Pitchapa Rattanaburi, Eiichiro Fukusaki, Shuichi Shimma
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words imaging mass spectrometry, quorum sensing metabolites, *Pseudomonas putida*, biofilms

3Na08 淡水域におけるバイオフィルム形成を介した生分解性プラスチック分解機構の解析

○大井 太士郎[1], 佐藤 俊輔[2], 諸星 知広[1]
（[1]宇都宮大院・工, [2](株)カネカ）
morohosi@cc.utsunomiya-u.ac.jp

【目的】水圏に廃棄され，微細化したマイクロプラスチックが大きな環境問題となっている．本問題の解決策として，生分解性プラスチックの使用が注目を集めているが，本研究グループでは，ある種の生分解性プラスチックが，海水中でバイオフィルム形成を伴いながら分解されることを報告している．本研究では，淡水サンプル中における生分解性プラスチック分解挙動を観察するとともに，分解に関わる細菌の単離，同定を行うことを目的とした．
【方法】5 カ所の淡水域（鬼怒川，霞ケ浦，北浦，河口湖，山中湖）からサンプリングした水に 6 種類の生分解性プラスチックフィルムを浸漬してインキュベートし，バイオフィルムを形成させた．最もバイオフィルム形成量が多かったポリ 3－ヒドロキシブチレート-*co*-3-ヒドロキシヘキサノエート（PHBH）については，バイオフィルムからランダムに細菌を単離し，PHBH パウダーを混合した R2A 寒天培地にコロニーを接種し, 周辺に透明帯を形成したコロニーを PHBH 分解細菌として単離した．PHBH 分解細菌の 16S rRNA 遺伝子を PCR により増幅して塩基配列を決定し，菌種の同定を行った．
【結果及び考察】6 種類の生分解性プラスチックを淡水域から採取したサンプルに浸漬したところ，特に PHBH を浸漬した場合にバイオフィルム形成量が多いことから，PHBH 分解活性を有する菌株のスクリーニングを行ったところ，PHBH 混合プレート上で透明帯を形成する菌株を多数単離することに成功した．コロニー形状や活性の強さを指標に各サンプルからそれぞれ 5～6 株を選択し，16S rRNA 塩基配列を基に系統樹を作成したところ，全 28 株が *Burkholderia* 目細菌であり，さらに 5 株が *Acidovorax* 属細菌であり，16S rRNA 塩基配列の相同性を指標に 3 つのグループに分類可能であることが明らかとなった．

Biofilm formation and degradation of commercially available biodegradable plastic films by bacterial consortium in the freshwater environments

○Taishiro Oi[1], Shunsuke Sato[2], Tomohiro Morohoshi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., [2]Kaneka Corp.)

Key words biodegradable plastic, biofilm, degradation, PHA

3Na09 工場冷却水由来 *Sphingopyxis* 属細菌によるアシル化ホモセリンラクトン分解機構の解析

○佐藤 新菜[1], 上村 哉生樹[1], 飯泉 太郎[2], 諸星 知広[1]
（[1]宇都宮大・工, [2]栗田工業(株)）
morohosi@cc.utsunomiya-u.ac.jp

【目的】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，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．スライム形成には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．AHL の分解により 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，冷却水中に生息する細菌による AHL 分解が，スライム発生抑制技術に有効である可能性が考えられる．本研究では，工場冷却水から細菌を単離するとともに，これらの細菌の中から AHL 分解細菌をスクリーニングし，AHL 分解機構を遺伝子レベルで解析する事を目的とした．
【方法および結果】工場冷却水から，高い AHL 分解活性を有する菌株をスクリーニングしたところ，EG6 及び FD7 と命名した菌株を取得することに成功し，16S rRNA の相同性から，両株共に *Sphingopyxis* 属細菌であることが明らかとなった．EG6 株及び FD7 株は，様々な構造の AHL を短時間で分解し，培養上清中にも高い酵素活性が存在していたことから，菌体外酵素として分泌していることが明らかとなった．次に，これらの菌株の完全ゲノムを決定したところ，既知の AHL 分解遺伝子と相同性を示す遺伝子（*qsdS*）が存在していたことから，クローニングして AHL 分解活性を調べたところ，高い AHL 分解活性を有することが明らかとなった．さらに，QsdS を精製し，様々な温度条件下における比活性を調べたところ，至適温度は 60℃付近と比較的高く，様々な温度で 10 分間プレインキュベートしても 50℃付近までは活性が大きく減少しなかったことから，一般的な AHL 分解酵素と比較して熱安定性も高いことが明らかとなった．

Identification and characterization of a novel *N*-acylhomoserine lactonase gene in *Sphingopyxis* sp. isolated from industrial cooling water systems

○Niina Sato[1], Yaoki Kamimura[1], Taro Iizumi[2], Tomohiro Morohoshi[1]
([1]Fac. Eng., Utsunomiya Univ., [2]Kurita Water Industries Ltd.)

Key words quorum sensing, acyl homoserine lactone, *Sphingopyxis*, cooling water system

3Na10 *Sphingopyxis* 属細菌おけるアシル化ホモセリンラクトン分解遺伝子の多様性解析

○上村 哉生樹[1], 佐藤 新菜[1], 飯泉 太郎[2], 諸星 知広[1]
（[1]宇都宮大院・工, [2]栗田工業(株)）
morohosi@cc.utsunomiya-u.ac.jp

【目的】多くのグラム陰性細菌において，配管の目詰まりやスライム形成の原因となるバイオフィルム形成機構には，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．AHL を人為的に分解して Quorum Sensing を抑制する技術は，バイオフィルム形成の抑制技術として注目されている．本研究グループでは，工場冷却水から単離した *Sphingopyxis* 属細菌が高い AHL 分解活性を有することを明らかにし，新規 AHL 分解遺伝子（*qsdS*）をクローニングすることに成功している．本研究では，様々な保存機関から入手した *Sphingopyxis* 属基準株を対象とし，AHL 分解活性を調査するとともに，*qsdS* 遺伝子の分布を明らかにすることを目的とした．
【方法及び結果】工場冷却水から単離した *Sphingopyxis* sp. EG6 株及び FD7 株，DSM 及び NBRC から入手した 8 株を用い，AHL 分解活性を調査したところ，EG6 株，FD7 株，*S. alaskensis* DSM 13593 株及び *S. bauzanensis* DSM 22271 株が高い AHL 分解活性を示した．次に，各菌株の染色体から *qsdS* の存在を調べたところ，高い AHL 分解活性を有する 4 株には *qsdS* 遺伝子が存在し，*qsdS* 遺伝子の周辺にはトランスポゾン様遺伝子は存在しなかった．さらに，他の AHL 分解活性がほとんど存在しない株は *qsdS* 遺伝子を有しないことが明らかとなり，一部の *Sphingopyxis* 属細菌の高い AHL 分解活性は，*qsdS* 遺伝子の存在が主な要因である可能性が示唆された．

Diversity and characterization of *N*-acylhomoserine lactonase gene from *Sphingopyxis* sp.

○Yaoki Kamimura[1], Niina Sato[1], Taro Iizumi[2], Tomohiro Morohoshi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., [2]Kurita Water Industries Ltd.)

Key words quorum sensing, acyl homoserine lactone, *Sphingopyxis*, lactonase

3Oa01 CRISPR/Cas9 システムによる eGFP ノックインニワトリの作製

萩原 遥太[1], 奥嵜 雄也[1], 飯島 信司[1,2], ○金岡 英徳[1], 西島 謙一[1]
（[1]名大院・工, [2]現愛工大・工・応化）
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．本発表ではトランスジェニック後代取得効率を向上させるため，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 CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行った後，レシピエント胚へと移植する方法の検討を行った．
【方法・結果】
我々が樹立したニワトリ PGC 株に CRISPR/Cas9 システムを用いて，eGFP 遺伝子のノックインを行なった．PGC で強く発現している遺伝子座をターゲットとしてノックインを行なった結果，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 株を樹立に成功した．この PGC 株をレシピエント胚に移植し，5.5 日胚で解析を行なった結果，最大で 84%の効率で移植した PGC がレシピエントの生殖腺へ定着していた．そこで移植を行なったレシピエント胚を孵化させ，生殖細胞キメラニワトリを作製した．性成熟後，これらのニワトリの精子を解析したところ，最大で約 0.6 コピーの導入遺伝子が確認できた．このキメラニワトリの精子を人工授精に用いて交配を行なった結果，90 羽中 27 羽（30%）という高効率でトランスジェニックニワトリの取得に成功した．これらの結果より，我々の樹立したニワトリ PGC 株は生殖細胞への分化が可能であり，この細胞を用いて様々な遺伝子改変ニワトリを作製することが可能になると考えられる．

Generating eGFP knock-in chicken using CRISPR/Cas9-mediated genome engineering

Yota Hagihara[1], Yuya Okuzaki[1], Shinji Iijima[1,2], ○Hidenori Kaneoka[1], Ken-ichi Nishijima[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Fuculty Eng., Aichi Inst. Tech.)

Key words CRISPR/Cas9, transgenic chicken, genome engineering

3Oa02 受容体モチーフライブラリのスクリーニングによる効率的な細胞増殖誘導の実現

○梅根 輝来人, 河原 正浩
（東大院・工）
kawahara@chembio.t.u-tokyo.ac.jp

再生医療や細胞治療では，目的の細胞を生体外で人為的に増殖・分化させる必要がある．このための手法の一つとして，サイトカインや足場材料などの開発が挙げられる．これらは受容体を介したシグナル伝達機構を制御する手法であり，受容体を活性化させるためのリガンドを開発するアプローチであるが，多くの細胞種において高い運命誘導効率を実現することが課題である．これに対し我々は，シグナル伝達を誘導する受容体を人工的に作製し，シグナル伝達のパターンや強度を変えることで，従来のように天然型の受容体に依存した系では無し得なかった高効率な細胞運命誘導を実現することを目的としている．
今回着目したのは，受容体が細胞内のシグナル伝達分子と相互作用する部位であるチロシンモチーフである．チロシンモチーフは受容体の活性化によりリン酸化を受け，リン酸化チロシンを含む周辺のアミノ酸残基まで含めてその相互作用に関与することが知られている．我々はこれまでに，天然受容体由来のモチーフを人為的に配置することで様々なシグナル伝達のパターンを得ることに成功しているが，より直接的に目的の細胞運命を効率的に誘導できる受容体を得るため，新たにモチーフスクリーニングという手法を採った．具体的には，モチーフと各シグナル伝達分子の相互作用がモチーフ配列依存的であることに着目し，モチーフ配列をランダム化したライブラリを作製し，シグナル伝達分子の活性化パターンを網羅的にカバーすることで，細胞の増殖を効率的に誘導できるモチーフをスクリーニングした．このように，モチーフに着目したフェノタイプスクリーニングはこれまでに無い系である．
これまでの実験により，Ba/F3 細胞の増殖を誘導するモチーフのスクリーニングに成功している．本発表では適応する細胞を増やし，系の応用性を拡張した試みに関して報告する．

Realization of efficient cell proliferation by screening of motif library

○Kirato Umene, Masahiro Kawahara
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words signal transduction, tyrosine phosphorylation, screening, proliferation

3Oa03 時計遺伝子 *Per2* 発現の再振動とグルコース添加条件との関係

深浦 恵梨[1], ○藤原 政司[1], 西出 真也[2], 本間 さと[2], 本間 研一[2], 高木 睦[1]
（[1]北大院・工, [2]北大院・医）
takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

【目的】約 24 時間周期の時計遺伝子の発現は細胞分裂やエネルギー代謝関連遺伝子の発現に関わっているとの報告がある．一方，動物細胞の培養中にグルコースを添加すると，時計遺伝子発現の再振動が細胞集団内で観察される．すなわち，グルコース添加操作による時計遺伝子発現の調節を通して，培養細胞集団の機能発現を制御することが期待された．そこで，その端緒として時計遺伝子 *Per2* 遺伝子の発現再振動とグルコース添加条件との関係を調べた．

【材料と方法】*Per2* プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれたラット間葉系幹細胞（MSC）様細胞をディッシュ内で増殖させた後，ルシフェリン及び 10% FCS 含有 DMEM-LG 培地（基本グルコース濃度 0.9 g/l）に培地交換し，すぐにルシフェラーゼ発光強度測定を開始した．発光振動が減衰する測定開始 5 日後に所定濃度のグルコースを培養液に添加し，発光強度の再振動を観測した．測定された振動曲線のグルコース添加前の振幅 l_1 に対する添加後の振幅 l_2 の比（l_2/l_1）を振幅増幅率 $A_{2/1}$ として再振動の指標とした．

【結果と考察】測定開始 5 日後に異なる添加濃度（終濃度 0.012～0.9 g/l）でグルコースを添加した結果，添加グルコース濃度に比例して，振幅増幅率 $A_{2/1}$ が大きくなる傾向にあった．次に，測定開始 5 日後の残存グルコース濃度が異なる（0.006～0.77 g/l）ようにしてからグルコース（0.9 g/l）を添加した結果，残存グルコース濃度が低い方が，振幅増幅率 $A_{2/1}$ が大きくなる傾向にあった．以上から，グルコース濃度の操作により時計遺伝子 *Per2* の発現再振動を調節できる可能性が示された．

Re-oscillation of clock gene *Per2* expression by glucose addition

Eri Fukaura[1], ○Masashi Fujiwara[1], Shin-ya Nishide[2], Sato Honma[2], Ken-ichi Honma[2], Mutsumi Takagi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Med., Hokkaido Univ.)

Key words circadian oscillation, clock gene, luciferase, glucose

3Oa04 長期的に安定な組換えタンパク質高生産株の構築に向けた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], 古賀 雄一[1], 大政 健史[1,2]
（[1]阪大院・工, [2]MAB組合）
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

[背景・目的]
バイオ医薬品生産で汎用される CHO 細胞は，染色体に不安定性をもつことが知られており，その性質が生産性に影響する．安定な抗体高生産 CHO 細胞株を構築するためには，ターゲットとなる適切な染色体の選択と効率的な遺伝子導入が重要である．本研究では染色体数の異なる CHO 細胞株の染色体多様性解析を行い，より高い比生産速度を示した通常より多い染色体数を持つ細胞において，安定した染色体や，抗体高発現に繋がる染色体の候補を特定することを目的とした．
[実験材料・方法]
核型解析には，単離した染色体数が 20 本，及び 39 本の CHO-DG44 細胞，及びそれらを宿主としたヒト化 IgG3 抗体生産細胞を用いた．各細胞の metaphase の細胞を回収し，カルノア液で細胞を固定後，mFISH 法による染色を行い染色体画像を得た．さらに，単離した染色体数が 20 本，及び 39 本の CHO-DG44 細胞を宿主とし，ヒト化 IgG1 抗体を生産する細胞を構築した．
[実験結果・考察]
各細胞約 50 細胞の核型画像から各細胞の 1～10 番及び X 染色体の平均本数と変動係数を算出した結果，通常より染色体数が多い IgG3 抗体高生産細胞にて，染色体数に関して 2 番，3 番，5～7 番，10 番染色体の本数が特に多いことが分かった．更に，染色体数の安定性に関して 1～6 番，8 番染色体の変動係数が平均よりも小さな値を示し，比較的本数が安定していることが分かった．両結果から，2 番，3 番，5 番，6 番染色体のような安定して本数の多い染色体が，安定な抗体高生産株の構築に繋がる効率的な遺伝子導入のターゲット候補になるのではないかと考えた．また，染色体数の多い細胞を宿主として IgG1 生産細胞を構築したところ，IgG3 の場合と同様，IgG1 においても高い比生産速度を示した．今後，IgG1 生産細胞に対しても染色体多様性解析を行う予定である．

Analysis of chromosomal diversity in CHO cell lines for establishment of stable high-productive cell line in the long term recombinant therapeutics production

○Kazuma Kita[1], Noriko Yamano[1,2], Yuichi Koga[1], Takeshi Omasa[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]MAB)

Key words Chinese hamuster ovary cells, chromosome aneuproidy, multicolor fluorescent *in situ* hybridisation method

3Oa05 ミニサークル DNA ベクターを用いた CHO 細胞への逐次遺伝子組込み

○河邉 佳典[1,2], 汪 雪[1], 羽田 毅[1], 井藤 彰[1], 上平 正道[1,2]
（[1]九大院・工, [2]次世代バイオ医薬品製造技術研究組合）
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】我々はこれまでにバクテリア由来のバックボーン配列を削除したミニサークル（MC）ベクターをドナーベクターとして用いることで，Cre-loxP システムをベースとした遺伝子組込み方法で，目的の抗体遺伝子を特定染色体に組み込んだ生産細胞を効率的に取得することに成功している．本発表では，MC ベクターを用いて逐次遺伝子組込みした際の目的細胞の取得効率および抗体生産性を評価した．
【方法と結果】目的遺伝子である scFv-Fc 発現ユニットを，対応する変異 loxP で挟んだドナーベクター（R2）を作製した．R2 内の目的遺伝子部分を MC 作製用プラスミドに組み入れた後，専用の大腸菌株へ形質転換し，R2 を MC 化した（mcR2）．また scFv-Fc 発現ユニットと GFP 遺伝子が対応する変異 loxP で挟まれた R3-Green プラスミドを作製した．ファウンダー細胞として DsRed と変異 loxP があらかじめゲノムに組込まれたファウンダー細胞（CHO/R1）を用い，R2 または mcR2 を R3-Green および Cre 発現ベクターとともに遺伝子導入した．FACS にて解析したところ，mcR2 を用いた場合，R2 と比較して 2-3 倍高くなった．GFP ＋細胞を単離後，取得した細胞株のゲノム PCR 解析および抗体生産を確認したところ，mcR2 を用いたときに目的細胞の獲得率が約 2 倍向上した．定量 PCR で解析したところ期待される遺伝子組込み数を有しており，比生産速度を測定したところ，mcR2 を用いて樹立した細胞でも，同等の生産性を示した．
【謝辞】本研究の一部は，国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の支援によって行われた．

Accumulative targeted transgene integration into CHO cell genome using minicircle DNA vectors

○Yoshinori Kawabe[1,2], Xue Wang[1], Takeshi Hada[1], Akira Ito[1], Masamichi Kamihira[1,2]
([1]Fac. Eng., Kyushu Univ., [2]MAB)

Key words Minicircle DNA vectors, Targeted transgene integration, CHO cells, Cre-loxP

3Oa07 レトロトランスポゾンベクターにおけるレトロ転位のための構成要素の解析

○村上 舞[1], 高橋 真美加[2], 河邉 佳典[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】我々はこれまでに，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行ってきた．本発表では，レトロトランスポゾンベクターにおけるレトロ転位に必要な遺伝子構成要素の調査を目的とした．
【方法と結果】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 LINE-1 の 3'UTR 内に挿入し，レトロトランスポゾンベクター pCEP4/mL12-sc を作製した．ORF2 欠損型レトロトランスポゾンベクター pCEP4/mL1-sc の ORF1 に変異をいれた pCEP4/mL1M-sc と，ORF1 および ORF2 を欠損させた pCEP4/mL-sc を作製し，レトロ転位能を評価した．レトロ転位能は，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薬剤 G418 で選抜できるシステムを用いた．pCEP4/mL1M-sc または pCEP4/mL-sc と対応する ORF 発現ベクターを CHO 細胞に一過性導入し，薬剤選抜した．その結果，G418 耐性コロニーが出現しなかったことから，レトロ転位にはレトロトランスポゾンベクター内部に完全な ORF1 の存在が必要であることがわかった．一方，pCEP4/mL12-sc ベクターからポリ A 領域を削除した pCEP4/mL12-scA-を用いた場合，レトロ転位効率が上昇した．出現したコロニーをクローン化し，ゲノム PCR 解析したところ，レトロ転位を示すゲノム構造であるとともに，抗体生産能を有していることがわかった．

Invesitgation of vector design required for retrotransposition in retrotransposon vectors

○Mai Murakami[1], Mamika Takahashi[2], Yoshinori Kawabe[2], Akira Ito[2], Masamichi Kamihira[1,2]
([1]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words retrotransposons, gene transfer, CHO cells, LINE-1

3Oa08 M2 型腫瘍随伴マクロファージ標的化バイオナノカプセルの開発

○李 昊[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）
haoli44@sanken.osaka-u.ac.jp

マクロファージは白血球の一種であり，死細胞や外来異物を貪食し，抗原提示の機能を司る一方，多くの疾患と密接に関係する細胞である．がんにおいては，腫瘍随伴マクロファージ（tumor-associated macrophage: TAM）が，がん組織周辺の微小環境に多数存在する．TAM は大別して M1 と M2 の二種類があり，M1 は抗腫瘍免疫を増強するのに対し，M2 は抗腫瘍免疫を抑制して，がん細胞の増殖や転移に好都合な環境を形成する．このように M2 型 TAM は，がんの進展に関与するため，治療標的として非常に重要な細胞と考えられている．我々が開発した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る直径約 30 nm の中空ナノ粒子である（Yamada ら，Nat. Biotech. 2003）．これまでに，BNC の表面にプロテイン G 由来の抗体 Fc 結合ドメインとプロテイン L 由来の抗体 Fab 結合ドメインのタンデム分子を提示させた GL-BNC や GL-BNC 融合リポソーム（GL-virosome）が，抗体の存在下で凝集し，ファゴサイトーシス経路によってマクロファージに積極的に取り込まれることを見出し，マクロファージ標的化ドラッグデリバリーシステム（DDS）として有望であることを示した（Li ら，Acta. Biomater. 2018）．本研究では TAM モデルとしてマウスマクロファージ RAW264.7 をヒト上皮がん細胞 A431 と共培養し，抗体を提示させた GL-BNC の細胞内取り込み量を測定した．その結果，RAW264.7 細胞は A431 細胞と比較して 15 倍以上の GL-BNC を取り込むことが明らかとなった．また，ヒト単球細胞株 THP-1 を M1 および M2 様細胞へ誘導し，それぞれの抗体提示型 GL-BNC 取り込み量を測定したところ，主に M2 型マクロファージに取り込まれていた．以上から，抗体提示型 GL-BNC は M2 型 TAM を選択的に標的可能な DDS ナノキャリアであることが示唆された．

Targeting of M2-type tumor-associated macrophages by antibody-displaying bio-nanocapsule

○Hao Li[1,2], Masaharu Somiya[1,2], Shun'ichi Kuroda[1,2]
([1]Inst. Sci. Ind. Res., Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)

Key words drug delivery system, antibody, tumor-associated-macrophage, bio-nanocapsule

3Oa09 網羅的匂い分子解析のリアルタイム定量化を目指したヒト嗅覚受容体発現細胞の樹立

○中村 実世[1], 立松 健司[1], 山﨑 智子[2], 黒田 俊一[1,2]
（[1]阪大産研, [2]香味醗酵）
skuroda@sanken.osaka-u.ac.jp

【背景】哺乳動物は数十万種類の匂い分子を嗅ぎ分ける能力を有するが，嗅覚受容体（OR）はヒトで約 400 種類と限られている．匂い分子 1 種類が複数の OR を異なる強度で活性化し，その匂い情報は 1 次嗅覚中枢である嗅球を経て，2 次神経，3 次神経を経て大脳皮質内前頭皮質嗅覚野へと伝播され，その活性化パターン（OR レパートリー）により匂い分子を識別すると考えられている．一方，特定の匂い分子に対する OR レパートリーの網羅的解析は，近年，我々がマウス嗅神経細胞で全自動 1 細胞解析単離装置により可能にしたが（鈴木ら，Sci. Rep. 2016），ヒト嗅神経細胞の取得が困難であるためヒト OR レパートリーの網羅的解析は依然困難である．他方，ヒト OR シグナル伝達系を培養細胞で再構成する試みは多数あるが，OR 機能の完全な再現が達成されておらず，またリアルタイム解析に不向きなルシフェラーゼアッセイに依存することが多い．
【目的】網羅的匂い分子解析をリアルタイムかつ定量的に行うのに適したヒト OR 発現細胞株の樹立を目指した．
【方法と結果】哺乳類 OR は匂い分子に結合すると，G タンパク質 Gαolf を介してアデニレートシクラーゼを活性化して細胞内 cAMP 濃度を上昇させる．次に，環状ヌクレオチド感受性チャネル（CNG）を開口させ，細胞外からの Ca イオンを流入させる．本研究では，ヒト胎児腎臓由来 293 細胞に CNG を構成するサブユニット群，OR 及び Gαolf の発現を促進するシャペロン群を安定発現させ，各種 Ca イオン指示薬を導入した．そして，Deorphanize 済のヒト OR 群を用いて，その匂い分子に対する応答性を指標に細胞株の最適化を行ったので報告する．

Establishment of human olfactory receptor-expressing cells for comprehensive, realtime, and quantitative analysis of odor

○Miyo Nakamura[1], Kenji Tatematsu[1], Tomoko yamazaki[2], Shun'ichi Kuroda[1,2]
([1]ISIR, Osaka Univ., [2]Komihakko Corp.)

Key words odorant response, cyclic nucleotide-gated channel, biosensor, high-throughput screening

3Oa10 免疫クリアランスを回避する生体膜由来ドラッグデリバリーキャリアの開発

○赤嶺 藍[1], 西村 勇哉[2], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[2]
（[1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ）
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

現在のがん治療では外科的手術や抗癌剤の副作用等によって患者にかかる負担が大きい場合が多い．そこで新たな治療法として，標的のがん組織のみに薬剤を送達するドラッグデリバリーシステム（DDS）の研究が活発に行われている．静脈から投与する DDS キャリアの場合，標的の腫瘍に到達するまでに異物として認識されてしまうと免疫細胞に捕獲されて最終的に排除されてしまう．そこで，このような免疫クリアランスを回避するキャリアの開発が必要である．本研究では，異物として認識されない自己細胞由来の微小粒子であるエクソソームに着目した．また，エクソソームを DDS キャリアとして利用するために，細胞標的能力の付与も行った．具体的には，エクソソームが本来持つ細胞認識能力をがん細胞標的能力に変更するため，多くのがん細胞に発現している Epidermal Growth Factor Receptor（EGFR）を標的とする single chain Fv（scFv）をエクソソーム表面に提示することを試みた．つまり，自己細胞由来のエクソソーム膜によって免疫クリアランスを回避し，表層提示した scFv によってがん細胞を標的可能なキャリアとする．実験方法としては，エクソソームの構成タンパク質である LAMP-2B の表層側の遺伝子を anti-EGFR scFv に遺伝子工学的に置換した膜タンパク質を構築した．これを HEK293T 細胞に形質転換し，anti-EGFR scFv 提示エクソソームを分泌発現させた．培養上清を回収し Western blotting を行った結果，目的のバンドが確認されたため，anti-EGFR scFv 提示膜タンパク質の分泌発現が示された．また，NanoSight による粒子径測定によってエクソソームとして粒子構造を形成している様子が観察された．さらに，共焦点レーザー顕微鏡やフローサイトメーターを用いて，標的のがん細胞への結合能力も確認された．

Development of biomembrane-derived drug delivery carrier for immune escape

○Ran Akamine[1], Yuya Nishimura[2], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words drug delivery system, antibody, Epidermal Growth Factor Receptor, Exosome

人名索引

A

Adegoke Oluwasesan 1Lp06
Adhitama Nikko 1Gp13
Adi Deddy Triyono Nugroho 1Fp06, 1Hp01
Adinda Putri Wisman 3Ca07
Aditiawati Pingkan 2Ca05
Ahmadi Hannaneh 1Ip03
Akasaka Naoki 1Ip16
Akashi Takahiro 3Ca07
Akhtar Mahmuda 2Fa02
Aki Tsunehiro 1Kp08
Alfaro Sayes Daniel Alejandro 2Hp05
Amaliyah Rohsari Indah Utami 1Hp05
Amoah Jerome 1Fp02, 2Hp05, 3Fa05
Amza Rezky Lastinov 1Fp03, 1Fp04
Anand Ajeeta 2Np05
Aoki Masahiro 2Op01
Aoyagi Hideki 1Fp18, 2Np05
Aslam Mehwish 1Gp03
Astawan Made 2Ca05
Aziz Amin ABD 2Na07

B

Baek Seong Yeol 2Gp08
Baranwal Priyanka 2Ja02
Batubara Irmanida S3Kc05
Bhatnagar Sharad 1Fp18

C

Champreda Verawat A2Hp01
Chang Te-Sheng 2Ca07
Choi Yong-Keun 1Lp13
Choi Yu Bin 1Mp12
Chowdhury Ankan Dutta 1Lp06
Chuang Derrick 2Jp03

D

Dahee Seo 3Ha01
Dalmacio Leslie Michelle S3Kc03
Dalsgaard Tage 1Ep12
Dang Tu 2Np06
Deo Vipin Kumar 1Ip08, 1Lp03, 1Lp06
Do Tuan Anh 2Np06
Dolgormaa Bataa 2Hp10
Du Zhi-Qiang 2Ka03
Duong Van Hop S3Kc04
Dutta Chowdhury Ankan 1Lp02
Dwivany Fenny 2Ca02
Dwivany Fenny Martha 2Ca03

E

Eltigani Sara 2La03
Eunjoo Kim 3Ha01
Eurwilaichitr Lily S3Kc02

F

Fahmida Nasrin 1Lp02
Fanani Much Zaenal 2Lp11
Fathima Artnice Mega 2Jp03
Felicia Irene Saputra 2Ca06
Fujimoto Akari 1Ip07
Fujiwara Ryosuke 1Jp12
Fujiwara Shinsuke 1Ip16
Fujiyama Kazuhito 1Ep13, 1Ep14, 2Hp10, 2Hp11
Fukuda Wakao 1Ip16
Fukui Toshiaki 2Ja04
Fukusaki Eiichiro 2Ca03, 2Ca04, 2Ca05, 2Ca06, 2Jp03, 2Kp08, 2Kp09, 2Op01, 3Ca07, 3Na07
Fukushima Ery Odette 2Lp11, 3Ka02
Furuta Masakazu 2Np06

G

Gede Suantika 2Ca06
Gim Geun Ho S3Da01
Goffar Muzajjad Gozal 1Ip08
Gomi Katsuya 3Ca07

H

Hama Shinji 1Fp02, 2Hp05, 3Fa05
Hecht Michael 2Ia03
Heida Naohiko 1Kp18
Hermiati Euis 1Hp01
Herrera Steven 2Ja08
Hiramatsu Rikito 1Ip07
Hirotani Ran 1Kp08
Honda Kazuki 2Np06
Hong Jong Wook S3Hc01

I

Ike Kazunori 1Ip07
Inagaki Kenji 2Ja08
Irifune Tomoya 2Ca04
Ishii Yuri 1Ip16

J

Jaewook Lee 1Lp01
Jang WonJe 1Mp12
Jeon Hyeon Jin 1Op06
Jeon Tae-Joon S3Bc01
Jeong David Wu-Young 1Op06
Jeong Wu-Young 1Lp13, 1Np17
Jo Soyeon 3La08
Juanssilfero Ario Betha 1Fp03, 1Fp04

K

Kabayashi Mayuko 1Ip07
Kadar Adinda Darwati 2Ca05
Kahar Prihardi 1Fp03, 1Fp04, 1Kp04, 3Ha09
Kanao Keita 2Ja02
Kato Tatsuya 1Ip07, 1Ip08
Kato Yasuhiko 1Gp13
Kazuhiro Mizuta 2Fa02
Ke An-Ni 2Ca07
Khin Thandar Myint 1Fp13
Khoris Indra M. 1Lp02, 1Lp03
Kihira Chie 1Fp03
Kim Hyung Joo 1Lp13, 1Np17, 1Op06
Kim Ji Eun 1Lp13, 1Np17, 1Op06
Kim Kwang Jin 1Lp13, 1Np17
Kim Si Wouk S3Da01
Kim Soyoung 2Gp08
Kim Sung Hee 1Fp01
Kimura Kazuyuki 2Ja02
Kisailus David 2Ja08
Kishida Masao 2Np06
Kojima Yasushi 2Op01
Kondo Akihiko 1Fp02, 1Fp03, 1Fp04, 1Fp06, 1Hp01, 1Jp12, 2Hp05, 3Fa05, 3Ha09
Kong In-Soo 1Mp12
Kusumah Dewi 2Kp06
Kwon-Young Choi 3Ha01

L

Lee Jae Min 1Mp16
Lee Jaewook 1Lp02, 1Lp03, 1Lp04, 1Lp06
Lee Sang Hyun 1Fp01, 1Lp13, 1Np17, 1Op06, 3La08, 3La09
Lee Woo Sung 1Op06
Le Thi Thanh Thu 1Np11
Liao James 2Jp03
Liao James C. 2Kp09
Limtong Savitree 2Hp10, 2Hp11
Liu Chi-Hsien 2Fa12
Liu Yi-Xin 2Fa12

M

Maeda Isamu 2Kp06
Matsuura Tomoaki 1Gp13
Meijer Wilfried J. J. 1Gp09
Meslhi Alaaeldin 1Np10
Miguel-Arribas Andres 1Gp09
Minkner Robert 1Ip09
Minoru Maeda 2Fa02
Misaki Ryo 1Ep13, 1Ep14, 2Hp10, 2Hp11
Mukti Yayon Pamula 1Ep13
Mun Ji-Young 2Gp08
Muranaka Toshiya 2Lp11, 3Ka02

Murhandarwati Elsa Heridiana 1Ip06

N

Nakajima - Kambe Toshiaki 1Fp13
Nakamura Satoshi 2Ja04
Nakashimada Yutaka 1Kp08
Nasrin Fahmida 1Lp06
Negoro Seiji 2Ja02
Nemoto Michiko 2Ja08
Nguyen Trinh 2Ha05
Nguyen Kim Nu Nu S3Kc04
Noda Shuhei 1Jp12

O

Odagaki Shin 2Ja02
Ogino Chiaki 1Fp02, 1Fp03, 1Fp04, 1Fp06, 1Hp01, 2Hp05, 3Fa05, 3Ha09
Oh Yujin 1Fp01
Ohashi Takao 1Ep13, 1Ep14, 2Hp10, 2Hp11
Ohyama Kiyoshi 2Lp11
Okamura Yoshiko 1Kp08
Okano Keiichi 2Op01
Okochi Mina 1Ep03
Oluwasesan Adegoke 1Lp01
Orita Izumi 2Ja04
Otsuka Hiromi 1Fp03
Otsuka Mitsuo 1Fp13

P

Pamella Apriliana 1Mp16
Parijadi Anjaritha Aulia Rizky 2Ca03
Park Enoch Y. 1Ip07, 1Ip09, 1Lp02, 1Lp03, 1Lp04, 1Lp06
Park Hae Dae 1Mp12
Park Sae Rom 3La08
Park Saerom 3La09
Park Y.Enoch 1Ip08
Pedersen Ole 1Ep12
Perez Charose Marie Ting 1Kp08
Pham Khanh Dung 1Kp01
Pham Thi Kim Dung 1Np11
Phang Siew Thing 1Jp05
Pontrelli Sammy 2Kp09
Porchetta Alessandro 1Ep08
Pradipta Ambara R. 2Ia04
Prasetya Bambang 1Fp04, 3Ha09
Prihardi Kahar 1Mp16
Puti Wanguyun Aken 1Gp06
Putra Filemon Jalu N 2Kp08
Putri Azalea 2Ma09
Putri Safira Latifa Erlangga 2Ca06
Putri Sastia 2Ca02, 2Ca04, 2Jp03, 2Ka04
Putri Sastia Prama 2Ca03, 2Ca05, 2Ca06, 2Kp08, 2Kp09

Q

Quayson Emmanuel 3Fa05

R

Rabemanolontsoa Harifara 1Jp05, 2Jp04
Rachmadona Nova 1Fp02
Rattanaburi Pitchapa 3Na07
Ren Dongni 2Ja08
Ribordy Greg 3Ha03
Ricci Francesco 1Ep08
Risanto Lucky 1Hp01

S

Saito Kazuki 2Lp11
Saka Shiro 1Jp05, 2Jp04
Sakuntala Saijai 2Ja07
Sakurai Sana Subhan Memon 2Kp09
Salpeter Ron S3Da04
Sasaki Kengo 3Ha09
Sawai Satoru 2Lp11
Seki Hikaru 2Lp11, 3Ka02
Seo Jeong Hyun S3Gc01
Shai Iris S3Da04
Shige Yuki 1Ip16
Shim Sok Young 1Op06
Shimma Shuichi 2Op01, 3Ca07, 3Na07
Shinya Ikeno 2Fa02
Soga Tomoyoshi 2Op01
Song Hak Jin 1Lp13, 1Np17, 1Op06
Srisawat Pisanee 3Ka02
Steven Nathanael 2Op01
Subagyo Dyah Candra Hapsari 2Ja04
Suhaimi Hamizah 1Ip07
Sumirat Ucu 2Ca04
Suwatthanarak Thanawat 1Ep03
Suzuki Tetsuro 1Lp06
Suzuki Tetsurou 1Lp03

T

Takano Eriko 2Ka04
Takemura Kenshin 1Lp02, 1Lp03, 1Lp04, 1Lp06
Tamada Yoshihiro 3Ca07
Tamura Takashi 2Ja08
Tan Marselina I. 2Op01
Tanaka Masayoshi 1Ep03
Tanaka Tsutomu 1Jp12
Teramura Hiroshi 1Hp01
Tomoko Shimokawa 2Fa02
Trinugraha Afi Candra 1Ip16
Triwahyuni Eka 2Jp04
Triyani 1Hp01
Tsai You-Shan 2Ja07
Tsai Yung Yu 2Hp11
Tsai Yung-Yu 2Hp10
Tu Phuong Trang 2Na09

U

Ueno Takashi 1Fp18
Uthailak Naphatsamon 1Ep14

V

Vipin Kumar Deo 1Lp05
Vipin Kumar Deo 1Ip06
Vogel Viola 2Op06

W

Watanabe Hajime 1Gp13
Watanabe Kenshi 1Kp08
Widya Asmara 1Ip06
Wijaya Hans 3Ha09
Wisman Adinda Putri 3Ca08
Wu Chih Chan 2Hp11
Wu Chih-Chan 2Hp10
Wu Jiumn-Yih 2Ca07

X

Xu Jian 1Ip07

Y

Yang Yung-Hun 1Lp13, 1Np17, 1Op06
Yasumoto Shuhei 3Ka02
Yeo Soo-Hwan 2Gp08
Yin Xuan 2Cp05
Yoon Tae Hang 1Lp13, 1Np17, 1Op06
Yopi 3Ha09
Yopi Yopi 1Fp04
Yoshida Ayumi 1Fp02, 2Hp05, 3Fa05
Yung-Hun Yang 3Ha01
Yusianto 2Ca04

Z

Zhong Jian-Jiang 2Ka03
Zinn Manfred 3Ha03

あ

藍川 晋平 2Gp09, 2Gp10
相田 涼介 1Ep01
愛知 真木子 S3Eb03
青井 真人 1Kp07
葵 理恵 1Mp01
青木 茂久 1Op11
青木 壮太 1Ip14
青木 直大 1Hp09
青木 裕史 2Fp03
青木 好辰 1Np15
青木 航 3Ia01, 3Ia10
青野 陸 3La10
青柳 秀紀 2Ep01, 2Ep10, 2Fp11, 2Np04, 3Ea01, 3Ea02, 3Ea04, 3Ea05, 3Ea06, 3Fa08, S3Cc04
赤尾 健 2Da11, 2Ka07
赤坂 直紀 1Gp05
赤澤 陽子 1Dp08
明石 貴裕 2Da12, 3Ca08
赤田 倫治 1Kp02, 2Ga11
赤沼 哲史 S3Hc02

赤嶺　藍　3Oa10
秋　庸裕　1Gp17, 1Kp07, 2Hp07, 2Hp08
秋田　紘長　S3Bc04
秋野　順治　2La01
秋山　佳丈　2Oa03, 2Oa06
秋好　陽香梨　2Ga01
秋吉　裕子　1Dp11
浅井　禎吾　3Ca01
朝井　洋明　S3Mc03
朝倉　大河　2Ja10, 2Ja11
淺田　元子　1Hp02, 1Hp03
浅野　静　A2Cp01
浅野　泰久　1Mp02, 1Mp06, A1Aa02, 2Lp03
浅野　悠太　1Gp18
浅見　忠男　S3Da03
浅見　優月　1Op10
朝山　宗彦　2Hp04
芦内　誠　2Ep11
芦田　久　2Ca08
小豆澤　友希　2Ep07
東　春奈　3Ca04
東　秀隆　2Ip03
東　雅之　1Cp04, 2Ha09, 2Ja03, 2Ka08, 2Kp05, 2Np03, 3Fa09
麻生　祐司　3Ga05, 3Ga06
足立　航平　3Ma05
足立　遥華　2Ip06
新　裕太　2Fa07
跡見　晴幸　1Gp03, 2Ma11
阿野　貴司　2Ha04, 2Ha07, 2Ha08, 2La11
阿野　嘉孝　2Jp05, 2Jp10
油井　信弘　1Fp09, 2Hp09, 2La06, 3Fa04
油谷　幸代　2Kp07
阿部　歩　1Mp09
阿部　勝正　1Mp07, 1Mp08, 2Gp03
阿部　克也　1Fp09, 2Hp09, 2La06, 3Fa04
阿部　敬悦　1Ip13, 2Fa05, 2Fa06
阿部　啓子　2Ca08
阿部　峻之　2Da07, 2Da08, 3Ca04
阿部　拓哉　1Kp02
阿部　匡史　1Mp04
安部　菜月　1Op10
阿部　文明　1Lp17
天尾　豊　S3Bc05
天知　誠吾　S3Fb02, S3Fb04
天羽　宏枝　2Fa09
鮎川　翔太朗　2Ia07
荒　学志　1Kp01
荒井　滋　2La01
荒井　進　2Ha06
新井　隆　1Kp06
新井　智博　2Na09
荒井　啓　2Ga04, 2Ga05
新井　宗仁　1Mp17, 2Lp09, 2Lp10
荒井　良仁　2Mp01
新井　亮一　2Ia03
荒井　渉　2Mp05
荒岡　亮祐　1Jp02
新川　翔也　1Lp16
荒川　知子　3Ha05
荒木　希和子　1Hp16, 1Hp17, 1Hp18, 2Na07, 2Na08
荒木　千絵　2Op04
荒木　優大　2Lp01
荒木　通啓　2Ip08, 2Ip11, S3Gb05
荒木　保幸　S3Gc06
嵐田　遥　2Ha01
有川　尚志　A1Aa04
有田　稔彦　1Ip13
有馬　一成　1Dp08
有馬　二朗　1Ip10, 2La03, 3Ma01, 3Ma11
有本　圭吾　2Da10
粟谷　晃也　2Mp03
安藤　晃規　2Ja07
安藤　翔太　2Ha10, 2Ha11
安藤　寛　3Ga05, 3Ga06

い

飯尾　魁　3Fa07
飯郷　雅之　2Ha01
飯島　信司　2Op11, 3Oa01
飯嶋　益巳　1Lp09
飯泉　太郎　3Na09, 3Na10
飯田　順子　1Kp16
飯田　千里　S3Fb04
飯野　健太　S3Mc06
五十嵐　圭日子　1Hp10
井川　聡　2Ep07
生田　宗一郎　2Gp05
生田　直子　1Cp10, 1Cp11
井口　晃徳　2Cp03
井口　博之　1Np06
池　道彦　1Hp13, 1Hp14, 2Na03, 3Na03, 3Na04, S3Fb03
池内　真志　1Op12
池上　健仁　3Na01
池川　繁男　2Ca01
池添　泰弘　S3Hc04
池田　彩　1Ep05
池田　和貴　S3Eb03
池田　丈　1Jp13, 1Jp14, 1Jp15, 1Lp10, S3Fb01, S3Gc04
池田　光　2Mp07, 2Mp08
池田　富貴子　2Hp03
池永　誠　2Cp05
池野　慎也　1Ep06
池袋　一典　1Ep08, 1Ep09
池部　仁善　S3Gb02
井沢　真吾　2Ha05
石井　沙弥　1Np06
石井　純　1Jp07, 1Lp12, 2Gp09, 2Gp10, 2Gp11, 3Ka06, S3Hb04
石井　伸佳　2Ep04
石井　正治　2Ep05
石井　もも子　2Ca10
石井　友理　1Gp05
石井　義孝　2Lp01, 2Mp10
石垣　友理　2Ia10
石川　周　1Gp09
石川　孝博　2Hp02
石川　聖人　1Gp04, 1Ip14
石澤　秀紘　1Hp13, 1Hp14
石島　智子　2Ca08
石田　圭　2Gp08
石田　丈典　1Jp13, 1Jp14, 1Jp15, 1Lp10
石田　尚之　2Ip03
石田　亘広　3Fa02
石田　裕幸　1Mp06
石原　真以　1Hp12
石原　真奈　2Lp01
井嶋　浩一朗　2Ep03, 2Fa11
泉田　智史　1Ep11
和泉　自泰　1Jp09, 1Kp17, S3Lc05
泉　可也　2Ha06
泉津　弘佑　3Ca01
磯﨑　勇志　1Dp05
礒部　公安　1Mp06
伊田　小百合　3Ga02
伊田　寛之　2Oa12
板谷　かえで　1Jp03
市川　響太郎　2Ma05
市川　暉　2Fa06
市毛　栄太　1Jp04
一谷　勝之　3Ca02
一瀬　博文　2La09
市橋　伯一　2Ia08
市橋　泰範　S3Cb02
市村　栄諭　1Np15
市村　武文　2Jp11
井手　圭吾　3Ia02
井出　曜子　2Hp03
井出口　浩迪　2Gp05
井藤　彰　1Op14, A2Fp01, 3Oa05, 3Oa07
伊藤　あずさ　2Ca08
伊藤　公夫　S3Ec01
伊藤　潔人　S3Gb05
伊藤　圭祐　2Ga06
伊東　謙吾　2Ep09
伊藤　孝司　S3Mc06
伊藤　進　S3Dc04
伊藤　成輝　2Cp10
伊藤　創平　1Mp02
伊藤　俊彦　2Mp06
井藤　俊行　1Hp15, 1Jp02
伊藤　智之　2Ip01
伊藤　伸哉　2Ip05, 2Mp03
伊藤　紀幸　2Lp04
伊藤　遼　1Lp08, 2Ja09
伊藤　英晃　1Hp10

伊藤　栄紘　1Mp14
伊藤　昌文　2Ma02
伊藤　麻里　2Ca01
伊藤　みさご　2Np01
伊藤　通浩　3Ia02
伊東　祐二　1Dp08
伊藤　幸博　S3Cc02
伊藤　弓弦　2Oa07
伊藤　洋一郎　2Gp09, 2Gp10, 2Gp11
稲垣　慶一　1Op07
稲垣　賢二　3Ma10
稲垣　裕　1Ip06
稲留　弘乃　3Ca11
稲野　紘一　2Ia03
稲葉　悠　3Ea07
乾　博　2Hp02
乾　将行　1Np03, 1Np04, 1Np05, 2Ka05
犬伏　祐作　2Oa12
猪野　椋太　1Np18
井上　暁人　1Dp09
井上　順允　1Fp14
井上　加奈子　1Hp14
井上　謙吾　1Gp12
井上　潤　1Cp12
井上　翔太　2Kp10
井上　大介　1Hp13, 1Hp14, 2Na03, 3Na03, 3Na04
井上　貴行　1Ep12
井上　尚　3Ma11
井上　宏之　2Ma06
井上　諭宜　2Ka07
井上　善晴　3Ea08
井上　梨沙　2Lp03
猪熊　健太郎　3Ha07, 3Ha08, 3Ka05
井原　邦夫　2Kp01
今井　健人　1Ep04, 1Ep05
今井　皐　3Ma09
今井　俊宏　1Mp07
今井　史規　2Ha06
今井　祐太　2Oa08, 3Ia09
今田　勝巳　3Ma10
今中　洋行　2Ip02, 2Ip03
今村　維克　2Ip03
今村　保忠　1Fp09, 2Hp09, 2La06, 3Fa04
今村　香乃　3Ea03
岩井　謙一　3Ca02
岩井　良輔　1Op10
岩木　宏明　1Np14
岩倉　遼　2Kp02
岩崎　建史朗　3Ha02
岩崎　裕樹　2Jp06
岩田　悠志　1Kp06
岩田　至叡　3Fa03
岩本　孝信　1Kp01
岩本　七虹　2Ca09

う

魏　菲菲　1Lp15
上垣　浩一　3Ea11
上江田　真衣　2Na01
上田　朋美　1Gp11
上田　宏　1Dp09, 2Ia01
上田　茉奈　2Ka08
植田　愛美　2Cp10
上田　光宏　2Hp02
植田　充美　1Mp18, 3Ia01, 3Ia10
上地　敬子　3Ca05, S3Dc04
上野　絹子　1Ep08
上野　大心　1Ep16
上原　千央　2Ka10
上原　ひかる　2Op04
植松　千暁　3Ca03
上村　昌博　S3Kb01
上村　侑太郎　1Lp11
魚住　奎太　2Ma09
魚住　昇平　1Gp02
魚住　信之　2Ka10, S3Eb04
鵜飼　文広　2Lp06
筌場　将太　2La09
氏家　沙織里　2Cp03
宇田　泰三　1Dp04, 1Dp10, 1Dp11
内海　俊樹　3Ca02
内田　由乃　1Dp03
内野　佳仁　1Cp07
内堀　孝博　1Np16
内山　進　2Gp08
内山　友香　1Fp08
宇都宮　大貴　2Jp05
宇野　紘平　2Ma08
宇野　貴裕　1Hp17
馬越　泰　1Kp15
梅田　茉奈　2Mp05
梅津　光央　2Ia10, 2Ia11, 2Ia12, 2Ip01, 2Ip02, S3Gc02, S3Hc03
梅根　輝来人　3Oa02
梅野　太輔　2Ia02, 2Lp08
梅山　幸子　1Ep15
裏地　美杉　3Ma04
浦田　智宇　2Na11
卜部　喬史　1Kp11
上井　幸司　1Ip12
海野　源人　2Ja05

え

江口　真央　1Hp06
江田　智一　2Ep02
榎本　利彦　2Ia07
榎本　陽介　1Kp14
江邉　正平　2Ha04, 2Ha07, 2Ha08
江本　慎　2Ma07
遠藤　亮　2Gp06
遠藤　佳純　2Cp08
遠藤　輪　2Np04

お

及川　大樹　1Mp11
及川　未早来　2Ia11
生出　伸一　1Np04
王　悦　1Op01
オウ　カン　2Cp01
呉　準席　2Ma02
扇谷　悟　3Ha06
大井　太士郎　3Na08
大井　俊彦　3Ha03
大池　達矢　2Ha04, 2Ha07, 2Ha08, 2La11
大池　智明　1Lp14
大泉　太於　2Kp03
大江　史花　2Lp05
大川内　雅彦　1Gp17
大久保　忠相　2Na03
大熊　盛也　1Cp03, 1Np12
大河内　美奈　2Fp09
大澤　果穂　1Kp09
大澤　朗　1Cp10, 1Cp11, 1Cp12
大島　敏久　2Ma07, 2Ma08, 3La04, 3La05, 3La06, S3Bc04
大島　遼太郎　1Mp06
大城　隆　1Gp07, 1Gp08, 2Mp01
大城　麦人　2Ca11
大隅　早紀　2Op09
大園　昂貴　2La09
大薗　まみ　1Cp05
太田　大策　1Ep11
大田　竹留　3La11
太田　愛美　1Dp07
大田　悠里　1Mp01, 2Fp07
大竹　久夫　S3Fc04
大谷　千晶　1Gp07
大津　誠太郎　1Kp13
大塚　治　3Na05, 3Na06
大塚　未音　3Fa09
大音　徳　1Hp09
大取　靖秀　2Op10
大西　菜月　2Ga08
大西　康夫　1Fp11
大西　優　2La03
大貫　喜嗣　1Op13
大野　翔登　1Jp11
大野　遥　2Na10
大野　博司　1Jp01, S3Cb01
大場　慶司　1Ip12
大場　輝　3Ea03
大箸　信一　2Cp08
大橋　貴生　2La05
大橋　博之　3Ka07
大橋　雅卓　3Fa02
大橋　正孝　2Da09
大東　夏海　2Ca08
大堀　紗貴子　2Ma03
大政　健史　2Ip04, 3Ma05, 3Ma06, 3Oa04, S3Lc01

大室　有紀　1Dp09
大本　貴士　2Ha09, 3Ka07
大森　勇門　S3Bc04
大山　彰　2Ip08
岡　知里　1Dp07
岡　大椰　1Kp12, 2Kp01
岡﨑　文美　1Dp06
岡澤　敦司　1Ep11
小笠原　真也　2Fa08
小笠原　渉　1Kp01, 2Fp08
岡田　憲典　1Gp11, 1Gp12
岡田　丈　2Na11
岡田　晋治　2Ca08
岡田　真衣　3Ia09
岡田　若子　2Ja07
緒方　藍歌　1Op01
岡南　政宏　2Ha04, 2Ha07, 2Ha08, 2La11
岡野　憲司　1Fp12, 2Kp10, 2Kp11
岡野　健太郎　2Oa01
岡野　啓志　S3Bc03
岡野　凌一　2Np02
岡橋　伸幸　1Kp16, 2Op04
岡村　匡浩　1Np16
岡村　佳樹　2Lp05
岡村　好子　1Gp17, 1Kp07, 2Hp07, 2Hp08, 3Fa01
岡本　章玄　S3Ec02
岡本　繁久　3Ca02
岡本　淳之介　2Fa03
岡本　園子　2Fp10
小川　愛未　2Ep06
小川　広大　1Ip11
小川　順　2Ja07
小川　純平　2Ha02
小川　祥二郎　2Ca01
小川　貴弘　S3Fc02
小川　拓哉　1Gp06
小川　信明　1Hp10, 2Ia06, 2Lp02
小川　光輝　1Ep04, 1Ep05
沖　嘉尚　2Op05
荻田　亮　1Cp15, 2Ca09, 2La02
荻野　千秋　1Fp11, 1Hp04, 1Hp05, 1Kp04, 1Kp10, 1Mp16, 2Fa04, 2Ga03, 2Ip11, 2Kp07, 2Op02, 2Op10, 3Ea10, 3Oa10
荻原　淳　1Kp06, 3Ca03
奥嵜　雄也　3Oa01
奥津　果優　2Cp04, 2Cp05, 3Ca01
奥野　稔　3Na06
奥村　一仁　2Np03
奥村　友太　1Gp07, 1Gp08
小椋　義俊　1Gp15
小栗　一将　2Mp05
小栗　秀俊　2Fa03, 3La07
小栗　莉奈　2Ma03
桶田　凜　3Na01
小江　誠司　3La03
長田　裕之　S3Da03
小山内　崇　2Jp01, 2Jp02, 2Lp07
小澤　裕介　1Jp01
尾島　由紘　1Cp04, 2Ha09, 2Ja03, 2Ka08, 2Kp05, 2Np03, 3Fa09
尾瀬　農之　1Mp09
尾関　健二　1Kp11, 2Cp08, 2Cp09
小田　彰恭　2Op03
小田　忍　1Kp09, 2Kp04
小田　達也　2La07
織田　昌幸　3La01
小田　祐之亮　2Mp09
尾高　雅文　1Hp10, 1Ip18, 2Ia06, 2Lp02
小田巻　俊孝　1Gp15
越智　健太郎　1Np12
越智　匠　2Hp08
越智　浩　1Lp17
落合　秋人　1Ep01, 1Ep02, 1Ip11
乙黒　美彩　1Np01
鬼塚　正義　2Fa09
小沼　泰子　2Oa07
小埜　栄一郎　1Mp11
小野　聡子　2Ep06
尾上　昌平　3Ca02
小原　仁実　3Ga05, 3Ga06
小原　優季　3Fa06
小俣　達男　S3Eb03
小山　貴之　2Mp04
尾山　昌弘　2La02
折田　和泉　2Ja05, 2Ja06
恩田　岳英　1Fp09
恩田　裕　2Mp10

か

海道　直生　3Ha11
嘉悦　佳子　2Ka02
垣見　和宏　1Ip04
景山　達斗　1Op15
笠井　尚哉　1Cp16, 1Cp17, 1Cp18
笠井　由紀　2Hp03
笠倉　理紗　2Na12
笠嶋　めぐみ　S3Mc06
笠原　紳　2Ka10
梶原　康宏　S3Mc02
梶本　真由　1Hp11
梶山　慎一郎　2La01, 2La11
柏　雅美　2Ja01
柏木　紀賢　1Mp16, 3Ea10
柏原　大輔　2La08
数岡　孝幸　2Na04
春見　隆文　1Kp06
糟谷　まり　2Hp06
風　友稀　2Cp08
片岡　ちひろ　2Cp03
片岡　涼輔　3Ca03
片倉　啓雄　1Cp06, 1Cp09, 2Ep06, 2Jp07, 2Jp08, 3Ha11
片野　裕太　S3Bc03
片平　正人　2La08
片山　周平　2Fa04
片山　淳子　2Fa07
片山　翔太　2Ga09
片山　琢也　1Kp12
片山　徳賢　2Lp07
片山　葉子　S3Fc02
勝河　祐希　1Ip03
勝田　知尚　2Fa10
加藤　悦子　2Gp06
加藤　晃　1Ep16
加藤　幸一郎　S3Gc05
加藤　純一　1Fp16, 1Ip17, 1Np02, 2Hp08
加藤　節　2Hp08
加藤　創一郎　1Gp04
加藤　太一郎　1Dp08
加藤　完　1Jp01
加藤　晃代　1Dp01, 1Dp02, 1Dp03
加藤　寛子　1Lp12
加藤　寛人　2Oa10
加藤　寛之　3Ia08
加藤　雅士　1Np09, 2Ma01, 2Ma02, 2Ma03
加藤　康夫　1Mp06, 2Ja07, 2La04
加藤　泰彦　2Ga10
加藤　勇太　3Ha05
加藤　芳尚　3Ea07
加藤　りさ　2Ja05
加藤　竜司　1Op01, 2Oa07, 2Oa08, 2Oa09, 2Oa10, 2Oa11, 3Ia07, 3Ia08, 3Ia09, S3Bb04, S3Lc07
門岡　千尋　3Ca01, S3Dc05
金井　保　1Gp03
金尾　圭太　2Ja01
金ヶ崎　三千翔　1Np06
金森　拓　1Np16
金森　敏幸　2Oa10, S3Bb04
金山　直樹　1Dp07
蟹江　慧　1Op01, 2Oa07, 2Oa08, 2Oa09, 2Oa10, 2Oa11, 3Ia07, 3Ia08, 3Ia09, S3Bb04
金岡　英徳　2Op11, 3Oa01
金子　喬士郎　1Op01
金子　恒太郎　1Mp05
金子　直恵　2Ia05
金子　由喜　1Hp15
金子　嘉信　3Ha11
金子　凜　2Op03
金松　雅俊　2Ha06
加野　浩一郎　2Op05
賀野　壮一朗　3Ma02
狩野　文香　S3Eb04
鎌形　洋一　3Ha06
鎌田　健太郎　1Jp08
蒲池　利章　1Mp14
上條　順也　2Ma02
上平　正道　1Op14, 3Oa05, 3Oa07
上村　直史　2Ha03
上村　光浩　1Ep04, 1Ep05

上村　哉生樹　3Na09, 3Na10
神谷　典穂　S3Bc06
亀崎　和輝　S3Fc02
亀田　倫史　2Ia11, 2Ip01, S3Gb02, S3Hc03
鴨木　明子　1Np02
唐澤　昌之　1Mp10
河合　功治　1Mp05
河合　繁子　2Ia02, 2Lp08
河合　総一郎　1Gp06
河合　富佐子　3La01
河合　美桜　2Jp07, 2Jp08
川上　茅咲　3Ea03
河岸　洋和　1Fp15, 1Hp08, 2Na10
川口　太一　2Ha09
川口　剛司　1Hp11
川口　秀夫　1Fp11, 2Kp07
川﨑　了　2Fa03, 3Fa03, 3La07
川崎　健　1Np10
川崎　典起　3Ga01, 3Ga02
川﨑　はるか　2Ep02
川﨑　浩子　1Cp07, 2Ip10, S3Kc01
河﨑　雄太　2La08
川島　成貴　2Hp09
川島　万凜　2Fp06
川尻　彩音　3Fa07
川名　修一　1Kp16
川西　琢也　2Na01, 3Ga04, 3Na02
河野　響　1Gp11
川端　潤　2Lp06
河原　あい　1Cp13
河原　光希　2Mp04
河原　正浩　3Oa02, S3Lc06
河邉　佳典　1Op14, 3Oa05, 3Oa07
川村　出　2La08
川村　美帆　2Na05
川本　純　1Gp06
河本　正次　1Dp12
河原崎　泰昌　2Ga06
諫田　康成　2Oa03
神並　美華　1Op09
菅野　学　2Ka01
神原　亮大　1Jp13, 1Jp14, 1Jp15

き

木賀　大介　2Ia07
菊川　寛史　2Lp04, 2Lp05, 2Lp06
菊田　実花　3Ea01
菊地　淳　1Lp15, 2Ja10, 2Ja11, S3Cb05
菊地　のぞみ　3Ca11
菊地　真裕　2Ip02
菊池　亮太　2Ha09
来住　秀憲　2Ip04
岸田　隆寛　3Ka07
木島　尚輝　2Ma03
岸本　憲明　3Ea11
喜多　晃久　2Hp08, 2Jp06, 2Na02
北　一真　3Oa04
北　伸二　1Gp01
喜多　靖子　3Ca09
喜田　直孝　2Ka12
北岡　卓也　2La09
北岡　直樹　2La04
北垣　浩志　1Cp08, 2Ca10, 2Ca12, 2Da11, 2Jp09
北川　裕之　S3Mc06
北川　学　2Cp10, S3Db04
北川　雄輝　3Ma10
北川　諒治　2Ga07
北口　哲也　1Dp09, 2Ia01
北里　洋　2Mp05
北島　悠花　1Cp08
北田　雄基　3Ha08
北出　幸広　2Ka05
北野　勝久　2Ep07
北原　知恵　2Ia09
北堀　智希　1Kp07
北村　岳　2Na05
北村　さや香　3Ka10
北村　純一　1Mp13
北本　宏子　2Gp06, 2Gp07
木塚　康彦　S3Mc04
吉川　真広　1Hp12
木戸　ゆかり　2Mp05
木野　邦器　3La10, 3Ma02, 3Ma03
紀ノ岡　正博　2Oa01, 2Oa02, S3Lb03
木下　崇司　S3Mc06
木下　理恵　1Ip01, 1Ip02
木原　摩耶　2Np03
金　賢徹　1Op04
金　美海　2Oa01
木村　和幸　2Ja01
木村　勝紀　2Jp11
木村　信忠　2Ga01, 2Ka01
木村　将弘　2Fp04
木村　友紀　2Ia02
清野　珠美　3Ca10
桐村　光太郎　2Lp01, 2Mp09, 2Mp10
金城　浩二　1Lp08, 2Ja09
金原　和秀　1Np11, 1Np12, 2Na11

く

草加　直幸　1Op10
日下部　均　3Ma10
日下部　涼子　2Oa10
草場　裕貴　2Jp09
工藤　恒　2Lp09
工藤　優輝　2Ha10, 2Ha11
國澤　純　1Cp06
國武　絵美　2Gp06
國富　理紗子　2Ia04
久原　哲　2Fp06
久保　研二　1Ip12
久保　智里　1Lp17
久保　幹　1Hp16, 1Hp17, 1Hp18, 2Na07, 2Na08
久保　勇貴　1Gp15
久保田　瞳　1Mp02
窪寺　隆文　2Da12, 3Ca08
窪村　有紗　2La05
熊谷　和晃　2Ep02
熊谷　孝則　2Ga02
熊澤　皆　2Ip06
熊田　陽一　1Fp07, 1Fp12, 1Fp14, 2Ep03, 2Fa07, 2Fa08, 2Fa11, 2Fp02
熊野　舞香　2Ka11
倉敷　凌太　1Gp08
倉田　淳志　3Ea11
倉田　博之　S3Hb05
倉橋　敦　2Cp11
倉橋　健介　2Np01, 2Np02
倉光　香奈　1Cp09
倉本　歩　3Ma03
栗岡　純平　1Np18
栗林　喬　2Da10
栗原　達夫　1Gp06
栗本　昌樹　1Lp17
栗本　祐樹　2Ha03
厨　祐喜　2Ip08
黒木　洋明　2Ja10
黒沢　則夫　2Ma07, 2Ma08
黒澤　尋　1Op13
黒田　章夫　1Jp13, 1Jp14, 1Jp15, 1Lp10, S3Fb01, S3Gc04
黒田　俊一　1Lp09, 3Oa08, 3Oa09
黒田　照夫　2Ga02
黒田　ひかり　3Ga05
黒田　真史　1Hp13, 1Hp14, 2Na03, 3Na03, 3Na04, S3Fb03
黒部　督恵　3Ma07

け

解良　康太　S3Eb04
解良　芳夫　1Mp07, 1Mp08, 2Gp03

こ

小池　英明　2Gp07
小岩　雅和　2Fp04
小祝　敬一郎　1Gp14
高　暁冬　2Gp01
幸崎　涼　1Mp15
糀谷　紗季　2Ma02, 2Ma03
幸田　明生　2Ia10
合田　雅浩　3Ga03
合田　亮　2Np01
河野　恵子　S3Mb02
鴻池　史憲　2Fp01
古賀　雄一　2Ip04, 3Ma05, 3Ma06, 3Oa04
小川　雅人　1Lp08, 3Ia03
後閑　俊哉　2Mp08
小木戸　謙　2Fp03
越田　一朗　2Oa02
小柴　佑介　2Na12
兒島　憲二　S3Bc03
兒島　孝明　1Dp02, 1Dp03, 1Kp12, 2Kp01

児島　智樹　2Ia01
小島　伸彦　1Op11
小島　基　1Fp10
小関　卓也　2Ma05
小高　敦史　S3Mb05
小竹　史哉　3Na05, 3Na06
小谷　葉月　3Ia05
小谷　真也　1Ep07
児玉　浩明　1Ep15, 1Hp15, 1Jp01, 1Jp02, 1Jp03, S3Cb01
小寺　智博　1Kp03
後藤　綺花　2Ca01
後藤　猛　2Fa01, 2Fp10
五島　徹也　2Da11
後藤　正利　2Ga01, 3Ca01, S3Dc04, S3Dc05
児波　克哉　1Cp04
小西　正朗　1Np02, 2Cp02, 2Ep02, 3Ha05, 3Ha10
小濱　可奈絵　2Ca12
小林　功　S3Mc06
小林　一幾　2Ia02
小林　和輝　3Ea05
小林　淳平　1Kp05
小林　誠治　2Ja03
小林　新吾　A1Aa04
小林　巧　2Fa07
小林　剛　2Na05
小林　哲夫　2Kp01
小林　稔真　2Na12
小林　直也　2Ia03
小林　日花梨　2Ka09
小林　英城　2Mp05
小林　大起　1Ip10
小林　弥生　S3Fb04
小林　優真　3Ha07, 3Ka05
小林　洋介　2Ha06, 3Ha06
小堀　俊郎　1Gp17
駒　大輔　2Ha09, 3Ka07
小松崎　亜紀子　2Gp01
駒林　卓磨　3Ma03
五味　勝也　2Ga04, 2Ga05, 2Ga06, 2Ma05
古村　崚　3Ia01
古明地　敬介　2Fa05, 2Fa06
米野　雅大　2Ca08
小森　彩　1Fp10
小森　有華　1Dp03
是常　友紀　1Cp16
権平　文夫　2Fa08
近藤　昭彦　1Cp11, 1Cp12, 1Fp11, 1Fp12, 1Jp04, 1Jp16, 1Kp04, 1Kp05, 1Kp10, 1Lp12, 1Mp16, 2Fa04, 2Ga03, 2Gp09, 2Gp10, 2Gp11, 2Ip11, 2Op02, 2Op10, 3Ea10, 3Ha07, 3Ha08, 3Ka04, 3Ka05, 3Ka06, 3Oa10, S3Hb03
近藤　敬子　2La08
近藤　聡　1Hp09
近藤　澄夫　2Cp10
近堂　菜月　2La04
近藤　秀裕　1Gp14
近藤　龍一　1Mp14
今野　聖矢　1Mp07
今野　宏　S3Db01

さ

斉藤　寿槻　1Ep01, 1Ep02
斉藤　加奈子　2Fp07
斎藤　恭一　2Ia02, 2Lp08
斉藤　俊也　S3Eb04
齋藤　大輝　2Ka08
齋藤　貴広　1Mp02
齊藤　隆行　2Ka07
齊藤　太郎　1Ep09
齋藤　翼　3La10
齊藤　三希子　S3Da05
齋藤　裕　2Ia11, S3Hc03
佐賀　清崇　2Ha06
酒井　亜希　3Ia05
酒井　杏匠　2Ma01, 2Ma02, 2Ma03
酒井　謙二　2Na09, S3Cb03, S3Cc05
境　慎司　S3Lb05
酒井　徹平　2Oa08
阪井　康能　3Ka01
酒井　優　2Ma01
坂上　寛敏　1Np02
榊原　早津季　2Ma10
坂口　由希菜　1Gp08
酒瀬川　信一　1Mp02, 2Mp04
酒瀬川　世瑠　1Cp15
坂田　研二　1Lp15, 2Ja10, 2Ja11
阪田　真澄　2Ip07
酒谷　佳寛　2Ia08
阪中　幹祥　1Gp15
坂本　康二　2Lp08
坂元　仁　1Gp10
阪本　龍司　2Hp02
坂本　憲広　1Cp10
坂元　博昭　1Lp14, 3La04, 3La05, 3La06, 3La11
阪本　真由子　1Cp08, 2Ca12
坂本　祐一朗　2Ep03, 2Fa11
鷺　陽香　1Jp01
櫻谷　英治　S3Kb03
櫻庭　春彦　2Ma07, 2Ma08, 3La04, 3La05, 3La06, S3Bc04
提箸　祥幸　1Ip11
座古　保　2Ep07, 2Ia04, 2Ia05
佐古田　久雄　1Gp05
佐坂　文武　3Fa01
笹川　洋平　2Mp05
佐々木　海　1Mp09
佐々木　克仁　2Ma05
佐々木　建吾　1Cp10, 1Cp11, 1Cp12
佐々木　智子　2Hp04
佐々木　大作　2Hp04
佐々木　大介　1Cp10, 1Cp11, 1Cp12, 1Kp05
佐々木　千鶴　1Hp02, 1Hp03
佐々木　美月　2Hp04
篠笥　光慶　1Cp14
佐々木　陽介　1Cp02
笹野　佑　2Gp05
佐々野　僚一　1Lp16
笹原　健嗣　2Ia03
笹渕　優衣　2Mp06
佐藤　麻子　2Op06
佐藤　俊輔　A1Aa04, 3Na08
佐藤　伸　1Hp07
佐藤　喬章　2Ma11
佐藤　高彰　2Ia03
佐藤　琢　S3Bb04
佐藤　友哉　1Cp08
佐藤　新菜　3Na09, 3Na10
佐藤　道夫　2La08
里村　武範　2Ma07, 2Ma08, 3La04, 3La05, 3La06, 3La11
佐野　杏奈　2Jp07
佐野　公亮　1Jp14
佐野　芽生　3Ga05, 3Ga06
佐野　元昭　2Fa05, 2Fa06
佐原　健彦　3Ha06
鮫島　正浩　1Hp10
澤川　史明　2Oa02
澤邊　朋美　1Cp04

し

椎名　一樹　2Kp04
塩谷　侑子　2Cp08
塩野　義人　2Ma05
塩見　尚史　2Oa05
塩屋　健一　2Ga12
繁　宥樹　1Gp05
重松　亨　2Cp03
志田　洋介　1Kp01, 2Fp08
七田　沙耶香　1Mp06
篠崎　一雄　S3Da03
篠田　優　2Lp03
篠原　玉樹　1Jp09
篠原　裕之　3Ca11
篠原　信　2Ja07, S3Da02
篠原　涼平　1Cp10
柴田　晃　1Cp17
柴田　敏行　1Mp18
渋田　真結　2Oa10, 2Oa11, S3Bb04
嶋田　礼迪　1Fp05
嶋津　敦子　2Fa09
島林　真人　3Ia04
島村　麻美子　1Cp07
清水　一憲　1Ep04, 1Ep05, 1Hp12, 1Lp17, 2Op09, 3Ia07
清水　克彦　1Ip10, 2La03, 3Ma01, 3Ma11
清水　（肖）金忠　1Gp15
清水　慈　2Lp04
清水　孝彦　1Jp01

清水　達也　S3Lb01
清水　智子　1Lp15
清水　弘樹　S3Mc01
清水　浩　1Jp08, 1Jp17, 1Jp18, 1Kp16, A1Aa03, 2Ip07, 2Op04, 3Ka06, 3Ka10, 3Ka11, S3Eb02
清水　美里　1Dp04
志水　元亨　1Np09, 2Ma01, 2Ma02, 2Ma03
清水　友佑　2Ep02
清水　裕　1Ep09
志村　芙美　2Fp04
下飯　仁　2Ka07
下川　直史　1Cp01, 1Cp02, 2Fp05
下川　麻優子　1Ep15
下里　剛士　S3Hc06
下澤　勇弥　1Mp03
下出　崇樹　3Na02
シャヒル　アミル　1Ep06
張　鈺爽　2Ia10
許　志豪　1Cp08
胥　欣欣　2Gp01
城　斗志夫　2Da10
城　宜嗣　2Lp02
荘司　長三　1Mp10
白井　智量　2Ip10, S3Hb03
白井　裕貴　2Mp11
白石　慧　1Mp11
白石　敦士　3Ca06
進　和美　S3Bb04
新海　佑介　1Dp02
新木　翔太　3Ma09
新谷　尚弘　2Ga04, 2Ga05
新谷　智子　2Ma05
新谷　政己　1Cp03, 1Np11, 1Np12, 2Na11
神藤　定生　1Fp08, 2Ma01
新間　秀一　1Kp13, 1Kp14, 3Ca08
新名　俊仁　1Jp03

す

鄒　子燕　2Ha02
末　信一朗　1Lp14, 2Ma07, 2Ma08, 3La04, 3La05, 3La06, 3La11
須江　夏希　3Ha04
末田　慎二　1Lp11
菅原　康里　1Fp09, 2Hp09, 2La06, 3Fa04
菅原　誠吾　1Kp03
杉浦　慎治　2Oa10, S3Bb04
鋤先　まゆ子　2Ip10
杉田　晴佳　2Ha03
杉野　雄規　1Hp04, 1Hp06
杉村　康司　1Ip12
杉本　恭子　1Kp09
杉本　直久　2Ha06
杉本　幸子　2Da08, 2Ka11, 2Ka12
杉本　良太　2Ca12
杉森　大助　1Mp02, 2Mp04
杉山　友康　3Na01
杉山　政則　2Ga02
杉山　峰崇　2Gp08
杉山　友亮　2Fp02
須崎　萌　2Op08
鈴木　昭浩　1Hp02
鈴木　淳巨　2Ia09
鈴木　市郎　2La08, 2Na05, 2Na12
鈴木　克彦　3Ca11
鈴木　健吾　2Ca12, 2Jp02
鈴木　康太　2Na12
鈴木　伸　3Ma02
鈴木　琢磨　2Mp07, 2Mp08
鈴木　健裕　2Fp10
鈴木　哲朗　1Lp05
鈴木　利雄　2Ca08
鈴木　尚幸　2Ja06
鈴木　菜月　2La03
鈴木　隼人　1Ep10
鈴木　治人　3La05, 3La06
鈴木　宏昭　1Hp12
鈴木　宏和　1Gp07, 1Gp08, 2Mp01
鈴木　寛人　2Ga11
鈴木　宗典　1Fp10
鈴木　義之　2Fp08
須田　彰一郎　3Ia02
須田　雅子　2Ka05
角田　一真　1Jp09
炭谷　順一　1Hp11

せ

関　実　2Oa04
関口　はつ美　2Op03
関口　拓史　2Ka12
瀬島　祐大　3Ka08
瀬筒　秀樹　S3Mc06
瀬戸口　翔　3Ca02
千賀　明香音　3La01
善藤　威史　1Cp13

そ

曾　伝濤　2Cp04
惣田　訓　3Na04, S3Fb03
相馬　智史　2Ja11
相馬　悠希　1Jp09, 3Ha02
曽我　亜由美　1Fp15
曽田　匡洋　2Ka02, 3Ea10
曾根　輝雄　1Mp09
園木　和典　2Ha03
園元　謙二　S3Cc03
曽宮　正晴　3Oa08
宋　致宖　2Ia03

た

ターナー　ピーター　1Ep12
平良　東紀　3Ca05, S3Dc04
田尾　文哉　1Op11
多賀　直彦　3Ea03
高井　まどか　S3Gc06
高尾　美月　1Jp10
高尾　佳史　S3Db03
高木　航太郎　1Cp03
高木　康裕　2Ca10
高木　佑希子　2Gp05
高木　妙子　2Fp07
高木　俊之　S3Bb04
高木　博史　2Da07, 2Da08, 2Da09, 2Ka11, 2Ka12, S3Mb08
高木　昌宏　1Cp01, 1Cp02, 2Fp05
高木　睦　1Op05, 3Oa03
高久　洋暁　1Kp01
高島　英造　1Mp04
高島　匠平　2Gp08
高須賀　太一　2Ma03
高瀬　良和　3Ca02
高田　和真　2Gp05
高田　良二　3Ca11
高谷　信之　S3Eb03
高塚　由美子　2Na06
高野　力　2Fp11
高野　真希　1Fp17, 2Kp02
高橋　海　1Lp08
高橋　慶太郎　1Np08
高橋　憲司　1Hp04, 1Hp05, 1Hp06
高橋　憲司　1Op07, 1Op08, 1Op09, 2Ep08
高橋　浩一　2Fa08
高橋　沙綾　1Fp15
高橋　沙織　3Ca11
高橋　修一郎　S3Kb04
高橋　祥司　1Mp07, 1Mp08, 2Gp03
高橋　智聡　2Op04
高橋　徹　1Ip13, S3Dc03
高橋　奈津美　1Kp11
高橋　宏和　1Gp17, 1Kp07, 2Hp07, 3Fa01
高橋　昌樹　2Ia01
高橋　将人　2Ep01, S3Cc04
高橋　雅弥　2Cp09
高橋　正之　3Ca09
高橋　真美加　3Oa07
高橋　祐菜　1Cp01
高橋　佳江　S3Mc01
高見　英人　2Mp05
高見沢　健留　1Kp01
高峯　和則　2Cp04, 2Cp05, 3Ca01
高宮　良太　2Op03
高村　映一郎　3La05, 3La06
高谷　直樹　2Kp03, 2La10
田川　聖一　3Ia04
瀧上　和也　2Mp02
瀧川　義浩　2La01
滝口　有沙　2Mp09
滝口　昇　2Na01, 3Ga04, 3Ia11, 3Na02
滝澤　昇　A1Aa01
瀧澤　秀世　2Oa03, 2Oa06
滝田　禎亮　S3Bc03
武生　みのり　1Mp09

田口　和真　1Np06
田口　精一　3Ha03
田口　久貴　2Gp05
田口　博明　1Dp10, 1Dp11
竹居　孝二　1Mp04
武内　章　2Ep06
竹内　健人　3Ha05
武内　正輝　3Ea09
武尾　正弘　1Np18, 2Ja01, 2Ka06
竹澤　俊明　1Op01
竹下　典男　S3Mb03
武田　志津　S3Gb05
竹田　哲也　1Mp04
武田　真由子　1Fp07
武田　穣　2La08, 2Na12
竹田　雄大　3La07
竹中　慎治　2Ma04
竹中　武藏　1Mp16, 2Op02, 3Ea10
竹原　一起　2Ka06
竹原　宗範　3Ea07, 3Ea08, 3Ea09
竹村　海生　2Jp06
竹村　謙信　1Lp05
竹屋　壮浩　2Jp01
竹山　春子　1Lp08, 2Ja09, 3Ia02, 3Ia03
田島　誉久　1Fp16, 1Ip17, 1Np02, 2Hp08
田代　康介　2Fp06
田代　幸寛　2Na09, S3Cb03, S3Cc05
田代　陽介　1Cp03, 2Ha10, 2Ha11
多田　和樹　2Lp08
多田　三菜美　1Hp13
舘　博　2Na04
立花　亮　1Gp16, 2Oa12
巽　祐介　3Ma05
楯　芳樹　1Op15
伊達　康博　1Lp15, 2Ja10, 2Ja11
館野　浩章　2Oa07
立松　謙一郎　S3Mc06
立松　健司　3Oa09
田中　克典　2Ia04
田中　賢二　2Ep09, 2Ja06
田中　孝明　1Ep01, 1Ep02, 1Ip11
田中　拓未　1Ip13, 2Gp06, 2Gp07
田中　勉　1Fp12, 1Jp04
田中　剛　1Fp05, 1Lp07
田中　俊雄　1Cp15, 2Ca09, 2La02
田中　成美　1Mp08
田中　信行　2Op06
田中　眞人　2Ip06
田中　祐圭　2Fp09
田中　優　2Ca11
田中　瑞己　2Ga04, 2Ga06, S3Mb04
田中　靖浩　1Np15, 2Hp06
田中　悠二　1Np01
田中　裕也　1Np03
田中　陽　2Op06
田中　淳和　2La12
田中　礼士　1Mp18
田邊　弘毅　1Ip13
谷　明生　1Mp13
谷　修治　1Hp11
谷内　達彦　1Op08
谷口　博範　2Kp11
谷口　正之　1Ep01, 1Ep02, 1Ip11
谷口　茉莉亜　1Cp09
谷畑　友基　2Kp05
谷端　玲奈　2Fa08
田畑　和彦　1Jp11
田畑　琢也　1Lp12
田畑　風華　2Fa05
田原　悠平　1Cp03
玉井　雅也　2Gp11
玉置　尚徳　2Cp04, 2Cp05, 3Ca01, 3Ca02, S3Dc05
玉田　佳大　3Ca08
田丸　浩　1Dp06
田村　隆　3Ma10
田村　武幸　2Ip09
田村　具博　2Ka01
田村　廣人　1Dp01, 1Fp08
田村　磨聖　2Oa10, S3Bb04

ち

近成　直斗　1Np18
地白　和樹　1Gp16
千葉　靖典　2Gp01, S3Mc01
チュンチャイ　マッタナ　1Ip17
張　斯来　1Kp10, 2Fa04

つ

塚越　かおり　1Ep08, 1Ep09
塚越　崇之　3Fa04
塚原　拓也　2Hp03
塚原　正俊　2Da07, 2Da08, 3Ca04, S3Dc02
柘植　圭介　2Ca10, 2Ca12, 2Jp09
柘植　謙爾　1Jp07, S3Hb02
柘植　丈治　3La02
柘植　陽太　1Hp04, 1Hp05, 1Hp06
辻　史忠　1Kp03
辻　雅晴　2Cp06
辻　敬典　2Ga08
辻井　雅　S3Eb04
辻上　誠也　1Np09
辻塚　誠一郎　2Ep09
辻野　義雄　1Cp01, 1Cp02
津田　宏治　2Ia11, S3Hc03
津田　佑介　2La10
土金　恵子　2Ip10
土戸　哲明　1Gp10
土屋　麻美　2Jp07, 2Jp08
土屋　智顕　1Ep17
堤　浩子　1Kp10, 2Fa04, 2Ga03, S3Mb05
堤　祐介　S3Ec03
常田　聡　1Mp01, 2Fp07, S3Fc04
角岡　良亮　2Ip05
津吹　澄　2Ca01
坪井　宏和　2Ia10
坪井　裕理　1Lp15
湊元　幹太　1Dp05
鶴田　篤弘　1Dp08
鶴田　開生　2Ga12
鶴野　圭悟　3Ha02
鶴本　智大　1Ep11

て

出村　拓　1Ep16, S3Cc01
寺内　裕貴　1Ip13
寺尾　拓馬　2Ip10
寺澤　摩周　3Ia09
寺田　昭彦　S3Fc01
寺西　綾香　1Kp09
田　小維　2Na05

と

土居　克実　2Fp06
土居　幹治　2Ma04
土居　友梨子　1Hp10
東海　彰太　3Ma01, 3Ma04
堂崎　雅仁　S3Mc06
東條　元昭　2La12
東田　英毅　1Kp06
堂前　直　2Fp10
道羅　英夫　1Np11
遠山　忠　1Np15, 2Hp06
渡嘉敷　直杏　S3Dc03
渡嘉敷　正司　3Ca05, S3Dc04
渡嘉敷　みどり　3Ca05, S3Dc04
常盤　豊　3Ga02, 3Ga03
徳田　耕二　2Cp08, 2Cp09
徳田　宏晴　2Na04
徳光　浩　1Dp07
徳本　勇人　2Np01, 2Np02
徳樂　清孝　1Ip12
當舍　武彦　2Lp02
戸田　清　2Ep05
戸田　年彦　1Jp01
戸田　成美　1Jp13
戸田　弘　2Mp03
轟木　堅一郎　1Ep09
飛野　智宏　2Na12
冨田　昌弘　1Dp05
富田　因則　1Ep17
冨田　結芙子　2Jp02
富永　大介　2Kp07
富永　依里子　3Fa01
戸谷　吉博　1Jp07, 1Jp08, 2Ip07, 3Ka10, 3Ka11, S3Eb02
外山　博英　3Ca04, S3Dc03
豊川　洋一　2Da08
豊島　正和　1Jp18, 2Ip07, S3Eb02
豊田　晃一　1Np05
豊田　一　2Oa04

な

内藤　秋花　1Fp12

永　直文　3Na05
永井　宏平　2Ca08
長井　敏　2Ja10
永井　暉　1Jp17
中尾　貴一　2Fa08
長尾　達彦　2Mp01
中川　明　1Jp10
中川　克彦　2Na02
中川　恵蔵　2La04
中川　そらみ　1Ip01
中川　智行　1Mp13
中川　洋史　2Ka09
中川路　伸吾　1Gp15
中口　雄貴　1Ip18
長坂　理紗子　2Oa07
中里　美穂　2Mp10
中澤　奈美　2Kp03
中沢　伸重　1Np08
中澤　光　2Ia10, 2Ia11, 2Ia12, 2Ip01, 2Ip02
中澤　昌美　2Hp02
長澤　淳　2Ka12
中島　綾香　2Ca12
中島　一紀　2Fa03, 3Fa03, 3La07
仲島　菜々実　2Ka02
中島　凌　2La03
中島　健介　2Ga08
中島　森　1Gp15
中島　鈴佳　1Np16
仲嶋　翼　S3Kb02
中島　敏明　1Np16
中嶋　優里　1Cp18
中嶋　義隆　2Mp11
中島　芳浩　1Dp08
中島田　豊　1Gp17, 1Np02, 2Hp07, 2Hp08, 2Jp06
中瀬　舞　2Da12
中田　菜月　1Gp03
永田　智　3Ea08
永田　悠　2Kp10
仲谷　豪　2Ka02
中谷　肇　3Fa06
長谷　洸輝　1Op17
中西　文香　2Ia05
中西　周次　S3Ec04
中西　裕美子　1Jp01
長沼　孝文　3Ka03
中野　翔　1Fp16
中野　祥吾　1Mp02, 2Lp03
中野　翔太　2Oa06
中野　雄司　S3Da03
中野　秀雄　1Dp01, 1Dp02, 1Dp03, 1Kp12, 2Kp01
中野　雄揮　2Jp09
中野　洋介　1Kp15
中野　義勝　1Lp08, 2Ja09, 3Ia02
長野　正信　S3Db02
長濱　一弘　1Gp02, 1Kp17, 2Ga12
長濱　統彦　2Mp05
中東　良太　3Ma04
中道　優介　2Ma06
永峰　賢　2La12
中村　彰宏　2Fp08
中村　明日香　2Na08
中村　和音　2Ga02
中村　克哉　1Fp10
中村　佳祐　1Cp05
中村　聡　2Ja05
中村　匠汰　2Ip06
中村　泰斗　1Op02
中村　貴子　2Cp07
中村　卓登　3La06
中村　史　1Op04, 2Op08
中村　実世　3Oa09
中村　泰之　1Lp12, 2Gp09, 2Gp10, 2Gp11
中村　嘉利　1Hp02, 1Hp03
中村　隆太郎　1Ip18
仲本　準　1Ip15
長森　英二　1Op17, 1Op18, 3Ka07
中山　敦好　3Ga01, 3Ga02
中山　沢水　2Ep11
中山　二郎　1Cp08, 2Ca11
中山　亨　1Mp11, S3Bc02
中山　知哉　1Cp06
仲山　英樹　2Ha02
中山　泰宗　1Gp02, 1Kp17, 2Ga12
永山　恵美　1Ip13
名越　健太郎　3Ma09
那須野　亮　2Da08
灘中　里美　S3Mc06
生井　智仁　2La10
生江　俊樹　1Ep02
成田　琴美　2Ep06
成田　裕司　1Op01

に

新岡　宏彦　3Ia04
二井手　哲平　2Ia11, 2Ia12, 2Ip01, 2Ip02
二階堂　愛　2Mp05
西　輝之　2Gp09, 2Gp10, 2Gp11
西　羽美　2Ip01
西　美智佳　1Ip10
西江　百加　2Jp05
西岡　宗一郎　S3Mc06
西川　洋平　1Lp08, 3Ia03
西口　大貴　1Jp17, 1Jp18
西里　亮　3Na06
西島　謙一　2Op11, 3Oa01
西島　拓人　2Ha06
西田　敬二　1Jp04, S3Lc04
西田　真一朗　2Op02
西出　真也　3Oa03
西野　泰斗　1Op10
西野　智彦　2Cp01
西八條　正克　2Fp01
西村　勇哉　2Op02, 2Op10, 3Oa10
西本　歩紗　2Hp02
西矢　芳昭　1Mp03, 2Mp11, 3Ma07, 3Ma08, 3Ma09
西山　陶三　2Gp09, 2Gp10, 2Gp11
西山　由美子　1Dp07
西山　佳孝　S3Eb03
新田　克章　2Ka04
新田見　匡　2La08, 2Na12
仁宮　一章　1Hp04, 1Hp05, 1Hp06, 1Op07, 1Op08, 1Op09, 2Ep08

ぬ

額田　夏生　1Dp06
沼田　圭司　2Hp01, S3Hc05
沼本　穂　2Cp07
沼本　修孝　3La01

ね

根岸　諒　1Lp07
根来　誠司　1Np18, 2Ja01, 2Ka06
根来　宏明　S3Mb05
根本　理子　3Ma10
根路銘　伸介　2Kp05

の

盧　鎮栄　3Ha02
野口　恵一　1Ip18, 2Lp02
野口　祐司　2Ka02
野口　理紗　2Gp10
野島　大佑　1Fp05
野尻　秀昭　1Gp11, 1Gp12
野田　修平　S3Hb03
野田　尚宏　1Mp01, 2Fp07, 2Fp08, 2Ka01
後野　直哉　3Ka11
野中　衛　2Ia06
野辺　善仁　2Op03
登　祐介　2Hp07
野村　一樹　2Cp03
野村　高志　2Lp02
野村　泰治　2La04
野村　匡志　2Lp09
野村　亘　3Ea08

は

萩原　遥太　3Oa01
萩原　玲子　2Op05
朴　龍洙　1Ip06, 1Lp01, 1Lp05
白米　優一　2Ep11
箱田　優奈　3Ea02
パサック　ニシット　1Ep06
端　瞭太　1Fp07
橋口　周平　1Cp05
橋爪　克己　2Mp06
橋本　和紀　1Hp03
橋本　文雄　3Ca02
橋本　雅仁　1Cp05
橋本　悠　2Ka06
橋本　龍馬　2Ka05

橋本　渉　2Ga05
蓮沼　誠久　1Jp16, 1Kp05, 2Gp09, 2Gp10, 2Kp07, 3Ha07, 3Ha08, 3Ka04, 3Ka05, S3Gb04
長谷川　泰子　3Ca03
長谷川　大介　2Ja10
長谷川　智弘　3Ea04, S3Cc04
長谷川　文香　3Ea06
長谷川　真梨菜　1Cp15
長谷川　雄将　1Cp03
長谷川　友香　2La05
長谷川　喜衛　1Np14
秦　康祐　1Jp09
畑　浩介　1Kp07
秦　洋二　1Kp10, 2Fa04, 2Ga03, S3Mb05
羽田　彩夏　1Ip01
羽田　毅　3Oa05
畠山　明　2Da10
畠中　孝彰　3Fa02
畑中　唯史　2La03, 3Ma04
畠中　玄彦　3Na03
秦野　琢之　2Gp04
畠平　智子　2Fp04
八久保　晶弘　1Np02
蜂須賀　真一　2Ma11
服部　修平　2Ia12
服部　祥平　S3Fc02
初野　優花　2Ip06
花井　泰三　1Fp07, 3Ha02
花崎　麻由　1Cp18
花城　隆二　3Ga03
馬場　俊輔　3Ia04
馬場　利明　3Ma09
馬場　美聡　S3Bc03
幅田　亜香莉　3Ka01
濱田　和宏　3Ka08
濱田　浩幸　2Op07, 3Ha02
浜地　格　S3Bb01
濱地　野乃香　1Mp18
濵野　樹　2Np02
浜本　晋　2Ka10, S3Eb04
早川　正幸　2Ka09
林　浩之輔　S3Bc06
林　順司　S3Bc04
林　哲太郎　2Mp05
林　哲也　1Gp15
林　英輝　2Lp02
林　秀謙　2Mp02
林　真人　1Fp17
林　幹朗　1Jp11
林　優花　1Mp02
林　勇樹　1Mp17, 2Lp09, 2Lp10
林谷　美貴子　1Ip06
早瀬　伸樹　2Hp08, 2Na02
原　清敬　1Jp07, 1Jp08
原　駿平　2Op11
原　崇　2Da10
原　富次郎　2Na06
原　正之　1Op02, 1Op03
原　良太郎　3Ma02
原口　典久　2Ga12
原田　憲　3La02
原田　尚志　2Ga07
原田　玲奈　3Ea04
原山　重明　2Hp03
バランワル　プリヤンカ　2Ja01
番場　崇弘　1Kp05, 3Ka04
馬場　健史　1Jp09, 1Kp17, S3Lc05

ひ

東　達也　2Ca01
東　恒仁　1Op16
東内　遥菜　2Ep11
東久保　遥　1Gp05
東山　明広　2Na02
引地　啓太　2Fp05
樋口　剛志　1Ip13
樋口　美栄子　2Hp01
緋田　安希子　1Ip17
秀瀬　涼太　1Gp05, 2Ma10
美藤　友博　1Ip10, 2La03, 3Ma01, 3Ma11
一二三　恵美　1Dp04, 1Dp10, 1Dp11
平井　英明　2Ha01
平井　浩文　1Fp15, 1Hp08, 2Na10
平岡　潔　1Gp14
平賀　和三　2Ka05
平口　侑香里　S3Gc06
平島　宗一郎　2Gp04
平谷　朋之　3Na05
平野　竜行　2Na06
平野　美佳子　2Jp09
平松　愛子　3Ha04
広井　佳臣　1Op10
廣岡　青央　3Ca10
広川　安孝　1Fp07
廣瀬　竜郎　1Hp09
廣田　潤哉　1Kp02
廣田　泰志　3Ga04
廣田　隆一　1Jp13, 1Jp14, 1Jp15, 1Lp10, S3Fb01
廣野　育生　1Gp14
弘埜　陽子　1Jp07, 1Jp08
廣部　綾乃　2Ep08

ふ

傅　博　1Op05
深浦　恵梨　3Oa03
深谷　愛衣　1Gp12
深谷　健　2Gp08
吹谷　智　1Gp15, 3Ka08
福居　俊昭　2Ja05, 2Ja06
福井　瑞季　3Ea11
福﨑　英一郎　1Kp13, 1Kp14, 1Kp15, 1Lp16, 2Ca02, 2Ka04, 3Ca08
福澤　薫　S3Gc05
福島　エリ オデット　1Ep10
福田　伊津子　1Cp10, 1Cp11, 1Cp12
福田　淳二　1Op15, 2Na12, S3Lb04
福田　展雄　2Gp02
福田　寛史　2Hp04
福田　美南海　1Ip11
福田　青郎　1Gp05, 2Ga09, 2Ma09, 2Ma10
福谷　洋介　1Ip18
福永　隼大　2Ia04
福間　剛士　2Ia03
福本　悠地　2Ha08
藤井　達也　2Ma06
藤井　翼　2Ka06
藤井　陽平　1Kp12
藤江　秀斗　2Ha12
藤岡　勘太郎　2Mp05
藤川　彩美　2Ca12
藤川　康夫　1Ep11
藤木　哲也　A1Aa04
藤澤　瑞希　2La01
藤田　憲一　1Cp15, 2Ca09, 2La02
藤田　直子　2Mp06
藤田　英明　1Op17, 1Op18
藤谷　将也　2Oa09, 3Ia07, 3Ia08, 3Ia09
藤野　尚人　2Ha06
藤丸　裕貴　2Da11
藤村　孝志　1Dp12
藤村　弘行　2Ja09, 3Ia02
藤本　舜　2Oa01
藤本　尚志　2Na04
藤本　遼　2Na09
藤森　一浩　2Ha06, 3Ha06
藤山　和仁　2La05
藤原　篤男　2La08
藤原　郁也　1Lp14
藤原　伸介　1Gp05, 2Ga09, 2Ma09, 2Ma10
藤原　卓人　2Mp01
藤原　政司　1Op05, 3Oa03
藤原　祐気　2Gp04
冨士原　由貴　2Oa05
藤原　由梨　1Jp09
二神　泰基　2Cp04, 2Cp05, 2Ga01, 3Ca01, 3Ca02, S3Dc05
二又　裕之　1Cp03, 2Ha10, 2Ha11
二見　淳一郎　1Ip01, 1Ip02, 1Ip03, 1Ip04
舟橋　久景　1Jp13, 1Jp14, 1Jp15, 1Lp10
古川　雅崇　1Cp07
古澤　力　3Ia05
古瀬　久幹　2Ep05
古田　雅一　1Gp10
古根　隆広　1Cp10
古野　正浩　1Lp16
古屋　俊樹　3La10
不破　啓貴　1Ep07
フワイジ　アラー　1Ep06

ほ

北條　晴佳　2Lp02
星　直美　2Ka10
星　奈美子　1Cp12
星　英之　2Np01
星子　裕貴　2Ha12
星田　尚司　1Kp02, 2Ga11
星野　一宏　1Fp17, 2Kp02
星野　保　2Cp06
星山　貴文　3Ea08
細井　啓貴　2Ep08
細川　久顕　3Na04
細川　正人　1Lp08, 3Ia02, 3Ia03
細田　晃文　1Fp08
細山　哲　2Ip10
堀　采音　1Dp12
堀　克敏　1Gp04, 1Ip14, 2Ia09, 3Fa06, 3Fa07, S3Gc03
堀　玄澄　2Mp07
堀　千明　2Ma03, 3Ha03
堀　知行　S3Fb02, S3Fc03
堀　勝　2Ma02
堀　雄一　1Ip17
堀　良美　2Kp07
堀内　淳一　1Fp07, 1Fp12, 1Fp14, 2Ep03, 2Fa07, 2Fa08, 2Fa11, 2Fp02, 3Ha05
堀内　貴之　S3Lc02
堀江　正信　1Op17, 1Op18
堀江　裕紀子　2Ca01
堀尾　京平　1Gp17
堀川　学　1Mp11
堀川　凌平　1Jp13, 1Jp15
堀口　一樹　2Oa02
堀越　智　2Ep10
堀之内　貴明　3Ia05
本荘　知子　1Ip02, 1Ip03
本庄　宏　3Ha02
本田　亜由美　2Ia12
本田　孝祐　2Kp10, 2Kp11, A2Mp01, S3Cc06
本田　真也　2Gp02
本多　裕之　1Ep04, 1Ep05, 1Hp12, 1Lp17, 2Op09, 3Ia07
本多　裕基　1Op04
本間　研一　3Oa03
本間　さと　3Oa03
本間　宣行　2Fp08
本間　陽名　1Hp10
本間　裕章　3Fa09
本間　裕人　2Na04

ま

眞井　洋輔　1Op16
前　佳佑　1Op18
前田　勇　2Ha01
前田　憲慶　1Hp18
前田　昂亮　1Kp16, 2Op04
前田　憲成　2Ha12
前田　智也　1Np03, 3Ia05
前田　浩　3Ca06
眞榮田　麻友美　3Ca05, S3Dc04
前田　みのり　2La11
前田　義昌　1Fp05
前林　正弘　2Ma02
茅　逸皓　1Lp07
曲　正樹　1Dp07
牧野　祥嗣　2Ip05
政井　英司　2Ha03
真崎　雄一　1Op16
桝尾　俊介　2La10
増田　茜　1Hp08
増田　亜理沙　3Ea06
益留　綾菜　3Ca02
増見　恭子　2Fa10
増村　威宏　2Cp07
増本　純也　2Ia05
増本　博司　S3Mb06
町田　雅之　2Cp08
松井　旺大　3Ea08
松井　裕史　2Oa10, S3Bb04
松浦　昌平　2La12
松浦　友亮　2Ga10
松岡　友洋　3Ka09
松岡　正佳　1Gp02, 1Kp17, 2Ga12
松川　哲也　2La01, 2La11
松倉　智子　2Fp07
松倉　秀典　3Ia10
松崎　弘美　1Cp13
松崎　典弥　S3Lb02
松崎　祥平　1Lp14
松崎　大典　S3Cc04
松崎　隆　S3Bc06
松崎　浩明　2Gp04
松崎　祐二　S3Mc05, S3Mc06
松鹿　昭則　2Ma06
松下　青葉　2Gp08
松下　貴子　2La12
松田　史生　1Jp07, 1Jp08, 1Jp17, 1Jp18, 1Kp16, 2Ia08, 2Ip07, 2Op04, 3Ka06, S3Eb02
松田　将典　2Ep10
松田　祐介　2Ga08, 2Ga09
松野　善治　1Cp17
松村　栄太郎　1Jp10
松村　憲吾　S3Mb05
松村　洋寿　1Hp10, 1Ip18, 2Ia06, 2Lp02
松村　幸彦　1Gp17, 2Hp07, 2Hp08
松村　吉信　1Np13
松本　圭司　A1Aa04, 3Ga05, 3Ga06
松本　謙一郎　3Ha03
松元　太一　1Cp05
松本　光史　1Fp05
松本　美徳　3Ma08
松本　美穂　3Ka03
松本　侑也　3Ma10
松山　彰収　1Cp16
松山　恵介　1Kp07
松山　茂　S3Mb06
的場　一隆　2Fa07
黛　新造　1Kp07
丸田　秀平　2Fp03
丸山　潤一　1Kp12, S3Hb01
丸山　悠　1Ip03
丸山　正晴　1Jp18
万　クン　3Ma04

み

見市　絢香　1Jp16
三浦　隆匡　1Cp07
三浦　豊和　2Hp08
三上　達也　1Ep15
三木　健夫　1Cp14
三木　智寛　1Ip18
三﨑　亮　2La05
三島　俊介　1Ep11
水澤　愛衣　2Op08
水谷　治　2Ga05, 3Ca04, S3Dc03
水無　渉　S3Cb04, S3Gb01
水沼　正樹　S3Mb01
溝手　結　2Fa10
三田　一至　2La06
三谷　恭雄　2Ka01
三井　雅貴　2Cp08
三井　亮司　1Mp13
満倉　浩一　2Lp04, 2Lp05, 2Lp06
皆川　純　S3Eb01
水口　和信　2Fp01
水口　千穂　1Gp11, 1Gp12
南　尚嗣　1Np02
南　博道　1Jp10
南畑　孝介　S3Bc06
峯苫　智晴　1Ip04
三原　笑　3Ea10
宮尾　寛樹　1Lp11
宮川　幸　1Cp08, 2Ca12
三宅　淳　3Ia04
三宅　英雄　1Mp15, 1Mp18, 3Ha04
三宅　良磨　2Lp06
宮崎　翔子　1Fp11
宮崎　つぐみ　2Kp03
宮澤　佳甫　2Ia03
宮澤　拳　2Fa05, 2Fa06
宮澤　せいは　2Ip10
宮下　夏美　2Gp08
宮田　大暉　3Ma06
宮田　真人　1Cp03
宮野　恵　1Gp09
宮本　昭弘　2Gp04
宮本　憲二　2Ja07
宮本　弘毅　2Ja01
宮本　樹里　2Ep09
宮本　龍樹　1Mp01
宮本　捺央　1Kp04
宮本　浩邦　1Hp15, 1Jp01, 1Jp02,

1Jp03, S3Cb01, S3Cc05
宮本　義孝　1Op12
三好　佑奈　2Na11
三好　柚紀　1Cp06

む

穆　廷林　2Oa04
向井　克之　1Cp16
向井　伸彦　3Ca09
向山　正治　1Jp04
ムスタファ　ヌルル・アシファ　2Ha12
俗多　秀美　2Ep09
武藤　宏行　3Na06
村井　雄大　2Fp06
村上　明男　1Fp07
村上　紀里子　1Kp06
村上　達也　S3Bb03
村上　舞　3Oa07
村上　将和　1Np13
村上　陽亮　2Lp06
村澤　友紀恵　1Np13
連　綾香　1Hp16
村瀬　祥光　1Mp18
村田　和義　2Ia03
村田　純　1Mp11
村田　俊輔　1Np09
村田　大　2Fp01
村田　昌浩　2Ip11
村田　和加惠　1Cp15
村中　俊哉　1Ep10
村松　和明　2Op03
村山　和隆　2Mp04
村山　晃一　2Fp11
村山　亮太　2Gp08
室　尚吾　3Ea07

め

馬久地　みゆき　2Ja11

も

望月　祐志　S3Gc05
元島　史博　1Mp06
元根　啓佑　3Ia01
本村　圭　1Jp13, 1Jp14, 1Jp15
百瀬　直樹　1Dp06
百田　理恵　2Ca11
森　一樹　3Ia03
森　一博　1Np15, 2Hp06
森　健太朗　3Na04
森　瞬也　2Ja06
モリ　テツシ　1Mp18
森　智夫　1Fp15, 1Hp08, 2Na10
森　利明　1Mp06
森　英樹　1Op02, 1Op03
森　史也　1Mp14
森内　良太　1Np11
森川　正章　1Hp13, 1Hp14, 2Hp06
森崎　久美子　2Hp01
森下　しおみ　1Dp02
森田　暁人　2Ga01
森田　啓介　3Ka06
森田　健太　2Op10
森田　大地　2Ga02
森田　友岳　2Gp07
森田　直樹　2Fp06
森田　真広　1Lp01
森田　雅宗　2Fp07
森田　将之　1Mp04
森田　涼斗　2Na08
森本　一輝　2Cp02
森本　兼司　2Mp07, 2Mp08
森山　陽介　S3Mb02
森芳　邦彦　3Ka07
森脇　脩一郎　2Op11
諸星　知広　3Na08, 3Na09, 3Na10

や

八木　寿梓　2Mp01
八木　秀郁　1Op03
八島　悠里乃　1Jp10
安池　一貴　2Ha10, 2Ha11
保川　清　S3Bc03
安田　直子　2Ja09
安本　玖太郎　1Gp14
八十原　良彦　2Gp09, 2Gp10, 2Gp11, 2Lp04
矢田　椋己　3Ga06
谷内江　望　S3Gb03, S3Lc03
矢内　健太郎　2Fp09
柳川　綾　2La01
柳澤　颯太　1Mp10
柳沢　真澄　2Oa10, S3Bb04
柳田　湧太　2Op03
柳田　藤寿　1Np01
柳場　まな　3Ka03
柳谷　洸輔　1Np12
柳本　敏彰　2Gp04
矢野　嵩典　1Mp13
矢野　達也　3Ia11
藪　浩　1Ip13
山内　隆寛　2Da12
山内　悠至　3Ia10
山浦　由登　3Ea11
山形　雄一郎　1Kp11
山形　洋平　3Ca06
山上　あゆみ　S3Da03
山上　由莉　3La01
山岸　彩奈　1Op04, 2Op08
山岸　一雄　1Kp03
山口　愛彩　2Ma03
山口　和真　2Na04
山口　健一　2La07
山口　翔太　2Ja01
山口　政光　1Kp13, 1Kp14
山口　湧己　1Ip15
山口　良弘　2Ca09, 2La02
山崎　思乃　1Cp06, 1Cp09, 2Ep06, 2Jp07, 2Jp08, 3Ha11
山崎　将太朗　1Ep16
山崎　敦史　1Np07
山崎　貴史　3Ha03
山﨑　智子　3Oa09
山崎　晴丈　1Kp01
山﨑　祐二　2Na05
山崎　勇人　2Ga10
山路　大樹　2Gp11
山地　秀樹　2Fa10
山下　聡　1Np02
山下　忠紘　2Op06
山下　春来　3Ia07
山下　光雄　3Na05, 3Na06
山下　美春　1Np09
山副　敦司　1Cp07
山田　映未　1Dp09
山田　修　2Ga05, 3Ca04, S3Dc01, S3Dc03
山田　憲治　2Ha06
山田　茂　2Oa03
山田　隆　1Np10
山田　朋宏　1Ep09
山田　浩司　1Mp04
山田　浩之　2Ia10
山田　将大　1Gp03
山田　真澄　2Oa04
山田　みなみ　1Cp17
山田　美和　2Ka07
山田　芽生　2Ma09
山田　佑樹　2Ka02
山田　裕紀　1Lp09
山中　勇人　3Ka07
山野　尚子　3Ga01, 3Ga02
山野　範子　2Ip04, 3Ma05, 3Ma06, 3Oa04
山平　真也　S3Bb04
山村　栄虎　1Gp01
山村　茂樹　S3Fb02, S3Fb04
山村　英樹　2Ka09
山本　恵理　2Jp11
山本　佳奈　2Ca02
山本　航平　2Oa02
山本　修也　3Ia04
山本　哲郎　2Cp10
山本　哲史　2Na03
山本　英樹　1Kp03
山本　美也子　2Ga02
山本　恭士　3Ka01
山本　裕貴　2Da11
山本　耀吾　2Fp05
山本　涼平　2Oa11
山脇　千佳　2La02
遣水　潤　2Da10
鎗水　透　2Gp06, 2Gp07

ゆ

湯川　貴弘　3Ka04
雪本　寛　2Ha07, 2Ha08
湯村　秀一　3Ka01

由里本　博也　3Ka01
尹　基石　3La03

よ

叶　暁亭　1Jp07
養王田　正文　1Ip18, 2Lp02
世嘉良　宏斗　3Ga02, 3Ga03
横江　奨　1Gp04
横尾　岳彦　2Gp01, S3Mc01
横田　亜紀子　1Mp01
横田　篤　1Gp15, 3Ka08
横田　早希　2Fa01, 2Fp10
横田　大輝　2Cp08
横山　佐一郎　2Ja11
横山　春花　2Cp09
吉岡　育哲　2Mp09
吉岡　貫太郎　1Op14
吉岡　実咲　1Ip02
吉川　秀一　2Ca10
吉川　翔太　1Jp02, 1Jp03
吉川　千晶　1Mp06
吉川　友理　1Mp13
吉﨑　由美子　2Cp04, 2Cp05, 3Ca01
吉田　磨仁　2La12
吉田　啓　2Oa07, 2Oa08
吉田　圭佑　1Gp15
吉田　健一　1Gp09
吉田　浩爾　2Ha06
吉田　聡　3Ca11
吉田　慎一　2Fp01
吉田　琢哉　2Op11
吉田　知華　2Cp09
吉田　知哲　1Lp10
吉田　豊和　2Lp04, 2Lp05, 2Lp06
吉田　尚弘　S3Fc02
吉田　信行　3Ka09
吉田　春菜　2Op03
吉田　真梨　3Fa08
吉田　理一郎　3Ca02
吉野　知子　1Fp05, 1Lp07, S3Bb02
吉原　賢　2Op09
吉原　静恵　2Np01, 2Np02
吉原　侑希　2Ca08
吉見　啓　2Fa05, 2Fa06
吉村　緑　2Ga04
吉村　弥生　S3Mc01
吉本　将悟　1Ip14, 3Fa06, 3Fa07
吉本　真　1Gp15
善本　裕之　S3Mb07
依田　聖未　1Op13
依田　伸生　2Jp07, 2Jp08
米井　嘉一　2Cp11
米倉　円佳　1Hp09

ら

羅　宮臨風　1Fp16
楽　隆生　3Ga02

り

李　文成　2La07
李　歓　2Fa11
李　昊　3Oa08
李　在郁　1Lp05
劉　暁麗　2Ka02
劉　涛　2Ja03
劉　雅軒　1Np14
林　理希　2Ma04

わ

ワイズ　里沙　2Ma01
ワイナンス　マシュー　2Da11
若井　暁　1Kp10, 2Fa04, 2Ga03
和氣　駿之　1Mp11
分部　友紀　2Ha10, 2Ha11
和田　潤　3Ca10
和田　征太郎　2Jp10
和田　健彦　S3Gc06
和田　大　3Ka08
和田　愛未　1Mp17
和田　竜之介　1Kp11
渡部　昭　2Ma05
渡辺　一樹　3Ha10
渡邊　桂子　2Oa05
渡邉　研志　1Kp07
渡邉　好一　3La04
渡辺　智　1Jp14
渡邉　荘爾　2Ia02
渡邉　泰祐　1Kp06, 3Ca03
渡辺　大輔　2Da07, 2Da08, 2Da09, 2Ka11, 2Ka12, S3Mb08
渡辺　隆司　2Ga01
渡邊　崇人　2Ga01
渡邉　徹　2Gp09, 2Gp10, 2Gp11
渡邉　直暉　2Ip11
渡邉　肇　2Ga10
渡邉　輝　1Ip12
渡部　広機　2Oa03
渡部　裕美　2Mp05
渡辺　万由子　1Dp11
渡辺　芳人　1Mp10
渡邉　理沙　2Mp10
渡邉　凌　1Hp15
渡部　玲子　2Jp11
渡部　裕介　2Gp03
汪　雪　3Oa05

キーワード索引

A

A functional amino acid accumulation 2Da09
2A peptide 2Fa10
A-fuel-oil 2Na11
A.kawachii 1Kp11
abiotech stress 1Ep06
absolute quantitation 1Jp17
Accessary enzyme 1Mp16
accreditation A1Aa01
Acetate 1Kp08
acetic acid 1Cp05, 1Jp05
acetic acid bacteria 1Gp05, 1Ip16, 2Jp04, 2Jp05
acetylation 2Ia02, 3Ma11
acetylcholine esterase 3Ma11
acetylome 2Ia02
acid tolerance 2Cp01, 2Fp11, 3Ea06
Acidomonas methanolica 2Jp05
acidophiles 1Ip16
acidphilic activity S3Bc02
Acinetobacter 1Ip14, 3Fa06, 3Fa07, S3Gc03
aconitate isomerase 2Mp09
acrolein 2Ia04
actin 1Mp04
actinomycetes 1Mp16, 2Ka03, 2La11
activated carbon 3Fa05
activated sludge 1Np15, 1Np16, 2Na12
active components S3Kc05
active site structure 3Ma08
acyl homoserine lactone 3Na09, 3Na10
acyl-ACP reductase 2Lp09
adaptive laboratory evolution 2Kp09
adenylation domain 3Ma02
adhesion 1Cp09, 1Ip14, 3Fa06, 3Fa07, S3Gc03
adipose-derived stem cells 1Op09
adsorption 3Na02
aerial culture condition 1Fp09
aerial microalgae 1Fp09, 2Hp09, 2La06, 3Fa04
aerobic hydrogen production 1Fp15
affinity chromatography 2Fp01
affinity selection 2Ip04, 2Ip05
AFM 2Op08
agar plate 3Ea04
Agar plate culture S3Cc04
agarose 2Op06
aggregation A1Aa02
agmatine 2Ga09
agricultural technology S3Kb04
agricultural waste S3Da05
Agrochemicals 2Na08
Agromyces sp. 2Lp04
AI S3Gb05
air quality control 1Np17
airlift bioreactor 1Fp07
Alcohol acyltransferase 1Mp06
alcohol dehydrogenase 2Mp03
alcoholic fermentation 2Ka11, S3Mb08
aldoxime-nitrile pathway A1Aa02
algae 2Mp01
alginate 1Jp05, 1Mp18, 2Hp08, 3Fa08
Alginate beads 2Hp05
alginate lyase 1Mp18
alkaline phytase 1Mp12
alkane biosynthesis 2Lp09, 2Lp10
Alkanediols 2Lp04
alkyl alpha-glucoside 2Mp10
alpaca VHH antibody 1Dp08
alpha-1,3-glucan S3Dc03
alpha-EG 2Cp08
alpha-glucosidase 2Mp06, 2Mp10
alpha-isopropylmalate synthase 2Da08
alternative oxidaze 2Kp03
Alzheimer's disease 1Ip12
Alzheimer's diseases 2Ia05
amazake 2Cp10, 2Cp11, S3Db04
amino acid 1Np02, 2Jp02, 3Ia07
amino acid methyl ester 3Ma11
amino acids S3Da04
3-amino-4-hydroxybenzoic acid 1Fp11
aminoacylase 3Ma09
6-aminohexanoate 2Ka06
aminopeptidase 3Ma01, 3Ma04
aminotransferase 1Jp11, 2Ka06
amylase gene 2Ga05, S3Mb04
amyloid 1Dp10, 2Ia04, 2Ia05, 3Ia09
Amyloid-beta 1Ip12, 2Ia05
amyloidgenic proteins 2Ia04
anaerobes 1Gp12
anaerobic bioremediation 2Na06, 2Np02
anaerobic condition 1Np12
anaerobic respiration 2Hp02, S3Fb04
anchor shape 1Fp06
angiogenesis 1Ep02
angiogenic activity 1Ep01
animal alternative S3Lb02
AnMicro S3Kc02
anthocyanidin 2Ca10
anthocyanin 1Ep11, 2Ca10
Anti - mutagenicity S3Db01
anti-idiotype 1Ep09
antibacterial 2Ep09, 2Kp06, 3Ia05, S3Kc05
antibacterial chlorophylls 2La06
antibacterial substances 3Ea01
antibiotics 2Gp03, 2Ha08, 2Ka03
antibody 1Dp01, 1Dp06, 1Dp07, 1Dp09, 1Gp14, 1Ip02, 1Ip03, 2Fa12, 2Ia12, 3Oa08, 3Oa10, S3Gc02, S3Lc02, S3Mc05
antibody drug 1Ep09
antibody fragments 2Fp01
antibody glycosylation 2Fa09
antibody mimetics 2Ip01
antibody-binding protein 1Lp11
antifungal activity 1Ip11, 3Ea08, 3Ea11
antifungal agents 2Kp05
antigen 1Ip04, 2Ia01
antigenase 1Dp04, 1Dp11
antimicrobial S3Da02
antimicrobial activity 2La04, 3Ea07
antimicrobial materials 2Ep11
antimicrobial substances 2La11
antimonate reduction S3Fb04
antimony 3Na04
antimony trioxide S3Fb04
antioxidant 2Ca10
apoptosis 1Ip11
apple 1Cp16
aptamer 1Ep08, 1Ep09
Arabidopsis thaliana 1Ep16
archaea 2Ma09, 2Ma10, 2Ma11
arginine 3Ca09
arginine uptake 3Ca10
aromatic amino acid 3Ma10
aromatic chemicals S3Hb03
aromatic compound 2Ka05, 3Ka05
aromatic ring compound 1Jp12
arsenic reduction S3Fb02
Arthrobacter 2Ka06
artificial inteligence 3Ia04
artificial intelligence 2Ia11
artificial neural network 3Ha10
artificial protein design 1Mp02
ASEAN S3Kc02
aspartic protease 2Ma04
Aspergillus aculeatus 1Hp11
Aspergillus glaucus 2Ma04
Aspergillus kawachii 3Ca01, S3Dc05
Aspergillus luchuensis 2Ga05, 3Ca02, 3Ca03, 3Ca04, 3Ca05, S3Dc02, S3Dc03, S3Dc04
Aspergillus luchuenss S3Dc01
Aspergillus nidulans 1Np09, 2Kp03, 2Ma03
Aspergillus oryzae 1Kp10, 1Kp11, 1Kp12, 2Ca01, 2Fa04, 2Fa05, 2Fa06, 2Ga03, 2Ga04, 2Ga06, 2Ia10, 2Kp01, 2Ma05, 3Ca06, 3Fa05, S3Db01, S3Hb01, S3Mb04
Aspergillus terreus 3Ga05

astaxanthin 1Fp14
asymmetric hydrolysis 2Lp06
Asymmetric oxidation 2Lp04
atmospheric pressure plasma 2Ma02
atomic force microscopy 1Ip13, S3Gc01
Atomic Force Microscopy(AFM) 2Op02
ATP 1Jp07
ATP regeneration 1Jp08
atrophy 2Op09
AuNP 1Lp02
AuNP/MNP 1Lp05
Aurantiochytrium 1Kp07
autoencoder 3Ia04
automation S3Lb03
Autonomously replicating plasmid 2Gp10, 2Gp11
autothermal aerobic digestion S3Cb03
autothermal thermophilic aerobic digestion 2Na09
autotransporter 3Fa07, S3Gc03
auxin 1Hp15
Awamori 2Da07, 3Ca04, 3Ca05, S3Dc02, S3Dc04

B

B cells 1Dp12
B-cell receptor 1Dp05
Bacillus 2Ha04
Bacillus cereus S3Fb01
Bacillus licheniformis 2Ja03
Bacillus subtilis 1Gp09, 1Gp10, 2Ca09, 2Ha08, 3Ha01
Bacillus subtilis natto 2Mp08
Bacillus thuringiensis 2Fa02
bacteria 2Na03
bacterial conjugation 1Gp09
bacterial consortium 2Hp08, S3Cb03
bacterial cultivation 2Fp07
bacterial detection 2Fp07
bacterial diversity 3Ca09
bacterial growth enhancement 2Ha04
bacterial microflora 1Hp18
bacteriocin 1Cp13
Bacteroides 1Cp10
baculovirus 1Ip07, 2Fp10
baker's yeast 2Ka12
banana 2Ca02, 2Ca03
basidiomycetes 2Gp06, 2Na04
beauty materials 2Cp08
beer-spoilage A2Cp01
beige adipocytes 2Oa05
benchtop NMR 1Lp15
benefit S3Kc04
benzene 1Mp10
beta hairpin peptide 2Ip02
beta-propeller phytase 1Mp12
biased-randomization 3Ia01
bifidobacteria 1Gp15
big data S3Gb01
Bile acid 1Cp08, 1Ep04
bio-3D printer 1Op08, 1Op09
bio-base plastics S3Cb04
bio-based monomer 2Ha03
Bio-digital S3Kb01
bio-nanocapsule 1Lp09, 3Oa08
bio-polymer 2Ep05
bio-production 1Gp05
bioactuator 2Oa06
bioaugmentation 2Na11
bioconjugate S3Bc06
bioconversion 1Fp10
biodegradable dispersant 3Ea09
biodegradable plastic A1Aa04, 3Ga01, 3Ga02, 3Ga04, 3Ha03, 3Na08
biodegradation 1Hp07, 1Np13, 1Np18, 2Na02, 2Na03, 3Ga01
biodevices 1Lp14
biodiesel 2Hp10
biodiesel fuel 1Fp02, 2Hp07, 3Fa05, S3Eb03
bioeconomy S3Kb01, S3Kb02
bioenergy 2Lp08
bioethanol 2Ha05
biofilm 2Ha08, 2Hp09, 3Na08, S3Da02
biofilms 3Na07
biofuel 1Hp09, 2Hp04, 2Ja04
biofuel cell 3La04, 3La05, 3La06
biofunctional property S3Ec03
bioimaging S3Bb01
bioindustry S3Kb02
bioinformatics A1Aa02, 2Ip09, 2Ip11, 2Jp01, 2Kp01, 3Ia03, 3Ia07, S3Hc03
biological containment 1Jp14
biologics S3Lc01, S3Mc01
bioluminescence 1Dp08, 2Lp10
biomass 1Fp12, 1Hp02, 1Hp10, 1Hp11, 1Hp14, 2Hp06, 2Hp07, A2Hp01, 3Ha03, 3Ha10, S3Da01, S3Da03
Biomass degrading enzyme 1Mp16
bioMEMS 2Oa06
biomimetic membrane S3Bc01
biomineralization 1Ip10, 2Ja08, 3Fa01, 3Fa02, 3La07, 3Na06, S3Fb01
biopharmaceutical S3Lc02
biopolymer 3La09
bioproducts 1Hp09
bioreactor 2Fa12, 2Na04
biorefinery 1Hp05, 2Ma02, 3Ha05
bioremediation 1Gp12, 2Na05, 2Na10, 2Np01, 2Np04, 2Np06, 3Fa01, 3Na06, S3Fb02
bioresources A2Hp01, S3Kc01, S3Kc03
biosafety 1Jp14
biosensing 2Ip03
biosensor 1Gp13, 1Lp06, 1Lp09, 1Lp10, 2Ia01, 2Ia02, 3Oa09, S3Bc01, S3Gc04
biosilica 2Fa03, 3La07
biosorption 1Np15, 2Np03, 2Np04, 3Fa03
biosurfactant 1Fp17, 2Ka08
biosynthesis 2Ha02, 2La10, S3Gb05
biosynthetic pathway 2Ip10
biotechnology S3Gb01, S3Kb01, S3Kb04
Biotherapeutics 1Kp18
biotin ligase 1Lp11
biotinylation 1Ip04
biovolatilization 3Na03
bisphenol A 1Np13, 1Np15
bisphenol S 1Np18
bitter peptide 1Ep05
Black koji mold S3Dc01
blood pressure S3Db04
BRC S3Kc01
Brevundimonas vesicularis 1Ep07
brown rice 2Ca01
bulking 2Na12
bulky ketone reduction 2Mp03
2,3-butanediol 3Ka06
1,2,4-Butanetriol 3Ka04
butanol 1Jp04, 2Jp03

C

^{13}C metabolic flux analysis A1Aa03, S3Eb02
^{13}C-Isotope labeling 2Ja11
^{13}C-metabolic flux analysis 1Kp16, 2Op04, 3Ka10
C2C12 1Op18
C4 chemicals 1Kp06
Ca^{2+}-binding sites 3La01
Caenorhabditis elegans 2Np01, 3Ia10
calcium S3Mb03
calcium alginate beads 3La10
callus 3Fa08
Calvin cycle 1Jp18
Calyptogena community 3Ea11
cAMP 2Kp02
cancer biomarker 1Ip02
cancer cell 1Ep03
cancer cells 1Op08
Cancer heterogeneity 2Oa10
cancer immunotherapy 1Ip01
Cancer metabolism 2Op04
cancer metastasis 2Op08
Candida albicans 1Ip11, 2Kp05
Candida boidinii 3Ka01
caprylic acid 2Da10
carbohydrate-protein interaction S3Gc01
carbon dioxide 2Ep01, 2Jp06, S3Fc02
carbon nanomaterial 3La04
carbon nanotube 1Lp14
carbon source 1Kp01
carbon/nitrogen ratio 2Hp09
carbonyl sulfide S3Fc02

Cardiomyocyte beating 2Op07
cardiomyocyte differentiation 1Op13
carotenoid 1Kp01, 1Kp07
carotenoids 1Fp09, 2Gp03
catalytic antibody 1Dp04, 1Dp10, 1Dp11
catalytic triad S3Bc02
cationic peptide 1Ep01, 1Ep02
CBM 1Hp11
CD90 1Op05
cell S3Gc06
Cell and lipid production 1Fp03
cell death 2Gp04
cell diversity 1Np13
cell fate control S3Lc06
Cell free expression system 1Dp02
cell manufacurability S3Lb03
cell membrane 3Ea08, S3Mb03
cell migration promotion 1Ep02
cell morphology 2Oa08, 2Oa09, 3Ia08, S3Lc07, S3Mb03
cell processing 2Oa04
cell proecssing S3Lb03
cell quality control 2Oa11
cell sheet S3Lb01
cell sorter S3Bb04
cell stiffness 2Op08
cell surface display 3Fa03, 3Ha07, 3Ha08
cell wall 2Fa05, 2Fa06, 2Ka10, S3Mb02
cell wall degradation 1Cp16, 1Cp17
cell wall integrity 3Ea08
cell-cell interactions 2Oa12
cell-free protein synthesis 1Dp01, 1Dp03
cellobiohydrolase 2Ia10
cellobiose 1Kp02, 3Ha02
cellobiose dehydrogenase 1Hp10
cellulase 1Cp16, 1Cp17, 1Cp18, 1Mp15, 1Mp16, 2Mp05, 3Ha04, S3Cc02
cellulose 1Cp09, 1Hp02, 2Ma02, 3La08
cellulose degradation 1Hp08
cellulose nanofiber 1Hp03
cellulose-binding domain 2Ia10
cellulosome 1Fp08
central metabolism 3Ka08
centromere 2Gp04, 2Gp10
ceramide 1Cp16
Ceriporiopsis subvermispora 2Ga01
Cesium 2Np01
chamber assay 1Op15
chaperonin 2Ma09
chemical biology S3Bb01
chemical modification S3Mc03
chemical production S3Hb04
chemosensory protein 1Ip17
chemotaxis 1Ip17, 1Np01
chemotaxonomy 2La01
chicken 2Op11
chimeric receptor 1Ip17
Chinese hamuster ovary cells 3Oa04
Chinese spirits 2Cp05
CHIR99021 1Op13
chiral alcohol 2Mp03
chitin 1Cp09, 1Gp03
chiton 2Ja08
chitosan 2Ca02, 2Ja01, 2Ja02
Chlorella sorokiniana 2Hp05
CHO cells 2Fa09, 3Oa05, 3Oa07, S3Lc02
chondrocytes 2Op03
Chromatography 1Ip09, 2Fp03, S3Lc05
chromosome aneuproidy 3Oa04
Chromosome engineering 2Gp05
chronological lifespan 1Cp15
circadian oscillation 3Oa03
circRNA 1Gp18
Circular Dichroism 1Ip17
circular industry S3Fc04
circular RNA 1Gp16
circulating tumor cell S3Bb02
cis,cis-muconic acid 2Ha03
citric acid 3Ca01
Citrobacter 2Ja01, 2Ja02
cleavage equivalence 1Lp17
cleavage sites 1Ep16
click chemistry S3Mc04
clock gene 3Oa03
cloning 2Oa07
closest species to *Heliorestis baculata*^{T} 2Na09
Clostridium 1Jp05
Clostridium beijerinckii 3Ha04
Clostridium cellulovorans 1Mp15
Clostridium clariflavum 2Jp04
Clostridium saccharoperbutylacetonicum 1Jp04
Clostridium thermocellum 2Jp04
Co-expression 1Ip08
CO_2 fixation 2Ja06, 3La11, S3Bc05
Coccomyxa 2Hp03
coculture 2Na10, 3Ha02
coenzyme S3Bc05
coenzyme-independent dioxygenase 3La10
coffee 1Cp17
Coiled-Coil 2Ia09
cold-adapted microorganism 1Gp06
collaboration S3Kc04
collagen score 2Cp08
Collagen synthesis stimulation 1Op06
colony morphological analysis 2Oa07
Color changes 2Ca03
Colorimetric bioassay 1Lp03
Combinatorial biosynthesis 3Ka02
composite 1Hp03
compost 1Hp15, 1Jp03
comprehensive analysis 1Ep16
Concentrated juice 3Ca11
consensus motif 1Np05
contamination 1Jp13
continuous culture 2Fp04
control process S3Cc05
controlled release 1Op04
cooling water system 3Na09
coral 2Ja09, 3Ia02
corn cob 1Fp12
corrosion S3Ec01
Corynebacterium glutamicum 1Fp11, 1Np03, 1Np04, 1Np05, 2Ka05
cosmetic 3Ea03
counterselection 1Gp04
craft beer S3Kb03
Cre-loxP 3Oa05
Cre/LoxP system 2Hp03
CRISPR-Cas9 1Kp07
CRISPR-PCD 2Gp05
CRISPR/Cas9 2Gp06, 3Oa01
Critical Quality Attributes 1Kp18
cross-linking S3Bc06
CRP 2Fa08
crude glycerol S3Kb03
Cryopreservation 2Oa03
Cryptomeria japonica S3Db03
Crystal protein 2Fa02
crystal structure S3Bc04
crystallographic study 2Ia09
cultivation 2Fp08
culture collection 2Ip10
culture condition S3Da01
culture fluid 2Ep05
Culturomics 1Cp07
CutA1 2Ip03
cyanobacteria 1Fp07, 1Fp08, 1Ip15, 1Jp13, 1Jp14, 1Jp15, 1Jp16, 2Ga12, 2Ip07, 2Jp01, 2Jp03, 2Lp07, 2Lp09, S3Ec04
cyclic imino acid 3Ma07
cyclic nucleotide-gated channel 3Oa09
CYP505D6 2Ma01
Cys-SO- 2Lp02
Cystathiine beta-synthase 1Kp03
cytochrome P450 1Fp10, 2La09
cytochrome p450 monooxygenase 2Lp11
cytoskeleton 1Mp04

D

3D culture 1Op12, 2Oa10, 2Oa11, 2Oa12, S3Lb02
2D electrophoresis 3Ca10
3D image analysis 1Op07
3D tissue 1Op08, 1Op09
D-amino acid 1Kp15, 2Ma07, 3Ma02,

S3Bc04
D-lactic acid 1Fp12
D-xylose 3Ka04
Daphnia magna 1Gp13, 2Ga10
data integration 2Ip08
data science S3Cb05
database 2Ia12
de-differentiated fat cells 2Op05
decarboxylase 2Lp05
deep biosphere S3Fc03
deep eutectic solvents 1Fp01
Deep sea bacterium *Aneurinibacillus* sp. YR247 3Ea11
deep-sea organism 2Mp05
deeplearning 3Ia04
degradation 1Np14, 3Na08
Dehalococcoides 2Na05
dehalogenation 2Na06
dehydrogenase S3Bc04
dehydrozingerone 2La02
dengue virus detection 1Lp02
denitrification S3Fc01
Designed antibody 2Ip06
designed biomass S3Cc03
destabilization 1Mp03
detection 1Gp17, 1Lp05, A2Cp01
deubiquitination 3Ha06
development S3Lc03
deviated cell state 2Oa07
DGGE S3Db02
diatom 1Fp05, 2Ga08
dicarboxylic acids S3Hb03
Diester 2Lp06
dietary fiber 1Cp10
differentiation 1Op03, 2Op06
differentiation potential 2Oa01
dimerization 3La02
dimorphism 2Kp02
1,4-dioxane 2Na03
dipeptide 2Ga06, 3Ma02
diploidization 3Ha08
Dipodascopsis 1Np07
direct electron transfer 3La06
direct fermentation 1Jp11
directed evolution 2Lp10
Disinfectant 2Ep07
disinfection 2Ep08
disordered protein S3Gc04
dissociation 2Oa02
diversity S3Kc04
DNA 1Ep09
DNA aptamer 1Lp09
DNA assemble 2Gp11
DNA barcode 3Ia01, S3Gb03, S3Lc03
DNA fragment analysis 3Na01
DNA ligase IV 2Gp09
DNA polymerase 2Ia08
DNA sensor 1Lp10
DNA sequence 3Ia04
DNA synthesis S3Gb03
DNanocap S3Hc06
DO-stat 2Ep03, 2Fa11
dockerin 1Fp08
dough fermentation 2Ka12
downstream process S3Cc03
droplet microfluidics 2Fp07
Drosophila melanogaster 1Kp13, 1Kp14
drug delivery system 3Ia09, 3Oa08, 3Oa10, S3Bb03
drug resistance 2La02
DT40 cells 1Dp07
duckweed 1Hp13, 1Hp14
dye-linkd dehydrogenase 2Ma07
dye-linked dehydrogenase 2Ma08
dynamical analysis 2Kp07

E

earthworm 2Ha07
ecdysteroid 1Gp13
eicosapentaenoic acid 2La12
electrochemical cultivation S3Ec04
electrochemical detection S3Gc01
electrochemistry S3Ec03
electron 2Ha10
electron transfer flavoprotein 2Hp02
Electrophysiology 2Op07
electrospinning 1Lp14
elongation 2La08
embryoid body 1Op13
emulsification 2Ka08, 2Kp05
emulsion 2Fp07, 2Fp08
emulsion droplet 2Fp06
enantioseparation 1Kp15
encapsulation 2Ia06
endocrine disrupting chemicals 1Np18, 2Ga10
endoglucanase 1Mp15
endoglycosidase S3Mc05
endoglycosidases S3Mc06
endonuclease 2Gp02
endotoxin 3Ea02
Engineered yeast 3Ka02
engineering education A1Aa01
enrichment culture 3Na04
environmental analysis S3Cb05
environmental microorganisms 1Lp07
enzymatic conversion A1Aa02
enzymatic residue 1Hp06
enzymatic synthesis S3Bc04
enzymatic transesterification 1Fp02
enzyme 1Mp05, 2Ip11, A2Hp01
enzyme activity 2Lp07, S3Hc02
enzyme engineering 2Lp09
enzyme immobilization 3La09
enzyme inhibitors S3Kc05
enzyme production 1Fp16, 2Fa05, 2Fa06
enzyme reaction 1Jp10, S3Bc06
Epidermal Growth Factor Receptor 3Oa10
epigenetics 1Ip03
epitope mapping 2Ip06
ergothioneine 2Ka02
Erlenmeyer flask S3Cc04
Erythritol 1Kp06
Escherichia coli 1Cp04, 1Dp01, 1Dp03, 1Ep06, 1Gp01, 1Jp08, 1Jp10, 1Jp11, 1Jp12, 1Mp10, 2Ep03, 2Ep10, 2Fa11, 2Ha09, 2Kp07, 2Kp09, 2Kp10, 3Ea02, 3Fa09, 3Ha02, 3Ia05, 3Ka10, 3Ka11, S3Hb03
esoxomes S3Hc01
esterification 1Fp09
ethanol 1Kp02
ethanol fermentation 1Hp08, 3Ha10
ethanol production 1Jp17, 2Ha06, 2Jp06, 3Ka06
ethanol stress 2Gp08
ethyl alpha-D-glucoside (alpha-EG) 2Cp09
2-Ethyl-2-methyl-1,3-propanediol 2Lp04
ethylene 1Fp08, 1Gp02
Euglena 2Hp02
Euglena gracillis 2Ca12
Euplectella 1Ip10
evolution 2Ia07, 2Ia11
evolutionary engeneering 3Ia05
ex vivo glycosylation 2Fa09
exosome 1Ep03, 1Gp18, 2Fa07, 3Oa10
expression 2Op11
expression system 1Gp05, 1Gp07
extracellular matrix 1Op02, 1Op05
extracellular electron transfer 2Ha11
extracellular electron transport S3Ec02

F

Fab fragment 2Fa10
FAS2 2Da10
fast-growing microbes 3Ea04
fatty acid 2Kp06, S3Eb03
Fe(III) reduction S3Fc03
fed-batch culture 2Ep03, 2Fa11, 2Jp08, 3Ha03
feed development 2Ja10
feedback 1Np04
Feline calicivirus 2Ep07
fermentation 2Ca01, 2Ca11, 2Cp06, 2Ha06, 2Jp02, 2Ka03, 2Ka07, 2Kp04, 2Kp06, 3Ca11
fermentation control 2Cp03
fermentation inhibitor 3Ha08
fermented plant extract 2Ca10
fermentor 2Ep04
Fetal bovine serum 1Op17
field omics S3Cb02
field test S3Cc01

filamentous bacteria 2Na12
filamentous fungi 1Kp12, 2Fa05, 2Fa06, 2La09, 2La12
firefly luciferase 1Dp08
FISH 2Na09
fish diversity S3Cb05
fitness 1Np11
fitness cost 1Gp11
Flavonoid 2La05
flavoprotein 1Gp12, 2Ma07, 2Ma08, 2Mp11
FlbC 2Ga04
Flexivirga alba ST13 3Na01
floc formation 3Fa09
Flocculant 2Ja03
flocculent Saccharomyces cerevisiae 3Ha09
floral 2La01
flour 2Ca11
flow cytometry 1Gp12, 2Oa01
flower yeast 1Fp13
fluctuation 3La05
fluorescence 2Ia01
fluorescence spectra 1Dp09
fluorescent aptamer 1Ep08
fluorescent microscopy 1Dp09
fluorescent protein 2Ga11
fluorometric biosensor 1Lp02
flux balance analysis 2Ip08
FMO S3Gc05
food additives 3Ea02
food microbiology 2Ca11
food pairing S3Db03
forest biomass 1Hp16
formate dehydrogenase 1Fp15, S3Bc05
fouling 2Fp04
Fragment molecular orbital S3Gc05
freeze tolerant 2Cp02
freeze-thaw stress 2Ka12
fucoidan 2Mp01
full consensus design 1Mp02
full-length cDNA synthesis 2Ka01
fumarase 2Lp07
functional food 1Ep04
functional property 2Kp06
functionality S3Db02
fungus S3Mb03
furfural 2Ha05
fusion protein 1Fp16, 2Fa03

G

G-protein-coupled receptor 1Lp12
G-quadruplex 1Ep08
GABA 2Ha02
gag protein 1Ip08
gallic acid 2Lp05
[*GAR*$^+$] 2Ka11
garlic 1Kp03
gas film 1Ep12
GC-MS 1Kp16
GC/MS 1Lp16, 2Ca04, 2Ca06, 2La01
gelatin 2Oa12
gene 1Ep17
gene disruption 2Ja01, 2Ja02, S3Mb06
gene expression 1Gp01, 2Ca02, 3Ha09, S3Bb03, S3Mb04
gene expression analysis 2Gp07, 2Op05
gene knockout 1Gp03
gene regulation 3Ca01
gene silencing 1Ep15
gene transfer 1Np12, 1Op04, 3Oa07
generate electricity 2Ha07
genetic circuit 1Jp09
genetic code 2Ia07
Genetic Modification 3La07
genome 1Lp08, 2Ga03, S3Dc01
genome analysis 2Ga02
genome design S3Hb02
genome editing 1Jp04, S3Gb03, S3Hb01, S3Lc03
genome engineering 2Ga07, 3Oa01, S3Lc04
genome integration 1Gp13, 2Ga10
genome mining 2Ga02
genome scale model (GMM) A1Aa03, S3Eb02
Geobacillus 1Gp07, 1Gp08
germination 1Gp10
GFP 2Ga11
GID complex S3Mb05
glaB 2Ga04
glucan 2Fp04
Gluconobacter 2Jp10
glucose 3Oa03
glucose dehydrogenase 2Mp11
glucose repression 2Jp08, 2Ka11
Glucosyltransferase 1Mp11
glucuronoxylanase 2Ma06
glutamate fermentation 2Jp02
glutathione 1Kp05
glycemic control S3Da04
glycerol 3Fa09
glycopeptide synthesis S3Mc01
glycoprotein S3Mc05
Glycoside hydrolase family 30 2Ma06
glycosylated peptide S3Mc02, S3Mc03
glycosylation 2Ma04, S3Mc03, S3Mc04, S3Mc05
Glycosylceramide 1Cp08
glycosyltransferase 2La05, S3Mc01, S3Mc04
gold colloid S3Bb03
gold nanoparticle 1Lp01
gold@silver nanohybrids 1Lp03
goldfish 1Dp06
GP64 2Fp10
GPCR 1Dp05
GPI anchor 2Gp01
grain 1Ep17
Green chemistry 1Mp06
green fluorescent protein 2Ia11
gSELEX 1Kp12
gSELEX-Seq 2Kp01
GST-tag 3La02
GTPase 1Mp04
gut S3Cb01
gut microbiome 1Cp07
gut microbiota 1Jp03

H

hair follicle 1Op15
halo assay 1Hp12
Halomonas 3Ga03
Halomonas elongata 2Ha02
hazardous chemical 2Ha12
HBsAg 2Fp03
headspace 2Ep01, S3Cc04
headspace GC-MS 2Ip10
heart S3Lb01
heat shock protein 1Ip15
heavy metal pollution 2Np02
heavy metals 3Fa01
Heck reaction 3Ga06
Hemagglutinin 1Ip08, 2La03
heme containing membrane protein 1Hp10
hemicellulose 1Kp11
Hemodialysis 2Op07
Hepatitis B virus(HBV) 2Op02
hepatocyte 1Op11, 2Op05
heterologous production 1Ep07, 3Ka01
hexavalent chromium 3Na01
High cell density culture 1Fp03
high pressure 2Cp03
high solid state scarification 1Fp06
high-throughput screening 2Lp10, 2Op09, 3Ia09, 3Oa09
high-throughput sequencing S3Fc03
hippuric acid 3Ma09
hiPS cells 2Oa03
histidine 2Ka02
histidine rich protein 1Ip10
homologous recombination 2Gp06, 2Gp09
human colon 1Cp11, 1Cp12
human excreta S3Cb03
Human glucocerebrosidase 1Ep14
human induced pluripotent stem cell 2Oa01, 2Oa02, 2Oa07
human iPS cells 1Op13
human lymphocyte 1Op04
human monoclonal antibody 1Dp03
human skeletal muscle cells 2Op09
humic acid 2Kp03
hyaluronic acid 2Ep06
hybrid hydrogel bead 3La09

hybrid vigor 2Da11
Hybridoma technology 1Dp05
hydrodynamic filtration 2Oa04
hydrogel S3Bb02, S3Bb04
hydrogen activation 3La03
hydrogen peroxide 2Ka09, 2Op10
hydrogen-oxidizing bacteria 2Ja06
hydrogenase 1Fp15
hydrogenase structural genes 3La03
hydrolase 1Mp08, 1Mp17, 2Lp06
hydrolysis 3Ga04
hydrophobin 1Ip13
hydroponics 1Ep10
Hydroxyapatite 2Fp02
4-hydroxybenzoate 2Ka05
hydroxybutylic acid 3Ga02
3-hydroxybutyric acid 3Ga03
3'-hydroxygenistein 2Ca07
hydroxylation 1Jp10, 1Mp10
hyperphosphatemia 2Np05
hyperthermia A2Fp01
hyperthermophile 2Ma11
hyperthermophilic 2Ia06
hyperthermophilic archaeon 1Gp03, 3La05
hypothetical proteins 2Ma03

I

ICP S3Hc01
IgA-enhancing effect 1Cp06
image analysis 2Oa10, 2Oa11, 3Ia08
image-based analysis S3Lc07
image-based assesment 2Oa08
image-based evaluation 2Oa09
imaging analysis 1Lp10
imaging mass spectrometry 1Kp14, 2Op01, 3Ca07, 3Ca08, 3Na07
Imidacloprid 1Kp13
imidazole dipeptide 3Ma03
immobilization 1Fp16, 1Lp11, 2Ga08, 2Ga09, 2Ip03, 3Fa06, 3La08, S3Gc04
immobilized bacteria 1Jp05
immobilized carrier 3Na05
immobilized cell 2Hp05
immobilized cell culture 3Fa08
immunosensor 1Lp11
immunosuppression 1Dp12
immunotherapy 1Ip03
in silico screening 2Lp03
in siloco screening 1Ep04
in situ extractive fermentation S3Cc03
in vitro coupled transcription/translation 2Ia08
in vitro metabolic engineering 2Kp11, A2Mp01, S3Cc06
in vitro model 1Cp11, 1Cp12
in vitro molecular evolutionary engineering 2Ia08
in-process measurement S3Lc07
inactive Cas9 system 3Ka06
indigenous skin bacteria 3Ea01
indigestible dietary fiber 1Cp11
Indonesian tempe 2Ca05
industrial development S3Kb02
inertial force 2Oa02
inflammasome 2Ia05
information content 3Ia08
inhibitor 3Ha05
Inhibitory Chemical Complexes 1Fp04
Ink jet printing 2Oa03
innovation S3Fc04
inositol 1Mp09
insect cell 2Fa10
Insecticide 1Kp13
insertion-sequencing 1Gp15
Interaction analysis S3Gc05
interface cultivation 1Kp09
intermediate filament 2Op08
international cooperation S3Kc01
interspecific cross 2Da11
intestinal bacteria 1Cp09, 2Np05
intestinal colonization 1Gp15
intestinal microbiota 1Cp10, 1Jp01
INTMSAlign_Angler 2Lp03
intracellular pH 1Ip16
intravenous immunoglobulin 1Dp12
ion characteristics 2Np04
ionic liquid 1Hp04, 1Hp05, 1Hp06, 1Mp05, 3La09
iPS cell 1Op14, 2Oa08
IPTG 3Ka07
iron S3Ec01
iron homeostasis 1Np09
iron respiration S3Ec02
iron sulfur cluster 1Np09
Iron-sulfur protein 3Ka04
irritation 1Cp02
isolation 1Cp07, 2Na09, 2Op03, S3Fc03
isomaltose S3Db01
isoprenoid 2Lp08
itaconic acid 3Ga06

J

JABEE A1Aa01
Jamu S3Kc05
Japanese eel 2Ja10
Japanese sake yeast 2Da09
Jeotgalicoccus 2Kp08
jumbo phage 1Np10

K

kaolin 3Ea09
Keio collection 3Ia05
5-keto-D-gluconate 2Jp10
ketose 3-epimerase 2Mp07
kifunensine 1Ep13
killer gene 1Cp14
kimoto 3Ca09
kinetic model 1Jp17
kinetics 1Mp15, 2Fp02, S3Hb05
Kluyveromyces marxianus 1Kp02
koji 2Cp11
Komagataeibacter europaeus 1Gp05
Kouleothrix 2Na12
kraft pulp 1Fp06
Kynureninase 2Fp02

L

L-amino acid ligase 3Ma03
L-glutamate 2Ha02
L-glutamate oxidase 1Mp02
L-lactic acid 2Kp11, 2Ma08, S3Cc05
L-Leucine 2Da08
L-lysine alpha oxidase 3Ma10
L-rhamnose isomerase 2Mp08
L-theanine 1Jp11
lactate dehydrogenase 1Kp10
lactate-utilizing bacteria 1Jp02, 1Jp03
lactic acid bacteria 1Cp06, 1Cp13, 1Np01, 2Cp01, 2Jp07, 2Jp08, 2Jp09, 2Np04, A2Cp01, 3Ea06
lactic acid bacterial diversity 1Np01
lactic acid fermentation 2Jp11
Lactobacillus acidophilus 3Ea06
Lactobacillus bulgaricus 2Jp11
Lactobacillus gasseri 3Ea02
Lactobacillus plantarum 1Cp13, 1Fp12
Lactobacillus sakei 1Cp06
lactonase 3Na10
lactose 1Kp02
laminin 2Fa04
Lanthanides 1Mp13
lasso peptide 1Ep07
Late Embryogenesis Abundant 2Fa02
latex 2Fa08
latex turbidimertic 2Fa08
LC-MS/MS 1Kp15
LC/MS 1Lp17
LEA peptide 1Ep06
leaf bacteria 1Np06
leakage 3Fa08
learning efficiency 3Ia11
LED 1Ep11
legume 1Ep10
leucine-responsive regulatory protein 1Ip16
light harvesting S3Eb01
light response 1Np06
light/dark transition 1Jp18
Lignan 1Mp11
lignin 1Hp02, 1Hp06, 2Ga01, 2Ha03
lignocellulosic biomass 1Hp04
lignocellulosic materials 1Hp05
Lilium japonicum 2La01
LINE-1 3Oa07
lipase 1Fp01, 3La08, S3Db01

lipid 1Kp01, 2Ca08, 2Hp04, S3Da01
lipid accumulation 2Hp09, 3Ka03
Lipid droplet 2Fa01
lipid production 1Kp07, 1Kp08
lipid remodeling 2Gp01
lipid vesicle 1Cp02, 2Fp05
Lipid yield 1Fp04
Lipomyces 1Fp04, 3Ka03
Lipomyces starkeyi 1Kp04
Lipomyces starkeyii D35 1Fp03
Lipomycetaceae 1Np07
lipopolysaccharide 1Cp05
liposome 1Cp01
liquid chromatography 1Kp17
liquid culture 2Ep01
liquid fertilizer S3Cb03
liquid nitrogen 3Ea05
liquor 2Da07
Litopenaeus vannamei 2Ca06
Livestock S3Cb01
localized surface plasmon resonance 1Lp06
long chain fatty acids 1Fp05, 1Kp04
long tandem repeat 2Ga03
long-term stability 1Mp05
longevity 1Np08
Lotus japonicus 1Ep10
low shear and modeled-microgravity culture 3Ea06
low temparature 2Oa05
low temperature optimization 1Mp03
LPS-neutralizing activity 1Ep01
LSPR 1Lp02
luciferase 3Oa03
LysoPlasmalogen 2Mp04
lysosomal diseases S3Mc06

M

machine learing S3Hc03
Machine learning 1Lp15, 2Ip11, 2Ja11
Macrophage 2Ka08
magnetic nanoparticle A2Fp01
magnetic patterning 1Hp12
Magnetofluoro immunosensing 1Lp04
major hitocompatibility complex 1Ip04
malate dehydrogenase 1Mp03
MALDI-Imaging Mass Spectrometry 1Kp13
MALDI-IMS 3Ca07
MALDI-TOF MS 1Cp07
maleic acid 1Hp01
malic acid S3Mb05
malic enzyme 3La11
mammalian cell S3Lc01
mandelic acid 3Ga02
manganese 2Np06
mannanase 2Mp02
manufacturing technology S3Kb04
Maralia 1Ip06
marine 2La07, 2Mp05
marine microalgae 2Ga07, 2Hp05
marine microbiology 3Ia02
marine snow 2Ja10
marine technology S3Kb04
marker recycling 2Gp09
Mass spectrometry 1Kp17, 1Kp18, S3Lc05
Mathematical analysis 2Op07
mathematical model 2Kp07, S3Hb05
mating 2Gp02
Max-Blend 1Fp06
MazF 1Mp01
mechanobiology 2Op06
mediator 3La11
Medicago truncatula 2Lp11
medical device 1Op12
medium chain fatty acids 1Fp05
Megasphaera elsdenii 1Jp02
Megasphaera elsdnii 1Jp03
membrane curvature-sensing protein 2Fp09
membrane lipids 1Cp02, 2Fp09, S3Mb02
membrane potential S3Eb04
membrane prtotein S3Bc01
membrane reactor 2Fp04
membrane technology 3Ha09
membrane vesicle 1Cp06
membrane vesicles 1Cp03
Merozoite surface protein 1-19 1Ip06
Merozoite surface protein 3 1Ip06
mesenchymal stem cell 1Op03, 1Op05, 2Oa09
meta-fermentation S3Cc05
metabolic analysis 1Jp01, 1Jp09, 1Lp16, 2Jp03, 2Ka04, S3Gb04
metabolic control analysis A1Aa03
metabolic engineering 1Fp05, 1Fp11, 1Jp08, 1Jp09, 1Jp12, 1Jp16, A1Aa03, 2Ip09, 2Jp01, 2Jp03, 2Jp06, 2Ka02, 2Ka03, 2Ka04, 3Ka01, S3Eb02, S3Gb04, S3Hb02, S3Hb04, S3Hb05, S3Mb06
metabolic flux 1Kp10
metabolic flux analysis 2Ip09, S3Mb06
metabolic model 2Ip08
Metabolic profiling 2Ca03, 2Ja11
metabolic response 1Jp18
metabolism 1Jp16, 2Ca08, 2Ca11, 2Ha09, 2Ha10, 2Jp07, 2Ka06, S3Mb01
Metabolite profile 2Ca05
metabolite sensor 1Lp12
Metabolome 2Jp09, S3Lc05
Metabolomics 1Kp17, 1Lp15, 2Ca04, 2Ca05, 2Ca06, 2Kp08, 2Kp09, S3Lc05
metagenome 2Mp03
metagenomic libraries 1Np10, A2Hp01
metal absorption 2Np06
metal recovery 2Np03
metallic biomaterials S3Ec03
methane fermentation 2Ha12
methane monooxygenase 1Mp14
methanol 2Ja05, 2Kp10
methanotroph 1Gp04
8-methoxydaidzein 2Ca07
Methyl methacrylate 1Mp06
methylation index 2Op01
methylation reaction 2Kp10
Methylobacterium 1Mp13
methylotroph 1Mp13, 2Ja05
methylotrophic yeast 2Gp01, 3Ka01
MFC 2Ha09
mic S3Ec01
micro vascular structure 1Op07
microalgae 2Hp04, 2Hp06, S3Da01
microalgae growth-promoting bacteria 2Hp06
microbial biotechnology S3Kc02
microbial cell array 1Hp12
microbial community 2Ha12, 2Ja09, 2Np02, 3Ea05, S3Fb02
microbial dark matter 2Fp11, 3Ea04
microbial flora 1Cp10, 1Cp12, 2Ca08, S3Cb05
microbial fuel cell 2Ha07, 2Ha08, 2Ha09
microbial production S3Hb01
microflora 1Cp11
microfluidic device 1Lp08, 2Fp06, 2Oa04, 2Op06, 3Ia03
microorganisms 1Cp08, 2Fp06, 2La07, 2Na08, S3Gb04, S3Kb03, S3Kc01, S3Kc03
microplastic 3Ga02
microRNA 1Gp16
microsensor 1Ep12
microsphere 3La08
microtube 2La08
microwave 2Ep10
milk 1Fp13
mineral 3Ga03
Minicircle DNA vectors 3Oa05
minimal media 2Kp09
MinION 2Ga03
MinION nanopore sequencing 2Ka01
miso S3Db04
mitochondrial pyruvate carrier protein 1Kp10
mixed culture S3Cc05
model validation 2Ip08
MOF S3Hc04
molecular chaperone 1Ip15
molecular design 2Ip04
molecular dynamics simulation S3Gb02
molecular evolution 1Ip15, S3Gc02,

S3Hc03
molecular weight 3Ga04
moloney murine leukemia virus S3Bc03
molybdenum blue method 3La07
monascus anka 2Cp04
Monitored Natural Attenuation 2Na06
monitoring device 2Ep01
monoclonal antibody 1Dp02, 2Ip06
monolith 2Fp03
monoterpenoid 1Fp10
Moorella thermoacetica 2Jp04
Morolic acid 3Ka02
motility 1Np01
Motor neuron 1Op14
mouse 3Ia11
mRNA 1Gp17
mRNA degradation 1Ep16
mucin 2Op11
Mucor circinelloides 2Kp02
muiltistress tolerance 2Ka09
multi-subunit protein 2Fa04
multicolor fluorescent *in situ* hybridisation method 3Oa04
multicopper oxidase 3La06
multilamellar vesicles 1Cp03
multiple attribute methods 1Kp18
Musa acuminata cv. AAA 2Ca03
mutagenesis 2Ia12, S3Hc02
mutant 2Ka09
mutational analysis 1Ep08
Myxozyma 1Np07

N

n-dodecanol 2La02
N-glycan 1Ep13
N-methyl amino asid 3Ma08
NAD(P)H 2Ma11
NAD^+ salvage synthesis 2Kp11
NAD^+/NADH balance 2Jp08
NAD/NADH balance 2Jp07
NADH dehydrogenase-II overexpression 3Ka08
nano particle 2Op10
Nano-bio system S3Gc05
nanobiotechnology S3Bc01
nanobubble 2Ep08
nanocapsules 2Ia06
nanometer scale particles S3Hc01
nanoneedle array 1Op04
Nanoparticle 2Ia10
nanoparticles 1Fp18
nanostructure 2Ia03, S3Gc06
Narazuke 2Cp07
natto extract 1Ep01
natural antibody 1Gp14
natural product S3Hb01
Natural rubber 2Fa01
negative chemical ionization 1Kp16
nematodes 2Np02
neonicotinoid 2Na10
Neospora caninum 1Ip07
nerve cells 1Op12
neural network 3Ia10
neural stem cell 1Op02, 3Ia09
Neuromuscular junction 1Op14
neurotransmitter 1Kp14
Next generation sequencer 3Ca04, S3Dc02
next generation sequencing 2Ip05, 2Na05
NGS 3Ia01
Nicotiana benthamiana 1Ep13, 1Ep14
Nicotiana tabacum 1Ep15
Nicotinic acid 3Ca11
[NiFe]hydrogenase 3La03
nitrification 2Ja07, S3Da02, S3Fc01
nitrifying bacteria 1Mp01, 2Ja07
nitrilase 2Lp03
nitrile 2Lp03
nitrile hydratase 2Lp02
nitrogen fixation 2Ha01, 2Hp01
nitrogen metabolism 1Jp16, 3Ca06
nitrogen removal S3Fc01
nitrogen-fixing bacteria 3Fa04
nitrophenol 1Np14
nitrous oxide S3Fc01
NMR 2Ja10, 2Ja11
Non-recombinant breeding 3Ha11
non-thermal effect 2Ep10
non-woven fabric 1Op05
nonribosomal peptide synthetase 3Ma02
Nonylphenol monooxygenase 1Np18
Noro virus 1Lp05
norovirus detection 1Lp06
Norovirus model 2Ep07
Norovirus RNA detection 1Lp01
norovirus-like particles 1Lp03
nucleic acid amplification S3Bc03
nutrient starvation stress S3Mb07
nylon-6 2Na01

O

OaAFP1 1Ip11
1-octen-3-ol 3Ca03
odor learning 3Ia11
odorant response 3Oa09
Ogataea minuta 2Gp01
oil degrading bacteria 2Na11
oil palm empty fruit bunch 1Hp01
Oleaginous yeast 1Fp03, 1Fp04
oleaginous yeasts 1Kp04
oleic acid 2Hp10
olfactory processing 3Ia11
oligodeoxynucleotides S3Hc06
oligosaccharide S3Mc02
oligotroph 3Ka09
on site coating 2Ep11
oncomiR 1Gp16
one-dimensional alignment 1Lp14
one-pot conversion 1Hp04
open circuit voltage 1Lp13
optimiztion S3Cc06
Optogrnrtics 3Ia10
oral delivery S3Hc06
organ engineering S3Lb01
organic cultivation 1Hp18
organic matter 2Na07
organic soil 1Hp17
organic solvent 3Ma06
Organophosphorus compounds 1Mp08
organophosphorus hydrolase 1Mp07
oriented immobilization 1Lp09, 3La05, 3La06
ornithine 3Ca09
outdoor cultivation 2Hp04
outer membrane protein 1Ip14, S3Ec02
outer membrane vesicles 1Cp04, 1Cp05
oxidase 2Jp11
oxidation 3Ma01
oxidative stress 1Op18, 2Hp11
Oxidosqualene cyclase 3Ka02
oxygen 1Ep12
oxygen limitation 1Fp11
oxygen sensing 3Ka11
oxygen transfer performance 2Ep02
oxygen transfer rate 2Ep04
oxygen-radical pretreatment 2Ma02

P

P450 1Mp10
paddy field 2Na07
Paenibacillus 1Hp15
palm oil mill effluent 1Fp02
pancreatic cancer 2Op10
pathway design S3Cc06
PCA 2Da11
PCL nanoparticle 1Op06
PCR A2Cp01
PCR-DGGE 2Ep10, 3Ea05
1,3-PDO 1Fp07
pear 1Cp15
pectinolytic 1Hp12
6-pentyl-alpha-pyrone 1Kp09
peptidase 2Fp08, 3Ma03
peptide 1Ep03, 1Ep04, 1Gp18, 1Op01, 2Fa02, 3Fa02, 3Fa03, 3Ia07, S3Gc02, S3Hc04
peptide array 1Ep03
peptide bond formation 3Ma01
Peptidic compound 3Ea11
Periodontal disease 2La03
peroxidase-like activity 1Lp03
peroxide 1Cp01
peroxin S3Mb05
Peroxynitric acid 2Ep07
PET-hydolyzing cutinase 3La01
PGPB 1Hp15

pH slide culture 2Fp11
PHA 2Ja05, 2Ja06, 3Na08
PHA synthase 3La02
phage 1Np10
phage display 1Dp08, 2Ip01, 2Ip02, 2Ip04, 2Ip05
Phanerochaete chrysosporium 2Ma01
PHB 3Ga03
phenol 3Ka10
phenolic acid decarboxylase 3Ca05, S3Dc04
phenotype-based screening 3Ia08
phenylalanine 2Ep06, 3Ka07
pheS 1Gp04
Philippines S3Kc03
phosphatase 1Mp09
phosphate 3Na02, S3Fc04
phosphate compound 1Mp17
phosphate estimation 2Np05
phosphate metabolism 1Jp15
phosphite 1Jp13, 1Jp14, 1Jp15
phospholipase D 2Mp04
phospholipid 2Ca12
photo-cleavable peptide array 1Lp17
photoconducter 2Ep09
photodynamic reaction 1Op03
photosynthesis 2Ip07, S3Eb03
photosynthetic bacteria 2Hp01, S3Ec04
photosystem II 1Mp14, 2Ga12, S3Eb01
phylogenetic analysis 2Ka07, 3Ca04, 3La03, S3Dc02
phytase 1Mp09, 1Mp17
phytate 1Mp12
phytic acid 1Mp09
phytohormone S3Da03
phytopathogens 2La11
Pichia 3Ha07
Pichia kudriavzevii 2Gp08
Pichia membranifaciens 3Ha05
Pichia pastoris 2Gp09, 2Gp10, 2Gp11, 2Ma04
pigment 1Fp18, 1Np06, 2Cp04, 2La07
plant breeding S3Cc02
plant cell culture 2La07
plant chemical biology S3Da03
plant factry system S3Cb04
plant growth 1Hp18
plant growth regulator S3Da03
Plant Growth-Promoting Bacteria 1Hp13, 1Hp14
plant microbial fuel cell 1Lp13
plant monitoring system 1Lp13
plant sample 3Ea05
Plant symbiotic bacteria 1Mp13
Plant-made pharmaceuticals 1Ep14
plasma 1Lp16
plasmid 1Gp11, 1Np11, 1Np12, 3Ka07
plasmid retention 2Gp10
Plasmon resonance 1Lp01
Plasmonic-magnetic graphene 1Lp04
plastic degrading bacteria 2Na01
PMMA-tag 2Fa07
pneumatic S3Hc01
poly(3-hydroxybutyrate) 3Ga01
poly(diaminopropanoic acid) 3Ea07
poly(epsilon-L-lysine) 3Ea07, 3Ea08, 3Ea09
poly-gamma-glutamate 2Ep11
Poly-gamma-glutamic acid 2Ca09, 2Ja03
polyacrylamide capsule 3Na05
polyamine 2Ca01, 2Ia04
Polycaprolactone 1Op06
Polychlorinated biphenyls 2Na06
polyester 3Ga01
polyhydroxyalkanoate 2Ja05
polymer 1Op01, 2Ca09
polyphenol 1Ep11
polysaccharide 1Op01
polysaccharide-degrading enzyme 2Mp01, 2Mp05
polyunsaturated fatty acid 2La12
Populus spp S3Cc01
Porphyromonas gingivalis 2La03
post-tlanslational modification 2Ia02
poultry S3Cb01
Pre-treatment optimization 2Ka04
pretreatment 1Lp16, 3Ea04
pRING 1Gp16
process engineering 2Ia11
product regioselectivity 2Lp11
production 1Jp12, 2Ja01, 3Ha02
prolamin 2Cp07
Prolamine 2Cp09
proliferation 3Oa02
proline 3Ma07
promoter 1Gp06, 1Gp08, 1Np05, 2Gp07, 3Ha04
2-propanol 2Ja04
prophage 1Np11
protamine 2Ga08
protease 1Cp17, 1Cp18, 1Lp17, 3Ca02
proteasome 2Ka12
protein 1Gp01, 1Ip18, S3Gb02, S3Gc03, S3Gc06, S3Hc03, S3Mc02, S3Mc03
Protein Conversion 3Ha01
protein data bank 2Ip01
protein engineering 1Ip01, 1Ip02, 1Ip03, 1Ip04, 1Mp03, 2Ia03, 2Ip01, 2Ip02, S3Lc06
protein expression 1Gp06, 2Ga12, 2Gp07, 3Ha04
protein folding S3Mc02
Protein G 2Fp01
protein hydrolysates 1Ep05
protein interaction S3Lc03
protein kinase C 1Op16
Protein L 2Fp01
protein labeling S3Bb01
protein nanobuilding block 2Ia03
protein production 1Cp04
protocatechuic acid 1Np16
protoplast S3Dc03
Pseudoalteromonas 1Np02
Pseudomonas 1Gp11, 1Np14, 1Np16, 2Mp09
Pseudomonas aeruginosa 3Ma11
Pseudomonas fluorescens 2La10
Pseudomonas putida 1Np17, 2Ha03, 3Na07
Pseudomonas sp. 1Mp12, S3Fb03
Pseudomonas stutzeri 3Na03
Pseudomonas stutzeri NT-I 3Na05
Pseudozyma antarctica 2Gp06, 2Gp07
psychrophile 1Np02
psychrotroph 1Fp16
purification 1Ip09, 2Fp02
PVA 1Op02
pyrazine 2La10
Pyrococcus chitonophagus 1Gp03
pyrogallol 2Lp05
pyruvate S3Hb03
Pythium 2La12

Q

Qdot 1Ip12
quality control 2Oa08, S3Lc07
quantum dot 1Lp01, 1Lp05
quantum dots 1Lp06
Quartz Crystal Microbalance 1Ip13
Quenchbody 1Dp09
quorum sensing 3Na09, 3Na10
quorum sensing metabolites 3Na07

R

Rabbit 1Dp02
Radioactive substances 2Np01
Rahnella sp. 2Lp05
Ralstonia eutropha 2Ja04, 2Ja06
randomized controlled trials S3Da04
rare earth 2Np03
rare mating 3Ha11
rare sugar 1Mp18
RDR6 1Ep15
reactive oxygen species 1Op03
receptor 1Gp10
receptor protein 2Fp10
Rechargeable bio-mineral 2Ha10
recombinant antibody 2Ip06
redox balance 3Ka08
reductase 1Mp18
regenerative medicine 1Op10, S3Lb03, S3Lc01
RelA 3Ha01
relaxation time 1Lp15
renewable resource 3Ka03
repeated fermentation 1Kp04

replication 2Ia08
resistance 3Ea01
resistant starch 2Mp06
Resistantprotein 2Cp09
resource recovery 3Na03
respiration 2Kp03
respiratory chain 3Ka08
Resveratrol 3Ka05
retrotransposons 3Oa07
reverse transcriptase S3Bc03
reversible decarboxylase 2Lp01
RFP 2Ga11
rhizobacteria 1Lp13
Rhizopus sp. 2Cp05
Rhodococcus 2Ga01, 2Lp06, 3Ka09
rhodopsin 1Jp07, 1Jp08
Rhodosporidium toruloides 1Kp01, 2Hp10, 2Hp11
Rhodotorula gracilis 2Gp03
rice 1Ep12, 1Ep17, S3Cc02
rice blast fungus 1Hp10
rice husk biochar 2Ha04
rice koji 2Cp10, 3Ca07, 3Ca08
RIM15 3Ha11
RISA-PCR 3Na01
RNA binding protein 3Ca01
RNA-seq 1Gp08, 2Ja08
RNase III 1Np03
Root culture 1Ep14
rotated slurry bioreactor 2Na11
Rubber particle protein 2Fa01

S

16S rDNA 2Ja09
16S rRNA 1Np02
S-adenosylhomocysteine 2Op01
S-adenosylmethionine 2Kp10, 2Op01
S-Allyl-L-cysteine 1Kp03
S-system 2Kp07
saccharification 1Hp01, 2Ha06, S3Cc02
Saccharomyces S3Mb07
Saccharomyces arboricola 2Da11
Saccharomyces cerevisiae 1Cp14, 1Cp15, 1Kp03, 1Kp05, 1Lp12, 1Np08, 2Cp03, 2Da07, 2Da08, 2Da12, 2Fa01, 2Ga06, 2Ga11, 2Gp04, 2Gp05, 2Ha06, 2Ka07, 2Ka08, 2Ka09, 2Ka10, 2La02, 2Np06, 3Ha06, 3Ha08, 3Ha11, 3Ka04, 3Ka06, S3Hb04, S3Mb02, S3Mb05, S3Mb06, S3Mb08
safety evaluation 2Cp11
Sakaguchi flask S3Cc04
sake 2Cp06, 2Da12, 3Ca08, S3Db03
sake lees 2Cp07
sake yeast 2Cp03, 2Da10, 2Da12, 3Ca10, S3Mb08
salicylate decarboxylase 2Lp01
sarcosine oxidase 3Ma07, 3Ma08
sarfactant 1Cp01
scaffold 2Ip03
scaffold protein 2Ip04
scale-up 2Ep04
scFv 1Dp06, 2Ep03, 2Fa07, 2Fa08, 2Fa11
Scheffersomyces (*Pichia*) *stipitis* 3Ka05
Scheffersomyces stipitis 3Ha07
Schizosaccharomyces pombe 2La05
screening 1Gp07, 2Fp09, 2Ip10, 2Kp05, 2Na01, 3Ga05, 3Ga06, 3Oa02
screening method 3Ka03
SDGs S3Cb04
seawater 1Jp13
secondary metabolism 2Ga02
secondary metabolite 2Kp04
seconday cell wall S3Cc01
secreted protein 1Gp06
secretion 2Ja02
secretome 2Ma03
secretory expression 1Cp04
selective cultivation 1Jp15
selenium 3Na05, 3Na06, S3Fb03
self assembly 2Fa03
Self-assembed monolayer 1Ip13
self-assembly S3Hc04
self-cloning 2Hp03
self-sufficient P450 2Ma01
semi-hydrolysis S3Cc03
semiconductor S3Fb01
semiconductor nanoparticle S3Fb03
sensor 1Lp04
sensory evaluation 2Ca06
separation 1Ip09
Sequence-specific cleavage 1Mp01
serine enzyme S3Bc02
serine protease S3Bc02
Sesaminol 1Mp11
Sesamum indicum 1Mp11
sewage sludge 2Ha12
Sf9 cell 2Fp10
SFX 2Lp02
Shinella sp. NN-6 2Mp07
Shirakami kodama yeast 1Np08
Shiranuka 1Ip12
short-chain fatty acids 1Jp02
shuttle vector 1Ep07
sigma factor 1Np05
signal peptide 1Mp07
signal transduction 1Lp12, 3Oa02
silica 2Ga08, 3Fa02, S3Fb01
silica gel 1Ep05
silica particle formation 1Ip10
silicon S3Gc04
silicon dioxide 2Ha04
silk S3Hc05
silkworm 1Ip07
silkworm haemolymph 1Ip09
silver nanoplate 2Ep09
simulation 2Ep04
single cell 3Ia03
single cell protein 1Fp13
single-cell analysis 1Lp07, 1Lp08, 3Ia10, S3Bb02
site-directed mutagenesis 1Mp17, 3Ma10
site-specific recombination 2Gp04
Skeletal muscle 1Op17, 1Op18
Skeletal muscle tissue engineering 1Op14
skin barrier function 2Cp10
skin condition 2Cp10, S3Db04
skin tissue engineering 1Op15
skin-whitening 2Ca07
smart cell 1Jp07, S3Gb05
Smart cell industry S3Kb01
Snf1 1Np08
SOD 1Jp01
soil 2Na08
soil amendment 1Hp16
soil bacteria 1Hp17, 2Ha01, 2Na07, S3Da02, S3Fb02
soil ecosystem 2Ha07
soil environment 1Hp18, 2Na07
soil microbe 1Hp16
soil temperature 1Hp17
soil water content 1Hp17
Solanum lycopersicum 1Np17
solid-liquid interface 2Kp04
Solid-state culture 2Ga04
Solid-state saccharification 2Cp05
soluble expression 2Fa03
solvatochromic parameters 1Fp01
somatic hypermutation 1Dp07
specialized cellulose film 2Fp11
Specialty coffee 2Ca04
specific isolation 2Fa07
specific production rate 2Ep06
Sphaerotilus montanus 2La08
spheroid 1Op10, 1Op12, 2Oa11, 2Oa12
Spheroid morphology 2Oa10
sphingolipid 2Ca12
Sphingomonas 1Mp08, 1Np13
Sphingopyxis 3Na09, 3Na10
Spiculisporic acid 1Fp17
split intein 3Ma05
splitGFP 1Gp18
SPME-GCMS 3Ca03
Spo0A 3Ha01
spore 1Gp10
sRNA 1Np03
stability 1Fp01
Staphylococcus aureus 3Ea03
Staphylococcus epidermidis 3Ea03
starch-free wheat bran 1Kp11
statistical analysis 3Ha10
statistical design 1Fp18
steel S3Ec01
Stereospecific monoclonal antibody

1Dp05
stiffness 1Op02
storage protein 2Cp07
Strain development 1Kp06
streptococcus thermophilus 2Jp11
Streptococcus zooepidemicus 2Ep06
Streptomyces 2Ka02, 2Ka04, 3Ea07, 3Ea10, 3Ma04
Streptomyces coelicolor A3(2) 2Ka01
Streptomyces thermoviolaceus 3Ea10
streptozotocin 2Ga02
stress factor 1Hp13
stress resistance 2Cp02
stress response 1Np06, 2Ka10, S3Mb01, S3Mb02
stress tolerance 2Hp11
structural analysis 2La08
sturgeon 1Gp14
Subgroup I 1Dp11
Subgroup II 1Dp04
substrate affinity 3Ma08
substrate specificity 2Mp04, 3Ma01, 3Ma07, 3Ma10
subtilisin 3Ma05, 3Ma06
sucrose 2Jp07
sugar analog S3Mc04
sugar extraction 1Hp09
sugar phosphate 1Kp16
sugar-induced cell death S3Mb07
sugarcane bagasse 1Hp01
sulfanilic acid 2Na02
sulfate aerosol S3Fc02
sulfate reduction 3Na04
sulfate-reducing bacteria 2Ha10, 2Ha11, S3Ec02
sulfate-respiration 2Ha11
sulfite ion 2Na02
Sulfolobus acidocaldarius 2Ma09
sulfur transfer 2Ma10
superoxide dismutase 2Op10
supramolecular complex 2Ia03
surface S3Hc04
surface treatment S3Ec03
surfactant 1Cp02, S3Bb03
suspension cell culture 1Ep13
sustainable S3Da05
svm 2Ip11
SWEET 1Hp09
sweet potato *shochu* 3Ca02
Sweet sorghum juice 3Ha09
symbiosis 2Hp08, 3Fa04
symbiotic bacteria 3Ia02
synchronous expression 2Fa04
Synechococcus S3Eb03
Synechocystis 2Lp07
Synechocystis sp. PCC 6803 1Jp18
Synechocystis sp. PCC6803 S3Eb02
Synechocystis sp. PCC 6803 1Jp17
syntetic biology S3Cc06
synthetic bioengineering A2Mp01
synthetic biology 1Jp07, 1Jp09, 2Gp05, 2Gp11, 2Ia01, 2Ia07, 2Lp08, 3Ia01, S3Gb01, S3Hb02, S3Hb04
synthetic genomics 1Gp09
synthetic receptor S3Lc06
system biology 3Ia02

T

T cells 1Dp12
T7 3Ka07
Talaromyces cellulolyticus 2Ma06
Talaromyces purpurogenus 1Fp18
Talaromyces trachyspermus 1Fp17
tannase 2Ma05
tanscriptional regulator 2Jp10
tapping 2Oa02
Target-AID 1Jp04
Targeted transgene integration 3Oa05
taru S3Db03
taste 1Ep05
taxonomy 1Np07
TCA cycle 3Ka10
tea leaf 1Cp18
tellurium 3Na03, S3Fb03
Terbium binding protein 2Ia09
terephthalic acid 1Np16
terminal alkene 2Kp08
terpenoid 2La09
TGF beta 1Ip01
Thalassiosira pseudonana 2Ga09
therapeutic protein S3Lc01
thermal stability 2Ia12
thermo stability 1Mp05
thermoachidophiles 2Ma09
Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum 2Mp02
Thermococcus kodakarensis 2Ga09
Thermomyces lanuginosus 1Fp02
thermophile 1Gp02, 2Ma10, A2Mp01, S3Cb01
Thermophilic actinomycetes 3Ea10
thermostability 1Gp07, 2Ga12, S3Bc03
thermostability enhancement 1Mp02
thermostabilization 3La01
thermostable enzyme 1Gp02, 2Kp11, 2Ma07, 2Ma08, 3Ma05, 3Ma06, S3Hc02
thermotolerant mutant 2Hp11
Thiol-ene reaction 3Ga05
Thraustochytrid 1Kp08
three dimension S3Bb04
Tissue culture 1Op17
tissue engineering 1Op07, 1Op10, 1Op11, 2Oa06, A2Fp01, S3Lb02, S3Lb04, S3Lb05
TNF-alpha 2Jp09
TNFalpha 2Ip05
tolB 1Cp03
toluene 1Np17, 3Ma09
toluidine blue o 2Np05
TORC1 S3Mb08
toxicity 1Op16, S3Lb02
toxin-antitoxin 1Mp01, 1Np03
trans-aconitic acid 2Mp09
transcription factor 1Kp12
transcriptional factor 1Np09
transcriptional regulation 2Ga05, 3Ka11, S3Dc05
transcriptional regulator gene 2Ga05, 2Jp01
transcriptome 2Ca02, 2Ka01, 2Kp01, 2Oa09, 3Ca06, S3Dc05
transformation 2Hp01, 3Fa03, S3Dc03
transgenic chicken 3Oa01
transgenic silkworm S3Mc06
transglycosylation S3Mc06
transient expression system 2Fa09
translation 1Dp01
transporter 2Ga06, 2Ka10, 3Ha06, 3Ka09, S3Dc05, S3Eb04, S3Mb04
transposon mutagenesis 1Gp15
traveling force 2Ep05
trehalose 1Np04, 3Ka09
trehalose-6-phosphate synthase 1Np04
triad 1Dp10
Trichoderma sp. 1Kp09
Trichosporon moniliiforme 2Lp01
Triclosan 2Na04, 3Ea01
5', 5', 5'-trifluoro-DL-leucine resistance 2Da08
triglyceride 2Ca08, 2Hp03
Trimeric autotransporter adhesin 2Ia09
triterpene 2Lp11
Triterpenoid 1Ep10, 2Lp08
tropical microbes S3Kc04
tubulin 2Kp02
tulipalin 2La04
tuliposide 2La04
tumor associated antigen 1Ip02
tumor-associated-macrophage 3Oa08
Two-Hybrid System 2Ga10
tyrosine phosphorylation 3Oa02

U

UbiC 2Ka05
ubiquitin-like 2Ma10
UCP1 2Oa05
UDP-rhamnose 2La05
ulcerative colitis 1Cp12
ultrafine babble 2Ep02
ultrasound 2Ep08
uncultured bacteria 2Fp06
unsaturated carbonyl compounds 1Op16
Untargeted metabolomics 2Ca05
UV irritation 1Cp01
UV-B 1Ep11
UV-radiation 1Ep06

V

valetate 1Jp02
vanillin 2Ha05, 3La10
vascularization S3Lb01
vector 1Gp11
venus 1Gp08
VHH 2Ip02
Vibrio cholera toxin S3Gc01
vinegar fermentation S3Db02
vinyl compounds 3Ga05, 3Ga06
4-vinylguaiacol 3Ca05, S3Dc04
viologen S3Bc05
Virus separation and detection 1Lp04
virus-like particle 1Ip07
Virus-like particles 1Ip08, 2Fp03
viscosity measurement 2Ep05
VND transcription factors S3Cc01
volatile 3Ca03
volatile fatty acids 2Hp07, 2Hp08
volatile organic compound 2Na05
vulcanized natural rubber 1Hp07

W

wall biotechnology 3Fa04
waste 1Cp18
waste glycerol 1Kp06, 2Jp05
waste water treatment 1Fp13
wastewater 3Na02
wastewater treatment 2Na03, 3Na04, S3Cb04, S3Fb04
water soaking 2Cp04
wax ester fermentation 2Hp02
96 well plate format 2Op09
white-rot fungi 1Fp15, 1Hp08, 2Na10
white-rot fungus 2Ga01
whole cell biocatalyst 3Fa05
whole cell reaction 3La10, 3Ma03
whole genome amplification 1Lp07
wine 3Ca11
Wolffia S3Da04
wood decay 1Hp08
Wood rotting fungi 1Hp07
wound healing 1Ep02

X

Xanthomonas campestris WU-9701 2Mp10
Xanthophyllomyces dendrorhous 1Fp14
Xiaoqu-Mijiu 2Cp05
xylanase 1Hp11
xylene 3Ma09
xylitol 1Fp14
xylooligosaccharide 2Ma06
xylose 1Kp05, 3Ha03, 3Ha06

Y

yeast 1Kp05, 1Kp17, 2Cp02, 2Cp06, 2Ep02, 2Gp02, 2Gp08, 2Ha05, 2Ka07, 2Ka11, 2Np03, 3Ha05, 3Ha07, 3Ka05, S3Mb01, S3Mb07, S3Mc01
Yellow chive 2La03

Z

zebrafish 2Ca07
zeta potential 3Ea09
zymogen S3Bc06

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27日（月）です．あらかじめ大会ホームページより希望する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．混乱を避けるためセミナー開始時刻の5分前までにはランチョンセミナー会場へお越しください．10:30までに整理券の引き換えを行われなかった場合，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のでご注意ください．なお，当日空席がある場合は，事前予約なしでもご入場いただけます．10:30～11:30までは大会受付（大会3日目は11:20まで），これ以降は直接講演会場にお越しください．

9月5日（水）（11：45～12：45）

1LS1　株式会社島津製作所　第4学舎4号館2階　LS1会場
野生動物の腸内細菌叢解析と糞便メタボローム解析

1LS2　エッペンドルフ株式会社　第4学舎4号館2階　LS2会場
装置からみた培養手技 -大量に、安全に、簡単に-

1LS3　ノバ・バイオメディカル株式会社　第4学舎2号館5階　LS3会場
培養プロセス中の成分分析の重要性 －回分、流加から連続製造に向けて－

9月6日（木）（11：45～12：45）

2LS1　タカラバイオ株式会社　第4学舎4号館2階　LS1会場
－タンパク質実験効率化のご提案－独自膜技術を用いた製品ラインナップのご紹介

2LS2　三洋貿易株式会社　第4学舎4号館2階　LS2会場
動物細胞・微生物の培養経過を非侵襲リアルタイムセンシングする技術他

2LS3　宇宙航空研究開発機構 (JAXA)　第4学舎2号館5階　LS3会場
国際宇宙ステーション「きぼう」日本実験棟を利用した高品質タンパク質結晶生成実験の新しい展開

9月7日（金）（11：35～12：35）

3LS1　ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社　第4学舎4号館2階　LS1会場
メタボローム解析による吟醸酒成分と品質との相関解析

3LS2　東ソー株式会社　第4学舎4号館2階　LS2会場
動物細胞培養から考える抗体医薬品の分子不均一性

3LS3　P&Gイノベーション合同会社　第4学舎2号館5階　LS3会場
酵母の代謝解析の最新知見と化粧品原料への応用～代謝物網羅解析とビッグデータ解析による機能性物質の発見～

SHIMADZU
Excellence in Science

第70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 5日（水）11：45～12：45

場所　LS1 会場（第4学舎4号館4201教室）

セミナー番号　1LS1

野生動物の腸内細菌叢解析と糞便メタボローム解析

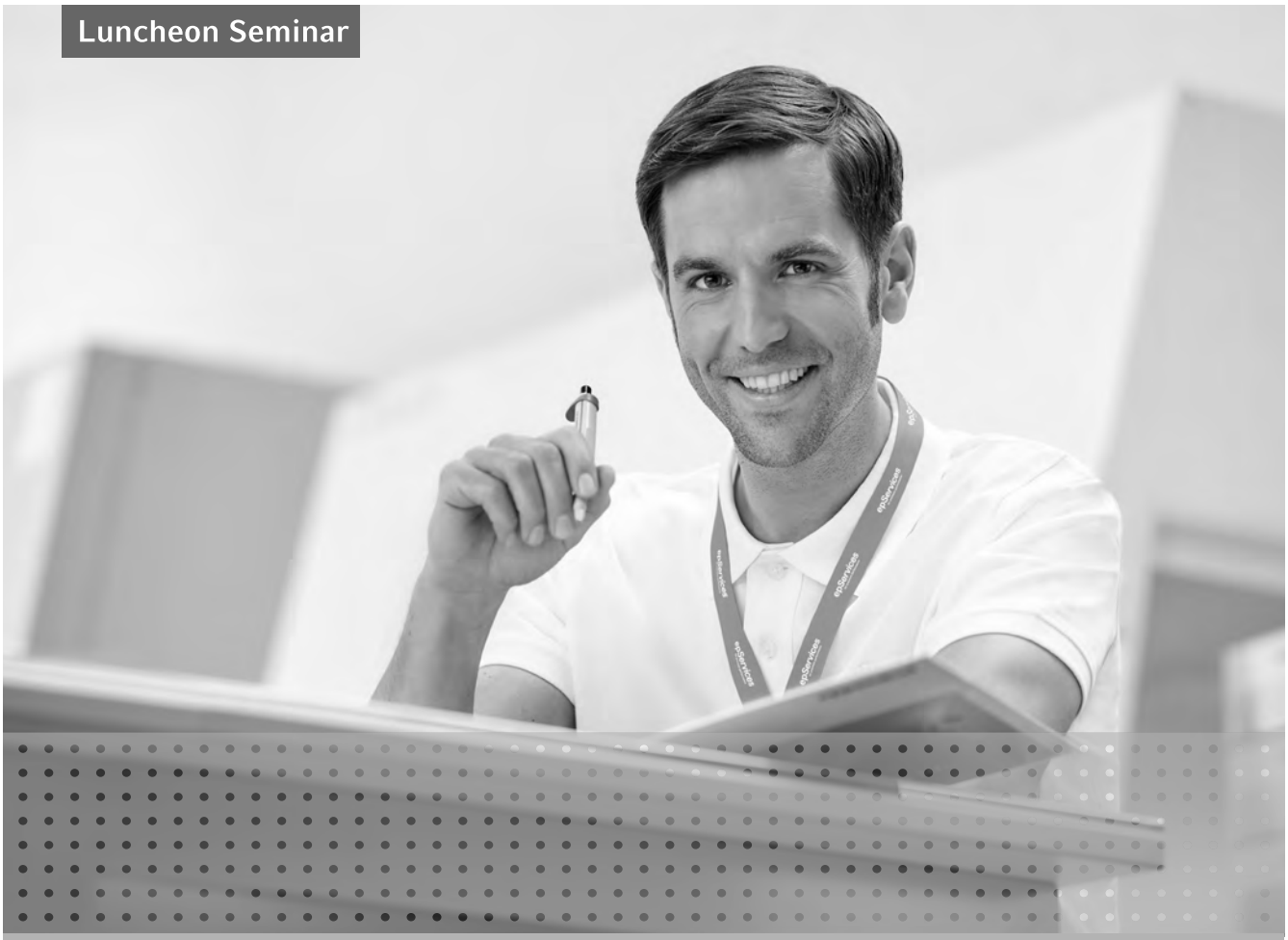
野生動物は、厳しい生存環境で生き残るために様々な能力を発達させている。とりわけ、食物や水の利用性に制限がある場合、特殊な食性とそれを支える消化体制を発達させて環境に適応している。こうした能力の生理学的基盤や細菌学的基盤があきらかにされると、将来の産業応用も可能なリソースとしての価値も展望されるようになると期待している。野生動物の食物、とりわけ草食の場合、摂食を妨げるための二次代謝物が植物体内に含まれる事が多い。動物側では、唾液の成分を変化させて化合物を吸着したり、味覚受容体を変えることによって当該の化合物を感じないようにするなどの適応が見られる一方で、消化管に共生する細菌によって化合物自体を分解する手段も発達させている。次世代シーケンス技術の発達によって、細菌集団の16Sメタ解析が進歩し、以前よりも高い精度で、菌叢構成の比較ができるようになったが、それはあくまでも比較する集団の構成が「違う」ことを明らかにするだけであり、実際にどの細菌が特定の機能に貢献しているのかを知るためには、細菌自体を取り出して検討するほかはない。具体的には、単離菌の古典的な生化学解析に加えて、全ゲノム解析などを実施してきた。また、16SrRNAのメタ系統解析情報を意味のあるものにするためには、酵素類のメタ発現解析も必要であるが、解析の負荷が大きいため、我々も試みてはいるものの、データとして確保できていない状況である。そこで、生化学的な網羅解析、すなわちメタボローム解析を実践しようとしているので、その必要性についても紹介したい。

演者　牛田 一成 先生
中部大学創発学術院/応用生物学部

株式会社 島津製作所　分析計測事業部　https://www.an.shimadzu.co.jp/

eppendorf

Luncheon Seminar



See You There!

9 月 5 日（水）11:45~12:45　会場：LS2（第 4 学舎 4 号館 4202 教室）　講演番号：1LS2

装置からみた培養手技 - 大量に、安全に、簡単に -

ご使用中の菌体培養装置は何年前に購入されましたか？
医薬品・食品開発をはじめ、数多くの R&D に欠かすことのできない培養装置は、シンプルながら日に日に進化を続けています。
本セミナーでは新製品のインキュベーターシェーカーとジャーファーメンターを中心に、その利便性と快適性をご紹介します。

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

第70回日本生物工学会大会
ノバ・バイオメディカル株式会社共催　ランチョンセミナー1LS3
日時：9月5日（水曜・大会1日目）　11：45-12：45
会場：LS3（第4学舎2号館）

培養プロセス中の成分分析の重要性
－回分、流加から連続製造に向けて－

演者：　大阪大学大学院工学研究科　生命先端工学専攻
教授　大政健史先生

要旨

21世紀に入って動物細胞を用いた生産技術は長足の進歩を遂げ、さらに周辺技術も格段に発展し、10g/Lを超える生産例もいくつも報告されている。
これらの長足の進歩は、特に2005年に世界の医薬品売上高ランキングベスト10に抗体医薬がランクインしてから顕著になった。特に、Chinese hamster ovary卵巣由来細胞（CHO細胞）を用いた抗体医薬生産は、2010年ごろを境に、急速にCHO細胞を用いて生産される抗体医薬の上市数が増加し、現在では、48品目（米国市場）となっている。これらの高生産や、多数の上市が実現された背景には、高生産細胞の開発のみならず、培地を含めた培養プロセスの改良が大きな貢献をしている。
本講演では、動物細胞、特にCHO細胞を用いた抗体生産を例に取り上げ、最近の進歩ならびに、今後予測される連続生産における培養プロセスについて、培地成分分析の重要性の観点から解説する。

その他、ノバ・バイオメディカル株式会社より、
細胞培養液分析装置のご紹介をさせて頂きます。

お問い合わせ先
nova biomedical
ノバ・バイオメディカル株式会社
〒108-0073 東京都港区三田3-13-16
三田43MTビル
TEL:03-5418-4141　FAX:03-5418-4676
MAIL:novabio@novabiomedical.co.jp
http://www.novabiomedical.com

第70回日本生物工学会大会

2LS1

-タンパク質実験効率化のご提案-

独自膜技術を用いた製品ラインナップのご紹介

本セミナーでは、タカラバイオがご提供する独自の膜技術をベースにしたタンパク質実験に関連する製品（Capturem™シリーズ）をご紹介します。独自の膜技術とは、独自ポリマー構造のことで、これにより膜表面積の最大化が可能となり、レジンカラムに比べ、圧倒的に小さいBed volumeを実現しています。これにより、洗浄効果の最大化と溶出時の洗浄バッファーの残存を極力抑えた高純度精製が可能です。本技術を有する関連製品の基本コンセプトは、“迅速・簡便を極限まで追求した実験ワークフローの実現”です。本技術を用いた製品である Hisタグ融合タンパク質の精製・濃縮用カラムにより、EDTAや還元剤（DTTやTCEPなど）を含む幅広い条件下において、5分~15分でタンパク質精製が完了します。免疫沈降や共免疫沈降実験に最適化したキットでは、サンプルと免疫沈降用抗体を10分間インキュベートした後、5分間のカラム操作で実験が完了するワークフローをご紹介します。また、トリプシンを固定化したカラムでは、標的タンパク質を2分間の遠心操作で完全消化し、MS解析用サンプルを迅速・簡便に調製することが可能です。ストレプトアビジンの固定化カラムでは、ビオチン化ターゲットの濃縮・精製を15分以内に完了します。
この独自の膜技術により、タンパク質実験の大幅な時間短縮が可能になります。
本セミナーでは、データを交えながら、皆様の実験の効率化にお役に立つ情報をお届けします。

日　時：9月**6日**（木）11：45-12：45

会　場：関西大学 千里山キャンパス
（第4学舎4号館4201教室）

演　者：井上　晃一（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

SANYO
TRADING CO.,LTD.

第70回 日本生物工学会大会

三洋貿易株式会社

ランチョンセミナー

9月 6日（木）11:45～12:45
LS2会場（第4学舎4号館4202室）
講演番号：2LS2

ラベルフリーセルモニター
iLine F

連続培養/分離濃縮ユニット
BioSep

～最新のバイオプロセス器材の紹介～

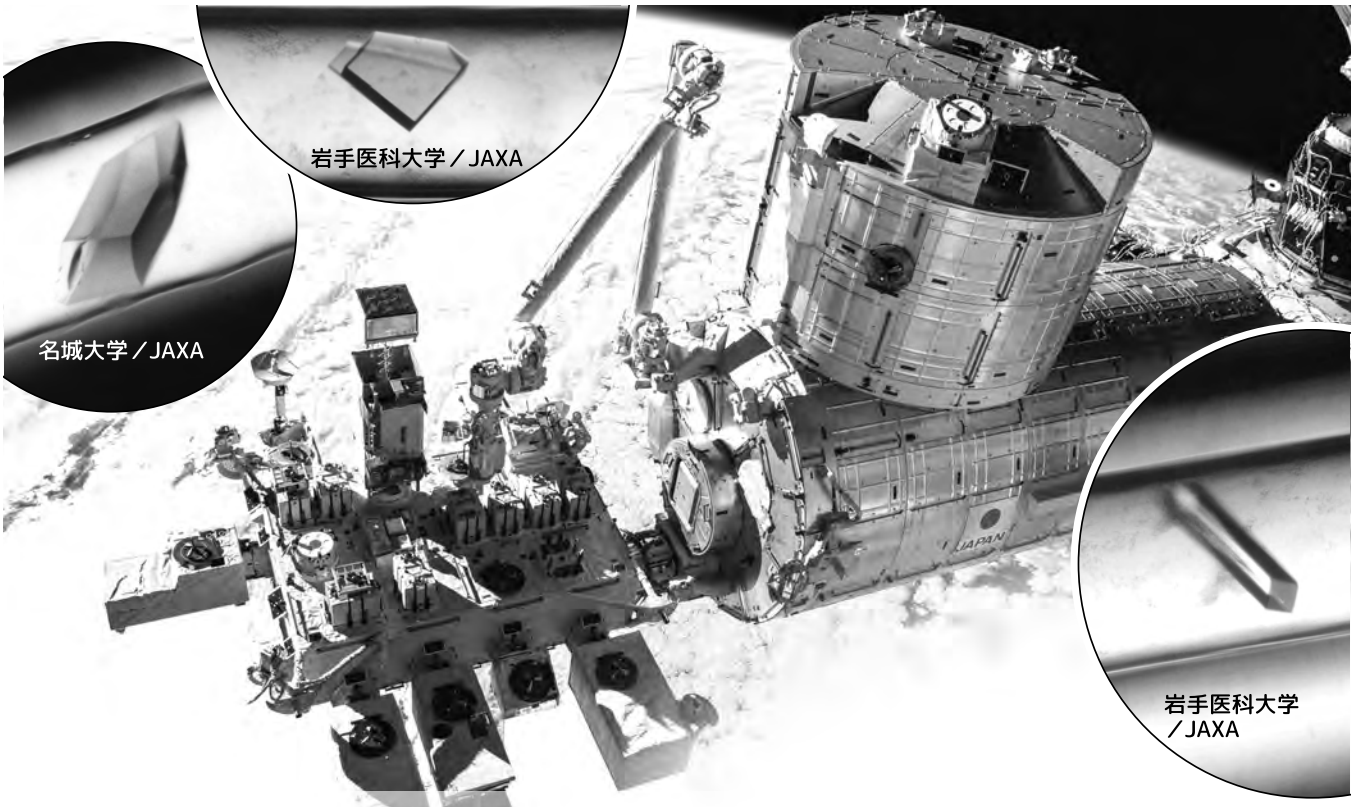
動物細胞・微生物の培養経過を非侵襲リアルタイムセンシングする技術他

弊社では、長年バイオセンシング器材におけるリーディングカンパニーの一つ独国PreSens社製品、2017年からラボスケールからプラントスケールでの細胞培養装置、バイオプロセス器材におけるリーディングカンパニーの一つであります蘭国Applikon社製品、その他特長ある製品を取り扱っております。

本講演では、次の特長あるバイオプロセス器材製品群を紹介いたします。

- 光学式バイオプロセスセンサー（DO/pH/CO_2）
- ラベルフリーリアルタイムセルモニター iLine F (生細胞数、密度他)
- 光学式完全非接触濁度（OD）モニター
- アコースティック（音響共鳴）バイオシェーカー RAMBio（超好気培養）
- 24ウェルマイクロバイオリアクタ microMarix（条件検討、スクリーニング用途）
- 音響式連続細胞培養・デブリ分離ユニット　BioSep
- その他バイオプロセス関連器材

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-sl@sanyo-trading.co.jp
URL: http://www.sanyo-sl.com

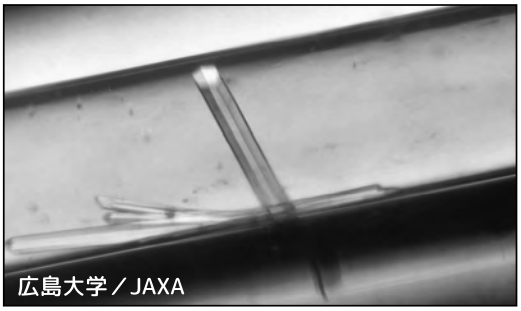


国際宇宙ステーション「きぼう」日本実験棟を利用した高品質タンパク質結晶生成実験の新しい展開

国際宇宙ステーション（ISS）「きぼう」日本実験棟で行われている「高品質タンパク質結晶生成実験」（Protein Crystal Growth：PCG）は、実験で得た成果を医薬品や新素材の開発へ応用するなど、私たちの生活の質の向上につながるような具体的な成果が期待されています。

今年、運用開始から 10 周年を迎える「きぼう」とともにスタートしたPCG実験は、現在までに運用方法・体制・適用技術を大きく進展させて参りました。つまり、10 年前の JAXA では、宇宙実験に参加する研究者自身が構造解析技術を持っていることを参加の前提条件としていましたが、今日までの経験や知見を踏まえ、実験への参加要件の緩和につながる様々な取組みを行いました。さらに、試料の打上便の増加や結晶化条件の多様化を実現し、研究者の皆さまにとって「きぼう」をより身近に、使いやすいと感じていただけるよう、継続して改善を行っております。

今回は、JAXA PCG のこれまでの経緯を踏まえつつ、JAXA がご提供できるサービス、宇宙実験の実際、今後の可能性、展望についてご紹介します。



ランチョンセミナー

セミナー番号：2LS3

日時：9月6日（木）
11：45 ～ 12：45

会場：LS3 会場（第4学舎2号館）

JAXA

第70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

日　時　2018　年9月7日（金）
11:35 -12:35

会　場　LS1　（第4学舎4号館4201教室）

講演番号　3LS1

演　者　高橋 圭 先生
（独立行政法人 酒類総合研究所　成分解析研究部門）

メタボローム解析による
吟醸酒成分と品質との相関解析

清酒（日本酒）は、米及び米こうじを原料とし、並行複発酵により酵母がアルコールをつくった醸造酒です。清酒の中でも吟醸酒は、高度に磨いた米を用い、低温で長期間発酵させ、果物のような香りと雑味の少ない洗練された味わいを特徴とします。吟醸酒の品質の向上には、科学的知見に基づいた優れた醸造技術を欠かすことはできません。
しかし、吟醸酒品質・オフフレーバーと化学成分との関連性については、いまだ不明な点が多く残されています。私たちは、吟醸酒品質・オフフレーバーと化学成分との関連性を明らかにすることを目的とし、HMT社のベーシックスキャンサービス（ターゲット代謝物質濃度計算オプション込み）を利用し、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置(CE-TOFMS)により、吟醸酒を分析しました。
本セミナーでは、吟醸酒のメタボローム解析により得られた結果から、吟醸酒の品質と相関する極性代謝物成分を解析した具体例を中心に紹介します。

HMT Human Metabolome Technologies

The Society for Biotechnology, Japan / Annual Meeting 2018

第 70 回 日本生物工学会大会

東ソー ランチョンセミナー

TOYOPEARL TSKgel

講演番号 **3LS2**

演題

動物細胞培養から考える抗体医薬品の分子不均一性

日時　9月7日(金) **11:35 – 12:35**

会場　**LS2会場**（関西大学 千里山キャンパス 第4学舎4号館4202教室）

演者　**鬼塚 正義** 先生（徳島大学社会産業理工学研究部）

抗体医薬品は主に動物細胞を宿主とした組換えタンパク質として生産されている。抗体医薬品は化学構造や立体構造が均一であることが望ましいが実際には分子不均一性を示す。宿主細胞内の生物化学反応により翻訳後修飾を含めた抗体生成が行われ、その反応制御が困難であることが不均一性の原因である。将来的には「分子不均一性の積極的な制御」が抗体医薬品製造のバイオプロセスにおける最も重要な研究開発項目になるのではないかと考えている。このセミナーではCHO細胞を宿主としたIgG1抗体を中心に細胞培養中に発生する凝集抗体や糖鎖構造の不均一性について、発生機構や制御方法について基礎的な知見を発表する。具体的には培養中における凝集抗体の発生機構、凝集抗体の構造的特徴、糖鎖構造と凝集抗体の関連性、糖鎖構造の制御の可能性などを紹介する。また新規アフィニティーリガンドFcRゲルを使用した分析例も合わせて紹介する。

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/

M1805GX.A

The Society for Biotechnology, Japan/Annual Meeting 2018 at Osaka
第70回 日本生物工学会大会

SK-II Sponsored Seminar

SK-II ランチョン セミナー

9月 7日(金) 11:35−12:35
LS3会場（第4学舎2号館5階） セミナー番号：3LS3

酵母の代謝解析の最新知見と化粧品原料への応用

〜代謝物網羅解析とビッグデータ解析による機能性物質の発見〜

Latest review on yeast metabolic profiling and its application for skin care ingredient

~Metabolomics and big data analysis to identify functional molecules~

酵母は古くから様々な有用物質（アルコール、アミノ酸、抗生物質など）の生産に用いられてきました。

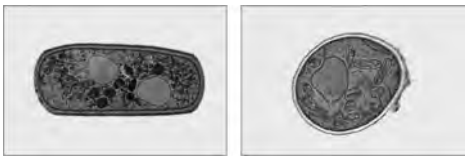
近年、バイオテクノロジーのさまざまな要素技術においてイノベーションが起こり、微生物をつかった物質生産プロセスを合理的にデザインすることが可能になりました。これによって、狙った機能性物質を安定して製造できる「スマートセル」として、酵母をつかった物質生産にも革新がおこっています。それを可能にしているのが様々な最新の代謝解析技術です。

今回そうした技術を、はじめて化粧品原料に用い、ガラクトミセス酵母にユニークな機能性物質と、その特徴的な生産プロセスを検討しました。また、細胞内だけでなく細胞外の代謝物の経時変化を分析し、さらに電顕による形態観察を同時に行うことで、本酵母の代謝メカニズムを物質動態や形態レベルまで包括的に理解することをはじめて試みました。こうした代謝解析への新たなアプローチを紹介します。

Yeast has been historically used to produce various useful metabolic materials such as alcohol, amino acid, and anti-biotics. Recently various innovations occurring in biotechnology, enables us to consistently produce targeted compound from microbes as we design. We named this evolutional metabolic engineering standing on yeast as “Smart cell”. This innovative engineering has been enabled by advancement on comprehensive metabolic profiling technique.

This time, we first time applied this latest technique to skin care ingredient, metabolites of *Galactomyces* yeast, and confirmed its unique functional compounds under certain unique production process.

At the same time, conducting time course profiling of range of functional compounds in a cell as well as extracellular region, combined with electronic microscope observation, first time we tried to get a holistic view about metabolic process from molecular dynamics to morphology.
We introduce this new approach.



〈ガラクトミセス酵母〉
Galactomyces yeast

演 者
presenters

蓮沼 誠久先生 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 教授
Tomohisa Hasunuma, professor, Kobe University Graduate School of Science. Technology and Innovation

大隅 正子先生 綜合画像研究支援 理事長
Masako Osumi, president, Integrated Imaging Research Support

お問い合わせ：
P&G イノベーション合同会社 SK-II グローバル テクニカルマーケティング　宗 千栄子
Tel 078-336-6265/ E-mail soh.c@pg.com

ワークショップ

生物工学系の研究・開発の安全のために
―基本的な考え方と実践例―

主催：生物工学会生物工学教育委員会
協力：株式会社 化学同人

生物工学教育委員会では，大学･高専･企業等の研究における安全のために「バイオ実験を安全に行うために（仮）」の編集に協力しました．本書をより有効にお使い頂くため，安全・安心を実現するための基本的な考え方と実践例を紹介します．また，本書各章の主担当者によるパネルディスカッションを行います．

日　時　9月6日（木）16:40～17:40
会　場　D会場（第4学舎3号館1階）
プログラム

16:40　はじめに　青柳秀紀（生物工学教育委員会委員長，筑波大院・生命環境）

16:45～17:20　生物工学系の研究・開発の安全のために　片倉啓雄（関西大・化生工）
・安全検出思想と危険検出思想
・危険予知のツボ（逆・裏・対偶，外挿，連想術）
・フォルトツリーとイベントツリー
・危険源と危険状態
・本質安全と制御安全
・元気が出る安全巡視　（参考：生物工学会誌91, 346–349 (2013)）

17:20～17:40　パネルディスカッション
司会：　中山亨（東北大院・工）
パネラー：　青柳秀紀（筑波大院・生命環境），片倉啓雄（関西大・化生工），杉森大助（福島大・理工），福井希一（阪大院・薬），岡本賢治（鳥取大院・工）
テーマ：
・組織の構成員の安全に対する意識を如何にして高めるか
・ルールに従うだけでなく，ルールを提案できる人材を育てるには
・危険源を見つける（気づく）感性を高めるには

当日は本書を特別価格で販売する予定です．

生物工学若手研究者の集い（若手会）

例年開催している若手会総会・交流会に加え，日本生物工学会関西支部若手企画委員と共催で「ものづくり交流サロン　～学生・若手研究者×企業・公設試～」を開催します.

日　時	9月6日（木）17：00～20：00
会　場	関西大学 千里山キャンパス 凜風館2階食堂・ディノア
プログラム	17:00～17:10 若手会総会（会長挨拶，会計報告） 17:10～20:00 ものづくり交流サロン（企業・公設試によるポスターセッション） 18:10～20:00 若手会交流会
会　費	一般3,000円，学生1,000円（すべて税込み） ※会費は当日の若手交流会の受付でお支払い下さい.
申　込	8月17日（金）までに，大会ホームページ（https://www.sbj.or.jp/2018/）の申込フォームよりお申し込みください．事前登録にご協力ください.
定　員	150名　※当会の参加に年齢制限はございません．皆様どうぞご参加ください.

ものづくり交流サロン　～学生・若手研究者×企業・公設試～

日本生物工学会は，生物工学に関する研究の進歩普及，人材育成の推進，人的交流の促進，産学連携の促進，国際協力の促進を図り，我が国の学術および科学技術の振興，福祉の発展に寄与することを目指している団体です．これらを達成するために様々な企画を推進しており，本年度大会期間中にその一環として，関西支部若手企画委員と若手会の共催で「ものづくり交流サロン」を開催する運びとなりました.

「ものづくり交流サロン」では，文章では伝わりにくい知識やものづくりの心を発展的に継承するため，実学に携わる企業や公設試験研究機関の研究者・技術者と，次の世代を担う若い研究者・学生の皆さんが対話する場を提供します．気軽に参加できるサロン風のポスターセッションです．企業や公設試験研究機関が開発した技術や製品について，やりがい，こだわり，苦労話，こぼれ話をじかに聞くことができる貴重な機会ですので，是非ご参加ください.

出展企業・機関などの情報は大会ホームページ（https://www.sbj.or.jp/2018/）に掲載しますので，是非ご覧ください.

第70回　日本生物工学会大会講演要旨集

二〇一八（平成30年度）

日本生物工学会

第 70 回日本生物工学会大会講演要旨集

2018 年 8 月 7 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