第71回（2019年）
日本生物工学会大会

講演要旨集

会　期　2019年（令和元年）9月16日（月・祝）～18日（水）

会　場　岡山大学津島キャンパス

公益社団法人 日本生物工学会

第71回
日本生物工学会大会
（2019）

一般講演・シンポジウム

会　期　2019年9月16日（月・祝）～18日（水）
会　場　岡山大学 津島キャンパス（岡山市北区津島中）

授賞式典・受賞講演

日　時　2019年9月16日（月）9：00～11：30
会　場　岡山大学 津島キャンパス　創立50周年記念館（金光ホール）（K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　2019年9月16日（月）18：30～20：30
会　場　岡山ロイヤルホテル　2階 光楽の間

ランチョンセミナー

期　間　2019年9月16日（月）～18日（水）
会　場　岡山大学 津島キャンパス　一般教育棟A棟・E棟（S1, S4, S5会場）

展 示 会

期　間　2019年9月16日（月）～18日（水）
会　場　岡山大学 津島キャンパス 大学会館

生物工学若手研究者の集い（若手会）総会・交流会／イブニングセッション

日　時　2019年9月17日（火）18：00～20：00
会　場　岡山大学 津島キャンパス ピーチユニオン3階

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 …… (6)

実行委員会担当者表 …… (7)

会場案内図 …… (8)

受賞者一覧 …… (12)

プログラム

第1日目　授賞式，受賞講演，シンポジウム・招待講演，
一般講演，ランチョンセミナー …… (13)

第2日目　シンポジウム・招待講演，一般講演，ランチョンセミナー …… (30)

第3日目　シンポジウム・招待講演，一般講演，ランチョンセミナー …… (58)

要旨

第1日目　受賞講演 …… (79)

シンポジウム・招待講演 …… (83)

一般講演 …… (98)

第2日目　シンポジウム・招待講演（午前の部） …… (139)

シンポジウム・招待講演（午後の部） …… (146)

一般講演（午前の部） …… (164)

一般講演（午後の部） …… (189)

第3日目　シンポジウム・招待講演（午前の部） …… (235)

シンポジウム（午後の部） …… (244)

一般講演（午前の部） …… (251)

一般講演（午後の部） …… (275)

人名索引 …… (297)

キーワード索引 …… (311)

ランチョンセミナープログラム …… (323)

ランチョンセミナー要旨 …… (324)

2019年8月21日（水）～11月8日（金）まで
大会HP（https://www.sbj.or.jp/2019/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16日（月・祝）			
	午　前	昼	午　後	
	9:00-11:30	12:00-12:50	13:15-17:30	18:30-20:30
K会場 五十周年記念館 金光ホール	授賞式・受賞講演（功労賞，生物工学賞，功績賞，技術賞）			
S1会場 A21		[L] ヒューマンメタボロームテクノロジーズ株式会社	[S] 世界を目指す日本の酒類【本部企画】（15:30-17:30）	
S2会場 A41			[S] 微生物ダークマターとマイクロバイオータ研究が導く新しい生物工学（13:15-15:15）	
S3会場 B41			[S] 産業化を目指した生体分子工学の新たな潮流（15:00-17:30）＊KSBB招待講演 (Prof. Tae-Joon Jeon) を含む	
S4会場 E11		[L] 東ソー株式会社	[S] 酵母におけるアミノ酸研究の新展開（13:15-15:15） [S] 食品成分が腸内環境に及ぼす影響（15:30-17:30）	
S5会場 E21		[L] オンチップ・バイオテクノロジーズ株式会社	[S] 動物細胞培養の新研究領域への挑戦～学問の境界領域で起こるイノベーションを目指して～（13:15-15:15）	
A会場 A36			酵素学，酵素工学（13:30-17:30）	
B会場 A37			バイオマス，資源，エネルギー工学（13:30-17:30）	
C会場 B21			環境浄化，修復，保全技術（13:30-17:18）	
D会場 B32			生物化学工学（13:30-17:30）	
E会場 D12			受賞講演（斎藤賞）（13:30-13:50） オミクス解析（13:54-15:18） 植物細胞工学，組織培養，育種工学（15:18-17:06）	
F会場 D23			タンパク質工学（13:30-17:06）	
G会場 D25			受賞講演（アジア若手賞）（13:30-13:50） 発酵生理学，発酵工学（13:54-15:42） 遺伝子工学（15:42-17:30）	
H会場 D32			培養工学（13:30-15:18） バイオプロセス（15:18-17:30）	
I会場 D34			受賞講演（江田賞）（13:30-13:50） 代謝工学（13:54-15:54）	
J会場 E23			受賞講演（照井賞）（13:30-13:50） セル＆ティッシュエンジニアリング（13:54-15:42）	
大学会館	展示会 (10:00-17:30)			
岡山ロイヤルホテル				懇親会

会場	9月17日（火）			
	午　前	昼	午　後	
	9:00-11:36	12:00-12:50	13:15-17:30	18:00-20:00
S1会場 A21		[L] 株式会社林原	[S]持続可能な開発目標（SDGs）を生物工学にどう活用するか【本部企画】（13:15-17:15）	
S2会場 A41	[S]次世代のバイオプロセスを拓く複合微生物系精密制御技術（9:30-11:30）	代議員会（11:50-13:00）	[S]微生物による物質生産の新展開（15:00-17:30）＊KSBB招待講演(Prof.Sung Ok Han）を含む	
S3会場 B41	[S]食農工産業の持続的発展を牽引する次世代植物バイオテクノロジー（9:00-11:30） ＊KSBB招待講演(Prof.Hei Chan Lee)を含む		[IS] Development of Biosensing Technology Targeting Sustainability Development Goals「持続可能な開発目標を目指したバイオセンシングの開発と展開」（13:15-15:45）＊KSBB招待講演(Prof. Jong Wook Hong)を含む	
S4会場 E11		[L] タカラバイオ株式会社	[S]複雑組織製造に必要な基盤技術を考える～バイオリアクターの側から～（13:15-15:15） [S]新しいデータ駆動型サイエンスによる複雑な生命現象の理解（15:30-17:30）	
S5会場 E21	[S]タンパク質工学におけるドライ－ウェット技術融合の新展開（9:30-11:30）	[L] 株式会社島津製作所	[S]物質生産や代謝制御における呼吸鎖の役割（13:15-15:15） [S]微生物ポリアミンが支える高齢化社会の生活（15:30-17:30）	
A会場 A36	遺伝子工学（9:00-11:36）		酵素学，酵素工学（13:30-17:30）	
B会場 A37	バイオマス，資源，エネルギー工学（9:00-11:36）		酵素学，酵素工学（13:30-17:30）	
C会場 B21	代謝工学（9:00-11:36）		バイオマス，資源，エネルギー工学（13:30-14:42） 発酵生理学，発酵工学（14:54-17:06）	
D会場 B32	生物化学工学（9:00-11:36）		遺伝子工学（13:30-17:30）	
E会場 D12	食品科学，食品工学（9:00-11:36）		分類，系統，遺伝学（13:30-16:30）	
F会場 D23	オミクス解析（9:00-10:36）		バイオセンシング，分析化学（13:30-17:18）	
G会場 D25	セル＆ティッシュエンジニアリング（9:00-11:36）		抗体工学（13:30-15:30） セル＆ティッシュエンジニアリング（15:30-17:06）	
H会場 D32	醸造学，醸造工学（9:00-11:36）		醸造学，醸造工学（13:30-17:30）	
I会場 D34			核酸工学/糖鎖工学/脂質工学/ペプチド工学（13:30-17:30）	
J会場 E23	発酵生理学，発酵工学（9:00-11:24）		タンパク質工学（13:30-17:18）	
大学会館	展示会（9:00-17:30）			
ピーチユニオン3階				若手会総会・交流会／イブニングセッション

会場	9月18日（水）		
	午　前	昼	午　後
	9:00-11:30	12:00-12:50	13:15-15:18
S1会場 A21	[IS]Recent Topics on Cultivation and Measurement: New Challenges by Start-Up Companies「培養計測の最近のトピックス～スタートアップ企業による新たな取り組み～」【本部企画】／特別招待講演（Prof. Jochen Buechs)を含む（9:30-11:30）	[L] 三洋貿易株式会社	
S2会場 A41	[S]大規模な、遺伝子・ゲノムを扱うツールとしての接合伝達システムの開発と展望（9:30-11:30）		[S]生合成工学における有用生体機能分子の次世代創製技術（13:15-15:15）
S3会場 B41	[S]インシリコタンパク質設計で加速するタンパク質工学・応用構造生物学（9:30-11:30）		[S]日本におけるバイオジェット燃料生産技術の最先端（13:15-15:15）
S4会場 E11		[L] 天野エンザイム株式会社	[S]ペアで紹介します，WetとDryの融合研究（13:15-15:15）
S5会場 E21	[S]生体と対話するナノ界面科学（9:30-11:30）		
A会場 A36	バイオマス，資源，エネルギー工学（9:00-11:24）		酵素学，酵素工学（13:30-15:18）
B会場 A37	遺伝子工学（9:00-11:24）		酵素学，酵素工学（13:30-15:18）
C会場 B21			抗体工学（13:30-14:42）
D会場 B32	生物化学工学（9:00-11:24）		生物化学工学（13:30-14:54）
E会場 D12	生合成，天然物化学（9:00-11:24）		生合成，天然物化学/有機化学，高分子化学（13:30-15:18）
F会場 D23	食品科学，食品工学（9:00-10:48）		センサー，計測工学（13:30-14:54）
G会場 D25	生体医用工学/セル＆ティッシュエンジニアリング（9:00-11:24）		セル＆ティッシュエンジニアリング（13:30-15:18）
H会場 D32	醸造学，醸造工学（9:00-11:24）		培養工学（13:30-15:18）
I会場 D34	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（9:00-11:24）		発酵生理学，発酵工学（13:30-15:18）
J会場 E23	環境工学，廃水処理技術（9:00-11:24）		環境工学，廃水処理技術（13:30-15:18）
大学会館	展示会（9:00-14:00）		

IS：国際シンポジウム
S：シンポジウム
L：ランチョンセミナー

座長一覧

一般講演

9月16日（月）

会場	講演番号	時間	座長			
A	1Ap01-06	13:30-14:42	西矢	芳昭	吉田	豊和
	1Ap07-12	14:54-16:06	杉森	大助	吉田	裕美
	1Ap13-18	16:18-17:30	畑中	唯史	森	光一
B	1Bp01-06	13:30-14:42	岡村	好子	田中	剛
	1Bp07-12	14:54-16:06	油井	信弘	大槻	隆司
	1Bp13-18	16:18-17:30	池	道彦	古屋	俊樹
C	1Cp01-06	13:30-14:42	笠井	大輔	平井	浩文
	1Cp07-12	14:54-16:06	杉山	友康	中島	一紀
	1Cp13-17	16:18-17:18	前田	勇	諸星	知広
D	1Dp01-06	13:30-14:42	佐々木千鶴		前田	淳史
	1Dp07-12	14:54-16:06	梶山	博司	金尾	忠芳
	1Dp13-18	16:18-17:30	堀内	淳一	前田	憲成
E	1Ep03-08	13:54-15:18	豊田	晃一	根本	理子
	1Ep09-12	15:18-16:06	能年	義輝		
	1Ep13-16	16:18-17:06	加藤	晃		
F	1Fp01-06	13:30-14:42	新井	宗仁	神谷	典穂
	1Fp07-12	14:54-16:06	赤沼	哲史	伊藤	創平
	1Fp13-16	16:18-17:06	堀	克敏		
G	1Gp03-06	13:54-14:42	児玉	浩明		
	1Gp07-10	14:54-15:42	善藤	威史		
	1Gp11-18	15:42-17:30	赤澤	真一	秋	庸裕 田中 瑞己
H	1Hp01-08	13:30-15:18	中島田	豊	野田	尚宏 三浦 夏子
	1Hp09-12	15:18-16:06	加藤	且也		
	1Hp13-18	16:18-17:30	田島	誉久	花井	泰三
I	1Ip03-06	13:54-14:42	松田	史生		
	1Ip07-11	14:54-15:54	荻野	千秋		
J	1Jp03-06	13:54-14:42	河邉	佳典		
	1Jp07-10	14:54-15:42	東	恒仁		

9月18日（水）

会場	講演番号	時間	座長			
A	3Aa01-06	9:00-10:12	小西	正朗	藤森	一浩
	3Aa07-11	10:24-11:24	松崎	浩明	吉田	信行
B	3Ba01-06	9:00-10:12	星田	尚司	横尾	岳彦
	3Ba07-11	10:24-11:24	石井	純	杉山	峰崇
D	3Da01-06	9:00-10:12	勝田	知尚	久保	幹
	3Da07-11	10:24-11:24	加藤	竜也	佐藤あやの	
E	3Ea01-06	9:00-10:12	荒川	賢治	小笠原泰志	
	3Ea07-11	10:24-11:24	星野	一宏	山中	一也
F	3Fa01-09	9:00-10:48	小林	拓嗣	福﨑英一郎	宮本 浩邦
G	3Ga01-06	9:00-10:12	伊藤	大知	高木	昌宏
	3Ga07-11	10:24-11:24	長森	英二	藤田	聡史
H	3Ha01-06	9:00-10:12	平良	東紀	二神	泰基
	3Ha07-11	10:24-11:24	片倉	啓雄	渡部	潤
I	3Ia01-06	9:00-10:12	兒島	孝明	前田	和勲
	3Ia07-11	10:24-11:24	三宅	淳	八幡	穣
J	3Ja01-06	9:00-10:12	東	雅之	田代	幸寛
	3Ja07-11	10:24-11:24	滝口	昇	米光	裕

9月18日（水）

会場	講演番号	時間	座長			
A	3Ap01-09	13:30-15:18	大西	浩平	佐藤	喬章 和田 大
B	3Bp01-09	13:30-15:18	岡﨑	文美	倉掛	昌裕 炭谷 順一
C	3Cp01-06	13:30-14:42	青木	航	梅津	光央
D	3Dp01-07	13:30-14:54	多賀	直彦	竹原	宗範
E	3Ep01-09	13:30-15:18	麻生	祐司	一瀬	博文 文谷 政憲
F	3Fp01-07	13:30-14:54	朴	龍洙	Jeffrey Harmon	
G	3Gp01-09	13:30-15:18	金岡	英徳	河原	正浩 福田 展雄
H	3Hp01-09	13:30-15:18	青柳	秀紀	金	美海 村松 和明
I	3Ip01-09	13:30-15:18	井沢	真吾	柘植	丈治 薬師 寿治
J	3Jp01-09	13:30-15:18	久能	樹	黒田	真史 佐々木建吾

9月17日（火）

会場	講演番号	時間	座長			
A	2Aa01-06	9:00-10:12	新谷	政己	鈴木	宏和
	2Aa07-12	10:24-11:36	野田	正文	安枝	寿
B	2Ba01-06	9:00-10:12	阿野	貴司	菊川	寛史
	2Ba07-12	10:24-11:36	浅田	元子	原	清敬
C	2Ca01-06	9:00-10:12	高木	博史	廣田	隆一
	2Ca07-12	10:24-11:36	桐村光太郎		園木	和典
D	2Da01-06	9:00-10:12	芦内	誠	熊田	陽一
	2Da07-12	10:24-11:36	藤原	伸介	吉野	知子
E	2Ea01-06	9:00-10:12	Sastia Prama Putri			山﨑 正夫
	2Ea07-12	10:24-11:36	松崎	弘美	山崎	思乃
F	2Fa01-08	9:00-10:36	石川	森夫	相馬	悠希 戸谷 吉博
G	2Ga01-06	9:00-10:12	小島	伸彦	福田	淳二
	2Ga07-12	10:24-11:36	蟹江	慧	山田	真澄
H	2Ha01-06	9:00-10:12	北垣	浩志	倉橋	敦
	2Ha07-12	10:24-11:36	尾関	健二	楠本	憲一
J	2Ja01-06	9:00-10:12	豊田	晃一	若井	暁
	2Ja07-11	10:24-11:24	松下	一信	和田	大

9月17日（火）

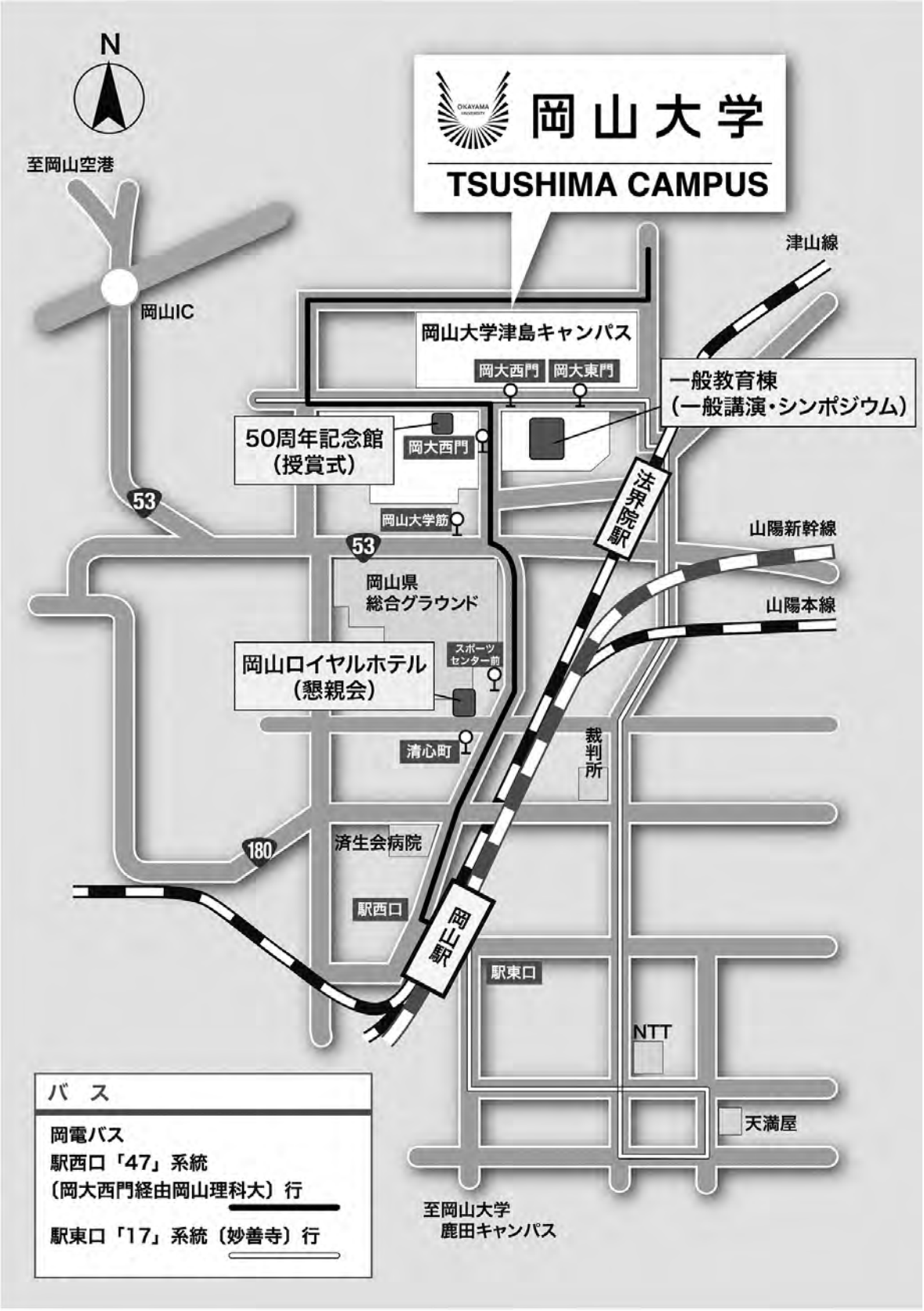
会場	講演番号	時間	座長			
A	2Ap01-06	13:30-14:42	古賀	雄一	若山	守
	2Ap07-12	14:54-16:06	有馬	二朗	鈴木	伸
	2Ap13-18	16:18-17:30	田村	隆	松村	洋寿
B	2Bp01-06	13:30-14:42	池田	丈	戸田	弘
	2Bp07-12	14:54-16:06	加藤太一郎		高橋	征司
	2Bp13-18	16:18-17:30	亀谷	将史	末	信一朗
C	2Cp01-06	13:30-14:42	喜多	晃久	田丸	浩
	2Cp07-12	14:54-16:06	川口	秀夫	本田	孝祐
	2Cp13-16	16:18-17:06	外山	博英		
D	2Dp01-06	13:30-14:42	金井	保	渡邊	崇人
	2Dp07-12	14:54-16:06	熊谷	孝則	広岡	和丈
	2Dp13-18	16:18-17:30	新垣	篤史	福居	俊昭
E	2Ep01-06	13:30-14:42	阿座上弘行		川上	了史
	2Ep07-14	14:54-16:30	川崎	健	竹中	慎治 中川 智行
F	2Fp01-06	13:30-14:42	菊地	淳	竹内	俊文
	2Fp07-12	14:54-16:06	甲元	一也	福谷	洋介
	2Fp13-17	16:18-17:18	新間	秀一	竹山	春子
G	2Gp01-09	13:30-15:30	鬼塚	正義	金山	直樹 中野 秀雄
	2Gp10-16	15:30-17:06	加藤	竜司	中村	史
H	2Hp01-06	13:30-14:42	中山	俊一	根来	宏明
	2Hp07-12	14:54-16:06	磯谷	敦子	稲留	弘乃
	2Hp13-18	16:18-17:30	五島	徹也	渡辺	大輔
I	2Ip01-06	13:30-14:42	牧野	祥嗣	山崎	智彦
	2Ip07-12	14:54-16:06	尾島	由紘	田中	祐圭
	2Ip13-18	16:18-17:30	落合	秋人	清水	一憲
J	2Jp01-06	13:30-14:42	上田	宏	平	大輔
	2Jp07-12	14:54-16:06	小池あゆみ		宮本	和英
	2Jp13-17	16:18-17:18	座古	保	徳樂	清孝

第71回日本生物工学会大会（2019）

実行委員会・業務分担（○：責任者）

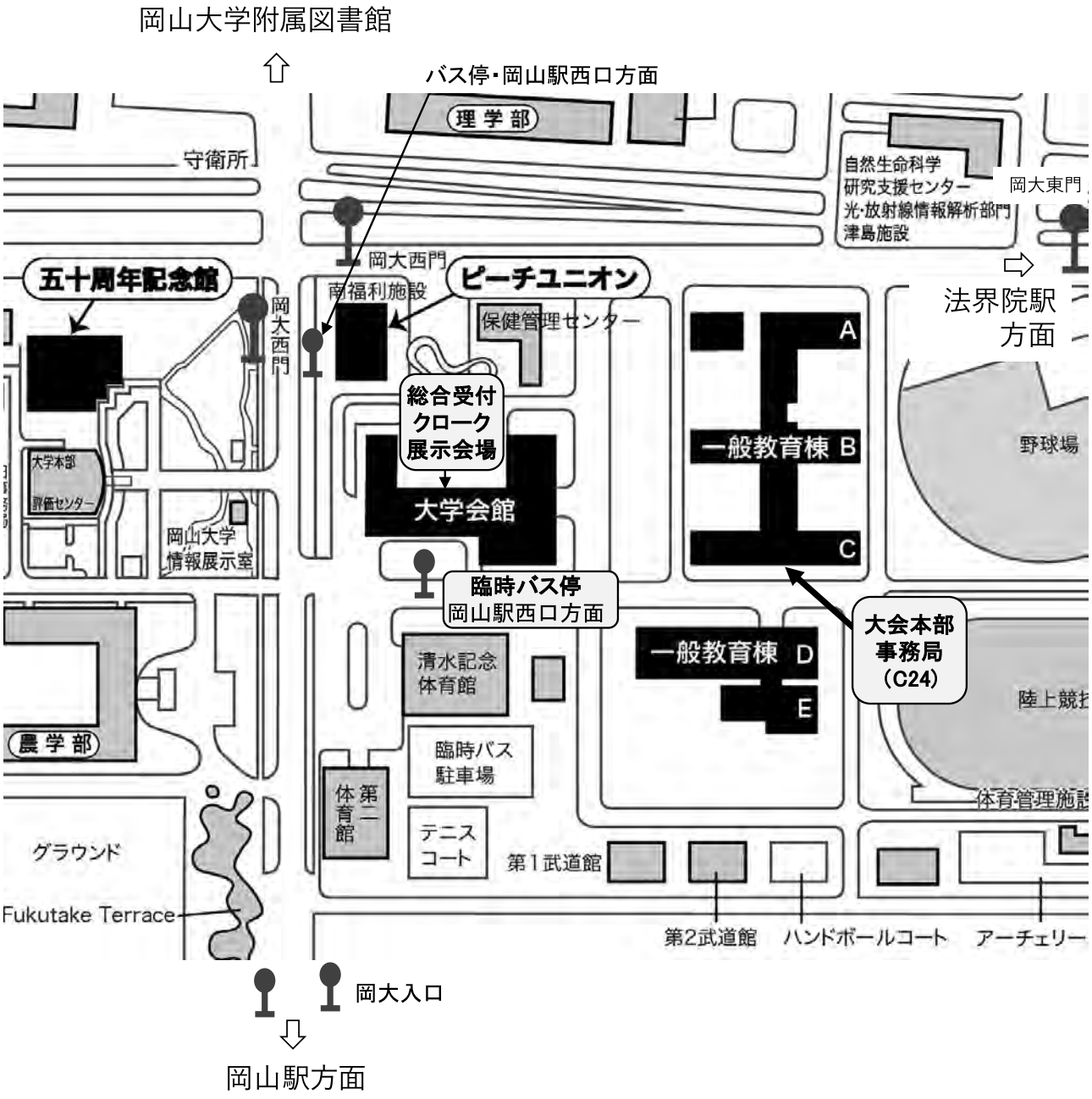
実行委員長	稲垣 賢二
副実行委員長	加藤 純一・滝澤 昇
総務	○二見 淳一郎・今中 洋行・田村 隆・森 光一・岩井 良輔
会計	○金山 直樹・曲 正樹
広報	○滝澤 昇
プログラム	○滝澤 昇・今中 洋行・加藤 純一・多田 宏子・曲 正樹・金尾 忠芳・二見 翠・根本 理子・山田 浩司・岩井 良輔・畑中 唯史・矢野 嵩典・工藤 季之・森 光一・上村 一雄・金子 明裕・阿賀 創・山本 拓生・渡邊 光・丸 勇史・佐藤 あやの・能年 義輝・冨田 秀太・三宅 剛史・大城 隆・中島田 豊・田島 誉久・赤尾 健・小山 和哉・櫻谷 英治・有馬 二朗・芦内 誠・山田 陽一
会場	○今中 洋行・多田 宏子・曲 正樹・金尾 忠芳・有馬 二朗・林 将也・能年 義輝・佐藤 あやの
シンポジウム	○田村 隆
ランチョンセミナー	○神崎 浩・多田 宏子
受付・クローク	○根本 理子・森 光一・田村 隆・辻野 義雄
授賞式	○金尾 忠芳
展示	○神崎 浩・丸 勇史
懇親会	○谷 明生・三井 亮司・矢野 嵩典
若手交流会	○今中 洋行・田島 誉久
託児所	○二見 翠
顧問	中西 一弘・大森 斉・上村 一雄

会場への交通案内


N
至岡山空港
岡山IC
岡山大学
TSUSHIMA CAMPUS
津山線
岡山大学津島キャンパス
岡大西門
岡大東門
一般教育棟
（一般講演・シンポジウム）
50周年記念館
（授賞式）
岡大西門
53
岡山大学筋
53
法界院駅
山陽新幹線
岡山県
総合グラウンド
山陽本線
岡山ロイヤルホテル
（懇親会）
スポーツセンター前
清心町
裁判所
済生会病院
180
駅西口
岡山駅
駅東口
NTT
天満屋
至岡山大学
鹿田キャンパス
バス
岡電バス
駅西口「47」系統
（岡大西門経由岡山理科大）行
駅東口「17」系統（妙善寺）行

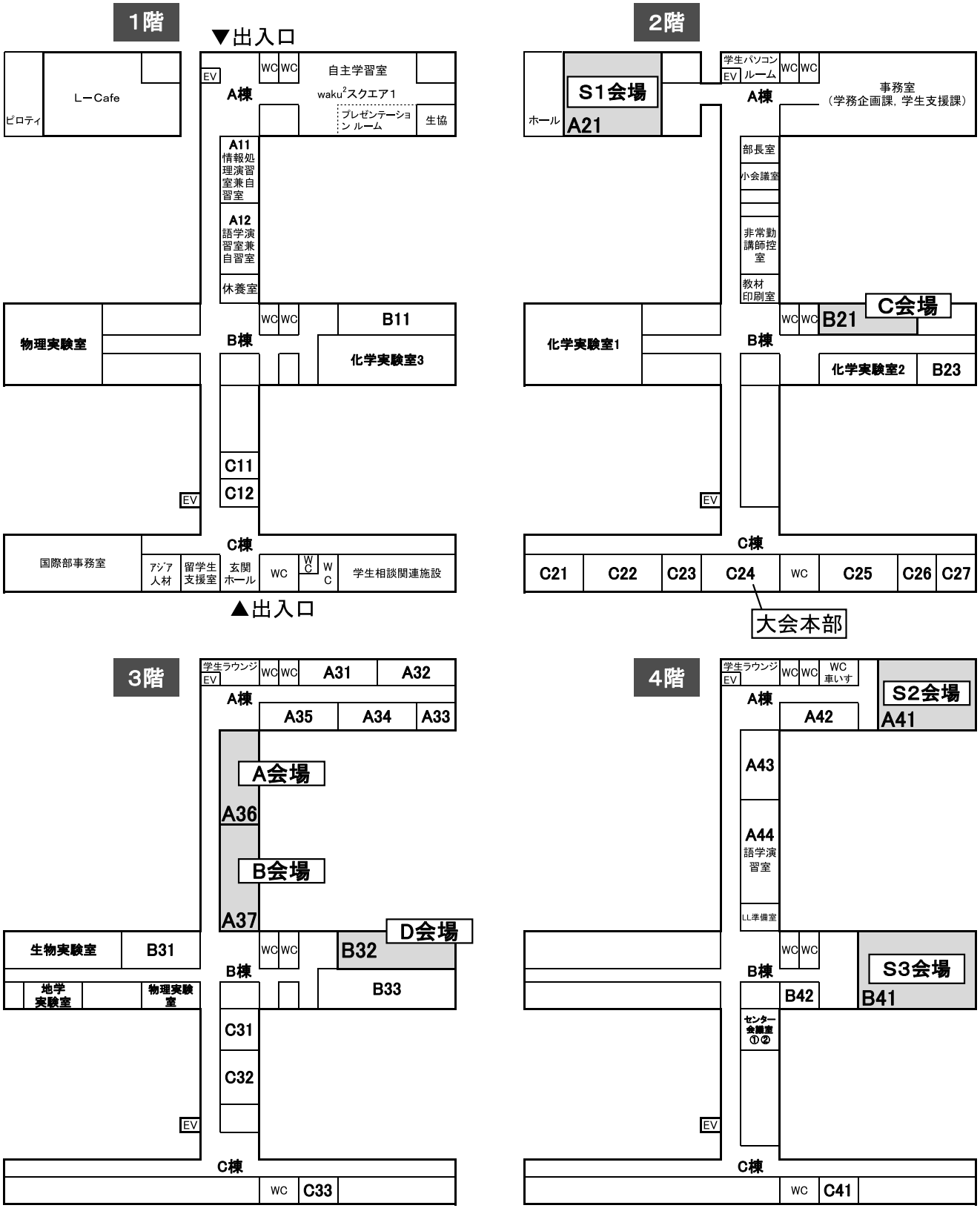
会場案内

＜津島キャンパス会場配置図＞



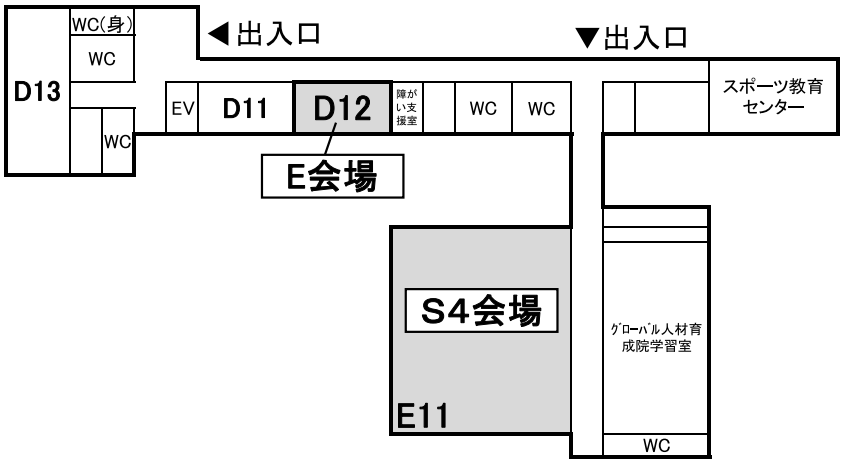
＜講演会場配置図＞

一般教育棟　A, B, C棟

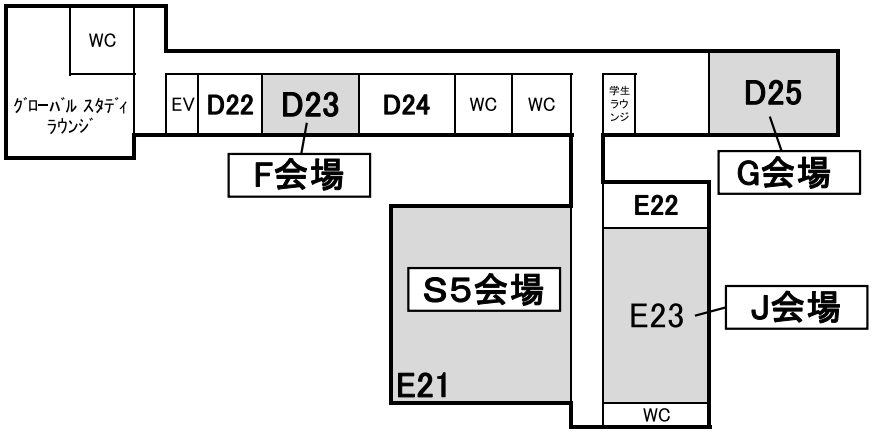


一般教育棟　D, E棟

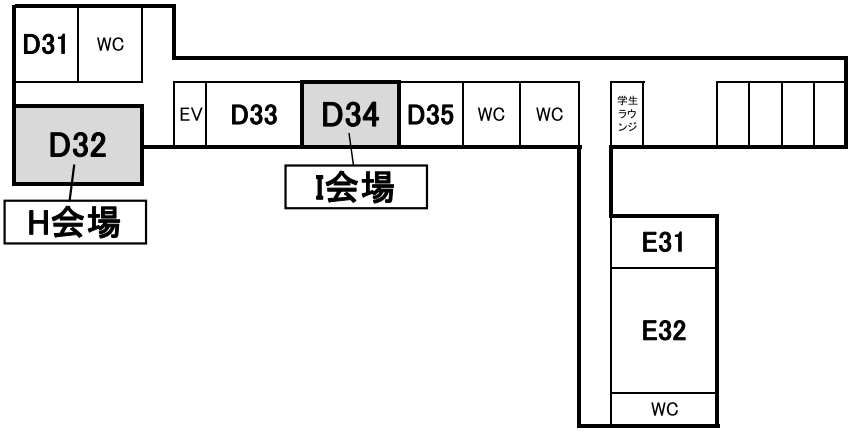
1階



2階



3階



日本生物工学会　2019年度　受賞者

本年度の受賞者が決定しましたのでお知らせ申し上げます.

■第38回　生物工学賞　伊藤　伸哉（富山県立大学工学部・教授）
「新規酸化還元系バイオプロセスの基盤技術開発とその応用」

■第13回　生物工学功績賞　紀ノ岡正博（大阪大学大学院工学研究科・教授）
「再生医療に資する細胞製造性に関する研究」

■第13回　生物工学功労賞　今井　泰彦（キッコーマン株式会社環境部・部長）
「未来社会を先導する技術開発研究の実現を目指した産学連携活動への貢献」

■第52回　生物工学奨励賞（江田賞）　伊藤　一成（岡山県工業技術センター・研究員）
「無通風箱培養法を利用した固体培養における麹菌の生育と酵素生産に関する研究」

■第55回　生物工学奨励賞（斎藤賞）　佐々木建吾（神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科・特命准教授）
「持続可能・健康社会の構築に向けた複合微生物系の制御」

■第42回　生物工学奨励賞（照井賞）　杉浦　慎治（産業技術総合研究所創薬基盤研究部門・上級主任研究員）
「圧力駆動型Microphysiological systemsの開発」

■第28回　生物工学技術賞　小原　聡[1]*・寺島　義文[2]・杉本　明[3]・福島　康裕[4]・菊池　康紀[5]
([1]アサヒクオリティ＆イノベーションズ株式会社，[2]国際農林水産業研究センター，[3]サトウキビコンサルタント，[4]東北大学，[5]東京大学，*現，東京大学)
「選択的発酵酵母を利用した砂糖・バイオエタノール逆転生産プロセスの開発」

■第16回　生物工学アジア若手賞（Young Asian Biotechnologist Prize）　Li Tan（Chinese Academy of Sciences, China）
「Recycling of municipal solid waste via ethanol and/or methane fermentation」

■第8回　生物工学アジア若手研究奨励賞（The DaSilva Award）　Han Xiao（Shanghai Jiao Tong University, China）
「Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient biosynthesis of antitumor ganoderic acid HLDOA」

■第27回　生物工学論文賞

1）**Atchara Manowattana[1]・Charin Techapun[1]・渡辺　昌規[2]・Thanongsak Chaiyaso[1]**
([1]Chiang Mai University, Thailand，[2]山形大学)
Bioconversion of biodiesel-derived crude glycerol into lipids and carotenoids by an oleaginous red yeast *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 in an airlift bioreactor

2）**石井　友理[1]*・赤坂　直紀[2]・佐古田久雄[2]・秀瀬　涼太[1]**・藤原　伸介[1]**
([1]関西学院大学，[2]マルカン酢株式会社，*現，バーチャレクス・コンサルティング株式会社，**現，神戸大学)
Leucine responsive regulatory protein is involved in methionine metabolism and polyamine homeostasis in acetic acid bacterium *Komagataeibacter europaeus*

3）**鈴木　伸・原　良太郎*・木野　邦器**
(早稲田大学，*現，京都大学)
Production of aminoacyl prolines using the adenylation domain of nonribosomal peptide synthetase with class III polyphosphate kinase 2-mediated ATP regeneration

4）**菅沼　政俊[1]*・野村　雄[1]・比嘉友紀子[1]・片岡由起子[1]・船隈　俊介[1]・岡﨑　博之[1]・鈴木　健夫[1]・藤山　和仁[2]・瀬筒　秀樹[3]・立松謙一郎[3]・田村　俊樹[3]***
([1]シスメックス株式会社，[2]大阪大学，[3]農業・食品産業技術総合研究機構，*現，大日本蚕糸会)
N-glycan sialylation in a silkworm-baculovirus expression system

5）**高橋　将人・青柳　秀紀**
(筑波大学)
Effect of intermittent opening of breathable culture plugs and aeration of headspace on the structure of microbial communities in shake-flask culture

6）**渡辺　大輔[1]*・熊野　舞香[1]・杉本　幸子[1]・伊藤　稔[1]・大橋　正孝[2]・砂田　啓輔[3]・高橋　俊成[3]・山田　翼[3]・高木　博史[1]**
([1]奈良先端科学技術大学院大学，[2]奈良県産業振興総合センター，[3]菊正宗酒造株式会社，*現，京都大学)
Metabolic switching of sake yeast by kimoto lactic acid bacteria through the [*GAR*$^+$] non-genetic element

7）**米倉　円佳[1]・青木　直大[2]・廣瀬　竜郎[2,3]*・大杉　立[2]**・近藤　聡[1]・大音　徳[1]**
([1]トヨタ自動車，[2]東京大学，[3]農業・食品産業技術総合研究機構，*現，高崎健康福祉大学，**現，東京農業大学)
生きた植物から可溶性糖を取り出す：糖輸送体SWEETと排水液による採取方法の検討

■第8回　生物工学学生優秀賞（飛翔賞）

1）**伊藤　智之**（東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻）
「情報科学と進化工学を組み合わせた分子認識タンパク質創出プロセスの開発」

2）**高野　力**（筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻）
「SCF法を活用した好酸性微生物や耐酸性微生物の高効率なスクリーニング系の開発」

3）**本山　智晴**（静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府食品栄養科学専攻）
「L-アミノ酸を起点とするピラジン生合成機構の解明とその応用」

4）**橋田　礼博**（大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻）
「回転浮遊培養におけるヒトiPS細胞集塊挙動の速度論的解釈」

5）**大川　敦司**（岡山大学大学院環境生命科学研究科農生命科学専攻）
「PLP依存性L-メチオニン代謝関連酵素の構造機能解析と応用」

6）**馬場嵩一朗**（佐賀大学大学院農学研究科，現，鹿児島大学大学院連合農学研究科応用生命科学専攻）
「清酒酵母の育種と醸造特性評価」

第 1 日（9 月 16 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）

K 会場　五十周年記念館 金光ホール（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　名誉会員，功労会員推戴

9:20　各賞授賞

9:55　1A-Ka01　**〈生物工学功労賞〉**
生物工学功労賞受賞にあたって
……○今井 泰彦[1,2]（[1]キッコーマン, [2]野田産研）

10:05　1A-Ka02　**〈生物工学賞〉**　座長：**木野 邦器**
新規酸化還元系バイオプロセスの基盤技術開発とその応用
……○伊藤 伸哉（富山県大・工）

10:40　1A-Ka03　**〈生物工学功績賞〉**　座長：**高木 昌宏**
再生医療に資する細胞製造性に関する研究
……○紀ノ岡 正博（阪大院・工）

11:10　1A-Ka04　**〈生物工学技術賞〉**　座長：**今井 泰彦**
選択的発酵酵母を利用した砂糖・バイオエタノール逆転生産プロセスの開発
……○小原 聡[1], 寺島 義文[2], 杉本 明[3], 福島 康裕[4], 菊池 康紀[5]
（[1]アサヒ Q&I, [2]国際農研セ, [3]サトウキビコンサルタント, [4]東北大院・工, [5]東大・未来ビジョン研セ）

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）

I 会場　D34（13:30〜13:50）

13:30　1A-Ip01　**〈生物工学奨励賞（江田賞）〉**　座長：**吉田 聡**
無通風箱培養法を利用した固体培養における麹菌の生育と酵素生産に関する研究
……○伊藤 一成（岡山県工業技術センター）

E 会場　D12（13:30〜13:50）

13:30　1A-Ep01　**〈生物工学奨励賞（斎藤賞）〉**　座長：**高木 博史**

健康・持続可能社会の構築に向けた複合微生物系（ヒト腸管・バイオガス発酵槽内）の制御

……○佐々木 建吾（神戸大院・科技イノベ）

J 会場　E23（13:30〜13:50）

13:30　1A-Jp01　**〈生物工学奨励賞（照井賞）〉**　座長：**上平 正道**

圧力駆動型 Microphysiological systems の開発

……○杉浦 慎治（産総研・創薬基盤）

G 会場　D25（13:30〜13:50）

13:30　1A-Gp01　**〈生物工学アジア若手賞〉**　座長：**藤山 和仁**

Recycling of municipal solid waste via ethanol and/or methane fermentation

……○Li Tan [1,2]

（[1] Chengdu Inst. Biology, Chinese Academy of Sciences, [2] Coll. Architect. Environ., Sichuan Univ.）

シンポジウム・招待講演

S1 会場　A21（15:30〜17:30）

世界を目指す日本の酒類【本部企画】

15:30　はじめに

……山田 修

座長：**山田 修**

15:33　1S-S1p01　日本ワインの戦略

……○安蔵 光弘（メルシャン株式会社シャトーメルシャン）

座長：**髙瀬 良和**

16:11　1S-S1p02　酒造り 200 年、茨城の田舎の造り酒屋からジャパニーズクラフトビールの世界発信

……○木内 敏之（木内酒造合資会社）

座長：**堤 浩子**

16:42　1S-S1p03　日本酒を世界へ

……○宇都宮 仁（日本酒造組合中央会）

17:27　おわりに

……堤 浩子

S2 会場　A41（13:15〜15:15）

微生物ダークマターとマイクロバイオータ研究が導く新しい生物工学

13:15　はじめに
…… 花井 泰三
座長：**石井 正治**

13:20　1S-S2p01　微生物ダークマターへのアクセス：培養手法の革新と未知増殖制御メカニズムの解明
…… ○青井 議輝（広島大院・統合生命科学）

13:45　1S-S2p02　物質循環・代謝におけるマイクロバイオータ機能の具現化ツール開発
…… ○小川 順, 岸野 重信, 安藤 晃規, 竹内 道樹, 原 良太郎, 上田 誠
（京大院・農）

14:10　休憩
座長：**青柳 秀紀**

14:15　1S-S2p03　微生物ダークマターが創り出す未知物質の探索
…… ○中島 琢自, 松尾 洋孝, 高橋 洋子, 大村 智（北里大・生命研）

14:40　1S-S2p04　プラスチック分解細菌のエネルギー獲得戦略
…… ○吉田 昭介（奈良先端大・バイオ）

15:05　おわりに
…… 青柳 秀紀

S3 会場　B41（15:00〜17:30）

産業化を目指した生体分子工学の新たな潮流／招待講演

15:00　1S-S3p01　**〈招待講演（韓国生物工学会）〉**　座長：**座古 保**
Nanopore technology for the detection of single bacterial spores
……○Tae-Joon Jeon
（Dept. Biol. Eng., Inha Univ.）

15:30　はじめに
…… 座古 保
座長：**座古 保**

15:35　1S-S3p02　検査・診断用ペーパーデバイスの開発
…… ○内村 浩美（愛媛大・セ）
座長：**上田 宏**

16:00　1S-S3p03　ペプチド分子設計による人工ウイルスキャプシドならびに微小管内包分子の創製
…… ○松浦 和則（鳥取大・工）

16:25　1S-S3p04　蚕を起点とする持続可能な高付加価値タンパク質生産プロセスの構築
…… ○神谷 典穂[1,2], 南畑 孝介[1,3], 日下部 宜宏[4]
（[1]九大・未来化セ, [2]九大院・工, [3]KAICO(株), [4]九大院・農）
座長：**神谷 典穂**

16:45　1S-S3p05　モノクローナル抗体迅速探索プラットフォーム技術の社会実装
…… ○中野 秀雄[1,2], 加藤 晃代[2], 大内 将司[2], 兒島 孝明[1]
（[1]名大院・生命農学, [2]iBody 株式会社）

17:05 1S-S3p06 Beyond Q-body: 色素修飾が不要な新規免疫測定素子の構築
……○上田 宏[1], 安田 貴信[2], 上野 慶行[2], 井上 暁人[2], 髙橋 昌樹[2], 大室 有紀[1], 北口 哲也[1], 董 金華[1,3]
（[1]東工大・化学生命研, [2]東工大・生命理工, [3]濰坊医学院）

17:25 おわりに
……上田 宏

S4 会場　E11（13:15〜15:15）

酵母におけるアミノ酸研究の新展開

13:15 はじめに
……高木 博史
座長：**高木 博史**

13:20 1S-S4p01 アミノ酸による出芽酵母の寿命延長機構
……○水沼 正樹（広島大院・統合生命科学）

13:42 1S-S4p02 アミノ酸（L-トリプトファン）による分裂酵母細胞の生育阻害
……○北村 憲司[1,2], 永島 直翔[2]（[1]広島大・自然科学研セ・遺伝子, [2]広島大院・統合生命科学）
座長：**水沼 正樹**

14:04 1S-S4p03 液胞アミノ酸コンパートメンテーションの機構・生理・応用
……○関藤 孝之[1], 河田 美幸[1,2]（[1]愛媛大院・農, [2]愛媛大・学術支援センター）

14:26 1S-S4p04 清酒醸造におけるアミノ酸高生産酵母の積極的活用
……○小高 敦史（月桂冠・総研）

14:48 1S-S4p05 アミノ酸の代謝制御・生理機能に着目した酵母の高機能開発
……○高木 博史（奈良先端大・バイオ）

15:10 おわりに
……水沼 正樹

S4 会場　E11（15:30〜17:30）

食品成分が腸内環境に及ぼす影響

座長：**中山 二郎**

15:30 はじめに
……北垣 浩志
座長：**北垣 浩志**

15:32 1S-S4p06 スフィンゴ脂質の健康機能性
……○菅原 達也（京大院・農）

15:50 1S-S4p07 植物・真菌由来スフィンゴ脂質の消化管への機能性
……○木下 幹朗（帯畜大・食品科学）

16:08 1S-S4p08 腸内細菌によるグルコシルセラミドの分解
……○浅沼 成人（明治大・農）

16:26 休憩

座長：**北垣 浩志**

16:34 1S-S4p09 アジア人の食習慣と腸内細菌叢と健康に関する研究
……○中山 二郎（九大院・農）

座長：**中山 二郎**

16:52 1S-S4p10 食物繊維と 腸内細菌叢
……○徳井 教孝（中村学園大・薬膳科学研）

17:10 1S-S4p11 高齢者の食習慣と腸内細菌叢の多様性
……○三成 由美（中村学園大・栄養）

17:28 おわりに
……中山 二郎

S5 会場　E21（13:15～15:15）

動物細胞培養の新研究領域への挑戦～学問の境界領域で起こるイノベーションを目指して～

13:15 はじめに
……蟹江 慧

座長：**蟹江 慧**

13:18 1S-S5p01 微小重力環境での細胞培養と再生医療への応用
……○河原 裕美[1], 猪村 剛史[2], 大塚 貴志[2], 弓削 類[1,2]
（[1]スペース・バイオ・ラボラトリーズ, [2]広島大院・医系科学研究科）

13:37 1S-S5p02 閉鎖系自動培養システム：CELLAFORTE
……○竹内 誠亮（ニプロ）

座長：**曽宮 正晴**

13:56 1S-S5p03 ヒト細胞の 3 次元培養によるがん微小環境の構築と解析
……○高橋 治子（広島大院・統合生命科学）

座長：**堀江 正信**

14:15 1S-S5p04 細胞が発生する力のアッセイ
……○松井 翼（阪大院・基礎工）

14:34 1S-S5p05 ディープラーニングとバイオメディカルイメージング技術
……○新岡 宏彦（大阪大学 データビリティフロンティア機構）

座長：**岩井 良輔**

14:53 1S-S5p06 フレキシブルフィルム力分布センサシステムの開発：動物細胞計測に向けて
……○森脇 健司[1], 岩井 良輔[2], 太田 風輝[2], 藤崎 和弘[1], 笹川 和彦[1]
（[1]弘前大院・理工, [2]岡山理大・フロンティア理工学研究所）

15:12 おわりに
……岩井 良輔

一般講演

A 会場　A36（13:30～17:30）

【酵素学，酵素工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 1Ap01 サルコシンオキシダーゼの各種環状イミノ酸に対する反応特異性および立体選択性
……○黒部 督惠[1], 松本 美徳[1], 山本 真由香[2], 中嶋 義隆[1,2], 西矢 芳昭[1,2]
([1]摂南大院・理工, [2]摂南大・理工)

13:42 1Ap02 リンゴ酸デヒドロゲナーゼの基質特異性と立体構造解析に基づく構造変化メカニズムの考察
……○下澤 勇弥[1,2], 西矢 芳昭[1], 佐々本 康平[1,2], 氷見山 幹基[2], 中村 努[2]
([1]摂南大院・理工, [2]産総研)

13:54 1Ap03 *Pseudomonas* sp. VT1B 株由来ポリビニルアルコール分解関連酵素の精製
……○山中 章裕, 松尾 直紀, 森 哲也, 西本 友之（林原）

14:06 1Ap04 新奇スルホンアミド分解酵素の反応特性解析
……○柴田 幹哉[1], 満倉 浩一[2], 吉田 豊和[2]（[1]岐阜大院・自科技, [2]岐阜大・化学・生命工）

14:18 1Ap05 *N*-Cbz-アミノ酸を脱保護する微生物酵素の反応特性
……○府川 祐太[1], 満倉 浩一[2], 吉田 豊和[2]（[1]岐阜大院・工, [2]岐阜大・工）

14:30 1Ap06 フタル酸類に作用する新奇脱炭酸酵素の探索
……○魚住 和輝[1], 奥村 直也[2], 満倉 浩一[3], 吉田 豊和[3]
([1]岐阜大院・自科技, [2]岐阜大院・工, [3]岐阜大・工)

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 1Ap07 好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来糖エピメラーゼ ST2245 の反応機構
……○小野 真由子[1], 中野 祥吾[1], 河原林 裕[2,3], 伊藤 創平[1]
([1]静県大院・薬食生命, [2]産総研, [3]次世代バイオ医薬品製造技術研究組合)

15:06 1Ap08 ニトリルヒドラターゼの中性子構造解析に向けた取り組み
……○辻井 啓夢[1], 林 英輝[1], 松村 洋寿[1], 野村 高志[2], 當舎 武彦[3],
玉田 太郎[4], 日下 勝弘[5], 久保 稔[2], 城 宜嗣[3], 尾高 雅文[1]
([1]秋田大院・理工, [2]兵庫県大院・生命理, [3]理研・SPring-8, [4]量子科学技術研究開発機構,
[5]茨大・フロンティア応用原子科学研究センター)

15:18 1Ap09 クライオ電子顕微鏡によるロイシン脱水素酵素の高分解能構造を用いた耐熱化機構の解明
……○山口 浩輝[1], 亀川 亜希子[2], 中田 國夫[1], 柏木 立己[1], 水越 利巳[1], 藤吉 好則[2], 谷 一寿[3]
([1]味の素バイオ・ファイン研, [2]東京医科歯科大・高等研究院・セスプル, [3]三重大・院医)

15:30 1Ap10 単糖合成を目指した高度好熱菌由来トランスケトラーゼの X 線結晶構造解析および諸性質の検討
……○吉田 裕美[1,2,3], 吉原 明秀[3,4], 塚本 郁子[2], 秋光 和也[3,4], 何森 健[3,4], 増井 良治[5], 神鳥 成弘[1,2,3]
([1]香川大・総合生命研究セ, [2]香川大・医, [3]香川大・国際希少糖機構, [4]香川大・農, [5]阪市大院・理)

15:42 1Ap11 有機溶媒中における Tk-subtilisin の酵素活性の解析
……○宮田 大暉, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史（阪大院・工）

15:54 1Ap12 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 の基質特異性スイッチ
……小山 貴之[1], 酒瀬川 信一[2], 村山 和隆[3], ○杉森 大助[1]
([1]福島大・共生システム理工, [2]旭化成ファーマ, [3]東北大院・医工)

16:06 休憩・接続チェック（12 分）

16:18 1Ap13 卵殻膜分解活性を示す微生物由来エラスターゼの特性解析と加水分解物の生理活性評価
……○今藤 嵩大[1], 横山 萌[2], 木村 行宏[2], 山下 陽子[2], 芦田 均[2], 竹中 慎治[2]
([1]神戸大・農, [2]神戸大院・農)

16:30 1Ap14 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* NBRC101254 における xylanase 生産に与えるセルロースの影響
……○正木 佑弥[1], 萩原 万貴[2], 有吉 由佳[2], 村上 周一郎[2]
([1]明治大院・農, [2]明治大・農)

16:42 1Ap15 補酵素 B_{12} 関与ジオールデヒドラターゼの作用による 3,3,3 - トリフルオロ - 1,2 - プロパンジオールからの脱フッ素化を伴うアセトアルデヒドの生成
……○森 光一[1], Jiang Dong[2], Golding Bernard T.[2], 虎谷 哲夫[1]
([1]岡山大・工, [2]Sch. Nat. Environ. Sci., Newcastle Univ.)

16:54 1Ap16 好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来 Encapsulin に内包されるフェリチン様タンパク質の発現系構築及び機能解析
……○竹原 直輝, 野中 衛, 松村 洋寿, 小川 信明, 尾高 雅文（秋田大院・理工）

17:06 1Ap17 シリカ重合酵素群で構成されるフィラメントの形成コントロール
……○岡本 淳之介, 中島 一紀, 川﨑 了（北大院・工）

17:18 1Ap18 味覚センサーを用いた放線菌由来アミノペプチダーゼの評価
……○畑中 唯史[1], 石井 恵[2], 中東 良太[3]
（[1]岡山生物研, [2]岡山農研, [3]ナガセケムテックス(株)）

B 会場　A37（13:30〜17:30）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 1Bp01 窒素源存在下で油脂を高蓄積する海洋性クラミドモナス変異株の選択的育種
……○小山 智己[1], 加藤 悠一[2], 佐藤 勝也[3], 大野 豊[3], 蓮沼 誠久[1,2], 近藤 昭彦[1,2,4]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大・先端バイオ工, [3]量研高崎・放射線生物応用, [4]神戸大院・工）

13:42 1Bp02 海洋性クラミドモナス油脂高蓄積変異株における油脂・カロテノイド増産メカニズムの解明
……○加藤 悠一[1], 小山 智己[2], 佐藤 勝也[3], 大野 豊[3], 張 嘉修[4], 蓮沼 誠久[1,2], 近藤 昭彦[1,2,5]
（[1]神戸大・先端バイオ工, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]量研高崎・放射線生物応用, [4]国立成功大・化工, [5]神戸大院・工）

13:54 1Bp03 *Nitratireductor* sp. OM-1 の窒素非感受性株の確立および油脂合成経路の解析
……○山下 瀬菜[1], 高橋 宏和[1], 渡邉 研志[1], Campanaro Stefano[2], Treu Laura[2], Angelidaki Irini[2], 秋 庸裕[1], 加藤 節[1], 中島田 豊[1], 松村 幸彦[3], 岡村 好子[1]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]デンマーク工科大, [3]広島大院・工）

14:06 1Bp04 焼酎粕を用いた油糧微生物ラビリンチュラの培養による DHA 生産
……○小玉 誠[1], 森谷 亜希[1], 高橋 克嘉[2], 林 雅弘[3]
（[1]宮崎・工技セ, [2]宮崎・食開セ, [3]宮崎大・農）

14:18 1Bp05 ゲノム編集を用いた TAG lipase ノックアウトによる海洋珪藻 *Fistulifera solaris* のオイル生産性向上
……○屋部 佑介[1], 串山 夏望[1], 松本 光史[2], 野島 大佑[1], 吉野 知子[1], 田中 剛[1]
（[1]農工大院・工, [2]電源開発）

14:30 1Bp06 海洋珪藻 *Fistulifera solaris* を用いたシクロオキシゲナーゼ遺伝子のオルガネラ特異的発現によるプロスタグランジン高生産
……○松本 奈々, 鶴 雄基, 野々山 智美, 前田 義昌, 吉野 知子, 田中 剛
（農工大院・工）

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 1Bp07 気相条件における気生微細藻類 *Coccomyxa* sp. KGU-D001 の生育と脂質蓄積
……○川島 成貴, 油井 信弘, 藤井 克彦（工学院大・先進工・生化）

15:06 1Bp08 気相条件下での気生微細藻類 *Coelastrella* sp. KGU-Y002 のキサントフィルのエステル化における水分量の影響
……○恩田 岳英, 油井 信弘, 藤井 克彦（工学院大・工）

15:18 1Bp09 *Emticicia* sp. EG3 による *Euglena gracilis* のバイオマスと油脂の生産促進
……○遠山 忠[1], 花岡 翼[2], 山田 康嗣[3], 鈴木 健吾[3], 田中 靖浩[1], 森川 正章[4], 森 一博[1]
（[1]山梨大院・総研部, [2]山梨大院・医工農, [3]ユーグレナ, [4]北大院・環境）

15:30 1Bp10 炭化水素生産微細藻類 *Botoryococcus braunii* の共生細菌が生産する藻体生育促進物質の探索
……○村山 拳午, 大槻 隆司（山梨大院・医工農・生命環境）

15:42 1Bp11 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], 乾 博[2], 上田 光宏[1], 阪本 龍司[1]
（[1]阪府大院・生環科, [2]阪府大院・栄養）

15:54 1Bp12 有用油脂生産藻の特性分析と環境ストレス耐性評価
……○高木 明香莉[1], 佐々木 美月[1], 佐々木 大作[2], 朝山 宗彦[1]
（[1]茨城大院・農, [2]Biox 化学工業）

16:06 休憩・接続チェック（12 分）

16:18 1Bp13 様々な有機物がウキクサの成長に及ぼす影響
……○牧田 晟洋[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 1Bp14 暗期パルス光照射によるアオサノリの２倍速生育
……○梶山 博司[1], 箕田 康一[1], 武田 真樹[1], 木村 祐太[1], 宇山 裕貴[1], 山崎 直人[2], 山本 博文[2]
（[1]徳島文理大院・工・ナノ物質工, [2]徳島文理大・薬）

16:42 1Bp15 組換え *Ralstonia eutropha* による糖質炭素源からのポリヒドロキシアルカン酸共重合体生合成におけるアセトアセチル-CoA 還元反応の改変効果
……Zhang Mengxiao, 栗田 俊輔, 折田 和泉, 中村 聡, ○福居 俊昭（東工大・生命理工）

16:54 1Bp16 未活用資源を用いた PHA 生産および合成遺伝子の特定
……○張 傣喆[1], 中村 友綺[1], 小野寺 瑠依[1], Motakatla Venkateswar Reddy[2]
（[1]室蘭工業大院・工・環境創生工学, [2]Inst. Mol. Microbiol. Biotech. Münster Univ.）

17:06 1Bp17 白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株のリグニン分解系を制御する転写因子の探索
……○岸川 凜太郎[1], 森 智夫[2], 河岸 洋和[2,3,4], 平井 浩文[2,3]
（[1]静大院・総合科技, [2]静大・農, [3]静大・グリーン科技研, [4]静大・創科技院）

17:18 1Bp18 リグニンモデル化合物のエーテル結合を切断する微生物の探索
……○大谷 早紀[1], 利根川 聡史[1], 羽部 浩[2], 古屋 俊樹[1]
（[1]東京理科大理工・応生, [2]産総研・環境管理）

C 会場　B21（13:30～17:18）

【環境浄化，修復，保全技術】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 1Cp01 芳香族有機塩素化合物の微生物分解に及ぼす土壌の影響
……○八田 貴, 久渡瀬 太一, 劉 昊, 周 法宇（岡山理大・工）

13:42 1Cp02 組換え大腸菌を用いた高効率リン酸トリス(2-クロロエチル)分解
……○阿部 勝正, 篠原 輝, 高橋 祥司, 解良 芳夫（長岡技科大）

13:54 1Cp03 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* によるネオニコチノイド系殺虫剤の分解
……○大野 遥[1], 一瀬 博文[2], 森 智夫[3], 河岸 洋和[3,4,5], 平井 浩文[3,4]
（[1]静大院・総合科技, [2]九大院・農, [3]静大・農, [4]静大・グリーン科技研, [5]静大・創科技院）

14:06 1Cp04 Effect of *Pseudomonas putida* on toluene removal activity in the rhizosphere of *Solanum lycopersicum* L.
……○Hak Jin Song[1], Yong-Keun Choi[1], Ji Eun Kim[1], Kwang Jin Kim[2], Yunjeong Yang[1], Eun Bin Lee[1], Sang Hyun Lee[1], Yung-Hun Yang[1], Hyung Joo Kim[1]
（[1]Dept. Biological Eng., Konkuk Univ., [2]Urban Agric. Res. Div., NIHHS, Rural Development Administration）

14:18 1Cp05 *Pseudomonas* sp. PTH10 株における新規フタル酸代謝酵素遺伝子群の機能解析
……儀武 菜美子[1], 岩崎 卓巳[2], 西 達也[2], ○笠井 大輔[1], 福田 雅夫[1,3]
（[1]長岡技科大, [2]（株）ジナリス, [3]中部大・応生）

14:30 1Cp06 *Rhodococcus* 属細菌による低温条件下での A 重油分解の分子機構の解析
……○三好 佑奈[1], 岡田 丈[1], 新谷 政己[1,2], 金原 和秀[1]
（[1]静大院・総合科技, [2]静大・グリーン科技研）

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 1Cp07 GFP を融合したイガイ由来接着タンパク質の作製と材料吸着挙動
……○志賀 敏英, 中島 一紀, 岩田 至叡, 川﨑 了（北大院・工）

15:06 1Cp08 金属結合ペプチドを発現した大腸菌の金属固体への結合および微粒子凝集特性
……○中島 一紀, 岩田 至叡, Aneksampant Apichaya, 川﨑 了（北大院・工）

15:18 1Cp09 鉄を電子源とする硫酸還元菌の単離とその腐食プロセスの電気化学的解析
……○平野 伸一[1], Irene Davidova[2], Joseph Suflita[2], 長岡 亨[1], 松本 伯夫[1]
（[1]電中研, [2]オクラホマ大）

15:30 1Cp10 六価クロム還元細菌 *Flexivirga alba* ST13^T 株の六価クロム還元遺伝子の探索
……○桶田 凜, 広瀬 佑紀, 土井 晃一郎, 丸山 竜人, 松井 徹, 杉山 友康
（東京工科大院・バイオニクス）

15:42 1Cp11 開発途上国のヒ素汚染地下水を利用可能にするための微生物技術の開発
……○遠藤 銀朗, 石井 啓介, 高橋 森里, 宮内 啓介（東北学院大・工）

15:54 1Cp12 Different inactivation behaviors of Gram-positive and Gram-negative bacteria in TiO_2 based photocatalytic disinfection
……○Na Liu[1], Cheng Zhang[1], Nobuaki Negishi[2], Yingnan Yang[1]
（[1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Environ. Mgt. Res. Inst. AIST Tsukuba）

16:06 休憩・接続チェック（12 分）

16:18 1Cp13 種々の固体表面上における家電単離菌のバイオフィルム形成の評価
……○山本 克哉[1], 尾島 由紘[1], 下野 雅仁[2], 多久島 朗[2], 東 雅之[1]
（[1]阪市大院・工, [2]LG Japan Lab）

16:30 1Cp14 牛糞堆肥と竹パウダーを施用した水稲栽培土壌における細菌叢と窒素固定活性の季節変化
……○前田 勇, 稲場 克弘, Ao Zhalaga, 平井 英明（宇都宮大・農）

16:42 1Cp15 農耕地から放出される環境破壊ガス N_2O を抑制するための、カビ脱窒を阻害する化合物の探索
……○松岡 真生[1,2], Ashutosh Kumar[3], Muhammad Muddassar[3], 松山 晃久[1,2], Kam Y. J. Zhang[3], 吉田 稔[1,2]
（[1]理研・環境資源, [2]東大院・農生科, [3]理研・ライフサイエンス）

16:54 1Cp16 淡水サンプルから分離した *Undibacterium* 属細菌における生分解性プラスチック分解酵素の機能解析
……○大井 太士郎[1], 佐藤 俊輔[2], 諸星 知広[1]（[1]宇都宮大院・工, [2]カネカ）

17:06 1Cp17 微生物発酵による BDF 廃液からのフマル酸生産法の検討
……○湯浅 一貴[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）

D 会場　B32（13:30～17:30）

【生物化学工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 1Dp01 植物の成長促進効果をもたらす光合成細菌の菌体成分の検討
……○林 修平, 岩本 康成, 森 康一, 中嶋 桃香, 平川 夕貴, 山本 進二郎, 宮坂 均
（崇城大・生物生命）

13:42 1Dp02 2 段階マイクロ波水熱処理を用いた稲わらからの糖生産
……○宮本 上聖, 中村 嘉利, 浅田 元子, 佐々木 千鶴（徳島大院・先端技科）

13:54 1Dp03 トマトの糖度に及ぼすパルス光照射の影響
……○武田 真樹[1], 上田 愛巳[1], 神内 奈々子[2], 木村 祐太[1], 宇山 裕貴[1], 谷川 浩司[2], 前田 淳史[2], 梶山 博司[1,2]
([1]徳島文理大院・工・ナノ物質工, [2]徳島文理大・理工・ナノ物質工)

14:06 1Dp04 イチゴの着果と糖度に及ぼす暗期パルス光照射の影響
……○上田 愛巳[1], 武田 真樹[1], 木村 祐太[1], 宇山 裕貴[1], 谷川 浩司[2], 前田 淳史[2], 梶山 博司[1,2]
([1]徳島文理大院・工・ナノ物質工, [2]徳島文理大・理工・ナノ物質工)

14:18 1Dp05 レタスの代謝物産生に及ぼすパルス光照射の影響
……○米村 彩乃[1], 宇山 裕貴[1], 木村 祐太[1], 武田 真樹[1], 谷川 浩司[2], 梶山 博司[1,2], 前田 淳史[2]
([1]徳島文理大院・工・ナノ物質工, [2]徳島文理大・理工・ナノ物質工)

14:30 1Dp06 レタスの生育に及ぼす青色パルス光照射の影響
……○木村 祐太[1], 武田 真樹[1], 上田 愛巳[1], 米村 彩乃[1], 宇山 裕貴[1], 谷川 浩司[2], 前田 淳史[2], 梶山 博司[1]
([1]徳島文理大院・工・ナノ物質工, [2]徳島文理大・理工・ナノ物質工)

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 1Dp07 培養効率化へ向けた培地改善への Substratome アプローチ
……○立花 成我, 小西 正朗（北見工大）

15:06 1Dp08 ＣＦＤ解析と生物反応モデル式を組み合わせた商業スケールバイオリアクターにおける物質生産シミュレーション技術の開発
……○沖野 祥平, 渡邉 実, 種田 大介（日揮）

15:18 1Dp09 下水汚泥中の Social cheater 様細菌群に対する電気培養の効果
……○遠矢 将太郎, 高辻 義行, 前田 憲成（九工大院・生体工）

15:30 1Dp10 *Haematococcus pluvialis* を用いたアスタキサンチンの効率的生産
……○山本 麗奈, 堀内 淳一, 熊田 陽一（京工繊大院・工芸科学）

15:42 1Dp11 遺伝子組換え乳酸菌によるコーンコブを原料とした D-乳酸の高濃度・高収率生産
……○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)

15:54 1Dp12 遺伝子組換えシアノバクテリアを用いた 1,3-プロパンジオール生産におけるグリセロール添加効果
……○武田 真由子[1], 端 瞭太[1], 広川 安孝[2], 花井 泰三[2], 村上 明男[3], 熊田 陽一[1], 堀内 淳一[1]
([1]京工繊大院・工芸科学, [2]九大院・農, [3]神戸大院・工)

16:06 休憩・接続チェック（12 分）

16:18 1Dp13 組換え大腸菌を用いた DO-stat 流加培養による単鎖抗体の菌体外生産
……○井嶋 浩一朗, 坂本 祐一朗, 川見 菜実香, 熊田 陽一, 堀内 淳一（京工繊大院・工芸科学）

16:30 1Dp14 Enhanced production of anti-CRP single-chain variable fragment (scFv) antibody using *Escherichia coli* by DO-stat fed-batch culture
……○Nghia Nguyen Hieu, Michimasa Kishimoto, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

16:42 1Dp15 微生物培養による平板培地の pH 変化挙動解析と利用
……○原田 玲奈, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

16:54 1Dp16 微生物の振盪フラスコ培養中における培養栓の換気能評とその応用
……○高橋 将人, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

17:06 1Dp17 セルロースメンブランを用いた植物生育促進細菌の評価・培養法の開発
……大矢 裕之[1], ○藤原 優人[2], 中村 真由[1], 青柳 秀紀[1,2]
([1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生物資源)

17:18 1Dp18 **pH 変動培養による有用金属回収微生物の新規スクリーニング法の開発**
……○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）

E 会場　D12（13:54〜15:18）

【オミクス解析 】

13:18　接続チェック（12 分）

13:54　1Ep03　コリネ型細菌における ECF シグマ因子 SigE のレギュロン同定
……○豊田 晃一[1], 乾 将行[1,2]（[1] RITE, [2] 奈良先端大・バイオ）

14:06　1Ep04　超好熱菌の分岐鎖ポリアミン依存的に発現する遺伝子の温度依存性
……○尾崎 守, 福田 萌子, 濱川 匡史, 福田 青郎, 藤原 伸介（関西学院大・理工）

14:18　1Ep05　*Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成におけるポリアミン類の影響の検討
……○綿井 大輔[1], 坂中 哲人[2], 久保庭 雅恵[2], 福﨑 英一郎[1]
（[1] 阪大院・工, [2] 阪大院・歯）

14:30　1Ep06　*Zygosaccharomyces rouxii* の株間メタボローム解析による凍結耐性関連代謝物の探索
……○菊池 成真, 森本 一輝, 小西 正朗（北見工大）

14:42　休憩・接続チェック（12 分）

14:54　1Ep07　不均衡変異導入法で単離されたリボフラビン高生産 *Ashbya gossypii* のゲノム解析
……○畔上 純也[1], 横森 愛美[1], 加藤 竜也[1,2], 道羅 英夫[2], 朴 龍洙[1,2]
（[1] 静大院・総合科技, [2] 静大・グリーン科技研）

15:06　1Ep08　非モデル珪藻のトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析に基づく被殻形成関連タンパク質の同定
……岩城 沙弥子[1], 小布施 祈織[1], 田村 隆[1], 稲垣 賢二[1], 真山 茂樹[2], ○根本 理子[1]
（[1] 岡山大院・環境生命, [2] 東京学芸大・教）

E 会場　D12（15:18〜17:06）

【植物細胞工学，組織培養，育種工学】

15:18　1Ep09　機械学習を用いた植物 mRNA 切断に関わる特徴の選抜
……○上野 大心, 山崎 将太朗, 出村 拓, 加藤 晃（奈良先端大・バイオ）

15:30　1Ep10　イネ、バラ、レタスにおける mRNA の内部切断に関わる配列的特徴の比較
……○向田 尭史, 上野 大心, 山崎 将太朗, 出村 拓, 加藤 晃（奈良先端大・バイオ）

15:42　1Ep11　Droplet Digital PCR 法を用いた植物 mRNA の内部切断の定量的な測定法の確立
……○成瀬 つきひ, 上野 大心, 山崎 将太朗, 出村 拓, 加藤 晃（奈良先端大・バイオ）

15:54　1Ep12　植物におけるリボソームの停止・停滞に影響を与えるm RNA の配列的特徴についての解析
……○伊藤 光佑, 上野 大心, 山崎 将太朗, 出村 拓, 加藤 晃（奈良先端大・バイオ）

16:06　休憩・接続チェック（12 分）

16:18　1Ep13　Production of recombinant *β*-glucocerebrosidase in *Nicotiana benthamiana* root culture induced by plant hormones
……○Naphatsamon Uthailak[1,2], Takao Ohashi[1], Ryo Misaki[1], Kazuhito Fujiyama[1]
（[1] ICBiotech, Osaka Univ., [2] Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.）

16:30　1Ep14　植物免疫活性化能を持つ低分子環状ペプチド剤の探索とそれらを細胞内で生成させる遺伝子カセットを導入した形質転換シロイヌナズナの病害抵抗性の解析
……○能年 義輝[1], 渡邉 恵[1], 守屋 綾子[1], 香西 雄介[2], 山中 由利恵[1], 木村 麻美子[2], 北松 瑞生[3]
（[1] 岡山大院・環境生命, [2] 理研・環境資源, [3] 近畿大院・総合理工）

16:42 1Ep15 気孔開口を抑制するKチャネル阻害剤の同定とその構造活性相関
……○鈴木 喬太[1], 遠藤 晃輔[1], 島田 友輝[1], 有澤 美枝子[2], 熊田 佳菜子[2], 一刀 かおり[3], 谷井 沙織[2], 古田 未有[2], 井坂 修久[4], 山口 利男[5], 浜本 晋[1], 石丸 泰寛[1], 魚住 信之[1]
([1]東北大院・工, [2]東北大院・薬, [3]東北大院・生命, [4]新潟薬大・応生命, [5]新潟薬大・薬)

16:54 1Ep16 交流電場印加による植物種子の発芽および初期成長促進効果
……○小山 純弘, 田村 泰之, 石川 元, 石川 陽一（エイブル）

F 会場　D23（13:30〜17:06）

【タンパク質工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 1Fp01 新規活性型トランスグルタミナーゼ前駆体の触媒特性の評価
……○有吉 龍太郎[1], 佐藤 崚[1], 南畑 孝介[2], 後藤 雅宏[1], 神谷 典穂[1,3]
([1]九大院・工, [2]KAICO, [3]九大・未来化セ)

13:42 1Fp02 酵素架橋反応を介したタンパク質装飾リポソームの調製とその特性評価
……○駒田 拓也[1], Razi Muhamad Alif[1], 高原 茉莉[2], 若林 里衣[1], 後藤 雅宏[1,3], 神谷 典穂[1,3]
([1]九大院・工, [2]北九州高専, [3]九大・未来化セ)

13:54 1Fp03 低温菌 *Pseudoalteromonas nigrifaciens* Sq02 を用いた外来タンパク質低温分泌生産システムの構築と分泌機構の解明
……○河合 総一郎, Puti Wanguyun Aken, 川本 純, 小川 拓哉, 栗原 達夫（京大・化研）

14:06 1Fp04 麹菌由来 hydrophobin RolA- Cutinase CutL1 間の相互作用における CutL1 側の新たな相互作用部位の探索
……○金 允卿[1], 寺内 裕貴[1], 田中 拓未[1], 吉見 啓[2], 阿部 敬悦[1,2]
([1]東北大院・農, [2]東北大・未来研)

14:18 1Fp05 麹菌界面活性蛋白質ハイドロフォビン RolA の自己組織化機構の解析
……○寺内 裕貴[1], 田中 拓未[1], 三ツ石 方也[2], 藪 浩[2], 吉見 啓[3], 阿部 敬悦[1,3]
([1]東北大院・農, [2]東北大・多元研, [3]東北大・未来研)

14:30 1Fp06 出芽酵母のピルビン酸キナーゼに含まれる G-body 局在化シグナル配列の探索
……○内海 亮太郎[1], 吉村 柚紀[1], 大谷 優太[2], 三浦 夏子[1], 植田 充美[2], 片岡 道彦[1]
([1]阪府大院・生環科, [2]京大院・農)

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 1Fp07 超好熱古細菌由来耐熱性セルラーゼの糸状菌での発現および更なる耐熱化
……○仙波 弘雅[1], 山田 浩之[1], 坪井 宏和[1], 幸田 明生[1], 石川 一彦[2], 坊垣 隆之[1]
([1]大関総研, [2]産総研・バイオメディカル)

15:06 1Fp08 生産性を劇的に向上させる蛋白質人工設計 〜難生産性 L-アミノ酸酸化酵素の改良と、D-アミノ酸動的光学分割法への展開〜
……○南野 優季, 中野 祥吾, 伊藤 創平（静県大院・薬食生命）

15:18 1Fp09 離散的モチーフ様配列による酵素のインシリコ機能的分類法の開発と検証
……○平松 希望, 本山 智晴, 中野 祥吾, 伊藤 創平（静県大院・薬食生命）

15:30 1Fp10 BRET を利用したホタルルシフェラーゼの発光色変換
……○金丸 愛望, 鶴田 篤弘, 有馬 一成, 伊東 祐二, 加藤 太一郎（鹿児島大院 理工 生化）

15:42 1Fp11 細胞内発光を利用したハイスループットスクリーニングにより得られた高活性変異体アシル ACP 還元酵素の評価
……○林 勇樹[1], 新井 宗仁[1,2]（[1]東大院・総合文化, [2]東大院・理）

15:54 1Fp12 好熱菌酵素の低温高活性化の実例と進化情報を用いた低温高活性化法の提案
……○赤沼 哲史（早大・人間科学）

16:06 休憩・接続チェック（12 分）

16:18 1Fp13 AFM を用いた高付着性細菌及びその細胞表層タンパク質の接着力測定
……○石井 慧, 吉本 将悟, 堀 克敏（名大院・工）

16:30 1Fp14 ニホンカブトムシ *Trypoxylus dichotomus* 上翅のプロテオーム解析
……○村田 智志[1], Rivera Jesus[2], Kisailus David[2], 新垣 篤史[1]
（[1]農工大院・工, [2]Dept. Chem. Environ. Eng., Univ. California at Riverside, U.S.A.）

16:42 1Fp15 VHH 抗体提示型分子認識素子を用いた AuNP のワンステップ機能化
……○池田 湧, 石田 尚之, 今村 維克, 今中 洋行（岡山大院・自科）

16:54 1Fp16 Methodical investigations for the efficient purification of recombinant proteins from silkworm compounds
……○Robert Minkner[1], Jian Xu[2], Holger Zagst[3], Imke Oltmann-Norden[3], Hermann Wätzig[3], Tatsuya Kato[1,2], Enoch Y. Park[1,2]
（[1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Inst. Medic. & Pharm. Chem., TU Braunschweig, Germany）

G 会場　D25（13:54〜15:42）

【発酵生理学，発酵工学 】

13:18 接続チェック（12 分）

13:54 1Gp03 放線菌スクリーニング用固／液界面培養法
……○椎名 一樹[1], 小田 忍[2]（[1]金工大院・工, [2]金工大・ゲノム研）

14:06 1Gp04 様々な分離源からのバクテリオシン生産菌の探索とその構造解析
……○善藤 威史, 山城 圭輔, 桑原 美空, 野見山 泰成, 大橋 千紘, 園元 謙二
（九大院・農）

14:18 1Gp05 オリゴエステル分泌生産における種々アルコール化合物の添加効果
……○水野 匠詞[1,3], 櫻井 徹生[1,3], 廣江 綾香[2,3], 田口 精一[2], 柘植 丈治[1,3]
（[1]東工大・物質理工, [2]東農大・生命科, [3]JST・MIRAI）

14:30 1Gp06 *Acidomonas* 属酢酸菌のレアアースによるグリセロール生育抑制
……宇都宮 大貴, 西江 百加, 堀田 靖人, 稗田 莉奈, ○阿野 嘉孝（愛媛大院・農）

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 1Gp07 「魔法の弾丸」アスコフランの全生合成経路の同定と高生産 〜アフリカ眠り病の根絶を目指して〜
……○荒木 康子[1], 淡川 孝義[2,3], 松崎 素道[4,5,6], 趙 理海[4], 松田 侑大[2], 星野 翔太郎[2], 篠原 靖智[1], 山本 雅一[7], 城戸 康年[4,7,8], 稲岡 健ダニエル[4,5], 永宗 喜三郎[6], 伊藤 考太郎[1], 阿部 郁朗[2,3], 北 潔[4,5]
（[1]キッコーマン, [2]東大院・薬, [3]東大・CRIIM, [4]東大院・医, [5]長崎大・TMGH, [6]国立感染研, [7]ミトコンドリア研, [8]阪市大・医）

15:06 1Gp08 好熱菌発酵産物の施与による植物のシステミックな成長促進と防御応答の活性化がネコブセンチュウの感染被害に与える影響
……○梅山 幸子[1], 柳瀬 裕介[1], 宮原 平[1], 宮本 浩邦[1,2,3], 児玉 浩明[1]
（[1]千葉大院・園芸, [2]サーマス（株）, [3]理研 IMS）

15:18 1Gp09 異担子菌酵母 *Cryptococcus diffluens* の L-ガラクトン酸変換経路の解明
……松原 健生, ○岸田 正夫（阪府大院・生環科）

15:30 1Gp10 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるアグマチン産生機構の解明
……○加藤 紗也[1], 赤坂 直紀[1], 五味 勝也[2], 福田 青郎[1], 藤原 伸介[1]
（[1]関西学院大院・理工, [2]東北大院・農）

G 会場　D25（15:42〜17:30）

【遺伝子工学】

15:42　1Gp11　GUS リポーター遺伝子を用いた単細胞性緑藻 *Coccomyxa* のプロモーター活性評価
…… 大迫 香穂, ○笠井 由紀, 阿部 淳, 高木 さつき, 井出 曜子, 原山 重明（中央大・理工）

15:54　1Gp12　新規モデル生物を目指したミミズ形質転換技術の開発－hEPO 遺伝子導入法の検討－
…… ○神田 直輝, 山谷 竜大, 町田 悠, 竹内 綾, 赤澤 真一（長岡高専・物質工）

16:06　休憩・接続チェック（12 分）

16:18　1Gp13　グルコースによる麹菌アミラーゼ生産抑制におけるグルコキナーゼの関与
…… ○田中 瑞己[1], 河原崎 泰昌[1], 五味 勝也[2]（[1]静県大・食栄, [2]東北大院・農）

16:30　1Gp14　*Aspergillus aculeatus* における ManR を介した選択的遺伝子発現制御に関わる転写因子の探索
…… ○角谷 朝香, 炭谷 順一, 谷 修治, 川口 剛司（阪府大院・生環科）

16:42　1Gp15　代謝産物解析と遺伝子解析によるクエン酸生産糸状菌のカビ毒非生産性の検証
…… ○大越 佳乃[1], 吉岡 育哲[1], 中川 博之[2], 桐村 光太郎[1]（[1]早大・先進理工, [2]農研機構・食品）

16:54　1Gp16　クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L における CRISPR/Cas9 システムを用いたハイスループット遺伝子ノックアウト法の構築
…… ○吉岡 育哲, 脇本 紗梨, 桐村 光太郎（早大・先進理工）

17:06　1Gp17　好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* による物質生産
…… ○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・工, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]長瀬産業）

17:18　1Gp18　CRISPR-Cas9 システムによるオーランチオキトリウム属の生産脂質の改質
…… ○北堀 智希[1], 渡邉 研志[1], 青井 真人[1], 畑 浩介[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・統合生命科学, [2]長瀬産業, [3]出光興産）

H 会場　D32（13:30〜15:18）

【培養工学 】

13:18　接続チェック（12 分）

13:30　1Hp01　固体培地上でコロニーを形成しない微生物の選択的獲得：未培養微生物への効率的アクセス
…… ○馬場 啓彰, Jung Dawoon, 加藤 節, 中島田 豊, 青井 議輝（広島大院・統合生命科学）

13:42　1Hp02　微生物間相互作用の促進は増殖の開始を誘導する：難培養性微生物の獲得に向けた新しいアプローチ
…… ○杉山 周[1], Eun Young[1], 鈴木 陸太[1], 加藤 節[1], 中島田 豊[1], 大橋 晶良[2], 金田一 智規[2], 青井 議輝[1]（[1]広島大院・統合生命科学, [2]広島大院・工・四類）

13:54　1Hp03　新規回転振盪培養機構による微生物培養について
…… ○小林 由衣乃[1], 川村 奈々[2], 竹園 恵[1], 中島 敏明[3], 茂野 俊也[4], 小野寺 正幸[1]（[1]新潟工大院・工・生産開発工, [2](株)プリス, [3]筑波大院・生命環境, [4]つくば環微研）

14:06　1Hp04　Water-in-oil ドロップレットを用いた腸内細菌培養手法の開発
…… ○村山 周平[1,2], 大田 悠里[2,3], 斉藤 加奈子[2,3], 松倉 智子[2], 森田 雅宗[2], 関口 勇地[2], 常田 聡[3], 野田 尚宏[1,2,3]（[1]東大院・新領域, [2]産総研・バイオメディカル, [3]早大院・先進理工）

14:18 1Hp05 RNase 活性を指標とした微生物増殖 water-in-oil ドロップレットの検出法 “FNAP-sort” の確立
……○大田 悠里[1,2], 斉藤 加奈子[1,2], 髙木 妙子[2], 松倉 智子[2], 森田 雅宗[2], 常田 聡[1,2], 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）

14:30 1Hp06 エマルションドロップを用いた微生物の培養
…… ○川島 万凜, 村井 雄大, 川本 智也, 金 相完, 久原 哲, 田代 康介
（九大院・生資環）

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 1Hp07 G-body 形成に関わる因子のスクリーニングを目的とした低酸素培養系の確立
……○吉村 柚紀[1], 平山 伶奈[1], 大谷 優太[2], 内海 亮太郎[1], 三浦 夏子[1], 植田 充美[2], 片岡 道彦[1]
（[1]阪府大院・生環科, [2]京大院・農）

15:06 1Hp08 麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸完全分散変異株の液体培養における流体特性の解析
……○市川 暉[1], 宮澤 拳[1], 吉見 啓[2], 古明地 敬介[1], 加藤 好一[3], 阿部 敬悦[1,2]
（[1]東北大院・農, [2]東北大・未来研, [3]佐竹化学機械工業）

H 会場　D32（15:18〜17:30）

【バイオプロセス】

15:18 1Hp09 大腸菌共培養に向けたリアクター制御プロセスの開発
…… ○楠田 みのり, 戸谷 吉博, 清水 浩（阪大院・情報）

15:30 1Hp10 Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase（RubisCO）反応を経由したグリコール酸ポリマー生合成系構築とその応用
…… 大潟 祥梧[1], 永田 暁洋[1], 齋藤 樹理[1], 横尾 俊憲[1], 工藤 悠希[1], 堀 千明[1], ○大井 俊彦[1], 田口 精一[2], 松本 謙一郎[1]
（[1]北大院・工, [2]東農大院・農）

15:42 1Hp11 異なる人工遺伝子回路持つ二つの大腸菌による共培養系の構築
……岩崎 建史朗[1], 本庄 宏[1], 相馬 悠希[2], 鶴野 圭悟[1], 盧 鎮栄[1], 濱田 浩幸[1], ○花井 泰三[1]
（[1]九大院・農, [2]九大・生医研）

15:54 1Hp12 Efficient production of itaconic acid using a psychrophile-based simple biocatalyst
……○Gonglinfeng Luo, Takahisa Tajima, Junichi Kato（Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.）

16:06 休憩・接続チェック（12 分）

16:18 1Hp13 Heterotrophic and Mixotrophic growth of *Haematococcus pluvialis* for the production of astaxanthin using wastewater as a carbon source
…… ○Nombuso Temalangeni Dlamini[1], John Chi-Wei Lan[2]
（[1]Grad. Sch. Biotechnol. and Bioeng., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan, [2]Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan）

16:30 1Hp14 分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いた遺伝子組換えヒトトランスフェリンの分泌生産
…… ○渡部 貴大, 山中 祐実, 大前 俊昭, 山崎 翔子, 小島 千明, 久保田 進, 原 太志, 小谷 哲也, イディリス アリムジャン
（AGC）

16:42 1Hp15 抗体生産性及び品質の向上を目指した CHO 細胞における転写因子 TFE3 の機能解析
…… ○黒田 昂輝[1], 山野-足立 範子[1,2], 古賀 雄一[1], 大政 健史[1,2]
（[1]阪大院・工, [2]MAB 組合）

16:54 1Hp16 CHO 細胞バイオプロセスのための細胞自家蛍光情報の利用検討
…… ○長谷川 倫男（アズビル・技開）

17:06 1Hp17 新規プロテイン A 非含有セラミックス担体による血清中イムノグロブリン G の精製
……○加藤 且也[1], 北村 昌大[1], 永田 夫久江[1], 笠原 真二郎[2]
（[1]産総研・日特ラボ, [2]日本特殊陶業）

17:18 1Hp18 マルチモーダルクロマト担体に対するタンパク質の吸着挙動解析
……○大原 彩香[1], 栗山 尚浩[2], 黒田 典孝[2], 高橋 良輔[2], 迫田 裕美子[2], 堀内 淳一[1], 熊田 陽一[1]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]ワイエムシィ）

I 会場　D34（13:54〜15:54）

【代謝工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:54 1Ip03 オーランチオキトリウム属における脂質生産関連遺伝子の発現解析
……○長谷川 真輝[1], 渡邉 研志[1], Marie Ting Perez Charose[1], 黛 新造[2], 角田 祐介[3], 秋 庸裕[1]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]出光興産, [3]中国電力）

14:06 1Ip04 麹菌 *Aspergillus oryzae* の不飽和化酵素遺伝子の共過剰発現化による遊離ジホモ-γ-リノレン酸の生産向上
……○玉野 孝一[1,2], 安中 優太[3], 伊藤 あやの[3], 三浦 愛[1], 菅 英一郎[4], 小山 泰二[4], 田村 具博[1,2]
（[1]産総研・生物プロセス, [2]産総研・CBBD-OIL, [3]北海道ハイテク専門学校, [4]野田産研）

14:18 1Ip05 油性酵母 *Lipomyces starkeyi* によるトリテルペノイド生産
……○小島 基[1], 金本 拓也[2], 鈴木 宗典[1], 關 光[2], 村中 俊哉[2], 中村 克哉[1]
（[1]神戸天然物化学(株), [2]阪大院・工）

14:30 1Ip06 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の遺伝子的改変による長鎖長脂肪酸の生産
……○宮本 捺央[1], Amza Rezky Lastinov[1], Prihardi Kahar[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）

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 1Ip07 トランスオミクスによる出芽酵母の中心炭素代謝制御機構の解明
……○山崎 一輝, 丸山 正晴, 西野 駿佑, 岡橋 伸幸, 清水 浩, 松田 史生
（阪大院・情報）

15:06 1Ip08 ロテノン処理に対するヒト乳がん細胞株 MCF-7 の代謝アダプテーション解析
……○辻 周真, 丸山 正晴, 岡橋 伸幸, 松田 史生（阪大院・情報）

15:18 1Ip09 ^{13}C 代謝フラックス解析を用いた非上皮系細胞株の定量的代謝比較
……○島 知輝, 丸山 正晴, 岡橋 伸幸, 松田 史生（阪大院・情報）

15:30 1Ip10 蛍光式溶存酸素センサーを使用した呼吸活性の測定法
……○高寺 美砂都[1], 一瀬 涼[2], 山崎 思乃[1], 片倉 啓雄[1]
（[1]関西大・化生工, [2]関西大院・理工）

15:42 1Ip11 乳酸菌の高密度培養のための好気的流加培養による乳酸生産の抑制
……○一瀬 涼[1], 高寺 美砂都[2], 山崎 思乃[2], 片倉 啓雄[2]
（[1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工）

J 会場　E23（13:54〜15:42）

【セル＆ティッシュエンジニアリング】

13:18 接続チェック（12 分）

13:54 1Jp03 ROCK inhibitor の添加が hiPS 細胞集塊の細胞外マトリックスに与える影響
……○松本 崇揮, 金 美海, 紀ノ岡 正博（阪大院・工）

14:06 1Jp04 ラット間葉系幹細胞の分化に対して光増感反応による活性酸素刺激が及ぼす影響の解析
……○森 英樹, 原 正之（阪府大院・理）

14:18 1Jp05 単一細胞トランスクリプトーム解析に基づく血中循環腫瘍細胞の上皮間葉転換状態の評価
……○山川 ひとみ[1], 根岸 諒[1], 下山 達[2], 小泉 史明[2], 田中 剛[1], 松永 是[1], 吉野 知子[1]
（[1]農工大院・工, [2]がん・感染症センター都立駒込病院）

14:30 1Jp06 システイン誘導体による煙中の不飽和カルボニル化合物の解毒メカニズムの解明
……○東 恒仁[1], Elmeligy Enas[1], 眞井 洋輔[1], 野矢 洋一[2], 真崎 雄一[1], 久下 裕司[2], 三輪 聡一[1]
（[1]北大院・医・細胞薬理, [2]北大・アイソトープ総セ）

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 1Jp07 神経筋接合評価のための iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築
……○吉岡 貫太郎[1], 井藤 彰[2], 河邉 佳典[1], 上平 正道[1]
（[1]九大院・工, [2]名大院・工）

15:06 1Jp08 マイクロラインパターンを用いた筋管細胞の配向制御によるアセチルコリン受容体の凝集促進
……○葛西 晴郎[1], 清水 一憲[1], 長島 拓則[1], 古谷 太樹[1], 前川 忠義[1], 山岡 奈央[1], 本多 裕之[1,2]
（[1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創成セ）

15:18 1Jp09 生体内細胞位置を模倣した三次元神経筋共培養マイクロデバイスの開発
……○中村 健人[1], 清水 一憲[1], 山岡 奈央[1], 長島 拓則[1], 今泉 裕[1],
古谷 太樹[1], 伊藤 卓治[2], 岡田 洋平[2], 本多 裕之[1,3]
（[1]名大院・工, [2]愛知医大・神経内科, [3]名大院・創薬）

15:30 1Jp10 犠牲ファイバーを利用した細胞内包多孔性ハイドロゲルの作製と細胞機能評価
……○蓑田 義将[1], 堀 有音[1], 鵜頭 理恵[2], 山田 真澄[2], 関 実[2]
（[1]千葉大院・融合, [2]千葉大院・工）

ランチョンセミナー

LS1-1 ヒューマンメタボロームテクノロジーズ株式会社

S1 会場　A21（12:00〜12:50）

LS1-2 東ソー株式会社

S4 会場　E11（12:00〜12:50）

LS1-3 オンチップ・バイオテクノロジーズ株式会社

S5 会場　E21（12:00〜12:50）

第 2 日（9 月 17 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

シンポジウム・招待講演（午前の部）

S2 会場　A41（9:30〜11:30）

次世代のバイオプロセスを拓く複合微生物系精密制御技術

9:30　はじめに
……常田 聡

座長：**常田 聡**

9:40　2S-S2a01　硝化微生物コンソーシアの制御と高機能化デザイン
……○安藤 晃規[1,2], 小川 順[1,2]（[1]京大・生理化学, [2]京大院・農）

10:05　2S-S2a02　プラスミドによる複合微生物系の制御を目指して〜複合微生物系におけるプラスミドの動態〜
……○新谷 政己[1,2,3]（[1]静大院・総合科技, [2]静大・グリーン科技研, [3]理研・バイオリソース）

座長：**二又 裕之**

10:30　2S-S2a03　大規模ネットワーク分析による菌叢動態の解明と制御
……○東樹 宏和（京大・生態研）

10:55　2S-S2a04　生態学は生物群集デザインに活用できるか？
……○近藤 倫生, 東 豊浩, 加藤 広海, 川津 一隆, 長田 穣, 永田 裕二（東北大院・生命）

11:20　おわりに
……加藤 純一

S3 会場　B41（9:00〜11:30）

食農工産業の持続的発展を牽引する次世代植物バイオテクノロジー／招待講演

9:00　はじめに
……岡澤 敦司

座長：**田口 悟朗**

9:05　2S-S3a01　フォトン検出を用いた光合成機能センシングによるシロイヌナズナの生理変化の早期診断
……○本橋 令子[1,2], 深沢 知加子[1], 切岩 祥和[1], 明賀 史純[3], 篠崎 一雄[3], 勝又 政和[4]（[1]静大・農, [2]静大・グリーン科技研, [3]理研・環境資源, [4]浜松ホトニクス.中央研）

9:27　2S-S3a02　食農産業における LED の利活用技術の開発
……○藤川 康夫[1], 鶴本 智大[1], 泉田 智史[2], 三島 俊介[3], 岡澤 敦司[4], 加藤 悠一[5], 蓮沼 誠久[5,6]（[1]日亜化学工業株式会社, [2]ヒューマン・チップス有限会社, [3]大塚電子株式会社, [4]阪府大院・生命環境, [5]神戸大・先端バイオ工, [6]神戸大院・科技イノベ）

座長：**高橋 征司**

9:49 2S-S3a03 大気圧空気プラズマを用いた低残留植物病害防除法の開発
…… ○金子 俊郎, 二瓶 健司, 胡 玥, アハマドシャヒー アハマドノール, 高島 圭介（東北大院・工）

10:11 2S-S3a04 任意の圃場環境に最適な作物の育種を可能に － データ科学に基づく作物設計基盤技術の開発
……○平山 隆志[1], 最相 大輔[1], 井藤 純[2], 高萩 航太郎[2], 香西 雄介[2], 鷲見 典克[3], 池田 陽子[1], 井上 小槙[4], 上原 由紀子[4], 清水 みなみ[4], 服部 公央亮[5], 梅崎 太造[3,5], 辻 寛之[2], 持田 恵一[1,2,4]
（[1]岡山大・資源植物科研, [2]横浜市大・木原研, [3]名古屋工大院, [4]理研・環境資源研, [5]中部大・工）

座長：**岡澤 敦司**

10:33 2S-S3a05 バイオエコノミーが引き起こす食農デジタル産業におけるゲームチェンジ
…… ○齊藤 三希子（ルール形成戦略研究所）

10:55 おわりに
…… 高橋 征司

11:00 2S-S3a06 **〈招待講演（韓国生物工学会）〉** 座長：**岡澤 敦司**
Effects of FIR emission and phytochemicals on Lymphedema alleviation
……○Hei Chan Lee, Dae Hoon Kim
（Dept. Pharm. Eng. & Biotechnol., Sun Moon Univ.）

S5 会場　E21（9:30～11:30）

タンパク質工学におけるドライ－ウェット技術融合の新展開

9:30 はじめに
…… 今中 洋行

座長：**梅津 光央**

9:32 2S-S5a01 非抗体分子骨格を用いた人工結合タンパク質作製基盤の構築
…… ○安井 典久（岡山大院・医歯薬）

9:55 2S-S5a02 抗体医薬を代替する標的結合小型タンパク質デザイン
…… ○門之園 哲哉（東工大・生命理工）

座長：**今中 洋行**

10:18 2S-S5a03 機械学習と実験の融合によるタンパク質の高機能化
…… ○齋藤 裕[1,4], 及川 未早来[2], 中澤 光[2], 亀田 倫史[1,4], 津田 宏治[3,4], 梅津 光央[2,4]
（[1]産総研・人工知能, [2]東北大院・工, [3]東大院・新領域, [4]理研・革新知能）

10:41 2S-S5a04 人工タンパク質構造ライブラリーの創出
……○古賀 信康[1,2,3]（[1]自然・生命創成, [2]自然・分子研, [3]総研大）

11:04 2S-S5a05 理論と実験によるタンパク質デザイン
…… ○新井 宗仁[1,2]（[1]東大院・総合文化, [2]東大院・理）

11:28 おわりに
…… 今中 洋行

シンポジウム・招待講演（午後の部）

S1 会場　A21（13:15〜17:15）

持続可能な開発目標（SDGs）を生物工学にどう活用するか【本部企画】

13:15　はじめに
……今井 泰彦
座長：**今井 泰彦**

13:20　2S-S1p01　SDGs に対する生物工学研究のあり方
……○木野 邦器（早大・先進理工）
座長：**安原 貴臣**

13:40　2S-S1p02　住友化学グループの SDGs の取組み
……○冨ケ原 祥隆（住友化学）
座長：**髙木 忍**

14:15　2S-S1p03　SDGs と科学技術イノベーション
……○白木澤 佳子（国立研究開発法人科学技術振興機構）
座長：**田口 精一**

14:50　2S-S1p04　大学は SDGs 達成にどのようにかかわれるか
……○狩野 光伸（岡山大学・SDGs 推進企画会議）

15:25　休憩
座長：**児島 宏之**

15:35　2S-S1p05　世界のバイオエコノミーと関連する合成生物学議論
……○藤島 義之（新エネルギー・産業技術総合開発機構・技術戦略研究セ・ 海外技術情報ユニット）
座長：**荒 勝俊**

16:00　2S-S1p06　世界最先端のバイオエコノミー社会の実現－我が国の戦略－
……○服部 正（内閣府・科技）
座長：**荒 勝俊**

16:20　（総括）パネルディスカッション
……講演者全員

17:10　おわりに
……安原 貴臣

S2 会場　A41（15:00〜17:30）

微生物による物質生産の新展開／招待講演

15:00　はじめに
……清水 浩
座長：**清水 浩**

15:05　2S-S2p01　Oligosaccharide fermentation by engineered yeast to produce value-added products
……○Yong-Su Jin [1,2]
（[1] Dept. Food Sci. & Human Nutrition., Univ. of Illinois, Urbana, IL, USA, [2] Carl R. Woese Institute for Genomic Biology, Urbana, IL, USA）

15:30 2S-S2p02 **〈招待講演（韓国生物工学会）〉**

Designer *Corynebacterium glutamicum* for advanced production from primary to high-valued chemicals

…… Young Jin Ko [1], Young-Chul Joo [1], Jeong Eun Hyeon [1,2], ○Sung Ok Han [1]

（[1] Dept. Biotechnol., Korea Univ., [2] Dept. Food Sci. Biotechnol., Sungshin Women's Univ.）

15:55 休憩

座長：**戸谷 吉博**

16:05 2S-S2p03 ATP 生成の向上による物質生産の高度化

…… ○原 清敬（静岡県大院・食栄環）

座長：**原 清敬**

16:30 2S-S2p04 シアノバクテリアのクエン酸回路を基盤としたバイオプラ原料の生産

…… ○小山内 崇（明治大・農）

座長：**小山内 崇**

16:55 2S-S2p05 光を利用した微生物の代謝の制御と可視化

…… ○戸谷 吉博, タンダル セバスチャン トミ, 妹尾 幸枝, 鎌田 健太郎, 清水 浩（阪大院・情報）

17:20 おわりに

…… 清水 浩

S3 会場　B41（13:15〜15:45）

Development of Biosensing Technology Targeting Sustainability Development Goals
「持続可能な開発目標を目指したバイオセンシングの開発と展開」《国際シンポジウム》／招待講演

13:15 Opening Remarks

……Enoch Y. Park

座長：**Enoch Y. Park**

13:20 2S-S3p01 Electrical pulse induced electrochemical sensor for cancer cell detection

……Akhilesh Babu Ganganboina [1,2], ○Ruey-an Doong [2,3]

（[1] Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2] Dept. Biomed. Eng. & Environ. Sci., Natl Tsing Hua Univ., [3] Inst. Anal. Environ. Sci., Natl Tsing Hua Univ.）

座長：**Eiichi Tamiya**

13:45 2S-S3p02 Patch-type biosignal monitoring system based on flexible electronics

……○Takafumi Uemura [1,2], Tsuyoshi Sekitani [1,2]（[1] ISIR, Osaka Univ., [2] AIST-Osaka Univ. PhotoBIO-OIL）

座長：**Enoch Y. Park**

14:10 2S-S3p03 Crystallinity and morphology control of whitlockite nanocrystals synthesis in tri-solvent system

……Caifeng Wang [1], Ki-jae Jeong [1], ○Jaebeom Lee [2]

（[1] Dept. Cogno-Mechatronics Eng., Pusan National Univ., [2] Dept. Chem., Chungnam National Univ.）

14:35 Break

座長：**Enoch Y. Park**

14:45 2S-S3p04 Centrifugal microfluidics devices for bioassay

……○Masato Saito [1,2]（[1] Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2] PhotoBIO Lab, AIST-Osaka Univ）

15:10 2S-S3p05 **〈招待講演（韓国生物工学会）〉** 座長：**Eiichi Tamiya**

Exosome based theragnosis for future medicine

……Kyusoon Shin [1], Ju Young Kim [1], Chang Hyun Lee [1], Kwang Sik Kim [1], ○Jong Wook Hong [1,2,3]

（[1] Grad. Sch. Bionano. Eng. Hanyang Univ., [2] Dept. Bionano. Eng. Hanyang Univ., [3] Center of exosome and bioparticulate research, Hanyang Univ.）

15:35 Closing Remarks

…… Eiichi Tamiya

S4 会場　E11（13:15〜15:15）

複雑組織製造に必要な基盤技術を考える〜バイオリアクターの側から〜

13:15　はじめに
……長森 英二

座長：**長森 英二**

13:20　2S-S4p01　動物細胞培養用バイオリアクターの研究を振り返って
……○飯島 信司（愛工大・工）

座長：**伊藤 大知**

13:45　2S-S4p02　人工酸素運搬体（パーフルオロカーボンエマルジョン）の開発
……○福島 昭二（神戸学院大・薬・臨床薬剤）

14:10　休憩

座長：**長森 英二**

14:20　2S-S4p03　ヘモグロビンを封入した人工酸素運搬体（人工赤血球）
……○伊藤 大知（東大院・医・疾患生命工学セ）

座長：**伊藤 大知**

14:45　2S-S4p04　複雑組織製造に必要な基盤技術を考える〜バイオリアクターの側から〜
……○長森 英二（大工大・工）

S4 会場　E11（15:30〜17:30）

新しいデータ駆動型サイエンスによる複雑な生命現象の理解

座長：**青木 航**

15:30　2S-S4p05　トランスオミクスビッグデータからＳＤＧ障害疾患に対する新薬発見
……○植田 充美[1,2]（[1]京大院・農, [2]CREST）

座長：**植田 充美**

15:54　2S-S4p06　データ駆動型代謝数理モデル構築とシアノバクテリア代謝工学への応用
……○松田 史生（阪大院・情報）

16:18　2S-S4p07　質量分析を基盤としたシングルセル分子フェノタイプ解析
……○和泉 自泰, 馬場 健史（九大・生医研）

16:42　2S-S4p08　1 細胞セルオミックスによる多細胞ネットワークが織り成す生命現象の解明
……○青木 航[1,2]（[1]京大院・農, [2]JST・さきがけ）

座長：**青木 航**

17:06　2S-S4p09　逆強化学習による「動物の行動戦略」のデータ駆動的解読
……○本田 直樹（京大院・生命）

S5 会場　E21（13:15〜15:15）

物質生産や代謝制御における呼吸鎖の役割

13:15　はじめに
……薬師 寿治

座長：**川向 誠**

13:16 2S-S5p01 Two tales of the respiratory chain: 呼吸鎖が物質生産に直接的に関わるお話と間接的に関わるお話
……○薬師 寿治[1,2,3], 片岡 尚也[1,2,3], 松下 一信[1,2,3]
（[1]山口大・院創成, [2]山口大・農, [3]山口大・中高温微セ）

座長：**薬師 寿治**

13:39 2S-S5p02 大腸菌の呼吸鎖欠損変異株が示す異常な糖代謝の解析
……○横田 篤（北大院・農）

座長：**川向 誠**

14:03 2S-S5p03 ユーグレナの嫌気的呼吸鎖に共役したワックスエステル生産
……○中澤 昌美（阪府大院・生環科）

14:27 2S-S5p04 清酒酵母のミトコンドリア活性・ミトファジーがその醸造特性に及ぼす影響
……○北垣 浩志（佐賀大・農）

座長：**薬師 寿治**

14:51 2S-S5p05 分裂酵母の物質代謝と呼吸鎖の関連
……○川向 誠（島根大・生資・生命科）

15:14 おわりに
……川向 誠

S5 会場　E21（15:30〜17:30）

微生物ポリアミンが支える高齢化社会の生活

座長：**栗原 新**

15:30 はじめに
……藤原 伸介

15:35 2S-S5p06 微生物がつくる様々なポリアミン
……○藤原 伸介（関西学院大・理工）

15:50 2S-S5p07 ポリアミンと健康：ポリアミンによるグリコサミノグリカン合成促進機序
……○東 恭平（東理大・薬）

16:15 2S-S5p08 ポリアミン摂取による長寿の基礎的背景と消化管の役割
……○早田 邦康（自治医大さいたま医療センター 循環器病臨床医学研究所）

座長：**藤原 伸介**

16:40 2S-S5p09 健康長寿社会へ向けた腸内細菌由来ポリアミン産生促進技術の開発とその保健効果
……○松本 光晴（協同乳業・研・技術開発）

17:05 2S-S5p10 ヒト腸内常在菌叢最優勢種のポリアミン合成・輸送経路の遺伝学的解明
……○栗原 新（近畿大院・生物理工）

17:25 おわりに
……栗原 新

一般講演（午前の部）

A 会場　A36（9:00〜11:36）

【遺伝子工学】

8:48 接続チェック（12 分）

9:00 2Aa01 プラスミドが宿主に及ぼす負荷を軽減する因子の探索・同定
……○森 光矢[1], ファン チィー キム ユン[1], 金原 和秀[1], 新谷 政己[1,2]
([1]静大院・総合科技, [2]静大・グリーン科技研)

9:12 2Aa02 好気・微好気・嫌気条件下における接合伝達性の比較
……○越智 健太郎[1], 柳谷 洸輔[1], 雪 真弘[2], 大熊 盛也[2], 金原 和秀[1], 新谷 政己[1,2,3]
([1]静大院・総合科技, [2]理研・バイオリソース, [3]静大・グリーン科技研)

9:24 2Aa03 同じ不和合性群に属しても塩基組成の違うプラスミドの宿主域は異なる
……○徳田 真穂[1], 柳谷 洸輔[1], 井上 謙吾[2], 雪 真弘[3], 大熊 盛也[3], 金原 和秀[1], 新谷 政己[1,3,4]
([1]静大院・総合科技, [2]宮崎大・農, [3]理研・バイオリソース, [4]静大・グリーン科技研)

9:36 2Aa04 *Geobacillus* 属細菌における高度遺伝子発現を可能とするプラスミドベクター
……○倉敷 凌太[1], 大城 隆[2], 鈴木 宏和[2] ([1]鳥取大院・持続創生, [2]鳥取大・工)

9:48 2Aa05 安価な青白スクリーニングが可能なクローニングベクターの開発
……○鈴木 宏和[1,2], 栗山 克[1], 山﨑 竜次[2], 日野 智也[1,2], 永野 真吾[1,2], 大城 隆[1,2]
([1]鳥取大・工, [2]鳥取大院・工)

10:00 2Aa06 病原性細菌の毒素産生能力を阻害する物質の探索システムの開発とその利用
……○野田 正文[1], Sultana Nasrin[1], Danshiitsoodol Narandalai[1], 井上 裕介[2], 東川 史子[1], 杉山 政則[1]
([1]広島大院・医系科学, [2]三井製糖株式会社)

10:12 休憩・接続チェック（12 分）

10:24 2Aa07 組換え RNA 分子の高生産に向けたコリネ型細菌での発現系構築
……羽城 周平, 三橋 麻由, ○安枝 寿（味の素バイオ・ファイン研）

10:36 2Aa08 コリネ型細菌での転写ユニット増幅による組換え RNA 分子の高生産
……○羽城 周平, 三橋 麻由, 安枝 寿（味の素バイオ・ファイン研）

10:48 2Aa09 組織空間的トランスクリプトーム解析及びゲノム変異解析に向けた微量生体分子抽出法の開発
……○山崎 美輝[1,2], 細川 正人[3], 有川 浩司[4], 髙橋 清文[4], 松永 浩子[4], 竹山 春子[1,2,3,4]
([1]早大院先進理工, [2]産総研 CBBD-OIL, [3]早大理工総研, [4]早大ナノライフ創新研)

11:00 2Aa10 極微小組織切片からの単一細胞レベルトランスクリプトーム解析
……○松永 浩子[1], 髙橋 清文[1], 山崎 美輝[2,3], 有川 浩司[1], 細川 正人[4], 竹山 春子[1,2,3,4]
([1]早大ナノライフ創新研, [2]早大院先進理工, [3]産総研 CBBD-OIL, [4]早大理工総研)

11:12 2Aa11 遺伝子組換え技術を応用したオオミジンコにおける幼若ホルモン活性の可視化
……○野田 彩乃, 加藤 泰彦, 松浦 友亮, 渡邉 肇（阪大院・工）

11:24 2Aa12 放線菌を用いたタンパク質発現量を調節する遺伝子配列設計手法の開発
……○田島 直幸[1], 北川 航[2], 齋藤 裕[1], 西宮 佳志[2], 玉野 孝一[2], 安武 義晃[2], 田村 具博[2], 亀田 倫史[1]
([1]産総研・人工知能, [2]産総研・生物プロセス)

B 会場　A37（9:00～11:36）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

8:48 接続チェック（12 分）

9:00 2Ba01 *Bacillus* 属細菌を用いた微生物発電の試み
……○福本 悠地, 江邉 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司（近畿大院・生物理工）

9:12 2Ba02 *Bacillus* 属細菌 IA 株と燻炭を組み合わせた微生物資材の開発
……○江邉 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司（近畿大院・生物理工）

9:24 2Ba03 新奇な好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* を用いたタンパク質生産株の開発
……○齊藤 朱音[1], 三原 笑[1], 曽田 匡洋[3], 荻野 千秋[1], 柏木 紀賢[2], 竹中 武藏[2], 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)

9:36 2Ba04 コーヒー抽出残渣の発酵資源化
……○水谷 友梨香[1], 加藤 愛理[2], 関川 貴寛[2,3], 菊川 寛史[2,3], 原 清敬[2,3]
([1]静県大院・薬食生命, [2]静県大・食栄, [3]静県大院・食栄・環)

9:48 2Ba05 油性酵母を用いた脱脂米糠加水分解物から機能性油脂生産
……○渡辺 昌規[1], 窪田 健太[1], 佐久間 健輔[1], 竹中 慎治[2], Chaiyaso Thanongsak[3]
([1]山形大院・農, [2]神戸大院・農, [3]タイ・チェンマイ大・農産)

10:00 2Ba06 スギ由来セルロースナノファイバーを用いたバイオポリマーコンポジットの作製
……○妹尾 政都, 中村 嘉利, 浅田 元子（徳島大院・先端技科）

10:12 休憩・接続チェック（12 分）

10:24 2Ba07 *Xanthophyllomyces dendrorhous* によるアスタキサンチン発酵生産への柑橘果皮抽出液の利用
……○景山 裕也, 若林 敬二, 原 清敬（静県大院・薬食生命）

10:36 2Ba08 小松菜からの内生菌の単離および植物免疫活性化能の評価
……○黒川 摩利[1], 中野 正貴[1], 北畑 信隆[2], 朽津 和幸[1], 古屋 俊樹[1]
([1]東京理科大理工・応生, [2]東大院・農生科)

10:48 2Ba09 土壌環境および植物成長を改善する資材の探索
……○富永 信一, 荒木 希和子, 久保 幹（立命館大院・生命科学）

11:00 2Ba10 *Bacillus subtilis* の土壌環境及び植物成長に及ぼす影響解析
……○東本 繰未, 荒木 希和子, 久保 幹（立命館大院・生命科学）

11:12 2Ba11 イオン液体で前処理した木質系バイオマス中の多糖およびリグニンのリファイナリー
……○廣部 綾乃[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)

11:24 2Ba12 鶏ふんからのリン回収技術の検討
……○野村 勇揮[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）

C 会場　B21（9:00～11:36）

【代謝工学】

8:48 接続チェック（12 分）

9:00 2Ca01 *Pseudomonas* sp. LAB-08 株由来増殖抑制物質による解糖系抑制の可能性
……○本荘 雅宏[1], 鈴木 研志[1], 田代 陽介[2], 二又 裕之[3]
([1]静大・創科技院, [2]静大・工, [3]静大・グリーン科技研)

9:12 2Ca02 ロドプシンを利用した大腸菌における光駆動 ATP 再生の物質生産への応用
……○田中 涼[1], 鎌田 健太郎[1], 戸谷 吉博[1], 松田 史生[1], 石井 純[2], 柘植 謙爾[2], 弘埜 陽子[3], 原 清敬[3], 清水 浩[1]
([1]阪大院・情報, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]静県大・食栄)

9:24 2Ca03 「アミノ酸機能工学」による大腸菌へのストレス耐性の付与
……○磯貝 章太, 高木 博史（奈良先端大・バイオ）

9:36 2Ca04 酸素をスイッチとしたコリネ型細菌中央代謝経路の切り換え
……小林 俊介[1], 村井 克輝[1], 川口 秀夫[2], 白井 智量[3], 仁宮 一章[1,4], 髙橋 憲司[1], 近藤 昭彦[2,3], ○柘植 陽太[1,4]
([1]金沢大院・自科, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]理研・環境資源, [4]金沢大・新学術)

9:48 2Ca05 解糖系とペントースリン酸経路への代謝フラックスの分岐比が細胞内代謝プロファイルに及ぼす影響
……○村井 克輝[1], 佐々木 大介[2], 白井 智量[3], 内倉 寛斗[1], 佐々木 建吾[2], 仁宮 一章[1,4], 髙橋 憲司[1], 近藤 昭彦[2,3], 柘植 陽太[1,4]
([1]金沢大院・自科, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]理研・環境資源, [4]金沢大・新学術)

10:00 2Ca06 バクテリアの還元型リン化合物輸送体 HtxBCDE における基質認識メカニズムの解析
……○廣田 隆一, 三好 克樹, 池田 丈, 石田 丈典, 舟橋 久景, 黒田 章夫
（広島大院・統合生命科学）

10:12 休憩・接続チェック（12 分）

10:24 2Ca07 好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* 代謝改変株を用いたエタノール生産増強に向けた培養工学的検討
……○加藤 淳也[1], 竹村 海生[1], 岩崎 祐樹[2], 加藤 節[1], 青井 議輝[1], 和田 圭介[2], 村上 克治[2], 松鹿 昭則[2], 中島田 豊[1]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]産総研・機能化学）

10:36 2Ca08 アコニット酸イソメラーゼ遺伝子とクエン酸輸送体遺伝子を共発現させた大腸菌生細胞によるクエン酸からの *trans*-アコニット酸の生産
……○小田 祐之亮, 吉岡 育哲, 滝口 有沙, 桐村 光太郎（早大・先進理工）

10:48 2Ca09 *Ochrobactrum* sp. WU-1502 を利用したレブリン酸からの 2-オキソグルタル酸の生成
……○大浦 智之[1], 齋藤 慎太郎[1], 吉岡 育哲[1], 羽部 浩[2], 桐村 光太郎[1]
（[1]早大・先進理工, [2]産総研・環境管理）

11:00 2Ca10 不均一なリグニン由来フェノールからの 4-ヒドロキシ安息香酸生産
……○阿久津 美歩[1], 上村 直史[2], 政井 英司[2], 園木 和典[1]
（[1]弘前大院・農生, [2]長岡技科大・生物）

11:12 2Ca11 大腸菌の共培養によるイソプレノール合成経路のボトルネックの解消
……○川井 隆太郎, 戸谷 吉博, 清水 浩（阪大院・情報）

11:24 2Ca12 *Pseudomonas stutzeri* NT-I のセレン代謝を促進する培地成分の検討
……○池田 美紗希, 黒田 真史, 井上 大介, 池 道彦（阪大院・工）

D 会場　B32（9:00〜11:36）

【生物化学工学】

8:48 接続チェック（12 分）

9:00 2Da01 LAL 固定化ビーズ法を用いたグラム陰性菌の培養に伴うエンドトキシンの遊離特性の定量的解析（第 3 報）
……大瀧 賀也[1], ○徳永 成美[2], 青柳 秀紀[1,2]（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生物資源）

9:12 2Da02 LAL 固定化ビーズ法を用いたエンドトキシンの高感度・迅速検出法の開発と利用（第 5 報）
……猪瀬 陽加[1], ○川﨑 芳美[2], 青柳 秀紀[1,2]（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生物資源）

9:24 2Da03 イオンコンプレックス化技術を利用したポリ γ グルタミン酸の効率的な回収技術の開発
……○白米 優一, 山内 七海, 芦内 誠（高知大・農）

9:36 2Da04 酢酸菌を宿主とした異種タンパク質生産の試み
……○植川 泰好, 繁 宥樹, 赤坂 直紀, 福田 青郎, 藤原 伸介（関西学院大院・理工）

9:48 2Da05 リン脂質組成を改変した膜受容体-マグネトソーム複合体の開発
……○藤本 一嗣, 田山 爽也華, 前田 義昌, 田中 剛, 吉野 知子（農工大院・工）

10:00 2Da06 細胞模倣膜を用いた界面活性剤刺激性評価に関する研究
……○藤根 志帆[1], 佐々木 陽介[1], 下川 直史[1], 辻野 義雄[1,2], 高木 昌宏[1]
（[1]北陸先端大・マテリアル, [2]岡山理大・経営）

10:12 休憩・接続チェック（12 分）

10:24 2Da07 Characterization of Tryptamine-coupled resin for affinity purification of human IgG
……○Michelle Rakotondravao[1], Naohiro Kuriyama[2], Noritaka Kuroda[2], Ryosuke Takahashi[2], Yumiko Sakoda[2], Jun-ichi Horiuchi[1], Yoichi Kumada[1]
（[1]Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]YMC）

10:36 2Da08 エクソソームのアフィニティ分離を目指した単鎖抗体固定化担体の開発
……○小林 巧, 新 裕太, 堀内 淳一, 熊田 陽一（京工繊大院・工芸科学）

10:48 2Da09 高親和性ウサギ scFv の開発とイムノクロマトグラフィへの応用
……○中尾 貴一[1], 岡西 崚輔[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）

11:00 2Da10 ミックスモードクロマトグラフィを用いた治療用酵素ヒト Kynureninase の高効率分離
……○杉山 友亮, 熊田 陽一, 堀内 淳一（京工繊大・工芸科学）

11:12 2Da11 空間的環境が細胞の凝集，分散に与える影響
……○瀬川 直矢, 上岡 惇也, 佐々木 啓, 紀ノ岡 正博（阪大院・工）

11:24 2Da12 FISH 法を用いたチャイニーズハムスター由来細胞における内部テロメア配列と染色体転座の解析
……○イ ジュンホ, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史（阪大院・工）

E 会場　D12（9:00～11:36）

【食品科学，食品工学】

8:48 接続チェック（12 分）

9:00 2Ea01 質量分析イメージングによる発酵過程における紅麹二次代謝物の可視化技術の確立
……○南 牧歩[1], 比嘉 悠貴[2], 福﨑 英一郎[1], 新間 秀一[1]
（[1]阪工大院・工, [2]小林製薬中央研究所）

9:12 2Ea02 メタボロミクスに基づくテンペ発酵過程における成分の経時的変動解析
……○南部 洋輔, Putri Sastia Prama, 福﨑 英一郎（阪大院・工・生命先端）

9:24 2Ea03 Optimization of processing method to increase amino acid content in *Tempe*, an Indonesian fermented food
……○Hadi Akbar Dahlan, Sastia Prama Putri, Eiichiro Fukusaki
（Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.）

9:36 2Ea04 モンゴル乳製品由来乳酸菌がコレステロール代謝に与える影響
……○宮本 侑子[1], 峯崎 美歌子[1], 李 怡然[2], 竹下 正彦[2], 有馬 勇夫[2], Tsend-Ayush Chuluunbat[3], Oyunsuren Tsendsuren[4], 小川 健二郎[5], 西山 和夫[1], 山﨑 正夫[1]
（[1]宮崎大・農, [2]南日本酪農共同（株）, [3]蒙科技大, [4]蒙バイオ協会, [5]宮崎大・TT 推進機構）

9:48 2Ea05 焼酎粕を用いた麹菌培養物(FPS)がコレステロール代謝に及ぼす影響
……○加藤 寛隆[1], 小境 敏揮[2], 章 超[2], 河野 邦晃[2], 岩井 謙一[2], 髙瀬 良和[2], 小川 健二郎[3], 西山 和夫[1], 山﨑 正夫[1]
（[1]宮崎大院・農, [2]霧島酒造, [3]宮崎大・テニュアトラック推進機構）

10:00 2Ea06 レスベラトロールおよびその重合体の血管保護作用
……○寺門 和奏[1], 里中 健太[1], 宮崎 均[2], 吉田 滋樹[2]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生命環境系）

10:12 休憩・接続チェック（12 分）

10:24 2Ea07 *Lactobacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシン生合成遺伝子の同定および分子解析
……○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）

10:36 2Ea08 たくあん漬けから分離した *Lactococcus lactis* PJR24 が生産するバクテリオシンの特性
……○高橋 孝太郎[1], 如田 奈津美[2], 河原 あい[1], 松崎 弘美[1,2]
（[1]熊本県大院・環境共生, [2]熊本県大・環境共生）

10:48 2Ea09 スサビノリ由来硫酸化多糖体ポルフィランの抗炎症作用に関する研究
……柳戸 彩奈, 山口 健一, ○小田 達也（長崎大院・水産環境）

11:00 2Ea10 麹菌培養物に由来する腸炎に有効な機能性分子の探索
……○Danshiitsoodol Narandalai, 野田 正文, 東川 史子, 杉山 政則
（広島大院・医系学・未病予防医学共同研究講座）

11:12 2Ea11 *Lactobacillus antri* が産生するメンブランベシクルの IgA 産生促進作用の解析
……○佐々木 晴菜[1], 仲田 真穂[1], 前田 新一[2], 雑賀 あずさ[3], 國澤 純[3], 片倉 啓雄[2], 山崎 思乃[2]
（[1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工, [3]医薬基盤研究所）

11:24 2Ea12 *Lactobacillus sakei* 由来メンブランベシクルによる IgA 産生促進メカニズムの解明
……○三好 柚紀[1], 井谷 彩乃[2], 雑賀 あずさ[3], 長竹 貴広[3], 松永 安由[3], 國澤 純[3], 片倉 啓雄[2], 山崎 思乃[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）

F 会場　D23（9:00〜10:36）

【オミクス解析】

8:48 接続チェック（12 分）

9:00 2Fa01 ^{13}C 代謝フラックス解析に基づくシアノバクテリアの単波長光照射下に対する応答解析
……○山本 千晶, 北村 さや香, 豊島 正和, 戸谷 吉博, 清水 浩（阪大院・情報）

9:12 2Fa02 クラブトリー陽性および陰性の差異に基づく酵母代謝のプロファイルの比較
……○井村 誠[1,2], 新田 克章[2], 岩切 亮[1], 松田 史生[3], 清水 浩[3], 福崎 英一郎[2]
（[1]三菱商事ライフサイエンス, [2]阪大院・工, [3]阪大院・情報）

9:24 2Fa03 LC-MS を用いたアミノ酸鏡像異性体の高速分析に資するクロマトグラフィー条件の改良
……○吉川 航平, 古野 正浩, 田中 信男, 福崎 英一郎（阪大院・工）

9:36 2Fa04 GC/MS を基盤としたヒト血漿メタボロミクスにおける固相誘導体化法と従来誘導体化法の比較
……○新川 翔也[1], 佐々野 僚一[2], 古野 正浩[1], 福崎 英一郎[1]
（[1]阪大院・工, [2]アイスティサイエンス）

9:48 2Fa05 親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析による親水性代謝物の一斉分析法の開発
……中谷 航太[1], 和泉 自泰[1], 高橋 政友[1], 櫻井 恵太[2], 佛願 道男[2], ○馬場 健史[1]
（[1]九大・生医研, [2]日立化成テクノ）

10:00 2Fa06 次世代定量メタボローム解析に資する安定同位体標識内部標準品群調製法の開発
……○相馬 悠希[1,2], 藤原 由梨[2], 高橋 政友[1], 後藤 麻衣子[1], 下平 武彦[1], 池田 明夏里[3], 寺内 勉[3], 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, [3]大陽日酸株式会社）

10:12 2Fa07 クローン病自然発症モデル SAMP1/YitFc マウスの病状進行に伴う 腸内細菌叢および糞便メタボライトの変動
……○小松 陽介[1,2], 清水 由宇[1], 山野 めぐみ[1], 中村 公則[1,3], 綾部 時芳[1,3], 相沢 智康[1,3,4]
（[1]北大院・生命科学, [2]森永乳業, [3]北大院・先端生命, [4]北大・国際連携研究教育局）

10:24 2Fa08 オミクスアプローチを適用した熟成チーズの細菌相多様性と品質の連関の検証
……○海野 良輔[1], 志波 優[2,3], 佐藤 実穂[1], 鈴木 敏弘[1], 石川 森夫[1]
（[1]東京農大応生科・醸造, [2]東京農大生命科・分微, [3]東京農大・ゲノムセ）

G 会場　D25（9:00〜11:36）

【セル＆ティッシュエンジニアリング】

8:48　接続チェック（12 分）

9:00　2Ga01
マイクロキャリア培養した間葉系幹細胞のデキストラナーゼおよびキレート剤併用によるトリプシンフリー回収法
…… 岡村 洋, ○藤原 政司, 高木 睦（北大院・工）

9:12　2Ga02
交流電場印加による非接触な足場依存性細胞の剥離法
…… 小山 純弘, 和田 昌憲, 田村 泰之, 石川 元, 小林 準次, ○石川 陽一（エイブル）

9:24　2Ga03
接着細胞の自己凝集化技術を用いたヒト間葉系幹細胞スフェロイドの作製精度と質の評価
……○草加 直幸[1,2], 安部 菜月[3], 鈴木 康平[4], 広井 佳臣[4], 西野 泰斗[3], 岩井 良輔[2]（[1]岡山理大院・工, [2]岡山理大・フロンティア理工学研, [3]日産化学・生物科学研, [4]日産化学・材料科学研）

9:36　2Ga04
接着細胞の自己凝集化技術を用いた 3 次元毛細血管集合体の作製と形状制御
……○橋本 真悟[1,2], 滝澤 昇[1], 岩井 良輔[2]（[1]岡山理大院・工, [2]岡山理大・フロンティア理工学研）

9:48　2Ga05
In vitro 毛幹形成技術とこれを利用した毛髪の再生医療
……○中嶋 陸満[1], 清水 亮啓[1], 景山 達斗[1,2], 福田 淳二[1,2]（[1]横国大院・工, [2]神奈川県産業技術総合研（KISTEC））

10:00　2Ga06
ヒト不死化筋芽細胞株 Hu5/KD3 を用いた三次元骨格筋組織の構築
…… ○長島 拓則[1], 清水 一憲[1], Hadiwidjaja Stacy[1], 大隅 早紀[1], 本多 裕之[1,2]（[1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創成セ）

10:12　休憩・接続チェック（12 分）

10:24　2Ga07
コラーゲンチューブ培養法による肝細胞微小線形オルガノイドの作製
…… ○佐伯 琴音, 榎本 紗希子, 矢嶋 祐也, 鵜頭 理恵, 山田 真澄, 関 実（千葉大院・融合）

10:36　2Ga08
スフェロイド形成によるヒト iPS 細胞由来肝細胞の代謝機能向上
…… 田尾 文哉, 赤間 剛, ○小島 伸彦（横市大院・生命ナノシステム）

10:48　2Ga09
毛細血管構造を有するスフェロイドの内部構造の三次元的解析
…… ○小西 研吾[1], 稲垣 慶一[1], 髙橋 憲司[1], 仁宮 一章[2]（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術）

11:00　2Ga10
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とその非破壊的評価
…… ○谷内 達彦[1], 髙橋 憲司[1], 仁宮 一章[2]（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術）

11:12　2Ga11
近赤外光情報を用いたスフェロイドの非侵襲的品質評価
……○永井 美希[1], 山本 涼平[1], 渋田 真結[1], 蟹江 慧[1], 五十嵐 陽子[2], 菅沼 寛[2], 加藤 竜司[1,3]（[1]名大院・創薬, [2]住友電気工業, [3]名大・ナノライフシステム研究所）

11:24　2Ga12
多糖とペプチドを用いたハイブリッド細胞足場材料の最適化検証と評価
…… ○王 悦[1], 蟹江 慧[1], 金子 喬士郎[1], 杉本 礼子[1], 成田 裕司[2], 緒方 藍歌[2], 宇都 甲一郎[3], 荏原 充宏[3], 加藤 竜司[1,4]（[1]名大院・創薬, [2]名大院・医, [3]物材機構, [4]名大・ナノライフシステム研究所）

H 会場　D32（9:00〜11:36）

【醸造学，醸造工学】

8:48　接続チェック（12 分）

9:00　2Ha01　日本の発酵食品の基盤、麹グリコシルセラミドは脂質代謝を改善する
……○北垣 浩志[1], 浜島 弘史[1], 光武 進[1], 田中 優[2], 宮川 幸[1], 西向 めぐみ[3], 中村 強[4], 柳田 晃良[5], 中山 二郎[2], 永尾 晃治[1]
（[1]佐賀大・農, [2]九大院・農, [3]岩手大院・連農, [4]福岡女子大学, [5]西九州大学）

9:12　2Ha02　麹由来グリコシルセラミドの腸内細菌への作用解析
……○永留 真優[1], 阪本 真由子[1], 宮川 幸[1], 北島 悠花[1], 中村 強[2], 中山 二郎[3], 北垣 浩志[1]
（[1]佐賀大院・農, [2]福岡女子大, [3]九大院・農）

9:24　2Ha03　紅麹に含まれる抗炎症作用物質の解析
……○小濵 可奈絵[1], 阪本 真由子[1], 柘植 圭介[2], 深見 裕之[3], 金 英寿[3], 北垣 浩志[1]
（[1]佐賀大・農, [2]佐賀工業技術センター, [3]小林製薬株式会社）

9:36　2Ha04　麹甘酒には食後血糖値及びインスリン量の上昇を抑制する成分が含まれる
……○倉橋 敦[1], 中村 彩奈[1], 小黒 芳史[1], 渡辺 賢一[2], 尾崎 信紘[3], 後藤 博[4], 平山 匡男[4]
（[1]八海醸造・研究開発, [2]新潟大院・医歯学総合, [3](一社) 新潟県労働衛生医学協会, [4]新潟バイオリサーチパーク）

9:48　2Ha05　卵麹の開発
……○中川 拓郎[1], 山下 秀行[1], 宮本 哲也[2]（[1]樋口松之助商店, [2]キユーピー）

10:00　2Ha06　麹を用いて美味しさを引き出した卵黄、「熟成卵黄」の開発
……○宮本 哲也, 木原 明彦, 設樂 弘之（キユーピー）

10:12　休憩・接続チェック（12 分）

10:24　2Ha07　α-EG とレジスタントプロテイン高含有のどぶろく醸造法
……○高橋 雅弥, 内川 瞳, 町田 雅之, 尾関 健二（金工大・ゲノム研）

10:36　2Ha08　純米酒エキスに含まれる α-EG が真皮層のコラーゲンに与える影響
……○三谷 恵一, 大浦 友紀, 原田 春佳, 根路銘 伸介, 奥田 伸哉, 坊垣 隆之（大関総研）

10:48　2Ha09　芋焼酎由来成分の脳機能改善作用
……○章 超, 河野 邦晃, 岩井 謙一（霧島酒造）

11:00　2Ha10　牛乳由来ホエイを原料とする食酢醸造とその機能性解析
……○河股 優輔[1], 若山 守[1], 林 順司[2], 豊竹 洋佑[1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]徳島大・生物資源）

11:12　2Ha11　熟成期黒酢発酵液由来乳酸菌の D-アミノ酸生成能について
……○星 南穂子[1], 藤井 暁[2], 橋口 和典[2], 長野 正信[2], 亀谷 将史[1,3], 新井 博之[1,3], 石井 正治[1,3]
（[1]東大院・農生科, [2]坂元醸造, [3]東大微生物連携機構）

11:24　2Ha12　発酵食品データベースの構築と公開
……○楠本 憲一, 曲山 幸生（農研機構・食品部門）

J 会場　E23（9:00〜11:24）

【発酵生理学，発酵工学】

8:48　接続チェック（12 分）

9:00 2Ja01 日本酒生産にヒントを得た麹菌酵素カクテルと酵母を用いた高純度希少糖生産

……○若井 暁[1,2], 堤 浩子[3], 秦 洋二[3], 荻野 千秋[4], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]海洋研究開発機構, [3]月桂冠・総研, [4]神戸大院・工）

9:12 2Ja02 Implementation of different fermentation strategies to enhance the production of microbial carotenoids from *Gordonia terrae* TWRH01

……○Wai Leng Carmen Loh[1,2], John Chi-Wei Lan[1], Hui Suan Ng[2]
（[1]Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan 32003, R.O.C., [2]Faculty Appl. Sci., UCSI Univ., Kuala Lumpur 56000, Malaysia.）

9:24 2Ja03 Evaluation of γ-aminobutyric acid (GABA) production by *Bacillus subtilis* BBEL02 using alternative carbon sources from wastes

…… ○Arlene Cherilyn Asun[1], John Chi-Wei Lan[1], Hui-Suan Ng[2]
（[1]Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan 32003, R.O.C., [2]Dept. Food Sci. Nutr., F. Appl. Sci., UCSI Univ., UCSI Hts., 56000 Cheras, KL, MY）

9:36 2Ja04 Evaluation of polyhydroxyalkanoates (PHA) production by *Ralstonia eutropha* H16 in a single-chamber electro-fermentation system

……○Yuen Hing Lai, John Chi-Wei Lan
（Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan 32003, R.O.C.）

9:48 2Ja05 高温の嫌気条件下で誘導されるコリネ型細菌のグルコース消費促進に伴う遺伝子発現・酵素活性の変動

…… ○松沢 弘貴[1], 豊田 晃一[2], 水野 光[1], 仁宮 一章[1,3], 髙橋 憲司[1], 乾 将行[2], 柘植 陽太[1,3]
（[1]金沢大院・自科, [2]RITE, [3]金沢大・新学術）

10:00 2Ja06 高温下におけるコリネ型細菌を用いた乳酸・コハク酸生産と酵素ターンオーバーの必要性

……○内倉 寛斗[1], 仁宮 一章[1,2], 髙橋 憲司[1], 柘植 陽太[1,2]
（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術）

10:12 休憩・接続チェック（12 分）

10:24 2Ja07 グルコース消費速度と代謝遺伝子の発現レベルの関係

……○山口 陽[1], 内倉 寛斗[1], 豊田 晃一[2], 乾 将行[2], 柘植 陽太[1,3]
（[1]金沢大院・自科, [2]RITE, [3]金沢大・新学術）

10:36 2Ja08 増殖できない高温下におけるコリネ型細菌の代謝挙動

……○小林 俊介[1], 仁宮 一章[1,2], 髙橋 憲司[1], 柘植 陽太[1,2]
（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術）

10:48 2Ja09 耐熱性コリネ型細菌による高温グルタミン酸発酵

…… ○古賀 凌[2], 友広 いずみ[1], 曽川 沙希[1], 松谷 峰之介[2], ナンタポン ナワラート[3], 片岡 尚也[1,2,4], 藥師 寿治[1,2,4], 松下 一信[1,2,4]
（[1]山口大・農, [2]山口大院・医系, [3]スラナリー工科大, [4]中高温微生物セ）

11:00 2Ja10 ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の欠失が *Corynebacterium glutamicum* のリジン生産に与える影響

…… ○新森 彰信, 郭 朕, 和田 大, 横田 篤（北大院・農）

11:12 2Ja11 糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* による抗体等バイオ医薬品製造技術の開発

…… ○深田 寛朗[1], 十倉 充範[2], 臼田 佳弘[1]（[1]味の素バイオ・ファイン研, [2]味の素研究開発企画部）

一般講演（午後の部）

A 会場　A36（13:30〜17:30）

【酵素学，酵素工学】

13:18　接続チェック（12 分）

13:30　2Ap01　**組換え L-メチオニン脱炭酸酵素の迅速簡便な精製法の確立及び結晶構造解析**
……○大川 敦司[1], 林 将也[1], 室田 昌輝[2], 志波 智生[2], 原田 繁春[2], 根本 理子[1], 田村 隆[1], 稲垣 賢二[1]
（[1]岡山大院・環境生命, [2]京工繊大院・工芸科学）

13:42　2Ap02　高基質特異性酵素 L-グルタミン酸オキシダーゼの活性中心アミノ酸残基の機能解析
……○矢野 佳果[1], 松尾 慎作[1], 伊藤 菜奈子[2], 今田 勝巳[2], 日下部 均[3], 根本 理子[1], 田村 隆[1], 稲垣 賢二[1]
（[1]岡山大院・環境生命, [2]阪大院・理, [3]（株）エンザイムセンサ）

13:54　2Ap03　*Geobacillus kaustophilus* 由来グリシンオキシダーゼの基質阻害および基質特異性の改変
……○東浦 優希[1], 小田 龍佑[1], 川崎 大志[1], 野村 隆臣[2], 新井 亮一[2], 西矢 芳昭[1]
（[1]摂南大・理工・生命科学, [2]信州大・繊維・応用生物）

14:06　2Ap04　安定性を向上したグリシン酸化酵素変異体を用いたグリシン測定法の構築
……○巽 萌美[1], 星野 亘[1], 小玉 優哉[1], Techawaree Ueatrongchit[2], 高橋 一敏[1], 山口 浩輝[1], 田上 宇乃[1], 宮野 博[1], 浅野 泰久[2], 水越 利巳[1]
（[1]味の素株式会社, [2]富山県大・生医工研セ）

14:18　2Ap05　超好熱古細菌（始原菌）由来プロテアーゼ（Tk-SP）の Pro ペプチドが成熟化に与える影響
……○長尾 征秀, 前川 大樹, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史（阪大院・工）

14:30　2Ap06　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, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史（阪大院・工）

14:42　休憩・接続チェック（12 分）

14:54　2Ap07　*Elizabethkingia* sp. TT1 由来組換え L-アミノ酸エステラーゼの高発現系の構築と菌体反応による Val-Gly 合成
……○大西 敦也[1], 田中 貴大[1], 林 順司[2], 豊竹 洋佑[1], 若山 守[1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]徳島大院・社会産理工）

15:06　2Ap08　アスパラギン合成酵素を用いた β-アスパルチル化合物合成法の検討
……○山田 泰蔵[1], 林 順司[2], 豊竹 洋佑[1], 若山 守[1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]徳島大・生物資源）

15:18　2Ap09　*Thermococcus kodakarensis* 由来 β-アスパルチルトランスペプチダーゼ遺伝子のクローニング、発現および諸性質の解明
……○深瀬 葵[1], 林 順司[2], 高木 一好[1], 豊竹 洋佑[1], 若山 守[1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]徳島大院・社会産理工）

15:30　2Ap10　*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株由来 γ-グルタミルトランスペプチダーゼ II C 末端領域の活性および安定性に及ぼす影響
……○八田 誠二[1], 野々村 祐輝[1], 林 順司[2], 高木 一好[1], 豊竹 洋佑[1], 若山 守[1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]徳島大院・先端技科）

15:42　2Ap11　*Pseudomonas nitroreducens* 由来 γ-グルタミルトランスペプチダーゼの構造と機能に関する研究
……○池添 浩輝[1], 林 順司[2], 豊竹 洋佑[1], 若山 守[1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]徳島大・生物資源）

15:54 2Ap12 Immobilization and site directed mutagenesis of Trp525 residue of γ-Glutamyltranspeptidase from Pseudomonas nitroreducens (PnGGT) to improve Theanine production
……○Putthapong Phumsombat[1], Chiharu Sano[1], Takao Hibi[2], Takafumi Itoh[2], Junji Hayashi[1], Yosuke Toyotake[1], Mamoru Wakayama[1]
([1] Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2] Dept. Biosci. Fukui Prefectural Univ.)

16:06 休憩・接続チェック（12 分）

16:18 2Ap13 **L-アミノ酸を起点とするピラジン合成酵素群の発見とその解析**
……○本山 智晴[1,2], 中野 祥吾[1], 山本 雄大[3], 常盤 広明[3], 浅野 泰久[4], 伊藤 創平[1]
([1]静県大院・薬食生命, [2]日本学術振興会, [3]立教大・理, [4]富山県大・工)

16:30 2Ap14 *trans*-3-ヒドロキシプロリンの実用生産に向けたバイオプロセス開発
……○原 良太郎[1,4], 西川 健幸[2], 奥原 拓也[2], 纐纈 健人[3], 木野 邦器[1,2]
([1]早大・理工総研, [2]早大・先進理工, [3]協和発酵バイオ, [4]京大院・農)

16:42 2Ap15 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
……○勝目 智也, 鈴木 伸, 木野 邦器（早大・先進理工・応化）

16:54 2Ap16 アデニル化酵素を利用したフェルラ酸アミド合成法の開発
……○鈴木 伸, 早田 優理, 木野 邦器（早大・先進理工・応化）

17:06 2Ap17 *Proteus vulgaris* 由来 L-アミノ酸デアミナーゼの機能解析とアンモニア生産への応用
……○宮澤 沙哉佳, 梅澤 覚, 木野 邦器（早大院・先進理工・応化）

17:18 2Ap18 *Bacillus sp.*由来のシアン分解活性を示す新規ニトリラーゼの発現・精製と機能・構造解析
……○佐々木 春弥[1], 小川 貴弘[2], 小松 大祐[2,3], 加賀谷 夏海[4], 松村 洋寿[1], 尾高 雅文[1], 養王田 正文[2]
([1]秋田大院・理工, [2]農工大院・工, [3]アイ・エス・ソリューション, [4]秋田大・理工)

B 会場　A37（13:30〜17:30）

【酵素学，酵素工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 2Bp01 養菌性キクイムシと共生するセルロース資化性糸状菌が生産するセルラーゼの同定と機能解析
……○堤 星太郎[1], 酒井 杏匠[1], 山口 愛彩[1], 都築 翔[1], 鈴木 啓仁[2], 梶村 恒[2], 志水 元亨[1], 加藤 雅士[1]
([1]名城大院・農, [2]名大院・生命農学)

13:42 2Bp02 α-1,3-glucanase を含む溶菌酵素溶液を利用した *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) からのプロトプラスト形成
……○石原 真奈, 楊 俐聡, 吉岡 育哲, 桐村 光太郎（早大・先進理工）

13:54 2Bp03 リゾクトニア属糸状菌の分泌酵素群による水稲伝染性糸状菌類の防除
……原 富次郎, 高塚 由美子, ○Da Xia, 関 未央（京大・エネ研）

14:06 2Bp04 真菌細胞壁分解酵素を基盤とした抗真菌システムの開発
……○平良 東紀[1], 津波古 遥奈[1], 矢野 成和[2], 上地 敬子[1]
([1]琉球大・農, [2]山形大院・理工)

14:18 2Bp05 *Bacillus cereus* が形成するシリカ層より発見された長鎖ポリアミンの合成メカニズムの解析
……○山本 光士郎[1], 池田 丈[1,2], 舟橋 久景[1,2], 廣田 隆一[1,2], 黒田 章夫[1,2]
([1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・統合生命科学)

14:30 2Bp06 ホタル生物発光のアルパカ抗体による制御
……○小野 陽介[1], 鶴田 篤弘[1], 有馬 一成[1], 伊東 祐二[1], 赤澤 陽子[2], 中島 芳浩[2], 加藤 太一郎[1]
([1]鹿児島大学 理工学研究科 生命化学専攻, [2]産総研)

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 2Bp07 シークワァーサー由来フラボノイドメチル化酵素の分子改変およびポリメトキシフラボノイド生産への応用
……○戸田 弘, 伊藤 伸哉（富山県大・生医工研セ）

15:06 2Bp08 二成分型フラビン依存性モノオキシゲナーゼを利用したヒドロキシエクオールの合成
……○野澤 大樹[1], 橋本 貴史[1], 向井 克之[2], 松山 彰収[2], 古屋 俊樹[1]
（[1]東京理科大理工・応生, [2]（株）ダイセル）

15:18 2Bp09 パラゴムノキの天然ゴム生合成マシナリを構成するタンパク質の機能解析
……山口 真琴[1], 幸治 幸治[1], 廣森 美樹[1], 石井 智樹[1], 和氣 駿之[1], 山下 哲[2], 戸澤 譲[3], 山口 晴彦[4], 井之上 ゆき乃[4], 伏原 和久[4], 中山 亨[1], ○高橋 征司[1]
（[1]東北大院・工, [2]金沢大院・自科, [3]埼玉大院・理工, [4]住友ゴム工業（株））

15:30 2Bp10 スクアレン-ホペン環化酵素による Botryococcene の環化反応
……○金指 真菜[1], 久野 斉[1], 星野 力[2]（[1]デンソー, [2]新潟大院・自然）

15:42 2Bp11 Fe^{2+}-chelate および ferric-chelate reductase を組み合わせたセスキテルペノイド合成法の開発
……○梅澤 覚[1,2], 木野 邦器[1]（[1]早大院・先進理工・応化, [2]長谷川香料）

15:54 2Bp12 4-メトキシサリチル酸を生成する 6-メトキシサリチル酸脱炭酸酵素の発見
……○青野 陸[1], 森 弘樹[1], 原 良太郎[2], 木野 邦器[1,2]
（[1]早大院・先進理工, [2]早大・理工総研）

16:06 休憩・接続チェック（12 分）

16:18 2Bp13 好熱性独立栄養性細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の cysteine synthase と硫黄同化代謝
……○亀谷 将史[1,2], 中山 宗一郎[1], 新井 博之[1,2], 石井 正治[1,2]
（[1]東大院・農生科, [2]東大・微生物連携機構）

16:30 2Bp14 タンパク質酸化能を有する *Penicillium citrinum* AIU Z26-4-8 由来オキシダーゼ遺伝子のクローニングと異宿主による発現検討
……○髙嶋 大輝[1], 前田 航[1], 土屋 高伸[1], 新谷 智子[2], 五味 勝也[2], 下飯 仁[1], 山田 美和[1]
（[1]岩手大院・連農, [2]東北大院・農）

16:42 2Bp15 電子伝達向上を目指した酵素分子-電極間の距離制御によるバイオデバイスの設計
……○多喜 俊介[1], 中村 卓登[1], 高村 映一郎[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]福井大学院・工・繊維, [2]福井大学院・工・生物応用化, [3]福井大学・生命セ, [4]香川大・農, [5]大工大・工）

16:54 2Bp16 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[1], 坂元 博昭[1,2], 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]福井大学・ライフセ, [3]福井大学院・工・生物応用化, [4]香川大・農, [5]大工大・工）

17:06 2Bp17 酵素カスケードシステムとレドックスポリマーを用いたアミノ酸バイオ電池用アノード電極の開発
……○堀永 晃作[1], 里村 武範[1,2], 高村 映一郎[1], 坂元 博昭[1,2], 櫻庭 春彦[4], 大島 敏久[5], 末 信一朗[3]
（[1]福井大院・工, [2]福井大・生命セ, [3]福井大, [4]香川大・農, [5]阪工大院・工）

17:18 2Bp18 高性能バイオデバイスに向けた部位特異的変異導入による 超好熱性アーキア由来マルチ銅オキシダーゼの酸化還元電位改変
……○高村 映一郎[1], 多喜 俊介[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]福井大学院・工・繊維, [2]福井大学院・工・生物応用化, [3]福井大学・生命セ, [4]香川大・農, [5]大阪工大）

C 会場　B21（13:30〜14:42）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

13:18　接続チェック（12 分）

13:30　2Cp01　*Clostridium cellulovorans* と *Clostridium beijerinckii* による温州みかん残渣からの IBE 発酵
……○富田 寿男[1], 岡﨑 文美[1,2,3], 田丸 浩[1,2,3]
（[1]三重大院・生資, [2]三重大・先端科学研支バイオインフォ, [3]三重大・スマートセルイノベ研）

13:42　2Cp02　*Clostridium cellulovorans* およびメタン生成菌の共培養によるシュガービートパルプからのバイオメタンガス生産
……富田 寿男[1], ○岡﨑 文美[1,2,3], 田丸 浩[1,2,3]
（[1]三重大院・生資, [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）

13:54　2Cp03　Enhanced methanogenesis of cellulose by addition of nanobubble water
……○Xuezhi Wang, Tian Yuan, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu, Zhenya Zhang
（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

14:06　2Cp04　Efficient biomethane production from anaerobically digested ammonium-rich waste under optimal illumination condition
……○Yunxin Zhu, Hanying Zheng, Nan Zhang, Yingnan Yang
（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

14:18　2Cp05　雑草中の水溶性成分および非水溶性成分をそれぞれ基質としたメタン発酵における微生物相解析
……○松田 修平, 大槻 隆司（山梨大院・医工農）

14:30　2Cp06　河口底泥からの海洋性キチン分解菌叢の探索と VFAs 生産
……○脇 滉[1], 早瀬 伸樹[1], 中島田 豊[2], 喜多 晃久[1]
（[1]新居浜高専, [2]広島大院・統合生命科学）

C 会場　B21（14:54〜17:06）

【発酵生理学，発酵工学】

14:42　休憩・接続チェック（12 分）

14:54　2Cp07　*Saccharomyces cerevisiae* 由来のグリセロール資化性酵母の育種とグリセロールからのエタノール発酵
……○Zhang Kuan[1], 中西 昭仁[1,2], 軽部 征夫[1,2]（[1]東京工科大院・バイオニクス, [2]東京工科大・応生）

15:06　2Cp08　Quality improvement of terasi, Indonesian shrimp paste, by monitoring the microorganism composition during controlled fermentation
……○Arisa Sato[1,2], Dea Indriani Astuti[2], Sastia Prama Putri[1,2], Eiichiro Fukusaki[1]
（[1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Biotechnol., Sch. of Life Sci. and Technol., Inst. of Technol. Bandung）

15:18　2Cp09　セルロース系バイオマスを原料とするカフェ酸発酵のためのゲノム編集による大腸菌代謝改変の作製と培養法の検討
……○川口 秀夫[1], 宮崎 翔子[1], 寺本 潤[2], 西田 敬二[2], 南 博道[3], 佐塚 隆志[4], 近藤 昭彦[1,2]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大・先端バイオ工セ, [3]石川県大・生物資源研,
[4]名古屋大・生物機能セ）

15:30　2Cp10　発酵阻害物質に高い耐性を持つスリランカの酵母
……○外山 博英[1,2], Maduka Subodinee[2], 水谷 治[1,2]（[1]琉球大・農, [2]鹿児島大院・連農）

15:42　2Cp11　新奇キシロース資化性ラビリンチュラのキシロース代謝経路とメタボローム解析
……○林 雅弘[1], 松田 綾子[1], 長岡 綾[1,2]（[1]宮崎大・農, [2]林兼産業）

15:54 2Cp12 好熱菌プロバイオティクスを給与した豚における筋タンパク質の構成変化
……○鷺 陽香[1], 高木 誠仁[2], 西内 巧[3], 宮本 浩邦[1,4,5], 佐藤 成樹[6], 児玉 浩明[1]
([1]千葉大院・園芸, [2]千葉大院・融合, [3]金沢大・学際, [4]サーマス（株）, [5]理研・生命医科学, [6]千葉大院・理学)

16:06 休憩・接続チェック（12 分）

16:18 2Cp13 好熱菌発酵産物の給与がブタ腸内の乳酸資化菌 *Megasphaera elsdenii* の有機酸代謝に与える影響
……○板谷 かえで[1], 荒岡 亮祐[1], 宮本 浩邦[1,2,3], 児玉 浩明[1]
([1]千葉大院・園芸, [2]サーマス, [3]理研・生命医科学)

16:30 2Cp14 好熱性アセトジェン *Theromoanaerobacter kivui* の代謝改変によるエタノール生産
……○登木 耕陽, 佐藤 悠, 岡野 憲司, 本田 孝祐（阪大院・工）

16:42 2Cp15 有機性廃棄物の二次資源化に向けた天然菌叢とアセトジェンの共培養システムの開発
……○佐藤 悠[1], 佐々木 由佳[1], 登木 耕陽[1], 岡野 憲司[1], 木村 浩之[2], 本田 孝祐[1]
([1]阪大院・工, [2]静大・グリーン科技研)

16:54 2Cp16 *C.necator* 組換え株の化学合成独立栄養条件下での回分培養による 3-ヒドロキシ酪酸と 3-ヒドロキシヘキサン酸の共重合ポリエステルの CO_2 からの生合成
……○鈴木 尚幸[1], 宮本 樹里[1], 折田 和泉[2], 福居 俊昭[2], 田中 賢二[1]
([1]近畿大・産理工, [2]東工大・生命理工)

D 会場　B32（13:30〜17:30）

【遺伝子工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 2Dp01 超好熱性アーキア由来キチナーゼ ChiC の細胞膜局在化に関与するアミノ酸配列の同定
……○渡邉 大輔, Aslam Mehwish, 山田 将大, 金井 保, 跡見 晴幸（京大院・工）

13:42 2Dp02 超好熱性アーキア *Pyrococcus chitonophagus* がもつキチナーゼの遺伝学的機能解析
……山田 将大, 中田 菜月, Aslam Mehwish, ○金井 保, 跡見 晴幸（京大院・工）

13:54 2Dp03 *Pseudomonas* sp. TB-97 株によるテレフタル酸からの有用物質生産
……○金森 拓[1], 中島 鈴佳[1], 岡村 匡浩[1], 内堀 孝博[2], 中島 敏明[1]
([1]筑波大院・生命環境, [2]パナック工業株式会社)

14:06 2Dp04 コアグラーゼ陰性ブドウ球菌由来アシル化ホモセリンラクトン分解酵素の機能解析
……○上村 哉生樹[1], 染谷 信孝[2], 諸星 知広[1]（[1]宇都宮大院・工, [2]農研機構）

14:18 2Dp05 納豆菌のポリ - γ - グルタミン酸生産に関与する高度に保存された Yj g F/YER057 c /UK114 ファミリータンパク質
……○木村 啓太郎[1], ル ティ トゥ ホン[1], 八谷 剛史[2,3], 長谷 純嵩[2], 志波 優[4], 吉川 博文[4,5], 榊原 康文[2]
([1]農研機構・食品, [2]慶應大・理工, [3]岩手医大・メディカル・メガバンク, [4]東農大・応生科, [5]東農大・ゲノム)

14:30 2Dp06 ビフェニル/PCB 分解細菌 *Rhodococcus wratislaviensis* T301 株の色素脱色型ペルオキシダーゼの発現
……○渡邊 崇人[1], 木村 信忠[2], 末永 光[3], 廣瀬 遵[4], 二神 泰基[5], 陶山 明子[6], 藤原 秀彦[6], 後藤 正利[7], 古川 謙介[6]
([1]京大・生存研, [2]産総研・生物プロセス, [3]産総研・創薬基盤, [4]宮崎大・工, [5]鹿児島大・農, [6]別府大・食物栄養, [7]佐賀大・農)

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 2Dp07 D-サイクロセリン生産性放線菌のゲノムマイニング
……○矢尾井 健人[1], 黒田 照夫[2], 森田 大地[2], 熊谷 孝則[2]
([1]広大・薬, [2]広大院・医系科学)

15:06 2Dp08 プロモーターおよびターミネーターがビフィズス菌の遺伝子発現に与える影響
……○小酒井 智也[1], 下総 葉子[2], 野村 泉[3], 鈴木 徹[3]
([1]岐阜大院・連農, [2]岐阜大院・自科技, [3]岐阜大・応生科)

15:18 2Dp09 マクロピノサイトーシス誘起ペプチドを利用した海洋性紅色光合成細菌の新規形質転換系の開発
……○樋口 美栄子, 沼田 圭司（理研・環境資源）

15:30 2Dp10 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のビスフェノール A (BPA)分解能の不安定化評価法の構築
……○村上 将和[1], 仲野 育惠[1], 松村 吉信[2]（[1]関西大・生命生物工, [2]関西大・ORDIST）

15:42 2Dp11 放線菌線状プラスミドの接合伝達に対する *ttrA* の影響
……○深田 悠太[1], 大橋 沙季[1], 丸山 直也[1], 池田 治生[2], 片岡 正和[1]
([1]信州大院・生命医工, [2]北里大・北里生命研)

15:54 2Dp12 枯草菌を宿主とした低毒性物質で誘導可能なタンパク質発現系の開発
……○広岡 和丈（福山大・生命工）

16:06 休憩・接続チェック（12 分）

16:18 2Dp13 ポリヒドロキシアルカン酸生産菌で機能する転写制御スイッチの確立
……○平山 歩夢[1], 折田 和泉[1], 中村 聡[1], 梅野 太輔[2], 福居 俊昭[1]
([1]東工大・生命理工, [2]千葉大院・工)

16:30 2Dp14 *Methylorubrum extorquens* における C_1 化合物代替資化経路の構築
……○平林 翼[1], 折田 和泉[1], 新田 克章[2], 中村 聡[1], 福﨑 英一郎[2], 福居 俊昭[1]
([1]東工大・生命理工, [2]阪大院・工)

16:42 2Dp15 枯草菌の正常株および発芽システム欠損株の混合培養系における発芽のための相補条件
……○坂元 仁[1], 土戸 哲明[1], 古田 雅一[1,2] ([1]阪府大・微生物制御研究センター, [2]阪府大院・工・量子)

16:54 2Dp16 環境汚染物質依存性の生物学的封じ込めシステムの開発
……○石川 聖人, 飯尾 魁, 堀 克敏（名大院・工）

17:06 2Dp17 微生物細胞内 mRNA 直接検出法による遺伝子発現の可視化
……○堀尾 京平[1], 高橋 宏和[2], 加藤 節[1,2], 小堀 俊郎[3], 秋 庸裕[1,2], 中島田 豊[1,2], 岡村 好子[1,2]
([1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・統合生命科学, [3]農研機構)

17:18 2Dp18 磁性細菌のマグネトソーム遺伝子領域の改変による磁気微粒子合成能の制御
……○新垣 篤史, 丸山 実菜, 依田 卓東, 松永 是（農工大院・工）

E 会場　D12（13:30～16:30）

【分類，系統，遺伝学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 2Ep01 *Acer palmatum* 樹皮からの未培養細菌の探索と *Abditibacteriota* 門に属する新規微生物の全ゲノム解析
……○小林 和輝, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

13:42 2Ep02 大腸菌の実験室進化による金属イオン利用能の置換検討
……○川上 了史[1], 堀内 祐貴[2], 大石 悠起子[2], 関田 美沙[2], 山口 紘武[2], 宮本 憲二[1]
([1]慶大・理工, [2]慶大院・理工)

13:54 2Ep03 16S rDNA 解析を用いたスサビノリ共在細菌叢の網羅的解析と地域性
……○實野 佳奈[1], 井手 圭吾[1,2], 有川 浩司[3], 松永 浩子[3], 齋藤 寛[4], 竹山 春子[1,2,3,5]
([1]早大院・先進理工, [2]産総研 CBBD-OIL, [3]早大ナノライフ創新研, [4]東海大院, [5]先進生命動態研)

14:06 2Ep04 キノコ成分による歯周病原性細菌のバイオフィルム抑制成分の検索
……○阿座上 弘行[1], 飯田 亮平[1,2], 會見 忠則[3]
([1]山口大院・創科・農, [2]鳥取大院・連農, [3]鳥取大・農)

14:18 2Ep05 ランタノイド Sm は *Methylorubrum* 属細菌の低栄養環境下での生育を促進させる
…… ○水野 洸介, 原田 雄斗, 岩本 悟志, 島田 昌也, 早川 享志, 中川 智行
（岐阜大・院・自然科学）

14:30 2Ep06 乳酸菌の菌体脂肪酸に 10OH オクタデカン酸が出現する培養条件について
…… ○鈴木 健一朗, 平塚 功尚, 柴野 麻由, 増子 穂, 宮崎 穂乃香, 茂木 太極, 中山 俊一, 門倉 利守
（東農大・応生科）

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 2Ep07 ホウレンソウのポストハーベストにおける菌叢変遷と鮮度劣化への PPFMs の関与
……○Wang Lun[1], 繁原 安美[2], 阪口 由佳[3], 谷 明生[4], 中野 浩平[1], 島田 昌也[2], 早川 享志[2], 中川 智行[2]
（[1]岐阜大院・連農, [2]岐阜大・応生科, [3]岐阜大院・自然科学, [4]岡山大・資源植物科研）

15:06 2Ep08 エタノール発酵能の違いは種の違い？南極産担子菌酵母 *Mrakia blollopis* の全ゲノム解析による種の再検討
…… ○辻 雅晴[1], 石原 潤一[2], 高橋 弘喜[2], 野口 英樹[3]
（[1]国立極地研, [2]千葉大・医真菌研究セ, [3]データサイエンス共同利用基盤施設）

15:18 2Ep09 鰹節のかび付け工程で働く好乾性糸状菌の菌叢解析
…… ○中林 麗奈[1], 木村 行宏[1], 横田 仁子[2], 土居 幹治[2], 竹中 慎治[1]
（[1]神戸大院・農, [2]マルトモ）

15:30 2Ep10 鰹節カビ *Aspergillus* 属糸状菌が生産する加水分解酵素の解析
……○小川 千晶[1], 中林 麗奈[1], 上村 真理子[2], 木村 行宏[1], 横田 仁子[3], 土居 幹治[3], 竹中 慎治[1]
（[1]神戸大院・農, [2]神戸大・農, [3]マルトモ）

15:42 2Ep11 原油湧出地由来の異化的硫酸塩還元トルエン分解細菌の分離およびゲノム解析
…… ○杉本 岳人, 佃 怜奈, 中村 浩平（岐阜大院・自科）

15:54 2Ep12 ジャンボファージ RSP13 と RSL28 の特殊なゲノム DNA の解析
…… ○川崎 健, 大戸 駿弥, 山田 隆（広島大院・統合生命科学）

16:06 2Ep13 洗濯工程における衣類等に付着する微生物叢変動の解析と微生物細胞付着評価法の構築
…… ○野田 浩史[1], 奥田 裕暁[1], 山中 優志[2], 冨岡 敏一[2], 脇田 克也[3], 松村 吉信[1,2,4]
（[1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工, [3]パナソニック・アプライアンス社, [4]関西大・ORDIST）

16:18 2Ep14 コシヒカリの頑健、大粒、早晩生同質遺伝子リソース「コシヒカリ駿河シリーズ」の開発
…… ○富田 因則（静大・グリーン科技研）

F 会場　D23（13:30～17:18）

【バイオセンシング，分析化学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 2Fp01 がん診断のための高感度で前処理不用なインタクトエクソソームセンシング
…… 森 貴翔, 清水 拓, 片山 航, 源 和晃, 高野 恵里, 砂山 博文, 北山 雄己哉, ○竹内 俊文
（神戸大院・工）

13:42 2Fp02 新規 LC/ESI-MS/MS 定量法による 3 種の麹のエルゴチオネイン含量測定
…… ○堀江 裕紀子[1,3], 後藤 綺花[2], 今村 梨子[2], 伊藤 麻里[3], 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）

13:54 2Fp03 画像解析によるプローブ粒子の液中拡散挙動に基づいた MRSA DNA センサの開発
……○松島 雛子[1], 一木 啓志[1], 童 俞靜[2], 莊 漢聲[2], 高村 映一郎[1], 里村 武範[1], 坂元 博昭[1], 末 信一朗[1]
([1]福井大院・工, [2]台湾國立成功大學・生物醫學工程學系)

14:06 2Fp04 溶解度パラメータを NMR 記述子から予測するマテリアルズインフォマティクス戦略
……○黒谷 篤之[1], 柿内 俊文[2], 伊藤 研悟[1], 菊地 淳[1,3,4]
([1]理研・環境資源, [2]AGC 中央研究所, [3]横市院・生命医, [4]名大院・生命農学)

14:18 2Fp05 多角的分析データを用いたポリマー物性予測システムの構築
……○坂田 研二[1], 菊地 淳[1,2,3] ([1]理研・環境資源, [2]横市院・生命医, [3]名大院・生命農)

14:30 2Fp06 QCM を用いたベタイン型添加剤による ELISA の高感度化機構解析
……○三宅 子龍, 甲元 一也 (甲南大院・フロンティアサイエンス)

14:42 休憩・接続チェック (12 分)

14:54 2Fp07 哺乳類嗅覚受容体発現細胞パネルによる気相中におい分子検出技術の開発と官能評価応用への展開
……○福谷 洋介[1,2], 木田 仁[2,3], Mainland Joel D[4], 養王田 正文[1], 松波 宏明[2]
([1]農工大・院工・生命工, [2]デューク大・医・分子遺伝, [3]農工大・院工・機械システム, [4]モネル化学感覚研究所)

15:06 2Fp08 顕微ラマン分光法及び多変量スペクトル分解法を用いた生理活性物質 penicillin 及び avermectin の菌体内検出
……○堀井 俊平[1,2], 安藤 正浩[3,4], 中島 琢自[5], アショク サムエル[3], 松本 厚子[5], 高橋 洋子[5], 竹山 春子[1,2,3,6]
([1]早大院・先進理工, [2]産総研・CBBD-OIL, [3]早大・ナノライフ創新研, [4]JST・さきがけ, [5]北里大・生命科学研, [6]早大・理工総研)

15:18 2Fp09 微小液滴作製技術を応用したサンゴ共在微生物の高精度な単一細胞ゲノム解析技術の確立
……○西川 洋平[1,2], 細川 正人[3], 井手 圭吾[1,4], 小川 雅人[1,4], 竹山 春子[1,2,3,4]
([1]産総研・早大 CBBD-OIL, [2]早大・ナノライフ創新研, [3]早大・理工総研, [4]早大院・先進理工)

15:30 2Fp10 腸管組織内共生日和見細菌アルカリゲネス菌の形態変化に伴う、シトクロム c 蓄積と宿主細胞のアポトーシス誘導
……○柴田 納央子[1,2], 國澤 純[2,3,4,5,7], 安藤 正浩[6,7], 細川 正人[8], 堀井 俊平[1,9], 細見 晃司[3], 竹山 春子[1,7,8,9], 清野 宏[2,10,11]
([1]早大院先進理工, [2]東大国際粘膜ワクチン開発研究セ, [3]医薬健栄研ワクチン・アジュバント研究セ, [4]阪大院歯学, [5]神戸大院医学, [6]JST さきがけ, [7]早大ナノライフ創新研, [8]早大理工総研, [9]産総研 CBBD-OIL, [10]UCSD 医学, [11]千葉大院医学)

15:42 2Fp11 防腐作用のシングルセル解析
……○宮原 佳子, 矢野 剛久, 久保田 浩美, 永井 智 (花王)

15:54 2Fp12 結合タンパク質を用いたアスタキサンチン分離法の確立
……○八木 周和[1], 原 清敬[1,2] ([1]静県大院・薬食生命, [2]静県大・食栄)

16:06 休憩・接続チェック (12 分)

16:18 2Fp13 質量顕微鏡を用いたコムギ葉(*Triticum aestivum*)断面におけるアゾキシストロビンの経時的分布可視化法の開発
……○生田 宗一郎[1], 福﨑 英一郎[1,2], 新間 秀一[1,2] ([1]阪大院・工, [2]阪大島津イノベーション共同研究講座)

16:30 2Fp14 質量イメージングによる組織内酵素活性可視化法の開発
……○竹尾 映美, 福﨑 英一郎, 新間 秀一 (阪大院・工)

16:42 2Fp15 グラフェン量子ドット－金ナノ粒子－ポリアニリンナノワイヤ複合体を用いた電気化学的バイオセンサーによるカニクイザル糞便からのＨＥＶの検出
……○竹村 謙信[1], Dutta Chowdhury Ankan[2], 李 天成[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]国立感染研, [4]浜医大・医・医学科)

16:54 2Fp16 ペプチドアレイを反応基盤とした、ミルク抗原ペプチド検出技術の開発
……○久保 智里[1], 栗本 昌樹[1], 田中 祐圭[2], 越智 浩[1], 阿部 文明[1], 大河内 美奈[2]
（[1]森永乳業, [2]東工大・物質理工）

17:06 2Fp17 CD 型マイクロ流路を用いた食品中のサルモネラ菌迅速検出
……○久保 いづみ（創価大・理工）

G 会場　D25（13:30〜15:30）

【抗体工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 2Gp01 CHO 細胞を用いたサメ由来重鎖抗体の全長発現と特性解析
……○江夏 朔, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史（阪大院・工）

13:42 2Gp02 PDIa4 is responsible for the folding and assembly of antibody in CHO cell
……○Masafumi Yohda[1], Kei Komatsu[1], Kento Kumon[1], Mayuno Arita[1], Masayoshi Onitsuka[2], Takeshi Omasa[3]
（[1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Fac. Eng., Tokushima Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.）

13:54 2Gp03 Functional production of human antibody by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*
……○Hung Hiep Huynh[1], Takuya Katayama[1,2], Toshihiro Sakamoto[3], Reiko Shinkura[2,3], Jun-ichi Maruyama[1,2]
（[1]Dept. Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo, [3]Inst. Quant. Biosci., The Univ. of Tokyo）

14:06 2Gp04 再構成型無細胞タンパク質合成系を用いた抗体-酵素融合タンパク質(Zipbodyzyme)の効率的合成
……○伊藤 玲奈[1], Almasl Alfi[1], 加藤 晃代[2], 兒島 孝明[1], 中野 秀雄[1]
（[1]名大院・生命農学, [2]iBody 株式会社）

14:18 2Gp05 タンパク質生産量を増大させる N 末端 SKIK ペプチドタグ配列に関する研究
……○古川 裕貴[1], 加藤 晃代[1,2], 中野 秀雄[1,2]（[1]名大院・生命農学, [2]iBody 株式会社）

14:30 2Gp06 ヒト免疫グロブリンは T 細胞受容体シグナルを抑制することで T 細胞を直接的に制御する
……○堀 采音[1], 藤村 孝志[2], 河本 正次[2]（[1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・統合生命科学）

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 2Gp07 リポソームを用いたキンギョ免疫法による scFv 断片の取得
……岡﨑 文美[1,3,4], 栗山 風貴子[1], 安達 優華[2], ○田丸 浩[1,3,4]
（[1]三重大院・生資, [2]三重大・生資, [3]三重大・先端科支バイオインフォ, [4]三重大・スマートセルイノベ研）

15:06 2Gp08 scFv 型抗体を発現するニワトリ B 細胞株 DT40 の樹立と利用
……○岡 知里, 野田 凌太郎, 曲 正樹, 徳光 浩, 金山 直樹（岡山大院・統合科学）

15:18 2Gp09 ニワトリ B 細胞株 DT40 における scFv 型抗体の発現効率の改善
……○野田 凌太郎, 岡 知里, 曲 正樹, 徳光 浩, 金山 直樹（岡山大院・統合科学）

G 会場　D25（15:30〜17:06）

【セル＆ティッシュエンジニアリング】

15:30　2Gp10　間葉系幹細胞の画像品質判定におけるロバストモデル構築手法の開発
……○竹本 悠人[1], 今井 祐太[1], 吉田 啓[1], 蟹江 慧[1], 加藤 竜司[1,2]
（[1]名大院・創薬, [2]名大・ナノライフシステム研究所）

15:42　2Gp11　画像解析技術による浮遊系細胞の細胞形態プロファイリング
……○久田 拓海[1], 藤谷 将也[1], 蟹江 慧[1], 加藤 竜司[1,2]
（[1]名大院・創薬, [2]名大・ナノライフシステム研究所）

15:54　2Gp12　細胞形態情報解析による神経系モデル細胞の薬剤応答プロファイリング
……○今井 祐太[1], 吉田 啓[1], 蟹江 慧[1], 飯田 円[2], 勝野 雅央[2], 加藤 竜司[1,3]
（[1]名大院・創薬, [2]名大院・医学, [3]名大・ナノライフシステム研究所）

16:06　休憩・接続チェック（12 分）

16:18　2Gp13　がん幹細胞モデル miPS-LLCcm の細胞形態の深層学習法による解析
……○杉山 友康[1], 相田 紗織[2], 西迫 栄[1], 笠井 智成[1], 佐藤 淳[1], 亀田 弘之[2]
（[1]東京工科大・応用生物, [2]東京工科大・コンピュータサイエンス）

16:30　2Gp14　がんの悪性度に関与するネスチンのテール領域とアクチン繊維の相互作用解析
……○水澤 愛衣[1], 須崎 萌[1], 山岸 彩奈[2], 長崎 晃[2], 貴嶋 紗久[3], 上田 太郎[4], 中村 史[1,2]
（[1]農工大院・工, [2]産総研・バイオメディカル, [3]産総研・生物プロセス, [4]早大院・先進理工）

16:42　2Gp15　ナノニードルを用いた繰り返し引っ張り試験による中間径フィラメントの可動性解析
……○中村 史[1,2], 須崎 萌[2], 水澤 愛衣[2], 山岸 彩奈[1], 飯嶋 益巳[3], 黒田 俊一[4]
（[1]産総研・バイオメディカル, [2]農工大院・工, [3]東農大・応生科, [4]阪大・産研）

16:54　2Gp16　高転移性マウス乳がん細胞の浸潤機構に関わる塩素イオンチャネル Clic1 の機能解析
……○山岸 彩奈[1], 伊藤 文恵[2], 金 賢徹[1,3], 中村 史[1,3]
（[1]産総研・バイオメディカル, [2]農工大, [3]農工大院・工）

H 会場　D32（13:30〜17:30）

【醸造学，醸造工学】

13:18　接続チェック（12 分）

13:30　2Hp01　醸造酵母からの異数性染色体株の新規選抜手法の開発
……○草場 裕貴[1], 山本 裕貴[1], 野口 英樹[2], 豊田 敦[2], 北垣 浩志[1]
（[1]佐賀大・農, [2]遺伝研）

13:42　2Hp02　酵母の染色体異数性が清酒醸造に与える影響と酵母育種への応用
……○堀田 夏紀[1], 小高 敦史[1], 松村 憲吾[1], 杉山 峰崇[2], 笹野 佑[3], 原島 俊[3], 秦 洋二[1], 石田 博樹[1]
（[1]月桂冠・総研, [2]阪大院・工, [3]崇城大・生物生命）

13:54　2Hp03　出芽酵母における GID 複合体遺伝子の変異がリンゴ酸生成とタンパク質発現に与える影響
……○根来 宏明[1], 松村 憲吾[1], 松田 史生[2], 清水 浩[2], 秦 洋二[1], 石田 博樹[1]
（[1]月桂冠・総研, [2]阪大院・情報）

14:06　2Hp04　**清酒酵母の変異処理によるリンゴ酸高生産株の育種と醸造特性評価**
……○馬場 嵩一朗[1], 澤田 和敬[2], 永野 幸生[1,3], 木村 圭[1,4], 玉置 尚徳[1,5], 後藤 正利[1,4], 小林 元太[1,4]
（[1]鹿児島大院・連農, [2]佐賀県工技セ, [3]佐大・分析セ, [4]佐賀大・農, [5]鹿児島大・農）

14:18 2Hp05 酵母において TTC 染色性に影響を及ぼす因子の探索

……○田中 純平[1], 高須 耀子[1], 山元 翔太[1], 久保田 恵理[2], 兼崎 友[2], 門倉 利守[1], 鈴木 健一朗[1], 中山 俊一[1]
([1]東農大・応生科, [2]東農大・ゲノムセ)

14:30 2Hp06 転写因子 *RDS2* が清酒酵母と実験室酵母の発酵能に及ぼす影響

……○大木 尭之, 桑山 翔一, 田中 純平, 門倉 利守, 鈴木 健一朗, 中山 俊一
(東農大院・農)

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 2Hp07 ホップに含まれるアデノシン分解活性の発見とビール醸造への応用可能性

……○太田 拓[1], 土屋 友理[1], 杉山 巧[2], 太田 惣介[1], 加藤 優[1], 今井 健夫[3], 稲留 弘乃[1]
([1]キリンホールディングス（株）酒類技術研究所, [2]キリンビール（株）名古屋工場, [3]キリンホールディングス（株）ものづくり人材開発センター)

15:06 2Hp08 ホップのアデノシン分解活性を活用したプリン体オフのビール系飲料の開発

……○土屋 友理[1], 太田 拓[1], 羽場 清人[2], 杉山 巧[3], 加藤 優[1], 今井 健夫[4], 稲留 弘乃[1]
([1]キリンホールディングス(株)酒類技術研究所, [2]キリンビール(株)商品開発研究所, [3]キリンビール(株)名古屋工場, [4]キリンホールディングス(株)ものづくり人材開発センター)

15:18 2Hp09 革新的醸造・分析技術が示す次世代酒米で醸成した清酒の風味

……○小林 拓嗣[1], 岩橋 佑真[2], 小松 夕子[1], 熊崎 努[1], 水上 留以[1], 児玉 詩織[1], 劉 利雲[1], 上垣内 宏司[1], 包 紅彬[1], 大作 理文[1], 齊藤 亮太[1], 矢澤 彌[1], 髙橋 正之[1], 織田 健[1], 奥田 将生[1], 田中 淳也[3], 有馬 秀幸[3], 清野 珠美[4], 廣岡 青央[4], 岩下 和裕[1,2]
([1]酒総研, [2]広島大院・統合生命科学, [3]山口県産技セ, [4]京産技研)

15:30 2Hp10 協会系酵母と系統の異なる清酒酵母に見られる葉酸の高蓄積とそれを維持する機構

……○柴田 裕介[1], 山田 翼[1], 藤井 力[2,3], 赤尾 健[2], 五島 徹也[2], 高橋 俊成[1], 田中 伸哉[1]
([1]菊正宗酒造, [2]酒総研, [3]福島大)

15:42 2Hp11 清酒酵母における老香を発生させにくい変異株の育種

……○槇本 純[1], 井上 豊久[1], 池田 優理子[2], 神田 涼子[2], 磯谷 敦子[2], 藤井 力[2], 中江 貴司[1]
([1]日本盛, [2]酒総研)

15:54 2Hp12 老香前駆体低生産性酵母からの自然突然変異カプロン酸エチル高生産性株の取得

……○池田 優理子[1], 神田 涼子[1], 磯谷 敦子[1], 藤井 力[1], 井上 豊久[2], 中江 貴司[2]
([1]酒総研, [2]日本盛)

16:06 休憩・接続チェック（12 分）

16:18 2Hp13 協会系酵母と近縁な広島 6 号酵母の特性解析及びその活用

……○山﨑 梨沙[1,2,3], 五島 徹也[2], 大場 健司[3], 大土井 律之[3], 赤尾 健[1,2]
([1]酒総研, [2]広島大院・統合生命科学, [3]広島総合技術研・食品工業技術セ)

16:30 2Hp14 白神こだま酵母より分離した高い冷凍耐性を有する胞子クローンの解析

……○福田 まみ[1], 浅内 由佳[2], 芦崎 瑞稀[2], 柴田 友香莉[2], 高橋 慶太郎[3], 中沢 伸重[1,2]
([1]秋田県大院・生資, [2]秋田県大・生資, [3]秋田総食研)

16:42 2Hp15 清酒酵母育種に向けた 4-VG 非生成株の判別方法の開発と自然環境における非生成株の分布と遺伝的解析

……○奥村 真衣[1], 吉村 明浩[3], 澤井 美伯[3], 正木 和夫[3,4], 向田 潤[5], 三井 亮司[5], 島田 昌也[1,2], 早川 享志[1,2], 中川 智行[1,2]
([1]岐阜大院・自然科学, [2]岐阜大・応生科, [3]岐阜県食品科学研, [4]酒総研, [5]岡山理大・理)

16:54 2Hp16 分離酵母 AB2 および SUNF5 株の同定と醸造特性

……○野地 秀和[1], 本間 裕人[2], 徳田 宏晴[2], 數岡 孝幸[2]
([1]東農大院・醸造, [2]東農大・醸造)

17:06 2Hp17 カプロン酸エチル高生産清酒酵母の育種と醸造特性の解析

……○大橋 正孝[1], 都築 正男[1], 清水 浩美[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)

17:18 2Hp18 ハイビスカス花から採取した泡盛酵母とその変異株の比較ゲノム解析を用いた特徴づけ
……○阿部 峻之[1], 豊川 洋一[2], 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）

I 会場　D34（13:30〜17:30）

【核酸工学／糖鎖工学／脂質工学／ペプチド工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 2Ip01 Baby Spinach アプタマーに対する三重鎖形成配列の付加による蛍光強度の増強および pH 応答性蛍光アプタマーの開発
……○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）

13:42 2Ip02 G カルテット構造による CpG ODN の免疫活性化能の向上
……○山崎 智彦[1,2], 星 和明[1], Tu Thi Tram Anh[1,2], 塚越 かおり[3], 津川 若子[3], 早出 広司[4], 池袋 一典[3]
（[1]物材研・機能性材料, [2]北大院・生命科学, [3]農工大院・工, [4]Joint Dept. Biomed. Eng., Univ. North Carolina at Chapel Hill）

13:54 2Ip03 GMD-GFT 二重破壊によりフコース結合糖鎖を検出限界以下にした CHO 細胞の樹立と解析
……○武智 大樹[1], 岩崎 将士[1], 三﨑 亮[1], 大橋 貴生[1,2], 藤山 和仁[1]
（[1]阪大・生工国際セ, [2]摂南大院・理工）

14:06 2Ip04 流路チップによるナノサイズダブルエマルジョンの連続生産系の構築および評価
……○牧野 祥嗣, 佐野 七海, 伊藤 伸哉（富山県大・工）

14:18 2Ip05 ビタミンE疎水部構造の違いと膜相分離
……○中谷 祐将[1], 下川 直史[1], 浦野 泰臣[2], 野口 範子[2], 高木 昌宏[1]
（[1]北陸先端大・マテリアル, [2]同志社大・医生命システム）

14:30 2Ip06 カチオンの構造に依存した負電荷脂質膜の相分離
……○永田 佳嗣[1], 引地 啓太[1], 秀瀬 涼太[2], 藤原 伸介[3], 下川 直史[1], 高木 昌宏[1]
（[1]北陸先端大・マテリアル, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]関西学院大・理工）

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 2Ip07 相模湾由来単離株 51-CS のメンブランベシクルの特性の解析
……○福井 瑞季[1], 倉田 淳志[2], 三好 柚紀[3], 山崎 思乃[4], 今井 友也[5], 栗原 達夫[6], 上垣 浩一[2]
（[1]近畿大院・農, [2]近畿大・農, [3]関西大院・理工, [4]関西大・化生工, [5]京大・生存研, [6]京大・化研）

15:06 2Ip08 大腸菌の *nlpI* 遺伝子が外膜小胞の生産量および特性に与える影響
……○尾島 由紘, 児波 克哉, 澤邊 朋美, 東 雅之（阪市大院・工）

15:18 2Ip09 変異導入 LEA ペプチドの発現による大腸菌の酸耐性の向上
……○池野 慎也[1], メトワリー キャレド[1,2]（[1]九工大院・生体工, [2]アイン シャムス大・農）

15:30 2Ip10 光学的特性を選択可能な金ナノ粒子グリーン合成ペプチドの効率的探索
……○田中 祐圭, 林 美伶, 高橋 雄太, 大河内 美奈（東工大・物質理工）

15:42 2Ip11 爆発性芳香族化合物の簡便・迅速な検出に向けた TNT 認識ペプチド修飾量子ドットの作製
……○児美川 拓実[1], Tamang Abiral[2], 田中 祐圭[1], Critchley Kevin[2], Evans Stephen[2], 大河内 美奈[1]
（[1]東工大・物質理工, [2]Sch. Phys. Astron., Univ. Leeds）

15:54 2Ip12 機能性高分子の epsilon-poly-L-lysine 修飾による細胞内送達法の確立
……○武内 大和[1], 牛丸 和乗[1], 加藤 康夫[2], 丸山 千登勢[1], 濱野 吉十[1]
（[1]福井県大院・生物資源, [2]富山県大・生医工研セ）

16:06 休憩・接続チェック（12 分）

16:18 2Ip13 生体膜透過性・水溶性の一挙改善を志向した機能性低分子化合物の oligo(beta-Lys)修飾
…… ○兼田 康平[1], 武内 大和[1], 加藤 康夫[2], 丸山 千登勢[1], 濱野 吉十[1]
（[1]福井県大院・生物資源, [2]富山県大・生医工研セ）

16:30 2Ip14 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], 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）

16:42 2Ip15 イネにおける新規な抗真菌タンパク質の探索
…… ○三井田 篤志[1], 落合 秋人[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）

16:54 2Ip16 ヒト iPS 細胞の未分化増殖を可能にする新規ペプチド化合物の分子進化工学的スクリーニング法による探索及び人工 FGFR アゴニストとしての機能解析
…… ○佐藤 将[1], 大貫 喜嗣[1], 升井 伸治[1,2], 川上 隆史[1,3,4], 黒澤 尋[1]
（[1]山梨大院・医工総, [2]山梨大学・発生研セ, [3]JST さきがけ, [4]MEXT 卓越研究員）

17:06 2Ip17 ペプチドアレイを利用した環状ペプチドの構造と配列の最適化
…… 小崎 一功[1], 鈴木 健弘[1], 清水 一憲[1], ○本多 裕之[1,2]
（[1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創成セ）

17:18 2Ip18 ジスルフィド架橋によるヘテロ二量体ペプチド合成法の開発と細胞内機能性ペプチド探索系への応用
……○小崎 一功[1], 清水 一憲[1], 本多 裕之[1,2]（[1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創成セ）

J 会場　E23（13:30〜17:18）

【タンパク質工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 2Jp01 新規人工タンパク質超分子 TIP60 のアセンブリ制御に向けたサブユニット間相互作用の解析
…… ○大原 直也[1], 川上 了史[2], 宮本 憲二[2]（[1]慶大院・理工, [2]慶大・理工・生命情報）

13:42 2Jp02 中空・多孔構造を有する人工タンパク質ナノ粒子 TIP60 の機能化
…… ○那須 英里圭[1], 川上 了史[2], 宮本 憲二[2]（[1]慶大院・理工, [2]慶大・理工・生命情報）

13:54 2Jp03 カイコ発現系を用いた White Spot Syndrome Virus（WSSV）抗原タンパク質の発現および評価
……○中西 崇文[1], Boonyakida Jirayu[1], Xu Jian[2], 佐藤 純[3], 加藤 竜也[1,2], 朴 龍洙[1,2]
（[1]静大・創科技院, [2]静大・グリーン科技研, [3]国立研究法人水産研究・教育機構）

14:06 2Jp04 外来タンパク質を内包するナノ粒子タンパク質発現系の構築
…… 石原 沙季, 立田 祐琳亜, 岡 拓二, ○平 大輔（崇城大・生物生命）

14:18 2Jp05 GroEL/GroES 複合体を利用した生細胞へのナノ粒子薬剤局所送達システムの検討
…… ○根木 麻耶加[1], 依田 ひろみ[2], 小池 あゆみ[1,2]（[1]神奈川工大院 応用化学・バイオサイエンス, [2]神奈川工大 バイオメディカル研究センター）

14:30 2Jp06 可逆的カチオン化転写因子タンパク質の生細胞内導入における効率と経路の検討
…… ○中野 智貴[1], 周 伯揚[2], 二見 翠[2], 二見 淳一郎[1]
（[1]岡山大院・統合科学, [2]岡山理大・工）

14:42 休憩・接続チェック（12 分）

14:54 2Jp07 自己ユビキチン化能を有する人工 RING finger の作製法
…… ○宮本 和英, 中谷 有沙, 齋藤 一樹（姫路獨協大・薬）

15:06 2Jp08 YFP 断片融合抗体プローブを用いたヒストン翻訳後修飾検出系の構築
…… ○大室（松山） 有紀, 北口 哲也, 木村 宏, 上田 宏（東工大）

15:18 2Jp09 抗体の配列柔軟性を利用した部分構造移植による機能性タンパク質の創出
……○阿久津 澪[1], 中澤 光[1], 二井手 哲平[1], 亀田 倫史[2], 宮田 健[3], 梅津 光央[1]
（[1]東北大院・工, [2]産総研・人工知能, [3]鹿児島大・農）

15:30 2Jp10 エピゲノム薬を用いた複合免疫療法における診断薬開発の基礎検討
……○勝河 祐希, Ahmadi Hannaneh, 本荘 知子, 二見 淳一郎（岡山大院・統合科学）

15:42 2Jp11 抗がん抗原抗体が認識するエピトープ解析とがん免疫サイクル活性化の評価
……○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・統合科学, [2]岡山大・医・細胞生物）

15:54 2Jp12 部位特異的ビオチン化と refolding assay を組み合せた neo-antigen スクリーニング法の開発
……○峯苫 智晴[1], 垣見 和宏[2], 二見 淳一郎[1]（[1]岡山大院・統合科学, [2]東大病院・免疫細胞治療）

16:06 休憩・接続チェック（12 分）

16:18 2Jp13 触媒活性を有する新規タンパク質繊維の開発
……○八木 創太[1], 赤沼 哲史[2], 山岸 明彦[3]
（[1]理研・生命機能, [2]早大・人間, [3]東薬大・生科）

16:30 2Jp14 量子ドットナノプローブを用いたアミロイドβオリゴマー形成阻害活性の評価法の開発
……○髙木 翔梧, 倉賀野 正弘, 徳樂 清孝（室工大院・工）

16:42 2Jp15 自動化微量ハイスループットスクリーニングシステムによるシソ栽培品種のアミロイドβ凝集阻害活性の詳細分析
……○島森 圭弥, 倉賀野 正弘, 佐々木 里奈, 上井 幸司, 徳樂 清孝（室工大院・工）

16:54 2Jp16 ヘパリンによるアミロイド凝集促進効果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], Pradipta Ambara R.[2], 田中 克典[2], 座古 保[1]
（[1]愛媛大院・理工, [2]理研）

17:06 2Jp17 MIF スーパーファミリータンパク質に対する抗リウマチ薬メトトレキサートの構造・機能解析
……○中垣 尊[1], 出茂 鮎美[2], 杉島 小雪[1], 面川 歩[3], 松村 洋寿[1], 尾高 雅文[1], 涌井 秀樹[1]
（[1]秋田大院・理工, [2]秋田大・理工, [3]秋田大院・医）

ランチョンセミナー

LS2-1 株式会社林原

S1 会場　A21（12:00〜12:50）

LS2-2 タカラバイオ株式会社

S4 会場　E11（12:00〜12:50）

LS2-3 株式会社島津製作所

S5 会場　E21（12:00〜12:50）

若手会総会・交流会／イブニングセッション

ピーチユニオン 3 階（18:00〜20:00）

第 3 日（9 月 18 日）

太字の一般講演は今年度の生物工学学生優秀賞（飛翔賞）受賞者の発表です.

開始時間	講演番号	演　　題	発表者氏名（所属） ○印は講演者を示す

シンポジウム・招待講演（午前の部）

S1 会場　A21（9:30〜11:30）

Recent Topics on Cultivation and Measurement: New Challenges by Start-Up Companies
「培養計測の最近のトピックス〜スタートアップ企業による新たな取り組み〜」
【本部企画】《国際シンポジウム》／招待講演

9:30　はじめに
…… 児島 宏之

9:35　3S-S1a01　**〈特別招待講演〉**　座長：**児島 宏之**
Next generation bioprocess development
……○Jochen Buechs
（AVT-Chair of Biochem. Eng., RWTH Aachen Univ., Germany）
座長：**安原 貴臣**

10:00　3S-S1a02　無細胞タンパク質合成系 -SDGs 実現の生産財として-
……○南 賢尚（NUProtein 株式会社）

10:25　休憩
座長：**富田 悟志**

10:35　3S-S1a03　High-resolution plant data for greenhouse agricultural production
…… ○Kotaro Takayama[1,2], Hiroto Kitagawa[3]（[1] EIIRIS, Toyohashi Univ. Technol., [2] Fac. Agric., Ehime Univ., [3] PLANT DATA Ltd.）
座長：**今井 泰彦**

11:00　3S-S1a04　Development of culture system using co-culture with food grade medium
……○Ikko Kawashima（IntegriCulture Inc.）

11:25　おわりに
…… 安原 貴臣

S2 会場　A41（9:30〜11:30）

大規模な遺伝子・ゲノムを扱うツールとしての接合伝達システムの開発と展望

9:30　はじめに
…… 板谷 光泰

座長：**板谷 光泰**

9:35 3S-S2a01 T4SS および放線菌接合伝達システムを如何に使うか
……○片岡 正和（信州大院・生命医工）

9:57 3S-S2a02 放線菌の特異な接合伝達と染色体移動
……○池田 治生（北里大・生命研）

座長：**片岡 正和**

10:19 3S-S2a03 大規模網羅解析への接合伝達システムの活用
……○森 浩禎[1,2], 藤田 愛[1,2], 片岡 正和[3], 牧 泰史[4], 田村 武幸[5], 松野 浩嗣[6], 高坂 智之[6], 山田 守[6]
（[1]奈良先端大・データサイエンス, [2]奈良先端大・バイオ, [3]信州大・工, [4]大阪医大, [5]京大・化研, [6]山口大・創成科学）

10:41 3S-S2a04 接合伝達の分子機構の応用
……○金子 真也[1], 板谷 光泰[2]（[1]東工大・生命理工, [2]慶大・先端生命研）

11:03 3S-S2a05 ゲノム合成に必須な接合伝達系
……○板谷 光泰（慶應大学先端生命研）

11:25 おわりに
……板谷 光泰

S3 会場　B41（9:30〜11:30）

インシリコタンパク質設計で加速するタンパク質工学・応用構造生物学

9:30 はじめに
……杉森 大助

座長：**杉森 大助**

9:32 3S-S3a01 蛍光バイオセンサーで解き明かす細胞内代謝
……○今村 博臣（京大院・生命）

9:55 3S-S3a02 人工タンパク質設計技術を用いたサメシングルドメイン抗体の高機能化
……○竹田 浩之（愛媛大・PROS）

座長：**三原 康博**

10:18 3S-S3a03 *In silico* タンパク質設計を実現する分子シミュレーション手法の構築
……○原田 隆平（筑波大・計算セ）

10:41 3S-S3a04 Structure and engineering of CRISPR-Cas9
……○Hiroshi Nishimasu（Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo）

11:04 3S-S3a05 演繹的学習と帰納的学習の融合:第四次革新的データマイニング法による蛋白質の人工設計
……○伊藤 創平, 中野 祥吾（静県大院・薬食生命）

11:28 おわりに
……三原 康博

S5 会場　E21（9:30〜11:30）

生体と対話するナノ界面科学

9:30 はじめに
……梅津 光央

座長：**梅津 光央**

9:32 3S-S5a01 体と対話するナノ界面科学： バイオとナノデバイスの共生、サイバー空間と生体のシームレスな会話に向けて
…… ○山下 一郎（阪大院・工）

座長：**大河内 美奈**

10:00 3S-S5a02 デバイスが理解できる言語を非天然アミノ酸として含むアプタマーの創製
…… ○鵜澤 尊規[1,2]（[1]理研・開拓研究本部, [2]理研・創発物性科学研究センター）

座長：**吉野 知子**

10:30 3S-S5a03 細胞と対話をする足場材料による細胞機能のアクティブ制御
…… ○松崎 典弥（阪大院・工）

11:00 3S-S5a04 Plasmonic endoscopy for single cell interrogation
…… ○Hiroshi Uji-i[1,2]（[1]RIES, Hokkaido University, [2]Department of Chemistry, KU Leuven）

11:28 おわりに
…… 吉野 知子

シンポジウム（午後の部）

S2 会場　A41（13:15〜15:15）

生合成工学における有用生体機能分子の次世代創製技術

13:15 はじめに
…… 丸山 千登勢

座長：**荒川 賢治**

13:17 3S-S2p01 抗生物質の生合成研究から見出した新規 tRNA 依存型アミド合成酵素の基質認識機構
…… ○丸山 千登勢, 濱野 吉十（福井県大・生物資源）

13:40 3S-S2p02 試験管内人工生合成系で擬天然物を創る
…… ○後藤 佑樹（東大院・理）

14:03 3S-S2p03 機能未知及び潜在的二次代謝遺伝子資源からの生理活性分子生産を実現する TAR Cloning
…… ○山中 一也[1], 老川 典夫[1], 濱野 吉十[2]（[1]関西大・化生工, [2]福井県大・生物資源）

座長：**丸山 千登勢**

14:26 3S-S2p04 精密解析に基づく多価不飽和脂肪酸生合成酵素の機能改変
…… ○林 祥平[1], 佐藤 康治[2], 小笠原 泰志[2], 大利 徹[2]
（[1]北大院・総合化学, [2]北大院・工）

14:49 3S-S2p05 制御因子・低分子シグナル分子による放線菌二次代謝の合理的人為制御
…… ○荒川 賢治（広島大院・統合生命科学）

15:12 おわりに
…… 荒川 賢治

S3 会場　B41（13:15〜15:15）

日本におけるバイオジェット燃料生産技術の最先端

13:15 はじめに
…… 乾 将行

座長：**乾 将行**

13:20 3S-S3p01 バイオジェット燃料の普及への取り組み
……○中島 陸博（日本航空）

13:42 3S-S3p02 微細藻類ユーグレナを活用したバイオ燃料事業化
……○鈴木 健吾[1,2]（[1]ユーグレナ, [2]理研・環境資源）

14:04 3S-S3p03 微細藻類を用いたバイオジェット燃料生産プロセスの構築
……○武藤 潤（ＩＨＩ ソリューション・新事業統括本部 藻類バイオ燃料グループ）

座長：**鈴木 健吾**

14:26 3S-S3p04 高性能噴流床ガス化と FT 合成による純バイオジェット製造パイロットプラントの研究開発
……○山内 康弘[1], 篠田 克彦[1], 菱田 正志[1], 坂井 清彦[2], 小嶋 保彦[3], 水野 拓哉[4]
（[1]三菱日立パワーシステムズ, [2]ＪＥＲＡ, [3]東洋エンジニアリング, [4]JAXA）

14:48 3S-S3p05 100%グリーンジェット燃料の生産技術開発への挑戦
……○乾 将行[1,2]（[1]RITE・バイオ, [2]奈良先端大・バイオ）

15:10 おわりに
……鈴木 健吾

S4 会場　E11（13:15〜15:15）

ペアで紹介します，Wet と Dry の融合研究

座長：**兒島 孝明**

13:15 3S-S4p01 シンポジウム「ペアで紹介します，Wet と Dry の融合研究」開催趣旨
……○堀之内 貴明（理研・生命機能）

13:22 3S-S4p02 植物病原糸状菌を制御する菌類ウイルスの探索とゲノム解析の迅速化
……水谷 行善[1], カラッサンチオ マッテオ[2], 太田 綺弥[1], 藤森 文啓[3], ○上坂 一馬[4], ○千葉 壮太郎[1]
（[1]名大院・生命農学, [2]ボローニャ大・農環食科技, [3]名大・遺伝子, [4]東京家政大・家政）

13:49 3S-S4p03 プロトン共役型オリゴペプチド輸送体の基質多選択性解析
……○伊藤 圭祐[1], ○河合 駿[2]（[1]静県大院・薬食生命, [2]住友化学）

座長：**堀之内 貴明**

14:16 3S-S4p04 麹菌摂取による宿主腸内細菌叢の改善および大腸炎の緩和
……○兒島 孝明[1], ○志水 元亨[2], 馬場 保徳[3], 中野 秀雄[1], 加藤 雅士[2]
（[1]名大院・生命農学, [2]名城大院・農, [3]石川県大・生物資源研）

14:43 3S-S4p05 集まると変わること：酵母のストレス応答，あるいは生物と物理の共同研究について
……○小田 有沙, ○畠山 哲央（東大院・総合文化）

15:10 おわりに
……兒島 孝明

一般講演（午前の部）

A 会場　A36（9:00〜11:24）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

8:48 接続チェック（12 分）

9:00 3Aa01 酸素ラジカル処理による植物バイオマスからのバイオエタノール生産量の改善
……○伊藤 奨[1], 酒井 杏匠[1], 伊藤 昌文[2], 堀 勝[3], 志水 元亨[1], 加藤 雅士[1]
（[1]名城大院・農, [2]名城大院・理工, [3]名古屋大・低温プラズマ研究セ）

9:12 3Aa02 セルロース系エタノール生産のための発酵阻害物質耐性馴養変異体における責任遺伝子変異の同定
……○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）

9:24 3Aa03 好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* 代謝改変株によるリグノセルロース系バイオマスを基質とした高温エタノール発酵
……○竹村 海生[1], Rahayu Farida[1], 岩崎 祐樹[2], 加藤 節[1], 田島 誉久[1], 青井 議輝[1], 加藤 純一[1], 中島田 豊[1]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]産総研）

9:36 3Aa04 バイオマス糖化液の成分分析データからのバイオエタノール生産予測
……○小西 正朗, 渡辺 一樹, 立花 成我（北見工大）

9:48 3Aa05 酵母カルチャーコレクションからのバイオエタノール生産のための優良酵母の選抜と評価
……○荻野 千秋[1], Kahar Prihardi[1], 近藤 昭彦[2]（[1]神戸大・工, [2]神戸大院・科技イノベ）

10:00 3Aa06 細胞表層提示システムに適した宿主酵母の開発
……○猪熊 健太郎, 北田 雄基, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦（神戸大院・科技イノベ）

10:12 休憩・接続チェック（12 分）

10:24 3Aa07 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与
……○松崎 浩明, 渡邉 翔介, 秦野 琢之（福山大・生命工）

10:36 3Aa08 デルタロドプシンによる ATP 再生を伴う物質生産性の向上
……○塩澤 優稀[1], 弘埜 陽子[2], 原 清敬[1]（[1]静県大院・薬食生命, [2]静県大・食栄）

10:48 3Aa09 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）

11:00 3Aa10 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の *aldA* による低栄養性の付与
……○加藤 弘将, 池ヶ谷 凌士, 新谷 政己, 吉田 信行（静大院・総合科技）

11:12 3Aa11 *Talaromyces cellulolyticus* におけるセルラーゼの発現誘導機構の解析と、その育種開発と培養手法への応用
……○矢萩 大貴[1], 吉田 エリカ[1], 深田 寛朗[1], 十倉 充範[2], 臼田 佳弘[1]
（[1]味の素バイオ・ファイン研, [2]味の素研究開発企画部）

B 会場　A37（9:00〜11:24）

【遺伝子工学】

8:48 接続チェック（12 分）

9:00 3Ba01 メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* におけるアルコールオキシダーゼ遺伝子 *AOX1* の発現解析
……○横尾 岳彦[1], 吉原 瑛梨奈[1,2], 小松崎 亜紀子[1], 梅村 真理子[2], 千葉 靖典[1]
（[1]産総研・創薬基盤, [2]東薬大・生科）

9:12 3Ba02 デルタロドプシン発現が出芽酵母の代謝に及ぼす影響
……○大塚 健介[1], 弘埜 陽子[2], 石井 寛子[3], 石井 純[3], 岡橋 伸幸[1], 戸谷 吉博[1], 原 清敬[2], 松田 史生[1]
（[1]阪大院・情報, [2]静県大・食栄, [3]神戸大院・科技イノベ）

9:24 3Ba03 RNA-seq による発酵阻害物質耐性酵母 KS47-1 株の耐性機構の解明
……○竹内 健人[1], 加藤 勇太[1], 荒川 知子[1], 堀内 淳一[2], 小西 正朗[3]
（[1]北見工大院・バイオ環境, [2]京都工繊院・分子化学, [3]北見工大・地域未来デザイン）

9:36 3Ba04 *Pichia pastoris* において分泌シグナル配列の１アミノ酸置換はタンパク質分泌生産量を劇的に増大させる

……○伊藤 洋一郎[1], 石上 美佐[2], 橋場 倫子[2], 中村 泰之[1], 蓮沼 誠久[1], 石井 純[1], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]高機能遺伝子デザイン技術研究組合）

9:48 3Ba05 イントロンによる発現増強を受けるルシフェラーゼコーディング領域内配列の解析

……○菊田 浩希[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）

10:00 3Ba06 出芽酵母の実験室進化により導入された遺伝子変異のグリセロール資化能への影響

……○曽根 政人[1], 高橋 駿輔[1], 河合 一輝[1], 古澤 力[2,3], 平沢 敬[1]
（[1]東工大・生命理工, [2]理研・生命機能, [3]東大・生物普遍性）

10:12 休憩・接続チェック（12 分）

10:24 3Ba07 酵母とヒト培養細胞で扱えるプラスミドでのヒトヒストン遺伝子の解析

……○小野 嵩弘[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, [2]山口大・中高温セ, [3]山口大・生命医工セ）

10:36 3Ba08 *Saccharomyces cerevisiae* SPY3 の高温ストレス適応機構

……磯崎 日奈子[1], 山崎 真澄[1], 澤田 俊[1], 工藤 大喜[1], Devanadera Allad[2], Grace Pait Ivy[2], Pajares Irene[2], Nayve Jr. Fidel Rey P.[2], ○杉山 峰崇[1]
（[1]阪大院・工, [2]フィリピン大ロスバニョス校・国立分子生物学バイオテクノロジー研究所）

10:48 3Ba09 出芽酵母における任意領域の染色体外環状 DNA 化技術の開発

……○生田 宗一郎, 久富 歩, 笹野 佑, 田口 久貴（崇城大院・工）

11:00 3Ba10 Cloning and expressing recombinant glutamate decarboxylase (GAD) for boost of GABA production in beer-producing yeast

……○Pik Kuan Low, John Chi-Wei Lan
（Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan 32003, R.O.C.）

11:12 3Ba11 陽性/陰性選択マーカーと蛍光タンパク質から成る 3 機能性新規融合タンパク質を用いた酵母遺伝子スイッチの開発

……○能崎 健太[1], 冨永 将大[1], 梅野 太輔[2], 近藤 昭彦[1,3], 石井 純[1,3]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]千葉大院・工, [3]神戸大・先端バイオ工）

D 会場　B32（9:00～11:24）

【生物化学工学】

8:48 接続チェック（12 分）

9:00 3Da01 芝生土壌における細菌および *Bacillus subtilis* の挙動解析

……○柴田 徹[1], 平野 皓巳[1], 鈴木 宏佳[2], 服部 新吾[3], 岩田 卓也[2], 早川 敏広[3], 荒木 希和子[1], 久保 幹[1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]理研グリーン, [3]ケイアイ化成株式会社）

9:12 3Da02 芝生土壌における土壌成分及び細菌の解析

……○平野 皓巳[1], 柴田 徹[1], 鈴木 宏佳[2], 岩田 卓也[2], 早川 敏広[2], 服部 新吾[3], 荒木 希和子[1], 久保 幹[1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]株式会社理研グリーン, [3]ケイアイ化成株式会社）

9:24 3Da03 ブタ糞から単離された優占乳酸菌 *Lactobacillus amylovorus* 由来の S-Layer Protein の 探索と機能性評価

……○浅野 風斗[1], 吉川 翔太[1], 宮原 平[1], 大野 博司[3], 宮本 浩邦[1,2,3], 児玉 浩明[1]
（[1]千葉大・園芸, [2]サーマス, [3]理研・生命医科学）

9:36 3Da04 ウグイス糞の諸特性と細菌叢の解析とその利用
……藤茂登 遥香[1], ○石本 弥子[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 3Da05 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（第 2 報）
……○菊田 実花, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

10:00 3Da06 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（第 2 報）
……○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）

10:12 休憩・接続チェック（12 分）

10:24 3Da07 Strategic formulation of spray dried synbiotic and kinetics study to prevent hyperphosphatemia
……○Ajeeta Anand, Hideki Aoyagi
（Faculty Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

10:36 3Da08 模擬微小重力環境が腸内有用細菌の諸特性に及ぼす影響の解析と利用
……○増田 亜理沙, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

10:48 3Da09 コレラトキシン B サブユニットを利用した、機能性ペプチドの細胞小器官への送達
……吉井 優也, 是石 真友子, ○佐藤 あやの（岡山大・工）

11:00 3Da10 昆虫細胞を用いた MERS コロナウイルス様ナノ粒子の調製
……高見 佳宏[1], 町田 佑樹[1], デオ ヴィピン クマル[2], ○加藤 竜也[1,3], 朴 龍洙[1,3]
（[1]静大院・総合科技, [2]静大・国際連携, [3]静大・グリーン科技研）

11:12 3Da11 微細藻の細胞分裂に及ぼす培養温度・光強度の周期的制御の影響
……○勝田 知尚, 森本 高章, 桑井 仁葵, 山地 秀樹（神戸大院・工）

E 会場　D12（9:00～11:24）

【生合成，天然物化学】

8:48 接続チェック（12 分）

9:00 3Ea01 含窒素生理活性化合物 maniwamycin の生合成経路の解析
……○藤田 昂大[1], 達川 綾香[2], 岸本 拓也[2], 福本 敦[3], 安齊 洋次郎[3], 荒川 賢治[1,2]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]広島大院・先端物質科学, [3]東邦大・薬）

9:12 3Ea02 放線菌 *Streptomyces rochei* のポリケチド抗生物質 LM の生合成に関与する P450 水酸化酵素の機能解析
……○手島 愛子[1], 近藤 寿志[1], 殿川 亜未[1], 小中 勇二[1], 板倉 康浩[1], 荒川 賢治[1,2]
（[1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・統合生命科学）

9:24 3Ea03 ブテノライド型シグナル分子の構造多様性およびゲノムマイニングへの応用
……○江口 雄聡[1], 住吉 美保[2], 手島 愛子[2], 荒川 賢治[1,2]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]広島大院・先端物質科学）

9:36 3Ea04 *Streptomyces* 属放線菌における二次代謝制御因子改変による 物質生産性プロファイルの解析
……○見崎 裕也, 岩國 美由季, 高橋 譲, 鈴木 敏弘, 木梨 陽康, 荒川 賢治
（広島大院・統合生命科学）

9:48 3Ea05 抗腫瘍抗生物質マイトマイシンの生合成解析
……○中川 陽[1], 小笠原 泰志[2], 大利 徹[2]（[1]北大院・総合化学, [2]北大院・工）

10:00 3Ea06 ポリグルタミン酸生合成における新規エピメリ化反応
……○佐藤 将太[1], 重松 真由子[1], 加藤 陽菜多[1], 小笠原 泰志[2], 大利 徹[2]
（[1]北大院・総合化学, [2]北大院・工）

10:12 休憩・接続チェック（12 分）

10:24 3Ea07 放線菌 *Streptoalloteichus hindustanus* が生産する新規カチオン性ホモポリアミノ酸の構造決定及びその抗菌活性評価

……○福本 響[1], 戸口 梨那[2], 荒川 賢治[3], 濱野 吉十[4], 老川 典夫[1,2], 山中 一也[1,2]
（[1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工, [3]広島大院・統合生命科学, [4]福井県大・生物資源）

10:36 3Ea08 放線菌 *Streptoalloteichus hindustanus* に見出した新規 PLP 非依存型 Diaminobutyric acid ラセマーゼの機能解析

……○尾崎 僚[1], 福本 響[1], 濱野 吉十[2], 老川 典夫[1], 山中 一也[1]
（[1]関西大院・理工, [2]福井県大・生物資源）

10:48 3Ea09 ポリ-D-ジアミノブタン酸生産放線菌 *Streptoalloteichus hindustanus* に見出した新規 D-ペプチド分解酵素の同定

……○宮脇 大輝[1], 福本 響[1], 濱野 吉十[2], 老川 典夫[1], 山中 一也[1]
（[1]関西大院・理工, [2]福井県大・生物資源）

11:00 3Ea10 藍藻のバイオフィルム形成に関与するプトレシン合成酵素の機能解析

……○木花 将[1], 解良 康太[1], 植村 武史[2], 五十嵐 一衛[2], 魚住 信之[1]
（[1]東北大院・工, [2]アミンファーマ研）

11:12 3Ea11 卵菌 *Saprolegnia* による生理活性多価不飽和脂肪酸 Arachidonic acid 生産

……○高野 真希[1], 吉村 英莉[2], 星野 一宏[1]（[1]富山大院・理工, [2]富山大・工・生命）

F 会場　D23（9:00～10:48）

【食品科学，食品工学】

8:48 接続チェック（12 分）

9:00 3Fa01 清涼飲料水中に添加した殺菌乳酸菌体の菌株判別 RNA-MLSA 法の開発

……○青山 冬樹（アサヒ飲料・技術研）

9:12 3Fa02 深海底泥由来食肉加工用プロテアーゼ生産菌の探索

……○寺内 美結, 藤井 大樹, 衛藤 晋一, 飯田 章博（三菱商事ライフサイエンス）

9:24 3Fa03 家畜の腸内機能の in vivo 評価モデルとしての家畜フローラマウスの開発

……○宮本 浩邦[1,2,3], 須田 亙[3], 朝倉 三貴[3], 加藤 完[3], 児玉 浩明[1,2], 服部 正平[3], 大野 博司[3]
（[1]千葉大・園芸, [2](株)サーマス, [3]理研・生命医科学）

9:36 3Fa04 Metabolic profiling of cocoa cake from *Forastero* cacao beans by GC/MS analysis

……○Abu Hanifah[1], Hendy Firmanto[2], Sastia Prama Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1]
（[1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Indonesian Coffee and Cocoa Res. Inst.）

9:48 3Fa05 Untargeted GC/MS-based metabolomic approach of coffee beans obtained from different altitude and various post-harvest processing

……○Sastia Putri[1], Fitri Amalia[1,2], Yusianto[3], Pingkan Aditiawati[2], Eiichiro Fukusaki[1]
（[1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Sch. Life. Sci. Tech., ITB, [3]ICCRI）

10:00 3Fa06 Untargeted metabolomics approach to monitor metabolite changes during pineapple ripening process

……○Muhammad Maulana Malikul Ikram[1], Sobir Ridwani[2], Sastia Prama Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1]
（[1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Agronom. Hort. Bogor Agricultural Univ.）

10:12 3Fa07 GC/MS に基づくメタボロミクスを用いた品種と生息環境による食用エビの分類

……○大戸 優妃奈, Putri Safira Latifa Erlangga, Putri Sastia Prama, 福﨑 英一郎（阪大院・工）

10:24 3Fa08 Non-targeted metabolomics approach for size-based prediction of *Litopenaeus vannamei* (white leg shrimp)

……○Safira Latifa Erlangga Putri[1], Felicia Irene Saputra[2], Magdalena Lenny Situmorang[2], Gede Suantika[2], Sastia Prama Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1]
（[1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Sch. Life Sci. and Tech., Institute Teknologi Bandung）

10:36 3Fa09 Metabolomics-based research for the evaluation of post-harvest quality of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured in different salinity

……○Sri Hayati [1], Sastia Prama Putri [1], Julie Ekasari [2], Eiichiro Fukusaki [1]
([1] Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2] Faculty of Fisheries and Marine Sci., Bogor Agricultural Univ)

G 会場　D25（9:00～11:24）

【生体医用工学／セル＆ティッシュエンジニアリング】

8:48 接続チェック（12 分）

9:00 3Ga01 ビタミンナノエマルションの角膜細胞浸透性を利用した新規点眼薬の開発

……○高木 昌宏 [1], 三宅 深雪 [2], 栗岡 昌利 [3], 辻野 義雄 [1,4], 下川 直史 [1]
([1] 北陸先端大・マテリアル, [2] ライオン・先進解析科学研, [3] ライオン・薬品研, [4] 岡山理大・経営)

9:12 3Ga02 Gel-in-Oil ナノエマルション開発による機能性分子の安定送達

……○井嶋 博之, 山本 惠美子, 重栖 佑次, 堺 裕輔（九大院・工）

9:24 3Ga03 共培養マイクロデバイスを搭載した微小電極アレイチップによる iPS 由来運動神経・骨格筋細胞評価プロセスの開発

……○古谷 太樹 [1], 清水 一憲 [1], 伊藤 卓治 [2], 岡田 洋平 [2], 本多 裕之 [1,3]
([1] 名大院・工, [2] 愛知医大・神経内科, [3] 名大・予防早期医療創成セ)

9:36 3Ga04 インジェクタブル金属イオン架橋コハク酸修飾キトサンハイドロゲルによる術後腹膜癒着防止効果の検討

……○三橋 健斗 [2], 戚 蟠 [2], 高橋 彬 [1], 太田 誠一 [2], 伊藤 大知 [2]
([1] 東大院・工, [2] 東大院・医)

9:48 3Ga05 過酸化チタンナノ粒子 (PAA -TiOx)の 細胞内傷害

……○小寺澤 翔太 [1], 荻野 千秋 [1], 西村 勇哉 [2], 近藤 昭彦 [2]
([1] 神戸大院・工, [2] 神戸大院・科技イノベ)

10:00 3Ga06 超音波応答性とがん細胞標的性を有するナノ液滴を用いた超音波力学的がん細胞殺傷法

……○加藤 慎也 [1], 仁宮 一章 [2]（[1] 金沢大院・自科, [2] 金沢大・新学術）

10:12 休憩・接続チェック（12 分）

10:24 3Ga07 アルギン酸カルシウムとゼラチンの混合ハイドロゲルの性質

……森 英樹, ○原 正之（阪大院・理）

10:36 3Ga08 UV 架橋コラーゲンゲル上で共培養したマウス神経幹細胞/前駆細胞と血管内皮細胞の観察

……○白岩 侑馬, 森 英樹, 原 正之（阪府大院・理）

10:48 3Ga09 中皮細胞選択的接着ペプチドを利用した癒着防止シートの開発

……○杉山 亜矢斗 [1], 蟹江 慧 [1], 宇都 甲一郎 [2], 荏原 充宏 [2], 緒方 藍歌 [3], 成田 裕司 [3], 加藤 竜司 [1,4]
([1] 名大院・創薬, [2] 物材機構, [3] 名大院・医, [4] 名大・ナノライフシステム研究所)

11:00 3Ga10 高濃度スペルミンによる体細胞から多能性幹細胞への脱分化

……○塩見 尚史（神戸女学院大・人間科学）

11:12 3Ga11 新規イミダゾリウム系カチオン性ラジカル重合開始剤による抗菌性樹脂の応用可能性

……○辻 俊一 [1], 前田 知貴 [2,3], 實廣 亜希子 [1], 此枝 優希 [1], 小泉 英樹 [1], 堀田 篤 [2]
([1] キリン HD・基盤研, [2] 慶大・理工・機械工, [3] 茨大・F 応用原子科研セ)

H 会場　D32（9:00〜11:24）

【醸造学，醸造工学】

8:48　接続チェック（12 分）

9:00　3Ha01　*Aspergillus luchuensis* におけるフェノール酸脱炭酸酵素遺伝子破壊による 4-VG 生成への影響
……○眞榮田 麻友美[1,2], 本底 麻綸[2], 渡嘉敷 建孝[3], 後藤 正利[1,4], 水谷 治[1,2], 上地 敬子[2], 平良 東紀[1,2]
（[1]鹿児島大院・連農, [2]琉球大・農, [3]石川種麹店, [4]佐賀大・農）

9:12　3Ha02　麹菌 *Aspergillus oryzae* における新規ピリチアミン耐性マーカー遺伝子 *thiI* の同定とゲノム編集への応用
…… ○戸所 健彦, 坂東 弘樹, 小高 敦史, 堤 浩子, 秦 洋二, 石田 博樹
（月桂冠・総研）

9:24　3Ha03　Mapping *hazekomi* on rice koji grains using β-glucuronidase expressing *Aspergillus oryzae* and mass spectrometry imaging
…… ○ Adinda Putri Wisman[1], Yoshihiro Tamada[2], Shuji Hirohata[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.）

9:36　3Ha04　黄麹菌が生産する難消化性澱粉分分解酵素の探索およびその応用
…… ○伊藤 俊彦, 臼井 俊晴, 藤田 直子, 橋爪 克己（秋田県立大・生資科）

9:48　3Ha05　白麹菌 *Aspergillus kawachii* における *laeA* ホモログ遺伝子の機能解析
……○門岡 千尋[1], 池田 萌[2], 森 一樹[3], 奥津 果優[2], 吉﨑 由美子[1,2], 髙峯 和則[1,2], 後藤 正利[1,4], 玉置 尚徳[1,2], 二神 泰基[1,2]
（[1]鹿児島大院・連農, [2]鹿児島大・農, [3]鹿児島高専・専攻科, [4]佐賀大・農）

10:00　3Ha06　白麹菌 *Aspergillus kawachii* における α-アミラーゼ AmyB の機能解析
…… ○山口 正晃[1], 門岡 千尋[2], 奥津 果優[1], 吉﨑 由美子[1,2], 髙峯 和則[1,2], 後藤 正利[1,3], 玉置 尚徳[1,2], 二神 泰基[1,2]
（[1]鹿児島大・農, [2]鹿児島大院・連農, [3]佐賀大・農）

10:12　休憩・接続チェック（12 分）

10:24　3Ha07　醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* の凝集機構の解析
…… ○白川 大地, 脇中 琢良, 渡部 潤（ヤマサ醤油・製造本部）

10:36　3Ha08　醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の産膜制御機構の解析
…… ○茂木 亮介, 渡部 潤（ヤマサ醤油・製造本部）

10:48　3Ha09　ビール類醸造時に亜鉛濃度が酵母発酵に及ぼす影響の解析
…… ○沓掛 登志子, 高橋 沙織, 伊藤 一恵, 稲留 弘乃（キリンホールディングス・酒類研）

11:00　3Ha10　キシロースを資化する *Saccharomyces cerevisiae* の非組換え育種の試み
……○平松 孝太郎[1], 頓名 洋[1], 今野 紗希[2], 東原 成美[2], 山崎 思乃[2], 片倉 啓雄[2]
（[1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工）

11:12　3Ha11　レアメーティングにより造成した酵母の耐熱性とエタノール耐性の評価
…… ○高橋 葵[1], 海道 直生[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）

I 会場　D34（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】

8:48　接続チェック（12 分）

9:00 3Ia01 基質酵素反応予測のための 機械学習に基づく予測モデルの構築方法の探索と評価
……○渡邉 直暉[1], 村田 昌浩[2], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[3], 荒木 通啓[2,3]
([1]神戸大院・工, [2]京大院・医, [3]神戸大院・科技イノベ)

9:12 3Ia02 データ・マイニングを駆使した糸状菌由来転写因子の結合配列環境と発現応答の関連性の解析
……○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・遺伝子解析施設)

9:24 3Ia03 転写制御ネットワーク網羅的解析技術を用いたイネ側根メリステムサイズの 調節機構の解明
……○安福 航希[1], 兒島 孝明[1], 犬飼 義明[2], 中野 秀雄[1]
([1]名大院・生命農学, [2]名大・農学国際セ)

9:36 3Ia04 大腸菌アンモニア輸送-同化ネットワークの定量的動力学モデルの構築
……○前田 和勲[1], Westerhoff Hans V.[2,3,4], 倉田 博之[1], Boogerd Fred C.[2]
([1]九工大, [2]VU Univ. Amsterdam, [3]Univ. Manchester, [4]Univ. Amsterdam)

9:48 3Ia05 FBA シミュレーションによる単波長光照射下におけるシアノバクテリアの光合成電子伝達経路のフラックス状態の解析
……○豊島 正和, 山本 千晶, 戸谷 吉博, 清水 浩（阪大院・情報）

10:00 3Ia06 ボトムアップジェネティクスによる生命現象のハイスループット再構成
……○中原 航, 青木 航, 植田 充美（京大院・農）

10:12 休憩・接続チェック（12 分）

10:24 3Ia07 ディープラーニングによるヒト・ミトコンドリア DNA の分類と解析
……○三宅 淳[1], 馬場 俊輔[1], 中村 隼雄[1], 新岡 宏彦[2]
([1]大阪大学・国際医工情報センター, [2]大阪大学・データビリティーフロンティア機構)

10:36 3Ia08 ホログラフィック顕微鏡から得られる画像情報を活用した細胞解析
……○岡田 光加[1], 山川 倫誉[1], 澤田 隆二[1,4], 今井 祐太[2], 岡田 真衣[2], 江連 徹[1], 加藤 竜司[2,3]
([1]島津製作所, [2]名大院・創薬, [3]名大・ナノライフシステム研究所,
[4]パーソル パナソニック HR パートナーズ株式会社)

10:48 3Ia09 微生物による物質生産のための文献検索支援ツールの開発
……○山田 洋平[1], 宮澤 せいは[2], 細山 哲[2], 梶原 茂樹[1], 飯田 順子[1], 川﨑 浩子[2], 白井 智量[3]
([1]島津製作所, [2]NITE・NBRC, [3]理研・CSRS)

11:00 3Ia10 動物の表現型材料として捉える体毛の物性特徴抽出
……○塚本 楓[1], 坂田 研二[2], 菊地 淳[1,2,3]
([1]横市大院・生命医, [2]理研・環境資源, [3]名大院・生命農学)

11:12 3Ia11 自家蛍光シグネチャーに基づく新規スクリーニング技術の開発: 酵母の油脂生産性を一細胞レベルで評価する
……○平山 智弘[1], 八幡 志央美[2], 高部 響介[2], 風間 春香[3], 高久 洋暁[3], 野村 暢彦[2,4], 八幡 穣[2,4]
([1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生命環境系, [3]新潟薬大・応生科,
[4]微生物サステイナビリティ研究センター)

J 会場　E23（9:00～11:24）

【環境工学，廃水処理技術】

8:48 接続チェック（12 分）

9:00 3Ja01 Self-Growth Inhibiting Mechanism of Comamonas testosteroni R2 grown on phenol
……○JABIR Mohd[1,2], Tomoka Nishimura[1], Ayaka Minoura[1], Kenshi Suzuki[1], Masahiro Honjo[1], Kensei Masuda[1], Yosuke Tashiro[1,3], Hiroyuki Futamata[1,3,4]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Innov. Cent. Agric. Adv. Bioprocess, Univ. Technol. Malaysia,
[3]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

9:12 3Ja02 Resource-competitive microbes can stably coexist by flexible metabolic network in a synthetic microbial ecosystem

…… ○ Fatma Azwani [1,2], Kenshi Suzuki [2], Masahiro Honjo [2], Kensei Masuda [3], Yasuhisa Saito [4], Yosuke Tashiro [3], Hiroyuki Futamata [2,3,5]

（[1] Inst. Tropical Agric. Food Security., Univ. Putra Malaysia., [2] Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [3] Dept. Appl. Chem. Biochem. Eng. Grad. Sch. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [4] Dept. Mat., Shimane Univ., [5] Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.）

9:24 3Ja03 モデル微生物生態系における時空間的不均一性と生態系機能維持機構

…… ○鈴木 研志 [1], 本荘 雅宏 [1], ファティマ アズワニ [2], 増田 健誠 [3], ジャビエル モハマド [1], 天野 光喜 [4], 田代 陽介 [3], 二又 裕之 [1,3,5]

（[1] 静大・創科技院, [2] Universiti Putra Malaysia, Inst. Tropical Agric., [3] 静大院・総合科技, [4] 静大・工, [5] 静大・グリーン科技研）

9:36 3Ja04 特異な自家熱型高温好気消化プロセスにおける劇的な細菌群集構造の変遷機構の解明

…… ○田代 幸寛, Cheng Huijun, 河野 祥尚, 朝倉 侑弥, 神田 晃佑, 福井 諒, 奥川 友紀, 酒井 謙二

（九大院・農）

9:48 3Ja05 微細藻類 *Acutodesmus acminatus* におけるユウロピウム吸着に及ぼす代謝機能の影響

…… ○古橋 康弘 [1], 本多 了 [2], 原-山村 宏江 [2], 長谷川 浩 [2]

（[1] 金沢大院・自科, [2] 金沢大・理工）

10:00 3Ja06 Nutrients removal and auto-aggregation capabilities of two microalgal strains isolated from algal-bacterial aerobic granular sludge

…… ○Marjangul Nuramkhaan, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu, Zhenya Zhang

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

10:12 休憩・接続チェック（12 分）

10:24 3Ja07 *Methylobacterium* sp. FD1 株のホルムアルデヒド代謝系酵素遺伝子とホルムアルデヒド培地での発現

…… ○島本 真奈, 米光 裕, 楠部 真崇（和歌山高専）

10:36 3Ja08 *Methylobacterium* sp. FD1 株由来ホルムアルデヒドジスムターゼ (Fdm1) の特性解析

…… ○井元 誠志, 米光 裕, 岸本 昇（和歌山高専）

10:48 3Ja09 対流型水処理装置における窒素浄化能の向上

…… ○早坂 洋輝, 荒木 希和子, 久保 幹（立命館大院・生命科学）

11:00 3Ja10 リン酸基修飾酵母による鉱物化誘導の解析

…… ○吉田 真実 [1], 木原 摩耶 [1], 尾島 由紘 [1], 五十嵐 幸一 [1], 吉田 朋子 [2], 東 雅之 [1]

（[1] 阪市大院・工, [2] 阪市大・複合先端研究機構）

11:12 3Ja11 *Rhodotorula mucilaginosa* が形成するバイオフィルムを用いた水溶液中からの金属回収

…… ○菅 道哉, 尾島 由紘, 東 雅之（阪市大院・工）

一般講演（午後の部）

A 会場　A36（13:30～15:18）

【酵素学，酵素工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 3Ap01 Comparative enzymological characterization of l-asparaginases from lactic acid bacteria

……○Kodchakorn Phetsri, Makoto Furukawa, Risa Yamashiro, Yuka Kawamura, Yosuke Toyotake, Mamoru Wakayama

（Coll. Life Sci.,Dept. Biotechnol.,Ritsumeikan Univ.）

13:42 3Ap02 アラレマイシン合成酵素から 5-アミノレブリン酸合成酵素 ALAS への機能改変
……○川口 潤, 森 ひかる, 岩井 伯隆, 和地 正明（東工大・生命理工）

13:54 3Ap03 ビフィズス菌の含硫アミノ酸代謝に関与する C-S リアーゼの解析
……○黒瀧 空, 松本 菜々恵, 吹谷 智, 横田 篤, 和田 大（北大院・農）

14:06 3Ap04 *Sulfolobus tokodii* 由来色素依存性 L-乳酸脱水素酵素の大腸菌を宿主とした発現系の構築
……○宇野 紘平[1], 里村 武範[1,2], 黒沢 則夫[3], 櫻庭 春彦[4], 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）

14:18 3Ap05 分岐鎖ポリアミンが超好熱菌の RNA ポリメラーゼ複合体に及ぼす影響
……○福田 萌子[1], 家森 優佳[1], 濱川 匡史[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）

14:30 3Ap06 好塩性アーキアにおけるグリコールアルデヒド代謝酵素の同定と解析
……○佐藤 喬章[1], 平田 晃右[1], 南 瞭子[2], 跡見 晴幸[1]
（[1]京大院・工, [2]京大・工）

14:42 3Ap07 PL14 ファミリーに属する新規ウルバンリアーゼ
……佐藤 嶺, 小林 慎太郎, 籾山 健太, ○大西 浩平（高知大・農）

14:54 3Ap08 生細胞内分子クラウディング環境の再構成への試み
……○田中 遼治, 青木 航, 植田 充美（京大院・農）

15:06 3Ap09 ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の酵素フマラーゼ(FumC)の生化学解析
……○片山 徳賢, 小山内 崇（明治大院・農）

B 会場　A37（13:30～15:18）

【酵素学，酵素工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 3Bp01 Domain structure and function of α-1,3-Glucanase from *Streptomyces thermodiastaticus* HF3-3
……○Niphawan Panti[1], Vipavee Cherdvorapong[1], Wassana Suyotha[2], Kazuyoshi Takagi[3], Shigekazu Yano[4], Yosuke Toyotake[1], Mamoru Wakayama[1]
（[1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Dept. Indust Biotechnol., Fac. Agro Indust., Prince of Songkla Univ., [3]Dept. Applied Chem., Fac. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [4]Dept. Biochem. Engineer., Grad. Sci Engineer., Yamagata Univ.）

13:42 3Bp02 Characterization of catalytic α-1,3-glucanase isozymes from *Paenibacillus glycanilyticus* FH11 by using *Brevibacillus* system; Essential for suppression and degradation of *Streptococcus mutans* biofilms
……○Rattanaporn Intuy[1], Takao Hibi[2], Takafumi Itoh[2], Wassana Suyotha[3], Shigekazu Yano[4], Mamoru Wakayama[1]
（[1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Dept. Biosci. Fukui Prefectural Univ., [3]Dept. Indus. Biotech. Fac. Agro-indus. Prince of Songkla Univ., [4]Grad. Sch. Sci. Eng., Yamagata Univ.）

13:54 3Bp03 *Spirochaeta thermophila* 由来 β-1,3 オリゴグルカンホスホリラーゼの諸性質
……○藤野 早瑛, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司（阪府大院・生環科）

14:06 3Bp04 麹菌 *Aspergillus oryzae* が生産するヘミセルラーゼの協調的作用
……○松沢 智彦, 矢追 克郎（産総研・生物プロセス）

14:18 3Bp05 *Talaromyces cellulolyticus* 由来グルクロノキシラナーゼの機能解析
……○中道 優介, Fouquet Thierry, 伊藤 祥太郎, 渡邊 真宏, 松鹿 昭則, 井上 宏之
（産総研・機能化学）

14:30 3Bp06 好冷性海洋細菌 *Psychroflexus torquis* 由来 β-1,3-キシラナーゼの酵素化学的諸性質
……○谷口 瑞季[1], 工藤 基徳[2], 荻野 千秋[3], 近藤 昭彦[2,3], 田丸 浩[1], 青木 恭彦[4], 岡崎 文美[1]
（[1]三重大院・生資, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]神戸大院・工, [4]三重大院・地域イノベ）

14:42 3Bp07 κ-カラギナーゼ生産菌の分離およびその酵素の性質
…… ○倉掛 昌裕, 石本 圭亮, 山岡 美桜, 筒井 莊周, 長岡 洋大（福山大・生命工）

14:54 3Bp08 糸状菌 *Aspergillus nidulans* がペクチン応答的に生産する細胞外酵素の解析
…… ○木島 尚輝[1], 山口 愛彩[1], 大堀 沙貴子[1], 鈴木 裕満[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）

15:06 3Bp09 微生物由来耐熱性 β-アミラーゼの性質と X 線結晶構造解析
…… ○田中 真奈, 西村 重徳, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司（阪府大院・生環科）

C 会場　B21（13:30～14:42）

【抗体工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 3Cp01 天然構造特異的認識モノクローナル抗体の作製とその評価
…… ○磯﨑 勇志, 湊元 幹太, 冨田 昌弘（三重大院・工）

13:42 3Cp02 抗体断片の熱安定性向上を目的としたバイオ情報を活用したライブラリーデザインサイクルの提案
…… ○服部 修平, 本田 亜由美, 二井手 哲平, 中澤 光, 梅津 光央（東北大院・工）

13:54 3Cp03 DlagArt 法を用いた T-cell recruiting 抗体取得のための迅速確実スクリーニング
…… 杉山 在生人, ○中澤 光, 伊藤 智之, 梅津 光央（東北大院・工）

14:06 3Cp04 機能的ナノボディ探索に向けた酵母表層提示システムの最適化
…… ○梶原 果穂[1,2], 青木 航[1,2], 植田 充美[1,2]（[1]京大院・農, [2]JST・CREST）

14:18 3Cp05 ペプチドバーコードを付加した抗体の結合能の定量評価
…… ○松崎 友星[1,2], 青木 航[1,2], 植田 充美[1,2]（[1]京大院・農・応用生命, [2]JST・CREST）

14:30 3Cp06 アルカリフォスファターゼ融合 scFv を用いたモノクローナル抗体樹立
…… ○加藤 三恵子[1], 羽生 義郎[2]（[1]バイオピーク, [2]産総研・バイオメディカル）

D 会場　B32（13:30～14:54）

【生物化学工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 3Dp01 超音波処理を用いて低分子化した Schizophyllan の抗アレルギー活性
…… ○湯浅 凌我, 高野 真希, 星野 一宏（富山大院・理工・生命工）

13:42 3Dp02 カチオン性ペプチド Poly(ε-L-lysine) のカルボジイミド架橋反応による修飾： 構造解析および抗菌性分散剤としての特性評価
…… ○武内 正輝, 竹原 宗範（滋県大院・工・材料科学）

13:54 3Dp03 *N*-アシル化ポリ(ε-L-リシン)誘導体の合成と抗菌活性の評価
……○吉田 修[1], 松井 旺大[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）

14:06 3Dp04 *Enterococcus* sp.の生産するバクテリオシン
…… ○竹内 諒, 西野 智彦（東京工科大院・バイオニクス）

14:18 3Dp05 低濃度オゾン水の生成と殺菌効果の評価
…… 松郷 誠一[1], ○滝口 昇[2], 平野 一哉[2], 靜 良治[3]
（[1]金沢大・VBL, [2]金沢大・理工, [3]レネロファーマ（株））

14:30 3Dp06 天然物由来成分による皮膚常在菌の増殖への影響
……○多賀 直彦, 本脇 那々子, 石黒 悠生（東海大・農）

14:42 3Dp07 粉末消石灰の「待ち受け消毒」条件下における消毒効果の評価
……○松崎 慎史, 上井 幸司, 山中 真也, 徳樂 清孝（室工大院・工）

E 会場　D12（13:30〜15:18）

【生合成，天然物化学／有機化学，高分子化学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 3Ep01 糸状菌シトクロム P450 の潜在機能を活用した トリテルペノイド生合成
……○大園 昂貴[1], 北岡 卓也[2], 一瀬 博文[2]（[1]九大院・生資環, [2]九大院・農）

13:42 3Ep02 担子菌が有するセスキテルペン合成酵素の機能解明と利用
……○増永 夏輝[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）

13:54 3Ep03 褐色腐朽担子菌 *Postia placenta* のシトクロム P450 を利用したプロトイルデン誘導体の合成
……○木村 紘也[1], 北岡 卓也[2], 一瀬 博文[2]（[1]九大院・生資環, [2]九大院・農）

14:06 3Ep04 ナギラクトン E とアネトールの併用によって生じる相乗的抗真菌メカニズム
……○上田 裕貴[1], 山口 良弘[1], 荻田 亮[1,2], 田中 俊雄[1], 藤田 憲一[1]
（[1]阪市大院・理, [2]阪市大・健康研セ）

14:18 3Ep05 梨幼果の水およびエタノール抽出成分が出芽酵母の寿命延長およびその関連遺伝子の発現に及ぼす影響
……○村田 和加惠[1,2], 長谷川 真梨菜[1], 藤井 雄三[1], 藤田 憲一[2], 山口 良弘[2], 田中 俊雄[2], 荻田 亮[2,3]
（[1]米子高専, [2]阪市大院・理, [3]阪市大・健康研セ）

14:30 3Ep06 線虫を用いた *Candida glabrata* 感染症のハイスループットな解析系の開発
……○竹葉 惇貴[1], 箕田 康一[1], 前田 淳史[2], 水野 貴之[1], 文谷 政憲[1]
（[1]徳島文理大院・工, [2]徳島文理大・理工）

14:42 3Ep07 *Aspergillus* sp. S17-5 の産生するヒドロキシヘキシルイタコン酸の構造解析と生理活性評価
……○野村 友佑[1], 佐野 芽生[1], 小原 仁実[1], 和田 一仁[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&B 企画部）

14:54 3Ep08 Concentration of chitosan-like polysaccharide from the cultures of Citrobacter spp. and its crystalline nano/microfiber formation.
……○Priyanka Baranwal, Seiji Negoro, Masahiro Takeo
（Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo）

15:06 3Ep09 ベタイン型添加剤による酵素活性化と水和分子間相互作用の相関
……○青木 拓真, 甲元 一也（甲南大院・フロンティアサイエンス）

F 会場　D23（13:30〜14:54）

【センサー，計測工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 3Fp01 改変型ストレプトリジン O を用いた ASO 試薬の調製方法に関する開発
……○角田 洋輔, 北澤 宏明, 川井 淳, 岸本 高英（東洋紡）

13:42 3Fp02 Quantification of intracellular crowding level in *Bacillus subtilis*
……○Yuki Kitahara, Enno Oldewurtel, Sven van Teeffelen
（Dept. Microbiology, Pasteur Inst.）

13:54 3Fp03 A plant microbial fuel cell based biosensor for the indoor greenA plant microbial fuel cell based sensor for the indoor green plants monitoring plants monitoring
…… ○Ji Eun Kim [1], Tae Hang Yoon [1], Hak Jin Song [1], Wu-Young Jeong [1], Yunjeong Yang [1], Eun Bin Lee [1], Kwang Jin Kim [2], Ho Hyun Kim [3], Hyung Joo Kim [1]
（[1] Dept. Biological Eng., Konkuk Univ., [2] Urban Agric. Res. Div., NIHHS, Rural Development Administration, [3] Dept. Integr. Environ. Syst., Pyeongtaek Univ.）

14:06 3Fp04 Monitoring of an enzymatic reaction using broadband coherent anti-stokes Raman spectroscopy.
……○Jeffrey Harmon, Ryo Imai, Naoko Senda, Tomoyuki Sakai
（Hitachi Ltd., Res. and Dev. Group - Bio. Syst. Res. dept.）

14:18 3Fp05 A biosensor for Influenza virus detection, controlling distance dependent LSPR between AuNPs and CdZnSeS quantum dots
…… ○Fahmida Nasrin [1], Ankan Dutta Chowdhury [2], Kenshin Takemura [1], Enoch Y. Park [1,2]
（[1] Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2] Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.）

14:30 3Fp06 Controlling Size, Concentration and Distance of Surface Plasmon Resonance, Application of Virus Detection by LSPR Regulated Biosensor
…… ○Ankan Dutta Chowdhury [1], Fahmida Nasrin [2], Kenshin Takemura [2], Enoch Y. Park [1,2]
（[1] Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2] Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.）

14:42 3Fp07 Fluorescent-labeled liposomal amplified biosensor for the ultrasensitive detection of virus
…… ○Sabrina Sharmin, Ankan Dutta Chowdhury, Enoch Y. Park
（Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.）

G 会場　D25（13:30～15:18）

【セル＆ティッシュエンジニアリング】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 3Gp01 Cre 組換え酵素を用いたミニサークル DNA ベクター調製法の開発
……○久野 晶生 [1], 河邉 佳典 [1], 羽田 毅 [1], 井藤 彰 [1,2], 上平 正道 [1]
（[1] 九大院・工, [2] 名大院・工）

13:42 3Gp02 温熱誘導型遺伝子発現システムの遺伝子発現挙動解析
……○波多江 有輝 [1], 井藤 彰 [1,2], 増本 新也 [1], 小野 章彦 [3], 河邉 佳典 [1], 上平 正道 [1,3]
（[1] 九大院・工, [2] 名大院・工, [3] 九大院・シス生科）

13:54 3Gp03 ニワトリシアル酸転移酵素の解析とインフルエンザワクチン生産効率化への応用
……○金岡 英徳 [1], 加藤 万貴 [1], 牧田 芳隆 [1], 佐野 観月 [1], 飯島 信司 [2], 西島 謙一 [1]
（[1] 名大院・工, [2] 愛工大・工）

14:06 3Gp04 ニワトリ始原生殖細胞の分化・培養に関わるサイトカインの解析
…… 奥嵜 雄也 [1], 萩原 遥太 [1], 中山 裕貴 [1], 村上 晴太郎 [1], 飯島 信司 [1,2], 金岡 英徳 [1], ○西島 謙一 [1]
（[1] 名大院・工, [2] 愛工大・工）

14:18 3Gp05 細胞死受容体を利用した結合部位特異的抗体選択系の構築
…… ○河原 正浩, 江口 晃弘（東大院・工）

14:30 3Gp06 バイオ医薬品生産のためのチャイニーズハムスター腎臓組織由来細胞株の構築
……○河邉 佳典 [1,2], 巖 流征 [1], 山中 寛子 [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（MAB 組合））

14:42 3Gp07 医療タンパク質の高生産化に向けたチャイニーズハムスター卵巣細胞の改変
……○嶋田 順太[1], 三﨑 亮[1], 大橋 貴生[1,2], 藤山 和仁[1]
（[1]阪大・生工国際セ, [2]摂南大院・理工）

14:54 3Gp08 HCP 混入リスクの低減を目的とした *Anxa2*、*Ctsd* ノックアウト CHO 細胞株の樹立
……○福田 展雄, 千賀 由佳子, 本田 真也（産総研・バイオメディカル）

15:06 3Gp09 抗体医薬品生産細胞の高度化を目指した高機能化因子迅速同定システムの開発
……○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]次世代バイオ医薬品製造技術研究組合）

H 会場　D32（13:30〜15:18）

【培養工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 3Hp01 ITO 電極システムと試料の前処理を活用した新規微生物培養化法の開発
……○名取 暁[1], 小山 純弘[2], 青柳 秀紀[1]（[1]筑波大院・生命環境, [2]エイブル）

13:42 3Hp02 腸上皮細胞と腸内細菌の共培養法の開発
……○遠藤 輪, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

13:54 3Hp03 Silver nanoparticles biosynthesis from extracellular pigment of *Talaromyces purpurogenus* and their biomedical applications
……○Sharad Bhatnagar[1], Toshiro Kobori[1,2], Hideki Aoyagi[1]
（[1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Food Res. Inst., Natl. Agric. Food Res. Org., Tsukuba）

14:06 3Hp04 生体物質付着抑制材 prevelex®は細胞増殖因子の非特異的付着を抑制し効率的な細胞培養を可能とする
……○中嶋 宏之, 安部 菜月, 鈴木 康平, 広井 佳臣, 西野 泰斗（日産化学）

14:18 3Hp05 吸着剤を用いた培地再生方法の試み
……○北川 文彦[1], 菊池 晴菜子[2], 近藤 昌幸[1], 神保 陽一[1], 亀田 知人[2], 吉岡 敏明[2]
（[1]日機装・技術開発研, [2]東北大院・環境）

14:30 3Hp06 複雑な流体環境は単球の生理的機能を亢進する
……○小田 彰恭[1], 池田 光悦[1], 高橋 美裕[1], 野辺 善仁[2], 村松 和明[1]
（[1]電機大院 ・理工, [2]大洋技研）

14:42 3Hp07 **回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊挙動の速度論的解釈**
……○橋田 礼博[1], 植村 壽公[2], 紀ノ岡 正博[1]（[1]阪大院・工・生命先端, [2]阪大院・工・精科応物）

14:54 3Hp08 ヒト人工多能性幹細胞の無菌閉鎖系における塑性流体を用いた 1 L 規模の培養工程の構築
……○長谷 洸輝, 山本 陸, 紀ノ岡 正博（阪大院・工）

15:06 3Hp09 ヒト iPS 細胞培養における播種密度が分化ポテンシャルに与える影響
……○金 美海, 秋山 真一, 紀ノ岡 正博（阪大院・工）

I 会場　D34（13:30〜15:18）

【発酵生理学，発酵工学】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 3Ip01 ソルビトールストレスが酵母 OC-2 株の脂肪酸構成に与える影響
……○三木 健夫（山梨大院・医工総）

13:42 3Ip02 有機溶媒に対する酵母の応答：キシレンによる酸化的ストレスと翻訳抑制の惹起
…… 河合 孝朗[1], 芳本 奈々[1], 吉田 雅偲[2], ○井沢 真吾[1,2]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]京工繊大・工芸科学）

13:54 3Ip03 出芽酵母における自然発生型の新規マルチストレス耐性変異株の分離と解析
……○田中 桃未[1], 中川 洋史[2], 小林 日花梨[1], 小久保 晋[2], 山村 英樹[2], 早川 正幸[2]
（[1]山梨大院・医工総, [2]山梨大院・総研部）

14:06 3Ip04 Komagataeibacter medellinensis NBRC3288 の高温育種株の耐熱性メカニズム
…… ○水町 優希[2], 小田 みすず[2], 伊藤 光平[2], 松本 奈実[2], 松谷 峰之介[2], 片岡 尚也[1,2,3], 藥師 寿治[1,2,3], 松下 一信[1,2,3]
（[1]山口大・農, [2]山口大院・医系, [3]中高温微セ）

14:18 3Ip05 酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 株における酸化ストレス応答因子 Dps の機能解析
……○小林 聖弥[1], 鈴木 敏弘[1], 宮平 響子[1], 勝木 浩平[1], 岸 幹也[2], 石川 森夫[1]
（[1]東京農大応生科・醸造, [2]Mizkan Holdings・中研）

14:30 3Ip06 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 における *spo0A* 遺伝子が胞子形成とブタノール生産に及ぼす影響
……○古屋 一彦[1], 清 啓自[2], Panjuy Chaophaya[2], 門倉 利守[1], 鈴木 健一朗[1], 中山 俊一[1]
（[1]東農大院・農, [2]宮崎大・農）

14:42 3Ip07 1-ブタノールの添加が大腸菌細胞に与える影響
…… ○川畑 龍司[1], 荒木 勇登[2], 青井 議輝[1], 中島田 豊[1], 加藤 節[1]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]広島大・工）

14:54 3Ip08 ポリヒドロキシアルカン酸重合酵素活性部位における変異導入の影響
…… ○南部 友香, 柘植 丈治（東工大・物質理工）

15:06 3Ip09 P(3H2MB)生合成量増強のためのモノマー供給酵素の探索
…… ○木原 崇博, 古舘 祥, 柘植 丈治（東工大・物質理工）

J 会場　E23（13:30～15:18）

【環境工学，廃水処理技術】

13:18 接続チェック（12 分）

13:30 3Jp01 微生物由来蓄電性 Mackinawite による嫌気バイオコンバージョン活性の向上
…… ○安池 一貴[2], 片桐 美紀[1], 工藤 優輝[2], 田代 陽介[2,3], 二又 裕之[2,3,4]
（[1]静大・工, [2]静大院・総合科技, [3]静大・創科技院, [4]静大・グリーン科技研）

13:42 3Jp02 微生物燃料電池：アノード電極上のバイオマス量および細胞内グルタミン酸濃度と電流生成の相関
…… ○佐々木 大介[1], 佐々木 建吾[1], 柘植 陽太[2], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]金沢大・新学術）

13:54 3Jp03 バイオ電気化学的システムによる複合微生物系の制御
…… ○佐々木 建吾[1], 佐々木 大介[1], 森田 仁彦[2], 柘植 陽太[3], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]電中研, [3]金沢大・新学術）

14:06 3Jp04 好気的硫黄代謝細菌を活用した重金属除去
…… ○黒田 真史[1], 小林 慎[1], 高山 一也[2], 池 道彦[1]
（[1]阪大院・工, [2]日東電工(株)）

14:18 3Jp05 *Pseudomonas stutzeri* NT-I によるセレン化物半導体ナノ粒子の合成
…… ○佐藤 守, 黒田 真史, 井上 大介, 池 道彦（阪大院・工）

14:30 3Jp06 1,4-ジオキサン分解菌による多様な環状エーテル類の分解能の評価
…… ○中澤 昌俊, 井上 大介, 黒田 真史, 池 道彦（阪大院・工）

14:42 3Jp07 *Leptothrix* 属細菌の分泌ナノ繊維は連鎖状菌体に環境適応性を付与する

……○久能 樹[1,2], 森永 花菜[2,3,4], 杉本 真也[2,5], 豊福 雅典[1,2,6], 野村 暢彦[1,2,6], Utada Andrew[1,2,6]
（[1]筑波大・生命環境, [2]JST・ERATO, [3]筑波大院・生命環境, [4]産総研, [5]慈恵医大,
[6]筑波大・微生物サスティナブル セ）

14:54 3Jp08 Investigation of solar-driven Linear Fresnel Photocatalytic Reactor (LFP) for wastewater treatment

……○Cheng Zhang, Na Liu, Qiansu Ma, Akiho Yagi, Yingnan Yang
（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

15:06 3Jp09 Mass spectrometry imaging reveals the correlation between the production of quorum sensing metabolites and the biofilm development in *Pseudomonas putida* biofilms

……○Pitchapa Rattanaburi, Eiichiro Fukusaki, Shuichi Shimma
（Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.）

ランチョンセミナー

LS3-1 三洋貿易株式会社

S1 会場　A21（12:00～12:50）

LS3-2 天野エンザイム株式会社

S4 会場　E11（12:00～12:50）

9月16日（月・祝）

授賞式・受賞講演（9:00 ～ 11:30）
五十周年記念館（金光ホール）

授賞式（会長挨拶，KSBB 会長挨拶，名誉会員・功労会員推戴，各賞授賞）

〈生物工学功労賞〉

受賞者　今井 泰彦[1,2]（[1] キッコーマン，[2] 野田産研）
生物工学会功労賞受賞にあたって　1A-Ka01　p. 79

〈生物工学賞〉

受賞者　伊藤 伸哉（富山県大・工）
新規酸化還元系バイオプロセスの基盤技術開発とその応用　1A-Ka02　p. 79

〈生物工学功績賞〉

受賞者　紀ノ岡 正博（阪大院・工）
再生医療に資する細胞製造性に関する研究　1A-Ka03　p. 80

〈生物工学技術賞〉

受賞者　○小原 聡[1]，寺島 義文[2]，杉本 明[3]，福島 康裕[4]，菊池 康紀[5]
（[1] アサヒ Q&I，[2] 国際農研セ，[3] サトウキビコンサルタント，[4] 東北大院・工，
[5] 東大・未来ビジョン研セ）
選択的発酵酵母を利用した砂糖・バイオエタノール逆転生産プロセスの開発
1A-Ka04　p. 80

受賞講演（13:30 ～ 13:50）

〈生物工学奨励賞（江田賞）〉

受賞者　伊藤 一成（岡山県工業技術センター）
無通風箱培養法を利用した固体培養における麹菌の生育と酵素生産に関する研究
I 会場　1A-Ip01　p. 81

〈生物工学奨励賞（斎藤賞）〉

受賞者　佐々木 建吾（神戸大院・科技イノベ）
健康・持続可能社会の構築に向けた複合微生物系（ヒト腸管・バイオガス発酵槽内）の制御
E 会場　1A-Ep01　p. 81

〈生物工学奨励賞（照井賞）〉

受賞者　杉浦 慎治（産総研・創薬基盤）

圧力駆動型 Microphysiological systems の開発　J 会場　1A-Jp01　p.82

〈生物工学アジア若手賞〉

受賞者　Li Tan [1,2]（[1]Chengdu Inst. Biology Chinese Academy of Sciences, [2]Coll. Architect. Environ. Sichuan Univ.）

Recycling of municipal solid waste via ethanol and/or methane fermentation　G 会場　1A-Gp01　p.82

シンポジウム・招待講演

世界を目指す日本の酒類 【本部企画】（15:30 ～ 17:30）	S1 会場	p.83
微生物ダークマターとマイクロバイオータ研究が導く新しい生物工学（13:15 ～ 15:15）	S2 会場	p.84
産業化を目指した生体分子工学の新たな潮流 （15:00 ～ 17:30）	S3 会場	p.86
〈招待講演（韓国生物工学会）〉	1S-S3p01	p.86
酵母におけるアミノ酸研究の新展開 （13:15 ～ 15:15）	S4 会場	p.89
食品成分が腸内環境に及ぼす影響 （15:30 ～ 17:30）	S4 会場	p.92
動物細胞培養の新研究領域への挑戦 ～学問の境界領域で起こるイノベーションを目指して～（13:15 ～ 15:15）	S5 会場	p.95

一般講演（13:30 ～ 17:30）

酵素学，酵素工学	A 会場	p.98
バイオマス，資源，エネルギー工学	B 会場	p. 102
環境浄化，修復，保全技術	C 会場	p. 107
生物化学工学	D 会場	p. 111
オミクス解析／植物細胞工学，組織培養，育種工学	E 会場	p. 115
タンパク質工学	F 会場	p. 119
発酵生理学，発酵工学／遺伝子工学	G 会場	p. 123
培養工学／バイオプロセス	H 会場	p. 127
代謝工学	I 会場	p. 131
セル＆ティッシュエンジニアリング	J 会場	p. 134

1A-Ka01 生物工学功労賞受賞にあたって

○今井 泰彦[1,2]
（[1]キッコーマン, [2]野田産研）
yimai@mail.kikkoman.co.jp

この度、図らずも第 13 回生物工学功労賞を頂くことになり、身に余る光栄でございます。これもひとえに、諸先輩方や、学会役員を始め関係する皆様方のご指導と、ご支援のたまものと深く感謝しております。
この度の受賞は、私個人と申しますよりも、これまで、また現在も一緒に産学連携を進めて下さっている諸先輩方や皆様を代表して頂いたものと受け止めております。
キッコーマンに入社後、初めて参加させて頂いた学会が日本醗酵工学会の年次大会でした。まだ中之島の日本生命の研修所で開催されていた頃です。狭い会議室に大勢の参加者で熱気溢れる情景が未だに思い出されます。研修所に宿泊し、朝は食堂で一緒に朝食を摂り、その後は会議室で研究発表を聴講する、缶詰状態でのまるで合宿のような学会でした。その後、発表の機会も何回か頂きましたが、発表の準備中に新たな発見があったり、発表時の質疑応答が大変有意義な事に繋がったこともありました。
このような場を提供して頂いた学会には大変感謝しておりましたところ、2003 年に東日本支部で副支部長として木野支部長の下で支部活動をお手伝いすることになり、木野先生が主導的に進められていた産学連携の在り方を議論する活動に参加させて頂きました。お陰様で、支部委員の皆様をはじめ、大学、公的機関、科学装置・機械メーカー関係者、など多くの方々の協力を得て講演会やパネルディスカッションを通じて活発な議論が行われ、産学連携の在り方について共有化することができました、さらにその後の広範囲な方々が集まる賀詞交換会に結び付いたのではないかと思っております。
その後、2013 年からは、産学連携理事として再び学会活動に参加することになりました。園元会長、五味会長、木野会長の下で、色々な経験をさせて頂きました。特に、園元会長の提唱された、「イノベーティブな産学連携活動の推進」のため、大会でのシンポジウムでは新たな切り口として「食のおいしさを極める生物工学」「地球の未来資源に貢献する生物工学」「新しい農業と未来の食料のための生物工学」など、食を基軸として、学会員でない産官学の識者にご講演を依頼し、会員の皆様に、これからの未来社会に向けた方向性を提供することを心掛けました。
日本生物工学会は学問の進展、産業界の発展に大いに貢献してきた学会だと思います。学会の名称が醗酵工学から生物工学に変わり、対象も微生物から細胞へ拡大する中でも、醗酵という生物と人間を結び付ける中で生まれた、学会の風土や文化は時代を経ても引き継がれているのではないでしょうか。そして、これからも、その大きな原動力の一つが産学連携となって欲しいと思っております。現在、大学や官と産業界の会員で学会に期待するものが必ずしも一致しないことがあるかと思いますが、SDGs など世界的な目標を共有したり、お互いに情報交換を続けることで、次の時代に対する方向性が出てくるのでは無いかと期待しています。
現在まで 6 年間理事を務めさせて頂き、さらに 2 年間、理事としてお世話になることになりました。この栄えある賞を励みとしまして、今後とも学会の発展に貢献できますよう微力ながら誠実に努めて参りたいと存じます。
最後になりますが、これまでそして現在も、ご指導、ご支援頂いた多くの方々に心より御礼申し上げます。

Acceptance Speech of Meritorious Service Award

○Yasuhiko Imai[1,2]
([1]Kikkoman Corp., [2]Noda Inst. Sci. Res.)

Key words industry-academia collaboration

1A-Ka02 新規酸化還元系バイオプロセスの基盤技術開発とその応用

○伊藤 伸哉
（富山県大・工）
nbito@pu-toyama.ac.jp

この度の生物工学賞の受賞は、ご指導いただいた諸先生方、共同研究者の皆様、研究室の新旧スタッフと学生諸氏など、すべての関係の皆様のご協力の賜物であり、ここに厚く感謝申し上げます。

バイオプロセスを用いる有用物質生産には多くの報告例があるが、酸化還元酵素が工業的プロセスとして利用されている例は必ずしも多くない。これは他の酵素系と比較すると、反応に NADH/NADPH などの補酵素再生系を必要とすること、酵素の基質特異性が狭く汎用性に劣ること、目的とする基質や生成物が水難溶性のものが多く生体触媒が有機溶媒系で不安定であり、十分な生成物濃度が得られないこと、などの要因が考えられる。我々の研究室では、これらの問題に果敢に取り組み、さまざまな有用酵素触媒の微生物やメタゲノムからの探索、進化分子工学的手法による酵素触媒の改良、有機溶媒-水系における酸化還元プロセスの最適化、有機溶媒耐性菌の宿主・ベクター系開発と利用、メタゲノミクスと進化分子工学の融合技術の開発、更にこれらの技術を統合することにより効率的なバイオプロセスの研究開発を行ってきた。

【1】水素移動型不斉還元反応による光学活性アルコールの生産
ガス状スチレン資化性菌 *Rhodococcus* sp.由来のフェニルアセトアルデヒド還元酵素（PAR）及び *Leifsonia* sp.由来アルコール脱水素酵素（LSADH）を用いる *E. coli* 菌体反応により、各種ケトンから 100％に近い収率で高濃度に(*R*)/(*S*)-体のキラルアルコール（100-350 g/L、96->99％ *e.e.*）を生産するバイオプロセスの開発に成功した。LSADH と PAR は、いずれも数十種類のケトンから高い光学純度でキラルアルコールを生産することができる画期的な酵素触媒であり、同時に 2-プロパノールを水素源として補酵素の再生が可能なことから補酵素再生系を追加する必要がない。また、当該反応で高濃度のキラルアルコールを合成するためには、2-プロパノールのような極性有機溶媒を含有する反応系で高活性な触媒が必要であるが、進化分子工学的手法による改変酵素の開発により、この問題を克服するとともに、これら酵素の詳細な解析を行った。また、天然由来シクリトールの一種である(-)-*vibo*-クエルシトールなど各種環状キラルポリオールの実用レベルでの合成にも成功している。

【2】不斉酸化反応による光学活性エポキシド、インディルビン誘導体の生産
スチレン資化性菌由来のスチレンモノオキシゲナーゼ（SMO）系（StyA：FAD 依存性モノオキシゲナーゼ, StyB: FAD:NADH 酸化還元酵素）を使用し、$FADH_2$ の再生に LSADH を共役することにより、各種スチレン誘導体のみならず *n*-アルケンからも(*S*)-体のエポキシドを高光学純度で合成できることを世界で初めて報告した。さらに、これら酵素を *Kocuria* などの有機溶媒耐性菌に導入し、有機溶媒-水二相系において、汎用性の高いキラルエポキシドの合成プロセスを創製した。当該反応はエポキシ化のみならずスルフィド類のスルホキシドへの不斉酸化やインディルビンや同誘導体の合成反応にも応用できることを見出している。インディルビンは漢方薬に含まれる天然色素成分であり、最近、抗がん性のみならず潰瘍性大腸炎の治療効果が注目されている。

【3】酸化酵素の二量体化反応によるエピテアフラガリン類の生産と機能解析
ラッカーゼが没食子酸存在下、緑茶エキスの主要成分であるエピガロカテキン(EGC)やエピガロカテキンガレート(EGCg)を選択的に酸化し、紅茶の極微量成分であるエピテアフラガリンやエピテアフラガリン 3-*O*-ガレート（ETFGg）を合成できることを報告した。さらに、ETFGg が、膵臓リパーゼやマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)阻害活性など、肥満や歯周病などを抑制する優れた機能を有する食品素材であることを発見した。その他のデータも、ETFGg が EGCg よりも優れた健康機能を有する食品素材であることを示している。我々は、当該反応に適したラッカーゼの探索と同酵素の糸状菌での分泌生産、同酵素による効率的な ETFGg 生産にも成功している。

【4】メタゲノムからの効率的な酵素遺伝子の単離とその解析
Screening of Gene-specific Amplicons from Metagenomes(S-GAM)法と命名した PCR を基本技術とするメタゲノムからの効率的な酵素遺伝子のライブラリー構築技術を開発し、工業的に利用できる有用生体触媒を発見した。現在、同法の改良と汎用性の検証に取り組んでいる。特に、97-99％の相同性を有する酵素ライブラリーが、酵素の機能改変に有用なアミノ酸配列情報を提供できることを世界で初めて示し、この情報を用いて酵素の耐熱化などを行った。また酵素反応が困難である嵩高い置換基を持つケトン類の不斉還元に利用できる還元酵素の発見にも成功するなど、S-GAM 法の有用性を証明した。

以上、キラル化合物を中心に精密化学品のバイオプロセスによる生産、植物・食品に含まれる微量成分の天然素材からの酵素合成技術など、バイオプロセスに関する幾つかの基盤研究を行ってきたが、これらの技術や成果はグリーンケミストリーやバイオエコノミーのコンセプトに合致するものであり、今後の産学連携の進展による実用化が期待できる。

Research and development of novel biocatalysis focusing on oxidation-reduction reactions

○Nobuya Itoh
(Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

Key words biocatalysis, chiral alcohols, chiral epoxides, metagenome

1A-Ka03 再生医療に資する細胞製造性に関する研究

○紀ノ岡 正博
（阪大院・工）
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

再生医療や細胞治療が注目されるなか，細胞製造に関する技術開発が重要視されております．私は，これまで，ヒト幹細胞を育む技術を中心とした，マルチ発生レベルを有する発生工学プラットフォームに対する培養工学および細胞製造プラットフォームの創成を目指し，学問体系化を行ってまいりました．iPS細胞などの幹細胞の出現とそれらの培養技術の発展により，多種多様な分化細胞を大量に調製することが可能となってきました．さらに，人体を模擬した組織・臓器の形成への技術構築が一歩ずつ進んでおり，これらの新技術は，再生医療，細胞治療，創薬スクリーニング，人体機能解明など新しい医療・産業分野へ展開されるものと期待されております．展開の実現化には，細胞レベルから人体レベルまでのマルチスケールで，発生学の知識に基づき組織・臓器の構造・機能形成を目指した発生工学的プラットフォームが不可欠で，多くの研究者が本分野を牽引しております．これらの達成の効率化には，生物化学工学者の主たる領域である培養工学プラットフォームとの協働が基盤的技術の進展を加速すると考えてきました．

現状のプラットフォーム形成の多くは，発生工学的研究と培養工学的研究の進展において，細胞レベル（微視的レベル）から，集塊レベル（中視的レベル），培養組織（巨視的レベル）レベル，臓器，人体レベルへとマルチスケールでの技術開発，生物的ヘテロ（不均質性）解析によるデータ蓄積によって進められると考え，反応場である培養フォーマットと解析場である解析フォーマットに分け，発生工学プラットフォームの進展の段階を経ております．我々は，iPS細胞の大量培養並びに細胞挙動に注目した運命制御を目指し，未分化状態での増幅工程の確立，シミュレーション，さらに未分化状態からの逸脱現象に注目し，anomaly な発生メカニズムの理解と逸脱細胞の除去，発生抑制の構築を行ってきました．また，網膜分化細胞の成熟培養においては，細胞挙動制御により均一な成熟過程を導く方法開発や間葉系幹細胞の運命制御，筋芽細胞組織内の流動性と血管新生についての研究を行ってきました．

培養工学的プラットフォームの構築に伴い，社会実装として細胞製品の製造を目指した，細胞製造プラットフォームも必要不可欠な領域と考えられます．そこで，細胞製造プラットフォームでの課題抽出として，製品製造における既成概念として「製造性（manufacturability）（製造における種々の変動を考慮する際の製造設計の容易性）」を参考に，「細胞製造性（Cell manufacturability）」を新たに「生物的見地と工学的見地を理解し橋渡した工程による，細胞の製造に対する可能性」と定義しました．特に，生物的見地に関する単位系の欠如が，本領域を難しくしていると考え，度量衡学（メトロロジー）の考え方をもとに細胞応答に対する入力に関する単位系を見出すことが不可欠であると考えております．製造プロセスの構築にむけ，細胞製造性設計を「顧客に対する安心と製品品質に対する安定を得つつ，製造所内外（原材料調達，搬送や病院での調製も含む）での簡易・安全・安価なプロセスにて，如何に簡単に製造するかを考える細胞製品の製造設計」と定義しました．この細胞製造性の体系化を目指し，細胞製造の固有な特徴を捉え，工程の不安定性要因および細胞の質的変動機構について，入力変動の影響として細胞株間の影響，外乱として無菌操作，内なる乱れとして操作による遅発性，時間依存性についての検討を行ってきました．

これらの学問体系化を基に開発された再生医療に資する細胞製造技術を，社会実装の実現に向け，エコシステムの構築に向けた活動を行っております．社会実装へ向けて，「一人ではできない」ことを肝に銘じ，大阪大学大学院工学研究科内で，「細胞製造コトづくり拠点」を 2016 年から始動し，モノづくり，ルールづくり，ヒトづくりからなるコトづくり（エコシステムの構築）を実践しております．モノづくりでは，無菌環境の堅牢性に優れたアイソレータシステムをモジュール化し，柔軟にモジュール同士の組み合わせにより製造工程を効率よく実施できるフレキシブルモジュラープラットフォームを提案し，iPS細胞由来の網膜色素上皮細胞の製造工程の機械化に成功しました．これらの技術の実装に向け，ルールづくりとして，規制当局や日本再生医療学会と連携し，無菌操作の考え方に関するガイドラインを発表してまいりました．さらに，アイソレータシステムについては，ISO TC198/WG9 内で，細胞製造性については，ISO TC276/WG4 内で，本邦メンバーとともに国際標準化に向けて調整を行っております．また，ヒトづくりとしては，社会人教育を立ち上げ，教科書の存在しない細胞製造分野における教育活動を通し，細胞製造のセンスを広げて，再生医療に資する細胞製造のためのコトづくりを行っております．

最後に，これらの研究やコトづくり活動は，数多くの産官学の先生方のご協力のもとで行っており，この場をお借りして御礼申し上げます．

Study on cell manufacturability contributing to regenerative medicine

○Masahiro Kino-oka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words cell manufacturability, regenerative medicine, stem cell culture, biochemical engineering

1A-Ka04 選択的発酵酵母を利用した砂糖・バイオエタノール逆転生産プロセスの開発

○小原 聡 [1], 寺島 義文 [2], 杉本 明 [3], 福島 康裕 [4], 菊池 康紀 [5]
（[1]アサヒQ&I, [2]国際農研セ, [3]サトウキビコンサルタント, [4]東北大院・工, [5]東大・未来ビジョン研セ）
ohara@platinum.u-tokyo.ac.jp

【開発の背景】

世界的な人口増加に伴う将来的な食料・エネルギー不足が予測される中，植物資源を用いた食料とバイオ燃料の増産が望まれる。サトウキビは単位収量が高く，主に砂糖原料となるショ糖と，エタノール原料となる還元糖（ブドウ糖，果糖）を蓄積するため，小面積で多くの砂糖（食料）とエタノール（バイオ燃料）の生産が期待できる作物である。地球上の優良農地が減少するなか，世界の研究機関が多収性サトウキビ品種を開発している。しかしながら，サトウキビの多収化に伴い，土地あたりの糖生産量が増加する一方で，還元糖（砂糖結晶化阻害物質）含有率が増加することから原料あたりの砂糖回収率が低下する。その結果，砂糖を増産できず，糖蜜およびエタノールばかりが増産するため，多収性サトウキビは製糖産業に受容されず産業上利用されてこなかった。そこで 2002 年に砂糖・エタノールの同時的増産を目標とした革新的な還元糖の選択的エタノール変換プロセスの開発に着手した。

【技術の特徴】

開発した技術の特徴を以下に示す。

(1)還元糖のみを選択的にエタノールに変換する特殊な酵母（ショ糖非資化性酵母）を用いて，第一段階でサトウキビ搾汁中の還元糖のみを選択的にエタノール変換・回収し，第二段階で還元糖除去後の高純度のショ糖液から砂糖を高効率に生産する。砂糖とエタノールの生産順序を従来法（製糖→糖蜜からのエタノール製造）とは逆転させた世界初のプロセス（搾汁からの選択的エタノール製造→製糖）である。

(2)発酵後の搾汁に含まれるエタノールは製糖工場の濃縮工程において回収可能であり，新たな分離回収装置も熱源も不要である。

(3)還元糖の選択的変換・除去により，結晶化工程における砂糖回収率が約 1.5 から 2 倍（多収性サトウキビの場合）に向上する。

(4)既存の製糖工場に選択的発酵槽と熱交換器を挿入するのみで実施できるため，社会実装が容易である。

(5)ショ糖非資化性と凝集性（酵母分離機が不要）を併せ持った *Saccharomyces cerevisiae* 属（食品工場で利用可能）の選択的発酵酵母を利用する。

【本技術がもたらす効果】

人口増加と優良農地の不足が共存する状況下，現在の製糖技術では，今後の食料・エネルギー供給の不足は必至である。逆転生産プロセスと多収性サトウキビ等との組み合わせにより，食料競合の解消（砂糖・エタノールの同時的増産）が可能になり，物質循環型の高収益産業が展開できるようになる。また，従来，還元糖比率の高い夏季はサトウキビの収穫・砂糖生産が実施されてこなかったが，本技術によって夏季の工場稼働も可能となるため，収穫期間の大幅な延長が世界的に可能になる。その結果，工場・収穫機械の稼働率，土地・労働力の利用効率が向上し，原料および製品の生産コストの低減および農業経営の高度化が図れる。環境影響評価の結果，本技術を国内製糖工場（種子島）に導入した場合の温室効果ガス排出削減ポテンシャル量は 4.45 t-$CO_{2,eq}$/ha と算出され，現状（5.94 t-$CO_{2,eq}$/ha）と比較して 25%の温室効果ガスの排出削減効果が得られることが分かった。また経済性評価では，フィリピンの製糖工場（4,500 t/d 規模）に導入された場合，砂糖生産量が 9.7 万 t/y（現状比 1.95 倍）、エタノール生産量が 2.7 万 kL/y（現状ゼロ）に増加し，事業性評価指標となる内部利益率（IRR）が 14.9%，投資回収年数が 6.4 年という結果が得られた。本技術は，従来，バイオエタノール生産において指摘されてきた社会的課題（食料競合回避、温室効果ガス削減）を事業課題（経済性）の追究を通して解決している。

【今後の展望】

本技術は世界の製糖工場に導入可能であり、従来のサトウキビにおいても砂糖増産が可能となる。現在，オーストラリアの製糖工場に導入予定でプロジェクトが進行中である。今後，更なる技術開発を行い，日本発のイノベーションとして世界の食料・再生可能エネルギー生産に貢献していきたい。

Development of the inversion process using selective-fermentation yeast

○Satoshi Ohara[1], Yoshifumi Terajima[2], Akira Sugimoto[3], Yasuhiro Fukushima[4], Yasunori Kikuchi[5]
([1]Asahi Q&I, [2]JIRCAS, [3]Cane Consult., [4]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [5]Inst. Future Init. Univ. Tokyo)

Key words yeast, selective fermentation, sugar, ethanol

1A-Ip01 無通風箱培養法を利用した固体培養における麹菌の生育と酵素生産に関する研究

○伊藤 一成
（岡山県工業技術センター）
kazunari_itou@pref.okayama.lg.jp

醸造において麹造りに代表される固体培養は、物質の低移動性による培養状態の不均一性とそれに伴う再現性の低さ、培養管理制御の難しさなど、産業的利用を目指す場合に致命的な欠点を有している。これらは、培養基質の均一な攪拌が容易でなく、物質の低移動性から、発酵熱の生成拡散による品温状態の勾配と変動、水蒸気の発生拡散や結露による水分状態の勾配と変動、局所的な生育による栄養源の勾配と変動などが培養基質に生じることに起因する。この欠点を克服するべく、装置の複雑さや培養時の不安定要素を排除するため攪拌（手入れ）や通風を必要としない、簡便な培養システムの構築を目指した。

1. 新規固体培養法の考案と構築
固体培養中の発酵熱によって生じる水蒸気に着目、この水蒸気の移動を緩やかに制御できれば基質の均一性が達成できるのではないかと考えた。木箱の上下に空気を通さず水蒸気を通す延伸多孔質ポリテトラフルオロエチレン（ePTFE）膜を装着し、内部に一定の緩衝部（空間）を設けた培養器を作製した。この培養器を恒温恒湿槽に入れ培養器外部の温湿度を制御し培養（小麦ふすまと麹菌を利用）を行った。従来の堆積式培養と比較して、バッチ内のどの場所においても極めて均一で再現性の高い品温経過と水分状態になっていた。これは酵素生産においても同様であった。この新たな固体培養を無通風箱培養（non-airflow box (NAB) culture）法と名付けた。
2. NAB 法の特性
培養開始時の水分量を変えて NAB 法で培養すると、どの水分量でも基質が良く乾くことがわかった。酵素の発現・生産において水分は重要なパラメータであり、酵素によって水分要求性が異なる。従って、培養開始時の水分量を調節すれば水分要求性の異なる酵素を、複数同時かつ効率的に生産させることが可能であることがわかった。
水分量と酵素生産の関係を明らかにするため、乾燥する経過における酵素生産および麹菌の生育の詳細な解析を行った。どの酵素でも生産開始時期が早く、このときの生産速度が短時間で急激に上昇しており、おおよそ菌体の増殖経過と相関していた。水分状態の解析から、基質が徐々に乾くことで対数増殖期に最適な水分活性となり、菌体増殖が活発になることに起因すると考えられた。効率的な酵素生産のためには、菌体増殖に適した水分と目的とする酵素の生産に適した水分のバランスを考慮し、最適培養条件の設定が必要である。
NAB 法では、培養中に培養器外部の湿度（水蒸気分圧）を変えることにより、従来の固体培養では極めて困難だった培養制御が可能であることがわかった。さらなる酵素生産向上を目的とし、培養初期に菌体量を十分確保した後、基質の乾燥具合を制御した。菌体量は同じでも、乾く程度の違いにより酵素生産量が変化し、比較的緩やかに乾かした場合に増加した。また、どの酵素でも菌体あたりの生産が向上したことから、より効率的な複数同時の酵素生産が実現できることが示された。
NAB 法は中規模スケールの簡便な培養システムのため、実験室レベルでも手軽に実施でき、大規模スケールへの応用も容易である。また、環境の温湿度を適切に制御することで、品温と水分状態の管理が可能である。NAB は、再現性・作業性・制御性に優れた固体培養の基盤技術として、多様な物質生産の発展に大きく貢献できると考えている。
3. NAB 法の応用
清酒製造において目的にあった品質の麹を製造するためには、様々な条件で試験を行い、その品質を確認していく必要があるが、製造現場とスケールが大きく異なる実験室レベルでの試験では、生じる様々な培養状態の違いから、試験結果を製造現場に反映できないことが多い。そこで、培養制御が可能な NAB 法を利用し、現場での製麹経過を参考に米の試験製麹法の確立を目指した。できあがった米麹は正常な麹としての状貌をなし、しっかりと破精込み、局所的な不均一さは見られず、高い酵素力価と適度な酵素バランスを有していた。製造現場と遜色のない麹の再現を可能にした NAB 法は米の試験製麹法として、実際の製麹工程で系統だった解析が困難な麹の評価（破精の解析や遺伝子発現の解析等）に利用している。
併せて、目的とする品質の麹を造るために必要な制御（作業）と品温・水分経過の科学的な知見を得ることを目的とし、培養器内の発熱および熱と水分の空間動態について評価を行っている。例えば、発熱に伴い培養器内部の緩衝部で対流が生じ、培養器外への効率的な水蒸気の拡散が起こっていることが明らかになった。また、発熱を増やし緩衝部の体積を減少させると対流が少なくなり、潜熱を持った水蒸気の拡散が減少、水分量が多く品温の高い製麹経過になることがわかった。このように現場での適切な製麹工程の管理のために、NAB 法を利用した様々な製麹条件での計測データの蓄積を行っている。

このように NAB 法は、従来の固体培養で最大の欠点だった不均一性や低再現性を補うだけでなく、多様かつ積極的な固体培養制御も実現可能にした。今後、この方法が固体培養のスタンダードとなりうるだけでなく、これまでにない麹菌の潜在能力も引き出すことができるのではないかと期待している。

Studies on mycelial growth and enzyme production of *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using non-airflow box culture method

○Kazunari Ito
(Indusrtial Technolgy Center of Okayama Prefecture)

Key words non-airflow box, *Aspergillus oryzae*, uniform culture, *Koji* making

1A-Ep01 健康・持続可能社会の構築に向けた複合微生物系（ヒト腸管・バイオガス発酵槽内）の制御

○佐々木 建吾
（神戸大院・科技イノベ）
sikengo@people.kobe-u.ac.jp

発酵食品を製造し、または天然資源から再生可能な化合物／燃料を生産するための工業的なバイオプロセスの多くは単一の微生物で行われてきた。しかし自然界に目を向ければ、多種多様な複合微生物群、すなわち複合微生物系として存在している。近年の分子遺伝学的解析手法の進展により、複合微生物系中の大半の微生物は未分離であることが理解されてきている。また、複合微生物系内においては、微生物間で相互作用しながらエネルギー源を消費している。例えば嫌気生態系において、ある種の化合物分解は吸エルゴン反応であるために単一の微生物では分解が進まないものの、2 種類の微生物が共生する事によって発エルゴン反応となり分解が進行する事が知られており、栄養共生関係（syntrophic association）と呼ばれている。栄養共生関係を利用すれば、基質をより効率的に代謝して、生成物の収率を上げられると期待される。複合微生物系を使用する利点として、コストの掛かる滅菌を省けることが挙げられる。また、下水汚泥等の未利用バイオマス資源を利用する事が可能であることも利点であり、このような複雑な基質で培養することにより効率的な微生物触媒を集積することが可能である。複合微生物系は工業プロセスとして、食品の機能性向上、廃水の嫌気処理、バイオガスの生産等に利用されている。このように複合微生物系の持つ機能を最大限に利用するために、筆者らが進めてきた以下の 2 つの制御方法を紹介する。
(1) In vitro ヒト大腸細菌叢モデル
ヒト腸管内は数百種類以上、約 100 兆個の腸内細菌が生息している。通常は腸管内の恒常性が保たれて宿主の健康維持に貢献しているが、ヒト腸内細菌叢の乱れは様々な疾病に関与することが知られてきている。一方、昨今の市場に流通している機能性食品は、経口摂取後にヒト腸内細菌叢中の有益細菌の生育を促し、ヒトの免疫賦活・疾病予防などの作用を有して宿主の健康を促進している。そのため腸内環境を整える治療方法の一つとして、プレバイオティクスやプロバイオティクスを投与することが注目されてきている。しかし、ヒト腸内細菌叢に対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、前者は腸内細菌叢や消化物の腸内滞留時間がヒトと異なること、後者は倫理的制限が指摘されている。そのため反復実験や時系列での評価が可能となる in vitro 系が求められていたが、複雑なヒト腸内細菌叢を保持し、その多様性を維持することは困難とされていた。そこで筆者らは、実際のヒト腸内細菌叢を近似してデザイン化している、いわゆる Kobe University Human Intestinal Microbiota Model (KUHIMM)を構築してきた。KUHIMM は既存のプレバイオティクスに対する応答や疾患患者の腸内細菌叢の特徴を再現しており、患者の腸内環境異常を検出することに成功している。また KUHIMM を利用して、ヒト腸内細菌叢に対するテーラーメイド治療技術基盤の構築に向けた取り組みを紹介する。
(2) バイオ電気化学的システム
バイオ電気化学的システムは、電極上での酸化還元反応を利用して微生物の代謝を改変できることが知られている。一方、嫌気性消化（メタン発酵）の原料として廃棄物を利用することが可能であり、微生物の作用により分解されてメタンと二酸化炭素が生成される。メタン発酵は複数の過程を経て進行し、加水分解・酸生成・酢酸生成・メタン生成に分けられる。すなわち、酸生成細菌・酢酸生成細菌・メタン生成菌の少なくとも 3 種類の微生物群が共存する生態系を維持する必要がある。筆者らは、導電性の微生物付着担体を充填している固定床型リアクターに対して、バイオ電気学的システムを適用することによりメタン発酵を高効率化することに成功している。さらに、バイオ電気化学的システムを水素発酵に適用して、水素・メタン二段発酵に与える効果を調べた知見についても紹介する。

Control of microbial community in the human intestine or biogas fermenter for construction of healthy and sustainable society

○Kengo Sasaki
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words microbial consortia, gut, electrochemical cultivation, fermentation

1A-Jp01 圧力駆動型 Microphysiological systems の開発

○杉浦 慎治
（産総研・創薬基盤）
shinji.sugiura@aist.go.jp

近年、微細加工技術を用いた生体模倣デバイス microphysiological systems (MPS) に対する注目が集まっている。類似の概念としてマイクロ流体デバイス上に臓器モデルを再構成した Organ-on-a-chip (OOC)や、動物の個体応答をモデル化する Body-on- a-chip (BOC)がある。OOC はマイクロ流体デバイス上で臓器特有の三次元組織構造や血流、動きを再現し、インビトロで臓器機能を再現する新しい培養法として注目されている(1-3)。複数の臓器モデルを連結した Multiorgans-on-a-chip (MOC)や BOC は、通常であれば動物実験や臨床試験が必要とされる「動物の個体としての応答」を検出しうる細胞培養技術として期待されている(4, 5)。演者は所属する産業技術総合研究所（産総研）に 2004 年に入所以来、マイクロ流体デバイスを用いた細胞培養の産業化を目指して研究開発を行ってきた。本公演ではこの概略について紹介したい。
演者は 2004 年に産総研に入所し、マイクロフルイディクスを用いた細胞アッセイに関する研究の立ち上げを行うことになった。当時の産総研は吉川弘之理事長が「本格研究」を研究所の命題のひとつとして掲げ、特許出願や論文を書くための基礎技術開発（第一種基礎研究）だけでなく、産業応用のための研究（第二種基礎研究）にも積極的に取り組むことが要求されていた。また、2004 年頃はマイクロフルイディクスを用いた細胞培養に関する研究が少しずつ報告されるようになってきた時代であった。入所後、マイクロ流体デバイスの研究環境を整備しつつ予備実験をする中で、大学ではできない、産総研らしい研究を模索した。当時は、学生時代より扱ってきたマイクロフルイディクスの面白さを感じつつも、細胞培養に応用し、特に、産業利用されるようになるためには、多数のチューブ接続やシリンジポンプによる送液に代表されるような、流体ハンドリングの煩雑さを解決する必要があると感じていた。このような状況の中で発案したのが「圧力駆動型マイクロ流体培養デバイス」である（6)。空気圧は配管を通じて分配することができる点がポイントであり、これにより、複数の薬液を同時に送液するマルチスループット化が容易となります。また、エアフィルターを使うことで無菌空間の管理も容易となります。
近年では、Organs-on-a-chip へ世界的な着目が集まる中、演者らは「圧力駆動型マイクロ流体培養デバイス」をベースとしてとして複数得臓器連結培養を行うことのできる「圧力駆動型マルチスループット Organs-on-a-chip」を開発している(7)。これは、上述のデバイスと同様、クリーンベンチの中で培養チャンバーを組み立てた後、通常の細胞培養に使用するようにマイクロピペットを用いて試薬や細胞、培地を添加することができるものである。クリーンベンチ内で蓋をした後、専用の接続ユニットを介して圧力制御装置に接続し、スタートボタンを押すと循環培養が開始される構成となっている。循環培養の途中や終了した段階で、接続ユニットから切り離し、クリーンベンチ内に持ち込んで培養液を交換・サンプリングしたり、細胞を染色・回収したりすることも可能である。つまり、マイクロプレート用に市販されている様々なキットを用いた解析も可能となっており、生物系の研究者がチュートリアルを受ければ MPS を使用できるところまで開発が進んでいる。現在、この「圧力駆動型マルチスループット MPS」をプラットフォームとして、創薬産業へ応用すべく関連企業と連携しつつ、製造技術開発から、用途開発までを進めており、今後も MPS の普及を目指した研究活動を続け、本学会に貢献していきたいと考えている。

(1) Bhatia, S. N. et al. Nat. Biotechnol., 32, 760 (2014)
(2) Marx, U. et al. Altex, 33, 272 (2016)
(3) Esch, E. W. et al. Nat. Rev. Drug Discovery, 14, 248 (2015)
(4) Abaci, H. E. et al. Integr. Biol., 7, 383 (2015)
(5) Sung, J. H. et al. Anal. Chem., 91, 330 (2019)
(6) Sugiura, S. et al., Biotechnol. Bioeng., 100, 1156 (2008).
(7) Satoh, T. et al. Lab Chip, 18, 115 (2018)

Development of pressure driven microphysiological systems

○Shinji Sugiura
(BRD, AIST)

Key words Microphysiological systems, Organ-on-a-chip, microfluidic device

1A-Gp01 Recycling of municipal solid waste via ethanol and/or methane fermentation

○Li Tan[1,2]
([1]Chengdu Inst. Biology, Chinese Academy of Sciences, [2]Coll. Architect. Environ., Sichuan Univ.)
tanli@cib.ac.cn

Municipal solid waste (MSW) consists of >70% biodegradable materials. Mismanagement of the MSW causes serious environmental pollution. On the other hand, rapid consumption of fossil fuels and increasing demand of energy lead to serious energy crisis. Waste-to-energy is recognized as an option for sustainable MSW management and as one of the most significant renewable energy sources in future. Aiming at reducing emission of organic compounds and maximizing energy recovery, we systematically studied ethanol and/or methane fermentation to recycle MSW. We established an ethanol-methane two-stage fermentation approach to recycle carbohydrate-rich MSW. Waste paper is rich in cellulose. Process of presaccharification and simultaneous saccharification and fermentation (PSSF) was developed for efficient conversion of waste paper to ethanol with pH adjustment and nutrients supplementation, reaching ethanol yield, concentration and productivity of 90.8%, 45.3 g/L, and 0.54 g/L/h, respectively. The ethanol concentration was above the critical value of 40 g/L for economical distillation. Kitchen waste is acidulous and rich in starch and nutrients. Two processes, repeated-batch PSSF and continuous PSSF, were developed to convert kitchen waste to ethanol. Both processes produced ethanol higher than 40 g/L. Repeated-batch PSSF resulted to ethanol yield of 88.9%-91.2%, which was slightly higher than that of continuous PSSF (82.8%). On the other hand, continuous PSSF showed greater productivity of 11.5 g/L/h than repeated-batch PSSF of 3.3-3.5 g/L/h. A process of successive liquefaction, presaccharification, and simultaneous saccharification and fermentation (L+PSSF) was developed for co-fermentation of waste paper and kitchen waste. The ethanol yield, concentration, and productivity were similar to those of individual fermentation of each substrate, but co-fermentation was superior in free of pH adjustment and nutrients supplementation. Stillage eluted from the ethanol fermentation was subjected to methane fermentation. Biochemical methane potential (BMP) test showed that the stillage was biodigestible. However, methane fermentation was susceptible to NH_4^+ and/or S^{2-} inhibition due to the richness of nitrogen and sulfur in the stillage. Therefore, we investigated and elucidated the inhibitory laws of NH_4^+ and/or S^{2-} on methane production and methane production rate under thermophilic and mesophilic conditions. Based on this, NH_4^+ and S^{2-} inhibition to methane fermentation was alleviated by applying micro-aeration and biogas recirculation. Thus, stable performance of methane fermentation was achieved at very high organic loading rate 14 g/L/d. Microbial community analysis revealed that hydrolysis of cellulose was the critical step for methane fermentation of the stillage. Integrating ethanol fermentation with methane fermentation, energy of approximately 80% containing in the materials was recovered as ethanol and methane.

Recycling of municipal solid waste via ethanol and/or methane fermentation

○Li Tan[1,2]
([1]Chengdu Inst. Biology, Chinese Academy of Sciences, [2]Coll. Architect. Environ., Sichuan Univ.)

Key words municipal solid waste, bioenergy, ethanol fermentation, methane fermentation

1S-S1p01 日本ワインの戦略

○安蔵 光弘
（メルシャン株式会社シャトーメルシャン）
anzo-m@mercian.co.jp

ここ数年、日本ワインは日本のマーケットで注目を集めており、ワイナリーの数も増えている。2018 年 10 月 30 日から、日本ワインの表示に関する法律がスタートし、表示の基本的なルールが制定された。醸造専用ブドウの栽培を開始する人も増えており、今後もワイナリーの数、ブドウ畑の面積とも増加傾向と思われる。その中で、フランスやカリフォルニアをはじめとしたワイン生産国で行われている、コスト削減策を、積極的に取り入れることが必要と思われる。ワイン生産にかかわるコストのうち、果汁やワインを圧搾するプレス機、ワイン用の瓶詰めライン、貯蔵用のオーク樽など、そのほとんどが輸入に頼っている。その分、輸入のコストや、消耗品のリードタイムが最短でも数ヶ月あることなど、日本ワインが置かれている状況は簡単ではない。ワインは、果物を原料としているため、醸造はブドウが熟す時期に集中する。その分、プレス機や破砕機などは、秋の 2 ヶ月ほどしか使用しない。こういう機材は、購入費用がかかるため、年間に 2 ヶ月の使用では、減価償却に時間がかかる。諸外国では、こういった季節性の高い機材を共同で保持したり、アウトソーシングしている例も多い。国内でワイナリーの数が増えている現在、海外ワイン産地の戦略を参考にして、日本ならではのコスト削減策を議論する時期が来ていると思われる。

A strategy for japan wine making

○Mitsuhiro ANZO
(Mercian corporation , Chateau Mercian)

Key words wine

1S-S1p02 酒造り 200 年、茨城の田舎の造り酒屋からジャパニーズクラフトビールの世界発信

○木内 敏之
（木内酒造合資会社）
kiuchi@mwc.biglobe.ne.jp

日本で酒類を製造する為には、酒類の種類ごとに製造免許が必用であり酒税法で決められた最低製造数量以上の製造が必須である。ビールに関しては、2000KL と規定され、事実上大手ビール製造会社のみの独占状態になっていた。しかし 1994 年酒税法が改正され最低製造数量が 60KL に引き下げられ、地域のリゾート開発、地方公共団体の地域振興、さらには当社の様な酒類製造会社の新規参入等々 300 社もの企業がビール製造に参入しまさに地ビールバブルとなったのである。このブームは 2000 年頃まで続くものの、製造者の技術の未熟さによる品質問題、設備投資に比しての少ない製造数量ゆえの高原価、さらには、日本の食とのミスマッチ等の要因が相重なり、地ビールバブルは崩壊し製造者数は減少、2010 年には 208 社にまで下がった。
日本酒の製造会社であった当社は、企業規模の拡大と収益率の向上の為に 1995 年に新規にビール製造免許を取得し、「常陸野ネストビール」の製造を開始した。当時ほとんどの地ビール製造会社が、自社のレストランでの消費を目的に事業を行う「パブブルワリー型」で事業を行っていたが、当社は、先進地のアメリアに習い、瓶詰めを中心としたいわゆる「マイクロブルワリー」型クラフトビールをモデルに事業を考え、充填設備の導入、微生物管理の徹底により瓶詰めビールの販売をおこなった。
事業開始当時は、「地ビールバブル」の真っ最中であり、追加の設備投資をおこないながら 400KL ほどの製造まで達していた。しかし、当社でも前述の地ビールバブルの終焉と共に売上数量が低下、年間製造数も 100KL ほどまで落ち込んでしまった。
その様な中で着目したのが、小規模ビール醸造者をクラフトビールと称するアメリカの市場であった。アメリカのクラフトビールは、1980 年代よりブームとなり、1998 年当時は、2000 社ものクラフトビール製造会社が その個性を競い合っていた。
幸いにも当社では、何度かアメリカで最大のビールコンテストであるワールドビアカップで賞を得ており、アメリカのクラフトビール愛好家の中で日本に「常陸野」というクラフトビールがあるらしいと話題になっていたのである。1999 年にはアメリカの輸入クラフトビールの仕掛人ともいえる B.UNITED INTERNATIONAL 社（コネチカット州）よりアメリカへの輸出のオファーが舞い込みその第一歩としてコンテナ一台約 2 万本の常陸野ネストビールを輸出したのであった。
発売当初は、日本からの初のクラフトビールの輸入という珍しさもあり、驚くほどのスピードで販売され、それに伴い当社のビール工場もフル生産の状況となるのである。しかし、珍しさから真の日本発のクラフトビールとして定着させる事は、日本からの輸送コスト、製造規模による原価の高さ等を総合的に考えると、容易では無いであろうとの想像がついた。
そこで常陸野ネストビールの位置づけを、日本でしかできない真の日本のクラフトビールと位置づけ将来を見据えた商品開発に取り掛かったのである。
幸いにも、当社には、200 年近い日本酒製造の歴史や考え方がある。また、偶然にも当社の所在する茨城県那珂市は昭和初期よりビール麦の一大産地であり、ビール麦栽培の歴史があるのである。また、茨城は、暖地のミカン、寒地のリンゴが同じ畑で栽培できる気候であり、様々なビール用の素材が地域にある事が判明した。
それから約 20 年の歳月が過ぎ、今当社の製造するフクロウマークの常陸野ネストビールは、日本のクラフトビールとして世界 40 カ国以上で親しまれている。

常陸野ネストビール NIPPONIA には、地元農家の手で復元された日本最古のビール麦「金子ゴールデン」と日本生まれのホップ「ソラチエース」を使用。DaiDai には、茨城の筑波山麓に自生する日本の原種と言われる福来みかんをフレバー付けに使用。また、Saison Du Japon は、麦芽の糖化プロセスに、日本酒造りの米麹を加えさらには清酒酵母で醗酵させている。古代米を使った赤米エールは、その鮮やかな色合いと柑橘系のフレバーが人気である。
茨城の田舎の造り酒屋の地ビールからジャパネーズクラフトビールとして海外への挑戦、そこには、日本、酒造り 200 年、さらには酒蔵の歴史と伝統が必須であった。

Brewing for 200 years, from a sake brewery in the countryside of Ibaraki to dispatching Japanese craft beer around the globe.

○TOSHIYUKI KIUCHI
(Kiuchi Shuzou Goushi Kaisya)

Key words craft beer

1S-S1p03 日本酒を世界へ

○宇都宮 仁
（日本酒造組合中央会）
h.utsunomiya@japansake.or.jp

日本酒の輸出が好調である。2018 年の輸出金額は 222 億を超え、2007 年と比較すると金額で約 3 倍、数量で約 2.5 倍となり、価格の高い純米吟醸酒等特定名称酒の輸出が好調であることを示している。また、マイクロブルワリーを含む海外生産も増加している。
日本酒の消費は日本食レストランの普及とともに伸びたといえるが、それ以外の要因として、①品質向上及び②認知度や理解度の向上がある。①品質向上には、香気成分高生産酵母や高グルコース生産麹菌の育種など生物工学会会員が果たした役割が大きい。また、プロセスや生産・流通体制の改善により、生産段階から酸化を防ぐとともに低温流通が行われるようになったことで、海外のレストランでも国内と変わらない品質で楽しんでいただけるようになった。②認知度や理解度の向上には、2007 年に世界的なワインコンペティション（International Wine Challenge）に日本酒部門が開設され、審査時に外国人と日本人が評価のポイントについてディスカッションを行っていることや、ワイン専門家等への日本酒教育が貢献している。ディスカッションや日本酒教育を支える科学的知見には、近年の熟成やオフフレーバーに関する研究や料理との相性研究の成果が生かされている。日本酒は日本で独自の発展を遂げた醸造酒であり、ワインやビールと並ぶ世界の酒として認知されるようになるには、今後も、日本から様々な情報を発信し続けていく必要がある。

Sake to the World

○Hitoshi Utsunomiya
(Japan Sake and Shochu Makers Association)

Key words sake

1S-S2p01 微生物ダークマターへのアクセス：培養手法の革新と未知増殖制御メカニズムの解明

○青井 議輝
（広島大院・統合生命科学）
yoshiteruaoi@hiroshima-u.ac.jp

微生物のほとんどは培養困難であることが知られており、未解明・未利用のまま広大なフロンティアが残されている。近年の培養非依存的な網羅的解析手法の著しい進展により広大な未知領域の存在が明らかになったが、「鍵」となる微生物が培養できないため本質的な理解（因果関係など）や利用拡大に制限がかけられている状況でもある。そこで、多くの微生物は培養困難な普遍的な理由やメカニズムを解明できれば、現状では有効技術のない難培養性の未知微生物を培養化するための画期的な新戦略を導き出せるかもしれない。しかし，難培養性を説明可能な普遍的な理由は全く明らかになっていない。また、通常の培養法で容易に獲得（分離培養）できる微生物を解析しても「なぜ培養できないのか」という問いに対する答えには到達しないというジレンマが存在する。さらに、従来法に替わる画期的な分離培養手法もほとんど登場していない。

【新しい分離培養手法】
そこで、我々の研究グループでは、新規分離培養手法を開発してその有効性を実証しつつ、さらにそれらの手法を通じて得られた難培養性微生物を用いて未知なる増殖制御機構の解明に取り組んでいる。以下にその一部を挙げる。
１）微生物の罠：ナノメートルオーダーの構造体をデザインすることで、現場に設置するだけで自動的に複数の菌株をサンプリング・分離・培養する全く新しいタイプの分離培養手法。本手法は、人為的に微生物を分離・植菌するのではなく、「微生物自身が能動的に分離し、隔離した状態で増殖する」という点で既存の方法論に対して大きく異なる。
２）対象微生物の選択的分離：セルソーターを用いて形態学的な情報に基づいて対象微生物を生きたまま選択的に分離する方法。
３）in situ 培養：微生物は通過しない膜を用いた独立した培養チャンバーで構成された培養デバイスを用いた、実環境を模擬する培養手法（in situ 培養法）。
４）超高密度植菌法：培養初期の菌体密度を従来の方法の１万倍以上に高めることができ、培養期間中お互いに混在しないで分離した状態で増殖させる方法。培地条件は同一にもかかわらず従来法の 10 倍程度高い培養効率（コロニー形成率）を示すことが判明した。

【難培養性微生物とは何か】
なぜ多くの微生物はなぜ培養できないのか？そもそも普遍的な要因が存在するかどうかも定かではない。つまり、常識的には、多くの微生物が培養できない理由は「培地組成など培養条件が適合しない」こと（だけ）が原因ではないかと考えられる傾向にある。しかし我々は、このような「培養条件の不適合性」以外に、まだ十分に検討されていない普遍的な要因があり得ると仮定して検討した結果、実際に以下のような性質を見出している。
性質１）休眠と覚醒：多くの環境中の微生物は好ましくない条件下では容易に非増殖状態（休眠状態）に移行する。環境状況が好転しても休眠状態からは容易に脱却せず、そこから脱却するためには、シグナル様物質（覚醒因子）が必要である。そしてそれは増殖状態の特定の微生物（異種・同種）から分泌される。
性質２）多くの難培養性微生物（未培養微生物）は、自身が産出する代謝物（代謝副産物）に増殖を顕著に阻害され、コロニー形成が不可能であるなど従来法では容易に分離できない。また上記の１）および２）の性質を両方併せ持つような微生物種は極めて分離培養が困難である。実際に、上記に挙げた新規培養手法で得られた新規性の高い微生物の多くは、上記の性質をどちらか、または両方持っていることが判明した。

【まとめ】
これまでに得られた結果は、「個々の微生物種の適合性」だけではなく、普遍的に環境微生物の難培養性をコントロールするメカニズムが存在することを示唆している。また、微生物の「難培養性」について本質的な理解を得ること，すなわち増殖という微生物の活動の本来根幹となる部分を理解することに直結する。さらに、分離培養手法の革新や培養可能な微生物の拡充，そして環境微生物の「難培養性」を解明することにより、直接利用できるバイオリソースの大幅な拡大が見込まれることも期待できる。

Accessing to microbial dark-matter: innovation for microbial cultivation and discovering unrevealed growth controlling mechanism

○Yoshiteru Aoi
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words uncultured bacteria, isolation, microbial dormancy, microbial awakening

1S-S2p02 物質循環・代謝におけるマイクロバイオータ機能の具現化ツール開発

○小川 順, 岸野 重信, 安藤 晃規, 竹内 道樹, 原 良太郎, 上田 誠
（京大院・農）
ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

自然界において、微生物は、単一種であっても集団で、また、多数種が共存したコミュニティとして存在し、機能を発現している。さらには、微生物間のみならず、植物、動物といった異種生物間のインターフェースにおける多彩な集団としての微生物の機能が、生態系における様々なマクロな物質循環を駆動している。このような生物間インターフェースにおける集団としての微生物、すなわち「微生物生態系」が発揮する機能（マイクロバイオータ機能）は、健康増進における腸管の科学、作物生産における根圏の科学、化学工業におけるバイオプロセス開発、環境保全の科学など、持続的社会、健全な物質循環の実現に欠かせない多様な産業領域に関わるものと考えられる。微生物生態系を解析するオミクス技術を軸に、マイクロバイオータ機能を具現化する化合物、酵素、代謝といった個々の機能担体を統合化し、マイクロバイオータ機能を効率的に活用する技術を、健康医療、作物生産、物質生産における取り組みを例に紹介する。

１） 健康医療／腸内細菌脂質代謝研究

腸管微生物系の機能制御に役立つ化合物の発見を目指し、生活習慣病予防の観点から脂質にフォーカスした代謝解析に取り組んだ。その結果、食事脂質に由来する不飽和脂肪酸が腸内細菌により飽和化されることを見いだし、水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸、部分飽和脂肪酸、共役脂肪酸を代謝中間体として同定した。また、これらの脂肪酸の宿主組織における存在の確認、ならびに腸管上皮バリア保護や脂肪酸合成抑制などの多彩な生理機能を見いだした。焦点を絞った代謝解析から見いだされた化合物を起点として腸管複合微生物系機能の作用機序が明らかとなり、オミクス情報利用の方向性を明確化した成果と言えよう。

２） 作物生産／植物根圏細菌窒素代謝研究

資源循環型農業に重要な窒素循環においては、アンモニア酸化細菌や亜硝酸酸化細菌という単離培養し難い微生物群が機能している。したがって、これらの菌株を含む集団を対象にマネージする必要がある。集団の中でのアンモニア酸化細菌や亜硝酸酸化細菌のバランスを、環境制御によりどうやって管理可能かを解析した結果、栄養・酸素量をバランスよく調節することが重要だと判明した。この開発過程にオミクス技術を活用することで、環境変化と菌叢変化の関連を明確にとらえることができた。また、本成果を脱窒も含めた水質浄化研究へと展開している。ある化合物の代謝に着目した取り組みから、窒素循環複合微生物系を制御する環境要因が特定された好例であるといえよう。

３） 物質生産／複合微生物機能を活用したバイオプロセス開発

多様な化学反応（酸化反応・縮合反応など）や反応場（有機溶媒中など）に対応しうる次世代バイオプロセスとして、還元力やエネルギーを供給する微生物、環境耐性微生物、触媒活性微生物をカップリングした複合微生物系の開発に取り組んだ。例えば、ATP を供給する酵母とデオキシリボヌクレオシド分解代謝系を部分的に発現した微生物群を用いて、核酸医薬や抗ウイルス薬の中間体となるデオキシリボヌクレオシドの効率的生産系を構築した。

このように、応用を目指した具体性を持った取り組みにより、複合微生物系機能の解析・開発に有用な化合物、環境因子や微生物を提供することが可能となったと考える。

Development of implementation tool for microbiota function in material circulation and metabolism

○Jun Ogawa, Shigenobu Kishino, Akinori Ando, Michiki Takeuchi, Ryotaro Hara, Makoto Ueda
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words microbiota, gut microbiota, rhyzosphere, bioprocess

1S-S2p03 微生物ダークマターが創り出す未知物質の探索

○中島 琢自, 松尾 洋孝, 高橋 洋子, 大村 智
（北里大・生命研）
takuji@lisci.kitasato-u.ac.jp

ゲノム解析技術の進展により、微生物は多種多様な二次代謝産物を作り出すことあきらかとなった。[1]その二次代謝生合成経路はポリケチド, メバロン酸・非メバロン酸, アミノ酸, 糖質, シキミ酸経路の 5 つに大別でき、単独もしくは複数の代謝系が関わって二次代謝産物（天然物）の複雑・多様な構造を生み出している。そこには二次代謝の基質となる原料の違いや修飾酵素など様々な要因が関わっており、同じ類縁体でもわずかな構造的な違いにより全く異なる生物活性を示すなど、微生物が生産する二次代謝産物の有効利用を考えると天文学的な数になる。

一方、これまで製薬企業を主導に、微生物の二次代謝産物から薬の素となる有用物質を見いだす研究がなされていたが、天然物創薬から撤退する動きが相次いだ。その理由は、天然物探索研究は時間と労力を要し、費用対効果が低いことがあげられる。しかし、微生物が作り出す天然物の魅力はユニークな構造にあり、最近天然物を利用した創薬へと回帰する動きも見られている。

抗生物質の発見は Tyndall、Pasteur や北里柴三郎による微生物間の拮抗作用の観察から始まり、Fleming および Florey らのペニシリン発見により、抗生物質の実在を明らかにした。その後、Waksman が放線菌から抗生物質の探索を行い、*Streptomyces griseus* よりストレプトマイシンを発見し、抗生物質探索の幕開けとなった。ストレプトマイシンの発見を期に、多くの製薬企業や研究者は微生物が生産する抗生物質の探索研究を行った。しかし、近年は微生物の代謝産物から新規物質の発見報告数は減少していった。

演者らは、分離されてきた微生物の化合物生産能力を最大限に生かすために、特定の生物活性ではなく、化合物の物理化学的性状を指標に探索（physicochemical (PC) screening[2]）を行った。PC screening とは、培養液に含まれる化合物の質量分析値や UV スペクトルなどの情報を天然物データベースで検索し、新規性を予測して単離・精製および構造決定を行う手法である。構造決定後、生物活性を評価する。

北里大学大村創薬グループは微生物代謝産物から 500 以上の新規化合物を発見し、その生産菌を長期保存している。そのうち、エバーメクチン、スタウロスポリンやその他の有用物質を生産する放線菌約 330 菌株を復元し、4 種類の生産培地を用いて培養液抽出物ライブラリーを作製した。

そのライブラリーを用いて PC screening を行い、新規骨格を含む約 80 の新規物質を発見した。イミニマイシン[3,4]は放線菌 *S. griseus* OS-3601 株の培養液から発見した新規物質である。OS-3601 株は 40 年前、阿蘇の土壌から分離された放線菌で、ストレプトマイシン生産菌株として長期保存されていた。*S. griseus* は放線菌のモデル生物であり、ゲノム解析も終了している。イミニマイシンは弱い抗菌活性を示したが、その培養液には強力な抗菌活性を示す複数のシクロヘキシミド類縁体やストレプトマイシンも含まれており、抗菌活性を指標とする探索では見いだせなかった化合物である。PC screening は、このような有名な放線菌株からも新規物質を発見できる手法である。イミニマイシン A[3] は放線菌では初めての知見となるイミニウムイオンを持つインドリジン化合物、イミニマイシン B[4] はピリジニウムイオンを持つ類縁体であった。

PC screening の応用として、生体低分子をシリカに修飾し、新しい樹脂を作製した。生体低分子はエルゴステロールを用いた。エルゴステロール修飾シリカ（ES シリカ）を用いて PC screening を行い、放線菌 *Amycolatopsis* sp. K16-0194 株の培養液から新規物質ジピリマイシンを発見した。[5] ジピリマイシンは A 物質がカルボン酸で B 物質はアミドの側鎖を有し、ES シリカに B 物質は結合するが、A 物質は結合しなかった。この結果から ES シリカはアミドを認識していることがわかった。また、ES シリカに結合する既知物質の約 8 割は窒素を含む化合物であった。

PC screening は生物活性を指標としたスクリーニングと比べ、高い確率で新規物質を発見できる。さらに、生体低分子修飾シリカや質量分析を用いた硫黄化合物スクリーニングで新規物質が見つかってきている。これまで分離されてこなかった微生物ダークマターを活用し、PC screening と組み合わせることで多くの新規物質が発見できることを期待する。

参考文献

1)Alexander C. C., et al., Nature, 558: 440-444 (2018)
2)Nakashima T., et al., Biochem Pharmacol. 134: 42-55 (2017)
3)Nakashima T., et al., J. Antibiot., 69: 611-615 (2016)
4)Nakashima T., et al., Tetrahedron Lett., 30, 3284-3286 (2016)
5)Izuta S., et al., J. Antibiot., 71: 535-537 (2018)

What is presents from Darkmatter Microorganisms?

○Takuji Nakashima, Hirotaka Matsuo, Yokō Takahashi, Satoshi Ōmura
(Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ.)

Key words physicochemical screening, secondary metabolites, actinomycetes, new compounds

1S-S2p04 プラスチック分解細菌のエネルギー獲得戦略

○吉田 昭介
（奈良先端大・バイオ）
ssk-yoshida@bs.naist.jp

プラスチックは機能性とコストパフォーマンスを兼ね備えた素材である。しかし便利さの反面、現在のプラスチック経済は石油を原資とした非循環型であり、持続性を伴っていない。ポリエチレンテレフタレート (PET)は、ペットボトルや衣服の繊維などに汎用される主要なプラスチックのひとつである。廃棄された PET の一部はリサイクルされているが、従来のリサイクル手法は膨大なエネルギーを消費し、激烈な薬剤を使用するなど、高コスト・高環境負荷となっている。また、環境に流出した PET は、化学的に安定で生分解されないため、景観を破壊し、生態系に悪影響を与えている。
我々は、リサイクル工場から採取したサンプルを PET フィルムを唯一の炭素源として集積培養することにより、世界で初めて PET を分解・代謝するマイクロバイオータを得た。さらに、本マイクロバイオータから、PET を資化性新種細菌 *Ideonella sakaiensis* を分離することに成功した。その後の研究で、PET を高活性、且つ高特異性に加水分解する酵素 PET hydrolase (PETase)、続いて PETase により PET から分解産物として遊離されるモノヒドロキシエチルテレフタレート（MHET）を特異的に加水分解する酵素 MHET hydrolase（MHETase）を同定した。また、(1) PETase が細胞外、MHETase が外膜の内側に存在すること、(2) *I. sakaiensis* はテレフタル酸とエチレングリコールを共に資化可能であること、などが判明した。*I. sakaiensis* は PET 資化に必要な因子をすべて備え、かつ適材適所に酵素を配置することで、PET を効率的に資化していることがわかってきた。ゲノムが明らかにされている生物において、PETase、MHETase、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ、プロトカテク酸ジオキシゲナーゼといった PET 代謝に必須と考えられる酵素のホモログをすべて備えた生物は見い出されない。このことから自然界に PET 代謝系をもちうる生物が非常にまれであることがわかる。Blastp によるデータベース検索では PETase ホモログが Actinobacteria 門に偏在しているのに対し、それ以外の遺伝子は Proteobacteria 門に偏在していた。よって MHET アナログ代謝系の成立ののちに PETase をコードする遺伝子が Proteobacteria 門の細菌に水平伝播することにより代謝系の拡張がなされたと考えている。

Energy acquisition strategies of a plastic-degrading bacterium

○Shosuke Yoshida
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words PET, esterase, microbial consortium, evolution

1S-S3p01〈招待講演（韓国生物工学会）〉

Nanopore technology for the detection of single bacterial spores

○Tae-Joon Jeon
(Dept. Biol. Eng., Inha Univ.)
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. Either protein nanopore or solid state nanopore provides very versatile platform for single molecule studies or detection. However, nanopore technology has a significant hurdle that molecules larger than the nanopore cannot be translocated through the nanopore, precluding wide applications of the nanopore technology. Although the detection of bacteria and spores is important to maintain human health and safety, detection systems using a nanopore have not been reported. To overcome the current limitations, we designed the DNA hairpin that is complement to the aptamers and the aptamers are recognition elements for target molecules. The aptamers were characterized using alpha-hemolysin nanopores after the reaction of spores and aptamers and subsequent reaction with the complementary DNAs. As a result, we were able to detect *Bacillus thuringeinsis* HD-73 spores with the detection limit as low as 1.2×10^1 CFU/mL. Since aptamers can be selected for virtually almost any target molecule, our system is applicable to any target. In this presentation, along with our nanopores technology, I will present other representative membrane-based technologies including aquaporin based water purification system. 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.

Nanopore technology for the detection of single bacterial spores

○Tae-Joon Jeon
(Dept. Biol. Eng., Inha Univ.)

Key words biomimetic membrane, nanopore, ion channel

1S-S3p02 検査・診断用ペーパーデバイスの開発

○内村 浩美
（愛媛大・セ）
uchimura.hiromi.mb@ehime-u.ac.jp

１．はじめに
近年、日本国内においては高齢化が進んでおり、健康維持のためには適切な疾病治療法の提供に加えて、予防医療による健康維持増進や疾患の早期診断が重要である。このため、医療技術の発達に伴い、病気の同定のために様々な診断デバイスが開発・導入されている。先進国においては精密機器を用いた検査や診断が行われており、血液等を精密機器にかけることによって、糖尿病や悪性腫瘍等の定性評価が可能であるが、いずれも測定機器が高価であり、機器自体も大きいため持ち運びが難しい等の問題点を有している。また、発展途上国や被災地等においても病気の診断・早期発見が必要であることから、持ち運びが簡便で衛生的に使用でき、また、電力等の外部エネルギーを必要とせず、低コストで利用可能な診断機器が求められている。
そこで、本研究では、印刷技術を活用して耐水性紙基材の上に繊維等の親水性材料を意図した形状に転写することにより、転写された繊維部分を流路とする新たな紙製バイオチップの作製方法について検討を行った。

２．印刷技術を応用したバイオチップの作製
凸版印刷やオフセット印刷、インクジェット印刷等の印刷技術では、インキ転移量が少ないことから、親水性の繊維を印刷することは不可能である。また、インクの転写量が多く、比較的大きな顔料も印刷可能なスクリーン印刷を用いてバイオチップを作製する方法が Sun らによって報告されているが、これは疎水性物質の転写を目的としたものであり、これ自体を流路とするものではない。一方、本研究で提案するバイオチップは、基材となる「紙上に繊維を印刷」することで流路を形成するため、紙中に流路を形成する従来の手法とは一線を画するものである。
初めに、独自の印刷技術による繊維転写の可否について検証した。転写する繊維としてパルプ繊維を用い、蒸留水にパルプ繊維や増粘剤、バインダー、助剤を添加してインクを作製した。ここで、助剤を用いた理由は、インキ特性、印刷適性、流路となる印刷物の強度及び紙層構造、並びに吸液特性を制御する役割を担えると考えたからである。
耐水性の紙基材に独自の方法で繊維等を印刷し、その後、105℃で 15 分間乾燥させ流路を作製した。用いる繊維の繊維長を制御することで、繊維のように粗大な物質も印刷により転写可能であった。作製した流路に水を滴下したところ、水は流路のみを浸透し、基材や流路外への濡れ拡がりは確認されなかった。この結果から、独自の印刷技術により、従来の紙製バイオチップとは異なる新たなバイオチップの作製が可能であることが示された。

３．流路の構造と液体浸透量の制御
液体は毛管現象により流路を浸透するため、流路を構成する繊維の親水性や繊維間空隙等が液体の浸透性に影響すると考えられる。そこで、流路の構成材料やインクの配合条件が、液体の浸透に与える影響を調査した。流路の空隙構造を制御するため、パルプ繊維に加えて、副資材として 2 種類の繊維（A 繊維、B 繊維）を配合して印刷を行った。流路の吸水性を評価する手法としては、垂直給水度測定法を用いた。短冊状（幅 5 mm×長さ 110 mm）にカットした流路の端部を染料溶液に浸し、毛管現象により吸い上げられる染料溶液の高さを測定した。
副資材である A 繊維及び B 繊維を配合して作製した流路の液体浸透性を、垂直給水度測定法により評価した結果、A 繊維及び B 繊維のいずれにおいても、配合量が増えるに従って浸透高さが大きくなる、すなわち、液体の浸透性が向上することが示された。
A 繊維及び B 繊維の配合量を変えた際の流路断面の電子顕微鏡観察結果から、繊維の種類や配合量の違いにより、流路の構造に明らかな違いが確認され、A 繊維及び B 繊維を配合することで、流路内部に繊維間空隙が多く形成されていた。液体の流路となる空隙が多く形成されたことで、液体浸透性の向上につながったと考えられる。また、流路表面には、バインダーや助剤が流路壁を形成している様子が確認された。以上の結果より、流路の空隙構造や、流路を構成する素材の液体への親和性を変化させることで、液体の浸透性に違いが生じると推測される。すなわち、流路構造の制御により、液体の浸透性を制御可能であることが示唆された。

４．まとめ
本稿では、「繊維を印刷する」という、一見、印刷分野では邪道とも思われる手法を用いたバイオチップの作製方法について検討した。また、流路の構造により液体浸透性が変化することも確認された。イムノクロマト法等に代表されるように、バイオチップでは液体の浸透性を制御し、検体が流路を通過する時間を調整することも必要とされる。今回実施した特殊な印刷法では、使用する繊維の種類やインクの調製条件、繊維の転写量を調整することが可能であり、従来の紙製バイオチップと比較して流路設計の自由度が高いため、用途に応じたバイオチップを提供可能であるといえる。

Developments of paper-based diagnostic devices

○Hiromi Uchimura
(Paper Ind. Innov. Center, Ehime Univ)

Key words paper devices, diagnostic

1S-S3p03 ペプチド分子設計による人工ウイルスキャプシドならびに微小管内包分子の創製

○松浦 和則
（鳥取大・工）
ma2ra-k@tottori-u.ac.jp

近年、タンパク質・ペプチドの自己集合構造を合理的に設計することで、様々な人工のナノ構造体を構築することが可能となってきている。本講演では、ペプチドの合理的分子設計による人工ウイルスキャプシドおよび微小管内部結合ペプチドの創製に関する最近の研究を紹介する。
我々は 2010 年に、天然のトマトブッシースタントウイルス(TBSV)のキャプシドの内部骨格モチーフである beta-Annulus 構造を構成する 24 残基ペプチドを合成し、そのペプチド単独で水中で自己集合することで、TBSV キャプシドと同等の 30-50 nm の中空ナノカプセル（人工ウイルスキャプシド）を選択的に形成することを、DLS 測定・TEM 観察・SAXS 測定により見出した[1, 2]。この人工ウイルスキャプシドの zeta-電位の pH 依存性より、C 末端がキャプシド表面に、N 末端がキャプシド内部に配向していることが示唆された。つまり、酸性～中性 pH においては、人工ウイルスキャプシド内部はカチオン電荷に富んでおり、キャプシド表面は両性イオン性であることが考えられる。そのため、人工ウイルスキャプシドのカチオン性内部には、アニオン性色素や M13 phage DNA を内包することができた。また、アニオン性 CdTe 蛍光ナノ粒子の内包挙動を、蛍光相関分光(FCS)法により解析し、ペプチドの臨界会合濃度以上において蛍光粒子が内包されることを明らかにした。また、N 末端を Ni-NTA 錯体で修飾することにより、His-tagged GFP を人工ウイルスキャプシドに内包できることも明らかとしている。さらに、ペプチドナノカプセル表面に配向している C 末端側の化学修飾によりキャプシド表面への金ナノ粒子、DNA、コイルドコイル突起、ヒト血清アルブミンなどの表面提示 が可能であることを示してきた。さらに最近、キャプシド表面でリボヌクレアーゼ S (RNase S)を再構成することにより、酵素活性を有する RNase S を表面提示した人工ウイルスキャプシドを創製することにも成功している。
微小管はチューブリンダイマーが重合して形成される内径 15 nm のチューブ構造体であり、ナノデバイスへの応用が注目されている。微小管外部表面への分子修飾による機能化は確立されているものの、その内部空間への分子導入は殆ど注目されていなかった。本研究では、微小管関連タンパク質 Tau の繰り返し配列から 4 つのペプチド 1N, 1C, 2N, 2C を設計し、微小管内部への分子導入を試みた。テトラメチルローダミン（TMR）ラベルした全てのペプチドの微小管への結合が共焦点レーザー蛍光顕微鏡（CLSM）で確認された。特に、1N, 1C, 2C が微小管外部表面に結合するのに対し、2N は微小管内側の疎水性ポケットに結合することが明らかとなった。また、2N を金ナノ粒子（AuNP）に修飾することで、微小管への内包が透過電子顕微鏡（TEM）で確認された[3]。
さらに、2N を用いて微小管内部空間への緑色蛍光タンパク質（GFP）の導入を検討した。そのために、GFP の発色団形成に関与している N 末端から 11 番目までの β-ストランド（GFP11）と残りのタンパク質（GFP1-10）が再構成して蛍光が回復する Split-GFP を用いた。2N と GFP11 を連結した 2N-GFP11 と GFP1-10 を再構成させることで 2N-GFP を調製し、チューブリンと複合化後に GTP 誘導体により重合することで微小管を作製した。共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）により 2N-GFP の微小管への局在が確認された。2N-GFP 複合化微小管に蛍光標識抗 GFP 抗体を添加した結果、抗 GFP 抗体由来の蛍光がほとんど確認できなかった。従って、2N-GFP が微小管に内包されていることが示唆された。興味深いことに、2N-GFP 内包微小管は微小管に比べ 1.5 倍全長が長く、剛直性を表す持続長は 4.3 倍増加した。更に、運動速度は 1.5 倍増加していることが明らかとなった。
以上より、微小管内部に結合する Tau 由来ペプチドの開発に成功し、このペプチドを用いることで微小管内部への機能分子導入を達成した。

[1] K. Matsuura, K. Watanabe, K. Sakurai, T. Matsuzaki, N. Kimizuka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, 9662 (2010).
[2] K. Matsuura, *Chem. Commun.* (Feature Article), 54, 8944 (2018).
[3] H. Inaba, T. Yamamoto, A. M. R. Kabir, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *Chem. Eur. J.*, 24, 14958 (2018).

Creation of artificial viral capsids and functional molecule-encapsulated microtubules by peptide design

○Matsuura Kazunori
(Fac. Eng., Tottori Univ.)

Key words peptide, self-assembly, artificial viral capsid, microtubules

1S-S3p04 蚕を起点とする持続可能な高付加価値タンパク質生産プロセスの構築

○神谷 典穂 [1,2], 南畑 孝介 [1,3], 日下部 宜宏 [4]
（[1]九大・未来化セ, [2]九大院・工, [3]KAICO(株), [4]九大院・農）
kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

生体分子工学（Biomolecular Engineering）という用語は、意図する機能を発現する生体由来分子の設計と評価、さらには社会実装の観点から設計された分子の効率的生産プロセスの構築までを広く包含しており、特に機能評価に時間と労力を要するタンパク質集合系では、分子設計とプロセス工学の共奏が重要視されている [1]。現在、ラボでの基礎研究からバイオリアクターによる商業生産に至る各階層で様々な組換えタンパク質生産系を選択できるようになっているが、微生物発現系では発現困難なタンパク質への適用性と簡便なスケールアップの両立は容易ではない。そのような観点から、我々は蚕－バキュロウイルス発現系に注目した農工連携共同研究開発を進めている。
例えば診断薬で汎用される西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）は大腸菌での効率的発現が困難な酵素の１つであるが、九州大学農学部の高生産性蚕系統－バキュロウイルス発現系を利用することで、抗体結合タンパク質（protein G）との融合タンパク質としての発現と、ヘミンの導入による活性化が可能となる [2]。さらに、ビオチンと強く結合する４量体タンパク質である Streptavidin と HRP との融合タンパク質の発現ならびに活性化も可能であった [3]。これらの結果は、人工補欠分子族が導入された複合タンパク質や、新規多量体型酵素・タンパク質の設計に繋がる可能性を示唆している。
このように、多様な組換えタンパク質にアクセスできるようになると、さらなる高付加価値化の可能性が拡がる。例えば、酵素触媒によるタンパク質架橋反応と組み合わせることで、高分子量のタンパク質重合体を得ることができる。そこで、チロシン残基を配列中に含むペプチドタグ（Y-tag）を起点とするタンパク質重合体調製法 [4] を利用して、HRP を構成成分とする酵素ポリマー（HRP polymer）の調製を試みた。Y-tag 導入組換え HRP 水溶液に過酸化水素を適量添加すると、自己架橋反応により高分子量化が進行した。一方、過酸化水素の代わりにラッカーゼを適量添加しても重合反応は進行し、生成酵素ポリマーの比活性が向上したことから、分子状酸素を酸化剤として利用するより温和な条件下でのタンパク質架橋反応の利点が示された [5]。
蚕－バキュロウイルス発現系は、広い観点からは昆虫機能を活用したタンパク質生産系であり、また、再生可能な植物資源を利用したタンパク質生産系でもある。他の宿主では発現困難なタンパク質を基材とした、より社会的価値の高い機能性タンパク質の生産に繋げていくためには、さらなる分野横断型の共同研究が必要である。

References
[1] A.P.J. Middelberg et al., *Trend. Biotechnol.*, 2005, 23, 523-529.
[2] Patmawati et al., *Biotechnol. J.*, 2018, 13, 1700624.
[3] Patmawati et al., *J. Biotechnol.*, 2019, 297, 28-31.
[4] D. Permana et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 2018, 126, 559-566.
[5] D. Permana et al., *Biotechnol. J.*, DOI: 10.1002/biot.201800531.

Sustainable biomolecular engineering based on a silkworm-baculovirous expression system

○Noriho Kamiya[1,2], Kosuke Minamihata[1,3], Takahiro Kusakabe[4]
([1]CFC, Kyushu Univ., [2]Fac. Eng., Kyushu Univ., [3]KAICO Co.,Ltd., [4]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words baculovirus, protein expression, sustainability, silkworm

1S-S3p05 モノクローナル抗体迅速探索プラットフォーム技術の社会実装

○中野 秀雄 [1,2], 加藤 晃代 [2], 大内 将司 [2], 兒島 孝明 [1]
（[1]名大院・生命農学, [2]iBody株式会社）
hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp

我々は単一 B 細胞由来の抗体遺伝子とそれがコードする抗体タンパク質を、Fab として迅速に得られるシステムを開発し、「Ecobody 技術」と称している。まず動物あるはヒトの血液やリンパ節などから B 細胞を取得し、セルソーターや磁気ビーズなどを用いて、目的としている抗原等に結合する細胞を濃縮する。その後一細胞由来の RT-PCR と PCR により、抗体 cDNA の L 鎖と H 鎖の Fab 領域を増幅し、大腸菌無細胞タンパク質合成系での発現に必要な DNA 配列を付加した後、直ちに無細胞タンパク質合成系により抗体を Fab として合成し、ELISA 等でのアッセイを行い目的モノクローナル抗体の取得ができる技術である。B 細胞の取得からの一連の操作に必要な時間はわずか２日であり、また全て試薬を加えて混合する簡便な操作の連続であるため、自動化・機械化が容易であり、モノクローナル抗体取得のスループットを飛躍的に高めることが可能である。
一見するとできて当たり前のように思える技術だが、実は抗体を Fab として発現させるところにいくつかのキー技術がある。一般にタンパク質の機能でスクリーングするためには、合成量のばらつきを補正しなければならない。我々は、N 末端の開始コドンの直後に SKIK という短いペプチドタグ配列を挿入すると、合成量が顕著に増大することを見出した。元来大量に合成できるタンパク質の場合にはそれほど増大させるは大きくないが、少ないものほどより合成量の増大効果が顕著であった。このことより Fab 抗体の合成量がほぼ一定になり、クローンごとの差がほぼ消失した。さらに Fa b の L 鎖と H 鎖の C 末端にペアとなるロイシンジッパー配列を付加することで、それぞれの可変領域に依存する Fab の L 鎖と H 鎖との会合が顕著に促進された。主にはこの２つの効果により、一細胞由来の僅かな mRNA から増幅した DNA より、無細胞タンパク質合成系で直接合成した Fab 抗体を用いて、ELISA や免疫染色での機能評価が可能になった。
この技術の社会実装をめざし、名古屋大学発スタートアップとして iBody 株式会社を設立し、活動を開始した。本技術の特性を活かし、マウスでは得ることの困難な小分子に対するウサギモノクローナル抗体や、ヒト健常人や患者サンプルからのヒトモノクローナル抗体開発を行っている。

Social implementation of a high-throughput monoclonal antibody screening platform technology.

○Hideo Nakano[1,2], Teruyo Kato[2], Shoji Ohuchi[2], Takaaki Kojima[1]
([1]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., [2]iBody Inc.)

Key words high-throughput screening, monoclonal antibody, single cell

1S-S3p06 Beyond Q-body: 色素修飾が不要な新規免疫測定素子の構築

○上田 宏[1], 安田 貴信[2], 上野 慶行[2], 井上 暁人[2], 髙橋 昌樹[2], 大室 有紀[1], 北口 哲也[1], 董 金華[1,3]
（[1]東工大・化学生命研, [2]東工大・生命理工, [3]濰坊医学院）
ueda@res.titech.ac.jp

【背景：Q-body とは】我々は近年，抗体の抗原結合部位を構成する可変領域のアミノ末端近傍にリンカーを介して部位特異的に蛍光色素を修飾することで，抗原不在時にはその蛍光がタンパク内の Trp 残基などにより消光（クエンチ）しているが，抗原を加えるとクエンチが解消し濃度依存的に蛍光を回復するクエンチ抗体(Quenchbody, Q-body)が構築できることを見いだした[1,2]。無細胞タンパク質合成系を用いた非天然アミノ酸導入法，あるいは Cys 残基を持つタグを付加した組み換えタンパク質の色素修飾により構築した Q-body により，これまで各種ホルモンや違法薬物，農薬，ペプチドなどの低分子からインフルエンザ HA やアミロイド β オリゴマー[3]など各種高分子タンパク質を高感度に検出することに成功している。しかしこれまで，遺伝子構築から色素修飾まで多くの手間をかけて構築した Q-body から必ずしも良い蛍光応答が得られない，用いる色素によって応答が異なるといった問題の克服が実用上の課題となっていた。今回，これらの課題の回答となりうる方法論をいくつか見いだしたので報告する。

【PM Probe】抗体可変領域の構造はクローン毎にまちまちであり，Q-body への適性（色素の可変領域への入りやすさ，Trp の含量など）はそもそも異なると考えられる。我々は，抗体タンパク質レベルで Q-body への適性を調べるため，最近報告された抗体結合タンパク質 Protein M[4]に注目した。Protein M は多くの抗体の L 鎖に強く結合し，抗体の抗原結合部位近傍にその C 末が位置する。そこで，Protein M の C 末端をリンカーを介して蛍光色素修飾した PM probe を構築し，これと抗体を混ぜるだけで Q-body 化できないか，検討した。この結果，モデル抗体以外に複数の低分子認識抗体が抗原依存的な蛍光強度変化を示し，適性の高い抗体の簡便なスクリーニング法として機能する事が示唆された。

【CoiledBody】Q-body 構築にあたっては，いずれかの時点でタンパク質に色素を導入する必要があるが，未修飾色素を完全に除去する必要があり，その収率は必ずしも高くない。そのため，色素修飾用のタグの代わりにコイルドコイル形成ペプチド E4[5]を付加し，これと強く結合(Kd~4 nM)する K4 ペプチドの C 末を TAMRA で修飾し，両者を混合するだけで Q-body を構築出来ないか検討した。この結果，E4 修飾抗オステオカルシン Fab，および E4 修飾抗メトトレキサート V_{HH} ともに Q-body として機能した。さらに K4-TAMRA ペプチドに FITC を導入して用いた所，抗原添加により色素間の FRET 効率が向上し，より高い蛍光応答を示した。また E4 標識抗体断片を酵母表面に提示し，２色標識 K4 ペプチドを加えて抗原依存的な蛍光色変化をフローサイトメトリーで識別・選別できることも判明した。

【HiBody】以上は，直接ではないが蛍光色素を抗体に付加してセンサーとして用いている点では Q-body の派生物と言える。最近我々は，Q-body における色素修飾用タグの代わりに発光酵素 Nanoluc の C 末断片由来 11 アミノ酸からなるタグ配列(HiBiT)を一本鎖抗体 scFv あるいは Fab 断片の N 末に付加し，これに Nanoluc の残りの部分(LgBiT)と基質を添加した場合，抗原の有無により発光値が最大 4 倍変化する現象を見出した。すなわち，Trp による蛍光色素のクエンチでなく，ペプチド配列の抗原依存的な抗原内外への移動を検出するだけで，むしろ Q-body より高い感度で抗原検出を行えることが判明した。ある程度疎水性の高い配列と二つの可変領域断片(V_H/V_L)間相互作用が弱い抗体であれば抗体内の Trp の数に関わらず同様の現象が見られる可能性があり，新たな免疫検出原理として今後解析を進める所存である。

Reference

1) Abe et al., *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 17386-94 (2011).
2) Abe, Jeong, et al. *Sci. Rep.* **4**, 4640 (2014).
3) Dong, et al. *Anal. Biochem.* **550**, 61-67 (2018).
4) Grover et al. *Science* **343**, 656-61 (2014).
5) Litowski et al., *J. Biol. Chem.* **277**, 37272-9 (2002).

Beyond Q-body: Fabrication of immunosensor protein without dye labeling

○Hiroshi Ueda[1], Takanobu Yasuda[2], Yoshiyuki Ueno[2], Akihito Inoue[2], Masaki Takahashi[2], Yuki Ohmuro[1], Tetsuya Kitaguchi[1], Jinhua Dong[1,3]
([1]CLS, Tokyo Tech, [2]Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech, [3]Weifang Med. Univ.)

Key words biosensor, antibody, flow cytometry, nanoluc

1S-S4p01 アミノ酸による出芽酵母の寿命延長機構

○水沼 正樹
（広島大院・統合生命科学）
mmizu49120@hiroshima-u.ac.jp

アミノ酸は単なる生体分子としてのみならず、発生、代謝、ストレス耐性、老化・寿命など多彩な生理機能を有することが分かってきた。アミノ酸やグルコースなどの細胞内エネルギーは栄養・代謝センシング経路によりモニターされており、本経路はエネルギー代謝恒常性を維持している。栄養・代謝センシング経路として、IIS（インスリン/IGF-1 シグナル）経路、mTORC1（mammalian target of rapamycin complex 1）経路、AMPK（AMP 依存性プロテインキナーゼ）などが著名である。興味深いことに、これら三つの経路は栄養・代謝に関与するのみならず、酵母・線虫・ショウジョウバエ、マウスなどのモデル生物の寿命制御にも深く関与することが分かってきた。

この 20 年間のモデル生物を用いた研究から、食餌制限による寿命延長の基本的な仕組みが明らかになり、生物種を問わず共通点が多いことがわかった。食餌制限の中でも、アミノ酸の役割も明らかにされ、特に必須アミノ酸であるメチオニン制限は酵母・線虫・ショウジョウバエなどの寿命が延長することが分かってきた。

我々は、新規寿命延長メカニズムを明らかにするため、酵母を使って野生株よりも顕著に寿命が延長した変異株の取得に成功し(変異を *SSG1* と命名)、*SSG1* の機能解析を進めてきた。SSG1 変異株の解析から、寿命延長にアミノ酸の一種であるメチオニン代謝産物・*S*-アデノシルメチオニン(SAM)が関与することを世界に先駆けて見出した。具体的には、SAM の合成を促進させると、ATP を消費し(SAM は ATP とメチオニンから生合成される)、AMP 依存性キナーゼ AMPK が活性化し寿命延長する、これまでにない寿命延長メカニズムを提唱した。興味深いことに、SAM の拮抗阻害物質である *S*-アデノシルホモシステイン(SAH)を添加しただけでも、先と同様のメカニズムにより寿命延長することが分かった。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、*SSG1* 変異株は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、メチオニン代謝はエタノール発酵にも重要な役割を果たすことが予想された。Ssg1 タンパク質は、薬剤排出トランスポーター MATE ファミリーと相同性を有したことから、Ssg1 は SAM 濃度調節に関わることが予想された。まず、Ssg1 の細胞内局在を調べた結果、Ssg1 は液胞膜に局在した。さらに、*SSG1* 変異株は SAM/SAH を液胞に高蓄積した。このことから、Ssg1 は SAM/SAH の生合成や液胞輸送に関与するタンパク質であることが示唆された。本シンポジウムでは、Ssg1 タンパク質の機能を通してわかってきた寿命制御における SAM/SAH の役割やその生理的意義などついて議論したい。

Roles of methionine metabolism in lifespan extension in yeast

○Masaki Mizunuma
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words amino acid, yeast, lifespan

1S-S4p02 アミノ酸（L-トリプトファン）による分裂酵母細胞の生育阻害

○北村 憲司[1,2], 永島 直翔[2]
（[1]広島大・自然科学研セ・遺伝子, [2]広島大院・統合生命科学）
kkita@hiroshima-u.ac.jp

分裂酵母 *S. pombe* のユビキチンリガーゼ Ubr11 の機能欠損変異株はオリゴペプチドの取り込みと利用ができず、その原因がオリゴペプチド輸送体（Ptr2 と Isp4）の遺伝子発現不全のためであることを報告している。*ubr11* 欠損株の形質を抑圧する変異の解析から、Ubr11 が分解誘導する基質蛋白質は DNA 結合蛋白質の Upa1 であることが示唆され、実際に *upa1* 変異株ではオリゴペプチド輸送体の発現制御が破綻していた。
POT ファミリー輸送体(酵母の Ptr2)はバクテリアからヒトまで保存されたペプチド輸送体で、非常に多様な配列のジ・トリペプチドを幅広く輸送できるが、単純なペプチドのみならず複雑な構造の化合物も基質とし、ヒトではペプチド輸送体(PepT1, PepT2)を介して細胞に取り込まれる疾病の治療薬も少なくはないため、drug delivery system の観点でも注目されている。我々も、酵母では blasticidin S などいくつかの抗生物質がペプチド輸送体 Ptr2 を介して取り込まれる必要があることを示している。オリゴペプチドは構成アミノ酸とは異なる生理作用が期待されることから、様々なオリゴペプチドが *S. pombe* の増殖や生理機能を変化させるかについて調べる過程で、L-トリプトファン(Trp)を含む直鎖ジペプチドが *S. pombe* の増殖を強く阻害すること、アミノ酸単量体の L-Trp も弱いながら類似の効果を持つことを見つけた。増殖を阻害するアミノ酸は他にもあったが、様々な生物で、Trp は各種生理活性物質の前駆体であるとともに、寿命との関係も示唆されるため、本研究では Trp を中心にその作用機構について調べた。*S. pombe* の増殖阻害には Trp ジペプチドが細胞内に取り込まれる必要があり、Trp に関連する数種の物質も阻害効果を示した。Trp は蛋白質合成に利用される他、出芽酵母 *S. cerevisiae* では、キヌレニン経路によってキノリン酸（NAD の de novo 合成の基質）に、またはエールリッヒ経路でトリプトフォールに代謝される。*S. pombe* はキヌレニン経路を持たないが、エールリッヒ経路で最初に働く *ARO8* 及び類似の *ARO9* に相同性を示す *S. pombe* の３つの遺伝子(*aro8a, b, c* と命名)の各々を破壊すると、*aro8a* の破壊株のみフェニルアラニン要求性を示すものの、いずれも生育自体には大きな影響はなかった。フェニルアラニン要求性は *S. cerevisiae* の *ARO8* 遺伝子の強制発現で相補され、*ARO9* 遺伝子も弱いながら相補した。*S. pombe* の *aro8a* 株は Trp に高感受性化したが、３つの相同遺伝子の同時破壊でも相乗効果や致死性は見られず、*aro8a* は他の２つの相同遺伝子(*aro8b, aro8c*)とは協調せず独自に機能していた。
アミノ酸の Trp による *S. pombe* の増殖阻害は培地の窒素源に影響を受け、質的に劣るプロリンが窒素源だと強い増殖阻害効果があるが、アンモニアでは弱く、またプロリン使用時の感受性を緩和するアミノ酸もあった。Trp の効果は殺菌的ではなく、生存率の極端な減少は認められない。Trp 存在下で液体培養を続けると徐々に生育が回復したが、生育後も Trp には依然として感受性を示すため、耐性変異が生じた細胞が生育したわけではない。更に、増殖阻害が強い条件では色素が生産されて培地が褐変した。着色には *aro8a* が必須で、エールリッヒ経路の後半で働く出芽酵母の *ARO10* を強制発現すると、色調が薄くなるとともに、増殖阻害も弱まった。*aro8a* の発現増強でも阻害が緩和されたので、増殖阻害は Trp 自体か、（存在の証拠はないが）エールリッヒ経路以外の反応で代謝・生成された何らかの物質が原因と考えられる。増殖停止時の細胞周期進行への影響などを含め、Trp の細胞生育阻害の詳しい機構について調べている。

L-tryptophan-induced inhibition of cell growth in fission yeast *S. pombe*

○Kenji Kitamura[1,2], Naoto Nagashima[2]
([1]Gene Sci., N-BARD, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words *Schizosaccharomyces pombe*, growth inhibition, dipeptide, tryptophan

1S-S4p03 液胞アミノ酸コンパートメンテーションの機構・生理・応用

○関藤 孝之[1], 河田 美幸[1,2]
（[1]愛媛大院・農, [2]愛媛大・学術支援センター）
sekito@agr.ehime-u.ac.jp

出芽酵母において、栄養豊富条件ではアミノ酸が液胞内へ能動的に取り込まれ、細胞内の約 50%が液胞内に存在する。また、飢餓条件でオートファジータンパク質分解によって液胞内に生じたアミノ酸は速やかにサイトゾルへと排出される。液胞内のアミノ酸は細胞内で大きな割合を占め、オートファジー欠損株の生存率は飢餓条件で大きく低下することから、液胞内外へのアミノ酸輸送は生理的に重要な役割を担うと考えられる。また応用面においても、液胞アミノ酸コンパートメンテーションの強化・改変は効率的な物質生産に向けての新たなアプローチとなりうる。我々は液胞アミノ酸輸送を担う分子装置の同定解析を進め、AVT トランスポーターファミリーに属する Avt1 がヒスチジンと中性アミノ酸全般を液胞内へと取り込む一方で、Avt3、Avt4、Avt6、Avt7 がいずれも幅広い基質特異性を有し、アミノ酸を液胞外へと排出することを明らかにした。さらに、TOG ファミリーの Ypq1、Ypq2、Ypq3 がそれぞれリジン／アルギニン、アルギニン、ヒスチジンを液胞膜小胞に取り込むことを見出した。しかし依然未同定のトランスポーターが存在すると考えられ、1984 年に報告されたアルギニンとヒスチジンの交換輸送活性も長らくその実体が不明であった。我々は塩基性アミノ酸輸送に関わる *AVT1* および *YPQ1*、*YPQ2*、*YPQ3* 遺伝子破壊株の交換輸送活性を検討し、Ypq2 を欠損すると活性が大幅に低下することを見出した。さらに、Ypq タンパク質間に保存された PQ モチーフに変異を導入しても、活性が大幅に低下した。これらは Ypq2 がアルギニンとヒスチジンの交換輸送活性の本体であることを示唆している。我々は、こうしたトランスポーターの同定と並行してその調節機構についても研究を進めている。以前のマイクロアレイ解析では *AVT1*、*AVT4*、*AVT7* の発現は飢餓条件において GATA 転写因子に依存して誘導されることが示唆されていた。GATA 転写因子はプロリンのような資化しにくい窒素源を代謝する酵素およびトランスポーターの遺伝子発現を誘導し、窒素源の効率的な利用に重要な役割を果たす。我々はリアルタイム定量 PCR によって AVT ファミリー全７種の発現を再検討し、マイクロアレイと一致した結果を得るとともに、*AVT6* の発現が GATA 転写因子に依存することを新たに見出した。また、*AVT4* の発現がプロモーター中の GATA 認識配列への変異導入によって抑えられたことから、GATA 転写因子が直接 AVT4 を転写することが示唆された。こうした転写段階での調節に加え、Avt や Ypq タンパク質のうちいくつかは翻訳後段階での調節も示唆されており、液胞アミノ酸輸送の活性は細胞膜でのアミノ酸取り込みと同様に様々な段階で調節されることが分かってきた。
液胞アミノ酸トランスポーターの生理機能を理解する上で、欠損もしくは過剰発現による表現型は有効な手がかりを与えてくれるはずである。我々はプロリンを窒素源とした培地（SD+Pro）にリジンを添加すると、*avt4*Δ 株の生育が著しく阻害されることを見出した。またこの条件で *avt4*Δ 株の液胞内にはリジンが高度に蓄積していた。プロリンを細胞内に取り込むトランスポーター Put4 はグルタミンのような資化しやすい窒素源の存在下では、TORC1 の活性化が引き金となって液胞内へと移行、分解される。出芽酵母はリジンを窒素源として利用できないにも関わらず、*avt4*Δ 株では、TORC1 の基質である Sch9 のリン酸化と Put4 の液胞内への移行がともに野生株より長期間持続することが分かった。このことは液胞内に蓄積したリジンが TORC1 の活性に作用する可能性を示す。近年、動物細胞ではリソソーム内のアミノ酸が mTOR に作用し、活性を制御するとのモデルが提唱されている。我々の結果もこれと一致し、液胞内のアミノ酸が単なる栄養源としてではなく、シグナル分子としてアミノ酸代謝調節の根幹を担う可能性を示している。
液胞など内膜系のトランスポーターの研究は端緒についたばかりである。我々を含め最近の研究によって液胞膜では細胞膜と同様に多くのトランスポーターが厳密な制御を受け、アミノ酸を輸送することが分かってきた。さらに、液胞膜ではアミノ酸だけでなく多様な物質が液胞内外へと輸送される。将来、液胞膜局在性トランスポーターの機能や局在の改変により、有用物質の高度蓄積や細胞外排出能を賦与した新規有用酵母株の開発が可能と考えている。

The mechanism, physiology and application of vacuolar amino acid compartmentation

○Takayuki Sekito[1], Miyuki Kawano-Kawada[1,2]
([1]Grad. Sch. Agr., Ehime Univ., [2]ADRES, Ehime Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, vacuole, amino acid transporter, autophagy

1S-S4p04 清酒醸造におけるアミノ酸高生産酵母の積極的活用

○小高 敦史
（月桂冠・総研）
a_kotaka@gekkeikan.co.jp

清酒の味に寄与する成分として，糖，有機酸，アミノ酸などがある．糖は甘味，有機酸は酸味，アミノ酸は甘味・苦味・旨味などを呈する．糖や有機酸のバランスを変えることによって甘口・辛口など様々なタイプの清酒が造られる．それに対し，アミノ酸は多すぎると雑味と感じられるため，低く抑えられることが多い．清酒もろみにおけるアミノ酸の生成は，麹の酵素による米タンパク質の分解によるものと，酵母の生合成によるものがある．また，酵母が死滅することによって，菌体内のアミノ酸が清酒もろみ中に放出される．このようなことから，プロテアーゼ活性の低い麹菌株の使用や，酵母の死滅を抑えるような発酵管理などにより，清酒もろみ中でのアミノ酸の生成を抑えている．一方，個々のアミノ酸に目を向けてみると，呈味性の良いアミノ酸や，生理機能を持ったアミノ酸がある．このようなアミノ酸のみを清酒もろみ中で増やすことができれば，差別化された清酒および酒粕を製造することができる．
この目的を達成するために我々は，アミノ酸高生産酵母を積極的に活用することにした．まず，アミノ酸アナログ耐性を指標にアミノ酸高生産酵母の選抜を試みた．各種アミノ酸アナログ耐性株を取得し，小仕込み試験にて評価したところ，プロリンアナログであるアゼチジン-2-カルボン酸（AZC）に耐性を示した株の中から高頻度でプロリン高生産株を見出すことができた．得られた変異株の変異点を調べたところ，多くの変異株はα-グルタミルキナーゼをコードする *PRO1* に変異が入っていることが確認できた．このような変異株は，プロリンによるフィードバック阻害が解除されていると報告されている [1]．また，変異型 *PRO1* がホモに導入されている株は，変異型 *PRO1* がヘテロに導入されている株と比べて，AZC 含有培地での増殖が良好であり，清酒小仕込み試験でプロリンをより高生産した．
一方，プロリン高生産株の多くがコハク酸低生産となっていた．α-ケトグルタル酸からプロリンへのフラックスが増大し，α-ケトグルタル酸からスクシニル-CoA，コハク酸の合成が減少したのではないかと推察している．プロリンは甘味，コハク酸は旨味のある酸味であることが知られている．そこで，本菌株は淡麗辛口清酒の呈味性改良への応用が考えられた．小仕込み試験を行ったところ，変異株は親株に比べてα-ケトグルタル酸，コハク酸，グルタミン酸の含量が低く，リンゴ酸含量がやや高く，ピログルタミン酸，プロリンの含量が高く推移した．上槽酒の日本酒度，アルコール分，アミノ酸度は親株とほぼ同じであったが，変異株は親株より酸度が低く，官能的にも酸味が抑えられた淡麗辛口な酒質であると評価された．また，実地醸造においても同様の結果が得られ，本菌株が産業上有用であることが示された [2]．
現在，酒粕についての解析や，他のアミノ酸アナログ耐性株についての詳細な検討を行っている．

1) Takagi, Biosci. Biotechnol. Biochem., doi: 10.1080/09168451.2019.1576500
2) Kotaka et al., J. Brew. Soc. Japan, in press

Utilization of the sake yeast strains producing large amounts of amino acids

○Atsushi Kotaka
(Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

Key words sake yeast, amino acid, amino acid analogue

1S-S4p05 アミノ酸の代謝制御・生理機能に着目した酵母の高機能開発

○高木 博史
（奈良先端大・バイオ）
hiro@bs.naist.jp

微生物におけるアミノ酸代謝とその制御機構は生育環境や代謝様式などで異なり、複雑かつ頑強なネットワークを形成し、様々な代謝経路・産物やシグナル分子の制御系とのクロストークも存在する。学術的には、それらの仕組みを解明し、生命現象を理解することが重要である。一方、細胞内アミノ酸含量を人為的に制御することで、発酵食品・エタノール・有用物質などの生産性改善、食品の高付加価値化（味・風味の差別化、健康機能性の向上など）が期待できる。本講演では、酵母に見出したアミノ酸の代謝制御機構と生理機能に関する基盤的知見および得られた知見を酵母の高機能開発に応用した例を紹介する [1]。

プロリン（Pro）・アルギニン（Arg）[2)-11)]
酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、Pro が種々のストレスから細胞を保護すること、γ-グルタミルキナーゼ GK のアミノ酸置換（D154N, I150T など）により、フィードバック阻害感受性が低下し、Pro が過剰合成されることを明らかにした。また、パン酵母で Pro を蓄積させると、冷凍・高糖生地の発酵力が向上し、Pro の有用性が実証できた。一方、Pro の生理機能としては、ROS レベルの制御、リボファジーへの関与、細胞寿命の延長などが示唆された。さらに、N-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 を介して合成される Arg からフラボタンパク質 Tah18 依存的に一酸化窒素（NO）が合成されること、Dre2 タンパク質が NO 合成を制御することを見出した。NO は転写因子 Mac1 を活性化し、Cu^{+}輸送体 Ctr1 の発現誘導による細胞内 Cu^{+}の増加とスーパーオキシドディスムターゼ Sod1 の活性上昇により、高温ストレス耐性に寄与すると考えられる。同様の機構はパン酵母にも存在し、Pro と NO の合成系強化により、製パンストレス（冷凍、乾燥）に対する耐性と発酵力が向上した。

ロイシン（Leu）[12)]
沖縄の蒸留酒「泡盛」は香りと味に特徴があり、それらの生成には酵母が関与する。清酒、パンの主要香気成分（吟醸香、バナナ香）である酢酸イソアミルは、前駆物質のイソアミルアルコールがエステル化して生成される。酢酸イソアミルの生成に必須であるロイシン（Leu）の合成は、α-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ IPMS の活性が Leu によるフィードバック阻害を受けることで制御されている。我々は泡盛の高付加価値化を目指し、泡盛酵母の Leu アナログ（TFL）耐性変異株から Leu 蓄積株を分離した。また、小仕込み試験を行い、親株に比べて酢酸イソアミル含量が増加した菌株を取得し、IPMS のアミノ酸置換（S542F, A551V）がフィードバック阻害解除、TFL 耐性および Leu 高生産の原因であることを明らかにした。本研究は泡盛酵母の育種に関する初の成果であり、本菌株で製造した泡盛は香味性向上と特徴的風味が認められ、2016 年に商品化された（HYPER YEAST 101）。

バリン（Val）[13),14)]
必須アミノ酸として、またイソブタノール前駆体として重要な Val の高生産を目的に、大腸菌の情報をもとにアセトヒドロキシ酸シンターゼ（AHAS）の調節サブユニット Ilv6 にアミノ酸置換（N86A, G89D，N104H）を導入したところ、Val による AHAS フィードバック阻害が解除され、細胞内 Val 含量が著しく増加した。また、2 種類の分岐鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ（Bat1, Bat2）を解析した結果、両酵素自身の活性や機能に差はなく、ミトコンドリア局在が効率的な Val 合成や細胞の生育に重要であることが示された。

[1)]Takagi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, in press. doi: 10.1080/09168451.2019.1576500. [2)]Sekine et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 4011, 2007. [3)]Kaino et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 5845, 2008. [4)]Sasano et al., *Int. J. Food Microbiol.*, 152, 40, 2012. [5)]Tsolmonbaatar et al., *Int. J. Food Microbiol.*, 238, 233, 2016. [6)]Takagi et al., *Yeast*, 33, 355, 2016. [7)]Nasuno et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 11821, 2013. [8)]Nishimura et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 430, 137, 2013. [9)]Nasuno et al., *PLoS One*, 9, e113788, 2014. [10)]Yoshikawa et al., *Nitric Oxide*, 57, 85, 2016. [11)]Sasano et al., *Microb. Cell Fact.*, 11:40 doi:10.1186/1475-2859-11-40, 2012. [12)]Takagi et al., *J. Boiosci. Bioeng.*, 119, 140, 2015. [13)]Takpho et al., *Metab. Eng.*, 46, 60, 2018. [14)]Takpho et al., *Microb. Cell*, 5, 293, 2018.

Functional amino acid engineering in yeast focused on metabolic regulations and physiological functions

○Hiroshi Takagi
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words yeast, amino acid, metabolic pathway modification, functional property

1S-S4p06 スフィンゴ脂質の健康機能性

○菅原 達也
（京大院・農）
sugawara@kais.kyoto-u.ac.jp

植物由来グルコシルセラミドや牛乳由来スフィンゴミエリンなどの「スフィンゴ脂質」が、「食品セラミド素材」として注目されてきている。セラミドとはスフィンゴイド塩基に脂肪酸がアミド結合した構造であり、スフィンゴ脂質の基本骨格ともなる。皮膚の最外層である表皮にセラミドが多く存在し、皮膚バリア機能に深く関わっていることから、スフィンゴ脂質の経口摂取による皮膚バリア向上作用が期待されており、実際に多くの効果が報告されている。しかしながら、「どんな食品に、どんな化学構造のスフィンゴ脂質がどれくらい含まれているのか」、「どのように消化されて、体内に吸収されるのか」、「どのように体に（皮膚に）作用するのか」といった、食品成分や栄養素としての情報は、他の脂質成分に比べて極めて乏しい。そこで我々は、スフィンゴ脂質の定量法や化学構造の解析法を検討し、それらを応用することで、スフィンゴ脂質の健康機能性の評価を進めている。

ヒトを含むほ乳動物において、セラミド骨格を担う主要なスフィンゴイド塩基は、炭素数 18 のスフィンゴシンである。しかしながら自然界には、炭素数や二重結合の数が異なるスフィンゴイド塩基分子種も数多く存在し、その組成や構造は生物種によって異なることが知られている。高等植物においては、ジヒドロキシ型の 8-スフィンゲニンや 4, 8-スフィンガジエニン、トリヒドロキシ型の 4-ヒドロキシ-8-スフィンゲニンといった 8 位に不飽和結合をもつスフィンゴイド塩基分子が主要である。また、キノコや酵母といった真菌類の一部には、9-メチル-4,8-スフィンガジエニンが、海産無脊椎動物には 17 や 19 といった奇数の炭素鎖や、二重結合を 3 つもつスフィンゴイド塩基が確認されている。食品中の主要なスフィンゴ脂質は、畜産物に含まれるスフィンゴミエリンと、穀類や豆類、野菜類などの農産物に含まれるグルコシルセラミドである。農産物のグルコシルセラミド含有量を測定したところ、可食部 100 g あたり 1～10 mg 程度であり、穀類や豆類では 10～40 mg/100 g と比較的多く含まれていることがわかった（Lipids, 34, 1231, 1999）。また、海産物では、魚類の脳にスフィンゴ脂質が多いことや棘皮動物であるナマコにグルコシルセラミドが多く含まれていることも示された（J Oleo Sci 59, 509, 2010）。

経口摂取されたスフィンゴ脂質は、極性基（リン酸コリンや糖）、脂肪酸、スフィンゴイド塩基といった構成単位に消化された後、それぞれが小腸上皮細胞から体内へと吸収される。動物細胞に主要なスフィンゴイド塩基であるスフィンゴシンは、小腸上皮細胞に取り込まれた後、一部はスフィンゴ脂質に再利用されるが、大部分は脂肪酸に代謝変換されることが示されている。一方、我々は植物型スフィンゴイド塩基は、スフィンゴシンと比べて小腸上皮細胞から吸収されにくいことを見出した（J Nutr 133, 2777, 2003; J Lipid Res 51, 1761, 2010）。スフィンゴシン以外のスフィンゴイド塩基は、薬物排出トランスポーターである P-糖タンパク質によって、細胞外へ排出されることも示唆された（Biosci Biotechnol Biochem 68, 2541, 2004; J Nutr Sci Vitaminol 63, 44, 2017）。セラミドがそのまま吸収されるか否かはこれまでに直接的には示されていなかったが、スフィンゴミエリン投与後のラットリンパ液から、その組成に類似したセラミド分子種が検出され（Lipids 50, 987, 2015）、さらに菌体由来の遊離セラミドを経口投与したマウスの血中からも、その組成に類似したセラミド分子種が検出されたことから、セラミドの一部は、分解を受けずに直接吸収される可能性が高いと考えられる。

植物由来グルコシルセラミドや牛乳由来スフィンゴミエリンの摂取による皮膚バリア改善作用が報告されており、我々もまたその効果を動物実験にて確認している（Exp Dermatol 21, 448, 2012; J Dermatol Sci 78, 224, 2015）。前述のようにスフィンゴ脂質の吸収率は極めて低く、経口摂取されたスフィンゴ脂質が皮膚に到達して再利用されている可能性は考えにくい。さらには、摂取されたスフィンゴ脂質と表皮に含まれるセラミドの化学構造は、厳密には異なるにも関わらず、皮膚に対する効果が認められている。ナマコ由来グルコシルセラミドでも同様の効果が確認され（J Agric Food Chem 64, 7014, 2016）、異なる化学構造のスフィンゴ脂質でも皮膚に対する効果に大きな違いがないことから、直接的な影響ではないことが考えられる。スフィンゴ脂質摂取による表皮セラミド合成酵素の発現上昇が確認され、内因性スフィンゴ脂質の合成を促進することが皮膚バリア機能向上作用の機構の一つとして推測される。一方で、ナマコ由来グルコシルセラミドの摂取による盲腸内短鎖脂肪酸の増加も確認しており、スフィンゴ脂質の摂取が腸内環境に与える影響にも興味がもたれる。

Function of dietary sphingolipids for health

○Tatsuya Sugawara
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words food function, intestinal absorption, skin, sphingolipids

1S-S4p07 植物・真菌由来スフィンゴ脂質の消化管への機能性

○木下 幹朗
（帯畜大・食品科学）
kinosita@obihiro.ac.jp

スフィンゴ脂質は真核生物の生体膜の構成脂質として普遍的に存在している,各種クロマトグラフ法並びに質量分析法等の分析技術の進歩によって,これらの脂質群の化学組成が明らかになりつつある。近年では医学生物学の分野においてこれらの脂質群の重要性が認識されてきた。特に,１９９０年代 Merrill らの研究グループが発がんに関わるプロテインキナーゼ C の特異的阻害剤という報告(その後特異的の部分は否定されました。) から始まり、その後、当時話題となっていたプログラム細胞死（アポトーシス）誘導へのセラミドのセカンドメッセンジャーとしての関与、スフィンゴシン１リン酸と細胞増殖並びに遊走への関与並びに受容体の発見等、細胞内情報伝達物質としての機能が注目され始めた。また,農学的な機能性食品としての可能性については,Merrill らの研究グループの Schemltz らが哺乳類由来のスフィンゴ脂質で大腸がん予防効果を実験動物で初めて証明した。また,マイコトキシンである fumonisin はスフィンゴイドからセラミドへの生合成を阻害することが認められた 5。以上のことから,スフィンゴ脂質の各種生物活性について,現在多くの知見が集まりつつある。しかしながらグリセロリン脂質が様々な生物現象に,セカンドメッセンジャーなどのシグナル分子として作用している点や,プロスタグランジンをはじめとする脂肪酸の生理機能はかなりの部分明らかになっているが,スフィンゴ脂質がこれらに比較するといまだに不明な点が多い本シンポではではスフィンゴ脂質の中でも哺乳類と構造が異なる植物由来のスフィンゴ脂質の化学特性を哺乳類と比較しつつ解説したのち,食品機能性、特に,消化器官に対する機能性について,最近の知見を交えつつ発表する。

１. 大腸腺腫(ポリープ)への機能(１)

Schemltz らが哺乳類由来のスフィンゴ脂質を発表したことから,筆者らは植物や真菌由来のスフィンゴ脂質の大腸がんへの効果について調べた。また,セラミドやスフィンゴイド塩基には食餌性植物並びに真菌（酵母）由来グルコシルセラミド(GlcCer)は 1,2 ジメチルヒドラジン塩酸塩(DMH)誘導大腸腺腫発症を抑制すること見出した。上の細胞系での研究と実験動物による研究の結果より,スフィンゴ脂質は,大腸ガンに対して,１. 発症予防,２. 大腸ガン自体の排除（がん細胞の排除）、の２つの機能が考えられる。すなわち,動物実験の成績より,大腸ガンの前段階である,ACF の発症を抑制し,スフィンゴイド塩基やセラミドが大腸ガン細胞に対して,アポトーシスを誘導することである。今後実験動物系での大腸ガン発症系での長期投与実験を行うことも重要である。また,最近問題化している de novo 型大腸ガン（腺腫を経ずに直接癌が粘膜に生じる）への効果についても今後の課題である。

２. 腸管炎症に対する機能(2.3.4)

DMH 投与大腸ガンモデルマウスにおいて大腸腺腫発症抑制効果を見出し,この実験中に観察した大腸表面部の形態より食餌性スフィンゴ脂質は,大腸発ガン予防効果のみならず,抗炎症作用も期待できる所見を得た。そこで,デキストラン硫酸ナトリウム(以降 DSS)を用いた腸管炎症モデル動物系での,食餌性グルコシルセラミドの影響を調べた。その結果,グルコシルセラミド摂取は,DSS による大腸の炎症に伴う体重の減少を抑制することを見出し, またこの時,食餌性グルコシルセラミドは炎症性サイトカイン並びにケモカインを抑制することを報告した。すなわち食餌性グルコシルセラミドは腸管の炎症を抑制するので,そのメカニズムを解明する目的で,この機能の詳細を解明する目的で腸管モデル細胞である分化型 Caco-2 細胞を用いて炎症性ストレスを与えた場合のスフィンゴ脂質の影響を研究した。すなわち Caco-2 細胞を 3 週間コンフルエント状態で培養し, 分化型 Caco-2 細胞を誘導した。これに炎症性刺激として LPS (0～50 μg/mL),TNF-α (0～50 ng/mL)を用いた。スフィンゴ脂質 (グルコシルセラミド [GlcCer],ガラクトシルセラミド [GalCer]等)を 0～50 μM 添加し,細胞数の変動,細胞核の DAPI 染色による核の形態観察 4),抗体アレイを用いたサイトカインの変化,TLC 分析等を詳細に調査した。分化型 Caco-2 細胞において LPS 及び TNF-α 添加群では細胞増殖の抑制並びにアポトーシス細胞の有意な増加が観察された。一方,スフィンゴ脂質の添加がこれらの現象を抑制しました。すなわち,スフィンゴ脂質は細胞外からの炎症ストレスを緩和する可能性が示唆されました。また,サイトカインについて抗炎症性サイトカイン及びその他因子に関して顕著な差は確認されなかったが,一方で炎症性刺激によって誘導された炎症性サイトカイン並びにケモカインはスフィンゴ脂質添加により抑制傾向を示しました。また,この傾向は MIF,IL-6, IL-8, IL-18, ICAM-1 で顕著であった。さらに TLC 分析の結果ではスフィンゴ脂質が細胞表面においてその存在が確認され,この炎症緩和作用の作用箇所が細胞表面であることが示唆された。1. J Oleo Sci|, 2005, 54, 45-49. 2. J Oleo Sci 2017, 66, 1337-1342. 3. J. Oleo Sci. 2015, 64, 737-742, 4. J. Oleo Sci. 66 1337-1342

Effect of plant/fungi origin sphingolipid in diigestive tract

○Mikio Kinoshita
(Dept. Food Sci., Obihiro Univ. Agric. Vet. Med.)

Key words sphingolipid, cerebroside, inflammation

1S-S4p08 腸内細菌によるグルコシルセラミドの分解

○浅沼 成人
（明治大・農）
asanuma@meiji.ac.jp

スフィンゴ脂質の摂取は、抗大腸癌、抗炎症性腸疾患、抗アトピー性皮膚炎、美肌効果などの多様な作用を持つことが報告されている。天然のスフィンゴ脂質の給源としては、動物性のスフィンゴミエリンと植物性のグルコシルセラミド(GluCer)が代表であるが、これらを摂取した場合はいずれもセラミドやスフィンゴイド塩基に分解されてから吸収されると考えられている。近年は、多くの植物性食品に含まれていることから GluCer が注目されているが、GluCer は小腸で分解されにくく、摂取した GluCer の多くが大腸にまで流下すると考えられる。このことは、宿主の分解酵素の活性が低いことだけでなく、スフィンゴシン以外の化学構造のスフィンゴイド塩基は P-糖タンパク質による排出を受けやすいことも関係している。しかし、大腸には多種多様な腸内細菌が生息しているので、その中には GluCer 水解能を持つものが存在する可能性がある。腸内細菌の利用により GluCer からセラミドへの水解を増強すれば、食事性の GluCer の生理効果が更に高まると予想し、GluCer 水解能を持つ腸内細菌の探索を行ったので、その結果を報告する。ヒトの腸内細菌やラットの盲腸内細菌の中にグルコシルセラミダーゼ活性を持つものが存在することが報告されているが、我々が調べた限りでは、ヒトやラットの消化管内に GluCer 水解菌が必ずしも存在するわけではなく、これはイヌ、ネコ、ブタ、ウシ等の他の動物でも同様であった。むしろ、消化管内に GluCer 水解菌を保有する個体の方が希少であった。このことは、食事性 GluCer がほとんど分解や吸収を受けずに糞中に排泄されるという報告と一致する。動物の糞便より単離された GluCer 水解菌としては、*Blautia glucerasea* と *Glucerabacter canisensis* があり、どちらも *Clostridium* クラスター XIVa に属する菌であり、GluCer をセラミドに水解したが、セラミドからスフィンゴイド塩基への分解は行わなかった。また、ある動物個体の糞中混合細菌には、*B. glucerasea* も *G. canisensis* も存在しないにもかかわらず、GluCer の分解活性を示すものがあることから、これら以外の GluCer 水解菌も存在すると考えられ、動物個体によっては複数種の GluCer 水解菌が消化管内に生息する可能性もある。GluCer または GluCer 含有食品を給与したマウスに、*G. canisensis* を経口投与したところ、糞中に排泄される GluCer の量が低下した。このような GluCer 水解菌を腸管内で増やすことができれば、消化管内での GluCer からのセラミド産生が増加すると考えられる。デキストラン硫酸 Na を用いて腸炎を発症させたマウスに、*G. canisensis* を用いて調製したセラミドを供与したところ、血便や軟便といった症状は改善され、その程度は GluCer を供与した場合よりも大きかった。このことは、食事性 GluCer よりも食事性セラミドの方が生理効果が高い事を示しており、より分解された形であるセラミドの方が吸収されやすいのであろう。従って、GluCer を含む植物性食品を摂取した場合に、GluCer 水解菌をプロバイオティクスとして使用することで、GluCer 利用量が増加すると考えられ、今後はその機能を応用することが期待される。

Degradation of glucosylceramide by intestinal bacteria

○Narito Asanuma
(Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words intestinal bacteria, ceramide, glucosylceramide, probiotics

1S-S4p09 アジア人の食習慣と腸内細菌叢と健康に関する研究

○中山 二郎
（九大院・農）
nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp

ヒト腸内に共生する数百種・数十兆個から成る腸内フローラと呼ばれる細菌群集は、宿主が摂取する食物の消化残渣を大腸にて代謝し、宿主の健康に大きな影響を与えている。よって、腸内フローラはヒトの第三の臓器とも言われており、医学分野を始め、多くの研究が最近盛んになされている。特に、食との関係については、「何を食すると、どのような腸内細菌叢が構築され、それがどのように宿主の健康に影響を与えるか？」という疫学的な調査も盛んに行われている。そのような中、我々は、多様でユニークな食文化と健康長寿を誇るアジア人の腸内フローラに興味を持ち、アジア 10 か国の共同研究者と研究コンソーシアム（Asian Microbiome Project）を設立し、その調査を行ってきた。その結果、(1)アジア人の腸内フローラは発展途上国型と先進国型の二つに大きく分かれること、(2)国の食習慣を反映した特徴が腸内フローラに見られること、(3)中でも日本人の腸内フローラはビフィズス菌を多く保有するなど特徴的であること、(4)発展途上国では、食の西欧化とともに短鎖脂肪酸の腸内発酵量が低減するなど、野菜・穀類を中心としていた頃に保持していた優良な腸内フローラの機能が失われつつあること、(5)アジア伝統食品の中には腸内フローラを優良化する成分が含まれること、以上が示された。総じて、アジアの優良な食習慣が腸内フローラに反映されているものの、食の近代化によりその崩壊が始まっており、レトロスペクティブにアジアの伝統食を研究しながら、食育と食創を展開させることの重要性が明確に示された。

一方、日本人の腸内細菌叢はアジアの中においても、いち早く近代化を成し遂げた先進国の側面と、世界で一二を争う長寿国としての両側面から大変興味が持たれる。我々は、最近、116 名の日本人成人の糞便細菌叢を、細菌組成に基づいてクラスタリングすると、7 つの特徴的な細菌組成を有するグループが構成され、各グループがそれぞれ特徴的な食習慣や生活習慣とリンクしていることを見出した。特に、高脂肪食、低食物繊維食、多飲酒や日々の服薬、等が特定のグループに相関していた。また、さらにそれらの食習慣や生活習慣に相関するグループは、糞便中の一次胆汁酸の比率が高く、逆に酪酸量が少なく、腸内フローラの重要な機能である胆汁酸代謝能と酪酸発酵能が減弱していることが示された。このように腸内フローラについて、構造と機能の両面から集団においてきちんと観察することにより、食が腸内フローラに与える影響について俯瞰的に捉えることが可能となることが明示された。

近代化が着々と進むアジア各国において、アジア人が現代食と向き合いながらどのように健康をどのように維持していくべきか、腸内フローラの研究から一つの解決の糸口が見出されると期待される。

Asian Microbiome Project: Study on gut microbiota as interface between diet and health

○Jiro Nakayama
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words microbial flora, Asia, gut, diet

1S-S4p10 食物繊維と 腸内細菌叢

○徳井 教孝
（中村学園大・薬膳科学研）
yakuzen2010@nakamura-u.ac.jp

はじめに
日本の食文化の要となる米の消費量は減少し、小麦文化の象徴であるパン食が増加している。また現在では糖尿病患者の増加に伴い、低炭水化物食の流行の兆しがみられ、米への関心がさらに揺らいでいる。戦前には 1 日当たり 25g 以上を示した食物繊維摂取量は米の消費量低下とともに減少し、1970 年頃には 1 日当たり約 15g となり、現在までほぼこの値（平成 29 年の国民健康・栄養調査結果では、20 歳以上の男女の 1 日平均食物繊維摂取量は男性が 15.2g、女性が 14.8g）で推移している 。食物繊維摂取量の目標量（生活習慣病の予防が可能となる摂取量であり、2015 年版食事摂取基準の目標量は、18 歳から 69 歳まで男性は 20g、女性は 18g、70 歳以上では男性 19g、女性 17g ）を満たすためには、１日当たり 4g から 5g の食物繊維量を増やす必要がある。
最近の食物繊維摂取と健康に関する疫学研究では、食物繊維はまだまだ未知の機能性を保有していることを示唆している。例えば食物繊維を 1 日当たり 30g 以上摂取している高齢者はがんや心臓病、脳卒中、糖尿病、肺炎などの呼吸器疾患、抑うつや認知障害などの罹患リスクが低く、高齢になっても元気な老人でいる可能性が高い（J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2016）。また動物実験によると、認知能力の低下を招く脳の免疫細胞の慢性的炎症を抑制する作用が水溶性食物繊維に存在することが示唆されている（Front. Immunol.,2018）。このように、食物繊維は便通改善や血糖・脂質代謝を改善するばかりでなく、長寿要因の１つとなることが明らかにされつつある。

長期食生活調査における食物繊維摂取量の算定
日常の食生活における食物繊維摂取量を検討した研究が少ないため、福岡県在住の女性を対象に四季 16 週間の食事記録を実施して食物繊維摂取量を算定した。食事記録データが有効であった 34 名のデータを用いて、総食物繊維、水溶性食物繊維、不溶性食物繊維の摂取量を算出した。また、どの食品から食物繊維を摂取しているかを明らかにするため、各食品からの食物繊維摂取量の全食物繊維摂取量に対する寄与率を上位 50 まで求めた。16 週間の総食物繊維、水溶性食物繊維、不溶性食物繊維の 1 日平均摂取量は、それぞれ、9.5±4.9g、1.6±1.1g、7.7±3.8g であり、総食物繊維摂取量は 10g 未満の低い値を示した。食品別食物繊維摂取量は、総食物繊維では精白米が全総食物繊維摂取量の 10.3%と最高の割合を示し、上位 50 食品で全体の 86.7%を占めた。水溶性食物繊維においては、温州みかんの割合が 9.3%を示し、上位 50 食品で 89.9%を占めた。不溶性食物繊維は総食物繊維と同様に精白米が 12.7%と最も高い値を示し、上位 50 食品で 88.9%であった。これら累積割合はどの繊維も上位 100 食品あたりでプラトーに達した。これらの結果から、食物繊維摂取量は予想以上に低かったが、寄与率の高い 50 食品程度を摂取することで摂取量の増加が期待されることが明らかとなった。

食物繊維高含有米摂取と腸内細菌叢の変化
食物繊維摂取量を 1 日当たり約 5g 程度増加させるには、個人の食習慣を変えることが必要となるが長期間実施することは困難と考えられる。そこで、日常摂取している米を食物繊維高含有米に変えることで、食習慣を大きく変えることなく食物繊維摂取量を増加させることが可能と考え、食物繊維高含有米摂取による食物繊維増加、および腸内細菌叢への影響を検討した。2016 年 2 月、福岡県 K 町、F 市の住民を対象に、無作為に 3 群（D 群：食物繊維高含有米摂取群 54 名、O 群：オリゴ糖高含有米摂取群 53 名、C 群：精白米を摂取する群 54 名）に分けた。試験摂取期間は 4 週間とし、摂取前後に健康調査、排便調査、腸内細菌叢分析を行い、試験期間中は毎日ご飯の摂取量、排便回数を記録してもらった。解析は摂取前後のビフィズス菌構成割合の増加率を算出し増加率が０を超える人の割合を、C 群を対照群として D 群、O 群と比較した。その結果、食物繊維高含有米の各週の摂取頻度は 1 日お茶碗 2 杯程度で精白米摂取群に比べ 4.5g 程度多く食物繊維が摂取していた。増加率が 0 を超える人の割合は、D 群は 44.44%、O 群は 48.72%、C 群は 22.22%で、D 群、O 群とも C 群と比較してビフィズス菌の構成割合が増加した人の割合が有意に高かった。以上から、食物繊維高含有米、オリゴ糖高含有米を摂取することにより、ビフィズス菌の増加が示唆された。

結語
日本人の食物繊維摂取量は現在目標量に約 5g 程度不足しており、これを補うためには、食物繊維の多い米を摂取することが解決策の１つである。超高齢社会の日本では食物繊維摂取量増加は生活習慣病のみならず、認知機能障害に対してもその予防策として重要な保健政策と考えられる。

Intake of dietary fiber and improvement in gut microbiota

○Noritaka Tokui
(Inst. Prev. Med. Diet., Nakamura Univ.)

Key words microbial flora, dietary fiber, rice, epidemiology

1S-S4p11 高齢者の食習慣と腸内細菌叢の多様性

○三成 由美
（中村学園大・栄養）
yoshimi@nakamura-u.ac.jp

【目的】現在、我が国は超高齢社会に突入し、要介護認定者数が年々増加している。通所リハビリテーションは高齢者の心身機能、活動、社会参加を最大限に発揮できるように支援する介護予防サービスであり、介護予防の中で栄養も重要視されている。本研究は、通所リハビリテーション施設に通う高齢者の食習慣、生活習慣や排便習慣の実態について明らかにし、その評価として対象者の便検体を分析し、高齢者の食事や生活習慣と腸内細菌叢との関連について検討したので報告する。
【方法】調査期間は 2018 年 9～10 月、調査対象者は福岡県 O 市の同意の得られた通所リハビリテーション施設に通う高齢者 80 名（男性 23 名、女性 57 名）である。調査内容は食事や生活習慣、排便習慣、体質と健康、腸内細菌叢である。腸内細菌叢の分析は(株)テクノスルガ・ラボに依頼し、次世代シーケンサー・アンプリコン解析で行った。腸内細菌の種数（多様性）は 129 属において各対象者に検出された腸内細菌をカウントし、中央値で低多様性群、高多様性群の 2 群に分け解析を行った。解析には統計解析ソフト「IBM SPSS Statistics ver.22」を用いた。食事や生活習慣、排便状況、腸内細菌叢の結果は $\chi 2$ 検定を行い、有意水準は 5%未満とした。本研究は中村学園大学の倫理委員会からの承諾を得て実施された。
【結果】対象者の BMI は、18.5 未満の割合が男性、女性それぞれ 13.0%、28.6%であった。排便習慣では便秘薬服用者が男性、女性それぞれ 39.1%、35.1%であり、便秘薬服用有り、無しにおいて排便回数 1 日 1 回未満は男性、女性それぞれ 41.4%、29.4%であった。生活習慣と排便習慣との関連では 1 日の水分摂取量がコップ 5 杯以上とコップ 5 杯未満で比較した結果、「排便の量」をバナナに例え中バナナ 1 本(約 100g)以上はそれぞれ 50.0%、22.2%であり（$p < 0.05$）、現在歯数が 10 本以上と 10 本未満で比較した結果、中バナナ 1 本以上はそれぞれ 52.6%、21.4%であった（$p < 0.05$）。食習慣と排便量との関連では、中バナナ 1 本以上の排便量は「ヨーグルト」を毎日食べる、毎日食べないがそれぞれ 64.3%、23.5%であり（$p < 0.05$）、「海藻類」を 1 日 1 回以上食べると食べないがそれぞれ 59.1%、14.8%であった（$p < 0.05$）。対象者の腸内細菌の種数（多様性）については、「要介護度」で要支援、要介護の高多様性群はそれぞれ 71.4%、26.3%であり（$p < 0.05$）、「朝食タイプ」で和食タイプと和洋折衷タイプでそれぞれ 58.3%、11.1%であった（$p < 0.05$）。食品において「海藻類」で 1 日 1 回以上食べると食べないの高多様性群はそれぞれ 61.1%、26.7%であった（$p < 0.05$）。
【考察】通所リハビリテーション施設に通う高齢者は BMI が低いという問題点が抽出され、3 人に 1 人が便秘であることが示唆されたため、低栄養予防と腸内環境改善の食事の支援が重要であると考えられる。特に、腸内細菌の多様性を高める朝食は和食でプレバイオティクス食品である海藻類やプロバイオティクス食品であるヨーグルトを取り入れることが重要であり、現在、中医学を基本とした潤腸通便作用のある食材も取り入れた日本型薬膳メニューの開発に取り組んでいる。さらに、要介護に比べ要支援が腸内細菌の種数が多様であったことから、高齢者の自立を支援するための食のサポートも重要であると考えられる。

The influence of elderly dietary habits on the diversity of gut microbiota

○Yoshimi Minari
(Dept. Nutr. Sci., Nakamura Gakuen Univ.)

Key words elderly, dietary habits, gut microbiota

1S-S5p01 微小重力環境での細胞培養と再生医療への応用

○河原 裕美[1], 猪村 剛史[2], 大塚 貴志[2], 弓削 類[1,2]
（[1]スペース・バイオ・ラボラトリーズ, [2]広島大院・医系科学研究科）
yumi@spacebio-lab.com

私達は、物理的刺激に対する細胞応答に関する研究を行ってきた。特に重力は、人類の進化にも影響を与えた物理的刺激である。クリノスタットとは、回転により重力の方向を変えることのできる装置の総称で、重力生物学の実験手段として百数十年以上前から利用され、主に植物の重力による影響などの研究に使われてきた。私達は、このクリノスタットを細胞培養実験に応用するため、重力制御装置 Gravite（スペース・バイオ・ラボラトリーズ社製）を開発、製品化した。Gravite は、直行二軸のまわりに試料を 360°回転させ、重力ベクトルを時間軸で積分することにより宇宙ステーションと同じ 1000 分の 1G の微小重力環境をつくるだけでなく、3G までの過重力環境を作り出すことができる特徴がある。発売以来、NASA・ケネディー宇宙センターでも宇宙実験の予備実験に使う装置として活用されるなど、国内外の大学等の研究機関で Gravite を使った研究が行われている。
宇宙飛行士が宇宙へ行くと、筋萎縮や骨萎縮が起こることはよく知られている。宇宙の微小重力環境では、筋や骨の細胞の分化が抑制されることがこの一因と考えられている。Gravite による微小重力環境で筋芽細胞を培養すると、1G 環境下の静置培養と比較して筋の分化が抑制された。一方、過重力環境で筋芽細胞を培養すると、静置培養と比較して筋の分化が促進された。このように、重力は細胞の分化に影響を与えることが分かった。
細胞分化を抑制するという微小重力環境の特性を逆手にとり、近年、弊社では広島大学と共同で幹細胞培養と再生医療の研究に力を入れている。その結果、Gravite で培養した幹細胞は、通常の静置培養した幹細胞と比較して、分化が抑制されるだけでなく、増殖が早いことが分かった。さらに、Gravite で培養した幹細胞は、抗炎症効果を示すサイトカインの発現が高く、培養した幹細胞を中枢神経系疾患モデル動物に移植すると、運動機能の回復が早いことも分かった。国内外で幹細胞の培養技術の開発、再生医療の治験が進む中、遺伝子操作をすることなく、また、過剰な薬品を使用することなく、微小重力環境の特性を利用して幹細胞を培養するだけで幹細胞の機能が向上した私達の研究成果は、質の高い幹細胞が培養できる培養技術として、再生医療の発展に寄与できるものと考えている。
宇宙開発が進む昨今、宇宙生物学など様々な研究分野で、重力をキーワードとして研究が加速的に進むことが予想される。昨年は、幹細胞に関する研究論文雑誌（Stem Cell and Development）で、幹細胞（stem cell）と微小重力（microgravity）をキーワードにした特集号が 2 巻も組まれる程、世界的にも研究が活発な分野の一つになっている。本シンポジウムでは、私達のこれまでの研究成果の一部を紹介する。

Cell culture system under microgravity for regenerative medicine

○Yumi Kawahara[1], Takeshi Imura[2], Takashi Otsuka[2], Louis Yuge[1,2]
([1]Space Bio-Laboratories Co., Ltd, [2]Grad. Bio. Med. Sci. Hiroshima Univ.)

Key words microgravity, cell differentiation, regenerative medicine

1S-S5p02 閉鎖系自動培養システム：CELLAFORTE

○竹内 誠亮
（ニプロ）
takeuchi-masakatsu@nipro.co.jp

【目的】ES/iPS 細胞や体性幹細胞などの幹細胞は、細胞治療や創薬開発の分野への貢献が大きく期待されている。ヒト幹細胞を産業利用に繋げるためには、細胞の効率的な確保方法、品質を維持・管理しつつ培養する培養方法の確立など、「品質の確保されたヒト幹細胞の安定的な大量供給」を可能にする基盤技術の開発が極めて重要である。
そこで当社は、これまで NEDO 委託研究プロジェクト「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術開発」、経済産業省委託研究事業「iPS 細胞等自動培養装置開発加速事業」、AMED 委託研究プロジェクト「再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システムの開発」に参画し、閉鎖系培養容器である培養バッグを用いた自動培養システムを開発した。
【方法】当社の自動培養装置では、培養容器としてシャーレ等ではなく、当社が技術開発を続けてきた閉鎖系培養容器である培養バッグの技術をベースとして開発した。培養バッグの特長は、ガス透過性の高いフィルムを採用した閉鎖系の容器であり、シャーレなどの開放系の培養容器と比較して培養中の汚染リスクが低減できる。またバッグ内の培養液の蒸発が低いため培養環境を高湿度に設定する必要がなく、機械化が容易になるといった点が挙げられる。この培養バッグを装置に搭載するバッグ回路の一部として、システムの開発を行った。
自動培養装置の機能としては、培地交換、継代、細胞観察など一連の培養行程を実施することができ、1 ロットの最大培養面積：2000cm^2 まで大量培養が可能である。装置は、培地・試薬を充填したバッグを保管する冷蔵／常温保管ユニット、バッグ回路を搭載して細胞培養する培養ユニット、培養プログラム入力設定・細胞観察・培養環境制御を行う制御ユニットにて構成される。
開発した自動培養システムを用いて幹細胞の自動大量培養を実施した。
【結果・考察】自動培養システムを用いて、ヒト iPS 細胞の自動培養を実施した結果、10^6 オーダーから培養を開始し、培養終了時には 10^8 オーダーまでの培養が可能であることを確認した。
当システムは、2016 年 4 月に幹細胞用自動培養装置「CELLAFORTE(セラフォルテ)」の製品名にて、再生医療等の研究用として受注生産にて販売開始した。また幹細胞に限らず接着細胞全般で利用可能であることから、各種細胞の培養評価を検証中である。

Closed automated cell culture system ： CELLAFORTE

○Masakatsu Takeuchi
(NIPRO)

Key words closed system

1S-S5p03 ヒト細胞の 3 次元培養によるがん微小環境の構築と解析

○高橋 治子
（広島大院・統合生命科学）
harukot@hiroshima-u.ac.jp

がん組織内にはがん細胞だけでなく、間葉系細胞(間葉系幹細胞や線維芽細胞)、免疫細胞、血管やリンパ管などの種々の細胞が存在し、特殊ながん特有の微小環境(がん微小環境)を形成している。このがん微小環境は、がん細胞が発生・増殖する過程に密接に関わっており、がん微小環境を構成する細胞は、正常状態とは異なり、がんの悪性化を促進する様に機能が変化している事が報告されている。そのため、がん治療においてもがん微小環境全体を標的とする重要性が示されている。特に、がん微小環境に豊富に存在している線維芽細胞はがん関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblasts; CAF)と呼ばれ、正常組織や炎症組織内の線維芽細胞とは異なる性質を獲得し、がん組織へ向けた血管新生やがんの浸潤・転移などに関わっていることから、がん微小環境形成において重要な因子となっている。さらに、近年がん微小環境構成細胞として新たに神経が報告され、がん組織に神経軸索が投射されており、神経細胞から分泌される神経伝達物質によりがん化を促進していることが明らかとなりつつある。
これらのがん微小環境中のがん関連細胞の機能については、これまで主に生体内(in vivo)において検討されてきた。これらの検討により、各がん微小環境構成細胞のがん組織中での役割が明らかになってきたものの、がん細胞とがん微小環境細胞との相互作用の時空間変化等については、未だ解明されていない点が多い。例えば、がん細胞によって周囲に存在する正常な線維芽細胞が CAF へ変化する過程や、がん細胞と近接している軸索末端と細胞体が遠く離れて存在しているヒトの末梢神経における、神経細胞全体の変化を詳細に解析することは生体モデルでは非常に困難である。
そこで我々は、がん微小環境中の細胞がが細胞との相互作用により変化する動態を補足し、解析することを目的とし、ヒト細胞を 3 次元的に in vitro で培養するがん微小環境モデルの構築を試みている。さらに、構築したがん微小環境モデルから細胞を回収し、トランスクリプトーム解析などを行うことにより、その動的な変化による細胞の性質の変容について解析している。本シンポジウムでは、特に線維芽細胞や神経細胞とがん細胞との相互作用に着目し、正常な線維芽細胞や神経細胞とがん細胞を共培養を行い、がんの周辺に存在する細胞がが細胞によって変化し、がん微小環境の形成に寄与する様子について、時空間的なイメージングや、遺伝子発現解析等から検討した結果に関して報告する。

Development and analysis of tumor microenvironment by 3D in vitro human cell culture

○Haruko Takahashi
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words tumor, tissue engineering, three dimension

1S-S5p04 細胞が発生する力のアッセイ

○松井 翼
（阪大院・基礎工）
ts.mat29@me.es.osaka-u.ac.jp

接着細胞が発生する力は、細胞の分化、増殖、自死、運動などの基本的な生命機能に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。この力は細胞内アクトミオシン収縮によるものであり、常に細胞内で発生している力学的因子である。またこの細胞が発生する力は病理・生理においても重要な因子として認識されつつある。たとえば、がん腫瘍は一般的に正常組織と比較して硬くなる。このとき、腫瘍内部のがん細胞は強い力を発生していると考えられている。強い力はがん細胞が接着している細胞外基質の硬化を促進し、腫瘍を取り巻く力学的な環境を変化させる。これにより周囲の間質細胞とがん細胞自身の機能変化が惹起され、悪性化にもつながっていると考えられている。このように、細胞が発生する力を制御するシグナル伝達経路は新たな創薬ターゲット候補である。しかしながら、力を対象とした評価技術、とりわけ高効率に膨大数のサンプルを評価可能なアッセイ法が未整備なため、広がりを見せていないのが現状である。そこでこの問題点を克服するために、著者が所属する研究グループでは、生命科学系のラボであれば利用可能なコンベンショナルな位相差顕微鏡で力を評価できる技術の開発を行ってきた。
力は見ることができないため、細胞が発生する力により、接着している基質の変形を可視化する手法が考案され研究レベルで用いられている。その代表例の一つに Traction Force Microscopy (TFM) が挙げられる。TFM では、ハイドロゲル基質内に変形マーカーとして蛍光ビーズを包埋し、共焦点レーザー顕微鏡でスキャンし、力発生時と、細胞を剥離した状態で撮影する無負荷時状態の参照画像から、力を計算している。しかしながら、高価な装置を用い、かつ複雑な解析技術が要求される。
一方、私たちが開発した手法では、無負荷状態の参照画像が不要であり、位相差顕微鏡で観察可能な技術である。細胞培養基質として PDMS ゲルを用いる。PDMS ゲル表面を酸素プラズマ処理し、表面に酸化薄膜を形成する。またプラズマ処理により PDMS 表面が親水化されるため、細胞外基質タンパク質が吸着しやすくなり細胞は接着できるようになる。細胞が接着し、力が基質へと伝達されると、酸化薄膜が座屈する。つまり、基質表面に凹凸構造が生じ、位相差顕微鏡で観察すると明線（凸部）となってあらわれ、シワ構造が形成される。このシワは細胞が発生する力と正の相関がある。したがって、薬剤投与前後、遺伝子ノックダウン、変異体導入などの介入実験におけるシワの長さを比較し、力と標的シグナル経路との関係を解析することが可能となる。本発表では、これまでに本手法を用いて行ってきた細胞発生力アッセイの実施例を示す。

参考文献

Fujiwara S, Matsui TS, Ohashi K, Deguchi S, Mizuno K. Solo, a RhoA-targeting guanine nucleotide exchange factor, is critical for hemidesmosome formation and acinar development in epithelial cells. PLoS One 13: e0195124, 2018.
Ichikawa T, Kita M, Matsui TS, Nagasato AI, Araki T, Chiang S-H, Sezaki T, Kimura Y, Ueda K, Deguchi S, Saltiel AR, Kioka N. Vinexin family (SORBS) proteins play different roles in stiffness-sensing and contractile force generation. J Cell Sci 130: 3517-3531, 2017.
Fukuda SP, Matsui TS, Ichikawa T, Furukawa T, Kioka N, Fukushima S, Deguchi S. Cellular force assay detects altered contractility caused by a nephritis-associated mutation in nonmuscle myosin IIA. Dev Growth Differ 59: 423-433, 2017.

Assay for contractile force generated by nonmuscle cells

○Tsubasa S. Matsui
(Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

Key words mechanobiology, contraction, assay

1S-S5p05 ディープラーニングとバイオメディカルイメージング技術

○新岡 宏彦
（大阪大学 データビリティフロンティア機構）
niioka@ids.osaka-u.ac.jp

深層学習(Deep Learning)は 2012 年の画像認識コンペティション(ILSVRC2012)にて優勝したトロント大のチームが使用していたのを発端とし、爆発的に全世界に広がった。その背景には、大きく分けて 3 つの要素があるとされる。1 つ目はビッグデータが得られるようになったこと、2 つ目は GPU などの高速計算が可能なハードの登場、3 つ目は深層学習アーキテクチャの進化である。応用範囲は画像認識だけではなく、物体検出、音声認識、画像生成、翻訳、囲碁 AI、ロボット制御など様々である。バイオや医療のデータも対象であり、様々な応用が報告されている。例えば画像認識では、病理画像から癌細胞を認識すること[1]や、皮膚の写真から皮膚ガンを認識すること[2]、レントゲン画像から肺炎を認識すること[3]などが可能となっている。これまで、長年の経験を積んだ医師でなければできなかったことが深層学習によって可能なってきており、画像認識という分野において深層学習は人やこれまでの技術を圧倒する結果が示されている。
本講演では、バイオメディカル画像データを対象とし、1.培養細胞の分化認識に応用した研究[4]、2.レーザー硬性内視鏡画像のノイズリダクションについての研究について報告する。
1 では、iPS 細胞の自動細胞培養技術を背景とし、再生医療に用いる細胞のクオリティーチェックを目的としている。実際に用いた細胞は C2C12(マウス筋芽細胞)であり、筋管細胞への分化を深層学習により自動検出した。分化のレベルを分化開始日からの日数を基準に 3 段階に設定したところ、画像分類の正答率はおよそ 91.3%となった。さらに、実際の顕微鏡画像にマッピングを行った。画像取得において、位相差顕微鏡を用いており、非侵襲かつ高速な計測が可能である。
2 では、CARS(Coherent Anti-stokes Raman Scattering)硬性内視鏡を用いた。CARS は非線形ラマン散乱過程の一つであり、化学結合の情報を画像として取得することが可能となる。試料はウサギ前立腺筋膜を用いた。有髄神経は脂質を豊富に含むミエリン鞘が軸索を覆っており、脂質の CH2 分子振動(2845 cm-1)の計測により、神経を特異的にイメージングできる。しかしながら、S/N が低く、画像を得るには数分程度の露光が必要であった。1scan(２秒)で得た神経の画像を入力データとし、同じ場所の画像を 100 回積算して得た S/N の良い画像を教師データとして学習を行った。結果として 1scan の画像から、およそ 7～10 回積算した場合と同等の画像を得ることに成功した。

参考文献

[1] Ehteshami Bejnordi B et al., JAMA, 318(22), 2199-2210 (2017)
[2] Esteva A et al., Nature, 542(7639), 115-118 (2017)
[3] Rajpurkar P et al., arXiv:1711.05225 (2017)
[4] Niioka H et al.，Human cell，31(1), 87-93 (2018)

Deep learning and biological imaging technology

○Hirohiko Niioka
(IDS, Osaka Univ)

Key words deep learning, bio-imaging, object recognition, noise reduction

1S-S5p06 フレキシブルフィルム力分布センサシステムの開発：動物細胞計測に向けて

○森脇 健司[1], 岩井 良輔[2], 太田 風輝[2], 藤崎 和弘[1], 笹川 和彦[1]
（[1]弘前大院・理工, [2]岡山理大・フロンティア理工学研究所）
moriwaki@hirosaki-u.ac.jp

【背景と目的】 力を通して細胞の機能の解明や評価を行うメカノバイオロジーはここ１０年で急速に進展してきている。一般的な評価は、原子間力顕微鏡や光／磁気ピンセット、せん断流れなど、外部から力をあたえた際の細胞の応答から行われている。また、細胞が能動的に生み出す力を評価するため、マイクロピラープレートが開発されている。ピラーのたわみ量を観察することで、細胞がプレートにあたえる牽引力の分布が評価できるが、ピラーにより凹凸のある特殊表面で培養する必要がある。一方、フィルム型応力センサが開発されている。電極対で感圧層を挟んだシンプルな三層構造からなり、薄くフレキシブルであるため曲面にも利用できる。また、電極はフォトリソグラフィ技術によってマイクロレベルで任意設計できるため、形状を工夫することで多点分布計測や滑り方向も含めた三次元的な力の計測に応用できる。我々はこのセンサを採血手技における熟練者の力覚計測や内壁に作用する力が計測できるカテーテルシミュレータなどバイオメカニクス分野への応用を進めてきた。
これまで接触界面に作用する圧縮力に着目して計測を行ってきたが、細胞の評価においては接着力などの引張力も計測できる必要がある。本センサは、力が加わると感圧層が変形し電気抵抗値が変化することでその力を検出できる。これまで本センサは、電極／感圧層／電極の三層構造をカバーフィルムによって封止していただけであり、引張方向の力がセンサ表面に作用すると電極と感圧層が分離し導電経路が遮断されてしまうため引張力は計測できなかった。そこで、本研究では電極と感圧層を十分に密着させたセンサを作製し、本センサシステムによる引張力の計測可能性を検討し、その力検出能を調べた。
【方法】 導電性ペーストによる接着（Bonded sensor）と圧縮状態での貼り合わせ（Compressed sensor）という 2 種類の方法で電極と感圧層を密着させ、従来のセンサ（Separated sensor）と比較した。各センサとも、電極材には銅／ポリイミド積層フィルムを、感圧材には導電性ゴムを用いた。測定領域である上下電極の重複領域は直径 3mm の円で、Bonded sensor では 1μl の銀ペーストで銅電極と導電ゴムを接合した後、Compressed sensor では測定領域以外にスプレー糊を塗布し圧縮状態で貼り合わせた後、接着性防水ポリウレタンフィルムで封止した。
センサの校正は材料試験機を用い、ゴム板（10×10 mm、厚さ 2.5 mm）を介してセンサに引張／圧縮荷重を負荷した。微小な圧力を測定するため、定格 5 N のロードセルを試験機のチャックに固定した。センサをビニルテープで固定した後に、ロードセル－ゴム板－センサ間の各界面を両面テープで接合した。センサの電気抵抗値変化はブリッジ回路により電圧値変化に変換した。センサ抵抗値が著しく大きい場合センサ電圧はほぼゼロとなり，センサ抵抗値が減少するとともにセンサ電圧は入力電圧 5V に近づく。センサとロードセルの出力値はデータロガーを用いて計測した。
【結果と考察】 校正結果について、Separated sensor は、圧縮応力の増加に応じてセンサ電圧は変化したが、引張応力を印加した場合はほぼゼロであった。Bonded sensor は、圧縮／引張に関わらず印加圧力に対しセンサ電圧が変化した。電極－感圧層間を接着しているため、引張力が検出できたと考える。しかし、約 7 kPa までの引張応力を印加したところでセンサ電圧はほぼゼロとなり、除荷後もほぼゼロのままであった。銀ペーストが剥離してしまったことにより絶縁したと考えられる。一方、Compressed sensor では、20 kPa を超える比較的大きな引張応力を印加しても、センサが壊れることなくその応力を計測可能であった。電極－感圧層間は接着していないため、引張領域でのセンサ抵抗の変化は、センサ作製時に押し潰されていた導電ゴムの抵抗、もしくは、電極と感圧層間の接触抵抗の変化によると考えられる。
Compressed sensor について、低応力域における電圧応答特性を調べたところ、圧縮／引張領域ともにセンサ電圧はほぼ直線的に変化し、ノイズも小さいためサブ kPa オーダ以下の力検出分解能を有していた。また、サブ秒オーダ以下の応答速度を有しており、多点計測も可能であった。
【まとめ】 フィルム型センサの電極と感圧層を密着させることで引張力の測定が可能となった。微弱な接着力のモニタリングが可能であり、細胞と培養基板間にはたらく力分布の定量計測に応用できると考える。

Development of film-type force distribution sensor system: for evaluation of animal cells

○Takeshi Moriwaki[1], Ryosuke Iwai[2], Fuki Ohta[2], Kazuhiro Fujisaki[1], Kazuhiko Sasagawa[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Hirosaki Univ., [2]Inst. Front. Sci. Technol., Okayama Univ. Sci.)

Key words force monitoring, film sensor, adhesion, spheroid

1Ap01 サルコシンオキシダーゼの各種環状イミノ酸に対する反応特異性および立体選択性

○黒部 督惠[1], 松本 美徳[1], 山本 真由香[2], 中嶋 義隆[1,2], 西矢 芳昭[1,2]
（[1]摂南大院・理工, [2]摂南大・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る。本酵素はサルコシンと構造的に類似する環状イミノ酸である L-プロリンに対しても非常に微弱な反応性を有する。本酵素は分析用途に利用されるため、高い基質特異性が求められている。そこで当研究室では、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。本研究では種々の環状イミノ酸に対する反応性に関わるアミノ酸残基の特定を試みた。Sox の野生型および変異体の環状イミノ酸に対する反応特異性および立体選択性を調べると共に、ドッキングシミュレーションとの相関を見たので報告したい。
【結果および考察】 *Bacillus* 属由来 Sox(SoxB)と環状イミノ酸との結合モデルより、活性中心近傍の Y254 が環状イミノ酸との反応性に関わると推察した。Y254 のアミノ酸置換変異体を作成し、野生型と比較したところ、Y254A および Y254G が環状イミノ酸に対して高い反応性を示した。特に、Y254A の L-チオプロリンに対する触媒効率は野生型の約 580 倍に向上した。基質結合のエネルギースコアを算出したところ、その傾向に実験結果との相関が認められた。一方、*Chloroflexus aurantiacus* 由来 Sox(SoxCa)は SoxB よりも環状イミノ酸に対する反応性が高く、特に L-プロリンに対する反応性が約 8 倍高かった。また、L-プロリンおよび D-プロリンに対する触媒効率比より SoxB と SoxCa の立体選択性は逆であった。両酵素の配列相同性は約 37%であり、活性中心構造の差異に興味が持たれる。
【今後の方針】 SoxB と SoxCa の環状イミノ酸に対する立体選択性の違いを理解するために、SoxCa の結晶構造解析を行う。また、Sox の構造と環状イミノ酸に対する反応性の相関について更なる検討を行うと共に、基質特異性向上の方策へと繋げたい。

Reaction specifity and stereoselectivity of sarcosine oxidase for cyclic imino acids

○Masae Kurobe[1], Minori Matsumoto[1], Mayuka Yamamoto[2], Yoshitaka Nakajima[1,2], Yoshiaki Nishiya[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ., [2]Fac.Sch.Sci.Eng.,Setsunan Univ)

Key words sarcosine oxidase, proline, thioproline, stereoselectivity

1Ap02 リンゴ酸デヒドロゲナーゼの基質特異性と立体構造解析に基づく構造変化メカニズムの考察

○下澤 勇弥[1,2], 西矢 芳昭[1], 佐々本 康平[1,2], 氷見山 幹基[2], 中村 努[2]
（[1]摂南大院・理工, [2]産総研）
nishiya@lif.setsunan.ac.jp

【背景・目的】 リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（MDH）は、優れた基質親和性と本来の基質であるオキサロ酢酸（OAA）に対する高い基質特異性を併せ持ち、臨床検査薬酵素として広く利用されている酵素である。また、MDH は、基質の結合により活性中心の可動ループが Open 構造から Closed 構造へコンフォメーション変化することが知られている。そのため、構造変化は MDH の基質特異性と密接に関連していると考えられる。しかし、MDH の構造変化メカニズムは未だ明らかになっていない。そこで、熱安定性に優れた中等度好熱菌 *Geobacillus stearothermophilus* 由来の MDH（gs-MDH）を対象として、変異導入による基質特異性の変化および立体構造解析から、構造変化メカニズムの考察を試みた。
【結果・考察】 ホモロジーモデリングにより予測した gs-MDH の Open 構造および Closed 構造から、ジカルボキシ化合物である OAA による Arg86 と Arg155 の架橋が構造変化に重要であると推察された。そこで、Arg86 変異体を作成、評価したところ、OAA に対する触媒効率が約 1/250 に低下した。しかし、変異体はピルビン酸等のモノカルボキシ化合物に対する反応性が観察されたことから、構造変化には OAA による架橋以外の要因が存在することが示唆された。そこで、結晶構造解析を行い Open 構造（Apo 型）の結晶構造（分解能 1.95Å）を決定した。その結果、活性中心の 3 つの Arg（Arg86、92、155）による正電荷ポケット形成が観察された。以上より、基質結合ポケットにおける正電荷の中和が、構造変化のドライビングフォースとなることを示唆している。また、その構造変化メカニズムが、gs-MDH の優れた基質特異性を実現していると考えられる。

Discussion of structural change mechanism based on substrate specificity and structural analycis of malate dehydrogenase.

○Yuya Shimozawa[1,2], Yoshiaki Nishiya[1], Kohei Sasamoto[1,2], Tomoki Himiyama[2], Tsutomu Nakamura[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ., [2]AIST)

Key words structural change, substrate recognition, malate dehydrogenase

1Ap03 *Pseudomonas* sp. VT1B 株由来ポリビニルアルコール分解関連酵素の精製

○山中 章裕, 松尾 直紀, 森 哲也, 西本 友之
（林原）
tomoyuki.nishimoto@hb.nagase.co.jp

【背景と目的】ポリビニルアルコール (PVA)の分解には、Secondary alcohol oxidase (SAO)と β-diketone hydrolase (BDH)の 2 つの酵素が関与することが知られている。SAO は PVA 分子内の水酸基の酸化と β-ジケトンの生成、BDH は β-ジケトンの加水分解を触媒する。しかしながら SAO と BDH の遺伝子配列は明らかになっていなかった。本研究では両酵素活性を保有しているとの報告がある *Pseudomonas* sp. VT1B 株を入手し、SAO と BDH の遺伝子配列を明らかにすることを目的とした。
【方法】VT1B 株の培養上清から硫安分画および各種クロマトグラフィーにより精製した。酵素活性の測定は、PVA 酸化により生成される過酸化水素を指標とした SAO 活性および PVA の粘度低下を指標とした PVA 分解活性を用いた。精製タンパク質の N 末端アミノ酸配列解析と VT1B 株の全ゲノム解析から目的遺伝子配列を同定した。
【結果と考察】酵素精製の結果、SAO 活性と PVA 分解活性の両方の活性を示す約 100 kDa の単一タンパク質を 2 種類 (PVA-A、PVA-B)得た。VT1B 株の全ゲノム解析の結果、PVA-A と PVA-B の N 末端アミノ酸配列と一致する遺伝子配列がゲノム上に一つずつ存在することがわかった。遺伝子配列にコードされるタンパク質は約 100 kDa であり、N 末端側約 50 kDa の配列は既存の PVA 脱水素酵素、C 末端側約 35 kDa の配列は既存の酸化 PVA 加水分解酵素とそれぞれ高い相同性を示した。以上の結果から PVA-A、PVA-B は一つのタンパク質に SAO と BDH の 2 つの触媒ドメインを有するハイブリッド酵素であると考えられた。

Purification of polyvinyl alcohol degrading enzyme from *Pseudomonas* sp. VT1B

○akihiro yamanaka, naoki matsuo, tetsuya mori, tomoyuki nishimoto
(Hayashibara Co., Ltd.)

Key words polyvinyl alcohol, degradation, hybrid enzyme, enzyme purification

1Ap04 新奇スルホンアミド分解酵素の反応特性解析

○柴田 幹哉[1], 満倉 浩一[2], 吉田 豊和[2]
（[1]岐阜大院・自科技, [2]岐阜大・化学・生命工）
toyosida@gifu-u.ac.jp

【背景と目的】 スルホンアミドはサルファ剤や利尿剤などの医薬品の骨格に含まれる有用な化合物の一つであり、水産養殖や畜産などでも利用されている。しかし、化学的に安定で生体内で分解代謝を受けにくいため、環境へ排出されると蓄積しやすく、環境汚染や耐性菌の出現に繋がる可能性がある。スルホンアミドの化学的な分解は高熱、長時間の反応を必要とする。一方、これまでに報告されているスルホンアミドの酵素的分解は、分解活性が低いという問題がある。我々の研究室では、種々のスルホンアミド類を単一窒素源とした培地を用いて集積培養を行い、4-スルファモイル安息香酸(4-SBA)を分解して生育する微生物 *Achromobacter* sp. SA25 を見出している。そこで本研究では、SA25 株を用いた休止菌体反応の最適条件と基質特異性を調査した。
【方法と結果】*Achromobacter* sp. SA25 の菌体懸濁液を調製した後、休止菌体反応の反応温度と pH を検討したところ、30℃で pH6.5 のリン酸カリウム緩衝液を用いたとき最大活性を示した。この反応条件で 4-SBA 分解を経時的に調べたところ、4-SBA の減少に伴って 3,4- ジヒドロキシ安息香酸が生成し、72 時間後には 4-SBA の分解率が 96%に達した。また、市販及び合成したスルホンアミド類を用いて休止菌体反応を行い、基質特異性を調べた。その結果、4-スルファモイル安息香酸と 3-スルファモイル安息香酸のみに分解活性を示し、合成した 2-スルファモイル安息香酸、4-スルファモイル安息香酸メチルには作用しなかった。この結果、安息香酸の *o* 位にスルファモイル基がなく、カルボキシ基が保護されていない化合物を SA25 株の分解酵素が基質として受け入れることが示唆された。

Characterization of novel sulfonamide-degrading enzymes

○Mikiya Shibata[1], Koichi Mitsukura[2], Toyokazu Yoshida[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Gifu Univ., [2]Fac. Eng., Gifu Univ.)

Key words sulfonamide, *Achromobacter* sp., 3, 4-dihydroxybenzoic acid

1Ap05 *N*-Cbz-アミノ酸を脱保護する微生物酵素の反応特性

○府川 祐太[1], 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

【背景・目的】ベンジルオキシカルボニル (Cbz) 基は、アミノ基の保護基として利用され、その脱保護は一般的に Pd/C 触媒を用いた水素化分解によって行われる。化学的 Cbz 基の脱保護は有機溶媒中で行われるため、反応系に酵素反応を組み合わせることは困難である。そこで、カルバメート系保護基を脱保護する酵素に着目した。Cbz 基に対して選択的に作用する酵素を見出すことができれば、温和な条件下で Cbz 化合物を脱保護することができる。Cbz 基を脱保護する酵素は以前より研究されているが、報告例は少なく、反応特性に関する知見は乏しい。本研究では *N*-Cbz-DL-alanine をモデル化合物として用いて、Cbz 基を選択的に脱保護する微生物酵素を探索し、その反応特性を評価した。
【方法・結果】*N*-Cbz-DL-alanine を単一炭素・窒素源として用いて土壌試料から資化性菌を探索し、活性菌として U21 および U31 の 2 株を取得した。*N*-Cbz-DL-alanine を用いて緩衝液中で休止菌体反応を行うと、反応の進行に伴ってベンジルアルコールおよび安息香酸が生成し、脱保護は加水分解によって起こることが示唆された。活性菌の菌株同定より、U21 は *Burkholderia* 属、U31 は *Cupriavidus* 属の細菌であることが判明した。U31 菌体を用いた反応では 10 mM *N*-Cbz-DL-alanine が全て分解されたのに対し、U21 菌体では、*N*-Cbz-DL-alanine が 5 mM 程度まで分解されると反応速度が低下したことから、U21 はエナンチオ選択的な酵素を有すると考えた。そこで、*N*-Cbz-DL-alanine のアナログである *N*-Cbz-DL-2-aminobutyric acid を用いて、反応を経時的に調べた結果、U21 菌体を用いた脱保護反応は *S* 体選択的に進行し、2-Aminobutyric acid (2-ABA) の光学純度は反応 9 時間後に 89% ee となった。一方、U31 菌体は中程度の *S* 体選択性 (31% ee) を示した。

Characterization of microbial enzymes for deprotecting *N*-Cbz-amino acid

○Yuta Fukawa[1], Koichi Mitsukura[2], Toyokazu Yoshida[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Gifu Univ., [2]Fac. Eng., Gifu Univ.)

Key words benzyloxycarbonyl group, enzymatic deprotection

1Ap06 フタル酸類に作用する新奇脱炭酸酵素の探索

○魚住 和輝[1], 奥村 直也[2], 満倉 浩一[3], 吉田 豊和[3]
（[1]岐阜大院・自科技, [2]岐阜大院・工, [3]岐阜大・工）
toyosida@gifu-u.ac.jp

【背景と目的】芳香族カルボン酸の脱炭酸酵素の酵素群の中には、反応条件を設定すると効率的に炭酸固定反応を触媒する酵素活性が報告されている。この反応を利用すれば芳香族化合物にカルボキシル基を位置選択的に導入できることから、芳香族カルボン酸の生産に応用できる可能性を秘めている。我々がこれまで行ってきた芳香族カルボン酸脱炭酸酵素に関する研究は、ベンゼン環にカルボキシ基を一つもつ安息香酸類を用いてきた。一方、ベンゼン環にカルボキシ基を二つもつフタル酸類に作用する脱炭酸酵素は、これまでに 4,5- または 3,4-dihydroxyphthalic acid (EC.4.1.1.55 and 69) に関する研究に限られており、報告例もわずかである。そこで本研究では、新奇のフタル酸類脱炭酸酵素を取得する目的で、2,4-あるいは 4,6-dihydroxyisophthalic acid (2,4- or 4,6-DHIPA) を用いて土壌から脱炭酸酵素活性を有する微生物を探索した。
【方法と結果】フタル酸類に作用する新奇脱炭酸酵素を取得するため、2,4-または 4,6-DHIPA を炭素源とする培地に土壌サンプルを加えて、微好気性条件下で集積培養を行った。分離した微生物を培養したのち、培養液上清を TLC および HPLC 分析し、脱炭酸酵素活性を評価した結果、2,4-DHIPA に対して活性を示す微生物 UK8 株を見出した。16S rRNA 遺伝子を解析したところ、UK8 株は *Pseudomonas* sp.に属することが判明した。UK8 株の培養条件を検討したところ、2,4-DHIPA をインデューサーとして含む培地で培養したとき脱炭酸酵素活性を検出した。また、種々のフタル酸誘導体を用いて、休止菌体反応で基質特異性を調査した。

Screening of novel decarboxylase acting on phthalate derivatives

○Kazuki Uozumi[1], Naoya Okumura[2], Koichi Mitsukura[3], Toyokazu Yoshida[3]
([1]Grad. Sch. Eng., Gifu Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Gifu Univ., [3]Fac. Eng., Gifu Univ.)

Key words phthalate derivatives, decarboxylase, *Pseudomonas* sp.

1Ap07 好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来糖エピメラーゼ ST2245 の反応機構

○小野 真由子[1], 中野 祥吾[1], 河原林 裕[2,3], 伊藤 創平[1]
（[1]静県大院・薬食生命, [2]産総研, [3]次世代バイオ医薬品製造技術研究組合）
itosohei@u-shizuoka-ken.ac.jp

【目的】アーキアゲノム情報中には、必要な酵素をコードする遺伝子が見出されてこない事がある。好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来の ST2245 タンパク質は、細胞抽出液から精製された、グルコサミン 6 リン酸 (GlcN6P) をガラクトサミン 6 リン酸 (GalN6P) に変換する新規糖エピメラーゼである。これまでに、6 単糖の 4 位炭素の水酸基を異性化する酵素の報告例はなく、EC 番号 5.1.3.42 を 2019 年 2 月に取得している。ST2245 タンパク質の反応機構は相同性から推定出来ない全く新規なものであるため、X 線結晶構造解析や等温滴定型熱量測定 (ITC) を通じて、この新規酵素の反応機構の解明を試みた。
【方法】ST2245 の結晶化条件のスクリーニングは蒸気拡散法にて行った。得られたネイティブ結晶を用いて GlcN6P との共結晶を作製し、X 線結晶構造解析により基質複合体構造を取得した。なお、ST2245 は新規酵素であり類似構造が存在しないため、初期位相はヨウ素 SAD 法により決定した。基質複合体構造より活性部位残基を推定し、部位特異的変異体 (S75A、R294A) を作製した。変異体の ITC 解析と合わせて ST2245 が GlcN6P を GalN6P に変換する反応機構を推定した。
【結果と考察】X 線結晶構造解析の結果、ネイティブ結晶については 1.6Å、基質複合結晶については 1.1Å の分解能での構造決定に成功した。ITC 解析より、野生型の ST2245 は鎖状のグルコン酸 6 リン酸 (GlcA6P) を認識していたが、変異体 S75A および R294A では、いずれも GlcA6P の認識能力を失っていることが確認された。したがって S75 および R294 は反応を触媒する残基であることが示された。本研究において決定した新規構造および ITC 解析の結果から、ST2245 が GlcN6P を GalN6P に変換する過程で、環状糖から直鎖糖への変換を経由していることが推測された。本発表ではこれらの結果の詳細について報告する。

Reaction Mechanism of the Glucosamine 6-Phosphate 4-epimerase, ST2245 protein, isolated from acidothermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*

○Mayuko Ono[1], Shogo Nakano[1], Yutaka Kawarabayashi[2,3], Sohei Ito[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]AIST, [3]MAB)

Key words archaea, enzyme reaction, structural analysis, X-ray crystallography

1Ap08 ニトリルヒドラターゼの中性子構造解析に向けた取り組み

○辻井 啓夢[1], 林 英輝[1], 松村 洋寿[1], 野村 高志[2], 當舎 武彦[3], 玉田 太郎[4], 日下 勝弘[5], 久保 稔[2], 城 宜嗣[3], 尾高 雅文[1]
（[1]秋田大院・理工, [2]兵庫県大院・生命理, [3]理研・SPring-8, [4]量子科学技術研究開発機構, [5]茨大・フロンティア応用原子科学研究センター）
modaka@gipc.akita-u.ac.jp

[緒言] ニトリルヒドラターゼ(NHase)は、アクリルアミドの工業生産などに利用されている産業的に重要な酵素である。先行研究により、結晶構造をもとにした理論計算から活性中心近傍の水素結合ネットワークが、水和反応に重要であることが予測されている。そこで、我々は活性中心近傍の水素結合ネットワークを正確に決定することを目標に、NHase の中性子構造解析をすすめている。本発表では、大型結晶の作成条件並びに予備的な中性子回折実験の結果を報告する。
[実験] X 線結晶構造解析の NHase 結晶化条件である NHase 濃度 20 mg/mL、母液(100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM $MgCl_2$, 20% PEG8000)、結晶成長温度 10 ℃をもとに、
(1)NHase 濃度のみを 20～60 mg/mL、(2) PEG8000 濃度のみを 2～20%と変化させ、冷凍保存した NHase を用いてそれぞれ結晶化を行った。次に、(3)NHase 濃度(20, 30, 40, 50 mg/mL)と PEG8000 濃度(10, 15.5 20%)を、それぞれ組み合わせて計 12 通りの条件で、精製直後の NHase を用いて、結晶化を行った。条件(1)～(3)の結果をふまえ、(4)NHase 濃度(40, 50, 60, 70 mg/mL)と PEG8000 濃度(11, 12, 13, 14, 15%)をそれぞれ組み合わせて計 20 通りの条件で結晶化を行った。
PEG8000 濃度 15.5%、NHase 濃度(20 と 30 mg/mL)の条件で作成した大型結晶を、重水置換を行った後に、中性子線による測定を行った。
[結果と考察] 条件(1)～(3)の結晶化の結果、PEG8000 濃度 15.5%、NHase 濃度 20 mg/mL の条件において、結晶が最も大型化することが分かった。また、沈殿の原因に、NHase の品質の劣化が示唆された。
中性子測定については、0.07 mm^3 と小さい結晶の大きさにもかかわらず、きれいな回折スポットが観測されたことから、結晶の大型化により、より良い分解能が期待される。今後は、タンパク質の総量を増やすことによる結晶の大型化の更なる条件検討を行っていく。

Approaches toward neutron crystallography of nitrile hydratase

○Hiromu Tsujii[1], Hideki Hayashi[1], Hirotoshi Matsumura[1], Takashi Nomura[2], Takehiko Tosha[3], Taro Tamada[4], Katsuhiro Kusaka[5], Minoru Kubo[2], Yoshitsugu Shiro[3], Masafumi Odaka[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ., [2]Grad. Sch. Life Sci., Univ. Hyogo., [3]SPring-8, RIKEN, [4]Natl, QST, [5]Frontier Res. Ctr. Appl. Atomic Sci., Ibaraki Univ.)

Key words nitrile hydratase, neutron crystallography, hydrogen bond network, catalisis

1Ap09 クライオ電子顕微鏡によるロイシン脱水素酵素の高分解能構造を用いた耐熱化機構の解明

○山口 浩輝[1], 亀川 亜希子[2], 中田 國夫[1], 柏木 立己[1], 水越 利巳[1], 藤吉 好則[2], 谷 一寿[3]
（[1]味の素バイオ・ファイン研, [2]東京医科歯科大・高等研究院・セスプル, [3]三重大・院医）
toshimi_mizukoshi@ajinomoto.com

【背景と目的】
ロイシン脱水素酵素(LDH, EC 1.4.1.9)は分岐鎖アミノ酸の脱アミノ化を触媒する、NAD^+依存型の酸化還元酵素である。*Geobacillus stearothermophilus* 由来の LDH (*Gst*LDH)は耐熱性が極めて高いため、分岐鎖アミノ酸の定量や生産に有用である。しかしながら、*Gst*LDH の立体構造は決定されておらず、その耐熱性機構や補酵素認識機構は不明であった。そこで、我々は *Gst*LDH の立体構造解析を通じ、これらの構造メカニズムを解明した(1)。
【方法】
*Gst*LDH アポ体と NAD^+複合体について、クライオ電子顕微鏡(JEM-3000SFF, JEOL 社)による単粒子解析を実施した。また、耐熱性機構を考察するために、より耐熱性の低い近縁種の LDH との配列比較で見出されたアミノ酸残基の変異・欠損により、*Gst*LDH の耐熱性に与える影響を解析した。
【結果と考察】
単粒子解析の結果、*Gst*LDH アポ体と NAD^+複合体の密度マップをそれぞれ分解能 3.0Å、3.2Å で取得した。既知の近縁種由来の LDH と同様に、*Gst*LDH の立体構造は 8 量体を構成しており、単量体は NAD^+結合ドメインとコアドメインを形成していた。両者の立体構造を比較したところ、補酵素 NAD^+の結合に伴う全体構造の変化は見られなかった。また、Ser147 と NAD^+の相互作用によって部分的な構造変化が惹起され、142-144 残基が disorder していたほか、コアドメインにおける新たな相互作用の形成が見られた。NAD^+複合体は 80°C, 10 分間の熱処理後の残存活性がアポ体と比較して約 3 倍高く、NAD^+結合によって *Gst*LDH のコアドメイン界面の安定化が起こることが推定された。更に、近縁種の LDH との配列比較で見出されたアミノ酸残基の置換体および欠損体の解析から Ala94, Tyr127 および C 末端領域が *Gst*LDH の高い耐熱性に寄与していることが示唆された。

(1)*Journal of Structural Biology* 205, 11-21 (2019)

Structural insights into thermostabilization of leucine dehydrogenase by cryo-electron microscopy

○Hiroki Yamaguchi[1], Akiko Kamegawa[2], Kunio Nakata[1], Tatsuki Kashiwagi[1], Toshimi Mizukoshi[1], Yoshinori Fujiyoshi[2], Kazutoshi Tani[3]
([1]Res. Inst. Biosci. Prod. Fine Chem., Ajinomoto Co., Inc., [2]CeSPL, ARIS, TMDU, [3]Grad. Sch. Med. Univ. Mie)

Key words leucine dehydrogenase, cryo-electron microscopy, thermal stability, *Geobacillus stearothermophilus*

1Ap10 単糖合成を目指した高度好熱菌由来トランスケトラーゼの X 線結晶構造解析および諸性質の検討

○吉田 裕美[1,2,3], 吉原 明秀[3,4], 塚本 郁子[2], 秋光 和也[3,4], 何森 健[3,4], 増井 良治[5], 神鳥 成弘[1,2,3]
（[1]香川大・総合生命研究セ, [2]香川大・医, [3]香川大・国際希少糖機構, [4]香川大・農, [5]阪市大院・理）
h.yoshi@med.kagawa-u.ac.jp

【目的】トランスケトラーゼはペントースリン酸経路において，チアミン二リン酸（TPP）を補酵素とし，5 炭糖のケトース（キシルロース 5-リン酸）からケト基を含む 2 つの炭素を受け取り，5 炭糖のアルドース（リボース 5-リン酸）に転移させ，7 炭糖のケトース（セドヘプツロース 7-リン酸）を形成する。また，2 つめの反応として，キシルロース 5-リン酸とエリトロース 4-リン酸から，フルクトース 6-リン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸を形成する。トランスケトラーゼは通常リン酸糖を基質とするが，リン酸基を持たない単糖を基質とできるトランスケトラーゼが近年報告され，7 炭糖をはじめ様々な単糖の合成に応用できる可能性が示されている。今回,高度好熱菌 *Thermus thermophiles* HB8 由来トランスケトラーゼ（TtTK）について，その単糖合成酵素としての可能性を探るため，諸性質の検討および X 線構造解析を行った。
【方法】理研バイオリソースセンターより提供された TtTK の構造遺伝子を pET15b に組込み，N 末端に His タグを持つ組換体として大腸菌で発現させた。アフィニティーカラムを用いて精製後，TPP との共結晶化を行い，高エネルギー加速器研究機構 PF BL5A にてデータ収集を行った。
【結果と考察】TtTK/TPP 複合体の構造を 2.09Å 分解能で決定することができた。全体構造は他生物由来の TK の構造と良く似ていた。TtTK はダイマー構造をとっており，TPP はダイマーの界面に結合していた。近傍に MES 分子（緩衝試薬）が結合しており，その硫酸基は，R352，H415，R515 により塩橋を形成していた。これらの残基は，基質であるリン酸糖のリン酸を認識していると考えられ，リン酸を含まない単糖合成への分子設計の指針が得られた。

X-ray structure analysis and preliminary characterization of *Thermus thermophilus* HB8 transketolase

○Hiromi Yoshida[1,2,3], Akihide Yoshihara[3,4], Ikuko Tsukamoto[2], Kazuya Akimitsu[3,4], Ken Izumori[3,4], Ryoji Masui[5], Shigehiro Kamitori[1,2,3]
([1]Life Sci. Res. Center, Kagawa Univ., [2]Fac. Med., Kagawa Univ., [3]Int'l Inst. Rare Sugar Res. and Educ., Kagawa Univ., [4]Fac. Agric., Kagawa Univ., [5]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ.)

Key words *Thermus thermophilus*, transketorase, monosaccharide, X-ray structure

1Ap11 有機溶媒中における Tk-subtilisin の酵素活性の解析

○宮田 大暉, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史
（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。本酵素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。しかしながら、一般的に酵素は有機溶媒によって容易に変性し、本酵素が有機溶媒に対する耐性を有するかは解明されていない。そこで本研究では Tk-subtilisin の有機溶媒中での反応を加水分解反応と逆反応のペプチド合成反応の 2 点から解析した。
【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-Tk-subtilisin（Pro 体）として調製した。Pro 体は 80°C30 分の加熱により活性型 Tk-subtilisin（成熟体）に成熟化する。本研究では、Pro 体と成熟体それぞれについて、9 種類の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。有機溶媒は高沸点と水溶性の 2 点を考慮した。
Pro 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。これは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。成熟体は、多くの有機溶媒において残存活性は 50％以下となり、一方でエチレングリコールでは約 80％の残存活性を示し、耐性があると示唆された。したがって、ペプチド合成はエチレングリコールと先行研究で用いられていたアセトニトリルを使用した。エチレングリコールでの合成は確認されなかったが、アセトニトリルでは合成が確認された。本発表では、Tk-subtilisin の溶媒中での安定性およびペプチド合成反応の詳細について報告する。

Study of the enzymatic activity of Tk-subtilisin in organic solvents

○Hiroki Miyata, Noriko Yamano-Adachi, Yuichi Koga, Takeshi Omasa
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words subtilisin, thermostable enzyme, organic solvent

1Ap12 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 の基質特異性スイッチ

小山 貴之[1], 酒瀬川 信一[2], 村山 和隆[3], ○杉森 大助[1]
（[1]福島大・共生システム理工, [2]旭化成ファーマ, [3]東北大院・医工）
sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp

【緒言】
リポタンパク質関連ホスホリパーゼ A_2（Lp-PLA_2）は血小板活性化因子 PAF を加水分解する酵素であり，心血管疾患と脳卒中のリスク評価にその活性測定が利用されている。ところが，既存法には様々な課題があるため，本酵素の反応生成物であるリゾ PAF を特異的に簡易測定できる酵素の開発が期待されている。*Thermocrispum* sp.由来コリン型リゾプラズマローゲン（LyPlsCho）特異的 PLD（LyPlsCho-PLD）はリゾ PAF にも活性を示すため，Lp-PLA_2 活性測定への応用が期待できる。しかしながら，野生型酵素のリゾ PAF に対する相対活性は LyPlsCho の約 50%である。そこで我々は，リゾ PAF に対する活性を増強させるとともに，本酵素の基質認識メカニズムを明らかにすることを目指し，合理的設計による部位特異的アミノ酸置換を行った。
【方法】
LyPlsCho-PLD の立体構造モデルと基質類似化合物との docking simulation の結果から，基質認識に関与すると考えられる F211 を他のアミノ酸に飽和変異させた。各変異体は pET24a と BL21(DE3)を用いて細胞内に可溶性発現させ，HisTrap HP カラムで精製した。精製変異体に関して基質特異性および速度論試験を行い，構造活性相関について考察した。
【結果と考察】
F211 変異体は一様に LyPlsCho に対する活性が大幅に低下し，アミノ酸側鎖のサイズが小さい L, A 等に置換するとリゾ PAF に対する活性が著しく増加した。一方，極性あるいは嵩高い側鎖を持つ R, D, W 等に置換すると，両基質に対して活性が著しく低下した。変異体のうち特に変化が大きかった F211L 変異体に至っては，リゾ PAF/LyPlsCho 比が野生型の約 0.5 から 13 まで向上した。速度論解析の結果から，F211 は基質 *sn*-1 位エーテル鎖の認識に大きく関与しており，基質が酵素の疎水ポケットに結合する過程と生成物解離過程に深く関与すると結論づけた。

Switch of substrate specificity of choline lysoplasmalogen-specific phospholipase D

Takayuki Oyama[1], Shin-ichi Sakasegawa[2], Kazutaka Murayama[3], ○Daisuke Sugimori[1]
([1]Fac. Symbio. Syst. Sci., Fukushima Univ., [2]Asahi Kasei Pharma Corp., [3]Grad. Sch. Biomed. Eng., Tohoku Univ.)

Key words phospholipase D, lysoplasmalogen, LP-PLA_2, Lyso PAF

1Ap13 卵殻膜分解活性を示す微生物由来エラスターゼの特性解析と加水分解物の生理活性評価

○今藤 嵩大[1], 横山 萌[2], 木村 行宏[2], 山下 陽子[2], 芦田 均[2], 竹中 慎治[2]
（[1]神戸大・農, [2]神戸大院・農）
stakenaka@people.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】 卵殻膜は皮膚の保湿効果やコラーゲン合成の促進作用といった生理作用を示すと報告されており、化粧品、医薬品、健康食品などの分野において魅力のある天然素材であるが、あまり利用されていない。その要因として、卵殻膜が水に不溶な生体膜であることが挙げられる。微生物酵素による可溶化法は温和な条件で限定分解も期待されることから、分解に特化した微生物酵素の検索とその特性解析を行ってきた。本研究では、既報の *P. Aeruginosa* 由来エラスターゼ（LasB_ ME4）を基に見出した *P. indica* 由来エラスターゼ（rLasB_indica）を用いて卵殻膜加水分解条件の最適化、卵殻膜由来ペプチドの生理活性評価を行なった。
【方法】 rLasB_indica は、*E. coli*-pET28b(+) 発現系にて発現し、アセトンによる再活性化後、イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。組換え酵素を用いた卵殻膜加水分解条件の最適化後、同条件で卵殻膜由来可溶性ペプチドをゲル濾過クロマトグラフィーにて分画し、チロシナーゼ阻害活性試験、ABTS ラジカル消去活性試験、DPPH ラジカル消去活性試験および第二鉄還元力試験を行った。
【結果及び考察】 rLasB_indica は LasB_ME4 と 69％と比較的類似性が高かったが、rLasB_indica は試験した有機溶媒のうち 7 種に対して 1 週間以上安定で、LasB_ME4 とは有機溶媒耐性が全く異なっていた。LasB_ indica による卵殻膜加水分解は「卵殻膜（15 mg/ml）-7 mM Na_2SO_3-LasB_indica（17 U）を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) にて 45℃で 15 時間の反応」が最適であった。同条件で卵殻膜を分解することで得られた可溶性ペプチド・タンパク質量は、LasB_ME4 による調製物と比較して 10 倍以上となった。ゲル濾過で分画したペプチド画分は、チロシナーゼ阻害活性および抗酸化活性を示し、卵殻膜由来可溶性ペプチドの機能性を明らかにできた。

Characterization of an organic-solvent-stable elastase from *Pseudomonas indica* and its potential use in eggshell membrane hydrolysis

○Kodai Imafuji[1], Moe Yokoyama[2], Yukihiro Kimura[2], Yoko Yamashita[2], Hitoshi Ashida[2], Shinnji Takenaka[2]
([1]Fac. Agri. Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Agri., Kobe Univ.)

Key words Eggshell membrane, elastase, *Pseudomonas indica*, bioactive peptide

1Ap14 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* NBRC101254 における xylanase 生産に与えるセルロースの影響

○正木 佑弥[1], 萩原 万貴[2], 有吉 由佳[2], 村上 周一郎[2]
（[1]明治大院・農, [2]明治大・農）
smura@meiji.ac.jp

【背景・目的】バイオエタノールは、「カーボンニュートラル」な燃料として近年大量に製造されているが、その原料はトウモロコシ等のデンプン質であり、食糧との競合が問題とされている。そのため、非食用である木質系バイオマスに含まれるセルロースが発酵原料として注目されているが、難分解性 hemicellulose や lignin と複雑に結合した状態（lignocellulose）で存在するため、酵素による糖化が難しい。そこで本研究では、lignin を強力に分解する白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* に着目し、hemicellulose の主成分である xylan を加水分解する xylanase の生産を向上させる培養条件を検討した。
【方法と結果】 炭素源として 0.4％xylan を含む基本培地に、0.87%の可溶性 cellulose (CMC)、不溶性 cellulose (avicel)、および lignin を加えた培地にて 30℃で振盪培養し、経日的にサンプリングした培養上清に含まれる xylanase 活性を測定した。その結果、基本培地と比較し、CMC や avicel を添加した培地では、培養 3 日で約 3 倍の xylanase(1.5 U/mL)が生産された。また、lignin の添加によって xylanase 活性の増加はほとんど見られなかった。Cellulose 類の添加による xylanase 活性の増加の要因を調べるために、20 mL の培養上清を透析後、陰イオン交換カラムに供し xylanase を分画することで分析した。その結果、基本培地の培養上清は、素通り画分 (11.6 U)、またカラムに吸着した画分からはピーク 1 (0.39 U)およびピーク 2 (3.03 U)に分画された。一方 avicel を添加した培地からも、素通り画分 (39.77 U)、また同じ塩濃度で溶出されたピーク 1 (1.47 U)、およびピーク 2 (8.68 U)が得られた。以上の結果から、avicel の添加による xylanase 活性の増加は、基本培地で生産されている xylanase の種類が増加した訳ではなく、各々の酵素活性量が増加したためであることが明らかになった。

Effects of cellulose on xylanase production by *Phanerochaete chrysosporium* NBRC101254

○Yuya Masaki[1], Maki Hagihara[2], Yuka Ariyosi[2], Syuitirou Murakami[2]
([1]Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., [2]Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words xylanase, *Phanerochaete chrysosporium*, cellulose

1Ap15 補酵素 B_{12} 関与ジオールデヒドラターゼの作用による 3,3,3‐トリフルオロ‐1,2‐プロパンジオールからの脱フッ素化を伴うアセトアルデヒドの生成

○森 光一[1], Jiang Dong[2], Golding Bernard T.[2], 虎谷 哲夫[1]
（[1]岡山大・工, [2]Sch. Nat. Environ. Sci., Newcastle Univ.）
mori-ko1@okayama-u.ac.jp

補酵素 B_{12} 関与ジオールデヒドラターゼ（DD）は 1,2-プロパンジオール（PDO）からプロピオンアルデヒドを生成する反応を触媒する。今回、3,3,3‐トリフルオロ‐1,2‐プロパンジオール（F_3PDO）を基質として反応を行ったところ、反応速度は PDO を基質にした場合の約 1/22 であったが、DD に依存したアルデヒド生成が確認された。生成物としては 3,3,3‐トリフルオロプロピオンアルデヒド（F_3PA）を想定していたが、生成アルデヒドを 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン 誘導体化して TLC や NMR で分析したところ、予想に反してアセトアルデヒドであった。そこで、酵素反応に伴ってフッ素の脱離が起きているのではないかと考えて調べたところ、F^-の生成が確認された。しかし、反応の経時変化を調べたところ、アルデヒドと F^-の生成比率は一定ではなく、時間に伴って F^-の比率が増加する結果が得られた。さらに、F_3PA 標品をバッファー中で加温したところ、DD の有無に関係なく、F^-とアセトアルデヒドが生成した。また、F_3PDO を基質にした酵素反応で、DD の量や反応時間を振って調べたところ、アセトアルデヒドに加えて F_3PA が検出される場合もあった。また、F_3PA からアセトアルデヒドへの変換を HPLC で追跡したところ、F_3PA の減少に伴って未同定化合物が一旦増加し、その減少に伴ってアセトアルデヒドが増加することが示された。これらの結果から、F_3PDO からの直接の酵素反応生成物は当初想定していた F_3PA であるが、非酵素的な脱フッ素化で何らかの中間体が生成し、それに引き続く反応によってアセトアルデヒドが生成すると結論した。F_3PA からアセトアルデヒドへの変換には C-C 結合の開裂も必要になるが、F_3PA の段階的な脱フッ素化でマロン酸セミアルデヒドが生じ、それに続く脱炭酸反応によってアセトアルデヒドが生成するものと予想している。

The action of coenzyme B_{12}-dependent diol dehydratase on 3,3,3-trifluoro-1,2-propanediol results in unexpected formation of acetaldehyde accompanying defluorination

○Koichi Mori[1], Dong Jiang[2], Bernard T. Golding[2], Tetsuo Toraya[1]
([1]Fac. Eng., Okayama Univ., [2]Sch. Nat. Environ. Sci., Newcastle Univ.)

Key words dehalogenation, defluorination, vitamin B_{12}, cobalamin

1Ap16 好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来 Encapsulin に内包されるフェリチン様タンパク質の発現系構築及び機能解析

○竹原 直輝, 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

【研究背景】Encapsulin (Enc)は、分子量約 30 kDa のサブユニットのホモ 60 量体から成る、粒径約 25 nm の正二十面体構造の中空ナノカプセル型タンパク質であり、真正細菌から古細菌までに広く存在している。Enc の生体内での役割は、Enc 認識シグナル配列を有している酵素を内包することで、プロテアーゼ等の分解酵素から保護することと考えられているが、詳細は不明である。当研究室では、これまでに *Thermotoga maritima* 由来 Enc (*Tm*Enc)のバイオマテリアルとしての応用を目指して、生化学的性質、構造化学的性質を明らかにしてきた。本研究では、*Tm*Enc の生体内での役割を明らかにするために、天然の内包タンパク質であるフェリチン様タンパク質(Flp)の大腸菌発現系を構築し、機能解析を行った。
【方法】Flp 遺伝子を大腸菌発現ベクター pET30b に挿入し大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し発現させた。疎水性相互作用カラムとイオン交換カラムを用いて、Flp を精製した。サイズ排除クロマトグラフィー多角度光散乱検出器(SEC-MALS)により、精製した Flp の絶対分子量を測定した。Fe(II)SO4 と Flp のモル比が 5:1 になるように混合し、UV-vis スペクトル測定により 315 nm の吸光度を測定することで、フェロキシダーゼ活性を追跡した。
【結果及び考察】SEC-MALS の結果、130 kDa に光散乱のピークが観測された。Flp のアミノ酸配列から計算される分子量は 13 kDa であることから、10 量体であることが示唆された。また、フェロキシダーゼ活性測定では、Flp と Fe(II)SO4 を混合すると 315 nm の吸光の増加が観測されたことから、Flp がフェロキシダーゼ活性を有することが示された。

Overexpression and functional analysis of ferritin-like protein encapsulated in Encapsulin from *Thermotoga maritima*

○Naoki Takehara, Mamoru Nonaka, Hirotoshi Matsumura, Nobuaki Ogawa, Masafumi Odaka
(Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ.)

Key words Encapsulin, Ferritin like protein, Overexpression

1Ap17 シリカ重合酵素群で構成されるフィラメントの形成コントロール

○岡本 淳之介, 中島 一紀, 川﨑 了
（北大院・工）
nakashima@geo-er.eng.hokudai.ac.jp

【緒言】
海綿動物 *Suberites domuncula* の骨針内にはシリカ重合活性を示す silicatein α, silicatein β，足場タンパク質 silintaphin-1 が存在し，これらの酵素群（以下，silicatein 群とする）は疎水性相互作用により水溶液中で自己凝集し，フィラメント状構造体を形成することが知られている。この構造体が足場となりシリカ骨格が形成されると考えられているが，一方でこの凝集性が silicatein 群の工学的応用における障壁となっている。そこで，凝集の制御が可能になれば，silicatein 群を利用したナノファイバー状の機能性材料作製などへ応用可能になると考えられる。本研究では，silicatein α 及び silicatein β の N 末端側に粘性細菌由来 可溶性タンパク質である ProS2 を融合し，プロテアーゼによる ProS2 部位の切断によるフィラメント形成の制御を検討した。
【実験方法】
ProS2 を融合した silicatein（ProS2-Silα および ProS2-Silβ）を *E. coli* を宿主として大量 発現し，リフォールディングを行った。また，silintaphin-1 は mature タンパク質として発現した。これら 3 種類の酵素からなる silicatein 群を室温で静置し安定性を観察するとともに，溶液に部位特異的プロテアーゼを添加して ProS2 部位を切断し，添加前後の溶液を目視と 透過型電子顕微鏡 TEM により観察した。
【結果】
ProS2-Silα，ProS2-Silβ はいずれも不溶性画分に発現したが，リフォールディングによる可溶化に成功した。ProS2-を融合した silicatein 群は長時間凝集することなく可溶性を維持したが，プロテアーゼ添加後には速やかに凝集体が形成され，溶液が白濁した。また TEM 観察により，プロテアーゼ添加後にはフィラメント状構造体が形成されることが確認された。以上より，可溶性タンパク質 ProS2 の融合と切断による silicatein 群の凝集制御が可能であることが示された。

Control of filament formation of silica-polymerizing enzymes

○Junnosuke Okamoto, Kazunori Nakashima, Satoru Kawasaki
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words silica-forming protein, biomineralization, self-assembly

1Ap18 味覚センサーを用いた放線菌由来アミノペプチダーゼの評価

○畑中 唯史[1], 石井 恵[2], 中東 良太[3]
([1]岡山生物研, [2]岡山農研, [3]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 を分泌する放線菌 *Streptomyces cinnamonues* TH-2 株が、M28 ファミリーに属するアミノペプチダーゼ（M28AP）を分泌することを見出している。本発表では、M28AP および同じく放線菌由来 M24 ファミリーに属するアミノペプチダーゼ XPO DUET（ナガセケムテックス(株)製）によるタンパク質消化物の味覚に及ぼす評価結果を報告する。
【方法および結果】M28AP および XPO DUET は、*Streptomyces lividans* を宿主に分泌生産させたリコンビナント酵素を用いた。これらアミノペプチダーゼの評価を行う目的で、大豆タンパク質（不二製油(株)社製フジプロ E）の枯草菌由来プロテアーゼ（ナガセケムテックス(株)製, ビオプラーゼ SP）消化物を基質に、M28AP および XPO DUET を作用させ、得られた消化物を、味覚センサー((株)インテリジェントセンサーテクノロジー社製, SA402B）による評価を行った。その結果、M28A あるいは XPO DUET を単独で作用させた場合では、後味の旨味コクの値が、コントロール（アミノペプチダーゼ処理無し）と比較して著しく増強された。M28A および XPO DUET を併用した場合、後味の旨味コクの値は、コントロールよりも低下し、先味の旨味の値が若干向上した。現在、これら消化物について、遊離アミノ酸を分析中である。

Evaluation of *Streptomyces* aminopeptidases by electric tangues

○Tadashi Hatanaka[1], Megumi Ishii[2], Ryota Nakahigashi[3]
([1]RIBS, Okayama, [2]RIA, Okayama, [3]Nagase ChemteX Corporation)

Key words *Streptomyces*, aminopeptidase

1Bp01 窒素源存在下で油脂を高蓄積する海洋性クラミドモナス変異株の選択的育種

○小山 智己[1], 加藤 悠一[2], 佐藤 勝也[3], 大野 豊[3], 蓮沼 誠久[1,2], 近藤 昭彦[1,2,4]
([1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大・先端バイオ工, [3]量研高崎・放射線生物応用, [4]神戸大院・工）
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】 地球温暖化や化石燃料の枯渇の懸念から微細藻類を用いたバイオ燃料生産が注目を集めている．海洋性緑藻 Chlamydomonas sp. KOR1 株はこれまで報告されてきた微細藻類と比較して旺盛な増殖性とオイル生産性を示し，バイオ燃料生産者として有望である．KOR1 株を含む一部の微細藻類は培地中の窒素源が枯渇すると細胞内にオイルを多量に蓄積する．しかし窒素源枯渇条件では細胞増殖が抑制されるとともに細胞状態が悪化する．本研究ではオイル蓄積が窒素源枯渇条件でしか行われない事を生産プロセス上の問題と捉え，窒素源存在下でもオイルを蓄積する藻株を選択的育種により創出する．その株を用いてバイオマス生産とオイル蓄積を同時に行う新規培養プロセスを開発することを目的とした．
【方法】 炭素イオンビーム照射により KOR1 株の細胞集団にランダムな突然変異を導入した．窒素源存在下で培養した変異細胞集団から蛍光活性セルソーターでオイル高蓄積細胞を分取した．獲得株を独立栄養・窒素源存在下で培養し，オイルの含有率・生産性を評価した．
【結果と考察】 KOR1 を親株とした選択的育種により，窒素源存在下でもオイルを高蓄積する変異株 KAC1710 及び KAC1801 を獲得した．窒素源が残存する培養 5 日目の細胞内オイル含有率は，KOR1 株で約 12.5%であったのに対し，KAC1710 株では約 19.1%，KAC1801 株では約 26.6%であった．培養 0～5 日目の KAC1710 株と KAC1801 株のオイル生産性は約 121 mg/L/Day と約 162 mg/L/Day であり，KOR1 株の約 92 mg/L/Day を大きく上回った．現在，次世代シーケンサーを用いた変異解析などにより変異株のオイル蓄積機構の解明を進めている．オイル蓄積に関する学術的知見は，遺伝子工学的手法による優良株の創出にも有用であり，効果的にオイルを生産する培養技術の開発にも繋げる事が期待できる．

Selective breeding of marine Chlamydomonas mutants for improving oil accumulation under nitrogen-replete condition.

○Tomoki Oyama[1], Yuichi Kato[2], Katsuya Satoh[3], Yutaka Oono[3], Tomohisa Hasunuma[1,2], Akihiko Kondo[1,2,4]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Adv. Bio. Eng. Res. Cen., Kobe Univ., [3]Dept. Rdiation-Appli. Biol. QST Takasaki., [4]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words Chlamydomonas, biodiesel fuel, Selective breeding, Nitrogen-replete

1Bp02 海洋性クラミドモナス油脂高蓄積変異株における油脂・カロテノイド増産メカニズムの解明

○加藤 悠一[1], 小山 智己[2], 佐藤 勝也[3], 大野 豊[3], 張 嘉修[4], 蓮沼 誠久[1,2], 近藤 昭彦[1,2,5]
([1]神戸大・先端バイオ工, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]量研高崎・放射線生物応用, [4]国立成功大・化工, [5]神戸大院・工）
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】 微細藻類由来バイオ燃料生産の実用化に向けて様々な試みがなされている。海洋性緑藻 *Chlamydomonas* sp. JSC4 は光独立栄養・海水塩濃度条件において高い増殖性と油脂含有率を両立するが、明暗周期条件での油脂含有率低下が課題となっていた。これまでにイオンビーム変異誘発とフローサイトメトリーを用いた選抜育種を実施し、明暗周期条件でも高い油脂含有率を示す油脂高蓄積変異株 KOR1 の獲得に成功している。本研究では KOR1 の油脂蓄積メカニズムを代謝レベルで解明することを目的とした。
【方法】 明暗周期条件において培養した野生株 JSC4 と油脂高蓄積変異株 KOR1 の比較解析を実施した。ガスクロマトグラフィー質量分析、高速液体クロマトグラフィーにより細胞の油脂、炭水化物、カロテノイドの含有率を測定するとともに、透過型電子顕微鏡解析により細胞内構造を観察した。細胞内代謝物を抽出し、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析により網羅的な代謝プロファイリングを実施した。
【結果と考察】 明暗周期条件において、KOR1 は細胞内に多数の油滴を形成し、JSC4 の 2 倍以上の油脂含有率を示した。一方、JSC4 が有する大きなデンプン粒を KOR1 は形成せず、炭水化物含有率が著しく低下していた。KOR1 の油脂蓄積がデンプン関連の変異に起因することが示唆される。また KOR1 ではカロテノイドであるルテインと β カロテンの含有率も増加していた。デンプン合成経路、油脂合成経路、およびカロテノイド合成経路の上流に位置する非メバロン酸経路の代謝プロファイリングにより、各経路の中間代謝物量が KOR1 において全体的に増加していることを見出した。デンプン蓄積の異常が各経路における中間代謝物量の増加を引き起こし、合成基質の増加を介して油脂・カロテノイド含有率の向上に寄与した可能性が考えられる。

Metabolic profiling and morphological analysis of an oil-rich *Chlamydomonas* mutant

○Yuichi Kato[1], Tomoki Oyama[2], Katsuya Satoh[3], Yutaka Oono[3], Jo-Shu Chang[4], Tomohisa Hasunuma[1,2], Akihiko Kondo[1,2,5]
([1]Eng. Bio. Res. C., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Dept. Radiat.-Appl. Biol., QST Takasaki, [4]Dept. Chem. Eng., Natl. Cheng Kung Univ., [5]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words biodiesel fuel, pigment, microalgae, metabolic analysis

1Bp03 *Nitratireductor* sp. OM-1 の窒素非感受性株の確立および油脂合成経路の解析

○山下 瀬菜[1], 高橋 宏和[1], 渡邉 研志[1], Campanaro Stefano[2], Treu Laura[2], Angelidaki Irini[2], 秋 庸裕[1], 加藤 節[1], 中島田 豊[1], 松村 幸彦[3], 岡村 好子[1]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]デンマーク工科大, [3]広島大院・工）
okamuray@hiroshima-u.ac.jp

＜背景と目的＞
Nitratireductor sp.OM-1 株は廃液中の低級有機酸を資化し、窒素飢餓条件下では細胞重量あたり約 70 %の油脂を蓄積する。その油脂組成の半分以上がブテン酸エステルであることから、バイオディーゼル燃料への応用が期待できる。しかし、実際の廃液中には高濃度の窒素源が存在し、OM-1 株の油脂合成が阻害されることもわかっている。そこで本研究では、ゲノム情報から油脂合成経路を推定し、窒素豊富、窒素飢餓の両方の条件で油脂生産を行い、遺伝子発現を比較した。さらに、実廃液中での油脂生産能の向上を目指し、窒素非感受性株の確立を試みた。
＜方法・結果＞
OM-1 の油脂合成に関わる遺伝子について、窒素源の有無による発現の変化を解析した結果、窒素存在下では脂肪酸合成遺伝子は発現が促進されるが、ブテン酸合成に関わる遺伝子の発現が抑制されていた。このことから、短鎖エステル合成経路が直接、窒素による阻害を受けることが示された。次に、窒素非感受性株の取得のためにメタン発酵廃液再現培地（含 344 mg/L NH_4Cl）で馴化培養を繰り返し行ったところ、馴化前には細胞重量あたり 17 %だった油脂量が 38 %まで増加した。馴化培養後の細胞を Nile Red で染色し蛍光顕微鏡で観察すると一部の細胞に強い蛍光が見られたため、窒素存在下でも油脂を多く生産できる自然変異体が出現したことが示唆された。そこで、96 well プレートで単一コロニーごとに培養を行い、ハイスループットスクリーニングによって有望株の選抜を行った。選抜した株の油脂量は細胞重量あたり 40 %まで増加し、培養液あたり約 1 g/L の油脂生産性を示した。今後はこの株と野生株の比較発現解析を行い、油脂合成経路の窒素感受性に関わる遺伝子の解明を目指すとともに、未知のエステル化酵素の探索を試みる。

Establishment of nitrogen insensitive strain and analysis of lipid synthesis pathway of short-chain ester producing bacterium *Nitratireductor* sp. OM-1

○Sena Yamashita[1], Hirokazu Takahashi[1], kenshi watanabe[1], Stefano Campanaro[2], Laura Treu[2], Irini Angelidaki[2], Tsunehiro Aki[1], Setsu Kato[1], Yutaka Nakashimada[1], Yukihiko Matsumura[3], Yoshiko Okamura[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Technical Univ. Denmark, [3]Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ.)

Key words biodiesel fuel, biomass, volatile fatty acids

1Bp04 焼酎粕を用いた油糧微生物ラビリンチュラの培養による DHA 生産

○小玉 誠[1], 森谷 亜希[1], 高橋 克嘉[2], 林 雅弘[3]
（[1]宮崎・工技セ, [2]宮崎・食開セ, [3]宮崎大・農）
kodama-makoto@pref.miyazaki.lg.jp

【背景と目的】宮崎県の本格焼酎出荷量は日本一である。一方で、焼酎製造時の副生成物である焼酎粕が県内で約 30 万 t/年も発生している。飼肥料やメタン発酵によるガス化などにより活用されているが、その処理コストは大きく、より高付加価値な用途開発が望まれている。これまでに我々は、焼酎粕が乳酸菌や麹菌の培地として優れた性質を有することを見出している。今回は、優れた増殖性・脂質蓄積性を持つ油糧微生物「ラビリンチュラ」を対象として、DHA 高生産株を用いることにより、各種焼酎粕による培養適性や脂質生産性などを評価した。
【方法】芋・麦・米・ソバを原料とした焼酎の焼酎粕を固液分離することにより、それぞれの焼酎粕清澄液（CL）を得た。培養液は、CL にグルコースを添加し、人工海水が 1/2 濃度、pH 6.8 とし、滅菌処理した。ラビリンチュラは宮崎大学から供与された mh1913 株（*Aurantiochytrium* sp.）を用い、28℃で 72 時間振とう培養したのちに培養菌体を回収した。菌体は乾燥後、クロロホルム／メタノールにより菌体内脂質を抽出し、さらにメチルエステル化することにより GC で分析し、脂肪酸生産量を測定した。
【結果と考察】最も窒素含量が高い麦 CL について培養に最適な濃度を検討したところ、芋 CL と窒素濃度が同じとなるように希釈した場合に、最も脂質生産量が高くなった。他 CL も同様であったことから、全ての CL を芋 CL と同窒素濃度となるように希釈し、グルコース 3%添加により培養したところ、菌体収量はほぼ一定となった。ただし、脂質生産量は芋 CL が他より約 2 割高かった。ラビリンチュラ類は従属栄養性であり、培養には多量の栄養源が必要であるが、培地の窒素源として CL を利用可能であり、酵母エキスを用いた場合よりも脂質生産量を高めることができたことから、焼酎粕によるラビリンチュラ培養の低コスト化の可能性が見いだされた。

DHA production by cultivation of oleaginous microorganisms, Thraustochytrid using shochu distillation remnants

○Makoto Kodama[1], Aki Moritani[1], Katsuyoshi Takahashi[2], Masahiro Hayashi[3]
([1]Miyazaki Pref. Ind. Technol. Center, [2]Miyazaki Pref. Food R & D Center, [3]Fac. Agric., Univ. Miyazaki)

Key words *Aurantiochytrium*, DHA, shochu distillery wastewater

1Bp05 ゲノム編集を用いた TAG lipase ノックアウトによる海洋珪藻 *Fistulifera solaris* のオイル生産性向上

○屋部 佑介[1], 串山 夏望[1], 松本 光史[2], 野島 大佑[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

【背景と目的】微細藻類が蓄積する脂質はバイオ燃料や医薬品原料などへの応用が期待されている。海洋珪藻 *Fistulifera solaris* JPCC DA0580 株は脂質としてトリアシルグリセロール (TAG)を高蓄積することが可能であり屋外での大量培養系も確立されているが、実用化に向けては更なる生産性の向上が求められる。これまでに当該株の機能向上に向けて、高精度な遺伝子改変技術である CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集法の確立を試みてきた。本研究では CRISPR/Cas9 を用いて TAG 分解に関与する TAG lipase 遺伝子をノックアウトすることで、有用株の作出を試みた。
【方法】TAG lipase を標的にしたガイド RNA、及び Cas9 遺伝子を発現するベクターを構築し、パーティクルガン法により *F. solaris* 野生株へ導入した。得られた形質転換体について High resolution melting 解析を行うことで、ノックアウト株をスクリーニングした。選別したクローンについて TAG lipase 遺伝子のディープシークエンス解析を行い、標的遺伝子上の配列変異の検出を試みた。また、選別したクローンを貧栄養条件で培養することで TAG 蓄積を誘導した。その後、富栄養培地にクローンを播種することで TAG の分解を誘導した。24 時間毎に共焦点顕微鏡により TAG が蓄積しているオイルボディの体積を測定し、TAG 分解の抑制を評価した。
【結果と考察】ノックアウトクローンの TAG lipase 遺伝子のシークエンス解析の結果、相同組み換えにより修復されたと考えられる CRISPR/Cas9 システム由来の配列変異が検出された。また、TAG 分解条件における共焦点顕微鏡観察の結果、ノックアウトクローンは野生株と比較してオイルボディの分解が有意に抑制された。以上より、CRSIPR/Cas9 システムにより *F. solaris* の内在性遺伝子のノックアウトが可能であり、TAG 生産性を向上した機能改変株の作出に有用であることが示唆された。

Improvement of oil productivity in *Fistulifera solaris* by knocking out TAG lipase gene using CRISPR/Cas9 system

○Yusuke Yabu[1], Natsuno Kushiyama[1], Mitsufumi Matsumoto[2], Daisuke Nojima[1], Tomoko Yoshino[1], Tsuyoshi Tanaka[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]J-POWER)

Key words *Fistulifera solaris*, diatom, CRISPR/Cas9, TAG lipase

1Bp06 海洋珪藻 *Fistulifera solaris* を用いたシクロオキシゲナーゼ遺伝子のオルガネラ特異的発現によるプロスタグランジン高生産

○松本 奈々, 鶴 雄基, 野々山 智美, 前田 義昌, 吉野 知子, 田中 剛
（農工大院・工）
tsuyo@cc.tuat.ac.jp

【背景と目的】 プロスタグランジン (PG)は C20 脂肪酸を前駆体として合成される生理活性物質であり、医薬品原料としての需要が高い。PG の生合成はシクロオキシゲナーゼ (COX)が触媒する C20 脂肪酸への酸素付加反応から始まる。近年、モデル植物に外来 *cox* 遺伝子を導入し、PG を生産する試みがなされているが、前駆体である C20 脂肪酸の含有量が低いことが課題である。そこで、本研究では C20 脂肪酸を高蓄積する海洋珪藻 *Fistulifera solaris* JPCC DA0580 株(*F. solaris*)を用いて PG 生産を試みた。さらに PG の高生産に向けて前駆体の蓄積部位である小胞体への COX の特異的発現を試み、その影響を評価した。
【方法】紅藻 *Grancilaria vermiculophylla* 由来の *cox* 遺伝子（*gvcox*）、および小胞体シグナルペプチドを融合した *gvcox* 遺伝子を含むベクターをそれぞれ構築し、*F. solaris* にパーティクルガン法により導入した。得られたネオマイシン耐性株のうち、*gvcox* 遺伝子の導入が確認された形質転換体を選抜した。さらに、藻体から PG 抽出画分を調製し、LC-MS/MS 及び抗 PG 抗体を用いた競合法に基づく免疫測定によって、藻体内の PG を定量した。
【結果と考察】PG 定量解析の結果、形質転換体において、アラキドン酸を前駆体とした PG 4 種 （PGD_2、PGE_2、$PGF_{2\alpha}$、15-keto $PGF_{2\alpha}$）とエイコサペンタエン酸 （EPA）を前駆体とした PG 3 種 （PGD_3、PGE_3、$PGF_{3\alpha}$）の生産が確認された。さらに、シグナルペプチドの融合により生産量の向上が確認され、シグナルペプチド融合による COX の小胞体輸送が PG 生産量向上に有効であることが示唆された。以上より、海洋珪藻 *F. solaris* において紅藻由来の *cox* 遺伝子の機能発現が有効であり、PG 生産ホストとして有用であることが示された。

Highly efficient production of prostaglandins in *Fistulifera solaris* by expression of cyclooxygenase with cell organelle-specific targeting

○Nana Matsumoto, Yuki Tsuru, Tomomi Nonoyama, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words microalgae, prostaglandin, physiologically active substance, genetic engineering

1Bp07 気相条件における気生微細藻類 *Coccomyxa* sp. KGU-D001 の生育と脂質蓄積

○川島 成貴, 油井 信弘, 藤井 克彦
（工学院大・先進工・生化）
bt13347@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】気相では CO_2 を効率的に供給できるため、培養装置を省スペース化でき、微生物の脱水や回収も容易にする。気生微細藻類 *Coccomyxa* sp. KGU-D001 は、気相条件下で油滴形成に伴う脂質蓄積量の増加を引き起こすことがわかってきた。栄養源を供給することで生育でき、オイル生産性の向上が期待できる。本研究では、液相条件と気相条件で比較し、栄養源供給時の生育と脂質蓄積を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 21 日間で前培養した後、窒素源が枯渇した藻体を以下の 3 通りの方法で培養した。(1)偏平フラスコを用い Bold's Basal 液体培地で 17 日間通気培養した。(2)偏平フラスコを用い Bold's Basal 液体培地で 10 日間通気培養した後、細胞フィルムを作成し純水を含む綿上で 7 日間シャーレ内にて気相条件で静置培養した。(3)細胞フィルムを作成し BB 培地を含む綿上で、17 日間シャーレ内にて気相条件で静置培養した。その他の培養条件（温度 25℃、光強度 40 μmol photons m^{-2} s^{-1}）は揃えて行った。藻体のバイオマス量を測り、脂肪酸含有量は GC により測定した。
【結果・考察】培養 17 日後の *Coccomyxa* sp.のバイオマス量は、培養(1)と比べ培養(2)と(3)ではそれぞれ 4.6 と 3.6 倍増加した。脂肪酸含有量は、培養(1)が 154 mg/g dwc、培養(2)では 280 mg/g dwc、培養(3)では約 243 mg/g dwc であった。すなわち培養(1)、(2)および(3)のオイル生産性は、それぞれ 0.26、0.67 および 0.60 mg/g day となり、培養(1)と比べ培養(2)と(3)の生産性は約 2.5 倍高かった。以上のことより、*Coccomyxa* sp.は気相条件でも十分に生育可能であり、窒素源枯渇のストレスを与えつつ気相条件で CO_2 を供給すれば、効率的に脂質生産できることがわかった。今後は、気相条件における藻細胞の脂質代謝を明らかにし、細胞増殖や光合成活性についても分析する。

Growth and lipid accumulation in the aerial microalga *Coccomyxa* sp. KGU-D001 biofilm under aerial condition

○Naritaka Kawashima, Nobuhiro Aburai, Katsuhiko Fujii
(Dept. Chem. Life Sci., Sch. Adv Eng., Kogakuin Univ.)

Key words aerial microalgae, biofilm, lipid accumulation, nutrient source

1Bp08 気相条件下での気生微細藻類 *Coelastrella* sp. KGU-Y002 のキサントフィルのエステル化における水分量の影響

○恩田 岳英, 油井 信弘, 藤井 克彦
（工学院大・工）
bt13347@ns.kogakuin.ac.jp

【背景と目的】水酸基を有するカロテノイド(キサントフィル)はエステル化することでより有用な生理活性が付与される可能性がある。陸上の基物表面から単離した気生微細藻類 *Coelastrella* sp. KGU-Y002 は多種のエステル型キサントフィルを蓄積する性質をもち、液体培地中だけではなく、大気に晒されても(気相条件)キサントフィルを合成できることがわかってきた。しかし、藻体の水分がキサントフィルのエステル化に影響するかは明らかになっていない。本研究では、*Coelastrella* sp. のキサントフィルのエステル化について気相条件下での水分量を検討した。
【方法】直径 88 mm のシャーレ中に脱脂綿を敷いて 2.5、5.0、または 10.0 mL の純水をそれぞれ添加し、その上にメンブレンフィルターを用いて作成した藻体の細胞フィルム(1 mg/filter)9 枚置いた。培養温度 25℃、光強度 100 μmol photons m-2 s-1 の条件で 7 日間静置培養した。藻体のカロテノイド含有量は HPLC を用いて測定した。
【結果と考察】7 日間で、シャーレ内の水分量は約 3.5 mL 減少した。純水を添加しなかった場合には、藻体のバイオマス量とカロテノイド含有量は培養開始時から変化しなかった。純水 2.5 mL を添加したときには藻体のバイオマス量は培養開始時と比べてそれぞれ 1.8 倍増加し、純水 5.0、10.0 mL では約 2.9 倍に増加した。藻体は水分の供給が十分であれば、気相条件下でも光合成を行うことができ、炭素を固定できると考えられる。2.5 mL 以上の純水添加によって、培養開始時と比べて、カロテノイド含有量は 2.0 倍に増加した。また水分量が増えるにつれてエステル型キサントフィルの含有量は増加し、10 mL の純水添加では培養開始時と比べて約 2.5 倍に増加した。一定の水分量の供給がキサントフィルのエステル化に影響を与えることがわかった。今後はエステル化反応と光合成活性の関係を検討する。

Influence of water for xanthophyll esterification in the aerial microalgae *Coelastrella* sp. KGU-Y002 under aerial conditions

○Takahide Onda, Nobuhiro Aburai, Katsuhiko Fujii
(Fac. Eng., Kogakuin Univ.)

Key words aerial microalgae, water, xanthophyll, esterification

1Bp09 *Emticicia* sp. EG3 による *Euglena gracilis* のバイオマスと油脂の生産促進

○遠山 忠 [1], 花岡 翼 [2], 山田 康嗣 [3], 鈴木 健吾 [3], 田中 靖浩 [1], 森川 正章 [4], 森 一博 [1]
（[1]山梨大院・総研部, [2]山梨大院・医工農, [3]ユーグレナ, [4]北大院・環境）
ttohyama@yamanashi.ac.jp

【目的】*Euglena gracilis*（以下、*Euglena*）は、バイオディーゼルの原料となるワックスエステルや種々の生理学的効果が期待されているパラミロンを合成し、それらを細胞内に高蓄積する微細藻類である。*Euglena* を原料とした燃料生産の社会実装や機能性食品の普遍化に向けて、バイオマスの収量を向上させる *Euglena* 培養法の開発は重要な課題である。一方、近年、微細藻類と共生する細菌が宿主藻類の増殖に有益な効果を発揮することが報告されている。そのような共生細菌を利用することで、*Euglena* のバイオマス生産性を大幅に向上させることが期待できる。そこで本研究では、*Euglena* の増殖を促進する細菌を探索し、その増殖促進細菌を利用した新しい培養法によって *Euglena* のバイオマス生産性を向上させることを目的とした。
【方法および結果】下水処理水で培養した *Euglena* に共生する細菌を分離培養した後、分離菌株を個々に *Euglena* と共培養した。その結果、分離した *Euglena* 共生細菌の多くが宿主 *Euglena* の増殖を有意に促進した。その中でも EG3 株は、下水処理水中においても *Euglena* に対する高い増殖促進効果を示した。16S rRNA 遺伝子配列の解析から、EG3 株は *Emticicia* 属細菌と同定された。EG3 株と一時的に共培養して増殖活性を高めた *Euglena* を 15L の下水処理水が入った容器に接種して培養した。その結果、通常の *Euglena* 培養と比較して、*Euglena* のバイオマス生産速度と総脂質生産速度が 3 倍程度向上した。

Enhancement of biomass and lipid productivity of *Euglena gracilis* by *Emticicia* sp. EG3

○Tadashi Toyama[1], Tsubasa Hanaoka[2], Koji Yamada[3], Kengo Suzuki[3], Yasuhiro Tanaka[1], Masaaki Morikawa[4], Kazuhiro Mori[1]
([1]Grad. Fac. Interdisc. Res. Univ. Yamanashi, [2]Sch. Med. Eng. Agr., Univ. Yamanashi, [3]euglena Co., Ltd., [4]Grad. Sch. Environ. Sci., Hokkaido Univ.)

Key words *Euglea graclis*, *Emticicia* sp., growth promotion, biomass

1Bp10 炭化水素生産微細藻類 *Botoryococcus braunii* の共生細菌が生産する藻体生育促進物質の探索

○村山 拳午, 大槻 隆司
（山梨大院・医工農・生命環境）
tohtsuki@yamanashi.ac.jp

【背景・目的】
地球温暖化が深刻化する中、*Botoryococcus braunii* が生産する炭化水素は石油代替資源として注目されている。*B.braunii* の炭化水素生産量は他の藻類と比較して著しく多いが、生育が遅く単位時間当たりの生産量が少ない。生育の改善に繋がる現象として、我々は *B.braunii* 藻体表面から単離した共生細菌が生産する物質が *B.braunii* の生育を促進する可能性を見出した [1]。*B.braunii* 藻体表面の共生細菌の報告例は少なく、さらに生育を促進する物質の報告例はない。本研究では単離した No.13 株の培養上清の限外濾過により得た画分を無菌化した *B.braunii* に添加し、生育を比較することで生育促進物質の特定に繋がる情報を得ることを目的とした。
【方法】
No.13 株を 3 L の AF-6 培地(0.3% Glucose)で 5 日間、25℃にて振盪培養した。培養液を遠心した上清をフィルターで濾過し、タンジェンシャルフローシステムを用いて分子量 100 kDa 以上の画分 A と 100 kDa 以下 10 kDa 以上の画分 B を得た。AF-6 培地にタンパク質換算で終濃度が 1 μg/mL となるように画分 A あるいは B を添加し、*B.braunii* NIES836 株を OD_{660}=0.1 となるように接種して全量 80 mL で培養を行い、7 日ごとに乾燥重量の測定を行った。
【結果・考察】
21 日間培養を行なった結果、14 日目から 21 日目間の比増殖速度は画分物質を添加していない試験区と比較して画分 A 添加試験区では約 3.1 倍、画分 B では約 2.8 倍になった。また、画分 A、B をそれぞれ Native-PAGE で解析した結果、一本のバンドが確認でき、SDS-PAGE では画分 A から 200 kDa 以上のタンパク質、画分 B からは 100 kDa 以下のタンパク質が複数存在することが見出され、これらのタンパク質が会合して複合体を形成していることが推察された。今後は生育促進に携わると考えられるタンパク質を分離し、N 末端配列解析を行い、No.13 株から遺伝子クローニングを試みる。

Search for factors promoting growth of *Botoryococcus braunii* produced by the commensal bacterium.

○Kengo Murayama, Takashi Ohtsuki
(Grad. Sch. Life Environ Sci.,Univ Yamanashi)

Key words *Botoryococcus braunii*, Commensal bacterium, Growth promotion

1Bp11 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], 乾 博[2], 上田 光宏[1], 阪本 龍司[1]
（[1]阪府大院・生環科, [2]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 合成および細胞内 ATP レベル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低下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った。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)、ETF 酸化還元酵素 (ETFOR)、さらにアシル-CoA への還元反応を担うと予想されるトランスエノイル-CoA 還元酵素 (TER) およびアシル-CoA 脱水素酵素 (ACD) についてそれぞれ発現抑制を行い、低酸素状態でのユーグレナ代謝におけるミトコンドリア電子伝達系の寄与を詳細に調べた。
ETF、ETFOR の各発現抑制群ではコントロールと比べ 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 合成に利用していると示唆された。また、従来アシル-CoA への還元反応を担うと考えられてきた NADH 依存型 TER の発現抑制では WE 合成が全く変化しなかった。これに対し、フラビン依存型 ACD の 2 種のアイソザイムを同時に発現抑制すると WE 合成が大幅に低下した。これらの結果から、低酸素状態のユーグレナ代謝における WE 合成は、ミトコンドリア電子伝達系で生じた還元力を β-酸化の完全逆行反応に利用することで達成されてい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], Hiroshi Inui[2], Mitsuhiro Ueda[1], Tatsuji Sakamoto[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Dep. Nutri., Osaka Pref. Univ.)

Key words *Euglena*, wax ester, mitochondria, electron transfer system

1Bp12 有用油脂生産藻の特性分析と環境ストレス耐性評価

○高木 明香莉[1], 佐々木 美月[1], 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】 新奇緑藻パラクロレラ BX1.5 株を、異なる培養条件に晒した場合の細胞形態変化および脂質生産能の違いを分析するとともに環境ストレス耐性を調べ、屋内外培養技術のさらなる向上の礎とすることを目的とした。

【方法】 BX1.5 株を２%炭酸ガス充満式インキュベーター内で BG11、窒素欠乏 BG11－N、および リン欠乏 BG11－P 培地を用いた栄養条件下で培養し、光学顕微鏡により細胞形態を観察した。次に、細胞から全脂質を抽出し、メチルエステル化させた化合物を FID 分析して、脂質の組成と生産量を調べた。また、各培養条件下での培地 pH 変化や細胞内クロロフィル a 量を測定した。更に、十分に生育させた本株細胞を強酸・強アルカリ、高温、乾燥、高浸透圧など８条件のストレス下に一定時間晒した後、寒天培地にスポットし、生育を観察した。

【結果と考察】 本株を BG11－N/－P 培地で培養した場合、C16 飽和脂肪酸（燃料向き）ならびに C18 不飽和脂肪酸（食用油向き）を主成分とするトリアシルグリセロール（TAG）が BG11 培地で培養するより単位乾燥重量あたりで高生産されていたが、培養液あたりに換算するとバイオマス量そのものが低減することに伴い相対的に低下していた。よって、高濃度炭酸ガス条件下の BG11 培地で培養すると、培養液あたりの TAG 生産量が最も高くなることが明らかとなった。また細胞サイズは、BG11 のそれと比べて BG11－N 培養では小さく、BG11－P 培養では相対的に大きくなっており、培養条件により変化していた。一方、本株は、様々な環境ストレス耐性を示すことから、屋外培養にも適していると考えられた。更に、BG11－N/－P 培地由来細胞間で一部異なる耐性パターンを示したことから、培地 pH に加え、細胞内の脂質やクロロフィル a 蓄積量などの差もストレス耐性へ影響している可能性が示された。

Useful lipid production and stress resistance of a novel green alga

○Akari Takagi[1], Mitsuki Sasaki[1], Daisaku Sasaki[2], Munehiko Asayama[1]
([1]Grad. sch. Agric., Ibaraki Univ., [2]BioX Chem. Ind. Co., Ltd.)

Key words lipid, microalgae, *Parachlorella*, stress resistance

1Bp13 様々な有機物がウキクサの成長に及ぼす影響

○牧田 晟洋[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、無性生殖で増殖する水生植物であり、好適条件下では植物界で最大級の増殖速度を誇る。また、デンプンやタンパク質の含有率が高いことから、有望なバイオマス資源として注目を集めている。資源価値の高いウキクサを効率的に栽培するためには、最適な培養条件の探索が必要であり、光・温度条件や培養液中の無機成分がウキクサ亜科植物の成長に及ぼす影響については、これまでの研究で明らかにされつつある。しかし、培養液中の有機物がウキクサ亜科植物の成長やバイオマス組成に及ぼす影響については、不明な部分が多い。そこで、本研究では、様々な有機物が、ウキクサ亜科植物の一種であるコウキクサ(*Lemna minor*)の成長速度および有用物質の含有量に及ぼす影響を評価することを目的とした。
【方法・結果】滅菌した無機塩培地(対照系)と、そこに様々な有機物を添加した培養液を用意し、8 日間コウキクサ(*Lemna minor*)を培養した。その結果、対照系と比較し、D-グルコース、スクロース、L-グルタミン、L-アスパラギンを添加した系でコウキクサの成長促進が見られ、培養液中から吸収された D-グルコース、スクロースは炭素源、L-グルタミン、L-アスパラギンは窒素源として、コウキクサに利用されたものと考えられた。また、対照系のデンプン含有率 9.7%に対し、D-グルコース、スクロース添加系では、それぞれ 18.4 %、17.7 %と高いデンプン含有率が得られたことから、吸収されたこれらの糖の一部は、デンプン合成にも利用されたことが示唆された。
【謝辞】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」(JPMJAL1108)の一環として実施した。

Influence of various organic compounds on the production of duckweed biomass

○Akihiro Makita[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, biomass, organic compounds

1Bp14 暗期パルス光照射によるアオサノリの２倍速生育

○梶山 博司[1], 箕田 康一[1], 武田 真樹[1], 木村 祐太[1], 宇山 裕貴[1], 山崎 直人[2], 山本 博文[2]
（[1]徳島文理大院・工・ナノ物質工, [2]徳島文理大・薬）
kajiyama@fst.bunri-u.ac.jp

【背景と目的】
アオサノリ(*Monostroma latissimum*)は佃煮などの原料として重宝されているが、近年の海水温度上昇や水質変化により収穫量は減少傾向にある。そのため、安定した周年栽培が可能な陸上養殖技術が望まれている。アオサノリの単胞分裂や葉体形成に必須であるサルーシン（thallusin）の人工合成技術が徳島文理大学薬学部により確立されたことで、陸上養殖に道が拓けた。本研究の目的は、レタスの高速栽培で実績がある暗期パルス光技術をアオサノリに応用して、その生育促進効果を明らかにすることである。
【実験方法】
青色パルス光は、ピーク波長=449nm、パルス周波数<10 kHz、デューティー比 < 0.2、光合成有効量子束密度（PPFD）<1.0 に設定した。明期の照明には蛍光灯(PPFD=130)を用いた。パルス光照射の効果を調べるために、次の手順で参照試験をおこなった。アオサノリの単細胞と滅菌した海水が入ったフラスコをふたつ用意し、双方に適量のサルーシンを添加した。蛍光灯は１２時間点灯(明期)と１２時間消灯(暗期)を繰り返した。一方のフラスコには明期の蛍光灯のみを、残りのフラスコには暗期にパルス光を８時間照射した。栽培期間は４２日間であった。収穫までの葉体の生育過程は、重量、粒径分布、形状により評価した。重量は遠心分離機で脱水したのちに計測した。葉体の粒径はミー散乱スペクトルから求めた。葉体形状は光学顕微鏡で観察した。
【結果】
パルス光照射開始から１４日程度で生育に差が現れた。４２日後の収穫重量はパルス無しに比べておよそ２倍まで増加した。パルス無しの収穫重量には、パルス照射によって２週間程度早く到達していた。葉体数には、パルス光の有無による違いはなかった。一方、パルス光により、葉体の平均粒径は、１．８倍に増加し、葉体は全体に広がった形状に成長していた。

Double speed growth of *Monostroma latissimum* by using pulsed lighting during dark period

○Hiroshi Kajiyama[1], Koichi MIta[1], Masaki Takeda[1], Yuta Kimura[1], Hiroki Uyama[1], Naoto Yamasaki[2], Hirofumi Yamamoto[2]
([1]Dept. nano Mater., Grad. Sch. Eng., Tokushima Bunri. Univ., [2]Fac. Pharm., Tokushima Bunri Univ.)

Key words *Monostroma latissimum*, aquaculture, thallusin, pulsed lighting

1Bp15 組換え *Ralstonia eutropha* による糖質炭素源からのポリヒドロキシアルカン酸共重合体生合成におけるアセトアセチル-CoA 還元反応の改変効果

Zhang Mengxiao, 栗田 俊輔, 折田 和泉, 中村 聡, ○福居 俊昭
（東工大・生命理工）
tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】C_4 および C_6 ユニットからなるポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシヘキサン酸) [P(3HB-*co*-3HHx)] は柔軟性に優れた生分解性プラスチックとして普及が期待されている。我々はこれまでに *Ralstonia eutropha* の改変により糖質炭素源から P(3HB-*co*-3HHx)を生合成可能な株を作製した。高い 3HHx 組成での生合成には NADPH 依存型アセトアセチル-CoA レダクターゼ（PhaB1）の欠失が必要であったが、この PhaB1 欠失により生産量が減少した。本研究ではアセトアセチル-CoA が C_4 モノマーと C_6 モノマーの生合成経路の分岐点であることに着目し、その還元ステップの改変による PHA 共重合体生合成への影響を検討した。

【方法および結果】 *R. eutropha* P(3HB-*co*-3HHx)生合成株において PhaB1 を高基質親和性・低活性のパラログ PhaB2 に置換したところ、グルコースから 3HHx 分率 6~7 mol%の共重合体を乾燥菌体重量あたり 71~72 wt%で生合成した。この組成は PhaB1 欠失株と PhaB1 保持株の中間であり、アセトアセチル-CoA の(*R*)-特異的還元と(*S*)-特異的還元のバランスによるフラックス分配を変化させることで共重合組成の制御が可能であった。低基質親和性の PhaB1 変異酵素では大きな効果は見られなかった。また NAD 依存型(*S*)-3HB-CoA デヒドロゲナーゼおよびクロトナーゼの遺伝子導入により逆 β-酸化経路を強化し、かつ短鎖特異的 *R*-ヒドラターゼを導入した株はグルコース炭素源から P(3HB-*co*-12 mol% 3HHx) を蓄積率 75 wt%で生合成した。このことからクロトニル-CoA を分岐点としたフラックス再分配も組成・蓄積率の決定に重要な要因であると考えられた。

Modification of acetoacetyl-CoA reduction in *Ralstonia eutropha* for biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from structurally unrelated compounds

Mengxiao Zhang, Shunsuke Kurita, Izumi Orita, Satoshi Nakamura,
○Toshiaki Fukui
(Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech)

Key words biodegradable plastic, polyhydroxyalkanoate, *Ralstonia eutropha*, metabolic engineering

1Bp16 未活用資源を用いた PHA 生産および合成遺伝子の特定

○張 倎喆[1], 中村 友綺[1], 小野寺 瑠依[1],
Motakatla Venkateswar Reddy[2]
（[1]室蘭工業大院・工・環境創生工学, [2]Inst. Mol. Microbiol. Biotech. Münster Univ.）
ychang@mmm.muroran-it.ac.jp

[背景および目的] ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）はバイオマスを原料として微生物により生産される生分解性プラスチックである。しかし、高価格のため広範囲での実用化には至っておらず、生産コストの削減のため廃棄物を原料とした生産や、遺伝子組み換え技術を利用した生産量向上に向けた研究が行われている。その中、本研究では有機系廃水の利用可能性を評価した後、PHA の生産に関与する合成遺伝子の同定を行った。
[方法] 下水、濃縮下水、チーズホエー、希釈チーズホエー、チーズホエーの酢酸発酵液を用いた５つの条件において PHA 生産を行った。このうち酢酸発酵液を用いた条件では、第１段階反応としてチーズホエーを酢酸生産菌株と培養し、基質となる酢酸へ転換した。続く第２段階で、この酢酸発酵液を基質とした *Bacillus* sp. CYR1 株による PHA 生産を行った。一方 CYR1 株の PHA 合成経路を推定するため、CYR1 株の PHA 合成酵素をコードする遺伝子領域を PCR 法により増幅させ、得られた産物の配列解析を行った。
[結果] 下水およびチーズホエーから PHA が生産可能であることが示された。^{1}H NMR および ^{13}C NMR 解析により、得られた PHA は 3-ヒドロキシ酪酸（3HB）を主要な構成モノマーとすることが分かった。また、本研究で得られた最大 PHA 生産量は、チーズホエーの酢酸発酵液を基質とした条件であった。２段反応での PHA 生産が生産量の向上に効果的であることが示された。一方、遺伝子配列解析の結果、CYR1 株は既報の PHA 合成酵素の遺伝子配列と高い類似性を有することが示唆された。

PHA production using unused resources and identification of synthetic genes

○Young Cheol Chang[1], Yuki Nakamura[1], Rui Onodera[1],
Motakatla Venkateswar Reddy[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Muroran Inst. Technol., [2]Inst. Mol. Microbiol. Biotech. Münster Univ.)

Key words PHA, PHB, biodegradable polymer, bioresources

1Bp17 白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株のリグニン分解系を制御する転写因子の探索

○岸川 凜太郎[1], 森 智夫[2], 河岸 洋和[2,3,4], 平井 浩文[2,3]
（[1]静大院・総合科技, [2]静大・農, [3]静大・グリーン科技研, [4]静大・創科技院）
hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】
白色腐朽菌は、木材の主要成分であり難分解性芳香族高分子であるリグニンを単独で高度に分解可能な唯一の微生物である。リグニン分解には様々な酵素、低分子化合物が関与することは既に明らかにされているが、リグニン分解には多種多様な分子種が複雑に関わっているため、その全貌は未だに解明されていない。また、リグニン分解系全体の制御因子なども見つかっておらず、その特性を大幅に改善する分子育種法などは確立されていない。
当研究室では、これまでにトランスクリプトーム解析により高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株が、リグニン非存在時と比較してリグニン存在時に発現が増減する転写因子様遺伝子を数種得ており、これらが真にリグニン分解に関与しているかどうか、調査を行った。
【方法・結果】
ブナ木粉及び脱リグニン処理ブナ木粉（ホロセルロース）にて *P. sordida* YK-624 を培養し、total RNA を得て発現解析を行った。その結果、nitrogen assimilation transcription factor NIT-4 様遺伝子が、トランスクリプトーム解析の結果と一致してリグニン存在下で高発現していた。*nit-4* は、アカパンカビにおいては窒素制限下で発現し、硝酸／亜硝酸レダクターゼ遺伝子の発現を誘導する転写因子であるが、本腐朽菌由来 NIT-4 様遺伝子の相対発現量は、硝酸アンモニウム添加に影響されなかった。以上の結果より、NIT-4 様遺伝子は培地中の窒素濃度に関らず、リグニンに応答して高発現していると推測された。

Identification of transcription factors regulating lignin degradation in white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624

○Rintaro Kishikawa[1], Toshio Mori[2], Hirokazu Kawagishi[2,3,4], Hirofumi Hirai[2,3]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., 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, lignin degradation, transcription factor, *nit-4*

1Bp18 リグニンモデル化合物のエーテル結合を切断する微生物の探索

○大谷 早紀[1], 利根川 聡史[1], 羽部 浩[2], 古屋 俊樹[1]
（[1]東京理科大理工・応生, [2]産総研・環境管理）
tfuruya@rs.tus.ac.jp

【背景・目的】原油由来の芳香族化合物は化学製品の合成原料などに利用されているが、原油は有限の資源であり将来的に枯渇してしまう恐れがある。そこで近年、バイオマス資源のリグニンが芳香族化合物の供給源として注目されている。リグニンはモノリグノールと呼ばれる芳香族化合物が酸化重合した高分子化合物であり、多くのエーテル結合が含まれている。その中でも β-*O*-4 結合が最も多く含まれており、この結合を切断できればリグニンを低分子化することが可能と考えられる。本研究では、リグニンの β-*O*-4 結合に対するモデル化合物として 2-フェノキシアセトフェノン（2-PAP）を用い、本化合物のエーテル結合を切断可能な新規微生物の探索を実施した。

【方法・結果】日本各地から採取した 540 の土壌サンプルを生理食塩水に懸濁し、リグニン様の構造を含むニトロフミン酸を炭素源とする固体培地に塗布して生育可能な微生物を選択した。その結果、1183 株の微生物が取得された。つぎに、これらの微生物を 2-PAP を含む溶液に懸濁し、30℃で 72 時間振とうすることにより反応を行った。2-PAP のエーテル結合が切断されるとフェノールを生成することが予想されるため、フェノールを検出可能なギブス試薬を反応液の分析に用いた。その結果、9 株の微生物で反応液がギブス試薬の添加により呈色した。1 株の微生物の反応液について、HPLC により分析したところ、保持時間からフェノールと推定されるピークを含むいくつかのピークが検出された。このことからエーテル結合が切断されていることが示唆された。現在、二次スクリーニングで陽性を示した微生物について、属種同定や反応生成物の詳細な解析を進めているところである。

Search for microorganisms that cleave ether bond in a lignin model compound

○Saki Oya[1], Satoshi Tonegawa[1], Hiroshi Habe[2], Toshiki Furuya[1]
([1]Dept. Appl. Biol. Sci., Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]AIST, EMRI)

Key words ether bond, lignin, biodegradation, screening

1Cp01 芳香族有機塩素化合物の微生物分解に及ぼす土壌の影響

○八田 貴, 久渡瀬 太一, 劉 昊, 周 法宇
（岡山理大・工）
thatta@bme.ous.ac.jp

【背景と目的】ダコニール [2,4,5,6,-tetrachloroiso phthalo nitrile (TPN)] は農薬として世界的に使用され、中国では有機塩素系殺菌剤として最も多く使われている。*Paraburkholderia fungorum* は TPN を土壌成分が存在する場合のみ分解することを明らかにしている。特にバーミュキュライト、カオリナイトの存在下で分解が促進することを明らかにしている。今回の報告では、液体培養下での *Ralstonia pickettii* の 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) 分解に対する種々土壌の効果を調べた。
【方法】培養はバッフル付き三角フラスコを用い、無機塩培地に畑土、鹿沼土、赤玉土、バーミキュライト、カオリナイト、パーライト等の土壌を加え TPN あるいは 2,4,6-TCP の分解を調べた。土壌の濁りでの生育測定が難しいため、各化合物の分解は遊離塩素イオン濃度をチオンシアン酸水銀法により求めた。
【結果と考察】 TPN の分解は、無機塩培地のみではの場合殆ど分解しないが、培養液中に畑土、バーミキュライト、カオリナイトを 5%程度添加することにより分解が著しく促進された。一方、2,4,6-TCP の分解はバーミキュライト、カオリナイトでは抑制されたが、鹿沼土、パーライト存在下で分解が促進され TPN 分解に対する反対の効果を示した。培養液中に鹿沼土を加えた場合では非常に高濃度の 2,4,6-TCP 分解を示した。現在までに 0.1%以上の 2,4,6-TCP の分解の報告はなく、土壌が何らかの影響を及ぼしていると考えられた。

Effect of soils on chlorinated aromatic compounds degradation by Bacteria

○Takashi Hatta, Taichi Kudose, Hao Liu, Fayu Zhou
(Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

Key words biodegradation, soil, aromatic ring compound, fungicide

1Cp02 組換え大腸菌を用いた高効率リン酸トリス(2-クロロエチル)分解

○阿部 勝正, 篠原 輝, 高橋 祥司, 解良 芳夫
（長岡技科大）
katsuabe@vos.nagaokaut.ac.jp

Tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) は，有機リン酸トリエステルの中でも塩素を含むハロアルキル系有機リン酸トリエステルであり，ヒトを含む生物に対する毒性を有する．本研究室では微生物による含塩素難分解性有機リン化合物分解処理技術を開発するために，TCEP の分解能を有する *Sphingobium* sp. TCM1 株を自然界から単離し，TCEP 分解に必須である 3 つの酵素，ホスホトリエステラーゼ (HAD)，ホスホジエステラーゼ(PDE)，モノエステラーゼ(PME)の同定にも成功している．TCM1 株を用いた TCEP 分解系に関する研究も行ってきたが， 20 μM の TCEP を完全分解するのに 96 時間も要することから，今後，微生物を TCEP 環境浄化に用いるためにはより効率的な TCEP 分解微生物の創出が必要であると考えられる．そこで本研究では，異種細胞発現系の中でも最も研究されており，遺伝子工学的手法も確立されている大腸菌中で TCEP 分解酵素群を発現させ，その分解挙動や効率を詳細に解析することとした．
まず，大腸菌が PDE，PME の関連酵素を有していることから HAD のみを発現させることで TCEP の完全分解が可能となるか解析を行った．しかし，HAD のみの発現では TCEP を完全に分解できないことが明らかとなり，HAD に続く分解を担う PDE を共発現させた場合の分解挙動について再度検討した．pET-Duet ベクターを用いて HAD と PDE 共発現系を構築し，共発現大腸菌を用いて，無機塩培地中の TCEP 分解挙動について解析した．その結果，本菌は TCM1 株を用いた分解より 12 倍早い 8 時間程度で 50 μM の TCEP 完全分解できること，また，50 μM 以下の TCEP であれば IPTG 添加なしで完全分解可能であることが明らかになった．100 μM 以上の高い TCEP 濃度の場合に関しても培養液への IPTG 添加が必須ではあるが，72 時間で TCEP を完全分解しており，本菌は高濃度の TCEP 分解にも対応可能であることが示された．

Efficient degradation of tris(2-chloroethyl) phosphate by recombinant *Escherichia coli*.

○Katsumasa Abe, Hikaru Shinohara, Shouji Takahashi, Yoshio Kera
(Nagaoka Univ. Technol.)

Key words *Sphingobium*, recombinant *Escherichia coli*, biodegradation, organophosphorus compounds

1Cp03 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* によるネオニコチノイド系殺虫剤の分解

○大野 遥[1], 一瀬 博文[2], 森 智夫[3], 河岸 洋和[3,4,5], 平井 浩文[3,4]
（[1]静大院・総合科技, [2]九大院・農, [3]静大・農, [4]静大・グリーン科技研, [5]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攪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やヒトに対する悪影響が懸念されている。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。
我々はこれまでに代表的な白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* によって NEOs の一種であるアセタミプリド（ACE）が分解可能であり、その分解反応にはシトクロム P450（CYP）が関与しており、*P. chrysosporium* 由来 CYP 酵母異種発現スクリーニングシステムにより、ACE 分解には CYP5147A3 が関与していることを明らかにしている。この CYP を異種発現させた酵母を用いて NEOs 分解実験を行ったところ、ACE に対し高い分解活性を示した一方で、チアクロプリド、ニテンピラム、ジノテフランなど他の NEOs に対しても分解活性を示すことが明らかになった。一方で *P. chrysosporium* の *in vivo* における ACE 分解活性は低く、ジノテンフランはほとんど分解しなかった。この様に *in vivo* と CYP 組換酵母で NEOs の分解挙動が大きく異なることから、*P. chrysosporium* による NEOs 分解は、CYP5147A3 の発現量に大きく依存していること、また CYP5147A3 以外の酵素が関与していること等が予想された。

Degradation of neonicotinoid insecticides by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

○Haruka Ono[1], Hirofumi Ichinose[2], Toshio Mori[3], Hirokazu Kawagishi[3,4,5], Hirofumi Hirai[3,4]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ., [3]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [5]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words bioremediation, neonicotinoid, cytochrome P450, white-rot fungi

1Cp04 Effect of *Pseudomonas putida* on toluene removal activity in the rhizosphere of *Solanum lycopersicum* L.

○Hak Jin Song[1], Yong-Keun Choi[1], Ji Eun Kim[1], Kwang Jin Kim[2], Yunjeong Yang[1], Eun Bin Lee[1], Sang Hyun Lee[1], Yung-Hun Yang[1], Hyung Joo Kim[1]
([1]Dept. Biological Eng., Konkuk Univ., [2]Urban Agric. Res. Div., NIHHS, Rural Development Administration)
hyungkim@konkuk.ac.kr

In this study, toluene-degrading rhizobacteria were isolated and identified for the toluene reduction in indoor air. The isolated bacteria were applied to the rhizosphere of *Solanum lycopersicum* L. and their toluene degrade activity was investigated. Soil from toluene-contaminated rhizosphere of *Ardisia pusilla* A. DC. were used as bacterial samples for the enrichment culture (toluene as a sole carbon source). Among the samples, a bacterial strain which showed the highest growth rate with toluene removal activity was isolated and identified as *Pseudomonas putida*. Complete degradation of toluene in the cultivation medium was achieved in 24 h with a maximum rate of degradation of 8.3 mg/L/h. In the presence of 200ppm of toluene, the isolated strain (*P. putida* (0 ~ 1 x 10^6 CFU/ml)) in the rhizosphere of *Solanum lycopersicum* L. showed high toluene removal activity (maximum 1.5947 μg・m^{-3}). FISH and FE-SEM results showed that the isolated bacteria were successfully maintained in the rhizosphere of the plant root. These results suggest that the combination of toluene-degrading bacteria with plant (plant rhizosphere) has great potential for the indoor air quality control.

Effect of *Pseudomonas putida* on toluene removal activity in the rhizosphere of *Solanum lycopersicum* L.

○Hak Jin Song[1], Yong-Keun Choi[1], Ji Eun Kim[1], Kwang Jin Kim[2], Yunjeong Yang[1], Eun Bin Lee[1], Sang Hyun Lee[1], Yung-Hun Yang[1], Hyung Joo Kim[1]
([1]Dept. Biological Eng., Konkuk Univ., [2]Urban Agric. Res. Div., NIHHS, Rural Development Administration)

Key words *Pseudomonas putida*, *Solanum lycopersicum* L., plant rhizosphere, toluene-degrading bacteria

1Cp05 *Pseudomonas* sp. PTH10 株における新規フタル酸代謝酵素遺伝子群の機能解析

儀武 菜美子 [1], 岩崎 卓巳 [2], 西 達也 [2], ○笠井 大輔 [1], 福田 雅夫 [1,3]
（[1]長岡技科大, [2]（株）ジナリス, [3]中部大・応生）
dkasai1@vos.nagaokaut.ac.jp

【目的】*Pseudomonas* sp. PTH10 株はフタル酸を唯一の炭素源、エネルギー源として生育する。これまでの解析により、PTH10 株はフタル酸を 2,3-ジヒドロキシ安息香酸 (23DHB)へと変換し代謝する新規のフタル酸代謝経路を有することが示された。本研究では、PTH10 株のフタル酸代謝経路の全容を明らかにすることを目的として、本株のフタル酸代謝遺伝子群の同定と酵素の機能解析を行った。
【方法】遺伝子産物の機能を明らかにするために、大腸菌を宿主として各遺伝子を発現させた。各組換えタンパク質の酵素活性を測定することで、各遺伝子の機能を推定した。また、各遺伝子の破壊株を作製しフタル酸資化能を評価するとともに、各遺伝子の転写誘導性を明らかにした。
【結果】芳香環開裂酵素遺伝子の推定アミノ酸配列の相同性を基に PTH10 株のゲノムデータベースを検索した結果、既知の芳香環開裂ジオキシゲナーゼと約 30%の相同性を示す 1 つの ORF (*opaC*)を見出した。さらにその近傍には、芳香族化合物の水酸化に関わると考えられる水酸化酵素をコードする遺伝子群 (*opaAabcd*)とデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*opaB*)、そして amidohydrolase_2 family に属す加水分解酵素と相同性を示す *opaD* の存在が認められた。異種宿主発現により得られた各遺伝子産物の機能解析を行なった結果、これら *opa* 遺伝子が 23DHB を経由したフタル酸代謝経路に関与することが示唆された。さらに、各種遺伝子破壊株の解析から、*opa* 遺伝子群が PTH10 株のフタル酸代謝に必須であることが示された。また、各遺伝子の転写誘導性を評価した結果、*opa* 遺伝子群は、フタル酸代謝時に複数のプロモーターから誘導的に転写されることが示唆された。

Characterization of a novel *o*-phthalate catabolic gene cluster in *Pseudomonas* sp. strain PTH10

Namiko Gibu[1], Takumi Iwasaki[2], Tatsunari Nishi[2], ○Daisuke Kasai[1], Masao Fukuda[1,3]
([1]Nagaoka Univ. Technol., [2]Genaris inc., [3]Coll. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ.)

Key words aromatic ring compound, dioxygenase, decarboxylase

1Cp06 *Rhodococcus* 属細菌による低温条件下での A 重油分解の分子機構の解析

○三好 佑奈 [1], 岡田 丈 [1], 新谷 政己 [1,2], 金原 和秀 [1]
（[1]静大院・総合科技, [2]静大・グリーン科技研）
kimbara.kazuhide@shizuoka.ac.jp

【背景と目的】バイオオーグメンテーションは，分解微生物を汚染環境中に投入し，汚染を浄化する手法である．当研究室は， *Rhodococcus erythropolis* に属する 2 種の油分解菌を用いた液体培養において，30°C に比べ 15°C で高い A 重油分解率を示すことを報告している [1]．また，回転型スラリーバイオリアクターを用いることで，15°C の低温条件下における，高濃度 A 重油汚染土壌の迅速な浄化を達成した．しかし，その分子機構は不明である．本研究では，中鎖アルカン分解への関与が報告されている，アルカンモノオキシゲナーゼをコードする *alkB* 遺伝子に着目し，30，15°C の液体培養条件での遺伝子発現を解析することで，低温での分解メカニズムの解明を目指した．
【方法】2 種の菌株 A，C のドラフトゲノムシークエンスより，*alkB* 遺伝子のホモログがそれぞれ 5 または 4 個存在することがわかっている．本研究では，A 株を対象とし，A 重油を炭素源として，30，15°C で液体培養し，RNA を抽出後，qRT-PCR を行い，発現量を比較した．また，異なる炭素数のアルカンを単一炭素源として用いて，培養し，温度による生育と *alkB* 遺伝子の発現の違いを比較した．
【結果と考察】液体培養での A 重油分解で，3 日後に温度による分解率に差はないが，9 日後の分解率は 15°C では 90%，30°C では 60%と，15°C で高い結果となった．また，*alkB* 遺伝子のホモログの発現を比較した結果，培養 2 日目で 15°C において著しく大きい発現を示すホモログが存在した．このことから，これらが 15°C における A 重油分解の進行に関与している可能性が考えられた．また，鎖長の異なるアルカンにおいて，温度による分解率の違いがみられた．現在，*alkB* 遺伝子の役割を解明するため，各ホモログの破壊株の作製を試みている．

1. Shintani *et al*., 2019, J. Biosci. Bioeng., 127:197-200

Comparisons in transcriptional levels of *alkB* genes under different temperature conditions during degradation of A-fuel oil by *Rhodococcus erythropolis* strain A.

○Yuna Miyoshi[1], Jo Okada[1], Masaki Shintani[1,2], Kazuhide Kimbara[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words alkane 1-monooxygenase, transcription, low temperature, oil degrading bacteria

1Cp07 GFP を融合したイガイ由来接着タンパク質の作製と材料吸着挙動

○志賀 敏英, 中島 一紀, 岩田 至叡, 川﨑 了
（北大院・工）
nakashima@geo-er.eng.hokudai.ac.jp

【背景・目的】
環境負荷の小さい新たな接着材料として、イガイ由来の接着タンパク質（Mussel Adhesive Proteins: MAPs）が提案されている。MAPs の一つである Mytilus galloprovincialis foot protein type 5 (Mgfp-5)をコードする cDNA が単離され、大腸菌系での発現が報告されている。組換え Mgfp-5 は十分な接着能力を有し、生体接着剤料として有用であることが示されているが、吸着挙動やメカニズムの詳細は不明な点が多い。本研究では、緑色蛍光タンパク質（GFP）を Mgfp-5 に融合させることにより、吸着の可視化および機能解析の向上を目的とした。
【実験方法】
Mgfp-5 および GFP の融合遺伝子を Overlap PCR により作製し、In-Fusion 法により pET-22b(+)ベクターに挿入した。大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換し、37℃の条件下で発現を行った。変性条件下で His タグ精製を行った後、4℃で 24 時間透析をすることによってリフォールディングを行い、融合タンパク質（GFP-Mgfp-5）を作製した。精製 GFP-Mgfp-5 を蒸留水に溶かした溶液に固体サンプル（銅・ガラス・セルロース）を加え、25℃で 24 時間穏やかに振盪させることによって吸着実験を行った。
【結果】
SDS-PAGE により GFP-Mgfp-5 の発現が確認された。発現した GFP-Mgfp-5 は不溶性であったが、リフォールディングによって可溶化に成功した。吸着実験において，固体サンプルを蛍光顕微鏡で観察した結果、ガラスおよびセルロースに関しては表面に緑色蛍光が見られ GFP-Mgfp-5 の吸着が示唆されたが、銅に関しては蛍光が見られなかった。また、GFP のみを加えた溶液ではいずれの固体サンプルにおいても吸着が見られなかったことから、吸着が Mgfp-5 によるものであることが示された。以上より、Mgfp-5 の可視化が可能となり，吸着挙動の解析やメカニズム解明がより簡便になると考えられる。

Preparation and material adsorption behavior of mussel adhesive protein fused with GFP

○Hayahide Shiga, Kazunori Nakashima, Yoshiaki Iwata, Satoru Kawasaki
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words mussel adhesive proteins, immobilization, GFP

1Cp08 金属結合ペプチドを発現した大腸菌の金属固体への結合および微粒子凝集特性

○中島 一紀, 岩田 至叡, Aneksampant Apichaya, 川﨑 了
（北大院・工）
nakashima@geo-er.eng.hokudai.ac.jp

【緒言】 微生物細胞を生きたまま無機固体表面に選択的に固定化することができれば，バイオセンサーやバイオデバイス，微生物燃料電池，バイオリーチングやレアメタルの回収に応用できる。これまで様々な金属結合ペプチドが報告されており，抗体や酵素を主としたタンパク質分子の材料表面への固定化には用いられてきた。一方，それらを生きた微生物細胞の選択的な結合に利用した例は僅少である。本研究では，チタンおよびヘマタイト（Fe_2O_3）をモデル金属材料とし，外膜タンパク質に金属結合ペプチドを組み込んだ *E. coli* を作製し，金属プレートへの結合特性および金属微粒子の凝集性について検討した。
【方法】 *E.coli* 由来の外膜タンパク質 OmpA の膜外突出部分（Loop1 あるいは Loop1+Loop3）にチタン結合ペプチド（RKLPDAPGMHTW）およびヘマタイト結合ペプチド（STVQTISPSNH）をそれぞれ組み込んだ金属結合性 OmpA 遺伝子を作製した。これらの遺伝子を pET システムにより過剰発現した *E. coli* BL21(DE3)株を作製し，金属プレート（チタン，銅，ガラス，ヘマタイト等）への吸着実験を行った。蛍光顕微鏡によりプレート表面を観察し，細胞の吸着性および生細胞の評価を行った。
【結果と考察】 SDS-PAGE により，いずれのタンパク質においても十分な発現が確認された。金属プレートへの吸着実験では，コントロールの *E. coli* がいずれの金属にも吸着性を示さないのに対し，金属結合性 OmpA を過剰発現した *E. coli* はターゲットの金属プレートに吸着した。また，Loop1+Loop3 の両方に金属結合ペプチドを導入した株の方がより高い結合性を示した。さらに，チタン結合性を付与した *E. coli* はチタン微粒子の沈降速度を大きく増加させた。

Adsorption and particle aggregating property of *E. coli* expressing metal-binding peptides

○Kazunori Nakashima, Yoshiaki Iwata, Apichaya Aneksampant, Satoru Kawasaki
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words immobilized bacteria, membrane protein, metal-binding peptide

1Cp09 鉄を電子源とする硫酸還元菌の単離とその腐食プロセスの電気化学的解析

○平野 伸一[1], Irene Davidova[2], Joseph Suflita[2], 長岡 亨[1], 松本 伯夫[1]
（[1]電中研, [2]オクラホマ大）
s-hirano@criepi.denken.or.jp

【背景及び目的】金属腐食が化学的に起こりづらい環境 (嫌気、中性、常温・常圧) においても微生物が腐食を促進し、設備劣化を引き起こすことが明らかとなってきている。我々は、これまでに硫酸イオンを含む海水環境より長鎖炭化水素 (C_{25}-C_{50}) の存在下、鉄腐食活性を示し、原油関連施設において腐食被害を引き起こす微生物群集 SDB-culture を獲得している。長鎖炭化水素を電子供与体とした硫酸還元菌 (SRB) の代謝によって発生した硫化水素による腐食が推定されたが、長鎖炭化水素非存在下においても SDB-culture は高い腐食活性を示すため、異なる腐食メカニズムの存在が示唆された。そこで、本研究では SDB-culture より腐食微生物を単離し、その腐食過程の電気化学的な解析を行うことで腐食メカニズムを推定することを目的とした。
【方法及び結果】SDB-culture より鉄を単一電子供与体、CO_2/HCO_3^-を単一炭素源として 2 株の SRB (*Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*) を単離することに成功した。両株とも有機物非存在下、金属表面に腐食生成物を含むバイオフィルムを形成しながら腐食を引き起こし、特に *Desulfobulbus* は無菌区の 24 倍高い腐食活性 (鉄材料の重量減損) を示した。これらの腐食プロセスを電気化学的手法にて解析した結果、無菌区の 4～50 倍の腐食電流が検出されるとともに、cathode 電流の利用反応促進による腐食電位の上昇が確認された。また、電気化学解析から鉄表面に形成されたバイオフィルムには導電性の高い腐食生成物や、SRB に由来する鉄-細胞間の電子伝達に関わる酵素類が含まれていることが示唆された。以上の結果より、単離された SRB が鉄を電子源として利用しながら増殖することで、腐食反応を促進していることが推定された。本発表では、これら SRB 単離株の SDB-culture による腐食における役割についても合わせて議論する。

Isolation and electrochemical analysis of sulfate-reducing bacteria using iron as electron donor

○Shin-ichi Hirano[1], Irene Davidova[2], Joseph Suflita[2], Nagaoka Toru[1], Matsumoto Norio[1]
([1]CRIEPI, [2]Dept. Microbiol. and Plant Biol., Oklahoma Univ.)

Key words sulfate reducing bacteria, bio-corrosion, electron donor, iron

1Cp10 六価クロム還元細菌 *Flexivirga alba* ST13[T] 株の六価クロム還元遺伝子の探索

○桶田 凜, 広瀬 佑紀, 土井 晃一郎, 丸山 竜人, 松井 徹, 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】六価クロムには強い発癌性があり、産業利用による環境汚染が問題となっている。いくつかの微生物にはこの六価クロムを減少させることのできる遺伝子が報告されており、遺伝子ごとに様々なプロセスが存在する。また、六価クロムの還元には酵素が関わっており、単離することができれば酵素を用いた環境浄化も可能となる。我々の研究室が発見した新属新種の放線菌 *Flexivirga alba* ST13 株にも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が、ST13 株の六価クロム還元の作用機構は未だ判明しておらず、六価クロム還元遺伝子も不明である。そこで我々は ST13 株の六価クロム還元の作用機構を明らかにすることを目的として ST13 株の六価クロム還元遺伝子の探索を行った。
【方法と結果】ISOPLANT を使用して ST13 株のゲノム DNA 抽出を行い、次世代シーケンス受託企業「北海道システムサイエンス」に依頼して塩基配列を決定した。その結果、約 1400 万リード、4.5 ギガ塩基対のデータが得られた。塩基配列はゲノムアセンブラ Velvet を使用してコンティグの作成を行った。六価クロム還元に関わる遺伝子として他の細菌で *chrR*、*chrA*、*yieF*、*nemA*、*azoR*、*nfsA* が知られている。そこで、それらのアミノ酸と ST13 株との tblastn 相同性解析を行った結果、六価クロム還元酵素遺伝子 *chrR* において 60%という有為な相同性が確認された。現在、PCR で ST13 株の *chrR* の領域の増幅を行い、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進めている。

Genome analysis of *Flexivirga alba* ST13[T] for hexavalent chromium reducing gene

○Rin Oketa, Yuki Hirose, Koichiro Doi, Ryuto Maruyama, Toru Matsui, Tomoyasu Sugiyama
(Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol.)

Key words *Flexivirga alba* ST13, hexavalent chromium, gene, enzyme

1Cp11 開発途上国のヒ素汚染地下水を利用可能にするための微生物技術の開発

○遠藤 銀朗, 石井 啓介, 高橋 森里, 宮内 啓介
（東北学院大・工）
gendo@mail.tohoku-gakuin.ac.jp

[背景] 南アジアや東南アジアの開発途上国の大河デルタ地帯には深刻な地下水ヒ素汚染問題が存在しており、利用できる水資源が限られることにより経済発展が制約されている。これらの地下水中のヒ素は、溶解度の高い亜ヒ酸イオンとして存在している。そのため、微生物が持つヒ素酸化能力を活用して亜ヒ酸イオンを溶解度の低いヒ酸イオンに酸化した後に、同時に地下水に存在する金属イオンの酸化沈殿物と共沈させて除去する方法が有効と考えられる。
[方法]亜ヒ酸イオン吸着能を有しヒ酸イオン吸着能を有さない特別な性質を持ちかつ普遍的工業原料として安価に入手可能な担体としてコークスをろ材とする散水ろ床方式の微生物バイオリアクターを開発し、ヒ素酸化と鉄酸化を同時進行させかつ後段に水酸化鉄沈殿槽を設けることによりヒ酸イオンを共沈回収する連続処理実験を行った。
[結果] ヒ素酸化のための散水ろ床微生物付着担体としてコークスを用いることにより、亜ヒ酸イオンのヒ酸イオンへの酸化が効率よく行われ、酸化産物のヒ酸イオンはコークスに吸着されずに担体から溶脱することが分かった。この効率的ヒ素酸化はコークスが亜ヒ酸イオンを吸着し担体表面ヒ素濃度を高めることによると推察された。コークス散水ろ床は鉄イオンの酸化にも効果的であった。この結果、コークス担体散水ろ床の採用と後段に水酸化鉄沈殿装置を組み合わせることによって、初期濃度 800μg/L (800ppb)のヒ素は、50μg/L (50ppb)以下となるまで連続的に除去できることが知られた。これらの結果より、コークスをろ材として散水ろ床方式のバイオリアクターを構成することにより、建設コスト、エネルギーコストおよびメンテナンスコストをできるだけ必要としない、開発途上国に適合する地下水ヒ素除去技術が実現できると考えられた。

Development of microbial technology for arsenic removal from groundwater in developing countries

○Ginro Endo, Keisuke Ishi, Moriasato Takahashi, Keisuke Miyauchi
(Fac. Eng., Tohoku Gakuin Univ.)

Key words arsenic removal, ground water, bacterial oxidation, trickling filter process

1Cp12 Different inactivation behaviors of Gram-positive and Gram-negative bacteria in TiO_2 based photocatalytic disinfection

○Na Liu[1], Cheng Zhang[1], Nobuaki Negishi[2], Yingnan Yang[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Environ. Mgt. Res. Inst. AIST Tsukuba)
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

Photocatalytic disinfection technology has attracted a great attention in order to process microbial contamination due to its superior oxidation ability and nontoxicity. However, most of the reported studies have only used one model bacteria group. Considering that some differences in photocatalytic inactivation response have been reported for different type of microorganisms, more efforts should be focused on the establishment of possible differences in the photocatalytic disinfection efficiency depending on the selected indicator microorganism. Moreover, in real water environment, Gram-negative and Gram-positive bacteria are usually coexistent, while few related researches have been conducted to study the interaction between them in one photocatalytic system. According to the previous studies, a novel P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2 photocatalyst, firstly synthesized by our lab, has been demonstrated as a promising material for decomposing organic matter. Hence, in this study, the disinfection efficiency of P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2 on different types microorganisms was comparably investigated. The results showed that the novel composite could effectively inactivate both Gram-negative and Gram-positive bacterium either in single or mixed bacteria system. Due to the structural differences of these two types bacteria, the inactivation efficiency between them was also different. The present study results made an important foundation for future scaling up application of this novel photocatalyst in practical water disinfection.

Different inactivation behaviors of Gram-positive and Gram-negative bacteria in TiO_2 based photocatalytic disinfection

○Na Liu[1], Cheng Zhang[1], Nobuaki Negishi[2], Yingnan Yang[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Environ. Mgt. Res. Inst. AIST Tsukuba)

Key words P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2 photocatalyst, disinfection, Gram-positive, Gram-negative

1Cp13 種々の固体表面上における家電単離菌のバイオフィルム形成の評価

○山本 克哉[1], 尾島 由紘[1], 下野 雅仁[2], 多久島 朗[2], 東 雅之[1]
（[1]阪市大院・工, [2]LG Japan Lab）
ojima@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

【背景と目的】バイオフィルムは、微生物が固体表面に接着して作り出す生存形態の一つである。生活環境中では、ぬめりとして知られており、病原菌の感染源となり得るため問題視されている。家電に形成したバイオフィルムはブラッシングなどである程度除去できるが、一度形成されると完全な除去は難しい。そこで我々は、バイオフィルム形成の初期段階である微生物と固体表面の接着に着目し、種々のプラスチック材質上におけるバイオフィルム形成の評価とその阻害を目的とした。本研究では、生活環境中におけるバイオフィルムを評価するため、実際に家電 (加湿器)から単離した 3 種の菌株、*Acidovorax* sp.、*Brevundimonas* sp.、*Sphingobium* sp.を用いた。
【方法と結果】バイオフィルムを定量する手法としてクリスタルバイオレットによる染色法を用いた。本研究では 96well プレートの各 well に菌液を分注し、そこにプラスチックプレートを立てかけ、24 h 培養することでプラスチック上にバイオフィルムを形成させた。これをクリスタルバイオレットにより染色し、エタノールによる溶出後、595 nm の吸光度を測定することで、バイオフィルム量を評価した。ポリカーボネート (PC)、ポリスチレン (PS)、ポリエチレン (PE)、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 製のプレートを用いて評価を行った結果、*Acidovorax* sp.、*Brevundimonas* sp.において、PTFE 上ではバイオフィルム形成が阻害された。PTFE の高撥液性がバイオフィルム形成を阻害したと考え、凹凸撥液処理を施したポリプロピレン (PP)を実験に用いたところ、未処理の PP 製プレート上に比べて *Sphingobium* sp.を含めた 3 種すべての単離菌のバイオフィルム形成を阻害した。以上の結果より、凹凸撥液処理が家電単離菌のバイオフィルム形成阻害に有効であることがわかった。

Biofilm formation of bacteria isolated from home electronics on the various solid surfaces

○Katsuya Yamamoto[1], Yoshihiro Ojima[1], Masahito Shimono[2], Akira Takushima[2], Masayuki Azuma[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ., [2]LG Japan Lab Inc.)

Key words biofilm, plastic surface, liquid repellant

1Cp14 牛糞堆肥と竹パウダーを施用した水稲栽培土壌における細菌叢と窒素固定活性の季節変化

○前田 勇, 稲場 克弘, Ao Zhalaga, 平井 英明
（宇都宮大・農）
i-maeda@cc.utsunomiya-u.ac.jp

水稲栽培土壌における生物学的窒素固定活性の向上を目的として、高 CN 比の竹粉に着目し炭素源として竹粉、窒素源として牛糞堆肥を土壌に供給することで、窒素固定細菌による窒素固定が促進されるか否かを検討した。大学附属農場の圃場にて化学肥料施肥区画、牛糞堆肥施肥区画、牛糞堆肥・竹粉施肥区画の 3 試験区画を設定し、4 月、7 月、11 月の計 3 回について各区画から 3 箇所ずつ土壌のサンプリングを行った。無窒素固体培地にて形成されたコロニー数より窒素固定細菌生菌数を評価した。その結果、7 月採取土壌では 4 月あるいは 11 月採取土壌と比較し 2~3 倍多い細菌数が確認された。試験区画間の比較では 4 月と 7 月に採取した土壌では有意な差が認められなったのに対し、11 月採取土壌では牛糞堆肥施肥区画と牛糞堆肥・竹粉施肥区画で化学肥料施肥区画と比較し有意な増加が認められた。牛糞堆肥・竹粉施肥区画の土壌に於いて牛糞堆肥施肥区画の土壌よりも細菌数が多い傾向が認められた。窒素固定を触媒するニトロゲナーゼの活性を測定したところ、7 月採取土壌では 4 月あるいは 11 月採取土壌と比較し 2~3 倍高い活性が確認された。夏場の高温と水田底泥のより嫌気的な環境が窒素固定細菌生菌数とニトロゲナーゼ活性に寄与したものと推察される。試験区画間の比較では 4 月と 7 月に採取した土壌では同程度の活性が認められ、11 月採取土壌では牛糞堆肥・竹粉施肥区画、牛糞堆肥施肥区画、化学肥料施肥区画の順に高い傾向となった。サンプル土壌から DNA を抽出し 16S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシークエンスを行い菌叢の変化を解析中である。これらの結果から稲作土壌への竹粉供給による土壌窒素固定能への影響として、非栽培期における土壌への窒素源供給が増加し次期の稲作に向けた土壌改質に結び付く可能性が示唆された。

Seasonal changes in bacterial flora and nitrogen fixation activity in paddy field soil applied with cow manure compost and bamboo powder

○Isamu Maeda, Katsuhiro Inaba, Zhalaga Ao, Hideaki Hirai
(Fac. Agric., Utsunomiya Univ.)

Key words soil, nitrogen fixation, environmental bacteria

1Cp15 農耕地から放出される環境破壊ガス N_2O を抑制するための、カビ脱窒を阻害する化合物の探索

○松岡 真生[1,2], Ashutosh Kumar[3], Muhammad Muddassar[3], 松山 晃久[1,2], Kam Y. J. Zhang[3], 吉田 稔[1,2]
（[1]理研・環境資源, [2]東大院・農生科, [3]理研・ライフサイエンス）
masaki.matsuoka@riken.jp

近年、化学窒素肥料の農耕地への大量投与が重大な環境問題を引き起こしている。そのなかでも、強力な温室効果ガスでありオゾン層破壊物質でもある亜酸化窒素 N_2O の農耕地からの放出は、その対策の緊急性を要する深刻な問題である。農耕地からの N_2O 産生の主たる原因は土壌微生物による脱窒であり、N_2O 産生に関与する土壌微生物のなかでもカビの脱窒による影響は極めて大きい。その要因は、カビには N_2O 還元酵素が存在しないためにカビ脱窒による最終産物が N_2O である、ということにある。そこで、本研究では、農耕地からの N_2O 削減を目指し、カビの脱窒の鍵酵素である亜硝酸還元酵素 NirK の活性を阻害する化合物のスクリーニングを行なった。
まず、96 穴マイクロプレートで簡便に阻害化合物を識別できるように、糸状菌 *Fusarium oxysporum* 由来の NirK 酵素を用いて酵素活性の阻害度を評価する in vitro のアッセイ系と、*F. oxysporum* を用いて脱窒活性の阻害度を評価する細胞ベースのアッセイ系を構築した。続いて、カビの NirK の立体構造は明らかになっていないため、カビの NirK とアミノ酸配列の相同性の高く立体構造既知である細菌の NirK の立体構造を鋳型としたホモロジーモデリングを行ない、その構造を基に実行された in silico スクリーニングにより得られたヒット化合物に関して in vitro のアッセイ系並びに細胞ベースのアッセイ系を用いて阻害評価を行なった。結果として、化合物 2 種がカビ脱窒阻害剤として同定された。今後、本研究のスクリーニングにより得られたヒット化合物を基に、より効果的でかつ安全なカビ脱窒阻害剤を開発し、化学窒素肥料と共に阻害剤を農耕地に投与することができれば、N_2O の大気中への放出を抑制すると同時に、化学窒素肥料を効率的に植物に取り込ませ、投与する肥料を削減することが期待できる。

Screening of compounds inhibiting fungal denitrification toward prevention of environmentally-harmful N_2O emitted from agricultural soils

○Masaki Matsuoka[1,2], Ashutosh Kumar[3], Muhammad Muddassar[3], Akihisa Matsuyama[1,2], Kam Y. J. Zhang[3], Minoru Yoshida[1,2]
([1]CSRS, RIKENS, [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [3]CLST, RIKEN)

Key words denitrification, N_2O, inhibitor

1Cp16 淡水サンプルから分離した *Undibacterium* 属細菌における生分解性プラスチック分解酵素の機能解析

○大井 太士郎[1], 佐藤 俊輔[2], 諸星 知広[1]
（[1]宇都宮大院・工, [2]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、生分解性プラスチックの一種であるポリ 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）を淡水サンプルに浸漬すると、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、淡水サンプル中で PHBH 表面に形成したバイオフィルムから単離した *Undibacterium* 属細菌から PHBH 分解遺伝子（*phaZ*）をクローニングするとともに、精製 PhaZ における酵素活性の諸性質を解析することを目的とした。
【方法及び結果】河口湖および山中湖から単離した PHBH 分解性 *Undibacterium* sp. KW1 株および YM2 株を使用し、PacBio RS II を用いて全ゲノム配列を決定した。その結果、両菌株共に約 6.5 Mbp の染色体と 1 つの内在性プラスミドから構成されることが明らかとなった。次に、BLAST プログラムにより既知の PHA デポリメラーゼ遺伝子（*phaZ*）と相同性を示す配列を検索したところ、*Massilia* 属細菌のゲノムに存在する *phaZ* 様遺伝子と高い相同性を示す配列が存在していた。PhaZ の N 末端側にはシグナルペプチドが存在しており、PhaZ をヒスチジンタグ融合タンパク質として発現させたところ、培養上清から PhaZ を精製することに成功した。精製酵素と PHBH 粉末を混合してインキュベートしたところ、PHBH 粉末の分解がみられ、至適反応温度は 30～40℃付近であることが明らかになった。

Characterization of biodegradative plastic-degrading enzyme from *Undibacterium* sp. isolated from fresh water

○Taishiro Oi[1], Shunsuke Sato[2], Tomohiro Morohoshi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., [2]Kaneka Corp.)

Key words biodegradable plastic, *Undibacterium*, degradation, freshwater

1Cp17 微生物発酵による BDF 廃液からのフマル酸生産法の検討

○湯浅 一貴[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】フマル酸は、ポリエステル樹脂や染料の媒染剤、酸味料などの食品添加物として利用されている。フマル酸は従来、石油由来のベンゼンを原料としてきたが、資源の枯渇の観点から近年では、微生物を利用して糖からフマル酸を生産する製法が注目されている。しかし近年、糖の価格高騰の影響を受け、より安価な原料が求められている。そこで、バイオディーゼル燃料(BDF)を製造する際に、排出される BDF 廃液に着目した。BDF 廃液は、グリセリンを約 50%含有する粘性の液体である。しかし、強塩基性であることや夾雑物を多く含有していることが原因で処理コストが高く、より安価な処理法が求められている。そこで本研究では、この廃液を原料としたフマル酸生産が可能ではないかという作業仮説を立て、廃液を含有した培地において、フマル酸生産が可能か検討を行った。
【方法及び結果】100 倍希釈した廃液中のグリセリン濃度を高速液体クロマトグラフ(HPLC)にて測定した。本研究では、*Rhizopus delemar*(NBRC5441)をフマル酸生産菌とした。PDA 培地にて培養した菌体胞子を生理食塩水で懸濁させ、胞子懸濁液とした。グリセリン濃度 150g/L となるよう適宜希釈した廃液を唯一炭素源とした液体培地 30mL に対して 1mL の胞子懸濁液を植菌し、25℃、150rpm で振盪培養した。12 時間おきに HPLC を用いて培地中のグリセリン及びフマル酸の濃度の測定を行った。また、沈殿を洗浄および乾燥させ、乾燥菌体重量を測定した。純グリセリンを用いた際の結果と比較を行い、廃液による菌体増殖への影響を評価した。BDF 廃液を用いた培養においてフマル酸の生産が確認されたが、純グリセリンと比較して、増殖菌体量およびフマル酸生産量が抑制された。今後、プロセスの改良と共に、原因物質の特定および除去により、フマル酸の高効率生産を検討していく。

Fumaric acid production from BDF effluent by microbial fermentation

○Kazuki Yuasa[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 *Rhizopus* sp., glycerol, biodiesel fuel

1Dp01 植物の成長促進効果をもたらす光合成細菌の菌体成分の検討

○林 修平, 岩本 康成, 森 康一, 中嶋 桃香, 平川 夕貴, 山本 進二郎, 宮坂 均
（崇城大・生物生命）
shayashi@life.sojo-u.ac.jp

光合成細菌（紅色非硫黄細菌）は、農業・畜産業・水産業において、成長促進効果や病害抑制効果を示す微生物として利用されている。植物の成長促進効果においては、光合成細菌が産生する 5-アミノレブリン酸（クロロフィル前駆体）やインドール-3-酢酸（植物ホルモン）による効果と、光合成細菌の窒素固定による効果の両方と考えられてきた。光合成細菌の窒素固定による効果を検討するために、光合成細菌を超音波により破砕した状態（死菌）で植物に投与したところ、生菌と同等の成長促進効果を示した。さらに、水に可溶である 5-アミノレブリン酸やインドール-3-酢酸による効果を検討するために、超音波破砕した光合成細菌を遠心分離により上清（可溶成分）とペレット（不溶成分）に分けて別々に植物に投与したところ、上清だけでなく、薄く希釈したペレットを投与した場合でも成長促進効果を示した。光合成細菌の菌体を構成する不溶成分としてリン脂質やリポ多糖、ペプチドグリカンが考えられるが、その中でも動物や植物において自然免疫応答を引き起こす物質として知られているリポ多糖に注目して検討を行った。その結果、低濃度で成長促進効果を示すことがわかった。現在、この植物成長促進効果が他の微生物種のリポ多糖でも見られるのかどうか検討を行っている。

Cell components of photosynthetic bacteria that have a growth promoting effect on plants

○Shuhei Hayashi, Yasunari Iwamoto, Koichi Mori, Momoka Nakashima, Yuki Hirakawa, Shinjiro Yamamoto, Hitoshi Miyasaka
(Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words photosynthetic bacteria, growth stimulation, plant, lipopolysaccaride

1Dp02 2 段階マイクロ波水熱処理を用いた稲わらからの糖生産

○宮本 上聖, 中村 嘉利, 浅田 元子, 佐々木 千鶴
（徳島大院・先端技科）
ynakamu@bio.tokushima-u.ac.jp

本研究では未利用バイオマスを原料とし、グルコースとキシロースの生産を目的とした。グルコースとキシロースは熱分解される温度が異なるため、一度の処理ではどちらかの収量が減少する。多糖の加水分解反応によるグルコース、キシロースの収量を増加させるために加熱温度を２段階に変化させ処理することにした。低温での前段階でキシロースを、温度を上昇させた後段階でグルコース生成を行う２段階処理を検討し、実験を行った。比較と温度検討のために 1 段階での方法も検討した。
原料とした稲わらにまず 1 分間粉砕処理を行った。この粉砕試料 1 g あたり 15ml の反応溶媒を添加し、マイクロウェーブ発生装置を用いてマイクロ波水熱処理を行った。
・1 段階法…反応溶媒として 1wt%硫酸水溶液を用いた。120℃～180℃で 10℃毎に条件を変化させ、30min でマイクロ波処理を行った。上清中のキシロース、グルコース生産量を測定した。さらに残渣の酵素糖化を行いグルコース生産量を測定した。
・2 段階法… 1 段階法の結果をもとに、最もキシロース生成量が多かった条件の残渣を用いた。反応溶媒として 1wt%硫酸、2wt%硫酸を使用し、180℃～200℃で 10℃毎に変化させ、5min でマイクロ波処理を行った。上清中または残渣を酵素糖化して得られたグルコース生成量を測定した。
1 段階法では 0.497 g/(g-未処理稲わら)の糖〈キシロース 0.317g/(g-未処理稲わら)、グルコース 0.180 g/(g-未処理稲わら)〉が得られた。
2 段階法では 0.737 g/(g-未処理稲わら)の糖〈キシロース 0.317g/(g-未処理稲わら)、グルコース 0.420 g/(g-未処理稲わら)〉が得られ、1 段階法より多くの糖が生成されたため 2 段階法の有用性が示唆された。

Sugar production from rice straw using two-step microwave hydrothermal treatment

○Masatoshi Miyamoto, Yoshitoshi Nakamura, Chikako Asada, Chizuru Sasaki
(Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Tokushima Univ.)

Key words Microwave, Glucose, Xylose

1Dp03 トマトの糖度に及ぼすパルス光照射の影響

○武田 真樹[1], 上田 愛巳[1], 神内 奈々子[2], 木村 祐太[1], 宇山 裕貴[1], 谷川 浩司[2], 前田 淳史[2], 梶山 博司[1,2]
（[1]徳島文理大院・工・ナノ物質工, [2]徳島文理大・理工・ナノ物質工）
kajiyama@fst.bunri-u.ac.jp

【目的】
近年、トマトのビニールハウス栽培が盛んになっている。しかし、サラダ需要が多い夏場の生産が少ない。トマトの夏秋での栽培の課題は、高温期の草勢低下とそれに伴う減収である。また、高糖度トマトの需要が年々高まっている。これまでは、水分量を絞ったり、塩分濃度を高めたりして、糖度を高めているが、この方法だと小玉トマトしか栽培できないという問題がある。本研究の目的は、光が当たっていない暗期に微弱なパルス光を照射し、トマトの成長を促進させることで草勢低下を防ぎ、実に流れる養分を増加させ、糖度トマトの栽培技術を確立することである。
【実験方法・結果】
青色パルス光照射の有無による生育の対象実験をおこなった。青色パルス光の光質は、発光ピーク波長：449nm、パルス周波数＜ 10 kHz、デューティー比＜ 0.2、光合成有効量子束密度（PPFD）＜ 1.0 であった。明期に蛍光灯(PPFD = 130)を照射した。蛍光灯は 12 時間点灯(明期)と 12 時間消灯(暗期)を繰り返した。比較として、暗期に 8 時間パルス光を照射した。試験期間は 90 日であった。糖度は糖度屈折計の Brix％値から求めた。蛍光灯のみで栽培したトマトの花、蕾、実の総数と糖度を測定して、得られた結果や外観を基準に、パルス光照射の効果を調べた。
トマトの木の高さは 1.5 倍近くにまでなっていた。花、蕾、実の総数は、パルス光照射により 2 倍近くに増加した。糖度は平均して 1.5 度高くなった。本研究と同じようなパルス光をレタス栽培に応用したところ、生育速度が速くなるという結果が得られている。トマトの場合には、生育が促進されるだけでなく、実の数が増えて、糖度が高くなることが明らかになった。暗期のパルス光照射の生理学的な影響は不明であり、今後の研究課題である。

Effects of pulsed lighting during dark period on the sugar content

○Masaki Takeda[1], Aimi Ueda[1], Nanako Jinnai[2], Yuta Kimura[1], Hiroki Uyama[1], Kouji Tanikawa[2], Atsushi Maeda[2], Hiroshi Kajiyama[1,2]
([1]Dept. Nano Mater. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Tokushima Bunri Univ., [2]Dept. Nano Mater. Bioeng., Fac. Sci. Eng., Tokushima Bunri Univ.)

Key words *pulsed lighting*, sugar content, tomato

1Dp04 イチゴの着果と糖度に及ぼす暗期パルス光照射の影響

○上田 愛巳[1], 武田 真樹[1], 木村 祐太[1], 宇山 裕貴[1], 谷川 浩司[2], 前田 淳史[2], 梶山 博司[1,2]
（[1]徳島文理大院・工・ナノ物質工, [2]徳島文理大・理工・ナノ物質工）
kajiyama@fst.bunri-u.ac.jp

【背景と目的】
近年、イチゴはその味だけではなく、美白効果・シミ・シワ予防などの美容成分も注目されており、食用以外に化粧品などにも取り入れられている。イチゴは冬のクリスマスから旬の春までが生産のピークであり夏秋は国内では四季成り性のイチゴ、または海外からの輸入などの糖度・味ともに品質の低い割にその希少性から値段の高いものが主流となっている。しかし、イチゴはケーキや加工品など季節を問わず需要がある。本研究の目的は、光が当たっていない暗期に微弱なパルス光を照射することで、イチゴの着果促進、高糖度化、栽培期間短縮のための基本技術を確立することである。
【方法】
ワイルドストロベリーは水耕方式で 6 ヶ月栽培した。青色パルス光照射の有無による生育の対象実験をおこなった。青色パルス光の光質は、発光ピーク波長：449nm、パルス周波数＜ 10 kHz、デューティー比＜ 0.2、光合成有効量子束密度（PPFD）＜ 1.0 であった。明期には蛍光灯(PPFD=80)照射した。蛍光灯は 12 時間点灯(明期)と 12 時間消灯(暗期)を繰り返した。比較として、暗期に 8 時間パルス光を照射した。試験期間は 181 日であった。糖度は糖度屈折計の Brix%値から求めた。
【結果と考察】
パルス照射により着果数は 15%増加、根の湿重量は 1.5 倍に増加し、糖度はパルス照射により 1 度程度高くなったが、実の重量はほとんど同じであった。このことより、暗期パルス光照射により、イチゴの生育が促進され、着果数、糖度が増加することが明らかになった。
本研究と同じパルス光照射により、レタスの収穫重量は 1.5 倍程度増えると報告されている。レタスの場合、パルス光と同じ PPFD の連続光を照射しても、生育促進効果はないことが明らかになっている。このことから、本来は光合成に全く寄与しない光量でも、パルス光にすることで生育が促進していることがわかる。

Effects of pulsed lighting during dark period on the fruit bearing and sugar content

○Aimi Ueda[1], Masaki Takeda[1], Yuta Kimura[1], Hiroki Uyama[1], Kouji Tanikawa[2], Atsushi Maeda[2], Hiroshi Kajiyama[1,2]
([1]Dept. Nano Mater. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Tokushima bunri Univ., [2]Dept. Nano Mater. Bioeng., Fac. Sci. Eng., Tokushima bunri Univ.)

Key words *pulsed ligting*, sugar content, fruit bearing, strawberry

1Dp05 レタスの代謝物産生に及ぼすパルス光照射の影響

○米村 彩乃[1], 宇山 裕貴[1], 木村 祐太[1], 武田 真樹[1], 谷川 浩司[2], 梶山 博司[1,2], 前田 淳史[2]
（[1]徳島文理大院・工・ナノ物質工, [2]徳島文理大・理工・ナノ物質工）
maeda@fst.bunri-u.ac.jp

【目的】植物は光が当たっている明期に光合成と呼吸をするが、光が無い暗期は呼吸のみをしている。この暗期に微弱なパルス光を照射すると生育速度が 1.5 倍程度増加するという報告がある。生育速度が増加するのであれば、植物内の代謝物生産にも何らかの影響を及ぼすはずである。そこで、レタス内のビタミン C などの代謝物生産に暗期パルス光照射が及ぼす影響を明らかにすることが本研究の目的である。
【方法・結果】レタスは屋内で水耕栽培を行い、栽培 4 週間後に収穫し各代謝物量を測定した。明期の光源には LED 光(赤色(660 nm)、青色(450 nm))または蛍光灯を用い、パルス光を照射する際は、LED 光(青色(450 nm)、デューティー比＜ 0.2、光合成量子束密度(PPFD)＜ 0.1)の光源を用いた。レタス内のビタミン C は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いた誘導体化を利用し、波長 530 nm の UV 吸収より含有量を求めた。
パルス光照射の影響を調べるために、まず明期(LED 光)にのみパルス光照射を行なった場合と暗期にのみパルス光照射を行なった場合を比較した。ビタミン C 含有量はレタス 100g 中に、それぞれ 1.30 mg (明期)、1.98 mg (暗期)となった。暗期にパルス光照射を行うことで、生育速度だけでなくビタミン C 含有量が増加する傾向が見られた。次に明期の光源として蛍光灯を用いてレタス栽培を行なったところ、ビタミン C 含有量はレタス 100g 中に 1.91 mg であったが、これに加えて暗期にパルス光を照射したところ、ビタミン C 含有量は 2.53 mg に増加した。この結果から、明期の光源によらず暗期のパルス光照射によりビタミン C 量が増加することが明らかになった。
レタスの主な栄養素であるビタミン C で増加が見られたことから、他の代謝物生産も大きく変化している可能性が示唆された。そこで、他の代謝物も含めて暗期パルス光照射が代謝物生産に与える影響を併せて報告する。

Effect of pulsed lighting during dark period on metabolite production in *Lactuca sativa*

○Ayano Yonemura[1], Hiroki Uyama[1], Yuta Kimura[1], Masaki Takeda[1], Kouji Tanikawa[2], Hiroshi Kajiyama[1,2], Atsushi Maede[2]
([1]Dept. Nano mater. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Tokushima Bunri Univ., [2]Dept. Nano mater. Bioeng., Fac. Sci. Eng., Tokushima Bunri Univ.)

Key words *Lactuca sativa*, metabolite production, pulsed lighting

1Dp06 レタスの生育に及ぼす青色パルス光照射の影響

○木村 祐太[1], 武田 真樹[1], 上田 愛巳[1], 米村 彩乃[1], 宇山 裕貴[1], 谷川 浩司[2], 前田 淳史[2], 梶山 博司[1]
（[1]徳島文理大院・工・ナノ物質工, [2]徳島文理大・理工・ナノ物質工）
kajiyama@fst.bunri-u.ac.jp

[背景・目的]安心で安全な農作物の周年栽培を目的に LED や蛍光灯などの人工光を用いる植物工場が増えている。多くの植物工場では照明や空調のための光熱費が収益を圧迫している。そのため、収穫回数を増やせる高速栽培技術が望まれている。本研究の目的は、暗期に微弱な青色パルス光を照射することで、レタスの生育速度を向上できる光照射技術を開発することである。
[実験方法] レタスは、室温 22℃、湿度 40～50%、水耕方式で定植後 28 日間栽培した。蛍光灯(光合成有効光量子束密度(PPFD):100～110)を 12 時間照射（明期）と 12 時間消灯（暗期）を繰返した。暗期に①青色パルス光（449nm）、②青色連続光(449nm)を照射して、青色光照射無しの場合との生育比較試験をおこなった。青色パルス光は、周波数＜ 10 kHz、デューティー比＜ 0.2 に設定した。同じ PPFD 値のパルス光と連続光を 8 時間照射した。収穫後に、葉と根の湿重量と葉の形状と枚数を計測した。
[結果と考察]蛍光灯照射のみに比べて、①青色パルス光照射と②青色連続光照射では、それぞれ湿重量は 1.58 倍と 0.97 倍になっていた。このことから、同じ PPFD 値であっても、パルス光照射にはレタスの生育促進効果があることが明らかになった。さらに、レタスのビタミン C 量はパルス光照射により最大で５０％程度増加することが明らかになっている。同じパルス光をイチゴに照射した場合、着果数と糖度が向上するという結果が得られている。このことから、パルス光には、成長促進だけでなく、内在成分の増加効果があると結論できる。パルス光照射の生理学的な作用については今後の研究課題である。

Effects of pulsed blue lighting on the cultivation of Lactuca sativa

○Yuta Kimura[1], Masaki Takeda[1], Aimi Ueda[1], Ayano Yonemura[1], Hiroki Uyama[1], Kougi Tanikawa[2], Atsushi Maeda[2], Hiroshi Kajiyama[1]
([1]Dept. Nano mater. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Tokushima bunri Univ., [2]Dept. Nano mater. Bioeng., Fac. Sci. Eng., Tokushima bunri Univ.)

Key words *Lactuca sativa*, pulsed lighting, lettuce, cultivation

1Dp07 培養効率化へ向けた培地改善への Substratome アプローチ

○立花 成我, 小西 正朗
（北見工大）
Konishim@mail.kitami-it.ac.jp

酵母エキス (YE) は、微生物培養をはじめ，細胞培養やタンパク質生産などバイオプロセスにおける原料として頻繁に使用される。その組成は生産方法の差異に影響され変化する。この組成の違いは、多くの場合、バイオプロセスの収率に影響を与える。我々は、非標的分析と統計解析を用いた、メタボロミクスアプローチによる評価モデルに着目した。本研究では、バイオプロセスの実験的モデルとして、YE 成分組成から大腸菌の増殖を予測する統計モデルを検討した。酵母エキス成分をさまざまな濃度の YE を含む培地から抽出し、ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて分析した。酵母エキスを主成分分析 (PCA) により 3 つのクレードに分類した。酵母エキスを用いた大腸菌増殖は、同等量の添加で約 30% の差を示した。培地中の細菌増殖を、部分最小二乗回帰分析 (PLS − R) によって成分プロファイルから推定した。細菌増殖 (目的変数) と成分プロファイル (説明変数) との関係から予測モデルを作成し、相関係数を算出した。予測モデルは良好な培養結果予測を示した。相関係数は培地のアミノ酸のほとんどを増殖促進効果、メチオニンは増殖に負の効果を持つことを推定した。添加培養検証において、Tyr、Ser、Ile、Asp、Lys、Phe、Leu、Thr、および Gly は増殖促進に有意な影響を示さなかった。Asp、Val、Glu、Trp は細菌増殖を促進し、Met、Ala は阻害した。影響のある成分は Ala を除き推定された効果と一致した。この結果は、メタボロミクスアプローチによって有益なフィードバック情報を提供し、培養を改善できることを示す。

Substratome approach to improve medium compositions for bacterial growth.

○Seiga Tachibana, Masaaki Konishi
(Kitami Inst. Technol.)

Key words yeast extract, *Escherichia coli*, Substratome, predictive modeling

1Dp08 ＣＦＤ解析と生物反応モデル式を組み合わせた商業スケールバイオリアクターにおける物質生産シミュレーション技術の開発

○沖野 祥平, 渡邉 実, 種田 大介
（日揮）
okino.shohei@jgc.com

微生物による有用物質生産の研究開発の多くは、フラスコやジャーファーメンターなどの実験室スケールのリアクターを用いて、温度や基質濃度などの生産性に及ぼす因子を均一に維持した条件にて行われる。一方で商業生産においては、数十～数百立米スケールの巨大なリアクターが用いられるため、リアクター内の温度や基質濃度を常に均一に維持することは難しく、リアクター内には温度分布や濃度分布が発生する。この商業スケールリアクター内における温度や各種濃度の分布は、スケールアップの際に生じる商業スケールにおける生産性の低下の一つの原因となりうる。
そこで本研究では、商業スケールリアクター(800 m^3)における酵母を用いたエタノール生産に及ぼす温度分布の影響を例として取り上げ、CFD (Computational Fluid Dynamics）解析と、増殖、糖消費、エタノール生成の温度依存反応モデル式、及び発酵熱モデル式とを組み合わせたメソッドで、商業スケールリアクター内における不均一性が微生物の生産性に及ぼす影響をシミュレーションした。その結果、リアクター内には温度分布が発生し、完全均一系と比較してエタノール最終濃度が低下することが推定された。さらに、CFD 解析で得られた商業スケールリアクター内の温度分布を実験室スケールにて再現可能なスケールダウンシミュレータのデザインを試み、本装置にて実際に発酵試験を行うことで、実験室スケールにおいて商業スケールのシミュレーション結果が検証可能か検討している。
本研究は国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の委託研究として実施した。

Simulation of ethanol production in a commercial-scale bioreactor using computational fluid dynamics simulation including biological equations analysis

○Shohei Okino, Minoru Watanabe, Daisuke Taneda
(JGC Corp.)

Key words modeling, simulation, computational fluid dynamics, scale-up

1Dp09 下水汚泥中の Social cheater 様細菌群に対する電気培養の効果

○遠矢 将太郎, 高辻 義行, 前田 憲成
（九工大院・生体工）
toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp

【背景と目的】下水汚泥中の微生物群は、排水処理プロセスにおいて重要な役割を果たしており、多様な好気性細菌群が分解反応に関わっていることは報告されている。近年、単一菌のクォーラムセンシング阻害の環境適応から、Social cheater と呼ばれる、クォーラムセンシング阻害を受けて本来生育できない細菌でも、クォーラムセンシング阻害の影響を受けない細菌と共存させた際、阻害の影響を受けない細菌から栄養物を得て生存できるようになるという仕組みが報告されている。このような生存戦略は、下水汚泥のような複合微生物系でも、共生関係などの相互作用として知られているが、下水汚泥中の Social cheater 様細菌群に関する知見は少ない。本研究では、下水汚泥中の Social cheater 様細菌群について調査すること、また微生物の生体反応では、電子授受が密接に関係していることから、通電によって Social cheater 様細菌群への影響を調査することを目的とした。
【方法】滅菌した 50 mM リン酸緩衝液により汚泥濃度を 1%に調整したのち、この汚泥(100 g)を 100 mL のビーカーに入れた。電気刺激の効果を検証するに当たって、ポテンシオスタットを用いた三電極系を使用した。ポテンシオスタットの設定電位を-500 mV にし、撹拌しながら通電操作を行った。通電後、試料を段階希釈し、スキムミルクを含んだ LB 培地に塗布し、37℃で培養した。培養後、溶解斑を形成しないコロニーを Social cheater 様細菌群として計測した。
【結果と考察】電気刺激を与えた試料での Social cheater 様細菌群の生菌数は、Control の試料と比べ 10 倍多いことが確認でき、溶解斑を有する分解菌の生菌数も増加することが確認できた。このことから、電気刺激を加えると Social cheater 様細菌群が利用する代謝物を生成する微生物群の活性が増加したことで、間接的に生育が促進されることが示唆された。

Effect of Electrochemical Cultivation for Social Cheater-like Bacteria in Sewage Sludge

○Shotaro Toya, Yoshiyuki Takatsuji, Toshinari Maeda
(Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.)

Key words environmental bacteria, electrochemical cultivation, growth stimulation, social cheater

1Dp10 *Haematococcus pluvialis* を用いたアスタキサンチンの効率的生産

○山本 麗奈, 堀内 淳一, 熊田 陽一
（京工繊大院・工芸科学）
horiuchi@kit.ac.jp

【背景・目的】強い抗酸化作用をもつ赤色カロテノイド色素であるアスタキサンチンは、主に *Haematococcus pluvialis* を用いて生産されている。*H. pluvialis* によるアスタキサンチン生産では、増殖期とアスタキサンチン生産期を分ける二段階培養が行われるが、生産性が低く、せん断応力に弱い、アスタキサンチン生産期に細胞死が生じる等の課題があり、効率的培養方法の確立が求められている。本研究では、*H. pluvialis* によるアスタキサンチンの効率的生産を目的とした培養工学的検討を行った。
【方法】*H. pluvialis* NIES-144, NIES-2263, NIES-2892 を使用した。培地には複合培地 [1]を用い、フラスコ, ジャーファーメンター及びエアリフト型バイオリアクターにより種々の条件で回分培養を行った。
【結果・考察】アスタキサンチン生産に適した菌株を選択するため静置培養を行ったところ、いずれもほぼ同様の増殖を示し、OD730 は約 1.0 になり最大アスタキサンチン濃度は 0.6 mg/L であったので、NIES-144 を用いて更に検討を進めた。次にフラスコ培養により増殖特性を検討したところ、振とうにより本菌株の増殖が抑制される現象が認められ、撹拌強度が菌体増殖に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。次に *H. pluvialis* の工業的培養法を検討するためにジャーファーメンターを用いて回分培養を行ったところ、せん断応力の小さなセラミックス製プロペラ撹拌子を用い撹拌条件を 60rpm としてもアスタキサンチン生産は低下し、ジャーファーメンターによる効率的アスタキサンチン生産は難しいと考えられた。そこで現在、せん断応力の小さなエアリフト型バイオリアクターを用いた培養工学的検討を進めている。
1)M. Kobayashi et al. *J Ferment Bioeng* 71: 335-339(1991)

Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*

○Rena Yamamoto, Jun-ichi Horiuchi, Yoichi Kumada
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin, Air-lift bioreactor

1Dp11 遺伝子組換え乳酸菌によるコーンコブを原料とした D-乳酸の高濃度・高収率生産

○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】当研究室ではバイオマス中のセルロース成分を原料とした L/D-乳酸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当たりの乳酸生産収率を大幅に向上できる。近年遺伝子組換え技術により、乳酸菌にキシロース資化能を付与した D-乳酸生産菌が開発されている(1)。本研究ではこの乳酸菌を活用し、コーンコブ（とうもろこしの穂軸）から得られるグルコース・キシロースをともに利用した D-乳酸生産プロセスの開発を目指した。
【方法】菌株として *Lactobacillus plantarum(L. plantarum) NCIMB 8826 Δldh1::PxylAB-xpk1::tktΔxpk2::PxylAB* を用いた(1)。本菌はグルコースおよびキシロースをともに資化し D-乳酸を選択的に生産するよう代謝改変されている。原料のコーンコブは 1.5 %希硫酸で酸加水分解し、その後酵素糖化することによりキシロース及びグルコース成分を得た。このコーンコブ加水分解液に MRS 培地成分を添加し、有効容量 2 L のジャーファーメンターにより、pH6.0、37 ℃、200 rpm の条件で回分培養を行った。更に生産性向上を図るため酸加水分解処理のみを行ったコーンコブを用いて同時糖化発酵(SSF)を検討した。
【結果と考察】93.7 g/L のコーンコブを処理して得られた加水分解液を用いて回分培養を行ったところ乳酸濃度 43.5 g/L 対コーンコブ収率は 50.6％が得られ、コーンコブを原料とした D-乳酸生産が可能なことが明らかになった。
次に、SSF を試みた結果、乳酸濃度 46.8 g/L 収率 61％が得られ、生産性は 1.1 g/L/h となり大幅に向上した。さらにコーンコブ濃度を 250 g/L まで増加させ pH 調整剤として炭酸カルシウムを用いた SSF において最大乳酸濃度 143 g/L が得られ、対コーンコブ収率 67.5％、生産性 2.9 g/L/h を達成した。
1) Kenji Okano *et al., Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101:1869-1875 (2017)

High yield production of high-titer D-lactic acid from corn cobs by genetically engineered *Lactobacillus plantarum*

○Shuka Naito[1], Jun-ichi Horiuchi[1], Yoichi 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 lactic acid bacteria, biomass, D-lactic acid, Simultaneous Saccharification and Fermentation

1Dp12 遺伝子組換えシアノバクテリアを用いた 1,3-プロパンジオール生産におけるグリセロール添加効果

○武田 真由子 [1], 端 瞭太 [1], 広川 安孝 [2], 花井 泰三 [2], 村上 明男 [3], 熊田 陽一 [1], 堀内 淳一 [1]
（[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】これまで光合成細菌シアノバクテリア（藍藻）に 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] 本菌株を用いた 1,3-PDO 生産では中間代謝物のグリセロールが培養液中に顕著に蓄積するため、1,3-PDO の生産が抑制されることが課題であった。本研究では、予めグリセロールを添加することで 1,3-PDO 生産が向上する可能性があると考え、グリセロール添加が 1,3-PDO 生産に及ぼす影響およびグリセロール添加培地を用いた 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 [2]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、必要に応じてグリセロールを添加した。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】BG-11 に 26 mM のグリセロールを添加した培地を用いてフラスコ培養を行ったところ、グリセロールの排出が抑制され 1,3-PDO 生産が約 3 倍の 0.92 mM/day に向上した。この結果に基づき、グリセロール添加培地を用いてエアリフト型バイオリアクターによる連続培養を行ったところ、約 100 日の運転において 1,3-PDO の生産量が約 2.4 倍に向上した。

1)端瞭太ら, 第 69 回日本生物工学会大会, 3P-N187, 2018
2)Hirokawa *et al*. *Metab. Eng*. 34, 97-103, 2016

Effective 1,3-PDO production by genetically engineered cyanobacteria.

○Mayuko Takeda[1], Ryota Hashi[1], Yasutaka Hirokawa[2], Taizo Hanai[2], Akio Murakami[3], Yoichi Kumada[1], Jun-ichi Horiuchi[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ., [3]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words cyanobacteria, 1, 3-propanediol, airlift bioreactor

1Dp13 組換え大腸菌を用いた DO-stat 流加培養による単鎖抗体の菌体外生産

○井嶋 浩一朗, 坂本 祐一朗, 川見 菜実香, 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】 組換え大腸菌によるタンパク質生産では、目的タンパク質を菌体外に効率的に分泌生産させることは難しいとされてきたが、本研究室ではペリプラズム分泌シグナルを導入した大腸菌を用い、溶存酸素濃度(DO)を指標とした DO-stat 流加培養を行うことで、単鎖抗体(scFv)を効率的に菌体外生産できることを報告した。本研究では、DO-stat 流加培養における DO 条件が scFv の菌体外生産に及ぼす影響を検討することを目的とした。
【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 遺伝子を pET-22b(+)発現ベクターを用いて大腸菌 Rosseta2(DE3)株を形質転換した。この組換え大腸菌を用いて、2L 容 Jar-fermenter により DO=10, 30, 40, 60, 80 %の条件で DO-stat 流加培養を行い、約 100 時間流加培養を継続した。
【結果と考察】
DO=10, 30 %条件では、培養後期から発現 scFv の分解が起こり、急激に scFv の生産量が減少した。DO=10%条件において、最終的に OD_{600} は約 181 に達し、scFv 生産では、最高で 0.5g/L の活性型 scFv を培養液中に分泌した。DO=30%条件において、最終的な OD_{600} は約 122 に達し、scFv 生産では、最高で活性型 scFv を 0.35g/L 蓄積した。DO=40, 60, 80 %条件では、培養終了まで scFv を継続的に生産することができた。DO=40 %条件では、最終的な OD_{600} は約 94 に達し、scFv 生産では、活性型 scFv を 5.5g/L 蓄積した。DO=60 %条件では、最終的な OD_{600} は約 115 に達し、scFv 生産では、活性型 scFv を 4.9g/L 蓄積した。DO=80 %条件では、最終的な OD_{600} は約 113 に達し、scFv 生産では、活性型 scFv を 4.1g/L 蓄積した。
一連の実験を通し、最も可溶化率が高く、活性型 scFv の生産量が高かった培養条件は DO=40%であった。一方で、流加培地量当たりの生産性が最も高かった培養条件は、DO=80 %条件であった。

Extracellular production of single chain antibody by DO-stat fed-batch culture with recombinant *E. coli*

○Koichiro Ijima, Yuichiro Sakamoto, Namika Kawami, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words *Escherichia coli*, scFv, fed-batch culture, DO-stat

1Dp14 Enhanced production of anti-CRP single-chain variable fragment (scFv) antibody using *Escherichia coli* by DO-stat fed-batch culture

○Nghia Nguyen Hieu, Michimasa Kishimoto, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)
horiuchi@kit.ac.jp

Recombinant proteins expressed in *E. coli* are frequently misfolded into insoluble aggregates called inclusion bodies, which require a complicated process for purification including a refolding step. Therefore, the increase of solubility of expressed proteins has been a critical issue in recombinant protein production using *E. coli*. In this study, we developed a DO-stat fed-batch culture system, which allows maintaining DO in a fermenter constant by glucose feeding. Using the DO-stat fed-batch system, anti-CRP scFv production by *E. coli* employing the pET expression system was investigated. By employing a PID control to determine glucose feeding rate, DO in a fermenter was successfully maintained. The results of the fed-batch operation at DO=40% showed the solubility of anti-CRP scFv improved from 23-29% by flask and batch cultures to approximately 100%. The anti-CRP scFv production also increased from 0.14 g/L by a batch culture to 2.6 g/L. DO in a fermenter significantly influenced on the solubility and production of scFv and the optimal DO level was found to be between 40-60% for successful scFv production. It was also found that the increased addition of yeast extract in feeding medium was effective stabilize anti-CRP scFv production during fed-batch cultivation. Thus, it was found that the DO-stat fed-batch culture system greatly improves the solubility and production of anti-CRP scFv using *E. coli*.

Enhanced production of anti-CRP single-chain variable fragment (scFv) antibody using *Escherichia coli* by DO-stat fed-batch culture

○Nghia Nguyen Hieu, Michimasa Kishimoto, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words scFv, Solubility, fed-batch culture, DO-stat

1Dp15 微生物培養による平板培地の pH 変化挙動解析と利用

○原田 玲奈, 青柳 秀紀
（筑波大院・生命環境）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】 寒天平板（AP）培地などの平板培地は、微生物の単離培養に国内外で広く使用されているが、現在、培養できる微生物は自然界の全微生物の 1%程度であるとされ、その限界が指摘されている。この問題を解消するためには、その基礎として、微生物培養に伴う平板培地の培養環境の変化や特性を把握することが重要である。本研究では、微生物培養に伴う平板培地の pH 変化挙動の把握と、得られた知見の利用について検討した。
【方法と結果】 pH 指示薬の Bromothymol Blue（BTB）と R2A 培地（R2A）あるいは 20 倍希釈した Davis 培地（0.05 Davis）を含む AP 培地を作製した（BTB-R2A-AP 培地、BTB-0.05Davis-AP 培地）。種々の pH に調整した培地を用い、pH と BTB が呈する培地の色の対応表を作成した結果、AP 培地上の pH 分布の可視化（pH 値の推測）が可能となった。土壌試料懸濁液を BTB-R2A-AP 培地で培養した結果、培養初期は緑色（中性）を呈するが、培養の進行に伴いコロニー周辺が青色を呈し、最終的に培地のほぼ全範囲が青色（pH 8 以上）を示した。一方、BTB-0.05Davis-AP 培地で培養した結果、培養初期は同様に緑色（中性）を呈するが、培養が進行するとコロニー周辺は R2A と反対に、黄色を呈し、最終的に培地のほぼ全範囲が黄色（pH 6 以下）を示した。AP 培地上の pH 分布を等高線で表現した結果、培養経過に伴い pH が全体的に上昇あるいは低下（一部低下あるいは上昇）し、pH の不均一な分布が生じることが示された。pH の不均一な分布を解消するために、pH 変化を生じる菌を培養 6 h 毎に AP 培地から排除して培養した結果、培養微生物群集構造が変化し、新たな微生物を培養化できる可能性が示唆された。現在、ゲランガム平板培地についても同様に検討中である。

Monitoring the pH changes on the plate medium during microbial culture and its application

○Reina Harada, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words agar plate, microbial dark matter, pH

1Dp16 微生物の振盪フラスコ培養中における培養栓の換気能評とその応用

○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】 従来の振盪フラスコ培養法（batch 型）は様々な細胞で用いられている。現在、batch 型に囚われない次世代の振盪フラスコ培養法などが登場している中、従来法を深く理解することは、培養実験の高い再現性につながるだけでなく、次世代の振盪フラスコ培養法との互換性への詳細な検証も期待できる。我々は、従来の振盪培養中のフラスコ気相部に意図せず充満する CO_2 の重要性を述べてきた[1-3]。そこで、気相部のガス形成の要因の一つである通気性を有した培養栓が微生物培養に及ぼす影響を解析した。
【方法と結果】本研究では、我々が独自に開発したバイパス型のモニタリングデバイス（Circulation Direct Monitoring and Sampling System：CDMSS）[1, 4]を用いて、微生物の振盪培養中にフラスコ内に充満する CO_2 を指標に、培養栓を評価しながら、微生物に及ぼす影響を調べた。その結果、培養栓（換気能）の変更のみで増殖挙動が異なる微生物種が認められた。さらに、振盪培養を中断せずにフラスコ気相部に様々なガスを通気できるシステム（Automatic Aeration Flask System：AAFS）[2]と CDMSS を、Proportional Integral Differentia l （PID）制御装置に接続し、培養栓をつけたフラスコ気相部の CO_2 濃度を一定に制御する培養法を開発した。開発した PID 制御培養と従来の振盪フラスコ培養の比較実験を実施した結果、従来法では培養時間に伴い菌体の凝集が観察された *Pelomonas saccharophila* の凝集頻度を抑制でき、増殖が改善された（他の微生物種においても検討中）。本研究は、振盪培養中に通気性を有した培養栓によって形成されるフラスコ気相部のガス環境が微生物に影響を及ぼすこと初めて示した研究である。

1）*AMB express*, 7, 163 (2017).
2）*JBB*, 126, 96-101 (2018).
3）*AMB*, 102, 6637-6645 (2018).
4）*AMB*, 102, 4279-4289 (2018).

Evaluation and application of culture-plug during shake-flask culture with microorganism

○Masato Takahashi, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words aerobic culture, carbon dioxide, culture-plug, shake-flask culture

1Dp17 セルロースメンブランを用いた植物生育促進細菌の評価・培養法の開発

大矢 裕之[1], ○藤原 優人[2], 中村 真由[1], 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】
植物の生育を促進する細菌（Plant Growth Promoting Bacteria: PGPB）の利用は、持続可能な農資源利用に重要である。PGPB を探索する際、Plant Growth Promoting Activity（PGPA）が評価されるが、従来法は PGPA の項目ごとに個別の評価培地を用意し、それぞれに菌を播種する必要があり、操作が非常に煩雑である。また、PGPB の培養化においても、従来の寒天平板（AP）培養法では自然界の全細菌の 1％程度しか培養できず、多様な PGPB が取得できないという問題がある。この現状を踏まえ本研究では、セルロースメンブラン（UCM）を用いた PGPB の評価・培養法の開発をおこなった。
【方法と結果】
AP 培地に設置した UCM 上で培養した細菌を、UCM ごと新しい評価培地に順次移動することで、多項目の PGPA が評価できる系を考案、開発した（UCM 評価系）。シデロフォア（S）生産能とリン酸（P）可溶化能を持つ Pseudomonas tolaasii NBRC103163 や土壌試料などから分離培養した IAA 生産能を有する PGPB を用いて種々検討した結果、UCM 評価系では煩雑な操作が解消し、多項目の PGPA を評価できた。また、AP 培養法の問題点を解消するために、UCM を AP 培地に設置する培養系（UCM 法）を考案した。KBM 培地を用いて UCM 法と AP 培養法で根圏土壌試料を培養し、得られた培養微生物群集を PCR-DGGE 法で比較解析した結果、UCM 法で特異的に培養化される細菌が存在した。また、孔径 0.45 μm のフィルターで濾過した根圏土壌試料を UCM 法で培養した結果、AP 培養法では得られなかった種々の PGPB が単離培養でき、高い S 生産能が認められた。

Development of method for evaluation and cultivation of plant growth promoting bacteria using cellulose membrane

Hiroyuki Oya[1], ○Yuto Fujiwara[2], Mayu Nakamura[1], Hideki Aoyagi[1,2]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Coll. Agro-bio. Resour. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words plant growth promoting bacteria, plant growth promoting activity, cellulose membrane

1Dp18 pH 変動培養による有用金属回収微生物の新規スクリーニング法の開発

○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】 電子機器等の都市鉱山廃棄物に含まれる有用金属を再利用するため、微生物を用いた様々な有用金属の回収技術が開発されてきたが、優れた特性（耐酸性や耐金属性など）を有する有用金属回収微生物を探索、取得するには課題が多い。既に我々は、Specialized Cellulose Film (SCF) 法を用いて、培養中に pH を変動させることで、環境中から耐酸性微生物をスクリーニングする pH 変動培養法を開発している[1]。本研究では pH 変動培養法を活用した、有用金属回収微生物の効率的なスクリーニング系の構築と、優れた特性を有する有用金属回収微生物の取得を試みた。
【方法と結果】 最適化した pH 変動培養法を用いて pH を 7→1→7 と変化させ、環境試料から耐酸性微生物をスクリーニングした結果、土壌試料から *Enterobacter ludwigii* (16S rRNA 遺伝子シーケンス解析で同定) の単離培養に成功した。本菌は比較的高い耐酸性を示した (*E. ludwigii* は芽胞形成による休眠状態をとらず、耐酸性に関する報告はない) 。有用金属のモデルとして銅に着目し、硫酸銅を添加した培地で、pH を 7→1.5→7 と変動させる培養系を構築した。0.01% (w/v) 硫酸銅を用いて、pH 7 (2 days) →1.5 (2 days) →7 (1 day) の条件で本系を適用した。この結果、細菌の単離培養に成功し、16S rRNA 遺伝子シーケンス解析の結果、シデロフォア生産能を持つ *Paenibacillus sinopodophylli* と推定された（銅回収能力を評価中）。現在、様々な環境試料に本法を適用し、銅回収能力を持つ微生物のスクリーニングを検討中である。1) H29 日本生物工学会要旨 p. 161

Development of novel pH shift screening system for microbes capable of urban mining

○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, specialized cellulose film, uncultured bacteria, urban mining

1Ep03 コリネ型細菌における ECF シグマ因子 SigE のレギュロン同定

○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に関わるサブユニットである。extracytoplasmic function(ECF)シグマ因子ファミリーに属するものは、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。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 がコードされている。本菌における分子レベルでのストレス応答機構の解明を目的にこれら ECF シグマ因子の機能解明を進めており、SigC、SigD、SigH については標的遺伝子群(レギュロン)、認識プロモーターを同定している。SigE については 1) SigD、SigH と同様にアンチシグマ因子と複合体を形成し不活性化されること、2) 細胞表層ストレスへの耐性に関与すること、3) 認識プロモーター配列が SigH のものと類似していることがすでに報告されている。一方、SigE に制御される遺伝子としては group 2 シグマ因子 SigB をコードする *sigB* のみが知られている。本研究では SigE レギュロンの同定により、詳細な SigE 認識プロモーター配列およびその生理学的機能の解明を目的とした。
【方法と結果】ChIP-chip 解析によりゲノム上の SigE 結合領域 18 か所を同定した。結合領域内の保存配列から SigE の認識プロモーター配列を予測するとともに、結合領域下流遺伝子の転写開始点から、この配列がプロモーターとして機能することを確認した。SigH の認識配列と一部重複していたが、SigE 特異的な特徴が見られた。また、アンチシグマ因子遺伝子の破壊により、同定した SigE 認識プロモーターの下流に位置する遺伝子群の発現が野生株よりも上昇したことから、これらの遺伝子が SigE レギュロンであると結論付けた。SigE レギュロンのうち *sigB* を含む 8 遺伝子は SigH レギュロンにも含まれていた。本研究の一部は JSPS 科研費 17K15256 の助成を受けて実施された。

Identification of the regulon of the ECF sigma factor SigE in *Corynebacterium glutamicum*

○Koichi Toyoda[1], Masayuki Inui[1,2]
([1]RITE, [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, sigma factor, promoter, stress response

1Ep04 超好熱菌の分岐鎖ポリアミン依存的に発現する遺伝子の温度依存性

○尾崎 守, 福田 萌子, 濱川 匡史, 福田 青郎, 藤原 伸介
（関西学院大・理工）
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

【背景】ポリアミンは核酸をはじめとする生体分子との相互作用により様々な生命現象に関与している(1)。85℃を生育至適温度とする超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* は一般的な直鎖のポリアミンであるスペルミジンに加え、分岐鎖構造の N4-ビス（アミノプロピル）スペルミジンを有する。この分岐鎖ポリアミンは本菌の高温（93℃）での生育に必須であることがわかっている(2)。本研究では超好熱菌の分岐鎖ポリアミンの生理機能解明を目指し、特に翻訳に与える影響に着目して、培養温度の異なる培養を行い、分岐鎖ポリアミンに依存して発現量が変化するタンパク質網羅的な同定し、これらの温度依存性を検証した。
【方法と結果】分岐鎖ポリアミンを合成可能な *T. kodakarensis* KU216 株と分岐鎖ポリアミン合成酵素遺伝子の破壊株（DBP1 株）をそれぞれ栄養培地にて 85℃と 90℃で培養し、細胞抽出液を得た。これらに含まれるタンパク質を SDS-PAGE により分画した後、LTQ Orbitrap LC-MS を用いてタンパク質の同定、及びカタログ化を行った。90℃及び 85℃で培養した菌体を解析した結果、様々なタンパク質の発現が分岐鎖ポリアミンの有無に影響を受けることがわかった。特に細胞質型ヒドロゲナーゼの発現は、90℃及び 85℃で分岐鎖ポリアミンの存在に依存することがわかった。また 90℃で培養した DBP1 株からは鞭毛タンパク質の発現がほとんど確認されなかった。その一方で野生株や 85℃で培養した DBP1 株からは鞭毛タンパク質が検出された。これらの結果から、分岐鎖ポリアミンは超好熱菌の特定のタンパク質の翻訳に影響を与えるが、その寄与はタンパク質の種類や培養温度とも関連することが示唆された。
【参考文献】
(1) Muramatsu, A., *et al*., J. Chem. Phys., 145(23):230103. (2016)
(2) Okada, K., *et al*., J. Bacteriol., 196(10):1866-76. (2014)

Temperature dependency of expression of branched-chain polyamine dependently expressed genes in hyperthermophile.

○Mamoru Osaki, Moeko Fukuda, Masafumi Hamakawa, Wakao Fukuda, Shinsuke Fujiwara
(Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ.)

Key words hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*, Polyamine, proteomics

1Ep05 *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成におけるポリアミン類の影響の検討

○綿井 大輔 [1], 坂中 哲人 [2], 久保庭 雅恵 [2], 福﨑 英一郎 [1]
（[1]阪大院・工, [2]阪大院・歯）
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

臨床研究において，ポリアミンに分類される複数の物質が歯周病の重症度を示すバイオマーカーになることがこれまでに示唆されている．しかし，ポリアミンの歯周病への直接的影響に関する報告は未だにない．そこで本研究では，歯周病菌の中で最も高い病原性を示すことで知られるキーストン病原菌である *Porphyromonas gingivalis* の培養過程にポリアミンを添加することで，その影響を調べることを目的とした．共焦点レーザー顕微鏡を用いて，ポリアミン（Putrescine，Spermidine，Spermine，Cadaverine）添加による *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成の変化を観察したところ，Putrescine，Cadaverine を添加したことにより，有意にバイオフィルム形成が亢進することを実証した．次に，LC-MS/MS を用いてバイオフィルム形成に伴う菌体内アミン代謝物の経時的変化を分子レベルで裏付けた．その結果，培養過程で Putrescine を添加した際，ポリアミン（Agmatine，Spermidine）やその代謝上流にあるアミノ酸（Arginine，Citrulline，Ornithine，Glutamic acid）が減少することが分かった．この結果より，Putrescine によるこの代謝変動は *Porphyromonas gingivalis* バイオフィルム形成と何らかの関係があることが示唆された．

Investigation of effects of polyamines on biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*

○Daisuke Watai[1], Akito Sakanaka[2], Masae Kuboniwa[2], Eiichirou Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Dent., Osaka Univ.)

Key words *Porphyromonas gingivalis*, polyamine, biofilm formation, metabolite profiling

1Ep06 *Zygosaccharomyces rouxii* の株間メタボローム解析による凍結耐性関連代謝物の探索

○菊池 成真, 森本 一輝, 小西 正朗
（北見工大）
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

オホーツク圏の自然環境中から分離した環境酵母の一部が既存の凍結耐性酵母より強い凍結耐性を持つことを明らかにしている。しかし、それらの酵母の凍結耐性機構はわかっていない。先行研究では、*Saccharomyces cerevisiae* が細胞内に二糖や糖アルコールなどの低分子代謝物を蓄積することで凍結ストレスを緩和することが知られているが、その他の環境酵母については研究例がほとんどない。本研究では、凍結耐性に関与する代謝物に着目し、代謝産物組成と凍結耐性の関連性について解析することで凍結耐性に関係する成分について調査した。
独自に分離した *Zygosaccharomyces rouxii* SRT88 株、それらと同種の対照株(*Z. rouxii* NBRC0740, NBRC1733)を用いた。凍結耐性試験は、YM 培地で培養後、濁度(OD_{600})を 1 に合わせ、凍結融解操作前後で生菌数変化から半致死凍結回数(LF_{50})を算出することにより評価した。メタボローム解析では代謝物の変化を防ぐため、菌体を回収後に素早く凍結乾燥した。凍結乾燥菌体を合わせ、抽出溶媒、内部標準物質を加えてホモジナイズした。上清に超純水を加えて遠心後、上層を凍結乾燥した。乾燥物を誘導体化し、GC/MS で分析を行い、OPLS 法で解析した。
Z.rouxii SRT88 株とコントロール株(NBRC0740, NBRC1733)の半致死凍結回数 LF_{50} はそれぞれ 3.75 回、0.90 回、2.39 回であり、凍結耐性に明らかな違いが認められた。OPLS 解析の結果、代謝物組成と凍結耐性間で相関性の高いモデリングができた（R_2 >0.95，Q_2>0.90）。OPLS モデルにより算出された VIP 値と p 値から統計的に有意差が有り、重要度の高い代謝物をフィルタリングした(VIP ≥ 1.0，p ≤ 0.05)した。その結果、*Z.rouxii* SRT88 株は対照株 2 種に比べ、Mannitol や L-aspartic acid、citric acid を多く蓄積しており、これら多く含むことで凍結耐性を高めている可能性が示唆された。

Metabolome analysis among strains in *Zygosaccharomyces rouxii* to estimate metabolites associated to frozen resistance.

○Narumi Kikuchi, Kazuki Morimoto, Masaaki Konishi
(Kitami Inst. Technol.)

Key words freeze tolerant, taxonomy, metabolomics

1Ep07 不均衡変異導入法で単離されたリボフラビン高生産 *Ashbya gossypii* のゲノム解析

○畔上 純也 [1], 横森 愛美 [1], 加藤 竜也 [1,2], 道羅 英夫 [2], 朴 龍洙 [1,2]
（[1]静大院・総合科技, [2]静大・グリーン科技研）
kato.tatsuya@shizuoka.ac.jp

【目的】リボフラビンは、生体内において電子伝達系酸化還元酵素の補酵素であるフラビンモノヌクレオチド（FMN）やフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）の前駆体であり、必須の栄養素である。糸状菌 *Ashbya gossypii* はリボフラビン生産菌として知られており、現在工業的なリボフラビン生産に利用されている。当研究室では、ラギング鎖の複製エラー頻度を上げた改良型ポリメラーゼを利用した不均衡変異導入法により、野生株である *A. gossypii* ATCC10895 株に比べリボフラビン生産性が約 9 倍高い *A. gossypii* W122032 株の単離に成功している１。そこで、この野生株とリボフラビン高生産株のゲノム配列を解析し、*A. gossypii* のリボフラビン生産の新たな知見を得ることを目的とした。【方法及び結果】*A. gossypii* ATCC10895 株と W122032 株のゲノム DNA を Illumina 社の Miseq に共し、リードデータを取得した。すでに報告のある ATCC10895 株のゲノム DNA 配列を参照配列とし、リードデータのマッピングを行った。各遺伝子内の SNP および Indel 解析を行ったところ、今回使用した *A. gossypii* ATCC10895 株において、既存の ATCC10895 株の AGR073C 遺伝子において、アミノ酸置換を伴うヘテロザイガス変異が 1 つ確認された。W122032 株では 32 個のホモザイガス変異と 1377 個のヘテロザイガス変異がアミノ酸置換を伴う変異として確認された。これらヘテロザイガス変異において、W122032 株で変異が生じている割合が 21～75%であった。W122032 株の単核胞子を単離し培養したところ、菌糸の増殖は確認できなかった。このことから、*A. gossypii* の多核性や倍数性がこの結果を反映していると推測された。また W122032 株において、rDNA 領域のコピー数の増加も確認された。

Genomic analysis of riboflavin-overproducing *Ashbya gossypii* mutant isolated by disparity mutagenesis

○Junya Azegami[1], Ami Yokomori[1], Tatsuya Kato[1,2], Hideo Dohra[2], Enoch Y Park[1,2]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words *Ashbya gossypii*, riboflavin, disparity mutagenesis, genomic analysis

1Ep08 非モデル珪藻のトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析に基づく被殻形成関連タンパク質の同定

岩城 沙弥子[1], 小布施 祈織[1], 田村 隆[1], 稲垣 賢二[1], 真山 茂樹[2], ○根本 理子[1]
（[1]岡山大院・環境生命, [2]東京学芸大・教）
mnemoto@okayama-u.ac.jp

珪藻のシリカ被殻は、現在の微細加工技術では合成困難なナノ微細構造を有しており、その微細構造に由来する特性を生かし、太陽電池、ガスセンサー、分子フィルター、などナノテクノロジー分野への応用が報告されている。珪藻の被殻形成機構を明らかにできれば、上記分野への応用が可能な新しいセラミックス材料を開発できる可能性がある。珪藻の被殻形成機構解明に向けて、これまでは主に、ゲノム解読された特定のモデル珪藻を用いた解析が行われてきた。複数の被殻形成関連タンパク質が報告されているが、その多くが、モデル珪藻のみでしか存在が確認されておらず、珪藻に共通する被殻形成因子は不明である。本研究では、珪藻に共通する被殻形成機構を明らかにするため、3 種の非モデル珪藻のトランスクリプトームデータを新たに取得し、ゲノム解読された珪藻の遺伝子情報と共に網羅的な比較解析を行った。さらに、取得したトランスクリプトームデータを用いて、被殻局在タンパク質のプロテオーム解析を行った。
まず、*Nitzschia* 属、*Achnanthes* 属、*Pseudoleyanella* 属の３種の珪藻の RNA を、次世代シーケンサーを用いて解析し、トランスクリプトームデータを取得した。取得したトランスクリプトームデータとデータベース上に登録されている 5 種の珪藻の遺伝子情報を比較し、珪藻のみに保存された 880 個の遺伝子を抽出した。その中からさらに、既知の被殻形成関連タンパク質が持つ ER 輸送シグナル配列を持つものに絞り込んだ。被殻局在タンパク質のプロテオーム解析を行った結果、*Nitzschia* 属珪藻の被殻から ER 輸送シグナル配列を有し、特徴的な繰り返し配列を有する新規タンパク質が同定された。現在、本研究で同定したタンパク質について、遺伝子発現解析を用いて、被殻形成との関連を解析している。

Identification of proteins involved in frustule formation by transcriptome and proteome analyses of non-model diatom species

Sayako Iwaki[1], Kiori Obuse[1], Takashi Tamura[1], Kenji Inagaki[1], Shigeki Mayama[2], ○Michiko Nemoto[1]
([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Fac. Educ., Tokyo Gakugei Univ.)

Key words proteome, transcriptome, diatom, biomineralization

1Ep09 機械学習を用いた植物 mRNA 切断に関わる特徴の選抜

○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 の安定性は重要である。この安定性を制御する機構の一つとして、mRNA の分解機構が挙げられる。中でも内部配列の切断に依存する分解機構に関しては、動植物を問わず詳細な解析は行われていない。植物においては、切断部位を網羅的に同定する手法が報告されているが、実験手法、解析手法上の問題が存在していた。そのため、各切断部位の切断のされやすさ（切断率）を正確に数値化することができず、mRNA の切断に関わる配列等の特徴は不明であった。我々は、これらの問題点を改善した truncated RNA end sequencing (TREseq) をシロイヌナズナにおいて確立し、網羅的に切断部位を同定した。この手法を用いて解析を行ったところ、切断部位周辺には顕著な塩基の偏りが確認された。また、遺伝子単位の切断率と mRNA 上のリボソーム存在量には正の相関が認められ、翻訳過程が mRNA 切断に強く関与することが示唆された。酵母における先行研究において、翻訳過程は切断個所の決定にも強い影響を与えていることが知られているが、その詳細な知見は植物において不明である。そこで、これらの切断に関わる複数の要因（RNA の特徴）を想定し、機械学習 (random forest classifier) を用いてその切断に関わる重要な特徴の選抜を行った。特に重要な特徴を見ると、そのほとんどは配列的特徴であり、翻訳過程に関わる特徴はごくわずかであった。これらの結果は、配列依存的に mRNA の切断個所が決定されることを強く示唆している。将来的には、これらの解析を基に、導入する外来遺伝子について切断率が高い配列を除去するなど、導入外来遺伝子の安定的発現に寄与すると考えられる。

Selection of features related to mRNA cleavage in plant

○Daishin Ueno, Shotaro Yamasaki, Taku Demura, Ko Kato
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words *Arabidopsis thaliana*, bioinformatics, cleavage sites, mRNA degradation

1Ep10 イネ、バラ、レタスにおける mRNA の内部切断に関わる配列的特徴の比較

○向田 尭史, 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

導入遺伝子を発現させる上で、mRNA の安定性は蓄積 mRNA 量を制御する重要な要因の一つであると考えられる。この安定性を制御する機構として mRNA の分解機構が挙げられる。mRNA の分解機構はポリ A 鎖の短縮に依存する分解機構とエンドヌクレアーゼ等の内部切断に依存する分解機構に大別できる。ポリ A 鎖の短縮依存的な分解機構に関しては酵母において詳細な解析が行われているものの、エンドヌクレアーゼ等の切断に依存する分解機構に関しては不明な点が多い。植物では、シロイヌナズナにおいてゲノムワイドに切断部位を解析できる TREseq (Truncated RNA end sequencing) 法が確立し、G リッチな配列が mRNA の切断に関与していることが報告されている。しかし、これらの内部切断に関わる配列的特徴が、異なる植物種においても類似する傾向が見られるかどうかは不明である。
本研究では、イネ、バラ、レタスを対象に TREseq 法を用いて mRNA の内部切断部位を網羅的に同定した。そして、各切断部位での切断のされやすさの指標として、各切断部位のリード数をその遺伝子の mRNA 蓄積量で補正した値を cleavage score（CS 値）と定義し、解析を行った。その結果、シロイヌナズナと同様に切断部位周辺には G リッチな配列が認められた。このことは、異なる植物種において、共通の配列モチーフが mRNA の内部切断に関与していることを示唆している。

Comparison of sequence features related to mRNA degradation in rice, rose, and lettuce

○Takafumi Mukuta, Daishin Ueno, Shotaro Yamasaki, Taku Demura, ko Kato
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words plant mRNA, mRNA degradation, comprehensive analysis

1Ep11 Droplet Digital PCR 法を用いた植物 mRNA の内部切断の定量的な測定法の確立

○成瀬 つきひ, 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

導入遺伝子発現を理解する上で、転写、転写後、翻訳、翻訳後における様々な調節機構を解明することは重要である。なかでも転写後調節の一つであるm RNA の分解はm RNA の蓄積量を制御する重要な調節機構の一つとされている。このm RNA の分解には二つの機構がある。一つ目は、ポリ A 鎖の短縮に起因する分解であり、脱キャップに引き続き、5’-3’もしくは 3’-5’のエキソヌクレアーゼにより分解が引き起こされる。二つ目は、m RNA 内部配列の切断 (エンドヌクレアーゼ等) が起因となり、それに引き続く 5’-3’もしくは 3’-5’エキソヌクレアーゼにより分解される。ポリ A 鎖の短縮に依存する分解機構に関しては、いくつかのタンパク質因子が同定され詳細な解析が酵母を中心に行われているが、m RNA 内部配列の切断に依存する分解機構に関しては、生物種を問わず詳細は不明である。
当研究室では、m RNA の内部切断部位を網羅的に解析できる Truncated RNA End sequencing（TRE seq）法を確立し、シロイヌナズナ培養細胞を対象として、切断部位に関する情報を取得している。本研究では、実際に切断される部位を含む DNA 断片をレポーター遺伝子内に挿入したキメラ遺伝子を構築し、一過的に植物細胞内で発現させ、転写されたm RNA の内部切断を Droplet Digital PCR（ddPCR）を用いて定量的に解析する実験系を確立した。今後は、切断部位周辺配列を置換することで、内部切断に関わる配列的特徴を明らかにする。将来的には、これらの解析によって得られた知見を基に、導入遺伝子から不安定化に作用する配列を除去するなど、導入される外来遺伝子の安定的な発現に応用できると考えられる。

Establishment of quantitative measurement method of internal cleavage of plant mRNA by Droplet Digital PCR

○Tsukihi Naruse, Ueno Daishin, Shotaro Yamasaki, Taku Demura, Ko Kato
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words mRNA degradation, plant mRNA, *Arabidopsis thaliana*

1Ep12 植物におけるリボソームの停止・停滞に影響を与えるmRNA の配列的特徴についての解析

○伊藤 光佑, 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

近年、有用遺伝子を植物に導入し、有用タンパク質（医療用ワクチンや抗体）などを植物において生産する試みが行われている。導入された遺伝子は、転写、翻訳過程を経て、タンパク質となる。この中でも、mRNA をタンパク質へと変換する翻訳過程は、導入遺伝子を高発現させる上で、特に重要なステップであると考えられる。mRNA がタンパク質へと翻訳される効率（翻訳効率）に影響を与える要因として、リボソームの翻訳伸長反応が挙げられる。先行研究において、tRNA 量が豊富である最適コドンが mRNA 上に多く存在する場合、リボソームの翻訳伸長速度が早い（翻訳効率が高い）ことが真核生物の酵母において報告されている。その反対に、最適ではないコドン（rare codon)が多い場合は、リボソームの翻訳伸長速度は遅くなることが知られている。しかし、植物については、リボソームの翻訳伸長速度とコドンの関係性について、その詳細な知見は明らかとなっていない。本研究ではシロイヌナズナ培養細胞を対象として、リボソームプロファイリング法を用いることで、リボソームの停止・停滞に関するゲノムワイドな情報を取得した。遺伝子内におけるリボソームの停止・停滞部位の分布に着目すると、開始、終始コドンの近傍に多く見られ、コード領域内において 3 塩基単位の周期性が認められた。また、コドン、アミノ酸に着目した解析を行ったところ、プロリンに対応するコドンにおいて、動物等の先行研究で報告されている、顕著なリボソームの停止・停滞が観察された。今後、これらの解析を進めることにより、リボソームが停止・停滞する配列を特定する。

Sequence features related to ribosome stall/pausing in plant mRNA

○Kosuke Ito, Daishin Ueno, Shotaro Yamasaki, Taku Demura, Ko Kato
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words *Arabidopsis thaliana*, ribosome profiling, mRNA

1Ep13 Production of recombinant *β*-glucocerebrosidase in *Nicotiana benthamiana* root culture induced by plant hormones

○Naphatsamon Uthailak[1,2], Takao Ohashi[1], Ryo Misaki[1], Kazuhito Fujiyama[1]
([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

Enzyme replacement therapy has been used as the most effective treatment for Gaucher disease, a lysosomal storage disorder caused by the lack of *β*-glucocerebrosidase (GCase) activity. The most used commercial recombinant GCase is produced in mammalian cells. Compared to mammalian cells, plants provide advantages on pharmaceutical protein production including the low cost for production and no risk of the contamination by human pathogens. This study aimed to produce the recombinant GCase as an active enzyme in *Nicotiana benthamiana* root culture induced by plant hormones. Root of transgenic GCase-producing plants were induced and cultured in liquid medium supplemented with plant hormones [Indole-3-acetic acid (IAA) or Indole-3-butyric acid (IBA)]. The optimal condition for GCase production was determined under different concentrations of plant hormones and cultivation times. GCase production was analyzed using GCase activity assay, dry root weight and Western blot. Recombinant GCase was successfully produced in root culture with the enzyme activity 88.81± 2.98 Units/mg total protein at 5 weeks after induced by IBA (0.1 mg/L), which is higher than that induced by IAA from previous study (81.40 ± 17.99 Units/mg total protein). Purification and *N*-glycan analysis of GCase would be the next step in this study. This research provides the alternative plant system for recombinant GCase production. This system might be applied on the other recombinant proteins production in the future.

Production of recombinant *β*-glucocerebrosidase in *Nicotiana benthamiana* root culture induced by plant hormones

○Naphatsamon Uthailak[1,2], Takao Ohashi[1], Ryo Misaki[1], Kazuhito Fujiyama[1]
([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Human glucocerebrosidase, *Nicotiana benthamiana*, Root culture, Plant-made pharmaceuticals

1Ep14 植物免疫活性化能を持つ低分子環状ペプチド剤の探索とそれらを細胞内で生成させる遺伝子カセットを導入した形質転換シロイヌナズナの病害抵抗性の解析

○能年 義輝 [1], 渡邉 恵 [1], 守屋 綾子 [1], 香西 雄介 [2], 山中 由利恵 [1], 木村 麻美子 [2], 北松 瑞生 [3]
（[1]岡山大院・環境生命, [2]理研・環境資源, [3]近畿大院・総合理工）
noutoshi@okayama-u.ac.jp

抵抗性誘導剤は植物が本来持っている免疫力を活性化することで病害防除効果を示す農薬である。我々は独自に確立した植物免疫の定量評価系を利用し、これまでに市販の化合物ライブラリーの網羅的探索から植物免疫活性化剤を多数単離・解析してきた。病原体に直接作用しない抵抗性誘導剤には薬剤耐性菌が出現しないため、利用拡大が期待される。しかし、濃度依存性が出にくく、殺菌剤との競合により商品化に至りにくい。この欠点を補う方策として、抵抗性誘導剤を植物体に作らせることにより、耐病性品種として防除効果を享受する手法を考案した。現段階で本構想を実現しうる素材として環状ペプチドに着目した。そこで、7 残基の天然アミノ酸で構成される低分子環状ペプチドのライブラリー（8,000 分子種）を有機合成した。そして、そのうち 1,600 個を探索し、植物免疫応答を亢進する働きを持つ 10 個の環状ペプチドを得た。これらはシロイヌナズナおよびミナトカモジグサに投与すると、それぞれ斑葉細菌病、紋枯病に対する病害抵抗性を誘導した。これらの環状ペプチドには、植物への投与によって防御関連遺伝子を発現誘導するものもあったが、耐病性付与の程度との相関はなかった。次に、これら生理活性環状ペプチドのうち 3 種を選抜し、SICLOPPS (Split-Intein Circular Ligation Of Peptides and ProteinS)法を用いてこれらの環状ペプチドを細胞内で生成しうる遺伝子カセットを構築し、アグロバクテリウム法によりシロイヌナズナに導入した。これらの形質転換体は、病害抵抗性の向上を示し、本構想の実効性が示された。本遺伝子カセットは様々な作物種へ適用できる。また、ペプチドの探索指標を変えることにより、様々な植物機能の改変への応用も期待できる。

Transgenic Arabidopsis plants expressing gene cassettes for production of immune-activating small cyclic peptides exhibited increased disease resistance

○Yoshiteru Noutoshi[1], Megumi Watanabe[1], Ayako Moriya[1], Yusuke Kouzai[2], Yurie Yamanaka[1], Mamiko Kimura[2], Mizuki Kitamatsu[3]
([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]CSRS, RIKEN, [3]Grad. Sch. Sci. Eng., Kindai Univ)

Key words *Arabidopsis thaliana*, *Brachypodium distachyon*, Plant activator, Small cyclic peptides

1Ep15 気孔開口を抑制する K チャネル阻害剤の同定とその構造活性相関

○鈴木 喬太 [1], 遠藤 晃輔 [1], 島田 友輝 [1], 有澤 美枝子 [2], 熊田 佳菜子 [2], 一刀 かおり [3], 谷井 沙織 [2], 古田 未有 [2], 井坂 修久 [4], 山口 利男 [5], 浜本 晋 [1], 石丸 泰寛 [1], 魚住 信之 [1]
（[1]東北大院・工, [2]東北大院・薬, [3]東北大院・生命, [4]新潟薬大・応生命, [5]新潟薬大・薬）
uozumi@biophy.che.tohoku.ac.jp

【背景・目的】 植物の二酸化炭素の吸収や蒸散の調節は気孔の開閉によって行われる．気孔の開閉は孔辺細胞の体積変化によって生じる．シロイヌナズナの孔辺細胞には，K^+を細胞内に取り込む KAT1 と KAT2 という K^+チャネルが発現している．この K^+チャネルが開孔すると孔辺細胞内の K^+濃度が増大し，水が流入することによって孔辺細胞の体積が増大するため気孔が開口する．これまで植物 K^+チャネルに特異的な阻害剤は報告されていなかった．私たちは低分子化合物の中から，KAT1 を選択的に阻害する尿素系化合物を見出したことを報告している．今回は，その化合物の類似化合物を用いて，KAT1 阻害における構造活性相関を検討した．さらに，KAT1 を阻害する尿素系化合物が，植物の生理的機能におよぼす影響を調査した．
【方法・結果】 KAT1 の RNA を導入したアフリカツメガエルの卵母細胞の外液に，尿素系化合物の 41 種類の類似化合物を添加して，膜電位固定法による K^+電流の測定を行った．その結果，芳香族置換基や数種類のハロゲン基を水素に置換した化合物では阻害活性が見られなかったが，ハロゲン基は，電子求引性・置換基サイズ共に同程度であれば，別のハロゲン基に置換しても阻害活性が維持された．次に，シロイヌナズナの葉から気孔を単離したのち，暗所で一度気孔を閉じさせた．その後明所に移し，尿素系化合物を添加して気孔の開度を調べたところ，無添加と比較して約 60 %気孔の開口を阻害した．また，尿素系化合物を添加した培地上でのシロイヌナズナ生育試験を行ったが，根の伸長や葉の成長に影響は見られなかった．以上の結果から，尿素系化合物は気孔の開閉に特異的に作用することが示唆された．

Identification of K channel inhibitors that mediate stomatal opening and their structure-activity relationships

○Kyota Suzuki[1], Kosuke Endo[1], Tomoki Shimada[1], Mieko Arisawa[2], Kanako Kumada[2], Kaori Itto[3], Saori Tanii[2], Miu Furuta[2], Nobuhisa Isaka[4], Toshio Yamaguchi[5], Shin Hamamoto[1], Yasuhiro Ishimaru[1], Nobuyuki Uozumi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Pharm., Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ., [4]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [5]Fac. Pharm., Niigata Univ. Pharm.)

Key words transporter, inhibitor, *Arabidopsis thaliana*

1Ep16 交流電場印加による植物種子の発芽および初期成長促進効果

○小山 純弘, 田村 泰之, 石川 元, 石川 陽一
（エイブル）
koyama@able-biott.co.jp

【目的】植物種子の発芽と初期生育を促進向上させることは、農作物を生産する上で極めて重要である。本研究では、誘電損失（発熱）がほとんどない 1~300 MHz の交流電場に着目し、ルッコラ種子、小松菜種子、えんどう豆への交流電場印加による発芽および初期成長への影響について調査した。
【方法】1%寒天シャーレに植物の種子 50 粒を置床し、種子の 2/3 までの高さに蒸留水を加えた。えんどう豆の場合は 1%寒天シャーレに 30 粒を置床し、種子の半分までの高さに蒸留水を加えた。上下の平板電極で発生させた交流電場の間にシャーレを保持しながら種子の発芽を調べた。シャーレの水を補給しながら、温度 25℃、えんどう豆は 20℃のインキュベーターの暗所で実験した。3 種類の植物種子をそれぞれ 3 回反復実験し、発芽率を調べた。幼根の長さが 2 mm 以上に伸長した種子を発芽したものとし、48 時間までの発芽数から発芽率をそれぞれ算出した。また、交流電場印加開始から 3 日後に、交流電場印加サンプルと対照区（Control）から茎長の長い各種植物を 10 本ずつサンプリングし、茎長を測定した。
【結果と考察】ルッコラ種子を 1 Vpp/cm (peak to peak voltage/cm), 10 MHz から 100 MHz の交流電場で処理すると統計的に有意な発芽率の増加が確認され、高周波数側で発芽率促進効果が強くなる傾向を見出した。1 Vpp/cm, 100 MHz の交流電場を 10 時間、ルッコラ種子、小松菜種子、えんどう豆に印加することにより、顕著な発芽促進効果があった。また、各種植物種子に対して、1 Vpp/cm, 100 MHz の交流電場を 10 時間印加すると、3 日後には茎長が Control の 1.4 倍に伸長することを見出した。

Acceleration of germination and early growth of plant seeds by alternating electric field applications

○Sumihiro Koyama, Yasuyuki Tamura, Gen Ishikawa, Yoichi Ishikawa
(ABLE)

Key words Seed germination, Early growth, Alternating electric field

1Fp01 新規活性型トランスグルタミナーゼ前駆体の触媒特性の評価

○有吉 龍太郎 [1], 佐藤 崚 [1], 南畑 孝介 [2], 後藤 雅宏 [1], 神谷 典穂 [1,3]
（[1]九大院・工, [2]KAICO, [3]九大・未来化セ）
kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

微生物由来トランスグルタミナーゼ (Microbial Transglutaminase, MTG) は、タンパク質中の Gln 残基と Lys 残基の側鎖間架橋を触媒し、タンパク質同士を連結させ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である。近年では多様なバイオコンジュゲートの調製のための酵素として、例えば Antibody Drug Conjugates (ADCs) の調製における有用性が報告されている。MTG はプロペプチドが付加した前駆体として発現した後、限定分解を経て成熟型酵素となる。プロペプチドは分子シャペロンとして機能し、プロペプチドが欠損した活性型 MTG の可溶性発現は極めて困難であることから、微生物を宿主とした異種タンパク質発現系において必須の部分構造となる。一方、我々は、活性型 MTG の取得に際して、プロペプチド部位に変異を導入するという新たな観点で、限定分解を必要としない活性型 MTG 前駆体の取得に成功した。そこで本研究では、新規活性型 MTG 前駆体の基質特異性と活性の相関を評価した。
MTG 前駆体立体構造の解析情報に基づき、活性部位と強く相互作用している Tyr 残基 (Y12) を選択した。さらに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) を選択し、それを Arg 残基に置換した K10R/Y12X MTG 二重変異体を作製した。Gln 基質である Z-QG と 1 級アミン基質である Cadaverine および反応追跡のための NADH、GLDH、α-KG を含む溶液を調製し、NADH 由来吸光度の経時的測定から、Y12 の飽和変異体の MTG の触媒特性を評価した。その結果、アミノ酸の種類による初期活性の違い、活性と発現量の間のトレードオフの関係が明らかとなり、特に疎水性相互作用の解消と柔軟性の向上が触媒活性に影響を与えることが示唆された。現在は、異なる構造のアミン基質を用いて特異性の違いについて検討中であり、その結果についても報告する。

Evaluation of catalytic properties of novel active zymogen of transglutaminase

○Ryutaro Ariyoshi[1], Ryo Sato[1], Kosuke Minamihata[2], Masahiro Goto[1], Noriho Kamiya[1,3]
([1]Fac. Eng., Kyushu Univ., [2]KAICO Ltd., [3]CFC, Kyushu Univ.)

Key words cross-linking, propeptide, substrate specificity, zymogen

1Fp02 酵素架橋反応を介したタンパク質装飾リポソームの調製とその特性評価

○駒田 拓也 [1], Razi Muhamad Alif [1], 高原 茉莉 [2], 若林 里衣 [1], 後藤 雅宏 [1,3], 神谷 典穂 [1,3]
（[1]九大院・工, [2]北九州高専, [3]九大・未来化セ）
kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】リン脂質の自己集合より形成されるリポソームは、薬剤封入や脂質膜の装飾が可能なキャリアとして薬物送達（DDS）分野において汎用されている。本研究では、リポソームをタンパク質で装飾する手法として、脂質修飾タンパク質の利用に着目した。微生物由来トランスグルタミナーゼ(MTG)が触媒するグルタミン(Q)とリジン(K)残基の側鎖間架橋反応を利用した脂質修飾法により、緑色蛍光タンパク質(EGFP)の C 末端に MTG 認識基質 Q ペプチド配列を付加した組換え EGFP (EGFP-Q) と、反応性 K を有する脂質ペプチド(lipid-K)から脂質修飾 EGFP (EGFP-lipid) を調製した。その後、リポソームへの提示と培養細胞との相互作用を検討した。
【方法】EGFP-Q、lipid-K 及び MTG を補助界面活性剤共存下で混合、インキュベートした。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による精製と共に修飾率を算出した EGFP-lipid を、表面電荷の異なる市販リポソーム製剤と混合し、動的光散乱法により粒径変化を評価した。また、EGFP 装飾リポソームを細胞培養上清に添加し、蛍光顕微鏡を用いてリポソーム共存下における脂質修飾タンパク質と細胞との相互作用を評価した。
【結果と考察】HPLC による分析から高反応率で脂質修飾タンパク質の調製が可能なこと、リポソームの蛍光観察から EGFP 由来の蛍光が球状に局在していることが確認された。また、負あるいは中性に荷電したリポソームに比べ、正電荷リポソームとの組み合わせにおいて EGFP 由来の蛍光の細胞への顕著な移行が確認され、細胞膜との静電相互作用に基づきタンパク質の取り込みを促進可能なタンパク質装飾リポソームとしての可能性が示唆された。

Enzymatic preparation and characterization of protein-decorated liposomes

○Takuya Komada[1], Muhamad Alif Razi[1], Mari Takahara[2], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,3], Noriho Kamiya[1,3]
([1]Fac. Eng., Kyushu Univ., [2]Kitakyushu Natl. Coll. Technol., [3]CFC, Kyushu Univ.)

Key words drug delivery system, lipid-protein conjugate, liposome, enzymatic cross-linking

1Fp03 低温菌 *Pseudoalteromonas nigrifaciens* Sq02 を用いた外来タンパク質低温分泌生産システムの構築と分泌機構の解明

○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低温生産系は、目的タンパク質の熱変性を緩和すると同時に、活性を抑制することで、宿主細胞への毒性を軽減することが期待される。本研究では、ハマチ (*Seriola quinqueradiata*) の腸管由来の低温性グラム陰性細菌を宿主としたタンパク質分泌生産システムの開発とその機構解明に取り組んだ。
[方法]ハマチの腸管から 4 ℃での生育速度と分泌タンパク質生産能に秀でた低温菌を単離し、16S rRNA 解析と average nucleotide identity 解析により同定した。培養上清に多量に分泌される機能未知タンパク質 P320 の分泌能を利用するため、発現用ベクターである、pJRD-Cm に P320 をコードする遺伝子とその C 末端側に好冷菌 *Desulfotalea psychrophila* DSM12343 由来の温度感受性の高いタンパク質 PepF、LAP、PepQ、BglA をコードする遺伝子を組み込んだ。このプラスミドを本菌へ導入し、融合タンパク質の発現を確認した。さらに、P320 の分泌機構を解明するために、遺伝子破壊株作製用ベクター pK18*mobsacB*-Em を利用することで P320 遺伝子とその周辺遺伝子の破壊株の作製を行った。
[結果と考察]単離した菌体は *Pseudoalteromonas nigrifaciens* と同定され、*P. nigrifaciens* Sq02 と命名された。本菌は、終濃度 3%の塩化ナトリウムを含む LB 培地で 18 ℃から 4 ℃で良好に生育し、培養上清に機能未知の分泌タンパク質 P320 を分泌することが見出された。この P320 の分泌能を利用した融合タンパク質分泌発現系において各融合タンパク質が培養液上清から検出された。また、P320 遺伝子の周辺遺伝子群がコードする II 型分泌装置(T2SS)のホモログである P309、P310、P311、P315、および P319 について、それらの遺伝子を破壊することで P320 の上清への分泌量が顕著に減少することが見出された。

Secretory production of recombinant proteins at low temperatures by using a psychrotrophic bacterium, *Pseudoalteromonas nigrifaciens* Sq02, and elucidation of the secretion mechanism

○Kawai Soichiro, Puti Wanguyun Aken, Kawamoto Jun, Ogawa Takuya, Kurihara Tatsuo
(Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

Key words cold-adapted microorganism, protein expression, secreted protein, secretory production

1Fp04 麹菌由来 hydrophobin RolA- Cutinase CutL1 間の相互作用における CutL1 側の新たな相互作用部位の探索

○金 允卿[1], 寺内 裕貴[1], 田中 拓未[1], 吉見 啓[2], 阿部 敬悦[1,2]
（[1]東北大院・農, [2]東北大・未来研）
kabe@biochem.tohoku.ac.jp

Aspergillus oryzae は，生分解性プラスチック polybutylene succinate-*co*-adipate (PBSA)を唯一の炭素源として培養すると hydrophobin RolA と PBSA 分解酵素である cutinase CutL1 を共発現する。hydrophobin は糸状菌特有の両親媒性タンパク質で，PBSA に吸着した RolA は CutL1 と相互作用し PBSA 表面に CutL1 を濃縮することで PBSA の分解を促進する。これまでの研究によって，RolA と CutL1 の相互作用にはイオン的相互作用が関与し, RolA 側の正電荷残基(H32, K34, K41, K46, K51)と CutL1 側の負電荷残基(D30, E31, D73, D142, D171)が協奏的に作用することを明らかにした。しかし, 分子間相互作用解析装置 QCM (Quartz Crystal Microbalance)を用いた解析において, CutL1 側には既知の残基以外にも相互作用に寄与する残基が存在する可能性が示唆された。
本報告では，RolA との相互作用に寄与する新たな CutL1 側の残基を探索し, 相互作用機構をより詳細に解明することを目的とした。まず, CutL1 の立体構造モデルと CutL1 ホモログ間のアラインメント解析から相互作用に寄与すると推測される候補部位を選抜した。立体構造モデルから D117 を, ホモログ間のアラインメント解析から E109, D145, D203 を選択し, これらの残基をセリン残基に置換した点変異体を作製した。各 CutL1 変異体を麹菌発現系を用いて生産・精製し, QCM による RolA との親和性解析を行った。
その結果, RolA との相互作用の Kd 値は, D117S, D145S では野生株と大差なく, E109S, D203S では野生株に対して有意に大きな値を示した。このことから, E109, D203 は RolA との相互作用に寄与する新たな残基であることが示唆された。

Analysis of cutinase CutL1 amino acid residues involving in the interaction between *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA and CutL1

○Yoonkyung Kim[1], Yuki Terauchi[1], Takumi Tanaka[1], Akira Yoshimi[2], Keietsu Abe[1,2]
([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NICHe, Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, hydrophobin, cutinase, RolA

1Fp05 麹菌界面活性蛋白質ハイドロフォビン RolA の自己組織化機構の解析

○寺内 裕貴[1], 田中 拓未[1], 三ツ石 方也[2], 藪 浩[2], 吉見 啓[3], 阿部 敬悦[1,3]
（[1]東北大院・農, [2]東北大・多元研, [3]東北大・未来研）
kabe@niche.tohoku.ac.jp

糸状菌が特異的に分泌する低分子界面活性蛋白質ハイドロフォビンは、保存された 8 個のシステイン残基からなる 4 つの S-S 結合を有し (システインループ)、固体表面に吸着して β-アミロイド様の棒状自己組織化構造 rodlet を形成する。麹菌 *Aspergillus oryzae* ハイドロフォビン RolA は生分解性ポリエステル PBSA に吸着し、その後 PBSA 分解活性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 分解を促進する。ハイドロフォビンが固体表面吸着後に形成する自己組織化構造や生物学的機能については研究されてきているが、自己組織化の分子機構に関する研究はシステインループ中のアミノ酸配列の関与が示唆されている他は不明である。また、我々は RolA と CutL1 の相互作用が主にイオン的相互作用に依存することを明らかにしたが、一方で、CutL1 が固体表面上の RolA 自己組織化膜を通り抜けて下層の固体基質に到達する分子機構は未だ不明である。
本報告では、RolA-CutL1 間相互作用の分子機構の可視化を目指すため、まず、界面化学的手法を用いて RolA の自己組織化の過程を可視化・解析することを目的とした。最初に、RolA の自己組織化単層膜（Langmuir 膜；L 膜）を様々な pH 条件で作製し、RolA の自己組織化構造形成過程を解析した。次に、相転移前後の RolA L 膜を、UV-O_3 洗浄で親水化した Si 基板またはシランカップリング剤で疎水化した Si 基板に転写して、原子間力顕微鏡で RolA 自己組織化 L 膜を観察した。その結果、RolA は 2 段階の相転移を経て緻密な自己組織化膜を形成すること、自己組織化構造の形成は pH に影響を受けることが明らかになった。

Analysis of self-assembly mechanism of *Aspergillus oryzae* surfactant protein hydrophobin RolA

○Yuki Terauchi[1], Takumi Tanaka[1], Masaya Mitsuishi[2], Hiroshi Yabu[2], Akira Yoshimi[3], Keietsu Abe[1,3]
([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]IMRAM, Tohoku Univ., [3]NICHe, Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, hydrophobin, Atomic force microscopy, Langmuir monolayer

1Fp06 出芽酵母のピルビン酸キナーゼに含まれる G-body 局在化シグナル配列の探索

○内海 亮太郎[1], 吉村 柚紀[1], 大谷 優太[2], 三浦 夏子[1], 植田 充美[2], 片岡 道彦[1]
（[1]阪府大院・生環科, [2]京大院・農）
miura.natsuko@biochem.osakafu-u.ac.jp

【背景と目的】酵母は低酸素下において、解糖系酵素などがつくるタンパク質集合体である G-body を形成して代謝調節を行う(1)。G-body を形成する代謝酵素は 20 以上存在するが、G-body の形成機構は不明である。本研究では、低酸素下での代謝に必須な役割を果たす解糖系酵素が G-body 形成に特に重要であると仮定し、解糖系最終産物のピルビン酸を合成するピルビン酸キナーゼ（Cdc19p）の集合体形成に寄与するアミノ酸配列の解明を目的とした。【方法】我々は以前の研究で、G-body 構成酵素の一つであるエノラーゼ（Eno2p）のアミノ酸配列断片化により G-body 局在化シグナル配列を見出した(1)。そこで、Cdc19p についても同様にアミノ酸配列を断片化し、Cdc19p に含まれるアミノ酸配列のうち G-body 形成に関与するものを探索した。まず二次構造等を考慮し、Cdc19p の断片化部位を設計した。設計した各 *CDC19* 断片のヌクレオチド配列を高コピーのベクタープラスミドに組み込み、酵母に導入して、G-body 様の局在変化を示す *CDC19* 断片を探索した。*CDC19* 断片の局在変化は、各 *CDC19* 断片と融合発現した GFP を蛍光顕微鏡で観察し、顕微鏡の視野内に捉えた 50～400 細胞のうち、局在変化を示した細胞の割合を数値化して確認した。次に、得られた *CDC19* 断片配列をさらに 30～40 アミノ酸まで絞り込んだ。最後に、得られた *CDC19* 断片が G-body と同様の局在を示すかを調べるために、G-body 形成タンパク質と *CDC19* 断片にそれぞれ融合させた蛍光タンパク質の共局在を検証した。【結果と考察】本研究により、新たに G-body 様の局在変化を示す 4 つのアミノ酸配列を得た。以前に得られた Eno2p に含まれるアミノ酸配列との比較により、G-body 形成に寄与するアミノ酸配列の性質について検討したので、まとめて発表する。(1)Miura et al. 2013 Eukaryot. Cell.

Investigation of signal sequences responsible for G-body formation by pyruvate kinase in *Saccharomyces cerevisiae*

○Ryotaro Utsumi[1], Yuki Yoshimura[1], Yuta Ohtani[2], Natsuko Miura[1], Mitsuyoshi Ueda[2], Michihiko Kataoka[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words G-body, hypoxia, subcellular localization, signal sequence

1Fp07 超好熱古細菌由来耐熱性セルラーゼの糸状菌での発現および更なる耐熱化

○仙波 弘雅[1], 山田 浩之[1], 坪井 宏和[1], 幸田 明生[1], 石川 一彦[2], 坊垣 隆之[1]
（[1]大関総研, [2]産総研・バイオメディカル）
hironori.senba@ozeki.co.jp

【背景及び目的】
耐熱性の高いセルラーゼはバイオマスの高温下での糖化やナノセルロースの製造など過酷な条件での使用が可能であり、産業的に幅広い応用が期待される。しかし、現在市販されている耐熱性セルラーゼは少なく、また 90℃以上の高温で長時間活性を維持するものは市販されていない。そこで我々は超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 及び *P. furiosus* 由来エンドグルカナーゼに着目し、これらの酵素の糸状菌での大量発現と、90℃以上の高温に長時間耐え得る、さらなる耐熱化を目的として研究を行った。

【方法及び結果】
P. horikoshii 由来エンドグルカナーゼ（EGPh）遺伝子および耐熱性の向上を目的に一箇所のアミノ酸点変異を加えた 7 系統の変異型 EGPh 遺伝子（EGPh_M1~M7）を糸状菌用発現ベクターに導入し、*Aspergillus niger* にて発現させた。発現した酵素について 98℃、30 分間加熱後の残存セルラーゼ活性を測定し、熱安定性を比較した結果、3 箇所の点変異において熱安定性の有意な向上が見られた。熱安定性の向上した EGPh は 90℃、1 時間加熱後も活性の低下が見られなかった。
また、*P. furiosus* 由来エンドグルカナーゼ遺伝子（EGPf）を同様に *A. niger* で異種発現させた結果、発現した酵素には糖鎖付加が確認された。そこで、大腸菌にて糖鎖付加されていない同酵素を発現させ、100℃、1 時間加熱後の残存セルラーゼ活性から熱安定性を比較した結果、*A. niger* 発現 EGPf の方が有意に熱安定性に優れ、糖鎖付加により耐熱性が向上したことが示唆された。

Heterologous expression of thermophilic cellulase from hyperthermophilic archaea in filamentous fungi and its further thermophilization.

○Hironori Semba[1], Hiroyuki Yamada[1], Hirokazu Tsuboi[1], Akio Koda[1], Kazuhiko Ishikawa[2], Takayuki Bogaki[1]
([1]Gen. Res. Lab., Ozeki Corp., [2]Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words cellulase, thermostable enzyme, biomass, protein engineering

1Fp08 生産性を劇的に向上させる蛋白質人工設計 ～難生産性L-アミノ酸酸化酵素の改良と、D-アミノ酸動的光学分割法への展開～

○南野 優季, 中野 祥吾, 伊藤 創平
（静県大院・薬食生命）
itosohei@u-shizuoka-ken.ac.jp

【背景・目的】 海洋性細菌である *Pseudoalteromonas* 属において、L-アルギン酸化酵素のパラログと考えられる L-アミノ酸酸化酵素様遺伝子を発見した。しかし異種発現が困難な遺伝子であったので、人工 L-アルギニン酸化酵素 [1] の設計で用いた蛋白質設計法をこの L-アミノ酸酸化酵素様遺伝子に適用し異種発現を試みた。結果、既知の L-アミノ酸酸化酵素 (LAAO) と 20 種類のアミノ酸に対する反応性が類似していた。LAAO は L 体のアミノ酸をケト酸や D 体のアミノ酸変換する酵素であり、ラセミ化合物の光学分割への応用が長年検討されてきた。しかし大量調整可能な LAAO が存在しないためベンチスケールの段階で頓挫している。本発表では世界で初めて大量調整に成功した ArtLAAO (人工設計 LAAO) [2] による、アミノ酸誘導体の動的光学分割を中心に紹介する。
【結果・考察】 独自の *in silico* 選抜法 [1,3] で選抜したライブラリーより設計した ArtLAAO は、最も相同な *Pseudoalteromonas citrea* 由来 L-アミノ酸酸化酵素様遺伝子と比較し、655 残基中 96 点変異が入っていた。大腸菌を宿主とした異種発現において、*Aplysia californica* 由来 LAAO の 150 倍である 30 mg/L の高収量を示し、LAAO が難生産性であるという常識を覆す結果となった。また、複数の L-アミノ酸に対して反応性を示し、k_{cat} 値は 6.4 − 33.0 と高値であった。そこで、ファインケミカル生合成への足掛かりとして、ラセミ体アミノ酸誘導体、特に DL-Phe 誘導体、DL-Trp 誘導体の動的光学分割も検討した。結果、10 種類以上の誘導体で光学純度 99%以上、収率 70%以上で D 体を得ることができた。以上の結果より、AncLAAO はファインケミカル製造への応用が期待できる。
1) S. Nakano, et al., *Appl. Environ. Microbiol*., 2019、2) 特願 2019-62177、 3) S. Nakano, et al., *Biochemistry*

Breaking the mirror: a highly productive and active artificial L-amino acid oxidase, a novel stereoselective biocatalyst

○Yuki Minamino, Shogo Nakano, Sohei Ito
(Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka)

Key words L-amino acids oxidase, dynamic kinetic resolution, Sequence based protein design, Ancestral reconstruction

1Fp09 離散的モチーフ様配列による酵素のインシリコ機能的分類法の開発と検証

○平松 希望, 本山 智晴, 中野 祥吾, 伊藤 創平
（静県大院・薬食生命）
itosohei@u-shizuoka-ken.ac.jp

【背景】40%程度の相同性があれば、蛋白質の構造と機能は保存されるとされている。しかし、産業利用上重要な、生産性、安定性、反応の至適温度、活性化エネルギーといった機能は保存されていない。我々は、配列の保存性の相関を網羅的に解析し、離散的モチーフ様配列を定義している。このモチーフ様配列で選抜し設計することで、人工設計蛋白質は高機能化する [1,2]。そこで、このモチーフ様配列が、蛋白質の多様な機能と相関があると仮説を立てた。解析ライブラリーのモデルとして L-スレオニン脱水素酵素 (TDH) と相同な 2284 配列を用い、検証した。
【方法】*Cupriavidus necator* 由来の TDH (CnTDH) と相同な 5000 配列を Blast により取得し、配列の重複、ギャップを持つ配列等を削除し、2284 配列を解析対象とした。この配列を機械学習法で解析、離散的モチーフ様配列を定義した。143V/174L/188Y/214M を有する 403 配列を選抜、完全コンセンサス設計法で FcTDH-VLYM を設計した。同様に、143M/174L/188Y/214M、143M/174I/188Y/214M、143I/174L/188Y/214M、143I/174I/188Y/214M を有する配列を選抜、それぞれで完全コンセンサス TDH を設計、機能解析を行った。
【結果・考察】FcTDH-MLYM 以外の 4 つの酵素は可溶性画分にて発現、いずれも TDH であった。更に FcTDH-IIYM では、L-Thr に対する K_m 値が CnTDH と比較して約 30 倍低く、L-Thr のアナログである (*R*) -3-ヒドロキシ酪酸への反応性を有していた。FcTDH-VLYM の $T_{1/2}$ 値は CnTDH より約 20℃上昇し、耐熱性に優れていた。FcTDH-VLYM の NAD^+ への K_m 値は CnTDH の 1/15 であった。また、FcTDH-MIYM は反応の活性化エネルギーが 38 kJ/mol と最も低く、低温適応型の酵素であった。以上より、離散的モチーフ様配列は酵素の”多様な機能”と相関している事を確認した。
1) S. Nakano, *Appl. Env, Microbio.* 2019、2) S. Nakano, *Biochemistry*, 2018

***In silico* enzyme classification and consensus protein design using dispersed motif-like sequences.**

○Nozomi Hiramatsu, Tomoharu Motoyama, Shogo Nakano, Sohei Ito
(Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka)

Key words *in silico* protein sequence analysis, *in silico* classification/screening, dispersed motif-like sequence, consensus protein design

1Fp10 BRET を利用したホタルルシフェラーゼの発光色変換

○金丸 愛望, 鶴田 篤弘, 有馬 一成, 伊東 祐二, 加藤 太一郎
（鹿児島大院 理工 生化）
k0035454@kadai.jp

【研究目的】発光酵素は、蛍光タンパク質と融合することで発光エネルギーが蛍光タンパク質へと転移する「生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)」という現象が生じることがある。本現象は、これまで海洋産ルシフェラーゼについて知られていたが、ホタルルシフェラーゼを利用した BRET は報告されていなかった。今回我々は、ゲンジボタル由来ルシフェラーゼ(LUC-G)をある蛍光タンパク質と融合させることによって、高効率な BRET が生じることを見出したので報告する。また本現象を生物発光センサーに利用できるかの検討も行った。
【研究材料と方法】ゲンジボタル由来のルシフェラーゼタンパク質と蛍光タンパク質を、ペプチドリンカーを介して融合し、その発光スペクトルを測定することで BRET の存在を確認した。次にペプチドリンカーの長さと BRET 効率の関係を調査した。またペプチドリンカーにいくつかのプロテアーゼ切断認識配列を導入した融合タンパク質を作製し、これをプロテアーゼと反応させた際の変化を SDS-PAGE と発光スペクトルを測定することにより追跡した。
【結果と考察】LUC-G の N 末端に蛍光タンパク質を融合させた場合に、強い BRET シグナルが観察された。また 2 つのタンパク質を繋ぐリンカーは 7 アミノ酸の場合が最も BRET 効率が高かった。プロテアーゼ切断配列を挿入した融合タンパク質では、プロテアーゼ処理によってタンパク質の分断が確認でき、切断度合いによって BRET 効率も変化することが分かった。また様々なプロテアーゼに対する切断選択性を比較することで、生物発光センサーへの可能性を見出すこともできた。

BRET induced bioluminescent color change of firefly luciferase

○Narumi Kanemaru, Atsuhiro Tsuruta, Kazunari Arima, Yuji Itou, Dai-ichiro Kato
(Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ.)

Key words firefly luciferase, fluorescent protein, BRET, peptidase

1Fp11 細胞内発光を利用したハイスループットスクリーニングにより得られた高活性変異体アシル ACP 還元酵素の評価

○林 勇樹 [1], 新井 宗仁 [1,2]
（[1]東大院・総合文化, [2]東大院・理）
arai@bio.c.u-tokyo.ac.jp

2010 年に藻類で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）が同定された。このため、遺伝子組み換え微生物を用いて、バイオエネルギーの１つであるアルカン（軽油相当）の生成が可能となった。しかし、AAR の酵素活性は非常に低いため、微生物によるアルカン生産を実用化するためには、AAR 高活性化が必要不可欠である。タンパク質を高活性化する方法の１つとして進化分子工学的手法があげられる。多数の変異体を作成し、各変異体の活性を迅速に評価する。この変異と選択を繰り返すことで、タンパク質を高活性化する手法である。しかし、これまで AAR の活性を調べるには、菌体培養液の破砕、有機溶媒による抽出、ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）による定量という多段階プロセスが要していた。しかし、発表者は、大腸菌内で発現した AAR の活性（菌体内アルデヒド生成量）に応じて発光する大腸菌を開発した。本手法を用いる事で、変異体 AAR を発現する大腸菌のコロニー、あるいは大腸菌培養液の発光を外部からモニターするだけで変異体 AAR の活性をハイスループットで評価できるようになった。そこで本評価法を用いた進化分子工学的手法により、2000 種を超える変異体 AAR ライブラリから、コロニーアッセイにより約 400 種にしぼりこみ、液体培養により 68 種の高活性変異体 AAR を取得し、その塩基配列を解析した。その結果、38 種の新規変異体 AAR の塩基配列が明らかとなった。これらの高活性変異体を用いて大腸菌でアルカン生成を行い、得られた活性について報告する。

Evaluation of highly active acyl-(ACP) reductase selected by *in vivo* luminescence-based high-throughput screening

○Yuuki Hayashi[1], Munehito Arai[1,2]
([1]Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo, [2]Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)

Key words Acyl-(ACP) reductase, Alkane biosynthesis, Directed evolution, Bioluminescence

1Fp12 好熱菌酵素の低温高活性化の実例と進化情報を用いた低温高活性化法の提案

○赤沼 哲史
（早大・人間科学）
akanuma@waseda.jp

優れた耐熱性を持つ好熱菌酵素は高い潜在的工業用途を有するが、一方で、高温に比べて常温では著しく活性が低下するという欠点を持つ場合も多い。我々は、これまでの長年の研究で、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 と比べると小さく、複数のアミノ酸置換を導入しても、低温活性の更なる改善は見られなかった。本研究では、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。その結果、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。さらに、IPMDH の進化系統解析をおこない、祖先型 IPMDH のアミノ酸配列を推定した。系統樹の最も古い分岐点のアミノ酸配列（共通祖先配列）と、本研究で用いた好熱菌 IPMDH のアミノ酸配列を比較したところ、共通祖先配列と好熱菌酵素の配列とでアミノ酸が一致し、常温菌酵素ではアミノ酸が異なる部位のアミノ酸を置換することによって、好熱菌 IPMDH の低温活性に 2 倍以上の向上が見られる確率が高かったことが明らかとなった。この結果は、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。

Improvement of the low-temperature activity of a thermophilic enzyme and proposal of a new strategy for low-temperature activation using evolutionary information

○Satoshi Akanuma
(Dept. Hum. Sci., Waseda Univ.)

Key words thermostable enzyme, mutagenesis, kinetics, thermostability

1Fp13 AFM を用いた高付着性細菌及びその細胞表層タンパク質の接着力測定

○石井 慧, 吉本 将悟, 堀 克敏
（名大院・工）
khori@chembio.nagoya-u.ac.jp

多くの細菌は固体表面に付着し、細胞と細胞外マトリクスから構成されるバイオフィルムを形成する。バイオフィルムの形成は、排水処理技術に利用される一方で医療器具の汚染や分離膜のバイオファウリングの原因となるなど、様々な分野で重要な現象である。バイオフィルム形成は主に細胞外多糖の分泌によって促進されるが、表面への最初のアプローチである初期付着は細菌表層に提示されたアドヘシンと総称されるタンパク質によって起こる。初期付着はアドヘシンによる表面接着と細胞のブラウン運動による表面からの脱離が競合する可逆的な付着過程であるとされる。初期付着はバイオフィルム形成全体を左右する重要な過程であるが、どのようなパラメータが初期付着を支配するかは十分に明らかになっていない。
Acinetobacter 属細菌 Tol 5 株は表層のファイバー状アドヘシン AtaA を介し、卓越した初期付着能を示すことが報告されている。細胞外マトリクスの分泌を抑制した休止状態において、様々な表面に対してわずか数秒のうちに付着を達成することができる。これは、本来可逆的であるとされる初期付着過程を不可逆にするほど、AtaA が Tol 5 細胞に強力な接着力を与えていることを示唆している。しかしながら、Tol 5 及び AtaA の接着力の強さは定量可能な物理量で調べられていない。本研究では、高い初期付着能を示す Tol 5 及び AtaA の接着力を原子間力顕微鏡（AFM）を用いて定量的に測定した。
共有結合によってガラス表面に固定化した Tol 5 の細胞表面上を様々なプローブを用いて走査したところ、Tol 5 は、同じグラム陰性細菌である大腸菌や、接着性が報告されている *Bartonella henselae* と比較してはるかに高い細胞接着力を示した。さらに AtaA 単分子の接着力を調べたところ、既報の細菌アドヘシンよりも倍以上高い接着力を示した。

The adhesion force measurement of sticky bacteria and their cell surface proteins using atomic force microscopy

○Satoshi Ishii, Shogo Yoshimoto, Katsutoshi Hori
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words adhesion, autotransporter, atomic force microscopy, bacterial adhesion

1Fp14 ニホンカブトムシ *Trypoxylus dichotomus* 上翅のプロテオーム解析

○村田 智志 [1], Rivera Jesus [2], Kisailus David [2], 新垣 篤史 [1]
（[1]農工大院・工, [2]Dept. Chem. Environ. Eng., Univ. California at Riverside, U.S.A.）
arakakia@cc.tuat.ac.jp

甲虫表皮は主にキチンと表皮タンパク質で構成されており、部位によって強度や特性が異なるなど幅広い機械的特性を持っている。体の外側に存在し、外敵から身を守り飛行時には翼として使用される上翅は、軽量かつ高い強度を持つことから、生体を模倣した新素材開発への応用が期待されており、その形成機構の解明が求められている。モデル甲虫であるコクヌストモドキの上翅を用いた先行研究において、数種類のキチン結合モチーフを持つ表皮タンパク質が同定され、機能解析がなされている。その中で、キチンナノ繊維のアッセンブリに関与するタンパク質や、キチン分解の阻害によって表皮形成過程に関わるタンパク質の存在が明らかになっている。しかし、上翅に存在するタンパク質の全体像は明らかにされておらず、その詳細な形成機構は未だ解明されていない。本研究では、個体が大きく扱いが容易なニホンカブトムシを用いて、上翅に存在するタンパク質を網羅的に解析することを目的とした。ニホンカブトムシ上翅は羽化直後から時間経過とともに硬化していく特性を持つ。そこで、各成熟段階の上翅からタンパク質を抽出し SDS-PAGE を行った。その結果、硬化に伴い、上翅中のタンパク質のプロファイルが変化することが明らかとなった。次に、羽化直後の未成熟上翅と羽化後 8 日以上経過した成熟上翅に存在する表皮タンパク質を抽出し、質量分析計を用いて同定した。未成熟上翅・成熟上翅それぞれから特異的な表皮タンパク質が同定され、キチン結合モチーフを持つ表皮タンパク質が複数確認された。本研究では、これらの表皮タンパク質の上翅硬化過程における機能及び局在についての考察を行った。

Proteome analysis of elytra from Japanese rhinoceros beetle, *Trypoxylus dichotomus*

○Satoshi Murata[1], Jesus Rivera[2], David Kisailus[2], Atsushi Arakaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Dept. Chem. Environ. Eng., Univ. California at Riverside, U.S.A.)

Key words beetle, proteomics, cuticular proteins, chitin

1Fp15 VHH 抗体提示型分子認識素子を用いた AuNP のワンステップ機能化

○池田 湧, 石田 尚之, 今村 維克, 今中 洋行
（岡山大院・自科）
imanaka@okayama-u.ac.jp

【目的】
金ナノ粒子（AuNP）は LSPR（局在表面プラズモン共鳴）という特徴的な光学特性を有しており，サイズや溶媒中における分散・凝集の有無によってそれぞれ異なる色調を呈する．この性質を生かし，AuNP は体外診断薬や細胞内プローブなどバイオ，医学分野で幅広く利用されている．本研究では，AuNP の分散安定性を維持しつつ表面を生体分子で機能的に修飾する簡便な手法の開発を目的とし，固定化対象の分子認識素子の足場として超好熱菌由来の三量体タンパク質 CutA1，リガンド分子としてラクダ科動物由来の単ドメイン抗体である VHH 抗体 (VHHegfp)，そして独自に取得した金表面親和性ペプチドタグ (Au10-tag) を用い，分子デザインの可能性ならびに機能評価を行った．
【方法・結果】
まず，VHH 抗体を CutA1 に挿入する際のスペーサー長が発現に及ぼす影響を調べ，十分に可溶化が可能なスペーサー長を見出した．また，異なる様式の分子として VHHegfp を CutA1 に連結した素子の調製も進めた．続いて，CutA1 を足場としてデザインした各種 VHHegfp 提示型分子認識素子と AuNP 表面のブロッキング剤を兼ねた VHH 抗体非挿入の Au10-tag 連結 CutA1 を所定のモル濃度比で混合し，AuNP 表面へリガンドタンパク質を固定化した．各種 VHHegfp で修飾した AuNP の懸濁液に標的分子である緑色蛍光タンパク質 EGFP を添加し，蛍光強度の差異を指標に相互作用および機能的固定化の評価を行った結果，足場として CutA1 を用い，VHH 抗体を挿入あるいは連結することにより，低い固定化密度の場合においても相互作用量の顕著な増加がみられた．したがって Au10-tag と CutA1 を用いることで VHH 抗体の金ナノ粒子表面への機能的ワンステップ修飾が可能であることが示された．

Functionalization of AuNPs by one-step immobilization of VHH-displaying designer molecular recognition elements

○Yu Ikeda, Naoyuki Ishida, Koreyoshi Imamura, Hiroyuki Imanaka
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

Key words VHH, scaffold, molecular recognition, AuNP

1Fp16 Methodical investigations for the efficient purification of recombinant proteins from silkworm compounds

○Robert Minkner[1], Jian Xu[2], Holger Zagst[3], Imke Oltmann-Norden[3], Hermann Wätzig[3], Tatsuya Kato[1,2], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Inst. Medic. & Pharm. Chem., TU Braunschweig, Germany)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

We are using the silkworm *Bombyx mori* as a promising bioreactor for the production of recombinant proteins, instead of the widely used *Escherichia coli*-based expression system. The latter has relatively low production cost and is easily handled, yet post-translational modifications are limited, but the silkworm can produce foreign proteins with high expression level and post-translational modifications as well as insect cells do. However, it is difficult to purify recombinant proteins expressed in silkworm compared to cell culture systems. It is a challenge to purify expressed proteins from the silkworm compartments such as haemolymph and fat body. Up to date there is no systematically approach to purify recombinant proteins from the silkworm and mostly purifications are done with an affinity tag or with sucrose gradient centrifugations. Here, we purified mCherry from the haemolymph as a model recombinant protein aiming for development of up scalable methods. To reduce the amount of impurities before using chromatography, different kind of pre-treatments were investigated. The key point is a heat precipitation step with followed chromatography steps. After investigation of several chromatography methods, we decided for hydrophobic interaction, size exclusion and heparin affinity chromatography. The final purity and recovery were comparable to those of Strep-tag affinity purification. For further characterization the purified proteins were analysed using capillary electrophoresis.

Methodical investigations for the efficient purification of recombinant proteins from silkworm compounds

○Robert Minkner[1], Jian Xu[2], Holger Zagst[3], Imke Oltmann-Norden[3], Hermann Wätzig[3], Tatsuya Kato[1,2], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Inst. Medic. & Pharm. Chem., TU Braunschweig, Germany)

Key words Chomatogrphy, haemolymph, purification, silkwom

1Gp03 放線菌スクリーニング用固／液界面培養法

○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】現在、微生物が生産する生理活性物質として発見されている化合物の約3分の2は、放線菌による生産物である。放線菌は、特に抗生物質生産菌として天然物創業において重要視されており、多くのスクリーニングが行われてきた。しかし、従来のスクリーニング法による新規な抗生物質の発見例は、縮小する傾向にある。筆者らは最近、新規な二次代謝物生産システムとして、固／液界面培養法（S/L-IFC）を構築した。S/L-IFC では、寒天平板上に形成させた菌マットの上に疎水性有機溶媒を重層することで、菌が生産する疎水性二次代謝物を自動的に抽出することができる。そのため、従来の液体培養法とは異なる二次代謝物プロファイルを得ることができる。本研究では S/L-IFC による放線菌のスクリーニング法について、関連因子を標準化することで、プロトコルを構築することを目的とした。
【方法・結果】土壌から分離した放線菌の懸濁液を調整し、寒天平板上に植菌した。数日の前培養を通じて培地上に菌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 あるいは 0.65CS, 信越化学）を菌マット上に重層し、所定の日数静置培養を行った。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、溶存酸素等の各因子の標準化を図った。その結果、特に影響を与えた因子は、有機溶媒種と溶存酸素量であった。有機溶媒種では KF-96L-1CS を適用した場合、菌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にあった。シリコンオイルは、他の溶媒に比べて微生物毒性が低く、脱溶媒も容易なためスクリーニングに最適な溶媒であると考えられる。結論として、S/L-IFC は有用放線菌のスクリーニングに有効であることが示唆された。

Novel interfacial screening system of antibiotic-producing actinomycetes

○Kazuki Shiina[1], Shinobu Oda[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Kanazawa Inst. Technol., [2]Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words actinomycetes, antibiotics, secondary metabolite, interfacial culture

1Gp04 様々な分離源からのバクテリオシン生産菌の探索とその構造解析

○善藤 威史, 山城 圭輔, 桑原 美空, 野見山 泰成, 大橋 千紘, 園元 謙二
（九大院・農）
zendo@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】抗菌ペプチドであるバクテリオシンは、抗菌物質としての応用が期待され、とくに乳酸菌由来のものは安全性が高いと考えられる。その構造や性質は多様であり、種々のバクテリオシンを適材適所に用いることで、より高い効果が期待される。そこで、様々な分離源からバクテリオシン生産菌を探索し、バクテリオシンの構造決定を試みた。
【方法】野菜や花、土壌など約 30 種の試料を分離源とし、乳酸菌が生育しやすい条件で集積培養を行い、炭酸カルシウム含有 MRS 寒天培地上で乳酸菌様のコロニーを単離した。Spot-on-lawn 法などの抗菌活性試験によって分離株のバクテリオシン生産能およびその抗菌スペクトルを調べ、代表的な分離株を選抜し、16S rRNA 遺伝子配列によって菌種を同定した。特徴的な抗菌活性を示したものについては、逆相 HPLC 等で精製し、分子量およびアミノ酸配列を解析した。さらに必要に応じて、バクテリオシン遺伝子を解析し、その構造を推定した。
【結果と考察】様々な分離源から約 150 株の乳酸菌様分離株が得られ、20 株程度にバクテリオシン様の抗菌活性が認められ、選抜した 8 株は乳酸菌である *Lactococcus* 属や *Enterococcus* 属のほか、*Staphylococcus epidermidis* と同定された。*Lactococcus* 分離株のうち、3 株は nisin Z、lactococcin A、lacticin Q をそれぞれ生産し、1 株は garvieaecin Q、garvicin ML とともに新奇性の高いバクテリオシンを生産していた。*Enterococcus* の 3 株はバクテリオシンよりも大きな抗菌性タンパク質（クラス III バクテリオシン、バクテリオリシン）を生産していた。また、味噌から分離された *S. epidermidis* は nukacin ISK-1 を生産していた。

Screening and structural analysis of bacteriocins produced by new isolates from various sources

○Takeshi Zendo, Keisuke Yamashiro, Miku Kuwahara, Taisei Nomiyama, Chihiro Ohashi, Kenji Sonomoto
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words bacteriocin, lactic acid bacteria, antibacterial peptide, bacteriolysin

1Gp05 オリゴエステル分泌生産における種々アルコール化合物の添加効果

○水野 匠詞[1,3], 櫻井 徹生[1,3], 廣江 綾香[2,3], 田口 精一[2], 柘植 丈治[1,3]
（[1]東工大・物質理工, [2]東農大・生命科, [3]JST・MIRAI）
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

【背景・目的】現在、石油由来のプラスチックは身の回りの幅広い用途に利用されている。しかしながら、石油プラスチックは、焼却処分されると地球温暖化の原因となる二酸化炭素の濃度増加を生じ、環境中に流出するとマイクロプラスチックとなり海洋汚染を引き起こす。これらの問題を解決するために、植物資源から微生物により生合成でき、生分解性能をもつ微生物ポリエステルの研究が盛んに行われている。近年、ポリエステル生合成時にアルコール化合物を培地に添加すると、重合過程においてモノマーの代わりにアルコールが取込まれ、かつ、通常時に合成されるポリマーよりも低分子量化したオリゴエステルが菌体外に分泌されることが報告された（Utsunomia et al., *ACS Sustain Chem Eng*, 5, 2360, 2017）。本研究では、種々アルコール化合物の添加効果を検証することで、オリゴエステル生産量の向上を目的とした。
【実験】大腸菌 BW25113 株内で、モノマー供給酵素および重合酵素を発現させることで、オリゴエステルを分泌生産させた。炭素源にはグルコースを用いた。アルコールの添加効果は、ポリオールを中心に炭素鎖数 2～4 程度の化合物を調べた。培養上清中に分泌されたオリゴエステルは、溶媒を用いて回収し、NMR および ESI TOF-MS により構造解析を行った。
【結果・考察】種々アルコールの添加効果を調べた結果、アルコールの構造に依存してオリゴエステルの分泌量が大きく異なることが分かった。これは、各アルコールにおいて細胞内への取込効率や重合酵素による認識に差異があるためと考えられる。これらオリゴエステルは精製した後に構造解析に供し、添加したポリオールに対応したジオール末端構造を有することを確認した。よって、本研究で生産したオリゴエステルは、末端官能基を反応起点とすることで様々な材料の合成に利用することができる。

Effect of addition of various alcohols on fermentative production of oligoesters

○Shoji Mizuno[1,3], Tetsuo Sakurai[1,3], Ayaka Hiroe[2,3], Seiichi Taguchi[2], Takeharu Tsuge[1,3]
([1]Sch. Mater. Chem. Technol., Tokyo Tech, [2]Fac. Lif. sci., Tokyo Univ. Agric., [3]MIRAI, JST)

Key words polyhydroxyalkanoate, secretory production, oligoester, diol end group

1Gp06 *Acidomonas* 属酢酸菌のレアアースによるグリセロール生育抑制

宇都宮 大貴, 西江 百加, 堀田 靖人, 稗田 莉奈, ○阿野 嘉孝
（愛媛大院・農）
anoy@agr.ehime-u.ac.jp

【背景と目的】 細胞外酸化系が発達した酢酸菌では、グルコースなどの糖質は細胞外で酸化され、不完全酸化物を培地中に蓄積する。したがって、糖質は炭素源として細胞内に取り込まれず、他の細菌に比べ貧弱な生育を示す。酢酸菌にとって、グリセロールは生育を大幅に改善させる基質であり培養によく用いられてきた。ところが、我々は *Acidomonas* 属酢酸菌で、レアアースの一種 La^{3+}の存在下でグリセロール培地での生育が著しく抑制されることを見出した。近年、レアアースを要求するさまざまな“正”の微生物応答が報告されている中、これは“負”の応答と言える。本研究では、La^{3+}応答性のグリセロール生育抑制に着目し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法】 これまでに *Ac. methanolica* において、PQQ 依存性アルコール脱水素酵素（PQQ-ADH）がグリセロールの細胞外酸化に寄与していること、La^{3+}存在下で PQQ-ADH 活性が大きく低下すること、を見出している。そこで、グリセロール培地での生育と PQQ-ADH 活性の関係を考慮し PQQ-ADH 破壊株（*ΔadhA*）を作製し細胞応答を調査した。また、2 つの La^{3+}要求性酵素についても破壊株を作製し調査した。
【結果と考察】 野生株において、La^{3+}による生育阻害は 10 nM で十分であり、PQQ-ADH 活性が低下しているにもかかわらず反応生成物の蓄積が向上していた。*ΔadhA* 株においても生育抑制が観察されたことから、PQQ-ADH によるグリセロール酸化活性の低下が生育抑制の要因ではないと結論づけた。一方、La^{3+}要求性酵素の破壊株では生育抑制が解除され良好な生育が観察されたことから、これらの酵素が La^{3+}の検知にも機能していることが示唆された。

Growth inhibition on glycerol medium by the presence of rare-earth element in *Acidomonas methanolica*

Daiki Utsunomiya, Momoka Nishie, Yasuhito Horita, Rina Hieda, ○Yoshitaka Ano
(Grad. Sch. Agric., Ehime Univ.)

Key words acetic acid bacteria, lanthanides

1Gp07 「魔法の弾丸」アスコフランの全生合成経路の同定と高生産 ～アフリカ眠り病の根絶を目指して～

○荒木 康子 [1], 淡川 孝義 [2,3], 松崎 素道 [4,5,6], 趙 理海 [4], 松田 侑大 [2], 星野 翔太郎 [2], 篠原 靖智 [1], 山本 雅一 [7], 城戸 康年 [4,7,8], 稲岡 健ダニエル [4,5], 永宗 喜三郎 [6], 伊藤 考太郎 [1], 阿部 郁朗 [2,3], 北 潔 [4,5]
（[1]キッコーマン, [2]東大院・薬, [3]東大・CRIIM, [4]東大院・医, [5]長崎大・TMGH, [6]国立感染研, [7]ミトコンドリア研, [8]阪市大・医）
yaaraki@mail.kikkoman.co.jp

アスコフラノン(AF)は糸状菌 *Acremonium egyptiacum* から単離された２次代謝産物であり、これまでに抗炎症作用や脂質低下作用など様々な生理活性を有することが報告されている。その中でも、AF はアフリカ眠り病（動物ではナガナ病と呼ばれる）の病原体アフリカ型トリパノソーマの寄生時の呼吸に必須である TAO(trypanosome alternative oxidase)を強く阻害することから、抗寄生虫薬としての応用が期待されている。また、最近になって、AF がエキノコックス症や、低栄養・低酸素条件下で増殖するある種の癌細胞に対しても効果的であることが報告され、AF の大量生産系の構築が強く望まれている。
しかしながら、AF を工業的に大量生産するためには、*A. egyptiacum* は AF 生産量が低いこと、さらに、AF の類似化合物であり細胞毒性を有するアスコクロリン(AC)も同時に生産することが課題となっていた。そこで我々は、AF 生産量の異なる２つの培養条件下における発現差解析により、AF 及び AC の全生合成遺伝子を同定した。そして、AF と AC は途中までは同じ経路を経由して生合成された後、互いに離れた染色体位置にコードされている２つのテルペン環化酵素によって作り分けられていることを明らかにした。また、*A. egyptiacum* において AC のテルペン環化酵素をコードする遺伝子を破壊することで、AF のみを生産する株を取得することができた。さらに、AF の生合成において律速となっていた反応を強化することで AF の生産量を向上させることにも成功した。

Elucidating the complete biosynthetic pathway and improving productivity of ascofuranone ～aiming to eliminate sleeping sickness～

○Y Araki[1], T Awakawa[2,3], M Matsuzaki[4,5,6], R Cho[4], Y Matsuda[2], S Hoshino[2], Y Shinohara[1], M Yamamoto[7], Y Kido[4,7,8], D.K Inaoka[4,5], K Nagamune[6], K Ito[1], I Abe[2,3], K Kita[4,5]
([1]Kikkoman Corp., [2]Pharm. Sci., Univ. of Tokyo, [3]CRIIM, Univ. of Tokyo, [4]Medicine, Univ. of Tokyo, [5]Sch. of Tropical Medicine & Global Health, Nagasaki Univ., [6]Natl. Inst. of Infectious Diseases, [7]Inst. of Mitochondrial Science Co., Ltd., [8]Medicine, Osaka City Univ.)

Key words ascofuranone, African trypanosomiasis, secondary metabolism, ascochlorin

1Gp08 好熱菌発酵産物の施与による植物のシステミックな成長促進と防御応答の活性化がネコブセンチュウの感染被害に与える影響

○梅山 幸子 [1], 柳瀬 裕介 [1], 宮原 平 [1], 宮本 浩邦 [1,2,3], 児玉 浩明 [1]
（[1]千葉大院・園芸, [2]サーマス（株）, [3]理研IMS）
kodama@faculty.chiba-u.jp

未利用海産資源を好熱菌によって発酵させた好熱菌発酵産物（以下、Compost）は発酵菌叢が安定しており（JGAM, 2008）、当研究室では堆肥のモデルとして機能性を評価している。Compost は多くの農家で使用されており、作物の収量増加や病害軽減といった効果に加え、ネコブセンチュウ（RKN）による作物の被害が低減したという報告が寄せられている。RKN は、植物絶対寄生性で、農作物の収量低下を招く難防除性の害虫である。タバコを用いた実験においても、Compost を用いると RKN による根瘤形成が抑制されるとともに、植物体の重量が増加した。Compost は RKN の根への接近、侵入には影響を及ぼさないため、植物体の防御応答を高めていると考えられた。植物根圏―土壌微生物間では様々な相互作用が起こっており、Compost を施与した際の RKN による被害の軽減効果もまた、微生物が関与すると仮説を立てている。そこで、Compost を懸濁し、100 μm のメッシュでろ過した抽出液（compost extract; CE）施与区と、0.2 μm のポアサイズのフィルターで滅菌した Compost 抽出液（sterilized compost extract; SCE）施与区を比較し、植物体の生長や根瘤形成に与える影響を調べた。Control と比較すると CE 区で形成したネコブ数は約 40%にまで減少し、SCE 区では約 90%となった。根の重量は、Control と比較して、CE 区でのみ有意に増加した。このことから、CE に含まれる微生物が根瘤形成の抑制と植物根の成長促進に寄与していることが示された。さらに、root-split-system を用いた実験により、CE を施与することで植物のシステミックな防御応答が高まり、RKN による根瘤形成が抑制された。本研究では Compost による根の成長促進効果も Compost に含まれる微生物による植物側のシステミックな応答であるのか、さらにシステミックな応答に関わる遺伝子について検討したので報告する。

A thermophile-fermented compost systemically enhances the root growth and defense responses against the root-knot nematodes

○Yukiko Umeyama[1], Yusuke Yanase[1], Taira Miyahara[1], Hirokuni Miyamoto[1,2,3], Hiroaki Kodama[1]
([1]Grad. Sch. Horticul., Chiba Univ., [2]Sermas Corp., [3]Riken Center for Integr. Med. Sci.)

Key words compost, root-knot nematode, growth

1Gp09 異担子菌酵母 *Cryptococcus diffluens* の L-ガラクトン酸変換経路の解明

松原 健生, ○岸田 正夫
（阪府大院・生環科）
masyksd@biochem.osakafu-u.ac.jp

「目的」D-ガラクチュロン酸 (D-GalUA) はペクチンを構成するウロン酸化合物であり、我々は異担子菌酵母 *Cryptococcus diffluens* からこの D-GalUA を L-ガラクトン酸（L-GalA）に還元する D-ガラクチュロン酸還元酵素の単離に成功している。しかしながら、*C. diffluens* が L-GalA をさらに変換する代謝経路はまだ解明されておらず、今回はその代謝経路の解明のため、*C. diffluens* の持つ L-GalA 変換反応とその反応産物の解明を目的とした。
「方法と結果」*C. diffluens* OPU-FC11 株を D-GalUA 存在下で培養し、無細胞抽出液（Cell-free extract: CFE）を調製した。L-ガラクトノ-1, 4-ラクトンを開裂させて調製した L-GalA を *C. diffluens* 無細胞抽出液と反応させその反応産物を高性能陰イオン交換クロマトグラフィー（HPAEC）により解析し他ところ、L-GalA の減少に伴って増加する化合物のピークを検出した。この化合物の検出ピークはすでに報告された D-GalUA 代謝に関連する市販化合物のピークとは一致せず、新たな化合物を生産している可能性が示唆された。HPAEC により検出された新たなピークを示す化合物を分画精製し、MASS 解析を行った結果、得られた化合物の分子量は 177.06 であった。本化合物を、^{13}C-NMR 解析に供したところ、すでに報告例がある L-スレオ-3-デオキシヘキソウロソン酸（L-2-ケト-3-デオキシガラクトン酸）と類似のケミカルシフト値を示した。このことから酵母 *C. diffluens* においてデヒドラターゼ反応により L-GalA が L-スレオ-3-デオキシヘキソウロソン酸へと変換されることが示唆された。

Analysis for L-galacturonic acid exchange pathway in Basidiomycotic yeast *Cryptococcus diffluens*

Takeo Matsubara, ○Masao Kishida
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words yeast, L-galactonic acid, *Cryptococcus diffluens*

1Gp10 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるアグマチン産生機構の解明

○加藤 紗也[1], 赤坂 直紀[1], 五味 勝也[2], 福田 青郎[1], 藤原 伸介[1]
（[1]関西学院大院・理工, [2]東北大院・農）
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

アグマチン（Agm）は、アルギニン（Arg）の脱炭酸反応により生成する、ポリアミン生合成における中間代謝物である。近年の解析から、Agm はインスリン耐性や体重増加を緩和・抑制するなど、多岐に渡る生理活性機能を発揮することが示されている [(1)]。これより、Agm を著量含有する食品は、種々の健康増進作用を発揮することが期待される。清酒は Agm に富む事が知られており、先行研究によって清酒製造に関わる微生物である黄麹菌 *Aspergillus oryzae* RW1 株が主たる Agm 産生微生物であることが明らかにされた。さらに、固相培地特異的に Agm を産生し、低 pH 依存的に Agm 産生量が増大することがわかった。しかしながら、*A. oryzae* のタイプ株である RIB40 株のゲノム解析からは、Arg から Agm を産生するアルギニン脱炭酸酵素（ADC）遺伝子は見つかっておらず、Agm 産生の機構の詳細は不明であった。本研究では、*A. oryzae* のアグマチン産生機構の解明を目的とする。まず RIB40 株においても固相培地特異的かつ低 pH 依存的な Agm 産生が確認された。さらにアルギニン脱炭酸活性も検出された。そこで構造が類似するオルニチン（Orn）やリジン（Lys）を基質とする Orn 脱炭酸酵素（ODC）および Lys 脱炭酸酵素（LDC）に着目した。A. oryzae は、4 つの ODC オルソログおよび 2 つの LDC オルソログを有している [(2)]。これらの発現動態を RT-PCR にて確認したところ、固相培地で 1 種の LDC（LDC1）が発現していることが確認できた。そこで、LDC1 が ADC の機能を代替している可能性が高いと予測し、同遺伝子の転写量解析、および組換えタンパク質を用いた解析を行っている。

(1)Nissim., et al., J. Biol. Chem., 289:9710. (2014)
(2)Machida, M., et al., Nature., 438, 1157 (2005)

The mechanism of Agmatine production in *Aspergillus oryzae*

○Saya Kato[1], Naoki Akasaka[1], Katsuya Gomi[2], Wakao Fukuda[1], Shinsuke Fujiwara[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, agmatine, decarboxylase, rice syrup

1Gp11 GUS リポーター遺伝子を用いた単細胞性緑藻 *Coccomyxa* のプロモーター活性評価

大迫 香穂, ○笠井 由紀, 阿部 淳, 高木 さつき, 井出 曜子, 原山 重明
（中央大・理工）
ykasai@kc.chuo-u.ac.jp

我々は単細胞性緑藻 *Coccomyxa* 属の分子育種による油脂生産性の改良に取り組んでいる。*Coccomyxa* 属は窒素欠乏（－N）条件下で油脂を蓄積するので、油脂生産遺伝子を-N 条件下で高発現させるためのプロモーターの探索を行った。トランスクリプトーム解析から、多くの遺伝子の発現は－N 条件下で減少するが、アンモニアトランスポーター遺伝子（*AMT1*）は、－N 条件下でも高発現することが示された。*AMT1* プロモーター活性を定量的に測定するために、ゼオシン耐性遺伝子（*ble*）と β-glucuronidase 遺伝子（*GUS*）とを自己切断アミノ酸配列（2A）を介して結合したレポーター遺伝子カセットを、*AMT1* プロモーター（Ap）とターミネーター（At）との間、および *RBCS* プロモーター（Rp）とターミネーター（Rt）との間にそれぞれ挿入した発現コンストラクト（Ap_ble-2A-GUS_At および Rp_ble-2A-GUS_Rt）を作製した。これらの発現コンストラクトが導入された *Coccomyxa* 株で作られる Ble-2A-GUS ペプチドは、細胞質で Ble-2A と GUS とに切断され、Ble-2A は核に移行しゼオシン耐性（Zeo^r）を示す。このことから予想されるように、Rp_ble-2A-GUS_Rt 形質転換株では Zeo^r と GUS 活性とに相関が認められた。一方、Ap_ble-2A-GUS_At 形質転換株では、ゼオシン耐性を示しても GUS 活性は低かった。Real-time PCR で GUS mRNA の定量を行ったところ、Ap_ble-2A-GUS_At 形質転換株では GUS mRNA は 3’側から分解され易く、Rp_ble-2A-GUS_R 由来の GUS mRNA に比べ著しく不安定であった。この mRNA の不安定性が At に起因する可能性を検討中である。

The GUS-reporter-aided analysis of the *RBCS* and *AMT1* promoter activities in *Coccomyxa* under nitrogen-replete and-deplete conditions.

Kaho Osako, ○Yuki Kasai, Jun Abe, Satsuki Takagi, Yoko Ide, Shigeaki Harayama
(Fac. Sci. Eng., Chuo Univ.)

Key words *Coccomyxa*, ammonium transporter gene, promoter, GUS reporter gene

1Gp12 新規モデル生物を目指したミミズ形質転換技術の開発－hEPO 遺伝子導入法の検討－

○神田 直輝, 山谷 竜大, 町田 悠, 竹内 綾, 赤澤 真一
（長岡高専・物質工）
s-akazaw@nagaoka-ct.ac.jp

【目的】近年，遺伝子組換え生物を用いて治療薬を生産するバイオ医薬が注目されており，特に動植物個体を用いた生産法は高額な生産設備を必要としないため次世代型生産法として注目されている [1)]．そこで我々は，新規宿主としてミミズ *Eisenia fetida* 及び *Eisenia andrei* に注目し，異種遺伝子発現系の構築を目指してきた．両ミミズは経済協力開発機構（OECD）から生物毒性試験のモデル生物として認定されているため，本技術の進展により分子生物学的研究が加速化される事も期待される．これまでの研究で，切断した両ミミズ尾部への遺伝子導入に成功し，遺伝子導入に最適な培地及びエレクトロポレーション条件等を明らかにしてきた [2)]．しかしながら，糖タンパク質を含むヒトタンパク質の発現は未だ行っていない．そこで，本研究では形質転換効率向上条件をさらに検討すると共に腎性貧血のバイオ医薬品であり糖タンパク質である hEPO（human Erythropoietin）が発現可能か調査した．
【方法】マイクロシリンジやガラスキャピラリーを用いた遺伝子導入法を検討した．また，*E. andirei* 尾部を 24 h 培養した後，組織再生面に hEPO 遺伝子を導入した．遺伝子導入の確認は，EPO ELISA キットを用いて行った．
【結果】形質転換効率は 48%にまで向上した．また，*E. andrei* 尾部から hEPO の産生が検出され，人遺伝子の発現がミミズで可能である事が明らかとなった．
本研究は JSPS 科研費挑戦的萌芽研究（15K14713），基盤研究 C（17K07767）の助成を受けて実施された．

[1]赤澤真一. 古くて新しいミミズ研究. アグリバイオ. 北隆館. 2(11): 62-64 (2018).
[2]山谷竜大他．日本農芸化学会．2018 年 3 月．3A22a04.

Application of earthworm transformation method as a novel model organism development -Investigation of hEPO gene injection method-

○Naoki Kanda, Tatsuhiro Yamaya, Yu Machida, Aya Takeuchi, Sin-ichi Akazawa
(Dept. Material Eng., Natl. Inst. Technol., Nagaoka Coll.)

Key words Biological medicine, Earthworm, Transformation, *Eisenia sp.*

1Gp13 グルコースによる麹菌アミラーゼ生産抑制におけるグルコキナーゼの関与

○田中 瑞己[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

麹菌のアミラーゼ遺伝子の発現はマルトースにより誘導されるが、グルコースが存在するとカーボンカタボライト抑制により強く抑制される。また、細胞膜上のマルトーストランスポーター (MalP) は、グルコースが存在するとエンドサイトーシス依存的に液胞に輸送されて分解される。我々は最近、カーボンカタボライト抑制を制御する転写因子 CreA が、アミラーゼ生産条件では核内から細胞質に排出されて分解されることを明らかにした。出芽酵母においては、カーボンカタボライト抑制を制御する Mig1 の細胞内局在が、ヘキソキナーゼによって制御されることが報告されている。本研究では、グルコース存在時における麹菌のアミラーゼ生産抑制におけるヘキソキナーゼ (HxkA) とグルコキナーゼ (GlkA) の関与について解析した。
麹菌の *hxkA* 破壊株と *glkA* 破壊株を作成した結果、*hxkA* の破壊により分生子形成が著しく抑制されたのに対し、*glkA* 破壊による生育への影響は見られなかった。グルコース混合デンプン培地におけるハロー形成能を比較した結果、いずれの破壊株も野生株より明瞭なハローを形成し、*glkA* 破壊株はより大きなハローを形成した。細胞内の CreA 存在量を調べた結果、*glkA* 破壊株ではグルコース存在条件における CreA 量が野生株および *hxkA* 破壊株と比較して著しく減少していた。また、GFP 融合 MalP の分解を調べた結果、*glkA* 破壊株においてグルコース添加後の GFP-MalP タンパク質の分解が顕著に抑制されていた。さらに、MalP のグルコース誘導性エンドサイトーシスに必要なアレスチン様タンパク質 CreD はグルコースの存在により速やかに脱リン酸化されるが、*glkA* 破壊株では CreD の脱リン酸化が顕著に抑制された。以上の結果から、麹菌におけるグルコースによるアミラーゼ生産抑制においては、GlkA が重要であることが示唆された。

Involvement of glucokinase in glucose-induced repression of amylolytic enzymes production in *Aspergillus oryzae*.

○Mizuki Tanaka[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*, gene expression, transcriptional regulation, transporter

1Gp14 *Aspergillus aculeatus* における ManR を介した選択的遺伝子発現制御に関わる転写因子の探索

○角谷 朝香, 炭谷 順一, 谷 修治, 川口 剛司
（阪府大院・生環科）
shuji@biochem.osakafu-u.ac.jp

【背景と目的】*Aspergillus aculeatus* のセルロース、ガラクトマンナンに応答したセルラーゼ遺伝子 (*cel7b*, *cbhI*)、マンナン分解酵素遺伝子 (*manG*, *mndD*) の発現は正の転写因子 ManR によって制御されている。ガラクトース資化に関わる UDP-glucose 4-epimerase 遺伝子 (*uge5*) 欠損株において、*manG*, *mndD* のガラクトマンナンに応答した発現量は変化がなかったが *cel7b*, *cbhI* のセルロースに応答した遺伝子発現量は減少した。この Uge5 が直接/間接的に関わる ManR を介した選択的遺伝子発現制御機構を解明することを目的とし、本制御に関わる転写因子を探索した。【方法】ガラクトース資化に関わる転写因子 GalX に着目し、*Aspergillus nidulans* GalX のオルソログ遺伝子破壊株（*A. aculeatus* Δ*galX* ）を作出した。コントロール株 (MR12) と Δ*galX* を誘導条件下（1% Avicel、或いは 1% locust bean gum）または非誘導条件下（0.1% Bacto Tryptone）で 4 h、6 h 培養した際の *cbhI*, *cel7b*, *manG*, *mndD* の発現量を qRT-PCR 法により定量した。【結果と考察】Avicel 誘導条件下では *cbhI*, *cel7b* の誘導率のみが *galX* 破壊により 1/3 まで減少した。一方、locust bean gum 誘導条件下では各遺伝子の誘導率が *galX* 破壊により 150 倍以上増加した。以上より、ManR を介した選択的遺伝子発現制御に GalX が直接あるは間接的に関与していることが示された。

Screening for a transcription factor involved in ManR-dependent selective gene expression in *Aspergillus aculeatus*

○Asaka Kakutani, Jun-ichi Sumitani, Shuji Tani, Takashi Kawaguchi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words cellulase, gene expression analysis, enzyme production, biomass

1Gp15 代謝産物解析と遺伝子解析によるクエン酸生産糸状菌のカビ毒非生産性の検証

○大越 佳乃[1], 吉岡 育哲[1], 中川 博之[2], 桐村 光太郎[1]
（[1]早大・先進理工, [2]農研機構・食品）
kkohtaro@waseda.jp

【目的】
クエン酸は *Aspergillus niger* によって工業的に発酵生産されており、食品や飲料の酸味料、工業用薬品として使用されている。しかし、一部の *Aspergillus* Section *Nigri* に属する菌株にはカビ毒生産性が見られ、安全性が懸念されている[1]。クエン酸生産糸状菌 WU-2223L 株[2] は *A. tubingensis* に再同定されたが (未発表)、*A. niger* と同様 Section *Nigri* に属する。本研究では、代謝産物解析と遺伝子解析の両面から WU-2223L 株のカビ毒非生産性を示し、クエン酸生産糸状菌としての安全性について検証した。

【方法および結果】
Aspergillus 糸状菌により生産される可能性があるカビ毒としては、アフラトキシン、フモニシン、オクラトキシン、パツリンがある。そこで、培地組成を含めて数種の培養条件を設定し、培養液について代謝産物解析を行った。WU-2223L 株の培養液についての LC-MS 分析では、各カビ毒は検出限界未満であった。さらに、PCR を利用して各カビ毒の生合成遺伝子クラスターが存在するかどうかを検証した。すなわち、既報にある各カビ毒生産菌と非生産菌のゲノム情報を利用して、各カビ毒の生合成クラスター遺伝子あるいはその近傍の保存された遺伝子座間を PCR で増幅可能かどうかを検討した。*A. tubingensis* WU-2223L においては検討したカビ毒の生合成遺伝子クラスターについて欠失が認められ、カビ毒非生産性であることを明らかにした。以上より、代謝産物解析と遺伝子解析より、*A. tubingensis* WU-2223L はカビ毒非生産性で安全性の高いクエン酸生産糸状菌であることを明らかにした。

[1] Susca, A., et al., Frontiers in Microbiol., 282, 1-15 (2016).
[2] Kirimura, K., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 83, in press (2019).

Evidences for Mycotoxin Non-Production by a Citric Acid-Producing Filamentous Fungus Based on Metabolite and Genetic Analyses

○Kano Okoshi[1], Isato Yoshioka[1], Hiroyuki Nakagawa[2], Kohtaro Kirimura[1]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]NFRI)

Key words *Aspergillus tubingensis*, biosynthetic gene cluster, LC-MS analysis, mycotoxin

1Gp16 クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L における CRISPR/Cas9 システムを用いたハイスループット遺伝子ノックアウト法の構築

○吉岡 育哲, 脇本 紗梨, 桐村 光太郎
（早大・先進理工）
kkohtaro@waseda.jp

【目的】
クエン酸は糸状菌 *Aspergillus niger* を用いた工業的発酵により生産されている。演者らは、100 g/L を超えるグルコースから高収量（>50% (w/w)）でクエン酸を生産する WU-2223L 株を供試菌として研究を進めている [1]。供試菌はゲノム解析により *A. tubingensis*（以前は *A. niger*）と再同定された。一方、糸状菌の育種では、遺伝子ノックアウト効率が低いことや選択マーカーが限定されることが課題となることが多い。そこで、演者らはゲノム編集ツールとしての CRISPR/Cas9 システムを利用し、WU-2223L 株におけるハイスループット遺伝子ノックアウト法を構築した。
【方法および結果】
演者らは、*A. tubingeisis* WU-2223L の推定 U6snRNA 配列をクローニングし、オリゴヌクレオチドを任意のプロトスペーサー配列として挿入可能な gRNA 発現カセットを構築した。また、ATP-sulfurylase をコードする *sC* 遺伝子をターゲットとして設計した gRNA 発現カセットを DNA の状態で Cas9 タンパクと共形質転換し、セレン酸耐性株を取得した。取得したセレン酸耐性株については、*sC* 遺伝子のプロトスペーサー配列の周辺に Indel 変異を確認した。さらに、マイクロホモロジー媒介末端結合を利用してハイスループット遺伝子ノックアウト法を確立した。具体的には、*sC* 遺伝子の推定 Cas9 切断部位と相同な 15 bp の配列を付加したピリチアミン（PT）耐性遺伝子（*ptrA*）をノックインドナーとして用いて形質転換株を PT 耐性を指標に選択し、セレン酸含有培地上で 3 回継代培養した。無作為に選択した 30 個の PT 耐性株では、すべて *sC* 遺伝子がノックアウトされていた。以上より、演者らは CRISPR/Cas9 システムを用いたハイスループット遺伝子ノックアウト法の構築に成功した。

[1] Kirimura, K., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 83, in press (2019).
(DOI: 10.1080/09168451.2019.1574205) 他

High-throughput gene knockout method for citric acid produicing *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L by CRISPR/Cas9 system

○Isato Yoshioka, Sari Wakimoto, Kohtaro Kirimura
(Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, citric acid, CRISPR/Cas9 system

1Gp17 好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* による物質生産

○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・工, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]長瀬産業）
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

近年環境汚染が懸念されているため、本研究では微生物を用いた環境に優しい物質生産法を開発している。微生物の中でも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、それらを工業生産する宿主としても着目されている。しかし、培養温度が常温付近のものが多く、雑菌繁殖や、発酵熱の冷却コストが課題である。それらを解決すべく本研究では、好熱性放線菌の一種である *Streptomyces thermoviolaceus* (*S. thermoviolaceus*) に着目した。*S. thermoviolaceus* は先行研究が極めて少ないため、本研究では基礎研究の培養特性解析から行い、それらの結果を踏まえて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、*S. thermoviolaceus* の増殖速度を、研究対象としてよく用いられる放線菌 *Streptomyces lividans* や *Streptomyces albu* と比較した。その結果、*S. thermoviolaceus* は増殖速度が速いという物質生産に有利な特徴が確認できた。さらに、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、スクロースを資化することを確認した。その後、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。
以上の結果を基に、外来遺伝子導入による物質生産を目指した。目的物質には 3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸(3,4-AHBA) を選択した。3,4-AHBA は高強度、難溶性のプラスチックの原料で、現在は石油資源から化学プロセスで合成されている。バイオプロセスで合成することで、資源の枯渇化や多段階のプロセスによる高コストの改善が期待できる。本研究では、*Streptomyces murayamaensis* 由来の *nsp*I, *nsp*H の 2 つの遺伝子を導入することで、3,4-AHBA の生産に成功し、*S. thermoviolaceus* で初の外来遺伝子導入による物質生産を確認することができた。</i>

Substance production by thermophilic actinomycete, *Streptomyces thermoviolaceus*

○Emi Mihara[1], Musashi Takenaka[2], Norimasa Kashiwagi[2], Masahiro Sota[3], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondou[2]
([1]Fac. Eng., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Nagase & Co., Ltd)

Key words *Streptomyces*, Thermophilic actinomycetes, *Streptomyces thermoviolaceus*

1Gp18 CRISPR-Cas9 システムによるオーランチオキトリウム属の生産脂質の改質

○北堀 智希[1], 渡邉 研志[1], 青井 真人[1], 畑 浩介[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・統合生命科学, [2]長瀬産業, [3]出光興産）
aki@hiroshima-u.ac.jp

【背景・目的】海洋性の真核微生物ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* 属は高度不飽和脂肪酸や長鎖脂肪酸、炭化水素、カロテノイドなど様々な分野で需要の高い脂質を細胞内に蓄積する。また、増殖性も高いため、各脂質の効率的生産への利用が期待される。当研究室では独自に開発した相同組換え法で本微生物の脂質生合成機構解明や脂質生産性の向上を試みてきたが、新たにゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 による遺伝子ノックアウト及びノックインを試みた。
【方法・結果】カロテノイド高生産性でコロニーが赤橙色を呈する *Aurantiochytrium* sp. RH-7A 株に Cas9 ヌクレアーゼ遺伝子発現プラスミドを導入した RH-7A-CH 株に対して、β-カロテン合成酵素遺伝子 *crtIBY* を標的とする guide RNA（gRNA）を導入してノックアウトを試みた結果、コロニーの色が白く変化した Wc1、Wc2 および Wc4 株を取得した。また、*in vitro* で形成した gRNA-Cas9 複合体（RNP）を RH-7A 株に導入した結果、白色の Wc3 株を取得した。これらの株の *crtIBY* の塩基配列を解析した結果、Cas9 による標的部位の二重鎖切断に由来する非相同末端連結やヌクレアーゼによる塩基の欠失が生じたことが示唆され、本システムによる *crtIBY* のノックアウトに成功した。さらに、ゼオシン耐性遺伝子発現カセットを *crtIBY* 上の二重鎖切断導入部位付近の相同領域で挟んだドナー DNA を作成し、RNP とともに RH-7A 株へ導入した結果、ノックインで生じたと思われる白色コロニーとゼオシン耐性を示す株を単離した。現在、この株の解析を進めるとともに、各脂質生産性向上のための育種に CRISPR-Cas9 の適用を試みている。

Modification of lipid product of *Aurantiochytrium* sp. using CRISPR-Cas9 system

○Tomoki Kitahori[1], Kenshi Watanabe[1], Masato Aoi[1], Kosuke Hata[1], Hirokazu Takahashi[1], Yoshiko Okamura[1], Keisuke Matsuyama[2], Shinzo Mayuzumi[3], Tsunehiro Aki[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]NAGASE & CO., LTD., [3]Idemitsu Kosan Co., Ltd.)

Key words *Aurantiochytrium* sp., genome editing, carotenoid

1Hp01 固体培地上でコロニーを形成しない微生物の選択的獲得：未培養微生物への効率的アクセス

○馬場 啓彰, Jung Dawoon, 加藤 節, 中島田 豊, 青井 議輝
（広島大院・統合生命科学）
yoshiteruaoi@hiroshima-u.ac.jp

【背景と目的】環境中に存在する微生物のほとんどは未培養であり、多くの微生物は従来法では培養困難（できない）ことが広く知られている。これら未知微生物にアクセスすることは有用微生物資源の利用や環境微生物の理解の上で必要不可欠であるが、これまでに従来法に替わる新規な分離培養手法の開発には大きな発展がない。一方で、環境中から微生物を分離培養する際には、寒天など固体培地上でコロニーを形成させて分離する方法が一般的である。したがって、固体培地上でコロニーを形成できない微生物の多くは未だ分離されたことのない未培養微生物である可能性が高い。そこで本研究では、固体培地上でコロニーを形成しない微生物を選択的に分離培養可能な手法を確立すること、未培養微生物の獲得という観点において同アプローチの有効性を明らかにすることを目的とした。
【方法】コロニー形成をしない微生物の選択的獲得法は、液体培地で増殖した菌株のうち寒天平板培地上で増殖しない微生物のみ選択するというスクリーニングを鍵とする手法である。本研究では、本手法以外に、寒天平板培養、in situ 培養（実環境中での培養）、および in situ 培養と本手法を組み合わせた各方法を同時に行い、得られた分離株の多様性および新規性について比較評価した。また各手法で得られた分離株の増殖特性を比較評価した。
【結果と考察】新規手法により、実際にコロニーを形成しない微生物を選択的に獲得することが可能であることが示された。また、本手法を通じて獲得した分離株の多くは新規性の高い未培養微生物であり、従来法（寒天平板培養）に比べて新規性の高い分離株の獲得効率が顕著に高かった。またコロニーを形成しない微生物の多くは自身の代謝（副）産物により増殖が阻害されやすいという特性を持っていることが示唆された。

A new method for selective isolation of microbial types unable to form colonies on the solid medium: accessing to previously uncultivated microorganisms

○Hiroaki Baba, Dawoon Jung, Setsu Kato, Yutaka Nakashimada, Yoshiteru Aoi
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words uncultured bacteria, microbial cultivation, liquid medium

1Hp02 微生物間相互作用の促進は増殖の開始を誘導する：難培養性微生物の獲得に向けた新しいアプローチ

○杉山 周[1], Eun Young[1], 鈴木 陸太[1], 加藤 節[1], 中島田 豊[1], 大橋 晶良[2], 金田一 智規[2], 青井 議輝[1]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]広島大院・工・四類）
m183861@hiroshima-u.ac.jp

【目的】地球上に存在する膨大な種類の微生物のほとんどは培養できない（培養困難）ことが知られている。また、難培養性微生物は「なぜ従来の培養法では培養困難なのか」という理由も解明されていない。もし、難培養性の原因の一端を明らかにして培養可能な微生物種を大幅に拡大することができれば、学術的および産業的な波及効果は極めて大きい。しかし従来法に替わる画期的な分離培養手法の開発にはほとんど進展がないといっても過言ではない。そこで本研究では、微生物間の相互作用が休眠状態の微生物を覚醒させる可能性に着目し、培養開始初期から超高菌体密度を実現する新規培養手法を開発した。また本手法の開発を通じて未培養微生物の未知なる増殖制御機構を明らかにしつつ、未培養微生物へのアクセス方法を確立することを目的とした。
【方法及び結果】本研究で提案する新規分離培養手法（ゲル微粒子凝集培養）は多数の直径 10-30μm のゲル微粒子(GMD)に細胞を 1 つずつ封入し、それを油相中で凝集させてそのまま培養する方法である。これにより「各々のクローンは培養期間中分離状態を保つ条件で、従来法の 1 万倍以上の初期植菌密度」を実現する。本研究では、様々な環境サンプルを用いてゲル微粒子凝集培養を行った結果、従来法とは異なる微生物種が獲得可能であること、未培養微生物の獲得に有効であることが示唆された。また、得られた分離株を用いて増殖特性の評価を行ったところ、異種間・同種間の相互作用により増殖の開始が誘導される現象が確認されたため、自然環境中では、複雑な微生物間相互作用により各々の微生物の増殖が制御されている「増殖制御ネットワーク」が形成されている可能性が示唆された。

Promotion microbial interactions induces the onset of growth: a new approach towards the acquisition of uncultivable microorganisms

○Shu Sugiyama[1], Young Eun[1], Rikuta Suzuki[1], Sestu Katou[1], Yutaka Nakashimada[1], Akiyoshi Ohashi[2], Tomonori Kindaichi[2], Yoshiteru Aoi[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Eng.Hiroshima)

Key words uncultured bacteria, microbial interaction

1Hp03 新規回転振盪培養機構による微生物培養について

○小林 由衣乃[1], 川村 奈々[2], 竹園 恵[1], 中島 敏明[3], 茂野 俊也[4], 小野寺 正幸[1]
（[1]新潟工大院・工・生産開発工, [2](株)プリス, [3]筑波大院・生命環境, [4]つくば環微研）
onodera@acb.niit.ac.jp

微生物培養において三角フラスコを用いた回転振盪が広く用いられている。我々は、使用済み天ぷら油に代表される廃食用油の有効活用として、廃食用油を炭素源（C 源）に、安価な窒素源（N 源）と無機塩の添加により微生物を培養し、その菌体を家畜並びに養魚用飼料とすることを目指しており、油脂資化性酵母 *Meyerozyma guilliermondii* TY-89（TY-89）を用いて植物油を C 源に回転振盪培養を行っている。そのような中で、非水溶性の食用油の微細化は菌体の生育に有効であり、微細化促進の為にバッフル付き三角フラスコでの回転振盪培養が有効であること明らかにした。しかし、バッフル付き三角フラスコは通常のものよりも洗浄が困難、価格も高価であり、通常の三角フラスコでの培養が望ましいと考えられる。そこで回転振盪に反転を伴わせ、反転時に急激な流れの変化を起こすことで液体培地表面の乱れが増大し非水溶性 C 源を微細化させることが可能であると考え、通常の三角フラスコでもバッフル付きのものと同等の生育が得られるものと期待した。C 源として市販の植物油 10g/L、N 源として硫安 2g/L、その他無機塩からなる無機塩培地とし 500ml 容三角フラスコ（培地量 100ml）で、30℃、120rpm で TY-89 の回転振盪培養を行った。時計方向から反時計方向、反時計方向から時計方向に回転している時間を反転時間と定め、反転時間を 3 秒間～30 秒間として検討を行った。反転時間が 3 秒間の場合、通常の三角フラスコを用いてもバッフル付き三角フラスコでの従来の条件で培養した場合と同程度の生育挙動を認めた。また、反転時間を 30 秒間とした場合でも、バッフル付き三角フラスコでの一方向回転振盪を行った場合と同程度であった。以上、反転を伴う回転振盪は、微生物培養に有効であることを認めた。
本研究は、新潟工科大学 風・流体工学研究センターの研究課題として行われた。

Cultivation of microorganisms using a novel rotary shaking mechanism

○Yukino Kobayashi[1], Nana Kawamura[2], Satoshi Takesono[1], Toshiaki Nakajima[3], Toshiya Shigeno[4], Masayuki Onodera[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Niigata Inst. Technol., [2]PRECi Co., Ltd., [3]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [4]Lab. Tsukuba Env. Microb.)

Key words *Meyerozyma guilliermondii* TY-89, rotary shaking, yeast, waste

1Hp04 Water-in-oil ドロップレットを用いた腸内細菌培養手法の開発

○村山 周平[1,2], 大田 悠里[2,3], 斉藤 加奈子[2,3], 松倉 智子[2],
森田 雅宗[2], 関口 勇地[2], 常田 聡[3], 野田 尚宏[1,2,3]
（[1]東大院・新領域, [2]産総研・バイオメディカル, [3]早大院・先進理工）
noda-naohiro@aist.go.jp

【背景と目的】腸内細菌と疾患の関連性を解明するためにはメタゲノム解析のみならず、腸内細菌の分離培養も重要である。Water-in-oil ドロップレット培養法は油中に分散した微小水滴内に細胞を封入して培養する手法である。ドロップレットは短時間で大量に作製可能な上、区画化されているため、競合に弱い腸内細菌のハイスループット培養が可能になると考えた。腸内細菌の多くは嫌気性細菌であり、ドロップレットを用いた腸内細菌の嫌気培養例は報告されていない。本研究では、ドロップレットを用いた新規嫌気培養法の確立およびそれによる腸内細菌の培養を行った。
【方法】ドロップレットが嫌気環境であるか確認するために、酸素濃度に応じて蛍光寿命が変化する酸素感受性ナノプローブを分散させた培地を水相に、界面活性剤を含むフッ素オイルを油相に、直径約 130 μm のドロップレットを作製した。N_2/CO_2 (80:20) 混合ガスで置換したフッ素オイルが入ったバイアル瓶に作製したドロップレットを封入し、ドロップレットの蛍光を測定することでドロップレット内酸素濃度を算出した。次に、*Lactobacillus acidophilus* を封入したドロップレットを作製し、ガス置換したバイアル瓶に封入し、37℃で培養を行い、顕微鏡観察で細胞の増殖を確認した。
【結果】酸素感受性ナノプローブと *L. acidophilus* を封入したドロップレットは共に、バイアル瓶封入前後で形状の変化はほとんど確認されなかった。ガス置換したバイアル瓶中のドロップレット内酸素濃度は飽和溶存酸素濃度の 20%程度だった。*L. acidophilus* を封入したドロップレットでは細胞の増殖が観察された。これらの結果は腸内細菌培養への可能性を示唆していると考え、今後は本手法の複合サンプルへの適用を試みる。

Development of a culture method for gut microbes using water-in-oil droplets

○Shuuhei Murayama[1,2], Yuri Ota[2,3], Kanako Saito[2,3], Satoko Matsukura[2],
Masamune Morita[2], Yuji Sekiguchi[2], Satoshi Tsuneda[3], Naohiro Noda[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Frontier Sci., Univ of Tokyo, [2]Biomed. Res. Inst., AIST, [3]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words droplet microfluidics, , gut microbes, anaerobic, bacterial cultivation

1Hp05 RNase 活性を指標とした微生物増殖 water-in-oil ドロップレットの検出法 “FNAP-sort” の確立

○大田 悠里[1,2], 斉藤 加奈子[1,2], 髙木 妙子[2], 松倉 智子[2],
森田 雅宗[2], 常田 聡[1,2], 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・目的】近年，droplet microfluidics technology は，シングルセル解析，酵素スクリーニング，細胞培養など様々な用途で利用されている。マイクロ流路により water-in-oil ドロップレットを数十万単位で作製し，セルソーターを用いて高速かつ大量にドロップレットを解析できる特徴を活かし，本研究ではドロップレット内で微生物培養を行った。従来，ドロップレット内の微生物の増殖の検出には細胞生存マーカーである蛍光分子レゾルフィンが使用されてきたが，レゾルフィンはドロップレット間を移動するため，数時間経過すると細胞が増殖したドロップレットと空ドロップレットを区別できなくなる問題があった。そこで，長期的に微生物増殖ドロップレットを検出することを目的として，細胞が持つ RNase 活性を指標とした Fluorescent nucleic acid probe in droplets for bacterial sorting (FNAP-sort)を開発した(Ota *et al*., *PLOS One*, 2019)。【方法】純菌株として大腸菌と根粒菌，複合微生物系として土壌微生物を，それぞれ蛍光 RNA プローブと共に 1 nL のドロップレットに封入した。ドロップレット内で培養を行い，顕微鏡観察およびフローサイトメトリーにより蛍光強度を評価し，セルソーターを用いて蛍光強度に基づくドロップレットの分取を行った。【結果】純菌株を封入したドロップレットでは最長 7 日経過後も微生物増殖ドロップレットと空ドロップレットを蛍光に基づいて区別できた。土壌微生物を封入したドロップレットでは，蛍光強度の高いドロップレットを分取した結果，微生物増殖ドロップレットが濃縮され，RNase を指標とすることで微生物増殖ドロップレットの検出に成功した。

A detection method, named as "FNAP-sort", for droplets containing bacteria based on RNase activity

○Yuri Ota[1,2], Kanako Saito[1,2], Taeko Takagi[2], Satoko Matsukura[2],
Masamune Morita[2], Satoshi Tsuneda[1,2], Naohiro Noda[1,2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words bacteria, droplet microfluidics, RNase, FRET

1Hp06 エマルションドロップを用いた微生物の培養

○川島 万凜, 村井 雄大, 川本 智也, 金 相完, 久原 哲, 田代 康介
（九大院・生資環）
ktashiro@grt.kyushu-u.ac.jp

【背景】地球上には膨大な数の微生物が存在し、物質循環や発酵食品の製造など、我々は様々な面でその恩恵を受けている。しかし、単離・培養できる菌種はその 1%以下と考えられており、多くの微生物は未培養のままである。そこで、我々はエマルションドロップを用いた微生物の培養法を構築してきた。エマルションドロップとは界面活性剤を用いて油中に微細な水滴を封入させたものであり、各ドロップレットが個々の培養系として使用される。我々はドロップレット培養を用いて土壌環境微生物を培養し、菌叢の比較を行うことで、ドロップレット培養の特性を検討した。
【方法】Droplet Generator (On-Chip Biotechnologies)を用いてエマルションドロップを作製し、大腸菌や酵母などの菌株、及び土壌から採取した土壌細菌の培養を行った。一定期間培養後、DNA を抽出し、16SrDNA 領域を対象として次世代シーケンサーによって分析し、菌叢を解析した。
【結果・考察】ドロップレット培養と従来の培養法において DNA の増加量を比較すると、従来の培養法では 48 時間後に急激に増加したが、ドロップレット培養では 7 日間を通して緩やかに増加した。また、従来の培養法では菌叢が大きく変化していたが、ドロップレット培養においては土壌の菌叢が比較的保存されていることが分かった。それぞれの OTU 数を比較すると、ドロップレット培養は従来の方法の約 2 倍であり、今まで培養できなかった菌種も培養できる可能性が示唆された。また、異なる培地で培養したサンプルを比較すると、異なる菌種が増殖することが判明し、現在様々な培養条件において、ドロップレットで培養される菌叢の違いを検討している。

Culture of micro-organisms by emulsion droplet

○Marin Kawashima, Yuta Murai, Tomoya Kawamoto, Sangwan Kim,
Tetsu Kuhara, Kosuke Tashiro
(Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

Key words uncultured bacteria, environmental bacteria, emulsion

1Hp07 G-body 形成に関わる因子のスクリーニングを目的とした低酸素培養系の確立

○吉村 柚紀[1], 平山 伶奈[1], 大谷 優太[2], 内海 亮太郎[1], 三浦 夏子[1],
植田 充美[2], 片岡 道彦[1]
（[1]阪府大院・生環科, [2]京大院・農）
miura.natsuko@biochem.osakafu-u.ac.jp

【背景と目的】 細胞内におけるタンパク質集合体の形成は、生物において様々な環境の変化に適応するための新たな機構として注目を集めている。我々は以前の研究で、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞質内に散在する代謝酵素（主に解糖系酵素）が低酸素条件下で集合体を形成することを見出した（1)。この集合体は、近年 “Glycolytic body” または “G-body” と名付けられ、低酸素条件下における細胞の生存に重要であることが示唆された（2)。一方で、G-body 形成に必要な低酸素条件等の因子の解明は進んでいない。その理由として、従来の低酸素培養法では 1 サンプルあたりに要する培地量（100 ml）が多く、多数のサンプルを同時に扱うことが困難であるという問題があった。そこで本研究では、G-body 形成に関わる因子のスクリーニングを目的とした小容量低酸素培養系の確立を目指した。
【方法】小スケール低酸素培養を行い、酵母が細胞質内に G-body を形成できる条件を検討した。具体的には従来の 1/50 から 1/1000 の培地量で、市販の酸素吸収剤やマルチガスインキュベーターを用いた低酸素培養を行った。G-body を形成する細胞の割合は、顕微鏡画像の解析により算出した。さらに、G-body の形成を抑制する薬剤を用いて、新しく構築した低酸素培養法のスクリーニングへの利用を検討した。
【結果と考察】今回検討を行った低酸素培養法の全てで G-body の形成を確認できた。また、一部の薬剤を添加することにより G-body 形成が遅延することを新規な小容量低酸素培養系で確認できたことから、スクリーニングへの利用が可能であることが示唆された。

（1）Miura et al. 2013 Eukaryot. Cell.
（2）Jin et al. 2017 Cell Rep.

Establishment of hypoxic culture system for screening of factors in G-body formation

○Yuki Yoshimura[1], Reina Hirayama[1], Yuta Ohtani[2], Ryotaro Utsumi[1],
Natsuko Miura[1], Mitsuyoshi Ueda[2], Michihiko Kataoka[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words G-body, hypoxia, culture system, small scale

1Hp08 麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸完全分散変異株の液体培養における流体特性の解析

○市川 暉[1], 宮澤 拳[1], 吉見 啓[2], 古明地 敬介[1], 加藤 好一[3], 阿部 敬悦[1,2]
（[1]東北大院・農, [2]東北大・未来研, [3]佐竹化学機械工業）
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の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, 産業用糸状菌の麹菌において,菌糸接着因子を探索し、菌糸が全く塊を作らない菌糸完全分散株の作製に成功した 1)。これまでに菌糸完全分散株はジャー型発酵槽培養において野生株よりも高い酵素生産能と低培養液粘度を示すことが分かっている 2)。ところで，培養槽内の物理的作用や流体解析を行う手法として Computational Fluid Dynamics (CFD)シミュレーション（数値流体解析）がある。本研究では, 野生株と菌糸完全分散株のジャー型発酵槽を用いた培養と同一条件下での CFD シミュレーションを実施し，両株の培養槽内におけるフローパターン，流速分布，せん断応力分布を明らかにすることで，各々の特性を把握する。
【方法及び結果】培養には麹菌の野生株, 菌糸完全分散株それぞれに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用いた。佐竹化学機械工業(株)製 3 L 容ジャー型発酵槽に 1.5 L の培地を張り込み，30°C, 660 rpm, 60 時間培養を行った。培地中の分泌 CutL1 量は SDS-PAGE で定量評価した。その結果，CutL1 生産量はこれまでの結果が再現され，菌糸完全分散株で野生株に比べて高かった。次に，乱流モデルに Realizable k-e を用い CFD シミュレーション解析を行った。その結果，非ニュートン性の強い野生株の流動は，翼周りを中心としており培養槽上部まで培養液流動が形成されなかったが, 同じ非ニュートン性流体でも粘性が低い菌糸完全分散株では培養槽内全域に渡る流動を形成していた。現在，両株の酵素生産性と培養時の流動性の関係について解析中であり，その結果についても議論したい。

1)阿部ら, 特願 2017-91734
2)古明地ら, 2018 年度日本生物工学会 2Fa06

Computational fluid dynamics simulation of *Aspergillus oryzae* mutant of which hyphae fully disperse under liquid culture conditions.

○Hikaru Ichikawa[1], Ken Miyazawa[1], Akira Yoshimi[2], Keisuke Komeiji[1], Yoshikazu Kato[3], Keietsu Abe[1,2]
([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NICHe, Tohoku Univ., [3]Mixing Technol. Lab., Satake Chem. Equipment)

Key words *Aspergillus oryzae*, filamentous fungi, enzyme production, CFD simulation

1Hp09 大腸菌共培養に向けたリアクター制御プロセスの開発

○楠田 みのり, 戸谷 吉博, 清水 浩
（阪大院・情報）
shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】
微生物による有用物質の生産速度低下の原因の 1 つに、多数の遺伝子の過剰発現による代謝への負荷があげられる。その対策として、目的物質までの代謝経路を異なる株で分担し、それらを共培養することによって細胞当たりの負荷を軽減させるという方法がある。しかし、培養中に各株の菌体比が変動するという問題があり、最適な菌体比を維持するための培養プロセスの制御が必要である。本研究では、各菌株に異なる蛍光タンパク質を発現させることで細胞を区別し、菌体比を測定できると考えた。マイクロコンピューター Arduino Uno R3 (Arduino Holding) を用いて、リアルタイムで蛍光強度を計測できる装置を開発し、異なる蛍光タンパク質を発現する大腸菌の共培養において菌体比のモニタリングを目指した。
【方法・結果】
大腸菌 MG1655(DE3)株を宿主とし、*metB* もしくは *argH* 遺伝子を欠失したアミノ酸要求性株を構築した。次に、緑色蛍光タンパク質 (GFP) もしくは赤色蛍光タンパク質 (RFP) を発現させるためのプラスミドをメチオニン要求性株とアルギニン要求性株にそれぞれ導入し、met-GFP 株と arg-RFP 株を構築した。そして、Arduino Uno R3、LED 光源、光センサーを用いて、GFP および RFP の蛍光強度を測定するための装置を開発した。連続培養中に供給する培地のアミノ酸濃度を変化させながら met-GFP 株を単一培養し、蛍光強度を自作の装置でモニタリングした結果、アミノ酸濃度の変化に伴った蛍光の増減が確認された。同様に arg-RFP 株の単一培養を行った結果、アミノ酸濃度が増加した際に菌体濃度の増加は確認されたが、蛍光強度の増加は見られなかった。この原因を明らかにするため、蛍光タンパク質の発現による負荷の影響を検討し、結果の改善を試みた。

Development of reactor control process for co-culture of *Escherichia coli*

○Minori Kusuda, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Escherichia coli*, coculture, fluorescent protein, bioreactor

1Hp10 Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase（RubisCO）反応を経由したグリコール酸ポリマー生合成系構築とその応用

大潟 祥梧[1], 永田 暁洋[1], 齋藤 樹理[1], 横尾 俊憲[1], 工藤 悠希[1], 堀 千明[1], ○大井 俊彦[1], 田口 精一[2], 松本 謙一郎[1]
（[1]北大院・工, [2]東農大院・農）
mken@eng.hokudai.ac.jp

ポリヒドロキシアルカン酸は微生物産生ポリエステルであり、改変型重合酵素を用いることにより、非天然モノマーである GL ユニットをポリマー中に取り込んだ共重合体の合成が可能である。グリコール酸は、植物や藍藻などの炭酸固定経路（CBB サイクル）の鍵酵素である Ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) carboxylase/oxygenase（RubisCO）が、酸化反応により生成する 2-phosphoglycolate（2PG）を経由して合成可能であることが知られる。これらの知見から、CBB サイクルを GL ポリマーのモノマー供給系として利用できる可能が示された。そこで本研究では、RubisCO 経路を GL 供給系として利用したグリコール酸ポリマー合成系を構築した。
宿主として GL 酸化酵素欠損株（ΔglcD）*Escherichia coli* JW2946 株を用いた。本代謝経路の構築には、酸化反応に対する基質特異性が高い酵素の方が適していると考えられたため、CO_2/O_2 基質特異性が比較的低い *Rhodosprillum ruburum* 由来の RubisCO を用いた。RubisCO、RuBP を供給するリン酸化酵素（PrkA）、GL-CoA・3-ヒドロキシブチリル（3HB）CoA 供給酵素群および重合酵素の遺伝子を導入した組換え大腸菌を作成した。本組換え株を 2 % xylose を含むミネラル培地で培養して得られたポリマーをガスクロマトグラフィーおよび ^{1H}-NMR によって解析した結果、合成されたポリマーは GL と 3HB を含む共重合体であることが確認された。次に、いくつかの光合成細菌から単離した 2PG 脱リン酸化酵素（PGPase）遺伝子を導入したところ、いくつかの条件では、ポリマー生産性、GL 分率が上昇することが分かった。これらの結果から、RubisCO 経路を利用した GL ポリマーの合成が可能であることが示された。

Glycolate-based polyhydroxyalkanoate synthesis using ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in engineered *Escherichia coli*

Shougo Ohgata[1], Akihiro Nagata[1], Jyuri Saitou[1], Toshinori Yokoo[1], Yuuki Kudou[1], Chiaki Hori[1], ○Toshihiko Ooi[1], Seiichi Taguchi[2], Ken'ichiro Matsumoto[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric.)

Key words biosynthesis, polyhydroxyalkanoate, RubisCO

1Hp11 異なる人工遺伝子回路持つ二つの大腸菌による共培養系の構築

岩崎 建史朗[1], 本庄 宏[1], 相馬 悠希[2], 鶴野 圭悟[1], 盧 鎮栄[1], 濱田 浩幸[1], ○花井 泰三[1]
（[1]九大院・農, [2]九大・生医研）
taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】バイオマスから化学物質を生産する際には、バイオマスからグルコースなどの単糖を得る糖化プロセスが必要となる。糖化プロセスには、一般的に糖化酵素が必要となるが、糖化酵素の生産、精製に多大なコストが必要となる。もし、バイオマスの糖化・発酵を同時に行う効率的なプロセスが構築できれば、バイオエネルギーの社会実装に応聞く貢献できると考えられる。
【方法・結果】本研究では、微生物の菌体密度をセンシングする仕組みであるクオラムセンシングと呼ばれる機構を、大腸菌を溶かすファージが持つ溶菌遺伝子の発現に利用した。この機構を溶菌遺伝子の発現に利用することで、菌体が十分に増殖した時に、溶菌する人工生体分子ネットワークを構築することが可能となる。この人工遺伝子回路を、糖化酵素生産大腸菌に導入することで、糖化酵素を十分に生産した後（つまり十分に菌体が増殖した時）に、糖化酵素を放出する大腸菌（糖化・溶菌株）を構築した。この糖化・溶菌株と目的の物質を生産する大腸菌株を共培養すると、バイオマス（実際はモデル物質であるセルビオース）から単糖が生成され、目的生産物質が生産された。

Coculture system using engineered *E. colis* with different synthetic genetic circuits

Kenshiro Iwasaki[1], Hiroshi Honjyo[1], Yuki Soma[2], Keigo Tsuruno[1], Jinyeoung Rho[1], Hiroyuki Hamada[1], ○Taizo Hanai[1]
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ.)

Key words synthetic biology, coculture, bioproduction

1Hp12 Efficient production of itaconic acid using a psychrophile-based simple biocatalyst

○Gonglinfeng Luo, Takahisa Tajima, Junichi Kato
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)
jun@hiroshima-u.ac.jp

Easy preparation and coenzyme recovery make the whole-cell catalyst a more promising approach than purified enzyme to be applied in industrial fields in a large scale. However, the cell membrane can sometimes remain an obstacle for substrate uptake of the whole-cell catalyst resulting a poor efficiency of biotransformation. In this study, a whole-cell catalyst based on psychrophile Shewanella livingstonesis Ac10 was constructed. Psychrophiles are microorganisms which are able to survive and propagate at a very low temperture close to the ice point. Their cell membrane is highly flexible to maintain the substance exchange with environment, and its permeability can be improved via heat treatment at a moderate temperature. In this research, two enzyme genes were heterologously expressed in our biocatalyst to convert citric acid to itaconic acid, which is a potential platform replacing the petroleum-based counterparts in chemical industry. The membrane permeability of the biocatalyst was improved by heat treatment at 45°C for 15 min and the productivity of the cells after heat treatment was over 8-fold higher than those without heat treatment. We are currently working on maintaining the membrane integrity of this biocatalyst for a long time to aquire a high final titer of the product.

Efficient production of itaconic acid using a psychrophile-based simple biocatalyst

○Gonglinfeng Luo, Takahisa Tajima, Junichi Kato
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words psychrophile, membrane permeability, itaconic acid, heat treatment

1Hp13 Heterotrophic and Mixotrophic growth of *Haematococcus pluvialis* for the production of astaxanthin using wastewater as a carbon source

○Nombuso Temalangeni Dlamini[1], John Chi-Wei Lan[2]
([1]Grad. Sch. Biotechnol. and Bioeng., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan, [2]Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan)
tembusonkhosi@gmail.com

Haematococcus pluvialis (chlorophyceae) is a fresh water microalgae studied for its adaptive response to harsh environmental conditions and is known as the “king of antioxidant”. In this study, the microalgae were grown in either heterotrophic or mixotrophic conditions using wastewater as a medium for the production of astaxanthin. Mixotrophic microalgae showed higher specific growth rate, final biomass concentration and production of astaxanthin than microalgae cultivated under heterotrophic conditions. Moreover, supplementation of the inorganic culture medium with wastewater led to significant improvement in microalgal biomass production when compared with the culture enriched with sodium acetate due to the presence of growth promoting nutrients in wastewater. Furthermore, the dried biomass was extracted using generally recognized as safe solvents (acetone, ethanol and a mixture of the two solvents at different ratios). The amount of extracted astaxanthin was determined by HPLC analysis. Mixotrophic cultivation of *H. pluvialis* using wastewater could be considered a feasible alternative to reduce the costs of microalgal biomass production, since it does not require the addition of expensive nutrients to the culture medium.

Heterotrophic and Mixotrophic growth of *Haematococcus pluvialis* for the production of astaxanthin using wastewater as a carbon source

○Nombuso Temalangeni Dlamini[1], John Chi-Wei Lan[2]
([1]Grad. Sch. Biotechnol. and Bioeng., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan, [2]Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan)

Key words *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin, mixotrophic, heterotrophic

1Hp14 分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いた遺伝子組換えヒトトランスフェリンの分泌生産

○渡部 貴大, 山中 祐実, 大前 俊昭, 山崎 翔子, 小島 千明, 久保田 進, 原 太志, 小谷 哲也, イディリス アリムジャン（AGC）
takahiro.t.watanabe@agc.com

【背景・目的】
トランスフェリン(Tf)はヒトや動物の血漿中に含まれる鉄結合性糖タンパク質で、生体内では鉄イオンの貯蔵、運搬の役割を担っている。このような重要な生理活性から、Tf は幹細胞など様々な培養細胞の基本培地に添加する必須成分として知られている。一般的には、ヒトや動物の血清由来の Tf もしくは血清そのものを培地に添加する方法がよく用いられている。しかし、細胞治療や再生医療等の臨床応用の際には、ヒトや動物由来成分を用いることは安全上好ましくなく、動物由来成分不含の製造プロセスにより生産された遺伝子組換え Tf を用いることが望まれている。そこで、我々は遺伝子組換えヒト Tf（hTF）の生産を目的に、AGC 保有の分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*（*S. pombe*）を宿主としたタンパク質発現技術を用い、hTF 分泌生産系を構築した。今回、hTF 発現株作製、及びフェドバッチ培養の検討結果について報告する。
【方法・結果】
hTF 発現 *S. pombe* 株作製に際して、最適なプロモーター、分泌シグナル、及び宿主株を各々検討した結果、プロモーターとして hCMV プロモーターを、分泌シグナルとしてヒト PDI1 由来配列を、宿主株としてプロテアーゼ遺伝子 8 重破壊株を選択した。更に宿主株については、1,3-β-glucanosyltransferase をコードする *gas2* 遺伝子を削除する事で、hTF の生産性及び純度が向上した。また、hTF 発現ベクターの宿主株染色体への多コピー導入を検討し、更なる分泌量向上を実現した。得られた hTF 発現株を用い、フェドバッチ培養による高密度培養を行った結果、hTF 分泌生産量はバッチ培養時より約 10 倍向上した。イオン交換カラムにて培養上清から hTF の高純度精製を実施し、精製品の鉄イオンの結合活性を確認できた。

Secretory production of recombinant human transferrin using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*

○Takahiro Watanabe, Yumi Yamanaka, Toshiaki Oomae, Shoko Yamazaki, Chiaki Kojima, Susumu Kubota, Futoshi Hara, Tetsuya Kotani, Alimjan Idiris
(AGC Inc.)

Key words yeast, fed-batch culture, secreted protein

1Hp15 抗体生産性及び品質の向上を目指した CHO 細胞における転写因子 TFE3 の機能解析

○黒田 昂輝 [1], 山野-足立 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】
ゴルジ体は主にタンパク質の糖鎖修飾を主とする、翻訳後修飾の役割を担う細胞小器官である。翻訳後修飾は生体内生理活性に必須であることから、ゴルジ体の活性化は抗体の生産性や品質の向上に繋がると考えられる。そこで、我々はゴルジ体を包括的に制御する転写因子 TFE3 に着目した。抗体生産細胞において、TFE3 の発現量を適切に制御すれば、ゴルジ体の機能を最大限に引き出すことができ、抗体の生産性や品質を向上させることができると考えた。TFE3 の機能は HeLa 細胞などにおいては確認されているが、抗体医薬品生産の代表的な宿主細胞である CHO 細胞においては一切研究されておらず、その機能は未知である。そこで本研究では CHO 細胞における TFE3 の機能を解明することを目的とした。
【実験方法・結果・考察】
CHO 細胞培養時に、ゴルジ体へストレスを誘導する薬剤モネンシンを終濃度 10 μg/ml となるよう、培地に添加し、数時間培養後の TFE3 の局在変化及びゴルジ体関連タンパク質の発現量変化を解析した。蛍光免疫染色により TFE3 の局在を解析した結果、モネンシン添加前は TFE3 が細胞に一様に広がっていたのに対し、添加 4 時間後には、TFE3 の核との共局在が観察され、ゴルジ体へのストレスにより TFE3 が核へ移行していると推定された。また、添加 24 時間後にゴルジ体構造タンパク質である GM-130 の mRNA 発現量を調べたところ、添加前の約 1.6 倍に上昇していた。すなわち、ゴルジ体へのストレスによりゴルジ体関連タンパク質の発現が誘導されていると考えられ、TFE3 は HeLa 細胞内におけるものと同様の役割を CHO 細胞内でも有していることが示唆された。

Functional analysis of TFE3 in CHO cells aiming to improve antibody productivity and quality

○Kouki Kuroda[1], Noriko Yamano-Adachi[1,2], Yuichi Koga[1], Takeshi Omasa[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]MAB)

Key words Chinese hamster ovary cells, Therapeutic antibody, Golgi apparatus, TEF3

1Hp16 CHO 細胞バイオプロセスのための細胞自家蛍光情報の利用検討

○長谷川 倫男
（アズビル・技開）
n.hasegawa.om@azbil.com

【背景と目的】
抗体医薬品製造のバイオプロセスにおいては、一般的に CHO 細胞が使用されている。効率的に抗体を生産できるように、細胞の状態をモニタリングしプロセスを制御することを目的として、CHO 細胞培養中の、細胞の自家蛍光変化を調べた。一般的に細胞は、可視光域において、NADH やフラビンに由来する自家蛍光を呈する。このような蛍光の蛍光強度は、概して、グルコース代謝や酸素呼吸と相関することが報告されている。今回、CHO 細胞において、自家蛍光スペクトルから、プロセス管理に有用な情報が抽出できるかを検討した。

【方法と結果】
CHO 細胞をフラスコにて培養し、細胞集団の 3D 蛍光スペクトルを測定した。また、粒子を計測する装置で、一細胞ごとの蛍光強度を測定した。その結果、トリパンブルー法による細胞の生存率に応じて、スペクトルピークが長波長側にシフトすることが観察された。また、この変化は、測定波長を固定した場合、蛍光強度の変化として測定できた。3D 蛍光スペクトルを主成分分析したところ、概ね培養の初期・中期・後期と分けられると見ることができ、生存率が変化し始める段階から、細胞集団の 3D 蛍光スペクトルの変化が検出されていたと考えている。一方、これらの変化は培地中のグルコース濃度変化やアンモニア、乳酸生成とは相関がみられなかった。さらに、アンチマイシン A により酸化的リン酸化を阻害したときの蛍光変化を測定した。その結果、蛍光強度等に若干の変化が観察された。従って、CHO 細胞においても、生存率だけではなく、代謝変化に関連した蛍光変化が認められたと考えている。細胞の蛍光スペクトルの解析から、工業的に利用できる指標が得られないか探っている。

Study of autofluorescence spectrum of CHO cell cultivation for bioprocess monitoring.

○Norio Hasegawa
(Technol. Devel. Hdqrs., Azbil Corp.)

Key words CHO cell, autofluorescence, fluorescence spectra, bioprocess

1Hp17 新規プロテイン A 非含有セラミックス担体による血清中イムノグロブリン G の精製

○加藤 且也[1], 北村 昌大[1], 永田 夫久江[1], 笠原 真二郎[2]
（[1]産総研・日特ラボ, [2]日本特殊陶業）
katsuya-kato@aist.go.jp

【目的】近年、副作用が少ない次世代の医薬品として抗体医薬品が注目されている。抗体の分離・精製過程で用いられる従来の抗体精製カラム用粒子では、プロテイン A の様な抗体と特異的に結合する高価なタンパク質が用いられている。また、粒子に結合した抗体の回収時に用いる pH2～4 の酸性溶液が、回収後の抗体の凝集や変性を引き起こす原因ともなり、より安価で酸性溶液を用いずに抗体を精製できるカラム用粒子の開発が課題となっていた。そこで、本研究では、プロテイン A を含有せず、かつ血清中のイムノグロブリン G に対して高い選択的吸着特性を示すセラミックス粒子の開発を行った。
【方法と結果】今回作製した多孔質セラミックス粒子は、高い比表面積(100m^2/g 以上)を持ち、抗体（I g G）の分子サイズに適合するメソ孔(～10nm)を有することが特徴である。本粒子を用いて血清中に含まれる主成分タンパク質である抗体（イムノグロブリン G :I g G）、アルブミン、トランスフェリンを同量含む混合溶液から、抗体（IgG）の選択的な回収を試みた。従来のプロテイン A を用いたクロマトグラフィー用担体と同程度の時間で処理可能であった。3 種類のタンパク質のうちで、抗体（IgG）だけが、多孔質セラミックス粒子に対して非常に高い吸着量（143 ug/mg）を示し、アルブミン（12 ug/mg）やトランスフェリン（6 ug/mg）の吸着量の 10 倍程度であったことから、多孔質セラミックス粒子が、抗体（IgG）に対して優れた吸着選択能力を示すことが分かった。

Purification of immunoglobin G in serum using novel non-protein A ceramics particles

○Katsuya Kato[1], Masahiro Kitamura[1], Fukue Nagata[1], Shinjiro Kasahara[2]
([1]AIST-NGK Labo., AIST, [2]NGK Spark Plug Co., Ltd.)

Key words antibody, purification, protein A, IgG

1Hp18 マルチモーダルクロマト担体に対するタンパク質の吸着挙動解析

○大原 彩香[1], 栗山 尚浩[2], 黒田 典孝[2], 高橋 良輔[2], 迫田 裕美子[2], 堀内 淳一[1], 熊田 陽一[1]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]ワイエムシィ）
kumada@kit.ac.jp

【背景・目的】マルチモーダルクロマト担体は、静電相互作用や疎水性相互作用など、複数の相互作用の組合せが可能な構造のリガンドを有し、従来のクロマト担体では分離が困難な高次構造を有するタンパク質やポリマーの選択的な分離に適している。一方でそのターゲット分子に対する吸着性は、ターゲット分子の分子量やリガンドの構造に基づき、pH やイオン強度によって大きく異なることが知られているが、これらの吸着性への影響についてはほとんど詳細が明らかになっていない。本研究では、市販のマルチモーダルクロマト担体に対し、ターゲット分子の吸着性を評価し、リガンドの分子構造や担体の素材特性との因果関係を明らかにすることを目的とした。
【方法】モデルとなるターゲット分子としてヒト IgG を用いた。またクロマト担体として、GE 社製の Capto adhere を用い、クロマト担体を、異なる NaCl 濃度の緩衝液(pH 2～pH 10.8)で平衡化したのち、同じ緩衝液中に希釈したヒト IgG と混合し、室温で緩やかに撹拌しながらインキュベーションした。上清中のヒト IgG 濃度を吸光度法で定量し、担体上に吸着したヒト IgG 量を逆算した。
【結果・考察】代表的なマルチモーダルクロマト担体の Capto adhere のヒト IgG に対する吸着性を異なる pH 及び異なる塩濃度で評価した。その結果、Capto adhere の吸着範囲は、既存の陰イオン交換体よりも吸着範囲が広く、また 300 mM 以上の NaCl 存在下においてもヒト IgG の吸着性を維持できることが明らかとなった。この結果は Capto adhere のヒト IgG に対する吸着性が単に静電的相互作用のみならず、疎水性相互作用や水素結合等の寄与も大きいことが示された。発表では他のマルチモーダルクロマト担体についても報告し、また、カラムを用いたクロマト担体の評価についても述べる。

Adsorption characteristics of proteins against multimodal chromatographic resins

○Ayaka Ohara[1], Naohiro Kuriyama[2], Noritaka Kuroda[2], Ryosuke Takahashi[2], Yumiko Sakoda[2], Jun-ichi Horiuchi[1], Yoichi Kumada[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]YMC CO., LTD.)

Key words multimodal chromatography, resin

1Ip03 オーランチオキトリウム属における脂質生産関連遺伝子の発現解析

○長谷川 真輝[1], 渡邉 研志[1], Marie Ting Perez Charose[1], 黛 新造[2], 角田 祐介[3], 秋 庸裕[1]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]出光興産, [3]中国電力）
aki@hiroshima-u.ac.jp

【背景・目的】ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属は従属栄養条件下で高度に増殖し、高度不飽和脂肪酸やカロテノイドなどの脂質類を著量蓄積する。その応用範囲を安価な化成品やバイオ燃料の生産へ拡張するには、より安価な原料を培養基質として利用することが望まれる。そこで、当研究室では本微生物の酢酸資化性に着目し、様々な未利用・廃棄バイオマスや排気ガスから酢酸生成菌によって生産した酢酸を炭素源とした油脂発酵を試みている。本研究では、オーランチオキトリウム属の酢酸資化時における遺伝子発現プロファイルを解析し、脂肪酸生産性の向上に向けた育種標的を探索した。
【方法・結果】*Aurantiochytrium limacinum* SR21 株を酢酸を単一炭素源として培養したところ、グルコースの場合と比較して増殖と脂肪酸生成の遅延が認められた。そこで、対数増殖期の中期と終期に回収した菌体より抽出した mRNA から cDNA を合成し、リアルタイム PCR で中心代謝系遺伝子の発現レベルを比較した。その結果、対数増殖期中期では酢酸を脂肪酸合成の基質であるアセチル CoA に変換するアセチル CoA シンテターゼの遺伝子発現が酢酸資化時に有意に高かった。一方、脂肪酸生成に必須な補酵素 NADPH を供給するリンゴ酸酵素及び 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素の遺伝子発現レベルが酢酸資化時には低く、NADPH 供給強化の必要性が示唆された。以前に行ったメタボローム解析において、リンゴ酸酵素の基質であるリンゴ酸が酢酸資化時の細胞内に蓄積していたことから、同酵素遺伝子の発現増強が NADPH 供給を改善することが期待され、脂肪酸の生産強化のための標的となりうることが示唆された。

The expression analysis of lipid production-related genes in the genus *Aurantiochytrium*

○Masaki Haegawa[1], Kenshi Watanabe[1], Charose Marie Ting Pere[1], Sinzou Mayuzumi[2], Yusuke Sumita[3], Tsunehiro Aki[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Idemitsu Kosan Co., Ltd, [3]The Chugoku Electric Power Co., Inc.)

Key words Aurantiochytrium, Lipid production, marine microorganisms, Eukaryote

1Ip04 麹菌 *Aspergillus oryzae* の不飽和化酵素遺伝子の共過剰発現化による遊離ジホモ-γ-リノレン酸の生産向上

○玉野 孝一[1,2], 安中 優太[3], 伊藤 あやの[3], 三浦 愛[1], 菅 英一郎[4], 小山 泰二[4], 田村 具博[1,2]
（[1]産総研・生物プロセス, [2]産総研・CBBD-OIL, [3]北海道ハイテク専門学校, [4]野田産研）
tamano-k@aist.go.jp

微生物の生産する遊離脂肪酸（FFA）やその誘導体には、医薬品・健康補助食品やその原料として有用なものがある。そこで、FFA の高生産化と機能改良を、物質生産に優れた麹菌 *Aspergillus oryzae* を代謝工学的に改変することで、取り組んできた。これまでの研究で、アシル CoA 合成酵素遺伝子 *faaA* の破壊により、FFA 生産性を野生株の 9.2 倍に増大させることができた。さらに *faaA* 破壊株で、リノール酸からアラキドン酸への変換に働く 3 種類の遺伝子をモルティエレラ菌から単離して異種発現させた ARA1 株を構築した。この ARA1 株は、アラキドン酸の一反応前の生合成物質であるジホモ-γ-リノレン酸（DGLA）まで、遊離型で生産できることを明らかとした。そこで今回は、ARA1 株の遊離 DGLA 生産を向上させるため、生合成の中間反応であるステアリン酸からリノール酸への変換に働く麹菌本来の不飽和化酵素の強化に取り組んだ。
麹菌ゲノムには、10 種類の不飽和化酵素遺伝子の存在が予測されている。これらの一部はステアリン酸からオレイン酸への変換に働く Δ9-不飽和化酵素、残りはオレイン酸からリノール酸への変換に働く Δ12-不飽和化酵素をコードしている。しかし、この 10 個の中でどれが Δ9 型でどれが Δ12 型なのか解明されていない。さらに、それぞれの型において、最も機能している不飽和化酵素遺伝子はどれであるのかも、不明である。そこで、ARA1 株よりこれらの不飽和化酵素遺伝子を個別に過剰発現させた株をそれぞれ構築し、遊離脂肪酸組成を解析した。その結果、過剰発現化により、Δ9-不飽和化と Δ12-不飽和化を最も促進させる不飽和化酵素遺伝子を、1 個ずつ選出することができた。そこで次に、これらの選出された遺伝子を共に過剰発現させた株を構築した結果、以前の生産株と比べて、遊離 DGLA の割合を 8.1%から 12.9%に、生産性を約 1.5 倍に、高めることができた。

Increased production of free dihomo-γ-linolenic acid by co-overexpression of desaturase genes in *Aspergillus oryzae*

○Koichi Tamano[1,2], Yuta Yasunaka[3], Ayano Itoh[3], Ai Miura[1], Eiichiro Kan[4], Yasuji Koyama[4], Tomohiro Tamura[1,2]
([1]BPRI, AIST, [2]CBBD-OIL, AIST, [3]Hokkaido High Technol. Coll., [4]Noda Inst. Sci. Res.)

Key words *Aspergillus oryzae*, fatty acid, production, metabolic engineering

1Ip05 油性酵母 *Lipomyces starkeyi* によるトリテルペノイド生産

○小島 基[1], 金本 拓也[2], 鈴木 宗典[1], 關 光[2], 村中 俊哉[2], 中村 克哉[1]
（[1]神戸天然物化学(株), [2]阪大院・工）
m_kojima@kncweb.co.jp

油性酵母は一般的な出芽酵母に比べ脂肪酸の生産量が多いことから、近年、バイオディーゼル生産宿主として盛んに研究されている。演者らは油性酵母の特性に着目し、15 種の油性酵母の二次代謝産物の網羅的な解析を行い、脂肪酸生産性の高い *Lipomyces starkeyi* を物質生産宿主として選定した[1)]。脂肪酸生合成と同様の前駆体アセチル CoA から生産されるテルペノイドに着目し、弊社にて確立した形質転換法を利用してヨモギ属植物が生産する抗マラリア治療薬アルテミシニン(セスキテルペノイド)の前駆体生産に成功している[2)]。本研究では、様々な生理活性が報告されているトリテルペノイド、β-アミリン及びルペオールの生産を検討した。最も重要な漢方原料植物の一種であるウラルカンゾウ由来の β-アミリン合成酵素(bAS)及びルペオール合成酵素(LUS)遺伝子を *L. starkeyi* 由来 TEF プロモーター制御下で発現させるプラスミドを作製し、*L. starkeyi* ゲノム上へ導入した。RT-PCR により、これらの遺伝子転写産物が検出されたことから、*bAS* 及び *LUS* 遺伝子の発現を確認した。そこで、代謝産物を GC-MS により分析した結果、*bAS* 発現株及び *LUS* 発現株において、標準品と保持時間が同じピークが検出された。さらに、フラグメントパターンを比較したところ一致したことから、それぞれ β-アミリンとルペオールと同定した。これまで *L. starkeyi* を宿主としたトリテルペノイド生産報告例は無く、世界初の報告となる。

1) 小島基ら 第 66 回日本生物工学会大会講演要旨集
2) 小島基ら 日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨集

Production of triterpenoids, β-amyrin and lupeol, by the recombinant oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*.

○Motoki Kojima[1], Takuya Kanamoto[2], Munenori Suzuki[1], Hikaru Seki[2], Toshiya Muranaka[2], Katsuya Nakamura[1]
([1]KNC Laboratories Co., Ltd., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, triterpenoid, secondary metabolites

1Ip06 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の遺伝子的改変による長鎖長脂肪酸の生産

○宮本 捺央[1], Amza Rezky Lastinov[1], Prihardi Kahar[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】近年、C^{20} 以上の長鎖長脂肪酸がアルツハイマー病・がんの予防など、人の健康の維持や改善に繋がる報告が数多くされており、長鎖長脂肪酸の需要は高まってきている。そこで、再生可能資源を基質とした微生物からの生産が期待されている。本研究で使用した油脂酵母 *L. starkeyi* は、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、食料と競合しない植物バイオマスを糖源として脂肪酸合成が可能である。以上の特徴から、希少価値の高い長鎖長脂肪酸の生産での利用が期待されている。本研究では長鎖長脂肪酸の増加に向けた遺伝子組み換え方法の確立を試みた。
【実験方法】qPCR を用いて、酵母内の代謝経路を触媒する酵素の活性を測定した。そこから L. starkeyi 由来のプロモーターを選択した。発現モデル遺伝子として蛍光タンパク(GFP)をコードするプラスミドの設計と構築を行った。作成したプラスミドを酢酸リチウム法[1] によって導入した。得られた遺伝子導入株と野生株について、FACS を用いて GFP の発現量を指標にして発現系の評価を行った。
【結果と考察】遺伝子導入株と野生株を比較すると、遺伝子導入株の蛍光強度が比較的に高い結果となった。このことから、構築した遺伝子発現系の有効性は GFP の発現の比較により確認できた。本研究では、*L. starkeyi* 由来遺伝子を基づいてゲノム組み込み型プラスミドを作製し、*L. starkeyi* のゲノムに特定の遺伝子を破壊さらに導入することも確認できたので、当株における遺伝子組み換え方法の確立は成功した。また、当株の脂肪酸代謝における代謝改変を行い、長鎖長脂肪酸の生産を行っている。
【参考文献】

[1] Christopher H. Calvey Laura B. Willis Thomas W. Jeffries 2014 *Curr Genet* 60:223-230 An optimized transformation protocol for *Lipomyces starkeyi*

Production of long-chain fatty acids by genetic modification of the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○Nao Miyamoto[1], Lastinov Amza Rezky[1], Kahar Prihardi[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

1Ip07 トランスオミクスによる出芽酵母の中心炭素代謝制御機構の解明

○山崎 一輝, 丸山 正晴, 西野 駿佑, 岡橋 伸幸, 清水 浩, 松田 史生
（阪大院・情報）
fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】
出芽酵母は食品産業やバイオリファイナリーの重要な宿主であり、中心炭素代謝の詳細な理解と制御が求められている。そこで本研究では、これまで取得してきた細胞内代謝物量、酵素タンパク量、代謝フラックスのデータを統合したトランスオミクス解析を行い、増殖や代謝摂動に関与する代謝制御機構の解明を試みた。
【方法】
Saccharomyces cerevisiae 野生株 (S288C) と中心炭素代謝の 1 遺伝子破壊株 11 種の計 12 種を synthetic dextrose 培地で培養し、対数増殖期の菌体をプロテオーム、メタボローム解析に供した。加えて、補酵素は専用キットで測定した。^{13}C 代謝フラックス解析では、[1-^{13}C]glucose 培地で菌体を培養し、たんぱく質由来アミノ酸の ^{13}C 標識割合からフラックス分布を決定した。フィードバック制御に関与する代謝物は反応速度式のパラメータフィッティングにより推定した。
【結果と考察】
S. cerevisiae 12 株について、35 反応のフラックス値、43 個の代謝物、92 個の酵素タンパク量データを取得した。相関解析を行った結果、増殖速度は解糖系酵素群と負の相関、アミノ酸合成/クエン酸回路酵素群と正の相関が見出され、このような制御を担う分子として Gcn2/Gcn4 が関与する可能性が示唆された。さらにペントースリン酸経路の 6-phosphogluconate dehydrogenase のフラックスは反応に関与する NADP/NADPH 比との間に明確な相関がみられなかった。そこで、数理モデルを用いて候補代謝物の推定したところ、代謝物からアロステリック制御を受けている可能性が示唆された。

Elucidation of regulation mechanism of central carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* by transomics

○Kazuki Yamasaki, Masaharu Maruyama, Syunsuke Nishino, Nobuyuki Okahashi, Hiroshi Shimizu, Fumio Matsuda
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, central metabolism, transomics

1Ip08 ロテノン処理に対するヒト乳がん細胞株 MCF-7 の代謝アダプテーション解析

○辻 周真, 丸山 正晴, 岡橋 伸幸, 松田 史生
（阪大院・情報）
fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

【背景】
がん細胞が持つ特異的な代謝状態の実態を、代謝工学的なアプローチに基づいて解析することで、抗がん剤を処理したがん細胞が示す代謝適応過程に新たな知見をもたらすことが期待される。これまでに呼吸鎖複合体 I 阻害剤をモデルとした 13C-代謝フラックス解析を行い、ロテノン処理 24 時間後の代謝リワイアリングを明らかにした。そこで、本研究では細胞内代謝物プロファイルの時系列データを取得することで、より動的な代謝適応メカニズムの推定を試みた。
【方法】
ヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 を 6cm プレートに播種し、15 時間培養後、100 nM ロテノンを含む培地に交換した。その後 3, 6, 9, 24 時間の生細胞数測定と細胞回収を行った。細胞内代謝物はメタノール・クロロホルム・水法で抽出後、GC-MS と LC-MS（イオンペア法、PFPP 法）で分析を行った。
【結果・考察】
MCF- 7 に 100 nM ロテノンを処理した際の増殖挙動を確認したところ、処理後 3 時間は生細胞数が 0.77 倍に減少し、その後細胞増殖が回復した。これは、代謝を変化させることで、ロテノンの呼吸鎖阻害による ATP 産生の低下に適応したためであると推測された。この時の詳細な代謝変化を捉えるために、細胞内代謝物量を GC-MS と LC-MS で計測したところ、ロテノン処理後 24 時間目ではクエン酸、が 0.33 倍、イソクエン酸が 0.51 倍に減少し、乳酸が 2.6 倍に増加することが分かった。これはロテノン 100 nM 処理による酸化的な TCA サイクルの不活化と解糖系の活性化の結果と考えられ、主に解糖系で ATP を産生する代謝状態に移行したことが示唆された。さらに、細胞増殖に必要な核酸の前駆体量を観測したところグアノシン、アデニン、シチジン、イノシンがロテノン処理後 9 時間でそれぞれ、7.8, 1.7, 2.4, 2.0 倍に増加しており、de novo 核酸生合成が活性化していると推察され、増殖の再開に寄与した可能性が示唆された。

Metabolic adaptation analysis of rotenone-treated MCF-7 breast cancer cells

○Shuma Tsuji, Masaharu Maruyama, Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words rotenone, metabolic adaptation, MCF-7

1Ip09 ^{13}C 代謝フラックス解析を用いた非上皮系細胞株の定量的代謝比較

○島 知輝, 丸山 正晴, 岡橋 伸幸, 松田 史生
（阪大院・情報）
fmatsuda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

[背景・目的]
^{13}C 代謝フラックス解析法は、さまざまな生物種の細胞内代謝反応速度を計測できる。活発に増殖するがん細胞で中心炭素代謝が活性化していること着目し、これまでに、上皮系細胞株の解析を行い、代謝工学的な観点からその特徴を明らかにしてきた。本研究では非上皮系細胞株に ^{13}C 代謝フラックス解析を適用し、代謝フラックス分布の比較解析を試みた。
[方法]
ヒト神経膠芽腫由来細胞株 YKG-1 は 1.0×10^6 個、ヒト繊維芽肉腫由来細胞株 HT-1080 は 5.0×10^5 個の細胞を 10 cm プレートに播種し、[1-^{13}C]グルコース含有培地で培養した。0, 12, 16, 20, 24 時間後の細胞数を画像解析ソフトで、培地成分中の変化を HPLC で計測した。細胞内代謝物はメタノール・クロロホルム・水法で抽出し、*tert*-ブチルジメチルシリル化後、GC-MS で ^{13}C 標識割合を測定した。代謝フラックス分布は専門ソフトウェア mfapy で推定した。
[結果・考察]
YKG-1、HT-1080 細胞の比増殖速度、物質収支、細胞内代謝物の ^{13}C 標識割合の計測を行い、代謝フラックス分布を推定することに成功した。2 株のフラックス分布を比較すると、取り込まれたグルコースの 80%以上を乳酸として排出するワールブルク効果が観察されること、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ反応の代謝フラックスが低く保たれていることなどが分かった。これらの代謝的特徴は、上皮系細胞株とも共通であった。一方、解糖系からペントースリン酸経路への分岐する反応および、細胞外から取り込んだグルタミンを TCA サイクルへ流入させる反応の代謝フラックスはがん種間で異なっており、フラックスレベルでの代謝計測の重要性が明らかとなった。

Quantitative metabolic profiling of non-epithelial cancer cells using ^{13}C-Metabolic flux analysis

○Tomoki Shima, Masaharu Maruyama, Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words ^{13}C-metabolic flux analysis, central carbon metabolism, non-epithelial cancer

1Ip10 蛍光式溶存酸素センサーを使用した呼吸活性の測定法

○高寺 美砂都 [1], 一瀬 涼 [2], 山崎 思乃 [1], 片倉 啓雄 [1]
（[1]関西大・化生工, [2]関西大院・理工）
katakura@kansai-u.ac.jp

【背景と目的】呼吸は生物が生存するためのエネルギーを得る過程で非常に重要な代謝である。微生物の呼吸活性の測定法として、通気と排気の酸素濃度の差から求める方法、培養液中の酸素濃度の減少速度から求める方法が知られているが、何れもジャーファーメンタースケールで培養する必要がある。そこで、蛍光式溶存酸素センサーを用いて、サンプリングした少量の菌体の呼吸活性を測定する方法を考案した。
【方法】培養液中の酸素濃度 C [mol/L] の変化速度は $dC/dt = k_La\,(C^* - C) - Q_{O2}X$ で与えられる。ただし、k_La は酸素移動容量係数[1/h]、C^*は飽和酸素濃度 [mol/L]、Q_{O2} [mol/(g-cell・h)] は酸素比消費速度、X [g-cell/L] は細胞濃度である。通気を停止すると右辺第 1 項はゼロになるので $dC/dt = -Q_{O2}X$ となる。従って溶存酸素濃度の変化速度 dC/dt と細胞濃度 X から Q_{O2} を求めることができる。溶存酸素濃度の測定には Able-Biott 社の蛍光式溶存酸素センサーを用いた。
【結果と考察】4 ODunits の細胞を遠心分離で回収し、1 g/L のグルコースを含む MRS 培地 3 ml に懸濁した。内壁に蛍光膜 (Biott) を貼り付けた試験管 (16 mm× 105 mm) に入れ、ボルテックスして酸素飽和させた後、静置して溶存酸素濃度を経時的に測定した。蛍光膜に微細な泡が付着すると異常値を与えるため、培地には消泡剤を添加する必要があった。乳酸菌は通性嫌気性菌であるが、MRS 培地で通気回分培養した *Leuconostoc mesenteroides* NBRC 100496 の Q_{O2} は 15.9±0.7 mmol/(g-cell・h) であり、パン酵母に匹敵する呼吸活性があることがわかった。

Measurement of respiratory activity using fluorometric dissolved oxygen sensor

○Misato Takatera[1], Ryou Ichinose[2], Shino Yamasaki-Yashiki[1], Yoshio Katakura[1]
([1]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ.)

Key words respiratory activity, dissolved oxygen, fluorescent film, *Leuconostoc mesemteroides*

1Ip11 乳酸菌の高密度培養のための好気的流加培養による乳酸生産の抑制

○一瀬 涼 [1], 高寺 美砂都 [2], 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】 乳酸菌は増殖に伴い著量の乳酸を生産し、培地の pH は低下する。例え pH の低下を抑えても、乳酸自体による阻害のため、乳酸菌の高密度培養や高効率の物質生産は難しい。乳酸菌が乳酸を生産するのは、解糖系で消費した NAD^+を乳酸脱水素酵素（LDH）の反応で再生するためであるから、LDH 以外の代謝で NAD^+を再生できれば乳酸の生産を抑制できるはずである。そこで NAD^+再生系として、 膜結合型オキシダーゼによる呼吸代謝に注目した。更に、流加培養によって解糖系のフラックスを制限することで、乳酸生産の抑制を試みた。本研究の目的は好気的流加培養による乳酸生産の抑制によって、乳酸菌の高密度培養を実現することである。
【方法】 *Lactococcus lactis* MG1363 を 1 L h^{-1} の通気で好気的に 30℃で培養した。前培養液から回収した菌体を 800 mL のエキス類とグルコースを含まず、ヘムを 2.5 mg L^{-1} 含む MRS 培地に植菌し、グルコース 1.1～33.4 g L^{-1} とヘムを 2.5 mg L^{-1} 含む MRS 培地を、ある比増殖速度を与えるよう指数的に流加した。
【結果と考察】
回分培養では最大の比増殖速度が 0.77±0.14 h^{-1}、その間の乳酸の比生産速度 ρ は 1.2±1.5 g g-cell^{-1} h^{-1} であり、増殖菌体あたりの乳酸生産量 $Y_{L/X}$ は 1.80±0.03 g g-cell^{-1}、菌体収率 $Y_{X/S}$ は 0.22±0.04 g-cell g-glucose^{-1} であった。これに対し、μ=0.38±0.02 h^{-1} の流加培養では、ρ は 0.11±0.02 g g-cell^{-1} h^{-1} にとどまり、$Y_{L/X}$ は 0.29±0.07 g g-cell^{-1} に低下し、$Y_{X/S}$ は 0.38±0.07 g-cell g-glucose^{-1} に向上した。流加培養では回分培養に比べて、菌体収率が向上すると共に、$Y_{L/X}$ は回分培養の約 6 分の 1 に低下した。μ を 0.16～0.46 h^{-1} の範囲で変更して乳酸生産を検討したところ、0.38 h^{-1} 以下で乳酸生産が抑制された。発表では乳酸を抑制した長時間の流加培養でどこまで菌体濃度が増加したかを報告する。

Suppression of lactic acid production by aerobic fed-batch culture for high-density culture of lactic acid bacteria

○Ryo Ichinose[1], Misato Takatera[2], Shino Yamasaki-Yashiki[2], Yoshio Katakura[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words *Lactococcus lactis*, fed-batch culture, metabolic analysis, repression of lactate

1Jp03 ROCK inhibitor の添加が hiPS 細胞集塊の細胞外マトリックスに与える影響

○松本 崇揮, 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】人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の培養法では，低コストで大量細胞を得るために集塊培養が用いられている．ヒト iPS 細胞の集塊培養の課題の 1 つとして，同様の手法で培養を行ったとしても，様々な細胞株と培地の組み合わせによって得られる細胞数や細胞集塊の形状が大きく異なり，目的の細胞を安定して供給することが難しい点が挙げられる．この問題を解決するために，アポトーシスなどの細胞挙動に関連している Rho-associated protein kinase (ROCK) に着目し，ROCK 経路を阻害する ROCK inhibitor を用いることで，ヒト iPS 細胞の集塊形成と細胞増殖に影響を与えていることが分かった．そこで，本研究では ROCK inhibitor が細胞生存や増殖だけでなく，集塊の安定性など細胞集塊において重要な役割を果たす細胞外マトリックス (ECM) に影響があるかを検討した．
【方法】iMatrix-511 を用いて培養したヒト iPS 細胞 (Tic，1383D2) のコロニーを分散した後，ROCK inhibitor を添加した培地を用いて，バイオリアクターに細胞を播種した．播種から 24 時間後に ROCK inhibitor 無添加培地に切り替えた培養と ROCK inhibitor 添加培地を使用し続けた培養を行った．培養後，細胞集塊を回収し，ECM マーカー (CollagenI) と増殖マーカー (ki67) による免疫染色と，走査型電子顕微鏡を用いた ECM の構造の確認を条件間で比較した．
【結果】ROCK inhibitor 無添加条件と ROCK inhibitor 添加条件を比較すると，免疫染色では CollagenI と ki67 の発現に差異は見られなかった．一方，走査型電子顕微鏡を用いると ROCK inhibitor 無添加条件では細胞集塊表面上に線維状の構造が見られるのに対し，ROCK inhibitor 添加条件では粒子状の構造がみられた．これにより，細胞集塊表面上の ECM の構造に違いがあった．以上より，ROCK inhibitor の添加が ECM の構造に影響を及ぼすと考えられた．

Effect of rho-associated protein kinase inhibitor on extracellular matrix of human induced pluripotent stem cell cells

○Takaki Matsumoto, Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words extracellular matrix, rho-associated protein kinase inhibitor, human induced pluripotent stem cell, aggregate suspension culture

1Jp04 ラット間葉系幹細胞の分化に対して光増感反応による活性酸素刺激が及ぼす影響の解析

○森 英樹, 原 正之
（阪府大院・理）
morihide@b.s.osakafu-u.ac.jp

【背景】近年、活性酸素種（ROS）が神経幹細胞や間葉系幹細胞といった幹細胞の分化傾向に影響を与えることが報告されている。それらの報告の多くは過酸化水素やアミノレブリン酸を用いた細胞内ミトコンドリアにおける ROS 刺激によるものである。このような分化誘導調節を細胞外からの刺激によって引き起こすことができれば、ROS 発生源の細胞内残留を考慮しなくてもよい分化誘導法として幹細胞分化培養技術への応用が期待できる。本研究では光増感色素を固定したガラス基板を用いて、細胞外の細胞接着面から ROS 刺激を与えることにより間葉系幹細胞の分化傾向に影響を与えられるかについて検討した。
【方法と結果】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。ROS 刺激を与えるために平面照射型 LED による白色光を基材下面から照射した。照射は 1 分間の照射と 3 分間の消灯を 1 回、5 回、25 回の何れかの条件で行い、照射後 24 時間培養した後、細胞を回収し分化傾向を調べるために定量的 RT-PCR 法を用いて分化マーカー遺伝子の発現を調べた。骨分化マーカーとして *Runx2* と *Alpl*、軟骨分化マーカーとして *Col2a1* と *Acan*、脂肪分化マーカーとして *Pparg* と *Cebpa* を用いた。いずれのマーカーも照射回数に応じて変化したが、特に光照射 25 回の条件で *Alpl* や *Cebpa* の発現量の変化が光照射を行わない条件に比べて大きかった。また、更に 2 週間培養した細胞の組織化学的染色による解析も行った。ROS 刺激を与えた条件ではオイルレッド染色で染まった細胞が対照条件と比べて多い様子が見られた。

Effect of reactive oxygen species generated by phtotosensitizer on the differetiation of rat mesenchymal stem cells

○Mori Hideki, Hara Masayuki
(Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, reactive oxygen species, differentiation, photosensitizer

1Jp05 単一細胞トランスクリプトーム解析に基づく血中循環腫瘍細胞の上皮間葉転換状態の評価

○山川 ひとみ [1], 根岸 諒 [1], 下山 達 [2], 小泉 史明 [2], 田中 剛 [1], 松永 是 [1], 吉野 知子 [1]
（[1]農工大院・工, [2]がん・感染症センター都立駒込病院）
y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

【背景と目的】血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cell: CTC)は、がん組織から血管内に浸潤した細胞である。これまでに、一部のがん種において血液中の CTC 数が患者の予後と相関することがわかっており、近年では単一細胞遺伝子解析によって転移メカニズムの理解や治療標的因子の探索への応用が期待されている。当研究室は、希少な CTC の高効率な回収及び単一細胞分離に向け、MCA/GCM (Microcavity array/Gel-based cell manipulation)法を開発してきた。本研究では、MCA/GCM 法を用いて転移性がん患者 CTC の上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT)状態を評価することを目的とした。
【方法】胃がん患者及び膵臓がん患者血液 1 ml から、MCA/GCM 法により CTC 候補(CellTracker Green+, Hoechst+, CD45-)を分離し、Quartz-seq 法にて全トランスクリプトーム増幅を行った。キャピラリー電気泳動にて増幅産物の収量及び平均鎖長の評価を行い、qPCR にて GAPDH の増幅を確認できた細胞に対し RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。
【結果】胃がん患者 10 症例、膵臓がん患者 3 症例から分離した CTC 候補 27 細胞(胃がん: 15 細胞, 膵臓がん:12 細胞)に対して RNA-seq 解析を行った結果、23 細胞から単一細胞由来のトランスクリプトームデータを取得した。解析結果から、いずれの細胞においても血球系の特徴を持たず、また一般的に CTC の特徴とされる上皮性に関連する遺伝子群の発現は弱い傾向が見られた。さらに EMT の誘導に関連する遺伝子の発現が確認され、発現レベルは細胞間で不均一であった。このことから、本研究で得られた CTC は EMT が進み上皮性を失ったがん細胞であり、細胞によって進行状態に差異があることが示唆された。

Evaluation of epithelial mesenchymal transition-status of circulating tumor cells by single-cell transcriptome analysis

○Hitomi Yamakawa[1], Ryo Negishi[1], Tatsu Shimoyama[2], Fumiaki Koizumi[2], Tsuyoshi Tanaka[1], Tadashi Matsunaga[1], Tomoko Yoshino[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Tokyo Metropolitan Cancer Ctr. Infect. Dis. Ctr. Komagome Hosp.)

Key words Circulating tumor cell, single-cell analysis, transcriptome

1Jp06 システイン誘導体による煙中の不飽和カルボニル化合物の解毒メカニズムの解明

○東 恒仁 [1], Elmeligy Enas [1], 眞井 洋輔 [1], 野矢 洋一 [2], 真崎 雄一 [1], 久下 裕司 [2], 三輪 聡一 [1]
（[1]北大院・医・細胞薬理, [2]北大・アイソトープ総セ）
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ため、人体への影響が懸念されている。我々は以前、還元型グルタチオンや N-アセチルシステインなどのシステイン誘導体が、不飽和カルボニル化合物の細胞毒性を抑制できることを見出したが、そのメカニズムについては不明であった。本研究では、システイン誘導体による不飽和カルボニル化合物の細胞毒性の抑制メカニズムの解明を目的とした。
【方法】細胞傷害は、PI 染色とフローサイトメトリーを組み合わせた手法で評価した。システイン誘導体と不飽和カルボニル化合物の分析には高速液体クロマトグラフィー（HPLC）と質量分析計（MS）を用いた。タンパク質のカルボニル化は免疫沈降法とウエスタンブロッティングで検出した。
【結果と考察】システインやシステイン誘導体は、側鎖のチオール基を介して不飽和カルボニル化合物の細胞毒性を抑制した。システイン誘導体と不飽和カルボニル化合物の混和物を HPLC および MS で解析したところ、システイン誘導体は、不飽和カルボニル化合物と直接反応することが判明した。実際の煙抽出物中でも同等の反応物が生じていた。更に、システイン誘導体は、細胞内のタンパク質のカルボニル化を抑制した。以上の結果から、システイン誘導体は、不飽和カルボニル化合物と直接反応することで、細胞内のタンパク質をはじめとする生体内分子のカルボニル化修飾を防ぐことで細胞傷害を抑制しているものと考えられる。

Elucidation of molecular mechanism for detoxification of unsaturated carbonyl compounds in the smoke by cysteine derivatives

○Tsunehito Higashi[1], Enas Elmeligy[1], Yosuke Mai[1], Yoichi Noya[2], Yuichi Mazaki[1], Yuji Kuge[2], Soichi Miwa[1]
([1]Dept. Cell. Pharm., Grad. Sch. Med., Hokkaido Univ., [2]Central Inst. Isotope Sci., Hokkaido Univ.)

Key words toxicity, antioxidant, cysteine, unsaturated carbonyl compounds

1Jp07 神経筋接合評価のための iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築

○吉岡 貫太郎 [1], 井藤 彰 [2], 河邉 佳典 [1], 上平 正道 [1]
（[1]九大院・工, [2]名大院・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。その一例として筋委縮性側索硬化症 (ALS)患者由来の iPS 細胞から運動神経細胞へ分化誘導し、薬剤添加後の細胞生存率や遺伝子発現解析をすることで薬剤評価を行った報告がある。しかし、既存の報告では運動神経細胞が本来有している筋肉を収縮させる機能については詳細に調べられてはいない。本研究では、運動神経細胞の筋肉を収縮させる機能を調べるために、マウス iPS 細胞由来運動神経細胞とマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞からなる平面培養および三次元組織培養での神経筋接合を介した筋収縮モデルの構築を目指した。また、筋収縮モデルとしての有用性を高めるために、ヒト iPS 細胞由来運動神経細胞および筋芽細胞の利用を試みた。
[結果と考察]
初めに、iPS 細胞由来運動神経細胞が C2C12 細胞由来筋管と神経筋接合を形成するかを調べるため、マウス iPS 細胞由来運動神経細胞と 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。ま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筋収縮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。さらにヒト iPS 細胞由来筋芽細胞を用いてヒト iPS 細胞由来運動神経細胞との共培養を行った。共培養 10 日目に電気刺激を与えたところ、収縮する筋管の割合が上昇した。このことから、ヒト iPS 細胞を用いた実験系においても神経筋接合が形成されたことが示唆され、筋収縮モデルとしての有用性を高めることができたと考えられる。

A muscle contraction model using iPS cells for evaluation of neuromuscular junction

○Kantaro Yoshioka[1], Akira Ito[2], Yoshinori Kawabe[1], Masamichi Kamihira[1]
([1]Fac. Eng., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words iPS cell, neuromuscular junction, tissue engineering, coculture

1Jp08 マイクロラインパターンを用いた筋管細胞の配向制御によるアセチルコリン受容体の凝集促進

○葛西 晴郎 [1], 清水 一憲 [1], 長島 拓則 [1], 古谷 太樹 [1], 前川 忠義 [1], 山岡 奈央 [1], 本多 裕之 [1,2]
（[1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創成セ）
honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】生体骨格筋内の筋管細胞は一方向に配向し、運動神経細胞と神経筋接合部（neuromuscular junction:NMJ）を介してつながっている。NMJ は運動神経細胞の軸索末端で筋管細胞膜上のアセチルコリン受容体が凝集した構造である。ALS やサルコペニアなどの創薬を目指し、in vitro で運動神経細胞と骨格筋細胞が共培養されるが、NMJ の形成効率が低いことが大きな問題である。本研究では、生体内を模倣し筋管細胞の配向をそろえて培養することで、NMJ 形成に重要なアセチルコリン受容体の凝集が亢進するかどうかを検証した。
【方法と結果】微細加工技術を用いて幅 5～20 μm、高さ 0.5～1 μm のマイクロラインパターンをもつポリジメチルシロキサン製のマイクロラインパターン培養基板を複数作製した。表面処理により細胞接着性を向上させ、ヒト不死化骨格筋細胞を培養した。作製したラインパターン基板を用いてヒト筋管細胞の配向制御が可能であった。分化培養 5 日目に FITC 標識ブンガロトキシンを用いてアセチルコリン受容体の凝集を定量した。その結果、配向制御ありの筋管細胞上で、配向なしの筋管細胞に比べて有意に多くのアセチルコリン受容体の凝集が観察された。筋管細胞の分化度が影響したと考え、分化度の指標となる筋管細胞の太さや一細胞あたりの核の数などを定量したところ、配向させた筋管細胞の分化度が向上していることがわかった。以上のことから、筋管細胞の配向制御を行うことで、筋管細胞の分化度が向上し、アセチルコリン受容体の凝集が多く観察されたと示唆される。

Alignment of myotubes using the micro-line patterned surface and its effects on clustering of acetylcholine receptors

○Haruo Kassai[1], Kazunori Shimizu[1], Takunori Nagashima[1], Taiki Furutani[1], Tadayoshi Maekawa[1], Nao Yamaoka[1], Hiroyuki Honda[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]PME, Nagoya Univ.)

Key words micro device, skeletal muscle, alignment, acetylcholine receptor

1Jp09 生体内細胞位置を模倣した三次元神経筋共培養マイクロデバイスの開発

○中村 健人 [1], 清水 一憲 [1], 山岡 奈央 [1], 長島 拓則 [1], 今泉 裕 [1], 古谷 太樹 [1], 伊藤 卓治 [2], 岡田 洋平 [2], 本多 裕之 [1,3]
（[1]名大院・工, [2]愛知医大・神経内科, [3]名大院・創薬）
shimizukazunorichembio@gmail.com

【背景と目的】様々な神経筋関連疾患は、運動神経細胞や骨格筋細胞の変性あるいは神経筋接合部の異常により発症し、生命をも脅かす進行性の運動機能障害がもたらされる。しかしながら、こうした神経筋関連疾患の発症メカニズムはわかっておらず、有効な治療法や薬はほとんどない。本研究では、神経筋関連疾患の in vitro モデルへの応用を目指し、運動神経細胞に支配された三次元培養筋組織構築のためのマイクロデバイスを開発した。
【方法と結果】これまでに開発した培養筋組織収縮力測定デバイス[1]や運動神経・骨格筋細胞平面共培養デバイス[2]の要素技術を応用し、ポリジメチルシロキサンでデバイスを作製した。デバイスには収縮を発揮する三次元筋組織を培養するウェルと運動神経細胞を培養するチャンバーがあり、これらは運動神経細胞から伸びた軸索だけが通過可能な複数のマイクロ流路でつながっている。デバイス上でヒト iPS 由来運動神経細胞を培養後、ヒト不死化筋芽細胞株で三次元筋組織を構築し、一定期間共培養を行った。その後、神経用チャンバーの運動神経細胞体に対して選択的に刺激を負荷したところ、軸索と連結した三次元筋組織が収縮した。また、ナトリウムイオンチャネル阻害剤を神経用チャンバーに添加することで、その収縮が停止した。さらに免疫染色を行い、三次元筋組織内に神経筋接合部が形成されていることを確認した。これらの結果より、デバイス上の三次元筋組織は、軸索で連結した培養した運動神経細胞の支配を受けていることが示された。

[1] Shimizu, et al., Bioengineering (Basel), 4(2):56 (2017)
[2] Yamaoka, et al., BioChip J., in press.(2019)

Development of microdevices for culturing three-dimensional innervated skeletal muscle tissues

○Kento Nakamura[1], Kazunori Shimizu[1], Nao Yamaoka[1], Takunori Nagashima[1], Yu Imaizumi[1], Taiki Furutani[1], Takuji Ito[2], Youhei Okada[2], Hiroyuki Honda[1,3]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Dept. Neurol., Aichi Med. Univ., [3]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

Key words three-dimensional tissue, microdevice, iPS cell, neuromuscular junction

1Jp10 犠牲ファイバーを利用した細胞内包多孔性ハイドロゲルの作製と細胞機能評価

○蓑田 義将 [1], 堀 有音 [1], 鵜頭 理恵 [2], 山田 真澄 [2], 関 実 [2]
（[1]千葉大院・融合, [2]千葉大院・工）
m-yamada@faculty.chiba-u.jp

【背景と目的】 近年，動物細胞をハイドロゲルに内包して培養し，人工的な組織や臓器モデルを構築する研究が注目を集めている。ハイドロゲル内部において，生体組織と同程度の密度で細胞を培養する場合，内部に酸素や栄養分を供給するための，血管網のように連続した管腔構造を形成させる必要がある。しかし，毛細血管のような，直径数～数 10 μm 程度の制御された管腔構造をハイドロゲル内に精密に形成する技術はいまだ発展途上にある。本研究では，孔径の制御されたアルギン酸 Ca マイクロファイバーをハイドロゲル内に犠牲材料として包埋し，溶解させることで，連続的な管腔構造の制御を可能とする手法を提案する。実際に，マイクロ流路を用いて作製したマイクロファイバーを利用し，作製した多孔性ハイドロゲルを用いて動物細胞を培養し，連通孔の形成が細胞の生存率や機能に与える影響を評価した。

【方法】 マイクロ流体デバイスを用いて，直径 20 μm 程度のアルギン酸 Ca ファイバーを作製し，2 mm の長さで断片化した後，ファイバーとコラーゲンあるいは光架橋性ゼラチン（GelMA）水溶液を混合し，さらにヒト肝がん細胞（HepG2 細胞）を一定の比率で混合し，ゲル化させた後，クエン酸処理によってファイバーのみを溶解させることで，多孔性ハイドロゲルを作製した。ハイドロゲルの凍結切片を作製し，断面を観察し，さらに，内包した細胞の生存率や機能を評価した。

【結果と考察】 ハイドロゲルの凍結切片を観察したところ，ファイバー径に相当する空隙がハイドロゲル内部に均一に存在している様子が確認された。また，ファイバーの混合比を適切に調節することで，ゲル内部の空隙が連通することを確認した。さらに，細胞を内包した多孔性ハイドロゲルでは生存率及び機能が向上することが確認された。

Preparation of cell-encapsulating porous hydrogels using sacrificial microfibers and cell function analysis

○Yoshimasa Minoda[1], Aruto Hori[1], Rie Utoh[2], Masumi Yamada[2], Minoru Seki[2]
([1]Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Chiba Univ.)

Key words tissue engineering, cell, collagen

9月17日（火）

シンポジウム・招待講演　午前の部

次世代のバイオプロセスを拓く複合微生物系精密制御技術
（9:30 ～ 11:30）　S2 会場　p. 139

食農工産業の持続的発展を牽引する次世代植物バイオテクノロジー
（9:00 ～ 11:30）　S3 会場　p. 141
〈招待講演（韓国生物工学会）〉　2S-S3a06　p. 143

タンパク質工学におけるドライーウェット技術融合の新展開
（9:30 ～ 11:30）　S5 会場　p. 144

シンポジウム・招待講演　午後の部

持続可能な開発目標（SDGs）を生物工学にどう活用するか **【本部企画】**
（13:15 ～ 17:15）　S1 会場　p. 146

微生物による物質生産の新展開（15:00 ～ 17:30）　S2 会場　p. 149
〈招待講演（韓国生物工学会）〉　2S-S2p02　p. 150

Development of Biosensing Technology Targeting Sustainability Development Goals
「持続可能な開発目標を目指したバイオセンシングの開発と展開」**《国際シンポジウム》**
（13:15 ～ 15:45）　S3 会場　p. 152
〈招待講演（韓国生物工学会）〉　2S-S3p05　p. 154

複雑組織製造に必要な基盤技術を考える
～バイオリアクターの側から～（13:15 ～ 15:15）　S4 会場　p. 154

新しいデータ駆動型サイエンスによる複雑な生命現象の理解
（15:30 ～ 17:30）　S4 会場　p. 156

物質生産や代謝制御における呼吸鎖の役割（13:15 ～ 15:15）　S5 会場　p. 159

微生物ポリアミンが支える高齢化社会の生活（15:30 ～ 17:30）　S5 会場　p. 161

一般講演　午前の部（9:00 ～ 11:36）

遺伝子工学	A 会場	p.164
バイオマス，資源，エネルギー工学	B 会場	p. 167
代謝工学	C 会場	p. 170
生物化学工学	D 会場	p. 173
食品科学，食品工学	E 会場	p. 176
オミクス解析	F 会場	p. 179
セル＆ティッシュエンジニアリング	G 会場	p. 181
醸造学，醸造工学	H 会場	p. 184
発酵生理学，発酵工学	J 会場	p. 187

一般講演　午後の部（13:30 ～ 17:30）

酵素学，酵素工学	A 会場，B 会場	p. 189
バイオマス，資源，エネルギー工学／発酵生理学，発酵工学	C 会場	p. 198
遺伝子工学	D 会場	p. 202
分類，系統，遺伝学	E 会場	p. 207
バイオセンシング，分析化学	F 会場	p. 210
抗体工学／セル＆ティッシュエンジニアリング	G 会場	p. 215
醸造学，醸造工学	H 会場	p. 219
核酸工学／糖鎖工学／脂質工学／ペプチド工学	I 会場	p. 223
タンパク質工学	J 会場	p. 228

2S-S2a01 硝化微生物コンソーシアの制御と高機能化デザイン

○安藤 晃規 [1,2], 小川 順 [1,2]
（[1]京大・生理化学, [2]京大院・農）
aando@kais.kyoto-u.ac.jp

自然環境における窒素循環では、微生物群が果たす役割は大きい。特に硝化反応ならびに脱窒反応に関しては大部分を微生物が担う。これまでにコンポスト化や、排水処理などにおいて環境制御によりこれらの微生物群機能は利用されてきたが、難培養性微生物を含む極めて複雑な微生物群のため詳細な解析や制御などは困難であった。そこで本講演では、自然環境におけるこれらの複合微生物群機能を単純化することで、再構築、制御、デザインの可能性を検討した。土壌における有機廃棄物は、従属栄養微生物による分解を受けアンモニアとなり、さらに硝化細菌により亜硝酸イオン（NO_2^-）、硝酸イオン（NO_3^-）へと酸化される。硝化細菌は、主にアンモニア酸化菌群と亜硝酸酸化菌群により構成され、硝酸化成において鍵となる菌群として知られている。土壌中では、これらの微生物群が協調的に働くことで、作物への硝酸態窒素の供給を実現している。しかし、独立栄養細菌である硝化細菌が難培養性であること、大量培養が困難であること、また、硝化反応自体が制御困難な複合微生物系であることなどが、基礎的な解析や応用展開へのボトルネックとなっていた。そこで、これらのボトルネックに関して、難培養性の硝化細菌と複合微生物系の制御に焦点を当てた土壌微生物群の解析とモデル硝化微生物群の再構築の取り組みを紹介する。

・硝化微生物群の馴養と有機質肥料活用型溶液栽培
有機態窒素の硝化に必須な土壌微生物群の馴養培養法と、構築した硝化微生物群を活用する有機質肥料活用型養液栽培が開発されている。本栽培法は有機物の栽培系への利用が可能であり、加えて、高施肥性や根圏病害抑制効果などの従来の水耕栽培では見られなかった特徴などを示す。

・硝化反応における窒素動態と微生物群の解析
硝化工程中の窒素動態と菌叢の推移を解析し、有機物の無機化に関わる３つの役割（有機物の分解、アンモニア化成、硝酸化成）を担う菌群が、比較的単純な菌群で構成されていることを明らかにし、単純な細菌群のみで再現できる可能性を明らかにした。

・難培養性硝化細菌の分離培養の検討
実栽培現場では多様な環境が想定され、さまざまな環境に適した硝化細菌が必要となる。これまでは、硝化細菌のコロニー化に１ヶ月以上の培養期間を要していたが、培養条件を精査することで短期間でのコロニー化に成功した。

・硝化反応に関わる微生物生態機能の再構築
自然土壌中での有機物の無機化に関して、硝化に関わる代表的な微生物を活用し、有機態窒素のアンモニア化成と硝酸化成を同時に実現する微生物群集の再構築に成功した。また、微生物群をデザインすることで、多様な環境下において硝化反応を実現できる可能性を提示した。

Design and control of nitrifying bacterial consortia

○Akinori Ando[1,2], Jun Ogawa[1,2]
([1]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words nitrification, nitrifying bacteria, microbial consortia

2S-S2a02 プラスミドによる複合微生物系の制御を目指して～複合微生物系におけるプラスミドの動態～

○新谷 政己 [1,2,3]
（[1]静大院・総合科技, [2]静大・グリーン科技研, [3]理研・バイオリソース）
shintani.masaki@shizuoka.ac.jp

プラスミドは，接合伝達という現象によって，それを保有する供与菌から，保有しない受容菌へと移動する．プラスミドを受け取った受容菌は，プラスミド上の遺伝子のはたらきによって，その形質を大きく変えるため，プラスミドは微生物の急速な進化・適応能を担う重要な遺伝因子とされる．しかし，自然界の複合微生物系内で，どのプラスミドが，いつ，どの微生物に接合伝達するのかという情報は驚くほど少ない．演者らは，このような情報が明らかになれば，複合微生物系内におけるプラスミドの伝播現象の人為制御につながることを期待し，土壌や水圏など，様々な環境下におけるプラスミドの動態について研究を行ってきた．
演者らは以前，土壌の複合微生物系をモデル受容菌として，プラスミドを受け取った微生物を細胞レベルで検出・分離・解析する手法を確立した．接合伝達の検出には，GFP を接合完了体でのみ発現するシステムを用い，緑色蛍光を指標にしたセルソーターによって接合完了体を一細胞ずつ検出・分離した．得られた細胞を，培養せずに phi29 ポリメラーゼによって直接全ゲノムを増幅後，PCR でプラスミドの保有を確認するとともに 16S rRNA 遺伝子を増幅して接合完了体の属種の同定を行った．その結果，従来の培養法に依存する手法では，宿主として得られなかった微生物を得ることに成功した [1]．
プラスミドの好気条件下における接合伝達現象については研究が進められてきたが，地球上に広く分布する，微好気・嫌気条件下の接合伝達性についてはほとんど調べられていない．こうした条件下では，プラスミドの動態が変化する可能性がある．そこで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検証した．その結果，プラスミド・供与菌・受容菌の種類によらず，プラスミドの接合伝達頻度は好気条件と比べて微好気・嫌気条件下では 1/10～1/100 に低下した．また接合伝達頻度の違いは，各菌株の生育の違いには依らないことも示唆された．さらに，複合微生物系を受容菌群とし，好気・微好気条件下で得られる接合完了体について，セルソーターを用いて分離し，その種類を比較したところ違いが認められた．この結果は，酸素条件の違いによって，プラスミドのみかけの宿主域が変化することを示唆していた．
また，プラスミドの接合伝達能を指標にした収集法により，環境中の複合微生物系で実際に伝播している新たな自己伝達性プラスミドを複数取得した [2]．これまでに，下水処理場の嫌気処理槽，牛糞堆肥，湖沼底泥由来の 15 本のプラスミドの全塩基配列を明らかにしており，そのうち 7 本は報告例の少ない，PromA 群というプラスミド群に属する新規性の高いプラスミドであった（全 15 本のうち演者らが 7 本を決定）．また，2 本はプラスミド群が同定されていない新規なプラスミドであった．これらのことは，自然界には，未だ見過ごされている，実際に遺伝子の伝播を担うプラスミドが存在することを示唆している．興味深いことに，上述した PromA 群プラスミドのうち，塩基組成（GC 含量，コドン使用頻度，連続塩基の出現頻度）が大きく異なるプラスミドが存在した（例えば GC 含量は 10%も異なる）．これらのプラスミドの宿主域について，セルソーターを用いた手法で比較したところ，互いに異なっていた [2]．このことは，プラスミドの塩基組成の違いが，その宿主域を変化させる要因であることを示唆している．
以上，プラスミドの伝播の実態を知ることで，複合微生物系におけるプラスミドの挙動を人為的に制御するための手がかりを得られると考えている．講演ではこうした知見を利用した，複合微生物系の制御の可能性についても議論したい．

1. Shintani et al., 2014, Appl. Environ. Microbiol. 80:138-145.
2. Yanagiya et al., 2018, Front. Microbiol. 9:2602.

Behaviors of plasmids in various microbial community

○Masaki Shintani[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]BRC, RIKEN)

Key words plasmid, gene transfer, microbial community, bacteria

2S-S2a03 大規模ネットワーク分析による菌叢動態の解明と制御

○東樹 宏和
（京大・生態研）
hiro.toju@gmail.com

DNA メタバーコーディングによる生物叢分析が標準ツールとなった現在、これまで観察が困難だった生物間の関わりを「ネットワーク」という形で解き明かせるようになってきた。これまで、植物－真菌共生ネットワーク、細菌－真菌共存ネットワーク、腸内細菌ネットワークなどの解明を進めてきたが、技術開発によってさらにこの研究対象を拡大中である。また、そうした研究で得られた知見を基に、微生物叢の設計と制御を行うことを目指している。

特に注目しているのが、持続可能な農業における微生物叢の設計である。陸上への進出が始まったごく初期（4 億 6000 万年前）より、植物は地下部で真菌類と精緻な共生系を構築し、多様化を遂げてきた。地球上で現在生育する植物種の 9 割は、「菌根菌」と呼ばれる真菌たちの関わりを通じて、リンや窒素の供給を受けている。その一方で、根圏や葉圏にはまだその機能が知られていない、「内生菌」と呼ばれる細菌や真菌が生息している。

こうした無数の内生菌の中から、微生物叢や植物生理の動態に特に強い影響を与える「コア微生物」の探索を進めている。環境中には優れた機能を発揮する微生物種が数多く存在する。しかし、そうした機能の高い微生物を単離・増殖し、農地に投入しても、対象農地の土着微生物との競合に敗れ、定着しないことが多い。また、機能の異なる複数の微生物種を同時に利用しようとしても、微生物種どうしの相性が障壁となることがある。こうした、「機能性は高いが応用しにくい」微生物種の集合体を安定的に制御するため、「コア微生物種」を探索するアルゴリズムを開発した。

現在、植物共生微生物や土壌微生物の系を対象として、選び出された「コア微生物種」の効果検証を行うとともに、機能性を最適化した「コア微生物叢」の設計を進めている。一連の技術は、腸内細菌叢や水圏生物叢にも適用可能で、多様な産業分野における利用に向けて並行して実験を進めている。

本講演では、植物-微生物、および、微生物-微生物関係の複雑な相互作用ネットワークに関するインフォマティクスについて紹介しながら、微生物叢の制御に向けた展望を語りたい。

Toju H, Peay KG, Yamamichi M, Narisawa K, Hiruma K, Naito K, Fukuda S, Ushio M, Nakaoka S, Onoda Y, Yoshida K, Schlaeppi K, Bai Y, Sugiura R, Ichihashi Y, Minamisawa K, Kiers ET. (2018) Core microbiomes for sustainable agroecosystems. Nature Plants 4:247-257

Toju H, Tanabe AS, Sato H (2018) Network hubs in root-associated fungal metacommunities. Microbiome 6:116

Toju H, Yamamichi M, Guimarães PR Jr, Olesen JM, Mougi A, Yoshida T, Thompson JN (2017) Species-rich networks and eco-evolutionary synthesis at the metacommunity level. Nature Ecology & Evolution 1:0024

Toju H, Yamamoto S, Tanabe AS, Hayakawa T, Ishii HS (2016) Network modules and hubs in plant-root fungal biomes. Journal of the Royal Society Interface 13:20151097.

Toju H, Guimarães PR Jr, Olesen JM, Thompson JN (2015) Below-ground plant-fungus network topology is not congruent with above-ground plant-animal network topology. Science Advances 1:e1500291

Toju H, Guimarães PR Jr, Olesen JM, Thompson JN (2014) Assembly of complex plant-fungus networks. Nature Communications 5:5273

Kitada Y, Muramatsu K, Toju H, Kibe R, Benno Y, Kurihara S, Matsumoto M (2018) Bioactive polyamine production by a novel hybrid system comprising multiple indigenous gut bacterial strategies. Science Advances 4:eaat0062

Network science for managing microbiomes

○Hirokazu Toju
(Center for Ecological Research, Kyoto University)

Key words microbial community, microbial consortia, micobiome design, coculture

2S-S2a04 生態学は生物群集デザインに活用できるか？

○近藤 倫生, 東 豊浩, 加藤 広海, 川津 一隆, 長田 穣, 永田 裕二
（東北大院・生命）
michio.kondo.b8@tohoku.ac.jp

特定の生息地に共存する生物種のセットのことを生物群集（ecological community）と呼ぶ。生物群集は、多数の生物・非生物要素が相互作用する複雑系である。その駆動原理を理解することは基礎科学上の重要課題であるのみならず、生態系保全や生物資源管理、水質管理や病害虫管理などの様々な分野への波及効果を持つ。しかし、生態系の複雑性、時空間スケールの大きさ・多様性と観測の難しさから、生態系動態の理解、特にその予測や制御を可能にするような理解、は決して容易ではない。この話題提供では、生態学における種間相互作用論に着目し、生物群集デザインに向けた群集研究の一つの枠組み、方向性を提案する。

群集生態学（community ecology）は、生物群集の構造や成り立ち、あるいはその動態を研究する分野である。群集生態学において、生物群集は相互作用によって互いに関係し合う多種のネットワークとして捉えられる。個々の種間相互作用やそのネットワーク構造は生物種間の効果の伝わり方を規定するので、それぞれの個体群の動態やその総体である群集動態はその影響を受けることになる。実際、群集生態学では種間相互作用ネットワークのあり方によって、個体群の維持や多種共存の可能性が大きく変化することが理論予測されてきた。例えば、Robert May をはじめとする理論研究者は、種数や種間相互作用の密度で評価される「生物群集の複雑性」が高まると、ある閾値を超えた途端、群集動態が急激に不安定化することを予測している。他方、この理論予測は種間相互作用の密度依存性や柔軟性などといった現実の群集ネットワークの構造を考慮に入れることで逆転できる（複雑性による安定化）ことも予測されてきた。これらは種間相互作用が群集動態と密接に関わることを示す好例であろう。

群集動態や種間相互作用に関する理論予測の実証には、しかし、いくつもの壁がある。第一に、種間相互作用を検出・評価することの困難がある。種間相互作用が存在するとは、生物 A の個体群密度の時間変化が他の生物 B の密度の影響を受けることを意味している。生態学においては、生物種の人為的な取り除きや導入に対する群集の動的反応を見ることで種間相互作用を検出してきた。しかし、多種間に非常に多くの種観相互作用があったり、それらが時間変動する時、一つ一つの相互作用の量的評価には非常に大きな努力が求められる。第二に、群集安定性の評価における困難である。生物群集は常に撹乱の影響を受けており、個々の個体群密度はその影響で時間変動を見せることが通常である。この外力による変動それ自体は生物群集の安定性を表していない。種間相互作用によって生じる内生的な動態を評価してやる必要があるが、ここにも内生的な動態を外生的な動態から分離する難しさがある。また種間相互作用と安定性の両方が評価できたとして、両者の間の因果関係を検出することも容易ではないだろう。さらに生物群集の予測や制御、デザインが目標となるとき、種間相互作用や動態、両者の関係性がどのような状況依存性を持つかの把握が求められるようになる。生態系の構成要素やそれらの間の相互作用に関する情報が欠けた状態で、これを実現するのはほとんど不可能のようにも思える。

近年になって、非線形力学理論に基づいて時系列データから生態系情報を取り出そうとする、Empirical Dynamic Modeling（EDM）と呼ばれる時系列解析手法が注目されるようになってきた。この手法は、生態系構成要素や相互作用に関する情報が欠けた状態でも、特定の要素の時系列データから他の相互作用する要素に関する情報を取り出すことで、生物群集の状態や状態間の推移のルール把握を可能にしている。本講演では、この EDM を利用して種間相互作用やその特徴、さらには群集動態との関係を明らかにしようとする私たちの最近の試みを紹介し、このアプローチが生態学にもたらす新しい展開を考察する。さらに私たちが最近取り組んでいる細菌群集の実験系を利用した群集動態研究について紹介し、好ましい特徴を備えた生物群集のデザインを可能にする技術発展への道筋について議論したい。

What contribution can ecological approach make to community design?

○Michio Kondoh, Toyohiro Azuma, Hiromi Kato, Kazutaka Kawatsu, Yutaka Osada, Yuji Nagata
(Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ.)

Key words microbial diversity, microbial community, stability, time series analysis

2S-S3a01 フォトン検出を用いた光合成機能センシングによるシロイヌナズナの生理変化の早期診断

○本橋 令子[1,2], 深沢 知加子[1], 切岩 祥和[1], 明賀 史純[3], 篠崎 一雄[3], 勝又 政和[4]
（[1]静大・農, [2]静大・グリーン科技研, [3]理研・環境資源, [4]浜松ホトニクス.中央研）
motohashi.reiko@shizuoka.ac.jp

生物微弱発光やバイオフォトンと呼ばれる微弱な発光が細胞内の様々な代謝反応過程から放出されると考えられている。植物には遅延発光という分のオーダーで起こる比較的微弱な蛍光が検出される。光合成を行う藻類や植物はクロロフィルなどの光合成色素により光エネルギーを吸収する。吸収した光エネルギーにより、反応中心で電荷分離反応が起こり、反応中心クロロフィル p680 を介し、電子が電子伝達経路へと流れていく。光化学系 II のこの過程で余剰な光エネルギーは蛍光と熱として放出され、クロロフィルから放出される蛍光をクロロフィル蛍光と呼び、励起光の照射を停止するとナノ秒オーダーで消光する。しかし、励起光照射停止後、電子伝達の逆反応により、電荷分離したエネルギーの高い電荷（光化学系の酸化側に生じた正電荷と還元側に生じた負電荷）が再結合することでクロロフィル P680 が再励起状態になり、それが基底状態に落ちる際に放出される蛍光があるが、それが遅延発光である(Berden-Zrimec et al., 2011)。つまり、遅延発光を効率的に検出し、その減衰波形を解析することで、即時クロロフィル蛍光解析では得られていなかった酸素発生系を中心とした光化学系自身や光合成反応全体に関する情報を得ることが可能になる。
遅延発光の測定には光電子増倍管などの光子（フォトン）検出レベルの高度な微弱光計測技術が必要となるため、まだ商業的な活用事例はほとんどないが、浜松ホトニクス株式会社は、世界最高レベルの高感度・高精度の光検出技術を持ち、「光」の研究とその成果を活かしフォトン検出を用いた“光合成機能センシング”機器(TYPE-6100)を開発した。浜松ホトニクス社は、藻類の遅延発光を計測することで、有害化学物質による藻類の生長阻害を早期診断する迅速バイオアッセイ手法「藻類発光法」を開発し (Katsumata et al., 2017a)、サンゴにおける２種の除草剤の影響についても遅延蛍光により調査した(Katsumata et al., 2017b)。早期診断の原理提案、専用の測定装置、ソフトウェア、試薬類を合わせたシステム全体を開発し、遅延発光により藻類などの生長阻害を“早期診断する”ことの有効性の実証に取り組んでいる。現在は、水質検査業などのユーザーより、工場排水などの有害性評価での実用性検証が進んでいる。我々は上記のような研究内容を学会で知り、工場排水などの有害性評価だけでなく、高等植物の“光合成機能センシング”の研究に応用出来ないかと考えた。
モデル植物であるシロイヌナズナはほとんどの遺伝子の破壊株が整備され、ゲノム情報も集積し、栽培も簡単で、植物体サイズも小さく、一度に複数の実験が可能である。シロイヌナズナの葉緑体には、3500 以上のタンパク質が存在しているが、我々は葉緑体への局在が予測されたタンパク質の遺伝子破壊株を整備し、約 2500 ラインを保有している(Myouga et al., 2010)。明賀らはクロロフィル蛍光測定法（PAM 蛍光法）を用いて、葉緑体タンパク質の破壊株の中から光合成（光化学系 II 反応の量子収率）に関与するタンパク質の探索を行ない、多くの変異体を単離できたが、その多くがすでに論文として公表されているものであった(Myouga et al., unpublished data)。
我々は約 1900 の核ゲノムコードの葉緑体タンパク質遺伝子破壊株の遅延発光（蛍光）を測定し、野生型と異なる遅延発光減衰波形を示す葉緑体タンパク質遺伝子破壊株をスクリーニングした結果、25 変異株を得ことができた。得られた変異体の一部は野生型よりも生育が遅く、植物体のサイズが小さかったが、多くは野生型と表現型の違いは観察されず、表現型に表れない植物の生理的な変化を遅延発光によって検出できることが示された。25 の遺伝子破壊株の原因遺伝子と遅延発光減衰波形の類似性から、遅延発光の異常を遺伝子に結び付けることが可能であることもわかった。変異体の遅延発光減衰波形は大きく 4 タイプのグループに分けられ、各グループの原因遺伝子の機能の共通性が確認でき、最も大きなグループの原因遺伝子の機能は、NDH 複合体(NADH dehydrogenase-like complex)や NDH 構成するタンパク質 RNA の編集やフェレドキシン（Fd）を含む循環的電子伝達経路に関するものであった。また、２成分法により減衰波形を解析した場合、循環的電子伝達経路という類似の機能を持つ（NDH、Fd）タンパク質の遺伝子破壊株は、遅延発光減衰波形が類似していることが示された。
さらに、10 日間通常の MS 培地で栽培したシロイヌナズナの幼苗を N、P、K、Ca、Mg、S、Fe、B 欠乏の MS 培地に移植し、経時的 (1 ～ 7 日間)に遅延発光データを取得し、MS 培地で栽培したシロイヌナズナの遅延発光データと比較し、栄養欠乏の影響を遅延発光で検出できるか調べた結果、N、P、Fe 欠乏の影響を検出する事ができた。また、高温ストレスは 42 度で 1 .5 時間処理後に、22 度で 1 日栽培し、遅延蛍光を測定した結果、光合成の遅い反応の蛍光が減少する結果を得、高温ストレスの影響は 1 .5 時間から顕著な違いを検出可能である事がわかった。本研究により、フォトン検出を用いた光合成機能センシングによるシロイヌナズナの生理変化の早期診断が可能である事がわかったので成果を報告する。

Early diagnosis of physiological changes by the photosynthetic sensing using photon detection in *Arabidopsis thaliana*

○Reiko Motohashi[1,2], Chikako Fukazawa[1], Yoshikazu Kiriiwa[1], Fumiyoshi Myouga[3], Kazuo Shinozaki[3], Masakazu Katumata[4]
([1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]CSRS, RIKENS, [4]Hamamatsu Photonics)

Key words *Arabidopsis thaliana*, photosynthesis, tag lines, chloroplast

2S-S3a02 食農産業における LED の利活用技術の開発

○藤川 康夫[1], 鶴本 智大[1], 泉田 智史[2], 三島 俊介[3], 岡澤 敦司[4], 加藤 悠一[5], 蓮沼 誠久[5,6]
（[1]日亜化学工業株式会社, [2]ヒューマン・チップス有限会社, [3]大塚電子株式会社, [4]阪府大院・生命環境, [5]神戸大・先端バイオ工, [6]神戸大院・科技イノベ）
yasuo.fujikawa@nichia.co.jp

日本フォトニクス協議会（JPC）関西アグリバイオフォトニクス産業化研究会では、食農産業における LED の利活用技術の開発を目標に、光制御による植物・微細藻類の生育促進および有用物質生産の原理・プロセスについて、産学連携体制で基礎的に研究を行っている。
本講演では、その研究成果の一部を紹介する。
1 つ目は、収穫後の作物に紫外線 LED 光を照射しフェノール性有用物質の含量を高める研究である。これは、陸上植物が持つ UVR8 光受容体を介したポリフェノール生合成酵素の発現誘導に着目した技術である。具体的には、収穫後の作物に数分オーダーで紫外線 LED 光を照射した後、単に作物を貯蔵するだけで生体反応が誘導され、ポリフェノールを増産させることが出来る。ポリフェノールは強い抗酸化作用を持つため、ポリフェノール含有食品は機能性食品として注目を集めている。特に、ブドウを丸ごと発酵・熟成させた赤ワインは多くのポリフェノールを含み、動脈硬化予防、アルツハイマー予防、高血圧予防などの健康効果が期待される。現在は、本研究の応用として、醸造用ブドウ果皮のポリフェノール含量の増進を検討している。
2 つ目は、緑色 LED を用いた微細藻類バイオマス増産の研究である。これは、緑色 LED 光がクロロフィルに吸収されにくく、培養槽の深部まで届くことに着目した技術である。具体的には、緑色 LED を用いて培養槽内の照度分布の均一化を図りつつ、培養槽受光面の過度な光吸収による光酸化ストレスを抑制させることで、微細藻類の細胞密度や増殖速度を高めることが出来る。現在は、さらなる高い生産性を目指して光照射条件の最適化などを検討している。昨今、微細藻類は栄養バランスのよい植物性食品や、微細藻類由来のサプリメントとして注目を集めている。
今後，食品加工業者などと共同で本技術の実用化を進め，分野横断型産学連携による科学的根拠に基づいたオープンイノベーションの好例としたいと考えている。

Development of LED technology in food and agriculture industries

○Yasuo Fujikawa[1], Tomohiro Tsurumoto[1], Satoshi Izuta[2], Shunsuke Mishima[3], Atsushi Okazawa[4], Yuichi Kato[5], Tomohisa Hasunuma[5,6]
([1]Nichia Co., Ltd., [2]HumanChips Inc., [3]Otsuka Electronics Co., Ltd., [4]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [5]Eng. Biol. Res. C., Kobe Univ., [6]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words food and agriculture industries, LED, polyphenol, microalgae

2S-S3a03 大気圧空気プラズマを用いた低残留植物病害防除法の開発

○金子 俊郎, 二瓶 健司, 胡 玥, アハマドシャヒー アハマドノール, 高島 圭介
（東北大院・工）
kaneko@tohoku.ac.jp

近年，プラズマを農業に応用する研究が注目を集めており，特に大気圧プラズマを照射した溶液を植物の病害防除に用いる研究が盛んに行われている．大気圧プラズマで生成された電子，イオン，活性種が溶液に照射されることで，溶液中に新たな活性種が生成され，その殺菌効果を利用するものである．このとき，殺菌に作用する活性種の寿命が非常に短い（分オーダー以下）ため，植物に残留する量が極めて少ないことから，低残留の植物病害防除法として期待されている．本研究では，プラズマを照射する溶液として導電性液体および精製水を用いて，また大気圧プラズマを生成するガス種や生成電力等を変化させることで，低残留で植物への侵襲が少なく，かつ高効率の植物病害防除法を開発することを目的としている．
実験では，まず導電性液体としてプラズマ中に液体肥料の成分である硝酸カリウム溶液を高速で射出し，導電性であることから液体自体を電極として用い，プラズマと液体の接触を誘導する，新たなプラズマ照射溶液直接噴霧装置を作製した．本実験の目的は，プラズマ照射溶液（PES）噴霧により，短時間でイチゴ炭疽病菌分生子の発芽を抑制することである．プラズマ照射溶液直接噴霧装置で生成された PES には，プラズマ中を導電性液体が通過する機構により，プラズマ気液界面における液相短寿命活性種の高効率な生成が期待される．そこで，テレフタル酸（TA）を用いた化学プローブ法によって液相短寿命活性種の一種である OH ラジカルの計測を行った．実験結果を TA と OH ラジカルの反応速度と OH ラジカル同士の反応速度から定義した反応効率でフィッティングした結果，本装置で作製した PES には，気液界面付近（～10 nm）に局在する反応により，液相短寿命活性種である OH ラジカルが高濃度（30 mM）で生成されていることが分かった．
PES のイチゴ炭疽病菌分生子の発芽抑制効果を検証するために，液体導入量 F_{sol} を変化させて生成した PES を分生子に対して 5 秒間直接噴霧する実験を行い，それぞれの場合について発芽率を算出した．実験の結果，F_{sol} ~ 4 mL/min および 8 ~ 14 mL/min において，高い発芽抑制効果を示すことが分かった．また，装置へ導入するガスを空気からプラズマ活性ガス（大気圧プラズマ中を通過させた空気）に変更することで，F_{sol} ~ 18 mL/min の高流量域で発芽率が低くなることが観測された．
化学プローブを用いて PES 中の活性種を計測した結果，低流量（F_{sol} ~ 4 mL/min）の場合において，高濃度の H_2O_{2aq}（約 1 mM）, $NO_2^-{}_{aq}$（約 0.3 mM）が観測された．しかし，それぞれの試薬による比較実験の結果，発芽抑制には不十分な濃度であったため，低流量域では H_2O_{2aq} と $NO_2^-{}_{aq}$ の液相における化学反応で殺菌性を有すると報告されている液相短寿命活性種の過酸化亜硝酸 $HOONO_{aq}$ が生成され，それが発芽抑制に寄与していたと考えられる．一方で，高流量域（F_{sol} = 8 ~ 14 mL/min）ではいずれの活性種濃度も低下しており，液中の反応によらない短寿命活性種生成が関与していると考えられる．高流量域の発芽抑制効果を考察するために，気相活性種を FT-IR を用いて計測した結果，NO_{2gas} が多く観測された．したがって，この領域においては気相から供給される NO_{2gas} と液相表面に生成される OH ラジカルの気液界面における化学反応により $HOONO_{aq}$ が生成され，発芽抑制に寄与していると考えられる．また，さらなる高流量の F_{sol} = 18 mL/min においては，プラズマ活性ガス中の N_2O_{5gas} と OH 由来で液面に局在する H_2O_{2aq} が気液界面において化学反応し，殺菌性を有すると報告されている液相短寿命活性種の過硝酸 HO_2NO_{2aq} の生成も考えられ，高流量域における発芽抑制効果には複数の因子が存在し，いずれもプラズマ気液界面における化学反応に起因している可能性が示唆された．
次に硝酸カリウムの代わりに精製水を噴霧する装置を開発した．ここでは，プラズマ「生成部」とプラズマにより生成された活性種を精製水と接触・溶解させて高速で噴霧する「溶解・噴霧部」を分離した「プラズマ生成活性種溶解液噴霧装置」を用いて行った．その結果，プラズマで生成されたオゾンが精製水に溶解して殺菌（イチゴ炭疽病菌分生子の発芽抑制）に作用することと，そのオゾンがプラズマで生成された活性窒素種との精製水中での反応により短時間で消失し，1 分以内に検出限界以下の濃度になること，大気中にも安全基準の 0.1 ppm 以上は放出されないことが分かった．さらに，このプラズマ生成活性種溶解液をモデル植物に噴霧し，植物細胞からの電解質漏出率の測定により植物へのダメージを評価したところ，殺菌効果を示す噴霧時間 10 秒においては，ダメージが観測されないことが分かった．
以上の結果より，プラズマ照射溶液直接噴霧装置（導電性液体）およびプラズマ生成活性種溶解液噴霧装置（精製水）を用いて，プラズマおよび活性種を液体に照射することで，液相短寿命活性種を短時間・高濃度で生成することに成功し，短い噴霧時間でイチゴ炭疽病菌分生子の発芽を抑制できることを示した．このときの発芽抑制には液相短寿命活性種が寄与していることが示唆され，プラズマ気液界面における化学反応が重要な因子であることが示された．

Development of plant pathogen control method with low residual pesticides using atmospheric pressure air plasmas

○Toshiro Kaneko, Kenji Nihei, Hu Yue, Ahmad Shahir Ahmad Nor, Keisuke Takashima
(Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words air plasma, reactive oxygen nitrogen species, plant pathogen control, low residual pesticide

2S-S3a04 任意の圃場環境に最適な作物の育種を可能に － データ科学に基づく作物設計基盤技術の開発

○平山 隆志 [1], 最相 大輔 [1], 井藤 純 [2], 高萩 航太郎 [2], 香西 雄介 [2], 鷲見 典克 [3], 池田 陽子 [1], 井上 小槙 [4], 上原 由紀子 [4], 清水 みなみ [4], 服部 公央亮 [5], 梅崎 太造 [3,5], 辻 寛之 [2], 持田 恵一 [1,2,4]
（[1]岡山大・資源植物科研, [2]横浜市大・木原研, [3]名古屋工大院, [4]理研・環境資源研, [5]中部大・工）
hira-t@okayama-u.ac.jp

地球規模での温暖化が進む中、世界の各地で気象の変化が確認されている。また、国際的な気象観測機関によれば、今後も更にこの傾向が続き、３０年後の２０５０年には、現在とは大きく異なる気象状況になっていると予測されている。このような気象状況の変化は、当然のことながら農業生産、生活さらに経済活動に大きく影響するであろうと警告している。特に、農業生産への影響は深刻であり、何らかの対応が迫られている。将来気温が上昇することを見越して、すでに日本の各地で高温に耐性を示すイネや他の作物の品種改良が進められている。
環境の変化に耐性を持つ植物あるいは作物の作成、育種は、農耕に依存する人類の夢であり、それを目指し作物の育種学、さらにはこの数十年は分子生物学を基盤とした植物分子生物学が進展してきた。特に、演繹法に立脚した分子生物学による環境ストレス応答の理解は目覚ましいものがあり、これにより我々は、まだ大雑把ではあるが、植物がどのように環境の変化を認識し、それにどのように対応しているかを理解することができるようになった。しかしながら、得られた分子レベルの知見を圃場の作物の育種に適応させるには、まだ壁がある。何故なのか。一つには、注目する生命現象を詳細に捉えるために特定の条件のみを短時間変化させる一般的に用いられる実験条件と、様々な環境の変化が同時に且つ生育過程にわたり随時起きている圃場の環境条件の間に大きな違いがあるためではないか、と考えられている。もっと端的に言えば、圃場環境での遺伝要因と環境要因の相互作用が理解できていないためといえるだろう。もちろん、農業形質を指標にした QTL 解析や GWAS によって関連する遺伝要因が抽出されている。しかし、多くの場合、環境要因は考慮されておらず、遺伝要因と環境要因の相互作用を考慮しての育種はまだ難しいのが現状である。この問題の解決には、農業形質に関係する遺伝要因と環境要因の相互作用を記述することが必要である。しかし、遺伝要因と環境要因は、互いに影響し合い変化する複雑な関係であるため、その理解、記述は容易ではない。一般に作物のライフコースの後半で見られる農業形質は、その形質が現れる時点の相互作用だけではなく、生育の過程で構築された遺伝要因と環境要因の相互作用の積算に大きく影響されると考えられる。現在、圃場作物の遺伝要因と環境要因の相互作用を明らかにしようと、世界各国で圃場作物の詳細な表現型データの取得方法の開発、得られたデータの解析方法、それらを利用して、遺伝要因と環境要因から作物の生育または収量予測モデルの構築が試みられている。
我々は、作物のライフコースで農業形質に大きく影響する様々な生物的指標の変化（これを状態形質と定義）を捉え、その変化に関わる遺伝要因を特定するとともに影響する環境要因を抽出し、それらによって農業形質を説明するモデルを構築することが可能と考えた。現在、この考えに基づき、圃場オオムギの出穂期を農業形質の例として、圃場オオムギの時系列オミックスデータの収集、それらを利用した状態形質の抽出、状態形質を利用したモデルの構築、モデルとゲノム情報からの出穂時期の予測を中心とした研究プロジェクトを進めている。具体的には、出穂期の環境応答性が異なるオオムギ系統複数を実験圃場で生育し、経時的に画像を取得する一方、週ごとの形態測定、トランスクリプトーム、ホルモノーム、エピゲノム解析を行い、生長および生理的な情報をライフコースに沿って収集している。これらのデータを、人工知能を利用した非線形的分類法により構造化し、出穂期の系統間差や年次間差に関連した状態形質の抽出およびモデルの構築を進めている。また、出穂への生長相転換をより詳細に捉えるためメリステムの解析や圃場作物の画像解析の取り組みなどを含め、研究プロジェクトの概要と、これまでに得られた知見について紹介し、議論する予定である。

Data driven crop design technology

○Takashi Hirayama[1], Daisuke Saisho[1], Jun Ito[2], Kotaro Takahagi[2], Yusuke Kouzai[2], Norikatsu Sumi[3], Yoko Ikeda[1], Komaki Inoue[4], Yukiko Uehara[4], Minami Shimizu[4], Koosuke Hattori[5], Taizo Umezaki[3,5], Hiroyuki Tsuji[2], Keiichi Mochida[1,2,4]
([1]IPSR., Okayama Univ., [2]KIBR, Yokohama City Univ., [3]NITech., [4]CSRS, RIKEN, [5]Coll. Eng., Chubu Uni.)

Key words phenome, life-course multi-omics data, data science, Barley

2S-S3a05 バイオエコノミーが引き起こす食農デジタル産業におけるゲームチェンジ

〇齊藤 三希子
（ルール形成戦略研究所）
Mikiko.Saito@jp.ey.com

緑の革命以降、イノベーションが生まれていなかった食・農業分野において、近年、ロボット技術や深層学習、バイオテクノロジー等の著しい技術革新により、フードバリューチェーン全体にテクノロジーを導入する“アグリフードテック（AgriFoodTech）”やバイオエコノミーが注目を集めている。 AgriFoodTech の普及・拡大やバイオエコノミーの取組みは、気候変動や食料問題、環境負荷低減など、企業の経営活動や食文化に対しても大きな影響を及ぼしている世界的な社会課題解決だけでなく、新たなイノベーションが創出されることを期待されている。日本は化石燃料資源が乏しい国だが、化石燃料に変わる技術と自然資源を持っている。 しかし、日本企業が技術はあるのに世界で勝てない現状が続いている。一方、欧米各国は新たな技術開発やイノベーションの創出と同時に、規制・制度構築等のルール形成に取り組むことで、社会解決と経済成長の両立を図っている。AgriFoodTech やバイオエコノミーは、まだ世界でも始まったばかりであり、日本企業がゲームチェンジを引き起こせる可能性が残っている。本企業が技術はあるのに世界で勝てない現状から脱却するためには、民間主導の技術革新とルール形成戦略の両面から取り組む体制整備を構築することが急務である。本シンポジウムでは、気候変動による世界の食料及び食文化への影響を概説し、解決策として注目されている AgriFoodTech やバイオエコノミーの動向を紹介するとともに、ルール形成の重要性に関して言及する。

Game change in agriculture caused by bioeconomy

〇Mikiko Saito
(Center for Rule-making Strategies)

Key words bioeconomy, agriculture, secureeconomy

2S-S3a06〈招待講演（韓国生物工学会）〉

Effects of FIR emission and phytochemicals on Lymphedema alleviation

〇Hei Chan Lee, Dae Hoon Kim
(Dept. Pharm. Eng. & Biotechnol., Sun Moon Univ.)
heichan@sunmoon.ac.kr

Lymphedema is caused by the lymphatic vessel dysfunction mainly due to microbial infection, inflammation or lymph node dissection. Recently, thermal therapy using a Far Infrared Ray (FIR) and phytochemicals has been recognized as a medicine therapies. Especially, FIR treatment has been widely applied to the patients suffering from body fluid circulation system related diseases, such as hypertension, lymphedema, cardiovascular disease, ischemia and so on. Also, phytochemicals in essential oils (EOs) extracted from the plants have been utilized as another therapy against microbial infection, inflammation, oxidative stress, etc. Despite of these two therapies being used actively, the combination treatment of FIR and phytochemicals has not been studied yet. Thus, the main goal of this research is to analyze and abridge the previous studies for each therapy, and suggests a new hypothesis for the combined therapy on lymphedema. In conclusion, FIR therapy and phytochemicals alleviate the risk factors of Lymphedema through the regulation of specific cytokines and enzymes influencing to the chronic inflammation and blood flow. Additionally, essential oils from the plant extracts inhibit the activity of the micro-organisms including Staphylococcus aureus and Group A Streptococcus.

Effects of FIR emission and phytochemicals on Lymphedema alleviation

〇Hei Chan Lee, Dae Hoon Kim
(Dept. Pharm. Eng. & Biotechnol., Sun Moon Univ.)

Key words lymphedema, far infrared, phytochemicals

2S-S5a01 非抗体分子骨格を用いた人工結合タンパク質作製基盤の構築

○安井 典久
（岡山大院・医歯薬）
nyasui@okayama-u.ac.jp

抗体分子は，特異的な分子認識能を有するため，種々の研究での用途は広く，検査・診断試薬や医薬品としても利用されている。一方で，分子量が大きいこと，複数のポリペプチド鎖から構成されること，ジスルフィド結合を有すること，といった抗体の分子特性がしばしば利用上の問題となる。特異的な分子認識能の発揮に必要な抗体分子の構造的特徴は，安定な構造の免疫グロブリンドメインを骨格として，アミノ酸配列が多様性に富む相補性決定領域を分子表面に提示していることである。この構造的特徴を満たせば，免疫グロブリンドメインでなくとも抗体様の分子認識能を発揮できることが示されてきた。実際に，抗体分子の特異的な分子認識能を模倣し，かつ抗体の欠点を補うために，様々なタンパク質ドメインを非抗体分子骨格として用いた人工結合タンパク質の作製とそれらの利用が活発に行われている。
私たちは，任意の標的分子を特異的に認識する人工結合タンパク質を，生物工学領域を含む様々な研究において利用するために，それらを進化分子工学の手法を用いて作製する基盤を構築することを目指して研究に取り組んできた。具体的には，甘味タンパク質の人工改変体である一本鎖モネリンに着目し，その非抗体分子骨格としての有用性を検討した。
一本鎖モネリンは，97 アミノ酸残基から構成され，シスタチン様フォールドを形成する。一本鎖モネリンの局所的な 2 本のループのアミノ酸配列を多様化した変異体ライブラリーを作製した。ループのアミノ酸配列の多様化に際しては，アミノ酸組成にバイアスをかけ，標的分子に結合する人工結合タンパク質を取得する成功率の向上を図った。ライブラリーサイズが 1×10^9 以上の大規模なファージディスプレイライブラリーを作製し，その選別をモデル標的タンパク質 green fluorescent protein 変異体 (GFPuv) および yeast small ubiquitin-like modifier (ySUMO) に対して実施した。その結果，GFPuv と ySUMO それぞれに結合する一本鎖モネリン変異体を得ることができた。それらのうち，GFPuv に結合する人工結合タンパク質 (GBP-1) に着目し，その分子特性を解析した。精製サンプルを調製し，ゲルろ過クロマトグラフィーによる溶液挙動を解析した結果，GBP-1 が単分散することを確認した。また，表面プラズモン共鳴測定により，相互作用の解離定数を見積もることができた。さらに，GBP-1 と GFPuv の共結晶構造解析を行い，GBP-1 は設計通り，アミノ酸配列を多様化させた 2 本のループを用いて GFPuv を認識していることを明らかにした。以上のことより，一本鎖モネリンは，人工結合タンパク質の有望な非抗体分子骨格となることが示された。
本講演では，タンパク質工学におけるウェット技術に軸足を置く研究者の立場から，上述の新規な非抗体分子骨格に基づく人工結合タンパク質作製基盤の構築過程の詳細を，通常では論文に記載されず表に出てこないデータをも含めて紹介する。それにより，タンパク質工学，特に進化分子工学におけるウェット技術の限界とドライ技術の貢献が求められる点をあらためて認識するきっかけを提供したい。

Design and generation of synthetic binding proteins using a non-antibody molecular scaffold

○Norihisa Yasui
(Grad. Sch. Med. Dent. Pharm, Sci., Okayama Univ.)

Key words non-antibody molecular scaffold, protein engineering, phage display, directed evolution

2S-S5a02 抗体医薬を代替する標的結合小型タンパク質デザイン

○門之園 哲哉
（東工大・生命理工）
tetsuyak@bio.titech.ac.jp

がんや様々な自己免疫疾患の分子標的治療において、標的に強く結合する小型タンパク質は安価な抗体医薬代替分子としての利用が期待される。このような小型の抗体代替分子は化学合成により製剤コストを抑えることが可能であり、また抗体よりも組織浸透効率や体外排出効率が高く、細胞膜に発現する分子に限らず細胞内に局在する分子も標的として利用できるため、従来の抗体医薬の薬効を凌ぐ治療薬を開発することも可能である。そのため、新たな創薬モダリティとしての臨床応用を目指し、抗体代替小型タンパク質のデザイン技術の高度化が進められている。
従来のデザイン技術のほとんどは directed evolution （指向性進化法）に基づくものである。つまり、特定の小型タンパク質を足場骨格として選択し、それらの分子表面に存在するアミノ酸残基を他のアミノ酸へとランダム置換した変異体ライブラリーを作成し、その中から各種迅速スクリーニング法によって標的に強く結合する分子を取得する。この場合、網羅性に優れたスクリーニングが実現できるものの、ランダム化する残基が 1 つ増えるごとにライブラリーサイズが 20 倍になるため、各スクリーニング方法のライブラリーサイズの限界に依存して、必然的にランダム化できる残基の数は限られてしまう。また、結合領域（エピトープ）を選択できないため期待する場所に結合するとは限らず、標的結合分子を取得できたとしても薬効を示さないことがある。近年、スーパーコンピューターの高性能化と計算科学的手法の進歩により、構造計算で標的との結合構造をデザインし、合理的に標的結合分子を取得することが可能になりつつある。しかし、分子間の結合構造を正確に予測できる一般的な方法がまだ確立されていないため、計算技術の高精度化による汎用性の拡大が課題となっている。
そこで我々は、計算科学的手法と迅速スクリーニング法を組み合わせた標的結合小型タンパク質の半合理的デザイン技術“smart protein design”を提案し、基盤技術の構築を進めている。この場合、広大な分子空間を効率よく探索するため、構造計算を利用して小規模な小型タンパク質ライブラリーをデザインし、迅速スクリーニングによって全ての候補分子を評価することが特徴である。これにより、現段階での構造計算技術の不完全性をカバーすることが可能になる。そこで本講演では smart protein design の例として、ペプチドの構造ゆらぎ制御に着目した標的結合小型タンパク質デザインを紹介したい。

A design strategy for creating antibody mimetic small proteins

○Tetsuya Kadonosono
(Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech)

Key words protein engineering, smart protein design, antibody mimetics, small biopharmaceuticals

2S-S5a03 機械学習と実験の融合によるタンパク質の高機能化

〇齋藤 裕[1,4], 及川 未早来[2], 中澤 光[2], 亀田 倫史[1,4], 津田 宏治[3,4], 梅津 光央[2,4]
（[1]産総研・人工知能, [2]東北大院・工, [3]東大院・新領域, [4]理研・革新知能）
yutaka.saito@aist.go.jp

機械学習（人工知能）の流行はタンパク質工学の分野においても顕著である。ここ１年間で、タンパク質の機能改変に機械学習を利用した研究が国内外のグループから続々と発表されている。昨年、我々は機械学習とウェット実験を組み合わせることで、タンパク質の機能改変を大幅に効率化する技術を開発した（Saito et al. ACS Synth Biol. 2018）。本手法では、まず飽和変異法やランダム変異法によって少数の変異体を調製して実験を行い、機械学習のための学習データを取得する。次に、機械学習の一種であるベイズ最適化によって、どのような変異を導入すれば目的の機能を有するタンパク質が得られるか予測を行う。これにより、目的の機能を有するタンパク質を豊富に含み、なおかつ安価に実験を行える小規模な変異体群（スマートホットライブラリー）を提案することが可能となる。我々は本技術の有効性を蛍光タンパク質の機能改変において実証した後、現在は酵素などの様々な機能性タンパク質に対して応用展開を開始している。
本発表では、機械学習の利用において考慮すべき様々な事項について、我々の研究で得られた最新の結果を例に紹介する。例えば、学習データとして何個の変異体を取得するのか。特徴量には何を用いるのか。改変したい機能が複数ある場合（例えば蛍光タンパク質の蛍光強度と蛍光波長）、それらを同時に学習させるにはどうするか。学習データとして既にある程度性能の良い変異体が得られている場合と、ほとんどネガティブデータしかない場合で、機能改変の方向性はどのように変化するのか。予測を行う配列空間はどの程度まで大きくできるのか。欠損値や解釈の難しい実験データをどのように扱うのか。これらの問題には明確な答えが出ないことも多いが、我々の研究での取り組みや、既存研究において提案された方法について紹介する。以上を通して、タンパク質工学における機械学習の可能性と現状での課題について議論したい。

Improving protein functions with machine learning and experiments

〇Yutaka Saito[1,4], Misaki Oikawa[2], Hikaru Nakazawa[2], Tomoshi Kameda[1,4], Koji Tsuda[3,4], Mitsuo Umetsu[2,4]
([1]AIRC, AIST, [2]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. Front. Sci., Univ. Tokyo, [4]AIP, RIKEN)

Key words machine learning, artificial intelligence, protein engineering

2S-S5a04 人工タンパク質構造ライブラリーの創出

〇古賀 信康[1,2,3]
（[1]自然・生命創成, [2]自然・分子研, [3]総研大）
nkoga@ims.ac.jp

生命は悠久な進化の歴史の中でタンパク質分子を開発し，これらを用いて様々な生命現象を生み出している．望みの機能を持ったタンパク質分子を自在に設計することが可能になれば，細胞の制御・設計や医療への貢献，加えて新規酵素やマテリアル開発による産業への応用が期待される．我々は，タンパク質分子を主鎖構造を含めてゼロからデザインすることで，望みのタンパク質分子を創成する技術の構築を行っている．タンパク質を合理的にデザインする試みは1980 年代後半から行われてきたが，2000 年以降，計算機の性能向上と構造生物学の発展によるタンパク質立体構造の理解にともない，その技術が急速に発展している．この技術を用いて，自然界のタンパク質を改変することで，様々な機能性タンパク質の合理的デザインが現在盛んに行われている．しかしながら，タンパク質は進化の歴史の中で，自身の機能を発現することに構造を最適化してきており，これらを多少改変するだけでは新しい機能を付与することは難しい．また，多くの場合において天然のタンパク質構造の安定性は低く，少しの改変でも構造が壊れることが非常に多い．そこで我々は，機能デザインのための鋳型構造となる，安定で多種多様な形状の構造で構成される人工タンパク質構造ライブラリーの創出に向けて，計算機を用いて特定の立体構造に折りたたむアミノ酸配列を，主鎖構造を含めて完全にゼロから設計する手法の開発を行ってきた．その結果，タンパク質を主鎖構造からデザインするためのルールを発見し，これらを用いて様々な形状のタンパク質構造を原子レベルの精度でデザインすることに成功した．本講演では，これら研究成果の紹介に加えて，タンパク質設計技術の発展における，生化学実験結果の計算機デザインへのフィードバックの重要性について議論する．

Generation of de novo protein structure library

〇Nobuyasu Koga[1,2,3]
([1]NINS, ExCELLS, [2]NINS, IMS, [3]SOKENDAI)

Key words protein engineering

2S-S5a05 理論と実験によるタンパク質デザイン

○新井 宗仁 [1,2]
（[1]東大院・総合文化, [2]東大院・理）
arai@bio.c.u-tokyo.ac.jp

産業や医療などに役立つタンパク質を計算機で自由自在に設計できれば、私たちの生活は豊かなものになるだろう。タンパク質デザイン研究の最近の進展は目覚ましく、近い将来、自然界における生物進化を人類が超越する可能性もある。しかし、現在はタンパク質のフォールディング問題が未解決であるため、タンパク質の合理的設計法は未完成であり、進化分子工学などの実験が必要である。また、さまざまな理論的設計法でデザインされたタンパク質を実際に作製し、理論的手法を改良することも必要である。ここでは、我々が最近、実験と理論の両面から取り組んでいるタンパク質デザイン研究の例をいくつか紹介したい。

シアノバクテリアは、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）という 2 つの酵素を用い、光合成で軽油相当のアルカンを合成できることから、カーボンニュートラルな再生可能バイオエネルギーの生産源として注目されている。しかし AAR と ADO の活性は低いため、両酵素の高活性化が急務である。そこで我々は、AAR と ADO の酵素活性を向上させた変異体の創出を目的として、網羅的なアミノ酸置換変異解析や進化分子工学的実験などを進めている。これまでに AAR と ADO のアラニンスキャン変異解析を完了し、高活性化しうる変異導入部位を見出した。それらの変異部位において飽和変異解析を行うことにより、ADO の酵素活性を向上させた変異体を得ることができた。

抗体医薬品などの精製には、プロテイン A を用いたアフィニティークロマトグラフィーが用いられるが、抗体をプロテイン A から解離させるためには溶液を酸性条件にしなければならず、抗体が酸変性して凝集体を形成するリスクがある。それゆえ、pH 5.5 以上で抗体を解離可能なアフィニティーリガンドの創出が必要である。そこで我々は抗体結合領域と pH 制御領域の 2 つを連結させた新規キメラタンパク質を合理的に設計した。さらに、pH 制御領域の pH 応答性を改善するようなアミノ酸置換変異を合理的に設計して導入した結果、pH 7 で抗体と結合し、pH 5.5 で抗体を解離できるアフィニティーリガンドを開発できた。

天然変性タンパク質である c-Myb は未分化造血細胞の増殖や分化を制御する転写因子であり、転写コアクチベーター CBP の KIX ドメインと相互作用して転写を促進させるが、その過剰な発現は白血病の原因となる。したがって、c-Myb-KIX 間相互作用を阻害できれば白血病の新しい治療薬開発に貢献しうる。本研究では、c-Myb の転写活性化ドメイン TAD の断片に変異を導入することにより、c-Myb-KIX 間相互作用を阻害しうるペプチドを設計した。TAD は天然変性領域であるがヘリックス形成能が高く、N 末端側はヘリックスを形成してから標的分子と結合する「構造選択機構」によって KIX と結合する。そこで、アミノ酸配列からヘリックス形成能を予測する理論的手法を用いて TAD 断片の変異体を設計した結果、KIX との結合が野生型 c-Myb と比べて約 3 倍強いペプチドの創製に成功した。

近年目覚ましい発展を遂げているのが Rosetta ソフトウェアを用いた理論的なタンパク質設計である。新しい構造のデザインや結合タンパク質の結合能強化などの成功例は多いが、酵素活性を向上させた報告例は少ない。これは、酵素の場合には反応サイクルを考えた複合的な設計が必要になるからであろう。我々は最近、この問題を解決するために、Rosetta を用いてジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）の高活性化を試みた。DHFR の酵素反応サイクルにおける律速段階の反応を加速しうるような変異体を、理論的な網羅的変異解析によって探索し、実験で検証した結果、1 アミノ酸置換のみで活性を 2.5 倍向上させた DHFR 変異体の作製に成功した。本研究の手法は今後、酵素活性を理論的に向上させる上での一般的な手法となりうると期待される。

Experimental and theoretical design of proteins

○Munehito Arai[1,2]
([1]Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo, [2]Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)

Key words protein engineering, protein interaction, enzyme

2S-S1p01 SDGs に対する生物工学研究のあり方

○木野 邦器
（早大・先進理工）
kkino@waseda.jp

18 世紀後半からの産業革命以降、科学技術は著しい発展を遂げ、人々に豊かな生活を提供してきたが、一方で、食料問題や資源・エネルギー問題、炭酸ガス排出増大に伴う気候変動など地球規模での課題が山積している。このような状況にあって、国連は 2015 年 9 月に開催された国連サミットにおいて「持続可能な開発のための 2030 アジェンダ」を全会一致で採択し、「誰一人として取り残さない（leave no one behind）」持続可能で多様性と包摂性のある社会を実現するために、2030 年までを期限とする持続可能な 17 の開発目標（SDGs：Sustainable Development Goals）を掲げた。全世界はこの目標の達成に向けて積極的な取り組みを展開しているが、我が国においても、少子・超高齢化社会を背景に、健康・医療をはじめ、モノづくり技術や環境・エネルギー、農業・食料供給などの面で多くの課題を抱えており、その解決は今を生きる我々が担うべきものと考えている。持続可能な世界を実現するための 17 のゴールのうち 10 項目以上でバイオテクノロジーが貢献できるとされており、その意味で解決の鍵を握るバイオテクノロジーへの期待は大きい。
政府は第 5 期科学技術基本計画において、人々に豊かさをもたらす「超スマート社会（Society 5.0）」を未来社会の姿として、IoT やビッグデータ解析、人工知能などのサイバー空間とフィジカル空間（現実世界）を高度に融合させる取り組みを推進することでその実現を目指そうとしている。一方、OECD は生物資源とバイオテクノロジーを用いて地球規模の課題の解決と経済発展の共存を目指す「バイオエコノミー（Bioeconomy, Biobased Economy）」を提唱している。バイオテクノロジーに関連する産業市場は 2030 年には OECD 加盟国の全 GDP の 2.7%（約 200 兆円規模）に拡大し、このうち工業分野が 39%、農業分野が 36%を占めると OECD は予測している。これを契機に世界各国では具体的な戦略やビジョンを立案し、国家主導型の研究開発プログラムが積極的に進められている。生物工学にとっては今がチャンスと捉えるべきで、その使命を果たす時を迎えている。
公益社団法人日本生物工学会は、生物工学に関する研究の進捗普及を図り、もって我が国の学術・科学技術の発展に寄与することを目的に 1923 年に設立された大阪醸造学会に端を発する学術団体で、醸造・発酵工学をはじめ、酵素工学、生物工学、細胞工学、生命工学さらには環境工学など多彩な領域の研究者や技術者によって構成され、産業や社会との密接な連携によって発展を続けているバイオテクノロジーの学会である。科学技術の発展や新たな技術との融合によって知のフロンティアが拡大すると、従来のように知識や技術の全てを個人や一つの組織で産み出すことは困難になってくる。企業では新しい価値の創出に向けてオープンイノベーションを推進しているが、特化した専門領域を扱いながら多様な専門性を有する人材を結集させることができる学会は、産学官連携の展開の場として相応しいと考える。生物工学会では、新たな知識や価値の創出を促す取り組みを模索・実施しており、未知の可能性を有する生物機能に基づくバイオエコノミー戦略を推進することで超スマート社会に立脚する持続的な社会の実現に貢献したいと考えている。
進展著しいゲノム解析技術や編集技術、オーミックス研究やビッグデータ処理技術は、合成生物学をはじめ生体情報工学や細胞工学などを展開する生物工学における基盤技術であり、前述の革新的な情報通信技術を核とする高度な研究インフラの導入や異分野との連携や組み合わせを推進することで、モノづくり技術の開発研究は多様化し、化学工業・健康・医療・食料分野におけるビジネス創出の可能性はますます大きくなると期待される。
一方、「超スマート社会(Society 5.0)」では人々が快適で活力に満ちた質の高い生活を享受する人間中心の社会が達成できるとしているが、個としての人という概念が抜け落ちているように思われる。人の内面をインサイド空間とすれば、現実/仮想空間はアウトサイド空間として捉えることができ、それらが繋がることで、本来の人を中心とする社会のあり方が見えてくると思う。人の感性や意識空間をアウトサイド空間と繋げる研究は、人が昔から追い求めている究極的な問いに対する答えを我々に与えてくれるように思う。その世界を我々は「Society 5.0 ＋」として提唱しているが [1), 2)]、最近話題の脳腸相関をはじめ、人の五感（視覚・聴覚・嗅覚・味覚・触覚）に関わる脳科学や感性工学などに対しても生物工学は多くの関わりを持つことができると考える。
生物工学には、人が求める真の豊かさや幸せを実現するための研究として牽引的な役割を担い、未来社会にインパクトを与える領域としてその方向性を見失わずに使命を果たしていくことを期待したい。

1) 荒勝俊, 木野邦器：生物工学, 96, 720 (2018).
2) 木野邦器：化学と工業, 72, 105 (2019).

Direction of biotechnology research to SDGs

○Kuniki Kino
(Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words SDGs, Society 5.0, bioeconomy

2S-S1p02 住友化学グループの SDGs の取組み

○冨ケ原 祥隆
（住友化学）
tomigahara@sc.sumitomo-chem.co.jp

1. 住友化学の企業理念
住友化学の企業理念の中心をなす、住友の事業精神「自利利他 公私一如」（じりりた こうしいちにょ）とは、「住友の事業は自らを利するとともに社会を利するものでなければならない」という考え方である。
住友化学の事業は、約 1 世紀前、別子銅山の銅の製錬から生じる亜硫酸ガスによる環境問題に対し、亜硫酸ガスを回収して肥料にするという、環境問題を克服するとともに、地域の農産物の貢献にもつながる「ソリューション」を生み出すことで始まった。

2.「オリセット® ネット」事業による SDGs への貢献
住友化学は、MDGs（Millennium Development Goals）から継続して、「オリセット® ネット」（殺虫剤を練りこんだ樹脂製の蚊帳）事業を通じたマラリア対策に統合的に取り組んでいる。「オリセット® ネット」は樹脂に練りこんだ薬剤が徐々に表面に染み出すことで長期間効果が持続することが特長であり、2001 年に世界で初めて「長期残効型蚊帳」としての推奨を受け、特にアフリカにおける蚊帳の普及に貢献してきた。
マラリアは経済成長を阻む要因としても指摘されており、アフリカでは貧困や財政難のために十分な対策がとれず、マラリアに罹患することによって就業や教育の機会を失い貧困から脱却できないという悪循環が指摘されている。
そこで、世界保健機関（WHO）からの要請に応える形で、2003 年にタンザニアの現地企業に無償で技術供与し、アフリカでの「オリセット® ネット」生産を開始（現在は JV）し、ピーク時には 7000 人もの雇用を創出した。また、従業員の 85％以上が女性であることから、託児所や女子寮を整備するなど、女性の経済活動への参画にもつながっている。
さらに社会貢献活動として、NGO と共に、2005 年からアフリカの小・中学校の建設支援を中心とした教育支援も行っており、12 か国で 22 プロジェクトを実施し、総受益者数は 1 万 2000 人を超える。「オリセット® ネット」事業を通じた感染症対策のみならず、貧困、ジェンダー平等、教育といった経済・社会・環境への統合的貢献は、今後の SDGs ビジネスの一つのモデルとなると考える。

3. 住友化学グループでの SDGs 推進活動
2015 年に SDGs が採択され、開発途上国の支援から地球全体の目標となった。気候変動など環境分野や技術革新分野、経済成長などの経済分野も盛り込まれ、「世界を変える 17 目標」とのスローガンが掲げられた。
企業に期待されるのはイノベーションである。地球課題を解決するソリューションの提供、それは創業の DNA そのものであり、企業理念と一致している。そこで、SDGs の達成に向けて、いち早くグループ全体で「TSP」、即ち、トップコミットメント（T:Top）のもと、事業を通じて（S:Solution）、全員参加（P:Participation）による取り組みを開始。具体的には、2016 年から「Sumika Sustainable Solutions」と「サステナブルツリー」を開始した。

（1）Sumika Sustainable Solutions（SSS）
SSS は、環境面から SDGs に貢献する製品・技術を認定し、達成目標を掲げて実効的に取り組むものである。認定要件を外部専門家の意見も取り入れ設定し、これまでに温暖化対策、環境負荷低減などに貢献する合計 34 製品・技術を認定した。

（2）サステナブルツリー
「誰ひとり取り残さない」という理念に則り、3 万 3 千人のグループ全役職員が、SDGs への貢献の主体は自分たちであると気づき、主体的に取り組みを進めることを目的に開始した。具体的には、SDGs17 目標に対して、グループ役職員一人一人が「仕事や職場での取り組みを通じての貢献」を専用ウェブに投稿し宣言する。英語を母国語としない人たちにも「ジブンゴト」として捉えられるよう、11 か国語で SDGs の解説をマンガで配信。期間は 100 日間で、全世界から 9000 件を超える投稿が集まった。

4. 今後に向けて
持続可能な社会の実現のために、これから社会は大きな変革を遂げなければならない。大きな変革の時代だからこそ、創業の DNA である「住友の事業精神」を決して変わることのない経営の根幹とし、SDGs を道標「コンパス」とし、短期的な利益だけでなく長期的に社会を利するソリューションを提供するために、変革に挑み続けていく。

Sumitomo Chemical Group's initiatives for SDGs

○Yoshitaka Tomigahara
(Sumitomo Chemical Co., Ltd.)

Key words SDGs, WHO, Olyset Net

2S-S1p03 SDGs と科学技術イノベーション

○白木澤 佳子
（国立研究開発法人科学技術振興機構）
m5abe@jst.go.jp

2015 年に国連が全会一致で採択した「持続可能な開発目標（SDGs）」は、気候変動対策や防災、生物多様性、人間の安全保障など地球的かつ人類的課題をすべて包摂して掲げた目標です。この壮大かつ挑戦的な 17 の目標を 2030 年までに達成するためには、既存の分野、組織、業界等の枠組みを超えて、統合的に取り組むことが不可欠です。採択から約 4 年が経過し、SDGs について様々なところで見たり聞いたりする機会が増えてきています。その一方で、SDGs の達成を目指して、具体的に何をすればよいのかという声も多く聞きます。昨年の 4 月に「持続可能な社会推進室」を立ち上げた JST の取り組みや国内外の動向等を紹介しながら、科学技術イノベーションと SDGs について皆さんと考えたいと思います。

Science, Technology and Innovation (STI) for SDGs

○Yoshiko Shirokizawa
(Japan Science and Technology Agency, JST)

Key words SDGs, Sustainable Development Goals, Science, Technology and Innovation (STI), STI for SDGs

2S-S1p04 大学は SDGs 達成にどのようにかかわれるか

○狩野 光伸
（岡山大学・SDGs推進企画会議）
mitkano@okayama-u.ac.jp

大学セクターは SDGs 達成にどう関われるか。大学セクターの特徴は研究と教育である。
まず研究について考察する。SDGs のための研究とは、つまり SDGs として与えられた課題の範囲で研究しないといけないと思っておられる方々にお会いする。本当にそうか。私は、SDGs は、医学でいう臨床研究に似たものと見る。すなわち、病気（課題）があり、それを治したい（解決したい）。しかし、病気（課題）だけ見ていてもわからないことがある。例えば大気汚染による喘息（ぜんそく）。見える症状（課題）は息苦しさ、咳などである。体内の原因だけを注目すれば免疫反応と思われる。免疫を抑える治療をする。だがこれは根治ではない。治療が切れれば症状が再発する。そもそもなぜ起きているか。大気汚染によるのではないか。では大気汚染はそもそもなぜ起きているのか。・・・このようにして日本の公害疾患は解決されてきたであろう。対処のわからない病気（課題）に取り組もうとすれば、患者（現場）を自分の目でよく見て、「そもそも」を問うしかない。この、現場をよく観察し「そもそも」を問う活動は、当座の金銭的利益や、もしかすると論文も即時には産めない。直近には製品やサービスを生まないし、世の中で今は注目されていないと思いを同じくする学術誌や査読者も今はいないかもしれないからである。しかしいつしか治療（解決）に結びつくことができると期待される。この活動ができる場は、世の中でどこかといえば、結論として大学になろう。一般に研究活動は、課題認識→問い→仮説構築→検証→共有という 5 段階を踏むと表現できる。であると、SDGs は 1 段階目にあたる。身近な対象のどこに、SDGs とつながる事象が見出されるのか。それはどんな問いを生むのか。その問いにどんな仮説（当座の答え）を、どれだけたくさん、たてられるのか。そのうちのどれは、科学的方法の範疇で検証できるのか。あるいは検証のための新たな方法を開発できるのか。こうした考えや試みを地道に進めていく役割を、大学はその役割の一端として果たすべきだろう。道のりは遥かだが、本学では一歩を踏み出した。
次に教育はどうか。例えば本学の入学者数は学部で年間 2000 人程度である。これだけの数の若い人たちに一度に関与できるセクターというのはそう多くはない。これらの人たちに、今は何を教えているのか。まずは専門。入学前に高校での興味または（どちらかというと）成績で学部入学時には専門が決まっている。入学後は専門で知られている範囲の課題と、既知の解決法を学ぶ。その後に、その専門の範囲から類推あるいは取り組み可能な課題に取り組む。これはもちろん専門の深化のためには必要である。ただしそれらの「専門」からこぼれてしまったところに SDGs が存在している。誰がどのように取り組めるのか。少なくともそうした専門で取り扱えていない課題というものが存在することは若い人々に伝える必要があるのではないか。それを伝えようとするときに、SDGs は力を持つ。一つ一つの目標に、既存の専門はどこまでできているのか、どこに専門間の協力の余地があるのか、協力してもまだ足りぬところはどこにあるのか。これを学生の皆さんにも考えてもらう必要があるのではないか。本学はまず今年度から、学部入学生全員に、各人には一時間だけだが、一種の「教養」としてこうした SDGs 的な観方を伝える試みを始めた。今後どこまで効果が出るだろうか。少なくとも数人、SDGs のために何かできることをしたいという学生が現れていると聞く。
さて大学の役割は研究と教育のみか。地域とのきずなはどうか。例えば本学は戦後すぐの創設の時に地域から当時 3 億円もの寄附が集まって始まったという。こうした期待にどれだけこたえようとしてきたか。即時的に応えることはできないかもしれない。だが、長期的にでも応えようとできているか。そしてその方法は。SDGs に対する取り組みを始めてみて、本当は地域の皆様から大学は期待いただいていたということが幸い見出されてきた。そしてその発揮の仕方として、まずできることは、SDGs を共通言語に変化をもたらしたい様々なセクターの方々を、中立性と根拠ある新しい考えの提案で結ぶことである。岡山の地の利も、もちろんある。初の庶民のための学校は 1600 年代に岡山で起こった（閑谷学校）。「自らの名誉のために成したことであるなら、たとえ驚天動地の功績があっても、本人のために過ぎない」という意味の言葉もある幕末の改革家、山田方谷。西洋医学を広め東大の基礎も担った津山藩医。労働者、農民の改善のために企業立の研究所を作った大正の大原孫三郎。そして近年では持続的発展のための教育（ESD）を推進し、ユネスコからの受賞もある岡山。SDGs 未来都市に選定された岡山市と真庭市。本学と、これらを含めた地方自治体や地元の経済同友会あるいは商工会議所との連携も進みつつある。また、学内には、学内外の広範な関係者をまとめる窓口となる「国際学都おかやま創生本部」も設立された。この地だからこれだけの仲間が増えてきたこともあるだろうが、ありがたいことである。
これらの取り組みから、SDGs 達成に向けてどんな新たな取り組みがこれから現れるか、期待したい。

How can we achieve the SDGs in the higher education sector?

○Mitsunobu R. Kano
(SDGs initiatives promoting committee, Okayama Univ.)

Key words SDGs, Science Technology and Innovation, higher education

2S-S1p05 世界のバイオエコノミーと関連する合成生物学議論

○藤島 義之
（新エネルギー・産業技術総合開発機構・技術戦略研究セ・ 海外技術情報ユニット）
fujishimaysy@nedo.go.jp

バイオエコノミーとは何か？2009 年の OECD が発表したレポート“Bioeconomy to 2030, Designing a Policy Agenda”をきっかけとして世界に広まり、現在では 50 か国の国々で脱化石資源依存社会を実現するための戦略が作られている。世界でもコンセンサスを得た定義は存在しないが、化石資源をベースとした経済活動をサステイナブルなバイオ素材をベースとした経済活動に変えていこうとする世界的な流れであるといえる。
欧米の活動に目を向けると、欧州は 2012 年の政策発表、2014 年からの Horizon2020 に基づき、Biobased Industry Consortium という業界団体のまとめた産業ニーズに対し、Biobased Industry Joint Undertaking と呼ばれる公的資金団体が予算を投じ、欧州のバイオエコノミーバリューチェーンを作っている。米国についても 2012 年に National Bioeconomy Blueprint を発表し、バイオフュールやバイオケミカル等の産業化を産学官で強力に進めてきている。
バイオマスを活用するという考えは日本にも存在し、2002 年に作られたバイオマス・ニッポン総合戦略に基づき行われたバイオマスタウン（2005～2012 年）や、その後により地域のバイオマスを産業として定着させようとするバイオマス産業都市（2013 年～）の政策が地域のエネルギーやモノづくり産業を興す考えとして存在する。一方バイオテクノロジーについては、2002 年にバイオテクノロジー戦略大綱、2008 年にはドリーム BT ジャパンが発表されて、バイオテクノロジーによりモノづくりの進化、薬に頼らない健康の実現、環境の改善などが語られており、これらは実質的に日本が進めているバイオエコノミー戦略だったと言える。日本でも過去の戦略でもそれなりに技術開発では成功していたと言えると思われるが、化石資源ベースの経済活動を置き換えるという事にはつながっていない。
一方生物工学に目を向けると、BioFoundry という言葉の基に、世界の合成生物学を進めるアカデミアが Global BioFoundry Alliance を作り、バイオエコノミーにおけるモノづくりへの貢献をするという事で鋭意調整が進められている。日本も経済産業省・NEDO プロジェクトとして 2016 年から 5 年計画でスマートセルプロジェクトが進められ、様々な要素技術が作られてきており Global Biofoundry Alliance に対する貢献も行われてきている。
SDGs やパリ協定をきっかけに世界のバイオエコノミー戦略も脱化石資源社会の実現に向けて動いている。日本の生物工学会も日本と世界のバイオエコノミー実現に対し、期待されているところは大きい。6 月に作成される新バイオ戦略を解説し、生物工学会の可能性を議論したい。

Bioeconomy and related engineering biology global discussions

○Yoshiyuki Fujishima
(TSC, NEDO)

Key words bioeconomy, BioFoundry, SDGs, Paris Agreement

2S-S1p06 世界最先端のバイオエコノミー社会の実現－我が国の戦略－

〇服部 正
（内閣府・科技）

本年 6 月、重要分野の一つとしてバイオを位置づけた統合イノベーション戦略 2019 が閣議決定されるとともに、11 年ぶりのバイオ分野における政府の戦略となる「バイオ戦略 2019」が統合イノベーション戦略推進会議において決定された。統合イノベーション戦略 2019 の概略をご紹介するとともに、国内外の情勢にも触れつつ、バイオ戦略 2019 の策定の背景、狙い及び内容について概説したい。

はじめに、今般策定したバイオ戦略 2019 の前提となる「バイオエコノミー」について改めて認識を共有したい。2009 年に経済協力開発機構（OECD）が「バイオエコノミー」に関する報告書において、「2030 年にバイオテクノロジーを利活用した産業が OECD 加盟国の GDP の約 2.7%（約 1 兆ドル）に拡大する」との予測を示し、特に、農業・工業分野におけるバイオテクノロジーの軽視から転換すべきとの強いメッセージを発した。これが、バイオエコノミーを世界的に認知させた転換点と言えよう。その後、欧州連合、米国等各国がバイオエコノミー戦略を策定するが、共通することはいずれもバイオを単なるバイオテクノロジーの利活用と狭く捉えることなく、各々の国家戦略応じ、バイオテクノロジーや再生可能な生物資源を基盤としていかに競争力のある経済社会を実現するかという視点が貫かれている点にある。欧米各国はもはやバイオを技術の一分野としてではなく、これからの経済社会の前提として捉えていることを我々は認識しておくべきである。2015 年の持続可能な開発目標（SDGs）及びパリ協定の採択以降、その流れはより一層加速され、欧州においては「循環型経済（circular economy）」「健全な生態系（health ecosystems）」といった表現を用いてバイオエコノミー戦略を更新し、米国は「世界的な産業転換（The global industrial transition）」という表現でバイオエコノミーを定義し、展開されている取組について報告書としてとりまとめている。さらに、中国は国家戦略として農業、材料、医薬品・医療機器の分野を重点分野に位置づけ、マレーシア、タイ、インドネシアといったアセアン諸国もバイオエコノミー戦略を策定しており、バイオエコノミーを受け入れる世界的気運が高まっている。

このような世界の潮流も踏まえ、昨年 6 月に閣議決定された「統合イノベーション戦略」において、「医療・非医療分野が一体となった新たなバイオ戦略」を策定することが明記され、この度バイオ戦略 2019 が策定された。本戦略の策定に当たっては、中間とりまとめに加え、政府に設けた有識者会議における検討、省庁の担当者により構成されたタスクフォースの検討に民間、アカデミア、地方自治体の方々にも参画いただくことを通じて、過去の戦略の振り返りとバイオエコノミーを巡る世界と我が国のギャップを理解することに多くの時間を割き、主に①過去の戦略の反省②研究③データ④産業・事業化の観点から整理した。

バイオ戦略 2019 は戦略の第一弾として、我が国が伝統的に潜在力を有するバイオ分野に再度光を当て、対応をこれまでの分散型から集約型へと移行させつつ、国内のヒト・モノ・カネだけでなく世界の優秀な人材、投資を呼び込みことにより、国際的にも魅力ある一大イノベーションを起こせる国へと変貌を遂げることが狙いである。本戦略は、一言で要約すれば「国内外からの人材、投資を呼び込むための戦略」であり、これまでのような「バイオテクノロジーの利活用」を中心とする考え方から脱却し、我が国としてはじめて、持続可能な新しい社会経済システムの要素として欠かすことができないバイオエコノミーをいかに形成するかという戦略として策定されたことをご理解いただければ幸いである。

今後、バイオ戦略 2019 で提示された 9 つの市場領域ごとのロードマップの策定、国際拠点都市圏の形成などに向けて具体的な検討が進められる。日本生物工学会の会員の皆様の参画と行動を呼びかけさせていただきたい。

A challenge to the world's most advanced bioeconomy: The bioeconomy strategy for Japan 2019

〇Masashi Hattori
(CSTI Secretariat)

Key words bioeconomy, SDGs, circular economy

2S-S2p01 Oligosaccharide fermentation by engineered yeast to produce value-added products

〇Yong-Su Jin[1,2]
([1]Dept. Food Sci. & Human Nutrition., Univ. of Illinois, Urbana, IL, USA, [2]Carl R. Woese Institute for Genomic Biology, Urbana, IL, USA)
ysjin@illinois.edu

Conventional microbial fermentation to produce biofuels and chemicals has utilized monomeric sugars from renewable biomass as substrates. The monomeric sugars—glucose, fructose, galactose, and xylose—are produced from the enzymatic hydrolysis of poly or di-saccharides—cellulose, hemicellulose, starch, sucrose, or lactose—present in agricultural products. The enzymatic hydrolysis processes not only require hydrolytic enzymes, but also are often inhibited by monomeric sugars. As an alternative strategy to use the poly or disaccharides economically, direct utilization of the oligosaccharides by engineered yeast has been proposed. In this new scheme, oligosaccharides are transported into cells and hydrolyzed intracellularly instead of being consumed as a monomeric sugar after extracellular hydrolysis. Direct fermentation of oligo or di-saccharides—intermediates of polysaccharide degradation into monosaccharides—offers many advantages in converting renewable biomass into value-added products. I will discuss several examples of employing engineered yeast strains to produce biofuels, chemicals, and food ingredients through direct fermentation of the oligosaccharides.

Oligosaccharide fermentation by engineered yeast to produce value-added products

〇Yong-Su Jin[1,2]
([1]Dept. Food Sci. & Human Nutrition., Univ. of Illinois, Urbana, IL, USA, [2]Carl R. Woese Institute for Genomic Biology, Urbana, IL, USA)

Key words oligosaccharide, *Saccharomyces cerevisiae*, tagatose, lactose

2S-S2p02〈招待講演（韓国生物工学会）〉

Designer *Corynebacterium glutamicum* for advanced production from primary to high-valued chemicals

Young Jin Ko[1], Young-Chul Joo[1], Jeong Eun Hyeon[1,2],
〇Sung Ok Han[1]
([1]Dept. Biotechnol., Korea Univ., [2]Dept. Food Sci. Biotechnol., Sungshin Women's Univ.)
samhan@korea.ac.kr

In the field of metabolic engineering with synthetic biology, *Corynebacterium glutamicum* is one of attractive biosystems for production from essential primary metabolites to high-valued chemicals such as L-cysteine, taurine, heme, porphyrin and biliverdin, because it can produce various amino acids and is being used in industry. Thus, designing metabolic pathways of this industrial microbe to tailor the final product production is a key biotechnology and can be alternative process for large-scale and high-yield production. The production of L-cysteine, which is important sulfur-containing amino acid used in food additives, animal feed and agriculture, was increased in *C. glutamicum* by the combinatorial overexpression of the transcriptional regulator activating sulfur metabolism with major target genes in L-cysteine metabolism. For advanced production of food additive taurine from L-cysteine, L-cysteine producing strain was engineered by creating a new pathway from mammalian and deleting transcriptional repressor of L-cysteine metabolism. In this resulting strain, sulfur accumulation, L-cysteine biosynthesis as well as taurine production were enhanced, which is higher than in previously reported other strains. Also, deep understanding about the complex heme biosynthesis pathway and introduction of protein engineering and system metabolic engineering can contribute to production of high valued products derived from porphyrin. 5-aminolevulinic acid, which is the first compound in heme pathway and biomedical and agricultural agent, was first produced in *C. glutamicum* by heterologous expression of bottleneck enzymes of C5 pathway. And then, production of Zn-porphyrin, organic solar cell photosensitizer, was enhanced in *C. glutamicum* overexpressing the transcriptional regulator upregulating heme operon with bottleneck enzymes. Finally, for production of antioxidant agent biliverdin, unrevealed heme pathway in *C. glutamicum* was investigated and developed. This engineered strain successfully produced biliverdin, while heme producing strain showed negligible production. Therefore, customized engineering of *C. glutamicum* has drawn considerable attention as an attractive strategy for production of a variety of high valued products.

Designer *Corynebacterium glutamicum* for advanced production from primary to high-valued chemicals
Young Jin Ko[1], Young-Chul Joo[1], Jeong Eun Hyeon[1,2], 〇Sung Ok Han[1]
([1]Dept. Biotechnol., Korea Univ., [2]Dept. Food Sci. Biotechnol., Sungshin Women's Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, taurine biosynthesis, Zn-porphyrin, biliverdin

2S-S2p03 ATP 生成の向上による物質生産の高度化

〇原 清敬
（静岡県大院・食栄環）
k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp

現在、増殖速度が速い大腸菌や出芽酵母等の発酵微生物に、遺伝子組換え技術を用いた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バイオプロダクションの研究が盛んに行われている。しかし、目的物質の生産性が向上するにつれ、自然界での暮らしでは考えられない偏った重労働を課せられたこれらの発酵微生物が、しばしば細胞内エネルギー（ATP）不足に陥り、生育の低下や目的物質の生産性の頭打ちを引き起こすことは少なくない（参考文献）。これは、発酵そのものがインプットである資源（Resource）を「細胞自身の材料（Cell）」、「細胞内エネルギー（Energy）」、「目的生産物（Product）」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。今回の講演では、この発酵のジレンマを具体的に解決する方法として、我々が行った２つのアプローチについて紹介する。
一つ目は、細胞の増殖が終わった段階で、細胞膜の透過処理を行い、目的生産物の基質を供給する方法であり、酵素法や休止菌体法と呼ばれる。この方法を用いることで、バイオプロセスを細胞増殖フェーズと物質生産フェーズの２つに分け、細胞増殖フェーズにおいては、目的生産物へのエネルギー供給を抑え、細胞を十分に増殖させることができる。ただし、この方法のデメリットは、透過処理を行うことで、細胞膜に存在する呼吸鎖電子伝達系が機能しなくなり、ATP の供給力が低下してしまうことである。そこで、我々は、解糖系の ATP 再生力を向上させることでこの問題を解決した。
二つ目は、本来は光エネルギーを利用できない細胞に光エネルギー利用能を付与する方法である。大腸菌を含む原核生物では、呼吸鎖電子伝達系が細胞膜に存在するのに対し、出芽酵母を含む真核生物ではミトコンドリアに存在する。我々は、大腸菌の細胞膜や出芽酵母のミトコンドリア内膜に光リン酸化能を人工的に賦与することで、光エネルギーを利用して ATP の供給を可能にする新しい光駆動型宿主細胞を開発した。具体的には、高度好塩菌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や出芽酵母のミトコンドリア内膜に発現させることで、これらの宿主に本来の酸化的リン酸化能に加え、光リン酸化能を付与した。
以上のように細胞内エネルギー供給に着目した宿主改良を施すことにより、実際にいくつかの有用物質の生産性の向上がみられた。このように従来行われている目的生産物に応じた代謝改変だけでなく、細胞内エネルギー供給という細胞の根源的なシステムの改良は、様々な有用物質の生産性の向上につながると考えられる。
（参考文献）
Hara KY, Kondo A. ATP regulation in bioproduction. Microb Cell Fact. 2015;14(1): 198.

Improvement of ATP generation in bioproduction

〇Kiyotaka Hara
(Grad. Sch. Nutri. Environ. Sci. Univ. Shizuoka)

Key words ATP, rhodopsin, cell factory, energy metabolism

2S-S2p04 シアノバクテリアのクエン酸回路を基盤としたバイオプラ原料の生産

○小山内 崇
（明治大・農）
tosanai@meiji.ac.jp

シアノバクテリアは、酸素発生型光合成を行う最も単純な生物である。光合成メカニズムの基礎研究だけでなく、増殖の速さから、二酸化炭素をベースとした物質生産への応用も期待されている。
我々のグループでは、単細胞性シアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803（以下シネコシスティス）の代謝制御メカニズムの解明と、物質生産への応用のための研究を行なっている。これまでの研究により、シネコシスティスを暗・嫌気条件で発酵させると、細胞外にコハク酸や乳酸を放出することがわかっている（Osanai et al. 2015）。これらの物質は、生分解性プラスチックの原料となる。これまでの研究によって、RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigE 過剰発現や、酢酸合成酵素の１つである酢酸キナーゼの破壊、水素の合成酵素であるヒドロゲナーゼサブユニット H の発現抑制によって、発酵時のコハク酸、乳酸生産量が増加することが明らかになっている（Osanai et al. 2015; Iijima et al. 2016）。また、コハク酸増産株の発現パターンを解析し、糖代謝酵素遺伝子の発現が、２グループに分かれて制御されていることも明らかになった（Takeya et al. 2017）。
シネコシスティスのコハク酸、乳酸生産量をさらに増大させるために、酵素の生化学解析を通した代謝メカニズムの解明を進めている。コハク酸生産の律速酵素と言われているホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）の生化学解析を行ったところ、シネコシスティスの PEPC は、典型的な阻害剤であるリンゴ酸やアスパラギン酸で活性阻害を受けないことがわかった（Takeya et al. 2017）。また、オキサロ酢酸とリンゴ酸の可逆反応を触媒するリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（MDH）の生化学解析から、シネコシスティスの MDH が極端にオキサロ酢酸からリンゴ酸への変換反応に偏っていることが明らかになった（Takeya et al. 2018）。これらの結果は、シネコシスティスがコハク酸生産に適した代謝酵素を有していることを意味している。さらに、シネコシスティスの乳酸脱水素酵素（Ddh）がピルビン酸から乳酸を合成するだけでなく、MDH と同様にオキサロ酢酸からリンゴ酸を合成することが可能なことや、クエン酸シンターゼ（GltA）がホスホエノールピルビン酸によって活性阻害を受けることなどが明らかになっている（Ito et al. 2017, 2019）。一連の研究より、シネコシスティスの代謝酵素は他のバクテリアとは異なる生化学的特性を有していることがわかりつつある。また、これらの事実から、シネコシスティスはコハク酸、乳酸生産に関わる酵素が独自の制御を受けており、他のバクテリアでわかっている酵素改変を適用するだけでは、さらなる増産は困難であることを示している。
我々は、シネコシスティスで分かったコハク酸、乳酸生産を真核微細藻類でも試しており、真核生物であるユーグレナも発酵によってコハク酸を細胞外に放出することを明らかにしている（Tomita et al. 2016）。さらにユーグレナは、発酵時にグルタミン酸をはじめとするアミノ酸も細胞外に放出することがわかり、発酵時の pH が重要であることも明らかになった（Tomita et al. 2019）。
本発表では、これら微細藻類の発酵による有機酸生産についての研究成果を発表し、さらなる増産に向けた展望を紹介する予定である。

Reference
Iijima et al. 2016 Algal Res. 18, 305-313
Ito et al. 2017 Sci. Rep. 7, 15052
Ito et al. 2019 Sci. Rep. 9, 6038
Osanai et al. 2015 Front. Microbiol. 6, 1150
Takeya et al. 2017 Plant Cell Physiol. 59, 72-81
Takeya et al. 2017 Sci. Rep. 7, 41080
Takeya e tal. 2018 Front. Plant Sci. 9, 947
Tomita et al. 2016 Front. Microbiol. 7, 2050
Tomita et al. 2019 Algal Res. 126, 139-144

Bioplastic production using cyanobacteria based on knowledge of the TCA cycle enzymes

○Takashi Osanai
(Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words lactic acid, succinate, *Synechocystis*, TCA cycle

2S-S2p05 光を利用した微生物の代謝の制御と可視化

○戸谷 吉博, タンダル セバスチャン トミ, 妹尾 幸枝,
鎌田 健太郎, 清水 浩
（阪大院・情報）
ytoya@ist.osaka-u.ac.jp

様々な有用化合物が微生物の代謝を利用して生産されているが，生産速度や収率の低さが実用化への課題となっていることが多い．目的物質の生産性の向上には，代謝経路における炭素フラックスの最適化が必要であり，特に NADPH などの補酵素を生合成に必要とする化合物の生産では，補酵素の物質収支の考慮が重要である．例えば，3 分子のアセチル CoA と 2 分子の NADPH を使って合成されるメバロン酸の生産では，解糖系とペントースリン酸 (PP) 経路のフラックス比が収率に影響する．大腸菌は取り込んだグルコースを解糖系やペントースリン酸 (PP) 経路によってアセチル CoA に異化する．解糖系では 1 分子のグルコースから 2 分子のアセチル CoA を作ることができる．一方，PP 経路では 1 分子のグルコースから 5/3 分子のアセチル CoA と 2 分子の NADPH が作られる．つまり，PP 経路はアセチル CoA の供給には不利であるが，NADPH を生産できる．我々は、メバロン酸の生産において、解糖系と PP 経路のフラックス比を人為的に操作することで，フラックス比がメバロン酸収率に及ぼす影響を明らかにした (1)．このように NADPH を必要とする物質を高生産するためには、フラックス比のファインチューニングが重要である．
代謝を理想的な状態に維持するためには，フラックスを動的に制御する技術が必要である．上記の研究では，解糖系と PP 経路の分岐点に反応を触媒するホスホグルコースイソメラーゼをコードする pgi をイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) 誘導プロモーターで制御することで，フラックス比を IPTG の添加量によって人為的に操作した．しかし，IPTG などの薬剤の添加による遺伝子発現の制御は，一度添加した薬剤を培養系から除去することが難しいため，動的な On－Off 制御ができないという問題点がある．そこで本研究では，シアノバクテリアの遺伝子発現制御系 CcaS/CcaR を利用したオプトジェネティックスイッチを大腸菌に導入することで，光照射による代謝フラックスの制御技術の開発を目指した．CcaS/CcaR は二成分制御系であり，緑色光を吸収するとセンサータンパク質の CcaS がリン酸化し，リン酸基転移反応により転写因子の CcaR をリン酸化する．リン酸化された CcaR は cpcG2 プロモーターに結合し，下流の遺伝子発現を促進する．一方，赤色光を吸収すると CcaS/CcaR は脱リン酸化し，cpcG2 プロモーター下の遺伝子発現を抑制する．すなわち，緑色・赤色光の照射により On－Off 切替可能な発現制御系である．本発表では，緑色および赤色光の光照射による大腸菌における解糖系と PP 経路のフラックス比や解糖系とメチルグリオキサール経路のフラックス比の制御について報告する．
また，培養中にフラックスの情報をモニタリングできれば，その情報をフラックスの制御に利用できる．近年，大腸菌が解糖系フラックスについて転写因子 Cra を介して検知していることが報告されている．そこで，Cra の転写因子活性を蛍光タンパク質によって可視化できることを確認した．このシステムを利用することで，解糖系フラックスを蛍光強度によってモニタリングし，オプトジェネティックスイッチによって適切に制御する新しいバイオプロセスが構築できると考えている．

1) Kamata K. et al., Biotechnol. Bioeng., 116:1080-1088 (2019).

Control and visualization of metabolic flux in microorganism using light illumination

○Yoshihiro Toya, Sebastian Tommi Tandar, Sachie Senoo, Kentaro Kamata, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Escherichia coli*, optogenetics, glycolysis, NAD(P)H

2S-S3p01 Electrical pulse induced electrochemical sensor for cancer cell detection

Akhilesh Babu Ganganboina[1,2], ○Ruey-an Doong[2,3]
([1]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Dept. Biomed. Eng. & Environ. Sci., Natl Tsing Hua Univ., [3]Inst. Anal. Environ. Sci., Natl Tsing Hua Univ.)
radoong@mx.nthu.edu.tw

Facile and efficient detection of cancer cells at their preclinical stages is one of the central challenges in cancer diagnostics. A direct, rapid, highly sensitive and specific biosensor for detection of cancer biomarkers is desirable in early diagnosis and prognosis of cancer. In this presentation, a pulse-triggered ultrasensitive electrochemical sensor has been fabricated by using angiopep conjugated gold nanoparticles (Au NPs) onto carbon sphere (Agp@Au-C) as the sensing probe. The microstructural characterization clearly indicates the homogeneous distribution of Au NPs onto carbon sphere, which provide large reactive sites fo angiopep conjugation. The introduction of external electrical pulse during the cancer cell accumulation step on the sensing electrode shows higher affinity towards cancer cells in comparison with the tradition method due to the expanded surface of cancer cells. The sensitive as well as the limit of detection can be significantly enhanced in comparison with conventional electrochemical sensors. Under the optimal electrochemical pulse condition, the proposed sensor has demonstrated its capability of detecting cancer cells in a wide linear range of concentration. The validated impedimetric parameters for the sensing electrode in different pulsed condition even in human serum can pave an avenue for the development of high performance and robust sensing probes for cancer cell detection.

Electrical pulse induced electrochemical sensor for cancer cell detection
Akhilesh Babu Ganganboina[1,2], ○Ruey-an Doong[2,3]
([1]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Dept. Biomed. Eng. & Environ. Sci., Natl Tsing Hua Univ., [3]Inst. Anal. Environ. Sci., Natl Tsing Hua Univ.)

Key words electrochemical, cancer cell, sensing, impedance

2S-S3p02 Patch-type biosignal monitoring system based on flexible electronics

○Takafumi Uemura[1,2], Tsuyoshi Sekitani[1,2]
([1]ISIR, Osaka Univ., [2]AIST-Osaka Univ. PhotoBIO-OIL)
uemura-t@sanken.osaka-u.ac.jp

The internet of things (IoT) is a broadly attractive topic in many research fields related to clinical, automotive, infrastructure, wearable, and agricultural application. In the IoT systems, analog signals monitored by a sensor in real space are transferred to cyberspace via the internet. In this presentation, I will introduce the technology of patch-type biosignal monitoring system, which we have developed recently. And I will briefly mention about the technology of flexible electronics for a wearable biomonitoring system.

In this study, we have developed a wireless biosignal monitoring system with bio-conformable organic voltage amplifier circuits. The organic circuits were fabricated on a flexible 1-μm-thick polymer foil with p-type organic transistors, thin-film resistors, and capacitors. Therefore, the circuits are showing highly mechanical conformability to attach on soft human skin. Here, we will introduce two types of voltage amplifier circuits. One is a pseudo-CMOS inverter based single-end amplifier, which shows a signal gain over 60 dB. And the other is a differential amplification circuit, which has a capability of amplifying input signals while suppressing common-mode noise. To demonstrate the potential of improving signal integrity for biosignal monitoring, we have wirelessly recorded human electroencephalogram (EEG) or electrocardiogram (ECG) signal.

Organic thin-film transistors (OTFTs) are promising electrical components for biomedical applications because of their unique properties for lightweight, mechanically flexible and cost-effective processability. For example, to realize a precise biosignal detection, flexible and large area electrodes should be tightly placed to the target biological surface. Besides, it is desired to amplify the detected small biosignals nearby the electrodes for minimizing incoming noise. For this reason, flexible organic amplifier circuits integrated with biocompatible electrodes are suitable for a reliable biosignal sensing.

In the developed system, sheet-type flexible electrodes combined with amplifiers were connected with a palm-sized wireless voltage measurement module. The flexible hybrid system enables wireless biomonitoring with high signal integrity. As a result, using the single-end organic amplifier, the small EEG signal in the micro-volt range can be amplified to mV level, which would be readily measured with an inexpensive system. In another case, using the differential amplifier, the environmental artifacts such as 60 Hz electrical harmonic noise and human motion artifacts of the input signal was suppressed by approximately 60 times, yielding ECG signals with an improved signal-to-noise-ratio of 34.0 dB.

Patch-type biosignal monitoring system based on flexible electronics
○Takafumi Uemura[1,2], Tsuyoshi Sekitani[1,2]
([1]ISIR, Osaka Univ., [2]AIST-Osaka Univ. PhotoBIO-OIL)

Key words biosensor, wearable, organic circuits

2S-S3p03 Crystallinity and morphology control of whitlockite nanocrystals synthesis in tri-solvent system

Caifeng Wang[1], Ki-jae Jeong[1], ○Jaebeom Lee[2]
([1]Dept. Cogno-Mechatronics Eng., Pusan National Univ., [2]Dept. Chem., Chungnam National Univ.)
nanoleelab@cnu.ac.kr

Bone regenerative materials in bio-ceramics have been developed in recent decades, focusing especially on hydroxyapatite (HAP, Ca10(PO4)6(OH)2) and β-tricalcium phosphate (TCP, Ca3(PO4)2) due to their high biocompatibility and osteoconductivity. In recent years, whitlockite (WH, Ca18Mg2(HPO4)2(PO4)12) has attracted attention as a bone regenerative material. As the second most abundant biominerals in human bone, WH has been proven to be osteoinductive for the promotion of osteogenesis, in comparison to HAP, which is simply an osteoconductive material. The most critical difference between WH and HAP is the existence of Mg2+ ions in their crystal structures. Mg2+ is stored >50% in bone tissue and plays an essential role in our skeletal system, as well as nervous and muscular systems. For example, it has been reported that the Mg2+ ions released from WH in the vicinity of implants placed in osteoporotic bone can stimulate human turbinate-derived mesenchymal stem cells (hTMSCs) to induce osteogenic differentiation, while preventing osteoclast differentiation from monocytes. Further release of Mg2+ induces rapid bone formation and the expression of anabolic markers in peri-implant bone. Owing to the differences in the atomic radius of Mg2+ ions from Ca2+, WH crystals are composed under limited conditions, with a different morphology, crystallinity, and growth rate than HAP, and are thermodynamically less stable than HAP crystals. Due to the difficulty in the detection in living metabolisms, as well as its artificial synthesis, WH crystals have been relatively neglected in bone regeneration research. However, owing to Rowles' pioneer work on the preparation of WH, a number of reports have appeared in recent years. For example, Jang et al. introduced a new synthesis route of pure WH nanoparticles (NPs) that were precipitated under Mg2+-rich and physiologically relevant conditions. Its biological compatibility was evaluated, in which the pH was found to be a vital control factor in the reaction system. Qi et al. introduced a novel microwave-assisted method for the synthesis of WH microspheres. The microsphere showed high biocompatibility and an excellent ability to promote adhesion and spreading of MC-3T3 osteoblasts. Guo et al. studied hydrothermal growth of WH coating on β-TCP surfaces with the aim to enhance osteogenesis. However, the investigation of parameters for the synthesis of homogeneous WH remains a challenge, in particular for composition, size, and shape control, the mechanism of crystal formation, and its related biological study. In this study, we developed a novel methodology for the synthesis of different morphologies of pure WH using the solid-liquid-solution (SLS) tri-solvent process, based on the phase transfer and separation process across the liquid, solid, and solution interfaces. Key synthesis factors, including the ratio of precursors, interface between surfactants and atoms were optimized to grow WH nanocrystals with tunable sizes and morphologies, as well as different surface properties. In the experiment, HAP nanowires with high aspect ratio was also synthesized. In addition, molecular dynamics (MD) simulations were used to determine the growth mechanism of WH nanoplates (M1.5). Computational simulations through the finite element method (FEM) were carried out to reveal the solvent effect in the reaction. Biological suitability was evaluated in MG63 cells treated with 0.16 to 100 μg mL-1 of M0, M1.5 and P10 up to 7 days. Cell proliferation and ALP activity assays were carried out for hTMSCs and indicated that WH can enhance the proliferation and osteogenic differentiation of stem cells.

Crystallinity and morphology control of whitlockite nanocrystals synthesis in tri-solvent system
Caifeng Wang[1], Ki-jae Jeong[1], ○Jaebeom Lee[2]
([1]Dept. Cogno-Mechatronics Eng., Pusan National Univ., [2]Dept. Chem., Chungnam National Univ.)

Key words whitlockite, magnesium, solid-liquid-solution systems, osteogenic differentiation

2S-S3p04 Centrifugal microfluidics devices for bioassay

○Masato Saito[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]PhotoBIO Lab, AIST-Osaka Univ)
saitomasato@ap.eng.osaka-u.ac.jp

In recent years, construction of the rapid and highly sensitive biosensor device by inducing efficient micro-scale reaction is actively studied. Application of biosensors encompasses a broad area specially in human health management through diagnosis and prevention of lifestyle-related diseases (food poisoning bacteria and livestock epidemics in agricultural fields, etc.) by daily monitoring. As advancement to the merits of biosensors, chip devices that has point-of-care testing (POCT) performance for on-site (simple, quick, and sensitive) utility is highly desired and gradually being developed. The author has been energetically engaged in research on biosensing chip devices using nano / micro structures, and an example is introduced below.

The PCR remains an important technology and often used in molecular biology and testing. By placing the reaction site in a minute space, unique effects such as rapid heat exchange and prevention of molecular diffusion occur. The author exploited these effects and developed a reciprocating micro-channel PCR chip, showing rapid amplification and detection of the new influenza virus gene in just 9.5 minutes [1-4]. However, from the viewpoint of practicality, these devices should be easy and straightforward to operate and mass-producible. Conventionally, a syringe pump is used for liquid flow control in microchannel that complicates the system management and operation. To address this concern, a PCR solution driven by a self-propelled chip device has been developed that utilizes thermal convection generated in the microchannel assisted by centrifugation.

We focused on thermal convection to run the PCR solution by itself. Here, looking at the basic equation representing the Benard convection, a gravity-dependent variable exists. This means, if the magnitude of gravity can be changed, it is thought that the convection velocity can be controlled. To induce the gravity required to the desired thermal flow, a rotating platform has been utilized; rotating speed and radial position affects the artificial gravity. However, both the temperature and artificial gravity should be controlled in the desired system. In order to demonstrate this, we fabricated a ring-shaped microchannel (5 mm in diameter, channel width 500 μm) made by COP and a device capable of simultaneously controlling temperatures from two separate heaters (95°C and 60°C). For a 5 G load, the convection lap time in the ring channel flow path was about 12 seconds. When evaluated using human β-ACT DNA (120 pg) as a model target, rapid DNA amplification was possible within 10 minutes only [5]. In addition, in order to overcome the complexity of PCR solution preparation, we also developed a functional and convenient chip device that the automatically meters the amount of solution necessary for PCR using capillary action and centrifugal transfer. This enables PCR to be performed simply by just dropping an arbitrary amount of solutions without trained pipetting skill. The author tried to detect the drug resistance gene (IMP-6) in human stool samples using the developed device in collaboration with Prof. Dr. Tomono and co-workers, Medical School, Osaka University. It was possible to detect IMP-6 DNA simply and quickly from the sample solution without complicated sample preparation; boiling and dilution only without direct extraction [6]. Currently, the development is continuing for the headway of infection control.

In addition to the above, the author is also working on the development of centrifugation-assisted microdroplet PCR for rapid digital gene detection [7], and development of a portable multi-sensing system [8], etc. By promoting these researches and developments, a meaningful contribution to medical, biochemical research and social implementation is greatly envisioned.

References:

1) Analyst, 2011, 136, 2064-2068
2) Anal Bioanal Chem, 396(1), 457-464, 2010
3) Sensors and Actuators B: Chemical, 206, 303-310 (2015)
4) Biosensors and Bioelectronics 74 (2015) 725-730
5) Anal. Chem., 2017, 89 (23), pp 12797-12804
6) MicroTAS2017, p1244-1245
7) MicroTAS2017, p13-14.
8) Microsystems & Nanoengineering 4, Article number: 17083 (2018)

Centrifugal microfluidics devices for bioassay
○Masato Saito[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]PhotoBIO Lab, AIST-Osaka Univ)

Key words centrifugal-assisted thermal convection PCR, microfluidics

2S-S3p05〈招待講演（韓国生物工学会）〉

Exosome based theragnosis for future medicine

Kyusoon Shin[1], Ju Young Kim[1], Chang Hyun Lee[1], Kwang Sik Kim[1], ○Jong Wook Hong[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Bionano. Eng. Hanyang Univ., [2]Dept. Bionano. Eng. Hanyang Univ., [3]Center of exosome and bioparticulate research, Hanyang Univ.)
jwh@hanyang.ac.kr

Exosomes are extracellular vesicles that are secreted from cells. They consist of lipid bilayer shell and the size of exosomes is in the range of 50 to 200 nm in diameter. Exosomes contain genetic material such as proteins and nucleic acids which reflect the characteristics of the cells from which the exosomes are derived. Exosomes were considered to play a role of disposal of cellular waste at the time of their discovery, but recent studies have shown that exosomes are involved in cell-cell communication such as cancer metastasis. Currently the research has some limitations related to separation of exosomes from extracellular fluid due to their small size and the density (1.13 - 1.19 g / mL) inherent in exosomes.[1)]

Common methods used for exosome separation include ultracentrifugation, filtration, and precipitation. Ultracentrifugation is applicable to various body fluids, but it has a limitation that it causes damage to exosomes due to high centrifugal force which is severe, and exosomes are aggregated as a result. The yield of exosomes is remarkably low in ultracentrifugation method. In the case of filtration method, the purification of the exosome by the virtue of the pore size of the porous membrane causes damage to the exosomes. This method also suffers from low treatment capacity limit. The precipitant-based separation method can be easily used, but impurities other than exosomes are precipitated together, resulting in low purity, including incubation, and long separation time. [2)]

In this lecture, we will report the development of a micro-system-based exosome separation technology which keeps exosome intact by separating them through a continuous flow process[3)]. This technique is suitable for nondestructive separation of biomaterials including exosomes by precisely controlling the physical fluid behavior. It solves several problems such as low purity, throughput and long separation time. Furthermore, we will discuss the application of exosomes as a new biomarker for diagnosis of various disease states including cancer and its application as a new therapeutic system to replace or supplement cell therapy.

Exosome based theragnosis for future medicine
Kyusoon Shin[1], Ju Young Kim[1], Chang Hyun Lee[1], Kwang Sik Kim[1], ○Jong Wook Hong[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Bionano. Eng. Hanyang Univ., [2]Dept. Bionano. Eng. Hanyang Univ., [3]Center of exosome and bioparticulate research, Hanyang Univ.)

Key words exosome, separation, microsystem, future medicine

2S-S4p01 動物細胞培養用バイオリアクターの研究を振り返って

○飯島 信司
（愛工大・工）
iijimarecdna@aitech.ac.jp

微生物や動物細胞培養のためのバイオリアクターは古い研究の歴史を持ち、本会においてもかつては多くの研究者がしのぎを削った研究テーマであった。特に微生物培養では酸素供給が律速となることが多いため、pH センサーと並んで新たに開発された溶存酸素センサーの特性とそれを利用した培養制御の研究が数多く行われ、DO スタットによる基質の添加と酢酸など増殖阻害物質の生産抑制による高濃度培養の効率化など華々しい成果をあげた。さらに、培養基質であるグルコース濃度のオンライン測定と制御も試みられた。一方、動物細胞の培養においては、攪拌や通気に起因する剪断応力などによる細胞のダメージや、基質であるグルコース、グルタミンから生成する増殖阻害物質の乳酸やアンモニアの蓄積が大きな問題となった。このためバイオリアクターの攪拌翼の形状の改良や濾過型バイオリアクターの利用さらに連続培養などが試みられるとともに、前述のグルコースを始めアミノ酸などのオンライン測定なども行われた。これらの研究の歴史は複雑組織の構築を考えるときの一つのモデルになるものと考えられる。

History of research on animal cell bioreactor

○Shinji Iijima
(Fac. Eng., Aichi Inst. Technol.)

Key words bioreactor, oxygen sensing, sensor

2S-S4p02 人工酸素運搬体（パーフルオロカーボンエマルジョン）の開発

○福島 昭二
（神戸学院大・薬・臨床薬剤）
fukusima@pharm.kobegakuin.ac.jp

パーフルオロカーボン (PFC) は酸素をはじめとした気体の溶解性が高く、化学的・生物学的に不活性であると考えられたことから人工酸素運搬体として有力視されてきた。PFC が酸素運搬を行うには、当然のことながら循環血中に存在しなければならないが、PFC は水に全く溶解しない液体であるため、血管内に投与する場合には O/W 型エマルジョン製剤とする必要がある。また血中で長時間循環することが重要である。しかし、血中に投与されたエマルジョン粒子は RES を中心とした組織内に取り込まれ、速やかに血中から消失するため、酸素運搬能は数時間しか保つことが出来ない。我々はエマルジョン表面へ PEG 化リン脂質を導入することにより RES への取り込みを回避し、血中滞留性を向上させることを試みた。【実験方法】PFC として Perfluorodecalin (PFD)、perfluorotributylamine (FC-43)、および perfluorooctylbromide (PFOB)を使用し、乳化剤に精製卵黄レシチン、乳化補助剤としてパーフルオロアルコール脂肪酸エステル、および PEG 修飾 distearyl phosphatidyl ethanolamine (PEG－DSPE) を用い、また、新規に開発した高圧ジェット流型乳化機を用いて、エマルジョンを調製した。wistar 系雄性ラットを用い、ペントバルビタール麻酔下で全血液に対し 30%相当のエマルジョンを i.v. 投与し、経時的にヘマトクリット管に採血し、遠心処理により全血液に対する PFC の体積比 (フルオロクリット値) を測定した。また、輸血代替を想定し、高濃度酸素吸入下でヘマトクリット値が約 10% になるまで血液と PFC エマルジョンを交換し、経時的に血液ガスおよびイオン濃度を測定した。【結果・考察】PFC エマルジョンの単回投与において、投与直後のフルオロクリット値は約 10%を示したが、PEG 非修飾型 PFC エマルジョンの場合、いずれの PFC においても投与後 2 時間で約 2%に低下した。それに対し、PEG 修飾型エマルジョンの場合、投与後 4 時間においてもフルオロクリット値は 7%以上を示し、血中滞留性が大幅に延長した。これは、PEG 化リン脂質により粒子表面に水和相が形成されたことで、RES による取り込みが減少したためと考えられる。血液交換では、ヘマトクリット値を約 10% とした時フルオロクリット値は約 30%であり、24 時間後において約半分の 15% に低下した。血液分析では交換後 6 時間から pH の上昇が見られたが、それ以外には大きな異常は認められず、人工酸素運搬体としての本製剤の有用性を示すデータであると思われる。これらのデータに加え、その他の酸素運搬体の開発についても述べる。

Praparation and evaluation of perfluorocarbon emulsion as artificial oxygen carrier

○Shoji Fukushima
(Dept. Clinic. Pharmaceut., Pharm. Sci.,Kobegakuin Univ.)

Key words perfluorocarbon, emulson, oxygen, carrier

2S-S4p03 ヘモグロビンを封入した人工酸素運搬体（人工赤血球）

○伊藤 大知
（東大院・医・疾患生命工学セ）
taichi@m.u-tokyo.ac.jp

輸血用の赤血球製剤代替物として、多くの酸素運搬体が開発されてきた。これらは大別して、ヘモグロビンを用いたタイプと、PFC（パーフルオロカーボン）を用いた酸素運搬体に分類される。今後は新たに 3 次元組織を構築する培養プロセスにおいて、酸素運搬体が重要になってくると予想される。この場合は、体内に大量に投与が必要な人工血液としての酸素運搬体よりも開発のハードルは低くなると期待している。
ヘモグロビンは一つの分子に 4 つのサブユニットを持ち、各サブユニットにあるヘム鉄を酸素分子とグロビンタンパク質のイミダゾール基を配位することで、酸素を運搬することができる。このため酸素分圧と酸素飽和度の関係を示す酸素解離特性は、各ユニットの協奏的な効果によって、低酸素分圧で急激に酸素を吸収する S 字カーブを描く。このため空気の酸素濃度 21%、健常人のヘマトクリット値（血液中の赤血球体積分率）45%で、全身に酸素を供給する必要不可欠な酸素を運ぶことができる。
筆者らは、赤血球の同じサイズを持つシングル μm レンジの新しい酸素運搬体の開発に取り組んでいる。SPG（Shirasu Porous Glass）膜は、非常に均一な膜細孔径を持ち、異なった細孔径の膜を選択することで、非常に均一な膜乳化を行うことができる。ウシ血液から抽出したヘモグロビン(bHb)のみでは乳化したエマルションが安定分散しないが、ウシ血清アルブミン(BSA)を一定量以上混合することで、均一な乳化を可能とし、さらにグルタルアルデヒドで架橋することでヘモグロビンーアルブミン粒子(bHb-BSA 粒子)を得ることに成功した。bHb が 10wt%に対して、BSA が 5～20wt%の間で安定した膜乳化を実現した。この微粒子は、架橋により共同性は失われ、p50 の値は低酸素分圧側にシフトしているものの、高い酸素親和性と酸素解離曲線を示した。
凍結保存安定な材料であり、-80℃の保存で、少なくとも年単位で活性が維持される。今後の灌流培養系の構築に活用して頂けることを期待している。

Hemoglobin-based oxygen carriers (Artificial red blood cells)

○Taichi Ito
(CDBIM, Univ Tokyo)

Key words Oxygenation, hemoglobin, PFC, membrane emulsification

2S-S4p04 複雑組織製造に必要な基盤技術を考える～バイオリアクターの側から～

○長森 英二
（大工大・工）
eiji.nagamori@oit.ac.jp

はじめに（本シンポジウムの開催主旨）
次世代を担う再生医療・細胞治療技術として，複数の細胞種から構成され複雑構造（血管ネットワークや神経ネットワークなど）を有した機能的組織製品の実現が予期される．これを実現に導くには，対象とする臓器の成立ちを参考にしつつ，試験管内環境にて実現可能な方法により複雑組織構造を作り上げる高度な組織工学技術（I），試験管内で作製した複雑組織を十分な栄養や酸素の供給が可能な状態にて生かしつつ，生体内にて未成熟組織が機能的に成熟する環境を試験管内に実現（生体内環境模倣培養）することで機能的に育む技術（II），作製し育んだ組織の機能面を適切に評価可能な高度なアッセイ技術（III），の一連が求められると予想される．このように作製・評価が可能な機能的な組織は，創薬や安全性評価等の細胞アッセイにも活用可能と考えられる．同タイトルのシンポジウムは，ここに記述したような将来技術を思い描き，実現に導くための要素技術を考えると共に，解決すべきボトルネックを明確化・発信することを意図している．2018 年度大会では主に，上記の（I）複雑組織を作り上げるための技術群に着目して先進的な試みをシンポジストにご紹介頂いた．本大会では第 2 弾として，このような組織を育む装置としてバイオリアクター側に求められる仕様や要素技術について議論をしたい．

酸素運搬体を用いた超高密度かつ機能的な細胞培養
発表者を含む研究グループは，これまでに培養骨格筋組織を題材として，上記の（I）から（III）の要素技術開発に取り組んできた．中でも（II）において，生体組織並み（10^9 個/mL 以上）の超高密度な組織培養を可能とするために酸素律速の問題は深刻になると当初から予想され，酸素運搬体を用いた細胞培養の可能性を検討してきた．具体的には，PBS 緩衝液中でエマルジョン化されたパーフルオロカーボン (PFC エマルジョン) を用い，酸素供給速度を高める効果による超高密度培養に対する取り組み，酸素が豊富な環境で培養することで導かれる細胞の構造や機能の変化 [1]，のそれぞれについて検討状況をご紹介したい．

参考文献
１）Fujita, H., Shimizu, K., Morioka, Y., Nagamori, E., Enhancement of C2C12 differentiation by perfluorocarbon mediated oxygen delivery. J. Biosci. Bioeng. 110 (3), 359-362. (2010)

Considering complexed tissue-engineering techniques in all aspects for industrial tissue manufacturing

○Eiji Nagamori
(Fac. Eng., Osaka Inst. Technol.)

Key words tissue culture, perfluorocarbon emulsion, skeletal muscle

2S-S4p05 トランスオミクスビッグデータからＳＤＧ障害疾患に対する新薬発見

○植田 充美 [1,2]
（[1]京大院・農, [2]CREST）
miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

ＳＤＧ障害疾患の問題となっている感染症疾患の１つであるカンジダ症は、常在性真菌 Candida albicans によって引き起こされる日和見感染真菌症である。健常者においては、免疫細胞マクロファージが C. albicans の病原性を抑制する。しかし、抗生物質の過剰摂取や高齢化や AIDS 疾患などにより免疫力が低下すると、それを契機として C. albicans は病原性を発揮する。豹変した C. albicans は形態変化し病原性タンパク質を生産することで、マクロファージに貪食されずに脱出し、血流を通して全身の臓器に感染が広がっていく。このカンジダ症に有用な診断薬・抗真菌薬はほとんどないに等しい状況である。特に全身性カンジダ症の致死率は、敗血症、あるいは多臓器不全として 50%にも達する。
こういった問題を克服するためには、新規な機構を持つ抗真菌薬剤の開発が必要である。本シンポジウムでは、トランスオミクスビッグデータを活用したミックスドプロテオミクスを構築することにより、C. albicans のマクロファージ破壊機構の解明を試み、免疫療法の適用により、カンジダ症を完全に制御できる新薬を発見し実証した。
C. albicans のマクロファージ破壊脱出機構を詳細に解析するため、相互作用させた後、そのまま分離せずに高分離能ロング・モノリスカラム装備ナノ LC-MS/MS による 2 種生物由来のタンパク質群をオンラインで高速・精密に分離し、MS/MS による網羅的なタンパク質の同定とそれぞれの生物のゲノム情報を基にした帰属解析を行った結果、次のことが推定された。
1. マクロファージ内では、C. albicans は、グルコース飢餓状態が生じ、β 酸化とグリオキシル酸回路を働かせて、枯渇しているグルコースを自ら作り出している。さらに、プロテアソーム系により自身のタンパク質を分解し、アミノ酸合成も行っている。
２．マクロファージ内のストレスに対処するため、C. albicans は酸化ストレス、イオン欠乏ストレス、低 pH ストレスなどに対処するタンパク質を生産していることが分かった。
3. マクロファージに対して、C. albicans は病原性に関連していると報告されている、菌糸関連タンパク質、接着タンパク質、プロテアーゼ等を生産している。多くの機能未知タンパク質も同定され、これらも、マクロファージ内に分泌され、C. albicans のマクロファージ破壊脱出機構に重要な役割を担っていることが期待される。
4. マクロファージタンパク質としては、シャペロンタンパク質やアポトーシス関連タンパク質など 2 つのタンパク質が顕著に減少していた。C. albicans はこれらマクロファージタンパク質を分解することで、マクロファージ活性の低下を誘導し、破壊脱出しているのではないかと考えられた。
上記のミックスドプロテオミクスにより、C. albicans は、マクロファージのグルコース枯渇戦略をかいくぐるため、自らの脂肪酸の β—酸化により、形態を糸状タイプに変え、グリオキシル酸回路を稼働させ、グルコースを新生させエネルギーを得て、マクロファージの攻撃を撃破して、血管網へと浸潤しているものと考えられた。したがって、この中で、グリオキシル酸回路を遮断すれば、感染症を防御できると考えられた。そこで、グリオキシル酸回路の酵素であるリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（Mdh1p）に着目して、これに抗原性があることも知られているので、有望なワクチン候補になると期待される。C. albicans の MDH1 遺伝子をクローニングし、MDHp を大腸菌で発現させた、これからエンドトキシンを除去したのち、マウスに皮下、並びに経鼻投与を行った。血清中の抗体価上昇を確認後、致死量の C. albicans を接種して生存率を観察したところ、35 日目での生存率は、100％という結果を得た。この結果より、この戦略は、C. albicans に対するこれまでにない有望な未病・予防療法となった。
本疾患は、高齢化社会で現在増加してきており、早急な予防や早期診断法が求められているが、この新しいミックスドプロテオミクスにより、グリオキシル酸回路系の酵素に対する分子標的薬の開発や、抗原の事前投与による免疫力強化が有効であることが提唱された。
文献
植田充美ら、「ミックスドプロテオミクスの展開拡大」、p.78-87,「バイオイノベーションに向けて」(シーエムシー出版) 2019 刊行

Discovery of novel medicines specific for diseases with damages to SDGs from big data based on transomics

○Mitsuyoshi Ueda[1,2]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]CREST)

Key words transomics, SDG, mixed proteomics, infectious disease

2S-S4p06 データ駆動型代謝数理モデル構築とシアノバクテリア代謝工学への応用

○松田 史生
（阪大院・情報）
fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

はじめに：近年、ビッグデータの取得と活用が活発化している。しかし、生物を使ったものづくりに応用可能な数万点のデータセットが氾濫している状況とはいいがたい。そこで、我々は微生物代謝工学への利用を目的として、少数の培養条件から得た 3 種の定量データ(代謝物含量、酵素タンパク発現量、代謝フラックス）用いた、データ駆動型の代謝数理モデル構築を試みている。
代謝工学は、有用物質生産能を指標とする代謝経路の最適化問題に取り組んでいるともいえる。フラックスバランス解析に基づく代謝シミュレーション法の登場で、大域最適解がある領域を推定できるようになった。次なる課題は、局所最適化のため勾配評価である。現状の有用物質生産株周辺の地形を調べてもっとも勾配の大きな方向を探すこと、すなわち有用物質生産能に活性変化が最も影響する代謝反応を特定する感度解析の実現である。計算機シミュレーションで感度解析を行うには、「なんでも予測できる代謝数理モデル」は必ずしも必要なく、少なくとも①現状の有用物質生産株の代謝状態が再現でき、②代謝反応の活性増減が有用物質生産能に及ぼす影響を予測可能できればよい。しかし、代謝数理モデルのパラメタ（ミカエリス定数など）の情報が不足しているため、データ駆動型のパラメタ推定に期待が集まっている。
必要なデータの種類：感度解析のための代謝数理モデルはミカエリスメンテン型の速度式で記述されることが多い、したがって、代謝物含量 [*S*]、酵素タンパク質発現量 [*E*]、代謝フラックス *v* の実測データがあれば、残りのパラメタである *k* と K_M が推定できるのではないかと考えた。また、代謝物含量 [*S*]はメタボローム分析で取得できる相対定量値では不十分である。そこで代謝物濃度を測定可能の手法を構築した (Nishino et al. JBB. 2015)。
データ駆動型のシアノバクテリア代謝数理モデル構築：我々はまず、「光独立栄養条件下で培養したシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (PCC 6803)の代謝状態を再現可能な代謝数理モデルの構築」を目指した。また、予測力の高いモデルを 1 つ作ることはあきらめ、そこそこの予測力を持つモデル 100 個の集団（アンサンブル）を作成することを試みた。
まず、PCC 6803 の中心代謝 39 反応を、*k* と K_M などのパラメタが未定のままミカエリスメンテン型の速度式で記述した。つぎに、光独立栄養条件下の PCC 6803 から取得した[*S*], [*E*], *v* の実測値を式に代入した。残りの *k* と K_M のうち、K_M をランダムサンプリング(範囲は 0.01-10mM) し、式に代入すると、*k* は自動的に計算で決まる。39 反応について同様の操作を行い、速度式＋ランダムな K_M ＋計算で求めた *k* からなる代謝数理モデルを 1 つ生成した。この代謝数理モデルは、①光独立栄養条件下の PCC 6803 の代謝状態を再現できる。モデル生成を繰り返し、*k* と K_M が異なる代謝数理モデルを 1,000,000 個生成した。
次に、1,000,000 個のモデルに練習問題を解かせ、成績の良いものを選抜した。異なる条件（混合栄養条件）で培養した PCC 6803 から[*S*]、[*E*]、*v* の実測データを得た。酵素タンパク質発現量[*E*]を上記で作成した代謝数理モデルに代入し、定常に達するまで時間展開すると、混合栄養条件の代謝物含量と代謝フラックスの予測値が得られる。実測値に近い予測値を出したモデルが、②代謝反応の活性が増減した時の代謝状態を予測する能力が高いモデルであるといえる。本研究では予測能力の高いモデルトップ 100 個を選抜し、予測用のモデル集団（アンサンブル）とした。
エタノール生産能向上に寄与する代謝反応の予測：構築したモデルでエタノール生産速度の向上のための合理的な代謝改変箇所を予測した。まず、モデルアンサンブル 100 個をそれぞれで、感度解析（代謝コントロール解析）を行った。得られた結果も 100 個あるため、予測値にはばらつきがある。最低 90 個のモデルで同じ予測が得られた反応を調べたところ（アンサンブル予測）、PYK、PGK と PRK の 3 反応が過剰発現の候補として特定された。実際に、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 (Nishiguchi et al. Metab Eng 2019)。
データ駆動型代謝数理モデル構築の更なる活用に向けて：ミカエリスメンテン型の速度式に登場する、代謝物含量、酵素タンパク発現量、代謝フラックスを実測データが網羅できたことが、2 条件と少ないデータ点数でも、予測力の高い代謝数理モデルが構築できた鍵であると考えられた。さらに、アンサンブル予測をおこなうことで、予測精度の推定が可能となった。データ駆動型サイエンスをさらに展開させるには、データの量に加えてバリエーションの重要性をよく吟味していく必要があると考えられた。

Trans-omics data driven ensemble modeling of cyanobacteria metabolism using metabolic flux, metabolite concentration, and enzyme expression data

○Fumio Matsuda
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words dynamic metabolic model, metabolic engineering, cyanobacteria, metabolic flux analysis

2S-S4p07 質量分析を基盤としたシングルセル分子フェノタイプ解析

○和泉 自泰, 馬場 健史
（九大・生医研）
izumi@bioreg.kyushu-u.ac.jp

生命の最小単位である細胞は特異的な機能を持つ細胞集団に分類することができるが，近年の研究から同一細胞集団であっても多様性・不均一性を有することが知られている．この多様性が環境適応や疾患発症の過程において極めて重要な役割を担っていると考えられ注目されている．プロテオームおよびメタボロームは，生命システムを理解するための重要分子であると同時に，ゲノム情報の実行の結果，すなわち高解像度のフェノタイプとしても捉えることができる．一方，近年の次世代シーケンサーの技術革新に伴い，ゲノムおよびトランスクリプトーム情報は 1 細胞レベルで取得できるようになってきた．しかし，メタボロームおよびプロテオーム分析は，PCR のような観測対象物の増幅操作ができないため，細胞内に存在する膨大な種類の分子種をそのまま検出する必要がある．2016 年の Nature 誌に掲載された論文「Technology feature: Metabolomics Small molecules, Single cells (Fessenden M., *Nature*, 2016)」では，「質量分析計 (MS) の高感度化と細胞サンプリング技術の発展により 1 細胞での代謝解析が可能となりつつあるがこの研究分野はまだ発達初期段階 (infancy) である」と結論づけられた．この主な理由は，これまで 1 細胞メタボローム解析に適応されてきた細胞種がアフリカツメガエルの初期胚 (直径 1 mm，523 nL) など細胞サイズの大きいものが大半であり，さらに細胞内での存在量の多い 40 種程度の代謝物しか検出できないためであった (Rosemary M. et al., *PNAS*, 2015).
一般的な動物細胞の体積 (直径 20 μm，4 pL) は，上記の細胞の 100 万分の 1 程度である．したがって，一般的な動物 1 細胞のメタボローム解析を実施するためには，100 万倍の検出感度の向上および周辺技術の開発が必要不可欠である．そこで本研究では，一般的な動物細胞を測定試料として，ナノ液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (nano-LC/MS/MS) を基盤とした代謝物あるいはタンパク質の高感度計測技術および試料調製・試料導入技術を連携・連動させた「高感度分子フェノタイプ解析システム」の開発に取り組んだ．
我々はこれまで，一般的な動物 1 細胞からのメタボローム解析およびプロテオーム解析 (ショットガンプロテオミクス) を実施するために，(1) 顕微鏡下で標的とする生細胞を迅速に単離・回収する技術，(2) サンプルロスを低減させた微小空間内での前処理および微量試料導入技術，(3) nano-LC/MS/MS による超高感度分析技術を開発してきた．さらに，これらの要素技術を融合させた「1 細胞分子フェノタイプ解析法」を用いることで，HeLa 1 細胞 (直径 20 μm，4 pL) から，100 種の代謝物 (50 種の親水性代謝物および 50 種の疎水性代謝物) あるいは 100 種のタンパク質 (リボソームや細胞骨格タンパク質，一部の酵素など) の検出に成功した．また，開発した nano-LC/MS/MS システムの検出感度は，おおよそ 10 amol～1 fmol (化合物によって異なる) であり，メタボロミクスおよびプロテオミクス分野では世界最高感度の分析系である．そのため，一般的な動物細胞の 1 細胞解析にも適応可能であった．しかし，本分析系の検出感度は限界の域に達しつつあり，細胞内に微量に存在する分子群の検出は困難であると予想される．また，メタボローム分析とプロテオーム分析は，nano-LC/MS/MS 分析系により測定を行うものの，カラム担体の種類や移動相条件，あるいは測定のための前処理法 (トリプシン消化の有無など) が大きく異なるため，同一細胞からのメタボローム・プロテオーム同時測定は不可能である．以上のことから，現時点においては，「ライブセルイメージング」と「高感度分子フェノタイプ解析」の融合こそが新たな生命システムを紐解く現実的かつ効果的な解析手段であると結論づけた．すなわち，ライブセルイメージングによってヘテロな生細胞集団から蛍光等を指標に細胞特性を定義し，細胞特性の異なる少数細胞集団 (～50 cells) を迅速に回収し，高感度分子フェノタイプ解析を実施する．さらに, 細胞特性が同じ少数細胞集団のメタボロームおよびプロテオーム情報を統合して解析することで，生命システムの理解や新たな発見に貢献できると考えた．現在，がん細胞の細胞周期と代謝の差異を明らかにするために，ヘテロながん生細胞集団から細胞周期をリアルタイムに観測できる蛍光プローブ (Fucci: Fluorescent Ubiqutination-based Cell Cycle Indicator) を指標に，細胞周期の異なるがん細胞を回収し，分子フェノタイプ解析を進めているところである．
謝辞：本研究は科学技術振興機構 (JST) CREST「統合 1 細胞解析のための革新的技術基盤 (研究課題番号 JPMJCR15G4)」の支援を受け実施した．

Mass spectrometry-based molecular and phenotypic analysis at single-cell resolution

○Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba
(Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ.)

Key words single-cell analysis, metabolomics, proteomics, living cell

2S-S4p08 1 細胞セルオミックスによる多細胞ネットワークが織り成す生命現象の解明

○青木 航 [1,2]
（[1]京大院・農, [2]JST・さきがけ）
aoki.wataru.6a@kyoto-u.ac.jp

近年、生命科学の方法論が hypothesis-driven から data-driven へと大きく変わりつつある。その背景にあるのが、高性能な次世代シーケンサーや質量分析器の出現である。これらの技術的革新によりトランスオミックスデータの取得が比較的簡便になるとともに、バイオインフォマティクスパイプラインも整備され、従来考えられなかった規模でビッグデータの蓄積とその解釈が進みつつある。このようなオミックス解析（ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクス）は非常に強力だが、課題も存在する。それは、複雑な多細胞生物が、どのように細胞―細胞ネットワークを構築して高次生命現象を創発させるのか、といった組織レベルの問題に対してはアプローチしにくいことである。
そこで我々は、多細胞ネットワークが織り成す生命現象の理解を目指して、セルオミックスと名付けた新しい方法論の開発を進めてきた。具体的には、多数のニューロンが相互に接続して高次機能を創発する「脳」をモデルとして選択し、その動作原理を細胞ネットワークレベルで理解するための新規方法論 “functional cellomics”を提案している[1]。“Functional cellomics”の核となる技術のひとつが、オプトジェネティクスである。オプトジェネティクスとは、ニューロンにオプシンを発現させ、光照射によりニューロンの活性を自在に ON/OFF する技術である。オプトジェネティクスは強力な手法であるが、仮説を必要とするため完全に新しい発見は生まれにくく、また、それぞれの仮説に合わせた遺伝子組み換え生物を作製する必要があるためスループットが低いという弱点がある。そのためオプトジェネティクスは、神経ネットワークレベルの data-driven science を実現するための基盤技術にはなりえていない。そこで、オプトジェネティクスに Cre/lox ゲノム組換えシステムを組み合わせることで、神経ネットワークを構成するひとつひとつのニューロンにおいてオプシンが発現するか否かを“stochastic”に決定するシステムを構築した。このアプローチは従来のオプトジェネティクスに対して相補的特徴を持っており、仮説を必要とせず、ハイスループットに、各ニューロンの機能をネットワークレベルで評価可能である。この手法を用いると、さまざまなパターンでオプシンが発現した生物集団を簡単に創出することができ、この集団に対して光照射下で行動実験を行うことで、さまざまな表現型を示す個体を一度の実験で得ることが可能になる。この手法は仮説を立てずに網羅的な cellomics データが取得可能なため、細胞ネットワークの網羅的解析に貢献できると期待される。

[1] W. Aoki et al. 8, 10380 (2018)

Elucidation of biological phenomena of multicellular organisms by functional cellomics

○Wataru Aoki[1,2]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]PRESTO, JST)

Key words *Caenorhabditis elegans*, cellomics, functional cellomics, optogenetics

2S-S4p09 逆強化学習による「動物の行動戦略」のデータ駆動的解読

○本田 直樹
（京大院・生命）
honda.naoki.4v@kyoto-u.ac.jp

動物は外界の状況に応じて、より多くの報酬が期待できる行動戦略を持って行動していると考えられている。しかし、報酬には食べ物やお金など実態の伴うものだけでなく、間接的にそれらに結びつくものも含まれているため、自由に行動している動物を単に観察しているだけでは、「動物が何を報酬として、また何に価値を置いて行動しているのか？」を知ることは困難であった。そこで我々は、自由行動下の動物の行動時系列から「報酬によって規定される行動戦略」をデータ駆動的に解読する機械学習的手法（逆強化学習法）を考案した。
逆強化学習法の応用先として、線虫の温度走性行動に注目した。一定の温度で培養した線虫は、その培養温度を記憶し、温度勾配下では培養温度を目指して移動し、逆に一定の温度で餌のない飢餓状態を経験した線虫は、温度勾配下で飢餓温度を避けることが知られている。しかし、線虫がどのような戦略にしたがって行動して いるのかは全くの不明であった。線虫を温度勾配において追尾することで、行動時系列データを取得し、 そして逆強化学習法により、線虫にとっての報酬を推定した。 その結果、餌が十分ある状態で育った線虫は、「絶対温度」および「温度の時間微分」に応じて報酬を感じていることを明らかにした。この報酬に基づく戦略は２つの異なるモードから構成されており、一つは効率的に成育温度に向かう移動、もう一つは同じ温度の等温線に沿った移動を説明するものであった。また飢餓を経験した線虫は「絶対温度」のみに依存した報酬により、飢餓温度を避ける戦略を持っていることを明らかにした。さらには、推定された報酬を用いて線虫行動をシミュレーションすると温度走性行動が再現され、逆強化学習法の妥当性が示された。
この手法は行動とそれに伴う状態変化が定量的に観測可能な場合、線虫に限らず他の動物へも適用可能であることから、神経科学や行動生態学の基盤技術になることが期待される。

参考文献：Identification of animal behavioral strategies by inverse reinforcement learning. Yamaguchi S, Honda N* et al., PLoS Computational Biology (2018)

Data-driven identification of animal behavioral strategies by inverse reinforcement learning

○Naoki Honda
(Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ.)

Key words machine learning, behavioral analysis, reward, *Caenorhabditis elegans*

2S-S5p01 Two tales of the respiratory chain: 呼吸鎖が物質生産に直接的に関わるお話と間接的に関わるお話

○薬師 寿治 [1,2,3], 片岡 尚也 [1,2,3], 松下 一信 [1,2,3]
([1]山口大・院創成, [2]山口大・農, [3]山口大・中高温微セ)
juji@yamaguchi-u.ac.jp

呼吸鎖電子伝達系は化学的にはNADHとコハク酸の酸化が酸素の還元と共役することではあるが，膜電位とプロトン濃度勾配の形成として細胞のエネルギー生産に重要な役割を持つ。今回，呼吸鎖が酢酸菌による物質生産に直接的に関わるお話と間接的に関わるお話を提供して，応用展開の可能性や残された課題を議論する場になることを期待する。

【直接的に関わるお話】呼吸鎖には，電子受容体が酸素でないものや汲み出されるイオンがプロトンでないものなど，生物界には様々なバリエーションがある。酢酸菌の場合，様々な糖やアルコールを酸化する脱水素酵素が細胞膜に存在し，これらを電子供与体とする呼吸鎖電子伝達系が発達している。これら脱水素酵素は細胞質膜の外側に存在しており，培地中の基質を細胞内に取り込むことなく酸化することができる。加えて酢酸菌はそのようにして生じる酸化産物をしばらく消費することなく蓄積する。この特徴が物質生産に利点となり，酢酸発酵やソルボース発酵に利用される。このように酢酸菌は，物質を酸化するためだけにこのような呼吸鎖を発達させてきたように見える。しかし，この物質酸化系呼吸鎖であっても膜電位とプロトン濃度勾配を形成できるので，その生理学的意義は十分に理解できる。例えば，グリセロールはグリセロール脱水素酵素（GLDH）によってジヒドロキシアセトンにほぼ定量的に酸化され，グルコースはグルコース脱水素酵素（GDH）によってグルコン酸へほぼ定量的に酸化される。私たちはGLDHとGDHの基質特異性を再調査した。GLDHでは幾つかのアルドペントースが基質となり，アルドペント酸を生じることを提案した。L-リボースの酸化については詳細に解析し，L-リボン酸が生じることをNMRで確認した（Yakushi et al., 2018）。GDHでは，グルコースと比べるとほとんど酸化できないに等しいラクトースを酸化してラクトビオン酸を効率よく生産させることを試みた。GDHを酢酸菌で過剰発現することによって，ラクトース酸化系呼吸鎖の「入り口」を広くすることを試みた。酸化速度を上昇させることができたが，課題も見えてきた。

【間接的に関わるお話】呼吸鎖が補酵素のレドックスや細胞のフィットネスに関わることで，間接的に物質生産に影響する。酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* はEmbden-Meyerhof-Parnas経路とTCA回路の1部が遮断されており，解糖はペントースリン酸経路あるいはEntner-Doudoroff経路に依存し，酢酸を主な最終代謝産物とする。TCA回路は回らないが，解糖系でNADHは生産されるので，これをNADH脱水素酵素（NDH）で酸化しなければならない。さらに解糖に加えて，酢酸を生じるアルデヒド脱水素酵素が$NADP^+$依存であるがゆえに，NADPHの酸化も必要になることが期待される。しかしながら，膜画分のNADH酸化能（酸素を電子受容体とする）は十分に高いものの，酸素を電子受容体とするNADPH酸化能は極めて低い。公開されている酢酸菌ゲノムを網羅的に解析してみると，酢酸菌にはI型とII型のNADH脱水素酵素（NDH）が見られるが，*Gluconobacter* 属には一種の例外を除き，II型しか持たない。また，*G. oxydans* のほとんどの菌株が2種類のII型NDHを持つのに対して，より解析が進められているATCC621H株は例外的に1種類のII型NDHしか持たない（Matsutani et al., 2019）。以降，621H株が持っているII型NDHをc-NDHとし，もう一方をs-NDHと呼んで両者を識別する。以前，ドイツのグループから2種のII型NDHを持つ *G. oxydans* DSM 3504のs-NDH遺伝子を破壊して621H株のような遺伝型にすると，生育が悪くなることが報告された（Kostner et al., 2015）。この結果は，s-NDHがc-NDHには無い特性を持つ事を示唆している。c-NDHとs-NDHをそれぞれ大腸菌で発現させ，酵素活性を調べたところ，c-NDHはNADHに高い特異性を示しNADPHをほとんど酸化しなかった。一方，s-NDHは両者をほぼ同程度酸化した。ここで，グルコース脱水素酵素遺伝子欠損株（ΔgdhM株）を実験に用いた。ΔgdhM株は野生株よりも生育速度が低かった。野生株がグルコースではなくグルコン酸を細胞内に取り込んで酢酸まで代謝するのに対し，ΔgdhM株ではグルコースからグルコン酸へと変化させるルートを遮断しているため，細胞内にグルコースを取り込んで代謝する。この過程でNADPHを産出する。すなわち，グルコン酸の場合に比べて，グルコースの方が1分子NADPHを多く生産する。そこで，NADPHを酸化できるs-NDHを導入することでNADPHレベルの低下を試みた。ΔgdhM株と生育速度を比べるとs-NDHを導入した株は生育速度が上昇した。この結果から，ΔgdhM株の生育能低下の原因の一つがNADPHの蓄積と考察することができる。酢酸菌はおそらく，細胞外の物質酸化系呼吸鎖を発達させてきたため，細胞内でのNADPH酸化能に注力することなく進化してきたものと考えられる。

参考文献：

Yakushi et al. (2018), Appl Microbiol Biotechnol. 102: 3159.
Matsutani et al. (2019), Microbiology 165: 287.
Kostner et al. (2015), Appl Microbiol Biotechnol. 99: 375.

Two tales of the respiratory chain: a direct and indirect relationship to bioproduction

○Toshiharu Yakushi[1,2,3], Naoya Kataoka[1,2,3], Kazunobu Matsushita[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Innov., Yamaguchi Univ., [2]Fac. Agric., Yamaguchi Univ., [3]RCTMR, Yamaguchi Univ.)

Key words NAD(P)H, oxidation, cell membrane

2S-S5p02 大腸菌の呼吸鎖欠損変異株が示す異常な糖代謝の解析

○横田 篤
（北大院・農）
yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp

１．背景と目的

大腸菌の呼吸鎖はプロトン駆動力（pmf）形成を通じた酸化的リン酸化によるATP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比)や酸化還元バランス(NAD^+/NADH比)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点が多く，発酵生産菌育種のための基盤知見としてもさらなる理解が求められている。我々はこの相互関係を検証するために呼吸鎖酵素の欠損株を構築し，代謝解析を行ってきた。

具体的には，呼吸鎖酵素のうちpmf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（Cytbo_3）に注目し，*Escherichia coli* W1485（野生株）を親株として、その片方を欠失させた株（ΔNDH-I株，ΔCyt*bo*株），および両方を欠失させた株（ΔΔ株）を構築して解析した。各株のpmf形成能は，親株＞ΔNDH-I株≒ΔCyt*bo*株＞ΔΔ株と推定される。その結果，全ての欠損株で酢酸が著量生成されたが，ΔΔ株では野生株やΔNDH-I株，ΔCyt*bo*株では生成されないグルタミン酸（Glu）が，50 g/Lのグルコースから約7 g/Lも生成される異常な糖代謝が観察された[1)]。また，ΔΔ株ではNADHの蓄積による細胞内の還元化も観察された。ΔΔ株に見られるこのような異常な細胞外代謝産物の蓄積には，pmf形成能が他株に比べて著しく低いことや，細胞内還元化の影響が推測されたが，その機構は不明であった。

そこで，本研究では呼吸鎖酵素の欠損が糖代謝に与える影響を包括的に明らかにするために，単欠損株とΔΔ株についてトランスクリプトーム解析，およびメタボローム解析を行い野生株と比較した。さらに酸化還元バランスが呼吸鎖酵素欠損株の代謝に与える影響を解析するために，pmf形成能を持たないNADH脱水素酵素II（NDH-II）をIPTG誘導型のプラスミドで発現させる系を構築し，ΔΔ株に導入して（ΔΔ/NDH+株）その培養特性を解析した。

２．方法

親株 *E. coli* W1485と単欠損株（ΔNDH-I株，ΔCyt*bo*株）およびΔΔ株をジャーファーメンターで無機塩発酵培地を用いてバッチ培養し，対数増殖期後期の菌体を回収した。回収した菌体を用いてRNA-Seqおよびメタボローム解析を行い，遺伝子発現と細胞内代謝物の動態を網羅的に調べた。ΔΔ/NDH+株はIPTGを添加して同様にバッチ培養を行い，IPTG無添加の場合と生育，糖消費，細胞外代謝産物を比較した。

３．結果と考察

呼吸鎖酵素欠損株では転写・細胞内代謝物の両方で変化がみられた。その程度は単欠損株よりもΔΔ株で大きく，pmf形成能の異なると考えられる一連の変異株を用いることで，エネルギー欠乏の度合いと大腸菌の応答の関連が明瞭に示された。特に酢酸生成とGlu代謝に大きな変化がみられた。すなわち、ピルビン酸から酢酸を生成するpyruvate oxidaseをコードする *poxB* の転写量が，ΔΔ株＞単欠損株の順で増大していた。PoxBは呼吸鎖の電子伝達体であるユビキノンに電子を供与し，ユビキノールを生成させる。ユビキノールは末端酸化酵素によって再びユビキノンへと酸化され，その過程でpmfが形成される。ΔΔ株ではPoxBによる酢酸生成を活性化させ，pmf形成能の低下を補っていると推測した。また，ΔΔ株でGluの脱炭酸反応を担う *gadA*，*gadB* の転写量が増大し，細胞内のγ-アミノ酪酸（GABA）濃度も上昇しており，Glu脱炭酸反応系の促進が示唆された。本反応系はTCAサイクルを2-オキソグルタル酸からコハク酸へバイパスする反応とサイクル反応を形成し，Glu脱炭酸反応により細胞内H^+が消費されることでpmfを形成する。ΔΔ株ではpmf形成能の低下を補完するために本サイクル反応が促進され，それに伴いGluが大量に生成されたと考えられた。

一方、ΔΔ/NDH+株はIPTG添加により生育が増加したことから，細胞内還元化の影響で生育が低下する可能性が示された。細胞外代謝産物ではIPTG添加で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。このことから，NDH-IIの導入でNADHレベルが低下し，TCAサイクル方向への炭素流量が増大したことが示唆された。一方でGluの菌体あたりの生成量は変化せず，細胞内酸化還元バランスのGlu生成への影響は限定的と考えられた。以上より，大腸菌はpmf形成能の低下の程度に応じて，酢酸生成や上記のGlu代謝を促進させる新奇な恒常性維持機構を有していることが示唆された。

参考文献

1) Kihira, C., *et. al*., Alterations of glucose metabolism in *Escherichia coli* mutants defective in respiratory-chain enzymes, *J. Biotechnol*., 2012, 158:215-223

Analysis of unique glucose metabolism in *Escherichia coli* mutants defective in respiratory-chain enzymes

○Atsushi Yokota
(Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words respiratory chain, glutamic acid, gamma-aminobutyric acid, *Escherichia coli*

2S-S5p03 ユーグレナの嫌気的呼吸鎖に共役したワックスエステル生産

○中澤 昌美
（阪府大院・生環科）
mami@biochem.osakafu-u.ac.jp

ユーグレナ（和名ミドリムシ）は淡水に生息する単細胞真核光合成生物である。光合成により独立栄養的に生育するとともに、多種の単糖・アミノ酸の資化能を有しており従属栄養的にも生育することができる。余剰の光合成産物や外部炭素源由来の炭素は、細胞内に貯蔵多糖パラミロン（β-1,3-グルカン）として蓄積される。パラミロンを蓄積した細胞を嫌気・低酸素環境に曝露すると、速やかにパラミロンを分解し、脂肪酸－脂肪アルコールエステルであるワックスエステルを合成する。主生成物はミリスチン酸ミリスチル（C14:0-C14:0Alc）である。ユーグレナによる低酸素下ワックスエステル生産は 1982 年に発見され、その代謝に関する研究が進められてきた。一般的な生物においては、脂肪酸はマロニル-CoA を経由して合成される。そのため、アセチル-CoA カルボキシラーゼによる反応に ATP が必要であり、解糖系での基質レベルのリン酸化による ATP 獲得を含めても、低酸素下でのエネルギー獲得は不可能である。しかし、ユーグレナにはミトコンドリアにアセチル-CoA 依存型の脂肪酸合成系が存在する。この反応によって、ワックスエステル合成に伴うエネルギー獲得が可能であると考えられてきた。
演者らは、ユーグレナによるワックスエステル生産をバイオ燃料として活用することを目指し、実用化に向けてワックスエステル生産を向上させることを目的として、代謝系を詳細に解析してきた。その中で、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I の阻害剤であるロテノンの存在下でユーグレナを低酸素処理すると、ワックスエステル生産量が大幅に低下するとともに、細胞内の ATP/ADP 比が大きく低下することを見出した。このことを基盤として、ユーグレナの低酸素下ワックスエステル生産にはミトコンドリア電子伝達系が寄与しているという仮説を立てた。ユーグレナは、低酸素下では電子伝達体としてロドキノンという、ユビキノンと比べ低い酸化還元電位を有するキノンを利用することが示唆されてきた。そこで、複合体 I による NADH 酸化によって生じた還元力がロドキノンへ伝達され、電子伝達タンパク質（ETF）-ロドキノン酸化還元酵素（OR）、ETF を介して脂質合成系に渡される代謝モデルを構築した。そこで、ETF-OR、ETF の発現抑制を RNAi により行ったところ、コントロールと比べ約 20％にまでワックスエステル生産量が低下した。さらに、嫌気性光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* で発見されたロドキノン合成に関与する遺伝子 *rquA* のユーグレナオルソログと予想された遺伝子を発現抑制したところ、細胞内ロドキノン量がコントロールの約 2%程度まで低下した細胞の作出に成功した。このとき、ワックスエステル量は約 30％程度まで低下していた。電子を受容する脂質合成系の反応の候補としては、*trans*-エノイル-CoA からアシル-CoA への還元反応を想定した。脂肪酸の分解を担う β 酸化系においては、アシル-CoA の酸化反応にアシル-CoA 脱水素酵素（ACD）が機能する。本反応は一般的に不可逆反応であり、ユーグレナの脂肪酸合成系では機能しないと考えられてきた。しかし、本研究においてユーグレナ EST データベース上に存在する ACD アイソザイム（少なくとも 7 種存在）のうち最も発現量の高いものをノックダウンすると、ワックスエステル生産量が約 70%に低下することを見出した。これに対して、従来本反応を触媒すると考えられてきた *trans*-エノイル-CoA 還元酵素の発現抑制ではワックスエステル生産は全く変化しなかった。これらの結果から、ユーグレナは低酸素・嫌気条件下で、β 酸化完全逆行による長鎖脂肪酸合成と共役した嫌気的呼吸鎖によりエネルギーを獲得し、生存を維持していることが明らかとなった。これは、生物界で初めての発見となった。
最後に、電子伝達の調節とワックスエステル合成に関する知見を紹介する。脱共役剤である CCCP が存在すると、ユーグレナの低酸素下での ATP/ADP 比は大きく低下する。このとき、ワックスエステル生産量はコントロールの約 2 倍に増加していた。詳細なメカニズムは不明であるが、電子伝達の調節が物質生産能力に大きな変化を及ぼす例として今後さらなる解析を行う予定である。

Anaerobic respiration coupled with mitochondrial wax ester production in *Euglena gracilis*

○Masami Nakazawa
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words *Euglena gracilis*, wax ester, anaerobic respiration

2S-S5p04 清酒酵母のミトコンドリア活性・ミトファジーがその醸造特性に及ぼす影響

○北垣 浩志
（佐賀大・農）
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

清酒などの大規模化した発酵産業において、酸素はごく初期でほぼなくなることから、清酒酵母などの醸造酵母におけるミトコンドリアの役割の解析は進んでいなかった。我々は清酒醸造における清酒酵母におけるミトコンドリアの存在と構造、役割、それに影響を及ぼす遺伝的因子について研究してきた。
その結果、ミトコンドリアは清酒醸造の初期だけではなく、中期以降も観察されるが、その大きさは酸素濃度よりもむしろ発酵開始以降の出芽回数に依存していることを明らかにした。
清酒醸造中にミトコンドリアの分解であるミトファジーも起きているようであり、特に栄養の少ない吟醸酒でその傾向ははっきりしており、ミトファジーによりカーボンフローをエタノールの生産から細胞数の増殖に振りむけていると考えられた。
清酒醸造中にもミトコンドリアは存在することからミトコンドリアに着目した酵母育種も可能であると考え、ピルビン酸のミトコンドリア輸送阻害剤への耐性株を分離してピルビン酸低減株を取得できることを示した。
このピルビン酸低減株は 14 番染色体が通常の 2 本から 3 本に増加しており、この部分染色体の増加がピルビン酸の低減を引き起こしていた。14 番染色体上のミトコンドリアに局在するシトクローム c オキシダーゼをコードする CCP1 を 3 個から 2 個に減らすとピルビン酸が増加したことから、14 番染色体上の CCP1 の増加がピルビン酸低減のメカニズムの一端だと考えられた。
これらのことから、ミトコンドリアが清酒酵母、醸造酵母の育種の新たなターゲットになると考えられた。

1 Kadowaki et al., Appl Environ Microbiol. 2017 Dec 1;83(24).
2 Kitagaki H, Takagi H. J Biosci Bioeng. 2014 Apr;117(4):383-93.
3 Agrimi et al., FEMS Yeast Res. 2014 Mar;14(2):249-60.
4 Shiroma et al., Appl Environ Microbiol. 2014 Feb;80(3):1002-12
5 Horie et al., Biosci Biotechnol Biochem. 2010;74(4):843-7.
6 Kitagaki H, Shimoi H. J Biosci Bioeng. 2007 Sep;104(3):227-30.

Effects of mitochondrial activity and mitophagy on the brewing profiles of sake yeast

○Hiroshi Kitagaki
(Fac. Agric., Saga Univ.)

Key words mitochondria, sake yeast

2S-S5p05 分裂酵母の物質代謝と呼吸鎖の関連

○川向 誠
（島根大・生資・生命科）
kawamuka@life.shimane-u.ac.jp

分裂酵母は出芽酵母と約１０億年前に分岐したと推定されており、進化上２つの酵母は大きく離れている。分裂酵母は細胞の中央に隔壁が入ることから、通常多くの細胞が増殖する様式で分裂し、芽を出して増殖する出芽酵母と細胞分裂上の違いが顕著である。分裂酵母は、真核生物の基本的な代謝経路や増殖機構が保持されていることから、真核生物の細胞内制御の分子メカニズを理解する上で優れたモデル真核微生物である。分裂酵母は *Schizosaccharomyces* 属に分類され、現在 *S. pombe, S. cryophilus, S. octosporus, S. japonicus* の４種類が知られている。その中でも *S. pombe* が遺伝学、分子生物学、細胞生物学、生化学的な基礎研究において最が進んでいる。*S. pombe* は petiite negative 株と呼ばれるように、ミトコンドリア DNA を欠損させることができず、増殖におけるミトコンドリア機能に依存する程度が高い。
ミトコンドリアの機能のうち、呼吸鎖（電子伝達系）は、エネルギー獲得系で重要な役割を果たす。その中でも、ユビキノン（コエンザイム Q）は呼吸鎖の成分として、グラム陽性菌がメナキノンを有していることなどを除き、ほとんどの生物が保持している。大腸菌はユビキノンとメナキノンを両方有するが、ユビキノンを合成できなくとも、メナキノンを有することから増殖できるが、ユビキノンとメナキノンを両方合成できないと致死的になる。出芽酵母ではユビキノンを合成できなくとも解糖系でエネルギーを獲得する能力が高く、グルコースを糖源とした培地で、通常程度に増殖できる。一方、分裂酵母 *S. pombe* では、ユビキノン欠損株は最少培地での生育は著しく低下しており、増殖能力は低い。最少培地にシステインやグルタチオンを添加すると増殖能力が回復する。システインはサルファイドから合成され、グルタチオンの合成へと繋がる。呼吸欠損株においては、このシステインの合成力が低下していることが、*S. pombe* の１つの特徴である。*S. pombe* のユビキノン欠損株は、サルファイドキノンレダクターゼ活性が低いことから、硫化水素臭がする。加えてユビキノンは、オロチジン酸デヒドロゲナーゼの活性にも必要で、UMP 代謝経路への影響が出る。アンチマイシンにより呼吸鎖を阻害するとグルコースが低濃度である時、増殖が低下する。グルコースのシグナルは Gpa2－cAMP-PKA 経路によって伝達されるが、*pka1* 欠損株ではユビキノンの合成量が増加する。これはグルコース量の低下を感知して、電子伝達系の能力を更新している応答と考えられる。
S. japonicus は野生株が呼吸欠損株になっている日本で発見された分裂酵母である。日本国内の各地で単離されており、少なくとも弘前、長野、東京、三重、松江で単離されている。いずれの株もユビキノンの合成が著しく低く、*S. pombe* の２００分の１程度で、酸素消費量も著しく低く、天然の呼吸欠損株の性質を示している珍しい酵母である。*S. japonicus* では自然界に存在する中で呼吸鎖の能力を低下させた酵母で、我々はその代謝系に興味持っている。*S. japonicus* の代謝物を質量分析器で測定したところ、特徴的な化合物の合成が見られた。これらの分裂酵母の呼吸鎖の役割と応答について討論したい。

参考文献

１）戒能智宏、川向 誠：コエンザイム Ｑ １０基礎と応用（山本順寛編）：pp. 199-224, 丸善, (2015)
２）Kawamukai, M.： Biosynthesis of coenzyme Q in eukaryotes. Biosci. Biotechnol. Biochem. 80:23-33 (2016)
３）Kaino, T., K. Tonoko, S. Mochizuki, Y. Takashima, M. Kawamukai. *Schizosaccharomyces japonicus* has low levels of CoQ10 synthesis, respiration deficiency, and efficient ethanol production at high temperature. Biosci. Biotechnol. Biochem. 82:1031-1042 (2018)
4) Nishida, I., K. Yokomi, K. Hosono, K. Hayashi, Y. Matsuo, T. Kaino, M. Kawamukai. CoQ10 production in *Schizosaccharomyces pombe* is increased by reduction of glucose leveles or deletion of *pka1* . Appl. Microbiol. Biotechnol. on line (2019)

Metabolic relation with respiration in fission yeast

○Makoto Kawamukai
(Dep. Life Sci., Fac. Life & Env. Sci., Shimane Univ.)

Key words coenzyme Q, ubiquinone, fission yeast

2S-S5p06 微生物がつくる様々なポリアミン

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

プトレッシン、スペルミジン、スペルミンに代表されるポリアミンは全ての生物に普遍的に含まれる低分子の塩基性物質であり、細胞の増殖分化と密接に関わっている。最近の研究から発酵食品には多量のポリアミンが含まれており、人の健康と長寿に深く関係することが明らかになってきた。微生物発酵液の作るポリアミンは、自然界では飛翔昆虫の誘因にも関与し、生物間をつなぐ重要な物質でもある。アーキア、バクテリアは多様なポリアミンを作る（1)。特に原始的な微生物のポリアミンは、価数の多い特殊構造をもつ分子であったと予想される。この点はアミノプロピル基の転移酵素を用いた分子系統的な解析からもうかがえる(2, 3)。生命の起源は高温環境で生まれたと考えられるが、高度好熱菌（超好熱菌）はアーキア、バクテリアを問わず、分岐型構造のポリアミンか直鎖の長鎖ポリアミンを持つ(1)。つまり、価数の大きなポリアミンは、高温環境での生命機能に必須であったと予想される。実際、分岐鎖ポリアミンを合成できなくさせた超好熱菌の変異株は、生育上限温度が下がる(2)。分岐鎖ポリアミンが作用すると DNA の構造は濃度に応じて B 型構造から A 型構造へ、さらには C 型構造へと転移する(4)。特に高温環境下では、DNA 鎖上にユニークなループ構造が点在し(4)、このことからも高温での遺伝子発現調節に分岐鎖ポリアミンが関与していることが強く示唆された。分岐鎖ポリアミンの合成能を欠いた変異株を用いたオミックス解析では、発現量が変動した遺伝子は多数認められた。大腸菌 *Escherichia coli* では、ポリアミンが mRNA を介してする遺伝子の発現を調節するポリアミンモジュロンが見出されており(6)、同様の機構は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においても確認された。超好熱菌においては、分岐鎖ポリアミンが核酸の構造変化を介して、遺伝子の発現を制御していると予想される。真核微生物においては、本学会でも馴染みの深い麹菌 *Aspergillus oryzae* が、健康長寿に関与するポリアミンを作り出すことがわかってきた。麹菌は主にアジアの発酵食品において、糖化を行う微生物である。麹菌が作り出す糖を効率的にアルコールに変換する微生物が酵母であり、これら２種は並行複発酵しながらアルコールを生産する。酵母が添加されないと、アルコールを作らない糖化液（甘酒）となる。麹菌は一般的に蒸米という固相培地で菌糸を伸ばしながら繁殖し、このときにアグマチンというポリアミンが分泌生産される。アグマチンは認知症の防止や、筋力の低下を抑えるポリアミンである(7)。麹菌を固相培地で培養する際に、乳酸などで pH を下げるとアグマチンが大量に生産される。これは酸に対する適応応答と考えられるが、この酸誘導は液体培地でのみ起こる点が興味深い(7)。アグマチンの合成を支配するアルギニン脱炭酸酵素が、麹菌では液体培養では発現せず、固相培地特異的に作られているのであろう。ただ、麹菌にはアルギニン脱炭酸酵素のオルソログは存在しない。おそらくオルニチンやリジンの脱炭酸酵素がアルギニンを許容し、pH 依存的にアグマチン合成を制御していると予想される。麹菌の糖化液は日本酒、味噌、醤油など伝統的日本食に関与する微生物である。本シンポジウムでは微生物の作るポリアミンの役割に焦点をあて、最新の知見、特に「ひとの暮らしの向上」に繋げる情報を提供したい。

(1) Michael, A.J., J. Biol. Chem 293, 18693 (2018) (DOI:10.1074/jbc.TM118.005670) (2) Okada, K. et al., J. Bacteriol., 196, 1866 (2014) (DOI: 10.1128/JB.01515-14.) (3) Hidese et al., FEBS J., 284, 3684 (2017) (DOI:10.1016/j.bbrc.2017.12.053) (4) Muramatsu, A. et al., J. Chem. Phys. 145, 235103 (2016) (DOI: 10.1063/1.4972066) (5) Nishio, T. et al., Chem. Phys. Chem. 19, 2299 (2018) (DOI: 10.1002/cphc.201800396R1) (6) Igarashi, K. and Kashiwagi, K., J. Biol. Chem. 293, 18702 (2018) (DOI: 10.1074/jbc.TM118.003465) (7) Akasaka, N. and Fujiwara, S., Amino acids (Nature Springer) (2019) in press (DOI:10.1007/s00726-019-02720-7) (8) Akasaka, N. et al., Appl. Environ. Microbiol., 84, e00722-18 (2018) (DOI: 10.1128/AEM.00722-18)

Various polyamines produced by microbes

○Shinsuke Fujiwara
(Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ.)

Key words archaea, agmatine, polyamine, thermophile

2S-S5p07 ポリアミンと健康：ポリアミンによるグリコサミノグリカン合成促進機序

○東 恭平
（東理大・薬）
higase@rs.tus.ac.jp

グリコサミノグリカン [コンドロイチン硫酸 (CS)、デルマタン硫酸 (DS)、ヒアルロン酸 (HA)、ヘパリン、ヘパラン硫酸 (HS)およびケラタン硫酸]はウロン酸(ケラタン硫酸の場合はガラクトース)とアミノ糖が交互に結合し、各糖水酸基の一部に硫酸基が付加した直鎖の酸性多糖類である。グリコサミノグリカンはコアタンパク質と共有結合したプロテオグリカン (PG)として(HA は遊離の状態で)細胞膜表面や細胞外マトリックスに存在し、タンパク質と相互作用することで結合組織の保護・保湿の他、分化・形態形成、神経軸索伸長、細胞接着、免疫制御、創傷治癒および抗血液凝固といった多彩な生理作用を発揮する[1]。例えば、HA および CSPG であるアグリカンはコラーゲンと共に軟骨組織の主要な構成成分であり、HSPG であるシンデカンは皮膚組織においては創傷治癒に重要な役割を果たす。グリコサミノグリカンとタンパク質との相互作用には、二糖ユニットにおける硫酸基の数・位置、イズロン酸の有無、二糖ユニット配列、分子量などが重要であるが、糖鎖構造や発現量は老化と共に変化することが知られている。例えば、HS は発現量が、CS は 4 硫酸化が老化と共に減少することが報告されているが、その詳細なメカニズムはほとんど明らかとなっていない。

ポリアミン (プトレッシン、スペルミジン、スペルミン)は生物に普遍的に存在する生理活性アミンであり、細胞増殖・分化に必須の因子である。ポリアミンの特徴として、1) ポリアミンは細胞内では主として RNA に結合して存在し、ホルモンによる刺激や細胞の状態変化などに応じてその濃度が著しく変化すること、2) ポリアミンは特定の RNA 構造を変化させることで翻訳効率の低い mRNA のタンパク質合成を円滑にし、細胞増殖や生存率を促進することが知られている[2]。私達は、ポリアミンにより翻訳レベルで発現制御される遺伝子群を「ポリアミンモジュロン」と定義し、大腸菌、酵母、動物細胞におけるモジュロンを同定することでポリアミンの生理的意義を解明してきた[2]。組織ポリアミン量は老化と共に減少することから[3]、老化による糖鎖構造の変化にポリアミンが関与するのではないかと仮説を立て、新たなポリアミンモジュロンを同定すべく検討を行った[4,5]。

はじめに、ヒト皮膚中に含まれる GAG (DS、HS および HA)とポリアミンを測定した結果、HS 量とポリアミン量に正の相関があることを見出した[4]。次に、マウスの背中にパンチ生検創傷を施すと約 10 日間で傷は完治するが、ポリアミン生合成阻害剤を塗布すると治癒が遅れることが分かった。HS とポリアミンの関連性を明確にすべく、ポリアミン生合成阻害剤を用いて細胞内ポリアミン量を減少させたところ、HS の発現量が約半分に減少した。そこで、ポリアミンに感受性を示す HS 伸長酵素を探索した結果、HS 伸長酵素である Exotosin-1 (EXT1)および EXT2 を同定した。また、CS とポリアミンの関連性についても動物細胞を用いて調べた結果、細胞内ポリアミン量を減少させると CS の分子量および 4 硫酸化の減少が認められた[5]。そこで、ポリアミン感受性を示す CS 伸長酵素と 4 硫酸化酵素を探索したところ、Chondroitin sulfate synthase 1 (CHSY1)および Chondroitin 4-O-sulfotransferase 2 (C4ST2)を同定した。ポリアミンによる合成促進機構を調べたところ、EXT1、EXT2、CHSY1 はポリアミンにより翻訳レベルで、C4ST2 は転写レベルで合成促進を受けていた。レポーター遺伝子を用いて、ポリアミンによる EXT1、EXT2 および CHSY1 の合成促進機構を調べた。その結果、EXT1、EXT2 および CHSY1 の翻訳開始は miRNA や 5'-非翻訳領域に存在する 4 重鎖 RNA (G-quadruplex)により負に調節されており、ポリアミンは負の制御を解除することでタンパク質合成を円滑にすることが明らかになった。ポリアミンによる C4ST2 の転写促進については、その転写因子がポリアミンモジュロンの可能性が高いと考え、現在検討中である。

高ポリアミン食投与によるポリアミンの動態に関する研究により、ポリアミンは経口投与すると腸管に速やかに吸収され、全身の臓器や組織に移行することが明らかとなっている。また最近では、腸内細菌を利用したポリアミン供給に関する研究が活発になってきた。ポリアミンを継続的に摂取することで、組織 CS や HS の機能維持に伴う QOL の向上、ひいては健康寿命の伸長を期待している。

[1] Esko JD. et al. Essentials of Glycobiology. 3rd edition. Chapter 38, 2017 [2] Igarashi K. et al. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 107: 104, 2019. [3] Nishimura K. et al. Journal of Chemistry (Tokyo) 139: 81, 2006. [4] Imamura M. et al. Scientific Reports 21: 33549, 2016. [5] Yamaguchi K. et al. Biochemical Journal 475: 3797, 2018.

Polyamines in Health: Polyamines stimulate the glycosaminoglycan synthesis through the enhancement of the synthesis of their biosynthetic enzymes at the level of translation.

○Kyohei Higashi
(Fac. Pharm. Sci., Tokyo Univ. Sci.)

Key words Heparan sulfate, Chondroitin sulfate, Polyamines, translation

2S-S5p08 ポリアミン摂取による長寿の基礎的背景と消化管の役割

○早田 邦康
（自治医大さいたま医療センター 循環器病臨床医学研究所）
soda@jichi.ac.jp

合成ポリアミン（スペルミン、スペルミジンおよびプトレスシン）を加えて大豆の３倍程度のポリアミン濃度に調整した餌でマウスを飼育すると、老化が抑制され寿命が延長することを我々は世界で最初に報告した。また、高ポリアミン餌で飼育を続けた BALB/c マウスに少量（20 mg/kgBW）の発癌刺激（1,2-demethylhydrazine）を毎週１回１２週間繰り返した検討では、高ポリアミン餌群のマウスの大腸癌の発症率が低下した。ポリアミンには抗炎症・抗酸化作用、細胞や遺伝子を外的刺激から保護する作用、オートファジー誘導作用などの生理活性がある。しかし、類似の生理活性を有するポリフェノール類などの抗酸化物質と呼ばれている物質が動物の寿命を延長できないことを考慮すると、これらの生理活性が動物の寿命を延長し発癌を抑制していることは考え難い。

近年、癌を含む生活習慣病の発症と遺伝子メチル化異常には密接な関係のあることが報告されている。遺伝子メチル化とはメチル基が DNA のシトシンに付与されることによって遺伝子発現を調整する機構である。さらにメチル化は必ずしも固定されたものではなく、生活環境や生活習慣が変化することによってメチル化状態が変化することも報告されるようになってきた。ポリアミン合成と遺伝子メチル化は極めて密接な関係がある。すなわち、ポリアミン合成に必要な Aminopropyl 基は Decarboxylated S-adenosylmethionine（dcSAM）から供給されるが、dcSAM はメチル基の供給源である S-adenosylmethionine が Adenosylmethionine decarboxylase（AdoMetDC）の作用を受けたものである。我々が Jurkat 細胞を用いた検討では、ポリアミン合成の律速酵素である Ornithine decarboxylase (ODC)）の活性を 2-(difluoromethyl)ornithine (DFMO)を用いて抑制すると、dcSAM 濃度が上昇し、メチル化を制御する DNA メチルトランスフェラーゼ（DNMT １、３ a、および３ b）活性が低下し、DNA 全体の異常メチル化（脱メチル化と別の部位での高メチル化の進行）が生じた。ポリアミン合成を阻害した Jurkat 細胞にスペルミンを加えると、DNMT ３ a および３ b が活性化されて、異常メチル化の状態が改善された。ポリアミン濃度の異なる餌で飼育したマウスの腎臓の DNA でも同様の変化を確認した。すなわち、加齢とともに DNA 全体の異常メチル化が生じるが、高ポリアミン餌で飼育したマウスでは加齢ともに進行する異常メチル化が抑制されていた。ポリアミンによる遺伝子メチル化に係る生理活性を検討したところ、スペルミンは強い活性を有しており、生体内でもその作用を確認できるが、スペルミジンは活性が弱く、生体内ではその作用を確認できない。

ポリアミン合成能、とくにポリアミン合成の律速酵素である ODC の活性は加齢とともに低下する。その結果、ポリアミン合成が活発な成長期における体内のポリアミン濃度は急速に減少する。しかし、成長が止まった個体では、組織内や血液中のポリアミン濃度および尿中ポリアミン排泄量の減少は認めらないことが多くの研究で明らかにされている。人とマウスが高ポリアミン食を摂取すると、数か月という単位で徐々に血中スペルミン濃度が上昇するが、とくにヒトではスペルミジン濃度は全く変化しない。ポリアミンは直ちに腸管から吸収され全身の臓器や組織に移行することがわかっている。また、日常的に摂取している食品中に含まれるスペルミン/スペルミジン比は 1：1.5～2 とスペルミジン量が多く､マウスに投与した餌のスペルミン/スペルミジン比は 1:4 であった。増殖の活発な癌細胞ではスペルミジン濃度が高く、スペルミジン濃度は細胞増殖を反映すると理解されている。実際に、癌患者においては、活発な増殖能を有する癌組織から移行したスペルミジン濃度が上昇し、癌の治療によりスペルミジン濃度が減少することが報告されている。すなわち、体内ポリアミン濃度は局所で合成されるポリアミンの全身血流への供給の影響を強くうける。このことから、高ポリアミン食（スペルミジン＞スペルミン）の継続による血中スペルミンの上昇は、消化管系からスペルミンが供給されていることを示唆する。すなわち、腸管から吸収されたポリアミンが腸管の血管を介して肝臓内に運ばれ、腸肝循環を介して再び腸内細菌などの作用を経て、全身循環には主にスペルミンを供給する機構が存在する可能性がある。腸内細菌を含めた腸内環境が体内ポリアミン供給へ及ぼす役割とその機序が明らかにされることが期待されている。

参考文献

Soda K. (2019) Polyamine metabolism and gene methylation in conjunction with one-carbon metabolism. Amino acids 47(8):1665-1665. https://doi.org/10.1007/s00726-019-02733-2

Soda K. (2018) Spermine and gene methylation: a mechanism of lifespan extension induced by polyamine-rich diet. Int.J.Mol.Sci. 19(10):3106. https://doi.org/10.3390/ijms19103106

Biological background of life-span extension by increased polyamine intake and the importance of intestinal environment.

○Kuniyasu Soda
(Cardiovascular Res. Inst., Saitama Med. Center, Jichi Med. Univ.)

Key words lifespan, epigenetic, spermine, polyamine

2S-S5p09 健康長寿社会へ向けた腸内細菌由来ポリアミン産生促進技術の開発とその保健効果

○松本 光晴
（協同乳業・研・技術開発）
m-matumoto@meito.co.jp

腸管上皮細胞から吸収され、血中に移行し全身の細胞へ作用する可能性が高い腸内細菌叢由来の低分子化合物（代謝産物）は腸内細菌叢と健康を論じるに当たり重要因子である。演者らは、同腹仔から無菌マウスと通常菌叢定着マウスを作製し、それらの結腸内容物をメタボローム解析し、腸内細菌叢の影響を受ける代謝産物が多種類存在し、その一部は血中に移行し直接的に、また別の一部は吸収後、別の化合物に変換されて全身系に移行している知見を得て来た[1, 2]。

数多く存在する腸内細菌叢が放出している代謝産物の中でも、多岐に渡る機能を有し、全生物種の細胞内に普遍的に存在する生理活性物質ポリアミン（プトレッシン、スペルミジン、スペルミン．内プトレッシンとスペルミジンは腸内細菌叢が産生していることを確認済み）は注目に値する。ポリアミンは様々なストレスから核酸を保護し細胞増殖や分化に重要な役割を果たすことから、細胞の健全性を維持する物質と述べても過言ではないと考えられる、しかし、成長期の終わりと共に加齢に伴い生体内生合成能が低下し、演者らはこれが老化と関わっていると考えている。分子メカニズムは解明されたとは言い難いが、複数のグループより、モデル生物への外因性ポリアミンの供給（動物は飼料を介した経口投与）で寿命伸長効果が報告され、近年、アンチエイジングに効果的な生体への介入の一つとしてハイインパクト・ジャーナルに紹介されるなど注目されている[3]。我々は、外因性ポリアミンとして食餌由来ポリアミン以外に、恒常的に腸管腔内で生合成され生体へ供給されると考えられる腸内細菌叢由来ポリアミンに着目しており、「腸内細菌叢のポリアミン産生誘導により生体にポリアミンを供給すれば、細胞の健全化が維持され、老年病の予防や軽減に繋がる」と仮説を立案し、そのための技術開発と効果検証を進めて来た。具体的には、統一食事を摂取したヒト糞便のメタボロミクス解析データからスクリーニングし、腸内ポリアミン（特にスペルミジンとスペルミンの前駆体で腸管腔内濃度が高いプトレッシンに着目した）産生誘導物質としてアルギニン（Arg）を見出した。また、Arg とビフィズス菌（Bifidobacterium animalis subsp. lactis LKM512）の混合摂取がプトレッシン産生を強く誘導し、頸静脈カニューレラットにて血中ポリアミン濃度を測定した結果、投与 4～8 時間後に血中スペルミジン濃度が有意に増加し、スペルミンも増加傾向を示し、大腸内プトレシンが生体ポリアミンの供給源となっていることが認められた[4]。更に、14 ヶ月齢よりマウスにこれらの長期混合投与を行った結果、対照群と比較して、血中炎症マーカー等の抑制効果および寿命伸長効果を認めた[4]。この腸管内プトレッシン産生機序は、ビフィズス菌が Arg からプトレッシンを生合成し環境中に放出していると推測し実験を繰り返したものの、この現象は認められなかった。また、上述の通り、安定的にポリアミンを合成する腸内細菌は見つからなかったことから、特定のプトレッシン産生菌が存在するのではなく、複数の腸内細菌の相互作用で合成・放出されていると考えるに至った。そこで、ヒト腸内主要細菌グループから各々の代表細菌を選出し、Arg を含む培養液で 2 菌種毎の組合せで混合培養した結果、 Escherichia coli と Enterococcus faecalis の組合せが最も強く、各単独培養時の約 8 倍以上のプトレッシンを培養液中に放出することが認められた。更にこの産生量はビフィズス菌の添加で有意に増強された。これらの現象、培養液中の物質解析および文献情報により仮説を立案し、さらに E. coli と E. faecalis 遺伝子欠損菌株および相補菌株を用いた実験の結果、ビフィズス菌の産生する酸をトリガーとして、E. coli 等が保有する Arg を利用した耐酸性機構（副産物としてアグマチンを放出）と、E. faecalis が保有するアグマチンを利用した ATP 産生機構により、副産物としてプトレッシンが腸内環境中に放出されるという、異菌種間の独立した代謝経路が合わさったハイブリッド・ポリアミン合成機構を発見した[5]。

演者らは、この技術の社会への還元を目指している。既に、ヒト消化管下部でプトレッシン濃度を上昇させるために有効な Arg およびビフィズス菌（LKM512 菌株）の摂取量検討やコーティング技術等を開発済みで、ヒトでの効果判定試験を実施中である。BMI が高めの健常成人（平均年齢 45 歳）を対象に実施した 12 週間の経口投与試験では、Arg とビフィズス菌を含む試験食投与群で対照群と比較して、便中プトレッシン濃度が有意に高かったのに加え、血清中のスペルミジン濃度が有意に高い結果が得られた。これは、本開発技術（開発食）がヒトにおいても効果を発揮し、超高齢社会に突入した我が国において健康寿命の伸長に有効である可能性を強く示唆している。

[1] Scientific Reports 2: 233, 2012. [2] Fronteers in Systems Neuroscience 7: 9, 2013. [3]Cell 157: 1515-1526, 2014. [4] Scientific Reports 4: 4548, 2014. [5] Science Advances 4: eaat0062, 2018

Enhancement of polyamine production in intestinal microbiomes by controlling its metabolism, and the subsequent benefits to the health and longevity of society

○Mitsuharu Matsumoto
(Kyodo Milk Industry Co. Ltd.)

Key words intestinal microbiome, putrescine, *Bifidobacterium*, functional food

2S-S5p10 ヒト腸内常在菌叢最優勢種のポリアミン合成・輸送経路の遺伝学的解明

○栗原 新
（近畿大院・生物理工）
skurihara@waka.kindai.ac.jp

21 世紀初頭に行われた次世代シーケンサーの開発以降、様々な健康状態にあるヒトの糞便の菌叢解析（マイクロビオーム研究）が精力的に行われ、腸内細菌が肥満、糖尿病、自閉症、うつ病などの全身の疾患や健康状態に大きく影響を与えていることが明らかとなり、腸内細菌叢は「もう一つの臓器」とも呼ばれはじめている。これらの知見を基礎として今後行われる「ポストマイクロビオーム研究」においては、我々人類は腸内細菌の適切な制御を目指すべきであり、腸内環境制御への期待が高まっている。

食餌を変化させた場合の腸内細菌叢とトランスクリプトームの変化の比較から、腸内環境制御に重要なのは腸内細菌の遺伝子機能の制御であることが示唆されている。しかしながら、ヒト腸内細菌叢のメタゲノムデータから得られる塩基配列に含まれるコーディング領域のうち、機能予測が可能なものは現状わずか 20-30%であり、この機能予測が正確でない場合も多いと考えられる。したがって、腸内細菌叢の遺伝子機能の制御による腸内環境の制御は、制御の標的が明らかでないために困難である。この状況を打破するためには腸内細菌の遺伝子機能の実験的な同定が重要であると考えられる。

我々は、腸内細菌の遺伝子機能の解明を通じた腸内環境制御を最終目標として、ヒト腸内常在菌叢最優勢種の一斉培養系を構築した。この中で、共通培地として Gifu anaerobe medium (GAM) を用いればヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種のうち、入手可能な 45 種の 7 割超に相当する 32 種が培養可能であることを示した。この培養系は 96 穴プレート上に構築されているために、ヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種による特定の物質の資化性、特定の物質の変換性、特定の物質に対する抵抗性、特定の代謝産物の生産性について、培養条件によるバイアスを排除してハイスループットで解析が可能である。

ポリアミンはほぼ全ての生物がその細胞内に持ち、細胞増殖促進作用を始めとした様々な役割を果たす生理活性アミンである。ポリアミンの主要なものには、プトレッシン、スペルミジン、スペルミンがある。2009 年以降、世界中の研究者からポリアミン摂取がいくつかの動物の健康寿命伸長に著効を示すことが報告されている。生物はポリアミンを自ら合成する。また、食品は生物由来であるためこの中にはポリアミンが含まれる。一方で、細胞内のポリアミン濃度は加齢とともに減少するため、動物は食物中に含まれるポリアミンを小腸から積極的に吸収する。このため、小腸より下流の消化管にはポリアミンが存在しないことが予想されるが、消化管における最下流の臓器である大腸の内腔にも数 100 μM～数 mM というかなりの高濃度でポリアミンが存在し、このポリアミンは腸内細菌叢由来であることが報告されている。また、安定同位体を用いた実験により、ポリアミンは大腸粘膜を通じて血中に取り込まれることがわかっている。以上を総合すると、腸内細菌叢由来のポリアミンを大腸粘膜を通じて効率よく吸収すれば、加齢に伴う体内のポリアミン減少が補われ、ヒトの健康寿命を伸長させることが出来ると期待できる。大腸内では様々な老廃物の影響により、しばしば慢性炎症が生じ、これが様々な疾病につながっていると考えられている。ポリアミンは強い炎症抑制作用を持つことから、大腸腸管内のポリアミン濃度を適正に保つことは、腸内環境の改善を通じた健康増進に役立つと考えられる。しかし、ヒト腸内常在菌叢最優勢種のポリアミン生産能についてはわかっていないことが多く、その制御には多くの課題が存在する。

この問題を解決する目的で、培養条件によるバイアスを除去してハイスループット解析が可能となった上記のヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種について、培養した菌体と培養上清中のポリアミンを解析することで、輸送の有無、合成の有無を判定し、各菌種のゲノム情報に基づいた *in silico* 解析の結果と比較したところ、全く新規な配列を持つポリアミン合成酵素や輸送タンパクの存在が示唆された。次に、ヒト腸内常在菌叢最優勢 7 位の *Bacteroides thetaiotaomicron* のポリアミン合成系遺伝子の一つであるカルボキシスペルミジンデカルボキシラーゼ（CASDC）遺伝子について、遺伝子破壊株・相補株を用いた実験的な解析を行った。この結果、*B. thetaiotaomicron* の CASDC がスペルミジンの合成に必須であり、その生育に寄与していることを示していた。

ここまでの研究結果は一種類の腸内細菌を純粋培養して得られたものであるが、実際の腸内細菌は複雑な細菌叢を形成しているため、細菌叢を構成する細菌間で代謝産物の授受を行っていると考えられている。そこで、遺伝子操作した大腸菌および *Enterococcus faecalis* を共培養し、複数菌種にまたがるポリアミン合成系の存在を遺伝子レベルで証明した。

以上の研究により、ヒト健康に重要な影響を与えていると考えられる腸内環境を決定する因子の一つであるポリアミンの腸内常在菌叢による生産機構の一端が明らかとなった。

Genetic elucidation of polyamine synthetic enzymes and transporters in most dominant bacterial species in the human gut microbiota.

○Shin Kurihara
(Grad. Sch. BOST, Kinki Univ.)

Key words polyamines, gut microbiota, enzyme, transporter

2Aa01 プラスミドが宿主に及ぼす負荷を軽減する因子の探索・同定

○森 光矢[1], ファン チィー キム ユン[1], 金原 和秀[1], 新谷 政己[1,2]
（[1]静大院・総合科技, [2]静大・グリーン科技研）
shintani.masaki@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】プラスミドは，宿主細菌に「負荷」を与え，その適応度（fitness）を減少させる．我々の先行研究で，*Pseudomonas putida* KT2440 株と，その派生株である PpY101 株を，2 種類の異なるプラスミド，pBP136::*gfp* または pCAR1::*gfp* の宿主とした場合，KT2440 株の fitness は減少したのに対し，PpY101 株の fitness は増大した．2 株の全ゲノム配列の比較結果から，PpY101 株では，KT2440 株上の 4 つのプロファージ領域（P1-P4）のうち，P1 領域が欠損していること，プロファージ領域外の遺伝子に変異が入っていることが判明した．また pBP136::*gfp* をもつ両宿主のトランスクリプトーム解析の結果から，PpY101 株では，KT2440 株と比較して，プラスミドの有無によらず，P4 領域上の遺伝子（群）の発現量が増大していた．従って，プロファージ領域または変異が確認された遺伝子に，宿主の fitness に変化をもたらす因子が存在することが示唆され，我々はこの因子の探索・同定を試みた．
【方法・結果・考察】本研究では，プロファージ領域を欠損させた KT2440 株を準備し，それらがプラスミドをもつことで，fitness がどのように変化するかを競合試験により評価した．その結果，プロファージ領域を欠損させた KT2440 株を pBP136::*gfp* の宿主とした場合は fitness が減少し，pCAR1::*gfp* の宿主とした場合は fitness が増大した．この結果から，PpY101 株を 2 種類の異なるプラスミドの宿主とした場合に fitness が増大した原因は，pCAR1::*gfp* の場合はプロファージ領域の欠損であり，pBP136::*gfp* の場合はプロファージ領域の欠損でないことが示唆された．現在は，PpY101 株で変異が確認された遺伝子を KT2440 株から欠損させ，同様に競合試験を行っている．

Identification of factor(s) that reduces the burden of plasmids on the host

○Mitsuya Mori[1], Dung Pham Thi Kim[1], Kazuhide Kimbara[1], Masaki Shintani[1,2]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words fitness cost, plasmid, *Pseudomonas*

2Aa02 好気・微好気・嫌気条件下における接合伝達性の比較

○越智 健太郎[1], 柳谷 洸輔[1], 雪 真弘[2], 大熊 盛也[2], 金原 和秀[1], 新谷 政己[1,2,3]
（[1]静大院・総合科技, [2]理研・バイオリソース, [3]静大・グリーン科技研）
shintani.masaki@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* SMDBS 株と，通性嫌気性細菌の *P. stutzeri* JCM 5965 株を用い，プラスミドには pBP136（IncP-1 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．好気および嫌気条件で培養した供与菌・受容菌を，嫌気チャンバー内で接合させた場合を微好気および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，コロニーの出現を認めた後，酸素に曝露し，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．得られた完了体から伝達頻度を算出し，各条件下で比較した．さらに，モデル微生物群集（牛糞など）を受容菌候補として好気・微好気条件下の接合実験を行い，接合後の懸濁液をセルソーターに供することで接合完了体を単離した．その後，得られた接合完了体を 16S rRNA 遺伝子解析によって同定し，各条件下における宿主域の比較を行った．
【結果と考察】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 $1/10^1$～$1/10^4$ に低下し，酸素濃度の違いが接合伝達の効率に影響することが示唆された．宿主域の比較では，好気条件でのみ得られた完了体が 13 属，微好気条件でのみ得られた完了体が 1 属検出されたことから，既知の宿主域に加えて，未だ知られていない宿主の存在が示唆された．現在は土壌中の微生物群集を対象に宿主域の比較を試みている．

Comparisons of conjugation frequency of plasmids under aerobic, microaerobic and anaerobic conditions

○Kentaro Ochi[1], Kosuke Yanagiya[1], Masahiro Yuki[2], Moriya Okuma[2], Kazuhide Kimbara[1], Masaki Shintani[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]BRC, RIKEN, [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words horizontal gene transfer, bacterial conjugation, anaerobic condition, host range

2Aa03 同じ不和合性群に属しても塩基組成の違うプラスミドの宿主域は異なる

○徳田 真穂[1], 柳谷 洸輔[1], 井上 謙吾[2], 雪 真弘[3], 大熊 盛也[3], 金原 和秀[1], 新谷 政己[1,3,4]
（[1]静大院・総合科技, [2]宮崎大・農, [3]理研・バイオリソース, [4]静大・グリーン科技研）
shintani.masaki@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】PromA 群に属するプラスミド pSN1104-11 と pSN0729-62 は，同一細胞内で共存することができない不和合性を示す．それにも関わらず，GC 含量が 10%異なるほか，連続塩基の出現頻度，コドンの使用頻度等の塩基組成が異なるプラスミドである[1]．また，同様に IncP-1 群に属する，pBP136 と pDS1 も塩基組成に違いが認められ，GC 含量が 18%も異なる．プラスミドと宿主染色体の GC 含量は類似することが多い[2]という報告があることから，上記プラスミドの宿主域が異なる可能性が示された．本研究では上記のプラスミドの宿主域を比較することで，塩基組成の違いが宿主域に及ぼす影響を調べることを目的とした．
【方法・結果・考察】pSN1104-11 と pSN0729-62 を保持した供与菌を用い，牛糞堆肥や土壌中の微生物群集を受容菌候補として接合実験を行った．GFP とセルソーターを利用して接合完了体を収集し，16S rRNA 遺伝子の配列に基づき属レベルの同定を行った．その結果，pSN1104-11 をもつ 11 属と pSN0729-62 をもつ 8 属の接合完了体を取得し，そのうち 7 属，3 属は各プラスミドに特有の属であった．また，各接合完了体の基準種となる菌株の染色体 G C 含量は，pSN1104-11 の接合完了体の 7 属が 60%以上であるのに対し，pSN0729-62 については 6 属が 60%以下であった．従って，同じ不和合性群に属するにも関わらず，塩基組成の違いによって宿主域が異なり，プラスミドと宿主染色体の塩基組成に相関があることが示唆された．現在は，他の不和合性群でも同様の検証を行うため，pBP136 と pDS1 の宿主域の比較を行っている．

1)Yanagiya et al., 2018, Front. Microbiol. 9:2602.
2)Shintani & Suzuki, 2019, Shintani M., Suzuki H. (2019) Plasmids and Their Hosts. In: Nishida H., Oshima T. (eds) DNA Traffic in the Environment. Springer, Singapore

Host range of the same incompatiblity group plasmids could change with different base conpositions

○Maho Tokuda[1], Kosuke Yanagiya[1], Kengo Inoue[2], Masahiro Yuki[3], Moriya Okuma[3], Kazuhide Kimbara[1], Masaki Shintani[1,3,4]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Fac. Agric., Univ. Miyazaki, [3]BRC, RIKEN, [4]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words plasmid, host range, base composition

2Aa04 *Geobacillus* 属細菌における高度遺伝子発現を可能とするプラスミドベクター

○倉敷 凌太[1], 大城 隆[2], 鈴木 宏和[2]
（[1]鳥取大院・持続創生, [2]鳥取大・工）
hirokazusuzuki@tottori-u.ac.jp

【目的】*Geobacillus* 属細菌は環境に広く分布した中等度の好熱菌で，優れた増殖性やタンパク質生産能から，様々な分野への応用が期待される。本研究では，*Geobacillus* 属細菌の遺伝学的ツールの拡張を目的とし，*Geobacillus kaustophilus* HTA426 由来のマルトース誘導型プロモーター（P_{gk704}）を基盤とした新規発現ベクターの開発を行った。
【方法】P_{gk704} および T7 ターミネーター配列を含む発現カセットを大腸菌-*Geobacillus* シャトルプラスミドに導入することで，プラスミド pKR01 を得た。P_{gk704} の下流に，さらに異種タンパク質（Venus，BgaB，および Cat）の遺伝子を挿入し，HTA426 の派生株（MK244）や他 *Geobacillus* 属細菌を形質転換した。得られた形質転換体を様々な温度で培養し，細胞内に産生された異種タンパク質を分析した。
【結果と考察】Venus 生産株を 60°C で培養したところ，培養 2 日目において細胞蛍光強度が急激に上昇した。よって本ベクターからの遺伝子発現は，培養後期において自己誘導的に起こると考えられる。細胞内タンパク質を分析したところ，明確な Venus バンドが確認できた。50°C と 55°C で培養すると，Venus 産生量はさらに増加した。その際の Venus 量は，全タンパク質中の 20～30％程度と概算できた。MK244 から構築した BgaB 生産株では，幅広い温度範囲（50～60°C）で産生が見られた。65°C 培養においては BgaB 産生量が減少したが，マルトース存在下で培養することで産生量が 5 倍ほど上昇した。MK244 から構築した Cat 生産株では，50°C 培養において明確な生産が確認できた。生産量の温度依存性は，タンパク質の熱安定性やフォールディング効率の違いに起因すると思われる。さらに他 *Geobacillus* 属においても，pKR01 は Venus の高生産を指揮した。

A plasmid vector that directs substantial expression of heterologous genes in *Geobacillus* species

○Ryota Kurashiki[1], Takashi Ohshiro[2], Hirokazu Suzuki[2]
([1]Dept. Eng., Grad. Sch. Sust. Sci., Tottori Univ., [2]Fac. Eng., Tottori Univ.)

Key words *Geobacillus*, gene expression, maltose promoter, plasmid

2Aa05 安価な青白スクリーニングが可能なクローニングベクターの開発

○鈴木 宏和[1,2], 栗山 克[1], 山﨑 竜次[2], 日野 智也[1,2], 永野 真吾[1,2], 大城 隆[1,2]
（[1]鳥取大・工, [2]鳥取大院・工）
hirokazusuzuki@tottori-u.ac.jp

【緒言】大腸菌を宿主とした分子クローニングを迅速に行うためのツールとして，様々なクローニングベクターが開発されている。そのほとんどが，DNA 断片の挿入を簡便に判別できるようになっており，その際には LacZ の α 相補性と指示薬 X-gal を利用した青白スクリーニングが広く利用される。X-gal の呈色は明瞭だが，やや高価で，プレート 1 枚当たり約 30 円のコストがかかる。本研究では，その代替システムとしてインドール酸化酵素 BdsC に着目し，それを利用した新規クローニングベクターを開発した。
【実験と結果】*bdsC* 遺伝子を pUC19 の *Hin*dIII-*Xba*I サイト間に挿入し，得られたプラスミドで大腸菌を形質転換した。インドール誘導体を含む培地で生育させたところ，5-ブロモインドール（5Br）で最も鮮明なコロニー呈色が見られた。呈色条件を検証したところ，2 倍希釈した LB に 25 μg/ml の 5Br を混合させた培地が呈色に適していた。5Br は X-gal より安価であるが（プレート 1 枚当たり 0.2 円），呈色が遅く，その判別に 36 時間以上の培養が必要であった。そこで error prone PCR と飽和変異導入を用いて，活性が向上した BdsC をコードする変異遺伝子を作製した。BdsC の X 線立体構造解析から，見出された変異点は活性中心にあることがわかった。さらに本遺伝子にマルチクローニングサイト（12 種）を導入し，得られたプラスミド（pKBlue）の実用試験を行った。呈色は，培養 20 時間から 24 時間で確認できた。呈色がなかったコロニー由来のほぼ全てのプラスミドには何らかの DNA 断片が挿入されており，短い DNA 断片（54 bp）の挿入も検出できた。その一方で，呈色があったコロニー由来のプラスミドには全く断片挿入が見られなかった。従来システムと異なり，pKBlue はあらゆる大腸菌を宿主にできるとも考えられる。本ベクターは，クローニングベクターとして有用と期待できる。

Development of bdsC-based cloning vectors to screen DNA insersion using an inexpensive substrate

○Hirokazu Suzuki[1,2], Katsumi Kuriyama[1], Ryuji Yamasaki[2], Tomoya Hino[1,2], Shingo Nagano[1,2], Takashi Ohshiro[1,2]
([1]Fac. Eng., Tottori Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Tottori Univ.)

Key words *Escherichia coli*, plasmid, indigo, cloning

2Aa06 病原性細菌の毒素産生能力を阻害する物質の探索システムの開発とその利用

○野田 正文[1], Sultana Nasrin[1], Danshiitsoodol Narandalai[1], 井上 裕介[2], 東川 史子[1], 杉山 政則[1]
（[1]広島大院・医系科学, [2]三井製糖株式会社）
sugi@hiroshima-u.ac.jp

【目的・背景】 細菌が増殖する際、自身の細胞密度を感知し、細胞数が閾値を超えると、特定物質の生産にスイッチを入れるシステムを quorum sensing (QS) と呼ぶ。例えば, 細菌のバイオフィルム形成や抗菌物質産生などは QS による制御を受けている。当研究グループでは、優れた保健機能性を示す植物由来乳酸菌 (植物乳酸菌) をターゲットとして、QS 阻害物質を探している。
今回は、QS に関わる auto-inducer-3 (AI-3) に着目し、先ず、大腸菌の宿主・ベクター系を用いた QS 阻害物質のスクリーニングシステムの開発を目指した。次に、これまでに取得した 700 株以上から構成される「植物乳酸菌ライブラリー」に保存されている、QS 阻害物質を産生する乳酸菌株をスクリーニングした。
【方法・結果】AI-3 を認識する二成分制御系 QseBC および QseEF によってそれぞれ調節を受ける flhDC および recA 遺伝子のプロモーターの支配下に、beta-ガラクトシダーゼ構造遺伝子 (*beta-gal*) を配置するよう、乳酸菌と大腸菌間のシャトルベクター (pLES003-b) を基に、組換えベクター pLES-AQSA および pLES-AQSA2 を構築した。この組換えベクターを *E. coli* DH5alpha に導入することにより、QS 阻害剤スクリーニング用大腸菌宿主・ベクター系 (*E. coli* DH5alpha [pLES-AQSA] および *E. coli* DH5alpha [pLES-AQSA2]) を創出した。スクリーニング対象の各菌株の培養液上清を X-gal を含む LB 培地に加え、*E. coli* DH5alpha [pLES-AQSA] および *E. coli* DH5alpha [pLES-AQSA2] を培養し、青色素産生阻害の有無を観察した。
その結果、植物乳酸菌株 250 株について調査した結果、29-2E 株の培養液上清中に QseBC 系に対する阻害活性を見出した。他方、9-1A、27-2A2、27-2F、および 28-2A 株は、QseEF 系に対する阻害物質を産生する可能性が示された。

Establishment of a system to explore the functionl molecules inhibiting the virulence of pathogenic bacteria

○Masafumi Noda[1], Nasrin Sultana[1], Narandalai Danshiitsoodol[1], Yusuke Inoue[2], Fumiko Higashikawa[1], Masanori Sugiyama[1]
([1]Grad. Sch. Biomed. Health Sci., Hiroshima Univ., [2]Mitsui Sugar Co., Ltd.)

Key words lactic acid bacteria, quorum sensing

2Aa07 組換え RNA 分子の高生産に向けたコリネ型細菌での発現系構築

羽城 周平, 三橋 麻由, ○安枝 寿
（味の素バイオ・ファイン研）
hisashi_yasueda@ajinomoto.com

【背景・目的】
近年、RNA 分子の医療分野や農業領域への応用に期待が高まっている。従来、中長鎖長の RNA は酵素法により生産されているが、さらに大量かつ安価な製法として、目的配列をもつ長鎖核酸 RNA の微生物による発酵生産について検討した。
【方法】
発現のためのモデル RNA として、mRNA スプライシングに関与する U1A-RNA の部分 RNA（約 160 nt； U1A*-RNA と命名）等を用いた。アミノ酸発酵菌である *Corynebacterium glutamicum* の *rnc*（RNase III）欠損株を宿主に、ベクターは pAM330N 由来のシャトルベクター pVC7N[1)]にて、強力な転写活性をもつプロモーターを検索した。そして、U1A*-RNA の発現菌を培養後に、菌体から全 RNA 画分を調製し PAGE にて展開することで目的 RNA 分子の生産性を評価した。
【結果・考察】
目的 RNA である U1A*-RNA を強力に転写するためのプロモーターとして、コリネ型細菌に感染するファージ由来の F1 プロモーターが適していることがわかった。そしてターミネーターもファージ由来のものを採用し組換え RNA の基本的な発現系をコリネ型細菌で構築した。その系にて、U1A*-RNA が、内在の 5S rRNA 量と同程度で著量に生産できることがわかった[2)]。

1) J. Biosci. Bioeng., vol. 127, 529-538 (2019)
2) J. Biosci. Bioeng., In press

Construction of a fundamental over-expression system of target RNA molecule in *Corynebacterium glutamicum*

Shuhei Hashiro, Mayu Mitsuhashi, ○Hisashi Yasueda
(Res. Inst. Biosci. Prod. Fine Chem., Ajinomoto Co., Inc.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, RNA production, corynephage, promoter

2Aa08 コリネ型細菌での転写ユニット増幅による組換え RNA 分子の高生産

○羽城 周平, 三橋 麻由, 安枝 寿
（味の素バイオ・ファイン研）
hisashi_yasueda@ajinomoto.com

【背景・目的】
コリネ型細菌を宿主とした目的 RNA 分子の高発現系の構築を目指している。そのために、発現させるべき目的 RNA の転写ユニットを菌体内で増幅させるべく、RNA 転写系を搭載するプラスミドの高コピー数変異体を取得し、その RNA 発現性に及ぼす効果を検証した。
【方法】
発現のためのモデル RNA として、mRNA スプライシングに関与する U1A-RNA の部分 RNA（U1A*-RNA）を用いた。一方、RNA 転写系を搭載する pVC7N プラスミドの高コピー数変異体は、プラスミドの不和合性を利用した自然突然変異スクリーニングにより取得した。次に、その変異点（*cop1* 変異)を同定し、コピー数制御機構を解析すると共に、さらなる高コピー数変異体を取得した。それらのベクターに、U1A*-RNA の転写系を搭載し、コリネ型細菌での組換え RNA 分子の生産性向上を検討した。
【結果・考察】
高コピー数変異体として pVC7H1 を取得できた。そのコピー数は pVC7N の約 10 倍であった。*cop1* 変異は、複製開始タンパク質 Rep の ORF 上流に位置する一塩基変異であり、*cop1* 領域から転写される低分子 RNA が *rep*-mRNA との相互作用を介して Rep 発現量を調整するといったコピー数制御モデルが推定された。そのモデルに基づき、新たな変異体 pVC7H2（約 320 コピー/染色体）を取得することができた。そこで、pVC7H2 に U1A*-RNA 転写系を搭載したところ、転写ユニットの増加に伴って目的 U1A*-RNA が著量菌体内に蓄積し、バッチ培養においてその組換え RNA の生産量は約 300 mg/L-培地となった。

Overproduction of recombinant RNA by the expression-unit amplification in *Corynebacterium glutamicum*

○Shuhei Hashiro, Mayu Mitsuhashi, Hisashi Yasueda
(Res. Inst. Biosci. Prod. Fine Chem., Ajinomoto Co., Inc.)

Key words RNA production, *Corynebacterium glutamicum*, corynephage, high copy number plasmid

2Aa09 組織空間的トランスクリプトーム解析及びゲノム変異解析に向けた微量生体分子抽出法の開発

○山崎 美輝[1,2], 細川 正人[3], 有川 浩司[4], 髙橋 清文[4], 松永 浩子[4], 竹山 春子[1,2,3,4]
（[1]早大院先進理工, [2]産総研 CBBD-OIL, [3]早大理工総研, [4]早大ナノライフ創新研）
haruko-takeyama@waseda.jp

生体組織は様々な表現型の細胞で構成されている。そのため、生体組織の生命現象を理解するには、組織内の空間情報を用いて細胞の種類や機能を解析することが重要である。組織内の空間情報を用いた生体組織解析は、特にがん研究への応用が期待されている。がん組織は、形態や増殖性、薬剤耐性の異なる細胞集団で形成されており、細胞型の特定が治療の指針や予後因子となりうるからである。
近年の研究では、生体組織を構成する細胞型の検出法として、組織空間で異なる遺伝子発現変動を検出し、組織内での細胞の機能分布を特定する空間的トランスクリプトーム解析が多く行われている。しかし、細胞型を詳細に理解するには、トランスクリプトーム解析による表現型の検出に加え、ゲノム解析による変異の検出を行うことが重要となる。トランスクリプトーム解析では、サンプル間における遺伝子発現の変動に加え、一部の変異遺伝子の配列も検出可能であるが、検出可能な変異配列は比較的発現量の多い遺伝子に限られる。そのため、遺伝子の変異を網羅的に検出するには、ゲノム解析が必要となる。しかし、従来の方法では、ゲノムと RNA の分離工程における損失量が多く、微小組織に含まれる微量なゲノム及び RNA を同時に抽出し解析することは困難であった。
当研究室では、微小生体組織からの再現性のトランスクリプトーム解析に向け、タンパク質分解酵素を用いた細胞溶解、磁気ビーズによる RNA 精製を行う微小組織からの効率的な微量 RNA 抽出法を開発した。当処理は、磁気ビーズを使用して RNA を捕獲するため、磁気ビーズ溶液の上清から他の生体分子の抽出が可能となる。そこで本研究では、この方法を応用して同一の微小組織から効率的に RNA とゲノムの両方を同時に抽出・精製し、組織空間的なトランスクリプトーム解析及びゲノム変異解析を行う方法の検討を行った。

Development of biomolecules purification method for transcriptome and genomic analysis of micro tissue

○Miki Yamazaki[1,2], Masahito Hosokawa[3], Koji Arikawa[4], Kiyofumi Takahashi[4], Hiroko Matsunaga[4], Haruko Takeyama[1,2,3,4]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [3]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [4]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ.)

Key words RNA-seq, Biological tissue, transcriptome, Genome

2Aa10 極微小組織切片からの単一細胞レベルトランスクリプトーム解析

○松永 浩子[1], 髙橋 清文[1], 山崎 美輝[2,3], 有川 浩司[1], 細川 正人[4], 竹山 春子[1,2,3,4]
（[1]早大ナノライフ創新研, [2]早大院先進理工, [3]産総研 CBBD-OIL, [4]早大理工総研）
haruko-takeyama@waseda.jp

遺伝子の発現状態は、生体組織内において位置特異的に異なるとされている。すなわち、組織のどこから採取されたのかが明らかである微小組織切片の遺伝子発現分布情報と、顕微鏡下で得られる組織の形態情報を関連づけることができれば、より解像度を深めた空間的な組織構成の理解につながることが期待される。この技術は、生物学的機能の解明や、病理学における病因解明などへの幅広い応用が見込まれる。我々はこれまでに、顕微鏡下で対象組織を観察しながら極微小領域を高スループットで採取できる装置の開発を進めてきた。本装置では、先端がナイフ様の加工が施された針を使用し、試料を針先端でパンチングする要領で高速に採取する。針の内径は 110 μm で、5 分で 48 サンプルの高速試料採取を達成している。採取された組織切片には、概ね数十の細胞が含まれている（20μm 厚）。
我々の研究室では、上記微小組織切片を用いたトランスクリプトーム解析を進めている。微小組織切片は、組織内のどの部位から採取されたかが明確である。この微小組織切片に含まれる細胞群がどのような多様性を有するかという解析を実現することは、組織内での細胞の機能分布のより詳細な理解につながる。そこで本報告では、微小組織切片を単一細胞レベルでバラバラにし、それぞれを対象としたトランスクリプトーム解析を実施した。あらかじめ対象を絞って採取された微小組織切片由来の単一細胞レベルでのトランスクリプトーム解析は、高効率かつ高分解能な解析手法であり、生体組織の機能の理解や医療分野への幅広い応用が期待できる。

Transcriptome analysis derived from a small tissue section broken apart into a single cell

○Hiroko Matsunaga[1], Kiyofumi Takahashi[1], Miki Yamazaki[2,3], Koji Arikawa[1], Masahito Hosokawa[4], Haruko Takeyama[1,2,3,4]
([1]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [3]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [4]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words transcriptome, single cell, Biological tissue, gene expression

2Aa11 遺伝子組換え技術を応用したオオミジンコにおける幼若ホルモン活性の可視化

○野田 彩乃, 加藤 泰彦, 松浦 友亮, 渡邉 肇
（阪大院・工）
watanabe@bio.eng.osaka-u.ac.jp

[背景と目的] ホルモン活性を可視化する遺伝子組換え動物は生体の内分泌系の理解に有用である。幼若ホルモン (Juvenile Hormone: JH) は節足動物にとって、胚発生、脱皮・変態、性決定などの多くの生理現象の調節に関与する重要なホルモンであるにも関わらず、その作用機序の詳細は明らかになっていない。節足動物の中で甲殻類に属するオオミジンコは古くから毒性試験に利用され、JH に鋭敏に応答することが知られており、近年ゲノムが解読されゲノム編集技術も利用可能であることから本研究に適していると考えられる。そこで本研究では JH 応答性の蛍光タンパク質遺伝子を構築し、オオミジンコに導入することで JH 応答を可視化する遺伝子組換え体を作出することを目的とした。
[方法と結果] 昆虫およびミジンコで JH に応答することが知られている複数の遺伝子の発現量の変化を体内で JH が分泌される脱皮間で調べ、*Daphnia Hemoglobin 7*(*DHb7*)遺伝子が最も鋭敏に応答することを発見した。さらに、その上流に昆虫類の JH 応答配列に類似性の高い配列を見出し、これを緑色蛍光タンパク質遺伝子の上流に連結したレポーター遺伝子を構築した。レポーター遺伝子を有するプラスミドをミジンコ卵に注入し、ミジンコ内在性の JH に応答して緑色蛍光を示すことを確認した。また、JH 類似物質の曝露や、JH 受容体ノックダウンを行い、JH に応じて緑色蛍光の強度が変化する事を確認した。今後はゲノム編集によりレポーター遺伝子をノックインし、JH 活性を経時的にモニタリングできる組換え体の作製を行い、体内に蓄積された JH による脱皮抑制機能や性攪乱への影響の解明を目指す。

Visualization of juvenile hormone activities using an encoded reporter gene in *Daphnia magna*

○Ayano Noda, Yasuhiko Kato, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *Daphnia magna*, Juvenile Hormone, biosensor, gene expression analysis

2Aa12 放線菌を用いたタンパク質発現量を調節する遺伝子配列設計手法の開発

○田島 直幸[1], 北川 航[2], 齋藤 裕[1], 西宮 佳志[2], 玉野 孝一[2], 安武 義晃[2], 田村 具博[2], 亀田 倫史[1]
（[1]産総研・人工知能, [2]産総研・生物プロセス）
kameda-tomoshi@aist.go.jp

タンパク質遺伝子内の塩基配列は、翻訳効率に影響を与えることが知られている。最新の翻訳制御研究によると、コドン使用頻度や mRNA の二次構造形成度、翻訳に用いられる tRNA の種類など様々な配列特徴量が翻訳効率に寄与することが分かってきた。翻訳効率を配列改変により調節することで、目的とする酵素や抗体など機能性タンパク質の生産量を増加させることや、より効率的に流れる代謝経路の作成が可能となる。翻訳効率を調節する配列設計手法の開発を目的とし、放線菌ロドコッカス属(*Rhodococcus erythropolis*)を宿主とするタンパク質発現データと配列特徴量の関係を解析した。同一のベクター系を用いた 204 遺伝子の発現データと配列特徴量の関係を解析した結果、転写開始点から遺伝子の N 末端側 11 コドンまでの mRNA 二次構造形成傾向が特に発現量と関係することが明らかになった。遺伝子配列改変による発現調節の効果を確かめるため、12 種類の遺伝子について、それぞれ N 末端側 11 コドン分の取りうる全ての同義置換配列を生成し、最も mRNA 二次構造形成傾向が低いと予想された配列を実際に *R. erythropolis* に導入し、発現量を調べた。その結果、7 遺伝子は天然の遺伝子配列より発現量が増加した。さらに、N 末付近のコドン頻度やレアコドンの有無を考慮した配列を設計したところ、コドン頻度の相乗平均値が一定以上高く、レアコドンを含まない条件で最も形成傾向が低いと予想された配列では、9 遺伝子で天然の遺伝子配列の場合よりも発現量が増加した。特に、今回の遺伝子配列設計手法を用いることで、天然の遺伝子配列では発現量がほとんどない、もしくは発現量が少ない遺伝子は、すべて発現量を向上させることができ、本手法の有用性が示された。

Development of gene sequence designing method regulating protein expression level using actinomycetes

○Naoyuki Tajima[1], Wataru Kitagawa[2], Yutaka Saito[1], Yoshiyuki Nishimiya[2], Koichi Tamano[2], Yoshiaki Yasutake[2], Tomohiro Tamura[2], Tomoshi Kameda[1]
([1]AIRC, AIST, [2]BPRI, AIST)

Key words *Rhodococcus*, mRNA secondary structure, synonymous codon, codon usage

2Ba01 *Bacillus* 属細菌を用いた微生物発電の試み

○福本 悠地, 江邉 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司
（近畿大院・生物理工）
tano@waka.kindai.ac.jp

微生物燃料電池（Microbial Fuel Cell：MFC）は、微生物を触媒として用いる事により、有機物の化学結合における化学エネルギーを電気エネルギーに変換する装置である。MFC は、廃水中の有機物を微生物の栄養源にする事で、廃水処理と電力生産を同時に行う事ができる。*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 Bacillus 属細菌に着目した。*Bacillus* 属細菌は胞子、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。先行研究において、抗生物質を生産する *Bacillus subtilis* RB14 株を用いた MFC の作製を行い、電力と抗生物質の生産が認められた。バイオフィルム形成と抗生物質生産は培養 1 日目に認められたのに対し、電力生産は培養 7 日目以降に認められた。発電が認められた MFC から回収した培養液を新しい装置に移したところ発電が認められた。このことから培地中に蓄積した代謝物が RB14 株における発電に関与していると考えられた。抗生物質生産と電力生産の時期のずれ、発電への代謝産物の関与が RB14 株に特有のものかを調べるため、他の Bacillus 属細菌である IA 株を用いて MFC の作製を行ったところ、IA 株においても電力と抗生物質の生産が認められた。また、IA 株は、燻炭の添加により増殖が促進され、抗生物質生産も増加する事が明らかになっている。この性質を利用し、MFC に燻炭を添加する事により IA 株における電力、抗生物質生産に関する研究を行っている。

Power generation by microbial fuel cell of *Bacillus* sp.

○Yuji Fukumoto, Shohei Ebe, Tatuya Ohike, Masahiro Okanami, Takashi Ano
(Grad. Sch. BOST, Kinki Univ.)

Key words *Bacillus* sp., antibiotics, microbial fuel cell

2Ba02 *Bacillus* 属細菌 IA 株と燻炭を組み合わせた微生物資材の開発

○江邉 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司
（近畿大院・生物理工）
ebe.microbiotech@gmail.com

燻炭とはイネの籾殻を比較的低温で焼成することで作製される炭であり、日本では作物栽培での土壌改良材として古くから利用してきた。燻炭が作物生産を向上させる理由として土壌構造の改良といった物理的な要因が示されているが、それだけでなく土壌中の植物生長に関与する微生物の数を増加させるといった生物的な要因の存在も予想されていた。そこでこれまでの研究では炭存在下で増殖が促進される微生物の探索を試みた。その結果、燻炭を添加した液体培地で培養を行うことで燻炭非添加の培地よりも菌数が増加する *Bacillus* 属細菌 IA 株の単離に成功した。その上、燻炭を添加して培養を行うことで抗真菌活性物質の生産量が増加することを見出した。このことから IA 株と燻炭を組み合わせることで病原菌の植物への感染を防除可能な微生物資材を開発することが出来るのではないかと考えた。本研究では IA 株と燻炭を組み合わせた微生物資材の開発を目的とした。
初めに IA 株による植物病原菌からの感染防除能を評価するため、IA 株を植菌した土壌でキュウリを栽培し植物病原菌である *Rhizoctonia solani* K1 を接種した。その結果、IA 株を植菌した土壌で栽培したキュウリの病害レベルは IA 株非植菌の土壌で栽培したキュウリよりも低下し、IA 株が植物病原菌からの感染を防除できる可能性が示された。続いて微生物資材を作製する際のコストを抑えるため、IA 株の培養基質として籾殻と同様に稲作において排出される米糠に着目した。燻炭と米糠を組み合わせた培地を開発し IA 株の培養を試みた結果、乾燥重量 1 g 当たり 10^8 cfu を上回る菌数の培養物の作製に成功した。本研究により *Bacillus* 属細菌 IA 株と燻炭、米糠を組み合わせることで植物病原菌からの感染を防除可能な微生物資材の開発出来る可能性を示した。

Development of a microbial inoculant using rice husk biochar with *Bacillus* sp. IA

○Shohei Ebe, Tatsuya Ohike, Masahiro Okanami, Takashi Ano
(Grad. Sch. BOST, Kinki Univ.)

Key words *Bacillus* sp., rice husk biochar, microbial inoculant

2Ba03 新奇な好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* を用いたタンパク質生産株の開発

○齊藤 朱音[1], 三原 笑[1], 曽田 匡洋[3], 荻野 千秋[1], 柏木 紀賢[2], 竹中 武藏[2], 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

【目的】本研究では、CBP への応用が期待できる特長をもつ新奇な好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* (*S. thermoviolaceus*)に着目し、物質生産株としての開発を試みた。
【実験方法】異種タンパク発現遺伝子を *S. thermoviolaceus* に導入してタンパク分泌生産能を確認することにより、*S. thermoviolaceus* が CBP を含めた有用な工業的物質生産プロセスの宿主となりうるか検証を行った。タンパク質生産系を構築するにあたって、目的物質に *Aequorea victoria* 由来の緑色蛍光タンパク質(GFP)と *Thermobifida fusca* 由来の β-グルコシダーゼを選択した。初めに GFP 遺伝子を接合伝達法により *S. thermoviolaceus* に導入することで、*S. thermoviolaceus* を宿主として異種タンパク質発現が可能であるか検証した。
【結果】ゲノム組み込み型プラスミドの pTYM18-ermEp-xcsig-GFP 導入株で GFP の生産を確認することが出来た。次に同様の方法で β-グルコシダーゼを導入した結果、培養時間 24 h において最大酵素活性 7.53[Unit/L]の β-グルコシダーゼが分泌生産されていることが確認できた。*S. thermoviolaceus* の早い物質生産能は、別種の放線菌でタンパク生産の最大値が培養 72 h 後であると報告されている S. lividans と比較しても生産サイクル効率化の観点から工業的に大きく優れている。一方で、一過性多コピー型プラスミド pL99 を *S. thermoviolaceus* に導入したところ、GFP とグルコシダーゼともに生産はほとんど認められなかった。CBP を含めた工業的物質生産に *S. thermoviolaceus* を応用するためには、基質分解酵素の分泌生産量を増加させる必要がある。今後はプロモーター改変や組み込み数の増加など、遺伝子組み換えツールの検討を行うことで生産性の向上をはかっていく。

Development of a protein production strain using a novel thermophilic actinomycete,*Streptomyces thermoviolaceus*

○Akane Saito[1], Emi Mihara[1], Msahiro Sota[3], Chiaki Ogino[1], Norimasa Kashiwagi[2], Musashi Takenaka[2], Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Nagase & Co., Ltd)

Key words *Streptomyces*, thermophile

2Ba04 コーヒー抽出残渣の発酵資源化

○水谷 友梨香[1], 加藤 愛理[2], 関川 貴寛[2,3], 菊川 寛史[2,3], 原 清敬[2,3]
（[1]静県大院・薬食生命, [2]静県大・食栄, [3]静県大院・食栄・環）
kmr.suny.ms98p@gmail.com

【目的】日本のコーヒー輸入量は約 50 万トン（生豆換算,2016 年）であり、コーヒー飲料製造会社やカフェ、近年ではコンビニエンスストアなどから大量のコーヒー抽出残渣（コーヒー粕）が排出されている。本研究は、糸状菌等を利用してコーヒー粕の低分子化、酵母発酵阻害物質の分解を行い、高付加価値品を生産する酵母の培養に利用することで、コーヒー粕の有効利用を目的とする。
【方法】数種類の糸状菌をコーヒー粕含有培地で培養し、全有機炭素、全糖、カフェイン、フェノール類濃度などを分析し、その分解特性を評価した。また、コーヒー粕はアラビカ豆およびロブスタ豆を用い、コーヒー粕の粒度の検討も行った。さらに、コーヒー粕含有培地に多量に含まれるフェノールおよびカフェインによる酵母の生育の阻害特性を試験した。
【結果と考察】コーヒー粕の粉砕粒度が小さい方が、糸状菌により低分子化されやすかった。フェノール類については試験した全ての糸状菌で培養後減少し、カフェインについては数種類の糸状菌で減少した。また、フェノール耐性は酵母の種類によって異なり、カフェイン分解活性の高い糸状菌を用いることで、その後の酵母の培養における細胞濃度の高まりがみられた。さらに、コーヒー豆の種類と用いる糸状菌の組み合わせが、その後の酵母の発酵に関与することがわかった。これらのことから、コーヒー粕を糸状菌等により微生物処理することで、低分子化や酵母等の発酵微生物の増殖を阻害する物質の分解を行い、微生物発酵による有用物質生産の原料として有効利用できると考えられる。

Conversion of coffee ground to resources for fermentation

○Yurika Mizutani[1], Airi Kato[2], Takahiro Sekikawa[2,3], Hiroshi Kikukawa[2,3], Kiyotaka Hara[2,3]
([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., [3]Grad. Sch. Nutri. Environ. Sci. Univ. Shizuoka)

Key words coffee grounds, fungi, yeast, fermentation

2Ba05 油性酵母を用いた脱脂米糠加水分解物から機能性油脂生産

○渡辺 昌規[1], 窪田 健太[1], 佐久間 健輔[1], 竹中 慎治[2], Chaiyaso Thanongsak[3]
（[1]山形大院・農, [2]神戸大院・農, [3]タイ・チェンマイ大・農産）
mwata@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

【背景と目的】世界的な人口増加による食用油脂およびバイオ燃料原料としての新規油脂の需要増に伴い、国際的な油脂価格の高騰が問題となっている。しかしながら、国内で消費されている油脂のその殆どを海外からの輸入に頼っており、持続可能な油脂供給を可能にする新規油脂資源の開発が急務とされている。そこで本研究では、米油製造時に副生される脱脂米糠を単一炭素源とした微生物プロセスによる油脂生産の可能性について検討を行った。
【方法】本研究の油脂生産菌として、タイのドイ・インタノン国立公園中に自生する花、葉のサンプルから新規に分離された油性酵母である *Rhodotorula* sp. C7（C7 株）、*Rhodosporidium paludigenum* C10（C10 株）、同 TC32（TC32 株）の 3 株を用いた。油脂生成は、脱脂米糠の酸加水分解物を単一炭素源とした油脂生産培地に上記油性酵母を接種後、好気条件において、120 時間培養を実施した。培養後の菌体は集菌後、菌体増殖量、菌体内油脂含量及び脂肪酸組成の評価を実施した。
【結果と考察】油性酵母を用いた脱脂米糠からの油脂生産を実施した結果、C7 株において、乾燥菌体重量の約 60-70％程度の油脂を細胞内に蓄積するとともに、油脂生成収率は 30.5±4.4（%w/w、g 生成油脂重量/g 糖消費量）にまで達した。併せて、構成単糖であるグルコース、キシロース、アラビノースの同時資化が認められた。また、生成油脂の脂肪酸組成の解析の結果、C10 株由来の油脂は、米油とほぼ同等の脂肪酸組成（主要脂肪酸：オレイン酸、リノール酸）を示した。これらの結果より、新規に分離された油性酵母により脱脂米糠から米油相当の機能性油脂生産の可能性が示唆された。

Microbial lipid production from defatted-rice bran hydrolysate by using newly isolated oleaginous yeast.

○Masanori Watanabe[1], Kenta Kubota[1], Kensuke Sakuma[1], Shinji Takenaka[2], Chaiyaso Thanongsak[3]
([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Yamagata Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Kobe Univ., [3]Dept. Agro-Ind., Chiang Mai Univ.)

Key words oleaginous yeast, defatted-rice bran, oleic acid, linoleic acid

2Ba06 スギ由来セルロースナノファイバーを用いたバイオポリマーコンポジットの作製

○妹尾 政都, 中村 嘉利, 浅田 元子
（徳島大院・先端技科）
ynakamu@tokushima-u.ac.jp

スギは成長速度が速く、国内人工林の 18 % となる 448 万 ha を占め利用可能な状態にもかかわらず放置された状況にある。そこで、本研究ではスギを用いて水蒸気蒸煮処理、ミル処理を行い、セルロースナノファイバー(CNF)にまで解繊し、これをポリ乳酸と混合することでバイオポリマー強度の向上を試みた。スギを水蒸気蒸煮(処理条件 水蒸気圧力 10 , 15 , 20 , 25 atm 、蒸煮時間 5 min)、ミル処理(処理時間 10 sec)により処理を行った。ホロセルロース含有率が最も高かったものは 10 tm で処理したもので 69%であった。しかしリグニンの残存が確認された 15 atm で処理を行った際の 53 % を最高ホロセルロース含有率とした。続いて種々の水蒸気蒸煮処理条件で生成された処理物を水抽出、アセトン抽出、漂白処理、グラインダー処理を行い CNF 化した。これらとポリ乳酸を 50 wt% でコンポジットし、試験片を作製した。処理条件別に引張試験を行った結果、15 atm 処理条件物が最高値 58.1 Mpa/(g/cm3) とった。ポリ乳酸単体と強度を比較すると 1.76 倍の高い値を示した。また市販 CNF との比較実験として BiNFi-s(スギノマシン開発 CNF)を用い同様の方法で試験片を作製し、強度を比較したところ同様かそれ以上の結果が出たことから、水蒸気蒸煮処理、ミル処理で生産される CNF の有用性が明らかとなった。

Preparation of biopolymer composite using cedar-derived cellulose nanofibers

○Masato Seno, Nakamura Yoshitoshi, Chikako Asada
(Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Tokushima Univ.)

Key words cellulose, composting, steam treatment

2Ba07 *Xanthophyllomyces dendrorhous* によるアスタキサンチン発酵生産への柑橘果皮抽出液の利用

○景山 裕也, 若林 敬二, 原 清敬
（静県大院・薬食生命）
k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp

[目的] 柑橘類は、飲料、食品や香料として私達の生活に根付いた果物の一つである。しかし、ほとんどは果実のみが利用され、果皮に関しては有効活用されていないのが現状である。本研究では、抗酸化力が高いことで知られるアスタキサンチン（ASX）の生産能力を有する唯一の酵母である、*Xanthophyllomyces dendrorhous* (赤色酵母)の発酵に柑橘果皮抽出液を用い、生育と ASX 生産への影響を調べ、柑橘果皮の発酵原料としての利用の可能性について検討を行った。
[方法]乾燥柑橘果皮粉末を蒸留水に添加し、オートクレーブ抽出液を柑橘果皮抽出液として、赤色酵母を 22℃, 250 rpm の条件で 72 時間培養を行った。24 時間毎にサンプリングを行い、分光光度計による細胞濃度(OD_{600})の測定と HPLC による菌体内の ASX 量の測定を行った。
[結果及び考察]最小培地である SD 培地を基準とし、そこに柑橘果皮抽出液を添加した培地では、その量が増すごとに細胞濃度が高くなった。次に、柑橘果皮抽出液の栄養評価のため、柑橘果皮が SD 培地の炭素源であるグルコースおよび窒素・ミネラル源である Yeast Nitrogen Base(YNB)の代替としてなりうるかについて検証した。その結果、柑橘果皮抽出液には酵母の増殖に利用可能な炭素源および窒素・ミネラル源が含まれていることを確認した。さらに、柑橘果皮中の多くを占める多糖類のペクチンが酵母の炭素源として利用可能であることがわかり、特にペクチンに含まれる単糖であるアラビノースが最も赤色酵母の増殖に寄与している可能性が高いことがわかった。柑橘果皮を利用した ASX 生産は発展の余地が多く残されているが、今回の研究では、食品廃棄物である柑橘果皮が赤色酵母の発酵資源として利用可能であることを示すことができた。

Development of astaxanthin production using citrus peel extract by *Xanthophyllomyces dendrorhous*

○Yuya Kageyama, Keiji Wakabayashi, Kiyotaka Hara
(Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka)

Key words *Xanthophylloyces dendrorhous*, citrus peel, astaxanthin

2Ba08 小松菜からの内生菌の単離および植物免疫活性化能の評価

○黒川 摩利[1], 中野 正貴[1], 北畑 信隆[2], 朽津 和幸[1], 古屋 俊樹[1]
（[1]東京理科大理工・応生, [2]東大院・農生科）
tfuruya@rs.tus.ac.jp

【背景・目的】植物の内部に共生する植物内生菌には、植物免疫を活性化して病害抵抗性を高める作用を示す微生物の存在が知られている。この種の微生物は、植物内に安定に定着してその効果を発揮することから、微生物農薬への応用に期待が寄せられている。本研究では、植物免疫を亢進する新規微生物の取得を目的として、内生菌の研究がほとんどされていない小松菜に着目し、内生菌を収集した。また、微生物の植物免疫活性化能を簡便に評価する手法として、植物培養細胞の活性酸素種（ROS）生成を指標とした手法を確立し、取得株を評価した。さらに、この一次評価で陽性を示した株について、植物体を用いた病害抵抗性試験を実施した。
【方法・結果】有機農法により栽培された小松菜から 31 株の内生菌を単離し、16S rRNA 遺伝子配列をもとに属種同定を行った。取得株は *Proteobacteria* 門、*Actinobacteria* 門、*Firmicutes* 門に分類された。4 株は既報の微生物との相同性が 96%以下であり、属レベルで新規な微生物である可能性が示唆された。つぎに、取得株をタバコ培養細胞 BY-2 と共培養後、タンパク質性エリシターのクリプトゲインを添加して、植物免疫の指標のひとつである ROS 生成を測定した。その結果、いくつかの取得株は BY-2 細胞のクリプトゲイン誘導性の ROS 生成を亢進した。さらに、この一次評価で陽性を示した株を、シロイヌナズナ植物体と軟腐病菌を用いた病害抵抗性試験に供したところ、内生菌 *Delftia* sp. BR1R-2 および *Arthrobacter* sp. BR2S-6 をシロイヌナズナに接種した際にその病害抵抗性が著しく向上した。

Isolation of endophytes from Brassica rapa var. perviridis and evaluation of their plant immune-activating ability

○Mari Kurokawa[1], Masataka Nakano[1], Nobutaka Kitahata[2], Kazuyuki Kuchitsu[1], Toshiki Furuya[1]
([1]Dept. Appl. Biol. Sci., Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo)

Key words biocontrol agent, endophyte, plant immunity, reactive oxygen species

2Ba09 土壌環境および植物成長を改善する資材の探索

○富永 信一, 荒木 希和子, 久保 幹
（立命館大院・生命科学）
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景と目的】 現代では農薬や化学肥料を用いる農法が主流となっているが、環境負荷や農産物の安心・安全の観点から、農薬や化学肥料を低減することが求められている。我々は有機農法においても同等の高収量かつ高品質な農産物を栽培するため、再現性がある有機土壌を作製した。本有機土壌は、土壌中の全炭素、全窒素、全リン、および全カリウム量が、18,000 mg/kg、1,000 mg/kg、800 mg/kg、および 1,000 mg/kg 以上に調整されている。含水率を 30％程度に調整すると、土壌中の物質循環や微生物活性が向上し、良好な植物成長を与えるものである。本研究では、この有機土壌の性能をさらに向上させるため、土壌環境と植物成長をさらに向上させる資材の探索を行った。
【方法および結果】 市販のミネラル資材、高濃度窒素含有資材、微生物資材、および植物活性化剤を用いた。有機土壌に濃度を変え資材を投入し、栽培を行った。栽培作物にはコマツナを使用し、植物育成室において 5 週間栽培した。栽培開始 1 週間後に総細菌数、5 週間後に地上部重量の測定を行い、資材の効果を評価した。
各資材を投入した土壌は含水率調整後、総細菌数が増加する傾向を示した。特に窒素含有資材では、資材無投入土壌と比較して約 4 倍高い総細菌数が認められた。植物成長において、特にミネラル資材を添加することで約 60%地上部重量が増加した。このように、ミネラル資材、窒素含有資材、微生物資材、および植物活性化剤のいずれの資材においても、微生物の活性化と植物成長への効果が認められた。これらの結果は、異なるメカニズムにより引き起こされると考えられ、各資材の最適濃度や最適な組み合わせやがより効果的であると考えられた。リン循環活性や窒素循環活性に及ぼす各資材の影響や最適有機土壌の作製についても発表する予定である。

Search for materials that improve soil environment and plant growth

○Shinichi Tominaga, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words soil bacteria, fertilizer, plant growth, material cycle

2Ba10 *Bacillus subtilis* の土壌環境及び植物成長に及ぼす影響解析

○東本 繰未, 荒木 希和子, 久保 幹
（立命館大院・生命科学）
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景と目的】 *B. subtilis* の植物栽培土壌への接種は、窒素循環を円滑にすることによって、土壌中の無機態窒素を増加させ、植物成長へ寄与することが期待される。特に微生物の活動が活発で、有機物が豊富な有機栽培土壌では、*B. subtilis* が土壌への影響を介して植物成長を行う可能性がある。しかし、*B. subtilis* の植物体への直接的な作用により、植物の養分吸収を促したりストレス耐性を向上させたりする例は多く報告されているが、植物栽培土壌への影響は解明されていない。本研究では、*B. subtilis* を微生物数が豊富な植物栽培土壌に接種し、植物体、植物栽培土壌に与える影響の解析を試みた。
【方法】 植物育成室において、ブロッコリー 10 株を 14 週間有機栽培した。土壌に *B. subtilis* を接種した。接種回数の異なる 5 条件を用意し、接種頻度による影響の違いを解析した。1 週間ごとに、植物成長の評価と総細菌数の測定を行った。植物成長は、葉の面積合計値及び SPAD 値を用いて評価した。最終週の土壌を用いて、PCR-DGGE 法による菌叢解析を行った。
【結果】 *B. subtilis* を最も接種した条件では、未接種条件よりも葉の面積が約 20%増加した。SPAD 値はいずれも 60~70 の範囲であり、*B. subtilis* 接種による変化は認められなかった。よって、*B. subtilis* の接種は植物の品質を保ったままバイオマスを増加させる可能性があると考えられた。総細菌数の経時変化には、*B. subtilis* 接種による差が見られなかった。*B. subtilis* を最も多く接種した条件と未接種条件をクラスター解析した結果、相同性は約 48%であった。PCR-DGGE バンド数は、未接種条件よりも *B. subtilis* を最も多く接種した条件で増加した。よって、*B. subtilis* は多量に投入しても総細菌数を保ち、菌叢の豊かさを保つことで物質循環を促進する可能性が示唆された。

Influences of *Bacillus subtilis* on soil environment and plant growth

○Kurumi Higashimoto, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words *Bacillus subtilis*, PCR-DGGE

2Ba11 イオン液体で前処理した木質系バイオマス中の多糖およびリグニンのリファイナリー

○廣部 綾乃 [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】カーボンニュートラルな資源である木質系バイオマスは、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。そのため、糖化・発酵に用いるためには、この複雑な構造を緩和する効率的な糖化前処理が必要となる。そこで、本研究では木質系バイオマスを、イオン液体前処理、希硫酸前処理、アルカリ蒸解前処理の 3 つの前処理法でそれぞれ前処理し、糖液と糖化残渣リグニンを作製した。糖液においては発酵によりエタノールを生産し、糖化残渣リグニンにおいては、酸化的解重合によりリグニンモノマーを作製した。これらにおいて、それぞれの前処理法を比較した。
【方法および結果】イオン液体による前処理で得られたバイオマスは、希硫酸前処理およびアルカリ蒸解前処理の際に起こるヘミセルロースの消失は見られなかった。前処理バイオマスを酵素糖化し、糖液を調整した。グルコース濃度は、イオン液体前処理において 46.8 g/L、アルカリ蒸解前処理において 51.8 g/L の糖液が得られた。一方、キシロース濃度は、イオン液体前処理が 19.8 g/L となり、グルコース、キシロースいずれにおいても高い濃度を得たのはイオン液体前処理のみであった。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、グルコース、キシロースいずれにおいても、24 時間でほぼ完全に消費され、エタノール収率はいずれの前処理法においても 8 割程度を達成した。エタノール濃度は、イオン液体前処理において 15.6 g/L と最大となった。糖化残渣リグニンを酸化的解重合することで、リグニンモノマーを作製することに成功した。イオン液体前処理は、検討した前処理方法の中では、木質系バイオマスの前処理・糖化・発酵・リグニン利用の一貫したプロセスにおいて最も適していた。

Ionic liquid-assisted pretreatment for biorefinery of polysaccharides and lignin

○Ayano Hirobe[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 biomass, ionic liquid pretreatment, biorefinery

2Ba12 鶏ふんからのリン回収技術の検討

○野村 勇揮 [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】リンは生物に不可欠な元素であり、世界で生産されるリン鉱石の約 9 割が肥料用として使用されている。そのためリン鉱石は世界各国において食料政策に直接かかわる重要な戦略物質と位置付けられている。特にリン鉱石輸入依存国である日本は国内のリン資源からリンを回収し再利用する技術が求められている。下水汚泥や鉄鋼スラグ等様々な二次リン資源が候補にある中で、私は家畜糞尿特に鶏ふんに注目した。鶏ふんは重金属を含まず、リンが豊富であるという特徴がある。そのため、私は鶏ふんから肥料用に使える形のリンとして回収するプロセスを検討した。リン回収のプロセスは第一段階の鶏ふんの溶出と第二段階のリン化合物の晶析がある。鶏ふんの溶出では、より効果的に溶出させることが期待される phytase の効果を調べた。晶析では水酸化カルシウムによるリン酸の回収効果を確認した。
【方法】10 g の鶏ふんに 2 wt%のクエン酸水溶液 100 g を加えたものを二つ用意し、40 ℃、200 rpm の条件で 15 min 常時かく伴した。15 min 後、一方に酵素 phytase を 5000 U/L 加え、40 ℃、200 rpm で 45 min 常時かく伴した。その後、鶏ふんから得られたリン酸抽出液に水酸化カルシウムを加え、25 ℃、400 rpm の条件で 60 min 常時かく伴しリンを沈殿させた。
【結果と考察】phytase 無添加のものはリン酸濃度が 48 mM だったのに対し、phytase を添加のものは 58 mM のリン酸が溶出していた。よって phytase の添加により、リン酸の溶出量が増加することが分かった。またリン酸抽出液に水酸化カルシウムを加えることで phytase 無添加のものは 48 mM から 7 mM、phytase 添加のものは 58 mM から 12 mM までリン酸濃度が下がっていた。実験全体ではクエン酸、phytase、水酸化カルシウムしか使わずにリンを約 40 %回収することができた。

Study on recovery technology of phosphorus from poultry manure

○Yuki Nomura[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 phosphate, poultry manure, recovery

2Ca01 *Pseudomonas* sp. LAB-08 株由来増殖抑制物質による解糖系抑制の可能性

○本荘 雅宏[1], 鈴木 研志[1], 田代 陽介[2], 二又 裕之[3]
（[1]静大・創科技院, [2]静大・工, [3]静大・グリーン科技研）
futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

微生物利用産業の飛躍的発展のために、微生物を選択的に制御し複合微生物系を好適に制御する技術の確立が求められている。これまでに当研究室では環境細菌の一種である *Pseudomonas* sp. LAB-08 株による増殖抑制物質の生産を発見した。本増殖抑制物質は LAB-08 株自身の増殖には影響を与えないものの、異属微生物の増殖を抑制することが確認されている。従って、本物質を用いることで複合微生物系の好適制御が実現可能であると考えられた。しかし、本物質の詳細については不明であるため、本研究では増殖抑制物質の作用機序を解明することを目指す。
Escherichia coli BW25113 株は増殖抑制物質によって抑制を受けるものの、培養数十時間で増殖を復活させ適応を示した。そこで BW25113 株の一遺伝子欠損ライブラリである KEIO コレクションを用いて増殖抑制物質に対する耐性株の探索を行った。増殖抑制物質存在下で野生株と比較して有意に増殖を示した株を耐性株としたところ、抑制期間が短くなった複数の耐性株取得に成功した。これら耐性株は増殖抑制物質に適応するバイパス経路の迅速な形成が示唆され、耐性株の欠損遺伝子から抑制されている代謝経路が解糖系であることが推測された。そこで解糖系糖新生関連遺伝子の転写量を解析したところ、1,3-ジホスホグリセリン酸から 3-ホスホグリセリン酸へ変換する酵素遺伝子 *pgk* の転写量が著しく抑制されていた。従って増殖抑制物質による *pgk* 遺伝子の転写抑制、あるいはこの上流の代謝を担う GapA の酵素阻害が推測された。*Pseudomonas* 属細菌は解糖系の一部をバイパスしピルビン酸まで代謝を行うエントナー・ドウドロフ経路を有しており、このため増殖抑制物質による抑制を受けないことが考えられた。従って本増殖抑制物質はこのエントナー・ドウドロフ経路の有無による選択的抑制が可能であると示唆された。

Growth-repressing compound produced by *Pseudomonas* sp. LAB-08 would repress a part of glycolysis

○Masahiro Honjo[1], Kenshi Suzuki[1], Yosuke Tashiro[2], Hiroyuki Futamata[3]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words metabolism, growth, glycolysis

2Ca02 ロドプシンを利用した大腸菌における光駆動 ATP 再生の物質生産への応用

○田中 涼[1], 鎌田 健太郎[1], 戸谷 吉博[1], 松田 史生[1], 石井 純[2], 柘植 謙爾[2], 弘埜 陽子[3], 原 清敬[3], 清水 浩[1]
（[1]阪大院・情報, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]静県大・食栄）
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】
近年環境問題などへの対策から微生物による有用物質の生産が注目されている。しかし、バイオプロセスによる物質生産は収率が低いという課題がある。様々な有用物質の生合成にエネルギー物質として ATP が必要とされるが、ATP は主に二酸化炭素の排出を伴う TCA 回路を介して再生されるため、これが収率低下の要因であると考えられる。そこで、ロドプシンを用いた光駆動 ATP 再生に着目した。ロドプシンは、光の照射により細胞内のプロトンを細胞外へくみ出す能力を持つ。そのため、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、2 種類のロドプシンのプロトンポンプ能力を比較し、物質生産への応用に向けた検討を行った。
【方法と結果】
高度好塩菌由来のデルタロドプシンと海洋微生物由来のプロテオロドプシンの遺伝子をそれぞれ導入した EcDR 株、EcPR 株を構築した。培養は単一炭素源として 5 g/L グルコース含む M9 最小培地を用いて好気条件下で行った。プロトンポンプ能力は菌体を非緩衝溶液に懸濁し、光の点灯・消灯を繰り返したときの細胞外 pH の変化によって評価した。細胞内 ATP 濃度はルシフェラーゼ発光法で測定した。グルタチオン濃度は酵素法による DTNB 定量に基づいて測定した。明条件では 50 μE/m^2/sec の白色光を照射して培養を行った。細胞外 pH 測定の結果から、2 株とも光照射時にのみ pH が減少し、ロドプシンが大腸菌細胞膜で発現していることが確認された。また、プロトンポンプ能力は EcPR 株のほうが EcDR 株より高かった。生合成の過程で ATP の消費が起こる有用物質としてグルタチオンを目的物質に設定し、明条件と暗条件で培養を行った際の細胞内グルタチオン濃度を比較した結果、両株とも明条件でグルタチオン濃度が向上し、EcPR 株において増加量が大きいことが示された。

Application of light-driven ATP regeneration to production of useful materials by rhodopsin in *Escherichia coli*

○Ryo Tanaka[1], Kentaro Kamata[1], Yoshihiro Toya[1], Fumio Matsuda[1], Jun Ishii[2], Kenji Tsuge[2], Yoko Hirono[3], Kiyotaka Hara[3], Hiroshi Shimizu[1]
([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka.)

Key words *Escherichia coli*, rhodopsin, ATP regeneration, glutathione

2Ca03 「アミノ酸機能工学」による大腸菌へのストレス耐性の付与

○磯貝 章太, 高木 博史
（奈良先端大・バイオ）
hiro@bs.naist.jp

【背景・目的】我々は、細胞にストレス耐性を付与するプロリン・アルギニン・リジン・グルタミン酸（機能性アミノ酸）を高生産させることにより、有用物質の生産性向上を図る育種手法を「アミノ酸機能工学」と命名し、大腸菌に適用して研究を行っている。これまでに、機能性アミノ酸を高生産する大腸菌変異株のスクリーニングによりプロリン・リジンを高生産する変異株を取得し、リジン高生産株が野生型株よりも高いストレス耐性を示すことを明らかにした。しかしながら、機能性アミノ酸が大腸菌にストレス耐性を付与する機構については不明である。本研究は「アミノ酸機能工学」による大腸菌へのストレス耐性の付与およびその機構の解明を目的としている。
【方法・結果】プロリン高生産変異株について、プロリン代謝関連酵素の遺伝子配列を解析したところ、γ-glutamyl kinase (GK) をコードする *proB* 遺伝子に変異があり、アミノ酸置換（D107N または A117T）が導入されていることを見出した。D107A や A117V のアミノ酸置換によって GK はプロリンによるフィードバック阻害非感受性になることが報告されており、我々の取得した変異株も GK の活性制御が解除され、プロリンが高生産されたと考えられる。また、リジン高生産に寄与する変異について解析した結果も報告する。さらに、今回同定した変異や高機能化の報告がある変異を導入した遺伝子を発現させることで、プロリンやリジンの代謝を人為的に改変した株を作製し、各アミノ酸の生産量および各ストレス（高温・低 pH）に対する表現型を調べた。本発表では、これらの解析結果についても発表する予定である（本研究は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（ＮＥＤＯ）の委託業務で行われた）。

Improvement in stress tolerance of *Escherichia coli* by "functional amino acid engineering"

○Shota Isogai, Hiroshi Takagi
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words *Escherichia coli*, amino acid, stress tolerance

2Ca04 酸素をスイッチとしたコリネ型細菌中央代謝経路の切り換え

小林 俊介[1], 村井 克輝[1], 川口 秀夫[2], 白井 智量[3], 仁宮 一章[1,4], 髙橋 憲司[1], 近藤 昭彦[2,3], ○柘植 陽太[1,4]
（[1]金沢大院・自科, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]理研・環境資源, [4]金沢大・新学術）
ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】グルコースは代謝される際、グルコース-6-リン酸で解糖系とペントースリン酸経路（PPP）に分岐する。コリネ型細菌は代謝改変により好気条件下でジアミンのカダベリンを、嫌気条件でジカルボン酸のコハク酸を生産する。グルコースを単一炭素源とした場合、1 分子のカダベリンの生産のためには 4 分子の還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）が必要なため、NADPH の主要な供給源である PPP に多くの炭素を流す必要がある。本発表では酸素を代謝スイッチとして用いることで中央代謝経路の切り換えを行い、好気条件下でカダベリンを、嫌気条件下でコハク酸を生産する菌株の作製を目的とした。
【方法と結果】*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 株に代謝改変を施しカダベリン・コハク酸生産株を作製した。初めにコハク酸生産の際の副生成物である乳酸と酢酸の生合成遺伝子を欠損させた。リジンのフィードバック阻害解除のため、アスパルトキナーゼ遺伝子に一塩基置換を導入するとともに、大腸菌由来のリジン脱炭酸酵素遺伝子を導入した。また、ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子をプロモーター置換により高発現した。好気条件下で解糖系を OFF にして炭素を PPP により多く流すため、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ（PGI）遺伝子のプロモーターを嫌気条件下で特異的に働く ldhA 遺伝子のプロモーターに置換したところ、カダベリン生産量は約 4.7 倍に増加した。一方、コハク酸生産量は約 24%減少した。そこで PldhA-pgi 遺伝子セットをもう一コピーゲノムに導入したところ、コハク酸生産量は回復した。好気条件下における細胞内のグルコース-6-リン酸濃度は PGI 活性が低下するほど増加した。また、それぞれの生産株における解糖系への代謝フラックスの分岐比は PGI の比活性に比例しており、代謝経路の切り換えが確認できた。

Bidirectional switching of carbon flux between central metabolic pathways by oxygen level in *Corynebacterium glutamicum*

Shunsuke Kobayashi[1], Murai Katsuki[1], Hideo Kawaguchi[2], Tomokazu Shirai[3], Kazuaki Ninomiya[1,4], Kenji Takahashi[1], Akihiko Kondo[2,3], ○Yota Tsuge[1,4]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]CSRS, RIKENS, [4]InFiniti, Kanazawa Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, metabolic switch, oxygen, metabolic engineering

2Ca05 解糖系とペントースリン酸経路への代謝フラックスの分岐比が細胞内代謝プロファイルに及ぼす影響

○村井 克輝[1], 佐々木 大介[2], 白井 智量[3], 内倉 寛斗[1],
佐々木 建吾[2], 仁宮 一章[1,4], 髙橋 憲司[1], 近藤 昭彦[2,3], 柘植 陽太[1,4]
（[1]金沢大院・自科, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]理研・環境資源, [4]金沢大・新学術）
ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】グルコースは代謝される際、グルコース-6-リン酸で解糖系とペントースリン酸経路（PPP）に分岐する。この分岐比は下流の代謝産物の合成に大きな影響を与える。本発表では、アミノ酸生産菌であるコリネ型細菌を用いて、解糖系と PPP への分岐比が解糖系や TCA サイクル、アミノ酸を中心とした細胞内の代謝プロファイルにどのような影響を与えるかについて網羅的に検証した。
【方法と結果】*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 株に代謝改変を施すことで C5 のジアミンであるカダベリンの生産株を作製し、親株として用いた。解糖系と PPP の分岐比はグルコース-6-リン酸イソメラーゼ遺伝子（*pgi*）のプロモーターを置換することで変動させた。代謝フラックス解析により、PGI の比活性と解糖系への代謝フラックスの分岐比が比例関係にあることを確認した。*pgi* 欠損株では増殖が著しく減退したが、各種プロモーター置換株では PGI 比活性と解糖系への分岐比が増加するに伴い、増殖速度・グルコース消費速度が増加した。しかし、両者の値が一定値を超えると増殖速度・グルコース消費速度に違いが見られなかったことから、*pgi* 遺伝子は野生型のプロモーターでは必要以上に発現誘導されていることが示唆された。細胞内のグルコース-6-リン酸濃度は解糖系への分岐比が減少するほど増加した一方、下流の解糖系代謝物の濃度は減少した。また、TCA サイクルのリンゴ酸、フマル酸、コハク酸の濃度は解糖系への分岐比が増加するほど増加した。アミノ酸ではアラニン、バリン、ロイシンの濃度が解糖系への分岐比が増加するほど増加した。以上のように解糖系と PPP への代謝フラックスの分岐比が代謝プロファイルに与える影響を明らかにした。

Effect of split ratio between glycolysis and pentose phosphate pathway on metabolic profile in *Corynebacterium glutamicum*

○Katsuki Murai[1], Daisuke Sasaki[2], Tomokazu Shirai[3], Hiroto Uchikura[1],
Kengo Sasaki[2], Kazuaki Ninomiya[1,4], Kenji Takahashi[1], Akihiko Kondo[2,3],
Yota Tsuge[1,4]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]CSRS, RIKENS, [4]InFiniti, Kanazawa Univ.,)

Key words metabolic engineering, glycolysis, pentose phosphate pathway, metabolic flux

2Ca06 バクテリアの還元型リン化合物輸送体 HtxBCDE における基質認識メカニズムの解析

○廣田 隆一, 三好 克樹, 池田 丈, 石田 丈典, 舟橋 久景, 黒田 章夫
（広島大院・統合生命科学）
hirota@hiroshima-u.ac.jp

【目的】バクテリアにはリン酸（$PO(OH)_3$：リンの酸化数+5）のみならず、亜リン酸（$H\text{-}PO(OH)_2$）およびホスホン酸（$R\text{-}PO(OH)_2$：酸化数+3）、次亜リン酸（$H_2PO(OH)$：酸化数+1）など、酸化状態が異なるリン化合物を利用する多様な代謝機構が存在する。これらの特殊なリンの代謝機構は、抗生物質を利用しない微生物の選択的培養や、特定の還元型リン化合物に生育を依存させる生物学的封じ込めなど、従来のコンセプトとは異なる特徴を有する新しいバイオ技術の開発ツールとして利用できる。還元型リン化合物を含めた多くのリン化合物は極性分子であり、輸送体による取り込みが代謝の初段階となる。HtxBCDE は *Pseudomonas stutzeri* において見出された次亜リン酸輸送体であり、リン酸には特異性を示さず還元型の無機リン酸である亜リン酸および次亜リン酸のみを輸送する。この性質は還元型リン化合物に生育を依存させる生物学的封じ込めにおいて必須のツールであるが、その分子認識機構は不明である。本研究では、HtxBCDE の変異体を作製し基質特異性の解析を行った。
【方法・結果】HtxBCDE は binding protein-dependent 型の ATP-binding cassette（ABC）輸送体であり、基質結合タンパク質（HtxB）、膜貫通タンパク質（HtxC）、ヌクレオチド結合タンパク質（HtxD）から構成される。HtxBCDE を利用して作製した亜リン酸依存性株を、高濃度リン酸と亜リン酸が共存する培地で培養したところ、リン酸を利用することができる変異株が得られた。変異株の解析を行ったところ HtxC の Phe210 が Cys あるいは Ser に置換する変異が見出された。そこで HtxC の Phe210 を他のアミノ酸に置換した変異体を作製しリン酸および亜リン酸輸送能を評価した結果、Phe 以外にも亜リン酸特異性を維持できるアミノ酸が見出された。

Analysis of the substrate recognition mechanism of the bacterial reduced phosphorus compound transporter HtxBCDE

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

Key words phosphate, transporter, substrate specificity, reduced phosphorus compound

2Ca07 好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* 代謝改変株を用いたエタノール生産増強に向けた培養工学的検討

○加藤 淳也[1], 竹村 海生[1], 岩崎 祐樹[2], 加藤 節[1], 青井 議輝[1],
和田 圭介[2], 村上 克治[2], 松鹿 昭則[2], 中島田 豊[1]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]産総研・機能化学）
nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

＜背景と目的＞
バイオマス利用においてガス基質発酵は糖発酵に代わる技術として期待されている。我々は、水素、一酸化炭素、二酸化炭素を利用して独立栄養的に生育することができる好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* を用いたガス基質発酵によるエタノール生産の研究を進めてきた。これまでに、*M. thermoacetica* ATCC39073 株のホスホトランスアセチラーゼ（*pduL1*, *pduL2*）の破壊およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ（*aldh*）導入による代謝改変を行うことで最終代謝産物の酢酸の代わりにエタノールを生産する株を取得している。しかし、代謝改変株によるガス基質からのエタノール生産は見られなかった。そこで、本研究では、代謝改変株のガス基質資化性の消失原因を探るとともに、その回復手法に関わる検討を行った。
＜方法と結果＞
これまでに、酢酸生成が完全にエタノール生成に向かう、*pduL1, pduL2* をともに破壊し *aldh* を導入した株を用いて検討したが、水素分圧の高低に関わらず菌体増殖そのものがみられなかった。そこで、水素と二酸化炭素、または水素と一酸化炭素の混合ガスを基質とした代謝モデルを作成し、細胞内酸化還元バランスを化学量論的に検討したところ、水素と二酸化炭素では酸化還元バランスが合わないが、水素と一酸化炭素では満たされることと考えられた。そこで、水素と一酸化炭素の混合ガスを用い、酢酸は副生するものの ATP 供給低下が比較的少ないと考えられる *pduL2* 破壊 *aldh* 導入株を培養したところ、菌体の増殖およびエタノールの生産が確認された。以上の結果は、酸化還元バランスおよび ATP 供給の最適化により、ガス基質からでもエタノール生産が可能であることを示している。

Study on the ethanol production via gas fermentation by the genetically-engineered strains of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*

○Junya Kato[1], Kaisei Takemura[1], Yuki Iwasaki[2], Setsu Kato[1], Yoshiteru Aoi[1],
Keisuke Wada[2], Katsuji Murakami[2], Akinori Matsushika[2], Yutaka Nakashimada[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Res. Inst. Sustainable Chemistry, AIST)

Key words biomass, ethanol production, bacteria, gas fermentation

2Ca08 アコニット酸イソメラーゼ遺伝子とクエン酸輸送体遺伝子を共発現させた大腸菌生細胞によるクエン酸からの *trans*-アコニット酸の生産

○小田 祐之亮, 吉岡 育哲, 滝口 有沙, 桐村 光太郎
（早大・先進理工）
kkohtaro@waseda.jp

【目的】
trans-アコニット酸 (*t*AA) は可塑剤や機能性樹脂原料などに利用可能な有用有機酸である。現在、*t*AA の生産法は高温、高圧条件を必要とする化学合成によるものが主流で、環境負荷低減型の *t*AA 生産法が望まれている。演者らは、*t*AA 資化性細菌 *Pseudomonas* sp. WU-0701 の細胞内に *cis*-アコニット酸と *t*AA の異性化反応を触媒するアコニット酸イソメラーゼ (AI; EC 5.3.3.7)を見出し、その遺伝子を世界で初めて同定した [1]。さらに、AI 遺伝子を高発現させた大腸菌を用いて常温常圧下におけるクエン酸からの *t*AA の生産に成功した [2]。本研究では、糸状菌 *Aspergillus niger* のクエン酸発酵液を原料とし、AI 遺伝子と CitT 遺伝子 (後述) を高発現させた大腸菌生細胞による *t*AA 生産について検討した。

【方法および結果】
大腸菌のクエン酸輸送体 (CitT) は細胞膜に局在し、コハク酸などのジカルボン酸とクエン酸の対向輸送を行う。演者らは、大腸菌で CitT 遺伝子を発現させることで、基質であるクエン酸の取り込みが促進されることを予想し、AI 遺伝子と CitT 遺伝子を共発現させた大腸菌を作製した。60 g/L (312 mM) のクエン酸を含む基質溶液を原料に、当該組換え大腸菌生細胞を利用して *t*AA 生産を行なったところ、AI 遺伝子のみを発現させた大腸菌を用いた場合と比較して最大収量が増大することを見出し、さらに生菌体での反応の最適 pH を 7 と決定した。pH 7 に調節した *A. niger* のクエン酸発酵液を基質溶液として生産試験に供したところ、2 日間の反応で 57 g/L (296 mM) のクエン酸から 64.9 mM の *t*AA の生産に成功した。
(本研究は「早稲田大学理工総研-JXTG 若手研究奨励研究」の助成を受けて実施した。)
[1] K. Yuhara, et al., FEBS J., 282, 4257-4267 (2015).
[2] K. Koboyashi, et al., Chemistry Select, 6, 1467-1471 (2016).

Bioproduction of *trans*-Aconitic Acid from Citric Acid by Living Cells of *Escherichia coli* Co-expressing Genes Encoding Aconitate Isomerase and Citrate Carrier Protein

○Yunosuke Oda, Isato Yoshioka, Arisa Takiguchi, Kohtaro Kirimura
(Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words *trans*-aconitic acid, aconitate isomerase, citrate carrier protein CitT, *Aspergillus niger*

2Ca09 *Ochrobactrum* sp. WU-1502 を利用したレブリン酸からの 2-オキソグルタル酸の生成

○大浦 智之[1], 齋藤 慎太郎[1], 吉岡 育哲[1], 羽部 浩[2], 桐村 光太郎[1]
（[1]早大・先進理工, [2]産総研・環境管理）
kkohtaro@waseda.jp

【目的】
レブリン酸 (以下 LA) は木質系バイオマスからハイブリッド酸触媒を利用して安価に合成可能な炭素数 5 の α-ケト酸である [1]。LA は将来的には種々の有用化合物の基幹物質となりうる化合物で、LA を原料とした有用化合物生産に期待が寄せられている。しかし、LA はポルフィリン合成を阻害するため、微生物による LA の代謝や変換に関する報告は少ない。演者らは、LA 資化性微生物を探索し、LA からの有用化合物の生成について検討した。
【方法および結果】
土壌を試料として単離した WU-1502 株は、LA 20 g/L を唯一の炭素源とする合成培地において旺盛な生育を示し、7 日間の培養で OD_{600} は 20 に達した。WU-1502 株は形態観察から好気条件下で生育を示すグラム陰性桿菌であることが明らかになった。また、16S rRNA 解析から *Ochrobactrum lupini*, *O. cytisi*, *O. anthropi* に近縁の細菌であることが判明し、便宜上 *Ochrobactrum* sp. と同定した。WU-1502 株は LA 資化性を示す *Ochrobactrum* 属細菌として初めてのものである。さらに、*Ochrobactrum* sp. WU-1502 を用いて LA を基質とした whole cell reaction を行い、その反応液上清について HPLC 分析を行った。酢酸、コハク酸、ピルビン酸、2-オキソグルタル酸 (以下 2-OG) などの多くのトリカルボン酸回路中間体と推定されるピークが検出され、とくに 20 mM LA から 0.79 mM 2-OG の生成が確認された。以上より、微生物を利用して LA からの 2-OG 生産の可能性を見出した。

[1] H. Habe, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 79, 1552-1555 (2015).

Formation of 2-oxoglutaric acid from levulinic acid by *Ochrobactrum*. sp WU-1502

○Tomoyuki Oura[1], Shintaro Saito[1], Isato Yoshioka[1], Hiroshi Habe[2], Kohtaro Kirimura[1]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Environ. Manage. Res. Inst., AIST)

Key words levulinic acid, *Ochrobactrum* sp, tricarboxylic acid cycle, 2-oxoglutaric acid

2Ca10 不均一なリグニン由来フェノールからの 4-ヒドロキシ安息香酸生産

○阿久津 美歩[1], 上村 直史[2], 政井 英司[2], 園木 和典[1]
（[1]弘前大院・農生, [2]長岡技科大・生物）
sonoki@hirosaki-u.ac.jp

【目的】我々の研究グループでは需要の多い糖質を使用することなく、リグニンだけを炭素源としてポリマー原料等の有用物質を生産できる微生物株の開発を進めている。これまでに S-、G-、H-リグニン由来のフェノール類であるシリンガ酸 (SA)、バニリン酸 (VA)、4-ヒドロキシ安息香酸 (HBA) を炭素源として良好に生育する *Pseudomonas* sp. NGC7 株を単離し、その代謝経路を利用することでリグニン由来のフェノール類だけを炭素源として、基幹化合物の一つである *cis,cis*-ムコン酸を生産できることを明らかにした[1)]。本研究では液晶ポリマー原料である HBA の生産に資する微生物株の作出を目的とした。
【方法と結果】相同組換えにより NGC7 株の 4-hydroxybenzoate hydroxylase 遺伝子 (*pobA*)を破壊した NGC704 株は、SA と VA の資化能は保持していたが、HBA の資化能を失った。SA、VA および HBA の混合物を炭素源とした条件下では、SA と VA を炭素源として良好に増殖し HBA だけを蓄積した。また市販のサルファイトリグニンから酢酸エチルで抽出される画分を炭素源としても良好に増殖し、HBA を蓄積することが確認できた。そこでバガスリグニンの分解物モデル [シリンガアルデヒド (29.9%)、SA (3.6)、バニリン (33.5)、VA (2.4)、4-ヒドロキシベンズアルデヒド (29.3)、HBA (1.2)] を逐次添加する Fed-batch 培養を行った結果、NGC704 株は 10 g/L の HBA を生産できた。
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, JPMJAL1506) の支援を受けて実施した。
[1)]特願 2018-196001

Sugar-free 4-hydroxybenzoate production from heterogeneous lignin-related phenols

○Miho Akutsu[1], Naofumi Kamimura[2], Eiji Masai[2], Tomonori Sonoki[1]
([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., [2]Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech.)

Key words *Pseudomonas*, lignin, 4-hydroxybenzoate, Bio-based monomer

2Ca11 大腸菌の共培養によるイソプレノール合成経路のボトルネックの解消

○川井 隆太郎, 戸谷 吉博, 清水 浩
（阪大院・情報）
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】
イソプレノールは燃料や化成品などの原料であり、微生物によるバイオマス資源から発酵生産が望まれている。大腸菌に外来のイソプレノール合成経路を導入した先行研究が報告されているが、その生産性はまだ低く、実用化には更なる改善が必要である。低生産性の原因として、多数の外来遺伝子の過剰発現による代謝への負荷や、メバロン酸生産とイソプレノール生産に最適な細胞内環境が異なることが考えられる。本研究では、イソプレノール合成経路を２つに分け、それぞれの経路に関する酵素を発現した大腸菌株を共培養することで、生産性の向上を目指した。
【方法と結果】
大腸菌 MG1655（DE3）株を宿主として、グルコースからメバロン酸の合成を担うメバロン酸生産株（cMVA 株）と、メバロン酸からイソプレノールの合成を担うイソプレノール生産株（cIP 株）を構築し、培地中の代謝物濃度を HPLC、GC を用いて測定した。cMVA 株と cIP 株の菌体比を変えて植菌し、増殖停止期での培養を行った結果、共培養によるイソプレノール生産が可能であり、菌体比によってイソプレノール収率が変化することが確認された。また、cIP 株においてメバロン酸の取り込みが律速となっていることが示唆されていたため、細胞外にメバロン酸を添加して cIP 株を培養したところ、メバロン酸の濃度が増加するほどイソプレノールへの変換速度は増加し、最大で 0.33 mmol/g-DCW/h の比生産速度が実現された。その際の細胞内 ATP 濃度は 0.05 mM と非常に低く、イソプレノール合成に必要な ATP の供給不足が示唆された。イソプレノール合成経路のボトルネックを解消することで、メバロン酸からイソプレノールへの変換効率を向上し、共培養におけるイソプレノールの生産性向上が実現されると期待される。

Elimination of bottlenecks in the isoprenol synthetic pathway by co-culture of *Escherichia coli* cells

○Ryutaro Kawai, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Escherichia coli*, isoprenol, mevalonate, co-culture

2Ca12 *Pseudomonas stutzeri* NT-I のセレン代謝を促進する培地成分の検討

○池田 美紗希, 黒田 真史, 井上 大介, 池 道彦
（阪大院・工）
ike@see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】セレン (Se) は半導体原料等に利用されるレアメタルである一方で、その水溶性化合物は毒性が高いことから、廃水からの効率的な除去及び回収が求められている。*Pseudomonas stutzeri* NT-I は、水溶性のセレン酸および亜セレン酸を、不溶性の元素態 Se や揮発性の有機 Se 化合物に高効率で還元できることから、Se の生物学的処理技術への適用が期待されている。しかし NT-I 株は、高コストな天然培地中では高い Se 代謝活性を示すものの、無機塩培地中では Se 代謝活性が低く安定しないことから、Se 代謝を促進する培地成分の解明が求められる。本研究では、NT-I 株を用いた実用的かつ安定した廃水処理技術の確立に向けて、Se 代謝を促進する培地成分を解明することを目的とした。
【方法・結果】1 mM の亜セレン酸及びアミノ酸等の種々の成分を添加した乳酸無機塩培地で NT-I 株を好気条件下で培養 (28℃、120 rpm) した。経時的に培養液中の Se 濃度を分析し、添加した成分が NT-I 株の亜セレン酸還元能に及ぼす影響を評価した。アミノ酸等の成分を添加していない乳酸無機塩培地では、培養開始 24 時間後に初期添加 Se の 36 %が培地中に残存していたのに対し、天然培地の成分でもあるカザミノ酸を 1 g/L 以上添加した系では、ほぼ全量の Se が除去された。続いて、カザミノ酸に含まれる各種アミノ酸による影響を評価した結果、メチオニンの添加による亜セレン酸の還元の促進が確認され、0.1 g/L 以上のメチオニンを添加した系において、培養開始から 24 時間で初期添加 Se のほぼ全量が除去された。この結果より、NT-I 株のセレン代謝には含硫アミノ酸代謝が関連していることが示唆された。

Nutrients accelerating selenium metabolism of *Pseudomonas stutzeri* NT-I

○Misaki Ikeda, Masashi Kuroda, Daisuke Inoue, Michihiko Ike
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *Pseudomonas stutzeri*, selenium, reduction, methionine

2Da01 LAL 固定化ビーズ法を用いたグラム陰性菌の培養に伴うエンドトキシンの遊離特性の定量的解析（第 3 報）

大瀧 賀也 [1], ○徳永 成美 [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】 エンドトキシン（Endotoxin: ET）はグラム陰性菌の外膜構成成分の一種で、血中へ混入すると人体に重篤な症状を引き起こす。先に演者らは、“溶菌だけではなく、菌体の分裂に伴い ET が菌体外へ顕著に遊離する”タイプと、“溶菌の際にのみ ET が菌体外へ遊離する”タイプのグラム陰性菌が存在することを報告した [1, 2)]。演者らは、ET の遊離現象の機構の解明を最終目的とし、本研究では、(1) ET の遊離挙動の解析、(2) 菌体内の ET と菌体外に遊離した ET の特性の比較、(3) 遊離した ET の形態の解析、について検討をおこなった。

【方法と結果】前報 [1, 2)] と同様に ET の高感度迅速測定が可能な LAL 固定化ビーズ法を用いて、*Klebsiella pneumoniae* NBRC 3512、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 106052 など 6 種類のグラム陰性菌の培養（増殖）に伴う ET の遊離挙動を解析した結果、菌株間で遊離量、遊離率、単位菌体当たりの ET 活性（増殖ステージによっても異なる）が大きく異なった。また、SDS-PAGE を用いて種々解析した結果、ET の遊離現象に糖鎖の長さは関係ない（特定の構造の ET が遊離してくるのではない）ことが示唆された。遊離した ET の形態を調べるために、対数増殖期における ET の遊離率が高い *K. pneumoniae* を改変 802 培地で培養し、対数増殖期後期の培養液を用いて、密度勾配遠心分離法による分画をおこない、遊離した ET の浮遊密度の解析と透過型電子顕微鏡（TEM）を用いた観察をおこなった。その結果、遊離した ET はベシクル様の形態で存在することが示唆された。現在、他の菌株についても検討中である。

1）H28 生物工学会要旨集 p. 311
2）H29 生物工学会要旨集 p. 243

Application of LAL-conjugated-microbeads method for quantitative analysis of endotoxin-releasing characteristics of gram-negative bacterial cultures (part 3)

Kaya Ohtaki[1], ○Narumi Tokunaga[2], Hideki Aoyagi[1,2]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Col. Agro-bio. Resource. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words cultivation, endotoxin, gram-negative bacteria, Limulus amebocyte lysate

2Da02 LAL 固定化ビーズ法を用いたエンドトキシンの高感度・迅速検出法の開発と利用（第 5 報）

猪瀬 陽加 [1], ○川﨑 芳美 [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】
臨床現場では血液中のエンドトキシン（Endotoxin: ET）濃度の迅速で正確な測定が必須であるが、血液中の ET 濃度は非常に低いと共に、血液中には測定を阻害する夾雑物があるため、ET の正確な測定は困難であった。演者らは ET の測定法として LAL 固定化ビーズ（LAL-B）法を開発し、公定法では困難であった血清試料中の ET 濃度の測定を、正確、迅速かつ高感度におこなうことに成功した [1)]。本研究では、従来は測定が困難であった、LAL 反応に影響を与える因子（夾雑物、界面活性作用、濁度など）を含む種々の試料中の ET 濃度の測定に LAL-B 法を適用し、本法の有用性の評価と利用性の拡大について検討をおこなった。
【方法と結果】
前報 [1)] に従い LAL-B を作製した。LAL-B 法を用いて、有色で濁度の高い経腸栄養剤中の ET や界面活性作用を有する胆汁酸を含む試料中の ET の濃度を測定した結果、従来は測定不能だった ET 濃度の正確な測定ができた。腸内環境を模倣した系として経腸栄養剤中で大腸菌を培養した系について検討した結果、大腸菌からの ET の遊離が促進される場合があることが示唆された。一方、胆汁酸を含む培地で大
腸菌を培養すると培養液中の ET の活性が減少した。種々検討した結果、胆汁酸は大腸菌からの ET の遊離を抑制するのではなく、ET を不活化していることが示唆された。また、胆汁酸に ET を添加した試料を希釈した場合、ET の活性が復活しなかったのに対し、一般的に ET の不活化剤として知られる polymyxin B では希釈により ET の活性が一部回復した。現在、両者の不活化機構の違いについて解析中である。

1） H29 生物工学会要旨 p. 242.

Development of a rapid and sensitive method for assessing endotoxin by using LAL-conjugated-microbeads and its application (part 5).

Haruka Inose[1], ○Yoshimi Kawasaki[2], Hideki Aoyagi[1,2]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Coll.Agro-bio.Resour.Sci.,Univ.Tsukuba)

Key words bile acid, endotoxin, Limulus amebocyte lysate, polymyxin B

2Da03 イオンコンプレックス化技術を利用したポリγグルタミン酸の効率的な回収技術の開発

○白米 優一, 山内 七海, 芦内 誠
（高知大・農）
yuichi.haku@gmail.com

【背景と目的】ポリγグルタミン酸（ＰＧＡ）の回収にはＰＧＡ産生微生物の培養液に約３倍量のアルコールを必要とする。ただし、この方法では、ＰＧＡ純度が低いため、さらなる精製分離の工程も要する。回収効率の抜本的な改良が求められていた。２０１３年当初より、当研究室で開発されたＰＧＡイオンコンプレックス（ＩＣ）化技術を介してＰＧＡの効率回収技術の実用化に向けた検討が進んでいた。他方、異なる研究グループでもＩＣ化技術になぞらえてジェミニ型界面活性剤を利用していたが、いまだ多くの課題が多く残っている。今回、ＰＧＡＩＣ経由のＰＧＡ効率回収技術に関する有益な情報を得たので報告する。
【方法・結果】便宜上、当方の回収技術をＨＤＰ法、異なる研究室から提案されたジェミニ型回収技術をＢＤＰ法と呼ぶ。両回収法を比較した。前者はＰＧＡＩＣをごく少量のエタノールに溶解後、想定イオン結合数と等モル量のＨＣｌを添加することで結合部を解除させ（事実上のイオン低用量法）、アルコール不溶の沈殿物（ＰＧＡ‐Ｈ）を回収する。これに炭酸ナトリウム溶液を添加、得られた溶液はほぼ１００％のＰＧＡ回収率を示すことを明らかにした。ＢＤＰ法では、ＨＣｌの代わりに高濃度ＮａＣｌ溶液を用いる（イオン大過剰法）。この場合、①回収率が～８０％、②大過剰の塩を除く作業が必須、③ジェミニ型界面活性剤は極めて高価な薬剤で低コスト化に逆行する等、の問題があった。本件のＰＧＡＩＣを介した新たなＰＧＡ回収技術において最も注意すべきは水分の混入であることが判明した。実際、ＨＤＰ法においてもＢＤＰ法と同じく、人為的に水分混入をさせたモデル回収系を設計した。さらに、水分用量を種々変化させたところ、該混入量が増加するに伴い、高い相関性をもってＰＧＡの回収効率が低下することが明らかになった。

Efficient recovery of poly-γ-glutamate via formation of its polyion complex, PGAIC

○Yuichi Hakumai, NaNami Yamauchi, Makoto Ashiuchi
(Fac. Agric. Agric. Sci. Prog., Kochi Univ.)

Key words poly-gamma-glutamate, polyion complex, efficient recovery, hexadecylpyridinium

2Da04 酢酸菌を宿主とした異種タンパク質生産の試み

○植川 泰好, 繁 宥樹, 赤坂 直紀, 福田 青郎, 藤原 伸介
（関西学院大院・理工）
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

[目的] 酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* KGMA0119 は、食酢醸造用の酢酸菌として利用されてきた。本菌の菌体収量は大腸菌と同等に高く、細胞内の pH は他の酢酸菌ほど低くならない（1）。また、培地に酢酸を放出するため雑菌も繁殖しない。３種の共存可能なプラスミドも存在する(2)。これらの性質は本菌の物質生産用宿主微生物としての可能性を示す。本研究では酢酸菌を利用する高発現系の確立に向けて、高い転写活性を有するプロモーター、物質生産に活用できる制御系の探索を行った。
[結果と考察] 高発現を実現するために、細胞内での発現量の高い遺伝子に注目した。まず、RNA-seq 解析により、候補選別を行ったところ、分子シャペロニン *groES* 遺伝子の転写量が多く確認された。*K.europaeus* において、*groES* は構成的に発現しており、高い転写活性とともに安定な発現持続性が期待された。次に GFP をレポーターに用い、β-ラクタマーゼ遺伝子プロモーター（P_{bla}）を比較対象として、*groES* プロモーター（P_{groES}）の活性を評価した。蛍光強度を比較したところ P_{groES} を用いた場合 P_{bla} と比較し、蛍光強度で約 4 倍以上の活性増強が認められた。このことから P_{groES} は酢酸菌において高い転写活性を有すると考えられた。次に制御系についての検証をおこなった。先行研究で、アセトイン合成関連遺伝子 *aldC* の転写が、乳酸添加依存的に転写誘導されることが推察された。乳酸は添加剤として安価であり、安全性も高いことが知られている。そこでこの P_{aldC} プロモーター活性の乳酸依存性を検証した。L-乳酸ナトリウムを培地に添加し、転写量の変動を定量 RT-PCR により測定した。L-乳酸ナトリウムの添加量に応じて転写産物量の増加が確認された。最適な制御条件については、現在検討中である。

(1) 繁ら 2017 年度生物工学会(2) Akasaka et al., J.Biosci.Bioeng., 119, 661 (2015)

Trial of heterogeneous gene expression in acetic acid bacteria

○Yasuyoshi Uekawa, Yuki Shige, Naoki Akasaka, Wakao Fukuda, Shinsuke Fujiwara
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ.)

Key words acetic acid bacteria, *Komagataeibacter europaeus*, expression system, bio-production

2Da05 リン脂質組成を改変した膜受容体-マグネトソーム複合体の開発

○藤本 一嗣, 田山 爽也華, 前田 義昌, 田中 剛, 吉野 知子
（農工大院・工）
y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

【背景と目的】磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 は細胞内にリン脂質二重膜で覆われた磁気微粒子（マグネトソーム）を合成する。これまでに、複数種類のヒト由来膜受容体のマグネトソーム膜上への発現に成功している。しかし、動物細胞膜上で発現する膜受容体と比較して、マグネトソーム膜上の膜受容体はリガンドとの親和性が低いことが分かっている。この原因の一つとして、原核生物である磁性細菌と動物細胞との膜組成の違いが考えられた。磁性細菌が合成する脂質膜には、動物細胞膜に豊富に含まれるホスファチジルコリン (PC)が存在しない。そこで、PC を含有するマグネトソームを生合成し、マグネトソーム上に発現した膜受容体の活性向上への寄与を評価した。
【方法】*Legionella pneumophila* 由来 PC 合成遺伝子 (*pcs*)、または *Azospirillum brasilense Az39* 由来 PC 合成遺伝子 (*pmt*)を磁性細菌で異種発現させた。獲得した形質転換体の乾燥菌体およびマグネトソームから脂質を抽出し、膜脂質解析を行った。また、膜受容体の 1 種である Thyroid Stimulating Hormone Receptor (TSHR)合成遺伝子と *pcs* を含むベクターを *M. magneticum* AMB-1 に導入し、PC 合成による TSHR のリガンド結合能への影響を評価した。
【結果と考察】*M. magneticum* AMB-1 への PC 合成遺伝子の導入により、細胞およびマグネトソームの膜脂質中に PC が含有されていることを確認した。また、PC 含有率は *pcs* 導入株で全脂質中の 30 %、*pmt* 導入株で 20 %程度であった。また、野生株をホストとした TSHR 発現株から抽出したマグネトソーム膜上の TSHR のリガンド結合能は、$Kd = 1.25\times10^{-7}$ M であったのに対し、PC 含有マグネトソーム上では $Kd = 2.50\times10^{-8}$ M であった。以上より、マグネトソーム膜上へ PC を合成し、リン脂質組成の改変を行うことで TSHR のリガンド結合能が向上することが示された。

Functional analysis of membrane receptor-magnetosome complexes by modifying phospholipid compositions

○Kazushi Fujimoto, Sayaka Tayama, Yoshiaki Maeda, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words magnetotactic bacteria, membrane modification, phosphatidylcholine, receptor

2Da06 細胞模倣膜を用いた界面活性剤刺激性評価に関する研究

○藤根 志帆 [1], 佐々木 陽介 [1], 下川 直史 [1], 辻野 義雄 [1,2], 高木 昌宏 [1]
（[1]北陸先端大・マテリアル, [2]岡山理大・経営）
takagi@jaist.ac.jp

【背景・目的】
界面活性剤の刺激性評価方法として、ウサギの眼に界面活性剤を点眼するドレイズ試験があるが、定量性は低く、動物愛護の面でも代替法の開発が望まれている。ここでは、生体模倣膜リポソームに界面活性剤を作用させ、リポソームの膜形態変化のダイナミクスを観察し、その変形パターンを通して刺激性評価の指標を見出す研究を行い、膜脂質と界面活性剤の相互作用と刺激性の相関について界面活性剤の分子形状に基づいて考察した。

【方法】
不飽和リン脂質 Dioleoyl-Phosphatidylcholine(DOPC)からなるリポソームを作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用い、リポソームの変形過程を観察した。界面活性剤は構造を系統的に変化させることができるポリオキシエチレンアルキルエーテル（POE）CH3(CH2)x(OCH2CH2)yOH(x が疎水基、y が親水基を示す)の中から(x, y) = (15, 20), (17, 20), (21, 5), (21, 10), (21, 20), (21, 30)計 6 種を使用した。膜変形ダイナミクスを解析し、膨張・収縮速度の測定を行った。

【結果・考察】
親水基が小さいとリポソームが膨張し、大きいとリポソームが収縮した。また、疎水基が小さいとリポソームが破裂し、大きいとリポソームが収縮した。先行研究より、膜面積（余剰面積）が増加するダイナミクスは高刺激性で、リポソームが収縮するダイナミクスは低刺激性であることがわかっている。疎水基と親水基がともに大きい場合に刺激性が低くなることが予想される。また、Flip-Flop しやすい界面活性剤は刺激性が強いと考えられ、疎水基が大きい場合は強い分子間力により、大きな親水基は疎水部を通過する際の障害となるため、Flip-Flop が阻害されると考えられる。これらの結果から界面活性剤の分子構造と刺激性の相関について分子の動きに基づき議論する。

Evaluation of irritation induced by surfactants using model cell membrane

○Shiho Fujine[1], Yosuke Sasaki[1], Naofumi Shimokawa[1], Yoshio Tsujino[1,2], Masahiro Takagi[1]
([1]Sch. Mater. Sci., JAIST, [2]Dept. Man., Okayama Univ. Sci.)

Key words cell membrane, surfactant, membrane lipids

2Da07 Characterization of Tryptamine-coupled resin for affinity purification of human IgG

○Michelle Rakotondravao[1], Naohiro Kuriyama[2], Noritaka Kuroda[2], Ryosuke Takahashi[2], Yumiko Sakoda[2], Jun-ichi Horiuchi[1], Yoichi Kumada[1]
([1]Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]YMC)
kumada@kit.ac.jp

The most exclusively utilized ligand is Protein A while it has shown some disadvantages such as its instability under alkaline condition, which lead in this research to develop a new alternative chemical ligand, Tryptamine. Previous researches have already demonstrated that the interaction occurs on the nucleotide binding site located on the Fab region of human IgG and indole group of Tryptamine. As the properties of Tryptamine against any matrix still remain unveiled, Epoxy-activated Sepharose 6B as well as CM Sepharose Fast Flow are chosen as support. Tryptamine coupled Sepharose 6B showed binding affinity of 13 mg/cm^3 resin at pH 8. In the presence of 0.5 M of NaCl in the binding buffer, the maximum binding capacity of human IgG is 27 mg/cm^{3}resin with a dissociation constant (K_d) of 4.4x10^{-6} M. Compared to those of Protein A-resin, these values are relatively low but we could admit that Tryptamine can be used as affinity ligand for binding of human IgG. As this performance is not yet satisfying, some modification of parameters as well as the IgG species will be investigated.

Characterization of Tryptamine-coupled resin for affinity purification of human IgG

○Michelle Rakotondravao[1], Naohiro Kuriyama[2], Noritaka Kuroda[2], Ryosuke Takahashi[2], Yumiko Sakoda[2], Jun-ichi Horiuchi[1], Yoichi Kumada[1]
([1]Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]YMC)

Key words Affinity Ligand, Tryptamine, human IgG

2Da08 エクソソームのアフィニティ分離を目指した単鎖抗体固定化担体の開発

○小林 巧, 新 裕太, 堀内 淳一, 熊田 陽一
（京工繊大院・工芸科学）
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、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、担体へ対する scFv 固定化手法、さらには scFv 固定化担体の抗原結合活性ならびに、それらを用いたエクソソーム分離性能について検討した。
【方法】エクソソーム膜上の CD ９を標的抗原とする scFv を使用した。物理吸着法、アミンカップリング法を利用して scFv をポリスチレンラテックス粒子上へ固定化し、それらの吸着挙動と、担体の分散性に対する影響を評価した。また、SPR センサーを用いて、作成した scFv 固定化担体の抗原結合活性およびエクソソーム分離性能についても評価を行った。
【結果と考察】物理吸着法またはアミンカップリング法により、scFv 固定化後、溶液中に残存している scFv 濃度を測定することによって、固定化された scFv 量を決定した。また、アミンカップリング法では、溶液の pH を変化させることにより最適な scFv 固定化条件を決定した。さらに、SPR センサーの結果から、固定化方法によって抗原結合活性に関しても差が生じることが明らかとなった。本発表では、作成した scFv 固定化担体を用いるエクソソーム分離の性能についても発表する。

Affinity separation of Exosomal vesicles using single-chain Fv-immobilized micro particles

○Takumi Kobayashi, Yuta Atarashi, Jun-ichi Horiuchi, Yoichi Kumada
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words Exosome, scFv, affinity separation, immobilization

2Da09 高親和性ウサギ scFv の開発とイムノクロマトグラフィへの応用

○中尾 貴一[1], 岡西 崚輔[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] 現在 Whole 抗体の代替物として検査薬への利用に scFv が期待されている。この scFv のスクリーニングは Phage display 法に基づくバイオパニング操作によって通常行われるが、経験的要素の大きなファクターが結果に大きく影響するため、検査に利用可能な scFv の選定には多大な労力を要する。そこで本研究では、多重膜リポソーム (MLVs) 及びポリスチレンチューブを利用した 3 種類の抗原固定化担体を用いてバイオパニング操作を行い、各 Round 毎の濃縮度合を評価した。さらに、単離された scFv のイムノクロマトグラフィへの利用可能性を考察した。

[実験] scFv Phage library (Library size= 2.14×107) を調製し，3 種類の抗原固定化担体を用いてバイオパニング操作を 4 Round 行った。各 Round 毎に間接 ELISA を行い、特異 scFv の濃縮を確認した。単離された 22 種類の scFv クローンを組換え大腸菌を用いて生産し、Ni-NTA カラムを用いて精製した。さらに、scFv を PS plate (Maxisorp) 及び NC 膜上に固定化し、固定化後の抗原結合活性を Sandwich ELISA 及び Dot-Blot Assay により評価した。

[結果と考察] 3 種類の分離担体全てにおいて 3 回以上のバイオパニング操作で特異ファージを濃縮でき、アミノ酸配列を網羅的に解析した結果、22 種類の異なる CDRH3 配列を有する scFv が単離されている事が確認された。得られた 22 種類の scFv クローンを組換え大腸菌を用いて生産・精製を行った結果、20 種類の scFv を回収可能であった。得られた 20 種類の scFv を NC 膜上に固定化し、抗原結合活性を評価した結果、イムノクロマトグラフィに利用可能な 7 種類のリガンド用 scFv を単離できた事が明らかとなった。

Development of high-affinity rabbit scFv for immunochromatography

○Kiichi Nakao[1], Ryosuke Okanishi[1], Koichi Takahashi[2], Shinya Ogasawara[2], Fumio Gondaira[3], Jun-ichi Horiuchi[1], Yoichi Kumada[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Denka, [3]Denka Seiken)

Key words scFv, Influenza virus, Biopanning, Immunochromatography

2Da10 ミックスモードクロマトグラフィを用いた治療用酵素ヒト Kynureninase の高効率分離

○杉山 友亮, 熊田 陽一, 堀内 淳一
（京工繊大・工芸科学）
kumada@kit.ac.jp

【背景と目的】ヒト Kynureninase(KYNase)は血中の L-Kynurenine を分解し、免疫系の働きを正常化することから新規癌治療薬として期待されている。[1)]本研究では KYNase の大量生産のために、大腸菌菌体内可溶性画分からの高効率分離プロセスの開発を目的とした。特に lysate 中の KYNase のキャプチャーステップにおいて、これまでの研究で実績の高いハイドロキシアパタイト(HA)を吸着分離担体として選定した。[2)]さらに、pH や塩濃度といった緒条件が KYNase の HA に対する吸脱着性に与える影響を評価し、操作条件の最適化を行った。
【方法】N 末端に 6xHis-tag を融合した野生型 KYNase をモデルとし、発現ベクターで形質転換した大腸菌 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、菌体内に活性型の KYNase を生産した。pH 及び塩濃度(NaCl 及び NaPO4)などの条件を種々に変化させ、各条件において大腸菌 lysate を HA と混合し、KYNase を吸着させた。吸着前後の酵素活性を測定し、その差と担体の体積から KYNase の吸着密度を求め、比較した。
【結果】HA と KYNase が共に安定な pH 範囲(6.5～9.0)で吸着密度を比較したところ、低 pH ほど増大することが明らかになった。また、pH6.5 において塩濃度(NaCl, NaPO4)を 0～1000 mM の範囲で変化させ、同様の実験を行った。その結果 NaCl 及び NaPO4 共に高濃度ほど KYNase の吸着密度は低下した。しかし、NaPO4 と比較して NaCl の影響は小さいことが明らかになった。今後は、HA 充填カラムを用いた精製操作を実施し、動的吸着容量の流速依存性、さらには夾雑成分の影響も評価する予定である。

1)Harold A. Walsh and Nigel P. Botting (2002)
2)Eur. J. Biochem. 269, 2069-2074

Efficient separation of therapeutic enzyme, human Kynureninase by mix-mode chromatography

○Yusuke Sugiyama, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words Kynureninase, hydroxyapatite, mix-mode chromatography, purification

2Da11 空間的環境が細胞の凝集，分散に与える影響

○瀬川 直矢, 上岡 惇也, 佐々木 啓, 紀ノ岡 正博
（阪大院・工）
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景及び目的】細胞挙動は，細胞基質間接着や細胞間接着に影響を受け，これらの空間的環境の違いによって，細胞分化の成熟度や幹細胞の分化指向性が変化する．例えば，間葉系幹細胞においては，ポリスチレン面上にポリアミドアミン鎖構造の分岐回数（世代数）5 のデンドリマーを提示した培養面（G5 面）において培養することで，遊走が活性化され，伸縮を繰り返す形態変化や細胞集塊の形成が確認されている．また，形成された集塊を新たな G5 面に集塊のまま播種すると，細胞が集塊から遊離，遊走，再集塊形成を経て，cardiac troponin T （cTnT） 陽性細胞率が上昇することが確認されている．上記の細胞集塊の分散，凝集は，細胞が通過した後の培養面上の基質の劣化が原因と考えられている．今回，シミュレーションの観点から細胞基質間接着と細胞間接着とこれらの挙動との関係を明らかにすることを目的とした．
【方法】我々は細胞の挙動（細胞基質間接着，細胞間接着，遊走）をモデル化した細胞培養シミュレータを構築している．これを用いて初期の細胞配置（集塊の状態，まばらに細胞が存在する状態）と細胞基質間接着と細胞間接着の強さを表すパラメータを様々な組み合わせでシミュレーションを行った．
【結果及び考察】初期条件ごとに定常状態における細胞群の配置がいくつかのパターンに分けられることが確認された．ここから，凝集体が形成される際と，凝集体が分散する際では，細胞基質間接着と細胞間接着のバランスが大きく異なり，G5 面で，細胞が集塊から遊離，遊走，再集塊形成する挙動には，基質の劣化や細胞間接着能の上昇の影響を受けていることが示唆された．

Influence of spatial environment on formation and collapse of cell aggregates

○Naoya Segawa, Junya Kamioka, Kei Sasaki, Masahiro Kino-oka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words simulation, cell morphology, cell-cell connection, cell-substrate connection

2Da12 FISH 法を用いたチャイニーズハムスター由来細胞における内部テロメア配列と染色体転座の解析

○イ ジュンホ, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史
（阪大院・工）
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】近年、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞は抗体生産の宿主として汎用されている。しかし、生産株構築には CHO 細胞のゲノム不安定性により長期間を要しているのが実情である。不安定の要因の一つが染色体転座による導入遺伝子の欠失であるが、転座が起こる CHO 細胞の染色体上の位置は明らかになっておらず、この解明が細胞株構築時間の短縮に繋がると考えられる。モデル生物における先行研究によると、内部テロメア配列（ITS）で染色体が転座する可能性が報告されている。そこで、本研究ではチャイニーズハムスター由来細胞における転座と ITS の関係性を解析し、転座が起こる染色体上の位置を解明することを目的とした。
【実験方法】培養期間が把握できていない CHO 細胞の代わりに当研究室にて樹立されたチャイニーズハムスター肺由来 CHL 細胞を用い、CHL 細胞の長期培養により細胞樹立後の ITS と転座の関係性を解析した。解析では、二種類の fluorescence in situ hybridization（FISH）法、multicolor FISH（mFISH）、one color FISH（FISH）で転座と ITS の観察を行い比較した。
【結果及考察】培養期間が上がるにつれて、CHL の染色体と ITS の数に変化が見られなかったにもかかわらず転座の数は急激に上昇した。同様に、転座が発生した場所の ITS が増加したことから、CHL 細胞において ITS にて多くの転座が発生し、これがゲノム安定性のカギとなっていることが示された。比較のために長期培養した CHO 細胞株では、CHL 細胞と同様に多くの転座が ITS で発生していることが明らかとなった。しかし、ITS により発生した転座の比率は CHO 細胞株ごとに異なり、ITS が転座に与える影響は細胞株によって異なることが示唆された。

Analysis of the interstitial telomeric sequences and chromosomal translocations in Chinese hamster-derived cell lines using fluorescence *in situ* hybridization

○Junho Lee, Noriko Yamano-Adachi, Yuichi Koga, Takeshi Omasa
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Chinese hamster ovary cells, chromosomal translocation, FISH, Chinese hamster lung cells

2Ea01 質量分析イメージングによる発酵過程における紅麹二次代謝物の可視化技術の確立

○南 牧歩[1], 比嘉 悠貴[2], 福崎 英一郎[1], 新間 秀一[1]
（[1]阪工大院・工, [2]小林製薬中央研究所）
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

紅麹は，中国や台湾などのアジア圏で 1000 年以上発酵食品の原料として使用されてきた非常に歴史のある食材である．また紅麹菌は有用な二次代謝物を豊富に生産しており，紅麹は食品用色素としての利用だけでなく栄養補助食品や健康食品としても注目を集めている．
発酵が進むにつれて紅麹が赤色を呈色する理由は，紅麹菌の有性生殖の際に生じた子嚢胞子が成熟するにつれて赤く呈色することに由来する．子嚢胞子が呈色する際に二次代謝物が生成されると考えられているが，実際に発酵過程の紅麹菌において，どこで，どのように二次代謝物が生成されるのかは未だ明らかになっていない．
そこで，本研究では，質量分析イメージング法（MSI: mass spectrometry imaging）を用いて紅麹米における二次代謝物（モナコリン K，モナスシン，ルブロパンクタミン）の局在情報の時間変動を観測することを最終目標として当該物質群の組織内の局在可視化技術を確立すること目的とする．
イメージング質量分析法（MSI）は，標識を用いずに一度の測定で複数の化合物を同時に検出できることから，複数の二次代謝物の局在を一斉可視化することに有用であると考えられる．そこで本研究では，MSI を用いて紅麹米における発酵過程での二次代謝物の可視化を行った．
その結果，モナコリン K は発酵が進むにつれて表面から内部へと蓄積されていく様子が観測された一方で，色素成分（モナスシン，ルブロパンクタミン）は紅麹菌の子嚢胞子が多く存在する部分に蓄積しており，モナコリン K と色素成分との間で局在に違いが見られるということが判明した．このことから，紅麹米の発酵過程における二次代謝物の生成には子嚢胞子が深くかかわっており，今後子嚢胞子周辺において MSI を用いた可視化を行うことで紅麹菌の二次代謝メカニズムが明らかになると考えられる．

Establishment of the techniques for vizualization of secondary metabolites in beni-koji during fermentation using mass spectrometry imaging

○Makiho Minami[1], Yuki Higa[2], Eiichiro Fukusaki[1], Shuichi Shimma[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol., [2]R&D Center, Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd,)

Key words MALDI-imaging mass spectrometry, beni-koji, secondary metabolite, fermentation

2Ea02 メタボロミクスに基づくテンペ発酵過程における成分の経時的変動解析

○南部 洋輔, Putri Sastia Prama, 福崎 英一郎
（阪大院・工・生命先端）
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

テンペは, 皮を剥き, 茹でた大豆にクモノスカビ(*Rhizopus* spp.)と呼ばれる糸状菌を繁殖させたインドネシアの伝統発酵食品である. テンペは, 18 世紀からジャワ島で始まり, 今日に至るまで生産されているが, インドネシアでは主なタンパク源として親しまれてきた. 近年, そのタンパク含量の高さから, 肉の代用品としても注目されており, 現在では様々な国で製造されている. テンペには, 製造過程と発酵状態の微細な違いによって様々な種類が存在し, それらは質感や味といった特徴が異なると考えられ, 発酵過程では 食品の品質に寄与する様々な代謝物が生成されると言われている. 現在, テンペの健康的な効能についての研究が数多く報告されているが, 製造過程や発酵状態の違いに着目した研究は無い.
メタボロミクスは食品科学において, 製品の品質や安全性, そして製造過程が与える影響を評価するためのツールとして広く用いられており, これまで醤油や味噌といった大豆発酵食品において, メタボロミクスを用いた成分プロファイリングに関する研究が報告されている.
よって本研究では, テンペの発酵過程におけるメタボロームの経時的変動を GC/MS 分析により追跡し, テンペの発酵過程における代謝物変化の特徴を明らかにすることを目的とした.
その結果, クエン酸回路や糖類の代謝に関する化合物が発酵の後期に多く含まれていることが分かり, *Rhizopus* 種の発酵過程における異化代謝が見られた. また, 食品の味や機能に寄与する成分が発酵中に増加することが確認でき, テンペの製造過程において, 発酵が品質に関わる重要な段階の一つであることが示唆された.

Metabolomics-based time-course analysis of the component changes during tempe fermentation

○Yosuke Nambu, Sastia Prama Putri, Eiichiro Fukusaki
(Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan)

Key words food analysis, fermentation, metabolomics, GC/MS

2Ea03 Optimization of processing method to increase amino acid content in *Tempe*, an Indonesian fermented food

○Hadi Akbar Dahlan, Sastia Prama Putri, Eiichiro Fukusaki
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Tempe is a solid-state fermented soybean food originated from Indonesia. It is famous for its ability to provide complete amino acid nutrition at a low cost. *Tempe* has been reported to promote several health benefits, such as lowering of cholesterol and triglyceride levels and decrease blood sugar levels. To further improve nutritional benefits of *tempe*, it is important to optimize *tempe* processing methods. The objective of this study is to improve amino acid content in tempe by modifying the processing method. In this study, 3 factors (sonication time, initial soaking temperature and fermentation time) were selected as possible factors in improving *tempe*'s production process. Response surface methodology was used to describe possible interaction between the 3 factors in improving amino acid content. Untargeted analysis using GC/MS was firstly conducted and the result was validated with targeted amino acid analysis via LC-QTOF/MS. Based on the result, the interaction between the 3 factors was able to increase selected amino acids . Among the three factors, fermentation time was able to improve histidine, alanine, glutamine and tyrosine in *tempe* with statistical significance.

Optimization of processing method to increase amino acid content in *Tempe*, an Indonesian fermented food

○Hadi Akbar Dahlan, Sastia Prama Putri, Eiichiro Fukusaki
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *tempe*, amino acid, processing, metabolomics

2Ea04 モンゴル乳製品由来乳酸菌がコレステロール代謝に与える影響

○宮本 侑子[1], 峯崎 美歌子[1], 李 怡然[2], 竹下 正彦[2], 有馬 勇夫[2], Tsend-Ayush Chuluunbat[3], Oyunsuren Tsendsuren[4], 小川 健二郎[5], 西山 和夫[1], 山﨑 正夫[1]
（[1]宮崎大・農, [2]南日本酪農共同（株）, [3]蒙科技大, [4]蒙バイオ協会, [5]宮崎大・TT推進機構）
myamasaki@cc.miyazaki-u.ac.jp

【背景・目的】
コレステロール低下作用を持つ機能性素材の一つとして乳酸菌が注目されている。これまでに我々はモンゴルの伝統的な乳製品から分離したプロバイオティクス性を持つ乳酸菌株のコレステロール吸着能、胆汁酸吸着能および胆汁酸脱抱合能を評価してきた。本研究ではこれらの試験で有用性を認めた株がコレステロール代謝に与える影響についてマウスを用いて評価した。
【方法】
Balb/c マウスを 1 週間の予備飼育の後、通常食群（NC）、通常食に *Lactobacillus plantarum* 06CC2 株（5%）を添加した群（NC+L）、高コレステロール（0.5%）負荷群（HC）と HC に 06CC2 株を添加した群（HC+L）と未添加群を設定した合計 4 群に分けた。食餌は AIN-93G に準拠して調製し、3 週間飼育の自由摂食とした。屠殺後、肝障害を血清 AST, ALT 活性を指標に測定し、血清および肝臓コレステロール、HDL-コレステロール（血清のみ）、トリグリセリドを測定した。また、糞中コレステロール、胆汁酸を酵素比色法、短鎖脂肪酸を GC 法にて測定した。
【結果・考察】
血中コレステロールは高コレステロール (HCD) 群で上昇したが、HCD と HCD +L 群間に有意差は認められなかった。肝臓コレステロールは HCD 群より HCD +L 群で有意に低く、肝臓トリグリセリド及び肝障害の程度は HCD 群より HCD +L 群で低い傾向が認められた。一方、糞中コレステロールおよび総胆汁酸排泄量は HCD 群より HCD+L 群で有意に低かった。また、HCD+L 群では糞中酪酸濃度が有意に上昇していたが、酢酸、プロピオン酸濃度には影響が認められなかった。これらの結果から、06CC2 株は体内コレステロールプールを低下させることが示唆されたが、コレステロール排泄系の亢進に起因するものではないことが示唆された。

Effect of *Lactobacillus plantarum* derived from Mongolian dairy product on the cholesterol metabolism in mice.

○Yuko Miyamoto[1], Mikako Minezaki[1], Yiran Li[2], Masahiko Takeshita[2], Yuo Arima[2], Chuluunbat Tsend-Ayush[3], Tsendsuren Oyunsuren[4], Kenjiro Ogawa[5], Kazuo Nishiyama[1], Masao Yamasaki[1]
([1]Fac. Agric., Univ. Miyazaki, [2]Minami Nippon Dairy CO-OP Co. Ltd., [3]Mongolian Univ. Sci. Technol., [4]Mongolian Biotechnology Association, [5]Organization for Promotion of Tenure Track, Univ. of Miyazaki)

Key words lactic acid bacteria, cholesterol, bile acid

2Ea05 焼酎粕を用いた麹菌培養物(FPS)がコレステロール代謝に及ぼす影響

○加藤 寛隆[1], 小境 敏揮[2], 章 超[2], 河野 邦晃[2], 岩井 謙一[2], 髙瀬 良和[2], 小川 健二郎[3], 西山 和夫[1], 山崎 正夫[1]
（[1]宮崎大院・農, [2]霧島酒造, [3]宮崎大・テニュアトラック推進機構）
myamasaki@cc.miyazaki-u.ac.jp

【背景と目的】焼酎は宮崎県の特産品の一つであり、焼酎粕は焼酎の製造工程において生成される副産物である。これまでに我々は、焼酎粕から固液分離した液体で麹菌を培養させた麹菌培養物(fermented products : FPS)が通常食飼育下でマウスのコレステロール低下作用を持つことを示した（小境ら、2019）。そこで、本研究では高コレステロール食負荷下での FPS 摂食がコレステロール代謝に及ぼす影響を検証した。
【方法】AIN-93G に準拠した通常食および 10％FPS 混合食、また、それらに 0.5％コレステロールを混合したものを C57BL/6N マウスに給餌して 8 週間飼育した。屠殺後、臓器重量、血漿中の脂質および肝臓脂質、肝機能、糞中のコレステロール排泄に関するパラメーターを測定した。また、肝臓でのコレステロール代謝に関連するタンパク質の発現を評価した。
【結果と考察】通常食摂取マウスにおいて FPS により体重増加抑制と血漿コレステロールの有意な減少が認められた。一方で、FPS は高コレステロール食摂取マウスにおいては血漿および肝臓総コレステロールを有意に増加させたが、コレステロール代謝に関わるタンパク質の発現には影響しなかった。高コレステロール食摂取マウスにおいて FPS はコレステロールの排泄を促進しており、コレステロール蓄積の亢進作用とは矛盾していた。また、FPS による肝臓でのトリグリセリドレベルの減少効果が明らかとなった。
これらの結果から、FPS 摂食によるコレステロールの排泄促進効果が認められたが、有用素材としての利用法にはさらなる作用機序の解明が必要と考えられた。

Effect of dietary fermented products (FPS) derived from *shochukasu* on the cholesterol metabolism in mice

○Hirotaka Kato[1], Toshiki Kosakai[2], Cho Sho[2], Kuniaki Kawano[2], Ken-ichi Iwai[2], Yoshikazu Takase[2], Kenjiro Ogawa[3], Kazuo Nishiyama[1], Masao Yamasaki[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Univ. Miyazaki., [2]Kirishima Shuzo, [3]TT. univ. Miyazaki.)

Key words *Aspergillus luchuensis*, FPS, cholesterol

2Ea06 レスベラトロールおよびその重合体の血管保護作用

○寺門 和奏[1], 里中 健太[1], 宮崎 均[2], 吉田 滋樹[2]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生命環境系）
yoshida.shigeki.gf@u.tsukuba.ac.jp

【背景と目的】動脈硬化は血管内皮細胞(EC)が生活習慣の悪化により発生する活性酸素種によって障害を受けることで発症する。すなわち、EC の酸化ストレス抵抗性、創傷治癒能を高めることが動脈硬化の予防に繋がる。ブドウ葉中に含まれるレスベラトロール(Res)はガン細胞の増殖抑制効果や、抗炎症作用などの生物活性を有していることが報告されている。Res は EC においても酸化ストレス抵抗性、創傷治癒能を高めるという報告がなされている。一方、その重合体に関しては、その作用について十分に研究されていない。本研究では、Res 重合体を精製し、EC に対する血管保護作用を明らかにすることを目的とした。
【方法】ブドウ葉抽出物(Vineatrol®)を DIAION HP20 カラムクロマトグラフィーで粗分画した後、各重合体をシリカゲル 60 および、HPLC(ODS)を用いて精製した。精製後、^{1}H-NMR、LC-MS を用いて構造を確認した。細胞保護機能は H_2O_2 による酸化ストレス条件下での細胞生存率にて評価した。EC を各化合物存在下で培養した後に化合物含有培地を除去した。次いで H_2O_2 を添加した培地でさらに 24 時間培養を行った。培養後全細胞を回収し、トリパンブルー染色にて細胞生存率を測定した。創傷治癒能は疑似傷を作成し、24 時間後の傷中の細胞数を測定することで評価した。
【結果と考察】各化合物を 1～30 μM の濃度で添加し、最も効果的な濃度を検討した結果、酸化ストレス抵抗性および創傷治癒能どちらにおいても Res および二量体は 10 μM、三、四量体は 1 μM で最も有効に作用した。すべての化合物を各々の最も効果的な濃度で作用させると、酸化ストレス抵抗性、創傷治癒能共に化合物の重合度が大きいほど血管保護作用が高まることが明らかとなった。

Effects of resveratrol and its oligomers on vascular endothelial cell

○Wakana Terakado[1], Kenta Satonaka[1], Hitoshi Miyazaki[2], Shigeki Yoshida[2]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Faculty Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words resveratrol, endothlial cell, wound healing, oxidative stress

2Ea07 *Lactobacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシン生合成遺伝子の同定および分子解析

○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生合成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 $_{,}C_{18}$ 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、既知バクテリオシンの plantaricin A, NC8β および F と相同性を示したので、これら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生合成遺伝子は、*L. plantarum* の 8P-A3 株および J51 株の *pln* locus と同様の遺伝子クラスターを有していると考えられた [1)]。そこで、それらのゲノム情報を参考にプライマーを設計し、primer walking を行い、PUK6 株の plantaricin 遺伝子群 *pln* locus（約 20 kb）の塩基配列を決定した。また、InterPro を用いたドメイン解析を行った結果、この *pln* locus 上に推定のバクテリオシン様遺伝子およびその免疫タンパク質様遺伝子をさらに見出した。現在、各遺伝子の機能解析を進めている。

1) Tsapieva A, *et al*. (2011) Structure of plantaricin locus of *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. Benef. Microbes, 2, 255-261

Identification and molecular 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

2Ea08 たくあん漬けから分離した *Lactococcus lactis* PJR24 が生産するバクテリオシンの特性

○高橋 孝太郎[1], 如田 奈津美[2], 河原 あい[1], 松崎 弘美[1,2]
（[1]熊本県大院・環境共生, [2]熊本県大・環境共生）
matusaki@pu-kumamoto.ac.jp

【目的】乳酸菌が生産する抗菌性物質バクテリオシンは、安全な天然の食品保存料として期待されている。バクテリオシンの中で唯一食品保存料として使用が認められているナイシン A は、酸性領域でのみ安定で、グラム陰性菌に対しては単独では抗菌活性を示さない。そのため、新たな特徴をもつ新規バクテリオシンの探索が重要である。本研究では、日本の伝統的発酵保存食品のたくあん漬けから分離した乳酸菌が生産するバクテリオシンの特性を調べることを目的とした。
【方法および結果】たくあん漬けからバクテリオシン生産乳酸菌を 4 株分離した。これらの株の培養液上清の抗菌スペクトル、16S rRNA 遺伝子解析、ナイシン構造遺伝子に特異的なプライマーによる PCR の結果から、4 株のうちの 3 株をナイシン Z 生産菌 *Lactococcus lactis* と同定した。残り 1 株についても 16S rRNA 遺伝子解析により *Lactococcus lactis* PJR24 と同定・命名した。PJR24 株はナイシン以外のバクテリオシンを生産すると予想されたため、*L. lactis* が生産する代表的な 10 種類のバクテリオシン構造遺伝子（lacticin 3147, Q, RM および lactococcin A, B, 972, 513, M, G, Q）に特異的なプライマーを用いた PCR を行ったが、特異的増幅は見られなかった。そこで、PJR24 株のバクテリオシンを同定するため、本株の培養液上清について、硫安沈澱、透析、逆相 HPLC などによるバクテリオシンの精製を進めている。

Characterization of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* PJR24 from pickled Japanese radish

○Koutaro Takahashi[1], Natsumi Nyota[2], Ai Kawahara[1], Hiromi Matsusaki[1,2]
([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

Key words bacteriocin, lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis*

2Ea09 スサビノリ由来硫酸化多糖体ポルフィランの抗炎症作用に関する研究

柳戸 彩奈, 山口 健一, ○小田 達也
（長崎大院・水産環境）
t-oda@nagasaki-u.ac.jp

【背景と目的】スサビノリ(*Pyropia yezoensis*)は海苔の原料であるが，ノリ養殖現場では環境の栄養塩不足等に起因する商品価値の無い色落ちノリ問題がしばしば発生している。色落ちノリの有効利用との観点から、色落ちノリに含まれる硫酸化多糖体ポルフィランの生理活性について検討した結果、色落ちノリ由来ポルフィランは LPS 刺激マウスマクロファージ RAW264.7 細胞からの一酸化窒素(NO)産生を抑制する事を見出している。本研究では，ポルフィランの in vivo の効果を検討すると共にラジカル分解による低分子化と分解物の生理作用についても検討した。
【方法】乾燥ノリ粉末から熱水抽出したポルフィラン画分は DEAE イオン交換クロマトにより精製した。in vivo の効果はマウス(ddY, 5 w)に対する LPS 致死作用抑制効果で検討した。一酸化窒素(NO)は Griess assay により、tumor necrosis factor (TNF)-α は ELISA により測定した。RAW264.7 細胞の破骨細胞への誘導は receptor activator of nuclear factor κB ligand (RANKL)を用いた。ラジカル分解はアスコルビン酸と過酸化水素により行った。
【結果と考察】LPS と共にポルフィラン尾静脈投与したマウスの生残率は LPS 単独投与に比べ顕著に上昇し、ポルフィラン投与群の血漿 TNF-α も低下した。生育状態が異なる 4 種色落ちノリから得られたポルフィランの分子量分布及び抗炎症作用は異なり、低分子画分がより強い活性を示す傾向であった。ラジカル分解により、いずれのポルフィランも低分子化し、それに伴い抗炎症活性が上昇した。RANKL による RAW264.7 細胞の破骨細胞への誘導抑制効果も低分子化により上昇し、最も低分子量のポルフィランのラジカル分解物が最も強い抑制 1 を示した。以上の結果から、ポルフィランの抗炎症作用には分子サイズが重要であると推定された。

Anti-inflammatory activities of sulfated polysaccharide porphyran isolated from red alga *Pyropia yezoensis*

Ayana Yanagido, Kenichi Yamaguchi, ○Tatsuya Oda
(Grad. Sch. Fish. Sci. Environ. Stud., Nagasaki Univ.)

Key words inflammation, macroalga, marine environment, mechanism

2Ea10 麹菌培養物に由来する腸炎に有効な機能性分子の探索

○Danshiitsoodol Narandalai, 野田 正文, 東川 史子, 杉山 政則
（広島大院・医系学・未病予防医学共同研究講座）
sugi@hiroshima-u.ac.jp

【背景と目的】日本には, 麹菌や酵母などを利用した醗酵食品がある。「麹菌」を始めとする醸造微生物は, 味噌, 醤油などを生み出し, 日本人の食生活と健康に大きく貢献してきた。このため, Aspergillus (A.) oryzae のほか, A. sojae や A. luchuensis などの製造に利用される麹菌は国の宝物として 2006 年に「国菌」と呼ぶことを提唱した。
本研究では, これらの麹菌株の培養培地と培養条件を詳細に検討した結果, 液体培養液や固体培養物の水抽出液中に, きわめて高い保健機能性を持つ代謝産物の存在が確認された。
一方で、病原細菌による食中毒や腸炎の発生件数は増加の一途を辿っており, それらの病態の深刻さも問題となっている。本研究では, 細菌性腸炎モデル細胞を用い、麹菌を固体培養したのちの水抽出物中に, その感染・炎症を抑制する活性があるか否か、調査した。
【方法】A. oryzae S-03, A. sojae No. 9, A. luchuensis SH-41 をそれぞれ穀類や豆類を培地として固体培養し, 得られた各種麹に 3 倍量の蒸留水を加え, 室温にて抽出し, フィルター除菌したものを評価用サンプルとした。
腸管上皮細胞モデルとして, ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞を用いた。1 x 10^6cells/ml の Caco-2 細胞を 24 well plate に播種し 10% FBS を含む DMEM 培地で培養した。72h 培養後, 5%の麹エキスを含む DMEM 培地で 30 min インキュベートしたのち, 病原性サルモネラ菌もしくは黄色ブドウ球菌で腸管炎症を誘発させた。さらに, 24h 培養を続けたのち, Caco-2 細胞の生存率を測るとともに, 炎症サイトカインである IL-8 の分泌量を ELISA 法で評価した。
【結果と考察】A. oryzae S-03 や A. sojae No. 9 を用いた米、麦、そら豆麹の抽出液には, IL-8 の発現を阻害する活性が認められた。なお, A. oryzae S-03 麹抽出に含まる IL-8 の発現を抑制する物質は熱処理（100rpm°C, 10min）に不安定であった。

Koji-derived substances effective to the pathogen induced gastroenteritis in vitro

○Narandalai Danshiitsoodol, Masafumi Noda, Fumiko Higashikawa, Masanori Sugiyama
(Dept. Probiotic Sciences for Prev. Med, ., Grad Sch. Biomed. and Health Sc., Hiroshima Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, Caco-2 cells, IL-8

2Ea11 *Lactobacillus antri* が産生するメンブランベシクルの IgA 産生促進作用の解析

○佐々木 晴菜 [1], 仲田 真穂 [1], 前田 新一 [2], 雑賀 あずさ [3], 國澤 純 [3], 片倉 啓雄 [2], 山崎 思乃 [2]
（[1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工, [3]医薬基盤研究所）
shino.ya@kansai-u.ac.jp

【背景と目的】 細菌が放出するメンブランベシクル（MV）と呼ばれる膜小胞は、細菌間の情報伝達のみならず、宿主の免疫調節に関与するが、既往の MV 研究はグラム陰性菌や病原性のグラム陽性菌で先行しており、プロバイオティクスによる MV 産生の理解は進んでいない。我々は乳酸菌 *Lactobacillus antri* JCM 15950 の菌体が、マウスパイエル板細胞からの IgA 産生を促進することを見出しており、本研究では、本菌株の MV の産生とその IgA 産生促進作用について解析した。
【方法】 *L. antri* JCM 15950 は MRS 培地で 24 時間、37℃で静置培養した。培養液を遠心分離（8,500×g, 5 min, 4℃）し、上清をフィルターろ過（0.22 μm）した。超遠心分離（100,000×g, 1 h, 4℃）により得られた沈殿を 45% (w/v) OptiPrep で懸濁し、40～10%(w/v)の OptiPrep を重層して、密度勾配超遠心分離（100,000 ×g, 6 h, 4℃）により MV を精製した。IgA 産生促進作用は、BALB/c マウスの小腸からパイエル板を採取し、コラゲナーゼ処理にて分離したパイエル板細胞を用い、37℃で 4 日間培養した後、上清中の IgA 産生量を ELISA 法で定量することで評価した。
【結果と考察】 密度勾配超遠心分離により得られた各画分を透過型電子顕微鏡で観察したところ、ある画分に直径 50～200 nm の二重膜に覆われた中空の球状構造体が見られた。また、この画分はタンパク質および核酸を含み、本菌株は MV を産生することがわかった。また、IgA 産生促進作用は、MV が集積した画分にのみ認められた。一方、本菌株の IgA 産生促進作用はグラム陽性菌の細胞壁成分をリガンドとする toll-like receptor 2 を介してもたらされることから、MV にもこれらの菌体成分が存在していると推測される。現在、リポテイコ酸およびリポタンパク質を精製し、その免疫賦活作用の検証と MV における局在の解析を進めている。

Analysis of IgA-enhancing effects of membrane vesicles produced by *Lactobacillus antri*

○Haruna Sasaki[1], Maho Nakada[1], Shin-ichi Maeda[2], Azusa Saika[3], Jun Kunisawa[3], Yoshio Katakura[2], Shino Yamasaki-Yashiki[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [3]NIBIO)

Key words immunostimulation, membrane vesicle, IgA, lactic acid bacteria

2Ea12 *Lactobacillus sakei* 由来メンブランベシクルによる IgA 産生促進メカニズムの解明

○三好 柚紀 [1], 井谷 彩乃 [2], 雑賀 あずさ [3], 長竹 貴広 [3], 松永 安由 [3], 國澤 純 [3], 片倉 啓雄 [2], 山崎 思乃 [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】細菌の多くはタンパク質や核酸、細胞壁成分などを含むメンブランベシクル（MV）と呼ばれる膜小胞を産生する。我々は、日本酒生酛由来の乳酸菌 *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* NBRC 15893 の産生する MV が、TLR2 を介してマウスパイエル板細胞からの IgA 産生を促進することを見出し、腸管での感染防御や腸内フローラの維持に影響する可能性を指摘した。本研究では、MV がパイエル板細胞から IgA 産生を促進するメカニズムを解明することを目的とし、MV の標的細胞と IgA 産生促進に関与するサイトカイン類の特定を試みた。
【方法】*L. sakei* は 30℃で 24 時間培養した。培養上清をフィルターろ過（0.45 μm）後、超遠心分離（100,000×g, 1 h）により MV を回収し、OptiPrep を用いた密度勾配超遠心分離（100,000×g, 6 h）で精製した。パイエル板細胞は、BALB/c マウスの小腸からパイエル板を採取し、コラゲナーゼ処理により調製した。骨髄由来樹状細胞（BMDC）は、マウスの大腿骨および脛骨より採取した骨髄細胞から 20 ng/mL GM-CSF で誘導した。細胞培養は 5%CO_2 存在下、37℃で行った。
【結果と考察】MV の標的細胞を特定するため、磁気ビーズ標識抗 CD11c 抗体を用いたネガティブセレクション法により樹状細胞（DC）をパイエル板細胞から除去して MV を添加すると、IgA 産生促進作用は消失した。これより、パイエル板細胞からの IgA 産生促進には DC の TLR2 を介した MV の認識と DC の活性化が重要であることがわかった。次に、IgA 産生を促進するサイトカイン類を特定するため、BMDC に MV を添加し、関連遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により調べた。その結果、IL-6、IL-10、誘導型一酸化窒素合成酵素、レチナール脱水素酵素 2 の発現量が増加し、MV がパイエル板細胞で IgA クラススイッチ組換えおよび抗体産生細胞への分化を促進することが示唆された。

Analysis of IgA-enhancing mechanism by membrane vesicles derived from *Lactobacillus sakei*

○Yuki Miyoshi[1], Ayano Itani[2], Azusa Saika[3], Takahiro Nagatake[3], Ayu Matsunaga[3], Jun Kunisawa[3], Yoshio Katakura[2], Shino Yamasaki-Yashiki[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [3]NIBIOHN)

Key words membrane vesicles, lactic acid bacteria, immunoglobulin A

2Fa01 ^{13}C 代謝フラックス解析に基づくシアノバクテリアの単波長光照射下に対する応答解析

○山本 千晶, 北村 さや香, 豊島 正和, 戸谷 吉博, 清水 浩
（阪大院・情報）
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】シアノバクテリアは照射光の波長に応じてエネルギー移動プロセスを調節している。よって、光波長の変化により光合成による ATP と NADPH の合成速度が変化するが、代謝状態を変化させることで細胞内の ATP と NADPH の割合を一定に保っていると考えられる。本研究では様々な波長の照射光条件下において生育した細胞の ^{13}C 代謝フラックス解析を行うことで、光波長の変化に対する ATP と NADPH の合成と消費速度の変化を明らかにし、ATP と NADPH を一定に保つための代謝と光合成の応答を定量的に理解することを目指した。
【方法と結果】*Synechocystis* sp. PCC 6803 を研究対象とし、5 mM[1,2-^{13}C]グルコースを添加した改変 BG11 培地(50 mL)で培養した。光条件は 100 μE/m^{2}sec 白色光、青色光(470 nm)、赤色光(630 nm, 680 nm)とした。菌体のタンパク質構成アミノ酸を GC-MS により分析し、代謝フラックス分布を OpenMebius [Kajihata 2014]により決定した。100 μE/m^{2}sec の各色光下で酸素電極を用いて酸素発生速度を計測した。
^{13}C 代謝フラックス解析の結果より、青色光条件と赤色光(680 nm)条件における CO_2 固定反応のフラックスは他の光条件に比べて低かった。酸化的ペントースリン酸経路のフラックスが青色光条件と赤色光(680 nm)条件のみにおいて見られた。青色光条件と赤色光(680 nm)条件では光合成からの NADPH 供給が減少したことで CO_2 固定反応のフラックスが低下し、不足分を補うために酸化的ペントースリン酸経路が活性化されたことが示唆された。代謝フラックス分布から暗反応全体での ATP と NADPH の生産と消費速度を算出し、生産速度と消費速度の差分から光合成による ATP と NADPH の生産速度を推定した。酸素発生速度から推定した光合成による ATP と NADPH の生産速度と比較することで、光合成における電子のフラックス状態を推定した。

Response analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under single-wavelength light by ^{13}C Metabolic flux analysis

○Chiaki Yamamoto, Sayaka Kitamura, Masakazu Toyoshima, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words cyanobacteria, metabolic flux analysis

2Fa02 クラブトリー陽性および陰性の差異に基づく酵母代謝のプロファイルの比較

○井村 誠[1,2], 新田 克章[2], 岩切 亮[1], 松田 史生[3], 清水 浩[3], 福﨑 英一郎[2]
（[1]三菱商事ライフサイエンス, [2]阪大院・工, [3]阪大院・情報）
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

クラブトリー効果とはグルコースが一定濃度以上存在する場合，十分な溶存酸素濃度があっても酸素を最終電子受容体として利用せずに解糖系のみを利用するエネルギーマネージメントであり，*Saccharomyces cerevisae* で顕著に観察される．クラブトリー効果が発生すると対糖菌体収率が低下するため，生産現場ではクラブトリー効果をいかに回避するかが重要な課題である．回分培養の結果，クラブトリー陽性の *S. cerevisiae* は陰性の *Candida utilis* に比べ，比グルコース消費速度が高いにも関わらず，菌体収率が低下し，大量のエタノールを生産した．これらの現象による代謝レベルの影響を調べるために，LC-MS/MS と GC-MS を用いて，回分培養の各増殖段階での両酵母のメタボローム解析を実施した．代謝物量が表現型と密接に関係していることから，メタボロミクスは精密表現型解析に用いられ，異なる表現型の代謝物の比較により，その表現型を反映する代謝メカニズムの理解につながる．主成分分析の結果，PC1 に沿って *S. cerevisiae* と *C. utilis* の違いで分かれた．PC1 の分離はクラブトリー効果が酵母に与えた影響と考察でき，この分離には解糖系や TCA サイクル中の NADH 生成に関連する代謝物が貢献しており，これらの代謝物量は *S. cerevisiae* は *C. utilis* より低くなった．一方で，比グルコース消費速度を高く維持するためには、グルコース利用に必須の NAD^+を枯渇させてはいけない．そのために *S. cerevisiae* はエタノールを生産し，NADH を酸化していることが解析結果から改めて支持された。結果として，*S. cerevisiae* と *C. utilis* の間で NADH の比生産速度に違いが見られなかった．本研究において，クラブトリー効果によって崩れた NAD^+/NADH が中央代謝に与える影響を明らかにし，*S. cerevisiae* ではエタノールを生産することで NAD^+/NADH の比率を調整している可能性を示した．

A comparison of metabolic profiles of yeasts based on the difference of the Crabtree positive and negative

○Makoto Imura[1,2], Katsuaki Nitta[2], Ryo Iwakiri[1], Fumio Matsuda[3], Hiroshi Shimizu[3], Eiichiro Fukusaki[2]
([1]Mitsubishi Corporation Life Sciences Ltd., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [3]Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words metabolomics, Crabtree effect, NAD^+/NADH, batch culture

2Fa03 LC-MS を用いたアミノ酸鏡像異性体の高速分析に資するクロマトグラフィー条件の改良

○吉川 航平, 古野 正浩, 田中 信男, 福﨑 英一郎
（阪大院・工）
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景】
アミノ酸には L-アミノ酸，D-アミノ酸と呼ばれる鏡像異性体が存在する．近年のキラル分離，分析技術の進展によって，D-アミノ酸の生理機能の研究が医療，食品を初めとする様々な分野で始められている．D-アミノ酸の生理機能を効率よく検証し，これら研究を更に進捗させていくためには，D-アミノ酸分析手法のスループットの向上が期待される．当研究室ではこれまでに，キラルカラム CROWNPAK CR-I(3.0 mm i.d.×15 cm，5 μm particle size) (Daicel CPI，Osaka，Japan) 及び液体クロマトグラフィー-飛行時間型質量分析計 (LC-TOFMS) を用い，誘導体化することなく，アミノ酸の鏡像体分離・分析を行い，グリシン及び 18 種タンパク質構成アミノ酸鏡像異性体の一斉分析を 10 分以内で達成することに成功した[1]．そこで本研究では，本分析法を改良してスループットの更なる向上を試みた．
【方法】
カラム長を 15 cm から 5 cm に短縮することにより，スループットの向上を試みた．しかしカラム長の縮小は分離度の低下を招く．これを解決するために充填剤粒子径を直径 5 μm から 3 μm に微小化，さらにカラム外体積に起因する分散を軽減するために配管径を縮小した．
【結果】
充填剤粒子径の縮小によりカラム効率が向上され，各分析種（Analyte）の分離が改善された．また，カラム外分散の低減は，充填剤粒子径縮小の効果が小さかった，早期に溶出する分析種の分離の改善に特に貢献した．結果として，グリシン及び 15 種タンパク質構成アミノ酸鏡像異性体の一斉分析を 1 分以内で，グリシン及び 18 種タンパク質構成アミノ酸鏡像異性体の一斉分析を 3 分以内で行うことが可能となった．
【引用文献】
[1] Y. Konya, T. Bamba, E. Fukusaki.: Extra-facile chiral separation of amino acid enantiomers by LC-TOFMS analysis, *J. Biosci. Bioeng.*, 121, 349-353 (2016).

Improvement of LC conditions for high-throughput analysis of amino acid enantiomers by LC-MS

○Kohei Yoshikawa, Masahiro Furuno, Nobuo Tanaka, Eiichiro Fukusaki
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words D-amino acid, LC/MS, high-throuput, chiral separation

2Fa04 GC/MS を基盤としたヒト血漿メタボロミクスにおける固相誘導体化法と従来誘導体化法の比較

○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．しかし多くの誘導体化された代謝物は不安定であり，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解決すべき大きな問題である．加えて従来法では，サンプル抽出，遠心濃縮，凍結乾燥，誘導体化といった一連の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，従来の誘導体化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．

Comparison between conventional derivatization and solid phase analytical derivatization method of human plasma metabolomics based on GC/MS

○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, GC/MS, pretreatment, plasma

2Fa05 親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析による親水性代謝物の一斉分析法の開発

中谷 航太[1], 和泉 自泰[1], 高橋 政友[1], 櫻井 恵太[2], 佛願 道男[2], ○馬場 健史[1]
（[1]九大・生医研, [2]日立化成テクノ）
bamba@bioreg.kyushu-u.ac.jp

解糖系，クエン酸回路，アミノ酸代謝，核酸代謝など，生命活動を担う主幹代謝経路の中間代謝物は，イオン性 (親水性) 代謝物である．これまで親水性代謝物の測定は，主にキャピラリー電気泳動質量分析，イオンペア逆相液体クロマトグラフィー質量分析，親水性相互作用液体クロマトグラフィー質量分析 (HILIC/MS) によって実施されてきた．しかし，親水性代謝物は極性，電荷特性，分子量といった物性の範囲が広いため，単一手法での包括的測定には至っておらず，第一選択となる分析法の開発は未だ発展途上の段階にある．本研究では，1~3 級アミンおよび 4 級アンモニウム基を修飾したメタクリレートポリマー粒子を充填したカラム (GL-HilicAex) を設計し，親水性相互作用や陰イオン交換作用を組み合わせた親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析法 (HILIC/AEX/MS/MS) を開発したので報告する．
本研究は，陽イオン性 (ヌクレオシド，塩基)，両イオン性 (アミノ酸)，陰イオン性 (有機酸，糖リン酸，ヌクレオチドなど) 代謝物を測定対象として，各種分析条件における各代謝物の分離挙動及びその分離メカニズムを理解することで新規分析法の開発を行った．本手法は，ポリマー粒子系アミノカラムを用いて移動相 pH (塩基性) や添加剤の種類と濃度を最適化し，固定相の電荷，分析物の解離状態を変化させることで，HILIC (陽イオン性および両イオン性代謝物の保持分離) と AEX (陰イオン性代謝物の保持分離) の分離モードを有機的かつ段階的に働かせることのできる新しいクロマトグラフィーである．開発した新規 HILIC/AEX/MS/MS 分析法は次世代のメタボローム解析のツールとして，有効な活用が期待される．

Novel metabolomic analytical system for comprehensive and simultaneous analysis of hydrophilic metabolites by hydrophilic interaction/anion exchange liquid chromatography tandem mass spectrometry

Kohta Nakatani[1], Yoshihiro Izumi[1], Masatomo Takahashi[1], Keita Sakurai[2], Michio Butsugan[2], ○Takeshi Bamba[1]
([1]Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., [2]Hitachi Chem. Techno)

Key words metabolomics, next-generation metabolome analysis, HILIC, anion exchange

2Fa06 次世代定量メタボローム解析に資する安定同位体標識内部標準品群調製法の開発

○相馬 悠希[1,2], 藤原 由梨[2], 高橋 政友[1], 後藤 麻衣子[1], 下平 武彦[1], 池田 明夏里[3], 寺内 勉[3], 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, [3]大陽日酸株式会社）
y-soma@bioreg.kyushu-u.ac.jp

【目的】代謝物の包括的解析を旨とするメタボローム解析は，医薬・食品・環境等の幅広い分野において利用されており，各種クロマトグラフィー質量分析結果に基づく代謝物量比の相対比較や統計的解析が一般的に普及している．一方で，質量分析は諸所の分析条件や試料中の夾雑物の違いによって感度が大きく変動するため，定量分析が極めて難しく，異なる条件下で得られたデータの比較や統合が困難となっている．質量分析での定量を可能とする手法として「安定同位体希釈法」が知られているが，内部標準として高価な安定同位体標識化合物を解析対象ごとに用意する必要があり，解析対象が多岐に渡るメタボローム解析では，現状としてコスト・労力的に日常的な運用が困難である．本研究では，定量メタボローム解析に必要不可欠な「安定同位体ラベル化内部標準群 (SILIS)」を日常的に運用可能なコストで調製するための技術開発に取り組んだ．
【方法および結果】U-$^{13}C_6$-Glucose を単一炭素源とする最小培地を用いて大腸菌を複数回継代培養し，^{13}C 標識化された大腸菌から代謝物を抽出することで SILIS を取得した．各種クロマトグラフィーと高分解能質量分析を組み合わせたメタボローム解析によって SILIS 中の親水性代謝物約 200 種について同位体分子存在比を取得し，^{13}C 標識化率を詳細に解析した．その結果，継代回数を増すごとに ^{13}C ラベル化率が向上し，中央代謝系代謝物において ^{13}C ラベル化率 95%以上を担保することに成功した．一方で，一部の代謝物においては炭素骨格の 1 つないしは 2 つの原子が ^{12}C のまま置換されずに残存した．これら ^{12}C が残存する同位体分子は培養系中の $^{12}CO_2$ に由来することが示唆された．そこで次に ^{12}C 残存を低減し，^{13}C 標識化率の高い SILIS を取得するために，代謝工学的手法と培養工学的手法の双方から SILIS 調整法の改善に取り組んだ．

Development of production method of the stable isotope labeled internal standards mixture "SILIS" for next generation quantitative metabolome analysis.

○Yuki Soma[1,2], Yuri Fujiwara[2], Masatomo Takahashi[1], Maiko Goto[1], Takehiko Shimohira[1], Akari Ikeda[3], Tsutomu Terauchi[3], Yoshihiro Izumi[1,2], Takeshi Bamba[1,2]
([1]Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., [3]TAIYO NIPPON SANSO Co.)

Key words metabolic analysis, stable isotope, quantification, *Escherichia coli*

2Fa07 クローン病自然発症モデル SAMP1/YitFc マウスの病状進行に伴う 腸内細菌叢および糞便メタボライトの変動

○小松 陽介[1,2], 清水 由宇[1], 山野 めぐみ[1], 中村 公則[1,3], 綾部 時芳[1,3], 相沢 智康[1,3,4]
（[1]北大院・生命科学, [2]森永乳業, [3]北大院・先端生命, [4]北大・国際連携研究教育局）
yo-komatsu@morinagamilk.co.jp

【背景と目的】
クローン病（CD）は、回腸を中心として消化管のあらゆる部位に非連続性の炎症病変を生じる原因不明の難病である。近年、CD の発症と症状の悪化には、環境的要因と遺伝的要因だけでなく、宿主の腸内細菌叢の破綻が関係していることが報告されている。腸内細菌の構成変化により、その代謝産物（メタボライト）のパターンが変化し、CD の病態形成の要因となっている可能性が考えられるが、その詳細は不明である。もし、CD の病態形成に関連する腸内細菌およびそのメタボライトの変動パターンが明らかとなれば、CD のステージ診断に応用でき、早期治療が可能となるかもしれない。本研究の目的は、CD の病状と関連する腸内細菌および腸内細菌に由来する糞便中メタボライトを探索することである。
【方法と結果】
CD 自然発症モデルとして SAMP1/YitFc マウスを用い、経時的に採取した糞便の菌叢解析を実施した。その結果、慢性期における菌叢の多様性は、発症初期と比較して有意に減少した。さらに、慢性期において、Bacteroidetes 門細菌の増加と Firmicutes 門細菌の減少が見られた。続いて、糞便のプロトン NMR メタボローム解析を行ったところ、短鎖脂肪酸である酪酸や吉草酸をはじめとするいくつかのメタボライトの糞便中濃度は、発症初期から中期において、対照群と比較して有意に低かったが、慢性期には高い値を示した。一方で、タウリンは CD の経過を通して常に、有意に高い値を示した。
【結論】
本検討の結果、Bacteroidetes 門や Firmicutes 門などの腸内細菌および短鎖脂肪酸やタウリンなどのいくつかのメタボライトは、CD の発症や進行を評価するためのバイオマーカーとして有用であることが示された。これら変動を示した細菌やメタボライトについて、病態との直接的な関連性を確かめるために、今後さらなる検討を進めたい。

Alteration of gut microflora and fecal metabolites in the SAMP1/YitFc mouse, a spontaneous model of Crohn's disease-like ileitis

○Yosuke Komatsu[1,2], Yu Shimizu[1], Megumi Yamano[1], Kiminori Nakamura[1,3], Tokiyoshi Ayabe[1,3], Tomoyasu Aizawa[1,3,4]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ., [2]Morinaga Milk Industry Co., LTD., [3]Adv. Life Sci., Grad. Sch., Hokkaido Univ., [4]Global Institution for Collaborative Research and Education, Hokkaido Univ.)

Key words NMR metabolome, Crohn's disease, microbe

2Fa08 オミクスアプローチを適用した熟成チーズの細菌相多様性と品質の連関の検証

○海野 良輔[1], 志波 優[2,3], 佐藤 実穂[1], 鈴木 敏弘[1], 石川 森夫[1]
（[1]東京農大応生科・醸造, [2]東京農大生命科・分微, [3]東京農大・ゲノムセ）
m1ishika@nodai.ac.jp

【目的】ナチュラルチーズの製造には、スターター乳酸菌が人為的に添加される一方、これら以外の乳酸菌（非スターター乳酸菌）や乳酸菌以外の多様な細菌が熟成中に自然発生的に増殖する。しかし、チーズは原産国や種類、製法が多様であるが故、その品質と熟成時の細菌相の相関については不明な点が多い。そこで、本研究では、ナチュラルチーズの 16S rRNA メタゲノム解析および各種成分分析を行い、細菌相と成分分析結果の相関の有無について検証を行った。
【方法および結果】白カビ熟成チーズおよび細菌熟成チーズ計 5 点から抽出した DNA について、16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を増幅したライブラリを構築し、Illumina Miseq および QIIME2 による解析に供した。得られた結果を階層的クラスタリングに供したところ、白カビ熟成チーズは種類に依らず、類似した OTU の構成を示した一方、細菌熟成チーズではそれぞれが特有の構成を示した。乳酸菌相については、スターター乳酸菌の *Lactococcus* 属がいずれのチーズでも優占していたが、その他のスターター乳酸菌（*Leuconostoc*, *Lactobacillus*）と好塩性・好アルカリ性の非スターター乳酸菌（*Marinilactibacillus*, *Alkalibacterium*, *Vagococcus*）の占有率が逆相関の関係にあることが示された。さらに、各チーズの有機酸分析または香気成分分析結果と菌相解析結果との間で Spearman の順位相関分析を行ったところ、スターター乳酸菌および非スターター乳酸菌が OTU リード数の上位を占める場合と好塩性・好アルカリ性乳酸菌および海洋細菌が上位を占める場合では、成分組成が大きく異なり、逆相関の関係を示した。以上、チーズに自然発生的に存在する固有の細菌群はチーズの風味の形成に密接に関与することが統計的手法を適用することにより示された。

Verification of relationship between bacterial diversity and quality of ripened cheese applying omics approach

○Ryosuke Unno[1], Yuh Shiwa[2,3], Minori Sato[1], Toshihiro Suzuki[1], Morio Ishikawa[1]
([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Mol. Microbiol., Tokyo Univ. Agric., [3]Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric.)

Key words cheese, metagenome, bacterial diversity, correlation analysis

2Ga01 マイクロキャリア培養した間葉系幹細胞のデキストラナーゼおよびキレート剤併用によるトリプシンフリー回収法

岡村 洋, ○藤原 政司, 高木 睦
（北大院・工）
takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

【目的】間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell: MSC）を同種再生医療に利用するには、MSC の大量培養法の確立が重要である。当研究室において大量培養のためにマイクロキャリア（MC）を用いた培養が可能であることを確認したが、MC 表面に接着した細胞の回収において従来のトリプシン処理では細胞回収率が低いという問題点があった。さらに、トリプシン自身が培養細胞の品質を低下させることも知られているので、MC に接着した MSC をトリプシンフリーで高効率に回収する手法の検討を本研究の目的とした。
【方法と結果】ヒト骨髄由来 MSC をデキストラン製 MC ビーズ（Cytodex™1）上に接着させ、スピナーフラスコを用いて撹拌培養した。培養終了後、細胞を従来のトリプシン処理で回収した場合、細胞回収率が約 20%と低かったが、代りにデキストラナーゼ処理した場合、MC がほとんど溶解して細胞が凝集して遊離した。そこで、凝集に関わるカルシウムイオンのキレートを狙って EDTA または EGTA（1 mM）で処理した後、デキストラナーゼ処理で MC を溶解させ、さらに細胞分散促進のためにトリプシン溶液で処理した。その結果, 細胞の凝集体は減少し、特に EGTA を用いた場合約 60%の細胞を単離回収できた。次に、細胞品質を保つために、EGTA 溶液洗浄とデキストラナーゼ処理に続き、最後のトリプシン処理の代りに EGTA 溶液処理を用いた結果、凝集体の大部分が分散され、約 80%の細胞を単離回収することができた。また、この手法で得た細胞は CD90 陽性率が約 86%と、従来のトリプシン法で得た細胞の約 38%よりも高く、MSC として高品質であることも示唆された。

Trypsin-free harvest of mesenchymal stem cells on microcarriers by dextranase and chelate agents

Hiro Okamura, ○Masashi Fujiwara, Mutsumi Takagi
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, microcarrier, harvest, trypsin

2Ga02 交流電場印加による非接触な足場依存性細胞の剥離法

小山 純弘, 和田 昌憲, 田村 泰之, 石川 元, 小林 準次, ○石川 陽一
（エイブル）
ishikawa@able-biott.co.jp

【目的】本研究では、誘電損失（発熱）がほとんどない 1~300 MHz の交流電場を用いることにより、容器内で培養した足場依存性細胞を、非接触かつ消化酵素を用いずに、剥離・継代する手法について検討した。
【方法】T-25 カルチャーフラスコに 7 割以上のサブコンフルエントまで培養した足場依存性細胞を室温条件にて PBS(-)に置換し、上下または側面方向から交流電場を平行平板電極で印加した。交流電場印加後、10 回のピペッティングにより細胞を剥離し、剥離率および生存率について調査した。Thermo Fisher Scientific 社製の 2 段 1264 cm2 Cell Factory で培養した CHO-K1 細胞についても同様に、剥離率および生存率を調べた。
【結果と考察】0.062~2 Vpp/cm (peak to peak voltage/cm)、10~30 MHz の高周波交流電場を 10 分間印加すると、PBS(-)に置換した容器内の CHO-K1 細胞および BALB/3T3 細胞が剥離する現象を発見した。ピークとなる細胞剥離率は 0.25 Vpp/cm, 20 MHz, 10 分で、99.5±0.1%(平均値 ± 標準誤差, n=6) の CHO-K1 細胞、99.8±0.2%の BALB/3T3 細胞がそれぞれ剥離した。交流電場印加は、上下および側面方向の双方において、培養基板上からの剥離が確認された。これら足場依存性細胞は、Ca2+含有 PBS や培地中では剥離できなかった。交流電場印加による細胞剥離はほとんど細胞毒性が無く、90%以上の細胞が生細胞であることをトリパンブルー染色による生死判別テストで確認した。また、各種交流電界強度で 90 分間処理により剥離した CHO-K1 細胞は、遅延期(Lag phase)がほとんど存在せず、すぐに対数増殖期に入ることを明らかとした。

Alternating electric field application induced non-contact and enzyme-free cell detachment of anchorage-dependent cells

Sumihiro Koyama, Masanori Wada, Yasuyuki Tamura, Gen Ishikawa, Junji Kobayashi, ○Yoichi Ishikawa
(ABLE Corp.)

Key words cell detachment, Alternating electric field, Stack plates, Anchorage-dependent cells

2Ga03 接着細胞の自己凝集化技術を用いたヒト間葉系幹細胞スフェロイドの作製精度と質の評価

○草加 直幸 [1,2], 安部 菜月 [3], 鈴木 康平 [4], 広井 佳臣 [4], 西野 泰斗 [3], 岩井 良輔 [2]
（[1]岡山理大院・工, [2]岡山理大・フロンティア理工学研, [3]日産化学・生物科学研, [4]日産化学・材料科学研）
iwai@ifst.ous.ac.jp

【目的】我々は、接着細胞の自発的な凝集化を誘導する技術（CAT）を開発し、新規のスフェロイド作製法としての応用可能性を昨年度の本学会にて報告した。本研究では、再生医療用途を指向した、CAT を用いたスフェロイド作製法におけるヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hMSC）スフェロイドのサイズ均一性（作製精度）と未分化性及び多分化能（質）を評価することを目的とした。
【方法と結果】CAT 用のポリマーを細胞非接着性の培養皿に 0.4-2.5 mm^2 の面積でドット印刷し、hMSC を 30×10^4 cells/cm^2 で播種した。細胞は CAT ポリマーの印刷面にのみ接着した後に凝集化し、印刷面積に応じて理論値カーブに沿った約 250-500 μm の任意の異なるサイズのスフェロイドを形成した。ここで、スフェロイドの直径に対するサイズ誤差を計測したところ、約 2-7%とバラつきが生じ、従来の浮遊細胞の凝集化方法の約 6%と比べて精度が低い条件もあった。そこで、$10\text{-}30\times10^4$ cells/cm^2 の異なる播種密度において細胞を播種すると、概ね $20\pm2\times10^4$ cells/cm^2 の播種密度帯で従来法より高い 6%以下の精度でスフェロイドを作製できることが分かった。一方で、得られたスフェロイドは、hMSC マーカーである CD90 及び CD105 を 95%以上の割合で発現し、未分化性を維持していることが分かった。また、脂肪、骨及び軟骨分化誘導培地によって約 3 週間培養すると、脂肪、骨及び軟骨基質を豊富に蓄えた組織へと成熟化した。
【結論】CAT を用いたスフェロイドの作製法において、播種密度を至適化することで従来法より高い精度で hMSC のスフェロイドを作製でき、それらは未分化性を維持するとともに、分化誘導によって成熟度の高い脂肪、骨及び軟骨組織に分化することが確かめられた。本法の再生医療用の hMSC スフェロイドの作製法としての高い利用可能性が示された。

Evaluation of the size uniformity and quality of multicellular spheroids of human mesenchymal stem cells prepared by using adhered cell self-aggregation technology (CAT)

○Naoyuki Kusaka[1,2], Natsuki Abe[3], Kohei Suzuki[4], Yoshiomi Hiroi[4], Taito Nishino[3], Ryosuke Iwai[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Okayama Univ. Sci., [2]Inst. Front. Sci. Technol., Okayama Univ. Sci., [3]Biol. Res. Lab., Nissan Chemical, Co., [4]Materials. Res. Lab., Nissan Chemical, Co.)

Key words tissue engineering, spheroid, regenerative medicine, cell self-aggregation technology (CAT)

2Ga04 接着細胞の自己凝集化技術を用いた 3 次元毛細血管集合体の作製と形状制御

○橋本 真悟 [1,2], 滝澤 昇 [1], 岩井 良輔 [2]
（[1]岡山理大院・工, [2]岡山理大・フロンティア理工学研）
iwai@ifst.ous.ac.jp

【背景】血管毒性試験の培養モデルや再生医療用の複雑な立体組織構築には毛細血管構造が集合した組織体の利用が有効と考えられるが、それらを用途に応じて大量かつ任意の形状で作製する方法は確立されていない。我々は、接着細胞の自己凝集化技術（CAT）を開発した。独自に合成した CAT 用のポリマーを任意の数・形状で印刷した培養皿に細胞播種すると、細胞は CAT ポリマーの印刷表面にのみ接着した後、一体凝集化することで印刷形状に応じた 3 次元の細胞凝集塊が任意の数だけ得られる。本研究では、CAT を用いた組織作製法を 3 次元毛細血管集合体の作製へ応用することを目的とした。
【方法と結果】96 穴プレートの底面全体に CAT ポリマーを印刷した後、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を 10-80%の比率でヒト間葉系幹細胞（hMSC）と混ぜ合わせた細胞混合液を 20×10^4 cells/well で播種した。細胞群は HUVEC の混合比率に関わらず CAT ポリマー印刷表面への接着を経て well の外周から剥離、一体凝集化し、HUVEC の含有率が 20%以下では球状の凝集塊が、40%以上では脆弱な円盤状の凝集塊が形成した。ここで、これらの凝集塊の断面の組織分析を行ったところ、円盤状凝集塊においては毛細血管構造はほとんど見られなかったが、球状凝集塊においては全体に緻密な毛細血管様の管腔構造の構築が認められた。そこで、長方形状（8 mm×20 mm）に CAT ポリマーを印刷し、HUVEC を 20%以下の割合で混ぜ合わせた MSC 混合液を播種すると上記と同様に一体凝集化が生じ、棒状の毛細血管集合体が形成した。
【結論】CAT を用いた新規の組織作製法において、HUVEC の含有率が 20%以下の混合条件にて 3 次元の毛細血管集合体を作製することに成功し、その形状を制御することも可能であった。このような 3 次元毛細血管集合体の血管毒性試験モデルや複雑な立体組織構築への応用を目指している。

Shape-controlled preparation of three-dimensional blood capillary aggregated tissues by using adhered cell self-aggregation technology (CAT)

○Shingo Hashimoto[1,2], Noboru Takizawa[1], Ryosuke Iwai[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Okayama Univ. Sci., [2]Inst. Front. Sci. Technol., Okayama Univ. Sci.)

Key words tissue engineering, cell self-aggregation technology (CAT), 3D culture, capillary vessels

2Ga05 *In vitro* 毛幹形成技術とこれを利用した毛髪の再生医療

○中嶋 陸満 [1], 清水 亮啓 [1], 景山 達斗 [1,2], 福田 淳二 [1,2]
（[1]横国大院・工, [2]神奈川県産業技術総合研（KISTEC））
fukuda@ynu.ac.jp

【目的】 近年、脱毛症の新しい治療法として、毛包原基と呼ばれる移植組織を生体外で作製し、これを脱毛部に移植する毛髪再生医療が注目されている。我々は、この毛包原基が発生過程において、上皮系細胞と間葉系細胞の相互作用により自発的に形成される現象を、生体外で再現することで毛包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を再生する方法を報告してきた (T. Kageyama et al. *Biomaterials*, 154, 291-300, 2018)。今後実用化を進めるうえで、患者のニーズを考えると、毛包原基の移植部からほぼ確実に毛髪を再生させる必要がある。そこで本研究では、毛包原基を長期間培養することで、*in vitro* で毛髪を再生できる条件を見出し、さらに発毛した毛包原基を選別し、これを移植することで高効率で毛髪を再生させる技術の開発に取り組んだ。
【方法・結果】 マウス胎児から採取した上皮系細胞と間葉系細胞の混合液を、細胞非接着の丸底ウェル培養器に播種した後、マトリゲルを含む培地で培養を行った。2 種類の細胞は、数時間で 1 つの凝集体を形成した後、2 日間の培養中に各種細胞が自発的に分離することで毛包原基を形成し、培養 4 日目に毛包様組織を形成した。さらに培養を行うと、毛髪が伸長する様子が観察され、形成した毛髪は特徴的なキューティクル構造を有していた。そこで、この再生毛包組織をヌードマウスの背部に移植したところ、移植 8 日後には、移植部位から毛髪の再生が確認され、その毛髪再生効率は、毛包原基を移植する場合と比較して、優位に向上していた。以上より、本手法は高い再生効率で毛髪を再生するのに適した新たな毛髪再生法として有用である可能性が示された。

In vitro hair regeneration for regenerative medicine

○Rikuma Nakajima[1], Akihiro Shimizu[1], Tatsuto Kageyama[1,2], Junji Fukuda[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., [2]Kanagawa Inst. of Ind. Sci. and Technol. (KISTEC))

Key words hair regeneration, hair follicle germ

2Ga06 ヒト不死化筋芽細胞株 Hu5/KD3 を用いた三次元骨格筋組織の構築

○長島 拓則 [1], 清水 一憲 [1], Hadiwidjaja Stacy [1], 大隅 早紀 [1], 本多 裕之 [1,2]
（[1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創成セ）
shimizu@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】骨格筋は運動だけでなく、代謝や分泌も担う重要な器官である。マウス株化筋芽細胞 C2C12 を分化誘導した筋管細胞は再現よく収縮能を発現するため、筋研究の細胞材料として汎用される。一方、種差による生理反応の違いが懸念されることから、ヒト由来細胞材料に対する需要が大きい。ヒト初代やヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞の利用が進みつつあるが、ロット差や継代劣化、煩雑な分化誘導プロセスのため、再現よく収縮能を発現する筋管細胞を得ることが難しい。本研究では、ヒト不死化筋芽細胞株 Hu5/KD3[1]に注目した。Hu5/KD3 の収縮能の有無は未だ明らかになっていない。我々は Hu5/KD3 で三次元組織を構築し、収縮能の有無を評価した。さらに薬剤添加による筋萎縮モデルへの応用を検討した。
【方法と結果】作製した収縮力測定マイクロデバイス[2]上で Hu5/KD3 を三次元培養した。種々の条件で電気刺激を行った際の筋収縮力を測定し、免疫染色や遺伝子発現解析を行った。構築した三次元組織は、電気刺激に応答して収縮力を発現し、最大収縮力は約 400 μN に達した。これは C2C12 由来筋組織の約 5 倍の大きさの収縮力であった[2]ことから、Hu5/KD3 由来筋組織は収縮力を指標とする細胞アッセイに十分応用可能であると考えられた。そこで、収縮力を指標とした筋萎縮モデルへの応用を検討した。それぞれ異なる経路で萎縮を誘導するロバスタチン、デキサメタゾン、TNF-α を三次元筋組織に作用させたところ、いずれの薬剤を加えた場合でも筋収縮力が有意に減少し、筋萎縮マーカーの Atrogin-1 や MuRF-1 の発現が亢進した。以上の結果から、Hu5/KD3 は再現よく収縮力を発現するヒト由来筋細胞材料として有用であり、三次元筋萎縮モデルとしての応用も可能であると考えられる。

[1] Hashimoto *et al*., (2006)
[2] Shimizu *et al*., Bioengineering (2017)

Development of *in vitro* skeletal muscle tissues using immortalized human skeletal muscle cell line Hu5/KD3

○Takunori Nagashima[1], Kazunori Shimizu[1], Stacy Hadiwidjaja[1], Saki Osumi[1], Hiroyuki Honda[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]PME, Nagoya Univ.)

Key words 3D culture, skeletal muscle, atrophy, drug screening model

2Ga07 コラーゲンチューブ培養法による肝細胞微小線形オルガノイドの作製

○佐伯 琴音, 榎本 紗希子, 矢嶋 祐也, 鵜頭 理恵, 山田 真澄, 関 実
（千葉大院・融合）
m-yamada@faculty.chiba-u.jp

【背景と目的】 肝臓は多くの薬剤を代謝する臓器であり，生体外において作製した「肝臓模倣組織」は，たとえば薬剤の評価ツールとしての応用が期待されている。しかし，肝臓の主要な細胞である「肝細胞」を生体から単離し培養すると，その機能や生存率が急速に低下してしまう。そこで本研究では，生体の肝臓における「肝細胞が線形に配列しており」,「肝細胞がコラーゲンなどの細胞外マトリックス成分によって囲まれている」という 2 つの特徴を再現する培養系として「微小なコラーゲンチューブを用いたオルガノイド培養法」を提案し，細胞機能の評価を試みた。
【方法】 まず，上下 2 層から成るマイクロ流路構造を設計し，精密機械加工技術によって実際に作製した。下層の流路構造からマイクロノズルアレイ構造を通して周縁部にコラーゲン水溶液，中心部に細胞（肝細胞株）懸濁液が流れるように配置し，上層の流路構造においてコラーゲン水溶液をゲル化させることでヒト培養肝細胞（HepG2 細胞）を内腔に導入したコラーゲンチューブを形成した。最長で 1 週間程度細胞培養を行い，細胞の生存率や機能の評価を行った。
【結果と考察】 流路内において直径数 10 μm のコラーゲンチューブを連続的に作製することができた。チューブ内腔に導入された細胞は生存率を高く維持しており，培養するに従い細胞がチューブ内腔において増殖し，線形の組織体（オルガノイド）を形成する様子が観察された。本研究において作製した細胞導入コラーゲンチューブは，生体の肝組織の単位構造を形態的に模倣する上で有用であることが示唆された。

Formation of linear micro-organoids of liver cells by collagen tube-based cultivation

○Kotone Saeki, Sakiko Enomoto, Yuya Yajima, Rie Utoh, Masumi Yamada, Minoru Seki
(Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ.)

Key words tissue engineering, collagen tube, cell culture, liver cell

2Ga08 スフェロイド形成によるヒト iPS 細胞由来肝細胞の代謝機能向上

田尾 文哉, 赤間 剛, ○小島 伸彦
（横市大院・生命ナノシステム）
nobuhiko@yokohama-cu.ac.jp

【背景と目的】ヒト凍結肝細胞は創薬において必要不可欠な細胞であるが、ロットによって大きく性状が変化するために再現性よく実験を行うことができない。ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞はこの問題を解決できると期待されているものの、ヒト凍結肝細胞と比較すると代謝機能が低いため、さらなる成熟をもたらす培養技術の開発が望まれている。本研究では、３次元スフェロイド培養によってヒト iPS 細胞由来肝細胞の代謝機能、特に CYP 遺伝子群の発現を向上させることを目的とした。
【材料と方法】ヒト iPS 細胞由来肝細胞としてリプロセル社の ReproHepato を用いた。スフェロイド形成にはメチルセルロース法（Kojima et al., Biomaterials, 2012）を用いた。比較として平面培養および 96 穴 U 底プレートを用いたスフェロイド形成法を用いた。専用培地を用いて 3%の濃度となるようにメチルセルロース培地を作製し、$2x10^6$ cells/ml の細胞密度に調製した細胞懸濁液を 1 ul ずつ吐出した。吐出後、3%メチルセルロース培地の膨潤によって細胞は一点に集まり、その後細胞同士が接着することでスフェロイドが形成された。吐出から２日後にスフェイドを低接着処理された 24 穴プレートに移して培養を続けた。
【結果と考察】ReproHepato は凝集能力が低く、96 穴 U 底プレートでは効率よくスフェロイドを作製できなかった。一方、メチルセルロース法では安定的にスフェロイドを作製することができた。スフェロイドの CYP3A4、CYP1A2 および CYP2B6 遺伝子発現量を平面培養と比較したところ、培養 6 日目ではほとんど変化しなかったが、培養 14 日目ではそれぞれ 30 倍から 100 倍程度の発現増強が見られた。CYP3A4 については酵素活性も向上していた。以上の結果から、ヒト iPS 細胞由来肝細胞はスフェロイド培養によって CYP 遺伝子群の発現が向上することがわかった。

Functional enhancement of human iPS cell-derived hepatocytes by the three-dimensional spheroid culture

Fumiya Tao, Takeshi Akama, ○Nobuhio Kojima
(Grad. Sch. Nanobiosci., Yokohama City Univ.)

Key words human iPS cell, hepatocyte, spheroid, metabolism

2Ga09 毛細血管構造を有するスフェロイドの内部構造の三次元的解析

○小西 研吾[1], 稲垣 慶一[1], 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】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)などを混合した多細胞スフェロイドとすることで、三次元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、作製したスフェロイド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」を用いた。そして、それぞれのサンプル作製後、培養 1～3 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分裂細胞の染色には、それぞれ PI および PCNA 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。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、単一スフェロイドの全体の 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 multicellular spheroid

○Kengo Konishi[1], Keiichi Inagaki[1], Kenji Takahashi[1], Kazuaki Ninomiya[2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Inst. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words bio-3D printer, micro vascular structure, 3D image analysis

2Ga10 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とその非破壊的評価

○谷内 達彦[1], 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、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。また、同一の三次元組織を非破壊的・経時的に評価するため、画像解析による評価を行った。
【方法および結果】ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)・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、がん細胞を含む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合計 9 個のスフェロイドからなる(3×1×3)の三次元組織を作製した。ここで、中心に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。作製した三次元組織について、所定の時間ごとに、非破壊評価と破壊評価とを行った。非破壊評価としては、撮影した三次元組織の蛍光画像から、画像解析によりがん細胞に由来する蛍光の指標の経時変化を得た。一方、破壊評価としては、三次元組織をシングルセル化し、セルカウントとフローサイトメトリーを行うことで、生細胞数やがん細胞割合の経時変化を得た。これら両評価指標の相関性を調べた。

Fabrication and non-invasive evaluation of 3D tissue assembled by bio-3D printer using cancer cell-containing multicellular spheroids as building block

○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

2Ga11 近赤外光情報を用いたスフェロイドの非侵襲的品質評価

○永井 美希[1], 山本 涼平[1], 渋田 真結[1], 蟹江 慧[1], 五十嵐 陽子[2], 菅沼 寛[2], 加藤 竜司[1,3]
（[1]名大院・創薬, [2]住友電気工業, [3]名大・ナノライフシステム研究所）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

近年の細胞培養技術の発展から、3 次元的な細胞凝集塊（スフェロイド）として細胞を培養することで、生体に近い高機能な状態を作り出せる可能性が示されている。スフェロイドは、大量生産のための容器や培養技術が高度に進化してきており、創薬分野における In vitro ヒト細胞モデルや再生医療分野における組織構築の基礎部品として、様々な応用が期待されている。
しかし、ヒト細胞は 2 次元で平面的に培養している状態であっても、その品質の維持は難しい。さらに複雑な培養系であるスフェロイドは、スフェロイド作製における機能性の再現は難しい。創薬分野での評価やスクリーニングで利用されるためには、スフェロイドごとの品質の同等性評価や薬剤応答能の担保が重要となり、再生医療などでスフェロイドが治療用組織医薬品として利用される場合には、治療効果や組織修復効果につながる機能性の評価や管理が重要となる。このため、非破壊的かつ定量的なスフェロイド評価技術の開発が求められている。
本研究では、このような課題を解決する技術として近赤外イメージセンサーを用いたスフェロイドの機能性の非破壊評価の可能性と有効性を検証した。本研究では、これまで顕微鏡画像情報解析で得られた高次元の画像情報の特徴量化とモデリングの技術を応用し、近赤外イメージ情報を解析した例を紹介する。

Non-invasive quality evaluation of spheroids using near-infrared light imager

○Miki Nagai[1], Ryohei Yamamoto[1], Mayu Shibuta[1], Kei Kanie[1], Yoko Igarashi[2], Hiroshi Suganuma[2], Ryuji Kato[1,3]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]Sumitomo Electric Industries, Ltd., [3]Inst. Nano-Life-Sci., Nagoya Univ.)

Key words spheroids, quality evaluation, near-infrared light imager

2Ga12 多糖とペプチドを用いたハイブリッド細胞足場材料の最適化検証と評価

○王 悦[1], 蟹江 慧[1], 金子 喬士郎[1], 杉本 礼子[1], 成田 裕司[2], 緒方 藍歌[2], 宇都 甲一郎[3], 荏原 充宏[3], 加藤 竜司[1,4]
（[1]名大院・創薬, [2]名大院・医, [3]物材機構, [4]名大・ナノライフシステム研究所）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

生体内への移植のためのバイオマテリアルには、治療効果をもたらす細胞の培養性能と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力学特性などが求められる。バイオマテリアルの基材となる合成高分子は、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い面がある。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、化学合成可能な合成高分子の利点と生体機能性を有する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・最適化を目指した。多糖は生体適合性が高く、バイオマテリアル応用としても多く使用されており、低コストと言う利点も有する。本発表では、多種類存在する多糖高分子の中から、移植材料として必要な機能性を持つ多糖高分子を選出し、高分子の持つ物性値と機能との関連性に関して議論する。また、使用する多糖高分子の割合、機能性ペプチドとの組合せ等、ハイブリッド材料の最適化検証を実施し、評価したので報告する。

Optimization and evaluation of peptide-functionalized polysaccharide-protein hybrid material

○Yue Wang[1], Kei Kanie[1], Kyoshiro Kaneko[1], Reiko Sugimoto[1], Yuji Narita[2], Aika Ogata[2], Koichiro Uto[3], Mitsuhiro Ebara[3], Ryuji Kato[1,4]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Med. Nagoya Univ., [3]Natl. Inst. Mat. Sci., [4]Inst. Nano-Life-Sci., Nagoya. Univ.)

Key words cell-selective peptide, polysaccharide, biomaterial

2Ha01 日本の発酵食品の基盤、麹グリコシルセラミドは脂質代謝を改善する

○北垣 浩志[1], 浜島 弘史[1], 光武 進[1], 田中 優[2], 宮川 幸[1], 西向 めぐみ[3], 中村 強[4], 柳田 晃良[5], 中山 二郎[2], 永尾 晃治[1]
([1]佐賀大・農, [2]九大院・農, [3]岩手大院・連農, [4]福岡女子大学, [5]西九州大学)
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

[背景]
日本の発酵食品の多くには糖化剤として麹を使うが、その特異的な健康成分の報告は多くない。我々は日本の発酵食品、特に甘酒、濁り酒、塩こうじ、味噌、酒粕、大麦発酵エキスには共通して、他の食品素材には含まれない、特異的な構造を持つ麹グリコシルセラミド(KGC)が多く含まれることを明らかにしてきた。そこで KGC を肥満マウスに給餌しその栄養状態を調べた。
[実験方法]
KGC を抽出、粗精製し、1 %容量（対照は AIN-76）で 6 匹の健常マウス（C57BL/6N）と肥満マウス(db/db マウス）に 3 週間給餌した。
解剖後、肝臓の脂質や糞の胆汁酸を測定した。肝臓から total RNA を抽出し mRNA の発現量を qRT-PCR を用いて解析した。
[実験結果]
実験の結果、KGC 給餌マウスでは肝臓コレステロールが統計的に有意に低下し、糞中の胆汁酸が統計的に有意に増えていた。KGC 給餌マウスでは肝臓においてコレステロールから胆汁酸を合成分泌する CYP7A1 や ABCG8 の遺伝子が統計的に有意に増加していた。これらのことから、麹グリコシルセラミドは肝臓でのコレステロールから胆汁酸への変換を促し、肝臓のコレステロールを低下させ、脂質代謝を改善することが示された。
[考察]
この研究により、麹グリコシルセラミドの新たな健康効果として脂質代謝の改善効果が初めて明らかになり、この健康効果は日本の発酵食品全般に敷衍できると考えられた。
[発表論文]
Biosci Biotechnol Biochem. 2018 Dec 30:1-9. doi: 10.1080/09168451.2018.1562877.

Koji glycosylceramide commonly contained in Japanese fermented foods improves obesity.

○Hiroshi Kitagaki[1], Hiroshi Hamajima[1], Susumu Mitsutake[1], Masaru Tanaka[2], Miyuki Miyagawa[1], Megumi Nishimukai[3], Tsuyoshi Nakamura[4], Teruyoshi Yanagita[5], Jiro Nakayama[2], Koji Nagao[1]
([1]Fac. Agric., Saga Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ., [3]United Grad. Sch. Agric. Sci., Iwate Univ., [4]Fukuoka Womens' College, [5]Nishikyushu University)

Key words *Koji* making, liver, fermentation, fungus

2Ha02 麹由来グリコシルセラミドの腸内細菌への作用解析

○永留 真優[1], 阪本 真由子[1], 宮川 幸[1], 北島 悠花[1], 中村 強[2], 中山 二郎[3], 北垣 浩志[1]
([1]佐賀大院・農, [2]福岡女子大, [3]九大院・農)
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

【背景・目的】 発酵食品の製造に用いられる麹は、セラミドと単糖が結合してできたグリコシルセラミド(GC)を含んでいる。当研究室では、麹 GC が腸内細菌叢やコレステロール代謝を改善することを報告している[1,2)]。しかしそのメカニズムは解明されていない。現代の日本人は、高脂肪食の摂取により胆汁酸の分泌が増大し、その一部が腸内細菌によりデオキシコール酸(DCA)などの二次胆汁酸に変換され、腸内細菌叢の乱れにつながると考えられている。そこで本研究では、GC が二次胆汁酸から腸内細菌を保護するという仮説を立て、体内で起こる腸内細菌叢の変化を *in vitro* で解析する実験系の確立を試みた。
【方法・結果】 培地及び培養アンプルを嫌気性にし、LB 培地で大腸菌、GAM 培地で腸内細菌を培養し、それぞれの菌体から抽出した DNA を混合してリアルタイム PCR 解析を行った。その結果、分析する DNA 量に応じたサイクル数を検出することが出来た。次に、DCA 濃度 1%(w/v)に調製した GAM 培地で腸内細菌を培養し、*Bacteroides* と *Clostridium* の DNA 量をリアルタイム PCR により解析したところ、DCA 添加群は、無添加群と比較してサイクル数が有意に増加していた($p<0.05$)。さらに、DCA 濃度 1%(w/v)に調製した GAM 培地に GC を 20 μg/mL または 40 μg/mL 添加して腸内細菌を培養し、代表的な腸内細菌の DNA 量をリアルタイム PCR により解析したところ、GC 添加群は無添加群と比較して、サイクル数が減少する傾向が見られた。このことから GC が腸内細菌を二次胆汁酸から保護する可能性が考えられた。以上の結果より、体内で起こる腸内細菌叢の変化を解析する実験系の確立に成功した。この実験系は、麹 GC の腸内細菌制御作用のメカニズム解析の糸口になると期待される。
1)Hamajima et al.,Springer Plus,5,1321(2016)
2)Hamajima et al.,Biosci Biotechnol Biochem,1-9(2018)

Effect of koji glycosylceramide on the intestinal bacteria

○Mayu Nagadome[1], Mayuko Sakamoto[1], Miyuki Miyagawa[1], Yuka Kitajima[1], Tsuyoshi Nakamura[2], Jiro Nakayama[3], Hiroshi Kitagaki[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Saga Univ., [2]Fukuoka women's Univ., [3]Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

Key words glycosylceramide, intestinal bacteria, bile acid

2Ha03 紅麹に含まれる抗炎症作用物質の解析

○小濵 可奈絵[1], 阪本 真由子[1], 柘植 圭介[2], 深見 裕之[3], 金 英寿[3], 北垣 浩志[1]
([1]佐賀大・農, [2]佐賀工業技術センター, [3]小林製薬株式会社)
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

【背景・目的】紅麹は主に米を紅麹菌（Monascus spp.）で発酵させたもので、約 500 年前から血行促進や臓器機能改善といった効能が認められており、近年ではコレステロール抑制作用や炎症抑制作用をもつ物質が報告されている。これらの報告は M. purpreus についてものであることから、広く食品に使用されている M. anka, M. pilosus 由来の有用物質を探すため、炎症を抑える物質の探索とその構造決定を行った。
【方法】紅麹菌 M.anka から脂質を抽出し、分取 TLC にて脂質を分離・精製した（1～5 画分）。精製した脂質をマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞に添加し、リポポリサッカライド(LPS)を用いて炎症を誘発させ、24 時間培養した。培養後、一酸化窒素(NO)産生量と生細胞率を測定した。有用脂質については、1H-NMR (CDCl3)、GC-MS を用いて構造解析を行った。また、M. pilosus を用いて作製された紅麹からも脂質を抽出し同細胞試験を行った。
【結果・考察】M. anka から精製した 5 画分（脂質 1 ～5 とする）の脂質のうち、脂質 1 が RAW264.7 細胞の NO 産生を最も大きく減少させた(無添加群 34.8±0.4μM, 脂質 1 添加群 6.2±0.5μM, n=2, Tukey HSD 検定, $p<0.05$)。脂質 1 の構造解析を行ったところ、ergosterol と推測された。M. anka の類縁種である M. pilosus を用いて作製された紅麹由来の脂質にも NO 産生の有意な減少が確認された（無添加群 55.5±0.3μM, 脂質添加群 29.8±0.5μM, n=2, Tukey HSD 検定, $p<0.05$）。M. pilosus にも ergosterol に相当する極性を持った脂質があることを TLC で確認できたことから、現在、この脂質が ergosterol であることを 1H-NMR (CDCl3)、GC-MS を用いて検証している。
本研究により、紅麹菌 M. anka 及び M. pilosus の炎症抑制効果をもつ脂質成分が明らかとなり、紅麹の健康機能性のメカニズムの一端を解明することにつながると考えている。

Structural determination of anti-inflammatory substance derived from red yeast rice.

○Kanae Kohama[1], Mayuko Sakamoto[1], Keisuke Tsuge[2], Hiroyuki Fukami[3], Young-Soo Kim[3], Hiroshi Kitagaki[1]
([1]Fac. Agric., Saga Univ., [2]Industrial Technology Center of Saga prefecture, [3]KOBAYASHI Pharmaceutical Co., Ltd.)

Key words anti-inflammatory, red yeast rice, *Monascus spp.*

2Ha04 麹甘酒には食後血糖値及びインスリン量の上昇を抑制する成分が含まれる

○倉橋 敦[1], 中村 彩奈[1], 小黒 芳史[1], 渡辺 賢一[2], 尾崎 信紘[3], 後藤 博[4], 平山 匡男[4]
([1]八海醸造・研究開発, [2]新潟大院・医歯学総合, [3](一社) 新潟県労働衛生医学協会, [4]新潟バイオリサーチパーク)
a.kurahashi@hakkaisan.jp

【背景】麹甘酒は，我が国伝統の甘味飲料である．近年，麹甘酒の成分や機能性の研究が進みつつあり，単なる嗜好飲料から健康飲料としての認知が広がっているが，その主成分はグルコースであることから，体重増加や血糖値上昇への懸念の声が存在する．これまで我々は，麹甘酒の過剰摂取試験[1)]及び長期摂取試験[2)]から，1 日あたり麹甘酒 118 g 程度を継続摂取することは，安全性に問題がないことを報告している．本発表では，麹甘酒飲用後の血糖値及びインスリン量のモニタリングから，麹甘酒にはそれらを抑制する有用物質が含まれることが示唆されたので報告する．
【方法】本研究は，新潟バイオリサーチパーク研究倫理委員会の承認を得て，UMIN-CTR に事前登録の上で実施した(UMIN000033478)．事前検査によって選抜した成人 18 名を被験者に，無作為化，単盲検，3 群 3 期クロスオーバー試験として試験食-1 として麹甘酒 118 g，試験食-2 としてその 1/3 量の 39g，対照食として麹の原料である蒸米を麹甘酒と同等のグルコース量及びカロリーになるように酵素糖化した米糖化液 118 g を摂食させ，血糖値及びインスリン量を測定した．
【結果】対照食と比較して摂食量の少ない試験食-2 のみならず，対照食と同量である試験食-1 においても食後血糖値及びインスリン量の上昇の抑制が認められた．さらに，ラット反転小腸を用いた *ex vivo* 試験の結果からも麹甘酒からのグルコース吸収は，同濃度のグルコース水溶液に比べて低いことが示され，麹甘酒中には食後血糖値及びインスリン量の上昇を抑制する成分が含まれていることが示唆された．
1) 倉橋, 米井：日本醸造協会誌(2019)(印刷中), 2) 中村ら：日本農芸化学会 2019 年度大会 3B2p01

***Koji amazake* contains ingregients suppressing the postprandial increase in blood glucose and insulin level**

○Atsushi Kurahashi[1], Ayana Nakamura[1], Yoshifumi Oguro[1], Kenichi Watanabe[2], Nobuhiro Ozaki[3], Hiroshi Goto[4], Masao Hirayama[4]
([1]R&D Dept. Hakkaisan Brewery Co. LTD., [2]Grad. Sch. Med. Dent. Sci. Niigata Univ., [3]Niigata Assoc. of Occ. Health, Inc., [4]Niigata Bio-Res. Park Inc.)

Key words *koji*, *amazake*, blood glucose, insulin

2Ha05 卵麹の開発

○中川 拓郎[1], 山下 秀行[1], 宮本 哲也[2]
（[1]樋口松之助商店, [2]キユーピー）
t.nakagawa@higuchi-m.co.jp

鶏卵(卵)は準完全食品であり様々な調理方法が存在する一方で、その栄養成分はそのまま利用しており、微生物を利用した伝統的な食品はない。そこで古来より様々な醸造食品に利用されてきた麹菌を用いて卵の麹化を試みた。麹化する事で原料成分が変化し、調理では成し得ない風味を実現できると予想される。更に麹菌の酵素生産は基質によって変化する事から、卵の分解に適した酵素の生産が期待される。実際に卵麹で卵黄液を消化試験した際には、米麹とは異なる好ましい風味となった。卵と炭水化物源の混合原料では麹化した報告があるが、我々は様々な卵素材と種麹を組み合わせ、原料処理を工夫する事で卵と麹菌のみを用いる卵麹の製造方法を開発した。
【原料選定】散水及び製麹試験を行なった。ポリ袋内での散水時にダマを形成しにくく、かつ均一に分散する卵素材が数種類見つかった。更に麹菌を接種して麹化し、生育が良好で酵素力価が高い原料 1 種類を見出した。
【種麹選抜】10g 程度の小スケールで製麹試験を行い、生育が良好で過剰な胞子着生が起こらず、更に卵黄液の消化試験で風味が良好であった味噌用種麹 *Aspergillus oryzae* M-01 株を選んだ。
【スケールアップ】細菌汚染リスクを避ける為に M-01 株が良好に生育する最低限の水分量を決定した。原料処理として小さな固いダマが形成されない均一な散水混合と風味を損なわない加熱殺菌工程の検討を重ねた結果、10g から数十 kg までスケールアップを達成した。
【卵麹の酵素力価バランス】一般的な麹の原料である米や麦、大豆(醤油)の麹と比較すると卵麹はαアミラーゼが低く、pH6 の中性プロテアーゼが高い特徴的な酵素力価のバランスであることが分かった。

Development of the egg-koji

○Takuro Nakagawa[1], Hideyuki Yamashita[1], Tetsuya Miyamoto[2]
([1]Higuchi Matsunosuke Shoten Co. Ltd, [2]Kewpie Corp.)

Key words *Aspergillus oryzae*, egg, *Koji* making

2Ha06 麹を用いて美味しさを引き出した卵黄、「熟成卵黄」の開発

○宮本 哲也, 木原 明彦, 設樂 弘之
（キユーピー）
tetsuya_miyamoto@kewpie.co.jp

【目的】
卵は古代から世界中で食べられているにもかかわらず、チーズやみそなどのように微生物をそのまま利用し風味を向上した伝統的な食品はない。卵の風味の基盤である卵黄について現代の食品工業を見渡しても、微生物由来の酵素により機能性や風味を向上した製品はあるものの、微生物をそのまま利用した製品はない。そこで、本研究では和食の礎を築いている微生物である「麹」に着目し、卵黄を麹で加工することでおいしさを引き出した新しい食品の開発を試みた。

【試験方法】
麹菌 *Aspergillus oryzae* を卵素材で生育させた卵麹（(株）樋口松之助商店製）と食塩を卵黄に添加し加温熟成させ「熟成卵黄」を得た。
① 得られた熟成卵黄について風味の評価を行った。
② ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動と液体クロマトグラフ法でタンパク質の分解を測定した。
③ 揮発成分をＳＰＥＣ－ＧＳ／ＭＳ法により測定した。

【結果】
①熟成卵黄の風味は、卵黄らしさを残したままコクやうまみが増強され特有の美味しさが付与されていた。「卵麹」の代わりに米麹や微生物由来の酵素を用いた場合には卵黄らしさを損なう風味が発生し、卵黄としての美味しさの喪失が確認された。
②熟成卵黄では卵黄タンパク質の分解が認められた。また、遊離アミノ酸の総量は未処理の卵黄の 5 倍に増加していた。
③熟成卵黄で生成した揮発成分としてはジメチルトリスルフィド、メチオナールといったコクや熟成香にかかわるものや、３－メチルブタノールやフェニルアセトアルデヒドといった甘い香りの成分が認められた。

本研究の結果、麹を利用した熟成卵黄には、新しい食品としての大きな可能性があることが示唆された。今後はこの熟成卵黄の風味以外での可能性を調べるとともに、熟成卵黄独自の美味しさを追究することで食文化の多様化に貢献していきたいと考えている。

Development of delicious Koji-aged egg yolks.

○Tetsuya Miyamoto, Akihiko Kihara, Hiroyuki Shidara
(Kewpie Corp.)

Key words egg, *Aspergillus oryzae*, Koji, aging

2Ha07 α-EG とレジスタントプロテイン高含有のどぶろく醸造法

○高橋 雅弥, 内川 瞳, 町田 雅之, 尾関 健二
（金工大・ゲノム研）
ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【背景・目的】日本酒とどぶろくの製造法の違いはもろみを濾すか濾さないかの違いである。日本酒の仕込みに使用する蒸米や麹米は精米歩合 70%であるのに対し、どぶろくの仕込みでは、精米歩合 90%の一般的な炊飯米と麹米を使用する。これらの原料の違いがある中で、ethyl alpha-D-glucoside（以下 α-EG）と Resistant protein（以下 RP）の両者を高める醸造法の検討を目的とした。
【方法】どぶろくは掛米に炊飯したコシヒカリ・低グルテリン米、麹米に味噌醤油麹米・焼酎麹米を使用した。発酵温度は 15℃で発酵期間は 20 日間である。どぶろくの仕込み配合は掛米 29.9 g、麹米 4.5 g、水 13.9 mL、α-amylase（以下 AA） 0 or 50 mg、α-glucosidase（以下 AG） 0 or 2 mg である。α-EG は HPLC で定量した。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。
【結果・考察】味噌醤油麹米を使用したどぶろくでは、AG を添加することで、α-EG 濃度が 1%と高含有などぶろくを製造することができた。また、原料米の種類を変えたどぶろくでもほぼ同様な傾向がみられた。α-EG の有効量は 320-600 mg/日であるので、1 日 100 mL の飲用で、コラーゲンが増え、更に角質水分量が高い状態を維持できると推察できる。RP 量については AA、AG の添加の有無で大きな変化はなく、コシヒカリを使用したどぶろくでは 110-120 mg /100mL 含有することが分かった。また、低グルテリン米を使用したどぶろくでは 5 倍以上の RP を含有しており、一番高いもので 710 mg /100 mL 含有していた。RP の有効量が 113 mg /日であるので、1 日 100 mL 飲用で、便通改善、肥満抑制に効果があると推察できる。従って、α-EG・RP ともに 100 mL の飲用で有効量を超えるどぶろくが醸造できることが分かった。

Method for brewing α-EG and resistant protein rich doburoku

○Masaya Takahashi, Hitomi Uchikawa, Masayuki Machida, Kenji Ozeki
(Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words ethyl alpha-D-glucoside, Resistant protein, Prolamine, Doburoku

2Ha08 純米酒エキスに含まれる α-EG が真皮層のコラーゲンに与える影響

○三谷 恵一, 大浦 友紀, 原田 春佳, 根路銘 伸介, 奥田 伸哉, 坊垣 隆之
（大関総研）
keiichi.mitani@ozeki.co.jp

【背景及び目的】
演者らはこれまでにエチル α-$_D$-グルコシド(α-EG)がヒト皮膚線維芽細胞に対して増殖促進効果やコラーゲン，エラスチンなどの生産促進効果を有すること[1]，皮膚に塗布することによって短期的な保湿効果があることを報告している[2]．また α-EG 含有純米酒やそのエキスの継続飲用により真皮層のコラーゲン密度スコアが増加することが報告されている[3]．
本研究では純米酒エキスの飲用による真皮層のコラーゲン密度スコアの増加が α-EG によるものであるか，純米酒に含まれるその他成分によるものであるかを明らかにすることを目的とした．
【方法】
20～59 歳の男女 49 名を①α-EG 2%含有 純米酒エキス，②α-EG 1%含有 純米酒エキス，③α-EG 非含有 純米酒エキス，④飲用サンプルなしの 4 群に分けた．サンプル飲用群については被験者に毎朝飲用させ，飲用は 12 週間続けた．飲用終了後 4 週間は経過観察とし，摂取前，摂取中及び摂取後（2 週間毎）での両前腕のコラーゲン密度スコア（Derma Lab）を測定した．（二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験）
【結果】
①②α-EG 含有 純米酒エキス飲用群では、③α-EG 非含有 純米酒エキス飲用群と比較し，摂取 4 週目以降で真皮層のコラーゲン密度スコアが有意に増加しており，効果は α-EG 摂取中 12 週目までは維持されていた．また，③α-EG 非含有純米酒エキス飲用群と④飲用サンプルなしの群のコラーゲン密度スコアには差が見られなかった．この結果より，純米酒エキスの飲用による真皮層のコラーゲン密度スコアの増加は α-EG に起因することが明らかとなった．

1) T.Bogaki et al., Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2017 Sep;81(9): 1706-1711.
2) 坊垣ら,2015 年度日本農芸化学会大会講演要旨集 p.933
3) 尾関ら,第 69 回日本生物工学会大会要旨集 p.225

Effect of α-EG contained in sake extract on collagen in the dermal layer

○Keiichi Mitani, Yuki Oura, Haruka Harada, Shinsuke Nerome, Shinya Okuda, Takayuki Bogaki
(Gen. Res. Lab., Ozeki Corp.)

Key words alpha-EG, sake, collagen

2Ha09 芋焼酎由来成分の脳機能改善作用

○章 超, 河野 邦晃, 岩井 謙一
（霧島酒造）
zhang_chau@kirishima.co.jp

【背景・目的】
芋焼酎には高級アルコール、脂肪酸エステル、モノテルペンアルコール等の微量成分が含まれており、これまでにストレスの軽減作用や血栓溶解酵素の活性化作用等が報告されている。これらのストレス改善や血行促進の効果等により、脳機能の改善効果にも期待できるのではないかと考えた。そこで、芋焼酎蒸留後の冷却ろ過工程にて除去され廃棄される油性成分の焼酎油に着眼し、その有効利用の一貫として生理活性の探索を行った。本研究ではアミロイドβ誘発自発的交替行動障害モデルマウスに対する芋焼酎由来の油性成分の改善作用について検討し、遺伝子発現の解析によりその作用機序を考察した。

【方法】
試料は芋焼酎及びその焼酎油を使用した。焼酎油は芋焼酎原酒を冷却し、表面に浮いた物質を採取し、液液分離して回収した油性成分とした。マウスに芋焼酎及びその焼酎油を 2000 mg/kg の用量にて 15 日間経口投与し、投与 8 日目に 10 nmol/mouse のアミロイドβを左側脳室内に投与した。最終経口投与の 24hr 後に Y 字迷路試験によりマウスの自発的交替行動を測定した。迷路試験後にマウスの海馬を採取し、DNA マイクロアレイで遺伝子発現解析を行った。

【結果・考察】
迷路試験の結果、アミロイドβの投与により惹起されたマウスの自発的交替行動率が減少したのに対し、芋焼酎及びその焼酎油投与群では有意な増加が見られ、アミロイドβの脳室内投与で誘発されるマウスの自発的交替行動の障害を改善することが明らかになった。DNA マイクロアレイでの遺伝子発現の解析結果では、芋焼酎及びその焼酎油が炎症による機能障害の緩和、異常タンパク質蓄積の改善、免疫応答の制御ならびにタウタンパク質リン酸化の緩和を介して、アミロイドβ投与で惹起した脳・神経細胞障害が緩和され、記憶・学習の機能低下を改善することが示唆された。

Brain function improving effect of the sweetpotato shochu derived ingredients

○Cho Sho, Kuniaki Kawano, Ken-ichi Iwai
(Kirishima Shuzo)

Key words sweetpotato *shochu*, sweetpotato *shochu* oil, brain function improvement

2Ha10 牛乳由来ホエイを原料とする食酢醸造とその機能性解析

○河股 優輔[1], 若山 守[1], 林 順司[2], 豊竹 洋佑[1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]徳島大・生物資源）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

チーズ生産時、ホエイと呼ばれる水溶性成分が副産物として多量に排出される。ホエイは多様なタンパク質を含み、筋量増幅や認知症予防といった保険的機能をもつことが知られる。しかし、ホエイはラクトースと灰分成分の含量が高いことから、嗜好性と保存性に課題があり、食品素材としての開発は進んでいない。本研究では、ホエイの新たな利用法として、ホエイを原料とした食酢酵造を行い、嗜好性と保存性を改善すると共に従来の食酢に新たな機能性を加味することを検討した。
牛乳由来の脱塩ホエイ水溶液に、小麦ふすまもしくはナタネ粕で製麹した *Aspergillus oryzae* を添加することで、ホエイを糖化処理した。得られた糖化液を *Zymomonas mobilis* によるアルコール発酵、*Acetobacter pasteurianus* による酢酸発酵の順に供し、酢酸終濃度 4.2%となる食酢「ラクトー酢」の醸造に成功した。アミノ酸組成分析を行ったところ、ラクトー酢には穀物酢や黒酢よりもアミノ酸が豊富に含まれていた。特に Ala や Glu 含量が多く、ラクトー酢の強い甘味や旨味を引き出していることが示唆された。また穀物酢や黒酢と比較して、ラクトー酢に強いアンジオテンシン変換酵素阻害活性が認められたため、ラクトー酢の血圧降下作用が示唆された。ラジカル消去能を指標に抗酸化能を評価した結果、ラクトー酢が最も高い活性を示した。同様の手法を用いて醸造段階別に抗酸化能を評価したところ、ホエイ液のオートクレーブ処理及び糖化処理によって抗酸化能が上昇した。*A. oryzae* 無添加では抗酸化能に変化がなかったことから、*A. oryzae* 由来の麹成分が抗酸化物質の生成に関与していることが示唆された。さらに、ナタネ粕を用いた方が小麦ふすまを用いた場合よりも約 4 倍の抗酸化能を示すことから、ナタネ粕自体が抗酸化成分の生成に深く関わっていることが示唆された。

Vinegar production using cow's milk whey and its functional analysis

○Yusuke Kawamata[1], Mamoru Wakayama[1], Junji Hayashi[2], Yosuke Toyotake[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Fac. Bioresource., Tokushima Univ.)

Key words whey, *Aspergillus oryzae*, vinegar fermentation, antioxidant

2Ha11 熟成期黒酢発酵液由来乳酸菌の D-アミノ酸生成能について

○星 南穂子[1], 藤井 暁[2], 橋口 和典[2], 長野 正信[2], 亀谷 将史[1,3], 新井 博之[1,3], 石井 正治[1,3]
（[1]東大院・農生科, [2]坂元醸造, [3]東大微生物連携機構）
amishii@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

壺造り純米黒酢醸造において、発酵過程初期から継続的に乳酸菌が検出される。乳酸は発酵液の pH を低下させ酢酸発酵に不要な細菌の繁殖を防ぎ、乳酸菌が生産するその他の物質は黒酢の呈味性などに関与している。乳酸菌が生産するその他の物質の一つとして、D-アミノ酸に着目した。D-アミノ酸は呈味性に関与するだけでなく、人体内で重要な生理機能を担っていることが報告されている。黒酢は食酢の中でも D-アミノ酸を多く含むものとして知られている。過去に我々は D-アミノ酸高含有の熟成期黒酢発酵液について菌叢解析を行い、*Lactobacillus* 属の乳酸菌が優占化していたことを示している。この結果から、黒酢由来の乳酸菌は高い D-アミノ酸生成能を持つ可能性が考えられた。
熟成時期、期間の異なる 3 壺の熟成期黒酢発酵液から乳酸菌の単離を行った。単離された 17 株について 16S rRNA 配列を解析したところ、得られた部分の塩基配列に関しては 17 株全てでお互いに 100%一致し、Lactobacillus 属細菌と推定された。このうち 9 株と、比較対象として分譲菌株 *L. plantarum* NBRC 15891、*L. fermentum* NBRC 3071、*L. fermentum* NBRC3956 の 3 株を、初発菌体量を揃えて乳酸菌用天然培地で培養し、培養液中の DL-Ala、Ser、Glu、Asp を定量したところ、D-Ala、D-Ser、D-Asp が黒酢由来単離株で多量に蓄積していることが示された。特に D-Ala について、現在までに試した培養条件では、分譲菌株のうち D-Ala の蓄積量が最も多いものと比較しても、単離株では最大 4 倍程度の D-Ala の蓄積が見られた。培養前後の培地中の DL アミノ酸量を比較すると、いずれのアミノ酸種でも D 体の増加量と同等以上の L 体の減少が見られた。この事実より、L 体のラセミ化により D 体が生成されていると考えられる。発表においては、培養時間や培地の組成の違いによる D 体アミノ酸の蓄積量の変化も合わせて報告する。

D-amino acids productivity of lactic acid bacteria isolated from fermentation broth of rice black vinegar -during the aging process

○Naoko Hoshi[1], Akira Fujii[2], Kazunori Hashiguchi[2], Masanobu Nagano[2], Masafumi Kameya[1,3], Hiroyuki Arai[1,3], Masaharu Ishii[1,3]
([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Sakamoto Kurozu, Inc., [3]CRIIM, Univ. Tokyo)

Key words black vinegar, vinegar fermentation, D-amino acid, lactic acid bacteria

2Ha12 発酵食品データベースの構築と公開

○楠本 憲一, 曲山 幸生
（農研機構・食品部門）
kusumoto@affrc.go.jp

【目的】
日本人の食生活の変化と経済状況の悪化が重なり、バブル景気崩壊後から、主要な発酵食品である、味噌、醤油、漬物、清酒の消費量は減少し続けてきた。しかし、伝統発酵食品の魅力は、独特な香りと味、多様な栄養成分、そして長年にわたって日本人の生活と密着して形成された食文化にある。日本の豊かな食生活の一翼を発酵食品が担っている。近年、「和食文化」がユネスコ文化遺産に登録されたことを受けてその魅力を見直す機運が高まっており、業界の努力も加わり、上述した発酵食品の消費量も持ち直してきている。
本研究では、発酵食品の研究開発、生産、流通、教育の関係者が発酵食品の情報を簡便に収集するためのポータルサイトとして、データベースを提供することを目的とした。
【方法】
下記の環境でシステム開発をおこなった。
・DB サーバ：PostgreSQL、Web サーバ：Apache+PHP
登録するデータは、信頼できる文献に記載されたものに限定するという原則を設けた。これまでに、みそ文化誌、納豆沿革史、関係原著論文等をもとに登録作業をおこなった。
【結果】
食品（派生製品、成分等を含む）、微生物、原材料、食文化と、それが記載されている文献、問合せ先、ファイル、生理機能のデータと、それぞれの間の関連付け情報を登録したデータベースを構築した。現時点で、登録した食品数が約 2,600 件、文献数が約 2 万件である。閲覧システムは公開中（https://ffdb-web.dc.affrc.go.jp/）であり、公開から約 1 か月間のアクセス解析の結果についても発表する予定である。

Construction and release of a fermented food database

○Ken-Ichi Kusumoto, Yukio Magariyama
(NARO(NFRI))

Key words database, fermentation, fermented foods, food culture

2Ja01 日本酒生産にヒントを得た麹菌酵素カクテルと酵母を用いた高純度希少糖生産

○若井 暁[1,2], 堤 浩子[3], 秦 洋二[3], 荻野 千秋[4], 近藤 昭彦[1]
([1]神戸大院・科技イノベ, [2]海洋研究開発機構, [3]月桂冠・総研, [4]神戸大院・工)
wakais@jamstec.go.jp

機能性オリゴ糖は、整腸作用や免疫賦活活性などの様々な生体調節機能が見出されており、生活習慣病等の予防効果があるとして期待されている。日本は超高齢化社会に向かい、医療費負担による社会保障制度の破綻への危惧からも、健康寿命の延長は持続的な社会システムの構築に欠かせない一つの課題であり、機能性オリゴ糖はその一助になり得る食品補助成分と位置付けることができる。機能性オリゴ糖様の働きをすることが示唆されているイソプリメベロース（IP）は、キシログルカンを原料として複数の酵素処理を生産することが可能である。これまでに、我々は、遺伝子組み換え麹菌を用いて IP 生産に必要な酵素を大量生産し、これらを酵素カクテルとして用いることで、短時間で高濃度の IP を生産することに成功している。一方で、生産した糖液中には、副産物であるグルコースとガラクトースが著量残留しており、IP としての糖純度を上げる課題が残っていた。
本研究では、これまで使用していた異種由来セルラーゼの代替として麹菌由来エンドグルカナーゼをセルフクローニングして高発現することでオール麹菌酵素カクテルを調製した。麹菌エンドグルカナーゼを用いた酵素カクテルにおいても IP の高生産は可能であった。次に、副産物として必ず生じる、植物バイオマスキシログルカン由来の Glc や Gal の除去を目指した。日本酒生産にヒントを得て、糖消費に酵母を使用した結果、Glc や Gal をほぼ完全に消費することができ、長期間のインキュベーション後にも IP が消費されないことを確認した。本研究において、日本の発酵生産技術の知の蓄積から生み出された日本酒生産を参考にし、麹菌酵素カクテルと酵母の併用により、食品補助成分やサプリメントとしての経口摂取も可能な安全性を兼ね備えた高純度 IP を数日間中に g 単位で供給可能なシステムを構築することに成功した。

Production of rare-oligosaccharide isoprimeverose by Japanese sake brewing-like method

○Satoshi Wakai[1,2], Hiroko Tsutsumi[3], Yoji Hata[3], Chiaki Ogino[4], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]JAMSTEC, [3]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd., [4]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, rare sugar, *Saccharomyces cerevisiae*, oligosaccharide

2Ja02 Implementation of different fermentation strategies to enhance the production of microbial carotenoids from *Gordonia terrae* TWRH01

○Wai Leng Carmen Loh[1,2], John Chi-Wei Lan[1], Hui Suan Ng[2]
([1]Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan 32003, R.O.C., [2]Faculty Appl. Sci., UCSI Univ., Kuala Lumpur 56000, Malaysia.)
carmenwl94@gmail.com

Carotenoids serve as one of the most important group of natural lipid-soluble pigments exhibiting great biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory and provitamin A activities. Owing to their advantageous health effects, carotenoids are widely applied in various industries. Due to the increasing demand for natural carotenoids, attention has been raised by industries and academia in the production of microbial carotenoids which could be a promising alternative source of natural carotenoids to substitute the synthetic carotenoids. In present study, a carotenoid-producing strain, *Gordonia terrae* TWRH01 originally isolated from seawater in northern Taiwan was used by employing different fermentation strategies such as medium compositions comprising different concentrations of carbon and nitrogen sources, sodium chloride and pH as well as the different cultivation environment such as exposed to light or in dark. Ultrasound-assisted extraction was used to disrupt the intracellular pigments and the types of carotenoids were identified by GC-MS. The total carotenoid concentrations were quantified through HPLC and expressed as β-carotene equivalent. Besides, antioxidant capacity of the extract was evaluated through DPPH radical scavenging assay. Results revealed that the optimization of fermentation yielded 15.29 g L^{-1} dry biomass and 10.58 μM relative β-carotene concentration. Therefore, the new bacterial strain is a potential bioresource for the commercial production of natural carotenoids.

Implementation of different fermentation strategies to enhance the production of microbial carotenoids from *Gordonia terrae* TWRH01

○Wai Leng Carmen Loh[1,2], John Chi-Wei Lan[1], Hui Suan Ng[2]
([1]Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan 32003, R.O.C., [2]Faculty Appl. Sci., UCSI Univ., Kuala Lumpur 56000, Malaysia.)

Key words *Gordonia terrae*, fermentation, carotenoids

2Ja03 Evaluation of γ-aminobutyric acid (GABA) production by *Bacillus subtilis* BBEL02 using alternative carbon sources from wastes

○Arlene Cherilyn Asun[1], John Chi-Wei Lan[1], Hui-Suan Ng[2]
([1]Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan 32003, R.O.C., [2]Dept. Food Sci. Nutr., F. Appl. Sci., UCSI Univ., UCSI Hts., 56000 Cheras, KL, MY)
arlenecherilyn96@gmail.com

The γ-aminobutyric acid (GABA) is a major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system, commonly biosynthesized from decarboxylation of glutamic acid by glutamate decarboxylase (GAD). GAD can be expressed by human, animals and certain microorganisms, such as *Bacillus subtilis* used in this study. However, the bioproduction of GABA is inhibited by production cost mainly originated from media compositions. The increasing commercial demand for GABA in food and pharmaceutical industries demanded that an economical production of GABA by medium optimization and sourcing for alternative raw materials need to be established. In this study, the potential of industrial wastes, namely Brewers Spent Grain (BSG) and Microalgal Biomass (MB) as an alternative carbon source for GABA production was evaluated. BSG and MB were subjected to physical pretreatment coupled with chemothermal hydrolysis prior to fermentation to solubilize and de-structure the biomass to yield nutrients potentially used for fermentation. As a result, 0.14 g and 0.12 g of glucose were obtained per gram of BSG and MB, respectively. In addition, Total Kjedahl Nitrogen (TKN) of the hydrolysate was recorded to be 0.20 g and 0.22 g, respectively. Preliminary trials on the cultivation of *Bacillus subtilis* BBEL02 for bioproduction of GABA using media employing BSG and MB hydrolysate as carbon source had demonstrated promising outcomes thus far.

Evaluation of γ-aminobutyric acid (GABA) production by *Bacillus subtilis* BBEL02 using alternative carbon sources from wastes

○Arlene Cherilyn Asun[1], John Chi-Wei Lan[1], Hui-Suan Ng[2]
([1]Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan 32003, R.O.C., [2]Dept. Food Sci. Nutr., F. Appl. Sci., UCSI Univ., UCSI Hts., 56000 Cheras, KL, MY)

Key words *Bacillus subtilis*, waste, GABA, carbon source

2Ja04 Evaluation of polyhydroxyalkanoates (PHA) production by *Ralstonia eutropha* H16 in a single-chamber electro-fermentation system

○Yuen Hing Lai, John Chi-Wei Lan
(Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan 32003, R.O.C.)
yhing0829@gmail.com

One of the keys to the success of optimizing bio-products production is to balance the potential limitations for the bio-molecules formation in microbial metabolism. The electro-fermentation, a system integrates an electrochemical system with conventional fermentation by introducing electrodes, serves as a novel fermentation strategy. The introduction of electrodes as an additional electron donor or acceptor influences the electron balances within the fermentation environment and microbial metabolism which can potentially decrease the amount of by-products and increase the carbon yield throughout fermentation. This study aims to improve polyhydroxyalkanoates (PHA) production by *Ralstonia eutropha* H16 by electro-fermentation. A single-chamber bioreactor coupled with two graphite electrodes is utilized to grow *R. eutropha* H16 in order to investigate the impacts of supplied electric current on cell growth, PHA accumulation and substrate consumption. The electrodes act as a non-soluble electron donor (cathode) or acceptor (anode) which are connected to a direct current supply that applies electric current to the bioreactor. The yield of PHA could be increased as the metabolism pathway is facilitated by the electrodes, hence, electro-fermentation can be employed as a new fermentation strategy to accumulate target product with improved selectivity, enhanced microbial growth while reducing the use of additives for redox balances or pH control and increasing carbon efficiency.

Evaluation of polyhydroxyalkanoates (PHA) production by *Ralstonia eutropha* H16 in a single-chamber electro-fermentation system

○Yuen Hing Lai, John Chi-Wei Lan
(Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan 32003, R.O.C.)

Key words *Ralstonia eutropha* H16, electro-fermentation, polyhydroxyalkanoate

2Ja05 高温の嫌気条件下で誘導されるコリネ型細菌のグルコース消費促進に伴う遺伝子発現・酵素活性の変動

○松沢 弘貴[1], 豊田 晃一[2], 水野 光[1], 仁宮 一章[1,3], 髙橋 憲司[1], 乾 将行[2], 柘植 陽太[1,3]
（[1]金沢大院・自科, [2]RITE, [3]金沢大・新学術）
ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】コリネ型細菌はアミノ酸生産菌として工業的に広く利用されている有用細菌である。本菌を嫌気条件下で培養すると、増殖は停止するが代謝活性は維持され、乳酸とコハク酸を生産する。我々はこれまでに、好気条件下では増殖できない 42.5°C において嫌気条件下ではグルコース消費速度が向上し、乳酸・コハク酸の生産速度が増加することを報告した[1,2)]。本発表ではこの高温下におけるグルコース消費の促進を誘導する遺伝子発現と酵素活性の変動について検証した。
【方法と結果】試験菌株は野生株 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 株を使用した。嫌気条件下で菌株を 42.5°C と 30.0°C で培養し、DNA マイクロアレイを用いた転写解析の結果、グルコース消費速度が促進される 42.5°C ではヒートショック遺伝子群を含む 382 遺伝子の発現量が 2 倍以上に増加し、346 遺伝子の発現量が半分以下に低下した。グルコース消費に関わる遺伝子ではグルコーストランスポーター遺伝子とグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）遺伝子の発現量が 42.5°C で 2 倍以上に増加した。一方、グルコース-6-リン酸イソメラーゼやホスホフルクトキナーゼ、GAPDH、ピルビン酸キナーゼの比活性が温度の上昇と共に増加した。以上により、高温下におけるグルコース消費速度の促進効果はグルコース取り込みや解糖系の遺伝子の発現誘導と、酵素活性の増加に起因すると考えられた。

1)水野ら、第 69 回日本生物工学会大会 (2017)
2)水野、柘植、アグリバイオ 1:91-93 (2017)

Modulation of gene expression and enzyme activity at high temperature in *Corynebacterium glutamicum* under anaerobic conditions

○Hiroki Matsuzawa[1], Koichi Toyoda[2], Hikaru Mizuno[1], Kazuaki Ninomiya[1,3], Kenji Takahashi[1], Masayuki Inui[2], Yota Tsuge[1,3]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]RITE, [3]InFiniti, Kanazawa Univ.)

Key words gene expression, enzyme activity, high temperature, glucose consumption

2Ja06 高温下におけるコリネ型細菌を用いた乳酸・コハク酸生産と酵素ターンオーバーの必要性

○内倉 寛斗[1], 仁宮 一章[1,2], 髙橋 憲司[1], 柘植 陽太[1,2]
（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術）
ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】コリネ型細菌はアミノ酸生産菌として工業的に広く利用されている有用細菌である。本菌は 30°C を増殖至適温度とし、40°C を超えると増殖が停止する。本菌を嫌気条件下で培養すると、増殖は停止するが代謝活性は維持され、乳酸とコハク酸を生産する。我々はこれまでに、嫌気条件下では、本菌が増殖できない 40°C を超える高温条件でグルコース消費速度が向上し、乳酸・コハク酸の生産速度が増加することを報告した[1,2)]。高温下では酵素が不安定になることが予想されるため、本発表では乳酸・コハク酸生産反応における酵素のターンオーバーの必要性について検証した。
【方法と結果】乳酸生産株としてホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の欠損株を、コハク酸高生産株としては副生成物である乳酸や酢酸の生合成遺伝子を欠損させ、ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子をプロモーター置換により高発現した株を用いた。作製した代謝改変株を用いて、30°C、36°C、42°C、45°C で嫌気反応を行った結果、乳酸生産では 42°C で生産速度が最大となった。コハク酸生産では 36°C で生産速度が最大となったが、42°C でも増殖至適温度である 30°C より 23%高い生産速度を示した。次に酵素のターンオーバーの必要性を調べるため、新規のタンパク質合成を停止させるクロラムフェニコールの添加実験を 42°C で行った結果、乳酸はクロラムフェニコールの添加の有無に関わらず生産速度は同等であったが、コハク酸では 6 h 以降、生産が停止した。30°C でも同様に 6 h 以降はコハク酸生産が停止したことから、ピルビン酸からコハク酸に至るアナプレロティック経路か TCA サイクルに温度に関わらずターンオーバーが速い酵素が存在することが示唆された。

1)水野ら、第 69 回日本生物工学会大会 (2017)
2)水野、柘植、アグリバイオ 1:91-93 (2017)

Production of lactate and succinate by *Corynebacterium glutamicum* at high temperature and involvement of enzyme turnover

○Hiroto Uchikura[1], Kazuaki Ninomiya[1,2], Kenji Takahashi[1], Yota Tuge[1,2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]InFiniti, Kanazawa Univ.)

Key words high temperature, enzyme turnover, lactic acid, succinic acid

2Ja07 グルコース消費速度と代謝遺伝子の発現レベルの関係

○山口 陽[1], 内倉 寛斗[1], 豊田 晃一[2], 乾 将行[2], 柘植 陽太[1,3]
（[1]金沢大院・自科, [2]RITE, [3]金沢大・新学術）
ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】有用化合物生産においては高い対糖収率とともに高い生産速度が重要である。生産速度の向上には糖消費速度の増加が必要であるため、代謝遺伝子の高発現など代謝改変が試みられている。しかし、そもそも糖消費速度と代謝遺伝子群の発現レベルの関係は不明である。本発表ではアミノ酸生産菌であるコリネ型細菌を用いてグルコース消費速度と代謝遺伝子の発現レベルの関係を検証した。
【方法と結果】コリネ型細菌は嫌気条件下で培養すると、増殖は停止するが代謝活性は維持され、著量の乳酸と少量のコハク酸を生産する。従って嫌気条件下では細胞増殖を考慮する必要がなく、中央代謝経路のみに集中して糖消費速度と代謝遺伝子の発現レベルを検証できる利点がある。試験菌株として野生株である *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 株と乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（*ldhA*）欠損株を使用した。グルコースを単一炭素源とした最少培地を用いて生産反応を行った結果、*ldhA* 欠損株は野生株と比較してグルコース消費速度が 41%低下した。リアルタイム PCR で代謝遺伝子の発現量を測定した結果、グルコース消費速度が低い *ldhA* 欠損株ではグルコース取り込みに関わるホスホトランスフェラーゼシステムや、解糖系、アナプレロティック経路など、多くの遺伝子で発現レベルが低下した。*ldhA* 欠損株では乳酸生産によるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの再酸化ができないためにピルビン酸が蓄積する。従って、グルコース消費速度の低下かピルビン酸の蓄積により、代謝遺伝子群の発現レベルが低下した可能性が考えられた。

Correlation between glucose consumption rate and expression level of metabolic genes

○Akira Yamaguchi[1], Hiroto Uchikura[1], Koichi Toyoda[2], Masayuki Inui[2], Yota Tsuge[1,3]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]RITE, [3]InFiniti, Kanazawa Univ.)

Key words gene expression, glucose consumption, metabolic flux, glycolysis

2Ja08 増殖できない高温下におけるコリネ型細菌の代謝挙動

○小林 俊介[1], 仁宮 一章[1,2], 髙橋 憲司[1], 柘植 陽太[1,2]
（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術）
ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】微生物は増殖に際し、炭素源や窒素源、微量元素などを取り込んで自らの構成成分を生合成するとともに染色体を複製して二つの娘細胞に分裂する。一連の酵素反応からなる増殖の速度は温度によって大きく左右され、最適な温度が増殖至適温度と規定される。近年、物質生産菌を中心に実験室内進化により高温耐性を示す変異株の取得が進んでおり、次世代シークエンサーを用いて変異源の特定も行われているが、野性株の増殖至適温度がどのように決定されているのかは不明である。我々は代謝の観点から高温下における微生物の挙動に注目しており、増殖至適温度を決める因子を探索する一環として、本発表では増殖できない高温下における微生物の代謝挙動について検証した。
【方法と結果】モデル微生物としてアミノ酸生産菌であるコリネ型細菌を用いた。野生株である *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 株は 30°C を増殖至適温度とし、40°C を超えると増殖を停止する。ジャーファーメンターを用いて本菌を 30°C と 42°C で初期 OD_{600} をそれぞれ 0.8 と 10 で培養した。培地はグルコースを単一炭素源とした最少培地を用い、飽和酸素濃度の 20%以上を保つように通気・撹拌を行った。30°C における比増殖速度は 0.30 h^{-1} であり、42°C では細胞は増殖しなかった。しかし、増殖できない 42°C でもグルコースは消費され、単位菌体量あたりのグルコース消費速度は 30°C の 60%を示した。42°C では通常は嫌気条件下でのみ見られる乳酸の生産が確認され、消費したグルコースの 18%が乳酸に変換された。以上により、増殖できない高温下においてもグルコースは消費されるが、増殖至適温度とは大きく異なる代謝状態にあることが示唆された。遺伝子発現・酵素活性の解析結果と合わせて報告する。

Metabolic alteration in *Corynebacterium glutamicum* at non-proliferating high temperature

○Shunsuke Kobayashi[1], Kazuaki Ninomiya[1,2], Kenji Takahashi[1], Yota Tsuge[1,2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]InFiniti, Kanazawa Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, high temperature, metabolic response, glucose consumption

2Ja09 耐熱性コリネ型細菌による高温グルタミン酸発酵

○古賀 凌[2], 友広 いずみ[1], 曽川 沙希[1], 松谷 峰之介[2],
ナンタポン ナワラート[3], 片岡 尚也[1,2,4], 藥師 寿治[1,2,4],
松下 一信[1,2,4]
（[1]山口大・農, [2]山口大院・医系, [3]スラナリー工科大, [4]中高温微生物セ）
kazunobu@yamaguchi-u.ac.jp

【背景と目的】Corynebacterium glutamicum は、グルタミン酸やリジンなどのアミノ酸生産を行うグラム陽性菌である。この細胞増殖およびグルタミン酸発酵は熱を発生させ、それが増殖を妨げ、そしてその生産効率を低下させる。この問題を克服するために、発酵槽の温度は冷却システムによって３０℃未満に保たれてきたが、そのシステムには多大なコストがかかることが問題となっている。そこで私達は、温度に依存することなく様々な温度環境下でグルタミン酸を生産する株の創成を目的としており、これまでいくつかの耐熱性 C. glutamicum の取得や耐熱化育成を試みてきた。今回、得られた耐熱性株を用いて、様々な温度条件下でのペニシリン添加によるグルタミン酸生産性を比較し、有用な耐熱性株の検索を行うとともに、その有効性の解析を行った。
【使用菌株および結果】フラスコ培養の結果より耐熱性株であると考えられる分離株 PP80 と N24 株、そしてコントロール株である KY9002 株を Jar fermentor を用いて 30, 37, 39℃条件下でグルタミン酸生産量を比較した。その結果、KY9002 は温度が上昇するごとに生産量が低下したのに対して、耐熱性株である PP80 と N24 は高温条件下でも高いグルタミン酸生産性を示した。特に、PP80 はどの温度条件下でも最も高いグルタミン酸生産性を示し、39℃でも 30℃に近い生産性を示した。さらに、PP80 株の各温度条件下での培養における消費電力についても解析したので、併せて報告する。
（本研究は協和発酵バイオ・生産技術の協力を得て、JST-ALCA の支援のもと行われた。）

Optimization of glutamic acid fermentation in thermo-tolerant Corynebacterium glutamicum

○Ryo Koga[2], Izumi Tomohiro[1], Saki Sogawa[1], Minenosuke Matsutani[2], Nawarat Nantapong[3], Naoya Kataoka[1,2,4], Toshiharu Yakushi[1,2,4], Kazunobu Matushita[1,2,4]
([1]Fac. Agric., Yamaguchi Univ., [2]Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ., [3]Suranaree University of Technology, [4]Research Center for Thermotolerant Microbial Resources, Yamaguchi Univ)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, glutamate fermentation, Thermotolelance

2Ja10 ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の欠失が *Corynebacterium glutamicum* のリジン生産に与える影響

○新森 彰信, 郭 朕, 和田 大, 横田 篤
（北大院・農）
yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp

【背景と目的】*Corynbacterium glutamicum* は，様々な物質生産に利用されており，本菌の代謝経路に関する基盤知見の獲得は重要である．本研究では，リジンの前駆体であるオキサロ酢酸（OAA）の供給経路に関する知見を得ることを目指した．OAA は主にピルビン酸カルボキシラーゼ（PC）とホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）によるアナプレロティック反応で供給される．過去には，フラックス解析により PC がアナプレロティック反応の 90%を担っているとした報告や，PC の過剰発現によりリジン生産が向上したという報告がある．一方で，リジン生産時の PC 反応のフラックスはほぼ 0 であると推測した報告もある．このように PC の重要性については相反する報告が存在する．今回は，*C. glutamicum* に PC 欠損を導入してリジン生産試験を行い，リジン生産における PC の重要性を改めて評価した．
【方法】*C. glutamicum* ATCC13032 にアスパラギン酸キナーゼのフィードバック阻害解除変異（AK^{fbr}）を導入したリジン生産株（P 株）と，P 株に PEPC のフィードバック阻害解除変異（$PEPC^{fbr}$）を導入した株（R 株）の 2 株を親株として二重相同組換え法により PC をコードする *pyc* 遺伝子を欠失させた. Western-blotting により PC タンパク質が存在しないことを確認した後，これらの株を 2L ジャーファーメンターを用いて培養した．
【結果と考察】両 PC 欠損株において，生育，糖消費およびリジン最大生産量はそれぞれの親株に比べて変化しなかったが，リジン生産の遅れが観察された．また，$PEPC^{fbr}$ は PC 欠損によるリジン生産の遅れを緩和した．両 PC 欠損株で，PEPC 活性は PC 欠損により変化しなかった．これらの結果は，PC がアナプレロティック反応の大半を担うという報告とは相反しており，PC の重要性はそれほど高くないと考えられた．

The effects of pyruvate carboxylase gene deletion on lysine production in *Corynebacterium glutamicum*.

○Akinobu Shinmori, Zhen Guo, Masaru Wada, Atsushi Yokota
(Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, lysine production, pyruvate carboxylase, oxaloacetate

2Ja11 糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* による抗体等バイオ医薬品製造技術の開発

○深田 寛朗[1], 十倉 充範[2], 臼田 佳弘[1]
（[1]味の素バイオ・ファイン研, [2]味の素研究開発企画部）
hiroaki_fukada@ajinomoto.com

【背景と目的】糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* はセルラーゼ生産菌として分離され、高いタンパク質分泌能を持つことが知られている。我々は、*T. cellulolyticus* の細胞外プロテアーゼ活性が低いなど、異種タンパク質生産に適した性質を有することを見出し、抗体などのバイオ医薬品生産の発現宿主としての可能性を検討した。
【結果と考察】*T. cellulolyticus* のゲノムにヒト血清アルブミン（HSA）遺伝子を相同組換えにより導入し、異種タンパク質発現能を検討した。セルラーゼ発現系を利用することで HSA の分泌生産に成功したが、セルラーゼなどの宿主由来の高発現分泌タンパク質と比較して低い分泌発現量であった。また、弱いながらプロテアーゼ活性が認められ、分泌発現された HSA の分解も課題となった。分泌発現量に関しては、宿主由来のセルラーゼ遺伝子の一部を融合タグとして用いることで大幅に改善し、融合タグを分泌発現過程でプロセシングすることにも成功した。プロテアーゼ活性についても、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析から同定されたプロテアーゼ遺伝子を欠損することで抑制することができた。改良した発現系を用い、抗体の分泌発現を検討したところ、サブクラスの異なる複数種の抗体の分泌発現が可能であった。また、本発現系で生産した抗体の機能や性質についても確認をしており、*T. cellulolyticus* が抗体などのバイオ医薬品生産の分泌発現系となることを示した。

Development of secretory protein expression system for biopharmaceuticals using *Talaromyces cellulolyticus*

○Hiroaki Fukada[1], Mitsunori Tokura[2], Yoshihiro Usuda[1]
([1]Res. Inst. Biosci. Prod. Fine Chem., Ajinomoto Co., Inc., [2]R&D Planning Dept., Ajinomoto Co., Inc.)

Key words *Talaromyces cellulolyticus*, antibody, biopharmaceutical, albumin

2Ap01 組換え L-メチオニン脱炭酸酵素の迅速簡便な精製法の確立及び結晶構造解析

○大川 敦司[1], 林 将也[1], 室田 昌輝[2], 志波 智生[2], 原田 繁春[2],
根本 理子[1], 田村 隆[1], 稲垣 賢二[1]
（[1]岡山大院・環境生命, [2]京工繊大院・工芸科学）
kinagaki@okayama-u.ac.jp

【目的】放線菌 *Streptomyces* sp. 590 由来 L-メチオニン脱炭酸酵素(MetDC)は補酵素として, ピリドキサール 5'リン酸(PLP)を持つ酵素で, L-Met の脱炭酸反応を触媒する。本酵素は, L-Met への高い基質特異性を持つため, L-Met 飢餓による抗腫瘍活性を持つ酵素である。MetDC の高い基質特異性は抗腫瘍活性だけでなく L-Met の定量用酵素として利用できることを明らかにしてきた。しかし, 放線菌における MetDC の生産量は極微量であるため, 大腸菌を用いた異種発現系によって MetDC の大量精製系の構築を行った。また, 本酵素の構造と機能の相関解析を目指して MetDC の結晶構造解析を行った。【方法】MetDC 発現用プラスミド pET MetDC-KanR を用いて大腸菌 *E. coli* BL21(DE3)を形質転換し, MetDC を発現させた。精製は金属アフィニティーカラムを用いた。得られた結晶は Spring-8 BL41XU で解析データを収集し, 重原子置換法によって位相を決定した。【結果及び考察】大量精製法によって得られた MetDC は 1 ステップで精製度をおよそ 130 倍にまで向上することが出来た。その回収率は約 60%であり, 非常に効率の良い精製法が確立できた。結晶化はタンパク質濃度と PEG #1500 の濃度を検討することによって 2.2Å の分解能の結晶を得ることが出来た。得られた結晶は白金の単波長異常分散法（SAD 法）により位相決定に成功し, MetDC の全体構造や活性中心構造を明らかにした。得られた結晶はサブユニットあたり 1 分子の PLP が存在しており, 内部アルジミン構造をとった状態で得られた。ヒト由来の L-ヒスチジン脱炭酸酵素(HisDC)との相同性があり, 活性中心残基も類似していることが明らかとなった。また HisDC の基質認識に重要な残基として報告のある S349 が MetDC でも保存されていることが明らかとなり, MetDC でも基質認識に重要な役割を持つことが考えられる。現在, 変異導入実験を行っている。

Quick and simple purification and structural analysis of recombinant L-methionine decarboxylase.

○Atsushi Okawa[1], Masaya Hayashi[1], Masaki Murota[2], Tomoo shiba[2], Shigeharu Harada[2], Michio Nemoto[1], Takashi Tamura[1], Kenji Inagaki[1]
([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words L-methionine decarboxylase, pyridoxal-5'-phosphate, enzyme purification, crystal structure

2Ap02 高基質特異性酵素 L-グルタミン酸オキシダーゼの活性中心アミノ酸残基の機能解析

○矢野 佳果[1], 松尾 慎作[1], 伊藤 菜奈子[2], 今田 勝巳[2], 日下部 均[3], 根本 理子[1], 田村 隆[1], 稲垣 賢二[1]
（[1]岡山大院・環境生命, [2]阪大院・理, [3]（株）エンザイムセンサ）
kinagaki@okayama-u.ac.jp

【目的】L-グルタミン酸オキシダーゼ(LGOX)は，L-Glu の酸化的脱アミノ化反応を触媒する L-アミノ酸オキシダーゼの一種である．LGOX の基質特異性は極めて厳格であり，様々なバイオセンサーに利用されている．我々は LGOX の活性中心残基のうち，Trp564 が活性中心の空間保持に寄与すること，Arg305 が LGOX の L-Glu 認識に最も重要であることを明らかにした．この検討過程で作製した R305X 変異酵素は HisOX，TyrOX，および ArgOX といえるような酵素に基質特異性が変化していた．R305E 変異 LGOX (ArgOX)の X 線結晶構造解析の結果から，新たに Glu617 残基が基質と相互作用している可能性が考えられた．Glu617 の機能解明を目的として同残基への部位特異的変異導入を行い，E617X 変異 LGOX を作製し，精製及び性質検討を行った．【方法】LGOX 発現用ベクター pGOx を鋳型として部位特異的変異導入を行うことにより変異遺伝子を作製後，*E. coli* JM109 を形質転換，発現させて，精製，および性質検討を行った．酵素活性は酵素反応で生成する過酸化水素を 4-アミノアンチピリン法で定量し測定した．【結果】作製した変異酵素の中で E617K 変異 LGOX は興味深いことに L-Tyr を最も良い基質とし，厳格な基質特異性を示した．L-Tyr に対する *K*m は 2.5 mM であり，これまでに R305X 変異で作製した TyrOX (R305H 変異 LGOX)とほぼ同程度の基質親和性を示した．現在，Lys 以外のアミノ酸を導入した E617X 変異酵素の作製，性質検討を行っている．

Functional analysis of active site residues of L-glutamate oxidase

○Yoshika Yano[1], Shinsaku Matsuo[1], Nanako Itou[2], Katsumi Imada[2], Hitoshi Kusakabe[3], Michiko Nemoto[1], Takashi Tamura[1], Kenji Inagaki[1]
([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., [3]Enzyme Sensor Co. Ltd.)

Key words L-glutamate oxidase, active site residue, biosensor, substrate specificity

2Ap03 *Geobacillus kaustophilus* 由来グリシンオキシダーゼの基質阻害および基質特異性の改変

○東浦 優希[1], 小田 龍佑[1], 川崎 大志[1], 野村 隆臣[2], 新井 亮一[2], 西矢 芳昭[1]
（[1]摂南大・理工・生命科学, [2]信州大・繊維・応用生物）
nishiya@lif.setsunan.ac.jp

【背景と目的】 グリシンオキシダーゼ（Gox）は、*Bacillus subtilis* のゲノムデータに基づき発見された、グリシンの酸化的脱アミノ化を触媒する酵素である。本酵素は分析用途での応用が期待されている。複数のグラム陽性桿菌由来 Gox の酵素特性が解明された結果として、*Geobacillus kaustophilus* 由来 Gox（GoxGk）は基質阻害特性というユニークな特徴を示すことが分かった。そこで GoxGk の X 線結晶構造解析が行われ、分解能 2.2 Å での構造決定に成功した（PDB ID: 4YSH）。本研究では GoxGk の立体構造を基に基質阻害低減や基質特異性向上変異をデザインし、作成した変異酵素の特性評価を行った。
【方法】 立体構造解析は統合計算化学ソフトウェア MOE を使用した。変異体遺伝子は Inverse PCR 法にて作成し、His-tag 融合タンパク質として発現させた酵素をキレートカラムにて精製した。Gox 活性は、4-アミノアンチピリン－ペルオキシダーゼ系により測定した。
【結果と考察】 GoxGk の結晶構造情報より、活性中心ポケットにリガンドとしてグリシンが 2 分子入っており、基質阻害の要因と考えられた。そこで基質が複数結合しない様、ポケットが狭まった変異酵素を 3 種デザインした。各酵素のキネティック・パラメーターを比較したところ、変異酵素は基質阻害を低減できた。また、変異酵素の比活性は野生型の 2～8 倍向上した。したがって、本研究により GoxGk の機能向上が果たされ、実用化への貢献も期待された。また、活性中心の R336 残基近傍に位置する E55 の静電的相互作用に着目し、E55Q を調製した。野生型に比して E55Q は触媒効率が低下したが、基質特異性が高まると共に基質阻害が低減した。これら特性変化は、静電的相互作用の変化により R336 のフレキシビリティが増加し、結果として活性中心ポケットの空間が変化したためと考えられる。

Improvement of substrate inhibition and substrate specificity of glycine oxidase from *Geobacillus kaustophilus*

○Yuki Higashiura[1], Ryusuke Oda[1], Taishi Kawasaki[1], Takaomi Nomura[2], Ryoichi Arai[2], Yoshiaki Nishiya[1]
([1]Dept. Life Sci., Setsunan Univ. Sci. Eng., [2]Dept. Appl. Biol., FTST, Shinshu Univ.)

Key words glycine, oxidase, protein engineering, crystal structure

2Ap04 安定性を向上したグリシン酸化酵素変異体を用いたグリシン測定法の構築

○巽 萌美[1], 星野 亘[1], 小玉 優哉[1], Techawaree Ueatrongchit[2], 高橋 一敏[1], 山口 浩輝[1], 田上 宇乃[1], 宮野 博[1], 浅野 泰久[2], 水越 利巳[1]
（[1]味の素株式会社, [2]富山県大・生医工研セ）
moemi_tatsumi@ajinomoto.com

【背景と目的】 アミノ酸は生命にとって必須の化合物であり、生体内の濃度は食事や様々な疾患によって変動するため、アミノ酸濃度を測定することは食品科学、生理学研究、臨床領域など幅広い分野において重要な意義を有する。本発表で対象となるグリシンは、その血中濃度が肥満や糖尿病など様々な疾病と関連が示唆されている。従来、アミノ酸の測定には液体クロマトグラフィー法や質量分析法などが広く用いられてきたが、複数のアミノ酸を高い精度と正確性で網羅的に測定できる一方、大型かつ高額な装置とそれを扱える高い専門性を必要とするため、アミノ酸測定の機会は非常に限られていた。この課題解決のため我々は、アミノ酸代謝酵素を用いた酵素法によるアミノ酸濃度測定法の検討を進めてきた。しかし、既にトリプトファン酸化酵素やヒスチジン脱炭酸酵素などの例で報告したように、野生型のアミノ酸代謝酵素には活性や特異性、長期保存安定性など性質が不十分な酵素も多い。そこで、分子構造を参考に酵素工学により合理的改変を行い、高い活性や基質特異性、保存安定性を持つ酵素への高機能化を達成してきた。本発表では安定性の低いグリシン酸化酵素について、高い保存安定性の獲得に成功したので紹介する。
【結果】 *Bacillus subtilis* strain 168 由来グリシン酸化酵素について、システイン残基および補酵素 FAD 結合に関与する残基に注目して変異体をデザイン・評価した。その結果、野生型酵素は 4 ℃保存 1 ヶ月で 50％失活するのに対し、同温度で 1 年間保存しても 80％以上の活性を保つ安定な変異体を創出した。当該変異体を用いてヒト血漿中のグリシン濃度を比色検出により定量した結果、機器分析の測定値と比較して、定量値の乖離は 5.3％以下であり、添加回収率や再現性も良好な分析法を構築できた。

Enzymatic glycine analysis method using a stable glycine oxidase mutant

○Moemi Tatsumi[1], Wataru Hoshino[1], Yuya Kodama[1], Techawaree Ueatrongchit[2], Kazutoshi Takahashi[1], Hiroki Yamaguchi[1], Uno Tagami[1], Hiroshi Miyano[1], Yasuhisa Asano[2], Toshimi Mizukoshi[1]
([1]Ajinomoto Co., Inc., [2]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

Key words amino acid analysis, enzyme assay, protein engineering

2Ap05 超好熱古細菌（始原菌）由来プロテアーゼ（Tk-SP）の Pro ペプチドが成熟化に与える影響

○長尾 征秀, 前川 大樹, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史
（阪大院・工）
kogay@mls.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】Tk-SP は超好熱古細菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来のサチライシン様プロテアーゼである。本酵素は産業用酵素として期待されているが、大腸菌での発現量が限られている。Tk-SP の前駆体（Pro-Tk-SP）は Pro ペプチドが阻害剤として働き、プロテアーゼの自己分解を抑制することで成熟化効率を高めている。本研究では、Pro ペプチドと酵素活性ドメイン間の相互作用が成熟化に及ぼす影響を調査した。
【方法・結果】Pro-Tk-SP に、ドメイン間に静電相互作用の形成が見込める変異を 4 種類（G218D、F103R、S223K、N227D）、ドメイン間の界面の α ヘリックス上の Trp を除去する変異を 2 種類（W231Y、W268Y）導入し、計 6 種類の変異体を構築した。本研究では、これらの変異体について Pro ペプチドの Tk-SP に対する阻害能（IC_{50}）と、バイオレイヤー干渉法によりドメイン間の結合力を測定した。これらの値が野生型と比較して特に上昇した 2 つの変異体（S223K 変異体、W231Y 変異体）について阻害剤である Tk-Pro との共発現系を構築し、総活性と比活性から成熟化の効率を評価した。Tk-SP の活性を 50％阻害する Pro ペプチドの濃度（IC_{50}）が野生型では 6.43 μM であるのに対し、S223K 変異体と W231Y 変異体はそれぞれ 0.24 μM と 0.70 μM であった。またドメイン間の相互作用（K_D）は野生型が 6.83×10^{-7} M であるのに対し、S223K 変異体と W231Y 変異体はそれぞれ 5.97×10^{-8} M と 1.34×10^{-7} M であった。また酵素活性測定を行ったところ、野生型の総活性と比活性はそれぞれ 4.36×10^{4} Units と 9.75 Units/mg であるのに対し、S223K 変異体と W231Y 変異体はそれぞれ 7.88×10^{3} Units と 1.97 Units/mg、7.60×10^{4} Units と 23.57 Units/mg であった。この結果より、ドメインの間の相互作用を強化することにより Tk-SP の自己分解が抑制されることが示唆された。

The effect of propeptide binding affinity on maturation process of the protease from a hyperthermophilic archaeon

○Nagao Masahide, Maegawa Daiki, Yamano-Adachi Noriko, Koga Yuichi, Omasa Takeshi
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words subtilisin, thermostable enzyme, enzyme maturation

2Ap06 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, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史
（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°C, 100°C における半減期が 100 分の耐熱性に優れた 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, 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, ベクターを構築した. 発現後, split intein の PTS により, Tk-SP を再構成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°C) 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 を 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 V168, Y199, Y239, D307 を *Npu* DnaE intein の挿入箇所として設定した. これらの断片の発現を行ったところ, どの断片も増殖阻害を起こさず発現できた. Y239, D307 については N 末端側と C 末端側の断片のどちらも可溶性発現した. これらの断片について, カラム上で PTS を行う, PTS on-column により Tk-SP を再構成し, 酵素活性を測定した. その結果, Y239 で再構成された Tk-SP が野生型と同程度の活性を示した. Tk-SP において, *Npu* DnaE intein を利用した再構成系の構築に成功し, Y239 は PTS に適した挿入箇所であることが示唆された.

Studies on reconstruction of a thermostable protease using protein *trans*-splicing

○Yusuke Tatsumi, Noriko Yamano-Adachi, Yuichi Koga, Takeshi Omasa
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words split intein, subtilisin, thermostable enzyme

2Ap07 *Elizabethkingia* sp. TT1 由来組換え L-アミノ酸エステラーゼの高発現系の構築と菌体反応による Val-Gly 合成

○大西 敦也 [1], 田中 貴大 [1], 林 順司 [2], 豊竹 洋佑 [1], 若山 守 [1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]徳島大院・社会産理工）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

【目的】
短鎖ペプチドはアミノ酸単体にはない優れた生理機能を有することなどから、近年、酵素を利用したペプチド合成法に関する様々な研究が行われており、塩味、甘味、こく味など味覚に関わるものから血圧降下作用、疲労回復作用など健康に関わるペプチドなど、幅広く研究成果が報告されている。本研究室では、コク味物質として知られる γ-Glu-Val-Gly の構成成分である Val-Gly に着目し、本ペプチドの効率的合成法を確立することを目的として Val-OMe と Gly から Val-Gly 合成能を持つ *Elizabethkingia* sp. TT1 由来 L-アミノ酸エステラーゼ (TT1LAE)を見出した。今回は、組換え TT1LAE の精製と諸性質、高発現系の構築及び Val-Gly の菌体反応を検討した。
【方法・結果】
Elizabethkingia sp. BM10 由来 Cocaine esterase からプライマーを設計し、*Elizabethkingia* sp. TT1 のゲノムより PCR によって目的遺伝子の増幅を行った。シークエンス解析の結果、取得した遺伝子のアミノ酸配列と既報の L-アミノ酸エステラーゼのアミノ酸配列に高い相同性(70%)が確認されたため、TT1LAE 遺伝子の取得に成功したと判断した。そこで、TT1LAE 遺伝子を pET22b(+)ベクターに組込み、大腸菌 BL21(DE3)株に導入した。酵素の精製を行い、諸性質を検討した結果、本酵素の至適 pH は 9.0、至適温度は 25℃、安定温度は 25℃~40℃、安定 pH は 5.0~9.0 であった。続いて、結晶化に向けた大量発現系として、pCold-TF ベクターに組込むことで、trigger factor との共発現による可溶性画分への高発現が確認でき、本酵素は TF の切断除去に関わらず Val-Gly 合成活性を有することが分かった。また、将来的な生産系の検討として、pUC18 ベクターに組込み、Val-Gly の菌体内合成における培養条件を検討した。

High expression system of recombinant L-amino acid esterase from *Elizabethkingia* sp. TT1 and Val-Gly synthesis in cell reaction

○Atsuya Onishi[1], Takahiro Tanaka[1], Junji Hayashi[2], Yosuke Toyotake[1], Mamoru Wakayama[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Grad. Sch. Biosci. Bioind, Tokushima Univ.)

Key words dipeptide, Val-Gly, L-amino acid esterase

2Ap08 アスパラギン合成酵素を用いた β-アスパルチル化合物合成法の検討

○山田 泰蔵 [1], 林 順司 [2], 豊竹 洋佑 [1], 若山 守 [1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]徳島大・生物資源）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

【背景】β-アスパルチル化合物は、アスパラギンの β カルボニル基がアミノ酸やアミンでアミド化された化合物である。β-L-Asp-L-Lys や β-L-Asp-L-Arg が肌や髪に対して保湿効果を有することは報告されているが、そのほか生理活性をもつ β-アスパルチル化合物は知られていない。しかしテアニンやグルタチオンなど、生理活性をもつ γ-グルタミル化合物は多く報告されており、β-アスパルチル基と γ-グルタミル基はメチレン基 1 つの差異だけで構造が類似していることから、新規の生理活性を有する β-アスパルチル化合物の存在が期待される。この可能性を検討するには、まず β-アスパルチル化合物の生産法を確立する必要がある。そこで本研究では、*Streptococcus thermophilus* LMG 18311 株由来アスパラギン合成酵素 (StAS) に着目し、L-アスパラギン酸のアミド化を利用した β-アスパルチル化合物生産法を検討した。
【方法・結果】StAS 遺伝子を pET-28a(+)ベクターに組み込んだ発現プラスミドを大腸菌 BL21(DE3)株に導入し、StAS の発現を誘導した。細胞破砕液をアフィニティ精製および陰イオン交換精製に供した結果、高純度の StAS を得た。本酵素の最終精製倍率は 35.9 倍、収率は 43.4%であった。StAS の諸性質について調べたところ、至適温度が 37℃、安定温度が 30 ~ 40℃、至適 pH が pH 7.5、安定 pH が pH 5.5 ~ 9.0 であった。補因子の検討を行ったところ、本酵素の補因子は Mg^{2+}が最適であった。StAS はドナー基質として L-アスパラギン酸を認識したが、D-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、D-グルタミン酸は認識しなかった。アクセプター基質としては、オリジナルの基質であるアンモニアだけでなく、ヒドロキシルアミンおよびメチルアミンに対しても活性を示した。このことから、StAS を用いて様々なアミン由来の β-アスパルチル化合物を生産できる可能性が示された。

Synthesis of β-aspartyl compound using asparagine synthetase

○Taizo Yamada[1], Junji Hayashi[2], Yosuke Toyotake[1], Mamoru Wakayama[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Grad. Sch. Bioresource, Tokushima Univ.)

Key words asparagine synthetase, beta-aspartyl compound, amidation

2Ap09 *Thermococcus kodakarensis* 由来 β-アスパルチルトランスペプチダーゼ遺伝子のクローニング、発現および諸性質の解明

○深瀬 葵 [1], 林 順司 [2], 高木 一好 [1], 豊竹 洋佑 [1], 若山 守 [1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]徳島大院・社会産理工）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】
β-アスパルチルトランスペプチダーゼ（以下 BAT）は、L-アスパラギンとアミノ酸やアミンとの反応で β-アスパルチル化合物を合成する転移反応を触媒する酵素である。β-アスパルチル基とメチレン基 1 つのみ異なる構造をもつ γ-グルタミル基化合物は γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（以下 GGT）によって合成され、有用な生理活性をもつ化合物の報告も多く、GGT について盛んに研究されている。一方、β-アスパルチル基と γ-グルタミル基の構造には類似性があるものの、生理活性を有する β-アスパルチル化合物の報告は少なく、BAT を用いた β-アスパルチル化合物の合成に関する報告は未だない現状である。本研究では安定性の高い BAT の取得を目的として、*Thermococcus kodakarensis* 由来 BAT（TkBAT）に着目した。TkBAT の遺伝子クローニング、大腸菌での発現および化学的諸性質について検討した。
【方法・結果】
T. kodakarensis のゲノムを鋳型として TkBAT 遺伝子を PCR により増幅した。増幅 TkBAT 遺伝子を含む DNA 断片を pCold-TEV ベクターの *Nde*I と *Eco*RI サイトへ挿入し、発現プラスミド pCold-TEV/TkBAT を作製した。pCold-TEV/TkBAT で *Escherichia coli* BL21-Codon Plus(DE3)-RIPL 株を形質転換し、TkBAT を高発現させた。超音波破砕により無細胞抽出液を得たのちに、熱処理（70℃, 20 分間）、Ni^{2+}アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、精製酵素を得た。TkBAT の化学的諸性質について精製酵素を用いて検討した。TkBAT を 15 分間各温度で処理した結果、30℃処理の比活性を対照とした場合、50～90℃においても 80 %以上の残存活性を維持することが分かった。TkBAT の至適温度、至適 pH、pH 安定性について *E. coli* K-12 株由来 BAT（EcBAT）との比較検討も行った。

Cloning, expression and characterization of β-aspartyl transpeptidase gene from *Thermococcus kodakarensis*

○Aoi Fukase[1], Junji Hayashi[2], Kazuyoshi Takagi[1], Yousuke Toyotake[1], Mamoru Wakayama[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Grad. Sch. Biosci. Bioind, Tokushima Univ.)

Key words characterization, cloning, expression

2Ap10 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株由来 γ-グルタミルトランスペプチダーゼ II C 末端領域の活性および安定性に及ぼす影響

○八田 誠二 [1], 野々村 祐輝 [1], 林 順司 [2], 高木 一好 [1], 豊竹 洋佑 [1], 若山 守 [1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]徳島大院・先端技科）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) は微生物から哺乳類に至るまで幅広く存在する酵素であり、γ-グルタミル基の転移反応と γ-グルタミル結合の加水分解反応を触媒する。近年、*Helicobacter pylori* の病原性について GGT の関与が報告され、病原性微生物由来 GGT の研究が盛んに行われている。当研究室では、日和見感染症の原因菌である *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株の GGT に着目し、酵素化学的諸性質および生理的意義の解明を目的として研究を進めてきた。Gene Data Bank に登録されているゲノム解析情報から *P.aeruginosa* PAO1 株には GGT 遺伝子が３つ存在していると明らかになった。中でも PaGGT II は元の状態では発現および活性の確認が困難であったが、C 末端に His タグ配列を含むアミノ酸 25 残基を付加 (PaGGT II 25 a.a.) すると発現、活性を確認できた。立体構造予測を行うと、PaGGT II は C 末端ペプチド鎖が不自然に絡みつく構造が予測された一方で、PaGGT II 25 a.a.は絡みつきが解消された安定な構造が予測された。
本研究では PaGGT II の C 末端領域の修飾が酵素の活性および安定性に与える影響の評価を目的として、C 末端に付加するアミノ酸数の検討および特徴的な二次構造をもつ様にアミノ酸を付加し、酵素化学的諸性質の比較を行った。
C 末端に付加するアミノ酸数を変化させた PaGGT II を作製し、活性を評価すると 25 残基付加 PaGGT II が最も高い活性を示した。次に PaGGT II 25 a.a.の C 末端が、α-Helix (Ala 19 残基)および Random coil (Gly 19 残基) をそれぞれ取るような PaGGT II で高い活性を示した。活性を確認できた 3 種の変異型 PaGGT II (25 a.a.、Ala 19 残基、Gly 19 残基) の精製を行い、反応特性を比較したが有意な差はなかった。PaGGT II の C 末端は酵素活性に直接影響せず、フォールディングおよび自己触媒プロセッシングに影響していると示唆された。

Effect on activity and stability of γ-glutamyl transpeptidase II C-terminal region from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain

○Seiji Hatta[1], Yuki Nonomura[1], Junnji Hayashi[2], Kazuyoshi Takagi[1], Yosuke Toyotake[1], Mamoru Wakayama[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Tokushima Univ.)

Key words gamma-glutamyltranspeptidase, *Pseudomonas aeruginosa*, C-terminal

2Ap11 *Pseudomonas nitroreducens* 由来 γ-グルタミルトランスペプチダーゼの構造と機能に関する研究

○池添 浩輝 [1], 林 順司 [2], 豊竹 洋佑 [1], 若山 守 [1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]徳島大・生物資源）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

【背景】γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) は、γ-グルタミル化合物の γ-グルタミル基を他のアミノ酸へ転移する反応と、γ-グルタミル化合物を加水分解する反応を触媒する。茶の旨味成分として知られるテアニンは γ-グルタミルエチルアミドであり、産業的には *Pseudomonas nitroreducens* 由来 GGT (PnGGT) によって酵素合成される。テアニン合成能をさらに効率化するためには、PnGGT の触媒反応を決定づける構造的要因や基質認識に関わる構造的基盤を明らかにする必要がある。X 線結晶構造解析の結果、PnGGT は活性部位周辺に存在する 3 種のアミノ酸残基 (Trp385、Phe417、Trp525) が触媒反応に関与することが示唆された。本研究ではこのうちの Trp385 に着目し、触媒反応における本残基の役割を解析した。
【方法、結果】Trp385 を 4 種のアミノ酸 (Ala、Ser、Asp、Lys) それぞれに置換し、変異型 GGT (W385A、W385S、W385D、W385K) を得た。このうち、W385A は酵素前駆体として不溶性画分に発現し、W385D は可溶性画分、不溶性画分ともに発現がみられなかった。このことから、Trp385 は本酵素の発現や成熟に寄与することが示唆された。一方、W385S および W385K は可溶性画分に発現した。*p*-nitroaniline および γ-L-glutamyl hydroxamate を指標に、これら変異型の活性を測定した結果、野生型 GGT とは逆に転移活性が加水分解活性を上回ることが示された。このことから、Trp385 は本酵素の加水分解反応において、水分子との相互作用に重要な役割を担うことが示唆された。次に、受容体基質特異性について検討したところ、変異型は野生型と比較してメチルアミンにおける基質特異性が高く、イソプロピルアミン、Gly、Ala、Cys、Glu、Tyr および Lys に対しては活性が著しく低かった。このことから、Trp385 は本酵素の基質認識機構にも寄与していることが示唆された。

Studies on structure and function of the γ-glutamyltranspeptidase from *Pseudomonas nitroreducens*

○Hiroki Ikezoe[1], Junji Hayashi[2], Yosuke Toyotake[1], Mamoru Wakayama[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Fac. Bioresource, Tokushima Univ.)

Key words gamma-glutamyltranspeptidase, *Pseudomonas nitroreducens*, gamma-glutamyl compounds, substrate recognition

2Ap12 Immobilization and site directed mutagenesis of Trp525 residue of γ-Glutamyltranspeptidase from Pseudomonas nitroreducens (PnGGT) to improve Theanine production

○Putthapong Phumsombat[1], Chiharu Sano[1], Takao Hibi[2], Takafumi Itoh[2], Junji Hayashi[1], Yosuke Toyotake[1], Mamoru Wakayama[1]
([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Dept. Biosci. Fukui Prefectural Univ.)
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

γ-Glutamyltranspeptidase (GGT) is a ubiquitous enzyme that catalyzes the hydrolysis of the γ-glutamyl linkage of γ-glutamyl compounds and the transfer of their γ-glutamyl moiety to acceptor substrates. GGT is found in various organisms from bacteria to mammals and plays a key role in the metabolism of extracellular reduced glutathione. Currently, bacterial GGT have been interested in their use in synthesis of various γ-glutamyl compounds in the food and pharmaceutical industries such as γ-glutamyl DOPA, γ-glutamyltaurine and especially food additive which gives an Umami taste, Theanine produced by *Pseudomonas nitroreducens* (PnGGT). In our previous study, site direct mutagenesis by substituting various amino acids for Trp525 residue of PnGGT revealed that Trp525 is a key amino acid residue in determining the degree of involvement of water molecules in the reaction. Moreover, mutant enzyme (W525D) exhibited the highest transfer activity with lowest hydrolysis activity and also best production of theanine from ethylamine and L-glutamine. This study aims at applying W525D mutant *E. coli* recombinant strain to immobilization by using immobilizers such as calcium-alginate to improve efficiency of theanine production. The catalytic properties of immobilized cells have been evaluated in pH and thermal stability and reusability. As a result, it has been indicated that immobilized cells of W525D showed the optimal production of theanine at pH 11 and 50 °C with substrate molar ratio of 1:10, L-glutamine : ethylamine.

Immobilization and site directed mutagenesis of Trp525 residue of γ-Glutamyltranspeptidase from Pseudomonas nitroreducens (PnGGT) to improve Theanine production

○Putthapong Phumsombat[1], Chiharu Sano[1], Takao Hibi[2], Takafumi Itoh[2], Junji Hayashi[1], Yosuke Toyotake[1], Mamoru Wakayama[1]
([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Dept. Biosci. Fukui Prefectural Univ.)

Key words Theanine, immobilization, *Pseudomonas nitroreducens*, gamma-glutamyltranspeptidase

2Ap13 L-アミノ酸を起点とするピラジン合成酵素群の発見とその解析

○本山 智晴 [1,2], 中野 祥吾 [1], 山本 雄大 [3], 常盤 広明 [3], 浅野 泰久 [4], 伊藤 創平 [1]
（[1]静県大院・薬食生命, [2]日本学術振興会, [3]立教大・理, [4]富山県大・工）
itosohei@u-shizuoka-ken.ac.jp

【目的】生物に広く存在し、医薬品や香料でもあるピラジン化合物は、非酵素的に産生されると考えられてきた。しかし、いくつかの細菌で、L-スレオニン (L-Thr) からピラジンが生合成されることが示唆されている。我々は、短鎖型 L-スレオニン脱水素酵素 (TDH) に加え、新たにピラジン合成に関与する酵素 (PyrS) を複数の細菌のゲノム上に見出し、PyrS が TDH の代謝物からピラジンを合成することを発見した。本研究では、ピラジン合成に関与するこの酵素群の各種解析を行い、L-Thr を起点とする新規ピラジン合成機構の解明を試みた。
【方法】TDH に関しては、高分解能 X 線結晶構造、量子化学計算、変異体解析により分子レベルで生成物脱離機構を解明した。PyrS に関しては、GC/MS により基質や生成物の検討を行った。加えて、立体構造を決定し、活性中心の同定を行った。
【結果・考察】TDH の X 線結晶構造解析の結果、生成物である 2-amino-3-ketobutyrate (AKB) 結合構造を含む計 4 つの構造を分解能 1.2－1.9 Å にて決定した。構造比較の結果、基質の結合による D179 側鎖の構造変化に連動し、活性部位が開構造から閉構造へ切り替わることが示唆された。また、超高分解能構造を用い、量子化学計算フラグメント分子軌道法により、AKB とその周辺のアミノ酸との相互作用エネルギーを求めた。結果、基質に対して誘導適合した D179 側鎖が AKB に対して強い反発的な相互作用を持つことが見出された。つまり D179 側鎖が、基質の結合に伴い活性部位を閉構造にする機能と、反応産物を感知し、活性部位を再び開構造にする機能を合わせ持つことを見出した。PyrS に関しては GC/MS を用いた分析により、TDH の代謝物からピラジンを合成することが示された。さらに活性中心をアラニンに置換した変異体の活性が著しく低下したことから、ピラジン合成が酵素反応によるものであることを確認した。

Discovery of pyrazine synthesis enzymes originating from L-amino acids and its analysis

○Tomoharu Motoyama[1,2], Shogo Nakano[1], Yuta Yamamoto[3], Hiroaki Tokiwa[3], Yasuhisa Asano[4], Sohei Ito[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]JSPS, [3]Rikkyo Univ., [4]Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

Key words L-threonine 3-dehydrogenase, reaction mechanism, pyrazine

2Ap14 *trans*-3-ヒドロキシプロリンの実用生産に向けたバイオプロセス開発

○原 良太郎[1,4], 西川 健幸[2], 奥原 拓也[2], 纐纈 健人[3], 木野 邦器[1,2]
（[1]早大・理工総研, [2]早大・先進理工, [3]協和発酵バイオ, [4]京大院・農）
kkino@waseda.jp

【目的】ヒドロキシプロリン（Hyp）は医薬原料として有用である。天然の L-Hyp には、4 種類の位置・立体異性体があり、このうち 3 種類（*trans*-4-Hyp、*cis*-4-Hyp、*cis*-3-Hyp）はプロリンを直接水酸化する酵素を用いた工業生産が可能である。しかし、*trans*-3-Hyp には工業生産に対応する酵素が無い。最近、糸状菌由来プロリン水酸化酵素に *trans*-3-Hyp 合成活性が報告されたが、検討したところヒドロキシ基の位置選択性が低く、主生成物は *trans*-4-Hyp であった。一方、我々は L-プロリンを *trans*-3-Hyp に変換可能な水酸化酵素を見出している[1)]。本発表では、当該酵素を利用した実用的な *trans*-3-Hyp 生産のためのプロセス開発を報告する。
【方法・結果】好塩菌および放線菌由来のエクトイン水酸化酵素（EctD）遺伝子を PCR で増幅し、ベクターに連結後、大腸菌で発現させた。組換え酵素を精製し、基質特異性を検討したところ、L-プロリンを水酸化して *trans*-3-Hyp を生成したが、*trans*-4-Hyp などの異性体の副生は全く見られなかった。この結果は EctD と *trans*-3-Hyp のドッキングシミュレーションにより妥当と考えられた。また、構造類似体である 3,4-デヒドロ-L-プロリンや、2-メチル-L-プロリン、L-ピペコリン酸に対する水酸化活性も認められた。続いて、*ectD* 遺伝子発現大腸菌を触媒とした L-プロリンから *trans*-3-Hyp への変換反応を検討した。その結果、共基質である 2-オキソグルタル酸の枯渇に起因する反応停止が見られた。そこで、2-オキソグルタル酸の分解経路を遮断した株を造成し、同反応に供したところ、予想通り *trans*-3-Hyp 合成収率が向上した[2)]。

1) 原ら、日本生物工学会 2014 年度大会講演要旨集、1P-103
2) R. Hara et al., *Appl Microbiol Biotechnol*, DOI: 10.1007/s00253-019-09868-y, *in press*

Development of bioprocess for practical *trans*-3-hydroxyproline production

○Ryotaro Hara[1,4], Takeyuki Nishikawa[2], Takuya Okuhara[2], Kento Koketsu[3], Kuniki Kino[1,2]
([1]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [3]KYOWA HAKKO BIO CO., LTD., [4]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words *trans*-3-hydroxyproline, 2-oxoglutarate, ectoine hydroxylase, selective hydroxylation

2Ap15 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

○勝目 智也, 鈴木 伸, 木野 邦器
（早大・先進理工・応化）
kkino@waseda.jp

【目的】 D-アミノ酸含有ペプチドは、L-アミノ酸のみで構成されるペプチドに比べて、機能増強や新規生理活性を発現する可能性が示されているが、その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アミノ基による求核置換反応により、多様なジペプチドが合成可能であることを報告している[1)]。本法では、ジペプチドの N 末端側にはアデニル化基質となるアミノ酸が、C 末端側には求核剤となる任意のアミノ酸が導入可能になり、これまでに D-アミノ酸からなるジペプチドの合成に成功している[2)]。本研究では、合成可能な D-アミノ酸含有ジペプチドの種類拡張を目的とし、D-アミノ酸をアデニル化可能な酵素の探索とジペプチド合成への利用を検討した。
【方法・結果】 D-アミノ酸を基質とするアデニル化酵素として、*Bacillus subtilis* 168 由来の DltA に着目した。DltA においては、複数の D-Xaa （Xaa=Ala, Cys, Ser, Thr, Val） を認識し、L-Cys の化学的特性を利用した D-Xaa-L-Cys の合成が報告されている[3)]。この反応にはチオール基の存在が不可欠と考えられてきたが、我々の開発した合成法のコンセプトを踏まえると C 末端側に任意のアミノ酸が導入可能と推測した。そこで DltA の基質 D-Xaa に対して、求核剤としてチオール基を持たない D-Pro を用いて検証を行った。LC/MS 分析から、予想されるジペプチド D-Xaa-D-Pro の生成が確認された。本研究によって、我々の合成プロセスの汎用性が示され、D-アミノ酸含有ジペプチド合成の種類拡張にも成功した。

1) R. Hara, *et al.*, *Sci. Rep.*, 8:2950 (2018)
2) S. Kano, *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, DOI: 10.1128/AEM.00120-19 (2019)
3) T. Abe, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 291, 1735-1750 (2016)

Development of an enzymatic method for production of D-amino acid-containing dipeptides

○Tomoya Katsume, Shin Suzuki, Kuniki Kino
(Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words D-amino acid-containing dipeptide, chemoenzymatic synthesis, DltA, adenylation

2Ap16 アデニル化酵素を利用したフェルラ酸アミド合成法の開発

○鈴木 伸, 早田 優理, 木野 邦器
（早大・先進理工・応化）
kkino@waseda.jp

【背景・目的】フェルラ酸は植物細胞壁の構成成分であり、自然界に豊富に存在する再生可能資源である。このフェルラ酸と各種アミン類との縮合化合物であるフェルラ酸アミドは、植物種子の発芽抑制作用やインスリン分泌促進作用などの有用な生理活性を示すことが報告されている。フェルラ酸アミドは有機合成化学的手法により合成可能であるが、多段階反応で煩雑、副生成物の生成、有毒試薬や有機溶媒による環境負荷等の課題がある。一方我々は、基質のカルボキシ基をアデニル化する酵素反応とアミンによる求核置換反応を組み合わせたアミド結合形成反応を見出している[1)]。そこで、フェルラ酸をアデニル化可能な酵素を探索・利用することで、簡便かつ環境調和性の高い新規合成法を開発できると考えて検討した。

【方法・結果】目的酵素の候補として *Pseudomonas putida* KT2440 由来 feruloyl-CoA synthetase (FCS)および *Arabidopsis thaliana* 由来 4-coumarate: CoA ligase (At4CL1, At4CL2)に着目した。これら遺伝子を大腸菌にて異種発現させ、その精製酵素を用いて検討を行った。まず比色分析[2)]による基質特異性評価を行ったところ、いずれの酵素もフェルラ酸とその類縁体であるクマル酸および桂皮酸に対して活性を示した。そこで、フェルラ酸に対する活性が最も高い At4CL2 を用いてフェルラ酸アミドの合成を試みた。フェルラ酸に対して 5 種類のアミン(メチルアミン、ジメチルアミン、ピペリジン、L-Pro、D-Pro)を ATP および Mg^{2+}存在下で反応させたところ、HPLC 分析において、すべての反応液で新規ピークを検出した。さらに生成物の分取・精製後の MS 分析では推定されるアミド化合物の分子量と一致するピークが検出され、フェルラ酸アミドの合成が確認できた。

1) Hara, R., *et al.*, *Sci. Rep.*, 8:2950 (2018)
2) Hara, R., *et al.*, *Anal. Biochem.*, 477, 89-91 (2015)

Synthesis of ferulic acid amides by a novel chemoenzymatic process

○Shin Suzuki, Yuri Hayata, Kuniki Kino
(Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words ferulic acid, adenylation enzyme, amide bond formation

2Ap17 *Proteus vulgaris* 由来 L-アミノ酸デアミナーゼの機能解析とアンモニア生産への応用

○宮澤 沙哉佳, 梅澤 覚, 木野 邦器
（早大院・先進理工・応化）
kkino@waseda.jp

【背景・目的】L-アミノ酸デアミナーゼ（LAAD）は、L-アミノ酸のアミノ基を酸化的に脱離して α-ケト酸およびアンモニアを生成する酵素で、*Proteus* 属細菌においては幅広いアミノ酸に対する脱アミノ反応が報告されている。*P. mirabillis* には基質特異性の異なる 2 種類の LAAD が存在し、脂肪族および芳香族アミノ酸に作用する type1 と塩基性アミノ酸に作用する type2 の 2 種類が報告されている[1)]。一方、*P. vulgaris* は高い LAAD 活性を有するが、詳細な検討は type2 のみであり、type1 の機能は明らかになっていない。本研究では、*pv*LAAD type1 を新たに取得し、基質特異性解析と反応条件の最適化を行った。一方、多くのアミノ酸に対して活性を有する LAAD は、クリーンなエネルギー源である水素のキャリアとして注目されるアンモニアの、常温・常圧で効率的な生産が可能であり、持続可能な社会の実現に資すると考えている。
【方法・結果】既報[2)]の *pv*LAAD type2 をクエリーとして、*P. vulgaris* IAM12003 株のゲノム配列に対する BLAST 検索から type1 を見出し、同ゲノムを鋳型として目的遺伝子を取得した。当該酵素を大腸菌の膜結合型組換え酵素として発現させ、L-Ile を基質として脱アミノ化反応における至適反応条件を検討した。その結果、25℃、pH 9.0 において最も高い活性を示し、1 hr の反応で 10 mM の L-Ile をほぼ完全に脱アミノ化した。続いて、20 種類の L-アミノ酸に対する基質特異性を調べた結果、L-Ile や L-Tyr 等の脂肪族および芳香族アミノ酸に対して高活性を示した。*pv*LAAD をはじめ、多様なアミノ酸を基質とする LAAD を組み合わせることで、効率的なアンモニア生産プロセスの開発が可能であることが示された。

1) J.-Oh Baek, *et al., J. Basic Microbiol*., 51, 129-135, (2011).
2) E. Takahashi, *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem*., 63, 2244-2247, (1999).

Characterization of L-amino acid deaminase from *Proteus vulgaris* and application to ammonia production

○Sayaka Miyazawa, Satoru Umezawa, Kuniki Kino
(Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words L-amino acid deaminase, *Proteus vulgaris*, ammonia, alpha-keto acid

2Ap18 *Bacillus sp.*由来のシアン分解活性を示す新規ニトリラーゼの発現・精製と機能・構造解析

○佐々木 春弥[1], 小川 貴弘[2], 小松 大祐[2,3], 加賀谷 夏海[4], 松村 洋寿[1], 尾高 雅文[1], 養王田 正文[2]
（[1]秋田大院・理工, [2]農工大院・工, [3]アイ・エス・ソリューション, [4]秋田大・理工）
modaka@gipc.akita-u.ac.jp

【概要と目的】シアン化合物はメッキ工場や金属表面加工工場等、産業的に様々な用途で使われている。しかし、シアン化合物は、細胞内呼吸阻害を引き起こす毒性の高い物質であり、安定であるため、生分解、化学的分解を受けにくい。そのため、土壌や地下水に漏洩すると長期間環境中に残留してしまう問題があり、土壌汚染対策法の第二種特定有害物質に指定されている。そのため、汚染された土壌では、主として掘削による物理的除去が行われているが、膨大な費用を要するため、原位置における微生物分解による浄化が期待されている。これまでにシアン分解活性を示す酵素はいくつか報告されているが、詳しい構造・機能は明らかにされていない。近年、小松と養王田らは、シアン汚染地下水からシアン分解活性を示す *Bacillus* 属の菌株を単離した。本研究では、*Bacillus sp.*由来シアン分解酵素の組換え体を大腸菌で発現させて大量調製し、その生化学的特性と構造解析を試みたので、報告する。
【結果及び考察】 一次構造の相同性から、シアン分解酵素はニトリラーゼであることがわかった。*Bacillus sp.*由来ニトリラーゼ遺伝子を pET23 に挿入した発現系プラスミドを大腸菌 BL21(DE3)に導入して大量培養した。菌体を超音波破砕し、弱及び強陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等を組み合わせて、*Bacillus sp.*由来ニトリラーゼを単一精製した。シアン分解活性は、シアンイオンをクロラミンＴと反応させたあと、ピリジン－バルビツル酸との反応で生じる紫色色素を比色定量する方法で評価した。また、現在、精製酵素の結晶化に取り組んでいる。講演では、得られた最新のデータを含めて紹介する。

Recombinant expression, purification, and biochemical and structural charactrization of novel nitrilase degrading cyanide ion.

○Haruya Sasaki[1], Takahiro Ogawa[2], Daisuke Komatu[2,3], Natsumi Kagaya[4], Hirotoshi Matumura[1], Masafumi Odaka[1], Masafumi Yohda[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]IS-solution Co.,, [4]Faculty of. Sci. and Eng., Akita Univ.)

Key words bioremediation, cyanide ion, biodegradation, nitrilase

2Ap01 養菌性キクイムシと共生するセルロース資化性糸状菌が生産するセルラーゼの同定と機能解析

○堤 星太郎[1], 酒井 杏匠[1], 山口 愛彩[1], 都築 翔[1], 鈴木 啓仁[2], 梶村 恒[2], 志水 元亨[1], 加藤 雅士[1]
（[1]名城大院・農, [2]名大院・生命農学）
mkato@meijo-u.ac.jp

【目的】
養菌性キクイムシの一種であるアイノキクイムシ *Euwallacea interjectus* は菌類と共生関係を築いている。すなわち、樹木に穿孔して坑道を形成する際に、マイカンギアと呼ばれる胞子貯蔵器官内に貯蔵している菌類を坑道に接種し、生育した菌類を摂食する。これまでに、養菌性キクイムシが形成する坑道内の微生物叢を網羅的に解析した例はほとんどなく、共存するそれぞれの微生物の役割は未解明である。本研究では、アイノキクイムシが穿入したイチジク坑道内の菌叢を網羅的に解析し、その中からセルロース資化性菌の単離および、同菌が生産するセルラーゼを同定し機能を明らかにすることを目指した。
【方法・結果】
我々は、DGGE 解析によりアイノキクイムシが穿入したイチジク坑道内から 15 種類の細菌と 1 種の真菌を見出した。また、アイノキクイムシを破砕後、セルロースを唯一の炭素源にした培地にて共生する菌を集積培養することで、セルロース資化性菌 *Fusarium oxyspoum* EI 株を単離した。この EI 株は DGGE 解析で同定された真菌と同一であった。EI 株が生産する主要なセルラーゼを同定するため、セルロースを唯一の炭素源とする培地で培養し、培養ろ液中のセルラーゼを活性染色にて検出した。25 kDa 付近に高いセルラーゼ活性を持つバンドが検出され、このバンドを MALDI-TOF-MS にて解析したところ、Glycoside Hydrolase 12 ファミリーに属する酵素であった。この酵素を *Pichia pastoris* にて異種発現させ、その機能を解析したところ、キシログルカンに対して高い加水分解活性を有していたため、この xyloglucanase を FoXEG12A と命名した。現在、詳細な酵素学・生理学的解析を進めている。

Identification and characterization of cellulase from the cellulose-degrading ectosymbiotic fungus *Fusarium oxysporum* strain EI cultured by the ambrosia beetle

○Seitaro Tsutsumi[1], Kiyota Sakai[1], Aya Yamaguchi[1], Syo Tsuzuki[1], Yoshihito Suzuki[2], Hisashi Kajimura[2], Motoyuki Shimizu[1], Masashi Kato[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., [2]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words ambrosia beetle, *Fusarium oxysporum* strain EI, ectosymbiotic fungi, xyloglucanase

2Bp02 α-1,3-glucanase を含む溶菌酵素溶液を利用した *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) からのプロトプラスト形成

○石原 真奈, 楊 俐聡, 吉岡 育哲, 桐村 光太郎
（早大・先進理工）
kkohtaro@waseda.jp

【目的】
Aspergillus 属糸状菌の細胞壁にはグルカンやキチンなどが含まれており、これを浸透圧調整条件下で溶菌酵素を用いて除去することによってプロトプラストが形成される。演者らは、クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* WU-2223L（注：現在は *A. tubingensis* に再同定）等を供試菌としてプロトプラスト融合や遺伝子工学による育種を行ってきた[1]。しかし、β-1,3-glucanase と chitinase のみでは不十分で、高収量プロトプラスト形成にはさらに別種の酵素が必須である[2]。本研究では、第 3 の溶菌酵素成分として α-1,3-glucanase (EC 3.2.1.59) に着目し、*Aspergillus* Section *Nigri* 糸状菌の菌糸からのプロトプラスト形成条件について検討した。

【方法および結果】
演者らは、大腸菌を宿主として *Paenibacillus humicus* NBRC 102415T 由来 α-1,3-glucanase の組換え酵素を作製し実験に使用した。*A. tubingensis* WU-2223L 菌糸に β-1,3-glucanase (Zymolyase-20T)と chitinase とともに作用させ、プロトプラストの形成数を指標に α-1,3-glucanase の効果を検討した。湿重量 100 mg の菌糸に 3 mL の溶菌酵素溶液を作用させた場合、2 h 後のプロトプラスト数は β-1,3-glucanase と chitinase の場合は 10^6/mL 以下であったが、α-1,3-glucanase をさらに添加した場合は 2.9×10^7/mL に増大した。また、*A. niger* を含む他の *Aspergillus* Section *Nigri* 糸状菌についてもプロトプラスト形成条件を検討し、α-1,3-glucanase が高収量プロトプラスト形成に必須な酵素であることを明らかにした。

[1] Kirimura, K. and Yoshioka, I., Bio-based chemicals, citric acid., in: Murray M. Y. (Ed.), Comprehensive Biotechnology, vol. 3., Elsevier, London, in press (2019).
[2] Kirimura, K., and Usami, S., Sci. Engineer. Res. Lab., 115, 1-5 (1986).

Protoplast Formation from *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) Mycelia Using Lytic Enzyme System Containing α-1,3-Glucanase

○Mana Ishihara, Licong Yang, Isato Yoshioka, Kohtaro Kirimura
(Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, alpha-1, 3-glucanase, protoplast

2Bp03 リゾクトニア属糸状菌の分泌酵素群による水稲伝染性糸状菌類の防除

原 富次郎, 高塚 由美子, ○Da Xia, 関 未央
（京大・エネ研）
t-hara@iae.kyoto-u.ac.jp

我が国の稲作における病害の多くが植物伝染性糸状菌によるものであることは良く知られる。以前に、原と高塚らは本学会にて、バシラス綱細菌群が分泌するグリコシダーゼ類を有効成分とする複合微生物触媒が、トマト菌核病を高い奏功で防除することを報告した（２０１５年・鹿児島）。今回我々は、植物伝染性糸状菌の一種であるリゾクトニア属菌株が分泌する複合酵素群（以下、「粗酵素」）が、水稲伝染性糸状菌であるフザリウム属、ピシウム属、リゾプス属、トリコデルマ属、リゾクトニア属、ピリキュラリア属の６株のうち、２株の菌糸生長と、さらに１株の分生子形成を阻害したので報告する。本研究で使用した粗酵素は、リゾクトニア・ソラニＤ１３８株をふすま（麩）培養し、その麩麹から水抽出をおこなった後、ＭＦ膜濾過、ＵＦ膜濃縮、アセトン沈殿を経て、減圧真空乾燥で粉末化して調製した。本粗酵素は、β-グルカンであるパキマン、ラミナラン、酵母由来グルカンに対して分解活性を示す他、プロテアーゼ活性も示す複合反応型の加水分解酵素群で構成される。本粗酵素と水稲伝染性糸状菌とを９６穴プレート内で混和反応（ウエルアッセイ法）させた結果、30 mg/ml 以上の濃度でトリコデルマ・ビリデＮＢＲＣ３０５４６株とピリキュラリア・グリセアＭＡＦＦ１０１５１８株の菌糸生長を阻害し、トリコデルマ菌株に対しては顕著な溶菌作用が確認できた。また、フザリウム・フジクロイＭＡＦＦ２３５９４９株に対しては、分生子形成の遅延あるいは抑制が観察された。現在、ウエルアッセイ法による抗糸状菌活性を指標として酵素の分画精製を行っている。複数の活性画分を認めており、水稲伝染性糸状菌に対する抗菌性が加水分解活性のみによるものか、あるいは他の酵素活性が関与しているか等について、詳細を検討している。

The enzymes derived from *Rhizoctonia solani* inhibit the growth of rice infectious filamentous fungi

Tomijiro Hara, Yumiko Takatsuka, ○Xia Da, Mio Seki
(IAE, Kyoto Univ.)

Key words biocontrol, enzyme, hydrolysis reaction, rice infectious filamentous fungi

2Bp04 真菌細胞壁分解酵素を基盤とした抗真菌システムの開発

○平良 東紀[1], 津波古 遥奈[1], 矢野 成和[2], 上地 敬子[1]
（[1]琉球大・農, [2]山形大院・理工）
tokey@agr.u-ryukyu.ac.jp

植物は病原性真菌の感染を防ぐための因子として真菌細胞壁分解酵素を持つ。また，細菌類には真菌細胞壁の資化分解のための酵素を持つものがある。真菌細胞壁の主な構成多糖であるキチンおよびグルカンを分解する酵素の一部が抗真菌活性を示すことが知られている。これら真菌細胞壁分解酵素は，細胞膜や細胞質内に作用点を持つ抗菌性ペプチドおよび抗真菌剤の細胞膜へのアクセスや膜透過性を促進する効果が期待される。本研究では真菌細胞壁分解酵素を基盤とする新奇抗真菌システムの開発を目指し，作用点の異なる複数の真菌細胞壁分解酵素同士の組合せおよび市販の抗真菌剤との相乗効果について検討した。キチナーゼは熱帯樹木ガジュマル（*Ficus microcarpa*）乳液由来キチナーゼ-B（GlxChiB）を，β-1,3-グルカナーゼは Zymolyase（MC フードスペシャリティー社製）を，α-1.3-グルカナーゼは *Paenibacillus* 14B 株由来 PbAgl-B を用いた。抗真菌剤としては β-1,3-グルカン合成酵素阻害剤であるミカファンギン（Toronto Research Chemicals 社製）を用いた。供試菌株としては，*Trichoderma viride*，*Aspergillus luchuensis*，*Candida glabrata* を用いた。
キチナーゼは単独で，T. viride に対して強い抗真菌活性を示した。*A. luchuensis* に対して，キチナーゼ，β-1,3-グルカナーゼおよび α-1.3-グルカナーゼ単独では抗真菌活性を示さなかったが，これら 3 種の酵素を混合し作用させることによって，強い抗真菌活性を示すことが分かった。キチナーゼのみでは *C. glabrate* の生育を抑制することはできなかったが，キチナーゼとミカファンギンを併用した場合，ミカファンギンの最少阻止濃度を 4 分の 1 にまで減少させることができた。

Development of antifungal system based on fungal cell wall degrading enzymes

○Toki Taira[1], Haruna Tsuhako[1], Shigekazu Yano[2], Keiko Uechi[1]
([1]Fac. Agric., Univ. Ryukyus, [2]Grad. Sch. Sci. Eng., Yamagata Univ.)

Key words antifungal, chitinase, alpha-1, 3-glucanase, beta-1, 3-glucanase

2Bp05 *Bacillus cereus* が形成するシリカ層より発見された長鎖ポリアミンの合成メカニズムの解析

○山本 光士郎[1], 池田 丈[1,2], 舟橋 久景[1,2], 廣田 隆一[1,2], 黒田 章夫[1,2]
（[1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・統合生命科学）
ikedatakeshi@hiroshima-u.ac.jp

【目的】当研究室では、*Bacillus cereus* が可溶性のケイ酸($Si[OH]_4$)を取り込み、細胞内で重合して胞子表面に不溶性のシリカ(SiO_2)の層を形成することを発見した。シリカ層の形成メカニズムの解明に向けて、シリカ層の内部に存在する有機物の解析を行ったところ、長鎖ポリアミン(long-chain polyamine; LCPA)が存在することを発見した。一般的なポリアミンはアミノ基が 4 個以下であるのに対し、発見された LCPA にはアミノ基の数が 50 を超える非常に長いものも存在した。真核生物である珪藻や海綿が形成するシリカの内部からもよく似た構造の LCPA が発見されていることから、LCPA はシリカの形成において重要な役割を担っていることが示唆された。LCPA の合成メカニズムは未だ不明であるため、本研究ではその解明を目指した。
【方法・結果】LCPA の化学構造より、アミノプロピル基転移反応が繰り返されることで LCPA が伸長されると予想された。相同性検索により、LCPA 合成に関与すると予想されるアミノプロピル基転移酵素の候補遺伝子 BC5213 を発見した。BC5213 は下流の BC5214 遺伝子とオペロンを形成しており、BC5214 はアミノプロピル基供与体として働く dcAdoMet の合成を担う酵素 AdoMetDC をコードしていると予想された。そこで本オペロンの破壊株を作製したところ、LCPA が検出されなくなったことから、予想通り本オペロンが LCPA 合成に必須であることが確認された。続いて、大腸菌にて組換えタンパク質の発現を試みた。大腸菌には内在性の AdoMetDC が存在するため、BC5214 は LCPA 合成に必須ではないと予想していたが、実際には BC5213 を単独で発現させた場合では LCPA の合成は認められず、BC5213 と BC5214 を共発現させた場合でのみ細胞内での LCPA の合成が認められた。現在、この点についてさらなる解析を進めている。

Analysis of biosynthetic pathway of long-chain polyamines in *Bacillus cereus*

○Kohjiro Yamamoto[1], Takeshi Ikeda[1,2], Hisakage Funabashi[1,2], Ryuichi Hirota[1,2], Akio Kuroda[1,2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words *Bacillus cereus*, long-chain polyamine, silica, biomineralization

2Bp06 ホタル生物発光のアルパカ抗体による制御

○小野 陽介[1], 鶴田 篤弘[1], 有馬 一成[1], 伊東 祐二[1], 赤澤 陽子[2], 中島 芳浩[2], 加藤 太一郎[1]
（[1]鹿児島大学 理工学研究科 生命化学専攻, [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法を確立したいと考え、この活性制御にアルパカ由来抗体 VHH 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が制御できれば、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、かつその発光活性を阻害する抗体の探索を行うとともにその特性を調べた。さらに、得られた阻害抗体を二量化することにより、さらなる阻害能力の向上を試みた。
【研究材料と方法】 ファージディスプレイ法により、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 9 種の VHH 抗体が得られた。これらを大腸菌 HB2151 株にて発現・精製し、E-luc に対する発光阻害実験を行った。また、Biacore による結合力測定、ELISA による結合ドメインの特定、速度論解析による阻害様式の確認を行った。さらに、抗体の二量化により、阻害能力能力の向上を試みた。
【結果と考察】9 種の VHH を用いた発光阻害実験の結果、E-luc の発光量を 20% 以下に抑える#6 が得られた。また、結合力、結合ドメイン、阻害様式を確認した。得られた知見を基に、抗体の二量化を行い、結合力と阻害能力の向上が確認された。

The controlling of the bioluminescent activity of firefly luciferase by alpaca VHH antibody

○Yosuke Ono[1], Atsuhiro Tsuruta[1], Kazunari Arima[1], Yuji Ito[1], Yoko Akazawa[2], Yosihiro Nakajima[2], Daiichiro Kato[1]
([1]Dept.Bioscience,Grad.Sch.Sci. Eng.,Kagoshima Univ., [2]AIST)

Key words firefly luciferase, bioimazing, alpaca VHH antibody, phage display

2Bp07 シークワァーサー由来フラボノイドメチル化酵素の分子改変およびポリメトキシフラボノイド生産への応用

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

【背景・目的】近年、メチル化フラボノイド類(PMF)が様々な生理活性を有することが報告されており、予防医療などへの応用が期待されている。しかし、植物等に含まれる PMF は微量であり、試薬として高価なものが多く研究利用の障害となっている。植物体内において、PMF は SAM-依存型フラボノイドメチル化酵素(FOMT)の作用により生成・蓄積されていることから、これらの酵素を利用することにより効率的に PMF の生産を行うことができればその利用が大きく発展すると期待される。我々はこれまでに、柑橘植物であるシークワァーサー(*Citrus depressa*)から複数の FOMT 遺伝子を取得し、その特性を解析している。その一つである CdFOMT5 は、ケルセチンを基質としたときに最大 3 ないし 4 ヶ所の水酸基をメチル化する稀有な酵素であった。そこで進化分子工学的手法により本酵素のメチル化部位特異性を改変し、様々な PMF 生産への応用を検討した。
【実験方法・結果】CdFOMT5 と高い相同性(95.1%)を示すオレンジ由来 FOMT を異宿主発現させ CdFOMT5 と比較した結果、両者はメルセチンに対して異なるメチル化パターンを示した。両酵素は 17 アミノ酸残基の相違を示すことから、これらのアミノ酸残基がメチル化部位特異性に寄与していると推測された。そこで CdFOMT5 のアミノ酸残基をオレンジ型へと置換した変異体をそれぞれ作成し、ケルセチンに対するメチル化パターンの変化を検討した。その結果、N121V や L126F 変異体において、メチル化パターンの大きな変化が確認された。またその他の変異体においても、特定の水酸基に対する活性の低下など、蓄積する PMF のパターンが変化することが明らかとなった。これらのアミノ酸残基は ClassII FOMT のフラボノイド認識に関与すると思われる領域に位置することから、これらの残基が基質認識及び水酸化部位の制御に大きく関与することが示唆された。

Molecular engineering of flavonoid *O*-methyltransferase of *Citrus depressa* and utilization for producing polymethoxyflavonoids

○Hiroshi Toda, Nobuya Itoh
(Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

Key words flavonol, S-adenosylmethionine, methyltransferase, protein engineering

2Bp08 二成分型フラビン依存性モノオキシゲナーゼを利用したヒドロキシエクオールの合成

○野澤 大樹[1], 橋本 貴史[1], 向井 克之[2], 松山 彰収[2], 古屋 俊樹[1]
（[1]東京理科大理工・応生, [2]（株）ダイセル）
tfuruya@rs.tus.ac.jp

【背景・目的】大豆イソフラボンの腸内細菌による代謝物として得られるエクオールは、抗酸化作用やエストロゲン様作用などの有用な生理活性を有している。一方、ポリフェノール類の生理活性は水酸基の位置や数に大きく左右されるため、エクオールの水酸化体では生理活性の変化が予想され、その向上も期待できる。すでにエクオールの生産手法は確立されており、その水酸化により簡便にヒドロキシエクオールを合成できれば、応用展開も広がると考えられる。本研究では、二成分型フラビン依存性モノオキシゲナーゼ HpaBC に着目してそのエクオールに対する活性を評価し、ヒドロキシエクオールの合成を試みた。
【方法・結果】*Pseudomonas aeruginosa* 由来の HpaBC は、レスベラトロール等のポリフェノールに対して水酸化活性を示す[1)]。そこでまず、HpaBC のエクオールに対する活性を、本酵素を発現させた大腸菌細胞を利用して評価した。しかしながら、変換活性は微弱であった。そこで、一酸素添加反応を担う HpaB コンポーネントのホモログ酵素には活性の高いものも存在することを予想し、アミノ酸配列で 50～75%の相同性を有する酵素を 7 種選択して活性を評価した。その結果、興味深いことに位置選択性の異なる 2 つの酵素が取得され、*Rhodococcus opacus* 由来の酵素はエクオールの 3'位を、*Photorhabdus luminescens* 由来の酵素は 6 位を水酸化する活性を有していた。これらの酵素を利用してフラスコスケールでの反応を検討したところ、3'位水酸化体、6 位水酸化体ともに数 100 mg/L で合成できた。

1) T. Furuya, K. Kino, Tetrahedron Lett., 55, 2853-2855 (2014).

Biocatalytic synthesis of hydroxyequols by two-component flavin-dependent monooxygenases

○Daiki Nozawa[1], Takafumi Hashimoto[1], Katsuyuki Mukai[2], Akinobu Matsuyama[2], Toshiki Furuya[1]
([1]Dept. Appl. Biol. Sci., Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]Daicel Corp.)

Key words biocatalysis, equol, hydroxylation, monooxygenase

2Bp09 パラゴムノキの天然ゴム生合成マシナリを構成するタンパク質の機能解析

山口 真琴[1], 幸治 幸治[1], 廣森 美樹[1], 石井 智樹[1], 和氣 駿之[1], 山下 哲[2], 戸澤 譲[3], 山口 晴彦[4], 井之上 ゆき乃[4], 伏原 和久[4], 中山 亨[1], ○高橋 征司[1]
（[1]東北大院・工, [2]金沢大院・自科, [3]埼玉大院・理工, [4]住友ゴム工業（株））
takahasi@seika.che.tohoku.ac.jp

天然ゴム（NR）は，タイヤ生産をはじめとするゴム工業には不可欠な天然ポリマーである．NR の主骨格は *cis*-1,4-ポリイソプレンであり，その生合成は，*cis* 型プレニルトランスフェラーゼ（cPT）により触媒される．パラゴムノキの乳管細胞の細胞質（ラテックス）内においては，NR はゴム粒子（RP）と呼ばれる脂質一重膜構造のオルガネラ内に蓄積していることから，RP 膜上の cPT が可溶性のモノマー単位であるイソペンテニル二リン酸を連続的に縮合し，それにより生成する疎水性ポリイソプレン鎖（すなわち NR）が RP 内に収容されると考えられている．我々はこれまでに，パラゴムノキのラテックス特異的な cPT である HRT1 は，RP に適切に組み込まれたときにのみ *in vitro* で NR 生合成活性を示すことを示した．また，HRT1 と相互作用する RP 膜タンパク質 HRBP を同定し，さらに，HRBP が別の RP 膜タンパク質である REF とも相互作用することを示した．REF と HRBP の共発現は HRT1 の活性を安定化したため，この三者複合体を核とする NR 生合成マシナリが提唱された．本研究では，天然ゴム生合成における HRBP や REF の機能解析を行った．HRT1，REF はいずれも HRBP の N 末端側膜貫通領域近傍で相互作用すること，また，HRT1 の活性安定化には，この領域のみの共発現で十分であることが分かった．一方，HRBP は，NR 生合成には寄与しない別の cPT とも相互作用した．これらの結果から，パラゴムノキでは，cPT-HRBP 複合体が HRBP を介して REF と相互作用することで RP 膜上において安定化され，その結果として，cPT が NR を生合成できる様になったと考えられる．

Functional analyses of component proteins of the natural rubber biosynthetic machinery in *Hevea brasiliensis*

Makoto Yamaguchi[1], Kouji Kojima[1], Miki Hiromori-Suenaga[1], Tomoki Ishii[1], Toshiyuki Waki[1], Satoshi Yamashita[2], Yuzuru Tozawa[3], Haruhiko Yamaguchi[4], Yukino Inoue-Miyagi[4], Kazuhisa Fushihara[4], Toru Nakayama[1], ○Seiji Takahashi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ., [4]Sumitomo Rubber Ind., Ltd.)

Key words rubber biosynthesis, polyisoprene, prenyl transferase, *Hevea brasiliensis*

2Bp10 スクアレン-ホペン環化酵素による Botryococcene の環化反応

○金指 真菜[1], 久野 斉[1], 星野 力[2]
（[1]デンソー, [2]新潟大院・自然）
hitoshi_kuno@denso.co.jp

【背景と目的】スクアレン-ホペン環化酵素(SHC)はトリテルペンである Squalene を基質として、5 環性の Hopene と Hopanol を合成することが知られている。一方、Botryococcene(Bc)は微細藻類である *Botryococcus braunii* が細胞内外に蓄積するトリテルペンとして知られている。この Bc は歯車駆動に替わる低騒音の駆動方式である、トラクション駆動で動力の伝達を担うトラクションオイルとして市販品と同等のトラクション性能を有している。これまでの検討により、トラクションオイルは分子内に環状構造が存在することで、さらに性能が向上することが明らかとなっている。今回、Bc と SHC との酵素反応により、Bc 環化物が得られるか試みた。
【方法】基質の Bc は、B.braunii の Bc 合成酵素遺伝子を導入した組換え酵母で生産した。SHC を発現した大腸菌の破砕液を酵素源とし、反応に用いた。酵素反応液のヘキサン抽出物を SiO2 カラムで粗分画した後に、逆相 HPLC で精製した。取得した、Bc 変換物を NMR 解析にて構造決定した。
【結果】2 種類の Bc 変換物の精製に成功した。いずれの変換物も水酸基を有する、単環性構造であることが明らかとなった。

Cyclization of Botryococcene by Squalene hopene cyclase

○Mana Kanazashi[1], Hitoshi Kuno[1], Tsutomu Hoshino[2]
([1]DENSO CORP., [2]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words terpenoid, microalgae, yeast, biodiesel fuel

2Bp11 Fe^{2+}-chelate および ferric-chelate reductase を組み合わせたセスキテルペノイド合成法の開発

○梅澤 覚[1,2], 木野 邦器[1]
（[1]早大院・先進理工・応化, [2]長谷川香料）
kkino@waseda.jp

【背景・目的】多様な分子構造を有するセスキテルペノイドは、抗ストレス、抗腫瘍等の生理活性に加え、それぞれが特徴的な香気を有する化合物群であり、その産業有用性が高く注目されている。しかし、その多くは天然含量が少なく、工業的利用には効率的な合成プロセスの開発が求められている。我々はこれまでに、Fe^{2+}-chelate と ferric-chelate reductase を用いた新規合成法を構築し、黒胡椒の香気成分である(－)-ロタンドンの合成に成功している[1)]。Fe^{2+}-chelate による酸素添加反応と ferric-chelate reductase による Fe^{2+}-chelate の還元的供給および再生システムによって構成される当該プロセスは、幅広い酸化反応に適用可能であると考えられる。そこで、触媒として機能する Fe^{2+}/Fe^{3+}-chelate の種類と合成可能なセスキテルペノイドとの関係を精査し、当該プロセスの有用性を検証した。
【方法・結果】大腸菌由来 ferric-chelate reductase(YqjH)を用いた Fe^{3+}-chelate の還元において、リガンド構造の異なる各種 Fe^{3+}-chelate の還元活性を検証した。その結果、YqjH はカテコール等の酸素配位、EDTA 等の酸素窒素混合配位、*o*-フェナントロリン等の窒素配位構造を有する Fe^{3+}-chelate を幅広く還元した。引き続いてセスキテルペノイド合成を検証した結果、とくに窒素を含む Fe^{3+}-chelate(Fe(III)-nitrilotriacetic acid や Fe(III)-tris(2-pyridylmethyl)amine)を用いた場合に高い酸素添加効率が得られた。また、(－)-ロタンドンに加え、グレープフルーツの重要香気成分である(+)-ヌートカトンの酸化的合成も可能となった。この結果より、本反応プロセスは鉄触媒分子種および基質選択の面で柔軟性を有し、多様なセスキテルペノイド合成に応用可能であることが明らかになった。

1) 梅澤ら, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 講演番号 1D7p03, ポスター番号 P091

Development of the synthesis method of sesquiterpenoids using Fe^{2+}-chelate catalyst and ferric-chelate reductase

○Satoru Umezawa[1,2], Kuniki Kino[1]
([1]Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]T. Hasegawa Co., LTD.)

Key words sesquiterpenoid, Fe^{2+}-chelate, ferric-chelate reductase, oxygenation

2Bp12 4-メトキシサリチル酸を生成する 6-メトキシサリチル酸脱炭酸酵素の発見

○青野 陸[1], 森 弘樹[1], 原 良太郎[2], 木野 邦器[1,2]
（[1]早大院・先進理工, [2]早大・理工総研）
kkino@waseda.jp

【背景・目的】我々は、低炭素化社会の実現に向け、二酸化炭素を固定して汎用性のある有用化合物を生産する技術開発と、それを光合成の暗反応により二酸化炭素を吸収して生育する植物性バイオマスを原料とする有用化合物生産に展開させる検討を行っている。具体的には、非酸化的炭酸固定活性を有する微生物由来の可逆的脱炭酸酵素に着目し、これまでに、バイオマス資源であるリグニン由来芳香族化合物を原料として芳香族カルボン酸を合成する可逆的脱炭酸酵素を見出している[1]。本研究では、合成可能な芳香族カルボン酸の多様性の拡張を目的として、新規基質特異性を有する可逆的脱炭酸酵素の探索を行った。
【方法・結果】芳香族カルボン酸の一種である 6-メトキシサリチル酸(6MSA)を炭素源とする培地において集積培養を行い、6MSA を脱炭酸して 3-メトキシフェノール(3MP)を生成する *Cupriavidus* sp. TK を取得した。本株のゲノムライブラリーを構築し、6MSA に対する分解活性を指標としたショットガンクローニングを行ったところ、当該活性を担う酵素 6MSDC をコードする遺伝子の取得に成功した。大腸菌で発現させた組換え型タンパク質を用いて、6MSA に対する可逆的脱炭酸活性を評価したところ、6MSA を脱炭酸して 3MP を生成するものの、3MP への炭酸固定反応では 6MSA ではなくカルボキシ基の配置が異なる 4-メトキシサリチル酸(4MSA)が生成した。6MSDC は 4MSA に対する脱炭酸活性も示したが、既に取得している 4MSA に対して可逆的脱炭酸活性を示す *Arthrobacter* sp. K8 由来オルセリン酸脱炭酸酵素[1]との相同性は低く、*Burkholderia* sp. Strain BC1 由来 2-ヒドロキシ-1-ナフトエ酸脱炭酸酵素[2]と高い相同性を示した。

1) 村瀬ら, 日本農芸化学会, 2A10p19 (2018)
2) Pal Chowdhury P, et al., J. Bacteriol., 198, 1755-1763 (2016)

Discovery of 6-methoxysalicylic acid decarboxylase carboxylating 3-methoxyphenol to 4-methoxysalicylic acid

○Riku Aono[1], Hiroki Mori[1], Ryotaro Hara[2], Kuniki Kino[1,2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words aromatic acid decarboxylase, carboxylation, methoxysalicylic acid, low-carbon society

2Bp13 好熱性独立栄養性細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の cysteine synthase と硫黄同化代謝

○亀谷 将史[1,2], 中山 宗一郎[1], 新井 博之[1,2], 石井 正治[1,2]
（[1]東大院・農生科, [2]東大・微生物連携機構）
akameya@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Cysteine synthase (CS)は、Ser を前駆体とする化合物に硫化物イオンを転移して Cys を合成する、多くの生物の Cys 合成および硫酸同化代謝に必須な酵素である。一般的なバクテリアの CS は、O-acetylserine (acetyl-Ser)を基質として用いる。*Hydrogenobacter thermophilus* はバクテリアでもっとも古くに他から分岐した Aquificae 門に属す好熱性の独立栄養性細菌である。本菌からは、新規 phosphoserine phosphatase による O-phosphoserine (P-Ser)の脱リン酸化で Ser 合成が行われる（Chiba, JBC, 287:11934）など、アミノ酸代謝をはじめとする多くの代謝で新規機構が見つかってきた。
本研究では、*H. thermophilus* 由来 CS の酵素学的解析を通じ、本菌の硫黄同化代謝の解明を目指した。本菌由来 CS を大腸菌で異種発現・精製し、各種酵素学的解析に供した。基質として硫化物イオンと acetyl-Ser を加えたときに反応性を示したが、acetyl-Ser を P-Ser に代えたときにそれ以上の活性を示した。この結果から、本菌は一般的な微生物とは異なり、acetyl-Ser ではなく P-Ser を前駆体とした Cys 合成経路を有することが強く示唆された。また、P-Ser を基質とする CS の報告例は他の生物種でも少ないながらもあるが、本菌の CS はそれらいずれよりも高い反応性を有することが動力学的解析で示され、本酵素の産業利用における有用性も期待される。また、本菌は硫酸の代わりにチオ硫酸を唯一の硫黄源としても生育することから、本 CS が硫酸同化だけでなくチオ硫酸同化代謝にも寄与するかを検討した。

Cysteine synthase from a thermophilic and autotrophic bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, and its sulfur anabolism

○Masafumi Kameya[1,2], Soichiro Nakayama[1], Hiroyuki Arai[1,2], Masaharu Ishii[1,2]
([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, Univ. Tokyo)

Key words cysteine biosynthesis, sulfur assimilation, sulfate, thiosulfate

2Bp14 タンパク質酸化能を有する *Penicillium citrinum* AIU Z26-4-8 由来オキシダーゼ遺伝子のクローニングと異宿主による発現検討

○髙嶋 大輝[1], 前田 航[1], 土屋 高伸[1], 新谷 智子[2], 五味 勝也[2], 下飯 仁[1], 山田 美和[1]
（[1]岩手大院・連農, [2]東北大院・農）
myamada@iwate-u.ac.jp

【背景と目的】タンパク質の物性改変などへの応用を期待し、我々はタンパク質中のアミノ基を酸化的脱アミノ化する酵素を *Penicillium citrinum* AIU Z26-4-8 より取得した。本酵素は、タンパク質の他に、L, D-アミノ酸やアミンに対してもオキシダーゼ活性を示し、新規な基質特異性を有する。さらなる本酵素の諸性質解明を目指し、本研究では、本酵素の遺伝子クローニングと異宿主における発現を試みた。
【方法】本酵素の N 末端アミノ酸配列と *P. citrinum* のゲノム配列を参照して設計したプライマーを用い、ゲノム DNA および cDNA のクローニングを試みた。得られた遺伝子については、大腸菌 BL21(DE3)、*Saccharomyces cerevisiae* BY4743、および *Aspergillus oryzae* niaD300 に導入後、それぞれ発現誘導した。さらに、各組換え菌体を破砕して調製した粗酵素液と組換え麹菌の培養液上清を、SDS-PAGE と β-ラクトグロブリンを基質としたオキシダーゼ活性測定に供した。
【結果および考察】Z26-4-8 株由来ゲノム DNA と cDNA より得られた PCR 産物の塩基配列を解析した結果、プレプロ配列を含む 2,040 bp の ORF が見出され、イントロンは含まれていなかった。ORF を大腸菌で発現させた際、粗酵素液では活性が検出されず、不溶化した。酵母では、100 mL 培地当たり 4.2 mU の活性が得られた。麹菌では培地上清において 100 mL 培地当たり 60 mU の活性が得られ、菌体破砕粗酵素では 100 mL 培地当たり 283 mU と原株の約 80 倍の酵素生産量となった。よって、麹菌は本酵素の発現宿主として適していることが示された。

Cloning and heterologous expression of a novel oxidase gene with protein oxidizing activity from *Penicillium citrinum* AIU Z26-4-8

○Daiki Takashima[1], Wataru Maeda[1], Takanobu Tsuchiya[1], Tomoko Shintani[2], Katsuya Gomi[2], Hitoshi Shimoi[1], Miwa1 Yadama[1]
([1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Iwate Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, heterologous production, *Penicillium citrinum*, amino acid oxidase

2Bp15 電子伝達向上を目指した酵素分子-電極間の距離制御によるバイオデバイスの設計

○多喜 俊介[1], 中村 卓登[1], 高村 映一郎[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]福井大学院・工・繊維, [2]福井大学院・工・生物応用化, [3]福井大学・生命セ, [4]香川大・農, [5]大工大・工）
suyeb10@u-fukui.ac.jp

[緒言]
近年、資源の枯渇や地球温暖化の問題から、クリーンな次世代エネルギーとしてバイオ電池 (Biofuel cell:BFC)の実用化が期待されているが、酵素の安定性や電池の出力の低さなどが課題である。一般に BFC のカソード用酵素としてマルチ銅オキシダーゼ (MCO) がよく用いられている。MCO は補因子として 4 つの銅原子をもち、それぞれタイプ 1 (T1)、タイプ 2 (T2)、そして 2 つのタイプ 3 (T3) に分類され、T1Cu で電子を受け取り、T2/T3Cu に伝達し、O_2 の 4 電子還元反応を行う。電子授受を行う T1Cu と電極表面との距離はバイオカソードの性能に大きく影響し、酵素-電極間距離の制御によってバイオカソードの出力向上が期待できる。本研究では、超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来 MCO (McoP)をカソード触媒として、長さの異なるリンカーを用いて酵素分子の電極表面への固定化を行った。それぞれの電極を電気化学的に評価し、酵素-電極間距離の効果について解析した。
[方法]
グラッシーカーボン電極 (GCE)上に修飾した MWCNT にニトリロ三酢酸を修飾し、Ni イオンを配位させた。同様に GCE 上の MWCNT に N-(1-Pyrenyl) maleimide を修飾した。His-tag を C 末端に導入した McoP His と His-tag 末端にシステインを導入した McoP Cys を His-tag と Ni イオンのアフィニティ及び Cys の SH 基とマレイミド基の結合を利用し、酵素分子を配向的に固定した。それぞれの電極をサイクリックボルタンメトリー (CV)により電気化学的に評価した。
[結果]
O_2 飽和条件下での 2 種類の McoP 修飾電極の CV 測定を行った結果、0 V(vs. Ag/AgCl)における O_2 の還元電流は、McoP His および Cys 修飾電極では、それぞれ 368 μA/cm^2、439 μA/cm^2 であった。これは McoP Cys 修飾電極は McoP His 修飾電極と比べ酵素-電極間距離は約 0.7 nm 短いので電子移動効率が向上したことに起因するものと考えられる。

Improvement of electron transfer between an electrode and enzyme by distance control of enzyme molecule

○Shunsuke Taki[1], Takuto Nakamura[1], Eiichiro Takamura[1], Hiroaki Sakamoto[1,3], Takenori Satomura[2,3], Haruhiko Sakuraba[4], Toshihisa Ohshima[5], Shin-ichiro Suye[1,2,3]
([1]Dept. Front. Fib. Tech. Sci., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [4]Fac. Agric., Kagawa Univ., [5]Fac. Eng., Osaka Inst. Technol.)

Key words biofuel cell, multicopper oxidase, orientation, direct electron transfer

2Bp16 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[1], 坂元 博昭[1,2], 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]福井大学・ライフセ, [3]福井大学院・工・生物応用化, [4]香川大・農, [5]大工大・工）
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などの利点から、バイオマスの有用な利用法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出力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好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* 由来の L-プロリン脱水素酵素（LPDH）に着目してバイオアノードを作製してきた。近年、構造自由度の高い高分子を導入したメディエーター分子の電極上での揺動性を利用した電極では、得られる触媒電流値が増大することが報告されている。そこで本研究では電極上での酵素の揺動性に着目し、メディエーターとするフェロセンカルボン酸（Fc-COOH）を酵素と共に電極に固定化して酵素分子密度を変化させ、酵素分子の配向及び揺動を制御したバイオアノードの構築を目的とした。
[方法]
MWCNT を固定化したグラッシーカーボン電極を Pyr-NH_2, PBSE 混合液に浸漬させた後、電極上の Pyr-NH_2 に Fc-COOH を固定化した。その後、電極を AB-NTA, $NiCl_2$, LPDH 溶液の順に浸漬し、His-tag を介して LPDH を電極上に固定化した。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]
まず物理吸着によって LPDH とメディエーターを固定化した電極の CV を基質存在下で測定したところ、酵素反応に伴うフェロセン由来のピーク電流の増大（17.0 μA/cm^2）が見られた。一方で His-tag を介して LPDH を配向固定する際に、スペーサーにより LPDH 間の分子密度を小さくした電極では 35.7 μA/cm^2 の増大が確認された。His-tag を介して LPDH 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、さらに酵素分子密度を制御することでペプチドタグを介して酵素分子が電極上で揺動し、基質との接触性が高まったためであると考えられる。

Construction of high performance bioanode by orientated immobilization of thermostable enzyme in consideration of molecular fluctuation

○Haruto Suzuki[1], Eiichiro Takamura[1], Hiroaki Sakamoto[1,2], Takenori Satomura[2,3], Haruhiko Sakuraba[4], Toshihisa Ohsima[5], Shin-ichiro Suye[1,2,3]
([1]Dept. Front. Fib. Tech. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [2]Life Sci. Innov., Fukui Univ., [3]Dept. Appl. Chem. Biotech., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [4]Fac. Agric., Kagawa Univ., [5]Fac. Eng., Osaka Inst. Technol.)

Key words biofuel cell, hyperthermophilic archaeon, fluctuation, orientated immobilization

2Bp17 酵素カスケードシステムとレドックスポリマーを用いたアミノ酸バイオ電池用アノード電極の開発

○堀永 晃作[1], 里村 武範[1,2], 高村 映一郎[1], 坂元 博昭[1,2], 櫻庭 春彦[4], 大島 敏久[5], 末 信一朗[3]
（[1]福井大院・工, [2]福井大・生命セ, [3]福井大, [4]香川大・農, [5]阪工大院・工）
satomura@u-fukui.ac.jp

[目的]
バイオ電池は次世代のクリーンエネルギーの一つとして注目されているが、酵素の安定性や活性の低さに起因する電池の耐久性や低出力という課題を抱えている。我々は、これらの課題を解決するために高い安定性を有する好熱菌由来酵素を電極用素子としたバイオ電池の開発を進め長期間可動可能なバイオ電池の開発には成功している。しかしながら低電池出力の課題の解決には至っていない。そこで、我々は 4 種の脱水素酵素（色素依存性 L-プロリン脱水素酵素(LPDH)、NAD^+依存性ピロリン-5-カルボン酸脱水素酵素(P5CDH)、NAD^+依存性グルタミン酸脱水素酵素(GDH)、色素依存性 NADH 脱水素酵素(DI)）を組み合わせた基質の多段階酸化反応経路を設計し、電池出力向上を目指したアノードの開発を進めている。本研究では、多段階酸化反応を行う酵素群と本反応に必要な NAD^+とフェロセンを高分子化合物に修飾したレドックスポリマーを用いたアノード電極の構築を行った。
[実験・結果]
LPDH、P5CDH、GDH、DI の 4 種類の好熱菌由来酸化還元酵素とアルギン酸に修飾した NAD^+、カーボンナノチューブに修飾したフェロセンをグラッシーカーボン電極上に固定化した電極を作製した。作製した電極を用いてサイクリックボルタンメトリー測定を行った。その結果、作製した電極において基質の多段階酸化反応を確認することができた。このことから、高分子化合物に修飾した NAD^+、フェロセンは遊離の状態で用いた場合と同様に設計した基質の多段階酸化反応の電子伝達物質として機能していることが確認できた。現在、構築した電極をアノードとしたバイオ電池の構築を進めている。

Development of an anode electrode for amino acid powered fuel cells using multi-enzyme cascade system and redox polymer

○Kousaku Horinaga[1], Takenori Satomura[1,2], Eiichirou Takamura[1], Hiroaki Sakamoto[1,2], Haruhiko Sakuraba[4], Toshihisa Ohshima[5], Shin-ichiro Suye[3]
([1]Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., [2]Life Sci. Fukui Univ., [3]Fukui Univ., [4]Fac. Agric., Kagawa Univ., [5]Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol.)

Key words biofuel cell, oxidoreductase, thermophile

2Bp18 高性能バイオデバイスに向けた部位特異的変異導入による 超好熱性アーキア由来マルチ銅オキシダーゼの酸化還元電位改変

○高村 映一郎[1], 多喜 俊介[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]福井大学院・工・繊維, [2]福井大学院・工・生物応用化, [3]福井大学・生命セ, [4]香川大・農, [5]大阪工大）
e_takamr@u-fukui.ac.jp

[緒言]
酵素を電極触媒とするバイオ電池（Biofuel cell:BFC）は次世代エネルギーの一つとして注目されている。しかし、酵素の長期安定性や電池電圧の低さの問題から、実用化には至っていない。本研究では電池電圧の低さの改善を目指している。BFC の電池電圧は、酵素およびメディエータの酸化還元電位に依存する。我々は、長期安定性を有する超好熱菌 *Pyrobaculum aerophilum* 由来マルチ銅オキシダーゼ (McoP) を BFC のカソード触媒として用いてきた。しかし、McoP は酸化還元電位の低い MCO（~ +0.45 V（vs. SHE））に分類されるため、BFC を構築した際の電池電圧の低さが問題であった。本研究では、McoP の酸化還元部位である T1Cu の軸配位子（Met）を Leu もしくは Phe へ置換することで McoP の酸化還元電位の正側へのシフトを試みた。
[実験]
McoP の 470 番目の Met を遺伝子工学的に Leu もしくは Phe へ置換した変異型 McoP（M470L, M470F）は組換体より精製した。各 McoP 修飾電極を作製し、作製した各 McoP 修飾電極を作用極とする 3 電極方式によりサイクリックボルタンメトリー(CV)を行い、各 McoP の酸化還元電位を評価した。
[結果と考察]
CV による酸化還元電位評価の結果、酸化還元電位は野生型、M470L、M470F の順に 388、476、466 mV（vs. SHE）であった。2 つの変異体ともに酸化還元電位が野生型と比較して約 90 mV 正側へシフトした。これは、T1Cu と配位結合を形成する Met が Leu、Phe に置換されることで配位結合が形成されず T1Cu の酸化状態が不安定になるためである。一方、野生型が 95℃まで安定であるのに対して、M470F の熱安定性が 80℃まで低下していることから、嵩高い側鎖を有する Phe へ置換されることで McoP の熱安定性に寄与する構造への影響が大きくなってしまった可能性が考えられる。今後、M470 変異体をカソード触媒として用いた BFC の構築を行っていく。

Redox potential shift of multicopper oxidase from hyperthemophilic archaea using site-directed mutagenesis for high-performance biodevice

○Eiichiro Takamura[1], Shunsuke Taki[1], Hiroaki Sakamoto[1,3], Takenori Satomura[2,3], Haruhiko Sakuraba[4], Toshihisa Ohshima[5], Shin-ichiro Suye[1,2,3]
([1]Dept. Front. Fib. Tech. Sci., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [4]Kagawa Univ., [5]Osaka Inst. Tech.)

Key words biofuel cell, multicopper oxidase, redox potential, site-directed mutagenesis

2Cp01 *Clostridium cellulovorans* と *Clostridium beijerinckii* による温州みかん残渣からの IBE 発酵

○富田 寿男[1], 岡﨑 文美[1,2,3], 田丸 浩[1,2,3]
（[1]三重大院・生資, [2]三重大・先端科学研支バイオインフォ, [3]三重大・スマートセルイノベ研）
ytamaru@bio.mie-u.ac.jp

国連主導の二酸化炭素排出量削減にむけ、カーボンニュートラルであり、かつ、食料と競合しない第二世代バイオ燃料の研究が進められている。その実用化にむけて、高価な酵素購入を必要としない糖化酵素生産と糖からの発酵を同時に行う CBP（consolidated bioprocessing）が注目されている。本研究では、セルロソーム生産菌として *C. cellulovorans* を、IBE（isopropanol-butanol-ethanol）発酵菌として *C. beijerinckii* を用いた CBP を構築した。一方、オレンジジュース工場では外果皮や絞り粕が残渣として大量に発生しており、果皮に含まれるリモネンによる生育阻害のため、0.2 % (v/v) 以上のリモネン含有培地では *Saccharomyces cerevisia* 野生株ではエタノール生産量が優位に減少していたのに対し、*C. cellulovorans* および *C. Beijerinckii* の生育を調べた結果、0.5%(v/v) のリモネンを含む液体培地においても *C. beijerinckii* はリモネンを含まない液体培地と同様に IBE 発酵することが明らかとなった。一方、*C. cellulovorans* もリモネン濃度 0.5%(v/v)以下であれば、セルロース分解能に影響がないことが判明した。さらに、日本において広く生産されている温州みかん外果皮と搾汁粕を原料として、*C. cellulovorans* と *C. beijerinckii* からなる CBP を構築した結果、*C. cellulovorans* は前処理をしない外果皮ならびに搾汁粕に対して、全糖量の 85% が分解され、搾汁粕乾燥重量に対するブタノール収率は最大で 0.046 (g/g)が得られた。

IBE fermentation from mandarin orange wastes by consolidated bioprocessing with *Clostridium cellulovorans* and *Clostridium beijerinckii*

○Hisao Tomita[1], Fumiyoshi Okazaki[1,2,3], Yutaka Tamaru[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [2]Mie Univ. ASRC, [3]Mie Univ. SCIC)

Key words *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium beijerinckii*, agricultural waste, IBE fermentation

2Cp02 *Clostridium cellulovorans* およびメタン生成菌の共培養によるシュガービートパルプからのバイオメタンガス生産

富田 寿男 [1], ○岡崎 文美 [1,2,3], 田丸 浩 [1,2,3]
（[1]三重大院・生資, [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】有機系廃棄物からの再生可能エネルギーの生産手法としてメタン発酵があるが、セルロース系バイオマスからの生産効率には課題がある。そこで、本研究ではセルロース糖化能力に優れた嫌気性細菌 *Clostridium cellulovorans* とメタン生成菌との共培養によるシュガービートパルプ（SBP）からのバイオメタンガス生産系の構築を試みた。
【方法】乾燥粉砕した SBP を炭素源とし、メタン生成菌および *C. cellulovorans* の単独培養および共培養下における、糖化効率およびガス、有機酸の生産性を比較した。メタン生成菌の接種源にはメタン発酵消化液を用い、次世代シーケンサにより菌叢を解析した。
【結果】メタン発酵消化液中の主要なメタン生成菌として *Methanosarcina mazei*（存在比率 1.34%）が検出された。メタン生成菌のみの培養においては、SBP 中に含まれる不溶性多糖の顕著な分解は見られなかった。一方、*C. cellulovorans* との共培養においては、SBP 中の不溶性多糖の 87.3%が分解され、乾燥重量 1 kg の SBP から約 34 L のメタンガスを生成した。また、共培養条件下において、水素ガスが蓄積しなかったことから、*C. cellulovorans* が生成した水素ガスが、メタン生成菌により代謝されたことが示唆された。

Biomethane production from sugar beet pulp under cocultivation with *Clostridium cellulovorans* and methanogens

Hisao Tomita[1], ○Fumiyoshi Okazaki[1,2,3], Yutaka Tamaru[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [2]Adv. Sci. Res. Support Center, Mie Univ., [3]SCIC, Mie Univ.)

Key words *Clostridium cellulovorans*, methanogen, methane fermentation, agricultural waste

2Cp03 Enhanced methanogenesis of cellulose by addition of nanobubble water

○Xuezhi Wang, Tian Yuan, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu, Zhenya Zhang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
zhang.zhenya.fu@u.tsukuba.ac.jp

Nano-bubble water (NBW) with high mass transfer efficiency and hydrophobic property contains fine bubbles with diameters < 1 μm, which has been widely used in agricultural and biomedicine fields and many industries. Nowadays, much attention has been paid to the security and sustainability of lignocellulosic biomass in agro-industrial wastes containing high cellulose content. However, the complex structure of cellulose has limited its efficient utilization. Thus, this study aims to investigate the addition of different NBW (Air-NBW, N_2-NBW, O_2-NBW) during anaerobic digestion (AD) of cellulose. The accumulative CH_4 yields from the reactors with Air-NBW, N_2-NBW and O_2-NBW addition reached 228.2, 247.5 and 274.1 L/kg-VS_{added}, which were higher than that from the control (210.2 L/kg-VS_{added}). In addition to increase in cellulose removal by 15% and electron transport by 1.3 times, the maximum cumulative CH_4 yield was obtained from the O_2-NBW reactor, increasing by 30% compared to the control. The cellulase activity during AD was increased by 10-18% after NBW addition. The substrate-related bacteria like *Synergistetes*, *Thermotoga* and *Chloroflexi* showed higher relative abundance in the NBW-added. Moreover, methanogenic archaea including *Methanobacterium*, *Methanomassiliicoccus*, *Methanolinea*, *Methanosaeta*, and *Methanospirillum* likely contributed to the CH_4 production from AD of cellulose. This study provided an understanding of the mechanisms in the bioconversion of cellulose to CH_4 by AD under NBW addition.

Enhanced methanogenesis of cellulose by addition of nanobubble water

○Xuezhi Wang, Tian Yuan, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu, Zhenya Zhang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words cellulose, anaerobic degradation, methane fermentation, microbial community

2Cp04 Efficient biomethane production from anaerobically digested ammonium-rich waste under optimal illumination condition

○Yunxin Zhu, Hanying Zheng, Nan Zhang, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

Anaerobic digestion is an environmentally attractive strategy to recover renewable energy from livestock waste. However, high concentration of ammonia is the major toxicant during livestock biodegradation process and inhibits bio-methane production seriously. Recent year, intermittent illumination strategy has been reported as a novel approach to mitigate ammonia inhibition and improve digestion performance. Considering further utilization of illumination technology, identifying the optimal illumination condition is essential for highly efficient anaerobic treatment process. This study focused on optimizing illumination condition for improving bio-methane production from ammonia-rich waste. According to experimental design proposed by response surface methodology (RSM), 13 batch experiments were carried oat NH_4^+-N concentration of 2500 mg/L under various illumination conditions. With optimized combination of light intensity and illumination time, a two-fold increase in methane yield could be achieved comparing to control (dark condition). The analysis of variance (ANOVA) showed a statistically significant interaction of light intensity and illumination time on methane yields. Model validation proved the high adequacy of the model and exhibited the necessity of optimizing illumination condition for efficient anaerobic digestion process under ammonium-rich environment.

Efficient biomethane production from anaerobically digested ammonium-rich waste under optimal illumination condition

○Yunxin Zhu, Hanying Zheng, Nan Zhang, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words anaerobic digestion, ammonium-rich waste, illumination condition, statistical experimental design

2Cp05 雑草中の水溶性成分および非水溶性成分をそれぞれ基質としたメタン発酵における微生物相解析

○松田 修平, 大槻 隆司
（山梨大院・医工農）
tohtsuki@yamanashi.ac.jp

【背景・目的】雑草は豊富なバイオマスであり化石燃料に代わるエネルギー源の一つとなりうる。我々はギョウギシバという雑草のみを基質としてメタン生産可能な微生物群を取得しており、これまでの研究で培地作成時のオートクレーブにより雑草成分の約 50%が溶出し、メタン生産に影響を与えると考えられた。本研究は雑草中の水溶性成分および非水溶性成分をそれぞれ単独で基質としてメタン発酵を行い、各基質を資化する微生物群の動態を調べメタン生成機序に関する知見を得ることを目的とした。
【方法】粉末化し目抜き 100 μm の篩を通過したギョウギシバを 1%(w/v)でイオン交換水に懸濁後オートクレーブし吸引濾過を行った。得られた濾液を水溶性画分、濾紙上に回収された固体を非水溶性画分とした。0.1 M リン酸ナトリウムカリウム緩衝液(pH7.2)に基質としてギョウギシバ 0.2 g、ギョウギシバ 0.1 g 相当の水溶性画分、非水溶性画分 0.1 g のいずれかを添加し培地とした。ギョウギシバ基質で継代維持しているメタン発酵微生物群の培養液 1 mL を加え全量 20 mL とし、気相を窒素置換後 35℃で静置培養した。メタン生産量の測定を行うとともに、培養中回収した菌体の 16S rRNA 遺伝子をナノポアシーケンサー MinION を用いて解析し微生物群を構成する微生物を推定した。
【結果・考察】80 日間培養した結果、基質 1 g あたりのメタン生産量はギョウギシバ：184.5 mL、水溶性画分：96.8 mL、非水溶性画分：26.5 mL だった。16S rRNA 遺伝子解析の結果、全ての試験区で真正細菌は Proteiniphilum 属、古細菌は Methanobacterium 属の構成割合が最も高かったが、基質ごとに構成割合が明らかに異なる微生物が見出された。従って、水溶性画分、非水溶性画分をそれぞれ資化する微生物群間の相互作用がギョウギシバを基質とした場合のメタン生産量の増大に大きく寄与すると考えられた。

Analysis of microbial populations in methane fermentation using water soluble fraction and water insoluble fractions from weed as substrates

○Shuhei Matsuda, Takashi Ohtsuki
(Univ.Yamanashi)

Key words methane fermentation, microbial community, weed

2Cp06 河口底泥からの海洋性キチン分解菌叢の探索と VFAs 生産

○脇 滉[1], 早瀬 伸樹[1], 中島田 豊[2], 喜多 晃久[1]
([1]新居浜高専, [2]広島大院・統合生命科学)
kita@chem.niihama-nct.ac.jp

【背景・目的】
近年、世界中でエビやカニの消費量が伸び、それらの水産加工の際に膨大な量のキチン含有廃棄物が発生している。キチンは、自然界においてセルロースに次ぐ二番目に豊富なポリマーであるが、非常に硬度な構造を持つ難分解性ポリマーであるため、大腸菌や酵母などの一般的に工業利用されている微生物では分解ができない。よって、キチン含有廃棄物の処理が深刻な問題になっている。そのような中、過去の研究で、河口底泥中から未処理のキチン及びキチン含有廃棄物をいとも簡単に分解し、効率的にメタンを生成し得る海洋性キチン分解菌叢が発見された。そこで本研究は、メタン生産プロセスの第 1 段階で生産される酢酸やプロピオン酸などの揮発性脂肪酸（VFAs）を効率的に生産する海洋性キチン分解菌叢の探索と､その菌叢の性質について検討することを目的とした。
【方法・結果】
本研究では、まず新居浜近辺で採取した河口底泥を、5g/l のキチンを単独基質とし 30g/l の NaCl を含む液体培地に接種して、35℃で嫌気的に継代培養することによって、海洋性キチン分解菌叢の探索を行なった。その結果、河口底泥 2 サンプル（S-1 および H-1）からキチン分解菌叢が得られた。両菌叢は、VFAs としてそれぞれ主に酢酸を生産していた。その後、得られた菌叢の最適 pH と最適温度を検討したところ、両菌叢とも最適 pH は 7.5 付近で、最適温度は S-1 が 40℃、H-1 が 35℃であった。現在は採取した海洋性キチン分解菌叢の微生物構造を明らかにするために、菌叢解析を行っている。

Exploration of marine chitin degrading bacterial consortium from estuarine bottom mud and VFAs production

○Akira Waki[1], Nobuki Hayase[1], Yutaka Nakashimada[2], Akihisa Kita[1]
([1]Niihama Natl. Coll. Technol., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words chitin, bacterial consortium, symbiosis, volatile fatty acids

2Cp07 *Saccharomyces cerevisiae* 由来のグリセロール資化性酵母の育種とグリセロールからのエタノール発酵

○Zhang Kuan[1], 中西 昭仁[1,2], 軽部 征夫[1,2]
([1]東京工科大院・バイオニクス, [2]東京工科大・応生)
nakanishiah@stf.teu.ac.jp

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は古くから産業微生物として注目を集め研究されており、発酵による物質生産株として広く利用されている。現在までに *S. cerevisiae* の安定かつ安全な培養法や遺伝子解析・遺伝子組換え技術等が成熟してきており、*S. cerevisiae* を細胞工場として用いた各種有用物質の生産が強く期待されている。しかしながら、*S. cerevisiae* ではグルコースを炭素源とした発酵生産が主に行われるが、グリセロールを炭素源とした発酵生産はあまり知られていない。グリセロールはグルコースに比べ安価であるため、*S. cerevisiae* でグリセロールを有効に物質生産に活用できる系を構築できれば産業上大きなインパクトとなると考えた。そこで本研究では、はじめに *S. cerevisiae* からグリセロール資化性株の育種を狙った。具体的には、*S. cerevisiae* を 段階的に炭素源を限制した培地で複数回かつ長時間継代培養することで、最終的にはグリセロールを炭素源として有意に利用できるグリセロール資化性株の育種に成功した。その上で、単離されたグリセロール資化性株について、各種培地における増殖能評価や、 グリセロールからのエタノール直接生産能を定性・定量評価をするなど各種評価を行った。以上の通り、本研究ではグリセロール資化性株の単離・取得と、当該株のグリセロールからのエタノール生産について評価したので、本発表にてこれらを併せて報告する。

Generation of a glycerol-assimilating strain of *Saccharomyces cerevisiae* and its direct ethanol production from glycerol

○Kuan Zhang[1], Akihito Nakanishi[1,2], Isao Karube[1,2]
([1]Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol., [2]Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, glycerol, ethanol fermentation

2Cp08 Quality improvement of terasi, Indonesian shrimp paste, by monitoring the microorganism composition during controlled fermentation

○Arisa Sato[1,2], Dea Indriani Astuti[2], Sastia Prama Putri[1,2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Biotechnol., Sch. of Life Sci. and Technol., Inst. of Technol. Bandung)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Terasi is a traditional fermented shrimp paste used in Indonesian dish as condiments. Due to its affordability, the paste is widely consumed among the general population, and thus has a great impact in Indonesia. Currently, small-scale or home industry is common for *terasi* production, and natural fermentation process is the traditional method. Fermentation process is considered finish when desired aromatic odors are obtained. But this makes the fermentation process subjective, because the decision is solely dependent on the producer. Additionally, natural fermentation poses a higher risk for contamination of microbial pathogens. As a result, the food safety and food taste quality of the final product varies greatly from region to region. Therefore, it is necessary to improve the quality of *terasi* by means of controlled fermentation. Quality improvement can yield safer products, and can change the *terasi* production process from small-scale to large-scale. Hence, the objective of the research is to improve the quality of *terasi* by determining the most optimal fermentation starter culture. Optimal fermentation conditions were determined by analyzing the effect of the various starter inoculum on the inner microbial community, and results indicated that mixed culture of *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus subtilis*, and *Lactobacillus murinus* with ratio of 1:2:2 was the most effective for suppressing the growth of unwanted microorganisms.

Quality improvement of terasi, Indonesian shrimp paste, by monitoring the microorganism composition during controlled fermentation

○Arisa Sato[1,2], Dea Indriani Astuti[2], Sastia Prama Putri[1,2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Biotechnol., Sch. of Life Sci. and Technol., Inst. of Technol. Bandung)

Key words quality improvement, *terasi*, Indonesian shrimp paste, controlled fermentation

2Cp09 セルロース系バイオマスを原料とするカフェ酸発酵のためのゲノム編集による大腸菌代謝改変の作製と培養法の検討

○川口 秀夫[1], 宮崎 翔子[1], 寺本 潤[2], 西田 敬二[2], 南 博道[3], 佐塚 隆志[4], 近藤 昭彦[1,2]
([1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大・先端バイオ工セ, [3]石川県大・生物資源研, [4]名古屋大・生物機能セ)
kawaguchi_h@port.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】植物由来成分であるカフェ酸は植物由来成分は生理活性物質や芳香族ポリマー原料として多様な用途展開が期待される。我々はこれまでに、紙パルプをモデルセルロース系バイオマス原料とする組換え大腸菌によるカフェ酸の発酵生産を研究してきたが、グルコースを基質とする場合と比べて生産速度及び終濃度の低さが課題であった [(1)]。そこで本研究では、バイオマス植物として注目されるイネ科の C4 植物ソルガムのバガスからカフェ酸を効率的に生産するために、ソルガムの酵素糖化液を原料とする発酵生産法を最適化し、さらにゲノム編集により宿主大腸菌を代謝改変した。
【結果と考察】ソルガムのバガスを酵素糖化した糖化液を基質とする発酵生産では、グルコース標品よりも高いカフェ酸終濃度が得られた（100 mg/L）。一方で、カフェ酸収率は初期グルコース濃度と負の相関関係を示し、また糖化液では副生物である酢酸が増加していた。そこで、生産性を改善するために、Jar を用いたグルコースの逐次添加培養を行い、さらに培養期間中の溶存酸素濃度（DO）の影響を評価した。グルコース濃度を 17 g/L 以下で制御した 150 時間の培養後では、高 DO 条件と比べて低 DO 条件ではカフェ酸濃度が約 2 倍に増加することを明らかにした（360 mg/L）。しかし、低 DO 条件では副生物である酢酸及び乳酸の蓄積も 2 倍以上に増加していた（各 6 g/L, 3 g/L）。そこで、副生物の生成を抑えてカフェ酸収率を増加させるために、Target-AID 法 [(2)] によるゲノム編集で宿主大腸菌の酢酸および乳酸生合成能を欠損させたカフェ酸生産第 2 世代株を作製した。
【謝辞】本研究は、JST「未来社会創造事業」の支援を受けて実施した。
<References>
1. Kawaguchi, *et al*., Appl Microbiol Biotechnol. 101:5279-5290 (2017).
2. Banno, *et al*., Nat Microbiol. 3:423-429 (2018).

Genome editing and bioprocessing for enhanced caffeic acid production from cellulosic biomass by metabolically engineered *Escherichia coli*

○Hideo Kawaguchi[1], Shoko Miyazaki[1], Jun Teramoto[2], Keiji Nishida[2], Hiromichi Minami[3], Takashi Sazuka[4], Akihiko Kondo[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Eng. Biol. Res. Cent., Kobe Univ., [3]Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., [4]Biosci. Biotechnol. Cent., Nagoya Univ.)

Key words *Escherichia coli*, caffeic acid, biomass, genome editing

2Cp10 発酵阻害物質に高い耐性を持つスリランカの酵母

○外山 博英[1,2], Maduka Subodinee[2], 水谷 治[1,2]
（[1]琉球大・農, [2]鹿児島大院・連農）
toyama@agr.u-ryukyu.ac.jp

スリランカのトッディーから *Saccharomyces cerevisiae* 酵母を 18 株単離した。それらは 45℃でもアルコール発酵できた。高い塩耐性を示したので、発酵阻害物質に対する耐性も高いと期待して、バニリンなどの発酵阻害物質に対する耐性について調べた。すべての株が 18 mM バニリン存在下でも生育でき、1 株（SLY-10）は 21 mM でも生育可能であった。5 つの株（SLY-3, SLY-4, SLY-8, SLY-9, SLY-10）は 24 mM バニリン存在下でアルコール発酵することができた。バニリンはバニリルアルコールに還元されていた。さらに 4-ヒドロキシ安息香酸（24 mM）、フルフラール（30 mM）、5-ヒドキシメチル 2-フルフラール（5-HMF、30 mM）、酢酸（75 mM）およびギ酸（26 mM）存在下でもアルコール発酵できた。これらの発酵阻害物質の混合物（0.81 mM バニリン、9 mM フルフラール、9 mM 5-HMF、22.5 mM 酢酸、22.5 mM ギ酸）存在下でも 16.2-32.7 gL^{-1} のエタノールを生産することが可能であった。バニリン単独では SLY-10 が最も高い耐性を示したのに対し、混合物に対しては他の 4 つの株の方が高い耐性を示した。これらの株は木質バイオマスからのバイオエタノール生産に有用な菌株であると考えられた。

Yeast strains showing high tolerance against fermentation inhibitors

○Hirohide Toyama[1,2], Subodinee Maduka[2], Osamu Mizutani[1,2]
([1]Fac. Agric., Univ. Ryukyus, [2]United Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, vanillin

2Cp11 新奇キシロース資化性ラビリンチュラのキシロース代謝経路とメタボローム解析

○林 雅弘[1], 松田 綾子[1], 長岡 綾[1,2]
（[1]宮崎大・農, [2]林兼産業）
hayash-m@cc.miyazaki-u.ac.jp

【背景と目的】 従属栄養性油糧微生物ラビリンチュラによりバイオ燃料を生産するためには、多量の有機炭素源が必要となる。カーボンニュートラルでかつ安価な炭素源として検討されている、植物性バイオマス糖化液はヘミセルロース由来のペントースを多量に含有し、その資化性及び利用効率が技術的課題となる。本研究では、キシロース資化性ラビリンチュラを天然海より分離し、キシロース代謝経路の推定、キシロース代謝能の強化を行った。さらに中心代謝のメタボローム解析で脂質合成に関わる補酵素の供給バランス、分子育種ターゲットとしてのボトルネック酵素を探索した。
【方法】キシロースを単一炭素源として沖縄県石垣島からキシロース資化性ラビリンチュラを分離した。分離株の 18SrRNA 遺伝子の塩基配列に基づき分離株の系統解析を行った。さらに分離株を、キシロースを単一炭素源とする培地で約 3 年間継代培養してキシロースに馴化することでキシロース消費速度の向上を図った。また、キシロース代謝関連酵素活性を測定することによりキシロース代謝経路を推定し、GC-MS、LC-MS/MS により中心代謝関連のメタボライトや脂質合成関連補酵素を分析した。
【結果及び考察】分離株の mh1915 株を *Aurantiochytrium sp.* と属レベルまで同定した。また、mh1915 株には xylose reductase 活性が認められず、xylose isomerase（XI） 活性、xylulokinase（XK） 活性が認められ mh1915 株は XI-XK 経路でキシロースを代謝していると推察された。さらにメタボローム解析の結果、mh1915 株はキシロース馴化により NADPH の再生系が円滑に働きかつ FAS の活性化により総脂肪酸含量も上昇していた。

Xylose metabolic pathway and metabolome analysisi of a novel xylose assimilating thraustochytrid

○Masahiro Hayashi[1], Ayako Matsuda[1], Aya Nagaoka[1,2]
([1]Fac. Agric., Univ. Miyazaki, [2]Hayashikane Co. Ltd.)

Key words xylose, biodiesel fuel, metabolic analysis, *Auranchytrium*

2Cp12 好熱菌プロバイオティクスを給与した豚における筋タンパク質の構成変化

○鷺 陽香[1], 高木 誠仁[2], 西内 巧[3], 宮本 浩邦[1,4,5], 佐藤 成樹[6], 児玉 浩明[1]
（[1]千葉大院・園芸, [2]千葉大院・融合, [3]金沢大・学際, [4]サーマス（株）, [5]理研・生命医科学, [6]千葉大院・理学）
kodama@faculty.chiba-u.jp

【背景・目的】未利用の海産資源を好熱菌群によって発酵させた資材（以下、好熱菌発酵産物）を含む飼料を豚に給与すると、腸内フローラが改変し、子豚の成長促進や母豚の死産率の低下、脂肪蓄積の軽減、肉中の遊離アミノ酸の増加など、様々な有益な効果が確認されている。さらにこのような有益な効果をもたらすプロバイオティクスとして、好熱菌発酵産物由来の新菌種 *Bacillus hisashii* N-11T(国際寄託番号 BP-863)が単離されている。本研究では BP-863 株の給与による肉質の変化に着目し、筋タンパク質の構成の特性を明らかにする事を目的とした。
【方法】２つの系統、三元交配豚 LDB と LDK を対象として、BP-863 株を子豚の育成段階より給与し、最長筋を採取した上で、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング、二次元電気泳動および質量分析により、筋タンパク質の構成を網羅的に解析した。
【結果・考察】SDS-PAGE により、BP-863 の給与によって両系統で変化するバンドパターンが確認され、当該タンパク質の質量分析の結果より、筋収縮に関与するタンパク質として知られる速筋型トロポニン I (fTnI)と同定された。そこで抗 fTnI 抗体を作製し、ウエスタンブロッティングにより fTnI を定量的に検出できる系を確立した。さらに二次元電気泳動で調べたところ、BP-863 の給与によって fTnI の等電点が変化していたが、質量分析の結果より、当該等電点の変化はリン酸化によるものではないと判明した。また、筋タンパク質のショットガンプロテオーム解析を実施した結果、fTnI 以外のタンパク質としては、Calsarcin-3 や Fatty acid synthase 等が有意に増加する事が明らかになった。以上の結果から、豚の系統の違いを超えてプロバイオティクスが筋タンパク質の構成に影響する事が示唆された。プロバイオティクスによる筋タンパク質の構成変化は、他に類を見ない初めての知見と言える。

Muscle protein composition is changed by feeding thermophilic probiotics to pigs

○Haruka Sagi[1], Akihito Takagi[2], Takumi Nishiuchi[3], Hirokuni Miyamoto[1,4,5], Naruki Satoh[6], Hiroaki Kodama[1]
([1]Grad. Sch. Horticul., Chiba Univ, [2]Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., [3]Ad.Sci.Res.Cent, Kanazawa Univ., [4]Sermas co.ltd., [5]IMS,RIKEN, [6]Grad. Sch. Sci., Chiba Univ.)

Key words muscle protein, pig, probiotics, troponin I

2Cp13 好熱菌発酵産物の給与がブタ腸内の乳酸資化菌 *Megasphaera elsdenii* の有機酸代謝に与える影響

○板谷 かえで[1], 荒岡 亮祐[1], 宮本 浩邦[1,2,3], 児玉 浩明[1]
（[1]千葉大院・園芸, [2]サーマス, [3]理研・生命医科学）
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、排泄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、好熱菌発酵産物の給与によって、腸内で優占する乳酸菌種が L-乳酸産生菌から DL-乳酸産生菌へ変化することが確認された。また、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 *M. elsdenii* を単離し、その乳酸代謝に関する特性や腸内の乳酸菌との相互作用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、当該糞サンプルを *M. elsdenii* 選択培地に塗布した。給与区・非給与区からそれぞれコロニーを単離し、5 株の *M. elsdenii* 代表菌株を選抜した。代表菌株の有機酸産生能を調べたところ、給与区、非給与区の単離源の違いに関わらず乳酸資化能や産生する有機酸種に大きな違いはみられなかった。しかし、好熱菌発酵産物給与区から単離された代表菌株は L-乳酸よりも DL-乳酸を基質とした際に約 1.3 倍と有意に多くの吉草酸を産生し、また、L-乳酸よりも D-乳酸の資化速度が速いことも確認された。これらの結果から、好熱菌発酵産物の給与によってブタ腸内の DL-乳酸産生菌が増加することで、*M. elsdenii* がより生育しやすい環境となり、特に基質が DL-乳酸である場合に吉草酸産生能がより高くなるような *M. elsdenii* 株がブタ腸管内で増加すると考えられた。

Organic acid metabolism of lactate-utilizing bacterium *Megasphaera elsdenii* isolated from feces of pigs fed with a thermophile-fermented compost

○Kaede Itaya[1], Ryosuke Araoka[1], Hirokuni Miyamoto[1,2,3], Hiroaki Kodama[1]
([1]Grad. Sch. Horticul., Chiba Univ., [2]Sermas, [3]IMS,RIKEN)

Key words *Megasphaera elsdnii*, lactate-utilizing bacterium, compost, gut microbiota

2Cp14 好熱性アセトジェン *Theromoanaerobacter kivui* の代謝改変によるエタノール生産

○登木 耕陽, 佐藤 悠, 岡野 憲司, 本田 孝祐
（阪大院・工）
honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

[背景と目的] 一般的なバイオリファイナリーにおいて原料であるバイオマスは、物理的破砕や糖化処理を経て、発酵による物質生産へと供される。一方、前処理に要するコストの低減やその過程で生じるフルフラール類などによる発酵微生物への阻害作用の回避が、バイオリファイナリー分野における長年の課題となっている。そこで、熱分解によりバイオマスを水素や二酸化炭素等からなる混合ガスに変換した後、生じたガスを資化可能な微生物の作用でこれらを燃料や化学品へと変換する合成ガス発酵法が近年注目を集めている。合成ガス発酵法では、水素と二酸化炭素などの混合ガスの異化代謝により酢酸を生成するアセトジェンが汎用される。本研究では、既知のアセトジェンのうち、最も高い耐熱性と倍化速度を有する好熱性アセトジェン *Thermoanaerobacter kivui* に代謝改変を施し、混合ガスからエタノールを生産可能な株の育種に取り組んだ。
[方法と結果]はじめに、オロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(*pyrE*)を欠損させた *T. kivui* のウラシル要求性株を作製した。次に、*pyrE* をマーカーとして、ウラシル要求性株のゲノム上に *Pyrococcus furiosus* 由来のアルデヒドフェレドキシンオキシドレダクターゼおよび *Thermoanaerobacter* sp. X514 株由来のアルコールデヒドロゲナーゼをコードした遺伝子を組み込むことで、ATP 合成能を損なうことなく混合ガスをエタノールへと変換可能な *T. kivui* 代謝改変株を作製した。同株を用いることで現在までに、水素・二酸化炭素混合ガス雰囲気下の栄養培地で 2 g/L/day の速度でエタノールを生産することに成功している。

Metabolic engineering of thermophilic acetogen, *Thermoanaerobacter kivui*, for ethanol production from H2 and CO2

○Koyo Noboki, Yu Sato, Kenji Okano, Kohsuke Honda
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words syngas fermentation, ethanol, *Thermoanaerobacter kivui*

2Cp15 有機性廃棄物の二次資源化に向けた天然菌叢とアセトジェンの共培養システムの開発

○佐藤 悠[1], 佐々木 由佳[1], 登木 耕陽[1], 岡野 憲司[1], 木村 浩之[2], 本田 孝祐[1]
（[1]阪大院・工, [2]静大・グリーン科技研）
honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

[背景と目的] 有機性廃棄物の二次資源化プロセスであるメタン発酵では、多様な微生物の作用により有機物が段階的に分解され、水素・二酸化炭素を経てメタンが生成される。しかし、メタンは安価であるため小規模な事業所では設備投資や運転にかかるコストの回収が困難であり、メタンよりも高付加価値な物質を生産可能なプロセスの開発が望まれる。共同発表者である静岡大学の研究グループは、培養温度の制御により地下温水由来のメタン発酵菌叢中のメタン生成アーキアを特異的に阻害し、前駆体である水素と二酸化炭素を生成することに成功している。この現象をもとに我々は、「菌叢」と「水素と二酸化炭素からの物質生産を行えるアセトジェン」を組み合わせ、有機物からメタン以外の有用物質を生産する新システムを考案した。本研究では、(i)実験室レベルで水素と二酸化炭素を生成する「菌叢」を取得し、(ii)「水素と二酸化炭素からの物質生産が可能なアセトジェン」と組み合わせることで、上述の新システムの構築に向けた取り組みを行ったので報告する。
[結果] 静岡県川根温泉からサンプルを採水し、地下温水の組成を再現した合成培地にて菌叢の培養を試みた。その結果、60℃での培養時に約 4 mmol/L/day で水素と二酸化炭素を生成する菌叢を取得した。また、取得した菌叢の継代培養を行い、半年以上にわたり水素と二酸化炭素の生成能を損うことなく菌叢の安定した培養を行うことに成功した。さらに、ここで生じた水素と二酸化炭素を生育基質とした好熱性アセトジェン *Thermoanaerobacter kivui* の培養にも成功している。現在、*T. kivui* の代謝改変株を用いることで、菌叢が生成する水素と二酸化炭素からのエタノール生産試験を実施中である。

Development of a co-cultivation system of natural microbial consortium and thermophilic acetogen toward the recycling of organic wastes

○Yu Sato[1], Yuka Sasaki[1], Koyo Noboki[1], Kenji Okano[1], Hioryuki Kimura[2], Kohsuke Honda[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words syngas fermentation, methane fermentation, *Thermoanaerobacter kivui*, synthetic microbial consortium

2Cp16 *C.necator* 組換え株の化学合成独立栄養条件下での回分培養による 3-ヒドロキシ酪酸と 3-ヒドロキシヘキサン酸の共重合ポリエステルの CO_2 からの生合成

○鈴木 尚幸[1], 宮本 樹里[1], 折田 和泉[2], 福居 俊昭[2], 田中 賢二[1]
（[1]近畿大・産理工, [2]東工大・生命理工）
tanaka@fuk.kindai.ac.jp

3-ヒドロキシ酪酸（3HB）と 3-ヒドロキシヘキサン酸（3HHx）の共重合ポリエステルである PHBH は、柔軟性等に優れた微生物産生型の生分解性プラスチックとして期待されている。我々は、糖から PHBH を生合成する水素酸化細菌 *Cupriavidus necator* の遺伝子組換え株を用いた化学合成独立栄養条件下での PHBH 生合成について研究しており、フラスコ培養試験では 3HHx モル分率に富む PHBH を CO_2 から高菌体内含有率で生合成することを明らかにした。今回、ジャー発酵槽を用いた回分培養試験を行い、菌体生成と PHBH 生合成効率化における問題点を検証した。*C.necator* の換え株 4 種類について、無機塩合成培地、混合基質ガス（$H_2/O_2/CO_2$ = 8：1：1)、およびガラスジャー発酵槽を備えた閉鎖循環ガス発酵システムを用いて、回分培養試験を実施した。培地量は 600mL とし、pH は 7.0 に維持した。結果として、回分培養における菌体生成量と PHBH 蓄積率ともにフラスコ培養のそれよりも高く、とくに MF01/JAc 株では培地窒素源である塩安濃度を 2.42g/L とした時に DCW で約 70g/L の菌体生成量が得られた。菌体合成を高めるため、さらに塩安濃度を増やして培養を行ったが、菌体生成量はむしろ低下した。また、回分培養では PHBH 中の 3HHx モル分率がフラスコ培養に較べて低くなったが、これは培地 DO の不足が原因ではないかと考えられた。現在、酸素移動速度容量係数 kLa の高い撹拌翼・発酵槽を導入することにより、菌体生成と PHBH 生合成の改善を試みている。

Biosythesis of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) from CO_2 by batch culture of the genetically engineered *R.eutropha* in chemolithoautotrophic condition

○Naoyuki Suzuki[1], Jyuri Miyamoto[1], Izumi Orita[2], Toshiaki Fukui[2], Kenji Tanaka[1]
([1]Fac. Humanity-Oriented. Sci. Eng., Kinki Univ., [2]Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech)

Key words *Ralstonia eutropha*, PHBH, hydrogen-oxidizing bacteria, CO_2 fixation

2Dp01 超好熱性アーキア由来キチナーゼ ChiC の細胞膜局在化に関与するアミノ酸配列の同定

○渡邉 大輔, Aslam Mehwish, 山田 将大, 金井 保, 跡見 晴幸
（京大院・工）
atomi@sbchem.kyoto-u.ac.jp

【目的】
超好熱性アーキア *Pyrococcus chitonophagus* のキチナーゼ ChiC は、C 末端領域に推定膜局在ドメインがあり細胞膜への局在が予想されるが、アーキアの膜局在性タンパク質の膜局在化機構の解析はほとんど行われていない。本研究では ChiC の膜局在化に関わるアミノ酸配列の同定を行った。
【方法・考察】
ChiC の膜局在ドメインは、疎水性アミノ酸に富む領域に続いて、塩基性アミノ酸に富む配列をもつ。また疎水性アミノ酸配列内には膜結合が予想される同様のタンパク質においても保存されている配列が存在する。これらの配列の重要性を確かめるために、遺伝子組換えが可能な超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を用いて、野生型 ChiC、および五種類の変異型 ChiC 発現プラスミドを作製した。変異型 ChiC のうち三種は C 末端領域の欠失変異体であり、二種は保存配列の部位特異的変異体である。これらの発現プラスミドをもつ *T. kodakarensis* 株を培養し、各培養液を培養液上清画分・細胞質画分・膜画分に分画し、各画分について抗 ChiC 抗体を用いた Western blot 解析を行った。その結果、野生型 ChiC が主に細胞膜に局在すること、および ChiC の膜局在ドメイン内の各領域がその膜局在化に大きく寄与することが示唆された。

Identification of amino acid sequences involved in cell membrane localization of the chitinase ChiC in hyperthermophilic archaea

○Daisuke Watanabe, Mehwish Aslam, Masahiro Yamada, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi
(Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ.)

Key words hyperthermophile, archaea, chitinase, membrane localization

2Dp02 超好熱性アーキア *Pyrococcus chitonophagus* がもつキチナーゼの遺伝学的機能解析

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

【目的】*Pyrococcus chitonophagus*（前の名称は *Thermococcus chitonophagus*）はキチンを主有機物源とした培地により単離された超好熱性アーキアである。本菌のゲノム上には、３つのキチナーゼ遺伝子（*chiA*, *chiC*, *chiD*）が存在する(1)。本菌のキチン分解過程において、各キチナーゼが果たす役割の解明を目的として、本菌における遺伝子組換え系の構築とそれを用いたキチナーゼ遺伝子破壊株の作製を行った。
【方法・考察】前年度の大会において、*P. chitonophagus* の *pyrE* 破壊株を単離し（CHU1 株）、本菌を用いた *chiC* 破壊株と *chiD* 破壊株の単離を報告した。しかしながら、CHU1 株の形質転換効率は極めて低く、実用的な系とは言えなかった。そこで、制限修飾系（TypeI）遺伝子群をさらに破壊した株（CRU1 株）を作製し、本菌をホスト株として、各キチナーゼ遺伝子破壊株の作製を進めた。その結果、全てのキチナーゼ遺伝子の破壊株、CRDA1 株(CRU1:Δ*chiA*)、CRDC1 株 (CRU1:Δ*chiC*)、CRDD1 株 (CRU1:Δ*chiD*) が作製できたことから、*P. chitonophagus* において実用的な遺伝子組換え系を構築したと考えた。作製したキチナーゼ遺伝子破壊株を用いて、膨潤キチンの分解試験を行った結果、CRDA1 株において、ホスト株や他の遺伝子破壊株よりも、有意に低い swollen chitin の分解が観察された。以上のことから、本菌のキチン分解において、ChiA が主要な役割を果たしていることが考えられた。

1) Horiuchi A, Aslam M, Kanai T, Atomi H. 2016. A structurally novel chitinase from the chitin-degrading hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*. Appl Environ Microbiol 82: 3554 -3562

Genetic analysis of chitinase gene deletion mutants of the hyperthermophilic archaea, *Pyrococcus chitonophagus*

Masahiro Yamada, Natsuki Nakada, Mehwish Aslam, ○Tamotsu Kanai, Tamotsu Kanai
(Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ.)

Key words hyperthermophile, archaea, chitinase, gene disruption

2Dp03 *Pseudomonas* sp. TB-97 株によるテレフタル酸からの有用物質生産

○金森 拓[1], 中島 鈴佳[1], 岡村 匡浩[1], 内堀 孝博[2], 中島 敏明[1]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]パナック工業株式会社）
nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

【背景と目的】フィルム処理工場において PET フィルムをリサイクルする際、安価な化合物であるテレフタル酸 (TPA) が生成、蓄積してしまい、その処理が課題となっていた。そこで当研究室では TPA を効率よく分解する菌株 (TB-97 株) を取得、TPA が蓄積する課題は解決した。しかし、TPA を単に TB-97 株に分解・消失させるだけではもったいない。本研究では、TB-97 株の TPA 分解過程で生じる代謝中間体で、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プロトカテク酸 (PCA) に着目し、生産と蓄積を目的とした。TB-97 株は PCA 分解遺伝子 (*pca3,4*) を 2 セット保持しており PCA を蓄積できない状態であるため、遺伝子操作でこれらを破壊した菌株 (2 重破壊株) を取得し、PCA を蓄積させる。
【方法】*pca3,4* 破壊プラスミドを設計・構築し、大腸菌ケミカルコンピテントセルにヒートショック法で導入した。これと TB-97 株をメンブレン上で接合伝達、相同組換えさせた。1 セット目 (1 重破壊株) は *pca3,4* を抗生物質耐性マーカーと組み替えることで、2 セット目 (2 重破壊株) は 1 重破壊株の遺伝子に対して、*pca3,4* を全てくり抜くことで、それぞれ *pca3,4* を破壊した。取得した破壊株を TPA 基本培地 (TPA が唯一炭素源) や TPA 基本培地 (+1%リンゴ酸：TB-97 株の TPA 分解を阻害しない補助炭素源) で振盪培養し、TPA, PCA 濃度を HPLC で測定した。
【結果と考察】取得した 2 重破壊株を TPA 基本培地で培養した結果、若干の PCA 蓄積が見られ、確かに *pca3,4* の破壊に成功した。また、TPA 基本培地 (+1% リンゴ酸) での培養実験では、TPA 分解と PCA 蓄積 (5.5 g/L) が見られ、リンゴ酸の添加量次第で PCA の生産、蓄積もさらに向上すると考えられた。今後は PCA 高生産条件の検討及び、他菌株の有用物質生産経路を導入し他の有用物質生産を検討する。

Production of useful substrate by *Pseudomonas* sp. TB-97 strain.

○Taku Kanamori[1], Suzuka Nakajima[1], Masahiro Okamura[1], Takahiro Uchibori[2], Toshiaki Nakajima[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Panac ind, inc)

Key words terephthalic acid, protocatechuic acid, *Pseudomonas*, homologous recombination

2Dp04 コアグラーゼ陰性ブドウ球菌由来アシル化ホモセリンラクトン分解酵素の機能解析

○上村 哉生樹[1], 染谷 信孝[2], 諸星 知広[1]
（[1]宇都宮大院・工, [2]農研機構）
morohosi@cc.utsunomiya-u.ac.jp

【目的】グラム陰性細菌の多くは、アシル化ホモセリンラクトン（AHL）を介した Quorum Sensing により、病原性の発現やバイオフィルム形成等を制御している。これらの細菌が生産する AHL を人為的に分解することで、Quorum Sensing に制御される病原性発現を抑制可能である。コアグラーゼ陰性ブドウ球菌（CNS）は、臨床的危険度が低い皮膚などの常在菌である。本研究では、CNS から新規 AHL 分解遺伝子をクローニングするとともに、AHL 分解遺伝子を用いた病原性抑制効果について検討を行った。
【方法及び結果】CNS の一種である *Staphylococcus carnosus*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri* の全ゲノム配列中に、ジャガイモ葉から単離した *Solibacillus silvestris* 由来の AHL ラクトナーゼ（*ahlS*）相同遺伝子が存在することが明らかになった。これらの CNS 菌株の染色体から *ahlS* 相同遺伝子をクローニングし、大腸菌へ形質転換したところ、様々な構造のアシル鎖を有する AHL に対して分解活性を示し、特にアシル鎖長が短い AHL に対して高い分解活性を有することが明らかになった。次に、AhlS をマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現するプラスミドを作成し、融合タンパク質をアミロースレジンカラムで精製したところ、融合タンパク質は高い AHL 分解活性を有していた。さらに、融合タンパク質を緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株に投与したところ、Quorum Sensing に制御されるエラスターゼ活性を抑制可能であることが明らかとなった。

Characterization of *N*-acylhomoserine lactone-degrading enzyme from the coagulase-negative staphylococci

○Yaoki Kamimura[1], Nobutaka Someya[2], Tomohiro Morohoshi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., [2]NARO)

Key words quorum sensing, acyl homoserine lactone, staphylococci, lactonase

2Dp05 納豆菌のポリ - γ - グルタミン酸生産に関与する高度に保存された Yj g F/YER057 c /UK114 ファミリータンパク質

○木村 啓太郎[1], ル ティ トゥ ホン[1], 八谷 剛史[2,3], 長谷 純嵩[2], 志波 優[4], 吉川 博文[4,5], 榊原 康文[2]
（[1]農研機構・食品, [2]慶應大・理工, [3]岩手医大・メディカル・メガバンク, [4]東農大・応生科, [5]東農大・ゲノム）
keitarou@affrc.go.jp

【背景と目的】納豆菌のポリ - γ - グルタミン酸（γPGA）生産は細胞密度による制御を受け，定常期に観察される。そのため、細胞内情報伝達の鍵因子である *degQ* 遺伝子の破壊により γPGA 生産能は失われる。γPGA 生産制御に関わる新たな因子を探索するため、*degQ* 遺伝子破壊株の γPGA 生産を回復させる抑制変異のスクリーニングを試みた。
【方法】納豆菌（*Bacillus subtilis*(natto)）の *degQ* 遺伝子破壊株をエチルメタンスルホン酸で変異処理し，γPGA 生産が回復した抑制変異株を選抜した。次いで、得られた抑制変異株の全ゲノム塩基配列をゲノムアナライザー（Illumina IIx）で解析して変異を検出した。γPGA 合成遺伝子の発現は *pgsB-lacZ* 融合遺伝子の発現量（β - galactosidase 活性）を指標として、既報に従い測定した（Kimura et al., 2009）。相補試験等の遺伝学的実験は定法に従って行った。
【結果と考察】独立に取得した 3 株の抑制変異株には其々３～４個の変異が検出され、その内 *yabJ* 遺伝子の一塩基変異が 3 株に共通する変異であった。原因変異を特定するため、変異型 *yabJ* 遺伝子を親株（*degQ* 遺伝子破壊株）に導入し、γPGA 生産と γPGA 合成遺伝子の発現が回復することを確認した。興味深いことに、変異型 *yabJ* は野生型に対して優性であり、変異型を持つ株では γPGA 合成を直接制御する転写因子 DegU の発現量が大きく増加していた。YabJ は高度に保存された Yj g F/YER057 c /UK114 ファミリーに属するエナミン・イミン代謝物の解毒（脱アミノ反応）酵素であるとされている。しかし、異説も多くその機能には不明な点が多く残されている（Niehaus et al., 2015）。今回得られた実験結果から、抑制変異により *yabJ* 遺伝子産物が脱アミノ反応以外の何らかの機能を獲得して DegU の発現量を増加させたと推定された。

The highly conserved YjgF/YER057c/UK114 family gene is involved in poly-γ-glutamatic acid synthesis of *Bacillus subtilis* (natto)

○Keitarou Kimura[1], Le Thi Thu Hong[1], Tsuyoshi Hachiya[2,3], Sumitaka Hase[2], Yuh Shiwa[4], Hirofumi Yoshikawa[4,5], Yasubumi Sakakibara[2]
([1]NFRI, [2]Dept. Biosci. Inf., Keio Univ., [3]Iwate Med. Meg., Iwate Med. Univ, [4]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [5]Genome Res. Center, NODAI Res. Ins., Tokyo Univ. Agric.)

Key words *Bacillus subtilis*, poly(amino acid), gene expression, fermentation

2Dp06 ビフェニル/PCB 分解細菌 *Rhodococcus wratislaviensis* T301 株の色素脱色型ペルオキシダーゼの発現

○渡邊 崇人[1], 木村 信忠[2], 末永 光[3], 廣瀬 遵[4], 二神 泰基[5], 陶山 明子[6], 藤原 秀彦[6], 後藤 正利[7], 古川 謙介[6]
（[1]京大・生存研, [2]産総研・生物プロセス, [3]産総研・創薬基盤, [4]宮崎大・工, [5]鹿児島大・農, [6]別府大・食物栄養, [7]佐賀大・農）
takahito@rish.kyoto-u.ac.jp

【目的】自然界から供給される芳香族化合物の多くは植物リグニン由来である．リグニンは木材腐朽菌等により部分分解されるとその分解生成物である芳香族化合物の多くは土壌中に供給される．土壌中には，リグニンから供給された芳香族化合物を分解して増殖する細菌が数多く存在する．我々は，これまでに土壌中より *Pseudomonas* 属や *Rhodococcus* 属を始めとするビフェニル/PCB 分解細菌を十数株単離し，それらの遺伝生化学的研究及びゲノム解析を行ってきた．その結果，これらの細菌においては，ビフェニル/PCB 等の環境汚染物質だけではなく，様々なリグニン由来の芳香族化合物の分解代謝を担うと予想される遺伝子を数多く有していることが分かった．その内，今回は，ビフェニル/PCB 分解細菌 *R. wratislaviensis* T301 株の色素脱色型ペルオキシダーゼに注目し，その遺伝子の単離と発現を試みた．
【方法・結果】T301 株のゲノム情報を精査した結果，本菌のゲノム上には，3 種類の色素脱色型ペルオキシダーゼ遺伝子が存在することを確認した．また，これらの遺伝子産物は，強力なビフェニル/PCB 分解細菌 *R. jostii* RHA1 株由来のリグニンペルオキシダーゼ DypB と高い相同性を有していた．PCR にて増幅後，大腸菌の宿主ベクター系を用いて発現を試みたが，ほとんど可溶化発現しなかった．次に，*Rhodococcus* 属細菌の宿主ベクター系を用いてチオストレプトン誘導下で発現を試みたところ，可溶化発現及び高発現した．N 末端，C 末端及び両末端にヒスチジンタグをそれぞれ付加して精製した酵素は，ヘムの再構成やマンガンの添加によって活性が増加することが分かった．現在，本酵素の諸性質を調べている．

Expression of dye-decolorizing peroxidases from a biphenyl/PCB-degrader, *Rhodococcus wratislaviensis* T301

○Takahito Watanabe[1], Nobutada Kimura[2], Hikaru Suenaga[3], Jun Hirose[4], Taiki Futagami[5], Akiko Suyama[6], Hidehiko Fujihara[6], Masatoshi Goto[7], Kensuke Furukawa[6]
([1]RISH, Kyoto Univ., [2]BPRI, AIST, [3]BRD, AIST, [4]Fac. Eng., Univ. Miyazaki, [5]Fac. Agric., Kagoshima Univ., [6]Fac. Food Nut. Sci., Beppu Univ., [7]Fac. Agric., Saga Univ.)

Key words lignin, biphenyl/PCB, *Rhodococcus*, dye-decolorizing peroxidase

2Dp07 D-サイクロセリン生産性放線菌のゲノムマイニング

○矢尾井 健人[1], 黒田 照夫[2], 森田 大地[2], 熊谷 孝則[2]
（[1]広大・薬, [2]広大院・医系科学）
tkuma@hiroshima-u.ac.jp

【目的】*Streptomyces* (*S.*) *lavendulae* ATCC11924 は結核治療薬である D-サイクロセリン (D-CS) の生産菌として知られており, 私たちの研究により, その生合成遺伝子クラスター (BGC) や生合成経路はすでに明らかとなっている。ATCC11924 株のゲノムを解読したところ, 本菌株には, 依然として 20 個以上の BGCs が眠っていることが判明したため, 本研究では, ゲノム解析の結果に加え, 新規二次代謝産物の獲得を目的とした BGCs の異種発現について報告する。

【方法・結果】ATCC11924 株のゲノムシークエンスは PacBio RSII を用いて行った。約 74,000 のリードをアッセンブリーした結果, 7.32 Mb, 443 Kb および 295 Kb から成る 3 つのコンティグが得られ, これらを順にコンティグ 1, 2, 3 と命名した。続いて ATCC11924 のゲノムに対して antiSMASH 解析を行った結果, 本株には D-CS の BGC を含め 23 個の BGCs が存在していた。これらのうちコンティグ 1 中に含まれるクラスター 5 を対象として PCR による増幅を行い, EcoRV により処理した pSET152 と NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix を用いてライゲーションし pSET-1-5 を作成した。構築したベクターを接合伝達により *S. avermitilis* SUKA17 へと形質転換することで, 異種発現株である *S. avermitilis* SUKA17::pSET-1-5 の獲得に成功した。この菌株を培養することにより得られる二次代謝物については, HPLC を利用し今後さらに解析を進める予定である。同様にして, コンティグ 1 中のクラスター 13, コンティグ 2 中のクラスター 1 についても *S. avermitilis* SUKA17 を宿主として異種発現させ, 新規二次代謝産物の獲得を目指す。

Genome mining of D-cycloserine-producing microorganism

○Kento Yaoi[1], Teruo Kuroda[2], Daichi Morita[2], Takanori Kumagai[2]
([1]Sch. Pharm. Sci., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ.)

Key words D-cycloserine, genome mining, heterologous production, *Streptomyces lavendulae*

2Dp08 プロモーターおよびターミネーターがビフィズス菌の遺伝子発現に与える影響

○小酒井 智也[1], 下総 葉子[2], 野村 泉[3], 鈴木 徹[3]
（[1]岐阜大院・連農, [2]岐阜大院・自科技, [3]岐阜大・応生科）
suzuki@gifu-u.ac.jp

【背景と目的】プロモーターおよびターミネーターは、それぞれ転写の開始と終結に対して主要な役割を担っている。これらの構造は原核生物に共通して存在するが、その機能や性質は、大腸菌や枯草菌などを除くほとんどの生物種では詳しく検証されていない。また、近年、次世代シーケンサーの普及により、非常に多くの菌種のゲノム配列が決定され、ゲノム情報に基づく研究が活発化している。そのため、プロモーターやターミネーターが遺伝子発現に与える影響を、菌種ごとに検証する必要があると考えた。本研究においては、ヒト腸内フローラを構成するビフィズス菌に着目し、プロモーターやターミネーターの基本構造や機能を明らかにすることを目的とした。
【方法】*Bifidobacterium longum* NCC2705 より得られた RNA-Seq 解析から、プロモーターの構成要素である-10 領域と-35 領域のコンセンサス配列をそれぞれ推定した。次に、これらの推定配列から最適化配列を検証した。このとき、コンセンサス配列に 1 塩基ずつ変異を加えたプロモーターを用い、レポーターアッセイを行った。さらに、二つの領域間のスペーサー長の特徴についても検証を行った。一方、ターミネーターに関しては、本菌株のもつ 20 種類以上のターミネーターをレポーター遺伝子の下流に組込み、それらの機能性を評価した。プラスミドの構築では、pKO403 をベクターとし、プロモーター、レポーター遺伝子、ターミネーターを組込んだ。
【結果と考察】-35 領域と-10 領域のコンセンサス配列および最適化配列は、それぞれ TTGTGC/TTGNNN と TACAAT/TATAAT だった。また、スペーサー長としては 11 bp と 17 bp が本菌で機能し、大腸菌とは異なる特徴を示した。一方、ターミネーターの種類によって遺伝子発現に 4 倍以上の差がみられ、機能に違いがあることが示唆された。

An influence to gene expression in *Bifidobacterium* by promoter and terminator

○Tomoya Kozakai[1], Yoko Shimofusa[2], Izumi Nomura[3], Tohru Suzuki[3]
([1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Gifu Univ., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Gifu Univ., [3]Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

Key words *Bifidobacterium*, promoter, terminator, gene expression

2Dp09 マクロピノサイトーシス誘起ペプチドを利用した海洋性紅色光合成細菌の新規形質転換系の開発

○樋口 美栄子, 沼田 圭司
（理研・環境資源）
keiji.numata@riken.jp

マクロピノサイトーシスは、細胞外液をマクロピノソームという小胞により細胞内に取り込む現象であり、細胞内デリバリーの手法の一つとして注目されている。我々は、代表的な細胞透過性ペプチドであり、マクロピノサイトーシスを誘導することが知られている Tat ペプチドとマクロピノソームから細胞質への放出能を有する EED ドメインを、サルコシンリンカーで融合した dTat-EED ペプチドを開発し、DNA デリバリー能について検証した。ホスト生物としては、窒素固定や光合成能を有する海洋性紅色光合成細菌を用いた。紅色光合成細菌への外来遺伝子の導入には接合法が広く使われており、培養液に添加するだけで DNA が取り込まれる自然形質転換についてはほとんど報告されていない。DNA のデリバリーには、カナマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドをポリカチオン性ペプチドと混合したペプチド-プラスミド DNA 複合体を用いた。dTat-EED ペプチド（10 - 500 μM）を濃縮した紅色光合成細菌の培養液に添加することによりマクロピノサイトーシスを誘導した後、ペプチド-プラスミド DNA 複合体を培養液に加え 1 時間反応させた。反応液を除去した後、生育培地のみで一晩前培養し、カナマイシンを含む寒天培地で培養した。その結果、ペプチド濃度に依存してカナマイシン耐性コロニーが出現し、50 ・100 μM でより多くの耐性コロニーが得られた。500 μM では dTat-EED ペプチド処理直後に紅色光合成細菌は溶菌し、耐性コロニーが得られなかった。これらの結果から、マクロピノサイトーシスを誘起するペプチドにより紅色光合成細菌への DNA のデリバリーが可能であることがわかった。現在は、他の細菌種やペプチドの種類・DNA との量比などの最適化を進めている。

Development of a novel transformation method of marine purple photosynthetic bacteria using micropinocytosis-inducing peptide

○Mieko Higuchi-Takeuchi, Keiji Numata
(CSRS, RIKENS)

Key words transformation, peptide, photosynthetic bacteria, gene transfer

2Dp10 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のビスフェノール A (BPA)分解能の不安定化評価法の構築

○村上 将和 [1], 仲野 育惠 [1], 松村 吉信 [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。一方、本株は BPA 分解時に一時的な増殖能の低下や BPA 非分解菌 (AO1L 等) の出現などゲノム構造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 AO1 株の BPA 分解能の不安定化評価法の構築とゲノム構造解析を行い、ゲノム不安定化の頻度や要因を調べることを目的とした。
【方法と結果】AO1 株不安定化頻度は BPA 非分解細胞の出現率で評価した。様々な条件で培養した AO1 株細胞を BPA (115 μg/mL) とカザミノ酸 (1 g/l)、グルコース (1 g/l) を含む BSM 改変培地 (以下 BPA-BSM 改変培地) と BPA を含まない BSM 改変培地で培養した。30℃、3 日間培養を行い、BPA-BSM 改変培地で生育しなかった AO1 株の割合を BPA 非分解細胞出現率とした。まず、AO1 株を BPA 存在下の BPA-BSM 改変培地で培養した場合では不安定化頻度は 7% に対して、BPA 非存在下の BSM 改変培地で培養した場合の不安定化頻度は約 40%であった。このことは、BPA が AO1 株の BPA 分解能力を安定化させていることを示唆している。また、生育しなかった株の BPA 分解遺伝子の存在量をリアルタイム PCR 法で調査したところ、一部の BPA 分解遺伝子の存在量が非常に高い値となっていた。このことは、一部の BPA 分解遺伝子がプラスミドより遊離した状態で細胞内に多数存在していることを示唆しており、この状態が AO1 株の不安定性に関わっていると予想している。現在、遊離領域とその遊離頻度の特定を試みている。

Establishment of the destabilization evaluation method on the degradation ability of bisphenol A in *Sphingomonas bisphenolicum* AO1

○Masakazu Murakami[1], Ikue Nakano[1], Yoshinobu Matsumura[2]
([1]Dept. Life science & Biotech., Kansai Univ, [2]ORDIST. Kansai Univ)

Key words gene disruption, bioremediation, genome stability, xenobiotic compounds

2Dp11 放線菌線状プラスミドの接合伝達に対する *ttrA* の影響

○深田 悠太 [1], 大橋 沙季 [1], 丸山 直也 [1], 池田 治生 [2], 片岡 正和 [1]
（[1]信州大院・生命医工, [2]北里大・北里生命研）
mars@shinshu-u.ac.jp

【目的】
Streptomyces 属の伝達性プラスミドには環状と線状の２形態がある。巨大線状プラスミドの存在から、線状プラスミドは環状プラスミドより巨大な DNA を運搬できる利点がある。*S. avermitilis* 由来線状プラスミド SAP1 の接合伝達には *traA*、*traB*、*ttrA* の３遺伝子領域が必要である。これらの内、*ttrA* は線状プラスミドに特有のものである。本研究では *ttrA* と線状プラスミドの接合伝達の関連を調べた。
【方法と結果】
SAP1 由来の *ttrA*(*SAP1ttrA*)を組み込んだプラスミドを作成した。環状、あるいは線状のこれらのプラスミドを *S. lividans* TK21 に導入し、*S. lividans* TK24（str-6; Str^R）と接合させ、その伝達効率を測定した。さらに線状プラスミドの接合伝達に対する ttrA の作用が *cis* または *trans* かを確認するため、*ttrA* ORF の開始コドン直後に終始コドンを挿入し、TtrA の生成を停止させたプラスミドを作成し、通常の *ttrA* を含むプラスミドの伝達効率と比較した。
【結果と考察】
ttrA を含まない線状プラスミドは、*ttrA* を含むプラスミドに比べて伝達効率が大きく低下したが、環状プラスミドでは *ttrA* の有無による伝達効率の差異はなかった。この結果から *ttrA* は線状プラスミドの効率的な接合伝達に必要であることが確認できた。また、SAP1 由来の *traA*、*traB* と SLP ２由来の *ttrA*(*SLP2ttrA*)を組み込んだ線状プラスミドにおいて伝達効率の大幅な低下が見られたことから、*ttrA* は由来を同じくする *traA*、*traB* を特異的に認識していると考えられる。さらに TtrA の生成を停止させた *ttrA* を組み込んだ線状プラスミドは伝達効率が大きく低下した。これにより線状プラスミドの伝達は TtrA に依存していることが判明した。

Role of *ttrA* on conjugal transfer of linear plasmid SAP1 in *Streptmyces*

○Yuta Fukada[1], saki Ohasi[1], Naoya Maruyama[1], Haruo Ikeda[2], Masakazu Kataoka[1]
([1]Grad. Sch. BioMedical Eng. Shinshu Univ., [2]Kitasato Inst. Life Sci., Kiatasato Univ.)

Key words conjugation, linear plasmid, *Streptomyces*, transfer genes

2Dp12 枯草菌を宿主とした低毒性物質で誘導可能なタンパク質発現系の開発

○広岡 和丈
（福山大・生命工）
hirooka@fukuyama-u.ac.jp

【目的】タンパク質の異種発現系の微生物宿主としては大腸菌が一般的であるが、哺乳類に毒性を示すリポ多糖類を含むため医薬品・食品製造に関わるタンパク質を生産する場合にはこれらの有害物質を除去する必要が生じる。枯草菌は納豆などの発酵食品製造に用いられ安全性が認められているので、これを宿主とし、植物由来低毒性物質を誘導物質とするタンパク質高発現系の開発を試みている。その一例としてラムノースとグルコースで制御可能な枯草菌宿主タンパク質高発現系を構築し、評価を行なった。
【方法・結果】枯草菌のラムノース異化オペロンの制御領域 (P*rhaEW*) と、発現量のさらに高めるために、恒常的に発現する *cdd* 遺伝子の制御領域 (P*cdd*) と、定常期に高発現する *ylbP* 遺伝子の制御領域 (P*ylbP*) を組み合わせて連結し、種々のハイブリッド型発現誘導系を構築した。各構築を改変型 GFP 遺伝子 (*egfp*) と融合させて染色体中に導入した枯草菌株を作製し、それらをグルコースまたはラムノースを炭素源とした培地で培養し、蛍光強度を定量した。その結果、SD 配列を除いた P*rhaEW* と *ylbP* 遺伝子の SD 配列の連結 (P*rhaEWylbP*) を保持した菌株において最も厳密に発現制御が可能であることがわかり、SD 配列を除いた P*cdd* と *ylbP* 遺伝子の SD 配列の連結 (P*cddylbP*) を保持した菌株をグルコース存在下で培養した場合に EGFP 発現量が最大となった。グルコース存在下での発現量のさらなる向上を目指し、P*cddylbP* にカタボライト活性化する *ackA* と *pta* の各遺伝子の制御領域を組み込んだ各構築を作製して同様に評価したがグルコース存在下での発現量の上昇は認められず、制御領域の配置が重要であると考えられた。

***Bacillus subtilis* protein expression system inducible by non-toxic substances**

○Kazutake Hirooka
(Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ.)

Key words *Bacillus subtilis*, protein expression, rhamnose, glucose

2Dp13 ポリヒドロキシアルカン酸生産菌で機能する転写制御スイッチの確立

○平山 歩夢 [1], 折田 和泉 [1], 中村 聡 [1], 梅野 太輔 [2], 福居 俊昭 [1]
（[1]東工大・生命理工, [2]千葉大院・工）
tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は微生物が生産するポリエステルであり、生分解性を示すため環境調和型材料として注目されている。PHA の生産性向上には PHA 生産方向と細胞増殖方向の代謝フラックス制御が重要である。一方、近年の合成生物学研究では野生型 (WT) リプレッサーを用いて誘導剤添加により標的遺伝子の転写を誘導する ON スイッチに加え、逆表現型 (RP) の変異リプレッサーを用いて転写を抑制する OFF スイッチが開発されている。この技術の PHA 生合成制御への適用が考えられるが、PHA 生産菌で使用できる転写制御スイッチは開発途上である。本研究では PHA を多量に蓄積する *Ralstonia eutropha*、メタノールから PHA を生産する *Methylorubrum extorquens* で機能する転写制御スイッチの確立を目指した。
【方法】GFP 発現ベクターの *gfp* 上流にオペレーターを挿入し、リプレッサー遺伝子 (WT または RP) を導入した。リプレッサーは *Escherichia coli* 由来のコリン誘導性 BetI とアンヒドロテトラサイクリン (aTc) 誘導性 TetR を使用し、Bet ON/OFF スイッチおよび Tet ON/OFF スイッチを構築した。形質転換体は誘導剤非添加条件と添加条件で培養し、GFP 蛍光強度から発現制御を評価した。
【結果】*R. eutropha* に Bet ON スイッチを導入した株では *E. coli* 由来のコリン特異的トランスポーターを異種発現させることでコリン添加による GFP の発現誘導が観察された。*M. extorquens* に Tet ON スイッチおよび Bet OFF スイッチを導入した株では誘導剤添加に伴う GFP の発現誘導と発現抑制がそれぞれ観察されたが、変化量や応答速度に改善の余地が見られた。現在はオペレーターの挿入位置やリプレッサー発現量の最適化に加え、標的遺伝子上流からのリードスルーを防ぐためのターミネーター挿入によるスイッチの制御能の向上を検討している。

Establishment of transcriptional switches for Polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms

○Ayumu Hirayama[1], Izumi Orita[1], Satoshi Nakamura[1], Daisuke Umeno[2], Toshiaki Fukui[1]
([1]Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech, [2]Grad. Sch. Eng., Chiba Univ.)

Key words transcriptional regulation, polyhydroxyalkanoate, *Ralstonia eutropha*, methylotroph

2Dp14 *Methylorubrum extorquens* における C_1 化合物代替資化経路の構築

○平林 翼[1], 折田 和泉[1], 新田 克章[2], 中村 聡[1], 福崎 英一郎[2], 福居 俊昭[1]
（[1]東工大・生命理工, [2]阪大院・工）
tfukui@bio.titech.ac.jp

【背景と目的】 *Methylorubrum extorquens* 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として生育可能なメタノール資化性菌である。本菌はセリン回路によってメタノールを酸化して生じたギ酸を固定し、エチルマロニル-CoA (EMC) 経路によって C_1 受容体であるグリオキシル酸を再生、補充して資化代謝を維持している。各種 CoA チオエステルを代謝中間体とする EMC 経路は有用物質生産用経路として利用できるが、本経路はメタノール資化に共役した必須経路であるため、EMC 経路を物質生産に利用することでメタノール生育能が低下するという問題がある。本研究では、EMC 経路遮断によってメタノール生育能が欠失した *M. extorquens* 組換え株に代替資化経路を構築することで、メタノール生育能が相補された株を取得することを目的とした。
【方法と結果】 代替資化経路としてホルムアムデヒドをリブロース-5-リン酸に固定するリブロースモノリン酸経路 (RuMP) 経路を利用した。*M. extorquens* EMC 経路遮断株に *Mycobacterium gastri* に由来する RuMP 経路の２つの鍵酵素 3-ヘキスロース-6-リン酸シンターゼ (HPS)、6-ホスホ-3-ヘキスロイソメラーゼ (PHI) の融合酵素遺伝子をプラスミドベクターで導入したところ、顕著な HPS-PHI 活性を検出したが、メタノール単一炭素源では生育しなかった。この組換え株をメタノール添加培地で振とうしてメタボローム解析に供したところ、コントロール株と比較して種々の糖リン酸の細胞内濃度が顕著に低く、リブロース-5-リン酸の再生が不十分であるために RuMP 経路を維持できていない可能性が考えられた。現在、ペントースリン酸経路強化株の作製と解析を進めている。

Construction of an alternative C_1-assimilation pathway in *Methylorubrum extorquens*

○Tsubasa Hirabayashi[1], Izumi Orita[1], Katsuaki Nitta[2], Satoshi Nakamura[1], Eiichiro Fukusaki[2], Toshiaki Fukui[1]
([1]Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech, [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *Methylorubrum extorquens*, methanol, methylotroph, C_1 assimilation pathway

2Dp15 枯草菌の正常株および発芽システム欠損株の混合培養系における発芽のための相補条件

○坂元 仁[1], 土戸 哲明[1], 古田 雅一[1,2]
（[1]阪府大・微生物制御研究センター, [2]阪府大院・工・量子）
sakamoto.jj@gmail.com

〔背景〕細菌胞子は加熱や化学薬剤に対して高い耐性を示し、その不活性化は殺菌効率やその安全性に関する指標として利用されている。一方、発芽機能が損傷を受けた場合、見かけ上の死菌として判断され、食品の生物学的安全性を脅かしかねない問題を含んでいる。一般に生菌数評価は寒天培地による CFU 法が用いられるが、固体培養では正常胞子と損傷胞子が共存しても、液体中での共存と比較して、分泌される化学物質や酵素との接触確率が極めて低く影響を受けにくい。そこで液体培養系において、正常株とその発芽損傷株と見立てた発芽機能欠損株を混合培養することにより、正常胞子が発芽機能欠損株の発芽を幇助可能かを調査した。
〔方法と結果〕供試菌として正常株として枯草菌 168 株とその発芽機能欠損株として、コルテックス分解酵素欠損株、発芽レセプター欠損株、ペプチドグリカン分解物による発芽関連因子 *prkC* および表層バリアであるスポアコートタンパク質がほぼ存在しなくなる *cotE gerE* の二重欠損も上記の多重欠損株に多重化させ、DSM 培地で胞子を調製した。欠損株側にはネオマイシン耐性マーカーを保持させ、発芽機能欠損株が発芽しない限り、増殖反応が起こらない薬剤選択圧下で発芽培養を行った。今回実験に用いた既知の主要発芽関連因子の多重欠損株で 1/10^6 の割合で発芽する規格外発芽胞子が存在した。正常胞子の存在は、*sleB cwlJ ydhD yaaH gerA gerB gerK prkC* 株の発芽を幇助しなかったが、*sleB cwlJ ydhD yaaH gerA gerB gerK cotE gerE* の発芽は幇助した。これより現実の殺菌処理でもコートタンパク質が損傷して正常株の発芽関連因子が接触できる場合には、発芽を幇助できる可能性が示唆された。

Complementary conditions for germination in a mixed culture system of normal strain and germination system deficient mutants in *Bacillus subtilis*.

○Jin Sakamoto[1], Tetsuaki Tsuchido[1], Masakazu Furuta[1,2]
([1]Microorganism control Res. Center, Osaka Pref. Univ., [2]Dept. Quantum, Grad. Sch. Eng, Osaka Pref. Univ.)

Key words spore, germination, *Bacillus subtilis*, injured microbes

2Dp16 環境汚染物質依存性の生物学的封じ込めシステムの開発

○石川 聖人, 飯尾 魁, 堀 克敏
（名大院・工）
ishikawa.masahito@chembio.nagoya-u.ac.jp

[背景・目的]
遺伝子工学や代謝工学のめざましい発展により、遺伝子組換え微生物（GEMs）を利用することへの期待は日々高まっている。環境浄化においても、汚染物質の分解能力を高めた GEMs が開発され、より効果的な汚染物質除去が可能になると期待されている。しかし、環境浄化における GEMs 利用は生物多様性への影響が懸念されることから、現状は制限されている。「生物学的封じ込め」とは、遺伝子工学的手法を用いて微生物を特定の条件においてのみ増殖可能にする拡散防止措置である。汚染物質の分解能力を持ちながらも、その生育を汚染物質に依存するような GEM は汚染物質の除去が完了した後は増殖できなくなるはずである。我々は、このような GEM を構築できれば、環境浄化に適用可能な生物学的封じ込めシステムとなるのではないかと考えた。本研究では、トルエンを汚染物質のモデル化合物、トルエン分解菌である *Acinetobacter* sp. Tol 5 をモデル微生物として設定し、コンセプトの実現可能性を検証した。
[方法・結果]
生育に必須である外膜蛋白質 BamA のコード遺伝子を Tol 5 の染色体から破壊し、代わりにトルエン応答プロモーターの制御下にある *bamA* 遺伝子をプラスミドによって相補した。これにより、トルエン存在時のみ *bamA* 遺伝子は発現可能となる。得られた変異株は野生株と同等のトルエン分解活性を示しながらも、トルエン分解後にトルエンの無い環境に移すと生育が著しく抑制された。ただし、完全に生育を抑制できたわけではなく、トルエン非存在下でも生育可能となったエスケープ株が 5.3×10^{-7} の頻度で出現した。エスケープ株の発生要因を理解するために、プラスミドを抽出し、プロモーター周辺の解析を行った。発表当日はエスケープ株の主たる発生原因とその対策についても報告する。

Development of a biocontainment system depending on environmental pollutants

○Masahito Ishikawa, Kai Iio, Katsutoshi Hori
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words *Acinetobacter* , biodegradation, biocontainment

2Dp17 微生物細胞内 mRNA 直接検出法による遺伝子発現の可視化

○堀尾 京平[1], 高橋 宏和[2], 加藤 節[1,2], 小堀 俊郎[3], 秋 庸裕[1,2], 中島田 豊[1,2], 岡村 好子[1,2]
（[1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・統合生命科学, [3]農研機構）
okamuray@hiroshima-u.ac.jp

【目的】微生物の可視化は、これまで 16S rRNA を標的とした Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)により行われている。しかしゲノム上の遺伝子や mRNA はコピー数が少ないため、メタ解析データに基づいたプローブによる標識が難しかった。昨年我々は、任意の RNA 配列を cDNA の合成を必要とせず、直接検出を可能にする RNase H-assisted RCA (RHa-RCA)法を報告した。RHa-RCA 法により微生物細胞内で mRNA を増幅し、増幅産物を FISH 法により検出すれば、視覚的に遺伝子発現を捉えることが可能になる。そこで本研究では、RHa-RCA 法に基づく微生物細胞内 mRNA 直接検出法の確立と遺伝子発現の可視化を行うことを目的とした。
【方法・結果】初めに、細胞内に反応に必要な酵素やプローブを導入するため、細胞壁・細胞膜に適度な透過性を与える方法を検討し、モデルとして大腸菌に発現させた GFP mRNA に対して RHa-RCA と FISH を行った。その結果、ターゲット mRNA を *in situ* で検出することに成功し、細胞数全体の 80%以上が検出できた。次に、栄養共生系の細菌を識別することを目的に、ヨーグルト中の乳酸菌 *Streptococcus thermophilus* を検出対象とした。共生関係に関わっているピルビン酸－ギ酸リアーゼ活性化酵素遺伝子 *pflA* を検出標的とし、特異的な Padlock probe と FISH probe を設計して検出を行ったところ、*S. thermophilus* から特異的蛍光を得ることに成功した。
【考察】微生物コンソーシアムの相互関係に関わる mRNA を複数の蛍光プローブで検出することにより、遺伝子特異的にコンソーシアムを可視化することが可能になるだろう。

Visualization of gene expression by *in situ* direct detection method of mRNA

○Kyohei Horio[1], Hirokazu Takahashi[2], Setsu Kato[1,2], Tishiro Kobori[3], Tsunehiro Aki[1,2], Yutaka Nakashimada[1,2], Yoshiko Okamura[1,2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat. Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [3]NARO)

Key words mRNA, detection, microbial consortium

2Dp18 磁性細菌のマグネトソーム遺伝子領域の改変による磁気微粒子合成能の制御

○新垣 篤史, 丸山 実菜, 依田 卓東, 松永 是
（農工大院・工）
arakakia@cc.tuat.ac.jp

磁性細菌は、細胞内にマグネタイト (Fe_3O_4)から成る磁気微粒子を合成し、磁場に応答する性質を持つ細菌である。磁性細菌の合成する磁気微粒子はリン脂質及びタンパク質から成る薄膜で覆われていることからマグネトソームとも呼ばれ、水溶液中での分散性が高く、医療・計測分野への応用が期待されている。*Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株におけるこれまでの研究から、磁性細菌は細胞内に膜小胞を形成し、この中に鉄イオンの取込み、結晶化することで磁気微粒子を合成することがわかっており、この合成プロセスに関わる約 30 種類のタンパク質とその遺伝子（マグネトソーム遺伝子）が同定されている。本研究では、磁性細菌ゲノム中のマグネトソーム遺伝子の組合せとコピー数を改変することで、磁性細菌が合成する磁気微粒子のサイズや数の制御を行うことを目的とした。
マグネトソーム遺伝子の欠損により磁気微粒子合成能を失った突然変異株に、マグネトソーム遺伝子を機能毎に分類し、プラスミドとして再導入した。その結果、マグネトソーム遺伝子のうち、18 遺伝子の導入によって、磁気微粒子合成能が回復することがわかった。この時、細胞に導入したマグネトソーム遺伝子がゲノムに挿入される新しい現象を見出した。結晶成長に関わる遺伝子の追加導入によっては、細胞が合成する磁気微粒子の粒径が大きくなることが確認された。また、マグネトソーム遺伝子を 2 セット持つ遺伝子組換え株は、野生株の約 2 倍に相当する約 40 個の磁気微粒子を合成した。細菌に導入するマグネトソーム遺伝子の組合せやコピー数の改変により、粒子サイズや合成量の制御が可能なことが示された。

Regulation of magnetic particle biosynthesis by modification of magnetosome gene region in magnetotactic bacteria

○Atsushi Arakaki, Mina Maruyama, Takuto Yoda, Tadashi Matsunaga
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words bacteria, genome integration, genome engineering, biosynthesis

2Ep01 *Acer palmatum* 樹皮からの未培養細菌の探索と *Abditibacteriota* 門に属する新規微生物の全ゲノム解析

○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】
植物の樹皮は、樹冠により降水や UV 照射による攪乱が遮られることから、共生微生物にとって安定した環境であり、単離培養される微生物の多様性が高いことや、難培養、未培養の微生物門を他の器官と比較して多く宿していることが報告されている。そのため、樹皮は未培養微生物の分離源として有望である可能性があるが、微生物群集構造解析や網羅的単離を行った例は非常に少なく、明らかにされていない。本研究では、日本に自生する落葉広葉樹である、*Acer palmatum*（イロハモミジ）の樹皮に着目し、単離される微生物の系統的新規性の評価と、獲得された *Abditibacteriota* 門に属する新規微生物である IAD-21 株の全ゲノム解析を行った。
【方法と結果】
A. palmatum 樹皮とその周囲の土壌試料を、新技術開発財団植物研究園（静岡県熱海市）で採取し、DR2A 培地を用いて 2 週間培養し、コロニーを単離、16S rDNA の配列相同性により系統的新規性を評価した。樹皮試料からは、既存の種との相同性 95%以下の株が全体の 17.6%（6 株/34 株）獲得されたのに対し、土壌試料からは獲得できなかった。複数回の検討の結果、樹皮由来の単離株は相同性 95%以下の株が 30～40%を占める場合もあり、新規微生物の分離源として有望であることが示唆された。また、*A. palmatum* 樹皮より獲得された IAD-21 株の全ゲノム解析を、MinION と MiSeq を用いて行った。7.4 Mb、102 kb の 2 つのコンティグが環状化され、染色体とプラスミドであると考えられた。prokka によるオートアノテーションの結果、CDS 6,384 個、rRNA 遺伝子 6 個、tRNA 遺伝子 73 個であった。現在、*A. palmatum* の他の器官との単離株の系統的新規性の比較や、IAD-21 株の生理性状解析について検討中である。
※本研究の一部は「先進ゲノム支援」の支援を受けて実施された。

Exploration of uncultured bacteria from *Acer palmatum* bark and whole genome sequencing of novel bacteria belonging to phylum *Abditibacteriota*

○Kazuki Kobayashi, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words *Abditibacteriota*, *Acer palmatum*, tree bark, uncultured bacteria

2Ep02 大腸菌の実験室進化による金属イオン利用能の置換検討

○川上 了史[1], 堀内 祐貴[2], 大石 悠起子[2], 関田 美沙[2], 山口 紘武[2], 宮本 憲二[1]
（[1]慶大・理工, [2]慶大院・理工）
norikawakami@bio.keio.ac.jp

金属イオンは生物にとって重要な働きをしている。例えば、触媒の活性中心や呼吸における電子伝達、あるいはシグナル伝達などである。興味深いことに、同じ呼吸にしても、用いる金属イオンの種類は必ずしも生物種を超えて共通しているわけではない。これは、生物が自分の生育環境にある金属イオンを利用できるように適応的に進化してきた結果であると考えられている。このような生物の金属イオン利用能の獲得に関する知見から、我々は、生物の生育環境を人為的に制御してやることで、通常は利用することができない金属イオンを利用するように進化させられる可能性があるのではないかと考えた。我々が着目したのは、生物の進化の歴史で元素利用の置換が生じたことが予想されているモリブデン酸とタングステン酸である。我々は、本来はモリブデン酸を利用する大腸菌 DH5alpha 株を、高濃度のタングステン酸に暴露し長期間の継代培養を行えば、タングステン酸利用能を獲得する可能性があると考えた。実際に、2000 世代の実験室進化を検討した結果、タングステン酸を添加することで、効率的な増殖をするようになる大腸菌株の単離に成功した。
この大腸菌株は、モリブデン酸よりも十倍程度高い親和性をタングステン酸に示すことから、タングステン酸要求株であることが示唆された。ゲノム解析を行ったところ、生理機能との相関は不明であるが、モリブデン関連酵素群に変異も認められており、これらの変異が元素利用能に変化を及ぼした可能性が示唆されている。

Tungstate requiring strain of *E. coli* isolated from long term evolution experiment

○Norifumi Kawakami[1], Yuki Horiuchi[2], Yukiko Oishi[2], Misa Sekita[2], Hiromu Yamaguchi[2], Kenji Miyamoto[1]
([1]Keio. Univ. Faculty. Sci. Tech., [2]Keio.Univ. Grad. Sch. Sci. Tech.)

Key words *Escherichia coli*, Metal ions, long term evolution experiment

2Ep03 16S rDNA 解析を用いたスサビノリ共在細菌叢の網羅的解析と地域性

○實野 佳奈[1], 井手 圭吾[1,2], 有川 浩司[3], 松永 浩子[3], 齋藤 寛[4], 竹山 春子[1,2,3,5]
（[1]早大院・先進理工, [2]産総研 CBBD-OIL, [3]早大ナノライフ創新研, [4]東海大院, [5]先進生命動態研）
haruko-takeyama@waseda.jp

海苔は日本において非常に馴染み深い食材の一つである。日本で養殖されている多くは紅藻類のウシケノリ科アマノリ属に分類されるスサビノリ(学名：Pyropia yezoensis)であり、水産業界において重要な水産物となっている。先行研究でスサビノリの殻胞子を無菌培養すると正常に葉状体を形成しないことや、成長因子を産生する細菌や病気に関わる細菌が発見されており、宿主と共在細菌の相互作用が注目されるようになった。本研究では日本近海の３箇所で養殖されたスサビノリの共在細菌叢を 16S rDNA シーケンスにより網羅的に解析し、細菌叢の地域特異性を検討した。
サンプリングは千葉県の東京湾養殖場（千葉海苔）、有明海の養殖場（佐賀県サイトの佐賀海苔と熊本県サイトの熊本海苔）で行なった。スサビノリ（葉状体）から抽出されたゲノム DNA を用いて１６ S rDNA の可変領域である V3V4 領域のシーケンスを実施した。得られた配列情報の９割が宿主のスサビノリ葉緑体由来であり、解析対象である細菌叢のリード数は全体の１割以下となることから、増幅条件の検討を行った。すでに報告のある葉緑体配列を増幅しないようなプライマー配列では、増幅産物の多様性が低下することからプライマーは、V3V4 領域とし、葉緑体配列のブロッキングをペプチド核酸（Peptide Nucleic Acid：PNA）を用いて行った。結果、葉緑体配列の増幅を全体の１割未満に抑えることが可能であった。
有明海に面している佐賀海苔と熊本海苔では、千葉海苔と比べて比較的に細菌叢の類似性があり、共通の細菌の出現も見られた。また、葉状体に成長する前の糸状体の共在細菌叢も解析した結果、細菌叢が異なることから成長に従って変化することが示された。本発表では、より詳細な地域差等に関して議論する。

Comprehensive 16S rDNA analysis of *P. yezoensis* related microbe and their regional characteristics

○Kana Jitsuno[1], Keigo Ide[1,2], Koji Arikawa[3], Hiroko Matsunaga[3], Hiroshi Saito[4], Haruko Takeyama[1,2,3,5]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [3]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [4]Dept. Fisheries, Tokai Univ., [5]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dynam., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words macroalga, genetic diversity, marine environment, bacteria

2Ep04 キノコ成分による歯周病原性細菌のバイオフィルム抑制成分の検索

○阿座上 弘行[1], 飯田 亮平[1,2], 會見 忠則[3]
（[1]山口大院・創科・農, [2]鳥取大院・連農, [3]鳥取大・農）
azakami@yamaguchi-u.ac.jp

Eikenella corrodens は歯周病患者の病変部から頻繁に分離され、無菌動物への単一感染により歯周病を引き起こす歯周病原性細菌である。本研究では、種々のキノコ抽出物から *E. corrodens* のバイオフィルム抑制成分を検索することを目的とした。
先の研究で、市販の食用キノコの抽出物からバイオフィルム抑制を示すシイタケメタノール抽出物とヤマブシタケ水抽出物について、それらに含まれるバイオフィルム抑制成分の同定を試みた。シイタケの子実体を粉砕後メタノールで抽出したものを逆相薄層クロマトを行い、分画後バイオフィルム抑制画分を得た。極性の高い低分子化合物がバイオフィルムの抑制をすることが示唆された。また、ヤマブシタケ子実体を粉砕後、水で抽出したものを、硫安分画、イオン交換クロマトで分画し、バイオフィルム抑制成分を得た。2 種のタンパク質画分を混合することでバイオフィルムの抑制を示すことを明らかにした。
さらに、鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センターで作成されたキノコ抽出物ライブラリーからバイオフィルム抑制を示すものを検索したところ、ホシダケ属の *Asterostroma macrosporum* の培養濾液から抑制活性を見つかった。そこで、同センターより *A. macrosporum* の菌株を購入し、培養を行った。菌糸体をメタノール抽出したものと培養濾液についてバイオフィルム抑制活性を調べた。その結果、培養濾液のみから抑制活性が示された。

Screening of inhibitor of biofilm by periodontopathogenic bacteria from mushroom

○Hiroyuki Azakami[1], Ryohei Iida[1,2], Tadanori Aimi[3]
([1]Dept. Biol. Chem., Grad. Sch. Sci. Tech. Inov., Yamaguchi Univ., [2]United Grad. Sch. Agric. Sci., Tottori Univ., [3]Fac. Agri., Tottori Univ.)

Key words biofilm, mushroom, *Eikenella corrodens*, periodontopathogenic bacteria

2Ep05 ランタノイド Sm は *Methylorubrum* 属細菌の低栄養環境下での生育を促進させる

○水野 洸介, 原田 雄斗, 岩本 悟志, 島田 昌也, 早川 享志, 中川 智行
（岐阜大・院・自然科学）
t_nakaga@gifu-u.ac.jp

【目的】
低栄養細菌が持つ低栄養環境下への適応能力は、バイオレメディエーションなど様々な分野への応用が期待できるため、その適応機構は非常に強い関心を集めている。一方、メチロトローフ細菌は水道水中にも存在するなど、低栄養環境に適応できることが知られている。これまで私たちのグループでは、*M. extorquens* GM97 株が低栄養環境下でランタノイド（Ln）の一種 Sm に応答し、そのコロニー径を増大させる現象を見いだした。しかし、Sm に対する応答はメチロトローフ細菌において普遍的なのか、またその分子メカニズムは不明なままである。そこで本研究では、低栄養環境下での Ln 応答のメチロトローフ細菌における普遍性、さらにその分子メカニズムの解明を目的とした。
【方法・結果】
自然界より獲得したメチロトローフ細菌 75 株について、低栄養培地（1/100 普通栄養培地）でのコロニーの形態を観察した。そのうち 15 株は Sm の添加によりコロニー径が増大した。よって Sm への応答はメチロトローフ細菌に普遍的な性質ではないものの、特定の菌株が保持する特性であることが示された。さらに GM97 株を用いてコロニー径増大の原因解明を目指した。モルフォロジー解析では、Sm の有無に関わらず細胞の大きさに差異は見られなかった。一方、1 コロニー当たりの細胞数が Sm 添加により約 20 倍に増加したことから、Sm は GM97 株の増殖を促進することが示された。また、増殖に対する Ln 特異性を観察したところ、メタノール脱水素酵素の補因子 La や Ce では増殖が促進されず、より原子量が大きい Eu などが Sm と同様の応答を示した。これらのことから GM97 株は低栄養環境では比較的原子量が大きい Ln に、メタノール環境では La、Ce に応答するなど、生育環境に応じて Ln を使い分けていることが示唆された。

Lanthanide Sm enhances the oligotrophic growth of *Methylorubrum* strain

○Kosuke Mizuno, Yuto Harada, Satoshi Iwamoto, Masaya Shimada, Takashi Hayakawa, Tomoyuki Nakagawa
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Gifu Univ.)

Key words lanthanide, methylotroph, oligotroph, Samarium

2Ep06 乳酸菌の菌体脂肪酸に 10OH オクタデカン酸が出現する培養条件について

○鈴木 健一朗, 平塚 功尚, 柴野 麻由, 増子 穂, 宮崎 穂乃香, 茂木 太極, 中山 俊一, 門倉 利守
（東農大・応生科）
ks206184@nodai.ac.jp

【目的】細菌の菌体脂肪酸組成は脂肪酸種の多様性や、細胞膜を構成する極性脂質への局在による安定性などから、分類群を特徴づける分類指標として有効である。*Lactobacillus acetotolerans* は食酢醸造の有害菌として分離され、高度な酢酸耐性を有する。通常の MRS 培地では、菌体脂肪酸は C16:0、C18:1、シクロプロパン C19:0 から構成されているのに対し、酢酸存在下で培養すると、菌体脂肪酸の 50%以上が 10OH オクタデカン酸(10OH-C18:0)となることが見いだされた。また、この現象が現れるためには酢酸とともに Tween80 が必要であることも明らかとなった。そこで、このような現象はほかの乳酸菌でも起こるのか、培養条件とともに調べた。
【方法と結果】いくつかの乳酸菌株について、0 - 5%の酢酸ナトリウムを添加した MRS 培地（Tween80 の含量は 1 g/L）で培養した菌体から菌体脂肪酸メチルエステルを調整し、その組成を調べた。*Lactobacillus* 属では *L. mali* NRIC 1692 が同様の応答をしたのに対し、*L. gasseri* NRIC 1546 では当該ピークの出現は見られなかった。*Pediococccus damnosus* NRIC 0216 では 2 - 9%の微量の増加が見られた。C18:1 がオレイン酸であることが特徴である *Carnobacterium* 属では、調べた *C. divergens* NRIC 1629、*C. maltaromaticum* NRIC 1691 は、ともに *L. acetotolerans* NRIC 0322 と同様、培地酢酸濃度とともに、10OH-C18:0 の顕著な増加が見られた。10OH-C18:0 の増加とともに、オレイン酸の組成が減少し、*cis*-バクセン酸の組成は少量であり、変化はなかった。10OH-C18:0 の出現は、菌種によって異なることが明らかになったので、この結果に基づき出現の条件を検討している。

Occurrence of 10OH-octadecenoic acid in the cellular fatty acids of lactic acid bacteria

○Kenichiro Suzuki, Noritaka Hiratsuka, Mayu Shibano, Minori Masuko, Honoka Miyazaki, Taichi Moteki, Shunichi Nakayama, Toshimori Kadokura
(Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words lactic acid bacterial diversity, fatty acid

2Ep07 ホウレンソウのポストハーベストにおける菌叢変遷と鮮度劣化への PPFMs の関与

○Wang Lun[1], 繁原 安美[2], 阪口 由佳[3], 谷 明生[4], 中野 浩平[1], 島田 昌也[2], 早川 享志[2], 中川 智行[2]
（[1]岐阜大院・連農, [2]岐阜大・応生科, [3]岐阜大院・自然科学, [4]岡山大・資源植物科研）
t_nakaga@gifu-u.ac.jp

【目的】
青果物は収穫後も呼吸・代謝を行ない、それに伴い鮮度劣化・外見悪化を引き起こすとされる。一方、青果物の葉上には様々な微生物が生息し、共生関係を結んでいる。特に植物腐敗の要因とされる微生物群のみならず、植物生長促進微生物群も青果物の代謝を促進することで保蔵に対してマイナス効果を示すと考えられ、収穫後のホウレンソウにおける菌叢変化がその保蔵に大きな影響を及ぼすと思われる。そこで、本研究では収穫後ホウレンソウの 20℃保蔵環境下でのホウレンソウ鮮度劣化における植物葉上微生物群の関与について解析した。
【方法・考察】
20℃で保蔵したホウレンソウの葉上に生息する微生物群を 16S rRNA アンプリコンシーケンスにて菌叢を解析した。その結果、保蔵 3 日目には植物腐敗菌 *Erwinia* 属が増加し、その後、*Pseudomonas* 属が支配的になった。一方、*Methylobacterium* 属細菌を Pink-Pigmented Facultative Methylotrophs（PPFMs）として単離し、MALDI-TOF/MS により同定/クラスター解析を行ったところ、0 日目の PPFMs は季節や個体により菌叢が異なるものの、保蔵 6 日目にはほぼ *M. fujisawaense* と *M. extorquens* に集約された。また、保蔵したホウレンソウの鮮度評価として、ビタミン C 含量を定量したところ、単離した *M. fujisawaense* をホウレンソウへ定植した結果、ビタミン C 含有量が有意に減少した。これらのことから、青果物の鮮度劣化には *Erwinia* 属のみならず、PPFMs も青果物の鮮度劣化において重要な因子の一つと考えられ、これら細菌群の制御が青果物の鮮度保持技術に繋がるものと考えられる。

Changes in spinach phylloepiphytic bacteria communities and Involvement of PPFMs in reduced freshness

○Lun Wang[1], Ami Shigehara[2], Yuka Sakaguchi[3], Akio Tani[4], Kohei Nakano[1], Masaya Shimada[2], Takashi Hayakawa[2], Tomoyuki Nakagawa[2]
([1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Gifu Univ., [2]Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [3]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Gifu Univ., [4]IPSR., Okayama Univ.)

Key words phylloepiphytic bacteria, PPFMs, spinach, *Methylobacterium*

2Ep08 エタノール発酵能の違いは種の違い？南極産担子菌酵母 *Mrakia blollopis* の全ゲノム解析による種の再検討

○辻 雅晴[1], 石原 潤一[2], 高橋 弘喜[2], 野口 英樹[3]
（[1]国立極地研, [2]千葉大・医真菌研究セ, [3]データサイエンス共同利用基盤施設）
spindletuber@gmail.com

担子菌酵母の 1 種である *Mrakia* 属菌は南極域の中でも特に環境の厳しい大陸性南極では菌類の優先種であり、この地域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。昭和基地から約 60km 離れたスカルブスネス露岩域では、*Mrakia* 属菌の中でも *Mrakia blollopis* という種の分離頻度が最も高かった[1]。我々はスカルブスネス露岩域から分離した *Mrakia blollopis* について低温での成長能やエタノール発酵について報告してきた[2]。その中で *M.blollopis* の中にはエタノール発酵能が高い系統と低い系統が存在していること、低温での成長能はエタノール発酵能と関連があること、さらにこれらの能力は ITS 領域を用いた系統解析により予想できることを発見した[2]。このように *M.blollopis* には大きく特徴が異なる２つの系統が存在するが、両系統とも *M.blollopis* のタイプである CBS8921 株と ITS 領域では 99.5%以上の相同性があり、現在の分類の基準では同種の扱いとなっている。そこで、本講演では同種ではあるが大きく異なる特徴を持った *M.blollopis* の２つの系統、各 6 株ずつについて全ゲノム解析を行い、種の再検討を行ってみた。
その結果、高エタノール発酵系統のゲノムサイズは約 29Mb、低エタノール発酵系統のゲノムサイズは 33Mb となり、高エタノール発酵性の株の方が低エタノール性の株よりゲノムサイズが約 1 割小さかった。全ゲノム配列によるマッピング率は高エタノール発酵系統の株と低エタノール発酵系統の株では 86~89%であった。このことから、エタノール発酵能、低温での成長能など特徴が大きく異なる両系統は全ゲノム配列での相同性が低いことから、別種と考えることが妥当だと考えている。 今後、菌類の新種報告には、ITS 領域などによる系統解析だけでなく、全ゲノム解析も必要とする方向で提案していきたい。

Reclassification of Antarctic Basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis* by whole genome analysis

○Masaharu Tsuji[1], Junichi Ishihara[2], Hiroki Takahashi[2], Hideki Noguchi[3]
([1]NIPR, [2]MMRC., Chiba Univ., [3]ROIS-DS)

Key words Antarctic yeast, ethanol fermentation, whole genome analysis, reclasification

2Ep09 鰹節のかび付け工程で働く好乾性糸状菌の菌叢解析

○中林 麗奈[1], 木村 行宏[1], 横田 仁子[2], 土居 幹治[2], 竹中 慎治[1]
（[1]神戸大院・農, [2]マルトモ）
stakenaka@people.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】 日本の伝統食品である鰹節には、大きく分けて荒節と枯節の 2 種類が存在する。原料のカツオをおろし、煮熟・焙乾したものが荒節、さらに *Aspergillus* 属糸状菌（鰹節カビ）を使ってかび付け発酵・熟成させたものが枯節である。かび付け工程は、脂質の分解、香味の付与、色調の変化などをもたらす。鰹節カビは、*A. glaucus* およびその類縁種と言われてきたが、節の水分含量が約 20%から 15%まで減少していく過程で、どのような *Aspergillus* 属糸状菌が発酵・熟成を担っているかその詳細は明らかではない。本研究では菌叢解析法を検討するとともに、かび付け工程やサンプルの違いによる好乾性糸状菌の優占種やそれらの構成比を明らかにしたので報告する。
【方法】 「同じ製造元から入手した 1 番から 4 番枯節」と「製造元の異なる 4 番枯節」を鰹節カビ分離源とし、菌糸体・胞子懸濁液を MY20 平板培地にて培養して得られた菌糸体から混合ゲノム DNA を得た。β-tubulin 遺伝子（benA 部分断片、約 400 bp）を増幅できるプライマーを用い、PCR-DGGE（変性剤濃度 5%から 35%、60℃で 3 時間）にて解析を行った。分離・選抜した優占種について鰹節（荒節）粉にて固体培養を行い、各種加水分解酵素活性を調べた。
【結果と考察】 鰹節表面から単離した糸状菌を同定しながら、*A. amstelodami* 、*A. chevalieri* 、*A. pseudoglaucus* 、*A. ruber* 、*A. sydowii* の 5 種を PCR-DGGE 法にて同時に検出できる条件を確立できた。「同じ製造元から入手した 1 番から 4 番枯節」では、1 番枯節の段階での構成比に関わらず、かび付け発酵が進むと構成比が変わり、4 番枯節では *A. pseudoglaucus* および *A. chevalieri* がおおよそ 1:1 の比率で収束していた。一方、「製造元が異なる 4 番枯節」については、上述の 2 種の他に *A. amstelodami*、*A. ruber*、*A. sydowii* も優占種となっていた。

Fungal community dynamics during fermentation and ripening of katsuobushi bonito

○Reina Nakabayashi[1], Yukihiro Kimura[1], Satoko Yokota[2], Mikiharu Doi[2], Shinji Takenaka[1]
([1]Grad. Sch. Agri. Kobe Univ., [2]Marutomo Co., Ltd.)

Key words fungal community, katsuobushi bonito, PCR-DGGE, xerophilic *Aspergillus*

2Ep10 鰹節カビ *Aspergillus* 属糸状菌が生産する加水分解酵素の解析

○小川 千晶[1], 中林 麗奈[1], 上村 真理子[2], 木村 行宏[1], 横田 仁子[3], 土居 幹治[3], 竹中 慎治[1]
（[1]神戸大院・農, [2]神戸大・農, [3]マルトモ）
stakenaka@people.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】 鰹節のかび付け発酵に関わる好乾性 *Aspergillus* 属の菌叢を PCR-DGGE 解析によって調べた結果、5 種の *Aspergillus* 属糸状菌を見出すことができた。かび付け工程では、脂質の分解、香味の付与、色相の変化がもたらされることから、鰹節カビが分泌生産する種々の菌体外加水分解酵素が働いていると予想される。本研究では、主に *A. chevalieri* 種について脂質分解やタンパク質の分解に関わるリパーゼやペプチダーゼなどの菌体外加水分解酵素について特性を明らかにすることを目的とした。
【方法】 粗酵素液の調製：試験菌株を鰹節（荒節）粉を用いて固体培養（30℃、10 日間）行い、緩衝液 (pH 5.0) にて抽出液を得た。酵素の精製：粗酵素液を緩衝液 (pH 7.5) にて透析後、各種クロマトグラフィーにより精製した。酵素活性測定：リパーゼ（カルボキシエステラーゼ）活性測定には pNP-butyrate や pNP-palmitate 等の人工基質を用い、ペプチダーゼ活性測定には Leucine p-nitroanilide を用いた。
【結果及び考察】2 番および 4 番枯節より調製した鰹節ライブラリーについて加水分解酵素の生産特性を調べた結果、pNP-butyrate に対して高活性を示す株が多く見られた。一方、カゼインやヘモグロビンに対して活性を示した株は 5 株のみであった。つづいて、試験菌株 *A. amstelodami*、*A. chevalieri*、*A. pseudoglaucus*、*A. ruber*、*A. sydowii* の 5 種について得られた粗酵素液についてイオン交換クロマトグラフィーを行ったところ、リパーゼ（カルボキシエステラーゼ）の溶出パターン（クロマトグラム）は互いに相違が見られた。特に、*A. chevalieri* 種由来サンプル中にはイオン交換クロマトグラフィーにて荷電や分子量の異なる複数のリパーゼが見られたことから、すべてのタンパク質（リパーゼ/カルボキシエステラーゼ）同定を目指し、精製を進めている。

Characterization of extracellular hydrolytic enzymes from katsuobushi mold, *Aspergillus* spp

○Chiaki Ogawa[1], Reina Nakabayashi[1], Mariko Uemura[2], Yukihiro Kimura[1], Satoko Yokota[3], Mikiharu Doi[3], Shinji Takenaka[1]
([1]Grad. Sch. Agri., Kobe Univ., [2]Fac. Agri., Kobe Univ., [3]Marutomo Co., Ltd.)

Key words Katsuo bonito, xerophilic *Aspergillus*, lipase, peptidase

2Ep11 原油湧出地由来の異化的硫酸塩還元トルエン分解細菌の分離およびゲノム解析

○杉本 岳人, 佃 怜奈, 中村 浩平
（岐阜大院・自科）
knak2007@gifu-u.ac.jp

【背景・目的】 BTEX は毒性や拡散性から土壌汚染の観点で注目され、その動態を調査するうえで嫌気的 BTEX 分解細菌の理解が不可欠である。そこで、原油湧出地の産生水を植菌源として、トルエンと硫酸塩をそれぞれ電子供与、受容体とする培養条件で継代を繰り返し、半固体培地で得られたコロニーから異化的硫酸塩還元（Dissimilatory Sulfate Reducing, 以下 DSR）トルエン分解細菌 TSK を分離した。TSK のゲノム解析から嫌気的トルエン分解に関わる遺伝子群の知見を得た。
【結果・考察】 トルエン-硫酸塩の集積培養で、トルエン分解に伴う硫酸塩の減少を確認した。集積培養系のメタ 16S rDNA 解析から、*Syntrophobacteraceae* 科細菌が優占種であることが明らかになった。この *Syntrophobacteraceae* 科細菌 OTU に近縁な 16S rDNA を含むコロニーからゲノム解析を行った。DSR 反応に関わる遺伝子群(*sat*、*aprBA*、*dsrAB*)を検出し、その配列は *Syntrophobacteraceae* 科細菌に近縁であった。嫌気的トルエン分解関連遺伝子群に注目すると、TSK は *Desulfobacteraceae* 科細菌に近縁な遺伝子群(*bss*、*bbs*)を有し、一部の遺伝子が欠けていたが *Syntrophaceae* 科に近縁なベンゾイル CoA から芳香環の開裂に関わる遺伝子群、および *Desulfobacteraceae* 科に近縁な開裂後のアセチル CoA までの代謝に関わる遺伝子群が存在した。さらに、TCA 回路およびアセチル CoA 経路に関わる遺伝子群の存在から、トルエンの嫌気的完全酸化が示唆された。また、硫酸塩還元関連遺伝子群、TCA 回路およびアセチル CoA 経路に関わる遺伝子のほとんどが *Syntrophobacteraceae* 科細菌に近縁であった。したがって *Syntrophobacteraceae* 科細菌に嫌気的トルエン分解に関わる遺伝子群が水平伝播した可能性が示唆され、本研究により *Syntrophobacteraceae* 科細菌の嫌気的トルエン代謝遺伝子群とその代謝機構を明らかとした。

Isolation and genomic analysis of dissimilatory sulfate-reducing toluene-degrading bacteria from production water of oil field

○Taketo Sugimoto, Reina Tsukuda, Kohei Nakamura
(Grd. Sch. Nat. Sci. Technol., Gifu Univ.)

Key words *Syntrophobacteraceae*, Metagenome analysis, sulfate-reducing, toluene-degrading bacteria

2Ep12 ジャンボファージ RSP13 と RSL28 の特殊なゲノム DNA の解析

○川崎 健, 大戸 駿弥, 山田 隆
（広島大院・統合生命科学）
takeru@hiroshima-u.ac.jp

【目的】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・利用可能となったが、自然環境中には未だ取得できない遺伝情報も存在するらしい。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 と RSL28 を発見した、これを報告する。異常な電気泳動の遅れを示し、制限酵素での切断が確認できない RSP13 ゲノムに対し、RSL28 ゲノムは通常の電気泳動速度であり、一部の制限酵素に対して感受性を示すことから、これらファージのゲノム修飾メカニズムは大きく異なると予想された。本研究はこれらファージの塩基配列解読を目的とした。
【方法・結果】以前の研究により RSP13 ファージゲノムを urea 処理することで、異常な泳動遅れの改善が報告されていた。そこで両ファージゲノムについて urea 処理、guanidine 処理、プロテアーゼ処理、加熱処理等を行った後、ゲノム増幅試薬（GenomiPhi、REPLI-g）による DNA 増幅を行い、得られた産物について次世代シークエンス解析を行なった。その結果、RSL28 については 2 つの contig 配列を取得できた。PCR により gap sequence を取得し、全ゲノム配列取得に成功した。十分な冗長度でのシークエンスにも関わらず gap が生じたことから、この領域は特に高度に修飾されているものと予想された。一方、この方法では RSP13 ファージのゲノム情報は取得できなかったことから、RSP13 ファージに対し UV を用いた変異導入を行い、通常の DNA ポリメラーゼによる複製が可能になった変異体の取得を行なっている。
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。環境中には難読性ゲノムを持つ巨大ファージが、予想よりも高頻度で存在すると思われる。

Analysis of odd genomic DNA from jumbo phage RSP13 and RSL28

○Takeru Kawasaki, Syunya Ooto, Takashi Yamada
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words phage

2Ep13 洗濯工程における衣類等に付着する微生物叢変動の解析と微生物細胞付着評価法の構築

○野田 浩史 [1], 奥田 裕暁 [1], 山中 優志 [2], 冨岡 敏一 [2], 脇田 克也 [3], 松村 吉信 [1,2,4]
（[1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工, [3]パナソニック・アプライアンス社, [4]関西大・ORDIST）
ymatsu@kansai-u.ac.jp

〔目的〕近年、洗濯工程における抗菌処理に関心が高まり、抗菌剤配合の洗剤がよく使用されている。しかし、微生物細胞が原因と考えられる洗濯後衣類の異臭低減にはつながっていない。これまでの我々の研究で、洗濯乾燥後の綿布にも多くのバクテリア細胞が付着していること、綿布に付着しやすいバクテリアが存在することが予想されていた。そこで本研究では、綿布付着バクテリア叢やその由来、洗濯時の付着細胞数の変動調査、さらには微生物細胞付着モデル系を構築し、付着バクテリア細胞数軽減に向けた手法構築を目的とした。
〔方法/結果〕実験には家庭環境で使用されていた綿布を使用し、洗濯工程における付着細胞数変動を調べるため、付着細胞はストマッカ処理で回収した。細胞数は顕微鏡観察法とコロニーカウント法で測定し、死細胞数割合は蛍光染色法で測定した。その結果、洗剤を用いた洗濯では、洗剤を用いない洗濯に比べて細胞は脱離しやすかったが、洗濯によって十分な脱離効果は得られず、残存付着細胞に対して顕著な殺滅効果も認められなかった。付着細胞から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子領域を増幅後、次世代シーケンサーで塩基配列を決定し、OTU 解析を行った。その結果、Moraxellaceae 科が多く見られた。異臭綿布から脱離しにくい菌（吸着菌）や洗濯水で検出されやすい菌（通過菌）を単離し、16S rRNA 遺伝子による簡易同定を行なった。単離した吸着菌や通過菌の細胞表面構造を SEM によって観察した結果、吸着菌の方が小さい傾向があった。また、吸着菌、通過菌の綿布に対する付着評価系も構築した。今後、付着評価系を用いて菌が綿布に付着する要因を探索するとともに、脱離モデル実験系を構築し、綿布に付着しにくい条件の特定を試みる。また、綿布付着真菌類叢解析も行う。

Evaluation of microflora attached on clothing through the washing process and construction of the microbial cell attachment evaluation method.

○Hirofumi Noda[1], Hiroaki Okuda[1], Masashi Yamanaka[2], Toshikazu Tomioka[2], Katsuya Wakita[3], Yoshinobu Matsumura[1,2,4]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [3]Panasnonic co. Ltd., [4]ORDIST, Kansai Univ.)

Key words biofilm, malodor, house laundry

2Ep14 コシヒカリの頑健、大粒、早晩生同質遺伝子リソース「コシヒカリ駿河シリーズ」の開発

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

世界のイネの単収は 20 世紀後半の緑の革命に代表される短稈化によって約 2 倍に向上したが、現在は頭打ちである。さらに、地球温暖化で激化する気候変動の下で、西日本豪雨、大型台風をはじめ農業生産への被害が相次いでおり、イネを丈夫に頑健に改良する必要がある。加えて、自由貿易化の流れの中で国際競争力を高めるため、低コスト・多収化させる必要がある。本研究では、頑健、バイオマス増大、大粒、早晩生などの未同定形質について、連続戻し交雑でコシヒカリのゲノムに取込む過程で遺伝子分析を行い、次世代シーケンス解析で遺伝子を同定しつつ、同質遺伝子系統を開発した。その結果、粒重を 34%増加させる大粒遺伝子 Gw、頑健・強稈で穂数を 2.3 倍に増加させるバイオマス増大遺伝子 Bms、背丈を 15-20cm 短縮して倒伏を防止する短稈遺伝子 d60、d65、晩生遺伝子 Hd16、2 週間開花を早める極早生遺伝子 e1 を単独移入するとともに、大粒＋短稈 Gw+d60、Gw+sd1、バイオマス増大＋短稈 Bms ＋ sd1、Bms ＋ d60、Bms ＋ d65 など 50 組合せの遺伝子をコシヒカリゲノムに集積し、気候変動下で生産が安定する同質遺伝子リソースを開発した。5 回以上の戻し交雑毎に当該遺伝子を NGS で診断するスマートゲノム育種によって、従来の緑の革命による短稈に加えて頑健、バイオマス増大、大粒、早晩生をコシヒカリゲノムに統合したスーパーコシヒカリ 9 品種「コシヒカリ駿河 Gg、d60Gg、e1Gg、Hd16、d60Hd16、Bms、d60Bms、d65Bms、sd1Bms」を品種登録出願した。食味、品質は新潟コシヒカリと遜色なかった。気候変動により地球規模で作物に損害が生じており、「新・緑の革命」が望まれている。本研究では、多様な短稈遺伝子に加えて大粒、バイオマス増大等頑健・多収化に有効な遺伝子を付与・統合することにより、1 種類の短稈に依存する従来育種から脱却し、新・緑の革命の基盤を築いた。

Development of robust, large grain, early or late-maturing isogenic resources "Koshihikari Suruga Series"

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

Key words rice, genome, gene, expression

2Fp01 がん診断のための高感度で前処理不用なインタクトエクソソームセンシング

森 貴翔, 清水 拓, 片山 航, 源 和晃, 高野 恵里, 砂山 博文, 北山 雄己哉, ○竹内 俊文
（神戸大院・工）
takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

エクソソームは、細胞から分泌される 100 nm 程度の大きさの細胞外小胞で、唾液、血液、尿などの体液中で観察される。エクソソームには、細胞由来のタンパク質や microRNA などが含まれており、生体内で細胞間コミュニケーションやがん増殖・転移のための微小環境形成に関連することが報告[1]されて以来、その関連研究は、爆発的に進展している。
我々は、これまで分子インプリンティング技術を用いて、様々な分子を選択的に認識可能な分子認識材料（分子インプリントポリマー：MIPs）を報告してきた。MIPs は，鋳型分子と機能性モノマーを複合化し、架橋剤を加えてポリマー化し，鋳型分子を取り除くことで，鋳型分子写し取った空間を高分子内に形成した分子認識材料である。最近では、MIPs 作製後、インプリント空間内のみに化学修飾を施すポストインプリンティング修飾（PIM）も開発し、MIPs に対して高度な機能を付与することができるようになった[2]。
本研究では、エクソソームの結合空間内に、PIM による抗体と蛍光レポーター分子を導入し、インタクトのエクソソームを超遠心などの前処理なしで高感度蛍光検出可能な新規エクソソームセンシング材料を創製した[3]。このセンシング材料のエクソソームに対する応答を蛍光顕微鏡により観察したところ、エクソソーム添加量依存的に蛍光強度が変化し、10^{-17} M オーダーでエクソソームが検出できることがわかった。また、認識空間内に導入する抗体の種類を変化させることで、癌患者由来エクソソームの特異的な検出を試みたところ、エクソソームをバイオマーカーとしたがん診断の可能性が示されたので報告する。

[1] Hoshino, A. et al., Nature 2015, 527, 329-335.
[2] Takeuchi, T. et al., Chem. Commun. 2018, 54, 6243-6251.
[3] Mori, K., et al., Angew Chem. Int. Ed. 2019, 58, 1612.

Highly sensitive pretreatment-free intact exosome sensing for cancer diagnosis

Kisho Mori, Taku Shimizu, Wataru Katayama, Kazuaki Minamoto, Eri Takano, Hirobumi Sunayama, Yukiya Kitayama, ○Toshifumi Takeuchi
(Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words exosomes, sensor, cancer diagnosis, molecular imprinting

2Fp02 新規 LC/ESI-MS/MS 定量法による 3 種の麹のエルゴチオネイン含量測定

○堀江 裕紀子 [1,3], 後藤 綺花 [2], 今村 梨子 [2], 伊藤 麻里 [3], 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・目的】 エルゴチオネイン (EGT) は強い抗酸化作用を有するアミノ酸であり，その積極的な摂取による健康増進が注目されている．黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は EGT の産生能力を有しており，EGT 高含有食品開発への利用が期待される．そこで本研究では LC/ESI-MS/MS を用いた麹中 EGT の新規定量法を開発し，原料の異なる麹の EGT 含量の比較と，発酵による EGT 含量の変化を追跡した．
【実験・結果】 EGT は逆相 LC における保持が極めて弱く，さらに ESI-MS/MS 応答性も十分ではなかった．そこで，疎水性かつプロトン親和性の高い 2-iodo-*N*-(8-quinolinyl)acetamide による誘導体化を導入した．反応はジエチルアミン存在下，60°C，5 分で完結した．得られた誘導体は ODS カラムに十分な保持を示し，また，正イオン検出 ESI-MS における高い応答性と MS/MS における特徴的プロダクトイオン (*m/z* 167) の生成から，誘導体化前の 100 倍の感度を示した．本法は発酵過程の EGT 含量の追跡に十分な検出感度 (定量限界：0.080 μg/g) を有し，日内・日間変動試験 (RSD ≤ 7.8%)，添加回収試験 (94.9 − 100.0%) の結果も良好であった．本法を用いて白米，玄米または米糠を *A. oryzae* で発酵させた 3 種の麹 (各 3 ロット) を分析したところ，米糠麹の EGT 含量が最も多く (139 − 217 μg/g)，米糠が EGT 産生に適した原料であることが示された．さらに，米糠試料の EGT 含量を追跡したところ，発酵開始 12 時間後から急激に増加し，45 時間の発酵により，原料の約 140 倍まで増加することが明らかとなった．

Determination of EGT contents in three *Aspergillus oryzae*-fermented rice products by newly developed LC/ESI-MS/MS method.

○Yukiko Horie[1,3], Ayaka Goto[2], Riko Imamura[2], Mari Itoh[3], Shigeo Ikegawa[4], Shoujiro Ogawa[1,2], tatsuya Higashi[1,2]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Tokyo Univ. Sci, [2]Fac. Pharm. Sci., Tokyo Univ. Sci., [3]Koken Co., Ltd., [4]Gemai Koso Co., Ltd.)

Key words ergothioneine, *Aspergillus oryzae*, rice malt, LC/ESI-MS/MS

2Fp03 画像解析によるプローブ粒子の液中拡散挙動に基づいた MRSA DNA センサの開発

○松島 雛子 [1], 一木 啓志 [1], 童 俞靜 [2], 莊 漢聲 [2], 高村 映一郎 [1], 里村 武範 [1], 坂元 博昭 [1], 末 信一朗 [1]
（[1]福井大院・工, [2]台湾國立成功大學・生物醫學工程學系）
suyeb10@u-fukui.ac.jp

【背景と目的】メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は弱毒性であるため健常者には無害であるが、抗生物質に耐性を持っているため免疫力が低下している患者は日和見感染し重症化してしまう。そこで、MRSA の拡散を防ぐためには、MRSA を迅速・簡便に検出する必要がある。現在の検出法には阻止円、凝集塊、電気泳動法などがあるが、いずれの方法も時間・手間を要し、その場分析は困難である。
以前我々は、MRSA 固有の相補的 DNA 断片と電子メディエータをシグナル分子として固定化したナノ粒子（プローブ修飾ナノ粒子）により、MRSA に由来する DNA を選択的に捕捉し、ピコモルレベルの高感度なバイオセンシングシステムを構築した。しかし、一方で B/F 分離の工程が必要であること、複数検体の同時計測が不可能であるといった課題があった。
そこで本研究では、溶液中におけるナノ粒子の拡散率を計測する技術に着目した。拡散率とは、溶液中で物体がブラウン運動により生じた運動性の指標である。生体分子が粒子と複合体を形成した場合、体積増加により拡散率が低下することが予想される。本研究では、プローブ修飾ナノ粒子が DNA と複合体を形成する際の粒子の拡散率を画像解析から検出する新規バイオセンサを検討した。
【方法】MRSA の全ゲノムの内、薬剤耐性能を示す遺伝子領域の 25bp を MRSA 遺伝子捕捉用のプローブとして蛍光粒子表面へ固定化した。そのプローブナノ粒子と MRSA の DNA をハイブリダイゼーションさせ、その溶液を蛍光顕微鏡で 1 秒を 15 フレームで 20 秒間撮影し、その画像からその拡散率を算出した。
【結果と考察】標的 DNA が存在する場合、粒子の拡散率が減少することが確認された。これは、粒子が DNA とハイブリダイゼーションし複合体を形成し、体積増加をすることで、拡散率が減少したと考えられる。これらの結果より MRSA 検出システムの可能性が示された。

Development of a novel MRSA DNA sensor based on in-liquid Diffusibility analysis of probe particles by image processing

○Hinako Matsushima[1], Keishi Ichiki[1], Yujing Tong[2], Hansheng Zhuang[2], Eiichirou Takamura[1], Takenori Satomura[1], Hiroaki Sakamoto[1], Shin-ichiro Suye[1]
([1]Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., [2]Dept. Biomed. Eng.,NCK Univ)

Key words biosensor, MRSA, image processing, brownian motion

2Fp04 溶解度パラメータを NMR 記述子から予測するマテリアルズインフォマティクス戦略

○黒谷 篤之 [1], 柿内 俊文 [2], 伊藤 研悟 [1], 菊地 淳 [1,3,4]
（[1]理研・環境資源, [2]AGC 中央研究所, [3]横市院・生命医, [4]名大院・生命農学）
jun.kikuchi@riken.jp

【概要】物質の溶解度は、物質の特徴理解等の為に重要な物性値の１つである。特に分散項(dD)、水素結合項(dH)、極性項(dP)の 3 成分の定量性を数値化したハンセン溶解度パラメータ(HSPs)は、その特性から薬物の吸収性評価、高分子化合物と溶媒等間の相溶性評価等様々な場面で利用されている。主な HSPs 値の予測法の１つとして既知データからの機械学習による計算法があり、これまでに分子構造の線形表記法である SMILES 記法等から取得した分子記述子群を訓練データとして回帰予測をした報告はあるが(B.S. Lengeling *et al*, 2018, etc)、NMR のスペクトルデータ自体を記述子群の訓練データとして HSPs を回帰予測する報告は未だ無い。これが可能になれば、高分子化合物等の開発時に NMR データから材料設計指針が得られることが期待されるため、左記機械学習による新たな HSPs 値の回帰予測法の確立を検討した。
【方法】まず、各 HSPs 値(dP, dH, dD)を目的変数とし、^{13}C-NMR データ、又はこれに SMILES 記法からの分子情報等を加えたデータを説明変数とした訓練データおよびテストデータのセットを作成した。次に、R 言語の機械学習用パッケージ(caret)を利用して訓練データから多数の予測モデルの候補群を作成し、適正条件の検討から最適な HSPs 値の予測モデルを選抜した。更に、選抜したモデルを利用し、テストデータによる予測値と実測値の関係等から精度を確認した。また、このモデルを利用して高分子化合物の HSPs 予測に適用できるかを検証した。
【まとめ】上記の NMR のスペクトルデータ、又はこれと組み合わせたデータセットに基づいた機械学習による HSPs 値予測でも一定の精度が得られた。また、本報告では、HSPs 予測モデルの高分子化合物への応用等、予測モデルの効果的な利用戦略にも展開する。

Materials Informatics Strategy for Prediction of Solubility Parameters from NMR Descriptors

○Atsushi Kurotani[1], Toshifumi Kakiuchi[2], Kengo Ito[1], Jun Kikuchi[1,3,4]
([1]CSRS, RIKEN, [2]AGC Res. Cent., [3]Grad. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [4]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words Solubility, NMR, Prediction, Polymer

2Fp05 多角的分析データを用いたポリマー物性予測システムの構築

○坂田 研二 [1], 菊地 淳 [1,2,3]
（[1]理研・環境資源, [2]横市院・生命医, [3]名大院・生命農）
jun.kikuchi@riken.jp

【背景・目的】ポリマー物性には電子的特性なら量子化学計算、機械的特性なら分子動力学計算、さらには既存の物性データベースと分子記述子との機械学習で予測できる物性もあるが、生分解性のように高次構造が支配的な物性や、高次構造を左右する製造プロセス等に関しては、分析データを記述子とした機械学習により、材料設計指針が得られると期待できる。そこで本研究では当研究室で開発したピーク分離 [1]・機械学習解析ツール [2] 等を用いて材料設計、品質評価に関わる物性予測システムの確立を目指した。
【方法】予測する物理データの目的変数として、熱重量示唆熱分析装置、示差走査熱量計を用いて市販のポリマー試料の融点、ガラス転移点等の物理データを取得した。説明変数として時間領域 NMR、固体 NMR を用いて緩和減衰曲線、^{1}H 異方性・等方性スペクトルを取得し、これらのスペクトルデータを機械学習により物理データの予測モデルを作成し、モデル精度の検証を行った。
【結果】各種ポリマーにおける異方性・等方性スペクトルを数値化し、ランダムフォレストによりポリマー試料の融点予測回帰モデルを作成し、モデル精度を比較した結果、等方性スペクトルのモデル精度の方が少し優れていたが、異方性スペクトルで作成したモデルも同等の精度が得られた。数値化した緩和減衰曲線データを用いて 89 種の機械学習により融点回帰モデルの精度を比較した結果、xgbDART が最も適したアルゴリズムであることが抽出され、また回帰曲線に関わる重要変数から緩和時間の短い成分と融点との関係性が示唆された。これらの結果から異方性・等方性スペクトル、緩和減衰曲線は機械学習を組み合わせることで、物理データの予測が可能であることが示唆された。

【参考文献】
[1] Yamada et al. (2019) *ACS Omega* 4, 3361-3369.
[2] Ito et al. (2018) *Chem Sci*. 9, 8213-8220.

Physical property prediction of polymer based on various chemical approaches

○Kenji Sakata[1], Jun Kikuchi[1,2,3]
([1]CSRS, RIKENS, [2]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [3]Grad. Sch. BioAgriSci., Nagoya Univ.)

Key words Solid-state NMR, Physicochemical property, Machine learning, Materials informatics

2Fp06 QCM を用いたベタイン型添加剤による ELISA の高感度化機構解析

○三宅 子龍, 甲元 一也
（甲南大院・フロンティアサイエンス）
koumoto@konan-u.ac.jp

【目的と背景】
酵素免疫測定法（ELISA）は、病気の診断や、食品の衛生管理、環境分析など幅広く利用されている。我々の研究室では、研究室で開発したベタイン型添加剤を用い、その検出感度の向上や抗体使用量の削減に成功し、日本農芸化学会2019 年度大会にて報告した。しかし、ELISA の各ステップでベタイン型添加剤がどのように働いているのか、その作用機構については不明な点も多かった。そこで本研究では、水晶発振子マイクロバランス(QCM)測定法を用い、ベタイン型添加剤の作用機構について、評価、検討した。
【結果と考察】
ELISA プレートのウェル表面を模倣するため、スピンコーターでポリスチレンを表面に被覆した水晶振動子を用意し、ベタイン型添加剤として、炭素鎖が 1 から 5 の 5 つの誘導体を用いた。まず一次抗体の吸着について評価したところ、ベタイン型添加剤の表面への吸着と一次抗体の吸着がそれぞれ確認された。洗浄バッファで洗浄すると、一次抗体は吸着したままでベタインは速やかに洗い流された。実際、洗浄後の一次抗体の吸着量は分光学的に得られた結果と同じ 2 倍の吸着量の増加を示した。一方で、ベタイン型添加剤が競争的に表面へ吸着するため、速度は遅くなる傾向があった。同様に QCM を用いて、一次抗体と抗原との結合、その複合体と二次抗体との結合、標識酵素の導入に対するベタイン型添加剤の効果についても評価した。発表では、それらについても詳細を報告する。

Mechanism of improved sensitivity on ELISA by addition of betaine-type additives using QCM measurements

○Shiryou Miyake, Kazuya Koumoto
(FIRST, Konan Univ.)

Key words ELISA, QCM, Betaine, High sensitivity

2Fp07 哺乳類嗅覚受容体発現細胞パネルによる気相中におい分子検出技術の開発と官能評価応用への展開

○福谷 洋介 [1,2], 木田 仁 [2,3], Mainland Joel D [4], 養王田 正文 [1], 松波 宏明 [2]
（[1]農工大・院工・生命工, [2]デューク大・医・分子遺伝, [3]農工大・院工・機械システム, [4]モネル化学感覚研究所）
fukutani@cc.tuat.ac.jp

哺乳類の嗅覚は、数百種類のにおい受容体(Odorant receptors; ORs)を介した分子認識により、周囲に漂う多様なにおいを高感度に感じることができる。鼻腔に入り込んだにおい分子が嗅粘液に溶け込んだ後、嗅覚神経細胞に発現している ORs と結合が生じることが全ての嗅覚反応の基盤となる。
これまで、我々は OR 発現培養細胞で気相中の匂い分子を検出する Vapor stimulation 法を開発してきた。本手法は、複数のマウス由来 OR を個々に発現させた培養細胞に対し、気化したにおい分子によって刺激する。cAMP 依存的な発光を示す Glosensor を用いることで、刺激したにおい分子に対した OR 毎の異なる応答をリアルタイムで検出することが可能である。
分子構造が類似した匂い分子に対しても複数の OR の応答を総合的に評価することで、メチル基 1 つの違いの識別が可能であった。試験したにおい分子の中には、0.000001%という非常に低濃度の匂い溶液からの揮発成分に対しても応答を示す OR が見られた。今回開発した新規の OR 発現細胞アッセイ法は、匂い分子溶液を OR 発現細胞に直接添加する従来の手法と異なり、匂い分子の自発的な溶解で細胞を刺激するため、本来の嗅粘液中により近い状態を模倣できる。そのため、嗅粘液中に発現している代謝酵素などの関連因子の機能解析においても、非常に有効な手法だと考えられる。
これまで単一のにおい分子に対したアッセイを主に行っていたが、現在は 2 種類以上の混合物や合成香料に対する試験も行っている。本発表では、気相アッセイ法の最新のデータなどを交えて今後の展望についても報告する予定である。

Vapor detection with a panel of mammalian odorant receptors toward sensory evaluation applications

○Yosuke Fukutani[1,2], Hitoshi Kida[2,3], Mainland Joel D[4], Masafumi Yohda[1], Hiroaki Matsunami[2]
([1]Dept. of Biotech. and Lifesci., Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]Dept. Mol.Gen. & MicroBiol., Duke Univ. Med. Center, [3]Dept. of Mechanic. System Eng., Tokyo Univ. of Agric. and Technol.,, [4]Monell Chemical Senses Center)

Key words Odorant receptors, Vapor stimulation, Sensor, Olfactory mucosa

2Fp08 顕微ラマン分光法及び多変量スペクトル分解法を用いた生理活性物質 penicillin 及び avermectin の菌体内検出

○堀井 俊平 [1,2], 安藤 正浩 [3,4], 中島 琢自 [5], アショク サムエル [3], 松本 厚子 [5], 高橋 洋子 [5], 竹山 春子 [1,2,3,6]
（[1]早大院・先進理工, [2]産総研・CBBD-OIL, [3]早大・ナノライフ創新研, [4]JST・さきがけ, [5]北里大・生命科学研, [6]早大・理工総研）
haruko-takeyama@waseda.jp

顕微ラマン分光法は、非標識・低侵襲に物質の分子構造を明らかにできるため、蛍光ラベリングや遺伝子操作などの行程を踏まずに生体分子の細胞内分布を可視化できる。我々の研究グループでは、顕微ラマン分光計を用いることで、放線菌内における抗生物質 amphotericin B の生産を非破壊・非標識で検出可能であることを示した(Miyaoka et al., 2014)。しかし、生体成分と重複した位置にラマンバンドが存在する生理活性物質の検出は難しい。そこで、本研究では、多変量スペクトル分解法(MCR-ALS)を用いて、単一ラマンバンド解析が困難な生理活性物質の in situ 検出を試みた。
カビ *Penicillium chrysogenum* KF425 株及び放線菌 *Streptomyces avermitilis* KA325 株を液体培地にて培養を行った。培養後の菌体について、顕微ラマン分光計を用いてラマンスペクトルを測定し、MCR-ALS により解析を行った。MCR-ALS により、重畳したラマンスペクトルから単一物質に由来するスペクトル成分の抽出及び各成分の強度変化を算出できる。MCR-ALS 解析の結果、複雑なマッピングデータから生体成分及び抗生物質に由来するラマンスペクトルをそれぞれ抽出することができ、抗生物質の菌体内検出及び局在の可視化に成功した。また、*Streptomyces avermitilis* を寒天培地で培養した場合、気菌糸から胞子鎖が形成される。この形態変化における avermectin の生体内動態を顕微ラマン分光計により経日的にモニタリングしたところ、avermectin が胞子鎖に局在することが明らかとなった。以上より、本研究より、MCR-ALS により従来では困難であった化合物に対して in situ 検出が可能となり、本手法を抗生物質の生体モニタリングや生理活性物質生産菌体のスクリーニングへ適用できることが示唆された。

***In situ* Detection of Penicillin and Avermectin in Microbes by Raman Spectroscopic Multivariate Analysis**

○Shumpei Horii[1,2], Masahiro Ando[3,4], Takuji Nakashima[5], Samuel Ashok[3], Atsuko Matsumoto[5], Yoko Takahashi[5], Haruko Takeyama[1,2,3,6]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [3]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [4]PRESTO, JST, [5]Kitasato Inst. for Life Sci., Kitasato Univ., [6]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dynam., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words Raman microspectroscopy, MCR-ALS, Bioactive compounds, screening

2Fp09 微小液滴作製技術を応用したサンゴ共在微生物の高精度な単一細胞ゲノム解析技術の確立

○西川 洋平 [1,2], 細川 正人 [3], 井手 圭吾 [1,4], 小川 雅人 [1,4], 竹山 春子 [1,2,3,4]
（[1]産総研・早大 CBBD-OIL, [2]早大・ナノライフ創新研, [3]早大・理工総研, [4]早大院・先進理工）
haruko-takeyama@waseda.jp

環境微生物の 99%以上は実験室環境下での培養が困難であるとされており、これら難培養微生物の特徴や生態を明らかにするためには、単一細胞レベルでのゲノム解析が有用であると考えられる。近年では、Multiple displacement amplification (MDA)に代表される全ゲノム増幅法の開発および次世代シーケンサーの発展により、様々な環境中に生息する微生物の単一細胞ゲノム情報の取得が可能となりつつある。一方、従来までの単一細胞ゲノム解析手法では、細胞の分取、溶菌、全ゲノム増幅の効率が低く、特に環境微生物を用いた検証においては目的外 DNA の混入やキメラ配列の生成により、効率的なゲノム解析を行うことが困難であった。
そこで本研究では、単一細胞由来のゲノム情報をより高精度に取得するための技術開発を目的とし、ピコリットル容量の油中水滴型(W/O)微小液滴を反応場として用いたゲノム解析手法を開発した。マイクロ流体デバイスにより作製される均質な微小液滴を用いることにより、一度に 105 個以上の単一細胞に対して網羅的な全ゲノム増幅が可能となった。また、目的外 DNA の混入リスクを抑制することによって高精度なゲノム情報の解析を可能とした。さらに本研究では、開発した技術を環境サンプルに応用し、サンゴ組織内に共在する微生物を対象とした単一細胞ゲノム解析を実施した。解析の結果、組織懸濁液からサンゴ共在微生物として近年注目を集めている *Endozoicomonas* 属に分類される細菌の高精度なゲノム情報が新規に獲得され、得られた配列情報を用いて遺伝子の機能解析や系統解析が可能であることが実証された。本手法は幅広い種類の環境微生物に適用が可能であり、新しい単一細胞ゲノム解析技術としての応用が期待できる。

Development of an accurate single-cell genome sequencing method for coral commensal bacteria with droplet microfluidics

○Yohei Nishikawa[1,2], Masahito Hosokawa[3], Keigo Ide[1,4], Masato Kogawa[1,4], Haruko Takeyama[1,2,3,4]
([1]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [2]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [3]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [4]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words single-cell analysis, microfluidic device, environmental bacteria

2Fp10 腸管組織内共生日和見細菌アルカリゲネス菌の形態変化に伴う、シトクロム c 蓄積と宿主細胞のアポトーシス誘導

○柴田 納央子 [1,2], 國澤 純 [2,3,4,5,7], 安藤 正浩 [6,7], 細川 正人 [8], 堀井 俊平 [1,9], 細見 晃司 [3], 竹山 春子 [1,7,8,9], 清野 宏 [2,10,11]
([1]早大院先進理工, [2]東大国際粘膜ワクチン開発研究セ, [3]医薬健栄研ワクチン・アジュバント研究セ, [4]阪大院歯学, [5]神戸大院医学, [6]JSTさきがけ, [7]早大ナノライフ創新研, [8]早大理工総研, [9]産総研 CBBD-OIL, [10]UCSD医学, [11]千葉大院医学)
haruko-takeyama@waseda.jp

我々の研究グループでは、腸管における主要な免疫誘導組織であるパイエル板内部において、日和見細菌の一種であるアルカリゲネス菌が樹状細胞内に定常的に共生し、樹状細胞を介した IgA 産生の促進に寄与することを示してきた(PNAS., 2010、Mucosal Immunol., 2018)。
一方で、宿主免疫系の機能不全等によりアルカリゲネス菌との共生関係が破綻すると、アルカリゲネス菌が全身性炎症を誘起するが(Science, 2012)、その共生破綻機序は明らかではない。そこで本研究では、宿主免疫系の機能不全に伴う、アルカリゲネス菌の共生破綻機序の解明を目指した。
アルカリゲネス菌を過剰増殖させると、桿状からフィラメント状への形態変化を起こす事が判明した。さらに、フィラメント状への形態変化に伴いアルカリゲネス菌の菌体内にシトクロム c が蓄積し、一部のシトクロム c は菌体外へ放出されることを見出した。シトクロム c は通常、細菌細胞膜や動物細胞のミトコンドリア内膜において、好気呼吸電子伝達系の電子供与体として機能しているが、ミトコンドリアからシトクロム c が細胞質へ放出されると、アポトーシス促進因子として作用することが知られている。これらの報告と一致し、アルカリゲネス菌が定常的に共生している樹状細胞に、形態変化後のアルカリゲネス菌を感染させることで、樹状細胞の細胞質におけるシトクロム c が増加し、それと連動しアポトーシスが高率に誘導されることが明らかになった。
以上の解析結果から、アルカリゲネス菌の共生破綻機序として、アルカリゲネス菌の形態変化に伴う菌体内シトクロム c の蓄積及び、シトクロム c の樹状細胞の細胞質での増加と、それに起因したアポトーシス誘導機構の存在が示唆された。

Morphological changes of the gut intra-tissue symbiotic opportunistic bacteria, Alcaligenes, are accompanied by cytochrome c accumulation and induction of host cell apoptosis

○Naoko Shibata[1,2], Jun Kunisawa[2,3,4,5,7], Masahiro Ando[6,7], Masahito Hosokawa[8], Shunpei Horii[1,9], Koji Hosomi[3], Haruko Takeyama[1,7,8,9], Hiroshi Kiyono[2,10,11]
([1]Grad.Sch.Adv.Sci.Eng.,WasedaUniv, [2]Int.Res.Dev.Cent.MucosalVac.,TokyoUniv, [3]Lab.Vac.Mat.,NIBIOHN, [4]Grad.Sch.Dent.,OsakaUniv, [5]Grad.Sch.Med.,KobeUniv, [6]PRESTO,JST, [7]Res.Org.NanoLifeInnov.,WasedaUniv, [8]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ, [9]CBBD-OIL,AIST,WasedaUniv, [10]Dep.Med.,UCSD, [11]Grad.Sch.Med.,ChibaUniv)

Key words peyers patches, dendritic cells, symbiotic bacteria

2Fp11 防腐作用のシングルセル解析

○宮原 佳子, 矢野 剛久, 久保田 浩美, 永井 智
(花王)
nagai.satoshi@kao.com

【背景と目的】化粧品等の製品中には防腐剤以外に界面活性剤等の防腐剤を不活性化する成分や糖・アミノ酸・植物エキス等の微生物を賦活化する成分が含まれる。しかし防腐剤の作用解析は単純な水溶液系でなされる場合が多く、特に賦活成分共存下での防腐剤の作用特性はわかっていない。マイクロデバイスとTime-lapse 蛍光顕微鏡を組み合わせたシングルセル解析は、複雑な系での個々の細胞の多様な挙動の解析に有効である。本研究では賦活成分と防腐剤が共存する系での防腐作用をシングルセルレベルで解析し、各防腐剤の作用特性を明らかにすることを目的とした。
【方法】化粧品の防腐剤に用いられるフェノキシエタノール（PE）と防腐助剤として用いられるエチレンジアミン四酢酸（EDTA）を使用し、モデル賦活成分として SCD 培地を用いた。菌株は PE に対してやや高い耐性を示した環境分離株 *Staphylococcus* sp. KMC153 を用いた。PE と EDTA の最小殺菌濃度（MBC）及び最小生育阻止濃度（MIC）における生残菌数の減少挙動及び両者を併用した際の生残菌数の減少挙動を確認した。さらに、PE 単独使用時及び PE・EDTA 併用時の細胞の挙動をシングルセルレベルで解析した。
【結果と考察】PE は MIC においても殺菌性を示したが、EDTA は MIC の 30 倍以上の濃度でも菌数減少は緩やかだった。一方で、PE と EDTA を併用すると殺菌性が向上し、より速やかに生残菌数が減少した。そこで死滅速度が同じになるよう濃度を調整して PE 単独使用時と PE・EDTA 併用時のシングルセルレベルでの細胞挙動を比較した結果、前者では死滅する細胞と分裂する細胞が共存していたが、後者は分裂せずに時間とともに死細胞が増加していた。本研究で得られた結果から、シングルセル解析は菌数変化からは得られない各細胞の挙動をとらえることができ、菌数変化が同じでも作用性は異なる場合があることが示された。

Analyses of preservative efficacy at single-cell level

○Yoshiko Miyahara, Takehisa Yano, Hiromi Kubota, Satoshi Nagai
(Kao Corp.)

Key words single-cell analysis, *Staphylococcus*, preservative

2Fp12 結合タンパク質を用いたアスタキサンチン分離法の確立

○八木 周和 [1], 原 清敬 [1,2]
([1]静県大院・薬食生命, [2]静県大・食栄)
k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp

[背景と目的] アスタキサンチンは強力な抗酸化作用を持ち近年、医・薬・食・化粧品等の分野にて広く応用されている。しかし、アスタキサンチンの分離には超臨界抽出等のコストがかかるプロセスが必要であり、エネルギーの消費が少なく、より精製度の高い分離法が求められている。そこで本研究では、ロブスター由来アスタキサンチン結合タンパク質であるクラスタシアニンのサブユニットを用い、アスタキサンチンを結合させて分離する方法の確立を目的とした。具体的には、大腸菌に組換えタンパク質として結合サブユニットを発現させ、精製後、アスタキサンチンとの結合を試みた。
[方法] pET ベクターを用いてクラスタシアニンのアスタキサンチン結合サブユニットが発現するように大腸菌 Origami B を形質転換した後、抗生物質を含む LB 培地にて培養し IPTG による誘導を行った。誘導後、菌体を超音波にて破砕し、アスタキサンチン結合タンパク質を精製した。次に、アセトンに溶解させたアスタキサンチンと結合タンパク質を混和し、これらの複合体の形成を試みた。
[結果と考察] 水系において疎水性物質のアスタキサンチンは析出するが、アスタキサンチン結合タンパク質を加えると、この析出は見られなくなったことからアスタキサンチンの結合タンパク質への結合が確認できた。また、今回用いた結合タンパク質は、複合体を形成すると吸収ピーク波長がシフトすることから、他のカロテノイド等の夾雑物質が存在するサンプル中のアスタキサンチンの特異的な定量にも応用ができ、高速液体クロマトグラフィー等を用いる従来の測定法とは異なる迅速で多サンプル同時分析が可能になると考えられる。

Development of astaxanthin separation method using its binding protein

○Yagi Shuwa[1], Kiyotaka Hara[1,2]
([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka.)

Key words *Escherichia coli*, astaxanthin, separation

2Fp13 質量顕微鏡を用いたコムギ葉(*Triticum aestivum*)断面におけるアゾキシストロビンの経時的分布可視化法の開発

○生田 宗一郎 [1], 福﨑 英一郎 [1,2], 新間 秀一 [1,2]
([1]阪大院・工, [2]阪大島津イノベーション共同研究講座)
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

アゾキシストロビンはストロビルリン系殺菌剤の一種であり，1996 年に商業販売が開始され，現在もなお世界中で広く用いられている。ミトコンドリアのチトクロム bc1 複合体の QO 部位に結合することで電子伝達系を阻害し、細菌や一部の菌類の呼吸を阻害することで効果を発揮する。さらに浸透性が高いことも知られている。しかし葉の表面に施与した際に，裏側までどのように浸透するかは知られていない。そこで本研究はマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)を搭載した質量顕微鏡(Mass Microscope)を用いて，コムギ葉断面におけるアゾキシストロビン浸透の可視化法を開発することを目的とした。
本研究では，コムギ葉断面の切片作製法を最適化した。その後，質量顕微鏡を用いてコムギ葉における経時的な薬剤浸透の可視化をおこなった。コムギ葉の切片作製のための包埋剤として 10%ゼラチンが最適であることがわかった。葉の表側に塗布した薬剤の包埋剤への流出を防ぐため、薬剤を塗布した裏側のみを包埋剤で固定し，液体窒素による凍結後，ミクロトーム内で厚さ 30 μm の凍結切片を作製した。続いて，アゾキシストロビン標準品を用いて MALDI によるイオン化の確認をおこなった。その後，コムギの最も穂に近い葉にアゾキシストロビンを塗布し，1 時間後，1 週間後，2 週間後のコムギ葉をサンプリングした。それらの試料に対し，最適化した切片作製法を用いて切片を作製し，質量顕微鏡を用いて解析をおこなった。その結果，アゾキシストロビンのコムギ葉における浸透の空間分布情報を取得可能となり，アゾキシストロビンが 1 時間であっても葉の裏側に到達することや維管束への浸透はほぼ見られないことが明らかになった。今回開発した手法を用いることで，コムギ葉におけるアゾキシストロビン以外の農薬の浸透可視化に応用することが可能であると考えられる。

Development of azoxystrobin visualization procedure in wheat leaves (*Triticum aestivum*) using Mass Microscope

○Soichiro Ikuta[1], Eiichiro Fukusaki[1,2], Shuichi Shimma[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Osaka University Shimadzu Innovation Analytical Laboratory)

Key words mass microscope, leaf cross section, fungicide, plant

2Fp14 質量イメージングによる組織内酵素活性可視化法の開発

○竹尾 映美, 福﨑 英一郎, 新間 秀一
（阪大院・工）
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

生体内もしくは組織内で酵素活性を見る方法は限定的であり拡張性が担保されていない。例えば、免疫染色や GFP では特定の酵素（タンパク質）の局在を見ることが出来る。しかし、それらの酵素が実際に活性を持っているか、さらにはその場所で機能を発揮しているかを判別することは出来ない。また、酵素活性を見る方法として酵素活性が働いた時にのみ呈色したり発光基質を用いる方法があるが、特殊な基質を作製するのが煩雑であるだけでなく、応用範囲が限られるといった問題がある。特に、低分子が基質の場合、基質への標識を導入の問題から、この手法を適用した例はほんのわずかしかない。
そこで着目されるのが、質量イメージング（MSI:mass spectrometry iamging）を用いた酵素活性測定方法である。MSI は、組織切片上で二次元的にイオン化及び質量分析を行うことで、分子の局在イメージを取得する手法である。本発表では、低分子を基質とする酵素活性可視化手法として MSI を応用した例を報告する。MSI を用いて酵素による代謝反応を可視化することは、これまでペプチド分解酵素については Grobe らにより報告されている。しかし、低分子に対して本手法を適用した例は報告がない。その理由として、以下の 2 点が挙げられる：(1) 対象の物質（基質および生成物）が内在性かつ高濃度で存在する、(2) 低分子物質は水に溶けやすいため、既に報告のある基質溶液への浸漬による基質の供給では組織切片上に残る水分量が多く、反応の際に基質および生成物の非局在化が起きる可能性がある。この問題を解決するため、アセチルコリン代謝を対象とし低分子基質における MSI による酵素活性測定方法の検討を行ったところ、特徴的な酵素活性分布が再現性良く得ることができた。本発表では、新規手法と分布結果を報告し、議論したい。

***In situ* enzyme-activity visualization by mass spectrometry imaging**

○Emi Takeo, Eiichiro Fukusaki, Shuichi Shimma
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words mass spectrometry imaging, enzyme, metabolite, acetylcholine

2Fp15 グラフェン量子ドットー金ナノ粒子ーポリアニリンナノワイヤ複合体を用いた電気化学的バイオセンサーによるカニクイザル糞便からのＨＥＶの検出

○竹村 謙信 [1], Dutta Chowdhury Ankan [2], 李 天成 [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]国立感染研, [4]浜医大・医・医学科）
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【目的】 E 型肝炎ウイルス（HEV）は E 型肝炎の原因ウイルスであり、その臨床症状は A 型肝炎に似通るが、致死率は 10 倍の高い。主にブタ、イノシシの未加熱肉摂食により感染が確認され、例年数百件の感染事例が報告され、食生活の安心・安全を脅かしている。その検出法には PCR 法に頼っているが、設備と熟練した技術を要し、ウイルス拡散防止のための高感度かつ迅速な検出法の開発が喫緊の課題である。本研究では、高導電性グラフェン量子ドットー金ナノ粒子ーポリアニリンナノワイヤ（GQD-AuPAni）ナノ複合体上に HEV 特異的抗体を修飾し、インピーダンス法によるＨＥＶの検出を行った。
【方法】 Au-PAni は水層と有機層を用いて界面重合法により合成し、ポリアニリンナノワイヤー中に 5～10 nm の金ナノ粒子（AuNP）を均一に配置した。GQD-AuP A ni に N,S 分子をドープした後、HEV 特異的抗体（Ab）を化学的修飾し Ab-GQD-AuPani 複合体を作製した。
【結果】 HEV が電極上の Ab-GQD-AuPani 複合体に特異的に結合すると、電気抵抗（Rct）が上昇し、Rct の測定により、HEV を検出することかできた。HEV 様粒子（HEV-LP）を用いた検出試験では検出限界 0.8 fg/ml と高い感度を示し、ヒト血清中の HEV-LPs 検体からも HEV-LP の検出ができた。臨床検体からの HEV 検出の可能性を評価するために、HEV に感染されたサル糞便を感染後４日目から４３日目まで採取し、本検出系と RT-qPCR によるＨＥＶ検出を行い、両者の結果を比較した。本検出系は糞便からのＨＥＶが検出され、その感度は RT-qPCR に比べやや低感度であったが、同様の傾向が示された。この結果は、本検出系が臨床検体からのＨＥＶの検出には有用であることが示唆された。

Electrochemical detection of Hepatitis E virus of fecal specimen samples collected from HEV-infected monkey using GQD-AuPAni nanocomposite

○Kenshin Takemura[1], Ankan Dutta Chowdhuly[2], Tensei Li[3], Tetsuro Suzuki[4], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Natl. Inst. Infect. Dis., [4]Hamamatsu Univ. Sch. Med.)

Key words virus, detection, electrochemical, nano-bio sensor

2Fp16 ペプチドアレイを反応基盤とした、ミルク抗原ペプチド検出技術の開発

○久保 智里 [1], 栗本 昌樹 [1], 田中 祐圭 [2], 越智 浩 [1], 阿部 文明 [1], 大河内 美奈 [2]
（[1]森永乳業, [2]東工大・物質理工）
chisato-kubo981@morinagamilk.co.jp

【背景・目的】
近年、食の安心安全に対する消費者の意識が非常に高まっており、食物アレルギーもその一例である。食品衛生法では、消費者の食品アレルギーによる健康危害の発生を防止する観点から、食品原材料のアレルゲン表示を一部義務化および推奨している。このような実情のもと、食品の維持管理や突発的な事故を予防する観点から、食品中のアレルゲンを迅速かつ簡便に検出する技術が求められている。更に、消費者を保護するという安全性を考慮すると、その検出には高い感度が要求される。本研究では、アレルゲンをペプチド単位で分離して検出し、各抗原ペプチドを高感度に検出する技術の開発を目的とし、ペプチドアレイを反応基盤とした新規ツールの評価検討を行った。

【方法】
Fmoc 固相合成法によりセルロースメンブレン上にペプチドを合成し、乳タンパク質（β-ラクトグロブリン、または αS1-カゼイン）の配列を網羅したペプチドアレイを 16-mer、3～5-mer ずらしで作製し、反応基盤とした。乳ペプチドが配合された様々な育児用ミルクと、各乳タンパク質の抗体をブレインキュベーションさせサンプルを調製した。このサンプルと前述のアレイを反応させ、競合的イムノアッセイを行った。

【結果】
各種育児用ミルクの乳アレルゲンタンパク質量を評価したところ、新規法にて従来法と同等の検出結果を得ることができた。さらに、乳アレルゲンを抗原ペプチド毎に評価したところ、従来法では乳アレルゲンタンパク質が検出されないほど低抗原なミルクに対しても、新規法では一部抗原ペプチドを再現性高く検出することに成功した。このことから、新規法は従来法よりも高い感度でアレルゲン検出可能であることが確認できた。本検出法を実用化することで、食品の品質を高いレベルで管理可能となるだけでなく、品質の高い製品開発・製品設計への活用も期待できる。

Development of technology to detect antigenic peptides of milk on the basis of reaction with peptide array

○Chisato Kubo[1], Masaki Kurimoto[1], Masayoshi Tanaka[2], Hiroshi Ochi[1], Fumiaki Abe[1], Mina Okochi[2]
([1]Morinaga Milk Industry CO., LTD., [2]Sch. Mater. Chem. Technol., Tokyo Tech)

Key words peptide array, allergen, milk, sensor

2Fp17 CD 型マイクロ流路を用いた食品中のサルモネラ菌迅速検出

○久保 いづみ
（創価大・理工）
kubo@soka.ac.jp

食品中のサルモネラ菌の検査では複数回の培養を行うことで細菌の分離と同定を行っている。培養は時間がかかり同定に至るまでに 4-7 日間を要する。本研究室ではディスクの回転によって生じる遠心力で溶液を簡便に送液して、チャンバーに細胞を捕捉し、PCR による細胞固有遺伝子を PCR できる細胞単離ディスクを開発している。そこで、本研究では食品中のサルモネラ菌の検出に際し固有遺伝子である *invA* の増幅により検出するため、食品由来の成分の除去のための前処理から検出までの迅速な方法の確立を目的とし、食肉試料からのサルモネラ菌の抽出と検出を試みた。
本研究では、鳥挽肉中のサルモネラ菌をフィルターバッグと遠心処理による回収をし、菌を *invA* 遺伝子の増幅用 PCR 試薬とともに細胞単離ディスクに流して分離し、このディスク上で PCR した。PCR 増幅産物は蛍光プローブで検出した。また、低濃度の菌は回収後培養して検出を行った。
まず、1 チャンバーに 1 個以上のサルモネラ菌が存在する際の蛍光強度比の閾値をリアルタイム PCR の結果をもとに確認した。PCR 後この閾値以上の蛍光強度比が増加したチャンバーにはサルモネラ菌が存在し、*invA* の増幅産物が存在したと判断することにした。これに基づき、鳥挽肉中の 4.6×10^{4}-10^{7} CFU/g のサルモネラ菌を細胞単離ディスクでの検出を行い、4.6×10^{5} CFU/g までは閾値以上のチャンバーが確認され、そのチャンバー数が濃度に依存して増加した。また、4.6×10^{4} CFU/g 未満の濃度のサルモネラ菌を検出する際には培養が必要であると考え、Nutrient Broth 培地を用いて 37℃で 4 時間振盪培養後、検出を行った。4 時間培養することにより、1.7×10^{4} CFU/g まで検出することができ、濃度に依存して閾値以上のチャンバー数も増加した。また、培養時間を 8 時間にすることで、30 CFU/g 以上の菌を検出できることが確認された。

Rapid detection of salmonella enterica in food utilizing a microfluidic device

○Izumi Kubo
(Faculty of Sci. Eng., Soka Univ.)

Key words pathogen, gene, PCR

2Gp01 CHO 細胞を用いたサメ由来重鎖抗体の全長発現と特性解析

○江夏 朔, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史
（阪大院・工）
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】ヒト由来 IgG 抗体医薬品が医薬品市場において大きな割合を占める中で、サメ由来重鎖抗体である Immunoglobulin new antigen receptor (IgNAR) が高い安定性を有する新たな抗体様タンパク質として注目されている。IgNAR は 1 つの可変ドメイン (VNAR) と 5 つの定常ドメイン (C1~C5) からなる。VNAR と C1-C4 ドメインは先行研究において発現され、高い熱安定性が示されている。一方、分子間ジスルフィド結合や 4 か所の糖鎖修飾部位を有する C5 ドメインは大腸菌や昆虫細胞を用いて発現させた報告例があるが、フォールディングやアッセンブリは確認されておらず、IgNAR の全長発現や特性解析は未だ行われていない。そこで本研究では高度な翻訳後修飾が行える CHO 細胞を用いて IgNAR 全長発現を行い、特性解析を試みた。
【実験手法】IgNAR 全長にプロテアーゼ切断配列 (P.C.S.) を介して精製用のタグとしてヒト IgGFc 領域を付加したコンストラクト (IgNAR-Fc) を抗体発現用ベクターに挿入した。無血清馴化 CHO-K1 細胞にエレクトロポレーション法によってベクターを導入し IgNAR-Fc 安定発現株を取得した。安定発現株を浮遊培養し培養上清を Protein A カラムを用いて精製し、Fc 領域をプロテアーゼによって切断し、Protein A カラムとサイズ排除クロマトグラフィーによって除去し、IgNAR を精製した。精製した IgNAR を用いて、バイオレイヤー干渉法とサーマルシフトアッセイにより親和定数や融点測定を試みた。
【結果・考察】SDS-PAGE による解析の結果、IgNAR は糖鎖修飾された二量体構造を形成していた。従って、CHO 細胞を用いた発現系は IgNAR の全長発現に適していると考えられた。また、融点測定により IgNAR は IgG よりも高い熱安定性を示した。現在、発現させた IgNAR の抗原に対する親和定数を測定している。

Expression and characterization of full-length shark derived antibody by using CHO cells

○Hajime Enatsu, Noriko Yamano-Adachi, Yuichi Koga, Takeshi Omasa
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words CHO cell, Shark antibody, IgNAR, Heavy chain antibody

2Gp02 PDIa4 is responsible for the folding and assembly of antibody in CHO cell

○Masafumi Yohda[1], Kei Komatsu[1], Kento Kumon[1], Mayuno Arita[1], Masayoshi Onitsuka[2], Takeshi Omasa[3]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Fac. Eng., Tokushima Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
yohda@cc.tuat.ac.jp

Therapeutic monoclonal antibodies are produced by mammalian cells, mostly CHO cells, because antibody formation requires intra- and inter-chain disulfide bond formation and glycosylation. Folding and assembly of antibody polypeptide chains take place in the ER. In its oxidative environment, protein disulfide isomerases (PDIs) catalyze disulfide bonds formation. In the antibody-producing plasma cell, ER is significantly expanded to meet the high antibody production. Thus, to enhance the antibody production by CHO cell, it seems necessary to improve the folding and assembly system in CHO cells. There exist various PDIs in mammalian cells. However, it is unknown which PDI is responsible for antibody production. When ER stress is induced by tunicamycin or thapsigargin, expression-level of pdia4 significantly increased in the antibody-producing CHO cell. Knockdown of pdia4 in the antibody-producing CHO cell caused significantly affected the production and maturation of antibody. PDIa4 could assist folding and assembly of the reduced and denatured antibody in vitro. Therefore, we concluded that PDIa4 takes an essential role in the folding and assembly in CHO cells.

PDIa4 is responsible for the folding and assembly of antibody in CHO cell

○Masafumi Yohda[1], Kei Komatsu[1], Kento Kumon[1], Mayuno Arita[1], Masayoshi Onitsuka[2], Takeshi Omasa[3]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Fac. Eng., Tokushima Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words antibody, protein folding, disulfide isomerase

2Gp03 Functional production of human antibody by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

○Hung Hiep Huynh[1], Takuya Katayama[1,2], Toshihiro Sakamoto[3], Reiko Shinkura[2,3], Jun-ichi Maruyama[1,2]
([1]Dept. Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo, [3]Inst. Quant. Biosci., The Univ. of Tokyo)
amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Monoclonal antibodies (mAbs) as one of the biopharmaceuticals take a pivotal role in the current therapeutic application. Generally, mammalian cell lines such as Chinese hamster ovary (CHO) are used to produce the recombinant antibody. However, there are still concerns about the high cost and the risk of pathogenic contamination when using mammalian cells. *Aspergillus oryzae*, the filamentous fungus considered as a GRAS (Generally Regarded As Safe) organism, has a great ability to secrete a large amount of proteins into the culture supernatant, and thus the fungus has been used as one of cost-effective microbial hosts for heterologous protein production. Pursuing this strategy, human anti-TNF alpha antibody adalimumab, one of the world's best-selling antibodies for treatment of immune-mediated inflammatory diseases including rheumatoid arthritis, was chosen to attempt for producing the full length of mAbs by *A. oryzae*. The nucleotide sequences for adalimumab heavy and light chains were optimized, fused with the coding sequence for alpha-amylase AmyB as "carrier protein", and then introduced into *A. oryzae* host. The tetramer form of recombinant adalimumab was successfully produced in the culture supernatants, and its antigen binding activity was detected by ELISA assay. These results demonstrated an alternative low-cost platform for human antibody production by using *A. oryzae*, possibly offering a reasonable expenditure for patient's welfare.

Functional production of human antibody by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

○Hung Hiep Huynh[1], Takuya Katayama[1,2], Toshihiro Sakamoto[3], Reiko Shinkura[2,3], Jun-ichi Maruyama[1,2]
([1]Dept. Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo, [3]Inst. Quant. Biosci., The Univ. of Tokyo)

Key words *Aspergillus oryzae*, monoclonal antibody, biopharmaceutical, adalimumab

2Gp04 再構成型無細胞タンパク質合成系を用いた抗体-酵素融合タンパク質(Zipbodyzyme)の効率的合成

○伊藤 玲奈 [1], Almasl Alfi [1], 加藤 晃代 [2], 兒島 孝明 [1], 中野 秀雄 [1]
（[1]名大院・生命農学, [2]iBody株式会社）
hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】 酵素修飾抗体は、ELISA、ウエスタンブロッティング、免疫染色などのさまざまなアッセイに広く使用されている。抗体は一般に酵素と化学的に結合しているが、このような抗体の化学修飾は、1)抗原結合能を低下させる、２）抗体と酵素の量比が一定でない、などの欠点を有している。遺伝的に酵素を抗体に融合させることで、これらの欠点を克服し、煩雑な修飾実験を省略することができる。当研究室では、遺伝的に酵素をロイシンジッパーが付加された Fab 抗体に融合させた、抗体-酵素融合タンパク質（Zipbodyzyme）を開発した。この二機能性タンパク質は、抗原結合と酵素活性の両方を保持しており、二次抗体を必要とせずに直接 ELISA に適用することが可能であった。本研究では、この Zipbodyzyme を Fab 抗体のハイスループットスクリーニングに使用することを目的とし、大腸菌再構成系無細胞タンパク質合成系による効率的な合成条件を調べた。
【方法と結果】SKIKm6Fab-LZ-HcNanoLuc はマウス由来抗 E. coli O157 抗体とルシフェラーゼの融合タンパク質にタンパク質発現量を増大させる SKIK ペプチドタグを付加した Zipbodyzyme である。このタンパク質を再構成型無細胞タンパク質合成キットである PURE frex を用い、原核生物ジスルフィド結合イソメラーゼである DcbC の種々の濃度条件下において発現させた。二次抗体を用いた ELISA およびルシフェラーゼの発光測定によって Zipbodyzyme の発現量を比較したところ、DsbC の濃度が高いほどその発現量は増加することが明らかとなった。現在、二次抗体を用いずにルシフェラーゼの活性によって抗原抗体反応を検出する One step ELISA に加え、タンパク質中のジスルフィド結合の架替を促進する Protein disulfide-isomerase（PDI）の添加効果を検討中である。

Efficient synthesis of antibody-enzyme fusion protein (Zipbodyzyme) by using PURE system

○Reina Ito[1], Alfi Almasl[1], Taruyo Kato[2], Takaaki Kojima[1], Hideo Nakano[1]
([1]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., [2]iBody inc)

Key words antibody, fusion protein, DsbC, PDI

2Gp05 タンパク質生産量を増大させる N 末端 SKIK ペプチドタグ配列に関する研究

○古川 裕貴[1], 加藤 晃代[1,2], 中野 秀雄[1,2]
（[1]名大院・生命農学, [2]iBody株式会社）
hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】大腸菌や酵母は組換えタンパク質発現のために最もよく用いられているが、発現させたいタンパク質によって難発現である場合がある。当研究グループは、目的タンパク質をコードする遺伝子の開始コドン直後に Ser-Lys-Ile-Lys の 4 つのアミノ酸からなる SKIK ペプチド配列を付加することにより、タンパク質生産量を増大可能であることを発見した。しかし、そのメカニズムは未だ明らかになっていない。そこで本研究では、N 末端 SKIK ペプチドタグ付加によるタンパク質生産量増大のメカニズムを解明するため、SKIK ペプチドタグをコードするコドンの影響を調べた。
【方法と結果】ウサギ由来の scFv の開始コドンの直後にコドンパターンの異なる 24 種類の SKIK ペプチドタグ配列を付加し、大腸菌発現プラスミドを構築した。それらのプラスミドを用いて、大腸菌無細胞タンパク質合成系、大腸菌 SHuffle T7 Express 株による IPTG 誘導およびオートインダクションによる 3 つの方法でタンパク質発現を行った。SDS-PAGE 解析の結果、タグ無と比較し、3 つの方法すべてにおいて 24 種類の SKIK ペプチドタグ付きタンパク質の合成量が増大しており、コドンの違いによる大きな差異は認められなかった。このことから、SKIK ペプチドタグ配列のコドンによる影響はないことが示唆された。今後、未解析のコドンの影響とともに、SKIK を他のアミノ酸配列に置換したときの影響を検討し、開始コドン付近の塩基配列と翻訳産物（アミノ酸配列）がどのようにタンパク質生産量増大に寄与しているのかを解明していく予定である。

Study on N-terminal SKIK peptide tag to increase protein production

○Yuki Furukawa[1], Teruyo Ojima-Kato[1,2], Nakano Hideo[1,2]
([1]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., [2]iBody Inc.)

Key words protein expression, translation, peptide tag

2Gp06 ヒト免疫グロブリンは T 細胞受容体シグナルを抑制することで T 細胞を直接的に制御する

○堀 采音[1], 藤村 孝志[2], 河本 正次[2]
（[1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・統合生命科学）
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、その作用機序は未だに謎に包まれている。そこで本研究では、様々な炎症病態において関与が認められる T 細胞に着目し、IVIg 製剤が T 細胞に与える免疫制御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 製剤の免疫抑制効果を検討したところ、本分子が T 細胞賦活剤による T 細胞増殖を抑制することを明らかとした。本抑制作用は T 細胞を精製した条件下でも消失しなかったことから、IVIg 製剤が T 細胞に対して直接的に作用し、その増殖を抑制することが示唆された。そこで次に、制御性 T 細胞 (Treg) の関与を調査するため、精製 T 細胞から内在性 Treg を除去した条件下で IVIg 製剤の増殖抑制能を確認するとともに、刺激に伴って出現する誘導性 Treg の存在量を解析した。その結果、内在性 Treg を除去しても IVIg 製剤の増殖抑制能は保持されたままであり、出現した誘導性 Treg の存在量はコントロール群と有意な差は認められなかった。そこで、IVIg 製剤がエフェクター T 細胞の活性化を直接的に抑制すると推測し、T 細胞受容体 (TCR) シグナルの停止箇所をシグナル分子のリン酸化・分解・核移行を指標に確認した。その結果、IVIg 製剤により TCR シグナルのカルシニューリン/NFAT、Ras-MAPK/AP-1、IKK/NF-κB 経路のいずれも停止していることが明らかになった。以上の結果から、IVIg 製剤は T 細胞の TCR シグナルを停止させることで、T 細胞の活性化を直接的に抑制することが判明した。本作用は、従来報告されている抗原提示細胞を介した T 細胞活性化抑制とは異なる新規な免疫制御機構である。

Human immunoglobulin directly regulates T cell proliferation by suppressing T cell receptor signaling

○Ayane Hori[1], Takashi Fujimura[2], Seiji Kawamoto[2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words intravenous immunoglobulin, T cell, immunosuppression

2Gp07 リポソームを用いたキンギョ免疫法による scFv 断片の取得

岡﨑 文美[1,3,4], 栗山 風貴子[1], 安達 優華[2], ○田丸 浩[1,3,4]
（[1]三重大院・生資, [2]三重大・生資, [3]三重大・先端科支バイオインフォ, [4]三重大・スマートセルイノベ研）
ytamaru@bio.mie-u.ac.jp

【目的】抗体（Immunoglobulin：Ig）は，B 細胞によって産生される糖タンパク質であり，免疫系の中でも獲得免疫において主要な役割を果たす分子である。また近年，抗体医薬や CAR-T 細胞治療法をはじめ，検査診断薬や分析試薬，基礎生物学の研究ツールなど幅広く利用される必要不可欠な分子である。当研究室では，スイホウガンという眼下に水泡を有するキンギョを免疫動物として，抗原特異的抗体の産生を行ってきた。本研究では，従来のアジュバントではなくドラッグデリバリーシステムにも利用されるリポソームを用いた新規免疫法を試みた。
【方法】中性リン脂質ホスファチジルコリン（DOPC）および酸性リン脂質ホスファチジルセリン（DOPS）またはホスファチジルグリセロール（DOPG）をそれぞれ DOPC/DOPG ＝ 1 ： 1 および DOPC/DOPS ＝ 1：1 の組成で調製した巨大リポソーム（GUV）に抗原タンパク質として蛍光タンパク質（EGFP）を封入して，スイホウガンに免疫した。各種の免疫個体から産生された抗体遺伝子の PCR 条件を検討し，キンギョ scFv（single chain Fv）遺伝子ライブラリーを構築した。免疫前後の水泡液から total RNA を抽出し、これを鋳型として goldfish Immunoglobulin M（gIgM）遺伝子に対する cDNA 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】各種の免疫個体から産生された抗体遺伝子の PCR 条件を検討し，キンギョ scFv（single chain Fv）遺伝子ライブラリーを構築した。さらに，構築したライブラリーからバイオパニングによって EGFP に対する親和性の高いクローンを選択し，ELISA 法によって最終的に EGFP に対する scFv クローンの取得に成功した。

Aquisition of scFv fragments from goldfish by using liposome-inclusion antigen

Fumiyoshi Okazaki[1,3,4], Fukiko Kuriyama[1], Yuka Adachi[2], ○Tamaru Tamaru[1,3,4]
([1]Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [2]Facult. Bioresour., Mie Univ., [3]Mie Univ. ASRC, [4]Mie Univ. SCIC)

Key words scFv, goldfish, liposime-inclusion antigen, phage display

2Gp08 scFv 型抗体を発現するニワトリ B 細胞株 DT40 の樹立と利用

○岡 知里, 野田 凌太郎, 曲 正樹, 徳光 浩, 金山 直樹
（岡山大院・統合科学）
nkanayam@okayama-u.ac.jp

我々は、抗原に結合することでその排除を担う抗体に注目し、新規なタンパク質改変システムを構築することで、既存抗体の機能改良を目指している。本研究で用いているニワトリ B 細胞株 DT40 は、自身の抗体遺伝子に変異を導入することができ、培養のみで抗体ライブラリを作成することが可能である。これまでに DT40 細胞の抗体遺伝子座を改変し、任意のタンパク質を抗体 Fc 融合タンパク質として発現させ、DT40 細胞の変異能力によって改変する系を構築している。本研究では、低分子化抗体の改良への DT40 細胞の利用を目的とし、一本鎖(scFv)抗体に着目した。ヒトの乳がんマーカーである HER2/neu 抗原に特異的なモノクローナル抗体 (Trastuzumab)を scFv-Fc 融合タンパク質として DT40 細胞に発現させることを試みた。Trastuzumab の重鎖可変部(VH)と軽鎖可変部(VL)を VH-VL あるいは VL-VH の順にリンカーで連結した scFv をコードする DNA を設計し、抗体 Fc 発現型 DT40 細胞の抗体重鎖遺伝子の可変部領域と置換した。樹立した細胞株は、VH-VL および VL-VH いずれの場合も scFv を Fc 融合タンパク質として DT40 細胞表面に発現可能であった。DT40 細胞の変異能力によって導入した scFv 遺伝子への変異導入頻度を評価したところ、頻度は低いものの変異導入は可能であることが示された。DT40 細胞において変異頻度の低い標的 DNA への変異頻度向上法についてはこれまでに開発しており、DT40 細胞を用いて Trastuzumab scFv への変異導入と HER2/neu 抗原への親和性向上を試みる予定である。

Establishment of scFv-expressing chicken B cell line

○Oka Chisato, Noda Ryotaro, Magari Masaiki, Tokumitsu Hiroshi, Kanayama Naoki
(Grad. Sch. ISEHS., Okayama Univ.)

Key words DT40 cells, antibody, somatic hypermutation

2Gp09 ニワトリ B 細胞株 DT40 における scFv 型抗体の発現効率の改善

○野田 凌太郎, 岡 知里, 曲 正樹, 徳光 浩, 金山 直樹
（岡山大院・統合科学）
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 制御可能なニワトリ B 細胞株 DT40-SW を用いて、外来抗体や Fc 融合タンパク質を細胞表面に発現させ親和性成熟を行うことに成功している。現在、低分子型抗体として anti-EGFR mAb (セツキシマブ)と anti-HER2/neu mAb (トラスツズマブ)を scFv 化して DT40 細胞に発現させ、改良することに試みている。各 scFv をコードする人工 DNA を設計し、DT40 細胞ゲノム上の抗体遺伝子可変部と置換した細胞を樹立したところ、anti- HER2/neu scFv -Fc 融合タンパク質は細胞表面に発現が確認できたが、anti-EGFR scFv-Fc は細胞表面への発現が確認できなかった。転写産物を解析すると、anti-EGFR scFv をコードする領域をスキップした異常転写産物が多く生成していた。anti-EGFR scFv をコードする人工 DNA 断片には、基となった抗体可変部 germline 配列と比べてアミノ酸の変異を伴わないサイレント変異を 12 ヶ所導入していた。このサイレント変異による Exonic Splicing Enhancer (ESE)分布の変化を ESEfinder3.0 (1)を用いて解析したところ、5’末端における高スコアの ESE がサイレント変異によって消失していた。Splicing acceptor 近傍の ESE の変異はスプライシング異常の原因となりうることから、anti-EGFR scFv DNA 断片上のこの ESE の消失により scFv が細胞表面に発現しなかったと推測した。この 5’末端の ESE を保持した人工 scFv をコードする DNA 断片を設計し、anti-EGFR scFv を発現する DT40 細胞株の樹立を試みている。

(1) krainer01.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home

Improvement of scFv expression efficiency in the chicken B cell line

○Ryotaro Noda, Chisato Oka, Masaki Magari, Hiroshi Tokumitsu, Naoki Kanayama
(Grad. Sch. ISEHS., Okayama Univ.)

Key words DT40 cells, antibody, somatic hypermutation

2Gp10 間葉系幹細胞の画像品質判定におけるロバストモデル構築手法の開発

○竹本 悠人[1], 今井 祐太[1], 吉田 啓[1], 蟹江 慧[1], 加藤 竜司[1,2]
（[1]名大院・創薬, [2]名大・ナノライフシステム研究所）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

ヒト細胞は、従来の医薬品では治療不可能であった疾患に対して治療効果が期待される次世代の医薬品である。間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell, MSC）は、その多分化能の他に、損傷部位修復能や免疫調節能が知られ、他家由来細胞医薬品として各国で承認されるなど、世界的に最も臨床実績のある細胞源である。しかし、生きた細胞そのものが治療効果をもたらす細胞医薬品の製造において、従来の遺伝子解析やマーカーの染色評価など破壊的な評価方法では品質管理を行うことが難しく、現状では熟練者の顕微鏡観察の感覚に依存している。

我々の研究グループは、このような課題解決に向けて、細胞画像から得られる形態情報を高次元情報として、細胞品質を非破壊的に予測するための機械学習モデルの構築の可能性と有効性を報告してきている。このような細胞品質予測のコンピュータモデルの最終形態は、構築されたモデルが複数の施設で利用できることであるが、ヒト細胞には大きな個体間のバリエーションがあることが知られており、どの程度のデータ量でどれだけロバストなモデルを構築できるかを示した報告や検証例はこれまで無い。

本研究は、複数のロット・メーカーの MSC から得られる細胞形態情報という高次元バイオデータのバリエーションと特徴を解析し、ここから得られる機械学習モデルの特性やロット間のバイアスについて比較検討することで、いかにロバストな品質評価モデルを構築できるかを検証したのでここに報告する。

Development of robust model for image-based cell quality evaluation of mesenchymal stem cells

○Yuto Takemoto[1], Yuta Imai[1], Kei Yoshida[1], Kei Kanie[1], Ryuji Kato[1,2]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]Inst. Nano life syst. Nagoya Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, Image analysis, cell morphology, Model robustness

2Gp11 画像解析技術による浮遊系細胞の細胞形態プロファイリング

○久田 拓海[1], 藤谷 将也[1], 蟹江 慧[1], 加藤 竜司[1,2]
（[1]名大院・創薬, [2]名大・ナノライフシステム研究所）
hisada.takumi@k.mbox.nagoya-u.ac.jp

創薬探索の工程における候補化合物の絞り込みには、様々なスクリーニング手法が用いられる。細胞の表現型の変化に注目したスクリーニング法は「Phenotype-based screening」と呼び、特定の受容体や酵素との相互作用情報に基づく「Target-based screening」に対して、First-in-class の薬剤開発実績が高いことが知られる。また、近年注目される複雑な疾患や脳・神経などの疾患のように分子メカニズムが解明されていない疾患に向けた薬剤探索においては、幹細胞研究の進歩とともにヒト細胞の応答性を直接評価する Phenotype-based screening に改めて注目が集まっている。

一般的に、Phenotype-based screening では増殖率や染色や抽出によるマーカー分子のエンドポイント評価が行われている。しかし、これらの方法は破壊的であるため、化合物が細胞に及ぼす経時的な効果の観察や、経時的な応答変化の情報は失われてしまう。また、エンドポイントの評価はコスト的に極めて大きいことも課題の一つとなっている。

我々はこれまで上記課題解決のため、平面培養細胞に対する非破壊的な評価技術としての細胞画像評価技術を開発しており、化合物スクリーニングにおいて有効であることを報告してきた。本研究では、これらの技術を浮遊系細胞に対して応用し、細胞形態情報解析による薬剤への応答性のスクリーニングの可能性について評価したので、これを報告する。

Morphology-based drug response profiling of suspension cells

○Takumi Hisada[1], Masaya Fujitani[1], Kei Kanie[1], Ryuji Kato[1,2]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]Inst. Nano-Life-Sci., Nagoya Univ.)

Key words high-throughput screening, Morphological profiling, Drug screening, Suspension cells

2Gp12 細胞形態情報解析による神経系モデル細胞の薬剤応答プロファイリング

○今井 祐太[1], 吉田 啓[1], 蟹江 慧[1], 飯田 円[2], 勝野 雅央[2], 加藤 竜司[1,3]
（[1]名大院・創薬, [2]名大院・医学, [3]名大・ナノライフシステム研究所）
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。このような技術を用いて、神経変性疾患の治療に向け、神経系細胞を用いた神経再生メカニズムの解明や神経細胞の保護機能を有する薬剤の探索のための評価系の構築が近年進んでいる。

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、神経変性疾患の発症時には既に疾患の進行度がすでに大きく進んでいることが多く、治療による改善効果を最大化しにくい点がある。このため、疾患早期の状態に近い細胞評価系の構築が期待されており、少ないポピュレーションの変性細胞に対する薬剤効果を検出する技術や、ヘテロ性が高い状態での神経系細胞の変化や応答を安定に評価する技術に期待が持たれている。

我々の研究グループではこれまで、細胞形態の画像情報処理を大量のライブイメージに対して適応することで、容器内に存在する大量の細胞のヘテロ性の定量化や品質評価が可能なことを検証し報告して来ている。本研究では、神経系細胞によく生じる「少数の集団の形態変化」を検出し、モデル系の細胞を識別する画像解析評価方法を検証したのでこれを報告する。このような細胞集団におけるヘテロ性解析は、創薬のための細胞アッセイにとどまらず、神経系細胞の薬剤応答や再生効果の評価に活用できると期待される。

Drug response profiling of neuronal cells by morphology analysis

○Yuta Imai[1], Kei Yoshida[1], Kei Kanie[1], Madoka Iida[2], Masahisa Katsuno[2], Ryuji Kato[1,3]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Medicine. Sci., Nagoya Univ., [3]Inst. Nano-Life-Sci., Nagoya Univ.)

Key words Drug screening, Phenotypic assay, high-throughput screening, Morphological profiling

2Gp13 がん幹細胞モデル miPS-LLCcm の細胞形態の深層学習法による解析

○杉山 友康[1], 相田 紗織[2], 西迫 栄[1], 笠井 智成[1], 佐藤 淳[1], 亀田 弘之[2]
（[1]東京工科大・応用生物, [2]東京工科大・コンピュータサイエンス）
tsugiyama@stf.teu.ac.jp

【はじめに】 画像の識別に人工知能（AI）技術を応用する研究が急速に高まっている。AI が細胞形態を識別できれば、極めて有用である。一方我々はがん幹細胞の培養細胞を利用した細胞評価系の構築を行っている。この細胞はマウス iPS 細胞から樹立された細胞 miPS-LLCcm であり、マウス個体への細胞移植によって悪性腫瘍を形成する点で、正常 miPS 細胞とは全く異なる性質を持つ。しかし幹細胞に特徴的な nanog 遺伝子の発現が認められ、その発現の消失は細胞形態の大きな変化を伴うことが知られている。そこで本研究は miPS-LLCcm の細胞形態を識別する AI の構築を目的とした。
【方法】 miPS-LLCcm 細胞の培養は論文（PLoS ONE 2012, 7: e33544）に記載の方法に従った。細胞画像は位相差画像と蛍光画像（nanog-GFP レポーター遺伝子の発現を示す）をペアで取得した。ペアの画像は形式を整えて、深層学習ソフトウェアに入力した。深層学習ソフトウェアは論文（2017 IEEE Conference on Computer Vision and Patrern Recognition） に記載の Conditional Genearative Adversarial Nets (CGAN) を実装した pix2pix を使用した。計算用のハードウェアは DGX-1 を使用した。
【結果と考察】 miPS-LLCcm 細胞はゼラチンでコートしたディッシュで培養した結果、細胞の一部は nanog-GFP レポーター遺伝子の緑色蛍光が失われていた。そこで蛍光を維持した細胞と失った細胞が混在した条件で培養を続け、その位相差細胞画像と蛍光細胞画像のペアを 10,221 セット取得した。次に、位相差細胞画像を見て蛍光細胞画像を予測する深層学習を行った。その結果、計算時間はデータ数に比例した。学習済み AI がテスト用に用意した位相差細胞を見て蛍光細胞画像を予測する精度は、学習のエポック数の影響が少なかった。現在さらに検討を進めている。

Analysis of miPS-LLCcm, a model of cancer stem cell, morphology using deep-learning of cell images

○Tomoyasu Sugiyama[1], Saori Aida[2], Sakae Nishisako[1], Tomonari Kasai[1], Atsushi Sato[1], Hiroyuki Kameda[2]
([1]Sch. Biosci. Biotech., Tokyo Univ. Tech., [2]Sch. Comp. Sci., Tokyo Univ. Tech.)

Key words cell morphology, artificial intelligence, cancer stem cell, miPS-LLCcm cells

2Gp14 がんの悪性度に関与するネスチンのテール領域とアクチン繊維の相互作用解析

○水澤 愛衣[1], 須崎 萌[1], 山岸 彩奈[2], 長崎 晃[2], 貴嶋 紗久[3], 上田 太郎[4], 中村 史[1,2]
（[1]農工大院・工, [2]産総研・バイオメディカル, [3]産総研・生物プロセス, [4]早大院・先進理工）
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、近年、悪性度の高いがん細胞で高発現であることが報告されている。我々は、マウス乳がん細胞株 FP10SC2 を用いてがん悪性度に対するネスチンの構造的機序について調査を行ってきた。ネスチンは 170 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、FP10SC2 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繊維と結合することが報告されており、繊維タンパク質間の結合により細胞骨格の安定なネットワーク構造が形成されると考えられている。我々は、FP10SC2 においてビメンチン－アクチン結合を確認しており、ネスチン遺伝子破壊によりその結合点が増加し、細胞弾性が上昇することを見出している。この結果より、我々は、ネスチンの巨大なテール領域は立体障害によりビメンチン－アクチン結合を阻害し、細胞を柔軟化することでがんの浸潤性に寄与すると考えているが、一方でネスチン自身もアクチン繊維に結合する可能性が示唆されており、単に柔軟化するのみではなく、そのテール領域には何らかの機能を有した構造が潜んでいるものと推察している。
そこで本研究では、ネスチンテール領域とアクチン繊維の結合に関するさらなる調査を行った。ネスチンテール領域（NTD）を 4 分割し、N 末端側に GFP を融合したタンパク質を作製した。4 分割したタンパク質を N 末端側からそれぞれ Q1NTD, Q2NTD, Q3NTD, Q4NTD とした。APTES でシラン化修飾したガラス基板にローダミンファロイジン染色アクチン繊維を吸着させ、Q1～4NTD をそれぞれ添加し、結合の様子を観察した。蛍光顕微鏡で観察した結果、Q4NTD がアクチン繊維と共局在している様子が確認された。このことから、ネスチンテール領域の最も C 末端側のドメイン 352 残基が、アクチン繊維と相互作用することが明らかとなった。

Analysis of interaction between actin filament and tail domain of nestin attributed to cancer malignancy

○Mei Mizusawa[1], Moe Susaki[1], Ayana Yamagishi[2], Akira Nagasaki[2], Saku Kijima[3], Taro Uyeda[4], Chikashi Nakamura[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Biomed. Res. Inst., AIST, [3]BPRI, AIST, [4]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words intermediate filament, nestin, actin, protein interaction

2Gp15 ナノニードルを用いた繰り返し引っ張り試験による中間径フィラメントの可動性解析

○中村 史[1,2], 須崎 萌[2], 水澤 愛衣[2], 山岸 彩奈[1], 飯嶋 益巳[3], 黒田 俊一[4]
（[1]産総研・バイオメディカル, [2]農工大院・工, [3]東農大・応生科, [4]阪大・産研）
chikashi-nakamura@aist.go.jp

我々は、AFM 探針を直径 200 nm 長さ 10 μm の針状に加工したナノニードルの挿入操作により、生きた細胞を低侵襲に解析する技術を開発してきた。その中で、抗体を修飾したナノニードルを用いて、標的の細胞骨格タンパク質と抗体の結合破断にかかる力を解析することにより、これを検出する技術を開発した。例えば、中間径フィラメントネスチンが高発現であるがん細胞では転移性が高いことが知られているが、マウス乳がん細胞株においてネスチン発現量の違いを生きたまま半定量的に評価することが可能である。この手法により、ネスチン欠損株の解析を行う中で、我々はナノニードル抜去時のフォースカーブの形状が大きく異なることに気づき、中間径フィラメントの機械的特性を評価する新手法を着想するに至った。
ネスチンは単独で繊維形成できず、同じ中間径フィラメントのビメンチンと共重合繊維を形成する。野生株、およびネスチン欠損株に対して、抗ビメンチン抗体修飾ナノニードルを挿入し、ビメンチン繊維と結合させ、結合を維持した状態で、振幅 2 μm で上下することで、繊維の繰り返し引っ張り試験を行った。連続 5 回上下したカーブを平均化した上で、ベースラインの交点で引っ張り時のカーブの傾きを評価した結果、ネスチン欠損株では傾きが有意に増大していた。この結果は、①引っ張られた繊維の量が多い、②繊維そのものが固い、③繊維が動きにくい、この 3 つの可能性を示唆する。ニードル抜去時の全結合破断仕事は引っ張った繊維の量を反映する。この値に有意差は無いので、繊維量の違いの可能性は否定される。ネスチンによる繊維そのものの柔軟化の可能性は現時点で否定されないが、ネスチンによりビメンチン－アクチン結合が阻害されるという別に実験結果から、傾きの違いはビメンチン繊維の可動性を反映すると考えている。

Analysis of mobility of intermediate filament by repeated tensile test using antibody-functionalized nanoneedle

○Chikashi Nakamura[1,2], Moe Susaki[2], Mei Mizausawa[2], Ayana Yamagishi[1], Masumi Iijima[3], Shun'ichi Kuroda[4]
([1]Biomed. Res. Inst., AIST, [2]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [4]Inst. Sci. Ind. Res., Osaka Univ.)

Key words intermediate filament, nestin, nanoneedle, AFM

2Gp16 高転移性マウス乳がん細胞の浸潤機構に関わる塩素イオンチャネル Clic1 の機能解析

○山岸 彩奈[1], 伊藤 文恵[2], 金 賢徹[1,3], 中村 史[1,3]
（[1]産総研・バイオメディカル, [2]農工大, [3]農工大院・工）
chikashi-nakamura@aist.go.jp

塩素チャネルは細胞膨張時に塩素イオンの排出を行うことで細胞内浸透圧を減少させ、調節性容積減少(Regulatory Volume Decrease; RVD)機構を誘導する。これまでに、高転移性マウス乳がん細胞 FP10SC2 (SC2)と中間径フィラメントネスチンのノックアウトにより浸潤性が低下した変異株(KO)における塩素チャネルの mRNA 発現量を解析したところ、Clic1 (Chloride intracellular channel protein 1)の発現量が KO 株において顕著に減少していることが明らかになった。Clic1 はがん細胞の浸潤能に寄与することが示唆されているが、その詳細な機能は不明である。そこで本研究では、SC2 株及び KO 株を用いて Clic1 発現量及び塩素イオン排出能の評価を行い、がん細胞の浸潤性と Clic1 の関係について調査した。
SC2 株はマウス乳がん細胞 4T1E 株から獲得した高転移性の細胞株である。そこで 4T1E、SC2、及び KO 株の Clic1 発現量をウェスタンブロットにより評価したところ、浸潤性の低い 4T1E 及び KO 株と比較して SC2 株における Clic1 発現量が高いことが確認され、Clic1 発現量とがん細胞の浸潤性に相関があることが示唆された。次に、ハロゲンイオンの結合で消光する蛍光タンパク質 YFP を細胞で発現させ、塩素イオン排出能の評価に用いた。あらかじめヨウ素イオンを細胞内に取り込ませ、YFP 由来の蛍光強度が減少した細胞を低張条件下に置いた結果、SC2 株では YFP の蛍光回復が認められた。一方、KO 株では蛍光の回復が確認されなかったことから、SC2 株では KO 株と比較して塩素イオン排出能が高いことが見出された。がん細胞の転移過程では、細胞や組織の小さな隙間を通過する際に細胞が圧縮され内圧が上昇することで移動が阻害されると考えられるが、Clic1 は塩素イオンを細胞外に排出することで狭窄された細胞の膨張を緩和し、浸潤を促進する機能を有すると推察している。

Functional analysis of chloride intracellular channel protein 1 which is involved in invasion mechanism of highly metastatic mouse breast cancer cell

○Yamagishi Ayana[1], Ito Fumie[2], Kim Hyonchol[1,3], Nakamura Chikashi[1,3]
([1]Biomed. Res. Inst., AIST, [2]Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words chrolide ion, chrolide channel, cancer cell, invasion

2Hp01 醸造酵母からの異数性染色体株の新規選抜手法の開発

○草場 裕貴[1], 山本 裕貴[1], 野口 英樹[2], 豊田 敦[2], 北垣 浩志[1]
（[1]佐賀大・農, [2]遺伝研）
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

【背景・目的】醸造酵母の一部は異数性染色体を持つことが近年世界中で報告されているが、その意義は解明されてこなかった。これに対し我々は醸造酵母の染色体の異数性がその醸造特性を支配することを初めて明らかにした[1)]。この知見は遺伝子組換え技術を使わずに染色体を操作できる技術の開発につながるが、異数性染色体を持つ醸造酵母の選抜手法についてはこれまで報告されていない。そこで本研究では、効率的に異数性染色体株を選抜する手法の開発を試みた。
【方法】正倍数体である焼酎酵母(S-3)を微小管重合阻害剤である nocodazole 含有の YPD 培地で 4 時間振盪培養し、染色体の不分離を誘導した。次にミトコンドリア活性を反映する TTC(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride)染色を行い、ミトコンドリア活性が向上したと考えられる株を選抜した。選抜した株は生育速度調査により生育速度が低い株を選抜した。核型解析にはリアルタイム PCR を用いた。
【結果】nocodazole 処理した S-3(3000cells)に対して TTC 染色と生育速度調査による選抜を行い、核型解析した結果、6.7×10^{-4}cells の頻度で異数体を確認した。続いて nocodazole 処理した S-3(5000cells)に対して同条件で実験を行ったところ、1.4×10^{-3}cells の頻度で異数体を確認した。実験室酵母の異数体出現頻度は 2.0×10^{-5}cells であることから[2)]、本手法を用いれば効率的に異数性染色体株を選抜できることがわかった。また獲得した 9 株の異数体のうち 5 株は 9 番、12 番の染色体のいずれかに異数性を示した。現在、獲得した異数体の醸造特性を調査している。この新たな手法により異数性染色体を持った醸造酵母を効率よく取得できるようになった。

1)Kadowaki et al., Appl. Environ. Microbiol., 83(24) (2017)
2)Hartwell et al., Yeast, 1:28-38 (1982)

Development of a new screening method of aneuploids from brewer's yeast

○Yuki Kusaba[1], Yuki Yamamoto[1], Hideki Noguchi[2], Toyoda Atushi[2], Kitagaki Hiroshi[1]
([1]Fac. Agric., Saga Univ., [2]NIG)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, aneuploidy, nocodazole, TTC staining

2Hp02 酵母の染色体異数性が清酒醸造に与える影響と酵母育種への応用

○堀田 夏紀[1], 小高 敦史[1], 松村 憲吾[1], 杉山 峰崇[2], 笹野 佑[3], 原島 俊[3], 秦 洋二[1], 石田 博樹[1]
（[1]月桂冠・総研, [2]阪大院・工, [3]崇城大・生物生命）
hotta@gekkeikan.co.jp

【背景・目的】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、ゲノムスケールで多数の遺伝子を一挙に操作することが可能である。染色体操作技術のひとつに、出芽酵母を対象とした、任意の染色体領域を重複できる PCR-mediated chromosome duplication (PCDup) 法がある[1)]。染色体の異数性や部分異数性によってそのコピー数が変化することで表現型が変化することが知られていることから、PCDup 法により作製された染色体部分重複株を用いて部分異数性と有用形質の関係について研究が進められている。そこで今回、染色体の部分異数性が清酒醸造にどのような影響を与えるのか明らかにするため、この染色体部分重複株を用いて清酒醸造試験を行った。さらに、異数性に着目して酵母育種を行った結果を報告する。
【方法・結果】実験室酵母 BY4742 を親株とし、16 本の染色体を 100～200 kb 毎に重複させた染色体部分重複株 50 株を、総米 50 g の清酒醸造試験に供した。上槽酒を分析したところ、2 番染色体の右腕部分を重複させた株でリンゴ酸が低生産になっていた。次に、エチルメタンスルホン酸で処理した清酒酵母から、シクロヘキシミド(CHX) に耐性を示す変異株を選抜した。CHX はタンパク質合成阻害剤であり、CHX を用いた有機酸組成が変化した株や異数体株の取得法が報告されている。変異株を用いて清酒醸造試験を行ったところ、リンゴ酸が低生産となっている株が得られた。また、異数性を解析した結果、リンゴ酸が低生産となっていた株は 2 番染色体が増加していた。以上の結果より、2 番染色体の異数性がリンゴ酸の生産性に影響を与えることが示唆された。また、異数性を変化させるという育種方法を用いて、リンゴ酸低生産酵母を取得できる可能性が示された。

1)W.Natesuntorn et al., Sci. Rep., 5, 12510 (2015)

Effect of yeast chromosomal aneuploidy on sake brewing and its application to sake yeast breeding

○Natsuki Hotta[1], Atsushi Kotaka[1], Kengo Matsumura[1], Minetaka Sugiyama[2], Yu Sasano[3], Satoshi Harashima[3], Yoji Hata[1], Hiroki Ishida[1]
([1]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [3]Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, aneuploid, sake, cycloheximide

2Hp03 出芽酵母における GID 複合体遺伝子の変異がリンゴ酸生成とタンパク質発現に与える影響

○根来 宏明[1], 松村 憲吾[1], 松田 史生[2], 清水 浩[2], 秦 洋二[1], 石田 博樹[1]
（[1]月桂冠・総研, [2]阪大院・情報）
negoro@gekkeikan.co.jp

【背景・目的】 清酒中のリンゴ酸は呈味に寄与する成分であり、様々なリンゴ酸高生産酵母が育種されている。我々は取得したリンゴ酸高生産酵母の解析を行った結果、*GID4*（alias *VID24*）の変異が高生産をもたらす要因であることを報告した[1)]。Gid4p はグルコースの存在に応答して糖新生酵素を分解する GID 複合体の構成要素であることが知られている[2)]。一方、*GID4* 変異株がどのようにリンゴ酸高生産能を獲得するのか不明な点が多い。今回 *GID4* 変異株が高生産となる機構の解析を行った。さらに各種 GID 欠損株を用い、GID 複合体がリンゴ酸生産およびタンパク質発現に与える影響を評価した。
【方法・結果】 *GID4* 野生株および変異株を宿主として、糖新生酵素の欠損株を作製しリンゴ酸生成能を調べると、*MDH2* の関与が推察された。Gid4p が糖新生酵素を分解に導く際には、N 末端側プロリンを認識するとされる[2)]。Mdh2p の N 末端プロリンを変異させると、*GID4* 野生株でも変異株と同程度のリンゴ酸生成能を示したため、*GID4* 変異株は Mdh2p を細胞内に蓄積することでリンゴ酸高生産になったと考えられた。*GID4* 野生株および欠損株のターゲットプロテオームを行うと、変異株で Mdh2p の蓄積が確認されたと同時に、他の中心代謝酵素についても発現強度の変動が見られた。次に、各種 GID 欠損株（*gid1*～*9*Δ）について培養上清の代謝物測定と、細胞内のターゲットプロテオームを行った。*gid1, 2, 3, 4, 5, 8, 9*Δ は対照株よりリンゴ酸生産能が高く、エタノール生産が低かった。これらの株ではグルコースをピルビン酸まで代謝する解糖系酵素が亢進している一方で、ピルビン酸をエタノールへ変換する経路の酵素発現強度が低く、代謝物生成の変化を反映していると考えられた。

1) H. Negoro et al., J. Biosci. Bioeng., 121, 665 (2016)
2) S. J. Chen et al., Science, 355, 6232 (2017)

Effects of mutations of GID protein-coding genes on malate production and enzyme expression profiles in *Saccharomyces cerevisiae*

○Hiroaki Negoro[1], Kengo Matsumura[1], Fumio Matsuda[2], Hiroshi Shimizu[2], Yoji Hata[1], Hiroki Ishida[1]
([1]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd., [2]Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words GID complex, malic acid, *Saccharomyces cerevisiae*, proteome

2Hp04 清酒酵母の変異処理によるリンゴ酸高生産株の育種と醸造特性評価

○馬場 嵩一朗[1], 澤田 和敬[2], 永野 幸生[1,3], 木村 圭[1,4], 玉置 尚徳[1,5], 後藤 正利[1,4], 小林 元太[1,4]
（[1]鹿児島大院・連農, [2]佐賀県工技セ, [3]佐大・分析セ, [4]佐賀大・農, [5]鹿児島大・農）
gentak@cc.saga-u.ac.jp

【背景・目的】佐賀大学では清酒『悠々知酔』を県内の酒蔵と共同で醸造している。本研究では、悠々知酔の酒質の幅を広げるために有明海から分離した清酒酵母の育種改良を行い、良好な酸味を呈するリンゴ酸を高生産する株の取得を目的とした。さらに比較ゲノム解析によりリンゴ酸の高生産能獲得に関与する原因変異遺伝子の特定を試みた。
【方法および結果】有明海干潟から 5 株の *Saccharomyces cerevisiae* を分離した。小仕込試験と製成酒の成分分析の結果、5 株とも発酵経過は良好であったが悠々知酔酵母 Y52 株よりもリンゴ酸生産量が低かった。分離株のうち官能的に評価が高かった H3-1 株を親株とし、変異剤 EMS により変異を誘発した。得られた 6000 の変異株からコハク酸ジメチル感受性株（DMSS）を 236 株取得し、麹エキスで発酵試験を行った。その結果、親株の 2 倍以上のリンゴ酸を生成する 11 株の中から総有機酸生成を指標に 5 株を選抜した。小仕込試験の結果、いずれの株も親株の 3 倍以上のリンゴ酸を生成しており、特に DMSS233 株と DMSS167 株のリンゴ酸生成能が高かった。総米 1kg にスケールアップした小仕込試験の結果、DMSS167 株はリンゴ酸生産量が多く、官能的な評価も高かった。さらに、分離株 H3-1 のドラフトゲノムを MinION と HiSeq を併用して決定した。決定したドラフトゲノムを参照ゲノムとし DMSS233 株と DMSS167 株に対して比較ゲノム解析を行った結果、DMSS233 株と DMSS167 株の CDS に導入された変異点をそれぞれ 510 カ所と 429 カ所同定した。これらのうち、リンゴ酸生産に関与する可能性があり、塩基置換によりアミノ酸の性質が大きく変化した 25 の変異遺伝子を選抜した。今後は、リンゴ酸高生産変異株由来の一倍体を取得し、リンゴ酸高生産能を維持した一倍体に共通する変異遺伝子を同定することで、リンゴ酸高生産能獲得に関与する原因遺伝子の特定を試みる。

Breeding of malate hyperproducing mutants from isolated sake yeasts and evaluation of the brewing characteristics.

○Shuichiro Baba[1], Kazutaka Sawada[2], Yukio Nagano[1,3], Kei Kimura[1,4], Hisanori Tamaki[1,5], Masatoshi Goto[1,4], Genta Kobayashi[1,4]
([1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [2]Ind. Technol., Cen. Saga., [3]Cen. Ana., Saga Univ., [4]Fac. Agric., Saga Univ., [5]Fac. Agric., Kagoshima Univ.)

Key words sake yeast, breeding, malic acid, NGS analysis

2Hp05 酵母において TTC 染色性に影響を及ぼす因子の探索

○田中 純平[1], 高須 耀子[1], 山元 翔太[1], 久保田 恵理[2], 兼崎 友[2], 門倉 利守[1], 鈴木 健一朗[1], 中山 俊一[1]
（[1]東農大・応生科, [2]東農大・ゲノムセ）
s3nakaya@nodai.ac.jp

【背景・目的】2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride（TTC）染色試験とは、還元されることで赤色を呈する化合物 TTC を用いて生体活性を測定する簡便な方法であり、醸造分野においては主に酵母の識別で用いられている。清酒醸造においては、清酒酵母は TTC 染色性を示し野生酵母は示さないことから、清酒醪の品質管理に重用されている。しかし、その有用性に反し酵母においてどの様な遺伝子が TTC 染色性に影響するかは明らかになっていない。そこで、本研究では酵母の遺伝子を破壊することで TTC 染色性に関与する遺伝子を探索した。
【結果】TTC 染色性を示さないウラシル要求性実験室酵母 BY4741 にウラシル生合成遺伝子 *URA3* を導入した株 BY4741U は TTC 染色性を示すようになった。この BY4741U を親株として電子伝達系の Complex III や IV を破壊すると TTC 染色性が低下すること、各破壊株の Complex III と IV の酵素活性の測定結果から、TTC は電子伝達系の Complex IV において還元され、Complex III も TTC 染色性に関与していることを明らかにした。また、実験室酵母 BY4743 と BY4743U（*URA3* 相補株）について RNA-Seq 法により網羅的転写解析を行ったところ、ミトコンドリアのピルビン酸トランスポーター遺伝子群の転写量が増加していた。BY4741U を親株としてこれらの遺伝子を破壊したところ、*JEN1* と *MPC2* の破壊株において TTC 染色性が低下したことから、電子伝達系に至る代謝経路を破壊することでも TTC 染色性は失われることが示された。さらに、各破壊株の生育能やグルコース消費能およびエタノール生成能を YM10 培地にて比較したところ親株との差異が見られなかったことから、TTC 染色性を示さなくても生育能や発酵能は維持されることが示唆された。

The disruption of genes encoding pyruvate transporter leads to decrease of TTC staining ability in yeast

○Jumpei Tanaka[1], Yoko Takasu[1], Shota Yamamoto[1], Eri Kubota[2], Yu Kanesaki[2], Toshimori Kadokura[1], Kenichiro Suzuki[1], Syunichi Nakayama[1]
([1]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, TTC staining, pyruvate transporter, mitochondria

2Hp06 転写因子 *RDS2* が清酒酵母と実験室酵母の発酵能に及ぼす影響

○大木 尭之, 桑山 翔一, 田中 純平, 門倉 利守, 鈴木 健一朗, 中山 俊一
（東農大院・農）
s3nakaya@nodai.ac.jp

【目的】清酒醸造に用いられる清酒酵母は、低温生育能やアルコール発酵能などにおいて他の醸造用酵母とは異なる性質を有することが知られており、これら清酒酵母を特徴付ける多くの遺伝子が報告されている。先の研究により、転写因子に着目し核タンパク質を比較したところ糖新生などを制御する *RDS2* の発現量が清酒酵母においては実験室酵母に比べ 34 倍高いことが明らかとなった。そこで本研究では清酒酵母と実験室酵母において *RDS2* 遺伝子を破壊し *RDS2* が生育能や発酵能に与える影響を調べた。
【方法・結果】清酒酵母 K701 由来の一倍体 H3(MAT alpha)と H12(MAT a)、実験室酵母の一倍体である BY4741 と BY4742 に *URA3* 遺伝子を導入した BY4741U と BY4742U においてオーレオバシジン耐性遺伝子を用いた相同組換えによりそれぞれ *RDS2* 遺伝子破壊株を取得した後、接合により二倍体 *RDS2* 遺伝子破壊株を取得した。また、コントロール株として K701 と BY4743U にそれぞれオーレオバシジン耐性遺伝子を挿入したプラスミドを導入した株を用いた。*RDS2* 破壊株とコントロール株それぞれをグルコース 10%を炭素源とする YM10 培地にて 30℃にて培養したところ、清酒酵母の *RDS2* 破壊株はコントロール株と比較して生育能が低下したが、実験室酵母の *RDS2* 破壊株は生育に変化はみられなかった。清酒酵母の *RDS2* 破壊株はコントロール株と比較して有機酸生成量に変化がみられたが実験室酵母においては変化がみられなかった。これらの事より *RDS2* は清酒酵母の生育や発酵に関与しているが、実験室酵母においては関与していないことが示唆された。

The effect of *RDS2* on a fermentation ability in sake and laboratory yeasts

○Takayuki Ohki, Syoichi Kuwayama, Jumpei Tanaka, Toshimori Kadokura, Kenichiro Suzuki, Syunichi Nakayama
(Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric.)

Key words sake yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *RDS2*, organic acid

2Hp07 ホップに含まれるアデノシン分解活性の発見とビール醸造への応用可能性

○太田 拓[1], 土屋 友理[1], 杉山 巧[2], 太田 惣介[1], 加藤 優[1], 今井 健夫[3], 稲留 弘乃[1]
（[1]キリンホールディングス（株）酒類技術研究所, [2]キリンビール（株）名古屋工場, [3]キリンホールディングス（株）ものづくり人材開発センター）
Hironori_Inadome@kirin.co.jp

【背景・目的】
プリン体とは、細胞中の核酸を構成する成分の一つで、様々な食品に含まれている。プリン体が肝臓で分解されると尿酸がつくられるが、尿酸が一定の濃度以上になると血中で結晶化し体に悪影響を及ぼすことがある。これまでにビール類のプリン体オフを商品化しているが、現製法では香味の幅が限定されることから、新たなプリン体低減方法の開発が望まれていた。発酵前の麦汁に含まれるプリン体成分は、アデニン等のプリン塩基や、アデノシン・グアノシン等のプリンヌクレオシドがある。麦汁中のアデニンは発酵中にビール酵母によって消費されるが、ビール酵母はアデノシン・グアノシンを資化できないため製品に残存する。そこで、本研究では新たなプリンヌクレオシド低減法を開発することを目的とした。

【結果・考察】
低減方法の手がかりを得るため、市販製品のプリン体成分を分析したところ、非加熱のホップを発酵液中に浸漬させる製法の商品において、アデノシンが低い傾向があることを見出した。そこで、ホップにアデノシンを分解する作用があるとの仮説を立て、麦汁へホップペレットを添加し、プリン体成分を分析したところ、アデノシンが完全に分解され、アデニンの生成が見られた。この分解は、ホップペレットを熱処理すると観察されなくなったことから、ホップに含まれる酵素の作用と考えられた。一方、グアノシンは熱処理の有無に関わらず変化は見られなかった。以上より、ホップにはアデノシン分解活性が含まれ、非加熱のホップを麦汁に処理することで、アデノシンをアデニンに分解できることが明らかとなった。発酵工程でアデニンをビール酵母に消費させることでプリン体を低減できるため、プリン体オフビールの新たな製法への応用が期待される。

Discovery of adenosine degradation activity contained in hops and its application to brewing

○Taku Ota[1], Yuri Tsuchiya[1], Takumi Sugiyama[2], Sosuke Ota[1], Masaru Kato[1], Takeo Imai[3], Hironori Inadome[1]
([1]Res. Lab. for Alcoholic Beverage Technol., Kirin Holdings. Co. Ltd., [2]Kirin Brewery Nagoya, Kirin Brewery Co. Ltd., [3]Technical Talent Development Center, Kirin Holdings. Co. Ltd.)

Key words purine body, hop, brewing, enzyme

2Hp08 ホップのアデノシン分解活性を活用したプリン体オフのビール系飲料の開発

○土屋 友理[1], 太田 拓[1], 羽場 清人[2], 杉山 巧[3], 加藤 優[1], 今井 健夫[4], 稲留 弘乃[1]
（[1]キリンホールディングス(株)酒類技術研究所, [2]キリンビール(株)商品開発研究所, [3]キリンビール(株)名古屋工場, [4]キリンホールディングス(株)ものづくり人材開発センター）
Hironori_Inadome@kirin.co.jp

【背景、目的】
我々はこれまでに、プリン体の含量が少ない原料を選抜し、酵母によるプリン体生成を抑える発酵法を用いることで、プリン体オフのビール系飲料を開発し商品化してきた。本開発では、ホップがアデノシン分解活性を持ち、麦汁やビール中のアデノシンをアデニンに分解できることを新たに発見したことを受けて、ホップを活用したプリン体オフのビール系飲料の製造方法の開発を行うことを目的とした。

【方法・結果】
ホップのアデノシン分解活性を活用して、プリン体を低減したビール系飲料を製造する方法の検証を行った。製造設備の制約により、ホップを麦汁の糖化工程より前に添加することが難しいため、発酵開始時にホップを添加する方法を検討した。その結果、麦汁に含まれる非資化性のアデノシンが資化性のアデニンに変換され、酵母によりアデニンが資化されることによって発酵液のプリン体を低減できることが明らかになった。このアデノシン分解効果は、煮沸したホップを用いると認められなかったことから、ホップに由来する酵素の活性によるものと示唆された。ホップを発酵開始時に添加する方法は、ミルセン等のホップの樹脂様の香りを低減し、リナロール等の華やかな香りを付与できる製法であり、苦味を抑えて華やかなホップ香気を付与することができる。本製法をプリン体オフのビール系飲料の製造に応用することにより、プリン体を低減しつつ、ホップ由来の香味の優れたビール系飲料を製造する新たな技術を確立することができた。

Development of purine-off low malt beer utilizing hop's adenosine degradation activity.

○Yuri Tsuchiya[1], Taku Ota[1], Kiyoto Haba[2], Takumi Sugiyama[3], Masaru Kato[1], Takeo Imai[4], Hironori Inadome[1]
([1]Research Laboratories for Alcoholic Beverage Technologies, Kirin Holdings Co., Ltd., [2]Laboratory for New Product Development, Kirin Brewery Co., Ltd., [3]Kirin Brewery Nagoya, Kirin Brewery Co., Ltd., [4]Technical Talent Development Center, Kirin Holdings Co., Ltd.)

Key words purine, hop, beer brewing

2Hp09 革新的醸造・分析技術が示す次世代酒米で醸成した清酒の風味

○小林 拓嗣[1], 岩橋 佑真[2], 小松 夕子[1], 熊崎 努[1], 水上 留以[1], 児玉 詩織[1], 劉 利雲[1], 上垣内 宏司[1], 包 紅彬[1], 大作 理文[1], 齊藤 亮太[1], 矢澤 彌[1], 髙橋 正之[1], 織田 健[1], 奥田 将生[1], 田中 淳也[3], 有馬 秀幸[3], 清野 珠美[4], 廣岡 青央[4], 岩下 和裕[1,2]
（[1]酒総研, [2]広島大院・統合生命科学, [3]山口県産技セ, [4]京産技研）
iwashitact@nrib.go.jp

【背景と目的】我々は、次世代酒米（兵庫錦、Hyogo Sake 85、石川酒 68 号、夢ささら、祝、京の輝き）と山田錦について、小仕込みや試験醸造酒の高度な分析と比較解析を行ってきた。本発表では、試験醸造酒の各種分析値から官能評価得点を予測するモデルの構築とその応用について報告する。
【方法】H29BY 次世代酒米及び山田錦を用いて、小仕込み試験（精米歩合 70% 及び 50%）と各府県製造場及び酒総研にて試験醸造を行った。製成酒は、一般成分・香気成分と味覚センサーを用いた分析、ターゲット・ノンターゲットメタボローム分析を行った。さらに、試験醸造酒については、定量的記述分析法（QDA 法）による官能評価を行った。これらのデータにより orthogonal projections to latent structures (OPLS) 回帰分析を行い、各官能評価項目に対する分析値からの予測モデルを構築した。
【結果】試験醸造酒の官能評価得点の予測値と実測値を比較したところ、「カプロン酸エチル：$R^2 = 0.72$」や「甘味：$R^2 = 0.81$」、「渋・刺激味：$R^2 = 0.61$」など 13 項目中 11 項目において $R^2 > 0.6$ でモデル化できた。このモデルを用いることで、各種分析値から次世代酒米で醸成した清酒の風味を表現可能であることが示された。加えて、OPLS 回帰以外にもサポートベクターマシン回帰など他の機械学習手法についても検討を行った。また、一般に、小仕込みによる清酒は官能評価も難しく、酒造技術者に製成酒の特徴を分かりやすく伝えることが難しい。そこで、本モデルを小仕込みに応用した例についても紹介する。
本研究は、農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）」の支援を受けて実施した。

Progressive brewing and analytical techniques reveal flavor of sake made from next generation sake rice

○Takuji Kobayashi[1], Yuma Iwahashi[2], Yuko Komatsu[1], Tsutomu Kumazaki[1], Rui Minakami[1], Shiori Kodama[1], Liyun Liu[1], Hiroshi Kamigakiuchi[1], Hongbin Bou[1], Tadafumi Ohsaku[1], Ryota Saito[1], Hisashi Yazawa[1], Masayuki Takahashi[1], Ken Oda[1], Masaki Okuda[1], Junya Tanaka[3], Hideyuki Arima[3], Tamami Kiyono[4], Kiyoo Hirooka[4], Kazuhiro Iwashita[1,2]
([1]NRIB, [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [3]Yamaguchi prefectural Industrial Technol. Inst., [4]KITC)

Key words next generation sake rice, metabolome, sensory analysis, machine learning

2Hp10 協会系酵母と系統の異なる清酒酵母に見られる葉酸の高蓄積とそれを維持する機構

○柴田 裕介[1], 山田 翼[1], 藤井 力[2,3], 赤尾 健[2], 五島 徹也[2], 高橋 俊成[1], 田中 伸哉[1]
（[1]菊正宗酒造, [2]酒総研, [3]福島大）
y-shibata@kikumasamune.co.jp

【目的】全国の清酒粕の成分分析の結果、協会系酵母と系統が異なる清酒酵母 Km67 株を使用した清酒粕には葉酸が豊富に含まれていることが明らかとなった。葉酸は水溶性ビタミン(B9)に分類され、核酸の合成やアミノ酸代謝に関与し、貧血、鬱病、大腸ガンなどの発症リスクを軽減することが知られている。当社ではこれまでに、Km67 株の *HMT1* 遺伝子が酒粕中の葉酸高含有に関与していることや、Km67 株の場合、醪醪が停止してからも醪中の葉酸含量が減少せずに維持されていることを明らかにしてきた[1]。今回は店頭に並んでいる酒粕を想定し、Km67 株の酒粕を 4℃で保存した際の葉酸の保存性や葉酸代謝関連物質含量の変化を調べたので報告する。
【方法及び結果】Km67 株と K701 株でそれぞれ仕込んだ醪を上槽し、得られた酒粕を 4℃で保存し続け、1 週間ごとに葉酸含量を測定した。その結果、K701 株に関しては、上槽後から 4℃での保存期間が長くなるにつれて次第に酒粕の葉酸含量が減少し、12 週間の保存で検出されなくなった。一方、Km67 株の場合、4℃での保存期間が 6 週間になっても葉酸含量がほとんど減少せず、12 週間の保存後も乾燥酒粕 100g あたりまだ約 400μg の葉酸が残っていた。この Km67 株の高蓄積した葉酸を維持する機構の解明のため、同じ酒粕中の葉酸代謝関連物質であるメチオニン、*S*-アデノシルメチオニン(SAM)、*S*-アデノシル-L-ホモシステイン(SAH)、ホモシステインの含量を測定し、比較した。その結果、メチオニン、SAM、ホモシステイン含量の変遷に菌株間で違いが見られ、特に Km67 株の酒粕では、K701 株と比べて、4℃保存中にホモシステインが多く蓄積していた。このことから、Km67 株はホモシステインをメチオニンに変換するために必要な葉酸も多く蓄積し続けているのではないかと推察される。
1）柴田ら： 日本生物工学会大会講演要旨集 p143 (2017)

Mechanism of accumulating and holding large amounts of folates in sake yeast not belonging to Kyokai yeasts

○Yusuke Shibata[1], Tasuku Yamada[1], Tsutomu Fujii[2,3], Takeshi Akao[2], Tetsuya Goshima[2], Toshinari Takahashi[1], Nobuchika Tanaka[1]
([1]Kiku-Masamune Sake Brewing Co., Ltd., [2]NRIB, [3]Fukushima Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, folate, pressed sake cake, methionine cycle

2Hp11 清酒酵母における老香を発生させにくい変異株の育種

○槇本 純[1], 井上 豊久[1], 池田 優理子[2], 神田 涼子[2], 磯谷 敦子[2], 藤井 力[2], 中江 貴司[1]
（[1]日本盛, [2]酒総研）
jun.makimoto@nihonsakari.co.jp

老香は清酒の貯蔵劣化臭であり、その主成分はジメチルトリスルフィド(DMTS)である。磯谷らは清酒における DMTS の主要な前駆物質として 1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl) pentan-3-one (DMTS-P1)を同定し[1]、酵母のメチオニン再生経路の遺伝子である MRI1, MDE1 のいずれかを破壊した株を用いることで清酒中の DMTS-P1 及び DMTS 生成ポテンシャル（清酒を 70℃で 7 日間貯蔵後の DMTS 量）が顕著に減少することを明らかにした[2]。これまでに我々は mri1, mde1 変異株のスクリーニング方法を確立し、清酒酵母協会 701 号(K701)の一倍体から DMTS-P1 生産能の低い mri1, mde1 変異株を各 1 株ずつ取得している[3]。さらに、mde1 変異株については、戻し交雑により、mde1 ホモ変異型の交雑株を取得した[4]。
今回は、発酵能の良い mri1 変異株の取得を目的とし、戻し交雑によって mri1 ホモ変異型二倍体株の取得を試みた。その結果、5 株のホモ変異型の交雑株を取得し、これらについて清酒小仕込試験を実施したところ、K701 と遜色のない清酒が得られた。製成酒の DMTS-P1 濃度、DMTS 生成ポテンシャルは対照の K701 の製成酒と比べて顕著に低かった。さらに、取得した株の中で小仕込結果の良好であった 1 株を用いて全ゲノムシーケンスを実施し、MRI1 以外に FAS2, ARO9, KGD1 などいくつかの遺伝子にホモ接合型の変異が生じていることがわかった。

1)磯谷ら, 日本醸造協会誌, 104(12), 919 (2009)
2) Wakabayashi et al., J. Biosci. Bioeng., 116, 475 (2013)
3)若林ら, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 講演番号 3C23a07
4)若林ら, 第 69 回生物工学会大会, 講演番号 4P-H086

Cross breeding of sake yeast mutants which resist generating the deterioration

○Jun Makimoto[1], Toyohisa Inoue[1], Yuriko Ikeda[2], Ryoko Kanda[2], Atsuko Isogai[2], Tsutomu Fujii[2], Takashi Nakae[1]
([1]Nihonsakari Co.,Ltd., [2]NRIB)

Key words dimethy trisulfide, hineka, sake yeast, mutant

2Hp12 老香前駆体低生産性酵母からの自然突然変異カプロン酸エチル高生産性株の取得

○池田 優理子[1], 神田 涼子[1], 磯谷 敦子[1], 藤井 力[1], 井上 豊久[2], 中江 貴司[2]
（[1]酒総研, [2]日本盛）
isogai@nrib.go.jp

清酒の貯蔵劣化臭である老香（ひねか）の主要成分はジメチルトリスルフィド（DMTS）であり、その前駆体（DMTS-P1）の生成には、酵母の *MRI1* 及び *MDE1* 遺伝子が関与する。本研究では、老香を生じにくい吟醸酒用酵母の取得を目的として、前演者の取得した K701 由来の *mri1* ホモ変異型二倍体株を用い、自然突然変異によるカプロン酸エチル高生産株の育種を行った。
YPD 培地の C 源をグリセロールに置換し、セルレニン（1 μg/mL）を添加した培地に *mri1* ホモ変異型二倍体株（親株）を播種し、セルレニン耐性株を 16 株取得した。このうち 14 株は、液体培養において K1801 よりカプロン酸エチル生産性が高かった。醸造特性を確認するために、これらの候補株と親株、K701、K1801 を用いて小規模醸造試験を行った。試験は α 米と乾燥麹を用いて 2 回行い、1 回目は候補株 14 株を用いて一段仕込みを、2 回目は候補株 6 株を用いて三段仕込みを行った。2 回目の試験では 45℃42 日間貯蔵前後の官能評価も行った。
候補株は、発酵経過、製成酒の一般成分（アルコール度、日本酒度、酸度、アミノ酸度）、有機酸及びアミノ酸組成が親株とほぼ変わらず、DMTS-P1 濃度及び DMTS 生成ポテンシャル（清酒を 70℃で 7 日間貯蔵後の DMTS 量）も、親株と同様に大幅に低減していた。候補株の製成酒は、親株や K701 はもちろん、カプロン酸エチル高生産株である K1801 の製成酒に比べてもカプロン酸エチル濃度が高かった。官能評価では、貯蔵前の製成酒は味、香り、総合評価ともに有意差は見られなかったが、貯蔵後、候補株は親株と同様、製成酒の老香や硫黄様の香りが K701 と K1801 に比べ有意に低く、総合評価も良い傾向であった。

Breeding of *Ginjo sake* yeasts which resist generating the deterioration flavor *hineka* during the storage

○Yuriko Ikeda[1], Ryoko Kanda[1], Atsuko Isogai[1], Tsutomu Fujii[1], Toyohisa Inoue[2], Takashi Nakae[2]
([1]NRIB, [2]Nihonsakari Co., Ltd.)

Key words dimethyl trisulfide, ethyl caproate, hineka, sake yeast

2Hp13 協会系酵母と近縁な広島 6 号酵母の特性解析及びその活用

○山﨑 梨沙 [1,2,3], 五島 徹也 [2], 大場 健司 [3], 大土井 律之 [3], 赤尾 健 [1,2]
([1]酒総研, [2]広島大院・統合生命科学, [3]広島総合技術研・食品工業技術セ)
akao_t@nrib.go.jp

【背景・目的】
広島県ではこれまでに，温暖な気候に適した独自の清酒酵母が分離・選抜され，清酒醸造に用いられている。最古の分離株として，大正 15 年に県内酒造会社の醪から分離された広島 6 号（H6）酵母がある。昭和 2 年より頒布をされていたとの記録があるが，現在は使用されていない。以降は日本醸造協会より頒布されている協会 7 号酵母（K7）を代表とする優れた特性を持った協会系酵母が広まり，現在も主流となっている。H6 の遺伝的背景の調査や協会系酵母との特性比較を行い，清酒醸造に活用できるよう改良を行うことを目的として研究を行っている。

【方法・結果】
出芽酵母の中での H6 の系統的な位置付けを明らかにするために，全ゲノム解析結果を用いて系統樹を作成したところ，H6 は，協会系酵母群と同じ枝に位置し，少し離れて分岐していた。協会系酵母の高発酵性の原因とされている機能欠失変異 *rim15*^{5055insA} 及び *msn4*^{C1540T} についてタイピングを行ったところ，*msn4*^{C1540T} のみを有していた。2 つの変異の片方のみを有する菌株の初めての例である。
さらに，清酒小仕込み試験を行ったところ，協会系酵母と比較してやや緩慢な発酵経過を取ったが，清酒醸造に十分に使用できる発酵力を有していた。興味深いことに，清酒の貯蔵劣化臭である老香の主要成分である DMTS の既知前駆体の生成が少なく，製成酒の DMTS 生成ポテンシャルも低いという特徴が見られた。
一方，多くの協会系酵母では，胞子形成能を持たず，ごくまれに生成した胞子もほとんど発芽しないことが知られている。H6 の胞子形成能について調べたところ，正常な胞子を形成し，四胞子分離が可能であった。
現在，これまで明らかになった H6 の特性の詳細な解析を行うと同時に，他の菌株にない特性を生かし，遺伝子組換えや変異処理に頼らない，新規清酒酵母菌株の育種を行っている。

CCharacterization of sake yeast strain Hiroshima no.6 that is closely-related to Kyokai sake yeast strains .

○Risa Yamasaki[1,2,3], Tetsuya Goshima[2], Kenji Oba[3], Ritsushi Ohdoi[3], Takeshi Akao[1,2]
([1]NRIB, [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [3]Hiroshima Prefectural Res.Inst.Food Technol. Res.Center)

Key words sake yeast, phylogenetic tree, sporulation

2Hp14 白神こだま酵母より分離した高い冷凍耐性を有する胞子クローンの解析

○福田 まみ [1], 浅内 由佳 [2], 芦崎 瑞稀 [2], 柴田 友香莉 [2], 高橋 慶太郎 [3], 中沢 伸重 [1,2]
([1]秋田県大院・生資, [2]秋田県大・生資, [3]秋田総食研)
nnakazawa@akita-pu.ac.jp

1997 年に白神山地の腐葉土から採取された白神こだま酵母の胞子クローンである IB1411 株は、高い冷凍耐性を示すことを見出した。本研究では IB1411 株の冷凍耐性メカニズムの解析を試みた。
冷凍処理により転写が上昇すると報告されている *CTT1*、*TPS1* および *HSP104* 遺伝子の転写量を調べたところ、冷凍処理により全ての遺伝子の転写量は実験室株のそれの 2～5 倍であった。次に、IB1411 株を種々のストレス耐性試験に供し、高い熱ショック耐性を有していることを明らかにした。そこで、熱ショック耐性に関与している *HSP104* あるいは *BTN2* 遺伝子の破壊株の冷凍条件下での生存率を調べた。どちらの破壊株も野生型株に比べ、生存率が 30～50％低下した。Hsp104 タンパク質は熱ショックを与えると顆粒を形成することが報告されている。冷凍処理下で Hsp104 タンパク質が顆粒を形成しているかを観察した結果、IB1411 株の顆粒形成率は実験室株のそれの約 2 倍であった。このことより、冷凍耐性に対して Hsp104 タンパク質が関与していることが示された。*HSP104* 遺伝子の転写因子である Msn2 タンパク質の核局在率の観察により、冷凍処理の有無に関わらず核局在率は約 80％と非常に高いことが分かった。また、Msn2 タンパク質は PKA 経路によって負に制御されていることから、PKA 活性が低下しているかを検討した。その結果、冷凍解凍後の IB1411 株の PKA 活性は実験室株のそれと比較して低く、このことは、PKA 活性の低下が IB1411 株の高い冷凍耐性の一因であることを示している。

Mechanism of high tolerance to freeze-thaw stress in a spore clone isolated Shirakami kodama yeast

○Mami Fukuda[1], Yuka Asanai[2], Mizuki Ashizaki[2], Yukari Shibata[2], Keitaro Takahashi[3], Nobushige Nakazawa[1,2]
([1]Grad. Sch. Bioresour. Sci., Akita Pref. Univ., [2]Biotech Biore., Akita Pref. Univ., [3]ARIF)

Key words Shirakami kodama yeast, freeze-thaw, Hsp104

2Hp15 清酒酵母育種に向けた 4-VG 非生成株の判別方法の開発と自然環境における非生成株の分布と遺伝的解析

○奥村 真衣 [1], 吉村 明浩 [3], 澤井 美伯 [3], 正木 和夫 [3,4], 向田 潤 [5], 三井 亮司 [5], 島田 昌也 [1,2], 早川 享志 [1,2], 中川 智行 [1,2]
([1]岐阜大院・自然科学, [2]岐阜大・応生科, [3]岐阜県食品科学研, [4]酒総研, [5]岡山理大・理)
t_nakaga@gifu-u.ac.jp

【目的】
4-ビニルグアイアコール（4-VG）は、煙様・スパイス様の香りをもつことから、清酒のオフフレーバーの一つに数えられる。一般に、4-VG はフェルラ酸の脱炭酸反応で生成されるが、本反応は主に出芽酵母の Pad1p/Fdc1p により触媒される。きょうかい酵母は *FDC1* のナンセンス突然変異のため 4-VG 生成能をもたないが、野生酵母による清酒醸造ではしばしば 4-VG 生成がみられ、その品質を著しく低下させている。つまり 4-VG 生成は野生酵母の清酒醸造の能力を左右する最重要因子の一つである。しかし、野生酵母における 4-VG 生成株の見分け方や自然界における分布などの知見はほとんどない。そこで、本研究では野生酵母の 4-VG 生成の判別方法、さらには 4-VG 生成能の分布と遺伝系統を示すことを目指した。
【結果・考察】
まず、4-VG 生成能の簡易的な判別法の開発を行った。フェルラ酸の吸収極大である 322 nm にて YNB 培地中のフェルラ酸の定量を行うことで、その分解量から 4-VG 生成能を推測できた。また、Pad1p/Fdc1p 遺伝子欠損株が桂皮酸に対する感受性を示したことから、4-VG 非生成株の桂皮酸に対する感受性を観察したところ、桂皮酸存在下ではプチコロニーを形成した。このように、桂皮酸に対する感受性により 4-VG 非生成株を判別できる可能性を示した。一方、野生酵母における 4-VG 生成能を観察したところ、59 株中 50 株が 4-VG 生成能をもち、非生成株は 9 株であった。そこで、4-VG 非生成株における *FDC1* の変異点を観察したところ、ナンセンス突然変異を生じている 2 株と変異点がない 7 株が存在した。これらより、自然界において *fdc1* 欠損による 4-VG 非生成株は少数であり、その他因子の変異による 4-VG 非生成株も存在する可能性が示された。

Development of method for detection of 4-VG non-producing *sake* yeast strain and their distribution in natural environment

○Mai Okumura[1], Akihiro Yoshimura[3], Yoshinori Sawai[3], Kazuo Masaki[3,4], Jun Mukaida[5], Ryoji Mitsui[5], Masaya Shimada[1,2], Takashi Hayakawa[1,2], Tomoyuki Nakagawa[1,2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Gifu Univ., [2]Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [3]Gifu Pref. Res. Inst. Food Sci., [4]NRIB, [5]Fac. Sci., Okayama Univ. Sci.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, sake, 4-VG, ferulic acid

2Hp16 分離酵母 AB2 および SUNF5 株の同定と醸造特性

○野地 秀和 [1], 本間 裕人 [2], 徳田 宏晴 [2], 數岡 孝幸 [2]
([1]東農大院・醸造, [2]東農大・醸造)
t3kazuok@nodai.ac.jp

【目的】清酒製造用酵母として、日本醸造協会から頒布されているきょうかい酵母が広く用いられている。きょうかい酵母は、醪からの分離や育種によって取得された優れた醸造特性を有している酵母である。一方で、近年の消費者の嗜好の多様化に伴い、酒質の多様化が求められている。それに対応するため、新規清酒製造用酵母の分離や既存酵母からの育種が試みられている。本研究では、自然界からの分離株であり、清酒醪で高いアルコール発酵性を示す AB2 株および SUNF5 株の同定とそれらの醸造特性解明を目的としている。
【方法】AB2 株および SUNF5 株の糖の発酵性および資化性、硝酸塩資化性、ビタミン要求性、TTC 還元性、Yeastcidin 耐性などの生理学的諸性質を試験するとともに、26S rDNA-D1/D2 領域と ITS 領域の塩基配列を用いた分子系統解析を行い、同定を行った。次に、総米 600 g の三段仕込み（麹歩合 23%、汲水歩合 150%）を行ない、醪育成中の有機酸濃度および香気成分濃度の推移を対照株きょうかい 901 号（K901）株と比較することで醸造特性を調査した。
【結果】生理学的性質をきょうかい 9 号（K9）株と比較すると、AB2 株および SUNF5 株は α-メチル-D-グルコシドを資化しないが、試験した他の性質は K9 株と同じであった。また分子系統解析の結果、K9 株と AB2 株および SUNF5 株は同じ系統枝に位置したことから、AB2 株および SUNF5 株はともに *S. cerevisiae* と強く推定された。次に醪育成過程における有機酸組成変化を調査したところ、SUNF5 株は醪育成全期間において K901 株よりもピルビン酸およびリンゴ酸が低濃度で推移した。一方で、AB2 株は K901 株よりもリンゴ酸、コハク酸および乳酸が低濃度で推移した。香気成分については K901 株と比較して AB2 株はカプロン酸エチル高生成であり、酢酸エチル、酢酸イソアミル、酢酸イソブチルおよびイソブチルアルコール低生成であった。

Identifications and brewing characteristics of the isolates, AB2 and SUNF5

○Hidekazu Noji[1], Hiroto Homma[2], Hiroharu Tokuda[2], Takayuki Kazuoka[2]
([1]Dept. Brewing and Fermentation, Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Brewing and Fermentation, Tokyo Univ. Agric.)

Key words sake yeast, sake

2Hp17 カプロン酸エチル高生産清酒酵母の育種と醸造特性の解析

○大橋 正孝[1], 都築 正男[1], 清水 浩美[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奈良県独自の菌株開発を目指している。これまでの研究で、野生酵母から清酒の醸造に適した酵母の分離（山乃かみ酵母）や、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。山乃かみ酵母は、奈良県桜井市大神神社境内のささゆりの花から分離した酵母で、その酵母で醸造した清酒には、協会酵母で醸造した清酒よりも、リンゴ酸、イソアミルアルコールを約 2 倍多く含んでおり、また、オルニチン蓄積酵母で醸造した清酒には、オルニチンを約 3 倍多く含んでいる。これらの酵母は、それぞれ特徴を持つが、清酒の良い香りとされる吟醸香の成分であるカプロン酸エチルの生産性は高くない。そこで、酵母の付加価値を高めるために、これらの酵母を親株として、セルレニンをスクリーニングに使用し、カプロン酸エチルの前駆物質であるカプロン酸を細胞内に高蓄積する変異株の分離することによって、カプロン酸エチル高生産清酒酵母の育種を検討した。
【方法及び結果】山乃かみ酵母を培養し、セルレニン及びプロリンアナログ（アゼチジン-2-カルボン酸：AZC）を含有する最少（SD）寒天培地で生育できる株を分離した。一方、オルニチン蓄積酵母は、EMS 処理後、セルレニン及び AZC を含む 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、細胞内のカプロン酸含量をキャピラリー電気泳動装置で測定した。その結果、親株よりも細胞内カプロン酸含量が増加した株を 8 株分離した。現在、この変異株を用いて、総米 46g の小仕込み試験を行い、清酒中の香気成分などを含む醸造特性を解析している。

Breeding of Japanese sake yeast mutants with enhanced ethyl caproate productivity and analysis of their fermentation profiles

○Masataka Ohashi[1], Masao Tsuduki[1], Hiromi Shimizu[1], Daisuke Watanabe[2], Hiroshi Takagi[2]
([1]Nara Pref. Inst. Ind. Dev., [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words Japanese sake yeast, Ethyl caproate production

2Hp18 ハイビスカス花から採取した泡盛酵母とその変異株の比較ゲノム解析を用いた特徴づけ

○阿部 峻之[1], 豊川 洋一[2], 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

泡盛は 600 年を超える歴史を持つ日本最古の蒸留酒であり、沖縄県の代表的な伝統食品である。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。これまでに、南国のイメージであるハイビスカス花を試料として泡盛製造に実用可能な酵母 HC02-5-2 株を単離し、さらに HC02-5-2 を親株として特定の香気成分を多く産生する T25 株を得た。今回、HC02-5-2 と T25 の特徴を明らかにするために次世代シーケンサーを用いた解析を行った。HC02-5-2 株の詳細な系統解析を目的として得られた配列についてデータベース（Sequence Read Archive）より酵母株のリード配列情報を取得し、比較ゲノム解析に供した。S288c 株を参照配列とした変異情報から Single Nucleotide polymorphisms (SNPs) を抽出しこれらを比較することにより系統樹を作成した。その結果、パン酵母やワイン酵母など単離源が類似する酵母株は系統樹上でクレードを作る傾向にあることが確認できた。系統樹において、泡盛 101 号酵母は清酒酵母のクレードに含まれる一方、HC-02-5-2 および T25 はワイン酵母のクレードに含まれた。一方、S288c 株を参照配列として、泡盛 101 号、HC02-5-2 および T25 のゲノム配を比較したところ、香気成分の特徴を説明しうる変異が遺伝子上に見出された。以上のことから、比較解析によりそれぞれの酵母株が有する醸造特性の背景となりうるゲノムの特徴づけが可能であることが分かった。本研究において用いられた手法は単離された産業微生物株の分類や特徴づけにおいて、酵母にとどまらず応用可能である。
Abe *et al*., Front Genet (2019) (in press)

Comparative Genomics of a New *Saccharomyces cerevisiae* Isolated from Hibiscus Flower and Its Mutant for Awamori Brewing

○Takayuki Abe[1], Yoichi Toyokawa[2], Daisuke Watanabe[2], Hiroshi Takagi[2], Masatoshi Tsukahara[1]
([1]Biojet, [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Awamori, genome

2Ip01 Baby Spinach アプタマーに対する三重鎖形成配列の付加による蛍光強度の増強および pH 応答性蛍光アプタマーの開発

○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可能な核酸リガンドである。その中でも Baby Spinach アプタマーは 3'5'-ジフルオロ-4-ヒドロキシベンジリデンイミダゾリノンに対し結合し、その微弱な蛍光を増強する RNA アプタマーである。このような蛍光発光アプタマーは、細胞内において持続的に転写させ続けることで特定の物質や核酸配列の挙動を継時的に観察することが可能である。しかし、正確に標的を追跡するには蛍光強度の増強が求められている。また、pH をはじめとする細胞内環境により蛍光強度が変化するアプタマーを設計することで、細胞内環境の詳細な解析が可能になる。
これまでに、Baby Spinach アプタマーがグアニン四重鎖構造 (G4) という 4 つのグアニンから形成される G-カルテット構造が重なった構造を有することが明らかとなっている。一方、核酸の高次構造のひとつである三重鎖構造は低い pH 環境下においてフーグスティーン塩基対を介して安定に形成される構造であり、pH に応答した構造変化を引き起こすことができる。また、これまでに G4 と三重鎖構造の両方を有するアプタマーが獲得されており、G4 が三重鎖構造により安定化される可能性があると考えられる。
そこで本研究では、G4 形成アプタマーである Baby Spinach アプタマーに対し三重鎖形成配列を融合し、蛍光発光強度の増強および pH 応答性の付与を試みた。最初に Baby Spinach アプタマーに対して種々の三重鎖形成配列を融合し評価した結果、アデニンとウラシルをそれぞれ 10 塩基あるいは 20 塩基含む三重鎖形成配列を融合した場合に蛍光強度が 5 倍程度増強した。次に、pH6~pH10 の環境下における蛍光強度を評価した結果、pH の上昇に伴う蛍光強度の減少が確認された。これより Baby Spinach アプタマーに対して三重鎖形成配列を融合することで、蛍光発光強度の増強および pH 応答性の付与に成功した。

Development of pH-responsible fluorescence aptamer by fusing triplex forming sequence to Baby Spinach aptamer

○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, Fluorescence aptamer, G-quadruplex, triplex

2Ip02 G カルテット構造による CpG ODN の免疫活性化能の向上

○山崎 智彦[1,2], 星 和明[1], Tu Thi Tram Anh[1,2], 塚越 かおり[3], 津川 若子[3], 早出 広司[4], 池袋 一典[3]
（[1]物材研・機能性材料, [2]北大院・生命科学, [3]農工大院・工, [4]Joint Dept. Biomed. Eng., Univ. North Carolina at Chapel Hill）
yamazaki.tomohiko@nims.go.jp

細菌やウィルスの DNA に存在する非メチル化シトシン-リン酸-グアニン配列（CpG）モチーフを含む合成オリゴデオキシリボヌクレオチド（ODN）は自然免疫受容体であるトール様受容体 9（TLR9）のアゴニストとして機能し、B 細胞や樹状細胞からの炎症性サイトカインや I 型インターフェロン(IFN)の発現を誘導し、免疫系を活性化する。ODN は核酸分解酵素により容易に分解されることから、ワクチンアジュバントなどの免疫賦活剤としての体内での利用に問題がある。そのため、現在までに報告されている CpG ODN の大部分は、ホスホジエステル（PD）骨格をホスホロチオエート（PS）化することにより、核酸分解酵素に対する耐性が増強されている。しかしながら、PS 化による急性毒性やタンパク質への非特異的吸着による副作用が懸念される。
我々は CpG ODNs の安定性を増強させるため、グアニン四重鎖（G4）構造に着目した。
G4 構造を形成する配列はテロメアなどに存在し、核酸の修飾や分解を防ぐ役割がある。CpG ODNs に G4 構造を形成させるため、CpG モチーフ間にポリグアニン配列を導入した G4-CpG ODN を開発した。我々の開発した G4-CpG ODN は円二色性スペクトル測定、ポリアクリルアミドゲル電気泳動ならびに融解曲線解析から、パラレル型の分子間 G4 構造を形成することが示唆された。G4-CpG ODN は G4 構造を形成しない ODN と比較して血清中での高い安定性を示し、またヒト B 細胞株への取込量が増加した。免疫沈降法により G4-CpG ODN が TLR9 に結合すること、レポーターアッセイにより TLR9 を介して NF- k B シグナルを活性化することが示された。G4-CpG ODN の免疫活性化能を B 細胞株と末梢血単核球細胞を用いて評価した結果、G4-CpG ODN は免疫活性化の指標となる IL-6 と IFN ガンマを高く誘導することが示された。

Ref) K. Hoshi, T. Yamazaki* et.al., Nucleic Acid Therapeutics (in press)

G-quadruplex structure improves the immunostimulatory effects of CpG oligonucleotides

○Tomohiko Yamazaki[1,2], Kazuaki Hoshi[1], Thi Tram Anh Tu[1,2], Kaori Tsukakoshi[3], Wakako Tsugawa[3], Koji Sode[4], Kazunori Ikebukuro[3]
([1]RCFM, Natl. Inst. Mater. Sci. (NIMS), [2]Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [4]Joint Dept. Biomed. Eng., Univ. North Carolina at Chapel Hill)

Key words adjuvant, oligodeoxynucleotides, G-quadruplex, toll like receptor

2Ip03 GMD-GFT 二重破壊によりフコース結合糖鎖を検出限界以下にした CHO 細胞の樹立と解析

○武智 大樹[1], 岩崎 将士[1], 三﨑 亮[1], 大橋 貴生[1,2], 藤山 和仁[1]
（[1]阪大・生工国際セ, [2]摂南大院・理工）
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

【背景および目的】
近年バイオ医薬品の市場が拡大し続けている。バイオ医薬品の多くが翻訳後修飾によりタンパク質に糖鎖が結合した糖タンパク質であり、その糖鎖構造がタンパク質の安定性、免疫原性、生理活性に多大な影響を及ぼすことが知られている。特に、バイオ医薬品の代表である抗体では、Fc 領域に付加した *N*-結合型糖鎖への α-1,6-フコース結合を除去することで抗体依存性細胞障害(ADCC)活性が大きく上昇することが知られている。そこで我々は、組換えタンパク質生産のプラットフォームであるチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いて、ゲノム編集技術を利用してフコシル化糖鎖を持たない CHO 細胞を構築した。しかし、糖鎖のフコシル化阻害が細胞の性質にどのような影響を与えるのかよく分かっていないため、当該変異株の糖鎖構造、生育速度、他の糖鎖修飾関連酵素発現量の解析を行った。
【方法および結果】
CRISPR/Cas9n ゲノム編集技術を用いて、GDP-フコースを合成する GDP-マンノース-4,6-デヒドラターゼ(GMD)遺伝子をノックアウトした単独破壊株(CHO-K1-D20 株)および当該基質をゴルジ体内に輸送する GDP-フコートランスポーター(GFT)遺伝子を破壊した二重破壊株(CHO-K1-D20T16 株)を構築した。接着型および浮遊型の野生株、CHO-K1-D20、D20T16 の細胞株よりそれぞれ全可溶性タンパク質糖鎖を調製し、HPLC および質量分析器を用いて糖鎖構造を解析した結果、フコシル化糖鎖が検出されない CHO-K1-D20T16 株の樹立に成功した。また初期細胞数を均一にして生育速度を計測した結果、遺伝子破壊による影響は見られなかった。また、qRT-PCR を行い mRNA の発現量を比較した結果、細胞の浮遊化により個々のフコシル化関連酵素発現量が変化することが分かった。
本研究は、AMED「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の助成を受けて行われた。

Fucosylated N-glycan structures undetected in the characterization of newly established GMD-GFT double knockout CHO cell line

○Hiroki Takechi[1], Masashi Iwasaki[1], Ryo Misaki[1], Takao Ohashi[1,2], Kazuhito Fujiyama[1]
([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

Key words Chinese hamster ovary, Fucose, Glycan

2Ip04 流路チップによるナノサイズダブルエマルジョンの連続生産系の構築および評価

○牧野 祥嗣, 佐野 七海, 伊藤 伸哉
（富山県大・工）
makino@pu-toyama.ac.jp

【目的】リポソームまたはダブルエマルジョンは、ドラッグデリバリーシステム（DDS）担体として優れる。その表面特性、サイズ等を制御すれば、より高い機能性の付与が可能である。表面をポリエチレングリコール（PEG）等により修飾すれば、生体内の排除系を回避するステルス能が備わる。また、表面に組織、細胞特異的な分子を修飾すれば、病巣への特異的送達を実現するアクティブターゲティング（AT）型とできる。そして、がんターゲティング担体を指向する場合には、EPR 効果（Enhanced Permeability and Retention effect）が期待できるサイズへの制御が有効である。これらの複数の特性制御が可能な、簡単かつ連続的な粒子生成系の構築により、機能性リポソームの開発促進が期待される。そこで我々は、流路チップを用いて高機能性リポソームまたはダブルエマルジョンを連続的に生成する系の構築を試みた。
【方法・結果】まず、water-in-oil（w/o）エマルジョンから water-in-oil-in-water（w/o/w）エマルジョンを段階的に作成する方法の検討を行った。その結果、直径 100～300 nm の w/o/w エマルジョンの簡単が操作（ピペッティング）で生成でき、高い水溶性試薬の内包率も確認された。そこで、この条件をもとに w/o/w エマルジョンの生成までを連続的に行えるようなチップを作成した。w/o エマルジョン構築用チャンバーの下流に w/o/w エマルジョン構築用チャンバーを配置した流路チップを、加工したアクリル板を重層し圧着して作成した。内水相、油相、外水相を一定流速で流したところ、ピペッティング操作時と同様の外径 100～300 nm の粒子を確認することができた。さらに、修飾官能基を持つものを含む PEG 修飾脂質を溶解した外水相を使用したところ、w/o/w エマルジョン表面への修飾が確認された。

Evaluation of double emulsion formation by continuous flow fluidic devices

○Yoshihide Makino, Nanami Sano, Nobuya Itoh
(Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

Key words lipid vesicle, microfluidic device, drug delivery system, double emulsion

2Ip05 ビタミン E 疎水部構造の違いと膜相分離

○中谷 祐将[1], 下川 直史[1], 浦野 泰臣[2], 野口 範子[2], 高木 昌宏[1]
（[1]北陸先端大・マテリアル, [2]同志社大・医生命システム）
takagi@jaist.ac.jp

【背景と目的】ビタミンＥは、生体内で α-tocopherol(toc)として最も多く存在する。構造上類似する α-tocotrienol(toc3)も存在するが、機能に違いがある。Toc は小胞体ストレス関与の神経細胞死を抑制する効果があり、toc3 にはガン細胞の増殖抑制効果がある。Toc と toc3 は、脂質部分の構造のみが異なるため、機能の差に膜相互作用が関係していると考えられた。生体膜には、飽和脂質とコレステロール(Chol)を含む相分離構造（ラフト）が存在し、細胞信号伝達に重要である考えられている。本研究では生体模倣膜で再現した相分離構造（液体秩序相、固体秩序相）に対する toc と toc3 の影響の違いを明らかにすることを目的としている。
【方法】飽和脂質、不飽和脂質、コレステロールにビタミンＥ（toc, toc3）を添加し、生体模倣膜を作成し、顕微鏡観察結果に基づいて、相分離構造形成率の測定をおこなった。相分離構造の揺らぎのデータを画像解析し、線張力を測定した。リン脂質とビタミンＥの親和性を定量的に解析するために、示差走査熱測定を行った。
【結果と考察】ビタミンＥ添加により chol を含まない固体秩序相の形成率の低下がみられ、示差走査熱測定では相転移温度の低下が認められたため、ビタミンＥは固体秩序相に入り、不安定化させることがわかった。さらに、toc は toc3 より、強く固体秩序相形成を阻害することがわかった。小胞体膜ではコレステロール含量が少なく、固体秩序相が存在すると考えられ、また変性タンパク質は、固体秩序相に蓄積する。このことは、toc が toc3 よりも小胞体ストレスによる細胞死を抑制できる事と関連していると考えられた。また、toc は、chol を含む液体秩序相の形成には影響しないが、線張力を低下させていることがわかった。

Effect of vitamin E (tocopherol and tocotrienol) on membrane phase-separation

○Yusuke Nakatani[1], Naofumi Shimokawa[1], Yasuomi Urano[2], Noriko Noguchi[2], Masahiro Takagi[1]
([1]Sch. Mater. Sci., JAIST, [2]Dept. Med Life Systems., Doshisha Univ.)

Key words alpha-tocopherol, alpha-tocotrienol, Liquid-ordered domain, Solid-ordered domain

2Ip06 カチオンの構造に依存した負電荷脂質膜の相分離

○永田 佳嗣[1], 引地 啓太[1], 秀瀬 涼太[2], 藤原 伸介[3], 下川 直史[1], 高木 昌宏[1]
（[1]北陸先端大・マテリアル, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]関西学院大・理工）
takagi@jaist.ac.jp

[背景]
リン脂質が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る。リポソームでの相分離構造は、生体膜のラフト構造と類似しており、相分離における荷電脂質の役割が広く議論されている。本研究では荷電脂質膜において相分離を誘起する塩（金属イオン、ポリアミン等）に注目し、様々な価数や構造を持つ塩を添加した際の相分離挙動を観察した。
[実験方法]
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、組成は DOPS/DPPC/Chol=40:40:20 に固定した。また、塩としてポリアミン(プトレシン二塩酸塩(+2)、スペルミジン三塩酸塩(+3)、スペルミン四塩酸塩(+4)、N4-bis(aminopropyl)spermidine（+5)) を添加した。また比較のため、NaCl(+1)、NH_4Cl(+1)、プロピルアミン塩酸塩(+1)、$MgCl_2$(+2)、$CaCl_2$(+2)、エチレンジアミン塩酸塩(+2)、ヘキサメチレンジアミン二塩酸塩(+2)も用いた。蛍光顕微鏡観察によって相分離構造を観察し、相分離形成率の違いを調べた。
[結果・考察]
リポソームに塩を加えない場合は、負電荷脂質間の静電反発により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。これはカチオンが負電荷脂質に吸着することによって脂質の頭部基の電荷を遮蔽することによるものだと考えられた。価数が大きい場合、またはカチオンサイズが小さい場合に、より低濃度で相分離が観察される傾向があることが分かった。依存性としては価数依存性が非常に強いことがわかった。相分離形成は静電遮蔽だけでなく、膜面へカチオンが吸着した際の、カチオン間の立体反発などに依存していることが示唆された。

Phase separation of negatively charged lipid membranes depending on the structure of the cation

○Yoshitsugu Nagata[1], Keita Hikichi[1], Ryota Hidese[2], Shinsuke Fujiwara[3], Naofumi Shimokawa[1], Masahiro Takagi[1]
([1]Sch. Mater. Sci., JAIST, [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ.)

Key words lipid vesicle, membrane potential, lipid

2Ip07 相模湾由来単離株 51-CS のメンブランベシクルの特性の解析

○福井 瑞季 [1], 倉田 淳志 [2], 三好 柚紀 [3], 山崎 思乃 [4], 今井 友也 [5], 栗原 達夫 [6], 上垣 浩一 [2]
（[1]近畿大院・農, [2]近畿大・農, [3]関西大院・理工, [4]関西大・化生工, [5]京大・生存研, [6]京大・化研）
kurata090401@nara.kindai.ac.jp

【背景と目的】細胞外膜小胞（メンブランベシクル:MV）は、細菌が生産する小胞であり、細胞膜や細胞壁、タンパク質、核酸などが含まれる。現在、我々は乳酸菌やビフィズス菌の MV の構成成分を分析し、免疫細胞に対する生理活性を解明している。本研究では深海底泥由来の細菌群集に注目した。海洋表層から深度 500 m まで MV が存在するが、海洋由来 MV 生産菌はほとんど探索されておらず、MV の特性は検討されていない。そこで MV 生産菌を探索し、得られた単離株の MV を用いて特性の解明を試みた。
【方法】相模トラフ（深度 246 m - 928 m）由来の細菌群集 61 種類を、蛍光色素 FM4-64 を用いて培養液上清中の MV 生産量を比較し、MV 生産菌を探索した。分画遠心分離、限外ろ過、フィルター濾過（0.2 μm）、サイズ排除クロマトグラフィーで単離株の培養液から MV を回収した。電気抵抗ナノパルス法により MV の粒径と個数を測定した。MV 画分中のタンパク質と DNA を、それぞれ N 末端アミノ酸解析と次世代シーケンサーで分析した。免疫細胞を用いて MV 画分により誘導されるサイトカインや抗体を分析した。
【結果と考察】深海由来の細菌群集から MV 生産菌として単離株 51-CS 株、51-WL 株を得た。51-CS 株のゲノム DNA（4,095,040 bp）を解析し、16S rRNA 遺伝子（1551 bp）から 51-CS 株は *Bacillus subtilis* に分類できた。MV の粒径は平均 85.8 ± 35.7 nm で、培養液中には 3.8×10^{10} MVs/mL の MV が含まれた。MV 画分中にはスメアー状の DNA（11,309～100 bp）を検出できた。タンパク質を分析した結果、Serine protease Vpr、Triose phosphate isomerase を MV 画分中に特徴的に見出した。さらに、Raw264 細胞を用いた MV 画分による IL-6 産生の促進、マウスパイエル板細胞を用いた MV 画分による IgA 産生の促進を見出した。本菌株の MV や構成成分をアジュバントとして活用できる可能性が示唆された。

Characteristic analysis of membrane vesicles of a bacterial isolate 51-CS from Sagami Bay

○Mizuki Fukui[1], Atsushi Kurata[2], Yuki Miyoshi[3], Shino Yamasaki-Yashiki[4], Tomoya Imai[5], Tatsuo Kurihara[6], Kouichi Uegaki[2]
([1]Grad. Sch. Agric. Kinki Univ., [2]Fac. Agric., Kinki Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [4]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [5]RISH, Kyoto Univ., [6]Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

Key words membrane vesicles, deep-sea sediment, *Bacillus subtilis* 51-CS, IgA-enhancing effect

2Ip08 大腸菌の *nlpI* 遺伝子が外膜小胞の生産量および特性に与える影響

○尾島 由紘, 児波 克哉, 澤邊 朋美, 東 雅之
（阪市大院・工）
ojima@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

【目的】近年，大腸菌を含むグラム陰性細菌が生産し、外膜やペリプラズムタンパク質から構成される外膜小胞(outer membrane vesicles; OMVs)と呼ばれる細胞外小胞に注目が集まっている．大腸菌の *nlpI* 遺伝子は外膜に存在するリポタンパク質をコードしており，欠損によりペプチドグリカンの分解が促され，OMVs 生産量を増加させる事が報告されている．そこで本研究では，*nlpI* 欠損が OMVs の量的および質的に与える影響について調べた．
【方法および結果】BL21(DE3)と *nlpI* 欠損株の培養上清から超遠心分離により OMVs を回収し，含まれるタンパク質量とリン脂質量を基準として生産量を評価した．タンパク質量は SDS-PAGE に基づく外膜タンパク質のバンド強度から，リン脂質量は蛍光染色試薬 FM4-64 を用いて蛍光強度から比較したところ，タンパク質基準で野生株の約 4 倍，脂質基準では約 2 倍の OMVs 生産量となった．この結果から *nlpI* 遺伝子の欠損が OMVs のタンパク質と脂質の組成に影響を与えた可能性が考えられる．また TEM 観察やナノ粒子マルチアナライザーを用いた分析によって，*nlpI* 欠損株が生産した OMVs は粒子径が小さくなる傾向が示された．以上より，*nlpI* 遺伝子の欠損は大腸菌 OMVs の生産量を増加させるだけでなく，構成成分や粒子径などの特性にも影響を与えることがわかった．

Effects of *nlpI* gene on the production and properties of outer membrane vesicles of *Escherichia coli*

○Yoshihiro Ojima, Katsuya Konami, Tomomi Sawabe, Masayuki Azuma
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words *Escherichia coli*, outer membrane vesicles, *nlpI*

2Ip09 変異導入 LEA ペプチドの発現による大腸菌の酸耐性の向上

○池野 慎也 [1], メトワリー キャレド [1,2]
（[1]九工大院・生体工, [2]アイン シャムス大・農）
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。元来、LEA タンパクは様々なストレス耐性に関与す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 ペプチドの発現により塩・熱ストレス・紫外線耐性が向上することを見出してきた。本研究では、変異を導入した LEA ペプチドを大腸菌に発現させることにより、大腸菌に対する酸耐性の評価をおこなう。
【実験方法と結果】
pET 系の発現ベクターに各 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、細胞内に各 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回収し、異なる pH の LB 培地で培養し、その後コロニーカウント法および WST を用いた細胞活性測定により酸耐性を評価した。その結果、塩基性アミノ酸を導入した変異 LEA ペプチドの発現株において優位にコロニー数および細胞活性が増加した。本結果より、LEA ペプチドが塩、熱ストレス、紫外線ストレスのみならず酸への耐性も強化し、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。

In vivo* expression of LEA peptide for enhancing acid tolerance in *Escherichia coli

○Shinya Ikeno[1], Khaled Metwally[1,2]
([1]Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol., [2]Fac. Agric. Ain Shams Univ.)

Key words *Escherichia coli*, abiotech stress, LEA peptide, acid tolerance

2Ip10 光学的特性を選択可能な金ナノ粒子グリーン合成ペプチドの効率的探索

○田中 祐圭, 林 美伶, 高橋 雄太, 大河内 美奈
（東工大・物質理工）
okochi@chemeng.titech.ac.jp

環境負荷のかからないナノ粒子合成（グリーン合成）技術の開発が求められている。近年、多様性に富むペプチドライブラリーから、温和な条件でナノ粒子合成を触媒する配列が同定されている。そこで本研究ではペプチドアレイ技術を利用し、スポットの色調により合成される粒子の光学特性情報を取得できる、新たな金ナノ粒子合成触媒ペプチドの探索技術の開発を実施した。
これまでに取得している金粒子結合性をもつ 200 配列のペプチドアレイを金イオン溶液に浸漬することで、各ペプチドの粒子合成触媒活性を評価した。本手法では各ペプチドにより合成された粒子が同スポットに沈着し、画像解析により合成された粒子の光学物性情報を取得が期待される。そこで、得られたアレイの画像解析を Image J により行い、粒子合成に伴い各スポットが示す色調をもとに、各ペプチド配列を赤(R)、青(B)、緑(G)に分類した。特徴的な色調を示す粒子を合成するペプチドについては粉末合成し、溶液中で金イオン溶液と混合することでナノ粒子を合成し、紫外可視分光法、透過型電子顕微鏡（TEM）によって粒子のキャラクタリゼーションを行った。
色調の分類により選択されたペプチドを用いて合成された金ナノ粒子の粒径は、R、G、B ペプチドでそれぞれ 8.9±1.9 nm、2.6±1.2 nm、34.7±6.7 nm であり、吸収スペクトルからも形状やサイズが異なることが確認された。また、各色調を示す金ナノ粒子を合成するペプチド配列内のアミノ酸出現頻度の結果から、触媒ペプチド内のヒスチジンの存在により、合成される粒子サイズを規定できる可能性が示唆された。今後、取得したペプチドライブラリーの解析を詳細に実施することで、粒子合成制御のメカニズムを理解することで温和な条件での緻密な粒子合成に向けたペプチド配列のデザインが可能になることが期待される。

Effective peptide screening for optical property selective gold nanoparticle green-synthesis

○Masayoshi Tanaka, Mirei Hayashi, Yuta Takahashi, Mina Okochi
(Sch. Mater. Chem. Technol., Tokyo Tech)

Key words gold colloid, peptide, biosynthesis

2Ip11 爆発性芳香族化合物の簡便・迅速な検出に向けた TNT 認識ペプチド修飾量子ドットの作製

○児美川 拓実[1], Tamang Abiral[2], 田中 祐圭[1], Critchley Kevin[2], Evans Stephen[2], 大河内 美奈[1]
（[1]東工大・物質理工, [2]Sch. Phys. Astron., Univ. Leeds）
okochi@chemeng.titech.ac.jp

昨今のテロ事件の増加を受けて、爆発物の迅速かつ簡便なオンサイト検出の需要が高まっている。これまでに、表面プラズモン共鳴や電気化学インピーダンスセンサを用いたオンサイト検出デバイスが開発されてきたが、いずれも装置の校正および検出に時間が要するなど、実用化に向けた問題が指摘されている。そこで本研究では、対象を代表的な爆発性化合物である 2,4,6-Trinitrotoluene（TNT）とし、量子ドットを用いた蛍光による迅速かつ簡便な検出法の開発を目指した。具体的には、以前探索した TNT 結合性ペプチドを表面に固定化した CdTe/CdS コアシェル型量子ドットを使用し、TNT 添加時の蛍光変化からの検出を試みた。また、類似構造を持つ分子に対する選択性についても評価した。まず、CdTe/CdS コア/シェル型量子ドットを合成し、透過型電子顕微鏡による粒径分布の取得、および蛍光分光光度計による蛍光スペクトル測定を行った。次に、TNT 抗体からペプチドアレイ技術を用いてスクリーニングした TNT 結合性ペプチド(ARGYSSFIYWFFC)を量子ドット表面にリガンド交換反応によって固定化し、動的光散乱および表面電荷からペプチドの固定化を確認した。その後、量子ドットに対して TNT 溶液を滴下した際の蛍光スペクトルの変化を測定した。この結果から、TNT 滴下後 1 分以内に量子ドットの蛍光が消光することが確認され、検出限界は 228 ppb であった。また、他の類似化合物に対する一定の選択性も確認された他、感度は劣るもの UV ランプ下での肉眼での検出も可能であった。これらの結果より本技術は、新たなオンサイトでの迅速かつ簡便な爆発物検出法としての可能性を持つことが示唆された。

TNT binding peptide modified quantum dots fabrication for the simple and rapid detection of the explosive aromatic compounds.

○Takumi Komikawa[1], Abiral Tamang[2], Masayoshi Tanaka[1], Kevin Critchley[2], Evans Stephen[2], Mina Okochi[1]
([1]Sch. Mater. Chem. Technol., Tokyo Tech, [2]Sch. Phys. Astron., Univ. Leeds)

Key words peptide, explosive detection, quantum dots

2Ip12 機能性高分子の epsilon-poly-L-lysine 修飾による細胞内送達法の確立

○武内 大和[1], 牛丸 和乗[1], 加藤 康夫[2], 丸山 千登勢[1], 濱野 吉十[1]
（[1]福井県大院・生物資源, [2]富山県大・生医工研セ）
hamano@fpu.ac.jp

【目的】放線菌 *Streptomyces albulus* が生産する epsilon-poly-L-lysine（e-PL）は、25~35 残基の L-lysine が直鎖状につながった天然の塩基性ペプチドである。これまでに我々は、e-PL の生合成機構を解明しており（*Nat. Chem. Biol.*, 4, 766, 2008）、e-PL 合成酵素の基質特異性を応用し、e-PL のカルボキシ末端に種々官能基を導入できることを見出した。例えば、e-PL 生産菌を HO-PEG_4-azide 含有培地で培養するだけでクリックケミストリーに利用可能な e-PL-PEG_4-azide が生産される。e-PL は、その化学的特性から生体膜透過性が期待され、実際にクリックケミストリーにて蛍光色素を e-PL 修飾したところ、e-PL は速やかに動物細胞内に送達することを確認した。そこで本研究では、e-PL-PEG_4-azide が機能性高分子に生体膜透過性を付与する化学修飾分子として利用できるか検証した。
【方法と結果】タンパク質や酵素、抗体などの高分子化合物はその大きな分子サイズが足枷となり、生体膜を透過しない。そこで、これらを e-PL 修飾することで生体膜透過性を付与できるか、蛍光タンパク質 monomeric Azami Green（mAG）をモデル高分子化合物として検証した。組換え酵素として得た mAG の酵素表面に化学的に dibenzocycloactyne (DBCO)基を導入し、azide/DBCO のクリックケミストリーを介して mAG の e-PL 修飾を行った。得られた e-PL 修飾 mAG の生体膜透過性を HeLa 細胞で確認したところ、未修飾の mAG と比較して、顕著な生体膜透過性が確認された。また、ATP 依存的な能動輸送が抑制される低温環境下においても細胞内への取り込みが観察されたことから、他の塩基性ペプチドと同様に能動輸送とは異なる経路でも細胞内に送達されることが示唆された。さらに現在、e-PL 修飾した酵素が細胞内で正常に機能するか、Cre recombinase をモデルとして検証を進めており、その結果についても報告する。

Intracellular delivery of macromolecules modified with epsilon-poly-L-lysine

○Yamato Takeuchi[1], Kazunori Ushimaru[1], Yasuo Kato[2], Chitose Maruyama[1], Yoshimitsu Hamano[1]
([1]Grad. Sch. Biosci. Biotec., Fukui pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

Key words drug delivery system, click chemistry, polycation

2Ip13 生体膜透過性・水溶性の一挙改善を志向した機能性低分子化合物の oligo(beta-Lys)修飾

○兼田 康平[1], 武内 大和[1], 加藤 康夫[2], 丸山 千登勢[1], 濱野 吉十[1]
（[1]福井県大院・生物資源, [2]富山県大・生医工研セ）
hamano@fpu.ac.jp

【目的】化合物の水溶性を確保しつつ生体膜透過性を改善する新しい化学修飾技術を開発できれば、現在の創薬スピードを加速させることができる。そこで、我々は放線菌 *Streptomyces rochei* NBRC12908 が生産する抗生物質 streptothricin（ST）の beta-lysine oligopeptide [oligo(beta-Lys)] 構造に着目した。oligo(beta-Lys) 構造は、1~7 残基の beta-Lys がイソペプチド結合で直鎖状に結合したポリカチオン性ペプチドであり、ST の高い水溶性と生体膜透過性に寄与する構造モチーフであると考えられる。そこで本研究では、oligo(beta-Lys)構造の生体膜透過性を検証するとともに、種々低分子化合物を oligo(beta-Lys)修飾するための基盤技術を構築した。
【方法と結果】oligo(beta-Lys)にはアミノ基が多数存在し、有機化学的な手法にて低分子化合物を部位特異的に oligo(beta-Lys)で修飾するには極めて高度な合成技術が必要である。そこで本研究では、oligo(beta-Lys)の生合成酵素である Orf19 の応用利用を試みた。ST の生合成において、Orf19 はフリーの beta-Lys（伸長基質） と Orf18 に結合した beta-Lys（アクセプター基質）を基質としてオリゴマー化（ペプチド合成）を触媒する。そこで、アクセプター基質の構造アナログとして、beta-Lys-PEG_3-azide を用いて酵素反応を行ったところ、興味深いことに、beta-Lys のオリゴマー合成活性を検出した。さらに、beta-homoLys-PEG_3-azide、alpha-Lys-PEG_3-azide をアクセプター基質に用いて酵素反応を行ったところ、驚くべきことに、beta-homoLys-PEG_3-azide を用いた場合に最も効率良く beta-Lys の鎖長伸長が進行した。現在、本法で合成した oligo(beta-Lys)$_n$-PEG_3-azide 化合物を用いたクリックケミストリー法にて、蛍光色素の oligo(beta-Lys) 修飾を行っており、その生体膜透過性と水溶性の結果について報告する。

Chemical modification of the bioactive small molecules with oligo(beta-Lys) for improving cell membrane permeability and water solubility.

○Kohei Kaneda[1], Yamato Takeuchi[1], Yasuo Kato[2], Chitose Maruyama[1], Yoshimitsu Hamano[1]
([1]Grad. Sch. Biosci. Biotec., Fukui pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

Key words drug delivery system, enzyme production, peptide, *Streptomyces* sp.

2Ip14 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], 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】近年、真菌感染症においても薬剤耐性菌の増加が問題となっており、新薬の開発が求められている。当研究室では、多段階の作用機序により耐性菌を発現しにくいと期待されるディフェンシンに着目した。これまでに、イネ由来ディフェンシン OsAFP1 が、ヒト病原性真菌 *Candida albicans* に対してアポトーシスを誘導することにより抗真菌活性を示すことを見出した。本研究では、カスパーゼの活性化を評価することにより、アポトーシス誘導における主要経路を明らかにした。また、真菌の細胞膜を構成する脂質との結合特異性を評価することにより、アポトーシス誘導における OsAFP1 の具体的な標的分子を探索した。
【方法と結果】使用する 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。まず、開始型であるカスパーゼ 8 および 9、実行型であるカスパーゼ 3 の活性化を評価した。*C. albicans* 細胞（OD_{650} = 0.0125）に終濃度 16 μM の OsAFP1 を処理し、各カスパーゼの活性化を検出する FITC 標識 FLICA を処理後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、カスパーゼ 9 および 3 の蛍光が強く観察され、カスパーゼ 8 の蛍光が観察されなかったことから、OsAFP1 は内因性経路によってアポトーシスを誘導していることが明らかになった。次に、細胞膜を構成する脂質をニトロセルロース膜上に固定した PIP Strip に 2.5μg/ml の OsAFP1 を処理して結合させ、抗体反応後、化学発光法を用いて OsAFP1 の局在性を検出することにより標的分子を探索した。その結果、OsAFP1 はホスファチジルイノシトール 3 リン酸（PI(3)P）に強く結合したことから、*C. albicans* 細胞の細胞膜に存在する PI(3)P の 3 位のリン酸基を標的としてアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。現在、標的分子の認識メカニズムの解明を目指し、X 線結晶構造解析を進めている。

Analysis of apoptosis induction of rice defensin against *Candida albicans*

○Kodai Koudai[1], Akihito Ochiai[1], Takaaki Tanaka[1], Yoshiyuki Sagehashi[2], Masayuki Taniguchi[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]HARC/NARO)

Key words defensin, apoptosis, caspase, lipid binding

2Ip15 イネにおける新規な抗真菌タンパク質の探索

○三井田 篤志 [1], 落合 秋人 [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、約 50 残基のアミノ酸からなる抗菌タンパク質の一種である。当研究室では、長い食経験を持つイネ由来ディフェンシン OsAFP1 に着目した。これまでに、OsAFP1 はヒト病原性真菌 *Candida albicans* に対して強力な抗真菌活性を有することを明らかにし、断片ペプチドを用いた解析により、OsAFP1 の抗真菌活性に関わる部位を明らかにした。最近、OsAFP1 の活性部位において高い相同性を示すホモログタンパク質 OsAFP1p をイネゲノム中に見出した。そこで本研究では、OsAFP1p の組換えタンパク質を調製し、*C. albicans* に対する抗真菌活性を測定することにより、OsAFP1p の抗真菌薬としての可能性を検証した。
【方法と結果】OsAFP1p の発現プラスミドを大腸菌 Rosetta-gami (DE3)株に導入することにより組換えタンパク質の大量発現系を構築した。この組換え大腸菌を 2000 mL の LB 培地において 16℃, 48 時間培養したときに OsAFP1p は最も高純度で安定的に発現した。発現させた組換えタンパク質は、2 段階のステップにより高純度に精製した。*C. albicans* に対する抗真菌活性は、濁度と CFU を測定することにより評価した。前者は、終濃度 0.25 μM～16 μM に調整した OsAFP1p と終濁度 OD_{650} = 0.01 の *C. albicans* と混合して 12 時間培養し、濁度を測定することにより評価した。後者は、同様に処理した菌液を寒天培地に散布し、コロニー形成単位(CFU)を計測することにより評価した。その結果、OsAFP1 と類似して、OsAFP1p は終濃度 8 μM において抗真菌活性を示すことが明らかになった。既存の抗真菌薬の MIC は 0.1 μM 程度であることから、抗真菌薬としての利用には、その活性の強化が必要であるかもしれない。また、OsAFP1 と配列相同性を示さない 33％のアミノ酸残基が抗真菌活性に関与しないことも示唆された。

Screening of novel antifungal proteins from rice

○Atsushi Miida[1], Akihito Ochiai[1], Takaaki Tanaka[1], Yoshiyuki Sagehashi[2], Mayayuki Taniguchi[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]HARC/NARO)

Key words defensin, antifungal activity, *Candida albicans*, rice

2Ip16 ヒト iPS 細胞の未分化増殖を可能にする新規ペプチド化合物の分子進化工学的スクリーニング法による探索及び人工 FGFR アゴニストとしての機能解析

○佐藤 将 [1], 大貫 喜嗣 [1], 升井 伸治 [1,2], 川上 隆史 [1,3,4], 黒澤 尋 [1]
（[1]山梨大院・医工総, [2]山梨大学・発生研セ, [3]JSTさきがけ, [4]MEXT 卓越研究員）
kurohiro@yamanashi.ac.jp

ヒト iPS 細胞などの多能性幹細胞は再生医療や創薬への応用が期待されており、分化させた目的細胞を大量に調製するために多能性幹細胞を試験管内で効率よく増殖させる研究が進められている。現在ヒト iPS 細胞の未分化維持培養には塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）が汎用されている。bFGF は線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）のリガンドタンパク質であり、細胞膜上の糖鎖であるヘパラン硫酸への結合を介して bFGF が二量体化することにより、FGFR の二量体化・自己リン酸化が引き起こされ、下流のシグナル伝達が促される。しかし、bFGF はプロテアーゼ分解や熱失活を受け易く、37℃の培養条件下において短時間で失活してしまうという欠点がある。そのため、新鮮な bFGF を繰り返し培地へ添加して細胞培養を行う必要があり、操作繁雑性やコストの増加という問題点が存在している。従って、ヒト iPS 細胞の未分化維持培養を可能にする bFGF の機能を模倣しつつ、かつ、より安定性の高い代替分子の開発が現在求められている。
本研究では、人工 FGFR アゴニストの開発を目的とし、ペプチド化合物ライブラリーからの分子進化工学的スクリーニング法を用いて、FGFR の細胞外ドメインに特異的に結合する新規人工ペプチド化合物の探索を行い、同定することに成功した。得られた新規人工ペプチド化合物は bFGF と同等の結合力で FGFR と結合することが機能解析の結果判明した。
本発表では、新規人工ペプチド化合物の更なる機能解析の結果と、それを用いてヒト iPS 細胞の未分化維持培養を試みた結果について発表する。

Ultra-high-throughput screening and function analysis of novel cyclic *N*-alkyl peptides for the proliferation of human iPS cells in undifferentiated state as artificial FGFR agonists.

○Masashi Sato[1], Yoshitugu Ohnuki[1], Shinji Masui[1,2], Takashi Kawakami[1,3,4], Hiroshi Kurosawa[1]
([1]Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi, [2]ABC, Yamanashi Univ, [3]JST, PRESTO, [4]MEXT, LEADER)

Key words bFGF, FGFR agonist, human iPS cells, peptide

2Ip17 ペプチドアレイを利用した環状ペプチドの構造と配列の最適化

小崎 一功 [1], 鈴木 健弘 [1], 清水 一憲 [1], ○本多 裕之 [1,2]
（[1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創成セ）
honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】環状ペプチドは高い分子認識能、酵素分解耐性などの特徴をもち、新薬開発の候補分子として注目されている。本研究では、活性の高い環状ペプチドを取得する新規探索手法の開発を目指した。ペプチドアレイ技術を利用して、環状ペプチドの環の長さと構成するアミノ酸の 2 点に注目して、ペプチドの最適化を試みた。
【方法と結果】セルロースメンブレン上に配列中に Cys (C)を 2 つ含むペプチドを合成し、酸化反応によってジスルフィドを形成させてペプチドの環化を行った。ペプチドを合成したメンブレンを切り出し、96 ウェルプレートに入れて Calcein で染色した細胞を播種し、ペプチドに対する細胞接着量を蛍光値で評価した。本研究では、新生血管やがん細胞の細胞膜に存在する CD13 に結合する NGR 配列を含む環状ペプチドを設計し、$CD13^{+}$の細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の接着を評価した。まず、Ala (A)で長さを調節したアミノ酸 5~13 残基からなる環状ペプチドを合成し、最適なペプチド骨格を検討したところ 8~10 残基のペプチドが比較的高い細胞接着能を示した。このため 9 残基の CAANGRAAC を骨格として選択し、ペプチドのアミノ酸配列の最適化を行った。まず、配列中の A を 1 つずつ C 以外のアミノ酸 18 種に置換したところ、N 末端から 3, 7 残基目を His (H)に置換したペプチドが高い接着能を示した。次に、3, 7 残基目を H に置換した 3 種のペプチド CAX_1NGRX_2AC (X_1:X_2=H:H, H:A, A:H)を元に、残りの A 部分の最適化を行った。アミノ酸を構造や物性を元に 8 グループに分け、2 箇所の A を同時に網羅置換したペプチド 64 種を評価した。その結果、既報の高接着ペプチド(KCNGRC）の約 2.6 倍の接着能を示すペプチド配列の取得に成功した。

[1] Soudy, R., *et al.*, *ACS Comb. Sci.*, 14, 11 (2012)

Optimization of cyclic peptide structure and sequence using peptide array system.

Ikko Kozaki[1], Takehiro Suzuki[1], Kazunori Shimizu[1], ○Hiroyuki Honda[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]PME. Nagoya Univ.)

Key words peptide array, cyclic peptide, peptide screening, NGR peptide

2Ip18 ジスルフィド架橋によるヘテロ二量体ペプチド合成法の開発と細胞内機能性ペプチド探索系への応用

○小崎 一功 [1], 清水 一憲 [1], 本多 裕之 [1,2]
（[1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創成セ）
honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】我々は細胞膜透過性ペプチド(CPP)とペプチドアレイ技術を組み合わせた細胞内機能性ペプチド探索系の構築に成功してきた[1, 2]。しかし、CPP の付加は機能性ペプチドの活性に影響を与えることが懸念される。本研究では、細胞内の還元環境で分解されるジスルフィド結合で CPP と機能性ペプチド間を架橋できる合成法を開発し、CPP の影響を排除した新規細胞内機能性ペプチドの探索系構築を目指した。
【方法と結果】セルロースメンブレン上に Fmoc-Lys(ivDde)-OH を合成し、主鎖に光切断リンカー、システイン(C)、CPP を、側鎖に光切断リンカー、C、機能性ペプチドをそれぞれ合成した。酸化反応により主鎖、側鎖間でジスルフィドを形成させ、UV 照射で CPP-機能性ペプチド複合体を切り出した。質量分析により、目的ペプチドの選択的な合成と、還元剤処理によるジスルフィドの分解を確認した。また、既報[3]の細胞死誘導ペプチド(WELVVLGKL)と CPP をジスルフィドで架橋し、HeLa 細胞に添加して WST-8 assay による細胞生存率評価で、ペプチドの細胞死活性評価を行った。合成ペプチドは高い細胞死活性を示したことから、開発した系を用いてペプチドの細胞内機能評価が可能であることが示された。最後に、1 アミノ酸置換体(162 種)を合成し、活性評価を行った。その結果、アミノ酸置換による細胞死活性の変化を確認し、有意に細胞死活性の高い複数のペプチド配列を取得した。また、アミノ酸の位置と性質が細胞死活性と関連することが示唆された。

[1] Matsumoto, R., *et al.*, *Scientific Reports*, 5, 12884 (2015)
[2] Kozaki, I., *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 124, 2 (2017)
[3] Araujo, C. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 289, 24 (2014).

Development of heterodimeric peptide synthesis method by disulfide bridge and application to intracellular functional peptide screening systems.

○Ikko Kozaki[1], Kazunori Shimizu[1], Hiroyuki Honda[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]PME. Nagoya Univ.)

Key words peptide array, cell penetrating peptide, peptide screening, disulfide bond

2Jp01 新規人工タンパク質超分子 TIP60 のアセンブリ制御に向けたサブユニット間相互作用の解析

○大原 直也[1], 川上 了史[2], 宮本 憲二[2]
（[1]慶大院・理工, [2]慶大・理工・生命情報）
kmiyamoto@bio.keio.ac.jp

ウイルスキャプシドやフェリチンのようなタンパク質によるケージは、幅広い応用が期待される。これまで、オリゴマータンパク質の融合や計算機を用いた方法により多くのタンパク質超分子が人工的に作られてきた。我々のグループでは、多面体の幾何学に基づき 5 回対称タンパク質 Lsm と 2 回対称タンパク質 MyoX の融合タンパク質を設計し、アニオン性切頂二十面体型中空タンパク質超分子、TIP60(Truncated Icosahedral Protein 60-mer)の構築に成功した。TIP60 は高い対称性、均一性を持ち、内外に導入されたシステイン残基は化学修飾が可能である。またカチオン性タンパク質や金属イオンの添加に応答してさらなる巨大な構造を形成する。このことから、TIP60 はタンパク質ケージとして、あるいはナノビルディングブロックとしての利用が期待できる。さらに、最近我々は外部因子の添加により TIP60 のアセンブリを *in vitro* で可逆的に制御することを目指し、まず変異導入により TIP60 のアセンブル機構について詳細に解析した。その結果、サブユニット界面に位置する少数の電荷を持つアミノ酸残基が水素結合ネットワークを形成し、アセンブルに大きく寄与していることが明らかとなった。また、いくつかの変異体は電気泳動による解析で、完全な 60-mer に加えて 15-mer や 30-mer と推測される複数の構造が共存していることを確認し、*in vitro* での可逆的アセンブルの実現可能性が示唆された。本研究の進展により構造のダイナミクスを組み込んだ新規なタンパク質超分子の設計を示すことができると考える。

Analysis of the interaction mechanism of newly designed protein supramolecule TIP60

○Naoya Ohara[1], Norifumi Kawakami[2], Kenji Miyamoto[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Keio Univ., [2]Dept. Biosci. Info., Keio Univ.)

Key words protein supramolecule, self-assembly, mutagenesis

2Jp02 中空・多孔構造を有する人工タンパク質ナノ粒子 TIP60 の機能化

○那須 英里圭[1], 川上 了史[2], 宮本 憲二[2]
（[1]慶大院・理工, [2]慶大・理工・生命情報）
kmiyamoto@bio.keio.ac.jp

【背景・目的】 人工タンパク質ナノ粒子は、高い構造の均質性や生体適合性が見込まれ、変異導入による設計的な機能化が可能なことから、有用なナノ分子材料となることが期待されている。当研究グループは近年、中空の球状人工タンパク質ナノ粒子 TIP60 の設計・構築に成功した。TIP60 は、5 角形を形成する 5 量体タンパク質 LSm protein と、それらを繋ぐ 2 量体タンパク質 Myosin X coiled-coil を結合した融合タンパク質が自己組織化することで、六角形面に孔の空いたサッカーボール様の構造を形成する。TIP60 は、その中空で多孔構造を有するという特徴から、化合物を内包するナノカプセルとして機能すると期待される。そこで本研究では、TIP60 の構造を維持したまま、可逆的に化合物を内包・放出する系の構築を行った。
【方法・結果】 変異導入により、TIP60 の内側と外側にそれぞれ選択的にシステインを導入した変異体を作製した。まず、マレイミドを有する化合物で修飾実験を行い、TIP60 の内外のシステインがそれぞれ修飾可能であることを明らかにした。さらに、添加する化合物の大きさと TIP60 内部への侵入可能性の関係を分子量の異なる 4 種類の Methyl-PEG$_n$-Maleimide で修飾実験を行い、その修飾率を内外のシステインで比較することで明らかにした。その結果、化合物の分子量の増加に伴って内側のシステインは外側のシステインと比較して顕著に修飾率が低下し、TIP60 内部への化合物の侵入可能性が TIP60 表面の孔を通過できる化合物の大きさに依存することが示唆された。また、内側にシステインを導入した変異体で、チオールを有する化合物による修飾を行い、ジスルフィド結合の形成と解離で化合物が可逆的に内包・放出できることを明らかにした。

Functionalization of a Porous Hollow Artificial Protein Nanoparticle TIP60

○Erika Nasu[1], Norifumi Kawakami[2], Kenji Miyamoto[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Keio Univ., [2]Dept. Biosci. Info., Keio Univ.)

Key words protein nanoparticle, chemical modification, nanocapsule

2Jp03 カイコ発現系を用いた White Spot Syndrome Virus（WSSV）抗原タンパク質の発現および評価

○中西 崇文[1], Boonyakida Jirayu[1], Xu Jian[2], 佐藤 純[3], 加藤 竜也[1,2], 朴 龍洙[1,2]
（[1]静大・創科技院, [2]静大・グリーン科技研, [3]国立研究法人水産研究・教育機構）
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【目的】White Spot Syndrome Virus (WSSV）とは、ニマウイルス科ウィスポウイルス属に属するウイルスであり、ロッド状のヌクレオカプシドに VP15、VP24 および VP26 タンパク質が存在し、その外側のエンベロープに VP19、VP28 タンパク質が存在する。このウイルスは主にエビやその他甲殻類に感染し、感染したエビは 2 週間で死に至る。現在クルマエビの養殖に莫大な被害を及ぼしているが、未だにこのウイルスに対しての効果的な対策がない。本研究では、これらウイルス抗原タンパク質をカイコ発現系を用いて発現して精製を行い、クルマエビへのウイルス感染実験でワクチンとしての評価を行った。
【方法及び結果】C 末端に FLAG タグを挿入した、上記 5 つの抗原タンパク質を発現する組換えカイコ核多角体病ウイルスバクミドを作製し、カイコ培養細胞で組換えウイルス調製を行った。組換えウイルスをカイコ幼虫または蛹に注射し、3 日後脂肪体を回収した。回収した脂肪体から、Anti-FLAG ビーズを用いて抗原タンパク質を精製した。5 つの抗原タンパク質 VP15、VP19、VP24、VP26、VP28 をそれぞれ 245 μg、313 μg、278 μg、332 μg、381 μg 精製できた。またそれら抗原タンパク質をクルマエビに筋肉注射 21 日後(20μg/g エビ) に人為攻撃を行い、その後 15 日間エビの観察を行った。対照群の死亡率が 60%であったのに対し、構造タンパク質の 1 つである VP15、VP26 の死亡率はそれぞれ 40%、44%であった。この結果から VP15、VP26 で WSSV に対するワクチン効果が示唆された。

Production of Five Antigens of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Silkworm and Evaluation

○Takafumi Nakanishi[1], Jirayu Boonyakida[1], Jian Xu[2], Jun Sato[3], Tatsuya Kato[1,2], Park Enoch Y[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]National Research Institute of Aquaculture, Japan Fisheries Research and Education Agency)

Key words White spot syndrome virus, Shrimp, Silkworm, Recombinant Protein

2Jp04 外来タンパク質を内包するナノ粒子タンパク質発現系の構築

石原 沙季, 立田 祐琳亜, 岡 拓二, ○平 大輔
（崇城大・生物生命）
hira@life.sojo-u.ac.jp

ナノ粒子タンパク質エンカプスリンは、1 種類のタンパク質の多量体化によって形成されたナノカプセルである。 60 または 180 量体が知られており、直径 20～30 nm 程度の正二十面体粒子が形成されると報告されている。さらに、エンカプスリンはその粒子の内部に別のタンパク質（荷物タンパク質）を特異的に封入するという性質を持っている。封入される荷物タンパク質は、その N 末端または C 末端に特有の十から数十残基のアミノ酸配列（標的ペプチドと呼ばれる）を有する。標的ペプチドが認識されることによって、荷物タンパク質はエンカプスリン粒子に特異的に組み込まれ、その荷物タンパク質が粒子内で機能して、鉄貯蔵および活性酸素の除去などに働くと考えられている。また、エンカプスリンを用いたドラッグデリバリーシステムへの応用も試みられているが、粒径制御や荷物タンパク質の封入量の制御は実現されていない。
そこで本研究では、好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来のエンカプリン（GkEnc）について大腸菌発現系を構築し、ナノ粒子形成を調べた。さらに荷物タンパク質のモデルとしてミオグロビン、緑色蛍光タンパク質（GFP）等を用いて、これらの遺伝子に標的ペプチドを融合した上で共発現させることで、GkEnc 粒子に封入できるかどうかを調べた。GkEnc を単独で発現精製した試料を電子顕微鏡で観察したところ、直径約 40 nm のナノ粒子の形成が確認できた。また、GkEnc とミオグロビンや GFP 等との共発現を SDS-PAGE で確認したところ、GkEnc に加えて荷物タンパク質のバンドも明確に確認された。これらのことから、GkEnc ナノ粒子に荷物タンパク質を高効率に封入することが可能であると考えられた。さらに、荷物タンパク質に融合する標的ペプチドを変異させることで、GkEnc に封入される荷物タンパク質量の制御が可能であることが示唆された。

Construction of expression system of protein nanoparticle capsulating a target protein

Saki Ishihara, Yuria Tatta, Takuji Oka, ○Daisuke Hira
(Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words encapsulation, protein expression, expression system

2Jp05 GroEL/GroES 複合体を利用した生細胞へのナノ粒子薬剤局所送達システムの検討

○根木 麻耶加[1], 依田 ひろみ[2], 小池 あゆみ[1,2]
（[1]神奈川工大院 応用化学・バイオサイエンス, [2]神奈川工大 バイオメディカル研究センター）
koike@bio.kanagawa-it.ac.jp

GroEL/GroES 複合体は、カプセル構造をしたタンパク質で、細胞内の変性タンパク質を GroEL が捕捉し、続いて ATP と GroES が結合すると、直径 5 nm の閉鎖空間に変性タンパク質を落とし込みフォールディングを介助する。ATP が加水分解され ADP になると、GroES が解離することに伴い内包物が放出される。このため、ATP 加水分解活性低下型変異体は GroEL/GroES 複合体維持時間を延長することも分かっている。我々は、GroEL/GroES 複合体が生細胞へのナノ粒子薬剤局所送達システムに利用できると考え、複合体を１２日間維持できる $GroEL^{D52,398A}$ 変異体と、核移行シグナル（AhR）を N 末端に融合した GroES 変異体である $GroES^{N\text{-}AhR}$ の複合体を作製した。蛍光色素で標識した $GroEL^{D52,398A}$/$GroES^{N\text{-}AhR}$ 複合体に GFP を内包し、CHL 細胞に添加したところ、$GroEL^{D52,398A}$/$GroES^{N\text{-}AhR}$/GFP は 24 時間以内で細胞質に、48 時間以内で核に到達した。そこで今回、細胞膜透過効率を向上する目的で、Arg に富んだ膜透過ペプチド（PTD）を $GroES^{N\text{-}AhR}$ の N/C 末端に融合し、複合体安定性と細胞膜透過性を比較した。精製した PTD 融合 GroES 変異体は、野生型 GroES と混合して一晩おくことでヘテロ７量体を形成し、$GroEL^{D52,398A}$ と安定な複合体を形成することがゲル濾過クロマトグラフィーによる解析でわかった。そこで、蛍光標識した $GroEL^{D52,398A}$/ PTD 融合 $GroES^{N\text{-}AhR}$ 複合体を CHL 細胞に添加したところ、N 末端 PTD 融合 $GroES^{N\text{-}AhR}$ では、細胞添加後 5 時間以内に細胞質に、4～7 時間で核に到達したことが顕微鏡観察で確認できた。シグナル配列と PTD を組み合わせることで、簡単に効率的局所送達が可能になると考えられる。

Nanoparticle delivery system using GroEL/GroES complex to access their target sites in living cell

○Mayaka Negi[1], Hiromi Yoda[2], Ayumi Koike-Takeshita[1,2]
([1]Dept. Appl. Chemi. Biosci., Grad. Sch. Eng., Kanagawa Inst. of Tech., [2]Biomed. Res. Ctr., Kanagawa Inst. of Tech.)

Key words GroEL/GroES, chaperonin, nanocarrier, delivery system

2Jp06 可逆的カチオン化転写因子タンパク質の生細胞内導入における効率と経路の検討

○中野 智貴[1], 周 伯揚[2], 二見 翠[2], 二見 淳一郎[1]
（[1]岡山大院・統合科学, [2]岡山理大・工）
p2uv6qh1@s.okayama-u.ac.jp

本研究では細胞機能の制御を司る転写因子タンパク質の細胞内導入法の改善を目的とした。転写因子タンパク質は構造的にゆらぎが大きく凝集しやすい物性から、変性状態のタンパク質の SH 基を可逆的にカチオン化・可溶化して細胞内に送達し、細胞質内の還元的環境下で活性構造に巻き戻す in cell folding 法の最適化を進めた。肝臓特異的転写因子 HNF-4α タンパク質と人工転写因子 GAL4-VP16 タンパク質をモデルとして、各可逆的カチオン化タンパク質を調製し、カチオン化法と細胞導入時の添加物の検討、および細胞内導入経路を解析した。タンパク質のカチオン化条件としては、HNF-4α では平均分子量 1200 以上のポリエチレンイミンの付加により導入効果が改善した一方で、GAL4-VP16 の場合は、１価の一級アミンの付加でも十分な導入が確認された。この結果からタンパク質の細胞内導入の効率化にはカチオン化量だけでなく、タンパク質自身の物性も関わることが示唆された。また GAL4-VP16 を用いた細胞内導入実験では、阻害剤を用いた実験よりクラスリン依存性エンドサイトーシス経路により取り込まれることが明らかとなった。さらに GAL4-VP16 の導入では、両親媒性ペプチドである Endo-PORTER との共導入により導入効率が劇的に改善した。蛍光標識した GAL4-VP16 を用いた実験では、Endo-PORTER の効果でエンドソーム内の GAL4-VP16 が生細胞内の細胞質に拡散する様子が確認された。以上の結果から、in-cell folding 法による転写因子タンパク質の細胞内導入は、各タンパク質の物性に応じたカチオン化条件と添加剤の条件をそれぞれ最適化することで、細胞内導入効率が大幅に変動することが示唆された。

study on rate limiting factor for intracellular delivery of reversibly cationized transcription factor into mammalian cells

○Tomoki Nakano[1], Hakuyo Shu[2], Midori Futami[2], Junichiro Futami[1]
([1]Grad. Sch. ISEHS., Okayama Univ., [2]Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

Key words protein engineering, protein folding, transcriptional regulator gene, mammalian cell

2Jp07 自己ユビキチン化能を有する人工 RING finger の作製法

○宮本 和英, 中谷 有沙, 齋藤 一樹
（姫路獨協大・薬）
miyamoto@himeji-du.ac.jp

【背景】生体内では、構造異常などが原因で不要となったタンパク質を分解・管理等する品質管理機能であるユビキチン化がある。ユビキチン化は、基本的にユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)およびユビキチンリガーゼ(E3)の 3 つの酵素が関与しており、ユビキチンが E1 から E2 に転移し、そして E3 を介して基質に付加される。ユビキチン化は、細胞の機能維持に重要な働きをしている他、乳がん、白血病などの疾患に関わることが報告されている。これら疾患に罹患すると E2 酵素の発現量が変化する。しかしながら、ユビキチン化反応は E2-E3-基質の組み合わせが複数あることで多様性を示すので、複雑なカスケード反応となっている。この理由により、これまで E2 活性を定量的に計測するのは困難であるとされてきた。そこで、我々は、人工 RING finger (ARF)を作製し、それを活用する E2 活性の検出法を検討してきた。
【方法・結果】オリジナルの E3 は、その活性部位を通して、特異的に E2 と結合しユビキチンを基質に転移することができる。この E3 が有する E2 との特異的結合部位のみ（5 残基：PKLTC）を 38 残基のペプチドに移植して、ARF の設計・作製を行ってきた。ARF を活用することで、ユビキチン化に関連する E2 活性の検出を行うことができる手法を開発してきた。今回、ヒト急性前骨髄性白血病細胞株の培養上清をサンプルとして、その中に含まれる E2 活性の検出・測定を行ったので報告する。

1.K. Miyamoto *et al., Protein Science,* 28, 448-453 (2019).
2.K. Miyamoto *et al., Methods in Molecular Biology,* 1867, 75-87(2018).
3.K. Miyamoto *et al., Protein Science,* 27, 987-992(2018).
4.K. Miyamoto *et al., Protein Science,* 27, 1354-1363(2018) [Review]
5.K. Miyamoto *et al., Protein Science,* 27, 1704-1709(2018).

Creation of artificial RING finger with auto-ubiquitination activity

○Kazuhide Miyamoto, Arisa Nakatani, Kazuki Saito
(Pharm. Sci., Himeji Dokkyo University)

Key words ubiquitination, ubiquitin ligase, peptide, ubiquitin

2Jp08 YFP 断片融合抗体プローブを用いたヒストン翻訳後修飾検出系の構築

○大室（松山） 有紀, 北口 哲也, 木村 宏, 上田 宏
（東工大）
ueda@res.titech.ac.jp

【背景】 タンパク質は、リン酸化・アセチル化等の様々な翻訳修飾により、その生理機能や局在が調整される。本研究では、細胞のがん化に関わるヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のアセチル化（H3K9ac）を認識する抗体に、YFP 断片を融合させることによって、核内での YFP 再構成によるアセチル化反応の高感度検出を狙った。
【方法】 YFP を C 末βストランド（FP11）と残りの部分（FP1-10）に２分割すると、２断片が近接した時、元の全長 YFP の構造が形成される。本研究では、H3K9ac を認識し、細胞内で機能的発現ができる１本鎖抗体（intrabody）1)に FP11 を融合させ、COS-7 細胞に、核移行シグナル（NLS）を融合させた FP1-10 と共発現させた。ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤の添加によって、H3K9 のアセチル化を誘導した時、FP11 融合 intrabody が H3K9ac に結合し、核内に局在している NLS-FP1-10 と近接することを期待して、再構成した YFP の蛍光検出を試みた。
【結果と考察】 HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A、バルプロ酸、ボリノスタットを COS-7 細胞に添加すると、核内に YFP の蛍光が観察された。さらに、各阻害剤の濃度依存的に、蛍光強度の増加が見られた。本系は、非可逆的な YFP の再構成を原理とするため、脱アセチル化反応を検出できない反面、高感度に HDAC 阻害剤の効果を測定できることから、抗がん剤スクリーニング系として有用である可能性がある。
参考文献 1) Sato, Y *et al. Sci. Rep.* 3:2436 (2013).

Development of post-translational modification detection system using YFP fragment fused antibody

○Yuki Ohmuro-Matsuyama, Tetsuya Kitaguchi, Hiroshi Kimura, Hiroshi Ueda
(Tokyo Tech)

Key words post-translation, antibody, intrabody, fluorescent protein

2Jp09 抗体の配列柔軟性を利用した部分構造移植による機能性タンパク質の創出

○阿久津 澪[1], 中澤 光[1], 二井手 哲平[1], 亀田 倫史[2], 宮田 健[3], 梅津 光央[1]
（[1]東北大院・工, [2]産総研・人工知能, [3]鹿児島大・農）
mitsuo@tohoku.ac.jp

組換えタンパク質合成に用いる宿主細胞は様々であるが、中でも大腸菌発現系は遺伝子操作が簡便かつ安価である。一方で、複雑な構造を持つタンパク質は大腸菌での発現が難しく、変異導入をするタンパク質の機能解析や産業応用に困難を伴う場合がある。そこで本研究では、難発現のタンパク質の機能部分構造を、大腸菌でも発現しうる足場タンパク質に移植して、大腸菌発現可能な機能性タンパク質を創出することを試みた。足場タンパク質としては、配列相同性が低くアミノ酸の変化に寛容な部分領域を持つ、抗体の可変領域断片に着目した。この領域は相補性決定領域（CDR）と呼ばれており、標的タンパク質に対する特異性に関与する。移植により CDR 領域へ機能構造を再構築する技術の開発を目指す。
まず X 線結晶構造解析を用いて移植する機能領域と交換される CDR 領域候補を選出し、双方の移植領域末端の距離差を考慮して数種のキメラ抗体を設計した。そしてこれらを大腸菌で発現させた結果、多くの変異体は野生型と同程度以上に発現した。円偏光二色性測定からは、調製した変異体の多くは野生型と大きく構造が変わらないことが分かった。また、その機能を ELISA で評価したところ、機能の付与に成功したことが分かった。これらの結果より、配列柔軟性の高い抗体に対して本移植設計を行うことで、機能化組換えタンパク質を創出しうることが示された。

Application of flexible sequence on antibody for chimeric functional protein.

○Mio Akutsu[1], Hikaru Nakazawa[1], Teppei Niide[1], Tomoshi Kameda[2], Takeshi Miyata[3], Mitsuo Umetsu[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]AIRC, AIST, [3]Fac. Agric., Kagoshima Univ.)

Key words protein engineering, antibody, CDR

2Jp10 エピゲノム薬を用いた複合免疫療法における診断薬開発の基礎検討

○勝河 祐希, Ahmadi Hannaneh, 本荘 知子, 二見 淳一郎
（岡山大院・統合科学）
pk060wia@s.okayama-u.ac.jp

免疫チェックポイント阻害剤の登場でがん免疫サイクルの活性化が確実なオプションの 1 つとなった．がん免疫サイクルを活性化するためには，がんの「抗原性」が高い方が当然有利である．このがんの抗原性を規定する因子には体細胞変異に由来する変異抗原が知られているが，がん細胞でしばしば発現が認められる精巣特異的なタンパク質群である「Cancer-Testis(CT)抗原」も重要な共通がん抗原である．我々はがん免疫治療が奏功する際のバイオマーカーとして，末梢血で CT 抗原をはじめとした様々な自己抗体に着目し，これらの抗体価を高感度に定量評価する抗体検査診断薬を開発中である．現在，免疫チェックポイント阻害剤単独では奏功しない cold-tumor に対して，様々な複合免疫療法の開発が期待されている．その一例として，DNA 高メチル化などのエピジェネティック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との併用が提唱されている．本研究では各種のがん細胞株に対して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することから着手した．メチル基転移酵素阻害剤の decitabine 処理では，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がん抗原遺伝子の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．個別化医療が必要な複合免疫治療において，末梢血の抗がん抗原抗体検査でがんの抗原性が評価できるかの可能性についても議論したい．

Study on companion diagnostics for combined cancer immunotherapy using epigenetic drug

○Yuki Katsukawa, Hannaneh Ahmadi, Tomoko Honjyo, Jyunichiro Futami
(Grad. Sch. ISEHS., Okayama Univ.)

Key words protein engineering, antibody, immunotherapy, epigenetic

2Jp11 抗がん抗原抗体が認識するエピトープ解析とがん免疫サイクル活性化の評価

○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・統合科学, [2]岡山大・医・細胞生物）
futamij@okayama-u.ac.jp

【背景と目的】がん免疫サイクルの活性化ががん免疫治療の鍵となる．この際，がん細胞内に含まれる異常蛋白質が「がん抗原」が目印となり免疫応答が活性化し，細胞性免疫応答（腫瘍の殺傷）と同時に液性免疫応答も誘導され，複数の抗がん抗原抗体が血中で上昇する．この後者の自己抗体の変動は 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各種の腫瘍関連蛋白質も健常人の血液中には存在しない蛋白質であり，がん抗原として機能する可能性が示唆されている．これらの血中遊離抗原の特徴は、複数の SS 結合や糖鎖付加を有する剛直な構造タンパク質が多く、これらの抗原に対する自己抗体のエピトープ解析は、がん免疫サイクルを考察する上で非常に重要なデータとなる。
【方法】各種抗原をコードする 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 ベクターにクローニングし，FreeStyle293F 細胞で分泌発現と精製を行った．Native 構造の抗原の一部は 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.
【結果と考察】がん患者の血清中に存在する腫瘍関連抗原に対する自己抗体は多種多様であり、個人差が大きかった。また、同一抗原に対する反応性を比較すると、native 構造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大半であった．がん免疫サイクルの活性化に付随する液性免疫応答の機構から考察すれば本結果は合理的であり，全配列エピトープを露出した MUSCAT-Assay 法で鋭敏にがん免疫サイクルの活性化がモニタリングできる可能性が示唆された.

Epitope analysis of anti-tumor antibody and evaluation of anti-tumor immune cycle

○Misaki Yoshioka[1], Tomoko Hojo[1], Rie Kinoshita[2], Junichiro Futami[1]
([1]Grad. Sch. ISEHS., Okayama Univ., [2]Dept. cell biol. Med., Okayama Univ.)

Key words protein engineering, tumor associated antigen, antibody, cancer biomarker

2Jp12 部位特異的ビオチン化と refolding assay を組み合せた neo-antigen スクリーニング法の開発

○峯苫 智晴[1], 垣見 和宏[2], 二見 淳一郎[1]
（[1]岡山大院・統合科学, [2]東大病院・免疫細胞治療）
futamij@okayama-u.ac.jp

【背景と目的】がん細胞表面には、体細胞変異に由来する neo-antigen が MHC-I と複合体を形成して存在し抗原提示を行っており、これを T 細胞が認識・活性化することでがん細胞を傷害する。各 neo-antigen のがん化や免疫応答への貢献度は未知であるため個別化医療(ペプチドワクチン)実現のためにはより抗原性の高い neo-antigen の迅速なスクリーニング法の開発が必要であり、本研究では効率的な手法を探索している。
【方法】このアッセイでは、MHC-I 分子に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を利用する。具体的には、まず MHC-I 分子の α 鎖の細胞外ドメインを Avitag 付加型で生産し、β 鎖と UV により開裂する人工ペプチドとともに refolding・精製する。さらに Avitag 部分を biotin 化し streptavidin を用いて四量体を形成して安定化し、UV 照射によって抗原候補ペプチドとのペプチド交換を行い、CTL と共培養して活性化を測定する手順となる。MHC-I 分子を構成する α 鎖は多型であり、本研究ではマウス α 鎖(2Db,2Kb)とヒト α 鎖(hA2,hA24)の 4 種類を調製した(β 鎖は共通)。
【結果と考察】現時点までに本アッセイ系ではマウス α 鎖 2Db を用いた refolding と精製、UV 照射によるペプチド交換及びペプチド特異的 CTL の活性化が確認された。しかし同様の操作を 2Kb, hA2 に行った場合の refolding 効率は最適化が必要な状況で、α 鎖のタイプ別に refolding 条件が異なる様である。今後はヒト α 鎖 hA2 をモデルとした refolding・精製の高収率プロトコル確立を目指すとともに、様々な型の α 鎖を網羅するハイスループットながん抗原ペプチドのスクリーニング系を開発し、個別化医療の発展に繋げたい。

Development of neoantigen screening method by site-specific biotinylation and refolding assay

○Chiharu Minetoma[1], Kazuhiro Kakimi[2], Junichiro Futami[1]
([1]Grad. Sch. ISEHS., Okayama Univ., [2]Dept.Immunother. Tokyo Univ. Hosp.)

Key words protein engineering, antigen, major hitocompatibility complex, biotinylation

2Jp13 触媒活性を有する新規タンパク質繊維の開発

○八木 創太[1], 赤沼 哲史[2], 山岸 明彦[3]
（[1]理研・生命機能, [2]早大・人間, [3]東薬大・生科）
sota.yagi@riken.jp

タンパク質は無機材料を上回る圧倒的な機能性を持つことから、新規機能性材料への利用が期待されている。特にタンパク質繊維は繊維業界に留まらず、ナノテクノロジー分野、医薬業界でも応用が注目されている。また、さらなるタンパク質繊維の用途拡大のために、本来繊維化しないタンパク質を用いた自然界にはない全く新しい繊維開発技術の確立も求められている。これまで、本来ダイマーであるスレリスリンとモノマーである LARFH というタンパク質の α ヘリックス上にそれぞれ相補的な結合面を設計することで両者が共重合した繊維を作ることに成功してきた（Yagi et al., BBA, 2016）。本研究では、この手法を用いて他の繊維化しないタンパク質も繊維とすることができるかを検証した。始めに、ダイマータンパク質 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素（以下 IPMDH）の α ヘリックス上に LARFH と同様の結合面を作成した。この IPMDH 改変体は結合面を持つスレリスリンと相互作用が確認できたが、その結合力は弱く繊維形成は認められなかった。そこで、分子間でジスルフィド結合を形成させることで分子間結合の強化を図った。結合面中に 1 つずつシステイン残基を導入したスレリスリン改変体と IPMDH 改変体は混合すると、分子間でジスルフィド結合を形成し、巨大な複合体形成が生じていることが分かった。この IPMDH とスレリスリンの混合物を電子顕微鏡で観察したところ太さ約 9nm 最大長約 1um 程の繊維構造が認められた。さらに、この混合物における IPMDH の酵素活性を測定したところ、IPMDH 活性も維持されていることがわかった。つまり、IPMDH はスレリスリンと共に繊維化してもその酵素活性は失わず、触媒機能を有するタンパク質繊維が開発できた。

Development of artificial protein fiber holding catalytic activity

○Sota Yagi[1], Satoshi Akanuma[2], Akihiko Yamagishi[3]
([1]BDR, RIKEN, [2]Fac. Hum. Sci., Waseda Univ., [3]Sch.Life Sci., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

Key words protein interaction, fiber, enzyme activity

2Jp14 量子ドットナノプローブを用いたアミロイド β オリゴマー形成阻害活性の評価法の開発

○髙木 翔梧, 倉賀野 正弘, 徳樂 清孝
（室工大院・工）
tokuraku@mmm.muroran-it.ac.jp

【背景・目的】
アルツハイマー病（AD）の原因の一つに、アミロイド β（Aβ）タンパクが脳内で凝集・蓄積して形成した、老人斑が神経細胞死を引き起こす、アミロイドカスケード仮説がある。しかし、近年、老人斑の量と疾患の進行との間には相関性が低いこと、凝集により形成される繊維より中間体である Aβ オリゴマー（Aβ-o）の神経毒性が高いことが明らかとなり、凝集体中でもオリゴマーが AD における神経細胞死の主原因であると考えられるようになってきた。そこで、本研究では量子ドット（QD）標識 Aβ（QDAβ）を用いた新たなオリゴマー形成阻害活性評価法の開発に取り組んだ。また、開発した手法を用い、数種類のポリフェノールの Aβ-o 形成阻害活性の評価を行った。
【方法】
QDAβ と凝集阻害物質を混合した溶液を 37 ℃、24 時間インキュベートした後、蛍光顕微鏡で観察後し、ImageJ ソフトウェアによって解析した。未標識 QD の各スポットの平均蛍光強度を、基準値とし、オリゴマー形成後の各スポットの蛍光強度を基準値で割った値を相対蛍光（RF）と定義した。それぞれの値をクラス分けし全体の相対蛍光値で割ることで、オリゴマー形成レベルを算出した。
【結果と考察】
QDAβ を PBS 中で 24 時間インキュベートすることで蛍光強度の大きいスポット数が増加した。定量化により、モノマーを表す RF1 のスポットの割合は 79% から 23% に減少したことから、モノマーが減少しオリゴマーが形成されたことを数値化できた。
Aβ 凝集阻害活性が期待されるポリフェノール類（ロスマリン酸、ケルセチン、クルクミン）のオリゴマー形成阻害活性（50% 阻害濃度；IC_{50}）を添加濃度 RF1 値の減少曲線から算出したところ、化合物の中で最も高いオリゴマー形成阻害効果を示したのはロスマリン酸であった。

Development of evaluation method for inhibitory activity of amyloid β oligomer formation using quantum dot nanoprobe

○Shogo Takagi, Masahiro Kuragano, Kiyotaka Tokuraku
(Grad. Sch. Eng., Muroran Inst. Technol.)

Key words alzheimer's disease, amyloid-beta, Qdot, oligomer

2Jp15 自動化微量ハイスループットスクリーニングシステムによるシソ栽培品種のアミロイド β 凝集阻害活性の詳細分析

○島森 圭弥, 倉賀野 正弘, 佐々木 里奈, 上井 幸司, 徳樂 清孝
（室工大院・工）
tokuraku@mmm.muroran-it.ac.jp

【背景・目的】 アルツハイマー病（AD）は脳内におけるアミロイド β（Aβ）の凝集・蓄積が発症の引き金となることから、Aβ の凝集・蓄積を阻害する物質は病気の予防や治療に有用である。我々は量子ドットによるイメージング技術を応用した Aβ 凝集阻害物質の微量ハイスループットスクリーニング法（MSHTS 法）を開発し、シソの EtOH 抽出物が高い活性をもつことを明らかにした。本研究では、自動化および粗抽出物の評価に最適化した新たな MSHTS システム（Sasaki et al., Sci. Rep., 2019）を用い、3 か所の圃場で栽培した 15 種の栽培品種について、収穫部位、収穫時期別の Aβ 凝集阻害活性を評価した。
【方法】 シソ 15 品種を北海道内の 3 か所の圃場で栽培し、7 月下旬、8 月下旬、10 月上旬に収穫した。収穫した植物は洗浄し、各部位（葉、茎、根、芽）に分けた後に、重量の 5 倍量の EtOH に 1 週間浸漬・抽出した。その後、抽出液を減圧下溶媒留去し、粗抽出物サンプルとした。得られたサンプルを自動化 MSHTS システムにより評価し、Aβ 凝集阻害活性を 50% 効果濃度（EC50）として評価した。
【結果と考察】 評価した全てのサンプルにおいて葉が高い活性を示し、芽、茎、根は活性を示さない、もしくは低活性であった。以前、報告した 52 種類の香辛料を用いた 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 et al., PLOS ONE, 2013）より、約 10 倍高い Aβ 凝集阻害活性を有するシソ葉サンプルも確認できた。また、7 月下旬より 8 月下旬および 10 月上旬に収穫したサンプルの方が高活性である傾向がみられた。さらに、10 月上旬に 3 か所で収穫されたシソ葉サンプルの EC50 の平均は異なる結果を示した。我々は、3 か所に設置した気象観測装置より得られたデータから、気候や土壌水分量がシソの Aβ 凝集阻害活性に関わっている可能性を見出した。

Detailed analyses of amyloid β aggregation inhibitory activity of Perilla frutescens cultivars by automated microliter-scale high-throughput screening system

○Keiya Shimamori, Masahiro Kuragano, Rina Sasaki, Koji Uwai, Kiyotaka Tokuraku
(Grad. Sch. Eng., Muroran Inst. Technol.)

Key words Alzhheimer's disease, amyloid-beta, Qdot, Perilla

2Jp16 ヘパリンによるアミロイド凝集促進効果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], 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

【背景と目的】タンパク質は凝集することにより、オリゴマーや β シート構造に富む線維状の凝集体を形成する。これらのアミロイド凝集は細胞毒性を有し、細胞に沈着して細胞死を誘導するため、多くの疾病を引き起こすと考えられている。細胞表面に存在するグリコサミノグリカンなどはタンパク質のアミロイド化に関与しているとされるが、特に負電荷を帯びたヘパリンはさまざまな蛋白質のアミロイド線維形成を促進することが知られている。近年我々のグループでは、酸化ストレス条件下で細胞から放出される高毒性分子アクロレインが、ポリアミンと速やかに 8 員環化合物を形成し、アミロイド β（Aβ）などのタンパク質のアミロイド凝集形成を抑制することを見出した。一方、8 員環化合物はヘパリンと静電相互作用すると考えられる。そこで、本研究では 8 員環化合物がヘパリンによるタンパク質の凝集促進を阻害し得るかどうかを検討した。タンパク質はアルツハイマー病、2 型糖尿病の原因タンパク質である Aβ、アミリンを用いた。

【実験方法】5 μM の Aβ、アミリンをヘパリンおよび cSPM 存在下・非存在下において 37℃、pH 7 で 24 時間インキュベートした。その後、アミロイド線維に特異的に結合する蛍光プローブであるチオフラビン T を用いて線維形成の評価を行った。

【結果】Aβ、アミリンどちらにおいてもヘパリン存在下では非存在下の時に比べて高い ThT 蛍光強度を示した。このことから、既報同様にヘパリン存在下ではアミロイド線維形成が促進されることが示された。それに対して、cSPM が共存する場合で、ヘパリン存在下の場合に観察された ThT 蛍光強度の増加は観察されなかった。このことから、cSPM とヘパリンの相互作用はヘパリンによるタンパク質の線維化促進効果を打ち消すことが示唆された。

Effect of polyamine-induced cyclic compound on the promotion of amyloid formation by heparin

○Risako Kunitomi[1], Ambara R. Pradipta[2], Katsunori Tanaka[2], Tamotsu Zako[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Ehime Univ., [2]RIKEN)

Key words amyloid, polyamine, acrolein, glycosaminoglycan

2Jp17 MIF スーパーファミリータンパク質に対する抗リウマチ薬メトトレキサートの構造・機能解析

○中垣 尊[1], 出茂 鮎美[2], 杉島 小雪[1], 面川 歩[3], 松村 洋寿[1], 尾高 雅文[1], 涌井 秀樹[1]
（[1]秋田大院・理工, [2]秋田大・理工, [3]秋田大院・医）
modaka@gipc.akita-u.ac.jp

【概要と目的】メトトレキサート(MTX)はジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の特異的阻害剤として古くから知られており、急性白血病のような悪性腫瘍の治療薬として古くから用いられてきた。その後、低用量の MTX 投与が関節リウマチを含む炎症性疾患の治療に有効であることが明らかとなり、現在では、関節リウマチの第一選択薬として広く用いられている。MTX の白血病治療に対する薬理作用は、DHFR に対する葉酸拮抗作用によることが既に知られているが、免疫系に対する薬効の作用機序は未だ明らかになっていない。そこで我々は MTX 新規標的タンパク質として、炎症関連タンパク質マクロファージ遊走阻害因子(MIF)を同定し、MTX との相互作用解析を進めてきた。本研究では、MTX の免疫系に対する作用機序を解明するために、MIF と同じ炎症性シグナル経路に関与し、MIF と高い構造的な相同性を有する D-Dopachrome tautomerase (DDT)に着目した。本発表では MTX による DDT の構造及び活性に対する影響について報告する。
【結果及び考察】 ヒト末梢血単核球の cDNA から、DDT 遺伝子のクローニングを行った。大腸菌発現系によって DDT を大量発現させた後、疎水性相互作用カラム、弱陰イオン交換カラムを用いて単一精製した。1 L あたり約 32 mg のタンパク質を精製することができた。10 mg/mL DDT と母液として 0.2 M Zinc acetate、0.1 M MES (pH 6.0)、10% PEG 8000 を用いて、ハンギングドロップ法により、10℃で DDT の単結晶を作製した。DDT 単結晶の X 線結晶構造解析の結果、1.37 Å の分解能の構造解析に成功した。DDT は MIF と同様にホモ 3 量体構造をとることが確認された。4-ヒドロキシフェニルピルビン酸を基質として用いて、MTX による DDT のトートメラーゼ活性の阻害効果を検討したところ、活性阻害がわずかにみられた。現在、MTX-DDT 複合体の結晶化による X 線結晶構造解析を進めている。

Structural and functional analysis of anti-rheumatic drug methtrexate on MIF superfamily proteins.

○Takashi Nakagaki[1], Ayumi Izumo[2], Koyuki Sugishima[1], Ayumi Omokawa[3], Hirotoshi Matsumura[1], Masafumi Odaka[1], Hideki Wakui[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ., [2]Faculty of. Sci. and Eng., Akita Univ., [3]Gra. Sch. of Med., Akita Univ)

Key words Methotrexate, anti-rheumatic drug, D-Dopachrome tautomerase

9月18日（水）

シンポジウム・招待講演　午前の部（9:30 ～ 11:30）

Recent Topics on Cultivation and Measurement: New Challenges by Start-Up Companies
「培養計測の最近のトピックス～スタートアップ企業による新たな取り組み～」
【本部企画】《国際シンポジウム》 S1 会場 p. 235
〈特別招待講演〉 3S-S1a01 p. 235

大規模な遺伝子・ゲノムを扱うツールとしての接合伝達システムの開発と展望
S2 会場 p. 237

インシリコタンパク質設計で加速するタンパク質工学・応用構造生物学
S3 会場 p. 239

生体と対話するナノ界面科学 S5 会場 p. 242

シンポジウム　午後の部（13:15 ～ 15:15）

生合成工学における有用生体機能分子の次世代創製技術 S2 会場 p. 244

日本におけるバイオジェット燃料生産技術の最先端 S3 会場 p. 246

ペアで紹介します，Wet と Dry の融合研究 S4 会場 p. 249

一般講演　午前の部（9:00 ～ 11:24）

バイオマス，資源，エネルギー工学	A 会場	p. 251
遺伝子工学	B 会場	p. 254
生物化学工学	D 会場	p. 257
生合成，天然物化学	E 会場	p. 259
食品科学，食品工学	F 会場	p. 262
生体医用工学／セル＆ティッシュエンジニアリング	G 会場	p. 264
醸造学，醸造工学	H 会場	p. 267
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. 270
環境工学，廃水処理技術	J 会場	p. 273

一般講演　午後の部（13:30 ～ 15:18）

酵素学，酵素工学	A 会場，B 会場	p. 275
抗体工学	C 会場	p. 280
生物化学工学	D 会場	p. 281
生合成，天然物化学／有機化学，高分子化学	E 会場	p. 283
センサー，計測工学	F 会場	p. 285
セル＆ティッシュエンジニアリング	G 会場	p. 287
培養工学	H 会場	p. 289
発酵生理学，発酵工学	I 会場	p. 292
環境工学，廃水処理技術	J 会場	p. 294

3S-S1a01〈特別招待講演〉

Next generation bioprocess development

○Jochen Buechs
(AVT-Chair of Biochem. Eng., RWTH Aachen Univ., Germany)
jochen.buechs@avt.rwth-aachen.de

The development of bioprocesses traditionally starts in shake flasks. In the last years, also shaken micro titer plates were introduced, to benefit from a higher throughput. These two types of bioreactors are used for primary and secondary screening and for medium (ingredients) optimization. Final strain selection and evaluation and process optimization require more elaborated experiments, for which small numbers of bench-scale stirred tank bioreactors are usually applied. This traditional bioprocess development procedure has several crucial disadvantages. 1) No information about the kinetic properties of the cultured microorganisms is collected during work in micro titer plates and shake flasks, as measuring options for online monitoring are scarce. Very frequently, only endpoint determinations of product concentration are performed. Based on this scant information strains are selected and transferred to the next steps of bioprocess development. 2) Micro titre plates and shake flasks are operated in batch mode, whereas production processes are most often conducted in fed-batch mode. This results in completely different physiological conditions for the cultured microbes. Strains selected in batch screening programs might not be the most suited for large-scale fed-batch production. 3) In micro titre plates and shake flasks the pH has to be controlled by pH buffers. This results in elevated levels of osmotic stress. In stirred tank bioreactors it is possible to control pH by titration.
In this talk a new concept for improved bioprocess development will be presented, which minimize the disadvantages of the traditional methodology. The new concept is based on different dedicated small-scale culture technologies with e.g. 48, 96 or 384 parallel bioreactors. These offer a lot of online monitoring options, including measurement of the oxygen and carbon dioxide transfer rates (OTR, CTR) and the respiratory quotient (RQ), optical density (OD), dissolved oxygen tension (DOT), pH value and biogenic fluorescence signals. To a large extent, the necessity of time course sampling and offline analysis is avoided. If these small-scale culture devices are combined with a liquid handling robot, whole process work flows, which are usually associated with a lot of manual labor work, can completely be automated. Media preparation, inoculation of main cultures at identical biomass concentration from pre-cultures, addition of inducers to initiate recombinant protein production, taking samples and separating the cell pellets from supernatant, disrupting cells to extract target proteins, freezing samples and finally analyzing of product (e.g. enzyme activity), can be performed by such an automated platform. Process development is accelerated, as a maximum of stoichiometric and kinetic information about the cultured microbial systems is already collected in early steps of process development at much higher throughput compared to the traditional procedure. In addition, also in micro titer plates and shake flasks, fed-batch operating mode as well as pH control by supplementation of pH controlling agents is enabled. As a result, screening is conducted at conditions very close to production scale. It has been proven that bioprocesses can readily be transferred from these new small-scale culture devices to bench-scale and larger stirred tank reactors. As a prerequisite, it has to be ensured that the fundamental engineering parameters like e.g. maximum oxygen transfer capacity, specific power input or level of ventilation are kept constant during scale-up from shaken micro titer plates and shake flasks to stirred tank bioreactors.

Next generation bioprocess development

○Jochen Buechs
(AVT-Chair of Biochem. Eng., RWTH Aachen Univ., Germany)

Key words bioprocess development, small scale culture systems, online monitoring, nutrient feeding

3S-S1a02 無細胞タンパク質合成系 -SDGs 実現の生産財として-

○南 賢尚
（NUProtein株式会社）
masataka.minami@nuprotein.jp

無細胞タンパク質合成系は、当初は翻訳メカニズム解析のために開発された。1950 年代にはラット肝臓を用いた無細胞タンパク質合成系により、tRNA の存在が明らかにされ、さらに、1961 年には Nirenberg らが、大腸菌由来の無細胞抽出液を用い、遺伝コードの解明を行い、ノーベル賞を受賞するなど分子生物学にとって重要な研究ツールであり、その歴史は古い。

無細胞タンパク質合成系は高スループットでタンパク質が合成できるものの、1982 年には大腸菌を宿主としてヒト型インスリンが開発されて以来、コスト面等から工業的なタンパク質生産には、大腸菌あるいは CHO 細胞を宿主とする遺伝子組換えタンパク質産生が利用されている。

NUProtein 社では無細胞タンパク質合成系の特徴を維持・発展させつつ、工業的なタンパク質合成にも利用できるよう低コスト化を念頭にコムギ胚芽由来無細胞タンパク質合成系を開発した。

本講演では、NUProtein 社が開発したコムギ胚芽由来無細胞タンパク質合成系の低コスト化を実現した製造方法、スケールアップの必要のないリニアな収量と高回転率等の特徴を示す。
また、2015 年に国連サミットで採択された「持続可能な開発目標（SDGs）」の 17 のグローバル目標の内、低環境負荷の面から「クリーンな社会」、原材料の面から「持続可能な生産と消費」、廉価なタンパク質が合成可能な面から「健康格差是正」、幹細胞応用の面から「食料確保」の各視点で、コムギ胚芽由来無細胞タンパク質合成系の特徴を示し、研究用ツール即ち研究用消費財にとどまらず、最終製品であるタンパク質を生産するための生産財としてこれら目標への貢献可能性について述べる。

Cell free protein synthesis system as producer goods to achieve SDGs

○Masataka Minami
(NUProtein Co., Ltd.)

Key words eukaryotic cell free protein expression, cytokine, emission free process

3S-S1a03 High-resolution plant data for greenhouse agricultural production

○Kotaro Takayama[1,2], Hiroto Kitagawa[3]
([1]EIIRIS, Toyohashi Univ. Technol., [2]Fac. Agric., Ehime Univ., [3]PLANT DATA Ltd.)
aa17091@gmail.com

To achieve stable and maximized greenhouse crop production, more advanced control schemes are required to control the complex crop production process. The crop centric concept for highly-sophisticated strategy for environmental control in greenhouses is expressed by the term speaking plant approach (SPA) and the most essential technology in SPA concept is the accurate monitoring of plant's growth and physiological status. This lecture will high-light the high-resolution plant growth/physiological information named "Plant data" obtained by using the chlorophyll fluorescence (CF) imaging robot and the photosynthesis/transpiration real-time monitoring chamber. The CF is red light emitted from plant leaf. Plant leaf absorbs light energy for photosynthesis but a part of the excessive/residual light energy that is not used for photosynthetic reaction is dissipated as CF. By illuminating a dark-adapted leaf with a stable intensity excitation light, dynamic changes in CF emission, which is called "CF induction phenomenon/curve", are observed. The shape of the CF induction curve varies depending on the status of photosynthetic function. A numerical index representing the shape of the CF induction curve, which was defined in our previous study, is useful to evaluate the changes in invisible photosynthetic function of tomato canopy in greenhouse. The photosynthesis/transpiration real-time monitoring chamber is an open-bottom chamber, 50 × 100 × 210 cm (W × D × H) in size, that encloses two two-meter high tomato plants with transparent film and the three fans at the top of the chamber exhaust interior air. By comparing the CO_2 and H_2O concentrations in inflow and outflow air, the photosynthetic rate and transpiration rate at an interval of 5 min is monitored. PLANT DATA Ltd., which is an Ehime University oriented start-up company, is preparing to provide services on CF imaging robot and photosynthesis/transpiration real-time monitoring chamber for commercial greenhouse crop production.

3S-S1a04 Development of culture system using co-culture with food grade medium

○Ikko Kawashima
(IntegriCulture Inc.)
ikko@integriculture.jp

The sustainability of producing meat and other animal-sourced agricultural products are coming under question due to their large environmental footprint. Possibility of such products made by mammalian cell culture has been sought since 1930's, but any scaling effort has been hampered by prohibitively high cost of adding growth factors and endocrine factors in cell culture. Furthermore, little progress has been made in studies on the use of cultured cells as food. For example, basal media containing nutrients such as amino acids and vitamins contain several substances that are not approved as food or food additives, and the development of basal media composed only of food or food additives are needed.

In in vivo systems, minor compounds are produced in organs and transported to other organs and tissues through blood vessels. In this study, a scalable flow-based system with food grade basal medium that allows inter-organ material transfer was constructed and tested for animal cell culture to reduce the cost of cell culture.

In this study, a scalable flow-based system that allows inter-organ material transfer was constructed and tested for animal cell culture to reduce the cost of cell culture. And we found intercellular interactions that proliferate cells that constitute organs such as from liver and muscle tissue. Also, these results show that this method was able to remove the need for addition of endocrine factors usually required for cell growth to reduce the cost of cell culture. In addition, a newly developed basal medium consisting only of food and food additives solved one of the production processes for using cultured cells in food.

High-resolution plant data for greenhouse agricultural production

○Kotaro Takayama[1,2], Hiroto Kitagawa[3]
([1]EIIRIS, Toyohashi Univ. Technol., [2]Fac. Agric., Ehime Univ., [3]PLANT DATA Ltd.)

Key words photosystem II, chlorophyll, photosynthesis, robot

Development of culture system using co-culture with food grade medium

○Ikko Kawashima
(IntegriCulture Inc.)

Key words co-culture

3S-S2a01 T4SS および放線菌接合伝達システムを如何に使うか

○片岡 正和
（信州大院・生命医工）
mars@shinshu-u.ac.jp

次世代シーケンサの登場、計算機の進化、ゲノム編集技術の開発など、技術面での飛躍的革新は、我々に“ひょっとしたら人工生命体をゲノムレベルから再設計して作れるかも！我々は天照大御神になれるかも！”という妄想を抱かせる。実際 J. Crag Venter 率いるグループでは 10 年前に化学合成したゲノムを移植することで科学者の夢の一つである人工設計された微生物の合成に人類史上初めて成功している。この一歩は大きな進歩だったが、動植物細胞などはおろか、多くの工業等に有益な微生物での人工細胞の設計、誕生への道は多くの技術障壁が存在しており、遠き道である。大きな技術障壁の一つに 50 kb を超える大きな DNA の操作と細胞間移動がある。

生物の、特に性を持たない細菌の進化を考えると、遺伝子水平移動が進化に果たした役割は大きい。古典的な F. Griffith の発見に端を発する遺伝子水平移動機構は、自然形質転換、形質導入、接合伝達の 3 経路が知られている。接合伝達は F 因子による大腸菌遺伝学への貢献や R 因子による薬剤耐性の拡散で知られる。我々を含む本シンポの講演者のグループでは、DNA 伝播機構として細胞外に DNA 露出せず水による剪断を受けないこと、F 因子の Hfr の例のように大きさの制限がほぼないと見なせること、接合伝達による DNA の細胞間移送は混合培養するだけで樹立できることから接合伝達機構の基礎から応用までを研究対象としている。

Type IV Secretase (T4SS)の利用：T4SS は F 因子や Ti プラスミドで知られ、応用例も多い。F 因子は接合伝達のスループット性の高さから奈良先端の森グループによるシステム生物学で重要な大腸菌の網羅的遺伝子二重欠損株の作製に使われている。F 因子は伝達宿主域が狭いため、応用性の面から *Pseudomonas aeruginosa* 由来の IncP に分類される R 因子、RK2 のシステムを利用している。RK2 をゲノムに持つ大腸菌株 S17-1 や RK2 由来のプラスミド由来の T4SS を利用して様々な菌へ DNA を異種間輸送することを検討した。枯草菌を用いた例では、プラスミド状態での導入では、形質転換能を失った *Bacillus subtilis* 株に対しても標準株である *B. subtilis*168 株と同程度の効率で導入が可能だった。枯草菌の自然形質転換では *com* 遺伝子産物群の働きによって ssDNA として外部 DNA が取り込まれ、RecA 依存的に相同組換えが起きるが、接合法の場合には相同組換えの効率が極端に低かった。この不利点は一点交差の組換え株を追加培養し、相同組換え株を取得することで解決した。また、T4SS が認識する接合開始点、*oriT* の最適長を調べ、二カ所の TraI の認識部位が効率的な異種間接合に必要なことが判明した。この領域を一部削ることで大腸菌間の移動効率は大きく影響されなかったが、大腸菌から枯草菌あるいは放線菌への移送効率は大きく損なわれた。

T4SS と放線菌システムの組み合わせによる遺伝子輸送システム：放線菌は T4SS とは異なる、二重鎖 DNA モーターを利用した接合伝達機構を持つ。また多くの実用放線菌菌種では形質転換法の開発がなされていない。T4SS と放線菌線状プラスミドの接合システムを利用し、異なる遺伝背景を持つ様々な放線菌へ効率的に二次代謝産物の生合成経路を導入する二段階接合手法を北里研究所の池田らと共に開発した。大腸菌で操作した BAC や Cosmid 上の二次代謝生合成経路を T4SS で *Streptomyces avermitilis* 由来でアクチノファージ φC31 の att 部位を挿入した線状プラスミド SAP1 を保持する制限修飾系の緩い中間宿主 *S. lividans* へ導入した。接合で移送された生合成遺伝子クラスターを含むベクターは *att* 部位を介して SAP1 に組み込まれ、SAP1 の接合伝達機構を利用して様々な放線菌へ移送可能であった。このシステムでは BAC に搭載可能な大きさの DNA を制限修飾系を気にせず、形質転換系の開発をすることなく混ぜるだけで様々な遺伝背景の放線菌へ移送可能であった。

放線菌の接合システム：放線菌の接合システムは、染色体をプラスミドの移送に伴って可動化できるなど T4SS とは大きく異なるが、詳細にはわかっていない。また小型環状プラスミドのシステムと超巨大な線状プラスミドの接合システムも異なる可能性がある。小型環状プラスミドの接合システムでは我々が解析してきた pSN22 の TraB システムについては分子生物学的解析の結果を、線状プラスミドのシステムについては必要遺伝子の異所発現によって得られているシステムの特徴を紹介する。

Application of T4SS and Streptomyces conjugative transfer systems

○Masakazu Kataoka
(Dept. Biomedical Eng. Grad. Sch. Shinshu Univ.)

Key words conjugation, Type IV secretion, Horizontal Gene Transfer, *Streptomyces*

3S-S2a02 放線菌の特異な接合伝達と染色体移動

○池田 治生
（北里大・生命研）
ikeda@ls.kitasato-u.ac.jp

Streptomyces 属の細菌は 1944 年に Waksman が *S. griseus* の培養液から抗結核薬のストレプトマイシンを発見して以来、抗生物質の探索源として広く利用されてきた産業微生物である。*Streptomyces* 属は真正細菌(グラム陽性高 GC 含量細菌)にもかかわらず、染色体は環状構造ではなく、真核細胞生物と同様に線状構造を有している。また、これらの菌株が保有する plasmid も環状構造のみならず線状構造を有しており、接合伝達能を有するものも存在する。*Streptomyces* 属の伝達性の plasmid の特徴は、クラム陰性桿菌などの腸内細菌の plasmid の伝達とは異なり、接合は 2 本鎖 DNA で伝達されていくこと、さらに接合伝達に伴い宿主染色体の移動(染色体の組み換えを生じる)が観察されることである。また、*Streptomyces* 属の環状 plasmid の接合にはグラム陰性菌の plasmid の *tra* オペロンのような多数の遺伝子が関与しているのではなく、FtsK/SpoIIIE family DNA translocase とそれが結合する *cis*-acting locus of transfer (*clt*)配列のみで達成される。さらに線状 plasmid では DNA translocase 様タンパク質(TraA/TraB)そして DNA helicase(TtrA)によって接合が達成される。２次代謝産物の生合成遺伝子群のような非常に複雑な遺伝子配置をしている遺伝子群を発現させる場合、染色体と同様に線状構造のレプリコンのほうが安定に発現する。また 100 kbp を越える２次代謝産物遺伝子群を導入した線状 plasmid も接合伝達によって同種ならびに異種 *Streptomyces* 属株に導入することが可能であり、物質生産も確認できた。一方、接合 plasmid による染色体の移動は plasmid 種によって効率が異なるが環状多コピー plasmid pIJ101 を用いた場合、10^{-3} の頻度で染色体の組み換えを確認することができた。*S. avermitilis* の染色体の右末端には *traA/traB* ならび *ttrA* が配置しており、さらなる詳細な解析によって、*S. avermitilis* の染色体自身が接合能を有している”trasnsmissible replicon”であることが示唆された。

Unique conjugation system and chromosome mobilization in Streptomyces transmissible plasmid

○Haruo Ikeda
(Kitasato Institute for Life Sicences, Kitasato University)

Key words *Streptomyces*, plasmid, conjugton, antibiotics

3S-S2a03 大規模網羅解析への接合伝達システムの活用

○森 浩禎[1,2], 藤田 愛[1,2], 片岡 正和[3], 牧 泰史[4], 田村 武幸[5], 松野 浩嗣[6], 高坂 智之[6], 山田 守[6]
（[1]奈良先端大・データサイエンス, [2]奈良先端大・バイオ, [3]信州大・工, [4]大阪医大, [5]京大・化研, [6]山口大・創成科学）
hmori@gtc.naist.jp

私たちのグループは、大腸菌ゲノムプロジェクト終了後、US グループによる MG1655 株と日本プロジェクトグループの W3110 株の詳細な比較、配列確認作用、正確なアノテーションを目指した国際コミュニティーの構築とアノテーション作業を続けてきた。それと並行して、アノテーション情報を基にした全遺伝子プラスミドクローンライブラリーと一遺伝子欠失株ライブラリーの構築を進めた。現在では、目的に応じた５種のクローンライブラリーと２種の欠失株ライブラリーを完成し、コミュニティーの内外を問わず広く公開し、オープンリソースとして広く活用されている。

2007 年に中心代謝経路欠失株における細胞内生理状態の定量解析を行なった(Ishii et al., 2007, PubMed: 17379776)。その結果が示したことは、中心代謝経路のように非常に重要な経路にも関わらず、細胞はその欠失を受け入れるだけでなく、欠失の細胞内生理状態に及ぼす影響は、それほど大きなものではなく、細胞自体は非常に安定に保たれていたことであった。まさに細胞のロバスト性であるが、それ以降ロバスト性の分子機構解明を目的として、大腸菌全遺伝子の網羅的二重欠失株による遺伝的相互作用解析を目的とした技術開発を進めた。大腸菌といえども、タンパク質をコードする遺伝子数は 4000 を超え、システマティックな二重欠失株ライブラリー構築はそれまでの技術では到底達成できるものではなかった。そこで、開発を進めたのが、２種類の一遺伝子欠失株ライブラリーを構築し、一方を Hfr 化し接合により高効率で組合わせ、二重欠失株を作製する手法である。そのために、一方の欠失株を Hfr 化する CIP と名付けたツールの開発を進めた。F plasmid による Hfr 化は、F の持つ IS や Tn の配列を利用して宿主ゲノムに相同組換えで挿入される。一方、我々は挿入部位と挿入方向を決め、特定の場所から特定の向きで受容菌側に宿主ゲノム DNA を送り出すための設計を行なった。幸い、接合と DNA 移動に必須の *tra* 領域と *oriT* 領域には IS と Tn が存在しない。またオペロンを構成しており、接合に機能する断片とそれ以外の機能断片を簡単に分離できる。接合に必須の断片のみを切り離し、以下の設計デザインを行い、Hfr 化プラスミドツールを作製した。1) 大腸菌染色体上 10 箇所への CIP の挿入、2) 挿入部位より両方向にゲノム DNA を受容菌に移動、3) 受容菌側に移動後、プラスミドの複製起点は機能できない、4) 欠失株の持つ Km および Cm 以外の薬剤耐性、5) 接合後の供与菌の選別、のデザインを行なった。そこで、1) は染色体上欠失しても表現型に影響が出ない遺伝子領域の非コード領域 10 カ所を選択し、その領域約 300bp の断片を組込み相同領域とした。2)は、300bp の組込み領域を両方向にクローン化を行い、時計回りおよび反時計回りに大腸菌ゲノム DNA を CIP の挿入領域より接合移動できる設計を行なった。3)は F の *ori2* の代わりに、*oriRg* を複製起点としてもたせ、*pir* を持つ宿主にのみで複製可能になるようにデザインした。4)は *aadA* による Sm 耐性を持たせ選択可能にし、5)に関しては、宿主に持たせた pir 遺伝子断片を *dapA* 遺伝子領域に挿入し、*dapA* を破壊し、DAPA(Diaminpimelic acid)存在下でのみ生育可能な宿主にすることにより、3)を同時に解決できる手法を取った。現在は、染色体上 10 カ所、両方向で、20 種類の Hfr 化を制御できるようにしている。

開発した CIP を接合により Cm 耐性を持つ欠失株に移動し Hfr 化を行う。1 時間程度の接合後、DAPA を含まない、欠失株の持つ Cm と CIP の持つ Sm を含む培地で選択を行う。受容菌側ではプラスミドとしては複製できないので、ゲノム DNA に相同領域を利用して挿入されたものが Sm 耐性を獲得することが期待される。耐性能の確認と PCR による挿入部位の構造確認を行なったのち、Hfr 株として分離する。これを供与菌として、Keio collection 約 4000 の遺伝子欠失株と寒天培地上で接合を行い、供与菌側の Cm 耐性断片で置換された遺伝子欠失と、Keio collection の Km 耐性断片による欠失とを高効率で組合せ、二重欠失株の作製を行う。その二重欠失株の生育を、寒天培地上で、スキャナーによる画像取得と画像解析による生育の定量化を行い、合成致死など遺伝的相互作用解析を行なっている。

我々の欠失株ライブラリーには、欠失により LB 培地で生育できない遺伝子の欠失株は存在しない。そこで、このような必須遺伝子の遺伝的相互作用解析を、同じく接合を用いて、必須遺伝子の発現抑制株と Keio collection の欠失株を組合わせ、解析を可能にする手法の開発を行なった。発現抑制には CRISPRi を用い、gRNA を構成的発現、dCas9 をテトラサイクリン発現誘導プラスミドの構築を行い、F 由来の oriT を持たせることで、接合移動を可能にし、上記と同様に接合による網羅的必須―非必須遺伝子間相互作用解析を可能にした。

これまでの開発と解析を進めてきた、接合を活用した高効率遺伝子欠失多重化手法の紹介と、問題点を共有する。また、新たに開発した欠失株には 20 塩基の分子バーコードを導入しているが、その新たな活用方法も紹介し、リソースとしての共有も図りたい。

Application of conjugal DNA transfer to HT genetic network analysis

○Hirotada Mori[1,2], Ai Fujita[1,2], Masakazu Kataoka[3], Yasushi Maki[4], Takeyuki Tamura[5], Hiroshi Matsuno[6], Tomoyuki Kosaka[6], Mamoru Yamada[6]
([1]Data Science Center, NAIST, [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, [3]Eng. Fac. Eng., Shinshu Univ., [4]Osaka Med Col, [5]Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., [6]Grad. Sch. Sci & Tech. for Innovation)

Key words *Escherichia coli*, gene knockout, conjugal DNA transfer, genetic network

3S-S2a04 接合伝達の分子機構の応用

○金子 真也[1], 板谷 光泰[2]
（[1]東工大・生命理工, [2]慶大・先端生命研）
skaneko@bio.titech.ac.jp

次世代シーケンサーの登場やゲノム編集技術の進歩によって、生物の設計図であるゲノム自体の関心が非常に高まっている。これに伴いゲノム解読や部分的な編集にとどまらず、ゲノム自体の DNA を設計し、合成し、活用しようとする研究が世界各国で開始された（1）。しかしゲノムを構成している DNA は長大なポリマーであるため、長くなればそれだけ物理的ダメージを受けやすくなり扱いが難しくなる。すなわちゲノムのような大きなサイズの DNA（経験上 200kb 以上のサイズの DNA）を無傷で扱うには、ピペッティングを伴う *in vitro* 操作などは適さない。そこで大腸菌、酵母、枯草菌を宿主とした *in vivo* でのゲノム合成法が報告されているものの、合成されたゲノムを活用する手段についての報告は極めて少ない(2)。我々は自然界での水平伝播に習って、サイズの大きな DNA の取り扱いツールとしての接合伝達の活用法に着目した。

自然界では DNA による遺伝情報のやり取り(水平伝播)が微生物間で頻繁に生じていることが報告されている。水平伝播の様式として、ファージによる「形質導入(transduction)」、細胞外の DNA を取り込む「形質転換(transformation)」、そして TypeIV secretion system による「接合伝達(conjugation)」が知られている。これらの中で「接合伝達(conjugation)」は、細胞間に TypeIV のチャネルと呼ばれるタンパク質の管が形成され、その中を DNA が運ばれる仕組みなため、ゲノムサイズの非常に大きな DNA でも安定して移動させることが可能であり、今後合成された大きなサイズの DNA を安定に扱うための強力なツールになると期待される。我々は、これまで枯草菌のゲノム自体をベクターとして用いる枯草菌ゲノムゲノムベクター(*Bacillus subtilis* Genome Manipulation; BGM)システムの開発を行ってきた(3, 4)。シアノバクテリアの 3.6Mb(3,600kb)のサイズのゲノム DNA も合成することが可能であり(5)、大腸菌の Bacterial Artificial Chromosome(BAC)や酵母の Yeast Artificial Chromosome(YAC)のシステムを凌駕する柔軟な合成ツールであると考えている。しかしながら合成後の大きなサイズの DNA を如何に無傷で他の宿主に移すかがこれまでの課題であった。

枯草菌の接合伝達に関わるプラスミドとしては、これまでに納豆菌由来の pLS20 が単離されている(6)。65kb のサイズを持つ pLS20 プラスミドはタイプ IV の接合伝達能を有し、自身の接合伝達だけでなく、mob 遺伝子と oriT 配列を有する他の小型プラスミド(*Staphylococcus* 由来の pUB110 や納豆菌由来の pLS30)の接合伝達にも関与することが明らかとなっている。この pLS20 に抗生物質マーカーを組み込んだ pLS20cat を用いて、枯草菌の標準株である 168trpC2 株由来の宿主間における接合伝達能の詳細を解析した。レシピエントとなる枯草菌株はゲノム中に別の抗生物質マーカーが組み込まれており、複数の抗生物質耐性で選択することで接合伝達効率をモニターすることができ、その結果 pLS20cat 依存性の接合伝達効率はドナー株とレシピエント株双方の growth 状況に大きく依存していること、また制限修飾酵素による影響を受けていることなどが明らかになってきた。pLS20cat 存在下における pLS30 や pUB110 などの接合伝達効率も同様で、ドナー株とレシピエント株の growth が対数増殖初期において最も効率が良いことが示されている。本講演では、こうしたステージ特異的な枯草菌の接合伝達様式について海外の知見も交えて紹介するとともに、接合伝達を含めた菌株間の DNA の移行システムをツールとして活用し(7)、ゲノム合成技術に向けた展望を議論したい。

(1) Jef D. et al., *Science*.2016, Vol.353, p.126.
(2) Hutchison CA 3rd et al., *Science*. 2016, Vol.351, p.1414.
(3) Iwata T. et al., *BMC Genomics* 2013, Vol.14, 300
(4) Kaneko S. et al., *J. Biochem* 2018, Vol.163, p.305.
(5) Itaya M. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, Vol.102, p.15971.
(6) Itaya M.et al., *Biosci Biotechnol Biochem*.2006, Vol.70, p.740-742.
(7) Kuroki A. et al., *Gene* 2007, Vol.399, p.72-80.

Application of molecular mechanism of Conjugation

○Shinya Kaneko[1], Mitsuhiro Itaya[2]
([1]Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech, [2]IAB, Keio Univ.)

Key words *Bacillus subtilis*, conjugation, genomic DNA

3S-S2a05 ゲノム合成に必須な接合伝達系

○板谷 光泰
（慶應大学先端生命研）
mita2001@sfc.keio.ac.jp

ゲノム合成は世界の大きな潮流である。ゲノムサイズは、生物種により大きく変動するが、最小ゲノムサイズはバクテリアの 500kbp で、それを下回る DNA は長鎖 DNA の範疇になる。しかしながらその 500kbp でも、ゲノムは巨大すぎて損傷を受けやすく、無傷で純粋に大量に試験管で作り出すことは 20 世紀には不可能であった。
不可能を可能にしたのは我々が独自に開発した枯草菌（こそうきん）と呼ばれるバクテリアである。枯草菌は、大腸菌、酵母と並んでモデル生物の一種であるが、ゲノム編集、ゲノム操作が柔軟に適用できる数少ない生物材料で、ゲノム構造を思うがまま変化させられる。30 年前、誰も見向きもしなかった枯草菌のこの能力にとりつかれ、独自のアイデアと膨大な試行錯誤の繰り返しと 7 年の歳月をかけて、世界で初めてゲノムの完全合成に成功し報告した（2005 年）。合成対象としたゲノムは光合成で生育するラン藻（シアノバクテリア）ゲノムで、サイズ 3,500 kbp と巨大であり、枯草菌ゲノムとキメラ状態の株をシアノバチルス 1.0 と呼称して、世界にインパクトを与えた。枯草菌でのゲノム合成は、ドミノと呼ばれる長鎖 DNA（通常は 50kbp）を切れ目なく連続して連結して得られる。枯草菌の効率良いゲノム編集操作のおかげで、確実なゲノム連結が行えたが、ゲノムは合成するだけでも大事業である。
本講演では、ドミノを連結するステップに接合伝達の系を適用する長年にわたる開発と実際に適用できるレベルになったことを紹介する。この新世代の枯草菌ゲノム合成システムでは、今後迅速化と簡便化が期待される。さらに、ゲノムは合成するだけでは片手落ちであり、合成ゲノムを再起動させるためのシャーシ株に移動させるためにやはり接合伝達システムが重要であり、その開発にも触れたい。枯草菌でのゲノム合成手法の独自性は高く、現在でも独走状態が続いている。枯草菌での接合伝達システムは、大腸菌のそれと比較して種類が限定され、開発に時間はかかった。枯草菌という認知度の高くない生物を用いたことで、理解され認められるまでの道のりは平坦ではない。前例は自ら作り出さねばならず、まとまった成果には時間がかかることがなかなか認識されないのがもどかしい。世界がゲノム合成に舵をきった今、合成対象は現存のゲノムだけでなく、完全に設計されたゲノムにもおよび、合成ゲノムを機能させるまでの一気通貫システムの構築が必須である。枯草菌という日本発のゲノム合成システムが接合伝達の適用で、時間とコストでも有利なシステムとして世界標準化を目指したい。

【参考文献】
１）板谷、金子：「ゲノム合成の潮流」実験医学、vol.37, (No.3) 452-457 (2019)
２）金子、板谷:「細胞外核酸を利用した簡便で迅速な形質転換系の確立」化学と生物,54:p.668-673 (2016)
３）柘植、板谷：「ゲノム再編集のための遺伝子クラスター単位の構築」化学と生物 54, p.740-746. （2016）
３）板谷：「生命システムにおけるゲノム科学とゲノム工学」、第 7 章、pp131-146、'生命システム工学―進化分子工学から進化生命工学へ',田口精一編、【化学同人】(2012)
４）板谷'合成生物学' 浅島誠・他編、シリーズ現代生物科学入門 9、第 2 章「ゲノム構造の再編成」、pp35-65 岩波書店 (2010)

Conjugation systems essential tool for genome synthesis by a Bacillus subtilis genome vector

○Mitsuhiro Itaya
(Inst. Adv. Biosci. Keio Univ)

Key words *Bacillus subtilis*, competent, genome engineering, conjugation transfer

3S-S3a01 蛍光バイオセンサーで解き明かす細胞内代謝

○今村 博臣
（京大院・生命）
imamura@lif.kyoto-u.ac.jp

細胞は自身の生存・増殖のため、外部環境の変化に応じて細胞内代謝を精密に制御している。また、様々な疾病において、細胞内代謝の様式が大きく変化していることも知られている。そのため、細胞内代謝を正確に測定することは、細胞の恒常性維持のしくみや疾病の原因の理解のために非常に重要である。また、生物の代謝を利用した物質生産を制御する上でも、細胞内代謝の測定技術は極めて有用であると考えられる。ところが、細胞内代謝物の測定は、従来、多数の細胞を破壊して得られた抽出液をクロマトグラフィーや質量分析で分析することでおこなわれてきたため、個々の細胞における代謝物濃度のばらつきや時間変動を知ることは原理的に不可能であった。他方、近年になり様々な蛍光タンパク質の開発が進んで遺伝子工学的な利用が可能になったことにより、蛍光タンパク質と他の機能的タンパク質を組み合わせることによって、イオン濃度やシグナル伝達系酵素の活性等を光のシグナルへと変換する蛍光バイオセンサーを開発できるようになった。我々は、生細胞内における代謝物の時空間的な動態を明らかにするためには、こうした可視化技術が強力な技術となると考え、代謝物濃度を測定するための蛍光バイオセンサーの開発を進めた。
まず、我々は、ATP の生細胞内動態を明らかにするため、枯草菌由来の ATP 合成酵素 ε サブユニットと蛍光タンパク質を組み合わせた一連の蛍光 ATP バイオセンサーの開発を進めた。アデノシン三リン酸（ATP）は細胞内のエネルギーのキャリアとして働く、極めて重要な代謝物である。フェルスター共鳴エネルギー移動（FRET）型バイオセンサーである「ATeam」は ε サブユニットを介してシアン色蛍光タンパク質（CFP）と黄色蛍光タンパク質（YFP）を融合したかたちをとっている。ATP 濃度が高くなると ε サブユニットに ATP が結合し、それに伴う構造変化によって CFP-YFP 間の距離と角度が変化することで、蛍光タンパク質間の FRET 効率が変化する。すなわち ATP 濃度によって蛍光の発光スペクトルが変化する。ATeam を用いることで、細胞分裂において一過的に細胞内 ATP 濃度が減少することや、細胞の局所において ATP 濃度が異なることなどが見出され、細胞内の ATP 濃度が動的に変化していることが明らかになってきた。一方、単一蛍光タンパク質型バイオセンサーである「QUEEN」は、緑色蛍光タンパク質（GFP）の蛍光団近傍のループ部分に ε サブユニットを融合させたかたちをとっている。ATP の結合に伴う ε サブユニットの構造変化によって GFP の蛍光団周囲の環境が変化するために、ATP 濃度によって蛍光の励起スペクトルが変化する。QUEEN の蛍光シグナルは蛍光タンパク質の成熟の影響を受けにくいため、特に増殖の早い細菌における ATP イメージングに有用である。QUEEN を用いることによって、全く同じ環境で培養した場合であっても、個々の大腸菌細胞の ATP 濃度には大きなばらつきがあることが見出された。
次に我々は、ロイシン、イソロイシン、バリンに特異的な蛍光バイオセンサーの開発を進めた。これらのアミノ酸は側鎖に分岐構造をもつため分岐鎖アミノ酸（Branched-Chine Amino Acids, BCAA）と総称される。生細胞内の BCAA 濃度は mTOR 経路などを通じて細胞の代謝に大きく影響を及ぼすと考えられているものの、細胞や生体内の BCAA 濃度を測定する方法は確立されておらず、その動態は必ずしも明確ではない。分岐鎖アミノ酸バイオセンサーは、大腸菌に由来する分岐鎖アミノ酸結合タンパク質（LIVBP）内のループ部分に CFP と YFP を挿入させることで作成した。既に決定されている LIVBP の立体構造から期待されたとおり、この蛍光バイオセンサーは分岐鎖アミノ酸の結合に伴う立体構造変化により大きな FRET 効率の変化を示した。バイオセンサーを発現させたがん細胞のイメージングにより、細胞外から細胞内への分岐鎖アミノ酸の取り込みには 1 種類の輸送体が主要な役割を果たしていること、そして細胞質からミトコンドリア内へのバリンの輸送はロイシンやイソロイシンとは異なる輸送体が担っていることが示唆された。従来、蛍光バイオセンサーにおいて使用する機能的タンパク質はほぼ例外なく天然由来のものであり、人工的に設計したタンパク質の利用はほとんど検討されてこなかった。我々は、大腸菌由来 LIVBP を、人工設計された非天然型 LIVBP に置き換えた蛍光分岐鎖アミノ酸バイオセンサーも作成し、良好なデータを得ている。本シンポジウムでは、その成果についても報告する予定である。

Visualization of intracelular metabolism with protein-baesd fluorescent biosensors

○Hiromi Imamura
(Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ.)

Key words biosensor, ATP, branched-chain amino acids, imaging

3S-S3a02 人工タンパク質設計技術を用いたサメシングルドメイン抗体の高機能化

○竹田 浩之
（愛媛大・PROS）
takeda.hiroyuki.mk@ehime-u.ac.jp

抗原分子を特異的に認識し強く結合する抗体は、標的の固定、検出、攻撃などの目的で研究、検査、診断、治療などの幅広い領域で使われている。特に近年、シングルドメイン抗体や Fab、scFv などの低分子抗体が、安定化シャペロンや多重特異性抗体創出に適した機能性分子として注目されている。

サメなどの軟骨魚綱板鰓類が持つ重鎖抗体 IgNAR の可変領域を切り出すことにより、VNAR というシングルドメイン抗体を創出することができる。VNAR は約 15 kDa と非常に小さい、最小の抗体分子の 1 つである。煮沸しても巻き戻り結合活性を維持できる高い可塑性、大腸菌で発現でき低コスト生産が可能など、ラクダ由来のシングルドメイン抗体 VHH と似た特性を持つ。VHH との相違点として、VNAR は 20～35 残基と長く多様性に富んだ CDR3 を持つ。また抗体を持つ生物種の中で進化的に最も古い生物であるサメを用いた抗体作製は、抗体作製で利点をもたらす。つまり、ヒトやマウスと遺伝子やタンパク質の配列が大きく異なるサメを免疫に用いれば、創薬標的タンパク質のような哺乳動物間で高度に保存された抗原タンパク質であっても、免疫系が標的抗原を異物として認識し、抗体が誘導される可能性が高い。同様に、新規なエピトープに結合する抗体の創出にも最適である。難点は、サメがモデル生物ではないため遺伝子配列や二次抗体などの研究リソースが非常に限られていることである。またサメは人工繁殖できないため、生きたサメ個体を天然から捕獲・飼育する必要があることも、サメ VNAR の開発を難しくしている。

私たちは愛媛県・伊予灘に豊富に生息するエイラクブカ (*Hemitriakis japanica*) を用いた VNAR 作製技術を開発した。エイラクブカは鋭い歯を持たずおとなしい性状の小型サメであり、安全に飼育する事ができる。私たちは愛媛県の協力のもと、エイラクブカの安定入手経路、陸上飼育技術、個体識別技術、エイラクブカ IgNAR に対する二次抗体などを開発し、エイラクブカへの免疫を安全かつ安定に行える体制を整えた。免疫によって抗原特異的な抗体価の上昇が見られたエイラクブカ個体の脾臓から RNA を抽出し、IgNAR 可変領域を増幅、VNAR 提示ファージライブラリを構築した。バイオパニングによる抗原特異的ファージ濃縮と NGS による網羅的配列解析により抗原特異的 VNAR を取得できる体制を整えた。すでに球状可溶性タンパク質、転写因子、タンパク質複合体などの免疫と抗体作製に成功しており、膜タンパク質などの高難度な抗原への抗体作製に挑戦している。また、高圧巻き戻し技術により、大腸菌で発現させた封入体から活性のある VNAR を低コスト大量生産する技術も確立した。

私たちは従来の抗体よりも可塑性と発展性に優れる VNAR を、研究用途だけではなく医療、診断、バイオセンサーなどへの様々な目的に応用しようと考えている。VNAR は従来の抗体よりも圧倒的に生産コストを低減できるため、食品、農業など従来とは異なった分野へ展開できる可能性もある。そのためには、取得した抗体を使用目的に応じて改良・高機能化できる技術が必要である。例えば医療分野への応用には、ヒト化技術により抗原性を抑制することが必須である。また、診断薬として使用するためには可能な限り親和性と生産性を向上することが望まれる。目的に応じて様々な高機能化を柔軟に実施するための手法を模索していたところ、ある学会でたまたま中野先生の人工タンパク質設計法に関する講演を拝聴し、衝撃を受け、その場で共同研究を申し込んだ。配列情報のみから *in silico* で全く新規なタンパク質配列を創製する同技術を VNAR 改変に用いれば、天然サメ個体から取得した VNAR のヒト化、高親和性化、安定化などの多様な高機能化を迅速かつ効果的に実施できる可能性が高いと期待し、開発を進めている。

Engineering of shark single domain antibody by using *in silico* artificial protein design

○Hiroyuki Takeda
(PROS, Ehime Univ.)

Key words in silico artificial protein design, single domain antibody, VNAR

3S-S3a03 *In silico* タンパク質設計を実現する分子シミュレーション手法の構築

○原田 隆平
（筑波大・計算セ）
ryuhei@ccs.tsukuba.ac.jp

計算機の演算性能と分子動力学(MD)シミュレーションの信頼性向上に伴い, 生体分子の機能解明や構造予測に関する理論研究が進んでいる. しかし, 現在の高性能な計算機を用いても解明困難な生体反応が数多く存在している. 何故ならば, 現状の MD シミュレーションが到達可能な時間スケールが, 機能発現の時間スケールと比較して非常に短いからである. 発表者らは, 現状における MD シミュレーションの時間スケールの問題点を解決するため, 長時間 MD シミュレーションに代えて複数の異なる初期構造から短時間 MD シミュレーションを独立・並列に繰り返し実行する「データ駆動型分子動力学シミュレーション」の概念を提案し, タンパク質の大規模構造変化やフォールディング経路探索などに適用してきた.
開発手法の一例として, “Parallel Cascade Selection MD (PaCS-MD)“ の概念を紹介する. PaCS-MD は, 構造遷移における始・終構造が与えられた条件下で, 始構造から終構造へ至る遷移経路を探索する. 具体的には, 反応座標として平均自乗距離(Root-Mean Square Deviation: RMSD)の値を参照して探索構造をランキングし, 終構造に類似した(RMSD が小さい)分子構造を遷移確率が高い初期構造として選択し, 短時間 MD シミュレーションをリスタートさせるサイクルを繰り返し, 終構造へ遷移する「稀にしか起こらない構造揺らぎ」の出現確率を上昇させる. 遷移確率の高い構造から逐次的に短時間 MD シミュレーションをリスタートすることで, 選択した分子構造が終構造へ近づき, 遷移経路を探索できる. PaCS-MD は適用にあたり, 構造変化の始・終構造が既知であることが条件となるが, 終構造が未知の場合にも適用可能な形式に拡張した構造サンプリング法も提案している. 講演では, PaCS-MD の拡張版や, 具体的な適用例を紹介すると共に, 今後の研究展望として, 開発手法の *in silico* タンパク質設計への展望を議論したい.

Enhanced molecular dynamics simulation methods for *in silico* protein design

○Ryuhei Harada
(CCS, Univ. of Tsukuba)

Key words molecular dynamics simulation, rare events of proteins, enhanced sampling methods

3S-S3a04 Structure and engineering of CRISPR-Cas9

〇Hiroshi Nishimasu
(Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
nisimasu@bs.s.u-tokyo.ac.jp

The RNA-guided endonuclease Cas9 cleaves its target DNA and is a powerful genome-editing tool. However, the widely used *Streptococcus pyogenes* Cas9 enzyme (SpCas9) requires an NGG protospacer adjacent motif (PAM) for target recognition, thereby restricting the genomic loci that can be targeted. Here, we report a rationally engineered SpCas9 variant (SpCas9-NG) that can recognize relaxed NG PAMs. We solved the crystal structure of SpCas9-NG in complex with the guide RNA and its target DNA, demonstrating that the loss of the base-specific interaction with the third G is compensated by newly introduced non-base-specific interactions to achieve the NG PAM recognition. We showed that SpCas9-NG induces indels at endogenous target sites bearing NG PAMs in human cells, and that the off-target cleavage is reduced by previously reported high-fidelity mutations. In addition, we found that a SpCas9-NG D10A nickase fused with cytidine deaminase can induce C-to-T base editing at target sites with NG PAMs in human cells. Thus, SpCas9-NG expands the targetable space in Cas9-mediated genome engineering. Furthermore, we would like to present the data showing a comparison of the cleavage activity of SpCas9-NG with that of the recently reported xCas9 variant.

Structure and engineering of CRISPR-Cas9

〇Hiroshi Nishimasu
(Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)

Key words crystallographic study, protein engineering

3S-S3a05 演繹的学習と帰納的学習の融合:第四次革新的データマイニング法による蛋白質の人工設計

〇伊藤 創平, 中野 祥吾
（静県大院・薬食生命）
itosohei@u-shizuoka-ken.ac.jp

同じ反応を触媒し似た立体構造を持つ酵素であっても、由来する生物種によって生産性や安定性は大きく異なる。アミノ酸という同じ部品で作られ、1 次配列という単純な文字列にその秘密が隠されているはずなのに、この秘密を解き明かすことができない。わずか 10 個のアミノ酸がつながった分子でも可能な組み合わせは 20^{10} = 10 兆通り。100 個以上のアミノ酸が繋がっているタンパク質・酵素では、ほぼ無限の組み合わせ可能。生命が利用しているタンパク質の配列は、あまりに多様で並べて比較しても違いに対する規則性が見出だせない。だから合理的な説明ができない。
配列の保存性からタンパク質の高次構造や機能を見ると、20~30%のわずかな相同性であってもほぼ同じ形状や機能に収束する。酵素であれば反応特異性や基質特異性が保存され、似た EC 番号が付与される。この”相同な領域に保存された機能”に研究者は注目、演繹的に解析する手法の開発を長年行ない、医療・健康・食品・環境・農業・エネルギー等の広い分野でバイオの力を活用してきた。しかし、このような演繹的手法は、配列の違いに重きを置かない解析であるため、本質的にタンパク質がもつ多様な機能を活用しきれない。
そんな中、構造生物学が大好きだった大学院生 N 君は、タンパク質の配列と立体構造を詳細に比較、変異体多数をデザインし実験してみたところ、すべて失敗に終わり研究が嫌いになりそうになった。研究棟の屋上で西に沈む夕日に涙をにじませていたところ、ふと、配列数がいくら増えても正確に配列を比較し、コンピューターで解析しやすい出力に加工できる画期的な方法を思いついた。次世代シーケンサー等の解析技術の進歩により、配列データベースが拡大の一途をたどる今日、より多くの配列を扱う自分のアイデアに夢を感じた。

さて、私達の研究チームは、静岡に職を得た N 先生を中心に、配列データベースを帰納的に解析、タンパク質分子全体を再設計する技術の開発と検証をここ数年鋭意進めてきました。具体的には、10000 を超える相同な配列をアンサンブル機械学習法により解析、情報を抽出できる状態にします。そして、研究の目的とデータの特徴と研究の目的に合わせて、データの加工、分類、選抜、タンパク質分子全体の設計をするパラメーターを調整(パレート最適化)します。タンパク質は人と同じで多様であり、関係するデータベース(配列、立体構造)も異なります。よって、演繹的な手法で見出された、有用な個性を持つタンパク質の情報に合わせて、データを加工するところが秘訣となります。そんなわけで、”演繹的学習と帰納的学習の融合:第四次革新的データマイニング法による高機能タンパク質の人工設計”という、大変きな臭いタイトルになったわけです。本技術の特徴は、パソコンに学習させるデータを揃えるのに苦労したり、パソコンに依存し人間の出番がなくなってしまうような技術ではないところです。研究者が苦労して発見・探求してきた課題無くして成立しない技術ですので、互いの聡明さ (Artificial and Human Intelligence) を褒め合いながらお酒が飲める楽しい共同研究に発展します。反応性や生産性の向上、基質選択性の拡張、相互作用の共進化の解析と求められる課題は様々ですが、課題を達成できる確率は 50%以上になってきた感触があります。技術と言えども生みの親に似るものなのでしょうか、研究とお酒が大好きな N 先生の遺伝子を受け継いだ研究者フレンドリーな技術です。
相同性が低い領域に潜む規則性を抽出することで、機能未知なタンパク質であっても機能的な分類、進化速度が早いウィルスタンパク質の分類も可能となりました。また、私達の研究チームによって設計、高機能化した人工タンパク質は、かなりの数の大学・企業との共同研究において暗躍しており、近うちにいくつかの大きな成果を報告できそうです。本シンポジウムにおいても、いくつか発表が間に合うことを期待しています。本学会において、 4 名の修士学生が成果を発表しますので、ぜひご覧になってください。本シンポジウムにおきましては、そんな技術と人工設計した蛋白質の紹介をさせていただきます。

Synergy of artificial intelligence and human intelligence: a sequence-based inductive and deductive learning approach applied to artificial protein design.

〇Sohei Ito, Shogo Nakano
(Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka)

Key words protein engineering, in silico classification and screening, data mining, artificial protein design

3S-S5a01 体と対話するナノ界面科学： バイオとナノデバイスの共生、サイバー空間と生体のシームレスな会話に向けて

○山下 一郎
（阪大院・工）
yamashita@pmdp.arl.eng.osaka-u.ac.jp

現在クラウド・デジタル世界の圧倒的コンピューティングパワーや高速データ通信、膨大なデータハンドリング技術が、人工知能 AI の発展やビッグデータ技術と相まって世界を大きく変え始めている。実空間は IoT で検出され、サイバー空間と一体となり、さらこれらの情報はビックデータとして処理され、AI が判断し、アクチエータが実空間にフィードバックする世界（Society5.0）が始まりつつある。その先にはマイクロ・ナノサイズで、細胞や生体とデバイスとが相互に検出・観測・刺激し、対話する世界がある。そこでは、生体・細胞とデバイスが共生し高度に連携しこれまでとは全く違う新しい世界となる。
しかし、細胞とデバイスの共生を実現するには大きな困難がある。それは両者が物理的に出会う固体表面と生体の表面が、構造と機能両面において根本的に異なることに起因する。生体・細胞の表面は「数ナノメータ単位で非周期的に配置されたペプチド、糖鎖、タンパク質などの要素が時々刻々ダイナミックに動く世界」であり、揺れ動く微細構造、時々刻々変化する化学分子の分泌/吸収や相互作用、それらの経時的変化、多層構造、異なる時定数動作などが機能を担う。一方デバイス固体表面は「原子間力・ファンデルワールス力など近距離力が支配する世界」であり、その構造は硬く結晶構造が基本で、その機能は 1～3 次元の原子結合構造から生まれる自由電子、ホール、電圧、フォノン、プラズモン、フォトンなど直接触れない機能担体にゆだねられている。
生体・細胞とデバイスが共生には、この「強い原子結合から生まれる自由電子、フォノン、プラズモン」で機能するデバイスと「揺れ動く微細表面構造や分子の吸脱着」を信号として機能する生体・細胞とが対話できるナノ界面が必要となる。その界面は、まずナノ領域で両者に親和性が有り、生体・細胞の表面構造に応じて変化する自己組織能をもち、状況により自己修復することが求められる。これを実現するためには最新の無機・有機アプタマー技術や DNA・プロテインオリガミ技術、タンパク質の超分子自己集合設計技術、シミュレーション技術を動員する必要がある。さらに生体・異質の信号をつなぐためにこの界面の物理化学的性質をダイナミックに制御することも重要となる。例えば界面での誘電率を制御することで生物とデバイスの電気的結合制御を可能とする技術も必要となる。
これらの課題解決には新しい「対話型ナノ界面科学」が必要となる。この界面科学は大変挑戦的であるが、現在のナノテクノロジーをフルに用いれば回答を出せる段階に来たと思われる。
このようなナノレベルで生体・細胞とデバイスの共生が実現すれば生体・細胞関連工学・科学、さらには医療が一変する。ナノデバイスにより生体の多点同時測定長時間記録が可能となり、多量の細胞情報がビッグデータとしてサイバー空間に取り込まれ、AI で解析されることにより、細胞の理解が飛躍的に進む。さらにその知見を基に細胞の人工的改変が可能になり、サイバー空間から対話型ナノ界面を持つデバイスによって、生体への刺激・反応検出・フィードバックが行え、細胞からナノデバイスへの支援を求めるなど、サイバー空間と生体のシームレスな対話も可能になる。このような生体とデジタル空間が混然一体となる近未来では、我々は体を実時間でモニターし・補助するデバイスが生活の一部となっているかもしれない。「対話型ナノ界面科学」が未来にどのように発展していくのかはまだ予測できないが、これまでの工学・科学を超えた、生体とデバイス共生の新しい挑戦が求められている。

Nano-interface science that interacts with living organisms: Symbiosis of biology and nanodevices towards seamless communication between cyber space and living organisms

○Ichiro Yamashita
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words interactive interface, aptamer, selforganization, cyber space

3S-S5a02 デバイスが理解できる言語を非天然アミノ酸として含むアプタマーの創製

○鵜澤 尊規 [1,2]
（[1]理研・開拓研究本部, [2]理研・創発物性科学研究センター）
tuzawa@riken.jp

あらゆるものがインターネットに繋がる IoT 技術は進化し続けており、様々な家電だけではなく、ウェアラブル末端を介して生体もインターネットに繋がっている。IoT 技術は今後更に進化することは確実であり、今後は細胞さらには生体分子がインターネットと繋がる新しい世界になると予想される。このような世界の実現のためには、無機材料からなるデバイスと細胞・生体分子とのナノスケール界面における高度な信号交換、いわばデバイスと生体との対話を可能とする材料が必要となると我々は考えている。

デバイスと生体との対話における重要な役割を果たす材料の１つとして、分子進化工学的手法によって創出されるペプチドアプタマーの利用が想定されている。2018 年にノーベル化学賞が与えられた進化分子工学的手法は、天然のスープから分子や生物が進化したとするダーウィン的進化を模倣したものである。天然アミノ酸からなるペプチドのスープ、つまり多様な配列を含むライブラリーペプチド集団に対して、任意のターゲット分子に結合するという人工的な選択圧を掛けることで、ターゲットに結合するペプチドを回収し、それらの数を増幅し、再度ライブラリーとして選択圧を掛けるサイクルを続けることで、特定のターゲット分子に結合するペプチドが得らえる。最終的に得られるペプチドは特にペプチドアプタマーと呼ばれている。

我々は上述の進化分子工学的手法を拡張し、機能性の非天然アミノ酸を含むペプチドライブラリーからペプチドアプタマーを得ることで、無機材料からなるデバイスに何らかのシグナルを送ることができる種々のペプチドアプタマーの創出を進めている。特に、感度の高い蛍光分光法を用いたセンサーとしての利用を目指して、環境応答性の蛍光色素を非天然アミノ酸として組み込んだアプタマーの選出を精力的に進めている。まず、我々は環境応答性の蛍光色素としてニトロベンゾオキサジアゾール(NBD)を主に用いている。この蛍光色素は、水溶液中では水によって消光されるものの、疎水性雰囲気下では蛍光を発生することが知られている。NBD を含むペプチドアプタマーがターゲットに結合すると、NBD 周囲の溶媒環境の変化に伴って NBD の蛍光強度が変化することが期待される。我々はこのコンセプトを実証するために、NBD を含むペプチドライブラリーから、カルシウム結合型のカルモジュリンに結合するペプチドアプタマーを選出した。得られたペプチドアプタマーはカルモジュリンに結合すると、NBD 由来の蛍光強度が 10 倍に増えることが分かった。MD シミュレーションの結果からも、このペプチドアプタマーの NBD がターゲット結合時に疎水性環境下に置かれることが示唆された。夾雑物として 50％血清が存在する条件下においても、夾雑物のないバッファー中でみられる場合と同様の結合能を示すことから、ターゲット特異性も高いことが示された。ターゲットの結合に伴って蛍光強度が増加するというコンセプトの実証に成功したことから、次に我々はこのペプチドアプタマーの高感度化を試みた。具体的には、ペプチドアプタマーの NBD をナフタルイミド系蛍光色素(4-DMN)に変えることで、バックグラウンドの蛍光強度をほぼゼロにまで弱められた結果、ターゲットの有無で蛍光強度を 100 倍に増加させることに成功している。我々の拡張型進化分子工学的手法はカルモジュリン以外のターゲットにも利用できることが分かっており、これまでにウイルス由来のタンパク質、藻類の貯蔵多糖に結合すると蛍光を発するペプチドアプタマーの選出にも成功している。このことは我々の拡張型進化分子工学的手法の一般性を示している。今後は拡張型進化分子工学的手法によって得られるペプチドアプタマーをデバイスと組み合わせることにより、発展が期待される生体分子がインターネットと繋がる新しい世界の構築に貢献できると期待できる。

Generation of aptamers containing unnatural amino acids as signal transduction elements

○Takanori Uzawa[1,2]
([1]CPR RIKEN, [2]CEMS RIKEN)

Key words aptamer, unnatural amino acid, in vitro selection

3S-S5a03 細胞と対話をする足場材料による細胞機能のアクティブ制御

○松崎 典弥
（阪大院・工）
m-matsus@chem.eng.osaka-u.ac.jp

これまで様々な生体材料が研究開発され、既に幅広い医療現場で活躍している。生体分子と材料の接点はその界面で起こるため、生体分子に認識されないバイオイナートな表面設計や、生体分子と相互作用するバイオアクティブな表面設計が主に研究されてきた。しかし、これらの材料設計だけで全てが解決できるわけではない。疾患部位の環境は、刻一刻と動的に変化する。例えば、動脈硬化、心筋梗塞、線維化、腫瘍形成は、病気の進行に従いその微小環境の細胞、液性因子、細胞外マトリックス（ECM）成分が劇的に変化し、それに伴い臓器の弾性率や細胞・コラーゲン線維の配向性も変わる。そこで、疾患の環境変化に柔軟に対応してその構造や性質を動的に変える生体材料の分子設計が、今後重要になると考えられる。例えば、メカノバイオロジーでは、組織・臓器に対応した材料の弾性率の最適化だけでなく、疾患ステージに対応した最適な弾性率の動的制御や、必要に応じて幹細胞の分化誘導を促進する弾性率の動的制御も重要になると考えられる。さらに、細胞の配向が乱れた組織では、細胞の再配向を誘導する高分子繊維の動的配向制御が必要になる。これらを実現するためには、微小環境変化に応答して高分子材料の機能を動的に制御する分子設計が必要である。そのためには、生体との「対話」が求められる。
従来の生体材料では、材料から細胞・生体分子への「一方向の情報伝達」に基づく分子設計が行われてきた。細胞接着性・非接着性表面や血液適合性表面、抗菌性表面などは、材料表面から生体分子への働きかけによりその機能を発現している。一方、生体機能の基本は「対話」である。生体分子と「双方向」の情報伝達を可能とする動的な生体材料の分子設計が今後重要になると考えられる。
このようなコンセプトに基づき、我々はこれまで、ECM のように細胞と対話をする高分子材料の開発と組織工学への応用を研究してきた。具体的には、細胞間の接着を誘起する ECM ナノ薄膜で細胞表面をコートすることで、様々な三次元組織体が構築できることを報告してきた。また、最近では、マイクロメートルサイズの足場材料が、細胞の組織化を動的に誘導し、生体類似の ECM 密度の高い組織体が構築できることを見出している。本シンポジウムでは、これらの内容について報告する。

Active control of cell functions by cell-interactive scaffolds

○Michiya Matsusaki
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words biomaterials, tissue engineering, molecular recognition, scaffold

3S-S5a04 Plasmonic endoscopy for single cell interrogation

○Hiroshi Uji-i[1,2]
([1]RIES, Hokkaido University, [2]Department of Chemistry, KU Leuven)
hiroshi.ujii@es.hokudai.ac.jp

Metal nanowires can be used as wave-guides for propagating surface plasmon polaritons (SPPs), allowing the spatial confinement and transfer light energy over micrometer distance through the structures below sub-diffraction limited diameter. SPPs confined at the surface of single crystalline metal nanowires, such as wet-chemically synthesized silver nanowires, can propagate over tens of microns before energy is lost by Ohmic damping. Alternatively, the use of surface plasmoncs allows us to concentrate light energy in nanometer regions, such as a nanogap between metal nanoparticles, leading to a massive enhancement of electromagnetic filed that can be used for surface enhanced Raman scattering (SERS) or fluorescence (SEF) spectroscopy/microscopy.
In this contribution, we introduce a noble nanoscopic techniques using a combination of these two concept, that of SERS/SEF detection of (bio)molecules and that of sub-diffraction limit SPPs wave-guiding. Specifically, we demonstrate that SPPs launched along a silver nanowire (50 ~ 100 nm diameter) can remotely excite SERS [1,2] and SEF [3] in the vicinity of the nanowire surface due to the SPPs wave-guiding effect. The ability to transfer SERS/SEF excitation over several microns, through sub-diffraction limited structures, will be discussed with respect to potential application toward super-resolution endoscopy [1] and tip-enhanced Raman microscopy [4]

1) G. Lu, H. De Keersmaecker, L. Su, B. Kenens, S. Rocha, E. Fron, C. Chen, P. Van Dorpe, H. Mizuno, J. Hofkens, J. A. Hutchison, H. Uji-i. Advanced Materials, 2014. 26, 5124-5128.
2) J. A. Hutchison, S. P. Centeno, H. Odaka, H. Fukumura, J. Hofkens, H. Uji-i, Nano Lett., 2009, 9, 995 - 1001.
3) L. Su, G. Lu, B. Kenens, S. Rocha, E. Fron, H. Yuan, C. Chen, P. Van Dorpe, M. B. J. Roeffaers, H. Mizuno, J. Hofkens, J. A. Hutchison, H. Uji-i, Nature Commun. 2015, DOI: 10.1038/ncomms7287.
4) Y. Fujita, R. Chiba, G. Lu, N. Horimoto, S. Kajimoto, H. Fukumura, H. Uji-i, Chem. Commun. 2014. 50, 9839-9841.

Plasmonic endoscopy for single cell interrogation

○Hiroshi Uji-i[1,2]
([1]RIES, Hokkaido University, [2]Department of Chemistry, KU Leuven)

Key words Plasmonics, single cell spectroscopy, endoscopy

3S-S2p01 抗生物質の生合成研究から見出した新規 tRNA 依存型アミド合成酵素の基質認識機構

○丸山 千登勢, 濱野 吉十
（福井県大・生物資源）
c-maruyama@fpu.ac.jp

1943 年に初めて単離され、以来、数多くの放線菌から見つかっている抗生物質 streptothricin（ST)は、強力な抗菌活性を示すにも関わらず、ヒトなどの真核生物への毒性が強く医薬品や農薬として利用されていない。ST 及び ST 類縁化合物は共通して、アミノ糖とアミノ酸誘導体からなる streptothrisamine 骨格を有し、アミノ酸側鎖として、1〜7 残基の beta-Lys oligopeptide [oligo(beta-Lys)]、あるいは glycine 誘導体が結合することで数多くの類縁化合物が存在する。興味深いことに、これまでに天然より単離された ST 類縁化合物の側鎖構造は、beta-Lys タイプまたは glycine タイプの 2 種類しか見つかっておらず、これら以外のアミノ酸を側鎖に持つ化合物は見つかっていない。従ってこれら 2 つのアミノ酸側鎖の生合成経路の解明は、beta-Lys、glycine に次ぐ、第 2、第 3 のアミノ酸側鎖を有する新規 ST 類縁化合物の創製につながると期待された。そこで我々はこれまでに ST 生産菌 *Streptomyces rochei* NBRC12908 のゲノムライブラリーより ST 生合成遺伝子を取得し、oligo(beta-Lys)が新奇反応メカニズムを有する非リボソーム型ペプチド合成酵素（NRPS）Orf5、18、19 によって生合成されることを明らかにした。本講演では、glycine 誘導体側鎖を有する ST 類縁化合物 BD-12 の生合成研究から見出した新奇アミド合成酵素と、最近新たに見出したそのホモログ酵素を利用した新規 ST 類縁化合物創製について紹介する。

1. BD-12 生合成遺伝子群の同定

glycine 誘導体側鎖の生合成を明らかにするために、まず、BD-12 生産菌 *S. luteocolor* NBRC13826 の BAC ライブラリーより、BD-12 生合成に関わる全ての遺伝子セットを有する BAC クローンを取得し、本遺伝子群から、glycine 誘導体側鎖の生合成酵素遺伝子の探索を試みた。当初、我々は、glycine 側鎖も ST の beta-Lys 側鎖と同じく、NRPS によって生合成されると予想し、BD-12 生合成遺伝子群から Orf5、18、19 のホモログ酵素遺伝子を探索したが、予想に反し、本遺伝子群には NRPS をコードする遺伝子が存在していなかった。そこで、各遺伝子産物の構造予測を基にアミド合成に関わる酵素遺伝子を探索した結果、 Orf11 が FemAX family に相同性を示すことが判明した。FemAX は、微生物のペプチドグリカン生合成過程におけるペプチド架橋反応を触媒する tRNA 依存型ペプチド合成酵素として知られている。従って BD-12 の glycine 側鎖は、NRPS ではなく、tRNA 依存的なメカニズムで生合成される可能性が示唆された。

2. tRNA 依存型アミド合成酵素 Orf11 の *in vitro* 解析

次に我々は、Orf11 の機能解析を行うために、Orf11 組換え酵素を用いた *in vitro* 反応を試みた。Orf11 の基質となる aminoacyl-tRNA の供給には、大腸菌由来 *in vitro* タンパク質合成システムを利用し、streptothrisamine と glycine を基質に酵素反応を行ったところ、BD-12 生合成中間体 glycylthricin の生成が確認された。さらにタンパク性アミノ酸 20 種類を基質として添加し、Orf11 の基質特性を調べたところ、興味深いことに、alanine をわずかに基質認識し、alanine 側鎖を有する新規 ST 類縁化合物 alanylthricin を与えた。前述したように、ST 及び ST 類縁化合物のアミノ酸側鎖には、beta-Lys タイプまたは glycine タイプの 2 種類しか見つかっていない。しかし、本酵素を用いた反応において、第 3 のアミノ酸側鎖を持つ新規 ST 類縁化合物の創製に成功した。すなわち、Orf11 ホモログ酵素の探索とその応用利用は、さらなる新規 ST 類縁化合物の創出への可能性が期待された。

3. Orf11 ホモログ酵素遺伝子の探索と応用利用に関する研究

放線菌ゲノムデータベースより、Orf11 に相同性を示すホモログ酵素遺伝子の探索を行ったところ、最近、Orf11 と高い相同性を示すホモログ酵素 Sba18 を見出した。そこで、Orf11 と同様に機能解析を行ったところ、Sba18 は、Gly-$tRNA^{Gly}$ 以外にも Ala-$tRNA^{Ala}$、Ser-$tRNA^{Ser}$ を基質として認識し、glycylthricin だけでなく、新規 ST 類縁化合物 alanylthricin、serylthricin を生成することを明らかにした。従って Orf11 と Sba18 は 75%の相同性を示しながら、その基質特異性は大きく異なり、Sba18 は aa-$tRNA^{aa}$ 分子における $tRNA^{aa}$ 構造、アミノアシル基構造の両者に対して、広い基質特異性を有するアミド合成酵素であることが判明した。さらに最近、本酵素を利用して、様々なアミノ酸側鎖を有する新規 ST 類縁化合物の酵素合成に成功した。本講演ではこれらの研究成果について紹介する。

Insight into a flexible substrate selectivity of novel aminoacyl-tRNA-dependent amide synthetase

○Chitose Maruyama, Yoshimitsu Hamano
(Fac. Biotechnol., Fukui Pref. Univ.)

Key words *Streptomyces*, antibiotics, biosynthesis, tRNA-dependent amide synthetase

3S-S2p02 試験管内人工生合成系で擬天然物を創る

○後藤 佑樹
（東大院・理）
y-goto@chem.s.u-tokyo.ac.jp

強い生物活性を示すペプチド性天然物は、タンパク質には見られない特殊な主鎖骨格や側鎖構造を持つものが多い。天然物に広く見られるこれらの骨格を、de novo の人工生物活性ペプチドの構成モチーフとして活用できないだろうか？天然物の重要な局所骨格モチーフを持ちつつ、全体構造は全く新規な生物活性分子は、単なる天然物の類縁体の範疇を超え、天然物を模した人工生物活性分子『擬天然物』と呼べるはずである。望みの活性を有した擬天然物ペプチドを創製するため、我々は擬天然物ペプチドの大規模ライブラリーを構築可能な試験管内人工生合成系を開発している。本講演では、この人工生合成系を用いた生物活性擬天然物の開発を紹介する。

Elaboration of pseudo-natural peptides by artificial in vitro biosynthesis systems

○Yuki Goto
(Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)

Key words in vitro reconstitution, artificial biosynthesis, pseudo-natural products

3S-S2p03 機能未知及び潜在的二次代謝遺伝子資源からの生理活性分子生産を実現する TAR Cloning

○山中 一也[1], 老川 典夫[1], 濱野 吉十[2]
（[1]関西大・化生工, [2]福井県大・生物資源）
kazuyay@kansai-u.ac.jp

抗がん剤や抗生物質などの医薬品として利用される化合物の多くは放線菌の二次代謝産物として生産される。古くから主に陸上土壌から単離された放線菌が創薬リード化合物の生産に利用されてきたが、近年ではこうした古典的手法による新規化合物の取得頻度は大幅に下がり、かつて医薬品産業において重要な役割を果たしてきた天然物創薬研究もその役割を終えようとしている。
一方、次世代シーケンサーが普及したことに伴い多くの放線菌ゲノムには 20～30 に上る潜在的な二次代謝遺伝子群がコードされていることが明らかになったことで、放線菌の創薬資源としての重要性が近年再び注目されつつある。すなわち、放線菌ゲノム上に見いだされる通常の培養条件下では機能発現していない“休眠状態”の二次代謝関連遺伝子群にコードされる各種酵素のアミノ酸配列からその機能や、生産される化合物の構造及び生理活性を推定し、その情報に基づいて合理的に実際の化合物を探索するゲノムマイニングと呼ばれる手法が次世代の天然物創薬研究を支えるものと期待されている。しかしながら、ゲノム解析技術の急速な進歩に相反して、数十～百 kb に及ぶ長大な領域にコードされる二次代謝産物の生合成に関与する遺伝子群を過不足なく正確にクローン化し利用する技術の欠如のため、生理活性天然物の探索及び生合成研究においては、依然として研究対象とする二次代謝遺伝子群毎にコスミドや Bacterial Artificial Chromosome (BAC)を利用して構築したゲノムライブラリーから研究対象とする遺伝子群を不足なく含むクローンを探し当て、異種発現により生産物の有無を確認するという非常に古典的で手間のかかる手法に頼らざるを得ないのが現状である。すなわち、急速な DNA 解析技術の進歩に対してその利用技術の発展が追い付いていないと言える。
そこで我々は、酵母の *in vivo* 相同組換え能を利用した Transformation-Associated-Recombination (TAR) 法を用いて任意の二次代謝産物生合成遺伝子群をゲノムライブラリーの構築を経ることなく微生物ゲノムから直接且つ過不足なくベクターへクローン化し、異種発現宿主において化合物生産に結び付けることを目指して研究を進めてきた。我々が“TAR による休眠遺伝子資源の掘り起こし”手法の有効性を検証すべく最初の研究対象として選んだ未同定遺伝子群は、海洋放線菌 *Saccharomonospora sp.* CNQ490 ゲノムに見出した推定リポペプチド生合成遺伝子群であった。その理由は、当該遺伝子群のバイオインフォマティックな解析結果が、(1)チオテンプレート型の非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)によって生合成されるペプチド骨格が、既に皮膚感染症治療薬として実用化されているダプトマイシンと類似していると予想されたこと、(2)当該遺伝子クラスターにはハロゲン化酵素遺伝子がコードされていたことから、生産物は既知のリポペプチドとは異なるユニークな生理活性を発現する可能性があることを示していたからである。そこで、73-kb（全ゲノムの 1.5%に相当）に及ぶ長大な領域にコードされるこの推定ハロリポペプチド生合成遺伝子群を、CNQ490 株ゲノムから直接クローン化し、更に制御遺伝子の改変、モデル放線菌での異種発現を通して、新規リポペプチドの探索を試みた。その結果、制御遺伝子欠失変異を施した異種発現株からは、期待した通りペプチド骨格の 2 つの芳香族アミノ酸残基が共に塩素化された新規リポペプチド抗生物質及びその誘導体の生産が確認された。この化合物が TAR 手法による休眠遺伝子群の覚醒により演者らが手にした最初の天然物となった。従って、このハロリポペプチドには TAR により生み出された長男坊 太郎(Taro)であるという特別な思いがあり、主生産物を Taromycin A と命名した。
このように、TAR を用いる新規二次代謝産物探索及び生合成研究の手法は、合理的に遺伝子資源を化合物生産に結び付ける画期的な技術と言えるが、このプロトタイプ TAR 法においても、安定にクローン化できる遺伝子サイズに上限があること、酵母内での相同組換え過程でクローン化遺伝子を保持しない疑陽性クローンが一定頻度で出現することから、依然として小規模ではあるが陽性クローン(～数%)の選抜過程が必要であった。これまでに、我々は本手法をハイスループット化し、網羅的天然生理活性物質の探索研究手法として応用することを目指し、より長大な領域にコードされる二次代謝産物生合成遺伝子群をも安定に、且つ煩雑な追加の選抜過程を経ることなくゲノム DNA からワンステップで効率的に直接クローニング出来るように改良研究を進めてきた。本講演ではその進捗や新規二次代謝産物生合成研究に於ける TAR 法の応用例についても紹介したい。

TAR cloning that allows the efficient production of natural product molecules from uncharacterized gene collections

○Kazuya Yamanaka[1], Tadao Oikawa[1], Yoshimitsu Hamano[2]
([1]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [2]Fac. Biotechnol., Fukui Pref. Univ.)

Key words natural product, homologous recombination, heterologous production

3S-S2p04 精密解析に基づく多価不飽和脂肪酸生合成酵素の機能改変

○林 祥平[1], 佐藤 康治[2], 小笠原 泰志[2], 大利 徹[2]
（[1]北大院・総合化学, [2]北大院・工）
shohei884@eis.hokudai.ac.jp

ドコサヘキサエン酸 (DHA: C22:6 ω3) やエイコサペンタエン酸 (EPA: C20:5 ω3) などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は膜脂質の構成成分であり、また、プロスタグランジン類などのシグナル分子の前駆体である。これら PUFA は機能性脂質と呼ばれ、動脈硬化や高脂血症改善などの生理活性を示すことが知られており、医薬品やサプリメントとして需要が増加している。現在の供給源は魚油等の海洋資源であるが、海洋資源の保護の観点から海洋資源に依存しない供給源が求められており、新規供給源として微生物発酵が注目されている。
微生物には 2 つの PUFA 生合成経路が知られている。１つは酸素依存型不飽和化酵素と炭素鎖長伸長酵素によって *cis* 二重結合の形成及び伸長反応が触媒され、オレイン酸から段階的に PUFA を合成する経路である。もう１つはポリケチド合成酵素 (PKS) に似た酵素複合体 PUFA 合成酵素によって *de novo* で PUFA を合成する経路である。PUFA 合成酵素は 3 つまたは 4 つのサブユニットから構成され、ドメインが連続的に反応を触媒し、最終生産物を特異的に合成するが、その詳細な生合成機構は明らかとなっていない。
これまでに DHA、EPA とアラキドン酸 (ARA C20:4 ω6) の生合成に関与する PUFA 合成酵素遺伝子が報告されている。興味深いことに、これら 3 つの PUFA 合成酵素は cis 二重結合の導入位置 (ω3 or ω6) や炭素鎖長 (C20 or C22) の異なる PUFA を特異的に合成するにも関わらず、そのドメイン構造が類似している。そこで、我々はこれら PUFA 合成酵素を用いて精密な生合成解析を行い、生産物の *cis* 二重結合の導入位置と炭素鎖長制御機構の解明に取り組んだ。
上述のように 3 つの PUFA 合成酵素は似たドメイン構造を持つ。そこで、大腸菌を用いた異種宿主発現系を構築し、各々のサブユニット酵素遺伝子やドメインを相互に交換することで生産物の制御に関与する遺伝子とドメインを解析した。その結果、EPA と ARA 合成酵素の 2 つの dehydratase (DH) ドメインおよびサブユニット C にある β-ketoacyl synthase (KS_C) /chain length factor (CLF) ドメインが *cis* 二重結合導入の位置の制御に関与すること、DHA と EPA 合成酵素のサブユニット C にある KS_C/CLF ドメインが炭素鎖長 (C20 or C22) 制御に関与することが明らかとなった。
2 つの DH ドメインはそれぞれ、モジュラー型 PKS 中の DH (DH_{PKS})と *cis* 型不飽和脂肪酸の生合成に関わる FabA 型 DH (DH_{FabA}) と相同性を示すことから、これらが *cis* 二重結合の導入位置を制御すると予想された。そこで、EPA と ARA 合成酵素由来の両 DH ドメインの組換え酵素とアシル化 acyl carrier protein (ACP) または *N*-アセチルシステアミン (SNAC) 基質を用いて *in vitro* 機能解析を試みた。その結果、3-hydroxyhexanoyl-ACP 基質に対して、ARA 合成酵素では DH_{PKS} が DH_{FabA} と比較して高い触媒活性を示し、逆に EPA 合成酵素では DH_{FabA} が DH_{PKS} よりも高い活性を示した。また、DH_{FabA} は脱水反応に続く二重結合の異性化も触媒し、*cis* 二重結合を形成することがわかった。以上から経路中間体である 3-hydroxyhexanoyl-ACP に対する 2 つの DH ドメインの基質特異性の違いが生産物の *cis* 二重結合の導入位置を制御していることを明らかとした [1]。
次に、DHA と EPA 合成酵素由来 KS_C/CLF ドメインの *in vitro* 機能解析を行った。PUFA 合成酵素にはサブユニット A にも KS ドメイン (KS_A) が存在するため、両 KS ドメインの組換え酵素を調製し、炭素鎖長の異なる ACP 基質を用いてその基質特異性を比較した。その結果、KS_A は何れも炭素鎖長が短い基質を認識する一方、KS_C は何れも中鎖の基質を認識することが分かった。次に、炭素鎖長が 18 の基質を用いて同様に反応を行ったところ、何れも KS_A のみが炭素鎖長 18 から 20 への縮合反応を触媒することがわかった。すなわち、EPA 生合成の最後の縮合反応は KS_A が関与することが示された。DHA 生合成の最後の縮合反応についても解析した結果、DHA 合成酵素由来の KS_C が炭素鎖長 20 から 22 への縮合反応を触媒することが示唆された。以上の結果から PUFA 合成酵素は鎖長伸長に 2 つの KS ドメインを使い分け、KS_C の僅かな基質特異性の違いが最終生産物の炭素鎖長を制御していることが明らかとなった [2]。
これまでに得られた知見に基づき、DHA 発酵生産に利用されている微細藻類由来 DHA 合成酵素に変異導入し、DHA から EPA 合成酵素へと変換させることに成功した。本シンポジウムでは明らかとなった PUFA 生合成マシナリーとその機能改変の詳細について紹介したい。

1) S. Hayashi *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, 58, 2326-2330.
2) S. Hayashi *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed.*, doi: 10.1002/anie.201900771.

Dissecting and engineering of polyusaturated fatty acid synthases for product control

○Shohei Hayashi[1], Yasuharu Satoh[2], Yasushi Ogasawara[2], Tohru Dairi[2]
([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words polyunsaturated fatty acid, polyketide synthase, fatty acid biosynthesis

3S-S2p05 制御因子・低分子シグナル分子による放線菌二次代謝の合理的人為制御

〇荒川 賢治
（広島大院・統合生命科学）
karakawa@hiroshima-u.ac.jp

放線菌は微生物由来二次代謝産物の７割近くを生産する有用土壌微生物である。放線菌二次代謝産物に関して、近年では生合成遺伝子の改変による非天然型抗生物質の創製も盛んに行われており、創薬の研究シーズとして期待される。近年の次世代シークエンサー解析によると、一菌株あたり 30 種類以上の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターがコードされているが、通常生産されるのは約 1-2 割であり、残りの 8-9 割は遺伝子発現されていないことが多く、多くの二次代謝生合成遺伝子クラスターは休眠状態である。すなわち、これら休眠二次代謝クラスターの合理的活性化技法（ゲノムマイニング）の確立が、生物資源の有効利用とともに近年停滞気味の新規生理活性天然物の取得に繋がるといっても過言ではない。

ゲノムマイニング技法として、二次代謝遺伝子の異種発現、転写リプレッサーの遺伝子破壊、主要二次代謝の生合成遮断による代謝改変、などが挙げられ、世界中で有用生理活性物質の獲得を目指し、様々な研究が展開されている。我々は、２つのポリケチド抗生物質ランカサイジン・ランカマイシンを生産する放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株を研究材料とし、特異な二次代謝生合成機構の解明と生産制御システムの合理的理解を展開している。本発表では、我々のゲノムマイニング技法の最近の成果について詳述するとともに、制御因子や二次代謝生産誘導シグナル分子による物質生産誘導についての可能性について議論する。

Rational control of secondary metabolism in *Streptomyces* species through the regulatory pathways and low-molecular signaling molecules

〇Kenji Arakawa
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words biosynthesis, *Streptomyces*, regulation, antibiotics

3S-S3p01 バイオジェット燃料の普及への取り組み

〇中島 陸博
（日本航空）
nakashima.mtxm@jal.com

「航空機持続可能な社会のために JAL グループができること」
JAL グループでは、「SDGs をはじめとする社会の課題解決へ貢献」を目指し、環境負荷軽減に向けてさまざまな取り組みを行っています。なかでも、航空会社として重要な課題として捉えているのは、CO_2 の排出量削減についてです。2010 年、JAL グループは、「2020 年度までに 2005 年度対比で CO_2 排出量を輸送量当たり 23%削減する」ことを宣言。使用燃料の削減に注力し、従来機よりも CO_2 排出量を削減できるボーイング 787 型機や、エアバス A350 型機といった省燃費機材を導入するなど、あらゆる取り組みを行ってまいりました。
今後は、環境に優しい社会の実現に向けてさらにもう一歩踏み込むために、調達する燃料の質にも着目。CO_2 排出量そのものの削減を目指し、バイオジェット燃料の利用促進を加速させていきたいと考えています。バイオジェット燃料とは、欧米を中心に開発や実用化が進んでいる燃料の一種です。その原料や製造技術はさまざまですが、都市ごみや廃木材などを原料にすることで、CO_2 排出量を大幅に削減することができます。
JAL グループでは、国際民間航空機関（ICAO）が定める国際航空分野の CO_2 排出量削減の方針に合わせ、バイオジェット燃料の実用化を促進。2018 年には、一般廃棄物（都市ごみ）を原料としてバイオジェット燃料を開発する、フルクラム社への出資を行いました。今後、フルクラム社で量産体制が確立した後は、北米発便を中心に、本格的にバイオジェット燃料の搭載を進めていきたいと考えています。
「衣料品で空を飛ぶ！チャーターフライト実現に向けて」
バイオジェット燃料の実用生産に向けた活動は、欧米を中心に、先行して取り組まれています。一方で、JAL グループが使用する燃料の約 7 割は日本で給油しているため、「国産」のバイオジェット燃料の安定的な供給も不可欠だと考えています。こうした背景を受けて、JAL グループでは、日本の航空会社として国産のバイオジェット燃料の製造も目指し、アジアにおいても機運を高めていくべく、研究開発を始めています。
開発促進に向けた取り組みの一つとして、現在、「10 万着で飛ばそう！JAL バイオジェット燃料フライト」を実施しています。これは、バイオジェット燃料が皆さまにとって身近な素材である、衣料品からも製造できることに着目したプロジェクトです。日本環境設計株式会社の協力のもと、全国の皆さまから衣料品を回収し、Green Earth Institute 株式会社と共に、公益財団法人地球環境産業技術研究機構の技術を使い、国内の既存施設にて国産バイオジェット燃料の製造を行います。
2018 年 10 月 15 日～12 月 10 日の期間、全国の衣料品店や百貨店をはじめとする 50 社約 1000 店舗にご参加いただき、店頭に回収ボックスを設置して不要となった衣料品の提供を募集いたしました。その結果、おかげさまで 10 万着を大幅に超える約 25 万着の古着を回収することができました。現在、工場にて古着の選別作業と溶解作業が行われています。
このバイオジェット燃料を使ったチャーター便の運航は、2020 年を予定しています。本取り組みを契機として、日本国内において、今後、安定的な供給を叶えるべく、量産化への取り組みが加速化することを期待しています。
JAL グループは今後も、環境の課題解決に積極的に取り組み、社会の進歩発展に貢献してまいります。

Effort for widespread use of bio-jet fuel

〇Takahiro Nakashima
(JAL)

Key words Bio-jet fuel, alcohol to jet, CO_2 reduction

3S-S3p02 微細藻類ユーグレナを活用したバイオ燃料事業化

○鈴木 健吾 [1,2]
([1]ユーグレナ, [2]理研・環境資源)
suzuki@euglena.jp

微細藻類の一種であるユーグレナは低酸素条件下におかれるとワックスエステルという長鎖脂肪酸と脂肪族アルコールがエステル結合した脂質を作り出す。このワックスエステルは炭素鎖 14 の脂肪酸（ミリスチン酸）と脂肪族アルコール（ミリスチルアルコール）から構成されるものが主成分であり、その分解により生成するバイオ燃料は、ジェット燃料等に適した性質であることが明らかとなっている。また、他の微細藻類が作り出す脂質も同様に、バイオ燃料として優れた性質を示すことがわかり、再生可能エネルギー創出の担い手として微細藻類に対する期待が高まっている。
化石燃料と競合できる価格でのバイオ燃料の生産のためには、原料となる油脂の効率的生産が必須となる。用いる株の育種は、生産性の向上に大きく貢献できる可能性があり、ユーグレナについても重イオンビーム照射による変異導入がユーグレナの変異体作出に効果的であることが示唆され、実証例として高温に耐性がある変異体株が作出された。これを遺伝子導入に依らない手法として利用し、ユーグレナ育種が実施されている。重イオンビーム照射はゲノムに大きな欠失をランダムに導入する。このため、これを用いた育種は、様々な変異が導入された個体集団の中から、目的の形質を示す個体を選抜することが必要となる。生物学的に多様な形質を有する細胞の集団から、個々の細胞を高速選抜する技術としては FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)が有効であり、これを利用して油脂を高含有する育種を実施した。BODIPY505/515 を用いてユーグレナ生細胞内の油脂を染色し、FACS により選抜する方法を確立することにより、重イオンビームによる変異導入と組み合わせ、実証例において野生型よりもさらに 40%程度高い油脂含量を有する株の作出に成功した。近年は、油脂生産における代謝関連のメカニズムもメタボローム解析や遺伝子の発現制御により明らかになってきており、これらの知見を活用することにより様々な形質を付与し、燃料生産に特化したユーグレナ育種株として発展していくことが期待される。
さらに、ユーグレナを活用したバイオ燃料の生産においては、培養装置の低コスト化、培養から油脂抽出におけるエネルギー投入量の削減、培養に供する栄養源の低コスト化も大きな課題である。この課題に取り組むため、多気クリスタルタウン（所在地：三重県多気郡多気町）の中部プラントサービスが保有する木質バイオマス発電所の隣接地に、バイオ燃料向けの研究開発に特化した研究、培養を行う設備を建設し、実証試験を行った。実証を行う上で以下のシステムを組み合わせることにより、ユーグレナの培養から油脂抽出までの一貫生産システムを構築することを目指している。
・火力発電所から排出される排ガス中の CO2 を効率的に利用するシステム
・火力発電所内で未利用な排熱・排水を培養や油脂抽出工程に有効利用するシステム
・培地コスト低減のために下水中に含まれる栄養源を利用するシステム
（本事業は、経済産業省資源エネルギー庁「平成 28 年度 微細藻類燃料生産実証事業費補助金」を活用）
藻類バイオ燃料事業が採算合うようにするためには、材料となる油脂を安く生産できるようにするなど、解決すべき課題は多い。一方で、それらの課題と並行して、実際にユーグレナのワックスエステルを利用してバイオ燃料の生産ができることを実証するために、バイオジェット・ディーゼル燃料製造実証プラントを神奈川県横浜市に建設した。当該プラントでは、ユーグレナ・ワックスエステル以外の植物油脂からも併せて燃料を試験生産する計画であるが、年間で 125 kL 生産を目指して運転を実施している。さらに、バイオ燃料を生産して供給する事業を成立させるために、さらに燃料生産以外の面でも低コスト化と安定供給を目指して様々な検討が必要である。例えば、経済性を担保するにあたっては、油脂を抽出した後の脱脂藻体等の副産物を有効利用することも全体としての経済性を考慮する上で重要である。各種課題を解決するには、広域の技術領域における開発と協力関係が必要で、生物工学を中心とした異分野融合のプロジェクトとして推進している。

Commercialization of biofuel using a microalga Euglena

○Kengo Suzuki[1,2]
([1]euglena Co., Ltd., [2]CSRS, RIKENS)

Key words biomass, euglena, algae, metabolic engineering

3S-S3p03 微細藻類を用いたバイオジェット燃料生産プロセスの構築

○武藤 潤
（ＩＨＩ ソリューション・新事業統括本部 藻類バイオ燃料グループ）
jun_mutou@ihi.co.jp

世界的に CO_2 排出量が増加しており、パリ協定を始め排出量削減に向けて国際的な取り組みが行われている。航空機の利用増加に伴う CO_2 排出量の増加から、CO_2 排出量削減の一環でバイオジェット燃料の使用へ向けた取り組みが行われている。世界の航空会社からなる業界団体 IATA（International Air Transport Association）は、航空機に関わる CO_2 排出量を 2050 年までに 50%削減（2005 年比）することを掲げており、目標達成のためには航空機の技術革新や運用方法の改善に加え、バイオ燃料の導入が不可欠であるとしている。
このような世界環境の変化から、当社では 2011 年より微細藻類を用いたバイオジェット燃料生産プロセスの開発に取り組んでいる。2013 年には 100m^2 規模の開放型培養槽を屋外に設置し、数か月の培養試験を行いながら基礎データを取得し、屋外における安定培養のノウハウを蓄積した。2015 年には 1500m^2 規模の培養槽を設置し、運転方法の確立と曝気・収穫・乾燥などの要素技術の検証を行った。2018 年には日本より日射量が高くより生産性の向上が見込まれるタイ王国のサラブリ県に 1ha 規模のパイロットプラントを整備し、商用に向けた一貫生産プロセスの実証試験を進めている。
微細藻類によるバイオ燃料生産は、非農耕作地でも実施可能なため、持続可能な燃料生産手段として注目されている。当社では *Botoryococcus braunii*（以下、Bb）を品種改良し、高速増殖能と高オイル含量を併せ持つ株「高速増殖型ボツリオコッカス（Hyper-Growth *Botryococcus braunii*、以下、HGBb)」を用いている。HGBb は炭素源として CO_2 を利用し光合成により主に炭素と水素のみからなる炭化水素油を生産する。HGBb から分泌された油は液中に漏出することなくコロニー内部に蓄積し、HGBb の乾燥物重量のうち油含量は 50wt%にのぼる。微細藻類を大量に培養し、有価物を獲得する技術は例えば機能性食品などで実用化されている。本プロセスから生産する最終目的物が燃料であることから低コスト・低エネルギーにて大量に培養する必要がある。
当社が取り組むバイオジェット燃料生産プロセスは、微細藻類を生産する培養工程、培養液から微細藻類を濃縮する収穫工程、濃縮した液体から水分を除く乾燥工程、乾燥物から油を抽出する抽出工程、抽出した油からジェット燃料を精製する改質工程、からなる。当社では比較的規模が大きく、生物に合わせて設計を行う必要がある培養工程～乾燥工程を開発対象としている。
培養工程では光合成を促進させるために十分に撹拌し、均等に HGBb へ CO_2 を供給する必要がある。一般的に開放型培養槽を均一に撹拌するためには撹拌翼を液中に設置し、液中に CO_2 を供給するためには曝気装置を培養槽全面に配置する方法が存在するが、コストおよびエネルギーがかかる。そのため当社では曝気管を培養槽全域に走査する機構の曝気装置を採用している。この方式により少ない曝気量で効率的に CO_2 を培養槽全体に供給することが可能となる。また培養槽全体を曝気しつつ走査するため、培養液撹拌の効果も得られる。
収穫工程では HGBb の粒径が大きい性質を利用し、ろ過による固液分離方式を利用している。このとき発生した脱水液（藻体濃縮液）を乾燥工程に排出する。ろ液は再生処理を行った後に再度培養工程にて利用する。ろ過方式では藻体を含む培養液を輸送するためのポンプ動力が発生するため、より低エネルギーな回収方法として HGBb の浮上性を利用した回収方法を検討している。HGBb を含む培養液を静置すると油を含んだ比重の軽い HGBb が自然に浮上し濃縮され浮上層が発生する。回収した浮上層のみを一旦静置することで再度浮上層させると、更に濃縮することが可能である。
乾燥工程では化石燃料由来の熱エネルギーを用いない風乾による自然乾燥方法を採用している。水分を除く工業的手法として、一般的には加熱乾燥や凍結乾燥法が知られているものの、いずれもエネルギーがかかる。当社では、太陽由来の熱エネルギーや自然風を用い乾燥し、人力で乾燥物の回収を行うことで、プロセスの低エネルギー化の検討を進めている。
微細藻類由来の純バイオジェット燃料をジェット燃料として用いるためには、石油由来のジェット燃料との混合バイオジェット燃料の要求仕様である ASTM D7566 を満たす必要がある。弊社の純バイオジェット燃料は ASTM D7566 Annex2 で定義されている水素化処理プロセスを利用し、改質を予定している。現在までに国内の培養設備で HGBb を生産・抽出油の作製を行い、改質プロセス最適条件を探索するための改質試験を実施した。得られた改質条件で ASTM D4054 における Tier1、Tier2 試験用サンプルを生産し、現在 ASTM 認証取得を目指している。
本開発は、 国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託事業（プロジェクトコード P17005）で実施したことを記し、謝意を表す。

Development of production process of algae-based bio-jet fuel

○Jun Muto
(Algae-based Biofuel Group, Solution Headquarters, IHI Corp.)

Key words Bio-jet fuel, microalgae, production

3S-S3p04 高性能噴流床ガス化と FT 合成による純バイオジェット製造パイロットプラントの研究開発

○山内 康弘[1], 篠田 克彦[1], 菱田 正志[1], 坂井 清彦[2], 小嶋 保彦[3], 水野 拓哉[4]
（[1]三菱日立パワーシステムズ, [2]ＪＥＲＡ, [3]東洋エンジニアリング, [4]JAXA）
yasuhiro_yamauchi@mhps.com

【背景と目的】 航空業界では、今後拡大が予想される航空需要を背景に、二酸化炭素排出量削減による地球温暖化抑止対策が喫緊の課題となっており、2016 年 10 月、国際民間航空機関（ＩＣＡＯ）が、長期的な二酸化炭素排出抑制目標（2020 年以降の排出量増加ゼロ）を策定し、その達成のためにバイオジェット燃料の普及促進は不可欠としている。
バイオジェット燃料の市場形成および導入拡大に対する期待が世界的に高まる中、バイオジェット燃料市場形成へ向けて、ライフサイクルアセスメント（製造に係る化石エネルギー収支）や二酸化炭素排出量削減率等の評価基準をクリアし、かつ低コスト製造技術の開発が必須となっている。
このような状況を背景として、2030 年頃のバイオジェット燃料の商用化に向けて、その生産技術について、より高効率な工業化を実現するための課題抽出およびその対策を盛り込んだ一貫製造プロセスのパイロットスケール試験を行い、安定的な長期連続運転および製造コストの低減などの実現可能性を検証する計画である。本実証試験では、スケールアップに適した部分酸化式噴流床ガス化技術と、反応器容積を大幅にコンパクト化できるマイクロチャンネル FT 合成技術を組み合わせたパイロットスケール一貫製造設備（原料処理 0.7t/D、純バイオジェット燃料製造 20l/D 程度）を JERA 新名古屋火力発電所構内に建設し、検証運転により技術の検証を行うと共に、得られた燃料を実エンジン燃焼試験に供し燃料性能を評価する計画である。
この実証研究は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（ＮＥＤＯ）の委託業務で行うものです。

Development of once-through process of biomass gasification and FT synthesis

○Yasuhiro Yamauchi[1], Katsuhiko Shinoda[1], Masashi Hishida[1], Kiyohiko Sakai[2], Yasuhiko Kojima[3], Takuya Mizuno[4]
([1]Mitsubishi Hitachi Power Systemes, Ltd., [2]JERA Co., [3]TOYO Engineering Co., [4]JAXA)

Key words biojetfuel, gasification, waste wood chip, Fischer-Tropsch process

3S-S3p05 100%グリーンジェット燃料の生産技術開発への挑戦

○乾 将行[1,2]
（[1]RITE・バイオ, [2]奈良先端大・バイオ）
inui@rite.or.jp

航空機からの CO_2 排出量は世界の CO_2 全排出量の約 2%を占め、2017 年時点で約 8 億 6 千万トンに達し、今後何の対策も講じなければ 2050 年には現在の 2～5 倍の排出量になると予測されている。航空機は電動化などが難しいため、航空機からの CO_2 排出削減に向けて再生可能資源であるバイオマスを原料にしたバイオジェット燃料に大きな期待が寄せられている。このような背景の下、我々はバイオマス由来のブタノール（バイオブタノール）を化学的に変換したアルコール系ジェット燃料（Alcohol to Jet：ATJ）と、石油系ジェット燃料と任意の割合で混合可能で、単独でもジェット燃料の規格を満たす新規な 100%グリーンジェット燃料の 2 つのバイオジェット燃料の製造技術開発を行っている。
バイオブタノールを原料としたジェット燃料は、2016 年に米国材料試験協会（ASTM）の規格をクリアして、商業フライトへの利用が可能となった。バイオブタノールについては、RITE が独自に開発した RITE バイオプロセスを利用して、高効率バイオブタノール生産プロセスの開発を進めている。本生産技術の特徴は、原料としてセルロース系バイオマスを利用可能で、且つ高速・高収率生産が可能な点にある。開発にあたっての課題は、ブタノールによる生産細胞への高い毒性であった。そこで我々は、生産菌に対するブタノール耐性付与などの育種技術や増殖非依存型バイオプロセス（RITE バイオプロセス）の特性によりこの問題を解決した。現在、米国立再生可能エネルギー研究所（NREL）との共同研究により、非可食バイオマス由来の混合糖を原料としたバイオブタノール生産技術を、米パシフィック・ノースウエスト国立研究所（PNNL）との共同研究により、ブタノールを化学的にオリゴマー化による drop-in 燃料に変換する技術開発を進めている。ブタノールのバイオ生産では、世界最高レベルの生産性を達成しており、生産菌のブタノール耐性の向上、生産菌の代謝経路の最適化、および省エネルギー型ブタノール回収技術の開発などの個別要素技術開発を進め、これらを組み合わせることによってバイオブタノールの更なる高速・高収率な生産を目指している。一方、国内におけるバイオジェットプロジェクトへの技術協力にも取り組んでいる。2018 年 10 月から始まった日本航空株式会社（JAL）が主催する「10 万着で飛ばそう！JAL バイオジェット燃料フライト」プロジェクトである。本プロジェクトは、JAL と日本環境設計株式会社が協力して回収した古着を原料として、RITE 発のベンチャー企業である Green Earth Institute 株式会社がイソブタノールを生産し、ASTM に適合したバイオジェット燃料を製造するものであり、JAL は、2020 年中に、このバイオジェット燃料を使用した日本初のチャーターフライトの運航を目指している。
次に 100%グリーンジェット燃料の開発目的や背景について説明する。ジェット燃料は炭素数 C9～C15 のノルマルパラフィン、イソパラフィン、シクロパラフィン、芳香族化合物を主成分とする炭化水素化合物の混合物であり、ASTM が定める規格によって析出点や密度などの様々な物性が規定されている。この中で、芳香族化合物は燃焼性が悪いために含量に上限が設けられているが、ニトリル系 O リングを膨潤させる性質から燃料系機器の気密性の維持に必須な成分である。ATJ も含めてこれまでに ASTM によって認証を受けているバイオジェット燃料はいずれもバイオマスから製造される成分はイソパラフィンのみであり、イソパラフィンの密度はシクロパラフィンや芳香族化合物の密度よりも軽いため、イソパラフィンのみからなるバイオジェット燃料の密度はジェット燃料の規格よりもかなり軽くなる。そのため既存のバイオジェット燃料に必須な成分である芳香族成分をほとんど含まないため 100%では使用できず、いずれも石油系ジェット燃料と混合して使用され、その混合比率の上限は最大で 50%までとなっている。そこで我々は、イソパラフィンだけでなくシクロパラフィンや芳香族化合物も含み、石油系ジェット燃料と任意の割合で混合可能な新規な 100%グリーンジェット燃料の製造技術開発を開始した。製造法の概要を講演で解説する予定である。
航空部門からの CO_2 排出量削減対策として、国際民間航空機関（ICAO）は航空機からの CO_2 排出量を 2020 年以降増やさないという目標を立てており、国際航空運送協会（IATA）は 2050 年時の CO_2 排出量を 2005 年時の 50%まで削減するという目標を立てている。従って、これらの目標を達成するには 2050 年時において、ジェット燃料消費量の 60%以上をバイオジェット燃料で代替させる必要がある。本講演では、我々が開発中の 2 つのバイオジェット燃料技術に関する開発状況と今後の展望について紹介する。

Challenge to develop 100% green jet fuel production technology

○Masayuki Inui[1,2]
([1]Bio, RITE, [2]Div. Biol. Sci., NAIST)

Key words bio jet fuel, alcohol to jet, CO_2 reduction, *Corynebacterium glutamicum*

3S-S4p01 シンポジウム「ペアで紹介します，Wet と Dry の融合研究」開催趣旨

〇堀之内 貴明
（理研・生命機能）
takaaki_horinouchi@riken.jp

分析技術の発展に伴うデータ量の増大により、バイオインフォマティクスを始めとする計算科学的解析（Dry 解析）の生物工学分野における重要性が高まっている。しかしそれには高度な専門知識を要し、さらにターゲットや目的によって手法が多種多様である等のハードルが存在する。分析技術等の技術革新はデータ解析の質および量の変化をもたらし続けており、各研究者が Wet 実験ならびに Dry 解析の全てを独力で課題解決することはますます困難になると予想される。そのため、Wet 系ならびに Dry 系研究者の連携の重要性が高まっている。

本シンポジウムでは、Wet と Dry の融合研究について、それぞれを担当する 2 名の研究者を招聘し、「1 演題につき 2 名が登壇するペアプレゼンテーション形式」により紹介していただく。通常のシンポジウム講演とは異なり、講演要旨集の各演題に対し登壇者が 2 名ずつアサインされていることに注意されたい。

様々な分野からの幅広い研究事例を題材とし、共同研究の成立の経緯や連携の取り方などの具体的な内容についてそれぞれの視点から紹介していただくことにより、Wet 系ならびに Dry 系研究者の連携の秘訣を議論できれば幸いである。

Introduction of symposium "Paired Presentation by Wet and Dry Researchers: How to Integrate Wet and Dry Study? "

〇Takaaki Horinouchi
(BDR, RIKEN)

Key words bioinformatics

3S-S4p02 植物病原糸状菌を制御する菌類ウイルスの探索とゲノム解析の迅速化

水谷 行善[1], カラッサンチオ マッテオ[2], 太田 綺弥[1], 藤森 文啓[3], 〇上坂 一馬[4], 〇千葉 壮太郎[1]
（[1]名大院・生命農学, [2]ボローニャ大・農環食科技, [3]名大・遺伝子, [4]東京家政大・家政）
uesaka@gene.nagoya-u.ac.jp, chiba@agr.nagoya-u.ac.jp

植物病害を引き起こす病原微生物の約 8 割は、糸状菌（いわゆるカビ）である。これらの防除には基本的に化学農薬が用いられており、消費者の環境・健康に対する意識の高まりを受けて微生物を用いて病原菌を制御する生物的防除法に大きな期待が持たれるようになってきている。生物防除では、Trichoderma 属等の糸状菌や Bacillus 属等の細菌が主たる生物農薬として利用されるが、現在では菌類ウイルス（マイコウイルス）が第 3 のプレーヤーとして考えられるようになった。主立った植物病原糸状菌を対象にウイルスハンティングが広く実施され、新規ウイルスが次々に報告された結果、菌類ウイルスの豊かな多様性が理解されてきている。例えば、コムギの重要病害である赤かび病菌（*Fusarium boothii*）BL13 株には 2 種類の RNA ウイルス、Fusarium boothii large flexivirus 1 (FbLFV1)とその defective RNA（FbLFV1 の内部配列欠損 RNA 種；D-RNA）、および Fusarium boothii mitovirus 1（FbMV1）が共感染しており、宿主菌の生育やコムギ穂に対する病原性を顕著に抑制する。これらウイルスのゲノム解析の結果、FbMV1 は最も広く感染が確認されている Narunavirus 科 Mitovirus 属の 1 種で、FbLFV1 は新たなウイルス科を形成すると思われる新奇ウイルスであることが明らかにされた。旧来の cDNA ライブラリ構築に基づくウイルスゲノム解析は多大な労力と時間を要したが、昨今の NGS による塩基配列解析技術の革新により、新規ウイルスのゲノム解析は飛躍的に簡略化されていることは言及するまでもない。しかし、本菌株およびウイルス同定のために、Illumina Hi-seq を利用したウイルス由来 RNA 配列の網羅的取得を試みた結果、種々の問題に直面することになった。
まず、１）菌類ウイルスでは全く新規のウイルス群が発見されることは珍しくなく、リファレンス配列情報が利用できない場合がある。また、２）末端配列情報が得られたか不明であり、RACE による追加解析が必要である。場合によっては、３）互いに近似なゲノム配列をもつ quasi species や D-RNA が混在することがある。最後に、４）コスト削減のために、ウイルス由来核酸を混合して配列解析に供することが一般的であり、同一種異系統ウイルスが含まれる場合も少なくなく、また取得コンティグの帰属（どの菌株に感染するウイルスか）も RT-PCR で決定する必要がある。以上の理由から、*de novo* アッセンブリで完全長ゲノム配列が取得できないことも多く、配列取得後の追加実験も数多くあるなど、NGS の技術革新を活かしきれていない。事実、FbLFV1 および FbMV1 の解析では、これらのウイルスゲノム解析に際し、上記の事由により想定外の労力と時間を必要とした。
そこで、演者らの研究グループでは、Oxford Nanopore Technologies の MinION を用いた RNA direct sequencing をプラットフォームとして、RNA ウイルスゲノム決定法の開発を試みている。MinION の利点は、1 分子 RNA の完全長配列が取得でき、D-RNA の混在が問題にならない点、また工夫次第で末端配列の決定ができる点にある。問題点としては、RNA 配列の解析精度は未だ高くなく、およそ 20％のエラーが含まれることで近似配列の差別化が困難な点、加えてリファレンス配列の無い新規ウイルスの配列決定が比較的難しい点が挙げられる。本研究では、上記の利点を最大限活かし、難点となる *de novo* アッセンブリの精度をバイオインフォマティクスによるワーキングフローの構築により可能な限り向上させた。また、配列の帰属決定についても簡便な方法を模索している。以上で構築したプロトコルを用いて、実際に Fusarium 属菌に感染している RNA ウイルス群のゲノムを網羅的に決定した例を紹介したい。

Accelerated procedures in screening for and genome characterization of fungal viruses that attenuate virulence of plant pathogenic fungi

Yukiyoshi Mizutani[1], Matteo Calassanzio[2], Ayane Ota[1], Fumihiro Fujimori[3], 〇Kazuma Uesaka[4], 〇Sotaro Chiba[1]
([1]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., [2]Dept. AEFST, Bologna Univ., [3]Cent. Gene Res., Nagoya Univ., [4]Dept. Domestic Sci., Tokyo Kasei Univ.)

Key words virus, pathogen, genome, direct RNA sequencing

3S-S4p03 プロトン共役型オリゴペプチド輸送体の基質多選択性解析

○伊藤 圭祐[1], ○河合 駿[2]
（[1]静県大院・薬食生命, [2]住友化学）
sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp, kawais3@sc.sumitomo-chem.co.jp

プロトン共役型オリゴペプチド輸送体(POT)を介したペプチド輸送システムは微生物から高等動・植物まで広く保存されており、生体内への栄養源アミノ酸の高効率な取り込みを担っている。POT は 8,400 種類のジ・トリペプチドを輸送する“基質多選択性”を有し、その幅広い基質認識の結果、ヒト小腸・腎臓においてはβラクタム系抗生物質、抗ウィルス薬、降圧薬、抗ガン剤などの薬物輸送体としても機能する。しかしこれまで、膨大な基質数に比較して取得された POT 親和性データが少なすぎること、また解析方法が実験ごとに異なるためデータの直接比較が難しいことなどが課題となり、POT の基質多選択性の全体像、およびその分子基盤となる多基質認識メカニズムは明らかとされていなかった。
本講演では Wet/Dry 融合研究の成功事例として、我々の研究グループが取り組んだ POT の基質多選択性解析を紹介する[1]。

【ジペプチドライブラリーを用いた網羅的親和性測定】
ペプチドの生体吸収性解析には多くの場合、動物にペプチドを投与し血中アミノ酸の濃度変化を解析する方法等が用いられてきた。しかし膨大な数の基質について POT への親和性を解析するためには、ハイスループットな解析システムが不可欠である。そこで我々は、迅速・簡便な新規 POT 解析システム（Fluorescence-based Competitive Uptake assay）を開発し、ジペプチドライブラリーを用いて各種 POT（出芽酵母 scPtr2p、ヒト hPEPT2、線虫 cePEPT1、シロイヌナズナ NPF8.2、カンジダ酵母 caPTR2、納豆菌 YclF）の基質親和性を網羅的に測定した。
一連の測定データから、各 POT に対するジペプチドの親和性は最大で 3,000 倍以上異なることが明らかとなった。真核生物 POT の基質多選択性は大枠で保存されており、“ヒト必須・準必須アミノ酸”である芳香族・分岐鎖アミノ酸を含むペプチドを高効率に吸収することが示された。本講演では、現在まで知られる中で最も基質親和性が高い“超”高親和性型 POT（caPTR2）について、有用物質生産への応用例も紹介する。

【インフォマティクスを活用した分析と予測】
近年、測定技術の飛躍的な発展に伴い、生物学では膨大な実験データが得られることが標準的になりつつある。その中で、インフォマティクス技術を活用することで、膨大かつ多様なデータから新しい知見や法則を効率的に見出すことが重要となっている。さらに、知見や法則を見出すだけでなく、それらを基にした新たな研究の展開も期待されている。
インフォマティクスの活用が重要となる中で、我々はこれまで、多様な生理活性を持ち、膨大な組み合わせを持つ“ペプチド”に着目し、その生理活性とペプチド配列の関係性を効率的に評価する「ペプチドインフォマティクス」を開発してきた。ペプチドインフォマティクスは、物理化学的指標（分子量、疎水度、溶解度など）とインフォマティクス（統計解析・機械学習）を組み合わせることで、生理活性の持つ物理化学的性質を分析し、得られた法則を用いることで現象の予測～新規機能性ペプチドのデザインへ繋げる技術である。また、ペプチドは数十～数百に及ぶ様々な指標に置換することが可能であり、複雑な生物学的な現象を精密に表現することを可能としている。本技術を用いることで、ペプチド - 細胞間、タンパク質間接着や高分子ポリマーとの相性などの法則の導出や新規ペプチドのデザインに成功してきた[2, 3]。
本講演では、ペプチドインフォマティクスを POT の網羅的親和性測定データに適用した事例について紹介する。具体的には、前パートで用いたジペプチドライブラリーを物理化学的指標に置換し、POT の基質多選択性を分析し、加えて機械学習を利用することで *in silico* での予測を試みた。さらに、物理化学的指標がペプチドだけでなく低分子化合物も同様に定量できることに着目し、ジペプチドライブラリーから構築した予測モデルから POT から吸収可能な医薬品を推定した試みについても報告する。ここでは、解析結果を紹介するとともに、Wet データを解析する上での工夫も含めて、紹介する。

[1] *Nature Commun.* 2013 4(2502).
[2] *Bioengineering (Basel)*. 2016 Nov 19;3(4).
[3] *Anal Sci.* 2016;32(11):1195-1202.

Analysing the substrate multispecificity of a proton-coupled oligopeptide transporter using a dipeptide library

○Keisuke Ito[1], ○Shun Kawai[2]
([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Sumitomo Chemical Co., Ltd.)

Key words peptide, transporter, informatics, physicochemical property

3S-S4p04 麹菌摂取による宿主腸内細菌叢の改善および大腸炎の緩和

○兒島 孝明[1], ○志水 元亨[2], 馬場 保徳[3], 中野 秀雄[1], 加藤 雅士[2]
（[1]名大院・生命農学, [2]名城大院・農, [3]石川県大・生物資源研）
kojimat@agr.nagoya-u.ac.jp, moshimi@meijo-u.ac.jp

日本では古くから、多彩な味噌、醤油、清酒などを醸造し豊かな食文化を形成してきた。味噌、醤油、清酒などの醸造には麹菌および酵母の働きが不可欠であり、それらの働きによって、米、麦、大豆などの原料に含まれるデンプンやタンパク質などが分解・代謝され、糖、アミノ酸、ペプチドだけでなく、それぞれの食品に特徴的な香味が生成される。これまで、発酵食品に含まれる様々な成分が免疫力の向上など我々の健康増進・維持に寄与していることが多数報告されている。また、発酵食品の中には、熟成後に加熱処理やろ過を行い麹菌や酵母の働きを停止させることで、醸造後の品質を均一化して販売されているものも少なくない。しかしながら、加熱やろ過の工程を省いた生タイプの味噌、醤油、清酒、甘酒、塩麹、かぶら寿司の中には、麹菌が生きたまま存在しており、我々は麹菌を生きたまま摂取している場合がある。また、加熱やろ過の工程によっては、麹菌は完全に死滅していない可能性もある。近年、腸内フローラおよびそれらの活動の違いが我々の健康および疾患と深く関連していることが明らかになってきた。しかし、真核微生物である麹菌が腸内まで生きたまま届くのか、酸素濃度が低い腸内で活動しているのか、活動しているのであれば麹菌が生産した代謝物や酵素が宿主や腸内フローラにどのような影響を及ぼしているのかについては、全くと言っていいほど分かっていない。
酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、生育環境中の酸素濃度が低くなるとアルコール発酵を行い生育することが知られている。一方、糸状菌については従来、絶対好気性であると妄信されていたために、嫌気条件下での生育の研究は殆どされてこなかった。ところが近年、研究代表者らによる研究などから、麹菌および類縁の糸状菌が腸内のような低酸素条件下（O_2 濃度が 0.1%以下）において、硝酸の還元を伴う脱窒やアンモニア発酵、および分岐鎖アミノ酸発酵などを行うことで、酸素呼吸ができない低酸素条件下で細胞内に蓄積する NADH を NAD^+ に酸化（細胞内レドックスの調節）すること、生成した NAD^+ を用いて解糖系などで ATP を生産することで、低酸素条件下において麹菌がゆっくりと生育できることが明らかになっている。
近年、腸内細菌の研究が発展し、我々の食生活の違いによって腸内フローラが変化すること、腸内細菌の活動の違いが我々の健康および疾患と深く関連していることが明らかになってきている。一方、真核微生物である麹菌 *Aspergillus oryzae* は、1,000 年以上前から我が国の発酵食品製造に用いられており、日本人は少なからず麹菌を生きたまま食する機会があったと考えられる。しかし、摂取した麹菌が腸内で活動しているのか、腸内フローラにどのような影響を及ぼすのかなどについては未知である。
本発表では、マウスに生きた麹菌および滅菌した麹菌を摂取させることによって、麹菌の摂取によって腸内フローラにどのような影響を及ぼすのか、宿主の腸内環境改善（大腸炎の緩和など）効果があるのか、について紹介する。なお、この研究アプローチの過程で、16S rRNA 遺伝子によるマウス腸内フローラの網羅的解析の必要性に直面し、Wet と Dry の融合研究へと舵を切った。
麹菌を摂取することで我々の腸内フローラを改善し健康増進・維持に寄与することが明らかになれば、麹菌を用いて製造した（発酵）食品の新しい魅力になる可能性がある。Wet 系研究者と Dry 系研究者の連携の具体例を示しつつ、本融合研究の今後の方向性についても紹介したい。

***Aspergillus oryzae* administration to mice increases the population of Bifidobacterium spp. in intestinal microflora and represses DSS-induced colitis.**

○Takaaki Kojima[1], ○Motoyuki Shimizu[2], Yasunori Baba[3], Hideo Nakano[1], Masashi Kato[2]
([1]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., [3]Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, 16S rRNA gene sequencing analysis, Intestinal microflora

3S-S4p05 集まると変わること：酵母のストレス応答，あるいは生物と物理の共同研究について

○小田 有沙, ○畠山 哲央
（東大院・総合文化）
odar@g.ecc.u-tokyo.ac.jp, hatakeyama@complex.c.u-tokyo.ac.jp

More is different というのは物理学者の P. W. Anderson（1977 年ノーベル物理学賞受賞）による有名な言葉である。これは、大雑把に言えば、ミクロなスケールの構成要素を多数集めることによって、マクロなスケールでは構成要素の単なる足し算とは異なる、新たな構造が生まれるという意味だ。この言葉は、1972 年に、当時の要素還元主義的な科学の風潮に対する一種の反論として Science 誌に掲載された。実際、我々は多くの自然現象において More is different の実例を見いだすことができるし、物理学（特に統計物理学）の分野では古くからこの More is different を学問として体系化してきた。
この More is different を、非常に乱暴なアナロジーではあるが、共同研究の体制にも当てはめることができるのではないだろうか。たくさんの人が集まったからといって、質的に新しい研究が生まれるとは限らない（実際に、それぞれの持つ技術の単なる足し算か、あるいは「船頭多くして船山に上る」のような状態になっているように見える共同研究も多い）が、全く異なるバックグラウンドを持つ研究者が集まり密に相互作用することによって、単なる足し算ではない質的に新しい研究コンセプトが生まれることもあるだろう。
そこで、本発表では、酵母の細胞生物学をバックグラウンドに持つ研究者と、生物の理論物理学をバックグラウンドに持つ研究者が共同研究することにより、新しい研究を生み出そうとする取り組みの一端を紹介したい。最近の我々の共同研究により、酵母の多細胞レベルでのストレス応答は、その性質が一細胞レベルのストレス応答と大きく異なることが見出された。まさに More is different である。当日は、我々がどのようにその発見に至ったのかを、対談（あるいは漫才）形式で発表したい。

More is different: Stress response of yeast cells and collaboration between biology and physics

○Arisa Oda, ○Tetsuhiro S. Hatakeyama
(Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo)

Key words yeast, stress response

3Aa01 酸素ラジカル処理による植物バイオマスからのバイオエタノール生産量の改善

○伊藤 奨[1], 酒井 杏匠[1], 伊藤 昌文[2], 堀 勝[3], 志水 元亨[1], 加藤 雅士[1]
（[1]名城大院・農, [2]名城大院・理工, [3]名古屋大・低温プラズマ研究セ）
mkato@meijo-u.ac.jp

【目的】 バイオエタノール生産では、酸やアルカリを用いた前処理により植物細胞壁に含まれるリグニンなどの高次構造を破壊する必要がある。その過程でリグニンからバニリンなどの低分子芳香族アルデヒドが生成する。生成したバニリンはエタノールの生産に利用される酵母の生育を阻害することから、効率的にバイオエタノールを生産する上で問題になっている。
本研究では、水溶液中のバニリンに対して、低温大気圧プラズマから発生する酸素ラジカルを照射することで、バニリンを毒性の低い化合物に変換しうるか検討した。さらに、リグニンを含む未利用植物バイオマスとして稲ワラを用いて酸素ラジカル処理の有効性を調べた。
【方法・結論】 酸素ラジカル発生装置を用いて、水溶液中のバニリン対して酸素ラジカルを照射後、HPLC および GC-MS 分析した。酸素ラジカル処理により、バニリンは大きく減少し、それに伴いバニリン酸、プロトカテクアルデヒド、5-ヒドロキシバニリン、およびシュウ酸が検出された。生成した化合物はすべて、バニリンに比べて細胞毒性の低いものとして報告されている。そこで、バニリンに酸素ラジカルを照射した生成物を添加した液体培地で酵母を生育させたところ、バニリンを添加したコントロール（酸素ラジカル非照射）と比較して、酵母の生育が大きく改善し、エタノールの生産量も向上した。さらに、アルカリ処理した稲ワラに酸素ラジカルを照射した実験でも同様の結果が得られた。
以上のことから、稲ワラをアルカリ前処理することで生成するバニリンは、酸素ラジカル処理によって細胞毒性の低い化合物に変換され、酵母の生育およびバイオエタノールの生産量が改善されることが明らかになった。従って、アルカリ前処理した植物バイオマスの酸素ラジカル処理は、酵母の生育およびエタノール生産を向上に有効であることが示された。

Oxygen radical treatment improves bioethanol production from plant biomass

○Shou Ito[1], Kiyota Sakai[1], Masafumi Itou[2], Masaru Hori[3], Motoyuki Simizu[1], Masashi Katou[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol, Meijo Univ., [3]Cent. Low-temp. Plasma Sci., Nagoya Univ.)

Key words oxygen radical treatment, bioethanol, vanillin

3Aa02 セルロース系エタノール生産のための発酵阻害物質耐性馴養変異体における責任遺伝子変異の同定

○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】
同時糖化併行複発酵（SSCF）プロセスによるセルロース系エタノール生産の実用化には、Xylose 代謝性能の付与に加えて、バイオマスに含まれる有機酸やフラン類などのエタノール発酵阻害に耐性のある株の開発が不可欠である。しかし、Glucose/Xylose 培地では高い発酵性能を示すにもかかわらず、多様な阻害物質を高濃度に含むバイオマスを原料とした場合には、期待した発酵性能を発揮できない場合が多い。実際に、我々がこれまでの研究で開発したグルコース・キシロースを含むモデル培地でエタノール変換効率 95%という非常に高い発酵性能を示した IR-2 B12 株は、サトウキビバガスを用いた SSCF プロセスでは全く発酵できないこと、B12 株を親株として独自の馴養法により変異体 IR-2 C 株を取得したことを報告している（日本生物工学会第 69 回大会、藤森他）。
【方法・結果】
コントロール（親株、B16）及び取得した独立した 4 馴養実験に由来する 9 変異体からゲノム DNA を取得し、IonPGM を用いて全ゲノムシーケンスを行った。得られたリードを、IR-2 ゲノムをリファレンスとして、variations を取得した。遺伝的背景を利用した論理アルゴリズム法により、得られた Variation の中から阻害物質耐性をもたらす責任遺伝子変異を示す Binary code を作成し、論理的に真となる variation を抽出したところ、候補遺伝子変異の中に、阻害物質耐性の表現型を示す株のすべてにおいて同一の遺伝子の、しかも異なる場所にストップとなるアミノ酸置換が認められた。この結果から、この遺伝子変異（おそらく機能欠損）が発酵阻害物質耐性を獲得することに重要な役割を果たしていることが示唆された。
※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。

Identification of responsible gene mutations in the inhibitors-resistant mutants for efficient production of cellulosic ethanol.

○Kazuhiro E. Fujimori[1], Yosuke Kobayashi[1,2], Takahiko Sahara[1], Satoru Ohgiya[1], Yoichi Kamagata[1]
([1]BPRI, AIST, [2]Biomaterial in Tokyo)

Key words ethanol, biomass, genome, acclimation

3Aa03 好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* 代謝改変株によるリグノセルロース系バイオマスを基質とした高温エタノール発酵

○竹村 海生 [1], Rahayu Farida [1], 岩崎 祐樹 [2], 加藤 節 [1], 田島 誉久 [1], 青井 議輝 [1], 加藤 純一 [1], 中島田 豊 [1]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]産総研）
nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

[緒言]化石資源の枯渇から代替資源として再生可能なバイオマス、特にリグノセルロース系バイオマスが注目されており、その有用物質への効率的な微生物変換技術の開発が世界中で盛んに行われている。本研究室においても好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* ATCC39073 を用いたリグノセルロース系バイオマスのエタノール変換に関する研究を進めており、これまでに酢酸合成関連遺伝子 (*pduL1*、*pduL2*) を両方破壊し、エタノール生産関連遺伝子 (*aldh*) 導入した株 aldhΔpduL1ΔpduL2 を作成し、グルコース等の純粋な単糖から主生産物としてエタノールの生産を確認した。本研究では aldhΔpduL1ΔpduL2 を用いてリグノセルロース系バイオマスを基質とした際のエタノール収率、及び糖の有用性に関して検討した。
[方法]リグノセルロース系バイオマスとして杉 (*Cryptomeria japonica*) と稲わら (*Oryza sativa*) を選択した。それぞれを粉砕後 1.5 % H_2SO_4 と混合し、オートクレーブ (121 ℃、90 min) で処理した。その後、セルラーゼ酵素 (55 ℃、48 h) により糖化処理したものを培養基質として用いた。全糖濃度の測定にはフェノール・硫酸法を用い、各糖濃度の測定、及び生産物濃度の測定には HPLC を用いた。
[結果]杉、稲わらの糖加水分解物のエタノール収率は双方とも 0.40 g/g-total sugar であった。これはグルコースやキシロースを単一基質とした際のエタノール収率 (0.5 および 0.4 g/g-sugar) と同程度であった。一方、糖化液中のグルコース、キシロース資化速度は、単一基質と比較して低下した。これは、酸加水分解によって副生するフラン誘導体やフェノール化合物が酵母や細菌の発酵を阻害するという報告があることから、本実験においても同様の原因によって資化速度が低下したと考えられた。

Thermophilic ethanol fermentation from lignocellulose hydrolysate by genetically engineered *Moorella thermoacetica*

○Takemura Kaisei[1], Rahayu Farida[1], Iwasaki Yuki[2], Kato Setu[1], Tajima Takahisa[1], Aoi Yoshiteru[1], Kato junichi[1], Nakashimada Yutaka[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]AIST)

Key words ethanol fermentation, biomass

3Aa04 バイオマス糖化液の成分分析データからのバイオエタノール生産予測

○小西 正朗, 渡辺 一樹, 立花 成我
（北見工大）
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

木質バイオマス等を原料とした微生物反応によるバイオ燃料生産やバイオリファイナリーによる物質生産は，石油由来のオイルリファイナリーの代替技術として、注目されている。しかしながら，天然原料は，その産地や栽培環境，品種などの違いにより，組成が異なることが知られている。また，糖化処理などの前処理条件により得られる発酵原料としての糖化液の組成が変動する。変動の大きいバイオマスを原料として安定的に微生物生産する場合，原料の違いや前処理条件により変動する糖化液組成が後段のエタノール発酵に与える影響を正確に把握する必要がある。農産廃棄物であるトウモロコシの芯(corncob)および非可食部(corn stover)を原料とした酵母によるバイオエタノール発酵をモデルとして，糖化前処理工程における硫酸処理の条件と原料の違いによる発酵特性に与える影響を糖化液組成から予測するモデルの構築を試みた。産地の異なる 3 種類の concob ならびに自家栽培したトウモロコシ由来の corn stover を硫酸-酵素処理法[硫酸濃度は 1-3%(w/v)]により糖化し，糖化液を調製した。調整した糖化液は塩化メチレンで抽出後、ガスクロマトグラフィー質量分析法により揮発性成分分析に供した。206 成分のピークが得られた。糖化液を培地として，*Saccharomyces cerevisiae S288c* 株を用いて，フラスコ培養によるエタノールを生産した。原料や前処理条件により，菌体増殖やエタノール生産量に変動が認められた。成分データを独立変数，72 時間目の菌体増殖量やエタノール生産量を従属変数として，部分最小二乗法を用いて回帰分析したところ，成分データと培養結果に高い相関が得られた。相関関係に基づく重要度解析を実施したところ，furfural や 5-hydroxymethyl furfural の他，methoxyacetophenone, apocynin などが阻害成分として見出された。

Estimating ethanol production from composition profiling of lignocellulosic biomass hydrolysates

○Masaaki Konishi, Kazuki Watanabe, Tachibana Seiga
(Kitami Inst. Technol.)

Key words lignocellulosic materials, ethanol production, *Saccharomyces cerevisiae*

3Aa05 酵母カルチャーコレクションからのバイオエタノール生産のための優良酵母の選抜と評価

○荻野 千秋 [1], Kahar Prihardi [1], 近藤 昭彦 [2]
（[1]神戸大・工, [2]神戸大院・科技イノベ）
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【背景】 実際のバイオエタノールに適した酵母株をライブラリーから選抜し、エタノール生産を実バイオマス（バガスおよび OPEFB）から効率的に行う生産システムの確立を目指した。
【実験手法】 本研究では、エタノール生産に適した酵母株を高速かつ適切に選抜するために、NBRC 及びインドネシアカルチャーコレクションを酵母株をモデルライブラリーとして用いてスクリーニング手法を確立することを目指した。方法としては、実バイオマスの糖化液を想定して、グルコース及びキシロース、さらには高濃度の複数の副生成物(酢酸、ギ酸等)から構成されるモデル発酵培地を作製し、この培地中の高温度（35℃）で増殖し発酵する酵母株の選抜及び発酵特性の解析を確立した。また、多検体スクリーニング（一度 96 検体）を可能にするために、スクリーニングはディープウェルで行い、分析は多検体分析に適している高速 HPLC を用いて行った。
【結果】 その結果、エタノール生産用宿主株として 2 株、また乳酸生産用の候補宿主として 8 株、酵母株の選抜に成功した。何れの株も、これまでに上記の目的で使用された経験の無い株であり、非常に新しい知見を有している。立候補株の中から増殖能および発酵性の高さを比較して最終的にエタノール生産用宿主株として 1 株（Saccharomyces cerevisiae スクリーニング番号 F118）を選択した。また、インドネシア側では同じ手法でエタノール生産用宿主株として 1 株(Saccharomyces cerevisiae BTCC3)の選抜に成功した。これらの酵母株に対して発酵能の評価を行い、さらに微生物生産プラットフォームとして使えるようにこれらの酵母株の遺伝子組換え技術も開発を行った。

Selection of candidate yeast strain for ethanol production from culture collection

○Chiaki Ogino[1], Prihardi Kahar[1], Akihiko Kondo[2]
([1]Fac. Eng., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words yeast, ethanol production, biomass

3Aa06 細胞表層提示システムに適した宿主酵母の開発

○猪熊 健太郎, 北田 雄基, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦
（神戸大院・科技イノベ）
akondo@kobe-u.ac.jp

【背景】近年、炭素循環型社会実現の観点から、再生可能なセルロースなどの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セルラーゼなどの酵素を集積・固定する細胞表層工学技術である。我々はこの技術を利用して酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞表層にセルラーゼを提示し、セルロース分解能力を付与する技術の開発・改良に取り組んでいる。これまでは、主にセルラーゼ表層提示用の遺伝子カセットを改良することで細胞表層に提示されるセルラーゼの量を増やし、酵母のセルロース分解能力を向上させてきたが、一方で、酵母の細胞壁に提示できる酵素の総量には構造上の限界があることから、その限界を超える量の酵素を提示するためには、遺伝子カセットだけでなく、それを導入する宿主酵母の細胞壁も表層提示に適したものに改変する必要があると考えられた。そこで本研究では、宿主酵母の改変による細胞表層セルラーゼ活性の向上を試みた。
【方法・結果】*S. cerevisiae* の細胞壁の形成に関与する 5 つの遺伝子(*CCW12*, *CCW14*, *DAN1*, *TIP1* および *CWP1*)を同時にノックアウトした株を作成し、それらの株を宿主としてセルラーゼの一種である β-グルコシダーゼ（BGL）およびエンドグルカナーゼ(EG)を表層提示した株をそれぞれ構築した。そして、その菌体重量当たりの酵素活性を測定した結果、5 遺伝子をノックアウトした株を宿主とした株では、従来の株に比べて表層の BGL 活性と EG 活性がそれぞれ約 66%向上した。さらに、ノックアウトする遺伝子の組み合わせについて検討したところ、少なくとも BGL 活性については、*CCW12* および *CCW14* の 2 遺伝子をノックアウトするだけで、上記の 5 遺伝子ノックアウト株とほぼ同等の活性向上が見られた。

Development of recombinant yeast strains suitable for enzyme display system

○Kentaro Inokuma, Yuki Kitada, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words yeast, cell surface display, cell wall, cellulase

3Aa07 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与

○松崎 浩明, 渡邉 翔介, 秦野 琢之
（福山大・生命工）
matsuzaki@fukuyama-u.ac.jp

近年、エネルギー消費量の増大により化石燃料の枯渇が危惧されている。そこで、バイオマス資源を利用したエネルギー生産が注目されている。しかし、サトウキビやトウモロコシなどの糖・デンプン系バイオマスの利用は、食糧不足や食糧の価格高騰を招く。本研究では、アルコール発酵酵母 *Saccharomyces cerevisiae* への遺伝子導入によるセルラーゼ生産能の付与により、セルロース系バイオマスからのバイオエタノールの生産を目指している。当研究室の過去の研究で *Cryptococcus flavus* 由来のカルボキシメチル(CM)-セルラーゼ（CMC1）や *Saccharomycopsis fibuligera* 由来の β-グルコシダーゼ（BGL1）の生産能を付与したが、セルロースからのエタノール生産量は十分ではなかった。エンド型とエキソ型など種々のセルラーゼの生産によりセルロース分解効率を高めることが重要であると考えた。そこで、BGL1 および細菌 *Cellulomonas fimi* 由来のエンド型セルラーゼ（cenA）とエキソ型セルラーゼ（cex）の 3 種のセルラーゼ生産能の付与を検討した。まず、*cenA* 遺伝子と *cex* 遺伝子を *GAP1* プロモーター、*MEL1* 分泌シグナル配列と *GAP1* ターミネーターとの間に連結した分泌発現型の *cenA* と *cex* を持つ YEp 型プラスミド pHM1061 を構築した。また、*BGL1* 遺伝子を *GAP1* プロモーターに連結した分泌発現プラスミド pHM1062 を構築した。pHM1061 と pHM1062 を導入した二重形質転換体は、コンゴレッド染色、MUC 発色法、及び *p*-NPG 活性からエンド型とエキソ型のセルラーゼ及び β-グルコシダーゼを分泌生産していることが確認できた。しかし、セルラーゼ活性は低いと考えられた。さらに、*CMC1* 遺伝子を *GAP1* プロモーターに連結した分泌発現プラスミド pSC7 を導入した三重形質転換体はコンゴレッド染色で二重形質転換体よりもセルラーゼ活性が高かった。この形質転換体は紙片を形が崩れるぐらいまで分解した。

Breeding of cellulase-producing *Saccharomyces cerevisiae*

○Hiroaki Matsuzaki, Shosuke Watanabe, Takushi Hatano
(Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ.)

Key words cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation

3Aa08 デルタロドプシンによる ATP 再生を伴う物質生産性の向上

○塩澤 優稀 [1], 弘埜 陽子 [2], 原 清敬 [1]
（[1]静県大院・薬食生命, [2]静県大・食栄）
k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp

【目的】現在盛んに行われている、微生物を利用した有用物質生産や、遺伝子組換え技術を用いてそれらの生産性を向上させる研究では、細胞内エネルギー物質である ATP の不足による、生産性の頭打ちや、微生物の増殖の低下が問題となることがある。そこで、本研究では有用物質生産によく用いられる出芽酵母の ATP 再生を活性化させるために、高度好塩菌 *Haloterrigena.turkmenica* がもつ光駆動型プロトンポンプの一種であるデルタロドプシンを出芽酵母のミトコンドリア膜に発現させた。これにより、呼吸鎖電子伝達系に加え、デルタロドプシンにもプロトンの濃度勾配を形成させることで、ATP 再生を活性化させることを目的とした。本研究では、グルタチオンなどの、生産される際に ATP を消費する物質を生産物の指標として用いた。
【方法】出芽酵母 BY4741 株に ATP 消費を伴うグルタチオン排出トランスポーター（Gxa1）を発現させた株に、デルタロドプシンを発現させた。この株および親株を光受容分子（all-trans-retinal）および要求性アミノ酸を含む最小培地にて、光を照射しながら培養し、任意の時間にサンプリングを行った。
【結果および考察】BY4741 株にデルタロドプシンを発現させると、24 時間目の細胞内グルタチオン濃度が約 1.5～2 倍に上昇した。また、Gxa 1 とデルタロドプシンを共発現させた場合、細胞内グルタチオン濃度の上昇だけでなく、細胞外グルタチオン濃度の上昇もみられた。グルタチオンの合成と排出には ATP の消費を伴うため、これらの活性化は、デルタロドプシン発現により ATP 再生が活性化されたことに起因すると考えられる。

Improvement of bioproduction with ATP recycling by delta-rhodopsin

○Yuuki Shiozawa[1], Yoko Hirono[2], Hara Kiyotaka[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka.)

Key words ATP, glutathione, light, rhodopsin

3Aa09 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。当研究室では、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分解に関与する微生物を分離し、その分解機構について検討を行ってきた。本研究では、複数の微生物の共生による分解促進機構について検討を行った結果について報告する。
【方法・結果】当研究室では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 *Bradyrhizobium* sp.の 624S 株及び *Aminobacter* sp.の 11A 株を分離している。スルファニル酸を単一炭素源とした無機塩液体培地に 624S 株及び 11A 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、両株ともに 4.3mM のスルファニル酸を完全に分解した。この培養上清の亜硫酸イオン濃度を測定したところ、両株ともスルファニル酸の分解に伴い亜硫酸イオンが生成していることが明らかになった。集積培養液からは 624S 株及び 11A 株以外に、スルファニル酸を資化することはできない *Diaphorobacter* sp.の 624L 株も分離されている。この 624L 株と 624S 株及び 11A 株の共培養を行うとスルファニル酸の分解速度が上昇し、亜硫酸イオンの蓄積が観察されなかった。本結果から 624L 株には亜硫酸イオンを酸化する能力があることが示唆され、現在、624L 株の亜硫酸イオン酸化機構について検討を行っている。

Effect of sulfite ion on sulufanilic acid degrading microorganism

○Akihiro Higashiyama, Akihisa Kita, Katsuhiko Nakagawa, Nobuki Hayase
(Niihama Natl. Coll. Technol.)

Key words sulfanilic acid, sufite ion, microorganisms, bacteria

3Aa10 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の *aldA* による低栄養性の付与

○加藤 弘将, 池ヶ谷 凌士, 新谷 政己, 吉田 信行
（静大院・総合科技）
yoshida.nobuyuki@shizuoka.ac.jp

【背景と目的】*Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は炭素・窒素・硫黄源無添加の無機塩培地に良好に生育し、CO_2 を要求するという超低栄養性を示す。これまでに N9T-4 株の短鎖脂肪族アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする *aldA* を破壊すると、この低栄養性が失われること、低栄養環境で *aldA* が高発現することが判明している。本研究では、N9T-4 株の持つ低栄養性を他の細菌に付与することを目的として、低栄養性の低い様々な *Rhodococcus* 属細菌に N9T-4 株の *aldA* を導入し、低栄養条件下での生育および物質生産性の比較を試みた。
【方法および結果】まず、供試菌株として N9T-4 株を初めとした様々な *Rhodococcus* 属細菌の低栄養性を比較した。低栄養条件下での培養は炭素源を含まない BM 培地、富栄養条件下での培養は LB 培地を用いたスポットテストの結果から、15 種のロドコッカス属細菌の多くは、強弱はあるものの低栄養性を示したが、*R. erythropolis* IFM 155 株と *R. erythropolis* NBRC 15567 株が低栄養条件で生育を示さなかった。また、細胞内に多量のトリアシルグリセロール（TAG）を蓄積し、バイオ燃料生産菌として有望視されている *R. wratislaviensis* DSM 44193 株は、N9T-4 株と比較して弱いながらも低栄養性を示した。ナイルレッド染色後に蛍光顕微鏡観察することによって TAG の蓄積を確認したところ、富栄養条件で培養した際には TAG の蓄積を示す強い蛍光が観察できたが、低栄養条件では TAG の蓄積が認められなかった。大腸菌-*Rhodococcus* シャトルベクターである pNit-RC2 に、N9T-4 株の *aldA* とその上流領域を挿入した pNit-NN を用いて、DSM 44193 株を形質転換した。その結果、形質転換体の低栄養条件での生育は向上しなかったが、蛍光顕微鏡観察の結果、低栄養条件での TAG の蓄積が確認できた。

Conferring of oligotrophy to other bacteria by introduction of *aldA* of *Rhodococcus erythropolis* N9T-4

○Hiromasa Kato, Ryoji Ikegaya, Masaki Shintani, Nobuyuki Yoshida
(Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words oligotroph, *Rhodococcus*, triacylglycerol, aldehyde dehydrogenase

3Aa11 *Talaromyces cellulolyticus* におけるセルラーゼの発現誘導機構の解析と、その育種開発と培養手法への応用

○矢萩 大貴[1], 吉田 エリカ[1], 深田 寛朗[1], 十倉 充範[2], 臼田 佳弘[1]
（[1]味の素バイオ・ファイン研, [2]味の素研究開発企画部）
yoshihiro_usuda@ajinomoto.com

【背景と目的】非可食バイオマスからバイオマス糖化酵素であるセルラーゼによって分解・生成される糖類は、発酵生産において、食資源と競合しない主原料として期待されている。しかし、現在のセルラーゼの製造コストが高いことが実用化に向けた課題となっており、より効率的なセルラーゼの生産技術が求められている。そこで、我々は有望なセルラーゼ生産糸状菌である *Talaromyces cellulolyticus* のセルラーゼ遺伝子の発現誘導の機構を解析し、その知見を菌株育種および培養手法の構築に応用することとした。
【結果と考察】*T. cellurolyticus* の細胞内に局在する β-glucosidase をコードする *bgl1A* 遺伝子を破壊した結果、セルロース炭素源培養におけるセルラーゼ発現がほぼ失われた。また、野生株のセルラーゼ分泌生産量を約 7 倍に向上させる *bgl1A* 内のアミノ酸置換変異も見出され、*T. cellurolyticus* のセルラーゼ発現に重要な役割を担うことが示された。この BGL1A をセルロースの分解生成物であるセロビオースに作用させると、糖転移反応によって数種のセロオリゴ糖を生成した。その中でも、グルコース 2 分子が β-1,6 結合した二糖であるゲンチオビオースの *T. cellurolyticus* のセルラーゼ発現に対する高い誘導能が明らかとなった。ゲンチオビオースは BGL1A によるセロビオースからの糖転移反応以外にも、BGL1A や細胞外分泌型の BGL3A を介した高濃度グルコースからの縮合反応によっても簡便に生成・蓄積することができた。このようにして調製されたゲンチオビオースを含む糖液を用いた、高効率かつ安定的なセルラーゼの生産培養プロセスを報告する。

Elucidation of cellulase induction mechanism in *Talaromyces cellulolyticus* and its application to cellulase production

○Daiki Yahagi[1], Erika Yoshida[1], Hiroaki Fukada[1], Mitsunori Tokura[2], Yoshihiro Usuda[1]
([1]Res. Inst. Biosci. Prod. Fine Chem., Ajinomoto Co., Inc., [2]R&D Planning Dept., Ajinomoto Co., Inc)

Key words cellulase, *Talaromyces cellulolyticus*, beta glucosidase, gentiobiose

3Ba01 メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* におけるアルコールオキシダーゼ遺伝子 *AOX1* の発現解析

○横尾 岳彦[1], 吉原 瑛梨奈[1,2], 小松崎 亜紀子[1], 梅村 真理子[2], 千葉 靖典[1]
（[1]産総研・創薬基盤, [2]東薬大・生科）
t.yoko-o@aist.go.jp

【背景と目的】酵母 *Ogataea minuta* は、メタノールを唯一の炭素源として増殖可能なメタノール資化性酵母の一種である。アルコールオキシダーゼをコードする遺伝子 *AOX1* は、メタノール存在下で強力な発現誘導が引き起こされるが、本酵母種における *AOX1* の発現調節メカニズムは不明のままであった。*AOX1* がどのような条件で発現誘導あるいは抑制がなされるか、また、発現調節にはどのような因子が関与しているかについて検討を行った。
【方法、結果と考察】*AOX1* の発現レベルを調べるために、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の酸性ホスファターゼ（APase）遺伝子 *ScPHO5* を *AOX1* プロモータの下流に接続したレポータ遺伝子を構築した。本レポータ遺伝子を *O. minuta* NBRC 10746 株に導入し、APase 活性を測定することにより、*AOX1* プロモータの発現の強さを調べた。メタノールを炭素源として培養した場合は高い APase 活性を示した一方、グルコースやグリセロールを炭素源とした場合は、活性は顕著に抑制され、この系が期待通りに動作することが確認された。グルコースやグリセロールに、さらにメタノールを加えても活性は抑制されたままであり、これらの炭素源は強力なカタボライト抑制を示すことが見出された。近縁のメタノール酵母種からの類推により、*AOX1* の転写調節因子の候補となる遺伝子 *TRM1*、*TRM2* および *MPP1* を取得した。これらの破壊株を作製し、前述のレポータ系により *AOX1* プロモータの活性を測定したところ、メタノール培養時の APase 活性は野生型株の 0.2 から 0.4 倍の値を示し、これらはいずれも *AOX1* プロモータの発現誘導に関与していることが明らかになった。

Characterization of gene expression of *AOX1*, which encodes alcohol oxidase, in methylotrophic yeast *Ogataea minuta*

○Takehiko Yoko-o[1], Erina Yoshihara[1,2], Akiko Komatsuzaki[1], Mariko Umemura[2], Yasunori Chiba[1]
([1]BRD, AIST, [2]Sch.Life Sci., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

Key words methylotrophic yeast, gene expression, alcohol oxidase, Ogataea minuta

3Ba02 デルタロドプシン発現が出芽酵母の代謝に及ぼす影響

○大塚 健介[1], 弘埜 陽子[2], 石井 寛子[3], 石井 純[3], 岡橋 伸幸[1], 戸谷 吉博[1], 原 清敬[2], 松田 史生[1]
（[1]阪大院・情報, [2]静県大・食栄, [3]神戸大院・科技イノベ）
fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は炭素源から中心代謝機能を通じて、細胞増殖に必要なエネルギー（ATP）を得ている。われわれは高度好塩菌 *Haloterrigena turkmenica* 由来の光駆動プロトンポンプであるデルタロドプシン(dR)に着目し、光エネルギーでプロトン勾配を生成し ATP 再生能を向上することを試みている（原ら、第 70 回日本生物工学会大会）。本研究では dR を発現が *S. cerevisiae* の発酵プロファイルおよび細胞内代謝物組成に及ぼす影響を検討した。
【方法】 *S. cerevisiae* BY4742 株を宿主として用いた。形質転換は酢酸リチウム法で行った。レチナール(10 microM を添加した SD 培地中 30℃、光照射条件下で 120 rpm で培養した。培地中のエタノール濃度は液体クロマトグラフィーで測定した。細胞内代謝物はメタノール・クロロホルム・水法で抽出後、GC-MS で分析を行った。
【結果と考察】
S. cerevisiae BY4742 株に dR 遺伝子を発現した BY4742 pGK426::dR 株を構築した。dR の活性発現に必要な補因子であるレチナール添加培地で培養したところ、特徴的な淡いピンク色を示した。そこで BY4742 pGK426::dR 株とコントロール株(BY4742 pGK426）を光照射条件下で培養し、細胞内代謝物を抽出して GC-MS を用いたメタボローム分析法で細胞内代謝物の組成を比較した。その結果、デルタロドプシンの発現により濃度が変化した代謝産物があった。さらに、光照射条件下 SD 培地中でフラスコスケールでの回分培養を行った。その結果、BY4742 pGK426::dR 株はコントロール株と比較して比増殖速度に明確な差は無かった。

Effect of deltarhodopsin expression on the yeast metabolism

○Kensuke Otsuka[1], Yoko Hirono[2], Hiroko Ishii[3], Jun Ishii[3], Nobuyuki Okahashi[1], Yoshihiro Toya[1], Kiyotaka Hara[2], Fumio Matsuda[1]
([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, deltarhodopsin

3Ba03 RNA-seq による発酵阻害物質耐性酵母 KS47-1 株の耐性機構の解明

○竹内 健人[1], 加藤 勇太[1], 荒川 知子[1], 堀内 淳一[2], 小西 正朗[3]
（[1]北見工大院・バイオ環境, [2]京都工繊院・分子化学, [3]北見工大・地域未来デザイン）
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

【背景と目的】我々が分離した酵母 *Pichia membranifaciens* KS47-1 は，一般的な酵母の増殖・発酵を妨げる発酵阻害物質が含まれるリグノセルロース系バイオマス由来糖化液でも増殖できる．しかしながら，耐性機構については未知であった．本研究では，糖化液に対する KS47-1 株の遺伝子応答を調査するため，トウモロコシの芯（コーンコブ）から作製した糖化液(HL)と活性炭処理による阻害物質除去をした同様の糖化液(AC)の間で，本菌株の遺伝子発現を比較し分析した．
【方法】コーンコブ(1:10=コーンコブ:水）を 3.0 %硫酸により糖化処理した(HL)．さらに 3 % (w/v)の活性炭を添加し，阻害物質を 3 時間に吸着除去した(AC)．糖化液を培地として KS47-1 株を培養し，対数増殖細胞(OD600=11.4~13.7，(n = 2))において Illummina HiSeq による RNA-seq 解析した(Q30:>94%)．TopHat2 を用いて KS47-1 株のドラフトゲノムにマッピングした．発現量解析には Cufflinks，Cuffdiff を用いた．変動遺伝子予測には GO term finder を用いた．BLAST 解析により *Saccharomyces cerevisiae* データを用いて遺伝子機能予測した．
【結果と考察】両者の糖化液において増殖が観察されたが，HL では増殖に遅延が見られた．約 5Gb のリードをマッピングした結果，2919 遺伝子が検出された．カバー率は 103%前後であった．HL で培養した場合，膜輸送タンパク質に多くの変動が認められたため，多剤薬剤ポンプ等膜輸送が関与していることが示唆された．また，発酵阻害物質であるフルフラール(FL)や 5-HMF の分解に関係する ADH6, ALD4 の発現量が，発酵阻害物質存在下で上昇したことから，細胞内で FL や 5-HMF を分解し，酢酸としていることが考えられる．

Explore the tolerant mechanism of *Pichia membranifaciens KS47-1* of inhibitor tolerant yeast by RNA-seq

○Kento Takeuchi[1], Yuta Kato[1], Tomoko Arakawa[1], Jun-ichi Horiuchi[2], Masaaki Konishi[3]
([1]Grad. Sch. Bio. Environ., Kitami Inst Tech, [2]Dept. Biomole. Eng. Kyoto Inst. Tech., [3]Sch. Reg. Innov. Soc. Design Eng. Kitami Inst. Tech.)

Key words RNA-seq, inhibitor, *Pichia membranifaciens*, yeast

3Ba04 *Pichia pastoris* において分泌シグナル配列の１アミノ酸置換はタンパク質分泌生産量を劇的に増大させる

○伊藤 洋一郎[1], 石上 美佐[2], 橋場 倫子[2], 中村 泰之[1], 蓮沼 誠久[1], 石井 純[1], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]高機能遺伝子デザイン技術研究組合）
yito@dragon.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。*P. pastoris* でのタンパク質分泌生産には、分泌シグナル配列として *Saccharomyces cerevisiae* 由来の MFα 配列がよく利用されている。先行研究にて、我々はタンパク質分泌生産を劇的に増加させる MFα 配列の V50A 変異を偶然見つけていた。そこで本研究では、*P. pastoris* でのタンパク質分泌生産の更なる向上を目指して、MFα シグナル配列の最適化を検討した。*S. cerevisiae* での MFα シグナル配列の進化分子工学の先行研究結果を参考に、V50A 変異を含む 1 アミノ酸置換体を作製し分泌生産量を評価したところ、複数の 1 アミノ酸置換体において、目的とするタンパク質の分泌生産性が 5 倍程度増加することが分かった。しかしそれらの変異を組み合わせても、分泌生産性の増加は見られなかった。GFP を分泌生産させた酵母細胞を顕微鏡観察した結果、野生型シグナル株では液胞内に緑色蛍光が観察された。一方、1 アミノ酸置換体では緑色蛍光は確認されなかったことから、1 アミノ酸置換体では液胞への目的タンパク質のミスソートが減少したため、高分泌生産されることが示された。

Single amino acid substitutions of secretory signal MFα make large improvement for secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*

○Yoichiro Ito[1], Misa Ishigami[2], Noriko Hashiba[2], Yasuyuki Nakamura[1], Tomohisa Hasunuma[1], Jun Ishii[1], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]TRAHED)

Key words *Pichia pastoris*, secretory production, secretion signal, recombinant protein production

3Ba05 イントロンによる発現増強を受けるルシフェラーゼコーディング領域内配列の解析

○菊田 浩希[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）
hoshida@amaguchi-u.c.jp

［背景と目的］現在、タンパク質大量発現技術が必要とされている。一般にタンパク質の発現量には塩基配列やプロモーター強度、プラスミドコピー数、使用コドンなどが影響する。これまでに私たちは、分泌性ルシフェラーゼ遺伝子をコードする yCLuc をイントロンを含むプロモーターで発現させると、イントロンを持たない場合に比べ 40 倍程度発現量を増加することを明らかにした。このイントロンによる発現増強メカニズムの解明を目指した。
［方法、結果］yCLuc と同じアミノ酸配列のルシフェラーゼをコードするが使用コドンが異なる hCLuc を同様に発現させたところ、イントロンを与えなくても hCLuc は yCLuc に比べて 40 倍程発現量が高く、さらにイントロン配列を与えてもその活性は増加しなかった。発現量の差と、イントロンによる発現増強のメカニズムを解明するために、yCLuc と hCLuc のキメラ遺伝子を構築し、イントロンの有無によるルシフェラーゼ活性を比較した。その結果 yCLuc の 100 bp~200 bp の配列が発現抑制とイントロンによる発現増強に関与することが分かった。さらにこの範囲で hCLuc と yCLuc で異なる塩基を、hCLuc で一つずつ yCLuc の塩基に変異させたところ、一つの変異での影響は比較的小さかった。そこで変異させる塩基の数を多くしていくと発現抑制とイントロンによる発現増強が強くなり、101 bp~140 bp 中の 9 塩基の変異で yCLuc と同じ程度の抑制と増強を示した。この結果からコーディング配列内の特定領域の配列が発現を低下させ、イントロンによる発現増強にも関与していることが分かった。

A specific region of a lucferae coding sequence interferes with its expression and is involved in intron-mediated enhancement

○Hiroki Kikuta[1], Hisashi Hosida[1,2,3], Rinji Akada[1,2,3]
([1]Dept. Appli. Chem., Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., YamaguchiUniv., [2]YURC-TMR., [3]YUBEC)

Key words intron, intron-mediated enhancement, luciferase, *Saccharomyces cerevisiae*

3Ba06 出芽酵母の実験室進化により導入された遺伝子変異のグリセロール資化能への影響

○曽根 政人[1], 高橋 駿輔[1], 河合 一輝[1], 古澤 力[2,3], 平沢 敬[1]
（[1]東工大・生命理工, [2]理研・生命機能, [3]東大・生物普遍性）
thirasawa@bio.titech.ac.jp

【緒言】バイオディーゼルを油脂から製造する過程で副生産物として得られるグリセロールは供給過剰になっており、現在その有効的な利用方法が求められている。当研究室では、グリセロールを基質として出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* による有用物質生産を行うことを目指し、グリセロールを主要な炭素源とした合成培地での植え継ぎを繰り返す実験室進化により、グリセロール資化能が向上した進化株を得ることに成功した (Kawai *et al*. 2019 JBB)。また進化株の RNA-Seq 解析を行い、その結果に基づきグリセロール資化能が向上した組換え株の再構築を行った。さらなる出芽酵母のグリセロール資化能の向上を目指し、本研究では実験室進化株のゲノムリシーケンス解析を行い、進化の過程で導入された変異のグリセロール資化能への影響を評価した。
【方法および結果】上記実験室進化により取得した実験室進化株からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーによるゲノムリシーケンス解析を行ったところ、グリセロール資化能が顕著に向上した 85 世代後の細胞には *HOG1*、*SIR3*、*KGD2*、*SSB2* の 4 つの遺伝子の ORF 内に変異が導入されていることが明らかとなった。そこで、それぞれ同定されたこれらの変異を元株に導入した組換え株を構築し、グリセロールを炭素源とする合成培地で培養することで、同定された変異のグリセロール資化能への影響を調べた。その結果、元株は培養開始から 200 時間以上経過しても増殖を開始しないのに対して、*HOG1* 遺伝子の変異導入株は培養開始 24 時間後には増殖が開始した。また、この *HOG1* 遺伝子の変異は、上記実験室進化の初期の段階で導入されていた。これらの結果から、*HOG1* 遺伝子に導入された変異が、出芽酵母のグリセロール資化能の向上に寄与していることが明らかとなった。

Effects of mutations introduced through adaptive laboratory evolution on glycerol assimilation ability in *Saccharomyces cerevisiae*

○Masato Sone[1], Shunsuke Takahashi[1], Kazuki Kawai[1], Chikara Furusawa[2,3], Takashi Hirasawa[1]
([1]Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech, [2]BDR, RIKEN, [3]UBI, Univ. Tokyo)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, glycerol, genome engineering, adaptive laboratory evolution

3Ba07 酵母とヒト培養細胞で扱えるプラスミドでのヒトヒストン遺伝子の解析

○小野 嵩弘[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, [2]山口大・中高温セ, [3]山口大・生命医工セ）
b014vf@yamaguchi-u.ac.jp

［背景と目的］遺伝子を酵母やヒト培養細胞などのそれぞれの宿主で発現させるには、宿主特有のプロモーター、複製起点、選択マーカーなどを組み込んだプラスミドを別々に用意する必要があった。一方、複数種の生物間で扱えるシャトルプラスミドも知られているが、プロモーターは目的遺伝子上流に配置する必要があるため、遺伝子発現できる宿主は 1 種類に限られていた。そこで、本研究では酵母、大腸菌、ヒト培養細胞において遺伝子発現を効率的に行えるプラスミドを開発した。
［方法、結果］酵母、大腸菌、およびヒト培養細胞で効率的に遺伝子発現できるプラスミドを作製した。このプラスミドは目的遺伝子を酵母発現用 *TDH3* プロモーター下流にクローニングすることで、酵母で発現させることができる。大腸菌と培養細胞では、PCR により、目的遺伝子とそれぞれの宿主のプロモーターが末端となるように増幅し、これらを各細胞に導入する。大腸菌では相同組み換え、ヒト培養細胞では非相同末端結合によってプロモーター下流に目的遺伝子がつながることで遺伝子発現が可能になる。
このプラスミドが、複数の生物において効率的に遺伝子発現できることを証明するために、進化的保存性の高いヒストン遺伝子(hH3F3A)を利用した。赤色蛍光タンパクと融合させ、その発現を観察したところ、酵母とヒト培養細胞において核での発現が見られた。また、N 末端側からの削除解析も効率的に行えるため、hH3F3A の核移行シグナルの同定を行ったところ、ヒストン N 末端領域を削ることで徐々に核から細胞質へ移行した。そこで、ヒストンアセチル化で知られる N 末端領域の Lysine にアミノ酸変異を与えることで、細胞内局在の変化を調べている。

Histone gene analysis with a plasmid that can be used for gene expression in yeast and human cluture cells

○Takahiro Ono[1], Hisashi Hoshida[1,2,3], Rinji Akada[1,2,3]
([1]Dept. Appli. Chem., Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., YamaguchiUniv., [2]YURC-TMR., [3]YUBEC)

Key words yeast, mammalian cell, histone, plasmid

3Ba08 *Saccharomyces cerevisiae* SPY3 の高温ストレス適応機構

磯崎 日奈子 [1], 山崎 真澄 [1], 澤田 俊 [1], 工藤 大喜 [1],
Devanadera Allad [2], Grace Pait Ivy [2], Pajares Irene [2],
Nayve Jr. Fidel Rey P. [2], ○杉山 峰崇 [1]
（[1]阪大院・工, [2]フィリピン大ロスバニョス校・国立分子生物学バイオテクノロジー研究所）
sugi2@bio.eng.osaka-u.ac.jp

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はバイオエタノールの発酵生産宿主として利用されている。主にバイオマスが豊富な熱帯地域でバイオエタノール生産が行われているが、ブラジルやタイなどでは発酵熱も加わり発酵温度が酵母の至適温度である 30℃を容易に超え、増殖や発酵が著しく低下する 40℃以上になることもある。そのため、冷却設備や冷却コストが必要となるが、優れた高温ストレス耐性を示す出芽酵母が開発できれば生産コストの効率化が進む。そこで、本研究では、自然界から単離された *S. cerevisiae* の中で 42℃という最も高い高温ストレス耐性を示す酵母 SPY3 の高温ストレス適応機構を解析し、高温ストレス耐性向上に重要となる知見を得ることにした。SPY3 は、高温の 41.5℃条件下において、95%の収率でエタノールを生産した。マイクロアレイ解析を行い、研究室株と SPY3 の遺伝子発現を比較した結果、419 遺伝子が発現上昇していた。その中には ROS の除去関連遺伝子が多数含まれており、SPY3 で強く発現している ROS の除去関与遺伝子群が高温ストレス条件下で増大する ROS の蓄積を抑えていることを見出した。SPY3 で発現上昇した遺伝子の多くを制御しうる転写活性化因子として Ace2、Sfp1 および Gcn4 を見出した。これらの遺伝子は高温ストレス条件下で高発現しており、破壊すると SPY3 の高温ストレス耐性は顕著に低下した。さらに、*SFP1* の過剰発現によって SPY3 の高温ストレス耐性がさらに向上したことから、SPY3 の優れた高温ストレス適応機構には *SFP1* の機能が重要であることが明らかとなった。

Mechanism of adaptation to high temperature stress in *Saccharomyces cerevisiae* SPY3

Hinako Isozaki[1], Masumi Yamasaki[1], Shun Sawada[1], Daiki Kudo[1],
Allad Devanadera[2], Ivy Grace Pait[2], Irene Pajares[2], Fidel Rey P. Nayve Jr.[2],
○Minetaka Sugiyama[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]BIOTECH, UPLB)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, high temperature resistance, reactive oxygen species

3Ba09 出芽酵母における任意領域の染色体外環状 DNA 化技術の開発

○生田 宗一郎, 久富 歩, 笹野 佑, 田口 久貴
（崇城大院・工）
sasano@bio.sojo-u.ac.jp

【目的】バイオエタノール等の生産に用いられる酵母菌株には様々なストレス耐性やキシロース資化能などの能力が求められるが、現在の遺伝子工学技術ではせいぜい数個の遺伝子を改変させることしかできない。そのため大幅な遺伝子領域を自在に扱う技術の開発が不可欠である。出芽酵母の栄養増殖中ではゲノム全域に渡り多くの遺伝子領域が染色体から抜け出し環状化し、染色体外環状 DNA（EccDNA）として存在することが明らかになってきている。この EccDNA は染色体から独立して複製する DNA であり、この DNA が酵母の性質の変化や環境適応に関与していることも分かってきた。本研究では将来的に菌株育種に応用することを目指し、出芽酵母において狙った遺伝子領域を自在に EccDNA 化する技術の開発を目的とした。
【方法・結果】本研究では EccDNA 作製のために我々が以前に開発した CRISPR-PCS 法を応用した手法を用いた。9 番染色体の約 20 kb の内部領域を標的として、この領域の両末端で CRISPR/Cas9 法により DNA 二重鎖切断を引き起こした後、PCR により調製した両端と相補的な配列（50 bp）とマーカー遺伝子を持つ DNA 断片を連結することで標的領域の EccDNA 化を行った。コロニー PCR により、得られた形質転換体では標的領域が EccDNA 化したことが示唆された。また 15 番染色体の約 200~400 kb の内部領域を標的とした場合でも同様の結果が得られ、さらにサザン解析によっても EccDNA 化されたことを支持する結果が得られた。本技術は新奇なゲノム工学技術として微生物育種への応用が期待される。現在、人工的に作製した EccDNA の細胞内でのふるまいを解析するため、細胞内コピー数の測定や EccDNA の胞子分離パターンの解析を行っている。

Extrachromosomal circularization of targeted DNA region in the budding yeast

○souichiro Ikuta, Hisatomi Ayumu, Yu Sasano, Hisataka Taguchi
(Grad. Sch. Eng., Sojo Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, CRISPR/Cas9, Extrachromosomal circular DNA

3Ba10 Cloning and expressing recombinant glutamate decarboxylase (GAD) for boost of GABA production in beer-producing yeast

○Pik Kuan Low, John Chi-Wei Lan
(Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan 32003, R.O.C.)
lpka6752@gmail.com

Glutamate decarboxylase (GAD: EC 4.1.1.15) catalyses the decarboxylation of L-glutamate to gamma-aminobutyric acid (GABA). GABA is an important neurotransmitter that affects the transmission of signals between brain cells and the nervous system in the human body. The present study attempted to insert a full length GAD gene sequence into beer yeast strain to enhance synthesis of GAD which is predicted to cause the increase of GABA production during beer fermentation. The complete gene sequence was cloned, followed by insertion of the DNA gene template into the pIYC08 vector. The gene was then cloned into PGASO-nkit-7-Sc-TEF1 vector, followed by the expression in wild type yeast strain cells to improve GABA production. The expression of GAD gene was confirmed by SDS-PAGE analysis and enzymatic activity studies. To our best knowledge, this is the first finding on successful cloning of the GAD gene in wild type yeast strain cells.

Cloning and expressing recombinant glutamate decarboxylase (GAD) for boost of GABA production in beer-producing yeast

○Pik Kuan Low, John Chi-Wei Lan
(Biorefin. Bioprocess Eng. Lab., Dept. Chem. Eng. Mater. Sci., Coll. Eng., Yuan Ze Univ., Taiwan 32003, R.O.C.)

Key words GABA, glutamate decarboxylase (GAD), yeast, gene expression

3Ba11 陽性/陰性選択マーカーと蛍光タンパク質から成る 3 機能性新規融合タンパク質を用いた酵母遺伝子スイッチの開発

○能崎 健太 [1], 冨永 将大 [1], 梅野 太輔 [2], 近藤 昭彦 [1,3], 石井 純 [1,3]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]千葉大院・工, [3]神戸大・先端バイオ工）
junjun@port.kobe-u.ac.jp

【目的】 遺伝子発現を自在に制御し新規生物機能を構築するために、よく特徴付けられた内/外来の転写因子を利用して、主に原核生物において機能最適化された人工の転写制御系（遺伝子スイッチ）が多数開発されてきた。一方、真核生物である酵母では、低いスイッチ性能と機能最適化の困難さから、実用に供するスイッチが不足している。本研究では、新規融合タンパク質を用いて、目的のスイッチを迅速かつ簡便に創り出す新規な進化工学法の確立を目的とした。
【実験と結果】 Pseudomonas fluorescens 由来の転写因子 PhlF と Simian virus 40 由来の転写活性化ドメイン、核移行シグナルを融合し、人工転写活性化因子 PhlTA を作製した。PhlTA はオペレーター配列 phlO に結合して下流遺伝子の転写を活性化し、誘導物質 2,4-diacetylphloroglucinol（DAPG）が結合することで phlO から解離して転写を抑制する。ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ HSV-TK とブレオマイシン耐性タンパク質 Ble、緑色蛍光タンパク質 GFP から成る新規融合タンパク質 TBG を構築して phlO 下流に配置し、ランダム変異 PCR によって PhlTA 変異体ライブラリと共に酵母 Saccharomyces cerevisiae に導入した。変異体ライブラリをまず抗生物質 Zeocin（Ble により無毒化される）を加えて培養し、TBG を発現した細胞のみを選抜した（ON 選抜）。次に DAPG とプロドラッグである 5FdU（HSV-TK により活性化される）の存在下で培養することで、TBG をリーク発現する細胞を選択的に死滅させた（OFF 選抜）。得た培養液から、GFP 蛍光により S/N 比が向上した変異体をスクリーニングした結果、最高で 7 倍の向上がみられた。また、選抜時の誘導状態を入れ替えることで、逆転型変異体（DAPG 結合時に phlO に結合）の取得に成功し、S/N 比は 14 倍に達した。このように、本手法が酵母遺伝子スイッチの改良・改質に有効であることを実証した。

Development of yeast genetic switches using a novel tri-functional fusion protein consisting of positive/negative selection markers and fluorescent protein

○Kenta Nozaki[1], Masahiro Tominaga[1], Daisuke Umeno[2], Akihiko Kondo[1,3],
Jun Ishii[1,3]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Chiba Univ., [3]Eng. Biol. Res. Ctr., Kobe Univ.)

Key words yeast, genetic switches, screening, directed evolution

3Da01 芝生土壌における細菌および *Bacillus subtilis* の挙動解析

○柴田 徹[1], 平野 皓巳[1], 鈴木 宏佳[2], 服部 新吾[3], 岩田 卓也[2], 早川 敏広[3], 荒木 希和子[1], 久保 幹[1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]理研グリーン, [3]ケイアイ化成株式会社）
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景および目的】ゴルフ場での芝生管理では、競技に支障がでないよう、年間を通して高品質な芝生の管理が求められている。このため、芝生土壌は、砂土を客土としており、化学肥料中心の施肥が行われ、1 年中芝草が生育している特殊な環境である。そのような環境下で、芝生管理では、芝生を刈り、生育し、再度刈るというプロセスを繰り返す。そのため、芝生の刈りカスであるサッチの残渣が土壌に蓄積することが問題となっており、微生物資材を用いた有機物の除去が試みられている。先行研究において、*Bacillus subtilis* を投与することで、芝生に残存するサッチを分解することが認められた。本研究では、*B. subtilis* を芝葉面に散布し、芝生土壌の深度における *Bacillus* 属細菌および微生物の挙動を解明した。
【方法および結果】2018 年 4 月から 2019 年 3 月において、静岡県のゴルフ場試験地より、ベント芝および高麗芝の芝生土壌を採取し、土壌の *Bacillus* 属細菌数および細菌数を毎月定量した後、経時変化を解析した。その結果、土壌中の総細菌数は、N. D. (6.6×10^6 cells/g 以下) ~1.5×10^8 cells/g の範囲であった。また、夏季に増加して、冬季に減少する傾向を示し、土壌表層ほど豊富であった。一方、*Bacillus* 属細菌数は、N. D. (8.1×10^4 cells/g 以下) ~3.7×10^6 cells/g の範囲であり、土壌表層部から深部にかけて徐々に減少していた。*Bacillus* 属細菌は、芝葉面に最も豊富に存在し、最大で 1.2×10^7 cells/g を示した。これらの結果から、散布した *B. subtilis* は芝葉面に付着し、サッチとして土壌表面から深部に浸透することが推定された。

Analysis of behavior of soil bacteria and *Bacillus subtilis* in lawn soil

○Toru Shibata[1], Hiromi Hirano[1], Hiroyoshi Suzuki[2], Shingo Hattori[3], Takuya Iwata[2], Toshihiro Hayakawa[3], Kiwako S. Araki[1], Motoki Kubo[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]RIKENGREEN CO.,LTD., [3]K-I CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.)

Key words *Bacillus subtilis*, soil bacteria, lawn field, soil environment

3Da02 芝生土壌における土壌成分及び細菌の解析

○平野 皓巳[1], 柴田 徹[1], 鈴木 宏佳[2], 岩田 卓也[2], 早川 敏広[2], 服部 新吾[3], 荒木 希和子[1], 久保 幹[1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]株式会社理研グリーン, [3]ケイアイ化成株式会社）
kubo@sk.ritsumeikan.ac.jp

【背景及び目的】芝草は環境緑化また、優れた踏圧耐性などから、ゴルフ場やサッカーグラウンドなど様々な場所で使用さている。芝は主に砂土中で化学肥料によって養分を維持し管理されている。芝生土壌の有機物は主に芝の刈カス（サッチ）であり、何年にも渡る芝生の維持から通常の耕作地とは大きく土壌環境が異なると推察される。本研究では芝生土壌のデータベース構築を目指し、土壌における土壌成分及び細菌の解析を行う事を目的とした。
【方法及び結果】2018 年 4 月から 2019 年 3 月において、微生物資材の散布頻度を変えた計 6 条件で芝を管理している静岡県のゴルフ場試験地より高麗芝とベント芝の土壌を毎月採取した。サンプリングは表層から 5cm、10cm、15cm の深度で行った。土壌中の全炭素量、全窒素量等の成分及び総細菌数の分析を行った。
芝生土壌の総細菌数は N. D. (6.6×10^6 cells/g 以下)～1.5×10^8 cells/g の範囲にあり、季節変動が見られ、畑土壌と比較すると低かった。これは有機物の蓄積がサッチによるものであり、それが少ないため微生物数も少ないと考えられる。全炭素量は上部で 9,000 mg/kg、下部で 3,000 mg/kg 程度でいずれの条件でも経時変化はみられなかった。また微生物資材の散布頻度が高いほど全炭素量は低かった。これらの結果から微生物資材散布によりサッチが分解されたことが示唆された。一方、全窒素量は 900 mg/kg～180 mg/kg の間で変動が見られた。これは化学肥料の施肥による影響だと考えられた。芝生の生育している土壌環境は有機物の蓄積が低いが一定数の微生物が生育しており、サッチによる有機物の供給が微生物により循環している環境であった。

Analysis of soil composition and bacteria in lawn soil

○Hiromi Hirano[1], Toru Shibata[1], Hiroyoshi Suzuki[2], Takuya Iwata[2], Toshihiro Hyakawa[2], Shingo Hattori[3], Kiwako S. Araki[1], Motoki Kubo[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]RIKENGREEN CO.,LTD., [3]K-I CHEMICAL INDUSTRY CO.,LTD.)

Key words lawn, soil environment, soil nutrient

3Da03 ブタ糞から単離された優占乳酸菌 *Lactobacillus amylovorus* 由来の S-Layer Protein の 探索と機能性評価

○浅野 風斗[1], 吉川 翔太[1], 宮原 平[1], 大野 博司[3], 宮本 浩邦[1,2,3], 児玉 浩明[1]
（[1]千葉大・園芸, [2]サーマス, [3]理研・生命医科学）
kodama@faculty.chiba-u.jp

当研究室では未利用海産資源を高温下で発酵させた好熱菌発酵産物の機能性に関する評価研究を進めている。当該産物を家畜ブタに給与すると、死産率の低下、飼料要求率の増加、成長促進といった有用な効果をもたらす事が確認されている。また好熱菌発酵産物を給与した豚ではブタ腸内固有の優占乳酸菌である *Lactobacillus amylovorus* が糞中にて増加することが明らかとなっている。*L. amylovorus* は細胞壁の最外層に S 層とよばれる規則的構造を持つことが知られている。S 層の構成タンパク質である S-layer protein (SLP) は、バクテリア-宿主間の相互作用に関与することが知られている。そこで本研究では、当該産物の給与後に増加する *L. amylovorus* 由来の SLP の探索とその機能性の評価を進めた。好熱菌発酵産物を給与した豚から単離された *L. amylovorus* 4-4 株、及び 4-８株を対象とし、グアニジン塩酸塩処理を行い細胞壁表面物質含有画分を獲得し、エドマン分解法、並びに質量分析法を用いて解析した。その結果、*L. amylovorus* 由来の画分から SLP 断片を同定することに成功した。粗抽出した SLP 画分と lipopolysaccharide（LPS）を混合した後、SDS-PAGE により泳動した結果、ゲルシフトする傾向が確認され、SLP が LPS と吸着する可能性があることが推察された。さらに、フローサイトメトリーを用いて SLP と LPS の吸着能を検証した結果、*L. amylovorus* 菌液区とグアニジン塩酸塩処理菌液区との間ではわずかながら吸着能の差を確認することができた。以上の結果、並びに最新のデータを踏まえて、腸内の LPS に対する *L. amylovorus* の役割について議論する。

Identification of S-layer protein (SLP) of *Lactobacillus amylovorus* isolated from pig feces and its functional evaluation

○Futo Asano[1], Shota Yoshikawa[1], Taira Miyahara[1], Hiroshi Ohno[3], Hirokuni Miyamoto[1,2,3], Hiroaki Kodama[1]
([1]Fac. Horticul., Chiba Univ., [2]Sermas, [3]IMS,RIKEN)

Key words compost, *Lactobacillus*, surface layer protein(SLP)

3Da04 ウグイス糞の諸特性と細菌叢の解析とその利用

藤茂登 遥香[1], ○石本 弥子[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】
ウグイス（*Horornis diphone*）の糞は洗顔料やシミ抜きとして江戸時代から近年まで利用されてきた。しかし現在は、鳥獣保護管理法の施行により糞の入手が困難となり、製品の製造ができない。ウグイス糞が化粧品的効能を示す機構は、これまで学術的検討が十分になされておらず、糞の主な要素である細菌叢（腸内由来）についても未解明な部分が多い。本研究ではウグイス糞が化粧品的効能を示す機構の解明とその利用を最終目的とし、今回は、ウグイス糞の諸特性を解析すると共に細菌叢の解析と培養化を試みた。
【方法と結果】
ウグイス糞を元素分析した結果、餌よりも糞の方が窒素の含有比が高かった。また、ウグイス糞にはプロテアーゼ活性、トリプシン活性、抗酸化活性が検出された。次世代シーケンサー（MiSeq）を用いて、ウグイス糞の細菌群集構造を解析した結果、門レベルではすべての試料において *Firmicutes* が最も多く（80%以上）含まれていた。属レベルでの解析では *Lactococcus*（22.43%）、*Macrococcus*（14.73%）、*Weissella*（14.39%）などが多く検出されたが、糞試料によりその存在比は異なっていた（現在、比較のため他の鳥類の細菌群集構造解析を実施中）。ウグイス糞試料からプロテアーゼ産生細菌の単離培養を試みたところ、次世代シーケンサーを用いた細菌群集構造解析において存在比が低い細菌のみが複数、培養化された。現在、他の機能を有する細菌の単離培養について検討中である。

Analysis of characteristics and bacterial flora of *Horornis diphone* fecal matter and its utilization

Haruka Fujimoto[1], ○Yako Ishimoto[2], Hideki Aoyagi[1,2]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Col. Agrobio. Resource. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words bacterial community, cosmetics, fecal sample, *Horornis diphone*

3Da05 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（第 2 報）

○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]
化粧品や石鹸などに添加されている抗菌性物質（防腐剤、抗菌剤、抗生物質等）は、雑菌や病原菌の抗菌や殺菌を目的としている。しかしながら、抗菌や殺菌の対象ではない皮膚常在菌も抗菌性物質に曝されているにも関わらず、常在菌の生理活性に及ぼす影響については知見が少ない。肌のバリア機能を担う皮膚常在菌に及ぼす影響を解析することは、抗菌性物質の適切な評価と使用、皮膚の健康の保持に重要である。この背景を踏まえ演者らは、抗菌剤のトリクロサン（TCS）が皮膚常在菌の生理活性に及ぼす影響の解析をおこない、皮膚常在菌が TCS 耐性を獲得することを報告した [1]。本研究では皮膚常在菌が獲得した TCS 耐性の持続性評価と共培養系における諸挙動の解析を試みた。
【方法と結果】
TCS 耐性を獲得した皮膚常在菌 2 菌株（*Staphylococcus epidermidis* [Se], *S. aureus* [Sa]）を TCS 無添加の培地 [Control-M] を用いて繰り返し継代培養し評価したところ、一度獲得した TCS 耐性は安定に維持されることが示された。TCS 耐性の有無が皮膚常在菌叢に及ぼす影響を解析するために、TCS 耐性を持たない Se と Sa、TCS 耐性を有する Se-TCS と Sa-TSC、を Control-M や TSC 添加培地 [TCS-M] を用いて種々の組み合わせや培養条件で共培養をおこない、定常期の生菌数（CFU）と培地の pH を測定した。その結果、Control の条件（Control-M で Se と Sa を培養）と比較して、TCS 耐性の獲得によって定常期における Se または Se-TCS と Sa または Sa-TCS の CFU の割合と培地の pH に変化が認められた。この結果から、TCS 耐性の獲得により皮膚常在細菌叢のバランスが崩れ、常在菌の担うバリア機能が弱まってしまう可能性が示唆された。現在、変化した菌のバランス（割合）を改善する方法について検討中である。
1)H30 生物工学会要旨 p. 265.

Influence of antibacterial substances on the physiological activities of indigenous skin bacteria (part 2)

○Mika Kikuta, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words coculture, indigenous skin bacteria, triclosan

3Da06 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（第 2 報）

○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、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様々な影響が報告されてきたが、試料の温度管理が適切になされていなかったため、 (1) 試料の加熱による効果、(2) マイクロ波の特異的（非加熱）効果、あるいは、(3) 両者の相乗効果、が複合的に作用する可能性が否定できず、前述の現象が生じる要因は未解明であった。先に演者らは、マイクロ波（非熱効果）により、(A) モデル微生物である大腸菌（*Escherichia coli* K12）の増殖能が向上する、(B) サイズの大きな微生物を除去した土壌試料では、培養化される微生物叢が変化する、ことをはじめて報告した [1]。本研究では、これらの現象の普遍性の検証やマイクロ波（非熱効果）に対して感受性の高い微生物の探索を試みた。
【方法と結果】 マイクロ波照射中の試料の温度は、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）がグラム陽性菌である *Lactobacillus acidophilus* 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 35 から 45 W で 37℃を維持）を照射しながら液体培養をおこなった場合、グラム陰性菌である *E. coli* K12 同様、コントロールと比較し、最終菌体濃度が増加（1.2 倍）した。また、*L. acidophilus* では *E.coli* とは異なり菌体サイズの増大が認められた（1.33 倍）。マイクロ波（非熱効果）に対し感受性を持つ微生物を探索するため、土壌、池の水などの様々な環境試料の培養をおこない、培養化された微生物叢を PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法で解析した。その結果、マイクロ波（非熱効果）により培養化が、(a) 促進される微生物、(b) 抑制される微生物、(c) 影響を受けない微生物、の存在が示唆された。
1） H30 生物工学会要旨集 p.180

Influence of microwave (non-thermal effect) on the physiological activities of microbes (part 2)

○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 microbial dark matter, microwave, non-thermal effect, PCR-DGGE

3Da07 Strategic formulation of spray dried synbiotic and kinetics study to prevent hyperphosphatemia

○Ajeeta Anand, Hideki Aoyagi
(Faculty Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

Probiotics can be administrated as phosphate-accumulating organisms to prevent hyperphosphatemia at early stages of chronic kidney disease in future. Reported phosphate binders for the treatment of hyperphosphatemia have high pill burden, cost and associated disadvantages like deposition in bones and adverse health effects. In this study, a spray dried synbiotic preparation (SD) was formulated using *Lactobacillus casei* JCM 1134 and *Aloe vera* as follows: Lysine derivatization (DAVK) of deacetylated *A. vera* (DAV) formed the first layer around *L. casei* and the second layer of SD was composed by the supernatant obtained from DAV preparation. SD was characterized and evaluated for phosphate accumulation under in vitro trials. Results showed that the outer layer served as the sacrificial layer for the survival of *L. casei* during harsh conditions of gastric juice and DAVK enhanced the phosphate accumulation by 2.5-fold by lowering the zeta potential. Kinetics study of phosphate accumulation by SD revealed the polynomial trend (R^2=0.955) with maximum phosphate accumulation capability approx. 0.62 [mg-phosphate/mg-SD]. The obtained exponential trend and maximum phosphate accumulation capability of SD made a good stand to compete with commercial phosphate binders. The strategic formulation of SD has safe status and high potential to prevent hyperphosphatemia with additional probiotic benefits.

Strategic formulation of spray dried synbiotic and kinetics study to prevent hyperphosphatemia

○Ajeeta Anand, Hideki Aoyagi
(Faculty Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words *Aloe vera*, hyperphosphatemia, *Lactobacillus casei*, phosphate accumulation

3Da08 模擬微小重力環境が腸内有用細菌の諸特性に及ぼす影響の解析と利用

○増田 亜理沙, 青柳 秀紀
（筑波大院・生命環境）
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。先に演者らは、新たな培養法として、模擬微小重力（LSMMG）培養に着目し、LSMMG 環境が種々の腸内有用細菌の生理活性に及ぼす影響を解析し、(A) LSMMG 培養により *Lactobacillus acidophilus* JCM1028 の耐酸性が向上する、(B) LSMMG 条件で *L. acidophilus* の耐酸性試験をおこなうと、NG 条件よりも高い生存率を示す、新規な現象を見出した [1]。本研究では、様々な乳酸菌やビフィズス菌を対象に、この現象の普遍性の有無を解析するとともに、この現象を活用した耐酸性プロバイオティクスの取得を試みた。
[方法と結果] HARV bioreactor を用い、LSMMG 培養や LSMMG 条件下での耐酸性試験が、種々の乳酸菌やビフィズス菌の諸特性 (増殖、培養液の pH、胃酸耐性) に及ぼす影響を解析した。その結果、今回検討した乳酸菌やビフィズス菌の中には、LSMMG 培養や LSMMG 条件下での耐酸性試験において、*L. acidophilus* と同様な挙動を示す菌株が複数存在した。特に、*Bfidobacterium breve* JCM1192 は、LSMMG 培養することで NG 培養した場合と比べて顕著な耐酸性の向上が見られた (耐酸性試験の生存率は、NG 培養 = 0%、LSMMG 培養 = 1.5%) 。LSMMG 培養した *B. breve* を酸耐性試験後、寒天平板培地に播種し、生成したコロニーを取得、培養、評価した結果、耐酸性の高い *B. breve* を取得できた (耐酸性試験の生存率 = 42%、耐酸性の維持も認められた) 。以上の結果より、LSMMG 培養や LSMMG 条件下での耐酸性試験は耐酸性プロバイオティクスの取得に利用できることが示唆された。現在、他の菌株や耐酸性以外の特性について検討中である。

1) H30 日本生物工学会要旨集 p. 267

Effect of low shear and modeled-microgravity condition on the physiological activities of enteric useful bacteria and its application

○Arisa Masuda, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words acid tolerance, bifidobacterium, lactic acid bacteria, low shear and modeled-microgravity

3Da09 コレラトキシン B サブユニットを利用した、機能性ペプチドの細胞小器官への送達

吉井 優也, 是石 真友子, ○佐藤 あやの
（岡山大・工）
ayano113@cc.okayama-u.ac.jp

病巣への薬剤送達は、主に細胞表面タンパク質を標的とすることにより実現し、特定の疾患の治療に利用されている。しかし、このような方法では細胞小器官特異的に薬剤を送達できない。
コレラトキシンは、致死性のある A サブユニットと、A サブユニットを細胞内へ送り届ける役割を果たし毒性のない B サブユニットからなる。本研究では、この B サブユニット (以下、CTxB) を改変することにより、機能性ペプチドを細胞小器官であるゴルジ体や小胞体へ送達可能なシステムを構築し、現在の薬物送達法では治療が困難な疾患の治療に役立つ新しい細胞内薬剤送達法の開発を目指した。
機能性ペプチドには、11 アミノ酸残基からなる HiBiT を利用した。HiBiT は、LgBiT と結合することによりルシフェラーゼ活性を発現する。LgBiT をゴルジ体や小胞体内腔に安定発現させた細胞に、HiBiT を融合した CTxB (以下、改変 CTxB) を取り込ませ、細胞内の改変 CTxB の局在および量の経時的変化をルシフェラーゼ活性により追跡した。
改変 CTxB は、細胞と接触およそ 15 分後にゴルジ体に到達し、その 45 分後に小胞体に到達した。さらに、小胞体への送達には、小胞体保留シグナルである KDEL 配列の改変 CTxB の C 末端への付加が有効であった。今後、本法の改変 CTxB をさらに改変することにより、本法は、ゴルジ体内腔に局在し翻訳後修飾に関わる酵素の欠損によって起こる疾患、例えば I-cell 病などの治療へ新たなアプローチとなる可能性がある。

Delivery of the functional peptide to organelles using cholera toxin B subunit

Yuya Yoshii, Mayuko Koreishi, ○Ayano Satoh
(Fac. Eng., Okayama Univ.)

Key words Golgi apparatus, Endocytosis, drug delivery system

3Da10 昆虫細胞を用いた MERS コロナウイルス様ナノ粒子の調製

高見 佳宏 [1], 町田 佑樹 [1], デオ ヴィピン クマル [2], ○加藤 竜也 [1,3], 朴 龍洙 [1,3]
（[1]静大院・総合科技, [2]静大・国際連携, [3]静大・グリーン科技研）
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【目的】中東呼吸器症候群（MERS）は、2012 年以降中東地域で広く発生しているウイルス性の重症呼吸器感染症であり、MERS コロナウイルス（MERS-CoV）によって引き起こされる。現在のところ日本では症例はないが、2015 年には韓国で感染およびその拡大の報告があり、感染率は低いが致死率が高いことから、ワクチンや特異的治療法の開およびや早期検出法の確立が必須である。本研究では、それらの開発のため MERS-CoV 様ナノ粒子の調製を目的とした。
【方法および結果】MERS-CoV の構造タンパク質である S タンパク質、E タンパク質および M タンパク質をコードする遺伝子を購入し、それぞれの遺伝子を pFastBac1 ベクターのポリヘドリンプロモーター下流に挿入して、それぞれの遺伝子発現カセットを構築した。また、それら 3 つの遺伝子発現カセットを有する pFastBac1 ベクターを Gibson assembly 法で構築した。それらベクターから Bac-to-Bac 法で組換え BmNPV (BmNPV/S および BmNPVS/E/M)バクミドを構築し、Bm5 細胞にトランスフェクションすることでそれぞれの組換え BmNPV を得た。それぞれの組換え BmNPV を Bm5 細胞に M.O.I. 1 で感染させたところ、それぞれの組換えタンパク質の発現が確認されたが、S, E, M タンパク質の共発現では、S タンパク質を有する MERS-CoV 様粒子の調製ができなかった。そのためそれぞれのタンパク質を発現する Bm5 細胞 1×10^6 個を 5 μm 孔のメンブランフィルターに押し出すことで、S タンパク質、E タンパク質および M タンパク質を有するナノ粒子を作製した。ショ糖密度勾配遠心分離で粒子を部分精製し、免疫電子顕微鏡で粒子表面の S タンパク質を検出した。この方法により、昆虫細胞から MERS コロナウイルス様ナノ粒子を調製することができた。

Preparation of MERS coronavirus-like nanoparticles from insect cells

Yoshihiro Takami[1], Yuki Machida[1], Vipin Kumar Deo[2], ○Tatsuya Kato[1,3], Enoch Y. Park[1,3]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Org. Int. Collab., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words MERS, Bm5 cells, BmNPV, Nanoparticles

3Da11 微細藻の細胞分裂に及ぼす培養温度・光強度の周期的制御の影響

○勝田 知尚, 森本 高章, 桑井 仁葵, 山地 秀樹
（神戸大院・工）
katsuda@kobe-u.ac.jp

【背景と目的】緑藻の一種 *Haematococcus pluvialis* を用いたアスタキサンチンの工業的生産では，予め多数の細胞を得た上でそれらを誘導し，アスタキサンチン生合成を促す手法がとられる．我々は細胞増殖段階の効率化を目指し，培養温度と照射光強度の制御方法について検討したところ，これまで最適温度とされてきた 20.0°C で一定に保持して培養するよりも，20.0°C と細胞分裂が抑制される 30.5°C との間で 12 h 毎に温度を変化させつつ培養するほうが，増殖速度，ならびに最高細胞密度が約 30%向上することを見出した．そこで本研究は，こうした培養温度・光強度の周期的制御が微細藻の細胞分裂に及ぼす影響を検討した．
【方法】微細藻株には *H. pluvialis* NIES-144 を使用した．炭素源を CO_2 に依存する無機培地に再懸濁したのち，仕込み体積 200 mL のバブルカラム式光培養器を用い，CO_2 を 5 v/v%で添加した空気を 0.5 vvm で通気しつつ培養を行った．このとき，光培養器はガラス壁の恒温水槽中に設置し，外部から白色蛍光灯光を照射光強度 140 μmol・m^{-2}・s^{-1} で一定，ないし 70 と 210 μmol・m^{-2}・s^{-1} で所定時間ごとに変化させつつ照射した．また，異なる温度を設定した 2 台のチラーをタイマーリレーで所定時間ごとに切替え運転し，恒温水槽中の水温を変化させて培養温度を制御した．
【結果と考察】*H. Pluvialis* は，培養温度を一定に保持したときには細胞数密度が連続的に増加したが，12 h ごとに変化させたときには，培養温度を高めたときに細胞数密度が急に増加することが観察された．照射光強度の周期的変化によって微細藻の細胞分裂が同調することは知られているが，*H. Pluvialis* においては培養温度を変化させたときにも同調することが見出された．

Effects of circadian control of cultivation temperature and light intensity on the cell division of microalgae

○Tomohisa Katsuda, Takaaki Morimoto, Hitoki Kuwai, Hideki Yamaji
(Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words microalgae, *Haematococcus pluvialis*, cell cycle, circadian cycle

3Ea01 含窒素生理活性化合物 maniwamycin の生合成経路の解析

○藤田 昂大 [1], 達川 綾香 [2], 岸本 拓也 [2], 福本 敦 [3], 安齊 洋次郎 [3], 荒川 賢治 [1,2]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]広島大院・先端物質科学, [3]東邦大・薬）
karakawa@hiroshima-u.ac.jp

【目的】放線菌は抗生物質などの多種多様な二次代謝産物を生産し、ゲノム上に 30 種もの二次代謝生合成クラスターが存在するが、通常培養では約 2 割の代謝産物しか確認されず、残り 8 割はゲノム上に「埋もれている」といえる。放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は、通常培養において 2 つの抗生物質ランカサイジン（LC）、ランカマイシン（LM）を生産する。LC、LM 生合成遺伝子およびリプレッサー遺伝子 *srrB* に変異を加えた三重破壊株（KA57 株）において、通常培養非生産のアゾキシアルケン型化合物 KA57-A が蓄積した。本化合物のようなアゾキシ結合は非常に珍しく、クロモバクテリウム・ビオラセウムの quorum sensing を阻害することも明らかになっている。本研究では、KA57-A の構造類似体 maniwamycin に注目し、アゾキシ結合形成を含めた生合成経路の解明および構造多様化を目指した。
【方法および結果】TOHO-M025 株（maniwamycin 生産菌）を培養し、代謝産物を酢酸エチルで抽出した。その後 LH20 ゲル濾過およびシリカゲルクロマトグラフィーによって分画、精製を行ったところ、分子式 $C_{12}H_{22}N_2O_4$ の maniwamycin G が得られた。TOHO-M025 株について PacBio RS-II シークエンサーによりゲノム解析を行った。KA57-A および maniwamycin などのアゾキシアルケン化合物生合成遺伝子クラスターとの比較解析を行ったところ、酸化還元酵素や縮合酵素、キナーゼ酵素などの共通の遺伝子群を見出すことができた。また、標識基質の取り込み実験により、maniwamycin の N 原子はセリンおよびグルタミン酸由来であることが分かった。現在、脂肪族アミンの炭化水素鎖と生理活性の相関性を解明するために、炭化水素鎖の異なるアミンの添加培養等も進めている。

Analysis of the biosynthetic pathway of nitrogen-containing bioactive compound maniwamycin

○Kota Fujita[1], Ayaka Tatsukawa[2], Takuya Kishimoto[2], Atsushi Fukumoto[3], Yojiro Anzai[3], Kenji Arakawa[1,2]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [3]Sch. Pharm., Toho Univ.)

Key words *Streptomyces*, biosynthesis, azoxyalkene, enzyme reaction

3Ea02 放線菌 *Streptomyces rochei* のポリケチド抗生物質 LM の生合成に関与する P450 水酸化酵素の機能解析

○手島 愛子[1], 近藤 寿志[1], 殿川 亜未[1], 小中 勇二[1], 板倉 康浩[1], 荒川 賢治[1,2]
（[1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・統合生命科学）
karakawa@hiroshima-u.ac.jp

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株の生産する 14 員環マクロライド化合物ランカマイシン（LM）は、グラム陽性細菌に対して抗菌活性を持ち、構造はマクロライド系抗生物質エリスロマイシンと極めて類似している。当研究室では、LM 生合成遺伝子クラスターが線状プラスミド pSLA2-L にコードされていることを明らかにしており、そのうち P450 水酸化酵素遺伝子 *lkmK*, *lkmF* および糖転移酵素遺伝子 *lkmL*, *lkmI* の機能に着目した。遺伝子破壊株の代謝産物解析により、LM の生合成経路ではアグリコン 8,15-dideoxy lankanolide に対して、LkmK(15 位水酸化)→LkmL(3 位水酸基への L-arcanose 付加)→LkmF(8 位水酸化)→LkmI(5 位水酸基への D-chalcose 付加)の順に酵素反応が進行することがわかった。そこで、本研究では *lkmK* および *lkmF* のタンパク発現系を確立し、これらの水酸化酵素の基質認識解析を行った。
まず、予想基質を得るために、Δ*lkmK*-*lkmL* 株、Δ*lkmF*-*lkmI* 株を培養・抽出し、それぞれの株から 8,15-dideoxylankanolide、3-O-L-arcanosyl-8-deoxylankanolide を単離し、構造を決定した。
タンパクは、LkmK は大腸菌発現系を用い、LkmF は大腸菌系では反応が進行しなかったため、放線菌発現系を用いて調整を行った。*lkmF* 遺伝子を放線菌大量発現ベクター pHSA81 に連結してプラスミド pYK01 を得て、S. lividans TK64/pYK01 株を構築した。二重破壊株から得られた基質と酵素を用いて *in vivo* 反応を行なったところ、どちらも LkmK, LkmF によって水酸化された。また、Δ*lkmK*, Δ*lkmF*, Δ*lkmL*, Δ*lkmI* 株から得られた LM 誘導体についても酵素による基質変換反応を行い、*lkmF*, *lkmK* の基質特異性の解析を行った。
本発表では、各 LM 誘導体のバイオアッセイ試験の結果も合わせて、詳細を報告する。

Functional analysis of P450 hydroxylase involved in biosynthesis of polyketide antibiotic Lankamycin in *Streptomyces rochei*.

○Aiko Teshima[1], Hisashi Kondo[1], Tsugumi Tonogawa[1], Yuji Konaka[1], Yasuhiro Itakura[1], Kenji Arakawa[1,2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima-Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words P450, biosynthesis, enzyme, antibiotics

3Ea03 ブテノライド型シグナル分子の構造多様性およびゲノムマイニングへの応用

○江口 雄聡[1], 住吉 美保[2], 手島 愛子[2], 荒川 賢治[1,2]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]広島大院・先端物質科学）
karakawa@hiroshima-u.ac.jp

【目的】放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は抗生物質ランカサイジン(LC)およびランカマイシン(LM)を生産し、それらの生合成はシグナル分子 SRB により厳密に制御されている。SRB は SRB 生合成因子 SrrX によって生合成され、2,3-二置換ブテノライド構造を有している。また放線菌のシグナル分子全体のうち、6 割は γ-ブチロラクトン構造と推測されているが、残り 4 割は[1]SRB などのブテノライド型、[2]新規骨格、[3]シグナル分子非生産、に大別できる。そこで本研究では、放線菌シグナル分子におけるブテノライド型分子の多様性の検証、さらにシグナル分子の誘導生産システムを利用した休眠二次代謝の活性化を目指した。
【方法・結果】まず、SRB の多様性検証のために供試菌として本学の保存菌株からランダムに選択した 86 株を培養し、代謝産物を酢酸エチルで抽出した。その後、抽出物を *ΔsrrX* 株へ添加培養し LC・LM 生産の回復を調べたが、いずれの供試菌抽出物においても回復は認められず、SRB は独特なシグナル分子構造であることが示唆された。
次に、SRB を供試菌株に対し網羅的に添加培養し、非添加と比較することで、SRB による代謝誘導が引き起こされるかを検証した。供試菌に化学合成した SRB を 1 μM 添加培養し、酢酸エチルで抽出後、TLC 解析を行い SRB 添加の有無による代謝プロファイルの変化を比較したところ、69 菌株中 8 株において代謝産物の変化が見られた。
また最近、*Streptomyces ansochromogenes* において、SRB よりも側鎖の短いブテノライド型分子 SAB の存在が報告された。化学合成した SAB を *ΔsrrX* 株へ添加培養したところ、通常培養では見られない緑色スポットが検出できたため、現在その化合物の単離・解析を行っている。

Structural diversity of butenolide-type signaling molecules and its application toward genome mining

○Yuto Eguchi[1], Miho Sumiyoshi[2], Aiko Teshima[2], Kenji Arakawa[1,2]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ)

Key words *Streptomyces rochei*, Signaling molecule, Genome mining, Secondary metabolism

3Ea04 *Streptomyces* 属放線菌における二次代謝制御因子改変による 物質生産性プロファイルの解析

○見崎 裕也, 岩國 美由季, 高橋 譲, 鈴木 敏弘, 木梨 陽康, 荒川 賢治
（広島大院・統合生命科学）
karakawa@hiroshima-u.ac.jp

[背景] 放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株の有する線状プラスミド pSLA2-L 上にはポリケチド抗生物質 Lankacidin(LC)・Lankamycin(LM)の生合成遺伝子クラスターがコードされている。両抗生物質の生産はシグナル分子 SRB(*Streptomyces rochei* butenolide)合成酵素 SrrX→シグナル分子レセプター SrrA→SARP 型活性化因子 SrrY（→LC 生産）→SARP 型活性化因子 SrrZ（→LM 生産）といったカスケードにより制御されている。制御カスケード解明の一環として構築した *srrB* 欠失株の代謝産物解析を行ったところ、LC, LM 生産が 5 倍以上向上しており、制御カスケードにおける *srrB* の関与が示唆された。*S. rochei* 染色体上には 35 種の生合成クラスターが存在しており、対応する化合物としてアゾキシアルケン化合物 KA57-A、ポリケチド化合物ペンタマイシンおよびシトレオジオールの 3 種類が取得されている。残りの 32 種の生合成クラスターの代謝産物は未同定であり、生合成クラスターが休眠している可能性がある。染色体上の制御遺伝子を探索したところ、レセプターホモログが 5 個存在した。本発表では、[1]制御カスケードにおける *srrB* の機能解析、および[2]染色体上レセプター遺伝子の改変による二次代謝産物生産量の増大および休眠二次代謝の活性化の試みについて報告する。
[1]親株、制御遺伝子欠失株を対象として、(1)抗生物質生産量、(2)転写産物(*srrA, srrB, srrY*)の発現解析、および(3)菌体量、について経時変化解析を行った。その結果、*srrB* は培養後期に *srrY* の発現を抑制することで、抗生物質生産における負の制御因子として機能していることが示唆された。
[2]SrrB と相同性を有するレセプターホモログ遺伝子 *SRO_1739* に着目し、遺伝子破壊を行った。代謝産物を HPLC および ESI-MS 解析に共したところ、親株にはみられない化合物を検出した(分子式 $C_9H_9O_2N$)。

Analysis of metabolic profile changes by modification of regulatory genes in *Streptomyces*

○Yuya Misaki, Miyuki Iwakuni, Yuzuru Takahashi, Toshihiro Suzuki, Haruyasu Kinashi, Kenji Arakawa
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words regulation, antibiotics

3Ea05 抗腫瘍抗生物質マイトマイシンの生合成解析

○中川 陽[1], 小笠原 泰志[2], 大利 徹[2]
（[1]北大院・総合化学, [2]北大院・工）
dairi@eng.hokudai.ac.jp

【緒言】
Mitomycin は、放線菌 *Streptomyces ardus* が生産する抗腫瘍抗生物質であり、ベンゾキノン、ピロリジジン、アジリジンが縮環した四環性のミトサン骨格を構造上の特徴とする。その生合成について、標識体の投与実験から、3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) と D-glucosamine を前駆体とすることが明らかにされている。また、生合成遺伝子クラスターの解析から AHBA がアミノシキミ酸経路で生合成されることも示されている。しかし、AHBA 形成以降の経路については報告がない。そこで、本研究では組換え酵素を用いた *in vitro* 実験でその解明を試みた。
【方法、結果、考察】
クラスターの各遺伝子について相同性解析したところ、AHBA の生成後、アシル CoA リガーゼ (MitE) によるアシルキャリアタンパク質 (MmcB) へのロード、または、グリコシル基転移酵素 (MitB) による糖転移反応の何れかが起きると予想された。そこで、これらの組換え酵素を発現、精製後、*in vitro* で反応を解析した。その結果、 MitE が ATP 存在下で AHBA を MmcB へロードし、AHBA-MmcB を生成することを LC-MS 分析により確認した。また、MitB が AHBA-MmcB と UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) 間のグリコシル化反応を触媒することも確認した。他方、AHBA と UDP-GlcNAc を用いた MitB の反応は進行しなかった。以上より AHBA が、先ず MitE によって MmcB へロードされ、続いて MitB によってグリコシル化される経路が明らかとなった。

Biosynthesis of the antitumor antibiotics mitomycins

○Yo Nakagawa[1], Yasushi Ogasawara[2], Tohru Dairi[2]
([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words antibiotics, acyl carrier protein, biosynthesis, *in vitro* analysis

3Ea06 ポリグルタミン酸生合成における新規エピメリ化反応

○佐藤 将太[1], 重松 真由子[1], 加藤 陽菜多[1], 小笠原 泰志[2], 大利 徹[2]
（[1]北大院・総合化学, [2]北大院・工）
dairi@eng.hokudai.ac.jp

【研究背景】
ポリグルタミン酸 (PGA) は *Bacillus* 属細菌が生産する D,L-グルタミン酸 (Glu) の混合ポリマーである。これまでに 3 つの酵素 PgsBCA の生合成への関与が示されているが、いずれも膜酵素であり *in vitro* での反応解析がほとんどなされておらず、詳細は未解明である。納豆菌はグルタミン酸ラセマーゼを有し、D-Glu を生合成できることから、これまで D,L-Glu の両者の重合反応により混合ポリマーが生合成されると考えられてきた。しかし、最近当研究室でペプチド系天然物 MS-271 の生合成における D-トリプトファン残基の導入に関わる新規ペプチドエピメラーゼ (MslH) を見出した。PgsA が MslH と高い相同性を有することから、PGA の生合成においても L-Glu 残基のエピメリ化反応によって D-Glu 残基が導入される可能性が示唆された。この場合、PGA の残基はすべて L-Glu を基質に生合成される。そこで本研究では安定同位体標識した D-、L-Glu の投与実験によりその検証を行った。

【方法・結果および考察】
生産菌はグルタミン酸ラセマーゼを持ち D-、L-Glu を相互変換するため、生産菌を用いた投与実験では Glu の由来の判別は難しい。そこでグルタミン酸ラセマーゼ欠損大腸菌 (WM335 株) で PGA を異種宿主生産し、重水素標識した D-、L-Glu の投与実験を行った。標識 PGA を精製、酵素的加水分解後、LC-MS で分析した結果、標識 L-Glu 投与時のみ PGA の D-Glu 残基への重水素の取り込みが確認された。この結果から PGA の D-Glu 残基の由来は L-Glu であり、その形成にエピメリ化反応が関与することが明らかになった。

Involvement of peptide epimerization in poly-γ-glutamic acid synthesis

○Shota Sato[1], Mayuko Shigematsu[1], Hinata Kato[1], Yasushi Ogasawara[2], Tohru Dairi[2]
([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words poly-gamma-glutamate, biosynthesis, epimerization, tracer experiments

3Ea07 放線菌 *Streptoalloteichus hindustanus* が生産する新規カチオン性ホモポリアミノ酸の構造決定及びその抗菌活性評価

○福本 響[1], 戸口 梨那[2], 荒川 賢治[3], 濱野 吉十[4], 老川 典夫[1,2], 山中 一也[1,2]
（[1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工, [3]広島大院・統合生命科学, [4]福井県大・生物資源）
kazuyay@kansai-u.ac.jp

【緒言】 数種の *Streptomyces* 属放線菌が二次代謝産物として生産する epsilon-poly-L-lysine (e-PL)は、極めて強い抗菌活性や細胞膜透過性を示すことから、抗菌剤やドラッグデリバリーキャリアとしての応用が期待されている。類縁のカチオン性ポリアミノ酸にも同様の生理活性が期待できることから、我々は、ゲノムマイニングによる新規ポリマー探索を進めており、その過程で放線菌 *Streptoalloteichus hindustanus* が Poly-D-diaminobutanoic acid に加えての Lysine の異性体を構成残基とする新規カチオン性ホモポリアミノ酸を併産することを見出した。本研究は、この新規ホモポリアミノ酸の構造決定ならびにその抗菌特性を明らかにすることを目的とする。
【方法】 *S. hindustanus* 培養液上清から陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて当該ポリアミノ酸を分離精製した。構成アミノ酸残基及びその立体化学は、精製標品を加水分解した後、Marfey 法を用いて決定した。また、その結合様式及び鎖長は、それぞれ NMR 及び LC-MS により決定した。抗菌活性については各種指標菌株に対する最小生育阻止濃度 (MIC)に基づいて評価した。
【結果及び考察】 各種解析の結果、推定生合成酵素の *in vitro* 基質特異性解析の結果に基づいて予想した通り、当該ポリアミノ酸は L-beta-lysine のみが直鎖状につながったイソペプチド構造の epsilon-poly-L-beta-lysine (b-PL)であることが判明した。このことから、b-PL が天然物としては 5 例目のカチオン性ホモポリアミノ酸であることが確認された。また MIC 評価において、b-PL は e-PL と同様に幅広い抗菌スペクトルを示したが、特に糸状菌類に対しては e-PL と比較して顕著に強い抗菌活性を示すことも分かった。

Structure and bioactivity of a novel cationic homo poly-amino acid produced by *Streptoalloteichus hindustanus*

○Hibiki Fukumoto[1], Rina Tiguchi[2], Kenji Arakawa[3], Yoshimitsu Hamano[4], Tadao Oikawa[1,2], Kazuya Yamanaka[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [3]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [4]Fac. Biotechnol., Fukui Pref. Univ.)

Key words secondary metabolism, homo poly-amino acid, genome mining, bioactivity

3Ea08 放線菌 *Streptoalloteichus hindustanus* に見出した新規 PLP 非依存型 Diaminobutyric acid ラセマーゼの機能解析

○尾崎 僚[1], 福本 響[1], 濱野 吉十[2], 老川 典夫[1], 山中 一也[1]
（[1]関西大院・理工, [2]福井県大・生物資源）
kazuyay@kansai-u.ac.jp

【緒言】D-アミノ酸はさまざまな生物に分布し、L-アミノ酸には無い重要な生理機能を示すことが知られている。一般に、D-アミノ酸は生体内で異性化酵素によって対応する L-アミノ酸から生合成される。これまでに Ala や Glu 等の標準アミノ酸については、それぞれ異性化酵素が同定されているが、非標準アミノ酸の異性化酵素に関する知見は未だ乏しい。このような背景下、我々は、天然物としては稀な D 体の 2,4-Diaminobutyric acid (D-Dab)のみから構成されるホモポリアミノ酸 Poly-D-Dab を生産する放線菌 *Streptoalloteichus hindustanus* から、先例のない PLP 非依存型の Dab 特異的ラセマーゼを見出した。本酵素の構造機能相関に関する研究は、不分明な部分が多く残される D 型非標準アミノ酸生合成に関する知見の拡充を導くものと期待できる。従って、本研究は *S. hindustanus* に見出した新規 PLP 非依存型 Dab ラセマーゼ(*Sh*-DabR)の詳細な酵素学的性質の解明を目的とする。
【方法】*Sh-dabR* 遺伝子を pET21b ベクターにクローニングし、*E. coli* Rosetta 2 (DE3)株を宿主として発現させることで組換え *Sh*-DabR を得た。この組換え *Sh*-DabR を L-Dab を基質として各種条件下で反応させ、生じた D-Dab を改変 Marfey 法により定量評価することで各種酵素学的性質を解析した。また、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて本酵素の四次構造についても解析した。
【結果及び考察】これまでの解析の結果、*Sh*-DabR は単量体として機能しており、弱塩基性 pH 領域で最大活性を示すなど、その酵素学的特性が Diamonopimelate epimerase (DapF)と類似していることが分かった。*Sh*-DabR の一次構造は近縁放線菌由来の DapF と 20%程度の相同性しか示さないが、触媒残基と推定される 2 つのシステイン残基が保存されていることから、PLP 非依存型の DapF と類似した機構により Dab の異性化を触媒するものと推定される。

Characterization of an unprecedented PLP-independent diaminobutyric acid racemase from *Streptoalloteichus hindustanus*

○Ryo Ozaki[1], Hibiki Fukumoto[1], Yoshimitsu Hamano[2], Tadao Oikawa[1], Kazuya Yamanaka[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Fac. Biotechnol., Fukui Pref. Univ.)

Key words racemase, enzymatic characterization, D-amino acid, genome mining

3Ea09 ポリ-D-ジアミノブタン酸生産放線菌 *Streptoalloteichus hindustanus* に見出した新規 D-ペプチド分解酵素の同定

○宮脇 大輝[1], 福本 響[1], 濱野 吉十[2], 老川 典夫[1], 山中 一也[1]
（[1]関西大院・理工, [2]福井県大・生物資源）
kazuyay@kansai-u.ac.jp

【緒言】一般に、生体内で生合成されるタンパク質は L-アミノ酸から構成される。生体にはタンパク質合成系のみならず、多様なタンパク質分解系も存在するが、これらの分解酵素も一部の例外を除き L-アミノ酸残基を特異的に認識して分解する。いくつかの β-ラクタマーゼ様の酵素が、例外的に D-アミノ酸含有ペプチドに作用することが報告されているが、これらは何れも短鎖 D-アミノ酸含有ペプチドの *N*-末端付近の D-アミノ酸残基を遊離するのみである。したがって D-アミノ酸のみから構成される長鎖 D-ペプチドに作用する天然のペプチダーゼは報告がない。このような背景下、我々は長鎖 D-ペプチド(poly-D-Dab)生産放線菌 *Stereptoalloteichus hindustanus* が、細胞表層に強い D-ペプチド分解酵素を有していることを明らかにした。本研究は、当該新規酵素の同定とその酵素化学的諸性質を明らかにすることを目的とする。
【方法】*S. hindustanus* ゲノム配列の *in silico* 解析により見出した推定 poly-D-Dab 生合成遺伝子(*pdb*)クラスター全長を BAC ベクターにクローニングした。このベクターを導入した異種放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 株の poly-D-Dab 分解活性を休止菌体反応にて確認した。次に *pdb* クラスターにコードされる D-ペプチド分解酵素候補遺伝子を大腸菌を宿主として発現させ、得られた組換え酵素の poly-D-Dab 分解活性を評価した。
【結果及び考察】*pdb* クラスター全長を導入した *S. lividans* は、休止菌体反応において非導入株には見られない顕著な poly-D-Dab 分解活性を示したことから、D-ペプチド分解酵素が当該遺伝子クラスターにコードされることを確認した。更に、組換え酵素として調製した *pdb* クラスターにコードされる β-ラクタマーゼ様の酵素が、同様の強い poly-D-Dab 分解活性を示したことから、当該酵素が D-ペプチド分解酵素の実体であることを確認した。

Identification of an unprecedented D-peptide degrading enzyme from *Streptoalloteichus hindustanus*

○Hiroki Miyawaki[1], Hibiki Fukumoto[1], Yoshimitsu Hamano[2], Tadao Oikawa[1], Kazuya Yamanaka[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Fac. Biotechnol., Fukui Pref. Univ.)

Key words secondary metabolism, peptidase, beta-lactamase, D-peptide

3Ea10 藍藻のバイオフィルム形成に関与するプトレシン合成酵素の機能解析

○木花 将[1], 解良 康太[1], 植村 武史[2], 五十嵐 一衛[2], 魚住 信之[1]
（[1]東北大院・工, [2]アミンファーマ研）
uozumi@biophy.che.tohoku.ac.jp

【背景・目的】酸素発生型光合成細菌であるシアノバクテリア（*Synechosystis* sp. PCC6803）は塩ストレスなどの環境ストレスを感知してバイオフィルムを形成する。我々は，ポリアミン生合成経路の最初の反応を担うアルギニン脱炭酸酵素（Adc）遺伝子を不活化すると，ポリアミン濃度は低下し，バイオフィルム形成は促進されることを報告した（K. Kera *et al.*, 2018）。今回、バイオフィルム形成に関与するポリアミンの種類とその合成酵素を明らかにする目的で、Adc の次の反応を触媒するプトレシン合成酵素（Auh）の遺伝子の同定とその遺伝子産物の機能を解析した。
【方法・結果】シアノバクテリアのゲノム上には、2 つの *auh* 相同遺伝子（*auh1*、*auh2*）が存在する。これらの酵素機能を明らかにするために、Auh1、Auh2 を大腸菌で異種発現させ、Ni アフィニティークロマトグラフィーにより精製酵素標品を取得した。アグマチンを基質として反応後、高速液体クロマトグラフィーにてプトレシン量を測定した。その結果、Auh は両方とも活性を有し、更に Auh1 は Auh2 の約 3 倍の比活性を示すことが明らかになった。Auh のシアノバクテリアにおける機能を明らかにするために、Auh1、Auh2 の各単一欠損株（*Δauh1*, *Δauh2*）と二重欠損株（*Δauh1/2*）を作製し、生育試験をおこなった。その結果、通常培地（BG11）において *Δauh1* と *Δauh1/2* 株で細胞増殖速度の低下が観察された。比活性の高い Auh1 の欠損株でより遅延が観察されたことから、ポリアミンは細胞増殖を促進することが示唆された。次に、バイオフィルム形成量を測定したところ、野生株と欠損株でバイオフィルム量に差は観察されなかった。このことから、ポリアミンに加えてアグマチンもバイオフィルム形成制御に関与することが示唆された。

Characterization of agmatine ureohydrolases, Auh1 and Auh2, in cyanobacteria

○Masashi Kihana[1], Kota Kera[1], Takeshi Uemura[2], Kazuei Igarashi[2], Nobuyuki Uozumi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Amine Pharma Res. Inst.)

Key words cyanobacteria, biofilm, polyamine, stress response

3Ea11 卵菌 *Saprolegnia* による生理活性多価不飽和脂肪酸 Arachidonic acid 生産

○高野 真希[1], 吉村 英莉[2], 星野 一宏[1]
（[1]富山大院・理工, [2]富山大・工・生命）
khoshino@sus.u-toyama.ac.jp

多価不飽和脂肪酸(PUFA)は生活習慣病や脳機能の活性化など様々な調節効果および生理活性を有するため注目されている。特に、Arachidonic acid (ARA)はエイコサノイドの前駆体として知られており、神経伝達などに関わる生理活性物質として重要な役割をもつ。近年では安定な生産を目指した接合菌 *Mortierella* による ARA 生産が行われている。しかし本菌種は豊富な栄養を必要とし、さらに増殖を高めるには土壌抽出液など複雑な成分を要する。このため、液体培養に適した低栄養下で ARA 生産を可能とする新規な菌種が求められる。本研究では淡水の低栄養培地下で増殖する卵菌 Saprolegnia に着目し、本菌種による ARA 生産について検討した。
ARA 生産株選択のため、NBRC 保存の *Saprolegnia* 属糸状菌 8 株を 28℃、pH 5.5、好気条件下で 7 days 振とう培養を行った。得られた菌体は乾燥し、脂質成分を抽出およびメチル化した後、GC を用いて菌体内の脂肪酸成分を分析した。その結果、8 株すべてにおいて ARA 生産が確認できた。特に、*S.semihypogyna* NBRC 33252 の ARA 生産量が最も高かったため、本菌株を選択した。ARA 生産量を向上させるため、初期 pH を検討した結果、pH4.0 ではほぼ増殖しなかったが、pH4.5 以上で中性に近いほど菌体重量が増加し、pH 7.5 では 15.4 g/L に達した。このとき培養液当たりの総脂肪酸量は約 1.0 g/L であり、ARA 生産量は 0.3 g/L、菌体あたりの含量は 20.8 mg/g-DCW であった。このとき、Linoleic acid が 5.9 mg/g-tFA、γ-Linolenic acid が 0.7、および ARA が 30.1 であり、ARA 生合成がスムーズに進んでいることがわかった。また、20℃で培養したところ ARA 生産量および含量は 0.35 g/L および 34.4 mg/g-DCW に向上できた。さらに、培地中に Soy oil を添加した場合、ARA 生産量および含量を 0.92 g/L および 57.7 mg/g-DCW へと増加させることができた。

Production of physiological active PUFA Arachidonic acid by Oomycota *Saprolegnia*

○Maki Takano[1], Eri Yoshimura[2], Kazuhiro Hoshino[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Univ. Toyama, [2]Dept. Life Sci. Bioeng., Univ. Toyama)

Key words *Saprolegnia* , polyunsaturated fatty acid, arachidonic acid

3Fa01 清涼飲料水中に添加した殺菌乳酸菌体の菌株判別 RNA-MLSA 法の開発

○青山 冬樹
（アサヒ飲料・技術研）
fuyuki.aoyama@asahiinryo.co.jp

【目的】
現在機能性表示食品制度を利用した食品において、特定の菌株を利用した場合、当該の菌株の定性、定量試験方法を開発し、また第 3 者機関で実施可能な必要がある。乳酸菌を用いた発酵乳、ヨーグルト等の場合、生きた乳酸菌の特異的検出培地と菌種や菌株特異的 PCR などにより比較的容易に定量定性が可能であることが多いが、乳酸菌が添加されて殺菌された清涼飲料水の場合は、生菌を得ることができず菌株判別を行うことは極めて難しい。そこで清涼飲料水中に添加した死菌体の菌株判別手法の開発を行った。
【方法】
L. amylovorus, *L. gasseri* の培養菌体および清涼飲料水中の死菌体の核酸を抽出し、主にタイピング用に使用されている 6 遺伝子の解析を行った。また清涼飲料水中に添加した乳酸菌体の核酸を抽出し分解・保存状況を確認した。菌株特異的な一塩基を解析できるように 100-400nt 程度を増幅する複数の MLST(A)法用のプライマーを開発しタイピングを実施した。
【結果】
製造直後の製品中から回収した乳酸菌体では 400nt 程度の長さを増幅するプライマーを用いて解析可能であったが、常温 1 年間保存を行うと増幅・解析ができなかった。しかし 2-4 個の遺伝子の 100-200nt の配列を増幅・解析するプライマーを開発し、解析配列の系統樹解析を行った結果、既存の *L. amylovorus*, *L. gasseri* の菌株を判別することが可能であった。本方法により清涼飲料水中に添加した乳酸菌体の MLST(A)法を実施し、菌株を判別することが可能となった。

Developmet of RNA MLSA method for typing of *Lactobacillus* in pasteurized acid bevarage

○Fuyuki Aoyama
(Asahi Soft Drinks Co., Ltd., Technol. Res. Develop. Lab.)

Key words *Lactobacillus*, mRNA, MLST, typing

3Fa02 深海底泥由来食肉加工用プロテアーゼ生産菌の探索

○寺内 美結, 藤井 大樹, 衛藤 晋一, 飯田 章博
（三菱商事ライフサイエンス）
miyu.terauchi@mcls-ltd.com

本講演では、深海底泥微生物由来の酵素のはたらきによる食肉加工産業利用への可能性について紹介する。
【背景】海洋は地球の大部分を占めるが、そこに生存する生物については未知なことが多く取り残されている。深海は一般的に水深 200-2000m を指し、低温及び塩分を含む特異的な環境であるため、深海に存在する微生物の特性が、食品利用への新たな可能性として期待されている。一方、食肉加工現場においては、食品衛生の観点上、低温で処理することが多く、また、調味液などの塩分の高い状況下に置かれることが多い。そこで、本研究では耐塩・低温活性プロテアーゼ生産菌のスクリーニングを深海底泥サンプルより行った。
【方法】深海底泥サンプルは、JAMSTEC 供与サンプル(日本近海で採取場所の異なる 5 サンプル)を使用した。各種培地及び培養温度(4,15,30℃)で生育した菌をピックアップし、食肉の構成タンパク質の一種であるエラスチンを窒素源とした寒天培地を用いて、1 次スクリーニングを行った。さらに、2 次スクリーニングとして試験管及びフラスコ培養へスケールアップを行い、有用菌株の選抜を実施した。選抜菌株においては現場製造性を考慮し、培地の窒素源の変更、Jar スケールでのプロテアーゼ生産性検討、市販酵素との酵素特性の比較試験及び選抜菌株の 16S rRNA 配列解析を実施した。
【結果】1 次スクリーニングより、エラスチン分解性を示した 63 菌株を取得した。さらに、2 次スクリーニングにおいて特に低温での活性に優位性の見られた No.1-1 株と、特に高力価を示した No.4-15 株の計 2 株を選抜した。市販酵素と比較したところ、No.1-1 株が最も低温、高塩濃度下で高い活性を示していた。

Screening of protease production bacteria from deep-sea sediments for meat processing

○Miyu Terauchi, Taiki Fujii, Shinichi Eto, Akihiro Iida
(Mitsubishi Corporation Life Sciences Limited)

Key words food processing, deep-sea, protease, screening

3Fa03 家畜の腸内機能の in vivo 評価モデルとしての家畜フローラマウスの開発

○宮本 浩邦[1,2,3], 須田 亙[3], 朝倉 三貴[3], 加藤 完[3], 児玉 浩明[1,2], 服部 正平[3], 大野 博司[3]
（[1]千葉大・園芸, [2](株)サーマス, [3]理研・生命医科学）
hirokuni.miyamoto@riken.jp

薬剤耐性菌の蔓延防止は世界的に取り組むべき喫緊の課題であり、国内外の畜産業界では、抗生物質の使用規制の準備を進めている。そのため、抗生物質の代替製剤の開発は急務であるが、産業動物を対象とした試験は、コスト、労力、安全性などの観点から障壁が高く、新規の投機的な製剤の開発は非常に難しい。一方、実験用動物として汎用されるマウスは、衛生的に管理された SPF (specific pathogen free) 環境下で飼育されており、その腸内フローラは産業動物のそれとは大きく異なっているため、必ずしも適切な評価モデル系とは言えない。そこで、本研究では、家畜の腸内フローラを移植したマウス(以下、家畜フローラマウス)を育成することによって、家畜の腸内機能の評価のための *in vivo* モデル系の構築を目的とした。アイソレーター内で、豚糞の希釈溶液をゾンデを用いて経口投与によって、無菌マウス腸内に移植し、普通食下で飼育した場合、豚固有の優占乳酸菌のうち、*Streptococcus* sp.が糞中の菌叢構成として 8%前後、*Bifidobacterium* sp.が 3%前後確認されたが、高脂肪食条件下で飼育した場合、それぞれ 1%以下になった。*Enterococcus* sp.については、普通食条件下で 2%前後の菌であるのに対して、高脂肪食条件下では、15%になった。また、優占芽胞菌である *Clostridium* sp.は、普通食条件下で 15%前後であったが、高脂肪食条件下では、30%を超えた。これらのデータを踏まえて、家畜の成長に貢献しうる生菌剤候補の *Bacillus hisashii*N11^{T} の機能性を評価したところ、成長促進を伴う脂肪蓄積軽減効果を検証することができた。これらの結果から、少なくとも豚糞由来の菌叢を移植した家畜フローラマウスは、食餌条件によって異なる腸内菌叢の挙動を示し、家畜用の飼料添加物などの効果を検証することが可能なモデル評価系であることが示唆された。

Establishment of livestock animal microflora harboring-mouse as a in vivo model to estimate physiological effects of feed additives on gut function of livestock animals

○Hirokuni Miyamoto[1,2,3], Wataru Suda[3], Miki Asakura[3], Tamotsu Kato[3], Hiroaki Kodama[1,2], Masahira Hattori[3], Hiroshi Ohno[3]
([1]Fac. Horticul., Chiba Univ., [2]Sermas co.ltd., [3]IMS,RIKEN)

Key words Livestock animal, *in vivo* model, gut function, microbial flora

3Fa04 Metabolic profiling of cocoa cake from *Forastero* cacao beans by GC/MS analysis

○Abu Hanifah[1], Hendy Firmanto[2], Sastia Prama Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Indonesian Coffee and Cocoa Res. Inst.)
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

The emergence of consumer awareness about cocoa beans origin and genotype used in chocolate leads to the growing market of premium chocolate with unique flavor. Furthermore, the complex flavor of chocolate also affected by the process of fermentation, drying, and roasting. Previous studies to discriminate the flavor characteristics of cocoa beans from different genotypes, origins, and processing step have been reported. However, there are still limited studies focusing on one genotype from one origin country of cocoa beans in the form of cocoa cake (cocoa liquor after separated from cocoa butter). In this study, pools of unfermented cacao beans of *Forastero* cultivar from 8 provinces of Indonesia was sun-dried and pressed to separate the fat content and yield a cocoa cake. Cacao beans were collected from 5 farms from each city and samples were obtained from 2 to 3 cities from each province. GC/MS analysis followed by principal component analysis (PCA) was employed to observe the difference between Indonesian cacao beans metabolic profile. Clustering of samples based on geographical origins was observed, in which samples from the same provinces are grouped together. In addition, there was a tendency that samples from the same islands but different provinces were also closely clustered together. The results highlight some amino acids and polyphenols that contributed to the clustering of cocoa cake based on geographical origins.

Metabolic profiling of cocoa cake from *Forastero* cacao beans by GC/MS analysis

○Abu Hanifah[1], Hendy Firmanto[2], Sastia Prama Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Indonesian Coffee and Cocoa Res. Inst.)

Key words cocoa bean, origin, cocoa cake, metabolic profiling

3Fa05 Untargeted GC/MS-based metabolomic approach of coffee beans obtained from different altitude and various post-harvest processing

○Sastia Putri[1], Fitri Amalia[1,2], Yusianto[3], Pingkan Aditiawati[2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Sch. Life. Sci. Tech., ITB, [3]ICCRI)
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Metabolomics, the study of comprehensive profiling of metabolites, is a useful tool to elucidate factors affecting coffee beans quality, such as altitude and postharvest processing. In this study, GC/MS-based untargeted metabolite profiling was employed to coffee samples grown in different altitude: high (1200-1500 m), low (760-900 m) and very low (below 760 m) and from various post-harvest processing: dry/natural processing, honey processing, semi-washed processing and full-washed processing. Principal component analysis (PCA) showed that coffee samples were clustered based on their post-harvest processing described by first principal component (PC1) with 40.1% variance and separation based on altitude was shown in PC2 with 20.1% variance. The sample processed by dry/natural process were excluded to give more insights on sample clustering based on altitude. The loading plot of PCA suggested that several amino acids were accumulated in lower altitude, while sugar compounds were accumulated in high altitude samples. This is the first study to elucidate the effect of altitude and post-harvest processing to coffee beans using metabolomic approach and visualization of metabolite changes of coffee grown in different altitude might be beneficial for development of Arabica coffee beans quality.

Untargeted GC/MS-based metabolomic approach of coffee beans obtained from different altitude and various post-harvest processing

○Sastia Putri[1], Fitri Amalia[1,2], Yusianto[3], Pingkan Aditiawati[2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Sch. Life. Sci. Tech., ITB, [3]ICCRI)

Key words coffee grounds, GC/MS, altitude, post harvest processing

3Fa06 Untargeted metabolomics approach to monitor metabolite changes during pineapple ripening process

○Muhammad Maulana Malikul Ikram[1], Sobir Ridwani[2], Sastia Prama Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Agronom. Hort. Bogor Agricultural Univ.)
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Pineapple is one of the most cultivated tropical fruit in the world. In 2016, its market value reach 233 billion JPY. At present, the major problem in pineapple industry is the short shelf life of pineapple fruit that causes crop loss during distribution. This is due to lack of detailed knowledge on the pineapple ripening stages due to its non-climacteric characteristic. Therefore, the objective of this research is to investigate metabolite changes in pineapple ripening process by using untargeted metabolomics approach. The strategy is to analyze crown, peel, and flesh part of pineapple from all ripening stages of pineapple by using color and GC/MS analysis. These data were subsequently analyzed by multivariate analysis to perform Principal Component Analysis (PCA) and Projection to Latent Square (PLS). Pineapple variety used in this experiment was Queen var. from Indonesia. Colorimetric analysis based on CIE-LCH color spectrum indicated that color changes in Hue spectrum were increased relative to the ripening stages. PCA also showed clustering of samples based on ripening stages from C0 into C4 stages (Codex Stan 182-1993) for all parts of pineapple. Metabolites that were associated with the ripening stages are threonic acid, threitol, and trehalose in crown part, threonine, isoleucine, and GABA in flesh part, and β-alanine, mannose, and tyrosine in peel part. Using untargeted metabolomics approach, a deeper understanding regarding the changes during ripening in pineapple, a non-climacteric fruit can be obtained

Untargeted metabolomics approach to monitor metabolite changes during pineapple ripening process

○Muhammad Maulana Malikul Ikram[1], Sobir Ridwani[2], Sastia Prama Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Agronom. Hort. Bogor Agricultural Univ.)

Key words *Ananas comosus*, metabolomics, ripening, non-climacteric

3Fa07 GC/MS に基づくメタボロミクスを用いた品種と生息環境による食用エビの分類

○大戸 優妃奈, Putri Safira Latifa Erlangga, Putri Sastia Prama, 福﨑 英一郎
（阪大院・工）
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

エビは世界で年間 650 万 t 消費されている水産食品である．日本はエビの消費大国といわれ，年間約 26 万 t 消費している．日本で消費されているエビは輸入されたものと国産のものに分けられ，輸入されるエビは主に東南アジアで集約的に養殖されているものである．
エビはその品種，また養殖と天然といった生息環境の違いによってその価格が大きく影響される．近年，エビの産業で問題になっているのが偽装表記の事例である．経済的利益を得るためにエビの品種を偽装する，または養殖エビを天然と偽って売る，といった事件が起こっている．これは消費者たちの安全性への懸念が大きな問題となり得る．安心してエビを食べるためには検出方法が必要であるが，その検出方法は確立されていない．
そこで検出方法の確立の第一歩として，メタボロミクスの運用を考案した．メタボロミクスは代謝物全体の網羅的解析であり，遺伝子差異や環境要因による表現型の違いを観察することのできる強力な方法論である．エビの代謝物プロファイリングの解析を行うことで，品種や生育環境によってエビを分類することを試みた．
産地や養殖池の異なる 7 品種，13 種類のサンプルを GC-MS で分析し，得られた代謝物プロファイルを PCA に供することにより，品種ごとに分類された．次に 3 品種の天然・養殖を含む 13 種類のサンプルを用いた実験においては，天然・養殖間で代謝物プロファイルに差があることが明らかになった．

Classification of shrimps by species and habitat using GC/MS-based metabolomics

○Yukina Ohto, Safira Latifa Erlangga Putri, Sastia Prama Putri, Eiichiro Fukusaki
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words metabolic analysis, shrimp, food analysis

3Fa08 Non-targeted metabolomics approach for size-based prediction of *Litopenaeus vannamei* (white leg shrimp)

○Safira Latifa Erlangga Putri[1], Felicia Irene Saputra[2], Magdalena Lenny Situmorang[2], Gede Suantika[2], Sastia Prama Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Sch. Life Sci. and Tech., Institute Teknologi Bandung)
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Shrimp has been known for its taste delicacy and unique flavor as its worldwide demand is expected to grow continuously. The information regarding the taste quality of different-sized shrimp might be useful as the consumer will acknowledge what comes into their plate in a particular price. This study aims to show the utilization of non-targeted metabolomics in elucidating the correlation between shrimp size and its metabolites profiles, focusing on non-volatile taste active compounds. In total, 15 samples (2-23 gr) were collected from Indonesia. Metabolomics workflow were applied using GC/MS as the analytical platform. Among 90 detected metabolites, some of them are reported to exhibit taste properties, such as sweetness, saltiness, sourness, bitterness, and umami. These includes water-soluble components which consist of free amino acids, fatty acids, nucleotides, as well as non-nitrogenous substances such as organic acids and sugars. The relative intensity of these metabolites was varied in each shrimp size, reflecting the change that occurred during the metabolism. The changes in metabolite concentration may also reflect taste quality of shrimp. The Projection to Latent Structure (PLS) showed that 5 highest VIP score metabolites (malic acid, alanine, proline, fumaric acid) were taste-related compounds. This study provides the insight on how taste active metabolites are varied according to the size of shrimp. The results from this study may suggest the best shrimp size having optimum taste quality.

Non-targeted metabolomics approach for size-based prediction of *Litopenaeus vannamei* (white leg shrimp)

○Safira Latifa Erlangga Putri[1], Felicia Irene Saputra[2], Magdalena Lenny Situmorang[2], Gede Suantika[2], Sastia Prama Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Sch. Life Sci. and Tech., Institute Teknologi Bandung)

Key words *Litopenaeus vannamei*, metabolomics, size, taste-active compound

3Fa09 Metabolomics-based research for the evaluation of post-harvest quality of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured in different salinity

○Sri Hayati[1], Sastia Prama Putri[1], Julie Ekasari[2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Faculty of Fisheries and Marine Sci., Bogor Agricultural Univ)
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Salinity plays an essential role in shrimp aquaculture, possibly affecting post-harvest quality (physical attributes) and metabolome profiles. Currently, there are no studies reporting salinity effect on post-harvest quality. This study aims to investigate the effect of different salinity on metabolome profile and physical attributes of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Shrimp samples obtained from different salinity were collected from Indonesia. Non-targeted metabolomics workflow was applied using GC/MS and its physical attributes (texture and color) were analyzed. In controlled system, Principal Component Analysis (PCA) of samples from different salinity levels (10, 20, and 30 ppt) showed that samples were clustered together based on different salinity. Physical attributes were also found to be affected by salinity. Color spectrum (ΔL^* and Δb^*) and texture parameter (springiness and cohesiveness) showed a positive trend as the salinity increase. In addition, in uncontrolled system, PCA of shrimp samples from different salinity (2, 7, 10, 12, and 30 ppt) showed that PC1 separated samples of low and high salinity with amino acids and trehalose contributing the most to the separation. The resultant heatmap revealed that the metabolites intensities were increased proportionally with salinity. The result from this study will provide new knowledge on the importance of specific metabolites affected by different salinity, which could be useful to improve post-harvest quality of shrimp.

Metabolomics-based research for the evaluation of post-harvest quality of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured in different salinity

○Sri Hayati[1], Sastia Prama Putri[1], Julie Ekasari[2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Faculty of Fisheries and Marine Sci., Bogor Agricultural Univ)

Key words *Litopenaeus vannamei*, salinity, metabolomics, post-harvest quality

3Ga01 ビタミンナノエマルションの角膜細胞浸透性を利用した新規点眼薬の開発

○高木 昌宏[1], 三宅 深雪[2], 栗岡 昌利[3], 辻野 義雄[1,4], 下川 直史[1]
（[1]北陸先端大・マテリアル, [2]ライオン・先進解析科学研, [3]ライオン・薬品研, [4]岡山理大・経営）
takagi@jaist.ac.jp

【背景・目的】
ビタミンA（VA:レチノールパルミチン酸エステル）は、疲れ目やドライアイの症状に対して、ムチン産生による涙液固定化やヒアルロン酸産生による角膜修復を促進することで有効性を発揮する。しかし、VA は脂溶性のため、点眼薬中に澄明に分散させる技術が必要である。本研究では、界面活性剤を用いて均一に分散させた VA ナノエマルションを調製し、ドライアイ症状に効果のある点眼薬の開発を試みた。
【方法】
乳化剤として POE(60)硬化ひまし油(HCO)とトリブロック型高分子界面活性剤 F127(EOPO)を用いて VA ナノエマルションを調製した。細胞模倣膜（GUV）は、ラフトの相分離構造を模したモデル膜等を、静置水和法にて調製し、エマルションと接触後、形態変化を観察した。角膜上皮細胞は、1 晩培養してエマルション溶液と接触させた後、細胞透過性をレーザー共焦点顕微鏡で観察した。
【結果・考察】
HCO 系ナノエマルションでは、GUV の収縮を観測したが、乳化滴の吸着で収縮傾向は加速された。一方、EOPO 系ナノエマルションでは、GUV の内側に向う膜の引き込みや小胞を形成するエンドサイテイックな形態変化が観測され、さらに、ラフト模倣構造を有する GUV では、EOPO 系のエンドサイテイックな形態変化がラフトを起点に加速された。付着状態の角膜細胞にナノエマルションを作用させると、HCO 系より EOPO 系の方が経時的に細胞中心部の VA 蛍光強度が高まることから、VA が効果的に透過し、輸送されたことが示唆された。また、角膜細胞では、実際の細胞膜からエンドサイテイックに小胞形成する様子や、細胞内部構造の同定から VA ナノエマルションが核周辺に輸送されたことがわかり、EOPO 系ナノエマルションの一連の細胞透過挙動が VA の有効性発現に関与していると考察した。

Development of a new eye drops using corneal cell permeability of vitamin nanoemulsion

○Masahiro Takagi[1], Miyujki Miyake[2], Masatoshi Kurioka[3], Yoshio Tsujino[1,4], Naofumi Shimokawa[1]
([1]Sch. Mater. Sci., JAIST, [2]Adv. Analytic Sci. Lab., Lion, [3]Pharma. Res. Lab., Lion, [4]Dept.Man., Okayama Univ. Sci.)

Key words cell membrane, drug delivery system, liposome, Crneal cell

3Ga02 Gel-in-Oil ナノエマルション開発による機能性分子の安定送達

○井嶋 博之, 山本 惠美子, 重栖 佑次, 堺 裕輔
（九大院・工）
ijima@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

増殖因子をはじめとする機能性分子の使用は細胞培養から再生医療にいたるさまざまな分野において重要かつ不可欠なものとなっている。しかしながら、それら機能性分子は一般的に極めて高価であり、また安定性に乏しい。また、増殖因子による組織再生促進などの有効性発現には数日以上の持続的作用が不可欠である。そこで本講演では、増殖因子などの機能性分子を固定化および徐放可能な Gel-in-Oil ナノゲルエマルション（G/O エマルション）の開発ならびにその有効性について報告する。
増殖因子との高い親和性を有するヘパリン固定化ゼラチンを IPM 中に分散させた W/O エマルションを作製し、冷却もしくは化学架橋により G/O エマルションを作製した。また、この仕込み時に増殖因子を加えることにより、増殖因子固定化 G/O エマルションを作製した。本 G/O エマルションは良好な保存安定性や経皮吸収性を示した。さらにこれらは動物細胞培養における増殖促進効果や経皮吸収による血管新生促進効果などを示した。つまり、機能性を保持したまま増殖因子を固定化保持しつつ、使用時にはその徐放性により有効性を発現できる G/O エマルションが開発できた。

Stable delivery of functional molecules by development of Gel-in-Oil nanoemulsion

○Hiroyuki Ijima, Emiko Yamamoto, Yuji Omoso, Yusuke Sakai
(Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words nanogel emulsion, drug delivery system, tissue engineering, growth factor

3Ga03 共培養マイクロデバイスを搭載した微小電極アレイチップによる iPS 由来運動神経・骨格筋細胞評価プロセスの開発

○古谷 太樹 [1], 清水 一憲 [1], 伊藤 卓治 [2], 岡田 洋平 [2], 本多 裕之 [1,3]
（[1]名大院・工, [2]愛知医大・神経内科, [3]名大・予防早期医療創成セ）
honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】運動神経は活動電位の伝播に伴う神経伝達物質の分泌によって神経筋接合部を介して骨格筋にシグナルを伝え、シグナルを受け取った骨格筋もまた活動電位を発生し収縮する。多くの神経筋疾患ではこの機構に異常が生じる。微小電極アレイ（MEA）チップは培養細胞の活動電位を評価する有用なツールであるが、従来の共培養法では運動神経細胞と骨格筋細胞由来の活動電位を分けて評価できなかった。そこで本研究では、MEA チップ上に搭載する神経軸索だけが通過できるマイクロ流路をもつ共培養デバイスを開発し、ヒト iPS 由来運動神経細胞と骨格筋細胞の活動電位をそれぞれ測定する共培養プロセスを構築した。
【方法と結果】開発したマイクロデバイスを MEA チップ上に搭載し、ヒト iPS 由来運動神経細胞・骨格筋細胞をそれぞれ培養区画に播種した。これらの区画は軸索だけが通過可能なマイクロ流路で繋がっているため、細胞体を分離した状態での共培養が可能であり、区画底面の微小電極により、それぞれの細胞の活動電位測定が可能である。MEA チップ表面の処理条件や細胞播種濃度を種々検討し、長期の共培養が可能になった。実際に共培養を行い、神経特異的に刺激するグルタミン酸を加えたところ、添加量の増加に伴い両方の区画で高頻度に活動電位が発生した。次に、筋細胞特異的な活動電位阻害剤を加えると、筋区画の細胞のみ活動電位がほぼなくなった。これらの結果から、MEA チップを用いて、神経筋接合部を介して繋がった iPS 由来運動神経細胞と骨格筋細胞の活動電位をそれぞれ測定することに成功した。

Development of coculture process of human iPSC-derived motor neurons and myotubes on multielectrode array chips

○Taiki Furutani[1], Kazunori Shimizu[1], Takuji Ito[2], Yohei Okada[2], Hiroyuki Honda[1,3]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Dept. Neurol., Aichi Med. Univ., [3]PME, Nagoya Univ.)

Key words microdevice, iPS cell, MEA chip, neuromuscular junction

3Ga04 インジェクタブル金属イオン架橋コハク酸修飾キトサンハイドロゲルによる術後腹膜癒着防止効果の検討

○三橋 健斗 [2], 戚 蟠 [2], 高橋 彬 [1], 太田 誠一 [2], 伊藤 大知 [2]
（[1]東大院・工, [2]東大院・医）
taichi@m.u-tokyo.ac.jp

依然として臨床現場では外科手術後の癒着形成が問題となっている。術後癒着とは、健常な状態では離れて存在する組織同士が術中に傷害された結果、組織間でのフィブリンブリッジの形成を介して組織同士が半永久的に癒合してしまう疾患である。癒着組織の形成は腸閉塞や不妊を引きおこす原因となるため、術後癒着をいかに防止するかが外科的に重要である。そのため、投与が簡便で、腹腔鏡手術時も使用可能な癒着防止材としてより良い *in situ* 架橋ハイドロゲルの開発が望まれている。
イオン架橋はゲル化時間の観点などから *in situ* 架橋ハイドロゲルを作製する上で有望な手段であるが、その架橋構造の制御が長年の課題となっている。本研究では、多価金属イオンとの配位形成が可能なコハク酸キトサン(CH-Su)に着目した。キトサンはアミノ基を持つ多糖類であり、金属イオンキレート部位であるコハク酸の修飾が容易である。さらに、CH-Su は両性電解質であるため高い生体適合性を実現可能である。本研究では、多価金属イオン(Fe^{3+} , Al^{3+}, Ca^{2+})で CH-Su ハイドロゲルを作製し、イオン種によるゲルの物性変化について検討を行うことで、新規癒着防止 *in situ* 架橋ハイドロゲルの開発を目指した。CH-Su を Fe^{3+}で架橋した CH-Su/Fe^{3+}ゲルの場合、ゲルから遊離した Fe^{3+}が高い細胞毒性を引き起こした。Ca^{2+}は CH-Su との錯形成定数が低く、溶解速度が非常に速くなった。その一方で、CH-Su を Al^{3+}で架橋した CH-Su/Al^{3+}ゲルは安定したキレート錯体を形成し、かつ細胞毒性が低いことが分かった。さらに CH-Su/Al^{3+}ゲルはラット盲腸擦過癒着モデルにおいて最も高い癒着防止効果を示し、そのうちの多くの個体において HE 染色像中に術後癒着の痕跡は認められなかった。これらの結果から、CH-Su/Al^{3+}ゲルは術後癒着防止用 *in situ* 架橋ハイドロゲルとして有用である可能性が示唆された。

Prevention of postoperative peritoneal adhesions using metal ion - crosslinked N-succinyl chitosan hydrogels

○Kento Mitsuhashi[2], Pan Qi[2], Akira Takahasi[1], Seiichi Ohta[2], Taichi Ito[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, [2]Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)

Key words N-succinyl chitosan, ionic crosslinking, hydrogel, peritoneal adhesion

3Ga05 過酸化チタンナノ粒子 (PAA -TiOx)の 細胞内傷害

○小寺澤 翔太 [1], 荻野 千秋 [1], 西村 勇哉 [2], 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

本研究では shRNA を用いた RNA サイレンシグでは得られなかった SOD 1, SOD 2, GPx1 の欠損 株、及び新たな CAT 欠損株を作製するため、 CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集すい臓 がん細胞 BxPC-3 で行った。まず、欠損させる遺伝子中の PAM 配列 (NGG) 直前の標的部位 に対して、ワトソン -クリック塩基対形成をベースに guideR NA をデザインした。この guideRNA を、 Cas9 発現遺伝子を持つプラスミドに導入し、 BxPC-3 に形質転換させた。 細胞内に導入された Cas9 ヌクレアーゼは guideRNA と複合体を形成する。この複合体が 標的配列へ guideRNA によって導かれ、 Cas9 ヌクレアーゼがゲノム DNA に対して二重鎖切断 (DSBs)を引き起こす。ゲノム DNA は非相同末端連結もしくは相同組換え修復によっ て修復される が、このとき過剰発現されている CRISPR/Cas9 によって繰り返し二重鎖切断 が導入されるこ とで修復エラーを引き起し、欠失や挿入などの変異を導入することができ る。本研究では、このとき CRISPR/Cas9 で引き起こされるフレームシトによって標的遺伝 子 SOD1, SOD2, GPx1, CAT のいずれかをノックアウトした BxPC-3 株を作製した。

Cell injuries investigation by PAA-TiOx

○Shota Koterasawa[1], Chiaki Ogino[1], Yuya Nishimura[2], Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words radical, hydrogen peroxide, nano particle

3Ga06 超音波応答性とがん細胞標的性を有するナノ液滴を用いた超音波力学的がん細胞殺傷法

○加藤 慎也[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】がん治療システムの１つに光増感剤（光照射により O_2 を $^1O_2$ に励起させる化合物）を用いた“光力学的がん細胞殺傷法”がある。しかし光の到達しない部位の治療に問題が残る。そこで、超音波の体内への進達性に着目し、本研究では、超音波応答性とがん細胞標的性を有するナノ液滴を用いた“超音波力学的がん細胞殺傷法”の開発を行った。ナノ液滴としては、脂溶性の光増感剤を混合したリン脂質からなる一重膜のミセル構造で、その内部がパーフルオロカーボン（高濃度の O_2 を溶存できる低沸点溶媒）であり、さらに、ミセル表面にがん細胞に結合するがん細胞標的ペプチドを修飾した約 100 nm サイズの液滴を作成した。本研究では、まず、本ナノ液滴の超音波応答性を評価し、次に、本ナノ液滴のがん細胞標的性を評価し、最後に、本ナノ液滴を用いた超音波力学的がん細胞殺傷を実証した。
【方法および結果】作成したナノ液滴の超音波応答性を評価するため、ナノ液滴に暗所で超音波照射を行い、$^1O_2$ 検出試薬を用いて $^1O_2$ の発生量を評価した。その結果、ナノ液滴に超音波照射をした場合のみ高い $^1O_2$ 発生が見られた。次に、本ナノ液滴のがん細胞標的性を評価するため、ヒト乳腺がん由来細胞株 (MCF-7) もしくは正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF)に対して、脂溶性蛍光色素 DiO でラベルしたナノ液滴を添加・インキュベートし、蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーで評価した。その結果、がん細胞 MCF-7 に対してのみナノ液滴の顕著な結合が見られた。最後に、本ナノ液滴を用いた超音波力学的がん細胞殺傷を評価するため、MCF-7 細胞に対してナノ液滴を結合させたうえで超音波を照射し、細胞生存率を計測した。その結果、ナノ液滴と超音波照射を併用した条件では、細胞生存率が大きく低下した。

Targeted sonodynamic cancer therapy using nanodroplets consisting of photosensitizer and perfluorocarbon

○Shinya Kato[1], Kazuaki Ninomiya[2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words drug delivery system, nanodroplet, ultrasound

3Ga07 アルギン酸カルシウムとゼラチンの混合ハイドロゲルの性質

森 英樹, ○原 正之
（阪大院・理）
hara@b.s.osakafu-u.ac.jp

【緒言】 ゼラチンはコラーゲン蛋白質サブユニットの変性物で、疎水性相互作用や水素結合で互いに分子会合するので、低温で固まる熱可塑性のハイドロゲルを作る。酸性多糖類のアルギン酸は粘稠な水溶液を作るが、カルシウムイオンの添加でイオン架橋してハイドロゲルを作る。どちらも安全性と生体適合性が高く、医療用具や食品素材として使われている。架橋原理の異なる 2 種の生体高分子の混合ゲルの物理的性質を調べた。
【実験方法】 先ず加熱により溶解した Type A ゼラチン水溶液を調製し、これにアルギン酸ナトリウム水溶液を加えて１%(w/v)アルギン酸と共に、2、4、8%(w/v)ゼラチン含む混合液を調製した。この液を冷却して円板状のゲルを作り、0.5MCaCl2 水溶液に浸漬してカルシウムイオンを 1 日間含侵させ、ゼラチンとアルギン酸カルシウムの混合ゲルを調製した（以下、2%ゲル、4%ゲル、8%ゲル）。
【結果と考察】 2%ゲル、4%ゲル、8%ゲルの 120°C15 分の加熱処理の前後で圧縮試験を行い、ゲルのヤング率（Young's modulus）を求めた。加熱の前後どちらでも、ゼラチン濃度が高くなる程ヤング率の値も大きくなった。また 4%ゲル、8%ゲルでは加熱処理で数値が低下し、ばらつきが増えた。ゼラチン濃度が高めのゲルでは、ゼラチン分子自身の会合で力学的な硬さが増すが、加熱処理より溶解・溶出すると考えた。加熱処理により溶出するゼラチン蛋白質の定量を行うと 2%ゲル、4%ゲルでは差がないが、8%ゲルでは加熱によるゼラチンの溶出が見られた。上記の結果から得た結論としては、ゼラチン、アルギン酸のどちらの分子の会合も混合ゲルのヤング率などの物性に寄与するが、加熱によっては前者、カルシウムイオンの除去によっては後者の影響が減る事を確かめた。
【備考】 本研究の一部は公益財団法人日本食品化学研究振興財団の支援を受けて行われた。

Properties of hydrogel consisting of gelatin and calcium alginate

Hideki Mori, ○Masayuki Hara
(Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

Key words gelatin, alginate, hydrogel, Young's modulus

3Ga08 UV 架橋コラーゲンゲル上で共培養したマウス神経幹細胞/前駆細胞と血管内皮細胞の観察

○白岩 侑馬, 森 英樹, 原 正之
（阪府大院・理）
hara@b.s.osakafu-u.ac.jp

【緒言】神経細胞やグリア細胞への多分化能と自己複製能をもつ神経幹細胞/前駆細胞(neural stem/progenitor cells：NSPC)は，無血清培地下で培養が可能であり，薬効・毒性試験などのための中枢神経モデルに応用されている。これに血管形成細胞を組み合わせて培養し，適切な形状に加工できれば更に有用なモデルになると考えられる。これまでに我々はコラーゲンゲル表面の粘弾性の違いが，NSPC の分化や細胞伸展を変化させることを報告した。本研究では，紫外線(UV)架橋によって粘弾性を変化させた I 型コラーゲンゲルを細胞の足場材料として用い，脳毛細血管内皮細胞株(bEnd.3)とマウス胎仔脳由来 NSPC(mNSPC)の共培養を試み，各々の細胞の接着や形態について調べた。
【方法】0.5%I 型コラーゲン溶液より作製した線維化コラーゲンゲルの表面にスリットが入ったフォトマスクを置き，UV 照射(254 nm)を施し，UV 架橋パターンコラーゲンゲルを作製した。ゲル上に bEnd.3 を播種，1 週間培養した後，mNSPC を小さな細胞集塊の状態で播種し，更に 2 週間の共培養を行った。PI/calcein-AM 染色で共培養 1，2 週間目の細胞の生死判別を行った。また，GFAP，Nestin 等の抗体を用いた蛍光免疫染色によって共培養系中の各細胞の分布を確かめた。
【結果と考察】bEnd.3 はコラーゲンゲル上 UV 照射領域に多数接着したが，未照射領域に接着した細胞は少なかった。一方，mNSPC は未照射領域や bEnd.3 が接着している UV 照射領域のいずれにも接着した。共培養 2 週間でも両細胞の生存が確認できた。Nestin や GFAP 陽性の細胞は UV 照射領域に接着した bEnd.3 上や，UV 未照射のコラーゲンゲル上に小さな細胞集塊の状態で疎らに接着している様子が見られた。また，bEnd.3 上とコラーゲンゲル上との間で mNSPC の細胞集塊の形態に違いが見られた。このことは，今後の中枢神経モデルの設計に有用な情報になる。

Observation of mouse neural stem/progenitor cells cultured with brain capillary endothelial cells on UV-crosslinked collagen hydrogels

○Yuma Shiraiwa, Hideki Mori, Masayuki Hara
(Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words collagen, neural stem cell, endothelial cell, coculture

3Ga09 中皮細胞選択的接着ペプチドを利用した癒着防止シートの開発

○杉山 亜矢斗[1], 蟹江 慧[1], 宇都 甲一郎[2], 荏原 充宏[2], 緒方 藍歌[3], 成田 裕司[3], 加藤 竜司[1,4]
（[1]名大院・創薬, [2]物材機構, [3]名大院・医, [4]名大・ナノライフシステム研究所）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

心臓外科手術後の損傷治癒過程では、周囲組織における癒着が高い頻度で生じてしまうことが知られている。臓器周囲組織の癒着は、再手術の際には手術時間延長や臓器損傷の危険性を招き、臓器の機能不全を引き起こすリスクを有する。このような癒着現象は損傷部位の修復メカニズムの一端でもあるため、その回避には根本的な解決法が無い。現在、心臓外科における癒着防止には、ePTFE 性の心膜シートなどが利用されているが、より良い術後組織の再生と癒着防止に向けての新しいバイオマテリアル開発が望まれている。
心臓は心膜と呼ばれる薄い膜で包まれており、中皮細胞がその表面を覆っている。中皮細胞は、臓器の動きを容易にするために滑りやすい面を作っているほか、炎症・免疫応答を調節し、フィブリンの分解や細胞の遊走も制御している。このため、中皮細胞の再生や補填により癒着を軽減させる再生医療的コンセプトの癒着防止の研究事例が報告されつつある。
これまで我々の研究グループは、治療を促進させる細胞の接着や増殖を促進し、その他の細胞を相対的に退けるような機能性を有する細胞選択性ペプチドを複数単離しており、これを用いた体内留置型医療機器表面の機能化を試みて来ている。これら細胞選択性ペプチドは、数残基と短い配列でありながら相対的な細胞の「棲み分け」を促進する効果を有し、純度の高い分子の化学合成や定量的な表面修飾に有利だと考えている。本研究ではこのような細胞選択性ペプチドで機能化した生体親和性フィルムによって生体内における癒着部位の現象を軽減できるのではないかと考え、このための中皮細胞選択的ペプチドの単離とバイオマテリアル表面への機能化法について検証を行ったのでこれを報告する。

Development of adhesion barrier sheet functionalized with mesothelial cell-selective adhesion peptides

○Ayato Sugiyama[1], Kei Kanie[1], Koichiro Uto[2], Mitsuhiro Ebara[2], Aika Ogata[3], Yuji Narita[3], Ryuji Kato[1,4]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]Natl. Inst. Mat. Sci., [3]Grad. Sch. Med. Nagoya Univ., [4]Inst. Nano-Life-Sci., Nagoya Univ.)

Key words cell-selective peptides, Anti-adhesion, Mesothelial cell, Fibroblast

3Ga10 高濃度スペルミンによる体細胞から多能性幹細胞への脱分化

○塩見 尚史
（神戸女学院大・人間科学）
n-shiomi@mail.kobe-c.ac.jp

【目的】 がん幹細胞（CSC s ）はがん再発の要因になっているが、がん組織がCSCsを生み出すメカニズムについてはほとんどわかっていない。そこで、本研究では、がん細胞がポリアミンを高濃度に産生することに着目し、高濃度のポリアミンがこの脱分化を誘導するのではないかと考えて研究を行った。
【方法及び結果】 高濃度ポリアミンの影響を明確にするために、がん細胞ではなく、ヒト肺由来の正常線維芽細胞 TIG-1-20 を用いた。TIG-1-20 細胞を 40μM のスペルミンを含有する MEM 培地で培養した後、Cellatis DEF-CSTM500 培地に変えることにより、スペルミン誘導幹細胞（PIS 細胞）の spe-1 株を得た。その細胞では、SOX2 や OCT3/4 遺伝子が誘導され、多能性幹細胞のマーカーを発現したが、それと同時に、高濃度のスペルミンによりアポトーシスが誘導され、Rho-Rock 経路が活性化された。一般にがん細胞はアポトーシス阻害能を有する。そこで、スペルミン、アポトーシス阻害剤、Rock 阻害剤を添加した培地で TIG-1-20 細胞を培養した。その結果、得られた PIS 細胞（PIS 細胞 spe-2 株）は、アポトーシスは起こっておらず、多能性幹細胞のマーカーを発現し、外胚葉、中胚葉、内胚葉への分化が可能であり、心筋細胞、褐色脂肪細胞、前期神経細胞に分化可能であった。以上の結果から、高濃度スペルミンは体細胞を多能性幹細胞に脱分化する効果があり、がん細胞はこの効果を利用すると同時にアポトーシス作用を回避することで、CSCs や脱分化細胞を生みだしていると考えられる。また、体細胞を多能性幹細胞にする PIS 細胞(spe-2 株)作製法は、簡便且つ高効率であり、今後再生医療への利用が可能かもしれない。

High Concentration of spermine induces the dedifferentiation of somatic cells into pluripotent stem cells

○Naofumi Shiomi
(Dept. Hum. Sci., Kobe Coll.)

Key words polyamine, stem cell

3Ga11 新規イミダゾリウム系カチオン性ラジカル重合開始剤による抗菌性樹脂の応用可能性

○辻 俊一 [1], 前田 知貴 [2,3], 實廣 亜希子 [1], 此枝 優希 [1], 小泉 英樹 [1], 堀田 篤 [2]
（[1]キリンHD・基盤研, [2]慶大・理工・機械工, [3]茨大・F応用原子科研セ）
Toshikazu_2_Tsuji@kirin.co.jp

【緒言】これまでにカチオン性ナノ粒子・ゲルの創成を目的に、4 級アンモニウム構造を有する新規重合開始剤 ADIP（イミダゾリウム系カチオン性アゾ化合物）を合成した(Uchiyama *et al.* , *Angew. Chem. Int. Ed.* , 2018, 57, 5413)。ADIP に備わる生物学的機能を新たに探索した結果、ADIP で合成したひも状ポリスチレン（PS）から成る樹脂の抗菌機能が分かってきたので、ここに報告する。
【方法】(1) PS フィルムの作製
ADIP を用いた懸濁重合により、粉状のカチオン性 PS を合成した。合成したカチオン性 PS 粉体、もしくは市販の PS (Sigma Aldrich, #430102)とカチオン性 PS 粉体とを等重量混合した粉体を用意し、熱プレス成形（180℃、4 MPa）し、2 種類の厚さ約 0.1mm のカチオン性 PS フィルムを得た。
(2)PS フィルムの抗菌性試験
抗菌試験は JIS Z 2801:2000 抗菌加工製品―抗菌性試験方法に準じた。菌種は黄色ぶどう球菌(Staphylococcus aureus, NBRC 12732)を用いた。
【結果・考察】
市販 PS と混合して作製したカチオン性 PS フィルムの平板ゼータ電位は 7.0 mV で、市販の PS のみから成るフィルムのゼータ電位 -23.3 mV と比較して有意に表面が正に帯電していた。重合開始剤を ADIP にすることで材料物性に変化が出ることを見出した。いずれのカチオン性 PS フィルムも、黄色ぶどう球菌に対する強い抗菌活性を示し、特にカチオン性 PS のみから成るフィルムは、黄色ぶどう球菌を 0.01%以下の数に低減させる効果を示した。比較試験として、特定の条件でカチオン性を示す市販の 1～3 級アミン系アゾ重合開始剤で PS を合成し、熱プレス成形によりフィルムを作製した。これらフィルムは全く抗菌性を示さず、ADIP で合成した PS から成るフィルムでのみ抗菌性が発現することも明らかとなった。今後は、抗菌性 PS 材料としての活用を目指して、安全性や細胞培養への影響も精査していく予定である。

Antimicrobial polymers synthesized using a novel cationic radical initiator containing imidazolium group.

○Toshikazu Tsuji[1], Tomoki Maeda[2,3], Akiko Jitsuhiro[1], Yuki Konoeda[1], Hideki Koizumi[1], Atsushi Hotta[2]
([1]Cent. Lab. Key Tech., KIRIN HD Co. Ltd., [2]Dept. Mech. Eng., Keio Univ.,, [3]Front. Res. Cent. Appl. Atomic. Sci., Ibaraki Univ.)

Key words antibacterial, polystyrene, cationic radical initiator, Staphylococcus aureus

3Ha01 *Aspergillus luchuensis* におけるフェノール酸脱炭酸酵素遺伝子破壊による 4-VG 生成への影響

○眞榮田 麻友美 [1,2], 本底 麻綸 [2], 渡嘉敷 建孝 [3], 後藤 正利 [1,4], 水谷 治 [1,2], 上地 敬子 [2], 平良 東紀 [1,2]
（[1]鹿児島大院・連農, [2]琉球大・農, [3]石川種麹店, [4]佐賀大・農）
tokey@agr.u-ryukyu.ac.jp

泡盛古酒の特徴香バニリンは，醸造中に原料米中のフェルラ酸（FA）の脱炭酸反応により生成された 4-ビニルグアヤコール（4-VG）から，貯蔵中に非酵素的酸化によって生成される。醸造中の FA の脱炭酸反応は酵母や乳酸菌等の代謝もしくは，蒸留時の酸と熱によるものと考えられてきた。*Saccharomyces cerevisiae* では phenylacrylic acid decarboxylase（PAD1）と ferulic acid decarboxylase（FDC1）の 2 つの酵素が共同して FA から 4-VG を生成することが報告されている。*Aspergillus luchuensis* のゲノム上には，*S. cerevisiae* の *pad1* および *fdc1* と相同性を有する遺伝子と，これとは全く相同性の無い細菌類および *Candida* 属の phenolic acid decarboxylase（PAD）と相同性を有する *pad* 遺伝子が存在する。
これまでに，我々は *A. luchuensis* mut. *kawachii* の *pad1* 破壊株が親株と同様の FA から 4-VG への変換能（FAD 活性）を有する事，*A. luchuensis* var. *awamori* ISH1 株（以下，ISH1 株）の *pad* 遺伝子（*alpad*）を大腸菌で発現させた AlPAD が十分な FAD 活性を示す事，ウエスタンブロッティングにより定量した麹中の AlPAD 量とモロミおよび蒸留液中の 4-VG 量に高い相関がある事を示した。本研究では，AlPAD の 4-VG 生成への寄与を明確にするために *alpad* 破壊株を作成し，静止菌体反応による FAD 活性および醸造中の 4-VG 生成量を野生株と比較した。
alpad 破壊株の作製は ISH1 株を親株として，アグロバクテリウム法で行った。得られた *alpad* 破壊株を用いて終濃度 0.5 mM FA または 1%米ぬかを添加した最少培地で培養した菌体を用いて静止菌体反応を行った。その結果， *alpad* 破壊株では FAD 活性は検出されなかった。このことから，*A. luchuensis* における FAD 活性の本体は AlPAD であることが分かった。今後，*alpad* 破壊株を用いて醸造を行い，モロミおよび蒸留液中の 4-VG 量を親株と比較する予定である。

Effect of gene disruption of phenolic acid decarboxylase on 4-VG production in *Aspergillus luchuensis*

○Mayumi Maeda[1,2], Marin Motosoko[2], Tatsunori Tokashiki[3], Masatoshi Goto[1,4], Osamu Mizutani[1,2], Keiko Uechi[2], Toki Taira[1,2]
([1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [2]Fac. Agric., Univ. Ryukyus, [3]Ishikawatanekojiten, [4]Fac. Agric., Saga Univ.)

Key words *Aspergillus luchuensis*, phenolic acid decarboxylase, awamori, 4-vinylguaiacol

3Ha02 麹菌 *Aspergillus oryzae* における新規ピリチアミン耐性マーカー遺伝子 *thiI* の同定とゲノム編集への応用

○戸所 健彦, 坂東 弘樹, 小高 敦史, 堤 浩子, 秦 洋二, 石田 博樹
（月桂冠・総研）
todokoro@gekkeikan.co.jp

【背景・目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は伝統的発酵産業や工業的酵素生産に用いられる糸状菌であり、その産業上の重要性から広く研究・利用されている。遺伝子の機能解析や有用形質の獲得には変異導入がしばしば用いられるが、その方法は自然変異や遺伝子組み換え、近年はゲノム編集と多岐にわたる。いずれの方法も目的変異株は一般的に薬剤耐性を指標に選抜されるが、*A. oryzae* が多種の薬剤に耐性を示すことから、使用できる薬剤は限られている。その中でピリチアミン（PT）耐性選抜は *A. oryzae* において 0.1 mg/L と低濃度で機能するため安全面・環境面で優れているが、既知のマーカー遺伝子（*thiA*）による PT 耐性獲得はプロモーター領域の限られた範囲への変異導入が必要なため、ゲノム編集への利用は困難であった。そこで本研究では、麹菌 *A. oryzae* において PT 耐性に寄与する新規マーカー遺伝子の同定とゲノム編集への応用を試みた。
【方法・結果】*A. oryzae* RIB40 の UV 変異株から、*thiA* に変異を持たない PT 耐性株を得た。全ゲノム解析の結果、アミノ酸トランスポーターをコードすると推定される遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が確認され、機能推定のため BlastP 検索を行ったところ *Schizosaccharomyces pombe* のチアミントランスポーター（Thi9）と約 50%の相同性を示した。この遺伝子（*thiI* とする）の変異が PT 耐性に寄与するのかを確認するため、*thiI* をターゲットとしたゲノム編集により *thiI* の機能欠損株（Δ*thiI*）を取得した。Δ*thiI* は PT 耐性を示すことが確認された一方で、最小培地（Czapek-dox）において栄養要求性を示さなかった。これらの形質から、*thiI* は麹菌においてゲノム編集に利用できる有望な新規マーカー遺伝子であることが示唆された。

Identification of a novel pyrithiamine resistance marker gene *thiI* in *Aspergillus oryzae* and its application for genome editing

○Takehiko Todokoro, Hiroki Bando, Atsushi Kotaka, Hiroko Tsutsumi, Yoji Hata, Hiroki Ishida
(Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

Key words *Aspergillus oryzae*, genome editing, pyrithiamine resistance, selection marker gene

3Ha03 Mapping *hazekomi* on rice koji grains using β-glucuronidase expressing *Aspergillus oryzae* and mass spectrometry imaging

○Adinda Putri Wisman[1], Yoshihiro Tamada[2], Shuji Hirohata[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 brewing. In sake brewing process, the quality of rice koji is mainly evaluated by experienced sake brewers based on visual inspection of the *haze*, which is defined by the extent of the spread of the fungal hyphae on/into the rice grains. There is rising interest in gaining insight of the factors that affect the quality of rice koji to develop a more sophisticated brewing control without skilled veteran intelligence. Several studies have focused on *haze* formation and enzymatic production during rice koji production. However, there are limited analytical methods available to monitor hyphal growth on a solid surface.
Here we show that a β-glucuronidase (GUS) expressing strain of *Aspergillus oryzae* is utilized to visualize and map fungal growth on rice koji grains. A new GUS staining method by spraying was developed in order to obtain best representation of the mycelial distribution. Our developed method was able to produce clear indigo color on a thin section of rice koji. Furthermore, indigo color observations revealed that *A. oryzae* hyphae penetrated the steamed rice grain and reached the center of rice in the last stage (43h) of rice koji making process. Additionally, mass spectrometry imaging (MSI) of glucose demonstrates that the area of mycelial penetration is directly correlated with the distribution of glucose.

Mapping *hazekomi* on rice koji grains using β-glucuronidase expressing *Aspergillus oryzae* and mass spectrometry imaging

○Adinda Putri Wisman[1], Yoshihiro Tamada[2], Shuji Hirohata[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, *hazekomi*, GUS, mass spectrometry imaging

3Ha04 黄麹菌が生産する難消化性澱粉分分解酵素の探索およびその応用

○伊藤 俊彦, 臼井 俊晴, 藤田 直子, 橋爪 克己
（秋田県立大・生資科）
toito@akita-pu.ac.jp

[目的]
澱粉合成酵素及び澱粉分枝酵素のアイソザイム SSIIIa、BEIIb の二重欠損変異体米（以下#4019 と表記）は、アミロース含量 46%の超高アミロース米であり、難消化性を示す。演者らはこれまでに＃4019 を基質とした難消化性澱粉分解酵素活性測定法を構築した。また、#4019 を麹米とし、清酒麹菌 (*Aspergillus oryzae*) で作成した麹に含まれる α-グルコシダーゼが難消化性澱粉分解酵素活性に関与していることを推察した。本研究では#4019 の後継品種である A6BC2 及び酒造好適米 5 品種を麹米に用いて各種酵素活性と難消化性澱粉分解活性を比較し、α-グルコシダーゼの関与を確認した。また、A6BC2 麹の優れた消化能による酒粕の加工法を模索するために山田錦麹を対照とした酒粕消化試験を行った。
[方法]
50%精米した吟の精, 日本晴, A6BC2, 山田錦, 美山錦および秋田酒こまちを原料米とし、清酒用麹菌 (No.5 : 秋田今野商店) を用いて製麹した。得られた麹から 0.5% NaCl を含む酢酸緩衝液で酵素を抽出透析し、澱粉分解に関与する各種酵素活性を測定した。また、60%精米した原料米 A6BC2 および山田錦と清酒用麹菌で作成した麹を用いて 15%塩水中にて 30C°, 96 hr の条件で酒粕消化試験を行い、得られた上澄みの °Bx 糖度を測定した。
[結果]
6 品種の澱粉分解関連酵素活性と難消化性澱粉分解酵素活性を比較したところ、全ての品種において α-グルコシダーゼ活性と当該酵素活性の間に高い相関が認められた。また、A6BC2 麹および山田錦麹を用いた酒粕消化試験では、A6BC2 麹には、山田錦麹と比較して明らかな °Bx の上昇が認められた。

Investigation resistant starch digestive enzyme from *Aspergillus oryzae* and development of its application.

○Toshihiko Ito, Usui Toshiharu, Naoko Fujita, Katsumi Hashizume
(Faculty of Bioresouce sci., Akita Pref. Univ.)

Key words enzyme, resistant starch

3Ha05 白麹菌 *Aspergillus kawachii* における *laeA* ホモログ遺伝子の機能解析

○門岡 千尋[1], 池田 萌[2], 森 一樹[3], 奥津 果優[2], 吉﨑 由美子[1,2], 髙峯 和則[1,2], 後藤 正利[1,4], 玉置 尚徳[1,2], 二神 泰基[1,2]
（[1]鹿児島大院・連農, [2]鹿児島大・農, [3]鹿児島高専・専攻科, [4]佐賀大・農）
futagami@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

【目的】焼酎製造に用いられる白麹菌 *Aspergillus kawachii* は、糖化酵素に加えてクエン酸を高生産する能力をもつ。*Aspergillus* 属糸状菌においてメチルトランスフェラーゼ LaeA は、二次代謝生産や分化の制御因子として研究されてきた。本研究は、白麹菌において *laeA* のホモログ遺伝子とクエン酸生産との関連を解明することを目的とした。
【方法・結果】モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の *laeA* をクエリとして、白麹菌のゲノムに *laeA*、*laeA2*、および *laeA3* 遺伝子を見出した。まず、白麹菌において各遺伝子の破壊株を構築し、CAP 液体培地におけるクエン酸生産を測定した。その結果、*laeA* 破壊株のクエン酸生産量はコントロール株の約 0.04 倍に低下した。また、*laeA* 破壊株に *laeA* を相補した結果、クエン酸生産能が回復した。一方、*laeA2* 破壊株と *laeA3* 破壊株のクエン酸生産量は、コントロール株と有意な差は見られなかった。これらの結果から、白麹菌において *laeA* がクエン酸生産に関与することが示唆された。LaeA はヒストンのメチル化レベルを制御することでグローバルに遺伝子発現を制御すると考えられている。そこで、*laeA* 破壊による遺伝子発現変動を調べるために、CAP 液体培地で培養したコントロール株と *laeA* 破壊株から RNA を抽出し、cap analysis gene expression (CAGE) -seq 解析を行った。その結果、*laeA* 破壊株は、コントロール株と比較して、590 遺伝子の発現が上昇、658 遺伝子の発現が減少したことが示唆された。発現減少遺伝子の中には、クエン酸合成酵素遺伝子や推定クエン酸輸送体遺伝子が含まれており、クエン酸低生産の原因であると考えられた。

Functinal analysis of *laeA* homologus genes in the white koji fungus, *Aspergillus kawachii*

○Chihiro Kadooka[1], Moe Ikeda[2], Kazuki Mori[3], Kayu Okutsu[2], Yumiko Yoshizaki[1,2], Kazunori Takamine[1,2], Masatoshi Goto[1,4], Hisanori Tamaki[1,2], Taiki Futagami[1,2]
([1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [2]Fac. Agric., Kagoshima Univ., [3]Nat. Inst. Tech. Kagoshima Col., [4]Fac. Agric., Saga Univ.)

Key words *Aspergillus kawachii*, methyltransferase, citric acid, transcriptome

3Ha06 白麹菌 *Aspergillus kawachii* における α-アミラーゼ AmyB の機能解析

○山口 正晃[1], 門岡 千尋[2], 奥津 果優[1], 吉﨑 由美子[1,2], 髙峯 和則[1,2], 後藤 正利[1,3], 玉置 尚徳[1,2], 二神 泰基[1,2]
（[1]鹿児島大・農, [2]鹿児島大院・連農, [3]佐賀大・農）
futagami@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

【目的】焼酎製造に用いられる白麹菌は、α-アミラーゼやグルコアミラーゼ等を大量に分泌生産する性質をもち、原料である米や大麦、サツマイモに含まれるデンプンを単糖レベルに分解する役割がある。白麹菌の分泌型 α-アミラーゼとして、中性 α-アミラーゼ（AmyA）と耐酸性 α-アミラーゼ（AsaA）の 2 つが報告されているが、白麹菌のゲノムにはもう 1 つ分泌型 α-アミラーゼをコードする *amyB* 遺伝子が存在する。しかし、*amyB* の発現量は低いため、これまでにその α-アミラーゼ活性は評価されていない。本研究は、AmyB の酵素学的諸性質と生理機能を解析することを目的として行った。
【方法・結果】まず、白麹菌において *amyA* と *asaA* の二重破壊株と *amyA*、*asaA*、*amyB* の三重破壊株を構築した。デンプンを炭素源とした培地において、Δ*amyA* Δ*asaA* 株と Δ*amyA* Δ*asaA* Δ*amyB* 株の生育に顕著な違いは見られなかった。しかし、各株の培養上清の α-アミラーゼ活性を測定した結果、Δ*amyA* Δ*asaA* 株と比較して Δ*amyA* Δ*asaA* Δ*amyB* 株は α-アミラーゼ活性が低下したことから、AmyB は白麹菌の総アミラーゼ活性に寄与していることが示唆された。次に、Δ*amyA* Δ*asaA* 株において、*amyA* プロモーターの制御下で *amyB* を発現する株を構築した。リアルタイム RT-PCR によって Δ*amyA* Δ*asaA* PamyA-*amyB* 株においてコントロール株と比べて *amyB* が約 20 倍高発現したことを確認した。また、培養上清を Native-PAGE に供し、ヨウ素-デンプン反応によるデンプン分解酵素の活性染色を行った。その結果、Δ*amyA* Δ*asaA* PamyA-*amyB* 株において、AmyB 由来と推定されるバンドが出現した。本菌株を用いて AmyB を精製し、酵素学的諸性質の解析に取り組む予定である。

Functional characterization of α-amylase AmyB in the white koji fungus *Aspergillus kawachii.*

○Masaaki Yamaguchi[1], Chihiro Kadooka[2], Kayu Okutsu[1], Yumiko Yoshizaki[1,2], Kazunori Takamine[1,2], Masatoshi Goto[1,3], Hisanori Tamaki[1,2], Taiki Futagami[1,2]
([1]Fac. Agric., Kagoshima Univ., [2]United Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [3]Fac. Agric., Saga Univ.)

Key words *Aspergillus kawachii*, shochu, alpha-amylase, *amyB*

3Ha07 醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* の凝集機構の解析

○白川 大地, 脇中 琢良, 渡部 潤
（ヤマサ醤油・製造本部）
j_watanabe@yamasa.com

【背景】醤油乳酸菌は諸味中で乳酸を生成し，醤油の香味形成に重要な役割を果たしている．醤油乳酸菌には凝集性を有する株（凝集性株）と有しない株（非凝集性株）が存在することが古くから知られている．非凝集性株は醤油諸味の圧搾時に生揚げ醤油に移行し濁質の原因となる．この濁質は，濾過工程の負荷を大きくすることから，醤油の発酵スターターとしては，圧搾時に生揚げ醤油に移行しない凝集性株が望ましい．しかし，醤油乳酸菌の凝集機構は明らかになっておらず，凝集性株の効率的な取得や育種の障害となっていた．
【方法】凝集性の YA197 株から，自然変異により非凝集性となった変異株を単離した．イルミナ社の Nova Seq を用い YA197 株と変異株から各約 1 Gb のデータを取得した．リードを Platanus でアセンブルし，得られたスキャホールドにリードをマッピングすることで変異点を同定した．
【結果】YA197 株から得られたリードをアセンブルした結果，227 本のスキャホールドが取得された．スキャホールドの N50 は 45.5 Kb，総延長は 2.38 Mb であり，分断されてはいるものの醤油乳酸菌ゲノムのほぼ全長をカバーする配列が得られたと考えられた．「YA197 株のスキャホールドに変異株のリードをマッピングしてコールされた変異」から「YA197 株のスキャホールドに YA197 株のリードをマッピングしてコールされた変異」を差し引いた結果，42 ヶ所の変異候補が抽出された．これらについてマッピングの状況を目視で確認したところ，変異が確認できたのは 1 ヶ所のみであった．この変異は ORF 上の 168 bp の欠損であり，56 アミノ酸残基の欠損を引き起こしていると考えられた．現在，この変異と凝集性との関連について更なる解析を行っている．

Analysis of aggregation mechanism in *Tetragenococcus halophilus*

○Daichi Shirakawa, Takura Wakinaka, Jun Watanabe
(Yamasa Corp.)

Key words soy sauce, *Tetragenococcus halophilus*, aggregation

3Ha08 醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の産膜制御機構の解析

○茂木 亮介, 渡部 潤
（ヤマサ醤油・製造本部）
j_watanabe@yamasa.com

【背景】醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の特定の株は醤油諸味表面に白い皮膜を形成することが知られており，この現象を産膜と呼ぶ．皮膜状に生育した酵母は，不快臭成分であるイソ酪酸やイソ吉草酸を生産し，醤油の品質を低下させるため，産膜の防止は醤油醸造において重要である．*Z. rouxii* NBRC 110957 株による産膜には *FLO11D* 遺伝子が必須であることが明らかになっている．Flo11D は Flo11 ドメインを有しており，*Saccharomyces cerevisiae* において，Flo11 ドメインは invasive growth やバイオフィルム形成などに寄与していることが知られている．NBRC 110957 株による産膜は，グルコース欠乏下での高浸透圧ストレスによって *FLO11D* 発現が誘導されることで引き起こされる．しかし，*FLO11D* の発現制御機構の詳細は明らかになっていない．
【結果と考察】*S. cerevisiae* における *FLO11* 発現制御は詳しく調べられており，MAP キナーゼ経路や cAMP-PKA 経路などが関与していることが明らかになっている．NBRC 110957 株の *FLO11D* 発現制御においても類似の機構が存在している可能性が考えられたため，NBRC 110957 株において，それらの経路に関与する遺伝子の破壊株を作製した．遺伝子破壊株を食塩存在下で生育させたところ，cAMP-PKA 経路に関与する転写因子をコードする *SFL1* 遺伝子が，産膜に重要であることが明らかになった. *SFL1* 遺伝子の欠損は食塩存在下での *FLO11D* 転写量を有意に低下させたことから，Sfl1 が *FLO11D* 発現を介した産膜に重要な役割を果たしていることが考えられた．現在は，*SFL1* 遺伝子と *FLO11D* 発現制御機構の関係について，詳細な解析を進めている．

An analysis of flor formation by *Zygosaccharomyces rouxii*

○Ryosuke Mogi, Jun Watanabe
(Yamasa Corp.)

Key words soy sauce, *Zygosaccharomyces rouxii*, flor

3Ha09 ビール類醸造時に亜鉛濃度が酵母発酵に及ぼす影響の解析

○沓掛 登志子, 高橋 沙織, 伊藤 一恵, 稲留 弘乃
（キリンホールディングス・酒類研）
Hironori_Inadome@kirin.co.jp

【背景と目的】
ビール類の醸造において、発酵助剤である硫酸亜鉛の添加は発酵を促進させる一方で pH の低下や香味の変化など好ましくない影響を及ぼすこともある。このため、亜鉛が発酵中の酵母にもたらす現象の解明を目的として、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

【方法】
酵母発酵における亜鉛の影響を詳細に調べる目的で、亜鉛濃度が異なる合成培地を用いた発酵試験を行った。発酵過程で経時的に酵母を回収し、RNA seq による網羅的な遺伝子発現解析を行った。続いて、亜鉛濃度が異なる麦汁を発酵させた発酵タンク（試験醸造レベル）から回収した酵母についても遺伝子発現解析を行い、合成培地での結果と比較を行った。

【結果と考察】
麦汁中の亜鉛濃度の違いによって亜鉛トランスポーター、ADH、ジンクフィンガー、抗酸化酵素など亜鉛関連タンパクの遺伝子に発現変動が起こることが示された。また、鉄トランスポーターなど鉄関連タンパクについても遺伝子の発現変動がみられ、細胞内代謝に影響を与えている可能性が示唆された。

Analysis of the effect of zinc concentration on yeast fermentation during beer brewing.

○Toshiko Kutsukake, Saori Takahashi, Kazue Ito, Hironori Inadome
(Kirin Holdings. Res. Laboratories for Alcoholic Beverage Technol.)

Key words gene expression analysis, RNA seq, zinc, beer brewing

3Ha10 キシロースを資化する *Saccharomyces cerevisiae* の非組換え育種の試み

○平松 孝太郎 [1], 頓名 洋 [1], 今野 紗希 [2], 東原 成美 [2], 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】
化石燃料に代わるバイオエタノールは、食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマスを原料とすることが求められている。リグノセルロースには五炭糖が 2～4 割含まれ、特にキシロースの発酵の可否はエタノール収率に大きく影響する。酵母のキシロース発酵にはトランスポーター、および xylose reductase (XR)、xylitol dehydrogenase (XDH)、xylulokinase (XK)が必要である。エタノール発酵に用いられる *S. cerevisiae* は、XR、XDH 活性をもつ株は稀で、多くは XK 活性が十分ではなく、キシロートランスポーター活性には不明なところが多い。一方、キシロース発酵性微生物の遺伝子を導入した組換え酵母は、実用化の際に拡散防止措置が容易ではない。そこで、キシロース資化性 *S. cerevisiae* の非組換え育種を試みた。
【方法】
ガラクトース 2%を含む YP 培地で培養した菌体にキシロースを添加し、30℃で 30 分インキュベートして取込ませた。菌体を洗浄後、水に懸濁し 37℃で 1 時間振盪して取込まれたキシロースを抽出して定量し、取込みの初速度を細胞数で除して取込み活性を求めた。菌体を破砕して粗酵素を調製し、xylose、xylitol、xylulose を基質として NADPH(NADH)の酸化還元による吸光度変化を測定し、酵素活性を算出した。
【結果と考察】
研究室保有の 150 株をスクリーニングした結果、キシロース発酵性酵母 *Pichia stipitis* NBRC 10007 株の約 2 分の 1 の XDH 比活性、3 分の 1 の XK 比活性をもつ株を得た。また、良好にエタノール発酵するパン酵母のグルコース取込み活性の、約 1 割のキシロース取込み活性をもつ株を数株得た。XR 比活性は何れの株も NBRC 10007 株の 1/100 以下であった。今後、交雑によって XR 以外の活性が高い 1 倍体を育種し、変異処理してキシロースを単一炭素源とする培地で XR 比活性が向上した株を得る。

Non-recombinant breeding of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*

○Kotaro Hiramatsu[1], Hiroshi Tonna[1], Saki Konno[2], Narumi Higashihara[2], Shino Yamasaki-Yashiki[2], Yoshio Katakura[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, xylose transporter, bioethanol

3Ha11 レアメーティングにより造成した酵母の耐熱性とエタノール耐性の評価

○高橋 葵[1], 海道 直生[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

【緒言】バイオエタノール生産に用いる微生物には様々な性質が求められるが、それらの性質を全て持つ微生物はまだ造成・発見されていない。遺伝子組換え生物には拡散防止措置が必要なため、本研究室では組換えによらない *Saccharomyces cerevisiae* の育種を目指している。昨年度までに、*RIM15* 遺伝子をホモで欠失しエタノール耐性をもつ 2 倍体の協会 6 号酵母（K6）に、耐熱性の PS28 から得た 1 倍体を 2 回レアメーティングして 4 倍体を造成した。減数分裂を伴う胞子形成により 2 倍体を得ることで、*RIM15* 遺伝子をホモで欠失し、かつ耐熱性を持つ株が含まれていることを示した。また、4 倍体から得られた胞子発芽株について、*RIM15* 遺伝子をホモで欠失した株が速やかに増殖する条件で培養し、エタノール耐性株の濃縮をした。本研究では、胞子発芽株のエタノール耐性と耐熱性を評価する方法を確立するとともに、2 つの耐性を併せ持つ株を選抜する方法について検討した。
【方法と結果】20% glucose を含む YPD20 培地に植菌し、30℃で静置培養した。Glucose が枯渇する前に 50%グルコース溶液を 1/4 容追加投入し、濁度とエタノール濃度から比生産速度を求めた。その結果、エタノール濃度が 50 g/L 以上の区間において、エタノール耐性を持つ K6 は耐性を持たない PS28 に比べて高い比生産速度を示し、この条件でエタノール耐性を評価できると分かった。また、10% glucose を含む YPD10 培地に初期菌体濃度を統一して植菌し、42℃で静置培養した。22 時間ごとに遠心処理により菌体を回収し、新しい同培地に懸濁して発酵を繰り返した。3 回目の繰り返し発酵において、耐熱性株と非耐熱性株の比生産速度に顕著な差が見られた。これをふまえ、エタノール耐性株を濃縮した培養液に対して 42℃での繰り返し発酵を 5 回行い、耐熱性株を濃縮し、単離した株の評価をしている。

Screening and evaluation of yeast tolerant for heat and ethanol breeded by rare-mating

○Aoi Takahashi[1], Naoki Kaido[1], Shino Yamasaki-Yashiki[2], Yoshio Katakura[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, rare-mating, heat tolerance, ethanol tolerance

3Ia01 基質酵素反応予測のための 機械学習に基づく予測モデルの構築方法の探索と評価

○渡邉 直暉[1], 村田 昌浩[2], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[3], 荒木 通啓[2,3]
（[1]神戸大院・工, [2]京大院・医, [3]神戸大院・科技イノベ）
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】
近年分子生物学データベースには、ゲノムシーケンス技術の発展によりアノテーションが付与されていない遺伝子やタンパク質配列が爆発的に増加しているため、アノテーションを計算的手法により早急に決定する必要がある。それらの配列の中には代謝工学において重要な酵素配列が含まれていることが推測され、特定の基質と反応する新たな酵素・新たな基質と反応可能な特定の酵素が存在する可能性がある。それらを新たに発見することは代謝工学において非常に重要である。
【方法】
本研究では、このような酵素の発見や代謝経路の拡張のため酵素配列の反応予測を近年注目されている複数の機械学習を用いて 2 通りの方法で行った。まず酵素のアミノ酸配列を用いて Enzyme Commission (EC) number の予測モデル(E-model)を構築した。次に酵素配列に基質・生成物の化学構造情報を加えて EC 予測と同時に酵素の反応予測が可能なモデルを構築した。こちらは基質-酵素(SE-model)・基質-酵素-生成物(SEP-model)の 2 種類作成した。
【結果と考察】
モデルの予測精度を評価したところ、前者の E-model において予測精度は低い結果となったが後者の 2 つのモデルにおいては用いた機械学習の種類に限らず予測精度が大幅に向上し高い精度となった。さらにこの方法によって構築されたモデルを用いることで 1 つの酵素に対する複数の反応予測への可能性も見出された。これらの結果より、酵素配列情報にさらに基質・生成物の化学構造情報を加えて予測モデルを作る方法は、酵素配列の反応予測に非常に有効的な方法である。また将来的な酵素反応予測のため機械学習の種類ごとに予測に重要な因子や予測結果の傾向の違いを議論した。

Exploration and evaluation of machine learning based models for predicting enzymatic reactions

○Naoki Watanabe[1], Masahiro Murata[2], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[3], Michihiro Araki[2,3]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words bioinformatics, enzyme reaction, Machine learning

3Ia02 データ・マイニングを駆使した糸状菌由来転写因子の結合配列環境と発現応答の関連性の解析

○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・遺伝子解析施設）
kojimat@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp

【目的】当研究グループではこれまで Genomic SELEX-Seq (gSELEX-Seq)と発現変動解析によって得られる情報を統合することで、転写因子によって直接的に発現制御される遺伝子をゲノムワイドで同定してきた。この過程で、上流領域に結合 DNA モチーフを保有するにも関わらず、標的転写因子の高発現に応答しない遺伝子が多数検出された。このことから、転写因子-DNA 間相互作用には、DNA 配列に加え、未知の要因が関与していることが示唆された。そこで本研究では、先行研究によって得られた *Aspergillus oryzae* におけるキシラン・セルロースやペントース代謝などに関与する転写因子 AoXlnR の転写制御情報を基に、データ・マイニングを用いて各遺伝子のモチーフ付近の配列を比較し、これらの配列環境が転写制御に与える影響を網羅的に解析することを目的とした。
【方法・結果】gSELEX-Seq とマイクロアレイ解析によって得られた AoXlnR 転写制御に関わる遺伝子に対して、データ・マイニングを行なった。具体的には、マイクロアレイ解析によって得られた発現変動遺伝子のプロモーターにおける AoXlnR 結合モチーフと発現変動レベルとの相関解析を行い、プロモーター中に 5’-GGCTAA-3’、5’-GGCTGA-3’が共在することで、下流遺伝子の発現が AoXlnR 高発現依存的に促進されること、またこの影響は 2 つのモチーフ間の距離と関連があることを数理的に示した。さらに、DNA 構造に関連するパラメーターを用いて遺伝子プロモーター中の AoXlnR 結合 DNA モチーフ近傍の配列構造の解析を行ったところ、AoXlnR による実際の発現制御の有無によってその DNA 構造が大きく異なることが明らかとなった。

Analysis of the relationship between a filamentous fungal transcription factor binding site environment and the expression responses of regulated genes by using data mining.

○Hiroya Oka[1], Takaaki Kojima[1], Kunio Ihara[2], Tetsuo Kobayashi[1], Hideo Nakano[1]
([1]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., [2]Center for Gene Res, Nagoya Univ)

Key words *Aspergillus oryzae*, bioinformatics, transcriptional regulation, promoter

3Ia03 転写制御ネットワーク網羅的解析技術を用いたイネ側根メリステムサイズの 調節機構の解明

○安福 航希[1], 兒島 孝明[1], 犬飼 義明[2], 中野 秀雄[1]
（[1]名大院・生命農学, [2]名大・農学国際セ）
hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】イネの根系改良による耐乾性育種は、世界的な干ばつが頻発する現状における米の増産のための有効手段の一つである。この耐乾性を高めるためには、側根の発達を促進することが重要であり、これはイネの側根分裂組織(メリステム)サイズを増大させることによって可能となる。このメリステムサイズ制御機構には、標的遺伝子の発現を制御する転写因子が大きく関わっている。その一つである OsbZIP1 は、細胞壁形成に関与する転写因子であるものの、その詳しい機能は未知である。
そこで本研究では、OsbZIP1 によって発現制御される遺伝子を網羅的に同定し、OsbZIP1 を介した側根メリステムサイズの制御機構を解明することを目的とした。
【方法・結果】本研究グループは、高速 DNA シークエンス技術を駆使したトランスクリプトーム解析システムを確立している。このシステムは、in vitro の転写因子結合情報をゲノムワイドで出力する gSELEX-Seq と細胞内での転写因子依存的発現変動する遺伝子（DEG）の情報を出力する RNA-Seq を相補完的に用いることにより、従来の手法に比べてより高精度かつ網羅的な標的転写因子制御下の遺伝子の同定を可能とする。
そこでまず、イネ野生株および OsbZIP1 変異株のそれぞれから RNA を抽出し、高速 DNA シークエンサー MiSeq に供した。これによって取得した配列データに対し、バイオインフォマティクスを用いて OsbZIP1 依存的に発現変動する数百種類の DEG を同定した。この DEG には根の伸長や、転写因子に関係する遺伝子が含まれていた。
現在、OsbZIP1 によって直接的に発現制御される遺伝子の網羅的同定を行うため、gSELEX-Seq を用いた OsbZIP1 のゲノム上の結合部位の網羅的同定を行っている。

Elucidation of regulation mechanism of rice lateral root meristem size using transcriptional regulatory network comprehensive analysis

○Kohki Yasufuku[1], Takaaki Kojima[1], Yoshiaki Inukai[2], Hideo Nakano[1]
([1]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., [2]ICCAE, Nagoya Univ.)

Key words *Oryza sativa*, gSELEX-seq, RNA-Seq, Transcript factor

3Ia04 大腸菌アンモニア輸送-同化ネットワークの定量的動力学モデルの構築

○前田 和勲 [1], Westerhoff Hans V. [2,3,4], 倉田 博之 [1], Boogerd Fred C. [2]
（[1]九工大, [2]VU Univ. Amsterdam, [3]Univ. Manchester, [4]Univ. Amsterdam）
kmaeda@bio.kyutech.ac.jp

大腸菌の主な窒素源はアンモニアである。大腸菌は TCA 回路の中間代謝物である 2-オキソグルタル酸（α-ケトグルタル酸）にアンモニアを付加することでグルタミン酸とグルタミンを合成する。細胞に含まれる窒素の約 90%はグルタミン酸に由来し、残りはグルタミンに由来する。従って、大腸菌がどのようにアンモニアを環境から獲得しているのか、また、どのようにグルタミン酸とグルタミンの合成を制御しているのか明らかにすることは重要である。これを達成するには、実験データを定量的に再現できる精密な動力学モデルが不可欠だが、そのような動力学モデルを構築することは非常に難しい。

この問題を解決するために、我々は制約付き最適化に基づく新しい動力学パラメータ推定手法を開発した。この手法によって、様々な実験で得られた不均一な実験データや生物学的知見を同時に満たす動力学モデルを構築できる。さらに、我々はこの手法をアンモニア輸送-同化ネットワークに適用することで、定量的な動力学モデルを構築した (Maeda et al., *npj Syst Biol Appl*, 2019)。この動力学モデルは、３つの異なる研究グループ(JD Rabinowitz, T Hwa, and M Merrick)から得られた実験データを定量的に説明できる。次に、我々は、この動力学モデルを使って、これまで一般に受動輸送体と考えられてきたアンモニアトランスポーター AmtB が能動輸送体である可能性が高いことを示した。

大腸菌アンモニア輸送-同化ネットワークの動力学モデルはグルタミン酸などの有用代謝物の生産性の向上に貢献できる。また、我々の動力学パラメータ推定手法は、アンモニア輸送-同化ネットワークに限らず様々な動力学モデルに適用可能であり、シミュレーション駆動の有用細胞設計を加速することができる。

Developing a quantitative kinetic model of *E. coli* ammonium transport-assimilation network

○Kazuhiro Maeda[1], Hans V. Westerhoff[2,3,4], Hiroyuki Kurata[1], Fred C. Boogerd[2]
([1]Kyushu Inst. Technol., [2]VU Univ. Amsterdam, [3]Univ. Manchester, [4]Univ. Amsterdam)

Key words kinetics, transporter, *Escherichia coli*, L-glutamate

3Ia05 FBA シミュレーションによる単波長光照射下におけるシアノバクテリアの光合成電子伝達経路のフラックス状態の解析

○豊島 正和, 山本 千晶, 戸谷 吉博, 清水 浩
（阪大院・情報）
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】シアノバクテリア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。シアノバクテリアは様々な波長の光を有効利用するために複数の光合成色素を持ち、生育光環境に合わせて光合成電子伝達や代謝状態を変化させてきた。特に光化学系 I と II の励起比（PSI/PSII 励起比）が変わると ATP や NADPH の合成量が変わると考えられる。本研究では、シアノバクテリア *Arthrospira platensis* と *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて、光合成機構を精緻化したゲノムスケール代謝モデルを構築し、フラックスバランス解析シミュレーションにより様々な波長の光照射下における光合成と代謝の状態を予測することで、光化学系の励起比と光合成電子伝達ならびに代謝状態の関係を明らかにする。
【方法と結果】我々の研究室で構築された *Synechocystis* のゲノムスケール代謝モデルを異なる波長の光照射下での生育を予測できるように光合成反応の精緻化を行った。モデルの正確性を検証するために、過去に報告されている白色 LED とピーク波長が 460nm、530nm、590nm、640nm、680nm の LED 光照射下における *Arthrospira* の増殖速度や吸収スペクトルなどの生理学的解析データと我々が行った同様の光条件下における *Synechocystis* の生理学解析データを用いた。検証の結果、*Arthrospira* において細胞の吸収スペクトルとアンテナタンパク質であるフィコビリソームから PSI と PSII へのエネルギー分配比を考慮することで実験結果を正確に予測することができた。*Synechocystis* においても実験結果を正確に予測することができた。このモデルを用いて PSI/PSII 励起比と ATP・NADPH 合成の関係を明らかにし、単波長光照射における ATP・NADPH 合成状態を利用した物質生産などで検証を行う。

Study on flux of photosynthetic elecrtron transport in cyanobacteria under different spectral light based on flux balance analysis

○Masakazu Toyoshima, Chiaki Yamamoto, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words cyanobacteria, flux balance analysis, different spectral light, photosynthetic bacteria

3Ia06 ボトムアップジェネティクスによる生命現象のハイスループット再構成

○中原 航, 青木 航, 植田 充美
（京大院・農）
miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景】転写・翻訳・代謝などの生命現象を理解するためには、生命現象の *in vitro* 再構成により必要十分条件となる遺伝子セットを決定することが重要である。従来の生命科学では還元的手法と構成的手法を交互に適用することで生命現象の必要十分条件を決定してきた。しかし、このアプローチでは生命現象の全体像が把握しにくく、必要十分条件の決定には多大な労力と時間を要する。
【目的】*in vitro* 再構成を高速に達成するための新規方法論ボトムアップジェネティクスの開発を目指した。ボトムアップジェネティクスでは、遺伝子群をリポソームに封入し、生命現象の再構成を試みる。再構成が行われるとリポソーム内のレポーターが蛍光を発する。蛍光リポソームを FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)で選別し、NGS (Next Generation Sequencer)を使って蛍光リポソームに共通する遺伝子を特定する。以上の手順により、一度の試行で必要十分条件となる遺伝子セットを特定できるため、生命現象理解の高速化が期待される。
【結果】当研究室では、ボトムアップジェネティクスを用いた β-ガラクシド加水分解システムの *in vitro* 再構成に成功している[1]。そこで、いまだ再構成が成功していない大腸菌相同組み換えの *in vitro* 再構成を目指した。相同組み換えに必要なエキソヌクレアーゼは遺伝子を分解するため、NGS 解析ができなかった。そこで、網羅的に T7 プロモーター変異体を構築・評価し、遺伝子発現強度を自由に制御できるシステムを構築した[2]。また、遺伝子を環状化し、ヌクレアーゼ耐性を付与した。本発表では、これらの技術を用いたボトムアップジェネティクスによる相同組み換えの再構成についてまとめて報告する[3]。

[1] Aoki *et al*, Sci Rep, 4:4722 (2014)
[2] Komura *et al*, PLOS ONE, 13: e0196905 (2018)
[3] Nakahara *et al*, submitted

High-throughput reconstruction of biological systems by using bottom-up genetics

○Wataru Nakahara, Wataru Aoki, Mitsuyoshi Ueda
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words Bottom-up genetics, Homologous recombination, *Escherichia coli*, PURE system

3Ia07 ディープラーニングによるヒト・ミトコンドリア DNA の分類と解析

○三宅 淳 [1], 馬場 俊輔 [1], 中村 隼雄 [1], 新岡 宏彦 [2]
（[1]大阪大学・国際医工情報センター, [2]大阪大学・データビリティーフロンティア機構）
jun_miyake@bpe.es.osaka-u.ac.jp

【緒言・要約】 DNA を用いたハプログループの分類には SNP を用いることが通常であった。我々は遺伝子の全長を用いた新しい方法を見出したので報告する。ｍｔ DNA 全長にわたる塩基配列を用いるとハプログループの分類が可能である。当該分類においては、部分的な遺伝子配列（例えば SNP）の変動がハプログループの変移につながらないことを見出した。
【方法】 ヒトミトコンドリア(mt)DNA（350 本）のシークエンスを人工知能である Stacked Autoencoder(SAE)を用いて圧縮し、2 次元もしくは 3 次元空間にプロットした。SNP 情報は MitMap より得た。ハプログループとしては、L0（アフリカ系）、L3（アフリカ系）、M（アジア系）、N（中東系）、R（ヨーロッパ系）、U（ヨーロッパ系）を例として用いた。
【結果】 SAE によって圧縮された mtDNA は、それぞれのハプログループ毎に明瞭にまとまったクラスターとしてプロットされた。SNP を用いることなく DNA の全長のシークエンスからハプログループを同定できることが示された。さらに、特定のハプログループに属する遺伝子を用い、その SNP の配列を他のハプログループのものに置換したシークエンスを作り出し、解析を行った。しかし、SNP の置換は、その遺伝子の属するクラスターから他のクラスターへの移動をもたらすことがなかった。
【議論】 SAE による分類では、遺伝子の部分(SNP)の変化はハプログループの変更に結び付かない。遺伝子の全長にわたる配列の変化があった場合は別種のハプログループに属するものとして認識する場合がある。人工知能(SAE)を用いるこの分類方法は、人工知能の DNA シークエンスに関する「認識」に基づくものである。これまで、SNP という「部分」がハプログループという「全体」を示すとされてきたことについて、改めて分類の概念の検討が必要である。。

Classification of human mitochondrial DNA by deep learning

○Jun Miyake[1], Shunsuke Baba[1], Hayao Nakamura[1], Hirohiko Niioka[2]
([1]Global Center for Medical Engineering and Informatics, Osaka University, [2]Osaka University Institute for Datability Science)

Key words artificial intelligence, mitochondria, DNA, haploid

3Ia08 ホログラフィック顕微鏡から得られる画像情報を活用した細胞解析

○岡田 光加[1], 山川 倫誉[1], 澤田 隆二[1,4], 今井 祐太[2], 岡田 真衣[2], 江連 徹[1], 加藤 竜司[2,3]
（[1]島津製作所, [2]名大院・創薬, [3]名大・ナノライフシステム研究所, [4]パーソル パナソニック HRパートナーズ株式会社）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

我々はIHM（In-line Hologlaphic Microscopy）方式を用いた、細胞培養解析装置CultureScanner CS-1を開発してきた。本方式は、培養器上部より照射したレーザーを、培養器後方に設置したセンサーで受光するシンプルな光学系である。センサーには、細胞を透過した光と細胞周辺を透過した光の干渉縞が記録され、干渉縞から光の伝播計算をすることで、細胞の光学厚みを表現する位相情報と、透過光の強さを表現する強度情報の2つの情報を用いて細胞を記述できる。IHM方式を用いた細胞画像撮影は、レンズを用いない光学系なために焦点を合わせる必要がなく、手技等による画像のばらつきが生じにくい他、IHM方式から得られる位相情報の画像には、細胞辺縁部にハロが生じないという画像解析上の利点もある。また、IHM方式の大きな特徴として、細胞の光学厚み情報という細胞内の乾燥タンパク質濃度を表現する*[Baber R. et.al, Nature(1952)]*高次元情報が得られることは、本装置で細胞を解析する際の大きな新規性である。
これまで我々は、IHM画像から細胞形態やテクスチャ情報を抽出する基本的な技術を開発し、細胞数の計測や、iPS細胞の未分化・未分化逸脱を分類するアルゴリズムを確立しており、本研究ではこれらの技術をベースに、IHM画像の特性や、画像から得られる独自の特徴量を活用した細胞画像解析手法を検討したのでこれを報告する。

Cell analysis using image information obtained from the In-Line Hologlaphic microscope

○Mika Okada[1], Momoya Yamakawa[1], Ryuji Sawada[1,4], Yuta Imai[2], Mai Okada[2], Toru Ezure[1], Ryuji Kato[2,3]
([1]Shimadzu Corp., [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [3]Inst. Nano-Life. Syst., Nagoya Univ., [4]Persol Panasonic HR Partners)

Key words cell morphology

3Ia09 微生物による物質生産のための文献検索支援ツールの開発

○山田 洋平[1], 宮澤 せいは[2], 細山 哲[2], 梶原 茂樹[1], 飯田 順子[1], 川﨑 浩子[2], 白井 智量[3]
（[1]島津製作所, [2]NITE・NBRC, [3]理研・CSRS）
yoyamada@shimadzu.co.jp

【背景と目的】微生物が本来持たない新たな機能を付加して，高効率に付加価値物質を生産する「スマートセル」に向けた研究・開発が進められている．NITEでは生物遺伝資源のバイオテクノロジーへの利活用を目的に9万株にのぼる微生物資源を保有，分譲，情報公開している．この多様な微生物資源の中から，目的とする付加価値物質の生産につながる有用遺伝子やそれらを有する微生物を選定するためには，目的物質の代謝情報，それに関与する酵素情報，酵素を有する微生物情報，遺伝子情報，ゲノム情報，さらに特許情報などについて，文献や各種データベース(DB)の網羅的な検索が必要である．十分な情報を得るには，多大な時間を要し，時には情報検索漏れが生じる場合がある．情報検索漏れの原因としては，同一酵素の名称あるいは遺伝子名の表記が異なることと，分類学的再編による学名変更もその要因である．そこで，本研究では，微生物による物質生産を目的として，酵素名を入力するだけで，それに関連する文献情報を，短時間かつ網羅的に抽出するための検索支援ツールを開発した．
【方法】開発したツールは，単一酵素名を元に各種酵素DBから自動的に酵素名の別称と関連遺伝子名を抽出し，検索語として自動的にPubMed検索することで網羅的な文献リストを得られるようにした．次に，微生物，遺伝子，酵素，代謝物等の名称を含む11.5万語の関連語を各種DBから収集，辞書を作成し，検索で得た全文献からこれら関連語を抽出し可視化することで，一見して目的酵素に関連がある文献であるかを確認できるようにした．
【評価】モデルとして4酵素について，本検索支援ツールによる検索とマニュアル検索を比較したところ，ツール検索では有用文献の90%を抽出でき，作業時間は40%短縮することができた．

Development of literature search support tools for bioproductions with microorganisms

○Yohei Yamada[1], Seiha Miyazawa[2], Akira Hosoyama[2], Shigeki Kajihara[1], Junko Iida[1], Hiroko Kawasaki[2], Tomokazu Shirai[3]
([1]Shimadzu Corp., [2]NBRC, NITE, [3]CSRS, RIKEN)

Key words screening of microorganisms, enzyme activity, literature search support tools

3Ia10 動物の表現型材料として捉える体毛の物性特徴抽出

○塚本 楓[1], 坂田 研二[2], 菊地 淳[1,2,3]
（[1]横市大院・生命医, [2]理研・環境資源, [3]名大院・生命農学）
jun.kikuchi@riken.jp

【背景・目的】動物は永い進化史において海から陸へと生存圏を移すことに伴い、乾燥、日射や氷点下といった過酷な環境要因から、体毛を蓄え環境適応してきた。また羽毛・体毛の独特な表現型は、子孫を遺すために重要な材料形質でもある。ヒトにおいても直立歩行してから最も日射を受け、かつ重要器官である脳を保護する頭髪に関しては、現代人に至るまで退化することなく表現型材料として保持し続けている。ここでは体毛を材料科学の視点から捉え直すことで、動物に特徴的な物性情報抽出を試みることとした。
【方法】鳥類、哺乳類、ヒトの羽毛・体毛サンプルについて、Intactで固体NMR・TD-NMR・FT-IR・Autographを用いて計測した。サンプルを微粉化処理後TG-DTA、洗浄・二層抽出後溶液NMRを用いて計測を行った。
【結果】CPMAS・1H異方性スペクトルをピーク分離し、前者からタンパク質の2次構造情報、後者から水の運動性の異なる3成分を抽出した。また、Solid EchoとCPMGから得られる緩和曲線からも運動性の異なる3成分が得られ、緩和の最も速い成分の割合は動物種に特有な場合もあることを見出した。Autographによる引張試験では、伸び率・切断強度ともに種による違いが見られ、特に切断強度に大きな特徴が現れた。FT-IRではケラチンスペクトルを用いてPKSPツール[1-3]を基にピーク分離し、ヒト間で比較すると、男女で傾向は無く個人の経時変化の影響が大きいことが分かった。本発表では、マテリアルズ・インフォマティクスと類似の計測記述子を統合解析した例も議論したい。
【参考文献】
[1] Ito et al. (2014) Anal. Chem. 86, 1098-1105.
[2] Wei et al. (2015) Anal. Chem. 87, 2819-2826.
[3] Yamada et al. (2019) ACS Omega 4, 3361-3369.

Feature extraction of hair physical properties as phenotypical materials in animals

○Kaede Tsukamoto[1], Kenji Sakata[2], Jun Kikuchi[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ, [2]CSRS, RIKENS, [3]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words Hair, Physical property, Solid-state NMR, Descriptor

3Ia11 自家蛍光シグネチャーに基づく新規スクリーニング技術の開発: 酵母の油脂生産性を一細胞レベルで評価する

○平山 智弘[1], 八幡 志央美[2], 高部 響介[2], 風間 春香[3], 高久 洋暁[3], 野村 暢彦[2,4], 八幡 穣[2,4]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生命環境系, [3]新潟薬大・応生科, [4]微生物サステイナビリティ研究センター）
yawata.yutaka.ga@u.tsukuba.ac.jp

有用微生物のスクリーニングにおいては、細胞の性質評価に多くの時間と手間を要することがボトルネックとなっている。これまではLC/MSによる生体分子の同定や、大量培養を介した候補株からの目的の表現型の選抜などの操作が必要であった。そこで我々は、自家蛍光に基づいて一細胞ごとの表現型を予見的に評価する技術を開発し、迅速かつ非破壊的なスクリーニングを可能にすることを目的とした。
自家蛍光とは細胞内の多様な生体分子が発する微弱な蛍光であり、様々な生理状態を反映することが明らかになっている。この自家蛍光を用いることで、GFPなどの侵襲的なタグを必要としない表現型評価が可能となる。これまでに我々は、共焦点イメージングと画像解析により、一細胞ごとの「自家蛍光シグネチャー」を解析する技術 (CRIF) を開発している (特許第6422616号)。さらに機械学習などを用いて、自家蛍光シグネチャーに基づいて細胞の増殖状態や生育条件を高感度に判別できることが明らかになっている。
今回我々は、油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂生産性をモデルとして、CRIFがスクリーニングにおける細胞評価技術として応用可能であるか検証した。まず、油脂生産性の異なる3株 (野生株、油脂高蓄積株、油脂低蓄積株) の自家蛍光シグネチャーを比較すると、株ごとに異なる特徴が見られ、さらに、油脂生産の進行に伴い経時的に蛍光パターンが変化していた。この結果は、自家蛍光シグネチャーが一細胞ごとの油脂生産性を反映することを示す。また、油脂生産初期の細胞の自家蛍光シグネチャーに基づいて細胞の油脂生産性を予測する機械学習モデルを構築することが可能であった。
今回の結果はCRIFを利用して候補株を見つける新たな迅速スクリーニング法の展望を示すものである。
(本研究の一部はNEDOスマートセルプロジェクトの支援を受けて行われた。)

Single-cell innate fluorescence analysis for high-throughput screening: A proof-of-concept study

○Tomohiro Hirayama[1], Shiomi Yawata[2], Kyosuke Takabe[2], Haruka Kazama[3], Hiroaki Takaku[3], Nobuhiko Nomura[2,4], Yutaka Yawata[2,4]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]Dept. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci, [4]MiCS., Univ. Tsukuba)

Key words screening, lipid, microscopy, oil

3Ja01 Self-Growth Inhibiting Mechanism of Comamonas testosteroni R2 grown on phenol

〇JABIR Mohd[1,2], Tomoka Nishimura[1], Ayaka Minoura[1], Kenshi Suzuki[1], Masahiro Honjo[1], Kensei Masuda[1], Yosuke Tashiro[1,3], Hiroyuki Futamata[1,3,4]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Innov. Cent. Agric. Adv. Bioprocess, Univ. Technol. Malaysia, [3]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
jabir.mohd.din18@shizuoka.ac.jp

Understanding interspecies interaction is the key in manipulation of complex microbial ecosystem. Although the growth of phenol-degrading Comamonas testosteroni strain R2 collapsed under chemostat conditions supplied with phenol as a sole carbon and energy source, strain R2 could maintain the phenol-utilizing activity under the presence of non-phenol degrader Stenotrophomonas sp. strain Y. The growth of strain R2 was more repressed under batch conditions by the supernatant from the longer incubation culture of strain R2-chemostat culture. Strain R2 was able to degrade phenol in the supernatant treated by strain Y. Real-time qPCR analysis showed that population densities of strains R2 and Y were maintained under chemostat conditions. These results suggested that strain R2 produced self-inhibiting metabolites and strain Y utilized them as resources, resulted in coexistence on phenol. The strain R2 supernatant was fractionated with hexane, ethyl acetate, and H2O. The growth inhibition was only observed in H2O-fraction. The effect of the H2O-fraction on kinetic parameters for phenol and catechol of strain R2 were investigated. Phenol-and catechol-oxygenating maximum rate were not affected but their affinities were lower than control conditions, indicating that the self-growth inhibition of strain R2 was based on competitive inhibition. These results suggested that the relationship between strains R2 and Y was cooperative interaction and served as a model in understanding the metabolic network of microbial ecosystems.

Self-Growth Inhibiting Mechanism of Comamonas testosteroni R2 grown on phenol

〇JABIR Mohd[1,2], Tomoka Nishimura[1], Ayaka Minoura[1], Kenshi Suzuki[1], Masahiro Honjo[1], Kensei Masuda[1], Yosuke Tashiro[1,3], Hiroyuki Futamata[1,3,4]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Innov. Cent. Agric. Adv. Bioprocess, Univ. Technol. Malaysia, [3]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words *Stenotrophomonas* sp., , *Comamonas testosteroni* R2, coexistence, interspecific interaction

3Ja02 Resource-competitive microbes can stably coexist by flexible metabolic network in a synthetic microbial ecosystem

〇Fatma Azwani[1,2], Kenshi Suzuki[2], Masahiro Honjo[2], Kensei Masuda[3], Yasuhisa Saito[4], Yosuke Tashiro[3], Hiroyuki Futamata[2,3,5]
([1]Inst. Tropical Agric. Food Security., Univ. Putra Malaysia., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [3]Dept. Appl. Chem. Biochem. Eng. Grad. Sch. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [4]Dept. Mat., Shimane Univ., [5]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
fatma.hjaziz@yahoo.com

Our study investigated how microbial ecosystems maintain its functional stability with coexistence. The synthetic microbial ecosystem (SME) under chemostat and resouce limiting conditions with 3 kinds of bacteria (*Pseudomonas* sp. LAB-08, *Comamonas testosteroni* R2 and *Cupriavidus* sp. P-10) were studied in a steady states long term reconstructed experiments. We then analysed a mathematical model of the population dynamics to build connections between practical approaches. Based on parameters of competition and growth activity, the population dynamics showed difference outcomes. The reproducibility and stability of bacterial community structure was observed before and after starvation, whereas the kinetic parameters for phenol and catechol of the SME shifted in different dynamic equilibrium. It was revealed that forming mechanism of microbial community structure changed even in the similar community structure as transcriptional levels of genes encoding phenol hydroxylase and catechol dioxygenase differed before and after starvation. Transcriptional levels indicated phenol was degraded by strains R2 and P-10 whereas strain LAB-08 became a dominant. Catechol was degraded mainly by strain P-10, suggested that strain P-10 would incur the cost for phenol and catechol degradation, despite other strains contributed partially to degrade resources. These results experimentally indicated that the flexibly metabolic networking systems allow microbial ecosystem to exhibit the homeostasis with coexistence.

Resource-competitive microbes can stably coexist by flexible metabolic network in a synthetic microbial ecosystem

〇Fatma Azwani[1,2], Kenshi Suzuki[2], Masahiro Honjo[2], Kensei Masuda[3], Yasuhisa Saito[4], Yosuke Tashiro[3], Hiroyuki Futamata[2,3,5]
([1]Inst. Tropical Agric. Food Security., Univ. Putra Malaysia., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [3]Dept. Appl. Chem. Biochem. Eng. Grad. Sch. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [4]Dept. Mat., Shimane Univ., [5]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words fuctional stability, metabolic network, synthetic microbial ecosystem

3Ja03 モデル微生物生態系における時空間的不均一性と生態系機能維持機構

〇鈴木 研志[1], 本荘 雅宏[1], ファティマ アズワニ[2], 増田 健誠[3], ジャビエル モハマド[1], 天野 光喜[4], 田代 陽介[3], 二又 裕之[1,3,5]
([1]静大・創科技院, [2]Universiti Putra Malaysia, Inst. Tropical Agric., [3]静大院・総合科技, [4]静大・工, [5]静大・グリーン科技研)
futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

微生物生態系は工業や農業といった様々な分野で活用されている。一方で明確な制御法が確立されておらず、それには微生物生態系の理解が必要不可欠である。微生物生態系は多様な微生物が共存することで形成されたシステムであることから、まず、微生物共存機構および生態系機能維持機構の解明を目的とした。システムを単純化するため、phenol 資化細菌である *Cupriavidus* sp. P-10 株および *Comamoans testosteroni* R2 株を用いた二菌株混合培連続集積養系をモデル微生物生態系と位置づけ解析を行なった。唯一の炭素源を phenol とすることで生態系機能を phenol 分解とした。一般に単一基質が供給される連続集積培養系では、増殖速度が速く基質に対する親和性が高い微生物のみが生存し他は排除される。上記二菌株では R2 株のみが生存すると推定されたにも関わらず、二種は共存し P-10 株が高い菌密度を示した。そこで phenol に対する動力学的解析を行ったところ、P-10 株は R2 株と比較して、より高濃度で最大分解速度を示すことが明らかとなった。即ち、phenol 濃度による基質の分配が可能であることを示した。培養系内の phenol 濃度分布を解析した結果、P-10 株を優占化可能とする時空間的不均一性が存在することが示された。しかし phenol の分配率が一定であれば競争排除が起きてしまう。つまり、phenol 分配率は優占種が入れ替わる境界を跨いで揺らいでいると考えられた。そこで、各菌株の phenol hydroxylase 遺伝子の転写量を解析した結果、その値は変動した。従って、P-10 株および R2 株は僅かなフェノール濃度の変化に、遺伝子転写レベルで揺らぐことで長期共存が可能であり、生態系機能は集団としての代謝状態が変化することで維持されていると推察された。

Metabolic fluctuation corresponding to substrate-spatiotemporal heterogeneity generate functional stability in a synthetic microbial ecosystem

〇Kenshi Suzuki[1], Masahiro Honjo[1], Azwani Fatma[2], Kensei Masuda[3], Mohd Jabir[1], Koki Amano[4], Yosuke Tashiro[3], Hiroyuki Futamata[1,3,5]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Inst. Tropical Agric., Universiti Putra Malaysia, [3]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [4]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [5]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words synthetic microbial ecosystem, functional stability, coexistence, heterogeneity

3Ja04 特異な自家熱型高温好気消化プロセスにおける劇的な細菌群集構造の変遷機構の解明

〇田代 幸寛, Cheng Huijun, 河野 祥尚, 朝倉 侑弥, 神田 晃佑, 福井 諒, 奥川 友紀, 酒井 謙二
（九大院・農）
tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp

自家熱型高温好気消化（ATAD）プロセスは、複合微生物系を用いた排水処理であるが、常温で進行する活性汚泥法と比較すると、学術的知見は圧倒的に少ない。演者らは、福岡県築上町でヒトし尿および浄化槽汚泥を原料とする ATAD プロセスが世界で類をみない特異な理化学特性・微生物特性を示し、3 フェーズ（初期、中期、終期）で進行することを報告した（AEM,84,e02537-17,2018）。特に、優占門は初期から中期にはグラム陰性細菌である *Proteobacteria* 門から *Bacteroidetes* 門に変遷し、終期にはグラム陽性細菌である *Firmicutes* 門へと劇的に変化するが、この変遷機構は明らかとなっていない。そこで本研究では、特異な ATAD プロセスにおける細菌群集変遷機構の解明を目的とした。
実機における各フェーズの ATAD 試料を実験に用いた。まず、加水分解酵素活性（β-glucanase、Protease、Lipase）および溶菌活性（*Micrococcus lysodeikticus*、*Escherichia coli*）を、各フェーズの温度（30°C、45°C、54°C）および pH（7.5、8.4、9.0）条件で測定した。一部のフェーズにのみ、β-1,3-Glucanase や Protease が検出されたが、細菌群集構造変遷との関連は不明であった。一方、終期からは、グラム陽性細菌である *M. Lysodeikticus* には活性がなく、グラム陰性細菌である *E. coli* にのみ溶菌活性を示したことから、変遷機構の一つであることが示唆された。また、メタゲノム解析を行ったが、溶菌に関与する遺伝子が検出されず、溶菌因子を特定できなかった。さらに、実機の ATAD 試料（初期、中期、終期）を高振とう条件で、それぞれ 30°C、45°C、54°C で培養した結果、実機 ATAD プロセスにおける一部の主要細菌の変遷を再現することができた。よって、温度に加えて、高振とうによるせん断応力が細菌群集構造の変遷に寄与していることが示唆された (Cheng ら,JBB,126,196-204,2018)。

Elucidation of mechanisms for dynamic bacterial community changes in autothermal thermophilic aerobic digestion process

〇Yukihiro Tashiro, Huijun Cheng, Yoshihisa Kawano, Yuya Asakura, Kosuke Kanda, Ryo Fukui, Yuki Okugawa, Kenji Sakai
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD), bacterial community changes, cell lysis activity, shering force

3Ja05 微細藻類 *Acutodesmus acminatus* におけるユウロピウム吸着に及ぼす代謝機能の影響

○古橋 康弘[1], 本多 了[2], 原-山村 宏江[2], 長谷川 浩[2]
（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・理工）
rhonda@se.kanazawa-u.ac.jp

廃棄物からの希少金属の回収は、金属資源が乏しい我が国の産業において重要な課題であり、バイオソープションは従来の化学的手法に変わる低コスト・低環境負荷型の金属回収技術として研究されてきた。廃棄物からの金属回収について、多金属成分系において回収対象の金属を高品位で回収することが課題である。しかしながら金属イオンの化学性質が支配する細胞表面や細胞外分泌物による化学吸着では化学性質が酷似しているランタノイドなどの選択的吸着は困難である。この課題を解決するためには、生物代謝による特定の金属を選択的吸着が重要である。そこで本研究ではユウロピウムに対して高い吸着能を持つ微細藻類 *Acutodesmus aucminatus* における生物代謝のユウロピウム吸着に対する関与について調べた。
微生物の滅菌処理として主要な方法である紫外線及びオートクレーブによって不活化させた藻体をそれぞれ作成し、ユウロピウムの吸着に用いた。その結果、生細胞と比較して吸着量は大幅に減少した。また生細胞と不活性藻体の両方において約 30 分でユウロピウムを迅速に吸着した。さらに生細胞な場合のみ、約 9 時間までユウロピウムの吸着量は増加した。よって生細胞および不活性藻体に見られた迅速なユウロピウム吸着は細胞表面における化学吸着であり、生細胞のみに見られるその後のユウロピウム吸着には、*A. acuminatus* の生物代謝機能が関与していると考えられる。

Effect of metabolic mechanism of europium absorption by microalgae *Acutodesmus acuminatus*

○Yasuhiro Furuhashi[1], Ryo Honda[2], Hiroe Hara-Yamamura[2], Hiroshi Hasegawa[2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Inst. Sci. Eng., Kanazawa Univ.)

Key words microalgae, biosorption, europium, metal recovery

3Ja06 Nutrients removal and auto-aggregation capabilities of two microalgal strains isolated from algal-bacterial aerobic granular sludge

○Marjangul Nuramkhaan, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu, Zhenya Zhang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
lei.zhongfang.gu@u.tsukuba.ac.jp

Nutrients removal and auto-aggregation capabilities were examined on two microalgal strains (A1 and A2) isolated from algal-bacterial aerobic granular sludge treating synthetic domestic wastewater. All the performances under light/dark cycle condition were higher than only dark cultivation. When initial NH_4-N and PO_4-P concentrations were 50 mg/L and 5 mg/L, respectively, A1 removed PO4-P about 96% in comparison to 87% by A2 within 5 days under light/dark cycle condition, which sharply decreased to 52% (A1) and 35% (A2) under only dark condition. In terms of NH4-N removal, A1 achieved 93% and 49% respectively under light/dark cycle and only dark conditions, while A2 obtained 84% and 36% on day 5. In the first two days' light/dark cultivation, the auto-aggregation index of A1 was around 59%, which gradually increased to 62%, 71% and 82% on days 3, 4 and 5, respectively. During only dark cultivation this index ranged between 50-54%. In contrast, less increase was detected on the auto-aggregation index of A2, about 29% on day 1, which increased to the highest (50%) on day 5 during light/dark cultivation. While under only dark condition this index of A2 slightly increased from 26% to 32% during the first two days, which decreased from day 3 onwards and reached 11% on day 5. In summary, compared to A2, A1 grows faster with better nutrients removal and an higher auto-aggregation index, which may contribute more to algae granulation and highly efficient nutrients removal in the established algal-bacterial granule system.

Nutrients removal and auto-aggregation capabilities of two microalgal strains isolated from algal-bacterial aerobic granular sludge

○Marjangul Nuramkhaan, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu, Zhenya Zhang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words aerobic granular sludge, microbial community, microalgae, isolation

3Ja07 *Methylobacterium* sp. FD1 株のホルムアルデヒド代謝系酵素遺伝子とホルムアルデヒド培地での発現

○島本 真奈, 米光 裕, 楠部 真崇
（和歌山高専）
yonemitsu@wakayama-nct.ac.jp

【背景と目的】FA 分解菌 *Methylobacterium* sp. FD1 株は、FA 最小発育阻止濃度（FA-MIC）が 33 mM で、よく知られている *Methylobacterium* sp. AM1 株の FA-MIC（1 mM）に比べて著しく高い。FD1 株の FA 耐性機構を解明することは、より高い FA 耐性能を持つ FA 分解菌の育種に応用できると考えられる。本研究では、まず FD1 株の FA 代謝系酵素遺伝子の調査とそれら遺伝子の発現に対する FA の影響を調べた。
【方法】FD1 株の全ゲノムシーケンスは、菌体より精製した全 DNA を鋳型に MiSeq（Illumina 社）を用いて行った。得られたシーケンスデータは DDBJ の Pipeline および SPAdes を使ってアッセンブルした。ゲノムアノテーションは Local Blast にて行った。FD1 株の FA 代謝系酵素遺伝子の発現解析は、まず FA 含有 Soybroth 培地にて培養した菌体より mRNA を精製後、cDNA 化し、次いでリアルタイム PCR により各種遺伝子の転写量の相対定量を行った。
【結果と考察】FD1 株は、全ゲノムシーケンス解析の結果、ゲノムサイズが 7.0 Mbp で、約 8 千個のタンパク質をコードしていると示唆された。次に既知の FA 代謝系酵素遺伝子を用いてアノテーションした結果、AM1 株で明らかになっている *fae*, *glyA*, *mtdA*, *fdh*, *mxaF* 等以外に *fdm1*, *fdm2*, *gd-faldh* 等が存在した。これら遺伝子の転写量を調べた結果、*fdm1* および *fae* は FA によりそれぞれ平均 9.6 倍および 2.5 倍高くなり、FA 誘導型発現であると示唆された。その他の遺伝子は FA にほとんど影響されず、構成的発現と示唆された。これより FD1 株の高い FA 耐性は *fdm1* などの FD1 株特異的遺伝子による可能性がある。

Expression of the formaldehyde metabolic enzyme genes of *Methylobacterium* sp. FD1 in formaldehyde medium

○Mana Shimamoto, Hiroshi Yonemitsu, Masataka Kusube
(Natl. Inst. Technol., Wakayama Coll.)

Key words formaldehyde, metabolism, gene expression analysis, real time PCR

3Ja08 *Methylobacterium* sp. FD1 株由来ホルムアルデヒドジスムターゼ (Fdm1) の特性解析

○井元 誠志, 米光 裕, 岸本 昇
（和歌山高専）
yonemitsu@wakayama-nct.ac.jp

【背景と目的】ホルムアルデヒド (FA) は工業原料として幅広く用いられており、化学工業において重要な化学物質である。しかし、FA は強い毒性を持つことから、工業廃水などの液相中の FA や気相中の FA は分解処理が必要となる。当研究室では、微生物あるいは酵素を用いた FA 分解処理技術の開発を目指し、既に FA 分解菌 *Methylobacterium* sp. FD1 株を分離し、その FA 分解が主にホルムアルデヒドジスムターゼ (Fdm) であることを明らかにした。そこで、この Fdm の構造や機能を明らかにすることを目的に、既に、Fdm 遺伝子 (*fdm1*) をクローニングし、His タグ付き Fdm1 (Fdm1-6His) の精製を試みた。本研究では、Fdm1-6His の特性として至適 pH・温度およびミカエリス定数 (K_m) を調べた。
【方法】Fdm1-6His は、遺伝子組換え大腸菌の細胞破砕液の可溶性画分より、金属 (Co^{2+}) アフィニティクロマトグラフィで精製した。Fdm1-6His の FA 分解活性は、FA を含む緩衝液に Fdm1-6His を含む酵素溶液を添加し、所定の時間インキュベートした。反応の停止は、2 M HCl の添加により、行った。Fdm1-6His の Fdm 活性は、FA 分解によって生成したギ酸を HPLC で定量することで測定した。なお、Fdm 活性は、1 mg の Fdm1-6His が 1 分間に分解する FA の物質量とした。
【結果と考察】Fdm1-6His の至適 pH および至適温度は、それぞれ 6.0 付近および 30 ℃付近と分かった。Fdm1-6His の K_m および最大反応速度 (V_{max}) は、それぞれ 0.21 M および 3.8 mmol/(min・mg) であった。*Pseudomonas putida* F61 株由来 Fdm では K_m が 0.35 M であることが報告されており、Fdm1-6His の方が FA に対してより高い親和性を持つと考えられた。今後は、Fdm1-6His の高次構造、結合金属および補酵素の調査、並びに FA 分解処理システムへの応用を検討する予定である。

Characterization of formaldehyde dismutase (Fdm1) of *Methylobacterium* sp. FD1

○Seiji Imoto, Hiroshi Yonemitsu, Noboru Kishimoto
(Natl. Inst. Technol., Wakayama Coll.)

Key words formaldehyde dismutase, *Methylobacterium* sp. FD1, formaldehyde degradation

3Ja09 対流型水処理装置における窒素浄化能の向上

○早坂 洋輝, 荒木 希和子, 久保 幹
（立命館大院・生命科学）
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】止水環境において、有機物流入量が微生物による分解量を上回ると、有機物が底泥に蓄積し水質悪化が生じる。これまでに水域の対流と微生物分解による自浄作用に着目し、ポンプ及び微生物カラムによって自浄作用の促し水質を改善する対流型水処理装置の開発を行ってきた。微生物カラムではポンプの流速を変え酸素供給量を調節することで、好気的もしくは嫌気的環境を作り出している。本装置は脱炭酸と脱窒が行われることが確認されたが、窒素除去の向上が課題であった。本研究では脱窒菌の生育に適したカラム条件を検討し、対流型水処理装置の脱窒を促進させることを目的とした。
【方法と結果】微生物カラムの吸着担体としてポリエステル培土とポリビニルアルコール（PVA）を用いた。脱窒を促す最適密度条件の検討を行うため、低・中・高の密度条件でカラムに担体を充填した。担体には自然池底泥中の微生物を吸着させた。その後、カラムに高濃度の硝酸態窒素濃度を含む富栄養水を通過させ、窒素減少量から両担体の脱窒に適したカラム内密度条件を評価した。また装置による持続的な窒素除去効果を確認するため、硝酸態窒素濃度が一定値を下回った時点で新しい富栄養水に交換し、窒素減少量と総細菌数および脱窒菌数を 56 日間観察した。いずれの担体においても低密度条件で最も高い硝酸態窒素の減少が観測された。担体密度の違いによるカラム内溶存酸素量の差は小さく、流速が速いことで基質と脱窒菌との接触頻度の高くなる低密度条件で脱窒が最も活発に行われたと考えられた。56 日間の連続窒素除去実験の結果、硝酸態窒素は継続的に減少し、その減少率はポリエステル培土カラムで 0.25 mg/day、PVA カラムで 0.22 mg/day であった。繊維質なポリエステル培土と多孔質な PVA はいずれも長期間、脱窒菌の生育に適した環境を維持できることが確認された。

Improvement of denitrification efficiency in our new water treatment system.

○Hiroki Hayasaka, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words denitrification, bacterial column, water purification, water circulation

3Ja10 リン酸基修飾酵母による鉱物化誘導の解析

○吉田 真実[1], 木原 摩耶[1], 尾島 由紘[1], 五十嵐 幸一[1], 吉田 朋子[2], 東 雅之[1]
（[1]阪市大院・工, [2]阪市大・複合先端研究機構）
azuma@osaka-cu.ac.jp

【諸言】 本研究室では、微生物吸着材として、酵母にリン酸基を修飾したリン酸基修飾酵母の開発を行ってきた。特徴として、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であり、さらに酸性溶液で脱離できることが明らかになっている。また 2018 年の本大会では、希土類元素に対する選択的な回収も可能であることも報告している。このリン酸基修飾酵母を金属イオン溶液中で長時間反応させると、吸着に続いて鉱物化が起こることが観察された。酵母による鉱物化はこれまで報告されているが、多くは生体反応を利用したバイオミネラリゼーションであり、死菌であるリン酸基修飾酵母による鉱物化はこれまでに報告がない現象である。本発表ではこの鉱物化の詳細な解析を行った。
【実験方法】 リン酸基修飾酵母は、市販の製パン用ドライイーストをアルカリ条件下で $Na_3P_3O_{10}$ と 20 時間反応することにより作製した。乾燥させたリン酸基修飾酵母を金属イオン溶液に懸濁した後、数日間振とうさせ、酵母表面での鉱物化を誘導した。鉱物化は SEM 観察によって確認し、EDS、XAFS を用いて鉱物の分析を行った。
【結果と考察】 リン酸基修飾酵母と銅イオンの反応によって、酵母表面での鉱物化が引き起こされることが SEM で観察された。鉱物化は反応 3 日後から確認され、7 日後程度で完了することが分かった。同様の結果が、希土類元素であるジスプロシウムでも確認された。銅イオンとリン酸基修飾酵母で形成した鉱物は、EDS 解析により Cu, P, O で構成されていることが予測された。XAFS 解析の結果より、形成した鉱物は、標準試料のりん酸銅(II)と比較して、局所構造は極めて類似しているが結晶性が低い鉱物であるということが示された。

Analysis of mineralization induced by phosphorylated yeast

○Mami Yoshida[1], Maya Kihara[1], Yoshihiro Ojima[1], Koichi Igarashi[1], Tomoko Yoshida[2], Masayuki Azuma[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ., [2]OCARINA, Osaka City Univ.)

Key words yeast, phosphorylation, metal adsorption, mineralization

3Ja11 *Rhodotorula mucilaginosa* が形成するバイオフィルムを用いた水溶液中からの金属回収

○菅 道哉, 尾島 由紘, 東 雅之
（阪市大院・工）
azuma@osaka-cu.ac.jp

重金属の多くは人体に悪影響を及ぼすため、環境中からの適切な除去が望まれている。また、循環型社会の実現に向けて都市鉱山などからの効率的な金属の回収も求められている。これまでに凝集沈殿法などによる金属回収が提案されているが、近年、環境への負荷が小さく低コストであることから微生物吸着剤が注目されている。しかし、連続的な金属吸着には微生物の固定が必要となる。我々は、微生物が形成するバイオフィルムの活用を検討するため、バイオフィルムを形成する酵母 *Rhodotorula mucilaginosa* を用い金属吸着について評価した。
最初に、*R. mucilaginosa* NBRC0889 株を用い浮遊細胞での吸着能を評価した結果、微生物吸着試験によく用いられる *Saccharomyces cerevisiae* より高い吸着能を確認した。次に、バイオフィルム形成に適した材料検討を行った。各プラスチック板を浸漬させた培地中で 48 時間培養し、クリスタルバイオレット染色による評価の結果、ポリプロピレン板が適していることが分かった。バイオフィルム量をさらに高めるために、表面に凹凸があり表面積が大きい円筒状のポリプロピレン製担体 (内径 3.5 mm, 外径 5.5 mm, 高さ 11 mm)にバイオフィルムを形成させた結果、ポリプロピレン板よりもバイオフィルム量が顕著に増加した。そこで、バイオフィルムによる金属吸着を評価した。金属溶液には 10 ppm, 10 mL の Cu^{2+}溶液を用い、10 分の接触により吸着を行い溶液中に残った Cu^{2+}濃度を ICP-OES で測定した。バイオフィルムを形成した担体 1 つには約 1×10^8 cells が含まれ、20 μg 程度の Cu^{2+}を吸着することを確認した。細胞当たりの吸着量は浮遊細胞と比べて約 3 倍以上高く、バイオフィルムに含まれる多糖などへの吸着が考えられた。現在は、バイオフィルムを形成した担体を用い、連続的な金属回収について検討している。

Metal recovery from aqueous solution using biofilm formed by *Rhodotorula mucilaginosa*

○Michiya Suga, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words *Rhodotorula mucilaginosa*, heavy metal, biosorption, biofilm

3Ap01 Comparative enzymological characterization of l-asparaginases from lactic acid bacteria

○Kodchakorn Phetsri, Makoto Furukawa, Risa Yamashiro, Yuka Kawamura, Yosuke Toyotake, Mamoru Wakayama
(Coll. Life Sci.,Dept. Biotechnol.,Ritsumeikan Univ.)
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

L-asparaginase (ASNase; EC 3.5.1.1.) is the critical enzyme that catalyzes hydrolysis of L-asparagine to L-aspartic acid and ammonium. Generally, ASNase from *E. coli* and *Erwinia chrysanthemi* have been mainly applied for leukemia treatment but a few studies of ASNase from lactic acid bacteria (LAB) have been reported, especially in the food application. Thus, the aim of this study is to characterize ASNase production by cloning and expression of ASNase gene from five LAB strains in *E. coli.* Among LABs examined, these strains were selected based on phylogeny analysis from the genomic LAB original strains. ASNase activity was screened by GlDH assay. ASNases genes were closely 1 kbp and inserted into *NdeI* and *XhoI* sites of pET-28a (+) and transform into *E. coli* BL21(DE3). The recombinant ASNases were purified to be homogeneity using Ni Sepharose 6 Fast Flow column. They showed the high specificity for L-Asn significantly. Optimum and stability of pH and temperature were in the range of 5 - 9 and 30 - 50°C respectively. The activities of the enzymes were significantly inhibited by Ni^{2+} ion. Among five strains, the recombinant ASNase from *Streptococcus thermophilus* NBRC 13957 showed the highest specific activity at 113.0 U $mg^{-1}$and K_m, V_{max}, and k_{cat} values were 2.91 mM, 174.82 U mg^{-1}, and 1.53×102 $s^{-1,}$ respectively. Results of this study indicated that the recombinant ASNases from LABs were active at the wide range of pH and temperature, possibly reflect the potential of L-ASNase as catalyst in food processing industry.

Comparative enzymological characterization of l-asparaginases from lactic acid bacteria

○Kodchakorn Phetsri, Makoto Furukawa, Risa Yamashiro, Yuka Kawamura, Yosuke Toyotake, Mamoru Wakayama
(Coll. Life Sci.,Dept. Biotechnol.,Ritsumeikan Univ.)

Key words l-asparaginase, lactic acid bacteria, characterization, cloning

3Ap02 アラレマイシン合成酵素から 5-アミノレブリン酸合成酵素 ALAS への機能改変

○川口 潤, 森 ひかる, 岩井 伯隆, 和地 正明
（東工大・生命理工）
mwachi@bio.titech.ac.jp

【背景と目的】*Streptomyces* sp. A012304 株から発見された抗生物質アラレマイシンの合成酵素である AlmA は、ポルフィリン前駆体である 5-アミノレブリン酸（ALA）の合成酵素 ALAS のホモログである。ALAS はグリシンとスクシニル CoA を基質として ALA を合成するのに対し、AlmA はアラニンとスクシニル CoA を基質としてアラレマイシン中間体を合成していると考えられた。ALAS は動物、真菌、α-プロテオバクテリアに属する一部の細菌において保存されているのに対し、多くの細菌と植物は ALAS と全く関連のない HemA を介した経路により ALA を合成する。ALAS がどのように出現し進化してきたのか興味深い。本実験では AlmA と ALAS の進化上の関係性を探るために、AlmA の反応生成物をアラレマイシン中間体から ALA へと変化させる機能改変を試みた。
【方法】AlmA と ALAS のアミノ酸配列比較や ALAS の結晶構造を基に、両者の基質特異性の違いをうむアミノ酸残基を推定した。塩基置換したプライマーを用いた PCR 法により変異 AlmA をコードするプラスミドを構築した。変異 AlmA の ALA 合成活性を調べるため、ALA 要求性を示す大腸菌 MG1655Δ*hemA* 株で変異 AlmA を発現させ、その生育を調べた。
【結果】ALAS の活性部位において基質のグリシンと隣接するアミノ酸残基に注目して、82 番目のセリン残基をトレオニン残基に置換した AlmA-S82T を作製した。AlmA-S82T は Δ*hemA* 株の生育をわずかに回復した。そこでさらに、活性部位ループにある 86 番目のグリシン残基をセリン残基に置換した AlmA-S82T/G86S を作製した。その結果、Δ*hemA* 株の生育が顕著に回復した。この結果から AlmA-S82T/G86S は ALA 合成活性を持つようになったと考えられた。本実験より、AlmA と ALAS の進化的関連性が強く示唆された。

Functional transformation of alaremycin synthesizing enzyme to 5-aminolevulinic acid synthase ALAS

○Jun Kawaguchi, Hikaru Mori, Noritaka Iwai, Masaaki Wachi
(Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech)

Key words evolutionary engeneering, 5-aminolevulinic acid, ALAS, alaremycin

3Ap03 ビフィズス菌の含硫アミノ酸代謝に関与する C-S リアーゼの解析

○黒瀧 空, 松本 菜々恵, 吹谷 智, 横田 篤, 和田 大
（北大院・農）
wada@chem.agr.hokudai.ac.jp

【背景・目的】
ビフィズス菌は宿主に対して整腸作用や免疫賦活化作用などの健康増進効果を示し，プロバイオティクスとして発酵乳製品などに用いられている．ビフィズス菌の有用効果を充分に活用するためにはビフィズス菌自身の栄養生理に関する理解が必要である．しかし，ビフィズス菌の栄養代謝については不明な点が多いのが現状である．アミノ酸代謝については特に生物に必須な含硫アミノ酸であるシステイン（Cys）／メチオニン（Met）の代謝系は研究が進んでいない．我々はビフィズス菌の含硫アミノ酸代謝系に着目し，全容を解明することを目指して研究を行なっている．本研究では，含硫アミノ酸代謝系の中でも未だ同定されていない L-シスタチオニンの C-S 結合を切断し，Cys とホモシステインを与える C-S リアーゼの詳細な評価を行い，同定を試みた．
【方法・結果】
ヒト由来の *Bifidobacterium longum* 105-A のゲノムから RNA-Seq により Met を単一硫黄源とした場合に誘導される遺伝子，あるいは他の細菌の C-S リアーゼのアミノ酸配列との比較により，４つの C-S リアーゼ候補遺伝子（BL105-A_0013，BL105-A_0509，BL105-A_0510，BL105-A_1451）を選抜した．それらの遺伝子を pET ベクターに導入して発現ベクターを構築した．それらを大腸菌に導入して，発現誘導剤（IPTG）を添加し，C-S リアーゼを発現させ，得られた酵素について DTNB 法を用いて活性測定を行った．
その結果，BL105-A_1451 遺伝子から生産されるタンパク質にのみ活性が認められ，シスタチオニン β-リアーゼ（CBL）活性があると考えられた．現在 BL105-A_1451 産物が実際にどのような反応を触媒するのかについて詳細に検証中である．

Analysis of C-S lyase involved in sulfur amino acid metabolism in *Bifidobacterium longum* 105-A

○Sora Kurotaki, Nanae Matsumoto, Satoru Fukiya, Atsushi Yokota, Masaru Wada
(Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words *Bifidobacterium longum*, sulfur amino acid metabolism, cystathionine beta-lyase

3Ap04 *Sulfolobus tokodii* 由来色素依存性 L-乳酸脱水素酵素の大腸菌を宿主とした発現系の構築

○宇野 紘平 [1], 里村 武範 [1,2], 黒沢 則夫 [3], 櫻庭 春彦 [4], 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）
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）はフラビン類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クラスターを見出した。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、SDS-PAGE の結果から本酵素は 2 つの異なるタンパク質からなるヘテロ複合体構造をとっていることが判明した。また、本酵素の詳細な酵素化学的性質を測定した結果、本酵素は、これまでに見出されている Dye-LLDH に比べ非常に高い安定性を示したことから応用のための有用性が確認できた。しかし、現在用いているアーキアを宿主としたタンパク質発現系では発現量が少ないため酵素の応用利用の律速となっている。そこで、本研究では大腸菌を宿主として好熱性アーキア由来 Dye-LLDH を発現させる発現系の構築を目的とした。
[方法]
Dye-LLDH を構成するタンパク質をコードする遺伝子を導入した大腸菌用タンパク質発現用プラスミドを作成した。この発現プラスミドを *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL に導入し形質転換した。その後、得られた形質転換株を培養、組換えタンパク質誘導後、本酵素の精製を行った。
[結果と考察]
大腸菌を宿主として用いることにより *S. acidocaldarius* を宿主とした場合に比べて組換えタンパク質発現の効率化に成功した。また、発現した組換え Dye-LLDH は *S. acidocaldarius* を宿主として発現させた酵素と同様の安定性が確認できた。

Construction of expression system of dye-linked L-lactate dehydrogenase from *Sulfolobus tokodii* using *E. coli* as host

○Kohei Uno[1], Takenori Satomura[1,2], Norio Kurosawa[3], Haruhiko Sakuraba[4], Shin-ichiro Suye[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., [2]Life Sci. Univ. Fukui., [3]Soka Univ., [4]Fac. Agric., Kagawa Univ.)

Key words flavoprotein, thermostable enzyme, L-lactic acid, dye-linked dehydrogenase

3Ap05 分岐鎖ポリアミンが超好熱菌の RNA ポリメラーゼ複合体に及ぼす影響

○福田 萌子 [1], 家森 優佳 [1], 濱川 匡史 [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】ポリアミンとは分子内に 2 個以上のアミノ基をもつ脂肪族炭化水素の総称であり、細胞分裂から転写・翻訳など様々な生命現象に寄与する。超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* は至適温度を 85℃にもつアーキアであり、スペルミジン[34]のような直鎖ポリアミンに加え、分岐型構造をもつポリアミンである N^4-ビス（アミノプロピル）スペルミジン[3(3)(3)4]を有している。分岐鎖ポリアミン合成酵素遺伝子（BpsA）を破壊した *T. kodakarensis* では、90 〓 C 以上では野生株に比べ比増殖速度が著しく低下する。本研究では高温環境で重要な分岐鎖ポリアミンについて、超好熱菌細胞内における転写、特に RNA ポリメラーゼ（RNAP）複合体への寄与について研究を行った。
【方法と結果】トランスクリプトーム解析より、BpsA 破壊株では転写産物量が減少する遺伝子が存在することがわかった。このため RNAP が分岐鎖ポリアミンの影響を受けると推察された。そこで His タグ融合 RNAP を生産する *T. kodakarensis*（KUWL 株）及びさらにこの BpsA 破壊株（DBP4 株）を作製し、それぞれの株から RNAP を抽出した。DBP4 株由来 RNAP は KUWL 株 RNAP に比べて高温での転写活性が低く、熱安定性が低いという結果が得られた。また各 RNA ポリメラーゼを SDS-PAGE により分画し LC-MS 解析を行った。その結果、KUWL 株で検出されたリボソームタンパク質の多くが、DBP4 株では検出されなかった 1)。このことから野生株 *T. kodakarensis* 細胞内で RNAP とリボソームは共役しており、この共役には分岐鎖ポリアミンが必要であることが示唆された。

１) Yamori Y. et al., Amino Acids (2019) in press

Effect of branched-chain polyamine on RNA polymerase complex in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*.

○Moeko Fukuda[1], Yuka Yamori[1], Masahumi Hamakawa[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 *Thermococcus kodakarensis*, branched-chain polyamine, transcription, RNA polymerase

3Ap06 好塩性アーキアにおけるグリコールアルデヒド代謝酵素の同定と解析

○佐藤 喬章[1], 平田 晃右[1], 南 瞭子[2], 跡見 晴幸[1]
（[1]京大院・工, [2]京大・工）
takaakisato@sbchem.kyoto-u.ac.jp

【背景】
当研究室におけるこれまでの研究により、高塩濃度環境下に生育している好塩性アーキアの一部が有する新規ヌクレオシド分解経路の存在が示唆されている。本経路ではヌクレオシドのリボース部位がジヒドロキシアセトンリン酸とグリコールアルデヒドに代謝される。ジヒドロキシアセトンリン酸はさらに中央糖代謝経路により代謝され得るが、グリコールアルデヒドがどのように代謝されるかは不明であった。そこで、本研究では好塩性アーキアにおけるグリコールアルデヒド代謝酵素の同定を進めた。
【方法・結果】
好塩性アーキアのゲノム情報を基にグリコールアルデヒド代謝酵素をコードする遺伝子の候補を探索し、上記のヌクレオシド代謝経路を構成する遺伝子とオペロンを形成している遺伝子を見出した。この遺伝子を発現させた大腸菌の無細胞抽出液中の活性を解析したところ、その発現産物はグリコールアルデヒドを補酵素存在下で還元する活性を示すことが示唆された。しかし、大腸菌での発現量が低く、精製も困難であったため、好塩性アーキアの無細胞抽出液から各種カラムクロマトグラフィーにより目的タンパク質を精製することにした。その結果、グリコールアルデヒド還元活性を示すタンパク質をほぼ単一となるまで精製することができた。そこで精製酵素の生化学的解析を進めた。数種の基質に対する活性を検討したが、その中ではグリコールアルデヒドに対してのみ有意な活性を示し、高い基質特異性が示唆された。速度論的解析により各速度論的パラメーターも算出した。また、培地への各種ヌクレオシドの添加により、本酵素の細胞内における活性が上昇することも明らかにした。さらに、LC-MS 解析により精製酵素の同定を行った。予測とは異なり、元々候補として推定していたものとは異なる酵素であった。

Identification and functional analysis of an enzyme metabolizing glycolaldehyde in halophilic archaea

○Takaaki Sato[1], Kosuke Hirata[1], Ryoko Minami[2], Haruyuki Atomi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ., [2]Fac. Eng., Kyoto Univ.)

Key words halophile, archaea, nucleoside, metabolism

3Ap07 PL14 ファミリーに属する新規ウルバンリアーゼ

佐藤 嶺, 小林 慎太郎, 籾山 健太, ○大西 浩平
（高知大・農）
kouheio@kochi-u.ac.jp

緑藻は硫酸化多糖ウルバンを細胞壁構成成分として持つ。我々は 2 種類の緑藻、ミナミアオサとミナミアオノリから熱水抽出したウルバンを唯一の炭素源として生育する資化細菌を多数単離している。資化細菌は菌体外に多糖分解酵素であるウルバンリアーゼを分泌し、ウルバンをオリゴ糖化したのち、菌体内に取り込む。ゲノム配列解析の結果、いずれの資化細菌も polysaccharide lyase (PL)24 ならびに PL25 ファミリーに属するウルバンリアーゼを複数種保有していることが明らかとなっている。さらに、PL24 ファミリー酵素は C 末端側にウルバン結合領域を持つロング型と持たないショート型の 2 種類があることも判っている。一方、資化細菌が分泌する菌体外タンパク質を網羅的に解析した結果、菌体外にはロング型の PL24 ファミリー酵素が主要なウルバン分解酵素として存在していた。ところが、ミナミアオノリ由来ウルバンを基質としたときにのみ、ウルバン分解活性を示す分子質量 25 kDa の菌体外酵素が新たに検出された。しかも、本酵素はミナミアオノリ由来ウルバン資化細菌の培養上清にだけ存在していた。そこで、本酵素をコードする遺伝子の同定を試みたところ、PL14 ファミリーに属する新規のウルバンリアーゼであることが明らかとなった。本酵素遺伝子は、すべてのミナミアオノリ由来ウルバン資化細菌に存在しており、酵素活性の結果とよく一致していた。本酵素はこれまでに知られているいずれのウルバンリアーゼとも相同性を示さない。本酵素遺伝子をクローニングし大腸菌で発現、精製を行い、酵素の性質を調べた。新規ウルバンリアーゼはミナミアオサ由来ウルバンに対して反応性を全く示さなかった。一方、ミナミアオノリ由来ウルバンに対しては活性を有していたが、ロング型 PL24 ファミリー酵素とは異なるウルバン分解パターンを示した。

A novel ulvan lyase belonging to PL14 family

Ryo Satoh, Shintaro Kobayashi, Kenta Momiyama, ○Kouhei Ohnishi
(Fac. Agric. Agric. Sci. Prog., Kochi Univ.)

Key words polysaccharide-degrading enzyme, glycoside hydrolase, ulvan, substrate specificity

3Ap08 生細胞内分子クラウディング環境の再構成への試み

○田中 遼治, 青木 航, 植田 充美
（京大院・農）
miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景と目的】*in vitro* での酵素反応解析は、希薄溶液で行われてきた。しかし、細胞内は核酸・タンパク質などの高分子が高密度に夾雑したクラウディング環境である。細胞内で起きるクラウディング現象は酵素反応に様々な影響を及ぼすと考えられるので、生化学反応のさらなる理解のためには細胞内環境を模倣した *in vitro* 反応系での実験が必要である。しかし、このような反応系は作製できていない。そこで、細胞破砕液が反応系として利用されてきたが、細胞破砕液の高分子濃度・粘度は低く、細胞環境を正確に再現できていない。例えば、溶媒の除去によって細胞破砕液を濃縮する方法で高分子濃度を細胞に近づけたところ、粘度が細胞内より大幅に高くなるという課題があった[1]。正常な細胞内では、高分子濃度が 300-400 mg/mL と極めて高いが、代謝関連の機構が粘度上昇を抑制していることが示唆されている[2]。そこで本研究では、細胞破砕液の濃縮と代謝関連機構の再構成によって、細胞と同等の高分子濃度・粘度の *in vitro* 反応系を作製することを目指した。

【方法と結果】我々は、代謝に関連する要素の中でも特に ATP 合成酵素に注目した。その回転運動による物理的な攪拌が高濃度溶液の粘度上昇を抑制し、酵素反応を活性化するのではないかと仮説を立て、その検証を行った。初めに、凍結乾燥によって大腸菌破砕液を 2 時間濃縮して、タンパク質濃度の変化を測定した。また、濃縮に伴う粘度の増加を FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching)で評価し、GFP 分子の拡散係数の低下を確認した。さらに ATP 合成酵素を反転膜小胞として調製し、その粘度に与える影響を評価した。これらの結果をまとめて報告する[3]。

[1] Fujiwara et al, PLOS ONE 2013; 8(1):e54155, [2] Parry et al, Cell 2014; 156(1-2): 183-194, [3] Tanaka et al, submitted

Chanllenge of reconstruction of intracellular macromolecular crowding conditions

○Ryoji Tanaka, Wataru Aoki, Mitsuyoshi Ueda
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words molecular crowding, bottom-up reconstruction, FRAP, molecular motor

3Ap09 ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の酵素フマラーゼ (FumC)の生化学解析

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

【背景と目的】米国エネルギー省の定めるバイオリファイナリーでの重要な 12 品目にはコハク酸やフマル酸、リンゴ酸という C4 化合物が含まれる。フマラーゼは、TCA 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。しかし、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ため、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、フマル酸または L-リンゴ酸に対する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 Ala 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、フマル酸及び L-リンゴ酸に対する K_m はそれぞれ 0.244 mM、0.478 mM となり、L-リンゴ酸に対する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 415.1、90.3 s^{-1} mM^{-1} となった。*Sy*FumC_A314E では至適温度及び pH は違いがほとんど見られなかったが、フマル酸を基質としたときの k_{cat} が 101.2 s^{-1} から 37.8 s^{-1} へと低下した。このことは L-リンゴ酸を基質にした場合でも確認された。
以上より、今回改変した活性部位近傍のアミノ酸残基は触媒活性に重要な残基であると考察される。今後は他種シアノバクテリアのフマラーゼについても解析を行いたいと考えている。

Biochemical characterization of Fumarase C properties from a unicellular cyanobacterium demonstrates enzymatic activity altered by an amino acid substitution.

○Noriaki Katayama, Takashi Osanai
(Grad. Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words biochemistry, cyanobacteria, enzyme activity, TCA cycle

3Bp01 Domain structure and function of α-1,3-Glucanase from *Streptomyces thermodiastaticus* HF3-3

○Niphawan Panti[1], Vipavee Cherdvorapong[1], Wassana Suyotha[2], Kazuyoshi Takagi[3], Shigekazu Yano[4], Yosuke Toyotake[1], Mamoru Wakayama[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Dept. Indust Biotechnol., Fac. Agro Indust., Prince of Songkla Univ., [3]Dept. Applied Chem., Fac. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [4]Dept. Biochem. Engineer., Grad. Sci Engineer., Yamagata Univ.)
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

α-1,3-glucanase is an enzyme that hydrolyzes α-1,3-glucan, the main component of extracellular polysaccharides synthesized from sucrose by *Streptococcus mutan* via glycosyltransferases, component of dental plaque in human, also has been found in the cell wall of fungi. In previous study were determine the amino acid sequence of GH 87 α-1,3-glucanase from *Streptomyces thermodiastaticus* HF3-3 (Agl-ST2) which was categorized as new group of α-1,3-glucanase, multi-domains enzyme including N-terminal binding domain, carbohydrate binding module family 35, C-terminal catalytic domain and discoidin domain (DS), respectively. The comparison of Agl-ST2 with the related enzymes revealed high similarity to mycodextranase (85%), whereas had low homology with α-1,3-glucanase. But the properties indicated that Agl-ST2 belongs to α-1,3-glucanase. Since Agl-ST1 is generated from Agl-ST2 by truncation of DS region, the multi-domains of Agl-ST1 showed same as Agl-ST2 but without DS. In this study to understand domain structure and function of Agl-ST(1&2) in α-1,3-glucan hydrolysis, we are interested in determining each domain structure and function of the Agl-ST in the α-1,3-glucan binding and hydrolysis by constructing several domain deletions and site-directed mutation. The preliminary results of Agl-ST with site-directed mutation indicated low activities of hydrolysis α-1,3-glucan, while preparation of several domain deletions and the evaluation of their function are in the process of collecting data and analyzing.

Domain structure and function of α-1,3-Glucanase from *Streptomyces thermodiastaticus* HF3-3

○Niphawan Panti[1], Vipavee Cherdvorapong[1], Wassana Suyotha[2], Kazuyoshi Takagi[3], Shigekazu Yano[4], Yosuke Toyotake[1], Mamoru Wakayama[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Dept. Indust Biotechnol., Fac. Agro Indust., Prince of Songkla Univ., [3]Dept. Applied Chem., Fac. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [4]Dept. Biochem. Engineer., Grad. Sci Engineer., Yamagata Univ.)

Key words alpha-1, 3-glucanase, alpha-1, 3-glucan, alpha-1, 3-glucan-binding activity

3Bp02 Characterization of catalytic α-1,3-glucanase isozymes from *Paenibacillus glycanilyticus* FH11 by using *Brevibacillus* system; Essential for suppression and degradation of *Streptococcus mutans* biofilms

○Rattanaporn Intuy[1], Takao Hibi[2], Takafumi Itoh[2], Wassana Suyotha[3], Shigekazu Yano[4], Mamoru Wakayama[1]
([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Dept. Biosci. Fukui Prefectural Univ., [3]Dept. Indus. Biotech. Fac. Agro-indus. Prince of Songkla Univ., [4]Grad. Sch. Sci. Eng., Yamagata Univ.)
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

α-1,3-Glucan has been recognized as a virulence factor in dental caries. Two novel catalytic domains of α-1,3-glucanase isozyme genes were cloned from *P. glycanilyticus* strain FH11 and expressed in *Brevibacillus* system. The recombinant enzymes, in termed CatAgl-FH1 and CatAgl-FH2, were purified to homogeneity with specific activity 0.70 U/mg and 0.77 U/mg respectively. The molecular mass of enzyme was estimated 62 kDa by SDS-PAGE. Both recombinant enzymes exhibited the different properties. The optimal pH of CatAgl-FH1 and CatAgl-FH2 were 5.5 and 6.0, respectively. The pH stability of CatAgl-FH1 and CatAgl-FH2 were in a range of pH 4.0-11.0 and 4.5-9.0, respectively. The optimal temperature of CatAgl-FH1 and CatAgl-FH2 were 60°C and 55°C, respectively and they were stable until 60°C. Thin Layer chromatography revealed their mode of hydrolysis towards α-1,3-glucan was endo-cleavage pattern. The major products of CatAgl-FH1 were di- and trisaccharide but mainly trisaccharide was for CatAgl-FH2. Both enzymes showed high tolerance against high concentration of sodium fluoride. For *S. mutans* biofilms studies, both of recombinant enzymes inhibited biofilm formation via hydrolyzing α-1,3-glucan more than 80% compared to untreated biofilm at 16 h reaction time without affecting bacterial growth. Morover, CatAgl-FH1 was able to degrade formed biofilm approximately 70% while CatAgl-FH2 showed less than 40% at 16 h of reaction time. Therefore, these enzymes could be applied in oral hygiene products such as toothpaste.

Characterization of catalytic α-1,3-glucanase isozymes from *Paenibacillus glycanilyticus* FH11 by using *Brevibacillus* system; Essential for suppression and degradation of *Streptococcus mutans* biofilms

○Rattanaporn Intuy[1], Takao Hibi[2], Takafumi Itoh[2], Wassana Suyotha[3], Shigekazu Yano[4], Mamoru Wakayama[1]
([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Dept. Biosci. Fukui Prefectural Univ., [3]Dept. Indus. Biotech. Fac. Agro-indus. Prince of Songkla Univ., [4]Grad. Sch. Sci. Eng., Yamagata Univ.)

Key words *Streptococcus mutans*, alpha-1, 3-glucanase, catalytic domains, *Brevibacillus*

3Bp03 *Spirochaeta thermophila* 由来 β-1,3 オリゴグルカンホスホリラーゼの諸性質

○藤野 早瑛, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司
（阪府大院・生環科）
monger@biochem.osakafu-u.ac.jp

【背景・目的】グルコース（Glc）が β-1,3 結合したラミナリオリゴ糖（LO）は機能性食品などへの応用が期待されており、安価な合成法が望まれている。本研究では LO を合成する方法として、ホスホリラーゼに着目した。LO に作用するホスホリラーゼは通常、ラミナリビオースの加リン酸分解反応とその逆反応を触媒するラミナリビオースホスホリラーゼとラミナリトリオース以上の LO の加リン酸分解反応とその逆反応を触媒する β-1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼ（LOP）に大別される。GH149 に属する *Euglena gracilis* 由来の LOP（EgLOP）は LO のみならず、安価な Glc も糖受容体として認識する非常に有用な酵素であるが、安定性に問題があった。そこで本研究では、好熱菌 *Spirochaeta thermophila* 由来 EgLOP ホモログについて大腸菌を用いて異種発現を行い、発現産物の機能解析を行うことを目的とした。
【方法・結果】*S. thermophila* から PCR により目的遺伝子を取得した。C 末端に His-tag が付加されるよう発現プラスミドを構築し、宿主を大腸菌 JM109（DE3）とすることで目的遺伝子が可溶性タンパク質として発現した。この発現産物を StLOP と命名し、アフィニティクロマトグラフィーおよび疎水クロマトグラフィーによって電気泳動的に単一になるまで精製した。本酵素はゲル濾過による分子量測定の結果、単量体であることが示された。また 55℃、30 分の処理で約 80％以上の残存活性を示し、ホスホリラーゼとしては比較的熱安定性が高いことが判明した。脱リン酸合成反応のカイネティックパラメータを測定した結果、触媒効率が他の EgLOP ホモログよりも高く、LO 合成酵素として有用であることが示された。また、基質の重合度が高くなるにつれて触媒効率が低下し、短いオリゴ糖合成に適していることが示唆された。

Characterization of β-1,3-oligoglucan phosphorylase from *Spirochaeta thermophila*

○Sae Fujino, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words *Spirochaeta*, phosphorylase, laminarioligosaccharide, kinetics

3Bp04 麹菌 *Aspergillus oryzae* が生産するヘミセルラーゼの協調的作用

○松沢 智彦, 矢追 克郎
（産総研・生物プロセス）
matsuzawa-tomohiko@aist.go.jp

[背景と目的] 糸状菌は植物等が生産する多糖類を分解・資化するために様々な酵素を分泌している。植物が生産する多糖類は構造が多種多様であり、複雑な枝分かれ構造を有している。例えば、ヘミセルロースの一種であるキシログルカンは beta-1,4-グルカン主鎖にキシロースが規則的に枝分かれした構造を基本とし、さらにキシロース側鎖にはガラクトースなどの糖が付加されている。このような複雑な多糖類は単一の酵素のみでは分解できず、様々な酵素の協調的作用が必要不可欠である。我々はキシログルカンの分解に関与する麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来イソプリメベロース生成酵素（IpeA）をコードする遺伝子を同定した。本酵素はキシログルカンオリゴ糖の非還元末端のイソプリメベロース（alpha-D-xylopyranosyl-(1→6)-D-glucopyranose）ユニットを認識して遊離するユニークな加水分解酵素であり、キシログルカンの分解に重要な役割を担っている。我々は IpeA と協調的に働く酵素の探索を行い、麹菌におけるキシログルカン分解機構の解明を目指した。
[方法と結果] IpeA をコードする遺伝子はキシログルカンオリゴ糖存在下において劇的に発現が誘導される。本遺伝子と同調的に発現している遺伝子を探索したところ、beta-ガラクトシダーゼ（LacA）をコードする遺伝子がキシログルカンオリゴ糖存在下において発現が誘導されることを見出した。LacA の基質特異性を調べた結果、本酵素はキシログルカンオリゴ糖のガラクトース側鎖を効率的に遊離させることが明らかになった。また、LacA と IpeA が相互依存的にキシログルカンオリゴ糖を分解する機構を見出したので報告する。

Synergetic effects of two hemicellulases in *Aspergillus oryzae*

○Tomohiko Matsuzawa, Katsuro Yaoi
(BPRI, AIST)

Key words *Aspergillus oryzae*, hemicellulose, beta-galactosidase, enzyme

3Bp05 *Talaromyces cellulolyticus* 由来グルクロノキシラナーゼの機能解析

○中道 優介, Fouquet Thierry, 伊藤 祥太郎, 渡邊 真宏, 松鹿 昭則, 井上 宏之
（産総研・機能化学）
nakamichi-y@aist.go.jp

メチルグルクロン酸側鎖 (MeGlcA) 依存的にキシラン主鎖を分解するグルクロノキシラナーゼは、糖質加水分解酵素ファミリー 30 (GH30) のサブファミリー 7 並びに 8 に分類される。細菌由来の GH30-8 キシラナーゼと比較して、主として真菌類に由来する GH30-7 キシラナーゼの機能についての知見は乏しく、立体構造に関する情報は全く無い。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 GH30-7 キシラナーゼ Xyn30B の機能と立体構造を明らかにした。
Xyn30B は、グルクロノキシランを基質として、キシロース主鎖の還元末端から 2 糖目に MeGlcA を保持する様々な長さの酸性キシロオリゴ糖 ($MeGlcA^2Xyl_n$, n > 2) を生成した。一方、Xyn30B によるグルクロノキシランの分解が進行すると、反応液中にキシロビオース (Xyl_2) が蓄積し、続いてキシロテトラオース (Xyl_4) 並びにキシロヘキサオース (Xyl_6) が生成した。従って、Xyn30B は、グルクロノキシラナーゼ活性に加えて、キシロオリゴ糖の非還元末端からキシロビオースを遊離または転移させるキシロビオヒドロラーゼ活性を示す新規なキシラナーゼであることが分かった。Xyn30B の作用機構を明らかにするため、結晶構造を決定した。Xyn30B において、Arg-46 がグルクロノキシラナーゼ活性に重要であり、本アミノ酸残基が他の GH30-7 グルクロノキシラナーゼにも保存されていることを見出した。また、基質結合部位に配置した Xyn30B 特有のループ構造が、キシロビオヒドロラーゼ活性の発現に必要であることが示唆された。

Functional analysis of glucuronoxylanase from *Talaromyces cellulolyticus*

○Yusuke Nakamichi, Thierry Fouquet, Shotaro Ito, Masahiro Watanabe, Akinori Matsushika, Hiroyuki Inoue
(Inst. Sustain. Chem., AIST)

Key words *Talaromyces cellulolyticus*, glucuronoxylanase, xylooligosaccharide, X-ray crystallography

3Bp06 好冷性海洋細菌 *Psychroflexus torquis* 由来 β-1,3-キシラナーゼの酵素化学的諸性質

○谷口 瑞季 [1], 工藤 基徳 [2], 荻野 千秋 [3], 近藤 昭彦 [2,3], 田丸 浩 [1], 青木 恭彦 [4], 岡崎 文美 [1]
（[1]三重大院・生資, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]神戸大院・工, [4]三重大院・地域イノベ）
okazaki@bio.mie-u.ac.jp

【目的】β-1,3-キシラナーゼ（EC 3.2.1.32）は、海藻特有の多糖である β-1,3-キシランを加水分解するエンド型の酵素であり、海藻バイオマスの糖化およびガン細胞へのアポトーシス誘導効果を有する β-1,3-キシロオリゴ糖の生産などに有用である。本研究では、産業利用上有用な好冷性 β-1,3-キシラナーゼの開発を目的とし、南極域の海氷から分離された好冷性海洋細菌 *Psychroflexus torquis* 由来 β-1,3-キシラナーゼの酵素化学的諸性質の解明を試みた。
【方法】*Psychroflexus torquis* ATCC 700755 のゲノム DNA から β-1,3-キシラナーゼ遺伝子（*P.t.* xyn26A）を PCR により増幅し、pCold-ProS2 ベクターに連結した。構築したプラスミドベクターを大腸菌 BL21(DE3)に導入し、ProS2 タグとの融合タンパク質として発現させ、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）担体により精製した。β-1,3-キシランを基質として遊離した還元糖量を定量し、酵素活性を測定した。
【結果】発現誘導した組換え大腸菌内に目的タンパク質の生産が確認された。菌体を超音波破砕したところ、目的タンパク質が凝集性を示した。そこで、終濃度 500 mM のアルギニン塩酸塩および塩化ナトリウムの共存下において凝集を抑制し、IMAC 担体により精製した。次いで、ProS2 タグを切断し、精製組換え酵素（*P.t.* Xyn26A）を得た。本酵素は β-1,3-キシランに特異的に作用し、至適 pH は 6.0 付近、至適温度は 35 度付近であった。また、本酵素は反応の初期から β-1,3-キシロビオースを主に生成したことから、エンドプロセッシブ型の作用機構を有することが示唆された。

Biochemical characterization of a psychrophilic β-1,3-xylanase from Antarctic sea-ice bacterium, *Psychroflexus torquis*

○Mizuki Taniguchi[1], Motonori Kudou[2], Chiaki Ogino[3], Akihiko Kondo[2,3], Yutaka Tamaru[1], Takahiko Aoki[4], Fumiyoshi Okazaki[1]
([1]Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [4]Grad. Sch. Region. Innov. Stud., Mie Univ.)

Key words beta-1, 3-xylanase, beta-1, 3-xylan, *Psychroflexus torquis*, psychrophile

3Bp07 κ-カラギナーゼ生産菌の分離およびその酵素の性質

○倉掛 昌裕, 石本 圭亮, 山岡 美桜, 筒井 荘周, 長岡 洋大
（福山大・生命工）
kurakake@fukuyama-u.ac.jp

【背景と目的】紅藻類から得られる κ-カラギーナンはゲル化剤として広く食品の添加物として利用されている。非消化性の食物繊維であり、コレステロールの排出作用、整腸作用等の機能性も有している。この κ-カラギーナンを酵素法により分解することで液状の食物繊維へ、さらに分解することでオリゴ糖となり、その用途はさらに広がることが期待できる。本研究では土壌から κ-カラギーナン分解菌を分離することで、κ-カラギナーゼの探索を行い、その酵素の性質について調べた。
【方法】1%κ-カラギーナン、1.5%寒天の平板培地にて土壌から κ-カラギーナン分解菌の分離を行った。分離菌を φ18 mm×180 mm 試験管の 0.5%κ-カラギーナン、0.25%酵母エキスの液体培地 3 ml に植菌し、レシプロ振とう 150 回/分、30 ℃で 3 日間培養した。遠心分離 (3000rpm、10 分間)した上清 0.2ml を 1%κ-カラギーナン 1ml に加え混ぜ、pH6 、40℃で 60 分間反応させた。氷水中に 30 分間保持することでゲル化させた。遠心分離 (3000rpm、2 分間) し、上澄みの糖濃度を DNS（3,5-ジニトロサリチル酸）法により求め酵素活性を算出した。また上清を取り除き、残存ゲルの重量を測定した。
【結果と考察】土壌からの κ-カラギーナン分解菌の分離の結果、生育の良いものとして菌株 33 株が得られ、液体培養において細菌 Y35 株に κ-カラギナーゼ生産性が認められた。酵素生産条件を調べるため培養液の炭素源を κ-カラギーナンの他に λ-カラギーナン、ラクトース、ガラクトース、グルコース等として培養したところ、λ-カラギ―ナンによる酵素生産性が高いことがわかった。さらに培養条件について検討し、生産酵素の性質について調べた。

Isolation of κ-carrageenase-producing strain from soil and the enzymatic properties.

○Masahiro Kurakake, Keisuke Ishimoto, Mio Yamaoka, Sousyu Tsutsui, Youdai Nagaoka
(Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ.)

Key words carrageenan, carrageenase, enzymatic hydrolysis, fiber

3Bp08 糸状菌 *Aspergillus nidulans* がペクチン応答的に生産する細胞外酵素の解析

○木島 尚輝 [1], 山口 愛彩 [1], 大堀 沙貴子 [1], 鈴木 裕満 [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】 植物バイオマスの主成分である多糖類の分解の速度および効率が高まれば、バイオ燃料生産やバイオリファイナリーなどの産業分野に大きく貢献することができる。糸状菌 *Aspergillus nidulans* はデンプン、セルロース、ヘミセルロース、ペクチン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研究が盛んに行われている。本研究では、ペクチンを唯一の炭素源に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解析した。また、同定されたタンパク質の中で機能が明らかになっていないタンパク質 (Hypothetical Protein ; HP) や、既知の CAZyme (Carbohydrate-Active enZymes；糖質関連酵素) に分類されているがその機能が証明されていないタンパク質を選抜し、それらの機能を解析した。
【方法および結果】 ペクチンを唯一の炭素源にした培地で *A. nidulans* を所定時間培養後、菌体をろ別した。得られた培養ろ液から 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、総数で 304 種のタンパク質が同定され、その内の 55 種が HP であった。また、ペクチンの分解に関わる酵素である Glycoside Hydrolase family 78 (GH78) や GH105、 Polysaccharide Lyase family 1 (PL1) 、PL3 、PL4 、PL9 に属するタンパク質が発現していた。いくつかの HP をメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いて異種発現させ、機能解析をした。その結果、新規ラムノガラクツロナン分解酵素などを見出すことに成功した。

Secretome analysis of *Aspergillus nidulans* grown on pectin

○Naoki Kijima[1], Aya Yamaguchi[1], Sakiko Ohori[1], Hiromitsu Suzuki[1], Taichi Takasuka[2], Chiaki Hori[3], Motoyuki Shimizu[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

3Bp09 微生物由来耐熱性 β-アミラーゼの性質と X 線結晶構造解析

○田中 真奈, 西村 重徳, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司
（阪府大院・生環科）
monger@biochem.osakafu-u.ac.jp

【背景と目的】 β-アミラーゼはデンプンを非還元末端からマルトース単位に加水分解する酵素であり、食品産業にて利用される。近年、酵素の主な獲得源である穀物の価格が高騰傾向にあることやマルトース製造段階で熱処理が行われることから、安定供給が可能でかつ耐熱性を有する β-アミラーゼの獲得が望まれる。
当研究室において土壌を分離源として熱安定性を示す β-アミラーゼ生産菌のスクリーニングが行われ *Bacillus* 属に属する一菌株が単離された。そこで、本研究では本菌株由来 β-アミラーゼの諸性質を検討するとともに、X 線結晶構造解析によって熱安定性を決定する構造的要因について知見を得ることで、産業応用に資する β-アミラーゼを創製することを目的とした。
【結果】 高効率分泌発現を特徴とする *Brevibacillus* を宿主とし、本酵素遺伝子を発現させたところ、高い生産性が確認できた。得られた培養上清を用いて酵素を精製し、諸性質を検討した。その結果、本酵素の至適温度は 50℃で、60℃、60 分間の処理後も安定であり、市販品酵素で最も熱安定性が高いとされるダイズ由来酵素よりも安定性に優れていた。また産業利用を考慮して高温条件で生デンプン分解を調べた結果、植物由来酵素と比較して高い生デンプン分解活性を有することが判明した。本酵素の高い熱安定性に関与する構造的要因を明らかにするため、精製酵素の結晶化及び X 線結晶構造解析を行った。その結果、1.8Å の解像度で立体構造の決定に成功した。本酵素は$(\beta/\alpha)_8$ バレル構造からなる触媒ドメインと CBM20 に分類されるスターチ結合ドメインを有し、熱安定性の低い *Bacillus cereus* var. *mycoides* 由来 β-アミラーゼ(identity : 52%)と非常に類似した立体構造であることが判明した。両者の構造の類似性より、本酵素が有する耐熱性は微小な構造の違いに起因するものであると推察された。

Characterization and X-ray crystallography of thermostable beta-amylase from microbe.

○Mana Tanaka, Shigenori Nishimura, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words beta-amylase, thermostable enzyme, *Bacillus*, X-ray crystallography

3Cp01 天然構造特異的認識モノクローナル抗体の作製とその評価

○磯﨑 勇志, 湊元 幹太, 冨田 昌弘
（三重大院・工）
tomita@chem.mie-u.ac.jp

幅広い分野で利用されているモノクローナル抗体は、近年、分子標的治療薬 (抗体医薬) として注目される。しかし、現在のモノクローナル抗体の多くは、目的抗原の一次配列を認識しており、その天然構造 (立体構造) を認識することは極めて困難である。目的抗原の天然構造を認識することができれば、今までにない革新的な分子標的治療薬として期待できる。
そこで、私達の研究室では、ハイブリドーマ技術を応用した『立体構造特異的ターゲティング (SST) 法』を開発した。本技術の最大のポイントは、DNA 免疫によって感作された立体構造認識 B 細胞を目的抗原発現ミエローマ細胞によって、抗原抗体反応に基づき選択するところにある。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融合し、抗体産生ハイブリドーマを作製する。その結果、新規法によって得られるモノクローナル抗体は目的抗原の立体構造を認識している可能性が極めて高いと考えられる。
本研究では、創薬のターゲットとして注目されている GPCR の一つである huCRHR1 (ヒト Corticotropin-releasing hormone receptor 1) をモデルタンパク質として研究を進めた。SST 法に基づき目的の抗体産生ハイブリドーマを作製した後、限界希釈法を利用してクローン化を行い、プロテイン A を用いて精製を行った。
精製モノクローナル抗体は、Cell-ELISA 法、免疫蛍光染色法、ウェスタンブロッティング法によって評価を行った。その結果、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞への特異的結合が確認された。一方、ウェスタンブロッティング法においては、通常のモノクローナル抗体では変性抗原への結合が確認されたが、精製モノクローナル抗体では確認できなかった。これらの結果から、本研究で作製されたモノクローナル抗体は huCRHR1 の立体構造を特異的に認識している可能性が示された。

Selective production of native structure-specific monoclonal antibodies and their evaluation

○Yushi Isozaki, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita
(Grad. Sch. Eng., Mie Univ.)

Key words DNA immunization, GPCR, hybridoma technology, stereospecific monoclonal antibody

3Cp02 抗体断片の熱安定性向上を目的としたバイオ情報を活用したライブラリーデザインサイクルの提案

○服部 修平, 本田 亜由美, 二井手 哲平, 中澤 光, 梅津 光央
（東北大院・工）
mitsuo@tohoku.ac.jp

抗体の熱安定性向上を試みる際に、抗体の可変領域断片(Fv)の相補性決定領域(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ことに着目し、FR のレアなアミノ酸残基を出現頻度の高いアミノ酸に置換する手法が報告されている。しかし、標的認識に寄与しない FR に変異導入を行うことで予期しない結合活性の低下が起こりうる。そこで、設計したライブラリーをスクリーニングすることにより目的機能を有するタンパク質を取得する進化分子工学的な手法を用いることで、変異体の特性をモニタリングしながら抗体改変が可能となる。本研究では、バイオ情報から変異導入部位の決定と候補のアミノ酸の選抜を行い、設計した小規模ライブラリーのスクリーニングを行うサイクルを繰り返すことで抗体断片の熱安定性向上を試みた。
我々は、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、安定性が向上することで結合力が低下してしまうことが示された。そこで、結合活性を維持した状態で安定性が向上した変異体の取得を試みた。出現頻度をしきい値に設定し、段階的に野生型か出現頻度の高いアミノ酸かを選択する小規模ライブラリーのスクリーニングを行うサイクルを繰り返し行うことで、新規変異体の取得を行った。その結果、結合活性を維持した状態で Tm 値が 15 度以上向上した変異体の取得に成功した。

Bioinformatics library design cycle: improvement of thermostability of antibody fragment

○Shuhei Hattori, Ayumi Honda, Teppei Niide, Hikaru Nakazawa, Mitsuo Umetsu
(Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words antibody, bioinformatics, thermostability, mutagenesis

3Cp03 DlagArt 法を用いた T-cell recruiting 抗体取得のための迅速確実スクリーニング

杉山 在生人, ○中澤 光, 伊藤 智之, 梅津 光央
（東北大院・工）
mitsuo@tohoku.ac.jp

抗体医薬開発は進化の一途を辿っており、種々の治療に適した新規抗体構造体の開発が進められている。中でも T-cell recruiting 抗体の開発は、がん治療薬開発に直結する構造体の 1 つとして注力されている。T-cell recruiting 抗体を開発するために、これまでは、大規模 Fv 変異体提示ファージを作製し、結合活性スクリーニングしたのち、性能の良い数クローンについて、1 つ 1 つ遺伝子組換えによって T-cell recruiting 抗体化し、がん傷害機能を評価していた。手間がかかる上に結合力でのみスクリーニングを行うため偽クローンを取得する例もしばしば見られた。このことから、多検体の T-cell recruiting 抗体について、がん傷害性を指標に評価できるスクリーニング手法の開発が急務であった。
本研究では、以前に作製した培地上清中でも目的の抗体量を正確に測定できる Tag-sandwitchELISA を用いて、培地上清での細胞傷害活性試験と組み合わせることでハイスループットな T-cell recruiting 抗体スクリーニング法（Domain library approach for generating Antibody recruiting T-cell 法：DlagArt 法）を完成させた。この手法を用いて二重二価な T-cell recruiting 抗体（BiBian）をモデルとして細胞傷害活性試験にてスクリーニングを行い。迅速に 88 種から 5 種の Her2 結合性変異体を取得した。

Rapid and sure screening process of T-cell recruiting antibody using DlagArt method

Aruto Sugiyama, ○Hikaru Nakazawa, Tomoyuki Ito, Mitsuo Umetsu
(Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words antibody, screening, phage display, protein engineering

3Cp04 機能的ナノボディ探索に向けた酵母表層提示システムの最適化

○梶原 果穂 [1,2], 青木 航 [1,2], 植田 充美 [1,2]
（[1]京大院・農, [2]JST・CREST）
kajiwara.kaho.32a@st.kyoto-u.ac.jp

酵母表層提示システムは、新しいタンパク質工学のために広く使用されてはじめているスクリーニングプラットフォームである。この方法では、提示タンパク質の発現量はプロモーターによって調節され、分泌効率は分泌シグナルに影響を受ける。また、提示タンパク質の基質へのアクセサビリティおよび酵素活性はアンカータンパク質の長さに影響を受ける。すなわち、目的に応じてシステムを最適化することが必要である。本研究では、ラクダ科動物が持つ単鎖抗体の可変部位であるナノボディの変異体ライブラリーを評価するために、酵母表層提示システムの最適化を行った。
我々はモデルとして抗ニワトリ卵白リゾチームナノボディ（HEN Nb）を用いた[1]。HEN Nb の表層提示を最適化するために、プロモーター・分泌シグナル・足場タンパク質の組み合わせを検討した。プロモーターとして、恒常発現プロモーターまたはガラクトース誘導性プロモーターを比較した。また、アンカータンパク質の長さとして 320 または 649 アミノ酸を、分泌シグナルとしてグルコアミラーゼまたはアルファプレタンパク質由来の配列を比較した。それぞれの酵母株に対して、HA-tag に対する免疫染色により総提示量を、蛍光標識リゾチームを用いた染色によりアクセサビリティと活性を評価したので、その結果をまとめて報告する。本研究で得られた結果は、ナノボディの活用に最適な酵母表層提示システムの開発につながると期待される[2]。

[1] Lauwereys et al. The EMBO Journal. 1998. 17: 3512-3520.
[2] Kajiwara et al. submitted.

Optimization of the yeast surface display system for screening of functional nanobodies

○Kaho Kajiwara[1,2], Wataru Aoki[1,2], Mitsuyoshi Ueda[1,2]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]CREST, JST)

Key words yeast surface display, protein engineering, nanobody, library

3Cp05 ペプチドバーコードを付加した抗体の結合能の定量評価

○松崎 友星 [1,2], 青木 航 [1,2], 植田 充美 [1,2]
（[1]京大院・農・応用生命, [2]JST・CREST）
miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景】 ファージや酵母を用いた抗体ディスプレイ系は、ハイスループットに抗体を取得するための優れた方法論であるが、弱点もある。例えば、提示された抗体は安定化されることが多く、遊離状態の抗体と異なる性質を示すことがある。そこで、遊離状態の抗体の結合能をハイスループットに評価するための新規方法論「ペプチドバーコーディング法」を開発してきた[1]。本手法では、DNA バーコードを付加した抗体遺伝子ライブラリーを発現させ、DNA バーコードに対応するペプチドバーコードとの融合抗体ライブラリーを取得する。次に、結合能の高い抗体からペプチドバーコードを切り出し、質量分析機で同定する。本手法は、遊離状態の抗体の結合能を評価できるため、より優れた抗体スクリーニング法になる可能性がある。本研究では、ペプチドバーコーディングの拡張を目的として、ペプチドバーコードを付加した抗 GFP ナノボディの定量アラニンスキャニングを試みた。
【方法と結果】 6 つの異なるペプチドバーコードをそれぞれ付加した抗 GFP ナノボディをメタノール資化性酵母で分泌発現させ、解離定数を測定した。これらの抗 GFP ナノボディの解離定数は同程度であり、ペプチドバーコードの付加は抗体の結合能に影響を与えないと考えられた。また、抗 GFP ナノボディの 5 つのアラニン置換変異体を作製し、解離定数を測定した。その結果、結合能が変化した抗 GFP ナノボディ変異体が得られた。これらの抗 GFP ナノボディのアラニン置換変異体にそれぞれペプチドバーコードを付加し、GFP との一斉結合アッセイを行った。結合したナノボディからペプチドバーコードを切り出し、質量分析機で定量分析することで、抗体の結合能の定量評価が可能となった。これらの結果をまとめて報告する[2]。

[1]Miyamoto et al., PLOS ONE, 2019, 14(4): e0215993.
[2]Matsuzaki et al., submitted

Quantitative evaluation of affinities of antibodies fused with peptide barcodes

○Yusei Matsuzaki[1,2], Wataru Aoki[1,2], Mitsuyoshi Ueda[1,2]
([1]App. Life Sci., Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ., [2]CREST, JST)

Key words peptide barcoding, nanobody, yeast, alanine scanning

3Cp06 アルカリフォスファターゼ融合 scFv を用いたモノクローナル抗体樹立

○加藤 三恵子 [1], 羽生 義郎 [2]
（[1]バイオピーク, [2]産総研・バイオメディカル）
mieko.kato@bio-peak.com

【背景】我々は、組換え技術を利用し、効率的にモノクローナル抗体を樹立できる抗体ダイレクトクローニング法 ™ を開発した。本法は、大腸菌に一本鎖抗体(scFv）の発現ベクターを導入し、抗原を固定したメンブレン上にコロニーを形成させるとともに発現誘導し、陽性クローンの同定とクローニングを同時に行なうことにより、簡便に目的抗体を取得できる。
【目的】抗体ダイレクトクローニング法 ™ は、陽性クローンが産生した抗原特異的 scFv の検出に、scFv に付加したタグを認識する酵素標識 2 次抗体を用いる。この検出ステップには長時間を要し、2 次抗体に由来するバックグラウンドや偽陽性がスクリーニングの効率を低下させている。そこで、scFv の N 端にアルカリフォスファターゼ(AP)を融合させ直接検出することで、目的 scFv の検出に 2 次抗体を必要としないシステムを開発することとした。
【方法】初めに、抗マウス IgG scFv の N 端に AP を融合した発現ベクターを作製し、大腸菌に導入後、融合させた AP を直接検出することにより、コロニーの同定が可能かどうかの検討を行った。次いで、ウサギにマウス IgG を免疫した脾臓より調整した抗体遺伝子に、AP を融合した抗マウス IgG scFv 発現ベクターライブラリーを作製し、大腸菌に導入後、2 次抗体を使用せず抗体ダイレクトクローニング法 ™ 実施し、抗マウスモノクローナル抗体の樹立を試みた。
【結果】2 次抗体由来のバックグラウンドや偽陽性が低減したことにより、短時間かつ正確に新規モノクローナル抗体を樹立することが可能となった。さらに、scFv に融合させた AP を直接検出することから、2 次抗体を用いることによる反応の増幅の影響を受けないため、目的抗体の親和性や産生量等の性質も、スクリーニングと同時に評価できるようになった。

Establishing the monoclonal antibody by screening Alkalinephosphatase-scFv library

○Mieko Kato[1], Yoshiro Hanyu[2]
([1]Bio-peak Co., Ltd., [2]Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words monoclonal antibody, screening, scFv, alkaline phosphatase

3Dp01 超音波処理を用いて低分子化した Schizophyllan の抗アレルギー活性

○湯浅 凌我, 高野 真希, 星野 一宏
（富山大院・理工・生命工）
khoshino@sus.u-toyama.ac.jp

【緒言】Schizophyllan (SPG)は担子菌 *Schizophyllum commune* が生産する β1-3, 1-6 glucan であり、従来、抗がん剤や免疫増強剤として使用されてきた。しかし、SPG は 10^6-10^7 の分子量を有することから難溶性であり、かつ汎用性が低く、活用が難しいことが指摘されてきた。近年では、生理活性を有する低分子化多糖類が注目されている。そこで、新規生理活性の探索を目的として低分子化 SPG (LSPG)に着目した。本研究では、超音波処理を行うことにより LSPG を生成することを検討するとともに、LSPG の抗アレルギー活性を評価した。
【方法】*S. commune* を 8 日間好気振とう培養し、培養液中の生成 SPG をメタノール沈殿で回収した。SPG の低分子化は 0.4% (w/v)の SPG 水溶液に対して超音波処理することで行った。LSPG はさらに GFC を用いて分子量の異なる Fraction A-E に分画した。LSPG の抗アレルギー活性は RBL-2H3 細胞を用いた β-Hexosaminidase (β-Hex)放出率の比較より評価した。
【結果】SPG に対して超音波処理を行った結果、平均分子量は処理時間 30 min で 8.9×10^5 まで低下した。次に、この LSPG および SPG の添加による、RBL-2H3 細胞を用いた β-Hex 放出試験を行った結果、SPG の β-Hex 放出率が無添加と比較して増加した。一方、LSPG は 12%放出率が減少した。さらに、この LSPG を GFC によって Fraction A-E に分画した。これら分画の β-Hex 放出試験を行った結果、平均分子量 2.1×10^4 を有する Fraction C は 67%放出率を減少させることができた。また、脱顆粒におけるサイトカインの発現について、IL-4, IL-13 および TNF-α の遺伝子発現を RT-qPCR により解析した結果、Fraction C 添加時に IL-4 は増加し、IL-13 は減少した。現在、脱顆粒におけるサイトカインの発現および細胞内 Ca^{2+} について詳細に検討中である。

Anti-allergy effect of low-molecule Schizophyllan cleaved by ultrasonic treatment

○Ryoga Yuasa, Maki Takano, Kazuhiro Hoshino
(Grad. Sch. Sci. Eng., Univ. Toyama)

Key words anti-allergy, ultrasonic treatment, Schizophyllan

3Dp02 カチオン性ペプチド Poly(ε-L-lysine) のカルボジイミド架橋反応による修飾： 構造解析および抗菌性分散剤としての特性評価

○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】*Streptomyces* 属放線菌が生産する Poly(ε-L-lysine)（ε-PL）は生体適合性、抗菌活性、凝集活性等を示す生分解性のポリカチオンである。当研究室では ε-PL が静電反発力に基づく分散能を示すことを見出し、種々の産業分野で利用されている分散剤に対して、ε-PL が生分解性の代替材料となる可能性を報告した。本研究では、より広範な条件での利用、分散能の向上を目指し、ε-PL 分子間の架橋重合体を調製した。架橋化により、ε-PL の静電反発力に加え、ポリマー鎖間の斥力の増大による分散安定化を期待した。
【方法】水中、架橋補助剤（*N*-Hydroxysulfosuccinimide, Sulfo-NHS）存在下で ε-PL（n = 22-36, M_w/M_n = 1.01, JNC(株)）を 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide（EDC）と反応させることで、架橋重合化 ε-PL を合成した。得られた架橋体の分子量を SDS-PAGE より見積った。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の架橋化 ε-PL を加え、遠心分離（75 × g, 4 min）後の上層の残留濁度（550 nm）を測定し、分散能を評価した。
【結果と考察】Sulfo-NHS との反応を pH 4.8-5.5、また EDC ・ HCl 添加時に pH 7.6-8.0 に制御し得られた架橋体について、SDS-PAGE 解析でラダー状に数量体まで高分子量化したバンドが確認できた。また、原料 ε-PL よりも見かけ上、低分子量側にバンドの広がりを示す反応条件も見出せ、分子内架橋反応が優先したことが示唆された。架橋二-四量体 ε-PL のカオリン懸濁液に対する分散能は原料の ε-PL と同程度であった。また、架橋体化した ε-PL の抗菌性についても検討した。

Modification of a cationic peptide poly(ε-L-lysine) by carbodiimide cross-linking reaction: characterization of the structure and antimicrobial dispersant properties

○Masateru Takeuchi, Munenori Takehara
(Dept. Mater. Sci., Grad. Sch. Eng., Univ. Shiga Pref.)

Key words poly(epsilon-L-lysine), biodegradable dispersant, antimicrobial, cross-linking

3Dp03 *N*-アシル化ポリ(ε-L-リシン)誘導体の合成と抗菌活性の評価

○吉田 修[1], 松井 旺大[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* 属放線菌が生合成する Poly(ε-L-lysine) （ε-PL）は、L-lysine 残基のみで構成されるカチオン性ホモポリマーである。ε-PL は幅広い抗菌スペクトルを有する生体適合性のペプチドであり、安全性の高い新規の抗菌剤として注目されている。抗菌活性の発現において、ε-PL のカチオン性は重要な役割を担っていると考えられるが、その作用機構の詳細は不明である。本研究では、*N*-アシル化 ε-PL を合成し、それらの抗菌活性試験を行い、抗菌活性におけるカチオン性の寄与、また置換基の効果について調査することを目的とした。
【方法】 中重合度体 ε-PL（n = 22-36, JNC(株)）を無水酢酸、γ-ブチロラクトンまたは無水コハク酸と加熱還流し（50-80 °C, 1-6 h）、*N*-アシル化 ε-PL 誘導体を合成した。被検菌として *E. coli* NBRC 3301、*B. subtilis* NBRC 3335、*S. cerevisiae* BY4741 を用いた。種々の濃度の ε-PL 誘導体を含む栄養培地にて各菌株を 24 h 旋回培養を行ない、OD_{660} を測定することで、各菌株に対する ε-PL 誘導体の IC_{50} を評価した。
【結果と考察】三種の異なる *N*-アシル化 ε-PL 誘導体をそれぞれ修飾率 10-90％の範囲で得た。いずれの ε-PL 誘導体においても抗菌活性が顕著に低下したことから、抗菌活性の発現にはポリマーのカチオン性が寄与していることが強く示唆された。このとき、導入した置換基の違いにより活性低下の程度は異なったものの、*E. coli*、*B. subtilis*、*S. cerevisiae* の順に、抗菌活性の低下の程度が大きい傾向が得られた。*E. coli* に対しては中重合度体の ε-PL が、また *S. cerevisiae* に対しては低重合度体（n = 5-20）が、有意に高い抗菌活性示すことが報告されていることから、菌株間の感受性の差は *N*-アシル化修飾による ε-PL の見かけの低重合度化に起因することが考えられた。

Synthesis of *N*-acylated derivatives of poly(ε-L-lysine) and evaluation of the antimicrobial activity

○Osamu Yoshida[1], Akihiro Matsui[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), antimicrobial, cationic peptides, cell membrane

3Dp04 *Enterococcus* sp.の生産するバクテリオシン

○竹内 諒, 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】バクテリオシンは細菌が生産する抗菌性ペプチドである。多くのバクテリオシンはヒトの消化管内で分解されることから安全性が高いと考えられている。当研究室で保有するバクテリオシン生産能力の高い乳酸菌 *Enterococcus* sp.は培養中に活性が低下するという問題が存在する。本実験ではこの活性低下の原因を明らかにすることを目的とする。

【方法】500 mL の坂口フラスコに、pH 低下対策のため炭酸カルシウムを 1％添加した 200 mL のバクテリオシン生産用培地（グルコース 2％、酵母エキス（BD）0.5％）を入れて、*Enterococcus* sp.を 37℃で振とう培養した。生菌数はコロニー計数法で測定し、培養液中のバクテリオシン活性は、遠心分離上清を *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* NBRC100495 を指標菌に用いた寒天拡散法で測定した。細胞外に存在するタンパク質分解酵素によって、バクテリオシンが分解されている可能性を考え、培養液中のタンパク質分解活性をアゾカゼインを用いて測定した。また、定常期の培養液を加熱、冷蔵し、バクテリオシン活性の低下に与える影響を確認した。さらに、メンブレンフィルターで菌体を取り除いた定常期の培養液のバクテリオシン活性を測定した。

【結果と考察】培養液の遠心分離上清のバクテリオシン活性の低下は定常期である培養約 40 時間目からはじまった。一方、アゾカゼイン分解活性は対数増殖期後期である培養 12 時間目でピークに達し、その後低下したことから、活性低下とずれが見られた。加熱、冷蔵、メンブレンフィルター等の処理後もバクテリオシン活性は低下しなかったことから、バクテリオシン活性低下は、細胞外に放出されるタンパク質分解酵素によるものではなく、細胞内もしくは表面に存在するタンパク質分解酵素による可能性が示唆された。

Production of bacteriocin by *Enterococcus* sp.

○Ryo Takeuchi, Tomohiko Nishino
(Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol.)

Key words *Enterococcus*, bacteriocin, lactic acid bacteria, biopreservation

3Dp05 低濃度オゾン水の生成と殺菌効果の評価

松郷 誠一[1], ○滝口 昇[2], 平野 一哉[2], 靜 良治[3]
（[1]金沢大・VBL, [2]金沢大・理工, [3]レネロファーマ（株））
tackey@se.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】オゾン水の酸化作用に起因した殺菌能力が様々な分野で利用されている。医療分野では末梢血管循環障害の改善や糖尿病性皮膚潰瘍における創傷治癒の促進に用いられている。本研究では、生成時における負担の少ない低濃度オゾン水（0.1 ppm 以下）に注目し、その殺菌能力について評価を行った。
【実験方法】（１）低濃度オゾン水の作製：レネロファーマ株式会社製の気体オゾン発生器を用い、滅菌水 1 L に低濃度のオゾンガスを 20 分間曝気することによって低濃度オゾン水を作製した。（２）殺菌実験：殺菌実験には E. coli DH5α を用いた。培養液の OD600 が 0.5（液量：100 mL）となるよう遠心ボトル（200 mL 容）に調整後、遠心分離により集菌・洗浄したものを殺菌実験サンプルとした。サンプルを低濃度オゾン水またはコントロールである LB 培地 100 mL に懸濁後、37℃, 160 rpm で 20 分間接触させた。再度集菌・洗浄後、滅菌した 500 mL 三角フラスコに移し、37℃, 160 rpm で培養して経時的に OD600 を測定した。12 h および 24 h においては生菌数の計測も行った。
【結果と考察】低濃度オゾン水処理サンプルの生菌数はコントロールに比べて 4 割程度低く、増殖曲線による評価と比較すると明らかに低い結果であった。これは、低濃度オゾン水処理により、液体培養においては増殖活性を有するが、固体培養においては増殖できない細胞が多く存在することを示唆している。過酸化水素水を用いた実験との比較についても併せて報告する。

Evaluation of cytotoxicity of low-concentrated ozone water

Seiichi Matsugo[1], ○Noboru Takiguchi[2], Kazuya Hirano[2], Ryoji Shizuka[3]
([1]VBL, Kanazawa Univ., [2]Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ., [3]Renelopharma Inc.)

Key words *Escherichia coli*, cytotoxicity, growth, ozone

3Dp06 天然物由来成分による皮膚常在菌の増殖への影響

○多賀 直彦, 本脇 那々子, 石黒 悠生
（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。しかしながら、これらの皮膚常在菌は、増殖することにより不快な臭いを発する。本研究は、皮膚常在菌の増殖を抑えるとともに、ヒトに対して安全な天然物由来成分について検討した。
【方法】使用菌株は、皮膚常在菌として *Staphylococcus epidermidis* NBRC 100911、および *Staphylococcus aureus* NBRC 102135 を用いた。使用培地は，702 液体培地および 802 平板寒天培地を用いた。皮膚常在菌の培養は、試験管を用いた振盪培養で行った。抗菌活性は、spot on lawn 法で検出した。抗菌活性検出のポジティブコントロールとして、テトラサイクリン塩酸塩を用いた。培養分析は、検鏡、培養液 pH、培養液濁度、および CFU を分析した.
【結果】抗菌物質を溶解させる溶媒の皮膚常在菌に対する抗菌活性について検出した結果、水、メタノール、エタノール、および DMSO に皮膚常在菌に対する抗菌活性は検出されなかった。皮膚常在菌に対して強い抗菌活性を示すテトラサイクリン塩酸塩の抗菌活性を示す最小濃度を検討した結果、4 種類の使用溶媒全てにおいてテトラサイクリン塩酸塩の濃度が数 μ g/m L で抗菌活性が得られた。天然物由来成分の抗菌活性を検出した結果、ウイキョウ油層抽出物が皮膚常在菌に対して抗菌活性を示した。皮膚常在菌の液体培養における松脂添加の影響を添加した結果、濃度依存的に増殖が始まる時間を遅らせた。松脂添加濃度を低くして増殖に影響を与えない濃度を明らかにするとともに、松脂添加濃度を高くすることによる増殖開始遅延に与える影響について検討している。

Effects of natural components on the growth of skin-borne bacteria

○Naohiko Taga, Nanako Motowaki, Yui Ishiguro
(Sch. Agric., Tokai Univ.)

Key words antibacterial, *Staphylococcus epidermidis* , *Staphylococcus aureus*

3Dp07 粉末消石灰の「待ち受け消毒」条件下における消毒効果の評価

○松崎 慎史, 上井 幸司, 山中 真也, 徳樂 清孝
（室工大院・工）
tokuraku@mmm.muroran-it.ac.jp

[背景・目的]
全国の畜産農家等では豚コレラや口蹄疫などの家畜伝染病による甚大な被害が発生している。家畜伝染病予防のため、畜産農家の出入り口に粉末消石灰を散布する「待ち受け消毒」が実施されているが、実際の使用条件と同等の適切な消毒効果評価法は知られておらず、その効果に疑問が持たれていた。そこで、本研究では現場により近い条件下における評価法の開発に取り組んだ。また、開発した手法により、実験の際の湿度や気温、粉末消石灰の含水量など、様々な条件下における粉末消石灰の消毒効果や、新たに開発したゼオライト配合粒状消石灰の消毒効果を評価した。
[方法]
本研究では病原性細菌のモデルとして大腸菌（*E. coli* XL-1 blue）を使用した。大腸菌を対数増殖期まで培養し、遠心分離、リン酸生理食塩水による洗浄で完全に培地を除去した。インキュベーター中で菌体を乾燥させ、消石灰との接触面積の増加を図るため乾燥菌体を微細化した。その後、粉末消石灰を添加し、経時的に接触反応させた。接触反応後、消石灰を中和することが可能な十分量のリン酸バッファーを添加することで瞬時に中和した。中和溶液の生菌数は希釈平板法によって測定した。
[結果・考察]
開発した手法により粉末消石灰の消毒効果を評価したところ、粉末消石灰のみでは消毒効果は検出されず、水を添加することで有意な消毒効果がみられた。さらに湿度コントロール下における消毒効果への影響を調査したところ、湿度20~80％の範囲では消毒効果はみられなかったが、90%以上で有意な消毒効果が確認された。これらの結果より、「待ち受け消毒」を目的として粉末消石灰を散布する際、湿度 90％以上の条件でなければ、水と共に散布する必要があることが明らかになった。また、ゼオライト配合粒状消石灰についても粉末消石灰と同等の消毒効果が見られた。

Evaluation of the disinfecting effect of slaked lime powder under the situation of "standby disinfection"

○Shinji Matsuzaki, Koji Uwai, Shinya Yamanaka, Kiyotaka Tokuraku
(Grad. sch.Eng., Muroran Inst. Technol.,)

Key words domestic animal infectious, standby disinfecton, slaked lime powder

3Ep01 糸状菌シトクロム P450 の潜在機能を活用した トリテルペノイド生合成

○大園 昂貴 [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】トリテルペノイドは各種生物が産生する代謝産物であり、創薬資源のリード化合物として期待されている。しかしながら、自然界におけるトリテルペノイド供給量には限りがあることや化学合成が困難であることから、トリテルペノイドの産業利用には戦略的合成技術が求められる。本研究では、トリテルペノイド合成酵素（TTS）およびシトクロム P450（P450）の組み合わせによってトリテルペノイドの構造多様性が生まれることに着目し、植物由来 TTS と糸状菌由来 P450 を非合目的に組み合わせることで多種多様なトリテルペノイドの生合成を試みた。
【方法】ルペオール合成酵素（*LUS*）または β-アミリン合成酵素（*bAS*）の発現プラスミドを保持する酵母に糸状菌 P450 発現プラスミドを組み込み、人工液体培地 25 mL に植菌し、培養した（3 日間、28°C、160 rpm）。培養後、遠心分離により回収した菌体を 20%水酸化カリウム水溶液（水：エタノール = 1:1）に懸濁し、煮沸により得られた溶菌液から酢酸エチル及びヘキサンを用いて細胞内代謝産物を抽出した。減圧乾固した代謝産物に TMSI-C を用いて TMS 誘導体化サンプルを調製し、GC-MS 分析に供してルペオールまたは β-アミリンに対して変換活性を有する P450 分子種を特定した。
【結果と考察】本研究で用いた P450 計 425 種のうち、ルペオールに対しては 4 種、β-アミリンに対しては 3 種の P450 が変換活性を示した。また、それぞれの基質に対して共通する 2 種の P450 が変換活性を示したことから、それらの P450 がルペオールや β-アミリンのみならず多くのトリテルペノイドに広く活性を示すことが示唆された。本研究の結果は、生物種の壁を超えた酵素協同作用が様々なトリテルペノイドの合成ツールになり得ることを示唆しており、有用天然物・疑似天然物の獲得を促進すると期待される。

Applications of fungal cytochrome P450 monooxygenase for production of various triterpenoids

○Koki Ozono[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

3Ep02 担子菌が有するセスキテルペン合成酵素の機能解明と利用

○増永 夏輝 [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.kyuahu-u.ac.jp

[背景と目的] テルペノイドはイソプレンユニットを構成単位とする天然物であり、医薬品・香料などの高付加価値化合物としても利用が期待されている。その中でも、3 つのイソプレンユニットからなるセスキテルペノイドは著しく高い構造多様性を有すことから、これらの選択的・効率的合成を可能にするセスキテルペン合成酵素 (STS) の機能理解に興味が持たれる。
担子菌はセスキテルペノイド産生能に秀でた生物であることが知られ、多彩な STS の探索源として期待が持たれる。本研究ではセスキテルペノイドを標的とする天然物合成新戦略の創発に向け、種々の担子菌 STS の獲得および機能解明を試みた。
[方法] ゲノム配列が公開されている *Trametes versicolor*、*Pleurotus ostreatus*、*Agaricus bisporus*、*Phanerochaete chrysosporium*、*Postia placenta* を供試菌に利用した。種々の培養条件で生育させた担子菌からトータル RNA を抽出し、RT-PCR によって標的 STS の cDNA を増幅した。得られた PCR 産物を酵母発現ベクターに連結し、*Saccharomyces cerevisiae* に形質転換して STS を異種発現させた。形質転換酵母を人工液体培地（20 mL）に植菌して 3 日間培養し（28°C）、フラスコ内の気相および培養液に生じた代謝物を GC-MS で分析した。
[結果と考察] 形質転換酵母が与える代謝物を GC-MS によって分析したところ、STS 依存的に生じる多くのセスキテルペノイドが同定された。各種 STS が与えた生成物を比較したところ、各種担子菌が特徴的に与える化合物も多く見出された。本結果より、多くの担子菌が種に特徴的な STS 機能を備えると推察され、担子菌 STS の機能ライブラリを拡大することで、多種多様なセスキテルペノイドの戦略的合成が可能になると期待された。

Functional characterization of sesquiterpene synthases from wood-rotting basidiomycetes

○Natsuki Masunaga[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 Sesquiterpene synthase, white-rot basidiomycetes, Heterologous expression

3Ep03 褐色腐朽担子菌 *Postia placenta* のシトクロム P450 を利用したプロトイルデン誘導体の合成

○木村 紘也[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

【緒言】セスキテルペノイド（STP）は構造多様性に富み、ユニークな生物活性を示す化合物も多く存在することから、創薬シード化合物の探索資源として期待される。本研究では STP の中でも多様な薬理活性が知られる Δ6-protoilludene に焦点をあて、褐色腐朽担子菌 *Postia placenta* が有する Δ6-protoilludene 合成酵素（PpSTS-08）とシトクロム P450（P450）を利用して多種多様なプロトイルデン誘導体の合成を試みた。
【実験方法】PpSTS-08 を機能発現する *Saccharomyces cerevisiae* に *P. placenta* に由来する 184 種類の P450 を共発現させた形質転換酵母を作出し、人工培地中で 3 日間培養した（20 mL, 28℃, 160 rpm）。所定時間後、培養液画分に蓄積した生成物を固相抽出カラムで回収し、GC-MS 分析に供してプロトイルデン水酸化体をスクリーニングした。
【結果および考察】PpSTS-08 と CYP-5344B1 の共発現によって Δ6-protoilludene-8-ol が、PpSTS-08 と CYP-5348E1 または-5348J3 を共発現によって Δ6-protoilludene-5-ol が得られた。CYP-5348J3 は未同定のプロトイルデン水酸化体を与えることも示された。さらに、複数の P450 を PpSTS-08 と共発現させてプロトイルデン多重水酸化体の合成を試みた。CYP-5344B1 に加えて CYP-5150D15V1、-5150D15V2、-5027B4v1 または-5150D11v1 を共発現させることで Δ6-protoilludene のジオール体と考えられる生成物が生じた。現在、NMR 等を用いて生成物の構造同定を進めている。
本研究により、*P. placenta* に由来するプロトイルデン水酸化酵素を同定し、少なくとも 5 種類のプロトイルデン誘導体を得ることに成功した。プロトイルデン類は抗腫瘍活性などの有用活性を持つことが報告されており、本研究で得られた代謝物の生物活性にも興味が持たれる。

Biosynthesis of protoilludene derivatives using cytochromes P450 from the brown-rot basidiomycete *Postia placenta*

○Hiroya Kimura[1], Takuya Kitaoka[2], Hirofumi Ichinose[2]
([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words *Postia placenta*, cytochrome P450, terpenoid, Protoilludene

3Ep04 ナギラクトン E とアネトールの併用によって生じる相乗的抗真菌メカニズム

○上田 裕貴[1], 山口 良弘[1], 荻田 亮[1,2], 田中 俊雄[1], 藤田 憲一[1]
（[1]阪市大院・理, [2]阪市大・健康研セ）
kfujita@sci.osaka-cu.ac.jp

【背景および目的】ナギ由来のナギラクトン E は出芽酵母に対して細胞壁生合成を阻害することで微弱な抗真菌作用を発揮する。一方でアニスオイルの主成分であるアネトールも微弱な抗真菌作用を示すが、本物質は他の薬剤と併用した場合、薬剤排出の阻害を介してその作用を増幅する場合がある。本研究では、両物質を併用した際に見られる相乗的抗真菌作用の仕組みを探ることを目的とした。
【方法および結果】*Saccharomyces cerevisiae* BY4741 株を用いて、まず液体培地希釈法により、各薬剤の最小生育阻害濃度 (MIC) および両薬剤を併用した場合の相乗効果を調べた。その結果、各薬剤を単独で使用した場合、薬剤処理 48 時間後、ナギラクトン E とアネトールの MIC はそれぞれ 500 μM と 2500 μM となった。また両薬剤を併用した場合、最も効果的な組み合わせは 31.25 μM ナギラクトン E と 625 μM アネトールとなり、併用処理は相乗効果を示すことがわかった。次いで薬剤排出ポンプ関連遺伝子欠損株 14 株を用いて菌体の濁度により増殖を観察したところ、脂溶性分子の排出に関わる多剤耐性薬剤排出ポンプ Pdr5p の遺伝子欠損株においてのみ、ナギラクトン E の感受性が上昇した。さらに、リアルタイム PCR を用いて *PDR5* の遺伝子発現量を測定した。両物質を併用すると薬剤処理時間の経過に伴って *PDR5* の発現量が低下し、培養 72 時間後にはコントロールレベルまで減少した。また、PDR5-GFP 株を用いて、併用処理した細胞における Pdr5p の発現量を間接的に確認した。その結果、GFP 由来の蛍光が消失したので、PDR5p の発現量も減少したと判断した。
以上の結果より、両物質の併用によっておこる相乗的抗真菌作用にはアネトールによる *PDR5* の発現抑制が関わっている可能性が示唆された。

Synergistic antifungal mechanism induced by nagilactone E in combination with anethole

○Yuki Ueda[1], Yoshihiro Yamaguchi[1], Akira Ogita[1,2], Toshio Tanaka[1], Ken-ichi Fujita[1]
([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Res. Center Urban Health and Sports, Osaka City Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, anethole, nagilactone E, drug resistance

3Ep05 梨幼果の水およびエタノール抽出成分が出芽酵母の寿命延長およびその関連遺伝子の発現に及ぼす影響

○村田 和加恵[1,2], 長谷川 真梨菜[1], 藤井 雄三[1], 藤田 憲一[2], 山口 良弘[2], 田中 俊雄[2], 荻田 亮[2,3]
（[1]米子高専, [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健康寿命の延伸に向けた関心が高まっている。人の健康を阻害する一つの要因として、細胞老化による免疫機能の低下や活性酸素種の影響による DNA の損傷など、細胞機能の低下に起因する加齢関連疾患が挙げられる。細胞寿命の延伸についての研究は多岐にわたり進められており、その一つとして寿命延長効果を付与する成分の探索とその応用が期待されている。本研究では、ヒトの寿命決定機構と共通性を有することから寿命・老化研究に適したモデル細胞であるとされている出芽酵母を用いて、梨幼果の水およびエタノール抽出成分による細胞寿命の延長効果を検討した。
梨の幼果を破砕し、蒸留水あるいは 70% エタノールに懸濁し遠心後、上清をサンプルとした。細胞寿命の評価は経時寿命をコロニーカウントによって測定することにより行った。また RT-PCR 試験によって出芽酵母の mRNA の発現量を分析し、梨抽出成分による遺伝子レベルでの影響を評価した。
実験の結果、梨幼果の水抽出成分およびエタノール抽出成分のいずれを付与した場合においても、コントロールと比べて著しく経時寿命を延長させる効果が認められた。さらに、RT-PCR によって mRNA の転写量について調べたところ、梨幼果の水抽出成分を付与したものでは、ヒト長寿遺伝子（SIRT1）の相同遺伝子とされている *SIR2*、および *SIR4* の発現量に増加傾向が認められたが、エタノール抽出成分を加えたものでは、それら遺伝子の発現量に差は認められなかった。以上の結果から、梨の効果における、水抽出成分およびエタノール抽出成分では、異なる成分がそれぞれに異なる機序によって出芽酵母の寿命延伸に関与している可能性が示唆された。

Effects of water and ethanol soluble components from unripe pear fruit on lifespan extension and gene expression of budding yeast.

○Wakae Murata[1,2], Marina Hasegawa[1], Yuzou Fujii[1], Ken-ichi Fujita[2], Yoshihiro Yamaguchi[2], Toshio Tanaka[2], Aikira Ogita[2,3]
([1]Yonago Natl. Coll. Technol., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [3]Res. Center Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Chronological lifespan, pear, sirtuin gene

3Ep06 線虫を用いた *Candida glabrata* 感染症のハイスループットな解析系の開発

○竹葉 惇貴[1], 箕田 康一[1], 前田 淳史[2], 水野 貴之[1], 文谷 政憲[1]
（[1]徳島文理大院・工, [2]徳島文理大・理工）
bunya@fst.bunri-u.ac.jp

【背景・目的】
Candida glabrata は真菌感染症を引き起こす原因真菌の 1 つであり、感染症患者数は真菌感染症患者の中で 2 番目に多い。また、天然に広く存在しており *C. glabrata* は既存の抗真菌薬に対し低感受性であり、治療・予防が困難であるため、感染・発症機構解明や新たな治療薬の開発が必要とされている。そこで我々は、線虫(*Caenorhabditis elegans*)を感染宿主として用いた *C. glabrata* 感染症に効果のある化合物のスクリーニングを目的に、簡便かつ迅速な解析系の開発を行った。
【方法】
今回の研究では、線虫の生残率測定と線虫体内の *C. glabrata* の蛍光による観察、線虫内生菌数の測定を行った。生残率測定では、*C. glabrata* と接触した線虫と大腸菌のみを餌として与えた線虫、*C. glabrata* に接触し抗真菌薬を与えた線虫の 3 種を 20℃と 25℃で培養し測定した。線虫体内の *C. glabrata* の観察は、生きている細胞のみが蛍光を発する蛍光試薬を用いて顕微鏡観察した。また、線虫体内の生菌数を求めるため、線虫をホモジナイズし、寒天培地に塗布してコロニーを計数した。
【結果】
生残率の測定では、*C. glabrata* に感染した線虫の生残率は、大きく低下した。線虫内生菌数も経日的に増加し、蛍光観察すると、蛍光強度が日ごとに強くなることが確認できた。20℃と「25℃+抗真菌薬」の場合は生残率に大きな低下はなく、生菌数は減少し、蛍光強度は弱くなった。*C. glabrata* と接触した線虫を 25℃で培養した時、生残率が低下し、生菌数が増加したことから、線虫でヒト *C. glabrata* 感染症を再現できたと考えられる。また、線虫内生菌数の増減と蛍光観察での蛍光強度が比例していることから、線虫内生菌数を蛍光観察によって評価が可能になった。これにより、抗真菌薬のハイスループットスクリーニングや *C. glabrata* の感染機構解明に応用できることが示唆された。

Development of analysis system for *Candida glabrata* infection using nematode

○Junki Takeba[1], Koichi Mita[1], Atsushi Maeda[2], Takayuki Mizuno[1], Masanori Bun-ya[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokushima Bunri Univ., [2]Fac. Sci. Eng., Tokushima Bunri Univ.)

Key words *Candida glabrata*, *Caenorhabditis elegans*, fungal disease

3Ep07 *Aspergillus* sp. S17-5 の産生するヒドロキシヘキシルイタコン酸の構造解析と生理活性評価

○野村 友佑[1], 佐野 芽生[1], 小原 仁実[1], 和田 一仁[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&B企画部）
aso@kit.ac.jp

【目的】イタコン酸(IA)などの微生物産生ビニル化合物は、抗炎症性や抗菌性などの生理活性を有しており新たな創薬シード化合物として注目されている。しかし、これら微生物産生ビニル化合物の報告数は限定されている。一方、発表者らはアルケンとハロゲン化アルキルの付加反応である Mizoroki-Heck 反応を用いたビニル化合物産生菌の選択的分離法を新たに開発した。そこで本研究では、本分離法を用いて土壌よりビニル化合物産生糸状菌を分離するとともに、産生するビニル化合物の構造解析と生理活性を評価した。
【方法・結果】各地より採取した 86 種の土壌をクロラムフェニコール添加ポテトデキストロース培地に塗布・培養し 430 株の糸状菌を分離した。各株の培養液上清を Mizoroki-Heck 反応に供した後、反応液を HPLC 解析することでビニル化合物産生菌を探索した。その結果、IA とは異なる 2 つのビニル化合物を同時に産生する S17-5 株を得た。分取 HPLC を用いて両ビニル化合物を培養液から精製後、LC-MS および NMR を用いて構造解析した。その結果、両ビニル化合物はそれぞれ IA の類縁体である 8-ヒドロキシヘキシルイタコン酸(8-HIA)、9-ヒドロキシヘキシルイタコン酸(9-HIA)と同定された。また、26S rRNA 遺伝子配列解析の結果、S17-5 株は *Aspergillus* sp.と同定された。次に、それぞれ IA、8-HIA、9-HIA を HeLa、MRC-5 細胞の各培養液に添加し、24 h 培養後の生細胞数を測定することで細胞毒性を調べた。その結果、8-HIA を添加した場合では HeLa、MRC-5 ともに生細胞数が減少したが、9-HIA を添加した場合では MRC-5 のみ生細胞数が減少した。一方、IA ではこの傾向は見られなかった。よって 8-HIA、9-HIA には IA と異なり細胞毒性があることが明らかとなった。

Structural analysis and bioactivity characterization of hydroxyhexylitaconic acids produced by *Aspergillus* sp. S17-5

○Yusuke Nomura[1], Mei Sano[1], Hitomi Ohara[1], Kazuhito Wada[2], Keiji Matsumoto[2], Yuji Aso[1]
([1]Kyoto Inst. Tech, [2]Kaneka Corp. R&B Planning)

Key words *Aspergillus*, bioactivity, hydroxyhexylitaconic acids, structural analysis

3Ep08 Concentration of chitosan-like polysaccharide from the cultures of Citrobacter spp. and its crystalline nano/microfiber formation.

○Priyanka Baranwal, Seiji Negoro, Masahiro Takeo
(Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo)
takeo@eng.u-hyogo.ac.jp

Chitin/chitosan is a polysaccharide composed of N-acetyl-D-glucosamine/D-glucosamine linked with beta 1,4-glycosidic bonds. Our previous studies have shown that several bacterial strains belonging to the Citrobacter genus can produce a chitosan-like polysaccharide into the cultures as a soluble form, which showed flocculation activity against kaoline (fine cray powder) solutions. Thus, it can be used as a microbial flocculant. In this study, we report the recovery and concentration method and the crystalline nano/microfiber formation of the polysacchride.
The polysaccharide could be recovered and concentrated from the cultures by hollow fiber membrane modules with >100kDa-cutoff hydrophilic membranes without significant loss of the flocculation activity. When the 50 to 100-fold concentrated samples were preserved in a refrigerator, crystalline nano/microfibers appeared in the sample solutions. The width of each primary fiber was at nano meter levels and the length was various. Larger crystalline fibers grew probably from dozens of the nanofibers, forming a unique sheaf-like structure with the size of approximately 1 mm by 0.5 mm, in which the nanofibers seem to be tightly packed in the middle and unpacked at both ends. After washing the fibers with water repeatedly and dissolving them with acids, the solution still showed strong flocculation activity.

Concentration of chitosan-like polysaccharide from the cultures of Citrobacter spp. and its crystalline nano/microfiber formation.

○Priyanka Baranwal, Seiji Negoro, Masahiro Takeo
(Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo)

Key words *Citrobacter*, bioflocculant, microfiber, chitosan

3Ep09 ベタイン型添加剤による酵素活性化と水和分子間相互作用の相関

○青木 拓真, 甲元 一也
（甲南大院・フロンティアサイエンス）
koumoto@konan-u.ac.jp

【背景と目的】
我々の研究室で開発したベタイン型添加剤は、特異な水和挙動を示し、水溶液中で酵素の活性化や安定化をした。また、その水和挙動と分子間相互作用の関係を調べるために、Record Jr らが報告している蒸気圧測定法から、ベタイン型添加剤と種々のイオン及び中性分子との間に特異的な水和分子間相互作用が働くことも明らかにし、日本農芸化学会 2019 年度大会において報告した。本研究では、水和パラメーターと酵素反応との相関を調べるために、各実験で得られた水和に関するパラメーターと酵素活性化パラメーターを比較した。
【結果と考察】
酵素反応としては、α-グルコシダーゼによるマルトースの加水分解反応を用い、その速度論パラメーターを、ベタイン型添加剤の溶液物性に与えるパラメーターとして密度及び粘度測定による水和パラメーターを算出し、水和分子間相互作用では分子間に働く化学ポテンシャルを蒸気圧測定法から見積もった。まず、炭素鎖長の異なる５つのベタイン型添加剤を用い、酵素反応における速度論パラメーターを算出したところ、グリシンベタインのアルキル鎖が長くなるにつれて、酵素と基質の相互作用を示す Km 値が低下していった。ベタイン型添加剤と基質であるマルトースの間にも強い排他的な相互作用が働いており、ベタインの水和に伴う溶媒の物性が酵素の活性化に関与していることが明らかとなった。発表では、得られた一連の解析結果について詳細に報告する予定である。

Relationship between enzyme activation and intermolecular hydration layer interaction by addition of betaine derivatives

○Takuma Aoki, Kazuya Koumoto
(FIRST, Konan Univ.)

Key words betaine, hydration, repulsive interaction, kinetic parameter

3Fp01 改変型ストレプトリジン O を用いた ASO 試薬の調製方法に関する開発

○角田 洋輔, 北澤 宏明, 川井 淳, 岸本 高英
（東洋紡）
Takahide_Kishimoto@toyobo.jp

【背景・目的】
A 群レンサ球菌は上気道感染症や猩紅熱など多くの化膿性疾患の原因となることが知られている。その診断方法としては A 群レンサ球菌が産生するストレプトリジン O(SLO)に対する抗体(ASO)価の測定が行われている。ASO 試薬の原料に用いられる SLO は、これまで主にレンサ球菌そのものを培養することで製造されてきたが、生産性が低いため、低コストかつ高純度な SLO を製造することは困難であった。また、SLO は溶血活性を有するため、工業スケールでの製造及び使用時の安全性の観点から溶血活性を欠損させることが望まれていた。そこで、我々は溶血活性が無く、安全面に配慮した高純度な改変型 SLO を工業スケールで高生産するための技術を開発し、すでに販売を開始している。今回更に我々は、この改変型 SLO を広く普及させるため、ASO 試薬調製に適したラテックス粒子の探索及び固定化条件の検討を行った。
【方法・結果】
溶血活性を欠損させた改変型 SLO を生産する組換え大腸菌の培養、各種クロマトグラフィーによる精製を行い、SDS-PAGE にて単一バンドとなった改変型 SLO を調製した。続いて、公知のラテックス粒子への固定化法をベースにラテックス粒子の種類や改変型 SLO の感作条件を検討した。ラテックス粒子に関しては、数種のカルボキシル基導入ラテックス粒子の中から改変型 SLO の感作に適している粒子を見出し、感作条件に関しては、pH、感作量などが試薬性能に与える影響を調べ、固定化条件の最適化を図った。さらに、共有結合によるラテックス試薬の調製においてはラテックス粒子のロット間差が試薬性能に影響しやすいことが知られているため、各ロットの性状と試薬性能との相関についても詳細に検討を行った。発表当日はロット間差の影響も含めて、検討結果の詳細を報告予定である。

Development of manufacturing of ASO reagent with mutant Streptolysin O

○Yosuke Sumida, Hiroaki Kitazawa, Atsushi Kawai, Takahide Kishimoto
(Toyobo Co., Ltd.)

Key words *Streptococcus pyogenes*, Streptolysin O, antigen, ASO IVD reagent

3Fp02 Quantification of intracellular crowding level in *Bacillus subtilis*

○Yuki Kitahara, Enno Oldewurtel, Sven van Teeffelen
(Dept. Microbiology, Pasteur Inst.)
yuki.kitahara@pasteur.fr

Bacterial cytoplasm is densely packed with macromolecules. This crowded environment is biologically important for various processes such as protein diffusion, protein-protein interaction, enzymatic reaction, etc. To maintain the crowding level bacteria must coordinate dry-mass production and cell-volume expansion, but the coordination mechanism is still unclear. Here we investigated how bacteria balance dry-mass growth and volume growth at the single-cell level by using rod-like bacterium *Bacillus subtilis*.
To quantify dry mass of the cell we applied quantitative phase microscopy named SLIM. To measure the cell volume we carried out two dimensional segmentation of phase-contrast images. We also calculated dry-mass density (dry mass/volume) as a proxy of crowding.
Our measurements revealed that during exponential growth and even upon sudden nutritional downshifts volume growth was well synchronized with dry-mass growth, and therefore dry-mass density was constantly maintained. In contrast, when we treated cells with drugs targeting cell-wall synthesis, volume growth was severely arrested while dry-mass growth still continued, which caused an increase of dry-mass density. However, after washing out the drugs, cells interestingly accelerated volume-expansion rate by increasing cell diameter and decreased dry-mass density to the original level. This implies that *B. subtilis* regulates its intracellular crowding level by changing cellular morphology.

Quantification of intracellular crowding level in *Bacillus subtilis*
○Yuki Kitahara, Enno Oldewurtel, Sven van Teeffelen
(Dept. Microbiology, Pasteur Inst.)

Key words *Bacillus subtilis*, growth, cell morphology

3Fp03 A plant microbial fuel cell based biosensor for the indoor greenA plant microbial fuel cell based sensor for the indoor green plants monitoring plants monitoring

○Ji Eun Kim[1], Tae Hang Yoon[1], Hak Jin Song[1], Wu-Young Jeong[1], Yunjeong Yang[1], Eun Bin Lee[1], Kwang Jin Kim[2], Ho Hyun Kim[3], Hyung Joo Kim[1]
([1]Dept. Biological Eng., Konkuk Univ., [2]Urban Agric. Res. Div., NIHHS, Rural Development Administration, [3]Dept. Integr. Environ. Syst., Pyeongtaek Univ.)
hyungkim@konkuk.ac.kr

A plant microbial fuel cell (PMFC) technique based biosensor for the indoor green plants monitoring was investigated. The consumption of plant exudates by electrochemically active bacteria (EAB) in the rhizosphere was the basis of this method. The result shows that the OCP (open circuit potential) from the PMFC was highly depended on the plant health in the system. Cultivation conditions such as watering, fertilizing, temperature variation, and lighting also affected the OCP development from the PMFC system. With the live plant, OCP was about 0.4V. The addition of fertilizer increased the OCP to 0.7V. However, the heat induced dead plant showed the remarkable potential decrease (0.0V). In the dark condition, a gradual decrease in potential development was observed (0.38V to 0.25V). In the multiple examination conditions such as combination of watering, lighting and temperature variation, the OCP development was also affected. Without water and light, the potential was decreased. Among the combination of environmental conditions, the temperature variation showed the highest effect on the OCP developments from the PMFCs. These results suggested that the application of PMFC technique provides a cost effective, rapid plant health monitoring method.

A plant microbial fuel cell based biosensor for the indoor greenA plant microbial fuel cell based sensor for the indoor green plants monitoring plants monitoring
○Ji Eun Kim[1], Tae Hang Yoon[1], Hak Jin Song[1], Wu-Young Jeong[1], Yunjeong Yang[1], Eun Bin Lee[1], Kwang Jin Kim[2], Ho Hyun Kim[3], Hyung Joo Kim[1]
([1]Dept. Biological Eng., Konkuk Univ., [2]Urban Agric. Res. Div., NIHHS, Rural Development Administration, [3]Dept. Integr. Environ. Syst., Pyeongtaek Univ.)
Key words plant health monitoring, plant microbial fuel cell, rhizobacteria, electrochemically active bacteria

3Fp04 Monitoring of an enzymatic reaction using broadband coherent anti-stokes Raman spectroscopy.

○Jeffrey Harmon, Ryo Imai, Naoko Senda, Tomoyuki Sakai
(Hitachi Ltd., Res. and Dev. Group - Bio. Syst. Res. dept.)
Jeffrey.harmon.zv@hitachi.com

Designing enzymatic reactions is very important for biochemical industries. For testing the design of an enzyme, a cell-free synthesis system is useful. However, to evaluate performance of the enzymatic reaction, destructive measurements such as HPLC or MS are necessary, which is typically a time-consuming process. On the other hand, optical measurement methods perform a non-invasive and rapid check of the performance through measuring the concentration of substrates.
Here, we demonstrate the measurement of an enzymatic reaction with broadband coherent anti-stokes Raman spectroscopy (CARS). CARS is an adaptation of Raman spectroscopy which boasts signal levels that are several orders of magnitude greater than spontaneous Raman systems, and allows for rapid analysis of the reactions.
We present a feasibility study about using a broadband (500-3500 cm^{-1}) CARS system for monitoring biomolecules produced via an enzymatic reaction. We firstly checked the system sensitivity using glucose. Glucose concentration levels were estimated and quantified having a system sensitivity of more than 10 mM for 10 seconds per sample. As a demonstration of monitoring enzymatic reactions, an imperative step in the glycolysis process was monitored using the CARS system. The decomposition of fructose 1-6 bisphosphate into GADP and DHAP was observed from the change in fructose concentration.

Monitoring of an enzymatic reaction using broadband coherent anti-stokes Raman spectroscopy.
○Jeffrey Harmon, Ryo Imai, Naoko Senda, Tomoyuki Sakai
(Hitachi Ltd., Res. and Dev. Group - Bio. Syst. Res. dept.)

Key words coherent anti-stokes Raman spectroscopy, biomolecule monitoring, glucose concentration

3Fp05 A biosensor for Influenza virus detection, controlling distance dependent LSPR between AuNPs and CdZnSeS quantum dots

○Fahmida Nasrin[1], Ankan Dutta Chowdhury[2], Kenshin Takemura[1], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

Development of label free sensing has been emerging in recent science to fulfil the growing demand in the field of biosensor. In this report, a localized surface plasmon resonance (LSPR) regulated approach has presented for the detection of Influenza virus, controlling the distance between gold nanoparticles (AuNPs) and fluorescent CdZnSeS quantum dots. Here, we present a new combination of AuNPs and CdZnSeS QDs linked with a peptide chain of 18 amino acids after functionalization in its both ends. The synthesized peptide has been used here as a linker between these duos and provide the anchoring sides for the antibody conjugation. In the optimized condition, the fluorescent properties of the QDs has been enhanced due to the surface plasmon effect of the adjacent AuNPs. On the basis of the physical significance on LSPR sensing, we have attempted to detect different concentration of Influenza virus and studied their detection sensitivity by analyzing the quenched spectra of the QDs fluorescence due to the induced steric effect of the virus molecule on the LSPR behavior. A linear range of 10^{-15} to 10^{-9} g mL^{-1} Influenza virus has been obtained with a detection limit of 0.8 fg mL^{-1}. On the basis of the obtained results and the detection mechanism, we hope, the method of this proposed biosensor can be a good alternative for the general biomolecule detection by changing the entrapped antibody and its corresponding analytes, in the wide variety of other sensing application in future.

A biosensor for Influenza virus detection, controlling distance dependent LSPR between AuNPs and CdZnSeS quantum dots
○Fahmida Nasrin[1], Ankan Dutta Chowdhury[2], Kenshin Takemura[1], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words AuNPs, QDs, LSPR, Influenza Virus detection

3Fp06 Controlling Size, Concentration and Distance of Surface Plasmon Resonance, Application of Virus Detection by LSPR Regulated Biosensor

○Ankan Dutta Chowdhury[1], Fahmida Nasrin[2], Kenshin Takemura[2], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

Localized surface plasmon resonance (LSPR) has been emerging recently as a most applicable system among label-free biosensing techniques due to its nanoscale phenomenon which offers sensitive, robust, and facile detection technique. There are several biomolecule sensors are reported so far tuning the LSPR mechanism of a fluorescent molecule and its counterpart of noble metal nanoparticle in term of their sizes, concentration, alignment, and distance. Though the technologies are now widely studied and used to measure biomolecular interactions, several challenges remain to optimize their parameters for a most suitable state of biosensing. Here, in this report, we offer a complete analysis of sensing strategy optimizing all the probable parameters to get the best results in detection. On the basis of the physical significance on LSPR sensing, we have attempted to detect different virus concentration as the analyte and studied their detection pathway by altering the LSPR behavior between CdSeTeS QDs and AuNP. Depending on their size, shape, concentration, pH and most importantly distance, we have framed different sensing platform for the virus detection by enhancing or quenching the fluorescence of CdSeTeS QDs. Applying this system, we have found the LOD of 32.6 fg mL-1 for the detection of Norovirus like particle (NoV-LP) taken as a reference for CdSeTeS QDs-AuNP based sensor.

Controlling Size, Concentration and Distance of Surface Plasmon Resonance, Application of Virus Detection by LSPR Regulated Biosensor

○Ankan Dutta Chowdhury[1], Fahmida Nasrin[2], Kenshin Takemura[2], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words fluorescence spectra, localizasion analysis, sensor, virus

3Fp07 Fluorescent-labeled liposomal amplified biosensor for the ultrasensitive detection of virus

○Sabrina Sharmin, Ankan Dutta Chowdhury, Enoch Y. Park
(Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

Amplification of sensing signal is one of the most promising mechanism for the detection of low amount of analytes. In this report, we have presented a fluorometric method to detect influenza virus by a newly developed fluorophore-labeled liposome and magnetic combined system. Homogeneously distributed amine-functionalized dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) liposome has been constructed and filled with strong fluorophore of Rhodamine 6G. In addition, APTES-functionalized Fe_3O_4 nanoparticles are also synthesized by standard silanization process. These two nanocomposites are conjugated with monoclonal antibodies for Influenza virus. Addition of different concentration of viruses in the biosensing system, Rh6G-liposome and magnetic particles can bind with the viruses and make a sandwich like structure. The Fe_3O_4-conjugated Rh6G-liposome system has magnetically separated from its analyte medium and then externally heated at the melting point of liposome to burst out the fluorophores from the core of the liposome. Hence, large number of fluorophores can come out from few numbers of viruses and amplify the detection signal significantly. The detection limit has been found in the range of femto molar concentration of influenza virus. Minimal cross-reactivity with similar viruses and proteins confirms the stable and non-leaky MB-liposome platform with low background signal. In summary, the rapid response and high sensitivity of this present method can offer a huge potential in point-of-care diagnostics for virus detection.

Fluorescent-labeled liposomal amplified biosensor for the ultrasensitive detection of virus

○Sabrina Sharmin, Ankan Dutta Chowdhury, Enoch Y. Park
(Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words immunoliposome, liposome immunoassay

3Gp01 Cre 組換え酵素を用いたミニサークル DNA ベクター調製法の開発

○久野 晶生[1], 河邉 佳典[1], 羽田 毅[1], 井藤 彰[1,2], 上平 正道[1]
（[1]九大院・工, [2]名大院・工）
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

＜目的＞我々は、これまでに Cre-*loxP* システムをベースとして、ゲノム上の特定部位に目的遺伝子を複数導入することが可能な逐次遺伝子組込みシステム（AGIS）を開発しており、AGIS を用いることで高生産 CHO 細胞株の構築に成功している。この際、ドナーベクターとして、バクテリア由来の配列（バックボーン）が取り除かれたミニサークル DNA ベクター（MC）が効率的な遺伝子組み込みに有効であることがわかった。本研究では、簡便で高収率な MC 調製法の開発と細胞への組み込み評価を行った。
＜方法と結果＞ *loxP* 配列を有するプラスミド（R2）へ Cre タンパク質を添加し、Cre-*loxP* 反応を利用することで *in vitro* で MC を作製した。MC 精製後、制限酵素処理して電気泳動を行い、回収率を評価したところモル換算で 10.5%の R2 が MC 化し回収できた。MC 回収率向上のために Cre-*loxP* 反応効率の改善を行った。Cre 反応の方向を MC 化の方向に制御するために、R2 のもつ 2 つの *loxP* 配列に変異を加えた R2-mlox を作製した。R2-mlox として、*loxP* 配列のスペーサー領域の異なる 3 つのプラスミド (R2-mlox-SpWT, R2-mlox-Sp8, R2-mlox-Sp12) を作製し、これらのプラスミドを利用して Cre 反応および MC 精製を行い、MC 化効率が上昇する *loxP* 配列の検討を行った。その結果、R2-mlox-SpWT、R2-mlox-Sp8 を用いたときに MC 化効率が高くなった。さらに、最適な Cre 量や反応時間を検討したところ、初期量からモル換算で 50.7%の MC が回収できた。次に、精製した MC が細胞で正常に機能するか評価した。Cre-*loxP* 組換え反応により目的遺伝子がゲノムへ組み込まれると、赤色蛍光が消光する CHO/*hprt*-DsRed 細胞に対して、MC を Cre 発現ベクターとともに一過性導入したところ、蛍光のシフトを観察できたことから、精製した MC は細胞で正常に機能することが示された。

Preparation of minicircle DNA vector using Cre recombinase

○Akio Kuno[1], Yoshinori Kawabe[1], Takeshi Hada[1], Akira Ito[1,2], Masamichi Kamihira[1]
([1]Fac. Eng., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words minicircle DNA vector, Cre/LoxP system, CHO cells

3Gp02 温熱誘導型遺伝子発現システムの遺伝子発現挙動解析

○波多江 有輝[1], 井藤 彰[1,2], 増本 新也[1], 小野 章彦[3], 河邉 佳典[1], 上平 正道[1,3]
（[1]九大院・工, [2]名大院・工, [3]九大院・シス生科）
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

【目的】本研究では、組織工学的に作製した三次元組織において、任意の場所とタイミングで血管新生を促すシステムの構築を目指し、熱ストレスに応答して一過的に血管内皮細胞増殖因子（VEGF）および緑色蛍光タンパク質（EGFP）を共発現する一過的温熱誘導型遺伝子発現システムと、持続的に遺伝子共発現を行う持続的温熱誘導型遺伝子発現システムを開発した。
【方法と結果】一過的温熱誘導型では、テトラサイクリン応答配列（TRE）と熱ショックプロモーター（HSP）からなる人工合成プロモーターを作製し、人工合成プロモーターで、IRES を介して VEGF と EGFP が共発現する発現ユニットをレンチウイルスベクターに組み込んだ。このベクターを、人工転写活性化因子（tTA）を恒常的に発現するレンチウイルスベクターとともに C2C12 細胞へ感染させた。感染させた細胞集団に対して、GFP を指標に限界希釈法で細胞クローンを樹立し、熱応答性を評価した。細胞播種 24 時間後に、ウォーターバスを用いて 43℃で 1 時間加温した。24 時間後に FACS で解析したところ、GFP 発現がみられた。48 時間後に再度 FCAS で解析したところ、蛍光割合の減少を確認できたことから、一過的温熱誘導ができたと考えられる。
一方、持続的温熱誘導型では、HSP プロモーターをスイッチとして tTA を発現させた後、TRE-PCMVmin プロモーターで応答させることで、ポジティブフィードバックループを形成し、持続的発現系が構築できるように設計した。tTA 発現ユニットならびに、目的遺伝子（TRE-PCMVmin /VEGF/IRES/EGFP）を有した各レンチウイルスベクターを C2C12 細胞に感染させた。細胞集団に対して、43℃で 1 時間加温し、蛍光発現がみられた細胞を FACS でソートしたところ、1 ヶ月以上持続的に発現する細胞が得られた。

Gene expression behavior analysis of heat induction type gene expression system

○Yuki Hatae[1], Akira Ito[1,2], sinya Masumoto[1], Akihiko Ono[3], Yosinori Kawabe[1], Masamiti Kamihira[1,3]
([1]Fac. Eng., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ.)

Key words heat shock protein, angiogenesis, regenerative medicine, vascular endothelial growth factor

3Gp03 ニワトリシアル酸転移酵素の解析とインフルエンザワクチン生産効率化への応用

○金岡 英徳[1], 加藤 万貴[1], 牧田 芳隆[1], 佐野 観月[1], 飯島 信司[2], 西島 謙一[1]
（[1]名大院・工, [2]愛工大・工）
kaneoka@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】
新型インフルエンザ発生とパンデミックの懸念からインフルエンザワクチン生産の効率化が急がれている。しかしながら、現在行われている発生途中のニワトリ胚（発育鶏卵）を用いるワクチン生産は時間がかかり、急な流行に対応できない。ヒトインフルエンザウイルスは感染時に細胞表面を覆う糖鎖構造末端の α-2,6 結合型シアル酸を認識するが、発育鶏卵では α-2,3 結合型シアル酸が大部分を占め、ワクチン生産に必要なウイルス培養に長時間を有する原因になっている。そこでこの問題を解決するため、糖鎖制御工学の概念に基づき α-2,6 結合シアル酸転移酵素を導入したトランスジェニックニワトリを作製し、このニワトリ由来の発育鶏卵（ヒト型糖鎖含有鶏卵）を用いてインフルエンザワクチン生産効率化を目指している。
【方法・結果】
我々はこれまでのニワトリシアル酸転移酵素の研究により、インフルエンザウイルスを培養する漿尿膜において、α-2,6 結合型シアル酸の形成に必要なシアル酸転移酵素 ST6Gal1 の発現量が低い一方で、ニワトリが多く持つ α-2,3 結合型シアル酸を形成する ST3Gal6 の発現量が高いことを明らかにしてきた。これらの結果に基づき、2 種類のニワトリ糖鎖改変法を検討した。ひとつ目は CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により、ST3Gal6 遺伝子座に α-2,6 結合シアル酸を形成する ST6Gal1 遺伝子を組込むことで、α-2,3 結合シアル酸を減少させると同時に、α-2,6 結合シアル酸形成を促進させる方法である。もうひとつは Cre/loxP 作動性遺伝子発現変換を利用した糖鎖改変システムを piggyBac トランスポゾンにより導入する方法を検討した。まずは今回のシステムを培養細胞において導入確認を行い、その結果として起こる糖転移酵素の発現量変化を解析した。

Analyses of chicken sialyltransferases for optimization of influenza vaccine production

○Hidenori Kaneoka[1], Maki Kato[1], Yoshitaka Makita[1], Mizuki Sano[1], Shinji Iijima[2], Ken-ichi Nishijima[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Fac. Eng., Aichi Inst. Technol.)

Key words influenza vaccine, CRISPR/Cas9, transgenic chicken

3Gp04 ニワトリ始原生殖細胞の分化・培養に関わるサイトカインの解析

奥嵜 雄也[1], 萩原 遥太[1], 中山 裕貴[1], 村上 晴太郎[1], 飯島 信司[1,2], 金岡 英徳[1], ○西島 謙一[1]
（[1]名大院・工, [2]愛工大・工）
nishijima@chembio.nagoya-u.ac.jp

[背景と目的] ニワトリは発生分野などで古くからモデル生物として用いられてきただけでなく、ニワトリ卵白で生産された最初の組換え医薬品が我が国においても臨床に供されるなど実用面でもその有用性が示されている。将来精子・卵子となる始原生殖細胞を長期培養して操作した後、ニワトリ個体まで効率よく発生させることができれば、ニワトリの遺伝子改変を自由に進めることができる。ニワトリ胚から採取した始原生殖細胞は BMP や Activin などのサイトカインの添加で長期培養が可能となったが、その分化に関する知見はまだ限られたものである。これまでの解析から、マウス始原生殖細胞の誘導分化に重要な転写調節因子がニワトリ始原生殖細胞の正常な発達にも関与していることが明らかとなっている。また、BMP や Activin はマウス ES 細胞から始原生殖細胞を in vitro で誘導する際に添加されるサイトカインである。そこで、未分化な ES 細胞様の細胞が存在する産卵直後の胚盤葉期胚に着目し、これらサイトカインの影響を検討した。
[方法および結果] 白色レグホン胚盤葉期の細胞を回収し、BMP 及び Activin を含む始原生殖細胞培養用の培地で培養し、3 日後に遺伝子発現を検討した。その結果、CVH や DAZL など生殖細胞特有遺伝子の発現レベル上昇は認められなかった。一方、ある程度の分化を誘導するとされるサイトカインなしの DMEM 培地においてもやはり生殖細胞関連遺伝子の発現は低いものであった。また、ニワトリ始原生殖細胞の分化に重要との報告がある CVH 遺伝子の過剰発現によっても DAZL などの発現は始原生殖細胞に比べて低いものであり、他の因子の重要性が推測された。

Analysis of chicken primordial germ cells

Yuya Okuzaki[1], Yota Hagihara[1], Yuki Nakayama[1], Seitaro Murakami[1], Shinji Iijima[1,2], Hidenori Kaneoka[1], ○Ken-ichi Nishijima[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Fac. Eng., Aichi Inst. Technol.)

Key words chicken, germline

3Gp05 細胞死受容体を利用した結合部位特異的抗体選択系の構築

○河原 正浩, 江口 晃弘
（東大院・工）
kawahara@chembio.t.u-tokyo.ac.jp

【背景・目的】 膜蛋白質は医療における重要なターゲットであり、膜蛋白質抗原に対する高特異性・高親和性抗体を迅速、簡便かつ確実に取得する系の開発が必要とされている。そこで本研究では、動物細胞膜上に提示させた膜蛋白質抗原の特定のエピトープに対してより高い親和性で結合する抗体を簡便に得るための技術を開発した。
【実験方法・結果】 本研究では、細胞死シグナルを伝達する受容体 Fas に着目した。本研究で考案した系では、抗原 - Fas 融合蛋白質と、抗原特異的抗体クローンを用いた合成小分子依存的二量体化抗体を細胞に遺伝子導入して共発現させる。得られた細胞に、使った抗体クローンの抗原親和性に影響する部分の配列をランダム化した抗体ライブラリーを遊離の状態でさらに共発現させる。この細胞に合成小分子を添加して培養すると、抗原 - Fas 融合蛋白質が活性化されて細胞は死滅するが、抗体ライブラリーの中に、元の抗体クローンより親和性の高い抗体があれば、その抗体は二量体化抗体よりも優先的に抗原に結合するので、抗原 - Fas 融合蛋白質の二量体化を阻害し、細胞死を阻害して生存する。生存した細胞から抗原への親和性が上昇した抗体遺伝子を得ることができる。実際に、抗原として ErbB2 を用いてライブラリースクリーニング実験を行った。その結果、元の抗 ErbB2 クローンよりも解離が起きにくく高い親和性で結合する scFv クローンが複数得られ、いずれも元クローンと同一のエピトープに結合することが分かった。以上より、本系では特定のエピトープに結合する抗体の親和性成熟が可能であることが示された。

Designing an epitope-specific antibody selection system utilizing a cell death receptor

○Masahiro Kawahara, Akihiro Eguchi
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words antibody, receptor, screening, mammalian cell

3Gp06 バイオ医薬品生産のためのチャイニーズハムスター腎臓組織由来細胞株の構築

○河邉 佳典[1,2], 巌 流征[1], 山中 寛子[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（MAB組合））
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】我々はこれまでにチャイニーズハムスター腎臓組織の初代細胞から不死化させた純国産のオリジナル細胞株、CHK 細胞の樹立に成功している。CHK 細胞の遺伝子転写産物を RT-PCR 法で解析したところ、腎幹細胞マーカーの発現が認められた。このことから、CHK 細胞は腎幹細胞が形質転換したもので、培養条件を制御することにより、増殖性と機能分化を任意のタイミングで切り換えることが可能な細胞株であると考えた。本研究では、CHK 細胞を用いて、セルエンジニアリングにより増殖と機能性を任意のタイミングで制御可能なバイオ医薬品生産宿主細胞の創製を目指した。
【方法と結果】はじめに、低分子薬剤等を用いて細胞内シグナルを調節することで、機能分化誘導に適した培養環境条件を調査した。低分子薬剤や液性タンパク質因子等複数の候補物質を様々な濃度で細胞培養液に添加した。その結果、セミコンフルエントの細胞密度から、毒性なく細胞形態の変化とともに増殖性を低下させる物質として、レチノイン酸（all-trans RA）、エストラジオール（E2）、および PD0325901 を見いだした。これらの物質は、血清条件で不死化した CHK 細胞ならびに無血清・浮遊馴化した CHK 細胞どちらにおいても同濃度の添加で有効であった。各低分子薬剤添加時に発現している遺伝子の転写産物をマイクロアレイにより解析したところ、各低分子薬剤添加条件で異なる遺伝子において有意な発現変動が観察された。現在、見出された低分子薬剤や変動遺伝子をベースとした人工の遺伝子発現系を構築しており、合わせて報告する。
（本研究は、日本医療研究開発機構（18ae0101063h0001）により助成を受けて実施した。）

Establishment of immortalized cell line derived from kidney of Chinese hamster for production of biopharmaceuticals

○Yoshinori Kawabe[1,2], Ryusei Iwao[1], Hiroko Yamanaka[1], Masamichi Kamihira[1,2]
([1]Fac. Eng., Kyushu Univ., [2]MAB)

Key words CHK cells, Biopharmaceuticals, Kidney

3Gp07 医療タンパク質の高生産化に向けたチャイニーズハムスター卵巣細胞の改変

○嶋田 順太[1], 三﨑 亮[1], 大橋 貴生[1,2], 藤山 和仁[1]
（[1]阪大・生工国際セ, [2]摂南大院・理工）
Fujiyama@icb.ecs.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】医療タンパク質の多くは合成後に輸送小胞によって細胞外へ分泌されるが、適切に分泌されず細胞内に蓄積し、生産性が制限されることが課題である。小胞による輸送は、多数のタンパク質及びそれらの複合体によって仲介されており、それらの発現量を変化させることで目的タンパク質の分泌量を向上できる可能性がある。本研究では特に SNARE タンパク質に注目した。SNARE は様々な細胞小器官や輸送小胞に存在し、それらが互いに結合し複合体を形成することで、輸送小胞と標的膜との膜融合を引き起こす。今回は、リサイクリングエンドソーム、後期エンドソーム、ゴルジ体において働く 6 種類の SNARE を選択した。チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞におけるこれらの SNARE の過剰発現効果を検証し、分泌経路を補強することによって、医療タンパク質の生産性の向上を目指す。
【方法】哺乳類発現用ベクターにヒト由来の SNARE 遺伝子をそれぞれ挿入し、6 種類のベクターを作成した。ヒト抗デングウイルス抗体を安定発現する CHO‐K1 細胞に、構築したベクターをそれぞれリポフェクション法により導入し、SNARE を一過性に発現させた。24 時間後に、細胞培養液中に分泌された IgG を回収し、サンドイッチ ELISA 法を用いて IgG 生産量を定量した。
【結果と考察】一過性発現した SNARE のうち、4 種は生産性にほとんど影響を与えず、1 種は負の影響を与えたが、ある種の SNARE の一過性発現は、組換え IgG の分泌生産性に正の影響を与えた。この SNARE はトランスゴルジネットワーク（TGN）において発現され、初期エンドソームから TGN への逆行性輸送に関与する。この逆行性輸送では TGN から細胞膜への輸送に必要なタンパク質のリサイクルが行われていると言われており、当該 SNARE の一過性発現によりこのリサイクルが活性化し、抗体の分泌輸送が促進されたと示唆される。

Modification of Chinese hamster ovary cells for high productivity of biohparmaceuticals.

○Junta Shimada[1], Ryo Misaki[1], Takao Ohashi[1,2], Kazuhito Fujiyama[1]
([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

Key words Chinese hamster ovary, IgG, Productivity, SNARE protein

3Gp08 HCP 混入リスクの低減を目的とした *Anxa2*、*Ctsd* ノックアウト CHO 細胞株の樹立

○福田 展雄, 千賀 由佳子, 本田 真也
（産総研・バイオメディカル）
nob-fukuda@aist.go.jp

チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞は、モノクローナル抗体等の組換え治療用タンパク質の生産における宿主細胞として広く利用されてきた。宿主由来タンパク質（HCP）の大部分は精製過程において除去されているが、最終製品中に含まれる 100ppm 以下の HCP が治療用タンパク質の品質低下や免疫応答を誘発することが報告されている。これらの HCP を精製過程において完全に除去することは現実的には困難であるため、理想的には不要タンパク質を発現しないノックアウト細胞株を樹立して宿主とすることが望ましい。しかしながら、細胞自身の増殖や治療用タンパク質の生産能力に対して、遺伝子ノックアウトが及ぼす影響については未だ評価されていない。
そこで本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いて、*Anxa2* または *Ctsd* ノックアウト CHO 細胞株を樹立することで、治療用タンパク質に対する HCP 混入リスクの低減を目的とした遺伝子ノックアウトの実現可能性を評価することとした。樹立した細胞株のライセート中に標的 HCP が存在しないことを確認したのち、各細胞の増殖能および生存率を評価したところ野生型と同等の数値を示すことが確認された（*Biotechnol Prog.* 2019 Apr 11:e2820.）。これらの細胞株を宿主として治療用タンパク質を生産することで、治療用タンパク質の品質低下や免疫応答のリスク低減が可能となることが期待される。今後は候補遺伝子のノックアウトの影響を比較していく必要があり、治療用タンパク質の生産能力や安定性の定量的評価についても、分析手法の整備における課題として検討を進めていく。

***Anxa2*- and *Ctsd*-knockout CHO cell lines to diminish the risk of contamination with HCP**

○Nobuo Fukuda, Yukako Senga, Shinya Honda
(Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words gene knockout, CHO, host cell proteins

3Gp09 抗体医薬品生産細胞の高度化を目指した高機能化因子迅速同定システムの開発

○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]次世代バイオ医薬品製造技術研究組合）
onitsuka@tokushima-u.ac.jp

抗体医薬品は主に動物細胞を用いた組換えタンパク質として製造されている。現在、生産対象の抗体分子や製造プロセスの特性に応じて、生産細胞の高度化や改変を目的としたセルエンジニアリング手法の開発が求められている。しかしながら高度化や改変に有用な遺伝子、即ち高機能化因子（Production enhancer gene: PEG）を発掘、同定するには 6 ヶ月程度の時間と多大な実験量が必要である。そこで我々は抗体医薬品の製造で汎用されている CHO 細胞を対象として、PEG の迅速同定システムを開発した。本システムでは IgG1 抗体生産 CHO 細胞にエピソーマル発現システムを導入している。即ち EBNA1 発現遺伝子を CHO 細胞染色体に組み込み、評価対象となる遺伝子発現用のプラスミドには oriP 配列を組み込むことで、導入プラスミドが細胞内で複製しながら細胞が増殖する。開発したシステムを用いて発表論文として抗体生産能力の向上が報告されている遺伝子を評価した結果、必ずしも PEG として作用しないことが示され、従来手法の問題点が推察された。また各種の遺伝子を評価した結果、複数の PEG を同定することに成功した。さらに PEG の 1 つを CHO 細胞の染色体に導入した安定発現細胞を構築したところ、小フラスコを用いた培養試験で IgG1 生産量が 0.5g/L（親細胞）から 1.9g/L（改変細胞）に劇的に向上した。本システムは遺伝子導入から 10 日程度の短期間と少ない労力で高機能化因子を同定できるため、従来の評価・同定手法と比較して労力と期間の点で圧倒的に優位な手法であり、生産細胞の合理的な高度化に貢献するであろう。

Rapid identification of production enhencer gene (PEG) in CHO antibody production

○Masayoshi Onitsuka[1,2], Atsuko Shimadzu[2], Hiroe Amou[2]
([1]Grad. Sch. Biosci. Bioind, Tokushima Univ., [2]MAB)

Key words recombinant protein production, CHO cells, cell engineering, production enhancer gene

3Hp01 ITO 電極システムと試料の前処理を活用した新規微生物培養化法の開発

○名取 暁[1], 小山 純弘[2], 青柳 秀紀[1]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]エイブル）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】
未開拓な遺伝子資源や有用代謝産物の獲得、機能解明を目指し、未培養微生物の培養化が国内外で期待され、新たな方法論が求められている。この現状を踏まえ、本研究では未培養微生物の培養化を目指し、酸化インジウムスズ（ITO）電極システムに着目し、本システムの各プロセスにおける特性（微生物の選抜や回収の特徴や仕組み）を把握すると共に、環境試料の適切な前処理と組み合わせることで、未培養微生物の培養化を試みた。
【方法と結果】
筑波大学構内で採取した土壌や池の水などの環境試料を 0.8 μm の孔径を有するフィルターで濾過する等の前処理により適宜調製し実験に使用した。ITO 電極（作用電極）、白金電極（対電極）および銀／塩化銀電極（参照電極）を装備したチャンバーに、調製した試料を投入し、－0.4 V の定電位を印加し、電極上に微生物を集めた（プロセス１）。続いて±20 mV、9 MHz の正弦波電位を印加し（プロセス２）、微生物を取得した（電極上に残存した菌はスクレーパーを用いて取得）。それぞれのプロセスで得られた微生物を R2A 寒天培地等で培養し、PCR-DGGE 法などで培養微生物叢を解析した結果、高周波電位の印加により特異的に培養化する細菌の存在が示唆された（電位の印加で培養化が抑制［または死滅］する細菌も存在）。このことから、高周波電位刺激によって培養化が、(a) 促進される、(b) 阻害される、(c) 影響を受けない、3 つのタイプの細菌が存在することが示唆された。また、PCR-DGGE 解析で高周波電位刺激を加えた場合にのみ特異的に見られたバンドのシークエンスを解析したところ、相同性が 95%未満の細菌が複数存在した（現在、単離培養について検討中）。

Development of culture method for uncultured microbes using ITO electrode system and sample pretreatment

○Akira Natori[1], Sumihiro Koyama[2], Hideki Aoyagi[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]ABLE. Co.)

Key words ITO electrode, pretreatment, microbial dark matter, PCR-DGGE

3Hp02 腸上皮細胞と腸内細菌の共培養法の開発

○遠藤 輪, 青柳 秀紀
（筑波大院・生命環境）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】
近年、腸内細菌叢が宿主の健康や疾患に関係していることが示されているが、腸内環境で生じる諸現象のメカニズムの多くは未だ解明されていない。特に腸管内の物質動態の把握は腸内細菌の機能を理解するために重要であり、その解析には腸内環境を模倣した *in vitro* 実験モデルの開発が望まれる。しかし現状では、腸上皮細胞と腸内細菌の共培養は技術的に困難であり、両者が関与する現象の解析に *in vitro* 実験系は十分に活用できていない。本研究では、腸上皮細胞と腸内細菌の共培養を実現するために、共培養時に制御すべき培養因子を把握するとともに、その因子を制御した共培養系の構築を試みた。
【方法と結果】
共培養時に制御すべき培養因子を明らかにするために、想定される物理化学的な環境の変化（栄養源の枯渇、微生物代謝物の添加、培養液の pH の低下）を Caco-2 細胞（腸上皮細胞）に与え、その影響を評価した。種々検討した結果、特に培養液の pH の低下が腸上皮細胞の生存率やバリア機能を大きく低下させることが明らかになった。次に、上述の培養因子を制御し、共培養を実現するために微生物と腸上皮細胞の生育空間を隔てた培養系を構築した。本培養系を用いて共培養を試みたところ、適切な条件を設定することで、24 h の共培養後にも良好な腸上皮細胞の生育が認められた。以上の結果から、培養因子をコントロールすることによって、それぞれの細胞を個別に培養する場合よりも生体内環境を高度に模した *in vitro* 腸管モデルが構築できる可能性が示唆された。

Development of co-culture method of intestinal epithelial cells and intestinal bacteria

○Rin Endo, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words Caco-2 cells, coculture, microbial flora, viability

3Hp03 Silver nanoparticles biosynthesis from extracellular pigment of *Talaromyces purpurogenus* and their biomedical applications

○Sharad Bhatnagar[1], Toshiro Kobori[1,2], Hideki Aoyagi[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Food Res. Inst., Natl. Agric. Food Res. Org., Tsukuba)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

Bio-fabrication of nanoparticles is attaining increasing attention due to environmental costs associated with conventional techniques. Moreover, functionalized nanoparticles generated from biological reduction process have demonstrated interesting biomedical applications. In this view, extracellular pigment produced by *Talaromyces purpurogenus* was used as an economical and environmentally friendly reducing agent for synthesis of silver nanoparticles (AgNPs). In order to synthesize silver nanoparticles, silver nitrate was mixed with pigment and incubated with light for 48 h. Produced AgNPs were found to have a surface plasmon resonance around 410 nm and rate of synthesis was influenced by pigment pH. The biosynthesized AgNPs were characterized by Transmission electron microscopy (TEM), Dynamic light scattering (DLS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Electron probe micro analyzer (EPMA) and Zeta potential. TEM analysis indicated the presence of spherical AgNPs with size distribution from 5-40 nm. The AgNPs exhibited a significant antimicrobial activity against *E. coli* and *S. epidermidis*. The cytotoxic potential of AgNPs was investigated against human cervical cancer (HeLa), human liver cancer (HepG2) and human embryonic kidney (HEK-293) cell lines with 5-fluorouracil acting as a positive control. A significant activity was recorded against HepG2 cell lines with an inhibitory concentration (IC_{50}) value of 11.1 μg/ mL.

Silver nanoparticles biosynthesis from extracellular pigment of *Talaromyces purpurogenus* and their biomedical applications

○Sharad Bhatnagar[1], Toshiro Kobori[1,2], Hideki Aoyagi[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Food Res. Inst., Natl. Agric. Food Res. Org., Tsukuba)

Key words Anti-cancer activity, Green nanotechnology, Silver nanoparticles, *Talaromyces purpurogenus*

3Hp04 生体物質付着抑制材 prevelex®は細胞増殖因子の非特異的付着を抑制し効率的な細胞培養を可能とする

○中嶋 宏之, 安部 菜月, 鈴木 康平, 広井 佳臣, 西野 泰斗
（日産化学）
nishino@nissanchem.co.jp

タンパク質等の生体物質は保存や調製時に疎水性相互作用により容器表面に非特異的に付着してしまう。そこで我々は非特異的付着を防止する新規材料としてリン酸ユニットとアミンユニットから構成される双極性イオンポリマー prevelex®を開発した。本研究では prevelex®を各種基材に塗布した際のタンパク質付着抑制効果を確認するとともに、細胞培養への応用を検討した。
ポリプロピレン(PP)やポリスチレン(PS)、ガラス製の器具に prevelex®を塗布して HRP 標識 IgG 蛋白質の付着を評価したところ、prevelex®を塗布した器具は付着量が 9 割以上減少した。また、この付着抑制効果はタンパク質の分子量や等電点に依存せず、gamma 線滅菌後も効果が保たれた。
細胞培養を行うとき Basic fibroblast growth factor(bFGF)等の細胞増殖因子を培養培地に添加することがある。しかし、これら細胞増殖因子は培養容器に付着するため培地中での濃度が細胞培養時に低下することが懸念されている。そこで、細胞培養用プレートに prevelex®を塗布し、スフェロイド状態のヒト子宮由来平滑筋肉腫細胞(SKN 細胞)と bFGF 0.01-100 ng/ml を加えて 4 日間培養したところ prevelex®を塗布したプレートは細胞増殖が 1.5 倍早かった。また bFGF の EC50 を算出したところ prevelex®塗布により EC50 が 1/6 以下に減少した。更に ELISA 試験により prevelex®が細胞培養プレートへの bFGF の付着を抑制することも確認できた。
以上のように prevelex®は PP や PS、ガラス製の培養容器に塗布可能であり、本材料を塗布した培養容器はより低い細胞増殖因子の濃度にて効率的に細胞を培養できることが明らかとなった。現在 prevelex®を用いた幹細胞の培養システムを検討している。

Biological material adhesion inhibitor prevelex® suppresses nonspecific adhesion of cell growth factors and enables efficient cell culture

○Hiroyuki Nakajima, Natsuki Abe, Kohei Suzuki, Yoshiomi Hiroi, Taito Nishino
(Nissan chemical Corp.)

Key words protein adsorption, cell growth factor, cell culture

3Hp05 吸着剤を用いた培地再生方法の試み

○北川 文彦 [1], 菊池 晴菜子 [2], 近藤 昌幸 [1], 神保 陽一 [1], 亀田 知人 [2], 吉岡 敏明 [2]
（[1]日機装・技術開発研, [2]東北大院・環境）
f.kitagawa@nikkiso.co.jp

【背景と目的】スピナーフラスコ等を用いておこなわれる高密度攪拌培養では、細胞の高密度化に伴い、様々な問題が生じる。特に、iPS 細胞の維持や分化誘導を高密度攪拌培養で行う場合、乳酸やアンモニア等の老廃物の蓄積やグルコース等の栄養源が枯渇することにより、高頻度で高価な培地を交換する必要があり、培養コストが増加する。我々は、培養コストを低下させるために、細胞培養中の培地から細胞老廃物である乳酸とアンモニアを吸着剤により除去することで、培地再生しながら高密度攪拌培養するシステムの開発を目指している。本研究では、培養上清から細胞老廃物を吸着除去可能な吸着剤の探索と、吸着剤による培地再生方法の有効性を検証することを目的とした。
【方法】継代培養直前の乳酸とアンモニアを含んだ培養上清に、様々な吸着剤を浸漬して乳酸、アンモニア除去性能を確認し、最適な吸着剤を探索した。また、選定した乳酸吸着剤とアンモニア吸着剤を細胞培養用培地に浸漬させた後、LS-MS/MS を用いた培地成分網羅的解析を実施し、培地成分吸着の有無を調べた。さらに、細胞培養により増殖や性質を確認した。
【結果と考察】乳酸吸着剤として層状複水酸化物、アンモニア吸着剤として L 型ゼオライトを用いることで、培養上清中から乳酸とアンモニアを除去可能であることを確認した。また、培地成分網羅的解析の結果、吸着剤による培地有用成分吸着は数種類であった。さらに、層状複水酸化物と L 型ゼオライトを浸漬した培地にて細胞培養したところ、細胞の増殖性や性質に影響を与えないことを確認した。以上の結果から、培養上清から乳酸・アンモニアを選択的に吸着する吸着剤を選択でき、これらの吸着剤を用いた培地再生手法は、有用であると考えられる。

Medium regeneration method utilizing adsorbents for large scale cell culture

○Fumihiko Kitagawa[1], Hanako Kikuchi[2], Masayuki Kondo[1], Yoichi Jimbo[1], Tomohito Kameda[2], Toshiaki Yoshioka[2]
([1]Nikkiso Co., Ltd., [2]Grad. Sch. Environ. Stud. Tohoku Univ.)

Key words regeneration, cell

3Hp06 複雑な流体環境は単球の生理的機能を亢進する

○小田 彰恭[1], 池田 光悦[1], 高橋 美裕[1], 野辺 善仁[2], 村松 和明[1]
（[1]電機大院 ・理工, [2]大洋技研）
k-muramatsu@mail.dendai.ac.jp

【背景・目的】
血液中の好中球や単球が血管外遊走（ホーミング）をする際、ホーミングレセプターである L-セレクチンとその認識リガンドである細胞表面糖鎖との蛋白質-糖鎖分子の相互作用により、細胞の流速を減速することが知られているが、血管内の流体環境が L-セレクチンの発現に与える影響については不明な点が多い。そこで本研究では、血管内のような複雑な流体環境を想定した in vitro 系において、ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 を用いることで、複雑な流体環境が単球の生理的機能に及ぼす影響について評価した。
【実験方法】
複雑な流体環境は自転公転式攪拌装置を用いて創出した。自公転式攪拌装置による動的環境下、あるいは静置培養下で THP-1 を培養し、RT-PCR 法にて L-セレクチンの経時的な発現挙動の評価を行った。また、それぞれの環境下で培養した THP-1 にホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート（PMA）による刺激後、マクロファージ様細胞の出現数及びその生理的機能について比較・評価した。
【結果・考察】
複雑な流体環境（動的環境）下で培養した THP-1 は、静置培養下の細胞と比較し、L-セレクチンの発現が促進され、PMA 依存的な接着性の亢進を認めた。さらに、動的環境下で培養した THP-1 を PMA で刺激したところ、静置培養と比べてマクロファージ様細胞の接着性と遊走活性が向上した。一方、接着後の細胞における接着因子遺伝子の発現比較では、両群間で顕著な差は確認されなかった。これら結果により、血液循環がもたらす流体環境は、白血球の刺激感受性を高め、細胞間接着の向上に寄与する内在的要因となる可能性を示唆した。

Complicated dynamic fluid environment upregulated the expression of physiological function of monocyte

○Akinori Oda[1], Koetsu Ikeda[1], Miyu Takahashi[1], Yoshihito Nobe[2], Kazuaki Muramatsu[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng. Tokyo Denki Univ., [2]Taiyo Giken Co.Ltd)

Key words dynamic fluid environment, rotation/revolution, monocyte, culture

3Hp07 回転浮遊培養におけるヒト iPS 細胞集塊挙動の速度論的解釈

○橋田 礼博[1], 植村 壽公[2], 紀ノ岡 正博[1]
（[1]阪大院・工・生命先端, [2]阪大院・工・精科応物）
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

近年，再生医療，創薬・疾患研究におけるヒト iPS 細胞の利用拡大に伴い，細胞の大量培養技術の確立が強く求められている．ヒト iPS 細胞の大量培養には，省スペース化・高密度培養を可能とする浮遊培養が適しているが，同じ工程で培養を行ったとしても細胞株の種類に依存して細胞収率が変動してしまう．現在，この変動に対応した制御手法が確立されていないことが，大量培養技術を構築していく上での問題点の 1 つとなっている．この原因として，培養過程で形成される細胞集塊の挙動が細胞増殖に与える影響について十分に理解されていないことが挙げられる．本研究では，細胞集塊の挙動（細胞増幅，集塊合一，集塊崩壊）に着目し，これらの挙動が細胞増殖に与える影響を，反応速度論的解釈を通じて明らかにすることを目的とした．
我々は，静置培養系（細胞増幅のみが発生）と回転浮遊培養系（細胞増幅，集塊合一，集塊崩壊が発生）を用い，ヒト iPS 細胞集塊（253G1 株，201B7 株）の培養を 72 h 行った．2 つの培養系間で，細胞増幅の評価指標である比増殖速度・比死滅速度，集塊合一・集塊崩壊の評価指標である比集塊数増幅速度・比集塊サイズ増幅速度を比較した．253G1 株では初期の 24 h で集塊合一が高頻度で発生しており，その後の比増殖速度が静置培養系と比較して著しく低下していた．一方で 201B7 株では，培養開始から 24 h 以降，細胞集塊がシングルセルへと崩壊する頻度が高く，こちらも静置培養系と比較して比増殖速度が著しく低下していた．さらに我々は，細胞集塊凍結切片の免疫蛍光染色の結果から，集塊合一に寄与している E-cadherin や集塊形成の安定性に寄与している ECM の発現が細胞株間で顕著に異なることを見出した．以上から，これらのタンパク質発現の違いが集塊合一・集塊崩壊の発生頻度を変化させ，細胞増殖に影響を与えていることが示唆された．

Elucidation of kinetics on aggregate behaviors of human induced pluripotent stem cells in rotating flow culture

○Akihiro Hashida[1], Toshimasa Uemura[2], Masahiro Kino-oka[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Prec. Sci. Technol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ)

Key words human induced pluripotent stem cells, kinetics on aggregate behaviors, coalescence, collapse

3Hp08 ヒト人工多能性幹細胞の無菌閉鎖系における塑性流体を用いた 1 L 規模の培養工程の構築

○長谷 洸輝, 山本 陸, 紀ノ岡 正博
（阪大院・工）
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSCs) を再生医療や創薬研究など種々の分野に活用する試みがなされている．そのため多量の細胞の用意する増幅工程の構築が急務となるが，hiPSCs のせん断応力への脆弱性から大規模 (> ca. 1 L) での培養例は少なく，hiPSCs に適した培養系の検討は十分ではない．また製造を鑑みて，異物混入や交差汚染の危険性を排除した工程設計が求められるため，無菌閉鎖系の培養工程構築が望まれる．そこで iPSCs を無菌的に培養可能な大量培養工程構築を目指し研究を行った．
【方法】交差汚染のリスク低減並びに，装置の滅菌，洗浄処理とそのバリデーションを必要としないという有用性から本研究ではシングルユース培養装置を利用した．また，無撹拌で細胞の浮遊維持が可能となる塑性流体を培地として採用した．低頻度の振とう操作により，液界面での酸素供給と培養環境の均質化を行いながら 120 h 培養を行った．また塑性流体は中空糸膜内を流動させることで膜分離での液交換が可能である．そこで培養装置と膜分離装置を無菌的に接続し培養 48，96 h において培地交換を行った．培養 24 h 毎に細胞密度の計測を行い，対数増殖期の比増殖速度を算出し細胞の増殖能を評価した．
【結果と考察】膜分離装置を用いた培地交換操作と、装置間の無菌接続により，培養期間において閉鎖系を維持した培養が可能であった．また本培養工程において塑性流体を用いることで、1 L 規模の培養装置での hiPSCs 増殖が確認され、とくに対数増殖期における細胞の比増殖速度は，既存の小規模撹拌型培養装置での培養と同等の値を示した．これらの結果から本研究で提案した培養系は、塑性流体を用いたことで hiPSCs の増殖能維持が可能になり、また無菌閉鎖系の維持が可能となる培養工程の構築が行われた．

Development of 1 L scale closed expansion process with plastic fluid for human induced pluripotent stem cell

○Hiroki Nagatani, Riku Yamamoto, Masahiro Kinooka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words closed culture process, plastic fluid, hiPSCs expansion, single-use culture bag

3Hp09 ヒト iPS 細胞培養における播種密度が分化ポテンシャルに与える影響

○金 美海, 秋山 真一, 紀ノ岡 正博
（阪大院・工）
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【目的】ヒト iPS 細胞の産業利用・医療応用する上で細胞の品質管理や規格化の需要が高まり，様々な研究が行われている．近年では iPS 細胞株の品質評価や規格化技術の確立へ向けてエピジェネティック修飾解析が有用になってきた．しかし，ヒストン修飾によるクロマチン構造変化は，遺伝子の転写制御に重要な役割を果たす報告はあるが，細胞増幅培養での育て方の違いが未分化性と分化ポテンシャルに与えている影響は明らかではない．本研究では，iPS 細胞培養における播種密度の違いがエピジェネティックスの変化と分化ポテンシャルに及ぼす影響について検討する．

【方法および結果】ヒト iPS 細胞を 2 つの播種密度 2.5×10^3 cells/cm^2 と 2.5×10^4 cells/cm^2 で iMatrix 面上に播種し，StemFit AK02N 培地を用いて継代培養を行った．継代 1 と 50 回目の細胞を用い， 216 h の培養を行い，培養中のヒストン H3 の 4 番目と 27 番のリジンのメチル化(H3K4me3，H3K27me3) の変化をウェスタンブロット法で解析した．その結果，H3K4me3 と H3K27me3 はいずれも培養中にする増加する傾向がみられ，培養 216 h で播種密度の違いを比較すると高密度条件でメチル化のレベルがより高いことが確認された．さらに，高密度条件の 50 回継代培養を行った細胞と比べると，1 回継代培養を行った細胞よりはるかに高いことが分かった．これらの細胞を用い三胚葉への分化誘導へと誘導したところ，異なる播種密度で継代した細胞での各胚葉系の分化ポテンシャルが変化していることが確認された．以上の結果から，細胞の周囲の状況によってヒストンのメチル化に変化が生じ，繰り返された培養操作によってメチル化の異常がおきている可能性が示され，それが分化ポテンシャルに変化をもたらすことが分かった．

Impact of seeding density on differentiation potential in culture of human iPS cells

○Mee-Hae Kim, Shinichi Akiyama, Masahiro Kino-oka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Human induced pluripotent stem cells, Expansion culture, Histone methylation, Differentiation potential

3Ip01 ソルビトールストレスが酵母 OC-2 株の脂肪酸構成に与える影響

○三木 健夫
（山梨大院・医工総）
takemiki@yamanashi.ac.jp

【目的】酵母に含まれる脂肪酸の構成比は、培養温度によって変化することが知られている。これは酵母のストレス応答の一例とされている。一方、温度変化以外のストレスに対する酵母の脂肪酸構成比変化について調査したものは少ない。本研究では、3M ソルビトール溶液を用いて浸透圧ストレスを与えた酵母 *Saccharomyces cerevisiae* OC-2 株の脂肪酸構成比を解析した。また、浸透圧ストレス耐性と関係する *GPD1* あるいは *GPD2* 遺伝子を欠損した株についても同様に調査を行った。

【方法】*S. cerevisiae* OC-2 株および本株の *GPD1*、*GPD2* 遺伝子破壊株を SD 合成培地にて定常期まで培養した。酵母細胞を集菌し洗浄した後、3M ソルビトール溶液(50ml)に対して 2.5×10^7 clls/ml になるよう細胞を接種し、28℃で 2 時間、浸透圧ストレスを与えた。ストレス処理後、細胞を洗浄し凍結乾燥させ、脂肪酸抽出メチル化キットおよびメチル化脂肪酸精製キット(Cat. No.06482-04, 06482-94；ナカライテスク)用いて、酵母細胞より脂肪酸を抽出・精製した。脂肪酸抽出をガスクロマトグラフィーに供し、脂肪酸構成比を測定した。

【結果】非ストレス条件下にある OC-2 株および *GPD1*、*GPD2* 遺伝子破壊株の脂肪酸構成を調査した結果、脂肪酸（C14, C14:1, C16, C16:1, C18, C18:1）の比率は 3 株とも同様であった。一方、浸透圧ストレスを与えた場合、各株とも C16:0 に対する C16:1 割合は大きく変化しなかったものの、C18:0 に対する C18:1 の割合が 20％程度増加しており、この傾向は *GPD1* 遺伝子破壊株で強く見られることがわかった。この様な現象が観察される原因について、現在調査中である。

Effect of Sorbitol stress on fatty acid component in yeast *S. cerevisiae* OC-2

○Takeo Miki
(Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

Key words lipid, yeast, osmotic response, stress

3Ip02 有機溶媒に対する酵母の応答：キシレンによる酸化的ストレスと翻訳抑制の惹起

河合 孝朗[1], 芳本 奈々[1], 吉田 雅偲[2], ○井沢 真吾[1,2]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]京工繊大・工芸科学）
thioredoxin@kit.ac.jp

発酵による疎水性物質の生産には水・有機溶媒二相系がしばしば用いられるため、微生物の有機溶媒耐性の向上が強く求められている。バクテリアでは有機溶媒に対する応答機構や耐性改善について多数の研究報告があるのに対し、真菌類についての報告は非常に少ないのが現状である。そこで我々は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の有機溶媒に対するストレス応答機構を解析し、得られた知見を基に有機溶媒耐性の改善に取り組んでいる。本研究では、シックハウスシンドロームの原因物質の一つでもあり、代表的な有機溶媒であるキシレンに対する酵母の細胞応答について解析を行った。
0.02%以上のキシレンによってミトコンドリアの断片化と細胞内活性酸素種(ROS)レベルの有意な上昇が速やかに引き起こされた。また、ROS レベルの上昇に伴って、酸化的ストレス応答性の転写因子 Yap1 の核局在と、Yap1 標的遺伝子である *GPX2* などの転写活性化が確認された。0.02% キシレンストレス下では Gpx2 タンパク質レベルも顕著に増加したのに対し、0.03% キシレンストレス下では *GPX2* mRNA レベルが顕著に増加したにもかかわらず、Gpx2 タンパク質レベルの上昇が認められなかった。そこで、タンパク質合成に対する影響をポリソーム解析などで検討したところ、0.03% 以上のキシレンストレスによって酵母の翻訳活性が持続的に強く抑制されることを新たに見出した。以上の結果から、0.03% 以上のキシレン存在下ではタンパク質の新規合成を介したストレス耐性の獲得は困難だと考えられた。また、酵母のキシレン耐性を改善する上では、キシレンの細胞内への侵入を防ぎ、細胞外への排出能を前もって高めることが有効だと考えられた。

Xylene causes oxidative stress and pronounced translation repression in *Saccharomyces cerevisiae*

Takao Kawai[1], Nana Yoshimoto[1], Masasi Yoshida[2], ○Shingo Izawa[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words xylene, translation repression, oxidative stress, *Saccharomyces cerevisiae*

3Ip03 出芽酵母における自然発生型の新規マルチストレス耐性変異株の分離と解析

○田中 桃未[1], 中川 洋史[2], 小林 日花梨[1], 小久保 晋[2], 山村 英樹[2], 早川 正幸[2]
（[1]山梨大院・医工総, [2]山梨大院・総研部）
youji@yamanashi.ac.jp

【背景・目的】出芽酵母において，食品製造過程における冷凍や高糖濃度などの様々なストレス，すなわちマルチストレスにより発酵力や生存率に影響を受けることが問題となっている．本研究室では，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）を用いて，これまでにエチルメタンスルホン酸により変異処理を行った実験室酵母からマルチストレス耐性変異株を取得し，原因変異遺伝子として *CDC25* 遺伝子のミスセンス変異である *CDC25-P1306L* を同定している．しかし，変異処理を行わずに LCH 法で取得されるマルチストレス耐性変異株については知見が少ない．そこで本研究では，LCH 法で取得される自然発生型のマルチストレス耐性変異株における原因変異遺伝子の同定を目的として実験を行った．
【方法・結果】野生型の実験室酵母株を，変異処理を行うことなく 10 mM の過酸化水素含有 YPDA 平板培地にプレーティングして培養し，生育コロニーの分離およびスポット試験により，17 株の過酸化水素耐性変異株を取得した．取得した株の高ショ糖濃度耐性および高エタノール濃度耐性を調査したところ，高エタノール濃度に耐性を示さなかった 1 株以外の変異株は両ストレスに耐性を示した．また，取得した変異株のうち 7 株について優性劣性試験を行った結果，過酸化水素に対し優性もしくは半優性のストレス耐性変異を持っていることが明らかになった．さらに，これらの株について *CDC25* の塩基配列を解読した結果，7 株中 5 株は *CDC25* に様々な種類の *CDC25-P1306L* とは異なる変異を持つことが判明した．従って，LCH 法を用いることで，*CDC25* に変異を持つ自然発生型のマルチストレス耐性変異株が多く取得できることが示唆された．現在，*CDC25* 変異とマルチストレス耐性の関係を解析するとともに，残りの変異株についても原因変異遺伝子の同定を進めている．

Isolation and analysis of new multistress-tolerant spontaneous mutants of *Saccharomyces cerevisiae*

○Momomi Tanaka[1], Youji Nakagawa[2], Hikari Kobayashi[1], Susumu Kokubo[2], Hideki Yamamura[2], Masayuki Hayakawa[2]
([1]Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi, [2]Grad. Fac. Interdisc. Res., Univ. Yamanashi)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, spontaneous mutant, muiltistress tolerance, hydrogen peroxide

3Ip04 Komagataeibacter medellinensis NBRC3288 の高温育種株の耐熱性メカニズム

○水町 優希[2], 小田 みすず[2], 伊藤 光平[2], 松本 奈実[2], 松谷 峰之介[2], 片岡 尚也[1,2,3], 薬師 寿治[1,2,3], 松下 一信[1,2,3]
（[1]山口大・農, [2]山口大院・医系, [3]中高温微セ）
kazunobu@yamaguchi-u.ac.jp

【背景と目的】酢酸菌は偏性好気性菌であり、果実やその酸敗した果実酒などの中で高濃度の糖やアルコールを様々な糖酸、有機酸に酸化的に変換して高濃度で蓄積する能力を有している。中でも *Acetobacter* や *Komagataeibacter* は産業的な食酢の生産に用いられているが、酢酸発酵を行う際に発酵熱が生じることで培地の温度が上昇し生育や酢酸発酵が阻害される。そのため細かい温度制御が必要となるが、もし酢酸菌自身が耐熱性を獲得し高温で発酵可能な耐熱化株を得ることができれば冷却のコスト削減などの効果が期待できる。本研究では *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 を発酵条件下で高温適応育種し得られた株である ITO－1 株に生じた *spoT* 遺伝子の変異（C 末制御ドメイン一部の欠失）に注目して研究を行なった。
【結果】これまでに ITO－1 株は発酵条件下では耐熱性を示すが非発酵条件下では耐熱性を示さないことが分かっており、*spoT* の C 末制御ドメイン全域を欠失した ΔspoT 株を作製し調べたところ、発酵条件下で ITO-1 株と同じように耐熱性を示すことが明らかになっている。しかしながら今回、ΔspoT 株は非発酵条件でも ITO-1 株と異なり耐熱性を示すことを明らかにした。また spoT は、pp(p)Gpp の合成分解を介して細胞伸長に関与すると報告されているため、細胞長を測定したところ ΔspoT 株と ITO－1 株で同じ条件でも細胞長に違いが見られた。これらの違いは *spoT* における C 末制御ドメインに２つの領域があるためと考え、ITO-1 株と同じ欠損を持つ株の作製を進めているので併せて発表する。
（本研究は JST-ALCA の支援を受けて行われた。）

Analysis of thermotolerance mechanism in thermally adapted strains of Komagataeibacter medellinensis NBRC 3288

○Yuki Mizumachi[2], Misuzu Oda[2], Kouhei Ito[2], Nami Matsumoto[2], Minenosuke Matsutani[2], Naoya Kataoka[1,2,3], Toshiharu Yakushi[1,2,3], Kazunobu Matsushita[1,2,3]
([1]Fac. Agric., Yamaguchi Univ., [2]Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ., [3]Research Center for Thermotolerant Microbial Resources, Yamaguchi Univ.)

Key words thermotolerance, acetic acid, spoT

3Ip05 酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 株における酸化ストレス応答因子 Dps の機能解析

○小林 聖弥[1], 鈴木 敏弘[1], 宮平 響子[1], 勝木 浩平[1], 岸 幹也[2], 石川 森夫[1]
（[1]東京農大応生科・醸造, [2]Mizkan Holdings・中研）
m1ishika@nodai.ac.jp

【目的】食酢醸造に用いられる酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* はエタノールを細胞膜上の脱水素酵素によって酢酸に不完全酸化し（酢酸発酵）、生成した酢酸を細胞内で完全酸化する（酢酸過酸化）絶対好気性菌である。本菌の電子伝達系の駆動時には、電子の授受に付随した活性酸素種（ROS）の発生が予測される。そこで本研究では本菌の ROS 応答機構の解析を行った。
【方法及び結果】*A. pasteurianus* NBRC 3283 株を、エタノール存在下で培養を行ったところ、酢酸過酸化時に著量の ROS の蓄積が見られた。一方、同時期におけるカタラーゼの活性は低かった為、本菌は ROS 耐性機構を有する可能性が示唆された。そこで、大腸菌において ROS 耐性への関与の報告がある Dps に着目し、本菌 Dps の機能について検証を行った。プラスミド DNA と Dps の共存下で H_2O_2 と Fe^{2+}に暴露した結果、プラスミド DNA の断片化が抑制された。また、Dps は H_2O_2 と Fe^{2+}存在下で濃度依存的にヒドロキシラジカルの発生を抑制し、Fe^{2+}の添加により Fe^{3+}の Dps 分子内での保持を示す 305nm の吸光度の上昇が見られた。これらの結果から本因子はヒドロキシラジカルによる酸化障害に対して防御的な作用を示すことが強く示唆された。さらに *dps* 遺伝子の破壊による影響について検討した結果、*dps* 破壊株は親株と比較して顕著な H_2O_2 感受性を示すとともに、細胞内に Fe^{2+}が蓄積した。以上のことから、本菌 Dps は細胞内 Fe^{2+}を捕捉し、Fenton 反応を阻害することで酢酸過酸化期における菌体に ROS 耐性を付与している可能性が示唆された。

Functional analysis of Dps against oxidative stress in *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283

○Seiya Kobayashi[1], Toshihiro Suzuki[1], Kyoko Miyahira[1], Kohei Katsuki[1], Mikiya Kishi[2], Morio Ishikawa[1]
([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Mizkan Holdings Co., Ltd.)

Key words *Acetobacter pasteurianus*, Dps, ROS tolerance, Fenton reaction

3Ip06 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 における *spo0A* 遺伝子が胞子形成とブタノール生産に及ぼす影響

○古屋 一彦[1], 清 啓自[2], Panjuy Chaophaya[2], 門倉 利守[1], 鈴木 健一朗[1], 中山 俊一[1]
（[1]東農大院・農, [2]宮崎大・農）
s3nakaya@nodai.ac.jp

【背景・目的】
ブタノール生産能と胞子形成能を有する嫌気性グラム陽性細菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4（以下 N1-4）は熱感受性があり、30℃で旺盛にブタノールを生産するのに対して 37℃ではブタノール生産能が顕著に低下する。顕微鏡観察をしたところ、37℃では栄養増殖を停止し胞子形成している可能性が示唆された。そこで胞子形成開始を担う転写因子 *spo0A* を破壊し、胞子形成を阻害することでブタノール生産能が回復するかどうかを検討した。
【結果】
spo0A 遺伝子破壊には clostron システムを用いた。エリスロマイシン（以下 Em）耐性遺伝子が *spo0A* 遺伝子に挿入されることで、PCR にて増幅される DNA 断片のサイズの差異に基づいて遺伝子破壊を確認した。Em 耐性遺伝子を有するプラスミドを含むコントロール株と比較した結果、*spo0A* 破壊株は 30℃と 37℃培養では共に生育能が低下し、ブタノール生成能を失い酢酸と酪酸のみを生成するようになった。一方、顕微鏡観察では胞子の形成を確認した。このことから、*spo0A* 遺伝子はブタノール生成を正に制御する重要な因子であり、Spo0A が活性化し胞子形成が引き起こされることが熱感受性の直接的な原因ではない可能性が示唆された。

Characterization of *spo0A* disruptant in spore-forming butanol-producing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4

○Kazuhiko Furuya[1], Keiji Kiyoshi[2], Chaophaya Panjuy[2], Toshimori Kadokura[1], Kenichiro Suzuki[1], Syunichi Nakayama[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric., [2]Fac. Agric., Univ. Miyazaki)

Key words *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, butanol production, sporulation, *spo0A*

3Ip07 1-ブタノールの添加が大腸菌細胞に与える影響

○川畑 龍司[1], 荒木 勇登[2], 青井 議輝[1], 中島田 豊[1], 加藤 節[1]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]広島大・工）
setsukato@hiroshima-u.ac.jp

【背景・目的】 低炭素社会の実現に向けて、バイオ燃料は石油に代わる環境にやさしい燃料として注目されている。特にバイオブタノール生産はエネルギー密度の高い、優れた燃料生産技術として研究が進められている。しかし、ブタノールはほかのアルコールと比べて高い細胞毒性があり、ブタノール生産菌の増殖を妨げ、その結果最大ブタノール濃度が低いことが課題となっている。そこで本研究では、1-ブタノールが微生物に対してどのように毒性をもたらすのかを、大腸菌細胞をモデルとして 1 細胞解析により検討した。
【方法・結果】 LB 培地で対数増殖期まで培養した大腸菌 BW25113 株に 0～2%の 1-ブタノールを添加し、さらに 2 時間培養後に顕微鏡で細胞観察を行った。同時に、死細胞染色試薬の Propidium iodide を加えて生死判定も行った。その結果、2%のブタノール濃度において死菌率が大きく上昇し、70%以上が死細胞と判定された。また、1-ブタノール濃度が 2%のとき細胞の変形が観察された。その形態は細胞質のタンパク質が凝集した細胞とよく似た表現型であり、1-ブタノールの毒性は細胞内タンパク質の凝集を介して細胞死を引き起こす作用があることが示唆された。そこで、凝集タンパク質と共局在することが知られている *IbpA* をマーカーとして、タンパク質の凝集体形成がブタノール添加後どういったタイミングで起こるのか、また凝集体の形成がどのようにして最終的に細胞死を引き起こすのか、その様子をタイムラプス観察により解析する予定である。

Effect of 1-butanol addition on *Escherichia coli* cells

○Ryuji Kawabata[1], Yuto Araki[2], Yoshiteru Aoi[1], Yutaka Nakashimada[1], Setsu Kato[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ.)

Key words *Escherichia coli*, butanol, aggregation

3Ip08 ポリヒドロキシアルカン酸重合酵素活性部位における変異導入の影響

○南部 友香, 柘植 丈治
（東工大・物質理工）
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

[背景]ある種の微生物は、ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)と呼ばれるポリエステルを PHA 重合酵素の触媒反応を介して重合を行う。PHA 重合酵素(PhaC)には、活性中心であるシステインを含む共通したアミノ酸配列 G-X-C-X-G-G が存在する。この配列は保存性が高く、我々は、PhaC ボックスと呼ぶことを提唱している。本研究では、この PhaC ボックス内に存在するアミノ酸に点変異を導入し、重合活性への影響について調査した。
[実験] Ralstonia eutropha 由来の PHA 重合酵素である PhaCRe の PhaC ボックスに対して、活性中心である 319 位のシステイン及びその周辺である 317、321、322 位のグリシンに対して Overlap-PCR により点変異を導入した。この変異遺伝子をモノマー供給酵素遺伝子保持したプラスミドに挿入し、Escherichia coli XL1-Blue に形質転換した。LB 培地に炭素源としてグルコース 20g/L 添加し、30℃で振とう培養を行った。また LB 培地にグルコース 20g/L と PHA の染色色素である Nile Red を含む寒天培地を作製し、これに変異株を塗布し、30℃で静置培養を行った。ポリマー蓄積の確認は、ガスクロマトグラフィーと Nile Red プレートによる目視で行った。
[結果・考察]まず、タンパク質構造に影響の少ないアラニンを PhaC ボックスに導入した結果、活性中心である C319 を置換した変異体（C319A）のみがポリマーの合成を行わなかった。次に、Halomonas 属では S-X-C-X-G-G という PhaC ボックス様の配列を有することから、PhaCRe の 317 位グリシンをセリンに置換した変異体（G317S）を作成して調べたところ、PHA の合成が観察された。さらに PhaC ボックス内を種々のアミノ酸に置換して重合能を調べたところ、G322 はアミノ酸置換に対して許容性が低く、G317 及び G321 は許容性が高いことが示唆された。

Polymerization activity of polyhydroxyalkanoate synthase having point mutation at its active site

○Yuka Nambu, Takeharu Tsuge
(Sch. Mater. Chem. Technol., Tokyo Tech)

Key words polyhydroxyalkanoate, PHA synthase, *Ralstonia eutropha*, PhaC Box

3Ip09 P(3H2MB)生合成量増強のためのモノマー供給酵素の探索

○木原 崇博, 古舘 祥, 柘植 丈治
（東工大・物質理工）
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

＜緒言＞ 微生物が炭素貯蔵物質として蓄積するポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、生分解性、熱可塑性、生体適合性を有するバイオポリエステルとして利用できる。その中でもα位にメチル基が付いた3-ヒドロキシ-2-メチルブタン酸(3H2MB)を構成ユニットとするP(3H2MB)は、既存のPHAと比較して結晶化速度が速いため、緩慢な結晶化挙動を示すバイオポリエステルの欠点を解消することが期待されている。しかし、現在、P(3H2MB)を含むポリマーの大量生産にはチグリン酸を原料として合成可能であるが、合成量は乾燥菌体重量の20 wt%程度である。そのため、P(3H2MB)の生産量増強のためにはモノマー供給酵素や重合酵素の機能を増強する必要がある。本研究では、チグリン酸からP(3H2MB)を生合成する際のモノマー供給酵素である*R*-特異的エノイルCoAヒドラターゼ（*R*-ヒドラターゼ、PhaJ）に着目し、他細菌由来の*R*-ヒドラターゼに置き換えることでP(3H2MB)生産量が増強されるのかを調べた。
＜実験＞ *Aeromonas caviae* 由来のPHA生合成オペロンを組み込んだ大腸菌に、種々の細菌由来の *phaJ* 遺伝子を共発現させ、チグリン酸を炭素源としてP(3H2MB)を生合成した。PHA含有量は細胞から回収したPHAの重量を用いて算出し、PHAモノマー組成はGCMSにより確認した。
＜結果・考察＞これまでP(3H2MB)の合成を行っていた *A. caviae* 由来のPhaJに加えて本研究室で用いている *Pseudomonas* 属および *Bacillus* 属のPhaJを比較した結果、*P. aeruginosa* 由来のPhaJ1を共発現した組換え大腸菌が最も合成量が多く、中鎖PHA特異的なPhaJはP(3H2MB)モノマーを供給できないことが明らかになった。しかし、*A. caviae* のPHA生合成オペロンをそのまま導入した時と比較して生産量が減少したことから、P(3H2MB)の生合成にはオペロンごとPHA合成遺伝子を導入することが適切であることが示唆された。

Verification of PHA monomer supplier for enhancing P(3H2MB) production

○Takahiro Kihara, Sho Furutate, Takeharu Tsuge
(Sch. Mater. Chem. Technol., Tokyo Tech)

Key words polyhydroxyalkanoate, monomer supplier, *R*-hydratase

3Jp01 微生物由来蓄電性 Mackinawite による嫌気バイオコンバージョン活性の向上

○安池 一貴[2], 片桐 美紀[1], 工藤 優輝[2], 田代 陽介[2,3], 二又 裕之[2,3,4]
（[1]静大・工, [2]静大院・総合科技, [3]静大・創科技院, [4]静大・グリーン科技研）
futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

嫌気微生物群集による物質変換能力は、環境浄化、メタン発酵あるいは発酵食品生産等に利用されている。その一方で、嫌気条件下における諸々の微生物反応は段階的に進行し一般的に遅いため、物質変換能力の向上が求められる。そこで本研究では、硫酸還元細菌 *Desulfovibrio* sp. HK-II 株が生産する蓄電性バイオミネラル（Rechargeable bio-mineral : RBM）である Mackinawite（$Fe_{X+1}S$,X=0~0.11）が嫌気バイオコンバージョンに及ぼす影響について解析した。
汽水湖底泥を摂取源とし、4 mM 乳酸および RBM を添加した系（RBM 系）および RBM 無添加系（Control 系）を構築し、時系列的に有機酸、水素およびメタンを測定した。乳酸消費後、乳酸追加を 2 回実施した後に培地上清を新鮮な培地と 95%交換する継代回分培養を数百日間実施した。その結果、両培養系において乳酸の分解に伴い、酢酸およびプロピオン酸が蓄積した。Control 系と比較し RBM 系の変換速度が速い傾向を示した。具体的には RBM 系および Control 系のプロピオン酸の蓄積量は約 7.1 mM および 7.6 mM であり RBM 系の方が若干低く、酢酸消費およびメタン生成速度は RBM 系の方が速かった。PCR-DGGE に基づく MDS 解析では微生物群集構造が RBM 系および Control 系のみならず上清および沈殿物においてもそれぞれ異なった。SYBR Green I による蛍光顕微鏡観察では RBM 系において微生物凝集体が RBM 上に確認され、電気化学的測定である DPV 測定では RBM 系において Control 系で見られないピークが存在した。また、両培養系のギブズ自由エネルギーを計算した結果、Control 系では約-73 kJ $reaction^{-1}$ であったのに対し RBM 系では約-190 kJ $reaction^{-1}$ と約 2.6 倍大きいことが示された。以上の結果から、RBM を電子授受の場として利用する特異的な微生物群集が形成され、結果的に嫌気バイオプロセスの向上に寄与していることが示唆された。

Improve of anaerobically bio-conversion activity by biogenic rechargeable mackinawite

○Kazuki Yasuike[2], Miki Katagiri[1], Yuki Kudo[2], Yosuke Tashiro[2,3], Hiroyuki Futamata[2,3,4]
([1]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words interspecies electron transfer, electrosymbiosis, rechargeable bio-mineral

3Jp02 微生物燃料電池：アノード電極上のバイオマス量および細胞内グルタミン酸濃度と電流生成の相関

○佐々木 大介[1], 佐々木 建吾[1], 柘植 陽太[2], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]金沢大・新学術）
daisuke@port.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】我々は微生物燃料電池(MFC)の微生物ないしは微生物群集を対象とした網羅的細胞内代謝解析を実施し、代謝状態と機能を結びつけて評価することに成功している。すなわちMFCの電流生成量とTCA回路の代謝物濃度およびATP/ADP比には正の相関が存在し、逆に解糖系の代謝物濃度には負の相関があることを報告してきた。本報告では、全く同じ装置構成および運転条件でいくつかのMFCを運転し、電流生成量が異なったMFCの微生物群集に対して詳細な解析を行うことで、電流生成に寄与する因子を明らかにすることを目的とした。
【方法】模擬排水を基質としてエアカソード型MFC(250 mL 容量)を水理学的滞留時間：24 h で運転し、電流生成量に差が出たMFCのパフォーマンスを解析した。またアノード電極上および発酵液からDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子を標的とした網羅的な微生物群集構造解析を実施した。さらに代謝状態を比較するため、それぞれのアノード電極上から回収した微生物群集の細胞内代謝物を抽出し、LC-MS/MS・GC-MSを用いて網羅的に解析した。
【結果・考察】電流生成量の違いで化学的酸素要求量の除去率や有機酸濃度に有意差は検出されなかったが、アノード電極上のバイオマス量は電流生成量に負の相関を示した。また電流生成が大きい場合は *Geobacter* sp.の割合が高かったが、小さい場合は他の発酵性細菌やメタン生成菌が優占化していた。代謝解析では、過去の知見と同様にTCA回路関連の代謝物濃度・ATP/ADP比の上昇が電流生成量と正の相関することが示されただけでなく、菌体増殖の指標であるグルタミン酸の濃度と電流生成量に負の相関があることが明らかになった。つまり本報告から、アノード電極上のバイオマス量および細胞内グルタミン酸濃度の増加が電流生成を減少させる因子の一つであることが示唆された。

Less biomass and intracellular glutamate in anodic biofilms lead to efficient electricity generation by microbial fuel cells

○Daisuke Sasaki[1], Kengo Sasaki[1], Yota Tsuge[2], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]InFinti., Kanazawa Univ.)

Key words microbial fuel cell, microbial community, anodic biofilm, intracellular glutamate

3Jp03 バイオ電気化学的システムによる複合微生物系の制御

○佐々木 建吾[1], 佐々木 大介[1], 森田 仁彦[2], 柘植 陽太[3], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]電中研, [3]金沢大・新学術）
sikengo@people.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】バイオ電気化学的システムは、電極上での酸化還元反応を利用して微生物の代謝を改変できることが知られている。一方、メタン発酵のような嫌気性消化においては複合微生物系が関わっており、酸化還元バランスを保って反応を進行させている。嫌気性消化を利用して廃棄物より水素・メタンを得る水素・メタン二段発酵は処理速度が速いプロセスとして知られている。本報告では、バイオ電気化学的システムを水素発酵に適用して、水素・メタン二段発酵に与える効果を明らかにする事を目的とした。
【方法】グルコース 10 g/L を含む合成液体培地を基質として使用し、初期 pH を 6.5 に調整した。液体培地を水素発酵槽に投入して、55℃で連続運転した。水素発酵については、1) 電気化学的制御を行ったもの、2) 電気化学的制御を行っていないもの、を準備した。バイオ電気化学的システムについて、電極として炭素板を使用し 3 電極方式を用いた。作用極上の電位を－1.0 V（銀／塩化銀電極基準）に制御した。なお、この制御法では水電解による水素生成は起こらない。水理学的滞留時間 2 日で定常状態になるまで運転して、水素発酵の廃液は後段のメタン発酵槽に投入した。後段の水理学的滞留時間は 4 日とした。
【結果】電気化学的制御を行った、ないしは行っていない水素発酵槽間におけるガス組成はほぼ等しく、水素ガス含量は約 52%であった。しかし、両者の水素発酵槽間において、有機酸プロファイルに変化が認められた。電気化学的制御を行った水素発酵槽の廃液を投入したメタン発酵槽では、制御を行っていないものの廃液を投入したメタン発酵叢に比べて、メタン生成量が増加していた。本発表では詳細な微生物叢解析結果についても報告し、バイオ電気化学的システムの可能性について論じる。

Control of microbial community in the bioelectrochemical system

○Kengo Sasaki[1], Daisuke Sasaki[1], Masahiko Morita[2], Youta Tsuge[3], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]CRIEPI, [3]InFinti, Kanazawa Univ.)

Key words microbial community, hydrogen, methane fermentation, electrochemical cultivation

3Jp04 好気的硫黄代謝細菌を活用した重金属除去

○黒田 真史[1], 小林 慎[1], 高山 一也[2], 池 道彦[1]
（[1]阪大院・工, [2]日東電工(株)）
kuroda@see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】重金属類は、様々な産業に利用される一方で、そのほとんどが高い毒性を有するため、世界各地で重金属による深刻な水環境汚染が発生している。硫化物法は硫化ナトリウム等の硫化剤を添加することで排水から重金属を除去する技術であり、除去効率が高い反面、運転中に毒性・腐食性の高い硫化水素が発生するため、実処理への適用例は少ない。本研究では、細菌の好気的硫黄代謝を用いることで、硫化水素を発生させることなく重金属を硫化物として沈殿・除去できる新規プロセスの創成を目指し、重金属除去活性の高い新規硫黄代謝細菌の集積と単離を試みた。
【結果・考察】兵庫県生野鉱山付近から採取した土壌から、チオ硫酸ナトリウム、塩化銅(II)、塩化亜鉛(II)、塩化カドミウム(II)、およびキレート剤としてニトリロ三酢酸を含む TSB 培地（以下、重金属含有 TSB 培地）を用いて、各重金属を安定して 70～100%の除去率で除去する微生物集積系を構築した。メタ 16S rRNA 解析の結果、得られた集積系は主に *Lysinibacillus* sp.、*Stenotrophomonas* sp.、*Ochrobactrum* sp.、*Paenibacillus* sp.の 4 種から成ることが明らかとなった。集積系からこれら 4 種の細菌を単離し、それぞれ HM1、HM2、HM3、HM4 株と命名した。各菌株の重金属除去能力を評価したところ、いずれの菌株も 94%以上の Cu 除去率を示したが、HM2、HM3、HM4 の 3 株は Cd 除去率が 15.7～48.9%、Zn 除去率が 13.5～41.3%に留まった。一方、HM1 株は Cu、Cd、Zn をそれぞれ 100%、99.9%、86.4%除去し、最も高い重金属除去能力を示したことから、*Lysinibacillus* sp. HM1 は重金属除去プロセスを担う細菌として有望であるものと考えられた。

Heavy metal removal by using bacterial sulfur metabolism under aerobic condition

○Masashi Kuroda[1], Makoto Kobayashi[1], Kazuya Takayama[2], Michihiko Ike[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Nitto Denko Corp.)

Key words heavy metal, wastewater treatment, thiosulfate, sulfur metabolism

3Jp05 *Pseudomonas stutzeri* NT-I によるセレン化物半導体ナノ粒子の合成

○佐藤 守, 黒田 真史, 井上 大介, 池 道彦
（阪大院・工）
ike@wb.see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景及び目的】近年、従来の半導体にない優れた特性を示す半導体ナノ粒子が注目されており、これらを利用した高機能製品の創出が期待されている。他方、現在の半導体ナノ粒子合成プロセスは高環境負荷であるという課題を抱えており、微生物を用いた低環境負荷な合成方法への関心が高まっている 。我々はこれまでに好気条件下で亜セレン酸（Se(IV)）還元能を示す 細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I を用いて Bi_2Se_3 ナノ粒子の合成に成功しているが、このような生物反応が Bi 以外の金属から成る化合物半導体ナノ粒子の合成に適用可能かは明らかにされていない。そこで本研究では、半導体ナノ粒子の生物合成の知識基盤の構築を目指して、種々の金属イオンに対する NT-I 株のセレン化物半導体合成特性を検討した。
【方法】*P. stutzeri* NT-I を TSB 培地中で 24 時間回転振盪培養後、Se(IV)と各種金属（Sc(III)、V(III)、Cr(III)、Mn(II)、Fe(III)、Co(II)、Ni(II)、Cu(II)、Zn(II)、Ga(III)、Cd(II)、In(III)、Sb(III)、Bi(III)）の塩化物をそれぞれ 1.0 mM となるように添加し、72 時間回転振盪培養を行った。経時的に試料を採取し、液相と固相の各金属濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析により測定した。また、固相に含まれる粒子を透過型電子顕微鏡（TEM）により観察した。
【結果と考察】試験した金属イオンのうち、Cd(II) および Bi(III)を添加した培養系においてのみ、液相の金属濃度の減少と固相の金属量の増加が確認された。また、24 時間以降には金属濃度がほぼ一定となったことから、NT-I 株による粒子合成反応は 24 時間以内に生じたと考えられた。得られた粒子を TEM で観察したところ、細胞の周囲に直径 20~80 nm の粒子が確認された。以上のことから、NT-I 株は Bi_2Se_3、CdSe ナノ粒子の合成能を有することが明らかになった。

Biosymthesis of selenide semiconductor nanoparticles by *Pseudomonas stutzeri* NT-I

○Mamoru Sato, Masashi Kuroda, Daisuke Inoue, Michihiko Ike
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *Pseudomonas stutzeri*, nanoparticle, biosynthesis, selenium

3Jp06 1,4-ジオキサン分解菌による多様な環状エーテル類の分解能の評価

○中澤 昌俊, 井上 大介, 黒田 真史, 池 道彦
（阪大院・工）
ike@wb.see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】環状エーテル類は、化学的に非常に安定なエーテル結合を有することから、一般的に生物難分解性であることが知られているが、発がん性が疑われる 1,4-ジオキサン（DX）のように人体に有害なものも含まれ、環境汚染に伴う悪影響が懸念されている。一方、近年では、DX をはじめとする環状エーテル類を分解する細菌が複数発見されてきている。また、これまでの知見から、DX の生分解では、可溶性鉄（II）モノオキシゲナーゼ（SDIMO）を触媒とするエーテル結合の開裂が重要な役割を果たすと推測されている。DX 以外の環状エーテルにおいても、同様の機構により生分解が進行する可能性が考えられることから、本研究では、DX に対して異なる分解特性を示す 3 種の DX 分解菌（構成型資化菌、誘導型資化菌、共代謝菌）をモデル DX 分解菌として選定し、多様な環状エーテル類の分解能を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】本研究では、誘導型 DX 分解菌 *Mycobacterium* sp. D6、構成型 DX 分解菌 *Pseudonocardia* sp. D17 及び共代謝型 DX 分解菌 *Rhodococcus* sp. T1 を供試菌株として用い、エーテル結合の数や炭素数、環構造への修飾の有無の異なる 14 種の環状エーテルを対象物質として選定した。各物質を単一炭素源として添加した無機塩培地に各試験菌株を植種し、各物質の分解と試験菌株の増殖をモニタリングした。その結果、3 種の DX 分解菌による環状エーテル類の分解能は、エーテル結合の数や環構造に修飾する官能基の種類及び修飾部位によって大きく異なることが観察され、化学構造が分解性を決定する重要な因子である可能性が明らかとなった。また、ゲノム解析の結果から、各菌株が保有する SDIMO 遺伝子が異なっていることが明らかとなり、SDIMO の多様性も各分解菌による環状エーテル類の分解特性に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

Abilities of 1,4-dioxane degrading bacteria to degrade various cyclic ethers

○Masatoshi Nakazawa, Daisuke Inoue, Masashi Kuroda, Michihiko Ike
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words 1, 4-dioxane, cyclic ethers, biodegradation, soluble di-iron monooxygenase gene

3Jp07 *Leptothrix* 属細菌の分泌ナノ繊維は連鎖状菌体に環境適応性を付与する

○久能 樹[1,2], 森永 花菜[2,3,4], 杉本 真也[2,5], 豊福 雅典[1,2,6], 野村 暢彦[1,2,6], Utada Andrew[1,2,6]
（[1]筑波大・生命環境, [2]JST・ERATO, [3]筑波大院・生命環境, [4]産総研, [5]慈恵医大, [6]筑波大・微生物サスティナブル セ）
kuno.tatsuki.gb@u.tsukuba.ac.jp

湧出地下水が流れ込む小川、側溝等の水圏に広く生息する鉄酸化細菌 *Leptothrix* 属は、酸化鉄粒子で被覆されたマイクロチューブから成るバイオマットを構築する。フィラメント状に分裂した *Leptothrix* 属細菌は、菌体表面から無数の有機物ナノ繊維を分泌する。これら繊維が絡まったチューブ原基の外側に酸化鉄粒子が沈着することで、マイクロチューブを形成する。然しながら、細菌の増殖過程におけるリアルタイムの分泌ナノ繊維のダイナミクスは明らかになっていない。本研究では、高さを 1.3 um に制限したチャンバーを有するマイクロ流路デバイスを用い、二次元空間における鉄酸化細菌の増殖をリアルタイムで観察した。野生型株は、デバイス表面に接着後にフィラメント形成を開始するが、ナノ繊維非分泌株は、接着出来ず、ほとんど増殖しなかった。即ち、フィラメントの伸長にはナノ繊維を介した接着が必須であった。ナノ繊維の骨格である糖鎖のアミノ基を蛍光染色した結果、接着直後の菌体周囲の蛍光シグナルに偏りがあり、増殖方向にはシグナルが検出されなかった。金ナノ粒子でラベルしたナノ繊維を大気圧走査電顕で観察しても同様の偏りがみられた。従って、ナノ繊維による伸長方向の決定が示唆された。一方、伸長したフィラメントの周囲には強い蛍光シグナルが観察された。時折先端部分の菌体が分離するので、分裂につれてマイクロチューブ原基が順次形成されると予想される。狭いチャンバー空間では伸長するフィラメントは、壁に衝突しても“折れ曲り”または“反転”して伸長を継続した。分泌ナノ繊維による接着力と衝突による反発力によるシミュレーション結果と一致し、低角度の衝突では“折れ曲り”、逆に高角度の衝突では、“反転”する頻度が高かった。以上の結果、分泌ナノ繊維は環境適応性を付与すると考えられる。

***Leptothrix* nanofibril appendages impart adaptability to whole filaments**

○Tatsuki Kunoh[1,2], Kana Morinaga[2,3,4], Shinya Sugimoto[2,5], Masanori Toyofuku[1,2,6], Nobuhiko Nomura[1,2,6], Andrew Utada[1,2,6]
([1]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]ERATO, JST, [3]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [4]AIST, [5]Sch. Med., Jikei Univ., [6]MiCS, Univ. Tsukuba)

Key words biofilm, growth control, surface attachment, nanofibril

3Jp08 Investigation of solar-driven Linear Fresnel Photocatalytic Reactor (LFP) for wastewater treatment

○Cheng Zhang, Na Liu, Qiansu Ma, Akiho Yagi, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

Wastewater has become a serious problem. Photocatalysis has shown degradation capacity of organic pollutant under illumination. As solar light was considered to be the low-cost light source for photocatalysis, many photoreactors have been developed, among which Inclined Plate Collector (IPC) was the most mature photoreactor. However, due to solar motion, these photoreactors were unable to provide stable and efficient solar energy for photocatalyst by passively accepting solar light. In recent years, the linear Fresnel concentrators with multi-column mirrors were designed to track solar light and showed the potential to provide stable and efficient solar energy. Therefore, in this study, a photocatalytic reactor based on the linear Fresnel concentrator for wastewater treatment was firstly developed and named LFP. The main components of LFP include multi-row mirrors, quartz glass tubes and control system. The mirrors can be controlled to track solar motion and reflect solar light onto quartz glass tubes individually. Therefore, wastewater involved with photocatalyst in quartz glass tubes could be illuminated by stable and efficient solar light. For the comparative experiments between LFP with IPC, TiO_2 and Rhodamine B solution were used as photocatalyst and model of wastewater, respectively. For LFP, the light intensity was stable and efficient, and the temperature increased rapidly and then remained stable. Therefore, LFP showed much higher degradation efficiency of Rhodamine B than IPC.

Investigation of solar-driven Linear Fresnel Photocatalytic Reactor (LFP) for wastewater treatment

○Cheng Zhang, Na Liu, Qiansu Ma, Akiho Yagi, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words wastewater treatment, photocatalytic reactor, solar energy

3Jp09 Mass spectrometry imaging reveals the correlation between the production of quorum sensing metabolites and the biofilm development in *Pseudomonas putida* biofilms

○Pitchapa Rattanaburi, Eiichiro Fukusaki, Shuichi Shimma
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Quorum sensing (QS) is generally used to describe the phenomenon that bacteria release and perceive signal molecules to coordinate cooperative behavior in response to their population size and biofilm development. QS-based communication has therefore been considered a social trait. Understanding the heterogeneity of QS metabolites exist in biofilms related to the stages of biofilm development is important to know the mechanism driving the biofilm formation. Mass spectrometry imaging (MSI) is a technique to directly visualize the production of metabolites from microbial biofilms. In this study, the method for matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-MSI visualization of the QS metabolites distribution in *Pseudomonas putida* biofilms was developed and applied to examine the correlation between metabolites production and cultivation times. Here we show that *N*-acyl-homoserine lactones are homogeneously produced in the early stage of *P. putida* biofilms and act mainly as regulatory signals for biofilm formation. In addition, the spatially distribution of quinolones and siderophore which are the key metabolites involved in the process of extracellular polymeric substance production and iron chelation were visualized correlated to the swarming motility of *P. putida* in the mature biofilms. Our findings broaden the perspective on QS by showing that the heterogeneity in QS has a relationship with the stages of biofilms and provide more information to understand the mechanism of biofilm formation.

Mass spectrometry imaging reveals the correlation between the production of quorum sensing metabolites and the biofilm development in *Pseudomonas putida* biofilms

○Pitchapa Rattanaburi, Eiichiro Fukusaki, Shuichi Shimma
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words mass spectrometry imaging, quorum sensing, *Pseudomonas putida*, biofilm

人名索引

A

Adinda Putri Wisman 3Ha03
Aditiawati Pingkan 3Fa05
Ahmadi Hannaneh 2Jp10
Almasl Alfi 2Gp04
Amalia Fitri 3Fa05
Amza Rezky Lastinov 1Ip06
Anand Ajeeta 3Da07
Aneksampant Apichaya 1Cp08
Angelidaki Irini 1Bp03
Ao Zhalaga 1Cp14
Aoyagi Hideki 3Da07, 3Hp03
Arita Mayuno 2Gp02
Ashutosh Kumar 1Cp15
Aslam Mehwish 2Dp01, 2Dp02
Astuti Dea Indriani 2Cp08
Asun Arlene Cherilyn 2Ja03

B

Baranwal Priyanka 3Ep08
Bhatnagar Sharad 3Hp03
Boogerd Fred C. 3Ia04
Boonyakida Jirayu 2Jp03
Buechs Jochen 3S-S1a01

C

Campanaro Stefano 1Bp03
Chaiyaso Thanongsak 2Ba05
Cheng Huijun 3Ja04
Cherdvorapong Vipavee 3Bp01
Choi Yong-Keun 1Cp04
Chowdhury Ankan Dutta 3Fp06
Critchley Kevin 2Ip11

D

Da Xia 2Bp03
Dahlan Hadi Akbar 2Ea03
Danshiitsoodol Narandalai 2Aa06, 2Ea10
Devanadera Allad 3Ba08
Dlamini Nombuso Temalangeni 1Hp13
Doong Ruey-an 2S-S3p01
Dutta Chowdhury Ankan 2Fp15, 3Fp05, 3Fp07

E

Ekasari Julie 3Fa09
Elmeligy Enas 1Jp06
Eun Young 1Hp02
Evans Stephen 2Ip11

F

Fatma Azwani 3Ja02
Firmanto Hendy 3Fa04
Fouquet Thierry 3Bp05
Fujiyama Kazuhito 1Ep13
Fukusaki Eiichiro 2Cp08, 2Ea03, 3Fa04, 3Fa05, 3Fa06, 3Fa08, 3Fa09, 3Ha03, 3Jp09
Furukawa Makoto 3Ap01
Futamata Hiroyuki 3Ja01, 3Ja02

G

Ganganboina Akhilesh Babu 2S-S3p01
Golding Bernard T. 1Ap15
Gomi Katsuya 3Ha03
Grace Pait Ivy 3Ba08

H

Hadiwidjaja Stacy 2Ga06
Han Sung Ok 2S-S2p02
Hanifah Abu 3Fa04
Harmon Jeffrey 3Fp04
Hayashi Junji 2Ap12
Hayati Sri 3Fa09
Hibi Takao 2Ap12, 3Bp02
Hirohata Shuji 3Ha03
Hong Jong Wook 2S-S3p05
Honjo Masahiro 3Ja01, 3Ja02
Horiuchi Jun-ichi 1Dp14, 2Da07
Huynh Hung Hiep 2Gp03
Hyeon Jeong Eun 2S-S2p02

I

Imai Ryo 3Fp04
Intuy Rattanaporn 3Bp02
Irene Davidova 1Cp09
Itoh Takafumi 2Ap12, 3Bp02

J

Jeon Tae-Joon 1S-S3p01
Jeong Ki-jae 2S-S3p03
Jeong Wu-Young 3Fp03
Jiang Dong 1Ap15
Jin Yong-Su 2S-S2p01
Joo Young-Chul 2S-S2p02
Joseph Suflita 1Cp09
Jung Dawoon 1Hp01

K

Kahar Prihardi 3Aa05
Kam Y. J. Zhang 1Cp15
Katayama Takuya 2Gp03
Kato Junichi 1Hp12
Kato Tatsuya 1Fp16
Kawamura Yuka 3Ap01
Kawashima Ikko 3S-S1a04
Kim Dae Hoon 2S-S3a06
Kim Ho Hyun 3Fp03
Kim Hyung Joo 1Cp04, 3Fp03
Kim Ji Eun 1Cp04, 3Fp03
Kim Ju Young 2S-S3p05
Kim Kwang Jin 1Cp04
Kim Kwang Jin 3Fp03
Kim Kwang Sik 2S-S3p05
Kisailus David 1Fp14
Kishimoto Michimasa 1Dp14
Kitagawa Hiroto 3S-S1a03
Kitahara Yuki 3Fp02
Ko Young Jin 2S-S2p02
Kobori Toshiro 3Hp03
Komatsu Kei 2Gp02
Kumada Yoichi 1Dp14, 2Da07
Kumon Kento 2Gp02
Kuriyama Naohiro 2Da07
Kuroda Noritaka 2Da07

L

Lai Yuen Hing 2Ja04
Lan John Chi-Wei 1Hp13, 2Ja02, 2Ja03, 2Ja04, 3Ba10
Lee Chang Hyun 2S-S3p05
Lee Eun Bin 1Cp04, 3Fp03
Lee Hei Chan 2S-S3a06
Lee Jaebeom 2S-S3p03
Lee Sang Hyun 1Cp04
Lei Zhongfang 2Cp03, 3Ja06
Liu Na 1Cp12, 3Jp08
Loh Wai Leng Carmen 2Ja02
Low Pik Kuan 3Ba10
Luo Gonglinfeng 1Hp12

M

Ma Qiansu 3Jp08
Maduka Subodinee 2Cp10
Mainland Joel D 2Fp07
Malikul Ikram Muhammad Maulana 3Fa06
Marie Ting Perez Charose 1Ip03
Maruyama Jun-ichi 2Gp03
Masuda Kensei 3Ja01, 3Ja02
Minkner Robert 1Fp16
Minoura Ayaka 3Ja01
Misaki Ryo 1Ep13
Mohd JABIR 3Ja01
Motakatla Venkateswar Reddy 1Bp16
Muhammad Muddassar 1Cp15

N

Nasrin Fahmida 3Fp05, 3Fp06
Nayve Jr. Fidel Rey P. 3Ba08
Negishi Nobuaki 1Cp12
Negoro Seiji 3Ep08
Ng Hui Suan 2Ja02

Ng Hui-Suan 2Ja03
Nguyen Hieu Nghia 1Dp14
Nishimasu Hiroshi 3S-S3a04
Nishimura Tomoka 3Ja01
Nuramkhaan Marjangul 3Ja06

O

Ohashi Takao 1Ep13
Oldewurtel Enno 3Fp02
Oltmann-Norden Imke 1Fp16
Omasa Takeshi 2Gp02
Onitsuka Masayoshi 2Gp02
Oyunsuren Tsendsuren 2Ea04

P

Pajares Irene 3Ba08
Panjuy Chaophaya 3Ip06
Panti Niphawan 3Bp01
Park Enoch Y. 1Fp16, 3Fp05, 3Fp06, 3Fp07
Phetsri Kodchakorn 3Ap01
Phumsombat Putthapong 2Ap12
Porchetta Alessandro 2Ip01
Pradipta Ambara R. 2Jp16
Prihardi Kahar 1Ip06
Puti Wanguyun Aken 1Fp03
Putri Safira Latifa Erlangga 3Fa07, 3Fa08
Putri Sastia 3Fa05
Putri Sastia Prama 2Cp08, 2Ea02, 2Ea03, 3Fa04, 3Fa06, 3Fa07, 3Fa08, 3Fa09

R

Rahayu Farida 3Aa03
Rakotondravao Michelle 2Da07
Rattanaburi Pitchapa 3Jp09
Razi Muhamad Alif 1Fp02
Ricci Francesco 2Ip01
Ridwani Sobir 3Fa06
Rivera Jesus 1Fp14

S

Saito Masato 2S-S3p04
Saito Yasuhisa 3Ja02
Sakai Tomoyuki 3Fp04
Sakamoto Toshihiro 2Gp03
Sakoda Yumiko 2Da07
Sano Chiharu 2Ap12
Saputra Felicia Irene 3Fa08
Sato Arisa 2Cp08
Sekitani Tsuyoshi 2S-S3p02
Senda Naoko 3Fp04
Sharmin Sabrina 3Fp07
Shimizu Kazuya 2Cp03, 3Ja06
Shimma Shuichi 3Ha03, 3Jp09
Shin Kyusoon 2S-S3p05
Shinkura Reiko 2Gp03
Situmorang Magdalena Lenny 3Fa08
Song Hak Jin 1Cp04, 3Fp03
Suantika Gede 3Fa08
Sultana Nasrin 2Aa06
Suyotha Wassana 3Bp01, 3Bp02
Suzuki Kenshi 3Ja01, 3Ja02

T

Tajima Takahisa 1Hp12
Takagi Kazuyoshi 3Bp01
Takahashi Ryosuke 2Da07
Takayama Kotaro 3S-S1a03
Takemura Kenshin 3Fp05, 3Fp06
Takeo Masahiro 3Ep08
Tamada Yoshihiro 3Ha03
Tamang Abiral 2Ip11
Tan Li 1A-Gp01
Tashiro Yosuke 3Ja01, 3Ja02
Techawaree Ueatrongchit 2Ap04
Toyotake Yosuke 2Ap12, 3Ap01, 3Bp01
Treu Laura 1Bp03
Tsend-Ayush Chuluunbat 2Ea04
Tu Thi Tram Anh 2Ip02

U

Uemura Takafumi 2S-S3p02
Uji-i Hiroshi 3S-S5a04
Utada Andrew 3Jp07
Uthailak Naphatsamon 1Ep13

W

Wakayama Mamoru 2Ap12, 3Ap01, 3Bp01, 3Bp02
Wang Caifeng 2S-S3p03
Wang Lun 2Ep07
Wang Xuezhi 2Cp03
Westerhoff Hans V. 3Ia04
Wätzig Hermann 1Fp16

X

Xu Jian 1Fp16, 2Jp03

Y

Yagi Akiho 3Jp08
Yamashiro Risa 3Ap01
Yang Yingnan 1Cp12, 2Cp04, 3Jp08
Yang Yung-Hun 1Cp04
Yang Yunjeong 1Cp04, 3Fp03
Yano Shigekazu 3Bp01, 3Bp02
Yohda Masafumi 2Gp02
Yoon Tae Hang 3Fp03
Yuan Tian 2Cp03
Yusianto 3Fa05

Z

Zagst Holger 1Fp16
Zhang Cheng 1Cp12, 3Jp08
Zhang Kuan 2Cp07
Zhang Mengxiao 1Bp15
Zhang Nan 2Cp04
Zhang Zhenya 2Cp03, 3Ja06
Zheng Hanying 2Cp04
Zhu Yunxin 2Cp04

V

van Teeffelen Sven 3Fp02

あ

相沢 智康 2Fa07
相田 紗織 2Gp13
會見 忠則 2Ep04
青井 真人 1Gp18
青井 議輝 1Hp01, 1Hp02, 1S-S2p01, 2Ca07, 3Aa03, 3Ip07
青木 恭彦 3Bp06
青木 拓真 3Ep09
青木 航 2S-S4p08, 3Ap08, 3Cp04, 3Cp05, 3Ia06
青野 陸 2Bp12
青柳 秀紀 1Dp15, 1Dp16, 1Dp17, 1Dp18, 2Da01, 2Da02, 2Ep01, 3Da04, 3Da05, 3Da06, 3Da08, 3Hp01, 3Hp02
青山 冬樹 3Fa01
赤尾 健 2Hp10, 2Hp13
赤坂 直紀 1Gp10, 2Da04
赤澤 真一 1Gp12
赤澤 陽子 2Bp06
赤田 倫治 3Ba05, 3Ba07
赤沼 哲史 1Fp12, 2Jp13
赤間 剛 2Ga08
秋 庸裕 1Bp03, 1Gp18, 1Ip03, 2Dp17
秋光 和也 1Ap10
秋山 真一 3Hp09
阿久津 澪 2Jp09
阿久津 美歩 2Ca10
阿座上 弘行 2Ep04
朝倉 三貴 3Fa03
朝倉 侑弥 3Ja04
浅田 元子 1Dp02, 2Ba06
浅内 由佳 2Hp14
浅沼 成人 1S-S4p08
浅野 風斗 3Da03
浅野 泰久 2Ap04, 2Ap13
朝山 宗彦 1Bp12
芦内 誠 2Da03
芦崎 瑞稀 2Hp14
芦田 均 1Ap13
アショク サムエル 2Fp08
東 豊浩 2S-S2a04
東 雅之 1Cp13, 2Ip08, 3Ja10, 3Ja11
畔上 純也 1Ep07
麻生 祐司 3Ep07
安達 優華 2Gp07
新 裕太 2Da08
跡見 晴幸 2Dp01, 2Dp02, 3Ap06
阿野 貴司 2Ba01, 2Ba02
阿野 嘉孝 1Gp06

アハマドシャヒー　アハマドノール 2S-S3a03
油井　信弘 1Bp07, 1Bp08
阿部　郁朗 1Gp07
阿部　勝正 1Cp02
阿部　敬悦 1Fp04, 1Fp05, 1Hp08
阿部　淳 1Gp11
阿部　峻之 2Hp18
安部　菜月 2Ga03, 3Hp04
阿部　文明 2Fp16
天野　光喜 3Ja03
天羽　宏枝 3Gp09
綾部　時芳 2Fa07
新井　博之 2Bp13, 2Ha11
新井　宗仁 1Fp11, 2S-S5a05
新井　亮一 2Ap03
荒岡　亮祐 2Cp13
新垣　篤史 1Fp14, 2Dp18
荒川　賢治 3Ea01, 3Ea02, 3Ea03, 3Ea04, 3Ea07, 3S-S2p05
新川　翔也 2Fa04
荒川　知子 3Ba03
荒木　希和子 2Ba09, 2Ba10, 3Da01, 3Da02, 3Ja09
荒木　通啓 3Ia01
荒木　康子 1Gp07
荒木　勇登 3Ip07
有川　浩司 2Aa09, 2Aa10, 2Ep03
有澤　美枝子 1Ep15
有馬　一成 1Fp10, 2Bp06
有馬　秀幸 2Hp09
有馬　勇夫 2Ea04
有吉　由佳 1Ap14
有吉　龍太郎 1Fp01
淡川　孝義 1Gp07
安齊　洋次郎 3Ea01
安蔵　光弘 1S-S1p01
安藤　晃規 1S-S2p02, 2S-S2a01
安藤　正浩 2Fp08, 2Fp10

い

イ　ジュンホ 2Da12
今泉　裕 1Jp09
飯尾　魁 2Dp16
飯島　信司 2S-S4p01, 3Gp03, 3Gp04
飯嶋　益巳 2Gp15
飯田　章博 3Fa02
飯田　順子 3Ia09
飯田　円 2Gp12
飯田　亮平 2Ep04
五十嵐　一衛 3Ea10
五十嵐　幸一 3Ja10
五十嵐　陽子 2Ga11
生田　宗一郎 2Fp13, 3Ba09
池　道彦 1Bp13, 2Ca12, 3Jp04, 3Jp05, 3Jp06
池ヶ谷　凌士 3Aa10
池川　繁男 2Fp02
池添　浩輝 2Ap11
池田　明夏里 2Fa06
池田　光悦 3Hp06
池田　丈 2Bp05, 2Ca06
池田　治生 2Dp11, 3S-S2a02
池田　美紗希 2Ca12
池田　萌 3Ha05
池田　湧 1Fp15
池田　優理子 2Hp11, 2Hp12
池田　陽子 2S-S3a04
池野　慎也 2Ip09
池袋　一典 2Ip01, 2Ip02
井坂　修久 1Ep15
井沢　真吾 3Ip02
石井　啓介 1Cp11
石井　慧 1Fp13
石井　純 2Ca02, 3Ba02, 3Ba04, 3Ba11
石井　智樹 2Bp09
石井　寛子 3Ba02
石井　正治 2Bp13, 2Ha11
石井　恵 1Ap18
石上　美佐 3Ba04
石川　一彦 1Fp07
石川　元 1Ep16, 2Ga02
石川　聖人 2Dp16
石川　森夫 2Fa08, 3Ip05
石川　陽一 1Ep16, 2Ga02
石黒　悠生 3Dp06
石澤　秀紘 1Bp13
石田　丈典 2Ca06
石田　尚之 1Fp15
石田　博樹 2Hp02, 2Hp03, 3Ha02
石原　沙季 2Jp04
石原　潤一 2Ep08
石原　真奈 2Bp02
井嶋　浩一朗 1Dp13
井嶋　博之 3Ga02
石丸　泰寛 1Ep15
石本　圭亮 3Bp07
石本　弥子 3Da04
泉田　智史 2S-S3a02
和泉　自泰 2Fa05, 2Fa06, 2S-S4p07
出茂　鮎美 2Jp17
何森　健 1Ap10
磯谷　敦子 2Hp11, 2Hp12
磯貝　章太 2Ca03
磯崎　日奈子 3Ba08
磯崎　勇志 3Cp01
板倉　康浩 3Ea02
井谷　彩乃 2Ea12
板谷　かえで 2Cp13
板谷　光泰 3S-S2a04, 3S-S2a05
市川　暉 1Hp08
一木　啓志 2Fp03
一瀬　博文 1Cp03, 3Ep01, 3Ep02, 3Ep03
一瀬　涼 1Ip10, 1Ip11
一刀　かおり 1Ep15
井手　圭吾 2Ep03, 2Fp09
井出　曜子 1Gp11
イディリス　アリムジャン 1Hp14
井藤　彰 1Jp07, 3Gp01, 3Gp02
伊藤　あやの 1Ip04
伊藤　一恵 3Ha09
伊藤　一成 1A-Ip01
伊藤　圭祐 3S-S4p03
伊藤　研悟 2Fp04
伊藤　光佑 1Ep12
伊藤　考太郎 1Gp07
伊藤　光平 3Ip04
井藤　純 2S-S3a04
伊藤　奨 3Aa01
伊藤　祥太郎 3Bp05
伊藤　創平 1Ap07, 1Fp08, 1Fp09, 2Ap13, 3S-S3a05
伊藤　大知 2S-S4p03, 3Ga04
伊藤　卓治 1Jp09, 3Ga03
伊藤　俊彦 3Ha04
伊藤　智之 3Cp03
伊藤　菜奈子 2Ap02
伊藤　伸哉 1A-Ka02, 2Bp07, 2Ip04
伊藤　文恵 2Gp16
伊藤　昌文 3Aa01
伊藤　麻里 2Fp02
伊東　祐二 1Fp10, 2Bp06
伊藤　洋一郎 3Ba04
伊藤　玲奈 2Gp04
稲岡　健ダニエル 1Gp07
稲垣　慶一 2Ga09
稲垣　賢二 1Ep08, 2Ap01, 2Ap02
稲留　弘乃 2Hp07, 2Hp08, 3Ha09
稲場　克弘 1Cp14
乾　博 1Bp11
乾　将行 1Ep03, 2Ja05, 2Ja07, 3S-S3p05
犬飼　義明 3Ia03
井上　暁人 1S-S3p06
井上　謙吾 2Aa03
井上　小槙 2S-S3a04
井上　大介 1Bp13, 2Ca12, 3Jp05, 3Jp06
井上　豊久 2Hp11, 2Hp12
井上　宏之 3Bp05
井上　裕介 2Aa06
井之上　ゆき乃 2Bp09
井上　善晴 3Dp03
猪熊　健太郎 3Aa06
猪瀬　陽加 2Da02
井原　邦夫 3Ia02
今井　健夫 2Hp07, 2Hp08
今井　友也 2Ip07
今井　泰彦 1A-Ka01
今井　祐太 2Gp10, 2Gp12, 3Ia08
今田　勝巳 2Ap02
今中　洋行 1Fp15
今藤　嵩大 1Ap13
今村　維克 1Fp15
今村　博臣 3S-S3a01
今村　梨子 2Fp02
猪村　剛史 1S-S5p01

井村　誠　2Fa02
井元　誠志　3Ja08
岩井　謙一　2Ea05, 2Ha09
岩井　伯隆　3Ap02
岩井　良輔　1S-S5p06, 2Ga03, 2Ga04
巖　流征　3Gp06
岩城　沙弥子　1Ep08
岩切　亮　2Fa02
岩國　美由季　3Ea04
岩崎　建史朗　1Hp11
岩崎　卓巳　1Cp05
岩崎　将士　2Ip03
岩崎　祐樹　2Ca07, 3Aa03
岩下　和裕　2Hp09
岩田　卓也　3Da01, 3Da02
岩田　至叡　1Cp07, 1Cp08
岩橋　佑真　2Hp09
岩本　悟志　2Ep05
岩本　康成　1Dp01

う

上垣　浩一　2Ip07
植川　泰好　2Da04
上坂　一馬　3S-S4p02
上田　愛巳　1Dp03, 1Dp04, 1Dp06
上田　太郎　2Gp14
上田　宏　1S-S3p06, 2Jp08
上田　誠　1S-S2p02
上田　光宏　1Bp11
植田　充美　1Fp06, 1Hp07, 2S-S4p05, 3Ap08, 3Cp04, 3Cp05, 3Ia06
上田　裕貴　3Ep04
上地　敬子　2Bp04, 3Ha01
上野　絹子　2Ip01
上野　大心　1Ep09, 1Ep10, 1Ep11, 1Ep12
上野　慶行　1S-S3p06
上原　由紀子　2S-S3a04
植村　武史　3Ea10
植村　壽公　3Hp07
上村　真理子　2Ep10
魚住　和輝　1Ap06
魚住　信之　1Ep15, 3Ea10
筌場　将太　3Ep02
鵜澤　尊規　3S-S5a02
牛丸　和乗　2Ip12
臼井　俊晴　3Ha04
臼田　佳弘　2Ja11, 3Aa11
内川　瞳　2Ha07
内倉　寛斗　2Ca05, 2Ja06, 2Ja07
内堀　孝博　2Dp03
内村　浩美　1S-S3p02
宇都宮　大貴　1Gp06
宇都宮　仁　1S-S1p03
内海　亮太郎　1Fp06, 1Hp07
宇都　甲一郎　2Ga12, 3Ga09
鵜頭　理恵　1Jp10, 2Ga07
宇野　紘平　3Ap04
梅崎　太造　2S-S3a04
梅澤　覚　2Ap17, 2Bp11
梅津　光央　2Jp09, 2S-S5a03, 3Cp02, 3Cp03
梅野　太輔　2Dp13, 3Ba11
梅村　真理子　3Ba01
梅山　幸子　1Gp08
宇山　裕貴　1Bp14, 1Dp03, 1Dp04, 1Dp05, 1Dp06
浦野　泰臣　2Ip05
上井　幸司　2Jp15, 3Dp07
海野　良輔　2Fa08

え

江口　晃弘　3Gp05
江口　雄聡　3Ea03
江連　徹　3Ia08
衛藤　晋一　3Fa02
江夏　朔　2Gp01
榎本　紗希子　2Ga07
荏原　充宏　2Ga12, 3Ga09
江邉　正平　2Ba01, 2Ba02
遠藤　銀朗　1Cp11
遠藤　晃輔　1Ep15
遠藤　輪　3Hp02

お

老川　典夫　3Ea07, 3Ea08, 3Ea09, 3S-S2p03
及川　未早来　2S-S5a03
王　悦　2Ga12
扇谷　悟　3Aa02
大井　太士郎　1Cp16
大井　俊彦　1Hp10
大池　達矢　2Ba01, 2Ba02
大石　悠起子　2Ep02
大内　将司　1S-S3p05
大浦　智之　2Ca09
大浦　友紀　2Ha08
大潟　祥梧　1Hp10
大川　敦司　2Ap01
大木　尭之　2Hp06
大熊　盛也　2Aa02, 2Aa03
大河内　美奈　2Fp16, 2Ip10, 2Ip11
大越　佳乃　1Gp15
大作　理文　2Hp09
大迫　香穂　1Gp11
大島　敏久　2Bp15, 2Bp16, 2Bp17, 2Bp18
大城　隆　2Aa04, 2Aa05
大隅　早紀　2Ga06
大園　昂貴　3Ep01
太田　綺弥　3S-S4p02
太田　誠一　3Ga04
太田　惣介　2Hp07
太田　拓　2Hp07, 2Hp08
太田　風輝　1S-S5p06
大田　悠里　1Hp04, 1Hp05
大瀧　賀也　2Da01
大谷　優太　1Fp06, 1Hp07
大塚　健介　3Ba02
大塚　貴志　1S-S5p01
大槻　隆司　1Bp10, 2Cp05
大戸　駿弥　2Ep12
大戸　優妃奈　3Fa07
大土井　律之　2Hp13
大西　敦也　2Ap07
大西　浩平　3Ap07
大貫　喜嗣　2Ip16
大野　遥　1Cp03
大野　博司　3Da03, 3Fa03
大野　豊　1Bp01, 1Bp02
大場　健司　2Hp13
大橋　晶良　1Hp02
大橋　沙季　2Dp11
大橋　貴生　2Ip03, 3Gp07
大橋　千紘　1Gp04
大橋　正孝　2Hp17
大原　彩香　1Hp18
大原　直也　2Jp01
大堀　沙貴子　3Bp08
大前　俊昭　1Hp14
大政　健史　1Ap11, 1Hp15, 2Ap05, 2Ap06, 2Da12, 2Gp01
大村　智　1S-S2p03
大室　有紀　1S-S3p06
大室（松山）　有紀　2Jp08
大谷　早紀　1Bp18
大矢　裕之　1Dp17
岡　拓二　2Jp04
岡　知里　2Gp08, 2Gp09
岡　大椰　3Ia02
岡﨑　文美　2Cp01, 2Cp02, 2Gp07, 3Bp06
岡澤　敦司　2S-S3a02
小笠原　真也　2Da09
小笠原　泰志　3Ea05, 3Ea06, 3S-S2p04
岡田　丈　1Cp06
岡田　真衣　3Ia08
岡田　光加　3Ia08
岡田　洋平　1Jp09, 3Ga03
緒方　藍歌　2Ga12, 3Ga09
岡南　政宏　2Ba01, 2Ba02
岡西　崚輔　2Da09
岡野　憲司　1Dp11, 2Cp14, 2Cp15
岡橋　伸幸　1Ip07, 1Ip08, 1Ip09, 3Ba02
岡村　洋　2Ga01
岡村　匡浩　2Dp03
岡村　好子　1Bp03, 1Gp18, 2Dp17
岡本　淳之介　1Ap17
小川　健二郎　2Ea04, 2Ea05
小川　広大　2Ip14
小川　順　1S-S2p02, 2S-S2a01
小川　祥二郎　2Fp02
小川　貴弘　2Ap18
小川　拓哉　1Fp03
小川　千晶　2Ep10
小川　信明　1Ap16
荻田　亮　3Ep04, 3Ep05

沖野　祥平　1Dp08
荻野　千秋　1Gp17, 1Ip06, 2Ba03, 2Ba11, 2Ja01, 3Aa05, 3Bp06, 3Ga05, 3Ia01
奥川　友紀　3Ja04
奥嵜　雄也　3Gp04
奥田　伸哉　2Ha08
奥田　裕暁　2Ep13
奥田　将生　2Hp09
奥津　果優　3Ha05, 3Ha06
奥原　拓也　2Ap14
奥村　直也　1Ap06
奥村　真衣　2Hp15
小黒　芳史　2Ha04
桶田　凜　1Cp10
尾崎　守　1Ep04
尾崎　信紘　2Ha04
尾崎　僚　3Ea08
長田　穣　2S-S2a04
小山内　崇　2S-S2p04, 3Ap09
尾島　由紘　1Cp13, 2Ip08, 3Ja10, 3Ja11
尾関　健二　2Ha07
小田　彰恭　3Hp06
小田　有沙　3S-S4p05
織田　健　2Hp09
小田　忍　1Gp03
小田　達也　2Ea09
小田　みすず　3Ip04
小田　祐之亮　2Ca08
小田　龍佑　2Ap03
尾高　雅文　1Ap08, 1Ap16, 2Ap18, 2Jp17
越智　健太郎　2Aa02
越智　浩　2Fp16
落合　秋人　2Ip14, 2Ip15
鬼塚　正義　3Gp09
小野　章彦　3Gp02
小野　嵩弘　3Ba07
小野　真由子　1Ap07
小野　陽介　2Bp06
小野寺　正幸　1Hp03
小野寺　瑠依　1Bp16
小原　聡　1A-Ka04
小原　仁実　3Ep07
小布施　祈織　1Ep08
面川　歩　2Jp17
重栖　佑次　3Ga02
小山　貴之　1Ap12
小山　智己　1Bp01, 1Bp02
折田　和泉　1Bp15, 2Cp16, 2Dp13, 2Dp14
恩田　岳英　1Bp08

か

海道　直生　3Ha11
加賀谷　夏海　2Ap18
柿内　俊文　2Fp04
垣見　和宏　2Jp12
角谷　朝香　1Gp14
景山　達斗　2Ga05
景山　裕也　2Ba07
笠井　大輔　1Cp05
笠井　智成　2Gp13
笠井　由紀　1Gp11
笠原　真二郎　1Hp17
風間　春香　3Ia11
梶原　茂樹　3Ia09
梶村　恒　2Bp01
梶山　博司　1Bp14, 1Dp03, 1Dp04, 1Dp05, 1Dp06
柏木　立己　1Ap09
柏木　紀賢　1Gp17, 2Ba03
梶原　果穂　3Cp04
數岡　孝幸　2Hp16
片岡　尚也　2Ja09, 2S-S5p01, 3Ip04
片岡　正和　2Dp11, 3S-S2a01, 3S-S2a03
片岡　道彦　1Fp06, 1Hp07
片桐　美紀　3Jp01
片倉　啓雄　1Ip10, 1Ip11, 2Ea11, 2Ea12, 3Ha10, 3Ha11
片山　徳賢　3Ap09
片山　航　2Fp01
勝河　祐希　2Jp10
勝木　浩平　3Ip05
葛西　晴郎　1Jp08
勝田　知尚　3Da11
勝野　雅央　2Gp12
勝又　政和　2S-S3a01
勝目　智也　2Ap15
加藤　愛理　2Ba04
加藤　且也　1Hp17
加藤　晃　1Ep09, 1Ep10, 1Ep11, 1Ep12
加藤　紗也　1Gp10
加藤　純一　3Aa03
加藤　淳也　2Ca07
加藤　慎也　3Ga06
加藤　節　1Bp03, 1Hp01, 1Hp02, 2Ca07, 2Dp17, 3Aa03, 3Ip07
加藤　太一郎　1Fp10, 2Bp06
加藤　竜也　1Ep07, 2Jp03, 3Da10
加藤　完　3Fa03
加藤　晃代　1S-S3p05, 2Gp04, 2Gp05
加藤　陽菜多　3Ea06
加藤　寛隆　2Ea05
加藤　弘将　3Aa10
加藤　広海　2S-S2a04
加藤　万貴　3Gp03
加藤　雅士　2Bp01, 3Aa01, 3Bp08, 3S-S4p04
加藤　優　2Hp07, 2Hp08
加藤　三恵子　3Cp06
加藤　康夫　2Ip12, 2Ip13
加藤　泰彦　2Aa11
加藤　悠一　1Bp01, 1Bp02, 2S-S3a02
加藤　勇太　3Ba03
加藤　好一　1Hp08
加藤　竜司　2Ga11, 2Ga12, 2Gp10, 2Gp11, 2Gp12, 3Ga09, 3Ia08
門岡　千尋　3Ha05, 3Ha06
門倉　利守　2Ep06, 2Hp05, 2Hp06, 3Ip06
門之園　哲哉　2S-S5a02
金井　保　2Dp01, 2Dp02
斉藤　加奈子　1Hp04
金指　真菜　2Bp10
金本　拓也　1Ip05
金森　拓　2Dp03
金山　直樹　2Gp08, 2Gp09
蟹江　慧　2Ga11, 2Ga12, 2Gp10, 2Gp11, 2Gp12, 3Ga09
金岡　英徳　3Gp03, 3Gp04
金子　喬士郎　2Ga12
金子　真也　3S-S2a04
金子　俊郎　2S-S3a03
兼崎　友　2Hp05
兼田　康平　2Ip13
金丸　愛望　1Fp10
狩野　光伸　2S-S1p04
鎌形　洋一　3Aa02
鎌田　健太郎　2Ca02, 2S-S2p05
上岡　惇也　2Da11
上垣内　宏司　2Hp09
神鳥　成弘　1Ap10
上平　正道　1Jp07, 3Gp01, 3Gp02, 3Gp06
上村　直史　2Ca10
上村　哉生樹　2Dp04
神谷　典穂　1Fp01, 1Fp02, 1S-S3p04
亀川　亜希子　1Ap09
亀田　倫史　2Aa12, 2Jp09, 2S-S5a03
亀田　知人　3Hp05
亀田　弘之　2Gp13
亀谷　将史　2Bp13, 2Ha11
カラッサンチオ　マッテオ　3S-S4p02
軽部　征夫　2Cp07
川井　淳　3Fp01
河合　一輝　3Ba06
河合　駿　3S-S4p03
河合　総一郎　1Fp03
河合　孝朗　3Ip02
川井　隆太郎　2Ca11
川上　隆史　2Ip16
川上　了史　2Ep02, 2Jp01, 2Jp02
河岸　洋和　1Bp17, 1Cp03
川口　潤　3Ap02
川口　剛司　1Gp14, 3Bp03, 3Bp09
川口　秀夫　2Ca04, 2Cp09
川﨑　了　1Ap17, 1Cp07, 1Cp08
川崎　大志　2Ap03
川崎　健　2Ep12
川﨑　浩子　3Ia09
川﨑　芳美　2Da02
川島　成貴　1Bp07
川島　万凜　1Hp06
川津　一隆　2S-S2a04
川西　琢也　1Cp17, 2Ba12
河野　邦晃　2Ea05, 2Ha09

河野　祥尚　3Ja04
川畑　龍司　3Ip07
河原　あい　2Ea07, 2Ea08
河原　正浩　3Gp05
河原　裕美　1S-S5p01
河邉　佳典　1Jp07, 3Gp01, 3Gp02, 3Gp06
河股　優輔　2Ha10
川見　菜実香　1Dp13
川向　誠　2S-S5p05
川村　奈々　1Hp03
川本　純　1Fp03
河本　正次　2Gp06
川本　智也　1Hp06
河原崎　泰昌　1Gp13
河原林　裕　1Ap07
菅　英一郎　1Ip04
神田　晃佑　3Ja04
神田　直輝　1Gp12
神田　涼子　2Hp11, 2Hp12

き

木内　敏之　1S-S1p02
菊川　寛史　2Ba04
菊田　浩希　3Ba05
菊田　実花　3Da05
菊地　淳　2Fp04, 2Fp05, 3Ia10
菊池　成真　1Ep06
菊池　晴菜子　3Hp05
菊池　康紀　1A-Ka04
岸　幹也　3Ip05
岸川　凜太郎　1Bp17
岸田　正夫　1Gp09
岸野　重信　1S-S2p02
貴嶋　紗久　2Gp14
木島　尚輝　3Bp08
岸本　高英　3Fp01
岸本　拓也　3Ea01
岸本　昇　3Ja08
喜多　晃久　2Cp06, 3Aa09
北　潔　1Gp07
木田　仁　2Fp07
北岡　卓也　3Ep01, 3Ep02, 3Ep03
北垣　浩志　2Ha01, 2Ha02, 2Ha03, 2Hp01, 2S-S5p04
北川　文彦　3Hp05
北川　航　2Aa12
北口　哲也　1S-S3p06, 2Jp08
北澤　宏明　3Fp01
北島　悠花　2Ha02
北田　雄基　3Aa06
北畑　信隆　2Ba08
北堀　智希　1Gp18
北松　瑞生　1Ep14
北村　憲司　1S-S4p02
北村　さや香　2Fa01
北村　昌大　1Hp17
北山　雄己哉　2Fp01
城戸　康年　1Gp07
木梨　陽康　3Ea04
木野　邦器　2Ap14, 2Ap15, 2Ap16, 2Ap17, 2Bp11, 2Bp12, 2S-S1p01
紀ノ岡　正博　1A-Ka03, 1Jp03, 2Da11, 3Hp07, 3Hp08, 3Hp09
木下　幹朗　1S-S4p07
木下　理恵　2Jp11
木花　将　3Ea10
木原　明彦　2Ha06
木原　崇博　3Ip09
木原　摩耶　3Ja10
儀武　菜美子　1Cp05
金　相完　1Hp06
金　賢徹　2Gp16
金　美海　1Jp03, 3Hp09
金　允卿　1Fp04
金　英寿　2Ha03
木村　圭　2Hp04
木村　啓太郎　2Dp05
木村　信忠　2Dp06
木村　宏　2Jp08
木村　紘也　3Ep03
木村　浩之　2Cp15
木村　麻美子　1Ep14
木村　祐太　1Bp14, 1Dp03, 1Dp04, 1Dp05, 1Dp06
木村　行宏　1Ap13, 2Ep09, 2Ep10
清　啓自　3Ip06
清野　珠美　2Hp09
清野　宏　2Fp10
切岩　祥和　2S-S3a01
桐村　光太郎　1Gp15, 1Gp16, 2Bp02, 2Ca08, 2Ca09
金田一　智規　1Hp02
金原　和秀　1Cp06, 2Aa01, 2Aa02, 2Aa03

く

久下　裕司　1Jp06
日下　勝弘　1Ap08
草加　直幸　2Ga03
日下部　宜宏　1S-S3p04
日下部　均　2Ap02
草場　裕貴　2Hp01
串山　夏望　1Bp05
楠田　みのり　1Hp09
楠部　真崇　3Ja07
楠本　憲一　2Ha12
朽津　和幸　2Ba08
沓掛　登志子　3Ha09
工藤　大喜　3Ba08
工藤　基徳　3Bp06
工藤　優輝　3Jp01
工藤　悠希　1Hp10
久渡瀬　太一　1Cp01
國澤　純　2Ea11, 2Ea12, 2Fp10
國富　理紗子　2Jp16
久野　晶生　3Gp01
久野　斉　2Bp10
久能　樹　3Jp07
久原　哲　1Hp06
久保　いづみ　2Fp17
久保　智里　2Fp16
久保　稔　1Ap08
久保　幹　2Ba09, 2Ba10, 3Da01, 3Da02, 3Ja09
久保田　恵理　2Hp05
窪田　健太　2Ba05
久保田　進　1Hp14
久保田　浩美　2Fp11
久保庭　雅恵　1Ep05
熊谷　孝則　2Dp07
熊崎　努　2Hp09
熊田　佳菜子　1Ep15
熊田　陽一　1Dp10, 1Dp11, 1Dp12, 1Dp13, 1Hp18, 2Da08, 2Da09, 2Da10
倉掛　昌裕　3Bp07
倉賀野　正弘　2Jp14, 2Jp15
倉敷　凌太　2Aa04
倉田　淳志　2Ip07
倉田　博之　3Ia04
倉橋　敦　2Ha04
栗岡　昌利　3Ga01
栗田　俊輔　1Bp15
栗原　新　2S-S5p10
栗原　達夫　1Fp03, 2Ip07
栗本　昌樹　2Fp16
栗山　克　2Aa05
栗山　尚浩　1Hp18
栗山　風貴子　2Gp07
黒川　摩利　2Ba08
黒沢　則夫　3Ap04
黒澤　尋　2Ip16
黒田　章夫　2Bp05, 2Ca06
黒田　昂輝　1Hp15
黒田　俊一　2Gp15
黒田　照夫　2Dp07
黒田　典孝　1Hp18
黒田　真史　1Bp13, 2Ca12, 3Jp04, 3Jp05, 3Jp06
黒瀧　空　3Ap03
黒谷　篤之　2Fp04
黒部　督惠　1Ap01
桑井　仁葵　3Da11
桑原　美空　1Gp04
桑山　翔一　2Hp06

け

解良　康太　3Ea10
解良　芳夫　1Cp02

こ

胡　玥　2S-S3a03
小池　あゆみ　2Jp05
小泉　英樹　3Ga11
小泉　史明　1Jp05
郭　朕　2Ja10

纐纈　健人　2Ap14
香西　雄介　1Ep14, 2S-S3a04
高坂　智之　3S-S2a03
幸田　明生　1Fp07
甲元　一也　2Fp06, 3Ep09
古賀　信康　2S-S5a04
古賀　雄一　1Ap11, 1Hp15, 2Ap05, 2Ap06, 2Da12, 2Gp01
古賀　凌　2Ja09
小川　雅人　2Fp09
小久保　晋　3Ip03
小境　敏揮　2Ea05
小酒井　智也　2Dp08
小崎　一功　2Ip17, 2Ip18
幸治　幸治　2Bp09
兒島　孝明　1S-S3p05, 2Gp04, 3Ia02, 3Ia03, 3S-S4p04
小島　千明　1Hp14
小島　伸彦　2Ga08
小島　基　1Ip05
小嶋　保彦　3S-S3p04
五島　徹也　2Hp10, 2Hp13
小高　敦史　1S-S4p04, 2Hp02, 3Ha02
小谷　哲也　1Hp14
児玉　詩織　2Hp09
児玉　浩明　1Gp08, 2Cp12, 2Cp13, 3Da03, 3Fa03
小玉　誠　1Bp04
小玉　優哉　2Ap04
小寺澤　翔太　3Ga05
後藤　綺花　2Fp02
後藤　博　2Ha04
後藤　麻衣子　2Fa06
後藤　正利　2Dp06, 2Hp04, 3Ha01, 3Ha05, 3Ha06
後藤　雅宏　1Fp01, 1Fp02
後藤　佑樹　3S-S2p02
小中　勇二　3Ea02
児波　克哉　2Ip08
小西　研吾　2Ga09
小西　正朗　1Dp07, 1Ep06, 3Aa04, 3Ba03
此枝　優希　3Ga11
小濵　可奈絵　2Ha03
小林　和輝　2Ep01
小林　元太　2Hp04
小林　準次　2Ga02
小林　俊介　2Ca04, 2Ja08
小林　慎太郎　3Ap07
小林　聖弥　3Ip05
小林　拓嗣　2Hp09
小林　巧　2Da08
小林　哲夫　3Ia02
小林　日花梨　3Ip03
小林　慎　3Jp04
小林　由衣乃　1Hp03
小林　洋介　3Aa02
小堀　俊郎　2Dp17
駒田　拓也　1Fp02
小松　大祐　2Ap18
小松　夕子　2Hp09
小松　陽介　2Fa07
小松崎　亜紀子　3Ba01
五味　勝也　1Gp10, 1Gp13, 2Bp14
児美川　拓実　2Ip11
古明地　敬介　1Hp08
小山　純弘　1Ep16, 2Ga02, 3Hp01
小山　泰二　1Ip04
是石　真友子　3Da09
権平　文夫　2Da09
近藤　昭彦　1Bp01, 1Bp02, 1Dp11, 1Gp17, 1Ip06, 2Ba03, 2Ca04, 2Ca05, 2Cp09, 2Ja01, 3Aa05, 3Aa06, 3Ba04, 3Ba11, 3Bp06, 3Ga05, 3Ia01, 3Jp02, 3Jp03
近藤　寿志　3Ea02
近藤　昌幸　3Hp05
近藤　倫生　2S-S2a04
今野　紗希　3Ha10

さ

雑賀　あずさ　2Ea11, 2Ea12
最相　大輔　2S-S3a04
齊藤　朱音　2Ba03
齋藤　一樹　2Jp07
斉藤　加奈子　1Hp05
齋藤　樹理　1Hp10
齋藤　慎太郎　2Ca09
齋藤　寛　2Ep03
齊藤　三希子　2S-S3a05
齋藤　裕　2Aa12, 2S-S5a03
齊藤　亮太　2Hp09
佐伯　琴音　2Ga07
酒井　杏匠　2Bp01, 3Aa01
坂井　清彦　3S-S3p04
酒井　謙二　3Ja04
堺　裕輔　3Ga02
榊原　康文　2Dp05
阪口　由佳　2Ep07
酒瀬川　信一　1Ap12
坂田　研二　2Fp05, 3Ia10
坂中　哲人　1Ep05
坂元　仁　2Dp15
阪本　龍司　1Bp11
坂元　博昭　2Bp15, 2Bp16, 2Bp17, 2Bp18, 2Fp03
阪本　真由子　2Ha02, 2Ha03
坂本　祐一朗　1Dp13
鷺　陽香　2Cp12
佐久間　健輔　2Ba05
櫻井　恵太　2Fa05
櫻井　徹生　1Gp05
櫻庭　春彦　2Bp15, 2Bp16, 2Bp17, 2Bp18, 3Ap04
提箸　祥幸　2Ip14, 2Ip15
座古　保　2Jp16
迫田　裕美子　1Hp18
笹川　和彦　1S-S5p06
佐々木　啓　2Da11
佐々木　建吾　1A-Ep01, 2Ca05, 3Jp02, 3Jp03
佐々木　大作　1Bp12
佐々木　大介　2Ca05, 3Jp02, 3Jp03
佐々木　千鶴　1Dp02
佐々木　晴菜　2Ea11
佐々木　春弥　2Ap18
佐々木　美月　1Bp12
佐々木　由佳　2Cp15
佐々木　陽介　2Da06
佐々木　里奈　2Jp15
笹野　佑　2Hp02, 3Ba09
佐々野　僚一　2Fa04
佐々本　康平　1Ap02
佐塚　隆志　2Cp09
佐藤　淳　2Gp13
佐藤　あやの　3Da09
佐藤　勝也　1Bp01, 1Bp02
佐藤　純　2Jp03
佐藤　俊輔　1Cp16
佐藤　将太　3Ea06
佐藤　喬章　3Ap06
佐藤　成樹　2Cp12
佐藤　将　2Ip16
佐藤　守　3Jp05
佐藤　実穂　2Fa08
佐藤　康治　3S-S2p04
佐藤　悠　2Cp14, 2Cp15
佐藤　嶺　3Ap07
佐藤　崚　1Fp01
里中　健太　2Ea06
里村　武範　2Bp15, 2Bp16, 2Bp17, 2Bp18, 2Fp03, 3Ap04
佐野　七海　2Ip04
佐野　観月　3Gp03
佐野　芽生　3Ep07
佐原　健彦　3Aa02
澤井　美伯　2Hp15
澤田　和敬　2Hp04
澤田　俊　3Ba08
澤田　隆二　3Ia08
澤邊　朋美　2Ip08

し

椎名　一樹　1Gp03
塩澤　優稀　3Aa08
塩見　尚史　3Ga10
志賀　敏英　1Cp07
繁　宥樹　2Da04
茂野　俊也　1Hp03
繁原　安美　2Ep07
重松　真由子　3Ea06
靜　良治　3Dp05
設樂　弘之　2Ha06
實野　佳奈　2Ep03
實廣　亜希子　3Ga11
篠崎　一雄　2S-S3a01
篠田　克彦　3S-S3p04

篠原　輝　1Cp02
篠原　靖智　1Gp07
志波　智生　2Ap01
柴田　徹　3Da01, 3Da02
柴田　納央子　2Fp10
柴田　幹哉　1Ap04
柴田　裕介　2Hp10
柴田　友香莉　2Hp14
柴野　麻由　2Ep06
渋田　真結　2Ga11
島　知輝　1Ip09
嶋田　順太　3Gp07
島田　友輝　1Ep15
島田　昌也　2Ep05, 2Ep07, 2Hp15
嶋津　敦子　3Gp09
島本　真奈　3Ja07
島森　圭弥　2Jp15
清水　亮啓　2Ga05
清水　一憲　1Jp08, 1Jp09, 2Ga06, 2Ip17, 2Ip18, 3Ga03
清水　拓　2Fp01
清水　浩　1Hp09, 1Ip07, 2Ca02, 2Ca11, 2Fa01, 2Fa02, 2Hp03, 2S-S2p05, 3Ia05
清水　浩美　2Hp17
清水　みなみ　2S-S3a04
志水　元亨　2Bp01, 3Aa01, 3Bp08, 3S-S4p04
清水　由宇　2Fa07
下飯　仁　2Bp14
下川　直史　2Da06, 2Ip05, 2Ip06, 3Ga01
下澤　勇弥　1Ap02
下野　雅仁　1Cp13
下平　武彦　2Fa06
下総　葉子　2Dp08
下山　達　1Jp05
ジャビエル　モハマド　3Ja03
周　伯揚　2Jp06
章　超　2Ea05, 2Ha09
白井　智量　2Ca04, 2Ca05, 3Ia09
白岩　侑馬　3Ga08
白川　大地　3Ha07
城　宜嗣　1Ap08
白木澤　佳子　2S-S1p03
志波　優　2Dp05, 2Fa08
新谷　智子　2Bp14
新谷　政己　1Cp06, 2Aa01, 2Aa02, 2Aa03, 2S-S2a02, 3Aa10
神内　奈々子　1Dp03
神保　陽一　3Hp05
新間　秀一　2Ea01, 2Fp13, 2Fp14
新森　彰信　2Ja10

す

末　信一朗　2Bp15, 2Bp16, 2Bp17, 2Bp18, 2Fp03, 3Ap04
末永　光　2Dp06
菅　道哉　3Ja11
菅沼　寛　2Ga11
菅原　達也　1S-S4p06
杉浦　慎治　1A-Jp01
杉島　小雪　2Jp17
杉本　明　1A-Ka04
杉本　真也　3Jp07
杉本　岳人　2Ep11
杉本　礼子　2Ga12
杉森　大助　1Ap12
杉山　亜矢斗　3Ga09
杉山　在生人　3Cp03
杉山　周　1Hp02
杉山　巧　2Hp07, 2Hp08
杉山　友康　1Cp10, 2Gp13
杉山　政則　2Aa06, 2Ea10
杉山　峰崇　2Hp02, 3Ba08
杉山　友亮　2Da10
須崎　萌　2Gp14, 2Gp15
鈴木　喬太　1Ep15
鈴木　健一朗　2Ep06, 2Hp05, 2Hp06, 3Ip06
鈴木　健吾　1Bp09, 3S-S3p02
鈴木　研志　2Ca01, 3Ja03
鈴木　康平　2Ga03, 3Hp04
鈴木　伸　2Ap15, 2Ap16
鈴木　健弘　2Ip17
鈴木　哲朗　2Fp15
鈴木　徹　2Dp08
鈴木　敏弘　2Fa08, 3Ea04, 3Ip05
鈴木　尚幸　2Cp16
鈴木　治人　2Bp16
鈴木　宏和　2Aa04, 2Aa05
鈴木　裕満　3Bp08
鈴木　宏佳　3Da01, 3Da02
鈴木　宗典　1Ip05
鈴木　啓仁　2Bp01
鈴木　陸太　1Hp02
須田　亙　3Fa03
砂山　博文　2Fp01
鷲見　典克　2S-S3a04
角田　祐介　1Ip03
角田　洋輔　3Fp01
炭谷　順一　1Gp14, 3Bp03, 3Bp09
住吉　美保　3Ea03
陶山　明子　2Dp06

せ

瀬川　直矢　2Da11
戚　蟠　3Ga04
關　光　1Ip05
関　未央　2Bp03
関　実　1Jp10, 2Ga07
関川　貴寛　2Ba04
関口　勇地　1Hp04
関田　美沙　2Ep02
関藤　孝之　1S-S4p03
妹尾　幸枝　2S-S2p05
妹尾　政都　2Ba06
千賀　由佳子　3Gp08
善藤　威史　1Gp04, 2Ea07
仙波　弘雅　1Fp07

そ

周　法宇　1Cp01
早田　邦康　2S-S5p08
早出　広司　2Ip02
相馬　悠希　1Hp11, 2Fa06
曽川　沙希　2Ja09
曽田　匡洋　1Gp17, 2Ba03
曽根　政人　3Ba06
園木　和典　2Ca10
園元　謙二　1Gp04
染谷　信孝　2Dp04

た

平良　東紀　2Bp04, 3Ha01
大利　徹　3Ea05, 3Ea06, 3S-S2p04
田尾　文哉　2Ga08
多賀　直彦　3Dp06
高木　明香莉　1Bp12
高木　誠仁　2Cp12
高木　一好　2Ap09, 2Ap10
高木　さつき　1Gp11
高木　翔梧　2Jp14
高木　妙子　1Hp05
高木　博史　1S-S4p05, 2Ca03, 2Hp17, 2Hp18
高木　昌宏　2Da06, 2Ip05, 2Ip06, 3Ga01
高木　睦　2Ga01
高久　洋暁　3Ia11
高島　圭介　2S-S3a03
高嶋　大輝　2Bp14
高須　耀子　2Hp05
高須賀　太一　3Bp08
高瀬　良和　2Ea05
高塚　由美子　2Bp03
高辻　義行　1Dp09
高寺　美砂都　1Ip10, 1Ip11
高野　恵里　2Fp01
高野　力　1Dp18
高野　真希　3Dp01, 3Ea11
高萩　航太郎　2S-S3a04
高橋　葵　3Ha11
高橋　彬　3Ga04
高橋　一敏　2Ap04
高橋　克嘉　1Bp04
高橋　清文　2Aa09, 2Aa10
高橋　慶太郎　2Hp14
高橋　憲司　2Ba11, 2Ca04, 2Ca05, 2Ga09, 2Ga10, 2Ja05, 2Ja06, 2Ja08
高橋　浩一　2Da09
高橋　孝太郎　2Ea08
高橋　沙織　3Ha09
高橋　駿輔　3Ba06
高橋　祥司　1Cp02
高橋　征司　2Bp09
高橋　俊成　2Hp10
高橋　治子　1S-S5p03

高橋　宏和　1Bp03, 1Gp18, 2Dp17
高橋　弘喜　2Ep08
高橋　昌樹　1S-S3p06
高橋　将人　1Dp16
高橋　政友　2Fa05, 2Fa06
高橋　雅弥　2Ha07
高橋　正之　2Hp09
高橋　美裕　3Hp06
高橋　森里　1Cp11
高橋　雄太　2Ip10
高橋　譲　3Ea04
高橋　洋子　1S-S2p03, 2Fp08
高橋　良輔　1Hp18
高原　茉莉　1Fp02
高部　響介　3Ia11
高見　佳宏　3Da10
田上　宇乃　2Ap04
高峯　和則　3Ha05, 3Ha06
高村　映一郎　2Bp15, 2Bp16, 2Bp17, 2Bp18, 2Fp03
高山　一也　3Jp04
多喜　俊介　2Bp15, 2Bp18
滝口　有沙　2Ca08
滝口　昇　1Cp17, 2Ba12, 3Dp05
滝澤　昇　2Ga04
多久島　朗　1Cp13
田口　精一　1Gp05, 1Hp10
田口　久貴　3Ba09
竹内　綾　1Gp12
竹内　健人　3Ba03
竹内　俊文　2Fp01
竹内　誠亮　1S-S5p02
武内　正輝　3Dp02
竹内　道樹　1S-S2p02
武内　大和　2Ip12, 2Ip13
竹内　諒　3Dp04
竹尾　映美　2Fp14
竹下　正彦　2Ea04
竹園　恵　1Hp03
竹田　浩之　3S-S3a02
武田　真樹　1Bp14, 1Dp03, 1Dp04, 1Dp05, 1Dp06
武田　真由子　1Dp12
武智　大樹　2Ip03
竹中　慎治　1Ap13, 2Ba05, 2Ep09, 2Ep10
竹中　武藏　1Gp17, 2Ba03
竹葉　惇貴　3Ep06
竹原　直輝　1Ap16
竹原　宗範　3Dp02, 3Dp03
竹村　海生　2Ca07, 3Aa03
竹村　謙信　2Fp15
竹本　悠人　2Gp10
竹山　春子　2Aa09, 2Aa10, 2Ep03, 2Fp08, 2Fp09, 2Fp10
田島　誉久　3Aa03
田島　直幸　2Aa12
田代　康介　1Hp06
田代　幸寛　3Ja04
田代　陽介　2Ca01, 3Ja03, 3Jp01
立花　成我　1Dp07, 3Aa04
達川　綾香　3Ea01
立田　祐琳亜　2Jp04
巽　萌美　2Ap04
巽　祐介　2Ap06
田中　克典　2Jp16
田中　賢二　2Cp16
田中　純平　2Hp05, 2Hp06
田中　淳也　2Hp09
田中　孝明　2Ip14, 2Ip15
田中　貴大　2Ap07
田中　拓未　1Fp04, 1Fp05
田中　勉　1Dp11
田中　剛　1Bp05, 1Bp06, 1Jp05, 2Da05
田中　俊雄　3Ep04, 3Ep05
田中　信男　2Fa03
田中　伸哉　2Hp10
田中　祐圭　2Fp16, 2Ip10, 2Ip11
田中　優　2Ha01
田中　真奈　3Bp09
田中　瑞己　1Gp13
田中　桃未　3Ip03
田中　靖浩　1Bp09
田中　涼　2Ca02
田中　遼治　3Ap08
谷　明生　2Ep07
谷　一寿　1Ap09
谷　修治　1Gp14, 3Bp03, 3Bp09
谷井　沙織　1Ep15
谷内　達彦　2Ga10
谷川　浩司　1Dp03, 1Dp04, 1Dp05, 1Dp06
谷口　正之　2Ip14, 2Ip15
谷口　瑞季　3Bp06
種田　大介　1Dp08
玉置　尚徳　2Hp04, 3Ha05, 3Ha06
玉田　太郎　1Ap08
玉野　孝一　1Ip04, 2Aa12
田丸　浩　2Cp01, 2Cp02, 2Gp07, 3Bp06
田村　隆　1Ep08, 2Ap01, 2Ap02
田村　武幸　3S-S2a03
田村　具博　1Ip04, 2Aa12
田村　泰之　1Ep16, 2Ga02
田山　爽也華　2Da05
タンダル　セバスチャン トミ　2S-S2p05

ち

千葉　壮太郎　3S-S4p02
千葉　靖典　3Ba01
張　嘉修　1Bp02
張　傣喆　1Bp16
莊　漢聲　2Fp03
趙　理海　1Gp07

つ

塚越　かおり　2Ip01, 2Ip02
塚原　正俊　2Hp18
塚本　郁子　1Ap10
塚本　楓　3Ia10
津川　若子　2Ip02
佃　怜奈　2Ep11
柘植　圭介　2Ha03
柘植　謙爾　2Ca02
柘植　丈治　1Gp05, 3Ip08, 3Ip09
柘植　陽太　2Ba11, 2Ca04, 2Ca05, 2Ja05, 2Ja06, 2Ja07, 2Ja08, 3Jp02, 3Jp03
辻　周真　1Ip08
辻　俊一　3Ga11
辻　寛之　2S-S3a04
辻　雅晴　2Ep08
辻井　啓夢　1Ap08
辻野　義雄　2Da06, 3Ga01
津田　宏治　2S-S5a03
土戸　哲明　2Dp15
土屋　高伸　2Bp14
土屋　友理　2Hp07, 2Hp08
筒井　莊周　3Bp07
都築　翔　2Bp01
都築　正男　2Hp17
堤　星太郎　2Bp01
堤　浩子　2Ja01, 3Ha02
常田　聡　1Hp04, 1Hp05
津波古　遥奈　2Bp04
坪井　宏和　1Fp07
湊元　幹太　3Cp01
鶴　雄基　1Bp06
鶴田　篤弘　1Fp10, 2Bp06
鶴野　圭悟　1Hp11
鶴本　智大　2S-S3a02

て

デオ　ヴィピン クマル　3Da10
手島　愛子　3Ea02, 3Ea03
出村　拓　1Ep09, 1Ep10, 1Ep11, 1Ep12
寺内　勉　2Fa06
寺内　美結　3Fa02
寺内　裕貴　1Fp04, 1Fp05
寺門　和奏　2Ea06
寺島　義文　1A-Ka04
寺本　潤　2Cp09

と

土井　晃一郎　1Cp10
土居　幹治　2Ep09, 2Ep10
董　金華　1S-S3p06
當舍　武彦　1Ap08
東樹　宏和　2S-S2a03
道羅　英夫　1Ep07
遠矢　将太郎　1Dp09
遠山　忠　1Bp09
渡嘉敷　建孝　3Ha01
常盤　広明　2Ap13
徳井　教孝　1S-S4p10
徳田　宏晴　2Hp16
徳田　真穂　2Aa03
戸口　梨那　3Ea07

徳永　成美　2Da01
徳光　浩　2Gp08, 2Gp09
十倉　充範　2Ja11, 3Aa11
徳樂　清孝　2Jp14, 2Jp15, 3Dp07
戸澤　譲　2Bp09
戸田　弘　2Bp07
戸所　健彦　3Ha02
利根川　聡史　1Bp18
殿川　亜未　3Ea02
冨岡　敏一　2Ep13
冨ケ原　祥隆　2S-S1p02
富田　寿男　2Cp01, 2Cp02
冨田　昌弘　3Cp01
富田　因則　2Ep14
富永　信一　2Ba09
冨永　将大　3Ba11
友広　いずみ　2Ja09
戸谷　吉博　1Hp09, 2Ca02, 2Ca11, 2Fa01, 2S-S2p05, 3Ba02, 3Ia05
外山　博英　2Cp10
豊川　洋一　2Hp18
豊島　正和　2Fa01, 3Ia05
豊田　敦　2Hp01
豊田　晃一　1Ep03, 2Ja05, 2Ja07
豊竹　洋佑　2Ap07, 2Ap08, 2Ap09, 2Ap10, 2Ap11, 2Ha10
豊福　雅典　3Jp07
虎谷　哲夫　1Ap15
童　俞靜　2Fp03
頓名　洋　3Ha10

な

内藤　秋花　1Dp11
永井　智　2Fp11
永井　美希　2Ga11
中江　貴司　2Hp11, 2Hp12
中尾　貴一　2Da09
永尾　晃治　2Ha01
長尾　征秀　2Ap05
長岡　綾　2Cp11
長岡　亨　1Cp09
長岡　洋大　3Bp07
中垣　尊　2Jp17
中川　克彦　3Aa09
中川　拓郎　2Ha05
中川　智行　2Ep05, 2Ep07, 2Hp15
中川　博之　1Gp15
中川　陽　3Ea05
中川　洋史　3Ip03
長崎　晃　2Gp14
中沢　伸重　2Hp14
中澤　光　2Jp09, 2S-S5a03, 3Cp02, 3Cp03
中澤　昌俊　3Jp06
中澤　昌美　1Bp11, 2S-S5p03
中島　一紀　1Ap17, 1Cp07, 1Cp08
中島　陸博　3S-S3p01
中島　琢自　1S-S2p03, 2Fp08
中嶋　桃香　1Dp01
中島　鈴佳　2Dp03
中島　敏明　1Hp03, 2Dp03
中嶋　宏之　3Hp04
中嶋　義隆　1Ap01
中島　芳浩　2Bp06
中嶋　陸満　2Ga05
長島　拓則　1Jp08, 1Jp09, 2Ga06
永島　直翔　1S-S4p02
中島田　豊　1Bp03, 1Hp01, 1Hp02, 2Ca07, 2Cp06, 2Dp17, 3Aa03, 3Ip07
中田　國夫　1Ap09
中田　菜月　2Dp02
仲田　真穂　2Ea11
永田　暁洋　1Hp10
永田　智　3Dp03
永田　夫久江　1Hp17
永田　裕二　2S-S2a04
永田　佳嗣　2Ip06
長竹　貴広　2Ea12
中谷　有沙　2Jp07
中谷　航太　2Fa05
中谷　祐将　2Ip05
長谷　洸輝　3Hp08
永留　真優　2Ha02
中西　昭仁　2Cp07
中西　崇文　2Jp03
仲野　育惠　2Dp10
中野　浩平　2Ep07
中野　祥吾　1Ap07, 1Fp08, 1Fp09, 2Ap13, 3S-S3a05
中野　智貴　2Jp06
中野　秀雄　1S-S3p05, 2Gp04, 2Gp05, 3Ia02, 3Ia03, 3S-S4p04
中野　正貴　2Ba08
永野　真吾　2Aa05
長野　正信　2Ha11
永野　幸生　2Hp04
中林　麗奈　2Ep09, 2Ep10
中原　航　3Ia06
中東　良太　1Ap18
中道　優介　3Bp05
永宗　喜三郎　1Gp07
中村　彩奈　2Ha04
中村　克哉　1Ip05
中村　公則　2Fa07
中村　健人　1Jp09
中村　浩平　2Ep11
中村　聡　1Bp15, 2Dp13, 2Dp14
中村　卓登　2Bp15
中村　史　2Gp14, 2Gp15, 2Gp16
中村　努　1Ap02
中村　強　2Ha01, 2Ha02
中村　隼雄　3Ia07
中村　真由　1Dp17
中村　泰之　3Ba04
中村　友綺　1Bp16
中村　嘉利　1Dp02, 2Ba06
長森　英二　2S-S4p04
中山　俊一　2Ep06, 2Hp05, 2Hp06, 3Ip06
中山　二郎　1S-S4p09, 2Ha01, 2Ha02
中山　宗一郎　2Bp13
中山　亨　2Bp09
中山　裕貴　3Gp04
那須　英里圭　2Jp02
名取　暁　3Hp01
成田　裕司　2Ga12, 3Ga09
成瀬　つきひ　1Ep11
ナンタポン　ナワラート　2Ja09
南部　友香　3Ip08
南部　洋輔　2Ea02

に

新岡　宏彦　1S-S5p05, 3Ia07
二井手　哲平　2Jp09, 3Cp02
西　達也　1Cp05
西内　巧　2Cp12
西江　百加　1Gp06
西川　健幸　2Ap14
西川　洋平　2Fp09
西迫　栄　2Gp13
西島　謙一　3Gp03, 3Gp04
西田　敬二　2Cp09
西野　駿佑　1Ip07
西野　泰斗　2Ga03, 3Hp04
西野　智彦　3Dp04
西宮　佳志　2Aa12
西向　めぐみ　2Ha01
西村　重徳　3Bp09
西村　勇哉　3Ga05
西本　歩紗　1Bp11
西本　友之　1Ap03
西矢　芳昭　1Ap01, 1Ap02, 2Ap03
西山　和夫　2Ea04, 2Ea05
新田　克章　2Dp14, 2Fa02
仁宮　一章　2Ba11, 2Ca04, 2Ca05, 2Ga09, 2Ga10, 2Ja05, 2Ja06, 2Ja08, 3Ga06
二瓶　健司　2S-S3a03
如田　奈津美　2Ea08

ぬ

沼田　圭司　2Dp09

ね

根木　麻耶加　2Jp05
根岸　諒　1Jp05
根来　宏明　2Hp03
根本　理子　1Ep08, 2Ap01, 2Ap02
根路銘　伸介　2Ha08

の

能崎　健太　3Ba11
能年　義輝　1Ep14
盧　鎮栄　1Hp11
野口　範子　2Ip05
野口　英樹　2Ep08, 2Hp01
野澤　大樹　2Bp08

野島　大佑　1Bp05
野田　彩乃　2Aa11
野田　尚宏　1Hp04, 1Hp05
野田　浩史　2Ep13
野田　正文　2Aa06, 2Ea10
野田　凌太郎　2Gp08, 2Gp09
野地　秀和　2Hp16
野中　衛　1Ap16
野々村　祐輝　2Ap10
野々山　智美　1Bp06
野辺　善仁　3Hp06
登木　耕陽　2Cp14, 2Cp15
野見山　泰成　1Gp04
野村　泉　2Dp08
野村　隆臣　2Ap03
野村　高志　1Ap08
野村　暢彦　3Ia11, 3Jp07
野村　勇揮　2Ba12
野村　友佑　3Ep07
野村　亘　3Dp03
野矢　洋一　1Jp06

は

萩原　万貴　1Ap14
萩原　遥太　3Gp04
朴　龍洙　1Ep07, 2Fp15, 2Jp03, 3Da10
白米　優一　2Da03
端　瞭太　1Dp12
橋口　和典　2Ha11
橋田　礼博　3Hp07
橋爪　克己　3Ha04
橋場　倫子　3Ba04
橋本　真悟　2Ga04
橋本　貴史　2Bp08
羽城　周平　2Aa07, 2Aa08
蓮沼　誠久　1Bp01, 1Bp02, 2S-S3a02, 3Aa06, 3Ba04
長谷　純嵩　2Dp05
長谷川　倫男　1Hp16
長谷川　浩　3Ja05
長谷川　真輝　1Ip03
長谷川　真梨菜　3Ep05
畑　浩介　1Gp18
秦　洋二　2Hp02, 2Hp03, 2Ja01, 3Ha02
羽田　毅　3Gp01
波多江　有輝　3Gp02
畠山　哲央　3S-S4p05
畑中　唯史　1Ap18
秦野　琢之　3Aa07
八谷　剛史　2Dp05
八田　誠二　2Ap10
八田　貴　1Cp01
服部　公央亮　2S-S3a04
服部　修平　3Cp02
服部　新吾　3Da01, 3Da02
服部　正　2S-S1p06
服部　正平　3Fa03
花井　泰三　1Dp12, 1Hp11
花岡　翼　1Bp09
羽生　義郎　3Cp06
羽場　清人　2Hp08
馬場　嵩一朗　2Hp04
馬場　俊輔　3Ia07
馬場　啓彰　1Hp01
馬場　保徳　3S-S4p04
羽部　浩　1Bp18, 2Ca09
濱川　匡史　1Ep04, 3Ap05
浜島　弘史　2Ha01
濱田　浩幸　1Hp11
濱野　吉十　2Ip12, 2Ip13, 3Ea07, 3Ea08, 3Ea09, 3S-S2p01, 3S-S2p03
浜本　晋　1Ep15
早川　享志　2Ep05, 2Ep07, 2Hp15
早川　敏広　3Da01, 3Da02
早川　正幸　3Ip03
早坂　洋輝　3Ja09
林　修平　1Dp01
林　順司　2Ap07, 2Ap08, 2Ap09, 2Ap10, 2Ap11, 2Ha10
林　祥平　3S-S2p04
林　英輝　1Ap08
林　雅弘　1Bp04, 2Cp11
林　将也　2Ap01
林　美伶　2Ip10
林　勇樹　1Fp11
早瀬　伸樹　2Cp06, 3Aa09
早田　優理　2Ap16
原　清敬　2Ba04, 2Ba07, 2Ca02, 2Fp12, 2S-S2p03, 3Aa08, 3Ba02
原　富次郎　2Bp03
原　太志　1Hp14
原　正之　1Jp04, 3Ga07, 3Ga08
原　良太郎　1S-S2p02, 2Ap14, 2Bp12
原島　俊　2Hp02
原田　繁春　2Ap01
原田　春佳　2Ha08
原田　雄斗　2Ep05
原田　隆平　3S-S3a03
原田　玲奈　1Dp15
原山　重明　1Gp11
原-山村　宏江　3Ja05
坂東　弘樹　3Ha02
馬場　健史　2Fa05, 2Fa06, 2S-S4p07

ひ

稗田　莉奈　1Gp06
比嘉　悠貴　2Ea01
東　恭平　2S-S5p07
東　達也　2Fp02
東　恒仁　1Jp06
東浦　優希　2Ap03
東川　史子　2Aa06, 2Ea10
東原　成美　3Ha10
東本　繰未　2Ba10
東山　明広　3Aa09
引地　啓太　2Ip06
樋口　美栄子　2Dp09
久田　拓海　2Gp11
久富　歩　3Ba09
菱田　正志　3S-S3p04
秀瀬　涼太　2Ip06, 3Ap05
日野　智也　2Aa05
氷見山　幹基　1Ap02
平　大輔　2Jp04
平井　英明　1Cp14
平井　浩文　1Bp17, 1Cp03
平川　夕貴　1Dp01
平沢　敬　3Ba06
平田　晃右　3Ap06
平塚　功尚　2Ep06
平野　一哉　3Dp05
平野　伸一　1Cp09
平野　皓巳　3Da01, 3Da02
平林　翼　2Dp14
平松　孝太郎　3Ha10
平松　希望　1Fp09
平山　歩夢　2Dp13
平山　隆志　2S-S3a04
平山　智弘　3Ia11
平山　匡男　2Ha04
平山　伶奈　1Hp07
広井　佳臣　2Ga03, 3Hp04
廣江　綾香　1Gp05
広岡　和丈　2Dp12
廣岡　青央　2Hp09
広川　安孝　1Dp12
廣瀬　遵　2Dp06
広瀬　佑紀　1Cp10
廣田　隆一　2Bp05, 2Ca06
弘埜　陽子　2Ca02, 3Aa08, 3Ba02
廣部　綾乃　2Ba11
廣森　美樹　2Bp09

ふ

ファティマ　アズワニ　3Ja03
ファン チィー キム　ユン　2Aa01
深沢　知加子　2S-S3a01
深瀬　葵　2Ap09
深田　寛朗　2Ja11, 3Aa11
深田　悠太　2Dp11
深見　裕之　2Ha03
府川　祐太　1Ap05
吹谷　智　3Ap03
福居　俊昭　1Bp15, 2Cp16, 2Dp13, 2Dp14
福井　瑞季　2Ip07
福井　諒　3Ja04
福﨑　英一郎　1Ep05, 2Dp14, 2Ea01, 2Ea02, 2Fa02, 2Fa03, 2Fa04, 2Fp13, 2Fp14, 3Fa07
福島　昭二　2S-S4p02
福島　康裕　1A-Ka04
福田　淳二　2Ga05
福田　展雄　3Gp08
福田　雅夫　1Cp05
福田　まみ　2Hp14
福田　萌子　1Ep04, 3Ap05

福田　青郎　1Ep04, 1Gp10, 2Da04, 3Ap05
福谷　洋介　2Fp07
福本　敦　3Ea01
福本　響　3Ea07, 3Ea08, 3Ea09
福本　悠地　2Ba01
藤井　暁　2Ha11
藤井　克彦　1Bp07, 1Bp08
藤井　大樹　3Fa02
藤井　力　2Hp10, 2Hp11, 2Hp12
藤井　雄三　3Ep05
藤川　康夫　2S-S3a02
藤崎　和弘　1S-S5p06
藤島　義之　2S-S1p05
藤田　愛　3S-S2a03
藤田　憲一　3Ep04, 3Ep05
藤田　昂大　3Ea01
藤田　直子　3Ha04
藤谷　将也　2Gp11
藤根　志帆　2Da06
藤野　早瑛　3Bp03
伏原　和久　2Bp09
藤原　秀彦　2Dp06
藤村　孝志　2Gp06
藤本　一嗣　2Da05
藤茂登　遥香　3Da04
藤森　一浩　3Aa02
藤森　文啓　3S-S4p02
藤山　和仁　2Ip03, 3Gp07
藤吉　好則　1Ap09
藤原　伸介　1Ep04, 1Gp10, 2Da04, 2Ip06, 2S-S5p06, 3Ap05
藤原　政司　2Ga01
藤原　優人　1Dp17
藤原　由梨　2Fa06
二神　泰基　2Dp06, 3Ha05, 3Ha06
二又　裕之　2Ca01, 3Ja03, 3Jp01
二見　淳一郎　2Jp06, 2Jp10, 2Jp11, 2Jp12
二見　翠　2Jp06
佛願　道男　2Fa05
舟橋　久景　2Bp05, 2Ca06
古川　謙介　2Dp06
古川　裕貴　2Gp05
古澤　力　3Ba06
古田　雅一　2Dp15
古田　未有　1Ep15
古舘　祥　3Ip09
古谷　太樹　1Jp08, 1Jp09, 3Ga03
古野　正浩　2Fa03, 2Fa04
古橋　康弘　3Ja05
古屋　一彦　3Ip06
古屋　俊樹　1Bp18, 2Ba08, 2Bp08
文谷　政憲　3Ep06

ほ

包　紅彬　2Hp09
坊垣　隆之　1Fp07, 2Ha08
星　和明　2Ip02
星　南穂子　2Ha11
星田　尚司　3Ba05, 3Ba07
星野　一宏　3Dp01, 3Ea11
星野　翔太郎　1Gp07
星野　力　2Bp10
星野　亘　2Ap04
細川　正人　2Aa09, 2Aa10, 2Fp09, 2Fp10
細見　晃司　2Fp10
細山　哲　3Ia09
堀田　篤　3Ga11
堀田　夏紀　2Hp02
堀　采音　2Gp06
堀　有音　1Jp10
堀　克敏　1Fp13, 2Dp16
堀　千明　1Hp10, 3Bp08
堀　勝　3Aa01
堀井　俊平　2Fp08, 2Fp10
堀内　淳一　1Dp10, 1Dp11, 1Dp12, 1Dp13, 1Hp18, 2Da08, 2Da09, 2Da10, 3Ba03
堀内　祐貴　2Ep02
堀江　裕紀子　2Fp02
堀尾　京平　2Dp17
堀越　智　3Da06
堀田　靖人　1Gp06
堀永　晃作　2Bp17
堀之内　貴明　3S-S4p01
本荘　知子　2Jp10, 2Jp11
本庄　宏　1Hp11
本荘　雅宏　2Ca01, 3Ja03
本田　亜由美　3Cp02
本田　孝祐　2Cp14, 2Cp15
本田　真也　3Gp08
本田　直樹　2S-S4p09
本多　裕之　1Jp08, 1Jp09, 2Ga06, 2Ip17, 2Ip18, 3Ga03
本多　了　3Ja05
本間　裕人　2Hp16

ま

眞井　洋輔　1Jp06
前川　忠義　1Jp08
前川　大樹　2Ap05
前田　淳史　1Dp03, 1Dp04, 1Dp05, 1Dp06, 3Ep06
前田　勇　1Cp14
前田　和勲　3Ia04
前田　新一　2Ea11
前田　憲成　1Dp09
前田　知貴　3Ga11
眞榮田　麻友美　3Ha01
前田　義昌　1Bp06, 2Da05
前田　航　2Bp14
曲　正樹　2Gp08, 2Gp09
曲山　幸生　2Ha12
牧　泰史　3S-S2a03
牧田　晟洋　1Bp13
牧田　芳隆　3Gp03
牧野　祥嗣　2Ip04
槇本　純　2Hp11
政井　英司　2Ca10
正木　和夫　2Hp15
正木　佑弥　1Ap14
真崎　雄一　1Jp06
升井　伸治　2Ip16
増井　良治　1Ap10
増子　穂　2Ep06
増田　亜理沙　3Da08
増田　健誠　3Ja03
増永　夏輝　3Ep02
増本　新也　3Gp02
町田　雅之　2Ha07
町田　悠　1Gp12
町田　佑樹　3Da10
松井　旺大　3Dp03
松井　翼　1S-S5p04
松井　徹　1Cp10
松浦　和則　1S-S3p03
松浦　友亮　2Aa11
松尾　慎作　2Ap02
松尾　直紀　1Ap03
松尾　洋孝　1S-S2p03
松岡　真生　1Cp15
松倉　智子　1Hp04, 1Hp05
松郷　誠一　3Dp05
松崎　弘美　2Ea07, 2Ea08
松崎　典弥　3S-S5a03
松崎　慎史　3Dp07
松崎　浩明　3Aa07
松崎　素道　1Gp07
松崎　友星　3Cp05
松沢　智彦　3Bp04
松沢　弘貴　2Ja05
松鹿　昭則　2Ca07, 3Bp05
松下　一信　2Ja09, 2S-S5p01, 3Ip04
松島　雛子　2Fp03
松田　綾子　2Cp11
松田　修平　2Cp05
松田　史生　1Ip07, 1Ip08, 1Ip09, 2Ca02, 2Fa02, 2Hp03, 2S-S4p06, 3Ba02
松田　将典　3Da06
松田　侑大　1Gp07
松谷　峰之介　2Ja09, 3Ip04
松永　安由　2Ea12
松永　是　1Jp05, 2Dp18
松永　浩子　2Aa09, 2Aa10, 2Ep03
松波　宏明　2Fp07
松野　浩嗣　3S-S2a03
松原　健生　1Gp09
松村　憲吾　2Hp02, 2Hp03
松村　洋寿　1Ap08, 1Ap16, 2Ap18, 2Jp17
松村　幸彦　1Bp03
松村　吉信　2Dp10, 2Ep13
松本　厚子　2Fp08
松本　圭司　3Ep07
松本　謙一郎　1Hp10

松本　崇揮　1Jp03
松本　奈々　1Bp06
松本　菜々恵　3Ap03
松本　奈実　3Ip04
松本　伯夫　1Cp09
松本　光晴　2S-S5p09
松本　光史　1Bp05
松本　美徳　1Ap01
松山　彰収　2Bp08
松山　晃久　1Cp15
松山　恵介　1Gp18
真山　茂樹　1Ep08
黛　新造　1Gp18, 1Ip03
丸山　千登勢　2Ip12, 2Ip13, 3S-S2p01
丸山　直也　2Dp11
丸山　正晴　1Ip07, 1Ip08, 1Ip09
丸山　実菜　2Dp18
丸山　竜人　1Cp10

み

三井田　篤志　2Ip15
三浦　愛　1Ip04
三浦　夏子　1Fp06, 1Hp07
三木　健夫　3Ip01
見崎　裕也　3Ea04
三﨑　亮　2Ip03, 3Gp07
三島　俊介　2S-S3a02
水越　利巳　1Ap09, 2Ap04
水澤　愛衣　2Gp14, 2Gp15
水谷　治　2Cp10, 3Ha01
水谷　行善　3S-S4p02
水谷　友梨香　2Ba04
水沼　正樹　1S-S4p01
水野　洸介　2Ep05
水野　匠詞　1Gp05
水野　貴之　3Ep06
水野　拓哉　3S-S3p04
水野　光　2Ja05
水町　優希　3Ip04
箕田　康一　1Bp14, 3Ep06
三谷　恵一　2Ha08
三井　亮司　2Hp15
三ツ石　方也　1Fp05
満倉　浩一　1Ap04, 1Ap05, 1Ap06
光武　進　2Ha01
三橋　健斗　3Ga04
三橋　麻由　2Aa07, 2Aa08
水上　留以　2Hp09
南　博道　2Cp09
南　牧歩　2Ea01
南　賢尚　3S-S1a02
南　瞭子　3Ap06
南野　優季　1Fp08
南畑　孝介　1Fp01, 1S-S3p04
源　和晃　2Fp01
三成　由美　1S-S4p11
峯崎　美歌子　2Ea04
峯苫　智晴　2Jp12
蓑田　義将　1Jp10
三原　笑　1Gp17, 2Ba03
宮内　啓介　1Cp11
宮川　幸　2Ha01, 2Ha02
三宅　淳　3Ia07
三宅　子龍　2Fp06
三宅　深雪　3Ga01
宮坂　均　1Dp01
宮崎　翔子　2Cp09
宮崎　均　2Ea06
宮崎　穂乃香　2Ep06
宮澤　拳　1Hp08
宮澤　沙哉佳　2Ap17
宮澤　せいは　3Ia09
宮田　健　2Jp09
宮田　大暉　1Ap11
宮野　博　2Ap04
宮原　平　1Gp08, 3Da03
宮原　佳子　2Fp11
宮平　響子　3Ip05
宮本　和英　2Jp07
宮本　憲二　2Ep02, 2Jp01, 2Jp02
宮本　樹里　2Cp16
宮本　哲也　2Ha05, 2Ha06
宮本　捺央　1Ip06
宮本　浩邦　1Gp08, 2Cp12, 2Cp13, 3Da03, 3Fa03
宮本　上聖　1Dp02
宮本　侑子　2Ea04
宮脇　大輝　3Ea09
河田　美幸　1S-S4p03
明賀　史純　2S-S3a01
三好　克樹　2Ca06
三好　佑奈　1Cp06
三好　柚紀　2Ea12, 2Ip07
三輪　聡一　1Jp06

む

向井　克之　2Bp08
向田　潤　2Hp15
向田　尭史　1Ep10
武藤　潤　3S-S3p03
村井　克輝　2Ca04, 2Ca05
村井　雄大　1Hp06
村上　明男　1Dp12
村上　克治　2Ca07
村上　周一郎　1Ap14
村上　晴太郎　3Gp04
村上　将和　2Dp10
村田　智志　1Fp14
村田　昌浩　3Ia01
村田　和加恵　3Ep05
村中　俊哉　1Ip05
村松　和明　3Hp06
村山　和隆　1Ap12
村山　拳午　1Bp10
村山　晃一　1Dp18
村山　周平　1Hp04
室田　昌輝　2Ap01

め

メトワリー　キャレド　2Ip09

も

茂木　亮介　3Ha08
持田　恵一　2S-S3a04
茂木　太極　2Ep06
本底　麻綸　3Ha01
本橋　令子　2S-S3a01
本山　智晴　1Fp09, 2Ap13
本脇　那々子　3Dp06
籾山　健太　3Ap07
森　一樹　3Ha05
森　一博　1Bp09
森　貴翔　2Fp01
森　光一　1Ap15
森　康一　1Dp01
森　哲也　1Ap03
森　智夫　1Bp17, 1Cp03
森　ひかる　3Ap02
森　英樹　1Jp04, 3Ga07, 3Ga08
森　弘樹　2Bp12
森　浩禎　3S-S2a03
森　光矢　2Aa01
森川　正章　1Bp09, 1Bp13
森田　大地　2Dp07
森田　仁彦　3Jp03
森田　雅宗　1Hp04, 1Hp05
森谷　亜希　1Bp04
森永　花菜　3Jp07
森本　一輝　1Ep06
森本　高章　3Da11
守屋　綾子　1Ep14
森脇　健司　1S-S5p06
諸星　知広　1Cp16, 2Dp04

や

矢追　克郎　3Bp04
矢尾井　健人　2Dp07
八木　周和　2Fp12
八木　創太　2Jp13
薬師　寿治　2Ja09, 2S-S5p01, 3Ip04
矢澤　彌　2Hp09
矢嶋　祐也　2Ga07
安井　典久　2S-S5a01
安池　一貴　3Jp01
安枝　寿　2Aa07, 2Aa08
安田　貴信　1S-S3p06
安武　義晃　2Aa12
安中　優太　1Ip04
安福　航希　3Ia03
柳田　晃良　2Ha01
柳戸　彩奈　2Ea09
柳谷　洸輔　2Aa02, 2Aa03
柳瀬　裕介　1Gp08
矢野　成和　2Bp04
矢野　剛久　2Fp11
矢野　佳果　2Ap02

矢萩　大貴　3Aa11
藪　浩　1Fp05
屋部　佑介　1Bp05
山内　七海　2Da03
山内　康弘　3S-S3p04
山岡　奈央　1Jp08, 1Jp09
山岡　美桜　3Bp07
山川　ひとみ　1Jp05
山川　倫誉　3Ia08
山岸　明彦　2Jp13
山岸　彩奈　2Gp14, 2Gp15, 2Gp16
山口　陽　2Ja07
山口　愛彩　2Bp01, 3Bp08
山口　健一　2Ea09
山口　利男　1Ep15
山口　晴彦　2Bp09
山口　浩輝　1Ap09, 2Ap04
山口　紘武　2Ep02
山口　真琴　2Bp09
山口　正晃　3Ha06
山口　良弘　3Ep04, 3Ep05
山崎　一輝　1Ip07
山崎　思乃　1Ip10, 1Ip11, 2Ea11, 2Ea12, 2Ip07, 3Ha10, 3Ha11
山崎　将太朗　1Ep09, 1Ep10, 1Ep11, 1Ep12
山崎　直人　1Bp14
山崎　正夫　2Ea04, 2Ea05
山崎　真澄　3Ba08
山崎　梨沙　2Hp13
山崎　竜次　2Aa05
山崎　翔子　1Hp14
山崎　智彦　2Ip02
山崎　美輝　2Aa09, 2Aa10
山地　秀樹　3Da11
山下　一郎　3S-S5a01
山下　哲　2Bp09
山下　瀬菜　1Bp03
山下　秀行　2Ha05
山下　陽子　1Ap13
山城　圭輔　1Gp04
山田　康嗣　1Bp09
山田　泰蔵　2Ap08
山田　隆　2Ep12
山田　翼　2Hp10
山田　浩之　1Fp07
山田　将大　2Dp01, 2Dp02
山田　真澄　1Jp10, 2Ga07
山田　守　3S-S2a03
山田　美和　2Bp14
山田　洋平　3Ia09
山中　章裕　1Ap03
山中　一也　3Ea07, 3Ea08, 3Ea09, 3S-S2p03
山中　真也　3Dp07
山中　寛子　3Gp06
山中　優志　2Ep13
山中　祐実　1Hp14
山中　由利恵　1Ep14
山野　めぐみ　2Fa07
山野-足立　範子　1Ap11, 1Hp15, 2Ap05, 2Ap06, 2Da12, 2Gp01
山村　英樹　3Ip03
山本　惠美子　3Ga02
山本　克哉　1Cp13
山本　光士郎　2Bp05
山元　翔太　2Hp05
山本　進二郎　1Dp01
山本　千晶　2Fa01, 3Ia05
山本　博文　1Bp14
山本　雅一　1Gp07
山本　真由香　1Ap01
山本　裕貴　2Hp01
山本　雄大　2Ap13
山本　陸　3Hp08
山本　涼平　2Ga11
山本　麗奈　1Dp10
山谷　竜大　1Gp12
家森　優佳　3Ap05
八幡　志央美　3Ia11
八幡　穣　3Ia11

ゆ

湯浅　一貴　1Cp17
湯浅　凌我　3Dp01
雪　真弘　2Aa02, 2Aa03
弓削　類　1S-S5p01

よ

楊　俐聡　2Bp02
養王田　正文　2Ap18, 2Fp07
横尾　岳彦　3Ba01
横尾　俊憲　1Hp10
横田　篤　2Ja10, 2S-S5p02, 3Ap03
横田　仁子　2Ep09, 2Ep10
横森　愛美　1Ep07
横山　萌　1Ap13
吉井　優也　3Da09
吉岡　育哲　1Gp15, 1Gp16, 2Bp02, 2Ca08, 2Ca09
吉岡　貫太郎　1Jp07
吉岡　敏明　3Hp05
吉岡　実咲　2Jp11
吉川　航平　2Fa03
吉川　翔太　3Da03
吉川　博文　2Dp05
吉﨑　由美子　3Ha05, 3Ha06
吉田　エリカ　3Aa11
吉田　修　3Dp03
吉田　啓　2Gp10, 2Gp12
吉田　滋樹　2Ea06
吉田　昭介　1S-S2p04
吉田　朋子　3Ja10
吉田　豊和　1Ap04, 1Ap05, 1Ap06
吉田　信行　3Aa10
吉田　裕美　1Ap10
吉田　雅偲　3Ip02
吉田　真実　3Ja10
吉田　稔　1Cp15
吉野　知子　1Bp05, 1Bp06, 1Jp05, 2Da05
吉原　明秀　1Ap10
吉原　瑛梨奈　3Ba01
吉見　啓　1Fp04, 1Fp05, 1Hp08
吉村　明浩　2Hp15
吉村　英莉　3Ea11
吉村　柚紀　1Fp06, 1Hp07
吉本　将悟　1Fp13
芳本　奈々　3Ip02
依田　卓東　2Dp18
依田　ひろみ　2Jp05
米光　裕　3Ja07, 3Ja08
米村　彩乃　1Dp05, 1Dp06

り

李　怡然　2Ea04
李　天成　2Fp15
劉　昊　1Cp01
劉　利雲　2Hp09

る

ル ティ トゥ　ホン　2Dp05

わ

若井　暁　2Ja01
若林　敬二　2Ba07
若林　里衣　1Fp02
若山　守　2Ap07, 2Ap08, 2Ap09, 2Ap10, 2Ap11, 2Ha10
脇　滉　2Cp06
和氣　駿之　2Bp09
脇田　克也　2Ep13
脇中　琢良　3Ha07
脇本　紗梨　1Gp16
涌井　秀樹　2Jp17
和田　一仁　3Ep07
和田　圭介　2Ca07
和田　昌憲　2Ga02
和田　大　2Ja10, 3Ap03
綿井　大輔　1Ep05
渡辺　一樹　3Aa04
渡辺　賢一　2Ha04
渡邉　研志　1Bp03, 1Gp18, 1Ip03
渡部　潤　3Ha07, 3Ha08
渡邉　翔介　3Aa07
渡辺　大輔　2Hp17, 2Hp18
渡邉　大輔　2Dp01
渡邊　崇人　2Dp06
渡部　貴大　1Hp14
渡邉　直暉　3Ia01
渡邉　肇　2Aa11
渡辺　昌規　2Ba05
渡邊　真宏　3Bp05
渡邉　実　1Dp08
渡邉　恵　1Ep14
和地　正明　3Ap02

キーワード索引

A

Abditibacteriota 2Ep01
abiotech stress 2Ip09
acclimation 3Aa02
Acer palmatum 2Ep01
acetic acid 3Ip04
acetic acid bacteria 1Gp06, 2Da04
Acetobacter pasteurianus 3Ip05
acetylcholine 2Fp14
acetylcholine receptor 1Jp08
Achromobacter sp. 1Ap04
acid tolerance 1Dp18, 2Ip09, 3Da08
Acinetobacter 2Dp16
aconitate isomerase 2Ca08
acrolein 2Jp16
actin 2Gp14
actinomycetes 1Gp03, 1S-S2p03
active site residue 2Ap02
acyl carrier protein 3Ea05
acyl homoserine lactone 2Dp04
Acyl-(ACP) reductase 1Fp11
adalimumab 2Gp03
adaptive laboratory evolution 3Ba06
adenylation 2Ap15
adenylation enzyme 2Ap16
adhesion 1Fp13, 1S-S5p06
adjuvant 2Ip02
aerial microalgae 1Bp07, 1Bp08
aerobic culture 1Dp16
aerobic granular sludge 3Ja06
Affinity Ligand 2Da07
affinity separation 2Da08
AFM 2Gp15
African trypanosomiasis 1Gp07
agar plate 1Dp15
aggregate suspension culture 1Jp03
aggregation 3Ha07, 3Ip07
aging 2Ha06
agmatine 1Gp10, 2S-S5p06
agricultural waste 2Cp01, 2Cp02
agriculture 2S-S3a05
air plasma 2S-S3a03
Air-lift bioreactor 1Dp10
airlift bioreactor 1Dp12
alanine scanning 3Cp05
alaremycin 3Ap02
ALAS 3Ap02
albumin 2Ja11
alcohol oxidase 3Ba01
alcohol to jet 3S-S3p01, 3S-S3p05
aldehyde dehydrogenase 3Aa10
algae 3S-S3p02
alginate 3Ga07
alignment 1Jp08
alkaline phosphatase 3Cp06
alkane 1-monooxygenase 1Cp06
Alkane biosynthesis 1Fp11
allergen 2Fp16
Aloe vera 3Da07
alpaca VHH antibody 2Bp06
alpha-1,3-glucan 3Bp01
alpha-1,3-glucan-binding activity 3Bp01
alpha-1,3-glucanase 2Bp02, 2Bp04, 3Bp01, 3Bp02
alpha-amylase 3Ha06
alpha-EG 2Ha08
alpha-keto acid 2Ap17
alpha-tocopherol 2Ip05
alpha-tocotrienol 2Ip05
Alternating electric field 1Ep16, 2Ga02
altitude 3Fa05
alzheimer's disease 2Jp14
Alzhheimer's disease 2Jp15
amazake 2Ha04
ambrosia beetle 2Bp01
amidation 2Ap08
amide bond formation 2Ap16
amino acid 1S-S4p01, 1S-S4p04, 1S-S4p05, 2Ca03, 2Ea03
amino acid analogue 1S-S4p04
amino acid analysis 2Ap04
amino acid oxidase 2Bp14
amino acid transporter 1S-S4p03
5-aminolevulinic acid 3Ap02
aminopeptidase 1Ap18
ammonia 2Ap17
ammonium transporter gene 1Gp11
ammonium-rich waste 2Cp04
amyB 3Ha06
amyloid 2Jp16
amyloid-beta 2Jp14, 2Jp15
anaerobic 1Hp04
anaerobic condition 2Aa02
anaerobic degradation 2Cp03
anaerobic digestion 2Cp04
anaerobic respiration 2S-S5p03
Ananas comosus 3Fa06
Ancestral reconstruction 1Fp08
Anchorage-dependent cells 2Ga02
anethole 3Ep04
aneuploid 2Hp02
aneuploidy 2Hp01
angiogenesis 3Gp02
anion exchange 2Fa05
anodic biofilm 3Jp02
Antarctic yeast 2Ep08
Anti-adhesion 3Ga09
anti-allergy 3Dp01
Anti-cancer activity 3Hp03
anti-inflammatory 2Ha03
anti-rheumatic drug 2Jp17
antibacterial 3Dp06, 3Ga11
antibacterial peptide 1Gp04
antibiotics 1Gp03, 2Ba01, 3Ea02, 3Ea04, 3Ea05, 3S-S2a02, 3S-S2p01, 3S-S2p05
antibody 1Hp17, 1S-S3p06, 2Gp02, 2Gp04, 2Gp08, 2Gp09, 2Ja11, 2Jp08, 2Jp09, 2Jp10, 2Jp11, 3Cp02, 3Cp03, 3Gp05
antibody mimetics 2S-S5a02
antifungal 2Bp04
antifungal activity 2Ip15
antigen 2Jp12, 3Fp01
antimicrobial 3Dp02, 3Dp03
antioxidant 1Jp06, 2Ha10
apoptosis 2Ip14
aptamer 2Ip01, 3S-S5a01, 3S-S5a02
aquaculture 1Bp14
Arabidopsis thaliana 1Ep09, 1Ep11, 1Ep12, 1Ep14, 1Ep15, 2S-S3a01
arachidonic acid 3Ea11
archaea 1Ap07, 2Dp01, 2Dp02, 2S-S5p06, 3Ap06
aromatic acid decarboxylase 2Bp12
aromatic ring compound 1Cp01, 1Cp05
arsenic removal 1Cp11
artificial biosynthesis 3S-S2p02
artificial intelligence 2Gp13, 2S-S5a03, 3Ia07
artificial protein design 3S-S3a05
artificial viral capsid 1S-S3p03
ascochlorin 1Gp07
ascofuranone 1Gp07
Ashbya gossypii 1Ep07
Asia 1S-S4p09
ASO IVD reagent 3Fp01
asparagine synthetase 2Ap08
Aspergillus 3Ep07
Aspergillus kawachii 3Ha05, 3Ha06
Aspergillus luchuensis 2Ea05, 3Ha01
Aspergillus nidulans 3Bp08
Aspergillus niger 1Gp16, 2Bp02, 2Ca08
Aspergillus oryzae 1A-Ip01, 1Fp04, 1Fp05, 1Gp10, 1Gp13, 1Hp08, 1Ip04, 2Bp14, 2Ea10, 2Fp02, 2Gp03, 2Ha05, 2Ha06, 2Ha10, 2Ja01, 3Bp04, 3Ha02, 3Ia02, 3S-S4p04
Aspergillus tubingensis 1Gp15, 1Gp16, 2Bp02
assay 1S-S5p04
astaxanthin 1Dp10, 1Hp13, 2Ba07, 2Fp12
atomic force microscopy 1Fp05, 1Fp13

ATP 2S-S2p03, 3Aa08, 3S-S3a01
ATP regeneration 2Ca02
atrophy 2Ga06
AuNP 1Fp15
AuNPs 3Fp05
Auranchytrium 2Cp11
Aurantiochytrium 1Bp04, 1Ip03
Aurantiochytrium sp. 1Gp18
autofluorescence 1Hp16
autophagy 1S-S4p03
autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD) 3Ja04
autotransporter 1Fp13
Awamori 2Hp18, 3Ha01
azoxyalkene 3Ea01

B

Bacillus 3Bp09
Bacillus cereus 2Bp05
Bacillus sp. 2Ba01, 2Ba02
Bacillus subtilis 2Ba10, 2Dp05, 2Dp12, 2Dp15, 2Ja03, 3Da01, 3Fp02, 3S-S2a04, 3S-S2a05
Bacillus subtilis 51-CS 2Ip07
bacteria 1Hp05, 2Ca07, 2Dp18, 2Ep03, 2S-S2a02, 3Aa09
bacterial adhesion 1Fp13
bacterial column 3Ja09
bacterial community 3Da04
bacterial community changes 3Ja04
bacterial conjugation 2Aa02
bacterial consortium 2Cp06
bacterial cultivation 1Hp04
bacterial diversity 2Fa08
bacterial oxidation 1Cp11
bacteriocin 1Gp04, 2Ea07, 2Ea08, 3Dp04
bacteriolysin 1Gp04
baculovirus 1S-S3p04
Barley 2S-S3a04
base composition 2Aa03
batch culture 2Fa02
beer brewing 2Hp08, 3Ha09
beetle 1Fp14
behavioral analysis 2S-S4p09
beni-koji 2Ea01
benzyloxycarbonyl group 1Ap05
beta glucosidase 3Aa11
beta-1,3-glucanase 2Bp04
beta-1,3-xylan 3Bp06
beta-1,3-xylanase 3Bp06
beta-amylase 3Bp09
beta-aspartyl compound 2Ap08
beta-galactosidase 3Bp04
beta-lactamase 3Ea09
betaine 2Fp06, 3Ep09
bFGF 2Ip16
Bifidobacterium 2Dp08, 2S-S5p09, 3Da08
Bifidobacterium longum 3Ap03
bile acid 2Da02, 2Ea04, 2Ha02
biliverdin 2S-S2p02
bio jet fuel 3S-S3p05
bio-3D printer 2Ga09, 2Ga10
Bio-based monomer 2Ca10
bio-corrosion 1Cp09
bio-imaging 1S-S5p05
Bio-jet fuel 3S-S3p01, 3S-S3p03
bio-production 2Da04
Bioactive compounds 2Fp08
bioactive peptide 1Ap13
bioactivity 3Ea07, 3Ep07
biocatalysis 1A-Ka02, 2Bp08
biochemical engineering 1A-Ka03
biochemistry 3Ap09
biocontainment 2Dp16
biocontrol 2Bp03
biocontrol agent 2Ba08
biodegradable dispersant 3Dp02
biodegradable plastic 1Bp15, 1Cp16
biodegradable polymer 1Bp16
biodegradation 1Bp18, 1Cp01, 1Cp02, 2Ap18, 2Dp16, 3Jp06
biodiesel fuel 1Bp01, 1Bp02, 1Bp03, 1Cp17, 2Bp10, 2Cp11
bioeconomy 2S-S1p01, 2S-S1p05, 2S-S1p06, 2S-S3a05
bioenergy 1A-Gp01
bioethanol 3Aa01, 3Ha10
biofilm 1Bp07, 1Cp13, 2Ep04, 2Ep13, 3Ea10, 3Ja11, 3Jp07, 3Jp09
biofilm formation 1Ep05
bioflocculant 3Ep08
BioFoundry 2S-S1p05
biofuel cell 2Bp15, 2Bp16, 2Bp17, 2Bp18
bioimazing 2Bp06
bioinformatics 1Ep09, 3Cp02, 3Ia01, 3Ia02, 3S-S4p01
biojetfuel 3S-S3p04
Biological medicine 1Gp12
Biological tissue 2Aa09, 2Aa10
Bioluminescence 1Fp11
biomass 1Bp03, 1Bp09, 1Bp13, 1Dp11, 1Fp07, 1Gp14, 2Ba11, 2Ca07, 2Cp09, 3Aa02, 3Aa03, 3Aa05, 3S-S3p02
biomaterial 2Ga12
biomaterials 3S-S5a03
biomimetic membrane 1S-S3p01
biomineralization 1Ap17, 1Ep08, 2Bp05
biomolecule monitoring 3Fp04
Biopanning 2Da09
biopharmaceutical 2Gp03, 2Ja11
Biopharmaceuticals 3Gp06
biopreservation 3Dp04
bioprocess 1Hp16, 1S-S2p02
bioprocess development 3S-S1a01
bioproduction 1Hp11
bioreactor 1Hp09, 2S-S4p01
biorefinery 2Ba11
bioremediation 1Cp03, 2Ap18, 2Dp10
bioresources 1Bp16
biosensor 1S-S3p06, 2Aa11, 2Ap02, 2Fp03, 2S-S3p02, 3S-S3a01
biosorption 3Ja05, 3Ja11
biosynthesis 1Hp10, 2Dp18, 2Ip10, 3Ea01, 3Ea02, 3Ea05, 3Ea06, 3Jp05, 3S-S2p01, 3S-S2p05
biosynthetic gene cluster 1Gp15
biotinylation 2Jp12
biphenyl/PCB 2Dp06
black vinegar 2Ha11
blood glucose 2Ha04
Bm5 cells 3Da10
BmNPV 3Da10
Botoryococcus braunii 1Bp10
Bottom-up genetics 3Ia06
bottom-up reconstruction 3Ap08
Brachypodium distachyon 1Ep14
brain function improvement 2Ha09
branched-chain amino acids 3S-S3a01
branched-chain polyamine 3Ap05
breeding 2Hp04
BRET 1Fp10
Brevibacillus 3Bp02
brewing 2Hp07
brownian motion 2Fp03
butanol 3Ip07
butanol production 3Ip06

C

^{13}C-metabolic flux analysis 1Ip09
C-terminal 2Ap10
C_1 assimilation pathway 2Dp14
Caco-2 cells 2Ea10, 3Hp02
Caenorhabditis elegans 2S-S4p08, 2S-S4p09, 3Ep06
caffeic acid 2Cp09
cancer biomarker 2Jp11
cancer cell 2Gp16, 2S-S3p01
cancer cells 2Ga10
cancer diagnosis 2Fp01
cancer stem cell 2Gp13
Candida albicans 2Ip15
Candida glabrata 3Ep06
capillary vessels 2Ga04
carbon dioxide 1Dp16
carbon source 2Ja03
carboxylation 2Bp12
carotenoid 1Gp18
carotenoids 2Ja02
carrageenan 3Bp07
carrageenase 3Bp07
carrier 2S-S4p02
caspase 2Ip14
catalisis 1Ap08
catalytic domains 3Bp02

cationic peptides 3Dp03
cationic radical initiator 3Ga11
CDR 2Jp09
cell 1Jp10, 3Hp05
cell culture 2Ga07, 3Hp04
cell cycle 3Da11
cell detachment 2Ga02
cell differentiation 1S-S5p01
cell engineering 3Gp09
cell factory 2S-S2p03
cell growth factor 3Hp04
cell lysis activity 3Ja04
cell manufacturability 1A-Ka03
cell membrane 2Da06, 2S-S5p01, 3Dp03, 3Ga01
cell morphology 2Da11, 2Gp10, 2Gp13, 3Fp02, 3Ia08
cell penetrating peptide 2Ip18
cell self-aggregation technology (CAT) 2Ga03, 2Ga04
cell surface display 3Aa06
cell wall 3Aa06
cell-cell connection 2Da11
cell-selective peptide 2Ga12
cell-selective peptides 3Ga09
cell-substrate connection 2Da11
cellomics 2S-S4p08
cellulase 1Fp07, 1Gp14, 3Aa06, 3Aa07, 3Aa11
cellulose 1Ap14, 2Ba06, 2Cp03
cellulose membrane 1Dp17
central carbon metabolism 1Ip09
central metabolism 1Ip07
centrifugal-assisted thermal convection PCR 2S-S3p04
ceramide 1S-S4p08
cerebroside 1S-S4p07
CFD simulation 1Hp08
chaperonin 2Jp05
characterization 2Ap09, 3Ap01
cheese 2Fa08
chemical modification 2Jp02
chemoenzymatic synthesis 2Ap15
chicken 3Gp04
Chinese hamster lung cells 2Da12
Chinese hamster ovary 2Ip03, 3Gp07
Chinese hamster ovary cells 1Hp15, 2Da12
chiral alcohols 1A-Ka02
chiral epoxides 1A-Ka02
chiral separation 2Fa03
chitin 1Fp14, 2Cp06
chitinase 2Bp04, 2Dp01, 2Dp02
chitosan 3Ep08
CHK cells 3Gp06
Chlamydomonas 1Bp01
chlorophyll 3S-S1a03
chloroplast 2S-S3a01
CHO 3Gp08
CHO cell 1Hp16, 2Gp01
CHO cells 3Gp01, 3Gp09
cholesterol 2Ea04, 2Ea05
Chomatogrphy 1Fp16
Chondroitin sulfate 2S-S5p07
chrolide channel 2Gp16
chrolide ion 2Gp16
chromosomal translocation 2Da12
Chronological lifespan 3Ep05
circadian cycle 3Da11
circular economy 2S-S1p06
Circulating tumor cell 1Jp05
citrate carrier protein CitT 2Ca08
citric acid 1Gp16, 3Ha05
Citrobacter 3Ep08
citrus peel 2Ba07
cleavage sites 1Ep09
click chemistry 2Ip12
cloning 2Aa05, 2Ap09, 3Ap01
closed culture process 3Hp08
closed system 1S-S5p02
Clostridium beijerinckii 2Cp01
Clostridium cellulovorans 2Cp01, 2Cp02
Clostridium saccharoperbutylacetonicum 3Ip06
co-culture 2Ca11, 3S-S1a04
CO_2 fixation 2Cp16
CO_2 reduction 3S-S3p01, 3S-S3p05
coalescence 3Hp07
cobalamin 1Ap15
Coccomyxa 1Gp11
cocoa bean 3Fa04
cocoa cake 3Fa04
coculture 1Hp09, 1Hp11, 1Jp07, 2S-S2a03, 3Da05, 3Ga08, 3Hp02
codon usage 2Aa12
coenzyme Q 2S-S5p05
coexistence 3Ja01, 3Ja03
coffee grounds 2Ba04, 3Fa05
coherent anti-stokes Raman spectroscopy 3Fp04
cold-adapted microorganism 1Fp03
collagen 1Jp10, 2Ha08, 3Ga08
collagen tube 2Ga07
collapse 3Hp07
Comamonas testosteroni R2 3Ja01
Commensal bacterium 1Bp10
competent 3S-S2a05
compost 1Gp08, 2Cp13, 3Da03
composting 2Ba06
comprehensive analysis 1Ep10
computational fluid dynamics 1Dp08
conjugal DNA transfer 3S-S2a03
conjugation 2Dp11, 3S-S2a01, 3S-S2a04
conjugation transfer 3S-S2a05
conjugton 3S-S2a02
consensus protein design 1Fp09
contraction 1S-S5p04
controlled fermentation 2Cp08
correlation analysis 2Fa08
Corynebacterium glutamicum 1Ep03, 2Aa07, 2Aa08, 2Ca04, 2Ja08, 2Ja09, 2Ja10, 2S-S2p02, 3S-S3p05
corynephage 2Aa07, 2Aa08
cosmetics 3Da04
Crabtree effect 2Fa02
craft beer 1S-S1p02
Cre/LoxP system 3Gp01
CRISPR/Cas9 1Bp05, 3Ba09, 3Gp03
CRISPR/Cas9 system 1Gp16
Crneal cell 3Ga01
Crohn's disease 2Fa07
cross-linking 1Fp01, 3Dp02
cryo-electron microscopy 1Ap09
Cryptococcus diffluens 1Gp09
crystal structure 2Ap01, 2Ap03
crystallographic study 3S-S3a04
cultivation 1Dp06, 2Da01
culture 3Hp06
culture system 1Hp07
culture-plug 1Dp16
cuticular proteins 1Fp14
cutinase 1Fp04
cyanide ion 2Ap18
cyanobacteria 1Dp12, 2Fa01, 2S-S4p06, 3Ap09, 3Ea10, 3Ia05
cyber space 3S-S5a01
cyclic ethers 3Jp06
cyclic peptide 2Ip17
cycloheximide 2Hp02
cystathionine beta-lyase 3Ap03
cysteine 1Jp06
cysteine biosynthesis 2Bp13
cytochrome P450 1Cp03, 3Ep01, 3Ep03
cytokine 3S-S1a02
cytotoxicity 3Dp05

D

3D culture 2Ga04, 2Ga06
3D image analysis 2Ga09
3D tissue 2Ga10
D-amino acid 2Fa03, 2Ha11, 3Ea08
D-amino acid-containing dipeptide 2Ap15
D-cycloserine 2Dp07
D-Dopachrome tautomerase 2Jp17
D-lactic acid 1Dp11
D-peptide 3Ea09
Daphnia magna 2Aa11
data mining 3S-S3a05
data science 2S-S3a04
database 2Ha12
decarboxylase 1Ap06, 1Cp05, 1Gp10
deep learning 1S-S5p05
deep-sea 3Fa02
deep-sea sediment 2Ip07

defatted-rice bran 2Ba05
defensin 2Ip14, 2Ip15
defluorination 1Ap15
degradation 1Ap03, 1Cp16
dehalogenation 1Ap15
delivery system 2Jp05
deltarhodopsin 3Ba02
dendritic cells 2Fp10
denitrification 1Cp15, 3Ja09
Descriptor 3Ia10
detection 2Dp17, 2Fp15
DHA 1Bp04
diagnostic 1S-S3p02
diatom 1Bp05, 1Ep08
diet 1S-S4p09
dietary fiber 1S-S4p10
dietary habits 1S-S4p11
different spectral light 3Ia05
differentiation 1Jp04
Differentiation potential 3Hp09
3,4-dihydroxybenzoic acid 1Ap04
dimethy trisulfide 2Hp11
dimethyl trisulfide 2Hp12
diol end group 1Gp05
1,4-dioxane 3Jp06
dioxygenase 1Cp05
dipeptide 1S-S4p02, 2Ap07
direct electron transfer 2Bp15
direct RNA sequencing 3S-S4p02
directed evolution 1Fp11, 2S-S5a01, 3Ba11
disinfection 1Cp12
disparity mutagenesis 1Ep07
dispersed motif-like sequence 1Fp09
dissolved oxygen 1Ip10
disulfide bond 2Ip18
disulfide isomerase 2Gp02
DltA 2Ap15
DNA 3Ia07
DNA immunization 3Cp01
DO-stat 1Dp13, 1Dp14
Doburoku 2Ha07
domestic animal infectious 3Dp07
double emulsion 2Ip04
Dps 3Ip05
droplet microfluidics 1Hp05
droplet microfluidics, 1Hp04
drug delivery system 1Fp02, 2Ip04, 2Ip12, 2Ip13, 3Da09, 3Ga01, 3Ga02, 3Ga06
drug resistance 3Ep04
Drug screening 2Gp11, 2Gp12
drug screening model 2Ga06
DsbC 2Gp04
DT40 cells 2Gp08, 2Gp09
duckweed 1Bp13
dye-decolorizing peroxidase 2Dp06
dye-linked dehydrogenase 3Ap04
dynamic fluid environment 3Hp06
dynamic kinetic resolution 1Fp08
dynamic metabolic model 2S-S4p06

E

Early growth 1Ep16
Earthworm 1Gp12
ectoine hydroxylase 2Ap14
ectosymbiotic fungi 2Bp01
efficient recovery 2Da03
egg 2Ha05, 2Ha06
Eggshell membrane 1Ap13
Eikenella corrodens 2Ep04
Eisenia sp. 1Gp12
elastase 1Ap13
elderly 1S-S4p11
electro-fermentation 2Ja04
electrochemical 2Fp15, 2S-S3p01
electrochemical cultivation 1A-Ep01, 1Dp09, 3Jp03
electrochemically active bacteria 3Fp03
electron donor 1Cp09
electron transfer system 1Bp11
electrosymbiosis 3Jp01
ELISA 2Fp06
emission free process 3S-S1a02
Emticicia sp. 1Bp09
emulsion 1Hp06
emulson 2S-S4p02
encapsulation 2Jp04
Encapsulin 1Ap16
Endocytosis 3Da09
endophyte 2Ba08
endoscopy 3S-S5a04
endothelial cell 3Ga08
endothlial cell 2Ea06
endotoxin 2Da01, 2Da02
energy metabolism 2S-S2p03
enhanced sampling methods 3S-S3a03
Enterococcus 3Dp04
environmental bacteria 1Cp14, 1Dp09, 1Hp06, 2Fp09
enzymatic characterization 3Ea08
enzymatic cross-linking 1Fp02
enzymatic deprotection 1Ap05
enzymatic hydrolysis 3Bp07
enzyme 1Cp10, 2Bp03, 2Fp14, 2Hp07, 2S-S5a05, 2S-S5p10, 3Bp04, 3Ea02, 3Ha04
enzyme activity 2Ja05, 2Jp13, 3Ap09, 3Ia09
enzyme assay 2Ap04
enzyme maturation 2Ap05
enzyme production 1Gp14, 1Hp08, 2Ip13
enzyme purification 1Ap03, 2Ap01
enzyme reaction 1Ap07, 3Ea01, 3Ia01
enzyme turnover 2Ja06
epidemiology 1S-S4p10
epigenetic 2Jp10, 2S-S5p08
epimerization 3Ea06
equol 2Bp08
ergothioneine 2Fp02
Escherichia coli 1Dp07, 1Dp13, 1Hp09, 2Aa05, 2Ca02, 2Ca03, 2Ca11, 2Cp09, 2Ep02, 2Fa06, 2Fp12, 2Ip08, 2Ip09, 2S-S2p05, 2S-S5p02, 3Dp05, 3Ia04, 3Ia06, 3Ip07, 3S-S2a03
esterase 1S-S2p04
esterification 1Bp08
ethanol 1A-Ka04, 2Cp14, 3Aa02
ethanol fermentation 1A-Gp01, 2Cp07, 2Ep08, 3Aa03, 3Aa07
ethanol production 2Ca07, 3Aa04, 3Aa05
ethanol tolerance 3Ha11
ether bond 1Bp18
ethyl alpha-D-glucoside 2Ha07
ethyl caproate 2Hp12
Ethyl caproate production 2Hp17
Euglea graclis 1Bp09
euglena 1Bp11, 3S-S3p02
Euglena gracilis 2S-S5p03
Eukaryote 1Ip03
eukaryotic cell free protein expression 3S-S1a02
europium 3Ja05
evolution 1S-S2p04
evolutionary engeneering 3Ap02
exosome 2Da08, 2S-S3p05
exosomes 2Fp01
Expansion culture 3Hp09
explosive detection 2Ip11
expression 2Ap09, 2Ep14
expression system 2Da04, 2Jp04
extracellular matrix 1Jp03
Extrachromosomal circular DNA 3Ba09

F

far infrared 2S-S3a06
fatty acid 1Ip04, 2Ep06
fatty acid biosynthesis 3S-S2p04
Fe^{2+}-chelate 2Bp11
fecal sample 3Da04
fed-batch culture 1Dp13, 1Dp14, 1Hp14, 1Ip11
Fenton reaction 3Ip05
fermentation 1A-Ep01, 2Ba04, 2Cp10, 2Dp05, 2Ea01, 2Ea02, 2Ha01, 2Ha12, 2Ja02
fermented foods 2Ha12
ferric-chelate reductase 2Bp11
Ferritin like protein 1Ap16
fertilizer 2Ba09
ferulic acid 2Ap16, 2Hp15
FGFR agonist 2Ip16
fiber 2Jp13, 3Bp07
Fibroblast 3Ga09

filamentous fungi 1Hp08, 3Ep01
film sensor 1S-S5p06
firefly luciferase 1Fp10, 2Bp06
Fischer-Tropsch process 3S-S3p04
FISH 2Da12
fission yeast 2S-S5p05
Fistulifera solaris 1Bp05
fitness cost 2Aa01
flavonol 2Bp07
flavoprotein 3Ap04
Flexivirga alba ST13 1Cp10
flor 3Ha08
flow cytometry 1S-S3p06
fluctuation 2Bp16
Fluorescence aptamer 2Ip01
fluorescence spectra 1Hp16, 3Fp06
fluorescent film 1Ip10
fluorescent protein 1Fp10, 1Hp09, 2Jp08
flux balance analysis 3Ia05
folate 2Hp10
food analysis 2Ea02, 3Fa07
food and agriculture industries 2S-S3a02
food culture 2Ha12
food function 1S-S4p06
food processing 3Fa02
force monitoring 1S-S5p06
formaldehyde 3Ja07
formaldehyde degradation 3Ja08
formaldehyde dismutase 3Ja08
FPS 2Ea05
FRAP 3Ap08
freeze tolerant 1Ep06
freeze-thaw 2Hp14
freshwater 1Cp16
FRET 1Hp05
fruit bearing 1Dp04
Fucose 2Ip03
fuctional stability 3Ja02
functional cellomics 2S-S4p08
functional food 2S-S5p09
functional property 1S-S4p05
functional stability 3Ja03
fungal community 2Ep09
fungal disease 3Ep06
fungi 2Ba04
fungicide 1Cp01, 2Fp13
fungus 2Ha01
Fusarium oxysporum strain EI 2Bp01
fusion protein 2Gp04
future medicine 2S-S3p05

G

G-body 1Fp06, 1Hp07
G-quadruplex 2Ip01, 2Ip02
GABA 2Ja03, 3Ba10
gamma-aminobutyric acid 2S-S5p02
gamma-glutamyl compounds 2Ap11
gamma-glutamyltranspeptidase 2Ap10, 2Ap11, 2Ap12
gas fermentation 2Ca07
gasification 3S-S3p04
GC/MS 2Ea02, 2Fa04, 3Fa05
gelatin 3Ga07
gene 1Cp10, 2Ep14, 2Fp17
gene disruption 2Dp02, 2Dp10
gene expression 1Gp13, 2Aa04, 2Aa10, 2Dp05, 2Dp08, 2Ja05, 2Ja07, 3Ba01, 3Ba10
gene expression analysis 1Gp14, 2Aa11, 3Ha09, 3Ja07
gene knockout 3Gp08, 3S-S2a03
gene transfer 2Dp09, 2S-S2a02
genetic diversity 2Ep03
genetic engineering 1Bp06
genetic network 3S-S2a03
genetic switches 3Ba11
genome 2Aa09, 2Ep14, 2Hp18, 3Aa02, 3S-S4p02
genome editing 1Gp18, 2Cp09, 3Ha02
genome engineering 2Dp18, 3Ba06, 3S-S2a05
genome integration 2Dp18
Genome mining 2Dp07, 3Ea03, 3Ea07, 3Ea08
genome stability 2Dp10
genomic analysis 1Ep07
genomic DNA 3S-S2a04
gentiobiose 3Aa11
Geobacillus 2Aa04
Geobacillus stearothermophilus 1Ap09
germination 2Dp15
germline 3Gp04
GFP 1Cp07
GID complex 2Hp03
Glucose 1Dp02, 2Dp12
glucose concentration 3Fp04
glucose consumption 2Ja05, 2Ja07, 2Ja08
glucosylceramide 1S-S4p08
glucuronoxylanase 3Bp05
glutamate decarboxylase (GAD) 3Ba10
glutamate fermentation 2Ja09
glutamic acid 2S-S5p02
glutathione 2Ca02, 3Aa08
Glycan 2Ip03
glycerol 1Cp17, 2Cp07, 3Ba06
glycine 2Ap03
glycolysis 2Ca01, 2Ca05, 2Ja07, 2S-S2p05
glycosaminoglycan 2Jp16
glycoside hydrolase 3Ap07
glycosylceramide 2Ha02
gold colloid 2Ip10
goldfish 2Gp07
Golgi apparatus 1Hp15, 3Da09
Gordonia terrae 2Ja02
GPCR 3Cp01
Gram-negative 1Cp12
gram-negative bacteria 2Da01
Gram-positive 1Cp12
Green nanotechnology 3Hp03
GroEL/GroES 2Jp05
ground water 1Cp11
growth 1Gp08, 2Ca01, 3Dp05, 3Fp02
growth control 3Jp07
growth factor 3Ga02
growth inhibition 1S-S4p02
growth promotion 1Bp09, 1Bp10
growth stimulation 1Dp01, 1Dp09
gSELEX-seq 3Ia03
GUS 3Ha03
GUS reporter gene 1Gp11
gut 1A-Ep01, 1S-S4p09
gut function 3Fa03
gut microbes 1Hp04
gut microbiota 1S-S2p02, 1S-S4p11, 2Cp13, 2S-S5p10

H

Haematococcus pluvialis 1Dp10, 1Hp13, 3Da11
haemolymph 1Fp16
Hair 3Ia10
hair follicle germ 2Ga05
hair regeneration 2Ga05
halophile 3Ap06
haploid 3Ia07
harvest 2Ga01
hazekomi 3Ha03
heat shock protein 3Gp02
heat tolerance 3Ha11
heat treatment 1Hp12
Heavy chain antibody 2Gp01
heavy metal 3Ja11, 3Jp04
hemicellulose 3Bp04
hemoglobin 2S-S4p03
Heparan sulfate 2S-S5p07
hepatocyte 2Ga08
heterogeneity 3Ja03
Heterologous expression 3Ep02
heterologous production 2Bp14, 2Dp07, 3S-S2p03
heterotrophic 1Hp13
Hevea brasiliensis 2Bp09
hexadecylpyridinium 2Da03
hexavalent chromium 1Cp10
high copy number plasmid 2Aa08
High sensitivity 2Fp06
high temperature 2Ja05, 2Ja06, 2Ja08
high temperature resistance 3Ba08
high-throughput screening 1S-S3p05, 2Gp11, 2Gp12
high-throuput 2Fa03
higher education 2S-S1p04
HILIC 2Fa05
hineka 2Hp11, 2Hp12
hiPSCs expansion 3Hp08

histone 3Ba07
Histone methylation 3Hp09
homo poly-amino acid 3Ea07
homologous recombination 2Dp03, 3Ia06, 3S-S2p03
hop 2Hp07, 2Hp08
Horizontal Gene Transfer 2Aa02, 3S-S2a01
Horornis diphone 3Da04
host cell proteins 3Gp08
host range 2Aa02, 2Aa03
house laundry 2Ep13
Hsp104 2Hp14
Human glucocerebrosidase 1Ep13
human IgG 2Da07
human induced pluripotent stem cell 1Jp03
Human induced pluripotent stem cells 3Hp07, 3Hp09
human iPS cell 2Ga08
human iPS cells 2Ip16
hybrid enzyme 1Ap03
hybridoma technology 3Cp01
hydration 3Ep09
hydrogel 3Ga04, 3Ga07
hydrogen 3Jp03
hydrogen bond network 1Ap08
hydrogen peroxide 3Ga05, 3Ip03
hydrogen-oxidizing bacteria 2Cp16
hydrolysis reaction 2Bp03
hydrophobin 1Fp04, 1Fp05
hydroxyapatite 2Da10
4-hydroxybenzoate 2Ca10
hydroxyhexylitaconic acids 3Ep07
hydroxylation 2Bp08
hyperphosphatemia 3Da07
hyperthermophile 2Dp01, 2Dp02
hyperthermophilic archaeon 1Ep04, 2Bp16
hypothetical proteins 3Bp08
hypoxia 1Fp06, 1Hp07

I

IBE fermentation 2Cp01
IgA 2Ea11
IgA-enhancing effect 2Ip07
IgG 1Hp17, 3Gp07
IgNAR 2Gp01
IL-8 2Ea10
illumination condition 2Cp04
Image analysis 2Gp10
image processing 2Fp03
imaging 3S-S3a01
immobilization 1Cp07, 2Ap12, 2Da08
immobilized bacteria 1Cp08
Immunochromatography 2Da09
immunoglobulin A 2Ea12
immunoliposome 3Fp07
immunostimulation 2Ea11
immunosuppression 2Gp06
immunotherapy 2Jp10
impedance 2S-S3p01
in silico artificial protein design 3S-S3a02
in silico classification and screening 3S-S3a05
in silico classification/screening 1Fp09
in silico protein sequence analysis 1Fp09
in vitro analysis 3Ea05
in vitro reconstitution 3S-S2p02
in vitro selection 3S-S5a02
in vivo model 3Fa03
indigenous skin bacteria 3Da05
indigo 2Aa05
Indonesian shrimp paste 2Cp08
industry-academia collaboration 1A-Ka01
infectious disease 2S-S4p05
inflammation 1S-S4p07, 2Ea09
influenza vaccine 3Gp03
Influenza virus 2Da09
Influenza Virus detection 3Fp05
informatics 3S-S4p03
inhibitor 1Cp15, 1Ep15, 3Ba03
injured microbes 2Dp15
insulin 2Ha04
interactive interface 3S-S5a01
interfacial culture 1Gp03
intermediate filament 2Gp14, 2Gp15
interspecies electron transfer 3Jp01
interspecific interaction 3Ja01
intestinal absorption 1S-S4p06
intestinal bacteria 1S-S4p08, 2Ha02
intestinal microbiome 2S-S5p09
Intestinal microflora 3S-S4p04
intrabody 2Jp08
intracellular glutamate 3Jp02
intravenous immunoglobulin 2Gp06
intron 3Ba05
intron-mediated enhancement 3Ba05
invasion 2Gp16
ion channel 1S-S3p01
ionic crosslinking 3Ga04
ionic liquid pretreatment 2Ba11
iPS cell 1Jp07, 1Jp09, 3Ga03
iron 1Cp09
isolation 1S-S2p01, 3Ja06
isoprenol 2Ca11
itaconic acid 1Hp12
ITO electrode 3Hp01

J

Japanese sake yeast 2Hp17
Juvenile Hormone 2Aa11

K

Katsuo bonito 2Ep10
katsuobushi bonito 2Ep09
Kidney 3Gp06
kinetic parameter 3Ep09
kinetics 1Fp12, 3Bp03, 3Ia04
kinetics on aggregate behaviors 3Hp07
Koji 2Ha04, 2Ha06
Koji making 1A-Ip01, 2Ha01, 2Ha05
Komagataeibacter europaeus 2Da04
Kynureninase 2Da10

L

L-amino acid deaminase 2Ap17
L-amino acid esterase 2Ap07
L-amino acids oxidase 1Fp08
l-asparaginase 3Ap01
L-galactonic acid 1Gp09
L-glutamate 3Ia04
L-glutamate oxidase 2Ap02
L-lactic acid 3Ap04
L-methionine decarboxylase 2Ap01
L-threonine 3-dehydrogenase 2Ap13
lactate-utilizing bacterium 2Cp13
lactic acid 2Ja06, 2S-S2p04
lactic acid bacteria 1Dp11, 1Gp04, 2Aa06, 2Ea04, 2Ea07, 2Ea08, 2Ea11, 2Ea12, 2Ha11, 3Ap01, 3Da08, 3Dp04
lactic acid bacterial diversity 2Ep06
Lactobacillus 3Da03, 3Fa01
Lactobacillus casei 3Da07
Lactobacillus plantarum 2Ea07
Lactococcus lactis 1Ip11, 2Ea08
lactonase 2Dp04
lactose 2S-S2p01
Lactuca sativa 1Dp05, 1Dp06
laminarioligosaccharide 3Bp03
Langmuir monolayer 1Fp05
lanthanide 2Ep05
lanthanides 1Gp06
lawn 3Da02
lawn field 3Da01
LC-MS analysis 1Gp15
LC/ESI-MS/MS 2Fp02
LC/MS 2Fa03
LEA peptide 2Ip09
leaf cross section 2Fp13
LED 2S-S3a02
lettuce 1Dp06
leucine dehydrogenase 1Ap09
Leuconostoc mesemteroides 1Ip10
levulinic acid 2Ca09
library 3Cp04
life-course multi-omics data 2S-S3a04
lifespan 1S-S4p01, 2S-S5p08
light 3Aa08
lignin 1Bp18, 2Ca10, 2Dp06
lignin degradation 1Bp17
lignocellulosic materials 3Aa04
Limulus amebocyte lysate 2Da01, 2Da02

linear plasmid 2Dp11
linoleic acid 2Ba05
lipase 2Ep10
lipid 1Bp12, 2Ip06, 3Ia11, 3Ip01
lipid accumulation 1Bp07
lipid binding 2Ip14
Lipid production 1Ip03
lipid vesicle 2Ip04, 2Ip06
lipid-protein conjugate 1Fp02
Lipomyces starkeyi 1Ip05, 1Ip06
lipopolysaccaride 1Dp01
liposime-inclusion antigen 2Gp07
liposome 1Fp02, 3Ga01
liposome immunoassay 3Fp07
liquid medium 1Hp01
liquid repellant 1Cp13
Liquid-ordered domain 2Ip05
literature search support tools 3Ia09
Litopenaeus vannamei 3Fa08, 3Fa09
liver 2Ha01
liver cell 2Ga07
Livestock animal 3Fa03
living cell 2S-S4p07
localizasion analysis 3Fp06
long term evolution experiment 2Ep02
long-chain fatty acids 1Ip06
long-chain polyamine 2Bp05
low residual pesticide 2S-S3a03
low shear and modeled-microgravity 3Da08
low temperature 1Cp06
low-carbon society 2Bp12
LP-PLA$_2$ 1Ap12
LSPR 3Fp05
luciferase 3Ba05
lymphedema 2S-S3a06
lysine production 2Ja10
Lyso PAF 1Ap12
lysoplasmalogen 1Ap12

M

machine learning 2Fp05, 2Hp09, 2S-S4p09, 2S-S5a03, 3Ia01
macroalga 2Ea09, 2Ep03
magnesium 2S-S3p03
magnetotactic bacteria 2Da05
major hitocompatibility complex 2Jp12
malate dehydrogenase 1Ap02
MALDI-imaging mass spectrometry 2Ea01
malic acid 2Hp03, 2Hp04
malodor 2Ep13
maltose promoter 2Aa04
mammalian cell 2Jp06, 3Ba07, 3Gp05
marine environment 2Ea09, 2Ep03
marine microorganisms 1Ip03
mass microscope 2Fp13
mass spectrometry imaging 2Fp14, 3Ha03, 3Jp09
material cycle 2Ba09
Materials informatics 2Fp05
MCF-7 1Ip08
MCR-ALS 2Fp08
MEA chip 3Ga03
mechanism 2Ea09
mechanobiology 1S-S5p04
Megasphaera elsdnii 2Cp13
membrane emulsification 2S-S4p03
membrane lipids 2Da06
membrane localization 2Dp01
membrane modification 2Da05
membrane permeability 1Hp12
membrane potential 2Ip06
membrane protein 1Cp08
membrane vesicle 2Ea11
membrane vesicles 2Ea12, 2Ip07
MERS 3Da10
mesenchymal stem cell 1Jp04, 2Ga01, 2Gp10
Mesothelial cell 3Ga09
metabolic adaptation 1Ip08
metabolic analysis 1Bp02, 1Ip11, 2Cp11, 2Fa04, 2Fa06, 3Fa07
metabolic engineering 1Bp15, 1Ip04, 2Ca04, 2Ca05, 2S-S4p06, 3S-S3p02
metabolic flux 2Ca05, 2Ja07
metabolic flux analysis 2Fa01, 2S-S4p06
metabolic network 3Ja02
metabolic pathway modification 1S-S4p05
metabolic profiling 3Fa04
metabolic response 2Ja08
metabolic switch 2Ca04
metabolism 2Ca01, 2Ga08, 3Ap06, 3Ja07
metabolite 2Fp14
metabolite production 1Dp05
metabolite profiling 1Ep05
metabolome 2Hp09
metabolomics 1Ep06, 2Ea02, 2Ea03, 2Fa02, 2Fa05, 2S-S4p07, 3Fa06, 3Fa08, 3Fa09
metagenome 1A-Ka02, 2Fa08
Metagenome analysis 2Ep11
metal adsorption 3Ja10
Metal ions 2Ep02
metal recovery 3Ja05
metal-binding peptide 1Cp08
methane fermentation 1A-Gp01, 2Cp02, 2Cp03, 2Cp05, 2Cp15, 3Jp03
methanogen 2Cp02
methanol 2Dp14
methionine 2Ca12
methionine cycle 2Hp10
Methotrexate 2Jp17
methoxysalicylic acid 2Bp12
Methylobacterium 2Ep07
Methylobacterium sp. FD1 3Ja08
Methylorubrum extorquens 2Dp14
methylotroph 2Dp13, 2Dp14, 2Ep05
methylotrophic yeast 3Ba01
methyltransferase 2Bp07, 3Ha05
mevalonate 2Ca11
Meyerozyma guilliermondii TY-89 1Hp03
micobiome design 2S-S2a03
micro device 1Jp08
micro vascular structure 2Ga09
microalgae 1Bp02, 1Bp06, 1Bp12, 2Bp10, 2S-S3a02, 3Da11, 3Ja05, 3Ja06, 3S-S3p03
microbe 2Fa07
microbial awakening 1S-S2p01
microbial community 2Cp03, 2Cp05, 2S-S2a02, 2S-S2a03, 2S-S2a04, 3Ja06, 3Jp02, 3Jp03
microbial consortia 1A-Ep01, 2S-S2a01, 2S-S2a03
microbial consortium 1S-S2p04, 2Dp17
microbial cultivation 1Hp01
microbial dark matter 1Dp15, 3Da06, 3Hp01
microbial diversity 2S-S2a04
microbial dormancy 1S-S2p01
microbial flora 1S-S4p09, 1S-S4p10, 3Fa03, 3Hp02
microbial fuel cell 2Ba01, 3Jp02
microbial inoculant 2Ba02
microbial interaction 1Hp02
microbiota 1S-S2p02
microcarrier 2Ga01
microdevice 1Jp09, 3Ga03
microfiber 3Ep08
microfluidic device 1A-Jp01, 2Fp09, 2Ip04
microfluidics 2S-S3p04
microgravity 1S-S5p01
microorganisms 3Aa09
Microphysiological systems 1A-Jp01
microscopy 3Ia11
microsystem 2S-S3p05
microtubules 1S-S3p03
Microwave 1Dp02, 3Da06
milk 2Fp16
mineralization 3Ja10
minicircle DNA vector 3Gp01
miPS-LLCcm cells 2Gp13
mitochondria 1Bp11, 2Hp05, 2S-S5p04, 3Ia07
mix-mode chromatography 2Da10
mixed proteomics 2S-S4p05
mixotrophic 1Hp13
MLST 3Fa01
Model robustness 2Gp10
modeling 1Dp08
molecular crowding 3Ap08
molecular dynamics simulation

3S-S3a03
molecular imprinting 2Fp01
molecular motor 3Ap08
molecular recognition 1Fp15, 3S-S5a03
Monascus spp. 2Ha03
monoclonal antibody 1S-S3p05, 2Gp03, 3Cp06
monocyte 3Hp06
monomer supplier 3Ip09
monooxygenase 2Bp08
monosaccharide 1Ap10
Monostroma latissimum 1Bp14
Morphological profiling 2Gp11, 2Gp12
mRNA 1Ep12, 2Dp17, 3Fa01
mRNA degradation 1Ep09, 1Ep10, 1Ep11
mRNA secondary structure 2Aa12
MRSA 2Fp03
muiltistress tolerance 3Ip03
multicopper oxidase 2Bp15, 2Bp18
multimodal chromatography 1Hp18
municipal solid waste 1A-Gp01
muscle protein 2Cp12
mushroom 2Ep04
mussel adhesive proteins 1Cp07
mutagenesis 1Fp12, 2Jp01, 3Cp02
mutant 2Hp11
mycotoxin 1Gp15

N

N-succinyl chitosan 3Ga04
N_2O 1Cp15
NAD(P)H 2S-S2p05, 2S-S5p01
NAD^+/NADH 2Fa02
nagilactone E 3Ep04
nano particle 3Ga05
nano-bio sensor 2Fp15
nanobody 3Cp04, 3Cp05
nanocapsule 2Jp02
nanocarrier 2Jp05
nanodroplet 3Ga06
nanofibril 3Jp07
nanogel emulsion 3Ga02
nanoluc 1S-S3p06
nanoneedle 2Gp15
nanoparticle 3Jp05
Nanoparticles 3Da10
nanopore 1S-S3p01
natural product 3S-S2p03
near-infrared light imager 2Ga11
neonicotinoid 1Cp03
nestin 2Gp14, 2Gp15
neural stem cell 3Ga08
neuromuscular junction 1Jp07, 1Jp09, 3Ga03
neutron crystallography 1Ap08
new compounds 1S-S2p03
next generation sake rice 2Hp09
next-generation metabolome analysis 2Fa05
NGR peptide 2Ip17
NGS analysis 2Hp04
Nicotiana benthamiana 1Ep13
nit-4 1Bp17
nitrification 2S-S2a01
nitrifying bacteria 2S-S2a01
nitrilase 2Ap18
nitrile hydratase 1Ap08
nitrogen fixation 1Cp14
Nitrogen-replete 1Bp01
nlpI 2Ip08
NMR 2Fp04
NMR metabolome 2Fa07
nocodazole 2Hp01
noise reduction 1S-S5p05
non-airflow box 1A-Ip01
non-antibody molecular scaffold 2S-S5a01
non-climacteric 3Fa06
non-epithelial cancer 1Ip09
non-thermal effect 3Da06
nucleoside 3Ap06
nutrient feeding 3S-S1a01
nutrient source 1Bp07

O

object recognition 1S-S5p05
Ochrobactrum sp 2Ca09
Odorant receptors 2Fp07
Ogataea minuta 3Ba01
oil 3Ia11
oil degrading bacteria 1Cp06
oleaginous yeast 1Ip05, 2Ba05
oleaginous yeasts 1Ip06
oleic acid 2Ba05
Olfactory mucosa 2Fp07
oligodeoxynucleotides 2Ip02
oligoester 1Gp05
oligomer 2Jp14
oligosaccharide 2Ja01, 2S-S2p01
oligotroph 2Ep05, 3Aa10
Olyset Net 2S-S1p02
online monitoring 3S-S1a01
optogenetics 2S-S2p05, 2S-S4p08
Organ-on-a-chip 1A-Jp01
organic acid 2Hp06
organic circuits 2S-S3p02
organic compounds 1Bp13
organic solvent 1Ap11
organophosphorus compounds 1Cp02
orientated immobilization 2Bp16
orientation 2Bp15
origin 3Fa04
Oryza sativa 3Ia03
osmotic response 3Ip01
osteogenic differentiation 2S-S3p03
outer membrane vesicles 2Ip08
Overexpression 1Ap16
oxaloacetate 2Ja10
oxidase 2Ap03
oxidation 2S-S5p01
oxidative stress 2Ea06, 3Ip02
oxidoreductase 2Bp17
2-oxoglutarate 2Ap14
2-oxoglutaric acid 2Ca09
oxygen 2Ca04, 2S-S4p02
oxygen radical treatment 3Aa01
oxygen sensing 2S-S4p01
Oxygenation 2Bp11, 2S-S4p03
ozone 3Dp05

P

P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2 photocatalyst 1Cp12
P450 3Ea02
paper devices 1S-S3p02
Parachlorella 1Bp12
Paris Agreement 2S-S1p05
pathogen 2Fp17, 3S-S4p02
PCR 2Fp17
PCR-DGGE 2Ba10, 2Ep09, 3Da06, 3Hp01
PDI 2Gp04
pear 3Ep05
Penicillium citrinum 2Bp14
pentose phosphate pathway 2Ca05
peptidase 1Fp10, 2Ep10, 3Ea09
peptide 1S-S3p03, 2Dp09, 2Ip10, 2Ip11, 2Ip13, 2Ip16, 2Jp07, 3S-S4p03
peptide array 2Fp16, 2Ip17, 2Ip18
peptide barcoding 3Cp05
peptide screening 2Ip17, 2Ip18
peptide tag 2Gp05
perfluorocarbon 2S-S4p02
perfluorocarbon emulsion 2S-S4p04
Perilla 2Jp15
periodontopathogenic bacteria 2Ep04
peritoneal adhesion 3Ga04
PET 1S-S2p04
peyers patches 2Fp10
PFC 2S-S4p03
pH 1Dp15
PHA 1Bp16
PHA synthase 3Ip08
PhaC Box 3Ip08
phage 2Ep12
phage display 2Bp06, 2Gp07, 2S-S5a01, 3Cp03
Phanerochaete chrysosporium 1Ap14
PHB 1Bp16
PHBH 2Cp16
phenolic acid decarboxylase 3Ha01
phenome 2S-S3a04
Phenotypic assay 2Gp12
phosphate 2Ba12, 2Ca06
phosphate accumulation 3Da07
phosphatidylcholine 2Da05

phospholipase D 1Ap12
phosphorylase 3Bp03
phosphorylation 3Ja10
photocatalytic reactor 3Jp08
photosensitizer 1Jp04
photosynthesis 2S-S3a01, 3S-S1a03
photosynthetic bacteria 1Dp01, 2Dp09, 3Ia05
photosystem II 3S-S1a03
phthalate derivatives 1Ap06
phylloepiphytic bacteria 2Ep07
phylogenetic tree 2Hp13
Physical property 3Ia10
physicochemical property 2Fp05, 3S-S4p03
physicochemical screening 1S-S2p03
physiologically active substance 1Bp06
phytochemicals 2S-S3a06
Pichia membranifaciens 3Ba03
Pichia pastoris 3Ba04
pig 2Cp12
pigment 1Bp02
plant 1Dp01, 2Fp13
Plant activator 1Ep14
plant growth 2Ba09
plant growth promoting activity 1Dp17
plant growth promoting bacteria 1Dp17
plant health monitoring 3Fp03
plant immunity 2Ba08
plant microbial fuel cell 3Fp03
plant mRNA 1Ep10, 1Ep11
plant pathogen control 2S-S3a03
plant rhizosphere 1Cp04
Plant-made pharmaceuticals 1Ep13
plasma 2Fa04
plasmid 2Aa01, 2Aa03, 2Aa04, 2Aa05, 2S-S2a02, 3Ba07, 3S-S2a02
Plasmonics 3S-S5a04
plastic fluid 3Hp08
plastic surface 1Cp13
poly(amino acid) 2Dp05
poly(epsilon-L-lysine) 3Dp02, 3Dp03
poly-gamma-glutamate 2Da03, 3Ea06
polyamine 1Ep04, 1Ep05, 2Jp16, 2S-S5p06, 2S-S5p08, 3Ea10, 3Ga10
Polyamines 2S-S5p07, 2S-S5p10
polycation 2Ip12
polyhydroxyalkanoate 1Bp15, 1Gp05, 1Hp10, 2Dp13, 2Ja04, 3Ip08, 3Ip09
polyion complex 2Da03
polyisoprene 2Bp09
polyketide synthase 3S-S2p04
Polymer 2Fp04
polymyxin B 2Da02
polyphenol 2S-S3a02
polysaccharide 2Ga12
polysaccharide-degrading enzyme 3Ap07
polystyrene 3Ga11
polyunsaturated fatty acid 3Ea11, 3S-S2p04
polyvinyl alcohol 1Ap03
Porphyromonas gingivalis 1Ep05
post harvest processing 3Fa05
post-harvest quality 3Fa09
post-translation 2Jp08
Postia placenta 3Ep03
poultry manure 2Ba12
PPFMs 2Ep07
Prediction 2Fp04
predictive modeling 1Dp07
prenyl transferase 2Bp09
preservative 2Fp11
pressed sake cake 2Hp10
pretreatment 2Fa04, 3Hp01
probiotics 1S-S4p08, 2Cp12
processing 2Ea03
production 1Ip04, 3S-S3p03
production enhancer gene 3Gp09
Productivity 3Gp07
Prolamine 2Ha07
proline 1Ap01
promoter 1Ep03, 1Gp11, 2Aa07, 2Dp08, 3Ia02
1,3-propanediol 1Dp12
propeptide 1Fp01
prostaglandin 1Bp06
protease 3Fa02
protein A 1Hp17
protein adsorption 3Hp04
protein engineering 1Fp07, 2Ap03, 2Ap04, 2Bp07, 2Jp06, 2Jp09, 2Jp10, 2Jp11, 2Jp12, 2S-S5a01, 2S-S5a02, 2S-S5a03, 2S-S5a04, 2S-S5a05, 3Cp03, 3Cp04, 3S-S3a04, 3S-S3a05
protein expression 1Fp03, 1S-S3p04, 2Dp12, 2Gp05, 2Jp04
protein folding 2Gp02, 2Jp06
protein interaction 2Gp14, 2Jp13, 2S-S5a05
protein nanoparticle 2Jp02
protein supramolecule 2Jp01
proteome 1Ep08, 2Hp03
proteomics 1Ep04, 1Fp14, 2S-S4p07
Proteus vulgaris 2Ap17
protocatechuic acid 2Dp03
Protoilludene 3Ep03
protoplast 2Bp02
pseudo-natural products 3S-S2p02
Pseudomonas 2Aa01, 2Ca10, 2Dp03
Pseudomonas aeruginosa 2Ap10
Pseudomonas indica 1Ap13
Pseudomonas nitroreducens 2Ap11, 2Ap12
Pseudomonas putida 1Cp04, 3Jp09
Pseudomonas sp. 1Ap06
Pseudomonas stutzeri 2Ca12, 3Jp05
Psychroflexus torquis 3Bp06
psychrophile 1Hp12, 3Bp06
pulsed lighting 1Bp14, 1Dp03, 1Dp05, 1Dp06
pulsed ligting 1Dp04
PURE system 3Ia06
purification 1Fp16, 1Hp17, 2Da10
purine 2Hp08
purine body 2Hp07
putrescine 2S-S5p09
pyrazine 2Ap13
pyridoxal-5'-phosphate 2Ap01
pyrithiamine resistance 3Ha02
pyruvate carboxylase 2Ja10
pyruvate transporter 2Hp05

Q

QCM 2Fp06
Qdot 2Jp14, 2Jp15
QDs 3Fp05
quality evaluation 2Ga11
quality improvement 2Cp08
quantification 2Fa06
quantum dots 2Ip11
quorum sensing 2Aa06, 2Dp04, 3Jp09

R

R-hydratase 3Ip09
racemase 3Ea08
radical 3Ga05
Ralstonia eutropha 1Bp15, 2Cp16, 2Dp13, 3Ip08
Ralstonia eutropha H16 2Ja04
Raman microspectroscopy 2Fp08
rare events of proteins 3S-S3a03
rare sugar 2Ja01
rare-mating 3Ha11
RDS2 2Hp06
reaction mechanism 2Ap13
reactive oxygen nitrogen species 2S-S3a03
reactive oxygen species 1Jp04, 2Ba08, 3Ba08
real time PCR 3Ja07
receptor 2Da05, 3Gp05
rechargeable bio-mineral 3Jp01
reclasification 2Ep08
recombinant *Escherichia coli* 1Cp02
Recombinant Protein 2Jp03
recombinant protein production 3Ba04, 3Gp09
recovery 2Ba12
red yeast rice 2Ha03
redox potential 2Bp18
reduced phosphorus compound 2Ca06
reduction 2Ca12
regeneration 3Hp05
regenerative medicine 1A-Ka03, 1S-S5p01, 2Ga03, 3Gp02
regulation 3Ea04, 3S-S2p05

repression of lactate 1Ip11
repulsive interaction 3Ep09
resin 1Hp18
Resistant protein 2Ha07
resistant starch 3Ha04
respiratory activity 1Ip10
respiratory chain 2S-S5p02
resveratrol 2Ea06
reward 2S-S4p09
rhamnose 2Dp12
rhizobacteria 3Fp03
Rhizopus sp. 1Cp17
rho-associated protein kinase inhibitor 1Jp03
Rhodococcus 2Aa12, 2Dp06, 3Aa10
rhodopsin 2Ca02, 2S-S2p03, 3Aa08
Rhodotorula mucilaginosa 3Ja11
rhyzosphere 1S-S2p02
riboflavin 1Ep07
ribosome profiling 1Ep12
rice 1S-S4p10, 2Ep14, 2Ip15
rice husk biochar 2Ba02
rice infectious filamentous fungi 2Bp03
rice koji 3Ha03
rice malt 2Fp02
rice syrup 1Gp10
ripening 3Fa06
RNA polymerase 3Ap05
RNA production 2Aa07, 2Aa08
RNA seq 3Ha09
RNA-Seq 2Aa09, 3Ba03, 3Ia03
RNase 1Hp05
robot 3S-S1a03
RolA 1Fp04
Root culture 1Ep13
root-knot nematode 1Gp08
ROS tolerance 3Ip05
rotary shaking 1Hp03
rotation/revolution 3Hp06
rotenone 1Ip08
rubber biosynthesis 2Bp09
RubisCO 1Hp10

S

16S rRNA gene sequencing analysis 3S-S4p04
S-adenosylmethionine 2Bp07
Saccharomyces cerevisiae 1Ip07, 1S-S4p03, 2Cp07, 2Cp10, 2Hp01, 2Hp02, 2Hp03, 2Hp05, 2Hp06, 2Hp10, 2Hp15, 2Hp18, 2Ja01, 2S-S2p01, 3Aa04, 3Aa07, 3Ba02, 3Ba05, 3Ba06, 3Ba08, 3Ba09, 3Ep04, 3Ep05, 3Ha10, 3Ha11, 3Ip02, 3Ip03
sake 1S-S1p03, 2Ha08, 2Hp02, 2Hp15, 2Hp16
sake yeast 1S-S4p04, 2Hp04, 2Hp06, 2Hp11, 2Hp12, 2Hp13, 2Hp16, 2S-S5p04
salinity 3Fa09
Samarium 2Ep05
Saprolegnia 3Ea11
sarcosine oxidase 1Ap01
scaffold 1Fp15, 3S-S5a03
scale-up 1Dp08
scFv 1Dp13, 1Dp14, 2Da08, 2Da09, 2Gp07, 3Cp06
Schizophyllan 3Dp01
Schizosaccharomyces pombe 1S-S4p02
Science Technology and Innovation 2S-S1p04
Science, Technology and Innovation (STI) 2S-S1p03
screening 1Bp18, 2Fp08, 3Ba11, 3Cp03, 3Cp06, 3Fa02, 3Gp05, 3Ia11
screening of microorganisms 3Ia09
SDGs 2S-S1p01, 2S-S1p02, 2S-S1p03, 2S-S1p04, 2S-S1p05, 2S-S1p06, 2S-S4p05
Secondary metabolism 1Gp07, 3Ea03, 3Ea07, 3Ea09
secondary metabolite 1Gp03, 2Ea01
secondary metabolites 1Ip05, 1S-S2p03
secreted protein 1Fp03, 1Hp14
secretion signal 3Ba04
secretome 3Bp08
secretory production 1Fp03, 1Gp05, 3Ba04
secureeconomy 2S-S3a05
Seed germination 1Ep16
selection marker gene 3Ha02
Selective breeding 1Bp01
selective fermentation 1A-Ka04
selective hydroxylation 2Ap14
selenium 2Ca12, 3Jp05
self-assembly 1Ap17, 1S-S3p03, 2Jp01
selforganization 3S-S5a01
sensing 2S-S3p01
sensor 2Fp01, 2Fp07, 2Fp16, 2S-S4p01, 3Fp06
sensory analysis 2Hp09
separation 2Fp12, 2S-S3p05
Sequence based protein design 1Fp08
Sesquiterpene synthase 3Ep02
sesquiterpenoid 2Bp11
shake-flask culture 1Dp16
Shark antibody 2Gp01
shering force 3Ja04
Shirakami kodama yeast 2Hp14
shochu 3Ha06
shochu distillery wastewater 1Bp04
Shrimp 2Jp03, 3Fa07
sigma factor 1Ep03
signal sequence 1Fp06
Signaling molecule 3Ea03
silica 2Bp05
silica-forming protein 1Ap17
silkwom 1Fp16
silkworm 1S-S3p04, 2Jp03
Silver nanoparticles 3Hp03
simulation 1Dp08, 2Da11
Simultaneous Saccharification and Fermentation 1Dp11
single cell 1S-S3p05, 2Aa10
single cell spectroscopy 3S-S5a04
single domain antibody 3S-S3a02
single-cell analysis 1Jp05, 2Fp09, 2Fp11, 2S-S4p07
single-use culture bag 3Hp08
sirtuin gene 3Ep05
site-directed mutagenesis 2Bp18
size 3Fa08
skeletal muscle 1Jp08, 2Ga06, 2S-S4p04
skin 1S-S4p06
slaked lime powder 3Dp07
small biopharmaceuticals 2S-S5a02
Small cyclic peptides 1Ep14
small scale 1Hp07
small scale culture systems 3S-S1a01
smart protein design 2S-S5a02
SNARE protein 3Gp07
social cheater 1Dp09
Society 5.0 2S-S1p01
soil 1Cp01, 1Cp14
soil bacteria 2Ba09, 3Da01
soil environment 3Da01, 3Da02
soil nutrient 3Da02
Solanum lycopersicum L. 1Cp04
solar energy 3Jp08
solid-liquid-solution systems 2S-S3p03
Solid-ordered domain 2Ip05
Solid-state NMR 2Fp05, 3Ia10
Solubility 1Dp14, 2Fp04
soluble di-iron monooxygenase gene 3Jp06
somatic hypermutation 2Gp08, 2Gp09
soy sauce 3Ha07, 3Ha08
specialized cellulose film 1Dp18
spermine 2S-S5p08
spheroid 1S-S5p06, 2Ga03, 2Ga08
spheroids 2Ga11
Sphingobium 1Cp02
sphingolipid 1S-S4p07
sphingolipids 1S-S4p06
spinach 2Ep07
Spirochaeta 3Bp03
split intein 2Ap06
spo0A 3Ip06
spontaneous mutant 3Ip03
spore 2Dp15
sporulation 2Hp13, 3Ip06
spoT 3Ip04
stability 2S-S2a04
stable isotope 2Fa06
Stack plates 2Ga02
standby disinfecton 3Dp07
staphylococci 2Dp04

Staphylococcus 2Fp11
Staphylococcus aureus 3Ga11
Staphylococcus aureus 3Dp06
Staphylococcus epidermidis 3Dp06
statistical experimental design 2Cp04
steam treatment 2Ba06
stem cell 3Ga10
stem cell culture 1A-Ka03
Stenotrophomonas sp. 3Ja01
stereoselectivity 1Ap01
stereospecific monoclonal antibody 3Cp01
STI for SDGs 2S-S1p03
strawberry 1Dp04
Streptococcus mutans 3Bp02
Streptococcus pyogenes 3Fp01
Streptolysin O 3Fp01
Streptomyces 1Ap18, 1Gp17, 2Ba03, 2Dp11, 3Ea01, 3S-S2a01, 3S-S2a02, 3S-S2p01, 3S-S2p05
Streptomyces lavendulae 2Dp07
Streptomyces rochei 3Ea03
Streptomyces sp. 2Ip13
Streptomyces thermoviolaceus 1Gp17
stress 3Ip01
stress resistance 1Bp12
stress response 1Ep03, 3Ea10, 3S-S4p05
stress tolerance 2Ca03
structural analysis 1Ap07, 3Ep07
structural change 1Ap02
subcellular localization 1Fp06
substrate recognition 1Ap02, 2Ap11
substrate specificity 1Fp01, 2Ap02, 2Ca06, 3Ap07
Substratome 1Dp07
subtilisin 1Ap11, 2Ap05, 2Ap06
succinate 2S-S2p04
succinic acid 2Ja06
sufite ion 3Aa09
sugar 1A-Ka04
sugar content 1Dp03, 1Dp04
sulfanilic acid 3Aa09
sulfate 2Bp13
sulfate reducing bacteria 1Cp09
sulfate-reducing 2Ep11
sulfonamide 1Ap04
sulfur amino acid metabolism 3Ap03
sulfur assimilation 2Bp13
sulfur metabolism 3Jp04
surface attachment 3Jp07
surface layer protein(SLP) 3Da03
surfactant 2Da06
Suspension cells 2Gp11
sustainability 1S-S3p04
Sustainable Development Goals 2S-S1p03
sweetpotato *shochu* 2Ha09
sweetpotato *shochu* oil 2Ha09
symbiosis 2Cp06
symbiotic bacteria 2Fp10
Synechocystis 2S-S2p04
syngas fermentation 2Cp14, 2Cp15
synonymous codon 2Aa12
synthetic biology 1Hp11
synthetic microbial consortium 2Cp15
synthetic microbial ecosystem 3Ja02, 3Ja03
Syntrophobacteraceae 2Ep11

T

T cell 2Gp06
tag lines 2S-S3a01
TAG lipase 1Bp05
tagatose 2S-S2p01
Talaromyces cellulolyticus 2Ja11, 3Aa11, 3Bp05
Talaromyces purpurogenus 3Hp03
taste-active compound 3Fa08
taurine biosynthesis 2S-S2p02
taxonomy 1Ep06
TCA cycle 2S-S2p04, 3Ap09
TEF3 1Hp15
tempe 2Ea03
terasi 2Cp08
terephthalic acid 2Dp03
terminator 2Dp08
terpenoid 2Bp10, 3Ep01, 3Ep03
Tetragenococcus halophilus 3Ha07
thallusin 1Bp14
Theanine 2Ap12
Therapeutic antibody 1Hp15
thermal stability 1Ap09
Thermoanaerobacter kivui 2Cp14, 2Cp15
Thermococcus kodakarensis 1Ep04, 3Ap05
thermophile 2Ba03, 2Bp17, 2S-S5p06
Thermophilic actinomycetes 1Gp17
thermostability 1Fp12, 3Cp02
thermostable enzyme 1Ap11, 1Fp07, 1Fp12, 2Ap05, 2Ap06, 3Ap04, 3Bp09
Thermotolelance 2Ja09
thermotolerance 3Ip04
Thermus thermophilus 1Ap10
thioproline 1Ap01
thiosulfate 2Bp13, 3Jp04
three dimension 1S-S5p03
three-dimensional tissue 1Jp09
time series analysis 2S-S2a04
tissue culture 2S-S4p04
tissue engineering 1Jp07, 1Jp10, 1S-S5p03, 2Ga03, 2Ga04, 2Ga07, 3Ga02, 3S-S5a03
toll like receptor 2Ip02
toluene-degrading bacteria 1Cp04, 2Ep11
tomato 1Dp03
toxicity 1Jp06
tracer experiments 3Ea06
trans-3-hydroxyproline 2Ap14
trans-aconitic acid 2Ca08
Transcript factor 3Ia03
transcription 1Cp06, 3Ap05
transcription factor 1Bp17
transcriptional regulation 1Gp13, 2Dp13, 3Ia02
transcriptional regulator gene 2Jp06
transcriptome 1Ep08, 1Jp05, 2Aa09, 2Aa10, 3Ha05
transfer genes 2Dp11
Transformation 1Gp12, 2Dp09
transgenic chicken 3Gp03
transketorase 1Ap10
translation 2Gp05, 2S-S5p07
translation repression 3Ip02
transomics 1Ip07, 2S-S4p05
transporter 1Ep15, 1Gp13, 2Ca06, 2S-S5p10, 3Ia04, 3S-S4p03
tree bark 2Ep01
triacylglycerol 3Aa10
tricarboxylic acid cycle 2Ca09
trickling filter process 1Cp11
triclosan 3Da05
triplex 2Ip01
triterpenoid 1Ip05
tRNA-dependent amide synthetase 3S-S2p01
troponin I 2Cp12
trypsin 2Ga01
Tryptamine 2Da07
tryptophan 1S-S4p02
TTC staining 2Hp01, 2Hp05
tumor 1S-S5p03
tumor associated antigen 2Jp11
Type IV secretion 3S-S2a01
typing 3Fa01

U

ubiquinone 2S-S5p05
ubiquitin 2Jp07
ubiquitin ligase 2Jp07
ubiquitination 2Jp07
ultrasonic treatment 3Dp01
ultrasound 3Ga06
ulvan 3Ap07
uncultured bacteria 1Dp18, 1Hp01, 1Hp02, 1Hp06, 1S-S2p01, 2Ep01
Undibacterium 1Cp16
uniform culture 1A-Ip01
unnatural amino acid 3S-S5a02
unsaturated carbonyl compounds 1Jp06
urban mining 1Dp18

V

vacuole 1S-S4p03
Val-Gly 2Ap07
vanillin 2Cp10, 3Aa01

Vapor stimulation 2Fp07
vascular endothelial growth factor 3Gp02
4-VG 2Hp15
VHH 1Fp15
viability 3Hp02
vinegar fermentation 2Ha10, 2Ha11
4-vinylguaiacol 3Ha01
virus 2Fp15, 3Fp06, 3S-S4p02
vitamin B_{12} 1Ap15
VNAR 3S-S3a02
volatile fatty acids 1Bp03, 2Cp06

W

waste 1Hp03, 2Ja03
waste wood chip 3S-S3p04
wastewater treatment 3Jp04, 3Jp08
water 1Bp08
water circulation 3Ja09
water purification 3Ja09
wax ester 1Bp11, 2S-S5p03
wearable 2S-S3p02
weed 2Cp05
whey 2Ha10
White spot syndrome virus 2Jp03
white-rot basidiomycetes 3Ep02
white-rot fungi 1Bp17, 1Cp03
whitlockite 2S-S3p03
WHO 2S-S1p02
whole genome analysis 2Ep08
wine 1S-S1p01
wound healing 2Ea06

X

X-ray crystallography 1Ap07, 3Bp05, 3Bp09
X-ray structure 1Ap10
xanthophyll 1Bp08
Xanthophylloyces dendrorhous 2Ba07
xenobiotic compounds 2Dp10
xerophilic *Aspergillus* 2Ep09, 2Ep10
xylanase 1Ap14
xylene 3Ip02
xyloglucanase 2Bp01
xylooligosaccharide 3Bp05
Xylose 1Dp02, 2Cp11
xylose transporter 3Ha10

Y

yeast 1A-Ka04, 1Gp09, 1Hp03, 1Hp14, 1S-S4p01, 1S-S4p05, 2Ba04, 2Bp10, 3Aa05, 3Aa06, 3Ba03, 3Ba07, 3Ba10, 3Ba11, 3Cp05, 3Ip01, 3Ja10, 3S-S4p05
yeast extract 1Dp07
yeast surface display 3Cp04
Young's modulus 3Ga07

Z

zinc 3Ha09
Zn-porphyrin 2S-S2p02
Zygosaccharomyces rouxii 3Ha08
zymogen 1Fp01

ランチョンセミナー

本大会のランチョンセミナーは，事前登録不要・参加費無料です．開催日の朝10:30まで，受付にて整理券を配布いたしますので，参加ご希望の方は整理券をお受け取りください．セミナー開始時刻を過ぎると，整理券は無効となりますのでご注意ください．

整理券をお持ちでない方も聴講することは可能ですので，参加される場合は直接会場にお越しください．

ただし，お弁当を提供できない場合がありますのでご了承ください．

9/16（月）（大会１日目）12：00～12：50

LS1-1　ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社　S1会場（A21）

エクソソーム精製用ペプチドの開発

LS1-2　東ソー株式会社　S4会場（E11）

糖鎖改変タンパク質医薬品の生産～ニワトリの「糖鎖制御工学」～

LS1-3　株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ　S5会場（E21）

微生物培養の最新技術紹介

1. Water-in-oil(w/o)ドロップレットを活用した微生物培養技術
2. ゲルマイクロドロップによるタンパク質高分泌生産株の高速スクリーニング技術の開発

9/17（火）（大会２日目）12：00～12：50

LS2-1　株式会社林原　S1会場（A21）

栄養素の吸収と食品成分による調節～グルコーストランスポーターを中心に～

1. 栄養素の腸管吸収を担うトランスポーターと食品成分による制御
2. 新しい水溶性食物繊維『イソマルトデキストリン』の栄養素吸収調節作用

LS2-2　タカラバイオ株式会社　S4会場（E11）

目的遺伝子のはたらきを調べる3つの異なるアプローチをあなたに

－DNA、RNA、タンパク質レベルでの遺伝子機能解析システムのご紹介－

LS2-3　株式会社島津製作所　S5会場（E21）

1. 代謝階層をまたいだ計測の意義とデータ可視化の役割
2. 卓上型質量分析計による簡便な培養モニタリング

9/18（水）（大会３日目）12：00～12：50

LS3-1　三洋貿易株式会社　S1会場（A21）

～最新のバイオプロセス器材の紹介～

各種バイオプロセスセンサーおよび低ストレス連続培養・細胞分離技術他

LS3-2　天野エンザイム株式会社　S4会場（E11）

再生医療を酵素でサポートする―膵島移植に貢献する酵素―

HMT Human Metabolome Technologies

第 71 回　日本生物工学会　HMT ランチョンセミナー

日時　2019 年 9 月 16 日（月）12：00-12：50

会場　LS1-1

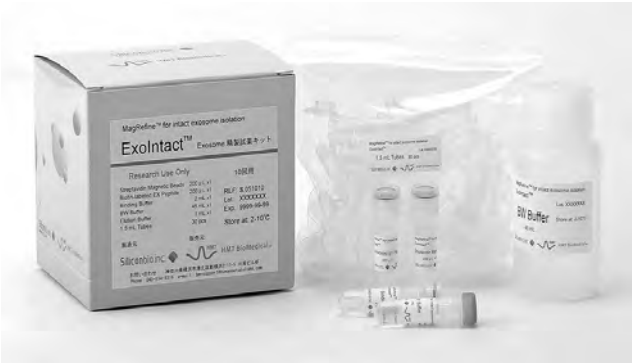
エクソソーム精製用ペプチドの開発

演者　広島大学 大学院統合生命科学研究科　生物工学ユニット　教授　黒田章夫先生

エクソソームは、内部に miRNA など細胞の情報が高度に保存されていることから、新たなバイオマーカーとして注目されている。また近年、間葉系幹細胞由来のエクソソームが、抗炎症作用や複合的な免疫制御作用を持つことが明らかとなり、エクソソームそのものを治療薬として利用する研究が活発に行われている。そのため、エクソソームを損傷の少ない状態で精製する技術の重要性が高まってきている。培養液や血清などからエクソソームを精製するには、エクソソームと結合し、なおかつ温和な条件でエクソソームを解離できる担体の開発が必要となる。演者らはリジンを含むペプチドが有効な親和性ペプチド（エクソソーム精製用ペプチド）になり得ることを見出した。このリジンの個数は少なくてもうまく結合せず、逆に多いと結合力は増すものの解離しにくくなる。ペプチドとリン脂質との結合を評価した結果、ホスファチジルイノシトールが最も高く、ホスファチジルコリンに関しては弱く結合することが分かった。またその結合は、リン酸ではほとんど阻害されないが、ポリリン酸で阻害されることから、リン脂質の複数のリン酸基を認識しているのではないかと考えている。

演者　HMT バイオメディカル株式会社　古川貴之

HMT バイオメディカルでは、黒田先生およびシリコンバイオ社が開発した、上記エクソソーム精製用ペプチドを利用したキット『MagRefine™ for intactexosome isolation ExoIntact™ Exosome 精製試薬キット』を本年４月に発売開始した。既存のゴールデンスタンダード法と考えられている超遠心分離法と比較すると、本キットを使用した場合のエクソソーム収量は高く、かつ夾雑たんぱく質は少ない結果が得られており、相対的な精製比は千倍以上であることが明らかとなった。本ランチョンセミナーでは、本キットのアプリケーション例について説明すると共に、弊社のサービス展開について紹介する。



ExoIntact™ Exosome 精製試薬キットのお問合せ

HMT BioMedical®

HMT バイオメディカル株式会社
〒222-0033 神奈川県横浜市港北区新横浜 2-11-5 川浅ビル４階
Tel:045-534-9316　Fax:045-534-9317

HMT Human Metabolome Technologies

受託解析のお問合せ
ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社
〒104-0033 東京都中央区新川 2-9-6 シュテルン中央ビル５階　Tel:03-3551-2180　Fax:03-3551-2181

The Society for Biotechnology, Japan / Annual Meeting 2019

第71回 日本生物工学会大会

東ソー ランチョンセミナー

講演番号 LS1-2

TOYOPEARL® TSKgel®

演題

糖鎖改変タンパク質医薬品の生産
～ニワトリの「糖鎖制御工学」～

日時

9月16日(月)

12:00 - 12:50

会場

S4会場〈E11〉

（岡山大学 津島キャンパス）

演者

西島 謙一 先生

（名古屋大学 大学院工学研究科生命分子工学専攻 准教授）

抗体をはじめとするバイオ医薬品は主にCHOをはじめとした培養動物細胞で生産されている。一方、ほ乳類の乳汁中や鳥類の卵中にこれらのタンパク質を生産させるための技術開発も進められてきた。ほ乳類に比べ大きく遅れていたニワトリでも、卵に生産させた最初の医薬品であるリソソーム酵素が2015年以降各国で上市されている。さらに、将来精子・卵子に分化する胚細胞である始原生殖細胞が唯一ニワトリで培養可能となり、ゲノム編集を含めたニワトリの遺伝子改変が今後爆発的に進むと期待される。

医薬品タンパク質の活性を考える上で、附加糖鎖構造の重要性は近年ますます注目されている。多様性・不均一性が特徴の糖鎖も、技術の進歩により詳細に検討できる時代が到来しつつある。本発表では、トランスジェニック技術をタンパク質医薬品の附加糖鎖制御に応用する我々のこれまでの検討と今後の展望について紹介したい。

東ソー株式会社
バイオサイエンス事業部
TOSOH

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
https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/

M1906GD.A

第71回　日本生物工学会大会
オンチップ・バイオテクノロジーズ株式会社
ランチョンセミナー

「微生物培養の最新技術紹介」

日時　　：2019年9月16日(月)　12:00- 12:50
会場　　：S5会場
講演番号：LS1-3

演題1　Water-in-oil(w/o)ドロップレットを活用した微生物培養技術

野田尚宏先生(産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門)

Water-in-oil (w/o)ドロップレットとは油中に分散した微小水滴（ドロップレット）のことです。直径30から150 μm（体積は数十ピコリットルから数ナノリットル）程度のw/oドロップレットを数百万個のオーダーで容易に作製する技術が開発されています。このw/oドロップレットに微生物を封入し、その内部で培養を行い、微生物が増殖したw/oドロップレットを選択的に回収し、さらに回収したドロップレットから微生物を生きた状態で獲得するという一連の技術をご説明いたします。以上のような説明を通してw/oドロップレット培養技術の利点や今後の課題・展望をご紹介いたします。

演題2　ゲルマイクロドロップによるタンパク質高分泌生産株の高速スクリーニング技術の開発

町田雅之先生（金沢工業大学・ゲノム生物工学研究所）

ゲルマイクロドロップ（GMD）は直径50 μm程度のアガロースなどの微粒子で、フローサイトメータによるソーティングが可能である。酵素などのタンパク質遺伝子を組み込んだ微生物を変異処理して、1個のGMDに1細胞以下となるように包埋し、培養によってGMD内に分泌・捕獲されたタンパク質を蛍光標識することにより、高速に高分泌生産株をスクリーニングすることができる。本研究では、オンチップバイオテクノロジーズ社のマイクロ流路型装置を利用することにより、粒径の揃ったGMDの作製、分泌生産量を指標としたソーティングについて、極めて簡便・迅速に行えることが示された。現在行っている、酵母を用いた結果などについて紹介する。

株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ
東京都小金井市中町2-24-16 農工大・多摩小金井ベンチャーポート
042-385-0461　http://www.on-chip.co.jp　info@on-chip.co.jp

日本生物工学会 2019 年度大会
LS2-1　株式会社林原　ランチョンセミナー

日時　2019 年 9 月 17 日（火）12:00 ～ 12:50

場所　岡山大学一般教育棟 A　S1 会場＜A21＞
（岡山市北区津島中 2 丁目 1 番 1 号）

栄養素の吸収と食品成分による調節

～グルコーストランスポーターを中心に～

●講師

公立大学法人前橋工科大学　工学部　准教授

薩　秀夫 先生

「栄養素の腸管吸収を担うトランスポーターと食品成分による制御」

私たちが摂取する食品に含まれる栄養素は、腸管の最表面に位置する腸管上皮細胞にて吸収されます。腸管上皮細胞の管腔側にはトランスポーターと呼ばれるタンパク質が発現し、栄養素はそれぞれ選択的なトランスポーターを介して吸収されることが知られています。本講演では、栄養素の中でもグルコースなど単糖に注目し、腸管上皮での単糖吸収に関わるグルコーストランスポーターと食品成分の相互作用について、糖尿病予防を目指したこれまでの研究例を紹介します。さらに、新しい水溶性食物繊維「イソマルトデキストリン」のグルコーストランスポーターに対する作用についての最新知見も紹介します。

●講師

株式会社林原　研究部門　開発部　食品開発課

定清　剛

「新しい水溶性食物繊維『イソマルトデキストリン』の栄養素吸収調節作用」

酵素のチカラで澱粉から製造される「イソマルトデキストリン」は様々な食品に配合しやすい新しい水溶性食物繊維素材です。本講演では栄養素の吸収に与える「イソマルトデキストリン」の影響について、ヒト臨床試験の結果を中心に紹介します。

◆配布サンプル◆
イソマルトデキストリンを主成分とする
「ファイバリクサ® 顆粒」をご用意しています。

HAYASHIBARA NAGASE Group　株式会社 林 原　https://www.food.hayashibara.co.jp/

第７１回日本生物工学会大会

LS2-2

目的遺伝子のはたらきを調べる3つの異なるアプローチをあなたに

－DNA、RNA、タンパク質レベルでの遺伝子機能解析システムのご紹介－

目的遺伝子機能を解析する方法は、DNA、RNA、タンパク質のどのレベルからのアプローチが良いかは研究目的によって異なります。　重要な点は、最も効果的と思われるレベルで、解析実験法が効率よく、さらに簡単に行えるシステムを利用する点になります。
タカラバイオは遺伝子機能解析分野において、RNAレベルおよびタンパク質レベルでの機能解析を可能にするシステムに加えて、近年熱い注目を集めるゲノム編集CRISPR/Cas技術を取り入れたゲノムワイドで遺伝子スクリーニングを行うシステムを新たに開発しました。これにより、DNA、RNA、タンパク質すべての面から遺伝子機能解析が行える、以下のシステムをご提供しています。

DNAレベル
CRISPR/Casのノックアウトを利用した関連遺伝子特定のためのスクリーニングシステム
・Guide-it™ CRISPR Genome-Wide sgRNA Library System

RNAレベル
電気のスイッチを入れるように目的遺伝子の発現ON/OFF調節が可能
・Tet System

タンパク質レベル
細胞内の標的タンパク質の“量”を正確、迅速かつ可逆的に直接コントロール可能
・ProteoTuner™ Shield System
低分子化合物を用いてタンパク質間相互作用を自在に制御
・iDimerize™ Inducible System

本セミナーでは、これらシステムの特長を詳しくご紹介し、遺伝子機能解析を行われている皆さまへのお役立ち情報をご提供いたします。

日　時：9月**１７日**（火）１２：00 - 12：50

会　場：S4会場＜E11＞

演　者：大門　尚志
（タカラバイオ株式会社　営業企画部
テクニカルサポート担当　博士（医学））

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

SHIMADZU
Excellence in Science

第71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17日(火) 12:00～12:50

場所 S5 会場 (E21)

セミナー番号 LS2-3

講演1 代謝階層をまたいだ計測の意義とデータ可視化の役割

演者 松田 史生 先生　大阪大学大学院 情報科学研究科バイオ情報工学専攻

生物代謝機能を最大限に活用したものづくりへの期待に応えていくには、代謝に関する我々の理解をさらに一段高める必要がある。酵素発現量、代謝フラックス、代謝物濃度を計測し、その代謝状態の意味を解釈していくことが求められる。多量の計測データを可視化し、解釈していくための方法論について議論したい。

講演2 卓上型質量分析計による簡便な培養モニタリング

演者 緒方 是嗣　株式会社島津製作所 分析計測事業部 ライフサイエンス事業統括部 MSBU

簡便な前処理のみで分析が可能なMALDI-8020やDPiMS-2020は卓上に設置できる省スペース設計で、この質量分析計で得られた測定結果は、統計解析ソフトeMSTAT　solutionにより、微生物や細胞の培養状態のモニタリングに利用できる。このコンパクトなシステムで実現できる解析方法について紹介する。

株式会社 島津製作所　分析計測事業部　https://www.an.shimadzu.co.jp/

SANYO
TRADING CO.,LTD.

第71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 18日（水）12:00～12:50
S1会場　＜A21＞
講演番号：LS3-1

バイオプロセスラマン
ProCellics

～最新のバイオプロセス器材の紹介～

各種バイオプロセスセンサー
および低ストレス連続培養・細胞分離技術他

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、
その他様々な特長ある細胞培養装置、バイオプロセス器材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。

- （蛍光式）光学式バイオプロセスセンサー（DO/pH/CO_2）
- （固定化酵素式）グルコース・乳酸（糖代謝）モニター
- （ラマン分光法式）バイオプロセスラマン（グルコース・乳酸・グルタミン・アンモニウムイオン・生細胞・アミノ酸他）モニター
- 音響式連続細胞培養・デブリ分離ユニット　BioSep
- ステムセル（動物細胞）用シングルユースバイオリアクタなど。

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

第 71 回 日本生物工学会大会

天野エンザイム株式会社ランチョンセミナー（LS３-2）

『再生医療を酵素でサポートする』
―膵島移殖に貢献する酵素―

日時　**令和元年９月 18 日（水）**
12 時 00 分～12 時 50 分

会場　**岡山大学　津島キャンパス**
岡山県岡山市北区津島中

座長　天野エンザイム株式会社 マーケティング本部
取締役メディカル用酵素事業部長　山口　庄太郎

演者　東京農工大学　大学院農学研究院
応用生命化学部門　教授　**山形　洋平　先生**

膵島移植は、健常者の膵臓組織よりインスリン産生細胞である膵島のみを分離し、糖尿病患者へと移植する治療法である。移植手術が不要であることから、患者への負担が軽いという大きな利点がある。膵島細胞は、膵臓組織を酵素処理することにより分離されるが、相応しい膵臓のドナーの確保が容易でないため、ダメージの少ない膵島を高収率で回収することが大きな課題となっており、そのために用いられる酵素製剤を最適化することが考えられる。東北大学後藤教授、東京農工大学山形教授と当社の研究グループでは、Collagenase に加え、*Clostridium histolyticum* 由来の Clostripain および Clostlysin® (Neutral Protease)を組み合わせることで、膵島へのダメージを最小限に抑えつつ、膵島分離効率を向上させられることを明らかにした。

AMANO 酵素一無限の可能性を求めて 天野エンザイム
www.amano-enzyme.co.jp

第71回　日本生物工学会大会講演要旨集

二〇一九

日本生物工学会

第 71 回日本生物工学会大会講演要旨集

2019 年 8 月 9 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