第73回（2021年）

日本生物工学会大会
講演要旨集

会　期　2021（令和 3）年 10 月 27 日（水）～ 29 日（金）

会　場　Zoom によるオンライン形式

公益社団法人 日本生物工学会

第73回
日本生物工学会大会
（2021）

一般講演・シンポジウム

会　期　2021年10月27日（水）～29日（金）
会　場　Zoomによるオンライン形式（H1～H7会場）

授賞式典・受賞講演

日　時　2021年10月27日（水）9：00～11：30
会　場　Zoomによるオンライン形式（H1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　2021年10月27日（水）18：00～20：00
会　場　Zoomによるオンライン形式（H1会場）

ランチタイムセミナー

期　間　2021年10月27日（水）～29日（金）12：00～13：00
会　場　Zoomによるオンライン形式（H5，H7会場）

展示会

期　間　2021年10月27日（水）～29日（金）9：00～17：30
会　場　WebおよびZoomによるオンライン形式

生物工学若手研究者の集い（若手会）

日　時　2021年10月28日（木）18：00～20：00
会　場　Zoomによるオンライン形式（H4会場）

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)

一般講演発表日程・演題番号表…… (6)

実行委員会担当者表…… (8)

受賞者一覧…… (9)

各種講演番号の見方…… (10)

プログラム

第1日目　授賞式，受賞講演，ランチタイムセミナー，シンポジウム …… (11)

第2日目　受賞講演，一般講演，ランチタイムセミナー，シンポジウム …… (15)

第3日目　受賞講演，一般講演，ランチタイムセミナー，シンポジウム …… (38)

要旨

第1日目　受賞講演 …… (63)

シンポジウム …… (65)

第2日目　受賞講演 …… (79)

シンポジウム …… (80)

一般講演 …… (98)

第3日目　受賞講演 …… (161)

シンポジウム …… (162)

一般講演 …… (175)

人名索引…… (241)

ランチタイムセミナープログラム…… (255)

ランチタイムセミナー要旨…… (256)

大会日程表

10月27日（水）

会場	午　前 9:00-11:30	昼 12:00-13:00	午　後		
			13:00-15:00(～16:00)	15:30-17:30	18:00-20:00
H1 会場	授賞式・受賞講演（功労賞，生物工学賞，功績賞，技術賞）		[S]バイオ戦略2020で目指すバイオエコノミー社会に向けての取り組み【本部企画】（～16:00）		懇親会
H2 会場			[S]「ゲノム合成」という方法論の秘めた可能性を考える	[S]創薬モダリティを支えるために次世代型遺伝子導入・ゲノム操作技術ができること	
H3 会場			[S]醸造技術の新展開 ―原料～醸造のこれから―【本部企画】	[S]泡盛の基盤研究と産業応用―地域特産品の研究成果を活用するには―	
H4 会場					
H5 会場		[L]株式会社ワイエムシィ			
H6 会場					
H7 会場		[L]ベックマン・コールター株式会社			

10月28日（木）

会場	午　前 9:00-12:00						昼 12:00-13:00	午　後 13:00-20:00		
	9:00-9:30	9:30-10:00	10:00-10:30	10:30-11:00	11:00-11:30	11:30-12:00		13:00-15:00（～16:00）	15:30-17:30	18:00-20:00
H1 会場	受賞講演（江田賞）（～9:20）		分類, 系統, 遺伝学/遺伝子工学		遺伝子工学			[S]持続型・循環利用型社会を実現する複合微生物工学研究の最前線と展望	[S]カーボンリサイクルに貢献する微生物	
H2 会場		受賞講演（斎藤賞）（～9:50）		遺伝子工学		遺伝子工学		[S]バイオとデジタルの融合による世界最先端のバイオエコノミー社会の実現に向けて ～データ駆動型バイオテクノロジーを支えるデータプラットフォーム～	[S]バイオエコノミーとグローカルバイオテクノロジー	
H3 会場	酵素学, 酵素工学		酵素学, 酵素工学		生体情報工学，バイオインフォマティクス/システムバイオロジー			[S]再構成的アプローチによる生物システムの理解と工学的活用	[S]大学ブランドのお酒造りから学ぶ発酵醸造学	
H4 会場		酵素学, 酵素工学		酵素学, 酵素工学		バイオセンシング, 分析化学/センサー, 計測工学				若手会
H5 会場	発酵生理学，発酵工学		代謝工学		生合成, 天然物化学/有機化学，高分子化学		[L]天野エンザイム株式会社 / 株式会社樋口松之助商店			
H6 会場		発酵生理学，発酵工学		代謝工学		核酸工学/ペプチド工学/脂質工学/糖鎖工学		[IS]Biotechnology for SDGs（～16:00） ＊KSBB, BEST招待講演を含む		
H7 会場	生体医用工学		植物細胞工学，組織培養，育種工学/セル＆ティッシュエンジニアリング		セル＆ティッシュエンジニアリング		[L]国立研究開発法人 科学技術振興機構（JST）			

10月29日（金）

会場	午　前 9:00-12:00						昼 12:00-13:00	午　後 13:00-17:30	
	9:00-9:30	9:30-10:00	10:00-10:30	10:30-11:00	11:00-11:30	11:30-12:00		13:00-15:00	15:30-17:30
H1 会場	受賞講演（照井賞）（～9:20）		環境浄化，修復，保全技術		環境工学，廃水処理技術			[S] 食のおいしさの計測科学の現状と課題【本部企画】	[S] バイオ分析の医療展開を目指して―ネオホストバイオテクノロジーの創成―
H2 会場		環境浄化，修復，保全技術/バイオマス，資源，エネルギー工学		バイオマス，資源，エネルギー工学		バイオマス，資源，エネルギー工学		[S] 国内バイオリソースと極限環境生物研究の融合による産業シーズの開拓	[S] 未培養微生物（微生物ダークマター）の分離・培養・開拓の新展開
H3 会場	生物化学工学		生物化学工学		生物化学工学			[S] 酢酸菌ナノセルロース研究の最前線：合成の分子メカニズムと応用	[S] 日本における海洋生分解性プラスチック開発の最先端
H4 会場		培養工学		バイオプロセス		タンパク質工学/抗体工学			
H5 会場	酵素学，酵素工学/タンパク質工学		タンパク質工学		タンパク質工学		[L] 株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ		
H6 会場		発酵生理学，発酵工学/代謝工学		代謝工学/オミクス解析		オミクス解析			
H7 会場	受賞講演（アジア若手賞）（～9:20）		醸造学，醸造工学		醸造学，醸造工学/食品科学，食品工学				

S：シンポジウム
IS：国際シンポジウム
L：ランチタイムセミナー

一般講演発表日程・演題番号表

一般講演発表日：10月28日（木）午前および10月29日（金）午前
会場　　：H1会場～H7会場
発表・討論時間：それぞれのブレークアウトルームで30分間参加者と討議

*演題番号の見方：　例　G2H5-0315 (第2日目　H5会場　03：11時台　15番のブレークアウトルーム）

分野	Session	第2日目（10月28日）		
		9:00-9:30	9:30-10:00	10:00-10:30
遺伝学，分子生物学および遺伝子工学	Genetics, Molecular, Biology, and Gene engineering			
1 分類，系統，遺伝学	1 Taxonomy, phylogenetics			G2H1-0201～0207
2 遺伝子工学	2 Genetic engineering			G2H1-0208～0212
酵素学，タンパク質工学および酵素工学	Enzymology, Protein engineering, and Enzyme technology			
3 酵素学，酵素工学	3 Enzymology, enzyme	G2H3-0101～0113	G2H4-0101～0113	G2H3-0201～0213
4 タンパク質工学	4 Proteins			
5 抗体工学	5 Antibody engineering			
代謝生理学・発酵生産	Metabolism and Fermentation production			
6 発酵生理学，発酵工学	6 Fermentation physiology, fermentation technology	G2H5-0101～0112	G2H6-0101～0112	
7 代謝工学	7 Metabolic engineering			G2H5-0201～0212
8 オミクス解析	8 Omics technology			
醸造・食品工学	Brewing and Food technology			
9 醸造学，醸造工学	9 Brewing, brewing technology			
10 食品科学，食品工学	10 Food science, food technology			
環境バイオテクノロジー	Environmental biotechnology			
11 環境浄化，修復，保全技術	11 Bioremediation			
12 環境工学，廃水処理技術	12 Environmental technology, wastewater treatment			
13 バイオマス，資源，エネルギー工学	13 Biomass, bioresource and energy engineering			
生物化学工学	Biochemical engineering			
14 生物化学工学	14 Biochemical engineering			
15 培養工学	15 Cell culture engineering			
16 バイオプロセス	16 Bioprocess engineering			
植物バイオテクノロジー	Plant cell technology			
17 植物細胞工学，組織培養，育種工学	17 Plant cell / tissue engineering			G2H7-0201～0202
動物バイオテクノロジー	Animal cell technology			
18 生体医用工学	18 Biomedical engineering	G2H7-0101～0113		
19 セル＆ティッシュエンジニアリング	19 Cell and tissue engineering			G2H7-0203～0213
バイオ情報工学	Bioinformation technology			
20 生体情報工学，バイオインフォマティクス	20 Bioinformatics			
21 システムバイオロジー	21 Systems biology			
分析計測化学	Analytical chemistry and Measuring devise			
22 バイオセンシング，分析化学	22 Biosensing and analytical chemistry			
23 センサー，計測工学	23 Sensors and monitoring devices			
生体関連化学	Biofunctional chemistry			
24 生合成，天然物化学	24 Biosynthesis, natural organic chemistry			
25 有機化学，高分子化学	25 Organic chemistry, polymer chemistry			
生体分子工学	Biomolecular engineering			
26 核酸工学	26 Nucleic acid engineering			
27 ペプチド工学	27 Peptide engineering			
28 脂質工学	28 Lipid engineering			
29 糖鎖工学	29 Glycoengineering			

第2日目（10月28日）			第3日目（10月29日）					
10:30-11:00	11:00-11:30	11:30-12:00	9:00-9:30	9:30-10:00	10:00-10:30	10:30-11:00	11:00-11:30	11:30-12:00
G2H2-0201～0212	G2H1-0301～0312	G2H2-0301～0312						
G2H4-0201～0213			G3H3-0101～0107					
			G3H5-0108～0113		G3H5-0201～0213		G3H5-0301～0313	G3H4-0301
								G3H4-0302～0313
				G3H6-0101～0104				
G2H6-0201～0211				G3H6-0105～0112		G3H6-0201～0207		
						G3H6-0208～0211		G3H6-0301～0311
					G3H7-0201～0215		G3H7-0301～0304	
							G3H7-0305～0315	
				G3H2-0101～0109	G3H1-0201～0215			
							G3H1-0301～0315	
				G3H2-0110～0115		G3H2-0201～0215		G3H2-0301～0315
			G3H3-0101～0114		G3H3-0201～0213		G3H3-0301～0313	
				G3H4-0101～0113				
						G3H4-0201～0213		
	G2H7-0301～0313							
	G2H3-0301～0305							
	G2H3-0306～0311							
		G2H4-0301～0312						
		G2H4-0313						
	G2H5-0301～0311							
	G2H5-0312							
		G2H6-0301						
		G2H6-0302～0306						
		G2H6-0307～0311						
		G2H6-0312～0315						

第73回日本生物工学会大会（2021）

実行委員会・業務分担（○：責任者）

実行委員長	上平 正道
副実行委員長	外山 博英
総務	○河邉 佳典・平良 東紀・神谷 典穂
会計	○水谷 治・田代 幸寛
広報	○花井 泰三・外山 博英
プログラム・ トピックス	○神谷 典穂・中山 二郎・竹川 薫・後藤 正利・小林 元太・榊原 陽一・ 坂本 寛・田口 久貴・田代 幸寛・玉置 尚徳・仲山 英樹・花井 泰三・ 馬場 健史・森村 茂・関 清彦・陶山 明子・伊東 祐二・小田 達也・ 井嶋 博之・善藤 威史・樋口 裕次郎・南畑 孝介・酒井 謙二・寺本 祐司・ 岡 拓二
シンポジウム	○井嶋 博之・林 圭・馬場 健史
授賞式	○酒井 謙二・河邉 佳典
懇親会	○平良 東紀・外山 博英・章 超
顧問	園元 謙二・水光 正仁・安部 淳一・光富 勝・木田 建次・原島 俊

日本生物工学会　2021年度学会賞受賞者

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40回　生物工学賞　五味　勝也（東北大学大学院農学研究科・教授）
「醸造微生物の分子生物工学研究と発酵生産分野への応用技術開発」

■第15回　生物工学功績賞　竹山　春子（早稲田大学理工学術院・教授）
「環境微生物資源の有効利用のためのシングルセル解析技術の開発と展開研究」

■第15回　生物工学功労賞　水光　正仁（宮崎大学 理事・副学長）
「蛋白質硫酸化に関する研究，人材育成，並びに学会活動を通した生物工学分野への貢献」

■第54回　生物工学奨励賞（江田賞）　金井　宗良（酒類総合研究所醸造微生物研究部門・主任研究員）
「清酒酵母の機能性成分高蓄積機構とその応用に関する研究」

■第57回　生物工学奨励賞（斎藤賞）　諸星　知広（宇都宮大学工学部・准教授）
「細菌間コミュニケーション機構の解析とその応用」

■第44回　生物工学奨励賞（照井賞）　小西　正朗（北見工業大学工学部・教授）
「成分分析と機械学習を用いた微生物培地解析に関する研究」

■第30回　生物工学技術賞　栗本　昌樹[1]・久保　智里[1]・越智　浩[1]・本多　裕之[2]・大河内美奈[3]
（[1]森永乳業株式会社，[2]名古屋大学，[3]東京工業大学）
「『ペプチドアレイ』を基盤とする低抗原性生理活性ペプチドの製造に関する研究」

■第18回　生物工学アジア若手賞（Young Asian Biotechnologist Prize）　Rodney Honrada Perez
（University of the Philippines Los Baños, Philippines）
Multiple bacteriocin production and the novel circular bacteriocin of newly isolated lactic acid bacteria

■第10回　生物工学アジア若手研究奨励賞（DaSilva Award）　Hui-Suan Ng (Grrace)（UCSI University, Malaysia）
An integrated approach for sustainable production of keratinase using aqueous biphasic electrophoresis

■第29回　生物工学論文賞

1）**Tee-Kheang Ng[1]・Ai-QunYu[1]・Hua Ling[1]・Nina Kurniasih Pratomo Juwono[1]・Won Jae Choi[1,2]・Susanna Su Jan Leong[1,3]・Matthew Wook Chang[1]**
（[1]National University of Singapore，[2]Agency for Science, Technology and Research in Singapore (A*STAR), [3]Singapore Institute of Technology）
Engineering *Yarrowia lipolytica* towards food waste bioremediation: Production of fatty acid ethyl esters from vegetable cooking oil

2）**Farhana Easmin[1]・笹野　佑[1]・木村　駿太[2]*・Naim Hassan[1]**・浴野　圭輔[1]・田口　久貴[1]・原島　俊[1]**
（[1]崇城大学，[2]大阪大学，*現，味の素AGF，**現，東北大学）
CRISPR-PCD and CRISPR-PCRep: Two novel technologies for simultaneous multiple segmental chromosomal deletion/replacement in *Saccharomyces cerevisiae*

3）**岡野　憲司[1]・朱　倩沁[1]・本田　孝祐[1]**
（[1]大阪大学）
In vitro reconstitution of non-phosphorylative Entner–Doudoroff pathway for lactate production

4）**明戸　剛[1,2]・星川優美子[1]・野島　大佑[1]・屋部　佑介[1]・前田　義昌[1]・吉野　知子[1]・高野　博幸[2]・田中　剛[1]**
（[1]東京農工大学，[2]太平洋セメント株式会社）
Selection and characterization of microalgae with potential for nutrient removal from municipal wastewater and simultaneous lipid production

5）**Aniruddha Bhalerao[1]・Rintu Banerjee[2]・Regina Nogueira[1]**
（[1]Leibniz University Hannover，[2]Indian Institute of Technology）
Continuous cultivation strategy for yeast industrial wastewater-based polyhydroxyalkanoate production

6）**眞榮田麻友美[1,2]*・本底　麻綸[2]・渡嘉敷建孝[3]・渡嘉敷直杏[1,2]・水谷　治[1,2]・上地　敬子[2]・後藤　正利[1,4]・平良　東紀[1,2]**
（[1]鹿児島大学，[2]琉球大学，[3]石川種麹店，[4]佐賀大学，*現，東京農業大学）
Phenolic acid decarboxylase of *Aspergillus luchuensis* plays a crucial role in 4-vinylguaiacol production during *awamori* brewing

7）**徳山　健斗[1]・下平　祥貴[1]・寺脇　貴弘[1]・楠瀬　泰弘[1]・中井　裕章[2]*・辻　雄一郎[2]**・戸谷　吉博[3]・松田　史生[3]・清水　浩[3]**
（[1]味の素株式会社，[2]味の素アニマル・ニュートリション・ヨーロッパ社，[3]大阪大学，*現，味の素株式会社，**現，欧州味の素食品社）
Data science-based modeling of the lysine fermentation process

■第10回　生物工学学生優秀賞（飛翔賞）

1）**河田　早矢**（東北大学大学院工学研究科）
「次世代シークエンサーからの大規模配列情報と連携した抗体の進化分子工学プロセスの開発」

2）**井上　暁人**（東京工業大学生命理工学院）
「ナノ抗体を用いた蛍光免疫センサとその高感度化のための酵母提示選択法の開発」

3）**木村　和恵**（名古屋大学大学院創薬科学研究科）
「ゲノムシャッフリングとデータ拡張技術を用いた細胞品質解析の高度化」

4）**戸田　成美**（広島大学大学院統合生命科学研究科）
「捕食圧下における藍藻の細胞形態変化の解析」

5）**守田　湧貴**（九州大学大学院生物資源環境科学府）
「黄麹菌のタンパク質品質管理機構に関する分子細胞生物学的解析」

各種講演番号の見方

受賞講演

```
A  1  H1 - 00 01
|  |  |      |  |
|  |  |      |  受賞講演内No.（発表順）
|  |  |      受賞講演は00固定
|  |  H1，H2，H7：ホスト名
|  1：1日目，2：2日目，3：3日目
A：受賞講演
```

シンポジウム

```
S  1  H1 - 01 01
|  |  |      |  |
|  |  |      |  課題内No.（発表順）
|  |  |      課題毎No.
|  |  H1，H2，H3，H6：ホスト名
|  1：1日目，2：2日目，3：3日目
S：シンポジウム
```

一般講演

```
G  2  H1 - 01 01
|  |  |      |  |
|  |  |      |  ブレイクアウトルームNo.
|  |  |      開始時間（01：9時台，02：10時台，03：11時台）
|  |  H1～H7：ホスト名
|  2：2日目，3：3日目
G：一般講演
```

ランチタイムセミナー

```
L  1  H5 - 00 01
|  |  |      |  |
|  |  |      |  ブレイクアウトルームNo.
|  |  |      ランチタイムセミナーは00固定
|  |  H5，H7：ホスト名
|  1：1日目，2：2日目，3：3日目
L：ランチタイムセミナー
```

第 1 日（10 月 27 日）

開始時間	講演番号	演　　題	発表者氏名（所属） ○印は講演者を示す

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

H1 会場（9:00〜11:30）

授賞式

9:00 会長挨拶

9:05 KSBB 会長挨拶

9:10 功労会員推戴

9:20 各賞授賞

9:55 A1H1-0001 **〈生物工学功労賞〉**

生物工学会功労賞受賞にあたって

…… ○水光 正仁（宮崎大学）

10:05 A1H1-0002 **〈生物工学賞〉** 座長：**髙木 昌宏**

醸造微生物の分子生物工学研究と発酵生産分野への応用技術開発

…… ○五味 勝也（東北大院・農）

10:40 A1H1-0003 **〈生物工学功績賞〉** 座長：**福﨑 英一郎**

環境微生物資源の有効利用のためのシングルセル解析技術の開発と展開研究

…… ○竹山 春子[1,2,3,4]

（[1]早大・先進理工, [2]早大・ナノ・ライフ機構, [3]産総研・早大 CBBD-OIL, [4]早大・先進生命動態研）

11:10 A1H1-0004 **〈生物工学技術賞〉** 座長：**秦 洋二**

「ペプチドアレイ」を基盤とする低抗原性生理活性ペプチドの製造に関する研究

…… ○栗本 昌樹[1], 久保 智里[1], 越智 浩[1], 本多 裕之[2], 大河内 美奈[3]

（[1]森永乳業, [2]名大院・工, [3]東工大・物質理工）

ランチタイムセミナー

L1H5-0001 株式会社ワイエムシィ

H5 会場（12:00〜13:00）

L1H7-0001 ベックマン・コールター株式会社

H7 会場（12:00〜13:00）

シンポジウム

H1 会場（13:00〜16:00）

【本部企画】バイオ戦略 2020 で目指すバイオエコノミー社会に向けての取り組み

13:00 はじめに
……今井 泰彦
座長：**今井 泰彦**

13:02 S1H1-0101 バイオエコノミー社会の実現に向けたバイオ戦略の新たな展開
……○宇井 伸一（内閣府 科学技術・イノベーション推進事務局）

13:42 S1H1-0102 経済産業省におけるバイオ産業政策の方向性について
……○保田 友晶（経済産業省）
座長：**髙木 忍**

14:12 S1H1-0103 三菱ケミカルのバイオプラスチック開発
……○加藤 聡（三菱ケミカル）
座長：**岡 賀根雄**

14:47 S1H1-0104 廃棄物をバイオプラスチックに ～バイオ技術によるサーキュラーエコノミーへの貢献～
……○小間 聡（積水化学工業 新事業開発部 BR グループ）
座長：**安原 貴臣**

15:22 S1H1-0105 メタン発酵技術を利用した資源の有効活用
……○東森 義和（霧島酒造）

15:57 おわりに
……安原 貴臣

H2 会場（13:00〜15:00）

「ゲノム合成」という方法論の秘めた可能性を考える

13:00 はじめに
……相澤 康則
座長：**相澤 康則**

13:05 S1H2-0201 合成生物学における新規ゲノム工学技術（CRAGE）の可能性
……○吉国 靖雄（Lawrence Berkeley National Laboratory）

13:35 S1H2-0202 大腸菌のメガサイズゲノムの合成と移植の技術
……○末次 正幸（立教大・理）
座長：**高木 博史**

14:00 S1H2-0203 マウス／ヒト人工染色体によるデザイナー細胞・動物の作製と応用
……○香月 康宏（鳥取大・染工セ）

14:25 S1H2-0204 ヒト細胞ゲノム大規模改変技術の開発とその応用
……○相澤 康則（東工大・生命理工）

14:55 おわりに
……高木 博史

H2 会場（15:30〜17:30）

創薬モダリティを支えるために次世代型遺伝子導入・ゲノム操作技術ができること

15:30 はじめに
……河邉 佳典
座長：**河邉 佳典**

15:35 S1H2-0301 ステルス型 RNA ベクターの開発
……○中西 真人（ときわバイオ株式会社）

16:00 S1H2-0302 ウイルス様粒子を用いた新規 CRISPR-Cas システムの送達技術の開発
……○奥嵜 雄也（名大院・生命農学）

16:25 休憩
座長：**金岡 英徳**

16:35 S1H2-0303 新規トランスポゾンベクターの開発
……○隈元 拓馬（都医学研）

17:00 S1H2-0304 低コスト製造技術を用いた CAR-T 細胞製品の開発
……○小笠原 隆広, 岡田 拓也, 鈴木 優衣, 飯塚 晃, 井家 益和
（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）

17:25 おわりに
……金岡 英徳

H3 会場（13:00〜15:00）

【本部企画】醸造技術の新展開—原料〜醸造のこれから—

13:00 はじめに
……明石 貴裕
座長：**明石 貴裕**

13:05 S1H3-0401 酒造用原料米の最近の展開
……○奥田 将生（酒総研）

13:25 S1H3-0402 近接リモートセンシングを活用した「山田錦」の生産安定技術の確立
……○有吉 真知子[1], 村田 資治[1], 金子 和彦[1], 徳永 哲夫[1], 荒木 英樹[2]
（[1]山口農林総合技術セ, [2]山口大・農）
座長：**赤尾 健**

13:45 S1H3-0403 霧島酒造における芋焼酎の原料確保に向けた取組
……○藤田 剛嗣（霧島酒造）

14:10 S1H3-0404 ワイン用ブドウの栽培環境と品質特性
……○小山 和哉, 大浜 友子, シャロンマリエガリド, 後藤(山本) 奈美（酒総研）
座長：**秦 洋二**

14:35 S1H3-0405 リポキシゲナーゼ-1 欠失ビールオオムギ品種の育成とビール品質向上
……○保木 健宏（サッポロビール）

15:00 おわりに
……秦 洋二

H3 会場（15:30〜17:30）

泡盛の基盤研究と産業応用—地域特産品の研究成果を活用するには—

15:30 はじめに
…… 平良 東紀

座長：**平良 東紀**

15:35 S1H3-0501 泡盛業界と研究機関の連携の試み
…… ○外山 博英（琉球大・農）

15:45 S1H3-0502 *Aspergillus luchuensis* の系統解析とその利用
…… ○塚原 正俊（バイオジェット）

16:05 S1H3-0503 黒麹菌による泡盛古酒香バニリン前駆体の生成過程
…… ○眞榮田 麻友美（東農大・応生科）

座長：**塚原 正俊**

16:25 S1H3-0504 アミノ酸に着目した酵母の育種と泡盛醸造への応用
…… ○高木 博史（奈良先端大・バイオ）

16:45 S1H3-0505 泡盛フレーバーホイールの作成と活用
…… ○宮本 宗周（在上海日本国総領事館）

17:05 S1H3-0506 泡盛蒸留粕を原料とする新規乳酸菌飲料の開発
…… ○上間 長亮（石川酒造場）

17:25 おわりに
…… 塚原 正俊

第 2 日（10 月 28 日）

太字の一般講演は今年度の生物工学学生優秀賞（飛翔賞）受賞者の発表です.

開始時間	講演番号	演　　題	発表者氏名（所属） ○印は講演者を示す

受賞講演（生物工学奨励賞（江田賞・斎藤賞））

H1 会場（9:00〜9:20）

9:00 A2H1-0001 **〈生物工学奨励賞（江田賞）〉** 座長：**吉田 聡**

清酒酵母の機能性成分高蓄積機構とその応用に関する研究

…… ○金井 宗良（酒総研）

H2 会場（9:30〜9:50）

9:30 A2H2-0001 **〈生物工学奨励賞（斎藤賞）〉** 座長：**高木 博史**

細菌間コミュニケーション機構の解析とその応用

…… ○諸星 知広（宇都宮大・工）

一般講演

H1 会場（10:00〜10:30）

【分類，系統，遺伝学】

10:00 G2H1-0201 へそ汚れを構成する菌叢とニオイとの関係性

…… ○矢野 剛久, 岡島 孝雄, 土屋 成輝, 辻村 久, 高木 豊（花王）

10:00 G2H1-0202 ショウジョウバエからの野生酵母の単離と産業への展開

…… ○清家 泰介[1], 武方 宏樹[2], 阪田 奈津枝[3], 古澤 力[3], 松田 史生[1]

（[1]阪大院・情報, [2]琉球大・理, [3]理研・生命機能）

10:00 G2H1-0203 自家蛍光分析で可視化する多様な細胞死プロセス

…… ○張 譯云[1], 高部 響介[3], 下段 千尋[2], 野村 暢彦[3,4], 八幡 穣[3,4]

（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大, [3]筑波大・生命環境系,
[4]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター）

10:00 G2H1-0204 ヤマブシタケ抽出物に含まれるバイオフィルム阻害タンパク質の精製と解析

…… ○濱治 百々子[1], 石丸 隆行[2], 飯田 亮平[2], 阿座上 弘行[1,3]

（[1]山口大院・創成科学, [2]宇部フロンティア大・食物栄養, [3]山口大学・中高温微セ）

10:00 G2H1-0205 放線菌 *Streptomyces* 属プラスミドの接合伝達関連遺伝子による染色体移行現象

…… ○溝脇 朱音, 深田 悠太, 片岡 正和（信州大院・生命医工）

10:00 G2H1-0206 RP4 の大腸菌-放線菌間での接合伝達に必要な最小 *oriT* 領域の特定

…… ○猪又 俊輔, 深田 悠太, 片岡 正和（信州大学院・生命医工）

10:00 G2H1-0207 魚病細菌 *Lactococcus garvieae* とその近縁種の全ゲノム配列に基づく識別および Multiplex PCR を用いた簡易識別法の開発

…… ○金川 怜美[1], 纐纈 智也[1], 小池 里佳[2], 古橋 佑真[1], ジラポンパイロ ワリッサラ[1], 久田 孝[2], 木村 凡[2], 高橋 肇[2], 庵原 啓司[1], 下平 潤[1]
([1]マルハニチロ株式会社, [2]東京海洋大学)

【遺伝子工学】

10:00 G2H1-0208 キンギョを利用した新規抗体遺伝子の取得

…… ○小幡 宏志郎[1], 山田 紗里奈[1], 田丸 浩[1,2,3]
([1]三重大院・生資, [2]三重大・先端バイオ, [3]三重大・スマートセル研)

10:00 G2H1-0209 ナノ空間反応場を利用した新型コロナウイルス RNA の超高感度検出技術の開発

…… ○松浦 俊一[1], 馬場 知哉[2], 池田 卓史[1], 金 良鏡[1], 夏井 望[1], 阿部 慈旺里[1], 山口 有朋[1]
([1]産総研・化学プロセス, [2]遺伝研・先端ゲノミクス)

10:00 G2H1-0210 T7 ファージによる蛋白質の折りたたみ改善配列の自律探索

…… 宮本 萌衣[1], ○河原崎 泰昌[1], 田中 瑞己[1,2] ([1]静県大・食栄, [2]農工大院・農)

10:00 G2H1-0211 オリゴ DNA を用いた新規遺伝子合成法の開発

…… ○猿渡 雄哉, 高橋 宏和, 岡村 好子 (広島大院・統合生命科学)

10:00 G2H1-0212 CDS の塩基配列が mRNA の安定性に及ぼす影響の解析

…… ○照山 拓海, 加藤 晃, 山﨑 将太朗, 川邊 陽文, 西村 侑美 (奈良先端大・バイオ)

H1 会場 (11:00〜11:30)

【遺伝子工学】

11:00 G2H1-0301 35S プロモーターのコアプロモーター領域への改変が転写開始点へ与える影響

…… ○斉藤 康平, 山﨑 将太朗, 川邊 陽文, 西村 侑美, 加藤 晃 (奈良先端大・先端科学技術)

11:00 G2H1-0302 結合領域周辺における DNA 構造パラメーターに基づく麹菌由来転写因子 AoXlnR の転写結合メカニズム予測モデルの構築

…… ○岡 大椰[1], 兒島 孝明[1], 加藤 竜司[2], 井原 邦夫[3], 中野 秀雄[1]
([1]名大院・生命農学, [2]名大院・創薬, [3]名大・遺伝子実験施設)

11:00 G2H1-0303 Novel molecular mechanism mediated by $Zn(II)_2Cys_6$ transcription factors regulating sclerotia formation in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

…… ○Xueyan Sun[1], Haruka Minagawa[1], Takuya Katayama[1,2], Hiroya Oka[3], Masahiro Ogawa[4], Takaaki Kojima[3], Hideo Nakano[3], Katsuhiko Kitamoto[5], Jun-ichi Maruyama[1,2]
([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., [4]Noda Inst. Sci. Res., [5]Nihon Pharmaceutical Univ.)

11:00 G2H1-0304 空間的な病理組織のゲノム変異およびトランスクリプトーム統合解析技術の開発

…… ○山崎 美輝[1,2], 松永 浩子[3], 細川 正人[4], 有川 浩司[3], 鈴木 直子[3], 林 大久生[5], 竹山 春子[1,2,3,6]
([1]早大院・先進理工, [2]産総研・早大 CBBD-OIL, [3]早大・ナノライフ創新研, [4]早大・理工総研, [5]順大・人体病理病態学講座, [6]早大・生命動態研)

11:00 G2H1-0305 組織空間的な転写産物解析によるマウス心機能発現制御機構の解析

…… ○松永 浩子[1], 牧野 祐樹[2], 杉山 夏緒里[4,5], 我妻 竜太[2,3], 山崎 美輝[2,3], 鈴木 直子[1], 濱口 悠[2], 浜田 道昭[2,3], 竹山 春子[1,2,3,5]
([1]早大・ナノライフ創新研, [2]早大院・先進理工, [3]産総研・早大 CBBD-OIL, [4]早大・理工総研, [5]早大・生命動態研)

11:00 G2H1-0306 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* におけるキチン資化遺伝子の発現調節機構の解明
……○米谷 舞衣[1], Chen Yamin[1], 折田 和泉[1], 今中 忠行[2], 福居 俊昭[1]
([1]東工大・生命理工, [2]立命館大・生命科学)

11:00 G2H1-0307 糸状菌における鉄恒常性維持のマスター制御因子 HapX と相互作用するタンパク質の機能解析
…… ○小林 吉生, 三浦 綾夏, 榊原 誠也, 辻上 誠也, 志水 元亨, 加藤 雅士
(名城大院・農)

11:00 G2H1-0308 キシロース発酵性酵母 *Spathaspora passalidarum* における遺伝子破壊法の確立
……○豊留 あいり[1], 山城 裕孝[2], 笹野 佑[1,2], 田口 久貴[1,2]
([1]崇城大院・工, [2]崇城大・生物生命)

11:00 G2H1-0309 新規ゲノム編集ツール TiD を用いたヒト細胞のゲノム編集
……○和田 直樹[1], 村上 愛美[1], 丸井 和也[1], 宮下 尚之[2], 刑部 祐里子[3], 刑部 敬史[1]
([1]徳島大院・社会産理工, [2]近畿大院・生物理工, [3]東工大・生命理工)

11:00 G2H1-0310 クエン酸高生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L の育種を目的とした CRISPR/Cas9 システムを利用した遺伝子置換法の開発
……○吉岡 育哲[1,2], 桐村 光太郎[1,2] ([1]早大院・先進理工, [2]早大・理工総研)

11:00 G2H1-0311 *Actinoplanes* 属放線菌 NBRC14279 株のゲノム解析
…… 近藤 永遠[1], 森田 大地[2], 黒田 照夫[2], ○熊谷 孝則[2]
([1]広島大・薬, [2]広島大院・医系科学)

11:00 G2H1-0312 ナノポアシークエンサーを用いたシロイヌナズナ 3'UTR の解析
…… ○藤巻 篤史, 山﨑 将太朗, 川邊 陽文, 加藤 晃 (奈良先端大・バイオ)

H2 会場 (10:30〜11:00)

【遺伝子工学】

10:30 G2H2-0201 PromA 群に属する新たな広宿主域プラスミドベクターの構築
……○上條 達哉[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)

10:30 G2H2-0202 これまで見過ごされてきた広宿主域 PromA 群プラスミドの性状分析
……○山本 雪絵[1], 陶山 哲志[2], 髙木 妙子[2], 大田 悠里[2], 野田 尚宏[2], 金原 和秀[1], 新谷 政己[1]
([1]静大院・総合科技, [2]産総研・バイオメディカル)

10:30 G2H2-0203 大腸菌プラスミドへの高頻度なトランスポゾン挿入現象
…… ○中村 美紀子[1], 相原 惇也[3], 鈴木 絢子[2], 星田 尚司[3], 赤田 倫治[3]
([1]信州大・基盤セ, [2]大分大・工, [3]山口大・工)

10:30 G2H2-0204 長鎖反復配列遺伝子の相同組換え頻度の解析
…… ○石川 聖人[1,2], 堀 克敏[1] ([1]名大院・工, [2]JST・さきがけ)

10:30 G2H2-0205 異なる酸素濃度がもたらすプラスミドの接合伝達頻度と宿主への影響
…… ○久野 航裕[1], 越智 健太郎[1], 徳田 真穂[1], 柳谷 洸輔[1], 水口 千穂[2], 野尻 秀昭[2], 雪 真弘[3], 大熊 盛也[3], 金原 和秀[1], 新谷 政己[1]
([1]静大院・総合科技, [2]東大院・農生科, [3]理研・バイオリソース)

10:30 G2H2-0206 *Geobacillus thermodenitrificans* K1041 の高効率形質転換は何を可能にするか
…… ○小山 幸祐[1], 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)

10:30 G2H2-0207 バイオプラスチック合成能力を有する *Cobetia* 属細菌の遺伝子組換え系の構築
…… ○梅林 勇気[1], 阿部 汐里[1], 河合 盛進[2], 鈴木 宏昭[2], 山田 美和[1]
([1]岩手大・農, [2]トヨタ紡織株式会社・新領域開拓部)

10:30 G2H2-0208 エピソーマルベクターを用いたオイル高生産珪藻 *Fistulifera solaris* の形質転換法の確立
……○藤井 大河[1], 渡邉 かほり[1], 前田 義昌[1], 吉野 知子[1], 松本 光史[2], 田中 剛[1]
([1]農工大院・工, [2]電源開発)

10:30 G2H2-0209 出芽酵母 *Ygr067C* プロモーターを利用した難生産性組換え蛋白質発現系
……○栗田 涼子[1], 長嶋 美乃里[2], 田中 瑞己[1,2,3], 河原崎 泰昌[1,2]
([1]静県大院・薬食生命, [2]静県大・食栄, [3]農工大院・農)

10:30 G2H2-0210 微細藻類 *Chlamydomonas* における安定的外来遺伝子発現株の開発
……○秋山 立幹[1], 河邉 佳典[1], 黄 冠[2], 白川 和輝[1], 上平 正道[1,2]
([1]九大院・工, [2]九大院・シス生科)

10:30 G2H2-0211 放線菌 *Streptomyces* 属を対象とした細胞内 pH 測定法の確立
……○蓮池 祐紀[1], 臼田 隆亮[2], 須藤 雅己[1], 片岡 正和[1]
([1]信州大院・生命医工, [2]信州大・工・技術部)

10:30 G2H2-0212 pH 感受性蛍光タンパク質を用いた大腸菌長期定常期のリアルタイム細胞内 pH 測定
……○臼田 隆亮[1], 須藤 雅己[2], 蓮池 祐紀[2], 片岡 正和[2]
([1]信州大・工・技術部, [2]信州大院・生命医工)

H2 会場（11:30〜12:00）

【遺伝子工学】

11:30 G2H2-0301 油脂酵母株 *Lipomyces starkeyi* によるポリヒドロキシアルカン酸生産
……○中村 優里[1], 近藤 昭彦[2], 荻野 千秋[1], Prihardi Kahar[1], 壷井 ひかり[1]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ)

11:30 G2H2-0302 酵母 *Kluyveromyces marxianus* 由来ポリガラクツロナーゼと分泌困難なタンパク質との融合タンパク質分泌生産系の開発
……○多葉田 菜月[1], 星田 尚司[1,2,3], 赤田 倫治[1,2,3]
([1]山口大院・創成科学・化学系, [2]山口大・中高温セ, [3]山口大・生命医工セ)

11:30 G2H2-0303 ペプチドグリカン不完全合成大腸菌によるバイオポリマー抽出の効率化
……○門屋 亨介[1], 高 相昊[2], 田口 精一[2] ([1]椙山女学園大・生活科学, [2]東農大・生命科学)

11:30 G2H2-0304 ソルビトールストレスによる GPD 遺伝子破壊株の脂肪酸組成変化
……○三木 健夫[1], 佐野 絢子[1], 井沢 真吾[2] ([1]山梨大院・医工総, [2]京工繊大院・工芸科学)

11:30 G2H2-0305 新規鎖置換型 DNA ポリメラーゼ生産菌の探索と酵素活性の比較
……○井上 瑛介[1], 福田 青朗[1,2], 保川 清[3], 柳原 格[4], 藤原 伸介[1,2]
([1]関西学院大院・理工, [2]関西学院大・理工, [3]京大院・農, [4]大阪母子医療センター)

11:30 G2H2-0306 ポリエステル生産菌 *Ralstonia eutropha* へのデンプン資化性付与
……○坂井 千紗[1], 折田 和泉[1], 有川 尚志[2], 佐藤 俊輔[2], 福居 俊昭[1]
([1]東工大・生命理工, [2]カネカ)

11:30 G2H2-0307 融合したタンパク質の発現量や機能とその境界領域配列の解析
……○荒木 幸次[1], 赤田 倫治[1,2,3], 星田 尚司[1,2,3]
([1]山口大院・創成科学・化学系, [2]山口大・中高温セ, [3]山口大・生命医工セ)

11:30 G2H2-0308 *Acinetobacter tjernbergiae* がもつ酵素特性が互いに異なるエステラーゼに関する研究
……○土橋 大地[1], 大畑 駿一郎[2], 高杉 早紀[2], 前田 謙太郎[1], 阿野 貴司[1,2], 岡南 政宏[1,2]
([1]近畿大院・生物理工, [2]近畿大・生物理工)

11:30 G2H2-0309 *Stenotrophomonas maltophilia* エステラーゼの活性解析と機能向上に関する研究
……○前田 謙太郎[1], 福井 健太郎[2], 土橋 大地[1], 阿野 貴司[1,2], 岡南 政宏[1,2]
([1]近畿大院・生物理工, [2]近畿大・生物理工)

11:30 G2H2-0310 *Aspergillus oryzae* とその近縁種を用いた硝酸ナトリウムトランスポーター解析
……○田中 智大（金工大院・工）

11:30 G2H2-0311 熱刺激によって高肝機能誘導可能な遺伝子改変ヒトヘパトーマ細胞株の特性評価
……○北野 裕之[1], Souvervielle Manuel[2], 河邉 佳典[1], 上平 正道[1,2]
（[1]九大院・工, [2]九大院・シス生科）

11:30 G2H2-0312 糸状菌 *Aspergillus aculeatus* における酸化ストレス応答への dipeptidyl peptidase IV の寄与
……○森 孝輔, 炭谷 順一, 谷 修治, 川口 剛司（阪府大院・生環科）

H3 会場（9:00〜9:30）

【酵素学，酵素工学】

9:00 G2H3-0101 パッションフルーツ種子から分離した内生細菌のレスベラトロールおよびピセアタンノール変換活性の評価
……○古屋 俊樹, 石田 葵（東京理科大院・理工）

9:00 G2H3-0102 コーヒー滓を電子供与体としたシトクロム P450 による酸化反応プロセスの確立
……○川名 秀明[1], 本田 裕樹[2], 古屋 俊樹[1]（[1]東京理科大院・理工, [2]奈良女子大・理）

9:00 G2H3-0103 欠損導入によるグルタミン酸脱炭酸酵素の改良
……○高木 啓詞[1,2], 小塚 康平[1], 海野 伊吹[1], 中野 祥吾[1], 伊藤 創平[1]
（[1]静県大院・薬食生命, [2]沼津工業技術支援センター）

9:00 G2H3-0104 好熱好酸性アーキア *Thermoplasma acidophilum* 由来の 2 種類のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの異種発現及び機能解析
……○佐藤 悠[1], Maruf Ilma Fauziah[2,3], 佐々木 由佳[1,3], Krebs Anastasia[3,4], Nieber Jochen[3,5], 谷口 博範[3], 岡野 憲司[1,6], 木谷 茂[1,6], Restiawaty Elvi[7], Akhmaloka[2,8], 本田 孝祐[1,6]
（[1]阪大・生工国際セ, [2]Dep. Chem., ITB, [3]阪大院・工, [4]CeBiTec, Bielefeld Univ., [5]Forschungszentrum Julich GmbH, [6]阪大・先導学研機, [7]Fac. Ind. Technol., ITB, [8]Fac. Sci. Comp., Univ. Pertamina）

9:00 G2H3-0105 *N*-Succinylaminoadamantane の位置選択的水酸化を触媒する微生物の探索と特徴解析
……○林 峻輔, 満倉 浩一, 吉田 豊和（岐阜大院・工）

9:00 G2H3-0106 超好熱性アーキア *Staphylothermus marinus* における ATP-dependent serine kinase の同定
……○佐藤 喬章[1], 森 康暢[1], 川村 弘樹[1], 藤田 嵩之[1], 永田 隆平[2], 藤橋 雅宏[3], 三木 邦夫[2], 跡見 晴幸[1]
（[1]京大院・工, [2]京大院・理, [3]大阪医薬大・医）

9:00 G2H3-0107 芳香族カルボン酸エステラーゼ EstAC の活性部位を構成するアミノ酸残基の同定と評価
……○後藤 知, 井上 茂樹, 本田 拓也, 加藤 歩並, 堀口 芽衣, 竹原 宗範
（滋県大院・工・材料科学）

9:00 G2H3-0108 *Amycolatopsis* sp. NT-119 由来ホスファチジン酸ホスファターゼの精製と諸特性解析
……○松井 萌[1], 藤田 大勢[1], 佐藤 佑香[2], 杉森 大助[1,2]
（[1]福島大院・共生システム理工, [2]福島大・共生システム理工）

9:00 G2H3-0109 *Paenibacillus* sp. が生産するガラクトオリゴ糖高生産酵素の同定と機能解析
……○尾高 伶, 馬場 康浩, 馬場 将弘, 堀口 博文（合同酒精）

9:00 G2H3-0110 セクレトーム解析から見出された Unsaturated Rhamnogalacturonyl Hydrolase の機能解析
……○亀山 綾音, 大堀 沙貴子, 鈴木 裕満, 加藤 雅士, 志水 元亨（名城大・農）

9:00 G2H3-0111 好乾性糸状菌が生産する耐塩性セルラーゼの探索と諸性質の検討
……○斉藤 大輔[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）

9:00 G2H3-0112 *Aspergillus sydowii* の生産する耐塩性 γ-グルタミルトランスペプチダーゼの特性解析
……○西川 有咲[1], 仙波 弘雅[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)

9:00 G2H3-0113 *Aspergillus chevalieri* 由来カルボキシエステラーゼ/リパーゼの特性解析
……○梅木 智哉[1], 上村 真理子[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)

H3 会場（10:00〜10:30）

【酵素学，酵素工学】

10:00 G2H3-0201 質量顕微鏡を用いたイネ科植物の発芽種子におけるグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化
……○生田 宗一郎[1], 福﨑 英一郎[1,2,3], 新間 秀一[1,2,3]
([1]阪大院・工, [2]大阪大学先導的学際研究機構, [3]大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)

10:00 G2H3-0202 蛍光標識ペプチドアレイを用いたプロテアーゼ切断特異性予測モデルの構築
……○水谷 嶺太[1], 森 陽子[1], 田添 佳歩[1], 小川 翔大[2], 清水 一憲[1], 本多 裕之[1]
([1]名大院・工, [2]名大院・創薬)

10:00 G2H3-0203 ラン藻におけるクエン酸蓄積を明らかにするアコニターゼの生化学解析
……○西井 麻貴, 伊東 昇紀, 片山 徳賢, 小山内 崇（明治大院・農）

10:00 G2H3-0204 化学酵素的アミド結合形成反応と分子内環化反応の連携による環状ジペプチド化合物のワンポット合成法の開発：ジケトピペラジンの合成
……○唐鎌 翔大[1], 鈴木 伸[2], 木野 邦器[1,2]（[1]早大・先進理工, [2]早大・理工総研）

10:00 G2H3-0205 化学酵素的アミド結合形成反応と分子内環化反応の連携による環状ジペプチド化合物のワンポット合成法の開発：ジケトモルフォリンの合成
……唐鎌 翔大[1], ○鈴木 伸[2], 木野 邦器[1,2]（[1]早大・先進理工, [2]早大・理工総研）

10:00 G2H3-0206 *Bacillus pumilus* に保存される MazEF 機構の機能解析
……○岡部 拓真[1,2], 葵 理恵[1,2], 石塚 寛子[2], 江 雨濃[2,3], 横田 亜紀子[2], 常田 聡[1], 野田 尚宏[1,2,4]
([1]早大院・先進理工, [2]産総研・バイオメディカル, [3]筑波大院・人間総合科学研, [4]筑波大院・グローバル教育)

10:00 G2H3-0207 ブタ排出糞中から単離された D-乳酸特異的資化菌 *Megasphaera indica*
……○保科 涼[1], 板谷 かえで[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)

10:00 G2H3-0208 げっ歯類の脳及び心臓におけるコリンアセチルトランスフェラーゼに対する酵素組織化学による *de novo* アセチルコリン合成の可視化
……○林 大暉[1], 竹尾 映美[1], 杉浦 悠毅[2], 福﨑 英一郎[1,3,4], 新間 秀一[1,3,4]
([1]阪大院・工, [2]慶応義塾大学医学部医化学教室, [3]大阪大学先導的学際研究機構, [4]大阪大学島津分析イノベーション協働研)

10:00 G2H3-0209 PL6 アルギン酸リアーゼ Aly85NT に見られるユニークな酵素特性
……○堀越 妃乃, 野村 隆臣（信州大院・繊維・応用生物）

10:00 G2H3-0210 超好熱古細菌(始原菌)*Thermococcus kodakarensis* KOD1 株由来リゾホスホリパーゼの特性解析
……○熊野 祐香, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史（阪大院・工）

10:00 G2H3-0211 コラーゲン由来ジペプチドであるヒドロキシプロリルグリシンの菌体反応系による生産
……○古渡 翔, 木野 邦器（早大・先進理工）

10:00 G2H3-0212 超好熱古細菌（始原菌）*Thermococcus kodakarensis* KOD1 株からの新規耐熱性システインプロテアーゼの同定
……○馬淵 幹[1], 田口 萌恵[2], 山野-足立 範子[1], 古賀 雄一[1], 大政 健史[1]
([1]阪大院・工, [2]味の素 AGF)

10:00 G2H3-0213 ヒアルロン酸を単糖に分解する *Haliscomenobacter hydrossis* 由来の菌体外酵素複合体
……○毛利 智海, 増沢 望, 武田 穣（横国大院・工）

H3 会場（11:00〜11:30）

【生体情報工学，バイオインフォマティクス】

11:00 G2H3-0301 未培養腸内細菌の１細胞ロングリードシーケンスによる完全長ゲノムの獲得
……○細川 正人[1,2], 小川 雅人[1], 西川 洋平[1], 佐伯 達也[2], 依田 卓也[2], 有川 浩司[2], 竹山 春子[1]
（[1]早大院・先進理工, [2]bitBiome）

11:00 G2H3-0302 麹菌におけるコウジ酸代謝関連転写因子 KojR の制御遺伝子の網羅的解析
……○水谷 友香, 岡 大椰, 兒島 孝明, 中野 秀雄（名大院・生命農学）

11:00 G2H3-0303 遺伝的に近縁な細菌の識別を可能にする PCR プライマー設計法の開発と *Lactobacillus delbrueckii* ６亜種の識別
……○高橋 正之, 森川 佳奈, 赤尾 健（酒総研）

11:00 G2H3-0304 FBA シミュレーションによるシアノバクテリアにおける光合成電子伝達フラックスの解析
……○豊島 正和[1,2], 山本 千晶[1], 植野 嘉文[3], 戸谷 吉博[2], 秋本 誠志[3], 清水 浩[2]
（[1]神戸大院・工, [2]阪大院・情報, [3]神戸大院・理）

11:00 G2H3-0305 細胞形態情報を用いた品質予測モデルにおける撮影バイアス解消技術
……○田中 健二郎, 竹本 悠人, 蟹江 慧, 加藤 竜司（名大院・創薬）

【システムバイオロジー】

11:00 G2H3-0306 動的代謝モデルを用いたシアノバクテリアのカルビン回路における制御機構の解析
……○田島 遼太郎[1], 池原 万由[2], 戸谷 吉博[1], 清水 浩[1]
（[1]阪大院・情報, [2]阪大・工）

11:00 G2H3-0307 高精度菌体増殖定量測定システムを用いた大腸菌細胞内 pH 調節遺伝子群の探索
……○須藤 雅己[1], 臼田 隆亮[2], 深田 悠太[1], 住田 和弥[1], 森 浩禎[3,4], 片岡 正和[1]
（[1]信州大院, [2]信州大・工, [3]信州大, [4]Inst. Anim. Sci. Guangdong Acad. Agric. Sci.）

11:00 G2H3-0308 高精度菌体増殖測定システムの多菌種への応用
……○住田 和弥[1], 深田 悠太[1], 森 浩禎[2,3], 片岡 正和[1]
（[1]信州大学院・生命医工, [2]信州大学, [3]Inst. Anim. Sci. Guangdong Acad. Agric. Sci.）

11:00 G2H3-0309 オートエンコーダーを用いた SARS-CoV-2 遺伝子のクラスター分析：変異プロファイリング
……○三宅 淳[1,2], 佐藤 孝明[1], 馬場 俊輔[1], 中村 隼人[1], 新岡 宏彦[3], 中澤 慶久[2]
（[1]阪大院・工, [2]阪大院・工・Hitz 協働研, [3]阪大・IDS）

11:00 G2H3-0310 同位体非定常 ^{15}N 代謝フラックス解析法の開発と大腸がん細胞株の窒素代謝経路への応用
……○村上 慶多, 近藤 佑哉, 岡橋 伸幸, 松田 史生（阪大院・情報）

11:00 G2H3-0311 ^{13}C 代謝フラックス解析法を用いた好中球の中心炭素代謝の解析と機能制御への応用
……○谷口 赳夫, 岡橋 伸幸, 松田 史生（阪大院・情報）

H4 会場（9:30〜10:00）

【酵素学，酵素工学】

9:30 G2H4-0101 *Pseudomonas nitroreducens* 由来 γ-グルタミルトランスペプチダーゼの活性部位を構成する芳香族アミノ酸残基の役割解明
……○小笹 彰宏[1], 池添 浩輝[1], 松井 大亮[1], 豊竹 洋佑[1], 日弄 隆雄[2], 伊藤 貴文[2], 若山 守[1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]福井県大・生物資源）

9:30 G2H4-0102 サンゴ粘液中の海藻忌避物質の探索
…… ○垣田 浩孝[1,2], 高橋 欄[2], 井口 亮[3], 鈴木 淳[3]
（[1]日大院・総合基, [2]日大・文理, [3]産総研・地調）

9:30 G2H4-0103 高電圧バイオ電池構築のためのマルチ銅オキシダーゼに おける T1 銅の第 2 配位圏への部位特異的変異誘発
…… ○平中 佑磨[1], 多喜 俊介[1], 髙村 映一郎[1], 坂元 博昭[1], 里村 武範[1], 櫻庭 春彦[2], 大島 敏久[3], 末 信一朗[1]
（[1]福井大院・工, [2]香川大・農, [3]大阪工大・工）

9:30 G2H4-0104 酵素特性の改良を目指したグリシン酸化酵素の機能解析
…… ○東浦 優希[1], 川崎 大志[2], 小田 龍佑[2], 西矢 芳昭[1,2]
（[1]摂南大院・理工, [2]摂南大・理工）

9:30 G2H4-0105 機械学習を利用した代謝酵素の補酵素特異性の設計と活性測定による検証
…… ○杉木 創, 二井手 哲平, 戸谷 吉博, 清水 浩（阪大院・情報）

9:30 G2H4-0106 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来新規アセチルキシランエステラーゼの生化学的特徴づけ
…… ○加藤 智江, 塩野 義人, 小関 卓也（山形大・農）

9:30 G2H4-0107 *Aspergillus nidulans* 由来新規ラムノガラクツロナンリアーゼの機能・構造解析
……○鈴木 裕満[1], 伊東 昂希[1], 酒井 杏匠[1], 堀 千明[2], 高須賀 太一[3], 加藤 雅士[1], 志水 元亨[1]
（[1]名城大院・農, [2]北大院・工, [3]北大院・農）

9:30 G2H4-0108 *Rhizoctonia solani* D138 株分泌酵素群による薬用ニンジン病害性糸状菌の成長阻害
…… ○山岸 純一, 髙塚 由美子, 川端 千翔, 原 富次郎（京大・エネ研）

9:30 G2H4-0109 RNA 検出を目指した *Thermus thermophilus* 由来の DNA ポリメラーゼの改変
……○安藤 友理[1], 福田 青郎[1,2], 保川 清[3], 柳原 格[4], 藤原 伸介[1,2]
（[1]関西学院大院・理工, [2]関西学院大・理工, [3]京大院・農, [4]大阪母子医療セ・研・免疫）

9:30 G2H4-0110 *Pseudonocardia thermophila* 由来 Co 型 Nitrile Hydratase の中性子構造解析に向けた大型結晶作成の条件検討
……○和田 凌太郎[1], 仲本 和義[1], 松村 洋寿[1], 野口 恵一[2], 養王田 正文[2], 尾高 雅文[1]
（[1]秋田大院・理工, [2]農工大院・工）

9:30 G2H4-0111 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株のマイコファクトシン生合成経路と低栄養生育との関連性について
…… ○岸本 真奈, 新谷 政己, 吉田 信行（静大院・総合科技）

9:30 G2H4-0112 ダイズ *Glycine max* 由来 L-メチオニン γ-アーゼの大腸菌発現，精製と性質検討
…… ○大川 敦司[1], 手嶋 琢[2], 松井 健二[2], 田村 隆[1], 稲垣 賢二[1]
（[1]岡山大院・環境生命, [2]山口大院・創成科学（農））

9:30 G2H4-0113 *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA の固定化 および Ethyl α-D-glucopyranoside の選択的生産への応用
…… ○曹 偉[1], 神戸 友美[1], 石井 義孝[2], 桐村 光太郎[1,2]
（[1]早大・先進理工, [2]早大・理工総研）

H4 会場（10:30〜11:00）

【酵素学，酵素工学】

10:30 G2H4-0201 高基質特異性 L-リシン α-オキシダーゼの基質側鎖の認識に関与する残基の機能解析
……○齋藤 雅哉[1], 赤井 元気[1], 松本 侑也[1], 上田 悠加[2], 松田 崚汰[2], 今田 勝巳[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]阪大院・理）

10:30 G2H4-0202 白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来新規フラビンモノオキシゲナーゼの機能・構造解析
……○森 玲香, 鈴木 裕満, 加藤 雅士, 志水 元亨（名城大院・農）

10:30 G2H4-0203 酸化酵素の化学修飾による改変脱水素酵素の特性解析
……○外山 二卯佳[1], 木村 太紀[2], 西矢 芳昭[1,2]（[1]摂南大院・理工, [2]摂南大・理工）

10:30 G2H4-0204 組換え大腸菌を用いた長鎖ポリアミンの生産とシリカ重合活性の評価
……○中杉 行秀, 舟橋 久景, 廣田 隆一, 黒田 章夫, 池田 丈（広島大院・統合生命科学）

10:30 G2H4-0205 *Mucor lusitanicus* 由来の低温発現性リパーゼの特性解析
……○横林 正雄[1], 田中 瑛子[1], 村上 周一郎[2]（[1]明治大院・農, [2]明治大・農）

10:30 G2H4-0206 カーボン結合ペプチド修飾マルチ銅オキシダーゼ固定化バイオカソードの性能向上を目的としたコール酸系界面活性剤による電子伝達の効率化
……○高村 映一郎[1], 後藤 慧史[1], 坂元 博昭[1], 里村 武範[1], 櫻庭 春彦[2], 冨永 昌人[3], 大島 敏久[4], 末 信一朗[1]
（[1]福井大院・工, [2]香川大・農, [3]佐賀大・理工, [4]大阪工大・工）

10:30 G2H4-0207 （講演中止）

10:30 G2H4-0208 中性子構造解析に向けた鉄型ニトリルヒドラターゼの精製と結晶化
……○藤井 康年[1], 辻井 啓夢[1], 岩藤 秀直[1], 仲本 和義[1], 松村 洋寿[1], 日下 勝弘[2], 玉田 太郎[3], 尾高 雅文[1]
（[1]秋田大院・理工, [2]茨城大学フロンティア応用原子科学研究セ, [3]量子科学技術研究開発機構量子生命科学研）

10:30 G2H4-0209 真核紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* 由来の酵素 beta-amylase の解析と産業利用に向けた酵素の固定化
……○村上 雅[1], 小山内 崇[2]（[1]明治大院・農, [2]明治大・農）

10:30 G2H4-0210 超好熱菌由来分岐鎖ポリアミンによるタンパク質の安定化効果
……○福田 萌子[1], 福田 青郎[1,2], 藤原 伸介[1,2]（[1]関西学院大院・理工, [2]関西学院大・生命環境）

10:30 G2H4-0211 *Paenibacillus* sp. A13 由来変異型マイコデキストラナーゼの機能解析と触媒残基の特定
……○平田 風子, 山内 夢乃, 稲福 隆之, 上地 敬子, 平良 東紀（琉球大・農）

10:30 G2H4-0212 様々な麹菌のアグマチン生産性
……○吉岡 美紗[1], 福田 青郎[1,2], 中川 拓郎[3], 赤坂 直紀[1], 藤原 伸介[1,2]
（[1]関西学院大院・理工, [2]関西学院大・生命環境, [3]樋口松之助商店）

10:30 G2H4-0213 *Aspergillus oryzae* が持つアルギニン脱炭酸酵素の探索
……○村上 優衣[1], 吉岡 美紗[2], 米田 大貴[2], 赤坂 直紀[2], 福田 青郎[1,2,3], 藤原 伸介[1,2,3]
（[1]関西学院大・理工, [2]関西学院大院・理工, [3]関西学院大学・生命環境）

H4 会場（11:30〜12:00）

【バイオセンシング，分析化学】

11:30 G2H4-0301 細胞内におけるヘムとヘムオキシゲナーゼ２の複合体形成を検出するバイオプローブ開発
……武本 美沙希, 坂本 寛, ○平 順一（九工大）

11:30 G2H4-0302 気相刺激法を利用した悪臭応答ヒト嗅覚受容体の同定と実用的な阻害剤探索
……○福谷 洋介[1], 阿部 雅司[1], 斉藤 遥[1], 江口 諒[2], 田澤 寿明[2], 松波 宏明[3], 養王田 正文[1]
([1]農工大院・工, [2]エステー株式会社, [3]Duke 大学・医)

11:30 G2H4-0303 量子ドットを包埋したハイブリットナノアーキテクチャーの作製と抗 HEV 抗体の検出への応用
……ガンガンボイナ アキレッシュ バブ[1], 竹村 謙信[2], ジャン イェンジン[3], 李 天成[3], ○朴 龍洙[1,2]
([1]静大・グリーン科技研, [2]静大・創科技院, [3]国立感染研)

11:30 G2H4-0304 シアノバクテリアにおける NADP(H)の正確定量
……○田中 謙也[1,2], 嶋川 銀河[2,3], 草間 翔子[2], 松田 真実[4], 蓮沼 誠久[1,4], 中西 周次[2]
([1]神戸大・先端バイオ工, [2]阪大院・基礎工太陽エネ研セ, [3]関西学院大・生命環境, [4]神戸大院・科技イノベ)

11:30 G2H4-0305 歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* 添加によるデンタルバイオフィルムの悪性化に寄与する代謝物の調査
……○仙田 貴大[1], 久保庭 雅恵[2], 坂中 哲人[2], 福﨑 英一郎[1,3,4], 新間 秀一[1,3,4]
([1]阪大院・工, [2]阪大院・歯, [3]大阪大学先導的学際研究機構, [4]大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)

11:30 G2H4-0306 磁気ナノ粒子による金ポリアニリンベース電気化学的ウイルスセンサーの感度向上
……○敦賀 健太[1], 朴 龍洙[1,2], アンカン ダッタ チョードリー[2] ([1]静大院・総合科技, [2]静大・グリーン科技研)

11:30 G2H4-0307 食品偽装抑止を目的とした果菜類への元素塗布によるマーキングシステムの開発
……○黒木 佑真[1], 楠 香奈[1], 福﨑 英一郎[1,2,3]
([1]阪大院・工, [2]大阪大学先導的学際研究機構, [3]大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)

11:30 G2H4-0308 糖尿病等の血糖値制御に関わるグルカゴン検出プローブの開発
……○重藤 元, 鈴木 祥夫, 山村 昌平（産総研・健康医工学）

11:30 G2H4-0309 サンプリング操作不要の簡易固体表面核酸検出法開発
……○舟橋 久景, 波多野 浩也, 黒田 章夫（広島大院・統合生命科学）

11:30 G2H4-0310 シグナリングプローブ方式 DNA マイクロアレイによる簡易迅速な微生物検出法の開発
……○武内 日陽里[1], 宇野 晴香[1], 田口 朋之[2], 蓼沼 崇[2], 平川 祐子[2], 吉野 知子[1], 前田 義昌[1], 松永 是[1], 田中 剛[1]
([1]農工大院・工, [2]横河電機株式会社)

11:30 G2H4-0311 Development of binary responsive virus biosensor using chromogen-encapsulated polymeric nanocarrier
……○Indra M. Khoris[1], Akhilesh B. Gangganboina[2], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

11:30 G2H4-0312 mini-G タンパク質およびグラフェンセンサーを利用した哺乳類嗅覚受容体のリガンド検出技術開発
……○高山 郁美, 福谷 洋介, 吉井 智哉, 生田 昴, 前橋 兼三, 養王田 正文
（農工大院・工）

【センサー，計測工学】

11:30 G2H4-0313 選択的機能破壊アッセイ系による芽胞の新規な発芽誘起物質の探索方法
……○坂元 仁[1,2], 朝田 良子[1,3], 古田 雅一[1,3], 土戸 哲明[1]
([1]阪府大・微制研, [2]関西大・化生工, [3]阪府大院・工)

H5 会場（9:00〜9:30）

【発酵生理学，発酵工学】

9:00 G2H5-0101 サーチュインが制御する *Ashbya gossypii* のリボフラビン生産

畔上 純也[1], 狩野 麻衣[1], 朴 龍洙[1,2,3], ○加藤 竜也[1,2,3]
（[1]静大院・総合科技, [2]静大・グリーン科技研, [3]静大・農）

9:00 G2H5-0102 コリネ型細菌での二本鎖 RNA 生産系の構築とその生産 dsRNA 含有菌体の摂食による標的作物害虫の生育抑制

○羽城 周平[1], 三橋 麻由[1], 千頭 康彦[2], 川口 はるか[2], 新美 輝幸[2], 安枝 寿[1]
（[1]味の素バイオ・ファイン研, [2]基生研・進化発生）

9:00 G2H5-0103 皮膚常在菌培養液配合化粧品の品質改善に関する研究 皮膚常在菌培養液の臭気

○多賀 直彦, 森田 拓弥（東海大・農）

9:00 G2H5-0104 **黄麹菌のタンパク質品質管理機構における AoCdc48 の生理機能解析**

○守田 湧貴, 竹川 薫, 樋口 裕次郎（九大院・生資環）

9:00 G2H5-0105 新規 ω3 不飽和化酵素の解析ならびにそれらを活用した *Mortierella alpina* による EPA 生産

○糸川 未来[1], 安藤 晃規[1,2], 奥田 知生[1], MO Brian King Himm[1], 中辻 諒平[1], 竹本 有貴[3], 池本 裕之[3], 菊川 寛史[4], 阪本 鷹行[5], 櫻谷 英治[5], 小川 順[1,2]
（[1]京大院・農, [2]京大・生理化学, [3]日清ファルマ, [4]静県大・食栄, [5]徳島大・生物資源）

9:00 G2H5-0106 Cell factory for Gamma Amino Butyric acid biosynthesis using *Bifidobacterium adolescentis*

○Hend Altaib[1], Tomoya Kozakai[1], Hazuki Nakao[1], Mahmoud A. M. El-Nouby[3,4], Yassien Badr[1,2], Emiko Yanase[1], Izumi Nomura[1], Tohru Suzuki[1]
（[1]Gifu University, Faculty of Applied Biological Sciences , Gifu, Japan, [2]Damanhour University, Faculty of Veterinary Medicine, El-Beheira, Egypt, [3]Gifu University, Graduate School of Engineering, Gifu, Japan, [4]Faculty of Agriculture, Alexandria University, Alexandria, Egypt）

9:00 G2H5-0107 大腸菌の呼吸鎖変異株 ΔNDH-IΔCytbo_3 におけるグルタミン酸代謝系酵素の 欠損がグルタミン酸異常蓄積に及ぼす影響

○今 壮太[1], 前田 智也[1], 吹谷 智[1], 和田 大[2], 横田 篤[1]
（[1]北大院・農, [2]摂南大・農）

9:00 G2H5-0108 定常期における大腸菌細胞の生理状態の解析

○加藤 節, 川畑 龍司, 青井 議輝, 中島田 豊（広島大院・統合生命科学）

9:00 G2H5-0109 高い β-グルカン生産能を持つ *Aureobasidium pullulans* の細胞壁構造の解析

○谷本 悟, 尾島 由紘, 鈴木 利雄, 東 雅之（阪市大院・工）

9:00 G2H5-0110 乳化およびマクロファージ活性化能を有する酵母由来 Gas1 タンパク質の構造と機能

○髙田 真穂, 二塚 美紀, 尾島 由紘, 東 雅之（阪市大院・工）

9:00 G2H5-0111 コリネ型細菌と大腸菌の高温下における代謝変動の共通性

○井口 貴博[1], 小林 俊介[1], 石井 伸佳[2], 柘植 陽太[1,3]
（[1]金沢大院・自科, [2]長瀬産業, [3]金沢大・新学術）

9:00 G2H5-0112 アルドラーゼを介した代謝系へのホルムアルデヒド取込みを伴う増殖非依存型発酵による有用物質生産

○山本 啓介, 中根 修平, 土坂 享成, 榎本 亜希代, 長谷川 真由, 瀧田 千温, 武田 明子
（Green Earth Institute）

H5 会場（10:00〜10:30）

【代謝工学】

10:00 G2H5-0201 分裂酵母を用いたグルコースからのバニリン生産技術の向上
……○川村 和佳菜[1], 藤江 直史[1], 田中 勉[1], 近藤 昭彦[2]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ)

10:00 G2H5-0202 コリネ菌を用いた 4-ヒドロキシ安息香酸生産技術の開発
……○道家 美紗[1], 盛尾 美和[1], 田中 勉[1], 近藤 昭彦[2]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ)

10:00 G2H5-0203 ゲノム編集によるオーランチオキトリウム属の脂肪酸生産性の向上
……○渡邉 研志[1], Perez Charose[1], 北堀 智希[1], 畑 浩介[1], 高橋 宏和[1], 佐久間 哲史[1], 岡村 好子[1], 中島田 豊[1], 山本 卓[1], 松山 恵介[2], 秋 庸裕[1]
([1]広島大院・統合生命科学, [2]長瀬産業)

10:00 G2H5-0204 好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* 代謝改変によるアセトンの高温ガス発酵
……○加藤 淳也[1], 竹村 海生[1], 加藤 節[1], 藤井 達也[2], 和田 圭介[2], 岩崎 祐樹[2], 青井 議輝[1], 森田 友岳[2], 松鹿 昭則[1,2], 村上 克治[2], 中島田 豊[1]
([1]広島大院・統合生命科学, [2]産総研)

10:00 G2H5-0205 光エネルギーを利用した大腸菌におけるメバロン酸のイソプレノールへの変換
……○佐野 海瑚人[1], 田中 涼[1], 鎌田 健太郎[1], 松田 史生[1], 石井 純[2], 弘埜 陽子[3], 原 清敬[3], 戸谷 吉博[1], 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)

10:00 G2H5-0206 フェニルアラニン高生産に向けたコリネ型細菌の代謝工学
……○片岡 尚也[1,2,3], 加藤 瑠華[1], 谷口 和彌[2], 松谷 峰之介[4], 松下 一信[2], 藥師 寿治[1,2,3]
([1]山口大院・創成科学, [2]山口大・農, [3]山口大・中高温微セ, [4]東農大・ゲノム解析セ)

10:00 G2H5-0207 エチレングリコール資化菌 *Rhodococcus jostii RHA1* によるグリコール酸生産
……○鈴木 快[1,2], 清水 哲[2], 乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ, [2]RITE)

10:00 G2H5-0208 大腸菌染色体上のリボソーム結合配列改変による中枢代謝フラックスの調節
……○澤田 将吾, 松田 史生, 戸谷 吉博, 清水 浩（阪大院・情報）

10:00 G2H5-0209 出芽酵母のエネルギー代謝の改善
……○大長 薫, 弘埜 陽子, 菊川 寛史, 田村 謙太郎, 原 清敬（静県大・食栄）

10:00 G2H5-0210 大腸菌生体内における非酸化的解糖系経路の代謝フラックスの評価
……○三吉 健太, 川井 隆太郎, 二井手 哲平, 戸谷 吉博, 清水 浩（阪大院・情報）

10:00 G2H5-0211 メバロン酸取り込み能力が強化された進化株のゲノム変異解析
……○村上 茉奈美[1], 川井 隆太郎[1], 前田 智也[2], 堀之内 貴明[2], 古澤 力[2,3], 戸谷 吉博[1], 清水 浩[1]
([1]大阪大学, [2]理化学研究所, [3]東京大学)

10:00 G2H5-0212 目的物質生産フラックス強化のためのシミュレーションに基づく増殖連動型の代謝設計
……○戸谷 吉博, 一色 衣香, 施 欣馳, 清水 浩（阪大院・情報）

H5 会場（11:00〜11:30）

【生合成，天然物化学】

11:00 G2H5-0301 アンブレインの人工生合成系構築と新規生物活性の解析
……山辺 陽太[1], 川越 幸奈[1], 奥野 琴音[1], 井上 真緒[1], 近岡 花菜子[1], ○上田 大次郎[1], 田島 木綿子[2], 山田 格[2], 柿原 嘉人[3], 原 崇[1], 佐藤 努[1]
([1]新潟大・自然研, [2]科博, [3]新潟大・歯)

11:00 G2H5-0302 ε-poly-L-lysine 生産放線菌 *Streptomyces albulus* におけるプロテアソーム遺伝子破壊株の造成と形態分化や二次代謝に与える影響の解析
……○美馬 未紗希, 老川 典夫, 山中 一也（関西大・化生工）

11:00 G2H5-0303 テリハボク(*Calophyllum inophyllum*) 種子油のマトリックスメタロプロテイナーゼ 9 阻害活性の評価
……○松井 杏美[1], 松川 哲也[1], 宇佐美 徹[2], 梶山 慎一郎[1]
（[1]近畿大院・生物理工, [2]株式会社すまエコ）

11:00 G2H5-0304 ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) の精子誘引物質候補 apigenin 生合成遺伝子 chalcone synthase ノックアウト株の作出、活性評価
……○諏訪 宏紀, 武部 夏実, 山崎 由美子, 松川 哲也, 大和 勝幸, 梶山 慎一郎
（近畿大院・生物理工）

11:00 G2H5-0305 L-スレオニンを起点とするピラジン生合成機構の解明とその応用
……○本山 智晴[1], 中野 祥吾[1], 長谷部 文人[2], 宮田 椋[1], 熊澤 茂則[1], 三好 規之[1], 伊藤 創平[1]
（[1]静県大院・薬食生命, [2]福井県大・生物資源）

11:00 G2H5-0306 ヌクレオシド系抗生物質トヨカマイシンの *Candida albicans* に対する作用の検討
……○横田 直紀, 谷畑 友基, 尾島 由紘, 東 雅之（阪市大院・工）

11:00 G2H5-0307 *Penicillium spiculisporum* が産生する「スピクリスポール酸」とその誘導体の抗菌活性
……○曽我 亜由美[1], 平 敏彰[2], 池田 歩[2], 望月 誉志幸[1], 関口 喜則[1]
（[1]磐田化学工業・開発, [2]産総研・化プロ）

11:00 G2H5-0308 非対称カロテノイドの生合成代謝経路工学
……○尾島 匠[1], 河合（野間） 繁子[1], 梅野 太輔[1,2]（[1]千葉大院・融合, [2]早大・先進理工）

11:00 G2H5-0309 前駆体枯渇毒性と蓄積毒性を利用したイソプレノイド合成経路の活性進化
……○小野里 由実[1], 荒木 道備[1], 木下 葵子[2], 河合（野間） 繁子[1], 梅野 太輔[1,3]
（[1]千葉大院・融合, [2]千葉大院・工, [3]早大院・先進理工）

11:00 G2H5-0310 抗生物質 resormycin 生合成遺伝子群に見出した Phenylalanine 水酸化酵素の機能解析
……○岸 千紘[1], 丸山 千登勢[1], 山中 一也[2], 濱野 吉十[1]
（[1]福井県大院・生物資源, [2]関西大・化生工）

11:00 G2H5-0311 Streptothricin 類縁生合成遺伝子群に見出した aminoacyl-tRNA 依存型アミド合成酵素の変異解析
……○内山 駿[1], 丸山 千登勢[1], Hamdy Sherif Ahmed Muhammed Ahmed[2], 中嶋 優[2], 森田 洋行[2], 濱野 吉十[1]
（[1]福井県大院・生物資源, [2]富山大・和漢医薬総合研）

【有機化学，高分子化学】

11:00 G2H5-0312 芳香族アミド化合物の One-pot chemoenzymatic 合成法を利用した簡便ヒストン脱アセチル化酵素 1 阻害剤スクリーニング法の開発
……○平田 佳之[1], 上里 新一[1], 松井 大亮[2]（[1]大阪医薬大, [2]立命館大・生命科学）

H6 会場（9:30〜10:00）

【発酵生理学，発酵工学】

9:30 G2H6-0101 *Moniliella megachiliensis* における窒素源飢餓とエリスリトール生産性との関連性
……○吉竹 彰虎[1], 渡邉 泰祐[1,2], 春見 隆文[1,2], 荻原 淳[1,2]
（[1]日大院・生資科, [2]日大・生資科）

9:30 G2H6-0102 出芽酵母に高糖濃度耐性を付与する新規変異遺伝子の有用性の検討
……○馬倉 朋奈[1], 塩入 壮馬[2], 小久保 晋[3], 早川 正幸[4], 山村 英樹[3], 中川 洋史[3]
（[1]山梨大院・医工農, [2]山梨大院・医工総, [3]山梨大院・総研部, [4]山梨県立大学）

9:30 G2H6-0103 実用パン酵母における過酸化水素耐性変異株の特性およびゲノム変異解析
……○露木 七菜子[1], 小久保 晋[2], 早川 正幸[3], 山村 英樹[2], 中川 洋史[2]
([1]山梨大院・医工農, [2]山梨大院・総研部, [3]山梨県立大学)

9:30 G2H6-0104 酸素制限による遺伝子組換えコリネ型細菌を用いた 3-amino-4-hydroxybenzoic acid 発酵の促進作用
……○川口 秀夫[1], 蓮沼 誠久[2], 大西 康夫[3], 佐塚 隆志[4], 荻野 千秋[5], 近藤 昭彦[1,2,5]
([1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大・先端バイオ工セ, [3]東大院・農生科, [4]名大・生命機能開発セ, [5]神戸大・工)

9:30 G2H6-0105 Metabolic regulation adapting to high methanol environment in the methylotrophic yeast *Ogataea methanolica*
……○Hao-Liang Cai[1], Ryohei Doi[2], Masaya Shimada[1,2], Takashi Hayakawa[1,2], Tomoyuki Nakagawa[1,2]
([1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Gifu Univ., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Gifu Univ.)

9:30 G2H6-0106 低栄養環境下における *Methylorubrum* 属細菌のランタノイドによる生育促進応答に関する研究
……○根本 侑知[1], 水野 洸介[1], 原田 雄斗[1], 岩本 悟志[1], 谷 明生[2], 三井 亮司[3], 島田 昌也[1], 早川 享志[1], 中川 智行[1]
([1]岐阜大院・自然科学, [2]岡山大・資源植物科研, [3]岡山理大・理)

9:30 G2H6-0107 *Streptomyces* sp. No. 3 株の生産する新しい抗生物質に関する研究
……○挾井 佳那[1], 阿部 優依奈[1], 村上 周一郎[2] ([1]明治大院・農, [2]明治大・農)

9:30 G2H6-0108 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 における細胞膜リン脂質の生理機能解析
……○辻 茜, 豊竹 洋佑, 河股 優輔, 山本 翔太, 松井 大亮, 若山 守
(立命館大院・生命科学)

9:30 G2H6-0109 温度が放線菌の代謝と細胞形態・生死に及ぼす影響
……○櫻井 惇[1], 内倉 寛斗[1], 山本 省吾[2], 山田 佑樹[2], 曽田 匡洋[2], 柘植 陽太[1,3]
([1]金沢大院・自科, [2]長瀬産業, [3]金沢大・新学術)

9:30 G2H6-0110 酢酸生産菌を用いた H_2/CO_2 からの低コスト酢酸生産の実現に向けた培地組成の検討
……○渡辺 直己[1], 加藤 節[1], 青井 議輝[1], 加藤 淳也[1], 秋 庸裕[1], 松浦 将吏[2], 沢田 健[2], 中島田 豊[1]
([1]広島大院・統合生命科学, [2]中国電力)

9:30 G2H6-0111 濃度依存的な 1-ブタノールの細胞毒性とその作用機序
……○新里 海咲[1], 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)

9:30 G2H6-0112 *Cyanidioschyzon merolae* を用いた有機酸生産法の開発
……○吉田 智尋[1], 小山内 崇[2] ([1]明治大院・農, [2]明治大・農)

H6 会場（10:30〜11:00）

【代謝工学】

10:30 G2H6-0201 有機溶媒耐性菌 *Kocuria rhizophila* DC2201 を利用したカロテノイド類化合物の生産
……○戸田 弘[1,2], 小野木 奈々[2], 金井 保[1,2] ([1]富山県大・生医工研セ, [2]富山県大・工)

10:30 G2H6-0202 逆グリオキシル酸経路を導入した大腸菌の開発と代謝評価
……○田中 恒作, 戸谷 吉博, 清水 浩（阪大院・情報）

10:30 G2H6-0203 リグニン由来芳香族化合物からの有用物質生産宿主である *Pseudomonas putida* KT2440 株へのグルコースとキシロースの共代謝能の付与
……○田中 誠[1], 後藤 杏香[1], 樋口 雄大[2], 園木 和典[2]
([1]弘前大院・農生, [2]弘前大・農生)

10:30 G2H6-0204 *Xanthophyllomyces dendrorhous* によるレチナールの生産
……藤野 紗代[1], 景山 裕也[1], 弘埜 陽子[2], 菊川 寛史[1,2], 松田 史生[3], 戸谷 吉博[3], 石井 純[4], ○原 清敬[1,2]
([1]静県大院・薬食生命, [2]静県大・食栄, [3]阪大院・情報, [4]神戸大院・科技イノベ)

10:30 G2H6-0205 油脂酵母 ATP-クエン酸リアーゼの生育と油脂生産への影響
……○佐藤 里佳子[1], 荒 学志[1], 山崎 晴丈[1], 志田 洋介[2], 小笠原 渉[2], 矢追 克郎[3], 荒木 秀雄[4], 石谷 孔司[3], 油谷 幸代[5], 高久 洋暁[1]
([1]新潟薬大・応生命, [2]長岡技科大, [3]産総研・生物プロセス, [4]不二製油, [5]産総研・CBBD-OIL)

10:30 G2H6-0206 *In vitro* metabolic engineering towards high yield coenzyme A production
……○Gladwin Suryatin Alim[1], Tomoka Iwatani[1], Kenji Okano[1,2], Shigeru Kitani[1,2], Kohsuke Honda[1,2]
([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]OTRI, Osaka Univ.)

10:30 G2H6-0207 油脂酵母の増殖期と油脂生産期の ^{13}C 代謝フラックス解析
……○松尾 有紗, 岡橋 伸幸, 清家 泰介, 松田 史生（阪大院・情報）

10:30 G2H6-0208 mBFP センサーを使った栄養飢餓大腸菌における細胞内 NADPH レベルの摂動解析
……○上野 航一郎, 戸谷 吉博, 清水 浩（阪大院・情報）

10:30 G2H6-0209 指向性タンパク質分解システムを利用したコリネ型細菌の代謝スイッチの開発
……松沢 弘貴[1], 竹本 訓彦[2], 櫻井 惇[1], ○柘植 陽太[1,3]
([1]金沢大院・自科, [2]国立国際医療研究セ, [3]金沢大・新学術)

10:30 G2H6-0210 好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* の代謝モデル構築とその検証
……○小林 友哉[1], 太田 勝巳[1], 屋良 みなみ[3], 渡邊 直揮[1], 豊島 正和[1], 竹中 武藏[2], 近藤 昭彦[2], 荻野 千秋[1]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]神戸大・工)

10:30 G2H6-0211 ギブス自由エネルギー変化を用いた出芽酵母実用株の代謝解析
……○杉村 政彦, 清家 泰介, 岡橋 伸幸, 松田 史生（阪大院・情報）

H6 会場（11:30〜12:00）

【核酸工学】

11:30 G2H6-0301 PD-SELEX 法を用いた直交性 RNA-RBP ペアの発見
……○福永 圭佑, 横林 洋平（沖縄科学技術大学院大学）

【ペプチド工学】

11:30 G2H6-0302 細胞評価及び動物行動試験評価を用いた新規塩味ペプチドの発見
……○竹内 友里, 池田 彩, 清水 一憲, 本多 裕之（名大院・工）

11:30 G2H6-0303 耐塩性ルシフェラーゼを用いた生物発光式エンドトキシン測定法の開発
……○八幡 悟史[1,2], 野田 健一[1], 下村 亜依[1], 黒田 章夫[2]
([1]東亜ディーケーケー, [2]広島大院・統合生命科学)

11:30 G2H6-0304 環状ペプチド探索系によるオキシトシン置換体の機能解析
……○木下 怜実[1], 吉岡 慶太郎[1], 小﨑 一功[1], 柴田 貴広[2], 清水 一憲[1], 本多 裕之[1]
([1]名大院・工, [2]名大院・生命農学)

11:30 G2H6-0305 環状バクテリオシン、エンテロシン NKR-5-3B の生合成機構の解析
……乗富 和寿[1], 増永 莉奈[1], 佐戸 翔太[1], Perez Rodney Honrada[1,2], 園元 謙二[1], 中山 二郎[1], ○善藤 威史[1]
([1]九大院・農, [2]フィリピン大学・ロスバニョス校)

11:30 G2H6-0306 Rapid tunning of peptide binding by PURE ribosome display and NGS
……◯Beixi Jia, Takaaki Kojima, Hideo Nakano（Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.）

【脂質工学】

11:30 G2H6-0307 電子顕微鏡により可視化された大腸菌の外膜小胞高生産株 Δ*mlaE*Δ*nlpI* の異常な膜構造
……◯尾島 由紘[1], 澤邊 朋美[1], 中川 真緒[1], 田原 悠平[2], 宮田 真人[2], 東 雅之[1]
（[1]阪市大院・工, [2]阪市大院・理）

11:30 G2H6-0308 大腸菌 Nissle1917 株の外膜小胞高生産株の特性解析
……◯中川 真緒[1], 尾島 由紘[1], 澤邊 朋美[1], 田原 悠平[2], 宮田 真人[2], 東 雅之[1]
（[1]阪市大院・工, [2]阪市大院・理）

11:30 G2H6-0309 油脂酵母の脂質生産機構の解明に向けた全ゲノム解析
……◯前田 紗香[1], 梶浦 裕之[2], 元岡 大祐[3], Wu Chih Chan[2], 三﨑 亮[2], 藤山 和仁[2]
（[1]阪大院・工, [2]阪大・生工国際セ, [3]阪大院・医）

11:30 G2H6-0310 *Corynebacterium glutamicum* における膜小胞を介した鉄輸送の解析
……◯川島 花雪[1], 永久保 利紀[2], 野村 暢彦[3,4], 豊福 雅典[3,4]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]東大院・農生科, [3]筑波大・生命環境系,
[4]筑波大・微生物サステイナビリティー研究センター）

11:30 G2H6-0311 メンブレンベシクルが細菌間で伝達する機構の解明
……◯臼倉 雄紀[1], 野村 暢彦[2,3], 豊福 雅典[2,3]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大・生命環境系, [3]筑波大・微生物サステナビリティー研究センター）

【糖鎖工学】

11:30 G2H6-0312 遺伝子組換えカイコ中部絹糸腺の糖鎖構造解析
……◯浅野 輝[1], 梶浦 裕之[2], 立松 謙一郎[3], 岩河 佑平[1], 三﨑 亮[2], 瀬筒 秀樹[3], 藤山 和仁[2]
（[1]阪大院・工, [2]阪大・生工国際セ, [3]農研機構・生物機能利用）

11:30 G2H6-0313 糖鎖の脱フコシル化が B 型肝炎ウイルス生活環に及ぼす影響の解析
……◯長峯 美季[1], 三﨑 亮[1], 本田 知之[2], 梶浦 裕之[1], 上田 啓次[3], 藤山 和仁[1]
（[1]阪大・生工国際セ, [2]岡山大院・医歯薬, [3]阪大院・医）

11:30 G2H6-0314 B 型肝炎ウイルス感染を阻害する配糖体の糖改変及び機能解析
……◯若松 明良[1], 三﨑 亮[1], 藤澤 悠[1], 本田 知之[2], 梶浦 裕之[1], 上田 啓次[3], 藤山 和仁[1]
（[1]阪大・生工国際セ, [2]岡山大院・医歯薬, [3]阪大院・医）

11:30 G2H6-0315 Production of beta1,4-galactosylated antibody in *Nicotiana benthamiana*
……◯Dua Nguyen[1], Hiroyuki Kajiura[2], Ryo Misaki[2], Kazuhito Fujiyama[2]
（[1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]ICBiotech, Osaka Univ.）

H7 会場（9:00〜9:30）

【生体医用工学】

9:00 G2H7-0101 機能化リンクモジュールの設計と ECM 模倣ハイドロゲルの開発
……◯大川 将志[1], 田部 亜季[1], 太田 誠一[1], 長門石 曉[2], 津本 浩平[2,3], 伊藤 大知[1,3]
（[1]東大院・工, [2]東大医科研, [3]東大院・医）

9:00 G2H7-0102 細胞外小胞のエンジニアリングによるタンパク質ソーティングの制御と薬物送達への応用
……◯曽宮 正晴, 黒田 俊一（阪大・産研）

9:00 G2H7-0103 哺乳類の繊毛細胞における Tppp3 の機能解析
……○酒井 敬史[1], 高岡 勝吉[2], 濱田 博司[3], 篠原 恭介[1]
([1]農工大院・工, [2]徳島大院・先端技科, [3]理研・生命機能)

9:00 G2H7-0104 質量分析イメージング法を用いた毛髪成分可視化によるストレスモニタリング手法の開発
……○植木 瞭生[1], 永井 裕崇[2], 古屋敷 智之[2], 福﨑 英一郎[1,3,4], 新間 秀一[1,3,4]
([1]阪大院・工, [2]神戸大院・医, [3]大阪大学先導的学際研究機構,
[4]大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)

9:00 G2H7-0105 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
……○水谷 涼[1], 仁宮 一章[2] ([1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術)

9:00 G2H7-0106 Rapid construction of hyperphosphatemia rat model using adenine
……○Ajeeta Anand[1], Muthukumar Serva Peddha[2], Hideki Aoyagi[1]
([1]Fac. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Dept. Biochem., CSIR Central Food Technol. Res. Inst. India)

9:00 G2H7-0107 新規 bFGF 内包 Gel-in-Oil エマルションの経皮送達による血管新生誘導技術
……○張 怡[1], 井上 雄太[1], Fardous Jannatul[1], 堺 裕輔[1], 小野 文靖[2], 井嶋 博之[1]
([1]九大院・工, [2]九大 GIC)

9:00 G2H7-0108 深層学習による細胞トラッキングを用いた培養ヒト表皮幹細胞の品質管理・同定技術の開発
……○弘瀬 拓矢[1], 古徳 純一[1], 土岐 富士緒[2], 西村 栄美[3], 難波 大輔[2]
([1]帝京大院・医療技術学, [2]東歯大・難治疾患研, [3]東大・医科学研)

9:00 G2H7-0109 電気生理学に基づく慢性血液透析治療中の心筋細胞拍動能の解析
……○濱田 浩幸（九大院・農）

9:00 G2H7-0110 低分子化合物を利用した軟骨分化機構の解析
……○下畑 宣行（立命館大・総研）

9:00 G2H7-0111 グルクロン酸修飾過酸化チタンナノ粒子による細胞損傷効果 の検討
……○森下 琢麻[1], 川元 皓貴[1], 鷲尾 周[3], 森田 健太[1],
西村 勇哉[2], 大谷 亨[1], 近藤 昭彦[2], 荻野 千秋[1]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]神戸大・工)

9:00 G2H7-0112 ポリフェノール配糖体修飾過酸化チタンナノ粒子開発と細胞損傷効果の検討
……○川元 皓貴[1], 森下 琢麻[1], 鷲尾 周[4], 森田 健太[1],
西村 勇哉[2], 佐々木 良平[3], 近藤 昭彦[2], 荻野 千秋[1]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ, [3]神戸大院・医, [4]神戸大・工)

9:00 G2H7-0113 分解性が制御されたヒアルロン酸誘導体を用いた注入型癒着防止剤の開発
……○守谷 郁, 蓮沼 直貴, 村松 和明（電機大院 ・理工）

H7 会場（10:00〜10:30）

【植物細胞工学，組織培養，育種工学】

10:00 G2H7-0201 NGS 解析に基づくゲノム育種で育成された大粒・短稈コシヒカリ型新品種「コシヒカリ駿河 d60Gg」及び晩生・短稈コシヒカリ型新品種「コシヒカリ駿河 d60Hd16」
……○富田 因則（静大・グリーン科技研）

10:00 G2H7-0202 気孔開閉を誘導する化合物の開発
……○筧 太心[1], 鈴木 喬太[1], 佐藤 奏音[1], 有澤 美枝子[2], 熊田 佳菜子[3], 谷井 沙織[3],
古田 未有[3], 水野 太郎[3], 元木 大介[3], 河野 優[4], 石丸 泰寛[1], 魚住 信之[1]
([1]東北大院・工, [2]九大院・農, [3]東北大院・薬, [4]東大院・理)

【セル＆ティッシュエンジニアリング】

10:00 G2H7-0203 Artificial transcriptional activation system for RNA detection
……○Feiyang Zheng[1], Yoshinori Kawabe[2], Masamichi Kamihira[1,2]（[1] Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., [2] Fac. Eng., Kyushu Univ.）

10:00 G2H7-0204 シグナル伝達特性を容易に設計可能なミニマル受容体の構築
…… ○河原 正浩, 中嶋 恭子（医薬基盤研究所）

10:00 G2H7-0205 白色脂肪細胞の寒冷刺激耐性機構とベージュ脂肪細胞への分化
…… ○塩見 尚史, 冨士原 由貴（神戸女学院大・人間科学）

10:00 G2H7-0206 クラッシュゲルを支持体として用いたスフェロイド積層用バイオ３Ｄプリンターによる三次元組織の作製
…… ○大野 莉歩[1], 仁宮 一章[1,2]（[1] 金沢大院・自科, [2] 金沢大・新学術）

10:00 G2H7-0207 マイクロデバイス上での区画化三次元ヒト神経筋組織モデルの構築
…… ○亀井 雄平, 山本 一貴, 秋山 裕和, 本多 裕之, 清水 一憲（名大院・工）

10:00 G2H7-0208 細胞画像情報解析を用いた間葉系幹細胞免疫抑制品質の非破壊評価
……○今井 祐太[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）

10:00 G2H7-0209 細胞形態情報解析の実用化を加速する Data Integration
……○竹本 悠人[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）

10:00 G2H7-0210 **限定された細胞形態データにおける品質予測モデルのためのデータ拡張技術**
……○木村 和恵[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）

10:00 G2H7-0211 新規コラーゲンマトリックス（LASCol）を用いたヒト iPS 細胞からの接着性凝集体形成
…… ○大貫 喜嗣[1], 米澤 優希[1], 國井 沙織[2], 森本 康一[2], 黒澤 尋[1]（[1] 山梨大院・医工総, [2] 近畿大院・生物理工）

10:00 G2H7-0212 ガンマ線架橋ポリビニルアルコールゲル上におけるマウス神経幹/前駆細胞の接着挙動の解析
…… ○小山 悠孝, 森 英樹, 原 正之（阪府大院・理）

10:00 G2H7-0213 収縮力測定可能なマイクロデバイス上での神経筋オルガノイドの構築
…… ○山本 一貴, 樋口 昌也, 秋山 裕和, 本多 裕之, 清水 一憲（名大院・工）

H7 会場（11:00〜11:30）

【セル＆ティッシュエンジニアリング】

11:00 G2H7-0301 紫外線架橋コラーゲンゲル上で培養した血管内皮細胞の接着特性の解析
…… ○森 英樹, 鈴木 咲紀, 原 正之（阪府大院・理）

11:00 G2H7-0302 CHO 細胞における ERGIC-53/MCFD2 の過剰発現が抗体の生産性に与える影響
…… ○桐本 豊, Samy Andrew, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史（阪大院・工）

11:00 G2H7-0303 CHO 細胞における Sar1A 過剰発現の抗体生産性への影響解析
…… ○角田 悠, 桐本 豊, サミー アンドルー, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史（阪大院・工）

11:00 G2H7-0304 96 ウェル型培養筋組織収縮力評価系を用いた抗筋萎縮ペプチドの探索
…… 山本 一貴, 大隅 早紀, 長島 拓則, 秋山 裕和, 本多 裕之, ○清水 一憲（名大院・工）

11:00 G2H7-0305 細胞シート高速積層技術を用いて構築した立体心筋組織の移植
……○田原 滉大[1], 坂口 勝久[1], 本間 順[3], 松浦 勝久[3], 岩﨑 清隆[2], 清水 達也[3]（[1] 早大院・先進理工, [2] 早大・創造理工, [3] 女子医大・先端生命研）

11:00 G2H7-0306 ニワトリシアル酸転移酵素による細胞増殖調節
……牧田 芳隆[2], 奥嵜 雄也[1], 佐野 観月[2], 金岡 英徳[2], 飯島 信司[3], ○西島 謙一[1]（[1] 名大院・生命農学, [2] 名大院・工, [3] 愛工大・工）

11:00 G2H7-0307 細胞培養における各種の糖添加による時計遺伝子 *Per2* の発現再振動
……垂水 遼真[1], ムタイリプ カイヤ[1], 深浦 恵梨[1], ○藤原 政司[1,2], 高木 睦[1,2]
([1]北大院・総合化学, [2]北大院・工)

11:00 G2H7-0308 魚血液に由来する栓球溶解物を用いた CHO 細胞の増殖促進
……○猪股 亮佑[1], 藤原 政司[1,2], 森島 輝[3], 塩谷 格[3], 山原 研一[4], 高木 睦[1,2]
([1]北大院・総合化学, [2]北大院・工, [3]日本水産, [4]兵庫医大)

11:00 G2H7-0309 CHK 細胞を用いた誘導型人工遺伝子発現システムによる scFv-Fc 抗体の生産
…… ○境 紘洋, 河邉 佳典, 巖 流征, 上平 正道（九大院・工）

11:00 G2H7-0310 MCA/GCM 法により回収した胃がん患者由来 CTC の単一細胞トランスクリプトーム解析
…… ○小林 侃[1], 根岸 諒[1], 山川 ひとみ[1], 堀川 万優子[1], 下山 達[2],
小泉 史明[2], 澤田 武志[2], 田中 剛[1], 吉野 知子[1]
([1]農工大院・工, [2]がん・感染症センター都立駒込病院)

11:00 G2H7-0311 がん細胞の柔軟化に関わる中間径フィラメントネスチンのテール領域とアクチン繊維の力学的相互作用解析
……○山岸 彩奈[1], 内田 幸希[2], 上田 太郎[3], 吉本 将悟[4], 堀 克敏[4], 中村 史[1,2]
([1]産総研・細胞分子工学, [2]農工大院・工, [3]早大院・先進理工, [4]名大院・工)

11:00 G2H7-0312 アミノ酸一次配列を用いた AI 予測に基づくアクチン-ビメンチン相互作用部位の同定
……○内田 幸希[1], 山岸 彩奈[2], 似田 優太[3], 三宅 淳[3], 中村 史[1,2]
([1]農工大院・工, [2]産総研・細胞分子工学, [3]阪大院・工)

11:00 G2H7-0313 外力印加時に塩化物イオンを排出するがん浸潤関連チャネル Clic1 の機能解析
……○長田 あかね[1], 山岸 彩奈[2], 中村 史[1,2]（[1]農工大院・工, [2]産総研・細胞分子工学）

ランチタイムセミナー

L2H5-0001 天野エンザイム株式会社/株式会社樋口松之助商店

H5 会場（12:00〜13:00）

L2H7-0001 国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）

H7 会場（12:00〜13:00）

シンポジウム

H1 会場（13:00〜15:00）

持続型・循環利用型社会を実現する複合微生物工学研究の最前線と展望

13:00 はじめに
…… 田代 幸寛
座長：**田代 幸寛**

13:10 S2H1-0601 好適制御に向けたモデル複合微生物系の形成機構
……○二又 裕之[1,2,3]（[1]静大・グリーン科技研, [2]静大・工, [3]静大・創科技院）

13:35 S2H1-0602 下水汚泥の嫌気消化促進のための微生物間相互作用の理解
…… ○前田 憲成（九工大院・生体工）

14:00 休憩

座長：**前田 憲成**

14:05 S2H1-0603 複合微生物 + 電気化学で有機性廃棄物の処理と発電
…… ○井上 謙吾（宮崎大・農）

14:25 S2H1-0604 自家熱型高温好気消化-液肥製造法制御のための複合微生物工学からのアプローチ
…… ○酒井 謙二, 田代 幸寛（九大院・農）

14:55 おわりに
…… 井上 謙吾

H1 会場（15:30〜17:30）

カーボンリサイクルに貢献する微生物

15:30 はじめに
…… 木邑 敏章

座長：**森川 正章**

15:40 S2H1-0701 微細藻類研究における課題および微細藻類研究拠点での取組について
…… ○野村 純平, 青柳 裕之, 青木 慎一, 田村 綾子（一般社団法人日本微細藻類技術協会）

16:00 S2H1-0702 微細藻バイオマスのカスケード利用に基づくバイオジェット燃料事業モデルの実証研究
…… ○鈴木 秀幸（ユーグレナ）

座長：**常田 聡**

16:20 S2H1-0703 カーボンニュートラル実現に向けた微細藻類産業利用の可能性
…… ○星野 孝仁（ちとせ研究所）

16:40 休憩

座長：**加藤 純一**

16:45 S2H1-0704 炭素循環型微生物発酵プロセスの開発
…… ○中島田 豊（広島大院・統合生命科学）

座長：**中島田 豊**

17:05 S2H1-0705 水素細菌とその利用
…… ○西原 宏史（茨城大農・食生科）

17:25 おわりに
…… 加藤 純一

H2 会場（13:00〜15:00）

バイオとデジタルの融合による世界最先端のバイオエコノミー社会の実現に向けて
〜データ駆動型バイオテクノロジーを支えるデータプラットフォーム〜

座長：**川﨑 浩子**

13:00 S2H2-0801 生物資源データの活用の現状と展望
……○仲嶋 翼（三菱 UFJ リサーチ&コンサルティング）

13:26 S2H2-0802 データ駆動型バイオロジーの実現に向けたメタボロミクス技術開発
……○津川 裕司[1,2,3]（[1] 農工大院・工, [2] 理研・生命医科学, [3] 理研・環境資源）

13:51 S2H2-0803 腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来
……○福田 真嗣[1,2,3,4]
（[1]慶大・先端生命研, [2]神奈川産技総研, [3]筑波大・医, [4]メタジェン）

14:16 S2H2-0804 NITE が目指す微生物を基軸としたデータ利活用戦略
……○市川 夏子（NITE・NBRC）
座長：**福﨑 英一郎**

14:41 パネルディスカッション
……講演者全員

H2 会場（15:30〜17:30）

バイオエコノミーとグローカルバイオテクノロジー

15:30 はじめに
……古賀 雄一
座長：**古賀 雄一**

15:40 S2H2-0901 サーキュラーバイオエコノミーにおける酵素学の重要性
……○五十嵐 圭日子（東大院・農生科）
座長：**仲嶋　翼**

16:05 S2H2-0902 沖縄から世界に向けたバイオエコノミー産業の創出を目指して
……○清水 雅士[1,2]（[1]マイクロバイオファクトリー株式会社, [2]Curelabo 株式会社）

16:30 S2H2-0903 クリエイティブコミュニティの中で生まれるバイオテクノロジーの新たな視点と発展
……○石塚 千晃（元株式会社ロフトワーク/ BioClub ディレクター）
座長：**河原崎 泰昌**

16:55 S2H2-0904 味噌用乳酸菌の工業的培養と「信州味噌」ブランド
……○石川 諭史（信州味噌研）

17:20 おわりに
……河原崎 泰昌

H3 会場（13:00〜15:00）

再構成的アプローチによる生物システムの理解と工学的活用

13:00 はじめに
……田端 和仁
座長：**田端 和仁**

13:15 S2H3-1001 擬天然ペプチド薬剤を創る再構成型人工生合成システム
……○後藤 佑樹（東大院・理）

13:35 S2H3-1002 細胞が針状ケイ酸体を運び繋ぎ足す新たな動物の骨格建築工法
……○船山 典子（京大院・理）

13:55 S2H3-1003 心臓と筋肉の収縮機構の違いを紐解く
……○茅 元司（東大院・理）
座長：**後藤 佑樹**

14:15 S2H3-1004 細胞内温度イメージングによる細胞内伝熱工学
……○岡部 弘基[1,2], 寶田 雅治[1], 船津 高志[1]（[1]東大院・薬, [2]JST・さきがけ）

14:35 S2H3-1005 植物免疫の時空間理解に向けた 1 細胞操作系の確立
……○別役 重之（龍谷大・農）

14:55 S2H3-1006 ウイルス 1 粒子計測によるウイルス集団の heterogeneity
……○田端 和仁（東大院・工）

15:15 おわりに
……後藤 佑樹

H3 会場（15:30〜17:30）

大学ブランドのお酒造りから学ぶ発酵醸造学

15:30 はじめに
……榊原 陽一
座長：**林　圭**

15:35 S2H3-1101 宮崎大学焼酎「薫陶」に至る長い道のり
……○清 啓自, 榊原 陽一, 水光 正仁（宮崎大・農）
座長：**青木 航**

15:50 S2H3-1102 佐賀大学オリジナル清酒「悠々知酔」に関わる微生物開発について
……○馬場 嵩一朗[1], 澤田 和敬[2], 永野 幸生[1,3], 折田 亮[4], 木村 圭[1,4], 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]佐賀大・分析セ, [4]佐賀大・農）
座長：**中島 一紀**

16:10 S2H3-1103 山梨大学が取り組むワイン科学教育
……○乙黒 美彩（山梨大・ワイン研）
座長：**榊原 陽一**

16:35 S2H3-1104 タテ・ヨコ・ナナメのつながり「10」〜鹿児島大学の取り組み〜
……○吉﨑 由美子[1,2]（[1]鹿児島大・農, [2]鹿児島大院・連農）
座長：**小林 元太**

17:00 S2H3-1105 東北大学オリジナル日本酒「萩丸」の製品コンセプトと現状
……○五味 勝也（東北大院・農）

17:25 おわりに
……小林 元太

H6 会場（13:00〜16:00）

《国際シンポジウム》KSBB-BEST-SBJ 合同シンポジウム　Biotechnology for SDGs

13:00 Opening Remarks
……Kazuhito Fujiyama
座長：**Kazuhito Fujiyama**

13:10 S2H6-1201 Nanobiodevice based on Biohybrid Material toward Organ-on-a-Chip and Biohybrid Robot
……○Jeong-Woo Choi
（Dept. of Chem. and Biomol. Sogang Univ. Korea）

座長：**Jeong-Woo Choi**

13:30 S2H6-1202 Application of single-chamber electro-fermentation system for enhancing synthesis of polyhydroxyalkanoate

……○John Chi-Wei Lan

（Yuan Ze University, Taiwan）

座長：**John Chi-Wai Lan**

13:50 S2H6-1203 Membrane dynamics and cell signaling

……○Masahiro Takagi（Sch. Mater. Sci., JAIST）

14:10 S2H6-1204 The Korean Bioindustry and Policy

……○Youn Hee Choi

（Center for Growth Engine Industries, Korea Institute for Industrial Economics & Trades (KIET), Korea）

14:30 Break

座長：**Youn Hee Choi**

14:35 S2H6-1205 Viral gene delivery for gene and cell therapy applications

……○Jae-Hyung Jang

（Dept. Chem.Biomol. Eng., Yonsei Univ.）

座長：**Jae-Hyung Jang**

14:55 S2H6-1206 Using electrorotation for characterizing microorganisms at single-cell level

……○Hsiang-Yu Wang[1], Yu-Sheng Lin[1], Bruno Le Piouffle[2]

（[1] Dept. Eng. Syst. Sci., National Tsing Hua University, Taiwan, [2] ENS Paris Saclay, CNRS Institut d'Alembert, LUMIN, France）

座長：**Hsiang-Yu Wang**

15:15 S2H6-1207 Biosensing of pancreatic cancer cell-derived exosomes using a glycan-lectin affinity

……Yonghyun Choi, ○Jonghoon Choi

（Chung-Ang University）

座長：**Jonghoon Choi**

15:35 S2H6-1208 Peptide functionalized biodevices for biomedical applications

……○Mina Okochi（Sch. Mater. Chem. Technol., Tokyo Tech）

15:55 Closing Remarks

……Masahiro Takagi

第 3 日（10 月 29 日）

太字の一般講演は今年度の生物工学学生優秀賞（飛翔賞）受賞者の発表です.

開始時間	講演番号	演　　題	発表者氏名（所属） ○印は講演者を示す

受賞講演（生物工学奨励賞（照井賞），生物工学アジア若手賞）

H1 会場（9:00〜9:20）

9:00 A3H1-0001 **〈生物工学奨励賞（照井賞）〉** 座長：**上平 正道**

成分分析と機械学習を用いた微生物培地解析に関する研究

……○小西 正朗（北見工大）

H7 会場（9:00〜9:20）

9:00 A3H7-0001 **〈生物工学アジア若手賞〉** 座長：**藤山 和仁**

Multiple bacteriocin production and the novel circular bacteriocin of newly isolated lactic acid bacteria

……○Rodney Perez

（Nat. Inst. Mol. Biol. Biotechnol., Univ. Phil. Los Banos）

一般講演

H1 会場（10:00〜10:30）

【環境浄化，修復，保全技術】

10:00 G3H1-0201 糸状菌 *Acremonium* sp. TUS-MM1 株のパツリン分解機能の解析

……○佐藤 梨奈[1], 三田 芽実[1], 中川 博之[2], 古屋 俊樹[1]

（[1]東京理科大院・理工, [2]農研機構・基盤技術研究本部高度分析研究センター）

10:00 G3H1-0202 放線菌 *Streptomyces* sp. TUS-ST3 株によるジフェニルエーテル化合物の分解

……○石井 香菜子[1], 利根川 聡史[1], 羽部 浩[2], 古屋 俊樹[1]

（[1]東京理科大院・理工, [2]産総研・環境創生）

10:00 G3H1-0203 水圏環境のデータベース解析

……○竹内 諒, 梶原 尚之, Tran Quoc Thinh, 荒木 希和子, 久保 幹（立命館大院・生命科学）

10:00 G3H1-0204 植物の病原性微生物の感染と土壌環境の関係解析

……○雲川 雄悟[1], 佐々木 匠[2], Tran Quoc Thinh[1], 荒木 希和子[1], 久保 幹[1]

（[1]立命館大院・生命科学, [2]立命館大・生命科学）

10:00 G3H1-0205 微生物を用いた新規雨水浄化処理装置の開発

……○戸倉 隆人, Tran Quoc Thinh, 荒木 希和子, 久保 幹（立命館大院・生命科学）

10:00 G3H1-0206 炭酸カルシウムと多糖に結合する融合タンパク質の作製とバイオセメントへの影響

……○酒井 仁, 中島 一紀, 川邉 徹弥, Hiranya Nawarathna, 川崎 了（北大院・工）

10:00 G3H1-0207 イガイ接着タンパク質を用いたマグネタイトの凝集コントロール
……○佐藤 岳大, 中島 一紀, 宮川 寛希, Anju Pilakka Veedu, 川﨑 了（北大院・工）

10:00 G3H1-0208 環境診断に資する指標決定に向けたファイトレメディエーションにおけるデータサイエンス
……○工藤 宏史[1], 韓 凝[1], 横山 大稀[2], 簡 梅芳[1], 菊地 淳[2], 井上 千弘[1]
（[1]東北大院・環境, [2]理研・環境資源）

10:00 G3H1-0209 複合環境下での 1,4-ジオキサン生分解における非分解菌の役割を示す経験的証拠
……○簡 梅芳[1], Tusher Tanmoy Roy[1,2], 井上 千弘[1]（[1]東北大院・環境, [2]Dept. Environ. Sci. Resour. Manage., Mawlana Bhashani Sci. Tech. Univ.）

10:00 G3H1-0210 光刺激応答性バイオナイロンの海水中での光暴露後の変化と微生物群集構造に対する影響
…… ○若井 暁[1], 塚谷 京[1], 磯部 紀之[2], 野牧 秀隆[1], 金子 達雄[3]
（[1]海洋研・超先鋭, [2]海洋研・海洋機能, [3]北陸先端大・環境エネルギー）

10:00 G3H1-0211 アンモニアガス耐性細菌の単離とアンモニア臭脱臭技術開発
…… 多田 彩華, 山崎 竜杜, 伊藤 優吾, 清 啓自, ○吉田 ナオト（宮崎大・農）

10:00 G3H1-0212 フェノールスルホン酸及びハイドロキノンスルホン酸分解菌を用いたビスフェノール S 代謝物の分解
…… ○武尾 正弘, 猪野 椋太, 大滝 世和（兵庫県大院・工）

10:00 G3H1-0213 Effective use of $Ca(OH)_2$ powder for disinfectant in farm and flooded area
……○Na Zhu, Shinji Matsuzaki, Kento Azuma, Xuguang Lin, Masahiro Kuragano, Koji Uwai, Shinya Yamanaka, Kiyotaka Tokuraku
（Muroran Inst. Technol.）

10:00 G3H1-0214 *Pseudonocardia* sp. D17 が保有する 1,4-ジオキサン分解酵素による塩素化エチレン類の好気的分解
…… ○西峯 隆悟, 南薗 洸佑, 中澤 昌俊, 井上 大介, 池 道彦（阪大院・工）

10:00 G3H1-0215 バイオプロセスを用いたアンチモン化合物合成の試み
…… ○村上 智哉[1], 富永 依里子[2], 岡村 好子[1]（[1]広島大院・統合生命科学, [2]広島大院・理）

H1 会場（11:00〜11:30）

【環境工学，廃水処理技術】

11:00 G3H1-0301 長期宇宙滞在に向けた微細藻類による水再生の検討
……○吉田 江里菜[1], 伊藤 喜龍[1], 加藤 悠一[2], 山崎 千秋[3], 蓮沼 誠久[1,2]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大・先端バイオ工学研究セ, [3]宇宙航空研究開発機構）

11:00 G3H1-0302 酸素供給能は自家熱型高温好気消化プロセスに影響を及ぼす
……○井出本 貴宏, Zhang Min, 田代 幸寛, 丸山 明子, 酒井 謙二（九大院・生資環）

11:00 G3H1-0303 （講演中止）

11:00 G3H1-0304 Enrichment of thermophilic methanogenic microflora from mesophilic waste activated sludge and evaluation of microbial community dynamics
…… ○Sumire Nakakoji[1], Melly Mellyanawaty[2,4], Masahiro Tatara[1], Lisendra Marbelia[2], Sarto[2], Irfan D.Prijambada[3], Wiratni Budhijanto[2], Yoshiyuki Ueno[5]
（[1]Kajima Technol. Res. Inst., [2]Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, Universitas Gadjah Mada, [3]Faculty of Agriculture, Universitas Gadjah Mada, [4]Environmental Engineering Department, Faculty of Engineering, Universitas Muhammadiyah Tasikmalaya, [5]Alchemic Lab, Inc.）

11:00 G3H1-0305 Improvement of ammonium-rich waste to bioenergy conversion from illuminated anaerobic bioreactor: optimization and practical feasibility
……○Yunxin Zhu, Zhiyuan Liu, Cheng Zhang, Jie Ming, Yingnan Yang
（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

11:00 G3H1-0306 活性汚泥由来テレフタル酸分解菌の検討
……○鵜殿 彩[1], 佐藤 聖[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)

11:00 G3H1-0307 止水域における対流型水処理装置を用いた物質循環のマスバランス解析
……○中平 創, 竹内 諒, Tran Quoc Thinh, 荒木 希和子, 久保 幹（立命館大院・生命科学）

11:00 G3H1-0308 海洋生分解性プラスチックの評価に適した酵素製剤の開発
……○常盤 豊（グリーンテクノプラス）

11:00 G3H1-0309 高塩濃度下で結晶性セレンを生成する亜セレン酸還元微生物集積系の特徴づけ
……○内田 寛大[1], 上田 優弥[1], 井上 大介[1], 西川 宏[2], 池 道彦[1]
([1]阪大院・工, [2]阪大・接合研)

11:00 G3H1-0310 レアアースイオンを選択的に回収できる機能性シルクの創製
……○石田 亘広[1], 畠中 孝彰[1], 細川 洋一[1], 小島 桂[2],
飯塚 哲也[3], 寺本 英敏[2], 瀬筒 秀樹[3], 亀田 恒徳[2]
([1]豊田中研, [2]農研機構・新素材開発, [3]農研機構・カイコ基盤技術)

11:00 G3H1-0311 Removal of copper ions from aqueous phase by wood leaf-derived biochar
……○Kyung Bin Oh, Yong-Keun Choi, Hak Jin Song, Jeong Wook Jo, Ju Yeon Lee, Hyung Joo Kim
(Dept. of Biological Engineering, Konkuk Univ.)

11:00 G3H1-0312 微生物農薬としての低栄養細菌の可能性
……○大池 達矢[1,3], 藤澤 綾乃[2], 江邉 正平[1], 岡南 政宏[1,2], 阿野 貴司[1,2]
([1]近畿大院・生物理工, [2]近畿大・生物理工, [3]十和田グリーンタフ・アグロサイエンス株式会社)

11:00 G3H1-0313 リンゴ黒星病拡散予測のための大気バイオエアロゾル観測法の確立
……○小林 史尚[1], 田中 和明[2], 佐野 輝男[2]（[1]弘前大院・理工, [2]弘前大院・農生）

11:00 G3H1-0314 多摩川を対象としたシングルセルゲノム解析による薬剤耐性菌の動態解明
……○塚田 祐子[1], 西川 洋平[2,3], 我妻 竜太[1], 小川 雅人[2,3], 井手 圭吾[1,3], 細川 正人[1], 竹山 春子[1,2,3,4]
([1]早大院・先進理工, [2]早大・ナノライフ創新研, [3]産総研・早稲田 CBBD-OIL, [4]早大・生命動態研)

11:00 G3H1-0315 殺菌コーティング剤の殺菌効果に関する研究
……○町 環多[1], 有路 友一[2], 岩橋 均[1]（[1]岐阜大・応生科, [2]甑園）

H2 会場（9:30〜10:00）

【環境浄化，修復，保全技術】

9:30 G3H2-0101 *Sphingomonas bisphenolicum*AO1 株の芳香族化合物分解における不安定化要因の探索とその改善
……○リュウ ロ[1], 村上 将和[1], 松村 吉信[1,2]（[1]関西大院・理工, [2]関西大・ORDIST）

9:30 G3H2-0102 緑膿菌バイオフィルム形成を抑制または促進する物質の探索
……○俣木 歩実[1], 松村 吉信[2]（[1]関西大院・理工, [2]関西大・ORDIST）

9:30 G3H2-0103 複合微生物系の機能安定性に寄与する因子の探索
……○天野 光喜[1], 本荘 雅宏[2], 池田 麗[3], 石澤 秀紘[4], 木村 元彦[3], 田代 陽介[3], 二又 裕之[4]
([1]静大院・総合科技, [2]静大・創科技院, [3]静大・工, [4]静大・グリーン科技研)

9:30 G3H2-0104 ケモスタット培養系における微生物間相互作用の揺らぎが生み出す異属三菌株の共存機構
……○本荘 雅宏[1], 鈴木 研志[2], 天野 光喜[3], 齋藤 保久[4], 武田 和宏[3],
木村 元彦[3], 石澤 秀紘[5], 田代 陽介[3], 二又 裕之[1,3,5]
([1]静大・創科技院, [2]東大院・農生科, [3]静大院・総合科技, [4]島根大・総合理工,
[5]静大・グリーン科技研)

9:30 G3H2-0105 微生物由来蓄電性鉱物を介した電子共生に基づく嫌気バイオプロセスの向上
……○林 稜也[2], 安池 一貴[2], 片桐 美紀[1], 大前 貴裕[2], 窪野 一郎[2], 田代 陽介[1], 二又 裕之[2,3]
([1]静大・工, [2]静大院・総合科技, [3]静大・グリーン科技研)

9:30 G3H2-0106 基質競合下における代謝ネットワークの進化と微生物共存
……○鈴木 研志[1,5], 上原 悠太郎[2], 栗栖 太[3,5], 野尻 秀昭[4,5]
（[1]東大院・農生科, [2]東大院・工・都市工, [3]東大院・工・水環セ, [4]東大院・農生科・アグテック, [5]東大・CRIIM）

9:30 G3H2-0107 合成ムスク香料の微生物分解
……○小島 史基[1], 松井 徹[1,2], 久保田 朝美[2], 谷村 那子[2], 浦瀬 太郎[1,2]
（[1]東京工科大院・バイオニクス, [2]東京工科大・応生）

9:30 G3H2-0108 Operation of a plant-based air purification filter system under various conditions
……○Jeong Wook Jo, Hak Jin Song, Yong Keun Choi, Ju Yeon Lee, Kyung Bin Oh, Hyung Joo Kim
（Dept. of Biological Engineering, Konkuk Univ.）

9:30 G3H2-0109 栄養源枯渇による *Leptothrix* 属細菌の糸状成長制御
……○久能 樹[1], 山本 達也[1], 小野 絵里香[2], 杉本 真也[3], Utada Andrew[1], 野村 暢彦[1]
（[1]筑波大・生命環境, [2]筑波大院・生命環境, [3]慈恵医大・医）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

9:30 G3H2-0110 有機栽培土壌と化学栽培土壌における根の分布パターンの解析
……○坪倉 美紗, Tran Quoc Thinh, 荒木 希和子, 久保 幹（立命館大院・生命科学）

9:30 G3H2-0111 土壌環境と地温の関係解析
……○平井 佑治, Tran Quoc Thin, 荒木 希和子, 久保 幹（立命館大院・生命科学）

9:30 G3H2-0112 木質バイオマスの農地利用を目指した新規土壌の開発
……○西原 大智, Tran Quoc Thinh, 荒木 希和子, 久保 幹（立命館大院・生命科学）

9:30 G3H2-0113 Development of organic soil condition for tomato cultivation
……○Zakirul Islam, Tran Quoc Thinh, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo
（Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.）

9:30 G3H2-0114 セルロース資化で発現誘導されるイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* 由来 CDH 遺伝子の解析
……○仲尾 日菜子, 本田 友音, 尾高 雅文, 松村 洋寿（秋田大院・理工）

9:30 G3H2-0115 環境に放出されたリンの植生利用の検討
……○滝口 昇, 花原 薫, 汲田 幹夫（金沢大・理工）

H2 会場（10:30〜11:00）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

10:30 G3H2-0201 壁面で生育する気生微細藻類の単離法の検討と高生育株のスクリーニング
……○石倉 優大, 油井 信弘, 藤井 克彦（工学院大・工）

10:30 G3H2-0202 気生微細藻類 BRCH-R-002 のストレス培養条件の検討とカロテノイド蓄積
……○野崎 正汰, 油井 信弘, 藤井 克彦（工学院大・工）

10:30 G3H2-0203 気生微細藻類 *Coccomyxa subellipsoidea* KGU-D001 の 水ストレス馴化機構に関する解析
……○森田 令一, 油井 信弘, 藤井 克彦（工学院大・工）

10:30 G3H2-0204 光化学系 II の水素発生を利用したバイオ燃料電池
……○杉山 葵, 岩橋 暁成, 堤 丈瑠, 川上 比奈子, 松尾 康光（摂南大院・理工）

10:30 G3H2-0205 グリシルセリンペプチドの水和とプロトン伝導
……○瀬溝 人生, 甲斐 美花, 西村 仁, 松尾 康光（摂南大院・理工）

10:30 G3H2-0206 ハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体を用いた新規無加湿プロトン伝導体
……○古関 智樹, 松尾 康光（摂南大院・理工）

10:30 G3H2-0207 Photon number based light stimulation strategy for enhancing bio-hydrogen conversion in a hybrid bioreactor
……○Zhiyuan Liu, Yunxin Zhu, Yujia Chen, Yingnan Yang（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

10:30 G3H2-0208 単細胞緑藻のみを用いて作製した細胞プラスチックスの解析と評価
…… ○鶴田 茜[1], 中西 昭仁[1,2]（[1]東京工科大・応生, [2]東京工科大院・バイオニクス）

10:30 G3H2-0209 池の光合成微生物を原料とした細胞プラスチックスの作製と評価
…… ○渡邊 真吏菜[1], 中西 昭仁[1,2]（[1]東京工科大院・バイオニクス, [2]東京工科大・応生）

10:30 G3H2-0210 *Citrobacter braakii*TB-96 株による廃グリセロールからの 1,3-プロパンジオール生産
……○山口 鳳大, 成田 拓真, Alawi Aseel, 中島 敏明（筑波大）

10:30 G3H2-0211 Metabolic Engineering of *Citrobacter braakii* strain TB-96 for the Production of 1,3-propanediol and 3-hydroxypropionic Acid from Glycerol
……○Aseel Alawi, Takuma Narita, Mizuki Matsumoto, Toshiaki Nakajima-Kambe（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

10:30 G3H2-0212 花酵母による廃棄乳を基質としたカロテノイド高含有飼料（SCP）生産
…… ○大久保 愛理, Khin Thandar, 大塚 光雄, 中島 敏明（筑波大院・生命環境）

10:30 G3H2-0213 魚類養殖におけるプロバイオティクス飼料開発
……○山田 紗里奈[1], 岡﨑 文美[1], 梅川 碧里[1], 中谷 肇[2], 堀 克敏[2], 田丸 浩[1]（[1]三重大院・生資, [2]名大院・工）

10:30 G3H2-0214 微生物による揮発性有機塩素化合物の共代謝による分解と生分解性プラスチックへの転換
…… ○張 ヨンチョル（室工院・工・環境創生工学）

10:30 G3H2-0215 食品排水から単離した C1 株の酢酸生産における最適培養条件の検討
…… ○井村 和茉, 張 ヨンチョル（室工院・工・環境創生工学）

H2 会場（11:30〜12:00）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

11:30 G3H2-0301 *Desulfovibrio* sp. HK-II 株の電気化学的代謝制御に向けた電位応答性の評価
……○大前 貴裕[1], 安藤 翔太[1], 窪野 一郎[1], 工藤 優輝[1], 田代 陽介[2], 二又 裕之[3]（[1]静大院・総合科技, [2]静大・工, [3]静大・グリーン科技研）

11:30 G3H2-0302 硫酸還元細菌 *Desulfovibrio* sp.HK-II 株の電子受容体変化に伴う代謝変換
……○窪野 一郎[1], 大前 貴裕[1], 工藤 優輝[1], 林 稜也[1], 田代 陽介[2], 二又 裕之[3]（[1]静大院・総合科技, [2]静大・工, [3]静大・グリーン科技研）

11:30 G3H2-0303 中度好塩性細菌 *Halomonas elongata* における不揮発性腐敗アミンを単一炭素・窒素源としたエクトイン生産
…… ○仲山 英樹[1,2,3], 河本 亮[2], 三好 勝之[2]（[1]長崎大・総合生産科学域, [2]長崎大院・水環, [3]長崎大・海洋未来イノベ）

11:30 G3H2-0304 Development of *Halomonas elongata* cell factory, which produces GABA in the cell and displays phytase on the cell surface
…… ○Ziyan Zou[1], Hideki Nakayama[1,2,3]（[1]Grad. Sch. Fish. Environ. Sci., Nagasaki Univ., [2]Inst. Sci. Technol., Nagasaki Univ., [3]Org. Marine Sci. Technol., Nagasaki Univ.）

11:30 G3H2-0305 海洋細菌 *Cobetia* sp. IU180733JP01(5-11-6-3)が poly(3-hydroxybutyrate)合成に利用可能な炭素源の検討
……○阿部 汐里[1], 松本 晶[1], 森谷 大樹[1], 河合 盛進[2], 鈴木 宏昭[2], 山田 美和[1]（[1]岩手大院・農, [2]トヨタ紡織・新規領域開拓部）

11:30 G3H2-0306 海洋底泥からのみかん外皮分解菌叢の探索
……○平田 さや[1], 小笠原 豪[1], 岡村 好子[2], 中島田 豊[2], 堀尾 京平[2], 早瀬 伸樹[1], 喜多 晃久[1]
([1]新居浜高専, [2]広島大院・統合生命科学)

11:30 G3H2-0307 海洋性アルギン酸分解菌叢におけるアルギン酸分解の分子メカニズム
……○堀尾 京平[1], 喜多 晃久[2], 高橋 宏和[1], 渡邉 研志[1], 秋 庸裕[1], 中島田 豊[1], 岡村 好子[1]
([1]広島大院・統合生命科学, [2]新居浜高専)

11:30 G3H2-0308 草食性陸ガニの生産するリグニン酸化酵素
…… ○三宅 克英, 永倉 佑真（名城大・理工）

11:30 G3H2-0309 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, 志波 勇介, 今久保 友則, 藤田 雄大, 秦野 琢之
（福山大・生命工）

11:30 G3H2-0310 セロオリゴ糖およびキシロオリゴ糖製造に適した *Trichoderma reesei* 変異株の獲得
…… ○野口 拓也, 加川 雄介, 齋藤 悠香, 平松 紳吾, 山田 勝成（東レ株式会社 先端融合研究所）

11:30 G3H2-0311 担子菌酵母の収集と特性評価
……○谷村 あゆみ[1], 足立 光[2], 田邊 公一[1,2], 島 純[1,2]
([1]龍大・発酵セ, [2]龍大院・農)

11:30 G3H2-0312 *Bacillus* 属細菌 IA 株と燻炭を組み合わせた微生物資材の開発 2
……○江邉 正平[1], 松瀬 一平[2], 大池 達矢[1], 岡南 政宏[1,2], 阿野 貴司[1,2]
([1]近畿大院・生物理工, [2]近畿大・生物理工)

11:30 G3H2-0313 固定化微生物を用いたタングステン酸水溶液からのタングステンの除去、回収、リサイクル
……○鶴田 猛彦[1], 佐藤 樹[1], 武井 大翔[1], 田口 翔太[1], 屋須 雅人[1], 宮里 匠[2]
([1]八戸工業大学工学部, [2]八戸工業大学大学院工学研究科)

11:30 G3H2-0314 α-1,3-グルカンを用いた新規機能性素材の開発
…… ○小倉 太一[1], 大垣内 誠[2], 豊竹 洋佑[1], 松井 大亮[1], 若山 守[1]
([1]立命館大院・生命科学, [2]島津製作所)

11:30 G3H2-0315 新奇な光半導体の光電変換反応による非接触殺菌に関する研究
…… ○田中 賢二[1], 岩下 真子[1], 米元 舞[1], 伊東 謙吾[2]
([1]近畿大・産理工, [2]（株）伊都研究所)

H3 会場（9:00〜9:30）

【生物化学工学】

9:00 G3H3-0101 酵母における有機酸資化経路の確立とバイオリファイナリー展開
……○壷井 ひかり[1], Prihardi Kahar[1], 近藤 昭彦[2], 荻野 千秋[1]
([1]神戸大・工, [2]神戸大院・科技イノベ)

9:00 G3H3-0102 サンプリング過程に含まれる火炎殺菌操作が微生物の振盪フラスコ培養に及ぼす影響の解析
…… ○高橋 将人, 青柳 秀紀（筑波大・生命環境系）

9:00 G3H3-0103 電界放出形走査電子顕微鏡（FE-SEM）を用いた微生物の簡易的観察手法の検討
…… ○松井 春美[1], 近藤 みずき[2], 高橋 美幸[2], 齊藤 信雄[2], 阿部 勝正[1]
([1]函館高専, [2]長岡技科大)

9:00 G3H3-0104 （講演中止）

9:00 G3H3-0105 液体培養下において増殖速度が接合菌 *Mucor lusitanicus* のペレットサイズに与える影響
…… ○大澤 亮[1], 村上 周一郎[2]（[1]明治大院・農, [2]明治大・農）

9:00 G3H3-0106 微小液滴を用いた大腸菌 Persisters からの覚醒に関わる発現遺伝子の探索
……○亀島 礼美[1,2], 大田 悠里[2], 千原 康太郎[3], 森田 雅宗[2], 野田 尚宏[1,2]
([1]東大院・新領域, [2]産総研・バイオメディカル, [3]ヘルムホルツ RNA 感染研究所)

9:00 G3H3-0107 食品添加物が腸内細菌やモデル複合系に及ぼす影響の解析
……○芦沢 紬希, 青柳 秀紀（筑波大院・生物資源科学学位プログラム）

9:00 G3H3-0108 腸上皮細胞と腸内細菌の共培養法の開発（第２報）
……○梅原 嘉宏[1], 遠藤 輪[2], 青柳 秀紀[2]（[1]筑波大院・生物資源科学学位プログラム, [2]筑波大・生命環境系）

9:00 G3H3-0109 微生物平板培養の諸特性の解析と利用
……○岡部 麻織[1], 原田 玲奈[2], 坂元 仁[3], 土戸 哲明[4], 青柳 秀紀[1,2]
（[1]筑波大院・生物資源科学学位プログラム, [2]筑波大・生命環境, [3]関西大・化生工, [4]大阪府大・微制研）

9:00 G3H3-0110 代謝経路の分断による 1,2-プロパンジオールの好気発酵生産技術の開発
……○野中 大輔[1], 藤原 良介[2], 田中 勉[1], 近藤 昭彦[3]
（[1]神戸大院・工, [2]理研・環境資源, [3]神戸大院・科技イノベ）

9:00 G3H3-0111 非水系胞子変換反応による Progesterone の新規なスクリーニング法の開発
……○白松 李茉, 山本 郁名, 小田 忍（金工大・ゲノム研）

9:00 G3H3-0112 カーボンブラックを用いた生物学的利用法の開発
……○山本 尚毅[1], 沖野 智也[3], 的場 直樹[3], 中西 昭仁[1,2]
（[1]東京工科大・応生, [2]東京工科大院・バイオニクス, [3]関西熱化学株式会社）

9:00 G3H3-0113 配列制御型酵素を用いたグリコール酸含有ポリヒドロキシアルカン酸の生合成
……○穂積 侑伽[1], 冨田 宏矢[2], 荒井 修造[3], 榊原 早也果[3], Mareschal Robin[4], 大井 俊彦[2], Zinn Manfred[4], 松本 謙一郎[2]
（[1]北大工, [2]北大院・工, [3]北大院・総合化学, [4]HES-SO Valais-Wallis）

9:00 G3H3-0114 Identification of a structurally novel lipoyl synthase in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*
……○Jian-Qiang Jin, Shin-ichi Hachisuka, Takaaki Sato, Tsuyoshi Fujiwara, Haruyuki Atomi
（Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ.）

H3 会場（10:00〜10:30）

【生物化学工学】

10:00 G3H3-0201 サケ・マス類のレッドマウス病原因菌 *Yersinia ruckeri* の経皮感染モデルの構築
……○中谷 肇, 堀 克敏（名大院・工）

10:00 G3H3-0202 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 3 報）
……○藤野 亜琴[1], 菊田 実花[2], 青柳 秀紀[1,2]（[1]筑波大院・生物資源科学学位プログラム, [2]筑波大院・生命環境）

10:00 G3H3-0203 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（第 2 報）
……増田 亜理沙[1], ○高津 あゆみ[2], 青柳 秀紀[1,2]（[1]筑波大・生命環境, [2]筑波大・生物資源）

10:00 G3H3-0204 ウグイス糞の諸特性と細菌叢の解析とその利用【第 2 報】
……○石本 弥子, 青柳 秀紀（筑波大院・生物資源科学学位プログラム）

10:00 G3H3-0205 新規ギ酸資化菌の探索方法の開発
……○柴田 和紘[1], 伊原 正喜[1,2]（[1]信州大院・総理工研, [2]先鋭領域融合研究群バイオメディカル研）

10:00 G3H3-0206 CO_2 conversion to acetate and ethanol by microbial electrosynthesis using *Clostridium ragsdalei*
……○Huan Ren[1,2], Kazuaki Ninomiya[1,2]（[1]Grad. Sch. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ., [2]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.）

10:00 G3H3-0207 ダイズの成長に伴う根圏微生物叢の変動解析
……○木伏 真子[1], 西川 洋平[2,3], 細川 正人[1], 井手 圭吾[1,3], 小川 雅人[2,3], 穴井 豊昭[5], 竹山 春子[1,2,3,4]
（[1]早大院・先進理工, [2]早大・ナノライフ創新研, [3]産総研・早大 CBBD-OIL, [4]早大・生命動態研, [5]九大院・農）

10:00 G3H3-0208 セルロースメンブランプレートを用いた植物生育促進細菌の獲得と評価
……○藤原 優人[1], 秋本 千春[2], 青柳 秀紀[1]（[1]筑波大院・生物資源科学学位プログラム, [2]農研機構・生物研）

10:00 G3H3-0209 Effect of light conditions on fungal pigment mediated silver nanoparticle biosynthesis and its characterization
……○Nobchulee Nuanaon[1], Sharad Bhatnagar[2], Hideki Aoyagi[1,2]
（[1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

10:00 G3H3-0210 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（第 2 報）
……○小鷹 健太[1], 名取 暁[1], 小山 純弘[2], 青柳 秀紀[1]
（[1]筑波大院・生物資源科学学位プログラム, [2]エイブル株式会社）

10:00 G3H3-0211 微生物を利活用したカセット型「泥の電池」の開発
……○成瀬 茂[1], 牟田 裕二[2], 大藪 隆樹[2], 冨永 昌人[1]
（[1]佐賀大院・理工, [2]ニシム電子工業株式会社）

10:00 G3H3-0212 微生物培養による平板培地 pH 挙動解析と利用 (第 2 報)
……原田 玲奈[1], ○小澤 拓真[2], 青柳 秀紀[1,2]（[1]筑波大・生命環境, [2]筑波大・生物資源）

10:00 G3H3-0213 好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* による外来性たんぱく質の分泌生産
……○荻野 千秋[1], 齊藤 朱音[1], 太田 勝己[1], 屋良 みなみ[1], 小林 友哉[1], 近藤 昭彦[2]
（[1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ）

H3 会場（11:00〜11:30）

【生物化学工学】

11:00 G3H3-0301 噴霧凍結造粒乾燥法による乳酸菌粉体の特性評価
……○川口 晋也, 三隅 雄一, 髙橋 雅人, 小林 祐介（プリス）

11:00 G3H3-0302 耐酸性細菌を利用した有用金属リサイクルシステムの開発
……○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）

11:00 G3H3-0303 緑藻と枯草菌との共培養による増殖特性の変化
……○大山 遥行, 山田 亮祐, 松本 拓也, 荻野 博康（阪府大院・工・化工）

11:00 G3H3-0304 緑藻 *C. reinhardtii* に対する UV 照射時代謝フロー応答の間接的評価
……○小澤 七海[1], 渡邊 雅彦[2], 中西 昭仁[1,2]（[1]東京工科大院・バイオニクス, [2]東京工科大・応生）

11:00 G3H3-0305 *Chlamydomonas reinhardtii* UV 照射株の油脂組成変化に関する評価
……○渡邊 雅彦[1], 小澤 七海[2], 中西 昭仁[1,2]（[1]東京工科大・応生, [2]東京工科大院・バイオニクス）

11:00 G3H3-0306 疎水化アガロースゲルの薬剤吸着挙動および熱力学的評価
……○森滿 優斗, 吉田 昌弘, 武井 孝行（鹿児島大院・理工）

11:00 G3H3-0307 低濃度オゾン曝気の飼育環境維持効果および飼育魚への影響
……○奥村 鈴音（金沢大院・自科）

11:00 G3H3-0308 肝臓様三次元組織との共培養による筋芽細胞の無血清培養
……○猪嶋 理登[1], 仁宮 一章[2]（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術）

11:00 G3H3-0309 灌流培養における CHL-YN 細胞の増殖制御
……○國田 紘夢, Sukwattananipaat Puriwat, 古賀 雄一, 山野-足立 範子, 大政 健史（阪大院・工）

11:00 G3H3-0310 セルサイズゼラチン微粒子をキャリアとする CHO 細胞の振とう培養系
……○長谷部 友権, 山田 真澄, 鵜頭 理恵, 関 実（千葉大院・融合）

11:00 G3H3-0311 燐光消失式酸素センサーの活用による k_La 値測定法の検討
……○佐藤 貴志, 長森 英二（大阪工大・院）

11:00 G3H3-0312 高い正電荷数を有する分岐鎖ポリアミンを用いた抗菌剤の開発
……○廣田 裕介[1], 福田 青郎[1,2], 山内 光陽[2], 増尾 貞弘[2], 岡本 裕也[3], 柳原 格[4], 林 翰佳[5], 藤原 伸介[1,2]
（[1]関西学院大院・理工, [2]関西学院大・生命環境, [3]大阪母子医療セ研・臨床検査, [4]大阪母子医療セ研・免疫, [5]台湾海洋大・生命工学）

11:00 G3H3-0313 新薬開発に向けた抗菌ペプチド・ダブルコオペラティブ効果の原理解明
……○杉原 加織[1], ドラブ エバ[2]（[1]東大・生産研, [2]ジュネーブ大）

H4 会場（9:30〜10:00）

【培養工学】

9:30 G3H4-0101 マイクロ流体デバイスを用いた菌糸生長の屈性の解析
……○山本 里穂, 福田 紗弓, Utada Andrew Shinichi, 竹下 典男（筑波大院・生命環境）

9:30 G3H4-0102 マイクロ流体デバイスで示す糸状菌の菌糸生長における可変性と伸長速度のトレードオフ
……○竹下 典男[1], 山本 里穂[1], 柳沢 直樹[2], 佐藤 良勝[2], 高谷 直樹[1], 福田 紗弓[1]
（[1]筑波大, [2]名大 ITbM）

9:30 G3H4-0103 低温性接合菌の胞子形成に与える環境因子の影響
……○秋葉 奏汰[1], 高橋 結[2], 村上 周一郎[2,3]
（[1]明治大院・農, [2]ミートエポック, [3]明治大・農）

9:30 G3H4-0104 糸状菌における撹拌翼形状とタンパク質生産分泌生産の相関解析
……○小野 太暉[1], 鈴木 智大[3], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[1], 坊垣 隆之[2], 坪井 宏和[2], 加戸 悠[2], 幸田 明夫[2], 辻野 義雄[1]
（[1]神戸大院・工, [2]大関総研, [3]神戸大・工）

9:30 G3H4-0105 麹菌の菌糸分散株における培養液粘度低下がもたらす生産性への影響
……○薄田 隼弥[1], 武藤 清明[2], 市川 暉[2], 宮澤 拳[2], 古明地 敬介[2], 吉見 啓[3,4], 加藤 好一[5], 阿部 敬悦[2,4]
（[1]東北大・農, [2]東北大院・農, [3]京大院・農, [4]東北大・未来研, [5]佐竹化学・攪拌研）

9:30 G3H4-0106 培地中へのエタノールの添加が *Euglena gracilis* に与える影響
……○髙橋 優, 島本 航輔, 小山内 崇（明治大院・農）

9:30 G3H4-0107 *Streptococcus zooepidemicus* が生産するヒアルロン酸の分子量に鉄が及ぼす影響
……○山本 晶穂[1], 丸山 夏歩[1], 山下 大悟[2], 成田 琴美[3], 武内 章[3], 山崎 思乃[2], 片倉 啓雄[2]
（[1]関西大院・理工, [2]関西大・化生工, [3]キユーピー）

9:30 G3H4-0108 ポリ-γ-グルタミン酸とキトサンを用いた微生物凝集法の開発とその利用
……○土井 健生, Parra Gabriel, 尾島 由紘, 東 雅之（阪市大院・工）

9:30 G3H4-0109 土壌より単離した *Bacillus licheniformis* RK14 株の自発的な凝集体形成
……○俣野 沙月, 尾島 由紘, 東 雅之（阪市大院・工）

9:30 G3H4-0110 三次元培養ヒト表皮の角層代謝物解析
……○田中 彩衣, 青木 元秀, 熊田 英峰, 梅村 知也, 内田 達也（東薬大院・生命）

9:30 G3H4-0111 臓器特異的 ECM ゲルを使用したチャイニーズハムスター腎臓由来幹細胞からの嚢胞様組織形成
……○堺 裕輔, 久保 善弘, 河邉 佳典, 上平 正道, 井嶋 博之（九大院・工）

9:30 G3H4-0112 マイクロキャリア表面電荷による歯髄由来間葉系幹細胞の増殖およびタンパク産生能評価
……○大木 悠一朗[1], 原納 弘大[2], 原 雄一[2], 笹島 義志[2], 佐々木 亮[2], 伊藤 隆徳[3], 藤城 光弘[3], 伊藤 大知[1,4]
（[1]東大院・工, [2]旭化成, [3]名大院・医, [4]東大院・医）

9:30 G3H4-0113 半導体加工技術で作製した微細な「ざる」を用いた培地-細胞分離
……○九鬼 真奈絵[1], 長森 英二[1], 四辻 史也[2], 田中 和真[2], 西川 美和子[3], 近藤 孝志[3]
([1]大阪工大・院, [2]大阪工大・工, [3]村田製作所)

H4 会場（10:30〜11:00）

【バイオプロセス】

10:30 G3H4-0201 乳酸発酵における機械学習を用いた天然培地設計
…… ○佐藤 美優, 中島 拓都, 邱 泰瑛, 小西 正朗（北見工大）

10:30 G3H4-0202 エタノールアミンを原料としたグリコール酸微生物合成系の実験計画法による最適化条件の検討
……○林田 宗記[1], 近江 翼[1], 村主 渉[1], 三浦 靖[1], 杉森 大助[2], 山田 美和[1]
([1]岩手大・農, [2]福島大・共生システム理工)

10:30 G3H4-0203 Effect of processing conditions on *Talaromyces purpurogenus* extracellular pigment: Thermal and UV stability kinetics
…… ○Sharad Bhatnagar, Hideki Aoyagi
(Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

10:30 G3H4-0204 CO_2 を再資源化する Gas-to-Lipids バイオプロセスの開発
…… ○奥田 源己[1], 渡邉 研志[1], 中瀬 玄徳[1], 廣谷 蘭[1], 石垣 元務[1], 中島田 豊[1], 松浦 将吏[2], 松山 恵介[3], 秋 庸裕[1]
([1]広島大院・統合生命科学, [2]中国電力株式会社, [3]長瀬産業)

10:30 G3H4-0205 *Ideonella sakaiensis* による PET を発酵原料としたポリヒドロキシアルカン酸の生産
…… ○藤原 涼雅[1], 佐貫 理佳子[2], 網代 広治[3], 福居 俊昭[4], 吉田 昭介[1]
([1]奈良先端大・バイオ, [2]京工繊大・応用生物, [3]奈良先端大・物質, [4]東工大・生命理工)

10:30 G3H4-0206 新規フラクトオリゴ糖生産酵母 *Zalaria obscura* Him3 の単離とフラクトオリゴ糖生産
…… ○吉川 潤[1], 本田 喜克[1], 齋藤 佑衣[1], 佐藤 大斗[1], 岩田 寛[2], 眞榮田 麻友美[1], 柏木 豊[1,2], 前橋 健二[1,2]
([1]東農大・応生科, [2]東農大院・応生科)

10:30 G3H4-0207 **藍藻培養における黄金色藻 *Poterioochromonas* の捕食被害低減の試み：亜リン酸による抑制効果の検討**
…… ○戸田 成美, 村上 博紀, 石田 丈典, 池田 丈, 舟橋 久景, 黒田 章夫, 廣田 隆一
(広島大院・統合生命科学)

10:30 G3H4-0208 大腸菌亜リン酸依存性株の生存性長期化と緊縮応答シグナル分子(p)ppGpp 合成促進因子 YtfK の関係
……○百川 直輝[1], 石田 丈典[1], 池田 丈[1], 舟橋 久景[1], 渡辺 智[2], 黒田 章夫[1], 廣田 隆一[1]
([1]広島大院・統合生命科学, [2]東農大・生命科学)

10:30 G3H4-0209 亜リン酸依存性による生物学的封じ込めを適用した藍藻の pH 依存的増殖メカニズムの解析
……○日野 智仁[1], 石田 丈典[1], 池田 丈[1], 舟橋 久景[1], 渡辺 智[2], 黒田 章夫[1], 廣田 隆一[1]
([1]広島大院・統合生命科学, [2]東農大・生命・バイオ)

10:30 G3H4-0210 CHO 細胞培養プロセスで発生する非天然構造抗体の分離と特性解析
…… ○伊藤 優花[1], 鬼塚 正義[2], 天羽 宏枝[2], 本田 真也[3]
([1]徳島大院・創成科学研究科, [2]徳島大院・社会産理工, [3]産総研)

10:30 G3H4-0211 サメ由来 IgNAR 抗体配列の融合による新規定常領域創製の試み
…… ○吉岡 由真[1], 天羽 宏枝[2], 鬼塚 正義[2]（[1]徳島大院・創成科学研究科, [2]徳島大院・社会産理工）

10:30 G3H4-0212 組換え CHO 細胞の培養プロセスで生じる凝集化抗体の構造的特徴
…… ○鬼塚 正義, 天羽 宏枝（徳島大院・社会産理工）

10:30 G3H4-0213 新規の不純物吸着剤を用いたシンプルで効果的な生物学的製品の精製方法
……○西八條 正克[1,2], 鴻池 史憲[1,2], 平山 翔太[1,2], 末岡 拓馬[1,2], 八浦 妃佐子[1,2], 水口 和信[1,2]
([1]カネカ, [2]次世代バイオ医薬品製造技術研究組合)

H4 会場（11:30〜12:00）

【タンパク質工学】

11:30 G3H4-0301 配列解析のすすめ
…… ○伊藤 創平, 小塚 康平, 川崎 真由, 本山 智晴, 中野 祥吾（静県大院・薬食生命）

【抗体工学】

11:30 G3H4-0302 生体内抗原を標的にした天然構造特異的モノクローナル抗体の作製
…… ○磯﨑 勇志, 湊元 幹太, 冨田 昌弘（三重大院・工）

11:30 G3H4-0303 新規架橋型高親和性低分子ペプチドを使った抗体医薬品の精製技術
…… ○伊東 祐二, 大迫 奈菜, 嶋本 亮輔, 寺西 広翼, 早田 光希, アブドゥール ラフィーク
（鹿児島大院・理工）

11:30 G3H4-0304 High functionality of antibody therapeutics for drug-delivery system using site-specific covalent modification with affinity peptide
……○Md Abdur Rafique, Nana Osako, Ryosuke Shimamoto, Kosuke Teranishi, Koki Hayata, Yuji Ito
(Dept. Chem. & Biosci., Kagoshima Univ.)

11:30 G3H4-0305 がん抑制タンパク質の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製
…… ○田中 基博, 森 宏太, 磯﨑 勇志, 湊元 幹太, 冨田 昌弘（三重大院・工）

11:30 G3H4-0306 抗 HTLV-1 ヒトモノクローナル抗体の HTLV-1 感染者血液からの探索
……○岡澤 歩夢[1], 木原 もなみ[1], 田中 勇悦[2], 福島 卓也[2], 兒島 孝明[1], 中野 秀雄[1]
([1]名大院・生命農学, [2]琉球大学・医学)

11:30 G3H4-0307 大腸菌再構成無細胞タンパク質合成系を用いた リボソームディスプレイによる抗体親和成熟技術の開発
…… ○奥田 理央, 伊藤 玲奈, 兒島 孝明, 中野 秀雄（名大院・生命農学）

11:30 G3H4-0308 CHO 細胞を利用した抗体生産システムにおけるトレハロース添加の影響
…… ○中野 美貴子, 三﨑 亮, 新 勇介, 梶浦 裕之, 藤山 和仁（阪大・生工国際セ）

11:30 G3H4-0309 **酵母提示系を用いたナノ抗体由来の蛍光免疫センサ“mini Q-body”選択法の開発**
…… ○井上 暁人[1], 安田 貴信[1], 北口 哲也[2], 村上 明一[3], 上田 宏[2]
([1]東工大・生命理工, [2]東工大・化学生命研, [3]徳島大院・医歯薬学研)

11:30 G3H4-0310 細胞選択的 RNAi を誘発する抗体-膜貫通ペプチド酵素的架橋設計
…… 安藤 優, ○中澤 光, 三浦 大輔, 梅津 光央（東北大院・工）

11:30 G3H4-0311 Intracellular detection of tumor suppressor protein p53 by Q-body technology
……○Yancen Dai[1], Atsushi Izutani[1], Takanobu Yasuda[1], Tetsuya Kitaguchi[2], Hiroshi Ueda[2]
([1]Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech, [2]CLS, Tokyo Tech)

11:30 G3H4-0312 SpyTag/SpyCatcher システムを用いたナノボディ変異体ライブラリの酵母表層提示
…… ○高市 裕基[1], 梶原 果穂[1], 青木 航[1,2,3,4], 植田 充美[1,2,3,4]
([1]京大院・農, [2]JST, CREST, [3]JST, COI-NEXT, [4]京都バイオ計測セ)

11:30 G3H4-0313 遊離ナノボディのアフィニティをハイスループットに評価するペプチドバーコーディング
…… ○宮崎 拓己[1], 松崎 友星[1], 青木 航[1,2,3,4], 植田 充美[1,2,3,4]
([1]京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻, [2]JST・CREST, [3]JST・COI-NEXT,
[4]京都バイオ計測センター)

H5 会場（9:00〜9:30）

【酵素学，酵素工学】

9:00 G3H5-0101 ヒト腸内細菌 *Bacteroides cellulosilyticus* による海藻多糖 β-1,3-キシランの資化機構 − 分泌型 β-1,3-キシラナーゼの機能解析 −

…… ○堀 沙那恵[1], 岡﨑 文美[1,2]（[1]三重大院・生資, [2]三重大・先端科学研支セ）

9:00 G3H5-0102 *Phanerochatae chrysosporium* 由来新規ジオキシゲナーゼの機能・構造解析

…… ○高橋 泰志, 加藤 大志, 鈴木 裕満, 加藤 雅士, 志水 元亨（名城大院・農）

9:00 G3H5-0103 発酵法・酵素法を組み合わせたハイブリッド型バイオ変換システムの開発

……○上杉 尚輝[1], 佐藤 悠[2], 岡野 憲司[2,3], 木谷 茂[2,3], Kerb Anastasia[4], Wendisch Volker[4], 本田 孝祐[2,3]
（[1]阪大院・工, [2]阪大・生工国際セ, [3]阪大・先導学研機, [4]CeBiTec, Bielefeld Univ.）

9:00 G3H5-0104 *Exophiala jeanselmei* KUFI-6N 株由来シクロアルカノンモノオキシゲナーゼの解析

…… 山本 泰誠, ○小林 健人, 長谷川 喜衛, 岩木 宏明（関西大　化学生命工）

9:00 G3H5-0105 時間分割 X 線結晶構造解析に向けた Co 型 Nitrile Hydratase の変異体作製及び酵素活性比較

……○福田 拓都[1], 仲本 和義[1], 松村 洋寿[1], 野口 恵一[2], 養王田 正文[2], 尾高 雅文[1]
（[1]秋田大院・理工, [2]農工大院・工）

9:00 G3H5-0106 *Aeropyrum pernix* K1 由来のメチル化酵素 M.ApeKI の特性評価とその応用

…… ○林 真央, 菅原 啓亮, 飯田 泰広（神奈川工大院・工）

9:00 G3H5-0107 ゼブラフィッシュ器官形成におけるタンパク質チロシン硫酸化の機能解明

……○黒木 勝久[1], 奥田 菜月[1], 上地 珠代[2], 剣持 直哉[3], Ming-Cheh Liu[4], 榊原 陽一[1], 水光 正仁[1]
（[1]宮崎大・農, [2]宮崎大・医, [3]宮崎大・フロンティア, [4]Univ. Toledo, Dept. Pharmacol.）

【タンパク質工学】

9:00 G3H5-0108 クライオ電子顕微鏡で観るタンパク質の立体構造と生物工学応用

…… ○谷 一寿（三重大・医）

9:00 G3H5-0109 *Bacillus* sp. OxdB-1 由来アルドキシム脱水酵素の結晶構造解析：結晶化に適した表面に位置するアミノ酸残基の重要性

…… ○松井 大亮[1,2], 村木 則文[3,4], Chen Ke[1,5], 森 智也[1], Ingram Aaron[6], 大池 敬子[6], Groeger Harald[6], 青野 重利[3,4], 浅野 泰久[1]
（[1]富山県大・生医工研セ, [2]立命館大・生命科学, [3]ExCELLS, [4]分子研, [5]Zunyi Med. Univ., [6]Bielefeld Univ.）

9:00 G3H5-0110 分子動力学的解析による高接着タンパク質の水中接着配向推定

…… ○笹原 純[1], 鈴木 淳巨[1], 藤本 和士[1], 岡崎 進[2], 堀 克敏[1]
（[1]名大院・工, [2]東大院・新領域）

9:00 G3H5-0111 インバースオートトランスポーターによる大腸菌表層ディスプレー

…… ○牧野 祥嗣, 金井 保, 伊藤 伸哉（富山県大・生医工研セ）

9:00 G3H5-0112 Purification and characterization of norovirus-like particle and its SpyTag-variants from silkworm (*Bombyx mori*)

……○Jirayu Boonyakida[1], Doddy Irawan Setyo Utomo[1], Jian Xu[2], Enoch Y. Park[3]
（[1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Inst. Biol. Info. Sci., East China Normal Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.）

9:00 G3H5-0113 新規 L-リジン-α-オキシダーゼの同定と反応機構の解明

……○杉浦 紗也加[1], 中野 祥吾[1,2], 丹羽 正純[1], 長谷部 文人[1], 松井 大亮[3], 伊藤 創平[1]
（[1]静県大院・薬食生命, [2]JST・さきがけ, [3]立命館大・生命科学）

H5 会場（10:00〜10:30）

【タンパク質工学】

10:00 G3H5-0201 超耐熱性 L-アミノ酸酸化酵素の開発と D-アミノ酸光学分割への応用
……○石田 千晴, 中野 祥吾, 南野 優季, 伊藤 創平（静県大院・薬食生命）

10:00 G3H5-0202 手足口病のためのチャイニーズハムスター卵巣由来細胞を用いたウイルス様粒子の生産
……○松嵜 日南, Nguyen Bich Thao, 金井 貴蓉, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史（阪大院・工）

10:00 G3H5-0203 CHO-K1 細胞株を用いた SARS-CoV-２-VLP 生産系の構築
……○保木本 達也, 松嵜 日南, Nguyen Bich Thao, 金井 貴蓉, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史（阪大院・工）

10:00 G3H5-0204 シリカ粒子形成促進タンパク質"グラシン"のシリカ吸着における kinetics 解析
……○坂手 勇斗[1], 門田 啓吾[2], 美藤 友博[1], 清水 克彦[3], 有馬 二朗[1]（[1] 鳥取大院・農, [2] 鳥取大・農, [3] 鳥取大・CoRE）

10:00 G3H5-0205 チリメンアオジソのアミロイドβ凝集阻害活性を向上させる栽培条件
……○島森 圭弥, 南部 智彦, 川又 大輝, 倉賀野 正弘, 飯森 俊文, 山中 真也, 上井 幸司, 徳樂 清孝（室工大院・工）

10:00 G3H5-0206 Developing a platform for novel binding scaffolds based on a beta-sandwich domain
……○Chukwuebuka Maxwell Ononugbo, Masahide Nagao, Hidekazu Kishi, Noriko Yamano-Adachi, Yuichi Koga, Takeshi Omasa（Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.）

10:00 G3H5-0207 マイクロ・ナノプラスチックの検出に向けたタンパク質プローブの開発
……○黒田 空来, 石田 丈典, 舟橋 久景, 廣田 隆一, 黒田 章夫, 池田 丈（広島大院・統合生命科学）

10:00 G3H5-0208 メタゲノム由来酵素 LC クチナーゼの PET 加水分解活性の向上
……○清水 敬太, Sulaiman Sintawee, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史（阪大院・工）

10:00 G3H5-0209 ヒト CutA とヒドロキシクロロキンの相互作用解析
……○今野 雅大, 尾高 雅文, 涌井 秀樹, 松村 洋寿（秋田大院・理工）

10:00 G3H5-0210 麹菌界面活性タンパク質ハイドロフォビン RolA の Langmuir 膜に対するポリエステラーゼ CutL1 特異的吸着の可視化技術の開発
……○齋藤 有美[1], 寺内 裕貴[2], 吉見 啓[3], 田中 拓未[4,5], 石崎 裕也[6], 三ツ石 方也[6], 藪 浩[7], 阿部 敬悦[1]（[1] 東北大院・農, [2] 京大院・学堂, [3] 京大院・農, [4] 農研機構, [5] 農環研, [6] 東北大院・工, [7] 東北大・WPI-AIMR）

10:00 G3H5-0211 カルボニル化した加齢毛髪タンパク質の修復方法の開発
……○礒辺 真人, 布施 直也, 松江 由香子（クラシエホームプロダクツ株式会社）

10:00 G3H5-0212 麹菌由来界面活性タンパク質 Hydrophobin RolA の自己組織化メカニズムおよびその界面科学的諸性質の解明
……○井田 大輝[1], 齋藤 有美[1], 寺内 裕貴[2], 田中 拓未[3], 吉見 啓[4], 石崎 裕也[7], 三ツ石 方也[7], 藪 浩[5,6], 阿部 敬悦[1]（[1] 東北大院・農, [2] 京大院・地球環学, [3] 農研機構, [4] 京大院・農, [5] 東北大・多元研, [6] 東北大・WPI-AIMR, [7] 東北大院・工）

10:00 G3H5-0213 HLA クラス II 組織適合性抗原γ鎖細胞外部位組換え体の発現系構築及び精製
……○太島 奈々, 江澤 理徳, 尾高 雅文, 涌井 秀樹, 松村 洋寿（秋田大院・理工）

H5 会場（11:00〜11:30）

【タンパク質工学】

11:00 G3H5-0301 部分コンセンサス設計〜二次構造誘導型コンセンサス変異によるタンパク質機能の強化〜
……○小塚 康平, 伊藤 創平, 中野 祥吾（静県大院・薬食生命）

11:00 G3H5-0302 H^+ポンプ能向上を目的とした微生物ロドプシンの改変
……○佐藤 良樹[1], 川崎 真由[1], 弘埜 陽子[2], 菊川 寛史[2], 中野 祥吾[2], 石井 純[3], 松田 史生[4], 戸谷 吉博[4], 伊藤 創平[2], 原 清敬[2]
（[1]静県大院・薬食生命, [2]静県大・食栄, [3]神戸大院・科技イノベ, [4]阪大院・情報）

11:00 G3H5-0303 カルボキソーム外殻タンパク質 CcmO の三量体界面に位置するアミノ酸への変異導入が CcmO 集合体形成に与える影響
……○杉山 由花[1], 大久保 詠一郎[1], 大畠 雅也[1], 松村 洋寿[1], 野口 恵一[2], 養王田 正文[2], 尾高 雅文[1]
（[1]秋田大院・理工, [2]農工大院・工）

11:00 G3H5-0304 The eliciting capability a humoral immune response in a mouse model induced with dengue virus-like particles serotypes 1 and 4 produced in silkworm larvae
……○Doddy Irawan Setyo Utomo[1], Sabar Pambudi[2], Enoch Y. Park[1,3]
（[1]Laboratory of Biotechnology, Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Center of Pharmaceutical and Medical Technology, Agency for the Assessment and Application of Technology, [3]Laboratory of Biotechnology, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University）

11:00 G3H5-0305 トランスグルタミナーゼ基質特異性の迅速スクリーニングのための cDNA ディスプレイプラットフォームの開発
……○大嶽 七菜[1], ダムナニョヴィッチ ヤスミナ[1], 兒島 孝明[1], 根本 直人[2], 人見 清隆[3], 中野 秀雄[1]
（[1]名大院・生命農学, [2]埼玉大院・理工学, [3]名大院・創薬）

11:00 G3H5-0306 新規 2 次元分離プロテオミクスによる自己抗体バイオマーカー探索法の開発
……○益井 実鈴[1], 塩川 つぐみ[2], 多田 宏子[2], 二見 淳一郎[1]
（[1]岡山大院・統合科学, [2]岡山大・自然生命支援セ）

11:00 G3H5-0307 バニラ香料分析に向けたバニリン応答嗅覚受容体のアミノ酸変異による高感度化
……○宮良 俊汰（農工大院・工）

11:00 G3H5-0308 大腸がん幹細胞における嗅覚受容体の機能解析
……○神津 涼奈[1], 福谷 洋介[1], 越澤 知世[1], 廣橋 良彦[2], 鳥越 俊彦[2], 養王田 正文[1]
（[1]農工大院・工, [2]札幌医大・医）

11:00 G3H5-0309 高分子溶液中での酵素反応によるタンパク質集合体の形成促進と機能評価
……○佐藤 崚[1], 南畑 孝介[1], 若林 里衣[1], 後藤 雅宏[1,2], 神谷 典穂[1,2]
（[1]九大院・工, [2]九大・未来化セ）

11:00 G3H5-0310 哺乳類嗅覚受容体のコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系おける Receptor transporting protein の効果
……○佐野 聖友, 福谷 洋介, 養王田 正文（農工大院・工）

11:00 G3H5-0311 人工脂質修飾タンパク質の膜ドメイン選択的局在化技術の応用
……○内田 和希[1], 大林 洋貴[1], 南畑 孝介[1], 若林 里衣[1], 後藤 雅宏[1,2], 下川 直史[3], 髙木 昌宏[3], 神谷 典穂[1,2]
（[1]九大院・工, [2]九大・未来化セ, [3]北陸先端大・マテリアル）

11:00 G3H5-0312 低分子化合物を用いたタンパク質変異耐性のダイナミック調節
……○塚田 美結[1], 河合（野間） 繁子[1], 梅野 太輔[1,2]（[1]千葉大院・融合, [2]早大・先進理工）

11:00 G3H5-0313 組換え大腸菌を用いた酢酸菌由来セルロース合成酵素複合体の調製および機能解析
……○岡 睦基[1], 二之湯 寛子[1], 今井 友也[2], 磯野 拓也[3], 山本 拓矢[3], 佐藤 敏文[3], 姚 閔[4], 田島 健次[3]
（[1]北大院・総合化学, [2]京大・生存研, [3]北大院・工, [4]北大院・先端生命）

H6 会場（9:30〜10:00）

【発酵生理学，発酵工学】

9:30 G3H6-0101 合成代謝経路を導入した大腸菌によるリコペン生産の基礎的検討
…… ○清水 絵理華[1], 野間 智也[1], 濱田 浩幸[1], 原田 尚志[2], 花井 泰三[1]
([1]九大院・農, [2]鳥取大・工)

9:30 G3H6-0102 （講演中止）

9:30 G3H6-0103 *Saccharomyces cerevisiae* と *Latilactobacillus sakei* の特異的バイオフィルム形成
…… 森村 一貴, 清水 悠平, 井上 崚雅, 門口 将己, 藤井 清矢, 田邊 公一, ○島 純
(龍谷大・農)

9:30 G3H6-0104 酵母 *Scheffersomyces stipitis* を宿主とした新規レスベラトロール生産酵母によるバイオマス由来の多様な糖類からのレスベラトロール生産
…… ○小林 優真[1], 猪熊 健太郎[1], 蓮沼 誠久[1,2] ([1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大・先端バイオ工学研究セ)

【代謝工学】

9:30 G3H6-0105 清酒酵母におけるオルニチン高生産メカニズムの解明
…… ○大橋 正孝[1], 那須野 亮[2], 磯貝 章太[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)

9:30 G3H6-0106 分裂酵母を用いたイタコン酸生産技術の開発
…… ○藤江 直史[1], 伊藤 美紀[1], 田中 勉[1], 近藤 昭彦[2]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ)

9:30 G3H6-0107 針葉樹サルファイトリグニンのアルカリ水酸化銅酸化分解物からのバニリン酸生産
…… ○樋口 雄大[1], 石丸 裕也[2], 坂本 千穂[1], 吉川 琢也[2], 上村 直史[3], 政井 英司[3], 増田 隆夫[2], 園木 和典[1]
([1]弘前大・農生, [2]北大院・工, [3]長岡技科大院・工・生物)

9:30 G3H6-0108 大腸菌によるグルコースからのヒドロキシチロソールの発酵生産
…… ○藤澤 誠[1], 駒 大輔[2], 大橋 博之[2], 山中 勇人[2], 森芳 邦彦[2], 長森 英二[1], 大本 貴士[2]
([1]大阪工大・院, [2]大阪技術研)

9:30 G3H6-0109 *Citrobacter* 属細菌バイオ凝集剤の *wspR* 遺伝子導入による生産促進
…… ○森茂 真菜, バランワル プリヤンカ, 松尾 友梨子, 武尾 正弘（兵庫県大院・工）

9:30 G3H6-0110 組換え *Cupriavidus necator* による高性能バイオプラスチックの生合成
…… ○岡本 沙樹[1], 板倉 真優[2], 久永 理央[2], 西 愛美[2], 西上 明花[2], 河原 あい[1], 田中 賢二[3], 田口 精一[4], 松崎 弘美[1,2]
([1]熊本県大院・環境共生, [2]熊本県大・環境共生, [3]近畿大・産理工, [4]東農大・生命科学)

9:30 G3H6-0111 *Rhodobacter sphaeroides* におけるポリヒドロキシ酪酸を介した代謝調節機構の解析
…… ○清水 哲[1], 寺本 陽彦[1], 乾 将行[1,2] ([1]RITE, [2]奈良先端大・バイオ)

9:30 G3H6-0112 ストレス誘導性突然変異によるバイオエンジニアリングは可能か？
…… ○米山 裕[1], 三嶋 玄隆[1], 渡邉 裕一[1], 内ヶ崎 啓[1], 下田 蒼[1], 関 翔太[1], 熊谷 俊高[2], 野地 智法[1], 安藤 太助[1]
([1]東北大院・農, [2]ファームラボ)

H6 会場（10:30〜11:00）

【代謝工学】

10:30 G3H6-0201 磁性細菌の脂質代謝制御によるマグネトソーム膜改変とマグネタイト形成能への影響評価
……○巴 瞭斗, 藤本 一嗣, 新垣 篤史, 田中 剛, 吉野 知子（農工大院・工）

10:30 G3H6-0202 ターゲットプロテオミクスの改良と酵素発現量に基づく細胞株の代謝評価
……○高橋 遼, 西本 和生, 岡橋 伸幸, 松田 史生（阪大院・情報）

10:30 G3H6-0203 ^{13}C 代謝フラックス解析を用いたマクロファージの分化に伴う代謝変化の解析
……○本谷 真奈, 谷口 赳夫, 岡橋 伸幸, 松田 史生（阪大院・情報）

10:30 G3H6-0204 油性酵母 *Yarrowia lipolytica* における Ehrlich 経路工学による短鎖分岐脂肪酸生産
……○奥浜 真乃助[1], 番場 崇弘[1], 湯川 貴弘[1], 雲北 涼太[1], Christopher Johnavricka Jr.[1], Matthew Wook Chang[2,3], Ling Hua[3], Gazi Sakir Hossain[3], 蓮沼 誠久[1,4], 近藤 昭彦[1,4,5]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]シンガポール国立大学・ヨンルーリン医学部・生化学科, [3]シンガポール国立大学・生命科学研究所・SynCTI, [4]神戸大学・先端バイオ工学研究センター, [5]理化学研究所・環境資源科学研究センター）

10:30 G3H6-0205 光駆動プロトンポンプを発現させたメバロン酸生産大腸菌の代謝解析
……○松山 千夏[1], 清家 泰介[1], 岡橋 伸幸[1], 戸谷 吉博[1], 弘埜 陽子[2], 平山 英伸[3], 石井 純[3], 清水 浩[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）

10:30 G3H6-0206 アンチセンスペプチド核酸を用いたマイクロバイオータ改変技術の開発
……○日詰 達哉[1], 岡野 憲司[2,3], 佐藤 悠[2], 本田 孝祐[2,3]
（[1]阪大院・工, [2]阪大・生工国際セ, [3]阪大・先導学研機）

10:30 G3H6-0207 Isopropanol production with CO_2 reutilization by engineered *Ralstonia eutropha*
……○Dyah Candra Hapsari Subagyo, Rie Shimizu, Izumi Orita, Toshiaki Fukui
（Tokyo Tech）

【オミクス解析】

10:30 G3H6-0208 シロイヌナズナにおいて狭帯域の 280 および 310 nm UV-B は特有の応答を誘発する
……○鶴本 智大[1,2], 藤川 康夫[1], 太田 大策[2], 岡澤 敦司[2]
（[1]日亜化学工業, [2]阪府大院・生環科）

10:30 G3H6-0209 シングルオリジンチョコレートの製造過程における代謝物プロファイリング
……○木谷 友香[1], Putri Sastia Prama[1,2], 福﨑 英一郎[1,2,3]
（[1]阪大院・工, [2]大阪大学先導的学際研究機構, [3]大阪大学島津分析イノベーション協働研究所）

10:30 G3H6-0210 線虫 *Caenorhabditis elegans* の神経細胞種特異的なプロテオミクス解析
……○油屋 駿介[1,2,3], 山内 悠至[3,4], 馬場 健史[1], 植田 充美[3,5,6,7,8], 青木 航[3,5,6,9]
（[1]九大・生医研, [2]学振特別研究員 PD, [3]京大院・農, [4]学振特別研究員 DC1, [5]京都バイオ計測セ, [6]JST・CREST, [7]JST・COI-NEXT, [8]京大 産官学連携本部, [9]JST・さきがけ）

10:30 G3H6-0211 HEC1B において Transforming growth factor-β1 による上皮間葉転換誘導時の代謝変化の調査
……○土岐 弥生[1], 大島 健司[4], 森井 英一[4], 福﨑 英一郎[1,2,3]
（[1]阪大院・工, [2]大阪大学先導的学際研究機構, [3]大阪大学島津分析イノベーション協働研究所, [4]阪大院・医）

H6 会場（11:30〜12:00）

【オミクス解析】

11:30 G3H6-0301 Comparative metabolomics and sensory evaluation of pineapple from different cultivar and ripening stage

..... ○Muhammad Maulana Malikul Ikram[1], Reo Mizuno[1], Sastia Prama Putri[1,2], Eiichiro Fukusaki[1,2,3]

([1] Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng. Osaka University, Suita, Japan, [2] Industrial Biotechnology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, Suita, Japan, [3] Osaka University-Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka University, Suita, Japan)

11:30 G3H6-0302 Metabolomics study of different mixing process of mixed tempe powder (Indonesian fermented food) from soybean and red kidney bean

..... ○Della Rahmawati[1,2], Made Astawan[3], Sastia Prama Putri[1,4], Eiichiro Fukusaki[1,4,5]

([1] Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ, [2] Dept. Food. Tech., Fac. Life. Sci. Eng., Swiss German Univ, [3] Dept. Food. Sci. Tech., IPB Univ, [4] Ind. Biotech. Div., Inst. Open. Transdiscip. Res. Init., Osaka Univ, [5] Osaka. Univ-Shimadzu. Omics. Innov. Res. Lab., Osaka Univ)

11:30 G3H6-0303 The metabolic profiling of coffee obtained from various altitude, geographical origin, and postharvest processes in Indonesia

..... ○Fitri Amalia[1], Pingkan Aditiawati[2], Yusianto[3], Sastia Prama Putri[1,2,4], Eiichiro Fukusaki[1,4,5]

([1] Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2] Sch. Life Sci. Tech., Institut Teknologi Bandung, [3] Indonesian Coffee and Cocoa Research Institute, [4] Industrial Biotechnology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., [5] Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka Univ.)

11:30 G3H6-0304 歯周病菌 *Prevotella intermedia* と *Porphyromonas gingivalis* の相互作用解析

..... ○青木 雄太[1], 久保庭 雅恵[2], 坂中 哲人[2], 眞弓 昌大[2], 天野 敦雄[2], 福﨑 英一郎[1,3,4]

([1] 阪大院・工, [2] 阪大院・歯, [3] 大阪大学先導的学際研究機構, [4] 大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)

11:30 G3H6-0305 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* における 1-Kestose 代謝メカニズムの解明

..... ○難波 有希[1], 吉田 佳鼓[1], 山口 颯人[1], 後藤 恭宏[2], 門田 吉弘[3], 栃尾 巧[3], 小椋 義俊[4], 林 哲也[2], 横田 篤[1], 吹谷 智[1]

([1] 北大院・農, [2] 九大院・医, [3] 物産フードサイエンス, [4] 久留米大・医)

11:30 G3H6-0306 Metabolomics-based approach to predict the quality of commercial sized tropical farmed-shrimps

..... ○Safira Latifa Erlangga Putri[1], Gede Suantika[2], Magdelena Lenny Situmorang[2], Sastia Prama Putri[1], Eiichiro Fukusaki[1,3,4]

([1] Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2] Schl. of Life Sci. and Tech, Inst. Teknologi Bandung, [3] Industrial Biotechnol. Div., Inst. for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., [4] Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka Univ.)

11:30 G3H6-0307 Correlation between metabolite profile and sensory profile of single-origin chocolates

..... ○Abu Hanifah[1], Tissa Aunilla[2], Sastia Prama Putri[1,3], Eiichiro Fukusaki[1,3,4]

([1] Dept. of Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2] Pipiltin Cocoa, [3] Industrial Biotechnol. Div., Inst. for Open and Transdiscip. Res. Initiatives, Osaka Univ., [4] Osaka Univ.-Shimadzu Omics Innov. Res. Laboratories, Osaka Univ.)

11:30 G3H6-0308 ノンターゲットリピドミクスを用いた腸内細菌脂質の計測と同定

..... ○岡橋 伸幸[1,2], 安田 柊[2], 津川 裕司[2,3,4], 池田 和貴[2,5], 有田 誠[2,6,7]

([1] 阪大院・情報, [2] 理研・生命医科学, [3] 理研・環境資源, [4] 農工大院・工, [5] かずさ DNA 研, [6] 慶大院・薬, [7] 横市大院・生命医)

11:30 G3H6-0309 トランスクリプトーム比較によるヒザラガイ類の超硬質歯形成関連遺伝子の探索

..... ○岡田 航輝[1], 伊藤 孝祐[1], 田村 隆[1], 稲垣 賢二[1], 守屋 央朗[1], Kisailus David[2], 大越 健嗣[3], 小布施 祈織[1], 根本 理子[1]

([1] 岡山大院・環境生命, [2] カリフォルニア大・アーバイン校, [3] 東邦大・理)

11:30 G3H6-0310 Possible existence of a non-mevalonate-like pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica*
……◯Sastia Putri[1,4], Sivamoke Dissook[1], Tomohisa Kuzuyama[2], Shigeru Kitani[3], Eiichiro Fukusaki[1,4,5]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [3]ICBiotech, Osaka Univ., [4]OTRI, Osaka Univ., [5]Osaka Univ. Shimadzu Omics Innov. Res. Lab.)

11:30 G3H6-0311 比較トランスクリプトーム解析による *Nitratireductor* sp. OM-1 の窒素感受性脂質合成経路の解析
…… ◯平田 悠人, 山下 瀬菜, 高橋 宏和, 渡邉 研志, 秋 庸裕, 岡村 好子（広島大院・統合生命科学）

H7 会場（10:00〜10:30）

【醸造学，醸造工学】

10:00 G3H7-0201 細胞サイズリポソームの動的形態変化における酒の吟醸香成分の影響と清酒の吟醸香評価の可能性
…… ◯依田 毅（青森産技八工研）

10:00 G3H7-0202 清酒醸造過程における酵母由来 peptidylprolyl cis-trans isomerase (PPIase)の挙動と機能に関する研究
……山田 宏樹[1], 二枝 紗里奈[1], 岸 ひかり[1], 藤原 久志[2], 若井 芳則[2], 井沢 真吾[3], ◯渡部 邦彦[1]
([1]京府大院・生命環境, [2]黄桜, [3]京工繊大院・工芸科学)

10:00 G3H7-0203 植物発酵物（FBP）のスギ花粉症抑制効果とその作用機序
……◯河本 正次[1], 藤村 孝志[1], 西岡 祐起[1], 堀 采音[1], 鳥居 英人[2], 藤岡 耕太郎[2], 岸田 晋輔[2]
([1]広島大院・統合生命科学, [2]万田発酵)

10:00 G3H7-0204 呈味成分及び香気成分プロファイルによる甘酒の分類化
…… ◯小平 一也, 村山 芳香, 倉橋 敦（八海醸造）

10:00 G3H7-0205 糖セラミドの腸内細菌への影響の *in vitro* 解析
……◯大塚 輝[1], 永留 真優[1], 満生 萌水[1], 戴 鳳凰[1], 張 乃睿[1], 中山 二郎[2], 北垣 浩志[1]
([1]佐賀大院・先進健康科学, [2]九大院・農)

10:00 G3H7-0206 麹甘酒は健康成人の便通を改善する
…… 倉橋 敦[1], 小黒 芳史[1], 小島 彩奈[1], 小平 一也[1], ◯榎本 利彦[1], 渡辺 賢一[2], 尾崎 伸紘[3], 後藤 博[4], 平山 匡男[4]
([1]八海醸造・研究開発室, [2]新潟大学院・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)

10:00 G3H7-0207 酢酸菌由来の外膜小胞の産生条件の検討
…… ◯桑原 直之, 松元 太一, 橋口 周平, 橋本 雅仁（鹿児島大院・理工）

10:00 G3H7-0208 麹菌そのものおよび麹菌を利用した食品の摂取による大腸炎緩和について
…… ◯野村 亮[1], 都築 翔[1], 兒島 孝明[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)

10:00 G3H7-0209 β-フェネチルアルコールを高生産する酵母への育種
…… ◯長谷川 哲哉[1], 大谷 里菜[1], 塩谷 瑞紀[1], 松尾 啓史[1], 大西 徹[1], 古家 美紀[1], 髙木 敬信[1], 大橋 正孝[2], 倉田 淳志[1], 上垣 浩一[1]
([1]近畿大院・農, [2]奈良産総セ)

10:00 G3H7-0210 チロソールを高生産する高香気清酒酵母の取得
…… ◯川崎 博資, 山田 翼（菊正宗酒造株式会社）

10:00 G3H7-0211 麹菌で利用可能なイトラコナゾール耐性マーカーの構築
…… ◯渡嘉敷 直杏, 外山 博英, 水谷 治（琉球大・農）

10:00 G3H7-0212 扁平精白米の醸造特性と製成酒への貯蔵劣化臭低減効果
……◯山﨑 梨沙[1], 大場 健司[1], 荒瀬 雄也[1], 平田 悠達[2], 梶原 一信[2], 川上 晃司[2], 大土井 律之[1]
([1]広島総合技術研・食品工業技術セ, [2]株式会社サタケ)

10:00 G3H7-0213 玄米を用いた泡盛醸造における FA および 4VG の生成過程の解析
……○杉江 雄貴[1], 眞榮田 麻友美[2], 上地 敬子[1], 渡嘉敷 建孝[3], 平良 東紀[1]
([1]琉球大・農, [2]東農大・応生科, [3]石川種麹店)

10:00 G3H7-0214 白麹菌における MAP キナーゼを介したクエン酸生産制御機構の解析
……○林 那波[1], 池田 萌[1], 門岡 千尋[2], 奥津 果優[1], 吉﨑 由美子[1], 髙峯 和則[1], 後藤 正利[3], 玉置 尚徳[1], 二神 泰基[1]
([1]鹿児島大院・農林水産, [2]崇城大・生物生命, [3]佐賀大・農)

10:00 G3H7-0215 ノンターゲットリピドミクスを用いた酵母の産業特性を実現する脂質組成の解析
……○小森 柊花[1], 岡橋 伸幸[1,2,3], 小倉 泰郎[4], 飯田 順子[3,4], 松田 史生[1,2,3]
([1]阪大院・情報, [2]阪大島津協働研, [3]阪大先導研, [4]島津製作所)

H7 会場（11:00〜11:30）

【醸造学，醸造工学】

11:00 G3H7-0301 全ゲノム情報を用いた系統解析による戦前の泡盛麹に含まれる黒麹菌類の菌叢の推定
……○塚原 正俊[1], 東 春奈[1], 久貝 樹幹[1], 外山 博英[2]
([1]バイオジェット, [2]琉球大・農)

11:00 G3H7-0302 酵母のイソアミルアルコール生成に関与する遺伝子の探索
……○小橋 有輝[1], 吉﨑 由美子[1,2], 奥津 果優[2], 二神 泰基[1,2], 玉置 尚徳[1,2], 髙峯 和則[1,2]
([1]鹿児島大院・連農, [2]鹿児島大・農)

11:00 G3H7-0303 試験製麹法における米麹の構造観察と乾燥の影響
……○伊藤 一成[1], 谷野 有佳[1], 五味 勝也[2], 狩山 昌弘[3], 三宅 剛史[1]
([1]岡山県工技セ, [2]東北大院・農, [3](株)フジワラテクノアート)

11:00 G3H7-0304 粕床による食材へのエチル α-D-グルコシド（α-EG）移行研究
……○山川 達也, 久保田 和樹, 柳田 茉子, 尾関 健二（金工大・ゲノム研）

【食品科学，食品工学】

11:00 G3H7-0305 *Lactobacillus plantarum* PUK6 の特性評価および多成分バクテリオシン生合成関連遺伝子の解析
……○河原 あい[1], 林 里帆[2], 志賀 梨沙[2], 松田 明香里[2], 善藤 威史[3], 松崎 弘美[1,2]
([1]熊本県大院・環境共生, [2]熊本県大・環境共生, [3]九大院・農)

11:00 G3H7-0306 HepG2 における発酵食品中 D-アミノ酸組成の抗脂肪肝効果
……○佐藤 友紀, 梅川 結, 進藤 昌（秋田県総合食品研究センター）

11:00 G3H7-0307 食用担子菌発酵ダイズのポリフェノール量および抗酸化活性
……○澤田 雄太, 福士 涼介, 新井 博文, 佐藤 利次（北見工大）

11:00 G3H7-0308 米糀甘酒の血糖値上昇抑制効果
……○山田 南実[1], 多田 孝清[2], 田川 進也[2], 北川 学[1], 倉石 徹[1], 伊藤 成輝[1]
([1]マルコメ, [2]KRI)

11:00 G3H7-0309 エビの代謝物プロファイルとテクスチャープロファイルに影響を与える要因の調査
……○島本 直輝[1], Putri Sastia Prama[1,2], 福﨑 英一郎[1,2,3]
([1]阪大院・工, [2]大阪大学先導的学際研究機構, [3]大阪大学島津分析イノベーション協働研)

11:00 G3H7-0310 焙煎豆と抽出コーヒーのメタボローム解析に基づくスペシャルティコーヒーの品質に関与する化合物の調査
……○竹上 哲司[1], Sastia Prama Putri[1,2], 福﨑 英一郎[1,2,3]
([1]阪大院・工, [2]大阪大学先導的学際研究機構, [3]大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)

11:00 G3H7-0311 Metabolic visualization reveals the distinct distribution of sugars and amino acids in rice *koji*
……○Adinda Putri Wisman[1], Yoshihiro Tamada[2], Shuji Hirohata[2], Eiichiro Fukusaki[1,3,4], Shuichi Shimma[1,3,4]
([1] Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2] Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd., [3] Industrial Biotechnology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., [4] Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka Univ.)

11:00 G3H7-0312 ノンターゲットメタボロミクスを用いた，テンペの保存状態の評価
……○環 宏太朗[1], Sastia Prama Putri[1,2], 福﨑 英一郎[1,2,3]
([1] 阪大院・工, [2] 大阪大学先導的学際研究機構, [3] 大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)

11:00 G3H7-0313 好熱菌発酵産物給与による養殖魚サクラマスのプロテオーム解析
……○碓井 茉依[1], 佐野 広明[2], 西内 巧[3], 宮本 浩邦[1,4,5], 児玉 浩明[1]
([1] 千葉大院・園芸, [2] マルハニチロ, [3] 金沢大・研究基盤, [4] サーマス, [5] 理研・生命医科学)

11:00 G3H7-0314 白カビ熟成チーズの細菌相と成分の相関と非スターター菌種の風味形成能の検証
……○海野 良輔[1], 大崎 友美加[1], 松谷 峰之介[2], 鈴木 敏弘[1], 石川 森夫[1]
([1] 東農大院・応生科, [2] 東農大・ゲノムセ)

11:00 G3H7-0315 Investigating the effect of adding Soy Hull to Tempe, an Indonesian fermented food
……○Hadi Akbar Dahlan[1], Sastia Prama Putri[1,2], Eiichiro Fukusaki[1,2,3]
([1] Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2] Industrial Biotechnology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., Japan, [3] Osaka University-Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka Univ., Japan)

ランチタイムセミナー

L3H5-0001 株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ

H5 会場（12:00〜13:00）

シンポジウム

H1 会場（13:00〜15:00）

【本部企画】食のおいしさの計測科学の現状と課題

13:00 はじめに
…… 林 圭
座長：**林　圭**

13:05 S3H1-1301 食のおいしさ研究への時間軸の挿入
……○金田 弘挙（九産大・生命科学）
座長：**今井 泰彦**

13:35 S3H1-1302 製造方法によるミルク入りコーヒー飲料のおいしさ創りと香味評価
……○秋山 正行（森永乳業 研究本部 食品開発研 飲料研）

座長：**安原 貴臣**

14:05 S3H1-1303 最新官能評価技術によるおいしさデザイン
……○川﨑 寛也（味の素食品研）
14:35 全体質疑応答／チャット質疑応答
14:55 おわりに
……児島 宏之

H1 会場（15:30〜17:30）

バイオ分析の医療展開を目指して—ネオホストバイオテクノロジーの創成—

15:30 はじめに
……上田 宏

座長：**神谷 典穂**

15:35 S3H1-1401 光イメージング技術開発とネオホストの医学研究・医療応用に向けて
……○今村 健志（愛媛大院・医）
16:00 S3H1-1402 動物細胞のネオホスト応用に向けた情報解析プラットフォーム構築
……○蟹江 慧（名大院・創薬）
16:20 休憩

座長：**座古　保**

16:25 S3H1-1403 非細胞コンパートメントの構築とその生物工学的応用
……○神谷 典穂[1,2]（[1]九大院・工, [2]九大・未来化セ）
16:45 S3H1-1404 生体膜の曲面構造を制御したネオホストの構築
……○田中 祐圭（東工大・物質理工）
17:05 S3H1-1405 医療応用のための非生物ネオホストの構築
……○村上 義彦（農工大院・工）
17:25 おわりに
……花井 泰三

H2 会場（13:00〜15:00）

国内バイオリソースと極限環境生物研究の融合による産業シーズの開拓

13:00 はじめに
……若井 暁

座長：**若井　暁**

13:05 S3H2-1501 カルチャーコレクション NBRC の極限環境微生物とその産業利用に向けた取り組み
……○森 浩二（NITE・NBRC）
13:33 S3H2-1502 深海バイオリソース提供事業とリソースを利用した新規有用酵素探索の紹介
……○澄田 智美（海洋研究開発機構）
14:01 S3H2-1503 Commercial application of an extremophilic red alga *Galdieria sulphuraria* for a circular economy
……○Eri Adams（Galdieria, Co., Ltd.）
14:29 S3H2-1504 国内温泉から単離された超高速度増殖能を有する独立栄養水素細菌の産業応用に向けた機能開発
……○石井 正治[1], 亀谷 将史[1], 兒玉 徹[2], 新井 博之[1], 湯川 英明[2]
（[1]東大院・農生科, [2]CO2 資源化研究所）

14:57 おわりに
……若井 暁

H2 会場（15:30〜17:30）

未培養微生物（微生物ダークマター）の分離・培養・開拓の新展開

15:30 はじめに
……青柳 秀紀
座長：**中尾 洋一**

15:32 S3H2-1601 微生物に新規化合物を求めて
……○長田 裕之（理研・環境資源）

15:54 S3H2-1602 誰も培養したことがない北極と南極の菌類の探索と産業利用への挑戦
……○辻 雅晴（旭川高専・物化）
座長：**木村 信忠**

16:16 S3H2-1603 難培養性微生物とは何か？どうしたら培養できるのか？
……○青井 議輝[1], Jung Dawoon[1], 町田 光史[2], 中尾 洋一[2]
（[1]広島大院・統合生命科学, [2]早大院・先進理工）

16:38 S3H2-1604 土壌微生物から発見された新規バイオポリマー PHBH が実用化されるまで
……○佐藤 俊輔（カネカ）
座長：**青柳 秀紀**

16:59 S3H2-1605 培養したからこそ見えてきたヒト腸内細菌の生態と機能
……○渡邊 洋平（ヤクルト中央研究所）

17:20 総合討論
おわりに
……青柳 秀紀

H3 会場（13:00〜15:00）

酢酸菌ナノセルロース研究の最前線：合成の分子メカニズムと応用

13:00 はじめに
……外山 博英
座長：**外山 博英**

13:02 S3H3-1701 世界で拡がるナノセルロースの生産と利用
……○平田 悟史（エンパシード）

13:26 S3H3-1702 酢酸菌におけるセルロース生産に関わる遺伝子の欠失と復帰変異
……○松谷 峰之介[1], Theeragool Gunjana[2], 薬師 寿治[3,4], 松下 一信[4,5], 石川 森夫[6]
（[1]東農大・ゲノム解析セ, [2]カセサート大・理, [3]山口大院・創成科学, [4]山口大・中高温微セ, [5]山口大・農, [6]東農大・応生科）

13:50 S3H3-1703 酢酸菌セルロース合成酵素複合体の構造と機能
……○田島 健次（北大院・工）
座長：**田島 健次**

14:14 S3H3-1704 セルロース合成酵素の天然活性再構成へむけて
……○今井 友也（京大・生存研）

14:38 S3H3-1705 ヒアルロン酸／セルロースの新規複合素材の創製
……○近藤 哲男（九大院・農）

15:02 おわりに
……田島 健次

H3 会場（15:30〜17:30）

日本における海洋生分解性プラスチック開発の最先端

15:30 はじめに
……乾 将行

座長：**乾　将行**

15:34 S3H3-1801 生分解性プラスチック開発の現状と課題
……○土肥 義治[1,2]（[1]東工大, [2]理研）

16:02 S3H3-1802 非可食性バイオマスを原料とし海洋分解性と強靭性を両立したバイオポリマーの開発
……○伊藤 耕三（東大院・新領域）

座長：**中村　純**

16:30 S3H3-1803 生分解開始スイッチ機能を有する海洋分解性プラスチックの研究開発
……○粕谷 健一（群馬大学）

16:58 S3H3-1804 光スイッチ型分解性プラスチックの開発ー海洋ゴミ問題解決を目指して
……○金子 達雄（北陸先端大・マテリアル）

17:26 おわりに
……中村 純

10月27日（水）

受賞講演

〈生物工学功労賞〉

受賞者　水光 正仁（宮崎大学）

生物工学会功労賞受賞にあたって　A1H1-0001　p. 63

〈生物工学賞〉

受賞者　五味 勝也（東北大院・農）

醸造微生物の分子生物工学研究と発酵生産分野への応用技術開発　A1H1-0002　p. 63

〈生物工学功績賞〉

受賞者　竹山 春子[1,2,3,4]

（[1]早大・先進理工，[2]早大・ナノ・ライフ機構，[3]産総研・早大 CBBD-OIL，[4]早大・先進生命動態研）

環境微生物資源の有効利用のためのシングルセル解析技術の開発と展開研究

A1H1-0003　p. 64

〈生物工学技術賞〉

受賞者　○栗本 昌樹[1]，久保 智里[1]，越智 浩[1]，本多 裕之[2]，大河内 美奈[3]

（[1]森永乳業，[2]名大院・工，[3]東工大・物質理工）

「ペプチドアレイ」を基盤とする低抗原性生理活性ペプチドの製造に関する研究

A1H1-0004　p. 64

シンポジウム

バイオ戦略 2020 で目指すバイオエコノミー社会に向けての取り組み**【本部企画】**　p. 65

「ゲノム合成」という方法論の秘めた可能性を考える　p. 67

創薬モダリティを支えるために次世代型遺伝子導入・ゲノム操作技術ができること　p. 69

醸造技術の新展開―原料～醸造のこれから―**【本部企画】**　p. 71

泡盛の基盤研究と産業応用―地域特産品の研究成果を活用するには―　p. 74

A1H1 (0001) 生物工学功労賞受賞にあたって

○水光 正仁
（宮崎大学，理事・副学長）

On receiving the Achievement Award of the Society for Biotechnology, Japan

○Masahito Suiko
(Executive Director and Vice President, Univ. of Miyazaki)
msuiko@cc.miyazaki-u.ac.jp

この度，小職の「蛋白質硫酸化に関する研究，人材育成，並びに学会活動を通した生物工学分野への貢献」に対しまして，第 15 回生物工学功労賞を頂くことになり，身に余る光栄に存じております．功労賞にご推薦，ご支援いただきました高木昌宏前会長をはじめ学会，産業界および大学の関係する皆様に深く感謝しております．

1979 年九州大学大学院農学研究科博士課程（農芸化学専攻）修了後，宮崎大学農学部助手，助教授，教授を経て，2015 年 10 月より現在も，宮崎大学理事・副学長（研究・企画担当）として，研究，教育，大学運営，社会貢献，そして学会運営に対して取り組んでおります．この間，1985 年から 2 年間米国ロックフェラー大学ノーベル賞受賞学者リップマン教授の下で硫酸化に関する研究に従事し，その縁で 30 数年米国のテキサス大学を始めいろいろな大学で国際共同研究を続けて参りました．

研究分野としては，生体機能として重要な翻訳後修飾のチロシン硫酸化および薬物代謝第 II 相反応としての硫酸化に関わる硫酸転移酵素の網羅的な機能解析および遺伝子工学的利用，さらには内分泌撹乱物質動態，そして現在極めて重要な研究であるウイルス侵入機構の解明や阻害剤探索の分野にまで及ぶ研究を行ってきました．また，これらの研究を通して数多くの優秀な人材が育ってくれました．

さらに，九州の大学生を対象に，アルコールに強いか弱いかの体質を遺伝子診断によって示し，お酒との上手な付き合い方を伝える活動や，教職員や学生が協力しながら，宮崎大学オリジナル芋焼酎「薫陶」を開発するなど，学部や大学の枠を越えた研究教育活動も行ってきました．

日本生物工学会との関係は，2000 年元九州大学教授古川健介先生に勧められ会員となり，九州支部長（2007−2009），評議員（2007−2011）そして 2010 年に開催された宮崎シーガイアワールドコンベンションセンターサミットでの第 63 回大会（園元謙二実行委員長）の副実行委員長，それがご縁で理事就任（2011−2015：企画委員長），特に 2012 年の神戸国際会議場で開催された創立 90 周年記念第 64 回大会での特別展示企画委員長（全国酒自慢 90 など），監事（2017−2019），この間，理事選考委員会委員長（2018）を務めたことであります．

2007 年塩谷捨明会長の時，九州支部長として理事会に参加した際，知っている先生の少ないことを痛感し，名前とお顔を覚えることに専念しました．理事会は，極めて真摯な議論が展開され，皆様が学会を背負っていることを強く感じ取りました．2010 年の第 63 回の宮崎大会で多くの会員に名前を覚えてもらい，理事就任となりました．2011 年，何故か、原島俊会長から企画委員会の委員長を命ぜられ，頼もしい大政健史理事と組むことになりました．最初の企画は，2012 年 5 月に開催された第 17 回生物工学懇話会でありました．その時ひらめいたのは，2011 年 3 月の東日本大震災後の復興状況はどうなっているのだろう，ということでした．そこで生物工学会にご縁のある福島県西郷村の佐藤正博村長に電話をし，講演をお願いしました．また，東日本の太平洋は世界の三大漁場であることからその後はどうなっているか，東京海洋大学の末永芳美教授に講演をお願いし快諾してもらいました．その時の懇話会は，参加者全員が集中しているのをよく記憶しています．2013 年の鹿児島志學館大学の原口泉先生の「幕末の薩摩と会津〜酒文化の比較」とパネルディスカッション「若手学生を交えての 50 年後の生物工学について」も面白い企画でありました．2014 年度のサントリー高橋賢蔵氏の「サントリーの商品開発」，2015 年の株式会社連由の小山由朗氏の「気づく力がヒット商品を生む」も記憶に残っています．今の教育手法のアクティブラーニングの先取りの講演でありました．

2012 年の創立 90 周年記念第 64 回大会の特別展示は特に記憶に残っています．特別企画委員長に任命され，私のわがままな企画を委員の皆様に提案しました．①「プロジェクト・バイオ」，②「ナショナルバイオリソース」，③「全国酒自慢 90」そして④「日本生物工学会歴史の展示」の特別企画を行いました．特に，③の全国酒自慢は圧巻でありました．理事の東京農業大学の貝沼章子先生にお願いして北は北海道から南は九州まで卒業生の蔵元に自慢の清酒を提供してもらいました．ほとんどが幻の清酒であり，続々と各蔵元から自慢の清酒が運ばれ，展示会場はあふれんばかりとなりました．生物工学会の最も得意とする醸造学の産物であることから朝から試飲を許可し，学会開催期間，このコーナーはいつも大勢の会員が集まり，試飲の結果，笑い声と共に大変盛り上がったことを覚えています．

このように，生物工学会の理事を楽しみながらいろいろな企画をしました．園元会長時代の厳しい学会運営費問題の時もどうやったら楽しい生物工学懇話会が企画できるか，そして会員が明るくなることが出来るかを考えていました．そうすると，生物工学会全体が見えるようになり，その結果は監事就任となりました．厳しい意見というより，会員をどうやって増やすか学会の魅力は何かをいつも提案していました．

最後になりましたが日本生物工学会の益々のご発展を祈り，また，このような過分なる賞を頂き誠にありがとうございました．

Key words sulfation, sulfotransferase, post-translational modification, shochu

A1H1 (0002) 醸造微生物の分子生物工学研究と発酵生産分野への応用技術開発

○五味 勝也
（東北大院農）

Molecular biotechnology on brewing microbes and its application to fermentation industries

○Katsuya Gomi
(Grad Sch Agric Sci, Tohoku University)
katsuya.gomi.a6@tohoku.ac.jp

この度は名誉ある日本生物工学会 生物工学賞を授与いただき身に余る光栄と存じます。わが国の重要な産業微生物である麹菌を主体に行ってきた 40 年近い研究の成果を評価していただいたものと思い、研究を開始した醸造試験所から現在の東北大学に至るまで一緒に研究を進めて下さった方々はもとより、暖かい励ましやご支援をいただいた多くの方々に心から感謝申し上げる次第です。

（1）麹菌の遺伝子組換え技術の確立

国税庁醸造試験所における麹菌の突然変異や細胞融合による有用菌株の育種が私の初めの研究テーマであった。突然変異誘発や細胞融合の技術は習得できたものの、有性世代がないことや多核細胞ゆえの古典遺伝学的解析の困難さから、詳細な菌株の解析を行うことができず十分な成果を得ることができたとは言えなかった。そこで、古典遺伝学的解析が難しくとも解析が可能と考えられた遺伝子工学手法の適用を試みた。その結果、麹菌における遺伝子導入法と宿主ベクター系を世界で初めて確立することに成功したが、このために突然変異や細胞融合で習得した技術が大いに役立ったことは非常に幸いであった。具体的な遺伝子組換え系としては、栄養要求性相補系、優性選択マーカー、二重選択マーカー宿主開発などである。麹菌の遺伝子組換え技術の確立はわが国の糸状菌における分子レベルの研究の端緒を開き、大学だけでなく多くの醸造業界（月桂冠、白鶴、大関、菊正宗、キッコーマン等）の研究者が糸状菌の分子生物学研究に参入することにつながり、わが国の糸状菌研究の発展に大きく貢献したものと考えている。一方、麹菌の遺伝子組換え系のさらなる改良を目的として、非相同末端結合に関与する DNA リガーゼ IV（LigD）の遺伝子破壊によって高頻度相同組換え宿主株を構築するとともに、高頻度相同組換え宿主株と Cre-*loxP* を利用した多重遺伝子破壊・導入システムの開発にも成功した。これらの麹菌の遺伝子組換え技術は、ポストゲノム研究において多数の遺伝子破壊株の作製を容易にしただけでなく、糸状菌の二次代謝化合物の生合成マシナリー研究にもきわめて有効に利用され、わが国の天然物化学領域の進展にも大きく貢献している。

（2）麹菌ゲノム解析の推進とゲノム解析データの有効利用

麹菌のゲノム解析を見据えて麹菌の cDNA ライブラリーを構築し、異なる培養条件下における発現遺伝子の網羅的スクリーニングを行うとともに、cDNA ライブラリーをベースとした EST 解析プロジェクトを産学官コンソーシアムとして立ち上げ、その後の麹菌のゲノム解析につなげた。ゲノム解析プロジェクトにおいても「学」の取りまとめ役と海外の他のアスペルギルス属糸状菌のゲノム解析グループとの調整役としてゲノム解析の推進に中心的な役割を果たした結果、麹菌を含めた 3 種類のアスペルギルス属糸状菌のゲノム解析の成果が 2005 年末に *Nature* 誌に掲載され、世界的に高い評価を得た。ゲノム解析結果をもとに網羅的なバイオマス分解酵素遺伝子の探索と麹菌における高生産と酵素学的諸性質を解明し、ゲノム解析データの利用の有効性が実証できた。

（3）麹菌のアミラーゼ遺伝子発現制御機構の解明とタンパク質生産への応用

遺伝子組換え技術が確立できるとその応用範囲は広がり、目的の遺伝子を多コピー導入または破壊することで高生産株や非生産株を効率的に造成できると同時に、遺伝子の発現制御機構の解析も可能になる。そこで、清酒製造における最も重要なアミラーゼ遺伝子の発現制御機構の解析を進めることにした。その結果、アミラーゼ遺伝子のプロモーター領域中の転写誘導シスエレメントの同定、同 DNA 配列に結合する必須の転写因子 AmyR を発見した。AmyR が結合するシスエレメント region III の同定は、このシスエレメントを複数個タンデムに連結した遺伝子高発現プロモーターの開発につながり、この改変型発現プロモーターは多数の大学・企業の研究者によって異種遺伝子高発現に利用されている。誘導基質の認識機構の解析の一環として、マルトース輸送体、マルターゼをコードする遺伝子（*malP* および *malT*）およびこれら遺伝子の発現誘導に関わる転写因子遺伝子 *malR* からなるマルトース遺伝子クラスターを発見し、これら遺伝子産物がアミラーゼ遺伝子の転写誘導に必要であることを明らかにした。一方、清酒醸造に必須のグルコアミラーゼは液体培養では発現せず、麹のような固体培養の条件でのみ発現するが、この固体培養特異的な遺伝子発現制御を司る転写因子として FlbC を発見した。FlbC はグルコアミラーゼと同様に固体培養で高生産され、清酒および醤油醸造でも重要なプロテアーゼの遺伝子発現制御にも必須な転写因子であることを明らかにした。また、アミラーゼ生産のグルコース抑制が転写因子 CreA によって行われるが、CreA の制御因子と考えられている脱ユビキチン化酵素 CreB との二重破壊によりアミラーゼやバイオマス分解酵素の生産が飛躍的に向上することを見出した。さらに、麹菌が疎水性固体基質である生分解性プラスチック上で生産する分解酵素（クチナーゼ）やハイドロフォビンの誘導発現に重要な転写因子 FarA を見出した。異種タンパク質生産では、麹菌のコドン使用頻度に最適化することにより、異種遺伝子の mRNA が安定化し、それに伴って異種タンパク質の生産性が向上することが明らかとなり、異種タンパク質の効率的生産にコドン最適化が有効であることを示すことができた。

Key words *Aspergillus oryzae*, transformation, transcriptional regulation, amylase gene

A1H1 (0003) 環境微生物資源の有効利用のためのシングルセル解析技術の開発と展開研究

○竹山春子 [1,2,3,4]*
([1] 早大院・先進理工・生命医科, [2] 産総研-早大生体システムビッグデータ解析オープンイノベーションラボラトリ, [3] 早大・ナノライフ創新研, [4] 早大・生命動態研)

Development and deployment of single-cell analysis technology for effective utilization of environmental microbial resources

○Haruko Takeyama[1,2,3,4]*
([1] Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Advanced Sci. Eng., Waseda Univ., [2]AIST-Waseda Univ. Comput. Bio Big-Data Open Innov. Lab. [3]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [4]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Univ.)
haruko-takeyama@waseda.jp

環境中には多様な微生物が存在しており，これらの微生物が有する特徴的な機能は，希少な遺伝子資源として産業・工業・医療などに活用されてきた．一方で，環境微生物はその大部分が依然として難培養性であり，これらの微生物の機能解明に向け，現在，ゲノム配列を基にした微生物の解析手法が広く行われている．次世代シーケンサーの発達によってビッグデータを用いた解析が可能となり，16S rRNA 遺伝子解析による微生物叢の解析や，メタゲノムショットガン解析による機能遺伝子の検出などが様々な環境サンプルを対象として実施されている．また，ビニングと呼ばれる手法によってメタゲノムからドラフトゲノムの情報を構築することが可能となり，近年，未培養環境微生物のドラフトゲノム登録数は急速に増加傾向にある．その一方で，多量な配列情報の取得の結果，環境中の微生物集団は驚くほどに多様性が高いことが明らかとなり，株レベルでの微生物の多様性解析や，環境中での存在比が少ない微生物の解析など，これまでの手法では効率的な解析が難しい微生物が多数存在することが明らかとなった．

そこで我々は，環境微生物の詳細解析に向け，微生物 1 細胞（シングルセル）レベルでの機能解析を可能とする独自技術の開発に取り組んできた．また，多様な微生物集団から有用な微生物の情報を効率的に獲得するため，標的となる活性を有する微生物を選抜し，個体レベルでのゲノム解析を可能にする技術の開発を同時に進めてきた．具体的には，上記技術の基盤要素である①微小液滴作製技術を応用したゲノム解析技術および②顕微ラマン分光法を応用した生体成分の *in-situ* 検出技術を開発し，これらの技術を組み合わせることによって微生物解析のための新たなプラットフォームを構築した．まず，①では，ピコリットル容量の油中水滴型の均質な液滴を高速に生成する技術を応用し，シングルセル全ゲノム増幅の反応場として使用した．マイクロ流体デバイスの使用により，均質な液滴を毎秒約 1000 個の割合で高速に生成することが可能とし，個々の液滴内に微生物を 1 細胞レベルで封入することにより，ハイスループットな反応を可能とした．また，液滴の構成成分としてアガロースを使用することによって細胞や DNA 分子を液滴内で捕捉することを可能とし，細胞溶解から全ゲノム増幅までの反応を，1 本のチューブ内で 10^5 個以上の細胞に対して完結させることが可能となった．本技術を活用することにより，多様な環境サンプルからのシングルセルゲノム解析が可能となり，株レベルでのゲノム情報の多様性が明らかとなった [1,2]．次に②では，物質に光を照射した際に生じる微小な散乱光をスペクトルとして分光し，対象物質の構造を分子レベルで解析するラマン分光法を応用することにより，迅速かつ低侵襲で，微生物 1 細胞からタンパク質や脂質，核酸などの生体分子をリアルタイムに検出する機構を開発した．また，多変量スペクトル分解法（MCR-ALS）を用いてスペクトルを分解することにより，微生物の代謝物の生産性の評価や，微生物に含まれる様々な生体分子の観察が可能とした [3]．

上記の技術を組み合わせることにより，生理活性物質生産菌を効率的にスクリーニングし，シングルセルレベルでの詳細な性状解析を可能にするプラットフォームの構築を行った．本プラットフォームでは，微小液滴内にシングルセルを封入した後，ラマン分光法を用いて二次代謝産物等の標的となる生体分子を生産する微生物の候補を特定する．候補となる微生物を含んだ液滴を選抜し，個別にゲノム解析を行うことによって，標的の生体分子を産生する微生物のゲノム情報をシングルセルレベルで獲得することができる．我々は，このプラットフォームを最古の多細胞動物の 1 つである海綿動物（*Theonella sp.*）の共生微生物に適用し，抗腫瘍活性が期待される物質 aurantoside を生産する共生微生物のスクリーニングを試みた．その結果，宿主由来の細胞や目的の二次代謝産物を産生しない標的外微生物が混入する組織懸濁液から，aurantoside 産生遺伝子群を保有する新規細菌（*Chloroflexi bacterium*）のシングルセルドラフトゲノムが獲得された．以上のように，本プラットフォームでは，環境中に多様に存在する微生物集団から，標的となる生体分子を産生する微生物を選択的に検出し，個別にゲノム解析を行うことによって個体レベルでの遺伝子情報を獲得することができる．これにより，従来までの手法では困難であった希少微生物の効率的なスクリーニングが可能となり，産業や医療分野に応用が可能な酵素や二次代謝産物の発見につながることが期待される．

本発表では，これまでに紹介した基盤技術とそれらを組み合わせたプラットフォームの詳細について応用事例を踏まえて紹介した後，シングルセル解析における今後の展望についても紹介したい．

References
1. R. Chijiiwa, M. Hosokawa, H. Takeyama, et al., (2020), Microbiome
2. M. Kogawa, M. Hosokawa, H. Takeyama, et al., (2018), Scientific Reports
3. S. Horii, M. Ando, A. Z. Samuel, H. Takeyama, et al., (2020), J. Nat. Prod.

Key words single-cell analysis, environmental microbiome, microbial resources

A1H1 (0004) 「ペプチドアレイ」を基盤とする低抗原性生理活性ペプチドの製造に関する研究

○栗本昌樹 [1]*, 久保智里 [1], 越智浩 [1], 本多裕之 [2], 大河内美奈 [3]
([1] 森永乳業株式会社, [2] 名古屋大学, [3] 東京工業大学)

Research for the production of low antigenic bioactive peptides based on "Peptide array"

○Masaki Kurimoto[1]*, Chisato Kubo[1], Hiroshi Ochi[1], Hiroyuki Honda[2], Mina Okochi[3]
([1] Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [2]Nagoya University, [3]Tokyo Institute of Technology)
m-kurimoto@morinagamilk.co.jp

1. はじめに

乳たんぱく質の酵素加水分解物（乳ペプチド）は、育児用ミルクにおけるアレルゲン性低減などの用途で、これまで世界中で使用されてきた。また近年では、血圧コントロールなど健康に関わる機能性が注目を浴びており、健康素材としての臨床試験も盛んに行われている[1]。一方、乳ペプチド中には様々なペプチド配列が混在し、それら個々を対象として扱うことは困難であった。そのため、乳に限らず、ペプチド製造とその実用化に関する二大課題といえる、①抗原性ペプチド群の分解・除去と、②生理活性ペプチド群の標的製造を実現するには、分画・分析の繰返しや酵素の組合せの膨大な試行錯誤が必要であり、社会へ発信する上で大きな足枷であった。

2. 「ペプチドアレイ」を反応基盤とした分析技術の開発

我々は、任意のペプチド配列を小さな基板上に多数合成できる「ペプチドアレイ」を基盤として、上記 2 つの問題の解決を目指し、ペプチドを個々の配列レベルで、精緻かつ革新的に分析・設計するための、以下 2 つの基幹技術の開発に成功した。

一つは、試料に含まれる残存抗原の配列特定と定量を同時に行う技術「Pep iEIA 法」である[2]。ペプチドアレイを反応基盤として試料のイムノアッセイを行い、ペプチドアレイのスポットごとに結合した抗体量を測定することで、試料に残存する抗原ペプチドを配列毎に定量することができる。本法は、既存技術と同等以上の感度で抗原を検出できるだけでなく、同時に検出した抗原のペプチド配列を特定可能なイムノアッセイ法である。

もう一つは、酵素のたんぱく質切断部位を特定する技術「Pep-MS assay 法」である[3]。ペプチドアレイ上に合成された様々なペプチド配列に酵素処理を施し、切断されたペプチド断片をスポットごとに回収して質量分析し、たんぱく質切断部位を一斉同定することができる。本法は、対象基質のペプチド配列を自由に設計できるという点で汎用性が高く、また、あらゆる酵素の基質特異性を幅広く、正確かつ迅速に把握できるため、実用性の高い技術であると考えられる。

3. まとめ

「Pep-iEIA 法」によって抗原をペプチド配列レベルで特定・定量できる意義は大きく、狙いを絞った抗原性低減が可能になる。また、食用たんぱく質が今後多様化した際に抗原性の検出技術がより重要になる。更に反応基盤をチップ化することにより、製造現場において様々な抗原を一斉モニタリングするための、マルチ型検出ツールとして応用できる可能性も有する。

また、産業用酵素は、今後遺伝子組み換え技術やゲノム編集を活用した新規な酵素生産が期待される。「Pep-MS Assay 法」を用いてそれらの新規酵素の切断部位を詳細に分析することで、たんぱく質から機能性ペプチドを効率よく切り出し、標的ペプチドの濃縮製造に最適な酵素系を選択することが可能になる。これにより、新たな機能性ペプチドの製品化にかかるリードタイムを短縮できるようになるため、本技術が健康食品業界にもたらす影響は非常に大きいと考えられる。

今回のペプチドに関わる 2 つの基幹技術によって、生理活性ペプチドを高濃度に含有しつつ、かつ抗原性ペプチドを最小限に抑制した、全く新しい製品群の開発も検討できるようになった。そして将来的には、抗原性が除去され、且つ疾病への移行を予防あるいは QOL を向上させる機能性ペプチド及びその配合製品を新たに社会へお届けし、人々の健康で幸せな生活に貢献できれば幸いである。

4. 文献

1. Yuda N., Tanaka M., Yamada A., Ochi D., Yamauchi K., Abe F., Sakane N.: Antihypertensive effect of the casein-derived peptide Met-Lys-Pro in individuals with high-normal blood pressure or grade 1 hypertension -A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial-, 薬理と治療, 46(4), 529-37 (2018)

2. Kubo C., Kurimoto M., Tanaka M., Ochi H., Abe F., Okochi M.: Peptide array-based inhibition ELISA for evaluating antigenicity in infant formulas, J. Biosci. Bioeng., 130, 374-381 (2020)

3. Kurimoto M., Shimizu K., Ochi H., Abe F., Honda H.: Pep-MS assay_Protease hydrolysis assay system using photo-cleavable peptide array and mass spectrometer, J. Biosci. Bioeng., 128, 156-161 (2019)

Key words: peptide, peptide array, allergy, allergen, protease, substrate specificity

S1H1 (0101) バイオエコノミー社会の実現に向けたバイオ戦略の新たな展開

○宇井伸一 [1*]
([1] 内閣府)

New development of bioeconomy strategy to realise bioeconomy society

○UI Shinichi[1*]
([1]Cabinet Office)
bio_csti.v9a@cao.go.jp

我が国では、「2030 年に世界最先端のバイオエコノミー社会を実現」することを目標とする総合的な政策パッケージとして、2019 年 6 月に「バイオ戦略 2019」を策定した。それ以降、毎年見直しを行い、更新することを通じ、必要な取組を機動的かつ強力に推進してきたところである。
2021 年度の見直し・更新では、第 6 期科学技術・イノベーション基本計画のほか、気候変動問題への対応の更なる加速やワクチン・治療薬等の開発競争の激化に代表される情勢変化など、最新動向を踏まえ、具体的な取組を充実させ、戦略の実行構想を示すべく、これまでの戦略をブラッシュアップした「バイオ戦略フォローアップ」を策定した。
今後は国を挙げて戦略の実行に注力していくことを念頭に置き、バイオエコノミーの推進とその鍵である市場領域の拡大を現実のものとしていく必要がある。本講演では、バイオ戦略に基づく取組の現状と方向性について全体像を説明する。

Key words bioeconomy, bioecomony strategy, bio-community

S1H1 (0102) 経済産業省におけるバイオ産業政策の方向性について

○保田 友晶 [1*]
([1]経済産業省 商務・サービスグループ 生物化学産業課)

Overview of METI's Policies for the Bio-Based Economy

○Tomoaki Yasuda[1*]
([1]Bio-Indusry Division, Ministry of Economy, Trade and Industry)
yasuda-tomoaki@meti.go.jp

近年の技術革新によりバイオテクノロジーは健康・医療、素材、環境も含めたあらゆる産業分野で大きな変革を起こしつつあり、国際的にもバイオ分野の民間投資が急増している。今年の経済産業省 産業構造審議会でも、今後の経済成長を牽引し、経済安全保障の観点でさらに重要性が増しているバイオ産業を次世代の産業の柱の一つとして位置づけた。バイオテクノロジーを活用する「バイオものづくり」は今後ますます成長が期待される分野であるといえる。

一方、圧倒的な量の研究資金・研究人材を投入する欧米諸国等と比べて必ずしも日本の取組は十分とは言えない中、我が国が産業化競争を勝ち抜いていくためには、産学官の有機的な連携の下に、従来の延長線上よりさらに踏み込んだ対応が必須である。

経済産業省では、これまでもバイオ分野におけるイノベーションの社会実装、産業化に向けて、スマートセルなどの先進技術開発の促進、バイオ医薬品の製造基盤技術等の開発・拠点整備、創薬型ベンチャーの資金調達を円滑化するための市場環境整備などを行ってきている。

直近では、「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発（NEDO）」を通じて、スマートセルの産業化をさらに促進するための微生物スケールアップ実証拠点として、関西圏及び東京圏においてバイオファウンドリ製造基盤の整備に着手するとともに、バイオ分野にける先進的な技術開発・産業化をより協力に促進するための施策の強化を進めている。

さらに、今般の新型コロナウイルス感染症の世界的な流行により社会経済活動が甚大な影響を受ける中、本年 6 月には「ワクチン開発・生産体制強化戦略」が閣議決定された。経済産業省としては、本戦略を踏まえて、更なる変異種や次なるパンデミックへの備えとして、国内におけるワクチン製造拠点の整備や創薬ベンチャーの育成といった取組を新たに進めることとしている。

このうち、ワクチン製造拠点については、平時は企業のニーズに応じたバイオ医薬品を製造することで設備と人材を維持しつつ、有事にワクチン製造へ切り替えられるデュアルユース設備の導入を促進するため、既存のワクチン製造拠点等の改修及び新規のバイオ医薬品製造拠点の構築を支援していく。あわせて、ワクチン製造に不可欠な製造基盤技術や、部素材・消耗品等の安定供給確保のための技術開発・実証も強化する。

また、創薬ベンチャー育成策については、創薬ベンチャーの大規模な開発資金の供給源不足を解消するため、NEDO 事業も参考にしつつ、ハンズオンによる事業化のサポートを行う認定ベンチャーキャピタル（VC）による出資を要件として、特に前臨床、治験第 1 相、第 2 相期の創薬ベンチャー企業に対する実用化開発を支援する。これにより、VC の目利き力を活かした優良ベンチャーの発掘・育成、VC の能力・投資規模拡大の加速化、③起業経験者の将来的な再起業なども含めた創薬ベンチャーエコシステム全体の底上げを図る。

本講演では、以上で紹介したバイオファウンドリ生産実証拠点の構築やバイオコミュニティ形成、ワクチン開発・生産体制強化を踏まえた新たな取組も含め、経済産業省における今後のバイオ産業政策の方向性について紹介する。

Key words Government Policy, Bio-foundry, COVID-19,Vaccine

S1H1 (0103) 三菱ケミカルのバイオプラスチック開発

○加藤　聡
（三菱ケミカル株式会社 Science & Innovation Center）

Development of Mitsubishi Chemical`s Bio Plastics

○Satoshi Kato
(Mitsubishi Chemical Corporation, Science & Innovation Center)
kato.satoshi.mb@m-chemical.co.jp

＜緒言＞

高分子化学の研究が始まってから今日まで約 100 年が経過した。天然高分子は 20 世紀になる前から利用されてきたが、合成高分子は 1920 年代に発明され、研究が開始された。その後 1930 年代から 1950 年代には石油化学工業の発展とともに多くの合成樹脂が研究され工業化された。2000 年以降は、高分子材料に対する高性能化の要求が高まるとともに環境配慮の要求に応える技術が必要となってきた。

植物由来樹脂の多くは脂肪族ポリエステルの構造を有する。脂肪族ポリエステルの研究の歴史は古く、微生物産生ポリエステルやポリ乳酸は、1920 年代から研究が開始されている。しかし、現在においても生分解性樹脂や植物由来樹脂の生産量は限定的であり樹脂全体生産量の１％にも達していない。生分解性樹脂や植物由来樹脂のさらなる普及には、高分子化学とバイオテクノロジーの協力が必要である。

世界のカーボンニュートラルに向けた温暖化ガス削減の動きで、主な温暖ガス排出国が 2050 年又は 2060 年以降、温暖ガス排出量を実質ゼロにするという目標を公表している。日本も菅総理が「2050 年カーボンニュートラル」、「脱炭素社会の実現」を目指すことを宣言し、小泉環境大臣が「2050 年カーボンニュートラル」の実現に向けて、2030 年に再生可能エネルギーを倍増させる「脱炭素政策パッケージ」を発表した。

＜三菱ケミカルの取り組み＞

三菱ケミカルは、化学を通じて、人・社会・地球の課題解決を目指した事業を推進させるための技術開発を行っている。その具体例の１つとして長年培ってきたポリエステル技術、ポリカーボネート技術により生分解性プラスチック、植物由来樹脂を事業化してきた。本講演では最近の海洋プラスチック問題解決に対する研究例と新規なバイオマスプラスチックの基礎研究についてご紹介する。

＜海水生分解性樹脂開発＞[1)]

近年、大量生産された合成樹脂が海洋に流出して蓄積し、環境破壊の懸念が大きな社会問題となっている。生分解性プラスチックは、自然環境中、微生物の働きにより水と二酸化炭素にまで分解されるため、海洋における環境負荷の対応策の一つとして期待されるが、海洋で生分解される合成樹脂の種類は非常に少ない。G20 でのグローバルなビジョンとして共有した“大阪ブルー・オーシャン・ビジョン”では 2050 年までに海洋プラスチックごみによる追加的な汚染をゼロにまで削減するということを目指しているが技術的には非常に高い目標である。

我々は、海洋で生分解する生分解性ポリエステルの開発のため、各種ポリエステルの海水中での分解性について分子構造と分解速度等の検討を行った。その結果高分子の一次構造や添加剤などで海水分解性を促進できる効果が認められた。

セルロースと各種ポリエステルについて、1 年以上の期間にわたり海岸定点で採取した海水で、生分解度を比較し、海水採取時期と生分解度の関係について評価した。

本検討の結果により、ポリエステルの海水生分解速度を大幅に促進させる方法が見出され、実用物性を備えた海水生分解性プラスチックの開発指針が得られた。

＜新規芳香族バイオマス樹脂探索＞[2) 3)]

合成高分子は、発明から約 100 年が経過し現在では人類に利便性、生産性、経済性など様々な恩恵をもたらしてきた。一方地球規模での気候変動対策が喫緊の課題となっており、脱炭素社会への変換が必要とされている。バイオマスポリマーの多くは脂肪族ポリエステルでありバイオマス芳香族ポリマーは、実用化されている例がない。本発表ではバイオマス芳香族ポリエステルの特性および工業化に向けた製造検討の結果に関して報告する。

植物由来 2,5-フランジカルボン酸ジメチル（FDCM）又は 2,5-フランジカルボン酸(FDCA)を芳香族ジカルボン酸として用い、ジオール成分として種々のジオールモノマー（エチレングリコール、1, 4-ブタンジオール、シクロヘキサンジメタノール）を用いて溶融重縮合によりポリエステルの重合を行った。

ＰＥＦ(ポリエチレンフラノエート)の特徴としてガスバリア性がＰＥＴより良好であることが知られているが、ＰＥＦの表面硬度はＰＥＴと比べ非常に高く、曲げ弾性率が 3500MPa とＰＥＴと比べ非常に高いということが判った。

1) 野口,池田,宮町,田中,加藤、第 29 回ポリマー材料フォーラム,164,Vol.29(2020)
2) 加藤,笠井,白浜,佐藤,田中、第 29 回ポリマー材料フォーラム,163,Vol.29(2020)
3) 特許第 5446121 号（三菱ケミカル）

Key words biodegradable polymer, biomass polymer, polybutylene succinate, polyethylene furanoate

S1H1 (0104) 廃棄物をバイオプラスチックに ～バイオ技術によるサーキュラーエコノミーへの貢献～

○小間聡[1]*
（[1]積水化学工業）

Turn waste into bioplastics
~ Contribution to the circular economy through biotechnology ~

○Satoshi Koma[1]*
([1]Sekisui Chem.)
satoshi.koma@sekisui.com

日本では年間約 6,000 万 t の有機性廃棄物が排出されており、そのエネルギー量はカロリー換算で約 200 兆 kcal に達する。この量は日本でプラスチックを生産するのに用いられる化石資源（年間約 3,000 万 t、約 150 兆 kcal）を置き換えられる程の量に相当するが、多くは焼却・埋立処分されているのが現状である。

有機性廃棄物の再資源化（再原料化）は、既存の工業プロセスで要求される原料特性とは相反する雑多・不均質且つ含まれる成分・組成の変動も大きいと言う特徴により進んでいなかったが、微生物の活用により、この壁を乗り越えられるところまで開発が進んできた。

一例としては、先ず有機性廃棄物を熱分解により均一成分である合成ガス（CO、H_2）に変換し、ガス組成の変動に強いガス発酵を用いてエタノールに変換、更にエタノールから化学プロセスで各種プラスチック類を生産する資源循環プロセスが実現可能である。

本シンポジウムでは、ガス発酵を利用した資源循環プロセスを事例として、プロセスの詳細、プロセスを実現するにあたってのバイオ技術の利点等に触れつつ、バイオ技術がサーキュラーエコノミー（資源循環社会）の実現に貢献出来る事等を紹介する。

Key words waste, bioplastics, ethanol production, *Clostridium*

S1H1 (0105) メタン発酵技術を利用した資源の有効活用

○東森 義和*
（霧島酒造）

Effective utilization of resources using methane fermentation technology

○Yoshikazu Higashimori
(Kirishima Shuzou CO.,Ltd.)
Higashimori-yoshikazu@kirishima.co.jp

芋焼酎は、大地の恵みである農産物（甘藷、米）が原料であり、その大地の恵みを余すことなく最大限利用するために、焼酎製造工程から排出される焼酎粕や芋くずを未利用資源と捉え、メタン発酵により回収したバイオガスをエネルギー源として利用している。焼酎粕は地元九州の自然が育んだ甘藷を原料とした地域資源であり、有機物を豊富に含んだバイオマス資源である。
メタン発酵によるバイオガス回収技術は国内外で研究開発されているが、液体処理限定のメタン発酵システムが多く、焼酎粕の固液分離や残った固体部分の処理も大きな課題となっている。メタン発酵槽の種類としては、大きく分類し「固定床式」「流動床式」「完全混合式」などがあり、焼酎粕は粘性が高く固形物を多く含むため、流動床式や完全混合式を用いて処理する場合、微生物の系外への押し出しなどの問題があり、前処理において固液分離が必要とされる。一方、固定床式は微生物を保持する担体が固定されているため、担体保持微生物の流出が起こりにくく、固液分離せずに処理が行えるため、バイオガスを最大限に回収できる。また、微生物の反応が速い高温発酵（約 55℃）により、粘性があり固形物が多い焼酎粕の高温処理を可能にし、メタン発酵により有機物 80%以上、固形分 60%以上が分解されてバイオガスが発生する。このバイオガスは、焼酎粕 1 トン当たり約 40Nm³発生し、ガスホルダを経由し焼酎製造工程のボイラーへ供給される。バイオガスは連続的に発生し、焼酎製造工程へ優先的に供給されるがバイオガスの需要は原料の種類、工程、時間帯ごとに変動するため、余剰ガスが発生する。余剰ガスは 3 基のガスエンジン発電機を台数制御し、無駄なくバイオガスを使い切るように運転している。
バイオガスを 100%使い切ることで大地の恵みを余すことなく最大限利用することが焼酎粕有効活用による資源循環サイクルに繋がっている。バイオマスエネルギーは、大気中の二酸化炭素を増加させない「カーボンニュートラル」と呼ばれる。今後も地域資源を有効活用することにより、温室効果ガス削減や循環型社会の形成への取組みを進める。

Key words Shochu, biomass,methane fermentatio

S1H2 (0201) 合成生物学における新規ゲノム工学技術(CRAGE)の可能性

○吉国靖雄 [1]*
（[1] 米国エネルギー省ジョイント・ゲノム研究所、ローレンス・バークレー国立研究所）

CRAGE enables rapid development of synthetic biology

○Yasuo Yoshikuini[1]*
([1]The U.S. Department of Energy Joint Genome Institute, Lawrence Berkeley National Laboratory)
yyoshikuni@lbl.gov

We developed chassis-independent recombinase-assisted genome engineering (CRAGE) and then extended its utility by developing CRAGE-duet. These CRAGE technologies enable single-step integration of large, complex DNA constructs directly into the chromosomes of diverse bacterial species across multiple phyla. Powerful applications are myriad. For example, CRAGE allows pathway engineering at the chromosome level and accelerates the DBTL cycle for industrial strain development. For instance, we developed a strain that can efficiently convert marine biomass to biofuels. The CRAGE systems also allow expression of single constructs in diverse chassis strains and testing of compatibility with the host's pathway. This multi-chassis approach enabled identification of ideal hosts for secondary metabolite biosynthesis and even allowed discovery of novel metabolites. In addition, the CRAGE systems are fully compatible with CRISPR systems; this compatibility enabled genome editing in non-model strains and thereby study of gene and pathway function. As a final example, we have started to use CRAGE systems to engineer root-associated microbes. This has allowed us to begin to understand spatiotemporal behaviors of bacteria in the rhizosphere and to create PGPRs that can significantly increase biomass yields. We believe that the speed, accuracy, efficiency, and versatility of CRAGE and CRAGE-Duet make them game-changing technologies in synthetic biology.

Key words Genome engineering, Synthetic Biology, Natural Product

S1H2 (0202)

大腸菌のメガサイズゲノムの合成と移植の技術

○末次正幸[1]*
([1]立教大学理学部)

Synthesis and implantation technology of the *Escherichia coli* genome

○Masayuki Su'etsugu[1]*
([1]Rikkyo University)
suetsugu@rikkyo.ac.jp

2010 年に 1Mb のマイコプラズマゲノムを酵母で人工合成し、細胞に移植することで合成バクテリアを生み出す研究がなされている。それ以降、メガサイズゲノムを合成したり移植したりする技術に大きな進展はなく、マイコプラズマ以外の生物種でのゲノム合成研究は逐次的にゲノム領域を短い合成 DNA と組換えていく手法に依存している。本講演では、我々のメガサイズ DNA のセルフリー合成技術と大腸菌へのゲノム移植技術について紹介する。
長鎖 DNA のセルフリー合成技術はそれぞれ独自の連結と増幅の 2 段階の反応からなる。連結反応は、互いに数十塩基対の「のりしろ」末端（オーバーラップ配列）を利用して、一回の反応で 50 断片以上の短い断片を連結することが可能である。連結して環状となった長鎖 DNA を次の増幅反応で増幅する。この増幅反応は大腸菌の染色体複製サイクルを 26 種の精製タンパク質で試験管内再構成した系であり RCR(Replication Cycle Reaction)と呼ぶ。RCR では複製サイクルが何度も自律的に繰り返し、環状 DNA の指数増幅が達成される。重要なポイントは環状 DNA のみが選択され、連結中間体の直鎖 DNA は増幅の鋳型とならないことである。なので、連結産物を精製せずにダイレクトに増幅反応にかけるだけで目的環状 DNA の増幅産物が得られる。その収量は 100ng/μL 程度と高濃度であり、しかも大腸菌から精製したプラスミドと同じスーパーコイル DNA が得られる。なので、増幅産物を形質転換にダイレクトに用いることができ、効率の良い DNA 導入が達成される。
また、RCR では 1Mb を超える長鎖環状 DNA の増幅も可能となっている。このとき用いた環状 DNA は大腸菌ミニマムゲノム株の環状染色体（3 Mb）から 1 Mb 領域を独自の細胞内手法で環状に抜き出したものである。
さらに我々は、この抜き出し技術を利用して大腸菌ミニマムゲノム株 3 Mb 染色体を 3 種の 1 Mb 染色体に分割することに成功した。興味深いことに、うまく染色体複製起点を設計することで、この 3 分割株は野生型大腸菌と大きく変わらない増殖速度で、元気よく増殖するものであった。
我々はこの 1 Mb の 3 分割染色体を環状スーパーコイルとして試験管内に精製して取り出すことに成功した。さらに、精製した 1 Mb 分割染色体を 4.6 Mb 染色体を持つ大腸菌野生株に形質転換で移植することにも成功した。
以上の成果は、ゲノムスケールの長鎖 DNA を人工合成し、細胞に移植して、デザインされた人工細胞を創成することにつながるものである。

Key words *Escherichia coli*, genome synthesis, chromosome splitting, genome implantation

S1H2 (0203)

マウス／ヒト人工染色体によるデザイナー細胞・動物の作製と応用

○香月　康宏[1]*
([1]鳥取大学・染色体工学研究センター)

Generation of designer cells and animals using mammalian artificial chromosomes and the application

○Yasuhiro Kazuki[1]*
([1] Chromosome Engineering Research Center, Tottori University)
kazuki@tottori-u.ac.jp

トランスジェニック技術は遺伝子を破壊または導入し、その表現型を解析することにより、これらの遺伝子がどのような機能を持つかを知る上で非常に重要な技術となっている。しかし、クローン化 DNA 断片を使用するこれまでのトランスジェニック技術では、細菌人工染色体（BAC）を用いても導入可能な DNA サイズは通常 200kb が限界であり、1Mb を超える大きさを持つ遺伝子や遺伝子クラスターの導入は不可能であった。哺乳動物の遺伝子は制御領域も含めると数百 kb 以上に及ぶことがあり、それらの全てを含む形で導入できないことが原因で遺伝子本来の発現を量的・質的に再現できないと考えられてきた。上述の課題を克服するために、我々は哺乳類細胞において自立複製・分配が可能なヒト人工染色体(human artificial chromosome:HAC)およびマウス人工染色体(mouse artificial chromosome:MAC)を構築し、Mb 単位の巨大なヒト遺伝子クラスターのマウス・ラットへの導入、すなわちトランスクロモソミック(Trans-chromosomic: TC)マウス・ラットの作製に世界で初めて成功した。これまでにヒト 21 番全長（35Mb）、ヒトジストロフィン遺伝子(2.5Mb)、ヒト薬物代謝酵素遺伝子クラスター(1.5Mb) 、ヒト抗体遺伝子群（3.5Mb）等を上記 HAC/MAC ベクターに搭載することに成功している。さらに、HAC/MAC へ巨大遺伝子を搭載した、いわば「Designed Chromosome」をマウスやラットに導入することで「Designed Animal」を作製し、疾患モデルマウスの発症メカニズムの解明と治療研究、完全ヒト抗体産生動物による抗体医薬品シーズの作製等、に取り組んできた。さらに、「Designed Chromosome」を用いた「Designed Cell」による基礎研究から応用研究にも取り組んでいる。本シンポジウムではヒト巨大遺伝子の機能解析、疾患モデルマウス・細胞による発症メカニズムの解明と治療研究、ヒト薬物代謝モデル動物による医薬品候補化合物のヒトにおける代謝・毒性予測、完全ヒト抗体産生動物による抗体医薬品シーズの作製等、人工染色体技術の創薬研究への応用を中心に紹介し、最近取り組んでいるゲノム合成技術と人工染色体技術の融合による次世代染色体工学技術についても紹介したい。

【参考文献】
1) **Kazuki Y et al.**, Human Artificial Chromosomes for Gene Delivery and the Development of Animal Models. ***Mol Ther.*** 2011;19(9):1591-601.

2) Uno N, Abe S, Oshimura M, **Kazuki Y.** Combinations of chromosome transfer and genome editing for the development of cell/animal models of human disease and humanized animal models. ***J Hum Genet.*** 2018;63(2):145-156.

3) **Kazuki Y et al.**, Humanized UGT2 and CYP3A transchromosomic rats for improved prediction of human drug metabolism. ***Proc Natl Acad Sci U S A.*** 2019;116(8):3072-3081.

Key words mammalian artificial chromosome, humanized animal model

S1H2 (0204) ヒト細胞ゲノム大規模改変技術の開発とその応用

○相澤康則[1]*, 大野知幸[1], 倉澤光[2]
([1]東京工業大学 生命理工学院, [2]神奈川県立産業技術総合研究所)

Development and application of large-scale engineering of the human cellular genomes

○Yasunori Aizawa[1]*, Tomoyuki Ohno[1], Hikarsu Kurasawa[2]
([1]School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, [2]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)
E-mail: yaizawa@bio.titech.ac.jp

現代人はゲノム技術革命の時代を生きている。ゲノム解読技術は成熟し、短時間で格安に膨大な DNA 配列情報を得ることが常識となった。得られるゲノム配列と cDNA 配列をもとにした比較ゲノム解析によって様々な生物種の遺伝子候補がリスト化され、これらに対する CRISPR 技術の活用によって遺伝子機能の解明はハイスループット化されつつある。このゲノム編集が成熟しつつある今、さらにゲノムの大部分あるいはゲノム全体を設計し、合成するいわゆる「ゲノム構築」という分野も生まれ、これまで不可能であったレベルや規模で生物システムを改変あるいは創出する動きが始まっている。「ゲノム構築」によってバイオテクノロジーも新しいフェーズに入ったといえる。ゲノムを構築するということは、細胞システムをデザインし、作ることであり、ここにゲノム工学とシステム生物学の融合がより活発化する時代を予見させる。

現時点でのゲノム構築の主な対象となっているのは、大腸菌や酵母といった比較的ゲノム構造が単純な単細胞微生物だけである。しかしゲノム構築時代の 10 年後、20 年後に想いを馳せると、高等生物のより複雑な細胞ネットワークの理解や、高等生物の産業的応用のために、より長く、より複雑なゲノムを持つ生物種もゲノム構築の対象となるのは必然である。このような時代の流れを考え、我々のグループでは、ヒト細胞内でのゲノム構築技術の開発をこれまで進めてきた。

本講演ではこれらゲノム構築技術のなかでも 100kb 規模のゲノム領域を改変することが可能な技術（UKiS 法；Universal Knock-in System）について紹介する。UKiS 法にはヒトゲノムを対象としたいくつかの利点がある。まず、アリル特異的なゲノム改変が可能である。ヒト体細胞の多くは二倍体であるが、これがゲノム改変と、その改変が及ぼす影響を評価する際に障害となる。UKiS 法では、複数のアリルそれぞれに対して異なるゲノム改変を施すことが可能となる。２つ目の利点は Scarless、すなわちゲノム改変後に、改変に伴う余分な配列が残らないという点である。通常、100kb レベルのゲノム改変をする際、ゲノム改変効率を高めるために、LoxP 配列や薬剤耐性遺伝子をターゲット領域に残さざるを得ない場合が多い。UKiS 法はこの事態を回避する工夫がなされているため、改変後は 100%設計通りの配列に改変することが可能となる。

本講演では UKiS 法の原理の詳細を紹介するとともに、UKiS 法を活用することで可能となる研究や事業開発の事例についても紹介する。そして高等生物に対するゲノム構築の未来について議論できれば幸いである。

Key words Genome engineering, Synthetic genomics, Human genome

S1H2 (0301) ステルス型 RNA ベクターの開発

○中西真人[1]*
([1]ときわバイオ株式会社)

Development of Stealth RNA Vector

○Mahito Nakanishi[1]*
([1]TOKIWA-Bio, Inc.)
nakanishi@tokiwa-bio.com

今世紀に入り、医薬品開発の主流は抗体などバイオ医薬品へと替わり、さらには細胞医薬・遺伝子医薬などの新規モダリティの開発も急速に進んでいる。これらの進展を支えているのが、ヒトを含む動物細胞に効率よく遺伝子を導入し、安定に発現する技術である。生物工学分野では、遺伝情報を動物細胞で安定に発現するためには、Episomal plasmid などの例外を除いて、細胞のゲノム DNA への挿入が必要であると考えられてきた。しかし、ゲノム DNA への遺伝子の挿入は、コピー数の増加による発現増強にも制限があるし、再生医療や遺伝子治療では挿入変異による細胞のがん化という重大な安全性の懸念が生じる。そのため、細胞内に存在する RNA をプラットフォームとして持続的な遺伝子発現が構築できれば、ゲノム DNA への挿入によるさまざまな制限を克服することが可能になると考えられてきた。

RNA を使った遺伝子発現系は、さまざまな RNA ウイルスを材料に開発することができる。しかし、インターフェロンの誘導や強い細胞毒性、素材となるウイルスの病原性への懸念により、逆転写酵素活性を持ちゲノム DNA への挿入を起こすレトロウイルス・レンチウイルスを除き、持続的な遺伝子発現系としての実用化は困難とされてきた。我々は、動物細胞に持続感染するユニークなセンダイウイルス変異株の研究成果を基に、ウイルス粒子の形成に必要な遺伝子をすべて欠損して安全性を担保すると共に、ウイルスのゲノム RNA の性質を動物細胞の mRNA に近づけることで安定な遺伝子発現を可能にしたステルス型 RNA ベクター（SRV）の開発を進めている。

SRV は、センダイウイルス由来の RNA-dependent RNA polymerase（RdRp）を使って遺伝子発現とゲノム RNA の複製を行う。そのため、原理的に、ゲノム DNA への挿入や干渉の可能性が無い。また、プロモーターに相当する概念は無く、mRNA の転写は RdRp が認識する 10 塩基の短い配列から開始される。一方で、DNA をベースにした発現系で問題となる搭載遺伝子間の干渉等が無いため、最大 10 個という多数の遺伝子を一つの SRV に搭載して同時に発現することや、12.4kbp という巨大な cDNA の発現にも成功している。そのため、SRV を使えば、H 鎖と L 鎖の同時発現による IgG の発現だけでなく、二重特異性抗体の製造に必要な 4 個の cDNA の同時発現など、複雑なサブユニットからなるバイオ医薬品の持続的な生産が可能である。また、4 個以上の転写因子を同時に発現する必要がある動物細胞のリプログラミングや、複雑な代謝系をすべて一つのベクターに搭載して治療効果を目指す次世代の遺伝子治療も、SRV が最も得意とする応用分野である。この中では、初期化因子を搭載して高品質のヒト iPS 細胞を作製するための SRV-iPSC が既に実用化されている。

一般に、RNA を使った遺伝子発現系では、遺伝子発現のレベルは素材となったウイルスの性質により制限され、それを大幅に変えることはできない。しかし、SRV では、ゲノム構造の最適化により、約 100 倍という大きなレンジの中で、使用目的に最も適したベクターを選択することができるようになった。例えば、抗体産生であれば最強の発現をするベクターが、遺伝子治療のためには発現の弱いベクターが適している。また、細胞のリプログラミング用には、標的となる細胞や使用する転写因子の性質によって最適な発現レベルを選ぶことができる。この特徴により、SRV はあらゆる技術の中で最高のリプログラミング効率を実現することができるようになった。

SRV のもう一つの大きな特徴として、安定な持続発現が可能である反面、遺伝子発現の必要が無くなった場合には細胞から完全に消去できる点が挙げられる。一方、DNA による遺伝子発現系では、ゲノム DNA に挿入された外来遺伝子を除去するのは容易ではなく、Episomal DNA も積極的に除去するシステムは知られていない。SRV の遺伝子発現の持続性は RdRp に依存しており、さまざまな方法で RdRp の活性を抑制すると SRV のゲノム RNA は急速に細胞から消失する。再生医療では、細胞のリプログラミングに使用した外来遺伝子を細胞内に残さない「Footprint-free」という性質が安全性の鍵を握るが、SRV はこれを確実に担保することができる数少ない技術である。また、遺伝子治療においては、副作用が出現した場合にベクターを消去して治療前の状態に戻すという、これまでは不可能だった高度な安全性の確保につながると期待される。

SRV による遺伝子発現は、自らの RdRp に依存するため、細胞特異性は非常に低い。さらに、搭載する遺伝子にもほとんど制限が無い。実用化に当たっては、遺伝子発現を可視化するための遺伝子（EGFP など）や、遺伝子導入できた細胞だけを選択するための薬剤耐性遺伝子（ピューロマイシン耐性など）をあらかじめ組み込んだベクターが用意されている。タンパク質生産のためには、CHO-DG44 細胞など DHFR 欠損の細胞と組み合わせて使える Methotrexate 耐性が有用である。この場合、遺伝子治療で使われている DHFR 変異遺伝子を使えば、DHFR を欠損していない細胞でも薬剤選択をすることができるので、広い応用が可能になる。

このように、SRV は、さまざまなソフト（遺伝子）を搭載することで、多方面への応用が可能な柔軟性の高いプラットフォームである。SRV の基本特許は、日本（特許第 6770224 号）、米国（US 10544431 B1）などで登録済みで、さらに性能が進化した次世代の SRV の開発も進められている。現在は再生医療領域や遺伝子治療領域での開発が先行しているが、生物工学領域での応用と実用化にも期待したい。

Key words vector, gene expression, RNA, gene therapy, regenerative medicine

S1H2 (0302) 遺伝子治療を目指した新規 CRISPR-Cas システムの送達技術の開発

○奥嵜雄也 [1]*
([1]名古屋大院・農・鳥類バイオサイエンス研究センター)

Development of novel CRISPR-Cas delivery system using virus-like particles

○Yuya Okuzaki[1]*
([1]Avian Bioscience Research Center, Nagoya Univ.)
[1]yo0619@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp

生体において高効率かつ正確なゲノム編集を実現するには、対象となる個体や組織に対し CRISPR-Cas9 などのゲノム編集酵素を効率良く送達するための技術が必要不可欠である。レンチウイルスベクターやアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターは、これまでにも遺伝子治療に用いられてきた実績があり、高い感染効率と中長期にわたる安定した遺伝子発現が期待できる。一方で、従来の遺伝子補充療法とは異なりゲノム編集を用いた遺伝子治療においては、目的とする変異を一度対象細胞に導入できれば長期間にわたる治療効果を期待できるため、ゲノム編集酵素を長期間発現させる必要はない。それどころか、生体内で長期間ゲノム編集酵素を作用させることは、予期せぬオフターゲット変異を増加させたり過剰な免疫応答を惹起させたりする恐れがある。したがって、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療においては、対象に対して一過的にゲノム編集酵素を送達する技術の開発が重要である。

そこで我々は、感染性のあるレンチウイルス様粒子 (VLP) 内部にタンパク質を封入し、対象細胞へ一過的に送達する技術である NanoMEDIC 法を開発した。本方法においては、まず低分子化合物 (AP21967) 依存的にヘテロ二量体を形成する FKBP12 タンパク質および FRB タンパク質を用いて、レンチウイルスの構造タンパク質をコードする HIV-*Gag* 遺伝子および *Streptococcus pyogenes* 由来 Cas9 (SpCas9) タンパク質にこれら二量体化誘導タンパク質を付加することで、Gag タンパク質により形成される VLP 内部に AP21967 存在下で SpCas9 を能動的に封入することに成功した。また Cas9 によるゲノム編集には、Cas9 タンパク質以外に目的とする標的配列の情報を持つ gRNA が必要である。gRNA を効率的に VLP に封入するため、我々は Gag タンパク質と相互作用するレンチウイルスのパッケージングシグナル配列 (Ψ^+) と 2 種類の自己切断活性を持つリボザイム配列を用いた。Ψ^+の下流に 2 種類のリボザイムに挟まれた形で gRNA を配置することで、Gag タンパク質とΨ^+の相互作用による VLP 内への RNA 取込みの促進と、リボザイムによる活性のある gRNA の放出を同時に実現することができた。

作製した SpCas9 封入 VLP は、遺伝子導入が困難なヒト iPS 細胞や、非増殖性のニューロンや筋芽細胞などのゲノム編集が困難な細胞種においても良好なゲノム編集効率を示した。また、Duchenne 型筋ジストロフィー患者由来の iPS 細胞より分化させた筋細胞を用いた遺伝子治療のモデル実験系では、90%以上の細胞においてエクソンスキッピングの誘導によるジストロフィン遺伝子の修復を確認することができた。さらにこの VLP は、筋ジストロフィー疾患モデルマウス (mdx マウス) においても単回の筋肉内投与によりエクソンスキッピングを誘導できることが確認された。

本手法は FRB ドメインを付加するタンパク質を変えることで様々なタンパク質を封入することができるため、SpCas9 だけでなく他のゲノム編集酵素を封入したり、あるいは他の治療用のタンパク質を封入し、一過的に送達するためのキャリアーとして応用できると期待される。

Key words genome editing, delivery system, CRISPR-Cas9, virus-like particles

S1H2 (0303) 新規トランスポゾンベクターの開発

○隈元拓馬 [1]*, 和田京介 [1,2], 丸山千秋 [1]
([1] 東京都医学総合研究所, [2] 北里大学)

Development of the novel genome-integrating vector system

○Takuma Kumamoto[1]*, Kyosuke Wada[1,2], Chiaki Ohtaka-Maruyama[1]
([1]TMiMS, [2]Kitasato Univ.)
kumamoto-tk@igakuken.or.jp

目的とする外来遺伝子を、標的の細胞や生体に安定的に組み込むことができる遺伝子導入法は、遺伝子改変動物の樹立に代わる手段として広く利用されている。しかしながら、従来の DNA 発現ベクターを用いた遺伝子導入法では、一過性の過剰発現(エピソーマル発現)を引き起こすことから、遺伝子導入後すぐにゲノムに組み込まれたトランスジェニック細胞を区別できなかった。この問題を解決するために近年、新しいゲノム挿入依存的遺伝スイッチ「iOn スイッチ(integration-coupled **On** gene expression)」を開発した。iOn スイッチは、一般的なトランスフェクションで標的細胞へ導入することで、エピソーマル発現のないゲノム由来の遺伝子発現を簡便に実現することに成功した。

この iOn スイッチを用いて、in vitro と in vivo における複数のアプリケーションを検討した。例えば in vitro において、triple transgenic stable cell line の樹立をトランスフェクション後7—10日ほどで高効率に作製する手法を確立した。また in vivo においては、トランスジェニック系統の樹立が難しいニワトリ胚神経細胞を用いて、体細胞トランスフェクションによる細胞系譜の追跡、多重クローン解析、および生体内モザイク解析に理想的なツールとなることを示した。これらの結果から iOn スイッチは、in vitro 及び in vivo において「Direct Transgenesis」を実現し、これまでの遺伝子導入ツールに変わる新しい遺伝ツールとしての応用が期待できる。

Key words piggyBac transposon, genome engineering, gene transfection, genetic switch

S1H2 (0304) 低コスト製造技術を用いた CAR-T 細胞製品の開発

○小笠原隆広[1], 岡田拓也[1], 鈴木優衣[1], 飯塚晃[1], 井家益和[1*]
([1]株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)

The development of CAR-T cell product with low-cost technology.

○Takahiro Ogasawara[1*], Takuya Okada[1], Yui Suzuki[1], Akira Iizuka[1], Masukazu Inoie[1*]
([1]Japan Tissue Engineering Co., Ltd.)
takahiro_ogasawara@jpte.co.jp

近年、キメラ抗原受容体を応用した「キメラ抗原受容体遺伝子改変 T 療法」（以下「CAR-T 療法」）が実用化され、その高い治療効果から大きな注目を集めている。本療法は海外での開発が先行しており、わが国でも米国から導入された製品が複数薬事承認されたが、ウイルスを用いた製造方法や高額な治療費が課題となっている。われわれは、ウイルスベクターを用いない日本発の新技術による国産 CAR-T 療法の実用化を目指している。

2017 年に信州大学の中沢教授と名古屋大学の高橋教授らの研究グループは、piggyBac トランスポゾン法を用いた CAR-T 細胞の作製方法を報告した（Mol Ther Methods Clin Dev, 2017, 8, 131-140）。本法は従来法とは異なった、全く新しい作製技術であり、通常の培養施設において簡便な作製工程によって安全な目的細胞を製造することができる。われわれは当該技術を導入し、CD19 を標的とした自家 CD19 CAR-T 細胞（開発コード：JPCAR019）の製品開発を進めている。

現在、世界各国の企業が CD19 以外の標的も含めた CAR-T 療法の開発を数多く進めているが、そのほとんどがウイルスベクターによる遺伝子導入法を採用しており、本邦における開発状況も同様である。これらの開発品はウイルスベクターに起因する様々な懸念点が指摘されており、がん遺伝子活性化のリスクや自己増殖性ウイルスの発生に関して慎重な管理が必要である他、細胞加工作業者に対するリスクも否定できない。さらに、これらに伴ったウイルス安全性を担保するための様々な品質試験や、拡散リスク防止のための重厚な施設と厳密な管理が必須であることから、極めて高額の治療となり、保険財政の圧迫や患者アクセスの障壁等が問題となっている。

本品のコア技術である piggyBac トランスポゾン法は、CAR-T 細胞の作製にウイルスベクターを不要とするものであり、安全性の高い安価な CD19 CAR-T 療法を提供することができる新技術である。これまでに、CD19 CAR-T 療法による治療を受けた患者の長期フォローアップ結果から、腫瘍量が少ない段階での投与、あるいは複数回の投与によって再発リスクを低減できる可能性が報告されている（N Engl J Med, 2018, 378, 449-459）。これらの治療方針は、安価な CAR-T 療法が実用化されることによって現実的に検討することができるものであり、費用の低下は治療法の多様性において新たな価値を創造することもできる。

一方、piggyBac トランスポゾン法は CD19 を標的とした CAR-T 療法に限定されたものではない。すなわち、理論上は細胞表面に発現する分子全てを CAR-T 療法の標的とすることが可能であり、CD19 以外の標的分子に対する CAR-T 細胞を作製することにより、多様ながん種に対して有効な細胞治療を提供することができる。造血器腫瘍では CD33 や BCMA 等が新たな標的分子として有望視されており、それぞれ急性骨髄性白血病や骨髄腫等のアンメットニーズの大きい領域に対して新たな CAR-T 療法が展開できる。さらに、従来の抗体医薬品では十分な有効性がない固形腫瘍に対しても、その抗体分子を CAR-T 細胞に活用することにより、T 細胞の固形腫瘍内への浸潤・集積機能が寄与し、抗腫瘍効果が顕著に向上することが期待できる。細胞治療による有効性と将来性を示すためにも、この CAR-T 療法を新たながん免疫治療法として実用化する意義は大きい。

CAR-T 療法は、簡便かつ安価で安全な細胞製造技術を確立しない限り、その普及には限界があると考える。本技術は、まさにこの課題を解決するために有効であり、JPCAR019 の製品化を達成することにより、わが国発の本技術が世界の CAR-T 療法のプラットフォームとなり得ることを実証していきたい。

Keywords Chimeric antigen receptor (CAR), T-cell therapy, Transposon, Cancer

S1H3 (0401) 酒造用原料米の最近の展開

○奥田将生*
（酒総研）

Recent development of studies on rice used for sake making

○Masaki Okuda*
(NRIB)
okuda@nrib.go.jp

清酒は「米」と「水」が主な原料である。清酒の原料米は、日本国内で生産されたジャポニカ品種のうるち米を高度に精白した米が用いられる。品種には大粒で中心部が白濁状となった心白を有する酒造好適米と食用米が用いられる。清酒の製造工程は他の酒類と比べ複雑で、米粒のまま蒸して仕込み、麹菌の酵素による米の溶解・糖化と酵母によるアルコール発酵が並行して進む“並行複発酵方式”で行われる。

清酒中の原料米に由来する成分は、米から直接移行するものは少なく、米の分解物や麹に由来するもの及び酵母により生成されるものが大半を占める。原料米の性質は製造工程に大きな影響を及ぼし、結果として清酒の品質に反映される。また、原料米のコストは製造原価の大半を占めるため、原料米の酒造適性は清酒製造者にとって重大な関心事となっている。

酒造用原料米に好ましい性質として、大粒、低タンパク質含量、心白を有する、吸水性が良い、消化性が良い、高度に精米できることがあげられる。これらの酒造適性を決定する要因は未だ不明な点が多く残っており、酒造適性要因解明のための原料研究が行われている。本発表では、醸造の視点から行われた清酒原料米のタンパク質やデンプンに関する近年の研究成果を紹介したい。

【タンパク質】

タンパク質は、清酒のもろみ中で麹菌の酵素によりアミノ酸やオリゴペプチドに分解される。これらは清酒の味わいに旨味やコクを与えると考えられている。一方、原料米のタンパク質含量が高いと製成酒に含まれるアミノ酸やオリゴペプチドが多くなり、雑味の原因になるとされている。近年、清酒中の呈味成分の探索が行われた結果、活性炭未処理の清酒から米の貯蔵タンパク質を構成するグルテリンに由来する呈味性オリゴペプチドが見出された。また、タンパク質のアミノ酸やオリゴペプチドへの分解過程の解析も進められてきた。このように、タンパク質の呈味特性解明に向けた研究が進捗してきた。

【デンプン】

デンプンは、米の大部分を占める成分で、その消化特性が米の利用率を左右するとともに味の濃淡に影響するとされる。我々は、まず米デンプン組成及び分子構造の詳細な解析を行い、酒造適性で最も重要な蒸米の酵素消化性との関連性について研究を行った。その結果、米デンプンの組成や分子構造に起因する蒸米中のデンプンの老化特性が蒸米の酵素消化性に大きく影響を及ぼすことを明らかにした。次に、イネ栽培時の気象条件の影響について解析したところ、イネ登熟期気温がデンプン構造を変化させ、酵素消化性に影響を及ぼすことを明らかにした。これらの知見を発展させ、イネ登熟期気温による酵素消化性の予測が可能になるとともに熱分析装置による酵素消化性の推定法を確立した。現在では、製造現場でも実施可能な酵素消化性の簡易推定法の開発に取り組んでいる。また、清酒品質への影響について検討したところ、イネ登熟期気温により変化する酵素消化性が、大吟醸酒のカプロン酸エチル濃度に影響を及ぼす可能性が示唆された。すなわち、デンプンの性質は、従来から言われる味の濃淡だけでなく、香気成分生成にも関与する可能性が示唆された。

本発表以外では、原料米のフェノール酸関連化合物・無機成分・心白構造、精米・原料処理特性、育種や栽培などの研究も盛んに進められている。これら原料研究の成果は、醸造技術の発展とともに各地域での酒造りへの貢献、酒米の栽培地域の拡大や新品種育成にも貢献している。今後も原料研究の益々の進展が期待される。

Key words sake, brewing, rice

S1H3 (0402) 近接リモートセンシングを活用した「山田錦」の生産安定技術の確立

○有吉真知子[1*]，村田資治[1]，金子和彦[1]，中島勘太[1]，徳永哲夫[1]，荒木英樹[2]
（[1]山口県農林総合技術センター，[2]山口大学大学院創成科学研究科）

Utilization of low altitude remote sensing to establishment of production stabilization technology in a rice cultivar “Yamadanishiki” for sake brewing

○Machiko Ariyoshi[1*], Motoharu Murata[1], Kazuhiko Kaneko[1], Kanta Nakashima[1], Tetsuo Tokunaga[1], Hideki Araki[2]
([1]Yamaguchi Pref. Agriculture and Forestry General Technology Center, [2]Grad. Sch. of Tech. for Innov., Yamaguchi Univ.)
ariyoshi.machiko@pref.yamaguchi.lg.jp

山口県では，酒造好適米「山田錦」を原料とした「吟醸酒」や「大吟醸酒」などの特定名称酒の需要が高く，実需者から高品質化と安定供給が求められている．生産現場においても，収益性の高い酒造好適米，いわゆる酒米の生産が活発化しており，新規に酒米栽培を始める生産者も増加している．しかし，「山田錦」は長稈で倒伏しやすく，肥培管理が難しいことから，山口県での単収は低く，玄米タンパク質含有率も地域や年次によるばらつきが大きいことが問題となっている．

近年リモートセンシングは，食用米などの高品質米生産に有効であることが示され，実用化されつつある．そこで，本研究では，近接リモートセンシングによって，「山田錦」の地上部窒素蓄積量を推定できるかどうかを確認するとともに，近赤外光と赤色光の反射率から得られる S1 値と収量，籾数関連形質および玄米タンパク質含有率との関係を明らかにすることを目的とした．さらに，穂肥窒素量と S1 値の変化の関係を明らかにした上で，穂肥窒素量を調節することで，「山田錦」の収量や玄米タンパク質含有率を制御できるかどうかも検討した．

2016 年から 2018 年にわたり，地力の異なる複数圃場に様々な窒素施肥区を設け，生育量や収量を評価した．最高分げつ期から穂揃期にかけて測定した S1 値と，測定時の地上部窒素蓄積量には，３年間を通じて高い正の相関が認められた．生育時期別の相関係数は，最高分げつ期，幼穂形成期，減数分裂期，穂揃期のいずれにおいても，すべての生育時期を一括した相関係数 0.918 に比べてさらに高くなった．各ステージの回帰直線の傾きは有意に異なり，生育が進むほど同じ S1 値に対する地上部窒素蓄積量は多くなる傾向があった．

S1 値と生育，収量および籾数関連形質に関連する項目との相関をみると，穂揃期の S1 値と総籾数との相関係数が 0.79 と高く，年次間差は認められなかった．玄米タンパク質含有率については，単年では穂揃期の S1 値と高い正の相関が認められたが，2018 年は他の 2 年より高タンパク質含有率となったため，他の 2 年の回帰直線と切片が有意に異なった．原因として，2018 年は出穂期とその後 5 日から 15 日頃の日照時間が極端に短かったことが考えられた．山口県農林総合技術センターで策定した指針では，「山田錦」で収量を 420 ㎏/10a 以上，品質を検査等級 1 等以上とするための適正籾数は 19～21 千粒/㎡としており，これを 3 年間一括した総籾数の回帰直線にあてはめると，籾数が適正範囲となる穂揃期の S1 値は 32～36 であった．また，玄米タンパク質含有率が 7.0%未満となる S1 値を 2016 年と 2017 年の結果から得られた回帰直線で特定した場合，穂揃期の目標 S1 値は 36 以下と試算された．

穂揃期の S1 値は，幼穂形成期以降の窒素施肥量（穂肥窒素量）に比例して高くなり，穂肥窒素量 0，2，4 ㎏/10a とした場合に，それぞれ有意な回帰直線が得られた．この関係から，穂揃期の目標 S1 値（32～36）を目的変数，幼穂形成期の S1 値と穂肥窒素量を説明変数とした重回帰分析により，予測式（穂揃期 S1 値=14.7+0.542×幼穂形成期 S1 値+2.75×穂肥量，決定係数 0.78）が得られた．

今後，収量および玄米タンパク質含有率予測の精度を高めるためには，これらと穂肥施用時期との関係をより精査するとともに，登熟期の日射量等についても考慮する必要があると考えられた．

Key words proximate remote sensing, protein content of brown rice, nitrogen accumulation in plants, spikelet number.

S1H3 (0403) 霧島酒造における芋焼酎の原料確保に向けた取組

○藤田 剛嗣*
（霧島酒造）

Efforts to secure raw materials of sweet potato *shochu* in Kirishima Shuzo

○Takashi Fujita
(Kirishima Shuzo Co., Ltd.)
fujita-takashi@kirishima.co.jp

【はじめに】

弊社は、宮崎県南西部、鹿児島市と宮崎市の中間地点にある都城市にて、芋焼酎の製造・販売を行っており、2016 年 5 月に創業 100 周年を迎えた。芋焼酎の製造工程は、蒸した米に種麹をつけ製麹を行い、できた麹に酵母、水を加え発酵させ一次醪を造り、一次醪に蒸したサツマイモと水を加え、さらに発酵させ二次醪を造る。その発酵の過程において米、サツマイモに含まれるデンプン、タンパク質などが麹の酵素により糖、アミノ酸に分解され、酵母によりアルコール、香気成分が生成される。それらを蒸留により蒸発させ冷却・凝縮したものが芋焼酎である。

弊社では、「おいしさの秘訣は 100%へのこだわり」として、九州産サツマイモ 100%、霧島裂罅水 100%、国産米 100%、自社工場生産 100%を掲げており、国産の原材料を用いて芋焼酎の製造を行っている。しかし、日本の農林水産業は、温暖化による気候変動、生産基盤の脆弱化など多くの課題を抱えており、弊社は関係機関と連携して、その解決に取り組んできた。その一部について紹介する。

【焼酎麹用米専用新品種「み系 358」の開発】

芋焼酎の麹に用いられる米は国産の需要が高まっており、弊社においても米トレーサビリティ法施行を前に準備を進め、タイ米から国産米に切り替えた。しかし、日本人の米離れや生産調整（減反）見直しなどの影響を受け、宮崎県の水稲の生産量は徐々に減少しており、焼酎用で需要が見込める加工用米の生産を行うことで、生産者の所得向上、および、耕作放棄地の増加を抑えることができないかと考えた。そこで、水稲品種の育種を行っている宮崎県総合農業試験場 作物部に相談し、焼酎麹用専用品種を選抜するための共同研究を行った。

焼酎では清酒のような酒造好適米は育成されておらず、心白形質やタンパク質含有率など選抜に必要な指標がなかった。そこで、粘りや柔らかさが特徴の主食用米にて吸水や蒸しの調整に苦労した経験から、吸水率、蒸米のさばけなど加工特性を中心に選抜することとした。宮崎県総合農業試験場が育成した系統の内、「み系 358」は、アミロース含量が多く、蒸米のさばけ評価にて、粘りはあるが硬い蒸米となり、べたつきが少なかった。また、収量性、耐病性など栽培特性にも優れ、生産者が作りやすいことも利点であった。み系 358 の焼酎醸造試験を行った結果、麹酸度が高く十分な酵素力価を有しており、官能試験の評価も高かったことから、現在、宮崎県、JA 宮崎経済連、焼酎メーカーなどが参画する宮崎県加工用米等生産・利用拡大推進協議会にて普及を進めており、令和 2 年度は 765 ha まで栽培が広がっている。

【直播適性が高い焼酎用サツマイモ新品種「スズコガネ」の開発】

サツマイモは栄養繁殖性作物であるため、種いもを苗床に伏せ込み、萌芽した苗を採苗し、畑に植え付ける挿苗栽培が一般的であるが、機械化などが遅れており労働時間が長い。また、日本の農業就業人口は減少の一途をたどっているが、南九州地域のサツマイモ生産者も例外ではなく、2015 年に弊社と取引がある生産者は約 2000 軒だったが、現在、1500 軒にまで減少している。今後、人手不足が深刻化する中で、生産者の負担軽減は急務であり、農研機構 九州沖縄農業研究センターと共同で直播栽培の実用化に向けた研究を開始した。

直播栽培とは、種いもを直接、畑に植え付ける栽培方法であり、育苗・採苗が不要で機械による植え付けが可能なことから大幅な省力化が期待できる。しかし、焼酎用の主力品種であるコガネセンガンを直播栽培すると親いも（種いも）が再肥大し、収量および品質が低下する。そこで、直播栽培が可能で、焼酎の酒質がコガネセンガンに類似した品種の開発を目的とした。九州沖縄農業研究センターで親いもの再肥大程度が小さく、子いも収量が多いなどの直播栽培適性が優れた系統を選抜し、それらの系統を用いて焼酎醸造試験を行った。焼酎原料用品種は収量、デンプン価が重要であるが、それに加え、モノテルペンアルコール（以下、MTA）が芋焼酎の特徴香に関与していることから、焼酎中の MTA の組成や含量がコガネセンガンと類似している系統を選抜することとした。農研機構と共同で品種登録を行った「スズコガネ」は、コガネセンガンと比較して、アルコール収得量が多く、リナロールは約 2 倍含まれているものの、その他の MTA は大差がなく、官能試験にてコガネセンガンに類似しているとの評価を得ている。

直播栽培は、種いもの貯蔵や植え付け深さなど栽培面に課題があり、スズコガネも発芽が遅いなど改善の余地があることから、農研機構生研支援センター「先導プロジェクト」の支援を受け、関係機関と連携し課題解決を図っている。

【おわりに】

弊社では、ムラサキマサリを用いた「赤霧島」、タマアカネを用いた「茜霧島」のように、サツマイモの品種を活かした商品開発を積極的に行っている。焼酎原料用サツマイモのほとんどが南九州で生産されており、芋焼酎の価値向上は、地域農業の成長・活性化につながると考えている。

ペルーにある国際ばれいしょセンターには、野生種や育成品種など合わせて 8000 点を超えるサツマイモ遺伝資源があるとされる。しかし、焼酎用として初めて育成された「ジョイホワイト」が品種登録されたのは 1995 年で、サツマイモ品種と焼酎の味わいに関する研究は始まったばかりであり、まだ見ぬ味わいがサツマイモには秘められていると考えている。微力ではあるが、それらの探求に力を注ぎたい。

Key words sweet potato *shouchu*, Mikei358, Suzukogane, direct planting

S1H3 (0404) ワイン用ブドウの栽培環境と品質特性

○小山和哉[1]*,大浜友子[1], シャロンマリエガリド[1], 後藤（山本）奈美[1]
([1]酒総研)

Climatic conditions in the growing site affect the accumulation of the quality-related compounds in the wine grapes in Japan

○Kazuya Koyama [1]*, Tomoko Ohama [1], Sharon-Marie Bahena-Garrido [1], Nami Goto-Yamamoto[1]
([1]NRIB)
koyama@nrib.go.jp

【はじめに】 ブドウは種々の二次代謝成分を果実に蓄積するが、これらは、色、呈味性、香りをもち、その品質と関連している。特に醸造用ブドウでは、果皮にフェノール化合物であるアントシアニン及びプロアントシアニジン（縮合型タンニン）などを含有しているが、これらは赤ワインにおけるワインカラーや渋みと関連があるため、その含量や質は重要である。また、果皮には香気成分の配糖体やシステインやグルタチオンが付加したそれ自体としては不揮発性の成分が含まれており、これらは、醸造中に抽出され、酵母のβグルコシダーゼなどによって分解され、初めてワインの香りとして感知される。これらの成分は気象や栽培環境の影響をうけ変動することが知られており、地域や年度によるワインの品質の違いとしてあらわれる。我が国においては、近年、ワイナリー数が増加しており、ワイン産地の拡大がみられるが、産地における醸造用ブドウ中の品質成分の組成及び栽培環境の影響に関する詳細な調査はみられない。我々は、平成 28～30 年度、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、11 の共同研究機関とともに実証試験に取り組んだ（日本ワインコンソーシアム）。本報告では、実証試験において全国のワイナリー圃場における赤ワイン用及び白ワイン用ブドウの品質に関連する成分蓄積に関する調査結果及び気象条件との関連について行った検討結果について報告したい。

【白ワイン用ブドウにおける香気成分の蓄積と栽培環境の影響】

白ワイン用ブドウにおいて重視される香気成分の前駆体を分析するため、収穫期のブドウ果粒より固相抽出カラム（Lichrolut® EN）を用いて、遊離型及び結合型香気成分を分画した。結合型香気成分画分をβグルコシダーゼ（ペクチナーゼ AR）によって分解し、生じた遊離型香気成分を SBSE-GCMS によって網羅的に解析する方法を開発した。このようにして検出される各種結合型香気成分（テルペン化合物、ノルイソプレノイド、揮発性フェノール等）は、ワイン用ブドウの香気成分ポテンシャルと考えられる。はじめに、日本で栽培されている甲州及びシャルドネ果実の香気成分ポテンシャルを測定した結果、甲州果実中では揮発性フェノール類を前駆体として顕著に含むのに対し、シャルドネは、ノルイソプレノイド類を高含有し、両者のテルペン類の組成が異なるなど品種間の違いを明確とすることができた。次に、日本ワインコンソーシアムの取り組みとして、各産地のブドウの香気成分ポテンシャルを３か年にわたって解析した。ソーヴィニヨンブランは明確な品種特性香を持ち、世界的に栽培されている醸造用ブドウ品種の１つであるが、日本においても北海道から九州まで広く栽培されている。３か年における 14 圃場における遊離型及び結合型の香気成分組成を判別分析した結果、寒冷地と温暖な地域に差異が認められた。北海道及び長野県の標高の高い寒冷地では、遊離型のリナロールを含む特定の種類のテルペン化合物、及びソーヴィニヨンブランの品種特性香の１つで、植物的な香りであるメトキシピラジンの濃度が暖地よりも高いことがわかった。各圃場の気象観測装置により取得された気象データを用いて、これらの特徴的な成分の蓄積との関連を OPLS 回帰解析によって調べたところ、成熟開始後１ヶ月、２か月の平均気温などの項目との VIP 値が高く、栽培地の気象条件が香気成分へ及ぼす影響が明らかとなった。

一方、品種特性香の１つであるチオール化合物の前駆体については、気象条件が近い地域内の圃場間でもその蓄積量に大きな違いがみられた。圃場間の違いは３ヶ年類似した傾向であり、気象条件以外の栽培要因の影響が示唆された。

【赤ワイン用ブドウにおけるフェノール化合物の蓄積と栽培環境の影響】

赤ワイン用ブドウにとって重要なフェノール化合物について着目した。簡便法であるグローリー法により、メルロー成熟期の果粒における全アントシアニン及び抽出性アントシアニン等について算出した。各種気象要因との関連を OPLS 解析によって調べたところ、全アントシアニン、抽出性アントシアニン含量は成熟開始後１か月、２か月の気温との VIP 値が高く、成熟開始前の気温との VIP 値は低いことがわかった。これは既報と一致しており、全国の栽培地におけるメルロー果実中の全アントシアニン濃度と成熟後１か月の積算気温との間では良い負の相関がみられることがわかった。一方、メトキシピラジンは閾値が極めて低い成分で、赤ワインにおいて、過度のメトキシピラジンはオフフレーバーとしてとらえられることが多い。生育期、収穫期のメルロー果実中のメトキシピラジン含量は気象条件が近い地域内の圃場間でも差がみられ、収穫期では閾値のレベルを超えるメトキシピラジンを含有する圃場もみられた。寒冷な地域では、収穫期の含量が若干高めとなるなどソーヴィニヨンブランと共通した傾向もみられたが、影響する要因については複雑であると考えられた。

このように、我が国の栽培地における赤ワイン用及び白ワイン用ブドウの品質関連成分の全体像がはじめて明らかとなった。栽培地における気温条件の違いは顕著な影響をもつことが明らかとなったが、成分によっては気温以外の要因の影響も示唆された。今後、これらの品質成分への気象以外の栽培要因などについても詳細に検討を行い、ブドウ・ワイン品質と関連する産地特性の詳細について解析していきたい。

【謝辞】本研究において、栽培地のブドウ及び気象・分析データをご提供いただいた日本ワインコンソーシアムの共同研究機関及び協力機関の皆様へ感謝いたします。

Key words terroir, wine grape, *Vitis vinifera*, climate, aroma compound, phenolic compound, prediction

S1H3 (0405) リポキシゲナーゼ-1 欠失ビールオオムギ品種の育成とビール品質向上

○保木 健宏[1]*
([1]サッポロビール株式会社原料開発研究所)

Breeding of lipoxygenase-1 null (LOX-less) malting barley varieties and improvement of beer quality

○Takehiro Hoki[1]*
([1]Crop Research Laboratories, Sapporo Breweries Ltd.)
takehiro.hoki@sapporobeer.co.jp

ビールの原料はオオムギ種子から製造される麦芽である。オオムギ種子リポキシゲナーゼ−1（LOX-1）は、ビール品質を低下させるトランス−2−ノネナール、トリヒドロキシオクタデセン酸の生成に関与しており、これらの物質の生成をコントロールできれば、ビール品質の改善が期待できる。本発表では、LOX-1 を持たない LOX−1 欠失オオムギの育種利用とビール品質の改善を中心として、これまでの研究の成果を紹介する。

【北米に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種「CDC PolarStar」】

連続戻し交配と MMAS（Molecular Marker-Assisted Selection）を適用し、北米初の LOX-1 欠失オオムギ品種「CDC PolarStar」の育成に成功した。収量性やその他の農業特性、一般的な麦芽品質は、その反復親であり、北米でその農業特性や麦芽品質が評価されていた二条ビールムギ品種である「CDC Kendall」と同等であった。これまで、LOX-1 欠失形質がオオムギの農業特性に与える影響について報告されておらず、本研究結果から、LOX-1 欠失形質がビールオオムギの農業特性に影響を与えることなく、LOX-1 欠失形質をビール品質改良のためビールムギ育種に利用できる重要な知見が得られた。

また、LOX-1 欠失形質のビール品質への影響を確認するため、パイロットスケール醸造設備および商業規模の醸造設備を用いて一連の醸造試験を実施し、LOX-1 活性がないことにより影響を与えうると想定される形質以外の一般的な麦汁・ビール品質に対し、LOX-1 欠失形質は大きな影響を与えないことが明らかとなった。

【豪州に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種「SouthernStar」】

連続戻し交配と MMAS を適用し、豪州に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種「SouthernStar」の育成に成功した。連続戻し交配の反復親として、豪州の二条ビールオオムギ品種であり、品質が極めて優れている点が評価されている「Flagship」を使用した。

収量性やその他の農業特性、一般的な麦芽品質は、「SouthernStar」と「Flagship」でほぼ同等であった。また、LOX-1 欠失形質のビール品質への影響を確認するため、パイロットスケール醸造設備を用いて醸造試験を実施し、一般的な麦汁・ビール品質は同等であり、それらに対し LOX-1 欠失形質は大きな影響を与えないことが明らかとなった。

【北海道に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種「札育 2 号」】

連続戻し交配と MMAS を適用し、LOX-1 欠失形質を「りょうふう」に導入することにより、北海道に適応した、本邦初の LOX-1 欠失オオムギ品種である「札育 2 号」の育成に成功した。連続戻し交配の反復親として使用した「りょうふう」は、北海道に適応した唯一の春播きビールムギ品種であり、20 年以上も日本のビール業界で使用されている品種である。

「札育 2 号」の収量性やその他の農業特性、一般的な麦芽品質は、「りょうふう」とほぼ同等であった。また、LOX-1 欠失形質のビール品質への影響を確認するため、パイロットスケール醸造設備を用いて醸造試験を実施し、一般的な麦汁・ビール品質は同等であり、それらに対し LOX-1 欠失形質は大きな影響を与えないことが明らかとなった。

【LOX-1 欠失オオムギ品種の香味耐久性】

本研究で育成した LOX-1 欠失オオムギ品種である「CDC PolarStar」「SouthernStar」および「札育 2 号」から製造したビールでは、対照と比較しトリヒドロキシオクタデセン酸（THOD）やトランス-2-ノネナール（T2N）などのビール品質を低下させる物質の含量が減少することが明らかとなった。

官能評価により、LOX-1 欠失オオムギ品種から製造したビールにおいて老化的香味が抑制されていることが明らかになり、T2N の低減とビールの老化的香味の抑制に対する LOX-1 欠失形質の効果が明確に確認された。また、一連の試験から、その効果は 30℃1 ヵ月の保存品で最も明確であることが明らかとなった。

「CDC PolarStar」における試験では、パイロットスケール醸造設備や商業スケールの醸造設備を用い、複数の醸造条件で醸造試験を実施した結果、官能評価においてほぼすべての試験で LOX-1 欠失形質の優位性が示された。特に、LOX-1 欠失形質の効果は麦芽使用率の低い、オオムギを副原料で使用する仕様でより顕著であった。また、商業スケールの醸造設備における T2N の低減と老化的香味の抑制効果を確認し、LOX-1 欠失形質が産業上応用可能あることを初めて示した。

「SouthernStar」の試験においても、T2N 含量低減と老化的香味の抑制について、LOX-1 欠失形質の効果が示された。本試験では、20℃5 か月の保存品でもその効果が確認され、LOX-1 欠失形質は通常の商業的流通において想定されるより広い温度条件の範囲でビール品質、新鮮さの保持に寄与する可能性が示された。

以上、本研究の結果から、LOX-1 欠失形質は、LOX-1 欠失オオムギ品種の育成に用いた、複数の反復親の異なる遺伝的背景において効果を発揮していることが明らかとなった。複数の産地に適応した LOX-1 欠失オオムギ品種を育成することは、異なる産地から LOX-1 欠失麦芽を調達しそれらを製品に使用することで、調達安定性と製品の香味耐久性を高めることに大きく寄与するものである。現在、各産地において育成を行った各品種を母本に用い次世代の LOX-1 欠失オオムギ品種の育成が進められており、本形質のさらなる普及と利用の進展が望まれる。

Key words barley, beer, breeding, lipoxygenase-1

S1H3 (0501) 泡盛業界と研究機関の連携の試み

○外山博英
（琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科）

Attempt of cooperation between Awamori industry and research institutes

○Hirohide Toyama
(Depart. Biosci. Biotech., Fac. Agric., Univ. Ryukyus)
toyama@agr.u-ryukyu.ac.jp

泡盛は日本の酒税法上の分類では焼酎乙類（本格焼酎）に分類される。政令ならびに財務省令によると，焼酎乙類の内，「米こうじ（黒こうじ菌を用いたものに限る。）及び水を原料として発酵させたアルコール含有物を単式蒸留器により蒸留したもの（水以外の物品を加えたものを除く。）」については、酒類の種類（品目）の表示を「泡盛」とすることができる，とされている。この条件に合うように製造されれば，沖縄県外で製造されたものでも，泡盛の表示は可能である。地域団体商標制度により認定されている「琉球泡盛」や「本場泡盛」を商標に使用できるのは沖縄県で作られたものだけである。黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* という独特の麹菌を使用し，できた黒麹に水と酵母のみを加え，副原料を足さないという独特の作り方（全麹仕込み）をするので，他の本格焼酎とは異なる風味やや味わいを持つ酒質となる。泡盛の特徴の一つとして，古酒化することが挙げられるが，ウイスキーのような樽熟成とは異なり，ガラス瓶やステレンスタンク内でも起こる酒質の化学変化である。

私は琉球大学に赴任して 14 年が経過した。赴任前には「泡盛学寄附講座」,「醸造学科」を新設するという触れ込みであったが，そのどちらも現在までに実現していない。赴任当初琉球大学では泡盛関連の研究があまり行われていないので，不思議に思い，古参の先生に質問したことがあった。その時の答えは，「学術的な成果があまり見込めないと思われたことと，沖縄県工業技術センターとの住み分け」であった。現在ではこのような考えは全くなく，逆に泡盛には学術的にもまだ解明されていない事項は多く，関係機関との連携はさらに重要性を増していると考えている。

本シンポジウムでは，泡盛酒造会社，(株)バイオジェット，奈良先端科学技術大学院大学，沖縄国税局との連携の実例とその成果について報告していただく。その導入部分として，歴史を含めた泡盛の一般的な情報を提供するとともに，我々と(株)バイオジェットと沖縄県酒造組合との連携で開始した沖縄県産業振興基金事業「泡盛のブランドイメージ向上を目指した古酒化に関する調査研究事業」について紹介する。

Key words Awamori, Black Koji, *Aspergillus luchuensis*, Okinawa

S1H3 (0502) *A. luchuensis* の系統解析とその利用

○塚原正俊
（バイオジェット）

Phylogenetic analysis of Aspergillus luchuensis and its utilization

○Masatoshi Tsukahara
(Biojet co., ltd)
tsuka@biojet.jp

泡盛は、約 600 年の歴史を有する沖縄県の特産品である。泡盛は、米を原料とし、黒麹菌を用い、全麹仕込み・単式蒸留で醸造した酒類として規定されている。特に、黒麹菌の利用は、泡盛独自の文化であり極めて重要な特徴である。この黒麹菌は様々な酵素活性の高さやクエン酸生産性、特徴的な風味の付与など泡盛醸造に不可欠な特性を有している。現在の一般的な泡盛醸造では、それぞれ異なる特性を有する 2 株（アワモリ株、サイトイ株）が利用されており、これらの特性を最大限活用する目的で 2 株を混合した種麹が用いられている。このように、黒麹菌の株間で醸造特性に明確な違いがあることから、商業的に有用な新たな黒麹菌株の存在も期待できる。以上のことから、我々は、複数の黒麹菌株の全ゲノム情報を用いた系統解析手法を構築し、黒麹菌のそれぞれの株について詳細な系統関係を解析することで、新たな商用黒麹菌の選抜を含め、様々な解析や考察に活用すべく検討を進めており、これらの経緯と成果について紹介する。

○黒アスペルギルス類の分類の変遷

A. niger や黒麹菌を含む黒アスペルギルス類の単離および分類は、1900 年頃から 2000 年頃にかけ、形態や生理学的特徴などを中心とした分類がなされた。この間、多くの新たな種の命名や、逆に種の集約が提唱されたが、それぞれ異なる内容であったことから混沌としていた [1]。その後、分子生物学的手法を用いた整理がなされ、黒アスペルギルス類は、*A. niger*、*A. tubingensis*、および黒麹菌の 3 種とすることが妥当であることが提唱され、この黒麹菌群について *A. luchuensis* として再定義された [1]。従来黒麹菌群に対して用いられてきた *A. awamori* という学名は既に黒麹群以外の多くの株にも付与されていたことから、混乱を避けるために *A. luchuensis* が新たな学名として採用された。

○全ゲノムデータを用いた黒アスペルギルス類、*A. luchuensis* の系統解析

我々は、泡盛黒麹菌の詳細な系統関係を評価するため、全ゲノム情報を用いた系統解析の手法を構築し、近縁種を含む 63 株について解析を行った。その結果、全ゲノム情報を用いた場合にも従来の分子生物学的手法での結果と同様に、*A. niger*、*A. tubingensis*、*A. luchuensis* の 3 種に分かれることが確認できた。さらに、*A. luchuensis* の各株間の系統関係が明らかになり、アワモリ株を含む A グループ、およびサイトイ株と白麹菌のカワチ株を含む SK グループの 2 つの大きなグループに分かれることが確認されるとともに、これらに属さない株が複数存在することが明らかとなった。

○比較ゲノム解析による各株の特性評価

多くの株の全ゲノム情報を用いて、比較ゲノム解析による各株の特性評価が可能となった。例えば、*A. niger* が産生するカビ毒のオクラトキシン A およびフモニシンクラスターについては、*A. tubingensis*、*A. luchuensis* の全ての株と *A. niger* の一部の株で欠損しており、黒麹菌の安全性を再確認することができた。また、泡盛の香気成分の 1 つである 1-octen-3-ol（マツタケオール）の生成に関与する *ppoC* 遺伝子は、*A. luchuensis* SK グループで欠損し、A グループや *A. tubingensis* では保持されていることなど、それぞれの種や系統ごとの特性を把握することができた。

○分岐年代の推定

系統解析の結果を用いて、黒麹菌 *A. luchuensis* の種内の分岐年代の推定を試みた。九州の本格焼酎で用いられる白麹菌は、沖縄から鹿児島に移出した黒麹から分離されており、この株の白色変異は約 100 年前と推定できる。これを尺度として、予備的に解析した結果、*A. luchuensis* の A グループ、SK グループは、泡盛の歴史より古い 1000 年以上前に分岐し、その後の A および SK グループ内の分岐は泡盛醸造の歴史に含まれる 600 年以内であることが示唆された。今後も様々な側面からの検討が必要ではあるものの、ゲノム情報を用いて、歴史的な視点で黒麹菌利用に関する知見が得られることが期待できる結果が得られた。

○戦前に用いられていた黒麹の菌叢の解析（一般講演：G3H7-0301）

戦前の黒麹は、友麹で製麹され複数の菌株が混在していた。これらの菌株に関して、発酵能や形態により分類された報告があるものの、現在の分類でどのような系統の株が含まれていたのかなどの解釈は難しかった。今回、戦前の研究報告内容を再検討するとともに、全ゲノム情報を用いた系統解析結果を用いて、戦前の黒麹に含まれる菌叢に関して一端を明らかにする試みを行った。その結果、地域ごとにそれぞれの傾向が観察されること、沖縄県南部の黒麹には 2 グループ（A、SK）に属さない株が広く含まれていたことなどが示唆され、過去の泡盛醸造に関する情報の一端が得られた。

○新たな泡盛黒麹菌株の選抜

系統解析により、泡盛醸造に現在用いられているアワモリ株、サイトイ株の系統的位置が明確になった。この結果から、新たな泡盛黒麹菌の候補株として、アワモリ株、サイトイ株から系統的に離れた位置にある株を複数選抜した。小仕込み試験により、これらの黒麹菌株を用いた泡盛醸造を行い、成分分析および官能評価を行ったところ、もろみのアルコール濃度は十分に上昇し泡盛醸造が可能であること、品質は従来の黒麹菌株と明確に区別できること、良好な風味の泡盛醸造が可能であることなどの結果が得られ、新たな泡盛黒麹菌の候補株となり得ることがわかった。

1）山田修、バイオサイエンスとインダストリー、71（6）、2013

Key words Aspergillus luchuensis, awamori, phylogenetic analysis, genome

S1H3 (0503) 黒麹菌による泡盛古酒香バニリン前駆体の生成過程

○眞榮田麻友美[1]*,平良東紀[2]
([1]東農大・応生科, [2]琉大・農)

Vanillin precursor production by *Aspergillus luchuensis* during *awamori* brewing

○Mayumi MAEDA[1]*, Toki TAIRA[2]
([1]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric, [2]Fac. Agric., Univ. Ryukyus)
mm207688@nodai.ac.jp

泡盛は沖縄の伝統的な蒸留酒で，全ての原料米に黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* を生やす全麹仕込みと，3年以上熟成させると香り豊かな古酒になることが最大の特徴である。泡盛古酒の特徴香の 1 つであるバニリンは米細胞壁に含まれているフェルラ酸（FA）に由来する。黒麹菌が持つフェルラ酸エステラーゼによって原料米から遊離した FA は，脱炭酸されて 4-ビニルグアヤコール（4-VG）になる。その 4-VG が蒸留液中に移り，貯蔵中に非酵素的酸化によってバニリンに変換される。これまでに，醸造中の FA の脱炭酸反応による 4-VG への変換は，蒸留時の熱や混入している酵母や乳酸菌が持つ酵素によるものだと考えられてきた。

一方で，*A. luchuensis* のゲノム上に細菌類のフェノール酸脱炭酸酵素（phenolic acid decarboxylase: PAD）と相同性を有する配列が存在することが知られている。これまでに，我々は *A. luchuensis* 由来 PAD 遺伝子（*alpad*）を大腸菌で発現させたリコンビナント AlPAD に，FA を 4-VG に変換する活性（FAD 活性）が十分にあることを報告している。また，麹を用いた実験では，製麹時間に伴い AlPAD の発現量が増加し，それに比例してモロミ中の 4-VG 量が増加することを示した [1]。そこで，AlPAD が泡盛醸造における 4-VG 生成の主要因であるという仮説を立て実験を行った。

はじめに，泡盛醸造中の 4-VG 生成における AlPAD の寄与率を明確にするために，泡盛実用菌株である *A. luchuensis* var. *awamori* ISH1 株（ISH1 株）の *alpad* 破壊株（*⊿alpad* 株）の作製を行った。作成した *⊿alpad* 株と野生株を用いて醸造試験を行い 4-VG 生成量を比較した。麹は製麹時間 30，42，54 および 66 時間の麹を用いた。その結果，モロミにおいて，野生株では製麹時間に伴い FA 量が減少し，4-VG 量は増加していた。*⊿alpad* 株においては，どの製麹時間においても FA および 4-VG 量は一定で，野生株と比較して FA 量は高く，4-VG 量は著しく低かった。蒸留液中の 4-VG 量はモロミ中の 4-VG 量と比例した。これらの結果をもとに泡盛醸造中の 4-VG 生成における AlPAD の寄与率を算出すると 88～94%であることが分かった。以上の結果から，泡盛醸造中の 4-VG 生成の主要因は AlPAD であることが明らかとなった [2]。

これまでに，モデル焼酎を用いた試験により，モロミ中の FA が蒸留時の熱によって 4-VG に変換されることが報告されている [3]。我々は実際の泡盛モロミを用いて，蒸留時の熱による 4-VG 生成への影響について調べた。AlPAD の影響のない *⊿alpad* 株で仕込んだモロミに FA を一定量添加した後，蒸留を行いモロミ中および蒸留液中の 4-VG 量を測定した。その結果，蒸留時の熱によって生成し蒸留液に移行する 4-VG 量は僅かで，その寄与率は 2-3%であることがわかった。

次に，泡盛醸造中の 4-VG 生成がいつ行われているのかを調べた。当初我々は，製麹中に発現された AlPAD の働きによって麹中の 4-VG が増え，それがモロミ中に溶出されると考えていた。しかしながら，定量の結果，麹に含まれる 4-VG 量は極めて少なく，モロミで検出される量の 100 分の 1 以下であることが分かった。これらの結果から，AlPAD は製麹中に発現・蓄積されるが，FA を 4-VG に変換する反応はモロミ発酵中に行われていることが示唆された。*alpad* の ORF にはシグナル配列のコード領域が無いことから AlPAD は菌体内酵素であることが示唆されている。また，AlPAD は pH 4.0 以下では FAD 活性を示さないことが，その酵素特性解析から明らかになっている。麹とモロミは *A. luchuensis* が生産するクエン酸によって通常 pH 3.5 程度であることから，AlPAD が細胞外で FA から 4-VG への変換を触媒することは不可能である。よって，*A. luchuensis* は細胞外から FA を取り込み，細胞内で AlPAD により 4-VG 変換し，その 4-VG を菌体外に放出することが示唆された。このことから，モロミ発酵中に FA を 4-VG に変換するためには，麹中の *A. luchuensis* の細胞が代謝可能な状態でモロミ中で維持されていなければならない。*A. luchuensis* は好気性微生物であることから，モロミ中では長く生存できないと考えられた。そこで，モロミ中で *A. luchuensis* による FA から 4-VG への変換が可能かどうかを検証するために，野生株で仕込んだモロミに多量の FA を添加し，一定時間後に添加した FA に由来する 4-VG が生成されるかどうかを調べた。その結果，モロミ発酵 2 日目までに FA を添加すると，添加後 24 時間以内に 4-VG が著しく増加することがわかった。このことから，*A. luchuensis* の細胞が代謝可能な状態でモロミ発酵 2 日目まで維持されており，その後維持されなくなることが示唆された。これらの結果から，泡盛醸造中の 4-VG 生成はモロミ発酵初期に行われていることが明らかとなった。

最後に，株の違いによる 4-VG 生成能の比較を行った。菌株は ISH1 株，*A. luchuensis* var. *saitoi* ISH2 株（ISH2 株），*A. luchuensis* RIB2604 株（RIB2604 株）を用いた。4-VG 生成能の比較は，それぞれの株を用いて小仕込み試験を行い，モロミおよび蒸留液中の 4-VG 生成量を比較した。その結果，モロミおよび蒸留液において ISH1 株の 4-VG 量が最も高く，次に ISH2 株が高かった。これらと比較して RIB2604 株の 4-VG 生成量は著しく低いことがわかった。これらの結果から，バニリン香に富む古酒づくりにおいて実用菌株である ISH1 株および ISH2 株の優位性が示された。

一連の研究により，泡盛醸造中の 4-VG 生成の主要因は AlPAD であり，製麹時間の延長に伴い *A. luchuensis* 細胞内の AlPAD 量が増加し，その AlPAD によってモロミ発酵初期に FA から 4-VG への変換が行われることが明らかとなった。バニリン前駆体である 4-VG が製麹時間が長いほど増加するという結果は，多くの杜氏が経験に基づき古酒の原酒に老麹を用いていることと一致している。また，AlPAD の発現量は，実験室株 RIB2604 株と比較して，沖縄県内で 9 割以上のシェアを占める実用菌株で圧倒的に高いことが分かった。これらのことから，本研究で得られた成果は，バニリン香に富む付加価値の高い古酒の製造技術の確立に貢献できることが期待される。

1) Maeda et al., J. Biosci. Bioeng., 126(2):162-168, 2018.
2) Maeda et al., J. Biosci. Bioeng., 130(4):352-359, 2020.
3) Koseki et al., J. Ferment. Bioeng., 82:46-50, 1996.

Key words *Aspergillus luchuensis*, phenolic acid decarboxylase, Awamori, 4-vinylguaiacol

S1H3 (0504) アミノ酸に着目した酵母の育種と泡盛醸造への応用

○高木 博史
（奈良先端大・バイオ）

Breeding of yeast strains focused on amino acid and their application to awamori brewing

○Hiroshi Takagi
(Div. Biol. Sci., NAIST)
hiro@bs.naist.jp

泡盛の製造には黒麹菌（*Aspergillus luchuensis*）と酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）が用いられ，泡盛の風味・酒質に大きな影響を与えている．特に，主要な芳香成分（高級アルコール，エステル類）は醸造過程で主にアミノ酸から酵母により生成される．また，醸造過程の副生成物である蒸留粕は，主に酵母由来のアミノ酸を豊富に含んでおり，飼料や飲食品への再利用が期待されている．これまで，泡盛の製造には主としてエタノール生産性および芳香性の高い「泡なし酵母（泡盛酵母 101 号）」が使用され，育種はほとんど行われてこなかった．従って，泡盛の品質向上や酒質の差別化，蒸留粕の有効利用には，アミノ酸の組成および生成量に特徴を有し，香味性の向上，栄養・健康機能の強化を可能にする酵母の育種が重要である．本講演では，アミノ酸の代謝および生理機能に着目した酵母の育種と泡盛醸造への応用例を紹介する．

1）ロイシン（Leu）代謝を介した香気成分の生成能強化 [1) 2)]

清酒やパンの主要な香気成分（吟醸香，バナナ様）である酢酸イソアミルは，Leu 合成経路の中間体（α-ケトイソカプロン酸）から合成される．一方，α-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ Leu4 はその活性が Leu によるフィードバック阻害を受けることで，Leu の細胞内含量を厳密に調節している．我々は泡盛酵母 101 号に突然変異処理を施し，Leu の毒性アナログ（5,5,5-トリフルオロロイシン）に耐性を示す変異株の中から，親株に比べて細胞内の Leu 含量が高く，泡盛中の酢酸イソアミルの含量が増加した菌株を取得した．また，本菌株の *LEU4* 遺伝子に見出したアミノ酸置換（Ser542Phe, Ala551Val）を伴う変異が Leu 高生産の原因（Leu4 活性のフィードバック阻害感受性低下）であることを明らかにした．本研究は泡盛酵母の育種として初めての例であり，アミノ酸アナログ耐性株の取得が育種に有効であることを実証した．本菌株で製造した泡盛は香味性が向上し，商品化された．また，泡盛のブランド化戦略として，沖縄に自生するハイビスカスの花から単離した野生酵母（*S. cerevisiae*）についても，同様の手法で Leu および酢酸イソアミルの含量が増加した菌株を育種し，変異遺伝子（*LEU4*）の同定や Leu 高生産機構の解明（Leu4 のアミノ酸置換（Gly516Ser）によるフィードバック阻害感受性低下）を行うとともに，泡盛の商品化に成功した．

2）リジン（Lys）・プロリン（Pro）高生産による蒸留粕の栄養・健康機能強化 [3) 4)]

蒸留粕は独特の風味のため食品への応用は難しいが，栄養素を豊富に含むため家畜飼料としての利用が期待されている．しかし，アミノ酸バランスの観点から必須アミノ酸の Lys を添加する必要がある．酵母における Lys 合成の律速酵素はホモクエン酸シンターゼ Lys20 であり，その活性は Lys により強くフィードバック阻害を受ける．我々は最近，泡盛酵母 101 号に突然変異処理を施し，Lys の毒性アナログ（アミノエチルシステイン）に耐性を示す変異株の中から，Lys を高生産する菌株を取得した．本菌株の *LYS20* 遺伝子にはアミノ酸置換（Ser385Phe）を伴うヘテロ変異が存在し，この変異が Lys 高生産に寄与することも判明した．さらに，Lys20 の立体構造モデルを用い、アミノ酸置換がリガンド結合性に及ぼす影響を *in silico* 解析することで，Lys20 の高機能化を試みた．その結果，Ser385Glu 置換体は野生型酵素と比べてフィードバック阻害感受性が大幅に低下し，Ser385Glu 発現株では元の置換体（Ser385Phe）発現株と比べて細胞内 Lys 含量が著しく増加し，蒸留粕製造への応用が期待できる．

近年，アミノ酸はその生理機能が注目され，様々な飲食品，化粧品などに添加されている．Pro は体内で主にコラーゲンの原料，角質層の保湿成分，エネルギー源，抗酸化剤として利用される．酵母において，Pro はグルタミン酸から合成されるが，初発酵素の γ-グルタミルキナーゼ Pro1 の活性が Pro によるフィードバック阻害を受けるため，細胞内の Pro 含量は厳密に制御されている．我々は最近，泡盛酵母 101 号に突然変異処理を施し，Pro の毒性アナログ（アゼチジン-2-カルボン酸）に耐性を示す変異株の中から，Pro を高生産する菌株を取得した．本菌株の *PRO1* 遺伝子にはアミノ酸置換（Gln79His）を伴う新規のヘテロ変異が見出され，この変異が Pro 高生産の原因（Pro1 活性のフィードバック阻害感受性がほぼ消失）であることを明らかにした．さらに，Pro1 の Gln79 を正荷電アミノ酸（Lys, Arg）に置換すると，His 置換体と同様にフィードバック阻害感受性が低下し，細胞内の Pro 含量が顕著に増加したことから，Pro1 高生産株が蒸留粕の高付加価値化に有用である可能性が示された．

酵母のアミノ酸代謝とその制御機構は生育環境や代謝様式で異なっており，それらの仕組みを解明し，生理的意義を理解することが重要である．また，得られた基礎的知見を活用して，酵母の細胞内アミノ酸含量を人為的に制御することで，泡盛および蒸留粕をはじめ，発酵・醸造食品の生産性改善，高付加価値化などが可能になる．

1) H. Takagi, *et al*., *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 140-147 (2015).
2) T. Abe, *et al*., *Front. Genet.*, **10**, 490 (2019).
3) S. Isogai, *et al*., *Appl. Environ. Microbiol*., **87**, e0060021 (2021).
4) A. Nishimura, *et al*., *Microorganisms*, submitted.

Key words yeast, amino acid, breeding, awamori

S1H3 (0505) 泡盛フレーバーホイールの作成と活用

○宮本宗周[1]*, 相澤常滋[2]
([1]在上海日本国総領事館, [2]沖縄国税事務所)

Awamori flavor wheel

○Munehiro Miyamoto[1]*, Joji Aizawa[2]
([1] Consulate-General of Japan in Shanghai, [2]Okinawa Regional Taxation Office)
munehiro.miyamoto@mofa.go.jp

ある飲食品から感じることのできる香りや味わいなどの表現を整理し、似た香り・似た味わいのものを近くに配置して車輪（ホイール）状に配列した図をフレーバーホイールと呼ぶ。酒類のフレーバーホイールは、ワイン、ビール、ウイスキーなど数多く作成されており、2006 年には清酒のフレーバーホイールが作成されている。酒類以外にも、コーヒー、紅茶、だし、チョコレート、チーズなど幅広い食品分野で作成されている。

筆者らは、沖縄県の泡盛研究関係者である沖縄県工業技術センター、琉球大学、沖縄工業高等専門学校と共にワーキンググループを立ち上げ、共同して泡盛のフレーバーホイールを作成した。これまで慣習的に使用されてきた香味表現の収集の他、多数の市販泡盛を専門家でテイスティングした結果得られたゴマ，ナッツ，醤油，ドライフルーツなどの表現を加え整理した結果、49 用語が得られ 17 種類に分類した。

泡盛フレーバーホイールをベースに、香味の強さを評価する官能評価法「QDA」を泡盛業界に導入するため、泡盛製造者の官能評価能力向上のための講習を開催して評価者を育成した。

アルコール度数 40 度以上の泡盛の古酒と古酒でない泡盛（一般酒）について、QDA により９つの香味特性の強さを評価した結果、「ドライフルーツ」、「カラメル様」、「甘い風味」、「バニラ」については古酒の平均値が高く、「キノコ様」の香味特性については一般酒の平均値が高かった。また、一般的に泡盛は、熟成を経て古酒となると口当たりが滑らかになり刺激感が低減すると言われているが、今回の品質評価の結果からは、一般酒と古酒の「刺激感」の特性に有意差はなかった。

また、泡盛製造者と共同して、泡盛の新品質の開発に取り組んだ。ラムやジンやウォッカやテキーラと比較テイスティングしながら、新品質に必要な各香味の強度を設計した。目標とする酒質を得るために、これまで泡盛ではあまり用いられてこなかった複数回蒸留という手法にたどり着いた。

Key words awamori, shochu, flavor wheel

S1H3 (0506) 泡盛蒸留粕を原料とする新規乳酸菌飲料の開発

○上間長亮
([1]株式会社石川酒造場)

Development of a novel lactic acid fermented beverage made from Awamori distillation remnants

○Choryo Uema
([1]Ishikawa distillery Inc.)
uemac@kamejikomi.com

弊社は，創業時からの甕仕込み製法にこだわり，守り続けている泡盛メーカーである。また，1973 年に世界で初めて『もろみ酢』を開発した元祖の蔵元である[1)]。もろみ酢は，泡盛の製造過程で生じる泡盛蒸留粕を絞った液体に黒糖などを混ぜて飲みやすく加工されたもので，清涼飲料水として販売されている。豊富なクエン酸とアミノ酸および食物繊維を含むことから，健康飲料として広く認知されている。

もろみ酢の持つ課題として，独特の風味を敬遠するお客様も多く，更なる顧客獲得のためには，風味の改善が求められていた。そこで，琉球大学農学部と風味改善を目的とした共同研究を行い，もろみ酢を乳酸菌で再発酵させる技術を確立した[2)]。これまで，クエン酸を多く含む泡盛蒸留粕を乳酸発酵させることは困難であったため，新規性の高い素材であると考える。この新規乳酸菌発酵素材について，琉球大学に加え，長崎国際大学薬学部とも共同研究を行い，マウスを用いた研究にて健康機能性の評価を行った。その結果，整腸作用，肝臓保全効果，脂質代謝改善効果，美肌効果，アレルギー抑制効果，血糖量改善効果を有することが分かった[3)]。さらに，体感のモニター調査を行った結果，整腸作用，肌の調子，お酒の抜け，睡眠の質について体感があることがわかった。この結果を踏まえ，健康機能性についてヒト臨床試験を実施した。これにより，整腸作用，肌の保湿，アルコール代謝に関して，統計的有意差を持って効果を示すことができた[4)]。

この新規乳酸菌発酵素材を『美らＢｉｏ（ちゅらびお）』という商品名で商品化を行っている。黒麹菌と酵母菌と乳酸菌の３つの菌の発酵によって得られた『美らＢｉｏ』は，新規性が高く，様々な健康機能性を有していることから，もろみ酢に次ぐ新たな泡盛蒸留粕の有効利用法として，市場拡大が期待できる。

（参考文献等）
1) 石川信夫. 沖縄の麹黒酢（もろみ酸）－泡盛蒸留廃液の有効利用－. 日本醸造協会誌. 95(7):520-525 (2000)
2) 上間長亮，平良東紀（石川酒造場，琉球大学）. 泡盛もろみ酢発酵飲料の製造方法. 特許第 6713636 号
3) 野嶽勇一，戸田聡美，射場仁美，平良寛進，上間長亮，平良東紀. もろみ酢の新規乳酸菌発酵飲料が示す風味の特徴とその摂取が肥満に及ぼす影響. 日本食生活学会誌. 31(4):221-228 (2021)
4) 上間長亮（石川酒造場）. 経口組成物.特開 2021-36776

Key words awamori, lactic acid bacteria, distillation remnants

10月28日（木）

受賞講演

〈生物工学奨励賞（江田賞）〉

受賞者　金井 宗良（酒総研）

清酒酵母の機能性成分高蓄積機構とその応用に関する研究　A2H1-0001　p. 79

〈生物工学奨励賞（斎藤賞）〉

受賞者　諸星 知広（宇都宮大・工）

細菌間コミュニケーション機構の解析とその応用　A2H2-0001　p. 79

シンポジウム

持続型・循環利用型社会を実現する複合微生物工学研究の最前線と展望　p. 80

カーボンリサイクルに貢献する微生物　p. 82

バイオとデジタルの融合による世界最先端のバイオエコノミー社会の実現に向けて
～データ駆動型バイオテクノロジーを支えるデータプラットフォーム～　p. 84

バイオエコノミーとグローカルバイオテクノロジー　p. 86

再構成的アプローチによる生物システムの理解と工学的活用　p. 88

大学ブランドのお酒造りから学ぶ発酵醸造学　p. 91

KSBB-BEST-SBJ 合同シンポジウム　Biotechnology for SDGs**《国際シンポジウム》**　p. 94

〈招待講演（韓国生物工学会）〉　S2H6-1201, S2H6-1204, S2H6-1205, S2H6-1207　p. 94, 95, 96, 97

〈招待講演（台湾生物工学会）〉　S2H6-1202, S2H6-1206　p. 94, 96

一般講演

分類，系統，遺伝学 p. 98

遺伝子工学 p. 99

酵素学，酵素工学 p. 110, 119

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 p. 116

バイオセンシング，分析化学／センサー，計測工学 p. 125

発酵生理学，発酵工学 p. 129, 138

代謝工学 p. 132, 141

生合成，天然物化学／有機化学，高分子化学 p. 135

核酸工学／ペプチド工学／脂質工学／糖鎖工学 p. 143

生体医用工学 p. 147

植物細胞工学，組織培養，育種工学 p. 150

セル＆ティッシュエンジニアリング p. 151

A2H1 (0001) 清酒酵母の機能性成分高蓄積機構とその応用に関する研究

○金井　宗良
（酒総研）

Analysis of functional ingredient accumulation mechanism and application in sake yeast

○Muneyoshi Kanai
(NRIB)
kanai@nrib.go.jp

清酒酵母は，昔より長い年月をかけて，清酒造りに最も適した酵母として自然に選抜されてきた醸造用酵母であり，アルコール高発酵性，低温増殖性，乳酸耐性，香気成分高生成など様々な醸造特性を有している．一方で，清酒酵母は *S*-アデノシルメチオニン（SAM）や，葉酸，チアミン，エルゴステロールなど，様々な栄養成分（機能性成分）を多く蓄積させる特性も持ち合わせている．そこで我々は，様々な微生物の中でも酵母，特に清酒酵母に高含有している機能性成分である SAM に着目し，清酒酵母における SAM 高蓄積機構の解明及びその現象の生理学的意義の理解を目的とし，その知見を基に，高品質な酒質を可能とする新たな優良清酒酵母の育種方法の開発，及び清酒酵母を用いた機能性食品等への応用展開を目指している．

SAM はメチオニンと ATP から合成され，主要なメチル基供与体として働くなど生体内に存在する含硫アミノ酸代謝の key 物質であるため，アルコール性肝機能障害，うつ病，関節炎など様々な疾病に予防・治癒効果が認められている機能性成分である．また，SAM 及び葉酸は様々な微生物の中でも酵母，特に清酒酵母に高含有しているため，日本の伝統的発酵食品である酒粕にも高含有していることを報告している（2012 年度日本醸造学会大会）．

1. 酵母における SAM 高蓄積機構の解析

まず，酵母細胞内での SAM 高蓄積機構の基礎的理解を目的に，SAM 高蓄積に寄与する新規遺伝子を同定するため，メチオニン耐性を指標に新規 SAM 高蓄積株の探索を試みた.結果，アデノシンキナーゼをコードする *ADO1* 遺伝子の機能欠損が SAM 高蓄積を示すという新規な知見を見出した．また，*ADO1* 遺伝子破壊株の DNA マイクロアレイ解析や，メチオニン生合成経路に関与する様々な代謝産物量を分析した結果，メチオニン合成経路及び糖・リン酸取り込み経路の活性化が SAM 蓄積を誘導するという新規な分子機構を明らかにした（文献 1）．

2. 実用可能な新規 SAM 高蓄積酵母の育種技術開発

ADO1 遺伝子破壊株が示すコルディセピン耐性を指標に，遺伝子組換え体にあたらない実用可能な新規 SAM 高蓄積酵母の育種技術を試みた結果，SAM がさらに高蓄積する実用清酒酵母の育種に成功し，当該方法にて特許を取得した（文献 2, Patent No. P5641192）．実際に，取得された酵母を用いて清酒製造試験を行った結果，清酒及び清酒粕内により多くの SAM が高含有することが分かった．なお，当該方法は清酒酵母に限らず，元々SAM の蓄積量が少ないパン・焼酎・ビール・ワイン酵母など他の醸造用酵母にも応用可能であり，醸造産業の発展への貢献のみならず，予防医学や健康・機能性食品分野への応用展開も期待される．

3. 清酒酵母における SAM 高蓄積機構の解析

次に，清酒酵母の SAM 高蓄積能に寄与する遺伝子を同定するため，清酒酵母と実験室酵母の交配による QTL（量的形質遺伝子座）解析を行った．結果，出芽酵母の第 8 番染色体に存在した有意な QTL から *ERC1/YHR032W* 遺伝子を同定し，清酒酵母が持つ SAM 高蓄積能に清酒酵母型 Erc1 の機能が深く関与していることを見出した（文献 3）．また，清酒酵母型 *ERC1* の SAM 蓄積に寄与する SNP を調べた結果，実験室酵母型 *ERC1* との塩基長の差の原因であるフレームシフト変異（N545I）が，清酒酵母の SAM 高蓄積能に寄与していることを明らかとした．さらに，清酒酵母型 *ERC1* の機能は清酒酵母の葉酸高蓄積機構にも深く関与していた（文献 4）．

4. 清酒酵母における高発酵性と SAM との関連性に関する解析

最後に，他の醸造用酵母と比較して清酒酵母の最も特筆すべき特徴の一つである約 20%のエタノールを生産可能とするアルコール高発酵性のメカニズムに注目し，清酒酵母に特徴的な SAM 高蓄積能との関係性について調べた．実験室酵母の二倍体（BY4743）に清酒酵母型 *ERC1* を発現させた株を構築し清酒小仕込み試験を行った結果，清酒もろみ液部のメチオニンの減少，酵母細胞内の ATP 量の減少及び SAM 量の増加が観察され，アルコール発酵性が向上することを明らかとした（日本農芸化学会 2019 年度大会）．以上より，液胞膜に局在する清酒酵母型 Erc1 の機能がアルコール発酵を正に制御していること，また清酒酵母のアルコール高発酵性と細胞内 SAM の蓄積との間に深い関係性が示唆された．

【文献】

(1) Kanai M., Masuda M., Takaoka Y., Ikeda H., Masaki K., Fujii T., Iefuji H., Adenosine kinase-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* accumulates *S*-adenosylmethionine because of an enhanced methionine biosynthesis pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **97**(3):1183-90 (2013).
(2) Kanai M., Yasuda N., Morimoto T., Yoshida S., Nishibori N., Mizunuma M., Fujii T., Iefuji H., Breeding of a cordycepin-resistant and adenosine kinase-deficient sake yeast strain that accumulates high levels of *S*-adenosylmethionine. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **83**(8):1530-1537 (2019).
(3) Kanai M., Kawata T., Yoshida Y., Kita Y., Ogawa T., Mizunuma M., Watanabe D., Shimoi H., Mizuno A., Yamada O., Fujii T., Iefuji H., Sake yeast *YHR032W/ERC1* haplotype contributes to high *S*-adenosylmethionine accumulation in sake yeast strains. *J. Biosci. Bioeng*., **123**(1):8-14 (2017).
(4) Kanai M., Kawata T., Morimoto T., Mizunuma M., Watanabe D., Akao T., Fujii T., Iefuji H., The sake yeast *YHR032W/ERC1* allele contributes to the regulation of the tetrahydrofolate content in the folate synthetic pathway in sake yeast strains. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **84**(5):1073-1076 (2020).

Key words　*S. cerevisiae*, Sake yeast, *S*-adenosylmethionine

A2H2 (0001) 細菌間コミュニケーション機構の解析とその応用

○諸星　知広
（宇都宮大・工）

Analysis and application of bacterial cell-cell communication system

○Tomohiro Morohoshi
(Fac. Eng., Utsunomiya Univ.)
morohosi@cc.utsunomiya-u.ac.jp

細菌間コミュニケーション機構の一つである Quorum Sensing（QS）とは、細菌がオートインデューサー（AI）と呼ばれるシグナル物質を介して周囲の菌体密度を感知し、ある一定密度を超えると様々な遺伝子の発現を活性化する機構のことである。グラム陰性細菌の場合、主要な AI としてアシル化ホモセリンラクトン（AHL）を使用することが知られている。QS が世界的に注目されている理由として、多くの病原性細菌が QS により病原性発現を制御している点が挙げられる。また、家庭の水回りに発生するぬめり、水処理システムのファウリング、工場冷却水循環システムのスライム形成など、細菌が形成するバイオフィルムの多くが QS に制御されることも知られている。これらの細菌の QS を人為的に阻害すると、病原性発現やバイオフィルム形成を効果的に抑制することが可能であり、殺菌剤などの従来の薬剤投与に代わる新しい微生物制御技術への応用が期待されている。一方で、ある種の細菌は、他の微生物の増殖を阻害可能な抗菌物質の生産を QS により制御することも知られている。この場合、QS を活性化することにより抗菌物質生産が増強、安定化することから、病原菌防除効果を有する微生物製剤の開発への応用も期待されている。以上の背景から、QS 制御技術は、世界中で幅広い専門分野の研究者により研究開発が行われてきた。本講演では、筆者らがこれまでに進めてきた QS に関する研究の中から、(1) QS 阻害に対する遺伝子工学的アプローチ、(2) QS 阻害に対する化学的アプローチ、(3) QS による抗菌物質生産制御機構の解析について、これまでの研究成果を紹介したい。

（1）QS 阻害に対する遺伝子工学的アプローチ

グラム陰性細菌の AI である AHL を人為的に分解することができれば、効果的に QS を阻害することが可能である。AHL 分解酵素には、AHL のラクトン環を加水分解する AHL ラクトナーゼと、AHL のアミド結合を切断する AHL アシラーゼの二種類が主に知られており、これらの酵素により病原菌が生産する AHL を分解することで、病原性発現を阻害することが可能である。筆者らは、これまでに植物共生細菌、魚類腸内細菌、好熱菌、活性汚泥構成細菌など、多種多様な分離源から新規 AHL 分解細菌の単離と AHL 分解遺伝子のクローニングを行ってきた。本講演では、工場冷却水循環システムを対象とした研究例を紹介する。工場冷却水中に存在する細菌から、AHL 分解活性を有する細菌をスクリーニングしたところ、*Sphingomonas* 科に属する様々な細菌種が AHL 分解細菌として存在することが明らかとなった。さらに、これらの菌株のゲノム解析を通して、新規 AHL ラクトナーゼ遺伝子である *qsdS* が *Sphingomonas* 科のゲノムに幅広く分布していることが明らかになり、QsdS は菌体外分泌型の AHL ラクトナーゼとして機能し、他の細菌の QS を効果的に阻害可能であることが明らかになった。

（2）QS 阻害に対する化学的アプローチ

QS 阻害効果を有する薬剤として、AHL 構造類似体など、様々な構造の拮抗阻害剤が世界的に開発されてきたが、高い QS 阻害効果を示す化合物の合成には至っていないのが現状である。筆者らは、これらの QS 拮抗阻害剤とはコンセプトが異なる、AHL に対する包接能を有するシクロデキストリン（CD）を用いた QS 阻害技術に着目し、研究を行ってきた。CD は、自身の疎水性空洞内に AHL のアシル鎖を包接し、系内の遊離 AHL 濃度を減少させることで QS の阻害が可能であるが、AHL に対する選択性や結合能が低いことが大きな課題であった。そこで、CD に様々な構造のアルキルアミノ基を修飾した CD 誘導体を合成したところ、AHL に対する結合能が大幅に向上することが明らかになった。さらに、様々なモデル病原菌に修飾 CD を投与したところ、非常に高い QS 阻害効果を示すことが明らかになった。CD は、食品添加物として使用されるなど安全性が高く、低コストで大量使用が可能であることから、今回合成した修飾 CD は、QS 阻害剤として幅広い用途に利用可能であると期待される。

（3）QS による抗菌物質生産制御機構の解析

植物を病害から保護する能力を有する細菌は、植物保護細菌と呼ばれている。特に、抗菌物質を生産して他の病原菌の増殖を阻害する植物保護細菌を微生物製剤として利用する技術には、大きな期待が寄せられている。一方で、植物保護細菌を用いた微生物製剤の効果は不安定であることが大きな問題となっており、抗菌物質を安定して生産させることが実用化に向けた重要な課題となってきた。本研究でモデル植物保護細菌として用いた *Pseudomonas chlororhaphis* は、主要な抗菌物質としてフェナジン誘導体を生産し、植物病原性真菌の増殖を効果的に抑制することが可能である。筆者らは、次世代シークエンサーを用いて、*P. chlororhaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508 株の完全ゲノム配列を決定し、StFRB508 株が *phz* 系、*csa* 系、*aur* 系の 3 系統の QS 機構を有する事を明らかにした。フェナジン誘導体生産は、*phz* 系 QS 機構により制御されているが、他の 2 系統の QS により生産された AHL も *phz* 系によるフェナジン生産を誘導することが可能であり、多重化した QS 機構がバックアップのような形でフェナジン誘導体生産の安定化に寄与することが初めて明らかとなった。以上より、QS は抗菌物質生産の安定化に対するターゲット因子として有用である可能性が示唆された。

以上のように、QS に関する研究は、細菌細胞が集団として行う生命活動を自在にコントロールできる技術に繋がる可能性が期待されている。今後も、QS 制御技術の実用化に向け、さらなる研究を展開させたいと考えている。

Key words　quorum sensing, acyl homoserine lactone

S2H1 (0601) 好適制御に向けたモデル複合微生物系の形成機構

○二又裕之*（静大・グリーン研）

Forming mechanisms of engineered complex microbial systems for appropriate management

○Hiroyuki Futamata*
(IGST, Shizuoka Univ.)
futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

１．はじめに

本研究の最終目標は複合微生物系の好適制御であるが，それを論理的に実行するのはなかなか難しい．その理由としては，１）純粋培養に基づく微生物の生理学的知見が通用しない場合があること（還元論的アプローチの限界），２）複合微生物系の複雑さ故に，構成因子としての各微生物群とシステム全体の関係性を理解できていないこと（個々の微生物の動態とシステムとしての自己組織化・動的平衡の関係），３）様々な複合微生物系があるため個々に適した方法を見出すことになってしまうこと（普遍化の困難性），が挙げられる．以上の理由等々から，複合微生物系の制御に資す原理・法則が見出されているとは言い難い．そこで本発表では，土壌や分離菌株を用いて構築した複合微生物系の特性を紹介し，複合微生物系の潜在能力を開花させるには，あるいは機能的安定性を図るにはどうすれば良いのか，に関する研究を通じて，複合微生物系の形成機構と制御について考察したい．

２．土壌を接種源とする複合微生物系の潜在的能力の開花

難分解性有害汚染物質トリクロロエテン（TCE）による汚染環境浄化に向けて，土着の好気性 phenol 分解細菌の活性化による効果的バイオスティミュレーションを検討した．実験方法は，バイアル瓶に飽和帯土壌，TCE，栄養塩，および phenol を添加し回分培養条件下で時系列的に TCE 濃度を測定した．Phenol 分解細菌は phenol 存在下でのみ phenol 分解酵素を産生し，本酵素の基質認識性の低さにより TCE を共代謝的に無害化する．Phenol を終濃度 20 ppm あるいは 200 ppm（200 ppm 系）となるように添加したが，TCE の減少は観察されなかった．一方，終濃度 20 ppm とする添加を断続的に 10 回実施した系（総投入 phenol 量は 200 ppm 系と同じ）では，TCE は加速度的かつ検出限界以下にまで減少した．この要因を探るため，phenol 分解細菌の phenol および TCE に対する動力学的パラメーターを解析した．その結果，両物質に対する親和性には正の相関があり，かつ，高親和性 phenol 分解細菌は TCE 高分解能を発揮した．本結果は，目的基質に対する微生物の生理学的特性の把握が複合微生物系の潜在能力を引き出す為に重要であることを示している．

上記の結果は，土着 TCE 高分解性 phenol 細菌の活性化には低濃度の phenol 供給が有効であることを示唆している．この仮説を実証するため，土壌を接種源，phenol を唯一の炭素源とする培地を用いて連続集積バイオリアクターを構築した．その結果，TCE 高分解性フェノール細菌の選択的活性化に成功し，リアクターは高 TCE 活性を発揮した．しかし，リアクター（複合微生物系）の phenol に対する親和性は予想と異なり，微生物群集の変遷を経て phenol に対して極低親和性の微生物が集積されていた．この結果は，微生物の動態をシステム全体の中で捉える必要性を示している．

３．微生物の共存機構とシステムの機能安定性

上記結果を受けて，phenol を唯一の炭素源とする培地で phenol 分解細菌分離菌株により構成された合成微生物群集を連続集積条件下で培養した．この手法の利点は，供試する微生物間の相互作用を予め把握できること，システムにおける個々の微生物の動態を解析可能であること，個の挙動とシステム全体の機能を連動させることが可能であること，が挙げられる．なお本研究では，培養系に phenol が蓄積されていない状態をシステムが機能的に安定していると定義した．

全ての供試微生物は純粋培養条件下では phenol を完全に資化可能であるにも関わらず，ある合成微生物群集では培養当初の機能的安定状態から phenol の蓄積が観察されシステムが崩壊した．一方で，phenol 資化性の異属３菌株（*Pseudomonas* sp. LAB-08 株，*Comamonas testosteroni* R2 株，*Cupriavidus* sp. P-10 株）を用いた合成微生物群集は，途中で phenol 供給を停止するという撹乱を数回実施したにも関わらず，約 800 日間以上，供試微生物の共存とシステムの機能的安定性を維持した．以上の結果は，数株から成る複合微生物系でさえも単なる微生物の集まりではないこと，機能的安定性には適切な菌株間の相互作用が必要であること，微生物の共存がシステムの機能的安定性に寄与していること，が示唆された．

そこで，長期間の機能的安定性を示した３菌株のゲノム解析を実施したところ，R2 株は phenol 分解酵素遺伝子（PH）と phenol の最初の変換物質である catechol の分解酵素遺伝子（C23O）が１つのオペロン下で制御されており，これは phenol 分解微生物の一般的な事例と一致していた．一方，LAB-08 株では，catechol 分解酵素遺伝子が別のタイプ（C12O）であり，これは PH と制御が分かれていた．P-10 株では，R2 株と同様の分解遺伝子に加えて別制御の下で C12O が存在していた．Phenol 供給停止の前後でこれらの遺伝子転写量を逆転写 qPCR 法により測定した．その結果，phenol 供給停止前では，３菌株間の PH 転写量に著しい差は観察されず，供給 phenol の分配により共存していることが示唆された．一方，phenol 供給停止後では，R2 株が phenol 分解を担い，代謝産物 catechol の一部を LAB-08 株および P-10 株が利用する代謝ネットワークの形成が示唆された．この様な役割分担の柔軟な形成が異属微生物の共存を可能とし，結果的にシステムの機能が安定的に発揮されたと考えられた．

４．複合微生物系の好適制御に向けた展望

これまで標的物質の生産や分解など，目的の機能に直接関わる微生物のみが着目されてきた．しかし，システムとして捉えた場合，物質変換に伴う様々な代謝産物が産生され，システムとして代謝不全に陥り崩壊に至ることが示唆されている．このことは，複合微生物系の安定性を図る上で，目的の反応に直接寄与しない微生物の重要性や利用性を示唆している．この観点から，複合微生物系を不完全な代謝を補完するシステムとして捉えることが，好適制御法を構築する上で大切なのではないかと考えられる．不完全代謝補完システムが健全に作動するためにも多様な微生物の共存が求められる．微生物の共存機構の理解は道半ばではあるものの，場の不均一性や微生物の機能的多様性が共存にとって重要な因子であることが見えてきた．今後、複合微生物系における機能的安定性の維持と微生物群集構造の関係性をより明確に捉え、複合微生物系のリデザイン化に資す知見の集積が必要となるだろう．

Key words Coexistence, Interspecies interaction, Heterogeneity, Fluctuation

S2H1 (0602) 下水汚泥の嫌気消化促進のための微生物間相互作用の理解

○前田憲成*
（九州工業大院・生命体）

Investigation of Microbial Interaction for Enhanced Anaerobic Digestion of Sewage Sludge

○Toshinari Maeda*
(Kyushu Inst. Technol.)
toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp

１．はじめに

我々の生活排水は、下水処理場において、活性汚泥法と呼ばれる好気性細菌群の分解活性を利用した手法で処理されている。排水が浄化される反面、増殖した微生物群が塊となり、これが下水汚泥として廃棄物となる。都市部では下水汚泥が日々大量に生成されており、その処理に莫大な費用が必要であるため、有効な資源利用が求められる。下水汚泥は、下水処理場における集積型のバイオマスであるため、この廃棄物を不変なバイオマスとして捉え、有効に利活用することにより、次世代エネルギー資源の鉱山としての魅力を秘めた原料となりえる。下水汚泥の資源利用法の一つに、嫌気消化がある。これは、下水汚泥を嫌気条件で培養することで、下水汚泥を原料として、メタンガスをバイオエネルギーとして回収する方法である。この下水汚泥の嫌気消化は古くから取り組まれている手法であるが、プロセスが不安定であること、時間がかかるなどの課題のため、依然バイオエネルギーの高度生産化には検討の余地がある技術である。

２．嫌気消化におけるメタン生成機構と微生物相互作用

下水汚泥の嫌気消化は、はじめに下水汚泥を低分子化する加水分解反応、低分子化された下水汚泥成分から有機酸を生成する酸生成反応、酢酸、水素と二酸化炭素からメタンを生成するメタン生成反応から成り立つ。加水分解にはタンパク質分解酵素、炭水化物分解酵素、脂質分解酵素、核酸分解酵素などが関わり、これらの酵素群を生成できる加水分解菌群が主役となる。その後、酸生成菌群が働き、酢酸などの有機酸を生成する。そして生成された酢酸、二酸化炭素と水素を原料として、メタン菌群がメタンを生成する。

下水汚泥からのメタン生成のプロセスでは、多くの微生物群が関与し、複雑な相互作用を受けながら、それぞれの反応が進行させていることが予想される。例えば、ある菌に対する相互作用を考えた場合、その菌に対して阻害または抑制作用を示す菌、逆に依存または促進作用を示す菌などが存在する可能性がある。このような相互作用は、加水分解反応、酸生成反応、メタン生成反応などで起こっており、これらの相互作用が複雑に関わり合い、最終産物としてメタンが生成される。また、下水汚泥の加水分解された成分は、全てがメタン生成に利用されているのか、それ以外に基質を利用する微生物群は存在しないのかなど、メタン生成の高速化、高度生産化には明らかにすべき点が多くある。そこで、筆者は、下水汚泥のメタン生成を促進に繋がる微生物間相互作用を明らかにすることを目的に研究を進めた。

３．嫌気消化における微生物相互作用を変化させるアプローチ

ここでは筆者が、下水汚泥の嫌気消化においてこれまで取り組んできた成果を概説する。

（１）抗生物質の効果

下水汚泥中の細菌間の相互作用を比較的容易に変化させる手法として、抗生物質の添加がある。使用する抗生物質によって抗菌スペクトルが異なるため、下水汚泥中の多種多様な細菌群の働きを変化することができる。一般的に抗生物質を下水汚泥に添加し、嫌気消化を行なうと、細菌群の活性が低下し、メタン生成が抑制されることが予想されるが、筆者の研究室ではアジスロマイシンを添加した場合にメタン生成が向上することを見出した。このアジスロマイシンの類似抗生物質は、ほぼ同様に下水汚泥の嫌気消化においてメタン生成が高まった。メカニズムとしては、メタン菌群の活性を抑制することなく、加水分解反応と酸生成反応を促進させたことがメタン生成の向上に繋がった。一方、クロラムフェニコールを添加した場合、メタン生成が抑制されることが明らかとなった。クロラムフェニコールにおいては、加水分解反応と酸生成反応は抑制されておらず、メタン菌群の不活性化が、メタン生成が低下した要因であった。

（２）クォーラムセンシング阻害の効果

クォーラムセンシングは、細菌群から生成され、放出されるシグナル物質を介して、その環境中の菌密度（菌の多さ）を認識して、遺伝子発現を促し、毒素などの物質生産を活性化する機構である。細菌におけるクォーラムセンシングについては、緑膿菌などのアシルホモセリンラクトン(AHL)に関する研究が進展しており、クォーラムセンシングを阻害する機構の一つに、AHL 中のラクトン環を開裂させる触媒活性を持つ AHL ラクトナーゼが知られている。一般的に、クォーラムセンシングに関する研究は単一菌の実験を対象としたものが多く、下水汚泥の嫌気消化のような複合微生物系での効果を調べた成果は少ない。筆者の研究室では、精製した AHL ラクトナーゼを下水汚泥に添加し、嫌気消化を行なったところ、メタン生成が抑制されることを見出した。メタン生成が抑制されるメカニズムとしては、AHL を介したクォーラムセンシングが阻害されることで、グラム陽性菌群の割合が増加し、その結果メタン活性が低下したことが示唆された。

（３）生物活性微量金属の効果

生物が織りなす化学反応、生物活動に影響を及ぼすものに、生物活性微量金属がある。これらは菌株の培養などにおいても Trace elements として頻繁に添加されている。この Trace elements の各元素が、下水汚泥の嫌気消化においてどのような影響を調べたところ、タングステン酸とセレン酸において、メタン生成に影響を及ぼすことが明らかとなった。その詳細を調べたところ、タングステン酸においては、酢酸資化性のメタン生成活性を高めることでメタン生成が向上することが明らかとなった。また、セレン酸においては、2 mg/L の低濃度ではメタン生成が向上すること、100 mg/L の高濃度ではメタン生成が抑制されることが分かった。セレン酸においては、2 mg/L の濃度では *Methanosarcina* 属の存在割合が増加、100 mg/L の濃度では減少することから、*Methanosarcinaa acetivorans* C2A 株を用いて、各濃度における増殖を比較したところ、2 mg/L のセレン酸では増殖促進、100 mg/L のセレン酸では増殖抑制が確認できた。

Key words Anaerobic digestion, Sewage sludge, Antibiotic, Quorum sensing, Trace elements

S2H1 (0603) 複合微生物 + 電気化学で有機性廃棄物の処理と発電

○井上謙吾*
（宮崎大・農）

Microbial Fuel Cells using Local Biomass

○Kengo Inoue*
([1]University of Miyazaki)
kinoue@cc.miyazaki-u.ac.jp

微生物燃料電池は微生物が有機化合物を分解する過程で生じる電子を電極で回収し発電する技術で、有機化合物の化学エネルギーを電気エネルギーに直接変換できる。有機性廃棄物を電子供与体として用いることで、発電と同時にその処理も行うことができる。微生物燃料電池はアノード（負極）側で電気化学活性微生物（「発電菌」とも呼ばれる）によって、有機物からの電子を回収し、カソードでは、外気中の酸素、電解液中のプロトン、アノードからの電子、で水を生成する反応などが起こる。代表的な電気化学活性微生物は嫌気性微生物が多く、電極への電子伝達が効率的に行われるためにはアノード付近を嫌気的に保つ必要がある。畜産廃棄物や食品廃棄物など有機性廃棄物は多様であるが、そのほとんどが微生物燃料電池で処理と発電を行うことができる。演者の所属機関がある宮崎県は屈指の畜産県であり、また、焼酎製造が盛んな地域である。本講演では、演者のグループがこれまでに開発してきた畜産廃棄物や焼酎粕といった地域バイオマス資源を利用した微生物燃料電池について紹介する。

畜産廃棄物は水分を多く含み、有機物の含有率も高いため、そのエネルギー密度は高く、バイオマスエネルギーとしての利用価値は高い。演者の研究グループは、カセット電極型微生物燃料電池を用いて牛糞尿への適用を試みた。牛糞尿を水に懸濁（固液比=1:50）したものを燃料として用いて 50 日程度運転したところ、1 日程度で出力が上昇し始め、5 日目に 3 W/m^3 ほどの出力を記録した後、出力が低下した。出力が低下した理由は微生物が電子供与体として利用しやすい有機化合物を消費し尽くしたことが原因と考えられたため、運転 9 日目に半回分処理（電解液の半分を新しい牛糞懸濁液に取り換える）を行ったところ、直後に出力は再び上昇し、その後 1 日程度でピークを迎えた後、2 日程度で出力は低下した。出力が低下したら半回分処理を行う作業を繰り返したところ、最大出力は徐々に高くなり、5 回の半回分処理を経た運転開始から 26 日目には最大出力 16.3 W/m^3 を記録した。ある程度安定して出力が得られるようになってから半回分処理を 10 日以上にわたり行わなかった場合、一時点を境に出力が急激に低下したものの、一定の出力（1 W/m^3 程度）を長期間維持することが明らかになった。牛糞懸濁液の上清のみを燃料とした場合には、最初の数時間は出力が見られたが、その後全く出力を得ることができなかったことから、牛糞懸濁液では、固体成分（セルロース、ヘミセルロース、リグニンなどを多く含む）が分解されて溶け出した有機物が電子供与体となって、長期にわたる出力を可能にしたものと考えられた。運転前の牛糞尿、および、アノードに形成されたバイオフィルムについて微生物群集構造を調べたところ、運転前では *Bacteroides* 属細菌（26.5%）や *Clostridium* 属細菌（18.4%）が多くを占めていたのに対し、運転後のアノードバイオフィルムには、*Clorofexi* 門（29.1%）や発電菌のモデル微生物として研究が進んでいる *Geobacter* 属細菌が有意に優占種（18.1%）となっていたことから、これらの微生物が牛糞尿中の有機化合物の分解や発電に寄与していたことが示唆された。

宮崎県は全国で最も焼酎生産量の多い県であり、主に芋焼酎が生産されている。芋焼酎粕は製造される焼酎の約 2.5 倍量発生し、その含水率は 90～95%と高く有機物濃度も高い。芋焼酎の醗酵過程では黒麹がクエン酸などの有機酸を生成して pH を下げるため、pH 4 付近と低く、産業廃棄物としては「廃酸」に分類される。演者の研究グループは、芋焼酎粕を燃料とした微生物燃料電池を構築するため、芋焼酎粕を純水で 10 倍希釈し、微生物燃料電池で予備試験を行った。運転開始から 5 日程度はほとんど出力がなかったが、6 日後から出力が上昇し始め、その後、11 日で最大 0.5 mW/m^3 程度の出力に達したことから、微生物燃料電池が芋焼酎粕に適用できることが示された。処理と発電に適した焼酎粕濃度を検討するため、COD 0.5、1、2、5、10、73 g/L の焼酎粕を調整し、発電特性と処理効率を測定した。0.5、1 g/L ではほとんど出力が得られなかったが、その他の条件では出力が確認でき、最も出力が高かったのは 10 g/L の濃度で 1.2 W/m^3 程度であった。有機物除去効率についても 10 g/L の濃度で最も高く、9 日間で 67.4%の COD が除去されていた。焼酎粕原液、COD 10 g/L の焼酎粕を用いた微生物燃料電池のアノードに形成されたバイオフィルム、焼酎粕原液を用いた微生物燃料電池のアノードに形成されたバイオフィルム、について微生物群集構造解析を行ったところ、運転前の焼酎粕原液では、*Bacillus* 属細菌が最も多く、40.9%に達していた。それに続き *Bacteroides* 属が 8.4%、*Methanobacterium* 属が 4.5%程度であった。高温での蒸溜の残渣物として、好熱好酸性菌の微生物種を含む *Bacillus* 属が多く検出されたのは理にかなう結果であった。COD 10 g/L の焼酎粕を用いた微生物燃料電池のアノードに形成されたバイオフィルムでは、*Bacteroides* 属細菌が 65.3%と最も多く、つぎに *Clostridium* 属細菌（12.1%）が多かった。これらの微生物種の中には電解液が中性の微生物燃料電池のバイオフィルムでも優占種として検出された報告例もあり、発電に関与している可能性が高い。さらに焼酎粕原液（COD 73 g/L）を用いた微生物燃料電池では、*Clostridium* 属細菌が 75.4%と圧倒的多数を占めていた。嫌気条件下での有機物の分解者として最も知られた存在である *Clostridium* 属細菌は、低い pH 条件での微生物燃料電池では発電にも寄与する可能性が示唆された結果であった。予想に反し、焼酎粕を用いた微生物燃料電池では *Geobacter* 属に分類される微生物は検出されなかったことから、発電に寄与している微生物は *Geobacter* 属細菌ではないことが示された。

上記のように、用いる有機性廃棄物の種類が違えば、そこで活躍する微生物種も異なる。また、有機物の濃度条件が違うだけでも微生物群集構造が大きく変化することも明らかになった。微生物燃料電池の改良のためには、有機性廃棄物の種類ごとで微生物燃料電池の構造や電極材料、運転方法（有機物の供給方法）を最適化する必要があるが、さらに発電や有機物分解に適した微生物群集構造の構築やその安定化も重要な改良へのアプローチ方法の一つである。

Key words Local biomass, Cattle manure, Shochu waste, Microbial fuel cell, *Geobacter*, *Clostridium*

S2H1 (0604) 自家熱型高温好気消化-液肥製造法制御のための複合微生物工学からのアプローチ

○酒井 謙二[1]*, 田代幸寛[1]
（[1]九大院・農）

Complex microbial engineering of autothermal thermophilic aerobic digestion process useful for producing liquid fertilizer from human waste

○Kenji Sakai[1]*, Yukihiro Tashiro[1]
([1]Faculty of Agriculture, Kyushu University)
kensak@agr.kyushu-u.ac.jp

遺伝子解析技術のハイスループット化と並行した分子系統分類の体系化により，培養を伴わない微生物群集構造解析法が急速に開発されてきた．これにより，廃水・廃棄物処理における難培養微生物を含む複合微生物系の構造と変換過程の特徴を，微生物の属・種レベルで推定することが可能になりつつある．その知見をもって複合微生物系によるプロセス制御や望ましい微生物群集の維持・育種を可能とすることが，「複合微生物工学」のひとつの目標と考える．

自家熱型高温好気消化（Autothermal Thermophilic Aerobic Digestion, ATAD）法は，有機物の好気分解に伴う自家発熱により高温状態を維持し，高濃度有機廃水を短期間で安定且つ衛生的な有機液肥に処理・変換する方法である．我々は福岡県築上町で稼働している他では見られない特徴的を持つ屎尿の ATAD プロセスと資源循環に注目している．具体的には，プロセスは理化学的変化および細菌群集構造変化の再現性が高いこと，好気プロセスであるにもかかわらず，硝化，好気的脱窒が進行せず窒素リッチな液肥が得られること，管理の最適化によりメタン発酵処理におけるエネルギー回収を凌駕できる可能性があることなどである．

本プロセスは温度や溶存酸素濃度，細菌群集構造で区別される 3 段階のフェーズを経て進行することが明らかになっている．それは既知の ATAD 法や活性汚泥法とは異なる，ダイナミックな遷移を見せ，最終フェーズの主要細菌群はいずれも未分離・難培養微生物である[1)]．実験室レベルで理化学的・微生物学的再現系について種々検討した結果[2)]，上記特徴は自吸式通気撹拌装置を適切な条件で用いることに由来すると結論した[3)]．これにより，種菌，温度，酸素供給量，撹拌速度などの運転制御因子と，処理性能，複合微生物系の群集構造変化の相関について議論が可能となりつつある．また，メタゲノム解析によりフェーズの変化，有機物分解系，無機窒素蓄積，主要細菌種交替，などに関与する遺伝子・起源微生物について推定が可能となった．

1) Tashiro Y. et al., Appl. Environ. Microbiol., 84(6):e02537-17(2018)

2) Cheng H. et al., J. Biosci. Bioeng., 126(2):196 (2018)

3) Zhang M. et al., J. Biosci. Bioeng. (2021) In press

Key words complex microbiological system, wastewater treatment, sustainable production system, complex microbial engineering

S2H1 (0701) 微細藻類研究における課題および微細藻類研究拠点での取組について

○野村 純平[1]*, 青柳 裕之[1], 青木 慎一[1], 田村 綾子[1]
([1] 一般社団法人 日本微細藻類技術協会)

Current Status of MicroAlgal Industries and Research Activities at Microalgae Research Station

○Junpei Nomura[1]*, Hiroyuki Aoyagi[1], Shinichi Aoki[1], Ryoko Tamura[1]
([1] Institute of Microalgal Technology, Japan)
junpei.nomura@imat.or.jp

近年、世界規模で CO_2 の排出量削減やカーボンリサイクル技術の開発が求められている中、光合成により CO_2 を吸収して成長する微細藻類は、持続可能なバイオマス資源として産業利用が期待されている。特に、バイオ燃料の資源としての利用に対してはその期待も大きく、これまでにも数多くの基礎研究により有用な成果が示されてきた。昨今では、藻類由来のバイオジェット燃料の実用化を目指した大規模実証試験が複数行われるなど、研究開発が基礎研究から次のフェーズに移りつつある。

一方で、微細藻類の産業利用における課題として、製品を作るために必要な各種工程の手法や条件、データの算出・表記方法など、基準が定まっていないことが挙げられる。そのため、実験データや技術の適切な比較や評価が困難であり、研究者や技術者による成果が有効に活用されることなく散在している状況となっている。また、微細藻類の産業利用を見据えた汎用的な実験施設や産・官・学の交流機会の不足も課題として挙げられる。

このような背景を受け、当協会では、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)からの委託を受け、「微細藻類技術開発/微細藻類研究拠点における基盤技術開発」事業として、以下の活動を行うことで上記課題の解決を図り、微細藻類の産業化に向けた支援を行っていく。

[微細藻類研究拠点の整備]

微細藻類からバイオジェット燃料を製造する各種工程について、網羅的且つ高精度に技術検証が可能な屋内研究拠点を広島県大崎上島に建設し、運用を行う。当研究拠点は、微細藻類の培養工程をはじめとする、収穫、濃縮、乾燥、成分抽出、分析の工程について、網羅的且つ高精度に技術検証が可能な屋内研究施設である。それぞれの工程について、複数の原理の技術を導入することにより、様々なアプローチを用いた技術検証を可能とする施設の設計になっている。当研究所の最大の特徴は藻類の培養設備にある。光環境や水温制御等が可能な3種の培養システム（オープンレースウェイポンド、フラットパネル型フォトバイオリアクター、チューブ型フォトバイオリアクター）により、世界各地の環境を模した条件での培養試験が可能であり、例えば、熱帯環境下における藻類の培養試験も行うことができる。当協会は、当研究所を藻類に関する基礎的なデータの取得に活用するだけでなく、将来的に企業や大学等が様々な研究開発に利用できるような環境の構築を進めている。

[標準化の推進]

当協会は、微細藻類バイオマスの生産に関わる各種試験・分析の手法や条件、評価基準、成果の表記方法等の標準化を実施する。標準化は、主に文献調査や当協会の会員からの情報をもとに情報整理を行った後に、上述した微細藻類基盤研究所を活用して標準データを取得し、成果の取りまとめを進める流れである。標準化された手法や条件、得られた標準データ等は、微細藻類関連技術の発展並びに産業化のため、学会や学術書等を通じて積極的に情報発信していく。また、藻類バイオジェット燃料の実用化に向け、藻類バイオマス生産に関するモデルケースや技術開発ロードマップの策定、政策への提言等にも取り組む計画である。

今回は、上述の取り組みの中から分析項目の標準化事例および研究拠点の概要について紹介する。

Keywords microalgae, standardization, analysis, bio-jet fuel, biomass, CO_2 emission, carbon recycling, photobioreactor

S2H1 (0702) 微細藻バイオマスのカスケード利用に基づくバイオジェット燃料事業モデルの実証研究

○鈴木 秀幸*, 稲葉 遊, 山本 芳正
（株式会社ユーグレナ バイオ燃料事業部）

Demonstration research of next-generation bio-jet fuel business model based on cascade utilization of microalgae biomass

○Hideyuki Suzuki*, Yu Inaba, Yoshimasa Yamamoto
(euglena Co., Ltd.)
h.suzuki@euglena.jp

【背景】

世界平均地上気温は 1900 年以降上昇し続け、2020 年には約 1.0 ℃の上昇に達した。地球温暖化への影響度が最も大きいと言われている原因は、化石燃料の燃焼により発生する CO2 であり、温室効果ガス総排出量の 77 %を占めている。大気中 CO2 濃度は 1760 年代にイギリスで始まった産業革命以降上昇し続け、産業革命前の 280 ppm から 2010 年には 400 ppm と 40 %も上昇した。IPCC 第 5 次評価報告書（2014）によると、最悪シナリオでは 2100 年で 4.8 ℃上昇する可能性も指摘されている。地球温暖化は、海面の上昇から熱波、大雨やそれによる洪水、干ばつなどの気候変動を引き起こし、人類だけでなく地球上に住む動植物の生態系にも大きな被害を及ぼし、農作物の収穫量の減少や生物多様性の減少、永久凍土の融解、それらが引き金として発生する未知ウィルスの世界規模への蔓延など、経済活動にも多大な被害をもたらすことになる。

そのような背景の下、世界規模での CO2 を始めとした温室効果ガス（GHG）排出削減の動きが高まり、2016 年に発行した「パリ協定」のもと、各締約国は「低炭素化」の政策を強力に進めている。2019 年 6 月、経済産業省は内閣府や文部科学省、環境省の協力を得てカーボンリサイクル技術ロードマップを策定した。ロードマップに示されたカーボンリサイクルのターゲット分野は化学品や燃料、鉱物など多岐に渡るものであるが、液体燃料の一候補として微細藻類バイオ燃料が位置付けられている。微細藻類が着目された理由は、土地面積当たりの燃料収量が高等植物よりも高く、食糧と競合しない、植林伐採等の熱帯林の破壊を伴わない、などの従来のバイオマス材の課題を解決できる策としての高い期待と捉えている。また、バイオジェット燃料の原料としては藻油の他に廃食油、パーム系廃棄油、獣脂などの廃棄物系油脂が考えられる。廃棄物系油脂の全世界での賦存量は 2030 年時点で約 3,100-4,200 万トン/年で、2050 年時点で約 5 億 kL の供給が求められているバイオジェット燃料の需要に対しては不足している。そのため、微細藻類のように高効率で油脂原料を大量生産することのできる新規原料が必要となる。

このような背景のもと、株式会社ユーグレナ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）委託事業「バイオジェット燃料生産技術開発事業／実証微細藻類基盤技術開発」に採択され、バイオジェット燃料用途の微細藻類大量培養技術確立に向けた取組を本格始動した。本講演では NEDO 事業含め当社の過去の研究成果に加え、今後の計画、商業化実現の見込みについて経済性・環境性の両観点から紹介する。

【これまでの成果】

微細藻類のもつ増殖能力を最大限引き出すには、その微細藻類種にとって最適な環境下で培養することが重要である。単位面積当たりの微細藻類の生産性は光合成速度に律速されるため、日射量が高く、また水温は年中通して安定した水温となる気候が望ましい。Harmelon と Oonk は著書（Microalgae Biofixation Processes）のなかで微細藻類の培養に適した土地として年間平均気温 15 ℃以上を条件として北緯度 37° と南緯度 37° の間を提案しているが、より高い日射量、安定した水温を望むとなれば赤道付近の地域が候補として挙げられるだろう。

高日射・高水温での培養では、その環境での生育に適した性能を持つ微細藻類の獲得が必要である。当社はこれまで、従来の Euglena gracilis よりも高温耐性のある株を福島県内の湖沼より単離した。本高温耐性株は 32℃以上の水温でも増殖速度が低下しにくく、29℃前後の最適水温における平均増殖速度も従来株の約 1.5 倍であった。本高温耐性株の獲得により、赤道付近での安定培養に目途が立った。

同時に適地選定も進捗している。これまで、インドネシア、コロンビアの 2 か国で小規模培養槽を用いた現地培養試験を実施し、日本国内における年間平均増殖速度に比べて、海外の適地では約 1.4 倍高いと推定されることも明らかになってきた。

本講演では、微細藻類の探索の他、廃熱を用いた新規乾燥方法などの生産工程全般について説明するとともに、商業生産時のユーグレナバイオジェット燃料による GHG 排出削減における寄与についての考察を紹介する。

微細藻類から油脂を抽出した残渣は高タンパク質含有であり、魚粉代替原料として期待される。残渣に含まれるアミノ酸成分分析を行ったところ、魚粉と非常に近似した組成であることを把握している。さらに、当社が採用している抽出方法では、ほとんど中性脂質のみが微細藻類から抜き取られ、それ以外の極性脂質は残渣に保持されていることも示唆されている。養殖用飼料においては脂質も重要な材料であるため、飼料利用するに適した性状の残渣であると言える。

【展望】

本プロジェクトで研究開発に取り組む目的は、バイオジェット燃料の原料たる微細藻類の安定大量培養技術の確立であるため、製品の内容としてはバイオジェット燃料用の原料である微細藻類油が主製品であるが、水産養殖用の飼料原料も併産することが可能である点が特徴である。この背景には、世界の人口増と食用魚介類の需要増がある。食生活を支える食用魚介類の供給量は 1960 年から 2010 年の 50 年間で、27 万トンから 123 万トンと実に 4.5 倍もの増加を見せている。今後の地球規模での人口増加に伴って、食用魚介類は更なる需要増を見込む。しかしながら、1990 年以降、世界の天然の食用魚介類の漁獲量は約 90 万トン/年で横ばい傾向であり、漁獲量の限界を迎えていると言って差し支えない。従って、食用魚介類の需要増を満たすには養殖生産に依存することは明白である。ところが、養殖飼料の主要なタンパク源はカタクチイワシ（アンチョビ）から作られる魚粉であり、アンチョビ自体もその漁獲量には上限があるため、養殖生産量を増加させるには魚粉に替わる原料が必要である。このような背景から、副産物の養殖用飼料原料としての活用は社会的意義が大きいと考える。

以上のように、微細藻類の大量培養を基盤技術とし、バイオ燃料用油脂と飼料用タンパク質原料を併産する事業モデルの実証結果と将来展望について議論する予定である。

Key words Biofuels, mass production technologies, by-products, aquaculture

S2H1 (0703) カーボンニュートラル実現に向けた微細藻類産業利用の可能性

○発表者名　星野孝仁[1*]、黄湘婷[1]、青柳裕之[1]、青木慎一[1,2]、野村純平[1,2]、松崎巧実[1,2]、遠藤政城[1]、Jose Romel. F. Malapascua[1]
([1]株式会社ちとせ研究所、[2]一般社団法人 日本微細藻類技術協会)

MicroAlgae Towards Sustainable and Resilient Industry

○Takanori Hoshino[1*], Hsiang-Ting Huang[1], Hiroyuki Aoyagi[1], Shinichi Aoki[1,2], Junpei Nomura[1,2], Takumi Matsuzaki[1,2], Masaki Endo[1], Jose Romel. F. Malapascua[1]
([1]Chitose Laboratory Corp., [2]Institute of Microalgal Technology, Japan)
takanori.hoshino@chitose-bio.com

陸上植物の栽培と比較して、微細藻類の培養は、
- 有用バイオマスの生産性が高い、
- 必要とする淡水の量が少ない、および
- 農耕に適した土壌を必要としない、

等の大きな優位性が論じられている。そのため、微細藻類培養は、効率的な一次生産であるばかりでなく、既存の農業と競合することなく一次生産量を増加させる方法の一つとして、その応用が期待されている。特に戦後、人口増加に伴う食糧・エネルギー・環境問題等への有効な対処方法として、その産業利用が検討されてきた。結果、微細藻類が初めて商業利用されて以降、一部の用途において微細藻類を利用した事業が継続的に確立されてきた。しかし、主要穀物で見られる規模での微細藻類の生産・産業利用には至っていない。

微細藻類の産業利用が拡大しない理由として、
① 大規模生産の欠如
② 多様な用途の欠如
の 2 点が、その主たるものとして挙げられる。①や②の要因として、体系的な研究開発基盤や開発方針の欠如、特定の藻類種や培養方式の不適切な利用、未確立な産業構造やサプライチェーン、および①や②そのものが挙げられる。また、今日ほど、環境持続性の重要性が正しく認知されず、環境持続性の経済的価値が適切に評価されない社会情勢であったことも、①や②の要因として特記されるべきである。

以前にも増して環境持続性がより求められる昨今、こうした課題を克服し、微細藻類が有する効率的な一次生産能、環境持続性、産業利用への汎用性を正確に評価、認知した上で、その産業利用を促進することの意義は大きい。

本講演では、微細藻類の産業利用に関わる課題の解決へ向けた、MATSURI プロジェクトや NEDO プロジェクト、日本微細藻類技術協会等、ちとせグループが関わる活動を紹介する。

Key words　Microalgae, CO_2, Carbon Utilization, Biomass, Sustainability, Commercial Applications

S2H1 (0704) 炭素循環型微生物発酵プロセスの開発

○中島田 豊[1*]
([1]広島大院・統合生命科学)

Development of carbon recycled fermentation process

○Yutaka Nakashimada [1*]
([1] Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)
nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

現在、化学品の大半は石油由来の原料から製造されており、石油消費量の約 23%を原料として使用するなど化学産業は石油資源を消費し大量の CO_2 を排出している状況にある。このため、経済産業省は CO_2 排出量削減を目的として、2019 年 6 月にカーボンリサイクル技術ロードマップを示した。このロードマップでは、CO2 を原料として製造する化学品としてポリカーボネート等を 2030 年頃に、オレフィンや BTX 等の汎用品を 2050 年頃に普及する方向性を提示している。また、CO_2 変換に必要なエネルギーとして水素の低コスト製造技術も進められている。一方でバイオマスに固定された有機炭素の循環利用も、外部エネルギーに大きく依存しない自立的カーボンリサイクルプロセスであり大きな魅力を有する。このため、微生物発酵よる化成品原料の製造技術の開発も盛んに進められている。

微生物発酵法では、主にバイオマス由来の糖質が製造原料であるので、糖プラットフォームとも呼ばれる。エタノール、プロパノール、ブタノールなどの短鎖アルコール類を中心として様々な化成品原料の生産が可能である。また、酵素特異性が高いため、うまく設計するとほとんど副産物のない高選択性を有する生産株の育種も可能である。しかし、糖プラットフォームによる発酵生産にはいくつかの制限があり、よく知られるところでは、非可食セルロース系バイオマスを原料とする場合、微生物が発酵可能な糖へ変換する前処理が高コストであること、化石資源と比較して原料であるバイオマスの調達量が地域性に依存し、スケールメリットによるコスト低減が極めて難しいことがある。さらに、多くの化成品原料ではその生産物阻害により生産物濃度が低い。例えば遺伝子組換え大腸菌によるブタノール生産では最大生産物濃度は 2%にも満たない。このため建設および運転コスト双方とも増大する。

多種多様な有機廃棄物・資源を効率的に利用する別の方法として、有機物を水蒸気改質し CO、H_2、そして CO_2 の混合物である合成ガスを経由する手法がある。これは、合成ガスプラットフォームとも呼ばれる。合成ガスからの代表的な炭化水素製造法としてはフィッシャー・トロプシュ法（FT 法）がある。FT 法は軽油などの中長鎖炭化水素生産を得意としており石油代替燃料の製造法として優れている。しかし、炭素鎖長の制御が困難であり低炭素鎖炭化水素生産には向かない。また、合成ガス経由でメタノールを生産し、さらにオレフィン（主にエチレン、プロピレン）を合成する MTO（Methanol To Olefine）プロセスや MTP（Methanol To Propylene）プロセスが、低炭素鎖炭化水素生産技術としてその商業化が期待されているが、メタノール製造コスト、副生産物を排除するための精製コストにいまだ課題が残る。

以上のように、現状のカーボンリサイクル技術には一長一短があり、糖プラットフォームでの発酵生産は C2-C6 くらいの短い炭素鎖長を効率よく作ることは得意だが、低濃度、原料調達に制限が多く高コストである。一方、合成ガスプラットフォームでの化学プロセスは、長い炭素鎖長を作ることが得意だが、短い炭素鎖長のポリマー原料を高収率に作ることが不得意である。この課題を打破する革新的な間接カーボンリサイクル技術に求められる必要条件は、糖プラットフォームにおける目的物質の”高選択性”と、合成ガスプラットフォームにおける”高経済性”を兼ね備える可能性を有することである。

そこで我々は、*Moorella thermoacetica* を代表とする好熱性合成ガス発酵微生物に着目し、同様の研究開発を進めてきた。本菌は、糖の他に合成ガスや H2/CO2 を基質として増殖し、おもに酢酸を生産する。また 55～65℃で旺盛に成育するので、エタノールやプロパノールなど低沸点化合物生産では蒸留と発酵を一つにした蒸留発酵が可能である。発酵液を発酵槽外に移しての蒸留操作がなければ、水を含む培地供給はほぼ不要となるので、排水処理コストも大幅に低減できる可能性があり、中温菌と比較して、特に低沸点化合物生産には有意な点が多い。

これまでに我々は、*M. thermoacetica* ATCC39073 株を宿主とする、合成ガスおよび H_2/CO_2 からの有用物質発酵生産株の開発を進めてきた。その中核技術は独自開発した遺伝子組換え技術にある [1-2]。この独自開発した遺伝子組換え技術を活用し、これまでに糖からの乳酸 [3]、およびエタノール生産株 [4]の育種に成功した。しかし、育種株は H_2/CO_2 での増殖は見られなかった。ガス基質での物質生産の可能性を信じて検討を進めたところ、エタノール生産株の一つが合成ガスからエタノール発酵可能なことを見いだした [5]。この発見を糸口として、現在、好熱性微生物発酵の優位点を生かすことができる、C2、C3 化合物を主要ターゲットして研究を推進している。その中で、合成ガスから C3 化合物であるアセトン生産菌に成功した [6]。合成ガスからのアセトン発酵を組み込んだプロピレン製造プロセスは、化学合成プロセスと比較しても遜色無い運転コストであるという評価も得ており、今後、菌株の更なる高性能化を進める予定である。

さらに、発酵プロセス開発においても、実証ハードルの低い野生株のホモ酢酸菌を用いた、実際の発電所排ガス由来 CO_2 と水素を用いた酢酸発酵プロセスの開発を行っており、その概要も合わせて紹介したい。

引用文献
1) A. Kita, *et al.*, J. Biosci. Bioeng. 115, 347-352　(2013).
2) Y. Iwasaki, *et al.*, FEMS Microbiol. Lett. 343, 8-12　(2013).
3) Y. Iwasaki, *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 83, e00247-00217　(2017).
4) F. Rahayu, *et al.*, Bioresour. Technol. 245, 1393-1399　(2017).
5) K. Takemura, *et al.*, J. Biosci. Bioeng. (In press).
6) J. Kato, *et al.*, AMB Express. 11: 59, 1-11　(2021).

謝　辞
本発表で紹介する研究コンセプトおよび成果は、 JSPS 科学研究費補助金、JST A-STEP、JST CREST、JST 未来社会創造事業、NEDO 先導研究、NEDO カーボンリサイクル・次世代火力発電等技術開発／CO_2 有効利用拠点における技術開発／研究拠点における CO_2 有効利用技術開発・実証事業に基づくものである。

Key words　Carbon dioxide, Fermentation, Chemolithotroph, Synthetic gas

S2H1 (0705) 水素細菌とその利用

○西原宏史*
（茨城大農・食生科）

Aerobic hydrogen-oxidizing bacteria and utilization for carbon recycling

○Hirofumi Nishihara*
(Dept. Food and Life Sci., Coll. Agric., Ibaraki Univ.)
hirofumi.nishihara.agr@vc.ibaraki.ac.jp

好気性水素酸化細菌（水素細菌）は水素を好気的に酸化してエネルギーを獲得し、炭酸固定を行って増殖することができる化学合成独立栄養細菌である。優れた水素酸化能と炭酸固定能を有しており、60～70 分程度で細胞分裂するものも知られるなど、独立栄養生物として高い増殖力があることが特徴といえる。

水素細菌のエネルギー代謝に関与する水素酸化酵素ヒドロゲナーゼは、機能と局在性の相違により主に 2 つに分けられる。細胞膜に局在し、電子伝達系と共役して ATP 生成に関与する膜結合型ヒドロゲナーゼと、水素の酸化によりピリジン補酵素を還元できる可溶性ヒドロゲナーゼである。水素細菌のヒドロゲナーゼは、水素から生命反応に必要な ATP や還元力をつくりだす重要な酵素である。

硫酸還元菌やメタン生成菌のような嫌気的に水素を利用する細菌は、古代地球より存在したとされている。その後、地球に好気的な環境が形成され、ヒドロゲナーゼが酸素による酸化失活に対する耐性をもつことによって水素の好気的利用が可能になったと考えられる。現在、水素細菌は土壌環境、水環境、海洋環境、高熱環境など様々な環境から分離されており、特に有機物の乏しい環境では、従属栄養細菌よりも水素やイオウ化合物をエネルギー源とする化学合成独立栄養細菌が優占的に存在するとの報告もある。放線菌に見られるタイプのヒドロゲナーゼは、大気レベルの極めて微量な水素を利用できることが示されている（1）。このように水素細菌の分布は広く、地球上の炭酸固定に大きく貢献しているものと思われる。

ヒドロゲナーゼは水素を酸化して電子を引き抜く反応を行うため、白金触媒に替わる水素燃料電池触媒としての利用が期待される。また、電子の供給系、例えば光化学反応との組み合わせなどにより、プロトンの還元による水素の合成を行うことができる。ヒドロゲナーゼはこのように重要な可能性をもつ酵素として着目されるが、一般的に酸素のある環境では活性が失われることが実用における大きな障壁として認識されてきた。しかしながら水素細菌由来のヒドロゲナーゼは好気的な環境でも触媒機能を維持することができ、X 線結晶構造解析によってその酸素耐性メカニズムの構造的な基盤が明らかになってきた（2, 3）。このような情報は、ヒドロゲナーゼの安定化や本酵素の機能を模倣したミミックの開発に貢献すると考えられる。また、水素を還元力（NADH）に変換できる水素細菌に産業上有用な還元反応を行う酵素を導入することで、水素を副原料として反応が進行する微生物触媒をつくることができる（4）。水素の酸化によって付加価値の高い還元反応が継続するというシンプルでクリーンな反応である。このように、水素細菌の機能を活用して水素の生産と利用の促進に関わる技術開発を進めることは、低炭素社会の形成に貢献するものと考えられる。

水素細菌の高い増殖力は、CO_2 を原料とする有機資源の生産への利用が期待されてきた。水素による炭酸固定は、天候に左右されずに省スペースの培養タンクで対応できることも特徴といえる。CO_2 の削減と資源化の必要性が益々求められるにつれて、水素細菌の菌体蛋白質の利用や、エネルギー物質や化学品原料の生産を目的とした代謝改変に関する試みも高まりつつあるように思われる。

(1) Mukan J et al. Atmospheric trace gases support primary production in Antarctic desert surface soil. Nature, 552: 400-403 (2017)
(2) Shomura Y et al. Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. Nature, 479: 253-256 (2011)
(3) Fritisch J et al. The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. Nature, 479:249-252 (2011)
(4) Oda T et al. Hydrogen-driven asymmetric reduction of hydroxyacetone to (*R*)-1,2-propanediol by *Ralstonia eutropha* transformant expressing alcohol dehydrogenase from *Kluyveromyces lactis*. Microb. Cell Fact., 12: 2 (2013)

Key words hydrogen-oxidizing bacteria, hydrogen, carbon dioxide

S2H2 (0801) 生物資源データの活用の現状と展望

○仲嶋翼[1]*
（[1] 三菱 UFJ リサーチ&コンサルティング株式会社）

Current status and prospects of utilization of bioresource data

○Tsubasa Nakajima[1]*
([1]Mitsubishi UFJ Research and Consulting Co.,Ltd.)
tsubasa.nakajima@murc.jp

これまでの 10 年で合成生物学的アプローチを可能にする生物の設計，構築，分析技術が大きく進展し，それを活用したバイオプロダクション等の実用化が進められている．また，ゲノム以外のオミクス階層（トランスクリプトーム，プロテオーム，メタボローム等）の分析技術や解析ツールも高度化してきている．本発表では，このようななか，特に微生物資源についてその利用がどのように変わってきているのかを整理し，これからの生物資源の整備と活用の在り方について考えたい．

合成生物学の発展と生物資源の活用

合成生物学的アプローチでは，分子パーツや細胞全体の設計段階において，生物資源データを活用してソフトウェアツールにより設計が行われている．また，細胞の構築段階でも，目的の遺伝子の入手は菌株からのクローニングではなく，配列情報から人工合成する流れが強くなってきている．このように生物資源データを積極的に使用しながら設計，構築，試験，学習を行うサイクル（DBTL サイクル）を高速で試行するために，この数年でバイオファウンドリが各国で整備されている．2019 年には国際的なアライアンス Global Biofoundries Alliance も設立され，非商業的なバイオファウンドリの連携が推進されているところである．

合成生物学を利用した事業化の推進は，米国，英国を中心とするスタートアップ企業がけん引している．このような企業は短期間で莫大な資金を集め，DBTL サイクルの高速化を支えるインフラの拡充に向けて投資を進めてきた．特徴として，オートメーション化や機械学習を活用することで分子パーツの最適化に向けた探索・評価速度を向上させていることに加え，独自の生物資源データベースを持ちその探索空間を拡張していることが挙げられる．例えば，Zymergen 社は 2018 年に Radiant Genomics 社を買収して多様な遺伝資源を含む 2 TB 以上のライブラリを取り込んでおり，Ginkgo Bioworks 社は 2019 年に Warp Drive Bio 社から 135,000 株以上の細菌の情報を含むゲノムデータベースを取得したことが発表されている．

データリソースの発展

パブリックなデータリソースもこの 10 年でさらに発展している．昨今の技術進展による解析の低コスト化，ハイスループット化，高感度化等に伴い，生み出されるデータが量的・質的に大きく増えてきている．近年は新たな株のデータ拡充よりも情報の質的な充実化に重点をおいているデータリソースも見られる．

また，微生物等の収集・保管・利用促進を行うカルチャーコレクションもデジタルデータの整備を推進している．例えば，ドイツのカルチャーコレクション DSMZ が開発，運用する Bac*Dive* は，保有する菌株を含めた原核生物を対象として分類学，形態学，生理学，培養，分離源，利用用途，分子生物学的データ等の収録を進めており，いまも発展を続けている．欧州の Microbial Resource Research Infrastructure（MIRRI）プロジェクトでは，これまで欧州内に分散していた菌株，データ，関連サービスを統合し，ユーザーが各種コンテンツにワンストップでアクセスできるように整備を進めている．

バイオエコノミー政策における生物資源の位置づけ

持続可能な生産・消費様式への転換や気候変動対策の必要性の観点から，各国・地域レベルでバイオエコノミーの推進が図られており，この 10 年間で多くの国・地域が戦略や政策を発表してきた．各国は強みを持つ農業基盤や産業基盤，生態系等を活用した展望を描いているものの，主要国のバイオエコノミー戦略では，生物資源を積極的に産業競争力に変えていくという観点は明確に位置付けられていない．他方，我が国で策定されたバイオ戦略 2019/2020 では，バイオ生産システム領域において我が国の豊富な微生物資源・生物資源が強みであることが認識されており，施策として，国内での生物資源及びその情報の整備・拡充を行うことが位置付けられている．

今後の生物資源の整備と活用への期待

今後は生物資源のデジタル化が量的・質的に一層進むものと考えられる．我が国のバイオ戦略に位置づけられたように，国内の豊富な微生物資源を活用していくために，様々な機関が保有する生物資源へのアクセシビリティの向上と，ゲノム情報及びそれ以外のオミクス情報等の表現型情報の収録を進めていくことが重要と考えられる．その際，データは人の手によるマニュアルな探索だけでなく，機械による探索・活用を受けることを前提に FAIR 原則（Findable, Accessible, Interoperable, Reusable）に則った形で情報の整備を行うことが求められる．また，デジタルデータに独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）等が有する菌株コレクションが紐づけられることで，研究者はバーチャル上の試行とデータの元になった菌株を用いた実験を往復することができるようになり，細胞生理の解明や産業利用に向けて，我が国の強みが強化されると期待される．今後，リソースの整備の推進と併せ，その活用に向けた方法論の深化やベストプラクティスの共有が望まれる．

なお，生物資源のデジタル情報の整備・利用にあたっては，生物多様性条約におけるデジタル配列情報（Digital sequencing information）の扱いについての議論に注目する必要がある．合成生物学の時代においてはデジタル配列情報の利用が実質的に遺伝資源の利用にあたるとして，アフリカ地域よりその位置づけについて提案がなされ，現在検討が進められている．本動向も踏まえつつ，データリソースのオープン・クローズの範囲や利用条件の最適化を行い，我が国の豊富な生物資源が，産業化・研究の推進に向けてその価値を最大限発揮できるように環境整備が進められることが期待される．

Key words bioresources, database

S2H2 (0802) データ駆動型バイオロジーの実現に向けたメタボロミクス技術開発

○津川裕司[1,2,3,*]
([1]農工大院・工, [2]理研・生命医科学, [3]理研・環境資源)

Advance in metabolomics for data-driven biotechnology

○Hiroshi Tsugawa[1,2,3,*]
([1]TUAT, [2]RIKEN CSRS, [3]RIKEN IMS)
htsugawa@go.tuat.ac.jp

生命を司る生体分子を包括的に捉え、複雑な生命代謝システムの解明を目指すオミクス研究を今以上に躍進させるためには、新たな生体分子情報を合理的かつ効率的に抽出し、データの再利用価値を高め、真にデータ駆動型バイオロジーが推進可能な情報科学基盤の創出が必須である。しかしながら次世代シーケンサー（NGS）を用いたゲノム研究に比べ、質量分析を用いた代謝オミクス研究の情報科学は、上記目標に対して遅れているのが現状である。その主な理由として（1）対象分子が多様であるためデータの複雑度が極めて高く、異なる代謝オミクス計測（メタボロミクス・リピドミクス・プロテオミクス・リン酸化プロテオミクス）から得られるデータの特徴を十分に考慮した情報科学基盤が確立されていない、そして（2）特に低分子化合物の場合、質量データを化学構造情報へと変換するための体系化された方法論が無くアノテーション（データの注釈付け）が不完全であり、計測データの 20－60%からしか生体分子情報を抽出できていないことが挙げられる。

このような背景のものと、発表者はこれまでメタボロミクス・リピドミクスの情報科学に主眼を当てた研究を行ってきた。本発表では、質量分析データ駆動型の代謝研究を行う上で必要となる基盤技術に関して、次に示す 3 つの項目に分けて発表する。

（1）質量分析ビッグデータを効率的に解析するプラットホームの研究開発 [1,2]
（2）ゲノム情報では予測できない化合物構造を推定する方法論の開発 [3,4]
（3）得られる代謝情報を用いて生命システムを記述する方法論の開発および応用 [5]

質量分析ビッグデータを効率的に解析するプラットホームの研究開発

質量分析データ駆動型の代謝研究を始めるにあたり、質量分析データへの迅速アクセス、適切な波形処理、そして着目すべき代謝成分を効率よく探索する基盤（ワークベンチ）開発が必須である。発表者が開発してきたプログラムの中でも 2015 年に公開された MS-DIAL[1]は、ガスクロマトグラフィー質量分析（GC-MS）、液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）、data independent MS/MS acquisition（LC-DIA-MS）、イオンモビリティを搭載した液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-IM-MS/MS）といった様々なデータタイプについて、効率の良いオミクス分子探索環境を提供する。MS-DIAL は簡便性・利便性の高さから人気が高く、2021 年現在ではユーザー数は 6000 人を超える。本発表では特に、MS-DIAL 環境が手がける解析の中でも、近年最も着目されている脂質オミクスの事例を紹介する [2]。

ゲノム情報では予測できない化合物構造を推定する方法論の開発

低分子化合物構造はゲノムから予測できないため、標準品の利用が代謝物をアノテーションする上で必須である。一方、利用可能な標準品には限りがあるため、標準品に依存しないアノテーション方法の開発、およびその信頼性をどのように高めていくかが重要となる。このような背景のもと、スペクトル情報を利用することで効率的な組成式推定、部分構造推定、代謝物クラスの推定、そして化合物全体構造の推定問題に取り組んできたため、本発表にてその一部を紹介する [3,4]。

得られる代謝情報を用いて生命システムを記述する方法論の開発および応用

10 年前に比べると、質量分析データから得られる代謝物情報の網羅性は格段に上がり（従来のおよそ 10 倍）、たとえば脂質メタボローム（リピドーム）は 1 つの検体あたり 1000 を超える脂質分子情報が円滑に得られるようになってきた。しかしながら近年、このように膨大な分子情報からどのように着目代謝物を絞り込み、新たな分子機能やメカニズム探索を効率よく行うかという新たな課題が生まれてきた。また、タンデム質量分析（MS/MS）情報から表現できる代謝物構造の記述は不完全であり、たとえばグリセロール骨格の極性基としてホスファチジルコリン、sn1 位にパルミチン酸、そして sn2 位にアラキドン酸が結合した分子情報は原則、PC 16:0_20:4 のように表現される。これは、炭素数 16 個・二重結合数 0 をアシル鎖に持つものと、炭素数 20・二重結合 4 つをアシル鎖に持つ分子が「どこか」に結合していることを表している。そのため、このような抽象的な化合物表記に基づき代謝システムを表現するためには、それに特化した統計手法の開発やデータ解釈の方法論が必要となってくる。本発表では、特に脂質メタボローム解析に焦点を当て、発表者が実際に行っているデータ解釈法やその応用例について紹介する [5]。

質量分析データ駆動型バイオロジーの今後

質量分析データを解析する基盤は、5–10 年前に比べると格段に進歩しており、従来問題視されていたデータ解析工程におけるボトルネック（膨大な解析時間や主観的なデータ解釈など）は間違いなく解決されてきた。今後の更なる発展により、オミクス情報のデジタル化やオープンデータ化が進み、本格的なオミクス情報化社会が創出される可能性がある。このような情報化社会に対応するためにはオミクス解析のクラウドソーシングや、未知代謝物の探索手法、データマネージメントや統合方法の開発など、まだまだ整備されなければならない課題が多く存在する。このような課題に取り組むためには、日本における質量分析情報科学に対する教育体制の充実、さらには情報科学従事者の恒久的な雇用体制・拠点構築なども視野に入れた議論を積極的に交わしていく必要があると発表者は考えており、本発表が議論の発端になれば幸いである。

参考文献

1. Tsugawa, H. et al. *Nature Methods* **12**, 523–526, 2015
2. Tsugawa, H. et al. *Nature Biotechnology* **38**, 1159–1163, 2020
3. Tsugawa, H. et al. *Analytical Chemistry* **88**, 7946–7958, 2016
3. Tsugawa, H. et al. *Nature Methods* **16**, 295–298, 2019
4. Yasuda, S. et al. *iScience* **23**, 101841, 2020

Key words Metabolic analysis, metabolomics, computational science, mass spectrometry

S2H2 (0803) 腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来

○福田真嗣[1,2,3,4,*]
([1]慶大・先端生命研, [2]神奈川産技総研, [3]筑波大・医, [4]メタジェン)

Realization of stratified medicine and healthcare based on the gut environment

○Shinji Fukuda[1,2,3,4,*]
([1]IAB, Keio Univ., [2]KISTEC-KAST, [3]Univ. Tsukuba Sch. Med., [4]Metabologenomics)
sfukuda@sfc.keio.ac.jp

ヒトの腸内にはおよそ 1,000 種類で 38 兆個にもおよぶとされる腸内細菌が生息しており、これらの集団（腸内細菌叢と呼ぶ）は腸管細胞群と密接に相互作用することで、複雑な腸内微生物生態系、すなわち「腸内エコシステム」を形成している。腸内エコシステムはヒトの健康維持に重要であることが知られているが、そのバランスが崩れると大腸癌や炎症性腸疾患といった腸そのものの疾患に加えて、自己免疫疾患や代謝疾患、さらには精神疾患や脳疾患といった全身性疾患につながることも知られている。したがってその重要性から、腸内細菌叢は異種生物で構成されるわれわれの体内の「もう一つの臓器」とも捉えられるが、一方で個々の腸内細菌がどのように振る舞うことで腸内エコシステムの恒常性維持に寄与しているのか、すなわち宿主－腸内細菌叢間相互作用の分子機構の詳細は不明な点が多い。

われわれはこれまでに、腸内細菌叢の遺伝子情報と代謝物質情報を網羅的に解析し、時系列情報に基づいて数理科学的に統合解析するメタボロゲノミクスを独自に構築した [1]。本手法を適用することで、腸内細菌叢から産生される代謝物質である酢酸や酪酸などの短鎖脂肪酸が、腸管上皮層のバリア機能を向上することで感染症抑制に寄与することや、免疫系に作用して大腸炎抑制に寄与することを明らかにした [2, 3]。また特定の腸内細菌やその代謝物質が、乳幼児や成人の腸管感染症予防に寄与すること [4-7]や、腎疾患の増悪に繋がる尿毒症物質産生に関与すること [8-10]、大腸がんにおいて口腔内細菌の関与や二次胆汁酸産生がその増悪因子となり得ることを明らかにした [11, 12]。このように、メタボロゲノミクスアプローチを適用することで、腸内環境を介した全身性の恒常性維持には、腸内細菌叢から産生される代謝物質が重要であることを明らかにした。

一方、われわれの研究成果のみならず、国内外の研究者からも腸内細菌叢が疾患だけでなく脳機能や精神状態、ホルモンバランスなど、様々な生体機能に影響を与えることが続々と報告されている。人間はヒトの細胞と腸内細菌の細胞とで構成される Superorganism と考えられることから、疾患のみならずヒトの様々な生体機能にも腸内細菌叢が影響を与え得ると考えられる。そこでわれわれは、生理機能の中でも特に運動機能に焦点を当て、腸内細菌叢と持久力との関係について研究を行った。その結果、駅伝選手の腸内には主要な腸内細菌の一種である *Bacteroides uniformis* が同年代の健康成人に比べて有意に多いことを見出した [13]。また *B. uniformis* をマウスに 4 週間経口投与し強制水泳試験を実施したところ、その遊泳時間が 2 倍も増加することを明らかにした。そのメカニズムに迫るためメタボロゲノミクスによりアプローチしたところ、腸管内の短鎖脂肪酸の有意な増加や、肝臓における糖新生や β 酸化の亢進が認められたことから、腸内細菌叢由来短鎖脂肪酸により肝臓でのエネルギー代謝が亢進することが明らかとなった [13]。次に *B. uniformis* をヒト腸内で増加させる食品成分として α-シクロデキストリンを同定し、8 週間の摂食試験を実施したところ、対照群と比較して運動後の疲労感が有意に軽減することや、走行試験での有意な持久力向上効果があることが明らかとなった [13]。これらの結果から、腸内細菌叢由来短鎖脂肪酸が、マウスのみならずヒトにおいても持久力向上や疲労軽減に寄与することが明らかとなった。

これらの基礎研究成果から、腸内細菌叢由来代謝物質が生体恒常性維持に重要な役割を担うことが明らかとなったことから、本研究成果を社会実装する目的で、慶應義塾大学と東京工業大学とのジョイントベンチャーとして株式会社メタジェンを設立した。本講演では、腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアをキーワードに、科学的根拠に基づく食習慣の改善、適切なサプリメント開発や創薬など、腸内エコシステムの適切な制御による新たな健康維持、疾患予防・治療基盤技術の創出に向けたわれわれの取り組みについて紹介する。

参考文献

1. Ishii, C., *et al.* : Int J Mol Sci, 19: 4079, 2018
2. Furusawa, Y., *et al.* : Nature, 504: 446-450, 2013
3. Fukuda, S., *et al.* : Nature, 469: 543-547, 2011
4. Kim, Y.G., *et al.* : Science, 356: 312-315, 2017
5. Kitamoto, S., *et al.* : Nat Microbiol, 5: 116-125, 2020
6. Nagao-Kitamoto, H., *et al.* : Nat Med, 26: 608-617, 2020
7. Caballero-Flores, G., *et al.* : Cell Host & Microbe, 28: 526-533, 2020
8. Mishima, E., *et al.* : J Am Soc Nephrol, 26: 1787-1794, 2015
9. Mishima, E., *et al.* : Kidney Int, 92: 634-645, 2017
10. Kikuchi, K., *et al.* : Nat Commun, 10: 1835, 2019
11. Yachida, S., *et al.* : Nat Med, 25: 968-976, 2019
12. Erawijantari, P. P., *et al.* : Gut, 69: 1404-1415, 2020
13. Morita, H., *et al.* : bioRxiv, doi: https://doi.org/10.1101/2020.03.04.975730

Key words gut microbiota, metagenome, metabolome, stratified medicine and healthcare

S2H2 (0804) NITE が目指す微生物を基軸としたデータ利活用戦略

○市川夏子[1]*
([1]NITE-NBRC)

NITE's data utilization strategy based on microorganisms

○Natsuko Ichikawa[1]*
([1]NITE-NBRC)
ichikawa-natsuko@nite.go.jp

次世代シーケンサーの登場による 1 サンプルあたりの解析コストの低下を皮切りに、バイオテクノロジー分野ではゲノム解析などの様々なオミクス解析が手軽に行えるようになってきた。今日、バイオ系ではデータを取り扱わない研究はないと言って良いほど、我々の研究はゲノム解析をはじめとするデータの恩恵を受けている。我が国が目指すバイオエコノミー社会の実現のためには「デジタル化の進展をうけ、得られたデータを収集し協調的に利活用するプラットフォームの整備が必要である」と経済産業省でも打ち出している。NITE は、これまで微生物などの生物資源の収集と保存・提供を行ってきた機関であり、その提供件数は世界でも有数のものである。NITE でも世界的な動向をうけて、これからの時代は生物資源とデータの両方をユーザーである研究者・企業の方々に提供することが重要と考えている。そのため、NITE は生物資源とその関連データのデータベースである DBRP を開発し、2019 年から公開を行っている。(https://www.nite.go.jp/nbrc/dbrp/top)

では、実際に研究者や企業の方はどのように日常の研究においてデータを使っているだろうか。巨大サイトと化した NCBI の中で迷子になったり、日々膨れあがるデータに途方に暮れてはいないだろうか。NITE では、これまで生物資源を管理してきた土台を活かし、生モノである微生物を基盤に、関連する様々な解析「結果」とメタデータの整備を行うことで、手に入る微生物とデータ双方へのアクセスをしやすくし、企業・大学等の研究者のデータの利活用を支援し、既存のデータ活用による効率的な新規機能や、新規メカニズムの発見につなげるなど、バイオ産業の発展に寄与したいと考えている。

具体的には、NITE の保有する微生物の関連データの集約や公知のデータを収集することでつながるデータを増やし、データ閲覧機能の改善などでデータを見やすく提供する。また、国家プロジェクトやコンソーシアムとの連携によりデータの散逸を防ぎ、再利用を促進することを目指している。本講演では、生物資源保存機関である NITE のデータ化戦略とデータ収集の取組みやデータにアクセスしやすくする仕組みなどについて紹介する。

Key words database, microbe, genome

S2H2 (0901) サーキュラーバイオエコノミーにおける酵素学の重要性

五十嵐圭日子
(東大院農生科)

Importance of Enzymology in Circular Bioeconomy

Kiyohiko Igarashi
(Univ. Tokyo)
aquarius@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

2020 年 10 月、管首相は就任の挨拶で 2050 年にカーボンニュートラルを実現すると宣言した。さらに、本年 4 月には米国主催の「Leaders Summit on Climate（気候変動サミット）」に向けて温室効果ガス 46%削減を表明した。温室効果ガスの削減や脱炭素社会の構築に関しては、これまでも各省が戦略やガイドライン、ロードマップという形で様々な目標を提示してきたが、今回の動きが明らかに異なるのは、努力目標を超えて、国民であったり世界の国であったりとの「約束」として発信されたことである。最終的にうまくいかなくていいというスタンスであったこれまでの取り組み方を捨てて、全国民が 2030 年の中間評価に向けて確実に温暖化効果ガスを減らすために努力しなければならないということなのである。このような野心的な削減目標を達成するためには、そもそも既存の社会システム・経済システムを大きく変える必要があるが、我々科学者にはそのための具体的な手法を、なるべく迅速に産み出すことが要求されている。

このようなニーズは、実はこれまでも断続的にはあった。バイオエタノールが良い例で、古くは第二次世界大戦末期に、東南アジアからの資源の補給路を絶たれた日本は、国内で調達可能な様々なバイオマスからのエタノール生産を模索したが、実際の大量生産に入る前に終戦を迎えた。1980 年代にはオイルショックを受けてバイオエタノールは再燃するが、原油の価格降下とともに下火となった。今世紀に入ってからも石油価格の高騰によってまたしてもバイオエタノールは注目されるが、日本では東日本大震災でエネルギー施策の前提が完全に崩れてしまっている。このように我が国ではいつも「緊急事態への対応」として動いている感があるバイオエタノールであるが、戦時中に必要だった状態から大きな変革が起こっているのは、なんと言ってもバイオテクノロジーの分野である。オイルショック後のバイオエタノール生産では、酵素を用いた糖化は価格が高すぎて非現実的というのが結論であったが、今世紀に入るとむしろ酵素を使っていないバイオエタノール生産が（澱粉由来まで含めても）見当たらない。すなわち、前世紀は純粋な化学的手法だった部分が、どんどん生化学的なプロセスに置き換わって行っていると言える。

実はこの流れは至極当然のことで、活性化エネルギーをいじらずに化学反応を行っても、結局必要なエネルギー（これは酸やアルカリの強さも含めて）は変わらず、根本的な解決にはならない。演者が研究をしているセルロースを考えれば簡単で、セルロースをただ水の中にどれだけ長い時間浸けておいても、グルコース間を繋いでいるグルコシド結合は切れないし、硫酸で加水分解するときも少なくとも 3%程度の硫酸で 100℃を超えるような温度にしない限り分解はしない。一方で、セルラーゼを使えば、弱酸性下 40℃程度（ほぼ常温）で分解できる。そのような酵素による効率の良い分解を見ても、これまでは経済的な観点のみからその利用が進まなかったところに、SDGs や ESG という新しい軸が出てきて、結果的に経済性は数多くある指標の一つでしかなくなってきているというのが現状である。このように経済性だけでなく、生物圏への負荷や循環性などを考慮して全体最適解を得るというのが「サーキュラーバイオエコノミー」の本質である（1）ため、そこでのもの作りは化学反応に用いられるエネルギーを極小にすることが重要で、生体触媒としての酵素の利用、さらには酵素の反応系をミミックした化学反応場の構築などが不可欠なのである。

翻って我々は酵素反応の本質が理解できているのだろうか？様々な生き物の全ゲノム配列情報からアミノ酸配列情報を得て、宿主のコドンに合わせて DNA を合成することで、組換え酵素も容易に大量に確度高く得られるようになった。また、Alphabet 社（Google の親会社）傘下の DeepMind 社が発表した AlphaFold2 を使えば、かなりの精度で蛋白質の構造を推定することができる時代になった。一方で、酵素に関する論文をどれだけ読んでも、それらの巧みさには感心させられるものの、反応メカニズムはあくまで推測、それをトレースしたり論理的に向上させたりする事は遠い未来のように感じられる。演者もそのような「酵素の真髄」に迫ることができずに周りをぐるぐる回っている一人であるが、なぜぐるぐる回ることになってしまっているのかは、セルラーゼの基礎学からわかり始めている。

例えば、きのこが生産するセルラーゼの一つ *Pc*Cel45A の活性中心では、水に溶けたアミノ酸では考えられないイミド酸型のアスパラギンが働いていることが分かった（2）。そのようなアミノ酸の存在がこれまで注目されてこなかった大きな理由の一つに、X 線結晶構造解析で見えていない水素の挙動が挙げられる。しかも、演者らの研究からは、その見えない水素達は蛋白質の中を飛び回っていると考えられ、当然酵素の反応性に大きな影響を与えていることが分かってきている。また、ここ 10 年ほど演者らが取り組んでいるセルラーゼの単分子動態解析結果（3,4）も、期待される活性が生化学的な反応で得られないことから、いかにして分子レベルの情報と実際の反応を繋げるかということが問われている。我々は、一分子実験から得られたセルラーゼのパラメータを与えた粒子をシミュレータにかけて、メゾスコピック領域の新しい酵素学を構築することに成功した（5）。演者は、このような全く新しい酵素学がサーキュラーバイオエコノミーの実現のために重要であると考えており、最近の研究例を紹介できたらと考えている。

参考文献
1. 五十嵐圭日子　バイオサイエンスとインダストリー　75 巻 4 号 344-348 頁
2. Nakamura, A., et al., *Science Adv.* 1: e1500263 (2015)
3. Igarashi, K., et al., ***J. Biol. Chem.*** 284:36186-36190 (2009)
4. Igarashi, K., Uchihashi, T., et al., ***Science*** 333: 1279-1282 (2011)
5. Ezaki, T., et al., ***Phys. Rev. Lett.*** 122, 9, 5 p., 098102 (2019)

Key words Circular Bioeconomy, Cellulase, Cellulose, Biomass

S2H2 (0902) 沖縄から世界に向けたバイオエコノミー産業の創出を目指して

○清水雅士[1]*
([1]マイクロバイオファクトリー株式会社, Curelabo 株式会社)

Creation of a Bioeconomy Industry from Okinawa to the World

○Masashi Shimizu[1]*
([1]Micro Bio Factory Co., Ltd. , Curelabo Co., Ltd.)
shimizu@microbiofactory.com

沖縄県の主要農作物であるさとうきびは世界で年間 18 億トン栽培される世界最大の農作物である. ブラジルや東南アジア, アフリカなど世界中で栽培されている. 製糖時に発生するバガスや糖蜜は安価に入手できるバイオマス資源となっている. 当社はこれらバイオマス資源をアップサイクルし, 繊維や染料, バイオコンポジット, バイオ炭など様々な製品開発を行う. さとうきびバイオマス資源を活用し, 沖縄から世界に向けてバイオエコノミー産業を創出する.

バガスは乾燥して粉末状に加工した後, マニラ麻と結合してバガス含有和紙を作る. 製造した和紙は, スリット加工を施し, 撚糸して和紙糸にする. 和紙糸は衣服の繊維に利用する. また, バガスと樹脂を混合したバイオコンポジットの開発に取り組んでいる. 糖蜜は微生物発酵の原料に利用する. 合成バイオ技術を活用して, アパレル産業で最大の需要があるインジゴ染料を糖蜜から製造する技術開発に取り組んでいる. インジゴ染料はジーンズの染料として広く利用され, ”ジャパンブルー”とも呼ばれる. インジゴ染料は, 植物の藍から製造されたものが利用されるのがかつては一般的であったが, 19 世紀末に化学合成法が開発されてからは石油由来の化学合成インジゴが幅広く流通している. 化学合成インジゴは石油由来のアニリンから製造されるが, 米国環境保護庁による毒性評価で B2(動物での十分な証拠に基づいて, おそらくヒト発がん性物質)に分類される))に分類され, アニリンを使用しないインジゴの代替製法が求められている. 当社は, 糖蜜から微生物発酵によりアニリンを使用せずにインジゴを製造する技術開発を実施している.

本シンポジウムではさとうきびのバガスや糖蜜資源を使った当社の素材開発の取り組みと沖縄から世界に向けたバイオエコノミー産業の創出の可能性について紹介したい.

Key words bioeconomy, biomass, upcycle

S2H2 (0903) クリエイティブコミュニティの中で生まれるバイオテクノロジーの新たな視点と発展

○石塚千晃（元株式会社ロフトワーク / BioClub ディレクター）

The future of biotechnology diversity in the creative community

○Chiaki Ishizuka(Former Loftwork Inc. / Director of BioClub)
boruneoboy@gmail.com

筆者は 2016 年 12 月から 2019 年まで BioClub のディレクターを務め、場の運営、イベントの企画・運用、コミュニティの形成に関わった。その経験から、バイオの専門領域外で育つバイオへの新たな視点や展望が生まれる場についてご紹介したいと思います。BioClub は、生物学や生命科学ー”バイオ”をキーワードに、様々な研究者、クリエイター、企業、市民が集うコミュニティとして 2016 年に株式会社 Loftwork を母体としてアーティストユニットの福原志帆とゲオアグ・トレメルを中心に設立。Loftwork が運営するコミュニティスペース「MTRL Tokyo」内にある一定の条件を満たせば専門外の方でも使用可能なバイオラボを運営する傍ら、産学問わず、ミートアップイベントやワークショップ、プロジェクト活動を行っています。これまでに、毎週火曜日の定例のメンバー同士が集まるコミュニティイベントをレギュラーイベントとして、東京大学や他バイオ系企業などと年間 60 本程度の一般向けイベントを開催。日本では一般市民のバイオテクノロジーへのリテラシーが低い中で、クリエイティブで発信力のある人々とバイテクノロジーの活用を多様な視点から模索することで、「バイオテクノロジーは自分たちも関心を持つに値する」と思ってもらうことを目標に、企画やプロジェクトを運営していました。また、企業のクリエイティブの発注に対して、芸術家やクリエイターとともに生物学の知見を活用したプロダクトやグラフィックなどの開発を行い、海外のクリエイティブアワードで受賞を受けるなど、従来の専門領域内では見られない活用の仕方が評価を受けてきました。また、海外のバイオとクリエイティブを繋ぐ機関（WAAG Society など）やコミュニティスペースとの連携拠点としての機能も果たしていたと言えます。

そもそも取り扱いが難しいバイオテクノロジーを扱うことを主軸として、BioClub が私企業とアーティストというメンバーを発端にどのような運営体制をとり、制約の多いバイオラボを一般の人々に貸し出す仕組み、プロジェクトの企画の作り方についてなどを交え、様々なステークホルダーが絡み合うコミュニティの作り方、運用について事例を交えてお話しできればと思います。

Key words creative community

S2H2 (0904) 味噌用乳酸菌の工業的培養と「信州味噌」ブランド

○石川諭史*
（信州味噌研究所）

The establishment of the method for the industrial mass production of Halophilic *Tetragenococcus* culture and development Brand of Shinshu Miso

○Satoshi Ishikawa*
(THE SHINSHU-MISO RESEARCH INSTITUTE)
ishikawasatosi@gmail.com

味噌は開放環境下で醸造されるため、意図的、偶発的に関わらず多数の微生物が関与し、いわゆる「蔵癖」が味噌の多様性を生む背景となっており、味噌は非常に地域色の強い食品である。一方で、味噌の醸造に利用される微生物には大別して麹菌、耐塩性酵母、耐塩性乳酸菌がある。麹菌は大豆、米、麦などの原料成分を分解する各種の酵素を生産し、耐塩性酵母や耐塩性乳酸菌は熟成中にアルコールや乳酸を生成して、味噌らしい色調や香味を形成する。

味噌に関わりの深い耐塩性乳酸菌には *Tetragenococcus halophilus* がある。小規模の試験仕込みの規模では、耐塩性乳酸菌を味噌発酵のスターターとして使用すると、麹臭等の原料臭の除去、味噌の塩馴れ、味の締まり等の効果が出る事が知られていた。

耐塩性乳酸菌を、工業的規模で使用する事は一般的でなかったが、1959 年に設立された信州味噌研究所では、1963 年に工業的規模の味噌用乳酸菌の培養生産体制を確立し、長野県内の味噌メーカーへの共同配布事業を開始した。（味噌用酵母は 1968 年から配布開始）こうして、味噌用微生物を「自然に入ってくるのを待つ」時代から、「積極的に利用する」時代へ変化していった。

「信州味噌」は長野県で醸造、生産される味噌の総称であり、信州味噌研究所の設立母体である長野県味噌工業協同組合が管理する団体商標（1955 年に登録認可）になっている。信州味噌の特徴の一つとして「色が淡く、ほのかな酸味」がある。

当初は、味噌の香味の改善を目的として、耐塩性乳酸菌を使用していたが、信州味噌研究所では、その効果に加え、信州味噌の特徴をより際立たせる菌株の分離選抜や育種を行い、現在では、熟成中の味噌の着色抑制能が高く、乳酸と酢酸の生成比（L/A 比）が高い性質を持つ菌株の実用化に至っている。

味噌用乳酸菌を発酵スターターとして供給するためには、できるだけ多くの菌数を得る事と、かつ培養ロット毎の菌数が一定範囲内になるよう、品質の安定化が重要である。

味噌用乳酸菌は生育至適温度が約 30℃、至適ｐＨが 7.0 付近である。酸性環境に弱く、ｐH5.0 以下になると死滅が始まるので、培養装置にはｐＨ自動調整機能が必須である。

味噌用乳酸菌の使用に当たっては、味噌の仕込時の品温および熟成温度、塩分、水分、対水食塩濃度｛100×塩分/（塩分＋水分）｝、初発菌数、味噌用酵母との菌数比の考慮が必要である。この設定が適正でないと、乳酸菌が有効に機能しない、もしくは、乳酸発酵が過剰になるといった事が起こりやすい。

信州味噌研究所では、これまでの業界内の蓄積知見も踏まえて、味噌用乳酸菌と味噌熟成の関係を模索した。その結果、熟成温度が約 30℃、対水食塩濃度が 20～22%、乳酸菌の初発菌数は味噌 1ｇ当たり 10 の 6 乗台、酵母は 10 の 5 乗台として、乳酸菌と酵母の比を 10:1 という条件にすると、味噌の風味にとって望ましいことが分かった。但し、各味噌メーカーで使用する際には、蔵癖や熟成条件、経過などによって若干の差があり、最終的には各メーカーによる「どうすれば自社の風味となるか」もしくは「どのような特徴の味噌を目指すのか」といった品質設計と、試験仕込みを繰り返す必要があった。このようにスターター用微生物の工業生産の為には、味噌メーカーへの技術指導、支援がセットであった。

更に、共同培養事業においては、微生物由来の風味の品質について、各味噌メーカーが足並みを揃える必要であり、長野県内の味噌メーカーでは「信州味噌」の共通の特徴を共有し、共同培養、配布事業を、現在で 50 年以上継続してきた。

このような信州味噌の醸し出す風味もあって、戦後から信州味噌の全国シェアに占める割合は増え続け、2020 年現在では 50%を越えようとしており、（2020 年度味噌出荷量（長野県 199,707 トン、全国 388,218 トン、出典　全味工連集計）今日までに「信州味噌」ブランドは日本国内で確固たる地位を築いている。

当研究所は、今年で設立 62 年を迎える。現状としては、個々のメーカー規模の構造的変化や、人口減や食生活の変化に伴う味噌需要の長期的な減少、嗜好の変化などにより、これまでの共通菌株による大量生産方式では、メーカーや消費者のニーズに合わなくなってきている。

今後は、味噌の市場をより一層海外に求めていくことや、微生物の共同培養事業について、個々の味噌メーカーの特徴、蔵癖にあったオーダーメイド式の多菌株少量生産方式への取組みや移行が課題である。長野県内においても各味噌メーカーの特徴を差別化し、そのメーカーならではの風味を強調していくことが、今後、各味噌メーカーが生き残っていく道と考えられる。これによって「信州味噌」ブランドは、グローバル化を考慮しながら、よりローカル性の特徴を強調できる、正に「グローカル」のブランドとして成長させることができるものと考える。

Key words　lactic acid fermentation, mass culture, miso fermentation, mass production,

S2H3 (1001) 擬天然ペプチド薬剤を創る再構成型人工生合成システム

○後藤 佑樹[1]*
（[1]東京大学大学院理学系研究科化学専攻）

In vitro reconstituted biosynthesis systems for pseudo-natural peptide ligands

○Yuki Goto[1]*
([1]Department of Chemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo)
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。これら特殊な骨格は、ペプチダーゼによる分解への耐性や標的分子への結合、また細胞膜の透過性に大きく寄与しており、当該天然物の強い生物活性に重要な役割を果たしている。長い進化の過程を経て生み出されたこれら特殊骨格は、強い生物活性を示すペプチド性天然物における特徴的かつ重要な局所骨格モチーフと言えよう。

天然物に広く見られるこれらの骨格を、de novo のペプチド薬剤の構成要素として活用できないだろうか？我々はこの発想のもと、天然物の局所骨格を持ちつつ全体構造は全く新規な人工分子『擬天然物ペプチド』の創製戦略を展開している。本講演では、DNA 鎖を加えてインキュベーションするだけで、天然物ライクな人工ペプチドを簡単に合成できる試験管内人工生合成システムの一例について紹介する。さらに、この人工生合成システムを活用した擬天然物ペプチドライブラリーの構築および生物活性擬天然物の創製例についても報告する。

Key words　bioactive peptides, natural products, in vitro reconstitution, pseudo-natural peptides

S2H3 (1002) 細胞が針状ケイ酸体を運び繋ぎ足す新たな動物の骨格建築工法

○船山典子[1]*,
（[1]京大　理　生物物理）

Conceptually new mechanisms of morphogenesis; cells carry, cement, and connect fine spicules to build up the skeleton of sponges

○Noriko Funayama[1]*
([1]Kyoto Univ. School of Science, Dept of Biophysics)
funayama@mdb.biophys.kyoto-u.ac.jp

カイメン動物は、非常に多種多様な種特異的な形態を持つ。私達はこの多様な形態を生み出す仕組みには、既知の形態形成機構とは根本的に異なる機構があるのではないか、と考え独自に研究を進めてきた。

発生生物学における**これまでの動物の形作り機構**は、細胞が並んだ上皮組織が折りたたまれる、細胞が上皮組織から離れて移動する、集合し結合し直すといった、「**細胞＝形をつくる要素**」形作り機構である。これに対し、私達はカイメン動物の骨格形成機構の解析から、根本的に異なる「**細胞＝作業員、形をつくる要素＝非細胞性構造物**」という、**新規コンセプトの形態形成機構**を見出している。今回はこの機構の概要を紹介し、工学的な視点からの議論などをいただければ幸いである。

＜カイメンの骨片骨格＞

動物の外形を決定するのは、骨格である。だからこそ恐竜の化石から、恐竜の外形を予測できる訳である。カイメンの骨格は、直径 4-10 ㎛、長さ 150-300 ㎛程のガラス質（含水性ケイ酸体を主成分とする）の微細な構造物（骨片）が非常に多数、柱と梁状に結合し形成されている。カイメンの身体は、テントがポールで中から支えられ形づくられているように、身体を覆う上皮組織が骨格を形成する骨片で支えられ、形づくられている。

＜形を作る要素：骨片の形成＞

ガラス質の骨片は、骨片形成細胞の細胞内で形成される。小胞の中にタンパク質の繊維が形成され両端方向に伸長しながら、主に含水性ケイ酸体のナノ粒子が層状に沈着し骨片が形成され、最終的には細胞外へ骨片はエクソサイトーシスにより細胞外へ放出される。

＜骨片骨格形成機構＞

では、どの様な仕組みで骨片は建てられ、繋げられるのだろうか？　骨格を全く持たない状態からの骨格形成過程を解析出来ること、形成する骨片が 1 種類であるという利点から、私達は淡水棲のカワカイメンという種の持つ無性生殖系、数千個の幹細胞集団からの個体形成過程を用いている（図 1）。生きたカイメン幼弱個体内で、骨片骨格が形成される過程の詳細なライブイメージング、カイメン側面からの撮影や遺伝子発現とライブイメージングの組み合わせなどの工夫を行い、これまでに、カイメン骨片骨格形成機構は以下の各段階を担当する細胞による一連の細胞作用（ステップ）の繰り返しによる、**自律分散システム**であることが明らかにしてきた。

＜骨片骨格形成機構のステップ＞

「「**1．骨片運搬**」骨片に結合し、上皮組織の上を効率良く移動する特殊な細胞集団（Transport cells と命名）が存在し運搬するという予想外の発見が研究の足がかりになった。重要なのは、運搬方向はランダムであることである。即ち、建てる予定の場というプレパタニングはなく、従って特定の場への骨片の運搬の誘引というメカニズムはない。「**2．骨片が上皮組織に刺さる**」Transport cells が骨片を運搬し続ける結果、身体の端などで骨片が体内空間を覆う上皮組織に刺さり、骨片の長さの半分ほどが上皮組織から身体の外に突き出る。「**3．先端が上がる**」ゆっくりと骨片の角度が変化し、先端が持ち上がる。「**4．建てられる・繋げられる**」骨片の基底側端付近の基底上皮細胞がコラーゲンを発現、骨片がコラーゲンマトリクスにより固定される、又は、建てられた骨片など骨格を形成する骨片の先に、新たな骨片が繋げられる。即ち、「**上皮組織上のランダムな方向への骨片運搬**」と「**上皮組織の形状により骨片がたまたま刺さると開始される一連のステップ**」により、骨片が 1 本建てられる、または繋げられる。この一連のステップの繰り返しにより、骨格が自己組織化し拡張するという機構である。

骨片骨格形成機構の利点

では何故、パタニングではなく自律分散システムが用いられているのだろうか。カイメン動物は固着性であり、動物でありながら植物の様に、種特異的な形態をもちながらも個体バリエーションが大きい、**柔軟な形作りが可能**である。例えば岩など固着した物の形も違うだろうし、バイオフィルムなど微小環境も異なる筈だ。この様にどの様に成長するか予測出来ず、刻々と形が変わる可塑的成長では、プレパタニングで骨片を建てる位置を制御する戦略は適さない。体内空間を覆う上皮組織上でストカステックに骨片を運搬し、身体の端、上皮組織を支える骨片の先端付近など、上皮組織の形が大きく変化し、骨片が刺さりやすい場でたまたま骨片が刺さると、その後の一連の細胞作用で骨片が骨格に加えられるこの仕組みは、**3 次元的な身体の端近くに骨片を骨格に加え**、その時その時の**成長に合わせ、自然に骨格を拡張し身体を形作ることを可能**にする、優れた機構と分かってきた。

細胞の個々のルールに従った挙動（作業）が上皮組織により上手く繋げられた自律分散システムによる骨組み建築は、地球外や深海など**事前の予測が完璧には出来ないような場**で、その場に合わせた**建物の骨組みを自己建築するロボットに応用できる可能性もあるのではないか**とも考え研究を進めている。

Key words　Morphogenesis, skeleton construction, Autonomous decentralized system

参考文献

Nakayama et al., Current Biology (2015) 25: 2549-2554　doi: 10.1016/j.cub.2015.08.023
Kishimoto et al. Dev. Growth Differ. 61: 485-500 doi:10.1111/dgd.12636
Funayama N.　Current Opinion in Genetics and Development 57: 91-97　doi:10.1016/j.gde.2019.08.001
秋山正和　船山典子　数理科学（サイエンス社）2021 年 9 月号
カイメンの形づくりとその数理的アプローチに関して

S2H3 (1003) 心臓と筋肉の収縮機構の違いを紐解く

○茅　元司[1]*, 樋口　秀男[1]
（[1]東京大学　大学院理学系研究科　物理学専攻）

Unraveling the differences in the contraction mechanisms between the heart and muscles

○Motoshi Kaya[1]*, Hideo Higuchi[1]
([1]Graduate School of Science, University of Tokyo)
kaya@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

心臓や骨格筋の収縮を担うタンパク質である心筋ミオシンと骨格筋ミオシンのアミノ酸組成は 8-9 割同一である．更に，遅筋ミオシンと心筋ミオシンの重鎖の遺伝子は同一である．こうした高いアミノ酸の相同性から，分子レベルにおける力発生メカニズムは心筋と骨格筋ミオシンではほぼ同じであると想像されてきた．しかし，心臓と骨格筋といった臓器レベルにおける収縮を考えると，それぞれの収縮形態はかなり違う．心臓，特に左心室の収縮では，収縮期に大きく一定の血液を拍出したのち，一気に血圧を低下させる弛緩をすることで，次の収縮に向けてなるべく多くの血液の流入を促す．従って，安定した高い収縮と迅速な弛緩を周期的に繰り返すことが心臓機能として重要である．一方，骨格筋においては，運動の強度や速さに応じて臨機応変に収縮力や収縮速度を変調させることのできる収縮能力が求められる．従って，こうした臓器レベルでの収縮能の違いが，分子レベルでの機能に由来するのか検証する必要がある．そこで本研究では，心筋ミオシンと骨格筋ミオシン 1 分子の特性，多分子が集合したフィラメントにおける特性を光ピンセットを用いて評価し，組織レベルでの収縮機能にどのように寄与しているのか考察した．

心筋ミオシンは豚心臓の左心室から，骨格筋ミオシンはウサギの腸腰筋（主に速筋）から精製した．1 分子計測実験では，心筋ミオシン，骨格筋ミオシン 1 分子を各々単離し，アクチン 1 本と相互作用させた状態で，アクチンの端に結合させたビーズを光ピンセットで補足し，引っ張ることで各分子に負荷を与えた．この負荷環境下における各ミオシン分子の構造変化をビーズの変位から評価した．その結果，骨格筋ミオシンは収縮力を出す構造変化であるパワーストロークを主に起こすのに対し，心筋ミオシンはパワーストロークだけでなく，その逆向きの構造変化であるリバーススストロークも高頻度に起こすことが判明した．次に，ミオシン多分子が集合したミオシンフィラメントが発生する力を光ピンセットを用いて計測した結果，心筋ミオシンは骨格筋ミオシンと同程度の分子数で構成されたフィラメントにおいて，骨格筋ミオシンの 2 倍程度大きな力を出すことが判明した．こうした 1 分子特性，多分子フィラメントにおける特性の違いを総合的に理解するため，シミュレーションモデルを構築した．シミュレーションモデルの解析から，心筋ミオシンは頻繁にリバーススストロークを発生させることで，ATP 加水分解サイクルの進行を送らせてアクチン線維により長時間結合し，その結果，アクチンに相互作用する分子数を増やすことで，より大きな力を出せることが判明した．一方，骨格筋ミオシンにおいては，パワーストロークを優先的に起こすことで，収縮方向への速度を上げてパワー（力×速度）出力の向上を優先させていることが判明した．さらに，心臓や骨格筋のサルコメア構造内における力発生を理解するシミュレーションモデルによって，心筋ミオシンに特徴的であったリバーススストローク特性を有することで，左心室の血圧変化のカーブに見られた安定した高い収縮力とその後に続く，迅速な弛緩を実現させている可能性が判明した．

以上の結果から，心筋ミオシンと骨格筋ミオシンの 1 分子特性には大きな違いがあり，心筋ミオシンではリバーススストロークを高頻度に発生させることで，心臓機能において重要な安定した血液の拍出，またその後に続く迅速な血圧低下を実現していると考えられる．一方，骨格筋ミオシンでは，パワーストロークを優先させることで収縮速度を上げ，その結果，骨格筋の高パワー出力を実現していると考えられる．アミノ酸組成が極めて似通った心筋ミオシンと骨格筋ミオシンではあるが，それぞれの分子特性の違いが組織レベルでの収縮能に強く結び付いているのは興味深い．

Key words　muscle, heart , skeletal myosin, cardiac myosin

S2H3 (1004) 細胞内温度イメージングによる細胞内伝熱工学

○岡部弘基[1,2*], 實田雅治[1], 船津高志[1]
([1]東京大学大学院薬学系研究科, [2]JST さきがけ)

Heat transfer in living cell reveled by intracellular temperature imaging

○Kohki OKabe[1,2*], Masaharu Takarada[1], Takashi Funatsu[1]
([1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, [2]PRESTO, JST)
okabe@mol.f.u-tokyo.ac.jp

温度は、分子の存在状態と活性を規定する最も基本的な物理量であり、温度の生命への関与は古くからの生物学の中心的命題である。環境の極端な温度変動は生命にとって脅威となる危険因子であり、生命は進化の過程で常に変動する過酷な環境温度に適応すべく複雑なシステムを作り上げたと考えられる。一方で、生理活動は幾万もの化学反応、とりわけ異化反応により成立するため、生命活動は大きな産熱を伴う。言うまでもなく、限られたエネルギーを効率的に利用することは生存にとって必須であり、熱は生命にとって効率的に利用すべきエネルギー源でもある。実際、後述するように種々の生物学的階層において熱を利用した現象が発見されつつある。このように、生命は熱に対して、回避と活用の一見相反する応答システムを備えていると考えられるが、その仕組みは完全に不明である。

生命における熱を理解するにあたり、我々は生命を構成する最小単位である細胞内の温度に着目した。細胞内部はあらゆる空間が高度に区画化された複雑な構造をとっており、細胞内で生体分子は不均一に分布している。この各ナノスペースにおける温度変動は生体分子の状態や動態に大きな影響を与えることにより、各々の生体分子間の相互作用を制御している可能性がある。しかし、サーモグラフィーや熱電対といった古典的な温度計測法で細胞内局所温度の計測はできないため、近年まで細胞内の温度に関する情報はほぼ皆無であった。我々は細胞内の温度を計測するため、高感度な蛍光性ポリマー温度センサー（Fluorescent polymeric thermometer, FPT）と高感度かつ高い定量性を備えた蛍光イメージング技術を用いて、単一細胞内の温度測定や生細胞内における温度分布のイメージングを報告した。この細胞内温度計測法により、単一生細胞内部の温度は 1°C 程度の温度変化を示しうること、また細胞内部には核やミトコンドリアといった細胞小器官に関連した不均一な温度分布が存在することを発見した。この結果は実際に細胞内の局所温度と細胞機能に関連があることを示しており、にわかに細胞内温度計測への注目と生物学的新機軸への期待を集める契機となった。実際、近年生細胞への応用を目的にした温度測定プローブの開発が爆発的に進められている

これまでに我々が発見した細胞内における 1−2 K 程度の温度変動は、続いて開発された異なる原理に基づいた細胞内温度計測法によりほぼ同じ温度変化として報告され、細胞内温度変化の妥当性を裏付けている。しかし、この細胞内温度変化を熱の移動としてとらえると大きな謎がある。つまり、単一細胞での発熱量を点熱源とし、細胞内を水と仮定した際の細胞サイズの空間での定常状態での熱拡散方程式から単純に計算される温度変動は実際に計測された温度変化より著しく小さい。この定量的見積もりの乖離は、細胞内の熱移動に関する仮定（細胞内熱環境を均一な水と仮定した事）に決定的な誤りがあることを示唆している。このことから、細胞内熱移動は均一水溶液と本質的に異なる特殊な性質を有することが示唆されている。

そこで、我々は細胞内局所での熱移動を実験的に検証するため、赤外（IR）レーザー照射による定量的かつ一過的な局所領域（1 μm）の加熱法を導入した。この人工熱源により細胞内局所ないし細胞と同程度のサイズのリポソーム内を一過的に加熱し（ΔT = 1.5 K 程度）、その後の熱緩和を詳細に記録した。この結果、生細胞内の熱源の広がりや熱緩和の時定数は水を内包するリポソームと比較して、はるかに抑制されている（遅い）ことを発見した。この結果は、生細胞内における熱移動がリポソームのような均一な水溶液とは異なることを示唆している。単なる高濃度タンパク質溶液では細胞内特異的な異常熱移動が生じないため、この現象は細胞内に形成されたユニークな環境に由来すると考えられる。

Key words Cell, Fluorescent thermometer, Intracellular temperature, Thermal biology

S2H3 (1005) 植物免疫の時空間理解に向けた 1 細胞操作系の確立

○別役重之*
（龍谷大学・農）

Optimization of single-cell gene expression system for spatiotemporal understanding of plant immunity

○Shigeyuki Betsuyaku*
(Fac. Agr., Ryukoku Univ.)
betsu@agr.ryukoku.ac.jp

多細胞生物では、発生や恒常性維持など多くの事象が個体・組織中の細胞間相互作用によって適切に制御されている。このような生命のしくみを、応用利用可能な形で正しく理解するためには細胞間相互作用のメカニズムに関する研究が欠かせない。

各細胞が固い細胞壁で囲まれ、動物のように組織中を容易に移動出来ない植物組織においては様々な形での細胞間相互作用による個体・組織の制御の鍵であると考えられ、形態形成のみならず免疫などにおいても細胞間相互作用の重要性が示唆されている。著者グループでも、植物細胞が病原体由来分子を認識することで誘導される植物免疫 Effector-Triggered Immunity（ETI）において、プログラム細胞死を起こす病原体認識細胞の周囲に、異なる防御応答シグナル系を活性化させた植物細胞が同心円的に生じることを見出している。このような細胞間相互作用を実験的に解析・理解するには、従来から行われてきた遺伝学・生化学的摂動を加えた状態での詳細な組織観察に加え、細胞レベルで“操作”するような実験系が望まれる。上記 ETI の空間的制御機構の解析の場合では、実際には病原体由来の様々な分子の影響もあるため、一細胞という最小単位で擬似的に病原体認識を誘導し、最小単位での ETI を“再構成”して、さまざまな摂動実験と空間パターンの観測を行う実験系の構築が非常に有用であると想定された。

動物多細胞組織では、近年急速に発展してきた光遺伝学などにより一細胞レベルで様々な細胞活性を操作することが可能であるが、それらの多くは動物細胞が持たない植物の光受容体を応用したものであり、植物多細胞組織での利用はそもそも困難である。薬剤誘導性プロモーターを用いた誘導系も、薬剤の局所投与技術の精度に依存してしまい、局所的な操作には”光”技術の有用性が高い。そこで、植物細胞間相互作用解析のための実験系として、顕微鏡視野下で利用可能な IR-LEGO（Infrared laser-evoked gene operator）による IR レーザー局所的照射系と、ヒートショックプロモーターを組み合わせた一細胞レベルの遺伝子発現制御系を用いる実験系を構築した。

モデル植物シロイヌナズナ植物で広範に用いられている *HSP18.2* プロモーター（pHSP18.2）と Cre-lox 組換え系を用い、熱誘導特異的に植物病原細菌由来分子 AvrRpt2 を発現する植物を構築したところ、多くが矮性個体となり健全な形質転換個体がほとんど得られなかった。その理由としては、pHSP18.2 が平常時にも維管束と呼ばれる通道組織周辺で活性を持っていたため、それら部位で AvrRpt2 が発現してしまい、プログラム細胞死を起こしてしまっていたためと想定された。これまで行われてきたような pHSP18.2 を用いた各種熱誘導実験では、本系のような細胞死を伴うものではなかったため、pHSP18.2 のこのような特性は問題にされてこなかったと考えられた。そこで、より厳密な発現制御を目指し、平常時に活性を示さない pHSP18.2ver2.0 を新たに選定し、薬剤制御型 Cre を発現する植物を構築した。本系を用いて、平常時には全く目的遺伝子を発現せず、薬剤存在下でのみ IR レーザー照射細胞特異的に一細胞レベルで目的遺伝子発現を誘導できる系の構築に成功した。著者グループでは本技術を用いて、一細胞レベルで上記 AvrRpt2 を誘導し、最小サイズの ETI を“再構成”することで空間的な植物免疫制御機構の理解を目指している。この最小 ETI 再構成によって、通常の病原細菌感染実験では不可能な、ETI 発動による細胞間相互作用を介した空間的な防御応答制御機構の解明につながることが期待される。このように、本技術は、免疫のみならず、植物の様々な細胞間相互作用の研究に広範に用いられる可能性を秘めており、その詳細に関して紹介したい。

Key words *Arabidopsis thaliana*, cell-cell interactions

S2H3 (1006)

ウイルス 1 粒子計測によるウイルス集団の heterogeneity

○田端和仁 [1]*
（[1] 東京大学大学院工学系研究科）

Heterogeneity of viral populations by single-particle measurements

○Kazuhito V. Tabata[1]*
([1]Grad. Sch. Eng., Univ. of Tokyo)
連絡先の E-mail **アドレス** <ktabata@smb.t.u-tokyo.ac.jp>

インフルエンザは、毎年流行しその関連死まで含めると、世界で数十万から百万人の死者が発生している。そのため、世界的にインフルエンザに対する対策が検討されているが、効果的な対策法は確立されていない。その原因の一つとして、インフルエンザの診断方法が挙げられる。一般的な診断方法はイムノクロマト法によるウイルスの検出であるが、発熱後 24 時間程度経過しないと正確な診断ができないと言う問題がある。また、現在市販されている抗インフルエンザ薬は発熱後 48 時間以内に投与する必要がある。イムノクロマト法では発熱後 24 時間経過しないと正確な診断ができないため、投薬できる期間は 24 時間しか残らない。そこで、私たちはイムノクロマト法に変わる簡便さで、高感度なウイルス検出法としてデジタルインフルエンザ検出法の開発を実施した[1]。

本法の原理は、2005 年に報告した微小な容器に酵素 1 分子を閉じ込めてその活性を蛍光検出する方法と同じである[2]。すなわち、インフルエンザウイルスと蛍光性基質を微小容器に閉じ込め、インフルエンザウイルスが持つノイラミニダーゼ活性を利用して検出している。微小容器を観察したところ、蛍光を発するチャンバーが確認された。また、ウイルスの濃度依存的に蛍光を発する容器の数が変化し、ノイラミニダーゼの阻害剤であるオセルタミビルを加えたところ蛍光は見られなくなった。このことから、観察されている蛍光はインフルエンザウイルス由来であることがわかる。また、蛍光を発しない容器と蛍光を発する容器が同時に観察されることから、蛍光を発している容器にはウイルス 1 粒子が閉じ込められていることが強く示唆される。このことから、インフルエンザウイルスのデジタル検出が可能であることがわかった。次に、既知のウイルス濃度のサンプル連続希釈して、検出限界の決定を試みた。すると、この実験においては 10^3PFU/ml であることがわかった。これは、既存のイムノクロマト法による検出限界より 10,000 倍高感度であり RT-PCR 法と同程度の検出感度である。また、検出までの時間も検討をしたところ、検出だけであれば 5 分以下で検出できることもわかった。これらのことから、既存法を遙かに上回るウイルス検出法になり得ることがわかった。さらに、スマートフォンをベースとした検出装置も開発したので、併せて報告したい。

一方このデジタルインフルエンザアッセイは、ウイルス 1 粒子のノイラミニダーゼ活性をモニターしているため、粒子間の違いを調べることが出来る。そこで、この活性を個々の粒子ごとに調べると、粒子間でノイラミニダーゼ活性に違いがあり、分布を形成していることがわかった。さらには、ノイラミニダーゼ阻害薬である Oseltamivir を加えてその阻害活性を調べたところ、一般的な計測法で得られる IC_{50} とほぼ同等（2nM）程度の値となった。これはデジタルアッセイを用いて個々の粒子を計測しても集団全体を計測した値と遜色ないことがわかる。しかし、デジタルアッセイでは個々の粒子を観察しているため、集団内のレアなイベントの検出が可能となる。

そこで、バルクアッセイにおいてノイラミニダーゼ活性が見られなくなる Oseltamivir 濃度（500nM）でデジタルアッセイを行った。すると、毎回数個の蛍光を発するチャンバーが確認され、ウイルス集団内に Oseltamivir に対して耐性を持つ粒子が混在している可能性を得た。このような集団の不均一性に関する可能性が示唆されたため、さらに詳細に調べるための実験系の開発も実施した。これは、デジタルアッセイにおけるチャンバー内の溶液を連続的に変化させ、同じ分子に対して複数の条件でデジタルアッセイを実施出来るシステムになっている。この実験系を用いてインフルエンザウイルス 1 粒子の Oseltamivir に対する IC_{50} を決定したところ、こちらも集団内での IC_{50} の分布が確認された。また、本実験系を用いると同じウイルス粒子に対して異なる阻害剤の効果を調べることが出来るため、Oseltamivir に対する IC_{50} を決定したあと同一ウイルス粒子に対して Zanamivir の IC_{50} も決定し、その相関を調べた。両者とも集団内での分布が見られたが、それらに相関はなく、ノイラミニダーゼ内部の結合部分が異なるというこれら薬剤の違いを示す結果となった。現在では、ノイラミニダーゼ活性というウイルス粒子の表現形のみならず、ウイルス 1 粒子由来の RNA ゲノム配列を決定し、集団内におけるその遺伝形の比較を行う実験も検討している。本発表では、デジタルインフルエンザアッセイを中心としたウイルス 1 粒子を対象とした研究成果に関して報告する。

Key words Digital assay, Influenza, virus particle, single molecule, heterogeneity

S2H3 (1101)

宮崎大学焼酎「薫陶」に至る長い道のり

○清 啓自, 榊原 陽一, 水光 正仁
（宮崎大・農）

The endeavor for developing original shochu of University of Miyazaki "Kunto".

○Keiji Kiyoshi*, Yoichi Sakakibara, Masahito Suiko
(Fac. Agric., Univ. Miyazaki)
kiyoshi.keiji.p8@cc.miyazaki-u.ac.jp

宮崎県は焼酎の国内主要産地であり、芋焼酎の生産は県内の重要産業となっていることからも、宮崎大学ブランドの芋焼酎の開発は弊学の長年の夢であった。宮崎大学ブランドのオリジナル芋焼酎「薫陶」は、その名称に「香をたいて香りを染み込ませ、土をこねて形を整えながら陶器を作り上げる」との意味を含み、「人徳・品位などで人を感化し、良い方向に導き教育する」という弊学の考えを示したものとなっている。本報告ではこの「薫陶」開発までの弊学における取り組みや、その醸造物の解析等について紹介する。

2016 年度に宮崎大学ブランドの一つとして、オリジナル芋焼酎の開発を目的とした宮崎大学焼酎プロジェクトを立ち上げ、翌年度より実際に開発・製造へと移行した。本プロジェクトは大学ブランドの開発であることから、可能な限り大学の有志による実施体制で執り行った。まず、原料の甘藷コガネンセンガンの栽培は、学内農場において植え付けから収穫までを一貫して行った。また、製品の顔となるパッケージの化粧箱やボトル、製品名称など総合的なプロデュースにおいても学内教員の協力の下行った。一方、製造においては酒類製造免許が必要であることから、製品の醸造においては県内の焼酎メーカー渡邊酒造場に委託することで、遂に製品化へと至った。

「薫陶」は純粋培養した醸造酵母の添加を行わず、いわゆる蔵付きや原料等に由来する酵母を用いた醸造を行っている。醸造中のもろみから酵母を単離し、単離株のレトロトランスポゾン Ty1 の PCR フラグメント形成パターンにより、もろみにおける酵母叢の変遷を解析した。想定した様に「薫陶」のもろみには複数種の酵母が存在し、また醸造したもろみの年度によって主要菌株は異なっていた。また、「薫陶」は熟成や割水によりまろやかな仕上がりにするより、あえて鮮烈な荒々しさを楽しめる原酒を製品としている。その最終製品をアルコール 20%に調整し味覚センサーにより機械的に解析したところ、一般に流通している芋焼酎とは一線を画した、個性が際立つ味であることが確認できている。これらの解析から、醸造した年度により酵母叢や風味が異なることから、年度での違いを楽しめるワインにおけるヴィンテージに似たプレミア感を付けることが可能では無いかと画策している。

学内での甘藷生産量が限られているため、「薫陶」自体の生産量も小規模であることから、現時点においては一般販売は行っていない。地域や OB・OG の方々に「薫陶」が認知され、毎年の楽しみとなり得れば、大学の新たな収入源として活躍してくれるのではないかと密かな期待を抱いている。

Key words shochu, fermentation, yeast

S2H3 (1102) 佐賀大学オリジナル清酒「悠々知酔」に関わる微生物開発について

○馬場嵩一朗[1], 澤田和敬[2], 永野幸生[1,3], 折田亮[4], 木村圭[1,4], 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]佐賀大・分析セ, [4]佐賀大・農)

Development of microorganisms involved with Saga University's original sake "Yuyuchishui"

○Shuichiro Baba[1], Kazutaka Sawada[2], Yukio Nagano[1,3], Ryo Orita[4], Kei Kimura[1,4], Goto Masatoshi[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.)
gentak@cc.saga-u.ac.jp

『悠々知酔（ゆうゆうちすい）』とは、地域貢献事業の一環として、佐賀大学と佐賀県内の酒造メーカーが連携して造り上げる大学オリジナル清酒のことである。2006年に窓の梅酒造株式会社に協力を仰ぎ始まった当事業は、以降複数年ごとに協力先の酒造メーカーを変えながら、本年度の造りで16年目を迎えることとなる。原料米には佐賀大学農学部付属アグリ創生教育研究センターで栽培した食用米を、酵母には当研究室で分離・育種改良した清酒酵母を使用している。2010年からは学生が酒造会社を訪ね、実際に清酒醸造に携わるようになり、近年は酒質や企画を考え、酒造会社と共に悠々知酔を造り上げ、さらには商品の販売まで行うスタイルへと変化を遂げてきた。大学で栽培した米を使い、大学で分離・育種した醸造微生物を使い、学生が製造・販売に携わることが当事業の最大の特徴であり、Labにおける基礎研究と清酒製造という実学との接点を学生自らが経験することが最大の目的のひとつである。

＜醸造微生物の分離・育種改良＞

当事業はヒノヒカリを原料米とし、以前に当研究室で分離された清酒酵母Y52株を用いてスタートした。同じ品種の原料米や同じ清酒酵母株を使用しても原料米の精米歩合、仕込配合や酒母の製造方法を変えるなどして毎年異なる酒質を生み出すこと、複数年ごとに協力先の酒造会社を変えることにより、酒造会社の個性を酒質に反映させることに面白みを持ち、悠々知酔の製造を続けてきた。しかしながら、近年の多種多様な酒質のニーズに対応するには、単一の米品種、単一の清酒酵母株のみの製造では限界がある。このような背景から当研究室では醸造微生物の開発に重きを置き、主に清酒酵母や乳酸菌の分離・育種改良を研究の一環として行ってきた。

① 清酒酵母Y52株の泡なし変異株の分離

清酒酵母Y52株は泡あり酵母であるため、細胞表層のAwa1タンパク質の存在により、高泡の形成が生じる。泡あり酵母を用いた製造は、高泡の形成を見越して、仕込み容量を制限し、健全な発酵を促すために櫂入れの頻度を高める必要がある。このような背景から、高泡形成を生じない泡なし酵母は製造現場では好まれる傾向にある。

我々は清酒酵母Y52株から自然突然変異により泡なし変異株Y5201株の分離することに成功した。2017年度からはこのY5201株を用いて悠々知酔を製造している。

② 有明海からの清酒酵母の分離と育種改良によるリンゴ酸高生産株の取得

悠々知酔の官能的多様性を広げるためには、清酒酵母Y52株やY5201株とは異なる性質を有する清酒酵母株の取得は有望な方法の一つである。佐賀県は有明海に面しており、ノリ養殖業・漁業等の点で非常に恩恵を受けている。地域的な特性も重要視される清酒醸造において、有明海をルーツに持つ清酒酵母はブランディングの点で意義があると考える。このような背景から、我々は有明海から清酒酵母の分離を試みた。

有明海干潟の泥を分離源とし、麹エキスによる集積培養、ITS領域のColony PCR、エタノール産生試験、塩基配列解析により5株の*Saccharomyces cerevisiae*を分離した。小仕込試験の結果、分離株5株は約15%アルコールを生産した。これら5株のうち最もエタノール生産能が高かったH3-1株をこのH3-1株を親株とし、爽やかな酸味を呈するリンゴ酸高生産酵母の育種改良を行った。変異剤エチルメタンスルホン酸により、突然変異を誘発させた。6000株からコハク酸ジメチルに対して感受性を示した236株の中から、発酵試験、小仕込試験により親株H3-1株の約5.6倍のリンゴ酸を生産するDMSS233株の取得に成功した。2019年度からリンゴ酸高生産株による悠々知酔の製造を実施し、酸味を中心とした酒質の多様性を広げることに成功した。

さらに、比較ゲノム解析により、DMSS233株のゲノム中に、13のナンセンス変異、2つのフレームシフト変異、325のミスセンス変異が導入された遺伝子を同定した。

③ 生酛からの乳酸菌の分離と製造への応用

伝統的な酒母である生酛は、蔵付きの乳酸菌を自然に増殖させ乳酸を生産させる製造方法である。酸味と深みのある生酛特有の味わいを醸すことができる一方、現在主流の醸造用乳酸を添加する速醸酛と比較すると、酒母の製造にかなりの時間と労力を費やす。そこで我々は、生酛の味わいを求めつつ、酒母製造期間の短縮を目指すために、生酛から２種の乳酸菌（球菌 *Leuconostoc mesenteroides* 桿菌 *Lactobacillus sakei*）を分離し、分離した乳酸菌を添加する酒母製法で悠々知酔の製造も行っている。

＜今後の展望＞

以上が、当研究室の研究成果を悠々知酔の実製造へと応用した例である。現在は香気成分高生産株の育種に取り組んでおり、実製造利用を目指している。また、将来的には麹菌の開発、原料米の育種改良なども視野に入れている。

佐賀大学および佐賀県、佐賀県内の酒造会社と共に、研究成果を清酒として表現していきたいと考える。

Key words Breeding, Brewing microorganisms, Development, Isolation, Sake, Sake brewing,

S2H3 (1103) 山梨大学が取り組むワイン科学教育

○乙黒美彩
（山梨大・ワイン科学研究センター）

Efforts in wine science and education at University of Yamanashi

○Misa Otoguro*
(Inst. Enol. Vitic., Univ. Yamanashi)
motoguro@yamanashi.ac.jp

本シンポジウムでは我が国のワイン産業の概況を紹介するとともに、山梨大学が長年取り組んできたワイン科学教育の実践とワイン科学研究の一部を紹介しワイン業界をはじめとした発酵醸造産業界へどのような人材を輩出していくのかを考えてみたいと思う。

山梨大学ワイン科学研究センターについて

山梨大学ワイン科学研究センターは1947年に山梨大学工学部の前身であるの山梨工業専門学校に附属発酵研究所として設置され、発酵化学研究施設に改称されたのち、時代のニーズとともに、ワイン科学研究センターへと発展的に改組された。現在では山梨大学大学院総合研究部附属の研究センターとして学部教育、大学院教育、社会人教育を担っている。当センターは現在、発酵微生物工学研究部門、機能成分学研究部門、果実遺伝子工学研究部門の3つの研究部門とエクステンション部門の計4つの部門から構成されている。

「ワイン科学特別コース」と「ワインフロンティア養成プログラム」

2012年山梨県内で初となる農学系学部の生命環境学部新設に伴い、それまで工学部生命工学科内に設置されていた「ワイン科学特別教育プログラム」を見直し、生命環境学部地域食物科学科内に「ワイン科学特別コース」を設置し継続し、合わせて修士課程として「食物・ワイン科学コース」を新設し、学部・修士課程の一貫したワイン科学教育に取り組んでいる。

一方、社会人に対するリカレント教育としては2006年に科学技術振興調整費＜地域再生人材創出拠点の形成＞に採択され、山梨県ワイン酒造組合や山梨県と連携しワイナリーに勤務する技術者と修士課程の学生を対象とした「ワイン人材生涯養成拠点」事業をスタートさせた。この事業はさらに2016年から「ワインフロンティリーダー養成プログラム」へと進化し国産ワインの品質向上、地域ブランド化、グローバルスタンダート化を中核となり推進できるリーダーを養成する目的で、現在も継続して社会人の再教育と修士課程学生への実践的な教育を実施している。本プログラムのカリキュラムはワイン醸造学、ブドウ栽培学、ワイン評価学といった理系学問のみならず、酒税法などに関するワイナリー経営学、ワインに関する法規を学ぶワイン法律学や国際的なマーケティングを学ぶ国際ワイン学、エチケットのデザインやブランディングに関するデザイン学、サービスを学ぶソムリエ学など多岐にわたっている。講師は当センターの教員や、世界的に著名なソムリエ、ボルドー大学などからも参画している。これらのプログラムを修了した受講生には教育の質保証として、筆記・実技による資格試験を行い，合格した社会人技術者には「ワイン科学士」を、修士の学生には「ワイン準科学士」の称号を与えている。現在までにワイン科学士105名、ワイン準科学士46名が誕生しており，日本のワイン産業を技術的に牽引している。

ワイン科学研究センターにおける教育研究

センターの3つの研究部門では地域食物科学科の4年生を受け入れ、ワイン科学をテーマとした卒論研究を行っている。また、成長著しい「日本ワイン」をさらに世界レベルに発展させるため、学内や学外からの大学院生も積極的に受け入れワイン科学に関する高度な修論研究、博士論文研究を通じ、ワイン産業をはじめとした多くの発酵産業に人材を輩出している。演者が所属する発酵微生物工学研究部門では地元甲府市と連携し武田信玄が祀られていることで有名な甲府市北部にある武田神社のお堀から酵母を分離し、各種ワイン醸造特性試験を実施して甲州ワインおよびマスカット・ベーリーA ワインに最適な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をそれぞれ選抜した。甲府開府500年を記念してこれらの酵母と甲府市産のブドウを用いて醸造したオール甲府市産のスパークリングワイン開発秘話を紹介する。

Key words wine, wine science, sparkling wine

S2H3 (1104) タテ・ヨコ・ナナメのつながり「10」～鹿児島大学の取り組み～

○吉﨑由美子[1]*
([1]鹿児島大学農学部附属焼酎・発酵学教育研究センター)

Vertical, horizontal, and oblique connections "10" ~Attempt of Kagoshima University

○Yumiko Yoshizaki[1]*
([1]Education and Research Center of Fermentation Studies, Kagoshima University)
k7814020@kadai.jp

【はじめに】

鹿児島大学農学部附属焼酎・発酵学教育研究センターは，平成 18 年にスタートした寄附講座「焼酎学講座」を前身として平成 23 年に設立された．令和 3 年 3 月に卒業・修了した 13 期生を含め，延べ 201 名の学生を輩出してきた．平成 30 年 3 月に 10 期生が卒業するタイミングで，同窓会が中心となり，これまでの研究をつめこんだ芋焼酎「北辰蔵だより『10』」を限定醸造した．卒業生と在校生，教員が「タテ・ヨコ・ナナメ」となり，関係性を強化できた取り組みを紹介する．

【附属焼酎・発酵学教育研究センターとは】

附属焼酎・発酵学教育研究センターは，鹿児島大学農学部の附属施設である．センターに所属する専任教員 5 名に加えて，農学部食料生命科学科応用微生物学研究室の教員 2 名の計 7 名が農学部食料生命科学科の焼酎発酵・微生物科学コースを担い，学生 (1 学年定員約 15 名) に焼酎を始めとした発酵食品および産業利用されている微生物について体系的なカリキュラムを提供している．焼酎メーカーにて 2 泊 3 日で焼酎造りを体験する宿泊実習やサツマイモの栽培および官能評価（きき酒）を学ぶ発酵食品製造実習などの製造に関する実習に加えて，農学部として少し変わった科目として実践経営論やビジュアルデザイン演習などにより，財務諸表の見方やラベルデザインなどを学ぶ講義も実施している．

これまでに焼酎発酵・微生物科学コース（前身の焼酎学コース含）より 29 名が焼酎メーカーに，6 名が発酵食品関連企業に就職している．また大学院では修士課程および博士課程を有し，10 名が焼酎メーカーに就職している．それだけではなく，社会人学生 10 名の中には，焼酎メーカー代表や後継ぎ 6 名や種麹メーカーの社員 1 名など，現場からリカレントを目的として入学し，修了した学生もいる．また他大学からの 3 年次編入や大学院進学などによる学生，留学生の受け入れ人数も多く，幅広い年齢，経験および知識を有する学生が所属していることも我々のコース（以後，焼酎学）の特徴とも言える．

大学は専門の教育カリキュラムを提供することが役目であるが，輩出した人材に卒業後に活躍してもらうことは焼酎学設立時からの大きな目標である．そのためには卒業生同士の助け合いが欠かせないと考え，卒業後は，同窓会という形で 2 年に一度は在校生を含めた交流を続けている（現在はコロナ禍につき実施できていない）．また焼酎業界は非常に仲が良く，鹿児島県工業技術センターが事務局を務める鹿児島県本格焼酎技術研究会において焼酎学の卒業生は顔を合わせることが多く，交流を深めている．

【タテ・ヨコ・ナナメのつながりで実現した特別醸造】

平成 29 年時に「今年の 4 年生は 10 期生であり，この春に焼酎学として節目を迎える」ということに気がついた．当時の在校生から，記念イベントとして「特別醸造」をしてみてはどうかという提案があった．すぐに同窓会に相談すると，酒造メーカーに勤める卒業生を中心に各期から代表 1 名が参加する形で記念イベントを実施する集まりができた（焼酎学講座 10 期到達記念イベント実行委員会）．

大学では，焼酎の酒質向上や新技術となるべき製造技術の開発や微生物の基礎知見の深化を目指し，10 期生まで研究を先輩から後輩へと渡してきた．自分の代では形にならなかった研究も，それが礎となりバトンを受け取った後輩が進めることで，学会発表や論文として報告することができている．「(1～10 期を) つなぐ」をコンセプトとして，これまでの研究を盛り込んだ形とすることがすぐに決定した．実際に応用できる研究成果から，麹に関する 2 課題，酵母に関する 1 課題，サツマイモに関する 1 課題，発酵に関する 1 課題の合計 5 つの研究課題を盛り込むことにした．この 5 つの研究は 1 期から 10 期まで 16 名の卒業・修了生が携わってきたものである．研究に直接携わっていない卒業生においても，ゼミなどで同期が報告をしていた“あの研究”が焼酎になることで，鹿児島大学や焼酎学と気持ちを「つなぐ」ものになることを期待した．

特別醸造の資金は，卒業生・在校生・教員を中心に寄附を依頼し，83 名の出資により準備した．製造は，社会人学生として大学院を修了した 1 期生の蔵元に 3,000 本の限定醸造を依頼した．焼酎を製造する時には，教員が現場に赴き，技術的サポートを行うことで新たな技術を実施した．卒業生と在校生は，要所要所で蔵元に出向き，仕込みの手伝いをすることで直接焼酎製造に関わった．

名称は実行委員会で出したいくつかの案から，卒業生の投票で「北辰蔵だより『10』」に決定した．ボトルラベルは，8 期生の小島舞さんがデザインをし，研究のつながりを感じさせる青海波柄と焼酎のお湯割りに欠かせない黒千代香のシルエットが施された素敵なデザインとなった．これは，大学で学んだビジュアルデザイン演習の成果であると考えている．10 期が卒業式を迎えた平成 30 年 3 月 23 日の翌日 (24 日) に焼酎のお披露目会を開催した．焼酎学の立ち上げをご支援いただいた鹿児島県酒造組合，鹿児島県全焼酎メーカーにも声をかけ，69 名の参加者の元，「北辰蔵だより『10』」をお披露目することができた．このイベントを通じて，卒業生の活躍を肌で感じることができ，在校生の良い刺激となった．

【さいごに】

焼酎の出来上がりは，どんなものになるかと心配したが，学生時代の皆の真剣な思いが詰まった“芋の香り豊かな芳醇な香味”の芋焼酎となった．大学ができることは教育の提供と研究の継続に留まるが，この 10 年の継続の力と卒業生の能力が合わさることでより大きな力を発揮できることを実感した．

Key words Shochu, connection, research results, graduate

S2H3 (1105) 東北大学オリジナル日本酒「萩丸」の製品コンセプトと現状

○五味 勝也
（東北大院農）

Tohoku University original sake "Hagimaru": Product concept and current situation

○Katsuya Gomi
(Grad Sch Agric Sci, Tohoku University)
katsuya.gomi.a6@tohoku.ac.jp

現在多くの大学で日本酒や焼酎、ワインなど、その大学の特徴を生かしたお酒が企画され販売されている。本講演では、東北大学農学部の関係者が関わったこだわりの日本酒である「萩丸」について、最初の企画にまつわる逸話や製造コンセプト、ならびに実際の製造と販売の現状を紹介することとしたい。

1. 大学の日本酒製造企画の端緒

東北大学オリジナル日本酒の製造企画が持ち上がったのは 2004 年 7 月のことである。東北大学の農学部では毎年 3 年生が鳴子温泉の近くにある農学部附属農場で農場実習を行うのだが、この年に演者の所属するコースの農場実習があり、その最終日に実習に参加した学生とコースの教員が世話になった農場の教員にお礼を兼ねて懇親会を行った席で、当時の農場長の教授から農場では宮城県で育種した酒造好適米の「蔵の華」を栽培しており、かなりの収量を上げているとの話があった。その話を聞いて演者は農場で栽培収穫した「蔵の華」を酒米に用いて東北大学の日本酒を造ったらどうかと思いつき農場長に提案したところ、彼も以前から大学の酒があればと思っていたとのことで、酒が入っていたこともあり二人とも意気軒昂になってすぐに実行に移そうということになったのが端緒であった。実は、演者が農場長の話を聞いて大学の酒を造ろうと思いついたのには伏線があった。その 4 年前に海外における AO 入試の実態調査でイギリス、フランス、スウェーデン、ドイツの 4 ヶ国の視察の際に、学術協定校のパリ第 6 大学のランチ時に大学の赤ワインを出していただいたのだが、東北大の参加者一同その赤ワインの味に加えて大学のワインというアイディアにも感心し、「東北大にも大学の酒があれば」→「日本の酒と言えば日本酒」→「日本酒と言えば醸造研究所出身のあなたでしょう」ということで、演者に東北大の日本酒を企画して欲しいという話になった。どのようなプロセスで実現したら良いのか分からなかったため、すぐには実行に移すことはできなかったものの、いつかは大学の酒を造って大学に訪問してくる海外の方々に喜んでもらいたい気持ちは強くあった。そのため、農場長から米の話を聞いた瞬間に「これでいけるかも」と思いついた次第である。

2. 東北大学オリジナル日本酒「萩丸」の製造コンセプト

製造コンセプトをどうしようかと農場長と相談した結果、他大学でも大学の酒が造られているので、それらとは違った特徴を出そうということになり、「蔵の華」は附属農場で栽培しており、「蔵の華」を開発したのも農学部の卒業生なので、酒米の育種から酒の販売まで一貫して東北大（農学部）関係者が携わるというストーリー性のある酒として企画することとした。また、2007 年に東北大学創立 100 周年を迎えるというタイミングにもあたっており、100 周年記念を祝う酒という意味でも話題性が付け加えることができると考えた。

「蔵の華」は、宮城県古川農業試験場において農学部卒業生が中心となり、「山田錦」と「東北 140 号」を交配した F1 株に、「東北 140 号」を戻し交配して育種されたもので、大粒で心白の発現率は低いものの低タンパク質で淡麗な酒を造るのに適しており、耐冷性といもち病抵抗性も強い酒造好適米である。製造は農学部出身の大学同窓会副会長が会長を務めていた（株）一ノ蔵に委託することとし、製造の全般を演者が監督し、販売等については農業経済系の教員と農学部同窓会が関与することで製造を開始した。演者は当初精米歩合 50%の純米吟醸酒を考えていたが、100 周年記念ということで総長から「世界に誇れる酒」との要望があったため、精米歩合 42%の純米大吟醸酒を製造することとした。また、日本酒の名称は学内から公募し、大学のロゴマークが萩を丸くかたどったものであることに由来した「萩丸」に決定された。

3. 日本酒の酒質ならびに現状と課題

大吟醸用の種麹と酵母（酸生成能の低い酵母：協会 1601 号と酢酸イソアミル生成能力の優れた酵母：協会 9 号を併せて使用）を用い、バランスのとれた吟醸香を持ち、味にふくらみのある良質の純米大吟醸酒として誕生した。100 周年記念年の前後は企画した演者にも手に入らないほど引きが多く嬉しい悲鳴であったのだが、その後は純米大吟醸酒という高品質ではあるがゆえの高価格（720 mL、2,800 円）が仇となり、販売量が伸び悩み、在庫も抱えるようになった（土産用には決して高いとは思えないのだが）。そこで、OB や教職員だけでなく学生にも手が届く価格の日本酒として、精米歩合 55%の特別純米酒の製造に規格変更することにした。この特別純米酒の製造にあたっては、農学部出身の宮城県産業技術総合センターの研究員が育種した吟醸酒用酵母「みやぎ酵母・ほの馥」を使用した。この酵母はエチルメタンスルホン酸を用いた突然変異誘発処理によりセルレニン耐性株として得られたもので、生成酒は吟醸香が穏やかで酒質もきれいでキレの良い酒に仕上がっている。720 mL、1,400 円と手ごろな価格に設定し、土産用だけでなく家飲みでも利用できるようにした。また、手土産用には少量・軽量な方が好ましいという声を受け、300 mL 瓶（750 円）も販売開始した。新型コロナウイルスの影響で出張や学内での懇親会がないこともあり、売上状況は厳しく、ここ 2 年は仕込を見合わせているのが現状である。学内に大学のオリジナル日本酒という特徴が周知されていないことが明らかとなったため、新ラベルへの切り替えに際して「東北大学オリジナル日本酒」を明記するとともに、今後は酒造りへの学生参加企画などの話題作りを視野に入れた販売戦略を考えている。

Key words sake, product concept, rice, yeast

S2H6 (1201)

Nanobiodevice based on Biohybrid Material toward Organ-on-a-Chip and Biohybrid Robot

○Jeong-Woo Choi [1*]

([1] Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Sogang University, Korea)

jwchoi@sogang.ac.kr

Nanobiodevice based on Biohybrid Material toward Organ-on-a-Chip and Biohybrid Robot

○Jeong-Woo Choi [1*]

([1] Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Sogang University, Korea)
jwchoi@sogang.ac.kr

Nanobiodevices have emerged as a breakthrough with huge potentiality for the development of new functional medical and electronic devices. Various nanobiosensors and biomemory devices based on biohybrid materials have been developed.

Based on nanobioelectroic technology a cell chip using spectroelectrochemical analysis has been developed as a valuable tool for evaluating effects of various kinds of chemicals, drugs or nanomaterials on target cells with high accuracy. The three dimensional nanopillar arrays were fabricated to be effective for cell adhesion, spreading and proliferations, as well as for enhancing the electrochemical signals from target cells. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) was applied as powerful tool to monitor the stem cell differentiation and to identify the circulating tumor cells using nanoplasmonic structures such as 3D graphene oxide-encapsulated gold nanostructure and Raman reporter-conjugated functional nanoparticles. The electrochemical signals achieved from cells showed linear correlations with the cell viability and internal cellular component as indicator for the cell behavior assessment. The electrochemical technique and SERS were finally combined as spectroelectrochemical tool which was found to be excellent tool for sensing intracellular metabolic state of cells.

Cell chip with nanopatterned surface was fabricated for sensing and increment of neural stem cell differentiation. Cell chip with the surface immobilized by biohybrid material was developed for spatiotemporal control of cell state, especially for differentiation of neural stem cell. And cell chip with the surface immobilized by the genetically engineered redox enzyme/organic/capacity-type nanoparticle was fabricated for control of charge trapping state inside neural cell, which can be used for biomemory device. By the integration of the proposed cell chips the brain-on-a chip with various functions can be fabricated to mimic the structure and function of brain.

Biohybrid robot has been developed due to its application possibility to the industrial robot and medical robot. The enhancement of bioactuator force has been needed since the movement of biohybrid robot by bioactuator is too weak for the real applications. To increase the performance, MoS_2 nanosheet based biohybrid actuator and hyaluronic acid-gold nanoparticle (HA-AuNPs) based biohybrid actuator were developed for biohybrid robot. Bioactuator composed of muscle cells/MoS_2 nanosheet showed high actuation performance since MoS_2 nanosheet augmented the motion of muscle cells. And HA-AuNPs were incorporated with a muscle cell bundle to construct the bioactuator used to fabricate the simple biohybrid robot with linear movement by electrical stimulation. HA-AuNPs enhanced the actuation performance of the muscle cell bundle, which increased the movement speed of the biohybrid robot. The bioactuators can be applied to construct the biohybrid robot with motion control by sensing function.

The proposed biohybrid material-based nanobiodevice should be a new type of platform for development of organ-on-a-chip (especially brain-on-a chip) and biohybrid robot in future.

Acknowledgments: This research was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (No.2019R1A2C3002300)

Key words nanobiodevice, biosensor, biomemory, bioactuator, biohybrid robot

S2H6 (1202)

Application of single-chamber electro-fermentation system for enhancing synthesis of polyhydroxyalkanoate

○John Chi-Wei Lan[1,2*], Yuen Hing Lai [1]

([1] Biorefinery & BioProcess Engineering Laboratory, Department of Chemical Engineering and Materials Science, Yuan Ze University, [2]Graduate School of Biotechnology and Bioengineering, Yuan Ze University)

Application of single-chamber electro-fermentation system for enhancing synthesis of polyhydroxyalkanoate

○John Chi-Wei Lan[1*], Yuen Hing Lai [1]

(1 Biorefinery & BioProcess Engineering Laboratory, Department of Chemical Engineering and Materials Science, Yuan Ze University, 2Graduate School of Biotechnology and Bioengineering, Yuan Ze University)
lanchiwei@saturn.yzu.edu.tw

Electro-fermentation is a novel approach that integrates traditional fermentation with an electrochemical system to influence the fermentation environment and microbial metabolism. In this study, a single-chamber electro-fermentation system was established and the functionality and performance were tested by a model microorganism, Saccharomyces cerevisiae on alcoholic fermentation with various strengths of electric current supply. Additionally, the polyhydroxybutyrate (PHB) production of *Ralstonia eutropha* H16 by electro-fermentation was evaluated upon completion of the electro-fermentation system setup. Besides, the effects of redox-mediated electro-fermentation and the effects of different onset of electric current supply (two-stage cultivation) on PHB production were also studied. The single-chamber electro-fermentation successfully influenced the alcoholic fermentation of S. cerevisiae where the biomass yield coefficient was improved in about 41% (0.103 g biomass · g substrate-1) with a 10 mA electric current supply. The growth kinetics of *R. eutropha* H16 under previously optimized cultivation conditions were determined. Electro-fermentation noticeably affected the cell growth, biomass production, substrate consumption and PHB accumulation of *R. eutropha* H16. The highest final residual biomass concentration (13.612 ± 0.019 g L-1), the highest maximum specific growth rate (μmax = 0.133 h-1) and the highest specific substrate utilization rate (qS = 0.187 g substrate · g biomass-1 h-1) were obtained with a 10 mA electric current supply. Furthermore, a remarkable enhancement of 18 to 30% of PHB content was achieved (up to 65 – 73% per total biomass) with the additions of 100 μM neutral red/methylene blue along with a 10 mA electric current supply. This could be considered as a breakthrough for PHB production via redox-mediated electro-fermentation. The growth suppression caused by redox-mediated electro-fermentation was perceptibly solved and the maximum PHB productivity was also improved via two-stage cultivation. As mentioned in the proposed mechanism, the additional electrons supplied upon supplementation of the redox mediator, accelerated the glycolytic pathway and redox cycling of NADH/NAD+ and eventually led to a spontaneous boost for ATP generation and further facilitate the biosynthesis of PHB.

Key words electro-fermentation, polyhydroxyalkanoate, mediator

S2H6 (1203)

Membrane Dynamics and Cell Signaling

○Masahiro TAKAGI[1]
([1]Japan Advanced Institute of Science and Technology)

Membrane Dynamics and Cell Signaling

○Masahiro TAKAGI[1]*
([1]School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology)
E-mail: takagi@jaist.ac.jp

【Background】

The cell membrane is constituted with many kinds of phospholipid molecules. It has been suggested that there is a domain structure called "Lipid raft" in membrane (1). Rafts contain high concentration of sphingolipids and cholesterol. Rafts concentrate receptor proteins and their behaviors are related to intracellular signaling. However, there are many unclear points about how lipid rafts are involved in cell signaling. As an example of the studies about membrane dynamics and cell signal transduction, I would like to introduce some research results about relationship between lipid raft and cell signaling using both cell-sized liposome and cultured cells.

【Lipid raft and neurotoxicity of amyloid β 】

Amyloid beta (Aβ) is a peptide responsible for the development of Alzheimer's disease (AD). Misfolding and accumulation of endogenous Aβ can lead to neural cell apoptosis through endoplasmic reticulum (ER) stress. Added exogenous Aβ can also result in ER stress, leading to neurotoxicity and apoptosis, which is identical to that caused by the endogenous peptide. We have speculated that the endocytic transport of Aβ causes ER stress and have previously shown that the oxysterol, in particular, 7-ketocholesterol (7-keto) induces more surface interaction between Aβ-42 and Jurkat cells than cholesterol. However, the interaction was not enough to induce intracellular transfer of the peptide.

In this study, we investigated the effect of another oxysterol, 25-hydroxycholesterol (25-OH) on the membrane raft-dependent transport of Aβ-42 in Jurkat cells. Interestingly, intracellular transfer of Aβ-42 was observed in the presence of 25-OH only after the inclusion of cholera toxin B subunit (CT-B), a marker used to detect the raft domain. We speculated that 25-OH can induce intracellular movement of Aβ peptides. Furthermore, CT-B together with GM1 provided negative curvature, which resulted in the intracellular transport of Aβ-42. Notably, we used a protofibrillar species of Aβ-42 in this study. We have shown that the transport was microtubule-dependent since it could not be observed in depolymerized microtubules. These results demonstrate that oxysterols and glycosyl chains are important factors affecting intracellular transport. These compounds are also associated with aging and advanced glycation are risk factors for AD. Thus, this study should provide important information for further understanding of the pathology of AD (2).

【Drug delivery by nanoemulsions】

Nanoemulsions of a lipophilic vitamin, retinol palmitate (vitamin A; VA), have a therapeutic effect on cornealdamage. The nanoemulsion based on a triblock-type polymer surfactant with polyoxyethylene and poly-propylene, EO100PO70EO100(EOPO) showed superior efficacy, as compared with a nanoemulsion based onpolyoxyethylene (60) hydrogenated castor oil (HCO). We studied the mechanism of VA nanoemulsions related to efficacy from the viewpoint of the interaction with plasma membrane–mimicking giant unilamellar vesicles(GUVs) and the plasma membrane permeation in corneal epithelial cells. When nanoemulsions and GUVs doped with fluorescent compounds were mixed each other, and observed by confocal laser microscopy, EOPO nanoemulsions induced endocytic morphological changes like strings and vesicles of the bilayer drawn inside a GUV by budding. Judging by isothermal titration calorimetry and ζ potential measurements, the EOPO nanoemulsions seemed to have stronger hydrophobic interactions with the lipid bilayer because of lower coverage of the core interface. Next, when the nanoemulsions prepared with a pyrene derivative of retinol (VApyr) were applied to corneal epithelial cells, the EOPO nanoemulsions greatly permeated the cells and gathered around the cell nucleus, as compared with HCO nanoemulsions. Furthermore, according to the three-dimensional images of the cell, it was found that the vesicles that absorbed nanoemulsions formed from the plasma membrane as real endocytosis, and were transported to the area around the nucleus.

Consequently, it is likely that EOPO nanoemulsions entered the cell by membrane-mediated transport, delivering VA to the cell nucleus effectively and enhancing the effect of VA. As a conclusion, we found that the EOPO nanoemulsion can effectively transport VA to the cell nucleus via endocytic cell permeability, thereby enhancing the efficacy of treatment of damaged corneal cells by VA (3).

These findings reveal that endocytic movements (in particular raft-dependent endocytic movements) are very important for cell signal transduction.

【Reference】

(1) K.Simon and E. Ikonen, ***Nature*** 387, 569-572 (1997)

(2) N.Sharma et al. ***FEBS Open Bio,*** 18, 865-876 (2017)

(3) M.Miyake et al. ***Colloids Surf B Biointerfaces,*** 169, 444-452 (2018)

Keywords: **Liposome, Lipid raft, Endocytosis, Membrane dynamics, Drug delivery**

S2H6 (1204)

The Korean Bioindustry and Policy

Youn Hee Choi
(Korea Institute for Industrial Economics & Trades (KIET), Korea)

The Korean Bioindustry and Policy

Youn Hee Choi
(Korea Institute for Industrial Economics & Trades (KIET), Korea)
yhchoi@kiet.re.kr

The era of the bio-economy has begun. The definition of bioeonomy, released by OECD, is that the application of biotechnology to primary production, health and industry could result in an emerging bioeconomy where biotechnology contributes to a significant share of economic output by 2030. There are many global trends affecting the advent of the bioeconomy, which are global aging, disruptive technological innovation and convergence, and the proliferation of bio-information. The era of bioeconomy is coming while increasing the National benefits & Utility from bioindustry sectors. Also, the bioindustry can be divided into 3 sectors, Red bioindustry, Green bioindustry, White bioindustry.

Therefore, there is severe competition around the world to secure competitiveness in bioeconomy. All the countries around the world are making Competitive Efforts to implement Bioeconomy to solve future problems such as "national burden in the age of aging". We are trying to find ways to save financial efficiency, through convergence between biotechnology and AI. We are also expecting the bioindustry, as a key growth engine, will lead global economic growth in the future. It will innovate the Healthcare system, improve the efficient production of Food and Natural Resource and also develop new energy and environmental products.

The Korean governments have fostered the bioindustry as a new growth engine while actively expanding R & D investment. From 1994, when The 1st National Framework Plan for Promotion of Biotechnology (Biotech 2000: 1994~2007) was established, the investment amount of governmental R & D projects has increased to a CAGR of 17.4% until 2019. Several government agencies and offices, including the ministry of Science & ICT, the ministry of Trade, Industry, and Energy, and the ministry of Health and Welfare are working in close partnership to foster the bioindustry in Korea. Also and most importantly, Korea has many capable research institutes in the public & private sectors. Those are performing world leading R&D in the field of biotechnology.

Thanks to the active policy support, the Korean bioindustry has been continuously growing. The production CAGR between 1994 and 2019 is 18.6%. Also, Korea's bioindustry has some potentials of technology commercialization. We could see that a series of successful special IPOs by some Korean biotech companies. Among top 20 KOSDAQ listed companies based on market capitalization, 10 are biotechnology companies, accounting for 50%. Also, a large scale of technology exports is being further accelerated in the Korean bioindustry.

Korea is considered to have a competitive edge in biopharmaceutical production. Korea is the world's second-largest biopharmaceutical producer, producing more than 60% of the world market in the biosimilar drugs. The Celltrion & Samsung Biologics are the representative companies in the area. The competitiveness of vaccine and drug development against to Covid-19 is also strengthening in Korea. Korean Bioindustry have potential to become globally competitive.

Overcoming the limitations on domestic supply capacity and securing the critical mass of demand would be possible with close networking in Korea and Japan. Through a strong cooperation against the Non-technical barriers and also a cooperation for technological & Industrial competitiveness, we can secure the competitiveness of Bioeconomy in both country.

Key words bioindustry, policy, bioeconomy, competitiveness

S2H6 (1205) Viral gene delivery for gene and cell therapy applications

Jae-Hyung Jang[1*], Yoojin Kim[1], Seokmin Oh[1], Joowon Kim[1], Zheng Rong Lau[1], Slgirim Lee[1]
([1]Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Yonsei University, Seoul, 03722, Korea)

Viral gene delivery for gene and cell therapy applications

Jae-Hyung Jang[1*], Yoojin Kim[1], Seokmin Oh[1], Joowon Kim[1], Zheng Rong Lau[1], Slgirim Lee[1]
([1]Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Yonsei University, Seoul, 03722, Korea)
j-jang@yonsei.ac.kr

Virus-mediated gene delivery has emerged as a powerful strategy for the treatment of a variety of human diseases, such as Parkinson's disease, X-linked adrenoleukodystrophy, hemophilia B, and Leber's congenital amaurosis, which have been regarded as incurable diseases. However, a number of challenges associated with viral gene delivery – such as the innate immunogenicity of viral vectors, limited tropism, spread of vectors to distant sites, and inefficient delivery to some non-permissive cell types – have continuously emphasized the need for significant advancement in developing safe and efficient virus delivery systems. All of these hurdles have hindered the extensive engagement of viral gene delivery for numerous human clinical trials. Adeno-associated viral (AAV) vectors, which are being broadly explored in clinical trials, have significant promise as therapeutic vectors due to their safety and delivery efficiency. Current approaches to design custom AAV vectors are limited to rational peptide insertion into or chemical modifications of the viral capsid structure. In the first part of this presentation, the successful application of a powerful evolution tool to create *de novo* bio-inspired AAV vectors that can significantly enhance the capabilities of gene delivery in numerous clinically valuable cell types will be presented. In the second part of this presentation, a potential strategy, the integration of viral gene delivery with engineered-biomaterials, that can diversify the application scopes of viral gene delivery for numerous applications in gene and cell therapy will be introduced. The biomaterial-mediated gene delivery has the capacity to mediate localized gene expression i) by reducing systemic spread of vectors at the target delivery site and ii) by potentially reducing side effects in off-target regions. Immobilizing gene delivery vectors onto biomaterial structures, which can support cell adhesion, can function to place the vectors directly inside the cellular microenvironment for subsequent cellular internalization, ultimately inducing localized gene expression adjacent to the structure and possibly enhancing gene delivery efficiency by sustaining the contact of the vectors with target cells. Importantly,

this system has the potential to reduce the vector quantities required for high level of gene expression, such that the use of lower doses can potentially reduce cellular toxicity, which is typically observed by the initial burst of gene vectors upon direct injection *in vivo*. In short, two representative approaches capable of promoting the potential of AAV vectors as gene delivery vehicles for many biomedical applications, including i) the evolution of AAV vectors and ii) the integration of AAV vectors with biomaterials, will be briefly introduced.

Key words gene therapy, adeno-associated virus, gene delivery, biomaterials

S2H6 (1206) Using electrorotation for characterizing microorganisms at the single-cell level

○Hsiang-Yu Wang[1], Yu-Sheng Lin[1,2] and Bruno Le Piouffle[2]
([1]Department of Engineering and System Science, National Tsing Hua University, Taiwan, [2] Université Paris Saclay, ENS Paris Saclay, CNRS Institut d'Alembert, LUMIN, France)

Using electrorotation for characterizing microorganisms at single-cell level

○Hsiang-Yu Wang[1], Yu-Sheng Lin[1,2] and Bruno Le Piouffle[2]
([1]Department of Engineering and System Science, National Tsing Hua University, Taiwan, [2] Université Paris Saclay, ENS Paris Saclay, CNRS Institut d'Alembert, LUMIN, France)
hywang@ess.nthu.edu.tw

Characterization of microorganisms at the single-cell level is important in studying the heterogeneity among a population and understanding the cell's interactions with the microenvironments. Current experimental technology for single-cell analysis includes optical observation and omic assays. For example, flow cytometry can be applied to observe the heterogeneity when suitable fluorescent labels are available. The profiling of single-cell genomes/transcriptomes has recently been achieved and offered information for gene expression activity. However, these methods still face challenges such as limited kinds of fluorescent labels or the invasive nature. Electrorotation is a noninvasive technology that uses native cell characteristics, *i.e.* dielectric properties, to analyze the change of intracellular contents as well as cell surface properties in a timely manner.

The dielectric properties of single cells are obtained from electrorotation by acquiring the rotational spectrum, *i.e.* the change of rotational speed of single cells with the frequency of applied AC electric field, and the fitting of experimental spectra with dielectric models. Proper dielectric models are critical in the accurate interpretation of electrorotation spectra, thus the accurate measurement of cellular properties. We propose a upgraded dielectric model with thickening cell wall and surface factor and validate the importance of including these factors in analyzing single microalgae cells. The proposed dielectric model enabled the accurate quantification of intracellular lipids with an error of around 2 wt% compared with conventional extraction and weighing. Additionally, the surface factor allowed the measurement of epistructure on the cell surface with a length down to 200 nm and the difference between electrorotation and SEM measured epistructure lengths was around 10%. These results show that electrorotation is a powerful tool in providing biophysical information of single microorganism cells and promising applications include the quantification of proteins, nucleic acids, or external additives such as heavy metal ions, inside single cells.

Key words electrorotation, single cell analysis, microalgae, lipid contents, surface properties

S2H6 (1207) Biosensing of pancreatic cancer cell-derived exosomes using a glycan-lectin affinity

○Jonghoon Choi[1-2*], Yonghyun Choi[1-2]
([1]Chung-Ang University, [2]Nanomedicine Corp.)

Biosensing of pancreatic cancer cell-derived exosomes using a glycan-lectin affinity

○Jonghoon Choi[1-2*], Yonghyun Choi[1-2]
([1]Chung-Ang University, [2]Nanomedicine Corp.)
nanomed@cau.ac.kr

The unique profile of upregulated glycosylation in metastatic cancer cells may form the basis for the development of new biomarkers for the targeting and diagnosis of specific cancers. This study introduces a pancreatic cancer cell-derived exosome detection technology, which is based on the specific binding of lectins to distinctive glycan profiles on the surface of exosomes. Lectins with a high and specific affinity for sialic acid or fucose were attached to bifunctional Janus nanoparticles (JNPs), which facilitated interactions with pancreatic cancer cell-derived exosomes in a microfluidic device. Here, we show that pancreatic cancer cell-derived exosomes from two cell lines and plasma samples collected from patients diagnosed with pancreatic cancer were successfully captured on the lectin-conjugated JNPs with affinities that were comparable to those of CA19-9, a conventional antibody. In addition, exosome detection using our platform could differentiate between metastatic and nonmetastatic pancreatic cancer cells. This study opens the possibility to achieve a new early diagnosis marker based on the glycan properties of pancreatic cancer cell-derived exosomes.

Key words Exosome; Janus nanoparticles; Glycan; Lectin; Metastatic cancer; Pancreatic cancer

S2H6 (1208) Peptide functionalized biodevices for biomedical applications

○Mina Okochi*
(Sch. Mater. Chem. Technol., Tokyo Tech)

Peptide functionalized biodevices for biomedical applications

○Mina Okochi*
(Sch. Mater. Chem. Technol., Tokyo Tech)
okochi@chemeng.titech.ac.jp

Recent advances in biotechnology and nanotechnology has explored and developed the interdisciplinary area of bionanotechnology which can be applied for bioanalyses. Peptides have attracted particular attention as valuable bio-interface molecules, because of their diverse functionalities and, with certain peptides, the potential for specific binding to particular materials including organic and inorganic. Focusing on peptides that retain partial features of protein function, molecular recognition peptide probes have been designed using peptide array by direct interaction analyses with variety of objects including bacteria, viruses, cell surface receptors, volatile organic compounds and metallic nanoparticles (1-4). Among various peptide screening techniques, coherent membrane-supported peptide array libraries by spot-synthesis have several advantages, including ease of peptide sequence identification (DNA sequencing is not necessary), chemical synthesis without a biological organism, and the acquisition of binding activity data from positive to negative sequences. Herein, we report on the development of peptide functionalized biodevices for biomedical applications.

Exosomes are a nano-sized subset of extracellular vesicles, typically 40-200 nm in diameter, important in intercellular communication. Exosomes carry functional biomolecules such as nucleic acids, proteins, metabolites, and lipids similar to those of their parent cells. Cancer cells are believed to release large numbers of exosomes carrying cancer-specific messenger molecules, which not only play an important role in cancer progression/metastasis but are also valuable as cancer biomarkers for pathological studies. In addition, cancer exosomes have been explored as therapeutic agents, including cell-created drug cartridges or gene delivery vesicles for site-specific targeting, due to their unique intracellular pathways and organ/cell-specific tropism. Herein, we report peptide-functionalized nanowires as a biorecognition interface for the capture and release of cancer-derived exosomes within a microfluidic channel. Exosome-binding peptide probe designed from amino acid sequence of EWI-2, an interacting protein of tetraspanin CD9 exosome marker. The designed peptide competitively inhibited partner interaction between EWI-2 and CD9 (5). Linkage of the exosome-targeting peptide with a ZnO-binding sequence allowed one-step and reagent-free peptide modification of the ZnO nanowire array device. Exosome-capturing ability of ZnO nanowires significantly improved by peptide functionalization. Furthermore, the captured exosomes could be subsequently released from the nanowires under a neutral salt condition for downstream applications. NTA-based analysis indicated an increase in the exosome recorery percentage from less than 10% in the unmodified nanowires to approximately 70% in the bifunctional peptide-modified nanowires, implying exosome release achieved by peptide modification (6). This engineered surface that enhances the nanowires' efficiency in selective and controllable collection of cancer-derived exosomes provides an alternative foundation for developing microfluidic platforms for exosome-based diagnostics and therapeutics.

The biorecognition nanointerface using synthetic peptides will offer great potential in micro- and nano-biomedical devices for versatile intermolecular interaction analyses and bioanalyses including disease diagnosis.

1. M. Tsutsui, M. Tanaka, T. Marui, K. Yokota, T. Yoshida, A. Arima, W. Tonomura, M. Taniguchi, T. Washio, M. Okochi, T. Kawai. Identification of individual bacterial cells through the intermolecular interactions with peptide-functionalized solid-state pores. *Anal. Chem.* 90 (3), 1511–1515 (2018).
2. Arima, I. H. Harlisa, T. Yoshida, M. Tsutsui, M. Tanaka, K. Yokota, W. Tonomura, J. Yasuda, M. Taniguchi, T. Washio, M. Okochi, T. Kawai. Identifying single viruses using biorecognition solid-state nanopores. *J. Am. Chem. Soc.* 140(48) 16834-16841 (2018).
3. T. Komikawa, M. Tanaka, K. Yanai, B. R. G. Johnson, K. Critchley, T. Onodera, S. D. Evans, K. Toko, M. Okochi. A bioinspired peptide matrix for the detection of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Biosens. Bioelectron.* 153, 112030 (2020).
4. M. Tanaka, M. Hayashi, L. Roach, T. Kadonosono, T. Nomoto, N. Nishiyama, K. Critchley, S. Evans, M. Okochi. Synthesis of near-infrared absorbing triangular Au nanoplates using biomineralisation peptides. *Acta Biomater.* 131, 519-531 (2021).
5. T. Suwatthanarak, M. Tanaka, Y. Miyamoto, K. Miyado, M. Okochi. Inhibition of cancer-cell migration by tetraspanin CD9-binding peptide. *Chem. Commun.* 57, 4906-4909 (2021).
6. T. Suwatthanarak, I. A. Thiodorus, M. Tanaka, T. Shimada, D. Takeshita, T. Yasui, Y. Baba, M. Okochi. Microfluidic-based capture and release of cancer-derived exosomes via peptide-nanowire hybrid interface. *Lab. Chip.* 21, 597-607 (2021).

Key words peptide, micro/nano system, exosome

G2H1 (0201) へそ汚れを構成する菌叢とニオイとの関係性

○矢野剛久[1]*, 岡島孝雄[2], 土屋成輝[3], 辻村久[3], 高木豊[4]
([1]花王(株)安全性科学研, [2]花王(株)研究戦略・企画部, [3]花王(株)解析科学研, [4]花王(株)スキンケア研)

Relationship between odor and the bacterial flora that make up navel stains

○Takehisa Yano[1]*, Takao Okajima[2], Shigeki Tsuchiya[3], Hisashi Tsujimura[3], Yutaka Takagi[4].
([1]Kao Corp. Safety Sci., [2] Kao Corp. Planning & Implement., [3] Kao Corp. Anal. Sci., [4] Kao Corp. Skin Care Products)
yano.takehisa@kao.com

へそ内部の汚れ（へそのごま）は、へその複雑な構造から通常の洗浄で十分に除去することが困難であり、その汚れが関与すると思われるニオイ、かゆみ、黒ずみは生活者課題の一つといえる。そこで、この度弊社では二剤硬化型シリコーンゲルを用いてへそ内部の汚れを効率的に取る技術（へそパック）を確立した。この技術を用いることでへそ内部の汚れを効率的に解析できるようになったことから、本研究では得られたへそ内部の汚れにおける菌叢に着目し、その生活者課題との関連性解明を目指した。

即ち、へそ内部の汚れに関連した課題認識を有する女性 24 名を対象に 7 日間のへそパック使用試験を行い、得られたへその汚れに含まれる微生物の菌叢を解析した。さらにその菌数やタンパク質、そして上記の生活者課題との関係性を調査した。

へそ内部の汚れに含まれるタンパク質量や菌数を 1 日目と 7 日目で比較したところ、汚れに含まれるタンパク質量は 7 日目の方が顕著に少なく、へそパックのへそ内部の汚れ除去効果が確認された。汚れに含まれる菌叢については、へそパック使用前後で有意な違いは見られず、各被検者特有の菌叢が確認された。一方、多くのサンプルでへその菌叢に関する既報と同様に *Corynebacterium* 属細菌が頻度高く検出され、一般的に皮膚上で多い *Cutibacterium* 属細菌等はあまり検出されなかった。

次に、生活者課題と菌叢の関連性を調べたところ、ニオイスコアや菌数、へそを清掃する習慣の有無等が菌叢の共変量として抽出された。このうち、ニオイスコアと関連する微生物の種類をさらに詳細に調べたところ、高ニオイスコア群で *Mobiluncus* 属細菌や *Arcanobacterium* 属細菌、*Peptoniphilus* 属細菌といった症状として異臭を伴う疾患に関与する培養困難な嫌気性細菌の存在比率が高く、こうした微生物が産生する様々な成分がニオイに関与する可能性が考えられた。

以上の結果から、へその汚れのニオイが顕著な人には上記のような菌種に代表される特有の菌叢があり、その菌叢を構成する微生物の菌数を減少させることはニオイ低減に寄与する可能性が考えられた。また、疾患に関与する多様な微生物が検出されたことから、その制御はニオイ低減に加えて、こうした微生物に基づく感染症の予防に向けても有用である可能性が考えられた。

Key words navel, microbiome, malodor, anaerobic

G2H1 (0202) ショウジョウバエからの野生酵母の単離と産業への展開

○清家泰介[1,2,3]*, 武方宏樹[4], 阪田奈津枝[3], 古澤力[3,5], 松田史生[1,2]
([1]大阪大学・院情報, [2]大阪大学・先導的学際研究機構, [3]理化学研究所・生命科学, [4]琉球大学・戦略的研究プロジェクトセンター, [5]東京大学・院理)

Isolation of wild yeasts from *Drosophila* and future expansion of industrial applications

○Taisuke Seike[1,2,3]*, Hiroki Takekata[4], Natsue Sakata[3], Chikara Furusawa[3,5], Fumio Matsuda[1,2]
([1]Grad. Sch. of Info., Osaka Univ., [2]Inst. of OTRI, Osaka Univ., [3]BDR, RIKEN, [4]CSRP, Univ. of the Ryukyus, [5]Grad. Sch. of Sci., The Tokyo of Univ.)
taisuke_seike@ist.osaka-u.ac.jp

【背景】
酵母は広く発酵食品に利用され、私たちの生活には欠かせない産業微生物の一つである。特に出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、酒類やパン類などの生産に広く利用されており、各企業がそれぞれの用途に合わせて望ましい表現型を示す *S. cerevisiae* 系統を確立させている。一方で、酵母を用いた有用物質生産においては、実績の高い出芽酵母 *S. cerevisiae* に加えて、新しい機能や特性を持った新たな酵母の利用も期待されている。しかし、モデル生物でない酵母の情報は不足しており、今後の産業利用へのさらなる発展に向け、自然界からの未知の酵母種の単離が求められている。
【目的・方法】
本研究では、野生酵母の探索にあたり、ショウジョウバエに着目した。ショウジョウバエは酵母を餌とし、移動性が高く、さらに腸管内に摂餌した微生物を蓄えるクロップと呼ばれる袋状の臓器を所有していることから、ハエの体内には多様な酵母が棲息していると考えられる。私たちは実際に、大阪・奈良・東京・沖縄などの様々な地域でバナナトラップを仕掛け、これまでに数千匹を超えるショウジョウバエを採集した。そしてハエの体内から酵母を分離し、コロニーの色・顕微鏡による細胞形態の観察、rRNA 遺伝子の塩基配列などから種を同定した。
【結果・考察】
現在までに、37 属 98 種類もの野生酵母を単離することに成功した。加えて、今まで報告のない新種酵母も 16 種発見しており、ハエの体内には多種多様な酵母が棲息していることが判った。そこで、単離した野生酵母において、発酵過程で生じるような熱や pH などのストレスへの耐性能、および主要な糖・アルコールの資化能について、詳細に解析中である。これまでに得られたデータとして、いくつかの地域のショウジョウバエから分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* が複数単離できた。興味深いことに、ほぼ全ての *S. japonicus* 株は高温耐性 (40℃以上)を有しており、さらに植物や果実などから分離された系統株に比べて、胞子形成能が非常に高いことも分かった (Seike *et al*., *J Fungi*, 2021)。このように、ショウジョウバエからは異なる表現型を示す酵母の単離が期待される。以上より、ハエを分離源として野生酵母を集める方法は非常に有用であることが示唆された。

Key words yeast diversity, *Drosophila*, *S. japonicus*, screening

G2H1 (0203) 自家蛍光分析で可視化する多様な細胞死プロセス

○張 譯云[1], 高部 響介[3], 下段 千尋[2], 野村 暢彦[3,4], 八幡 穣[3,4]*
([1]筑波大院・生命環境, [2]筑波大, [3]筑波大・生命環境系, [4]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)

Single-cell innate fluorescence signature reflects the process of cell death

○Yiyun Zhang[1], Kyosuke Takabe [3], Chihiro Shimodan[2], Nobuhiko Nomura[3,4], Yutaka Yawata[3,4]*
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Univ. Tsukuba, [3]Fac. of Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [4]MiCS, Univ. Tsukuba)
zhang.yiyun.sj@alumni.tsukuba.ac.jp

細胞の生と死は生物学上、最も基本的な課題であり医療や食品などの応用面では微生物制御の重要な指標であるとともに、生命科学分野では集団の形成、維持や機能における細胞死の役割が注目されている。一方、細胞死のメカニズムはネクローシス、VBNC、アポトーシスなど多様であり、統一的な視点で評価することは困難である。また現在、細胞の生死は培養や染色などによって評価され、破壊的または複雑な処理などを行わずに、非侵襲的に細胞の生死を判定することも困難である。そのため、様々な細胞死メカニズムを一つの手法で簡単かつ迅速に評価する事ができれば、細胞死とその機能の研究に新しい視点をもたらせると考えている。
本研究では、これを解決する方策として、細胞の「自家蛍光」に着目した。自家蛍光は細胞にレーザー光を照射した際に、タンパク質、脂質、核酸などの様々な生体分子から生じる細胞内在性の微弱なシグナルである。我々は細胞の生死によって細胞内の分子構成や代謝状態が変化することで、自家蛍光に変化が生じるのではないかと考えた。そこでまず大腸菌をモデルとして、様々な殺菌方法の間で一細胞ごとの自家蛍光の総体（「自家蛍光シグネチャー」）を比較した。その結果、死細胞は特徴的な自家蛍光シグネチャーを有し、それに基づいて生細胞との判別ができることがわかった。また、機械学習手法を用いることで、細胞の死因（殺菌方法）を一細胞自家蛍光シグネチャーから予測できた。さらに、大腸菌以外の菌種において、エタノール殺菌による自家蛍光シグネチャーの変化を観察した。各種細菌系統間においても生死によって共通する死細胞の特異的な自家蛍光パターンが存在することを発見した。本研究の結果は、細胞の“死因” を自家蛍光という細胞内在性のシグナルで迅速に判別できることを示唆しており、迅速かつ培養や染色を介さない細胞死プロセスのその場での評価方法へ発展することが期待される。

Key words Autofluorescence, non-invasive analysis, confocal microscopy

G2H1 (0204) ヤマブシタケ抽出物に含まれるバイオフィルム阻害タンパク質の精製と解析

○濱治百々子[1], 石丸隆行[2], 飯田亮平[2], 阿座上弘行[1,3]*
([1]山口大院・創成科学, [2]宇部フロンティア大・食物栄養, [3]山口大・中高温微セ)

Purification and characterization of biofilm-inhibiting protein contained in extract of *Hericium erinaceus*

○Momoko Hamaji[1], Takayuki Ishimaru[2], Ryohei Iida[2], Hiroyuki Azakami[1]*
([1] Yamaguchi Univ. [2] Ube Frontier Univ.)
azakami@yamaguchi-u.ac.jp

Hericium erinaceum（ヤマブシタケ）は食用キノコの一種で、神経保護や抗炎症性、抗酸化性特性など様々な薬理作用を示すことが報告されてきた。また、*Eikenella corrodens* は歯周病原性細菌の一つで、口腔内でバイオフィルムを形成する。本研究では、ヤマブシタケ抽出物が *E. corrodens* のバイオフィルムに及ぼす影響を調べた。

E. corrodens はヘミンと硝酸カリウムを含む TSB 培地で培養し、バイオフィルムの形成は 96 穴マイクロタイタープレートを用いた静置系のアッセイで評価した。ヤマブシタケの抽出物が歯周病原性細菌 *E. corrodens* のバイオフィルム形成を阻害することを発見した。しかし、メタノール抽出物からは阻害効果は見られなかった。ヤマブシタケのバイオフィルム阻害効果は用量依存的に見られ、それらは *E. corrodens* に対する抗菌作用によるものではなかった。ヤマブシタケの抽出物を硫安沈殿により分画したところ、70%画分から阻害活性が見られた。この画分を熱処理したところ、バイオフィルムの阻害は完全にはなくならなかった。これらのことから、部分的に熱に安定なタンパク質性の成分がバイオフィルムの阻害に関与することが示唆された。さらに、この画分を限外ろ過やイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過によって分画を行った。その結果、分子量が約 55kDa のタンパク質が *E. corrodens* のバイオフィルムを阻害することが示唆された。さらに、ヤマブシタケの抽出物が一旦形成されたバイオフィルムを分解する能力があることも示唆された。

Key words biofilm, *Hericium erinaceum*, periodontal disease, *Eikenella corrodens*

G2H1 (0205) 放線菌 *Streptomyces* 属プラスミドの接合伝達関連遺伝子による染色体移行現象

○溝脇朱音[1], 深田悠太[2], 片岡正和[3]*
([1]信州大学大学院)

Chromosomal Mobilization by Transfer-Related Genes of Conjugative Plasmid of *Streptomyces* spp.

○Akane Mizowaki[1], Yuta Fukada[2], Masakazu Kataoka[3]*
([1]Dept. BioMed. Eng. Gra. Sch. Shinshu Univ.)
21bs123g@shinshu-u.ac.jp

放線菌は市場の約 8 割の抗生物質を生産する細菌であり, また高い遺伝的多様性を有している．放線菌の多様性は遺伝子の水平伝播により獲得されてきたと考えられ, その機構の一つに接合伝達がある．

接合伝達は細菌間を横断するチャネルを形成して DNA を伝達する機構である．接合伝達は細胞内部で DNA の伝達が完結するために，DNA を水の剪断に晒さずに損傷無く輸送できる．この接合伝達はプラスミド依存性で，プラスミドの伝達によって新たな遺伝子が獲得される．さらにこのプラスミドの伝達に伴って，菌が自身の染色体を伝達させる染色体の移行現象が放線菌 *Streptomyces* 属で確認されている．伝達された染色体は受容した側の染色体と相同組換えを起こし, 組換え体が生じるとされている. 染色体移行現象は染色体組換えによって長大な遺伝子を損傷無く導入することが可能である．

この染色体移行現象を用いれば, 染色体をベクターとする放線菌での遺伝子導入法が確立できる．しかし本現象はプラスミドの移行と比較して頻度が低いという難点がある. そこで染色体移行現象を高頻度に発生されるための条件を検討した．*S. lividans* を用いて検討した結果，プラスミド pSN22 の接合伝達に関与する遺伝子を *trans* に発現させるとともに，接合伝達の起点配列となる *clt*（*cis*-acting locus of transfer）を染色体に組み込んだ場合に発生頻度が向上することを確認した．またこの条件において *S. lividans* から他の *Streptomyces* 属への染色体移行を確認したことも報告する．

Key words *Streptomyces*, conjugation transfer, Chromosomal Mobilization

G2H1 (0206) RP4 の大腸菌-放線菌間での接合伝達に必要な最小 *oriT* 領域の特定

○猪又俊輔[1], 深田悠太[1], 片岡正和[1]*
([1]信州大学大学院・生命医工)

Identification of the minimum *oriT* region required for RP4 conjugative transfer between *E. coli* and *Streptomyces*

○Shunsuke Inomata[1], Yuta Fukada[1], Masakazu Kataoka[1]*
([1] Dept. Biomed. Eng. Gra. Sch. Shinshu Univ.)
21BS104A@shinshu-u.ac.jp

遺伝子導入法の一つに「接合伝達」が存在する。接合伝達の中でも知見が集積しているシステムがIV型接合伝達システム(T4SS)である。本研究では *Pseudomonas* 由来の接合因子 RP4 を題材として用い、伝達のシス因子である *oriT* 領域の領域必要性を調べた。本システムによる接合伝達は DNA 輸送に関連するタンパク質の一つである relaxosome が伝達開始起点である *oriT* 領域に結合することで開始される。Relaxosome は TraJ、TraI、TraK といったタンパク質から成るタンパク質複合体であり、*oriT* にはそれぞれのタンパク質が結合する領域が存在する。*oriT* 領域の研究は大腸菌間での接合伝達を中心に研究が行われ、接合伝達に必須な *oriT* 領域は、TraJ、TraI 結合領域であると結論付けられた。しかしながら大腸菌-放線菌間での接合伝達に必要な最小 *oriT* 領域は未だ特定されていなかった。従って、本研究では T4SS を用いた大腸菌-放線菌間での接合伝達における *oriT* の最小伝達必須領域の特定を目指した。

本研究では 8 種類の異なる *oriT* 領域を有するプラスミドを作成後、RP4 の系を用いてそれぞれのプラスミドを大腸菌から放線菌に伝達させ、*oriT* 領域におけるそれぞれの接合伝達への影響評価を行った。その結果、TraK 結合領域を欠損させたプラスミドを用いた場合では、安定した接合伝達が確認された。しかしながら TraJ 結合領域を欠損させたプラスミドを用いた場合では伝達効率が大きく低下した。TraI 結合領域を欠損させたプラスミドを用いた場合では接合伝達が確認できなかった。これらの結果から大腸菌-放線菌間での接合伝達に必須な最小 *oriT* 領域は TraI 結合領域を含んだ約 70bp の *oriT* 領域であると結論付けた。また、大腸菌間での接合伝達に必須と考えられていた TraJ 結合領域が大腸菌-放線菌間での接合伝達では必須ではないことが明らかとなった。このことから接合伝達において必要な *oriT* 領域が受容菌の種ごとに異なることが示唆された。

Key words RP4 conjugative transfer, *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *oriT*

G2H1 (0207) 魚病細菌 *Lactococcus garvieae* とその近縁種の全ゲノム配列に基づく識別および Multiplex PCR を用いた簡易識別法の開発

○金川怜美[1], 纐纈智也[1], 小池里佳[2], 古橋佑真[1], ジラポンパイロワリッサラ[1], 久田孝[2], 木村凡[2], 髙橋肇[2], 庵原啓司[1], 下平潤[1]*
([1]マルハニチロ株式会社, [2]東京海洋大学)

Whole genome sequence analysis and development of a multiplex PCR for fish pathogen *Lactococcus garvieae* and related species

○Satomi Kanagawa[1], Tomoya Kouketsu[1], Rika Koike[2], Yuma Furuhashi[1], Walissara Jirapongpairoj[1], Takashi Kuda[2], Bon Kimura[2], Hajime Takahashi[2], Keishi Iohara[1], Jun Shimodaira[1]*
([1]Maruha Nichiro Corporation, [2]Tokyo University of Marine Science and Technology)
j-shiomodaira@maruha-nichiro.co.jp

【背景・目的】*Lactococcus garvieae* は魚の連鎖球菌症の原因菌で、日本では I 型と II 型の 2 種類の血清型が知られている。近年、近縁な 2 菌種として *L. formosnesis* と *L. petauri* の存在が報告されているが、これら 3 菌種は全ゲノム配列に基づく識別法以外では識別が困難であり、各種と血清型との関係性はいまだわかっていない。本研究では、3 菌種と血清型との関係を明らかにし、これらの菌種を簡易に識別する Multiplex PCR を開発した。

【結果・考察】*L. garvieae* として Genbank に全ゲノム配列が登録されていた 33 株を、ANI 値に基づいてクラスタリングした結果、4 菌種に分けられ、それぞれ *L. garvieae, L. formosensis, L. petauri,* 新種であった。このことから、これまで *L. garvieae* と同定されてきた菌株の中には、*L. formosensis* や *L. petauri* が存在することが明らかになった。血清型 I 型株の LG2 株は、*L. garvieae* の基準株との ANI 値が 98.51%、血清型 II 型株の 122061 株は *L. formosensis* の基準株との ANI 値が 98.42%であった。DNA-DNA hybridization を行った結果、当社で分離された I 型株と *L. garvieae* 基準株の交雑率は 71.2%、II 型株と *L. formosensis* 基準株は 77.5%であった。この結果より、血清型 I 型株は *L. garvieae*、II 型株は *L. formosensis* であることが明らかとなった。次に、ANI 値に基づいて再同定された 33 株に加えて Genbank に *L. petauri* として登録されていた 9 株、当社で分離され ANI 解析より同定された *L. garvieae* 2 株, *L. formosensis* 9 株と *L. formonsesis* 基準株 1 株の計 54 株のゲノムについて、Bidirectional best hit 法を用いて各種の固有遺伝子を探索した。*L. garvieae* は YxeA family protein、*L. formosensis* は Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase、*L. petauri* は Sucrose-6-phosphate hydrolase をコードする遺伝子が選定され、これらを標的とした 3 菌種を識別する Multiplex PCR を構築した。妥当性は culture collection から購入した 38 株、当社で分離された 39 株の計 77 株を対象に Multiplex PCR による識別結果と ANI 値に基づく同定結果を比較し、評価した。その結果、一致率は 100%であった。77 株の資化性を調べた結果、*L. petauri* のみスクロースの資化性を持つことが明らかになった。

Key words *Lactococcus garvieae*, fish pathogen, average nucleotide identity (ANI), multiplex PCR

G2H1 (0208) キンギョを利用した新規抗体遺伝子の取得

○小幡宏志郎[1], 山田紗里奈[1], 田丸浩[1,2,3]*
([1]三重大院・生資, [2]三重大・先端バイオ, [3]三重大・スマートセル研)

Acquisition of new antibody genes using goldfish

○Koshiro Obata[1], Sarina Yamada[1], Yutaka Tamaru[1,2,3]*
([1] Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [2] Mie Univ. ASRSC, [3] Mie Univ. SCIRC)
ytamaru@bio.mie-u.ac.jp

【目的】近年、世界の医薬品販売の多くはバイオ医薬品が占めるようになっており、その中でも抗体医薬品の割合は非常に高く、開発が急速に進んでいる。当研究室では、開発が進む抗体の新規作製法として魚類による抗体生産の研究を行っている。本研究では、その魚類のキンギョの一種であるスイホウガンへの免疫において、TF-EGFP を抗原として免疫した場合に得られる抗体遺伝子を PCR 反応により合成し、低分子抗体の scFv をコードする遺伝子を取得した。これらの抗体遺伝子を解析することで、キンギョ免疫システムを明らかにすることを目的とした。

【方法】大腸菌に抗原タンパク質とする TF-EGFP を発現させ、抽出、精製後、スイホウガンの水泡部分に 100 μg の TF-EGFP を注射して免疫を行った。免疫は 7 日毎に 1 回、計 3 回行い、免疫前と各免疫 3 日後に水泡液をサンプリングした。得られた水泡液から全 RNA を抽出し、抗体の軽鎖および重鎖の可変領域のそれぞれで cDNA を合成後、数段階の PCR 反応によって新規 scFv 抗体遺伝子を合成した。

【結果および考察】TF-EGFP を抗原としてスイホウガンに計 3 回免疫を行い、全ての個体、各免疫後のサンプルにおいて scFv 遺伝子を取得することができた。各段階の PCR 反応においては、目的の遺伝子断片が増幅されない場合もあったため、PCR 反応条件について再検討した。3 回免疫後のサンプルから得られた scFv 遺伝子は、他のサンプルに比べて明確に目的の scFv 遺伝子が合成されず、繰り返し免疫を行うことにより抗原特異的な抗体遺伝子の発現割合が増加していることが示唆された。このように、抗体生産において一般的に利用される哺乳動物ではなく、魚類のキンギョを利用することで、今まで得られなかった抗体やより特異性の高い抗体を取得できることが期待される。

Key words antibody, FISH, goldfish

G2H1 (0209) ナノ空間反応場を利用した新型コロナウイルス RNA の超高感度検出技術の開発

○松浦俊一[1]*, 馬場知哉[2], 池田卓史[1], 金良鏡[1], 夏井望[1], 阿部慈旺里[1], 山口有朋[1]
([1]産総研・化学プロセス, [2]遺伝研・先端ゲノミクス)

Development of ultra-sensitive detection techniques of the new coronavirus RNA using nanoporous reaction field

○Shun-ichi Matsuura[1]*, Tomoya Baba[2], Takuji Ikeda[1], Liangjing Jin[1], Nozomi Natsui[1], Shiori Abe[1], Aritomo Yamaguchi[1]
([1]Res. Inst. Chem. Proc. Technol., AIST, [2]Adv. Genom. Ctr., NIG)
matsuura-shunichi@aist.go.jp

【背景・目的】新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の診断においては、偽陰性（検出感度の問題）または偽陽性（検出精度の問題）の課題が指摘されている。従って、COVID-19 の精確な診断のためには、標的となる極微量 RNA に対する超高感度かつ高精度の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR 法）の確立が急務である。この課題を克服するために、本研究では、ナノ空間材料（メソポーラスシリカ）の規則性細孔に DNA 増幅酵素を精確に固定化し、酵素周辺の反応環境を至適化することにより 1 分子レベルの極微量 RNA の増幅検出を可能とする超高感度の RT-PCR 法を開発し、COVID-19 の精確な検査（偽陰性・偽陽性の大幅軽減）の実現をめざした。
【方法・結果】酵素の固定化担体として、細孔径や表面親疎水性が異なる 6 種類のメソポーラスシリカを作製した。反応基質となる新型コロナウイルス RNA には、SARS-CoV-2 検出用コントロール RNA（合成品）を適用した。国立感染症研究所の病原体検出マニュアル（2019-nCoV Ver.2.9.1）に従い、新型コロナウイルス RNA ゲノム上のスパイク(S)タンパク質領域を標的とした Nested RT-PCR 法、または、ヌクレオカプシド(N)タンパク質領域を標的とした TaqMan プローブを用いたリアルタイム one-step RT-PCR 法による遺伝子検査について検証した。現行の病原体検出マニュアルでは、40 サイクルで 2 段階の PCR 反応（Nested RT-PCR 法）による検出に合計 4 時間（2 時間の PCR 反応を 2 回）を要し、通常は、1 段階目の PCR での検出は困難であるところ、メソポーラスシリカの規則性細孔に DNA 増幅酵素を固定化することで 1 段階目の PCR において 1 分子レベルの極微量 RNA の精確な増幅検出を確認した。次に、リアルタイム one-step RT-PCR 法においてメソポーラスシリカ固定化 DNA 増幅酵素による効果を検証した結果、遊離の酵素を用いた場合と比較して、検量線（1000, 100, 10, 1 コピー）がより低い位置に平行移動（Cq 値が減少）したことからも高感度化（100 倍程度）が示唆された（特願 2021-109423）。
【謝辞】本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）ウイルス等感染症対策技術開発事業「新型コロナウイルス等感染症の精確な検査を可能にする極微量 RNA の超高感度増幅検出技術（RT-PCR 法）の開発」及び国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 CREST「超高感度ウイルス計測に基づく感染症対策データ基盤」の支援を受けて実施された。

Key words immobilized enzyme, DNA polymerase, RT-PCR, real time PCR

G2H1 (0210) T7 ファージによる蛋白質の折りたたみ改善配列の自律探索

宮本 萌衣[1], ○河原崎 泰昌[1]*, 田中 瑞己[1,2]
([1]静県大食, [2]（現所属）農工大院・農）

Sequence optimization for recombinant protein with higher foldability

Moe Miyamoto[1], ○Yasuaki Kawarasaki[1], Mizuki Tanaka[1,2]
([1]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., [2]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol.)
kawarsky@u-shizuoka-ken.ac.jp

【背景と目的】T7 ファージは大腸菌を自然宿主とするバクテリオファージであり、世代時間 15～20 分程度の溶菌サイクルにより急速に増殖する。この短時間に宿主細胞に侵入したファージゲノム DNA は、T7 DNA ポリメラーゼをはじめとする複製装置やファージ粒子蛋白質の発現を指令し、また自ら T7 DNA ポリメラーゼにより複製される。このファージゲノムの正確で高速な複製は、T7 DNA ポリメラーゼと宿主由来のチオレドキシン（TrxA）の結合に強く依存する。我々は、T7 ファージを蛋白質進化プラットフォームとし、標的蛋白質を宿主因子TrxA との融合蛋白質として発現させることで、フォールディング能が向上した蛋白質（およびその遺伝子）を進化工学的に作出できるのではないかと考え、プラットフォームの開発研究を行った。

【方法】目的蛋白質遺伝子への無作為変異導入は、PCR および TrxA 依存性ファージ DNA 複製によって行った。感染宿主として大腸菌 UC518 株（*ΔtrxA*）を用いた。発現コンストラクトは T7 ファージ gp3.8 の *Bgl*II サイトに挿入した。継続的な宿主への感染・増殖により陽性クローンの選択・進化を行った。

【結果と考察】*trxA* 遺伝子を予め挿入した試作ファージ（T7#31）を用い、フォールディングが向上した GFP の 8 重変異体 GFPmm1 を単離した。GFPmm1 の配列は初期ライブラリーには存在せず、感染を重ねる中で進化工学的に出現し、野生型配列よりも 10^6 以上の増殖能をファージに与えた。安定的に大きな TrxA 融合蛋白質を発現できるよう改良した T7#51（Δ（φ3.8-gp3.8N））では、単鎖抗体（ScFv）、赤色蛍光蛋白質（RFP）、および大腸菌膜蛋白質 TatC を進化的に一定の配列に収束させた。GFPmm1 同様、ScFv、RFP 上のアミノ酸置換は、いずれもβストランドの始点・終点、二次構造間接続部位など、構造境界上に位置していた。これにより、迅速・高効率な蛋白質のフォールディングには、合成直後の構造境界形成が重要な役割を担っている可能性が示された。一方、コドン最適化黄色蛍光蛋白質（YFP）や膜貫通領域を持つ TatA、凝集性大腸菌 HemB 蛋白質を目的蛋白質とした場合は、目的長の融合 TrxA 蛋白質を発現せず、想定外の相同組み換えやフレームシフトにより短絡 TrxA 蛋白質を発現する「暴走進化型」のファージが増殖し、課題が明確化された。以上、T7 ファージの高速増殖系を利用し、増殖速度を最大化する融合蛋白質配列を T7 ファージに自律探索させる実験系を試作したので、本大会でご評価頂き、ご助言賜りたい。

Key words mutagenesis, screening, bacteriophage T7, directed evolution, co-translational protein folding

G2H1 (0211) オリゴ DNA を用いた新規遺伝子合成法の開発

○猿渡雄哉, 高橋宏和, 岡村好子*
（広島大院・統合生命科学）

Development of a new method for gene synthesis using oligo DNA

○Yuuya Saruwatari, Hirokazu Takahashi, Yoshiko Okamura*
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)
okamuray@hiroshima-u.ac.jp

【背景・目的】
合成生物学の目標の一つは、生合成遺伝子群を用いて代謝経路を最適化し、有用物質の生産性を向上させることにある。その中で、初期の合成代謝経路の改変を繰り返す、設計(Design)、構築(Build)、試験(Test)、学習(Learn)の DBTL サイクルと呼ばれる生物工学的なワークフローによって物質生産性の向上を目指すことが必須となる。構築ステップにおいて、現在最も用いられるのは PCA（Polymerase Cycling Assembly)法と呼ばれる、PCR を基盤とした方法である。この方法は、合成困難な配列が存在し、PCR エラーにより配列に変異が入る可能性が有るためクローニング・シークエンスが必須となり、多大な時間と労力を要することが課題である。そこで本研究では、PCR を基盤とせず、正確な配列を維持可能かつ完全セルフリーで合成する CAIOS (circular assembling into ordered sequence)法を開発することを目的とした。
【方法・結果】
CAIOS は、(1) 複数のオリゴ DNA を *E.coli* ligase により環状に連結 (2) MPRCA(Multiply-Primed Rolling Circle Amplification)法による二本鎖化＋増幅 (3) ２度の制限酵素処理 (4) Lambda Exonuclease による一本鎖化という４つのステップからなり、長い１本鎖 DNA(ssDNA)を合成した。現在、我々は CAIOS 法を２回繰り返すことにより、1.2 kb 長の DNA 合成及び、配列の部分的な改変に成功している。
【考察】
本方法の利点は、phi 29 DNA ポリメラーゼを使用しているため増幅時にエラーが入る可能性が非常に低いことに加え、部分的な配列改変も容易であることが挙げられる。特に全行程が無細胞で行えるためハイスループット化も可能であると考えている。

Key words DNA synthesis, DNA polymerase, synthetic biology

G2H1 (0212) CDS の塩基配列が mRNA の転写および転写後調節に与える影響の解析

○照山拓海[1], 川邊陽文[1], 山﨑将太朗[1], 西村侑美[1], 加藤晃[1]*
([1]奈良先端大・バイオ)

Analysis of the effects of CDS sequences on mRNA transcription and post-transcriptional regulation

○Takumi Teruyama[1], Harunori Kawabe[1], Shotoro Yamasaki[1], Yumi Nishimura[1], Ko Kato[1]*
([1]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)
kou@bs.naist.jp

大部分の遺伝子は、機能するために DNA が mRNA に「転写」され、それが「分解」されずに蓄積し、「翻訳」されタンパク質として合成される必要がある。そのため、遺伝子組換え技術を用いて有用タンパク質を効率的に合成するためには、これらの複数の制御機構を考慮する必要がある。このような導入遺伝子を高発現するための手法の一つとして CDS の改変が挙げられる。CDS は mRNA の大部分を占める領域であり、mRNA の安定性や翻訳効率といった転写後調節に大きな影響を与えている。例えば、当研究室では、シロイヌナズナの内在性 mRNA の CDS 上には多数の内部切断部位が存在することを明らかとしており（Ueno et al ., 2018)、切断部位周辺に G リッチの特徴的な配列モチーフが存在することを明らかにしている。また、一般的にコドンの使用頻度はリボソームの伸長に影響を与えると言われており、レアコドンはリボソームを停滞させることで翻訳効率を低下させる。加えて、プロモーター周辺の領域も転写効率に影響を及ぼしており、プロモーター下流の広い領域を占める CDS の GC 含量などもまた転写効率に影響する。そのため、転写因子結合サイトの除去による転写効率の向上や、不安定化配列の除去による mRNA の安定化、コドン使用頻度最適化による翻訳効率の向上など、様々な観点から CDS 配列の最適化が行われてきた。一方で、このような CDS 配列の改変が、実際には転写、mRNA 分解、翻訳のどの過程に影響しているのかを in vivo にて詳細に調べるのは容易ではなく、どの過程に着目した改変が遺伝子の高発現に大きな影響を及ぼすのかを評価した事例は非常に少ない。そこで本研究では、CDS 配列の改変が導入遺伝子の発現に与える影響を詳細に評価することによって、導入遺伝子発現の効率化やタンパク質生産の安定化を目的とする。解析には、転写や、mRNA 分解、翻訳といった複数の異なる観点から最適化されたレポーター遺伝子の CDS 改変系列を用い、配列改変の影響を転写と転写後調節の２つに分けて評価した。具体的には、発現ベクターを植物細胞に一過的に導入し、35S プロモーターによって転写され、蓄積し、翻訳された転写効率および転写後調節の効率の影響を受ける発現量と、人工合成した mRNA を植物細胞に一過的に導入し、転写後調節の影響のみを受けた場合の発現量を比較することで、どの過程の効率の変化が最終的な発現量への影響が大きかったのかを評価した。その結果、CDS 配列の改変は転写効率および転写後調節の両方に大きな影響を与えることを明らかとした。さらにレポーター遺伝子によっては、CDS 配列の改変によって転写効率が 100 倍以上も向上する例を見出すことができた。本研究の結果は、植物へ導入した遺伝子を高発現させるため CDS 配列を改変する際に非常に重要な知見となる。

Key words CDS optimization, transcription, post-transcriptional regulation

G2H1 (0301) 35S プロモーターのコアプロモーター領域への改変が転写開始点へ与える影響

○斉藤康平[1], 山﨑将太朗[1], 川邊陽文[1], 西村侑美[1], 加藤晃[1]*
([1]奈良先端大・先端科学技術)

Effects of modifications of 35S promoter to core promoter region on transcription start site

○Kohei Saito[1], Shotaro Yamasaki[1], Haruhumi Kawabe[1], Yumi Nishimura[1],Ko Kato[1]*
([1] Grad. Sch. Sci. Technol., NAIST)
kou@bs.naist.jp

特定の遺伝子の 5'非翻訳領域（5' untranslated region: 5'UTR）は、mRNA へ転写された後に翻訳エンハンサーとして機能する。当研究室では、これまでに ADH や COR47 といった遺伝子から、高い翻訳エンハンサー能力を持つ 5'UTR の単離しており、導入遺伝子の発現量を大幅に向上させることに成功している。一方で、内在性遺伝子の研究より、転写開始点の違いによって 5'UTR の長さが数塩基異なるだけで、その 5'UTR 配列が有する翻訳能力には大きな差が生じることが示されている。よって、翻訳エンハンサーとして機能する 5'UTR を正確に転写することが、その能力を十分に発揮するために重要であると考えられ、そのためには転写開始点が 1 点に収束している必要がある。しかし、内在性遺伝子の多くは複数の転写開始点を有しており、転写開始点が 1 点に収束する遺伝子は非常に珍しい。そのため、植物における代表的な高発現プロモーターである CaMV35S プロモーターでも、様々な翻訳エンハンサーを連結した場合に転写開始点が分散または変動し、意図しない転写開始点から転写された mRNA の一部が十分な翻訳エンハンサー能力を発揮できない可能性が考えられる。以上のことから、本研究では、CaMV35S プロモーターの転写開始点を 1 点に収束させることを目的とし、CaMV35S プロモーター配列の改変を行った。配列の改変は転写開始点の網羅的解析が可能な CAGE データを参考に行い、シロイヌナズナ内在性遺伝子のうち、転写開始点収束度合いや mRNA 蓄積量、コアプロモーターエレメントの有無などの観点から複数の遺伝子を選抜し、その遺伝子のコアプロモーター配列と CaMV35S プロモーターのコアプロモーター配列を置換した。その改変 CaMV35S プロモーターと翻訳エンハンサーおよびレポーター遺伝子を組み合わせたプラスミドを作製し、一過性発現実験にて、mRNA 蓄積量とレポータータンパク活性値、次世代シーケンサー MinION による転写開始点決定を行った。その結果、未改変の CaMV35S プロモーターに翻訳エンハンサーを連結した場合、転写開始点が複数に分散してしまっていることが明らかとなった。さらに、未改変の CaMV35S プロモーター配列と比較して、いくつかの改変 CaMV35S プロモーター配列では翻訳効率の向上が確認された。このことから、CaMV35S プロモーター配列へ改変を施すことにより、より高い翻訳エンハンサー能力を有する mRNA が転写される割合が増加したことが示唆された。この結果は、高発現プロモーターとしてよく用いられる CaMV35S プロモーターと翻訳エンハンサーを組み合わせた際の能力向上につながるものであり、植物における導入遺伝子の高発現化への活用が期待できる。

Key words CaMV35S promoter, translational enhancer, transcription start sites

G2H1 (0302) 結合領域周辺における DNA 構造パラメーターに基づく麹菌由来転写因子 AoXlnR の転写結合メカニズム予測モデルの構築

○岡　大椰[1]、兒島　孝明[1*]、加藤　竜司[2]、井原　邦夫[3]、中野　秀雄[1]
([1]名古屋大学大学院生命農学研究科　[2]名古屋大学大学院創薬研究科
[3]名古屋大学遺伝子解析施設)

Construction of Prediction Model for Transcriptional Binding Mechanism of the *Aspergillus oryzae* Transcription Factor AoXlnR Based on DNA Structure Parameters around the Binding Region

○Hiroya Oka[1], Takaaki Kojima[1*], Ryuji Kato[2], Kunio Ihara[3] and Hideo Nakano[1]
([1] Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., [2] Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [3] Center for Gene Research., Nagoya Univ.)
E-mail: oka.hiroya@molbiotech-nagoya.org

【目的】 当研究グループでは、転写因子の結合部位解析と発現変動解析によって得られる情報を統合し、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する手法を確立している。この方法論を構築する過程で、開始コドン上流に DNA 結合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ることを確認した。このことから、転写因子-DNA 間相互作用には DNA 一次配列情報に加え、未知の要因が関与していることが示唆された。本研究では、先行研究によって得られた *Aspergillus oryzae* 由来の転写因子 AoXlnR の転写制御情報を基に、DNA 結合モチーフ付近の配列から DNA 構造情報を抽出し、それらを用いて機械学習による転写因子-DNA 結合メカニズム予測モデルの構築を行った。
【方法・結果】先行研究によって得られた AoXlnR 依存的な発現変動と各遺伝子のプロモーター配列を紐付けることで、プロモーターに存在する AoXlnR 結合モチーフを機能的モチーフと非機能的モチーフに分類した。その後、結合モチーフの前後 25 bp を抽出し、DNA 構造に関連するパラメーター HelT、ProT、MGW、Roll を算出した。最終的に、発現変動を教師値として機械学習モデルの構築を行い、DNA 構造情報のみを用いて各モチーフを正しく分類することが可能かどうかを検証した。その結果、AoXlnR 結合モチーフの下流に位置する遺伝子の発現変動の有無は、結合モチーフ周辺の特定の DNA 構造情報と密接に関係していることが明らかとなった。さらに、プロモーター内に存在する結合 DNA モチーフの個数に応じて遺伝子を分類し、それぞれ構築して用いた予測モデルを比較することで、プロモーター領域にあるモチーフの数によって、発現量の差に寄与するパラメータが異なることを明らかにした。

Key words transcriptional regulation, *Aspergillus oryzae*, bioinformatics, 3D DNA structure

G2H1 (0303) Novel molecular mechanism mediated by $Zn(II)_2Cys_6$ transcription factors regulating sclerotia formation in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

○Xueyan Sun[1], Haruka Minagawa[1], Takuya Katayama[1,2], Hiroya Oka[3], Masahiro Ogawa[4], Takaaki Kojima[3], Hideo Nakano[3], Katsuhiko Kitamoto[5], Jun-ichi Maruyama[1,2*]
([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Bioagric. Sci. Nagoya Univ., [4]Noda Inst. Sci. Res., [5]Nihon Pharmaceutical Univ.)

Novel molecular mechanism mediated by $Zn(II)_2Cys_6$ transcription factors regulating sclerotia formation in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

○Xueyan Sun[1], Haruka Minagawa[1], Takuya Katayama[1,2], Hiroya Oka[3], Masahiro Ogawa[4], Takaaki Kojima[3], Hideo Nakano[3], Katsuhiko Kitamoto[5], Jun-ichi Maruyama[1,2*]
([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Bioagric. Sci. Nagoya Univ., [4]Noda Inst. Sci. Res., [5]Nihon Pharmaceutical Univ.)
amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

Sclerotia are the asexual development structures with mycelial aggregation mass formed in a part of filamentous fungal species. Sclerotia are also capable of acting as repositories for sexual reproduction, and their formation is related to cryptic sexuality in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. Previously, we found that two novel $Zn(II)_2Cys_6$ transcription factors TrsA and TrsB are essential for sclerotia formation through screening with the deletion strain library of transcription factor genes in *A. oryzae*[1]. To investigate how TrsA and TrsB mediate sclerotia formation in *A. oryzae*, in the present study, ChIP-seq and RNA-seq analyses were employed[2]. Out of the candidate genes obtained by ChIP-seq analysis, *amyR* for a transcriptional activator of amylase genes was further characterized, since the upregulation of *amyR* in the deletions of *trsA* and *trsB* was revealed by qRT-PCR analysis. No sclerotia were found in *amyR* overexpressing strain, and the number of sclerotia was increased by the *amyR* deletion, indicating that *amyR* negatively regulates sclerotia formation. ChIP-qPCR analysis demonstrated that TrsB was enriched on the *amyR* promoter region, suggesting that TrsB directly downregulates *amyR* to affect sclerotia formation.

1) Nakamura *et al.* (2015) 67th SBJ Annual Meeting, Abstract book p. 89.
2) Minagawa *et al.* (2021) The 2021 Annual Meeting of JSBBA, 2B07-09.

Key words *Aspergillus oryzae*, sclerotia, transcription factor, ChIP

G2H1 (0304) 空間的な病理組織のゲノム変異およびトランスクリプトーム統合解析技術の開発

○山﨑美輝[1,2], 松永浩子[2], 細川正人[1,3], 有川浩司[3], 鈴木直子[3], 林大久生[4], 竹山春子[1,2,3,5]*
([1]早大院・先進理工, [2]産総研・早大 CBBD-OIL, [3]早大・ナノライフ創新研, [4]順大・人体病理病態学講座, [5]早大・生命動態研)

Integrated analysis of spatial genomics and transcriptomics in pathological tissue

○ Miki Yamazaki[1,2], Hiroko Matsunaga[3], Masahito Hosokawa[1,3], Koji Arikawa[3], Naoko Suzuki[3], Takuo Hayashi[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. Human Pathol., Grad. Sch. Med., Juntendo Univ., [5] Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)
haruko-takeyama@waseda.jp

生体組織の機能を理解するには、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。特にがん組織は、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、それら細胞の相互作用により病態が形成される。しかし、解析に使用できるがん病理組織は限られており、そのほとんどが生体分子の抽出が困難であるホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)標本の状態で保存されている。そこで本研究では、FFPE 標本の微小領域(直径 100 μm)から mRNA 及び DNA を同時に抽出する手法を検討し、分子標的薬投与前後の肺がん組織の解析に応用した。
効率的な微量 mRNA 及び DNA の同時抽出には、オリゴ d(T)付加磁気ビーズ及びカルボキシル基付加磁気ビーズを使用した。本手法を用いた微小組織の遺伝子発現解析では、従来の手法と比較して検出遺伝子数が約 20%上昇し、切片 1 枚から抽出した total RNA と同程度の遺伝子検出が可能となっている (Yamazaki et al. 2020)。微小組織から抽出した DNA は、全ゲノム増幅産物から複数の EGFR 変異の検出が可能となっている。また、脱架橋処理条件を、mRNA と DNA それぞれについて最適化することで、凍結標本だけでなく FFPE 標本の解析も可能とした。
続いて、本手法を分子標的薬投与前後の肺がん組織に応用し、空間的な遺伝子発現解析及び EGFR ゲノム変異の検出を行った。分子標的薬投与後の EGFR 変異陽性肺がん組織から、正常部位、残存する腫瘍部位、腫瘍周辺の間質、寛解部の間質を形態学的に分類の上採取し、薬剤投与前の肺がん組織からは、腫瘍部位を採取した。薬剤投与後の腫瘍部位では薬剤投与前に比べて、細胞外マトリックスと受容体の相互作用が活性化されており、薬剤投与後に残存するがん細胞の薬剤耐性獲得機構への影響が示唆された。腫瘍周辺の間質では寛解部の間質と比較して、免疫チェックポイント阻害剤の標的となる PD-L1 発現と PD-1 チェックポイント経路の活性化が見られた。
直径 100 μm の微小組織から遺伝子発現及びゲノム変異を同時に検出する当手法は、貴重な病理サンプルの解析に有用である。今後さらに知見を積み重ねることで、がん微小環境における各細胞の薬剤応答を捉え、新たな耐性獲得メカニズムの解明や新規治療法開発への応用を目指す。

Key words transcriptome, mutation, tumor, micro-tissue

G2H1 (0305) 組織空間的な転写産物解析によるマウス心機能発現制御機構の解析

○松永浩子[1], 牧野祐樹[2], 杉山夏緒里[4,5], 我妻竜太[2,3], 山﨑美輝[2,3], 鈴木直子[1], 濱口悠[2], 浜田道昭[2,3], 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・早大 CBBD-OIL, [4]早大・理工総研, [5]早大・生命動態研)

Analysis of the regulation mechanism in mouse cardiac function by tissue spatial transcriptomics

○Hiroko Matsunaga[1], Yuki Makino[2], Kaori Sugiyama[4,5], Ryota Wagatsuma[2,3], Miki Yamazaki[2,3], Naoko Suzuki[1], Yu Hamaguchi[2,3], Michiaki Hamada[2,3], 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., [5] Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

haruko-takeyama@waseda.jp

組織を形作る個々の細胞は遺伝子制御の基本単位であり、転写プログラムに基づいてその表現型や機能が決定されていく。一方、それぞれの細胞は個別に機能しているわけではなく周辺細胞と複雑にインタラクションすることでその形態および機能が決定されていく。我々の研究室では、組織内空間情報と紐付けされた生体組織の包括的な機能理解を目指し、組織の微小領域（直径 100μm)を顕微鏡下で形態を観察しながら網羅的かつ高速に採取するシステムの開発を進めてきた。採取された微小組織片は個別反応チューブに回収され、組織片が包含する DNA や mRNA、タンパク質などあらゆる生体分子の計測が可能である。本研究では、この技術を用い新生児マウス心臓を材料として継時的に変化する遺伝子発現の様子を捉えることで、生後 1 日目からの 1 週間で劇的に成熟していく心臓の様子をとらえることを目指した。

採取された微小組織片を用いた発現解析を進めている。これまでに生後 1 日目の心臓切片から網羅的に微小組織片を採取し、左心室に特徴的に発現する未成熟マーカー遺伝子の抽出や、生後 1 週間で発現量が大幅に低下していく遺伝子が抽出されてきている。解析に用いている全長転写物ライブラリからは、翻訳されない転写産物である non-coding RNA や転写産物の多様性に関与するアイソフォームの情報も併せて得られている。現在、生後 1 週間までの心臓組織の空間的転写産物の解析を進めており、継時的に変化しかつ空間的に特徴的に捉えられる転写制御の動態の理解から心臓の発達機構の理解につなげることを目指す。

Key words transcriptome, transcriptional regulation, heart, development

G2H1 (0306) 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* におけるキチン資化遺伝子の発現調節機構の解明

○米谷舞衣[1], Chen Yamin[1], 折田和泉[1], 今中忠行[2], 福居俊昭[1]*
([1]東工大・生命理工, [2]立命館大学・生命科学)

Elucidation of regulation mechanism for expression of chitin-assimilation genes in *Thermococcus kodakarensis*

○Mai Yonetani[1], Yamin Chen[1], Izumi Orita[1], Tadayuki Imanaka[2], Toshiaki Fukui[1]*
([1]Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech, [2]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)
tfukui@bio.titech.ac.jp

[目的]
キチンは自然界に大量に存在する再生可能バイオマス資源である。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* は、超好熱菌としては珍しいキチン資化能を有している。本菌のキチン資化関連遺伝子は、約 13 kbp の領域にクラスターを形成しており、その発現はキチンの分解物質である $GlcNAc_2$ によって誘導される。これまでにクラスター中の TK1762（機能未知タンパク質）、TK1763（PIN ドメインタンパク質）、および両方を欠失した株ではキチン資化関連遺伝子群の発現量が増加することが見出されており、これらのタンパク質が発現制御に関わることを推測している。EMSA 解析において TK1762 はキチン資化関連遺伝子のプロモーター領域への特異的な DNA 結合能を持ち、TK1763 と複合体を形成することでより強く結合することが示された。また、TK1762-TK1763 複合体と相互作用するタンパク質候補として隣接遺伝子にコードされる TK1761 (β-グリコシダーゼ) が検出された。本研究では、TK1761、TK1762、TK1763 の DNA 結合能に着目し、*T. kodakarensis* におけるキチン資化関連遺伝子群の発現制御について解明を行った。
[方法・結果]
先行研究の EMSA 解析において TK1761 の DNA 結合能が示唆されたが、β-グリコシダーゼが DNA に結合することはこれまでに報告がない。そこで、本研究において詳細な検討を行ったところ、TK1761 の DNA 結合能は確認されなかった。このことから、TK1761 は DNA には直接結合せず、TK1762-TK1763 複合体と相互作用していることが考えられた。次に、誘導物質である GlcNAc オリゴマーを添加あるいは非添加条件で培養した菌体について、抗 TK1762 抗体を用いた ChIP-qPCR により TK1762 の *in vivo* DNA 結合能を解析した。その結果、TK1762 は GlcNAc オリゴマーの非存在下においてキチン資化関連遺伝子領域に特異的に結合し、GlcNAc オリゴマー存在下で結合が解離することが示された。現在、TK1761 および TK1762 に関する ChIP-seq 解析、および、TK1761 と TK1762-TK1763 複合体の相互作用について欠失株を用いた解析を進めている。

Key words thermophile, transcriptional regulation, DNA-binding protein

G2H1 (0307) 糸状菌における鉄恒常性維持のマスター制御因子 HapX と相互作用するタンパク質の機能解析

○小林吉生[1*], 三浦綾夏[1], 榊原誠也[1], 辻上誠也[1], 志水元亨[1], 加藤雅士[1]
([1]名城大院・農)

Functional analysis of binding proteins of the fungal master regulator of iron homeostasis, HapX

○Yoshio Kobayashi[1*], Ayaka Miura[1], Seiya Sakakibara[1], Msaya Tsujikami[1], Motoyuki Shimizu[1], Masashi Kato[1]
([1]名城大院・農)
yoshioyosshy@outlook.jp

【緒言】HapX は我々が見出した真菌類特有の bZIP 型転写因子である。HapX は鉄欠乏条件下において HapB/C/E 複合体と相互作用し、TCA 回路、呼吸鎖、酸化ストレス応答、アミノ酸生合成系に含まれる鉄含有タンパク質の制御を通じて糸状菌の主要な生命活動に影響を与えるため、真菌の鉄恒常性維持機構の主要制御因子と考えられる。さらに HapX は、モノチオールグルタレドキシン GrxD との相互作用を介した鉄の感知能力に基づき、鉄欠乏時の液胞鉄貯蔵の抑制と鉄過剰時の液胞鉄貯蔵の促進に関与することが報告されている [1,2]。本研究では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* における鉄含有酵素遺伝子発現抑制の分子機構の全体像を明らかにすることを目的として、鉄欠乏条件下において HapX と相互作用するタンパク質の網羅的な解析を行った。

【方法・結果】*A. nidulans* において、*gapA* プロモーターを用いて 3 x FLAG-His タグを融合させた HapX を高発現させた株を作製した。この株を、鉄欠乏条件下で 2 日間培養後、HapX を精製した。得られた溶出画分をトリプシンによりペプチド断片へ分解後、LC-MS/MS に供して HapX と特異的に相互作用しているタンパク質を網羅的に解析した。その結果、これまで相互作用が報告されていない新たな HapX 相互作用タンパク質の候補を 10 種同定した。現在、これら候補タンパク質と HapX との相互作用を *in vitro, in vivo* 両面から解析を進めている。本研究は HapX の分子機能の理解に重要であるだけでなく、糸状菌による物質生産やヒト・植物の病原性糸状菌の防除にも貢献しうる。

1. Gsaller F et al. *EMBO J*. 33(19): 2261-76 (2014)
2. Misslinger M et al. *PLoS Genet*. 15(9): e1008379 (2019)

Key words HapX, *Aspergillus nidulans*, transcriptional regulation, protein-protein interaction analysis

G2H1 (0308) キシロース発酵性酵母 *Spathaspora passalidarum* における遺伝子破壊法の確立

○豊留 あいり[1], 山城 裕孝[2], 笹野 佑[1,2]*, 田口久貴[1,2]
([1]崇城大院・工, [2]崇城大・生物生命)

Development of gene disruption method in the xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum*

○Airi Toyodome[1], Hirotaka Yamashiro[2], Yu Sasano[1,2]*, Hisataka Taguchi[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Sojo Univ., [2]Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)
sasano@bio.sojo-u.ac.jp

バイオエタノール生産に用いられる酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、キシロースを発酵することができないため、キシロースを多く含むリグノセルロース系バイオマスを用いたバイオエタノール生産には適していない。そのため酵母の改良やキシロース発酵性酵母の利用が求められている。キシロース発酵性酵母 *Spathaspora passalidarum* は、嫌気性条件下のキシロース培地において高いエタノール生産性を示し、エタノール生産の宿主として近年注目されている。他のキシロース発酵性酵母には見られない特徴として、キシロース資化に関わる遺伝子 *XYL1* と *XYL2* がそれぞれ 2 つずつ存在することが明らかになっている。これらキシロース資化遺伝子の詳細な生理機能を明らかにするためには遺伝子破壊株を作製する必要があるが、これまで遺伝子破壊法は確立されていない。そこで、本研究ではエレクトロポレーション法を用いた遺伝子破壊法の確立を目指した。

モデル遺伝子としてアデニン合成に関与する *ADE2* 遺伝子の破壊を試みた。*ADE2* 遺伝子の上流と下流約 2 kb の領域の間にゼオシン耐性遺伝子を挟んだ遺伝子破壊用断片を作製し、エレクトロポレーション法を用いて *S. passalidarum* のゲノム内に導入した。コロニーPCR により *ADE2* 遺伝子座への断片の挿入を確認したが、得られた形質転換体はアデニン要求性を示さなかった。このことから本酵母は二倍体であることが示唆された。ヘテロ接合性の消失（LOH）を利用し、高濃度のゼオシン含有培地にてホモ破壊株を選択する方法を確立し、*ADE2* 遺伝子のホモ破壊株を取得した。取得した株のコロニーは赤色を呈し、アデニン要求性を示した。現在、他の遺伝子において破壊株作製を試みている。

Key words xylose-fermenting yeast, gene disruption, transformation

G2H1 (0309) 新規ゲノム編集ツール TiD を用いたヒト細胞でのゲノム編集

○和田直樹[1], 村上愛美[1], 丸井和也[1], 宮下尚之[2], 刑部祐里子[1,3], 刑部敬史[1*]
([1]徳島大院・社会産理工, [2]近畿大院・生物理工, [3]東工大院・生命理工)

Genome editing using a novel genome editing tool, TiD, in human cells

○Naoki Wada[1], Emi Murakami[1], Kazuya Marui[1], Naoyuki Miyashita[2], Yuriko Osakabe[1,3], Keishi Osakabe[1*]
([1] Tokushima Univ., [2]Kindai Univ., [3]Tokyo Tech.)
E-mail: wada.naoki@tokushima-u.ac.jp

近年、ゲノム上の狙った配列を短期間に正確かつ効率的に改変できるゲノム編集技術の開発が進んでおり、特に、CRISPR-Cas システムを利用した技術の発展が著しい。しかし、特異性や配列の選択性の問題など克服すべき課題もまだ残されており、さらには、国内の産業応用の際には知的財産の問題が生じることから、これらの課題を克服する新しい国産ゲノム編集ツールの開発が望まれている。

本研究では、自然界に存在する多様な CRISPR-Cas システムの中から、機能の同定が進んでいない CRISPR-Cas type I-D システムに注目し、ヒト細胞に対する新規ゲノム編集技術 TiD としての開発を行った。TiD は 5 つの Cas タンパク質 (Cas3d, 5d, 6d, 7d, 10d)と PAM 配列下流の 35-36 塩基を認識する gRNA で構成される。TiD gRNA は 35, 36 bp を認識することから、20 bp を認識する Cas9 よりも高い特異性を持つことが期待される。我々はまず *In vitro* において、TiD にユニークな Cas タンパク質である Cas10d が一本鎖 DNA 分解活性と ATP 分解活性を持つことを明らかにした。Cas3d でも同様に ATP 分解活性が検出されたことから、TiD においては Cas10d が DNA の切断、Cas10d と Cas3d がヘリカーゼ機能を担っていると考えられる。次に、ヒト細胞において DNA 二本鎖切断活性を検出する NanoLUC SSA reporter assay を開発し、TiD の各 Cas タンパク質と gRNA の共発現によって標的特異的な DNA 二本鎖切断を誘導できるかを検証した。その結果、TiD は GTT, GTC, GTA を PAM として認識し (GTT, GTC > GTA)、標的配列に対して DNA 二本鎖切断を誘導できることを明らかにした。さらに、ヒトゲノム上の遺伝子に対するゲノム編集を行い、TiD が CRISPR-Cas9 と同様の小さな挿入・欠失に加え、PAM を挟んで両方向に数十 kb にも及ぶ長鎖欠失を誘導することを明らかにした。これらの結果は、TiD が既存の技術とは異なるユニークなシステムであることを示唆している。また、標的配列以外のサイトに対するオフターゲット変異は検出されなかった。このことから、TiD は高い特異性を持つツールであると考えられる (Osakabe, Wada et al., NAR 2021)。また我々は、植物においても TiD によるゲノム編集が可能であることを報告しており(Osakabe et al., Comm. Biol. 2020)、これらの結果は、TiD が既報の CRISPR-Cas システムと比べてユニークなシステムであり、また、動植物における新規国産ゲノム編集ツールとして有用であることを示している。今後、医療、産業、農業分野を含めた様々な分野への応用展開が期待される。

Key words Genome editing, CRISPR-Cas, human cells, TiD

G2H1 (0310) クエン酸高生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L の育種を目的とした CRISPR/Cas9 システムを利用した遺伝子置換法の開発

○吉岡 育哲[1,2], 桐村 光太郎[1,2*]
([1] 早大院・先進理工, [2] 早大・理工総研)

Development of gene replacement method based on CRISPR/Cas9 system for breeding a citric acid-hyperproducing filamentous fungus *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L

○Isato Yoshioka[1,2], Kohtaro Kirimura[1,2*]
([1] Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2] Res. Inst. Sci. Eng, Waseda Univ.)
kkohtaro@waseda.jp

【背景・目的】

クエン酸は爽快な酸味を有するトリカルボン酸で食品や飲料の酸味料としての用途があり、工業的には *Aspergillus niger* をはじめとした *Aspergillus* section *Nigri* 糸状菌を用いて発酵生産されている[1]。また、クエン酸生産糸状菌は耐酸性に優れ、著量の糖を資化しクエン酸に変換することから種々の有用化合物生産菌の宿主として期待されている。しかし、糸状菌の遺伝子組換えではマーカー遺伝子の数に制限があることや相同組換え効率が低いことから、優良菌株の育種のためには効率的な遺伝子置換法が必要である。本研究では、クエン酸高生産糸状菌 *A. tubingensis* WU-2223L を宿主として CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集による遺伝子置換法を開発した。

【方法・結果】

演者らは、安定性や改変の容易さに優れた DNA を gRNA 源として利用することに着目した。そこで、ATP スルフリラーゼをコードする *sC* 遺伝子を標的とする gRNA 配列を含む DNA 断片と Cas9 タンパクを WU-2223L 株のプロトプラストに導入することで、セレン酸耐性を指標に *sC* ノックアウト (KO) 株の単離に成功した。すなわち、導入した DNA 断片が *in vivo* で gRNA 源として機能することを見出した。さらに、複数の gRNA 配列を 1 つの DNA 断片として導入することで、複数の遺伝子が高効率で同時に置換されることを想定し、*sC* および硝酸還元酵素をコードする *niaD* 遺伝子を標的に遺伝子ノックインを利用して KO を行った。演者らの予想通り、WU-2223L 株由来の相同効率組換え株を宿主として単離された *sC* の KO 株（セレン酸耐性株）の 95%以上で *niaD* も同時に KO されることを見出した。これらの知見をもとに、遺伝子置換株の選択マーカーとして利用する *sC* 遺伝子に関して分子内相同組換えを利用して *sC* 遺伝子の相補（復帰）によるマーカーレスキューが可能なノックインドナーを作製した。以上より、演者らは WU-2223L 株を宿主として DNA 断片を利用した高効率な遺伝子置換法と遺伝子置換に際して繰り返し利用可能なマーカーレスキュー法から成る高効率な遺伝子置換法の開発に成功した[2]。

[1] Kirimura, K. and Yoshioka, I. pp. 158-165, in: Moo-Young, M. (Ed.), Comprehensive Biotechnology, vol. 3. Elsevier, London (2019).
[2] Yoshioka, I and Kirimura, K. J. Biosci. Bioeng., **131**, 579-588 (2021).

Key words *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*), citric acid, CRISPR/Cas9, genome editing

G2H1 (0311) *Actinoplanes* 属放線菌 NBRC14279 株のゲノム解析

近藤 永遠[1], 森田 大地[2], 黒田 照夫[2], ○熊谷 孝則[2*]
([1] 広島大・薬, [2] 広島大院・医系科学)

Genome analysis of a strain NBRC14279 belonging to genus *Actinoplanes*

Towa Kondoh[1], Daichi Morita[2], Teruo Kuroda[2], ○Takanori Kumagai[2*]
([1]Sch. Pharm. Sci., [2]Grad. Sch. Biomed. Health Sci., Hiroshima Univ.)
tkuma@hiroshima-u.ac.jp

【目的】マイコプラネシン A（MYP A）は, 希少放線菌である *Actinoplanes awajinensis* subsp. *mycoplanecinus* NBRC14279 より生産される抗生物質であり, *Mycobacterium* 属細菌に対して特異的な抗菌活性を示す [1-3]。MYP A は 1983 年に報告された化合物であるが, これまで, その生合成遺伝子クラスターは明らかにされていない。本研究では, MYP A 生合成遺伝子クラスターを同定すること, 並びに, NBRC14279 株の二次代謝産物生産能を評価することを目的として, 本菌株のゲノム解析を行ったので報告する。

【方法・結果】NBRC14279 株ゲノムの塩基配列決定は, ロングリードシークエンスが可能な PacBio RSII を用いて行った。その結果, 平均長 9,180 bp のリードが 98,175 個得られ, HGAP3 プログラムによりアッセンブリーした結果, 約 11.5 Mb のコンティグが一つ得られた。この結果から, NBRC14279 株のゲノムは約 11.5 Mb であることが判明した。なお, GC 含量は 71.1%であり, 放線菌のゲノムとしては妥当な値であった。続いて, 得られたゲノム配列について, Prokka プログラムを用いてアノテーションを行ったところ, 10,190 個のタンパク質をコードする遺伝子, 130 個の tRNA をコードする遺伝子, および, 18 個（6 オペロン）の rRNA をコードする遺伝子が存在することが示唆された。次に, NBRC14279 株の二次代謝産物生産能を評価するため, antiSMASH ver. 6.0 プログラムを用いてゲノム配列を解析した。その結果, 20 個の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを含む領域の存在が示唆され, NBRC14279 株は *Streptomyces* 属放線菌と同等の二次代謝産物生産能を保有することが明らかになった。続いて, 得られたクラスターを詳細に解析したところ, 領域 12 に存在する non-ribosomal peptide synthetase をコードする遺伝子（*Aaw_7210*～*Aaw_7212*）を含むクラスター（*Aaw_7203*～*Aaw_7218*）が, MYP A 生合成遺伝子クラスターではないかと推定された。Aaw_7210, Aaw_7211 および Aaw_7212 は, それぞれ 6 個, 3 個および 1 個のモジュール構造を保有しており, 10 アミノ酸から成る MYP A のペプチド鎖伸長および環化を触媒するものと考えられた。また, これら遺伝子の周辺には, tailoring 酵素をコードすると考えられる遺伝子が存在していた。今後, 遺伝子破壊実験を実施する予定である。

【文献】

[1] Torikata, A. *et al. J. Antibiot.* **36**, 957-960 (1983). [2] Nakajima, M. *et al. J. Antibiot.* **36**, 961-966 (1983). [3] Nakajima, M. *et al. J. Antibiot.* **36**, 967-975 (1983).

Key words *Actinoplanes awajinensis*, mycoplanecin, genome analysis

G2H1 (0312) ナノポアシークエンサーを用いたシロイヌナズナ 3'UTR の解析

○藤巻 篤史[1], 山﨑 将太朗[1], 川邊 陽文[1], 加藤 晃[1*]
([1] 奈良先端大・バイオ)

Analysis of *Arabidopsis* 3'UTR using a nanopore sequencer

○Atsushi Fujimaki[1], Shotaro Yamasaki[1], Harunori Kawabe[1], Ko Kato[1*]
([1] Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)
kou@bs.naist.jp

遺伝子は、生命の設計図とも言える重要なものであり、生物の生存に必要なほとんどの物質は遺伝子の情報に基づいて合成されている。この遺伝子情報から目的の遺伝子産物が合成されることを遺伝子発現と呼ぶ。 遺伝子情報から目的のタンパク質が合成されるまでの過程には mRNA の転写や分解、翻訳といった複数の過程が存在しており、それらの過程は DNA 上のプロモーターやターミネーター、mRNA 上の非翻訳領域やタンパクコード領域といった様々な領域の配列によって制御されている。その中でも mRNA の 3’非翻訳領域(3’ UTR)は、翻訳されない一方で、マイクロ RNA 応答エレメント、AU リッチエレメント、ポリ A テール、RNA 二次構造、代替ポリアデニル化等を通して mRNA の安定性や翻訳効率など転写後調節に非常に重要であることが報告されている。加えてこの 3’ UTR 配列の 3’末端は、転写された mRNA が切断され polyA が付加されることによって決定され、これはターミネーター上の polyA シグナル等の配列に依存している。そのため polyA シグナル等の配列が不適切である場合は、pre-mRNA から変換される mRNA の量が低下し、下流遺伝子の転写にも影響を及ぼす。このようにターミネーター並びに 3’ UTR は、mRNA の転写、分解、翻訳といった幅広い過程に影響を及ぼす重要な要素であると言える。しかしながら、現在主流となっているショートリードシーケンサーを用いた RNA-Seq では、mRNA の 3’末端位置の網羅的な同定は困難であり、ターミネーターや 3’ UTR の重要性や、遺伝子発現に影響を及ぼす配列的特徴を詳細に解析することができなかった。一方で、近年発展が著しいロングリードシーケンスでは、1 つのリードで mRNA 分子全体を網羅することができるため、3’末端の情報を含む完全長の配列解析を高精度に実施することができる。
本研究では、Oxford Nanopore Technologies のロングリードシーケンサーを用いて、シロイヌナズナ植物体、およびシロイヌナズナ T-87 培養細胞の通常条件と熱ストレス条件の全長 cDNA の網羅的な解析を行った。その結果、それぞれの条件下で、約 1000 万の cDNA 配列を取得することに成功し、従来の RNA-seq では不明瞭だった遺伝子発現と 3’ UTR の長さ、3’ UTR の塩基パターン、条件間での 3’ UTR の変化などの様々な要素との関係性に関する情報が得られている。ここでは得られた解析結果の概観について紹介する。

Key words 3'UTR, polyadenylation, nanopore sequencer, transcriptome

G2H2 (0201) PromA 群に属する新たな広宿主域プラスミドベクターの構築

○上條達哉[1]，金原和秀[1]，新谷政己[1,2]*
([1]静大院・総合科技，[2]静大・グリーン研)

Construction of a new broad host range plasmid vector belonging to PromA group

○Tatsuya Kamijo[1], Kazuhide Kimbara[1], Masaki Shintani[1,2]*
([1]Grad. Sch. Integr. Sci Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
shintani.masaki@shizuoka.ac.jp

プラスミドは，微生物に，細胞外から遺伝子を挿入するためのベクターとして用いられる．しかし，既存のベクターを適用できる微生物の種類は限られているため，既存のベクターとは適用範囲の異なる新たなベクターを開発・構築することが重要である．当研究室では，環境中から多くの PromA 群プラスミドを取得してきた．本群のプラスミドは，広い宿主域を示し，異なる亜群に属するプラスミドの宿主域が互いに異なる[1]．そこで本研究では，PromA 群由来のベクターを構築することを目的として，プラスミドの複製開始点である *oriV* と，接合伝達開始点である *oriT* の特定を行った．

まず，*oriV* 領域が既に推定されている PromAβ 群[2]の情報を参考にして，異なる亜群のプラスミド，pSN1104-11(PromAγ)および pSN0729-62(PromAδ)の *oriV* の推定を行った．*repA* および推定 *oriV* 周辺領域断片，テトラサイクリン耐性遺伝子を pUC19 に挿入して，シャトルプラスミドを作製した．作製したシャトルプラスミドで *Pseudomonas* 属細菌を形質転換し，形質転換体の生育の可否によって，PromA 群由来のレプリコンが機能するか検証した．その結果，pSN1104-11 および pSN0729-62 由来のプロモーター領域を含む *repA*（それぞれ 1616，1430 bp）と *oriV*（それぞれ 731，717 bp）を挿入したシャトルプラスミドが *Pseudomonas* 属細菌内で複製された．従って，PromA 群プラスミド上の primase や single strand DNA binding protein 等，DNA 複製に関わると推定されるタンパク質をコードする遺伝子は，*Pseudomonas* 属細菌内における PromA 群プラスミドの複製に必須ではないことが示唆された．PromA 群の *repA* と *oriV* のみで構築されたミニプラスミドは，新規広宿主域ベクターとなりうるため，このベクターを複製可能な細菌の種類についても調べている．

プラスミドの接合伝達は，relaxase が *oriT* 内の特定の配列（*nic*）を認識し，二本鎖 DNA にニックを入れることで開始される[3]．本研究では，pSN1104-11 の *oriT* を oriTfinder[4]で推定した．推定 *oriT* 領域を挿入した pUC19 を作製し，pSN1104-11::*gfp* を保持する大腸菌を形質転換した．その後，得られた形質転換体を供与菌［ゲンタマイシン（Gm）感受性］，Gm 耐性を示す別の大腸菌を受容菌として接合し，接合完了体の生育の可否によって，PromA 群由来の推定 *oriT* が機能するか検証した．その結果，236 bp の推定 *oriT* 領域を挿入した pUC19 が接合伝達した．現在，当該領域の二本鎖 DNA のうち，どちらの鎖にニックが入り，伝達するのか調べている．

[Reference]
1) Yanagiya et al., *Front Microbiol*.,2018;9:2602
2) Gstalder et al., *Res Microbiol*.,2003;154:499-509
3) 松井ら，環境バイオテクノロジー学会誌, 2011;11(1-2);69-75
4) Li et al., *Nucleic Acids Res*.,2018;46:229-234

Key words plasmid, vector, PromA

G2H2 (0202) これまで見過ごされてきた広宿主域 PromA 群プラスミドの性状分析

○山本雪絵[1,2]，陶山哲志[2]，髙木妙子[2]，大田悠里[2]，野田尚宏[2]，金原和秀[1]，新谷政己[1,3]*
([1]静大院・総合科技，[2]産総研・バイオメディカル，[3]静大・グリーン研)

Characterization of PromA - a long time unnoticed group plasmids - having broad host range

○Yamamoto Yukie[1,2], Suyama Tetsushi[2], Takagi Taeko[2], Ota Yuri[2], Noda Naohiro[2], Kimbara Kazuhide[1], Shintani Masaki[1,3]*
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Biomed. Res. Inst., AIST., [3]Shizuoka Univ. RIGST.)
shintani.masaki@shizuoka.ac.jp

プラスミドは異なる細菌間を接合伝達により伝播し，遺伝子群を運ぶことで，宿主の生理的機能を劇的に変化させる．よって，プラスミドは，細菌の急速な進化を促し，多剤耐性菌の出現や蔓延の原因にもなる．先行研究[1,2]において，全国の環境試料から，元の宿主を培養しない方法でプラスミドを収集した．その結果，これまで報告例の少なかった PromA 群（Inc.グループ）に属するプラスミドが，種々の環境試料から多数取得された．また，異なる綱の細菌間を伝播する広宿主域プラスミドであることが示された[1]．従って，本群は，これまで見過ごされてきたものの，環境中で遺伝子の水平伝播を担う，主要なプラスミドグループのひとつだと予想された．これまでに，PromA 群プラスミドを複製，接合伝達可能な宿主域を調べ，その安定性を比較してきた．その結果，PromA 群のサブグループ(PromA β-1, -γ, -δ)の違いによって安定性が異なったことから，各プラスミドのコピー数に着目して比較を行った．また，本群プラスミドがこれまで見過ごされてきた原因の一つとして，PromA 群プラスミドをもつ環境中の宿主が難培養性である可能性が考えられた．そこで，培養に依存しない方法で，環境中における本群プラスミドの宿主の同定を試みた．

プラスミドコピー数は，大腸菌の染色体上と，PromA 群プラスミド上にそれぞれ 1 コピーある遺伝子(*uidA* と *repA*)の存在比を qPCR の結果から算出した．pSN1104-11::*gfp*(PromAγ)と pSN0729-62::*gfp*(PromAδ)が 1-2 コピーと算出されたのに対し，pMH0613-68::*gfp*(PromAβ-1)は，約 0.02 コピーと顕著に低かった．同じ PromA 群プラスミドであっても，サブグループによってコピー数が大きく異なることが示唆された．そこで，元来の宿主の同定は，大腸菌内で 1-2 コピーが安定に維持された PromAγ プラスミドを対象にした．まず，佐鳴湖(静岡県浜松市)底泥試料から採取した環境細菌を，直径 30 μm の液滴に 1 細胞ずつ，PromAγ プラスミドを特異的に検出する PCR 溶液とともに封入した．次に，PCR で生じた蛍光を指標に，250 万個から 422 個の目的の液滴を回収することに成功した．さらに，回収した液滴について 16S rRNA 遺伝子領域のアンプリコンシーケンス解析を行った結果，PromAγ プラスミドの環境中における宿主候補を，500 種以上から 10 種のバクテリアに絞り込むことができた．

[1)]Yanagiya et al, 2018, Front. Microbiol. 9:2602. [2)]山本雪絵，2019 年度卒業論文

Key words plasmid, self-transmissible plasmid, PromA plasmid, broad host range

G2H2 (0203) 大腸菌プラスミドへの高頻度なトランスポゾン挿入現象

○中村美紀子[1]*，相原惇也[2]，鈴木絢子[3]，星田尚司[2]，赤田倫治[2]
([1]信州大基盤研セ，[2]山口大工，[3]大分大工)

High-frequency transposon insertion into *E. coli* plasmid

○Mikiko Nakamura[1]*, Junya Aihara[2], Ayako Suzuki[3], Hisashi Hoshida[2], Rinji Akada[2]
([1]RCAST, Shinshu Univ, [2]Eng, Yamaguchi Univ, [3]Eng, Oita Univ)
nakamuramikiko@shinshu-u.ac.jp

生物工学における大腸菌プラスミドは有用タンパク質の製造やウイルスベクターワクチン、RNA ワクチンの鋳型にも用いられ、高品質であることが求められているが、我々はプラスミド調製時の通常の培養でトランスポゾンが高頻度にプラスミドに挿入されることを見出した。コロニーの 9 割に挿入されていることもあり、正常なプラスミドを得るためには、トランスポゾン挿入現象を把握しコントロールできるようにすることが重要である。そこで本研究では、トランスポゾン挿入現象を把握するため、トランスポゾン挿入のない集団（t0 集団）を用意し、いつ、どのくらいの頻度でトランスポゾンが挿入されるのかを調べた。

プラスミドには恒常発現する srlA プロモータの下流に赤色タンパク質遺伝子 eEmRFP を導入した pAmp-srlAp-eEmRFP プラスミドを用いた。正常プラスミドでは大腸菌コロニーは赤色を呈し、トランスポゾンが挿入された異常プラスミドでは白色となるので、トランスポゾン現象をコロニーの色で判別可能である。

赤色のシングルコロニーをピックして LB 液体培地、37℃で一晩培養し、培養液を希釈してプレートに撒くと、33～44%の白色コロニーが現れ、プラスミドにトランスポゾンが挿入されていた。シングルコロニーにトランスポゾン挿入が生じたプラスミドを持つ大腸菌が存在していたのか、それとも液体培養時に挿入したのかを調べるため、赤色コロニーを水に懸濁し、培養せずにそのままプレートに撒いた。生えてきた約 2700 コロニー全てが赤色を呈し、最初の赤色コロニーにはトランスポゾンが挿入されたプラスミドを持つ大腸菌は存在しておらず、液体培養時に生じたことが分かった。同時に、トランスポゾン挿入のない t0 集団を用意することができた。

t0 集団を用意できたので、次に、トランスポゾンが入るタイミングを液体培養で調べた。t0 集団を LB 液体培養すると、8 時間までは 4%未満であった白色コロニー出現率が、12 時間になると 33%と増え、8 時間目以降にトランスポゾン挿入現象が活発になることが分かった。次に、プレート上のコロニーをそのままプレートで培養を続けた場合にトランスポゾンが入るのかを調べた。t0 集団の大腸菌を撒いたプレートを 24、48、72 時間と培養し、各時間のコロニーをかきとりまき直し、生えてきた赤色と白色のコロニーを数えた。24 時間培養では 0%であったが、48 時間目で 2.5%、72 時間目では 16.7%の白色コロニーが出現した。プレートによるコロニー培養でも、24 時間培養以降にトランスポゾンが挿入されることが分かった。

トランスポゾンはプラスミドにほとんど入らないか、たとえ入ってもクローンを選ぶので問題にならないと考えられている。しかし本研究で、長時間培養するとトランスポゾン挿入が生じることが分かった。プラスミドの品質管理のためには、トランスポゾン挿入の検査、および、そのメカニズムの理解と抑制する仕組みが必要である。

Key words plasmid, transposon

G2H2 (0204) 長鎖反復配列遺伝子の相同組換え頻度の解析

○石川 聖人[1,2]*，堀 克敏[1]
([1]名大院・工，[2]JST さきがけ)

Analysis of the homologous recombination frequency of a long repetitive gene

○Masahito Ishikawa[1,2]*, Katsutoshi Hori[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]PRESTO, JST)
ishikawa.masahito@chembio.nagoya-u.ac.jp

[背景・目的]
相同組換えは、よく似た塩基配列間（相同配列間）で生じる DNA の組換えであり、損傷を受けた DNA の修復機構として生物に普遍的に保存されている。しかし、損傷 DNA 以外の相同配列に対しても作用することがあり、重要な遺伝情報を書き換えて機能喪失させるリスクがある。それにも関わらず、細菌ゲノムには類似性の高い配列が繰り返される反復配列が存在する。我々が独自に発見した接着性ナノファイバータンパク質 AtaA の遺伝子には、相同組換えの標的となる反復配列が複数種類存在する。一見、機能喪失がすぐにも起きてしまいそうな遺伝子構造をしているが、不思議なことに、AtaA の宿主細菌である *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 では安定に維持されている。本研究では、Tol 5 株に潜む *ataA* 遺伝子の相同組換え保護機構を明らかにするために、宿主細菌（Tol 5 株）と異種細菌における相同組換え頻度の定量に取り組んだ。
[方法・結果]
ataA 遺伝子の相同組換え頻度を定量するために“プローブプラスミド”を構築した。スクロースを毒性物質に変換する SacB 遺伝子を *ataA* 遺伝子の反復配列間に挿入し、これを Tol 5 株と大腸菌で複製できるプラスミドにクローニングした。プローブプラスミドを保持する形質転換体はスクロースを含む培地では増殖できないが、*ataA* 遺伝子の反復配列間で相同組換えが起こると *sacB* 遺伝子の欠失が起こり、プラスミドを保持していても生きられるようになる。プローブプラスミドで形質転換した Tol 5 株と大腸菌を液体培地で一晩培養した後に、スクロースの含まれる寒天培地と含まれない寒天培地に播種し、翌日に各培地に形成したコロニー数を計測した。スクロース含有培地で形成したコロニー数をスクロース不含有培地で形成したコロニー数で除した値を相同組換え頻度とした。Tol 5 株と大腸菌の相同組換え頻度を比較したところ、Tol 5 株は相同組換え頻度が大腸菌よりも約 100 倍低いことが明らかとなった。また、スクロース耐性を示した形質転換体からプローブプラスミドを抽出し、Nanopore シーケンサーで配列解析を行ったところ、相同組換えの生じた反復配列を特定することができた。本研究で得られた知見は、Tol 5 株に潜む *ataA* 遺伝子の相同組換え保護機構を明らかにするうえで重要であり、細菌が反復配列を維持するための基本原理の解明に繋がると期待する。

Key words repeat DNA sequence, homologous recombination, nanopore sequencer, *Acinetobacter*

G2H2 (0205) 異なる酸素濃度がもたらすプラスミドの接合伝達頻度と宿主域への影響

○久野航裕[1], 越智健太郎[1], 柳谷洸輔[1], 徳田真穂[2], 水口千穂[3], 野尻秀昭[3], 雪真弘[4], 大熊盛也[4], 金原和秀[1,2], 新谷政己[1,2,4,5]*
([1]静大院・総合科技, [2]静大院・創造, [3]東大院・農生科, [4]理研・BRC-JCM, [5]静大・グリーン研)

The effects of the different oxygen concentration on the conjugative transfer frequency of plasmids and the transconjugants

○Kosuke Kuno[1], Kentaro Ochi[1], Kosuke Yanagiya[1], Maho Tokuda[1], Chiho Minakuchi[2], Hideaki Nojiri[2], Masahiro Yuki[3], Moriya Ohkuma[3], Kazuhide Kimbara[1], Masaki Shintani[1,3,4]*
([1] Grad. Sch. Shizuoka Univ, [2]Grad. Sch. Tokyo Univ, [3]Riken BRC-JCM, [4]Shizuoka Univ. RIGST)
shintani.masaki@shizuoka.ac.jp

プラスミドは，染色体とは別に存在する自律複製可能な遺伝因子である．プラスミドは，異なる細胞間を水平伝播することで様々な遺伝子群を運び，微生物の進化や環境への適応に寄与する．プラスミドを介したこのような遺伝子の伝播は，微生物が豊富に存在する地中や，動物の腸内などの嫌気的な環境下でも普遍的に生じていると予測される．本研究では，モデルプラスミドとして pBP136 を使用し，酸素濃度の違いによるプラスミドの接合伝達性への影響を明らかにすることで，実環境中におけるプラスミド伝播の実態に迫ることを目的とした．まず，供与菌に絶対好気性の *Pseudomonas putida* SMDBS を，受容菌に 3 種類の通性嫌気性細菌を用いて，それぞれ好気（大気中酸素濃度）条件下で前培養した後，好気または嫌気（酸素濃度 150 ppm 以下）条件下で接合し，プラスミドの接合伝達頻度を比較した．その結果，2 種類の受容菌において，好気条件下の接合伝達頻度は，嫌気条件下よりも 10^1~10^3 倍上昇した．次に，好気・嫌気条件下で，土壌などの環境試料由来の微生物群集を受容菌候補とした接合実験を行った．その結果，好気・嫌気それぞれの条件からのみ得られた接合完了体が存在した．以上から，酸素濃度の違いによって，プラスミドが伝播する（またはしやすい）細菌の種類が変化することが示唆された．次に，供与菌・受容菌ともに通性嫌気性菌の *P. stutzeri* JCM 5965 派生株を用いて，前培養と接合を，それぞれ好気・嫌気条件とする，計 4 条件で接合実験を行い，プラスミドの伝達頻度を比較した．その結果，前培養の条件に依らず，接合を嫌気で行った条件よりも，好気で行った条件の方が接合伝達頻度は 10^2~10^3 倍上昇した．従って，接合時の酸素濃度の違いが，接合伝達頻度に強く影響することが示唆された．この結果について，接合時の酸素が，主として呼吸によるエネルギー生産に用いられるとすれば，菌体が酸素を取り入れてからその頻度が上昇するまでに時間を要すると考えた．そこで，嫌気条件での接合中に菌体を好気条件（大気中）に出し，その後もう一度嫌気条件に戻すことで，大気中の酸素への曝露時間を変えた接合実験を行った．その結果，酸素に曝露していない場合と比べ，10 秒間の酸素への曝露でも，接合伝達頻度は約 10 倍上昇した．以上より，プラスミドの接合伝達は，酸素に応答して促進される可能性が示された．

Key words plasmid, conjugation, oxygen, transconjugant frequency, transconjugant range

G2H2 (0206) *Geobacillus thermodenitrificans* K1041 の高効率形質転換は何を可能にするか

○小山幸祐[1], 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)

Biotechnological applications facilitated by efficient transformation of the thermophile *Geobacillus thermodenitrificans* K1041

○Kosuke Koyama[1], Ryota Kurashiki[1], Takashi Ohshiro[2], Hirokazu Suzuki[2]*
([1]Dept. Eng., Grad. Sch. Sust. Sci., Tottori Univ., [2]Fact. Eng., Tottori Univ.)
M21J5022M@edu.tottori-u.ac.jp

【目的】*Geobacillus* 属好熱菌への DNA 導入は概して難しいが，*Geobacillus thermodenitrificans* K1041 へは電気穿孔法による DNA 導入が可能で，試験管内で構築したプラスミドを直接導入することもできる。本研究では，K1041 株が変異ライブラリーの宿主として実践的であることを検証するために，本株を宿主とした変異プロモーターのライブラリー化とスクリーニングを行った。また，大腸菌経由では構築できなかったプラスミドを直接 K1041 株に導入することで，従来技術ではできなかった異種タンパク質分泌生産に成功した。本会では，利用可能なプラスミドベクターの解析も併せて報告する。

【実験と結果】5 種のプラスミド（pSTE33，pGKE74，pGKE119，pNW33N，および pGKE120）を電気穿孔法で K1041 株に導入した。pBST 系のプラスミド（pGKE74，pGKE119，および pGKE120）は，導入効率が高く（$>10^4$ cfu/μg），かつ高コピーであった（>500）。一方 pSTE33 は安定性が高く，抗生物質を含まない培地で継代培養しても維持された。これらプラスミドのうち，pGKE119 は発現ベクターとして構築されたもので，好熱菌プロモーター（P_{gk704}）を含む。pGKE119 に耐熱性レポータータンパク質遺伝子（*bgaB*，*venus*，および *cat*）をクローニングし，K1041 株に導入したところ，いずれの発現産物も高度に生産された。従来の研究では，*Geobacillus* 属へのプラスミド導入は大腸菌からの接合伝達によったため，分泌型セルラーゼ遺伝子のように大腸菌の生育阻害を引き起こす遺伝子は研究対象にできなかった。しかし，K1041 株へは pGKE119 に連結した後すぐに導入することができ，得られた形質転換体はセルラーゼを高度に分泌した（130 mg/L）。K1041 株がライブラリー宿主として有用であるか調べるために，P_{gk704} にランダム変異を導入し，pGKE119-*venus* の *venus* 上流に連結した。これらを K1041 株に導入したところ，10^3 規模の好熱菌ライブラリーを得た。コロニー蛍光を指標に発現特性が異なる変異プロモーターを探索したところ，複数のプロモーターが同定された。以上の結果は，K1041 株が好熱菌ライブラリーとタンパク質生産の宿主として実践的であることを示す。

Key words *Geobacillus*, thermophile, protein production, mutant library

G2H2 (0207) バイオプラスチック合成能力を有する *Cobetia* 属細菌の遺伝子組換え系の構築

○梅林 勇気[1], 阿部 汐里[1], 河合 盛進[2], 鈴木 宏昭[2], 山田 美和[1*]
([1]岩手大・農, [2]トヨタ紡織株式会社・新領域開拓部)

Establishment of a method for gene recombination of *Cobetia* sp. with an ability to synthesize bioplastics

○Yuki Umebayashi[1], Shiori Abe[1] , Sung-Jin Kawai[2] , Hiroaki Suzuki[2], Miwa Yamada[1*]
([1] Dept. Biolog. Chem. Food Sci., Iwate Univ., [2]New Field Pioneering Div. Toyota Boshoku Corp.)
myamada@iwate-u.ac.jp

【背景・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、微生物によって細胞内に合成･蓄積されるバイオプラスチックである。当研究室では、PHAの原料としての利用例が少ない海洋バイオマスに着目し、廃棄海藻を原料とした PHA の微生物合成を試みてきた。その結果、海藻を炭素源として典型的な PHA であるポリ(3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] を合成可能な 2 種の *Cobetia* 属細菌が見出すことに成功したが[1]、本菌株の P(3HB)生産量は低く、PHA 合成能力の改良が必要だと考えられた。しかし、これまでに *Cobetia* 属細菌の遺伝子組換えが行われた報告はない。そこで、本研究では、*Cobetia* 属細菌の遺伝子組換え法の確立を目的とした。
【方法・結果】
まず、迅速で簡便なエレクトロポレーション法の検討を行った。最初に、適切なエレクトロコンピテントセルを作成するため、低イオン強度となる培地組成、対数増殖期となる培養時間、菌体の洗浄操作の検討を行った。さらに、選択マーカーの種類、エレクトロポレーション時の電圧、添加するプラスミド DNA 量、および回復培養時間についても検討したが、いずれの条件でも形質転換体は得られなかった。
そこで、次に、接合伝達法での形質転換を試みた。*Escherichia coli* S17-1 株をプラスミド供与菌、*Cobetia* 属細菌を受容菌とした接合伝達を試みた結果、目的のプラスミドが導入された形質転換体が取得された。続いて、形質転換効率を向上させるため、プラスミド供与菌と受容菌の比率を検討した。その結果、*Cobetia* sp. IU180733JP01 (5-11-6-3) では、供与菌:受容菌の比率が 1:5 のとき、形質転換効率が 2.92×10^{-3} と最も高く、*Cobetia* sp. IU190790JP01 (5-25-4-2) では、供与菌:受容菌の比率が 1:2 のとき、形質転換効率が 2.01×10^{-2} と最も高かった。これらの値は、これまでに報告されている海洋細菌の形質転換効率 (*Oceanibulbus indolifex* : 2.7×10^{-2}, *Roseobacter denitrificans* : 2.0×10^{-4}) と同程度であるため、本研究で確立した接合伝達法による *Cobetia* 属細菌の形質転換は有効であると考えられる。
【参考文献】
[1] H. Moriya et al., Front. Bioeng. Biotechnol., 8, 974, 2020

Key words polyhydroxyalkanoate, gene recombination method, electroporation, conjugation

G2H2 (0208) エピソーマルベクターを用いたオイル高生産珪藻 *Fistulifera solaris* の形質転換法の確立

○藤井大河[1], 渡邉かほり[1], 前田義昌[1], 吉野知子[1], 松本光史[2], 田中剛[1*]
([1]東京農工大院・工, [2]電源開発株式会社)

Establishment of a transformation method for the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* using episomal vectors

○Taiga Fujii[1], Kahori Watanabe[1], Yoshiaki Maeda[1], Tomoko Yoshino[1], Mitsufumi Matsumoto[2], Tsuyoshi Tanaka[1]*
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]J-POWER)
tsuyo@cc.tuat.ac.jp

海洋珪藻 *Fistulifera solaris* はオイル蓄積性や、生育速度が高いことからバイオジェット燃料原料の生産株として期待されている。しかし実用化に向けては、エネルギー収支、及びコストの面に課題が残されており、更なるオイル生産性の向上が求められている。これまでに当研究グループでは遺伝子組み換え技術や CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いた分子育種によるオイル生産性の向上に取り組んできた。しかし、従来のパーティクルボンバードメント法などによる形質転換法では、真核微細藻類の形質転換効率が低いことが課題となっていた。また、従来法で作出される形質転換体は、導入遺伝子が染色体中にランダムに挿入された遺伝子組み換え生物であり、屋外開放系での大量培養への適用が困難であった。そこで本研究では、染色体とは独立して複製され、細胞からの除去が可能なエピソーマルベクターを設計し、形質転換効率が高い接合伝達により *F. solaris* に導入する方法を確立した。まず、*F. solaris* のエピソーマルベクターに組み込む、自律複製配列を検討した。モデル珪藻で有効性が示されている出芽酵母由来 CEN/ARS/HIS 配列、及び珪藻 *Cylindrotheca fusiformis* のプラスミド由来複製配列をそれぞれ含むベクターを構築した。なお各ベクターには接合伝達に必要な traJ 遺伝子、及び oriT 遺伝子、および形質転換体を選抜するための薬剤耐性遺伝子を挿入した。大腸菌 S17-1 株を用いて接合伝達により *F. solaris* に導入したところ、CEN/ARS/HIS 配列を含むベクターが最も有効であることが示された。また、得られた形質転換体からベクターを抽出し、制限酵素処理したところ珪藻に導入前と同一のバンドパターンを示した。このことから、導入したベクターが自律複製されるエピソーマルベクターとして機能することが示された。更に構築したエピソーマルベクターを用いて組み換えタンパク質を発現する手法を検討した。本研究はエピソーマルベクターの接合伝達によりオイル高蓄積微細藻類を形質転換した初めての報告である。

Key words microalgae, biojet fuel, episomal vector, bacterial conjugation

G2H2 (0209) 出芽酵母 *Ygr067C* プロモーターを利用した難生産性組換え蛋白質発現系

○栗田涼子[1], 長嶋美乃里[2], 田中瑞己[1,2,3], 河原崎泰昌[1,2]*
([1]静県大院・薬食生命, [2]静県大・食栄, [3]農工大院・農)

Development of a novel yeast diauxic-shift expression system using *Ygr067C* promoter for efficient production of difficult-to-express proteins

○Ryoko Kurita[1], Minori Nagashima[2], Mizuki Tanaka[1,2,3], Yasuaki Kawarasaki[1,2]*
([1] Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2] Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., [3](present address) Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol.)
kawarsky@u-shizuoka-ken.ac.jp

【背景と目的】組換え蛋白質の生産効率を向上させるためには、発現に適したプロモーターの選択や、発現環境の最適化が重要となる。例えば、分泌性蛋白質や酵素など、発現に伴い宿主細胞に対して毒性を与えるものがあり、この場合、恒常的なプロモーターの使用や増殖連動型の発現誘導では、十分な宿主菌体量および組換え蛋白質生産量を得ることが困難である。これらの細胞毒性を与える組換え蛋白質は、一般に難生産性蛋白質と呼ばれる。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *Ygr067C* は機能未知転写因子であり、指数増殖期の直後、diauxic shift で発現する特徴をもつ。そこで本研究では *Ygr067C* プロモーターを用いた発現系を設計・評価し、難生産性蛋白質の発現を容易化できる難生産性蛋白質発現系の構築を目指した。

【方法】*Ygr067C* プロモーターの活性は、細胞内での安定性を改良したレポーター遺伝子（GFP_{401}）を用いて定量し、最大の生産物収量を与える培地条件を検討した。宿主には BY4742 およびその *Ygr067C* 欠損株を用いた。難生産性蛋白質として麹菌 β−ガラクトシダーゼ *LacA* およびシイタケ菌糸特異的ラッカーゼ *Lcc 1* を用い、ガラクトース誘導性の *GAL1* プロモーターおよび銅誘導性の *CUP1* プロモーターで発現させた場合との生産量を比較した。

【結果と考察】*Ygr067C* プロモーターを使用した場合、グルコース濃度を 0.5%としたときに生産物量および菌体あたり生産物量が最大となった。生産物の収量は diauxic shift の長さと相関する傾向にあった。また、宿主細胞に *Ygr067C* 欠損株を使用することで、菌体あたり GFP_{401} 生産量がさらに 6.8 倍増加した。次に *LacA* および *Lcc1* の発現を試みたところ、*GAL1* プロモーターおよび *CUP1* プロモーターを用いた発現系では発現毒性による宿主細胞の生育阻害が見られたが、*Ygr067C* プロモーターを用いた発現系では菌体が増殖したのち、目的蛋白質が生産された。

以上より、*Ygr067C* プロモーターは diauxic shift において活性化し、*Ygr067C* 欠損株では活性がさらに増強される。また、*Ygr067C* プロモーターを用いた発現系では菌体濃度が高まったのちに目的蛋白質の発現を開始するため、発現毒性を有する蛋白質や酵素の生産に有用な発現系であるといえる。

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, promoter, recombinant protein, transcriptional regulation

G2H2 (0210) 微細藻類 *Chlamydomonas* における安定的外来遺伝子発現株の開発

○秋山 立幹[1], 河邉 佳典[1], 黄 冠[2], 白川 和輝[1], 上平 正道[1,2]*
([1]九州大院・工・化工, [2]九州大院・システム生命)

High and stable expression of exogenous genes in *Chlamydomonas*

○Tatsuki Akiyama[1], Yoshinori Kawabe[1], Guan Huang[2], Kazuki Shirakawa[1], Masamichi Kamihira[1,2]*
([1]Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ, [2]Sys. Life Sci., Kyushu Univ.)
*kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

微細藻類の遺伝子改変技術がさらに進歩すれば、バイオ燃料やバイオ医薬品だけでなく、食品や色素など多くのバイオ関連の付加価値製品の生産が見込まれる。我々はこれまでに *Chlamydomonas* における遺伝子・ゲノム改変に関する技術開発を行っており、組換え酵素 Cre と変異 *loxP* を用いて *Chlamydomonas* の核ゲノムへの外来遺伝子導入を報告している[1]。本研究では、安定的に外来遺伝子発現が可能な *Chlamydomonas* 細胞株を開発した[2]。

変異 *loxP* で挟まれたレポーター遺伝子（分泌型ルシフェラーゼ: *gLuc*）およびスペクチノマイシン耐性遺伝子（*Spec*）発現ユニットを有するプラスミドを作製し、エレクトロポレーション法により *Chlamydomonas*（cc-405）に導入した。導入した細胞を抗生物質含有寒天 TAP 培地上に塗布し、クローンを取得した。200 以上のクローンを培養し、gLuc の発光値を指標にスリーニングしたところ、安定して高い遺伝子発現を示す組換え細胞株（Chlamy/LS）を取得することができた。取得したクローンは、60 日間にわたり抗生物質非存在下で高レベルの遺伝子発現を示した。核ゲノム DNA に対してアダプターPCR 法を実施し、外来遺伝子のゲノム挿入部位を同定した。また、組換え酵素 Cre の一過的発現により、*gLuc* を削除した細胞株（Chlamy/S）を作製した。この細胞は起点となる *loxP* 配列を有しているため、外来遺伝子を同部位に Cre-*loxP* システムにより導入することができる。そこで、インターフェロン（*IFN*）遺伝子発現カセットを有するドナーベクターを作製し、Cre 発現ベクターとともに遺伝子導入した。導入後、薬剤スクリーニングにより得られた細胞のゲノム DNA を抽出し PCR 反応を行ったところ、Cre-*loxP* 反応で遺伝子導入が起こったときにのみ増幅可能なプライマーペアで増幅産物を確認できた。培養上清をウエスタンブロット法により解析したところ、期待される分子量でインターフェロンを検出でき、30 日間の長期培養において、選択圧がない状態で初期培養時の発現量を維持することを確認した。これらのことから、開発した細胞株を用いて外来遺伝子の安定発現細胞株の迅速な構築が可能となり、この細胞株を組換えタンパク質や高機能有用物質の生産ホストとして利用できることが期待される。

[1] Shirakawa, K et al., MATEC Web Conf., 333, 07003 (2021).
[2] Huang, G. et al., J. Biosci. Bioeng., in press.

Key words *Chlamydomonas reinhardtii*, Gene retargeting, Cre-*loxP*, Microalgae

G2H2 (0211) 放線菌 *Streptomyces* 属を対象とした細胞内 pH 測定法の確立

○蓮池祐紀[1], 臼田隆亮[2],須藤雅己[1],片岡正和[1]*
([1]信州大院・生命医工, [2]信州大・工・技術部)

Establishment of an intracellular pH measurement method for *Streptomyces* spp.

○Yuki Hasuike[1], Ryusuke Usuda[2], Masaki Suto[1], Masakazu Kataoka[1]*
([1]Dept. Biomed. Eng. Gra. Sch., Shinshu Univ., [2]Tech. Div. Eng. Fac. Eng.,Shinshu Univ)
21bs119j@shinshu-u.ac.jp

細胞内 pH は代謝や小胞輸送など様々な生化学反応に大きく関与し、それらを円滑に行うために細胞内 pH を一定に保つ機構が存在する。現在まで、細菌細胞内 pH の測定方法には一般に蛍光試薬を使った測定法が用いられてきた。この測定法では、蛍光試薬を菌との混合のみで測定が可能であるため測定が容易である。しかし、試薬の漏出により測定精度が低下することが確認されており、細胞内 pH を長時間かつ生きたままで測定することが困難である。

当研究室では大腸菌を対象として、リアルタイムで生細胞内 pH を測定可能な系の確立を行なってきている。この系は周囲環境の pH 値に応じて蛍光強度が変化する緑色蛍光タンパク質(GFP)変異体を発現させ、レシオメトリック測定を行うことにより細胞内 pH を測定する方法である。GFP 変異体は、遺伝子導入によって対象細菌が発現するため侵襲性がなく、連続的かつ長時間の測定を可能にした。本研究ではこのシステムの大腸菌以外の菌での細胞内 pH 測定を目的としている。

本発表では、産業的に有用な菌である放線菌 *Streptomyces* 属の細胞内 pH の測定について報告する。pH 感受性の蛍光タンパク質を発現させた *S. coelicolor* を培養し、3 日目から二次代謝時期までの細胞内 pH と外部 pH の値について測定を行った。その結果、外部 pH がアルカリにシフトしていき、それに伴い細胞内 pH が変化していくことが確認された。

Key words pH dynamics, *Streptomyces* sp. ,fluorescent protein, intracellular pH

G2H2 (0212) pH 感受性蛍光タンパク質を用いた大腸菌長期定常期のリアルタイム細胞内 pH 測定

○臼田 隆亮[1], 須藤 雅己[2], 蓮池 祐紀[2], 片岡 正和[2]*
([1]信州大・工・技術部, [2]信州大院・生命医工)

Real-term intracellular pH measurement in Escherichia coli during long-term stationary phase using pH-sensitive fluorescent proteins

○Ryusuke Usuda[1], Masaki Suto[2], Yuki Hasuike[2], Masakazu Kataoka[2]*
([1]Tech. Div., Eng. Fac. Eng., Shinshu Univ., [2]Dept. Biomed. Eng. Gra. Sch., Shinshu Univ.,)
mars@shinshu-u.ac.jp

細胞内 pH の恒常性は酵素機能や代謝、イオンチャネル活性などを伴う生物プロセスにおいて、基本的ながら依然として非常に重要なパラメータである。細胞内 pH 値の時間的変化を測定する試みは重要とされ、^{31}P-NMR を用いる方法やラジオアイソトープ標識した弱酸もしくは弱塩基を利用する方法(RI 法)の他、様々な手法が用いられてきた。しかし、これまでの pH 測定法は、前処理が煩雑な点や、連続して測定できないという欠点がある。また、必要となる設備や機材も複雑で、誰にでも利用可能な測定方法とは言い難い。今日では、pH 感受性の蛍光色素を用いた方法が考案されているが、色素の漏出における細胞間の変動で測定の精度が制限されるため、生きたまま pH 値の時間的変化を測定することが不可能である。

近年、周囲の環境の pH 値に応じて蛍光スペクトルが変化する緑色蛍光タンパク質(GFP)変異体が複数開発されている。GFP 変異体は、遺伝子導入により測定対象の細胞に作らせることができるため、前述のような前処理が不要であり、侵襲性もなく細胞内の特定の部位に局在させることができる。しかしながら“細菌”に関しては、微細で扱いにくいことから、生きたままで、かつリアルタイムで観測した報告は世界でも例がない。

本研究では、細菌内での pH 変化を生きた状態のまま測定できる系の確立を目的として、pH 感受性の蛍光タンパク質を発現させた大腸菌を 37℃で 10 日間長期培養した際の 1 日ごとの細胞内 pH と外部 pH の値について、蛍光分光光度計を用いた population 測定法と蛍光顕微鏡および蛍光試薬を用いて生きている大腸菌のみに注目した 1 細胞測定法の 2 つの異なる方法で行った。細胞内 pH は、pH 較正曲線をもとに 2 つの蛍光強度の比から換算した。population 測定では、細胞内 pH の挙動は培養開始後 pH7.0 周辺だったが、時間経過とともにアルカリ側へシフトする結果を得た。また細胞内 pH の変動は、72 時間以降で外部 pH の値に同調したことから、幅広い時間軸での pH を測定できたと考えられる。また 1 細胞測定法では、pH が 7.2-7.8 に維持されていることが観測された。

Key words *Escherichia coli*, pH dynamics, fluorescent proteins, long-term stationary phase

G2H2 (0301) 油脂酵母株 *Lipomyces starkeyi* によるポリヒドロキシアルカン酸生産

○中村 優里[1], 壷井 ひかり[1], Prihardi Kahar[1], 近藤 昭彦[2], 荻野 千秋[1]*
([1]神戸大・工, [2]神戸大・イノベ)

Polyhydroxyalkanoic acid production by an oleaginous yeast strain *Lipomyces starkeyi*

○Yuri Nakamura[1]*, Hikari Tsuboi[1], Prihardi Kahar[1], Akihiko Kondo[2], Chiaki Ogino[1]
([1] Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
* ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【目的】 現在、アブラヤシの果実から得られるパーム油は食品や化成品の原料として使途も広く、世界の植物油脂の中で使用量は最大である。しかし、このパーム油の生産工程で発生する POME(Palm Oil Mill Effluent)と呼ばれる搾油廃水に関して、処理に多くの問題を抱えている。POME にはオレイン酸やパルミチン酸などの遊離脂肪酸が多く含まれており、これらを有効利用する技術開発が望まれている。そこで本研究では、この POME に含まれる遊離脂肪酸を炭素源（栄養源）として、ポリヒドロキシアルカン酸(Polyhydroxyalkanoic acid; PHA)の生産を行う酵母株の開発を試みた。

【実験方法】 NBRC カルチャーコレクションより、パーム油産業廃棄物バイオマスを原料として、発酵可能な酵母のスクリーニングを行ってきた。その際、発酵阻害物質に耐性をもつ酵母株を網羅的に評価し、油脂酵母株ライブラリーより *L. starkeyi* D35 株を見出した。しかし、酵母は本来 PHA 生産能力を持たないため、酵母における PHA 生産を確立するために、*Pseudomonas putida* 由来のポリマー合成遺伝子 *PhaC1* を導入した。得られた *PhaC1* 導入株を YPD50 培地で 7 日間培養し、得られた菌体に対して PHA 抽出を行った。また、GC-MS を用いて細胞内の脂肪酸組成を分析した。加えて、生産量向上のためミネラル分を多く含む NMM 培地を用いた培養を行い、PHA 抽出量を比較した。

【結果】 PHA 抽出の結果、YPD50培地を用いた場合、PHA 生産はほとんど確認されなかったが、NMM 培地を用いた場合は生産量が増え、クロロフォルムによる抽出によって、PHA と推定される沈殿を2mg 確認された。また、GC-MS による分析結果より油脂含量に着目すると、*PhaC1*導入株は野生株に比べ、およそ半分の量しか油脂を作っておらず、減少した分の脂肪酸に関しては、PHA 生産に用いられたと考えられる。更なる生産量向上のために、今後は新たな遺伝子発現系の導入、POME を培地として用いた培養、プロモーター改変、更には PHA に関しては NMR 解析などを通して検討を行い、本発表にて報告を行う予定である。

Key words *Lipomyces starkeyi,* PHA, PHA synthase

G2H2 (0302) 酵母 *Kluyveromyces marxianus* 由来ポリガラクツロナーゼと分泌困難なタンパク質との融合タンパク質分泌生産系の開発

○多葉田菜月[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)

Development of secretory protein production system for difficult-to-secrete proteins by fusing with the polygalacturonase from the yeast *Kluyveromyces marxianus*

○Natsuki Tabata[1*], Hisashi Hoshida[1,2,3], Rinji Akada[1,2,3*]
([1]Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi University,
[2]Yamaguchi University Research Center for Thermotolerant Microbial Resources,
[3]Yamaguchi University Biomedical Engineering Center)
rinji@yamaguchi-u.ac.jp

[背景と目的]タンパク質の分泌量は、宿主やタンパク質の種類によって異なり、分泌発現が困難なタンパク質が存在している。このようなタンパク質でも多くの分泌量を得られる生産系の開発が求められている。一方で、分泌発現が容易なタンパク質も存在する。酵母 *Kluyveromyces marxianus* 由来のポリガラクツロナーゼ(KmPgu1)は、宿主を選ばず大量に分泌生産される。そこで本研究では、分泌発現が困難なタンパク質を、KmPgu1 との融合体として分泌させる生産系の開発を試みた。
[方法・結果]*Kluyveromyces lactis* は KmPgu1 を大量に分泌生産することができるが、*Saccharomyces cerevisiae* 由来のポリガラクツロナーゼ(ScPgu1)は分泌させることができなかった。そこで、Sc*PGU1* の分泌シグナル配列を除去して Km*PGU1* の C 末側に融合させてみたところ、融合体が分泌された。融合体の安定性を知るために Sc*PGU1* の C 末側から削除解析を行った結果、C 末より少し削除した場合はタンパク質がなくなったが、さらに削除すると安定に分泌されることがわかった。最終的には、Sc*PGU1* の21番目から40番目(21-40 aa)の領域が安定な配列であることがわかった。この安定な配列を C 末にもつ Km*PGU1* に、分泌困難であった *Aspergillus oryzae* 由来タカアミラーゼ(Ao*TAA*), *Saccharomycopsis fibuligera* 由来グルコアミラーゼ(Sf*GLU1*), *Moeziomyces antarcticus* 由来エステラーゼ(eMa*EST1*)を、分泌シグナル配列を除去して融合させたところ、融合体が分泌された。この有用な配列をリンカー配列 L2140 と名付け、配列内のアミノ酸に着目して解析を進めている。また、分泌シグナル配列を除去した Sc*PGU1* が L2140 を含むことから、分泌困難である Ao*TAA*, Sf*GLU1* の C 末側に融合させることで分泌量に変化がみられるか試したところ、分泌量の増加がみられた。このことから、L2140 のような安定な配列を分泌困難なタンパク質の C 末側に融合することで、構造の安定化を引き起こす可能性が考えられる。

Key words
yeast, secreted protein, fusion protein, linker

G2H2 (0303) ペプチドグリカン不完全合成大腸菌によるバイオポリマー抽出の効率化

○門屋亨介[1], 高相昊[2], 田口精一[2]*
([1]椙山女学園大・生活科学, [2]東農大・生命科学)

Efficient Extraction of Biopolymer by *Escherichia coli* with Incomplete Peptidoglycan Synthesis

○Ryosuke Kadoya[1], Sangho Koh[2], Seiichi Taguchi[2]*
([1]Sch. of Life Studies, Sugiyama Jogakuen Univ., [2]Sch. Life Sci., Tokyo Univ. Agric.)
st206172@nodai.ac.jp

現在、世界ではプラスチックによる環境汚染が深刻な問題になっている。ペットボトルやレジ袋が海洋に溢れ、海洋動物が誤飲により死亡するなどの深刻な問題を引き起こしている。さらに近年問題になっている事案が、海洋中のマイクロプラスチック問題である。マイクロプラスチックとは、5㎜以下の細かいプラスチック粒子のことをいい、有害物質を吸着し、海洋生物に摂取される。摂取されたマイクロプラスチックが、海洋生物やヒトに悪影響を及ぼすことが懸念されている。これらプラスチック問題の答えの一つが「生分解性バイオプラスチック（PHA）」である。PHA は微生物で生合成され、既存プラスチックと同等の物性を持ちながら自然環境中で水と二酸化炭素に分解される。

我々の研究グループでは、PHA の生産量向上を目的に PHA 生産宿主である大腸菌染色体にランダム変異を導入した結果、野生株と比較し生産量が約 1. 4 倍向上した株を獲得した。ランダム変異は、ペプチドグリカン合成酵素をコードする *mtgA* に挿入されていることが明らかになった。この変異株の PHA 合成時の細胞形態を顕微鏡で観察すると、細胞内での PHA 合成に伴い風船のように細胞が膨張する様子が観察された。このときのペプチドグリカン層を電子顕微鏡で観察すると、ペプチドグリカン層不完全合成の様子が観察された。

通常、微生物内で生合成された PHA はクロロホルムを用いて抽出される。この有機溶媒を用いた抽出法は以前から環境に良くないことが指摘されていた。ところが、細胞骨格であるペプチドグリカン不完全合成の変異株を利用することで、物理的に容易に細胞内から PHA の抽出が可能ではないかと考えた。そこで、PHA 合成時の変異株に対して、リゾチームと EDTA によって細胞破砕処理した菌体の様子を顕微鏡によって観察したところ、菌体破砕に伴って漏出したバイオポリマーの凝集体が観察された。一方、同条件で処理した野生株では、変異株と比較してより多くの菌体がポリマーを内包したまま細胞形態を維持していた。さらに、ペプチドグリカンの構成成分を分析したところ野生株と比較して変異株では、グリカン主鎖の *N*-アセチルムラミン酸と *N*-アセチルグルコサミンの量が少なく、ペプチド側鎖のアラニンとグルタミンの量が多いことがわかった。これらの結果を踏まえ、変異株ではペプチドグリカンの不完全合成が生じ、リゾチームと EDTA による PHA 抽出の効率化に寄与したと考えられた。従って、変異株は、PHA 合成量増強だけではなく、最終収量に関わる抽出工程の効率化の点においてもより実用的な宿主として期待される。

Key words *Escherichia coli*, PHA synthesis, Peptidoglycan

G2H2 (0304) ソルビトールストレスによる GPD 遺伝子破壊株の脂肪酸組成変化

○三木 健夫[1]*, 佐野 絢子[1], 井沢 真吾[2]
([1]山梨大院・医工総, [2]京工繊大院・工芸科学)

Changes in fatty acid composition of GPD gene-disrupted strain by sorbitol stress>

○Takeo Miki[1]*, Ayako Sano[1], Shingo Izawa[2]
([1] Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi, [2]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)
E-mail: takemiki@yamanashi.ac.jp

【目的】酵母に含まれる脂肪酸の構成比は生育段階を通じて比較的一定の値を示す。しかし、異なる培養温度で培養した場合には脂肪酸構成が変化することが知られており、これは酵母のストレス応答の一例とされている。一方、培養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、Saccharomyces cerevisiae OCM-2 株の GPD 遺伝子破壊株に 1.5M ソルビトール溶液による浸透圧ストレスによる脂肪酸構成比の変化について調査した。また、浸透圧ストレス耐性に重要なGPD1あるいはGPD2遺伝子を欠損した株についても同様の調査を行った。

【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、1.5M ソルビトール溶液(50ml)に対して 2.5×10^7 cells/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、各種脂肪酸構成比を算出した。

【結果】非ストレス条件下にある OCM-2、GPD1 および GPD2 遺伝子破壊株の脂肪酸構成比（C16, C16:1, C18, C18:1）は、3 株とも同様であったが、GPD1 遺伝子破壊株では、浸透圧ストレスにより C18:0 に対する C18:1 の割合が親株と比較して大幅に増加していることがわかり、浸透圧ストレスが本株の膜流動性に大きく影響を与えていることが示唆された。

Key words yeast, osmotic stress, GPD1, fatty acid

G2H2 (0305) 新規鎖置換型 DNA ポリメラーゼ生産菌の探索と酵素活性の比較

○井上瑛介 [1],福田青郎 [1,2],保川清 [3],柳原格 [4],藤原伸介 [1,2]
([1] 関西学院大院・理工, [2] 関西学院大・生命環境, [3] 京大院・農, [4] 大阪母子医療センター)

Search for new strand-replacement DNA polymerase producing bacteria and comparison of enzyme activities

○Eisuke Inoue[1], Wakao Fukuda[1,2], Kiyoshi Yasukawa[3],Itaru Yanagihara[4],Shinsuke Fujiwara[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Kwansei Gakuin Univ.,[2] Sch. Biol. Environ. Sci. Kwansei Gakuin Univ., [3] Grad. Sch. Agric. Kyoto Univ., [4]-Osaka Women's and Children's Hosp.)
eisuke@kwansei.ac.jp

[背景] 反応時に温度変化を必要としない DNA 等温増幅反応では、伸張方向の 2 本鎖 DNA をほどきながら DNA 合成を行う鎖置換活性を有するポリメラーゼを使用する。高い鎖置換活性を持つ DNA ポリメラーゼとして好熱性細菌 *Geobacillus stearotehrmophilus* 由来酵素 (*Bst* DNA polymerase) が汎用されているが、その類縁菌由来酵素にも同様の活性が期待される。発酵堆肥は、*Bacillus* 属細菌に富み、発酵過程で内部が高温になるため、*Geobacillus* 属好熱菌などが存在する。そこで本研究では堆肥を分離源として好気性好熱菌の単離および鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼの取得と性質の比較を試みた。
[結果と考察] 牧場の堆肥集積場 3 カ所から採取した状態の異なる堆肥より 2 回の *Bacillus* 属集積培養 (55~60 ºC)、さらにより高い温度での生育菌を探索するため培養温度を上げて集積培養を行い、好熱菌の単離を試みたところ、10 菌株が得られた。単離された菌株の 16S rDNA 領域の DNA 配列を解析したところ、10 株すべてが Bacillaceae 科細菌であることが分かった。その中でも好熱性の *Geobacillus* 属細菌、*Parageobacillus* 属細菌について各株由来 DNA ポリメラーゼ I について系統解析を行ったところ、*Bst* DNA polymerase と相同性が高く、鎖置換活性をもつことが期待された。一方で *Parageobacillus* 属細菌の由来 DNA ポリメラーゼ I は *Bst* DNA polymerase と比較して、特に鎖置換活性に関与している領域[(1)]のアミノ酸配列に違いが見られるため、酵素特性に違いがあることが予想された。これらの株から DNA ポリメラーゼ I に His タグを付加した組換え型酵素を取得し、M13 ファージ由来一本鎖 DNA を鋳型に 50 ºC~65 ºC で DNA 伸長反応を行い、鎖置換活性の有無を確認した。その結果、全ての新規分離した株由来の DNA ポリメラーゼに、DNA 合成活性と鎖置換活性が確認された。一方でこれら DNA ポリメラーゼは、等温核酸増幅の効率を低下させるヌクレアーゼ活性も有していた。現在、ヌクレアーゼ領域の除去を行い、改変した酵素の活性比較を行なっている。

Key words DNA polymerase, DNA strand displacement activity, *Geobacillus*

(1) Milligan et al. Evolution of a Thermophilic Strand-Displacing Polymerase Using High-Temperature Isothermal Compartmentalized Self-Replication, Biochemistry, 57, 4607−4619 (2018)

G2H2 (0306) ポリエステル生産菌 *Ralstonia eutropha* へのデンプン資化性付与

○坂井千紗 [1], 折田和泉 [1], 有川尚志 [2], 佐藤俊輔 [2], 福居俊昭 [1*]
([1] 東工大・生命理工, [2] カネカ)

Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for expansion of the substrate utilization range to starch

○Chisa Sakai[1], Izumi Orita[1], Hisashi Arikawa[2], Shunsuke Sato[2], Toshiaki Fukui[1*]
([1]Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech, [2]Kaneka Corp.)
tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】デンプンは食糧供給とは競合するものの安価で大量に入手可能であり、酵素糖化が容易であることから、微生物による物質生産の低コスト化に有用なバイオマスである。微生物産生ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、環境調和型高分子材料としての利用が期待されており、代表的な PHA 生産菌である *Ralstonia eutropha* はフルクトースなどを炭素源として効率的に PHA を生合成するが、デンプンは利用できない。そこで、本研究ではデンプンを直接炭素源として利用可能な *R. eutropha* 株の構築を目指した。
【方法】生デンプンに高い分解活性を示し、さらにグルコースまで分解可能であることが報告されている *Streptococcus bovis* 由来のα-アミラーゼ（$AmyA_{Sb}$）に着目した。*amyA*$_{Sb}$ に加え、シグナルペプチド（SP）を *Escherichia coli* 由来の Sec 輸送系 SP、*R. eutropha* 由来の III 型輸送系 SP、または *Pseudomonas* 属由来外膜リポタンパク質 OprI に置換した変異体の 4 種の発現ベクターを作製した。作製ベクターをグルコース資化性 *R. eutropha* 株に導入し、デンプン単一炭素源培地における生育評価と培養上清中のデンプン分解産物の解析を行った。また、C 末端に付加したタグに対する標識抗体を用いた蛍光顕微鏡観察により $AmyA_{Sb}$ の細胞内の局在を観察した。
【結果】デンプン単一炭素源培地において SP を置換していない $AmyA_{Sb}$ 発現株の生育が確認されたが、PHA 生合成は観察されなかった。培養上清中にはマルトースの蓄積が見られ、$AmyA_{Sb}$ のマルトース分解活性が低いことが示唆された。また、$AmyA_{Sb}$ の大部分が細胞質に局在していることが観察され、細胞外への輸送を改善する必要があった。現在は、$AmyA_{Sb}$ の細胞外発現量向上に向けたシグナルペプチドの置換、およびマルトース分解酵素の導入によるデンプン資化能の向上を進めている。

Key words poly(3-hydroxybutyrate), *Ralstonia eutropha*, alpha-amylase, secreted protein

G2H2 (0307) 融合したタンパク質の発現量や機能とその境界領域配列の解析

○荒木幸次[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)

Analysis of boundary region sequences of fused proteins for its expression and function

○Koji Araki[1], Hisashi Hoshida[1, 2, 3], Rinji Akada[1, 2, 3*]
([1]Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi University, [2]Yamaguchi University Research Center for Thermotolerant Microbial Resources, [3]Yamaguchi University Biomedical Enineering Center)
rinji@yamaguchi-u.ac.jp

2 つの遺伝子を融合させて 1 つのタンパク質として発現させる融合タンパク質は、1 つの分子内に別々の機能を持たせることができるため、単体タンパク質よりも高い価値を有すると考えられる。しかし、単純に 2 つの遺伝子をそのまま融合させた時に、それぞれのタンパク質の機能が保たれ、2 つの機能を効率よく発揮できているかどうかはわかっていない。そこで、本研究では融合タンパク質を作成し、境界領域配列と発現量や機能との関係性について解析を行った。
2 つのタンパク質を融合させたときのタンパク質機能への影響を調べるために、酵母細胞内で緑色と赤色の蛍光タンパク質である eEGFP と yEmRFP の融合タンパク質を発現させた。融合タンパク質の蛍光強度を顕微鏡下で観察したところ、eEGFP と yEmRFP の蛍光強度は単独で発現させているときより低下した。また、融合タンパク質の発現量をタンパク質電気泳動で観察すると、eEGFP と yEmRFP をそれぞれ単独で発現させた場合と比較して低下していることが判明した。 境界領域のアミノ酸が融合タンパク質に与える影響をより分かりやすく評価できるように、N 末アミノ酸を 13 個削り蛍光機能を弱めた yEmRFP を eEGFP の C 末に融合させたタンパク質（eEGFP-ΔN13yEmRFP）を作成した。この融合タンパク質に対して、境界部分に種々のアミノ酸配列を導入し、両蛍光タンパク質の機能変化を観察したところ、Cys を含む配列を導入した時に強い蛍光を得た。タンパク質電気泳動で発現量を観察すると、eEGFP-ΔN13yEmRFP と比較して発現量が増加していたので、Cys リンカー配列を eEGFP-yEmRFP, および yEmRFP-eEGFP の融合タンパク質境界部に導入したところ、蛍光強度や発現量増加が観察された。次に、どのような配列が境界領域に存在した場合に問題が起こるのかを調べる目的で、単一アミノ酸の 4 個の連続配列を eEGFP と yEmRFP の間に挿入した。その結果、12 種類のアミノ酸については両方の蛍光機能が保たれたが、残りの 8 種類は両方の蛍光機能が失われた。さらに、酵母ゲノムで長い連続配列を持つタンパク質を抽出し、eEGFP と yEmRFP の間に挿入した。Asn と Asp を多く含む TBS1 由来の配列、Gln と Ala を交互に含むアミノ酸配列を持つ GAL11 由来の配列が、強い蛍光を示した。

Key words amino acid, yeast, fusion protein, linker sequence

G2H2 (0308) *Acinetobacter tjernbergiae* がもつ酵素特性が互いに異なるエステラーゼに関する研究

○土橋大地 [1*], 大畑駿一郎 [2], 高杉早紀 [2]、前田謙太郎 [1]、阿野貴司 [1,2]、岡南政宏 [1,2]
([1] 近畿大院・生物理工, [2] 近畿大・生物理工)

Study on esterases with distinct enzymatic properties of *Acinetobacter tjernbergiae*

○Tsuchihashi Daichi [1*], Oohata Shun-ichiro[2], Takasugi Saki[2], Maeda Kentaro[1], Ano Takashi[1,2], Okanami Masahiro[1,2]
([1] Grad. Sch. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ., [2] Fac. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ.)
2033710008w@waka.kindai.ac.jp

エステラーゼは、エステル化合物中のエステル結合を加水分解する酵素である。エステラーゼは、エステル結合を持つ様々な化合物を効率的にアルコールとカルボン酸に分解し、付加的な因子を必要とせず、有機溶媒中でも安定して機能するものが多い。一般的に、細菌が産生するエステラーゼは、耐熱性および有機溶媒耐性等の多様な特性を持つことが報告されており、生分解性プラスチックをはじめとするエステル樹脂の効率的分解への利用が期待される。我々は、高いエステラーゼ活性を示す細菌 *Acinetobacter tjernbergiae* KV57 株を土壌環境中から単離している。
我々はまず、この細菌が培養上清へ分泌するエステラーゼ活性について、温度特性、pH 特性、基質特異性を調べた。その結果、分泌される酵素活性は、50℃、pH7.0 で極大活性値を示した。一方、人工基質である p-nitrophenyl エステル類に対する酵素活性を調べたところ、様々な鎖長（C_8～C_{18}）の p-nitrophenyl エステルを加水分解することができ、C_8 エステルおよび C_{12} エステルに対して極大値を示した。これは、この細菌が複数のエステラーゼを産生していることを示唆した。そこで、エステラーゼ遺伝子を単離するために、ゲノム DNA ライブラリーを構築し大腸菌に導入した。人工基質であるトリブチリンやトリオレインを分解する活性を指標としてスクリーニングした結果、エステラーゼをコードすると思われる遺伝子が 5 つ単離された。これらはいずれも α/β 加水分解酵素ドメインを持つタンパク質であったが、4 つはトリブチリンを分解する活性を示し、1 つはトリブチリンに加えてトリオレインも分解する活性を示した。本大会では、5 つの遺伝子産物について、それらの一次構造と酵素活性について報告し、生物工学的利用への可能性を考察する。

Key words エステラーゼ, リパーゼ, 遺伝子クローニング, 酵素, Bacterium

G2H2 (0309)

Stenotrophomonas maltophilia エステラーゼの活性解析と機能向上に関する研究

○前田謙太郎[1*]，福井健太郎[2]，土橋大地[1]，阿野貴司[1,2]，岡南政宏[1,2]
（[1]近畿大院・生物理工，[2]近畿大・生物理工）

Study on enzymatic characterization and functional improvement of a *Stenotrophomonas maltophilia* esterase

○Maeda Kentaro[1*], Fukui Kentaro[2], Tsuchihashi Daichi[1], Ano Takashi[1,2], Okanami Masahiro[1,2]
([1]Grad. Sch. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ., [2]Fac. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ.)
2033710005p@waka.kindai.ac.jp

エステラーゼは動物，植物，微生物に広く存在する加水分解酵素である。中でも微生物のエステラーゼは, 動植物のエステラーゼと比較して一般的に広範な温度および pH において高い活性を示し，広い基質特異性を有するものが多い。そのため，生分解性プラスチックをはじめとするポリエステル化合物の分解といった生物工学への利用が期待できる。我々は，これまでに *Stenotrophomonas maltophilia* 4A 株からエステラーゼ活性をコードする遺伝子を単離している。本研究では，この遺伝子がコードするタンパク質(X-Pro)を組換えタンパク質として大腸菌内で発現させ精製すること，および，アミノ酸置換を導入することによって機能を向上させることを目的とした。X-Pro を大腸菌で MBP タグ付き組換えタンパク質として発現させることで精製が確認できた。しかし，低温で長時間の誘導を必要とし，不溶性画分への移行も多く見られた。X-Pro の可溶性画分への移行を目指し，発現システムや培養条件などを試行した結果，N 末端から 20 アミノ酸を削除した $X\text{-}Pro_{21\text{-}525}$ を His タグ付きタンパク質として発現させることによって，高いエステラーゼ活性を保持したまま精製することができた。また，精製されたエステラーゼの活性特性を解析することで，本酵素が 30~45℃，pH6~8 という比較的広い範囲で高い活性を示し，中鎖脂肪酸エステルに対する基質特異性と高い基質親和性を持つという結果が得られた。さらに，本酵素に対して error-prone PCR を用いたランダム変異導入を試みたところ，低い温度域での活性が向上したと考えられる酵素が得られた。この酵素の詳細についても併せて報告する。

Key words esterase, enzyme activity, error-prone PCR

G2H2 (0310)

Aspergillus oryzae とその近縁種を用いた硝酸ナトリウムトランスポーター解析

○田中智大[1]，高橋遥香[2]，岩田そよ楓[2]，林円花[2]，佐野元昭[3]*，
（[1]金工大院・工，[2]金工大・バイオ科，[3]金工大・ゲノム研）

Sodium nitrate transporter analysis in *Aspergillus oryzae* and related species

○Tanaka Tomohiro[1], Takahashi Haruka[2], Iwata Soyoka[2], Hayashi Madoka[2], Sano Motoaki[3]*
([1]Grad. Sch. Eng., Kanazawa Inst. Technol. [2]Sch. Eng., Kanazawa Inst. Technol.[3]Genome Biotechnol. Laboratory, Kanazawa Inst. Technol,)
msano@neptune.kanazawa-it.ac.jp

日本酒や味噌、醤油等の製造に利用されている糸状菌である *Aspergillus oryzae* は、*nrtA* 遺伝子によってコードされている硝酸トランスポーター(NRT)を一つ持っているとされている[1]。*Aspergillus* 属の中で最も基礎研究に広く使用されている *A. nidulans* では、*nrtA* および *nrtB* 遺伝子によってコードされる NRT を二つ持っている[2]。*A. oryzae* NrtA は硝酸ナトリウムを取り込み、*A. nidulans* NrtA, NrtB は硝酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムの両方の取り込みを行っていることが分かっており[3]、属が同じであっても NRT の数と機能が異なることが知られている。そこで本実験では、まず *A. oryzae ΔnrtA* 株に、近縁種である *A. nidulans*、*A. niger*、*Penicillum rubens* の NRT 遺伝子をそれぞれ導入した形質転換体を作製する。次に得られた形質転換体を、硝酸ナトリウムを唯一の窒素源で生育させたとき、近縁種の NRT は *A. oryzae nrtA* の働きを相補するのか確認を行った。

形質転換体は、麹菌用高発現ベクターpNEN142 に *A. nidulans nrtA*、*A. nidulans nrtB*、*A.niger nrtA*、*P. rubens nrtA* を組み込んだプラスミドを作製し、そのプラスミドを PEG 法を用いて *A. oryzae ΔnrtA* に導入し、遺伝子の導入確認は PCR を用いて行った。得られた形質転換体 4 種と *A. oryzae ΔnrtA* の計 5 株を、窒素源を硝酸ナトリウムのみに制限した最小培地（MM 培地）を用いて生育確認を行った。コロニー直径を計測したところ、全ての形質転換体で、*A. oryzae ΔnrtA* より、明らかにコロニーサイズが大きくなっていた。これらのことから本実験で用いた *A. nidulans nrtA*、*A. nidulans nrtB*、*A.niger nrtA*、*P. rubens nrtA* は、*A.oryzae nrtA* の機能を一部相補したことが確認された。

参考文献
[1] M. Sano：“*Aspergillus oryzae nrtA* affects kojic acid production，” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*，Vol.80，2011，pp. 1776-1780
[2] Unkles S.E.*et al*：“Apparent genetic redundancy facilitates ecological plasticity for nitrate transport,” *EMBO J*，Vol.20-22，2001，pp.6246-6255
[3] Thorsten Schinko *et al* ：“ Transcriptome analysis of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans* reveals connections to nitric oxide metabolism，” *Molecular Microbiology* ，vol78，2010，pp.720–738

Key words NRT, *nrtA*, *nrtB*, $NaNO_3$

G2H2 (0311)

熱刺激によって高肝機能誘導可能な遺伝子改変ヒトヘパトーマ細胞株の特性評価

○北野裕之[1]，Manuel Souvervielle[2]，河邉佳典[1]，上平正道[1,2]*
（[1]九大院・工，[2]九大院・システム生命）

Characterization of a genetically engineered human hepatoma cell line with heat-inducible high liver function

○Hiroyuki Kitano[1], Manuel Souvervielle[2], Yoshinori Kawabe[1], Masamichi Kamihira[1,2]*
([1]Fac. Eng., Kyushu Univ., [2]Grad. Schl. Syst. Life Sci., Kyushu Univ.)
*kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

急性肝不全や劇症肝炎の患者に対する効果的な治療法は、現在のところ肝臓移植に限られるが、慢性的なドナー不足が問題となっている。肝機能を有した細胞を充填した装置と、肝不全患者との間で血液を循環させ、血液中の毒素の除去や生理活性物質の供給を行うバイオ人工肝臓（BAL）システムは、肝不全患者の肝機能を補助・代替する魅力的な手段である。BAL システムの臨床試験では主にブタ肝細胞が使用されているが、異種免疫反応を回避し、ヒトと同等な代謝機能を実現するためには、ヒト細胞の利用が望ましいと考えられる。本研究では、ヒトヘパトーマ HepG2 細胞に遺伝子改変を行うことで、高い肝機能を誘導発現可能なヒト細胞源の開発を目指した。本研究室で以前に樹立した、温熱に応答して人工転写因子（TA）の発現誘導により GFP を発現する遺伝子改変ヒトヘパトーマ細胞（HepG2-HS）において、導入遺伝子発現誘導のための加温条件を検討した。HepG2-HS 細胞では、熱ショックタンパク質プロモーターの制御下で TA が発現し転写増幅される。TA の発現は、細胞を 43°C で 30 分間加温することにより、細胞傷害をほとんど与えることなく誘導された。次に、TA に応答して発現する 8 つの肝特異的転写因子遺伝子を HepG2-HS 細胞に導入した。トランスフェクション後、マーカー遺伝子に対応したスクリーニング薬剤を用いて遺伝子導入細胞を選抜した。遺伝子導入細胞（HepG2-HS/8F）は、加温により肝特異的転写因子遺伝子を過剰発現することで、細胞増殖が抑制され肝機能が大きく向上することがわかった。また、HepG2-HS/8F 細胞は加温に応答して GFP を発現するため、GFP 蛍光を指標にして温熱応答した細胞を分取することが可能である。これにより、増殖抑制がかかり、肝機能が誘導された細胞のみを利用できるようになった。分取した細胞は、スフェロイドを形成させることにより、さらに肝機能が向上し、長期間維持できることがわかった。また、この細胞の温熱誘導前後での網羅的な転写産物解析により、多くの肝機能関連遺伝子発現が向上していることがわかった。HepG2-HS/8F 細胞は、通常培養条件下で旺盛に増殖し、加温により高肝機能を誘導可能であるため、BAL システムの構築や創薬における化合物スクリーニングのための新たな細胞源としての利用が期待される。

Key words human hepatoma, HepG2 cell, liver-specific function, heat-inducible gene expression system

G2H2 (0312)

糸状菌 *Aspergillus aculeatus* における酸化ストレス応答への dipeptidyl peptidase IV の寄与

○森　孝輔，炭谷　順一，谷　修治*，川口　剛司
（阪府大院・生環科）

Dipeptidyl peptidase IV is involved in oxidative stress response in *Aspergillus aculeates*

○Kosuke Mori, Jun-ichi Sumitani, Shuji Tani*, Takashi Kawaguchi
(Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)
shuji@biochem.osakafu-u.ac.jp

【背景・目的】我々はこれまでに、*A. aculeatus* において *dppIV* 高発現株が酸化ストレス耐性を獲得することを明らかにした。Dipeptidyl peptidase IV（DppIV）は、N 末端から二番目のアミノ酸がプロリンかアラニンの場合その C 末端側を加水分解する酵素である。この基質特異性は原核生物から哺乳類の DppIV まで広く保存されているが、DppIV の生理的な基質は酵母と哺乳類で生理活性を有すペプチドが分解されることが報告されているのみである。本研究ではまず、*A. aculeatus* DppIV の活性が酸化ストレス耐性付与に関与しているのかを解明することを目的とした。

【方法・結果】DppIV 野生型および触媒残基を改変した DppIV を糸状菌において発現し、DppIV 活性と酸化ストレス耐性機構との関連を遺伝学的に解析した。糸状菌において構成的に高発現する translation elongation factor 1α 遺伝子プロモーター（Ptef）制御下で *A. aculeatus* DppIV 野生型と、DppIV の 3 つの推定触媒残基をアラニンに置換した S614A、D695A、H730A, および各変異を組み合わせた二重変異、三重変異を有す改変 DppIV を発現するための発現カセットを構築した。protoplast-PEG 法により各発現カセットを用いて形質転換し、各発現カセットが orotidine 5’-phosphate decarboxylase 遺伝子座に 1 コピー挿入された株をサザンブロット解析により選択した。全ての改変 *dppIV* 高発現株でコントロール株と比較して *dppIV* が高発現していることを確認した。コントロール株, *dppIV* 高発現株, Δ*dppIV* 株, 7 種の各改変 *dppIV* 高発現株の胞子を最少培地と最少培地に 10 mM の H_2O_2 を含む培地にそれぞれ 1.0 x 10^2 個, 1.0 x 10^3 個, 1.0 x 10^4 個植菌して 30°C、培養 6 日目におけるコロニーの直径を比較した。最少培地上では全ての株が同様に生育した。H_2O_2 含有培地上では、*dppIV* 高発現株が生育したのに対し、多重変異 *dppIV* 導入株の生育が、コントロール株あるいは Δ*dppIV* 株と同程度まで生育が低下した。以上より、*A. aculeatus* において DppIV 活性が酸化ストレス耐性付与に寄与していることが遺伝学的に示された。

Key words cellulase, oxidative stress resistance

G2H3 (0101) パッションフルーツ種子から分離した内生細菌のレスベラトロールおよびピセアタンノール変換活性の評価

○古屋俊樹*, 石田葵
（東京理科大院・理工）

Bioconversion of resveratrol and piceatannol by endophytic bacteria isolated from *Passiflora edulis* seeds

○Toshiki Furuya*, Aoi Ishida
(Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci.)
tfuruya@rs.tus.ac.jp

【背景・目的】果物として親しまれているパッションフルーツ（*Passiflora edulis*）の種子には、レスベラトロールやピセアタンノール等の有用ポリフェノールが含まれており、機能性食品素材として注目されている。一方、植物は種子を微生物から守るために、これらの化合物を防御物質として蓄積すると考えられている。近年、植物の内部にも微生物が生存していることが明らかにされているが、植物内部の環境に適応した内生菌の中には、その環境に含まれている化合物を生産する株や変換する株の存在が報告されている。本研究では、パンションフルーツ種子から微生物を分離し、レスベラトロールおよびピセアタンノール変換活性を評価した。
【方法・結果】沖縄県産および熊本県産のパッションフルーツから種子を回収し、その表面を殺菌処理後、種子を切断もしくは破砕し、培地に接触させた。しかしながら、培地上に微生物コロニーは出現しなかった。一方、興味深いことに、無菌環境下で種子から発芽した芽を切断して培地に接触させることにより 19 株の細菌を取得することができた。種々の解析から、種子内部では抗菌化合物により細菌の増殖は阻害されており、発芽により種子内環境を逃れた株が芽を経由して培地上にコロニーを形成したことが示唆された。さらに、種子内生菌を培養後、菌体を回収し、レスベラトロールやピセアタンノールと反応させた。その結果、*Brevibacterium* sp. PE28-2 株はレスベラトロールをピセアタンノールに変換するという興味深い活性を有していることが明らかとなった [1]。
1) A. Ishida, T. Furuya, MicrobiologyOpen, in press (2021).

Key words endophyte, bioconversion, isolation, bacteria

G2H3 (0102) コーヒー滓を電子供与体としたシトクロム P450 による酸化反応プロセスの確立

○川名秀明 [1], 本田裕樹 [2], 古屋俊樹 [1]*
（[1] 東京理科大院・理工, [2] 奈良女子大・理）

Cytochrome P450-catalyzed oxidation reactions using coffee grounds as an electron donor

○Hideaki Kawana[1], Yuki Honda[2], Toshiki Furuya[1]*
([1]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]Nara Women's Univ.)
tfuruya@rs.tus.ac.jp

【背景・目的】近年、有用化合物の生産において効率や環境負荷低減の観点から、酵素を触媒として利用する生体触媒反応プロセスに期待が寄せられている。シトクロム P450 は温和な条件下で有機化合物の酸化反応を触媒するが、反応に必要な電子供与体を高価な NAD(P)H に依存する点が実用化への課題の 1 つとなっている。一方、シトクロム P450 の中でも P450 ペルオキシゲナーゼは NAD(P)H に依存せず、過酸化水素の供給のみで酸化反応を触媒することが可能である。我々は、未利用バイオマス資源のコーヒー滓に残存するポリフェノールを電子供与体として分子状酸素と反応させることにより、コストをかけずに過酸化水素を供給できるのではないかと考えた。本研究では、コーヒー滓と分子状酸素から過酸化水素を生成する反応条件を検討し、さらに生成された過酸化水素の存在下で P450 ペルオキシゲナーゼによる酵素変換を進行させることを目的とした。
【方法・結果】ポリフェノールのモデル化合物としてピロガロール、そして市販されているコーヒー粉末から調製したコーヒーと、その際に得られたコーヒー滓を、純水もしくは pH 7.4 のリン酸緩衝液に添加して 24 時間振とうした。その結果、いずれの場合もリン酸緩衝液を用いた場合に過酸化水素の生成が確認された。さらに、コーヒー滓等をリン酸緩衝液中で 24 時間振とう後の溶液を、P450 ペルオキシゲナーゼの一種である *Bacillus subtilis* 由来 CYP152A1 を含む反応溶液と混合し、2 種類の基質 4-メトキシ-1-ナフトールとスチレンの変換を試みた。その結果、それぞれの基質において生成物への変換が確認された。これより、コーヒー滓を電子供与体として CYP152A1 による酸化反応を進行させることができた。

Key words P450, oxidation, coffee grounds, biomass

G2H3 (0103) 欠損導入によるグルタミン酸脱炭酸酵素の改良

○髙木啓詞 [1, 2]*,小塚康平 [1],海野伊吹 [1],中野祥吾 [1],伊藤創平 [1]
（[1] 静県大院・薬食生命, [2] 沼津工業技術支援センター）

Improvement of glutamate decarboxylase by rational site-directed deletion

○Hiroshi Takagi [1, 2]*, Kohei Kozuka [1], Ibuki Unno [1], Shogo Nakano [1], Sohei Ito [1]
([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Numazu Technical Support Center Industrial Research Institute of Shizuoka Prefecture)
hiroshi1_takagi@pref.shizuoka.lg.jp

【背景と目的】グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）は、グルタミン酸を脱炭酸することで、γ - アミノ酪酸（GABA）に変換する酵素である。GABA は、ストレス緩和や血圧改善など機能性化合物として広く利用されており、高活性な GAD のスクリーニング、活性や耐熱性を向上する変異導入などの報告が多数ある。本研究では、配列ライブラリーの情報と Rosetta による構造安定性のシミュレーションを活用する事で、酵素の機能向上に寄与しうる欠損可能部位の予測手法を構築、実際に GAD に欠損を導入し検証する事を試みた。
【方法】*Levilactobacillus brevis* CGMCC 1306 由来の GAD（GAD-wild, Accession number: GU987102.1）と相同なアミノ酸配列を Blastp で入手し、cd-hit を用いて 90%以上相同な配列を除去したものを配列ライブラリーとした。配列ライブラリーを MAFFT でアライメントし、ギャップが 5%程度検出された領域を欠損導入の候補とした。さらに、候補領域を欠損させた GAD-wild の構造を Swiss-model を用いて予測し、予測構造の安定性を Rosetta を用いて評価した。欠損により予測構造の安定性が向上した領域を欠損可能部位とした。次に、組換え大腸菌を用いて候補領域に欠損を導入した GAD を作製し、酵素の諸性質（活性、pH 依存性、温度依存性）とサーマルシフトアッセイによる熱安定性を評価した。
【結果と考察】配列ライブラリー（113 配列）のアライメントの結果、GAD-wild 上の E114、A115、A154 でギャップが確認できた。これらのアミノ酸残基は酵素の分子表面のループに位置していた。そこで、Δ114、Δ115、Δ154、Δ114-115 の 4 種の欠損について、構造予測と安定性評価を行ったところ、Δ115 と Δ114-115 が GAD-wild よりも構造が安定化すると予測された。実際に、4 種の欠損を導入した GAD を作製したところ、4 種とも組換え大腸菌で酵素の生産が確認できた。生産した酵素を評価した結果、Δ115 と Δ114-115 において k_{cat} と T_m が向上したが、Δ114 と Δ154 では活性や T_m が低下した。以上の結果から、配列ライブラリーのアライメントに基づく欠損候補領域の絞り込みと構造シミュレーションによる安定性の評価により、欠損導入による GAD の改良に成功した。現在、上記領域に欠損を導入することで *L. brevis* の GABA 生産能の向上や耐酸性の強化を目指している。

Key words Glutamate decarboxylase, Gamma-aminobutyric acid, Lactic acid bacteria, Deletion, multiple sequence alignment

G2H3 (0104) 好熱好酸性アーキア *Thermoplasma acidophilum* 由来の 2 種類のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの異種発現及び機能解析

○佐藤 悠 [1]*, Ilma Fauziah Ma'ruf [2,3], 佐々木由佳 [1,3], Anastasia Kerbs[4], Jochen Nießer[5], 谷口博範 [3], 岡野憲司 [1,6], 木谷 茂 [1,6], Elvi Restiawaty[7], Akhmaloka[2,8], 本田孝祐 [1,6]
（[1] 阪大･生工国交セ, [2] バンドン工大・化, [3] 阪大院・工, [4] ピーレフェルト大・生工セ, [5] チューリッヒ研セ, [6] 阪大・先導学研機, [7] バンドン工大・産技, [8] ペルタミナ大・科コ）

Heterologous gene expression and characterization of two serine hydroxymethyltransferases from *Thermoplasma acidophilum*

○Yu Sato[1]*, Ilma Fauziah Ma'ruf[2,3], Yuka Sasaki[1,3], Anastasia Kerbs[4], Jochen Nießer[5], Hironori Taniguchi[3], Kenji Okano[1,6], Shigeru Kitani[1,6], Elvi Restiawaty[7], Akhmaloka[2,8], Kohsuke Honda[1,6]
([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Dep. Chem., ITB, [3]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [4]CeBiTec, Bielefeld Univ., [5]Forschungszentrum Jülich GmbH, [6]OTRI, Osaka Univ., [7]Fac. Ind. Technol., ITB,[8]Fac. Sci. Comp., Univ. Pertamina)
honda@icb.osaka-u.ac.jp

アミノ酸はタンパク質の構成要素であり、生体調節物質などの多様な生体分子の前駆体として機能する。このうち、核酸や抗酸化剤の前駆体となるグリシンの生合成に関連する酵素として、ピリドキサール-5'-リン酸を補酵素として機能するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ(SHMT)やスレオニンアルドラーゼ(TA)が挙げられる。SHMT と TA はどちらもグリシン生合成に寄与するが、両者の棲み分けについては未解明な点が多い。これまでの研究から SHMT の方が幅広い系統群において保存されており、TA を有する一部の原核生物もその欠損によりグリシン要求性を示さないため、SHMT を利用したグリシン合成が主流とされてきた。一方、発表者らは好熱性アーキアを対象とした解析により、一部の好熱性アーキアはゲノム上に 2 コピーの推定 SHMT をコードした遺伝子を持つことを突き止め、それらの詳細な仕組みに興味を持った。本研究では、好熱好酸性アーキア *Thermoplasma acidophilum* のもつ 2 コピーの推定 SHMT (Ta0811 と Ta1509)を対象として、これらの生化学的特性を調査した。その結果、Ta1509 はテトラヒドロ葉酸(THF)を補酵素としたセリン開裂と THF 非依存型のスレオニン開裂の両方の反応を触媒する 2 種類の活性を有しており、これまでに報告された SHMT と類似した特性を示した。一方、Ta0811 は THF 結合ドメインを欠いており、THF 非依存型のスレオニン開裂反応のみを触媒した。異なる基質濃度条件下でのカイネティクス分析により、Ta1509 のセリン開裂活性と比較して、Ta0811 は 3.5 倍高いスレオニン開裂活性を示した。加えて、各遺伝子に特異的なプライマーを用いた定量 PCR 解析により、*T. acidophilum* において Ta0811 の転写量は Ta1509 のおよそ 20 倍であることが示された。これらの結果から、Ta0811 により触媒されるスレオニンのアルドール開裂反応は *T. acidophilum* のグリシン生成合成において重要な役割を担うと推測される。本研究成果は好熱性アーキアにおけるアミノ酸代謝の多様性の一端を示唆する結果である。

Key words threonine aldolase, serine hydroxymethyltransferase, archaea, thermostable enzyme

G2H3 (0105) *N*-Succinylaminoadamantane の位置選択的水酸化を触媒する微生物の探索と特徴解析

○林 峻輔[1], 満倉 浩一[1*], 吉田 豊和[1]
([1]岐阜大院・工)

Screening and characterization of microorganisms catalyzing regioselective hydroxylation of *N*-succinylaminoadamantane

○Shunsuke Hayashi[1], Koichi Mitsukura[1*], Toyokazu Yoshida[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Gifu Univ.)
mitukura@gifu-u.ac.jp

【背景と目的】 1-Aminoadamantane から 5-amino-2-adamantanol (5-NH_2-2-adOH)を化学合成する場合、不活性炭化水素の水酸化であり、位置選択性の制御が難しいと予想される。一方、水酸化を触媒する微生物を用いた 5-NH_2-2-adOH 誘導体合成は一例のみあるが、水酸化の位置選択性は低かった。そこで本研究では、*N*-succinylaminoadamantane (NHScad) を用いて位置選択的水酸化を触媒する微生物を探索した。
【方法と結果】 土壌分離菌を用いて NHScad の水酸化を触媒する微生物を探索し、5-succinylamino-2-adamantanol (5-NHSc-2-adOH) のみを生成する *Burkholderia* sp. HS310 を見いだした。休止菌体を用いた反応条件を検討したところ、最適 pH と温度はそれぞれ pH 6、30℃であった。NHScad の溶解度を高めるため反応系に種々の有機溶媒と界面活性剤を添加し、活性に及ぼす影響を調べたところ、有機溶媒存在下では活性が顕著に低下した。一方、Tween 20, 40, 60 では活性が約 85%維持された。休止菌体反応を用いて基質特異性を調べるためにアダマンタンアミン誘導体を合成し、活性を評価した。

Key words adamantane derivatives, *Burkholderia* sp., regioselective, hydroxylation

G2H3 (0106) 超好熱性アーキア *Staphylothermus marinus* における ATP-dependent serine kinase の同定

○佐藤喬章[1*], 森康暢[1], 川村弘樹[1], 藤田嵩之[1], 永田隆平[2], 藤橋雅宏[3], 三木邦夫[2], 跡見晴幸[1]
([1]京大院・工, [2]京大院・理, [3]大阪医薬大・医)

Identification of an archaeal ATP-dependent serine kinase from the hyperthermophilic archaeon *Staphylothermus marinus*

○Takaaki Sato[1*], Yasunobu Mori[1], Hiroki Kawamura[1], Takayuki Fujita[1], Ryuhei Nagata[2], Masahiro Fujihashi[3], Kunio Miki[2], Haruyuki Atomi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ., [3]Fac. Med., Osaka Med. Pharm. Univ.)
takaakisato@sbchem.kyoto-u.ac.jp

アーキアは真核生物や細菌とは異なる第三の生物ドメインを形成する微生物である。アーキアの特徴の一つとして、他の 2 ドメインには見られない特有の代謝が挙げられる。例えば、真核生物や細菌は核酸の前駆体となるリブロース-5-リン酸をペントースリン酸経路により生合成するが、多くのアーキアはその代謝経路の代わりにリブロースモノリン酸経路を用いている（***J. Bacteriol.* 188**: 4698 [2006]）。我々は、アーキアの中でも 80℃以上を至適生育温度とする超好熱性アーキアを主要な研究対象として、新規な酵素や代謝経路の同定を目指して研究を進めている。

これまでに Euryarchaeota 門に属する超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* において、ADP をリン酸基供与体とする serine kinase（ADP-SerK）およびそれが機能するシステイン生合成経路を同定してきた（***Nat. Commun.* 7**: 13446 [2016]）。本酵素はセリン代謝にも寄与している可能性が考えられる。また本酵素の結晶構造解析も行い、活性残基や基質認識残基を同定してきた（***ACS Chem. Biol.* 12**: 1514 [2017] ）。

ADP-SerK の明確なホモログは *T. kodakarensis* を含む Thermococcales 目のみに分布していたが、低いながらも相同性を示すタンパク質は真核生物・細菌を含め幅広く分布していた。これら全ても ADP-SerK なのかを含め、それらの機能に興味が持たれた。これらの中では比較的高い ADP-SerK との相同性(45%程度)を示すタンパク質群が、アーキアの Crenarchaeota 門に属する Desulfurococcales 目の数種に存在していた。この内、超好熱性アーキア *Staphylothermus marinus* 由来の Smar_0555 タンパク質に焦点を当てて解析を進めた。大腸菌で組換え型タンパク質を調製し、精製・解析を行った。その結果、ADP ではなく ATP をリン酸基供与体とする serine kinase（ATP-SerK）であることが明らかとなった（***J. Bacteriol.* 203**: e0002521 [2021]）。そのリン酸基受容体に対する特異性は高く、L-セリンと構造が似ている L-スレオニン、L-ホモセリン、D-セリンは基質としてほぼ認識しなかった。ATP-SerK 遺伝子は、*S. marinus* のゲノム上でホスホセリンを中央糖代謝産物である 3-ホスホグリセリン酸へと変換すると思われる 2 つの遺伝子とオペロンを形成しており、セリン代謝へ寄与している可能性が考えられる。一方で、ADP-SerK や ATP-SerK とは一次配列の相同性は低いものの細菌においても serine kinase が存在することが報告された（***J. Biol. Chem.* 293**: 6147 [2018]）。これらの結果から、serine kinase は様々な生物に分布している可能性が示唆された。

Key words Archaea, kinase, serine, hyperthermophile, metabolism

G2H3 (0107) 芳香族カルボン酸エステラーゼ EstAC の活性部位を構成するアミノ酸残基の同定と評価

○後藤 知, 井上 茂樹, 本田 拓也, 加藤 歩並, 堀口 芽衣, 竹原 宗範*
（滋県大院・工・材料科学）

Identification and characterization of amino acid residues forming the active site of an aryl-carboxylesterase EstAC

○Satoshi Goto, Shigeki Inoue, Takuya Honda, Honami Kato, Mei Horiguchi, Munenori Takehara*
(Dept. Mater. Sci., Grad. Sch. Eng., The Univ. Shiga Pref.)
takehara@mat.usp.ac.jp

【背景・目的】 EstAC は、種々の芳香族カルボン酸エステルに加え、短鎖脂肪酸エステルに対しても加水分解能を示す基質特異性の広い酵素である（*Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012,** *76,* 1721）。相同タンパク質とのマルチプルアライメント解析より、EstAC は Ser-Xaa-Xaa-Lys モチーフを有するファミリーVIIIエステラーゼに分類され、同酵素群で保存されている S69、K72、Y180 が触媒部位として機能することが示唆された。本研究では、これらアミノ酸残基に加え、EstAC の推定三次元構造より活性への寄与が見込まれる Y139、D185 の役割を評価するとともに、基質の結合に関与するアミノ酸残基を調査した。
【方法】 エステラーゼ EstB (PDB: 1cl9) を鋳型として SWISS-MODEL を用い、EstAC の三次元構造を構築した。変異体 S69A、K72A、K72R、Y139F、Y180F、D185N、D185E、L350A、L350V、L350F の精製酵素について、pH スタットを用いた酸塩基滴定法で加水分解活性を評価した。Error-prone PCR 法で作製した変異遺伝子ライブラリーより、基質特異性の改変体を、基質とクロロフェノールレッドを含むプレート上で選抜した。分子ドッキングシミュレーションには AutoDock Vina を用いた。
【結果・考察】 S69A、K72A、Y139F、Y180F、D185N は野生型酵素と比較して著しく低い酵素活性を示したが、K72R、D185E については活性の減少の程度は小さかった。S69 の求核剤としての働きには、これらアミノ酸残基の側鎖間の水素結合ネットワークの形成が重要であることが強く示唆された。ホモロジーモデリングおよび進化分子工学の手法により、基質結合には L350 が関与することが考えられた。L350F は選抜プレート上では活性の向上がみられたが、酸塩基滴定法では活性が低下していた。ドッキングシミュレーションの結果から、L350V、L350F では生成物阻害の効果が働いていることが考えられた。

Key words carboxylesterase, active site, homology modeling, site-directed mutagenesis

G2H3 (0108) *Amycolatopsis* sp. NT-119 由来ホスファチジン酸ホスファターゼの精製と諸特性解析

○松井萌[1], 藤田大勢[1], 佐藤佑香[2], 杉森大助[1,2*]
([1]福島大院・共生システム理工, [2]福島大・共生システム理工)

Purification and characterization of phosphatidate phosphatase from *Amycolatopsis* sp. NT-119

○Matsui Megumi[1], Fujita Taisei[1], Sato Yuka[2], Sugimori Daisuke[1,2*]
([1]Grad. Sch. Symbio. Syst. Sci., Fukushima Univ., [2]Fac. Symbio. Syst. Sci., Fukushima Univ.)
sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp

【緒言】
ホスファチジン酸ホスファターゼ（PAP, EC 3.1.3.4）はホスファチジン酸（PA）の脱リン酸化を触媒する酵素であり、PA とジアシルグリセロール（DAG）の細胞レベル制御に関与している。これまでに酵母や動物由来 PAP については研究が進められているが、原核生物や分泌型 PAP については諸特性解析すら進んでおらず、立体構造や基質認識メカニズムに至っては未解明のままである。そこで本研究では、原核生物由来分泌型 PAP の機能解析を目指し、放線菌由来分泌型 PAP の精製と諸特性解析を行った。
【方法・結果と考察】
放線菌 112 株を対象にしたスクリーニングにより、培養上清に PAP を分泌生産する NT-119 株を取得することに成功した。NT-119 株の 16*S* rDNA 塩基配列解析の結果から、NT-119 株は *Amycolatopsis halotolerans* に近縁の新種 *Amycolatopsis* sp.と帰属された。培養条件検討の結果、PAP 分泌生産には MGP 培地が適しており、培養 2 日目の培養上清を 40%飽和硫安分画することにより PAP を回収できた。中間精製酵素サンプルを用いて本酵素（PAP_{NT119}）の諸特性解析を行った結果、pH 5.5~6.0、42℃付近で最大活性を示した。本酵素は、透析によって失活し、10 μM $MnCl_2$ 添加によって活性が回復した。本酵素は 1 mM $MnCl_2$ 存在下で最大活性を示し、その他金属イオンによる影響は確認されなかった。これらの結果から、本酵素は Mn^{2+}要求性と考えられ、Ca^{2+}もしくは Mg^{2+}要求性や金属イオン非要求性である既知 PAP とは異なる金属イオン要求性を示すことがわかった。PAP の精製工程を再検討し、パルミトイルセルロースアフィニティークロマトグラフィーを導入することにより、PAP_{NT119} を電気泳動的に単一となるまで精製することに成功した。SDS-PAGE 分析の結果、PAP は分子質量 34 kDa のポリペプチド鎖からなる単量体酵素であると推定した。放線菌由来分泌型 PAP として唯一報告されている *Streptomyces mirabilis* 由来 PAP の分子質量は 15 kDa であり、Ca^{2+}要求性であることから、放線菌由来新規 PAP の可能性が高いと考えられる。現在、精製酵素を用いた諸特性解析を進めている。

Key words *Amycolatopsis* sp., phosphatidate phosphatase, purification, characterization

G2H3 (0109) *Paenibacillus* sp. が生産するガラクトオリゴ糖高生産酵素の同定と機能解析

○尾高伶，馬場康浩，堀口博文，馬場将弘*
（合同酒精）

Identification and functional analysis of an enzyme from *Paenibacillus* sp. which produces high amount of galactooligosaccharides

○Rei Odaka, Yasuhiro Baba, Hirohumi Horiguchi, Masahiro Baba*
(GODO SHUSEI CO., LTD.)
r-odaka@oenon.jp

ガラクトオリゴ糖 (GOS) は，腸内のビフィズス菌を特異的に増殖させるプレバイオティクス効果を持つオリゴ糖の一種で，ラクトース分解酵素 (β-ガラクトシダーゼ) の糖転移反応を利用して工業生産されている．β-ガラクトシダーゼを生産する微生物には，酵母やカビ，細菌など幅広く知られているが，中でも細菌が生産するβ-ガラクトシダーゼは優れた GOS 生産能を持つことが報告されている．しかしながら，実用化されている酵素の数は限定的である．そこで本研究は，新規 GOS 製造用酵素の開発を目的とし，土壌からスクリーニングによって取得した *Paenibacillus* sp. S5390 株における GOS 高生産酵素の同定および機能解析を行った．

GOS 生産能が高い酵素として，Glycoside Hydrolase family (GH) 2 に分類されるβ-ガラクトシダーゼのほか，GH1 に分類され，1 次構造がβ-グルコシダーゼに近い酵素が報告されている．このことから，本研究においても両方の可能性を考慮して探索することとした．ゲノム解析の結果から S5390 株には 11 種類のβ-ガラクトシダーゼと，9 種類のβ-グルコシダーゼを有することが分かった.これらを順次組換え生産して GOS 生産能を評価したところ，β-グルコシダーゼに分類される BGL8 が本菌における GOS 高生産酵素であることが判明した．本酵素が生成する GOS の主要構造を HPAEC-PAD および NMR により解析したところ，主要の GOS は 3’-GL (Gal β1-3Gal β1-4Glc) であった．これは，4’-GL (Gal β1-4Gal β1-4Glc) または 6’-GL (Gal β1-6Gal β1-4Glc) を主要構造とする既存酵素とは異なるユニークな性質であるといえる．さらに，生成した GOS は 2 糖および 3 糖の割合が高く，本酵素は長鎖のオリゴ糖を生成しにくいと考えられた．

最後に，BGL8 により生成した GOS シロップのビフィズス菌資化試験を実施した．その結果，本 GOS シロップは 4’-GL を主要構造とする市販 GOS シロップと遜色ないビフィズス菌増殖効果を示しただけでなく，市販 GOS よりも高生育した菌株も存在したことから，本 GOS シロップの摂取により，4’-GL では増殖しにくいビフィズス菌も包括的に増殖させることができる可能性が示唆された．

Key words *Paenibacillus*, oligosaccharide, β-galactosidase, β-glucosidase

G2H3 (0110) セクレトーム解析から見出された新規 Unsaturated Rhamnogalacturonyl Hydrolase の機能解析

○亀山綾音 [1]，大堀沙貴子 [1]，鈴木裕満 [1]，加藤雅士 [1]，志水元亨 [1*]
（[1]名城大院・農）

Identification and characterization of an unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase from *Aspergillus nidulans*

○Ayane Kameyama[1], Sakiko Ohori[1], Hiromitsu Suzuki[1], Masashi Kato[1], Motoyuki Shimizu[1*]
([1]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ.)
moshimi@meijo-u.ac.jp

【緒言】 種々の多糖類を唯一の炭素源として、糸状菌 *Aspergillus nidulans* を培養し、生産された細胞外タンパク質を LC-MS/MS にてセクレトーム解析した。その結果、Glycoside Hydrolase family 105 (GH105) に分類される Unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase (URH) がペクチンを含むいくつかの多糖に対して応答的に生産されていた。糖質関連酵素データベース CAZY において、GH105 に分類される酵素は、非還元末端に C=C 二重結合を有する不飽和オリゴガラクツロン酸を加水分解する GH として登録されている。しかしながら、これまでに GH105 に分類される酵素は細菌由来のもののみ研究されており、真核生物由来の GH105 に属する酵素の機能については報告されていない。本研究では、真核生物由来の GH105 に分類される URH の機能について解析した。

【方法・結果】 *A. nidulans* 由来の URH (AnURH) をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* に異種発現させ精製後、unsaturated galacturonosyl rhamnose (ΔGR) 及び unsaturated pentagalacturonic acid (ΔGGGGG) と反応させた。 AnURH と ΔGR の反応産物を還元糖 HPLC にて解析したところ、ラムノースのピークが検出された。また、AnURH と ΔGGGGG の反応産物を MALDI-TOF-MS にて解析したところ、テトラガラクツロン酸のピークが検出された。以上のことから、 AnURH は不飽和 GR オリゴ糖および不飽和 GG オリゴ糖を加水分解することが示唆された。さらに、野生株および AnURH の遺伝子破壊株 (ΔAnURH 株) を ラムノガラクツロナン (RG) のみを炭素源にして培養した。その結果、野生株に比べて ΔAnURH 株の生育が鈍化したことから、*A. nidulans* において AnURH は、RG の分解・資化に重要な役割を果たすことが明らかになった。

Key words ; unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase, *Aspergillus nidulans*, glycoside hydrolase, secretome

G2H3 (0111) 好乾性糸状菌が生産する耐塩性セルラーゼの探索と諸性質の検討

○斉藤大輔 [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)

Isolation and characterization of salt tolerant cellulases from xerophilic molds

○Daisuke Saito[1], Yukihiro Kimura[1], Satoko Yokota[2], Mikiharu Doi[2], Shinji Takenaka[1*]
([1]Grad. Sch. Agric., Kobe Univ., [2]Marutomo Co., Ltd.,)
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・焙乾させたものが荒節であり，*Aspergillus* 属糸状菌 (鰹節カビ) を使ってさらに荒節をかび付け発酵させたものが枯節である．鰹節カビは，低水分活性下でも生育できる好乾性糸状菌に分類されることから [1]，高浸透圧や高塩濃度下においても，安定で活性を維持できる菌体外酵素群を有していることが予想される．例えば，鰹節カビの中には，糖質関連酵素を分泌することが明らかとなっている [2]．そこで，本研究では，研究室保有株の中から耐塩性セルラーゼを検索し，見出したβ-グルコシダーゼの精製と酵素の諸性質の解析を目的とした．

【方法】使用菌株および培養: 研究保有株 5 種を用い，固体培養を行った [1]．酵素活性測定: 既報の方法に従って，カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC) および *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (*p*NPBG) を基質として用いた．酵素の精製: 固体培養後，緩衝液にて抽出することで菌体外酵素 (粗酵素) を得た．続いて，イオン交換，ゲルろ過および疎水クロマトグラフィーにより精製した．タンパク質同定: SDS-PAGE 後，メインバンドについて LC-MS/MS-Mascot 解析を行った．

【結果および考察】試験した株いずれにおいても *p*NPBG に対する活性が見られた．総活性およびイオン交換クロマトグラフィーの溶出パターンから以後，*Aspergillus chevalieri* 由来β-グルコシダーゼ (BGL) の性質を調べることにした．同クロマトグラムには，BGL 活性のピークが 2 つ見られ (BGL1 および BGL2) ，それぞれ単一に精製した．SDS-PAGE の結果，BGL1 は 137 kDa, BGL2 は 46 kDa であった．また，PAS 染色の結果，BGL1 は糖鎖が付加された糖タンパク質であることがわかった．活性に与える NaCl 濃度について調べたところ，BGL2 は BGL1 に比べて耐塩性が優れていた．つまり，18.2% NaCl 存在下で，BGL1 の活性は 55%（相対活性）まで減少したことに対し，BGL2 の活性は塩の影響を受けなかった．タンパク質同定と配列を解析した結果，BGL1 および BGL2 はそれぞれ，*A. oryzae* RIB40 由来 BglX (AO090009000356, 73% (634/864 a.a.)) および BglC (AO090003000990, 61% (235/386 a.a.)) と類似性が見られた．現在，両 BGL の触媒化学的性質を調べている．

1) Takenaka et al., International Journal of Food Microbiology. (2021) 353: 109299.
2) Takenaka et al., Journal of the Science of Food and Agriculture. (2018) 99: 2042-2047.

Key words salt tolerance, *Aspergillus chevalieri*, extracellular hydrolytic enzyme, xerophilic mold

G2H3 (0112) *Aspergillus sydowii* の生産する耐塩性 γ-グルタミルトランスペプチダーゼの特性解析

○西川有咲 [1]，仙波弘雅 [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）

Characterization of salt tolerant γ-glutamyl transpeptidase from *Aspergillus sydowii*

○Arisa Nishikawa[1], Hironori Senba[1], Yukihiro Kimura[1], Satoko Yokota[2], Mikiharu Doi[2], Shinji Takenaka[1*]
([1]Grad. Sch. Agric., Kobe Univ., [2]Marutomo Co., Ltd.)
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であり，*Aspergillus* 属糸状菌（鰹節カビ）を使って荒節をかび付け発酵させたものが枯節である．鰹節カビは麹菌と比較し，より低水分活性下でも生育できる好乾性糸状菌に分類されることから，微生物遺伝資源としても興味深い糸状菌群である．我々は，これまでに脂質やタンパク質分解に関わる菌体外加水分解酵素群の特性解析を行ってきた [1]．本研究では，タンパク質同定の過程で見出したグルタミナーゼの諸性質の解析を目的とした．

【方法】試験菌株: 菌叢解析の過程で分離・選抜した菌株を用いた [1]．培養: 鰹節（荒節）粉にて固体培養を行い，粗酵素液を回収した．酵素の精製: DEAE-Toyopearl や Toyopearl HW-55 等を用いた各種クロマトグラフィーにより精製した．酵素活性測定: 既報の方法に従って γ-glutamyl-*p*-nitroanilide を基質とし，トランスペプチダーゼ活性（accepter, Gly-Gly）および加水分解活性を調べた．タンパク質同定: SDS-PAGE 後，メインバンドについて LCMSMS-Mascot 解析を行った．

【結果及び考察】試験した約 200 菌株の中で，*A. sydowii* MA0196 由来粗酵素において両酵素活性が顕著であった．固体培地の水分含量を変えて，同菌株の酵素の生産特性を調べたところ，水分活性が低下するに従って，酵素活性は高くなった．精製酵素の分子質量はゲル濾過法で 123 kDa であった．また，SDS-PAGE に供したところ，既報の γ-glutamyl transpeptidase (Ggt) で見られるように，large-subunit (72.5 kDa) と small-subunit (35.8 kDa) の 2 つのバンドが見られた．さらに，PAS 染色の結果，いずれも糖鎖が付加されていることがわかった．*A. oryzae* を小麦ふすま固体培地で培養して得られた粗酵素液は，約 20%の NaCl 存在下ではほとんど活性を示さないのに対し，*A. sydowii* 由来 Ggt は，トランスペプチダーゼ活性および加水分解活性ともに 40%以上の活性を維持していた．また，MA0196 株由来同酵素は，グリセロールを添加することで疑似的に水分活性を低下させた反応系においても活性を維持していた．Glutamyl accepter に対する特異性は，既報の類縁酵素と同様幅広かった．LCMSMS-Mascot 解析から得られた配列情報を基に同酵素遺伝子をクローニングし，さらに解析した結果，*A. oryzae* RIB40 由来 GgtA (AO090005000169) と 76% (339/442 a.a.) の類似性が見られた．

1) Takenaka et al., International Journal of Food Microbiology. (2021) 353: 109299

Key words salt tolerance, *Aspergillus sydowii*, extracellular hydrolytic enzyme, xerophilic mold

G2H3 (0113) *Aspergillus chevalieri* 由来カルボキシエステラーゼ/リパーゼの特性解析

○梅木智哉[1]，上村真理子[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）

Characterization of lipolytic enzymes from *Aspergillus chevalieri*

○ Tomoya Umeki[1], Mariko Uemura[1], Yukihiro Kimura[1], Satoko Yokota[2], Mikiharu Doi[2], Shinji Takenaka[1*]
([1]Grad.Sch. Agric., Kobe Univ, [2]Marutomo Co., Ltd.)
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・焙乾させたものが荒節であり，*Aspergillus* 属糸状菌（鰹節カビ）を使ってさらに荒節をかび付け発酵させたものが枯節である．かび付け工程では，鰹肉中の脂質の分解が進むことから，脂質分解に関わる菌体外加水分解酵素群の同定と特性解析を行ってきた[1)]．*A. chevalieri* からは，5 種類の脂質分解酵素を見出している[1)]．本研究では，親株由来脂質分解酵素（cLip 1 から cLip 5）およびその組換え酵素の諸性質の解析を目的とした．
【方法】培養：親株（*A. chevalieri*）は既報の方法に従って培養した[1)]．*Pichia pastoris* および大腸菌形質転換株は，それぞれ BMMY 培地および LB 培地等で培養し，組換え酵素を誘導生産した．異種発現：*Pichia pastoris*-pPICZαA または *E. coli*-pColdI の発現系によった．酵素精製：粗酵素液を調製後，イオン交換や疎水クロマトグラフィー等で精製した．酵素活性測定：基質として *p*-nitrophenyl ester または cod liver oil を用いた．また，低水分活性環境を疑似的に再現するためにグリセロールまたはソルビトールを反応液に添加した．
【結果及び考察】親株を固体培養して得られた粗酵素液を DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィーに供すると，溶出塩濃度の異なる複数のリパーゼ/エステラーゼ（cLip 1 から 5）が見られた．これらの画分はいずれも cod liver oil に対する活性を示したが，*p*-nitrophenyl ester に対する加水分解活性や活性に与える水分活性の影響結果が異なっていた．これらの脂質分解酵素の中でも，特に cLip 2，cLip 3，cLip 4 は，単一に精製できなかったことから，cLip 1 から 5 について酵母または大腸菌で異種発現させることで組換え酵素を調製・精製し，性質を調べることにした．*P. pastoris*-pPICZαA の発現系にて，活性体として rcLip 1 および rcLip 2 が得られた．また，*E. coli*-pColdI の発現系にて，rcLip 4 が活性体として得られた．これらの組換え酵素を生産・精製し，*p*-nitrophenyl ester に対する加水分解特性を調べた結果，rcLip 1 および rcLip 2 は C4 に対して，rcLip 4 は C2 に対して最大活性を示した．また，水分活性が低下するに従って，rcLip 1 および rcLip 4 の活性は高くなったが，rcLip 2 の活性は低下した．現在，rcLip 3 および rcLip 5 についても異種発現と組換え酵素の精製条件を検討している．

1) Takenaka et al., International Journal of Food Microbiology. (2021) 353: 109299

Key words Katsuobushi fermentation, lipolytic enzyme, Xerophilic *Aspergillus, Aspergillus chevalieri*

G2H3 (0201) 質量顕微鏡を用いたイネ科植物の発芽種子におけるグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化

○生田宗一郎[1]，福崎英一郎[1,2,3]，新間秀一[1,2,3*]
（[1]阪大院・工，[2]大阪大学先導的学際研究機構，[3]大阪大学島津分析イノベーション協働研究所）

Visualization of glutamate decarboxylase activity in Poaceae germinated seeds using mass microscope

○Soichiro Ikuta[1], Eiichiro Fukusaki[1,2,3], Shuichi Shimma[1,2,3*]
([1] Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2] Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ, [3] Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

生体内で酵素活性の分布を可視化すること生理現象の理解のために極めて重要である.近年，酵素の局在を可視化する新しい方法として，質量分析イメージング（mass spectrometry imaging: MSI）を，酵素組織化学に応用した手法が開発された(1)．質量顕微鏡は組織上の細分化した各点で，質量分析を行い低分子物質の局在を組織中で直接可視化することができる.しかし，植物サンプルにおいてこの手法を用いて酵素活性を可視化した報告例はない.

γ-aminobutyric acid (GABA)は近年人間の健康への寄与が報告されているため(2)，GABA 高含有食品が注目されている．発芽玄米や発芽大麦は，未発芽種子に比べて GABA を多く生産することから GABA 高含有食品として商業的に販売されている．そのため，発芽過程における GABA 生合成のメカニズムを明らかにすることで，GABA 高含有食品の開発につながる可能性がある．そこで本研究ではグルタミン酸から GABA への反応を触媒するグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)に注目した．
本研究の目的は，質量顕微鏡を用いたイネ科植物種子中の GAD 活性分布の可視化法の確立することとした．イネ科発芽種子の凍結切片上に 50 mM グルタミン酸-d3 をスプレー噴霧し 40℃で 2 時間インキュベートしたのちに，MSI を用いて切片上の GABA-d3 を検出することで GAD 活性の局在を可視化した．結果，イネ科発芽種子の胚において GAD 活性を可視化することに成功した．本発表では，その可視化手法と分布結果について報告する．

(1). Takeo, E.*et al.*, *Anal. Chem*., **92 (18)**, 12379 (2020)
(2). A Yoto, *et al. Amino Acids*, **43 (3)**, 1331 (2012)

Key words Mass microscope, enzymatic activity, glutamate decarboxylase, Poaceae

G2H3 (0202) 蛍光標識ペプチドアレイを用いたプロテアーゼ切断特異性予測モデルの構築

○水谷嶺太[1]，森陽子[1]，田添佳歩[1]，小川翔大[2]，清水一憲[1]，本多 裕之[1*]
（[1]名大院・工，[2]名大院・創薬）

Model construction of the proteolytic specificity using fluorescent labeling peptide arrays

○Ryota Mizutani[1], Yoko Mori[1], Kaho Tazoe[1], Shota Ogawa[2], Kazunori Shimizu[1], Hiroyuki Honda[1*]
([1] Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ, [2] Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ)
honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

ペプチドの中には、生理活性作用を有するものがあり、食品や医薬品、化粧品など幅広い分野で利用されている。生理活性ペプチドの製造において、タンパク質と酵素の組み合わせを加水分解予測ツールによって決定する。しかし、既存の予測ツールでは正確に推定できないことがある。従って、酵素の切断特異性の解明と、より正確な切断部位予測が必要とされている。
そこで我々は、末端を蛍光ラベルしたペプチドアレイを用いた蛍光強度の減少によるプロテアーゼの切断箇所検出技術を利用して、酵素加水分解による切断部位の予測に試みた。その中で、特異性の低いプロテアーゼや切断部位が未知のプロテアーゼに対しても適用可能な高精度な機械学習予測モデルの開発に着手した。今回は酵素としてトリプシン(食品グレード)を用いて、ペプチドアレイの学習データを設計・取得し、多変量解析を用いた切断部位予測を行った。
酵素切断の結果、アルギニン（R)、リジン（K）が含まれるペプチドの切断率が高かった。これは、トリプシンの切断部位の特徴と一致することから、取得したデータが妥当であった。次に、取得した切断率を用いて Random Forest による回帰モデルを構築し、5 分割交差検証で評価した。このモデルを使用してミルクタンパク質 6 種のアミノ酸配列を、1 残基ずらし 4 残基ごとに合成し切断率を予測した。得られた切断率の予測値を用いてトリプシンの切断部位を予測した。予測された切断部位は R、K が多い一方、他のアミノ酸も複数予測された。さらに、予測した切断部位を、LC-MS を用いて同定した切断部位と比較した。予測通り R、K 以外の切断点も検出された。MS で断片が検出された領域では、予測部位の 89%が同定部位と一致した。
また切断特異性を変化させて目的のペプチドを得るための方法として、反応操作条件に着目した。その中で pH 変化によるプロテアーゼ切断特異性への影響についての予測も試みた。pH 5 と pH 8 の条件下で実際にミルクタンパク質のひとつである α-lactalbumin をトリプシンで加水分解し、得られた断片を LC-MS を用いて同定した。結果として pH ごとに異なるペプチド断片が得られた。さらにペプチドアレイで pH の違いによる切断特異性の変化を評価したところ、含有するアミノ酸や隣接するアミノ酸の種類によって切断特異性の変化がみられた。この結果を使って Random Forest による回帰モデルを構築し、pH 5 における切断部位の予測を試みたところ、予測結果と実際の α-lactalbumin の切断部位のうち 78%が一致した。これらの予測モデルは生理活性ペプチドの製造において有力なツールになると考えられる。

Key words peptide array, protease, enzymatic hydrolysis, machine learning

G2H3 (0203) ラン藻におけるクエン酸蓄積を明らかにするアコニターゼの生化学解析

○西井麻貴，伊東昇紀，片山徳賢，小山内崇*
（明大院・農・農化）

Biochemical elucidation of citrate accumulation in cyanobacteria via kinetic analysis of aconitase

○Nishii Maki, Ito Shoki, Katayama Noriaki, Osanai Takashi*
(Graduate School of Agriculture, Meiji University)
tosanai@meiji.ac.jp

【目的】現在、化石燃料の枯渇や地球温暖化が問題になっており、持続可能な環境に優しい物質生産が求められている。その中で、光合成を行う細菌であるラン藻は、二酸化炭素から有用物質を生産できるため、石油に代わる持続可能な物質生産に向け、近年注目されている。モデルラン藻である *Synechocystis* sp. PCC 6803（以下、*Synechocystis* 6803）のクエン酸回路の代謝産物のうち、細胞内のクエン酸の濃度は他の代謝産物より 1.5～10 倍高い。また、ラン藻の増殖過程では、クエン酸からイソクエン酸への反応が、窒素同化のための 2-オキソグルタル酸供給に必要である。これまでにいくつかのクエン酸回路酵素の生化学解析が行われたが、*Synechocystis* 6803 におけるクエン酸蓄積の原因は不明であった。本研究は、クエン酸とイソクエン酸の可逆的異性化を触媒する *Synechocystis* 6803 由来のアコニターゼ（*Sy*AcnB）の生化学的解析を行った。
【方法】組換え *Sy*AcnB タンパク質を大腸菌で発現させ、大量培養を行った。その後、アフィニティークロマトグラフィーにより *Sy*AcnB を精製した。酵素活性は *cis*-アコニット酸（クエン酸とイソクエン酸の中間体）の生成を 240 nm の波長の吸光度で測定した。
【結果と考察】*Sy*AcnB は、pH 7.0-9.0 において、クエン酸よりイソクエン酸に対する親和性が高かった。また、イソクエン酸から 2-オキソグルタル酸への反応を触媒するイソクエン酸デヒドロゲナーゼ（ICD）と *Sy*AcnB のイソクエン酸に対する親和性を比較すると、イソクエン酸に対する ICD の親和性が *Sy*AcnB より高かった。したがって細胞内において、イソクエン酸はアコニターゼより ICD によって代謝されることと、クエン酸からイソクエン酸の反応は、化学平衡により進んでいることが示唆された。以上より、*Synechocystis* 6803 は、アコニターゼと ICD の 2 つの酵素の特徴のため、場合によっては、アミノ酸の生合成に関わる 2-オキソグルタル酸を生成し、クエン酸の蓄積もできると発見した。

Key words TCA cycle, enzyme activity, *Synechocystis*, aconitase

G2H3 (0204) 化学酵素的アミド結合形成反応と分子内環化反応の連携による環状ジペプチド化合物のワンポット合成法の開発：ジケトピペラジンの合成

○唐鎌翔大 [1]，鈴木伸 [2]，木野邦器 [1,2*]
（[1] 早大・先進理工，[2] 早大・理工総研）

One-pot production of cyclic dipeptides by combination of chemoenzymatic amide bond formation and intramolecular cyclization: Diketopiperazine synthesis

○Karakama Shota[1], Suzuki Shin[2], Kino Kuniki[1,2*]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2] Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)
kkino@waseda.jp

【背景】
ジケトピペラジン(DKP)は低分子でありながら血液凝固抑制や抗腫瘍作用など多様な生理活性を有する環状ジペプチドで、医薬品や創薬研究などで注目されている。DKP の生理活性は構成アミノ酸のキラリティーに依存した立体構造に起因することが知られているため、DKP 合成では立体構造制御が重要となる。DKP はジペプチドエステルから分子内環化反応を伴って生成するため、目的の DKP を得るには対応するジペプチドエステルの合成可否がその鍵を握ることになる。これまでに我々はアデニル化酵素を利用する化学酵素的アミド結合形成反応と分子内環化反応の連携によって D, L-アミノ酸を有する任意の DKP 合成が可能であることを報告している [1]。しかし、十分な合成量を確保できていないため、本研究は当該反応系の律速点の解明とその収量改善を目的とした。
【方法・結果】
アデニル化酵素として多様な D, L-アミノ酸を認識する *Brevibacillus parabrevis* IAM 1031 由来 tyrocidine synthetase A のアデニル化ドメイン(TycA-A)と反応の補強に大腸菌由来ピロリン酸分解酵素である PPase を使用した。様々な DKP の合成を実施し、基質に D-, L-Trp, Phe, Tyr, Met, Ile, Leu, Val, Ala を、求核剤に D-, L-Pro-OMe, Ser-OMe, Thr-OMe および Gly-OMe, *trans*-4-hydroxy-L-Pro-OMe の組合せからなる全 128 種類の DKP 合成を確認しており、本法の汎用性の高さを示すことができた。しかしながらほとんどの反応液において中間生成物であるジペプチドエステルの蓄積が見られ、分子内環化反応が十分に進行していないことが明らかとなった。そこで D-Trp-D-Pro-OMe をモデルとして当該ジペプチドエステルの精製を行い、DKP への反応条件を検討した。分子内環化反応はアミノ基による求核置換反応によって進行することから、pH の影響を受けると予想して検討を行った結果、cyclo(D-Trp-D-Pro)への環化反応は pH が中性付近(6.5-9.5)で加水分解されることなく容易に進行し、それ以外の pH では顕著に抑制されることを明らかにした。
1) 唐鎌ら、日本農芸化学会 2020 年度大会、講演番号：4A12a09.

Key words diketopiperazine, chemoenzymatic reaction, adenylation, cyclization

G2H3 (0205) 化学酵素的アミド結合形成反応と分子内環化反応の連携による環状ジペプチド化合物のワンポット合成法の開発：ジケトモルフォリンの合成

唐鎌翔大 [1]，○鈴木伸 [2]，木野邦器 [1,2*]
（[1] 早大・先進理工，[2] 早大・理工総研）

One-pot production of cyclic dipeptides by combination of chemoenzymatic amide bond formation and intramolecular cyclization: Diketomorpholine synthesis

Shota Karakama[1], ○Shin Suzuki[2], Kuniki Kino[1,2*]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)
kkino@waseda.jp

【背景】ジケトモルフォリン(DKM)はヒドロキシ酸とアミノ酸が縮合・環化した環状デプシジペプチドである。開環重合によりポリエステルアミドへ変換可能で高分子素材の合成原料となるほか、近年様々な生理活性を示すことが報告され、環状ジペプチドであるジケトピペラジン(DKP)とともに医薬品・創薬分野で注目されている有用化合物である。我々はこれまでに、アデニル化酵素による化学酵素的アミド結合形成反応と分子内環化反応を連携させることで、アミノ酸とアミノ酸エステルを原料とする DKP のワンポット合成に成功している [1]。本手法は、アミノ酸の類似体であるヒドロキシ酸を基質とする DKM 合成への展開を推測させるもので、その可能性を検証した。
【方法・結果】L-乳酸(L-Lac)と D-乳酸(D-Lac)を基質とする *Streptomyces tsusimaensis* NBRC 13782 由来 valinomycin synthetase のアデニル化ドメイン(A ドメイン)である Vlm2A[2]に着目した。Vlm2A を ATP 及び Mg^{2+}存在下で L-Lac または D-Lac を L-Pro-OMe と反応させ、必要に応じて加熱処理を行った後、LC/MS 分析に供した。その結果、cyclo(L-Lac- L-Pro), cyclo(D-Lac- L-Pro)の分子量と一致するピークがそれぞれ検出され、DKM が生成していることを確認した。
次に、使用可能なヒドロキシ酸の種類拡張を狙った。Vlm2A が乳酸のみならず L-, D-Ala も基質とした[2]ことから、逆にアミノ酸を基質とする A ドメインの中にヒドロキシ酸に対するアデニル化活性の存在を考えた。そこで、多様な種類の L-, D-アミノ酸を基質とする *Brevibacillus parabrevis* IAM 1031 由来 tyrocidine synthetase A の A ドメイン(TycA-A)を評価したところ、L-, D-フェニル乳酸(PLA), DL-4-ヒドロキシフェニル乳酸, DL-インドール-3-乳酸を認識し、これら 4 種類のヒドロキシ酸を L-Pro-OMe と反応させると、各ヒドロキシ酸に対応する DKM が生成した。また、L-PLA 及び D-PLA に対してさらに 4 種類のアミノ酸エステル Xaa-OMe (Xaa = Gly, L-Ser, L-Thr, *trans*-4- L-Hyp)を検討したところ、すべての組み合わせで DKM の合成を確認した。
以上、ヒドロキシ酸を基質とする Vlm2A や TycA-A などのアデニル化酵素を利用することで DKM 合成を実証した。本手法は、酵素・基質・アミノ酸エステルの自由な組み合わせによって、多種多様な環状ジペプチドの合成に展開可能と考えている。
1) 唐鎌ら、日本農芸化学会 2020 年度大会、講演番号：4A12a09
2) 佐々木ら、日本農芸化学会 2020 年度大会、講演番号：4A12a08

Key words diketomorpholine, chemoenzymatic reaction, adenylation, cyclization

G2H3 (0206) *Bacillus pumilus* に保存される MazEF 機構の機能解析

○岡部 拓真 [1,2]，葵 理恵 [1,2]，石塚 寛子 [2]，江 雨濃 [2,3]，
横田 亜紀子 [2]，常田 聡 [1]，野田 尚宏 [1,2,4*]
（[1] 早大院・先進理工，[2] 産総研・バイオメディカル，[3] 筑波大院・人間総合科学研，[4] 筑波大院・グローバル教育）

Functional analysis of MazEF system conserved in *Bacillus pumilus*

○Takuma Okabe[1,2], Rie Aoi[1,2], Hiroko Tamiya-Ishitsuka[2], Yunong Jiang[2,3], Akiko Yokota[2], Satoshi Tsuneda[1], Naohiro Noda[1,2,4*]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Biomed. Res. Inst., AIST, [3]Grad. Sch. Comp. Hum. Sci., Tsukuba Univ., [4]SIGMA., Tsukuba Univ.)
noda-naohiro@aist.go.jp

【背景】多くの細菌にはストレス誘導性システムである Toxin-Antitoxin system (TAs) が備わっている。MazEF system はその TAs の一つであり，トキシン MazF とアンチトキシン MazE で構成されている。MazF は配列特異的に切断する「RNA 干渉酵素」として知られており，MazE は MazF の働きを抑制するタンパク質である。通常環境では，MazE と MazF が複合体を形成し，MazF の活性が抑制されている。しかし，環境ストレスに曝されると MazE はプロテアーゼによって選択的に分解され，MazE から遊離した MazF は細菌内の代謝系に関わる RNA などを配列特異的に切断し，細胞活性を抑制している。この MazF の特徴である配列特異性を機能解析により明らかにすることで，MazF が切断する遺伝子の推測とその生理学的意義を推察することができる。そこで本研究では，UV や酸化ストレスといった環境ストレスに強いとされている *Bacillus pumilus* に保存されている MazEF 機構を対象に機能解析を行なった。
【方法・結果】*B. pumilus* 由来 MazE（MazE-bp），および MazF（MazF-bp）を取得するため，ヒスタグ融合タンパクとして大腸菌で過剰発現させ，それぞれカラムクロマトグラフィー法で精製した。精製した MazF-bp の RNA 切断活性，および MazE-bp 添加による切断活性の抑制を電気泳動により確認した。次に，MazF-bp を用いて，人工的に合成した RNA を切断し，その切断部位に保存された塩基配列を次世代シークエンサーで解析した。その結果，MazF-bp がある 6 塩基のメインターゲット配列，およびそれと 1 塩基異なるサブターゲット配列を認識して切断することが示唆された。これらのターゲット配列とその類似配列を含む蛍光 RNA プローブをそれぞれ MazF-bp に切断させ，各 RNA 配列に対する切断活性を評価したところ，メインターゲット配列がサブターゲット配列に比べて最も切断されやすいことが明らかとなった。さらに，MazF-bp の切断配列を統計学的に有意に多く含む遺伝子を *B. pumilus* のゲノム情報から抽出し，MazF-bp の細胞内の標的を推察し，生理学的意義を考察した。

Key words *Bacillus pumilus*, Toxin-Antitoxin system, RNA interferase

G2H3 (0207) ブタ排出糞中から単離された D-乳酸特異的資化菌 *Megasphaera indica*

○保科涼 [1]，板谷かえで [1]，宮本浩邦 [1,2,3,4]，児玉浩明 [1*]
（[1] 千葉大院・園芸，[2] 日環科学，[3] サーマス，[4] 理研・生命医科学）

Characteristics of a D-lactic acid-utilizing bacterium, *Megasphaera indica*, isolated from pig feces

○Ryo Hoshina[1], Kaede Itaya[1], Hirokuni Miyamoto[1,2,3,4], Hiroaki Kodama[1*]
([1]Grad. Horticul., Chiba Univ., [2]Japan Eco-Science, [3]Sermas, [4]IMS,RIKEN)
kodama@faculty.chiba-u.jp

未利用の海産資源を高温下で発酵させた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の生理作用を示すことがわかっている。また、同時に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、好熱菌発酵産物給与区では、ブタで代表的な乳酸資化菌 *Megasphaera elsdenii* の有意な増加が確認され、当研究室では、独自の選択培地を作成し、その単離に成功している。本研究では、さらに乳酸のみを炭素源とした培地を用いた豚糞の集積培養により、*M. elsdenii* とは異なる乳酸資化菌の単離を試みた。
集積培養により得られた単離菌について Eric-rep-PCR を行ったところ、*M. elsdenii* に特徴的にみられる 500 bp 付近の増幅産物が得られない単離菌が 3 株確認された。この 3 株の 16S rRNA 遺伝子は、ヒト糞由来の *Megasphaera indica* BLPYG-7 とそれぞれ 99. 7%の一致を示した。*M. indica* はヒトの糞便から単離された例があるのみなので、今回ヒト以外の動物種からの初の単離報告例となった。炭素源を含まない Basic 培地に DL-乳酸を加え、単離菌株について 24 時間嫌気培養を行ったところ、乳酸を代謝し、主に吉草酸や酪酸を産生した。また、DL-乳酸と L-乳酸を含む Basic 培地をそれぞれ作成し、乳酸異性体の代謝の違いを調べた結果、ヒト糞由来の標準菌株 *M. indica* DSM 25563^T は DL-乳酸と L-乳酸の両方を同等に代謝した。一方、単離菌株は L-乳酸を含む培地ではほとんど増殖せず、L-乳酸の資化もほとんど見られなかった。また、単離菌株は DL-乳酸を含む培地では、D-乳酸を優先して資化したのに対し、L-乳酸は培地に残存していた。以上の結果から、今回単離されたブタ由来の *M. indica* とヒト由来の標準菌株では乳酸異性体に対する代謝能が異なる可能性が確認された。

Key words lactic acid, D-lactic acid, butyric acid, lactate dehydrogenase

G2H3 (0208) げっ歯類の脳及び心臓におけるコリンアセチルトランスフェラーゼに対する酵素組織化学による *de novo* アセチルコリン合成の可視化

○林　大暉[1], 竹尾　映美[1], 杉浦　悠毅[2], 福崎　英一郎[1,3,4], 新間　秀一[1,3,4]*
([1]阪大院・工, [2]慶応義塾大学医学部医化学教室, [3]大阪大学先導的学際研究機構, [4]大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)

Mass spectrometric enzyme histochemistry for choline acetyltransferase reveals de novo acetylcholine synthesis in rodent brain and heart

○Hiroki Hayashi[1], Emi Takeo[1], Yuki Sugiura[2], Eiichiro Fukusaki[1,3,4], Shuichi Shimma[1,3,4]*
([1] Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Keio University School of Medicine, [3]Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ, [4] Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

生体内もしくは組織内で酵素活性分布を見る方法は限定的であり，拡張性を担保されていない．その理由としては以下の理由が挙げられる：(1) 呈色や発光基質を用いる方法に適した基質の作製が難しい，(2) 複数の酵素もしくは別の組織への応用範囲が限られる，という欠点がある．酵素は生体反応の多くに関係し，神経伝達をおこなう機構にも関わっている．しかし，従来の方法では，上記に挙げた欠点により，いくつかの酵素においては酵素の局在を明らかにしたのみで酵素活性は報告されていない．また，心拍を調節する神経を有する心臓において，神経に関わる酵素の活性分布は可視化されていない．

そこで，酵素活性の局在を可視化する新規手法として質量分析イメージング法（mass spectrometry imaging : MSI）を用いた．MSI は呈色や発光反応を必要とせず、一度に多種多様な化合物を検出することができる。我々のグループでは，コリンエステラーゼならびに，コリンアセチルトランスフェラーゼの活性分布をマウスの脳及び *Drosophila melanogaster* において MSI により明らかにした．しかし、MSI を用いて心臓内の酵素活性分布を可視化した報告例は無い。本発表では，MSI を用いてコリンアセチルトランスフェラーゼの活性分布についてマウス脳及び心臓において可視化したので報告する．

Key words　mass spectrometry imaging, enzyme histochemistry, choline acetyltransferase, mouse heart

G2H3 (0209) PL6 アルギン酸リアーゼ Aly85NT に見られるユニークな酵素特性

○堀越妃乃[1], 野村隆臣[1]*
([1]信州大院・繊維・応用生物)

Unique enzymatic properties of PL6 alginate lyase Aly85NT

○Kino Horikoshi[1], Takaomi Nomura[1]*
([1]Dept. Appl. Biol., Fac. Tex. Sci. Tech., Shinshu Univ.)
nomurat@shinshu-u.ac.jp

海洋性褐藻類に多く含まれるアルギン酸は，β-D-マンヌロン酸 (M) と α-L-グルロン酸 (G) がランダムに共重合した天然多糖類であり，その結合様式は M–M, M–G, G–G の 3 通りがある。アルギン酸リアーゼは，アルギン酸を β 脱離分解する酵素であり，各結合様式をそれぞれ優勢的に切断する poly M リアーゼ，poly G リアーゼ，poly MG リアーゼが存在，さらに各リアーゼに対して end 型と exo 型の触媒様式がある。また，糖質関連酵素のデータベースである CAZy において，Polysaccharide Lyase Family (PL Family) に分類されており，14 の family (PL5, 6, 7, 8, 14, 15, 17, 18, 31, 32, 34, 36, 39, 41) に存在が認められている。近年，PL6 アルギン酸リアーゼに関する解析が急速に進み，3 つの subfamily（PL6-1, 6-2, 6-3）に細分割されること，コンドロイチナーゼ B ドメインを含む共通の特徴があること，一方で 触媒様式や基質特異性に関しては様々なタイプが混在しており一貫性が見られないこと等が明らかにされてきている。

これまでに我々は，長野県信里地区のため池郡からアルギン酸を単一炭素源としたスクリーニングを行うことで，多糖類資化細菌 NT5 株を単離することに成功しており，少なくとも 4 種のアルギン酸リアーゼを遺伝子として保有していた。それらのうち 3 種は PL6 に属することを明らかにしている。本研究では分子系統解析より PL6-1 に属することが判明した Aly85NT について解析を行った。Aly85NT の酵素的諸性質を解析したところ，アルギン酸リアーゼの多くが 30℃以上で最大活性を示すのに対して，Aly85NT は 15–20℃が至適条件であり，0℃ (氷冷) でも 45%も活性を保持することが明らかとなった。また，アルギン酸を基質としたときの反応生成物について TLC および質量分析を行ったところ，不飽和ウロン酸の単糖から五糖が検出された。このことは，Aly85NT が endo 型と exo 型の両方の触媒様式を持つ二機能性酵素であることを示している。さらに，Aly85NT は Ca^{2+}を共存させることで非共存下よりも 20 倍以上も活性が向上することが認められ，アルギン酸リアーゼでは珍しい Ca^{2+}要求性であることも判明した。Ca^{2+}の存在は K_m ではなく k_{cat} の速度パラメーターに影響を及ぼしたことから，Ca^{2+}は基質との結合に直接関与するのではないことは示されたが，詳細な役割については分かっておらず，今後の課題として残された。

以上のように，Aly85NT はユニークな特徴を多く有しており，PL6 アルギン酸リアーゼに関する理解を深めるのに役立つと考えている。今後，部分的変異導入や C 末端側の機能未知領域の解析を進める予定である。

Key words　alginate, alginate lyase, PL family 6

G2H3 (0210) 超高熱古細菌（始原菌）*Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来リゾホスホリパーゼの特性解析

○熊野祐香[1], 古賀雄一[1]*, 山野-足立範子[1], 大政健史[1]
([1]阪大院・工)

Characterization of lysophospholipase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1

○Yuka Kumano[1], Yuichi Koga[1]*, Noriko Yamano-Adachi[1], Takeshi Omasa[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
kogay@mls.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】耐熱性の高い酵素は幅広い産業応用ができるとして近年着目されている。本研究では 80 ℃以上の高温環境で生育する嫌気性の古細菌（始原菌）の一種である *Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来の脂質分解酵素の一つであるリゾホスホリパーゼに着目した。リゾホスホリパーゼはリン脂質の *sn*-1 位と *sn*-2 位を切断する性質を有している。主に油脂精製において利用可能である。耐熱性の高いリゾホスホリパーゼは原油を精製する上で不純物のリン脂質を除去する高温条件下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。これらより本研究では *T.kodakarensis* KOD1 由来リゾホスホリパーゼの実用化に向けて、酵素活性の熱に対する安定性について解析した。

【方法・結果】リゾホスホリパーゼをコードすると推定される Tk0999 を発現用ベクターに導入し、*E.coli* BL21(DE3)を形質転換することで発現系の構築を行なった。その際 His タグを付与したもの (TkLysoPL-His) 、His タグを付与していないもの (TkLysoPL) を調製し、比較を行うこととした。これらの組換えタンパク質を精製し、精製された酵素を用いて酵素活性を測定した。
TkLysoPL-His と TkLysoPL の組換え発現体が確認され、どちらも可溶性画分に発現することも確認された。この酵素は 80 ℃で熱処理することで精製できたことから、大腸菌から発現させた組換え体においてもこれまでのリゾホスホリパーゼに比べ非常に高い熱安定性を有していると予想された。基質にパラニトロフェニル酪酸を用い、85 ℃で行なった活性測定では TkLysoPL-His、TkLysoPL どちらにおいても活性が確認された。このことから本酵素は高温環境下でも活性を示すことが確認された。

Key words　thermostable enzyme, lysophospholipase

G2H3 (0211) コラーゲン由来ジペプチドであるヒドロキシプロリルグリシンの菌体反応系による生産

○古渡翔, 木野邦器*
（早大院・先進理工・応化）

Production of hydroxylprolylglycine that is a collagen-derived dipeptide by whole cell reaction

○Kakeru Kowatari, Kuniki Kino*
(Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)
kkino@waseda.jp

【背景】
コラーゲンペプチドは、皮膚および骨機能の改善に資する健康素材として食品や化粧品分野で利用されている。このうち、*trans*-4-L-ヒドロキシプロリルグリシン (Hyp-Gly) はヒトプロテアーゼの影響を受けにくく、コラーゲンペプチド摂取後の血液中にジペプチドのまま長期間残存して機能性を示すことから[1]、近年それを精製した製品の供給期待が増大している。我々はこれまでに、無保護の L-アミノ酸を連結してジペプチドを合成する L-アミノ酸リガーゼ (Lal) の工業的利用法を検討している。そのうち、*Pseudomonas syringae* NBRC14081 株由来の Lal である TabS において、L-プロリルグリシン (Pro-Gly) 合成活性の向上に寄与する改変酵素の創製に成功している[2]。そこで本研究では、Hyp-Gly 合成への TabS 改変体の利用と菌体反応系による効率的な生産プロセスの開発を目指した。

【方法・結果】
TabS 改変体を高発現させた組換え大腸菌より精製酵素を調製し、宿主大腸菌内在の酵素による反応への影響を排除した状態で Hyp-Gly 合成活性を評価した。その結果、Pro-Gly と同様に、Hyp-Gly についても高収率で合成可能であることを確認した。続いて、高価な補酵素である ATP の外部添加省略による低コスト化を検討した。具体的には、上記組換え菌を反応触媒として、宿主の糖代謝と共役させる ATP 再生系を導入した。しかし、Hyp-Gly の蓄積は見られず、菌体が有する代謝活性にその要因があると考え種々検討を行った。その結果、Hyp-Gly 生産は、(i) Hyp-Gly の分解、(ii) 菌体内への Hyp の取り込み、(iii) Gly の代謝に関与する酵素の活性に大きく影響されることを突き止めた。各要因に対し該当する酵素の欠損もしくは生産条件の最適化を検討したところ、菌体反応系による ATP を外部添加しない条件での Hyp-Gly の生産に成功することができた。同条件における対 Hyp モル変換率は 80%を超え、Hyp-Gly 生産の工業化が期待できるプロセスの構築を達成した。

1) Shigemura Y., *et al*., *J. Food Chem.*, **129**, 1019–1024 (2011).
2) Kino H., *et al*., *J. Biosci. Bioeng.*, **122**, 155–159 (2016).

Key words　collagen-derived dipeptide, L-amino acid ligase, whole cell reaction

G2H3 (0212) 超好熱古細菌（始原菌）*Thermococcus kodakarensis* KOD1 株からの新規耐熱性システインプロテアーゼの同定

○馬淵 幹[1], 田口 萌恵[1], 山野-足立 範子[1], 古賀 雄一[1]*, 大政 健史[1]
（[1]阪大院・工）

Identification of a novel thermostable cysteine protease from *Thermococcus kodakarensis* KOD1

○Kan Mabuchi[1], Moe Taguchi[1], Noriko Yamano-Adachi[1], Yuichi Koga[1]*, Takeshi Omasa[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
kogay@mls.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】タンパク質分解酵素であるプロテアーゼは様々な分野で産業応用されている。触媒残基にシステインを持つシステインプロテアーゼは、真核生物または細菌から多く単離され、代表的なものにパパインやブロメラインなどが挙げられる。しかし、もう一つの生物種である古細菌由来のものは未だ同定報告がない。そこで本研究では超好熱古細菌（始原菌）*Thermococcus kodakarensis* に着目し、本菌由来の新規システインプロテアーゼの探索及びその遺伝子同定を目的とした。先行研究により、本菌の培養上清からシステインプロテアーゼと予想されるプロテアーゼ活性が確認されている。また、本菌の全ゲノムは既に解明されている。20 種類以上のプロテアーゼ遺伝子がアノテーションされており、システインプロテアーゼ遺伝子の存在も推定されている。したがって *T. kodakarensis* は古細菌（始原菌）由来システインプロテアーゼの探索において大きな可能性があると考えられる。
【方法・結果】*T. kodakarensis* の培養上清中のタンパク質を、硫安分画により濃縮及び粗精製した。その後限外ろ過によりさらに濃縮した。濃縮、精製したタンパク質について SDS-PAGE とザイモグラフィーを行ったところ、プロテアーゼ活性を持つタンパク質バンドが複数検出された。その内二つのタンパク質（約 65 kDa, 110 kDa）は、システインプロテアーゼ阻害剤により活性が阻害されたことから、システインプロテアーゼであると推定された。これらのタンパク質の遺伝子を同定するために、LC-MS/MS 解析を試みた。解析には濃度と分離度の高いタンパク質バンドが求められるため、ゲル抽出法によりサンプル調製を行った。*T. kodakarensis* の培養上清約 2 L から得られた濃縮、精製タンパク質を全て SDS-PAGE に流しタンパク質を分離した。目的の位置で切り出したゲル断片を集め、バッファー中で振盪させることで、自然な拡散によりタンパク質を抽出した。LC-MS/MS 解析の結果、目的タンパク質からのペプチドのアミノ酸配列が同定され、それらを基にいくつかの候補遺伝子を特定した。

Key words archaea, thermostable enzyme, identification, cysteine protease

G2H3 (0213) ヒアルロン酸を単糖に分解する *Haliscomenobacter hydrossis* 由来の菌体外酵素複合体

○毛利智海, 増沢 望, 武田 穣*
（横浜国立大学 工学研究院）

An extracellular enzyme complex, which degrades hyaluronan into monosaccharides, originated from *Haliscomenobacter hydrossis*

○Tomomi Mori, Nozomi Masuzawa, Minoru Takeda*
(Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ.)
takeda-minoru-bd@ynu.ac.jp

【背景・目的】*Haliscomenobacter hydrossis* は活性汚泥の固液分離障害との関連が指摘されている糸状性細菌であり、ゲノム解析もすでに完了している。糸状化は円柱状の細胞の連結によってもたらされ、細胞列全体は鞘と呼ばれる薄膜で覆われている。菌体表面の物性を決め障害の要因となると思しき鞘の化学的実体を明らかにすべく研究に着手した。しかし、従来の培地での増殖は貧弱だったことから培地の改良を試み、その過程でゲノム解析では予想されていなかったヒアルロン酸（HA）分解能が判明した。*H. hydrossis* が属するバクテロイデス門は高分子分解能に優れた分類群として知られているものの、HA 分解についてはほとんど調べられていない。HA 分解酵素は、*Bacillus* 属、*Staphylococcus* 属、*Streptococcus* 属などで詳細に調べられており、一部は主として医療用に市販されている。前述のようにゲノム解析において存在が予想されなかったことから、*H. hydrossis* の HA 分解酵素は遺伝子レベルで既知の細菌由来 HA 分解酵素と一線を画す新規な酵素と予想し、その特徴づけを行うこととした。
【結果・考察】細菌由来の HA 分解酵素（EC.4.2.2.1）は例外なく脱離酵素（多糖リアーゼ）であることから、*H. hydrossis* の酵素もリアーゼと想定し、活性は脱離反応に伴う不飽和グルクロン酸残基（ΔGalA）の生成に起因する 235 nm の吸光度上昇で測定した。HA を炭素源として *H. hydrossis* ATCC 27775 を培養し培養液を得て HA 分解活性を確認後、以下の手順で精製した。まず、TOYOPEARL Phenyl に対する吸着画分を回収した。続いて、pH 8.0 における TOYOPEARL DEAE-650M の素通り画分を回収した。これを Resource PHE での疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し活性ピークを回収した。SDS-PAGE に供したところ、分子量約 7 万 4 千のほぼ単一なバンドとして検出された。Resource S による陽イオン交換クロマトグラフィーも試みたが、pH 5.8 では素通りし、これより低い pH では失活した。Resource Q に対しては pH 8.8 で吸着たものの活性は著しく低下した。Native-PAGE も試みたが、やはり活性は大幅に低下した。このように、有意な活性を維持しての精製には疎水性相互作用クロマトグラフィーのみが適用可能だった。精製酵素は他の細菌由来酵素と同じく、コンドロイチン硫酸にも作用した。安定性と活性ともに中性から弱アルカリ性が適していた。至適反応温度は 55℃で、安定性も考慮すれば 35-40℃が最適だった。分解物の HPLC 分析を行ったところ、GlcNAc が検出された。したがって、*H. hydrossis* の HA 分解酵素は、GlcNAc-GalA の結合を切断するリアーゼ活性と GalA-GlcNAc の結合を切断するヒドロラーゼ活性の二つの活性を持つ複合酵素（多機能酵素）であると思われる。

Key words enzyme purification, hyaluronan, enzyme complex, bacteria

G2H3 (0301) 未培養腸内細菌の1細胞ロングリードシーケンスによる完全長ゲノムの獲得

○細川正人[1,2]*, 小川雅人[3,4], 西川洋平[3,4], 佐伯達也[2], 依田卓也[2], 有川 浩司[2], 竹山春子[1,3,4,5]
（[1]早大院・先進理工, [2]bitBiome, [3]早大・ナノライフ創新研, [4]産総研・早大・CBBD-OIL, [5]早大・生命動態研）

Obtaining of complete genomes by single-cell long-read sequencing of uncultured gut microbes

○Masahito Hosokawa[1,2]*, Masato Kogawa[2,3], Yohei Nishikawa[2,3], Tatsuya Saeki[2], Takuya Yoda[2], Koji Arikawa[2], Haruko Takeyama[1,3,4,5]
([1] Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]bitBiome, Inc. , [3] Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [4] CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [5] Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)
masahosokawa@aoni.waseda.jp

環境中に生息する多種多様な難培養性細菌の機能理解に向けて、これまでメタゲノム・シングルセル(1 細胞)ゲノム解析などの細菌ゲノム解析手法が開発されてきた。一方、腸内細菌など生息環境間の細菌種の共通性が高い場合には、単純な細菌群集構造解析に留まらず、個々の細菌株における機能比較までが求められる。例えば、宿主細菌の形質に大きな影響を与えるゲノム構造を明らかにすることが重要であり、そのためには完全長ゲノムの獲得が望ましい。近年、ロングリードシーケンサーを用いて、環境細菌の完全ゲノムが獲得されているが、1 細胞ゲノム(SAG)からは報告例がない。
本研究では、1 細胞ロングリードシーケンスを用いて細菌の完全ゲノムを構築するゲノムアセンブリパイプラインを構築した。本手法は、SAG 獲得のために行われる 1 細胞ゲノム増幅バイアスに起因する問題である「アセンブリ後のコンティグ配列の断片化」を解消するため、長鎖のゲノム配列を構築するよう設計した。大腸菌をモデルとした場合、従来のイルミナショートリードシーケンスでは、100-200 本程度のコンティグが得られていた。一方、ONT ロングリードシーケンスデータを開発手法にて処理した結果、1 本のコンティグからなる完全長ゲノムが獲得された。次に、当研究室で開発した SAG-gel 法（Microbiome, 2020)を用いて、ヒト糞便腸内細菌 SAG を収集し、ロングリードシーケンスとショートリードシーケンスを併用してデータを収集した。シーケンスデータの統合解析から、腸内細菌 *Anaerostipes hadrus, Ruminococcus gnavus, Agathobacter rectalis* について 3-8 人の検体から完全/準完全ゲノム配列を獲得した。*A. hadrus* の完全ゲノム配列の比較の結果、各株のゲノム全域にわたって主にプロファージと見られる株特異的配列領域が確認された。また、糖代謝系や薬剤耐性遺伝子など株ごとに所持している機能遺伝子モジュールが異なり、同一細菌種においても異なる機能を有することが示唆された。これらの株に見られる構造多型はホスト毎に異なる傾向を有しており、細菌亜株の判定、遺伝子伝播関係の推定などに有効であることが示唆された。本解析手法は、高精度な細菌ゲノム情報の高速な蓄積およびさらなる詳細な解析への貢献が期待される。

Key words single-cell analysis, genome, microbial community, microfluidic device

G2H3 (0302) 麹菌におけるコウジ酸代謝関連転写因子 KojR の制御遺伝子の網羅的解析

○水谷友香[1], 岡大椰[1], 兒島孝明[1]*,中野秀雄[1]
（[1]名古屋大学大学院生命農学研究科）

Comprehensive analysis of regulatory genes of KojR, a transcription factor related to kojic acid metabolism in *Aspergillus oryzae*

○Tomoka Mizutani[1], Hiroya Oka[1] , Takaaki Kojima[1]* , Hideo Nakano[1]
([1] Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)
kojimat@agr.nagoya-u.ac.jp

DNA 結合型転写因子は, ゲノム DNA 上の特定の塩基配列に結合し, 下流の遺伝子の発現を制御しているタンパク質の総称である. この DNA 結合型転写因子は, 転写制御ネットワークの中枢を担っており, その機能は極めて重要である. 本研究グループでは, ゲノム DNA より作製したゲノムライブラリーから標的転写因子に結合する DNA 領域を選択的に濃縮する手法 gSELEX-Seq(genomic Systematic evolution of ligands by exponential enrichment)とバイオインフォマティクスを駆使した転写制御機構の網羅的解析システムを構築している. 本発表では, *A. oryzae* において合成される有用有機酸, コウジ酸代謝に関連する転写因子, KojR に着目し, KojR を介したコウジ酸の合成制御機構の解明を目的とした.
MBP を付加した MBP-KojR と麹菌ゲノムライブラリーを用いた gSELEX による選択ラウンドを 2 回実施した. なお, 選択ラウンド 2 を実施する際, 標的 DNA 配列の選択圧の増強のため, 競合阻害剤である polydIdC を用いた. リアルタイム PCR によって各ラウンドで回収された DNA 量を定量したところ, MBP-KojR 依存的に結合 DNA が選択的に濃縮されていることを確認した. 次に, 取得した各選択由来の DNA プールをナノポアシーケンサーMinION に供し, 各プールあたり約 100Mb の配列データを取得した. 出力された配列データを基にバイオインフォマティクス解析を実施し, KojR 結合領域を同定した.
今後, RNA-Seq の発現変動解析の結果と照合した上で, KojR 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い, *A. oryzae* におけるコウジ酸合成制御機構の解明を試みる.

Key words transcriptome, bioinformatics, *Aspergillus oryzae*, high-throughput screening

G2H3 (0303) 遺伝的に近縁な細菌の識別を可能にする PCR プライマー設計法の開発と *Lactobacillus delbrueckii* 6亜種の識別

○髙橋　正之[1*], 森川　佳奈[1], 赤尾　健[1]
([1]独立行政法人　酒類総合研究所)

Development of PCR primer design algorithm for subspecies level identification, and differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* six subspecies by using the algorithm.

○Masayuki TAKAHASHI[1*], Kana MORIKAWA[1], Takeshi AKAO[1]
([1]National Research Institute of Brewing)
m.takahashi@nrib.go.jp

醸造など微生物を用いる食品産業において，微生物を亜種や株レベルで特定できることは，品質の安定化の面から重要である．産業で用いられる微生物はこれまでの選抜の歴史から，近縁でありながら品質への影響が異なり，産業や製品と亜種や株レベルで微生物が結びついていることが多い．一方，現在利用可能な簡便な分類・同定技術では解像度が低く，微生物を種・亜種・株レベルまで特定することは困難であり，詳細な解析を行う場合はコストや労力が課題となっている．近年，次世代型シーケンサーの飛躍的な進歩に伴い，幅広い生物種において基準株の全ゲノム配列の決定がなされ，広く利用可能な状況にある．我々はそれらの全ゲノム配列情報を利用し，入力された微生物ゲノム配列全てで増幅産物が得られ，かつ，増幅産物の断片長が異なるように増幅するためのプライマーセットをデザインするためのアルゴリズムを構築した．*Lactobacillus delbrueckii* は *Lactobacillus* 属細菌の基準種であり，ヨーグルトなどの乳製品の製造に用いられることの多い乳酸菌である．*L. delbrueckii* は下位分類に 6 つの亜種を含み，それぞれを識別するためには Multilocus sequence typing や各亜種特異的なプライマーを用いるなどの詳細な解析が必要だった．今回開発したプライマーデザイン法を用いて，*L. delbrueckii* 6 亜種の全ゲノム配列をテンプレートとしてプライマーセットを複数設計し，得られたプライマーセット候補配列の中から 3 つのプライマーセットを選択し、その実用性を評価することとした．プライマーの設計に用いた *L. delbrueckii* 6 亜種（6 基準株）に加え，*L. delbrueckii* 9 株，及び過去 *L. delbrueckii* と分類されていたが分類変更により現在は他種に分類されている 5 株をターゲットとして各亜種を識別可能か各プライマーセットを評価した結果，各プライマーセットは亜種毎に概ね予測された塩基長の断片を増幅し，３つのプライマーセットの結果の組み合わせにより各亜種を明確に識別することができた．本法は全ゲノム配列が得られている全ての微生物種について適用可能であり，簡便に解像度の高い微生物の同定を行うことが可能になると期待される。

Key words *Lactobacillus delbrueckii* six subspecies, Identification, Primer design algorithm, exhaustive search

G2H3 (0304) FBA シミュレーションによるシアノバクテリアにおける光合成電子伝達フラックスの解析

○豊島 正和[1,2], 山本 千晶[2], 植野 嘉文[3], 戸谷 吉博[2], 秋本 誠志[3], 清水 浩[2*]
([1]神戸大院・工, [2]阪大院・情報, [3]神戸大院・理)

Analysis of photosynthetic electron flow in cyanobacteria by FBA simulation

○Toyoshima Masakazu[1,2], Yamamoto Chiaki[2], Ueno Yoshifumi[3], Toya Yoshihiro[2], Akimoto Seiji[3], Shimizu Hiroshi[2*]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [3]Grad. Sch. Sci, Kobe Univ.)
toyoshima104@penguin.kobe-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 *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（FBA）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合成生物が光環境に応答してどのように光合成電子伝達経路を駆動しているのか、細胞がどのような順化適応状態にあるのかを明らかにする。
【方法と結果】シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の光合成反応を精緻化したゲノムスケール代謝モデルを構築し、6 種類の波長の光[ピーク波長 : 470 nm (Blue)、530 nm (Green)、580 nm (Yellow)、630 nm (Red1)、680 nm (Red2)]照射下における光合成の駆動と生育を FBA シミュレーションにより予測した。シミュレーション予測による比増殖速度と実際の実験結果を比較し、モデルを検証した。フィコビリソームの移動やなどのステート遷移を考慮した PSI/PSII 励起比をシミュレーションに用いることで正確に各光環境下における細胞の増殖を予測することができた。シミュレーション結果から Red1 照射下において、*Synechocystis* sp. PCC 6803 では type I NAD(P)H dehydrogenase (NDH-1)をサイクリック電子伝達として利用することで最も効率的に生育していることや Red2 照射下では、細胞の生育が NADPH 律速になっていることが示唆された。*ndhD1/D2* 欠損株において Red1 照射下での比増殖速度の低下が見られ、Red1 照射下において NDH-1 を介したサイクリック電子伝達により、より速く生育していることが明らかになった。

Key words cyanobacteria, cyclic electron transport, flux balance analysis, different spectral light, type I NAD(P)H dehydrogenase

G2H3 (0305) 細胞形態情報を用いた品質予測モデルにおける撮影バイアス解消技術

○田中健二郎[1]、竹本悠人[1]、蟹江慧[1]、加藤竜司[1,2*]
([1]名大院・創薬科学, [2]名大・ナノライフシステム研究所)

Elimination method for image-derived bias for robust cell quality prediction

○Kenjiro Tanaka[1],Yuto Takemoto[1] ,Kei Kanie[1], Ryuji Kato[1,2*]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]Inst. Nano-Life-Systems, Nagoya Univ.)
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

近年、細胞培養工学技術の発展により、我々は多種多様な「ヒト細胞」を入手可能となり、細胞医薬品や研究用細胞のための細胞産業は周辺産業を含めて大きく発展しつつある。細胞産業において、細胞の安定製造と品質管理は極めて重要な課題である。現在の細胞培養プロセスには様々なブレの要因が存在し、同一細胞・同一プロトコルであっても、実験施設や実験者の違いによって細胞の同等性が異なる場合がある。

当該分野では、細胞製造の安定化を目指すために、Quality by design（QbD）というコンセプトが普及しつつあり、規制当局を中心として QbD に基づいた規格整備が進められている。QbD とは、「サンプリングによって製品品質を担保する」のではなく、「製造プロセスを数値データとしてモニタリングする事で製品品質を担保する」という考え方であり、コンセプトの普及につれて細胞状態の定量化技術は強く求められる事となる。

我々のグループは細胞画像から得られる形態情報を画像処理により定量的に計測し、機械学習モデルを活用することで画像のみから定量的に細胞品質を評価する技術（細胞形態情報解析）を開発し、本学会でも報告してきた。

しかし今後、QbD の普及により、細胞製造業界全体で規格・標準プロトコルが整備されるに際して、この細胞形態情報解析においても、他施設間・他企業間で細胞同等性を細胞画像で比較検証するためのデータインテグレーションが必須となる。このとき求められるのは、撮影条件が完全同一ではない画像データ蓄積を活用するためのデータ規格化技術である。これは、画像由来「細胞形態データ」という新しいバイオビッグデータにおけるデータインテグレーション技術の開発と言える。

本発表では、複数施設で細胞画像品質予測システムをロバストに活用することを指向し、細胞画像に含まれる画像間バイアスの補正技術及び、バイアスを考慮し、様々なクオリティの画像を一律に解析可能なロバストモデルの構築技術を開発したので、ここに報告する。

Key words mesenchymal stem cell, machine learning, image analysis

G2H3 (0306) 動的代謝モデルを用いたシアノバクテリアのカルビン回路における制御機構の解析

○田島遼太郎[1], 池原万由[2], 戸谷吉博[1], 清水浩[1*]
([1]阪大院・情報, [2]阪大・工)

Investigating the regulatory mechanisms of the Calvin cycle in cyanobacteria using kinetic model

○Ryotaro Tajima[1], Mayu Ikehara[2], Yoshihiro Toya[1], Hiroshi Shimizu[1*]
([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Fac. Eng., Osaka Univ.)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】
シアノバクテリアは、光合成によって二酸化炭素を固定し直接有用物質生産を行える微生物として期待されている。シアノバクテリアは、昼夜の明暗サイクルに応じてカルビン回路を巧妙に制御し、適切な代謝状態を維持していると考えられている。中でも CP12 という小タンパク質が暗条件の代謝制御において重要な役割を担っていることが知られているが、それに加えて、カルビン回路に加えて、解糖経路が中間代謝物の調整に関与していることも示唆されている。本研究では、カルビン回路や解糖経路を含んだ動的代謝モデルを構築し、光量が変化した際にカルビン回路内の中間代謝物がどのように変化するのか、また、その中で解糖経路はカルビン回路に対してどのような影響を与えるのかを調べることを目的とした。

【方法と結果】
シアノバクテリアの中枢代謝経路の動的な変化を表現するために、反応速度論に立脚した数理モデルを構築した。モデルの構築においては報告されている反応速度パラメータを利用し、不足しているパラメータについては、先行研究で実験的に得られた代謝フラックスを説明できるよう調整した。本モデルでは光化学系の数理表現については直接立ち入らず、光量の変化については、光量によって光合成で生産される ATP と NADPH およびグリコーゲンの中枢代謝への供給速度を変化させることで表現した。シミュレーションでは、暗条件においてカルビン回路に CP12 による制御がなく解糖経路が含まれていない場合には、中間代謝物、および ATP や NADPH の減少および枯渇し代謝が破綻してしまうことが確認された。カルビン回路に CP12 による制御が含まれる場合には、中間代謝物の減少は確認されたものの、ATP および NADPH の消費は抑制され、CP12 の代謝における重要性が示唆された。CP12 によるカルビン回路の制御の有無を比較した際に、RuBP の減少速度について CP12 が存在した場合の方が大きいという結果となったが、これは CP12 破壊株の生理を調べた実験による先行研究の結果と一致していることが確認された。また、カルビン回路以外の経路を含めたシミュレーションも行って、CP12 の代謝制御への役割について解析した。

Key words kinetics, cyanobacteria, Calvin cycle, modeling

G2H3 (0307) 高精度菌体増殖定量測定システムを用いた大腸菌細胞内 pH 調節遺伝子群の探索

○須藤雅己 [1], 住田和弥 [1], 福田紘子 [2], 深田悠太 [1], 森浩禎 [3], 片岡正和 [1]*
([1] 信州大院 生命医工, [2] 信州大 工, [3] 広東省農業科学院)

Search for intracellular pH-regulated genes in Escherichia coli using a high-precision quantitative bacterial growth measurement system

○Masaki Sutou[1]*, Kazuya Sumida[1], Hiroko Fukuda[2], Masakazu Kataoka[1], Hirotada Mori[3]
([1]Dept. Biomed. Eng. Gra. Sch., Shinshu Univ., [2]Dept. Eng. Shinshu Univ., [3] Guangdong. Acad. Agri. Sci. China)

20bs109h@shinshu-u.ac.jp

大腸菌は代表的な中性菌であり、pH7 付近でよく生育する。多くの酵素の至適 pH 域及びその安定性が維持される pH は中性付近であり、細胞機能が円滑に働くためには、細胞内 pH が維持されることが必要である。従って外部 pH の変化に対して細胞内 pH を厳密に制御することは、大腸菌が生育するために非常に重要である。今日までの研究から、細胞内 pH の調節には Na^+/H^+アンチポーターの関与が示唆されている。しかしその一方で、Na^+/H^+アンチポーター欠損株においても、外部 pH 環境が変化した際に生育することから、別の細胞内 pH 調節機構が存在する可能性も考えられる。

我々は信州大学特任教授の森浩禎氏が開発した大腸菌非必須遺伝子の単一遺伝子欠損株ライブラリ(Keio collection)、高精度菌体増殖測定システム(Colony-live system)を用いて、大腸菌細胞内 pH 調節機構の解明を進めている。本発表では、Colony-live system を用いて解析した外部 pH が酸性化した際の大腸菌細胞内 pH 調節機構に関与する遺伝子群について報告する。Colony-live system と Keio collection を用いて、大腸菌全遺伝子を対象に網羅的な解析を行った。本発表では Colony-live system の特徴である視認できない菌体の生育度合いに言及し、その結果から大腸菌細胞内 pH 調節機構に関して議論したい。

Key words *E. coli* , pH-regulated gene, Colony-live system, Keio collection

G2H3 (0308) 高精度菌体増殖測定システムの多菌種への応用

○住田和弥 [1]*, 深田悠太 [1], 森浩禎 [2, 3], 片岡正和 [1]
([1] 信州大学院・生命医工, [2] 信州大学, [3] 広東省農業科学院.)

Application of high-throughput measurement system to multiple bacterial species

○Kazuya Sumida[1]*, Yuta Fukada[1], Hirotada Mori[2, 3], Masakazu Kataoka[1]
([1]Grad. Sch. Dept. Biomed. Eng., Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ., [3] Guangdong. Acad. Agri. Sci. China.)
21bs111c@shinshu-u.ac.jp

細菌の増殖は多くの場合において一次関数的なものではなく、誘導期や対数増殖期、定常期といったいくつかの過程に分けられる。細菌の増殖速度や対数増殖期に至るまでの時間(増殖遅延時間)等の増殖特性を定量的に把握することは、その菌種を基礎的に理解する事へつながり、実験対象の細菌の増殖特性は常に把握しておく必要がある。一般的に細菌の増殖測定には濁度法が用いられるが、これには液体培養下で菌体が十分に懸濁されている必要があり、液体培養が困難な細菌や、放線菌などの液体培養下で十分に懸濁されない細菌に対しては測定が困難となる。そこで我々はより適用範囲の広い操作が容易な増殖測定法として、森らにより開発されたハイスループット菌体増殖測定法である Colony-live システムに注目した。Colony-live システムは大腸菌の網羅的な遺伝的ネットワーク解析を目的として利用されており、本システムは高いスループット性に加え、コロニー単位での高精度な菌体の定量が可能である。しかし、本システムの利用はこれまで大腸菌での測定に限られており、その他の細菌を対象としては試行されていない。そこで本研究では Colony-live システムの大腸菌以外の多菌種への応用を試みた。測定対象は枯草菌や、生育の特徴から濁度法などでの測定の困難な放線菌といった工業応用性の高いグラム陽性菌を中心とした。その結果、大腸菌以外の菌種においても増殖特性の定量化に成功し、比較的生育の遅い放線菌の定常期に至るまでの増殖の過程も捉えることが可能であった。また、本システムを応用し測定で得られる画像を元にコロニーの 3D 化し視覚的に菌のコロニー形成を捉えたところ、枯草菌においては特徴的な二段階のコロニー形成が見られた。

Key words *Bacillus sp*., *Streptomyces sp*., growth, growth rate,

G2H3 (0309) オートエンコーダーを用いたSARS-CoV-2遺伝子のクラスター分析：変異と転移の遺伝子プロファイリング

○三宅 淳[1,2], 佐藤孝明[1], 馬場俊輔[1], 中村隼人[1], 新岡宏彦[3], 中澤慶久[2]
([1]阪大院工・生命先端、[2]阪大院工・Hitz協働研、[3]阪大IDS)

Cluster analysis of the SARS-CoV-2 gene using an autoencoder: genetic profiling of mutations and transitions.

○Jun Miyake[1,2], Takaaki Sato[1], Shunsuke Baba[1], Hayato Nakamura[1], Hirohiko Niioka[3],Yoshihisa Nakazawa[2] ([1]Osaka Univ., [2]Hitz Research Inst. Osaka Univ., [3]IDS, Osaka Univ.)
jun_miyake@bpe.es.osaka-u.ac.jp

新型コロナウイルスは急速に変異し、継続的に多数の遺伝子型を生み出す。ウイルスの特性を把握し、次の変異の可能性を含めて集団全体を把握するための適切な手法が求められている。オートエンコーダーを用いた方法がその一つと考えられる。オートエンコーダーによるクラスター（型）分類と、遺伝子の複数変異によって形成される関連（系統）には強い相関があると考えられる。

オートエンコーダーはTensor-Flowライブラリ（V2.0をV1.0にダウングレード）を使用した。コンピュータは、GPUとしてNVIDIA Quadoro P-6000を備え、研究室で構築した。オートエンコーダーによる遺伝子解析は文書ベクトル法を用い、5merからなる1024語の正規化ヒストグラムを持つベクトル（4^5＝1024次元）に置き換えた。4階層、3次元に圧縮し、x, y, z座標としてプロットした。比較解析のため、Maximum Likelyhood 系統分析（RAxML）を用いて、1000 回のブートストラップを行いて系統樹を作成した。新型コロナウイルスのヌクレオチド配列データは、NCBI Virusデータベースから入手した。解析の対象にはORF1ab遺伝子を用いた。ゲノム全長の2/3を占め、多くの特性をコードするため型の分類に適当と判断した。

オートエンコーダーによるクラスター分類と、系統樹解析は同様の分類を与えた。2019年12月から2021年2月までに全世界で採取された3万件を超えるSARS-CoV-2のORF1ab遺伝子配列について、その特徴の概要を3Dプロットで表現し、ウイルスタイプの時間的・地域的な拡大・減少・変容を示すことができた。SARS-CoV-2ウイルスは大きく5つの型（出現順にA、B、C、D、E）に分類された。2019年末に中国で発生したウイルス型（A型）は、2020年6月に実質的に消滅し、2020年2月以降、欧米で2つのウイルス型（B型、C型）が出現し、B型は世界的に流行している。C型は米国のみで流行しており、高い死亡率との関連が疑われているが、この型も2020年6月末に消滅した。D型はオーストラリアでのみ見られる。現在、流行の中心はB型とE型である。2020年末から流行した幾つかの型（バリアント）についても時系列解析の結果を示す。オートエンコーダーの俯瞰的方法によって、型の分類・認識が定量的・直感的に可能であり、時系列解析に有用な方法であることが示された。

Key words autoencoder, SARS-CoV, cluster-analysis, gene-profiling

G2H3 (0310) 同位体非定常 ^{15}N 代謝フラックス解析法の開発と大腸がん細胞株の窒素代謝経路への応用

○村上慶多, 近藤佑哉, 岡橋伸幸, 松田史生*
(大阪大学　大学院情報科学研究科)

Development of isotopically non-stationally ^{15}N-metabolic flux analysis and application for colorectal cancer cell lines in nitrogen metabolic pathway

○Keita Murakami, Yuya Kondo, Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda*
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)
fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】
^{13}C-代謝フラックス解析法(^{13}C-MFA）は、中心炭素代謝ネットワークの代謝流束（フラックス）を定量する代謝工学的手法である。一方、窒素代謝フラックスを定量するには、細胞内代謝物が ^{15}N で標識される時系列データを用いる同位体非定常法が必要である。本研究では、同位体非定常 ^{15}N 代謝フラックス解析法（INST ^{15}N-MFA）を開発し、悪性度の異なる大腸がん細胞株 2 株の窒素代謝経路の比較を試みた。
【方法】
[amido-^{15}N]グルタミンまたは[alpha-^{15}N]グルタミンを含む 2 種類の DMEM で大腸がん細胞株（HCT116）を培養し、細胞回収を行った。抽出した細胞内代謝物の ^{15}N 標識割合を質量分析計（SHIMADZU, LCMS-9030）で計測した。これらのデータを各代謝物で足し合わせた ^{15}N 積算標識割合を計算し、細胞回収の時系列を決定した。それを用いて[U-^{15}N]グルタミンを含む DMEM で悪性度の異なる大腸がん細胞株 2 株（HCT116, WiDr）を培養し、同様に ^{15}N 標識実験を行った。窒素代謝モデルと専用のソフトウェア”mfapy”（F. Matsuda *et al.*, 2021）を用いて、この実測値を説明する窒素代謝フラックス分布を計算した。
【結果および考察】
大腸がん細胞株（HCT116）を[amido-^{15}N]グルタミンまたは[alpha-^{15}N]グルタミンを含む DMEM で培養し、0, 6, 12, 24, 36, 48 時間後の細胞から抽出した細胞内代謝物の ^{15}N 標識割合を質量分析計で計測した。その結果、一部のアミノ酸と核酸代謝物がグルタミン由来の ^{15}N で標識されていた。グルタミン酸とアスパラギン酸の ^{15}N 積算標識割合は、6 時間後にそれぞれ 70%、69%で同位体定常に達していた。核酸代謝物のうち、代謝経路の上流に位置するイノシン一リン酸(IMP)，アデノシン一リン酸(AMP)の ^{15}N 積算標識割合は、6 時間後にそれぞれ 54%、41%とったことから、グルタミン由来の ^{15}N で核酸代謝物が急速に標識されていた。これらの知見を基に、最適化した INST ^{15}N-MFA 実験系を構築し、悪性度の異なる大腸がん細胞株 2 株(HCT116, WiDr) から ^{15}N 標識データを取得した。窒素代謝モデルを作成し、その実測 ^{15}N 標識割合を最もよく説明する窒素代謝フラックス分布を 2 株で推定することに成功した。その結果、悪性度の高い HCT116 では悪性度の低い WiDr よりも *de novo* プリン生合成フラックスが 1.2 倍増加していることが明らかとなった。
本研究の一部は新学術領域「代謝アダプテーション」の支援を受けた。
Key words metabolic flux analysis, nucleotide, metabolic engineering

G2H3 (0311) ^{13}C 代謝フラックス解析法を用いた好中球の中心炭素代謝の解析と機能制御への応用

○谷口赳夫 [1], 岡橋伸幸 [1], 松田史生 [1]*
([1] 大阪大学大学院情報科学研究科)

Analysis of central carbon metabolism in neutrophils using ^{13}C-metabolic flux analysis and its application to functional regulation

○Takeo Taniguchi[1], Nobuyuki Okahashi[1], Fumio Matsuda[1]*
([1]Grad. Sch. IST. Osaka Univ.)
takeo_taniguchi@ist.osaka-u.ac.jp

[背景と目的]
細胞機能に関与する代謝反応を特定することで、代謝への人為的介入による機能制御が可能となると期待される。それには、中心炭素代謝反応の流束（フラックス）を直接評価可能な ^{13}C 代謝フラックス解析法が有用である。そこで、本研究では、免疫細胞の一種である好中球に ^{13}C 代謝フラックス解析法を適用し、好中球機能の一つである活性酸素種（ROS）の産生に必要な NADPH 再生経路の特定及び代謝阻害剤を用いた介入による ROS 産生能の制御を試みた。
[方法]
骨髄系前駆細胞株 HL-60 を[1, 2-$^{13}C_2$]グルコース含有培地で培養した。レチノイン酸を添加し、6 日間培養することで HL-60 を好中球様に分化させ、大腸菌由来リポ多糖（LPS）を用いて免疫応答を誘導した。細胞数・培地成分の経時変化と細胞内代謝物の ^{13}C 標識割合を測定した。^{13}C 代謝フラックス解析は専用ソフトウェア"mfapy"を用いた（F. Matsuda et al., 2021）。
[結果と考察]
分化前、分化後、免疫応答中 HL-60 の ^{13}C 代謝フラックス解析を行った。分化前 HL-60 では、グルコースの取り込み速度は 140 nmol/10^6 cells/h、乳酸の分泌速度は 270 nmol/10^6 cells/h であった。分化後 HL-60 のグルコースの取り込み速度は分化前 HL-60 に比べて 29%にまで低下していた。一方、LPS 処理を行うと、分化後 HL-60 と比べて 191%に増加し、免疫反応中ではグルコース消費が活性化していた。中心炭素代謝経路の代謝フラックス分布を 3 条件間で比較した。その結果、NADPH 再生の主経路であるペントースリン酸経路の代謝フラックスは、分化後 HL-60 ではほぼゼロになり、LPS 処理することで 13 nmol/10^6 cells/h まで再び増加した。また、分化後 HL-60 の NADPH 再生するリンゴ酸酵素反応の代謝フラックスは、分化前と比べて 8.0 倍に増加し、LPS 刺激群でも 68 nmol/10^6 cells/h と依然として高活性を維持していた。これら二つの経路の阻害剤を処理し、ROS 産生量を測定したところ、両方の条件で ROS 産生量が減少したことを確認した。以上のことからペントースリン酸経路とリンゴ酸酵素反応は主要な NADPH 再生経路であり、それらに介入することで ROS 産生能を制御することができる可能性を示した。

Key words ^{13}C-metabolic flux analysis, neutrophil, NADPH, reactive oxygen species

G2H4 (0102) サンゴ粘液中の海藻忌避物質の探索

○垣田浩孝 [1,2]*, 高橋蘭 [2], 井口亮 [3], 鈴木淳 [3]
([1] 日大院・総合基, [2] 日大・文理, [3] 産総研・地質情報)

Search for algae repellents in coral mucus

○Hirotaka Kakita[1,2]*, Ran Takahashi[2], Akira Iguchi[3], Atsushi Suzuki[3]
([1]Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon Univ., [2]College of Humanities & Sciences, Nihon Univ., [3]Geological Survey of Japan, AIST)
kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp

サンゴ粘液とは造礁サンゴが海水中に分泌する透明な粘性のある有機物のことである。サンゴ粘液は様々なストレスへの応答物質として分泌され、例えば、サンゴ表面に付着する藻類や細菌の増殖に対する防御や忌避、強烈な紫外線や干潮時の乾燥からの防御等に役立っている。また非ストレス下でも粘液は餌捕獲の道具やサンゴ細胞内の代謝調節の一環として機能していることが示唆されており、サンゴ共生褐虫藻の光合成活動との連動が強く示唆されている。そこで本研究では、サンゴ粘液中の海藻類忌避物質を明らかにするために、サンゴ粘液中の多糖分解酵素活性やその反応生成物である単糖・二糖の組成を解明することを目的とした。サンゴ粘液はハマサンゴ 2 検体及びスギノキミドリイシ 14 検体から採取した。粘液採取はサンゴを蒸留水中に浸漬して採取する MQ 法及び海水から空気中に出して採取する Airdrop 法を用いた。粘液中の糖組成分析は、ほう酸含有移動相を用いたイオン交換高速液体クロマトグラフィー及び順相分配高速液体クロマトグラフィーにより行った。標準標品としてラムノース、マンノース、リボース、ガラクトース、フコース、グルコース、キシロース、アラビノース、フルクトース、ソルボース、N アセチルグルコサミン、N アセチルガラクトサミン、セロビオース、マルトース、メリビオース、ラクトース、マルトトリオース、セロトリオース、セロペンタオースを使用した。サンゴ粘液中の各糖濃度の割合は、セロビオース 35%、グルコース 22%、ラムノース 7%、ガラクトース 7%、キシロース 5%、その他 24%であった。同種のサンゴで同じ採取方法でもサンゴ株により糖濃度が異なる場合があった。これは採取時間が関係していると思われる。一方、採取方法の違いでは、MQ 法ではグルコースの濃度が 6～12 μ g/mL と、セロビオースの濃度（3～5 μ g/mL）より高くなるが、Airdrop 法ではセロビオースの濃度が高く（10～19 μ g/mL）、グルコース濃度は 1 μ g/mL 以下であった。MQ 法で観察されたグルコースはサンゴ粘液由来ではなく、サンゴ細胞内容物である可能性が示唆された。サンゴ粘液糖組成でセロビオースが有意に検出されたことから、サンゴ粘液中の海藻忌避物質として海藻細胞壁のセルロースを分解するセルラーゼ等の多糖分解酵素が存在することが示唆された。

Key words mucus, coral, algae

G2H4 (0101) *Pseudomonas nitroreducens* 由来 γ-グルタミルトランスペプチダーゼの活性部位を構成する芳香族アミノ酸残基の役割解明

○小笹 彰宏 [1], 池添 浩輝 [1], 松井 大亮 [1], 豊竹 洋佑 [1], 日幸 隆雄 [2], 伊藤 貴文 [2], 若山 守 [1]*
([1] 立命館大院・生命科学・生工, [2] 福井県大・生物資源)

The role of aromatic amino acid residues constituting the active site of gamma-glutamyltranspeptidase from *Pseudomonas nitroreducens*

○Akihiro Ozasa[1], Hiroki Ikezoe[1], Daisuke Matsui[1], Yosuke Toyotake[1], Takao Hibi[2], Takahumi Itoh[2], Mamoru Wakayama[1]*
([1]Ritsumeikan Univ., [2]Fukui Prefectural Univ.)
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

【背景】γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）は微生物から哺乳類に至る様々な生物に存在し、グルタチオンの代謝に関わる重要な酵素である。本酵素は、遊離の Gln 残基のγ基グルタミル基を他のアミノ酸やペプチドに転移する転移酵素活性と、γ-グルタミル化合物を加水分解して Glu を生成する加水分解活性を示す二機能性の酵素である。我々は、茶のうま味成分テアニンの工業生産に利用されている *Pseudomonas nitroreducens* NBRC 12694 由来 GGT の X 線構造解析により、酵素反応に関与するアミノ酸残基を明らかにしている [1]。そこで本研究では、基質ポケットに存在する Asn384、Trp385、Phe417 に着目し、変異導入でその役割を明らかにすることを目的とした。
【方法】Asn384、Trp385、Phe417 を PCR により部位特異的変異導入を行った。PCR 産物を *Dpn*I で処理し、大腸菌 Rosetta-gami B(DE3)に挿入した。その形質転換体を培養し、超音波破砕後、遠心分離で得られた上清を粗酵素液として、各種クロマトグラフィーで精製した。転移活性は L-Gln とヒドロキシルアミンを基質としてγ-L-グルタミルヒドロキサミンの生成を比色法で、加水分解活性はγ-グルタミル-*p*-ニトロアニリドを基質として、*p*-ニトロアニリンの生成を同様に比色法で測定した。
【結果と考察】Asn384 の変異導入：変異型酵素 N384A、N384W、N384V、N384Q、N384D、N384K は成熟形として発現が見られなかった。この結果から Asn384 が構造形成に関与していることが示唆された。Trp385 と Phe417 の変異導入：調製した変異型酵素はそれぞれ可溶性画分に発現され、精製後、野生型酵素と同様に SDS-PAGE 上でヘテロダイマー型酵素（およそ 20、40 kDa）として確認した。野生型酵素は転移活性に比べて 5 倍以上高い加水分解活性を示すが、立体障害の少ないアミノ酸残基に置換した W385S、W385K、F417S、F417A、F417D は転移活性が加水分解活性を上回った。これらの残基の活性中心領域での水分子の接近あるいは保持への関与が示唆された。また、野生型酵素は基質の立体選択性が見られないが、W385F、W385S、W385K、F417S、F417A、F417D において L-Gln に対する高い特異性を示した。変異導入によって供与体基質認識が変化したと考えられた。以上の結果から、W385 および F417 は酵素の活性、基質認識に影響を与える残基であることが示唆された。
【参考文献】[1]T. Hibi et al., *Biosci. Biotech. Biochem.* **83**(2):262-269, 2019

Key words gamma-glutamyltranspeptidase, *Pseudomonas nitroreducens*, substrate specificity

G2H4 (0103) 高電圧バイオ電池構築のためのマルチ銅オキシダーゼにおける T1 銅の第 2 配位圏への部位特異的変異誘発

○平中佑磨 [1]、多喜俊介 [1]、髙村映一郎 [1]*、坂元博昭 [1]、里村武範 [1]、櫻庭春彦 [2]、大島敏久 [3]、末信一朗 [1]
([1] 福井大院・工、[2] 香川大・農、[3] 大阪工大・工)

Site-directed mutagenesis to second coordination sphere of T1Cu in multicopper oxidase for high-voltage biofuel cell

○Yuma Hiranaka[1], Syunsuke Taki[1],Eiichiro Takamura[1]*,Hiroaki Sakamoto[1],Takenori Satomura[1],Haruhiko Sakuraba[2],Toshihisa Ohshima[3],Shin-ichiro Suye[1]
([1]Grad.Sch.Eng.,Fukui Univ., [2]Fac.Agric., Kagawa Univ., [3]Fac.Eng.,Osaka Inst. Technol.)
e_takamr@u-fukui.ac.jp

[背景]
近年、健康管理や疾病診断・治療を目的として、ウェアラブルセンサーや、生体埋め込み型デバイスの研究開発が活発化している。これらのデバイス用電源として安全・小型なバイオ電池（Biofuel cell: BFC） が注目されている。BFC は酸化還元酵素の働きによって燃料から電気エネルギーを取り出す燃料電池である。小型化が容易、常温で作動可能などの利点を持つが、低出力や短寿命が問題であり、実用化には至っていない。BFC のカソードには一般的にマルチ銅オキシダーゼ（MCO）が用いられている。本研究グループでは高い長期安定性、熱安定性を有する超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来の MCO（McoP）を電極触媒として用いることでバイオ電池の長寿命化を行ってきた。しかし、McoP の酸化還元電位 (+398 mV) は他の MCO と比較して低いため、電極触媒として用いた際に BFC の低電池電圧に繋がる。MCO の酸化還元電位は基質や電極から電子を受け取る T1 銅の酸化還元電位に大きく影響を受けるため、BFC の電池電圧向上には McoP の T1 銅の酸化還元電位の正側へのシフトが必要となる。先行研究においては McoP の T1 銅軸配位子を酸化還元電位の高い酵素に見られるアミノ酸に置換することで酸化還元電位を正側にシフトすることに成功した。
本研究では、McoP の酸化還元部位である T1 銅周辺の第 2 配位圏に着目し、酸化還元電位の高い酵素のアミノ酸配列を参考に変異を導入することで酸化還元電位の正側へのシフトを目的とした。
[実験・結果]
作製した McoP S388G, M393F, I435T, N462I, E464F, E466L, M471A を修飾したグラッシーカーボン電極を用いて脱酸素条件でサイクリックボルタンメトリーによって電気化学的評価を行った。その結果、I435T, N462I, E464F においては T1 銅の還元電位がそれぞれ 46, 75, 46 mV 正側にシフトした。このシフトは変異導入によって疎水性相互作用の低下及び水素結合の消失が起きたことによって T1 銅周辺構造が柔軟化したことに起因すると考えられる。したがって McoP において T1 銅第 2 配位圏の変異が還元電位調節に有効であることが示された。

Key words biofuel cell, multicopper oxidase, redox potential, mutagenesis

G2H4 (0104) 酵素特性の改良を目指したグリシン酸化酵素の機能解析

○東浦優希[1], 川崎大志[2], 小田龍佑[2], 西矢芳昭[1,2]*
([1]摂南大院・理工, [2]摂南大・理工)

Functional analysis of glycine oxidase for improving enzymatic properties

○Yuki Higashiura[1], Taishi Kawasaki[2], Ryusuke Oda[2], Yoshiaki Nishiya[1,2]*
([1] Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ., [2] Sci. Eng., Setsunan Univ.)
nishiya@lif.setusnan.ac.jp

【背景および目的】グリシンオキシダーゼ（Gox）はグリシンの酸化的脱アミノ化を触媒する酵素であり、生体内においてチアミン合成酵素として働く。チアミンはピリミジン部とチアゾール部が別々の経路で合成され、Gox の反応生成物であるイミノグリシンはチアゾールの一部となる。イミノグリシンは水との反応が容易であり、すぐに分解される。Gox はイミノグリシンを効率的に次反応へと渡すため、低ターンオーバーへと進化したと予想される。

Gox はグリシン測定への応用が可能であり、さらにわれわれは本酵素による特殊健康診断用新規馬尿酸測定法を開発した。これまでに複数のグラム陽性桿菌由来 Gox の酵素特性が解明され、中でも *Geobacillus kaustophilus* 由来 Gox（GoxGk）は高い熱安定性を保持しているため、分析用酵素への応用が期待できる。しかし、基質阻害や低比活性、低基質特異性といった課題が存在する。本研究では GoxGk の課題を解決し、分析用酵素として応用するため、立体構造ベースでの反応機構の解析、およびタンパク質工学による機能改変を行った。

【結果および考察】GoxGk とグリシンの複合体構造が解明され（PDB ID: 4YSH）、Closed 構造の活性中心領域においてグリシンは反応部位以外にもう 1 分子（非反応性グリシン）が確認された。また、活性中心の R336 が Open-Closed 構造変換を担っていると推測された。さらに R336 の近傍に存在する E55 も、Open-Closed 構造間で顕著な配向の違いを示した。このような構造比較により、R336 と非反応性グリシンおよび E55 との相互作用に着目し、これらの協同効果により低比活性および基質阻害をもたらすと推定した。そこで、非反応性グリシン結合部位を狭めた変異体、E55 変異体をそれぞれ作製し、酵素の特性評価を行った。その結果、基質阻害の低減や消失、さらに比活性の向上効果も確認された。

一方、N-メチルグリシンや N-エチルグリシンとの反応ではグリシンと比較して基質阻害が低減した。結合シミュレーションより、これらの基質は非反応性結合が生じにくいと推察された。さらに、E55 周辺残基の変異体では基質選択性の大幅な変化が見られたので報告する。

Key words glycine oxidase, protein engineering, crystal structure, *Geobacillus*, substrate inhibition

G2H4 (0105) 機械学習を利用した代謝酵素の補酵素特異性の設計と活性測定による検証

○杉木創[1], 二井手哲平[1], 戸谷吉博[1], 清水浩[1,*]
([1]阪大院・情報)

Design of experimental evaluation of coenzyme specificity engineering of malate enzyme using machine learning

○Sugiki Sou[1], Niide Teppei[1], Toya Yoshihiro[1], Shimizu Hiroshi[1,*]
([1] Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)
*E-mail: shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】

微生物の代謝を利用した有用物質の生産は、環境負荷が少ないという利点から注目されているが、生産性が低いという課題がある。その原因の一つとして、代謝反応を触媒する代謝酵素の特性が有用物質生産にとって妨げとなることがあり、合理的な代謝酵素の改変が求められている。しかし、タンパク質の構造を決めるアミノ酸配列の組み合わせは膨大であり、実験的な選定によって理想的な配列を得ることが非常に困難である。そこで本研究では、代謝酵素のアミノ酸配列と補酵素特異性の関係を記述した統計モデルを機械学習(ML)法により構築し、この結果をもとにした合理的な酵素設計を行った。また、設計した酵素のミカエリス定数(K_M)の測定による補酵素特異性の評価により ML モデルの妥当性を検証することを目的とした。

【方法と結果】

リンゴ酸酵素(ME)は依存する補酵素によって NAD^+/NADH の酸化還元反応に依存する NAD-ME と、$NADP^+$/NADPH の酸化還元反応に依存する NADP-ME に分けられる。公開データベースの KEGG から、由来生物や補酵素特異性が異なる ME のアミノ酸配列と補酵素特異性のデータを 952 個抽出し、70%をトレーニングセット、残りをテストセットとした。ロジスティクスモデルを利用して、トレーニングセットをもとに ML モデルを構築した。この ML モデルによるテストセットの補酵素特異性の予測結果は、実際のものとすべて一致した。次に、ML モデルによって予測されたアミノ酸配列と補酵素特異性の関係を実証する実験を行った。まず初めに用意した大腸菌由来の NADP-ME は NADP 型に特有の PTA ドメインを切り取った変異 NADP-ME を設計した。この変異 NADP-ME の酵素活性を *in vitro* で評価したところ、NAD^+への活性をある程度獲得し、$NADP^+$に対する K_M は約 6 倍となった。次に、ML モデルで学習された各アミノ酸残基の係数のうち最大値と最小値の絶対値の和として補酵素特異性のスコアを定義した。ML モデルにおいてスコアの高い残基ほど補酵素特異性の判断に寄与していると考えられるため、PTA ドメインを切り取った ME にスコアの高い残基から変異を加えた。設計した ME は、ML モデルによって NAD 型と NADP 型の中間と予測されたものと、NAD 型と予測されたもので、それぞれ 30 個と 50 個のアミノ酸が置換されている。これら 2 つの ME は、NAD^+に対する K_M がそれぞれ 0.19 倍、0.12 倍で親和性の増加が確認でき、さらに元々の $NADP^+$に対する活性は失われていた。

Key words malic enzyme, malic acid, NAD(P)H, NAD-dependent

G2H4 (0106) 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来新規アセチルキシランエステラーゼの生化学的特性

○加藤智江, 塩野義人, 小関卓也*
(山形大・農)

Biochemical characterization of two novel acetyl xylan esterases from *Aspergillus oryzae*

○Tomoe Kato, Yoshihito Shiono, Takuya Koseki*
(Yamagata Univ.)
tkoseki@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

植物細胞壁の構成要素のヘミセルロースの一種であるアラビノキシランは，キシロースからなる主鎖が，アセチル基などの側鎖によって修飾されている．キシランの効率的な分解には側鎖を分解するアクセサリー酵素が重要な働きをすると考えられている．アセチルキシランエステラーゼは，キシランのアセチル基を加水分解するアクセサリー酵素の一つである．麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 由来エステラーゼ遺伝子 *AoaxeB*(AO090005000495)は α / β ヒドロラーゼフォールドを持つ酵素を分類する ESTHER，炭水化物エステラーゼを分類する CAZy の両データベースで未分類であり，*AoaxeC*(AO090023000158)は ESTHER で FaeC ファミリーに分類されているが，詳しい特徴はわかっていない．本研究では，*AoaxeB*，*AoaxeC* を，それぞれ酵母 *Pichia pastoris* KM71 により異種発現させ，精製し，これを r*Ao*AXEB, r*Ao*AXEC として各酵素について特徴づけを行った．

α-ナフチルエステルを用いてエステラーゼ活性を測定したところ，r*Ao*AXEB の最適温度は 30℃，最適 pH は pH8 であり，α-ナフチル酢酸に対する基質特異性が高かった．また，r*Ao*AXEC の最適温度は 50℃，最適 pH は pH7 を示した．両酵素とも，小麦アラビノキシランから酢酸を遊離し，アセチルキシランエステラーゼであると考えられた．一方，フェルラ酸エステラーゼの基質に対しての活性は検出されなかった．

Key words *Aspergillus oryzae*, Acetylxylan esterase, FaeC family

G2H4 (0107) *Aspergillus nidulans* 由来新規ラムノガラクツロナンリアーゼの機能・構造解析

○鈴木裕満[1], 伊東昂希[1], 酒井杏匠[1], 堀千明[2], 高須賀太一[3], 加藤雅士[1], 志水元亨[1]*
([1]名城大院・農, [2]北大院・工, [3]北大院・農)

Functional and structural analysis of novel rhamnogalacturonan lyase from *Aspergillus nidulans*

○Hiromitsu Suzuki[1], Koki Ito[1], Kiyota Sakai[1], Chiaki Hori[2], Taichi Takasuka[3], Masashi Kato[1], Motoyuki Shimizu[1]*
([1]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., [2]Grad. Sch. Eng. Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Hokkaido Univ)
chupacabra821@gmail.com

【緒言】*Aspergillus nidulans* を始めとする糸状菌は細胞外に様々な多糖分解酵素を分泌することが知られている。ペクチンのみを炭素源にして *A. nidulans* を培養後、セクレトーム解析したところ、機能既知のタンパク質とアミノ酸配列レベルで全く相同性がない機能未知タンパク質 (HP) が多数同定された。その中の一つが新規ラムノガラクツロナンリアーゼ (AnRGL) であった。

【方法・結果】AnRGL をペクチンの構成多糖であるポリガラクツロン酸、ラムノガラクツロナン (RG)、α-1, 5-アラビナン、アラビノガラクタン、β-1, 4-ガラクタンと反応させたところ、RG のみに作用した。RG の反応産物を MALDI-TOF-MS にて解析したところ、不飽和結合を含む RG オリゴ糖が検出されたことから、AnRGL は現存するいずれの Polysaccharide Lyase (PL) ファミリーに属さない新規のラムノガラクツロナンリアーゼであることが判明した。また、X 線結晶構造解析から AnRGL は β-helix 型の構造を有することが示された。さらに、野生株および AnRGL の遺伝子破壊株 (ΔAnRGL 株) を RGI のみを炭素源にして 3 日間培養後、得られた細胞外画分と RG を反応させた。その結果、ΔAnRGL 株では RG オリゴ糖が検出されなかったことから、*A. nidulans* において AnRGL は、主要なエンド型のラムノガラクツロナン分解酵素であることが明らかになった。AnRGL は植物細胞壁を構成するペクチンを分解し、RG オリゴ糖を生産することから、ペクチンからのオリゴ糖生産および植物バイオマスの利用に貢献しうる。

Key words *Aspergillus nidulans*, rhamnogalacturonan lyase, secretome

G2H4 (0108) *Rhizoctonia solani* D138 株分泌酵素群による薬用ニンジン病害性糸状菌の成長阻害

○山岸純一[1], 髙塚由美子[1], 川端千翔[1], 上野 誠[2], 松本慎吾[2], 原富次郎[1]*
（京大・エネ研[1], 島根大・生物資源科学[2]）

The enzymes derived from *Rizoctonia solani* D138 control the growth of pathogenic filamentous fungi causing *Panax ginseng* desease.

○Jun-ichi Yamagishi[1], Yumiko Takatsuka[1], Chika Kawabata[1], Makoto Ueno[2], Shingo Matsumoto[2], Tomijiro Hara[1]*
(IAE, Kyoto Univ.[1], Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.[2])
t-hara@iae.kyoto-u.ac.jp

【背景と目的】薬用ニンジン（*Panax ginseng*）は、漢方薬の処方成分として使われる重要な薬用植物の一つである。しかし、その栽培には一般に 5 年という長い期間が必要とされ、その間の病害性糸状菌の感染による腐敗や枯死などが問題となっているものの、有効な防除法は少ない。我々は、2019 年の本大会（岡山）において、*Rhizoctonia solani* D138 株が分泌する複合酵素が、水稲伝染性糸状菌類の成長や分生子形成を阻害することを報告した。今回、薬用ニンジン苗から病害性を示す糸状菌を分離したことから、本菌株を被検菌とし、*R. solani* D138 株の分泌酵素群による防除的効果を調査した。
【方法と結果】薬用ニンジン病害性糸状菌株は、島根県大根島で栽培されたニンジン 1 年苗ならびに栽培黒ボク土から分離した。ガンマ線滅菌した黒ボク土に、次亜塩素酸塩で表面殺菌したニンジン苗を定植し、人工気象器内で数日間栽培した後、少量の非滅菌黒ボク土を滅菌水に懸濁した上清（土壌由来微生物を含む）を苗周辺に投入した。栽培 35 週間後に発生していた糸状菌類を採取し、PDA 培地を用いた分離作業により 6 株を取得した。形態観察とリボソーム RNA 遺伝子解析から、うち 5 株が病害性糸状菌として知られる *Fusarium solani* と同定された。分泌酵素群は、*R. solani* D138 株をふすま培養し、その培養物を水抽出した後、遠心分離、ろ過滅菌して調製した粗酵素で、グルカナーゼ活性やプロテアーゼ活性などを認めた。本分泌酵素群の *F. solani* に対する抗糸状菌活性を agar well 法を用いて調べたところ、菌糸成長を著しく阻害することが認められた。その他に、agar well 法による抗糸状菌活性を指標としたイオン交換クロマトグラフィー等による酵素の精製についても経過報告する。

Key words biocontrol, enzyme, *Panax ginseng* desease , filamentous fungi

G2H4 (0109) RNA 検出を目指した *Thermus thermophilus* 由来 DNA ポリメラーゼの改変

○安藤友理[1]、福田青郎[1, 2]、保川清[3]、柳原格[4]、*藤原伸介[1, 2]
（[1]関西学院大院・理工、[2]関西学院大・生命環境、[3]京大院・農、[4]大阪母子医療センター）

Modification of *Thermus thermophilus*-derived DNA polymerase for RNA detection

○Yuri Ando[1], Wakao Fukuda[1, 2], Kiyoshi Yasukawa[3], Itaru Yanagihara[4], *Shinsuke Fujiwara[1, 2]
（[1]Grad.Sch.Sci.Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Sch.Biol.Envion.Sci., Kwansei Gakuin Univ., [3]Grad.Sch.Agric.,Kyoto Univ., [4]Osaka Women's and Children's Hospital）
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

好熱性細菌 *Thermus thermophilus* M1 株由来耐熱性 DNA ポリメラーゼ（*Tth*-M1 ポリメラーゼ）は、DNA 合成活性に加え逆転写活性を有する。この活性を利用して RNA の検出ならびに SARS-Cov2 の効率的な検出が行われている(1)。本研究では *Tth*-M1 ポリメラーゼの DNA 伸長ドメインへの変異導入や、ヌクレアーゼドメインの除去を行い、酵素の安定性・活性に与える影響を検証した。DNA 伸長ドメインの変異導入として Thumb 領域近傍の 12 個のアミノ酸を *Bst* DNA ポリメラーゼ型に置換した *Taq* ポリメラーゼの先行研究 (2) を参考に *Tth*-M1 ポリメラーゼを改変した酵素 (*Bst*-*Tth* ポリメラーゼ)を設計した。また *Tth*-M1 ポリメラーゼの 5'→3'ヌクレアーゼドメインを取き Klenow フラグメント化した *Tth* ポリメラーゼ (Klen*Tth* ポリメラーゼ) を構築した。これら 2 種を大腸菌 BL21 CodonPlus(DE3)-RIL を宿主として、組換えタンパク質として発現し、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。これらの変異酵素を用いて PCR 又は RT-PCR を行い、*Thermococcus kodakarensis* KOD1 株由来 DNA ポリメラーゼと比較した。*Bst*-*Tth* ポリメラーゼは PCR で活性確認はできたものの KOD ポリメラーゼに比べ、RT-PCR での最終産物量が少なく、逆転写活性と耐熱性の低下が原因と考えられた。また本酵素には鎖置換活性は確認されなかった。次に、Klen*Tth* ポリメラーゼの DNA 合成活性を Ct 値の比較により行ったところ、*Tth* ポリメラーゼと同程度の活性を示した。また RNA からの検出感度を RT-PCR 法で比べたところ、両者とも同じ感度を示した。低分子化した Klen*Tth* ポリメラーゼは RNA 検出に利用可能と思われる。低分子化した Klen*Tth* ポリメラーゼの安定性に関しては現在検討している。

Key words DNA polymerase, PCR, RT-PCR, reverse transcriptase
(1) Nakura, Y. *et al*., PLoS One 16(6): e0252789. (2021)
(2) Milligan, J.N. *et al.,* Biochemistry 57(31):4607-4619. (2018)

G2H4 (0110) *Pseudonocardia thermophila* 由来 Co 型 Nitrile Hydratase の中性子構造解析に向けた大型結晶作製の条件検討

○和田 凌太郎[1], 仲本 和義[1], 松村 洋寿[1], 野口 恵一[2], 養王田 正文[2], 尾高 雅文[1]*
([1]秋田大院・理工, [2]農工大院・工)

Crystallization of cobalt-containing nitrile hydratase from *Pseudonocardia thermophila* for neutron crystallography

○Ryotaro Wada[1], Kazuyoshi Nakamoto[1], Hirotoshi Matsumura[1], Keiichi Noguchi[2], Masafumi Yohda[2], Masafumi Odaka[1]*
([1]Grad. Sch. Eng. Sci., Akita Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agri. Technol.)
modaka@gipc.akita-u.ac.jp

Nitrile Hydratase (NHase)はニトリル化合物を水和し、アミド化合物を合成する生体触媒であり、アクリルアミド等の工業生産に使用されている。NHase は α 及び β サブユニットから成るヘテロ四量体であり、反応中心に非ヘム Fe または非コリン Co を有する。この中心金属にシステインスルフェン酸(Cys-SO^-)、システインスルフィン酸(Cys-SO^{2-})が配位した特異的な八面体構造を持つため、詳細な触媒機構は未解明である。我々は時間分割 X 線結晶構造解析等の構造学的手法を用いて、NHase の反応機構解明に取り組んでいる。これまでに、栢沼らが行った理論計算から、NHase の触媒反応にはタンパク質内水素結合ネットワークを介した反応中心へのプロトンの授受が重要であることが示唆されている。そこで本研究では、NHase の水素結合ネットワークを観測するために、水素原子を直接観測可能な中性子構造解析を行うこととした。中性子構造解析には 1 mm^3 以上の大型結晶が必要であるため、ここでは、Co 型 NHase 組換え体の作製と結晶化条件の検討を行った。Co 型 NHase 遺伝子を挿入した pUC18 ベクターを用いて、大腸菌 BL21 (DE3)を形質転換した。形質転換体を 37℃で培養し、0.25 mM $CoCl_2$、0.1 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)を添加後、25℃でタンパク質発現を誘導した。その後、Co 型 NHase を単一精製し、限外ろ過膜により濃縮した。30 mg/mL Co 型 NHase 溶液、リザーバー溶液(300 mM $MgCl_2$、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 ~ 30% (w/v)PEG8000)、ハンギングドロップ法、4℃の条件で大型結晶作成の条件の最適化を行った。その結果、1 辺が約 300 μm のタンパク質結晶が得られた。得られた結晶を用いて、PF AR-NW12A (KEK)にて X 線回折実験を行ったところ、回折データが得られ、分解能 1.98 Å、R_{work}/R_{free} = 0.246/0.283 での構造精密化に成功した。しかし、得られた構造の反応中心には Co の電子密度が観測されなかった。また、αCys108 の SH 基と αCys113 の SO^-基のジスルフィド結合が形成されていた。現在、Co が配位した NHase を安定に得るために、培養条件を検討している。

Key words nitrile hydratase, crystallization, protein expression

G2H4 (0111) *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株のマイコファクトシン生合成経路と低栄養生育との関連性について

○岸本真奈[1], 新谷政己[1],吉田信行[1]*
（[1]静大院・総合科技）

Mycofactocin biosynthetic pathway involved in the oligotrophic growth of *Rhodococcus erythropolis* N9T-4

○Mana Kishimoto[1], Masaki Shintani[1], Nobuyuki Yoshida[1]*
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
yoshida.nobuyuki@shizuoka.ac.jp

超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は炭素・窒素・硫黄源およびエネルギー源無添加の無機塩固体培地(BM 培地)上で良好に生育する．本菌の炭素代謝については不明な点が多いが，栄養が乏しい条件下で生育するための独特なシステムを持っていると予想している．トランスクリプトーム解析により，低栄養条件で際立って発現する遺伝子として *N,N'*-ジメチル-4-ニトロソアニリン依存性のメタノール脱水素酵素(NDMA-MDH)をコードする *mnoA* と，NAD 依存性のアルデヒド脱水素酵素をコードする *aldA* を同定している．*aldA* は本菌の低栄養生育に必須な遺伝子であり最重要遺伝子として研究を進めてきた．一方，低栄養条件で最も高発現する *mnoA* は欠損させることで BM 培地での生育が低下するため，低栄養生育に重要な遺伝子であるが，低栄養生育における機能の詳細や生理学的な電子受容体は明らかになっていない．最近，グラム陽性菌である *Mycobacterium* 属細菌の NDMA-MDH の電子受容体がマイコファクトシン(MFT)であることが示唆されている．MFT はグラム陰性菌の PQQ に相当する役割を担うと予想され，生合成系も PQQ に酷似していると明らかになっているが，酵素の電子受容体であるという直接的な証明はされていない．また興味深いことに，本菌のゲノムにおいて MFT の生合成系遺伝子群は *aldA* と *mnoA* 間にすべて存在しており，低栄養条件で高発現していた．この領域には，他にも本菌の低栄養生育に関与すると思われる遺伝子がいくつか存在しており，低栄養性遺伝子クラスターとして注目している．本研究では N9T-4 株における MFT の生合成系遺伝子の低栄養生育への寄与について検討した．MFT 前駆体ペプチドをコードする *mftA* と，MFT に糖鎖を付加する糖転移酵素をコードする *mftF* の欠損株を作製し，その生育を検討したところ，どちらの欠損株も BM 培地での生育が著しく低下したため，MFT およびその糖鎖は本菌の低栄養生育に必須であることが明らかとなった．MFT はメチル化されるという報告があることから，遺伝子クラスター内に存在するメチル基転移酵素 *mftM* についても欠損させたが，BM 培地での生育に変化はなく，本菌の低栄養生育における *mftM* の関与は確認できなかった．

Key words oligotroph, *Rhodococcus erythropolis*, mycofactocin, methanol dehydorogenase

G2H4 (0112) 大豆由来 L-メチオニン γ-アーゼの大腸菌発現，精製と性質検討

○大川敦司[1]，手嶋琢[2]，松井健二[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]山口大院・創成科学（農）

Recombinant expression, purification and characterization of L-methionine γ-lyase from *Glycine max*.

○Atsushi Okawa[1], Takuya Teshima[2], Kenji Matsui[2], Michiko Nemoto[1], Takashi Tamura[1], Kenji Inagaki[1*]
([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2] Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Yamaguchi Univ.)
kinagaki@okayama-u.ac.jp

【目的】L-メチオニン γ-リアーゼ(MGL)は補酵素としてピリドキサール 5’リン酸(PLP)を持ち，主に L-Met とその誘導体の α，γ 脱離反応，L-Cys とその誘導体の α，β 脱離反応を触媒する多機能酵素である。鞍掛青大豆は煮ることで磯の香のするダイズ(*Glycine max*)の品種の一つである。この磯の香はジメチルスルフィドが原因物質であり，*S*-メチルメチオニンがその前駆体物質であることを明らかにしてきた。*S*-メチルメチオニンを高く蓄積する品種は 3 つある MGL 遺伝子の一つである MGL1 遺伝子のイントロンへのトランスポゾン挿入により MGL1 遺伝子発現が抑制されており，それによって蓄積する L-Met の毒性を回避するため *S*-メチルメチオニンへと変換していることを明らかにした。そこで L-Met 代謝に関与する MGL 1 の発現及び精製を行い，その性質を検討した。【方法】*G. max* 由来の MGL1 発現用プラスミドである pET24a-GmMGL1 を構築し，*E. coli* Rosette (DE3)を形質転換した。発現させた GmMGL1 は TALON metal affinity を用いて精製した。酵素活性は MBTH を用いて生産されるケト酸量を定量することにより決定した。【結果及び考察】GmMGL1 は TALON カラムを用いることで，ほぼ単一に精製が可能であった。精製した GmMGL1 は L-Met に対して約 1.0 U/mg の比活性を有していた。また L-Met を基質とした反応の至適 pH は 7.0，至適温度は 45℃であった。脱離反応の基質特異性を調べたところ L-Met，L-ホモシステイン(Hcy)以外に L-エチオニンに対して活性を持っていたが L-Cys に対する活性は確認できなかった。細菌由来の *Pseudomonas putida* MGL (PpMGL)と比較して，L-Met や L-Hcy に対する比活性は非常に低く，L-Met に対する最適条件下での K_m 値は PpMGL がおよそ 1.0 mM なのに対し GmMGL1 はおよそ 29 mM と非常に高い値を示した。また，GmMGL の構造モデルを作製し PpMGL の活性中心比較したところ，PpMGL で重要で，他の微生物由来 MGL でも保存されている残基である Cys116 や Gln349, Lys240 残基などの残基が GmMGL には保存されていないことが示唆された。現在，変異導入による GmMGL 1 の活性中心残基の解析を行うとともに，*G. max* における残りの MGL 遺伝子である MGL2 と 3 について遺伝子クローニングを行い発現精製を試みている。

Key words L-methionine γ-lyase, soybean, pyridoxal 5'-phosphate dependent enzyme L-methionine metabolism

G2H4 (0113) *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA の固定化および Ethyl α-D-glucopyranoside の選択的生産への応用

○ 曹 偉[1]，神戸 友美[1]，石井 義孝[2]，桐村 光太郎[1,2*]
([1]早大院・先進理工，[2]早大・理工総研)

Selective synthesis of ethyl α-D-glucopyranoside by immobilized XgtA, a glucose-transfer enzyme derived from *Xanthomonas campestris* WU-9701

○Wei Cao[1], Tomomi Kanbe[1], Yoshitaka Ishii[2], Kohtaro Kirimura[1,2*]
([1] Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2] Res. Inst. Sci. Eng, Waseda Univ.)
kkohtaro@waseda.jp

【背景・目的】

ethyl α-D-glucopyranoside (以下α-EG) は日本酒などに含まれる配糖体の一種で、保湿作用や整肌作用などの生理機能を有している。α-EG の酵素的生産法の開発が期待されているが、α-EG の生産量の向上や有機酸やオリゴ糖などの副生成物の除去などが課題であった。一方、*Xanthomonas campestris* WU-9701 由来のα-glucosidase (XgtA) は、マルトースを糖供与体としたグルコース転移反応により *l*-menthyl α-D-glucopyranoside やα-arbutin の選択的生産に利用可能である [1-3]。本研究では、担体に固定化した XgtA を調製し、α-EG の酵素的生産について検討した。

【方法・結果】

固定化担体には、活性基としてトレシルクロライドを持つメタクリレート系担体 TOYOPEARL AF-Tresyl-650 を使用した。XgtA の固定化は、精製 XgtA 3.5 mg を 1 mL の 30 mM K_2HPO_4-KH_2PO_4 (pH 8.0) 緩衝液に懸濁させた TOYOPEARL AF-Tresyl-650 100 mg に添加し、24 h、4 ºC にて攪拌して共有結合させることで行った。固定化 XgtA を使用したα-EG の生産試験は、1.2 M maltose、0.8 M ethanol および 100 mM KCl を含む 30 mM K_2HPO_4-KH_2PO_4 緩衝液 (pH 8.0) 1 mL に固定化 XgtA 30 mg を添加し、45 ºC で攪拌しながら反応させることを標準条件として実施した。生成物としてのα-EG は HPLC により定量した。この反応により生産された配糖体はα-EG のみであり、標準条件下 120 h の 1-batch 反応において、47.4 g/L のα-EG 生産に成功した。また、標準条件下 24 h の反応を繰り返し行った場合には、固定化 XgtA は 12 回の反応まで初期活性の 80%以上を維持していた。

[1] Nakagawa, H. *et al*., J. Biosci. Bioeng., **89**, 138-144 (2000).
[2] Sato, T. *et al*., J. Mol. Catal. B: Enzymatic, **80**, 20-27 (2012).
[3] Watanabe, R. *et al*., Biochem. Biophys. Res. Commun., **526**, 580-585 (2020).

Keywords Ethyl α-D-glucopyranoside, α-Glucosidase, Immobilized enzyme, *Xanthomonas campestris* WU-9701

G2H4 (0201) 高基質特異性 L-リシン α-オキシダーゼの基質側鎖の認識に関与する残基の機能解析

○齋藤雅哉[1]，赤井元気[1]，松本侑也[1]，上田悠加[2]，松田峻汰[2]，今田勝巳[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]阪大院・理)

Functional analysis of active site residues of L-lysine α-oxidase with high substrate specificity

○Masaya Saito[1], Genki Akai[1], Yuya Matsumoto[1], Yuka Ueda[2], Ryota Matsuda[2], Katsumi Imada[2], Michiko Nemoto[1], Takashi Tamura[1], Kenji Inagaki[1*]
([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)
kinagaki@okayama-u.ac.jp

【目的】糸状菌 *Trichoderma viride* 由来 L-リシン α-オキシダーゼ（LysOX）は L-リシン（L-Lys）の酸化的脱アミノ反応を触媒する L-アミノ酸オキシダーゼ（LAAO）の一種である。LysOX は L-Lys に対する厳格な基質特異性を有し，高活性かつ熱や pH に対する安定性に優れているため，L-Lys の微量定量用バイオセンサー等として幅広く利用され，抗腫瘍性酵素としても期待されている。これまでに我々は，LysOX-L-Lys 複合体の X 線結晶構造解析に成功し，Asp212 が直接，Asp315 が水分子を介して基質 L-Lys の側鎖 ε-アミノ基と相互作用することを明らかにした。今回は，Asp212，Asp315 等の基質側鎖の認識に関与する残基の機能解析を目的として，変異導入実験及び構造的な考察を行った。【結果】Asp212 残基に飽和変異導入を行ったところ，多くの変異酵素は L-Lys を最も良い基質とし，基質特異性に大きな影響は無かった。しかし，Asp212 残基を塩基性アミノ酸に置換した場合，基質特異性が極端に低下し，芳香族アミノ酸や疎水性アミノ酸に対する活性を獲得した。各変異酵素の L-Lys に対する速度論パラメータを算出した結果，k_{cat} 値は 8 割以下に低下，K_m 値は 10 倍以上高いものが多く，特に D212K LysOX は K_m 値が 2 桁上昇し，D212R LysOX は L-Lys 酸化活性がほぼ消失した。一方で D212E LysOX は，LysOX と同程度の K_m 値を示した。D315E, R LysOX に関しては，基質特異性に大きな影響は無く，L-Lys に対する K_m 値は，D315E LysOX は LysOX と同程度，D315R LysOX は 1 桁上昇した。さらに，活性中心の構造を，蛇毒由来の低基質特異性 LAAO と比較したところ，高基質特異性の LysOX では Phe439 や Trp371 等の嵩高い側鎖を持つ残基によって基質ポケットが狭まっていた。Trp371 は，当研究室で同じく研究を進めてきた高基質特異性の L-グルタミン酸オキシダーゼ（LGOX）でも，ほぼ同じ位置に存在しており，高基質特異性 LAAO に共通する構造的特徴であった。以上の結果より，Asp212，Asp315 両酸性アミノ酸残基が持つ負電荷によって基質 L-Lys に対する高い親和性を獲得でき，活性中心の空間を狭める役割を持つ Phe439 や Trp371 により他の基質のアクセスが妨げられ，これらの残基が LysOX の厳格な基質認識に寄与している事が明らかとなった。

Key words L-lysine α-oxidase, substrate recognition, crystal structure, antitumor enzyme, biosensor

G2H4 (0202) 白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来新規フラビンモノオキシゲナーゼの機能・構造解析

○森玲香[1]，鈴木裕満[1]，加藤雅士[1]，志水元亨[1*]
([1]名城大学院)

Functional and Structural Analysis of Novel Flavin Monooxygenase from White-rot Fungi *Phanerochaete chrysosporium*

○Reini Mori[1], Hiromitsu Suzuki[1], Masashi Kato[1], Motoyuki Shimizu[1*]
([1]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ)
moshimi@meijo-u.ac.jp

【研究背景】

白色腐朽菌担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は芳香族不定形高分子であるリグニンを含む全ての樹木成分を完全に分解する生物である。リグニンは、細胞外に分泌されるリグニン分解酵素により種々のリグニンフラグメントへと低分子化された後、細胞内へ取り込まれる。これらのリグニンフラグメントは細胞内でモノオキシゲナーゼによる酸化的脱炭酸や脱メトキシ化を受け、最終的に 1,2,4-Trihydroxybenzene (THB) に変換された後、ジオキシゲナーゼによる環開裂を受け代謝経路に取り込まれると考えられている。しかしながら、これらリグニンフラグメントの分解に関与する酵素の詳細は未だ明らかとなっていない。

代表的なリグニンフラグメントである Vanillic acid (VA) は脱炭酸・脱メトキシ化を経て THB へ変換されると推定されているが、これまでに上記の反応を触媒する酵素は報告されていない。40 年前の先行研究において *P. chrysosporium* の細胞破砕液に NADPH を添加すると VA を脱炭酸し Methoxyhydroquinone (MHQ) へ変換すると報告されていることから、VA の脱炭酸には補酵素として NADPH を用いる酵素が関与すると考えられた。芳香族化合物の変換に関与する酵素としてモノオキシゲナーゼが知られており、中でも Flavin-containing monooxygenase (FMO) は補酵素として NADPH を用いることから、*P. chrysosporium* 由来の FMO をターゲットに VA の脱炭酸酵素の探索と機能解析を行った。

【方法・結果】

P. chrysosporium のゲノム中にコードされている 59 種の FMO の分子系統樹を作成した。その中から、リグニンフラグメントを基質にする可能性のある FMO を 11 種選抜した。11 種の FMO のうち、大腸菌を用いた異種発現により 4 種の FMO (FMO2, 4, 8, 11) の発現に成功した。この 4 種の FMO を種々のリグニンフラグメントと反応させた後、その反応生成物を GC-MS にて同定したところ、FMO11 が VA、Syringic acid (SA) を脱炭酸することが明らかになった。VA、SA は共に代表的なリグニンフラグメントであるが、これまでに VA、SA の脱炭酸を触媒する酵素は報告されていない。本研究では、世界で初めてリグニンフラグメントの酸化的脱炭酸を触媒する酵素 FMO11 を見出した。現在 FMO11 の X-線結晶構造解析を行っている。

Key words flavin monooxygenase, *Phanerochaete chrysosporium*, lignin, vanillic acid

G2H4 (0203) 酸化酵素の化学修飾による改変脱水素酵素の特性解析

○外山二卯佳[1], 木村太紀[2], 西矢芳昭[1,2]*
([1]摂南大院・理工, [2]摂南大・理工)

Analysis of dehydrogenase constructed by chemical modification of oxidase

○Fuka Toyama[1], Hironori Kimura[2], Yoshiaki Nishiya[1,2]*
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ, [2]Sci. Eng., Setsunan Univ.)
nishiya@lif.setsunan.ac.jp

【背景・目的】分析分野において、酸化酵素の脱水素酵素化は臨床検査やバイオセンサなどへの用途が見込める。われわれは、腎機能評価マーカーであるクレアチニン測定用酵素として既に実用化されている *Arthrobacter* 属由来サルコシンオキシダーゼ(SoxA)を対象に、SH 基化学修飾にてデヒドロゲナーゼへ機能改変することに成功した。化学修飾は基質の酸化反応に影響を与えず、続いて起こる O_2 との反応を阻害した。モデル構造から、システイン残基近傍にある O_2 取込みのエントランスが修飾により狭まると予想された。本研究では、この化学修飾 SoxA の特性解析を行い、分析分野への応用が可能か検討した。

【結果・考察】まず、化学修飾による SoxA の二次構造変化を確認するため、CD スペクトル測定を行った。その結果、化学修飾 SoxA と未修飾酵素の CD スペクトルに差は見られず、修飾により大きな構造変化は起きていないことがわかった。次に、MALDI-TOF MS でのペプチド解析により、3 つのシステイン残基(C154、C232、C264)の修飾が確認された。そこで、これらの残基の変異体解析を行ったところ、C232 と C264 の同時修飾効果による O_2 取込み阻害が示唆された。また、種々の SH 基修飾剤での SoxA の化学修飾効果を比較したところ、どの修飾剤も効果が見られたが、特に Isothiazolinone を含むものが最もオキシダーゼ活性を低下させた。これは、化合物のフレキシビリティの違いによるものと考えられた。改変脱水素酵素の応用のために反応し得る色素を検討したところ、2,6-Dichlorophenolindophenol または 1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate とホルマザン色素の組合わせが利用可能であった。

【展望】改変酵素は溶存酸素と殆ど反応しないため、クレアチニンや前立腺がんマーカーであるサルコシン測定用センサへの応用が期待できる。また、SH 基修飾剤による酵素の機能改変は、修飾剤の選択肢が豊富で操作も簡便であることから、他酵素への適用を進めている。

Key words dehydrogenase, oxidase, chemical modification, sulfhydryl group

G2H4 (0204) 組換え大腸菌を用いた長鎖ポリアミンの生産とシリカ重合活性の評価

○中杉行秀, 舟橋久景, 廣田隆一, 黒田章夫, 池田丈*
(広島大院・統合生命科学)

Production of long-chain polyamines in recombinant *Escherichia coli* cells and evaluation of their silica polymerization activity

○Yukihide Nakasugi, Hisakage Funabashi, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Takeshi Ikeda*
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)
ikedatakeshi@hiroshima-u.ac.jp

グラム陽性細菌 *Bacillus cereus* は土壌中など自然界に広く存在し、低栄養状態下におかれると細胞内に胞子を形成する。当研究室では、*B. cereus* が環境中に存在する可溶性のケイ酸(Si[OH]$_4$)を取り込み、細胞内で不溶性のシリカ(SiO_2)へと重合して、胞子殻に蓄積することを発見した。また、このシリカ内部から長鎖ポリアミン(long-chain polyamine ; LCPA)と呼ばれる直鎖状の分子を発見した。この LCPA は、一般的なポリアミンであるプトレシンの一方の末端に多数のアミノプロピル基が連結した構造を有していた。アミノ基が 4 個以下の短鎖のポリアミンは全ての生物に存在し、細胞増殖因子等の様々な役割を生体内で果たすことがわかっている。一方、LCPA の機能は未だ不明な点が多いが、珪藻や海綿などのシリカ形成生物から共通して発見されているため、シリカ形成への関与が強く示唆された。本研究では、LCPA の機能解析に向けて、組換え大腸菌を用いた LCPA の生産法を確立し、シリカ重合活性の評価を行った。

これまでの研究で同定された *B. cereus* 由来 LCPA 合成酵素を、大腸菌に導入することで、LCPA を大腸菌細胞内で合成することが可能となった。まず、培地の組成や発現誘導条件の検討を行い、LCPA の合成に適した培養条件を決定した。LCPA の機能を定量的に解析するためには、組換え大腸菌の細胞抽出液から LCPA を精製するとともに、精製した LCPA を定量する必要がある。種々の検討の結果、LCPA とシリカ粒子の静電的な親和性を利用して、シリカ粒子を担体とした LCPA 精製法を開発した。また、精製した画分の全窒素測定を行うことで、LCPA の定量も可能となった。精製した LCPA を用いてシリカ重合活性の評価を行ったところ、短鎖のポリアミンと比較して、LCPA は非常に高い活性を示した。この結果から、LCPA がシリカ重合活性を有しており、ポリアミンの鎖長がシリカ重合活性に強く影響していることが示唆された。

Key words long-chain polyamine, silica, *Bacillus cereus*, biomineralization

G2H4 (0205) *Mucor lusitanicus* 由来の低温発現性リパーゼの特性解析

○横林正雄[1], 田中瑛子[1],村上周一郎[2]*
([1]明治大院・農, [2]明治大・農)

Characterization of *Mucor lusitanicus* lipase expressed under low temperature

○Masao Yokobayashi[1], Akiko Tanaka[1], Shuichiro Murakami[2]
([1]Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., [2]Sch. Agric., Meiji Univ.)
smura@meiji.ac.jp

【目的】低温性リパーゼは 20℃以下の低温で比較的高い活性を示す酵素であり、洗剤の製造や食品加工など様々な産業分野での利用が期待されている。これまでの研究で、接合菌 *Mucor lusitanicus* ATCC1216B の Protein ID 155817 をコードする推定リパーゼ遺伝子(*mpl1*)の発現量が、25℃の場合と比較して 10℃の低温条件下で有意に増加することを明らかにした(1)。そこで本研究では、*mpl1* がコードしているリパーゼの発現系を構築し、その酵素化学的性質を明らかにすることを目的とした。

【方法】pET22b プラスミドベクターに *mpl1* を導入し、組換えプラスミドを有する大腸菌形質転換株(MPL1 株)を作製した。組換え酵素の生産条件を検討するために、MPL1 株を LB 培地で種々の温度で培養し、得られる酵素量を評価した。得られた粗酵素液を *p*-nitrophenyl decanoate を基質として酵素反応を行い、Ni アフィニティーカラムに供することで精製した。SDS-PAGE により精製酵素の純度を確認し、各種酵素化学的性質を調べた。

【結果】MPL1 株を 25℃で培養した時に、回収される酵素量が最も多くなった。調製した粗酵素液から Ni アフィニティーカラムを用いた精製では、150 mM imidazole で溶出をした画分において、分子質量 38 kDa の単一のバンドが得られた。

精製酵素を用いて温度の影響を調べたところ、5℃で最大の活性を示したことから、MPL1 は低温性リパーゼであることが明らかとなった。また、本酵素の至適 pH は pH 5.5 であり、最適条件における MPL1 の比活性は、36 U/mg であった。精製酵素の安定性を調べたところ、本酵素は 25℃以下の温度で安定であり、pH 7.0~8.0 の範囲で 80%以上の活性を維持した。各種金属イオン、界面活性剤の影響を調べたところ、本酵素の活性は Triton X-100、Tween 20、Tween 80、デオキシコール酸、Zn^{2+}、Hg^{2+}、Fe^{2+}、Sn^{2+}の存在下で阻害された。

(1) 田中瑛子ら、日本農芸化学会 2019 年大会、講演要旨集、p. 357.

Key words *Mucor lusitanicus*、psychrophilic lipase

G2H4 (0206) カーボン結合ペプチド修飾マルチ銅オキシダーゼ固定化バイオカソードの性能向上を目的としたコール酸系界面活性剤による電子伝達の効率化

○髙村映一郎[1]*, 後藤慧史[1], 坂元博昭[1], 里村武範[1], 櫻庭春彦[2], 冨永昌人[3], 大島敏久[4], 末信一朗[1]
(1 福井大院・工, 2 香川大・農, 3 佐賀大・理工, 4 大阪工大・工)

Efficiency of electron transfer using cholic acid-type surfactant for improving the performance of the carbon-binding peptide modified multicopper oxidase immobilized biocathode

○Eiichiro Takamura[1]*, Satoshi Goto[1], Hiroaki Sakamoto[1], Takenori Satomura[1], Haruhiko Sakuraba[2], Masato Tominaga[3], Toshihisa Ohshima[4], Shin-ichiro Suye[1]
([1]Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., [2]Fac. Agric., Kagawa Univ., [3]Fac. Sci. Eng., Saga Univ., [4]Fac. Eng., Osaka Inst. Technol.)
e_takamr@u-fukui.ac.jp

[背景] 近年、疾病診断・治療を目的として、生体埋め込み型センサの研究が盛んになっており、本研究グループはセンサデバイス用電源として Biofuel cell（BFC）に注目した。しかし、BFC は酵素-電極間の電子移動効率の低さに起因する低出力が課題であった。以前に、BFC のカソード素子として一般的に用いられる Multicopper oxidase（MCO）と Single-walled carbon nanotube（SWCNT）間の界面を Steroid biosurfactant sodium cholate（SBSC）で修飾することにより、基質結合部位と SMBC の間で静電誘導が生じ、酵素-電極間の電子移動速度が向上するという報告があった。本研究グループでは SWCNT へ特異的に結合する Carbon nanotube binding peptide（CBP）を修飾した超好熱菌 *Pyrobaculum aerophilum* 由来 MCO（McoP-CBP）を用いることで酵素の配向固定化を行い、BFC の出力を向上させている。そのため、本研究では SBSC 修飾 SWCNT に McoP-CBP を固定化することでカソードのさらなる性能向上を目指した。

[実験・結果] SWCNT を *N*-Methyl-2-pyrrolidone（NMP）に分散後、Glassy carbon 電極上に滴下し風乾させた。その後、4 種類（Sodium Cholate（SC）、 Sodium Taurocholate（ST）、Sodium Deoxycholate（SD）、Sodium taurodeoxycholate（STdx））の 0.01% (w/v) SBSC 水溶液をそれぞれ電極上に滴下し、SWCNT 表面へ SBSC を修飾させた。SMBC/SWCNT 修飾電極へ McoP-CBP 溶液を滴下・洗浄することで各 McoP 修飾電極を作製した。電極評価のために作製電極を作用極とした 3 電極方式によるサイクリックボルタンメトリー（CV）を行った。

McoP-CBP/SBSC/SWCNT 修飾電極を用いた CV の結果、SC および SD を用いた電極では、他の SBSC を修飾した電極よりも酵素の固定化量が少ないにもかかわらず、高い電流密度を示した。これは、McoP-CBP を固定化する際に、スルホニル基を有する ST と STdx は負電荷が強いため、基質結合部位以外の酵素表面でも静電的な吸着が生じることで、静電誘導による酵素の配向固定化が阻害されるためだと考えられる。

Key words biofuel cell, multicopper oxidase, direct electron transfer, biosurfactant

G2H4 (0207) **講演中止**

G2H4 (0208) **中性子構造解析に向けた鉄型ニトリルヒドラターゼの精製と結晶化**

○藤井康年[1], 辻井啓夢[1], 岩藤秀直[1], 仲本和義[1], 松村洋寿[1], 日下勝弘[2], 玉田太郎[3], 尾高雅文[1]*
([1]秋田大院・理工, [2]茨城大学フロンティア応用原子科学研究セ, [3]量子科学技術研究開発機構量子生命科学研)

Purification and crystallization of Fe-type nitrile hydratase for neutron structural analysis

○Fujii Yoshito[1], Tsujii Hiromu[1], Iwato Hidenao[1], Nakamoto Kazuyoshi[1], Matsumura Hirotoshi[1], Kusaka Katsuhiro[2], Tamada Taro[3], Odaka Masafumi[1]*
([1]Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ., [2]Frontier Res. Center for Appl. Atomic Sci, Ibaraki University, [3]Inst. for Quantum Life Sci, Natl. Inst. for Quantum and Radiological Sci. and Technol.)
連絡先の E-mail **アドレス** modaka@gipc.akita-u.ac.jp

ニトリルヒドラターゼ(Nitrile Hydratase; NHase)はニトリルを水和してアミド化する酵素であり、アクリルアミドなどの工業生産に広く利用されている。しかし、酸化されたシステインを配位子とする特殊な金属反応中心を持つため、詳細な反応機構はわかっていない。また、理論計算による反応モデルから、反応中心付近の水分子を介した水素結合ネットワークが反応の進行に重要であると予測されている。

既に NHase の立体構造は X 線構造解析により明らかにされているが、水分子を観測することは困難である。そこで我々は、水分子の位置を観測可能な中性子線回折による NHase の解析を目指し研究を行っている。現在までに、0.72 mm^3 の大型結晶を作製することに成功しており、この結晶を用いた中性子線によるテスト測定では、最大分解能 2.6 Å が得られた。今後はタンパク質総量を増加させることで、中性子構造解析に必要な 1 mm^3 以上の結晶作製を目指す。一方、これまで、*R. erythropolis* N771 由来の天然型 NHase を用いて実験を行ってきたが、最近、菌体中の NHase の発現量が著しく減少した。そのため現在、天然型ならびに組換え体 NHase の発現条件の再検討を行っている。

本発表では、中性子結晶構造解析のための native NHase の大型結晶化と、天然型ならびに組換え体 NHase の発現及び精製の再検討について報告する。

Key words nitrile hydratase, neutron structural analysis

G2H4 (0209) **真核紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* 由来の β-amylase の性質解析と酵素の固定化**

○村上 雅[1], 小山内 崇[1]*
([1]明大院・農・農化)

Characterization and immobilization of β-amylase from eukaryotic red alga *Cynanidioschyzon merolae*.

○Miyabi Murakami[1], Takashi Osanai[1]*
([1]Graduate School of Agriculture, Meiji Univ.)
cf200124@meiji.ac.jp

我々は *Cyanidioschyzon merolae* 由来の β-アミラーゼ（以下、CmBAM）の特性の解析と産業利用を目指した酵素の固定化に関する研究を行なった。真核紅藻 *C. merolae* は、至適 pH 2.0-3.0、至適温度 40-50℃で生育する単細胞性の藻類である。*C. merolae* のタンパク質の耐熱性や耐酸性に着目し、その特性を解析することで、酵素などの有用なタンパク質の実用化を目指した。β-アミラーゼは、デンプンなどの多糖をマルトース単位で加水分解する酵素である。β-アミラーゼは産業用酵素として、食品や医薬品の製造などに利用されている。本研究ではこの CmBAM の性質を調査し、市場にある既存の穀類由来の β-アミラーゼに替わる安定供給可能な産業用酵素としての利用の可能性を探った。本研究では、CmBAM の最適条件は pH 6.0、最適温度 47℃であることを発見した。CmBAM の耐熱性は 50℃で 60%であり、大麦由来の β-アミラーゼと同等の耐熱性を有していた。続いて、CmBAM の活性は、KNO_3 や $NaNO_3$ の添加により上昇した。Cu^{2+}, Fe^{3+}, Zn^{2+}などの金属イオンは他生物種由来の β-アミラーゼの活性を低下させることが報告されているが、Fe^{3+}や Zn^{2+}は CmBAM の活性を低下させなかった。*C. merolae* 細胞からの粗抽出 CmBAM の活性は 21.7 U/g CDW (Cell Dry Weight)を示し、これは麦芽由来 β-amylase の活性の約 2 倍であった。また、最適温度や耐熱性は、工業的に利用されている大麦由来の β-アミラーゼと同等であった。CmBAM は基質としてアミロースに対して高い活性を示し、グリコーゲンに対しては低い活性を示した。これは高等植物由来の β-アミラーゼの特徴に近い性質であった。さらに、アミノ酸配列比較及び系統解析の結果、CmBAM は生デンプン吸着ドメインを持たないなど細菌由来の酵素とはいくつかの点で異なり、緑藻や高等植物由来の β-アミラーゼに近いと考えられる。酵素の固定化にも成功し、保存性、耐熱性の向上と酵素の再利用を可能にした。我々は CmBAM の生化学、物理化学的な性質の面と固定化も可能であることから、CmBAM は産業用生体触媒として利用できる可能性が高いと考えている。

Key words *Cyanidioschyzon merolae*, β-amylase, enzyme immobilization

G2H4 (0210) **超好熱菌由来分岐鎖ポリアミンによるタンパク質の安定化効果**

○福田萌子[1]、福田青郎[1,2]、藤原伸介[1,2]
([1]関西学院大学院・理工、[2]関西学院大・生命環境)

Stabilization of proteins by branched-chain polyamines from hyperthermophilic Archaea

○Moeko Fukuda[1], Wakao Fukuda[1,2], Shinsuke Fujiwara[1,2]
([1] Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2] Sch. Biol. Environ. Sci., Kwansei Gakuin Univ.)
fukuda.moeko@kwansei.ac.jp

【目的】ポリアミンは 2 個以上のアミノ基を持つ脂肪族炭化水素の総称であり、様々な生理活性を示す。その分布は生物によって様々で、特に超好熱菌は直鎖分岐鎖構造の違いや価数の異なる様々なポリアミンを有し、これらが高温環境での生育に寄与する。先行研究において、小型ポリアミンであるスペルミジン (3+) とスペルミン (4+) がリゾチームの不活性化と凝集を阻害する事が示されている(1)。本研究では酵母由来のアルコール脱炭酸酵素（ADH）をモデルタンパク質に用い、上記の小型ポリアミンを含む様々なポリアミンのタンパク質安定能を検証した。

【結果と考察】熱処理 (55 ℃) 後の ADH の残存活性の経時変化を測定することで、各ポリアミン添加による熱安定化効果を検証した。その結果スペルミジンでは高濃度 (100 μM) で添加した場合で安定化効果がみられたが、スペルミンでは安定化効果がほとんど確認されなかった。また超好熱菌特有の長鎖型ポリアミン (カルドヘキサミン, 6+) と分岐型ポリアミン (ビスアミノプロピルスペルミジン, 5+) では低濃度 (10 μM) でも安定化効果があり、特に分岐型ポリアミンの方が高い安定化効果を示した。これより分岐型構造が高い安定能を示すために重要と考えられる。また、スペルミジンまたは分岐型ポリアミン存在下・非存在下における ADH の CD スペクトル変化を様々な温度で測定した。この結果、15 μM スペルミジンでは 60 ℃を超える高温での構造変化を抑制できなかったが、15 μM 分岐型ポリアミンでは 80 ℃でも構造変化の抑制がみられた。分岐型ポリアミンは高温ストレスによる ADH の構造変化を抑制し、酵素活性を維持していることが示された。本結果より価数の大小が必ずしもタンパク質の安定化能を決めるわけではないものの、多価ポリアミン、分岐型ポリアミンは酵素の安定化剤として高い効果を持つことが示され、安定化能と構造との関連が示唆された。

(1) Kudou M., *et. al.*, Eur. J. Biochem. 270, 4547–4554 (2003)

Key words alcohol dehydrogenase, archaea, polyamine, thermophile

G2H4 (0211) *Paenibacillus* sp. A13 由来マイコデキストラナーゼの酵素学的諸性質の比較と触媒残基の特定

○平田風子[1], 山内夢乃[1], 稲福隆之[1], 上地敬子[1], 平良東紀[1]*
([1]琉球大・農)

Comparison of enzymatic properties of mycodextranases from *Paenibacillus* sp. A13 and identification of their catalytic residues.

○Fuko Hitata[1]*, Yumeno Yamauchi[1], Takayuki Inafuku[1], Keiko Uechi[1], Toki Taira[1]*
([1] Fac. Agric., Univ. Ryukyus)
tokey@agr.u-ryukyu.ac.jp

Aspergillus 属などの糸状菌の細胞壁は，キチンや β-1,3-グルカン，α-1,3-グルカンなどの多糖を主構成要素としており，細胞の形態維持や外環境からの細胞の保護を担っている。本研究では，一部の *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属糸状菌が窒素源飢餓時に特異的に生産する細胞壁多糖ニゲランに注目した。ニゲランとは，α-1,3-/α-1,4-グルコシド結合を交互に繰り返す多糖類である。宿主への病原性発揮や菌糸の凝集・接着に重要である α-1,3-グルカンと同じ α-グルカンに分類されるが，これまでにニゲランの生理学的な役割はわかっていない。これを明らかにするためには，糸状菌におけるニゲランの生合成・分解機構やニゲランを生産する糸状菌とニゲランを分解する土壌細菌との相互作用について検証していく必要がある。本研究では，土壌から分離した *Paenibacillus* sp. A13 株由来のニゲラン分解酵素（マイコデキストラナーゼ）の遺伝子クローニングを行い，異種発現させた組換え酵素の酵素学的諸性質と触媒残基を明らかにすることを目的とした。

まず，*Paenibacillus* sp. A13 株のマイコデキストラナーゼ遺伝子を BIC 法でクローニングし，組換え酵素として発現させた。本酵素は N 末端側から 3 つの糖質結合モジュール（CBM）と糖質加水分解酵素ファミリー87（GH87）に分類される触媒残基を持つことがわかった。野生型酵素に加えて，N 末端より 1 つまたは 2 つの CBM を欠損させた変異型酵素も作製し，併せて酵素化学的諸性質を解析した。その結果，野生型酵素の反応最適 pH は pH 6.0，反応最適温度は 55℃となった。変異型酵素の性質は野生型酵素と類似しており，比活性については野生型酵素が最も高く，CBM を欠損させるごとに比活性は低下した。野生型および変異型酵素はいずれもニゲランを特異的に加水分解してニゲロースを生成したため，本酵素が α-1,3-/α-1,4-グルコシド結合を持つニゲランの α-1,4-グルコシド結合を特異的に加水分解することがわかった。

次に，本酵素の触媒残基の特定を試みた。GH87 に分類される細菌由来の α -1,3-グルカナーゼの構造情報に基づいて 659, 682, および 683 番目のアスパラギン酸残基を触媒残基であると推定し，アラニンに置換した変異型酵素を作製した。作製した D659A，D682A および D683A 変異型酵素の活性は，いずれも野生型酵素の 2.1%以下と大幅に低下したため，これらアスパラギン酸残基が触媒残基であると特定した。

本研究の結果は，ニゲラン生産糸状菌とニゲラン分解酵素生産細菌の相互作用を明らかにするためのツールとして利用できることを示しており，ニゲランの生理学的な役割の解明に繋がることが期待できる。

Key words Nigeran, Mycodextranase, GH87, *Paenibacillus*

G2H4 (0212) 様々な麹菌のアグマチン生産性

○吉岡美紗[1], 福田青郎[2], 中川拓郎[3], 赤坂直紀[1], 藤原伸介[1,2]*
([1]関西学院大院・理工, [2]関西学院大・生命環境, [3]樋口松之助商店)

Agmatine productivity of various *Aspergilus strains*

○Misa Yoshioka[1], Wakao Fukuda[2], Takuro Nakagawa[3], Naoki Akasaka[1], Shinsuke Fujiwara[1,2]*
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Sch. Biol. Environ. Sci., Kwansei Gakuin Univ., [3]Higuchi Matsunosuke Shoten Co. Ltd.)
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

【目的】アグマチン (Agm) は、アルギニンの脱炭酸酵素 (ADC) によって生成されるポリアミン生合成中間代謝産物であり、認知症やアルツハイマー症等の治療への応用が知られている。我々は清酒用麹菌 *Aspergillus oryzae* RW 株による蒸米を糖化する過程で酸性条件下にすることで Agm が多く作られることを見出した (1)。このような特徴はゲノム配列が明らかになっている研究用株 (RIB40 株) でも確認されたが、麹菌の用途・種類は様々であり、他の麹菌株でも合成活性があるかは不明である。そこで、吟醸、清酒、味噌、味噌・甘酒、焼酎用の様々な菌株 (No. 1-12 株) を用いて麹菌の種類による Agm 生産性の違いを検証し、Agm 高生産株を選定することを目的とした。これまでに製麹時間により糖化液中の Agm 量が増加することが分かっている。そこで製麹時間（製麹温度 30℃、45 時間または 91 時間）の異なる麹に関して、麹破砕液中 ADC 活性の pH 依存性、及び各麹を用いた糖化液の Agm 含有量を分析した。

【結果】麹中 ADC 活性を測定したところ、麹菌株の種類や製麹時間によって活性値や pH 依存性が異なっていた。例えば、吟醸用 No. 1 株由来 ADC は製麹 45 時間では pH 3 と pH 4 で同等の活性を示すのに対し、製麹 91 時間では pH4 で最大活性を示した。清酒用 No. 2~6 株のうち No. 4 株由来 ADC も No. 1 株同様の pH 依存性の傾向がみられた。一方で No 6 株では製麹時間が異なっても活性の pH 依存性に変化は見られなかった。また焼酎用菌株 (No. 11, 12 株)では他の菌株と比較しても ADC 活性が低かった。以上の結果から、ADC 活性を示す酵素は複数あり、その有無や発現時期などが株ごとに異なると予想された。各麹菌株を用いた糖化液中では顕著に Agm 生産性が異なることが示された。例えば吟醸用 No. 1 株や清酒用菌株 (No. 2~5 株) の製麹 91 時間の麹菌を用いると Agm 生産性が高くなることが認められたが、同じ清酒用でも製麹時間が変化しても Agm 生産性が高くない株 (No. 6 株) も存在した。また、味噌用 (No. 7, 8 株) や味噌・甘酒用 (No. 9, 10 株) でも製麹 91 時間の麹菌を用いると Agm の蓄積が見られた。一方、他の菌株と比較しても ADC 活性が低かった焼酎用菌株 (No. 11, 12 株)では Agm 生産量は著しく低かった。今回の結果から、麹菌株間では顕著に Agm 生産性が異なり、糖化液中の Agm 量は製麹過程で発現する低 pH 依存性 ADC 活性と関係していることが示された。

(1) Akasaka N et al. 2018. Appl Environ.Microbiol., 17;84.

Key words *Aspergillus oryzae*, agmatine, arginine decarboxylase, polyamine, Koji

G2H4 (0213) *Aspergillus oryzae* が持つアルギニン脱炭酸酵素の探索

○村上優衣[1], 吉岡美沙[2], 米田大貴[2], 赤坂直紀[2], 福田青郎[1,2,3], 藤原伸介[1,2,3]*
([1]関西学院大 理工, [2]関西学院大院 理工, [3]関西学院大 生命環境)

Isolation of Arginine Decarboxylase from *Aspergillus oryzae*

○Yui Murakami[1], Misa Yoshioka[2], Hiroki Yoneda[2], Naoki Akasaka[2], Wakao Fukuda[1,2,3], Shinsuke Fujiwara[1,2,3]*
([1] Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [3] Sch. Biol. Environ. Sci., Kwansei Gakuin Univ.)
fqg47320@kwansei.ac.jp

【背景と目的】アグマチンは神経疾患や記憶・学習障害を緩和するポリアミンである。*A. oryzae* は低 pH 下で固相培地特異的にアグマチンを生産する [1]。ところが、その合成酵素であるアルギニン脱炭酸酵素 (ADC) の遺伝子オルソログはゲノム上に存在しない。そのため構造が似ている塩基性アミノ酸の脱炭酸酵素 (オルニチン脱炭酸酵素、リジン脱炭酸酵素など) が代替酵素として働いているのではないかと予想される。本研究では、*A. oryzae* RIB40 由来の ADC の同定を目的とし、高発現する部位 (気菌糸または栄養菌糸部分) の探索を行い、天然型 ADC の精製を試みた。

【方法】米 300g を製米し、*A. oryzae* RIB40 を用いて 45 時間培養し製麹した試料を、気菌糸、栄養菌糸部分に分け、局在性を検証した。次に栄養菌糸を含む画分を液体窒素と乳鉢を用いて砕き、さらに超音波処理を施すことで完全に破砕した。破砕液を用いて、様々な濃度の硫安で塩析し、分画条件を探った。活性が確認された画分について、陰イオンクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーによって活性画分を濃縮した。得られた酵素液を用いて、ADC 候補分子の生化学的特性の解析をおこなった。

【結果と考察】ADC の局在性を知るためにアルギニン脱炭酸活性を指標にして調べたところ、米の内側に伸長する栄養菌糸に高い活性がみられた。一方で気菌糸画分の活性は低かった。このことから ADC は蒸米に入り込む菌糸で高発現していると考えられる。粗酵素液を硫安分画したところ、60-80%飽和画分で高い ADC 活性が確認された。この画分を用いて Q カラムを用いた陰イオンクロマトグラフィーを行い、さらに Superdex200 によるゲル濾過クロマトグラフィーを行った。活性画分を用いて SDS-PAGE を行ったところ、約 45kD の分子質量のところに明瞭なバンドを確認することができた。この画分の pH 依存性を調べたところ、pH 3-11 で ADC 活性を示し、pH 4 で最大となった。このことから本酵素は *A.oryzae* の酸耐性に関与することが示唆された。

(1) Akasaka N. et al., Appl. Environment. Microbiol. 84: e00722 (2018)

Key words Agmatine, Arginine, *Aspergillus oryzae*, Polyamine

G2H4 (0301) 細胞内におけるヘムとヘムオキシゲナーゼ2の複合体形成を検出するバイオプローブ開発

武本美沙希, 坂本 寛, ○平 順一*
（九工大院・情報工）

Development of fluorescence-based bioprobe detecting heme-heme oxygenase 2 complex forming

Misaki Takemoto, Hiroshi Sakamoto, ○Junichi Taira*
(Kyushu Inst. Technol.)
taira@bio.kyutech.ac.jp

ヘムオキシゲナーゼ（HO）はヘムを酸化的に分解し、ビリベルジン、鉄、一酸化炭素（CO）を生成する。HO には誘導型の HO-1 と構成型の HO-2 の 2 種類のアイソフォームが知られ、HO-1 は酸化ストレスからの標的臓器や組織の保護、回復に重要な役割を果たしている。一方、HO-2 は精巣や脳を中心として全身に広く発現し、その生理的役割は長く不明であったが、一酸化窒素などと同様に、ヘム分解の生成物である CO がガス状シグナルメディエータとして機能する可能性が示されて以降、生体内での CO の供給源として、細胞内シグナリングに関わる可能性が指摘されている。HO-2 は構成型であることから、酵素活性はタンパク質レベルで調節を受けると考えられるが、HO-2 の活性を調節する因子や調節機構に関する知見は十分に蓄積されていない。本研究では、細胞内において HO-2 とヘムの結合を評価可能とするバイオプローブの開発を目指した。ヘム分解における最重要ステップである HO-2 に対するヘムの結合を評価可能とするバイオプローブは、HO-2 の酵素活性の調節機構の解明に有用なツールとなるものと期待される。

高感度緑色蛍光タンパク質（EGFP）をラット HO-2 の N 末端に結合させた融合タンパク質を作成し、構造の最適化を行った。HO-2 は HO-1 と比較すると、N 末端に機能未知の伸長配列を有する。これを除去することで検出感度を上げ、また、活性中心への変異導入によって、ヘム結合能を保持しつつヘム分解活性を除去することに成功した。このバイオプローブは EGFP-Δ19/D159H と名付けた。

EGFP-Δ19/D159H を COS-7 細胞内にて発現させ、ヘムプローブとしての機能評価を行った。5-aminolevulinic acid による細胞内でのヘムの生合成の亢進は、EGFP-Δ19/D159H が検出可能であることが示唆された。また、我々はこれまでに、HO-2 によるヘムの分解が、カベオラを構成する主要タンパク質として知られる caveolin-1 の細胞内領域 [CAV(1-101)] により競合的に阻害されることとを明らかとしている。これをふまえ、CAV(1-101) の発現による影響を評価したところ、EGFP-Δ19/D159H に対するヘムの結合が、CAV(1-101) の発現量に対応して低下することを確認した。この結果から、細胞内において caveolin-1 が HO-2 に対するヘムの結合を阻害し、ヘム分解における負の調節因子として機能することが示唆された。

Key words 5-aminolevulinic acid, caveolin-1, fluorescence bioprobe, heme oxygenase 2

G2H4 (0302) 気相刺激法を利用した悪臭応答ヒト嗅覚受容体の同定と実用的な阻害剤探索

○福谷 洋介[1]*, 阿部 雅司[1], 斉藤 遥[1], 江口 諒[2], 田澤寿明[2], 松波 宏明[3], 養王田 正文[1]
([1]農工大・院工・生命工, [2]エステー株式会社, [3]Duke 大・医)

Identification of malodor-responsive human odorant receptors and discovery of practical inhibitors using vapor stimulation assay

○ Yosuke Fukutani[1]*, Masashi Abe[1], Haruka Saito[1], Ryo Eguchi[2], Toshiaki Tazawa[2], Hiroaki Matsunami[3], Masafumi Yohda[1]
([1]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.filiation, [2]Research Section, R & D Division, S.T. Corporation, [3]Dept of Mol. Genet. and Microbiol., Duke univ.)
fukutani@cc.tuat.ac.jp

揮発性硫黄化合物(Volatile Sulfur Compound: VSC)であるメチルメルカプタンや硫化水素は悪臭防止法第に基づき特定悪臭物質に指定されている。VSC の悪臭は嗅覚閾値が低く、VSC の悪臭抑制技術開発は長年の課題となっている。VSC に応答するヒト嗅覚受容体（Odorant receptor, OR）の同定は VSC が常温気体という性質などから、OR 発現細胞を用いた従来のレポータージーンアッセイによるスクリーニングは困難である。そこで、演者らが開発した Vapor stimulation assay 法(1)を基盤に、VSCs に応答するヒト OR の探索を試みた。その結果、メチルメルカプタンと硫化水素ともに応答するヒト OR を 2 種、硫化水素のみに応答するヒト OR を 1 種同定した。さらに同定したヒト ORs の VSC 応答を抑制する香料の探索を行った。100 種以上の香料に対して、OR のメチルメルカプタン応答抑制作用の有無を検証ところ、OR のメチルメルカプタン応答を抑制する数種の香料を発見した。発見した香料とメチルメルカプタンの混合ガスに対してヒト官能評価試験を行ったところ、OR 応答を抑制した香料のメチルメルカプタン臭抑制作用は他の香料と比較し効果が高かった。以上のことから、ヒト OR を導入した Vapor stimulation assay 法は常温気体の分子に対して適応可能であり、実用的な香料探索研究にも活用できることが確認された。

(1) Kida, Fukutani et al., *Nat Commun*. 9(1):4556 (2018)

Key words Volatile sulfide, Odorant receptor, Antagonist, Deodorant

G2H4 (0303) 量子ドットを包埋したハイブリットナノアーキテクチャーの作製と抗 HEV 抗体の検出への応用

Akhilesh Babu Ganganboina[1]、竹村謙信[2]、Wenjing Zhang[3]、李 天成[3]、○朴 龍洙[1,2]
（[1]静大・グリーン科技研、[2]静大院・自科教・バイオサイエンス、[3]ウイルス第 2 部・国立感染研）E-mail: park.enoch@shizuoka.ac.jp

Quantum dots-encapsulated hybrid nanoarchitecture for anti-HEV antibody detection

Akhilesh Babu Ganganboina[1], Kenshin Takemura[2], Wenjing Zhang[3], Tian-Cheng Li[3], ○Enoch Y. Park[1,2]
(Res. Inst. Green Sci. Technol. Shizuoka Univ., Japan[1], Dept. Biosci., Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., Japan[2], Dept. Virol. II, Nat' l Inst. Infect. Dis., Japan[3])
E-mail: park.enoch@shizuoka.ac.jp

【目的】量子ドット（QD）をウイルス様粒子（VLP）に組み込んだウイルスキャプシドーナノ粒子ハイブリッド構造は、新しいタイプのバイオナノアーキテクチャーとしてさまざまな分野に応用が期待できる。本研究では、in vitro で無機 QD を E 型肝炎ウイルス様粒子（HEV-LP）に詰め込み、QD をカプセル化したハイブリットナノアーキテクチャーを作製し、抗 HEV 抗体検出用の蛍光バイオセンサーの構築を目指した。
【方法】HEV-LP は組換えバキュロウイルス発現システムによって発現し精製した。分解した HEV-LP を QD と混合させ VLP の自己組織化を行い、QD をカプセル化した QDs@HEV-LP を得た。さらに抗 IgG を結合した磁気ナノ粒子（anti-IgG-MNP）を作製し、抗 HEV 抗体の存在下で QDs@HEV-LP と anti-IgG-MNP は結合させ、夾雑物から標的抗体を磁気分離し、QD の蛍光を測定することで抗 HEV 抗体を定量化した。本法を用いて HEV に感染したサルの血清から抗 HEV 抗体の検出を行った。
【結果】G5 HEV に感染したサルのシリーズ血清から抗 HEV 抗体の検出に成功した。抗 HEV 抗体濃度は 12 dpi から増加し、19 dpi には 54.5 pg/mL、40 dpi に 110 pg/mL に達した。サルの糞便サンプルからの RNA コピー数は 16 dpi に最大値になり、抗体の産生により中和され 32 dpi 以後 HEV 陰性であった。標的抗体を他の 6 種類の抗体と混合して検出したところ、他の抗体の影響は認められなかった。本検出系の検出感度は 87 fg/mL であった。QD をカプセル化した QDs@HEV-LP を抗 HEV 抗体検出に使用したのは世界初めての成果であり、本法は臨床診断研究における高感度で特異的な抗体検出のための効率的手法であると考える。

Key words Virus-like particle, Hepatitis E virus, quantum dot, antibody

G2H4 (0304) シアノバクテリアにおける NADP(H)の正確定量

○田中謙也[1,2]*, 嶋川銀河[2,3], 草間翔子[2], 松田真実[4], 蓮沼誠久[1,4], 中西周次[2]
（[1]神戸大学先端バイオ工学研究センター, [2]大阪大学大学院基礎工学研究科附属太陽エネルギー化学研究センター, [3]関西学院大学生命環境学部, [4]神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科）

Highly-accurate quantification of NADP(H) in cyanobacteria

○Kenya Tanaka[1]*, Ginga Shimakawa[2,3], Shoko Kusama[2], Mami Matsuda[4], Tomohisa Hasunuma[1,4], Shuji Nakanishi[2]
([1]EGBRC, Kobe Univ., [2] Grad. Sch. Eng. Sci. RCSEC, Osaka Univ., 3, Sch. Biol. Environ. Sci., Kwansei-Gakuin Univ. 4, Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
tanaka@emerald.kobe-u.ac.jp

微細藻類の代謝状態を理解するためには、広範な代謝反応の酸化還元補因子である NADP(H)の定量的知見は重要である。光合成によって $NADP^+$を還元して NADPH を生成する微細藻類では、光条件に依存して NADP(H) ($NADP^+$と NADPH)の量比は変化する。しかし、シアノバクテリアにおいて、これまで報告された NADP(H)の定量では抽出時の光条件が明確に記載されておらず、測定値には大きな差異がある。
本研究では、*Synechocystis* sp. PCC 6803 に対して新たにフェノール抽出法を適用し、NADP(H)のレドックス比の光応答を調べた。野生株において、フェノール抽出法で得られた NADPH 量が NADP(H)量に占める割合は、暗順応状態で 42%、光照射条件で 68%、消灯直後で 32%であった。一方、NADPH の光依存的な増減は NADPH の自家蛍光を利用して *in vivo* で半定量的に測定できる。野生株において NADPH の蛍光レベルは光照射によって増加し、消灯後に最低値を示した。この挙動はフェノール抽出の結果と定性的に一致している。さらに NADPH の蛍光挙動が野生株と異なる NAD(P)H デヒドロゲナーゼ変異株においても、フェノール抽出法で得られた NADP(H)量比の光応答は NADPH 蛍光挙動と一致した。これらのことはフェノール抽出法によって素早く光合成および代謝状態がクエンチされ、細胞内 NADP(H)の変化を定量できたことを示している(1)。さらにフェノール抽出サンプルのメタボローム解析を行い、明暗変化によって起こる代謝変化を捉えることに成功した。
(1) Tanaka K, et al. *Photosynth Res* **148**, 57-66 (2021)

Key words NAD(P)H, phenol, cyanobacteria, redox

G2H4 (0305) 歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* 添加によるデンタルバイオフィルムの悪性化に寄与する代謝物の調査

○仙田 貴大[1], 久保庭 雅恵[2], 福崎 英一郎[1,3,4], 新間 秀一[1,3,4]*
（[1]阪大院工・生物工学, [2]阪大院歯・予防歯科, [3]大阪大学先導的学際研究機構, [4]大阪大学島津分析イノベーション協働研究所）

Investigation of metabolites contributing to the pathogenicity of dental biofilm by addition of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*

○Takahiro Senda[1], Masae Kuboniwa[2], Eiichiro Fukusaki[1,3,4], Shuichi Shimma[1,3,4]*
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Preventive Dentistry, Grad. Dent., Osaka Univ., [3] Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, [4] Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

口腔細菌はバイオフィルムと呼ばれる細菌の集合体を形成する．バイオフィルム内では低分子化合物を媒介とする細菌間コミュニケーションが繰り広げられている．歯周病菌の一種である *Porphyromonas gingivalis* は，歯周病におけるキーストーン病原体として知られており，低い存在比率であってもバイオフィルム内の病原性細菌の割合を高めることでバイオフィルムの悪性化に大きく寄与すると考えられている．そこで本研究では *Porphyromonas gingivalis* の存在がバイオフィルム悪性化を促進するメカニズムの一端を明らかにすることを目的とし，バイオフィルムの直接分析が可能である質量分析イメージング法（mass spectrometry imaging: MSI）を用いて解析を行った．分析対象物質には，細菌間コミュニケーションに用いられるシグナル分子として知られる3種のポリアミン（Putrescine, Spermidine, Spermine）を選択し，*Porphyromonas gingivalis* を含まない健全な口腔状態時のバイオフィルムと *Porphyromonas gingivalis* が存在する悪性化したバイオフィルムモデルを in vitro で構築し，比較を行った．
本研究では，MSIを適応するにあたり，バイオフィルムをメンブレン上に形成させる方法を試みた．しかし，バイオフィルムの薄さとバイオフィルムがメンブレンから剥離することが問題になった．そこで菌液の濃度と培養液量の調整を行い，本研究に適した培養方法を確立した．イメージング分析の結果では，悪性化したバイオフィルムでは健全な口腔状態時のバイオフィルムに比べ，3種のポリアミンともがバイオフィルム全体から高い強度で検出された．このことから，ポリアミンが仲介する細菌間コミュニケーションにより，バイオフィルムが悪性化する可能性が示唆された．

Key words mass spectrometry imaging, periodontal disease, biofilm, polyamine

G2H4 (0306) 磁気ナノ粒子による金ポリアニリンベース電気化学的ウイルスセンサーの感度向上

○敦賀健太[1],アンカンダッタチョードリー[2], 朴龍洙[1,2]*
([1]静大院・総合科技,[2]静大グリーン科技研)

Enhanced sensitivity of gold polyaniline based electrochemical virus sensor assisted by magnetic nanoparticles

○Kenta Tsuruga[1], Ankan Dutta Chowdhury[2], Enoch Y. Park[1,2]*
([1]Graduate School of Integrated Science and Technology ,Shizuoka univ , [2]Reserch Institute of Green Science and Technology, Shizuoka univ)
E-mail:park.enoch@shizuoka.ac.jp

インフルエンザウイルス（InV）は、発熱、頭痛、筋肉痛、関節痛、全身倦怠感、咳、鼻水などの症状を伴うインフルエンザを引き起こす可能性のあるウイルスである。インフルエンザは、高齢者や小児、慢性疾患を抱える患者などが感染すると重症化による入院や死亡のリスクが増加する。迅速で高感度な InV 検出法の開発は、インフルエンザの発生や拡大を防ぐ上で極めて重要である。現在、InV の検出においては、リアルタイム RT-PCR 法や Enzyme Immuno assay キットを用いた方法が用いられているが、操作の煩雑さや感度の問題がある。そこで本研究では、この問題を解決するために、迅速で高感度、簡便な InV の検出を、電気化学的手法を用いて行うこと及びこの検出法に磁気ナノ粒子による磁気分離のプロセスを加えることによる検出系のさらなる感度の向上を目的とした。ポリアニリンを電解重合によって金電極に堆積させた後に InV と特異的な抗体を修飾した N,S-グラフェン量子ドット-金ポリアニリン複合体を金電極上に修飾することによって作用電極を作製した。その後 InV との抗原抗体反応による電極の InV 依存性インピーダンス値を指標に調査を行った。実験の結果、1 pg/ml～1 ng/ml のウイルス濃度範囲においてインピーダンス値を指標にウイルスを検出した。また、抗体を修飾した磁気ナノ粒子を作製し、標的 InV の磁気分離を行った後に電極を用いた検出を行ったところ通常の検出法と比べて検出シグナルが50%程度向上した。以上の結果は、この検出法の臨床検査への応用の可能性を示唆するものである。

Key words biosensor, virus detection

G2H4 (0307) 食品偽装抑止を目的とした果菜類への元素塗布によるマーキングシステムの開発

○黒木 佑真[1], 楠 香奈[2], 福崎 英一郎[1,2,3*]
([1]阪大院・工, [2]大阪大学先導的学際研究機構, [3]大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)

Development of a marking system to prevent food fraud by means of applying elements to fruit vegetables

○Yuma Kuroki[1], Kana Kusunoki[1], Eiichiro Fukusaki[1,2,3*]
([1] Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2] Industrial Biotechnol. Initiative Div., Inst. for Open Transdisciplinary Res. Initiatives, Osaka Univ., [3] Osaka Univ. Shimadzu Omics Innov. Res. Laboratories)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

農作物の食品偽装を抑止するため，農作物由来の DNA や代謝物，元素を分析する手法が提案されてきたが，食品偽装抑止のための確実な手法は存在しない．食品偽装を抑止するためには，農作物自体に不可分な状態で農産物情報を付随させ消費者まで届ける形式が望ましい．本研究では、元素塗布によるマーキングシステムの開発を目的とする．当該システムでは，フィンガープリントとして濃度の異なる複数のマーカー元素溶液を調製し，果菜類の非食部に塗布し，不可分の形で流通させる．元素溶液が塗布された農作物の非食部を元素分析し，元素の濃度比を観測し，暗号解読することにより，個々の農作物固有の情報を知ることができる．

マーカー元素の条件として，果菜類の非食部に微量しか含まれていないことが挙げられる．そこで，トマトの非食部であるヘタに対し，誘導結合プラズマ質量分析計を用いて元素分析を行ったところ，13 元素がマーカー候補として見つかった．元素塗布法を検討するため，元素溶液を塗布したトマトのヘタに対し，同様に元素分析を行ったところ，再現良く元素を塗布できたことが分かった．今後は，安全性と誤差範囲を考慮し，サンプル間の区別が可能となる濃度比を決定する予定である．

Key words Food fraud, Marking system, Fruit vegetables, Element analysis

G2H4 (0308) 糖尿病等の血糖値制御に関わるグルカゴン検出プローブの開発

○重藤 元*, 鈴木 祥夫, 山村 昌平
（産総研・健康医工学）

Glucagon binding peptides for specific and sensitive detection of glucagon

○Hajime Shigeto*, Yoshio Suzuki , Shohei Yamamura
(Health and Medical Res. Inst., AIST)
hajime.shigeto@aist.go.jp

グルカゴンは血中のグルコース濃度の低下に応答して膵臓の α 細胞から分泌され血糖値を上昇させる作用を持つペプチドホルモンである。近年、グルカゴンのシグナル伝達を阻害したマウスを用いた解析により、血糖値の維持にはインスリンよりもグルカゴンが大きな役割を担っているとするグルカゴン中心説も提唱されている。また、グルカゴンは血糖値の上昇以外にもアミノ酸分解に関わるなど、様々な機能が報告されており、その重要性が再認識されている。

しかしグルカゴンは一般的な ELISA などの従来法では高感度かつ特異的に検出することが困難である。グルカゴンはプログルカゴンから切断され成熟体となるが、切断箇所により類似のアミノ酸配列を有する様々なペプチドが生産される。そのため、抗体を用いた ELISA 等の検出方法では偽陽性が検出される。特に類似体の中には GLP-I やオキシントモジュリンといった血糖値の低下に寄与するホルモンが存在しており、これらのペプチドを切り分けて検出を行うことは重要である。また ELISA 等で検出を行うためには解析に 1 日以上の時間が必要であることから、簡易迅速な検出方法も求められている。

生体内でのグルカゴンはグルカゴン受容体に結合することでシグナルを細胞内に伝達する。グルカゴン受容体は 7 回膜貫通型受容体であり、グルカゴンは細胞外ドメインに結合した後、膜貫通部位に挿入されることで受容体と結合する。グルカゴン受容体は特異性高くグルカゴンを認識することから、その認識部位を利用することで、特異性の高いプローブを作製が可能であると考えた。本研究では、抗体に依らない新しいグルカゴン検出プローブの開発のために、グルカゴン受容体配列からグルカゴン結合ペプチドをスクリーニングし、見出したグルカゴン結合ペプチドに環境変化に応答して蛍光強度変化を起こす蛍光色素を修飾することでグルカゴン検出プローブの開発を行った。開発したプローブのグルカゴン検出能を検討したところ、検出下限は 50 nM であり、市販の ELISA を超える特異性を有することが分かった。今後さらにプローブのアミノ酸配列を検討することで、さらなる検出感度と特異性を有するプローブの開発が期待される。ELISA を超える検出感度を実現することで、将来的に簡易迅速、高精度な血中グルカゴン検査、糖尿病診断法への応用が期待される。

Key words glucagon, glucagon receptor, glucagon binding peptide, hormone, diabetes, homogeneous assay

G2H4 (0309) サンプリング操作不要の簡易固体表面核酸検出法開発

○舟橋 久景[1]*, 波多野 浩也, 黒田 章夫 (広島大院・統合生命科学)

A simple detection of specific nucleic acids on a solid surface without sampling procedure

○Hisakage Funabashi[1]*, Hiroya Hatano, Akio Kuroda
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)
hisafuna@hiroshima-u.ac.jp-mail

特定配列核酸の検出は、疾病診断、食品検査など様々な分野で必要とされる重要な技術である。検出法は多岐にわたるが、その原理のほとんどは、水溶液中の反応を利用する。したがって、多くの場合「対象物をサンプリングして水溶液へ抽出してから」解析・検出するステップを経る必要がある。しかし近年では、特定生物種の存在痕跡を検出する環境 DNA 検査や、病原体の接触感染検査など、「固体表面に存在する核酸を直接検出できれば、より有益な情報が得られそうなニーズ」も存在する。そこで本研究では、固体表面に存在する核酸をサンプリングすることなく、そのままの状態で簡便に検出する方法の基礎技術開発を目指した。

当研究室では、標的核酸を認識すると構造変化を起こす DNA ナノピンセット構造体（DNA Nano-Tweezers: DNA-NT）とその利用法を開拓している。この構造体は、二つの標的認識部位が、標的核酸上の連続した配列を認識することによって、ピンセット構造が開いた状態から閉じた状態へと変化する。この構造変化をシグナル産生能制御に利用すれば、標的を認識した場合のみシグナルを産生するバイオセンシング分子が開発可能である。これまでに、標的認識に伴う構造変化を用いて、分割核酸酵素（ヘミン存在下でペルオキシダーゼ活性を示す G-quadruplex）の活性を制御する Split-Gq-based DNA-NT の開発に成功している(1)。そこで本研究では、この Split-Gq-based DNA-NT をヘミンとともに固体表面へスプレーで吹きつけることにより、標的核酸が存在する箇所が強いペルオキシダーゼ活性を示すようになると考えた。

濾紙に標的核酸モデルをスポットし乾燥させた。次に、標的核酸モデル検出用 Split-Gq-based DNA-NT とヘミンの混合溶液をスプレーにより噴霧した。さらにルミノール反応液を噴霧した。ただちに濾紙を暗箱に入れ、市販のデジタルカメラを用いて撮影を行った。その結果、標的核酸モデルをスポットした箇所から、ルミノール反応に起因すると考えられる強い発光が生じている画像の撮影に成功した。このことから、Split-Gq-based DNA-NT とヘミンを噴霧することによって、固体表面に存在する核酸をサンプリング等の操作なしに簡便に検出可能であることが示唆された。

(1) K. Nakatsuka, H. Shigeto, A. Kuroda, H. Funabashi, *Biosens. Bioelectron.*, 74, 222–226 (2015)

Key words バイオセンシング分子, DNA-NT, DNA 検出, Point of care testing

G2H4 (0310) シグナリングプローブ方式 DNA マイクロアレイによる簡易迅速な微生物検出法の開発

○武内日陽里[1], 宇野晴香[1], 田口朋之[2], 蓼沼崇[2], 平川祐子[2], 吉野知子[1], 前田義昌[1], 松永是[1], 田中剛[1]*
([1]東京農工大院・工, [2]横河電機株式会社)

Development of the simple and rapid method to detect the microbial genes with the signaling probe-based DNA microarray

○Hiyori Takeuchi[1], Haruka Uno[1],Tomoyuki Taguchi[2], Takashi Tadenuma[2], Yuko Hirakawa[2], Tomoko Yoshino[1], Yoshiaki Maeda[1], Tadashi Matsunaga[1], Tsuyoshi Tanaka[1]*
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Yokogawa Electric Company)
tsuyo@cc.tuat.ac.jp

マイクロアレイ解析は、食品や化粧品などの製造現場における微生物検出・同定法として利用されている。しかしながら、従来のマイクロアレイ法は、核酸抽出、標的核酸の増幅、蛍光標識、ハイブリダイゼーション、マイクロアレイの洗浄という煩雑な操作が含まれる。そこで当研究室では、マイクロアレイ解析の簡易化と迅速化を目的とし、標的核酸の増幅と蛍光標識、及びマイクロアレイの洗浄の 3 工程が不要なシグナリングプローブ方式の DNA マイクロアレイを開発した。シグナリングプローブ方式 DNA マイクロアレイでは、シクロオレフィンポリマー基板上で蛍光分子 Cy3 を修飾した蛍光プローブと消光分子 BHQ2 を修飾した消光プローブが二本鎖を形成している。Cy3 と BHQ2 が近接した状態では、フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) により Cy3 蛍光が消光している。ここに標的核酸を添加することで、標的配列に相補的な検出配列を有する消光プローブと優先的に二本鎖を形成する。その結果、蛍光プローブと消光プローブが解離し Cy3 蛍光が回復する。この蛍光を読み取ることで微生物を検出する。これまでに、シグナリングプローブ方式 DNA マイクロアレイによる大腸菌由来ゲノム DNA の検出が可能であることを実証した。しかしながら、検査結果の有効なフィードバックの実現には、検出工程の簡略化だけでなく菌種の判別に向けた検出パラメータの拡充が課題であった。そこで、ゲノム DNA に加わる新規検出パラメータの一つとして rRNA に着目した。rRNA には、古くから微生物に広く塩基配列が保存されている領域が複数存在する。この保存領域に挟まれた RNA 配列は、属や種として分類される特異的な集団内で一致しているため、rRNA は菌種判別に有用性があると考えられる。また、rRNA は細胞内存在量がゲノム DNA の 10^4〜10^5 倍程度であることから検出限界の向上が期待できる。そこで本研究では、シグナリングプローブ方式 DNA マイクロアレイによる微生物由来 16S rRNA、及び 5S rRNA の検出が可能であるか検証した。複数菌種から抽出した RNA を用いてハイブリダイゼーションを行ったところ、蛍光強度は添加した RNA 濃度に依存して増加することが確認できた。以上の結果から、微生物 RNA を標的とした簡易かつ迅速な微生物検査が可能であることが示された。

Key words 16S rRNA, 5S rRNA, microarray, PCR-free detection

G2H4 (0311) Development of binary responsive virus biosensor using chromogen-encapsulated polymeric nanocarrier

○Indra M. Khoris[1], Akhilesh B. Ganganboina[2], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Development of binary responsive virus biosensor using chromogen-encapsulated polymeric nanocarrier

○Indra M. Khoris[1], Akhilesh B. Ganganboina[2], 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

In the last decade, emerging and re-emerging infectious disease-viral agents have been a worldwide issue due to theirs co-existing infection within the same area. However, available immunoassay is based on the signal generation to single virus detection in the reaction chamber. An adaptive strategy is required to enable the recognition of multiple viruses for diagnostics and surveillance. The aim of this study is to develop colorimetric immunoassay for subtype detection of Influenza virus (IV/A). Instead of relying on an enzyme–substrate chromogenic mechanism, such as ELISA, the signal generation is shown by the group of chromogens which are responsive to a single stimulus, and each chromogen exhibits a unique signal, such as a pH-sensitive indicator substrate. The chromogen-dependent biosensor can bridge the transition from the single signal to the multiple response biosensor. Associating the multiple responses in a single readout translates more details on the viruses in the sample. In this work, a nanocarrier is deployed to bring specific signal amplification into the biosensor, depending on the target viruses. The nanocarrier is designed using pH-sensitive polymeric nanoparticle-laden nanocarriers (PNLNs) prepared by nanoprecipitation. After the PNLNs containing chromogens are conjugated to specific IV/A/H1N1 or IV/A/H3N2, the anti-subtypes IV/A antibodies-conjugated PNLNs (Ab-PNLNs) and anti-IV/A antibody-conjugated magnetic nanoparticles (Ab-MNPs) were added to the virus sample. The enriched PNLNs/virus/MNPs sandwich structure is treated in an alkaline solution to trigger the color signal. To analyze the result, the derivative absorbance is used to discriminate both color signals and the binary biosensor shows feasible detection on IV/A with excellent specificities of PP@PNLNs on IV/A/H1N1 and TP@PNLNs on IV/A/H3N2 with LODs of 27.56 and 28.38 fg mL^{-1}, respectively. It intrigues the distinguished analytical signal for one-step subtype influenza virus detection.

Key words: colorimetric, biosensor, nanocarrier, nanoprecipitation, diagnostic, immunoassay

G2H4 (0312) mini-G タンパク質およびグラフェンセンサーを利用した哺乳類嗅覚受容体のリガンド検出技術開発

○高山郁美[1], 福谷洋介[1], 吉井智哉[2], 生田昴[2], 前橋兼三[2], 養王田正文[1]
([1]農工大・院工・生命工, [2]農工大・院工・物理システム)

Development of ligand detection system of mammalian olfactory receptor using mini-G protein and graphene sensor.

○Ikumi Takayama[1], Yosuke Fukutani[1], Tomoya Yoshii[2], Takashi Ikuta[2], Kenzo Maehashi[2], Masafumi Yohda[1]
([1]Dept. of Biotechnol. Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]Dept. of Applied Physics. Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)
ikumi.takayama@yohda.net

哺乳類嗅覚受容体（Odorant receptor, OR）は、生物のニオイセンサーとして機能する G タンパク質共役型受容体（GPCR）である。嗅覚のニオイ検知の能力は感度、識別性ともに非常に優れるため、OR を活用した匂いセンサー開発が期待されている。一般に、 OR のリガンド探索を行う場合、OR 発現培養細胞を用い、OR のリガンド応答に伴うシグナル伝達下流で発現誘導されるレポーター遺伝子の活性を評価する手法がとられる。しかし、この手法は OR の精製タンパク質の機能解析には利用できず、汎用性のある新規 OR タンパク質アッセイ手法の開発が求められている。本研究では、OR の活性化後の最初のイベントである 3 量体 G タンパク質との結合に着目し、*in vitro* で合成した OR タンパク質におけるリガンド応答解析手法の確立を目的とした。方法としては、まず、非常にヒト OR52 ファミリーのコンセンサス配列からなり、高発現する hOR52 をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムによりプロテオリポソーム上に合成した。また、改変型 G タンパク質 α サブユニットである GFP-mini-Golf を組換え大腸菌から精製した。hOR52 発現リポソームと GFP-mini-Golf の混合溶液に、hOR52 のアゴニストを添加した。リポソーム画分を回収し、ウエスタンブロットを行ったところ、アゴニスト依存的な hOR52 と GFP-mini-Golf の相互作用を検出した。また、可溶化した hOR52 をグラフェンセンサーに搭載し、hOR52 のアゴニストを添加したところ、アゴニスト濃度に依存した電気抵抗変化の検出に成功した。以上から、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムにより合成した哺乳類 OR のリガンド応答検出を 2 つの異なる手法で成功した。現在、他のコンセンサス OR を含めた他の OR に対しても同様に評価可能か試験しており、その進捗も交えて報告する。

Key words Odorant receptor, GPCR, mini-G protein, Graphene sensor,

G2H4 (0313) 選択的機能破壊アッセイ系による芽胞の新規な発芽誘起物質の探索方法

○坂元 仁[1,2]*, 朝田 良子[1,3], 古田 雅一[1,3], 土戸 哲明[1]
([1]阪府大・微制研, [2]関西大・化生工, [3]阪府大院・工)

Screening of novel germination inducers of spores by selective function disruption assay system

○Jin J. Sakamoto[1,2]*, Ryoko Asada[1,3], Masakazu Furuta[1,3] and Tetsuaki Tsuchido[1]
([1]Res. Ctr. Microorg. Control, Osaka Pref. Univ., [2]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., and [3]Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ.)
jin.saka@kansai-u.ac.jp

我々は枯草菌芽胞の発芽の全容をわかった気になっていただけかもしれない。発芽における光学密度の低下にはコルテックス分解酵素だけでない複数の要因が絡んでいた。この発芽カスケードの上流因子や下流因子を場合分けした多重遺伝子破壊株の解析からノイズに邪魔されない発芽レセプターの独立した機能解析が可能になった。この選択的機能破壊アッセイ系は、新規な発芽剤の探索やその認識構造に関して多くの知見を提供するだろう。

〔背景〕枯草菌は飢餓条件下で芽胞（細菌胞子）と呼ばれるという耐久性細胞を形成する。発芽誘起物質により発芽し、栄養細胞となり、増殖を開始する。枯草菌の発芽には L-Ala による発芽に関与する GerA 系と、AGFK（L-アスパラギン、グルコース、フルクトース、K^+）による発芽に関与する GerB 系と GerK 系の発芽レセプターが報告されている。発芽過程の最終段階では 2 種類の主要コルテックス分解酵素 CwlJ と SleB の作用により芽胞特有の細胞壁であるコルテックスを分解して発芽後生長を経て栄養細胞となる。

我々はコルテックス分解酵素遺伝子（*cwlJ sleB ydhD yaaH*）4 重欠損とさらにそこへ発芽レセプター遺伝子（*gerAA gerAB gerAC gerBA gerBB gerBC gerKA gerKC gerKB*）の多重欠損の組み合わせの選択的機能破壊芽胞の発芽過程の解析から、コルテックス分解酵素非依存性の芽胞の光学密度低下現象を見出した。さらに発芽レセプターがこの光学密度の低下だけでなく、芽胞コア内に蓄積されたジピコリン酸の漏洩に関与している可能性が示唆された。発芽レセプターへの発芽誘起物質の受容とコルテックス分解酵素の活性化までのブラック・ボックスは不明であるが、発芽レセプター自体の機能評価にはこの選択的機能破壊芽胞システムは非常に有効なツールであると考えられた。20 種のアミノ酸の発芽能の再検証、AGFK 系の個々の 4 因子に関して光学異性体、無機イオン、糖類から発芽有機物質のスクリーニングに適用し、複数の新規な発芽誘起物質を検出した。枯草菌芽胞での発芽誘起物質の探索は散々やり尽くされたと考えられており、栄養源由来の新規な発芽誘起物質の報告は、1979 年の Moir らの L-Val を最後に途絶えていた。新規な発芽誘発物質の報告は 40 数年ぶりとなる。本システムは、発芽レセプターを標的にした発芽誘発物質、発芽阻害物質の探索、その認識構造の理解などへの貢献が期待できる。

Key words Spore, Germination, *Bacillus subtilis*, screening

G2H5 (0101) サーチュインが制御する *Ashbya gossypii* のリボフラビン生産

畔上純也[1]，狩野麻衣[1,3]，朴龍洙[1,2,3]，○加藤竜也[1,2,3]*
（[1]静大院・総合科技，[2]静大グリーン科技研，静大・農）

Sirtuins control the riboflavin production in *Ashbya gossypii*

Junja Azegami[1], Mai Kano[1,3], Enoch Y. Park[1,2,3], ○Tatsuya Kato[1,2,3]*
([1]Grad. Sch. Integr. Sci., Shizuoka Univ.
n, [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Fac. Agric., Shizuoka Univ.)
kato.tatsuya@shizuoka.ac.jp

糸状菌 *Ashbya gossypii* はリボフラビン生産することが知られており，工業的なリボフラビン生産にも利用されている．しかし，そのリボフラビン生産について不明な点が多い。以前に単離されたリボフラビン過剰生産変異株のゲノム解析により，サーチュイン遺伝子（*AgHST3*）へのミスセンス変異が認められた．したがって本研究では，サーチュインのリボフラビン生産への影響を調べた．まず始めにサーチュインの阻害剤であるニコチンアミド（NAM）を添加して，リボフラビン生産を確認した．5 mM の NAM を添加したところ，菌糸が濃い黄色を示し，リボフラビン生産量が約 4 倍上昇していた．しかし，ニコチン酸の添加では菌糸の色は変化しなかった．出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の 5 個のサーチュインアミノ酸配列から，*A. gossypii* には 4 つのサーチュイン遺伝子（*AgHST1*, *AgHST2*, *AgHST3*, *AgHST4*）が見出された．それぞれのサーチュイン遺伝子について遺伝子破壊株を作製したところ，*AgHST1*Δ, *AgHST3*Δ, *AgHST4*Δ株を単離できたが，*AgHST2* 遺伝子に関しては単離できなかった．*AgHST1*Δ, *AgHST3*Δ株の菌糸は野生株よりも濃い黄色を示し，リボフラビン生産量はそれぞれ約 4.3 倍，2.9 倍上昇していた．*AgHST3*Δ株と以前に単離されたリボフラビン過剰生産株において，ヒトサーチュイン 6（SIRT6）様活性が野生株に比べ減少しおり，ヒストン H3 の K9 および K56 のアセチル化（H3K9ac と H3K56ac）量が上昇していた．これらのヒストンのアセチル化は DNA 二本鎖切断（DSB）時に増加することが報告されており（Masumoto et al., Nature 436(7048):294–298, 2005; Yuan et al., Cell Cycle 8:1747–1753, 2009），DNA 二本鎖切断とリボフラビン生産の関係が示唆された．DSB 誘導剤であるカンプトテシンのリボフラビン生産への影響を調べた．50 μM 添加することで，H3K56ac 量が増加し，リボフラビン生産が約 1.4 倍上昇した．本研究により，*A. gossypii* において AgHst3 と DSB，リボフラビンの生産の関係が明らかになった。今後さらに，今までに報告のなかったサーチュインとリボフラビン生産の関係性の解明が期待される．

Key words *Ashbya gossypii*, Riboflavin, Sirtuin

G2H5 (0102) コリネ型細菌での二本鎖 RNA 生産系の構築とその生産 dsRNA 含有菌体の摂食による標的作物害虫の生育抑制

○羽城周平[1]*，三橋麻由[1]，千頭康彦[2]，川口はるか[2]，新美輝幸[2]，安枝寿[1]
（[1]味の素・バイオ・ファイン研，[2]基生研・進化発生）

Construction of recombinant double-stranded RNA production system in *Corynebacterium glutamicum* and growth inhibition of target crop pest by feeding on the dsRNA-producing microbes

○Shuhei Hashiro[1]*, Mayu Mitsuhashi[1], Yasuhiko Chikami[2], Haruka Kawaguchi[2], Teruyuki Niimi[2], Hisashi Yasueda[1]
([1]Res. Inst. Biosci. Prod. Fine Chem., Ajinomoto Co., Inc., [2]Evol. Dev. Biology, NIBB)
shuhei_hashiro@ajinomoto.com

【背景・目的】
二本鎖 RNA (dsRNA) は RNA 干渉作用による、農作物の高品質化や害虫駆除といった効果をもたらす環境低負荷な新規農業資材としての活用が見込まれている。一方、その目的とする dsRNA の大量製造技術は未だ確立されていない。そこで、コリネ型細菌を宿主とした目的 dsRNA の生産系について検討した。さらに、生産した dsRNA の機能を保持したままの生産菌の簡便な殺菌処理法を検討し、dsRNA を含む死菌体を対象害虫に投与することでその生育阻害効果を検証した。
【方法】
農業害虫ニジュウヤホシテントウ *Henosepilachna vigintioctopunctata* のアポトーシス阻害因子をコードする遺伝子 *diap1* を対象とし、その部分領域に対応する dsRNA (*diap1**-dsRNA) の生産を目指した。強力な転写活性の BFK20 ファージ由来 F1 プロモーターを対向配置した *diap1**-dsRNA の転写ユニットを高コピー数プラスミド pVC7H2[1])に搭載した pVC7H2-Hviap を構築した。dsRNA 分解酵素遺伝子を欠損した 2256LΔ*rnc* 株に pVC7H2-Hviap を導入し、*diap1**-dsRNA 生産菌として、その培養評価を実施した。次に、dsRNA 生産菌の殺菌処理法としてエタノール法等を検討した。害虫の生育評価として、殺菌処理した *diap1**-dsRNA 生産菌体を当該害虫の幼虫に摂食させた後、餌であるイモ葉へと幼虫を移し、その摂食量と幼虫体重の変化を記録した。
【結果・考察】
ジャーファーメンター培養の結果、*diap1**-dsRNA 生産量は培養液あたり 75 mg/L に達し、これまでに報告されてきた *E. coli* を宿主とした発現系と比較して高いことが示された。殺菌処理としてエタノール濃度 50%から 95%において、殺菌効果とともに菌体内 dsRNA の安定保持が出来ることが分かった。その殺菌処理した *diap1**-dsRNA 生産菌体を摂取した害虫の試験区で、葉の摂食量や幼虫の体重増加量の顕著な低下が確認され、目的 dsRNA 含有菌体による対象作物害虫の生育抑制効果が示された[2]。
1) *J. Biosci. Bioeng.*, **127**, 529-538 (2019)
2) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **103**, 8485-8496 (2019)

Key words dsRNA production, *Corynebacterium glutamicum*, corynephage BFK20, F1 promoter, high copy number plasmid, *Henosepilachna vigintioctopunctata*, *diap1*

G2H5 (0103) 皮膚常在菌培養液配合化粧品の品質改善に関する研究 ～皮膚常在菌培養液の臭気～

○多賀直彦*、森田拓弥（東海大・農）

Study on quality improvement of cosmetics containing skin-bacterium culture solution

○Naohiko Taga*, Takuya Morita (Sch. Agric., Tokai Univ.)
ntaga@agri.u-tokai.ac.jp

【背景・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いる。これらの皮膚常在菌は、皮脂、皮膚 pH、 温度などの影響をうけるが，常に皮膚上に存在している。皮膚常在菌は、宿主とたえず共生状態にあり、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。皮膚常在菌は、菌の増殖とともに匂いを放つ。本研究は、皮膚常在菌配合化粧水の品質改善を目的として、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis* の培養での臭いの発生について検討した。
【方法】使用菌株は、*Staphylococcus aureus* および *Staphylococcus epidermidis*、を用いた。使用培地は、702 液体培地、Peptone 溶液、Yeast extract 溶液、およびそれらを組み合わせたものを使用した。皮膚常在菌の培養は、初発 pH 2～9 に調整した 702 液体培地での培養および異なる組成の培地での培養を行った。培養分析は、培養液 pH、培養液濁度、臭いの程度、および臭いの発生時間とおよび消失時間を分析した。
【結果・考察】異なる初発 pH での培養は、初発 pH 5～9 では *S. aureus* および *S. epidermidis* 共に培養 24 h で pH 8 に収束した。臭いは、初発低 pH および初発高 pH で少なかった。これらは、培養液濁度が低く増殖が乏しかったため臭いが弱かったと考えられる。異なる組成の培地を用いた培養試験は、Yeast extract 溶液では、*S. aureus* の方が *S. epidermidis* よりも培養液濁度が高かった。Peptone 溶液では、その逆の結果が得られ、臭いは、Yeast extract 溶液で培養したものよりも Peptone 溶液で培養したものの方が臭いが強かった。これらの結果から、Peptone に臭いの原因があるのではないかと考えられた。702 液体培地以外の培養液濁度は、どの培地でも 702 液体培地よりも低かったため、培養液濁度が同じ条件で臭いの測定は出来なかった。培養での臭いの発生時間と消失時間を検討した結果、1 h 毎の培養液濁度と臭いの測定では、菌量の上昇と共に臭いも強くなるという結果が得られた。また臭いを認識した時間は 12 h であった。その後培養を続けていった結果、臭いを感じなくなったのは 40 h であった。培養時間 30 h 辺りから菌の凝集が見られはじめ、菌の凝集が見られはじめてから徐々に臭いが弱くなっていた。菌の凝集が培養液の臭いに影響することが示唆された。

Key words *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, odor, skin bacteria

G2H5 (0104) 黄麹菌のタンパク質品質管理機構における AoCdc48 の生理機能解析

○守田湧貴，竹川薫，樋口裕次郎*
（九大院・生資環）

Physiological analysis of AoCdc48 in the protein quality control system of *Aspergillus oryzae*

○Yuki Morita, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi*
(Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)
moritayuuki.538@agr.kyushu-u.ac.jp

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は有用酵素を菌体外へ大量に分泌できることから、醸造産業や有用異種タンパク質生産の宿主として利用されている。Cdc48 はユビキチン-プロテアソーム系(ubiquitin-proteasome system：UPS)のタンパク質分解経路全般に機能する AAA(ATPase associated with diverse cellular activities)型分子シャペロンであり、UPS に必須であることが知られている。そのため、細胞内の様々な生命現象を理解する上で Cdc48 は非常に重要な因子であり、生物種ごとに機能性に関する解析が行われている。しかし、糸状菌では Cdc48 の機能性および機能不全による影響は未だ十分に明らかとされていない。本研究では、*A. oryzae* の生育およびタンパク質高分泌生産性に対する AoCdc48 (Cdc48 in *A. oryzae*)の機能を明らかにすることを目的とした。
我々はこれまでに、生育が著しく抑制される *Aocdc48* 発現抑制時において、タンパク質分泌が可能であることを示している。この結果を踏まえ、α-アミラーゼと分泌小胞の細胞内局在に関して更なる解析を行った。その結果、α-アミラーゼは細胞壁での局在が確認されたが，分泌小胞は菌糸先端への極性が低下していることが明らかとなった。そのため、タンパク質分泌は行われているが、その分泌効率は低下している可能性が示唆された。そこで、解析可能な生育を示す AoCdc48 の ATPase 活性部位におけるアミノ酸点変異株を用いてα-アミラーゼの分泌生産量の解析を行った。その結果、変異株におけるα-アミラーゼの分泌生産量は対照株と比較して増加していることが明らかとなった。
次に、*Aocdc48* 過剰発現時における生育およびタンパク質高分泌生産性に関して解析を行った。まず、表現型解析ではコロニー形態、分生子数、気中菌糸長に異常が観察された。さらに、*Aocdc48* 過剰発現株における α-アミラーゼの分泌生産量は対照株と比較して低下していることが確認された。これらの結果から、*Aocdc48* の過剰発現によって AoCdc48 の機能が低下している可能性が示唆された。そこで、小胞体における UPS である小胞体関連分解(endoplasmic reticulum-associated degradation：ERAD)の基質分解能に関して解析を行った。その結果、*Aocdc48* 過剰発現時における ERAD 基質の細胞内蓄積量は対照株と比較して増加していることが確認された。
以上の結果により、*Aocdc48* の機能性は正常な菌糸生長と効率的なタンパク質高分泌生産に深く関与していることが明らかとなり、それらには AoCdc48 の細胞内存在量も重要である可能性が示唆された。また、今回のタンパク質分泌生産性に関する結果に対して Cdc48 の多機能性を考慮すると、タンパク質高分泌生産能に関連する UPS が ERAD 以外にも存在する可能性が考えられた。

Key words … *Aspergillus oryzae*, Cdc48, ERAD, secretion

G2H5 (0105) 新規 ω3 不飽和化酵素の解析ならびにそれらを活用した *Mortierella alpina* による EPA 生産

○糸川未来[1], 安藤晃規[1,2], 奥田知生[1], MO Brian King Himm[1], 中辻諒平[1], 竹本有貴[3], 池本裕之[3], 菊川寛史[4], 阪本鷹行[5], 櫻谷英治[5], 小川順[1,2]*
（[1]京都大院・農, [2]京大・生理化学, [3]日清ファルマ, [4]静県大・食栄, [5]徳島大・生物資源）

Characterization of novel ω3 fatty acid desaturases and their application toward eicosapentaenoic acid production in *Mortierella alpina*

○Miku Itokawa[1], Akinori Ando[1,2], Tomoyo Okuda[1], MO Brian King Himm[1], Ryouhei Nakatsuji[1], Yuki Takemoto[3], Hiroyuki Ikemoto[3], Hiroshi Kikukawa[4], Takaiku Sakamoto[5], Eiji Sakuradani[5], Jun Ogawa[1,2]*
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Nisshin Pharma, [4]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., [5]Grad. Sch. Technol, Industrial Social Sci., Tokushima Univ.)
itokawa.miku.56n@st.kyoto-u.ac.jp

近年、ω3 高度不飽和脂肪酸（ω3-PUFA）は、多彩な生理機能を有することから機能性食品や医薬品としての需要が増加している。これまで ω3-PUFA 源は魚油に依存していたが、純度や供給安定性などの面で課題があり、代替生産源の開発が活発化している。これまでに我々は、代替生産源として油糧糸状菌 *Mortierella alpina* の分子育種によるエイコサペンタエン酸 （EPA）の生産を報告してきたが、内在性の ω3 不飽和化酵素が低温でのみ活性化することから、生産性の観点で課題があった。そこで、本研究では、常温で EPA 生産を行うべく、常温下で ω3 不飽和化活性を示す酵素遺伝子を真菌を中心にスクリーニングし、常温下での EPA 生産を目指した。

常温下で EPA 蓄積が確認できる真菌を対象に、エイコサペンタエン酸（EPA）／アラキドン酸（ARA）比を指標としたスクリーニングを行なった結果、*Pythium sulcatum* と *Plectospira myriandra* を見出し、ω3 不飽和化酵素をコードする遺伝子 *psuω3* および *pmd17* をそれぞれの菌株から単離した。酵母発現系を用いた機能解析により、PSULω3 は炭素鎖長 18 および 20 の ω6-PUFA に対して、PMD17 は炭素鎖長 20 の ω6-PUFA 選択的に ω3 不飽和化酵素活性を示すことを明らかにした。続いて、*Mortierella alpina* に *psuω3* と *pmd17* を導入した結果、常温（28 ℃）条件下の培養において、EPA の蓄積が確認でき、それぞれ総脂肪酸中 38 %および 40 %に達した。本結果は微生物による商業的 EPA 生産への展開が期待できる成果である。

Key words *Mortierella alpina* , eicosapentaenoic acid, omega3 desaturase

G2H5 (0106) Cell factory for Gamma-aminobutyric acid biosynthesis using *Bifidobacterium adolescentis*

○Hend Altaib[1], Tomoya Kozakai[1], Yassien Badr[1,2], Hazuki Nakao[1], Mahmoud A. M. El-Nouby[3], Emiko Yanase[1], Izumi Nomura[1], and Tohru Suzuki[1]*
（[1]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, [2]Faculty of Veterinary Medicine, Damanhour University, [3]Faculty of Agriculture, Alexandria University）

Cell factory for Gamma-aminobutyric acid biosynthesis using *Bifidobacterium adolescentis*

○Hend Altaib[1], Tomoya Kozakai[1], Yassien Badr[1,2], Hazuki Nakao1, Mahmoud A. M. El-Nouby[3], Emiko Yanase1, Izumi Nomura[1], and Tohru Suzuki[1]*
（[1]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, [2]Faculty of Veterinary Medicine, Damanhour University, [3]Faculty of Agriculture, Alexandria University）
seibutsu@kougaku.ac.jp

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a potent bioactive compound with numerous physiological and psychological functions. *Bifidobacterium*, especially *B. adolescentis*, exhibits a strain-specific capacity for GABA production. Recently, GABA production using microbial cells has gained much interest. The catalog of bacterial cell factories for recombinant protein and amino acid production has been expanded. Finding new safe, efficient, and high-quality transformation platforms has been continuously investigated. Bifidobacteria are gram-positive, probiotic, generally regarded as safe bacterium with sufficient gene manipulation tools. Considering these features, in this study, we investigate the ability to use Bifidobacteria as an alternative transformation platform for GABA production. Fermentation parameters that scale up GABA production were observed, including substrate concentration, initial culture pH, and co-factor supplementation, using response surface methodology. Two recombinants with high production abilities, monitored by two different promoters, were focused. The optimum initial cultivation pH differed by changing the promoter. Original *gadB* promoter showed induction at acidic pH (4.4), while the constitutive *gap* promoter showed enhanced GABA production at pH (6.0) near neutral. Fed-batch fermentation was used to validate the optimum fermentation parameters, in which approximately 42 g/L GABA was produced. The conversion ratio of glutamate to GABA ranged between 92 to 100 %.
To our knowledge, this is the first report for such high GABA productivity from recombinant *B. adolescentis*. This study should pave the way for using *Bifidobacterium* as an efficient transformation platform for industrial production.

Key words *Bifidobacterium*, GABA, response surface methodology, microbial cell factories keyword.

G2H5 (0107) 大腸菌の呼吸鎖変異株ΔNDH-IΔCyt*bo*$_3$におけるグルタミン酸代謝系酵素の欠損がグルタミン酸異常蓄積に及ぼす影響

○今 壮太[1], 前田 智也[1], 吹谷 智[1], 和田 大[2], 横田 篤[1]*
（[1]北大院・農, [2]摂南大・農）

Effect of deleting genes encoding glutamate dehydrogenase or glutamate synthase on unusual glutamate production in *Escherichia coli* mutant defective in respiratory chain enzymes NDH-I and Cyt*bo*$_3$

○Sota Kon[1], Tomoya Maeda[1], Satoru Fukiya[1], Masaru Wada[2], Atsushi Yokota[1]*
([1]Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ., [2]Faculty of Agriculture, Setsunan Univ.)
yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp

我々は，大腸菌において，プロトン駆動力（PMF）形成能の高い二つの呼吸鎖酵素である，I 型 NADH 脱水素酵素（NDH-I）と，*bo* 型末端酸化酵素（Cyt*bo*）を同時に欠失させた変異株（ΔΔ株）が，生育の低下，中枢代謝の活性化及びグルタミン酸（Glu）を異常蓄積（50 g/L のグルコースから約 7 g/L）することを見出している．本研究では，ΔΔ株が通常の大腸菌株では見られない Glu を異常に蓄積するメカニズムを明らかにすることを目的とした．そこで，主要な Glu 生成経路である Glu 脱水素酵素（GDH）と Glu 合成酵素（GOGAT）に着目し，これらをΔΔ株から欠損させた株（ΔGDH 株及びΔGOGAT 株）を構築した．続いて，*Escherichia coli* W1485（野生株），ΔΔ株，ΔGDH 株及びΔGOGAT 株を用いて，ジャーファーメンターによるバッチ培養を行い，それぞれの株の生育及び代謝解析を行った．その結果，ΔGDH 株はΔΔ株とほぼ同程度の生育，糖消費及び Glu 生産量を示した．一方，GOGAT 欠損変異の導入により，ΔΔ株で見られた最大生育量の減少は部分的に回復したものの，糖消費及び Glu 生産量はΔΔ株と同程度であった．これらの結果から，ΔΔ株において GDH 及び GOGAT の単独欠損は，Glu の異常生産にはほとんど影響しないことが明らかとなった．続いて，ΔΔ株から GDH と GOGAT の両方を欠損させた株（ΔGlu 株）を構築したところ，ΔGlu 株はグルコース最少培地で増殖できず，Glu 要求性を示した．このことから，GDH と GOGAT 以外に Glu を生合成する経路は存在せず，ΔΔ株における Glu の異常生産においてもどちらか片方の酵素が存在すれば十分であることが明らかとなった．

Key words respiratory chain, central metabolism, redox balance, glutamate biosynthesis

G2H5 (0108) 定常期における大腸菌細胞の生理状態の解析

○加藤 節[1]*, 川畑 龍司[1], 青井 議輝[1], 中島田 豊[1]
（[1]広島大院・統合生命科学）

Physiological state of *Escherichia coli* cells in stationary phase

○Setsu Kato[1]*, Ryuji Kawabata[1], Yoshiteru Aoi[1], Yutaka Nakashimada[1]
([1] Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)
setsukato@hiroshima-u.ac.jp

【背景と目的】
自然環境において微生物細胞は栄養飢餓などの様々なストレスにさらされている。そのような環境下で細胞はどのように適応して生きながらえるのか、あるいは死滅するのだろうか。本研究では回分培養した大腸菌をモデルとして用い、定常期以降に細胞がどのような生理状態の変化を伴いながら死滅していくのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】
大腸菌を LB 培地で回分培養し、培養開始後 4 日間にわたり死菌率を測定した。同時に、定常期以降の細胞の生理状態の変遷を明らかにするため、細胞膜の恒常性、細胞内還元力、細胞内 ATP 濃度、タンパク質の生産能力を測定・評価した。細胞膜の恒常性と細胞内還元力については、個細胞をそれぞれ Propidium iodide (PI) 、5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) により染色することで測定した。細胞内 ATP 濃度については BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay（Promega）を用いて集団レベルで測定した。タンパク質生産能力については、発現誘導型プロモーター下においた Green Fluorescent Protein (GFP) の発現量を指標として個細胞レベルで評価した。

【結果と考察】
細胞の死菌率と PI 染色の結果を比較したところ、そのほとんどが死細胞である細胞集団において PI により染色される細胞の割合は 20%以下であった。ここから、再増殖能力を指標に死細胞と判断された細胞において、その多くでは細胞膜の恒常性は維持されていることがわかった。また、CTC 染色と ATP 濃度測定の結果から、一部の死細胞において細胞内還元力や細胞内 ATP が残存する可能性が示唆された。一方で、発現誘導により GFP を生産できる細胞の割合は生菌率と比例していた。以上の結果から、回分培養中での大腸菌の細胞死は膜構造の崩壊や細胞内還元力、ATP の枯渇によるものではなく、タンパク質合成能力の喪失に起因することが明らかになった。

Key words *Escherichia coli*, single-cell analysis, stationary phase

G2H5 (0109) 高いβ-グルカン生産能を持つ *Aureobasidium pullulans* の細胞壁構造の解析（一般公演用）

○谷本悟、尾島由紘、鈴木利雄、東雅之*
（阪市大院・工・化生系）

Analysis of cell wall structure of *Aureobasidium pullulans* with high β-glucan productivity

○Satoru Tanimoto, Yoshihiro Ojima, Toshio Suzuki, Masayuki Azuma*
(Dept. Appl. Chem. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)
azuma@osaka-cu.ac.jp

真菌の細胞壁主成分であるβ-グルカンには、食物繊維として腸管環境を整える機能の他にも、自然免疫の活性化作用などが知られている。*Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁成分であるβ-1,3-グルカンは、細胞内の UDP-グルコースを基質とする細胞膜酵素 Fks1 によって合成される。しかし、それらを細胞外に分泌できない。一方、Fks1 と相同な酵素によるβ-1,3-グルカン合成が推定されている *Aureobasidium pullulans* では、それらを細胞外に大量分泌できる。なお、*A. pullulans* のβ-1,3-グルカンにはβ-1,6-結合で分岐するグルコースが高頻度に存在することから、ここではβ-グルカンと表記する。我々は *A. pullulans* におけるβ-グルカン分泌機構を理解し、その機構を食品等に広く利用されている *S. cerevisiae* に導入することを目指している。本研究では、β-グルカンを高分泌する *A. pullulans* の細胞壁構造の解析を行い *S. cerevisiae* と比較した。

二形性真菌である *A. pullulans* を酵母および菌糸形態を誘導する培地で培養した結果、酵母形態誘導培地を用いた場合の方がβ-グルカン生産量が高かった。それら細胞の細胞壁画分を回収し、マンナン量、グルカン量、キチン量を分析し *S. cerevisiae* と比較した。グルカンに関しては、乾燥菌体を次亜塩素酸とアセトンにより処理することで回収し、^{1}H-NMR でその構造を解析した。その結果、α-グルカンのシグナルは存在せず、β-1,3-グルカンとβ-1,6-グルカンのシグナルが検出された。また、酵母と菌糸いずれの形態でもβ-1,6-グルカンのピークがβ-1,3-グルカンより小さかった。分泌β-グルカンはこれらのピーク強度がほぼ同じであることから、細胞壁β-グルカンは分泌β-グルカンよりもβ-1,6-グルカンの分岐が少ないと考えられた。発表では上記結果から *A. pullulans* の細胞壁構造を考察する。

Key words *Aureobasidium pullulans*, beta-glucan, cell wall

G2H5 (0110) 乳化およびマクロファージ活性化能を有する酵母由来 Gas1 タンパク質の構造と機能

○髙田真穂, 二塚美紀, 尾島由紘, 東雅之*
（阪市大院・工）

Structure and function of yeast Gas1 protein capable of emulsifying and activating macrophages

○Mao Takata, Minori Nizuka, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma*
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)
azuma@osaka-cu.ac.jp

乳化とは、2 種類の液体が両親媒性の界面活性剤によってミセルを形成し、他方の液中に分散する現象のことであり、食品や化粧品などに広く利用されている。界面活性剤の中でも生物由来の乳化剤は、化学合成品と比べ使用時の環境負荷が少なく安全性が高いことが期待されている。我々は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の細胞壁タンパク質の乳化作用に関する研究を進めている。先行研究では、*gup1* 遺伝子の欠損株が培養上清に分泌する乳化タンパク質の解析から、細胞表層に局在する Gas1 タンパク質が本来の生理機能の他に乳化能とマクロファージ活性化能を併せ持つことを明らかにした。Gas1 は、Gas ファミリーに属する GPI アンカー型タンパク質の 1 つである。Gas ファミリーには 5 つのアイソフォームタンパク質が存在しており、その中の Gas3 と Gas5 も Gas1 と同等の乳化能を持つことを確認している。

本研究では、Gas1 を乳化能を持つ糖タンパク質のモデルとして捉え、糖鎖などの構造と乳化能の関係を明らかにすることを目的とした。Gas1 はタンパク質部分の分子量が約 60 kDa で、SDS-PAGE の結果から 70 kDa 程度の糖鎖修飾を受ける。乳化活性に大きな影響を与えるアミノ酸領域を明らかにするため、*O*-結合型糖鎖修飾に関与するとされるセリンに富んだ領域（Ser-Box）、タンパク質の機能と安定性に必須であるシステインに富んだ領域（Cys-Box）などに着目し、各種変異 Gas1 を分泌発現する株を構築した。それら変異 Gas1 を培養上清から精製し、SDS-PAGE から糖鎖修飾量を比較した。さらに、鉱物油や食用油等に対する乳化能の評価、pH・塩耐性の比較などを行なっている。また、*N*-結合型糖鎖切断酵素である Endo H で処理した後の各種 Gas1 の乳化評価も行った。本発表では、上記の結果と Gas3 や Gas5 との比較から、Gas1 の構造と乳化活性の関係を考察する。

Key words *Saccharomyces cerevisiae*、Gas1、emulsification、biosurfactant

G2H5 (0111) コリネ型細菌と大腸菌の高温下における代謝変動の共通性

○井口貴博 [1], 小林俊介 [1], 石井伸佳 [2], 柘植陽太 [1,3]*
([1]金沢大院・自科, [2]長瀬産業, [3]金沢大・新学術)

Metabolic change in *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli* at non-proliferating high temperature

○Takahiro Iguchi[1], Shunsuke Kobayashi[1], Nobuyoshi Ishii[2], Yota Tsuge[1,3]*
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., [2]NAGASE & CO., LTD., [3]InFiniti, Kanazawa Univ.)
ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

微生物は増殖可能な温度範囲を有しており，その範囲を超えた高温では増殖できない．原因としては活性酸素種（ROS）の発生による細胞構成成分の損傷や酵素の失活など様々な要因がある．酵素の失活は代謝反応による細胞構成成分の合成阻害に直結するが，具体的にどの反応が阻害されているのかは不明である．そこで本研究ではコリネ型細菌と大腸菌が増殖できない高温に晒された時の代謝のボトルネックを明らかにすることを目的とした．両菌はともに 25~40℃付近で増殖する中温菌である．当研究室でコリネ型細菌の嫌気条件下におけるグルコース消費速度の温度依存性を調べたところ，好気条件では増殖できない 42.5℃において消費速度が最大となった [1]．コリネ型細菌は嫌気条件では増殖せずに発酵状態になり，グルコースから主に乳酸とコハク酸を生産することから，解糖系や一部の TCA 回路におけるグルコース代謝の至適温度は増殖可能温度を超える高温であることが示唆された．そこで本研究では細胞が増殖する好気条件において高温ではどの代謝反応が阻害されるかを調べた．コリネ型細菌を増殖至適温度（30℃）と非増殖温度（43℃）で初期 OD をそれぞれ 0.8, 10 に設定してジャーファーメンターを用いた培養を行い，発生した CO_2 を定量すると共に生産された化合物を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した．その結果，増殖至適温度では消費したグルコースの 44%が CO_2 に，50%が菌体に変換されたが，非増殖温度では 28%が CO_2 に変換された一方，菌体の代わりに乳酸（21%）やジヒドロキシアセトン（DHA）（17%），α-ケトグルタル酸（5.5%）やピルビン酸（1.4%）に変換された．乳酸や DHA は嫌気条件で生産されることから，高温下では好気条件であっても嫌気条件に類似した代謝状態になっていることが示唆された．我々はこの現象がコリネ型細菌に限らず中温菌に共通して起きる現象ではないかと考え，同じく中温菌である大腸菌を増殖できない高温で培養して同様の実験を行った．その結果，グルコースは CO_2（31%）以外にピルビン酸（25%）や乳酸（4.1%），α-ケトグルタル酸（0.8%）に加えて酢酸（29%）に変換された．両菌とも非増殖温度ではピルビン酸デヒドロゲナーゼの比活性が減少し，乳酸デヒドロゲナーゼの比活性は増加した．以上より，コリネ型細菌と大腸菌では好気条件でも高温下では嫌気条件のような代謝状態に変動し，その原因はピルビン酸周りを中心とした酵素活性の変動による代謝のオーバーフローだと考えられた．

Key words *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, high temperature, metabolic bottleneck

1) Uchikura et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 104, 6719–6729 (2020)

G2H5 (0112) アルドラーゼを介した代謝系へのホルムアルデヒド取込みを伴う増殖非依存型発酵による有用物質生産

○山本啓介 [1]*, 中根修平 [1], 土坂享成 [1], 榎本亜希代 [1], 長谷川真由 [1], 瀧田千温 [1], 武田明子 [1]
([1]Green Earth Institute 株式会社)

Production of useful chemicals by growth-arrested fermentation with aldolase-mediated incorporation of formaldehyde to the metabolic pathway

○Keisuke Yamamoto[1]*, Shuhei Nakane[1], Atsunari Tsuchisaka[1], Akiyo Enomoto[1], Mayu Hasegawa[1], Chiharu Takita[1], Akiko Takeda[1]
([1]Green Earth Institute Co., Ltd.)
keisuke.yamamoto@gei.co.jp

演者らが定義する増殖非依存型発酵とは、コリネ型細菌などの好気性微生物を好気的に増殖させる菌体増殖相と、増殖させた菌体を嫌気的（または微好気的）雰囲気に移し菌体の増殖を伴わず化合物の生産を行う物質生産相とから成る発酵手法である。この方法の利用により様々な特徴が生まれるが、演者らは特に、物質生産相において発酵阻害物質の存在下でも物質生産が可能であるという特長に着目し、この特長を「微生物に対して毒性を有する物質を物質生産の原料として用いる」という発想へと転換した。

これを実証する実験系として、一般的に生物に対して毒性を有すると認識されているホルムアルデヒドを増殖非依存型発酵における物質生産相で 2 次原料として添加し、1 次原料であるグルコースから解糖系を通じて生じるピルビン酸とアルドール反応させる人工代謝系をデザインした。この反応により 4-ヒドロキシ-2-オキソ酪酸が生じるが、このケト酸に対して①カルボニル還元、②カルボニル還元的アミノ化、③脱炭酸後のアルデヒド還元を行うことで、①2,4-ジヒドロキシ酪酸（DHB）、②ホモセリン（hSer）、③1,3-プロパンジオール（PDO）といった有用物質が生産されることが期待された。なお、DHB や hSer はメチオニンおよびその類縁体へと容易に変換可能で、大きな市場可能性を有する化合物である。また、PDO は化粧品基材または PET 代替プラスチックとして期待されている PTT の原料である。

天然においてレトロアルドール反応によりピルビン酸を生じると報告されているアルドラーゼを探索したところ、比較的広範なアルドラーゼにピルビン酸とホルムアルデヒドを基質とするアルドール反応の活性が検出された。その中から選択されたアルドール酵素及び上述①－③に対応する酵素をコードする遺伝子を、1dhA や ppc などの遺伝子を欠失させたコリネ型細菌 ATCC 13032 株に導入した形質転換体を作成した。これら菌体を用いて増殖非依存型発酵を行った結果、いずれも物質生産相において、目的物質の生産が確認された。特に DHB については他グループが報告している一般的な発酵手法による生産よりも大幅に速い速度で高濃度まで達する結果が得られている。本講演では、ホルムアルデヒド以外のアルデヒド利用の可能性も含め、本技術についてのこれまでの実験結果の詳細を紹介する。

Key words *Corynebacterium glutamicum*, formaldehyde, aldolase, methionine, 2,4-dihydroxybutyrate, homoserine, 1,3-propanediol

G2H5 (0201) 分裂酵母を用いたグルコースからのバニリン生産技術の向上

○川村和佳菜[1], 藤江直史[1], 田中勉[1]*, 近藤昭彦[2]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ)

Vanillin production from glucose in engineered *Schizosaccharomyces pombe*

○Wakana Kawamura[1], Naofumi Fujie[1], Tsutomu Tanaka[1]*, Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

本研究では、バイオマス資源であるグルコースを原料とし、分裂酵母を利用してバニリンを目的物質として生産することを目標とする。バニリンはバニラの香りの元となる化合物で、主に食品や化粧品の原料として利用されている。現在は化学プロセスによる生産が主流であるが、枯渇する恐れのある原料を使用している点や製造方法の消費者イメージが良くない点などが問題である。そこで、近年はバイオプロセスによる生産が注目されている。本研究では、酵素生産能が高く、効率的な物質変換を達成する可能性を持つ分裂酵母を宿主として選択した。

分裂酵母は本来バニリン生産能を持たないことから、異種生物から三種類の遺伝子（*3DSD*、*OMT*、*ACAR*）を CRISPR-Cas9 システムを利用して分裂酵母に導入し、バニリンの生産を目指した。まず、シキミ酸経路上の 3-デヒドロシキミ酸に 3-デヒドロシキミ酸デヒドラターゼ（3DSD）が作用してプロトカテク酸が生産される。ここからバニリンへは二通りの経路があり、一つ目の経路ではプロトカテク酸に *O*-メチルトランスフェラーゼ（OMT）が作用することで、3 位のヒドロキシ基がメトキシ基となり、バニリン酸が生成される。これに芳香族カルボン酸レダクターゼ（ACAR）が作用することで、1 位のカルボキシ基がアルデヒド基となり、バニリンが生産される。二つ目の経路では、それとは逆に ACAR、OMT が順に作用することで、プロトカテクアルデヒドを経由してバニリンが生産される。この三種類の遺伝子を導入した結果、46mg/L のバニリンが生産された。一方で、37mg/L のバニリン酸がバニリンに変換されずに残留していたため、バニリン酸からバニリンへの変換率の向上を目的として *ACAR* を追加で導入することにした。現在は CRISPR-Cas9 システムによる *ACAR* の追加導入に取り組んでいる。

Key words *Schizosaccharomyces pombe*, metabolic engineering, vanillin

G2H5 (0202) コリネ菌を用いた 4-ヒドロキシ安息香酸生産技術の開発

○道家美紗[1], 盛尾美和[1], 田中勉[1]*, 近藤昭彦[2]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ)

Production of 4-hydroxybenzoic acid from glucose using *Corynebacterium glutamicum*

○Misa Doke[1], Miwa Morio[1], Tsutomu Tanaka[1]*, Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

本研究では、コリネ菌を用いてバイオマス資源であるグルコースから 4-ヒドロキシ安息香酸を目的物質として生産することを目標とする。4-ヒドロキシ安息香酸はプラスチックや繊維の原料、化粧品・医薬品・食品の保存料に用いられる有用性の高い物質である。現在、4-ヒドロキシ安息香酸は主に石油由来のフェノールを原料として生産されているが、高温高圧下での生産であることや、石油燃料が将来枯渇する恐れがあることが問題視されている。また二酸化炭素排出による地球温暖化などの社会的問題を考慮し、持続可能な資源からの生産方法としてバイオプロセスにおける生産方法が注目されている。本研究では、遺伝子操作が確立されており、4-ヒドロキシ安息香酸をはじめとする芳香族化合物の毒性に対する耐性が高いことで知られているコリネ菌の遺伝子に改変を加えることで、グルコースからシキミ酸経路を経た 4-ヒドロキシ安息香酸高生産を目指した。

コリネ菌は 4-ヒドロキシ安息香酸生産能を持たないため、大腸菌由来の 4-ヒドロキシ安息香酸合成に関与するコリスミ酸ピルビン酸リアーゼ UbiC をコードする遺伝子 *ubiC* を発現させるべく、プラスミド pCC-H36-*ubiC* を作製後コリネ菌株に導入した。その結果、4-ヒドロキシ安息香酸の生産を達成した。

4-ヒドロキシ安息香酸の収量を高めるために、4-ヒドロキシ安息香酸分解酵素 *pobA* やフェニルプロパノイド分解経路(Phd 経路)に関する遺伝子群 *cg0344-47*、4-ヒドロキシ安息香酸分解に関する遺伝子群 *cg2624-40*、3-ヒドロキシ安息香酸を経てピルビン酸を生産する経路の遺伝子群 *cg3349-54* を破壊することにより、プロトカテク酸やピルビン酸などの副生成物の生産を抑制した。また、遺伝子 *cg2966* を破壊することで、補酵素 NADH の消費を抑制した。さらに *ubiC* のプロモーターを変更したプラスミド pCC-J2-A16-1-*ubiC* を作製し、pCC-H36-*ubiC* の代わりに pCC-J2-A16-1-*ubiC* を導入したところ、さらなる生産量の増加が見られ、最終的に 8.50 g/L の 4-ヒドロキシ安息香酸生産が得られた。

Key words *Corynebacterium glutamicum*, metabolic engineering, 4-hydroxybenzoic acid

G2H5 (0203) ゲノム編集によるオーランチオキトリウム属の脂肪酸生産性の向上

○渡邉 研志[1], Perez Charose[1], 北堀 智希[1], 畑 浩介[1], 青井 真人[1], 高橋 宏和[1], 佐久間 哲史[1], 岡村 好子[1], 中島田 豊[1], 山本 卓[1], 松山 恵介[2], 秋 庸裕[1]*
([1]広島大院・統合生命, [2]長瀬産業株式会社)

Improvement of lipid productivity of *Aurantiochytrium* sp. by genome editing

○Kenshi Watanabe[1], Charose Perez[1], Tomoki Kitahori[1], Kousuke Hata[1], Masato Aoi[1], Hiroaki Takahashi[1], Tetsushi Sakuma[1], Yoshiko Okamura[1], Yutaka Nakashimada[1], Takashi Yamamoto[1], Keisuke Matsuyama[2], and Tsunehiro Aki[1]*
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2] NAGASE & CO, LTD)
aki@hiroshima-u.ac.jp

【背景・目的】ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* 属は高度不飽和脂肪酸、長鎖飽和脂肪酸およびカロテノイドなど幅広い産業分野で有用な脂質分子種を蓄積する。その脂質生産性の向上を目指し、これまでに自然界からの新規株の単離のほか、突然変異誘発法や相同組換え法などの分子育種を試みてきたが、標的特異性と遺伝子改変効率の低さが課題であった。最近、*Aurantiochytrium* 属に対してゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 システムを新たに適用し、細胞外から導入したドナーDNA の標的特異的なノックイン効率を顕著に向上させることを報告した。そこで本研究では、同システムを利用して *Aurantiochytrium* 属の β 酸化系酵素および制御因子の遺伝子を破壊し、脂肪酸生産性に与える影響を評価した。

【結果】*Aurantiochytrium limacinum* SR21 株のゲノム中に存在するペルオキシソーム局在性の β 酸化関連酵素 acyl-CoA oxidase (ALAcox1, 2, 3)、ミトコンドリア局在性の β 酸化関連酵素 hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (ALHadh1)および出芽酵母の carbon catabolite-derepressing protein kinase (Snf1)と 56.9%の相同性を示す ALSnf1 の遺伝子を標的とした。各遺伝子を標的とする Cas9-gRNA 複合体と、ゼオシン耐性遺伝子発現カセットを標的部位の上下流との相同領域で挟んだドナーDNA を SR21 株に供導入して、ゼオシン含有寒天培地上でノックイン株を単離した。標的遺伝子座特異的なドナーDNA のノックインはサザンブロット解析で確認した。各遺伝子破壊株を酢酸を唯一の炭素源とする培地で培養したところ、ALSnf1 遺伝子破壊株では顕著な増殖抑制が認められ、ALSnf1 が酢酸の同化に重要な働きを持つことが推測された。ALAcox1 および ALAcox2 遺伝子破壊株の脂肪酸生産性は親株のそれと比較してそれぞれ 43%および 50%向上した。両酵素が酢酸資化時における脂肪酸の β 酸化に関与することが示唆され、その失活が脂肪酸の蓄積増加に資することが分かった。

Key words *Aurantiochytrium* sp., genome editing, fatty acid production

G2H5 (0204) 好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* 代謝改変によるアセトンの高温ガス発酵

○加藤淳也[1], 竹村海生[1], 加藤節[1], 藤井達也[2], 和田圭介[2], 岩崎祐樹[2], 青井議輝[1], 森田友岳[2], 松鹿昭則[1,2], 村上克治[2], 中島田豊[1]*
([1]広島大院・統合生命科学, [2]産総研)

Thermophilic bioconversion of gaseous substrates to acetone by a metabolically-engineered acetogen *Moorella thermoacetica*

○Junya Kato[1], Kaisei Takemura[1], Setsu Kato[1], Tatsuya Fujii[2], Keisuke Wada[2], Yuki Iwasaki[2], Yoshiteru Aoi[1], Tomotake Morita[2], Akinori Matsushika[1,2], Katsuji Murakami[2] and Yutaka Nakashimada[1]*
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]AIST)
nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

【背景・目的】地球温暖化をはじめとする環境問題は現代における大きな課題であり、二酸化炭素（CO_2）の削減、循環型の炭素利用社会が求められている。ホモ酢酸菌を利用したガス発酵生産はそのニーズに応える技術として注目を浴びている。ホモ酢酸菌は CO_2 と水素（H_2）、または一酸化炭素（CO）といったガス体の基質を資化し、酢酸を唯一の代謝物として独立栄養的に増殖する。この特性は CO_2 の資源化とともに、合成ガス（H_2 と CO が主成分）を利用したカーボンリサイクルに利用できる。合成ガスは製鉄所などから排ガスとして回収できるほか、有機性廃棄物の熱化学処理により得られる。我々はホモ酢酸菌の代謝改変によりガス発酵による有用物質生産技術開発を行っている。今回、化成品原料として用いられるアセトンを、好熱性ホモ酢酸菌 *M. thermoacetica* の代謝改変により発酵生産することを目的として研究を行った。アセトンは低沸点のため、高温発酵ができれば蒸留による発酵同時分離が可能となり、コスト削減やプロセスの簡易化につながる。

【結果・考察】ガス基質代謝中間体であるアセチル CoA と最終産物酢酸を基質としてアセトンを生成する耐熱性経路構築を外来遺伝子導入により行った。糖培養を行うとアセトン生産が確認でき、目的とする代謝経路の機能的発現に成功した。しかしアセトンに比べ酢酸の生産量が高かったため、さらに酢酸生成経路の一部を破壊した株を構築した。その結果アセトン/酢酸生成比は 0.35 から 2.23 まで上昇した。この株を用い、CO_2+H_2 を基質とした発酵試験を行ったところアセトンの生産が確認できた。しかし増殖は見られず、また ATP 不足を示唆するギ酸が蓄積したことから ATP 生産が不足していることが考えられた。そこで高いエネルギーを得られる CO を基質としたところ、アセトン生産とともに増殖が見られた。アセトン/酢酸生成比は 0.27 であった。さらに H_2 を添加すると生成比は 0.47 に上昇し、かつアセトン比生産速度も 0.09g/g-菌体/h となり２倍以上の上昇が見られた。以上より、本研究で得た代謝改変株は合成ガスによる揮発性化合物アセトンの高温ガス発酵を可能とする。

参考文献：Kato et al., *AMB Express* **2021**, 11(1), 59.

Key words Metabolic engineering, Anaerobes, Thermophile, Carbon dioxide

G2H5 (0205) 光エネルギーを利用した大腸菌におけるメバロン酸のイソプレノールへの変換

○佐野 海瑚人[1], 田中 涼[1], 鎌田 健太郎[1], 松田 史生[1], 石井 純[2], 弘埜 陽子[3], 原 清敬[3], 戸谷 吉博[1]*, 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)

Light-driven metabolic conversion from mevalonate to isoprenol in *Escherichia coli*

○Mikoto Sano[1], Ryo Tanaka[1], Kentaro Kamata[1], Fumio Matsuda[1], Jun Ishii[2], Yoko Hirono[3], Kiyotaka Hara[3], Yoshihiro Toya[1]*, Hiroshi Shimizu[1]
([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka.)
ytoya@ist.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】
イソプレノールは大腸菌を用いて生産することができる有用物質であり、燃料やゴムの原料として注目されている。この生合成経路では、中間物質のメバロン酸からイソプレノールに変換される際にエネルギーとして ATP が消費される。大腸菌は呼吸によって ATP を生産することができるが、その際取り込んだ炭素の一部を二酸化炭素として排出するため、イソプレノールの炭素収率の低下を招いてしまう。そこで、高度好塩菌などが保有する膜タンパク質で、光の照射によって細胞内外でプロトン濃度勾配を生み出すロドプシンに着目した。大腸菌の ATP 合成酵素はプロトン濃度勾配を利用して ATP を再生するため、ロドプシンを大腸菌の細胞膜に組み込むことで光を利用した ATP 再生を行うことができると考えた。本研究では、大腸菌にロドプシンを異種発現することで、光エネルギーを使って ATP を生産する仕組みを実装し、イソプレノール生産への応用を目指す。
【方法・結果】
大腸菌 MG1655(DE3)株を宿主として、メバロン酸からイソプレノールへの変換に必要な遺伝子と高度好塩菌由来のデルタロドプシン遺伝子を導入した菌株を構築した。ロドプシンによる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。細胞外 pH 測定の結果から、光照射時にのみ pH が減少し、また光強度が大きいほど pH の変化が大きいことが確認できた。
メバロン酸からイソプレノールへの変換能力を評価するため、LB 培地で細胞を増殖させた後、メバロン酸を単一炭素源とした M9 最小培地に細胞を懸濁し、0, 50, 100, 150 μmol/m²/sec の白色光を照射して培養を行った。培養液中のメバロン酸とイソプレノール濃度は HPLC と GC-FID を用いて測定した。培養の結果、光のみをエネルギー源として、メバロン酸をイソプレノールに変換する反応を駆動することに成功した。さらに光強度が大きいほど、イソプレノールへの変換量が大きくなっていることが示された。

Key words Light energy, Rhodopsin, *Escherichia coli*, Isoprenol

G2H5 (0206) フェニルアラニン高生産に向けたコリネ型細菌の代謝工学

○片岡 尚也[1,2,3]*, 加藤 瑠華[1], 谷口 和彌[2], 松谷 峰之介[4], 松下 一信[2], 薬師 寿治[1,2,3]
([1]山口大院・創成科学, [2]山口大・農, [3]山口大・中高温微セ, [4]東農大・ゲノム解析セ)

Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of phenylalanine

○Naoya Kataoka[1,2,3]*, Ruka Kato[1], Kazuya Taniguchi[2], Minenosuke Matsutani[4], Kazunobu Matsushita[2], Toshiharu Yakushi[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Yamaguchi Univ., [2]Fac. Agric., Yamaguchi Univ., [3]RCTMR, Yamaguchi Univ., [4]NODAI GRC, Tokyo Univ. Agric.)
nkataoka@yamaguchi-u.ac.jp

【背景・目的】*Corynebacterium glutamicum* は, グルタミン酸やリジンといったアミノ酸の工業的発酵生産に用いられている産業微生物である。フェニルアラニン (Phe) は, シキミ酸経路を経て生合成される芳香族アミノ酸の一つで, 植物ではフェニルプロパノイドなどの二次代謝産物の前駆体となる。*C. glutamicum* での Phe 生産に関するこれまでの報告は, 代謝制御発酵により構築された変異株によるものが多い。しかし, これら変異株は, Phe 生産に直接関与しない変異も数多く蓄積していることから, 生産能は優れているものの, 生育に時間を要する等, 頑強性の点から問題を抱えている。本研究では, 頑強性を保持したまま Phe を高生産可能な *C. glutamicum* を造成することを目的に研究を開始した。
【方法】*C. glutamicum* ATCC 13032 を親株として用いた。フィードバック制御を解除したコリスミ酸ムターゼおよびプレフェン酸脱水酵素 (PheA), 3-デオキシ-7-ホスホヘプツロン酸合成酵素 (AroH), をコードする大腸菌由来の *pheA*, *aroH* をクローニングしたプラスミド pPhe を Phe 生産プラスミドとして用いた。培養は, 444 mM のグルコースを含む 1 L の発酵培地で 2 L 容ジャーファメンターを用いて行った。
【結果】シキミ酸の高生産に有効と報告のある変異 (i) ジヒドロキシケセトン, キナ酸, プロトカテク酸生成酵素 (HdpA, QsuD, QsuB) の不活化, (ii) シキミ酸脱水素酵素の高発現, を導入することにより, 野生株で観察された Phe 生成量 (17.9 mM) の約 1.3 倍である 22.8 mM の Phe を生成する株が構築できた。生産性をさらに向上するべく, Phe と同様, プレフェン酸を重要中間体に生合成されるチロシン (Tyr) の合成経路の不活化を試みた。プレフェン酸からの Tyr 生成の初発酵素であるプレフェン酸脱水素酵素を不活化したところ, サプレッサー変異株の出現が確認された。そこで, 良好な生育を示す独立した二つのサプレッサー変異株を単離し, その Phe 生産能を評価した。その結果, サプレッサー変異株の一つが, 親株と比較して約 1.8 倍の 40.4 mM の Phe を生成した。次いで, シキミ酸経路の前駆体の一つであるホスホエノールピルビン酸 (PEP) は解糖により供給されることから, 本サプレッサー変異株を親株に, PEP-ピルビン酸代謝の改変が Phe 生産に及ぼす影響を調査した。その結果, PEP カルボキシラーゼの欠損により Phe 生成量が 50.7 mM に向上した。現在, さらなる Phe 生産能向上のため, PEP 供給に焦点を当て, グルコース取り込み系の改変を検討している。

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, phenylalanine, suppressor

G2H5 (0207) エチレングリコール資化菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 によるグリコール酸生産

○鈴木 快[1,2], 清水 哲[1], 乾 将行[1,2*]
([1]RITE, [2]奈良先端大・バイオ)

Glycolic acid production by an ethylene glycol assimilating bacterium *Rhodococcus jostii* RHA1

○Kai Suzuki[1,2], Tetsu Shimizu[1], Masayuki Inui[1,2]*
([1]RITE, [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)
inui@rite.or.jp

【背景および目的】近年、生分解性プラスチックの原料としてグリコール酸の需要が高まっている。バイオマスから製造可能なエチレングリコール（EG）からバイオプロセスによりグリコール酸を生産出来れば、従来の製造法に対し環境負荷の低減が期待される。これまでに我々は、*Rhodococuus jostii* RHA1 がグリコール酸を経由して EG を資化することを見出している。また RHA1 株における EG 酸化反応を担う機能未知デヒドロゲナーゼ遺伝子（*egaA*）および EG 酸化により生成されるグリコールアルデヒドの酸化反応を担うアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子（*aldA1*）をそれぞれ同定している。本研究では RHA1 株の菌体反応による EG からのグリコール酸生産について検討し、さらにグリコール酸分解経路の遮断や *egaA*、*aldA1* の高発現がグリコール酸生産に与える影響についても評価を行った。

【方法と結果】RHA1 株による EG を原料とした菌体反応によるグリコール酸生産を検討したところ、グリコール酸の一時的な蓄積が観察されたもののその量は経時的に減少した。このことから、生成したグリコール酸が分解されている事が推察された。そこでグリコール酸分解経路を破壊した Δ*glcD* 株による EG からのグリコール酸生産を評価したところ、RHA1 株で見られた生成グリコール酸の減少が見られず収率が大きく向上した。さらに、EG 酸化経路の強化を狙い Δ*glcD* 株に *egaA* 高発現プラスミドを導入した株、*aldA1* 高発現プラスミドを導入した株を作製して EG からのグリコール酸生産を評価したところ、最大グリコール酸生産速度が Δ*glcD* 株と比較してそれぞれ 2.2 倍、2.0 倍に上昇した。一方、両遺伝子の高発現プラスミドを導入した株における EG からのグリコール酸生産を評価したところ、最大グリコール酸生産速度は Δ*glcD* 株と比較して 1.6 倍の上昇に留まった。以上の結果から、*glcD* 破壊及び EG 代謝酵素の高発現により、グリコール酸生産速度および生産量が大きく向上することが示された。

Key words *Rhodococcus jostii*, ethylene glycol, glycolic acid

G2H5 (0208) 大腸菌染色体上のリボソーム結合配列改変による中枢代謝フラックスの調節

○澤田将吾[1], 松田史生[1], 戸谷吉博[1], 清水浩[1*]
([1]大阪大学院,・情報・バイオ情報)

Modulation of central metabolic flux by modification of ribosome-binding sequences on *E. coli* chromosomes

○Shogo Sawada[1], Humio Matsuda[1], Yoshihiro Toya[1], Hiroshi Shimizu[1*]
([1]Osaka Univ.)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】微生物を用いたモノづくりにおいて、代謝の流れを最適化する技術は重要である。代謝の調節には酵素遺伝子の発現量の調節が有効であるため、近年では RNAi や CRISPRi を用いた代謝制御が注目されている。しかし、これらの方法は外来の RNA やタンパク質を発現させる必要があり、宿主の代謝に負荷がかかる場合がある。また、利用可能な誘導剤やプラスミドの種類は限られている。以上の理由から、中枢代謝経路全体の代謝フラックス分布を最適な状態に調節することは困難であった。そこで本研究では、大腸菌染色体上のリボソーム結合部位(RBS)の塩基配列を改変することで代謝経路の分岐点におけるフラックス比を段階的に変化させる技術を開発した。本手法では外来遺伝子を導入せずに宿主の代謝調節が可能であり、代謝デザインに新たな自由度を提供できる。
【方法・結果】大腸菌 MG1655(DE3)において、遺伝子 *gltA* はアセチル CoA(AcCoA)とオキサロ酢酸からクエン酸を合成する酵素(Citrate synthase; CS)をコードしている。この遺伝子の発現抑制は酢酸のオーバーフローを起こし、酢酸生合成経路と TCA サイクルのフラックス比を変化させる。*gltA* は大腸菌 MG1655(DE3)における必須遺伝子と報告されており、この遺伝子の発現抑制は増殖速度と強い相関を持つことが考えられた。そこで、*gltA* の RBS について多重自動ゲノム工学法(MAGE)を用いたランダムな変異導入を行った。変異導入個所の絞り込みには RBS 強度を予測するツールである MAGE Oligo Design Tool(MODEST)を利用し、予測された RBS の改変候補を全て含むようにランダムな MAGE 用オリゴ DNA を作製した。変異導入によって得られた複数のシングルコロニーをグルコース炭素源の合成培地に植菌し、好気条件で培養を行い、増殖速度が段階的に低下した株を獲得した。これらの株について開始コドン上流の塩基配列を確認したところ、複数の点変異や欠失が確認された。続いて、得られた変異体のうち 4 つについて細胞破砕液の CS 活性を測定したところ、酵素活性が低下していた。以上から *gltA* の RBS 強度を改変し、CS 活性を変化させた株を取得できたと判断した。同様の方法で *pgi* の発現を抑制する RBS ライブラリーを取得し、解糖系とペントースリン酸経路(PPP)のフラックス比が段階的に変化していることを確認した。*gltA* と *pgi* の両方の発現量をそれぞれ 5 段階に変化させた計 25 株を構築し、増殖速度が段階的に変化していることを確認した。これらの株は PPP を利用した NADPH の再生能と AcCoA を出発物質とする代謝フラックスが段階的に変化すると考えられたので、今後は AcCoA と NADPH を必要とする物質の生産に応用できることが期待される。

Key words Multiplex automated genome engineering, Ribosome binding site, Metabolic regulation, *Escherichia coli*

G2H5 (0209) 出芽酵母のエネルギー代謝の改善

○大長薫[1], 弘埜陽子[1], 菊川寛史[1], 田村謙太郎[1], 原清敬[1]*
([1]静県大・食栄)

Improving energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*

○Kaoru Daicho[1], Yoko Hirono[1], Hiroshi Kikukawa[1], Kentaro Tamura[1], Kiyotaka Hara[1]*
([1]Sch.Food Nutr.Sci.,Univ.Shizuoka.)
k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp

【目的】現在、微生物を用いた有用物質生産において、遺伝子組換えにより物質生産性を向上させる研究が広く行われている。本研究では物質生産性を向上させるために、出芽酵母内に存在する酸性オルガネラである液胞に注目した。液胞膜には、液胞内部を酸性に維持するために ATP を消費してプロトンを輸送する V 型 ATPase が存在している。本研究では、液胞膜に光駆動型プロトンポンプであるデルタロドプシンを発現させることで液胞膜における ATP 消費を抑え、節約された ATP による有用物質生産の補強を目的とした。生産物の指標としては、生産の際に ATP を消費する有用物質であるグルタチオンを用いた。
【方法】出芽酵母 BY4741 株に液胞膜移行シグナルを融合させたデルタロドプシンを発現させた。この株およびベクターコントロール株を光受容分子 (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。また光を照射しない暗条件でも同様の実験を行った。
【結果・考察】BY4741 株にデルタロドプシンを発現させた株では、発現させてない株に対して植菌後 30 時間目の細胞内グルタチオン濃度が 2〜2.5 倍上昇した。また時間経過ごとにグルタチオン濃度は減少したが、デルタロドプシンの有無によりグルタチオン濃度の差は広がっていった。これらの結果から、ATP 消費を伴うグルタチオン合成の活性化は、デルタロドプシンの発現により生じた ATP 供給量の増加に起因すると考えられる。

Key words ATP, energy metabolism, *Saccharomyces cerevisiae*

G2H5 (0210) 大腸菌生体内における非酸化的解糖系経路の代謝フラックスの評価

○三吉 健太[1], 川井 隆太郎[1], 二井手 哲平[1], 戸谷 吉博[1], 清水 浩[1]*
([1]阪大院・情報・バイオ情報)

Metabolic flux evaluation of non-oxidative-glycolysis in *E. coli*

○Kenta Miyoshi[1], Ryutaro Kawai[1], Teppei Niide[1], Yoshihiro Toya[1], Hiroshi Shimizu[1]*
([1]Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】
微生物の代謝を利用した有用物質生産において、糖をアセチル CoA に変換する際の解糖系における CO_2 排出は、目的生産物質の収率低下を引き起こす課題となっている。そのため、*Bidfidobacterium adolescentis* 由来の非酸化的解糖系 (NOG) 経路は、CO_2 の排出なく 1 分子のグルコースを 3 分子のアセチル CoA に変換する魅力的な経路として注目されている。一方で、NOG 経路を利用した代謝においては、重要な補酵素である ATP や NADH などが生産されないため、目的物質生産に向けて解糖系と NOG 経路のフラックス比を調節する必要がある。
そこで本研究では、ホスホケトラーゼ（Fxpk）発現遺伝子を大腸菌に導入することで NOG 経路を構築し、重要な代謝中間体であるアセチル CoA の炭素収率を改善することを目指す。また、導入した NOG 経路が内在の解糖系に対してどの程度働いているかは分からないため、それを明らかにするための評価を試みる。

【研究内容】
大腸菌での発現用にコドン最適化した Fxpk 発現遺伝子を T7 プロモーター下で発現させた。Fxpk の発現は、ウェスタンブロッティングと酵素活性測定によって確認した。また、生体内での NOG 経路の寄与は ^{13}C 代謝フラックス解析により評価した。
Fxpk 活性測定では、Fxpk の生成物であるアセチルリン酸の生産量について、比色定量法による検討を行った。野生株ではアセチルリン酸は生産されなかったが、Fxpk 発現株ではアセチルリン酸が生産されたことから、Fxpk が機能すると確認された。
^{13}C 代謝フラックス解析では、シミュレーションにより事前に標識グルコースが解糖系もしくは NOG 経路を利用して代謝された場合のアミノ酸の標識割合について予測し、NOG 経路の寄与を判別するための標識実験を設計した。実際に ^{13}C 標識炭素を利用して培養を行ったところ、アミノ酸標識割合の変化から僅かながら NOG 経路を利用した生体内代謝が行われたと示唆された。この結果に基づいて、解糖系に対する NOG 経路の寄与をさらに増加させるため、解糖系の酵素を阻害する薬剤を添加した際の表現型の変化を評価中である。

Key words metabolic engineering, metabolic flux analysis, enzyme activity

G2H5 (0211) メバロン酸取り込み能力が強化された進化株のゲノム変異解析

○村上茉奈美[1], 川井隆太郎[1], 前田智也[2]、堀之内貴明[2]、古澤力[2,3]、戸谷吉博[1]、清水浩[1]*
([1]大阪大学, [2]理化学研究所, [3]東京大学)

Genomic mutation analysis of an evolved strain with enhanced mevalonate consumption

○Manami Murakami[1], Ryutaro Kawai[1], Tomoya Maeda[2], Takaaki Horinouchi[2], Chikara Furusawa[2,3], Yoshihiro Toya[1], Hiroshi Shimizu[1]*
([1]Osaka Univ., [2]RIKEN, [3]Tokyo Univ.)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

イソプレノールは新たなバイオ燃料やゴムの原料となる有用物質であり、微生物を用いた生産の実用化が望まれている。大腸菌を用いた生産では、メバロン酸経路中間体のメバロン酸の合成を担う株とメバロン酸を取り込みイソプレノールの合成を担う株を共培養することで生産性の向上を目指している。この共培養においては、後半の経路を担う株のメバロン酸取り込み強化が課題であった。これまでの研究で、メバロン酸要求性を付与した株を低濃度のメバロン酸を含む培地で長期間連続培養することで指向性進化実験を行い、メバロン酸取り込み能力が強化された進化株を獲得した。進化株ではメバロン酸への親和性を表す飽和定数の値が親株の約 10%にまで低下した。また、親株と比べてグルコース取り込み速度、乳酸生産速度が低下、酢酸生産速度が増加した。さらに、進化株のゲノム変異を解析したところ、*menC*, *malT* へのトランスポゾンの挿入、*gatC* の点変異が確認された。これらの変異が進化株の代謝状態に与えた影響やメバロン酸への親和性向上への寄与を確認するため、それぞれの変異を親株に導入した株を構築し培養評価を行った。３変異全てを導入した株では、飽和定数の値は親株の約 34%にまで低下した。一方、*menC* 単変異導入株では飽和定数が親株の約 75%に低下したが、*malT*, *gatC* 単変異導入株では飽和定数の低下は確認されなかった。このことから、*menC* 変異に加えて他 2 変異が入ることがメバロン酸への親和性向上に重要であることが示唆された。また、グルコース取り込み速度、有機酸生産速度に関しては、*menC* 単変異導入株では親株から進化株と同様の変化が確認されたが、*malT*, *gatC* 単変異導入株では進化株と同様の変化は見られなかった。本研究でのゲノム変異と表現型の関係性の調査は、メバロン酸取り込み強化のための代謝調整メカニズムの解明に役立つと考える。

Key words 指向性進化実験，変異解析，イソプレノール生産，連続培養

G2H5 (0212) 目的物質生産フラックス強化のためのシミュレーションに基づく増殖連動型の代謝設計

○戸谷 吉博[1], 一色 衣香[1], 施 欣馳[1], 清水 浩[1]*
([1]阪大院・情報)

Growth associated metabolic design for enhancing flux to target production based on *in silico* simulation

○Yoshihiro Toya[1], Kinuka Isshiki[1], Xinchi Shi[1], Hiroshi Shimizu[1]*
([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】
微生物を利用した有用物質生産において、代謝経路の律速点を解消し、目的物質の収率や生産速度を向上させることが求められている。多段階の反応からなる代謝経路において、どの反応が律速になっているかを同定し、それを解消することは難しい課題である。我々は、化学量論モデルとシミュレーションによって、増殖するためには、即ち細胞構成成分を作るには、目的物質の生産が強いられるように代謝経路を改変し、増殖を指標として基質から目的物質に至る経路の律速点が解消された変異株を取得できると考えた。本研究では、このアプローチを検証するため、大腸菌によるグルコースからの 2-ケトグルタル酸の生産について、増殖連動型の代謝経路を構築して指向性進化実験を行うことで、増殖速度が増加し、グルコースから 2-ケトグルタル酸に至る経路のフラックスが増強された変異株を取得できるか調べることを目的とした。
【方法・結果】
大腸菌の代謝経路の化学量論モデルを用いて、フラックスバランス解析による遺伝子破壊シミュレーションを実施した。その結果、*zwf*, *sucCD*, *pntAB*, *maeB* を欠失した代謝経路では、細胞増殖のために 2-ケトグルタル酸の生産が強いられることが予測された。*zwf*, *pntAB*, *maeB* は細胞合成に必要な NADPH を供給する反応を触媒する酵素遺伝子であり、これらを破壊した株では TCA 回路のイソクエン酸脱水素酵素によってしか NADPH を生産できなくなる。さらに、*sucCD* の破壊により TCA 回路が分断され、2-ケトグルタル酸がオーバーフローすると予測された。そこで、P1 ファージを用いた形質導入法により、大腸菌の *zwf*, *sucCD*, *pntAB*, *maeB* 破壊株を構築した。グルコースを単一炭素源とする合成培地を用いて野生株と遺伝子破壊株を培養したところ、野生株の比増殖速度が 0.53 h^{-1} に対して、遺伝子破壊株では 0.01 h^{-1} と著しい増殖低下がみられた。これはグルコースから 2-ケトグルタル酸に至る経路の中にためと考えられる。そこで、この遺伝子破壊株について変異を誘発することで、増殖速度が増加した進化株の獲得を試みた。遺伝子破壊株を合成培地の寒天プレートに塗布し UV を照射した後、インキュベートした。その結果、4 つの大きなコロニーを単離することができ、これらの進化株の比増殖速度を評価したところ、0.05 から 0.08 h^{-1} と親株に比べて増加がみられた。親株と進化株の代謝状態を比較することで、律速点解消のメカニズムが明らかになると期待される。

Key words 2-ketoglutarate, *Escherichia coli*, flux balance analysis, metabolic engineering, pathway design

G2H5 (0301) アンブレインの人工生合成系構築と新規生物活性の解析

山辺 陽太[1], 川越 幸奈[1], 奥野 琴音[1], 井上 真緒[1], 近岡 花菜子[1], ○上田 大次郎[1], 田島 木綿子[2], 山田 格[2], 柿原 嘉人[3], 原 崇[1], 佐藤 努[1]*
([1]新潟大・自然研, [2]科博, [3]新潟大・歯)

Construction of an artificial system for ambrein biosynthesis and investigation of some biological activities of ambrein

Yota Yamabe[1], Yukina Kawagoe[1], Kotone Okuno[1], Mao Inoue[1], Kanako Chikaoka[1], ○Daijiro Ueda[1], Yuko Tajima[2], Tadasu Yamada[2], Yoshito Kakihara[3], Takashi Hara[1], Tsutomu Sato[1]*
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Dept. Zoology, Natl. Museum Nat. Sci., [3]Fac. Dent., Niigata Univ)
sato@agr.niigata-u.ac.jp

龍涎香は、マッコウクジラ由来の希少天然物香料である。捕鯨されたマッコウクジラの 1 %から発見される。現在、捕鯨は再開されているがマッコウクジラはその対象となっていないため、幻の香料として知られている。その主成分はアンブレインであり、アンブレイン自体に香りは無く、紫外線などによる酸化分解により数十種類の化合物に分解され、ユニークないい香りを醸し出す。

当研究室において、*Bacillus megaterium* 由来二機能性テルペン環化酵素と変異型スクアレン—ホペン環化酵素を組み合わせることによって安価なスクアレンからアンブレインを酵素合成することに成功した。しかし、収率は 0.7 %以下と工業化及びラボスケールの研究を行う量には至らなかった。

そこで、酵素のリデザインを行い、環化開始部位とモデリングから二段階目の環状基質結合を阻害していると予想されている部位に変異を行った。結果 $BmeTC^{Y167A/D373C}$ においてアンブレインの収率（21.5 %）が野生型 BmeTC の最終産物（オノセロイド）の収率（4.6 %）を上回った変異体が得られた。今回初めて「アンブレイン合成酵素」を創出することに成功した。しかし、$BmeTC^{Y167A/D373C}$ は最初の基質であるスクアレンと反応性が悪かった。そこで、スクアレン取り込みの良い野生型 BmeTC と組み合わせた系を考案し、46.0 %の収率を得ることに成功した。

我々はラボスケールで実験を行うには十分な量のアンブレイン得ることができたため、生物活性実験を行った。

骨細胞において、破骨細胞分化誘導物質と 50 μM アンブレインが同等の活性を示し、10 μM 以上で破骨細胞誘導活性がある事が示された。破骨細胞誘導異常による大理石病などの治療薬としての可能性が示唆された。

また、ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞を用いて、アミロイドβ（Aβ）を介した神経細胞死に対するアンブレインの抑制効果について解析した。アルツハイマー病は、Aβが神経に凝集することで神経細胞のアポトーシス死を誘導すると考えられている。アンブレインを添加する事によって濃度依存的にアポトーシスを抑制することが明らかになった。このことからアンブレインは将来的にアルツハイマー病の治療薬となる可能性も示唆された。

Key words terpenoid, biosynthesis, ambrein

G2H5 (0302) ε-poly-L-lysine 生産放線菌 *Streptomyces albulus* におけるプロテアソーム遺伝子破壊株の造成と形態分化や二次代謝に与える影響の解析

○美馬 未紗希[1], 老川 典夫[1], 山中 一也[1]*
([1]関西大・化生工)

Effect of the proteasomal gene deletion in an ε-poly-L-lysine producer, *Streptomyces albulus*

○Misaki Mima[1], Tadao Oikawa[1], Kazuya Yamanaka[1]*
([1] Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)
kazuyay@kansai-u.ac.jp

【目的】プロテアソームは、真核生物の細胞において細胞質および核内のいずれにも分布しているタンパク質分解を行う巨大な円筒状のプロテアーゼ複合体である。プロテアソームは、プロテアーゼのようにランダムにタンパク質を分解するのではなく、ユビキチンにより標識されたタンパク質を認識して分解することで、細胞周期、免疫応答、シグナル伝達など必須の細胞機能制御を担っている。このようなユビキチン-プロテアソームシステムは真核生物及び古細菌に特有の系であると考えられてきたが、近年、真正細菌でもアクチノマイセス目が古細菌のものに似たプロテアソームを有していることが明らかとなった。しかし、アクチノマイセス目は真正細菌のタンパク質分解システムも同時に備えていることから、真正細菌におけるプロテアソームの生理的役割は不明なままである。そこで本研究では、ε-poly-L-lysine (Poly-L-Lys)生産放線菌 *Streptomyces albulus* をモデルケースとしてプロテアソーム遺伝子群破壊株を構築し、形態分化や二次代謝に与える影響の解析を通して真正細菌型プロテアソームの生理的役割の解明の足掛かりとすることを目的とする。

【方法】原核型ユビキチン様ペプチド(*pup*)、ATPase 複合体(*arc*)、proteasome accessory factor A (*pafA*)、Pup デアミナーゼ(*dop*)、及びプロテアソーム 20S コアを構成する *prcB-prcA* 遺伝子領域を含むプロテアソーム遺伝子群全域(*prc* cluster)、又は *prcB-prcA* 遺伝子領域のみをアプラマイシン耐性遺伝子と置換することで、2 種類のプロテアソーム遺伝子破壊株の造成を試みた。得られた破壊株を寒天培地に塗布し、野生株との形態分化能の差異を観察した。また、プロテアソーム遺伝子の破壊が本菌の二次代謝産物である Poly-L-Lys 及び 5 種類のポリエンマクロライド抗生物質の生産に与える影響を解析した。

【結果及び考察】*prc* cluster 全域破壊株は取得できなかった一方で、*prcB-prcA* 遺伝子破壊(Δ*prcBA*)株は高頻度で取得することができた。このことから、*prc* cluster にコードされる *pup*、*arc*、*pafA*、及び *dop* 遺伝子のいずれかは、プロテアソームシステムに加えて、何らかの必須の細胞機能制御へも関与している可能性が示唆された。一方、PrcA 及び PrcB から構成されるプロテアソーム 20S コア自体は、本菌の生育には非必須であったが、その破壊により貧栄養培地上での生育の遅延及び胞子形成能の著しい減弱を導いた。現在、Δ*prcBA* 株の二次代謝産物生産プロファイルについても解析を進めており、その結果についても合わせて報告する。

Key words bacterial proteasome, gene disruption, actinomycetes

G2H5 (0303) テリハボク（*Calophyllum inophyllum*)種子油のマトリックスメタロプロテイナーゼ 9 阻害活性の評価

○松井 杏美[1], 松川 哲也[1], 宇佐美 徹[2], 梶山 慎一郎[1]*
([1]近畿大学院生物理工学研究科, [2]すまエコ株式会社)

Inhibitory effects of *Calophyllum inophyllum* seed oil on matrix metalloproteinase 9

○Ami Matsui[1], Tetsuya Matsukawa[1], Toru Usami[2], Shin'ichiro Kajiyama[1]*
([1]Guraduate School of Biology-Oriented Science and Technology Kindai University, Wakayama, Japan, [2]Sumaeco Co.Ltd, Okinawa, Japan)
kajiyama@waka.kindai.ac.jp

テリハボク (*Calophyllum inophyllum*)はテリハボク科テリハボク属の植物で，熱帯から亜熱帯の沿岸部，日本では沖縄県や小笠原諸島に生息し，風や塩分に強く防風林として植樹されている。 本植物の種子から搾油されるタマヌオイルには抗酸化作用，抗菌作用，抗炎症作用が認められており，インド洋から太平洋の島嶼地域では伝統薬として使用されてきた。さらに最近では，タマヌオイルが抗アクネ菌活性やチロシナーゼ阻害活性などの肌トラブルに効能があることが報告（Phila et al. 2018, Jean-Luc et al. 2016）され，化粧品オイルの機能性原料としても注目されつつある。

一方、抗酸化作用や抗炎症作用などに関わる二次代謝成分としては 6 種の化合物の同定の報告(Mathieu et al. 2021) があるものの，他の美容効果に関する活性物質やその作用機構に関する知見は極めて限定的である。また，タマヌオイルが比較的普及している欧米ではしわやたるみなどの皮膚の老化を予防する効果を示す可能性が示唆されているものの，その化学的根拠は未だに示されていない。そこで本研究では、皮膚の老化に関与すると考えられているマトリックスメタロプロテイナーゼ 9 (MMP9)に着目し、タマヌオイルおよび, 種々の天然由来油脂の MMP9 阻害活性を比較検討した。実験材料としてはタマヌオイルに加えてアルガンオイル，ホホバオイル，モリンガオイル，ハイビスカスオイルおよびスクワランを用いた。油脂をメタノールで抽出し，得られた抽出物をヒト組換え MMP9 に対する阻害活性試験に供した。その結果，阻害活性はタマヌオイル抽出物にのみ検出され，タマヌオイル中には MMP9 阻害活性物質が存在することが推測された。

Key words *Calophyllum inophyllum,* matrix metalloproteinase 9（MMP9）

G2H5 (0304) ゼニゴケ（*Marchantia polymorpha* L.）の精子誘引物質候補 apigenin 生合成遺伝子 chalcone synthase ノックアウト株の作出、活性評価

○ 諏訪宏紀[1], 武部夏実[1], 山崎由美子[1], 松川哲也[1], 大和勝幸[1], 梶山慎一郎[1]*
([1]近畿大院・生物理工)

Characterization of *Marchantia polymorpha* L. chalcone synthase knockout mutant on sperm-attraction

○Hiroki Suwa[1], Natsumi Takebe[1], Yumiko Yamasaki[1], Tetsuya Matsukawa[1], Katsuyuki Yamato[1], Shin'ichiro Kajiyama[1]*
([1]Grad. Sch. BOST, Kindai Univ.)
kajiyama@waka.kindai.ac.jp

ゼニゴケ(*Marchantia polymorpha* L.)は，雌雄異株で性染色体をもち有性生殖を行う．さらに，葉状体上の杯状体から形成される無性芽を用いて無性的に増殖できるので，受精できない変異株の維持も可能である．また，ゼニゴケは生活環のほとんどを半数体で過ごすため，変異株の表現型の評価を早く行うことができる．これらの特性からゼニゴケは生殖研究において優れたモデル生物であり，精子走化性等の受精メカニズムの解明に寄与することが期待できる．我々はゼニゴケの精子誘引物質候補として，ゼニゴケ雌株の生殖器である雌器托から apigenin を単離した．しかし，apigenin は植物に普遍的に存在するフラボノイドであり，特異性が求められる精子誘引物質として生体内で作用しているかは検討が必要な状況であった．そこで apigenin 非生産株による精子誘引能を評価することを目的として，生合成に関与する chalcone synthase ノックアウト株の作出を行った．ゼニゴケゲノム情報を元にシロイヌナズナ chalcone synthase アミノ酸配列とホモロジー検索に供して上位 8 遺伝子を標的遺伝子として選択した．これらの 8 遺伝子に保存されている共通配列を標的としたものと，造精器と比べて造卵器に多く発現している遺伝子 Mapoly0021s0159 のみを標的としたものの 2 種類の gRNA を設計した．それらの gRNA を用いた CRISPR/Cas9 法による遺伝子破壊を，アグロバクテリウム法による形質転換によって行った．得られた形質転換体の雌器托を抽出し，HPLC 分析に供した結果，apigenin が検出限界以下まで減少したゼニゴケ変異株を選抜した．次に，変異株抽出物を精子誘引活性試験に供し，精子の運動の変化を観察した．その結果，野生株と比較して活性強度は弱くなっているものの，変異株抽出物にも誘引活性が認められた．さらに，雌器托から採取した造卵器を精子懸濁液中に静置したところ，野生株と同等の強い誘引が変異株にも確認できた．このことから，ゼニゴケ造卵器において apigenin ではない誘引活性物質が存在することが示唆された．

Key words *Marchantia polymorpha*, sperm-attractant

G2H5 (0305) L-スレオニンを起点とするピラジン生合成機構の解明とその応用

○本山智晴[1], 中野祥吾[1], 長谷部文人[2], 宮田椋[1], 熊澤茂則[1], 三好規之[1], 伊藤創平[1*]
（[1]静県大院・薬食生命, [2]福井県大・生物資源）

Elucidation of the biosynthetic mechanism of pyrazine from L-threonine and its application

○Tomoharu Motoyama[1]*, Shogo Nakano[1], Fumihito Hasebe[2], Ryo Miyata[1], Shigenori Kumazawa[1], Noriyuki Miyoshi[1], Sohei Ito[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Grad. Sch. Biosci. Biotec., Fukui Pref. Univ.)
itosohei@u-shizuoka-ken.ac.jp

【背景・目的】
ピラジンは香料や医薬品の原料として有用な化合物であり、アミノ酸と糖から非酵素的に産生される。近年、細菌の情報伝達物質として働くピラジン化合物が報告され、ピラジン生合成経路の存在が示唆されている。我々は、L-Thr 代謝酵素である L-スレオニン脱水素酵素 (TDH) および 2-アミノ-3-ケトブチル酸 CoA リガーゼ (KBL) が協同的に働くことで、L-Thr から 3-エチル-2,5-ジメチルピラジン (EDMP) が合成されることを発見した。本発表では、特にユニークな機能を有する KBL に着目した EDMP 生合成機構の解明およびその知見を応用したピラジンの合成例を報告する。
【方法・結果】
TDH と KBL は、L-Thr を Gly に代謝する酵素として知られている。TDH が L-Thr から 2-アミノ-3-ケトブチル酸 (AKB) を産生し、KBL は AKB を CoA 依存的に Gly に変換する。我々は、分子式 $C_8H_{12}N_2$ の未知化合物が、本代謝の副反応として、反応条件依存的に産生されることを見出した。まず、この化合物を単離・精製したのち NMR 解析を行い、本化合物が EDMP であることを証明した。加えて安定同位体 L-Thr を基質とし、TDH と KBL を反応させて産生した化合物を GC-MS 分析することで、L-Thr の代謝物が EDMP に取り込まれることを確認した。次に、TDH と KBL が触媒する EDMP 産生機構を解明することを目指した。TDH は L-Thr をアミノアセトンに変換する。一方で KBL について、L-Thr を直接的に代謝できる未同定の触媒能を有しているのではと考えた。事実、LC-MS 分析の結果から、KBL は L-Thr を代謝し Gly を産生することを発見した。本反応を触媒する酵素としてスレオニンアルドラーゼ (TA) が知られている。そこで KBL が TA 活性を有しているのか確認した。結果、KBL は既知の活性に加えて TA 活性も有していることが明らかとなった。TA 活性において L-Thr からアセトアルデヒドも産生されるため、そのアセトアルデヒドが EDMP 合成に関与することが考えられた。実際、非酵素的にアミノアセトンとアセトアルデヒドを反応させた結果、EDMP の合成が確認された。さらに、本知見を応用し、反応させるアルデヒドの種類を変えることで、多様なアルキルピラジンの合成に成功した。
T. Motoyama et al., *Communications Chemistry*, 2021, **4**, 108

Key words pyrazine, L-threonine 3-dehydrogenase, 2-amino-3-ketobutyrate CoA ligase, L-threonine aldolase

G2H5 (0306) ヌクレオシド系抗生物質トヨカマイシンの *Candida albicans* に対する作用の検討

○横田直紀, 谷畑友基, 尾島由紘, 東雅之*
（阪市大院・工・化生系）

Action mechanism of nucleoside antibiotic toyocamycin in *Candida albicans*

○Naoki Yokota, Tomoki Tanibata, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma*
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)
azuma@osaka-cu.ac.jp

深在性真菌症に対する治療薬については、副作用や薬剤抵抗性菌の問題から新たな薬剤が期待されている。放線菌が産生するトヨカマイシン（TM）は、アデノシン類似抗真菌化合物であり、特に病原性酵母 *Candida albicans* に対して高い選択毒性を示す。*C. albicans* における作用機構は明らかではないが、他種生物における解析からリボソーム生合成における TM の阻害作用が示唆されている。*Saccharomyces cerevisiae* に対する TM の作用は非常に弱く、ペーパーディスク法での増殖阻害濃度は、*C. albicans* に比べ 100 倍以上高いことを我々も確認している。本研究では、TM の *C. albicans* に対する高い選択性の要因を明らかにし、その作用機構に関する情報を得ること目的とした。

C. albicans の細胞膜にはアデノシン輸送タンパクが存在するが、*S. cerevisiae* ではその存在は知られていない。我々は、*C. albicans* ではアデノシン輸送タンパクによって TM が取り込まれると予想し、TM の取り込み能力の違いが両株間の感受性の違いの要因であると推測した。そこで、*C. albicans* のヌクレオシド輸送タンパクの一つである Cnt を恒常発現する *S. cerevisiae* を構築し TM に対する感受性を調べた。その結果、*S. cerevisiae* BY4741 株とアデニン要求性である W303-1A 株いずれにおいても TM 感受性が顕著に高くなった。また、*C. albicans* と形質転換した *S. cerevisiae* いずれにおいても、アデノシンの添加によって TM による増殖阻害は弱まった。また、TM の構造類似体であるツベルシジンや 5-ヨードツベルシジンに対しても感受性試験を行い、TM と同様の傾向を得ている。これらの結果から、TM の取り込み能力の違いが酵母間の作用の違いであることが示された。現在、Cnt を欠損させた *C. albicans* の構築と感受性の評価からも上記の確認を進めている。

Key words toyocamycin, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae,* antifungal

G2H5 (0307) *Penicillium spiculisporum* が産生する「スピクリスポール酸」とその誘導体の抗菌特性

○曽我亜由美[1], 平敏彰[2], 池田歩[2], 望月誉志幸[1], 関口喜則[1*]
（[1]磐田化学工業(株)・開発室, [2]産総研・化プロ）

An antimicrobial activity of Spiculisporic acid produced by *Penicillium spiculisporum*, and its derivatives

○Ayumi Soga[1], Toshiaki Taira[2], Ayumi Ikeda[2], Yoshiyuki Mochiduki[1], Yoshinori Sekiguchi[1]*
([1]Res. Inst., IWATA CHEMICAL CO., LTD , [2]RICPT, AIST)
asoga@i-kagaku.co.jp

〔目的〕
スピクリスポール酸（S 酸：(4S,5S)-4,5-ジカルボキシ-4-ペンタデカノリド）は *Penicillium spiculisporum* によって糖から発酵生産される天然の界面活性剤・バイオサーファクタントである。S 酸は、ラクトン環、C_{10} で分布なしのアルキル鎖、2 つのカルボキシ基からなるユニークな構造をしており、ラクトン環の開環体である 3-ヒドロキシ-1,3,4-テトラデカントリカルボン酸(O 酸)をはじめ、いくつかの誘導体に容易に変換することができる。バイオサーファクタントは様々な分野での活用が期待される素材であり、今回我々は、S 酸と各誘導体の物性評価を行った。その中で特に抗菌特性に関して新たな知見が得られたので報告する。

〔方法と結果〕
P. spiculisporum を通気撹拌培養し、菌体外に蓄積された S 酸を培養液から精製、結晶化して誘導体の作製を行った。ラクトン環の構造およびカルボキシル基の数が異なる 3 種類の誘導体（O 酸、D 酸、U 酸）を合成することができた。各誘導体の Na 塩について CMC や表面張力を調査したところ、D-1Na が最も高い能力を有していることが判明し、CMC は 2.1×10^{-4} M、表面張力は 33.0 mN/m であった。

次に、S 酸を用いて細菌、酵母、糸状菌に対する抗菌活性を簡易的に調査したところ、試験したすべての菌種で寒天培地上にハロが形成され、幅広い菌種に効果があることが示された。続いて液体培地を用いて S 酸と誘導体の抗菌活性を比較した結果、グラム陽性細菌に対しては D 酸＞S 酸＞O 酸の順であり、グラム陰性細菌に対しては逆の順であった。また、糸状菌・酵母に対しては D 酸＞＞S 酸・O 酸の順であることが判明した。

そこで D 酸について細菌 5 種、酵母 2 種、糸状菌 5 種を用いて MIC の測定を行った結果、真菌類に対して高い抗菌性を示し、*Aspergillus niger*、*P. pinophilum*、*Rhodotorula mucilaginosa*、*Candida albicans* などに対する MIC は 0.3 g/L であった。天然抗菌剤が効きにくい真菌に対しても高い抗菌力を有していることが確認できた。

またウイルス不活化試験も実施し、インフルエンザ A 型、ネコカリシウイルス、豚コロナウイルスに対して 0.01%処理で 90%以上の不活化効果が示された。

以上のことから、S 酸とその誘導体は幅広い抗菌スペクトルを有していることが確認できた。特に D 酸は、カビが発生する環境での活用など、市場展開が期待できる天然抗菌素材であると考えている。

Key words Spiculisporic acid, biosurfactant, antifungal, antibacterial

G2H5 (0308) 非対称カロテノイドの生合成代謝経路工学

○尾島匠[1], 河合(野間)繁子[1], 梅野太輔[2*]
（[1]千葉大院・融合, [2]早大院・先進理工）

Evolutionary engineering of selective pathways to asymmetric carotenoids

○Takumi Ojima[1], Kawai-Noma Shigeko[1], Daisuke Umeno[2]*
([1]Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)
t.ojima1021@gmail.com

【目的】
自然界には 750 を超える種類のカロテノイドが知られている.天然に存在するカロテノイドのほとんどは,グラニルグラニル二リン酸(C_{20}PP)が二分子縮合して形成した炭素数 40(C_{40})のフィトエン骨格の不飽和化,末端の修飾によって生合成されるため,対称性の高い構造を有している.微生物の中には,ファルネシル二リン酸(C_{15}PP)が二分子縮合して形成したジアポフィトエン(C_{30})骨格を基礎とするカロテノイド生合成も行われるが,この場合も骨格そのものは対称性が高い.一方,光合成マシナリーの中で,カロテノイドからクロロフィルへの高効率なエネルギー伝達の実現には,分子内電荷移動(ICT)励起状態の存在が重要とされる.カロテノイドの励起状態における ICT 特性を高めるためには,分子内分極を大きくする,すなわちカロテノイド分子のポリエン鎖の左右の末端に電子供与的な官能基と電子求引的な官能基を導入することが有効である.しかしながら,カロテノイド骨格の対称性のために,末端修飾酵素の多くが,両末端に等しく作用してしまう.その結果,両末端に異なる官能基をもつカロテノイドの選択的な生合成は非常に困難であった.

【方法・結果】
カロテノイド両末端に異なる修飾反応を選択的に施すために,カロテノイド骨格そのものを非対称化することを考えた.まず,(1)異なるイソプレニル二リン酸(C_{15}PP, C_{20}PP, C_{25}PP, C_{30}PP)合成酵素のコンビナトリアル発現,(2)ジアポフィトエン合成酵素 CrtM の活性ポケットの非対称化,を行うことにより,様々なサイズの非対称カロテノイド骨格を効率的に生合成する経路を構築した.次に,サイズ特異性の異なる様々なカロテノイド修飾酵素の追加共発現によって,非対称骨格の片側のみの不飽和化,修飾(環化,酸化など)を実現した.本講演では,両末端に異なる官能基を有するさまざまな非対称カロテノイドの選択的な生合成経路,それらの示すユニークな分子特性について報告する.

Key words carotenoid, synthetic biology, enzyme engineering

G2H5 (0309) 前駆体枯渇毒性と蓄積毒性を利用したイソプレノイド合成経路の活性進化

○小野里 由実[1], 荒木 道備[1], 木下 葵子[3], 河合 (野間) 繁子[1], 梅野 太輔[1,3]*
([1]千葉大院・融合, [2]千葉大院・工, 3 早大院・先進理工)

Directed evolution of isoprenoid pathway using depletion and cytotoxicity of its intermediates.

○Yumi Onozato[1], Naomasa Araki[1], Noriko Kinoshita[2], Shigeko Kawai-Noma[1], Daisuke Umeno[1,3]*
([1]Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Chiba Univ., [3]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)
jump.92173@gmail.com

【背景と目的】
医薬品や香料、天然色素などを含む 80,000 余りのイソプレノイド類は、すべてジメチルアリル二リン酸 (DMAPP) を building block として合成される。これまで、イソプレノイドの前駆体供給経路の強化を目指した様々な研究がなされてきたが、異常蓄積した IPP/ DMAPP による ATP 合成酵素の阻害効果のため、宿主の代謝能力が著しく落ちる。このため前駆体供給経路の単純な強化だけでは、イソプレノイド生産量の向上は見込めないことがわかってきた。一方で、我々は活性の高いイソプレノイド合成酵素の過剰発現が、DMAPP の枯渇を引き起こしキノンや細胞壁の合成を滞らせるという問題にぶつかった。つまり、DMAPP 供給・消費のどちらが過剰となっても、宿主の増殖には大きな阻害効果があり、結果としてイソプレノイド生産量のさらなる向上を停滞させる。本研究では、DMAPP 供給経路と消費酵素を、互いの細胞毒性を相互に解毒しあうかたちで共進化させることを試みた。

【結果および考察】
1. DMAPP 枯渇毒性を利用した前駆体供給経路の活性改良：DMAPP 消費酵素 (IspS) の過剰発現による DMAPP 枯渇毒性を利用し、イソペンテニル一リン酸化酵素 (IPK) の活性改良を行った。ランダム変異を導入して調製した IPK ライブラリの中から、DMAPP 枯渇状態 (IspS 過剰発現) から宿主の増殖をレスキューする変異体を探索した。1 ラウンドの進化工学で、IPK 経路によるイソプレノイド生産量は倍増した。
2. IspS と IPK 経路の相互解毒効果：改良型 IPK 変異体 (DMAPP 供給系) と IspS (DMAPP 消費系) を一細胞に共存させた。どちらの発現誘導も単独では致死であったが、両者が同時に発現誘導するときのみ、宿主の生育が可能であった。本講演では、この「相互解毒効果」を利用した、上・下流酵素の漸進的な交互共進化、そして相互依存を用いた安定発現系の構築の試みについても報告する。

Key words isoprenoid, directed evolution, synthetic biology, selection

G2H5 (0310) 抗生物質 resormycin 生合成遺伝子群に見出した Phenylalanine 水酸化酵素の機能解析

○岸千紘[1]*, 丸山千登勢[1], 山中一也[2], 五十嵐雅之[3], 濱野吉十[1]
([1]福井県大院・生物資源, [2]関西大・化生工, [3]微化研)

Functional analysis of Phenylalanine dihydroxylase found in the resormycin biosynthetic gene cluster.

○Chihiro Kishi[1]*, Chitose Maruyama[1], Kazuya Yamanaka[2], Masayuki Igarashi[3], Yoshimitsu Hamano[1]
([1] Grad. Sch. Biosci. Biotec., Fukui Pref. Univ., [2] Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [3] Institute of Microbial Chemistry, BIKAKEN)
s2173006@g.fpu.ac.jp

［目的］放線菌 *Streptomyces platensis* MJ953-SF5 が生産するペプチド化合物 resormycin[1]（RM）は、非タンパク性アミノ酸（NPAA）である beta-homolysine（beta-hLys）、hydroxy-L-valine（Val-OH）、2 つの水酸基を有する *p*-chlorophenylalanine からなる植物病原真菌特異的な抗生物質である。Phe 水酸化酵素は、フェニルケトン尿症の新たな診断用酵素としての応用利用が期待されることから、RM における Phe 誘導体の生合成経路には大変興味が持たれた。これまでの研究で我々は、RM 生合成遺伝子群（*res* 遺伝子群）を同定しており、興味深いことに、この *res* 遺伝子群には Phe hydroxylase に相同性を示す酵素遺伝子は *res8* 遺伝子のみであった。そのため、Res8 は 1 つの酵素で 2 箇所の水酸化反応を同時に触媒する新規水酸化酵素であると考えられ、既存の Phe 定量用酵素と比較して、2 倍の酵素活性を示す高感度な Phe 診断用酵素としての開発が期待された。そこで本研究では、*res* 遺伝子群の遺伝子破壊実験および組換え酵素を用いた *in vitro* 反応による Res8 の機能解析を試みた。
［方法と結果］まず、*res8* 遺伝子を in-frame で破壊し、*S. lividans* TK23 を宿主として異種発現を行ったところ、RM 生産性が完全に消失した。このことから、Res8 による Phe 水酸化反応は、RM のペプチド骨格が形成される前に触媒されると考えられた。次に、Res8 のアミノ酸配列からドメイン検索を行った結果、本酵素は、Tyr 生合成を触媒する Phe-4-hydroxylase（Phe4H）と同様に 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin（BH_4）を補酵素とする水酸化酵素であることが判明した。また、Res8 の触媒残基を明らかにするために、既存の Phe4H および、二次代謝産物生合成で見出された Phe-3-hydroxylase（Phe3H）とのアミノ酸配列比較を行ったところ、Phe4H や Phe3H で知られる BH_4 や鉄イオンとの結合に関わる保存モチーフがよく保存されている一方、Phe のベンゼン環周辺のアミノ酸残基に幾つかの違いが観察された。そこで Res8 の基質特異性を調べるために、組換え酵素を用いて Phe、*p*-Tyr、*m*-Tyr を基質に酵素反応を行った結果、Res8 はいずれの基質も認識し、Phe の 1 箇所または 2 箇所の水酸化、および *p*-Tyr と *m*-Tyr の 1 箇所の水酸化反応を触媒した。このことから、Res8 は幅広い基質認識機構を有する水酸化酵素であることが判明した。現在、Res8 によって触媒される Phe の水酸化部位の同定を進めており、その詳細について紹介する。
［参考文献］[1] M. Igarashi *et al.*, *J. Antibiot. Tokyo*, 50(12): 1020-1025 (1997).

Key words antibiotics, non-proteinogenic amino acid, biosynthesis

G2H5 (0311) streptothricin 類縁生合成遺伝子群に見出した aminoacyl-tRNA 依存型アミド合成酵素の変異解析

○内山駿[1]*, 丸山千登勢[1], Hamdy Sherif A. M. A.[2], 中嶋優[2], 森田洋行[2], 濱野吉十[1]
([1]福井県大院・生物資源, [2]富山大・和漢医薬研)

Mutation analysis of an aa-tRNA-dependent amide bond-forming enzyme showing a broad substrate recognition.

○Shun Uchiyama[1]*, Chitose Maruyama[1], Hamdy Sherif A. M. A.[2], Yu Nakajima[2], Hiroyuki Morita[2], Yoshimitsu Hamano[1]
([1] Grad. Sch. Biosci. Biotec., Fukui Pref. Univ., [2] Inst. Nat. Med., Toyama Univ.,)
s2173001@g.fpu.ac.jp

［目的］各種放線菌によって生産される抗生物質 streptothricin (ST) およびその類縁化合物は、共通して streptothrisamine 骨格とアミノ酸側鎖からなるが、興味深いことにその側鎖構造は、β-lysine 型と glycine (Gly)型の 2 種類しか見つかっていない。そこで我々は、第 2、第 3 のアミノ酸側鎖を有する新規 ST 類縁化合物の創製を目指してきた。これまでの研究で、ST 類縁化合物 BD-12 の Gly 側鎖のアミド結合形成が、FemXA family に相同性を示す Orf11 によって、Gly-tRNA^{Gly} 依存的に触媒されることを明らかにし[1]、そのホモログ酵素である Sba18 および Sbb17 を同定した。これら 2 つのホモログ酵素は 90%以上の配列相同性を示すが、Sbb17 は Orf11 と同様に Gly-tRNA^{Gly} を特異的に基質認識する一方、Sba18 は Gly-tRNA^{Gly} だけでなく、Ala-tRNA^{Ala}、Ser-tRNA^{Ser} を基質認識し、新規 ST 類縁化合物を生成した。この結果より、Sba18 が、aa-tRNA^{aa} の aminoacyl 基および tRNA^{aa} の両方に対して、基質特異性の広い酵素であることが判明した。そこで本研究では Sba18 および Sbb17 の配列比較を基に、基質認識に関わるアミノ酸残基の同定を試みた。
［方法と結果］Sba18 および Sbb17 の基質認識に関わる領域を同定するために、約 300 残基からなるこれらの酵素を 100 残基ずつ 3 つの領域に分け、それぞれの領域を相互に入れ替えたキメラ酵素を構築した。まず、Sba18 と Sbb17 の 210 番目付近に共通して存在する制限酵素 *Nde* I サイトを利用し、それぞれの C 末端配列を入れ替えたキメラ酵素遺伝子 *sba18-C-sbb17* および *sbb17-C-sba18* を作製した。これらのキメラ酵素の組換え酵素を調製し、*in vitro* 反応にて基質特異性を比較したところ、Sba18-C-Sbb17 は野生型 Sba18 と、Sbb17-C-Sba18 は野生型 Sbb17 と同様の基質認識を示した。このことから、C 末端領域は基質認識に関与しないことが判明した。本発表では、N 末端領域、および中央領域を入れ替えたキメラ酵素、また部位特異的変異型酵素を用いた解析結果について紹介する。
［文献］ [1] C. Maruyama *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 3640-3648, (2016)
Key words antibiotics, aminoacyl-tRNA

G2H5 (0312) One-pot chemoenzymatic 合成法で構築したアミド化合物ライブラリーを用いた簡便ヒストン脱アセチル化酵素 1 阻害剤スクリーニング法の開発

○平田佳之[1], 上里新一[1], 松井大亮[2*]
([1] 大阪医薬大, [2] 立命館大)

Development of a handy screening method of histone deacetylase 1 inhibitor using an amide compound library constructed by a one-pot chemoenzymatic synthesis

○Yoshiyuki Hirata[1], Shinichi Uesato[1], Daisuke Matsui[2*]
([1]Osaka Med. Pharm. Univ., [2]Ritsumeikan Univ.)
d-matsui@fc.ritsumei.ac.jp

【目的】ヒストンの Lys 残基の脱アセチル化を触媒するヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）は，がん抑制遺伝子や細胞周期関連タンパク質などの細胞の増殖および恒常性に関与することから，その阻害剤が求められている．我々はこれまでに HDAC の補欠分子族である亜鉛イオンを捕捉するアミド化合物が，HDAC type1（HDAC1）阻害活性を示すことを明らかにした[1]．本研究では，最近我々が開発した酵素法によりアミノ酸から誘導されるケト酸に，無触媒下にてヒドロキシルアミノ酸を反応させるケモエンザイマティック合成法[2]を用いて，96 穴プレート中で芳香族アミド化合物をワンポット合成し，得られたアミド化合物の HDAC1 阻害活性を評価する簡便スクリーニング系を開発した．
【方法】豚腎臓由来 D-アミノ酸酸化酵素遺伝子を pUC18 ベクターに挿入し，得られた発現プラスミドを大腸菌 JM109 に挿入した．培養後，菌体を超音波破砕と遠心分離し，96 穴プレート内でその上清（0.42 U）と各種 10 mM D-アミノ酸，カタラーゼを 10 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）を用いて 30ºC で反応しケト酸を合成した．反応液に *N,N*-ジメチルホルムアミド（DMF）を添加し，ケト酸と等モルの様々なヒドロキシアミノ酸を加え，50ºC で 18 時間反応し，アミド化合物を合成した．得られたアミド化合物に対し，HDAC1 Fluorimetric Drug Discovery Assay Kit（Enzo Life Science）を用いて HDAC1 阻害活性を測定した．
【結果と考察】酵素法により D-フェニルアラニンからフェニルピルビン酸を 97%の収率で得，フェニルピルビン酸と *N*-ベンジルヒドロキシベンジルアミンからベンジル-2-フェニルアセトアミドを 82%の収率で得た．これらを組合わせたワンポットケモエンザイマティック合成でも生成物を確認しており，本ケモエンザイマティック反応によるアミド化合物の合成法は大量生産を見据えた魅力的な反応である．本手法でアミノ酸やヒドロキシアミノ酸を変更させて，芳香族アミド化合物のワンポット合成法を構築した．得られたアミド化合物に対し，HDAC1 阻害活性を比較した結果，100 μM（2-フェニルアセチル）トリプトファンで 55%の阻害活性を確認した．
【参考文献】[1]Y. Hirata et al, *Sci. Rep.*, **8**, 1400 (2018), [2]D. Matsui et al, *Chem. Lett.*, doi:10.1246/cl.210286
Key words amide, one-pot process, chemoenzymatic synthesis, histone deacetylase 1

G2H6 (0101) *Moniliella megachiliensis* における窒素源飢餓とエリスリトール生産性との関連性

○吉竹彰虎[1], 渡邉泰祐[1,2]*, 春見隆文[1,2], 荻原淳[1,2]
([1]日大院・生資科, [2]日大・生資科)

Relationship between nitrogen starvation and erythritol production in *Moniliella megachiliensis*

○Shogo Yoshitake[1], Taisuke Watanabe[1,2]*, Takafumi Kasumi[1,2], Jun Ogihara[1,2]
([1]Dept. Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ., [2]Coll. Biores. Sci., Nihon Univ.)
watanabe.taisuke@nihon-u.ac.jp

【背景】担子菌系酵母 *Moniliella megachiliensis* は、高浸透圧条件において浸透圧ストレスの適合溶質としてエリスリトールを蓄積し、培養液中にも著量のエリスリトールを生産することが知られている。我々はエリスリトール生産培地に用いている窒素源(Yeast Extract) 濃度を上昇させると、高浸透圧条件下にも関わらず培養液中にエリスリトールが生成されなくなる現象を見出した。今回の発表では、この現象を踏まえ、本菌における窒素源飢餓現象の確認とその応答によるエリスリトール生産性への影響を調べることを目的とした。出芽酵母等では、窒素源飢餓時にそのセンサー分子であるラパマイシン標的タンパク質 *tor1* の発現量が低下することが知られている。そこで、本菌における *tor1* の遺伝子発現量を評価することにより、窒素源飢餓状態の程度を評価し、細胞内外のエリスリトール濃度との関連性を調べた。
【方法】供試菌株として *M. megachiliensis* SN-124A を使用した。30 w/v %グリセロール、0.5-2.0 w/v% Yeast Extract を 100 mL 調製し、30℃、200 rpm で 7 日間振盪培養した。生育は乾燥菌体重量測定により評価した。細胞内外のエリスリトール濃度とグリセロール濃度は、HPLC を用いて定量した。*Saccharomyces cerevisiae* S288C における TOR1 のアミノ酸配列に基づいて、*M. megachiliensis* における *tor1* の配列を決定した。菌体から全 RNA を抽出し、qRT-PCR によって *tor1* の発現定量を行った。
【結果】Yeast Extract 低濃度条件における生育抑制と細胞外におけるエリスリトール濃度の上昇が確認された。したがって、本菌は窒素源濃度低下時にエリスリトールを細胞外に高生産していることが示された。*M. megachiliensis* における TOR1 の探索の結果、出芽酵母等で見出されている TOR1 に対して約 40-50%の配列相同性を示し、N 末端側に HEAT repeat、C 末端側に FAT、FRB、PIK の各ドメインをもつアミノ酸配列が見出され、これを本菌における TOR1 とした。*tor1* の発現量は、Yeast Extract 低濃度条件において低下していたことから、本菌における窒素源飢餓現象が確認できたものと判断した。さらに、本菌において確認されているエリスリトール生合成関連遺伝子（transketolase, transaldolase, erythrose reductase）の発現との関連性を確認した結果、Yeast Extract 低濃度条件ではこれら生合成遺伝子の発現は抑制傾向を示したことから、これらの遺伝子と窒素源飢餓を介した *tor1* の発現抑制を引き金とするエリスリトール生合成経路の活性化との関連性は確認されなかった。

Key words Nitrogen starvation, Tor1, erythritol, Stress response

G2H6 (0102) 出芽酵母に高糖濃度耐性を付与する新規変異遺伝子の有用性の検討

○馬倉 朋奈[1], 塩入 壮馬[2], 小久保 晋[3], 早川 正幸[4],
山村 英樹[3], 中川 洋史[3]*
([1]山梨大院・医工農, [2]山梨大院・医工総, [3]山梨大院・総研部,
[4]山梨県立大学)

Evaluation of the usefulness of a novel mutant gene that confers high-concentration sugar tolerance on *Saccharomyces cerevisiae*

○Tomona Umakura[1], Soma Shioiri[2], Susumu Kokubo[3], Masayuki Hayakawa[4], Hideki Yamamura[3], Youji Nakagawa[3]*
([1]Grad. Sch. Med. Eng. Agr., Univ. Yamanashi, [2]Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi, [3]Grad. Fac. Interdisc. Res., Univ. Yamanashi, [4]Yamanashi Prefectur. Univ.)
youji@yamanashi.ac.jp

【背景・目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は幅広い産業で用いられているが、実用条件下において高糖濃度や冷凍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が低下することが問題となっている。よって、マルチストレスに耐性を持つ実用酵母の育種技術が求められている。本研究室において実験室酵母株に変異処理を行うことで、50% (w/v) グルコース存在下でも良好な生育を示す高糖濃度耐性変異株 YN176 が取得され、その原因遺伝子変異として *RAS1* 遺伝子のミスセンス変異を同定している。しかし、本変異による高糖濃度ストレス耐性機構や、本変異の育種における有用性については不明である。そこで本研究では、本変異遺伝子による高糖濃度ストレス耐性機構や、本変異遺伝子のマルチストレス耐性に与える効果、育種における有用性を検討することを目的とした。
【方法・結果】本変異遺伝子による高糖濃度ストレス耐性機構に関する知見を得るため、一倍体実験室酵母野生型株の *RAS1* を本変異遺伝子で置換した置換株の細胞内 cAMP 濃度の測定を行った。その結果、置換株が野生型株よりも低い細胞内 cAMP 濃度を示したことから、本変異遺伝子は cAMP-PKA 経路の活性を低下させることで高糖濃度ストレス耐性を向上させることが示唆された。一方で、本変異遺伝子のマルチストレス耐性に与える効果を調べるため、一倍体実験室酵母野生型株とその本変異遺伝子による置換株の様々なストレスに対する耐性をスポット試験により調べた結果、置換株は野生型株に比べ、高糖濃度ストレス耐性だけでなく熱ショック、高塩濃度、冷凍、乾燥等に対するストレス耐性も高いことが明らかとなった。続いて、本変異遺伝子が実用パン酵母の育種にも有用であるか否かを調べるために、二倍体実用パン酵母株の本変異による置換株をセルフクローニングにより構築することを試みた。その結果、二倍体実用パン酵母株の本変異によるヘテロ置換株およびホモ置換株の構築に成功した。現在、これらの置換株のストレス耐性について解析を進めている。

Key words *Saccharomyces cerevisiae,* high-concentration sugar tolerance, mutation, baker's yeast

G2H6 (0103) 実用パン酵母における過酸化水素耐性変異株の特性およびゲノム変異解析

○露木 七菜子[1], 小久保 晋[2], 早川 正幸[3], 山村 英樹[2],
中川 洋史[2]*
([1]山梨大院・医工農, [2]山梨大院・総研部, [3]山梨県立大学)

Characterization and genomic mutation analysis of hydrogen peroxide-tolerant mutant strains of baker's yeast

○Nanako Tsuyuki[1], Susumu Kokubo[2], Masayuki Hayakawa[3] , Hideki Yamamura[2] , Youji Nakagawa[2]*
([1]Grad. Sch. Med. Eng. Agr., Univ. Yamanashi, [2]Grad. Fac. Interdisc. Res., Univ. Yamanashi, [3]Yamanashi Prefectur. Univ.)
youji@yamanashi.ac.jp

【背景・目的】製パン過程においてパン酵母は冷凍、高糖濃度、乾燥などの多様なストレスにさらされ、発酵力や生存率が低下する。そのためストレスに耐性をもつパン酵母の需要が高まっている。しかし食品に使用するため、遺伝子組み換え技術に対する消費者の懸念から遺伝子操作技術を全く使用しないストレス耐性パン酵母の獲得が望まれている。本研究では実用パン酵母株から当研究室において開発された致死的濃度過酸化水素法（LCH 法）により取得された過酸化水素耐性変異株について、様々なストレスに対する耐性能や製パン条件下における発酵力の評価を行った。さらに実験室酵母で得られている知見と次世代シーケンス技術を用い、変異遺伝子の解析を行うことを目的とした。
【方法・結果】実用パン酵母株から LCH 法によって取得された YN214 株と YN215 株について、過酸化水素、高糖濃度、乾燥等のストレスに対する耐性をスポット試験により調べた結果、両株とも複数のストレスに耐性を示したことから、マルチストレス耐性変異株であることが示唆された。また、製パン条件下におけるストレス耐性試験を行った結果、YN214 株と YN215 株はともに、野生型株に比べ高糖濃度パン生地における発酵力と、乾燥ストレス処理後における発酵力が高かった。これら 2 株の変異遺伝子に関する知見を得るため、次世代シーケンスによるゲノム変異解析を行った。野生型株と YN214 株、YN215 株とのゲノム配列の比較により、両株とも 18,000 箇所以上の変異が検出された。そこで、本研究室において実験室酵母株から LCH 法によって分離されたマルチストレス耐性変異株が有する変異遺伝子に着目したところ、2 株とも *RAS1* 遺伝子および *CDC25* 遺伝子において複数の変異が見られた。従って、これらの変異が YN214 株と YN215 株のマルチストレス耐性に関与している可能性が考えられた。

Key words baker's yeast, hydrogen peroxide, mutant, genomic mutation analysis

G2H6 (0104) 酸素制限による遺伝子組換えコリネ型細菌を用いた 3-amino-4-hydroxybenzoic acid 発酵の促進作用

○川口 秀夫[1]*, 蓮沼 誠久[2], 大西 康夫[3], 佐塚 隆志[4], 荻野 千秋[5],
近藤 昭彦[1,2,5]
([1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大・先端バイオ工学セ, [3]東大院・農学生命科学, [4]名古屋大・生物機能開発セ, [5]神戸大院・工)

Oxygen limitation enhanced 3-amino-4-hydroxybenzoic acid production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*

○Hideo Kawaguchi[1]*, Tomohisa Hasunuma[2], Yasuo Ohnishi[3], Takashi Sazuka[4],Chiaki Ogino[5], Akihiko Kondo[1,2,5]
([1]Grad Sch Sci Tech Innov, Kobe Univ., [2]Eng Biol Res Cent, Kobe Univ., [3]Grad Sch Agr Life Sci, Univ. Tokyo, [4]Biosci Biotech Cent, Nagoya Univ., [5]Grad Sch Eng, Kobe Univ.)
kawaguchi_h@port.kobe-u.ac.jp

【目的】微生物の発酵による芳香族化合物の生産は、従来の石油からの生産体系に代わる、持続可能な生産技術として注目されている [1,2]。本研究では、超耐熱性バイオプラスチックの building block となるγ−アミノ酸 3-amino-4-hydroxybenzoic acid（3,4-AHBA）の微生物発酵に着目し、溶存酸素（DO）濃度制限による、遺伝子組換えコリネ型細菌を用いた 3-amino-4-hydroxybenzoic acid（3,4-AHBA）発酵促進作用について調べた。
【方法・結果】Jar を使って DO 制御下で培養を行った結果、酸素要求性である 3,4-AHBA の生産は DO と負の相関関係を示し、酸素供給律速である DO = 0 ppm で好気条件（DO ≥2.66 ppm（33%飽和酸素濃度））の 4 倍の生産性が得られた（1.3 g/L）。また、この酸素制限条件（DO = 0 ppm）では、好気条件の主要生産物であったアミノ酸の濃度が著しく減少し、代わって有機酸が著量蓄積した。酸素制限による代謝シフトと 3,4-AHBA 生産促進効果の作用機序を調べるため、DO = 0 ppm と 2.66 ppm における代謝プロファイルを比較した結果、酸素制限条件では好気条件と比べて補酵素 $NAD(P)^+$ の再生が低下しており、またピルビン酸が蓄積して通常の好気的な発酵と比べてアミノ酸代謝が著しく変動していることを明らかにした。メタボロームの結果から酸素制限条件に適応した代謝経路を設計し、作製した組換え株による酸素制限条件下での発酵を調べた結果、細胞あたりの 3,4-AHBA 生産性が親株の 3.6 倍に増加した代謝改変株を得ることができた。
【謝辞】本研究は JST CREST（JPMJCR13B3）, 未来社会創造事業（JPMJMI17EG）, JSPS 科研費 基盤研究(B)（19KT0009)の支援を受けて実施した.

【Reference】
1. A. Nag, *et al*. (2021) *Advanced Sustainable Systems*, 5(1):2000193.
2. H. Kawaguchi, *et al*. (2016) *Current Opinion in Biotechnology*, 42:30–39.

Key words *Corynebacterium glutamicum*, dissolved oxygen, metabolic engineering

G2H6 (0105) Metabolic regulation adapting to high methanol environment in the methylotrophic yeast *Ogataea methanolica*

○Hao-Liang Cai[1*], Ryohei Doi[2], Masaya Shimada[1,2], Takashi Hayakawa[1,2], Tomoyuki Nakagawa[1,2]
([1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Gifu Univ., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Gifu Univ.)

メチロトローフ酵母 *Ogataea methanolica* の高メタノール環境への応答における代謝制御

○蔡豪亮 [1], 土井遼平 [2], 島田昌也 [1,2], 早川享志 [1,2], 中川智行 [1,2*]
([1]岐阜大院・連農, [2]岐阜大院・自然科学)
[*]t_nakaga@gifu-u.ac.jp

Methanol, synthesized from greenhouse and natural gases, is considered as a next-generation energy source. The methylotrophic yeast is known to use methanol as sole carbon feedstock to grow, providing an alternative to sugar fermentation to produce a vast number of commodity chemicals in a sustainable way. However, the yeast shows severe growth defects on high methanol conditions.

In this study, metabolite profiling of *O. methanolica* that was conducted under glucose (Glc), low and high methanol (L- and H-MeOH) conditions to show the adaptation mechanism to a H-MeOH environment.

The yeast strain responded not only to the presence of methanol but also to its concentration based on the growth condition. Under H-MeOH conditions, *O. methanolica* downregulated the methanol utilization, glycolytic pathway, and the alcohol oxidase (AOD) isozymes and dihydroxyacetone synthase (DAS) expression compared with L-MeOH-grown cells. However, levels of energy carriers, such as ATP, NADH, and NADPH, were maintained to support cells survival.

In H-MeOH-grown cells, reactive oxygen species (ROS) levels were significantly elevated. Along with increasing ROS levels, ROS scavenging system expression was significantly increased in H-MeOH-grown cell.

Thus, we concluded that formaldehyde and H_2O_2, which are products of methanol oxidation by AOD isozymes in the peroxisome, are overproduced in H-MeOH-grown cells, and excessive ROS derived from these cells is generated in the cytosol, resulting in upregulation of the antioxidant system and downregulation of the methanol-utilizing pathway to suppress overproduction of toxic intermediates.

Cai HL, *et al*. 2021. *Microbial Biotechnol*. **14:** 1512-1524.

Key words methylotrophic yeast, methanol, metabolic response, stress resistance

G2H6 (0106) 低栄養下における *Methylorubrum* 属細菌のランタノイドによる生育促進応答に関する研究

○根本侑知 [1], 水野洸介 [1], 原田雄斗 [1], 岩本悟志 [1], 谷明生 [2], 三井亮司 [3], 島田昌也 [1], 早川享志 [1], 中川智行 [1*]
([1]岐阜大院・自然科学, [2]岡山大・植物研, [3]岡山理科大・理)

Study on growth stimulation of *Methylorubrum* strain by lanthanides in oligotriphic condition

○Yuchi Nemoto[1], Kosuke Mizuno[1], Yuto Harada [1], Satoshi Iwamoto[1], Akio Tani[2], Ryoji Mitsui[3], Masaya Shimada[1], Takashi Hayakawa[1], Tomoyuki Nakagawa[1*]
([1]Grad Sch Nat Sci Technol, Gifu Univ, [2]IPSR, Okayama Univ, [3]Fac Sci, Okayama Univ Sci)
[*]t_nakaga@gifu-u.ac.jp

【目的】

微生物群の低栄養環境への適応能力は、バイオレメディエーションをはじめとした様々な微生物産業分野への応用が期待できる。私たちは、低栄養環境下でランタノイド（Ln）に応答し、コロニー径を増大させる細菌として *Methylobacterium* sp. を単離し、報告してきた。しかし、これまで本株以外、Ln 依存的生育促進作用を示す細菌群は報告されておらず、Ln 依存的生育促進を示す微生物群が自然界に普遍的に分布するか、またその Ln に対する細胞応答の分子機構は示されていない。

本研究では低栄養環境下でコロニーが Ln 依存的に増大する C_1 細菌の自然界における分布、さらにその Ln 応答の分子メカニズムを解明することを目的とした。

【方法・結果】

自然界から単離した C_1 細菌 75 株を用いて、低栄養環境下での生育における Ln（Sm）の影響を観察した。その結果、75 株のうち 15 株が Sm 依存的にコロニー径を増大させた。また、これら 15 株は特定の属種に分布せず、C_1 細菌群に広く分布していた。

一方、最も Sm に応答した *Methylorubrum extorquens* GM97 株を選抜し、Sm 依存的なコロニー増大の分子機構の解明を目指した。低栄養環境下において、GM97 株は Sm により細胞形態を変化させないものの、コロニーあたりの細胞数が増加したことから、Sm によるコロニー増大の要因は細胞増殖の活性化にあると考えられた。さらにトランスクリプトーム解析を用いて Sm 依存的に発現量が変化する遺伝子群を同定したところ、高親和性 K^+輸送体をコードする Kdp オペロンの発現が上昇していた。また、Sm により細胞増殖が活性化された GM97 株は細胞内 Sm および K^+濃度が上昇していた。

本研究では、Ln 依存的生育促進を示す C_1 細菌が自然界に普遍的ではないものの、広く分布することを示した。また、その分子機構では Kdp が何かしらの役割をもつことが考えられた。これらは、C_1 細菌が自然界で Sm を積極的に生命活動に利用している裏付けであり、生態系における Ln の生物学的意義を示した新たな知見である。

Key words lanthanides, Sm, methylotrophic bacteria, growth stimulation

G2H6 (0107) *Streptomyces* sp. No. 3 株の生産する新しい抗生物質に関する研究

○挾井佳那 [1], 阿部優依奈 [1], 村上周一郎 [2*]
([1]明治大院・農, [2]明治大・農)

Study on new antibiotics produced by *Streptomyces* sp. No. 3

○Kana Kakoi[1], Yuina Abe[1], Shuichiro Murakami[2*]
([1]Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., [2]Sch. Agric., Meiji Univ.)
smura@meiji.ac.jp

【背景および目的】現在、薬剤耐性菌の出現が問題となっているため、新奇抗生物質の探索が必要となっている。当研究室では、これまでに細菌と真菌に抗菌活性を示す抗生物質を生産する *Streptomyces* sp. No. 3 株が分離されている [1)]。本菌を N-アセチルグルコサミンおよびグルコサミンを含む培地（GN 培地）で培養したところ、これまで用いていた AM 培地で生産される抗生物質とは異なる抗生物質を生産していることが示唆された。そこで、本研究ではこの新たに生産された抗生物質について特性を明らかにすることを目的とした。

【方法】*Streptomyces* sp. No. 3 株を AM 培地、または GN 培地で培養した培養上清を、Amberlite IRC-50 陽イオン交換カラムおよび Sephadex G-10 ゲル濾過カラムに供して分画した。各画分の抗菌活性は、検定菌として *Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli*、および *Candida utilis* を用いるディスク拡散法により生育阻止円の直径を測定することで評価した。活性を示す画分は、さらにシリカゲル薄層クロマトグラフィーに供し、紫外部吸収およびニンヒドリン法によりスポットを検出した。

【結果および考察】AM 培地および GN 培地から得られた培養上清を透析に供したところ、AM 培地では透析内液（分子量 500 以上）のみに抗菌活性が見られたのに対し、GN 培地では透析外液にも活性が確認された。Amberlite IRC-50 カラムに供したところ、2N NH_4OH で溶出した画分に抗菌活性が確認された。また、その画分を Sephadex G-10 カラムに供したところ、AM 培地で培養した場合には活性のピークは 1 つ（ピーク①）であったのに対し、GN 培地ではピーク①以外に他の 2 つの活性のピークが確認された（ピーク②・ピーク③）。さらに、ピーク②およびピーク③に含まれる物質を薄層クロマトグラフィーで分析したところ、ピーク②には少なくとも 6 種類、ピーク③には少なくとも 4 種類の物質が含まれていることが明らかになった。今後は、薄層クロマトグラフィーにおいて分離されたスポットについて、さらなる精製を進めていく予定である。

1）阿部優依奈ら，日本農芸化学会 2018 年度大会，大会講演要旨集，p. 376.

Key words antibiotics, actinomycetes, *Streptomyces*

G2H6 (0108) *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 における細胞膜リン脂質の生理機能解析

○辻茜, 豊竹洋佑*, 河股優輔, 山本翔太, 松井大亮, 若山守
（立命館大院・生命科学）

Physiological function analysis of plasma membrane phospholipids in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108

○Akane Tsuji, Yosuke Toyotake*, Yusuke Kawamata, Shota Yamamoto, Daisuke Matsui, Mamoru Wakayama
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)
連絡先の E-mail **アドレス**: toyotake@fc.ritsumei.ac.jp

【諸言】酢酸菌は内膜結合型のアルコール脱水素酵素 (ADH) とアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) の働きにより、エタノールから酢酸を生産するいわゆる「酢酸発酵」を行う。酢酸は培養液中にほぼ定量的に蓄積され、極めて強い抗菌活性を示すが、酢酸菌は高濃度の酢酸共存下でも生育を可能とする独自の生理メカニズムを有している。

酢酸菌の発酵生理と細胞構造には密接な関係があると考えられることから、その一つとして酢酸菌膜脂質の分子機能が注目されてきた。酢酸菌細胞膜を構成する脂質分子のうち、50%以上を占める主要分子が膜リン脂質である。現在、酢酸発酵の過程で特に重要なリン脂質分子は同定されていない。そこで本研究では、酢酸発酵の過程で変動する膜リン脂質を明らかにし、その生理的意義を解明することを目的とした。

【方法・結果】研究対象には、*Acetobacter* 属酢酸菌の一種である *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 を用いた。SKU1108 株をエタノールもしくは酢酸含有培地で培養し、得られた菌体から Bligh & Dyer 法にて全膜脂質を抽出した。抽出した脂質を TLC 展開したのち、プリムリン発色させたプレートから各リン脂質画分を分取した。リン脂質量は湿式分解リン定量法により定量した。その結果、酢酸存在下では、何も添加しなかった場合と比較してホスファチジルコリン (PC) のみが増加した。この結果から、PC は酢酸菌が急に酢酸に晒された場合における酢酸に対する防御機構に関与していることが示唆された。一方、エタノール存在下 (酢酸発酵条件下) では、何も添加しなかった場合と比較してホスファチジルエタノールアミン (PE) のみが増加した。ここで、ADH を構成する 3 つのサブユニット (I - III) のうち、サブユニット I と II をコードする遺伝子 *adhAB* を欠損させた酢酸発酵能欠失株 (Δ*adhAB*) を作製し、これを用いて上記と同様の解析を行なった。その結果、エタノール存在下で何も添加しなかった場合と比較して PE の有意な増加は認められなかった。さらに、Δ*adhAB* 株に *adhAB* 発現ベクターを導入した *adhAB* 相補株では、Δ*adhAB* 株と比較してエタノール存在下で PE 合成能が回復した。以上の結果から、酢酸発酵の過程で特に重要な膜リン脂質は PE であることが示唆された。

Key words alcohol dehydrogenase, membrane phospholipid, acetic acid fermentation, acetic acid bacteria

G2H6 (0109) 温度が放線菌の代謝と細胞形態・生死に及ぼす影響

○櫻井惇[1], 内倉寛斗[1], 山本省吾[2], 山田佑樹[2], 曽田匡洋[2], 柘植陽太[1,3]*
([1]金沢大院・自科, [2]長瀬産業, [3]金沢大・新学術)

Effect of temperature on metabolic activity, cell morphology and viability in *Streptomyces*

○Jun Sakurai[1], Hiroto Uchikura[1], Shogo Yamamoto[2], Yuuki Yamada[2], Masahiro Sota[2], Yota Tsuge[1,3]*
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., [2]NAGASE & CO., LTD., [3]InFiniti, Kanazawa Univ.)
ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

放線菌 *Streptomyces* 属は抗生物質などの二次代謝産物の生産菌として知られている．そのため二次代謝に関する研究は多く行われているが，二次代謝産物の前駆体合成に必要な一次代謝や細胞形態といった基礎的な特徴に注目した研究は多くない．有用化合物や細胞構成成分を合成するための酵素反応は温度によって大きな影響を受ける．一般的に有用化合物の生産は増殖至適温度で行われるが，糖消費や有用化合物生産に最適な温度は増殖至適温度とは異なる可能性がある．そこで本研究では *Streptomyces lividans* における温度変化に伴う一次代謝の変動を調べることを目的とし，培養温度が代謝活性と細胞の形態・生死に与える影響を検証した．336 h のフラスコ培養実験の結果，細胞濁度とグルコース消費量は増殖至適温度である 28ºC から 40ºC に上昇するにつれていずれも増加したが，44ºC では大きく減少した．最大となった 40ºC におけるグルコース消費量は 28ºC よりも 45%高かった．また一次代謝物であるトレハロースとリブロースの生産量はそれぞれ 36ºC と 40ºC で最大となり，28ºC よりも 2.6 倍と 4.3 倍に増加した．これらの結果から，*S. lividans* におけるグルコース消費の最適温度は 40ºC であり，加えて代謝物によって生産に最適な温度が異なることが判明した．次に形態と細胞の生死を観察した結果，40ºC では 28ºC と比較して細胞が短くなり，死細胞が増加することが判明した．この結果は細胞濁度による増殖の結果と矛盾したため，乾燥菌体重量と Colony Forming Unit（CFU）を測定し，正確な生細胞数を検証した．その結果，40ºC における最大乾燥菌体重量は 28ºC と比べて 26%減少し，40ºC における CFU は 28ºC よりも 10 分の 1 以下に減少した．これらの結果より，増殖至適温度よりも高温で培養を行った場合，細胞は損傷を受け，生細胞数も大きく減少することが判明した．以上より，*S. lividans* では多くの細胞が死滅する高温下でグルコース消費に関与する一次代謝が逆に促進されることを明らかにした．

Key words *Streptomyces*, high temperature, metabolic activity, cell viability

G2H6 (0110) 酢酸生産菌を用いた H_2/CO_2からの低コスト酢酸生産の実現に向けた培地組成の検討

○渡辺 直己[1], 加藤 節[1], 青井 議輝[1], 加藤 淳也[1], 秋 庸裕[1],松浦 将吏[2],沢田 健[2],中島田 豊[1]*
([1]広島大院・統合生命科学, [2]中国電力)

Investigation of medium composition for low cost production of acetate from H_2/CO_2

○Naoki Watanabe[1], Setsu Kato[1], Yoshiteru Aoi[1], Junya Kato[1], Tsunehiro Aki[1], Masashi Matsuura[2], Takeshi Sawada[2], Yutaka Nakashimada[1]*
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ. [2]The Chugoku Electric Power Company, Incorporated.)
nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

化石燃料への過度な依存による多量の排出二酸化炭素（CO_2）が大きな問題になっている．問題解決の手段の一つとし CO_2の有効活用を行うカーボンリサイクルが挙げられる．酢酸生産菌である *Acetobacterium woodii* は水素（H_2）をエネルギー源としてCO_2を資化し，酢酸を生産する．酢酸は油糧微生物オーランチオキトリウム属などを用いた発酵生産により油脂などの有用物質に変換できる．我々はこの特徴を排出 CO_2の有効活用に貢献するものづくりの技術として応用し，実用化を目指している．

実用化を目指した検討の中 *A. woodii* を用いた酢酸生産の課題として，培地の製造コストの高さが挙げられた．そこで本研究では，従来用いられている培地成分の中で特に培地のコストに大きく影響する酵母エキスに焦点を当て，その成分が *A. woodii* の増殖と酢酸生産に与える効果を検討した．

まず，培地に酵母エキスを添加せずに培養検討を行うと，増殖の開始に遅れが見られ，比増殖速度も低下したことから，酵母エキス中に含まれる成分が *A. woodii* の生育には重要であることが分かった．次に，酵母エキス成分であるビタミン類，微量元素，アミノ酸を個別に培地に添加し培養を行うと，酵母エキスの効果はアミノ酸によるものであることが判明した．さらに検討を進め，いくつかのアミノ酸の組み合わせが増殖に重要であることが判明した．以上の結果をもとに，本発表ではより低コストで効率よく酢酸生産可能な培地を提案する．

Key words yeast extract, acetate, H_2-CO_2

G2H6 (0111) 濃度依存的な 1-ブタノールの細胞毒性とその作用機序

○新里海咲[1], 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)

Concentration-dependent toxicity of 1-butanol to *Escherichia coli* cells

○Misaki Shinzato[1], Ryuji Kawabata[1], Araki Yuto[2], Yoshiteru Aoi[1], Yutaka Nakashimada[1], Setsu Kato[1]*
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Sch. Eng., Hiroshima Univ.)
setsukato@hiroshima-u.ac.jp

【目的】低炭素社会実現への取り組みの中で、燃料特性に優れているブタノールの発酵生産に注目が集まっている。しかしブタノールは強い細胞毒性を持つことから、実用的な発酵生産には至っていない。そのためブタノールの発酵生産には、毒性機構の解明と耐性付与が重要である。当研究室では、これまでにブタノール添加時に大腸菌細胞において異常な細胞構造が形成されることを見いだしていた。この異常構造の形成がブタノールの細胞毒性と関係するならば、異常構造の形成機構を解析することでブタノール毒性機構の一端を解明することができると考えた。そこで本研究では、ブタノール細胞毒性機構の解明と耐性付与技術の開発を目的として、この異常構造の特徴とその形成機構について詳細に解析した。

【方法・結果】対数増殖期の大腸菌に異なる濃度のブタノールを添加し、2 時間培養後に異常構造形成率・死菌率・比増殖速度を算出した。これにより、異常な細胞構造形成のブタノール濃度依存性、およびブタノールによる増殖阻害・細胞死との関係を解析した。その結果、濃度 1.5%以下では比増殖速度の大幅な低下が、濃度 1.5%以上では異常構造形成率と死菌率の急激な増加が起きていた。さらに、同一の細胞集団における異常構造形成率と死菌率を調査したところ、両者は強い正の相関関係にあることが明らかになった。このことから、異常構造形成は増殖阻害でなく細胞死と関係する現象であることが示唆された。次に異常構造がどの細胞構造に由来する構造体であるのかを検証するために、細胞膜・細胞壁・細胞質成分それぞれに特異的に結合する試薬で異常構造を有する細胞を染色した。その結果、細胞膜・細胞壁は正常の形態を維持していた。一方で、核酸やタンパク質などの細胞質成分を染色する Fluorescein isothiocyanate（FITC）の蛍光シグナルは異常構造と同様の局在を示していた。このことから、異常構造は細胞質成分で構成されていることが明らかになった。以上の結果より、ブタノールは大腸菌細胞に対して濃度 1.5%以上で細胞質成分を凝集、偏在させ、細胞死を引き起こすと考えられた。

Key words *Escherichia coli*, single-cell analysis, 1-butanol

G2H6 (0112) *Cyanidioschyzon merolae* を用いた有機酸生産法の開発

○吉田智尋[1], 小山内崇[1]*
([1]明大院・農・農化)

Development of organic acid production from *Cyanidioschyzon merolae*

○Chihiro Yoshida[1], Takashi Osanai[1]*
([1] Graduate School of Agriculture, Meiji Univ.)
cf200131@meiji.ac.jp

地球温暖化や化石燃料枯渇が懸念されている現代社会では、バイオプラスチック生産に関連した研究が世界的に行われている。バイオプラスチックは色々な原料から生産されるが、有機酸の一種である乳酸を原料としたバイオプラスチックは、生分解性を持つことが知られている。

微細藻類は、発酵中に二酸化炭素を炭素源として様々な物質を生産する。酸性、高温条件で生育する微細藻類 *Cyanidioschyzon merolae*（以下 *C. merolae* と記載）は、乳酸生産酵素をコードする 5 種類の遺伝子を持つ。しかし、*C. merolae* の乳酸生産能は明らかにされていない。また、乳酸生産は酢酸生産と競合するが、*C. merolae* は酢酸生産酵素をコードする遺伝子を持たない。私たちは、*C. merolae* が乳酸生産に適した生物であると考え、乳酸生産能を調査した。

本研究では、*C. merolae* を窒素源が含まれない M-Allen 培地で 3 日間明好気培養した。その後、窒素欠乏状態となった細胞を新たな M-Allen 培地に濃縮し、暗嫌気条件で発酵させた。

C. merolae は、pH 2.5、暗嫌気条件、40℃、10 時間の発酵で L-乳酸 135.7 mg/L、酢酸 8.0 mg/L、コハク酸 3.8 mg/L を生産し、L-乳酸は生産された総有機酸量のうち 92%を占めた。pH 2.5 での発酵には、コンタミネーションが防止され、生産された L-乳酸が容易に精製されるという産業的な利点がある。さらに、私たちは、pH 2.5 での発酵に比べ、pH 7.4 での発酵で乳酸生産量が増加することを発見した。これは、pH 7.4 での発酵で、*C. merolae* が受ける乳酸ストレスが軽減したためと考えられる。また、暗嫌気条件での発酵では、細胞内の貯蔵多糖量が減少した。これは、*C. merolae* が貯蔵多糖を有機酸に変換したためと考えられる。今後、乳酸耐性能を高めた株や代謝経路を最適化することで、産業的に二酸化炭素から L-乳酸生産を行うことができる可能性がある。

Key words microalgae, *Cyanidioschyzon merolae*, fermentation, lactic acid

G2H6 (0201) 有機溶媒耐性菌 *Kocuria rhizophila* DC2201 を利用したカロテノイド類化合物の生産

○戸田　弘[1,2]*, 小野木奈々[2], 金井　保[1,2]
([1]富山県大・生医工研セ, [2]富山県大・工,)

Bioproduction of carotenoids by organic solvent tolerant microorganism *Kocuria rhizophila* DC2201

○Hiroshi Toda[1,2]*, Nana Onogi[2], Tamotsu Kanai[1,2]
([1]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)
htoda@pu-toyama.ac.jp

【背景】β-carotene や astaxanthin などの各種カロテノイド化合物は微生物、藻類、植物、動物などが有する天然色素であり、様々な生理作用を示す。特に高い抗酸化作用を持つことから、近年サプリメントや化粧品等に利用されており、また一部のカロテノイドでは抗腫瘍活性や免疫賦活作用なども報告されていることから、これらの各種カロテノイドを効率的に生産できれば産業的利用価値が高いと考えられる。我々はカロテノイド生産を行う宿主として、グラム陽性細菌である *K. rhizophila* に着目した。*Kocuria* 属細菌は様々なカロテノイドを生産していることが知られており、基本的なカロテノイド生合成経路を有することから、その代謝経路を一部改変することで各種カロテノイド化合物の生産を試みた。

【実験方法・結果】*K. rhizophila* DC2201 のゲノム配列からカロテノイド合成に関与する遺伝子を探索した結果、CrtEBIYeYfEb から構成される一連のオペロンを見出した。このことから *K. rhizophila* では、lycopene から flavuxanthin を経て decaprenoxanthin などが生産されていることが推測された。そこで CrtEb 遺伝子を破壊することにより lycopene 生産株を作成した。得られた破壊株のコロニーは赤色を呈し、また培養菌体からの抽出物を HPLC 分析した結果 lycopene のピークが得られたことから、破壊株において lycopene が蓄積していることが確認された。

次に、*Paracoccus haeunndensis* 由来 CrtWZY 遺伝子を *E. coli-Kocuria* シャトルベクター[1,2]にクローニングし、CrtEb 破壊株に導入したがβ-carotene および astaxanthin の生成は確認されなかった。各遺伝子をそれぞれ単独で導入し活性発現を検討した結果、CrtY 発現株においてβ-carotene が蓄積したが、CrtW および Z について有意な活性が得られなかった。そこで *K. rhizophila* 内で発現可能な CrtW および CrtZ 遺伝子を探索した結果、それぞれ *Brevundimonas aurantiaca* および *Pantoea ananatis* 由来の遺伝子において有意な活性を得ることができた。現在これらの遺伝子の共発現系を構築し、astaxanthin, canthaxanthin および zeaxanthin の生産について検討中である。

1) H. Toda *et al*., J. Biosci. Bioeng. 124:255-262 (2017)
2) H. Toda *et al*., Front. Microbiol. 8:2313 (2017)

Key words *Kocuria rhizophila*, metabolic engineering, carotenoid

G2H6 (0202) 逆グリオキシル酸経路を導入した大腸菌の創出と代謝評価

○田中恒作[1], 戸谷吉博[1], 清水浩[1*]
([1]阪大院・情報)

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for introducing and evaluation of a reverse glyoxylate shunt

○Tanaka Kosaku[1], Toya Yoshihiro[1], Shimizu Hiroshi[1*]
([1]Grad. Sch. IST, Osaka University)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】
微生物の代謝を利用した物質生産において、二酸化炭素の排出は収率低下の要因であるため、炭素ロスをなるべく減らすことが重要である。近年、グリオキシル酸経路を逆向きに活用する人工代謝経路（rGS）が設計され、この経路を利用することでアセチル CoA を合成する際の炭素ロスを軽減できると期待されている。本研究では、rGS を大腸菌に実装し、二酸化炭素の排出を抑制し、グルコースから高収率に目的物質に変換可能な細胞を創出することを目指す。
【方法・結果】
rGS が大腸菌内で実装されて稼働したかを評価するため、グルコースを単一炭素源としたときに、増殖するためには rGS の利用が必須となるような遺伝子破壊をシミュレーションで予測し、クエン酸合成酵素を欠失した rGS 導入株を構築した。しかし、この株はグルコース単一炭素源では生育できず、グルコースに加えてコハク酸を供給することで増殖が可能になることが分かった。また、この株では、グルコースを同位体標識した実験により、rGS が働いてコハク酸を代謝していることが確認された。この株の培養実験の過程から、グルコースを単一炭素源として増殖可能な変異株の獲得に成功した。rGS 導入株に何らかの変異が生じた為、グルコース単一炭素源で増殖できるようになったと考えられる。グルコース単一炭素源の培養における培養液の分析結果から、変異株は酢酸を排出していることが分かった。rGS の稼働には ATP が必要になるため、この株はアセチル CoA から酢酸を生産する過程で ATP を獲得していることが示唆された

Key words **metabolic control**, **reverse glyoxylate shunt**, **Acetyl-CoA**

G2H6 (0203) リグニン由来芳香族化合物からの有用物質生産宿主である *Pseudomonas putida* KT2440 株へのグルコースとキシロースの共代謝能の付与

○田中誠[1], 後藤杏香[1], 樋口雄大[2], 園木和典[2*]
([1]弘前大院・農生, [2]弘前大・農生)

Co-metabolism of glucose and xylose by a *Pseudomonas putida* KT2440 recombinant available for value-added chemicals production from lignin-related aromatic compounds.

○Makoto Tanaka[1], Kyoka Goto[1], Yudai Higuchi[2], Tomonori Sonoki[2*]
([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., [2]Fac. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ.)
sonoki@hirosaki-u.ac.jp

我々はこれまでに，多様な芳香族化合物の資化能を持つ *Pseudomonas putida* KT2440 株を宿主として，リグニン由来芳香族化合物からムコン酸やプロトカテク酸などの化成品原料を高収率で生産できる微生物株を作出してきた。しかし，これらの微生物株は，本来増殖・エネルギー源として利用できるリグニン由来芳香族化合物のほとんどを目的の化合物へと収束し蓄積するため，細胞の増殖・エネルギー源にはグルコース等の糖類を要求する。グルコースは，ホモ多糖であるセルロースを加水分解することで得られるものの，セルロースは紙を始め，繊維やフィルムなどの誘導体，新素材として注目されているセルロースナノファイバーの原料としても需要がある。これに対して，混成多糖であるヘミセルロースは，セルロースと比較して用途は限定的であるため，増殖・エネルギー源として有用である。しかし，KT2440 株はグルコースなどヘキソースとは異なり，キシロースなどペントースを資化できない。そこで本研究では，KT2440 株にグルコースとキシロースを同時に利用できる性質を付与することを目的とした。

KT2440 株のキシロース酸化能を欠損させた glucose dehydrogenase 遺伝子 (*gcd*) 破壊株（KT2440Δ*gcd* 株）に transketolase 遺伝子, transaldolase 遺伝子, xylose isomerase 遺伝子, xylulokinase 遺伝子，そして xylose/H^+ symporter 遺伝子をプラスミドで導入した。得られた組換え体をグルコースとキシロース (それぞれ 5 g/L) を炭素源として含む無機塩培地で培養した結果，グルコースとキシロースは同時に代謝されなかった。しかし，グルコース (5 g/L) のみを炭素源として培養を開始し，グルコース濃度がおおよそ半分になった時点でキシロース (5 g/L) を追加した場合，グルコースとキシロースは同等の速度で代謝されることが示された。

そこで, KT2440Δ*gcd* 株の catabolite repression control protein 遺伝子 (*crc*) と vanillate *O*-demethylase 遺伝子 (*vanAB*) を欠損させ，リグニン由来芳香族化合物の一つであるフェルラ酸から耐熱性ポリマーの原料として利用可能なバニリン酸を生産できる KT2440Δ*gcd*Δ*crc*Δ*vanAB* 株に，前記のプラスミドを導入した。得られた組換え体はグルコースとキシロースを共代謝しながら増殖し，100 mol%の収率でフェルラ酸からバニリン酸を生産できることが示された。

本研究の一部は，JST 戦略的創造研究推進事業先端的低炭素化技術開発 (JST-ALCA, JPMJAL1506), JST 未来社会創造事業 (JPMJMI19E2) の支援を受けて実施した。

Key words Lignin, Hemicellulose, *Pseudomonas putida*, cometabolism

G2H6 (0204) *Xanthophyllomyces dendrorhous* によるレチナールの生産

○藤野 紗代[1], 景山 裕也[1], 弘埜 陽子[2], 菊川 寛史[1,2], 松田 史生[3], 戸谷 吉博[3], 石井 純[4], 原 清敬[1,2]*
([1]静県大院・薬食生命, [2]静県大・食栄, [3]阪大院・情報, [4]神戸大院・科技イノベ)

Retinal production by engineered *Xanthophyllomyces dendrorhous*

○Sayo Fujino[1], Yuya Kageyama[1], Yoko Hirono[2], Hiroshi Kikukawa[1,2], Fumio Matsuda[3], Yoshihiro Toya[3], Jun Ishii[4], Kiyotaka Hara[1,2]*
([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ.Shizuoka., [2]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., [3]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [4]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ)
k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp

赤色酵母は、強力な抗酸化作用を有するカロテノイド色素の一種であるアスタキサンチンを生合成可能な特異的な酵母である。アスタキサンチンなどのカロテノイドは、抗酸化作用や呈色作用を有することから、医療や食品、化粧品分野で非常に有用な化合物群である。我々は、赤色酵母によるアスタキサンチンの発酵生産法や赤色酵母の形質転換法の改良を行ってきた。赤色酵母は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* などの他の酵母と比較して、強力なテルペン合成経路を有し、β-carotene の合成経路が発達している。本研究では、*X. dendrorhous* を代謝工学的に改変し、有用化合物であるレチナールを生産することを目的とする。レチナールは、β-carotene 酸化還元酵素である β-carotene 15,15'-dioxygenase が β-carotene を変換することで生産される。そのため、本目的を達成するためには、*X. dendrorhous* の代謝工学技術と β-carotene 15,15'-dioxygenase を活性化させるための条件を検討する必要がある。また、代謝工学的改変では、β-carotene の生産を向上させる *X. dendrorhous* を開発し、β-carotene 15,15'-dioxygenase の働きを向上させるために至適温度や至適 pH を検討する必要がある。また、本研究では、*Halobacterium salinarum* 由来と *Mus musculus* 由来、*unculutured marine bacterium* 由来の 3 種類の β-carotene 15,15'-dioxygenase を赤色酵母に導入し、レチナールやカロテノイドの生産量を分析し比較した。本発表では、これらの取り組みについて発表する。

Key words terpenoid, metabolic engineering, gene expression, β-carotene

G2H6 (0205) 油脂酵母 ATP-クエン酸リアーゼの生育と油脂生産への影響

○佐藤里佳子[1]，荒学志[1]，山崎晴丈[1]，志田洋介[2]，小笠原渉[2]，矢追克郎[3]，荒木秀雄[4]，石谷孔司[3]，油谷幸代[5]，高久洋暁[1]*
（[1]新潟薬大・応生命，[2]長岡技科大，[3]産総研・生物プロセス，[4]不二製油，[5]産総研・CBBD-OIL）

Influence of growth and lipid productivity of ATP-citrate lyase in oleaginous yeast

○Rikako Sato[1], Satoshi Ara[1], Harutake Yamazaki[1], Yosuke Shida[2], Wataru Ogasawara[2], Katsuro Yaoi[3], Hideo Araki[4], Koji Ishiya[3], Sachiyo Aburatani[5], Hiroaki Takaku[1]*
([1]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Technol., [3]BPRI, AIST, [4]Fuji Oil Co., Ltd. [5]CBBD-OIL, AIST)
sato.rikako03@gmail.com

近年の急激な世界人口増加に伴い，食・工業・エネルギー分野の油脂需要が高まっている中，日本の油脂自給率は未だ低く，油脂の安定供給のための独自の油脂生産システムの確立が必要である．そこで我々は，様々な糖を資化し，細胞内に油脂（トリアシルグリセロール，TAG）を高蓄積する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* に注目した．産業利用へ向け，育種や遺伝子工学的技術活用による油脂生産性の向上が課題であるが，改変標的遺伝子の情報となる油脂生産機構には未解明な部分が多い．本研究では，油脂蓄積変異株の油脂合成経路における遺伝子発現比較解析を実施し，油脂生産の主要な役割を担う遺伝子を見出す．さらに，その遺伝子の破壊株，高発現株を作製し，生育と油脂生産性の評価を行い，油脂生産機構解明に繋がる知見を得ることを目的とした．

油脂合成経路は，アシル CoA 合成経路とケネディ経路から構成されている．野生株と油脂蓄積変異株の油脂合成経路の遺伝子発現比較解析を行った結果，アシル CoA 合成経路の関連全遺伝子において，油脂高蓄積・超高蓄積変異株では遺伝子発現量が上昇，一方で，油脂低蓄積変異株では発現量が低下した．すなわち，油脂生産量とアシル CoA 合成経路関連遺伝子の遺伝子発現量には正の相関関係があり，油脂生産には上記遺伝子の発現量が重要であると考えられた．そこで，アシル CoA 合成経路の初発酵素 ATP-クエン酸リアーゼ (ACL) を欠失させ，生育と油脂生産性への影響を評価した．*acl* 欠失株の生育はコントロール株と比較して遅延しており，最終細胞濃度はコントロール株の 77% であった．*acl* 欠失株の細胞あたりの TAG 量は，培養 3, 5 日目においてそれぞれコントロール株の 45%, 46% の TAG 量であった．以上より，ACL は本酵母の生育と TAG 生産に重要な因子であることが明らかとなった．次いで，ACL と油脂生産との強い関連性を明らかにするために，*ACL* 高発現株の油脂生産性を評価した．その結果，コントロール株と *ACL* 高発現株との間で細胞あたりの TAG 量は同程度であった．また，*ACL* 高発現株のアシル CoA 合成経路関連遺伝子の遺伝子発現解析では *ACL1*，*ACL2* 遺伝子は高発現していたが，下流の *ACC1*，*FAS1*，*FAS2* の遺伝子発現量はコントロール株と比較して同程度であった．すなわち，油脂高生産のためには，アシル CoA 合成経路全体の遺伝子発現量の向上が必要であると考えられた．

Key words oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, ATP-citrate lyase, lipid

G2H6 (0206) *In vitro* metabolic engineering towards high yield coenzyme A production

○SURYATIN ALIM Gladwin[1], IWATANI Tomoka[1], OKANO Kenji[1,2], KITANI Shigeru[1,2], and HONDA Kohsuke[1,2]*.
([1]International Center for Biotechnology, Osaka University, Suita, Osaka, Japan, [2]Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, Suita, Osaka, Japan)

In vitro metabolic engineering towards high yield coenzyme A production

○SURYATIN ALIM Gladwin[1], IWATANI Tomoka[1], OKANO Kenji[1,2], KITANI Shigeru[1,2], and HONDA Kohsuke[1,2]*.
([1]International Center for Biotechnology, Osaka University, Suita, Osaka, Japan, [2]Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, Suita, Osaka, Japan)
honda@icb.osaka-u.ac.jp

Coenzyme A (CoA) is an essential cofactor present in all domains of life. It is involved in numerous metabolic pathways as an acyl group carrier, including fatty acid metabolism, pyruvate oxidation through the TCA cycle, and production of secondary metabolites. This characteristic makes CoA a commercially valuable compound especially in the pharmaceutical, cosmetic, and clinical industries. However, CoA is difficult to accumulate in living cells at a high level because it is consumed in multiple metabolic pathways, hampering its manufacturing by typical cell cultivation and extraction approaches. The feedback inhibition by CoA to its biosynthetic enzyme, pantothenate kinase (PanK), is another obstacle for high yield production of CoA. To overcome this challenge, *in vitro* production of CoA in which the CoA biosynthetic pathway was reconstructed outside of cells using recombinant thermophilic enzymes was performed. The *in vitro* pathway was designed to be insensitive to the feedback inhibition by CoA using a CoA-insensitive type-III PanK from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. The utilisation of thermophilic enzymes heterologously expressed in a mesophilic host (e.g., *Escherichia coli*) allows for easy purification by heat-treatment process which kills the host and its proteins, leaving only the thermophilic enzymes in an active form. These heat-purified enzymes can be used directly for the production of CoA.

Furthermore, a statistical approach using design of experiments (DOE) was employed to rationally determine the enzyme loading ratio to maximize the CoA production rate. DOE is a powerful tool for *in vitro* production as it allows us to skip the tedious process of individual enzyme characterization that has to be performed for kinetic modelling. Consequently, 0.94 mM CoA could be produced from 2 mM D-pantetheine through the designed pathway. We hypothesized that the insufficient conversion yield was attributed to the high K_m value of *T. thermophilus* PanK towards ATP. From this result, approaches to improve the feasibility of CoA production through the *in vitro* pathway are discussed.

Keywords: *coenzyme A, thermostable enzyme, metabolic engineering, pantothenate kinase*

G2H6 (0207) 油脂酵母の増殖期と油脂生産期の ^{13}C 代謝フラックス解析

○松尾有紗[1]・岡橋伸幸[1]・清家泰介[1]・荻野千秋[2]・松田史生[1]*
（[1]大阪大学大学院情報科学研究科、[2]神戸大学大学院工学研究科）

^{13}C-metabolic fluxes analysis of *Yarrowia lipolytica* in growth and stationary phases

○A. Matsuo[1], N. Okahashi[1], T. Seike[1], C. Ogino[2], F. Matsuda[1]*
([1]Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University, [2]Graduate School of Engineering, Kobe University)
arisa_matsuo@ist.osaka-u.ac.jp

【背景および目的】油脂酵母 *Yarrowia lipolytica* は窒素制限条件下で菌体内に油脂を高蓄積する。*Y. lipolytica* の対糖油脂収率を代謝工学的に改善するには、油脂合成に必要な反応の酸化還元バランスをはじめとした代謝状態の把握に基づく油脂生産能向上戦略が必要である。そこで、本研究では ^{13}C 代謝フラックス解析を用いて *Y. lipolytica* の対数増殖期と、窒素制限条件下の油脂生産期の中心炭素代謝フラックス分布の比較を試みた。

【方法】油脂酵母 *Y. lipolytica* 野生株 CLIB89 を[1-^{13}C]グルコース含有 SD 培地、および窒素制限培地（炭素窒素比 = 20:1）で回分培養した。細胞濁度、培地成分、細胞内油脂量の経時変化および菌体構成成分を測定することで物質収支を決定し、加えて代謝物の ^{13}C 標識割合をガスクロマトグラフィー質量分析装置で経時測定した。代謝フラックス分布は専用ソフトウェア mfapy を用いて推定した。

【結果および考察】*Y. lipolytica* を窒素非制限条件下で回分培養すると、比増殖速度 0.33 h^{-1} で対数増殖し、グルコース比消費速度は 1.2 mmolg-DCW^{-1}h^{-1} に達した。一方窒素制限条件下では増殖が停止し、マンニトールやクエン酸の培地への排出、油脂の合成が確認された。油脂生産期のグルコース比消費速度は 0.086 mmolg-DCW^{-1}h^{-1} と大きく減少していた。^{13}C 代謝フラックス解析を実施し、対数増殖期と油脂生産期の細胞内中枢炭素代謝経路の代謝フラックス分布の推定に成功した。油脂生合成に必要な還元力（NADPH）の配給を担う酸化的ペントースリン酸経路のフラックスは対数増殖期で 1.0 mmolg-DCW^{-1}h^{-1} と推定された。一方、油脂生産期では 0.049 mmolg-DCW^{-1}h^{-1} に減少していた。得られたフラックス値から、NADPH の再生消費バランスを比較したところ、対数増殖期では NADPH 総再生量と細胞増殖での消費量が一致していた。一方油脂生産期では、再生された NADPH が細胞増殖に利用されず、余った NADPH が油脂生産に利用されていた。以上の結果より、定常期における全体的な代謝反応速度の活性化が油脂生産の向上につながると推測された。

Key words ^{13}C-Metabolic flux analysis, Central carbon metabolism, Oil production

G2H6 (0208) mBFP センサーを使った栄養飢餓大腸菌における細胞内 NADPH レベルの摂動解析

○上野　航一郎[1]，戸谷　吉博[1]，清水　浩[1]*
（[1]阪大院・情報・バイオ情報）

Perturbation analysis of intracellular NADPH level in starved *Escherichia coli* using mBFP sensor

○Koichiro Ueno[1], Yoshihiro Toya[1], Hiroshi Shimizu[1]*
([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】
ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)は、微生物内の幾つかの代謝経路で生産され、様々な生合成経路の推進力として利用される。NADPH 濃度の変化を観察することができれば、細胞内で還元力を生み出すメカニズムの理解に役立つと考えられる。これを実現するためには細胞内 NADPH 濃度の迅速かつ正確な評価が必要であるが、既存の酵素法ではリアルタイムでの測定を行うのは困難である。そこで、メタゲノム由来の青色蛍光タンパク質である mBFP に注目した。mBFP は NADPH と結合することで、その固有の蛍光を増幅するため、NADPH のレポータータンパク質として利用できる。本研究では、培養液中の炭素源が枯渇した栄養飢餓状態の大腸菌に、栄養源を供給した際のリアルタイムの代謝応答を、mBFP により測定した NADPH 濃度変化を指標として観察する。この摂動解析により、中枢代謝経路において、NADPH 再生に寄与している反応を調査することを目的とする。
【方法・結果】
mBFP を発現した大腸菌を LB 培地で培養した後、炭素源を含まない M9 最小培地で洗浄し、3 時間インキュベートすることで栄養飢餓状態を作り出した。その後、炭素源を添加した際の NADPH 濃度変化に伴い生じる、瞬時の mBFP の蛍光強度変化を測定することで摂動解析を行なった。取り込まれる炭素源によって、代謝の流れが変化し NADPH の再生機構が変わると考えられるため、複数種類の炭素源を使用して、予測される NADPH 濃度変化が確認できるかを確かめた。解糖系のグルコース 6 リン酸イソメラーゼを破壊した(Δpgi)株では、グルコースを炭素源とするとペントースリン酸(PP)経路を迂回して代謝することが強いられるため、NADPH 生産量が多くなることが知られている。そこで、Δpgi 株を用いてこの実験系の妥当性を確認したところ、グルコースを Δpgi 株に加えた条件では、予測通り NADPH 濃度が最も上昇する様子が確認された。一方で、興味深いことにキシロースや酢酸のような PP 経路を経由して代謝されない炭素源を添加した場合においても、ある程度の NADPH 濃度の増加がみられた。PP 経路を介さない NADPH 再生の仕組みとして、NADPH と NAD の間で水素転移を担うトランスヒドロゲナーゼを疑った。この反応も破壊して同様の実験を実施したところ、トランスヒドロゲナーゼ破壊株においても、キシロースや酢酸を添加した際に NADPH 濃度の増加がみられた。すなわち TCA 回路やリンゴ酸酵素など、中枢代謝経路の下流の反応が NADPH 再生を担っている可能性が示唆された。

Key words mBFP, NADPH, *Escherichia coli*, metabolic engineering

G2H6 (0209) 指向性タンパク質分解システムを利用したコリネ型細菌の代謝スイッチの開発

松沢弘貴[1], 竹本訓彦[2]*, 櫻井惇[1], ○柘植陽太[1,3]*
([1]金沢大院・自科, [2]国立国際医療研究セ, [3]金沢大・新学術)

Development of a metabolic switch induced by directional protein degradation in *Corynebacterium glutamicum*

Hiroki Matsuzawa[1], Norihiko Takemoto[2]*, Jun Sakurai[1], ○Yota Tsuge[1,3]*
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., [2]NCGM, [3]InFiniti, Kanazawa Univ.)
ntakemoto@ri.ncgm.go.jp or ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

微生物を用いた増殖連動型の有用化合物の生産では，細胞の増殖と目的化合物の生産は投入する炭素源を奪い合うトレードオフの関係にある．そのため，有用化合物の効率的な生産には代謝フラックスの制御が必要になる場合が多い．代謝フラックスを制御する場合，関連する遺伝子の破壊が一般的に行われるが，対象遺伝子が必須遺伝子であるなど，破壊できない場合はプロモーターの置換による発現量の調整が行われる．しかし，その場合は既に発現しているタンパク質は除去できない欠点がある．そこで本研究ではアミノ酸生産菌であるコリネ型細菌において，遺伝子の発現量ではなく、発現したタンパク質を選択的に分解する代謝スイッチの開発を行った．はじめにコリネ型細菌で効率的に働くタンパク質分解タグを選抜した。構成的プロモーターの制御下においた *gfp* 遺伝子の 3’末端に大腸菌とコリネ型細菌由来の SsrA タグやそのバリアントである SsrA-DAS タグを導入した株を作製した．SsrA タグを効率的にプロテアーゼにガイドする大腸菌由来の SspB タンパク質を IPTG 誘導により発現させたところ，大腸菌由来の SsrA-DAS タグを使用した株で IPTG 添加の有無による GFP 発現量の差が最大となった．選抜した分解タグを用いた代謝スイッチの実証にはナイロン原料の 1,5-ジアミノペンタン生産をモデルとした．コリネ型細菌はアミノ酸のリジンを生産するが，脱炭酸酵素遺伝子の導入により 1,5-ジアミノペンタンの生産が可能になる．1 分子の 1,5-ジアミノペンタンの生産には 4 分子の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，効率的な 1,5-ジアミノペンタンの生産にはグルコースからの代謝フラックスを NADPH の主な産生経路であるペントースリン酸経路に向ける必要がある．そこで解糖系とペントースリン酸経路の分岐点であるグルコース 6-リン酸を基質とするグルコース 6-リン酸イソメラーゼ遺伝子（*pgi*）に選抜した SsrA-DAS タグを導入することで 1,5-ジアミノペンタンの効率的生産を試みた．代謝改変で作製した 1,5-ジアミノペンタン生産株の *pgi* に SsrA-DAS タグを導入し，合わせて IPTG 誘導系の *sspB* 遺伝子を導入した株を作製した．グルコースを単一炭素源とした合成培地を用いて生産実験を行った結果，比増殖速度は 37%減少したが，1,5-ジアミノペンタンの生産量と対糖収率は 2.9 倍に増加し，生産速度も 66%増加した．以上の結果により，指向性タンパク質分解システムを利用したコリネ型細菌における新規代謝スイッチの開発に成功した．

Key words *Corynebacterium glutamicum*, metabolic switch, protein degradation, 1,5-diaminopentane

G2H6 (0210) 好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* の代謝モデル構築とその検証

○小林 友哉[1], 太田 勝巳[1], 屋良 みなみ[2], 渡邊 直揮[1], 竹中 武蔵[3], 豊島 正和[1], 近藤 昭彦[3], 荻野 千秋[1]*
([1]神戸大院・工, [2]神戸大・工, [3]神戸大院・技イノベ)

Construction and validation of a metabolic model for the thermophilic actinomycete *Streptomyces thermoviolaceus*

○Tomoya Kobayashi[1], Katsumi Ota[1], Minami Yara[2], Naoki Watanabe[1], Musashi Takenaka[3], Masakazu Toyoshima[1], Akihiko Kondo[3], Chiaki Ogino[1]*
([1] Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2] Fac. Eng., Kobe Univ., [3] Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
* ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【目的】 生物は多数の代謝反応により様々な物質を生産し、生育などの生理現象を行っている。細胞内の代謝反応は複雑なネットワークを構成しており、個々の部品の働きがシステム全体に及ぼす影響を理解することは難しい。現在、微生物の代謝を評価・デザインする手法として、ゲノムスケールモデル（GEM）シミュレーションが知られている。その一種である流速均衡解析（Flux Balance Analysis; FBA）は、細胞内の代謝を定常状態と仮定することで、化学量論と代謝流量だけに着目し、計算を簡易化したシミュレーション方法である。好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* は増殖速度が高く、比較的高温での培養が可能なことから、冷却コスト低減や雑菌混入防止の観点から工業的な応用が期待されている。本研究室では *S. thermoviolaceus* の遺伝子組み換えにより、化学物質やたんぱく質の生産を初めて成功させたが、これらの物質生産に適した代謝経路は未設計である。そこで本研究では、FBA によるシミュレーションを行うことで最も効率的に物質生産を行う経路モデルの構築を試みた。

【実験方法】 シミュレーションには対象生物の代謝反応を束ねた代謝モデルが必要である。従って本研究では、まず *S. thermoviolaceus* の生育に必要最低限の経路のみを加えたコアモデルを作成し、このモデルの評価を行う。先行研究において解析した *S. thermoviolaceus* のゲノムデータを Blast KOALA、KEGG mapper に入力し、好熱性放線菌の代謝経路をマッピングした。その結果を大腸菌の代謝経路と比較することにより、両種の中心代謝経路に大きな違いがないことがわかった。そこで、既存の大腸菌のモデルをテンプレートとし、マッピングした好熱性放線菌の代謝経路を参考に、コアモデルを構築した。

【結果】 構築したコアモデルに対して FBA を行ったところ、必須アミノ酸 20 種類の合成と菌体増殖が行われていることが確認でき、モデルが正常に機能していることがわかった。今後は、好熱性放線菌の菌体構成成分を分析し、菌体増殖式を決定する。また、作成したモデルと実際の培養結果を比較することで、モデルの妥当性の評価を行う。

Key words metabolic analysis , flux analysis , actinomycetes

G2H6 (0211) ギブス自由エネルギー変化を用いた出芽酵母実用株の代謝解析

○杉村 政彦、清家 泰介、岡橋 伸幸、松田 史生*
（大阪大学大学院情報科学研究科）

Metabolic analysis of budding yeast strains using Gibbs free energy change

○Masahiko Sugimura, Taisuke Seike, Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda*
(Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University)
masahiko_sugimura@ist.osaka-u.ac.jp

【目的】
出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には、発酵能力や増殖速度の異なる様々な実用株が存在する。これらの形質と細胞内代謝状態との関連から出芽酵母代謝工学に有用な知見を与えると期待される。代謝経路中の各反応の状態は、基質と生成物濃度からギブス自由エネルギー変化 (ΔG) を算出することで定量的に評価できる。そこで本研究では、出芽酵母実用株 11 株中の代謝物濃度を定量し、各代謝反応のΔG と発酵能力を株間で比較した。
【方法】
出芽酵母 *S. cerevisiae* の二倍体株（実験室株: BY4947、ワイン株: QA23、EC1118、OC-2、パン株: RedStar、NBRC0555、NBRC2043、清酒株: 協会 6 号、協会 7 号、協会 9 号）を 50 mL の SD 培地中、30℃、120 rpm で回分培養した。対数増殖期（OD_{600}=1.0 付近）の菌体を回収・抽出した後、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置(LC-MS/MS、島津製作所 LCMS-8040)を用いたメタボローム分析に供した。細胞内代謝物濃度は安定同位体標識化合物を用いた安定同位体希釈法で求めた。各反応の標準ギブス自由エネルギー変化 ($\Delta G'^0$) 値は eQuilibrator (https://equilibrator.weizmann.ac.il) から得た。
【結果および考察】
出芽酵母実用株 11 株を合成培地中で回分培養し、培養挙動を比較した。比増殖速度は実験室株やワイン株、ビール株 (0.32~0.36 h^{-1}) に比べてパン株と清酒株 (0.39~0.42 h^{-1}) で高い傾向がみられた。グルコース比消費速度やエタノール比生産速度でも同様の傾向が見られた。
次に対数増殖期の実験室株の菌体から代謝物を抽出し、安定同位体希釈法を用いた LC-MS/MS 分析によって 80 種類の代謝物の細胞内濃度を測定した。これを用いて中心炭素代謝経路の 30 反応のΔG を算出することに成功した。実験室株のホスホフルクトキナーゼ (PFK) とピルビン酸キナーゼ (PYK) 反応のΔG 値が解糖系の他の反応に比べて負に大きくなり、先行研究[1]と一致した。11 株の各反応のΔG 値と発酵能力を比較した結果、PYK が触媒する反応 (PEP + ADP -> Pyruvate + ATP) のΔG 値と比増殖速度が負に相関する傾向が見られた。また、ピルビン酸が TCA 回路へ流入する反応 (Pyruvate + Malate + 2 NAD -> Citrate + 2 NADH + CO_2) のΔG 値と比増殖速度が正に相関する傾向が見られたことからピルビン酸消費反応の活発と増殖速度との関連が示唆された。
参考文献：[1] J. O. Park *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2016
Key words Intracellular concentration, LC-MS/MS, *Saccharomyces cerevisiae*

G2H6 (0301) PD-SELEX 法を用いた直交性 RNA-RBP ペアの発見

○福永 圭佑[1], 横林 洋平[1]
([1]沖縄科学技術大学院大学、核酸化学・工学ユニット)

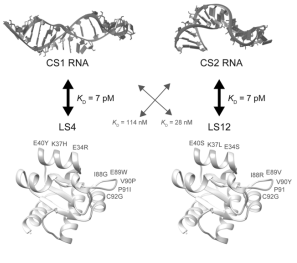
Discovery of orthogonal RNA-RBP pairs by using PD-SELEX

○Keisuke Fukunaga[1], Yohei Yokobayashi[1]
([1]Nucleic Acid Chemistry and Engineering Unit, Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University)
keisuke.fukunaga@oist.jp (K.F.)

ウィルスや古細菌由来の RNA-RNA 結合タンパク質（RBP）ペアは合成生物学研究やケミカルバイオロジー研究において目的の RNA とタンパク質を繋ぐアダプター分子として有用である一方、哺乳動物細胞において機能することが知られている RNA-RBP ペアの数は限られている。このような分子パーツの種類を増やすためには、機能する事が予め分かっている既存の RNA-RBP ペアを元に塩基置換・アミノ酸置換を行い、直交性を持つ新規 RNA-RBP ペアを創製することが有効な戦略となる。

発表者らは最近、バクテリオファージに提示させた RBP 変異体ライブラリーと RNA ライブラリーを試験管内で共進化させる新たな手法: PD-SELEX 法の開発に成功した[1]。古細菌由来のリボソームタンパク質である L7Ae を RBP スキャフォールドとして選択し、RNA 結合面に位置するアミノ酸 8 残基をランダム化したファージディスプレイ（PD）ライブラリーを構築した。また、20 塩基をランダム化した RNA ライブラリーも構築した。4.0×10^8 の多様性の PD ライブラリーと 1.1×10^{12} の多様性の RNA ライブラリーを初期ライブラリーとして用い、ライブラリー vs. ライブラリーのセレクションを 6 ラウンド行った後、次世代シーケンシングで RNA・PD 各ライブラリーで配列が濃縮されていることを確認した。

次に、どのタンパク質とどの RNA が結合するペアなのかを決定するため、濃縮された RBP の配列上位 20 種類をリコンビナントタンパク質として個別に調製した。また、6 ラウンド後の RNA 上位配列を含む小規模の多様性の第 2 世代 RNA ライブラリーを作製し、個々のリコンビナント RBP に対してセレクション（従来の SELEX 実験）を行い、次世代シーケンシングで結合のトレンドを明らかにした。最終的に表面プラズモン共鳴法を用いた結合解析から、非常に強い結合親和性（K_D 値 = 約 7 pM）、および高い特異性（S/N 比 =4000 以上）を持つ RNA-RBP ペア（CS1 RNA – LS4、及び CS2 RNA – LS12）を同定することに成功した（右図）。



1) K. Fukunaga and Y. Yokobayashi, *Nucleic Acids Res.* **2021**, in press [NAR Breakthrough Article], DOI: 10.1093/nar/gkab527

Key words Directed Evolution, Phage Display, SELEX, in vitro selection

G2H6 (0302) 細胞評価及び動物行動試験評価を用いた新規塩味ペプチドの発見

○竹内友里，池田彩，清水一憲，本多裕之*
（名大院・工）

Discovery of novel salty peptides using cell evaluation and animal behavioral test

○Yuri Takeuchi, Aya Ikeda, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda*
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)
honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

近年、塩分過剰摂取による生活習慣病のリスク向上が問題となっている。対策として減塩が行われるが、おいしさを感じられず実現は難しい。そこで塩味増強・代替物質の探索が行われているが、既存の塩味物質はえぐみや渋みが含まれる、塩味増強ペプチドは増強効果が弱いといった課題があり、新たな塩味物質が求められている。本研究では、塩味を評価できる細胞・動物実験評価系を構築し、新規塩味ペプチドの探索を試みた。

我々は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アレイを作製する技術を持っており、様々な生理活性ペプチドの探索に成功している。本研究では、既報の塩味ペプチドを残基伸長し評価した。塩味受容体ENaCの活性化によりCa^{2+}の細胞内流入が起きるため、活性評価にはCa^{2+}イメージングを用いた。Lipofectamineを用いてα，β，γの3種類のENaCサブユニットを一過性に共発現したHEK293細胞を作製した。20種の天然α-アミノ酸を物性により8群に分け、各群の代表アミノ酸を付加し残基伸長を行った。動物行動試験では8匹のC57BL/6Jマウスを用いた。細胞評価系で得た塩味ペプチドを給水瓶にいれ、対象とともに同時に2瓶を提示し、24時間での飲水量を計測してマウスの嗜好性を二瓶選択実験で評価した。

ENaC発現細胞を用いて評価した結果、RAをN末端側に伸長したペプチドNVRAが高活性であった。NVRAは元配列RAの5.3倍、既報の塩味ペプチドで最も活性の高いWWの1.5倍の活性を持つことがわかった。5残基に伸長した際は活性が低下した。続いて、NVRAの塩味をC57BL/6Jマウスを用いた二瓶選択実験で評価した。様々な濃度のNaClを用いて塩味嗜好性を評価したところ、50 mM 以下のNaClは嗜好性が高く、50 mM以上で逆転することがわかった。次に0.2 mM NVRAの嗜好性を調べた結果、NVRAのみで50mMのNaClと同等の嗜好性を示した。さらに0.2 mM NVRAを150 mM NaClに添加したところ、嫌悪性が消え、嗜好性がみられた。ENaCは「おいしい」塩味に関わる受容体であるため、NVRAを加えることによって、嗜好性の塩味が嫌悪性の塩味を凌駕したことが示唆された。以上より、NVRAペプチドはENaCを経由する「おいしい」塩味ペプチドであることが示唆された。

Key words peptide array, ENaC, Ca^{2+} imaging, two-bottle preference test

G2H6 (0303) 耐塩性ルシフェラーゼを用いた生物発光式エンドトキシン測定法の開発

○八幡悟史[1,2]*，野田健一[1]，下村亜依[1]，黒田章夫[2]
（[1]東亜ディーケーケー，[2]広島大院・統合生命科学）

Improved bioluminescence-based endotoxin measurement method using a salt-resistant luciferase mutant

○Satoshi Yawata[1,2]*, Kenichi Noda[1], Ai Shimomura[1], Akio Kuroda[2]
([1]DKK-TOA Corp., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)
s-yawata@toadkk.co.jp

【緒言】エンドトキシンはグラム陰性菌が持つ毒素であり，透析治療に用いられる透析液では，0.001 EU/mL以下と定められてる．カブトガニの血球成分（以下リムルス試薬）とルシフェラーゼの発光反応を組み合わせた生物発光法は，エンドトキシンを高感度・迅速に測定可能である．しかし，サンプルが透析液の場合，塩化ナトリウムにより発光反応が阻害され，低値を示してしまう．ホタルルシフェラーゼはアミノ酸の置換により，改良がおこなわれているが，塩化ナトリウムに対する抵抗性を上げた研究は行われていない．そこで本研究では，塩化ナトリウム存在下で発光が阻害されにくい変異型ルシフェラーゼを創製し，この変異型ルシフェラーゼを用いた透析液中のエンドトキシン測定法を開発した．

【実験】PCRランダム変異キットを用いて，北米ホタルルシフェラーゼ遺伝子全体に無作為に変異を導入した．変異遺伝子を大腸菌発現ベクターpET-28aに導入し，発現した組換えルシフェラーゼを140mM塩化ナトリウム溶液中で発光させ，発光阻害が少ない変異体を選別した．また，RO水と透析液で所定の値に標準エンドトキシンを調製し，発光測定により変異型ルシフェラーゼを評価した．

【結果と考察】140mM塩化ナトリウム存在下で60%以上の活性を保持する変異型ルシフェラーゼ2株が得られた．その変異アミノ酸の位置を確認したところ，変異はそれぞれVal288IleとGlu488Valであることが分かった．塩化ナトリウム存在下では野生型は44%まで発光が阻害されたが，Val288IleとGlu488Valの活性はそれぞれ67%および79%保持していた．288位と488位で他のアミノ酸による置換の効果を確認したが，最良の置換はそれぞれIleとValであった．さらに，2つの変異を組み合わせた二重変異体（以下ルシフェラーゼCR）では塩化ナトリウム存在下で95%以上の活性を保持していた．透析液中のエンドトキシンを，野生型ルシフェラーゼを用いて測定すると水に対して約35%と低値を示してしまう．一方ルシフェラーゼCRを用いた場合，95%以上の値を得ることができた．また，測定時間は20分で検出限界は0.00025EU/mLであった．本法によって透析液中のエンドトキシンを高感度・迅速に測定可能であることが分かった．

Key words endotoxin, detection, luciferase, dialysis, Limulus amebocyte lysate

G2H6 (0304) 環状ペプチド探索系によるオキシトシン置換体の機能解析

○木下 怜実[1]，吉岡 慶太郎[1]，小﨑 一功[1]，柴田 貴広[2]，清水 一憲[1]，本多 裕之[1]*
（[1]名大院・工，[2]名大院・生命農学）

Functional analysis of amino acid substitutes of oxytocin by cyclic peptide library

○Remi Kinoshita[1], Keitaro Yoshioka[1], Ikko Kozaki[1], Takahiro Shibata[2], Kazunori Shimizu[1], Hiroyuki Honda[1]*
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)
honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】
環状ペプチドは、分子内架橋により構造が固定され、直鎖ペプチドに比べて標的分子と強い相互作用を示すことから、創薬候補として注目されている。本研究では、9残基環状ペプチドで、子宮収縮ホルモンであるオキシトシン（CYIQNCPLG、以下OXT）を対象とし、遊離環状ペプチドの網羅的な探索構築および配列機能相関解析を行った。このため、我々が以前開発した光切断リンカーによる遊離ペプチドライブラリー構築技術と環状ペプチドアレイ技術[1]を用い、置換体ライブラリーの活性を評価した。
【方法】
Fmoc固相合成法でOXTの残基置換体遊離ペプチドライブラリーを作製した。置換ペプチドの活性を、GPCRの活性化が定量的に検出できる井上らのTGFα shedding assayを用いて調べた。残基置換では、天然α-アミノ酸を物性により8グループに分け、各グループの代表アミノ酸（A, L, F, S, N, D, K, P）を用いた。置換ペプチドに対して、OXT受容体に対するアゴニスト活性とアンタゴニスト活性を評価した。
【結果および考察】
代表アミノ酸を用いたOXT置換体のアゴニスト活性評価を行った。全ての残基置換体において元配列の活性を上回らなかったが、4, 8残基目を置換したものは活性が残る傾向にあった。4, 8残基目に対してCys以外のすべての天然アミノ酸で置換したところ、Q4Nでは元配列に比べ約35%、L8Iでは約82%のアゴニスト活性を示した。4残基目は無電荷親水性のアミノ酸、8残基目は側鎖の体積が中程度の疎水性アミノ酸であれば、比較的活性を持つことが示された。続いて、代表アミノ酸を用いたOXT残基置換体によるOXT受容体への阻害活性（アンタゴニスト活性）を評価した結果、2残基目置換体が比較的高い阻害活性を示し、Y2Lが最も高いことがわかった。さらに、2残基目を詳細に評価したところ、L置換体を含め、Y2I、Y2Wの3種類が高い阻害活性を有し、W置換体においては、既存の市販薬アンタゴニストに匹敵するK_d値であった。OXT置換体がアンタゴニスト活性を有するうえで、2残基目アミノ酸側鎖が疎水的で比較的体積が大きいことが重要であった。本探索系は、環状ペプチドの残基ごとのアミノ酸配列による特性を明らかにすることができ、種々の環状ペプチドの残基置換による最適化や高機能化に有用であると期待される。

参考文献：
[1] Kozaki I. et al., J Pep Sci., 27, e3287(2021)

Key words oxytocin, cyclic peptide, residue substitution, antagonist activity

G2H6 (0305) 環状バクテリオシン，エンテロシンNKR-5-3Bの生合成機構の解析

乗富和寿[1]，増永莉奈[1]，佐戸翔太[1]，Perez Rodney Honrada[1,2]，
園元謙二[1]，中山二郎[1]，○善藤威史[1]*
（[1]九大院・農，[2]フィリピン大学・ロスバニョス校）

Characterization of the biosynthetic mechanism of a circular bacteriocin, enterocin NKR-5-3B

Kazutoshi Noridomi[1], Rina Masunaga[1], Shota Sado[1], Rodney Honrada Perez[1,2], Kenji Sonomoto[1], Jiro Nakayama[1], ○Takeshi Zendo[1]*
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Univ. Philippines, Los Banos)
zendo@agr.kyushu-u.ac.jp

バクテリオシンは細菌がリボソーム上で合成する抗菌ペプチドであり，中でも，乳酸菌が生産するバクテリオシンは食品保存料などへの利用が期待されている．発酵魚より分離された乳酸菌 *Enterococcus faecium* NKR-5-3 が生産するエンテロシン NKR-5-3B（Ent53B）は，N 末端と C 末端がペプチド結合した環状バクテリオシンで，高い安定性や広い抗菌スペクトルを有し（1），その最小生合成遺伝子群は，*enkB*（Ent53B 前駆体），*enkB1*，*enkB2*，*enkB3*，*enkB4* の 5 つで構成される（2）．一般的な直鎖状バクテリオシンの場合，バクテリオシンの菌体外分泌と分泌されたバクテリオシンに対する自己耐性機構はそれぞれ別のタンパク質が担っている．一方，Ent53B では，5 つの生合成遺伝子を種々に組み合わせた発現株の解析から，ABC トランスポーターを構成する EnkB1 と EnkB3 がその両方の機能を担っていることが明らかとなった（2）．そこで，環状バクテリオシンにおける分泌機構と自己耐性機構の関係に注目し，Ent53B の分泌と自己耐性に関与すると考えられる EnkB3 について機能解析を行った．

EnkB3 と，同様の機能を持つと予想される他の環状バクテリオシン生合成タンパク質を比較したところ，ABC トランスポーターに特有な配列が見出され，その中でも Walker B 配列中の E146 は Mg^{2+} イオンを介した ATP の加水分解に直接作用するアミノ酸残基と考えられた．そこで，Ent53B 最小生合成遺伝子群を種々に組み合わせて構築した各プラスミドを鋳型に，インバース PCR によって EnkB3 に E146Q 変異を導入した種々のプラスミドを構築し，これらを発現宿主である *Enterococcus faecalis* JH2-2 に導入した．得られた変異株について，Ent53B の菌体外分泌能と Ent53B に対する自己耐性能を抗菌活性試験によって評価した．その結果，E146Q 変異株では，菌体外分泌能が失われ，自己耐性能が低下しており，EnkB3 による ATP の加水分解が Ent53B の菌体外分泌と自己耐性のいずれにも関与していることが明らかとなった．また，E146Q 変異株の菌体内には Ent53B やその前駆体が検出されなかったことから，Ent53B 生合成においてリーダーペプチドの切断・環状化と分泌が連続的に行われている可能性が示唆された．

1. Himeno K *et al*, Biochemistry, 54(31), 4863-4876 (2015).
2. Perez RH *et al*, J Bacteriol, 198(2), 291-300 (2016).

Key words antibacterial peptide, bacteriocin, lactic acid bacteria, circular peptide

G2H6 (0306) PURE リボソームディスプレイと NGS に用いた結合ペプチド配列の最適化

○Jia Beixi[1], 兒島 孝明[1], 中野 秀雄[1]*
([1]名大院・生命農学)

Rapid tunning of peptide binding by PURE ribosome display and NGS

○Beixi Jia[1], Takaaki Kojima[1], Hideo Nakano[1]*
([1]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)
jbeixi@molbiotech-nagoya.org

Ribosome display is an *in vitro* single-molecule display technology for selection and screening of huge variety of library. With the help of PURE system, the efficiency of ribosome display has been increased greatly. In addition, with the utilize of next-generation sequencing (NGS), we can monitor the enriched mRNA sequences in each selection step of the ribosome display. Here we tried to establish a combination scheme of PURE ribosome display, NGS analysis and bioinformatics to optimize a binding peptide, Strep-tag II, against a streptavidin mutant, Strep-tactin, as a model binder.

First, a NNK scanning library of the Strep-tag II sequence was constructed by replacing each of the 8 native codons to NNK triplet oligonucleotide. Then the library was transcribed *in vitro* and translated by PURE system. Then the mRNA-ribosome-peptide ternary complex was screened by Strep-tactin. The sequence of initial and the selected mRNAs were analyzed by NGS, followed by bioinformatics analysis to reveal preference of the binding peptide sequence. Several variants containing preferred amino acid residues were constructed and the binding to Strep-tactin was measured by binding assay check and the K_D of Strep-tag II and variants were measured by biosensor.

NGS analysis of the selected sequences and the initial NNK scanning library indicated that five positions in the Strep-tag II sequence (totally 8 residues) seems to be optimum because the proportion of original amino acids were enriched or maintained. However, the proportion of original amino acids in the other three positions were slightly eliminated and other amino acids were preferentially selected in the three positions. The K_D of constructed variants based on NGS analysis and wild type Strep-tag II was measured. One variant (S2I) showed a 5-fold increase in its binding affinity to Strep-tactin protein compared with strep-tag II. Also, one variant with low preference was also constructed and the K_D was measured and it was much lower than that of Strep-tag II. These results suggested the applicability of the ribosome display selection scheme in peptide optimization to target molecules.

Key words ribosome display, PURE system, NGS, Strep tag II

G2H6 (0307) <電子顕微鏡により可視化された大腸菌の外膜小胞高生産株 Δ*mlaE*Δ*nlpI* の異常な膜構造>

○尾島 由紘[1]*, 澤邊 朋美[1], 中川 真緒[1], 田原 悠平[2], 宮田 真人[2], 東 雅之[1]
([1]阪市大院・工, [2]阪市大院・理)

Aberrant membrane structures in hypervesiculating *Escherichia coli* strain visualized by electron microscopy

○Yoshihiro Ojima[1]*, Tomomi Sawabe[1], Mao Nakagawa[1], Yuhei O. Tahara[2], Makoto Miyata[2], Masayuki Azuma[1]
([1] Grad. Sch. Eng., Osaka City University, [2] Grad. Sch. Sci., Osaka City University)
ojima@osaka-cu.ac.jp

【背景と目的】
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。当研究室ではこれまでに大腸菌実験室株 BW25113 に対して、外膜と内膜の間を結ぶペプチドグリカン(PG)の架橋維持に関連する *nlpI* 遺伝子と、外膜外葉の脂質バランスを調整する *mlaE* 遺伝子の二重欠損株 Δ*mlaE*Δ*nlpI* が OMVs 高生産株となることを明らかにしてきた(Ojima et al, Biotech Bioeng, 117, 701-709, 2020)。そこで本研究では, 急速凍結レプリカ顕微鏡法などを用いることで、大腸菌の OMVs 高生産株の詳細な解析を行い、OMVs 生産の促進メカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】
急速凍結レプリカ電子顕微鏡法により Δ*mlaE*Δ*nlpI* 株を観察した結果、細胞の長軸の先端部にペリプラズム空間が広がることで原形質分離が起きている様子や、その先端部から外膜がくびれて OMVs が放出されている様子が観察された。この原形質分離は、各単独欠損株でも観察され、OMVs 高生産株に特有の形質であると考えられた。さらに細胞内小胞や多重膜の OMVs の存在も観察され、本株の細胞や生産する OMVs の異常な膜構造が明らかとなった(Ojima et al, Front Microbial, 12:706252, 2021)。続いて、Δ*mlaE*Δ*nlpI* 細胞のペプチドグリカン(PG)を界面活性剤等を用いて構造を維持したまま調製し、同様に急速凍結レプリカ電子顕微鏡法によって観察したところ、野生株には見られない大きな穴が多数確認された。それに加え、Δ*mlaE*Δ*nlpI* 株の細胞質内に組換え GFP を発現させると、野生株ではほとんど検出されなかった OMVs 画分への GFP の分泌が大幅に増加したことから、細胞質内タンパク質が OMVs 画分に含まれていることが示唆された。以上の結果から、Δ*mlaE*Δ*nlpI* 株では PG の穴から細胞内膜や細胞内成分がペリプラズムに流出し、その成分を内包した外内膜小胞(outer-inner membrane vesicles, OIMVs)が放出されたと結論づけられた。

Key words; *Escherichia coli*; *Outer Membrane Vesicles*; *plasmolysis*; *Quick-freeze, deep-etch electron microscopy*

G2H6 (0308) 大腸菌 Nissle1917 株の外膜小胞高生産株の特性解析

○中川 真緒[1], 尾島 由紘[1]*, 澤邊 朋美[1], 田原 悠平[2], 宮田 真人[2], 東 雅之[1]
([1]阪市大院・工, [2]阪市大院・理)

Characterization of the hyper-vesiculation strains of *Escherichia coli* Nissle 1917

○Mao Nakagawa[1], Yoshihiro Ojima[1]*, Tomomi Sawabe[1], Yuhei O. Tahara[2], Makoto Miyata[2], Masayuki Azuma[1]
([1] Grad. Sch. Eng., Osaka City University, [2] Grad. Sch. Sci., Osaka City University)
ojima@osaka-cu.ac.jp

【背景と目的】
大腸菌の外膜小胞(OMVs)は外膜の一部が隆起し遊離してできた細胞外小胞で、近年ナノキャリアやワクチンなど、その利用法が盛んに研究されている。当研究室ではこれまでに大腸菌実験室株 BW25113 の OMVs 高生産株である二重欠損株 Δ*mlaE*Δ*nlpI* を作製した。本研究では、OMVs を介して腸上皮株化細胞の免疫応答を調節することが報告されているプロバイオティクス大腸菌 Nissle1917(EcN)に着目した。実験室株と同様に Δ*mlaE*Δ*nlpI* 株を作製したところ、OMVs 生産量が増加したことを確認している。本研究の目的は二つで、EcN の OMVs 生産促進機構の解明と、生産された OMVs が腸上皮株化細胞の免疫応答に与える影響を解析することである。
【方法と結果】
はじめに、EcN の Δ*mlaE* Δ*nlpI* 株を急速凍結レプリカ電子顕微鏡法により観察した結果、細胞長軸の先端部から OMVs が隆起する様子と、長軸の先端部にペリプラズム空間が広がる原形質分離が起きている様子が観察された。 Δ*mlaE* Δ*nlpI* 株では原形質分離により先端部の外膜がくびれて小胞を形成しやすくなり、OMVs 生産が促進されると考えられた。また、広がったペリプラズム空間内に細胞内小胞と思われる構造体が観察された。さらに、細胞からペプチドグリカンを抽出し、急速凍結レプリカ電子顕微鏡法で観察した結果、Δ*mlaE* Δ*nlpI* 株のペプチドグリカンに小さな孔が観察された。これらの結果は実験室株 BW25113 の Δ*mlaE* Δ*nlpI* 株の結果と一致していた (Ojima et al, Front Microbial, 12:706252, 2021)。
次に、EcN が生産する OMVs が腸上皮株化細胞の免疫応答に与える影響を解析した。野生株と Δ*mlaE* Δ*nlpI* 株を 100 mL の LB 培地で培養後、フィルター濾過した上清を超遠心分離(109,000 ×*g*, 1 h)することで OMVs 画分を回収した。そして、10 日間 24 ウェルプレートで培養した腸上皮株化細胞 Caco-2 に回収した OMVs 画分を接触させた(37℃, 5%CO_2)。6 時間後に Caco-2 から RNA を抽出し、cDNA に逆転写後、炎症性サイトカイン IL-8 の発現量を qRT-PCR で測定した。その結果、 Δ*mlaE* Δ*nlpI* 株は野生株と比較して OMVs 生産量の増加に応じた IL-8 発現量の増加が確認されたが、同程度の量を接触させた際の違いはなく、IL-8 を指標にした場合の OMVs の質的な影響は見られなかった。

Key words *Escherichia coli* Nissle1917, Outer Membrane Vesicles, plasmolysis, Quick-freeze, deep-etch electron microscopy

G2H6 (0309) 油脂酵母の脂質生産機構の解明に向けた全ゲノム解析

○前田紗香[1]*, 梶浦裕之[2,4], 元岡大祐[3,4], Wu Chih Chan[2], 三﨑亮[2,4], 藤山和仁[2,4]
([1]阪大院・工, [2]阪大・生工国際セ, [3]阪大・微研, [4]阪大・先導的学際研究機構)

Whole genome analysis for the elucidation of lipid production mechanism in oleaginous yeast

○Sayaka Maeda[1]*, Hiroyuki Kajiura[2,4], Daisuke Motooka[3], Wu Chih Chan[2], Ryo Misaki[2,4], Kazuhito Fujiyama[2,4]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]ICBiotech, Osaka Univ., [3]RIMD, Osaka Univ., [4]Inst. OTRI)
maeda_sayaka@icb.osaka-u.ac.jp

バイオディーゼル燃料は化石燃料の代替エネルギー資源として注目されている。現在バイオディーゼル燃料の主原料は植物であるが、栽培時の農薬や肥料による環境汚染、気候や立地による生育の制限等の問題点が存在する。そこで、新たな油脂源として油脂酵母の利用が試みられている。油脂酵母とは乾燥菌体重量あたり 20%以上の油脂を生産、蓄積できる酵母のことである。我々は油脂酵母 *Rhodotorula mucilaginosa* TK16 の高温耐性変異体 、L1-1 の取得に成功した。産業化に必須な高温耐性をもつこの変異体は、高温耐性のみならず脂質生産性の大幅な向上も示した。
本研究では、TK16 と高温耐性変異体 L1-1 の全ゲノム解析と RNA-seq 解析を行い、全塩基配列の比較から、高温耐性機構と脂質生産性向上に寄与する因子の同定を目指した。MinION (Nanopore)のロングリード、MiSeq (illumine)のショートリードを用いたハイブリッドアッセンブリにより、TK16 からは 19 の contig を、L1-1 からは 18 の contig を得た。その後、blastx を用いて TK16 の全 contig に対して遺伝子情報のアノテーションを行った。近縁種である *R. toruloides* NP11 のタンパク質情報をもとに、TK16 においてタンパク質をコードする遺伝子、6658 個を同定した。TK16 のゲノム配列をリファレンス配列として L1-1 との類似性を比較すると、ストレス耐性に関連する遺伝子や、脂質生産経路に関連する遺伝子に変異が確認でき、遺伝子のみではなくプロモーター領域と推測される配列にも変異が認められた。また細胞増殖期における RNA-seq の結果から、TK16 と L1-1 で発現量が変化する遺伝子も確認できた。今後高温ストレス下における RNA-seq を行うことで、L1-1 の高温耐性や脂質生産性の獲得に至った因子の更なる解明が期待できる。

Key words Oleaginous yeast, NGS, RNA-seq, lipid production

G2H6 (0310) *Corynebacterium glutamicum* における膜小胞を介した鉄輸送の解析

○川島花雪[1]*, 永久保利紀[2], 野村暢彦[3,4], 豊福雅典[3,4],
([1]筑波大院・生命環境, [2]東大院・農生科, [3]筑波大・生命環境系, [4]筑波大・微生物サステイナビリティー研究センター)

Membrane vesicles-mediated iron acquisition in *Corynebacterium glutamicum*.

○Kayuki Kawashima[1]*, Toshiki Nagakubo[2], Nobuhiko Nomura[3,4], Toyofuku Masanori[3,4]
([1] Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2] Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [3] Faculty of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [4] Microbiology Research Center for Sustainability: MiCS Univ. Tsukuba)
s2121001@s.tsukuba.ac.jp

多くの細菌は生体膜に由来する微小な膜小胞 (membrane vesicles, MV) を細胞外に放出することが知られている. MV は主に脂質二重膜とタンパク質で構成されており, 細胞外に放出された後に周囲の細胞に付着・融合することで細胞間での様々な物質の輸送に関わることが知られている. MV はワクチンやドラッグデリバリーシステムといったバイオナノテクノロジー技術の有用な基盤になり得ることからその生物学的機能を利用した応用研究についても注目が集まっている. しかしながら, グラム陰性菌・グラム陽性菌のモデル生物において MV の機能に関する理解が進んできた一方で, 通常のグラム陽性菌とは大きく異なる細胞表層構造を有するミコール酸含有細菌においては, MV の機能に関する知見が乏しかった. そこで, 我々はミコール酸含有細菌のモデル生物の一種である *Corynebacterium glutamicum* を対象として, 本菌の生産する MV の生物学的機能の解明を目指した. 先行研究において, 我々は合成培地中で *C. glutamicum* が細胞外に外膜由来 MV を放出することを見出していた (Nagakubo *et al.*, 2021). この条件で産生される MV では, 鉄獲得に関与する膜タンパク質(HtaB)などが MV タンパク質の大部分を占めている. これまでに, 我々は上記 MV が鉄キレート活性を有することを見出していた. 以上の結果を踏まえて, 我々は本菌の MV が鉄の輸送担体として機能するという仮説を立て, これを検証した. 鉄の濃度を制限した合成培地に鉄イオンと混合して洗浄した上記の MV を加えると, 鉄制限により低下した本菌の生育が回復することを見出した. また, 遺伝子破壊などの実験結果から, この活性は MV に多く局在する HtaB やペプチド性シデロフォアに依らないことが示唆されていた. さらに, 鉄獲得に関連すると推測されるリポタンパク質を本菌の MV から検出することに成功したが, このタンパク質の欠損株から回収した MV についても野生株の MV と同様に生育の促進効果が見られた. これらの結果は, *C. glutamicum* の MV が本菌の鉄獲得システムの一部を担っており, その機能が MV タンパク質の組成にほとんど影響されないことを示唆している. 本研究の成果は, 未解明な点の多いミコール酸含有細菌由来 MV の機能の解明に繋がる.

参考文献
Nagakubo, T, Tahara, Y, Miyata, M, Nomura, N, Toyofuku, M. (2021). Mycolic acid-containing bacteria trigger distinct types of membrane vesicles through different routes. *iScience*. 24: 102015.

Key words *Corynebacterium glutamicum*[1], mycolic acid-containing bacteria[2], membrane vesicles[3], iron transport[4]

G2H6 (0311) メンブレンベシクルが細菌間で伝達する機構の解明

○臼倉雄紀[1], 諏佐勇磨[1], 野村暢彦[2,3], 豊福雅典[2,3,4*]
([1]筑波大院・生命地球科学研究科, [2]筑波大学・生命環境系, [3]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター, [4]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences)

Understanding how bacterial membrane vesicles deliver their cargo to cells

○Yuki Usukura[1], Yuma Susa[1], Nobuhiko Nomura[2,3], Masanori Toyofuku[2,3,4*]
([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba
[2]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba
[3]Microbiology Research Center for Sustainability, University of Tsukuba
[4]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences (SunRiSE))
toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp

多くの細菌はメンブレンベシクル（MV）と呼ばれる微小な膜小胞体を形成する。MV は生体内由来の物質を内包しており、この MV が周囲の細胞に付着・融合することでそれらの物質を輸送し、遺伝子水平伝播や病原性の寄与など様々な機能を発揮すると考えられている。このことから近年では MV と菌体との相互作用機構解明が微生物分野のみならず、臨床分野においても求められている。細菌による MV を介した物質輸送機構には MV の形成、伝播、付着・融合の過程があると考えられており、形成機構に関してはいくつかの機構が解明されている。その一方で MV の付着・融合に関わる因子や詳細なメカニズムについては未だ明らかになっていない。グラム陰性菌の MV においては細胞表層と同様に外膜由来の LPS が外側に提示されており、LPS はファージなどの外来微粒子の細胞認識に関わることが明らかにされている。中でも緑膿菌においては O 抗原が異なる 2 種類の LPS(A-band, B-band)が存在し、それらの存在比が細胞の基質への付着性といった物性にも影響する。このことから LPS の組成が MV の伝達性に影響することが予想される。そこで LPS が MV の物性や細胞付着性に及ぼす影響を明らかにすると同時に、MV と菌体との付着・融合の様子を解析するため MV1 粒子をトラッキングできるリアルタイムイメージング手法を確立した。

まず LPS の A バンド欠損および B バンド欠損株の緑膿菌から MV を回収した。回収した MV を蛍光膜染色剤によって染色し、菌体と培養することで菌体への MV 付着量を測定した。MV と菌体とのイメージングに関しては緑膿菌を基質に固定したところに蛍光染色した MV を添加することで MV が菌体に付着する瞬間を超解像顕微鏡によって観察することが出来た。さらに MV の蛍光が菌体表面へ移行することが示唆された。今後は本観察手法による MV の菌体への付着・融合機構を解明することで、細胞間で用いられる MV を介した細菌集団制御を目指している。

Key words cell-cell interactions, membrane vesicles, live-cell imaging, bacteria

G2H6 (0312) 遺伝子組換えカイコ中部絹糸腺の糖鎖構造解析

○浅野輝[1]*, 梶浦裕之[2,4], 立松謙一郎[3], 岩河佑平[1], 三崎亮[2,4], 瀬筒秀樹[3], 藤山和仁[2,4]
([1]阪大院・工, [2]阪大・生工国際セ, [3]農研機構・生物機能利用, [4]阪大・先導的学際研究機構)

Analysis of *N*-glycan in middle silk grand from transgenic silkworm

○Hikaru Asano[1]*, Hiroyuki Kajiura[2,4], Kenichiro Tatematsu[3], Yuhei Iwagawa[1], Ryo Misaki[2,4], Sedutsu Hideki[3], Kazuhito Fujiyama[2,4]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]ICBiotech, Osaka Univ., [3]NIAS., [4]Inst. OTRI)
asano_hikaru@icb.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】
カイコは、医療用有用タンパク質をはじめとするバイオ医薬品の生産宿主として近年注目され、実用化が進んでいる。しかしタンパク質翻訳語修飾の一つである糖鎖修飾経路はヒトとカイコで異なっており、カイコを用いて生産したバイオ医薬品を実用化するにはカイコ型糖鎖をヒト型糖鎖に改変する技術の確立が必要である。カイコ体内の絹糸合成器官である中部絹糸腺には、末端が GlcNAc 残基である糖鎖が豊富に含まれ、導入遺伝子によってヒト型糖鎖の合成が期待される。本研究では、ガラクトース転移酵素遺伝子やシアル酸転移酵素遺伝子を導入した組換えカイコの中部絹糸腺の糖鎖構造を解析した。
【方法】
ガラクトース転移酵素遺伝子及びシアル酸転移酵素遺伝子を導入したカイコの中部絹糸腺からリン酸バッファーを用いてタンパク質を抽出した。中部絹糸腺の糖鎖構造を解析するために抽出したタンパク質をヒドラジン分解し、得られた糖鎖をピリジルアミノ(PA)化することで蛍光標識した。その後 PA 化糖鎖を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と質量分析器を用いて分離・解析した。
【結果と考察】
遺伝子組換えカイコの中部絹糸腺の糖鎖構造は、HPLC による糖鎖の溶出時間の解析と質量分析器による糖鎖構成成分の解析によって推定した。解析した結果、ハイマンノース構造や末端に GlcNAc が結合した構造などカイコ中部絹糸腺本来の糖鎖構造に加え、糖鎖末端にガラクトースやシアル酸が結合した構造を確認できた。これらの結果より、導入したガラクトース転移酵素やシアル酸転移酵素がカイコ体内で機能し、糖鎖修飾経路に寄与したと考えられる。引き続き遺伝子組換えカイコの糖鎖構造解析を行い、解析結果をカイコ生産系に反映させることで、カイコを用いた有用タンパク質生産技術の向上・確立に貢献できる。

Key words *N*-glycan, Silkworm, Middle silk grand, Sialic acid

G2H6 (0313) 糖鎖の脱フコシル化が B 型肝炎ウイルス生活環に及ぼす影響の解析

○長峯 美季[1]*, 三﨑 亮[1], 本田知之[2], 梶浦 裕之[1], 上田 啓次[3], 藤山和仁[1]
([1]阪大・生工国際セ, [2]岡山大院・医歯薬, [3]阪大院・医)

Analysis of the relationship between defucosylation of N-glycan and HBV life-cycle

○Miki Nagamine[1]*, Ryo Misaki[1], Tomoyuki Honda[2], Hiroyuki Kajiura[1], Keiji Ueda[3], Kazuhito Fujiyama[1]
([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Med. Dent. Pharm, Sci., Okayama Univ., [3]Grad. Sch. Med., Osaka Univ.)
nagamine_miki@icb.osaka-u.ac.jp

【研究背景】
B 型肝炎ウイルス（HBV）感染により発症する B 型肝炎は、HBV 生活環に不明点が多いこともあり、完治が困難であることが知られている。そのため、HBV 生活環に関わる分子の同定が急務である。一方、いくつかのウイルスの表面タンパク質あるいは宿主細胞の糖鎖がウイルス生活環に深くかかわっているという報告が近年なされてきている。HBV の表面タンパクも糖鎖を保持しているが機能は未解明であり、HBV 生活環に関わる糖鎖構造を突き止めることは新たな HBV 治療薬の開発につながると考えられる。本研究では、生体内で重要な機能をもつことで知られるほか、HBV 擬似粒子を用いた先行研究で、その減少が HBV の侵入を抑制すると報告されていたフコシル化糖鎖に着目し、糖鎖の脱フコシル化が HBV 生活環におよぼす影響について調査した。

【研究方法および結果】
ゲノム編集技術でα1,6-フコース転移酵素（FUT8）遺伝子を破壊し、得られた変異候補株に関してレクチンブロッティングおよび糖鎖構造解析を行うことで、N-結合型糖鎖からα1,6-フコース結合を除去したヒト肝癌培養細胞（HepG2-ΔFUT8）の構築を確認した。またこの HepG2-ΔFUT8 の増殖を調べた結果、野生株と比較して細胞増殖が抑制されることが示唆された。HepG2 野生株と HepG2-ΔFUT8 に HBV を感染させることで感染効率を検証したところ、HepG2-ΔFUT8 では感染後 3 日後の細胞内ウイルス核酸量が野生株と比較して低下した。すなわち、HBV 感染宿主細胞の N-結合型糖鎖からフコースを除去することで、HBV 感染から HBV 遺伝子増幅の過程でいずれかの HBV 生活環が阻害されたことが示唆された。

Key words Hepatitis B virus, glycan, fucosyltransferase

G2H6 (0314) B 型肝炎ウイルス感染を阻害する配糖体の糖改変及び機能解析

○若松明良[1], 三﨑亮[1], 藤澤悠[1], 本田知之[2], 梶浦裕之[1], 上田啓次[3], 藤山和仁[1]*
([1]阪大・生工国際セ, [2]岡山大院・医歯薬, [3]阪大院・医)

Glycan-modification of a glycoside which inhibits HBV-infection and its characterization

○Akira Wakamatsu[1], Ryo Misaki[1], You Fujisawa[1], Tomoyuki Honda[2], Hiroyuki Kajiura[1], Keiji Ueda[3], Kazuhito Fujiyama[1]*
([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Med. Dent. Pharm, Sci., Okayama Univ., [3]Grad. Sch. Med., Osaka Univ.)
wakamatsu_akira@icb.osaka-u.ac.jp

B 型肝炎ウイルス（HBV）の感染により発症する B 型肝炎は、慢性肝炎、肝硬変、肝臓がんへと進行する可能性がある。アジア、アフリカを中心に HBV キャリアは多く、HBV に起因する B 型肝炎は世界中で見られている。感染防除にはワクチン接種が有効であるが、その普及率の低い地域で感染が広がっている。現在、HBV の感染者を完治することができる治療薬は見つかっていない。そのため、より効果的な新しい治療薬が求められている。HBV は、ヒトの肝細胞に感染するが、その際に肝細胞表面に存在するタンパク質を利用して侵入する。近年になってそのタンパク質の機能を阻害する配糖体 Proscillaridin A が、HBV の細胞への感染を阻害することが明らかとなった。しかし、Proscillaridin A は細胞死を引き起こすことが知られており、当該配糖体を直接医薬品として用いることが難しい。そこで我々は、配糖体の糖構造が配糖体自身の機能に大きく影響することに着目し、Proscillaridin A の糖構造を改変することでその機能性を向上できるのではないかと考えた。こうしたことを踏まえ、本研究では酵素学的手法を用いて糖構造を改変し、Proscillaridin A の細胞毒性と HBV 感染阻害能への影響を解析した。
エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ変異体の糖転移活性を利用し、*N*-結合型糖鎖を転移した配糖体を新しく合成した。糖の供与体基質としてシアリルバイアンテナおよびアシアロバイアンテナ糖鎖を有するグリコペプチドを用いた。糖構造を改変した配糖体を、逆相液体クロマトグラフィーを用いて分離精製した。各糖構造の異なる配糖体をヒト肝癌培養細胞の培地に添加し、24 時間後の生細胞数をカウントすることで、細胞毒性を比較した。添加する配糖体の濃度を変えることで、肝細胞の生存に支障をきたさない濃度を算出し、*N*-結合型糖鎖を付加した新規配糖体の中で細胞生存率が明らかに向上する濃度を見出した。また、配糖体存在下で HBV を感染させ、24 時間後の細胞に含まれるウイルス核酸量をリアルタイム定量 PCR で解析した結果、新規配糖体も Proscillaridin A と同様に HBV の感染を阻害できることが判明した。

Key words HBV, 配糖体, エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ, 細胞毒性

G2H6 (0315) Production of β1,4-galactosylated antibody in *Nicotiana benthamiana*

○Nguyen Kim Dua[1*], Hiroyuki Kajiura[1], Ryo Misaka[1], Kazuhito Fujiyama[1]
([1]International Center for Biotechnology, Osaka University)

Production of β1,4-galactosylated antibody in *Nicotiana benthamian*a

○Nguyen Kim Dua[1]*, Hiroyuki Kajiura[1], Ryo Misaki[1], Kazuhito Fujiyama[1]
([1]International Center for Biotechnology, Osaka University)
dua_nguyen@icb.osaka-u.ac.jp

Therapeutic antibodies have been recorded as the best-selling drugs in the past five years. As a result, the number of research studies in antibody engineering has dramatically evolved to enhance effectiveness and efficacy of recombinant antibodies. *Nicotiana benthamiana*, which is free from human pathogen contamination, has become one of the most attractive production systems for biopharmaceuticals.

In this study, IgG was transiently produced in *N. benthamiana*. Generally, the Fc region of IgG contains two *N*-glycans which are important for structural stability and effector functions. In particular, the terminal galactose (Gal) residues on Fc-glycan have been shown to increase CH2 domain stability and improve effector activities. However, the IgG produced in wild-type *N. benthamiana* lacked the terminal Gal residues in its *N*-glycan. Therefore, we co-expressed IgG and mouse β1,4-galactosyltransferase (GALT) to modify plant *N*-glycan with β1,4-linked Gal residue(s). The co-expression of IgG and β1,4-GALT resulted in β1,4-galactosylated glycan structures on the plant-produced IgG. Our study revealed that recombinant β1,4-galactosylated IgG was successfully produced with large amounts within a week in *N. benthamiana* co-expressed with mouse β1,4-GALT. This approach is time-saving and would be applied for production of glycoproteins which require terminal Gal residues.

Key words Agroinfiltration, β1,4-Galactosyltransferase, IgG production, *N*-glycan engineering

G2H7 (0101) 機能化リンクモジュールの設計と ECM 模倣ハイドロゲルの開発

○大川将志[1], 田部亜季[1], 太田誠一[1], 長門石曉[2], 津本浩平[1,2], 伊藤大知[1,3]*
([1]東大院・工, [2]東大医科研, [3]東大院・医)

Design of genetically engineered Link module and development of ECM mimetic hydrogel

○Masashi Okawa[1]*, Aki Tanabe[1], Seiichi Ohta[1], Satoru Nagatoishi[2], Kouhei Tsumoto[1,2], Taichi Ito[1,3]
([1] Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, [2] Inst. Med. Sci., Univ. Tokyo, [2] Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)
taichi@m.u-tokyo.ac.jp

【緒言および目的】細胞外マトリックス (ECM)はヒアルロン酸(HA)を主成分とするハイドロゲルである. HA にはリンクプロテインを介して糖やタンパクが結合し, 複合化・構造化されている. 一方で生物学の発展により生体内での HA 結合タンパクの機能及びその役割が明らかになってきており医療・バイオ分野への応用が期待されている. 本研究では, HA 結合タンパク質の一つである TSG6[1] に着目し, その HA 結合部位であるリンクモジュールを用いた ECM 模倣ハイドロゲルの創製を目指した.
【実験方法】TSG6 の HA 結合部位であるリンクモジュールを含む配列(アミノ酸配列: 31-133)の C 末端に微生物由来トランスグルタミナーゼ(MTG)反応性 tag[2] を導入し機能化リンクモジュール(LinkCFQ)を設計した. 大腸菌にて発現後, アフィニティークロマトグラフィーにより精製した. 発現・精製は SDS-PAGE により確認した. LinkCFQ の HA との相互作用解析を等温滴定カロリメトリー(ITC)により評価した. 加えて LinkCFQ とゼラチンとの混合系を用いて異なる pH 条件下で MTG 反応性を評価した. 最後に LinkCFQ と HA, ゼラチンを混合し MTG 架橋により ECM 模倣ハイドロゲルを作製した.
【結果および考察】アフィニティークロマトグラフィーにおける各フラクションの SDS-PAGE の結果より約 12 kDa に単一バンドが確認されたことから LinkCFQ の精製に成功した. これは多糖ベースのカラムとの弱い相互作用により最後に溶出し, 夾雑タンパクと分離できたためと考えられる. ITC 測定により HA との相互作用による発熱が確認され LinkCFQ の HA 結合能が示された. さらに, LinkCFQ はゼラチンとの混合系において pH 依存的な MTG 反応性を示し, 特に pH8, 9 において 90%以上の高い反応率を達成した. これは MTG(pI 8.9), ゼラチン(pI 8-9), LinkCFQ(pI9.5)であることから高 pH において静電反発が緩和し, 酵素-基質複合体形成が容易になったためと考えられる. 最後に作製した ECM 模倣ハイドロゲルの粘弾性特性評価では貯蔵弾性率 G'が損失弾性率 G"より高くなり, MTG 架橋によるハイドロゲルの形成が示された.
【参考文献】1)Anthony J. D, Caroline M. M, Matrix Biology, 78-79, 60-83 (2019)
2)Mari T, Rie W, Kosuke M, Masahiro G, Noriho K, Bioconjugate Chem. 28, 2954-2961 (2017)
【謝辞】HA をご提供頂いた Denka 株式会社, MTG をご提供頂いた味の素株式会社, ゼラチンをご提供頂いた新田ゼラチン株式会社に感謝致します。
Key words hyaluronan, Link module, transglutaminase, hydrogel

G2H7 (0102) 細胞外小胞のエンジニアリングによるタンパク質ソーティングの制御と薬物送達への応用

○曽宮正晴[1]*, 黒田俊一[1]
([1]阪大・産研)

Engineering of extracellular vesicles for protein sorting and drug delivery application

○Masaharu Somiya[1]*, Shun'ichi Kuroda[1]
([1]SANKEN, Osaka Univ.)
msomiya@sanken.osaka-u.ac.jp

エクソソームをはじめとする細胞外小胞（extracellular vesicle, EV）は、細胞から分泌されるサブミクロンサイズの膜小胞であり、内部に分泌細胞由来の核酸やタンパク質を内包している。EV は次世代のドラッグデリバリーシステム（DDS）として期待されており、EV 内部に任意の分子（積荷）を内包させる方法が複数報告されているが、いずれも内包効率は低く、新たな方法論の開発が必要である。本研究では、ヒト細胞から分泌される EV の膜タンパク質を改変し、小分子によって積荷タンパク質の細胞内ソーティングを制御することで、積荷タンパク質を EV 内に積極的に移行させ、細胞外に分泌させる方法を開発した。EV のマーカータンパク質であるテトラスパニン（CD81）の C 末端に FK506-binding protein（FKBP）を融合させるとともに、ラパマイシン存在化で FKBP と結合する FKBP-rapamycin binding protein（FRB）の C 末端に積荷タンパク質を融合させ、それぞれをヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞に発現させた。FRB 融合タンパク質は、ラパマイシンの存在下で CD81-FKBP と結合し、EV 内にソーティングされて細胞外に分泌されることが確認できた。しかしながら、この EV をレシピエント細胞に添加しても、内包物タンパク質の活性は認められなかった。この事から、EV がレシピエント細胞にエンドサイトーシスを介して取り込まれても、エンドソームからの脱出および内包物放出が不十分であると示唆された。そこで EV のエンドソーム脱出能を向上させる目的で、CD81-FKBP および FRB 融合タンパク質を発現する HEK293T 細胞に、水泡性口内炎ウイルス由来膜融合タンパク質 VSV-G を共発現させた。VSV-G を含む EV を添加したレシピエント細胞では、FRB 融合タンパク質が細胞内に放出されて機能することが確認できた。以上の結果より、CD81 を FKBP と融合し、任意のタンパク質に FRB を融合することで、ラパマイシンを用いたタンパク質の EV 内へのソーティングの制御が可能になった。EV のレシピエント内での効率的な内包物放出には、VSV-G などの膜融合タンパク質の存在が必要であり、EV の DDS 応用におけるエンドソーム脱出能の付与の重要性が明らかとなった。

Key words Extracellular vesicle, drug delivery system, protein engineering

G2H7 (0103) 哺乳類の繊毛細胞における Tppp3 の機能解析

○酒井 敬史[1]*, 高岡 勝吉[2], 鳥飼 純平[1], 濱田 博司[3], 篠原 恭介[1]
([1]東京農工大学, [2]徳島大学 先端酵素学研究所, [3]理化学研究所生命機能科学研究センター)

Functional analysis of Tppp3 in mammalian ciliated cells

○Takafumi Sakai[1]*, Katsuyoshi Takaoka[2], Junpei Torikai[1], Hiroshi Hamada[3], Kyosuke Shinohara[1]
([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Institute of Advanced Medical Sciences Tokushima University, [3]RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research)
s206166z@st.go.tuat.ac.jp

繊毛は細胞から突出した毛様の構造体であり、我々ヒトの体の恒常性に重要な役割を担っている。繊毛は運動性を持つ繊毛（運動性繊毛）と運動性を持たない繊毛（感覚繊毛や一次繊毛）が存在する。運動性繊毛は気管や卵管など限られた部分に存在し、ウィルスや細菌等の異物の排除や細胞の移動などに役割がある。一方、感覚繊毛は嗅上皮や網膜などの感覚器官に存在し外界からの刺激を受容するセンサーのような役割を担っている。Tppp３(Tubulin Polymerization Promoting Protein Family member3)は気管繊毛と嗅上皮の繊毛などの繊毛を持つ細胞に多くに発現するタンパク質であり、試験管内で微小管の重合・束化の促進を行うことが確認されている。しかし、気管や嗅上皮といった繊毛を持つ細胞での機能は未解明である。そこで本研究では、Tppp3 の繊毛細胞での機能を解明するために、Tppp3 ノックアウトマウスの気管、嗅上皮の繊毛細胞における表現型の検証を行った。検証の結果、Tppp3 ノックアウトマウス気管では繊毛同士が融合し巨大な構造体を形成する、という繊毛細胞の形態の異常が観察された。また、嗅上皮では繊毛細胞の減少と繊毛の生え方のパターンの異常が確認された。このことから Tppp3 は繊毛細胞の形態や分化において機能を持つ可能性が示唆された。本発表では、これらのデータから考えられる繊毛細胞における Tppp3 の機能とその分子機構について議論したい。

Key words cilia, olfactory, trachea, immunostaining

G2H7 (0104) 質量分析イメージング法を用いた毛髪成分可視化によるストレスモニタリング手法の開発

○植木瞭生[1], 永井裕崇[2], 古屋敷智之[2], 福崎英一郎[1,3,4], 新間秀一[1,3,4]*
([1]阪大院・工, [2]神戸大院・医, [3]大阪大学先導的学際研究機構, [4]大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)

Stress history monitoring based on mass spectrometry imaging of hair strand

○Ryo Ueki[1], Hirotaka Nagai[2], Tomoyuki Furuyashiki[2], Eiichiro Fukusaki[1,3,4], Shuichi Shimma[1,3,4]*
([1]Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, [2]Division of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Kobe University, [3]Industrial Biotechnology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, [4]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

うつ病等の精神疾患における問診では，初診以前の情報が欠如していることに加え，患者の主観および主治医の経験に頼ることが多い．このような背景から，客観的なストレスモニタリング手法が将来有用であると考えている．人から採取される検体のうち，毛髪は毛細血管から血中成分を吸収・保持し，一定速度で伸長する．そのため，血中のストレス関連物質（以下，ストレスマーカー）を経時的に保持する．また毛髪は侵襲性が少ない検体であるという利点も有する．本研究では，毛髪中のストレスマーカーの分析に質量分析イメージング法（mass spectrometry imaging: MSI）を用いる．従来の分析手法である LC/MS や GC/MS は複数の毛髪全体から抽出を行うため，分析結果は長期に保持されたストレスマーカーの積算となる．一方，MSI では抽出が不要であり，簡便な前処理である．さらに，１本の毛髪上での変動を可視化する．これらの特性を利用して，毛髪中のストレスマーカーの変動を MSI により可視化し，ストレス履歴をモニタリングする手法の開発を目的とする．初めに，うつ病モデルマウスの毛髪（神戸大学医学研究科薬理学分野より提供を受けた）から成分を抽出し，LC/MS により代謝物を測定した．主成分分析を行うことでストレスに寄与している代謝物を探索した．この結果と精神疾患に関する仮説に基づきストレスマーカーを決定した．毛髪試料の MSI では，うつ病患者から採取した毛髪内部に保持されたストレスマーカーを可視化するために毛小皮の除去，および毛髄質の露出を行った．作製した切片を用い，毛髪中ストレスマーカーのイオン化の可否を確認し，局在を可視化した．

LC/MS の結果，うつ病モデルマウスの毛髪中で増加する代謝物が存在することがわかった．さらに本実験で MSI を用いて毛髪中でのストレスマーカーの局在可視化に成功し，各代謝物は毛髪中で時系列に従い変動している様子が観察された．今後は，毛髪中ストレスマーカー分布画像とうつ病評価尺度の相関関係を確認し，結果の妥当性を評価する．今回開発した手法を用いることにより，うつ病に限らず様々な疾患のモニタリングに応用されることが期待される．

Key words MALDI-MSI, hair analysis, major depressive disorder, stress marker

G2H7 (0105) 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

○水谷涼[1], 仁宮一章[2*]
([1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術)

Targeted and ultrasound-triggered cancer cell injury using perfluorocarbon-loaded nano emulsion

○Ryo Mizutani[1], Kazuaki Ninomiya[2*]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)
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 200 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した。超音波に対する化学的応答の評価として、$^1O_2$検出試薬を用いて$^1O_2$の発生量を測定した。一方、超音波に対する物理的応答の評価として、ナノ液滴の濃度変化を分光光度計とナノ粒子解析装置を用いて測定した。その結果、ナノ液滴に超音波照射をした場合のみ、顕著な$^1O_2$発生と顕著なナノ液滴濃度の減少がみられた。この結果より、超音波によって、ナノ液滴に含まれる光増感剤の励起と、低沸点パーフルオロカーボンの気化によるナノ液滴の破裂が起きたと考えられる。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)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、蛍光顕微鏡で評価した。その結果、がん細胞 MCF-7 に対してナノ液滴の結合が見られた。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、細胞生存率が低下した。

Key words drug delivery system, ultrasound, perfluorocarbon

G2H7 (0106) Rapid construction of hyperphosphatemia rat model using adenine

○Ajeeta Anand[1], Muthukumar Serva Peddha[2], Hideki Aoyagi[1]*
([1]Fac. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Dept. Biochem., CSIR Central Food Technol. Res. Inst. India)

Rapid construction of hyperphosphatemia rat model using adenine

○Ajeeta Anand[1], Muthukumar Serva Peddha[2], Hideki Aoyagi[1]*
([1]Fac. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Dept. Biochem., CSIR Central Food Technol. Res. Inst. India)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

In India (the second largest populous country in the world) and Japan, the frequency of chronic kidney disorder (CKD) has increased tremendously in recent years. Hyperphosphatemia is the secondary issue of CKD with high phosphate levels accumulated in blood. Hyperphosphatemia further causes life threatening diseases like bone mineral disorders, vascular calcifications and worsen the patients' health quality. Therefore, it is required to evaluate and understand the biochemical and histological alterations under hyperphosphatemia condition. A hyperphosphatemia Wistar rat model was constructed using oral gavaging of adenine at 400 mg/kg/d with high phosphate diet (1.2 % [w/w]). The plasma phosphate, urea, and creatinine levels were found to be elevated by 3, 4, 10 folds, respectively within 10 d of induction. Histological studies corroborated the severe cystic degeneration with edema accumulation inside the tubules and Glomerulus degeneration of kidney. These results concluded the successful construction of hyperphosphatemia rat model due to renal damage. The reported range of hyperphosphatemia induction period is from 14 d to 60 d[1, 2]. However, this hyperphosphatemia model is rapid (only 10 d of induction) and non-invasive with specific and lesser dosage. In addition, this study emphasized the third 'R, refinement' of animal ethics by the development of hyperphosphatemia model with quick induction and less dosage of inducer with less pain. This study contributes to pharmaceutical and health industries for *in vivo* studies of the medicinal developments.

(1) Haut *et al*., *Kidney Int.*, 17: 72-73 (1980).
(2) Abbasian *et al*., *J. Clin. Med*., 1: 3534 (2020).

Key words adenine, hyperphosphatemia, kidney disorder, renal damage

G2H7 (0107) 新規 bFGF 内包 Gel-in-Oil エマルションの経皮送達による血管新生誘導技術

○張 怡[1],井上 雄太[1],Fardous Jannatul[1],堺 裕輔[1],小野 文靖[2],井嶋 博之[1]*
([1]九大院工,[2]九大 GIC)

A new technology of bFGF-contained Gel-in-Oil emulsion delivery for inducing angiogenesis

○Yi Zhang[1], Yuta Inoue[1], Jannatul Fardous[1], Yusuke Sakai[1], Fumiyasu Ono[2], Hiroyuki Ijima[1]*
([1] Eng., Kyushu Univ., [2]Kyushu GIC)
ijima@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

増殖因子は細胞培養から再生医療にいたる幅広い分野において重要かつ必要不可欠な要素である。しかしながら、増殖因子は一般的に極めて高価なものが多いうえ溶液中では容易に生理活性が失われるため、治療目的の使用には作用対象部位への効率的な送達および生理活性の維持が可能なリザーバーを有する機能的なデリバリーシステムの確立が必要となる。また、組織再生促進のような有効性発現には数日以上の持続的作用が不可欠である。そこで本研究では、増殖因子との高い親和性を有するヘパリン導入ゼラチンゲルを油中にナノ分散させた Gel-in-Oil ナノゲルディスパージョン（G/O-NGD）の開発を試みた。G/O-NGD は高い皮膚浸透性を示し親水性成分の経皮送達が可能であった。さらに、増殖因子を内包した G/O-NGD を皮膚に塗布することによって高い血管新生誘導効果が確認された。G/O-NGD は増殖因子をヘパリンに固定化することで安定保持と作用対象部位における徐放性有し、また水性溶媒中にゲルが分散しているため皮膚への浸透性向上が期待できる。

Key words growth factor, gel-in-oil, transdermal drug delivery, angiogenesis

G2H7 (0108) 深層学習による細胞トラッキングを用いた培養ヒト表皮幹細胞の品質管理・同定技術の開発

○弘瀬拓矢[1],古徳純一[1]*,土岐富士緒[2],西村栄美[3],難波大輔[2]
([1]帝京大学院,[2]東京医科歯科大学難治疾患研究所,[3]東京大学医学研究所)

Label-free quality control and identification of human keratinocyte stem cells by deep learning-based automated cell tracking

○Takuya Hirose[1], Jun'ichi Kotoku[1*], Fujio Toki[2], Emi Nishimura[3], Nanba Daisuke[3]
([1]Teikyo Univ, [2]Dept. Stem Cell. Biol, Med.Res.Inst. TDC,[3]Inst. Med.Sci., Univ. Tokyo)
kotoku@med.teikyo-u.ac.jp

幹細胞を基にした再生医療は，臨床活用が進んでいるが，培養細胞の品質管理は専門家による目視検査が基本であり，再生医療のための大規模な細胞製造は非常に困難である．そのため，細胞培養の工業化および，培養を標準化するための品質管理手法の開発が強く望まれる．我々は，培養ヒト幹細胞の非侵襲的な品質管理と，その同定のための深層学習を用いた自動細胞追跡技術（DeepACT；deep learning-based automated cell tracking）の開発を行ったので報告する．DeepACT は，深層学習を用いた細胞検出器と，状態空間モデルをベースとしたトラッキング技術を組み合わせることで，位相差顕微鏡画像から，高密度に密集したヒト表皮ケラチノサイトコロニーの個々の細胞を自動的に認識にし，追跡できる．また，DeepACT は，ケラチノサイトの動態をリアルタイムに解析することで，培養条件の変化に応じた動態を定量的に評価することが可能である．また，細胞の移動速度や空間情報を解析することで，幹細胞性のコロニーと非幹細胞性のコロニーを区別することが可能である．我々が開発したシステムは，再生医療で利用される幹細胞に対して広く適用することが可能であり，信頼性の高い非侵襲的な品質管理技術の基盤となりうる．

Key words deep learning, quality control, regenerative medicine, keratinocytes

G2H7 (0109) 電気生理学に基づく慢性血液透析治療中の心筋細胞拍動能の解析

○濱田浩幸[1]*
（[1]九大院・農）

Electrophysiological insights into the relationship between chronic hemodialysis treatment and cardiomyocyte beating

○Hiroyuki HAMADA[1]*
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ.)
hamada@brs.kyushu-u.ac.jp

慢性腎不全患者の約 25%が間歇的血液浄化療法（慢性血液透析）治療中に突然の心停止を経験し、約 40%の患者の死因が心血管系合併症であることが報告されている（たとえば Makar *et al.* 2017, 日本透析医学会統計データ 2019）。その理由を明らかにするため、慢性血液透析の治療条件と心機能障害の関係を探る多施設共同統計研究が進められ、それらの多くが治療中の水分除去速度だけでなく、血漿と薬液（透析液）の間の電解質濃度の較差も心機能障害の要因であることを示した（たとえば Rhee *et al.* 2018）。その電解質動態と心機能の関係を理解するには、電気生理学に基づく分析が欠かせない。電気生理学の分野では、早くから計算機シミュレーションの有用性が認識され、今日では、各種膜輸送体のイオン運搬機構および興奮収縮連関のキネティクスを考慮した心筋組織の拍動現象の微視的な数理解析が可能となっている。本発表では、透析治療中のカリウム動態に焦点を絞り、心筋細胞の電気生理学的計算機シミュレーションを通して透析液カリウム濃度が心筋細胞拍動能におよぼす影響を精査した。

世界最大規模の透析治療統計研究（DOPPS） phase5 の我が国のデータによると、透析前血清カリウム濃度は、第一四分位数 4.2（SKL）、平均 4.8（SKM）、第三四分位数 5.3 mM（SKH）であった。これらの濃度の患者に本邦のカリウム承認濃度 2.0 mM の透析液を適用した治療の数理解析を実践し、中心洞房結節細胞の拍動リズム（Hamada *et al.* 2020）と心室筋細胞の収縮力（O'Hara *et al.* 2011）の推移を評価した。まず、SKM ならびに SKH 患者の治療中の拍動リズムならびに収縮力は維持されたが、血清カリウム濃度が過分に低下する SKL 患者のそれらは維持困難であることが示された。次に、カリウム濃度を高めた透析液を SKL 患者に適用し治療中の心筋細胞拍動能を評価した。この場合には、体液中のカリウム濃度の低下は緩和され、心筋細胞内カルシウム循環の改善をもたらし、拍動リズムの不安定化ならびに収縮力の低下を軽減できた。以上をまとめると、血清カリウム濃度の低い患者の治療中の心筋細胞拍動障害は、透析液のカリウム濃度を適性化することにより回避できる可能性が示唆された。

Key words Mathematical model, Regulatory science, Cardiac beating, Hemodialysis treatment

G2H7 (0110) 低分子化合物を利用した軟骨分化機構の解析

○下畑宣行*
(立命館大・総研, 立命館大・生命)

Analysis of chondrogenic differentiation using small compounds

○Nobuyuki Shimohata*
(Res Org Sci Thechnol, Ritsumeikan Univ, Col Life Sci, Ritsumeikan Univ)

n-shimoh@fc.ritsumei.ac.jp

変形性関節症 (Osteoarthritis, OA)、特に膝関節に主病変をもつ膝 OA は、関節軟骨の摩耗を特徴とする炎症性関節疾患である。その発症要因としては、力学的負荷等に起因する軟骨の初期変性、それに続く破壊、及び軟骨下骨で生じる骨代謝異常であると考えられている。しかし、膝 OA の正確な分子機序に関してはまだ明らかにされていない部分がある。また、一般的な膝 OA 治療は対症療法に留まっているのが現状であり、関節軟骨の消失を防ぎ軟骨再生作用を有する疾患修飾性 OA 薬 (Disease-modifying OA drug, DMOAD) もまだ開発されていない。

TD-198946 (TD) は、OA の悪化に関与する軟骨細胞の肥大分化を促進せず、軟骨細胞分化を強く誘導する化合物として同定された。TD は DMOAD として有用な特性を有しているが、その知的財産権のために DMOAD として臨床開発することは困難であった。そこで我々は、TD の分子機序を解明し、TD と類似した作用を有する新たな DMOAD 候補を見つけることを計画した。プロテオミクス解析の結果、TD の標的として複数のミトコンドリアタンパク質を同定した。その中で、2 つのミトコンドリア内膜タンパク質に着目し、TD と標的タンパク質がどのように協働して軟骨分化に作用するかを調べた。TD は用量・時間依存的に MAPK を活性化することが分かり、また軟骨細胞の分化状態や TD の存在に応じて、標的タンパク質の細胞内局在が変化することが確認された。また、TD 標的タンパク質は、いくつかの低分子化合物と結合することが知られており、これらの化合物が TD と同様の軟骨細胞分化の促進効果や肥大分化の抑制作用を有することも明らかになった。

Key words small compounds, mitochondria, chondrocytes, differentiation

G2H7 (0111) グルクロン酸修飾過酸化チタンナノ粒子による細胞損傷効果の検討

○森下 琢麻[1], 川元 皓貴[1], 鷲尾 周[2], 森田 健太[1], 西村 勇哉[3], 大谷 亨[1],近藤 昭彦[3], 荻野 千秋[1]*
([1]神戸大院・工, [2]神戸大・工, [3]神戸大院・科技イノベ)

Examination of cell damage effect by glucuronic acid-modified titanium peroxide nanoparticles

○Takuma Morishita[1], Koki Kawamoto[1], Amane Washio[2], Kenta Morita[1], Yuya Nishimura[3], Tooru Ooya[1], Akihiko Kondo[3], Chiaki Ogino[1]*
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Fac. Eng., Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【目的】 がんの治療法の 1 つである放射線療法は、身体の深部にある切除困難な腫瘍に対して有効であると期待されているが、過剰な放射線量によって、周囲の放射線感受性の高い組織への治療リスクが高くなる問題がある。そこで、低線量で高い治療効果を得るために、当研究グループは放射線増感剤であるポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子（PAA-TiOx）を開発した。PAA-TiOx は *in vivo* で放射線増感効果を示したが、腫瘍に送達されなかった粒子は肝臓に蓄積され、体外に排泄されないことが課題となっていた。そこで本研究では、修飾剤を変更することで治療後に体外へ排泄される粒子を作製することを目的とした。

【実験方法】 新たな修飾剤としてポリエチレングリコール（PEG）とグルクロン酸（GlcA）を導入した。PEG は分散力かつ血中安定性を有しているため、網内系での捕食を回避できる効率よく腫瘍に送達できると考えられる。GlcA は肝臓内の代謝過程で異物と結合し、水溶性を増大させ、胆汁排泄を促進させる物質である。予め粒子に GlcA を修飾することで迅速に排泄できると考えられる。これらのことから、グルクロン酸・PEG 修飾過酸化チタンナノ粒子（GlcA-PEG-TiOx）の作製を目指した。粒子の合成はまず、PEG 修飾二酸化チタンナノ粒子（PEG-TiO_2）の PEG の OH 末端にグルクロン酸に保護基が付いた 1,2,3,4-テトラ-O-アセチル-β-D-グルクロン酸メチルを触媒であるルイス酸によって修飾させた。その後、脱保護と過酸化処理を行い、GlcA-PEG-TiOx を作製した。

【結果】 粒子作製後、FT-IR、TGA を用いることで結合していることを確認した。しかし、合成の過程で粒子の分散性が低下し、凝集してしまう粒子が多くみられたため、詳細に合成方法を検討する必要がある。今後の展望としては、分散型粒子への合成条件の改良を行い、*in vitro* での細胞損傷実験を行い、粒子の放射線増感効果の評価を行う。

Key words drug delivery system, titanium peroxide, glucuronic acid, PEG

G2H7 (0112) ポリフェノール配糖体修飾過酸化チタンナノ粒子開発と細胞損傷効果の検討

○川元 皓貴[1], 森下 琢麻[1], 鷲尾 周[2], 森田 健太[1], 西村 勇哉[3], 近藤 昭彦[3], 荻野 千秋[1]*
([1]神戸大院・工, [2]神戸大・工, [3]神戸大院・科技イノベ)

Development of polyphenol glycoside-modified titanium peroxide nanoparticles and examination of cell damage effect

○Koki Kawamoto[1]*, Takumi Morishita[1], Amane Washio[1], Kenta Morita[1], Yuya Nishimura[3], Akihiko Kondo[3], Chiaki Ogino[1]*
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Fac. Eng., Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
* ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【目的】 身体の深部に発生し、摘出困難な腫瘍への決定的な放射線治療法はまだ見つかっていない。過剰照射の放射線線量によって、放射線感受性の高い正常組織への治療リスクが存在する。そこで、低線量で治療効果を達成するために、当研究グループは放射線増感効果を持つ、ポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子（PAA-TiO_x NPs）を開発した。PAA-TiO_x NPs は *in vivo* での放射線増感効果を示したが、腫瘍以外の組織にも蓄積することが明らかになっている。本研究では、がん腫瘍への能動的な TiO_x NPs のデリバリーを達成するために、転移性腫瘍で頻繁に過剰発現するグルコーストランスポーター 1（GLUT1）を標的とした粒子の開発を目指す。その合成過程で、有機的な合成手法を必要としないポリフェノール配糖体修飾過酸化チタンナノ粒子を作製した。

【実験方法】 ポリフェノールの一種であるα-グルコシルルチン（RutinG）はルチンの配糖体であり、分子構造にグルコース残基を有する。また、RutinG が持つカテコール基は TiO_2 表面に容易に吸着・結合することが知られている。TiOx NPs は二酸化チタンナノ粒子（TiO_2 NPs）に H_2O_2 を反応させることで生成されることから、TiO_2 NPs に対し、RutinG と H_2O_2 を添加する量や順番のパターンを試行し、RutinG-TiOx NPs を作製した。具体的には、強酸性下で分散する TiO_2 NPs に RutinG を添加し、限外ろ過によって分散媒の pH を中性に変化させ、表面修飾 TiO_2 NP を取得した。その後に H_2O_2 を添加し、RutinG-TiO_x NPs した。また、作成した RutinG-TiO_x NPs の放射線増感効果を、すい臓がん細胞 MIAPaCa2 を用いてコロニーアッセイを行い評価した。

【結果】 作製した RutinG-TiO_x NPs の特性評価を行い、PAA-TiO_x NPs の特性と比較した。また、コロニーアッセイによって、RutinG-TiO_x NPs が PAA-TiO_x NPs と同等以上の放射線増感効果を持つことを *in vitro* で示した。今後の展望として、*in vitro* では、RutinG によるがん細胞標的の能力の評価を行うため、GLUT1 発現株と阻害株に対し、RutinG-TiO_x NPs を添加し、選択的な取り込み量の変化を観察し、本発表で報告する予定である。

Key words drug delivery, titanium dioxide, rutin

G2H7 (0113) 分解性が制御されたヒアルロン酸誘導体を用いた注入型癒着防止剤の開発

○守谷 郁, 蓮沼 直貴, 小関 愛子, 村松 和明*
（東京電機大学大学院 理工学研究科 生命理工学専攻）

Development of injectable anti-adhesion biomaterial using hyaluronan derivative with controlled enzymatic degradability

○Iku Moriya, Naoki Hasunuma, Aiko Koseki, Kazuaki Muramatsu.
(Life science and engineering, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Denki University)
k-muramatsu@mail.dendai.ac.jp

従来、開腹手術後に生じる臓器癒着の防止では、臓器間の接着を物理的に遮断する癒着防止フィルムが活用されてきたが、基本的に内視鏡手術には向いていない等の課題があった。そこで最近では、腹腔鏡手術にも対応可能なインジェクタブル型製品のニーズに応え、スプレー式の癒着防止材も商品化された。しかし、現行のスプレー式製品は、反応性化合物から構成されるため用時調製が必要であり、使用直前にあらかじめセットアップ作業や圧縮エアーとの接続を要する等、簡便性の観点では改善の余地が残されている。

演者等は、上記課題を解決するため、簡便な操作性と癒着防止能を兼ね備えた、高分子量ヒアルロン酸（HA）をベースとした ready-to-use が可能な注入型癒着防止材の開発を進めてきた。HA は内在性の分解酵素（ヒアルロニダーゼ等）によって速やかに代謝されるため、癒着防止材として利用するためには分解性の制御が必要となる。本開発品は、低分子量のポリグルタミン酸（PGA）を高分子量 HA に一定量グラフト化した HA 誘導体（PGA-g-HA）であり、HA がもつ生理活性と任意に制御された分解特性を併せ持つよう工夫されている。

そこで、ラットの腹膜擦過モデル（擦過エリア；20 mm×20 mm）において、処置後 1 週間の解剖学的および組織学的所見を得ることにより、開発品の癒着防止効果を検証した。解剖学的所見において、擦過のみ行なった陽性対照群では、消化器と腹膜との間で顕著な癒着形成が見られたのとは対照的に、PGA-g-HA を適用した実験群ではほとんど癒着形成を認めなかった。さらにこの結果は、市販のスプレー式癒着防止材を適用した比較対象群と比べても、優れた性能を示すものであった。また、組織学的所見において、PGA-g-HA を適用した実験群では、治癒過程にある腹腔内の炎症組織の肥厚化は顕著に抑えられていた。これらの結果より、分解性を制御した HA 誘導体からなる PGA-g-HA は、過度な組織の炎症反応を抑制することにより、早期の組織修復を実現することが予想された。

以上より、分解性が制御されたヒアルロン酸誘導体 PGA-g-HA は、優れた特性を有する注入型癒着防止材であることが示された。

Key words ヒアルロン酸、インジェクタブルゲル、分解制御、抗炎症性、癒着防止材

G2H7 (0201) NGS 解析に基づくゲノム育種で育成された大粒・短稈コシヒカリ型新品種「コシヒカリ駿河 d60Gg」及び晩生・短稈コシヒカリ型新品種「コシヒカリ駿河 d60Hd16」

○富田因則[1]*
([1]静岡大学グリーン科学技術研究所)

Large-grain and short-stem new variety "Koshihikari Suruga d60Gg" and late-maturing and short-stem new variety "Koshihikari Suruga d60Hd16" developed via Next-generation DNA sequencing

○Motonori Tomita
([1]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
tomita.motonori@shizuoka.ac.jp

コシヒカリのゲノムに粒重を 34%増加させる大粒遺伝子 *GW2*, 背丈を約 20 ㎝抑制する短稈遺伝子 *d60*, 開花を 2 週間遅延させる晩生遺伝子 *Hd16* を移入・統合した「コシヒカリ駿河 Gg」,「コシヒカリ駿河 d60Gg」,「コシヒカリ駿河 Hd16」および「コシヒカリ駿河 d60Hd16」の 4 品種が, 種苗法による審査を経て 2021 年 3 月に品種登録された. いずれも, 当該遺伝子を 5~7 回の連続戻し交雑で移入・集積するとともに, 次世代シーケンサーによる全ゲノム解析によってゲノムがコシヒカリに置換された同質遺伝子系統を選択・固定したものである. 品種「いのちの壱」の大粒形質を移入した大粒コシヒカリ型同質遺伝子系統(BC_4F_2)の全ゲノム解析の結果, 大粒遺伝子は第 2 染色体 8.1 Mb 地点のユビキチンリガーゼの 1 塩基欠損型の大粒遺伝子 *GW2* と同座であった(Tomita et al. 2019, *Int J Mol Sci*)。*GW2* を移入した大粒コシヒカリ型同質遺伝子系統は品種名「コシヒカリ駿河 Gg」で登録され, 千粒重 29.6 g(34%+)で食味は新潟コシヒカリに匹敵する初の大粒コシヒカリであり, 米国産コシヒカリと優位に差別化できる。さらに, 第 2 染色体 10.3 Mb 地点の XTH 様配列の欠損型である短稈遺伝子 *d60* を付与した「コシヒカリ駿河 d60Gg」は千粒重 28.8 g(31%+)で 24 ㎝(24%-)短稈化し, 大粒で穂重でも倒れにくい。伊勢神宮の神田で発見された変異種「イセヒカリ」の晩生形質を移入した晩生コシヒカリ型同質遺伝子系統(BC_6F_2)の全ゲノム解析の結果, 第 3 染色体 33.0~34.3 Mb 領域に SNPs が集中する他はコシヒカリに置換されていた. この内, コーディング領域でコシヒカリに対する変異は唯一, 晩生遺伝子 *Hd16* の第 9 エキソンの 1 塩基置換であった(Tomita et al. 2021, *Int J Genomics*). *Hd16* を移入した晩生コシヒカリ型同質遺伝子系統は品種名「コシヒカリ駿河 Hd16」で登録され、コシヒカリより 14 日晩生で高温登熟を回避できる。さらに,「コシヒカリ駿河 d60Hd16」は猛暑回避に加えて, *d60* によって 20 cm 短稈化し, 秋台風に対する耐倒伏性が強化され, 遺伝子の集積効果が相加的に現れた. 以上のように, 地球温暖化に伴う気候危機下で生産が安定・多収化し, 食味・品質は新潟コシヒカリと遜色のないスーパーコシヒカリ型品種を開発した. 本年度は愛媛県農林水産研究所他 3 県で生産力検定試験が実施されている.

Key words rice, genome, genome engineering

G2H7 (0202) 気孔開閉を誘導する化合物の開発

○筧太心[1]*，鈴木喬太[1]，佐藤奏音[1]，有澤美枝子[2]，熊田佳菜子[3]，谷井沙織[3]，古田未有[3]，斎藤望[3]，水野太郎[3]，元木大介[3]，河野優[4]，石丸泰寛[1]，魚住信之[1]*
（[1]東北大院・工，[2]九大院・農，[3]東北大院・薬，[4]東大院・理）

Development of chemical compounds that induce stomatal opening and closing

○Taishin Kakei[1]*, Kyota Suzuki[1], Kanane Sato[1], Mieko Arisawa[2], Kanako Kumada[3], Saori Tanii[3], Miyu Yoshida[3], Nozomi Saito[3], Taro Mizuno[3], Daisuke Motoki[3], Yuu Koono[4], Yasuhiro Ishimaru[2], Nobuyuki Uozumi[1]*
([1]Tohoku Univ., [2]Kyuusyuu Univ, [3]Tohoku Univ., [4]Tokyo Univ)
taishin.kakei.q8@dc.tohoku.ac.jp

【背景・目的】 植物は環境の変化に応じて気孔を開閉し，CO_2 の吸収，蒸散，O_2 の排出を行うことで，植物内の恒常性を維持している．この気孔の開閉調節は，孔辺細胞の膨張と収縮で行われ，孔辺細胞で機能するイオンチャネルが重要な役割を担っている．私たちは，植物の耐乾燥性を人為的に付与する目的で，孔辺細胞に発現するイオンチャネルの輸送活性を制御する化合物の探索を行っている．これまでに，孔辺細胞で機能する内向き整流性 K^+チャネルを選択的に阻害する化合物は存在しないことから，電気生理測定の手法を用いて独自のケミカルライブラリーから，植物イオンチャネルの阻害剤の単離を進めてきた．今回，これまでに見いだした候補化合物の植物への生理的な効果と乾燥刺激による情報伝達応答に関わる分子メカニズムについて検討した．

【方法・結果】K^+チャネル活性を阻害する化合物の植物における効果を調べるために，シロイヌナズナの気孔を調製後，その添加による気孔の開閉試験を行った．この候補化合物によって気孔は閉鎖したことから，K^+チャネル阻害が原因で気孔閉鎖に関与していると考えられた．次に，K^+チャネル遺伝子変異株に本化合物を添加したところ，気孔の閉鎖が観察された．このことは，本化合物は K^+チャネル阻害活性に依存しない気孔閉鎖を促す活性もあることが考えられた．ABA が誘導する気孔閉鎖情報伝達系に関わる遺伝子のシロイヌナズナ変異株を用いて，本化合物の影響を検討した．気孔閉鎖において細胞内 Ca^{2+}濃度の変化に関係する変異株において，本化合物の影響が消失したことなどから，細胞内 Ca^{2+}シグナルが関与することが示唆された．本 K^+チャネル阻害剤は，ABA 情報伝達系路の一部を阻害する生物刺激剤であると考えられる．

Key words transporter, inhibitor, *Arabidopsis thaliana*,

G2H7 (0203) Artificial transcriptional activation system for RNA detection

○Feiyang ZHENG[1], Yoshinori KAWABE[2], Masamichi KAMIHIRA[1,2*]
([1]Grad. Sch. Sci. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Eng., Kyushu Univ.)
*kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

[Introduction] Intracellular RNA contains both gene sequences and gene expression information. By combining RNA signals with gene expression regulation, cell types, gene mutations and other cellular information can be detected to achieve tissue-specific gene expression. In this study, we designed an RNA-induced transcriptional activation system based on aptamers and transcriptional activators.

[Materials and methods] To achieve RNA-induced transcriptional activation, we constructed expression plasmid vectors encoding MS2 bacteriophage coat protein (MCP) fused with transcriptional activator (MCP-TA) and PP7 bacteriophage coat protein (PCP) fused with tetracycline repressor (PCP-TetR). A target RNA encoding *MS2* and *pp7* aptamers and poly(U) terminal sequence was expressed under the control of human U6 promoter. Recombinant CHO cells harboring a GFP expression unit driven by a TRE promoter were established (CHO/TRE-GFP).

[Results and discussion] CHO/TRE-GFP cells were transfected with the vectors encoding fusion proteins and target RNA containing *MS2* and *pp7* sequences. GFP expression was observed in the cells transfected with all required vectors. In the condition without target RNA, GFP expression was not observed at all. *GFP* mRNA was upregulated over 30-fold compared with that without target RNA expression vector. Construction of RNA detection systems was also possible using other combinations of RNA motifs and proteins such as *com*/COM and *BoxB*/N22.

Next, to detect different RNA molecules simultaneously, a target RNA expression vector encoding *BoxB* and *pp7* sequences and a Gal4-N22 fusion protein expression vector were constructed. Recombinant CHO cells harboring TRE-GFP and UAS-RFP expression cassettes (CHO/TRE-GFP/UAS-RFP) were co-transfected with the fusion protein expression vector and *MS2-pp7*- or *MS2-BoxB*-tagged RNA expression vector. The expression of GFP or RFP was induced in the cells when corresponding target RNA vector was transfected without cross talk. In addition, cells expressing both *MS2-pp7*- and *MS2-BoxB*-tagged target RNAs exhibited the inducible expression of both GFP and RFP, as expected.

[Conclusions] In this study, the fusion proteins based on aptamers and transcriptional activator could detect RNA molecules, confirming inducible transgene expression. These results indicate that this system is useful as an RNA detection system and that further steps can be expected toward the development of general programable gene circuits.

Key words RNA detection, Transcriptional activation system, Gene expression

G2H7 (0204) シグナル伝達特性を容易に設計可能なミニマル受容体の構築

○河原　正浩*，中嶋　恭子
（医薬基盤研）

Construction of minimal receptors capable of readily designing signaling properties

○Masahiro Kawahara*, Kyoko Nakajima
(Natl. Inst. of Biomed. Innov.)
m-kawahara@nibiohn.go.jp

【背景・目的】
細胞内シグナル伝達は細胞運命を決定するために重要な役割を果たしている。従って、細胞内シグナル伝達特性を人工的に設計し制御できれば、合成生物学および細胞治療への応用が期待できる。そこで本研究では、複数のチロシンモチーフを組み込むことによってシグナル伝達特性を容易に設計可能で、二量体形成により活性化されるシンプルかつサイズの小さなミニマル受容体を構築した。

【実験方法・結果】
以下の機能性パーツを組み合わせてミニマル受容体を構成した。受容体のシグナル伝達場である膜への局在化シグナル配列、FK506 結合タンパク質の変異体（$FKBP_{F36V}$）、細胞内チロシンキナーゼである JAK をリクルートするドメイン、チロシンリン酸化された際に標的シグナル伝達分子を特異的にリクルート可能なチロシンモチーフ、およびモチーフ間を連結するためのリンカーである。膜透過が可能な合成小分子リガンド AP20187 は $FKBP_{F36V}$ に結合してミニマル受容体の二量体化を誘導し、JAK の活性化とチロシンモチーフのリン酸化、標的シグナル伝達分子のリン酸化チロシンモチーフへの結合および JAK によるリン酸化を逐次的に誘導する。これにより、標的シグナル伝達分子がリガンド依存的に活性化される。

まずは 2 つのチロシンモチーフを有するミニマル受容体を構築し、その際のモチーフ間リンカーとしてフレキシブルリンカー$(G_4S)_n$、ヘリックスリンカー$(EA_3K)_n$ を繰り返し数 n=1～3 として用いた。その結果、いずれのリンカーでも両方の標的シグナル伝達分子の活性化が可能であり、n=1 のミニマルリンカーで充分であることが分かった。そこで、チロシンモチーフを 4 つ選定し、ミニマルリンカーを介して 2 つ、3 つ、および 4 つ連結したミニマル受容体を構築した結果、いずれも標的シグナル伝達分子の活性化が見られ、最大 4 つのシグナル伝達分子の活性化に成功した。

Key words chimeric receptor, tyrosine motif, signal transduction, mammalian cell

G2H7 (0205) 白色脂肪細胞の寒冷刺激とベーシュ脂肪細胞への分化

○塩見尚史，冨士原由貴
（神戸女学院・人間科学）

Mechanism of cold stimulus resistance and differentiation to beige adipocytes in white adipocytes

○Naofumi Shiomi, Yuki Fujiwara
(Dept. Hum. Sci. Kobe College)
n-shiomi@mail.kobe-c.ac.jp

[目的]
ヒトの体は厳密な体温のコントロールがなされており、低温刺激を受けると脳からアドレナリンを分泌し、アドレナリン受容体を介して UCP1 の発現上昇したり、褐色脂肪細胞に誘導したりする。一方、マウスのような体温の変化する動物では、寒冷刺激に対して体全体が迅速に適応する必要があり、細胞自身に低温刺激対する耐性機構が備わって可能性があるが、それに関してはほとんど研究されていない。そこで、本研究では、マウス白色脂肪細胞に直接寒冷刺激を与えた場合の耐性機構について研究を行った。

[実験方法及び結果]
37℃で培養したマウス白色脂肪細胞 3T3-L24 に対して、16℃と 4℃で 1 時間寒冷刺激を与え、リアルタイム PCR によりその発現量を調べた。その結果、ベージュ脂肪細胞へ転写因子の PRDM16 遺伝子とベージュ脂肪細胞のマーカー遺伝子 UCP1 の発現量が高まり、その発現量はノルアドレナリンを添加した場合よりも高かった。また、寒冷刺激を継続すると、マーカータンパク質 UCP1 を発現しており、ベージュ脂肪細胞に分化していると考えらえた。このように、マウスの細胞では、低温刺激対して細胞が直接応答する機構が備わっていることを見いだした。

次に、寒冷刺激によりこれらの遺伝子発現量が高まるメカニズムについて調べた。寒冷刺激による Ca イオンの流入量と cAMP の量を調べた結果、寒冷刺激により Ca イオンの流入量が増加し、cAMP の量も増加した。また、マウス白色脂肪細胞は、低温感受性チャネルの TRPA1 と TRP8 を発現しており、Ca イオンの流入量は、TRP 阻害剤により抑制された。このことから、寒冷刺激を受けると TRP を通じて Ca イオンを取り込むと同時に、アデニル酸シクラーゼが活性化されて cAMP が増加し、ベージュ脂肪細胞に分化を促すと考えられた。

最後に、ヒトの脂肪細胞への直接的な寒冷刺激の影響を調べた。正常ヒト前駆脂肪細胞 HPA-s（コスモバイオ社）を脂肪細胞に分化した後、16℃で 1 時間寒冷刺激を与え、リアルタイム PCR によりその発現量を調べた。ヒトの脂肪細胞では TRPA1 を発現しておらず、寒冷刺激に対しても、ベージュ脂肪細胞のマーカー遺伝子の発現量に有意な変化は見られなかった。　以上の結果から、マウス白色脂肪細胞には、ヒトにはない、直接的な寒冷刺激から細胞を守る機構が細胞自身に備わっていると考えられる。

Key words adipocytes, cold-resistance, differentiation, UCP1

G2H7 (0206) クラッシュゲルを支持体として用いたスフェロイド積層用バイオ3D プリンターによる三次元組織の作製

○大野莉歩[1], 仁宮一章[2]*
([1]金沢大院 自科, [2]金沢大新学術)

Spheroid-based bio 3D printing using hydrogel slurry as support.

○Riho OHNO[1], Kazuaki NINOMIYA[2]*
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)
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、細胞と動物個体では薬剤評価の結果に大きな差があるといわれる。このような差を補完するための薬剤評価系として、培養細胞から作製される三次元組織の利用が必要といわれる。特にスフェロイドからなる三次元組織が注目されている。ここで、スフェロイド積層用バイオ 3D プリンターとは、多細胞スフェロイド（ビルディングブロック）を剣山（支持体）に刺すことで、デザイナブルな三次元組織を作製するものである。しかし、既存のスフェロイド積層用バイオ 3D プリンターでは、剣山自体が観察の妨げになる、三次元組織に穴が開くことで薬剤評価に影響がある、といった問題がある。そこで、本研究では、ハイドロゲルを物理的に粉砕したクラッシュゲルを支持体として用いた新規なスフェロイド積層用バイオ 3D プリンターを開発する。また、このクラッシュゲルを支持体として用いたスフェロイド積層用バイオ３D プリンターをモデル腫瘍三次元組織の作製へ応用した。

【方法および結果】ゲランガムのハイドロゲルをホモジナイザーにより粉砕し、クラッシュゲルを作製し、35 mm dish をベースにした自作培養器内に充填した。また、正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)・GFP 発現ヒト乳腺がん細胞株(MCF-7/GFP Cell Line)の 2 種の細胞を用いて、正常細胞スフェロイド・がん細胞スフェロイドを作製した。これらを、スフェロイド積層用バイオ 3D プリンターを用いてクラッシュゲル内に 3×3×1（合計 9 個）でスフェロイドを配置し、スフェロイド積層評価を行った。培養中のスフェロイド融合評価やがん浸潤評価を行った。培養終了後、多光子顕微鏡により三次元観察を行い、内部構造評価を行った。まず、クラッシュゲル内にデザイン通りにスフェロイドが配置できることが分かった。培養中にスフェロイドの融合やがんの浸潤が確認できた。また、培養終了後の多光子顕微鏡観察により内部構造評価を行った結果、剣山の穴に干渉されることなく、がん細胞の 3 次元的な遊走を評価することができた。

Key words spheroid[1], bio-3D printer[2], hydrogel slurry[3]

G2H7 (0207) マイクロデバイス上での区画化三次元ヒト神経筋組織モデルの構築

○亀井雄平, 山本一貴, 秋山裕和, 本多裕之, 清水一憲*
（名大院・工）

Compartmentalized three-dimensional human neuromuscular tissue models fabricated on a microdevice

○Yuhei Kamei, Kazuki Yamamoto, Hirokazu Akiyama, Hiroyuki Honda, Kazunori Shimizu*
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)
shimizu@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】身体の運動は、脳からの信号が脊髄前角の運動神経細胞体から軸索、神経筋接合部（NMJ）を介して骨格筋細胞へと伝達されることで引き起こされる。神経筋疾患では、伝達経路を構成する運動神経細胞・NMJ・骨格筋細胞などの機能不全により筋萎縮や筋力低下が発症し、死に至ることもある。多くの場合で詳細な発症メカニズムが不明であり、有効な治療薬がない。このため、メカニズム解明や治療薬開発に有用な新技術の開発が求められている。本研究では、神経筋疾患の *in vitro* 解析のため、運動神経細胞と培養骨格筋組織を長期に区画化共培養することが可能なマイクロデバイスの開発を目的とした[1]。
【方法と結果】開発したデバイスには運動神経細胞と骨格筋組織の培養領域があり、それぞれが軸索のみ通過できるマイクロトンネルを介して繋がっている。本デバイスの大きな特徴は、運動神経細胞からの信号で収縮する骨格筋組織の収縮力を評価できること、運動神経と骨格筋のそれぞれの細胞体を長期に区画化して培養できること、運動神経の細胞体や軸索、骨格筋組織に対して選択的な刺激が可能であることである。
デバイス上の神経培養領域でヒト iPS 細胞由来運動神経細胞を培養したところ、運動神経の軸索が筋培養領域に向かって伸長した。続いて、ヒト不死化骨格筋細胞を用いて筋培養領域に筋組織を構築し、共培養を開始した。共培養 4 日目に、培養骨格筋組織が自発的に収縮する様子が観察された。軸索選択的にせん断応力刺激を負荷して軸索を断裂させたところ、この自発収縮が消失した。このことから、デバイス上での共培養により、運動神経の軸索末端と骨格筋細胞の間に NMJ が形成されたことが示唆された。共培養 10 日目に、運動神経を活性化するグルタミン酸を各培養領域に添加したところ、神経培養領域に加えた場合にのみ、筋収縮が観察された。さらに各培養領域に作用機序の異なる阻害剤（テトロドトキシン、臭化ベクロニウム）を添加したところ、テトロドトキシンを神経培養領域、臭化ベクロニウムを筋培養領域に添加した条件で筋収縮が阻害された。このことから、開発したデバイスを用いて細胞選択的な薬効評価が可能であることが示唆された。今後は、NMJ をより多く安定的に形成させるためのデバイスの改良や、患者由来細胞を用いた神経筋疾患モデルの構築に取り組む予定である。

[1] Yamamoto, K. *et. al.*, Lab on a Chip., 21, 1897-1907, 2021

Key words: neuromuscular junction, human iPSCs, microdevices, phenotype screening

G2H7 (0208) 細胞画像情報解析を用いた間葉系幹細胞免疫抑制品質の非破壊評価

○今井祐太[1]、蟹江慧[1]、加藤竜司[1,2]*
（[1]名大院・創薬科学、[2]名大・ナノライフシステム研究所）

Morphology-based cell evaluation for mesenchymal stem cell immunosuppressive quality

○Yuta Imai[1], Kei Kanie[1], Ryuji Kato[1,2]*
([1] Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2] Inst. Nano-Life-Sci., Nagoya Univ.)
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

ヒト間葉系幹細胞(hMSC)は、自家および他家の細胞療法の材料として大きく期待を集める細胞である。特に、その免疫抑制治療効果は、hMSC を用いた細胞製品の市場を大きく牽引しつつあり、今後 hMSC の品質として重要な有効性評価項目となる可能性が高い。また、他家細胞を用いた細胞製品の設計では、より高性能な治療効果を持つロットや株の選抜が、経済的・効率的なマスターセルバンクの構築に極めて重要になると考えられている。
hMSC における免疫抑制能の品質計測は、単核球細胞との共培養などでの T 細胞増殖抑制性能評価がファーストスクリーニングとして利用されるが、時間・手間・コストがかかる上に、共培養する細胞の品質のぶれやコストは大きな問題となる。我々のグループはこれまで細胞の非破壊顕微鏡画像から得られる細胞形態をインプット情報として、本来は破壊的にしか得ることのできない細胞品質を機械学習によって非破壊的に評価・予測する技術開発を多数の例で証明してきた。本研究では、我々は hMSC の単核球細胞に対する T 細胞増殖抑制ポテンシャルの計測試験データとその培養中の画像データを解析することによって、非破壊的かつ超早期に hMSC の免疫抑制能を予測する画像解析モデルの開発に成功したためここにこれを報告する。このような画像品質評価技術は、今後の hMSC セルバンクを経済的・効率的に実現することに貢献できると考えられる。

Key words mesenchymal stem cell, image analysis, quality control, machine learning

G2H7 (0209) 細胞形態情報解析の実用化を加速する Data Integration

○竹本悠人[1]、蟹江慧[1]、加藤竜司[1,2]*
（[1]名大院・創薬科学、[2]名大・ナノライフシステム研究所）

Data integration of morphological big data for cell quality control

○Yuto Takemoto[1], Kei Kanie[1], Ryuji Kato[1,2]*
([1] Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2] Nano-Life-Systems Instit., Nagoya Univ.)
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

近年の再生医療分野の発展により、細胞治療の有効性が多く報告されいることに伴い、細胞製造の安定性と効率性を両立させる工学技術の発展が産業的な急務となっている。しかし、細胞製造プロセスは長く、複雑であることから細胞へ影響を及ぼす工程や因子は、未だ明確にされていない。また、過去の化成品医薬品の製造で行われていた Quality by testing（QbT）「最終製品の破壊的検査で製品品質を担保する品質管理」では、いつ・どこで・どのように品質が低下したのかを理解することができず、不安定性かつ非効率な製造プロセスになってしまう。そこで、細胞製造でもバイオ医薬品の分野で発展した Quality by design（QbD）というコンセプトの遵守が規制側からも求められ始めている。QbD というコンセプトは、「プロセスの安定性をデータで証明することで製品品質を担保する」という考え方であり、その最も重要なルールは『培養状態を定量的なデータで測り、分析・理解すること』とされる。
細胞培養の状態を測る技術として、顕微鏡による形態観察がある。細胞培養の有史以来、熟練者の経験や感覚を頼りにした日常的な品質評価が行われてきた。我々の研究グループでは、画像解析技術により、培養中の細胞画像から得られる「細胞形態情報」をインプロセスデータとして記録・管理し、機械学習などの AI 技術と組み合わせることによって細胞培養の定量的かつリアルタイムな品質評価を実現することを目指してきた[1]。これまでの研究で細胞画像が非破壊的な品質評価に有効性が示されてきたが、評価の基準となる細胞形態情報のデータクオリティは、画像クオリティやその後の解析アルゴリズムによって変動する可能性がある。今後、開発してきた評価技術を世界中の製造施設に広く展開することを考えると、扱うデータはビックデータになり、「データそのものの品質」を理解する必要があると考えた。
本研究では、実験者・実験日の異なる複数データセットから構成される細胞形態ビッグデータに潜むノイズ・バイアスを解明し、これを効果的に検出・除去することができるデータクオリティチェックアルゴリズムを開発した。最終的に、クオリティチェックによる data integration 技術の有効性は増殖能予測モデルのロバスト性検証で評価され、高精度なモデルであることが示された為、実用的な data integration が可能になったことを報告する。

References
1. Takemoto, Y, et al., J Biosci Bioeng., **20**, 30371-30376, 2020.

Key words mesenchymal stem cell, image analysis, quality control, machine learning

G2H7 (0210) 限定された細胞形態データにおける品質予測モデルのためのデータ拡張技術

○木村和恵[1]，蟹江慧[1]，加藤竜司[1,2]*
（[1]名大院・創薬科学，[2]名大・ナノライフシステム研究所）

Data augmentation technology for morphology-based prediction model in limited data

○Kazue Kimura[1], Kei Kanie[1], Ryuji Kato[1,2]*
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]Inst. Nano-Life-Systems, Nagoya Univ.)
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

近年、細胞医薬の急速な発展に伴い、ヒト細胞は細胞製品として工業的に大量生産される時代が到来しつつある。実際に、ヒト間葉系幹細胞（hMSCs）は、既存の医薬品では治療困難であった疾患に対して、新規治療薬として注目が高まっている。しかし、細胞医薬は、従来の低分子による医薬品に比べ、製造過程においての細胞の品質・有効性の予測が難しい。現在の細胞の品質評価法は、遺伝子発現や FACS によるタンパク発現マーカーによるものが多く、変遷的な細胞の特性を考慮した、経時変化を評価する非侵襲的な手法が求められている。

そこで、当研究室では、近年同様に急速に発展している機械学習や AI といったテクノロジー技術と、細胞製造技術を組み合わせることによる、「非侵襲的な細胞品質評価技術」の研究開発を報告してきた。本技術は、細胞の位相差画像から算出される細胞形態データと、実験的に得られる細胞品質情報を機械学習により紐づけることで、品質を非侵襲的に予測する技術である。こうした AI を実用化するには、質のいい学習データが必要である。しかし、既に活用されている他の産業や分野と比較して、細胞培養分野では、データ獲得に課題がある。細胞は、培養・加工過程において、変遷的であり、各培地条件などで形態変化を示す特性がある。そのため、それらを包括したデータ獲得には、大量のデータを獲得するための経時的撮影を行う設備・多様性に富んだデータを獲得するための各品質の細胞が必要であるがこれらを準備することは難しい。

そこで本研究では、品質予測モデルの精度向上のため、限定された細胞データから、データを水増しする「データ拡張技術」について検証した。脂肪由来間葉系幹細胞（ADSC）の３つの lot での長期培養による経時的な細胞形態変化・品質劣化データを用いて、各品質のデータ量へのモデル精度への寄与の不安定性について比較した。同様に、学習データの多様性による精度寄与についても検討し、学習データの「量と多様性」の観点から、精度向上に寄与する「学習データの質」を高めるデータ拡張法の可能性について研究を行った。

結果、本技術でのデータ拡張法を応用することにより、単純に得られたデータだけを用いて構築するモデルに比べ、データ強化に応用できる可能性を示唆した。

Key words mesenchymal stem cell, machine learning, data augmentation, image analysis

G2H7 (0211) 新規コラーゲンマトリックス（LASCol）を用いたヒト iPS 細胞からの接着性凝集体形成

○大貫喜嗣[1*]，米澤優希[1]，國井沙織[2]，森本康一[2]，黒澤尋[1]
（[1]山梨大院　医工総合，[2]近畿大院　生物理工）

Formation of adherent spheroid derived from human induced pluripotent stem cells on novel culture surface coated with low adhesive scaffold collagen (LASCol)

○Yoshitsugu Ohnuki[1]*, Yuki Yonezawa[1], Saori Kunii[2], Koichi Morimoto[2], Hiroshi Kurosawa[1]
([1]Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi, [2]Grad. Sch. BOST, Kinki Univ.,)
yonuki@yamanashi.ac.jp

【目的】
低接着性新規コラーゲン（Low adhesive scafold collagen, LASCol）は分散された細胞から接着性凝集体を自発的に形成する特徴を持つ。これまで、ヒト iPS 細胞からの凝集体形成は細胞非接着コート剤上で行われてきたが、培地交換の際に凝集体を損失するという問題を抱えてきた。LASCol 上で形成可能な接着性を保持した凝集体は、培地交換が容易で、培地交換の際に交換前の培地の残存を回避することができる有用なツールである。本研究では、LASCol コート上で酵素分散されたヒト iPS 細胞を培養し、LASCol が形成された接着性凝集体の大きさ、およびヒト iPS 細胞の性質に及ぼす影響について明らかにした。
【方法】
NutriStem® hPSC XF medium（以下、NutriStem）にて無フィーダー培養したヒト iPS 細胞（201B7, RIKEN BRC）を Accutase でシングルセルに分散した。10 μM Y-27632 含有 NutriStem にて 1.0, 2.0, 4.0 x 10^4 cells/cm^2 となるように各種コート剤を塗布した Tissue culture plate に播種した。コート剤には LASCol のほか、接着性コート剤として Vitronectin、非接着コート剤として Lipidure、同種コラーゲンとして Atelocollagen type I を使用した。細胞の形態、大きさおよび遺伝子発現解析を行い、LASCol 上で形成された接着性凝集体の特徴を明らかにした。
【結果】
分散したヒト iPS 細胞は、LASCol コート上でのみ自発的に接着性凝集体を形成した。LASCol 上で形成された接着性凝集体は、非接着コート剤である Lipidure 上で形成した凝集体と比較して、大きさが均一であった。また、初期中胚葉マーカー*T* および初期内容胚葉マーカー*AFP* の発現が Lipidure よりも高かった。
【結論】
LASCol 上で分散したヒト iPS 細胞から大きさの均一な接着性凝集体を多数形成することに成功した。また、従来法である非接着コート剤上で形成した凝集体と比較して初期内胚葉および初期中胚葉の遺伝子発現が増大した。このことから、形成した凝集体の遺伝子発現にも影響を及ぼすことが明らかとなった。

Key words iPS cells, spheroid formation, LASCol

G2H7 (0212) ガンマ線架橋ポリビニルアルコールゲル上におけるマウス神経幹/前駆細胞の接着挙動の解析

○小山悠孝[1]，森英樹[1]，原正之[1]*
（[1]阪府大院・理）

Analysis of neural stem/progenitor cell behaviors on a poly(vinyl alcohol) hydrogel crosslinked by gamma irradiation.

○Yutaka Koyama[1], Hideki Mori[1], Masayuki Hara[1]*
([1] Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)
hara@b.s.osakafu-u.ac.jp

合成高分子であるポリビニルアルコール（poly (vinyl alcohol) : PVA）は、その水溶液に放射線を照射して架橋すると透明で軟らかいハイドロゲル（PVA ゲル）を形成する。当研究室では、従来培養皿上で無血清培地を用いて細胞集塊（ニューロスフィア）形成を伴った浮遊状態で培養する神経幹/前駆細胞（neural stem / progenitor cell : NSPC）が、この PVA ゲル上では接着した状態で細胞集塊を形成しながら増殖することを発見した。NSPC は中枢神経系に存在する体性幹細胞で、自己複製能とニューロンやグリア細胞への多分化能を併せ持つ細胞である。本研究では、PVA ゲル上における NSPC の接着や増殖の詳しい経時変化を明らかにするために、PVA ゲル上でマウス NSPC を培養した時の接着細胞の様子を経時的に観察し、細胞の接着、増殖挙動を解析した。実験に使用した PVA ゲルは、5.5%（w/v）PVA 水溶液にγ線を 20 kGy 照射することで作製した。細胞が PVA ゲルに接着する時間を調べるために、PVA ゲル上にマウス NSPC を播種し、一定時間経過後に PVA ゲルに未接着の細胞を除去してから写真を撮影し、接着細胞数の経時変化を調べた。さらに、接着した細胞をそのまま培養し、3 日目と 6 日目に生細胞数を WST 法で測定し、細胞の増殖量を解析した。また、NSPC 以外の細胞種の PVA ゲルに対する接着や増殖の傾向と比較するために、ヒトグリア芽腫細胞 T98G、マウス線維芽細胞 Balb/3T3、マウス脳血管内皮細胞 b.End3 の 3 種類の株化細胞についても同様の測定を行った。その結果、播種から 11 時間後までは、マウス NSPC はあまり PVA ゲル上に接着していなかったが、24 時間後には複数の細胞が集まり PVA ゲル上に接着している様子が見られた。T98G、Balb/3T3 は播種 1 時間後には既に PVA ゲル全体に接着していた。b.End3 は PVA ゲルにはあまり接着しなかった。24 時間かけて PVA ゲルに接着したマウス NSPC は、その後の培養で 3 日目から 6 日目にかけて 3～16 倍に増加した。それに対して、PVA ゲルに接着した T98G および Balb/3T3 は、3 日目から 6 日目の間に 1～2 倍程度しか増殖しなかった。以上のことから、PVA ゲル上におけるマウス NSPC の接着および増殖挙動は、実験に用いた株化細胞とは大きく異なっており、マウス NSPC は長時間をかけて PVA ゲルに接着していることが分かった。また、マウス NSPC では、増殖する過程で細胞同士が集まる様子が見られたことから、NSPC の接着や増殖機構は株化細胞とは大きく異なると考えられる。

Key words neural stem cell, poly(vinyl alcohol), hydrogel, soft material

G2H7 (0213) 収縮力測定可能なマイクロデバイス上での神経筋オルガノイドの構築

○山本一貴，樋口昌也，秋山裕和，本多裕之，清水一憲*
（名大院・工）

Construction of neuromuscular organoids (NMOs) on microdevices for measuring contractile force

○Kazuki Yamamoto, Masaya Higuchi, Hirokazu Akiyama, Hiroyuki Honda, Kazunori Shimizu*
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)
shimizu@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】神経筋接合部は運動神経終末と骨格筋細胞を接続するシナプス結合であり、その機能不全は様々な神経筋疾患を引き起こす。培養細胞で構築した神経筋接合部の *in vitro* モデルは、神経筋疾患の病態解明や治療法開発に有用であると期待されている。しかし、神経筋接合部の形成は運動神経細胞、骨格筋細胞、シュワン細胞、細胞外マトリックスなどにより複雑に制御されているため、培養細胞を用いて、生体様の神経筋接合部を効率よく構築することは容易ではない。最近、平面培養法を用いて、ヒト iPS 細胞から運動神経細胞と骨格筋細胞、シュワン細胞から成る神経筋接合部の *in vitro* モデルを簡便に構築できることが報告された[1]。

我々はこれまで、培養筋組織の収縮力を測定可能なマイクロデバイスを開発し、収縮力を指標とするスクリーニング系を開発してきた[2-4]。本研究では、神経筋接合部を含む培養筋組織モデル（神経筋オルガノイド）を用いたスクリーニング系の開発を目指した。既報[1]を参考に、96 ウェルプレートフォーマットに改良したマイクロデバイス上でヒト iPS 細胞由来神経筋オルガノイドの構築と機能評価を行った。
【方法と結果】用いた細胞は、Doxycycline 添加で外因性の MyoD が過剰発現することで骨格筋細胞へと分化誘導されるヒト iPS 細胞である。ヒト iPS 細胞を培養皿上で骨格筋細胞に分化誘導した。4 日後に細胞を回収し、マイクロデバイス上で組織を構築し、骨格筋分化誘導培地で培養した。6 日後に運動神経細胞誘導培地に変更して培養を継続することで、神経筋オルガノイドへと分化誘導した。免疫染色やリアルタイム PCR を行った結果、構築した組織には運動神経細胞が含まれていることがわかった。グルタミン酸添加で運動神経細胞を発火させたところ、筋組織全体が収縮した。この結果は、組織内で筋管細胞と運動神経細胞が神経筋接合部を形成していることを示している。このように本手法により、マイクロデバイス上で神経筋オルガノイドの構築とその収縮力定量評価に成功した。今後、神経筋疾患由来 iPS 細胞を用いて神経筋オルガノイドを構築し、病態解明や治療法開発に応用する予定である。

[1] Saito, M. et al., JCI Insight, 4, e124299 (2019)
[2] Shimizu, K. et al., Bioengineering, 4, 56 (2017)
[3] Shimizu, K. et al., Journal of Bioscience and Bioengineering, 129, 632-637 (2020)
[4] Nagashima, T. et al., Advanced Biosystems, 4, 2000121 (2020)

Key words: organoids, neuromuscular diseases, phenotype screening, human iPSCs

G2H7 (0301) 紫外線架橋コラーゲンゲル上で培養した血管内皮細胞の接着特性の解析

○森英樹[1]*, 鈴木咲紀[1], 原正之[1]
([1]阪府大院・理)

Analysis of adhesive properties of vascular endothelial cells cultured on UV-crosslinked collagen gel

○Hideki Mori[1]*, Saki Suzuki[1], Masayuki Hara
([1]Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)
morihide@b.s.osakafu-u.ac.jp

酸性条件で溶けた I 型コラーゲン溶液を中性に変化させると形成する線維化コラーゲンゲルは多くのバイオマテリアル研究に用いられる材料であるが、血液脳関門モデルの細胞として用いられるマウス脳毛細血管内皮細胞（bEnd.3 細胞）の線維化コラーゲンゲルへの接着率は細胞培養用ディッシュに比べて低い。コラーゲンゲル表面に紫外線（UV）照射処理を施すことによって、接着する細胞数が増加することは既に報告していた。UV 照射コラーゲンゲルが血液脳関門モデルの足場材料として適当かどうかを調べるために、UV 照射により架橋したI型コラーゲンゲル上で bEnd.3 細胞を培養し、その接着や増殖、形態変化について調べた。15 分間の UV 照射で架橋した UV 架橋コラーゲンゲルは未架橋の線維化コラーゲンゲルと較べて約 2 倍の硬さ（ヤング率）を示した。UV 架橋コラーゲンゲル上では bEnd.3 細胞の接着率だけでなく、細胞増殖率も高かった。また、顕微鏡で経時的に観察したところ、UV 架橋コラーゲンゲル上で培養した細胞は速く増殖し、伸展することで培養 5 日目には細胞間に隙間のない単層状になるのに対して、未架橋の線維化コラーゲンゲル上では細胞数が少なく、細胞間に隙間があり細胞同士が集まって、網目状に繋がる形態を見せた。そこで細胞のコラーゲンゲルと血液脳関門の構造として重要な密着結合について調べるために、I型コラーゲンに結合するインテグリンのサブユニット遺伝子と密着結合に必要な接着分子である ZO-1 の遺伝子（*Tjp1*）発現を qRT-PCR 法で調べた。*Itga2* の発現は UV 架橋コラーゲンゲル上の細胞の方が未架橋の線維化コラーゲンゲル上の細胞より高かったが、*Itgb1* の発現には有意差は見られなかった。*Tjp1* の発現についても UV 架橋コラーゲンゲル上の細胞の方が未架橋の線維化コラーゲンゲル上の細胞より高かった。細胞間の密着結合の形成といった観点では、未架橋の線維化コラーゲンゲルの方が血液脳関門モデルの足場材料としては有利かもしれない。

Key words collagen, brain capillary endothelial cell, ultraviolet irradiation, viscoelasticity

G2H7 (0302) CHO 細胞における ERGIC-53/MCFD2 の過剰発現が抗体の生産性に与える影響

○桐本豊[1], 山野-足立範子[1,2], 古賀雄一[1,2], 大政健史[1,2]* ([1]阪大院・工, [2]阪大 OTRI)

A study on the effect of overexpression of ERGIC-53/MCFD2 on antibody productivity in recombinant CHO cells

○Yutaka Kirimoto[1], Noriko Yamano-Adachi[1,2], Yuichi Koga[1,2], Takeshi Omasa[1,2]*
([1]Grad. Sch. Eng., [2]OTRI, Osaka Univ.)
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

近年のバイオテクノロジーの発展により、バイオ医薬品が医薬品市場に与える影響は大きく、その大きな割合を占めるのは抗体医薬品である。抗体医薬品はその構造の複雑さから、主に動物細胞を宿主として生産されている。中でもチャイニーズハムスターの卵巣から単離された CHO 細胞は生産宿主として最も広く使用されている細胞である。しかし、CHO 細胞をはじめとする動物細胞によるタンパク質生産は製造コストが高いことから、セルエンジニアリングによる生産性の向上が課題の一つである。本研究で対象とした抗体生産細胞株 CHO-HcD6 は、細胞内分泌過程において小胞体が律速段階であることが報告されている。この律速の原因が小胞体からの輸送に関与する積荷受容体の不足であると仮定し、ERGIC-53/MCFD2 に注目した。ERGIC-53 は一回膜貫通型レクチンであり、小胞体内で組み上げられたタンパクと糖鎖を介して結合し、小胞体からの輸送を担う積荷受容体である。MCFD2 は ERGIC-53 と結合し、血液凝固因子の輸送を担うと報告されているが、その他の詳しい機能は解明されていない。本研究では、CHO-HcD6 に ERGIC-53/MCFD2 を過剰発現させることによって小胞体律速を解消し、それに伴う抗体生産性向上を目的とした。

哺乳動物細胞用発現ベクターpBudCE4.1 に CHO-K1 細胞由来の ERGIC-53、MCFD2 遺伝子を導入し、ERGIC-53 発現ベクターと ERGIC-53/MCFD2 発現ベクターを作成した。これらを CHO-HcD6 にトランスフェクションし、薬剤選択により過剰発現株を構築した。細胞株の生産性は回分培養における比生産速度から評価した。培養上清中の抗体濃度は ELISA 法により定量した。Mock と比較して ERGIC-53 過剰発現株は 1.3 倍、ERGIC-53/MCFD2 過剰発現株は 1.8 倍と生産性は有意に上昇した。後者の過剰発現株において、培養期間中に小胞体ストレス応答（UPR）が起きていたことが qPCR により確認された。1.8 倍の上昇は、ERGIC-53 過剰発現による分泌能の影響と UPR による小胞体の処理能力向上による相乗効果であると考えられる。また、積荷受容体の過剰発現による細胞内抗体輸送の影響をウェスタンブロッティングや蛍光免疫染色にて解析した。結果、2 つの過剰発現株において、アセンブリが完了していない抗体が小胞体内に蓄積していることが確認された。これはレクチンである ERGIC-53 が小胞体膜上にそのような不完全な抗体をとどめている可能性がある。よって、今後は ERGIC-53 の発現量や変異導入による親和性を制御することで、さらに抗体の分泌が改善されると期待される。今回の結果は、細胞内輸送に注目した戦略が抗体生産の向上に寄与する可能性を示すものとなる。

Key words Chinese hamster ovary cells, antibody, cell engineering, ER

G2H7 (0303) CHO 細胞における Sar1A 過剰発現の抗体生産性への影響解析

○角田悠[1], 桐本豊[1], 山野-足立範子[1,2], 古賀雄一[1,2], 大政健史[1,2]*
([1]阪大院・工, [2]阪大 OTRI)

Analysis of effects on antibody productivity by overexpression of Sar1A in CHO cells

○Yu Tsunoda[1], Yutaka Kirimoto[1], Noriko Yamano-Adachi[1,2], Yuichi Koga[1,2], Takeshi Omasa[1,2]*
([1]Grad. Sch. Eng., [2]OTRI, Osaka Univ.)
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

CHO 細胞は抗体医薬品の生産に汎用されている宿主細胞である。IgG 抗体生産 CHO 細胞内の分泌過程を解析した先行研究で、フォールディングやアセンブリが完了した抗体が小胞体内に蓄積していることが明らかにされ、抗体の小胞体からゴルジ体への輸送が律速段階と推定された[1]。

そこで本研究では、COPII 小胞の形成に関与するタンパク質 Sar1A に着目し、Sar1A 過剰発現の抗体生産性への影響を解析することを目的とした。Sar1A は小胞体膜上で、小胞体からゴルジ体への輸送を担う COPII 小胞の形成に関わる複数のタンパク質がアセンブリするための起点となる働きをする。Sar1A の発現量増加により COPII 小胞の形成が促進され、抗体の小胞体からゴルジ体への輸送が促進されると仮定した。哺乳動物細胞ベクターpBudCE4.1 に Sar1A 遺伝子をクローニングし、Sar1A 過剰発現ベクターを構築した。このベクターを IgG 生産 CHO-TU1 細胞にトランスフェクションし、安定発現株の選択を行った。Sar1A 過剰発現株と空ベクターを導入した Mock 細胞それぞれのセルプールを用いて抗体の生産性試験を行った結果、Sar1A 過剰発現株は Mock 細胞と比較して約 1.5 倍高い抗体比生産速度を示した。Sar1A 過剰発現株と Mock 細胞間で抗体の重鎖と軽鎖の mRNA 発現量に有意差はなく、Sar1A 過剰発現による抗体比生産速度の上昇は小胞体での抗体輸送律速の解消によるものであると推定された。

1）Kaneyoshi *et al*., J. Biosci. Bioeng., 127(1), 107-113 (2019).

Key words antibody, Chinese hamster ovary cells, COPII vesicle, endoplasmic reticulum

G2H7 (0304) 96 ウェル型培養筋組織収縮力評価系を用いた抗筋萎縮ペプチドの探索

山本一貴, 大隅早紀, 長島拓則, 秋山裕和, 本多裕之, ○清水一憲*
（名大院・工）

Screening of peptides with anti-atrophic activity using 96-well plate-formatted engineered human skeletal muscle tissues

Kazuki Yamamoto, Saki Ohsumi, Takunori Nagashima, Hirokazu Akiyama, Hiroyuki Honda, ○Kazunori Shimizu*
(Nagoya Univ.)
shimizu@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】近年の超高齢社会では筋力低下が問題になっており、それを予防・改善する物質の開発が求められている。我々はこれまでにマイクロデバイスを用いて、6 ウェルフォーマットの培養筋組織収縮力評価系を開発し[1]、それを用いてヒト筋萎縮モデルの構築を行った[2]。本研究では、評価系の改良を行い、96 ウェルフォーマットの評価系を新たに開発した。さらに、その評価系を用いて、ヒト筋萎縮モデルの収縮力低下を改善する抗筋萎縮ペプチドの探索を行った。

【方法と結果】96 ウェルフォーマットの収縮力測定マイクロデバイスを作製し、ヒト不死化骨格筋細胞 Hu5/KD3 を用いて三次元筋組織を構築した。構築した筋組織に電気パルス刺激を負荷することで筋収縮を誘導し、収縮力を定量評価した。筋組織構築 8 日後に、100 μM のデキサメタゾンを含む培地で 48 時間培養することで、筋力低下を伴う筋萎縮を誘導した。デキサメタゾンと同時にペプチドを加えることで、48 時間後の筋力低下を改善するペプチドのスクリーニングを行った。その結果、6 残基ペプチドの QIGFIW[3]がヒト筋萎縮モデルの収縮力低下を有意に改善することを見出した。さらに、6 残基目の W を、C 以外の 18 種類の天然アミノ酸に置換したペプチドの活性を評価した。その結果、Q に置換したペプチドの活性が元配列に比べて有意に高いことが明らかになった。このように本研究では、スループット性高く培養筋組織の収縮力を評価可能な系を確立し、収縮力低下を予防・改善する化合物の探索に応用可能であることを実証した。見出したペプチドは、予防・改善物質としての応用が期待される。また確立した評価系は、疾患 iPS 細胞などと組み合わせることで、様々な筋疾患に対して応用可能である。

[1] Shimizu, K. et al., Bioengineering, 4, 56 (2017)
[2] Nagashima, T. et al., Advanced Biosystems, 4, 2000121 (2020)
[3] Muthuramalingam, K. et al., J Functional Foods, 52, 147-155 (2019)

Key words: cell-based screening, tissue engineering, skeletal muscle atrophy, peptides

G2H7 (0305) 細胞シート高速積層技術を用いて構築した立体心筋組織の移植

○田原滉大[1],坂口勝久[1*],本間順[3],松浦勝久[3],岩﨑清隆[2],清水達也[3]
([1]早大院・先進理工,[2]早大・創造理工,[3]女子医大・先端生命研)

Transplantation of three-dimensional cardiac tissue by cell sheet rapid stacking

○Kodai Tahara[1],Katsuhisa Sakaguchi[1*],Jun Homma[3],Katsuhisa Matsuura[3],
Kiyotaka Iwasaki[2],Tatsuya Shimizu[3]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Sch. Creative Sci. Eng., Waseda Univ.,
[3]Inst. Adv. Biomedical Eng. Sci., Tokyo Women's Medical Univ.)
katsuhisa@toki.waseda.jp

細胞から立体組織を構築する組織工学技術は細胞治療や再生医療の極めて有用なツールとして注目を集めている．本研究所において開発された細胞シート工学技術は培養中の細胞をシート状に回収することができる組織工学技術である．我々は細胞シートの積層による立体組織構築を試みており，デバイスの上下運動のみで細胞シートを積層するスタンプ法を開発した．さらに，我々はスタンプ法を改良し，細胞シート同士の接着にフィブリンゲルを使用することで積層時間を短縮する「細胞シート高速積層技術」を開発した．細胞シート高速積層技術を用いることで短時間での細胞シート積層が可能となり，細胞へのストレスを低減させながら立体組織を構築することに成功した．そこで，細胞シート高速積層技術を用いた際の細胞移植効率を評価するために，細胞シート高速積層技術を用いて構築した立体心筋組織をラット背部に移植し，移植した組織の生着量を評価する実験を行った．本実験では，細胞シートを作製する際にヒト iPS 細胞由来心筋細胞のみを使用した条件と 3 種類の細胞(ヒト iPS 細胞由来心筋細胞，ヒト皮膚線維芽細胞，ヒト臍帯静脈内皮細胞)を使用した条件の生着量を比較した．また，細胞シートの積層数を 5 層，10 層，15 層としたときの生着量を比較した．その結果，細胞シートの積層数が 10 層かつ 3 種類の細胞を使用した際に生着量が最大となることが確認された．移植組織の生着量が最大となる条件が特定されたため，細胞シート高速積層技術の臨床応用を実現するための次の段階として，構築した立体心筋組織を心筋梗塞モデルラットの心臓に移植する実験を行った．その結果，移植 12 週後の時点で組織移植群の方が偽手術群よりも左室駆出率が約 14%良いことが確認された．また，心エコー解析により組織移植群の左心壁厚を測定したところ，拡張期左室前壁厚が約 1.6 mm 改善したことが確認された．これらの結果から，立体心筋組織の移植により，失われた心機能が回復することが示された．また，心臓切片の AZAN 染色により，移植した組織が生着し移植 12 週後も残存していることを確認した．本研究により，細胞シート高速積層技術を用いて構築した立体心筋組織の移植が心機能を改善させることが示されたため，細胞シート高速積層技術の心疾患治療への臨床応用が期待される．

Key words cell sheet, tissue engineering, myocardial infarction, cell therapy

G2H7 (0306) ニワトリシアル酸転移酵素による細胞増殖調節

牧田芳隆[1], 奥嵜雄也[2], 佐野観月[1], 金岡英徳[1], 飯島信司[1,3],
○西島謙一[2*]
([1]名大院・工,[2]名大院・生命農学,[3]愛工大・工)

Inhibition of cell growth by sialyltransferase

Yoshitaka Makita[1], Yuya Okuzaki[2], Mizuki Sano[1], Hidenori Kaneoka[1], Shinji Iijima[1,3],
○Ken-ichi Nishijima[2]
([1,2]Nagoya Univ., [3]Aichi Inst. Technol.)
nishijim@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp

[目的]
高等生物の細胞表面は厚い糖鎖の層で覆われている。これらの糖鎖は細胞-細胞間や分子間の結合を制御し、細胞の様々な機能に影響を与える。我々は、複合糖鎖の末端に存在し、マイナス荷電を有する特徴的な糖であるシアル酸に着目している。これまでに、糖鎖制御の目的でニワトリのシアル酸転移酵素をクローニングし基礎的な性質を報告してきている。本発表では、シアル酸転移酵素の強制発現により細胞増殖が負に制御されることを見出したため報告する。

[実験方法及び結果]
株化細胞として 2 種のニワトリ細胞を用いた。当研究室で樹立され将来精子・卵子になる唯一の胚細胞である始原生殖細胞(primordial germ cell, PGC)株は Activin, FGF, ニワトリ血清等を添加した Avian Knockout DMEM 培地で培養した。繊維芽細胞株 DF1 はウシ胎児血清添加 DMEM 培地で培養した。プロモーターとニワトリシアル酸転移酵素 ST6-1 との間に loxP 配列で挟まれた mCherry 遺伝子を挿入したトランスポゾン型のベクターを作製した。DF1 細胞にトランスポザーゼ一過性発現ベクターとともに作製したベクターの遺伝子導入を行い、mCherry 発現に基づきセルソーターにより安定発現細胞株を取得した。この細胞に Cre リコンビナーゼ発現ベクターを導入し一過的に発現させることで、蛍光の消失した細胞を回収した。これらの細胞では、定量 RT-PCR により ST6-1 過剰発現が確認され、レクチン染色により目的のα2-6 シアル酸量の増加が認められた。ST6-1 発現/非発現細胞を混合して培養したところ、経時的に ST6-1 非発現細胞の割合が上昇することが観察された。また、PGC 株においても同様の知見が得られた。これらの結果から、ニワトリシアル酸転移酵素 ST6-1 の発現により細胞増殖が低下することが明らかとなった。

Key words sialyltransferase, chicken, cell proliferation, DF1, primordial germ cell

G2H7 (0307) 細胞培養における各種の糖添加による時計遺伝子 *Per2* の発現再振動

垂水遼真[1], ムタイリプ カイヤ[1], 深浦恵梨[1], ○藤原政司[1,2],
高木睦[1,2*]
([1]北大院・総合化学,[2]北大院・工)

Reoscillation of clock gene *Per2* expression by addition of various sugars during cell cultivation

Ryoma Tarumi[1], Mutailipu Kayier[1], Eri Fukaura[1], ○Masashi Fujiwara[2], Mutsumi Takagi[2*]
([1] Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2] Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)
takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

【目的】動物の体内には、約 24 時間周期で発現量が振動する時計遺伝子がある．培養細胞でも時計遺伝子が発現しているが、個々の細胞での発現の位相が揃っていないので、細胞集団全体として発現の振動が観察されない．しかし、培養途中にグルコース添加を行うことで各細胞の位相が揃い、細胞集団全体として発現の再振動が観察されることが知られている．ところで、当研究室では時計遺伝子 *Per2* の発現再振動の振幅が添加グルコース濃度に比例して大きくなる傾向があることを示した．しかし、添加グルコース濃度が最大で 0.9 g/L の条件で行っており、それより高い濃度のグルコース添加は検討していない．さらにグルコース以外の糖でも同様な再振動が見られるか検討していない．そこで、より高濃度のグルコース添加や他の糖添加による時計遺伝子 *Per2* の発現振動について検討することを本研究の目的とした．
【方法】*Per2* プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれた Per2-Luc MSC 様ラット細胞を 35φ ディッシュに液量 2 mL で高密度（1.0×10^4 cells/cm²）で播種して接着させた．その後、ルシフェリン（100 μM）及び FBS（10%）含有の DMEM-LG 培地（グルコース濃度 0.9 g/L）に交換して振動開始を確認すると共に、10 分毎にルシフェラーゼ発光強度を測定し、振動の減衰を観察した．充分減衰した発光測定開始 5 日後に、所定の糖溶液 10 μL を培養液に添加し、発光強度の再振動を観察した．測定された振動曲線の糖添加前の振幅 1_1に対する糖添加後の振幅 1_2の比（$1_2/1_1$）を振幅増幅率 $A_{2/1}$ として求め、再振動の指標とした．
【結果と考察】培地交換と同時に開始した発光測定開始 5 日後に、グルコースを異なる添加濃度（終濃度 0.9～4.5 g/L）で添加した結果、添加グルコース濃度と振幅増幅率 $A_{2/1}$ は正の相関を示した．次に、発光測定開始 5 日後にグルコースの代わりにフルクトースまたはガラクトース（終濃度 0.9 g/L）を添加した結果、どちらも再振動を示したが、グルコース添加の場合より振幅増幅率 $A_{2/1}$ が明らかに小さかった．次に、フルクトースを異なる添加濃度（終濃度 1.8～4.5 g/L）で添加した結果、添加フルクトース濃度に比例して、振幅増幅率 $A_{2/1}$ が大きくなる傾向にあった．以上より、時計遺伝子 *Per2* はグルコース以外のフルクトース、ガラクトース添加にも応答して発現再振動が起こることが分かった．さらに、グルコースを含むこれらの糖添加により添加濃度依存的に *Per2* 発現振動を調節できる可能性が見いだされた．

Key words glucose, fructose, galactose, clock gene

G2H7 (0308) 魚血液に由来する栓球溶解物を用いた CHO 細胞の増殖促進

○猪股 亮佑[1],藤原 政司[1,2],森島 輝[3],塩谷 格[3],山原 研一[4],高木 睦[1,2*]
([1]北大院・総合化学,[2]北大院・工,[3]日本水産,[4]兵庫医大)

Thrombocyte lysate derived from fish blood enhances proliferation of CHO cells

○Ryosuke Inomata[1], Masashi Fujiwara[1,2], Kagayaki Morishima[3], Itaru Shioya[3], Kenichi Yamahara[4], Mutsumi Takagi[1,2*]
([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Nippon Suisan Kaisha, Ltd., [4]Hyogo Coll. Med.)
takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

【目的】動物細胞培養の培地に一般的に添加されているウシ胎仔血清（FBS：Fetal bovine serum）は哺乳類由来病原体の感染などの問題がある．そこで当研究室では代わりに魚類のブリ血清を用いて CHO 細胞を培養したが，細胞増殖促進効果が FBS に比べて低いことがわかった．ところで，哺乳類のヒトやウシでは，血液から濃縮した血小板の内容成分を放出させた血小板溶解物に高い細胞増殖促進効果が確認されている．一方，魚類の血液には血小板と同様に止血作用を担っている栓球が含まれている．そこで，ブリ血液から栓球溶解物（TL：Thrombocyte lysate）を調製し，CHO 細胞の接着培養での増殖促進活性を検討することを本研究の目的とした．
【方法】クエン酸添加により抗凝固処理したブリ血液から遠心（全血遠心）または Ficoll-Hypaque を用いた密度勾配遠心（FH 遠心）の 2 通りで栓球を含む画分を取得した．これらの画分について凍結（-80℃）融解を繰り返し TL を調製した．次に，Ham's F-12 培地（無血清培地）に TL を添加した培地と 6 穴プレートを用いて CHO 細胞 DP-12 clone#1934（ATCC CRL-12445）を 5%CO_2, 37℃条件下で接着培養した．コントロールとして，無血清培地，10%ウシ新生仔血清（NBS：Newborn bovine serum）培地を用いた．培養 24 h および 120 h の接着細胞数と浮遊細胞数を脱核染色法またはトリパンブルー染色法で計数した．
【結果と考察】FH 遠心から調製した TL を用いて接着培養を行った結果，細胞接着の TL による阻害が見られ，無血清培地と同程度の増殖しか示さなかった．そこで，10%NBS 培地で接着した後の細胞増殖促進活性を，FH 遠心で調製した TL または全血遠心で調製した TL を添加した培地で比較した．その結果，FH 遠心より全血遠心で調製した TL の培地の方が細胞密度が高かった．次に，播種時から種々の濃度（1.25, 2.5, 5%）で全血遠心から調製した TL を添加した培地で接着培養を行った．その結果，細胞は接着しなかったが，TL が低濃度ほど浮遊状態で良好な増殖を示し，1.25%TL 培地では 10%NBS 培地に匹敵する細胞密度を示した．以上のことから，全血遠心によりブリ血液から調製した低濃度 TL 培地は浮遊培養での高い細胞増殖促進活性が期待された．

Key words fish, serum, chinese hamster ovary cells, thrombocyte

G2H7 (0309) CHK 細胞を用いた誘導型人工遺伝子発現システムによる scFv-Fc 抗体の生産

○境 紘洋[1], 河邉 佳典[1], 巖 流征[1], 上平 正道[1]*
([1]九大院・工)

Production of scFv-Fc antibody using CHK cells with an inducible transgene expression system

○Koyo SAKAI[1], Yoshinori KAWABE[1], Ryusei IWAO[1], Masamichi KAMIHIRA[1]*
([1]Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)
*kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

【背景】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培養細胞から自発的に不死化させたオリジナル細胞株である CHK 細胞の樹立に成功している。CHK 細胞の特性に合わせて、低分子化合物（RA）による CHK 細胞の細胞増殖制御と目的遺伝子発現誘導の切り換えが可能な人工遺伝子発現システムを構築し、RA 依存的な組換えタンパク質生産システムを開発してきた。本発表では、低・無血清培地条件下での RA 添加による scFv-Fc 抗体生産誘導を検討したので報告する。
【実験方法】RA に応答する人工合成プロモーターの制御下で人工転写活性化因子（tTA）を発現する発現ユニットと、TRE プロモーターで目的遺伝子の発現が可能な発現ユニットをそれぞれ有するトランスポゾンベクターを作製した。遺伝子導入試薬を用いてトランスポターゼ発現ベクターとともに CHK 細胞に導入し、対応する抗生物質で選抜することで安定発現 CHK 細胞を樹立した。その後限界希釈法で細胞クローンを取得した。サブコンフルエントに近い細胞密度で細胞を播種し、培養上清中に分泌された抗体の濃度を ELISA 法で測定し、トリパンブルー色素排除法で細胞計数を行った。本実験では Fc 融合型一本鎖抗体（scFv-Fc）をモデル抗体として用いた。
【結果および考察】これまでに CHK 細胞に対して、一般に CHO 細胞で用いられている無血清培地により無血清馴化に成功した。しかし、同培地を用いて抗体遺伝子を導入した CHK 細胞を無血清馴化したところ、細胞増殖はみられたが RA の応答性が認められなかった。そこで、腎臓細胞用に開発された無血清培地（SF）を使用し、馴化を試みた。その結果、10%血清添加時と比較して、抗体濃度の低下が認められたものの無血清化を達成でき、RA 依存的に抗体の誘導生産が観察された。低血清条件下で評価したところ、1%血清含有 SF 培地では 10%血清下と比較して 1.3 倍増加が認められた。1%血清含有 DF 培地で生産させた場合、RA 添加で細胞増殖の抑制が観察されるとともに、1%血清含有 SF 培地と同程度の抗体濃度が認められた。RA 非添加条件下では抗体生産誘導がほとんど観察されなかったことから、導入した RA 応答型人工遺伝子発現システムを有する抗体生産 CHK 細胞は低血清・無血清条件下でも有効であることがわかった。
【謝辞】本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）（JP20ae0101063）の助成を受けて実施した。

Key words CHK cell, Inducible transgene expression system, scFv-Fc antibody production

G2H7 (0310) MCA/GCM 法により回収した胃がん患者由来 CTC の単一細胞トランスクリプトーム解析

○小林侃[1], 根岸諒[1], 山川ひとみ[1], 堀川万優子[1], 下山達[2], 小泉史明[2], 澤田武志[2], 田中剛[1], 吉野知子[1]*
([1]東京農工大院・工, [2]がん・感染症センター都立駒込病院)

Single cell transcriptome analysis of CTCs recovered from gastric cancer patients with the MCA/GCM method

○Takeru Kobayashi[1], Ryo Negishi[1], Hitomi Yamakawa[1], Mayuko Horikawa[1], Tatsu Simoyama[2], Fumiaki Koizumi[2], Takeshi Sawada[2], Tsuyoshi Tanaka[1], Tomoko Yoshino[1]*
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Tokyo Metropolitan Cancer Ctr. Infect. Dis. Ctr. Komagome Hosp.)
y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

【目的】血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cells：CTC)はがん患者血液中を循環する腫瘍細胞である。近年、CTC の網羅的な単一細胞トランスクリプトーム解析が可能となり、CTC の性質を理解すると共に病態モニタリングに向けた遺伝子マーカーの抽出がなされている。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、アジアに頻発するがん種であり、未だ CTC の RNA 解析報告例がない胃がんに着目し、MCA/GCM 法を用いた単一 CTC の分離及びトランスクリプトーム解析による転移性胃がん患者由来 CTC のキャラクタリゼーションを行った。
【方法】転移性胃がん患者血液 1 ml から、MCA/GCM 法により CTC 候補(CellTracker Green+, Hoechst33342+, 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。具体的には胃がん細胞株および CTC の遺伝子発現量を比較し、発現する遺伝子から CTC のキャラクタリゼーションを行った。
【結果と考察】胃がん患者 27 検体から分離した CTC 候補 112 細胞に対して RNA-seq 解析を行った。増幅産物の収量が 10 ng 以上かつ *GAPDH* の発現が確認された細胞のうちミトコンドリア関連遺伝子の発現量の割合が 25%以下の 47 細胞のみを以降の実験に用いた。これらの細胞は血球マーカーである CD45 遺伝子の発現が確認されなかったことより、分離した CTC 候補細胞は CTC であると判断した。また、トランスクリプトーム解析の結果、胃がん組織にて発現が報告されている遺伝子群の一部が発現していた。さらに分離した CTC は株化細胞と比較して上皮系遺伝子の発現が弱く、間葉系遺伝子の発現が強い傾向があった。また、*PF4* や *PPBP* などの血小板に特異的な遺伝子の発現が確認され、血小板が付着していることが示唆された。これらの結果から転移性胃がん患者由来 CTC の多くは血小板が結合し、上皮間葉転換（EMT）誘導によって上皮性を失っていることが考えられた。さらに、薬剤耐性の獲得に血小板接着の寄与が示唆されていることより、今後さらなる解析を進めていく予定である。

Key words circulating tumor cells, single-cell analysis, transcriptome

G2H7 (0311) がん細胞の柔軟化に関わる中間径フィラメントネスチンのテール領域とアクチン繊維の力学的相互作用解析

○山岸彩奈[1], 内田幸希[2], 上田太郎[3], 吉本将悟[4], 堀克敏[4],中村史[1,2]*
([1]産総研・細胞分子工学, [2]農工大院・工, [3]早大院・先進理工, [4]名大院・工)

Mechanical analysis of interaction between actin filament and tail domain of intermediate filament nestin involving cancer cell softening

○Ayana Yamagishi[1], Koki Uchida[2], Taro Q. P. Uyeda[3], Shogo Yoshimoto[4], Katsutoshi Hori[4], Chikashi Nakamura[1,2]*
([1]Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST, [2]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [4]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)
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、高転移性のがん細胞に高発現であることが報告されている。また、我々が用いるマウス乳がん細胞株においては、ビメンチンと共重合することによって、繊維を形成している。我々の研究室ではこれまでに、ネスチン破壊株の細胞弾性率が元株と比較して高くなり、ビメンチンーアクチン間の結合点数が増加することを見出した。170 kDa の巨大なネスチンテール領域がビメンチンーアクチン間の結合を阻害し、骨格構造を脆弱化することで、細胞柔軟化すると推測したが、一方で、ネスチンテール自身も C 末端側の領域でアクチン繊維と結合することが示唆されており、上記の仮説とは矛盾する。そこで本研究では、ネスチンテールとアクチン繊維の結合について詳細に調査することを目的とした。はじめに、原子間力顕微鏡を用いてネスチンテール領域とアクチン繊維の結合破断力を測定することで、これらが直接結合しているかどうかを評価した。まず様々な材料に対して高い接着性を示す AtaA タンパク質を被覆したガラス基板を作成した。これに対してアクチン繊維を結合させ、基板を洗浄後、BSA によりアクチン繊維が結合していない AtaA 表面をブロッキングした。ネスチンテールは、全長を四分割したうちの最も N 末端側に位置する Q1 領域と、最も C 末端側の Q4 領域を使用した。基板上のアクチン繊維とネスチンテール領域固定化カンチレバーを接触させた結果、Q1 と比較して、Q4 とアクチン間の結合破断力が有意に大きいことが確認された。以上より、ネスチンテール領域は C 末端側でアクチンに結合することで大きく伸展可能な構造になり、ネスチンテール領域がアクチンに結合しても細胞骨格構造の機械的強度には影響しないと考えた。実際に、抗ビメンチン抗体を修飾したナノニードルを細胞に挿入し、細胞内ビメンチンの引張試験を行った結果、ネスチンを含有する細胞骨格の方が、ビメンチンのみの細胞骨格と比較して可動性が高いことを確認した。よって、ネスチンはテール領域によってビメンチンーアクチン結合を立体障害で阻害し、細胞骨格の可動性を増加させることで、細胞を柔軟化すると考えられる。
Key words cancer, nestin, actin, atomic force microscopy

G2H7 (0312) アミノ酸一次配列を用いた AI 予測に基づくアクチン-ビメンチン相互作用部位の同定

○内田幸希[1], 山岸彩奈[2], 似田優太[3], 三宅 淳[3], 中村 史[1,2]*
([1]農工大院・工, [2]産総研・細胞分子工学, [3]阪大院・工)

Identification of actin-vimentin binding site assisted with AI analysis of primary sequence

○Koki Uchida[1], Ayana Yamagishi[2], Yuta Nitada[3], Jun Miyake[3], Chikashi Nakamura[1,2]*
([1] Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2] Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST., [3]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
chikashi-nakamura@aist.go.jp

中間径フィラメントの一種であるビメンチンは間葉系マーカーである。そのテール領域 55 残基でアクチン繊維と直接結合することが報告されている。我々の研究グループでもビメンチンとアクチンが細胞内で結合することを確認しているが、その結合部位は明らかとなっていない。タンパク質間相互作用を解析する方法として、共免疫沈降法などが用いられるが、これらの手法は繊維タンパク質同士の相互作用の評価には適用できない。そこで本研究では、アミノ酸一次配列を用いてアクチンービメンチン相互作用部位を予測することを試みた。
予測には、機械学習を用い、オートエンコーダを使用した異常検知を基礎とした。教師データには、NCBI データベースより 359 種の動物種のビメンチン及びアクチン配列を取得し、それぞれの種で組み合わせたものを使用した。試験データには、マウスのアクチン配列を 6 分割したものと、マウスビメンチンテール領域の N 末端側から順にアラニン変異を導入したものを使用した。教師データをオートエンコーダに 1000 回学習させてモデルを構築した後、試験データを入力し、その復元誤差を出力した。その結果、6 分割したアクチンのうち、N 末端側から 4 番目の領域において、復元誤差の出力に大きな変化が生じることが分かった。また、ビメンチンテール配列の C 末側半分の領域にアラニン変異を挿入した配列において復元誤差が大きくなることが分かった。以上のことから、アクチンの N 末端側から 4 番目の領域とビメンチンテールの C 末側半分の領域が相互作用することが予測された。予測結果を検証するために以下の wet 実験を行った。C 末側領域を欠損したビメンチン発現ベクターを作製し、ビメンチン KO 細胞の相補試験を行った。完全なビメンチンを発現した細胞では細胞全体に繊維が展開するのに対し、テール領域 C 末側を欠損したビメンチンは細胞の核周辺に凝集することが確認され、ビメンチン繊維の構造形成に大きく影響することが明らかとなった。この結果は、アクチンとの結合が失われたことを示唆すると考えられる。現在、復元誤差に大きく影響するアミノ酸に点変異を導入したベクターでの相補試験を行っており、その結果についても併せて報告する。
Key words vimentin, actin, autoencoder, protein-protein interaction

G2H7 (0313) 外力印加時に塩化物イオンを排出するがん浸潤関連チャネル Clic1 の機能解析

○長田あかね[1], 山岸彩奈[2], 中村　史[1,2*]
([1]農工大院・工, [2]産総研・細胞分子工学)

Functional analysis of Clic1, a cancer invasion-related channel involving chloride ion efflux induced by application of external force

○Akane Nagata[1], Ayana Yamagishi[2], Chikashi Nakamura[1,2*]
([1] Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2] Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST)
chikashi-nakamura@aist.go.jp

塩化物イオンチャネル Clic1 は低浸透圧刺激による細胞の膨張時に塩化物イオンを排出し、それに伴い水分子を排出させることで細胞容積を減少させる細胞容積調節機能をもつ。また、高浸潤性のがん細胞株で高発現であることから Clic1 はがん悪性度の指標として注目されている。我々が樹立したマウス乳がん細胞のネスチン欠損株（NKO 株）は元株 (WT 株)と比較して浸潤性が低下しており、Clic1 の発現が低下している。これまでにこの 2 つの株における、細胞容積調節機能を塩化物イオンの排出を指標に調査した。低浸透圧刺激と原子間力顕微鏡を用いた外力の印加で塩化物イオンが排出され、排出能は KO 株と比較して WT 株で有意に高いことを確認している。このことから、細胞膜の伸展により Clic1 チャネルが開口すると推察された。浸潤時にがん細胞が狭窄され、細胞膜が伸展することで塩化物イオンを排出し、細胞容積を減少させ隙間を通過すると考えている。以上のことから、我々はがん細胞の塩化物イオン排出を測定することでがん細胞の浸潤能を評価できると考えた。しかし、上記の結果は接着細胞で得られたものであり、患者から採取された細胞は短時間で基板に接着しない可能性があるため、より簡便な細胞固定方法が求められる。そこで本研究では、基板に繋留した細胞を用いて塩化物イオン排出能を評価する手法を検討した。さらに、外力印加時の塩化物イオン排出に寄与するチャネルが Clic1 であるかどうか明らかにすることを目的とした。

細胞膜修飾材 BAM を用いて基板に繋留したがん細胞に、塩化物イオンと相互作用することで蛍光強度が減少する蛍光色素（MQAE）を導入し、原子間力顕微鏡で外力を印加した際の塩化物イオン排出能を評価した。その結果、WT 株では NKO 株と比較して塩化物イオン排出能が有意に高いことが確認され、基板に繋留したがん細胞においても、外力印加により塩化物イオン排出能の評価が可能であることが示された。また、塩化物イオン排出における Clic1 の役割を調査するため、ゲノム編集により Clic1 の KO 株を作成した。現在同 KO 株を用いて外力印加による塩化物イオン排出能の評価を行っており、その結果についても報告する。

Key words　chloride ion, chloride channel, cancer cell, mechanosensing

10月29日（金）

受賞講演

〈生物工学奨励賞（照井賞）〉

受賞者　小西 正朗（北見工大）

成分分析と機械学習を用いた微生物培地解析に関する研究　A3H1-0001　p. 161

〈生物工学アジア若手賞〉

受賞者　Rodney Perez（Nat. Inst. Mol. Biol. Biotechnol., Univ. Phil. Los Banos）

Multiple bacteriocin production and the novel circular bacteriocin of newly isolated lactic acid bacteria　A3H7-0001　p. 161

シンポジウム

食のおいしさの計測科学の現状と課題**【本部企画】**　p. 162

バイオ分析の医療展開を目指して―ネオホストバイオテクノロジーの創成―　p. 163

国内バイオリソースと極限環境生物研究の融合による産業シーズの開拓　p. 166

未培養微生物（微生物ダークマター）の分離・培養・開拓の新展開　p. 168

酢酸菌ナノセルロース研究の最前線：合成の分子メカニズムと応用　p. 170

日本における海洋生分解性プラスチック開発の最先端　p. 173

一般講演

環境浄化，修復，保全技術 p. 175, 182

環境工学，廃水処理技術 p. 178

バイオマス，資源，エネルギー工学 p. 184

生物化学工学 p. 193

培養工学 p. 203

バイオプロセス p. 207

タンパク質工学 p. 210, 215

抗体工学 p. 210

酵素学，酵素工学 p. 213

発酵生理学，発酵工学 p. 223

代謝工学 p. 224

オミクス解析 p. 228

醸造学，醸造工学 p. 231

食品科学，食品工学 p. 236

A3H1 (0001) 成分分析と機械学習を用いた微生物培地解析に関する研究

○小西　正朗[1*]
（[1]北見工大・工）

Analysis of microbial culture media by component profiling and machine learning

○Masaaki Konishi[1*]
([1]Kitami Inst. Technol.)
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

微生物培養において，適正な培地を用いることは重要である。培養工学分野では生産性が最大になるように，培養する微生物の栄養要求性に対応した基礎培地をベースに炭素源，窒素源，リン源などの主要栄養成分ならびにアミノ酸やビタミンなどの微量成分の組成を最適化する。工業生産においては，糖蜜やエキスなど天然物が多用される。天然物由来成分は含有成分に季節変動があることや産地やメーカー・ブランドにより成分が大きく変化する場合がある。工場では天然成分の季節変動やサプライヤーの変更等により，物質生産性が低下することがある。スケールダウンした培養系での培地組成の再検討等で対応することになる。培地の最適化や生産操業の過程で要求される培地設計は，培養技術者や製造部門のノウハウや経験に依存する比重が大きい。そこで，発表者らは培地成分の分析値や組成と培養結果を機械学習で関連付けた数理モデルを活用することで，ノウハウや経験に依存度が低い培地の最適化法や解析法の提案をしている。

まず，天然物のモデルとして，複数のサプライヤーの酵母エキスの成分をガスクロマトグラフ質量分析計によるノンターゲッティング分析でプロファイリングし，それらの酵母エキスを用いた場合の大腸菌の増殖と成分プロファイル(“substratome”)の間の相関関係について，部分最小二乗法(PLS)を用いて解析した(Tachibana et al. 2019)。酵母エキスの成分データと大腸菌の増殖には高い相関関係が見出され，数理モデルからメチオニンが大腸菌増殖に対して阻害的に作用することを見出した。深層学習モデル(DNN)を用いることで，大腸菌の増殖だけでなく，異種タンパク質(緑色蛍光タンパク質，GFP)の生産性を高精度で予測することができ，パーミューテーション法を採用することで DNN モデルから増殖やタンパク質生産に重要な成分を抽出可能であることを報告している(Tachibana et al. 2021)。同様の手法は，バイオマス糖化液中の阻害物質プロファイルの解析にも有効で，我々はトウモロコシの芯(コーンコブ)や葉および茎(コーンストーバー)由来のリグノセルロース系バイオマス糖化液中の揮発性成分による酵母の増殖やエタノール生産に対する影響をモデル化できることも報告している(Watanabe et al. 2019)。GC-MS で得た揮発性物質のプロファイリングを用いた PLS モデルから furfural や 5-hydroxymethylfurfral などの糖の過分解物の他，含有量は少ないものの阻害効果が高い成分を見出すことに成功している。さらに，DNN を用いることで，培養中のタイムコース全体を高精度に予測できることや，autoencorder 構造のニューラルネットワークモデルを利用することで阻害成分を予測できることも報告している(Konishi 2020)。網羅的な成分分析データと培養結果を機械学習でモデル化することにより，成分の組成から培養結果を予測できるだけでなく，培養結果(＝従属変数)に影響が大きい成分を見出すことができることがわかった。

次に，成分プロファイルと生産性の相関モデルを用いた培地最適化手法(培地 AI)について検討するため，大腸菌によるタンパク質生産(GFP)生産について検討した。大腸菌の最小培地である M9 培地にアミノ酸やビタミンなど 31 種類の成分の添加の影響を評価した。多重共線性問題を回避するため，実験計画法に習いラテン方格(L81 直交表)を用いて 31 種×3 水準の培地組成をデザインし，ディープウェル培養にて，蛍光分光光度計にて GFP 生産量を評価した。成分と GFP 生産量の関係を種々の機械学習モデル(12 種)で評価したところ，線形回帰モデル(重回帰，Lasso 回帰, Ridge 回帰)やサポートベクトルマシンよりも決定木を弱学習器として用いるアルゴリズム(決定木，ランダムフォレスト，勾配ブースティング決定木)およびパーセプトロンを弱学習器とするモデル(ニューラルネットワーク，DNN)で高い相関が認められた。2 変数までの相互作用項を考慮した場合，線形モデルでも良好な精度で相関することがわかった。このことから，GFP 生産に影響する成分は成分間で相互作用があることが示唆された。最適な培地組成を探索するため，DNN モデルを未知関数とするベイズ最適化により，最適な培地組成を予測した。予測された組成の培地を実際に作成し GFP 生産量を確認したところ，予測と同等の GFP 生産を確認でき，当初の培養条件中で最も良好な条件と比べて，GFP 生産量が 17%増加したことがわかった。以上の結果から，ラテン方格を用いた実験計画法と同様の実験条件設定による収集されたデータセットによる機械学習モデルと学習モデルを未知関数とするベイズ最適化により，30 成分を超える培地成分の最適組合せを良好に予測できることがわかった。

今後，前出の培地 AI 技術に培地プロファイリングデータや分注ロボットを組合わせたハイスループット評価系を組合わせることで，工業用微生物培地を迅速かつ効率的に最適化できるシステムの開発につなげたい。

本研究の一部は NEDO プロジェクト「データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム（Data-driven iBMS）の研究開発」の一環として実施されました。

参考文献

Konishi M (2020) Bioethanol production estimated from volatile compositions in hydrolysates of lignocellulosic biomass by deep learning. J. Biosci. Bioeng. 129: 723-729

Tachibana S, Watanabe K, Konishi M (2019) Estimating effects of yeast extract compositions on *Escherichia coli* growth by a metabolomics approach. J. Biosci. Bioeng. 128: 468-474

Tachibana S, Chiou T-Y, Konishi M (2021) Machine learning modeling of the effects of media formulated with various yeast extracts on heterologous protein production in *Escherichia coli*. Microbiol. Open 10: e1214. https://doi.org/10.1002/mbo3.1214

Watanabe K, Tachibana S, Konishi M (2019) Modeling growth and fermentation inhibition during bioethanol production using component profiles obtained by performing comprehensive targeted and non-targeted analyses. Bioresourc. Technol. 281: 260-268.

Key words artificial intelligence, cultivation, machine learning, medium, optimization

A3H7 (0001) Multiple bacteriocin production and the novel circular bacteriocin of newly isolated lactic acid bacteria

○Rodney H. Perez
（National Institute of Molecular Biology and Biotechnology (BIOTECH), University of the Philippines Los Baños (UPLB), College, Laguna, Philippines）

Multiple bacteriocin production and the novel circular bacteriocin of newly isolated lactic acid bacteria

○Rodney H. Perez
(National Institute of Molecular Biology and Biotechnology (BIOTECH), University of the Philippines Los Baños (UPLB), College, Laguna, Philippines)
rhperez@up.edu.ph

Bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides by some bacterial strains in order to gain advantage in their ecological niche. These compounds have been traditionally appreciated for their utility in many food preservation-related applications but new areas of application have emerged in recent years due to new findings of their diverse bioactivities. Bacteriocin production in Generally Regarded As Safe (GRAS) lactic acid bacteria is a highly desirable trait as it enhances their utility. A new lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium* NKR-5-3, isolated from a Thai fermented fish, produces five novel bacteriocin peptides. Purification of these bacteriocins involved a 4-cycle chromatographic procedure from the culture supernatant of this strain. These bacteriocins are named enterocin NKR-5-3A (Ent53A), enterocin NKR-5-3Z (Ent53Z), enterocin NKR-5-3B (Ent53B), enterocin NKR-5-3C (Ent53C), and enterocin NKR-5-3D (Ent53D). Although the purification system failed to recover Ent53Z, its structural gene, *enk53Z*, was found downstream of *enk53A*, the encoding gene of Ent53A. The genes *enk53A* and *enk53Z* showed very high sequence identity to the encoding genes of brochocin A, a 2-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754.

The architecture of the genes encoding these bacteriocins (except the circular bacteriocin, Ent53B) is arranged in close proximity to each other together with the biosynthetic genes encoding the ABC transporter protein (*enkT*), immunity proteins (*enkIaz*, *enkIc*), and regulatory proteins (*enkR, enkK*) in a 13kb-long gene cluster. Whereas the biosynthetic machinery of the circular bacteriocin, Ent53B, is located in a gene cluster distant from other bacteriocins. A 9kb region encodes the *enkB1*, *enkB2, enkB3* and *enkB4* genes, which are responsible for the production, maturation, secretion and self-immunity of Ent53B.

Functional analysis of these genes confirmed their roles in the biosynthesis of these bacteriocins. EnkT is a wide-range ABC transporter protein responsible for the secretion of Ent53A, Ent53C, Ent53D, and Ent53Z. This transporter protein has a tolerant substrate recognition system enabling it to process non-cognate bacteriocin and even chimeric precursor peptides belonging to different sub-classes. Nonetheless, efficiency of the processing by EnkT is significantly higher using the cognate leader peptide moiety (*i.e* Ent53C leader peptide).

The response regulator protein, EnkR, histidine kinase protein, EnkK, and the bacteriocin Ent53D, comprise the three-component regulatory system responsible for the control of the production of these bacteriocins, except Ent53B. The bacteriocin Ent53D, with a threshold concentration of 2 nM, serves as the inducing peptide pheromone of EnkR and EnkK that can activate the transcription of the structural genes and corresponding biosynthetic genes of NKR-5-3 bacteriocins, except Ent53B.

The production system of the novel circular bacteriocin Ent53B is independent from the other NKR-5-3 bacteriocins. The processing of the precursor peptide of Ent53B requires the cooperative functions of four gene products *enkB1, enkB2, enkB3*, and *enkB4*. The interaction of the precursor peptide and its biosynthetic enzymes appears to favor helix structure promoting hydrophobic residues as only mutations with such residues at the first position were able to yield the mature circular bacteriocin. It worth noting that the three-dimensional NMR solution structure of Ent53B has a distinct orientation characterized by four helical segments that enclose a compact hydrophobic core, which together with its circular backbone impart high stability and structural integrity of its molecule.

Understanding the biosynthetic mechanism and structure information of these bacteriocins is useful in its future application such as designing strategies to effectively dispense its multiple bacteriocin arsenal.

Key words lactic acid bacteria, bacteriocins, biosynthetic mechanism, enterocins,

S3H1 (1301) 食のおいしさ研究への時間軸の挿入

○金田弘挙
（九産大・生命科学）

Inserting a time axis into food deliciousness research

○Hirotaka Kaneda
(Fac. Life Sci., Kyushu Sangyo Univ.)
kaneda@ip.kyusan-u.ac.jp

ヒトが飲食する際、五感（味覚、嗅覚、触覚、視覚、聴覚）全ての情報が複雑に絡み合い、さらにその場の雰囲気・環境やそれまでの食生活・食文化、その時の体調等も加味され「おいしさ（嗜好）」を感じると言われている[1]。なかでも、嗅覚の持つ嗜好への役割は極めて大きいことが知られている。食事の際の香りの感じ方には、食べ物を口に入れる前に鼻先から鼻腔を通して香りを感知する「オルソネーザルアロマ（鼻先香、立ち香）」と、食べ物を口に入れて咀嚼中や嚥下後、口中やのどから鼻に抜けて感じる「レトロネーザルアロマ（口中香、含み香）」の 2 種類がある。オルソネーザルアロマは「おいしそう」、レトロネーザルアロマは「おいしい・おいしかった」という感情に影響を及ぼしており、食の嗜好に関しては、オルソネーザルアロマよりレトロネーザルアロマが重要と考えられている。ここで、ヒトは、食品・飲料を口に入れてから嚥下後の間それぞれ異なるタイミングで脳に伝達される五感刺激が時間と共に変化する中、どのタイミングで感知される感覚から最終的においしさを判断しているのだろう？との疑問が沸く。ヒトは、喫食時、秒単位あるいはそれ以上のスピードで、味、香り、食感等を末梢部位で受容してその刺激を脳内の各領域に伝達・処理され感性・嗜好が形成される。その際、口腔内や鼻腔内での時間に伴う風味（味、香り）成分変化がもたらす感性・嗜好への影響については極めて興味深い。

近年、それら時間経過に伴う感覚や嗜好の変化を捉える Temporal dominance of sensations（TDS, 経時的優位感覚）、Temporal Check-All-That-Apply（TCATA）、Temporal Driver of Liking（TDL）等の官能評価が注目を集めており、食品を口に入れてから咀嚼中や嚥下後の時間に伴う風味、食感、嗜好の変化を捉えることができる。一方、香気成分の変化に関しては、フレーバーリリース・リアルタイム計測が近年注目を集めている。オルソネーザルアロマ成分変化に関しては、佐川らは、質量検出部のイオン化部に直接サンプル（香気成分）を導入して質量分析することで、食品からの揮発性成分の放散状態を 1 秒単位でのリアルタイム測定を可能とする Direct Analysis in Real Time 質量分析システム（DART-MS）を構築し、固形油脂食品のベースに香料を添加した食品の時間に伴う香気成分変化を捉えている[2]。田丸らは、DART-MS を用いて、マヨネーズ、生クリーム等加工食品の Oil in Water (O/W) エマルションのモデル系における開栓直後からしばらく放置した状態までの時間に伴う物理化学的性質の変化に伴う香気成分の気散状況を捉えた[3]。演者らは、レトロネーザルアロマを捉えるため、呼吸サイクルに合わせた呼気サンプルのリアルタイム計測を可能とするプロトン移動反応 TOF 質量分析システム（Proton Transfer Reaction Time of Flight Mass Spectrometer、PTR-TOF-MS）を用いて、実際にヒトが食品・飲料を口に入れてから咀嚼中や嚥下後の口中・鼻腔中に広がる香気成分をリアルタイム計測している[4]。本システムは、ヒドロニウムイオン（$H3O^+$）によるプロトン移動反応を利用したオンラインの化学イオン化質量分析計の一種で、試料前処理なしの直接オンライン分析で、質量計測におけるフラグメントが少なく簡便かつ迅速測定が可能である。なお、これらフレーバーリリース・リアルタイム計測は、ガスクロマトグラフィーのような分離を伴わない質量計測のため、異性体同士の違いを同定できないという欠点を持つ。

食品・飲料の感性・嗜好研究における時間軸の挿入により、食品・飲料を口に運ぶまでや口に入れて咀嚼中・嚥下後における時々刻々と変化する香気成分を捉えることで新たなおいしさの発見や新たな食べ方提案に結び付くのではないかと考えており、リアルタイムにオルソネーザルアロマやレトロネーザルアロマの変化を捉える DART-MS、PTR-TOF/MS 等のフレーバーリリース・リアルタイム計測に関しては、それらの欠点を十分に把握したうえで、TDS、TDL、TCATA 等の官能評価結果をどう説明できるのかを検討することで新たな商品開発やマーケティングへのヒントが得られるのではないかと期待している。

1) G.M. Shepherd; Neurogastronomy：How the Brain Creates Flavor and Why It Matters, Columbia University Press (2013).
2) 佐川岳人ら；日本食品科学工学会誌，62(7) 335-340（2015）.
3) 田丸峻次ら；日本農芸化学会 2019 年大会講演要旨集（2019）.
4) 金田弘挙；食品と科学，60(10)，14-19（2018）.

Key words foods and beverages, flavor, preference, time

S3H1 (1302) 製造方法によるミルク入りコーヒー飲料のおいしさ創りと香味評価

○秋山正行*
（森永乳業　研究本部　食品開発研　飲料研）

Flavor evaluation of a milk coffee drink developed using a new manufacturing method

○Masayuki Akiyama*
(Beverage Res. Section, Food Res. & Development Inst., R&D Div., Morinaga Milk Ind.)
m_akiyam@morinagamilk.co.jp

森永乳業の主要な RTD (Ready-To-Drink) 製品に、チルドカップコーヒー飲料がある。この製品は、プラスチックカップ入りのコーヒー飲料で、チルド（冷蔵 10℃以下）条件で流通、販売され、ストローで飲用される。製品特長は、その製造工程（超高温瞬間殺菌、無菌充填）や保存条件（冷蔵）に依り、常温流通の飲料製品に比べて、製造工程や保存中の品質変化が小さいため、原料本来の香味を製品に活かしやすいことである。
本講演では、チルドカップコーヒー飲料の製品開発において、開発者が理想とする「おいしさ」創りを目指して、新たに設計した製造方法（工程、条件）による香味への影響の検証、及び新しい製造方法で創った新製品と理想の「おいしさ」品との香味の比較評価から、新製品のおいしさを実証した開発研究を紹介する。
RTD コーヒー製品では、製造工程と製品保存中の物性や香味を安定化するために、コーヒー（抽出液）の酸度（pH）調整が行われる。しかし、この処理は、コーヒーの香味に大きな変化を及ぼす。これが、コーヒー本来の香味が活きた「おいしい」RTD 製品を製造する上での課題であった。そこで、コーヒーの pH 調整を行わずに製造する方法により、コーヒー本来の香味を保持した製品を開発することを目的とした。
コーヒーの pH 調整を行わずにミルク（入り）コーヒー飲料を製造する新しい方法として、従来のミルク分とコーヒー分を混合した後に加熱殺菌を行う BBS 製法（Blending Before Sterilization）を見直し、ミルク分とコーヒー分を別々に加熱殺菌した後に冷却し混合する BAS 製法（Blending After Sterilization）にすることで、殺菌工程と製品保存中の安定性も確保することができた。香味に関しては、カフェショップや家庭で、コーヒーの pH 調整を行わずに作る HMD（Homemade）製法によるミルクコーヒーを「おいしさ」の目標品と設定した。そこで、コーヒーの pH 調整による香気への影響、及び従来の BBS 製法、新 BAS 製法、及び HMD 製法によるミルクコーヒーの香気の違い、更に各製法品の香味を比較評価することで、新 BAS 製法品が、従来の BBS 製法品よりも、HMD 製法品に近い香味を創ることができる製法であることの検証を試みた。
具体的には、初めに pH 調整によるコーヒー香気の変化と、各製法によるミルクコーヒーの香気を、GC-MS、GC-O（匂い嗅ぎ）により分析、評価した。また、各製法によるミルクコーヒーの香味を、味認識装置 TS-5000Z（Insent）、及び QDA（定量的記述分析）法による分析型官能評価を行い、製造工程と条件の違いが香味に及ぼす影響を比較評価した。
GC-MS、GC-O 分析での香気成分の抽出には、製品をストローで飲用する際、香味への影響が大きい Retronasal Aroma (RA) の香気成分を対象とするために、Roberts and Acree (1995) が開発した RA Simulator (RAS) を用いた。BBS、BAS、及び HMD 製法による各ミルクコーヒーから RAS で捕集した香気成分を GC-MS と GC-O により分析した。GC-MS 分析データの主成分分析により、従来の BBS 製法品よりも、新 BAS 製法品の方が、HMD 製法品の香気成分特性に近いことが示唆された。GC-O 分析データからも同様に、BBS 製法品よりも、BAS 製法品の方が、HMD 製法品に近い匂い成分特性を有するミルクコーヒーであることが明らかとなった。また、コーヒー分とミルク分を別々に殺菌する BAS 製法において、ミルク分の殺菌方法として、間接式のプレート殺菌に比べて、直接式のインフュージョン殺菌の方が望ましいことも示された。
香りの評価に加えて、製造工程と条件が異なるミルクコーヒーの香味を、味認識装置を用いて分析した結果、BBS 製法品よりも BAS 製法品の方が、HMD 製法品に類似していることが示された。この結果は、分析型官能評価による香味特性の結果からも支持された。
コーヒーとミルクコーヒーの RA の GC-MS と GC-O 分析、及びミルクコーヒーの味認識装置による分析と分析型官能評価による比較検証から、コーヒーの pH 調整による香りへの影響、及びミルクコーヒーの製造工程と条件が製品の香味に及ぼす影響を明らかにした。結論として、新しい BAS 製法が、RTD ミルクコーヒーのおいしさ創りに有用であることが立証された。
森永乳業では、BAS 製法によるチルドカップミルクコーヒー飲料を、2006 年に初めて、高付加価値商品として製造、販売を開始した。数多くの製品が発売され、終売を繰り返す競争の厳しい RTD ミルクコーヒー市場で、現在でも本製法品が存続していることが、「おいしさ」を実証していると考えている。

Reference:
Roberts and Acree (1995). *J. Agric. Food Chem*. 43 (8), 2179-2186.
Ikeda *et al*. (2018). *J. Food Sci*. 83 (3), 605–616.
Ikeda *et al*. (2018). *J. Food Sci*. 83 (11), 2733–2744.
池田ら(2019)．九州大学大学院システム情報科学紀要．24(2)，23-28.

Key words RTD (ready-to-drink) milk coffee, retronasal aroma simulator (RAS), taste sensor analysis, sensory evaluation

S3H1 (1303) 最新官能評価技術によるおいしさデザイン

○川﨑寛也[1]*
([1]味の素株式会社食品研究所)

Deliciousness design using new sensory evaluation technique

○Hiroya Kawasaki[1]*
([1]Ajinomoto Co.,Inc.)
Hiroya_kawasaki@ajinomoto.com

おいしさをデザインするとは、おいしさを最大化した商品を開発するため、消費者の味覚・嗅覚・触覚（主に口腔内）において、どう感じられるかをデザインし、食品の官能特性（味・香り・風味・触感等）に落とし込むことである。我々の味覚・嗅覚・触覚は、「質」「強度」「時間」の情報を脳に運んでいる。官能評価は、これらの情報を、脳を経由したアウトプットとして計測する手法である。これまで、質と強度についての官能評価技術は、一般的であったが、近年、デジタル技術の発達により、食べたり飲んだりしてからの味や風味の経時変化を計測できる手法が出現した。そこで、本報告では、経時変化についての官能評価技術を、おいしさのデザインツールとして活用した事例を紹介する。

Temporal Dominance of Sensations（TDS）法は食品の味や風味、食感の質的経時変化を計測する官能評価手法として近年開発された手法で、dominant に感じた一つの特性を連続的に選択し、dominant の定義を「強くなくてもよく、注意をひく」としている。結果は特性用語の選択率を経時的に算出した TDS カーブで表現し、選択率の統計的有意性を検定する。TDS カーブによって、官能特性の経時変化が見える化される。

基本味溶液および混合基本味溶液の味質変化を TDS 法により計測したところ、MSG（うま味）、乳酸（酸味）、NaCl（塩味）溶液の単独水溶液において、濃度依存的にそれぞれの味質の duration は延長した。MSG/乳酸、乳酸/NaCl、NaCl/MSG の混合基本味溶液に関しては、MSG、NaCl、乳酸の DR と duration における互いの影響関係を整理することができた。

TDS カーブは官能特性の経時変化が見える化されるため、味や風味の経時変化のデザインに活用できることが考えられた。そこで、トップショコラティエの一人と、和の食材を活かしたチョコレートを試作した事例を紹介する。オリジナルチョコレートのフレーバーデザインコンセプトを議論し、試作を依頼した。そのチョコレートの TDS 評価を行い、フレーバーデザインについて TDS カーブを見ながら議論を行うというサイクルを進めた。最終的に、チョコレートの素材として「ほうじ茶」や「賀茂なすのしば漬け」などを用いた、和の素材の風味やうま味が経時的に変化するオリジナルチョコレートを作成することができた。これまでショコラティエの感覚で行われてきたフレーバーデザインを TDS により見える化することで、依頼者と情報共有し議論することが可能であり、経時変化を含めたフレーバーデザインツールとして活用できると考えている。

一方で、消費者が好む食品を開発する上で、消費者の感覚と開発担当者の感覚の乖離が課題となる場合がある。開発担当者は、日々の評価の中で味わう経験が多くなったり、開発上のテーマを意識することで、より解像度が高まるため、消費者が感じる感覚と乖離してくるのである。そこで、上述した TDS 法に加えて、新たに提案された Temporal Check-All-That-Apply（TCATA）法を用いて、消費者の感覚と開発担当者の感覚の違いを見える化することに成功した事例を報告する。

Temporal Check-All-That-Apply（TCATA）法は、複数の知覚情報を同時に選択し、結果は TDS 同様に特性用語の選択率を TCATA カーブで表現する。そこで、TDS データで有意に dominant な時間帯を TCATA カーブ上で強調した dominant TCATA カーブ（dTCATA カーブ）を考案した。市販のスープ 5 種類をサンプルとし、125 名の消費者パネルによる TDS 評価と 12 名の訓練パネル（食品の研究開発に携わっている社員）による TCATA 評価を実施した。特性評価用語は 9 項目とした。パネルはサンプルを口に入れた瞬間から、TDS または TCATA 評価を開始した。TDS データから有意に dominant な時間帯を特性用語毎に算出し、その時間帯を TCATA カーブ上で強調表示した dTCATA カーブを作成した。その結果、dTCATA カーブから、TDS で有意であっても TCATA では選択率が低いカーブは、社内パネルは気になっているが、訓練パネルはあまり感じていない特性の経時変化であると考えられ、消費者と開発担当者の感覚の違いを見える化することができた。

官能評価は、人の五感という曖昧で変化しやすいものを対象とするが、データ取得法や統計解析手法などを駆使することで、科学的データとして扱えるようになりうる。検査手法として発達したが、現在は製品開発フローの重要なステップとして、活用されており、製品の官能特性をデザインするツールとして活用されることを期待している。

Key words sensory evaluation, TDS, TCATA, design.

S3H1 (1401) 光イメージング技術開発とネオホストの医学研究・医療応用に向けて

○今村健志[1,2]*, 齋藤卓[1,2], 川上良介[1],
([1]愛媛大院医, [2]愛媛大医学部附属病院先端医療創生センター)

Development of optical imaging technology and application of Neohost in medical research

○Takeshi Imamura[1,2]*, Takashi Saitou[1,2], Ryosuke Kawakami[1]
([1]Dept. Mol. Med. for Pathogenesis, Ehime Univ. Grad. Sch. Med., [2] Translational Research Center, Ehime Univ. Hosp)
timamura-ind@umin.ac.jp

ネオホストバイオテクノロジーの創成においては、生物系ネオホストと非生物ネオホストの有機的結合とその応用展開が重要な鍵を握っている。よって、その実現においては両ネオホスト間の共通言語となり得る技術の開発と具体的な対象分野での応用展開が必須である。我々は光イメージング技術が階層を超えて天然・生物系ネオホストと化学・人工系ネオホスト繋ぐ共通言語になり得ると考え、その技術開発を進めてきた。

具体的には、両ネオホストの構造に加え、その動態をリアルタイムで画像化・解析する 4D イメージング技術、生物系ネオホストにおける微細なオルガネラから個体までマルチスケールイメージングする技術とそれを多元的解析可能なマルチカラーイメージング技術、さらに、構造や動態だけでなく、両ネオホストの分子、生きた細胞の機能やその周囲の環境を同時にイメージング可能な革新的光イメージング技術開発を進めてきた。

本発表では、我々がこれまで開発してきた、ミクロからマクロまで多階層のターゲットを時空間的に多元的解析が可能な革新的イメージング技術を紹介する。具体的には、超解像顕微鏡によるオルガネラの高解像リアルタイムイメージングからメダカやマウスの全身マクロイメージング、さらに 2 光子励起蛍光顕微鏡を用いた高解像生体深部イメージングまで、さまざまな最先端イメージング機器、革新的蛍光タンパク質や蛍光色素を駆使して、生体で細胞動態、細胞機能や細胞環境を画像化して解析する手法を紹介する。

まず、オルガネラの高解像リアルタイムイメージングの例として、ミトコンドリアをターゲットにした蛍光有機小分子と超解像顕微鏡を用いたミトコンドリアの高解像リアルタイムイメージングを紹介する。この手法では、これまで固定したサンプルを電子顕微鏡でしか観察できなかったミトコンドリアのクリステ構造を、生細胞のライブイメージングで観察することが可能である。

次に、全身マクロイメージングの例として、ヒトがん細胞株を皮下移植した免疫不全マウス（ヌードマウス）のがん微小環境リアルタイムイメージングおよびマルチカラーイメージングを紹介する。この手法では、がん細胞に加え、がん周囲の血管新生、リンパ血管新生およびプロテアーゼ活性などのリアルタイムマクロイメージングおよび多色同時イメージングが可能である。

さらに、高精細生体深部イメージングの例として、2 光子励起蛍光顕微鏡を用いた大脳新皮質から海馬までの生体脳深部の高解像 3D イメージングを紹介する。2 光子顕微鏡法は、生体深部組織における細胞の挙動および機能を調べる強力な技術であり、今回は我々が開発・応用した 1040nm 以上の励起波長を用いた赤外（IR）-2 光子励起顕微鏡および補償光学系についても紹介する。IR-2 光子励起顕微鏡は、赤色蛍光タンパク質/色素の適用を可能にし、従来の多光子顕微鏡と比較してより生体深部のイメージングを可能にする。

以上、ネオホストバイオテクノロジーの創成において必須のバイオフォトニクス技術を駆使した光イメージング技術開発と医学・医療応用について我々の知見を紹介する。階層を超えて天然・生物系ネオホストと化学・人工系ネオホスト繋ぐ革新的光イメージング技術が開発されると、ネオホストの具体的な応用、医学・医療応用、特にがん免疫と骨再生医療、DDS への応用が進むと期待される。

Key words bio-imaging, 2 two-photon excitation fluorescence microscope, super-resolution microscopy, medicine

S3H1 (1402) 動物細胞のネオホスト応用に向けた情報解析プラットフォーム構築

○蟹江慧[1]*
([1] 名大院・創薬科学)

Construction of data analysis platform for neohost application of animal cells

○Kei Kanie[1]*
([1] Grad. Sch. Pharm. Sci.)
kanie-k@ps.nagoya-u.ac.jp

近年、動物細胞が抗体医薬品や細胞医薬品として、新しい治療のモダリティとして注目されている。また、医療機器開発研究やドラッグスクリーニング、さらには動物代替の需要から、化粧品分野や培養肉分野など、新規分野を切り拓く材料として注目がなされている。最近の総説では、細胞を治療用の送達担体としての利用に関してまとめられており [1]、新たなホスト(ネオホスト)としての利用が考えられる。しかしながら一方で、動物細胞の『未知』なる部分に、非常に悩まされている報告例も少なくない。たとえば、同時に作られた iPS 細胞でも、分配先によって異常の有無や内容が異なっていることが報道されている [2]。また、動物細胞を用いた薬物アッセイの再現性が、施設間で異なるという研究報告例もある [3]。これらの要因の一つとして、動物細胞の取り扱い方の曖昧さが考えられる。特に実験室レベルでは、動物細胞の培養操作が非常に感覚的に行われていることが多い。

そこで発表者は、動物細胞培養をもっと根源的に『計測する（はかる）』ことが重要であると考え、本学会誌においてもその事例を紹介している [4]。その取り組みとしては、『動物細胞培養者の動線解析 [5]』、『流体シミュレーションによる細胞培養計測』、『ラボラトリーオートメーションによる細胞培養』などがあり、動物細胞培養を徹底的に計測することの意義を述べてきた。

また発表者は、これまでにペプチドを用いた動物細胞の細胞選択的制御に関わる研究も行なっており、複数の細胞選択的接着ペプチドの取得や表面設計を行なってきている [6, 7]。このような、細胞選択性を有する材料表面の開発や、その理解は、今後細胞をネオホストとして使用していく際に、送達先に関わる重要な知見となっていくと考えている。しかしながら、上述に述べたとおり動物細胞の取り扱いに関して理解をしていなければ、動物細胞と材料表面の正確な理解には辿り着けないものと考えている。つまり、材料表面と動物細胞を理解する上でも、『どのような品質の細胞を使用したか』、『どのような実験手技で評価したか』、『どのような実験結果を取得したか』などの、細胞に関わる全ての実験に対する情報が、評価結果に左右されるため、どこでどのような情報を取得するかは非常に大切になってくると考えている。

本発表では、発表者がこれまでに経験をしてきた動物細胞培養に関する評価方法や細胞選択的ペプチドとの相互作用に関して総合的に紹介する。さらに、動物細胞そのものの評価や、それに付随して起こる実験手技者、実験手技、実験評価方法を含め、その重要性を述べる。最終的には、全ての情報を一気通貫したプラットフォームが必要不可欠であると考えている。そのような考え方を踏まえ、動物細胞をネオホストとして使用する際に、さらにどのような評価計測方法やツール、考え方が必要となるかを議論したい。

参考文献

1) Bush,LM.*et al*.: *Trends. Pharmacol. Sci.*, **42**, 106 (2021).
2) 毎日新聞（2020/1/8 付記事）: https://mainichi.jp/articles/20200107/k00/00m/040/434000c (2021/3/17).
3) Niepel, M. *et al*.: *Cell. Syst*., **9**, 35 (2019).
4) 蟹江慧：生物工学, **99**, 288 (2021).
5) Kanie, K. *et al*.: *Regen. Ther*., **12**, 43 (2019).
6) Kanie, K. *et al*.: *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 1808 (2012).
7) Kurimoto, R. *et al*.: *Anal. Sci.*, **32**, 1195 (2016).

Key words animal cell, quality control, cell-selective peptide, image analysis

S3H1 (1403) 非細胞コンパートメントの構築とその生物工学的応用

○神谷 典穂[1,2]*
([1] 九大院・工, [2] 九大・未来化セ)

Construction and biotechnological application of artificial compartments

○Noriho Kamiya[1,2]*
([1] Fac. Eng., Kyushu Univ., [2] Center for Future Chem., Kyushu Univ.)
kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

生体系は、多様な区画（コンパートメント）と化学反応から構成される。生物の基本単位である細胞は、遺伝子改変技術の深化と分析技術の高度化により、物質生産のための反応場、生体反応解析のための分析場を提供する水系天然区画として、幅広く利用されている。一方、天然脂質や合成界面活性剤により形成される人工的な区画を用いた再構成系も進展しているが、実用的な観点から、その生物工学的活用には未だ余地が残されている。我々は、「水系コンパートメントのハイドロゲル化による安定化」というシンプルな発想に基づき、小分子から細胞までを包括的に評価・利用可能な機能性微小ハイドロゲルを設計し、これを非細胞コンパートメントとして利用することを試みている。

本研究では、水系コンパートメントの安定化に、酵素反応により促進されるハイドロゲル形成反応を利用する [1]。具体的には、末端にチオール (SH) 基を有する 4 分岐型ポリエチレングリコールと西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) ならびに HRP の基質となる小分子フェノール化合物の混合により、外部からの酸化剤（HRP の基質となる過酸化水素）の添加を必要とせずに形成されるジスルフィド結合を架橋点とするハイドロゲル（S-S 架橋ゲル）を基材として用いる。本ゲル化法は、穏和な酵素触媒条件下での SH 基間の架橋形成を利用するため、内包物を優しく且つ安定に包含可能であり、包括した細胞をそのまま培養することも可能である [2]。また、S-S 架橋ゲルは、穏和な還元条件下でのジスルフィド結合の解離により、内包物を簡便に回収可能な外部環境応答性を有している。さらに、ゲル形成溶液中にチオール基含有化合物を共存させることで、S-S 架橋ゲルの高分子ネットワーク中へ新たな機能部位を共有結合を介して導入できる点にも特徴がある [3]。

まず、ハンドリングが容易な水系コンパートメントとして、Liquid marble (LM) に注目した。LM は、疎水性固体微粒子の表面被覆により安定化された自立液滴であり、外部環境（気相）と物理的に隔離された微小液相を有する。これまでに、LM の内水相を反応場と見なした微小反応器への応用が報告されている。我々は、上述の酵素触媒ゲル形成反応を用いて LM の内水相をハイドロゲル化することで、Hydrogel marble (HM) を得た。HM が与える粒径数 mm の微小な 3 次元空間は、球状の細胞集塊（スフェロイド）形成のための細胞培養の場として利用でき、システイン (Cys) 水溶液の添加により HM からのスフェロイドの回収も可能であった [4]。

次に、LM の内水相を生化学反応場として利用し、その反応産物の機能性を指標とした選抜系の構築を試みた。モデル生化学反応として、複数の巨大生体分子が関与する無細胞タンパク質合成系を選択し、LM から HM への転換と共にその機能化が進行する系の構築を試みた。具体的には、遺伝子組換え技術によりペプチドタグ部分に Cys 残基を導入したタンパク質 (Protein-SH) の無細胞合成と、LM 内水相のハイドロゲル化を同時に進行させ、得られる HM の S-S 架橋ネットワーク中に Protein-SH がジスルフィド結合を介して固定化される系の構築に成功した [5]。さらに、分析対象を酵素とし、HM に固定化された酵素活性を指標とした選抜ならびに HM からの内包物の回収を行い、その表現型に対応する遺伝子の回収が可能なことを明らかにした。

Water-in-Oil (W/O) エマルジョン系は、粒径数～数十 μm 程度の小さな水系コンパートメントを与える。近年、W/O エマルジョンの内水相に細胞を包括・分画し、内包された細胞の機能に応じてハイスループットに選抜を行う手法が注目されている。例えば、対象とする細胞集団から、特定のタンパク質を分泌する能力の高い細胞を選別できれば、酵素やバイオ医薬品の生産に適した細胞株選抜の効率化が期待できる。そこで、上述のハイドロゲル形成法を用いて、W/O エマルジョンの内水相をハイドロゲル化した Hydrogel beads (HB) の作製を試みた。現在までに、対象タンパク質に特異的に結合する Protein-SH の導入による HB の機能化が可能なことを確認すると共に、HM から HB への微細化を達成した。

以上のように、微小水系区画のハイドロゲル化とゾル化を組み合わせることで、分子から細胞までを対象とした反応場（水あるいはゲル）、分析場（ゲル）、回収場（ゾル）をシームレスに構築することができる。水を媒体とする複合反応系を微小水滴中に丸ごと包括し、これをハイドロゲル化することで反応場・分析場の安定化を図り、最終的に内包物の選択的な回収・徐放までを実現可能な非細胞コンパートメント（ネオホスト）として、酵素の分子進化系ならびに細胞選抜系の構築を進めている。

References

1) K. Moriyama, K. Minamihata, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 5895-5898.
2) K. Moriyama, S. Naito, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya, *Biotechnol. J.*, 2016, **11**, 1452-1460.
3) W. Ramadhan, G. Kagawa, K. Moriyama, R. Wakabayashi, K. Minamihata, M. Goto, N. Kamiya, *ACS Appl. Bio Mater.*, 2019, **2**, 2600-2609.
4) W. Ramadhan, Y. Ohama, K. Minamihata, K. Moriyama, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya, *J. Biosci. Bioeng.*, 2020, **130**, 416-423.
5) N. Kamiya, Y. Ohama, K. Minamihata, R. Wakabayashi, M. Goto, *Biotechnol. J.*, 2018, 1800085.

Key words compartment, emulsion, hydrogel, protein engineering, redox, thiol

S3H1 (1404) 生体膜の曲面構造を制御したネオホストの構築

○田中 祐圭
（東工大・物質理工）

Establishment of NEOHOST with regulated membrane curvature structure

○Masayoshi Tanaka
(Sch. Mater. Chem. Technol., Tokyo Tech)
Tanaka.m.bn@m.titech.ac.jp

細胞は、分裂や運動、分化、小胞形成に代表されるように、細胞膜形態の緻密な制御を必要とするバイオプロセスを数多くもつ。そのため細胞膜の曲がり具合（曲率）の誘導原理、細胞に及ぼす影響、さらには曲面膜にある膜タンパク質機能への影響を理解できれば、細胞でおきる種々の生命現象を制御・調節されたネオホストの開発に繋がると考えられる。一般に、このような細胞内でみられる生体膜構造の制御プロセスは、構成する脂質成分の非対称性に加え、膜タンパク質や細胞骨格タンパク質の機能により説明されてきた。中でも、生体膜の曲面構造（曲率）を識別して局在し、膜構造を制御する“曲率認識タンパク質”の重要性が示されている。例えば、バナナ型の立体構造をもつ Amphiphysin タンパク質は、その曲面構造に相補的な生体膜構造に強く相互作用する。その際に、アミノ酸と脂質の静電的な相互作用や両親媒性ドメインの膜内への挿入などを通じて、曲率認識タンパク質は曲面生体膜構造を制御する。しかしながら、既知の生体膜曲率認識タンパク質(またはドメイン)の種類だけでは、生体内で見られる多様な曲面生体膜の動態制御機構を説明できないため、未知の曲率認識分子が存在することが示唆されている。一方、これまでの研究から、異なる曲率認識タンパク質は構造の類似性は高いがアミノ酸配列間の相同性が低いため、ゲノム情報から曲率認識能をもつタンパク質を予測することは困難であると指摘されている。そのため、混合タンパク質溶液の中にある曲率認識能をもつタンパク質について、その曲率認識能を直接評価し同定できる手法の開発が求められていた。今回、生体膜により被覆された粒径が制御された球形材料を利用した工学的なアプローチにより、生体膜の曲率を認識するタンパク質を選択的かつ網羅的に探索する方法論を見出したので報告する。

この手法では、はじめにサイズの異なる球形 SiO_2 粒子をシリーズ合成し、これらを生体膜で被覆することにより、様々な曲率の曲面生体膜材料(SSLB:Spherical Supported Lipid Bilayer)を人工的に調製する。球形 SiO_2 粒子をコアにもつことから、用いる粒径に応じて曲面膜構造を精密に制御できることに加え、その膜構造は溶液中において非常に安定である。ここで得られる異なる曲面膜材料(SSLB)について、表面積を揃えて表在性膜タンパク質混合溶液中で混和し、それぞれの曲面膜に結合したタンパク質を得る。これらを質量分析装置により網羅的に比較定量解析することで、生体膜の曲率認識能をもつタンパク質を探索できる。

本手法により、ヒト皮膚線維芽(NHDF)細胞及びヒト乳腺がん(MDA-MB-231)細胞それぞれから探索を行い、MDA-MB-231 細胞に特徴的に発現する曲率認識候補タンパク質のスクリーニングを実施した。ここで用いた細胞それぞれから同定された曲率認識候補タンパク質には、既知の曲率認識タンパク質や曲率認識能をもつことが強く期待されるタンパク質が複数含まれていたことから、本手法の有効性が確認されている。また、ミトコンドリアのクリステは幅が約 30 nm の棚状の曲面膜構造をとることが知られ、この構造を制御する既知のタンパク質が 30 や 50 nm の SSLB に結合する曲率認識候補タンパク質として同定された。これは、曲率認識タンパク質が結合する膜構造と、そのタンパク質機能とが密接に関わることを示唆している。さらに、がん細胞である MDA-MB-231 のみから同定された曲率認識候補タンパク質は、新たながんマーカーとしての利用が期待される。今後は、ここで新たに同定された曲率認識タンパク質の機能解析を推進することで、疾病やその悪性化機構の理解が進むことが期待される。

また、ここで開発された曲率認識タンパク質の探索法は、汎用性が高く、ほかの細胞や生物からも容易にスクリーニングを実施することができる。このような研究を推進することで細胞内で普遍的に見られる曲面膜構造制御機構の理解が深化し、細胞機能を制御・調節されたネオホストの開発に繋がることが期待される。

本講演では、このような手法を着想するに至った細胞内小胞の中にナノサイズの磁性粒子を生合成する磁性細菌と呼ばれる微生物に関する研究とともに、開発した曲率認識タンパク質の網羅的探索法、そしてヒト正常細胞とがん細胞から探索を進めた結果を中心に紹介する。

Reference

1) M. Tanaka *et al.*, *Anal. Chem.*, 92:16197-16203 (2020).
2) M. Tanaka *et al.*, *Biotechnol. J.* 13(12):e1800084 (2019).
3) M. Tanaka *et al.*, *Small*, 8(10):1590-1595 (2012).
4) M. Tanaka *et al.*, *Mol. Microbiol.* 76(2):80-88 (2010).

Key words Membrane Curvature Sensing (MCS) Protein, Spherical Supported Lipid Bilayer (SSLB), Comparative Proteomic Analysis

S3H1 (1405) 医療応用のための非生物ネオホストの構築

○村上義彦 [1]
（[1] 東京農工大学大学院工学研究院応用化学部門）

Construction of non-biological neo-hosts for medical applications

○Yoshihiko Murakami[1]
([1]Department of Applied Chemistry, Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)
muray@cc.tuat.ac.jp

タンパク質、多糖、核酸などの生体高分子は、生体内においてさまざまな形態で存在している。生体高分子が満たしている細胞内部（ゲル）、上皮組織と結合組織の境界に存在する基底膜（シート）、細胞外基質の主成分となるコラーゲン繊維（ファイバー）、糖タンパク質が濃縮した分泌顆粒（粒子）など、生体はまさに高分子ブロックの巧みな組み合わせによって構成されている。治療を目的として体内投与あるいは体内留置するデバイスを設計する際には、生体を構成するこれらの高分子ビルディングブロック（あるいはそれを模倣した高分子材料）に治療機能を付与するアプローチが有効である。以上の背景に基づき、本講演者は材料内部のナノ/マイクロ空間の構築に適した高分子乳化剤を合成し、界面現象を制御することによって、新規な空間や界面を組み込んだ高分子バイオマテリアル（非生物ネオホスト材料）の創製および医療応用を目指している。

例えば、高分子乳化剤（両親媒性ブロック共重合体）と内包物（疎水性の抗がん剤などの薬物）を有機溶媒に溶解し，水に対して徐々に透析することによって，自発的な集合が誘発され，疎水性物質を内包したミセルが容易に形成する。本講演者は、ミセルを架橋構造として材料内部に組み込むことによって、薬物徐放機能を兼ね備えた生体軟組織接着性ゲルを開発した [1-5]。数秒以内に迅速に形成するこのゲルは、生体軟組織に強固に接着し、出血部位に適用すれば高い止血効果を示す [2]。さらに、内部に組み込むミセルの組成を変化させることによって、複数の薬物の放出速度を自在に制御することも可能である [3]。一方、「組織接着性」と「生体『非』適合性」は表裏一体の関係にあり、「生体適合性が高く、生体に適度に接着する（密着する）」材料の開発が望ましい。このような性質を示す材料を実現するために、タンパク質を内包したミセルを内部に分散することによって、シート材料にタンパク質徐放機能を付与することも可能である [6,7]。

また、経肺投与の薬物送達システム（DDS）は、薬物（あるいは、薬物の入れ物である薬物キャリア）を吸入して肺へ薬物を送達する手法であり、「表面積が大きく毛細血管が多い肺胞を利用するため、薬物の吸収効率が高い」「患部に薬物を直接送達することができるため肺疾患の治療効果が高い」「痛みをともなわない」などの利点から、投薬方法としてのさらなる発展が期待されている。経肺投与に適した薬物キャリアは、「(a) 粒子径が 1〜3 μm 程度である」「(b) 粒子が軽く（＝タップ密度が低く）、吸気の流れに乗りやすい」「(c) 肺胞に到達後は薬物を迅速に放出する」などの条件を満たす必要がある。しかし、これらの条件をすべて満たす粒子の調製は難しく、経肺投与 DDS のさらなる発展を妨げる大きな一因となっている。条件(a)(c)は粒子の作製条件（粒子を形成する高分子の組成や、粒子調製時の撹拌速度など）の制御によって容易に達成できるが、条件(b)の達成は容易ではない。条件(b)を満たす粒子として有望な材料形態は「多孔質」であり、経肺投与 DDS の薬物キャリアとしての応用を目指し、現在までにさまざまな多孔質粒子が報告されている。しかし、「空孔数や空孔径の制御が極めて難しいため表面形態や内部構造が不均一になる」「タップ密度が 0.1〜0.3g/cm^3 程度である」など、実用化に向け解決すべき課題が極めて多いのが現状である。

本講演者は、高分子乳化剤や疎水性高分子の組成、撹拌回転数などを制御することによって、「『1 回のみ』の機械乳化操作で『多孔質』粒子が形成する」現象 [8]を発見している。これは、「高分子乳化剤の存在下で水と油を接触させるだけで自然に乳化が進行し（自己乳化現象）、粒子形成のプロセスにおいても自己乳化が保持される」という独自に見い出した現象である。一般に、多孔質粒子を形成するためには、「2 回」の機械乳化操作が必要となる上、得られる粒子の表面構造は不均一に破壊され、空孔径・空孔数の制御は極めて難しい。一方、本講演者の発見は「1 回のみの機械乳化操作」で多孔質粒子を形成した初めての報告例である。現在までに報告されている自己乳化現象を引き起こす物質の多くが低分子か低分子界面活性剤であり、その発生機構は未解明の点が多い。また、従来技術で作製した多孔質粒子のタップ密度は 0.1〜0.4 g/cm^3 程度であるが、自己乳化現象を利用した本研究の多孔質粒子の作製技術によって、0.05 g/cm^3 という世界最高レベルの「超低密度」を示すさまざまな表面形態の多孔質粒子を作製することが可能になった [8,9]。これは、自己乳化という弱い乳化現象を利用して内部構造を構築する独自の手法を用いることによって、一般的な方法（発泡や 2 回の機械乳化など）で得られる多孔質粒子よりも内部の空隙が大きくなっているためである。また、この「超低密度」多孔質粒子は気管支以降の肺深層部への送達率が高く、粒子に保持した薬物の体内移行率が極めて高いことも近年明らかになっている。さらに、肺内の免疫機構を回避できると考えられる 5 μm 以上の粒径を有する「超低密度」多孔質粒子が、治療効果を期待できる部位において多く沈着する性質を示すことも明らかにした [10]。すなわち、この「超低密度」多孔質粒子は、「高い肺送達能」と「肺内の免疫機構からの回避能」を両立できるバイオマテリアル（薬物キャリア）としての応用が期待できる。この「超低密度」多孔質材料作製法は他の材料形態にも適用可能であり、両面の多孔質構造が異なるシート [11]が容易に得られる。自己乳化現象を巧みに利用することによって、シートやファイバーなどのさまざまな形態の有機・無機材料を低密度化することが可能になれば、数多くの既存マテリアルの新たな用途・機能開拓の実現にもつながると期待される。

1) Murakami *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 80A, 421-427 (2007)
2) Murakami *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 91B, 102-108 (2009)
3) Murata *et al.*, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 153, 19-26 (2017)
4) Uchida *et al.*, *J. Polym. Sci: B. Polym. Phys.*, 51, 124-131 (2013)
5) Ito *et al.*, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 163, 257-265 (2018)
6) Moroishi *et al.*, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 102, 597-603 (2013)
7) Moroishi *et al.*, *Materials*, 11, 2588 (12 pages) (2018)
8) Takami and Murakami, *Langmuir*, 30, 3329-3336 (2014)
9) Nishimura and Murakami, *Langmuir*, 37, 3075-3085 (2021)
10) Nishimura *et al.*, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 159, 318-326 (2017)
11) Nishimura and Murakami, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 614, 126149 (2021)

Key words block copolymer, gel, sheet, particle, spontaneous emulsification

S3H2 (1501) カルチャーコレクション NBRC の極限環境微生物とその産業利用に向けた取り組み

○森浩二*
（NITE バイオテクノロジーセンター）

Extremophiles in NBRC, and the efforts for their industrial usage

○Koji Mori*
(NBRC, NITE)
mori-koji@nite.go.jp

NITE バイオテクノロジーセンター（NBRC）は，糸状菌，酵母，細菌，放線菌，古細菌，微細藻類及びファージなど幅広い微生物を保存・提供しているコレクションであり，現在約 9 万株（NBRC 株約 3 万株，スクリーニング用 RD 株約 6 万株）を保有する. NBRC のカルチャーコレクション業務が 2002 年に公益財団法人発酵研究所（IFO）のコレクションから譲渡された 15,000 株から始まったが，これに先んじて 1993 年よりゲノム解析を実施し，NBRC は極限環境微生物である *Pyrococcus horikoshii*，*Aeropyrum pernix* 及び *Sulfurisphaera tokodaii* の全ゲノム配列を決定し，公開した．IFO から譲渡された極限環境微生物が好酸性好熱性古細菌や高度好塩性古細菌など数種類に限られていたが，コレクション開設後に幅広い極限環境微生物を受入・提供するに至っている．本講演では NBRC が保有する極限環境微生物を紹介するとともに，その利用に向けた取り組みを紹介する．

極限環境微生物は，その培養において極限環境と同様な培養環境を構築しなくてはならず，しばしば特殊な培養方法や培養器具が必要となることもあり，ユーザーが利用を躊躇しがちである．このため，NBRC ではゲノムでの提供や乾燥標品からの復元培養サービスなどを行っている．一方で，極限環境微生物は高額な機材はなくとも概ね培養できると考えており，その培地作製方法や培養法などテクニカルな技術相談に応じることでハードルを下げていきたい．

極限環境微生物に限らないが，微生物を取り扱うにあたって安全性への配慮が必要であり，さらには微生物を産業利用するにあたって生物多様性条約，名古屋議定書やカルタヘナ法への対応など考慮すべきことも多い．NBRC では，それらへの支援業務や情報提供（微生物有害情報リスト，微生物有害性遺伝子情報データベースなど）も行っている．また，どんな有用な微生物資源も死滅してしまえば元も子もない．NBRC の保存技術を利用できるサービスとして，バックアップ保管や L 乾燥標品作製サービスを行っている．

微生物の分野においても様々な情報やデータがデジタル化されており，それらを最大限に活用することで産業・研究を発展させ，イノベーションを起こすことが求められている．NBRC では，微生物とその関連情報を一元化した「生物資源データプラットフォーム（DBRP）」を構築し，公開している．保有する微生物を中心に、微生物のカタログ情報に加え，物質生産や薬剤耐性などの情報，文献情報，ゲノムなどのオミックス情報といった様々な情報を関連するデータベースから収集し，微生物にひもづけて登録し，利用者に検索しやすい情報提供環境の構築をめざしている．

Key words extremophile, culture collection

S3H2 (1502) バイオリソース提供事業と リソースを利用した新規有用酵素探索の紹介

○澄田智美 [1]*
（[1] 海洋研究開発機構）

Introduction of the deep-sea bioresource open innovation project and search for valuable enzymes using the deep-sea bioresources

○Tomomi Sumida[1]*
([1]JAMSTEC)
sumidat@jamstec.go.jp

海洋研究開発機構(JAMSTEC)では、深海に生息する微生物に関する様々な研究が行われてきました。深海という暗黒で低温、高圧、時に熱水噴出孔などでは超高温となる極限世界においても、実に様々な生物多様性が維持されています。深海に生息する微生物は、極限環境に適応するために、陸上の微生物とは異なる特有の生存戦略を持っていることから、新規生理活性物質や有用酵素を探索する上で非常に重要なバイオリソースとなり、新しい技術開発やイノベーションの創出に繋がる有用なツールを発見できる可能性があります。しかしながら、研究船や探査機を所有していない機関では深海の試料採取が困難で、深海バイオリソースを利用した研究を行うことが出来ませんでした。そこで JAMSTEC では深海微生物の産業利用の促進を目指して、民間企業や外部機関と連携したオープンイノベーション体制を整備し、2020 年 2 月から深海バイオリソース提供事業を開始しました。

＊深海バイオリソース提供事業：http://www.jamstec.go.jp/cebn/bioresource/j/

本発表では、深海バイオリソース提供事業の紹介、深海バイオリソースを用いたこれまでの研究成果と今後提供予定の深海メタゲノム情報を利用した研究に関して紹介します。JAMSTEC では、深海微生物の単離及びその微生物の新規機能を解明する研究のために研究船や探査機を用いて採取した試料等を、深海バイオリソースとして提供しています。現在、微生物単離源として様々な地点・深さの深海堆積物と、スクリーニング株として約 4500 株の深海微生物株がご利用いただけます。また、今後深海メタゲノム情報の提供も検討しています。深海メタゲノム情報には、深海環境に固有の微生物および培養の困難な細菌の遺伝子情報も多く含まれており、遺伝子資源としてその利用価値は高いと思われます。そこで深海メタゲノム情報の有用性を検討するために、既報の酵素では腸内細菌など宿主感染型の細菌由来の配列が主に登録されている糖質分解酵素を対象にして、腸内環境とは全く異なる深海メタゲノム情報を用いて探索を行った結果、既報の酵素と相同性が 20%以下の難培養性細菌由来の候補配列を得ることができました。この配列を手がかりとしてさらに再検索を行った結果、細菌だけでなく古細菌から真核生物にまで広く分布する新規酵素群を発見しました。このように、深海バイオリソースは有用なバイオ資源であると考えられ、今後は深海バイオリソース提供事業を通じて様々な機関と連携し、深海バイオリソースの産業的利用や技術革新、イノベーションの創出に繋げていきたいと思っています。

Key words bioresources, screening, enzyme, metagenomic libraries

S3H2 (1503) Commercial application of an extremophilic red alga *Galdieria sulphuraria* for a circular economy

○Eri Adams
([1]Galdieria, Co., Ltd.)

Commercial application of an extremophilic red alga *Galdieria sulphuraria* for a circular economy

○Eri Adams
([1]Galdieria, Co., Ltd.)
eri_adams@galdieria.com

A red microalga *Galdieria sulphuraria* is a thermoacidophile which thrives in the vicinity of sulphur springs. This extremophile withstands temperatures up to 56 C and pH as low as zero. Metals are highly soluble in these environments and *G. sulphuraria* acquired tolerance to high concentrations of heavy metals and perhaps an ability to 'collect' precious metals such as gold and palladium. Due to increasing demand and limited supplies of mined gold and palladium, recovering these metals through urban mining utilising an environmentally friendly technology, biosorption, is a viable and appealing option.

The biosorbent capacity of *G. sulphuraria*, without modification or extensive pre-treatment, showed naturally high and selective metal collection for gold and palladium in highly acidic solvents commonly found in industrial wastewater. The optimal reaction conditions were determined and the mechanism by which the metals are recovered by the biosorbent was elucidated at the atomic level using a series of analytical tools including XAFS, SEM, TEM, FT-IR and XPS. It was found that the metals are adsorbed on the surface of the cells forming nanoparticles and the adsorption mechanisms are different for gold and palladium. Re-usability of the biosorbent was tested and improved through optimisation of elution and conditioning. Our challenges in metal recovery from actual wastewater and application of the technology for replacing highly toxic substances currently used such as mercury and cyanide in artisanal and large-scale gold mining operations will also be discussed.

A quality required for successful industrialisation of microalgae is an ability to grow them fast at minimal cost. *G. sulphuraria* is capable of utilising various organic compounds including sugars as a carbon source and grows heterotrophically as well as autotrophically to high biomass concentrations. Our efforts to improve the efficiency of cultivation will be introduced. Lastly, the commercial potential of *G. sulphuraria* beyond its use as biosorbent and a blueprint of how we would like this extremophile to contribute to reduction of negative environmental impacts from human activities and consequently to a circular economy are presented.

Key words *Galdieria sulphuraria*, gold, palladium, biosorption

S3H2 (1504) 国内温泉から単離された超高速度増殖能を有する独立栄養水素細菌の産業応用に向けた機能開発

○石井 正治[1]*, 亀谷 将史[1], 兒玉 徹[2], 新井 博之[1], 湯川 英明[2]
([1]東大院・農生科, [2]CO2 資源化研究所)

Development of functions of autotrophic hydrogen-oxidizing microorganism with significant growth ability, which was isolated from domestic hot spring, for the industrial application

○Masaharu Ishii[1]*, Masafumi Kameya[1], Toru Kodama[2], Hiroyuki Arai[1], Hideaki Yukawa[2]
([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Utilization of Carbon Dioxide Institute Co. Ltd)
141masaharu@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

本講演で取り上げる *Hydrogenophilus thermoluteolus* は、生育至適温度 52℃の高温性水素細菌である。本菌は、水素、酸素、二酸化炭素の混合ガス気相下で、完全無機培地に生育できる。しかも、こうした独立栄養条件下において、約 1 時間で倍加するという超高速度増殖能を有している細菌である。なお、本菌は酢酸、酪酸、リンゴ酸等の有機酸を唯一炭素源かつエネルギー源としても生育可能であり、通性独立栄養性を示す。

東京大学と CO2 資源化研究所では、多年にわたる連携的な研究を推進しており、本講演においては、これまでの成果、さらには今後の展望について紹介し、究極の炭素資源である二酸化炭素を独立栄養微生物（水素細菌）により有機資源化するプロセスについて提示する。

＜*Hydrogenophilus thermoluteolus* について＞

本菌は、分類当初は *Pseudomonas hydrogenothermophila* と記載されていたが、16S rRNA 遺伝子配列の解析により新属新種 *Hydrogenophilus thermoluteolus* と再分類されている (1)。なお、本菌の全ゲノムも解読されている (2)。

＜二酸化炭素固定系と関連代謝について＞

本菌は、カルビンベンソンサイクルにより二酸化炭素を固定していることが遺伝子並びに酵素レベルの実験において明らかにされている (3,4)。本菌が酢酸を唯一炭素源かつエネルギー源として生育する時にはグリオキシル酸経路が機能すること、さらには、カルビンベンソンサイクルの鍵酵素 RubisCO のオキシゲナーゼ反応によって生じる 2-ホスホグルコン酸はその後グリオキシル酸に代謝され、グリオキシル酸経路中の酵素、リンゴ酸合成酵素、によりリンゴ酸に変換され代謝されることも分かっている (5)。

＜ポリ－β－ヒドロキシ酪酸（PHB）蓄積と炭素代謝収斂について＞

本菌は窒素飢餓条件になると速やかに菌体内に PHB を蓄積するようになり、極めて短時間（概ね 6 時間以内）に強い炭素代謝収斂性（PHB 生産性）を示すことが明らかになっている(6) 。この炭素代謝収斂性については、ものづくりに活かすなど研究を展開させている。本発表においては、予備的知見にも基づき、我々が把握している代謝収斂の全体像も示したい。

＜遺伝子組換え系について＞

各種生化学的研究のツールとして、遺伝子組換え系が必須であり、本菌でも数種類の系が利用可能となっている。

＜今後の研究展開について＞

水素社会がごく近未来に見えてきている現在、水素をエネルギー源とする水素細菌の未来もハッキリと見えてきている。

究極の炭素資源である二酸化炭素を、水素ならびに水素細菌を最大限利活用して、如何に有機資源化するか、さらには循環させていくか、例を挙げつつ提案する。

(1) Hayashi, NR *et al.* Int. J. Syst. Bacteriol. 49:783-786 (1999)
(2) Arai, H *et al.* Microbiol. Resour. Announc. 8:e01132 (2019)
(3) Chung, SY *et al.* J. Ferment. Bioeng. 78:469-471 (1994)
(4) Hayashi, NR *et al.* Biosci. Biotech. Biochem. 64:61-71 (2000)
(5) Nguyen, TH *et al.* J. Jpn. Soc. Extremophiles, 16:27-36 (2017)
(6) Nguyen, TH *et al.* J. Biosci. Bioeng. 127:686-689 (2019)

Key words *Hydrogenophilus thermoluteolus*, hydrogen-oxidizing bacteria, production

S3H2 (1601) 微生物に新規化合物を求めて

○長田　裕之
（理研環境資源科学研究センター）

Exploration of new bioactive compounds from microorganisms

○Hiroyuki Osada
(RIKEN Center for Sustainable Resource Science)
osadahiro@riken.jp

1940-50 年代に微生物から抗生物質が続々と発見され、その後、抗生物質だけでなく高脂血症治療薬のスタチン類や免疫抑制物質のタクロリムスなどの有用化合物が微生物から単離された。しかし、新規微生物代謝産物の発見は、1990 年代をピークとして、その後は減少傾向にある。とは言っても、微生物代謝産物の化学構造と活性は、創薬資源として依然として魅力的なので、微生物から新規化合物を見出す努力は続いている[1, 2]。

本講演では、微生物が生産する新規化合物の発見を目指して我々が行ってきた研究について紹介する。

１）微生物の分離源を工夫した例：

微生物は、地球上に数百万種以上存在すると推定されているが、その大部分は通常の実験室条件では分離できないか培養できない。そういった未だ培養できない微生物は「微生物ダークマター」とも呼ばれ、多くの研究者の注目を集めている［3]。微生物ダークマターは、未知化合物の探索源として期待されているのだ。

1950 年代に世界中の製薬企業が挙って抗生物質の探索を行った。よく 99%の微生物は、まだ分離されていないと言われるが、放線菌門（*Actinobacteria*）に関しては 80%以上が分離されたという推察もある［4]。したがって、微生物創薬を目指す研究者の多くは、主要な放線菌（*Streptomyces* 属）以外の稀少放線菌や糸状菌、さらに特殊な微生物を分離して新規化合物をスクリーニングしている。

我々も、極限環境微生物研究の先駆者・掘越弘毅先生（1932-2016）が分離した微生物を培養して、その生物活性物質の探索をしたことがある。アルカリ培養、高温培養など、出来る限り極限微生物の分離源に近い培養条件で、培養液を調製した。抗細菌、抗真菌、殺細胞活性など幅広いスクリーニング系に供したが、100 種類ほどの培養液から、活性物質は一つも見出せなかった。抗生物質は、微生物同士の生存競争やクオラムセンシングに必要だという説があるが、特殊な環境では競合する相手がいないので、抗生物質を作らないのではないかと推測して、本共同研究を終了した。

次に、極端な深海ではなく、2-300 メートルほどの海底土壌中の微生物から、糸状菌を分離して、がん細胞の増殖阻害剤や分化誘導物質のスクリーニングを行った。私の恩師・磯野清先生（1931-）は、理研を定年された後、東海大海洋学部に移られたので、東海大学の海洋実習船で海底土壌を採取してもらい、真菌類機能開発研究所が糸状菌の分離と培養を担当した。最初は、海水に近い昆布茶培地を用いて菌の培養を行ったが、生育が遅く代謝産物の種類も少なかったため、その後は通常のジャガイモでんぷん培地を用いた。

その結果、静岡県駿河湾沖の海底土壌由来の糸状菌 *Penicillium sp.* 1689-P から新規化合物 epolactaene を見出した[5]。さらに、静岡県三保湾沖の海底土壌由来の糸状菌 *Penicillium sp.* BM923 から acetophthalidin、静岡県大井川沖の海底土壌由来の糸状菌 *Aspergillus sp.* BM939 から tryprostatin A, B、spirotryprostatin A, B、cyclotryprostatin A-D など多くの新規化合物を見出した[6-8]。しかし、これら糸状菌は、海洋に固有の菌ではなく、土壌中に生育していた菌が海中に流れ出たものである。貧栄養状態でほとんど生育できなかった環境から、良好な生育環境に切り替わったため、二次代謝が一時的に活性化されたのではないかと推測した。実際、菌の培養を継続すると、二次代謝能を失った例が見られた。

２）微生物の培養条件を工夫した例：

微生物のゲノム解読が進んだ結果、微生物（糸状菌および放線菌）のゲノム中には多数の二次代謝産物の生合成遺伝子（ポリケチド合成酵素 PKS、非リボソームペプチド合成酵素 NRPS）が存在することが明らかになった[9]。しかし、通常の培養条件で生産される化合物は少数で、培養条件を検討することで新規化合物が見出された例が多い。

我々は、放線菌、糸状菌を様々な培地で培養し、その代謝産物を液体クロマトグラフィーと質量分析装置（LC-MS）で分析し、得られた情報を多変量解析（主成分解析）した。その結果、培地の違いで微生物の代謝産物に様々な変化が見られた[10]。

Ascamycin 生産菌である *Streptomyces sp.* 80H647 株は、オートミールを主成分とする培地では、nocardamin 類を、コーンスティープリカーを主成分する培地では、tryptamine 類とγ-butyrolactone glycoside を生産した[10]。糸状菌 *Trichoderma sp.* RK10-F026 株は、YES 培地（yeast extract, sucrose が主要成分）では 20-mer の新規 peptaibol 類を、YMGS 培地（yeast extract, malt extract, glucose, soluble starch が主要成分）では 11-mer の新規 peptaibol（Zealpeptaibolin）を生産することを明らかにした[11]。培地中の何らかの化学物質が、遺伝子発現のスイッチを切り替えていると推定できるが、その特定には至っていない。

放線菌 *Streptomyces sp.* SN-593 株は、トマトエキスを含む培地で reveromycin A の生産が向上したので、トマトから二次代謝を活性化する成分の精製を試みた。トマトから活性物質を単離することはできなかったが、reveromycin A の生産を向上させる化合物として β-carboline（BR-1 と命名）を見出した[12]。BR-1 は LuxR ファミリー転写因子に結合することによって reveromycin A の生合成を促進することを明らかにした。BR-1 は、他の放線菌の LuxR ファミリー転写因子にも結合して二次代謝を活性化することを明らかにした。

[1] Keller NP: Nat Rev Microbiol. 17: 167-180 (2019)
[2] Osada H: J Antibiot. 72: 855-864 (2019)
[3] Lok C: Nature 522: 270-273 (2015)
[4] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH: Microbiol Rev. 59: 143-169 (1995)
[5] Kakeya H et al: J Antibiot. 48: 733-735 (1995)
[6] Cui CB et al: J Antibiot. 49: 527-533 (1996)
[7] Cui CB, Kakeya H, Osada H: Tetrahedron 52: 12651-12666 (1996)
[8] Osada H: Curr Med Chem. 10: 727-732 (2003)
[9] Ikeda H et al: Nat Biotechnol. 21: 526-531 (2003)
[10] Lopez JAV et al: J Antibiot. 72: 991-995 (2019)
[11] Rawa MSA et al: J Antibiot. 74: 485-495 (2021)
[12] Panthee S et al: Sci Rep 2019: e5802 (2019)

Key words　microbial metabolites, bioactive compounds, secondary metabolites

S3H2 (1602) 誰も培養したことがない北極と南極の菌類の探索と産業利用への挑戦

○辻　雅晴[1]*
（[1]旭川高専・物化）

Study for exploring the High Arctic and Antarctic fungi that no one has cultured before and challenging them for industrial use

○Masaharu Tsuji[1]*
([1]NIT, Asahikawa Coll.)
spindletuber@gmail.com

一般的に微生物の 99%以上は未培養であると言われている．菌類の種数については，150 万種とも 500 万種とも様々な推計がされている．現在までのところ，約 12 万種の菌類が報告されていることから，菌類においても約 92%～98%が未培養の菌類ダークマターとでもいう存在となっている．

日本の南極観測の拠点である昭和基地周辺からの菌類は，1961 年に椿啓介博士 (当時,発酵研究所,1924 年～ 2005 年) が報告したのが始まりだ．その後，椿らによって 1965 年までの 4 年間で 4 本の論文が発表され,子のう菌類 12 種，担子菌類 4 種が報告されている．その後，昭和基地周辺の菌類については，筆者が 2013 年に報告するまで約 50 年間報告はなく，2012 年までに基地周辺から報告された菌類の割合は南極全体から報告された菌類の 2%以下だった．

筆者らは，1960 年代以降菌類の報告がなかった南極の昭和基地周辺において，昭和基地がある東オングル島とそこから約 60 km 離れたスカルブスネス露岩域の 2 地点における菌類の多様性調査を行った．その結果，東オングル島では，*Vishniacozyma* 属，*Naganishia* 属，*Cystobasidium* 属などの担子菌酵母が優占していたのに対し，スカルブスネス露岩域では *Mrakia* 属，*Cryptococcus* 属などの担子菌酵母，*Thelabolus* 属などの子のう菌類が優占していた．南極大陸では，環境が厳しくなるにつれ,担子菌類の中でも単細胞の菌類である担子菌酵母の占める割合が増える．両地域でも担子菌酵母が優占していることは共通していたが，出現する属や種は全く異なっていた．この菌類調査で採取した菌類を ITS 領域と D1/D2 領域を使った分子系統解析および生理生化学的な解析を行った結果，筆者らは幸運にも *Cystobasidium tubakii* と *C. ongulense* という 2 種の新種の菌類を日本の南極観測史上初めて見出すことができた．

これらの研究の成果もあり，2013 年から 2019 年までの 7 年間で昭和基地周辺から報告した菌類の種数は 16 種から 77 種と約 4.8 倍まで増加した．

昭和基地における冬季の気温は-40℃前後で，南極の昭和基地では 1 年のうち 10 ヶ月間は平均最高気温がマイナスとなっている．つまり，昭和基地では 1 年の大半が 0℃以下の気温となる．では，南極に生息している菌類は氷点下でも成長するのだろうか？ 筆者は昭和基地のある東オングル島から分離した生育上限温度が 15℃以下の好冷菌から 30℃まで成長が可能な耐冷菌までの 16 種を選抜し，-3℃で培養することで氷点下における成長能を調べてみた．-3℃という培養温度は，インキュベータなどの温度の誤差を考慮すると，菌類の培養実験で広く使われている YPD 液体培地やポテト・デキストロース寒天培地が凍らない下限の温度である．その結果，至適増殖温度や増殖上限温度に関わらず，全ての種で-3℃での増殖を確認した．南極に生息している菌類は，-35℃まで呼吸をしているという報告もあることから，氷点下でも休眠せずに活動しているようだ．

筆者らは，文部科学省の北極域研究推進プロジェクト（ArCS）とその後継プロジェクトである北極研究加速プロジェクト（ArCS Ⅱ）の中で世界最北端の有人島と知られているカナダ高緯度北極にあるエルズミア島での菌類調査も行っている．世界最北端の有人島であるカナダ・エルズミア島の菌類については，筆者が報告するまで報告はなかったが，これらの調査の結果，北極からは *Gelidaterema psychrophila* と *Mrakia arctica, Mrakia hoshinonis , Vishniacozyma ellesmerensis* の 4 種を新種の菌類として見出すことができた．またエルズミア島も 1 年間のうち 9 ヶ月間は平均最高気温がマイナスとなっており，この島から見出した 4 種の菌類全てが，南極の菌類と同様に-3℃でも成長できることを確認した．

南極や北極に生息している菌類に共通した特徴として，-3℃という氷点下でも成長が可能ということの他に，アミノ酸要求性やビタミン要求性がないことがあげられる．これらの特徴は，貧栄養で 1 年のうち 9～10 ヶ月が氷点下という過酷な極地の環境で生存するために獲得した能力だと思われる．これらの菌類は，氷点下でも成長する能力や氷点下でも活性のある酵素など低温で優れた特徴を持っている． これらの特徴は低温でのバイオプロセスや排水処理、食品加工や洗剤など様々な分野での利用が期待できることから，南極や北極に生息している菌類は，新たな微生物資源として注目を集めている．

本講演では，以上の内容に加え，筆者がこれまで行ってきた南極や北極から新規菌類を取得するための取り組み，次世代シーケンサーを用いた多様性解析やさらに極地から取得した菌類を産業への利用を目指す試みなどについて紹介したい． また時間があれば南極産菌類の省エネ戦略の解明に向けた取り組みについてもご紹介したい．

Key words　Antarctica, High Arctic, fungus, bioprospecting

S3H2 (1603) 難培養性微生物とは何か？どうしたら培養できるのか？

○青井議輝[1]*, Jung Dawoon[1], 町田 光史[2], 中尾 洋一[2]
（1 広島大院・統合生命, 2 早稲田大・理工学術院）

What are uncultivables and how can we grow them?

○Yoshiteru Aoi[1]*, Jung Dawoon[1], Koshi Machida[2], Yoichi Nakao[2]
([1]Hiroshima Univ., [2]Waseda Univ.)
yoshiteruaoi@hiroshima-u.ac.jp

【難培養性微生物とは何か】

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。

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、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。

本講演では、主に海洋性カイメン由来の微生物をサンプル源として、網羅的に微生物を獲得して得られた結果について紹介しつつ、難培養性微生物の本質について議論することとする。

【新しい分離培養手法と難培養性微生物の本質を解明する取り組み】

本研究で用いた新規培養手法の一例を以下に挙げる。

1）微生物の罠[1]：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）in situ 培養[2) 3)]：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）。

3）超高密度植菌法[4) 5)]：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。

4）自身が産出する代謝物に感受性の高い微生物の選択的獲得[6)]：固体培地でコロニーを形成しにくい（またはコロニーを形成しない）微生物を選択的に獲得することで多くの未培養微生物を獲得することが可能になる。

さらに、上記の手法を通じて獲得した微生物を解析したところ、難培養性微生物に共通する以下のような性質を見出すことができた。

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。

【まとめと今後の展望】

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。

1）Tandgan et al., Plos One 2014.
2）Aoi et al., Manuals of Environmental Microbiology 4th edition, 2016.
3）Jung et al., Front Microbiol, 2021.
4）Seo et al., in preparation
5）特許第 6785465, 2020.
6）Jung et al., submitted.

Key words microbial cultivation, uncultivated microorganisms, dormancy and awakening, microbial interactions

S3H2 (1604) 土壌微生物から発見された新規バイオポリマーの実用化

○佐藤俊輔[1]*
（[1]株式会社カネカ Pharma & Supplemental Nutrition Solutions Vehicle バイオテクノロジー研究所）

Road to commercialization of novel biopolymer discovered from soil bacterium.

○Shunsuke Sato
([1]KANEKA CORPORATION)
Shunsuke.Sato@kaneka.co.jp

1991 年、当時の鐘ヶ淵化学工業株式会社（現カネカ）高砂工業所の土壌から、新規構造を有するポリヒドロキシアルカノエート(PHA)を蓄積する微生物（*Aeromonas cavae* FA440）が発見された。この新規 PHA は 3-hydroxybutyrate (3HB) と 3-hydroxyhexanoate（3HHx）2 種類のモノマーから構成される PHBH であった。当時は炭素数 4、及び 5 のモノマーから構成される short chain length PHA (scl-PHA)並びに炭素数 6 以上のモノマーから構成される medium chain length PHA (mcl-PHA)は知られていたものの、scl と mcl からなる共重合 PHA の存在は知られておらず、新規ポリマーとしてカネカが物質特許を取得した。

当時から、PHA をプラスチック代替材料として利用する研究は成されていたが、scl-PHA は結晶性が高く、硬くて脆い性質を有しており、ポリマー材料としての使用は困難であった。また、mcl-PHA は結晶化度が非常に低く、エラストマー様ポリマーであり、構造材料としての利用は出来ない材料であった。

一方で、PHBH は scl-PHA と mcl-PHA の中間性質を有しており、結晶性を有しつつ、その 3HHx 比率によって結晶化度が大きく変化することで、成形加工性と物性を両立することが可能な物性を有していた。

しかしながら、*A. caviae* の PHBH 生産性は低く、工業生産には不向きであったため、当時最先端の遺伝子工学手法による微生物育種を目指し、理化学研究所との共同研究を進めた。1997 年に理化学研究所にて *A. caviae* から PHBH 重合酵素遺伝子のクローニングに成功し、遺伝子工学による微生物育種が可能となった。*A. caviae* 由来の PHBH 重合酵素は scl-PHA を重合する class I PHA synthase に分類される酵素に近いアミノ酸配列であるが、mcl-PHA に属する 3-hydroxyhexanoate モノマーを重合する活性があることが判った。これらの結果から、微生物による PHA の重合はそれまで確認されてきた分類よりも曖昧な基質認識であり、環境微生物は、より多様な PHA を重合可能であることが示唆された。

PHBH の発見から 20 年間の生産研究を経て、2011 年には 1000 t /年規模の実証プラント稼働、30 年後の現在では 5000 t /年規模へと生産量を増強しつつ、バイオエコノミー社会における革新的ポリマー材料として社会実装を進めている。

自然環境中には 30 年前の PHBH のように、未だ発見されていない新規有用物質が多くあると考えている。目的を持った微生物スクリーニングとその後の応用研究によって、今後も環境調和型素材が多く発見、実用化されることを期待している。

Key words Biodegradable polymer, *Aeromonas caviae*, polyhydroxyalkanaoate

S3H2 (1605) 培養したからこそ見えてきたヒト腸内細菌の生態と機能

○渡邊 洋平[1*]
([1]ヤクルト中央研究所)

The ecology and function of human intestinal bacteria revealed by cultivation

○Yohei Watanabe[1*]
([1]Yakult Central Institute)
yohei-watanabe@yakult.co.jp

腸内細菌叢が宿主の健康に大きくかかわることがわかってきた。消化管上皮細胞へのエネルギー供給、病原細菌の定着阻害、免疫系の成熟促進、脳への働きかけなど、腸内細菌叢が宿主に与える影響は多岐にわたる。一方、第二世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析等により、ヒトの消化管には一人あたり数百種類、数十兆個の腸内細菌が存在することが明らかとなってきた。膨大な数の細菌が高密度で存在することから、腸内には極めて多様な菌種間相互作用ネットワークが存在すると考えられる。したがって、腸内細菌叢は、腸内環境に適応して進化してきた多数の菌種により構成される、複雑な生態系として捉える必要がある。そして、腸内細菌叢が宿主に与える影響を正しく理解するためには、生態系としての特性を理解することが重要である。しかし、腸内細菌の多くは未培養であったことから、どのような機能を持つ菌種が生態系中に存在するのか不明な点が多かった。そこで我々は、腸内細菌叢の機能をより深く理解することを目的として、ヒトの未培養腸内細菌の単離を試みた。延べ 28 人の便を、合計 102 パターンの培地に塗抹し、1049 コロニーを単離して系統解析した結果、多数の新菌種が含まれることがわかった。それらについて詳細な生化学性状解析を行い、最終的に 2 新科（*Christensenellaceae* 科、*Sutterellaceae* 科）、 4 新属（*Christensenella* 属、*Paraprevotella* 属、*Parasutterella* 属、*Succinatimonas* 属）、18 新菌種の提唱に至った。本講演では、これらを培養したからこそ見えてきた、腸内細菌の腸内環境適応戦略を中心に、未知だった菌種が宿主の健康状態に与える機能について紹介する。

これらの菌種の特性を調べたところ、多くは糖を増殖源として利用できる菌種であった。食事中の糖は下部消化管に豊富に到達することから、腸内細菌の重要な増殖源である。そのため、糖を利用できることは、他の腸内細菌との競争において重要な性質であると考えられ、実際にこれまで単離されているヒト腸内の最優勢菌種の多くは糖を利用できる。一方で、興味深いことに、18 新菌種の中には、糖を直接増殖源として利用することはできないが、その分解産物である有機酸を利用できる菌種が含まれることがわかった。

その代表例は、*Phascolarctobacterium* 属の新菌種 *P. succinatutens* である。この菌種は、コハク酸のみを資化可能であった。コハク酸は健康なヒトの糞便からはあまり検出されない有機酸である。本菌種の分布を検証した結果、意外なことにヒト腸内において準優勢菌種と呼べるほどに検出頻度および菌数レベルが高いことがわかった。共培養実験の結果、*P. succinatutens* は、糖からコハク酸を産生する他菌種に大きく依存してヒト腸内に定着していることが示唆された。糖からコハク酸を産生する菌種は腸内に豊富に存在することから、他菌種との獲得競争が激しい糖は利用せず、その代謝産物の利用に特化するという適応戦略が、ヒト腸内環境において成立しうることが明らかとなった。

一方、我々が単離した菌種が宿主に与える影響については、新種提唱時はほとんど何もわかっていなかった。しかし近年、これらの一部が宿主の健康状態に影響を与えるとの報告が増えてきた。多くの研究で、生きた菌体を用いた検証により特定菌種と宿主の健康状態との関連が示されている。講演では、単離菌体を用いたからこそ明らかとなった、未知「だった」菌種の機能の代表例についても紹介したい。

Key words cultivation, uncultured bacteria, microbial interaction

S3H3 (1701) 世界で拡がるナノセルロースの生産と利用

○平田悟史*
(エンパシード)

Production and Utilization of Nanocellulose in the World

○Satoshi Hirata
(Empacede)
satoshi.hirata@nanocellulose.biz

【はじめに】 鉄の 5 倍の強度で 5 分の 1 の重さというキャッチフレーズのセルロースナノファイバー（CNF）が注目されるようになってから 8 年が経過した。木材などのセルロース繊維を解繊して得られる CNF を樹脂に混ぜることで、高強度・軽量の複合材料を開発し、自動車・家電製品に使うという動きが日本では活発だが、世界的に見ると、他の種類のナノセルロースを別の目的で使うための研究が進んでいる。

【ナノセルロースの種類】 ナノマテリアルは縦・横・高さのいずれかの長さが 1～100 nm の物質であり、ナノセルロースはセルロースが主成分のナノマテリアルである。学術的な分類ではないが、次の 4 種類に分けられることが多い。

①セルロースナノファイバー（＝セルロースナノフィブリル）（CNF）
主に植物のセルロース繊維を解繊して作られた繊維状のナノセルロースで、繊維径は 3～100 nm、繊維長は数 μm～数百 μm。

②セルロースナノクリスタル（CNC）
主に植物のセルロース繊維を酸で分解して得られる紡錘形のセルロースで、繊維径は 3～50 nm、繊維長は 1 μm 以下。

③バクテリアナノセルロース（＝バクテリアセルロース）（BNC）
糖類を原料にして酢酸菌によって生合成されたナノセルロース。繊維径は 20～50 nm、繊維長は数 μm～数百 μm。ナタデココやコンブチャの成分でもある。

④チュニケート由来のセルロースナノファイバー（t-CNF）
ホヤという海産動物の外皮に含まれるナノセルロース。セルロース純度が高い。

【ナノセルロースの生産】 日本国内でナノセルロースを商業生産している（自社利用のみ、食品利用の場合を除く）会社は 22 社あり、うち CNF を生産している会社が 21 社、BNC を生産している会社が 1 社となっている。一方海外では CNF を生産している会社が 43 社、CNC が 20 社、BNC が 6 社、t-CNF が 1 社確認されている。

ナノセルロースに関する研究開発・実用化が盛んな地域は、北米、北欧、中国、日本の 4 つだが、この中で日本は唯一、CNC を商業生産していない。CNC は乾燥することができるので、原料の調達コストやエネルギーコストが安い地域で生産し、長距離輸送することで、日本国内での需要に対応できる。

この数年の間に、ナノセルロースの生産が世界に広まった。さきほど紹介した地域以外では、オーストラリア、インド、イラン、マレーシアでも、小規模ながらナノセルロースの商業生産が始まった。ナノセルロースは炭素繊維と比較されることが多いが、特殊な原料と高価な設備がないと製造できない炭素繊維と違い、セルロースを含む原料と実験設備があれば比較的簡単に製造できるため、今後、コモディティ化が進むことは間違いないと思われる。

【ナノセルロースの利用】 ナノセルロースが持つ特性を活かして、さまざまなアプリケーション開発が進められている。公開情報をもとにナノセルロースを使ったエンドユーザー向け商品の数を調べると、その数は日本が一番多い。ただそれらがキラーアプリケーションかというと、必ずしもそうではない。CNF を使用した A 社の商品と、CNF を使用していない B 社の商品を比べたとき、性能の点で A 社の商品が抜きんでているというケースはほとんどなく、B 社の商品の方が市場で大きなシェアを占めているケースが多々ある。また同じ A 社の中でも、CNF を使用した商品と、使用していない商品を併売し、新製品では CNF の使用をやめたケースもある。

過去 1 年間に国内で新たに発売された CNF を使ったエンドユーザー向け商品は、超ロング 5 倍巻きトイレットペーパー、クリームはんだ、スニーカー、ヘアケア商品、和菓子・洋菓子の 5 つで、うち 2 つはカルボキシメチル化 CNF を使ったものである。これに対し、海外で完全に市場投入されたものは、デンマークのヘッドフォンのみである。

ナノセルロースの利用について、海外では付加価値の高いバイオメディカル分野、エレクトロニクス分野、軍事分野での利用を目指した研究が多い。また脱炭素化、再生可能もキーワードとなっている。さらに用途に合わせて、CNF、CNC、BNC、t-CNF を使い分けている。冒頭説明したように、日本では CNF を樹脂と混ぜることで、自動車向けの高強度・軽量複合材料を目指した研究開発を官民を挙げて進めているが、海外でこのような取り組みをしているところは、韓国以外には見当たらない。

【国内のナノセルロース研究の課題と展望】 ナノセルロースは成長産業と言われ、日本国内での CNF の供給体制は整い、さまざまな種類の商品が発売されている。しかしナノセルロースの実用化が順調に進んでいるとは言い難い。ナノセルロースが使える用途はたくさんあるが、ナノセルロースを使用することによるコストアップを上回るメリットが得られていないことが一番の原因と考えられる。海外でも状況はほぼ同じで、利用先を需要が多い用途から、高くても売れる用途に軌道修正している。また日本の場合は、国の研究予算の大半が複合材料研究につぎ込まれ、それ以外の先端技術開発や基礎研究に充てられる予算が極めて少ないことも問題である。さらに日本では各企業がさまざまな種類の CNF を製品化していることから、知財などの関係で、研究者がそれらを使って自由に研究することが難しくなっている。しかも実験材料を高い値段で購入しなければならない。海外ではナノセルロースの新規用途開発はアカデミアが中心となって行われているが、日本では必ずしもそのような状況にはなっていない。研究開発を加速するためには、アカデミアがナノセルロースを無料で自由に使えるようにする必要がある。

【おわりに】 産業技術総合研究所に勤めていたときにナノセルロースに関わった経緯から、ナノセルロースに関するコンサルティング事業を行っている。今回はこの事業を通じて得た最新情報に基づいて、世界全体でのナノセルロースの生産と利用について、私見を述べた。当社では国内外の研究開発動向を定期的にウォッチして、ウェブサイトで公開している。今回のシンポジウムで紹介できなかった情報も掲載しているので、興味があれば参照していただきたい。
ナノセルロース・ドッコム https://nanocellulose.biz/

Key words nanocellulose, cellulose nanofibers, cellulose nanocrystal, bacterial cellulose

S3H3 (1702) 酢酸菌におけるセルロース生産に関わる遺伝子の欠失と復帰変異

○松谷 峰之介[1*], ティーラグール ガンジャナ[2], 薬師 寿治[3,4], 松下 一信[4,5], 石川 森夫[6]
([1]東農大・ゲノム解析セ, [2]カセサート大・理, [3]山口大院・創成科学, [4]山口大・中高温微セ, [5]山口大・農, [6]東農大・応生科)

Deletion and reversion of genes involved in cellulose production in acetic acid bacteria

○Minenosuke Matsutani[1*], Gunjana Theeragool[2], Toshiharu Yakushi[3,4], Kazunobu Matsushita[4,5], Morio Ishikawa[6]
([1]NODAI Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric., [2]Fac. Sci., Kasetsart Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Yamaguchi Univ., [4]Res. Center Thermo. Micro. Res., Yamaguchi Univ., [5]Fac. Agric., Yamaguchi Univ., [6]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)
連絡先の E-mail **アドレス** mm207299@nodai.ac.jp

酢酸菌が生成するバクテリアセルロースは微細なナノファイバーであり，その均一性・生体適合性など種々の性質からナノセルロース素材として化粧品などに利用されている。酢酸菌においては菌膜生成能を有する **R**（Rough）株と菌膜生成能がなく，静置で生育することができない **S**（Smooth）株が見いだされている。**R** 株で振盪培養を繰り返すと，菌膜形成能を失った **S** 株が出現し，**S** 株で静置培養を繰り返すと，再び菌膜形成能を有する **R** 株が現れる。この際，酢酸菌のセルロース生成能が，ゲノム不安定性に起因する変異により，速やかに消失し，アミノ酸置換を伴って復帰することを見出している。私たちは，この性質を利用して，バクテリアセルロースの増産やナノファイバーの物性の改変を可能にする有効なセルロース合成・生産変異株の育種および復帰変異機構の解明を目指して研究を進めている。本シンポジウムでは，これまでの研究の進捗について紹介する。

1）セルロース非生産株 *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 株の復帰変異

我々は以前、セルロース非生産株 *Ko. medellinensis* NBRC 3288 の完全長ゲノム配列を報告した(1)。*Komagataeibacter* 属には type I と type II の２つのセルロース生合成オペロンの存在が知られていたが，ゲノム解析株においては，type I と type II オペロンのいずれもが，それぞれフレームシフト変異と IS の挿入により，破壊されていることが見いだされていた。この株を親株として，静置培養を繰り返すことで 2 つの個別なセルロース生産株 R1 と R2 を得た(2)。Illumina シーケンサを用いてこれら適応株の変異箇所を同定したところ，R1, R2 でそれぞれ 8 箇所と 3 箇所の変異が見つかった。このうち 1 カ所は共通の遺伝子に対する変異であり，それぞれ異なる 1 塩基の欠損により type I オペロンの *bcsBI* 遺伝子が復帰していた。type II オペロンの IS には挿入欠損などの変化は生じていなかった。*bcsBI* の復帰変異を引き起こしていた箇所の直前部には 17bp からなる欠損領域が存在することが他の *Komagataeibacter* 属のゲノム配列との比較から推定された。それゆえ、この 17 塩基欠損によるフレームシフトがさらなる 1 塩基の欠損によって復帰した，つまり本来の BcsBI とは異なる 2 つの BcsBI 変異体が得られたことになった。このように，フレームシフト変異とそれを補償する塩基欠損（もしくは挿入）によってセルロース合成能のオン・オフが制御されることが明らかとなった。

2）*Komagataeibacter oboediens* MSKU3 株を用いたセルロース非生産変異株の取得とその復帰変異

NBRC 3288 株では 17 塩基の欠損が生じていることが推定されたため，より実用的なセルロース生産変異株の取得を目指して，短い挿入欠損領域を持つ非生産変異株を取得し，それを親株にして大量の復帰変異株の取得を試みた。私たちは，セルロース生産能力を持つ *Ko. oboediens* MSKU3 株の高温適応変異株 T4 および高エタノール適応変異株 E3 を得た(3)。これらの E3 と T4 株は，適応の過程で振盪培養を繰り返しているため，セルロース生合成オペロンの *bcsC* に，それぞれ 1 塩基の挿入変異と 5 塩基の欠損変異が生じていた。これらのセルロース非生産株から静置培養を繰り返す適応育種によって復帰変異の取得を試みたところ，*bcsC* に 1 塩基挿入が生じていた E3 においては複数の復帰変異株が得られたのに対し，5 塩基欠損変異が生じていた T4 株においては復帰変異を得ることが出来なかった。このことは非生産株への転換時に入る最初の変異が復帰変異の可否に密接に関連することを示唆している。E3 株からは，*bcsC* 遺伝子にアミノ酸置換をともなった少なくとも 4 種の復帰 R 株が得られ，そのうちの一つ R-3 株は親株の 6.5 倍のセルロース生産能を，別の R-9 株はより微細な繊維からなるセルロースを生成できることが明らかとなった(4)。それゆえ，適応的復帰変異法は種々の有益なセルロース生産菌の取得に利用できることが示された。

3）*Ko. oboediens* MSKU3 株を用いたセルロース非生産変異株の大量取得

上述の結果より、セルロース非生産株からの復帰生産株の取得は，振盪培養により最初に生じるセルロースオペロンへの破壊的変異の様式に依存することが示唆された。そこで，より高性能な復帰変異株の取得を可能にするセルロース非生産変異株の取得を目指して，系統的な振盪培養育種を進めている。個別に 5 系列の振盪培養育種を行い，それぞれの系列でセルロース非生産変異株の取得に成功している。振盪培養育種の過程で，継代培養の中期過程でセルロースの生産量が大幅に減少し、その後さらに継代培養を繰り返すことで完全に失われる経過をたどることが明らかになった。現在、これらの変異株についてゲノムリシークエンスによる変異箇所の確認を進めるとともに、さらに規模を拡大して、セルロース非生産変異株の育種を進めている。最終的には、25-40 程度の変異株を取得し、変異箇所を全て明らかにする予定にしている。

変異パターンと“復帰変異の可否および有用セルロース生産能”との関係を明らかにすることにより，有用セルロース生産株取得のための基盤となることが期待される。

1) Ogino *et al.*, J Bacteriol. 2011 193(24):6997-6998.
2) Matsutani *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol. 2015 99(17):7229-7240.
3) Taweecheep *et al.*, Appl Biochem Biotechnol. 2019 189(1):144-159.
4) Taweecheep *et al.*, Carbohydr Polym. 2019 226:115243.

Key words Acetic acid bacteria, *Komagataeibacter* sp., bacterial cellulose, non-cellulose producing mutant

S3H3 (1703) 酢酸菌セルロース合成酵素複合体の構造と機能

○田島健次
（北大院工）

Structure and function of cellulose synthase complex from *Gluconacetobacter*

○Kenji Tajima
(Fac. Eng., Hokkaido Univ.)
ktajima@eng.hokudai.ac.jp

ある種の酢酸菌は、グルコースなどの糖を基質としてセルロースを合成する。セルロースは、セルロース合成酵素複合体（ターミナルコンプレックス(TC)）と呼ばれる細胞膜に局在する酵素複合体によって合成されるが、酢酸菌によって合成されるセルロースは、太さが 50～100nm であり、TC はナノファイバーを紡ぎ出す超精密なナノマシンであるといえる。酢酸菌の TC には少なくとも 4 つのサブユニット(CeSABCD)が含まれており、糖転移反応による重合、排出、繊維化、結晶化という非常に複雑な過程を司っている。本発表では、これら 4 つのサブユニットの構造・機能について、他のセルロース合成菌における最近の知見を含めて紹介する。

Brown らは、1986 年に酢酸菌（*Gluconacetobacter=Komagataeibacter*）がセルロースを合成することを報告している[1]。植物を含め、すべてのセルロースは細胞膜に局在する TC によって合成され、酢酸菌において TC は、菌体の長軸に沿って直線的に平行に並んでおり、隣り合う TC から排出されたサブエレメンタリーフィブリル（SEF）が集まることでミクロフィブリル、さらにミクロフィブリルが集まることで最終的に一本のリボンと呼ばれる繊維（太さ 50～100nm）が形成される。TC を構成するセルロース合成酵素をコードする遺伝子群は、1990 年に Wong ら[2]および Saxena ら[3]によって初めて報告された。これらの報告によって、酢酸菌の TC には少なくとも 4 つのサブユニット CeSABCD が含まれている可能性が示唆され、CeSA の相同性検索によって、植物におけるセルロース合成酵素も同定されるに至った。酢酸菌において、*cesABCD* はオペロン（CeS オペロン）を形成しており、1994 年にエンドグルカナーゼ（CMCax）遺伝子および Cellulose complementing factor（Ccp）遺伝子[4]、1997 年にβグルコシダーゼ（Bgl）遺伝子がそれぞれクローニングされ[5]、これらは何れも CeS オペロンとクラスターを形成していることが分かった。

CeSA は、グリコシルトランスフェラーゼ・ファミリー2 ドメイン、PilZ ドメイン、8 個の膜貫通ドメイン（Transmembrane helix）を含む膜タンパク質であり、内膜に存在する糖転移酵素の一種である。Morgan らは、2013 年に *Rhodobacter spheroids* (*R. spheroids*) 由来の組換え CeSAB 複合体の立体構造を報告した[6]。Phyre2（ http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index ）を用いて *Gluconacetobacter hansenii* (*G. hansenii*) ATCC2376 由来 CeSA のモデリングを行ったところ、高次構造は *R. spheroids* 由来の CeSA とかなり類似していることが示唆された。

CeSB は BcsB ドメイン（機能未知）と C 末端側に一つ膜貫通領域が存在しており、2 つのセルロース結合ドメイン（CBD1・2）と 2 つのフラボドキシン様のドメイン（FD1・2）からなっており、CeSB の内側を通って外膜の方に移動するトランスロケーションに関与していると推定されている[6]。

CeSC は CeS オペロンによってコードされているタンパク質の中で最も大きく（約 130kDa）、N 末端側にテトラトリコペプチドリピート（TPR）、C 末端側に BcsC ドメインが存在している。CeSB と同様に遺伝子欠損によって in vivo におけるセルロース合成能が欠失することから、酢酸菌におけるセルロース合成に必須のタンパク質であることが分かっている[7]。最近、Acheson らは、大腸菌 *Escherichia coli*（*E. coli*）由来 BcsC（＝CeSC）の立体構造解析に成功した[8]。Phyre2 を用いて *G. hansenii* 由来 CeSC のモデリングを行ったところ、高次構造は *E. coli* 由来の CeSC と類似していることが示唆された。CeSC は外膜に局在し、*E. coli* では 6 位がフォスフォエタノールアミン修飾されたグルカン鎖 1 本がβバレルによって形成されるトンネルを通過して菌体外に排出されていると推定されている[8]。一方、*G. hansenii* では、太さ約 1.5nm の SEF として排出されていることが電子顕微鏡などによって観察されており[9]、後述する CeSD の存在も含めて CeSC の配置や分泌機構には差異があると推定される。

CeSD の遺伝子は CeS オペロンの一番下流側に存在し、分子量は約 17kDa と最も小さい。CeSD のアミノ酸配列は、これまで機能が知られているタンパク質とほとんど相同性がなく、その機能については全く分かっていなかった。Hu らは、大腸菌組換え株を使って CeSD を調製し、X 線結晶構造解析によってその構造を決定した[10]。CeSD には 5 つのαヘリックスが存在しており、八量体（オクタマー）で環状構造を形成していることが分かった。各サブユニットの N 末端はすべて環の内側に存在し、それらによって 4 つのトンネル構造が形成されている[10]。このトンネルをグルカン鎖が通っている可能性を検証するために、グルカン鎖のモデル化合物であるセロペンタオースとの共結晶化を行った。その結果、環内側の 4 つのトンネルに一つずつのセロペンタースが配置していることが確認された[10]。CeSD はセルロース合成菌の中でも酢酸菌を含むいくつかのバクテリアにしか存在していない TC サブユニットである。上述のように酢酸菌では合成されたグルカン鎖は、階層的に集積していくことによって最終的に一本のセルロース繊維（リボン）が形成される。この構造は大腸菌など CeSD を持っていないバクテリアによって合成されるセルロースと大きく異なっており、TC の構造と繊維形成メカニズムにおける相関関係に興味がもたれる。

参考文献
1. A. J. Brown: *J. Chem. Soc.*, **49**, 432 (1886).
2. H. C. Wong, A. L. Fear, R. D. Calhoon, G. H. Eichinger, R. Mayer, D. Amikam, M. Benziman, D. H. Gelfand, J. H. Meade, A. W. Emerick, et al.: *PNAS*, **87**, 8130 (1990).
3. I. M. Saxena, F. C. Lin, R. M. Brown, Jr: *Plant Mol. Biol.*, **15**, 673 (1990).
4. R. Standal, T. G. Iversen, D. H. Coucheron, E. Fjaervik, J. M. Blatny, S. Valla: *J. Bacteriol.*, **176**, 665 (1994).
5. N. Tonouchi, N. Tahara, Y. Kojima, T. Nakai, F. Sakai, T. Hayashi, T. Tsuchida, F. Yoshinaga: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1789 (1997).
6. J. L. W. Morgan, J. Strumillo, J. Zimmer: *Nature*, **493**, 181 (2013).
7. I. M. Saxena, K. Kudlicka, K. Okuda, R. M. Brown Jr.: *J. Bacteriol.*, **176**, 5735 (1994).
8. J. F. Acheson, Z. S.Derewenda, J. Zimmer.: *Structure*. **27**, 1855 (2019).
9. P. Ross, R. Mayer, M. Benziman: *Microbiol. Rev.*, **55**, 35 (1991).
10. S. Q. Hu, Y. G. Gao, K. Tajima, N. Sunagawa, Y. Zhou, S. Kawano, T. Fujiwara, T. Yoda, D. Shimura, Y. Satoh, M. Munekata, I. Tanaka, M. Yao: *PNAS*, **107**, 17957 (2010).

Key words cellulose synthase (terminal) complex, bacterial cellulose, *Gluconacetobacter*

S3H3 (1704) セルロース合成酵素の天然活性再構成へむけて

○今井友也[1]*
（[1]京都大学・生存研）

Reconstruction of cellulose synthase with its "native" activity

○Tomoya Imai[1]*
([1]RISH, Kyoto Univ.)
timai@rish.kyoto-u.ac.jp

【はじめに】

セルロースは天然の構造多糖であり，複数の分子鎖が規則正しく束ねられた結晶性繊維として存在する。このセルロースを合成する分子がセルロース合成酵素である。酵素タンパク質の生物工学的利用例は枚挙にいとまがないが，セルロース合成酵素については，そもそもその酵素活性の再構成系の報告例は限られており，その生物工学的利用には多くの障壁が残されている。その原因の一つは，セルロース合成酵素がグルコースを高分子量化する「重合」機能とともに，特定の結晶性固体構造を作り上げる「結晶化」機能も持つ複雑なタンパク質だからである。特に後者の機能は常温常圧水系溶媒下での高分子制御であり，高分子科学的に高度な機能であり，タンパク質科学的に未知に近い機能である。

近年，アメリカのグループからセルロース合成酵素の立体構造解析が続けて報告され[1,2]，構造情報ベースでの研究が進められる環境が整ってきた。そこでセルロース合成酵素の酵素活性再構成系を使った研究を今後進める必要があるが，現状，天然型構造のセルロース（I 型結晶・微小繊維形態）を合成できるセルロース合成酵素活性の再構成系の報告は極めて少なく，成功例においても酵素活性が極めて低い，他の多糖合成活性がコンタミしているなど，研究の展開の妨げになっている。

そこで我々はより単純な実験モデル生物として，古くからセルロース研究に使用されてきたセルロース生産性細菌である酢酸菌を選択し，天然型構造のセルロース合成活性の再構成を進めている。本発表ではその取り組みについて紹介させていただく。

【試験管内合成系】

膜タンパク質であるセルロース合成酵素は，分析にあたりまず細胞膜から界面活性剤により可溶化する必要がある。そこで我々は，セルロース合成酵素活性の研究に用いられたことのない界面活性剤のスクリーニングを行い，試験管内合成に用いた。

その結果，マイルドな界面活性剤と考えられているアルキルマルトシドを使った場合でも，天然構造である I 型結晶ではなく II 型結晶のセルロースが合成された[3,4]。しかし高分子量のセルロースを合成する点で，分解酵素の逆反応を使ったセルロース合成とは明らかに異なっており，本再構成系ではグルコースを高分子量化する「重合機能」は保持しつつ，高分子量化したセルロース分子鎖を結晶性繊維として束ねる「結晶化機能」を失っているものと考えられる。

また本系を使い，時分割小角 X 線散乱測定によりセルロース鎖が集合する過程をその場観察できることを示した[5]。今後，天然構造のセルロース試験管内合成に成功した場合，本法を用いることで，セルロース合成酵素が常温常圧水系溶媒下で高分子鎖を制御して特定の構造を作り上げる仕組みを明らかにできると考えられる。

【大腸菌細胞系】

上述の試験管内系では，セルロース合成酵素は溶媒中でランダムな運動をしていると考えられる。そこで，生きている細胞にセルロース合成酵素遺伝子を発現し，細胞膜上でセルロースを合成させることを試みた。セルロース合成酵素遺伝子とともに，c-di-GMP 合成酵素の遺伝子も同時に発現させることにより，セルロース合成に成功した[6]。しかし，本系でも天然型のセルロース構造を合成することはかなわず，結晶化機構が欠失していると考えられる。

しかし本系は，組換え体タンパク質を使ったセルロース合成酵素活性の評価を可能とした点で重要な研究である。我々は後続研究において，セルロース合成酵素タンパク質で保存されている FFCGS モチーフ配列に着目し，構造モデルを参考に設計した点変異体の評価に基づき硫黄－アレン相互作用というマイナーな相互作用がセルロース合成酵素の重合機構に重要であることを示した[7]。現在も，セルロース合成酵素の安定性向上等の目的で，種々の変異体タンパク質を設計・評価を行っている。

【まとめ】

複数ある結晶多形の中で，天然セルロースは例外なく結晶弾性率が最も高いセルロース I 型をもつことが知られている。つまりセルロース合成酵素は，材料としてのポテンシャルを最大限に引き出してセルロースを合成している。しかし現在まで，我々の行ってきたセルロース合成酵素活性の再構成系はいずれもセルロース II 型結晶構造を合成した。セルロース II がエネルギー的に最も安定な結晶多形とする知見に照らすと，セルロース合成酵素の結晶化機構は速度論的にセルロース分子鎖の集合を制御していると考えられる。この高分子制御素子としてセルロース合成酵素の機能を理解し，合成生物学的な展開を今後目指している。

Key words cellulose, reconstruction, enzyme, synthetic biology

1. Morgan, J.L.W. *et al.* (2013) Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* 493, 181-186. 10.1038/nature11744
2. Purushotham, P. *et al.* (2020) Architecture of a catalytically active homotrimeric plant cellulose synthase complex. *Science* 369, 1089-1094. 10.1126/science.abb2978
3. Hashimoto, A. *et al.* (2011) Extraction of cellulose-synthesizing activity of Gluconacetobacter xylinus by alkylmaltoside. *Carbohydrate Research* 346, 2760–2768
4. Penttilä, P.A. *et al.* (2016) Effects of reaction conditions on cellulose structures synthesized in vitro by bacterial cellulose synthases. *Carbohydrate Polymers* 136, 656–666
5. Tajima, H. *et al.* (2019) Observation of in vitro cellulose synthesis by bacterial cellulose synthase with time-resolved small angle X-ray scattering. *International Journal of Biological Macromolecules* 130, 765–777
6. Imai, T. *et al.* (2014) Functional reconstitution of cellulose synthase in Escherichia coli. *Biomacromolecules* 15, 4206–4213
7. Sun, S.-j. *et al.* (2016) Site-directed mutagenesis of bacterial cellulose synthase highlights sulfur–arene interaction as key to catalysis. *Carbohydrate Research* 434, 99–106

S3H3 (1705) ヒアルロン酸／セルロースの新規複合素材の創製

○近藤 哲男*
（九大院・農）

In vivo fabrication of hyaluronan/cellulose composite nanofibrils by synchronized biospinning of engineered *Gluconacetobacter*

○Tetsuo Kondo*
(Kyushu Univ.)
tekondo@agr.kyushu-u.ac.jp

過去 20 年以上にわたり、演者らは純粋なセルロース分子から成る高強度ナノ繊維であるバクテリアセルロース(BC)を生産するグラム陰性菌として知られる酢酸菌について、分泌に伴う走行挙動 [1-4] をもとに遺伝子導入による菌自体のナノマシン化を検討してきた [5]。

菌自体のナノマシン化のはじめとして演者らは、異種由来のカードラン(β-1,3 グルカン)合成酵素を発現した遺伝子組み換え酢酸菌において、菌体から排出されたカードランと BC が複合化し、ゲル状膜(ペリクル)を形成することを見出した [5]。本プロセスにおいて、このペリクルがカードラン-BC 間により強い相互作用が生じたことが示唆された。さらに最近、我々は、生理活性多糖であるヒアルロン酸(HA)合成酵素を酢酸菌で発現させることにより、HA と BC とを同時合成する遺伝子組換え酢酸菌を構築することに成功している [6]。

BC 材料は現在、主に医療分野での応用展開が進んでいるが、細胞との相互作用が弱いことが、組織工学分野への応用における課題となっている。一方、上記の研究で HA と BC の複合ペリクルは、通常の BC ペリクルと比べて細胞接着性が向上したことも示唆された [7]。そこで本発表では、これまでの一連の研究の流れをまとめるとともに、最近の HA と BC とを同時合成する遺伝子組換え酢酸菌の HA の排出関しても最近の知見を紹介する。

謝辞：本発表内容の中心は、高濱良氏（九大）、加藤歩並氏（九大），田川聡美氏（九大、現信州大）、田島健次氏（北大）との共同研究であるが、関連研究を開始以来約 15 年にわたり携わってきた九州大学バイオマテリアルデザイン研究室旧院生諸君（加茂陽子博士、玉元遊氏、中川理氏、方駒博士（現中国・南方科技大学）の貢献に感謝する。

参考文献：1) Kondo T et al. (2002) Biodirected epitaxial nanodeposition of polymers on oriented macromolecular templates. Proc National Acad Sci 99:14008–14013. 2) Hesse S and Kondo T(2005) Behavior of cellulose production of *Acetobacter xylinum* in ^{13}C-enriched cultivation media including movements on nematic ordered cellulose templates, Carbohydr. Polym., 60,457-465(2005) 3) Tomita Y and Kondo T (2009) Influential factors to enhance the moving rate of *Acetobacter xylinum* due to its nanofiber secretion on oriented templates, Carbohydr. Polym.,77: 754-759.4)Kondo T et al.(2012) Regulated patterns of bacterial movements based on their secreted cellulose nanofibers interacting interfacially with ordered chitin templates, J. Biosci. Bioeng. 114, 113-120. 5) Fang J et al. (2015) In Vivo Curdlan/Cellulose Bionanocomposite Synthesis by Genetically Modified *Gluconacetobacter xylinus*. Biomacromolecules 16:3154–60. 6) Takahama R. et al. (2019) セルロース学会第 26 回年次大会 講演要旨集. 7) 加藤歩並ら (2019) 第 69 回日本木材学会大会 要旨集.

Key words Hyaluronan; Bacterial cellulose nanofibril; Nanocomposite; recombinant *Gluconacetobacter*; in vivo production

S3H3 (1801) 生分解性プラスチック開発の現状と課題

○土肥義治 [1,2]*
（[1] 東京工業大学名誉教授, [2] 理化学研究所名誉研究員）

R&D of biodegradable plastics

○Yoshiharu Doi[1,2]*
([1] Tokyo Institute of Technology, [2] RIKEN)
ydoi@spring8.or.jp

（はじめに）漂流プラスチックやマイクロプラスチックなどの海洋ごみ問題が契機となり、プラスチック資源循環の在り方が再び国際的に議論され、先進主要各国においてその政策作りが始まった。2019 年 5 月にわが国は「プラスチック資源循環戦略」を策定し、2030－35 年までの目標（25%リデュース、100%リユース・リサイクル、再生利用の倍増、バイオプラスチックの 200 万トン導入）を公表した。2021 年 6 月には、「プラスチックに係る資源循環の促進等に関する法律」が成立した。また、2019 年 6 月の G20 大阪サミットにおいて、2050 年までに海洋プラスチックごみによる追加的汚染をゼロにまで削減することを目指す「大阪ブルー・オーシャン・ビジョン」が合意された。

現在、世界で 4 億トンを超すプラスチック、合成繊維、合成ゴムが年産されている。そして毎年数百万トンのプラスチックごみが海へ流出すると推定されている。流出した漁具・漁網によるゴーストフィッシングや鳥獣被害、漂着プラスチックごみによる観光資源被害や珊瑚礁死滅などの生態系への影響が報告されている。また、海洋を浮流する粒径 5mm 以下のマイクロプラスチックによる海洋生物への影響も懸念されている。

（ムーンショット目標 4）海洋プラスチックごみ対策として、プラスチック廃棄物の削減や漂着プラスチックごみの回収とともに、海洋に流出しても海の微生物によって分解・無機化される海洋生分解性プラスチックの開発が国家目標に挙がった。海洋微生物によって分解・無機化されるプラスチックとしては、微生物がつくるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）、化学合成のポリカプロラクトン（PCL）が知られている。しかし、多様な用途開発や製品の普及には、プラスチック物性の改良とともに、分解開始時期や分解速度を制御する技術の開発が喫緊の課題であった。社会問題を解決する野心的な目標に挑戦する「ムーンショット型研究開発制度」が 2020 年に始まり、山地憲治プログラムディレクターの統括するムーンショット目標 4「2050 年までに、地球環境再生に向けた持続可能な資源循環を実現」（NEDO）の一分野として「生分解のタイミングやスピードをコントロールする海洋生分解性プラスチックの開発」が取り上げられ、今回のシンポジウムにおいて講演される 3 名の先生方が PM として選出されて下記の課題の研究開発を推進されている。

伊藤耕三教授（東京大学）「非可食性バイオマスを原料とした海洋分解可能なマルチロック型バイオポリマーの研究開発」
粕谷健一教授（群馬大学）「生分解開始スイッチ機能を有する海洋分解性プラスチックの研究開発」
金子達雄教授（北陸先端科学技術大学院大学）「光スイッチ型海洋分解性の可食プラスチックの開発研究」

（講演の内容）ごみ問題や環境問題の解決を目指して、生分解性プラスチックの研究開発が 1990 年頃から世界各国にて始まった。また、地球温暖化対策の一つとして、再生可能なバイオマスからプラスチックをつくる研究が 2000 年頃から活発化した。「生分解性プラスチック」と「バイオマスプラスチック」を総称して、「バイオプラスチック」と呼ぶことが多い。本講演では、下記のテーマを中心に生分解性プラスチック開発の現状と課題を紹介する。

1. バイオエコノミー、サーキュラー・エコノミー、プラスチックごみ問題
2. 地球上の炭素循環と生分解性プラスチック
3. バイオプラスチックとその生産システム
4. バイオポリエステル PHBH の微生物生産について
5. バイオポリエステル PHBH の物性と生分解性について
6. バイオポリエステルの実用化と産学連携について
7. バイオマス化学産業の将来像について

Key words biodegradable plastic, biomass

S3H3 (1802) 非可食性バイオマスを原料とし海洋分解性と強靭性を両立したバイオポリマーの開発

○伊藤耕三
（東大院・新領域）

Development of biopolymers with marine degradability and durability from non-food biomasses

○Kohzo Ito
(Univ. Tokyo)
kohzo@k.u-tokyo.ac.jp

【はじめに】

３大材料と呼ばれる金属、セラミック、ポリマーの中で、ポリマーは軽量という点に特徴があることから、21 世紀の中心的かつ社会的課題である持続社会の発展のための材料として大きな注目を集めている。環境負荷の低減のためには、まずはポリマーの強靭性・耐久性を向上し、リユースして長く使うことが重要である。筆者は 2014 年に始まった内閣府　革新的研究開発プログラム（ImPACT）の中で、自動車用タフポリマーの開発に産学連携で取り組んできた。その際に利用された技術の１つが、ロタキサン構造を用いた環動高分子である。そこで本講演では、まず環動高分子について簡単に解説するとともに、ImPACT の主要な成果を紹介する。次に、ImPACT 終了後に演者が現在取り組んでいる NEDO ムーンショット型研究開発事業「非可食性バイオマスを原料とした海洋分解可能なマルチロック型バイオポリマーの研究開発」について概要を述べる。

【環動高分子】

2016 年のノーベル化学賞は、カテナンやロタキサンのようにトポロジカルに結合した超分子構造の合成やその分子機械としての特性に対して授与された。我々は、2000 年ころに代表的な超分子であるポリロタキサン構造を利用して、従来とは全く異なる架橋高分子を合成した [1]。具体的には、８の字状の架橋点が自由に動いて応力や張力を自動的に緩和する高分子材料を初めて作成し、このような超分子ネットワークを環動高分子材料（Slide-Ring Materials）と名付けた。最近、環動高分子で伸長誘起結晶化も発見され注目を集めている [2]。

【ImPACT「超薄膜化・強靭化「しなやかなタフポリマー」の実現」プログラム】

2014 年、内閣府　革新的研究開発推進プログラム（ImPACT）がスタートし、演者が代表者（プログラム・マネージャー : PM）を務める「超薄膜化・強靭化『しなやかなタフポリマー』の実現」が採択された。本プログラムでは、燃料電池や Li イオン電池のセパレータの超薄膜化、車体構造用樹脂の強靭化、タイヤの薄ゲージ化などを実現するために、「しなやかなタフポリマー」を新たに開発する。本プログラムの中では、環動高分子が基幹技術の１つとして使われている。たとえばポリロタキサンを他の高分子と化学的あるいは物理的に架橋することによって、外力が加わった際に応力の局所的集中を分散し、クラックの発生や亀裂の進展を抑えることができる。東レ株式会社では、ポリアミドという樹脂に少量の環動高分子の構造を組み込むことで、硬さや強さを保ちながらも、衝撃を受けても壊れにくい材料を開発することに成功した。開発した材料は、従来のポリアミドに比べて、約６倍の破断伸びと約２０倍の屈曲耐久性を示し、車体構造材を想定した衝撃試験では、２倍以上のエネルギーを吸収することが明らかになった。少量の環動高分子構造の導入により強靭性が大幅に向上する点が重要であり、比較的低コストで既存の安価な高分子材料の特性が改善することから、短期間での実用化が可能となっている。

【ムーンショット型研究開発事業】

2020年には、ImPACTの後継としてムーンショット型研究開発事業が始まり、演者が代表者（プロジェクト・マネージャー : PM）を務める「非可食性バイオマスを原料とした海洋分解可能なマルチロック型バイオポリマーの研究開発」が採択された。環境低負荷型高分子の分子設計と合成は、グリーンケミストリーとして、化学分野や高分子科学分野において長い間議論がなされてきた。新規なバイオマス由来の高分子材料や生分解性ポリマーが開発され、すでに実用化されているものもある。しかし、土壌と海洋の両方で生分解性を示すポリマー材料で実用化されているものは極めて少なく、また生分解性ポリマーは自然環境下で劣化が進みやすいので耐久性に劣り、機械特性も十分でないため、用途が限られ広範囲な分野での利用が進んでいない。すなわち、高分子の生分解性と耐久性・強靭性は典型的なトレードオフの関係にある。

本プロジェクトでは、このような特性における高分子のトレードオフ関係を打破するために、高分子の分解にマルチロック機構を導入する。すなわち分解の際に、コポリマー、動的架橋、超分子構造、光、熱、酸素、水、酵素、微生物、触媒などの複数の条件を同時に必要とすることで、使用時には分解を抑えてタフネスを保って劣化を防ぎ、環境中に誤って拡散した際には高速なオンデマンド分解が実現可能となる。本プロジェクトにおいて実用化を目指す製品は、非可食バイオマスを原料として得られるプラスチック、タイヤ、繊維、漁具などである。本プロジェクトに結集した産学官がマトリクス運営を通じて緊密に共同研究を行うことで、高分子の分解に関する日本発の新規概念を構築し、マルチロック型バイオポリマーの材料設計指針を確立する。これを優れた独自技術を有する我が国の企業へ技術移転することで、量産化・低コスト化を通じて実用化を推進すれば、世界全体の環境問題に対して重要な貢献を果たすことができると確信している。

1) Y. Okumura and K. Ito, Adv. Mater., 13, 485 (2001).
2) C. Liu, N. Morimoto, L. Jiang, S. Kawahara, T. Noritomi, H. Yokoyama, K. Mayumi, K. Ito, Science, 372(6546), 1078(2021).

Key words polymer, degradability, durability, toughness, supramolecule

S3H3 (1803) 生分解開始スイッチ機能を有する海洋分解性プラスチックの研究開発

○粕谷健一 [1, 2]*
([1] 群大院理工, [2] 群大食健セ)

Research and development of marine biodegradable plastics with degradation initiation switch function

○Ken-ichi Kasuya[1]*
([1]Faculty of Science and Technology, Gunma University, [2]Gunma University Center for Food Science and Wellness(GUCFW))
E-mail kkasuya@gunma-u.ac.jp

生分解性プラスチックを取り巻く情勢

日本では、海洋プラスチックごみの解決に向けて 2019 年に経済産業省が海洋生分解性プラスチックの開発ロードマップ [1]を策定し、これを公表している。このロードマップでは、現状商業化されている海洋生分解性プラスチックの普及、社会実装を目指したフェイズ 1 （Marine bio-degradable bio-based plastics 1.0（MBBP1.0））、セルロースナノファイバーなどと生分解樹脂との複合化により新しい材料開発を目指すフェイズ 2.0（MBBP2.0）、さらに革新的素材の研究開発を推進するフェイズ 3.0 (MBBP3.0)の 3 つの異なるフェイズから構成されている [1]。これに関連して、2020 年より最長 10 年の期間で、内閣府が主導するムーンショット型研究開発課題の中で，NEDO*がハンドリングする環境関連の 3 つの研究領域のうちの一つに「生分解のタイミングやスピードをコントロールする海洋生分解性プラスチックの開発」が選定され、海洋生分解性プラスチックの産学官での開発が本格的に始まった [2]。ムーンショット型研究開発において創出される新規海洋生分解性プラスチックは，近い将来に社会実装されることが期待されている。本講演では、本領域で採択された我々のプロジェクト（課題名：生分解開始スイッチ機能を有する海洋分解性プラスチックの研究開発）[2]の開発コンセプトについてその背景とともに紹介する。

スイッチング機能を持つ生分解プラスチックの開発

現在利用可能な多くの生分解性プラスチックでは、その生分解速度および分解開始時期の制御が困難であり、このことが、生分解性プラスチックの普及を妨げている。理想的な生分解性プラスチックは、使用期間中，機械的強度を保ち，不要時あるいは廃棄後に速やかに生分解されることが望まれる。現状の技術において、材料の生分解性と安定性は排他的であり、両立することは難しい。我々は、分解開始時期および分解速度が十分に制御された生分解性プラスチックを，時限生分解性プラスチック（Timing biodegradable plastics: TBP）と定義づけた。このような理想的な生分解性プラスチックである TBP を創出するためには，使用環境下において、非生分解性プラスチックとして振る舞い，なんらかのきっかけで生分解性プラスチックに変わる潜在的生分解性プラスチック（Potentially biodegradable plastics: PBP）を活用する必要がある。

TBP を開発するためには、生分解開始スイッチ機能を基盤材料である基盤樹脂に付与し、さらに材料の分解開始(スイッチオン)以降、完全無機化が達成される必要がある。理想的な材料創出には、これらの要素技術を材料設計に十分反映させる必要があるが、互いに排他的な部分もあり、かなりの困難を伴うと予想される。各要素に関しては、以下に示すようないくつかのエビデンスが見出されている。

1. 脂肪族ポリエステルの多くは、PBP であり分解開始時期や速度の制御の基盤材料になり得る [3]。
2. （海洋特有の）環境要因の変化は、分解開始のスイッチングのトリガーとして利用可能である [4]。
3. （海洋）環境中での生物刺激や生物集積の手法や、材料自身の高次構造制御は、分解速度制御に有効である可能性がある [5]。

当該プロジェクトにおいて、これらのエビデンスに基づき、海洋環境において確実に機能する社会実装可能な TBP を創出するために技術開発を推進している。

参考文献

1) 海洋生分解性プラスチック開発・導入普及ロードマップ（概要図），経済産業省.
2) NEDO プラス、特集 1 、第 79 号.
3) Baba et al. *Polym Degrad Stab*, 138, 18, 2017.
4) Tachibana, Baba, Kasuya, *Polym Degrad Stab*, 137, 67, 2017.
5) Kusaka, Iwata, Doi, *Int J Biol Macromol*, 25, 87,1999.

Key words marine biodegradable plastics, mbbp, timing biodegradable plastics, potentially biodegradable plastics, moonshot.

*本ムーンショットプロジェクトは、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 が推進する事業です。

S3H3 (1804) 光スイッチ型分解性プラスチックの開発 ―海洋ゴミ問題解決を目指して―

○金子達雄 [1]*, Mohammad Asif Ali[1], 岡島麻衣子 [1], 高田健司 [1]
([1] 北陸先端大院　環境・エネルギー)

Development of photo-switching degradable plastics -aiming to solution of plastic waste issues in marine environment-

○Tatsuo Kaneko[1]*, Mohammad Asif Ali[1], Maiko Okajima[1], Kenji Takada[1]
([1]Japan Advanced Institute of Science and Technology)
kaneko@jaist.ac.jp

＜緒言＞

大量のプラスチックごみは生態系に甚大な影響を与えている。例えば、海洋ごみの影響により、魚類、海鳥、海洋哺乳動物、ウミガメなど約 700 種もの生物が死傷しており、このうち 92%がプラスチックごみの影響、例えばポリ袋の誤飲・摂取によると報告されている。この問題を解決するに、ゴミ回収システムの構築が挙げられるが、根本解決には海洋分解性プラスチックの普及が必須である。生分解性プラスチックとして代表的なものに脂肪族系ポリエステルが挙げられる。特にポリヒドロキシアルカノエートの中で結晶化度の低いものに関しては、海洋分解性のプラスチックとしての普及が期待されている。しかし、その軟化温度や耐久性は工業用プラスチックと比較して遥かに低く、その改善が待たれている。脂肪族ポリエステルの構造を維持したままその軟化温度を上げる試みは活発で、ステレオコンプレックス化ポリ乳酸 やセルロース繊維コンポジット開発が検討されている。一方,分子レベルにおけるガラス転移温度の上昇はこのような手法では極めて難しい。このような中、我々は一般のナイロンよりも高い耐熱温度を示すナイロンをイタコン酸から開発する方法を見出した。本報では、これに加え加水分解性の光制御に関しても言及し、使用時は耐久性があるが海洋環境中で分解性へと変化するプラスチックへの活用に関して提案する。

＜結果・考察＞

ナイロンは分子鎖間水素結合が強いために本来の性能も高く、ポリエステルやビニル系ポリマーよりも高価であるにも関わらず広く使用されている。一方、アミド結合はエステル結合と比較して電子論的には加水分解性が悪く、その分解は困難とされている。他方、ナイロン 4 は疎水性が低く水を呼び込みやすいため、良い分解性を示し海洋分解性プラスチックの候補の一つとして注目されている。ナイロン 6 に関しても、分子量が小さいオリゴマーであれば、その親水性が高く分解酵素が発見されている。したがって、ナイロンの分解性はその親水性と深いかかわりがある。ここで、我々はナイロン 4 と同じ炭素数のアミド系化学種であるピロリドン環に注目した。その原料となるのはイタコン酸である。イタコン酸はクエン酸の熱分解により得られる化合物であるが、現在ではカビを用いた発酵により極めて安価に生産され、バイオリファイナリーの分野において特に注目されており、米国エネルギー省の提案するバイオリファイナリー基幹物質に含まれている。その理由として古くからビニル系モノマーとして広く活用されその生産量は数万トンにも上り年々増産されていることが挙げられる。一方、ジカルボン酸モノマーとしての利用に関しては不飽和ポリエステルの原料としての報告例があるのみで専門家であれば容易に発想されるはずのナイロン原料としての利用に関しては、我々の報告以外には学術系報告は皆無であった。そこで，我々はイタコン酸を出発物質とするバイオナイロンの合成を行うために、まずイタコン酸とヘキサメチレンジアミンを混合し重合を試みた。その結果、副反応が激しく起こりモノマーの反応性バランスを 1 : 1 から大きく崩れ、オリゴマーしか得られなかった。そこで、イタコン酸とジアミンのそれぞれの均一なアルコール溶液を混合することで瞬時に析出することで塩モノマーの結晶を合成した。この塩モノマー中ではイタコン酸とヘキサメチレンジアミンが 1 : 1 の存在比を分子レベルで維持しており上記の副反応が起こりにくくなると考えた。実際に、加熱によりバルク重合すると副反応を抑えられ、リン酸ナトリウム系の触媒の存在下で分子量が数万のポリマーを得るに至った。かつ、二重結合へのアミノ基のアザ-マイケル付加反応が起こることで形成した二級アミンが隣接するカルボン酸と反応することで 5 員環であるピロリドン環が主鎖中に形成することが分かった。得られたナイロンの熱物性および力学物性を評価したところ、いずれも既存のナイロンである PA66 や PA6 の示す性能と同等または超える値であった。さらに、これらバイオナイロンの分解性を調べた。まずアルカリ水分散条件（pH 10 程度）に於ける加水分解調べたところ、分散体はピロリドン環の開環反応を起こし水に溶解することが分かった。そこで弱アルカリ性（pH 7.5 - 7.9）の土壌に深さ 2-4 cm で分解試験を行った結果、96%～100%の大きな重量減少を示した。この結果は、長期間環境にさらされることで、物理化学的および生物的な作用が施され徐々に開環反応が進行し、カルボン酸が側鎖として遊離することでバイオナイロンの水溶性が向上したことによると考えている。さらにピロリドン環の光開環反応を応用し、樹脂の水中に於ける光照射下での浸食を観察した。その結果予想通り紫外線照射により次第に水中に消失しながら分解する現象が観察された。また、アミノ酸の添加によりペプシンで分解できるナイロン開発へと研究が展開している。これらの成果を基に、海洋などの水と光の強い刺激のある状態では、軟化しながら分解が進み、かつ海洋生物が誤飲しても分解できるプラスチック開発へと展開出来ると考えており、海洋プラスチックゴミ問題の解決のための重要な指針を与えると考えている。

Key words itaconic acid, nylon, pyrrolidone, biodegradability, photonic function

G3H1 (0201) 糸状菌 *Acremonium* sp. TUS-MM1 株のパツリン分解機能の解析

○佐藤梨奈[1], 三田 芽実[1], 中川博之[2], 古屋俊樹[1]*
([1]東京理科大院・理工, [2]農研機構・高度分析研究センター)

Characterization of *Acremonium* sp. TUS-MM1 capable of degrading patulin

○Rina Sato[1], Megumi Mita[1], Hiroyuki Nakagawa[2], Toshiki Furuya[1]*
([1]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]Research Center for Advanced Analysis, NARO)
tfuruya@rs.tus.ac.jp

【背景・目的】パツリンは、リンゴ果実に特異的に着生する *Penicillium expansum* が産生するカビ毒で、活性酸素種への抵抗性を低下させることにより細胞毒性を示すと考えられている。その作用機序から様々な微生物に対しても毒性を示すため、パツリン存在下で生育して、さらに本化合物を分解する微生物の報告は限られている。とくに糸状菌については、*Byssochlamys* 属の微生物による分解が 1 例報告されているのみで、パツリン変換産物や分解機構も明らかにされていない。我々はこれまでに、パツリン分解糸状菌 *Acremonium* sp. TUS-MM1 株を取得している。本研究では、TUS-MM1 株が有するパツリン分解活性成分の存在する画分や変換産物を解析した。
【方法・結果】栄養寒天培地上に生育させた TUS-MM1 株の菌体を滅菌水に懸濁し、遠心分離により菌体と菌体外成分に分けた。菌体を滅菌水で洗浄後、再懸濁した菌体をパツリンと反応させたところ、HPLC 分析によりパツリンの減少と変換産物と推定されるピークが確認された。この現象は、菌体をオートクレーブ処理後にパツリンと反応させると観察されなかった。変換産物と推定される化合物について、LC-MS および NMR により分析したところ、デソキシパツリン酸と同定された。
一方、菌体外成分をパツリンと反応させた場合にもパツリンの減少と、デソキシパツリン酸とは別の変換産物と推定される複数のピークが確認された。この現象は、菌体外成分をオートクレーブ処理後にパツリンと反応させても観察された。さらに、限外ろ過により分画したところ、分子量 2 万以下の画分に当該活性が検出された。これより、菌体だけでなく菌体が外に放出する成分もパツリンの変換に関与し、これらがパツリンを協調的に分解している可能性が示唆された。

Key words patulin, degradation, *Acremonium*, mycotoxin

G3H1 (0202) 放線菌 *Streptomyces* sp. TUS-ST3 株によるジフェニルエーテル化合物の分解

○石井香菜子[1], 利根川聡史[1], 羽部浩[2], 古屋俊樹[1]*
([1]東京理科大院・理工, [2]産総研・環境創生)

Degradation of diphenyl ethers by *Streptomyces* sp. TUS-ST3

○Kanako Ishii[1], Satoshi Tonegawa[1], Hiroshi Habe[2], Toshiki Furuya[1]*
([1]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]EMRI, AIST)
tfuruya@rs.tus.ac.jp

【背景・目的】ポリブロモジフェニルエーテル（PBDE）やリグニン等の化合物は、ベンゼン環同士が強固なエーテル結合により連結されている。このエーテル結合を効率的に切断可能な微生物を見いだせれば、環境負荷を低く抑えながら環境汚染物質の分解やリグニンからの芳香族化合物の回収に応用できる可能性がある。我々はこれまでに、エーテル結合の切断を指標とした探索により、4,4′-ジヒドロキシジフェニルエーテル（4,4′-DDE）を分解可能な *Streptomyces* sp. TUS-ST3 株を取得している。当該活性を示す *Streptomyces* 属細菌は他に報告されていない。本研究では、TUS-ST3 株による 4,4′-DDE の分解産物を解析し、さらに分解反応の経時変化を測定した。また、比較としてエーテル結合を有さない 4,4′-ジヒドロキシビフェニル（4,4′-DB）に対する分解活性も評価した。
【方法・結果】土壌腐植物質のニトロフミン酸を炭素源とする固体培地で培養した TUS-ST3 株の菌体を 5 mM の 4,4′-DDE を含む溶液に懸濁して 30℃で 72 時間振とうした。この反応液を HPLC で分析したところ、2 つの生成物に相当するピークが検出された。そこで、GC-MS および LC-MS で分析したところ、これらの生成物はヒドロキノンと 4,4′-DDE の一水酸化体と同定された（図）。TUS-ST3 株は 4,4′-DDE を炭素源として利用できないが、グルコースを炭素源として利用できることがわかったため、つぎに、グルコースを炭素源とする液体培地で培養した TUS-ST3 株の菌体を回収し、同様に 4,4′-DDE と反応させた際の経時変化を測定した。その結果、反応開始後 12 時間から 4,4′-DDE の減少およびヒドロキノンの生成が顕著に確認された。これより、4,4′-DDE 存在下でその分解酵素遺伝子の発現が誘導されることが示唆された。また、TUS-ST3 株の菌体を 5 mM の 4,4′-DB と反応させた場合にも、HPLC 分析で生成物と予想されるピークが検出された。現在、生成物の同定を進めているところである。

Key words biodegradation, diphenyl ether, ether bond, *Streptomyces*

G3H1 (0203) 水圏環境のデータベース解析

○竹内諒, 梶原尚之, Tran Quoc Thin , 荒木希和子, 久保幹*
（立命館大院・生命科学）

Database analysis of hydrosphere environment

○Ryo Takeuchi, Naoyuki Kajiwara, Quoc Thinh Tran, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo*
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】
水圏環境の要素として水質と底質が存在し、水質、底質を理解することは水圏環境の特徴を把握する上で必須である。水質は人間社会との関わりから環境基準が設けられるなど関心が高いため、膨大なデータが存在している。底質については、底土中の窒素やリンといった栄養分は水生植物の養分となり、底質中の微生物は水域に流入する有機物の分解を行うことで、水域のヘドロ蓄積を抑制するなど水圏環境中においても重要な役割を持つ。しかし、水圏環境の底質に関してはそのデータは不十分な現状にある。また底質は流速による堆積物の溜まりやすさなど、水圏環境の形態にも影響を受けることも考えられるが、十分に調査されていない。本研究は水圏環境の底質の特徴を理解するため、水圏環境のデータベースを構築し、水域ごとの特徴を把握することを目的とした。
【方法・結果】
琵琶湖南湖から 24 サンプル、草津市狼川から 18 サンプル、立命館大学 BKC キャンパス内の北野新池から 17 サンプルを採取し、サンプルから底質中の全炭素量(TC)、全窒素量（TN）、全リン量（TP）、全カリウム量（TK）など全 10 項目を測定した。水圏環境全体では TC：600~15,000 mg/kg(平均 7,000 mg/kg)、TN：200~1,200 mg/kg(平均 500 mg/kg)であり、畑や樹園地をはじめとする陸上の底質に比べ土壌成分量が低い傾向にあることがわかった。また水圏環境の底質中微生物数は平均 4.0×10^8 cells/g-soil であり、陸上の平均(6.5×10^8 cells/g-soil)に比べ、低い結果となった。このことは底土中の有機物が少ないことにより微生物が少なくなったためだと考えられた。各水域の平均 TC において、狼川の底質は 1,900±1,400 mg/kg、琵琶湖南湖の底質は 5,300±1,200 mg/kg、北野新池の底質は 10,200±2,300 mg/kg と流速が遅くなるとともに TC が増加する傾向にあることがわかった。このことから水域の流れにより堆積物が流されることが影響していると考えられた。TC が低かった狼川において、抽水植物のヨシが優占している地点では比較的 TC が高い傾向にあった。

Key words aquatic vegetation, reed, soil environment

G3H1 (0204) 植物の病原性微生物の感染と土壌環境の関係解析

○雲川雄悟, 佐々木匠, Tran Quoc Thinh, 荒木希和子, 久保幹*
（立命館大院・生命）

The effect of soil environments including microorganisms on the infectivity of pathogen to plant root

○Yugo Kumokawa, Takumi Sasaki, Quoc Thinh Tran, Kiwako S. Araki , Motoki Kubo*
(Ritsumeikan Univ.)
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】
農業現場において、植物病は作物の収量を大きく減少させる要因の一つである。植物病を引き起こす病原微生物は多種類存在しており、ウイルスをはじめ細菌、糸状菌、そして原生動物などの微生物が挙げられる。農作物への病原性微生物の感染や植物病の発症は、土壌や植物内に存在する微生物によって大きく影響される。例えば、*Heteroconium chaetospira* という糸状菌はハクサイの根に侵入し、黄化病菌や根こぶ病菌などの病原微生物の感染を抑制することが知られている。また、根に内生する *Bacillus* 属細菌や *Pseudomonas* 属細菌の一部は宿主の病害抵抗性を誘導する効果を持つことが分かっている。一方、栽培土壌に存在する微生物や植物内の微生物叢と、病原微生物の感染の関係については不明瞭である。本研究では、植物病と内生細菌叢の密接な関係について知見を深めるため、コマツナ（*Brassica rapa* var. *pervilidis*）に感染する根こぶ病菌を用いて、土壌微生物量や根こぶ病の発症と根内細菌叢の関係を解析することを目的とした。

【方法・結果】
根こぶ病を発症したコマツナ根から根こぶ病菌（*Plasmodiophora brassicae*）の休眠胞子を抽出し、休眠胞子懸濁液を作製した。コマツナを、ネコブ病菌休眠胞子が 5.0×10^4 spores/cm^3-soil 含んだ土壌（病土）に定植し、植物栽培室で栽培した。土壌は、化学肥料のみを添加した化学土壌と有機肥料のみを添加した有機土壌を使用した。病土から採取した株の根を発症根とし、根こぶ病菌を含まない土壌から採取した株の根を非発症根とした。根を表面殺菌した後、根内の細菌 DNA を Slow-stirring 法によって抽出し、カラムおよびビーズによる精製を行った。DNA サンプルを MiSeq により 16S rRNA 配列のシークエンス解析を行い、細菌種の組成と多様性を解析した。
結果、根内細菌叢の相同性は、栽培土壌（化学土壌、有機土壌）に関わらず発症根間と非発症根間で高くなることが分かった。細菌種に着目すると、非発症根では *Flavobacteria* 綱の細菌が顕著に多く 40%を占めていた。また、根こぶ病の抑制効果が知られる *Acidovorax* 属と *Variovorax* 属の細菌は非発症根で多く存在していた。発症根では、*Delftia* 属や *Stenotrophomonas* 属細菌の割合が非発症根に比べて高かった。Shannon 指数は発症根（化学と有機）で 3.7 と 2.6、非発症根（化学と有機）で 5.4 と 4.0 となり、細菌叢のα多様性は非発症根で高いことが示唆された。根こぶ病を発症することで根内の細菌叢が変化し、特定の細菌にとって生育しやすい環境になったと考えられる。

Key words plant pathogen、 root bacteria、 soil environment

G3H1 (0205) 微生物を用いた新規雨水浄化処理装置の開発

○戸倉　隆人*, Tran Quoc Thinh, 荒木　希和子, 久保　幹
（立命館大学院・生命科学）

Development of a new rainwater purification system using environmental microorganisms

○Takahito TOKURA*, Quoc Thinh TRAN, Kiwako S. ARAKI, Motoki and KUBO
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ)
Sb0046rs@ed.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】　降水量の少ない地域や，震災被害の起きた場所では水不足に直面する。その備えとして雨水タンクの利用が有効とされるが，雨水には不純物が混在しているため長期的な貯水では水質が悪化する。したがって安全・安心に雨水を利用するためには，タンクの水を浄化し，その水質を維持することが重要である。我々は環境微生物と対流による水域の自浄作用に着目し，ポンプおよび微生物吸着担体を入れたカラムによって雨水を浄化する処理装置を開発した。本装置は，雨水をタンクに貯水して給水ポンプにより対流を発生させることで，カラムに保持させた環境微生物に十分な量の酸素を供給する。装置の流速を調整してカラム内の酸素供給量を変化させ 2 種類の好気的及び嫌気的環境を再現し，それぞれ環境に順応した微生物を増殖し，維持させている。本研究では，この雨水浄化処理装置の水質を測定し長期的な浄化作用と水質維持能力を調査して装置の浄化機能の評価を行うことを目的とした。
【方法・結果】　浄化装置（2 m^3）には，流速を 9.0 L/min に設定した好気的環境カラム 2 本，0.6 L/min に設定した嫌気的環境カラム 1 本の計 3 本が装備されている。2018 年の 5 月から 2021 年 4 月までの期間，1 週間に 1 回装置のタンクから水を採取した。水質を調べるために，採取した水の全炭素量（TC），無機態炭素量（IC），有機体炭素量（TOC），全窒素量（TN），色度，濁度，電気伝導率（EC），pH を測定した。また，化学的酸素要求量（COD）を月に 1 回測定した。更に，15 L/日の頻度でタンクの水を放水して新たな雨水が流入する状態を作り，雨水流入の有無による水質変化を調査した。放水の無い期間である 2018 年 11 月～2019 年 4 月，2019 年 11 月～2020 年 4 月のサンプルと，放水のある期間である 2020 年 11 月から 2021 年 4 月のサンプルを比較した。月に 1 回，3 本のカラムから担体を採取し slow-stirring 法により総細菌数を定量した。放水の無い期間における TOC の平均値はそれぞれ 1.52 mg/L，0.98 mg/L，TN の平均値は 1.22 mg/L，1.11 mg/L，COD の平均値は 1.48 mg/L，0.98 mg/L となった。色度は 3.3，2.3 で濁度は 0.1，0.3 であった。一方，放水のあった期間における TOC の平均値は 0.52 mg/L, TN の平均値は 0.98 mg/L, COD の平均値は 0.62 mg/L となった。色度は 1.5，濁度は 0.1 であったことから放水の有無による水質の変化は小さいことがわかった。全期間を通した平均総細菌数は好気的環境カラムにおいては 2.1×10^8 cells/g であり 8 月以降上昇傾向を示した。嫌気的環境カラムにおいては 0.6×10^8 cells/g であり大きな変化は見られなかった。これらの結果から，15 L/日の放水量であれば放水の有無に関わらず，装置の稼働により微生物の働きは促進されたと言える。また，特に炭素処理の活発化により水質維持が行われていると考えられる。

Key words　Water quality, purification

G3H1 (0206) 炭酸カルシウムと多糖に結合する融合タンパク質の作製とバイオセメントへの影響

○酒井 仁、中島 一紀*、川邉 徹弥、Hiranya Nawarathna、川﨑 了
（北大院・工）

Preparation of fusion protein that binds calcium carbonate and polysaccharide and the effect on biocementation

○Jin Sakai, Kazunori Nakashima*, Kawabe Tetsuya, Hiranya Nawarathna, Satoru Kawasaki
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)
k.naka@eng.hokudai.ac.jp

【目的】
バイオセメントは、化学反応を用いてセメント物質を生成し、砂や土を固化させる環境負荷の小さい新たな固化技術である。当研究室では、尿素加水分解酵素であるウレアーゼを用いたバイオセメントについて研究を行っている。尿素（ウレア）がウレアーゼによって加水分解されるとアンモニウムイオンと重炭酸イオンが生成する。そのとき系中にカルシウムイオンが存在すると炭酸カルシウムが析出し、それがセメント物質となって固化が進行する。一方で、自然界に存在する天然のバイオミネラルは有機物と無機物が高度に組織化された階層構造を取っており、有機および無機成分のみでは達成できないような物理・化学的特性を示す。本研究では、そのような高い機能性を示す天然のバイオミネラルに着目し、有機物である多糖（キチン、セルロース、キトサン）と無機物である炭酸カルシウムを複合化するためのタンパク質デザインとバイオセメントへの応用を検討した。
【方法、結果】
ザリガニの外骨格に存在する CAP-1 を模倣し、有機物（キチン）と無機物（炭酸カルシウム）を複合化するための融合タンパク質を作製した。具体的には、*Bacillus circulans* 由来のキチナーゼ A1 のキチン結合ドメイン ChBD と炭酸カルシウムに結合する CaBP からなる融合タンパク質である。バイオセメントの生成反応では、0.75M 尿素、0.75M 塩化カルシウム、ウレアーゼ（2.5U/ml）を 25℃、160rpm で 24 時間振とうすることで炭酸カルシウムを生成させた。この際、非添加系、融合タンパク質添加系、キチン添加系、キチン＋融合タンパク質添加系で実験を行った。遠心分離後、沈殿物を蒸留水で洗浄、凍結乾燥した後、SEM-EDS 分析および XRD 分析を行った。非添加系では主に菱面体晶と球状結晶が見られ、XRD 分析の結果からバテライトとカルサイトであることがわかった。一方、融合タンパク質添加系ではカリフラワー状のカルサイトが見られた。キチン添加系ではキチン上に菱面体晶のカルサイトが生成していたのに対して、キチン＋融合タンパク質添加系では菱面体晶のカルサイトに加えて、花弁状粒子のバテライトが多数生成している様子が確認された。さらに、バイオセメントによる砂の固化実験において、融合タンパク質を添加することで固化強度が増大することが明らかとなった。

Key words　biomineralization, biocementation, fusion protein

G3H1 (0207) イガイ接着タンパク質を用いたマグネタイトの凝集コントロール

○佐藤 岳大, 中島 一紀*, 宮川 寛希, Anju Pilakka Veedu, 川﨑 了
（北大院・工）

Control of magnetite aggregation by mussel adhesive protein

○Takahiro Sato, Kazunori Nakashima, Hiroki Miyagawa, Anju Pilakka Veedu, Satoru Kawasaki
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)
k.naka@eng.hokudai.ac.jp

【緒言】
イガイ接着タンパク質（以下 MAPs とする）は、イガイの足糸に存在し、岩場や船底などへの接着に関与するタンパク質であり、環境にやさしい新たな接着剤として盛んに研究が行われている。MAPs は水溶液中で様々な物体表面に接着することが可能であるが、同時に接着能力に基づく高い自己凝集性を持つため、接着の制御が非常に難しい。そこで、接着の制御が可能になれば、水中で利用できる新たな接着剤としての利用や、生体医療分野への応用が可能になると考えられる。本研究では、MAPs の一種である、ムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* 由来の fp1 の N 末端側に、可溶化タグとして水核タンパク質 Inak の C 末端部分である InakC を融合（以下 InakC-fp1 とする）することで、自己凝集性の抑制を検討した。また、融合した InakC を部位特異的プロテアーゼにより除去し、fp1 の接着性の回復およびマグネタイト粒子の凝集を検討した。同時に、fp1 により凝集したマグネタイトへのプロテアーゼ添加による再分散を検討した。さらに、赤色蛍光タンパク質 mCherry を融合した fp1 を用いてマグネタイトへの吸着挙動について調査した。
【実験方法】
InakC-fp1 を *E. coli* を宿主として大量発現し、精製およびリフォールディングを行った。得られた InakC-fp1 および InakC 切断のための HRV 3C プロテアーゼをマグネタイト粉末に添加し、25℃、160rpm で 2 時間振盪した後、上清のタンパク質濃度の減少量を測定した。さらに、得られたマグネタイトの凝集体の SEM 観察を行うとともに、凝集体にトリプシンを添加し、凝集体の分散実験を行った。
【結果】
InakC-fp1 は不溶性画分に発現したが、リフォールディングにより可溶化した。マグネタイトの凝集実験において、InakC-fp1 のみの系では、上清のタンパク質濃度はほとんど減少しなかったのに対し、InakC-fp1 とともに HRV 3C プロテアーゼを添加した系では、上清のタンパク質濃度が大きく減少し、マグネタイト粒子の凝集が確認された。すなわち、InakC の除去により、fp1 のマグネタイトへの接着性が回復したことが示された。また、得られたマグネタイトの凝集体はトリプシンの添加によって 10 分以内に分散した。以上より、可溶化タグ InakC の融合と切断によるマグネタイトの凝集コントロールが可能であることが示された。

Key words　mussel adhesive protein, fusion protein, aggregation control, biointerface

G3H1 (0208) 環境診断に資する指標決定に向けたファイトレメディエーションにおけるデータサイエンス

○工藤宏史 [1], 韓凝 [1], 横山大稀 [2], 簡梅芳 [1]*, 菊地淳 [2], 井上千弘 [1]
（[1] 東北大院・環境, [2] 理研・環境資源）

Application of data science on phytoremediation towards identifying indicators for environmental diagnosis

○Hiroshi Kudo[1], Ning Han[1], Yokoyama Daiki[2], Mei-Fang Chien[1]*, Jun Kikuchi[2], Chihiro Inoue[1]
([1]Grad. Sch. Environ. Stud. Tohoku Univ., [2]CSRS, RIKENS)
meifangchien@tohoku.ac.jp

【背景および目的】土壌や地下水中における自然由来・人為由来のヒ素（As）濃度の高い地域が広範囲に存在しており、このような環境汚染の対策として、植物が汚染物質を吸収・蓄積する能力を利用した汚染修復技術であるファイトレメディエーションが有効である。モエジマシダ（*Pteris vittata*）は、地上部中に As を 22,630 mg/kg・DW までも蓄積することが報告されており、As のファイトレメディエーションへの利用が期待されている。近年では、モエジマシダの As 吸収や成長を促す根圏機能微生物とモエジマシダを組み合わせた微生物補助型ファイトレメディエーションの提案と適用が進められてきている。しかし、実環境に適用する際、環境中の土壌・植物・微生物による多数の因子が複雑に作用しあうため、As 除去に及ぼす効果を俯瞰的に評価することは、ファイトレメディエーションの制御や現場適応のデザイン上に重要だと考える。本研究では、モエジマシダによる As 除去に寄与する因子を明らかにすることを目的とし、複数の環境においてモエジマシダの栽培試験を実施し、その結果を統合解析した。

【方法および結果】宮城県における As 含有量の異なる 2 つの圃場（S と K、ヒ素含有量約 9 mg/kg と約 70 mg/kg）にモエジマシダの栽培実験を行った。モエジマシダのみと、二種類の根圏単離菌である m307 株と m318 株をそれぞれモエジマシダに接種した計 3 条件で、2020 年 6 月から 10 月までの期間で栽培した。植え付け時、9 月、10 月に植物および根圏土壌の試料を採取し、植物中 As 濃度、根圏中代謝産物および微生物叢をそれぞれ ICP-MS、NMR、16S rRNA アンプリコンシーケンス解析により分析し、得られたデータを Weighted Gene Correlation Network Analysis （WGCNA）によるネットワーク解析を行った。その結果、植物中の As 濃度は植え付け時の 1.04±0.19 $mg\cdot kg^{-1}$ に対し、圃場 S では 9.56±1.03 $mg\cdot kg^{-1}$、圃場 K では 85.96±7.26 $mg\cdot kg^{-1}$ (ともにモエジマシダのみ)にまで上昇した。WGCNA により解析した結果では、植物中の As 濃度に関連する因子として土壌中 β-グルコースが抽出され、両者の相関係数は 0.75 と高かった。今後はより多くのデータの蓄積が必要だが、データサイエンスはファイトレメディエーションにおける診断指標の決定に有効なアプローチであることを示した。

Key words　phytoremediation, data science, biological interaction, environmental diagnosis

G3H1 (0209) 複合環境下での 1,4-ジオキサン生分解における非分解菌の役割を示す経験的証拠

○簡梅芳 [1]*, Tusher Tanmoy Roy[1,2], 井上千弘 [1]
（[1] 東北大院・環境, [2]Dept. Environ. Sci. Resour. Manage., Mawlana Bhashani Sci. Tech. Univ.）

Empirical evidences reveal the role of non-degraders in the biodegradation of 1,4-dioxane under complex environment

○Mei-Fang Chien*, Tanmoy Roy Tusher, Chihiro Inoue
(Grad. Sch. Environ. Stud. Tohoku Univ., [2] Dept. Environ. Sci. Resour. Manage., Mawlana Bhashani Sci. Tech. Univ.)
meifangchien@tohoku.ac.jp

難分解性有機汚染物（persistent organic pollutants, POPs）による環境汚染の対策として、POPs 分解菌を利用する持続的かつ低環境負荷な浄化アプローチとして知られている。一般的には、汚染環境に生息する分解菌のみが注目され、これらの分解菌を純粋培養またはコンソーシアムとして適用するが、同じ環境に生息する非分解菌の役割は検討されてこなかった。本研究は、難分解でかつ人間への発がん性の疑いにより、近年世界的に規制が強化されている 1,4-ジオキサン（1,4-dioxane）を対象とし、合成コンソーシアム（Synthetic consortium; SC）による模擬複合環境での 1,4-ジオキサン分解における非分解菌の役割に着目して行った。

1,4-ジオキサン分解コンソーシアムから単離した 3 株の分解菌と 3 株の非分解菌を用いて SC を作製した。分解菌（D）のみを含む SCD を 4 つ、分解菌（D）と非分解菌（N）を含む SCDN を 4 つ、計 8 つの SC を作製した。共添加した基質として、分解されやすいグルコースや乳酸、1,4-ジオキサン分解時の中間産物のエチレングリコール、1,4-ジオキサンと構造類似なテトラヒドロフラン、その他 1,4-ジオキサンとよく共存する汚染物としてトルエンなど、計 8 種類の基質をそれぞれ 1,4-ジオキサンと混合した模擬複合環境を用意した。上記 SC を混合環境に適用した際の 1,4-ジオキサンの分解を測定し、Simplex lattice mixture design により解析した。

その結果、複数の分解菌からなる SCD よりも、非分解菌も一定な割合で存在した SCDN のほうがコンソーシアムとしての 1,4-ジオキサン分解能が高いことがわかった。これらの結果は、分解菌・非分解菌の共存および相互作用は 1,4-ジオキサンの効率的分解に寄与する実験的証拠であり、生物学的浄化技術を実汚染環境に適用する際、分解菌と非分解菌のバランスを意識したコンソーシアムの設計の重要性を提起した。

Keywords 1,4-dionxane, biodegradation, synthetic consortia, microbial coexistence

G3H1 (0210) 光刺激応答性バイオナイロンの海水中での光暴露後の変化と微生物群集構造に対する影響

○若井暁 [1]*, 塚谷京 [1], 磯部紀之 [2], 野牧秀隆 [1], 金子達雄 [3]
（[1] 海洋研・超先鋭, [2] 海洋研・海洋機能, [3] 北陸先端大・環境エネルギー）

Influence of light-responsive bionylon to marine microbial communities

○Satoshi Wakai[1]*, Misato Tsukatani[1], Noriyuki Isobe[2], Hidetaka Nomaki[1], Tatsuo Kaneko[3]
([1]X-star, JAMSTEC, [2]MRU, JAMSTEC [3]Grad. Sch. Adv. Sci. Technol., JAIST)
wakais@jamstec.go.jp

海洋に流出したプラスチックごみは、景観を損なうだけでなく、海洋生物による誤飲やゴーストフィッシング、マイクロプラスチック化による生物への影響などを引き起こし、重要な社会問題として近年注目されている。海洋環境に流失させない取り組みが大事であるが、不可抗力的に流失する場合もあり、環境中で分解されるプラスチックの開発が進められている。

光刺激応答性バイオナイロンは、疎水性の表面を持つが、一定量の紫外線に暴露することで表面の親水化が進む。この様な性質は、海洋に流失した際に強い紫外線に曝されることで表面が親水化し、生分解性が発現すると期待されている。実際に、人工的に紫外線を照射して水溶化させたバイオナイロンオリゴマーは、ナイロン分解酵素により分解できることが分かっている。

本研究では、性状の異なる光刺激応答性バイオナイロン四種を用いて、自然光暴露実験を実施し、バイオナイロンの形状変化と使用した海水中の微生物群集構造の変化を調べた。また、海洋環境は一律ではなく、特に内湾と外洋では人類起因的な汚染度が異なるため、横須賀岸壁海水（以後、横須賀海水）および沖縄外洋海水（以後、沖縄海水）を使用した。微生物細胞から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の一部を PCR により増幅し、次世代シーケンサ MiSeq を用いてアンプリコンシーケンシングを行い、Qiime 2 パイプラインを用いて微生物群集構造を解析した。

海水中の微生物群集構造は予想通り、横須賀海水と沖縄海水で明確に群集構造に違いが見られた。構成する微生物種は大きく異ならないが、Bacteroidia 綱および Gammaproteobacteria 綱の優占度に違いが見られた。自然光暴露実験後、比較的水溶化しやすいバイオナイロン Nylon 6i では、横須賀海水と沖縄海水でそれぞれ異なるクラスターを形成した。特徴的な傾向として、沖縄海水を使用した際に Gammaproteobacteria 綱微生物が群集構造の 8~9 割を占めるほどに増加した。また、親水化しにくい他のバイオナイロン三種では、一部のサンプルを除いて Alphaproteobacteira 綱微生物の有意な増加が見られた。

別途実施した BOD（生物化学的酸素要求量）試験では、Nylon 6i の添加により顕著な BOD の上昇を確認し、本バイオナイロンが生分解を受けていることも確認した。海洋での分解性が期待される生分解性素材については、分解後に環境中の生態系へ与える影響が最小限である必要もあり、材料特性・分解性・生態影響性の複合的な視点での評価を引き続き実施する。

Key words bionylon, biodegradable plastic, light-responsive, microbial community

G3H1 (0211) アンモニアガス耐性細菌の単離とアンモニア臭脱臭技術開発

多田彩華, 山崎竜杜, 伊藤 優吾, 清 啓自, ○吉田ナオト*
(宮崎大・農)

Isolation of ammonia gas-tolerant bacteria and their application to elimination of malodorous gas

Saika Tada, Ryuto Yamazaki, Yugo Ito, Keiji Kiyoshi, ○Naoto Yoshida*
(Fac. Agric., Univ. Miyazaki)
a04109u@cc.miyazaki-u.ac.jp

簡易式野外トイレは工事現場をはじめイベント会場、山岳地帯など下水設備が整っていない箇所から需要がある。しかしその汚水処理過程において、強いアンモニア臭が発生するので、現場環境の悪化が懸念事項となっている。アンモニアガスは生物にとって毒性が高く、生存を強く阻害する。アンモニア耐性生物は、処理能力に優れると予想される。自然界からアンモニア耐性を有する微生物を探索し、それらの機能を利用したアンモニア臭脱臭剤を開発する。

アンモニアガス 4000ppm を含む大気中で生育可能なアンモニアガス耐性細菌を 2 株単離した。これらの細菌はアンモニア水を含む液体栄養培地中でも生育可能であった。アンモニア水を 0.1-0.2%含む培地での生育は、全く含まない培地での生育より良好であった。アンモニア水の単離細菌に対する最小生育阻止濃度は 0.5%であった。アンモニアガス耐性細菌は最適生育 pH を 9 に持つ好アルカリ性細菌で、16SrRNA 遺伝子の解析から、*Bacillus lentus* であると同定した。

アンモニアガス 1000-1300ppm を含む大気中で窒素源を含まない固形培地で生育する細菌を 3 株単離した。単離した細菌はアンモニアガスなしではまったく生育が認められないので、アンモニアガス要求性細菌といえる。16SrRNA 遺伝子の解析から、*Paenibacillus lentus* および *Bacillus altitudinis* であると同定した。

単離細菌を固定した木材粉末のアンモニア臭の脱臭効果を評価した。*Bacillus altitudinis* を固定した木材粉末を通過した排気ガス中のアンモニアガス濃度は木材粉末のみを通過したそれの 30%に抑制された。細菌を固定した木材粉末は乾燥すると、脱臭効果を失うが、水分調整をすると脱臭能力を回復し、永続的に脱臭効果を発揮できる。アンモニアガス要求性細菌を固定した脱臭剤は簡易トイレのアンモニア臭脱臭剤として有望な技術である。

Key words gaseous ammonia, ammonia emission, deodorizer, *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp.

G3H1 (0212) フェノールスルホン酸及びハイドロキノンスルホン酸分解菌を用いたビスフェノール S 代謝物の分解

○武尾正弘*, 猪野椋太, 大滝世和
（兵庫県大院・工）

Degradation of bacterial bisphenol S metabolites by phenolsulfonate- and hydroquinonesulfonate-degrading bacteria

○Masahiro Takeo*, Ryota Ino, Seiwa Otaki
(Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo)
takeo@eng.u-hyogo.ac.jp

ビスフェノール S（BPS）は、耐熱性エンジニアリングプラスチックの材料として重要な化学物質であるが、その一方で内分泌攪乱作用を有する有害物質でもある。我々は、本物質が *Sphingomonas* 属細菌の保有するノニルフェノール（NP）酸化酵素で簡単にフェノールスルホン酸（PS）やハイドロキノンスルホン酸（HQS）へ分解されることを明らかにしている。本研究では、BPS の完全分解系の構築を目的に、新たに分離した *Cupriavidus* 属の PS 分解菌と *Delftia* 属の HQS 分解菌を用い、これらの BPS 代謝物に対する分解性と総合的な BPS の分解について検討した。

これまでの検討で NP 酸化酵素による BPS の分解で、主要な代謝物としてハイドロキノン（HQ）、PS 及び HQS が検出されてきた。そこで、研究室保有の HQ 分解菌 *Pseudomonas* sp. TSN1 株に NP 酸化酵素の遺伝子 *nmoA* を広宿主域ベクター pBBR1MCS-2 を介して導入したところ、その細胞懸濁液（OD_{600}=2.0）は 0.4mM BPS を 7h 程度でほぼ完全に分解し、PS 及び HQS を代謝物として生成した。HQ は代謝物として一時的に検出されたが、宿主の TSN1 株が HQ を分解できるため、分解試験 3h 後にはほぼ完全に消失した。また、この BPS 分解で 2 つの未同定の代謝物が検出された。この BPS の分解物を新たに分離した PS 分解菌 *Cupriavidus* sp. PSY7 株及び HQS 分解菌 *Delftia* sp. HQS1 株の細胞懸濁液（OD_{600}=1.0）を用いてそれぞれ分解させたところ、PS 分解菌による分解で PS の除去、HQS 分解菌による分解で HQS の除去が達成できた。しかしながら、2 つの未同定の代謝物の一つが最終的に残留すること、また、HQ が初期の分解で除去できない場合、その後の PS 分解や HQS 分解を阻害することも明らかになった。

BPS の単一菌による分解の報告はほとんどなく、また分解に時間を要することが予想されるため、このように比較的増殖の容易な分解資化菌の組み合わせで、BPS 分解の効率化が期待できることが示唆された。

Key words biodegradation, phenolsulfonic acid, hydroquinonesulfonic acid, EDCs

G3H1 (0213) 農場や浸水地域における消毒剤としての $Ca(OH)_2$ 粉末の効果的な使用

○ZHUNA[1], 松崎慎史[1], 東絢斗[1], LIN XUGUANG[1], 倉賀野正弘[1], 上井幸司[1], 山中真也[1], 徳樂清孝[1*]
（[1]室蘭工業大学大学院）

Effective use of $Ca(OH)_2$ powder for disinfectant in farm and flooded area

○NA ZHU[1], Shinji Matsuzaki[1], Kento Azuma[1], Xuguang Lin[1], Masahiro Kuragano[1], Koji Uwai[1], Shinya Yamanaka[1], Kiyotaka Tokuraku[1*]
([1]Muroran Inst. Tech.)
tokuraku@muroran-it.ac.jp

$Ca(OH)_2$, with high alkalinity, has been utilized as a disinfectant to inactivate pathogens such as bacteria and viruses, which are the main causes of infectious diseases in livestock and human. In Japan, $Ca(OH)_2$ powder is spread at the entrances to a farm and around livestock houses, or related facilities as a livestock hygiene service center. This method to disinfect tires of vehicles and shoes of humans is called “stand-by disinfection” system. $Ca(OH)_2$ powder is also used to disinfect flooded areas. However, the efficacy of these disinfection methods using solid $Ca(OH)_2$ powder has still remain unknown. For example, water is essential for the strong alkalinity that underlies its disinfecting effect, but it is unknown how much water is required under use conditions. In addition, $Ca(OH)_2$ reacts with carbon dioxide, reducing its pH, but it is unclear how long its degradation takes under actual use. Therefore, in this study, we established a new method to evaluate the disinfecting effect of solid $Ca(OH)_2$ powder and used it to evaluate the disinfecting effect under actual usage conditions. Moreover, we tried to develop a simple evaluation method using a pH indicator to detect a decrease in the disinfecting effect of $Ca(OH)_2$ due to carbonation.

In this study, we used E.coli XL-1 blue as the targeted pathogen to be disinfected. $Ca(OH)_2$ powder was contacted with the E.coli powder under various conditions, and the disinfecting effect was evaluated by the dilution plate method. The results revealed that $Ca(OH)_2$ requires a water content of 10% or more to work a disinfecting effect and $CaCO_3$ does not show disinfecting effect. The water contents of the $Ca(OH)_2$ powder samples spread on the flooded area were about 20%~30%, and the disinfecting effect of E.coli was also confirmed. On the other hand, the water contend of $Ca(OH)_2$ powder samples spread on the dried underfloor was about 1%~2% and showed no disinfectant effect. Moreover, we found that the pH of the $Ca(OH)_2$ decreased within about two weeks to one month due to the carbonation under “stand-by disinfection” conditions and lost its ability to disinfect. We also successfully developed a novel pH indicator solution that can detect a decrease in the disinfecting effect of $Ca(OH)_2$.These findings will help to establish a suitable method of applying $Ca(OH)_2$ powder to protect farms and people’s lives from infectious diseases.

Key words bacteria, disinfectant, farms and flooded areas, pH indicator.

G3H1 (0214) *Pseudonocardia* sp. D17 が保有する 1,4-ジオキサン分解酵素による塩素化エチレン類の好気的分解

○西峯隆悟[1], 南薗洸佑[1], 中澤昌俊[1], 井上大介[1], 池道彦[1*]
（[1]阪大院・工）

Aerobic degradation of chloroethenes by 1,4-dioxane degrading enzymes of *Pseudonocardia* sp. D17

○Ryugo Nishimine[1], Kousuke Minamizono[1], Masatoshi Nakazawa[1], Daisuke Inoue[1], Michihiko Ike[1*]
([1]Osaka Univ.)
ike@see.eng.osaka-u.ac.jp

代表的な土壌・地下水汚染物質である塩素化エチレン類（CEs）を好気的に分解可能な細菌株に関する報告は数多く存在するが、それらの細菌株の大半は共代謝菌であり CEs 分解に一次基質を必要とする。他方、近年になり、1,4-ジオキサン分解を触媒する soluble di-iron monooxygenase（SDIMO）が CEs も分解し得ることが報告された。我々が保有する 1,4-ジオキサン分解菌 *Pseudonocardia* sp. D17（D17 株）は、SDIMO により 1,4-ジオキサンを構成的に分解することが明らかとなっており、CEs も構成的に好気分解出来る可能性が考えられた。そこで本研究では、D17 株の CEs 分解能を評価すると共に、D17 株が保有する 2 種類の SDIMO（tetrahydrofuran monooxygenase（THFMO）、propane monooxygenase（PrMO））のうち THFMO の CEs 分解への関与について検討した。

まず、D17 株の CEs 分解能を評価するため、1,4-ジオキサン及び CEs を含まない MGY 培地で前培養した D17 株を用い、無機塩培地（BSM）内において、テトラクロロエチレン（PCE）、トリクロロエチレン（TCE）、シス-1,2-ジクロロエチレン（*c*-DCE）、トランス-1,2-ジクロロエチレン（*t*-DCE）、1,1-ジクロロエチレン（1,1-DCE）、クロロエチレン（VC）の 6 種類の CEs を用いた分解試験を実施した。その結果、D17 株は PCE を除く 5 種類の CEs を分解した。また、一部の CEs を用いた分解試験においては CEs 分解に伴う化学量論的な塩化物イオンの生成が確認され、CEs の完全分解が示唆された。更に、各 CEs の分解は試験開始直後から生じ、その分解速度は *c*-DCE, VC＞1,1-DCE≧*t*-DCE＞TCE であった。以上の結果から、D17 株は塩素数 3 以下の幅広い CEs を一次基質を添加することなく分解可能であり、好気性 CEs 分解に有望な細菌株であることが明らかとなった。

次に、D17 株が保有する *thm* 遺伝子群を *Rhodococcus rhodochrous* ATCC12674 に導入した THFMO 高発現形質転換体（ATCC12674_*thm*）を構築し、これを用いた CEs 分解試験を実施した。その結果、ATCC12674_*thm* は、D17 株で分解が確認された 5 種類の CEs のうち、*c*-DCE、1,1-DCE、VC の 3 種類を分解した。これより、D17 株の THFMO が *c*-DCE、1,1-DCE、VC の分解を触媒することが明らかとなった。一方、TCE と *t*-DCE は ATCC12674_*thm* による分解が確認されなかったことから、PrMO 或いはそれ以外が分解に関与していることが示唆された。

Key words chloroethenes, soluble di-iron monooxygenase, aerobic degradation

G3H1 (0215) バイオプロセスを用いたアンチモン化合物合成の試み

○村上 智哉[1], 富永 依里子[2] 岡村 好子[1*]
（[1]広島大院・統合生命科学, 広島大院・先進理工[2]）

Attempt to synthesize antimony compounds by bioprocess

○Tomoya Murakami[1], Yuriko Tominaga[2], Yoshiko Okamura[1*]
([1] Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2] Grad. Sch. Adv. Sci. Eng, Hiroshima Univ.)
okamuray@hiroshima-u.ac.jp

【目的】アンチモン(Sb)は，プラスチックや繊維製品などの難燃助剤などに加え触媒や顔料，近年では半導体材料など幅広い産業分野で用いられている．しかし，毒性が高い有害物質でもあるため，廃水や環境中の Sb 処理技術の開発が課題となっている．バイオレメディエーションの観点から細菌を用いた処理の注目が集まりつつあり，近年では Sb(Ⅴ)還元細菌も報告されている．しかし，Sb(Ⅲ)還元細菌の報告はない．一方，3 価のイオン態は 5 価のイオン態に比べて約 10 倍毒性が強いことが知られている．本研究では，Sb(Ⅲ)還元細菌を探索する中で，Sb(Ⅲ)を構成元素に持つ硫化物形成菌叢を発見したため，菌叢による鉱物形成とそのキャラクタリゼーションを行った．
【方法】Sb(Ⅲ)還元細菌の集積は，当研究室が保有している 44 の海洋サンプルに対し，酒石酸アンチモン(Ⅲ)カリウムと塩化インジウムを終濃度が 500 μM となるように同時に添加し，Sb(Ⅲ)に耐性を持つ菌叢として取得した．そこから，誘導結合プラズマ発光分光分析（ICP-OES)で培養上清や細胞分画の金属イオン濃度を測定し，鉱物を形成している菌叢を選抜した．その菌叢に対し粉末 X 線回折（XRD）装置を用いて結晶性を測定し，透過型電子顕微鏡に付属するエネルギー分散型 X 線分析（TEM-EDS）によって，形成された鉱物の構成元素を特定，電子線回折から結晶構造を解析した．
【結果・考察】インジウム(In)イオンはアンチモンイオンのカウンターイオンとして添加し，生育曲線は In の生育促進を示した．Sb が細胞内から検出された菌叢を選抜し，抽出した鉱物の評価を行った．XRD カーブは，結晶由来の回折パターンを示さなかったが，TEM-EDS では，電子密度の濃い菌体の形をした鉱物やナノサイズの粒子が凝集している様子とその周りに電子密度の薄い粒子が観察された．EDS の結果，電子密度の薄い鉱物からは In，P，O，C 由来の各ピークが検出され，電子密度の濃い鉱物では Sb と S のピークが大きく検出された．予想に反して Sb は In と化合物を形成せず，硫酸還元呼吸を行う細菌によってアンチモン硫化物が形成されることが示された。また，ナノサイズの粒子が凝集している部分の電子線回折は同心円状のリングパターンを示したため，Sb と S の多結晶構造を持つことが示唆された．以上より，Sb(Ⅲ)に耐性を持ち，アンチモン硫化物を形成する細菌を得ることに成功したと言える．

Key words marine bacteria, bioremediation, metal recovery, antimony

G3H1 (0301) 長期宇宙滞在に向けた微細藻類による水再生の検討

○吉田江里菜[1], 伊藤喜龍[1], 加藤悠一[2], 山崎千秋[3], 蓮沼誠久[1,2*]
（[1]神戸大学大学院・科学技術イノベーション研究科, [2]神戸大学・先端バイオ工学研究センター, [3]宇宙航空研究開発機構 (JAXA)）

Examination of water regeneration by microalgae for long-term space stay

○Erina Yoshida[1], Kiryu Ito[1], Yuichi Kato[2], Chiaki Yamazaki[3], Tomohisa Hasunuma[1,2*]
([1]Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University, [2]Engineering Biology Research Center, Kobe University, [3]Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA))
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

現在，国際協力による有人月面探査や火星探査に向けた動きが活発化しており，将来惑星探査に向けた技術の確立が必要である．月や火星での滞在は，地球からの距離が遠いことから，定期的な物資補給が難しいと思われる．そのため，一度輸送した物質を，できるだけ再生利用し，閉鎖空間内で持続的に物質循環させる技術が必要である．

尿や汗などの排水を飲料水に再生する「水再生」技術は，閉鎖空間内での物質循環を達成するために非常に重要な技術である．尿や汗などの排水を飲料水レベルの水質まで処理を行う技術について，国内では JAXA を中心に研究開発が進められているが，「水」の再生は行うものの，排水中に含まれる窒素，リンなどの無機化合物，尿素などの有機化合物の物質循環は達成できておらず，これらの化合物も有効活用し、物質循環させる技術の確立が必要である．

微細藻類は，窒素やリンなどを栄養源として増殖するうえ，増殖した藻類を食糧として利用できることから，排水中の化合物の物質循環のために適用できるポテンシャルを有している．しかし，微細藻類が排水成分によって生育できるのか，生育できる場合，どの程度の成分を消費できるのかは明らかではない．

本研究では，微細藻類による尿成分の利用可能性を検証することを目的とした．実験材料として尿素を主成分とした窒素（NH^{4+}, NO^{3-})や PO^{4-}などが含まれる模擬尿を用意し，数種類の微細藻類から模擬尿を利用して培養が可能なものを選定した．模擬尿に含まれる成分のみで培養したところ，すべての微細藻類において増殖は確認されなかった．そこで，一般的な培地に含まれる微量元素（鉄，マンガンなど）を模擬尿に添加して培養したところ，一部の微細藻類において増殖が確認され，模擬尿を利用した微細藻類培養に成功した．現在，培養後の上清の成分分析や，増殖に必須な微量元素の特定を行なっており，それらの結果についても報告する予定である．本研究の発展により，空気再生や水再生だけでなく，培養によって得られる藻体を宇宙滞在における食糧として利用することも可能になると考えられる．

Key words space station, microalgae, water regeneration, carbon fixation

G3H1 (0302) 酸素供給能は自家熱型高温好気消化プロセスに影響を及ぼす

○井出本貴宏[1]*, 張敏[1], 田代幸寛[1], 丸山明子[1], 酒井謙二[1]
([1]九州大学大学院生物資源環境科学府)

Oxygen supply capacity influences autothermal thermophilic aerobic digestion process

○Takahiro Idemoto[1]*, Min Zhang[1], Yukihiro Tashiro[1], Akiko Maruyama[1], Kenji Sakai[1]
([1]Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University)
tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp

自家熱型高温好気消化（ATAD）は、複合微生物による発熱等により 50°C 以上の高温下で好気的に進行するプロセスである。福岡県築上町で町内のし尿および汚泥を液肥化に応用されている実機では、温度、DO などの理化学特性および細菌叢は 3 段階で変化することを明らかにした（Tashiro et al., AEM, 2018）。本プロセスはサスティナブル資源循環利用技術として期待される。先行研究では，酸素供給方式およびせん断応力が理化学特性および細菌叢変化に寄与する因子であることを報告した（Zhang et al., JBB, in press）が、酸素供給に要する高い消費電力が課題である。そこで本研究では、未報告である因子として酸素供給能の重要な指標である K_La（総括酸素移動容量係数）が ATAD プロセスにおよぼす影響を調べた。

本実験では築上町液肥製造施設で採取した原料（し尿および汚泥）および種菌として液肥を用いた。エアレーター式撹拌装置を導入したバイオリアクターを用いて、撹拌速度 1000 rpm 一定で通気量を変化させて K_La を 10、25、50、90 h^{-1} に設定した。実機と同じ温度上昇プログラムで 9 日間消化を行った。温度、DO、pH、ORP を常時オンラインで計測し、適宜サンプリングした試料について、細菌叢、COD、アンモニア態窒素を分析した。低 K_La の場合、消化初期に DO がほぼ 0 となったが、高 K_La では DO は 4 mg/L 以上となった。細菌叢解析の結果、*Acinetobacter indicus* 類縁菌が優占となり、K_La の増加に伴い、占有率が大きくなった。さらに、いずれの K_La でもほぼ類似して COD が減少し、低酸素供給条件下でも有機物の分解が進行することが示唆された。また、K_La が小さい場合にアンモニア態窒素の維持率が大きかったが、K_La が大きい場合に維持率が小さかった。以上の結果、酸素供給能は細菌叢変化や理化学特性に影響を及ぼすことが明らかとなった。特に、消化効率および窒素維持率の観点からも、消費電力の小さい低酸素供給下でも本 ATAD プロセスを実施可能であり、高窒素含有液肥を生産できることが示唆された。

Key words autothermal thermophilic aerobic digestion, volumetric oxygen transfer coefficient, ammonia nitrogen, complexed microorganism

G3H1 (0303) 講演中止

G3H1 (0304) Enrichment of thermophilic methanogenic microflora from mesophilic waste activated sludge and evaluation of microbial community dynamics

○Sumire Nakakoji[1*], Melly Mellyanawaty[2, 4], Masahiro Tatara[1], Lisendra Marbelia[2], Sarto[2], Irfan D. Prijambada[3], Wiratni Budhijanto[2], and Yoshiyuki Ueno[5]
([1]Kajima Technical Research Institute., [2] Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, Universitas Gadjah Mada., [3]Faculty of Agriculture, Universitas Gadjah Mada, [4]Environmental Engineering Department, Faculty of Engineering, Universitas Muhammadiyah Tasikmalaya., [5]Alchemic Lab, Inc.)

Enrichment of thermophilic methanogenic microflora from mesophilic waste activated sludge and evaluation of microbial community dynamics

○Sumire Nakakoji[1*], Melly Mellyanawaty[2, 4], Masahiro Tatara[1], Lisendra Marbelia[2], Sarto[2], Irfan D. Prijambada[3], Wiratni Budhijanto[2] and Yoshiyuki Ueno[5]
([1]Kajima Technical Research Institute., [2] Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, Universitas Gadjah Mada., [3]Faculty of Agriculture, Universitas Gadjah Mada, [4]Environmental Engineering Department, Faculty of Engineering, Universitas Muhammadiyah Tasikmalaya., [5]Alchemic Lab, Inc.)
nakakoji@kajima.com

The anaerobic digestion has been a major technology for efficient organic discharging reduction with less energy consumption as well as biogas recovery. The enrichment of thermophilic methanogens is one of the technical challenges to expand its commercial application. In this study, we examined the enrichment process of thermophilic methanogenic microflora from waste activated sludge as seeding. We scheduled 20 days for batch incubation in 55 degree Celsius then observed stable biogas production in subsequent stepwise increasing of the organic loading rate in continuous cultivation. T-COD removal rate reached more than 70% at 78 days onward. 16S rRNA amplicon analysis of microflora showed the accumulation of *Methanosarcina thermophila* and *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, which are thermophilic methanogens, and *Hydrogonispora* sp. and *Syntrophomonas* sp., which are well known to coexist with methanogens in the anaerobic digestion reactors. These results imply that conventional seeding source such as waste activated sludge enable to establish our protocol of thermophilic methanogenic microflora enrichment.

Key words anaerobic digestion, thermophilic methanogen, microbial community wastewater treatment

G3H1 (0305) Improvement of ammonium-rich waste to bioenergy conversion from illuminated anaerobic bioreactor: optimization and practical feasibility

○Zhu Yunxin*, Liu Zhiyuan, Zhang Cheng, Ming Jie, Yang Yingnan
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Improvement of ammonium-rich waste to bioenergy conversion from illuminated anaerobic bioreactor: optimization and practical feasibility

○Zhu Yunxin, Liu Zhiyuan, Zhang Cheng, Ming Jie, Yang Yingnan*
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

Anaerobic degradation of ammonium-rich waste into methane has become attractive strategy for waste management and bioenergy conversion. However, excess ammonia generated during this process often acts as a strong inhibitor of anaerobes and repressed the conversion efficiency. Previous studies reported that light-stimulation was an effective strategy for overcoming ammonia inhibition, while little attention focuses on optimizing the light condition for an efficient performance during scale-up application. Moreover, solar as a promising light source, could be an eco-friendly alternative for future commercialization. Therefore, this study first optimized an innovative light-assisted bioprocess for promoting methane conversion from ammonium-rich feedstock. The possible mechanism and practical effectiveness was further revealed to provide guidance for practical application under solar illumination.

To identify the optimal light condition, 13 runs batch fermentation experiments were carried out under different light conditions with ammonium-rich substrate (NH_4^+-N concentration = 2500 mg/L) based on response surface methodology (RSM). The possible light-stimulating mechanism was revealed in view of key coenzyme activities, electron transfer capacity and sludge properties. Moreover, to confirm the practical effectiveness of proposed condition, batch experiments were conducted with different NH_4^+-N levels (2500-8000 mg NH_4^+-N/L) and light sources (simulated solar light and incandescent light). Finally, a 47-day semi-continuous experiment was carried out to verify its long-term effectiveness.

The optimized light condition contributed to doubled methane yield compared to the dark group. Mechanistic insight into enhancement revealed that the proposed light condition could improve microbial activity, promote the methanogenic pathway and favorable sludge properties (hydrophobicity and electroactivity). The effectively boosted digestion performance regardless of ammonia levels and comparable performance under simulated solar light (UV cut) illumination demonstrated the robust effectiveness for waste treatment and practical feasibility under sunlight illumination. Finally, the proposed condition led to a well-performed bioprocess with enriched microbiome during the long-term operation, indicating the promise of constructing an innoaive illuminated process for sustainable waste-to-energy conversion during practical application.

Key words anaerobic degradation, methanogen, scale-up, light stimulation, sunlight

G3H1 (0306) 活性汚泥由来テレフタル酸分解菌の検討

○鵜殿彩[1], 佐藤聖[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)

Study of terephthalic acid-degrading bacteria in activated sludge

○Aya Udono[1], Kiyoshi Sato[1], Takahiro Uchibori[2], Toshiaki Nakajima-Kambe[1*]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Panac ind, inc)
nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

光学用 PET フィルムのリサイクルにおいては、フィルム表面のコーティングを剥離する際にテレフタル酸 (TPA) を生じる。これは廃水処理施設の活性汚泥を用いて処理されている。しかし従来の活性汚泥法では処理が間に合わず、TPA が蓄積することが課題であった。これを解決するため TPA 分解菌のスクリーニングを行ったところ *Pseudomonas* sp. TB-97 株が得られ、その解析結果をもとに廃水に補因子を加えることで TPA 処理能が大幅に向上した。しかしその後、活性汚泥中の微生物叢の 16S rDNA アンプリコン解析を行った結果、本菌株が優占化していないことが明らかとなった。

そこで活性汚泥中で実際に TPA 分解に寄与する菌株を明らかにするため、活性汚泥を一定期間ごとに解析するとともに、実験室にて 1%TPA を添加し数日間振盪培養した活性汚泥についてアンプリコン解析を行った。その結果、汚泥中に一定して高頻度で存在し、かつ TPA 添加で検出数が約 1.75 倍増加した菌種を見い出した。アンプリコンの配列からこれは *Haliscomenobacter* 属と考えられた。そこで本菌株の取得を試みることとした。この菌株の特異配列部位を特定し、その範囲をカバーするプライマーを作成した。スクリーニングにより無作為に得たコロニーに対し、このプライマーを用いて PCR を行い、目的菌株候補を選別した。さらに簡易 TPA 分解試験を行い、結果としてこの中から 3 株の TPA 分解菌を得た。しかしこれらの 16S rDNA 配列決定を行ったところ、いずれもアンプリコン解析検出限界未満の割合で存在する *Pseudomonas* 属である可能性が示唆され、*Haliscomenobacter* は分離できなかった。

並行して、同じ汚泥を分離源として、様々な条件にて TPA 分解菌のスクリーニングを行ってきた結果、前述の 3 株に加え、TPA 培地を用いて 3 株、50% (v/v) 活性汚泥入り TPA 培地で 4 株の計 10 株の分解菌を取得した。これら菌株の中で *Pigmentiphaga* 属とみられる 4 株についてはアンプリコン解析での検出が確認された。しかしその検出数は 27,787 count 中 18 count と少なく、活性汚泥での存在割合が低い菌株であると考えられた。その他の 6 株は全て *Pseudomonas* 属であり、アンプリコン解析では検出不可なほど存在割合が低い株であると考えた。この結果から、実際の活性汚泥では培養不可能な TPA 分解菌が優占しているか、もしくは存在割合の低い他種の微生物群が共同で TPA 分解に寄与している可能性が考えられた。

Key words activated sludge, 16S rDNA amplicon sequencing, terephthalic acid, screening

G3H1 (0307) 止水域における対流型水処理装置を用いた物質循環のマスバランス解析

○中平創、竹内諒、Tran Quoc Thinh、荒木希和子、久保幹
（立命館大院・生命科学）

Mass balance analysis of material circulation using the convection type water treatment device in a water stagnation area.

○Sou Nakahira, Ryou Takeuchi, Quoc Thinh Tran , Kiwako Araki, and Motoki Kubo
(Ritsumeikan Univ.)
sb0047eh@ed.ritsumei.ac.jp

[背景・目的]

止水域において有機態炭素や有機態窒素の蓄積は、水質汚濁を引き起こす。河川などの流水域では、対流が発生しているため汚濁物質は十分な量の酸素とともに深部に移動し、底質の微生物により段階的に分解される。しかしながら、湖沼などの止水域では水の流れがほとんど存在しないため、自浄作用が微弱になり汚濁物質が蓄積しやすい。これまでに、水中や底質の有機態炭素や有機態窒素を浄化する対流型水処理装置を開発した。本装置は、流速を調整して酸素供給量を変えた 2 種類のカラム内で好気的環境及び嫌気的環境を作り、それぞれ環境に順応した微生物の増殖が行えるように設計している。この装置により、汚濁物質は CO_2 や N_2 として系外に排出され浄化が行われる。本研究では、本装置による浄化能力を検証し、池周辺からの有機物の流入量および池の浄化能を検証することを目的とした。

[方法・結果]

対流型水処理装置を立命館大学びわこ・くさつキャンパス敷地内にある北野新池（水量：2,340 ㎥）に設置した。池の周辺は森林（池と森林面積：38,000 ㎡）のみであり、人間生活における排水等は流入しない環境である。2014 年 7 月から 5 年間対流型水処理装置を稼働させたところ、水中の全炭素（TC）は約 36 %減少し、全窒素（TN）は約 22 %減少した。このことから、対流型水処理装置の継続的な稼働により、北野新池の TC と TN が除去され、水質の浄化維持が行われた。

これらの浄化量を元に、池の自然浄化能力および森林からの有機物流入量を推定するため、2019 年の 9 月より対流型水処理装置を停止させ、停止後の有機物の蓄積量をモニタリングした。装置停止後から 1 年間の水質を比較したところ、TC の値は約 18%上昇し、また TN は約 21%上昇した。これらの結果から、対流型水処理装置の処理能力は、約 35.1kg／年の TC、約 5.8kg／年の TN を除去していた。池の自然処理能力と森林からの有機物流入量を推定したところ、約 16kg／年の TC 蓄積、約 2.9kg／年の TN 蓄積が推定された。

Key words water purification, equipment

G3H1 (0308) 海洋生分解性プラスチックの評価に適した酵素製剤の開発

○常盤　豊[1*]
([1]グリーンテクノプラス)

Development of enzyme preparation suitable for evaluation of marine biodegradable plastics

○Yutaka Tokiwa[1*] ([1]Green Technol. Plus)
E-mail: tokiwayu@ozzio. jp

【背景】最近、深刻になっている海洋のプラスチックごみ問題への対応策の一つとして、海洋生分解性プラスチックの研究開発が注目されている。微生物が作るポリ(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸（PHB）やその共重合体は、海洋でも分解しやすい生分解性プラスチックとして知られている。また、発酵生産された(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸（*R*-3HB）を用いて、L-乳酸やL-フェニル乳酸、L-ロイシン酸、L-マンデル酸等との共重合体を化学合成し、海水によるそれらの分解特性の報告もある[1)]。

しかし、プラスチックの海洋生分解性の評価には長期間を要し、研究の進展を妨げる要因となっている。そこで、研究の初期段階において、多数の試料の海洋生分解性を短時間で評価できるようにするため、土壌から分離した放線菌ストレプトマイセス属由来の PHB 分解酵素[2)] の製剤化を行った。

【方法】ストレプトマイセス属由来の PHB 分解酵素は、0. 1～0. 2%PHB 粉末と 0. 01%酵母エキスを含む無機塩類培地（ｐH 7）を用いて、50 ℃で 1 ～ 3 日通気培養を行って生産した。菌体を除いた培養液は、濃縮・精製した後、乾燥して製剤化を行った。

製剤化した PHB 分解酵素による PHB 粉末や PHB を含むフィルムの分解は、50 ℃で一定時間反応させた後、粉末やフィルムを回収・乾燥して、それぞれの重量減少により評価した。

【結果】　PHB 粉末、および、PHB とポリ(*R*)-3-ヒドロキシ吉草酸（PHV）の共重合体（PHB/V）粉末について、PHB 分解酵素による分解特性を調べた。PHB/V 粉末は PHB 粉末に比べて、PHB 分解酵素による分解率が約 20～30%低下した。

また、PHB 単独のフィルム、および PHB とポリブチレンサクシネート（PBS）、ポリ（ブチレンサクシネート-co-アジペート）（PBSA）、ポリ L-乳酸（PLA）あるいはポリカプロラクトン(PCL)とのブレンド体（重量比 50:50）フィルムを調製して、PHB 分解酵素による分解特性を検討した。その結果、PHB フィルムの分解率は PHB 粉末に比べて 90%以上低下した。一方、ブレンド体フィルムの分解率は、PHB/PBS、PHB/PBSA、PHB/PLA および PHB/PCL でそれぞれ 17%、18%、6%、7%であった。

今後、PHB 分解酵素を活用した、PHB 構造を含む種々の共重合体やブレンド体が開発され、海洋生分解性プラスチックの社会実装の促進が期待される。

1）第 70 回日本生物工学会大会、トピックス集、p.33~34 (2018)
2）B.P. Calabia, Y. Tokiwa, *Biotechnol. Lett*. 28, 383-388 (2006)

Key words marine, biodegradable plastics, enzyme, *Streptomyces* sp.

G3H1 (0309) 高塩濃度下で結晶性セレンを生成する亜セレン酸還元微生物集積系の特徴づけ

○内田寛大[1], 上田優弥[1], 井上大介[1], 西川宏[2], 池道彦[1*]
([1]阪大院・工, [2]阪大・接合研)

Characterization of Microbial Consortium Capable of Reducing Selenite to Produce Crystalline Selenium under High Salt Conditions

○Kanta Uchida[1], Yuya Ueda[1], Daisuke Inoue[1], Hiroshi Nishikawa[2], Michihiko Ike[1*]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Joining and Welding Res. Inst., Osaka Univ.)
uchida@wb.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、その水溶性化合物は毒性が高く、排水からの効率的な除去手法が求められている。生物学的 Se 排水処理は、Se 代謝微生物を用いて水溶性 Se を不溶性の Se(0)に還元した後、固液分離処理により水中から Se を除去する手法で、経済性・環境性に優れている。一方、Se 製錬排水中には高濃度の塩分が含まれており、微生物作用への阻害が重大な課題となっている。また、通常、微生物作用により生じる赤色を呈する Se(0)は、粒径がナノメートルオーダーであるため、沈降性が悪く、固液分離による除去が困難である。

一方、我々は、特異な亜セレン酸 (Se(IV)) 還元反応により、嫌気条件下で結晶性黒 Se(0)を生成する耐塩性微生物集積系を新たに獲得した。本集積系は約 5%の塩濃度に耐性を持ち、さらに、沈降性に優れた黒色の結晶性 Se(0)を生成することから、生物学的 Se 排水処理技術の実用化に向け有望な微生物集積系であると考えられた。そこで本研究では、本集積系のより効率的な利用に向け、その特異な Se(IV)還元反応を特徴づけることを行うことを目的とした。

【方法・結果】1 mM の Se(IV)と、単一硫黄源として硫酸ナトリウム (0, 2, 8 mM) を添加した塩濃度約 5%の乳酸無機塩培地 (pH 7.0) を用いて、嫌気 4 日/好気 3 日の条件で 7 日間培養し (28℃, 120 rpm)、液相中の Se 及び硫酸イオン (SO_4^{2-}) 濃度を経時的に測定した。その結果、硫黄源を添加していない系では、液相 Se はほとんど除去されず、黒 Se (0)の生成も確認されなかった。また、硫黄源の添加量によって液相 Se 除去に大きな差が見られたことから、本集積系において Se と硫黄の代謝が強い相関性を有する可能性が示唆された。

続いて、上記とは別組成の乳酸無機塩培地 (SO_4^{2-} 8.4 mM, pH 7.0) に異なる濃度 (1, 2, 4, 8 mM) の Se(IV)を添加し、黒 Se(0)を生成するまでの間、嫌気的に培養を行った。その結果、Se(IV)が SO_4^{2-}よりも優先的に代謝されることが明らかとなった。また、色調観察の結果、黒 Se(0)は赤 Se(0)を経由して生成しており、SO_4^{2-}消費に伴い色調が変化していることが確認された。これらの結果から、本集積系における結晶性黒 Se(0)の生成は、集積系の硫黄代謝によって生じる硫化物、あるいはシステイン等の有機硫黄化合物と赤 Se(0)の反応により生じているものと示唆された。

Key words selenite reduction, halotolerance, crystalline selenium, microbial community

G3H1 (0310) レアアースイオンを選択的に回収できる機能性シルクの創製

○石田亘広[1]*, 畠中孝彰[1], 細川洋一[1], 小島桂[2], 飯塚哲也[3], 寺本英敏[2], 瀬筒秀樹[3], 亀田恒徳[2]
([1]豊田中研, [2]農研機構・新素材開発, [3]農研機構・カイコ基盤技術)

Creation of Functional Silk for Selective Recovery of Rare-Earth Ions

○Nobuhiro Ishida[1]*, Takaaki Hatanaka[1], Yoichi Hosokawa[1], Katsura Kojima[2], Tetsuya Iizuka[3], Hidetoshi Teramoto[2], Hideki Sezutsu[3] and Tsunenori Kameda[2]
([1]TOYOTA Central R&D Labs, [2]Silk Materials Research Group, NARO, Silkworm Research Group, NARO)
n-ishida@mosk.tytlabs.co.jp

【目的】 レアアースは先端材料に欠かせない金属資源であるが、分離回収に課題がある。一方で生物は、自然環境下から特定の金属イオンのみを選択的に認識して鉱物化する能力（バイオミネラリゼーション）を有しており、これまでに我々は本機能を模倣したレアアース鉱物化ペプチドについて報告している[1)]。本発表では、レアアース鉱物化ペプチドを共発現する遺伝子組換えカイコを作製し、カイコが生産するシルクを活用した新しいレアアース回収技術について提案する[2)]。
【方法】 シルクの主成分タンパク質であるフィブロインL（FibL）のC末端にレアアース鉱物化ペプチド（Lamp1）を融合するよう遺伝子発現ベクターを設計し、*piggy Bac* システムによってカイコ染色体中へ導入した。交配によってホモ化個体を選抜し、本カイコが生産するシルクを溶解もしくは粉砕後、各種レアアースイオンを添加して吸着効果を評価した。
【結果】 組換えカイコが生産するシルクを溶解し、フィブロインLタンパク質を精製した。これにレアアースイオンを添加した結果、Lamp1が含まれる融合タンパク質にのみレアアースを含む沈殿が認められた。続いて、セリシンを除去して粗粉砕したシルク粉末にレアアースイオンを添加した結果、シルク表面へのレアアース吸着が認められ、弱酸性溶液による洗浄を経ることで再利用できることを確認した。また、本シルクはレアアースを添加した模擬海水からでも同様の効果があることを明らかにした。これらの知見から、海水や工場排水に含まれる低濃度のレアアースを低エネルギーで回収できるプロセスにつながることが期待される。

1) Hatanaka et.al, *Nature Communications*, 8:15670, 2017.
2) Ishida et.al, *Molecules*, 25(3) 761, 2020.

Key words rare earth, *Bombyx mori*, biomaterial, biomineralization

G3H1 (0311) The Removal of copper ions from aqueous solution by wood leaf-derived

○Kyung Bin Oh[1]*, Yong-Keun Choi[1]*, Hak Jin Song[1], Jeong Wook Jo[1], Ju Yeon Lee[1], Kim Hyung Joo[1]
([1]Dept. of Biological Engineering, Konkuk Univ.)

The Removal of copper ions from aqueous solution by wood leaf-derived

○Kyung Bin Oh[1]*, Yong-Keun Choi[1]*, Hak Jin Song[1], Jeong Wook Jo[1], Ju Yeon Lee[1], Kim Hyung Joo[1]
([1]Dept. of Biological Engineering, Konkuk Univ.)
*dragonrt@konkuk.ac.kr

The present work focused on the impact of different pyrolytic temperature (350, 550 and 750 °C) for wood leaf-derived biochar (W-BC) production on the removal of copper (Cu) in aqueous phase. The physicochemical properties of W-BCs were evaluated using SEM, BET, FTIR, XRD, EA and XPS. Based on the results of properties, specific surface and crystallization of $CaCO_3$ (calcite) increased with the increase of pyrolytic temperature, whereas peaks of functional groups (i.e., hydroxyl and carbonyl) and crystallization of $MgCO_3$ (nesquehonite) decreased. Although the specific surface area as primary factor for the Cu adsorption were improved with the increase of pyrolytic temperature, the higher Cu adsorption capacity (14.1 mg Cu/g BC) by W-BC350 prepared at lower temperature (350 °C) was observed compared to it (5.4 mg Cu/g BC and 2.7 mg Cu/g BC) of other biochars (W-BC550 and W-BC750). Therefore, the Cu adsorption onto W-BC350 may be attributed to surface complexion (i.e., oxygen containing group (-OH) and C=O) and cation exchange (i.e., Mg) as possible mechanisms. According to the results of isotherm and kinetic model studies, Langmuir and Two compartment model were the best fitted models with the higher correlation (R^2=0.999 and R^2=0.945), indicating monolayer and complexed physico-chemisorption. Thus, the W-BC350 produced at lower temperature can be applied as cost-effective adsorbent for the Cu removal.

Key words: Biochar, Copper, Adsorption, Pyrolytic temperature, Wood leaf

G3H1 (0312) 微生物農薬としての低栄養細菌の可能性

○大池 達矢[1,3]*, 藤澤 綾乃[2], 江邉 正平[1], 岡南 政宏[1,2], 阿野 貴司[1,2]
([1]近畿大院・生物理工, [2]近畿大・生物理工, [3]十和田グリーンタフ・アグロサイエンス株式会社)

Potential of oligotrophic bacteria as a biological control

○Tatsuya Ohike[1,3]*, Ayano Fujisawa[2], Shohei Ebe[1], Masahiro Okanami[1,2], Takashi Ano[1,2]
([1]Grad. Sch. BOST, Kindai Univ., [2]Fac. BOST, Kindai Univ., [3]Towada Green tuff Agro-science Co., Ltd.)
ohike@towadaishi.com

土壌中には多種多様な微生物が存在しており、一部の有用微生物は作物栽培、医薬品、食品加工など我々の生活においても非常に重要な役割を担っている。特に農業資材の分野ではこれまでに、微生物製剤としての研究が行われてきたが、近年では新たな概念であるバイオスティミュラントとしても分類され、注目されている。有用微生物を元に作製された資材は、微生物そのものや微生物が生産する二次代謝産物を含むため、多機能で複合的な効果が期待されるが、その一方で有用微生物の増殖や物質生産には、高栄養培地や特別な物質生産培地が必要となる場合がある。しかしながら、田畑や土壌環境中、葉などの植物体上は栄養培地中と比較し、非常に貧栄養であることから期待される効果を発揮できない可能性が考えられる。そこで本研究では低栄養条件下でも生育できる細菌に注目した。
低栄養性細菌は、炭素源が少ない培養条件下（1-10 mg/L 以下）においても増殖可能な細菌であり、産業廃棄物などのバイオコンバージョン（生物変換）や植物体上などの低栄養環境下における植物病害防除などの可能性を有している。本研究では、低栄養条件下でも生育できる細菌の単離を行った。また、単離した菌株の低栄養条件下による増殖能や植物病原菌への抑制効果、物質生産などを試験し、その有用性を示すことを目的とした。
本試験では、腐敗した植物種子から *Pseudomonas protegens* DE 株を単離し、使用した。本菌株の栄養要求性を調べるため、栄養条件を変えたいくつかの培地で培養した結果、一般的な細菌培養用培地（高栄養条件下）および炭素源が 10 mg/L 以下のような低栄養条件下のいずれにおいても増殖することが認められた。また、植物病原菌である *Rhizoctonia solani* に対する抗真菌活性試験を行った結果、強い抗真菌活性を示し、抗真菌活性物質として pyrrolnitrin を生産することがわかった。このような結果から、本研究は低栄養性細菌を利用した自然環境中における新たな微生物製剤の可能性を示した。現在、植物試験における本菌株の抑制効果を試験しており、それらについても報告する予定である。

Key words oligotrophic bacteria, biocontrol agent, antifungal

G3H1 (0313) リンゴ黒星病拡散予測のための大気バイオエアロゾル観測法の確立

○小林史尚[1]*, 田中和明[2], 佐野輝男[2]
([1]弘前大・理工, [2]弘前大・農生)

Development of the atmospheric bioaerosol observation method for dispersion predicting of apple scab

○Kobayashi Fumihisa[1]*, Tanaka Kazuaki[2], Sano Teruo[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Hirosaki Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ.)
fumihisa@hirosaki-u.ac.jp

津軽半島地域において，「リンゴ栽培」は最も主要な産業であり、国内ばかりか国際的にも有名な産地である。リンゴは，感染症に弱く，無農薬で栽培することが非常に難しい。例えば，2016 年 6 月に，青森県などにおいてリンゴ黒星病が発生，拡大し，大きな被害が出た。リンゴ黒星病の原因菌は，*Venturia inaequalis* という糸状菌の一種で，胞子の拡散などによって生存地域を広げ，リンゴ黒星病感染地域が拡大する。一方，「大気バイオエアロゾル」とは大気中を浮遊する生物粒子のことで，ウィルスから微生物，花粉などを含む。小林（発表者）は，これまで、中国タクラマカン砂漠における黄砂バイオエアロゾルや南極上空大気バイオエアロゾル観測など多くの地域で実施した経験をもつ。
そこで本研究では，リンゴ黒星病拡散予測のために，小林（発表者）の大気バイオエアロゾル採集・分析技術（理工学部）およびリンゴ感染症研究者である佐野と田中（農学生命科学部）による共同研究によって *V. inaequalis* の大気バイオエアロゾル観測とその監視、拡大予測を実施する。
大気バイオエアロゾル観測は、弘前大学農学生命科学部附属リンゴ農園（40.59N, 140.47E）にて 2020 年 3 月 20 日から 11 月 25 日まで行った。大気中のサンプルの採集は、空気用ポンプを使用して吸引し、メンブレンフィルターで大気中の菌を採集した。フィルターは滅菌済みのものを 1 週間に 1 度取り換えた。雨水の採集は、50mL 遠沈管を設置して採集した。遠沈管はガンマ線滅菌済みのものを 1 週間毎に交換して行った。採取されたフィルターと雨水は，直接 DNA を抽出し，次世代シークエンサーを用いた ITS 領域のアンプリコン解析を行った。
リンゴ黒星病原因菌である *V. inaequalis* の大気中のコピー数濃度は，主に 8 月上旬，8 月中旬，および 9 月の中旬の 3 つのピークが検出された。雨水におけるコピー数濃度は，6 月下旬と，大気中濃度と同様に主に 8 月上旬，8 月中旬，および 9 月の中旬の計 4 つのピークが主に検出された。雨水中の 6 月下旬のピークが一次伝染にしては少し時期が遅すぎるので、分生胞子による初期の 2 次伝染と考えられる。病斑からの分生胞子の形成，拡散（2 次伝染）を何回も繰り返し，8 月の上旬と中旬に一番大きなピークがあり、9 月の中旬にも，もう一度ピークが検出されたと思われる。黒星病は、一般に、夏の暑い時期に一時的に勢力が弱くなり、9 月になって涼しくなるとまた活発化すると言われている。しかしながら，本研究結果では 8 月中にむしろ一番活発に胞子が飛散していることがわかった。 本研究は基盤研究（B）特設分野（17KT0067）の助成を受けたものである。

Key words Atmospheric bioaerosol, apple scab, metagenomic libraries

G3H1 (0314) 多摩川を対象としたシングルセルゲノム解析による薬剤耐性菌の動態解明

○塚田祐子[1], 西川洋平[2,3], 我妻竜太[1], 小川雅人[2,3], 井手圭吾[1,3], 細川正人[1], 竹山春子[1,2,3,4*]
([1]早大院・先進理工, [2]早大・ナノライフ創新研, [3]産総研・早稲田CBBD-OIL, [4]早大・生命動態研)

Single-cell genomics for revealing the dynamics of antibiotic resistant bacteria in Tama river

○Yuko Tsukada[1], Yohei Nishikawa[2,3], Ryota Wagatsuma[1], Masato Kogawa[2,3], Keigo Ide[1,3], Masahito Hosokawa[1], Haruko Takeyama[1,2,3,4*]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [3]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [4]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)
haruko-takeyama@waseda.jp

薬剤耐性菌の拡散は世界的な脅威として認知されており、薬剤耐性遺伝子（ARG : Antibiotic resistance gene）の分布や伝播に関する研究が注目を集めている。現在、メタゲノムを用いた解析が大規模に行われているが、本解析では、細菌の系統と ARG の情報を直接的に紐づけることは困難である。そこで本研究では、都市河川である多摩川を対象として、異なる地点・期間における環境細菌のシングルセルゲノム情報を網羅的に取得することにより、どの細菌がどの ARG を保有しているのかを 1 細胞レベルで明らかにし、ARG の分布・局在を明らかにすることを目的とした。

多摩川流域の 7 地点（奥多摩湖～河口付近）を対象として、2020 年 8 月と 11 月に川水を採取した。川水から DNA を抽出後、16S rRNA 遺伝子（V3-V4 領域）を対象とした菌叢解析を実施した。また、微小液滴を用いた 1 細胞レベルでのゲノム解析手法を用いて、川水由来の細菌のシングルセルドラフトゲノム（SAG : Single amplified genome）を構築した。得られた配列に対して既知の ARG 配列データベースを参照することにより、個々の SAG が保有する ARG の検出を行った。

16S rRNA 遺伝子による菌叢解析により、川水の細菌叢は上流から下流にかけて連続的に変化していることが明らかになった。一方、シングルセルゲノム解析では、合計 3,345 個の SAG を獲得し、このうち 306 個の SAG から、60 種類、計 415 個の ARG が検出された。ARG が検出された地点を調べた結果、地点特異的な ARG が 38 種であったのに対し、複数地点から検出された ARG は 22 種となり、細菌叢の変動に伴って変化する ARG と、地点を越えて広く分布する ARG が存在することが明らかとなった。以上の結果により、微小液滴を用いたシングルセルゲノム解析手法によって細菌個体ごとの ARG の分布解析が可能であることが示された。また、1 細胞ごとの ARG 検出数を評価した結果、24%の SAG から 2 つ以上の ARG が検出され、本手法が多剤耐性菌の検出にも有用であることが示唆された。

本発表では、大規模なシングルセルゲノム解析によって検出された ARG の分布情報に加え、複数の細菌系統において共通して検出された ARG や、地点・季節を越えて検出された ARG の伝播様式に着目した解析結果を紹介する。

Key words single-cell analysis, antibiotics, resistance, genome

G3H1 (0315) 殺菌コーティング剤の殺菌効果に関する研究

○町環多[1], 岩橋均[1]*, 有路友一[2]
([1]岐阜大・応生科, [2]甑園（株））

Studies on the Antibacterial Effectiveness of Disinfectant Coatings

○Kanta Machi[1], Hitoshi Iwahashi[1]*, Tomokazu Ariji[2]
([1]Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ, [2]koshikien)
h1884@gifu-u.ac.jp

1. 緒言

近年, 社会的な要請により抗菌コーティングが市役所や公共交通機関等の人が集まる場所で必須となっている. このような公共の場所で用いられる抗菌コーティングには, ①酸化チタンなどの光触媒を用いたもの, ②酸化銀など非触媒の抗菌物質を用いたものがある. 酸化銀と酸化チタンの殺菌性を比較・評価するため, 岐阜大学応用微生物学研究室では株式会社甑園の協力を得て, ①コーティング剤のみ, ②酸化銀を含んだコーティング剤, ③酸化チタンを含んだコーティング剤, ④酸化銀と酸化チタンを含んだコーティング剤の計 4 サンプルを作成し, 抗菌性の試験を行った.

2. 実験方法

①コーティング剤のみ, ②酸化銀を含んだコーティング剤, ③酸化チタンを含んだコーティング剤, ④酸化銀と酸化チタンを含んだコーティング剤の各サンプルで 1.5ml チューブの壁面をコーティングした.

サンプルをコーティングした 1.5ml チューブに PBS で希釈した大腸菌液（K12 株, 定常期）を加え, 2, 4, 8, 24 時間静置したのち, LB 寒天プレートに播いて保温、コロニーを形成させ, CFU を計測した.

3. 結果

殺菌試験の結果, ②酸化銀を含んだコーティング剤, ④酸化銀と酸化チタンを含んだコーティング剤の殺菌効果が最も高く, 約 4 時間でほとんどの大腸菌が死滅した. 一方, ③酸化チタンを含んだコーティング剤は 24 時間後でも大腸菌が残存していた. なお, ①ガラスコートのみでは, ほとんど殺菌効果が見られなかった.

4. 考察

実験の結果から, ②酸化銀を含んだコーティング剤は③酸化チタンを含んだコーティング剤よりも即効性の高い殺菌効果が示唆された. これには以下の理由が考えられる.「②酸化銀を含んだコーティング剤では, 銀イオンの溶出による金属毒性が主に殺菌効果をもたらしている. その一方で③室内の蛍光灯下では、酸化チタンを含んだコーティング剤の光触媒作用による殺菌効果は弱い.」

以上の理由及び実験の結果により, 汎用コーティング剤の殺菌力を向上させるには, 酸化チタンよりも酸化銀が有効であるといえる. このほか、市販の汎用コーティング剤との比較、酸化銀と酸化チタンを含む噴霧式コーティング剤の評価も行った。

Key words antibacterial, titanium dioxide

G3H2 (0101) *Sphingomonas bisphenolicum*AO1 株の芳香族化合物分解における不安定化要因の探索とその改善

○劉璐[1]、*村上将和[1]、*松村吉信[1,2]
([1]関西大・生命生物工, [2]関西大・ORDIST)

Identification of destabilizing factors in the degradation of aromatic compounds by *Sphingomonas bisphenolicum* AO1

○Lu Liu[1], Masakazu Murakami[1], Yoshinobu Matsumura[1,2]
([1]Dept. Life science & Biotech., Kansai Univ, [2]ORDIST. Kansai Univ)
連絡先の E-mail アドレス ymatsu@kansai-u.ac.jp

【背景および目的】ビスフェノール A(BPA)は乳児などにおいて神経機能や免疫システムの発達障害、内分泌撹乱作用、発がん作用を示す。そこで当研究室では、BPA 汚染土壌を浄化することのできる *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株を単離した。BPA 汚染土壌の浄化実験を行い、AO1 株が土壌に混入した BPA も分解可能であり、BPA が除かれた後には AO1 株自身もその環境から消失することも確認された。一方、本株は培養中に BPA 非分解菌が出現することを経験し、単離された BPA 非分解菌 AO1L 株では BPA 分解に関わる一部遺伝子の欠失が確認された。さらに、昨年度の研究では、BPA 分解能の不安定化が解消された自然突然変異株 AO1V12 や AO1V19 株の単離に成功した。そこで、本研究では AO1V12、V19 株の安定性の再確認とそのゲノム情報の解析および AO1 株や AO1L 株との違いについて調べることを目的とした。また、AO1 株の BPA 分解は中間代謝産物である 4-hydroxyacetophenone (4HAP) の分解が律速段階となることも示唆されている。そこで、AO1 株の BPA 分解能の向上と安定化に、4HAP 代謝速度の向上が必要であると予想し、4HAP 分解酵素候補遺伝子を見出しているものの、実際に 4-HAP の分解は確認されていない。そこで AO1 株と AO1L 株における 4-HAP 分解能についても調査した。

【方法および結果】昨年単離した変異株 AO1-V12 株、V19 株の L および L-BPA 培地増殖能を調べた。その結果、AO1 株と AO1-V 株の間で増殖能の大きな差は確認されなかった。また、L-BPA 培地中での BPA 分解を確認した結果、AO1-V 株のいずれも培養 4 時間で BPA 濃度が半分まで減少し、培養 8 時間でほとんどが分解されていた。この結果、用いた AO1V 株の BPA 分解能は AO1 株とほぼ同等で、より安定化していることが確認された。今後は、次世代シーケンサーを用いて AO1 株および AO1-V 株のゲノム構造を解析し、AO1 株における BPA 分解能安定化に関わる遺伝子領域を特定する予定である。次に、L-4HAP 培地における AO1 株と AO1L 株の増殖および 4-HAP 分解について調査した結果、4HAP が AO1 株の増殖を阻害することが確認され、115 μg/ml の 4-HAP を分解するのに 44 時間を要した。また、4-HAP の分解は培養約 20 時間以後に顕著となっていた。一方で、4HAP の分解産物は観察されなかった。AO1L 株においても 4-HAP は増殖を阻害し、115 μg/ml の 4HAP を全く分解できなかった。AO1 株を 4HAP を単一炭素源として含む無機塩培地（BSM 培地）で培養した結果、その増殖は非常に遅く、また、培養約 5 日でも約 50%の 4HAP が分解されずに残った。この現象は培地にグルコースを添加することで部分的に解消された。この結果は、AO1 株が 4HAP も BPA 同様に積極的に炭素源として活用できるものではないと予想される。今後は、4HAP 分解酵素を特定し、4 HAP および BPA 分解の効率化を試みる予定である。

Key words bisphenol A, Sphingomonas, biodegradation

G3H2 (0102) 緑膿菌バイオフィルム形成を抑制または促進する物質の探索

○俣木歩実[1], 松村吉信[2]*
([1]関西大院・理工, [2]関西大・ORDIST)

Isolation and characterization of inhibitors and enhancers for biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 from laboratory stock cultures.

○Ayumi Mataki[1], Yoshinobu Matsumura[2]*
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]ORDIST. Kansai Univ.)
K574639@kansai-u.ac.jp

【背景】バイオフィルム（BF）は、多種多様な細菌が高密度で生息する集団である。BF は固体表面への強力な付着や、薬剤耐性の上昇といった個々の細菌の単なる足し算を超えた特徴を示し、殺菌や除去が困難となっている。BF 形成過程を観察すると、物体への付着や BF の脱離に、細胞の運動性やバイオサーファクタント生産能等が重要であると報告されている。これまで、当研究室で自然環境から単離・保存している様々な微生物を用いて、単一菌株培養系および二菌株混合培養系で形成する BF 形成能を比較し、BF 形成を抑制または促進する組み合わせを探索してきた。その結果、*Pseudomonas aeruginosa* PA01 株の BF 形成を促進および抑制する培養液として、それぞれ、*Bacillus* sp. B24 株および *Bacillus* sp. A13 株の培養上清が確認された。本研究では、A13 株および B24 株の BF 形成の促進および抑制に関わる要因物質の探索を行った。

【方法】BF 形成菌株とし、*P. aeruginosa* PA01 株、BF 形成に栄養を及ぼす菌株として A13 株、B24 株を用いた。BF はポリスチレン製マイクロプレートで TSB 培地、37℃で形成させた。BF 定量はクリスタルバイオレット（CV）染色法を用いて A570 で評価した。運動性測定には 0.3%～1.0%寒天 TSB 培地を用いて 30℃、2 日間静置培養した。培養液上清の表面張力は表面張力計 CBVP-A3（協和界面科学（株））で測定した。

【結果】各菌株の培養時間における要因物質の生産量を調査するために、1～24 時間培養した A13 株および B24 株培養液上清を PA01 培養液に添加し、BF 形成増加率を比較した。その結果、A13 株は 12 時間培養上清において BF 形成抑制、B24 株は 2 時間培養において BF 形成促進に最も作用した。また、A13 株および B24 株培養上清中の BF 形成抑制・促進物質の耐熱性試験を行った結果、A13 株、B24 株ともに加熱の有無による BF 形成量の変化はなかった。このことから、要因物質は耐熱性を示す比較的低分子の物質であると考えられる。さらに、A13、B24 株培養上清を添加した PA01 株細胞の運動性（Swimming、Swarming、Twitching）の変化を調査した結果、A13 株および B24 株で 0.5%寒天培地において運動性の向上が確認された。また、A13、B24 株培養上清を添加し培養した PA01 株の培養上清の表面張力を測定した結果、B24 株培養上清添加によって PA01 株培養上清の表面張力が低下した。このことから Swarming に関与する鞭毛やバイオサーファクタント生産量が変化した可能性が高い。今後、要因物質の単離とそれらの作用特定を行う予定である。

Key words biofilm, mobility, biosurfactant, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus*

G3H2 (0103) 複合微生物系の機能安定性に寄与する因子の探索

○天野光喜[1], 本荘雅宏[2], 池田麗[3], 石澤秀紘[4], 木村元彦[1], 田代陽介[1], 二又裕之[1,4*]
（[1]静大院・総合科技, [2]静大・創科技院, [3]静大・工, [4]静大・グリーン科技研）

Exploration of factors relevant to the functional stability of complex microbial ecosystems

○Amano Koki[1], Honjo Masahiro[2], Ikeda Rei[3], Ishizawa Hidehiro[4], Kimura Motohiko[1], Tashiro Yosuke[1], Futamata Hiroyuki[1,4*]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka. Univ., [3]Fac. Eng. Shizuoka. Univ., [4]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

複合微生物系の好適制御は効率的な環境浄化や人の健康維持に極めて重要である。これまでの合成微生物系を用いた研究で、システムの機能安定性における微生物の共存や代謝ネットワークの重要性が示唆されている。しかし、この法則がより複雑な複合微生物系においても成立するかは不明である。そこで、本研究では土壌を接種源とする機能安定性の異なる複合微生物系を用いて、システムの機能安定性に寄与する因子の探索を目的とした。

森林土壌を接種源、フェノールを唯一の炭素源とする培地で連続集積培養系を 2 基（R-I および R-II）構築した。経時的にフェノール濃度を測定し、未蓄積の場合にシステムの機能安定性が発揮されていると判断した。数百日の運転中、R-I ではフェノールの蓄積は 2 回生じたが 1 日で安定状態に復帰した。しかし R-II では蓄積が 4 回生じ、安定状態への復帰までに 10 日以上必要な場合もあった。そこでフェノールに対する速度論量を測定した結果、両培養系で特異的な動力学的特性を示した。アンプリコンシーケンス解析結果では、両培養系で異なる微生物群集構造の形成が示唆された。そこで、両培養系から代謝産物を栄養源とする寒天培地で生育したコロニーをグルコースおよび有機物を含む複合培地（1/10TSB）で培養を試みた。その結果、R-I では供試したコロニーの内 20%しか 1/10TSB で生育しなかった。一方、R-II では 85%が 1/10TSB で生育し、その内の 82%がフェノールを資化可能であった。よって R-I は R-II と比較して代謝産物利用微生物がより多い群集構造であることが示唆された。

以上の結果から、複合微生物系においてシステムの機能安定性には代謝ネットワークを基盤とした各微生物の役割分担が重要であると示唆された。現在はこの仮説の検証を進めるべく、分離株の更なる解析を進めている。

Key words complex microbiological system, functional stability, kinetic analysis, microbial community structure

G3H2 (0104) ケモスタット培養系における微生物間相互作用の揺らぎが生み出す異属三菌株の共存機構

○本荘雅宏[1], 鈴木研志[2], 天野光喜[3], 齋藤保久[4], 武田和宏[3], 木村元彦[3], 石澤秀紘[5], 田代陽介[3], 二又裕之[1,3,5*]
（[1]静大・創科技院, [2]東大院・農生科, [3]静大院・総合科技, [4]島根大・総合理工, [5]静大・グリーン科技研）

The coexistence of three-strains based on the fluctuation of microbial interactions in chemostat cultures

○Masahiro Honjo[1], Kenshi Suzuki[2], Koki Amano[3], Yasuhisa Saito[4], Kazuhiro Takeda[3], Motohiko Kimura[3], Hidehiro Ishizawa[5], Yosuke Tashiro[3], and Hiroyuki Futamata[1,3,5*]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci. Univ. Tokyo, [3]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [4]Dept. Math. Shimane Univ., [5]Res. Inst. Green Sci. Technol. Shizuoka Univ.)
futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

自然環境において微生物は複数の微生物が共存した微生物群集として存在する。しかし、これらの微生物が如何にして共存しているか詳しい機構については未だ不明である。我々が微生物群集を制御し活用するためには微生物群集における共存機構の理解が希求される。そこで、本研究では数理学的解析と合成微生物系の解析を組み合わせることで群集における相互作用の解析および共存に及ぼす影響の理解を目指した。

数理学的解析では、ロトカ・ヴォルテラ方程式に菌株間相互作用を組み込み共存平衡点および微生物間相互作用の推測を行った。その結果、多様な相互作用を持つ多数の共存平衡点が推測された。興味深いことに、近接した共存平衡点でさえも相互作用は多様であった。

複合微生物群集系の解析では、共存が明らかとなっている異属三菌株を用いてフェノールを唯一の炭素源とした連続培養系を構築した。合成微生物群集における相互作用は、培養上清を用いて各菌株の純粋培養系における比増殖速度定数に及ぼす影響によって評価した。その結果、経時的な変化が観察され微生物間相互作用の揺らぎが示唆された。そこで、相互作用を加味した各菌株の競争力（J値）を計算した。理論的には、共存が成り立つ場合、菌株間で J値が一致すべきであるにも関わらず、合成微生物群集系では一致することなく、経時的な競争関係の入れ替わりが見られた。従って、微生物間相互作用の揺らぎによる競争関係の変化が共存を生み出していると示唆された。

以上の様に、本研究における数理学的解析および合成微生物群集系の解析から、異属三菌株の共存は微生物間相互作用の揺らぎに基づく競争関係の変化による動的平衡状態と考えられる。

Key words coexistence, microbial interaction, fluctuation

G3H2 (0105) 微生物由来蓄電性鉱物を介した電子共生に基づく嫌気バイオプロセスの向上

○林稜也[1], 安池一貴[1], 片桐美紀[2], 大前貴裕[1], 窪野一郎[1], 田代陽介[1], 二又裕之[1,3*]
（[1]静大院・総科技, [2]静大・工, [3]静大・グリーン科技研）

Enhancing anaerobic bioprocesses based on microbial electrosymbiosis via rechargeable biogenic minerals

○Ryoya Hayashi [1], Kazuki Yasuike[1], Miki Katagiri[2], Takahiro Omae[1], Ichio Kubono[1], Yousuke Tashiro[1], Hiroyuki Futamata[1,3*]
([1] Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., [2] Fac. Eng. Shizuoka Univ, [3] Shizuoka Univ., Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

微生物の物質変換能力の向上とその制御はバイオテクノロジーの進展に必須である。一般的に嫌気微生物生態系による物質変換は段階的反応プロセスであるために反応速度が遅い。解決策として導電性鉱物を介した電子授受システムが期待されている。しかし電子授受に基づく微生物応答は一部微生物で研究が進んでいるものの、実環境サンプルを用いた複合微生物系における微生物電子共生系に関する知見は少ない。そこで本研究では微生物由来蓄電性鉱物が微生物生態系に与える影響および形成される微生物群集について評価した。

佐鳴湖底泥を接種源とした微生物燃料電池の負極表面上より分離された硫酸還元細菌 *Desulfovibrio* sp. HK-Ⅱ株を Fe^{3+}および硫酸存在下で培養すると、蓄電性鉱物（RBM: Rechargeable Biogenic Mineral）が生成された。蓄電性を有することから RBM が電子授受の場として機能することが推察された。そこで RBM、佐鳴湖底泥および 4 mM 乳酸を添加した系（RBM 集積系）および RBM 無添加系（control 集積系）を構築し、継代回分培養を数十世代行った。経時的に有機酸、水素およびメタンを測定した。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。また、11 代目および 16 代目以降では酢酸消費に伴うメタン生成が確認された。酢酸消費、メタン生成速度は RBM 集積系の方が 2.1±0.41 倍速かった。SYBR Green Ⅰによる蛍光顕微鏡観察から RBM 集積系の多くの微生物が RBM 上に存在していることが確認された。継代毎に採取したサンプルを用いて 16S rRNA V4 領域のアンプリコンシーケンス解析を行った結果、RBM 集積系において特異的群集構造形成が確認された。アンプリコンシーケンス解析に基づく主座標分析から *Hydrogenophaga* 属および *Acetobacterium* 属が特異的群集構造形成に寄与していることが示唆された。RBM 集積系より分離された I-6 株は 16S rRNA 遺伝子解析の結果 *Acetobacterium* 属細菌であることが明らかとなった。微生物燃料電池で I-6 株を培養したところ電流生産が確認された。これらの結果から、RBM を電子授受の場とした微生物電子共生系が形成され、嫌気バイオプロセスの向上に寄与したことが示唆された。この微生物電子共生系の更なる理解のために更なる微生物の分離と解析を現在行っている。

Key words Electrosymbiosis, Extracellular electron transfer, Rechargeable biogenic mineral

G3H2 (0106) 基質競合下における代謝ネットワークの進化と微生物共存

○鈴木研志[1,5*], 上原悠太郎[2], 栗栖太[3,5], 野尻秀昭[4,5]
（[1]東大院・農生科, [2]東大院・工・都市工, [3]東大院・工・水環セ, [4]東大院・農生科・アグテック, [5]東大・CRIIM）

Evolution of a metabolic network enables multispecies coexistence under substrate limiting conditions.

○Kenshi Suzuki[1,5*], Yutaro Uehara[2], Futoshi Kurisu[3,5], Hideaki Nojiri[4,5]
([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Grad. Sch. Eng. Dept. Urban Eng., Univ. Tokyo, [3]Grad. Sch. Eng. Res. Ctr. WET., Univ. Tokyo, [4]Grad. Sch. Agric. Life Sci., AgTech., Univ. Tokyo, [5]CRIIM, Univ. Tokyo)
kensuzuki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

微生物は限られた資源を競合することから、共存できる微生物の数は資源の数に依存すると考えられてきた。しかし、実環境には多種多様な微生物が共存することで微生物生態系を形成しており、理論的理解と現実には大きな乖離が存在する。これまでの研究で、フェノールを唯一の炭素源として増殖できる異属細菌を組み合わせて培養すると、フェノールを競合しつつ代謝産物を分配することで共存できることが示唆されてきた。しかしその一方で、どの様な菌株の組み合わせでも共存が成立するわけではないことが示されてきた。即ち、多種共存には適切な菌株の組み合わせで代謝のネットワークが形成されることが必要不可欠であることが考えられた。そこで本研究では、5 種の異属フェノール分解菌を様々な順序で植菌し、群集構造変遷および細胞外に分泌された代謝産物を経時的に解析することで、微生物共存機構を代謝ネットワーク形成の観点から解明することを目的とした。

供試菌株として *Acinetobactor* C26 株、*Comamonas testosteroni* R2 株、*Cupriavidus* sp. P-10 株、*Pseudomonas* sp. LAB-08 株および *Variovorax* sp. HAB-30 株を用い、フェノールを唯一の炭素源とする連続集積培養系を構築した。本研究では R2 株を 1 種目とし 6 つのパターンで植菌を実施した。その結果、接種順序によって、共存できる種数が異なり、C26 株が早い段階で植菌されることで共存できる種数が増加することが示された。そこで、共存と代謝ネットワークの関係を解析するため、4 種の共存が確認された R2 株、C26 株、P-10 株、HAB-30 株そして LAB-08 株の順に植菌された培養系の培養上清に含まれる代謝産物を分析したところ、植菌した種数の増加に伴い代謝産物の種数が増加し、P-10 株を植菌することで代謝産物のプロファイルが最も大きく変化することが明らかとなった。ネットワーク形成に関与する代謝産物を推定するために、植菌に伴って新規検出あるいは消失する代謝産物を解析したところ、少なくとも 22 種の代謝産物が関与していることが推察された。また、それらの代謝産物は分子量 200 以上が多く、二次代謝産物や溶菌した細胞由来であることが考えられた。以上の結果から、本 5 菌株培養系では C26 株および P-10 株間で形成される代謝ネットワークが共存に寄与しており、適切なネットワークの進化が微生物の多種共存を可能にしていることが示唆された。

Key words Substrate competition, Coexistence, Metabolic network, Microbial community

G3H2 (0107) 合成ムスク香料の微生物分解

○小島史基[1], 久保田朝美[2], 谷村那子[2], 浦瀬太郎[1,2], 松井徹[1,2*]
([1]東京工科大学大学院・バイオ, [2]東京工科大学・応生)

Microbial degradation of synthetic musk ester compounds

○Chikamoto Kojima [1*], Asami Kubota [2], Nako Tanimura [2], Taro Urase [1,2], Toru Matsui [1,2]
([1]Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol., [2]Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol.)
matsuitor@stf.teu.ac.jp

【目的】
合成ムスク香料は、高級香水だけでなく洗剤用香料にも広く使われており、日常生活による環境中への拡散が大きいことから、PPCPｓ(Phermaceuticals and Personal Care Products)の一部と考えられている。本研究では、生分解性が高いとされているエステル系合成ムスク香料分解菌の探索と性質について検討した。

【方法および結果】
八王子、高尾山周辺の土壌、植物試料 120 点を用いて、エチレンブラシレート（EB, 長谷川香料より供与）を唯一の炭素源とする集積培養を行った。その結果、6 つの集積培養物が濁りを示した。純粋分離株 53 株中 13 株が EB を唯一の炭素源とし他培養において有意な生育と分解率を示した。得られた候補株 13 株をゲノム抽出後、PCR により増幅した 16SrRNA 配列による分類を行った結果、*Xenophilus* sp.，*Cupriavidus* sp.， *Pseudomonas* sp. *Comamonas* sp.， *Stenotrophomonas* sp.に属するプロテオバクテリア、*Bacillus* sp.に属するファーミキューテス，*Rhodococcus* sp.，に属するアクチノバクテリアなどの多様な細菌類が認められた。EB 以外の大環状ムスクとしてシクロペンタデカノン（CPD)、ペンタデカノラクトン（PDL)、ヘキサデカノリド（HDNL)、ヘキサデセンラクトン（HDEL）などに対する資化性を検討したところ、すべての株が CPD 以外の基質を炭素源として生育したことから、エステル加水分解を初発反応とする分解が示唆された。
EB を唯一炭素源とした培養液を酸性下酢酸エチル抽出を行ったが、分解産物は検出されず、休止菌体反応を行ったところ、予想されるジカルボン酸とグリコールが検出された。また、エステル系大環状ムスク（PDL、HDNL、HDEL）の中でも菌株により一部しか資化しないものがあることから、エステラーゼ（あるいはリパーゼ)、脂肪酸代謝の基質特異性が菌株により異なると考えられた。
分解スペクトルの広かった株について次世代シーケンサによるゲノムの網羅的解析を行った結果、リパーゼと高い相同性を示す ORF が認められ、一次配列にはリパーゼに特徴的なモチーフもいくつか認められた。

以上の結果から、エステル系合成ムスク香料の微生物分解が単一の細菌によって可能であること、香料の種類によって分解可能な菌株が異なること、などが明らかとなった。現在、分解特異性の違いがどのステップの違いによるものなのかなどについて検討を行っている。

Key words degradation, screening, xenobiotic compounds, bacteria

G3H2 (0108) Operation of a plant-based air purification filter system under various conditions

○Jeong Wook Jo[1*], Hak Jin Song[1], Yong Keun Choi[1], Ju Yeon Lee[1], Kyung Bin Oh[1], Hyung Joo Kim[1*]
([1]Dept. of Biological Engineering, Konkuk Univ.)

Operation of a plant-based air purification filter system under various conditions

○Jeong Wook Jo[1*], Hak Jin Song[1], Yong Keun Choi[1], Ju Yeon Lee[1], Kyung Bin Oh[1], Hyung Joo Kim[1*]
([1]Dept. of Biological Engineering, Konkuk Univ.)
hyungkim@konkuk.ac.kr

Since particular plant species are able to remove particulate matter (PM) resulting in concomitant air purification, plant based air filter systems have recently received significant attention. In this study, the performance of an air filter system using live plants incorporating active filter material was investigated. For the cultivation of the plant (*Syngonium podophyllum*) in the system, artificial soil (biochar), lighting and watering devices for the plant growth was incorporated in the system. The air flow was controlled by an electrical fan (diameter: 172mm, air flow rate: 0.106m^3/s). Among indoor pollutants, PM, CO_2, VOCs and airborne microorganisms were measured during the operation of the system. The system showed remarkable indoor pollutants reduction activity during the operation (e.g. the indoor PM (ca. 58.89% reduction), CO2 (ca. 5.2% reduction), airborne bacteria (ca. 86.44%) and airborne fungi (ca. 84.73%)). The system with the live plants provides over 3 months of stable air purification capacity and these results showed that the air purification using live plants can be applied for the construction of novel active air purification system.

Key words: Plants, Air purification system, Particulate matter, CO_2, VOCs, Biochar

G3H2 (0109) 栄養源枯渇による *Leptothrix* 属細菌の糸状成長制御

○久能　樹[1*], 山本達也[1], 小野絵里香[2], 杉本真也[3], Utada S. Andrew[1,4], 野村暢彦[1,4]
([1]筑波大生命環境, [2]筑波大院生命環境, [3]慈恵医大医, [4]筑波大 MiCS)

Regulation of *Leptothrix* filamentous growth by nutrient limitation

○Tatsuki Kunoh[1*], Tatsuya Yamamoto[1], Erika Ono[2], Shinya Sugimoto[3], Andrew S. Utada[1,4], Nobuhiko Nomura[1,4]
([1]U. Tsukuba, Fac. Life Env. Sci., [2] U. Tsukuba, Grad. Life Env. Sci., [3]Jikei U., Med., [4]U. Tsukuba, MiCS)
kuno.ttatsuki.gb@u.tsukuba.ac.jp

水圏生息の糸状性鉄酸化細菌 *Leptothrix* 属は、浄水施設において Fe や Mn 等の金属イオン除去に利用されているが、異常な糸状成長は配水管の閉塞や汚水処理施設における活性汚泥の固液分離障害により機能を低下させる。我々は、マイクロ流体デバイスを用い、二次元方向にのみ伸長させることで、細胞鎖内の 1 細胞の挙動や糸状成長の鍵を握る鞘構造の分布を経時観察できる顕微鏡システムを構築した。本研究では、栄養源を制限した培地をデバイスに注入し、糸状成長に対する栄養源枯渇の影響を明らかにした。P 源や C 源枯渇は細胞間のギャップを生じ、Ca 源枯渇は鞘形成を阻害して細胞鎖を分断させた。さらに C 源と Ca 源の同時枯渇によって細胞鎖が単細胞にまで分断された。また、静置培養で形成される浮遊性の薄膜(ペリクル)も C 源と Ca 源の同時枯渇により抑制された。これらの知見をベースに、栄養源制御による糸状成長抑制法の開発が期待される。

Key words: filamentous bacterium, *Leptothrix*, sheath, nutrient limitation, calcium

G3H2 (0110) 有機栽培土壌と化学栽培土壌における根の分布パターンの解析

○坪倉美紗, Tran Quoc Thinh, 荒木希和子, 久保幹*
（立命館大院・生命科学）

Analysis of the distribution patterns of plant root cultivated in organic and inorganic soils

○Misa Tsubokura, Quoc Thinh Tran, Kiwako S. Araki, and Motoki Kubo*
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】 根は，水分や養分の吸収，地上部の支持など植物成長に重要な役割を持つ．したがって，作物の栽培では土壌中の根の伸長や分布が作物の品質や収量にも関わるとされる．しかし，土壌地下部の挙動を把握することは容易でなく，栽培技術の評価は地上部に焦点を当てられることが多い．一方，近年，環境保全型農業が推進され，より省力的かつ安定した有機栽培技術の確立が急務である．有機肥料は慣行農業で使用される化学肥料とは肥料成分の水溶性や土壌への吸着性が大きく異なるが，肥料の違いが作物の根系構造に及ぼす影響は明らかでない．そこで本研究では，施肥方法の異なる 2 種類の土壌を用いて，土壌中の根の分布パターンを比較した．
【方法・結果】 有機肥料（牛糞，鶏糞，大豆かす，菜種油かす，骨粉）もしくは化学肥料 (N, P, K) をそれぞれ施肥した土壌を作製し，透明な円筒容器 (直径 10.5 ㎝) に土の深さが 20 ㎝になるように充填した．その後，ブロッコリーの種子を播種し，植物育成室（明 12 h/暗 12 h，23˚C）にて栽培を 21 日間行った．栽培期間中，根への光の影響を最小限にするため測定日以外は容器をアルミシートで遮光した．2～3 日ごとに，葉身の大きさ（葉長 ㎝× 葉幅 ㎝），主根が容器底面に到達する日数および側根の数と位置を計測した．結果，栽培 21 日目における葉身の大きさは，有機土壌で平均 72.7 ㎠，化学土壌で 75.3 ㎠と地上部の生育は同程度であり，すべての測定日において有意な差は見られなかった．主根が容器底面に到達した日数，側根を確認できた日数ともに，有機土壌では 12 日，化学土壌では 10 日であった．また栽培 21 日目における側根の合計数は，有機土壌で平均 24.8 本，化学土壌で 61.6 本であり，有機土壌よりも化学土壌で多かった．さらに土壌深度 2.5 ㎝ごとに解析すると，表面から深度 5.0 ㎝未満に位置する側根の数が全体に占める割合は，有機土壌で平均 74.0 %，化学土壌で 52.2 %であった．これら結果より，化学土壌よりも有機土壌で栽培したブロッコリーでは主根および側根の伸長速度が遅く，側根が表層寄りに分布する傾向が見られた．地上部の生育は同程度であったことから肥料成分の形態による土壌環境の違いは地下部である根の伸長速度と位置に変化をもたらすことがわかった．

Key words organic cultivation，root expansion，soil environment

G3H2 (0111) 土壌環境と地温の関係解析

○平井佑治, Tran Quoc Thinh, 荒木希和子, 久保幹*
(立命館大学院・生命)

Analysis of the effect of soil environment on soil temperature

○Yuji Hirai, Quoc Thinh Tran, Kiwako S. Araki and Motoki Kubo*
(Ritsumeikan Univ.)
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】

作物の成長は、気温のみならず地温も重要な要因となる。地温の変動は、気温などの外的要因だけでなく、土壌の性質などの内的要因にも影響される。例えば、土壌の物理的性質は地温に影響を与える要因の 1 つである。物理的性質が異なる土壌では、土壌微生物の挙動と地温変化も異なると考えられる。そのため、本研究では、土壌環境のうち、物理的性質と土壌微生物の地温に対する影響に着目した。これまでの研究において、温度一定条件下では土壌中の細菌数が多いほど地温は高かった。また、圃場での気温が変動する環境下では、土壌中の細菌数が多いほど地温日較差が小さかったことより、土壌細菌数は地温の安定化に寄与する可能性が示唆された。しかし、圃場での実験は外的要因 (日射量など) の影響が均一ではなく、土壌の組成や物理的性質も同じではなかったことから、本研究では、日射量と気温が同一の環境下で、物理的性質が均一の土壌での地温と微生物数の変化から土壌微生物による地温への影響を検証することを目的とした。

【方法・結果】

立命館大学びわこくさつキャンパス敷地内の畑地に縦横高 0.6 × 0.9 × 0.3 m の穴を 6 つ 0.6 m 間隔で掘った。土壌の物理的性質 (固相・気相・液相の割合) を変えることなく、有機肥料を施肥することで微生物数が変化する土壌条件を 5 つ作製した。この 5 種類の土壌と圃場の土壌 (Blank 土壌) を合わせて 6 種類の土壌を圃場の穴に埋めた。各土壌の深さ 10 cm、20 cm 部分と圃場の地表面から離した日陰部分に温度測定データロガーを設置し、2021 / 6 / 14 ~ 2021 / 7 / 11 において、1 時間ごとの地温と気温を測定した。測定期間中に土壌の総細菌数の測定を行った。その結果、有機肥料を多く施肥した土壌に比べて施肥していない土壌のほうが総細菌数は平均で 7.4×10^8 ~ 7.8×10^8 cells / g-soil 多かった。有機機肥料を多く施肥した土壌に比べて施肥していない土壌のほうが平均地温は深度 10 cm で 0.0 ~ 0.5℃、20 cm で 0.7 ~ 1.3℃ 高かった。そのため、気温が変動する室外の環境下でも、物理的性質が均一な土壌では有機物が多く細菌数の多い土壌ほど地温が高くなることが明らかとなった。

Key words organic materials, soil bacterial biomass, soil environment, soil temperature

G3H2 (0112) 木質バイオマスの農地利用を目指した新規土壌の開発

○西原大智, Tran Quoc Thin, 荒木希和子, 久保幹*
（*立命館大院・生命）

Development of a novel soil by the effective utilization of woody biomass in agricultural lands

○Taichi Nishihara, Quoc Thinh Tran, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo*
(*Ritsumeikan Univ)
kubo@ sk.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】

近年、地球温暖化の抑制や循環型社会の形成といった観点から、バイオマスの利活用が注目されている。廃棄物系バイオマスの利用率は着実に向上している一方で、未利用バイオマスの利用率は非常に低い。特に、林地残材は年間 800 万トンの発生量に対して 72 万トンの利用状況であり利用率が 9%に留まっている(農林水産省, 2021)。我々は、新たな利用方法として土壌改良材として活用することを試みている。森林バイオマスを用いた土壌改良に関する研究はこれまでも報告されているが、その多くが土壌表面へのマルチング材として利用である。そのため、木質バイオマスを土壌に混合した場合の、土壌組成の変化および植物成長に対する影響は不明瞭である。樹皮を発酵させたバーク堆肥や、木炭といった森林バイオマスに由来する有機資材では、土壌物理性の改善効果が認められているが、タンニンやフェノール化合物に起因する植物への成長阻害も報告されており、樹種の選択も検討の余地がある。本研究では森林バイオマスの有効利用と持続可能な農業を目指した新規土壌の開発を目的とし、森林バイオマスおよび有機資材を調整した土壌を作製し、土壌環境および植物成長を評価した。

【方法・結果】

森林バイオマスとして、スギ（繊維状、粉状）、スギの樹皮（繊維状、粉状）、ヒノキ（削り節、粉状）、マダケ（板状、粒状、粉状）、アカシア（粉状）、竹スギ混合（粉状）の木質チップを使用した。木質チップ、真砂土、黒土を用いて、土壌における木質チップの体積割合が 30~90%になるように土壌を作製後、土壌環境およびコマツナの生育を調査した。木質チップを活用した土壌では土壌微生物数が増加し 2.2×10^8~1.3×10^9 cells/g-soil 確認できた。また、樹種によってコマツナの生育に違いが見られた。スギ属を用いた土壌で最も生育が良く、市販の化学肥料を用いた園芸用培養土と遜色ない植物成長が確認されている SOFIX 有機標準土壌に対して 80%以上の相対成長率を示した。一方、ヒノキ土壌では 30~55%、マダケ属、竹杉混合土壌では 50%以下、アカシア土壌では生育不可となった。また、スギ土壌以外では土壌における木質割合が高くなるほど植物の成長が悪化したのに対し、スギ土壌では土壌 1 cm^3 当たり 5.0~10 g の間で割合を増やしても成長率は低下しなかった。スギ属の木質バイオマスを土壌に活用することが適切であることがわかった。

Key words plant growth, soil environment, woody biomass

G3H2 (0113) Development of organic soil condition for tomato cultivation

◯Zakirul Islam *, Quoc Thinh Tran, Kiwako S. Araki, and Motoki Kubo
(Graduate School of Advanced Life Sciences, Ritsumeikan University)
gr0451hv@ed.ritsumei.ac.jp

Development of organic soil condition for tomato cultivation

◯Zakirul Islam *, Quoc Thinh Tran, Kiwako S. Araki, and Motoki Kubo
(Graduate School of Advanced Life Sciences, Ritsumeikan University)
gr0451hv@ed.ritsumei.ac.jp

Background

For commercial purpose, the conventional cultivation system by using agrochemicals has been established for enhancing tomato yields. Compared to organic cultivation system, the cultivation using chemical fertilizers and pesticides is easy to control. However, cultivation practice with agrochemicals is unhealthy and harmful for environment. Development a soil condition especially for small-scale utilization in organic cultivation of tomato is still challenging to achieve stable and economic production. The objective of this study is to develop a suitable soil condition for organic tomato cultivation in the soil-limited pot.

Methods and Results

For this experiment, an organic field soil containing recommended nutrients for tomato cultivation was considered as the control treatment (T1). For the development of soil condition C/N ratio (20-25) was considered as precondition. For the base soil, wood chip, mountain soil, black soil, and peat moss were used on the volume basic. Cow manure, chicken manure, soybean meal, rice bran, and bone meal were added as the organic fertilizers to the weigh basic. This soil was as treatment-2 (T2). The organic fertilizers in treatment-3 (T3) and treatment-4 (T4) were 2 and 3 times higher than that in T2. Additionally, steel slag was added in T2, T3, and T4. Different sizes of pots 9 L (7 kg soil), 15 L (10 kg soil), and 50L (30 kg) were used. One plant in each 9 and 15 L pots and 3 plants in each 50L pots were transplanted. The experiment was conducted in triplicates in the green house. The initial C/N ratios for T1, T2, T3, and T4 were 20, 22, 24, and 20 respectively. After 3 months of cultivation, the highest yield was of T3 in 9L pot (10% higher than the control). The yield in T2 of 50L pot was 9% higher than that of T1. The highest sugar content of tomato fruits was in T2 and acid, lycopene, and glutamic acid content was found highest in T4.

The suitable condition for organic cultivation of tomato was T2 for long pot (≈ 50L soil) and T3 for small pot (≈ 9L soil).

Keywords: C/N ratio, organic soil, pot cultivation, tomato

G3H2 (0114) セルロース資化で発現誘導されるイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* 由来 CDH 遺伝子の解析

○仲尾 日菜子, 本田 友音, 尾高 雅文, 松村 洋寿*
（秋大院・理工）

Expression analysis of CDHs from the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in cellulose induction

○Hinako Nakao, Yuto Honda, Masafumi Odaka, Hirotoshi Matsumura*
(Grad. Sch. Eng. Sci., Akita Univ.)
matsumuh@gipc.akita-u.ac.jp

糸状菌 *Magnaporthe oryzae* により引き起こされるイネいもち病菌は、稲作における深刻な病害である。イネいもち病菌の防除には、菌体内のタンパク質を標的とする薬剤が用いられるが、耐性菌の発生が問題となっている。そこで我々は、菌体外タンパク質を標的とする新規防除剤の開発を目指し、*M. oryzae* のセルロース分解系に関わるセロビオース脱水素酵素(CDH)に着目している。先行研究により、*M. oryzae* のゲノムには、2 種類の CDH (*Mo*CDHs: MGG_11036、MGG_13809)が存在することが明らかとなった。2 種類の *Mo*CDH 遺伝子はドメイン配列が異なっており、さらに *Mo*CDH 組換え体は異なる酵素活性の至適 pH を示した。この結果は、2 種類の *Mo*CDH はセルロース代謝系において異なる役割を持つことが示唆している。本研究では、2 種類の *Mo*CDH のセルロース代謝系における役割を明らかにするために、グルコースまたはセルロースを炭素源として *M. oryzae* を培養した際の全分泌タンパク質量及び *Mo*CDH 発現量を比較した。*M. oryzae* を、2%グルコースまたはセルロースを含む液体培地を用いて、28℃で 9 日間振盪培養を行った。培養液を遠心分離し、上清と菌体をそれぞれ回収した。Bradford 法により、培養経過日数ごとに培養液上清の全分泌タンパク質の定量を行った結果、グルコース培地、セルロース培地ともに、培養日数経過に伴い菌体外タンパク質量の増加が確認された。このことから、グルコースとセルロースのどちらを炭素源にしても、*M. oryzae* の培養が可能であることが示された。次に、炭素源による分泌タンパク質の種類の差異を検討するために、培養液上清を 12% SDS-PAGE により分離し、LC-ESI/MS によるプロテオミクス解析を行った。その結果、グルコース培地と比較してセルロース培地において、2 種類の *Mo*CDH を含むセルロース分解系酵素の発現量の増加が観測された。この結果から、セルロース培地による培養により、*M. oryzae* のセルロース代謝系タンパク質の発現誘導が起こることが示され、さらに 2 種類の *Mo*CDH はセルロース代謝系に関与することが示唆された。現在、セルロースによる *Mo*CDH の経時的な発現誘導レベルを解析するために、定量 PCR での解析を進めているところである。

Key words cellobiose dehydrogenase, *Magnaporthe oryzae*, proteomics

G3H2 (0115) 環境に放出されたリンの植生利用の検討

○滝口 昇*, 花原 薫, 汲田幹夫
（金沢大・理工）

Agricultural use of phosphorus released into the environment

○Noboru Takiguchi*, Kaoru Hanahara, Mikio Kumita
(Coll. Sci., Eng., Kanazawa Univ.)
tackey@se.kanazawa-u.ac.jp

リンは，生体内では細胞膜や ATP の生成，遺伝的処理などの重要な役割を果たしており，あらゆる生物にとって必要不可欠な元素である．近年，主要なリン資源であるリン鉱石の枯渇の危機が懸念されており，それに伴って国際価格も高騰している．日本はリン鉱石の入手を輸入に依存しているため，今後は国内におけるリン資源の循環利用が望まれる．日本の土壌にはリン肥料の経年施肥により 38 万トンものリンが植物に利用されずに土壌中に蓄積している．これは，日本の農耕地にリンとの結合が強い鉄やアルミニウムが多く含まれており，リンが植物の利用できない難溶性リンとして存在しているためである．キレート剤の圃場への散布によるリン肥料節約が期待されるが，作物や土壌へ及ぼす影響についてはさらなる検討が必要である．本研究では，キレート剤の土壌および植物に対する影響について検討することを目的とし，植生試験によってキレート剤の効果を検証した．

生育が早く，また肥料の影響を検証する際によく用いられるコマツナを用いて植生試験を行った．土壌約 260 g を PET 製ポットに入れ，発芽率 90%以上の市販のコマツナの種子を播いた．これを 25℃，明暗サイクル 12 時間に設定した装置内で 3 週間栽培した．水は 1 日 1 回，キレート剤（133 mM，pH 5.6 に調整したクエン酸またはリンゴ酸溶液）は週に 1 回，有機酸が 2 mmol/100 g soil となるよう与えた．栽培開始から 7 日目に発芽率，22 日目に草丈，地上部重，本葉数を測定した．草丈，地上部重，本葉数については *t* 検定により有意差検定を行った．実験は事前の施肥無と有とで行い，施肥は N, P, K が全て 70 mg/L soil となるよう加えた．

発芽率は，全て種子の規格通り 90%以上となり，キレート剤の添加による異常は見られなかった．草丈，本葉数，地上部重は施肥無においてキレート剤を添加したポットで減少していた($p < 0.05$)．この要因としては，キレート剤調製の際に加えた NaOH の Na^+による土壌への浸透圧ストレスと団粒構造劣化作用により，コマツナの生育が阻害されたためであると考えられる．一方，施肥有ではキレート剤の添加による有意差は見られなかった．これは，肥料を加えたことで，キレート剤の作用が不明瞭となったと考えられる．また，十分な肥料が存在することで，コマツナが Na^+によるストレスにある程度耐えることができたためであると考えられる．

キレート剤による発芽率に異常は見られなかったが，その後の生育に負の影響が及んだ可能性がある．今後はキレート剤に使用する pH 調整剤のさらなる検討により，土壌や植物にストレスの少ないキレート剤の開発が期待される．

Key words phosphate in soil, chelating, agricultural use

G3H2 (0201) 壁面で生育する気生微細藻類の単離法の検討と高生育株のスクリーニング

○石倉優大，油井信弘，藤井克彦*
（工学院大学大学院）

Development of the culture method for aerial microalgae living on the wall and screening of fast-growth strains

○Yudai Ishikura, Nobuhiro Aburai, Katsuhiko Fujii*
(Kogakuin Univ.)
st13631@ns.kogakuin.ac.jp

【背景と目的】微細藻類は主に水圏に棲息するが、なかには陸上で生活する気生微細藻類が存在する。気生微細藻類は窒素等の栄養源が欠乏した壁面で生育し、緑色やオレンジ色の微生物マットを形成する。気生微細藻類はその生育環境から、栄養源枯渇や水圏に比べて激しい温度変化や強光などの環境ストレスに対し、耐性をもつと考えられる。ストレスに対する生体反応として、気生微細藻類は中性脂質やカロテノイドなどの機能性脂質を蓄積するが、これらは産業上有用性が高い。微生物マットからは異なる形態の気生微細藻類が観察され、これまで研究対象とされていない種も多く存在すると期待できる。本研究では、微生物マットから様々な気生微細藻類を得ることを目的に、その単離法を検討し、高い生育能を示す有望株をスクリーニングした。
【方法】気生微細藻類を含む微生物マットは、工学院大学八王子キャンパス構内の基物表面に形成されていたものから採集した。微生物試料を滅菌水で洗浄して液体培地に播種したが、生育した様子は見られなかった。そこで、光強度や窒素源、培養基物の検討を行い、光強度 2.0~51 μmol photons m^{-2} s^{-1}、窒素源 $NaNO_3$、培養基物をろ紙にして培養することで藻体コロニーが形成された。形成されたコロニーから藻体を 96 穴プレートに播種し、培養後、12 穴プレートに移し、培養と形態観察を行った。得られた藻株は各培養条件下(pH、窒素源、温度、光強度)、初期濁度 OD_{750} = 0.05 付近で培養を開始し、OD_{750} を経時的に測定することで生育を評価した。
【結果と考察】キャンパスの壁面から採集した気生微細藻類は、従来の方法では培養できていなかった。しかし、ろ紙を基物に用いた培養法により培養することができ、形態観察から多様な気生微細藻類が得られたことが示唆された。ろ紙の繊維中ではカビ等が菌糸を伸ばしにくいことや、気生微細藻類が効率的に CO_2 固定できるようになったため、気生微細藻類の培養基物に適していると考えられる。また、得られた株を培養したところ、多くの藻株は窒素源として硝酸イオンを選択するのに対し、アンモニウムイオンも窒素源として利用できる気生微細藻類も存在することがわかった。スクリーニングでは、高温条件下や強光条件下でも高い細胞密度で生育できるものも見られたため、生育の速さに関わらず培養条件に対して特徴的な反応を見せたものも有望株と判断した。今後は、スクリーニングを継続するとともに、有望株の培養スケールを拡大し、蓄積する脂質成分を分析するとともに、18S-rRNA 遺伝子に基づく属種の同定を行う。

Key words aerial microalgae, culture method, screening, biomass

G3H2 (0202) 気生微細藻類 BRCH-R-002 のストレス培養条件の検討とカロテノイド蓄積

○野崎 正汰，油井 信弘，藤井 克彦*
（工学院大学大学院）

Carotenoid accumulation in aerial microalga BRCH-R-002 under stress conditions

○Shota Nozaki*, Nobuhiro Aburai, Katsuhiko Fujii
(Kogakuin Univ.) (Grad. Sch. Eng. Kogakuin Univ.)
st13631@ns.kogakuin.ac.jp

【背景と目的】カロテノイドは天然色素であり、太陽光が当たる環境で生存する生物において重要な生理活性を示す。微細藻類は一般に水圏に生活しているが、陸上の岩場や基物の表面上で生活する気生微細藻類がいる。この藻類は、岩場や基物表面での温度変化、直射日光による強光、栄養源枯渇、乾燥などの過酷な環境で、脂肪酸やカロテノイドを多く蓄積する。当研究室では、緑藻綱 *Coelastrella* sp.やトレボウクシア藻綱 *Coccomyxa* sp.など様々な気生微細藻類を単離してきたが、未だ多くの藻株において、産生されるカロテノイドは十分には分かっていない。本研究では、新たに単離した気生微細藻類 BRCH-R-002 株のストレス培養条件を検討し、そのカロテノイド蓄積を分析した。
【方法】Bold's Basal 培地（BB 培地）で気生微細藻類 BRCH-R-002 を 21 日間培養した。その後、2 つのストレス負荷培養を行った。まず、BB 培地の窒素源の有無（窒素源添加:N+、無添加:N-）および種々の光条件、暗所:L-（0 μmol photons m^{-2} s^{-1}）、中光:L+（60 μmol photons m^{-2} s^{-1}）、強光:L++（140 μmol photons m^{-2} s^{-1}）で 7 日間培養した。次に、BB 培地（N+）および光強度（L++）で 2 日間培養後、1 時間毎に光強度を暗所と強光に適宜切り替えて培養した。培養後、乾燥細胞からメタノール:ジクロロメタン=3:1 とビーズ破砕によって脂質抽出物を得た。色素成分を分析するため、HPLC 分析を行った。カロテノイドの含有量を定量分析するとともに、未同定のピークについては、4 画分を分取し、吸収スペクトルと APCI-MS / MS により構造を解析した。
【結果と考察】BRCH-R-002 株は、培養条件 N-L++と N+L++において、アスタキサンチン含有量は多くなり 4 mg g^{-1} dcw となった。これは、BRCH-R-002 株は光ストレスに高い感受性を示し、過剰な光により誘導される活性酸素種をアスタキサンチンが消去することで、脂質の過酸化を抑制できるようになると考えられた。培養条件 N+L+と N+L++において、主要なカロテノイド（画分 4）を 12 mg g^{-1} dcw 蓄積した。この画分は、ルテインと同じ保持時間かつ似た吸収スペクトルであったが、$[M+H^+]$=567.4184 であり質量数が異なっていた。以上のことから、ルテインの類縁体と考えられた。他方、強光から暗所条件に短時間のうちに置き換えると、ゼアキサンチンが減少し、画分 3 が増加した。画分 3 は、$[M+H^+]$=585.4151 と吸収スペクトルからアンテラキサンチンと推定された。アンテラキサンチンは、過剰な光エネルギーを熱エネルギーに変換するキサントフィルサイクルの中間産物である。興味深いことに、暗所条件でビオラキサンチンが確認できず、BRCH-R-002 株は、アンテラキサンチンとゼアキサンチンのみの変換によって光環境に適応していると考えられた。

Key words aerial microalgae, carotenoids, stress condition

G3H2 (0203) 気生微細藻類 *Coccomyxa subellipsoidea* KGU-D001 の水ストレス馴化機構に関する解析

○森田 令一，油井 信弘，藤井 克彦*
（工学院大学大学院）

Mechanisms of water-stress acclimation of *Coccomyxa subellipsoidea* KGU-D001, an aerial microalgal strain

○Rei Morita, Nobuhiro Aburai, Katsuhiko Fujii*
(Kogakuin Univ.)
st13631@ns.kogakuin.ac.jp

【背景と目的】生活を豊かにする藻類バイオマスの商業生産では、より低コストの培養技術が求められている。先行研究より気生微細藻類 *Coccomyxa subellipsoidea* KGU-D001 株は、気相条件下で生存し、水ストレスに馴化することが示唆された。水ストレスへの馴化において、光合成などの代謝が関係していると考えられる。水ストレス馴化機構の解明は、新たな培養方法の開発につながる。本研究では、水ストレス条件下での KGU-D001 株の光合成能を評価し、水ストレス馴化機構の解明を目指した。
【方法】KGU-D001 株藻体を 14 mg 回収し、シリコン製の遮水性基物（28 cm^2）に均一に塗布し、細胞フィルムを作成した。細胞フィルムは純水を含ませた綿上に基物ごと静置し、光強度 40 μmol photons m^{-2} s^{-1} で培養した。水ストレス条件下での光合成能を評価するため、溶存酸素による光合成速度（酸素センサー）、クロロフィル含有量（分光光度計）、クロロフィル蛍光（PAM クロロフィル蛍光計）を分析した。
【結果と考察】光合成速度(酸素放出)は、培養 7 日間で 9 %減少し、培養 7 日から 14 日目の間で 41 %減少した。クロロフィル a、b の含有量は、培養 7 日間でそれぞれ 52、44 %減少し、培養 7 日から 14 日目の間でそれぞれさらに 58、67 %減少した。クロロフィル蛍光分析により得られた蛍光強度から、光化学系に関連するパラメーター（Fv/Fm、NPQ、Fv'/Fm'、qP）を計算した。Fv/Fm、NPQ、Fv'/Fm'は培養 7 日間でそれぞれ 30、85、31 %低下し、qP は 20 %増加した。続いて培養 7 日から 14 日目の間では、25、78、67 %増加し、qP はほぼ一定であった。培養開始時と培養 7 日目を比較すると、クロロフィル含有量が減少したが、光合成速度はほとんど変化しなかった。培養開始時では、NPQ が高い値を示したことから、光エネルギーは光化学反応ではなく、熱放散により熱として放出された。培養 7 日間 Fv/Fm が低い値を示したことから、光化学系が損傷し不足したエネルギーを炭水化物の分解により得ていると考えられる。培養 7 日から 14 日目の間では Fv/Fm、Fv'/Fm'が回復しつつ水ストレスに馴化し、必要最低限の光合成が行われていると考えられる。今後は、水ストレスへの馴化にともなう代謝変化を明らかにするため、細胞内の生体成分を定量分析する。

Key words aerial microalgae, biomass, photosynthesis, water-stress, acclimation

G3H2 (0204) 光化学系Ⅱの水素発生を利用したバイオ燃料電池

○杉山葵, 岩橋暁成, 堤丈瑠, 川上比奈子, 松尾康光*
（摂南大院・理工）

Biofuel cell using hydrogen generation of photochemical system II

○Aoi Sugiyama, Akinari Iwahashi, Takeru Tsutsumi, Hinako Kawakami, Yasumitsu Matsuo*
(Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ.)
ymatsuo@lif.setsunan.ac.jp

燃料電池は水素と酸素を燃料として、水のみを排出することから、クリーンでエネルギー変換効率の高い次世代エネルギーとしてよく知られている。最近では、自然界に豊富で、環境負荷の低減が期待できる生体由来材料を利用した燃料電池が非常に注目されている。燃料電池において、プロトン伝導性をもつ電解質と、燃料である水素の供給源は、特に重要であり、電解質もしくは水素供給源となりえる生体由来物質がいくつか報告されているが、いまだ数少ない。植物細胞の葉緑体チラコイド膜上のタンパク質である光化学系 II は、よく知られているように光合成の初期反応として光照射に伴い水分子を分解する。生成したプロトンおよび電子は、生体内では他の膜複合体に渡され、その後の反応に利用される。光合成反応を利用した燃料電池は非常に期待されているが、光化学系 II から生成される水素を直接利用した燃料電池はまだ実現していない。そこで我々は、コラーゲンを電解質とし、光化学系 II を水素供給源としたバイオ燃料電池を作製し、その特性評価を行った。
光化学系 II は高等植物 (ホウレンソウ) から、界面活性剤によって抽出した。得られた光化学系 II 溶液について、水素発生の測定を行ったところ、5 mL の抽出液において 0.5 mW/cm^2 の室内光下で約 7.41 × 10^{14} 分子 / 秒の水素発生が確認できた。また、光化学系 II 溶液を燃料電池の水素燃料としたバイオ燃料電池において、約 0.12 mW/cm^2 の出力が得られた。これらの結果は、光化学系 II を燃料電池の水素燃料として利用できることを示唆している。

Key words photosystem II, fuel cell, hydrogen source, photosynthesis

G3H2 (0205) グリシルセリンペプチドの水和とプロトン伝導

○瀬溝人生, 甲斐美花, 西村仁, 松尾康光*
（摂南大院・理工）

Hydration and proton conduction of glycylserine peptide

○Hitoki Semizo, Haruka Kai, Hitoshi Nishimura, Yasumitsu Matsuo*
(Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ.)
ymatsuo@lif.setsunan.ac.jp

近年、水素エネルギー社会の実現に向けて二酸化炭素を排出せず、環境に優しい次世代エネルギーである水素を主体とした水素型燃料電池の研究が盛んに行われている。現在利用されている燃料電池は、電解質の製造・廃棄時における環境負荷の問題、触媒である白金の枯渇の問題、さらに電解質・触媒が高価であるといった問題を含んでいる。生体由来物質は環境にやさしく、自然界に豊富に存在し、安価な物質として知られている。我々はこれまでコラーゲンやキチンが、水和によりプロトン伝導性を示し、燃料電池の電解質として利用可能であることを示唆してきた。生体由来物質であるタンパク質を構成するアミノ酸は、多くの種類が存在し、様々な官能基を有する。これまでの生体由来物質におけるプロトン伝導性の研究において、主鎖と結合している官能基が、プロトン伝導に深く関与していることがよく知られている。このことから、タンパク質におけるアミノ酸配列がプロトン伝導性と深く関係していると考えられる。そこで今回我々は、グリシンとセリンのジペプチドの結晶を作製し、そのプロトン伝導性を測定し、アミノ酸における水和とプロトン伝導性の関係について調べた。Gly-Ser 結晶は、水溶液蒸発法を用いて、Gly-Ser 溶液から作製した。Gly-Ser 結晶のプロトン伝導性は、相対湿度を変化させながら、100Hz から 1MHz の周波数領域において、インピーダンスを測定することにより調べた。その結果、Gly-Ser 結晶は、高湿度下で高いプロトン伝導性を示すことがわかった。この結果は、Gly-Ser 結晶が高湿度下でプロトン輸送を実現することを示唆している。さらに、この結果は、Gly-Ser ペプチド鎖の水和がプロトン輸送の実現に重要な役割を果たしていることを示唆している。

Key words biomaterial, proton, electrolyte

G3H2 (0206) ハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体を用いた新規無加湿プロトン伝導体

○古関 智樹[1], 松尾 康光[1*]
([1]摂南大院・理工)

New nonhumidified proton conductor using hydroxyapatite-collagen complex

○Tomoki Furuseki[1], Yasumitsu Matsuo[1*]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ.)
20d903ft@edu.setsunan.ac.jp

現在、環境に優しい次世代エネルギーである水素を主体とした水素エネルギー社会の実現に向けて、燃料電池の研究が盛んに行われている。燃料電池は水素と酸素を燃料とし、水素と酸素が反応して水になるときのギブスの自由エネルギーを電圧として得る発電システムであり、生成物として水のみが排出されるので、環境に優しい次世代デバイスとして注目されている。
また、よく知られている、糖やタンパク質などの生体高分子は自然に豊富に存在し、環境に負荷をかけない材料として注目されている。これらの生体高分子の持つ機能は非常に効率よく設計されており、抽出して利用することができれば新規デバイスへと発展する。この生物の機能を利用した研究としては、DNA、コラーゲンやキチンなどの生体高分子が高い水和性を示すことを利用したプロトン伝導素子やバイオ燃料電池への応用が知られており、特にこれらを電解質とした燃料電池では LED を点灯できることも明らかになっている。生体無機分子として知られるハイドロキシアパタイト(HAp)は、生体内に多く含まれており、様々なタンパク質と複合体を形成して存在している。HAp はすでに高温領域においてプロトン伝導性を有することが確認されており、プロトン伝導体としての研究が進められている。しかしながら、HAp-コラーゲン複合体は、安定に存在できるにもかかわらず、そのプロトン伝導性についてほとんど調べられていない。
本研究では、無加湿・中低温領域(100～200℃)において、魚の鱗に含まれる HAp-コラーゲン複合体が HAp 単体より 1 オーダー高いプロトン伝導を示すことが確認できた。また、その伝導性に対する活性化エネルギーは、HAp-コラーゲン複合体では 0.11eV、HAp 単体では 0.26eV となることが明らかになった。この活性化エネルギーの違いは、HAp-コラーゲン複合体が HAp 単体とは別の新たなプロトン伝導経路を有していることを示唆している。これらの結果から、HAp-コラーゲン複合体は無加湿・中低温領域でプロトン伝導を起こす新たなプロトン伝導体となると推察される。さらに、HAp-コラーゲン複合体中の HAp 含有量をリン酸水素二ナトリウムと塩化カルシウムによる HAp の合成をおこなうことで調整し、そのプロトン伝導性を調べた。その結果、HAp の含有量の増加に従い、プロトン伝導度の上昇が確認できた。この結果は、HAp 含有量が HAp-コラーゲン複合体のプロトン伝導性に影響を与えていることを示唆しており、HAp 含有量の増減により、プロトン伝導経路が変化することを示唆している。

Key words Fuel cell, Electrolyte, Collagen, Hydroxyapatite

G3H2 (0207) Photon number based light stimulation strategy for enhancing bio-hydrogen conversion in a hybrid bioreactor

○Liu Zhiyuan*, Zhu Yunxin, Chen Yujia, Yang Yingnan
（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

Photon number based light stimulation strategy for enhancing bio-hydrogen conversion in a hybrid bioreactor

○Liu Zhiyuan*, Zhu Yunxin, Chen Yujia, Yang Yingnan
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

The population growth has caused the energy depletion and greenhouse gasses emission which increased the demand for clean energy. Hydrogen is a clean energy with high energy content and the only combustion product is water. Fortunately, dark fermentation is an easy operated and cost-effective strategy for producing bio-hydrogen, but the process is limited in hydrogen productivity which mainly caused by the poor microbial activity. In order to improve dark fermentation process, previous study has developed a hybrid bioreactor, which consists of CPE and Fe-zeolite. CPE was the bedding material which could assist the microbial immobilization, and the Fe-zeolite played a vital role of supplying micronutrients. In order to further improve the bioreactor performance, the increase of microbial activity is of great importance. It is noteworthy that light stimulation has been proved as a promising strategy in activating microbes during methane fermentation, and the effective photon number (N_R) range is the essential controllable factor. However, the light stimulation effect with optimal N_R on bio-hydrogen conversion process hasn't been investigated yet. Therefore, the objective of this research is to investigate the optimal N_R for promoting bio-hydrogen conversion and the elucidation mechanism of light stimulation strategy in CPE and Fe-zeolite hybrid bioreactor.

The batch experiment results under different photon number condition suggested that light stimulation could effectively promote the bio-hydrogen conversion and the optimal N_R was 3.75×10^4 μmol·day^{-1}·L^{-1}. The hydrogen yield under the optimal N_R condition was 1.4 folds of the dark condition. Furthermore, the VFAs results showed that the light stimulation strategy under the optimal N_R condition could effectively promote the acetic pathway which caused higher hydrogen production. Microbial activity was analyzed by ATP and NADH which are both key factors that participate the metabolic pathway. The results further proved that the light stimulation under optimal N_R condition could effectively increase the microbial activity and lead to higher hydrogen production in the hybrid bioreactor.

Key words Bio-hydrogen conversion, light stimulation, photon number (N_R), hybrid bioreactor.

G3H2 (0208) 単細胞緑藻のみを用いて作製した細胞プラスチックスの解析と評価

○鶴田茜[1], 中西昭仁[1,2*]
([1]東京工科大学・応用生物学部, [2]東京工科大学大学院・バイオニクス専攻)

Analysis and evaluation of cell-plastics produced of cells as a sole raw-material

○**Akane Tsuruta[1], Akihito Nakanishi[1,2*]**
([1] Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol., [2] Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol.)
nakanishiah@stf.teu.ac.jp

【目的】
SDGs をはじめ炭素循環に関する社会の関心が高まる中、炭素源をバイオマスとしたグリーンプラスチックスは世界中で活発に研究されてきた。グリーンプラスチックスの生産では原料の抽出や精製に設備や費用コストの課題があったことから、本研究では強固な細胞壁を有する緑藻細胞を直接原料として使うことで、これらのコスト削減を狙う計画を立てた。さらに、当該研究では現在までにマトリックス成分として生分解性ポリマーを用いてきたが、マトリックス成分をも細胞から供給させて、細胞のみを由来とする細胞プラスチックスの作製を併せて計画した。そこで、本発表では細胞プラスチックス作製方法の検討ならびに作製された細胞プラスチックスの表面構造と力学特性の評価を目的とした。
【方法】
Chlamydomonas reinhardtii は光培養条件下 (通気速度 0.1 vvm; 通気ガス 0.8% CO_2; 光強度 170 μmol·m^{-2}·s^{-1}; 温度 23℃; 培地: 独立栄養培地 Modified Bold's Basal Medium) で培養された。培養 4 日の細胞は遠心分離 (2,500×*g*; 23℃; 3 min) で回収された。細胞は超音波破砕 (5 cycles (on: 30 sec; off 30 sec), on ice) に供せられ、細胞内容物は遠心分離 (21,500×g; 23℃; 3 min) の後に上清成分として回収された。細胞内容物の抽出効率は、上清中に含まれるクロロフィル量と破砕に供した細胞量の比から算出された。細胞内容物は 10、20、30 mg の細胞から回収され、各々10 mg 相当の湿潤状態の細胞と十分に混和された。それらは成型用容器へ導入後、23℃または 80℃で静置され、乾燥後の成型物は細胞プラスチックスとして準備された。細胞プラスチックスは走査型電子顕微鏡と引張強度試験機で表面構造と力学特性が評価された。
【結果・考察】
超音波破砕機による細胞内容物の抽出効率は、単位容積に対する細胞量の割合が増加しすぎることで低下することが明らかであったので、導入する細胞の最適点を設定した。細胞プラスチックス作製後、それらの表面構造を SEM 像解析した結果、今回準備された全ての細胞プラスチックスにて単細胞緑藻と考えられる粒形の構造体が確認された。従って、細胞が細胞内容物をマトリックスにして細胞プラスチックスの構造体として維持されていることが明らかになった。また、細胞プラスチックス成型時の温度や細胞へ導入する細胞内容物の割合によっても力学特性が異なる可能性が示されたので併せて報告する。

Key words *Chlamydomonas reinhardtii*, green plastics, cell-plastics, carbon recycling

G3H2 (0209) 池の光合成微生物を原料とした細胞プラスチックスの作製と評価

○渡邊真吏菜[1], 中西昭仁[1,2*]
([1]東京工科大院・バイオニクス, [2]東京工科大・応生)

Production and evaluation of cell-plastics produced of photosynthetic microorganisms in a pond

○Marina Watanabe[1], Akihito Nakanishi[1,2*]
([1]Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol., [2]Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol.)
nakanishiah@stf.teu.ac.jp

【目的】
近年、グリーンプラスチックスの一種として細胞プラスチックスが提案されている。細胞プラスチックスは光合成微生物の単細胞(もしくは高次組織を持たない細胞)そのものを原料にするので、空間に自由に配置することで成型を容易にし、また別途原料の発酵や抽出を必要とせず、比較的簡便に供出できる。本研究では、細胞の培養工程を省き、池の水から回収した光合成微生物の細胞をそのまま原料として用いて細胞プラスチックスを作製した。環境中から回収した光合成微生物をそのまま原料にして細胞プラスチックスを提供することで、グリーンプラスチックスにおいて課題であった原料供給コストの改善と今後の地産地消の実現化に寄与することを目的とした。
【方法】
光合成微生物の供給を狙い、大学構内の池の水を回収した。池の水の回収後、室温暗所で 72 時間放置し、上清を捨て、沈殿した光合成微生物を回収した。その後、光学顕微鏡下で細胞を確認した後に形態学的に評価した。高次組織を持たない細胞を用い成型するので、無毒性で汎用性や成型のための操作性に優れたバレイショデンプンを母材とした。成型された細胞プラスチックスは、母材の添加量と乾燥方法を改変して、SEM 像と引張試験により評価された。
【結果・考察】
池の水をそのまま遠心分離機にて細胞を回収すると手間がかかることから、池の水を回収後、細胞の自重で沈殿する時間の最適化を図った。その結果、45 L スケールのポリバケツであれば、室温暗所 72 時間で細胞は沈殿し、遠心分離せずとも効率的に回収できることが分かった。光学顕微鏡を用いた評価では、春から夏にかけて、原料となる主な微生物に変化は見られず *Scenedesmus* sp.や *Closterium* sp.、*Pediastrum* sp.などが評価された。SEM 像解析では、細胞プラスチックスの構成成分である緑藻細胞の外殻が維持されていること、表層は凹凸があるが空隙のない構造をしていること、断面からは充填された構造をしていることが明らかになった。季節により天候が異なるため、1L あたりに回収でできる細胞量や回収した細胞の種類にばらつきがあったが、細胞プラスチックスの力学的強度に影響を与えない可能性が示唆された。また、複合側に則らず母材としての選択が重要である可能性も示されたので併せて報告する。

Key words green algae, algal extract, green plastics, cell-plastics, carbon cycling

G3H2 (0210) *Citrobacter braakii* TB-96 株による廃グリセロールからの 1,3-プロパンジオール生産

○山口鳳大[1], 成田拓真[2], Alawi Aseel[2], 中島敏明[1*]
([1]筑波大, [2]筑波大院・生命地球科学,)

Production of 1,3-propanediol from waste glycerol by *Citrobacter braakii* strain TB-96

○Takahiro Yamaguchi [1], Takuma Narita [2], Alawi Aseel [2], Toshiaki Nakajima-Kambe [1*]
([1]Univ. Tsukuba, [2]Grad. Sch. Life Earth. Sci., Univ. Tsukuba)
s1810735@s.tsukuba.ac.jp

【目的】
地球温暖化問題の対策の 1 つとして、バイオディーゼル燃料(BDF)が注目されている。廃食用油等から BDF が製造される過程で副産物として廃グリセロールが生じるが、再利用できないためコストをかけて焼却処分されている。そこで、当研究室は生育が速く、コンタミネーションに強く、スケールアップが容易な菌株である *Citrobacter braakii* TB-96 株を取得し、グリセロールから 1,3-プロパンジオール(以下 1,3-PD)の発酵生産を行った。1,3-PD は化粧品やポリマー等の原料であり、今後大きな市場になると予測されている。これまでに、副産物であるギ酸と乳酸の生産を抑えるよう代謝改変をした TB-96 *Δldh Δpfl* 株を取得した。本研究では TB-96 *Δldh Δpfl* 株を用いて生産効率の上昇や生産コストの改善を目指した。
【結果】
窒素源として培地に使用している高価な酵母エキス(YE)を安価な窒素源に代替するため、YE の有効成分を探索した。その結果、シアノコバラミンと二価鉄の添加により 1,3-PD の生産量と生産効率が向上した。これらの補因子を加え最適化した培地で培養した結果、培養 96 時間目で 1,3-PD 生産量が 70 g/L に到達した。
補因子を加えた状態で窒素源を YE から全てコーンスティープリカー(CSL)に換えて培養を行った結果、最終的な 1,3-PD 生産量は最適化した培地より少なかったものの、培地コストの大幅な削減に成功した。
TB-96 株の課題として培養後期での 1,3-PD 生産の停滞がある。培養中の pH 調整によって生じる中和塩の蓄積が生育阻害を引き起こしていると考え、生育阻害への対処を試みた。そこで、補償溶質とよばれる、菌体内に取り込むことで浸透圧を軽減する物質の 1 つであるグリシンベタインを培地に添加し、その有効性を調べた。寒天培地に各濃度の NaCl とグリシンベタインを添加し、生育試験を行った結果、低塩濃度での生育の促進が確認された。現在、液体培地でグリシンベタイン添加による生育阻害の改善を検討している。
今後は他の生育阻害物質の検討や連続培養による 1,3-PD の大量生産を行う予定である。

Key words 1,3-propanediol, glycerol, *Citrobacter braakii*, fermentation

G3H2 (0211) *Citrobacter braakii* TB-96 株の代謝改変による廃グリセロールから 1,3-プロパンジオール及び 3-ヒドロキシプロピオン酸の生産

○Alawi Aseel[1], 成田拓真[1], 松本瑞樹[1], 中島敏明[1*]
([1]筑波大院・生命環境)

Metabolic Engineering of *Citrobacter braakii* strain TB-96 for the Production of 1,3-propanediol and 3-hydroxypropionic Acid from Glycerol

○Aseel Alawi[1], Takuma Narita[1], Mizuki Matsumoto[1], Toshiaki Nakajima-Kambe[1*]
([1] Grad Sch. Life Environ. Sci., Tsukuba Univ.)
nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

Waste glycerol produced during biodiesel fuels' (BDF) production is highly alkaline, impure containing fatty acids and other impurities. Thus, this waste glycerol is currently being incinerated, increasing BDFs' production cost. Using microorganism fermentation, this waste glycerol can be converted into valuable chemicals, such as 1,3-propanediol (1,3-PD) and 3-hydoxypropionic acid (3-HP). 1,3-PD is used as a monomer for polytrimethylene terephthalate (PTT) bioplastic, while 3-HP is a precursor of acrylic acid. Previously in our laboratory, *Citrobacter braakii* strain TB-96 was isolated. TB-96 is a promising strain for 1,3-PD production that shows fast growth and high 1,3-PD production ability.

To increase 1,3-PD production from glycerol in TB-96, the production pathways of lactate and formate, the main by-products of glycerol fermentation were disrupted to construct TB-96 double mutant strain. After investigating the optimal culture conditions of this double mutant strain, large-scale fermentation experiments showed high amount of 1,3-PD up to 70 g/L.

During the fermentation of glycerol into 1,3-PD, glycerol is firstly dehydrated into 3-hydoxypropionaldehyde (3-HPA) through the catalysis of glycerol dehydratase enzyme encoded by *gdh* gene. Consequently, the intermediate 3-HPA is reduced into 1,3-PD by the catalysis of propanediol dehydrogenase enzyme encoded by *pdh* gene. Moreover, after analyzing the whole genome of TB-96, *puuc* gene encoding for NADP/NAD-dependent aldehyde dehydrogenase enzyme which reduces 3-HPA into 3-HP was found.

Therefore, to produce 3-HP from glycerol using TB-96 we first aimed at disrupting *pdh* gene to stop the production of 1,3-PD and accumulate the intermediate 3-HPA. Contrary to our expectations, *pdh*-knocked out strain showed a small amount of 1,3-PD with no accumulation of 3-HPA at all. The deletion of *pdh* gene might have resulted in the collapse of redox system balance affecting the activity of *gdh* gene especially under anaerobic conditions. Therefore, overexpressing of *gdh* in *pdh*-knocked out strain is expected to accumulate 3-HPA under (semi-)aerobic conditions and is currently under investigation.

Key words Glycerol, 1,3-propandiol, *Citrobacter braakii*, 3-hydroxypropionaldehyde

G3H2 (0212) 花酵母による廃棄乳を基質としたカロテノイド高含有飼料(SCP)生産

○大久保　愛理[1], Khin Thandar[1], 大塚　光雄[1], 中島　敏明[1]*
([1]筑波大院・生命環境)

Production of carotenoid Rich-Single Cell Protein (SCP) by flower yeast cultivated in waste milk

○Airi Okubo[1], Khin Thandar[1], Mitsuo Otsuka[1], Toshiaki Nakajima-Kambe[1]*
([1] Grad. Sch. Life Environ. Sci., Tsukuba Univ.)
nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

乳牛は搾乳を１日でも怠ると乳房炎という病気に罹る恐れがあることから、搾乳量の調整は容易ではない。さらに牛乳はタンパク質や脂質を多く含むため、廃棄の際には水質汚濁が問題となる。よって、過剰に生産された牛乳は産業廃棄物としてコストをかけて処理されている。
そこで廃棄乳の有効利用法として、酵母を用いた高機能微生物タンパク(Single Cell Protein:SCP)生産における基質とすることを検討した。SCP を家畜飼料として利用することを見据えて、安全でイメージの良い花から酵母を単離した。花酵母である *Rhodotorula graminis* TY-99 株は油脂を分解し、不飽和脂肪酸やカロテノイドを体内へ豊富に蓄積する。特にカロテノイドはビタミン A の前駆体かつ抗酸化活性を有するため、飼料生産にとって大きな付加価値となる。

300 ml 容三角フラスコを用いて牛乳を基質とした TY-99 株の生育試験を行ったところ、一般的な酵母用培地（YM 培地）と比較して乾燥菌体重量が 6.8 倍、総カロテノイド収量が 3.0 倍に向上した。このことから牛乳に他の栄養源を添加する必要なく高収量を得ることが可能であると明らかになった。現在は実用化に向けて 1.5 L 容ジャーファーメンターへのスケールアップを試みており、培養条件の最適化を行っている。

AFFCO(Association of American Feed Control Officials)によると、SCP に必要なタンパク質含有量はバイオマスの 40%以上であると定められている。栄養分析により、TY-99 株のタンパク質含有量は大豆(43.6%)や牛乳(38.1%)よりも高いことが分かった。さらに必須アミノ酸であるリジン(7.4%)やスレオニン(5.2%)も多く含有しており、TY-99 株の添加により飼料に不足しがちな栄養素を補うことが期待できる。

Rhodotorula 属が産生する主なカロテノイドはβ-カロテン、トルレン、トルラロジンである。TLC を用いて TY-99 株由来カロテノイドの組成を調べたところ、これらのほかに新たな色素を確認した。*R. graminis* においてこの色素に関する報告はこれまでされていない。そこで HPLC を用いて未知色素の構造解析を行った結果、トルレンとトルラロジンの中間体である 16’-ヒドロキシトルレンと UV-vis スペクトルが一致したことなどから、未知色素を 16’-ヒドロキシトルレンと推定した。

Key words waste milk, carotenoid, *Rhodotorula graminis*, single cell protein

G3H2 (0213) 魚類養殖におけるプロバイオティクス飼料開発

○山田紗里奈[1],岡﨑文美[1],梅川碧里[1],中谷肇[2],堀克敏[2],田丸浩[1]*
([1]三重大院生資,[2]名大院工)

Probiotic feed development in fish farming

○Sarina Yamada[1]*, Humiyoshi Okazaki[1] , Midori Umekawa[1], Hajime Nakatani[2], Katsutoshi Hori[2], Yutaka Tamaru[1]
([1]Grad.Sch.Bioresour.Mie Univ. , [2]Grad.Sch.Eng Univ.)
ytamaru@bio.mie-u.ac.jp

【目的】畜産における飼料効率の悪さやメタンなどの地球温暖化ガス発生によって、動物性タンパク質生産が世界的な問題になっている。一方、水産養殖では魚粉が主要なタンパク質源として使用されており、資源枯渇や魚粉価格の上昇によって近年、大豆などの植物タンパク質に代替されることが検討されている。本研究では、水産養殖における微生物飼料の可能性やエコフィードの観点から、魚類プロバイオティクス飼料の開発を目指した。
【方法】微生物として酪酸生産菌で高いバイオマス分解能を示す *Clostridium cellulovorans* およびアスタキサンチン生産酵母 *Phaffia rhodozyma* について、ミカン搾汁粕あるいはソルガム搾汁液を用いて、それぞれの培地を用いて培養した。さらに、３品種のソルガム搾汁液を用いて酵母 *Saccharomyces cerevisiae* およびブタノール生産菌 *C. beijerinckii* を用いた培養も行った。
【結果・考察】ミカン搾汁残渣を用いた *C. cellulovorans* 培養の結果、約 85%が分解・糖化され、また培養とともに 3 mg/ml 以上の酪酸が生成していた。この結果から、*C. cellulovorans* はいわゆる酪酸菌 *C. butyricum* と同様のプロバイオティクス的な効果が期待できた。また、魚類養殖においてしばしば柑橘類が飼料に添加されていることから、*C. cellulovorans* による分解によってβ-クリプトキサンチンの抽出効果の増大も期待できる。一方、資源作物として期待されているソルガム（クミアイハチミツ）の搾汁液を用いて、アスタキサンチン生産酵母 *P. rhodozyma* を培養した。その結果、20%ショ糖含有培地と比較して同等の増殖を示した。さらに、その他２種のソルガム（スーパーシュガー、スイートソルゴー）を加えた３種類の搾汁液に対して、*S. cerevisiae* および *C. beijerinckii* を培養した。その結果、いずれのソルガム搾汁液においても、*S. cerevisiae* および *C. beijerinckii* は培養 10 日で最大のアルコール濃度を示した。以上の結果から、ミカン搾汁残渣やソルガム搾汁液が微生物飼料に有効であることが示唆された。

Key words *Clostridium* ,*Phaffia rhodozyma*

G3H2 (0214) 微生物による揮発性有機塩素化合物の共代謝による分解と生分解性プラスチックへの転換

○張　傛喆*
（室蘭工業大学院･環境創生工学･微生物工学研）

Cometabolic biodegradation of chlorinated volatile organic compounds and their conversion into biodegradable plastics by microorganisms

○Young-Cheol Chang*
(Div. Sustainable and Environ. Eng., Muroran Institute of Technology)
ychang@mmm.muroran-it.ac.jp

汚染物質の有用物質への転換に関しては最近マイクロプラスチックの海洋汚染問題が深刻化されていることを受け、生物分解性が高い生分解性プラスチックへの変換が期待されている。よって、従来のプラスチックを生分解性プラスチックに置き換えることは、プラスチック生産の全体的な持続可能性を高めるだけではなく、海洋汚染など環境負荷の減少、さらに生態系への影響を最小化することにもつながるため、有益である。一方、生分解性プラスチックの製造コストの削減のためには安価な原材料（微生物増殖基質）の確保が重要である。そこで、微生物の *Cupriavidus* sp. CY-1 株を用い、多種多様な毒性の芳香族化合物と揮発性有機塩素化合物を用いて生分解性プラスチックであるポリヒドロキシアルカノエート（PHA）を安価に生産することに成功した。特に、微生物（CY-1 株）による揮発性有機塩素化合物の PHA への転換は初めての成果である。グリーンサスティナブルケミストリーの観点から毒性の化合物の環境負荷の減少だけではなく、分解産物を有用物質へ転換する方法の開発が試みられているが、*Cupriavidus* sp. CY-1 株のように、フェノールなどの芳香族化合物と、未だに生分解性プラスチック生産基質としての利用が報告されていないトリクロロエチレン（TCE）などの揮発性有機塩素化合物に対しても高い分解能と生分解性プラスチックへの転換能力を示した菌株は報告されていない。よって、TCE 分解能を兼備し有用物質の生産が可能な微生物による低炭素化型 PHA 生産法の開発は優先課題と言える。実験の結果、揮発性有機塩素化合物のターゲット物質として試された TCE とシス-1,2-ジクロロエチレン（cDCE）は、フェノールを共基質として添加した条件下においてのみ分解可能であった。フェノールは CO_2 に転換できるが、フェノールの主要代謝物はカテコールであった。一方、TCE は共酸化され、CO_2 まで分解された。CY-1 株のみの特徴として CO_2 を増殖基質として直接利用することができることから CO_2 を触媒としたポリマーの生産が期待できる。CY-1 株によって TCE と cDCE は分解され、ポリ[(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸]（PHB）に変換された。PHB 生産量は、TCE と cDCE の初期濃度がそれぞれ 50 mg/L の時に最も多かった。一方、Tween 80 を加えた条件で最良の PHB 蓄積が確認された。非イオン性界面活性剤である Tween 80 は生物への毒性もほとんどなく、CY-1 株の増殖を促進する効果を有している。最後に TCE から生成された生分解性プラスチックの物性評価を行った結果、TCE 由来のポリマーは主に PHB であり、市販の PHB に匹敵する物性を示すことが示唆された。

Key words *Cupriavidus* sp. CY-1, tetrachloroethylene, *cis*-1,2-dichloroethylene, PHB

G3H2 (0215) 食品排水から単離した C1 株の酢酸生産における最適培養条件の検討

○井村 和茉, 張　傛喆*
（室蘭工業大学院･環境創生工学･微生物工学研）

Determination of optimal conditions for acetic acid production using C1 strain isolated from food wastewater

○Kazuma Imura, Young-Cheol Chang*
(Div. Sustainable and Environ. Eng., Muroran Institute of Technology)
ychang@mmm.muroran-it.ac.jp

現在、プラスチックは生活に欠かせないものになっているが、自然界で微生物によって分解されにくく、特に海洋マイクロプラスチックの出発物質となり生態系および生物に深刻な悪影響を及ぼす恐れがあると考えられている。この中、この問題を少しでも抑えるために、従来のプラスチックを生分解性プラスチック（PHA）へ置き換えていく必要性に対する認識が高まっている。一方 PHA の生産･利用は、環境汚染や生態系への影響を減少させるだけでなく、基質として様々なバイオマスを再利用できる観点から持続可能な PHA 生産に繋がる。しかし未だに、PHA 生産時のコスト高は大きな課題になっており、コスト削減を目指した研究が世界各地で行われている。PHA は多様な PHA 生産菌を用いて生産することができるが、当研究室で単離した PHA 生産菌（*Bacillus* sp. CYR1）による PHA 生産実験では、炭素源として酢酸の使用が適していることが明らかになっている。よって、単離した酢酸生産菌 *Acetobacter pasteurianus* C1 株を用いてバイオマスを酢酸に転換し、その酢酸を基質として PHA を生産する 2 段階生産システムを提案している。一方、現在酢酸の多くは、石油化学原料から製造する化学的な生産法がメインであるが、バイオマスを利用する細菌による酢酸生産は、環境に優しく PHA 生産コストの削減に繋がる可能性がある。したがって本研究では、酢酸の大量生産に必要な C1 株の酢酸生産における最適培養条件の検討を行うことを目的とし、最適初期エタノール濃度、最適 pH、最適温度、培養時の最適回転速度、さらに最適初期菌体濃度、以上 5 項目について検討を行った。酢酸生産菌は、酢酸生産時にエタノールを基質として必要とするため、初期エタノール濃度に関する実験を行った。各条件下で C1 株を供試菌株とし、液体培地を用いて数日間振とう培養を行った。また、経時的に試料を採取し、pH、OD_{600}、酢酸濃度、エタノール濃度を測定することで、各条件における酢酸生産速度および増殖パターンの違いを比較･検討した。その結果、pH4.0~7.0 の範囲で酢酸濃度の増加が見られた。しかし、pH3.0 と pH8.0 の条件では酢酸生産が観察されなかった。よって、C1 株は pH4.0~7.0 で酢酸生産が可能であり、最適初期 pH は、生産速度の観点からは pH4.0 であり、生産量の観点からは pH4.0 または pH5.0 であると結論付けた。同様にして初期エタノール濃度、温度、回転数、初期菌体濃度に関する条件の改良を試みて酢酸生産における最適条件の検討を行った結果、0.5%~7%のエタノール濃度範囲、また 25℃~37℃の温度範囲で酢酸生産が確認された。 以上の結果から、酢酸生産量を基準とした場合、初期エタノール 7%、培養温度 37℃、回転速度 180 rpm、そして初期菌体濃度 8%が、酢酸生産における最適条件であることが示唆された。

Key words *Acetobacter pasteurianus* C1, acetic acid, ethanol, PHA

G3H2 (0301)

Desulfovibrio sp. HK-II 株の電気化学的代謝制御に向けた電極電位応答性の評価

○大前貴裕 [1], 安藤翔太 [1], 窪野一郎 [1], 工藤優輝 [1], 田代陽介 [2], 二又裕之 [3*] ([1] 静大院・総合科技, [2] 静大・工, [3] 静大・グリーン科技研)

Evaluation of electrode potential for electrochemical metabolic control of *Desulfovibrio* sp. strain HK-II

○Takahiro Ohmae[1], Shota Ando[1], Ichio Kubono[1], Yuki Kudo[1], Yosuke Tashiro[2], Hiroyuki Futamata[3*] ([1]Grad. Sch. Int. Sci. Tec., Shizuoka Univ., [2]Dept. Eng., Shizuoka Univ. [3]Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.) futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

近年、微生物代謝による有用物質やエネルギーの生産および廃水処理が注目されている。例えば、細胞外導電性物質と電子授受が可能な電気活性細菌はエネルギー生産型廃水処理である微生物燃料電池への応用が期待されている。しかし、電気活性細菌の代謝制御に関する技術は未確立である。これまで本研究室では硫酸還元細菌が電気活性細菌同様に細胞外電子伝達を行ない、硫酸呼吸時に排出した酢酸を利用するエネルギー代謝に一変することを見出した。硫酸還元細菌は代表的な嫌気微生物であり、炭素および硫黄循環において重要な役割を担う反面、金属腐食の原因微生物であり、代謝制御技術の確立は工学的および生態学的に重要である。これまでに電気活性細菌は電子受容体の電位に応答して電子伝達経路を切り替えることが報告されている。そのため、電位の変化による電子伝達経路への影響を評価することは、代謝の電気化学的制御において必須であると考えた。そこで本研究では硫酸還元細菌 *Desulfovibrio* sp. HK-II 株を様々な電極電位において培養し、電位応答性を評価した。

Desulfovibrio sp. HK-II 株を硫酸呼吸条件下で前培養後、集菌・洗浄し、酢酸を電子供与体とした微生物燃料電池で培養した。酢酸濃度および電流密度を測定し、培養 23 日目において電流生産が安定したため培養液全量を回収し、電気化学セルに添加した。負電極電位を－0.6～ －0.1 V vs. SHE および+0.1～+0.6 V vs. SHE に設定し、酢酸濃度および電流密度を測定した。その結果、負電位では電流生産が確認されなかった一方で、+0.1 から+0.6 V のすべての正電位において酢酸消費に伴う電流生産が確認された。正電位では特に+0.3 V において酢酸消費速度が 0.37 mM day^{-1} と最大であり、+0.4 V から高電位になるに従い、酢酸消費速度は低下した。+0.5 V は電流生産が常時不安定であり、培養 60 日時点にて添加した酢酸の 23%が残存していた。+0.6 V は培養 15 日目以降、電流生産は次第に低下し、それに伴い酢酸消費速度も低下した。電極呼吸時の電子伝達鎖に関与するヘムタンパク質の特定を目的とした SDS-PAGE を行ったところ、硫酸呼吸時と比較して共通および特異的なヘムタンパク質が確認された。その為、電極呼吸に伴う電子伝達経路の変化が示唆された。現在、ゲノム解析と電極呼吸条件におけるトランスクリプトーム解析の結果から細胞外電子伝達に関与するタンパク質の解析を進めている。

Key words extracellular electron transfer, sulfate-reducing bacteria, redox potential

G3H2 (0302)

硫酸還元細菌 *Desulfovibrio* sp. HK-II 株の電子受容体変化に伴う代謝変換

○窪野一郎 [1], 大前貴裕 [1], 工藤優輝 [1], 林稜也 [1], 田代陽介 [1], 二又裕之 [1,2*] ([1] 静大院・総合科技, [2] 静大・グリーン科技研)

Metabolic transformation associated with the change of electron acceptor in the sulfate reducing bacteria *Desulfovibrio* sp. strain HK-II

○Ichio Kubono[1], Takahiro Ohmae[1], Yuki Kudo[1], Ryoya Hayashi[1], Yosuke Tashiro[2], Hiroyuki Futamata[1,2*] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.) futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】嫌気環境中において代表的な微生物の 1 つである硫酸還元細菌は有機物分解に寄与するとともに、水道管など金属腐食の原因微生物として負の側面を持つ。それ故、本微生物における代謝の更なる理解は学術的・工学的に重要である。我々は、硫酸還元細菌 *Desulfovibrio* sp. HK-II 株がこれまで排出していた酢酸を細胞外電子伝達（EET）に伴い利用し、金属腐食の原因である硫化水素を発生しないことを見出した。本結果は、硫酸還元細菌代謝の電気化学的制御の可能性を示唆している。しかし、EET に関与する代謝は未だ不明である。そこで本研究では、電極存在下にて電子供与体および受容体を変化させ、発生した電流密度と代謝活性を培養条件ごとに比較し、HK-II 株の EET 促進に関わる代謝の解明を目的とした。

【方法】HK-II 株を硫酸還元条件下で前培養し、菌体を洗浄後、乳酸を電子供与体とする微生物燃料電池（MFC）に添加した。経時的に、有機酸、pH、電流密度および OD_{600nm} で菌体量を測定した。初発の乳酸が完全に消費される前に乳酸（約 40 mM）を追加後、硫酸（約 10 mM）を添加した。適時 MFC より菌体を回収後、転写量解析を実施した。標的遺伝子は、乳酸から acetyl-CoA を介した TCA 回路、acetyl-CoA から酢酸への代謝、acetyl-CoA 経路および硫酸還元経路の一部計 17 遺伝子とした。

【結果・考察】MFC 培養開始後、乳酸減少に伴い電流密度と酢酸の増加が確認された。しかし、乳酸減少量の約 1/3 等価の酢酸生成にすぎず、EET 条件下において乳酸の完全酸化代謝の優位性が確認された（Condition I）。乳酸および硫酸を追加した結果、乳酸消費に伴う硫酸還元が観察され、乳酸の不完全酸化代謝が優位に生じた（Condition II）。その為、電流密度が大幅に減少すると予想したが、急激に増加した。その後、蓄積した酢酸を電子供与体とする EET の電流密度は最も低くなった（Condition III）。乳酸を起点とする諸種代謝遺伝子の転写量を測定した結果、Condition I において TCA 回路 succinate dehydrogenaze 遺伝子の転写が確認されなかった。一方で、Condition II では TCA 回路が完全かつ最も活発であった。また、Condition III と比較して高電流密度が観察された Condition I および II において pyruvate:ferredoxin oxidoreductase 遺伝子（*por*）転写活性の著しい増加が確認された。このことから、*por* が EET 促進に貢献していることが推察された。

Key words *Desulfovibrio*, sulfate reduction, extracellular electron transfer, metabolism

G3H2 (0303)

中度好塩性細菌 *Halomonas elongata* における不揮発性腐敗アミンを単一炭素・窒素源としたエクトイン生産

○仲山 英樹 [1,2,3*], 河本 亮 [2], 三好 勝之 [2] ([1] 長崎大・総合生産, [2] 長崎大院・水環, [3] 長崎大・海洋未来イノベ)

Ectoine production from putrefactive non-volatile amines as sole carbon and nitrogen sources in the moderate halophile *Halomonas elongata*

○Hideki Nakayama[1,2,3*], Ryo Kawamoto[2], Katsuyuki Miyoshi[2] ([1]Inst. Int. Sci. Tech., Nagasaki Univ., [2]Grad. Sch. Fish. Env., Nagasaki Univ., [3]Org. Marine Sci. Tech., Nagasaki Univ.) nakayamah@nagasaki-u.ac.jp

中度好塩性細菌 *Halomonas elongata* OUT30018 株（以下、OUT30018 株）は、リグノセルロース系バイオマス由来のグルコースやキシロース、アラビノース等の多様な炭素源の資化性に優れている。また OUT30018 株は、不揮発性腐敗アミンに属する毒性物質であるチラミンやヒスタミンを単一な炭素源かつ窒素源として資化してエクトインを生産する能力を有している。よって、多様なバイオマス由来の炭素・窒素源の資化能力に優れた *H. elongata* の特長を活かすことにより、窒素負荷が高い腐敗したタンパク質系廃棄バイオマス中の不揮発性腐敗アミンを含む多様な炭素・窒素源を活用してエクトイン等の有用物質を生産する実用性の高い細胞工場の開発が可能になることが期待される。しかしながら、OUT30018 株が備えたチラミンやヒスタミンを資化してエクトイン等の有用物質を生合成する代謝経路の詳細は未だ明らにされていない。そこで本研究では、OUT30018 株と近縁であるがチラミンやヒスタミンの資化能力を備えていない *H. elongata* DSM2581^T 株との比較ゲノム解析を行うことにより、OUT30018 株のみに存在するチラミンやヒスタミンの資化に関連する重要な遺伝子を含むゲノム領域の探索を行った。また、*H. elongata* のエクトイン生産効率を高めた細胞工場を創製すること目的に、エクトインをヒドロキシエクトインに変換するエクトイン水酸化酵素をコードした *ectD* 遺伝子及びエクトイン異化の鍵となるエクトイン分解酵素をコードした *doeA* 遺伝子の各遺伝子、あるいは両遺伝子を OUT30018 株のゲノム上から削除した 3 種の欠失変異株を作製し、NM1 株（*ΔdoeA*）、NM2 株（*ΔectD*）、NM3 株（*ΔdoeA, ΔectD*）を得た。そして、それぞれ 3 種の変異株におけるエクトインの生産特性を解析した。その結果、NM3 株においては、OUT30018 株と比較するとチラミンを単一炭素・窒素源とした最小培地で培養した際のエクトイン生産量が約 2 倍に増加した。その一方で、ヒスタミンを単一炭素・窒素源とした最小培地で培養した際のエクトイン生産量は、OUT30018 株においても高い水準に達しており、OUT30018 株には高効率にヒスタミンからエクトインを生産できる代謝経路が備わっていることが示唆された。今後は、窒素負荷が高い不揮発性腐敗アミンを含む未利用のタンパク質系廃棄バイオマスを原料とし、高付加価値のエクトイン等の有用アミノ酸類やペプチド・酵素等を高効率に生産する *H. elongata* 細胞工場の開発研究を展開し、SDG12 の達成に資する持続可能なリサイクルバイオ技術の構築を目指す。

Key words *Halomonas elongata*, cell factory, ectoine production, tyramine, histamine

G3H2 (0304)

Development of *Halomonas elongata* cell factory, which produces GABA in the cell and displays phytase on the cell surface

○Ziyan Zou[1], Hideki Nakayama[1*] ([1] Grad. Sch. Fish. Env. Sci., Nagasaki Univ.)

Development of *Halomonas elongata* cell factory, which produces GABA in the cell and displays phytase on the cell surface

○Ziyan Zou[1], Hideki Nakayama[1*] ([1]Grad. Sch. Fish. Env. Sci., Nagasaki Univ.) nakayamah@nagasaki-u.ac.jp

The moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata* OUT30018, is known to biosynthesize and accumulate ectoine as a major compatible solute in the cells to adapt a wide range of salinity environment between 0.3 and 21% NaCl. As *H. elongata* OUT30018 can utilize biomass derived various carbon and nitrogen sources, *H. elongata* OUT30018 could be one of the most useful cell factories for bio-producing fine chemicals from high salinity biomass resources. In this study, we investigated whether *H. elongata* OUT30018 could biosynthesize other compatible solutes than ectoine under high salinity environment, an ectoine-deficient salt-sensitive mutant *H. elongata* KA1 (*ΔectABC*) was subjected to an adaptive mutagenesis screening in search of mutants with restored salt tolerance. As a result, we obtained a mutant *H. elongata* Glutamate Over-Producing (GOP) strain, which attains higher salt tolerance than the *H. elongata* KA1 by over-producing L-Glutamic acid (Glu). However, *H. elongata* GOP is not as salt tolerant as the wild-type *H. elongata* OUT30018, probably because Glu is acidic, therefore, could not be accumulated to a high concentration in the cell. Decarboxylation of Glu by an enzyme L-Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) could simultaneously restore pH homeostasis of the cell and produce γ-aminobutyric acid (GABA), which is a valuable compound with osmolyte function. Therefore, we designed the codon-optimized *HopGadBmut* gene to encode the mutant GAD, which is active at wide pH range, and introduced the gene into the genome of *H. elongata* GOP. The resulting *H. elongata* GOP-Gad exhibits higher salt tolerance than *H. elongata* GOP by accumulating high concentration of GABA in the cell, showing its potential to be used as a GABA-producing cell factory, which can utilize crude glycerol from biodiesel production as a sole carbon source as well as inorganic nitrogen from livestock wastewater as a sole nitrogen source under high salinity environment. Furthermore, the cell-surface engineering of *H. elongata* GOP-Gad enable to generate *H. elongata* GOP-Gad-Phy producing a phytase on the cell-surface as a feed-enzyme for improving phosphorus availability of phytate contained in plant biomass. The *H. elongata* GOP-Gad-Phy would be a practical cell-factory for supplying both GABA and phytase as feed additives from waste biomass for sustainable development of livestock industry in future.

Key words *Halomonas elongata*, GABA, phytase, cell-surface engineering

G3H2 (0305) 海洋細菌 *Cobetia* sp. IU180733JP01(5-11-6-3)が poly(3-hydroxybutyrate)合成に利用可能な炭素源の検討

○阿部 汐里[1], 松本 晶[1], 森谷 大樹[1], 河合 盛進[2], 鈴木 宏昭[2], 山田 美和[1*]
([1]岩手大院・農, [2]トヨタ紡織・新規領域開拓部)

Investigation of sole carbon sources for poly(3-hydroxybutyrate) production in marine bacteria, *Cobetia* sp. IU180733JP01(5-11-6-3)

○Shiori Abe[1], Akira Matsumoto[1] ,Hiroki Moriya[1], Sung-Jin Kawai[2], Hiroaki Suzuki[2], and Miwa Yamada[1*]
([1]Dept. Biolog. Chem. Food Sci., Iwate Univ., [2]New Field Pioneering Div. Toyota Boshoku Corp.)
myamada@iwate-u.ac.jp

【背景・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が合成するバイオプラスチックである。我々は PHA の合成原料として廃棄海藻に着目しており、これまでに、褐藻類に安定的で多く含まれるアルギン酸を単一炭素源として、ポリヒドロキシブタン酸[P(3HB)]を合成する *Cobetia* sp. IU180733JP01(5-11-6-3)を新規に見出した[1]。さらに、本菌は、乾燥海藻を添加した培地においても P(3HB)を合成することが確認されている。一方で、海藻に含まれるアルギン酸以外の成分やその他の炭素源について、本菌の資化能力は明らかとなっていない。そこで、本研究では、本菌が P(3HB)合成に利用可能なアルギン酸以外の海藻成分および炭素源の検討を行った。
【方法・結果】
各炭素源濃度が 1%となるように添加した PHA 合成培地にて、本菌株を培養し、P(3HB)合成量をガスクロマトグラフィー分析によって測定した。海藻成分であるマンニトール、ラミナリン、セルロースをそれぞれ単一炭素源として培地に添加した結果、マンニトールを用いた際に菌の生育および P(3HB)合成が確認できた。また、その他の炭素源として、グルコース、フルクトース、スクロース、マルトース、キシロース、デンプン、グリセロール、グルコン酸をそれぞれ単一炭素源として培地に添加した結果、グルコース、フルクトース、スクロース、マルトース、グリセロール、グルコン酸を用いた際に菌の生育および P(3HB)合成が確認できた。続いて、ドラフトゲノム DNA の塩基配列から予測された ORF の情報を基に、各炭素源から P(3HB)合成への合成経路を推定した。その結果、本菌株において各炭素源は Entner-Doudroff 経路もしくは Embden-Meyerhof 経路を介してアセチル-CoA へと変換され、アセチル-CoA から 3 種の酵素 (PhaA, PhaB, PhaC)によって P(3HB)が生合成されると考えられた。本成果によって、我々が見出した菌株が海藻のみでなく他のバイオマスや廃棄物も原料として利用できる可能性を示唆することができた。
【参考文献】
1. H. Moriya et al., Front. Bioeng. Biotechnol., 8, 974, 2020

Key words polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutyrate, seaweed, *Cobetia* sp.

G3H2 (0306) 海洋底泥からのみかん外皮分解菌叢の探索

○平田 さや[1], 小笠原 豪[1], 岡村 好子[2], 中島田 豊[2], 堀尾 京平[2], 早瀬 伸樹[1], 喜多 晃久[1*]
([1]新居浜高専, [2]広島大院・統合生命科学)

Exploration of orange peel degrading bacterial consortium from marine sediment

○Saya Hirata[1], Tsuyoshi Ogasawara[1], Yoshiko Okamura[2], Yutaka Nakashimada[2], Kyohei Horio[2], Nobuki Hayase[1], Akihisa Kita[1*]
([1]Niihama Natl. Coll. Technol., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life,Hiroshima Univ.)
kita@chem.niihama-nct.ac.jp

【背景と目的】 みかん果汁生産の過程で生じる搾汁残渣の一部は、動物への飼料や堆肥の原料として利用されているが、その全てを処理することは困難である. また、バイオエタノール製造への利用においては、蒸留後に生じる蒸留廃液の処分に多額な費用が必要であることや、みかん搾汁残渣に含まれるリモネンが、微生物の働きを阻害すると報告されている. このような理由で、みかん搾汁残渣の完全資源化は途上にある. そのような中で、我々は海洋環境中から、みかん外皮を効率的に分解し、メタンを生産することができる海洋性メタン発酵菌叢の取得に成功した. そこで、本研究では、メタン生成プロセスの第一段階で生産される揮発性脂肪酸(VFAs)を効率的に生産する海洋性みかん外皮分解菌叢の取得と、その菌叢の性質について検討をすることを目的とした.
【方法および結果】 3%の NaCl を含む基本培地に、単独炭素源として 10g/l の未処理みかん外皮を投入し、海洋底泥を微生物源として接種したところ、みかん外皮を完全分解しメタンを生成することができるメタン発酵菌叢の取得に成功した. そこで、本菌叢を海洋底泥ごと継代培養したところ、安定的に約 12 日でみかん外皮を完全分解することが出来た. メタンの生産量は、11 日で 86.75 ml-methan/g であった. 次いで、本菌叢からメタン生成プロセスの第一段階に関与する微生物群(みかん外皮分解菌叢)を取得するため、メタン発酵培養液を、みかん外皮を単独炭素源とした培地に接種し培養を試みたが、pH が約 4.5 まで低下してしまい、増殖が確認できなかった. そこで、培養中の pH を安定化させるために、緩衝材として炭酸カルシウムを用いたところ、pH が 6.0 前後と安定し、10g/L の未処理みかん外皮を 6 日で完全分解することができた. 主な生産物は酢酸、プロピオン酸であり、培養 6 日でそれぞれ 0.83 g/l、0.12 g/l の VFAs を生産することができた. 現在、本海洋性みかん外皮分解菌叢の性質を明らかにするため、培養条件の検討および菌叢構造の解析を行っている.

Key words bacterial consortium, orange peel, volatile fatty acids, biomass

G3H2 (0307) 海洋性アルギン酸分解菌叢におけるアルギン酸分解の分子メカニズム

○堀尾京平[1], 喜多晃久[2], 高橋宏和[1], 渡邉研志[1], 秋庸裕[1], 中島田豊[1], 岡村好子[1*]
([1]広島大院・統合生命科学, [2]新居浜高専)

Molecular mechanism of alginate degradation in alginate-degrading bacterial flora

○Kyohei Horio[1], Akihisa Kita[2], Hirokazu Takahashi[1], Kenshi Watanabe[1], Tsunehiro Aki[1], Yutaka Nakashimada[1], Yoshiko Okamura[1*]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Niihama Natl. Coll. Technol.)
okamuray@hiroshima-u.ac.jp

【目的】褐藻類は第三世代バイオマスとして近年注目を集めているが，その主要糖質アルギン酸は難分解性であり，微生物による有用物質生産のための炭素源として利用できない．我々はこれまでにアルギン酸を高効率で嫌気分解し，有機酸を生産する菌叢 A302 を有明海底泥から取得した．しかし，本菌叢からアルギン酸分解能を保持する単菌の分離には至っておらず，アルギン酸分解には未知の微生物間相互作用が存在すると予想された．そこで，本菌叢に対してメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析を行い，相互作用を明らかにすることを目的とした．
【方法】菌叢 A302 を 5 g/L のアルギン酸 Na を含む培地で静置培養し，培養上清にカルバゾール硫酸法によるアルギン酸濃度測定と HPLC による有機酸濃度測定を行って，菌叢のアルギン酸分解及び有機酸生成の開始点を調べた．次に，アルギン酸分解が開始された時間の菌叢を取得し，抽出したトータル RNA 及びゲノム DNA の塩基配列を DNBSEQ-G400 で解読した．その後，メタゲノムデータを参照配列としメタトランスクリプトームデータをマッピングして遺伝子発現量を調べた．
【結果】本菌叢は培養開始後 6 時間から顕著なアルギン酸分解と有機酸生成を開始し，24 時間で 2.0 g/L の酢酸と 0.2 g/L のプロピオン酸を生成した．培養 6 時間の菌叢に対してメタ解析を行ったところ，メタゲノム解析で得られた 4 つの 16S rDNA 配列のホモロジー検索から，本菌叢は *Mangrovibacterium* 属細菌 78%，*Shewanella* 属細菌 20%及び 2 種の *Enterococcus* 属細菌を含む希少種で構成されていることが明らかになった．また，メタトランスクリプトーム解析から，*Mangrovibacterium* はアルギン酸リアーゼを含むアルギン酸代謝酵素遺伝子及びピルビン酸からの酢酸合成経路遺伝子の全てを高発現していることがわかった．一方，*Shewanella* はアルギン酸分解遺伝子を発現していなかったが，酢酸合成遺伝子のほか，嫌気条件下での酢酸生成で生じるギ酸の分解を行うギ酸デヒドロゲナーゼの遺伝子 *fdhABC* を高発現していた．
【考察】本菌叢のアルギン酸分解能は主に *Mangrovibacterium* が担っており，*Shewanella* はアルギン酸代謝中間体を利用した酢酸生成を協調して行っていると考えられる．また，*fdhABC* の高発現，及び培養上清にギ酸が蓄積していないことから，*Shewanella* は菌叢内でギ酸分解を担っており，ピルビン酸分解による酢酸生成・ATP 合成を促進し，*Mangrovibacterium* によるアルギン酸資化を支えていると予想される．

Key words bacterial consortium, alginate, transcriptome, genome, biomass

G3H2 (0308) 草食性陸ガニの生産するリグニン酸化酵素

○三宅克英*, 永倉佑真
(名城大・理工)

***De novo* transcriptome assembly of the midgut glands of herbivorous land crabs, *Chiromantes haematocheir* and identification of laccase genes involved in lignin degradation**

○Katsuhide Miyake*, Yuma Nagakura
(Fac. Sci. Eng., Meijo Univ.)
miyake@meijo-u.ac.jp

【背景及び目的】天然の原生林と海が接した海岸林に生息するアカテガニやクロベンケイガニなどの陸ガニ類は、海岸森林バイオマスの分解者として、海と森の間の物質循環に大きな役割を果たしている。これらの陸ガニ類は落ち葉や木片を食料として利用することが報告されている。本研究の目標は、これまで有用生物資源として省みられることのなかった陸ガニ類のバイオマス分解能力を解析、同定、抽出し、生物工学的な応用を可能にすることである。これまでの生態観察から、このカニは落ち葉のような柔らかいバイオマスだけでなく、固い切り株なども食料にしている可能性があり、バイオマス有効利用のボトルネックとなっている難分解性リグニン類の分解能力を持っているものと期待している。今回はリグニン類分解活性の指標としてグアヤコール酸化活性および 2, 6-ジメトキシフェノール（2,6-DMP）酸化活性に着目し、この活性の特徴を解析するとともに、全 RNA-seq 解析を行うことによって、遺伝子の単離も試みた。
【結果及び考察】アカテガニとクロベンケイガニを採集し、解剖後、肝臓と膵臓の機能を持つ中腸腺を採取し、粗酵素液を調製した。リグニン分解活性としてはパーオキシダーゼ活性（グアヤコール酸化活性）とラッカーゼ活性（2,6-DMP 酸化活性）に着目し、各個体の活性を調べた。グアヤコール酸化活性はアカテガニにおいてはオスよりもメスで高頻度に検出され、クロベンケイガニではほぼ全ての個体から強い活性が検出された。一方 2,6-DMP 酸化活性は、アカテガニでは餌に植物を与えたときにのみ活性を示し、クロベンケイガニでは餌の種類に関わらず活性を示した。クロベンケイガニの方が植食性が強く、またアカテガニではメスの方が植食性が強いという生態と一致する。これらの結果は、、この２つの活性が、植物バイオマスのリグニンの分解に機能しており、陸ガニ類の植食性の強さと強い関連性を持つことを示していた。この二つの酸化活性は異なる酵素によって反応されているものと思われる。アカテガニ及びクロベンケイガニの RNA-seq の解析から、リグニン分解酵素として知られるラッカーゼ遺伝子を複数見出し、そのうち最も発現量の多い酵素を大腸菌に生産させて活性を解析した。その結果、この酵素は 2, 6-DMP 酸化活性を担っていることが明らかとなった。グアヤコール酸化活性を示す酵素については特定できていない。

Key words land crab, laccase, lignin, 2,6-dimethoxyohenol, *Chiromantes haematocheir*

G3H2 (0309) 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, 志波勇介, 今久保友則, 藤田雄大, 秦野琢之
（福山大学・生命工）

Breeding of cellulase-producing *Saccharomyces cerevisiae*

○Hiroaki Matsuzaki*, Shosuke Watanabe, Yusuke Shiwa, Tomonori Imakubo, Yudai Fujita, Takushi Hatano
(Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ.)
matsuzaki@fukuyama-u.ac.jp

近年、エネルギー消費の増大により化石燃料の枯渇が危惧されている。また、化石燃料の消費は大気中の二酸化炭素濃度を増加させ、地球温暖化を招く。一方、セルロース系バイオマスは地球上に豊富に存在し、カーボンニュートラルにより、脱炭素社会の実現に有効な資源であると考えられる。そこで、我々は、化石燃料の代替燃料として、遺伝子導入によりアルコール発酵酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にセルラーゼ生産能を付与し、セルロース系バイオマスからバイオ燃料（現在の研究では、バイオエタノール）を生産することを目指している。古紙などの廃棄物を利用し、前処理を省き、手間やコストをできる限り削減しようとしている。本研究では、まず細菌 *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）および酵母 *Saccharomycopsis fibuligera* 由来の β-グルコシダーゼ（BGL1）の 3 種類の酵素の生産能を付与することを検討した。*cenA* と *cex* の分泌発現プラスミド pHM1061 は、*cenA* と *cex* を *GAP* プロモーターと *MEL1* 分泌シグナル配列の下流に連結して構築した。また、*BGL1* 分泌発現プラスミド pHM1062 は、*BGL1* を *GAP* プロモーターに連結して構築した。これらのプラスミドを導入した *S. cerevisiae* 二重形質転換体は、コンゴーレッド染色、MUC 染色法、および *p*-NPG 活性から 3 種類の酵素の分泌生産が確認できた。しかし、エンド型セルラーゼ活性（cenA の活性）は低いと考えられた。次に、酵母 *Cryptococcus flavus* 由来のカルボキシメチルセルラーゼ遺伝子 *CMC1*（cDNA）の分泌発現プラスミド pSC7 を導入した三重形質転換体は、エンド型セルラーゼ活性を強化でき、紙をある程度分解できた。さらに、紙の分解を向上させるためセロビオハイドロラーゼの生産を検討している。また、形質転換体による紙からのエタノールの生産を検討している。

Key words cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation, biomass

G3H2 (0310) セロオリゴ糖/キシロオリゴ糖併産用セルラーゼを生産する糸状菌変異株の獲得

○野口拓也[1], 加川 雄介[1], 齋藤 悠香[1], 西山 竜士[1], 平松 紳吾[1], 山田 勝成[1*]
（[1]東レ株式会社 先端融合研究所）

Isolation of a mutant strain of *Trichoderma reesei* dedicated to the production of cello-/xylo-oligosaccharides

○Takuya Noguchi[1], Yusuke Kagawa[1], Haruka Saito[1], Ryuji Nishiyama[1], Shingo Hiramatsu[1], Katsushige Yamada[1*]
([1] New Frontiers Research Laboratories, Toray Industries, Inc.)
takuya.noguchi.d3@mail.toray

Trichoderma reesei はリグノセルロース系バイオマスの分解酵素であるセルラーゼ、ヘミセルラーゼ生産菌として知られている。セルロース、ヘミセルロースの中間分解産物であるセロオリゴ糖、キシロオリゴ糖は腸内細菌叢の生育を促進するプレバイオティクスをはじめ、化粧品原料といった機能性素材として注目されている。

セロオリゴ糖あるいはキシロオリゴ糖の比率が高いバイオマス糖化物の製造を目的としたプロセス開発や生産菌の育種が報告されている。一方で、セロオリゴ糖およびキシロオリゴ糖を併産する研究は、これまでほとんど報告されていない。2017 年に報告された先行研究では、総糖に占めるセロビオース、キシロオリゴ糖の比率が 25.6%の糖化物を得たと報告されている [1]。

当社では、安価なセルラーゼのオンサイト生産を目指すべく、*T. reesei* をベースとした非遺伝子組換え技術によるセルラーゼ高生産変異株の開発に成功している [2]。本研究では、この高生産変異株をベースに非遺伝子組換え技術を用いてこれらのオリゴ糖併産を可能にするセルラーゼを生産する変異株の育種に取り組んだ。その結果、単糖の生成に重要な役割を果たすβ-グルコシダーゼ（BGL）、β-キシロシダーゼ（BXL）両酵素の活性が低下した変異株を獲得した。変異株の培養により得られたオリゴ糖併産用セルラーゼを用いてサトウキビ残渣であるバガスを糖化した結果、オリゴ糖比率 70%を超える糖化物が得られた。したがって、バイオマスからセロオリゴ糖およびキシロオリゴ糖を大量に併産するセルラーゼの生産に適した非組換え変異株の開発に成功した。

1) H. Zhang, Y. Xu and S. Yu; *Bioresour. Technol*., 234, 343-349, 2017
2) T. Noguchi, H. Saito, R. Nishiyama, N. Yoshida, T. Matsubayashi, Y. Teshima, C. Yamada, S. Hiramatsu, K.Yamada, Y. Kagawa; *Bioresour. Technol. Rep.*, 15, 100733, 2021

Key words *Trichoderma reesei*, cellullase, β-glucosidase, β-xylosidase, oligosaccharides

G3H2 (0311) 担子菌酵母の収集と特性評価

○谷村あゆみ[1], 足立光[2], 田邊公一[1,2], 島純[1,2*]
（[1]龍大・発酵セ, [2]龍大院・農）

Isolation and characterization of Basidiomycete yeasts

○Ayumi Tanimura[1], Hikaru Adachi[2], Koichi Tanabe[1, 2], Jun Shima[1,2*]
([1]Microb. Resour. Cent. Ferment. Brew., Ryukoku Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Ryukoku Univ.)
a18306@mail.ryukoku.ac.jp

担子菌酵母はエタノール生産性に乏しく、旧来からの食品利用等に結びつかないため、子嚢菌酵母と比べ、応用面での研究が進みづらかったと考えられる。しかし、子嚢菌酵母と比べ多系統性であるため、性質にも多様性があることが予想されている。The Yeasts の第 4 版（1998 年）には、子嚢菌系酵母は約 500 種、担子菌系酵母は約 200 種が記載されている。第 5 版（2011 年）は、それぞれ約 850 種と約 450 種となっており、担子菌酵母の探索が進展していることが推測される。
我々はこれまで、特殊な糖の資化能を有する株や、有用物質を生産する株を見出してきた。その大半が担子菌酵母であったことから、本研究では、担子菌酵母の選択的分離を目的とした。さらに、担子菌酵母の産業応用の可能性を探るため、それら分離株の発酵能や発酵産物の分析を行った。
分離源として、国内から採取した土壌や植物を用いた。分離の際の炭素源はグルコースとし、その他、ペプトン、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウムを添加した培地を用いた。
その結果、担子菌酵母であることが示唆される菌株を分離することができた。それら分離株から、有機酸資化性菌株、多糖類分解酵素産生株等を選抜することができた。現在、本菌株の解析や同定を進めているところである。

Key words Basidiomycete yeast, fermentation

G3H2 (0312) *Bacillus* 属細菌 IA 株と燻炭を組み合わせた微生物資材の開発 2

○江邉正平[1*], 松瀬一平[2], 大池達矢[1], 岡南政宏[1,2], 阿野貴司[1,2]
（[1]近畿大院・生物理工, [2]近畿大・生物理工）

Development of a microbial inoculant using rice husk biochar with *Bacillus* sp. IA 2

○Shohei Ebe[1*], Ippei Matsuse[2], Tatsuya Ohike[1], Masahiro Okanami[1,2], Takashi Ano[1,2]
([1] Grad. Sch. BOST, Kindai Univ., [2] Fac. BOST, Kindai Univ.)
ebe.microbiotech@gmail.com

燻炭とは稲作において発生する籾殻を比較的低温・低酸素条件下で焼成することで作製される炭であり、日本では作物栽培における土壌改良資材として古くから利用してきた。我々はこれまでに燻炭と土壌中の有用微生物の関係に着目し、燻炭存在下で増殖が促進される微生物の探索を行った。その結果、燻炭を添加した液体培地で培養する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、燻炭を添加した培養では植物病原性真菌の増殖を阻害する抗生物質の生産量が向上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植物への病原菌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資材の開発を目的とした。

Bacillus 属細菌 IA 株と燻炭を組み合わせた資材を作製するため、安価な培養基質として籾殻と同様に稲作で生じる廃棄物である米糠を用い、さらに燻炭の特性である多孔質性と軽い比重を利用した培養培地を考案した。つまり燻炭を高さが 8 cm となるように容器へ加え、そこに米糠懸濁液を添加して燻炭に吸水させた。この時、容器の下部が嫌気的な条件とならないよう燻炭間に気相が残るような体積の米糠懸濁液を加えた。この培養培地へ IA 株を植菌し、室温・静置条件下で培養を行った結果、培養物の乾燥重量 1 g 当たり 10^8 cfu を上回る培養物の作製に成功した。

次に、この IA 株燻炭培養物が実際に植物を病原菌から防除できるか評価した。ポットの底部に植物病原性真菌である *Rhizoctonia solani* K1 を植菌し、その上からバーミキュライトと IA 株燻炭培養物を混ぜ合わせた模擬土壌を加えた。この模擬土壌にコマツナ種子を播種し、人工気象器内で 10 日間の栽培を行うことで *R. solani* K1 への感染防除効果を評価した。栽培の結果、全てのコマツナ個体において *R. solani* K1 の感染は認められなかった。一方、培養物を加えなかったポット、IA 株を培養していない燻炭培地を混じたポットでのコマツナは *R. solani* K1 の感染による茎の萎凋と、萎凋に伴う倒伏および枯死が観察された。以上の結果から IA 株燻炭培養物による植物病原菌 *R. solani* K1 の感染防除効果が示された。

本研究では *Bacillus* 属細菌 IA 株と燻炭を組み合わせた植物を病原菌の感染から防除可能な資材の開発を試みた。その結果、米糠と燻炭を組み合わせた IA 株を培養可能な燻炭培地の作製、および IA 株培養物によるコマツナの *R. solani* K1 からの感染防除に成功した。本研究により稲作廃棄物である燻炭と米糠を用いて *Bacillus* 属細菌 IA 株の培養を行うことで、作物を病原菌の感染から防除することが可能な微生物資材となる可能性を示した。

Key words *Bacillus*, rice husk biochar, biocontrol agent, microbial inoculant

G3H2 (0313) 固定化微生物を用いたタングステン酸水溶液からのタングステンの除去、回収、リサイクル

○鶴田猛彦[1,2]*, 佐藤 樹[1], 武井 大翔[1], 田口 翔太[1], 屋須 雅人[1], 宮里 匠[2]
([1]八戸工大工, [2]八戸工大院工)

Removal, recovery, and recycle of tungsten from the aqueous tungstate solution using immobilized microorganism

○Takehiko Tsuruta[1,2]*, Itsuki Satoh[1], Hiroto Takei[1], Shouta Taguchi[1], Masato Yasu[1],Sho Miyasato[2]
([1]Dept. Eng. Hachinohe Inst. Tech, [2]Dept. Eng. Grad. Sch.Hachinohe Inst. Tech)
tsuruta@hi-tech.ac.jp

タングステン(W)は電球のフィラメントや切削工具として用いられている。自然界ではタングステン酸塩として鉱物中に存在するため、本研究ではタングステン酸ナトリウムの水溶液からの除去と回収およびその繰り返しを試みた。これまでの研究で塩化金酸のような錯イオンとして陰電荷をもつ錯イオンはグラム陰性細菌に高い金属除去能が認められたことから、本研究では *Pseudomonas saccharophila* の一菌株の休止菌体を用いて W の除去について検討を行った。

P. saccharophila の一菌株の休止菌体は高い W の除去能を示したことから、本菌株を包括固定化した固定化菌体を用いてタングステン酸イオンの水溶液からの W の除去および W と結合した固定化菌体からの水溶液への回収およびその繰り返しを試みた。本菌株の固定化菌体のタングステン除去の pH 依存性について検討したところ本固定化菌体は pH 3 で最も多量の W を除去できたことから、pH3 で W の除去を行った。

次に、W の除去の pH 依存性は高 pH 側でより W の除去量がシャープに減少したことから、固定化菌体に結合した W の水溶液への回収実験は 0.1M の炭酸ナトリウム水溶液で検討した。これらの検討から、*P. saccharophila* の一菌株の包括固定化菌体は高い W 除去能を有しており、本固定化菌体に結合したタングステン酸は 0.1M 炭酸ナトリウム水溶液を用いて容易に水溶液へ回収できることが明らかとなった。

そこで、タングステン酸の固定化菌体を用いた水溶液からの除去、炭酸水素ナトリウム溶液を用いた W を結合させた固定化菌体からの W の水溶液への回収、および、その繰り返しについて検討した。その結果、本固定化菌体は、タングステン酸ナトリウム水溶液から効率的に W を除去することができ、固定化菌体に結合した W は、炭酸ナトリウム水溶液によって容易に水溶液中に回収でき、これらの繰り返しが可能であることが明らかとなった。

Key words removal, recovery, recycle, tungsten, immobilized microorganism

G3H2 (0314) α-1,3-グルカンを用いた新規機能性素材の開発

○小倉太一[1], 大垣内誠[2], 豊竹洋佑[1], 松井大亮[1], 武田陽一[1], 若山守[1]*
([1]立命館大院・生命科学, [2]島津製作所分析計測事業部)

The development of a novel functional material using alpha-1,3-Glucan

○Taichi KOGURA[1], Makoto OGAITO[2], Yosuke TOYOTAKE[1], Matsui DAISUKE[1], Yoichi TAKEDA[1], Mamoru WAKAYAMA[1]*
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2] Shimadzu Co., Analytical & Measuring Instrument Div.)

【背景】 多糖類は、構成糖が様々な結合様式をとりうることから、構造多様性に富む天然高分子である。このうち代表的な多糖であるセルロースやデンプンは、以前からバイオベースプラスチックの原料として利用されてきた。しかし、その他の構成糖の組成や結合様式をもつ、これまであまり利用されてこなかった天然多糖類や微生物由来の多糖類について高機能性プラスチックとしての利用可能性を検討することは、バイオマス資源の有効利用という観点から依然として重要である。

α-1,3-グルカンは、口内細菌である *Streptococcus* 属などが有するグルコシルトランスフェラーゼ I（Gtf-I）によって、スクロースから合成される水不溶性の高分子多糖である。α-1,3-グルカンのヒドロキシ基をアセチル基やアジド基に置換した誘導体が、熱可塑性や高い耐熱性を示すことが近年報告され、新たなバイオベースプラスチックの素材として注目され始めている。しかし、α-1,3-グルカン誘導体に抗菌作用などの機能性を付与する試みや、他の生分解性樹脂との複合樹脂化などの検討はまだ進んでいない。そこで本研究では、Gtf-I を用いたα-1,3-グルカンの高収率な生産法を検討するとともに、カルボキシメチル（CM）化による新規なα-1,3-グルカン誘導体の合成やその諸性質の解析を行うことを目的とした。

【結果・展望】 *S. mutans* ATCC 700610 由来の Gtf-I（Sm-Gtf-I）発現プラスミドを *Escherichia coli* Rosetta-gami B（DE3）に導入し、大量発現を試みた。しかし、Sm-Gtf-I の発現量は SDS-PAGE で確認できないほど低かった。そこで、Sm-Gtf-I のシグナルペプチドを欠損させた変異型 Sm-Gtf-I の発現プラスミドを作製し、その発現量を調べた結果、野生型と比較して大きく発現量が増加した。また、変異型 Sm-Gtf-I を発現した大腸菌破砕液を用いてα-1,3-グルカン合成を行ったところ、野生型を用いて合成した場合は 0.3%だったのに対し、9.6%の収率を得ることができた。

作製したα-1,3-グルカンを 9%塩化リチウム・*N,N*-ジメチルアセトアミドに 0.1%の割合で添加し、50 時間・70 °C で撹拌することで溶解させた。これを用いて GPC による分子量測定を行った結果、分子量は約 20 万であることが分かった。

次にα-1,3-グルカンの CM 化と置換度の測定を行った。先行研究に従い、得られた CM 誘導体を水酸化ナトリウム水溶液に溶解させ、塩酸で逆滴定することで置換度を算出した。その結果、α-1,3-グルカンを 3 倍量の水酸化ナトリウム及びモノクロロ酢酸と 24 時間・40 °C で反応させることで置換度 0.3 の CM 誘導体が得られることが分かった。現在反応条件を検討し、0.5 以上の置換度の達成を目指している。また、得られた CM 誘導体に銀イオンを付加し、抗菌作用を持たせたフィルムの作製も検討している。

Key words alpha-1,3-glucan, *Streptococcus mutans*, biodegradable polymer, antimicrobial function

G3H2 (0315) 新奇な光半導体の光電変換反応による非接触殺菌に関する研究

○田中 賢二[1]*, 岩下 真子[1], 米元 舞[1], 伊東 謙吾[2]
([1]近畿大・産理工, [2]（株）伊都研究所)

Study for noncontact sterilization by photoelectric conversion of novel optical semiconductor

○Kenji Tanaka[1]*, Mako Iwashita[1], Mai Yonemoto[1], Kengo Ito[2]
([1] Fac. Humanity-Oriented. Sci. Eng., Kinki Univ., [2] Ito Research Institute Co., Ltd)
tanaka@fuk.kindai.ac.jp

【背景・目的】 二酸化チタンのような光触媒の多くは紫外光応用型がいまだ主流であるため、可視光応答型光触媒の開発が進められている。また、光触媒加工製品では触媒作用により品質が劣化する問題があるほか、食品や医療材料等では触媒と接触させない状態や暗所での抗菌効果も要求されている。㈱伊都研究所が開発した ABC 光半導体は、平板状銀ナノ粒子(AgPL)とボロン樹脂(B)、クレイ(C)の複合体であり、紫外光・可視光・近赤外光を吸収して光電変換を起こす塗料状の新規な半導体である。本光半導体は、これら光の照射下で強力な抗菌作用を示すが、光触媒とは異なり暗所でも明瞭な抗菌作用を示す。暗所での抗菌作用は、光照射下で蓄積された電気が遮光下で放電される本半導体特有のコンデンサー機能によるものと推察される。

本研究では、ABC 光半導体における新たな抗菌機能の探索と抗菌作用機能を解明する一端として、本光半導体への可視光の事前照射時間や暗所での保管時間が暗所での抗菌力にどう影響するのか調べた。また、ABC 光半導体の表面をポリマー素材で完全にコートした遮蔽フィルムを用いて、検定菌と直接接触させない状態でも抗菌作用を示すのか検証した。

【方法・結果】 抗菌試験は JIS R 1752 フィルム密着試験法を参考に実施した。予め白色光（照度 1000 lx）を異なる時間照射した ABC 光半導体固定化フィルムに、暗所中で大腸菌懸濁液を滴下して密着用 PET フィルムを被せ、30℃の暗所中または可視光照射下で 8 時間暴露した。洗い出した菌液を希釈し、30℃で 48 時間培養後コロニー数を計測し、生残菌数を比較した。また、光照射後に異なる時間で暗所保管した光半導体フィルムを使って抗菌試験を行った。結果として、フィルムへの可視光事前照射時間が長くなると暗所での抗菌効果は大きくなり、逆に事前照射後の暗所での保管時間が長くなるほど抗菌効果は小さくなった。

次に、酢酸ビニル樹脂（厚さ 1μm）で表面をコートした ABC 光半導体固定化フィルムを使って非接触状態で抗菌試験を行ったところ、光照射下で明瞭な抗菌効果が認められた。一方、酢酸ビニル樹脂層をさらに PET フィルム（厚さ 78μm）で覆った光半導体フィルムでは、抗菌効果は全く見られなかった。これらの結果は、ABC 光半導体の抗菌作用が、光触媒に見られるヒドロキシラジカル・OH などの活性酸素種の発生によるものではなく、電磁気的な作用によるものであり、とくに暗所における抗菌作用が遮光後放電によるものであることを強く示唆している。

Key words antimicrobial, nanosilver, photocatalyst, optical semiconductor

G3H3 (0101) 酵母における有機酸資化経路の確立とバイオリファイナリー展開

○壷井 ひかり[1], Prihardi Kahar[1], 近藤 昭彦[2], 荻野 千秋[1]*
([1]神戸大・工, [2]神戸大・イノベ)

Breeding of organic acid assimilation yeast for bio-refinery

○Hikari Tsuboi[1], Prihardi Kahar[1], Akihiko Kondo[2], Chiaki Ogino[1]*
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
* ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【目的】 リグノセルロースバイオマスの酵素糖化に向けた前処理では、一般的に希硫酸熱処理法が用いられるが、処理後の酸水溶液はその廃棄処理が問題とされている。希硫酸前処理法では、その後の中和工程で副生成物が出るために、問題となっている。本研究では希硫酸に替わり、有機酸であるマレイン酸による熱酸処理法の確立に成功している。マレイン酸は微生物が資化できる可能性が高い。そこで、我々は前処理後の残存マレイン酸を炭素源として資化可能な遺伝子組換え酵母株の開発を試みた。これにより、中和工程を必要とせず、処理酸を資源化することで、今までの廃棄処理の問題などを克服することが期待できる。

【実験方法】 我々は、NBRC カルチャーコレクションの酵母ライブラリーから *Saccharomyces cerevisiae* 酵母を対象としたスクリーニングを行い、前処理後のマレイン酸耐性を有する酵母として F118 株を見だしている。しかし、酵母はマレイン酸を自然的に利用することができないため、*Schizosaccharomyces pombe* 由来の有機酸トランスポーターである *Mae*P 、*Burkholderia fungorum* 由来の *Hbz*IJ、*Escherichia coli* 由来の *Dml*A をコーディングする遺伝子の発現系を導入し、形質転換体 F118/MaeP-JIA 株を取得した。比較対象株として、F118/MaeP 株も作製した。

【結果】 F118/MaeP-JIA 株および F118/MaeP 株をそれぞれ 1%のマレイン酸を含む YPD 培地中で発酵してみた。F118/MaeP 株はマレイン酸を資化できないが、F118/MaeP-JIA 株はマレイン酸を資化することが確認された。しかし、F118/MaeP が 60 g/L glucose から約 25 g/L エタノールを生産したものの、F118/MaeP-JIA 株はエタノール生産量が低く約 6 g/L であった。これは、F118/MaeP-JIA 株において炭素源が菌体増殖に優先的に利用されていることが理由であると予測している。今後、JIA 導入による菌体増殖やエタノール生産に及ぼす影響について検討を行い、本発表にて遺伝子発現によるエタノール発酵の相関関係について報告を行う予定である。

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Biomass

G3H3 (0102) サンプリング過程に含まれる火炎殺菌操作が微生物の振盪フラスコ培養に及ぼす影響の解析

○高橋 将人[1], 青柳 秀紀[1]*
([1]筑波大・生命環境系)

Analysis of the flame sterilization effects included in sampling operation on the microbial shake-flask culture

○Masato Takahashi[1], Hideki Aoyagi[1]*
([1] Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】 微生物の振盪培養中にフラスコ内の様々な培養因子（増殖や pH など）を測定するために、雑菌汚染を予防しながらサンプリングが実施される。一般的なサンプリング過程には、フラスコの振盪中断、クリーンベンチへのフラスコの移動、フラスコ上部に付与されている通気性を有した培養栓の開封、フラスコおよび培養栓の火炎殺菌などが含まれる。一連の操作が微生物に何かしらの影響を及ぼすことは、微生物培養に携わる熟練者は経験的に把握していたが、各操作が微生物に及ぼす影響の詳細を科学的にとらえた研究は我々が知る限りほとんどない。我々は、振盪フラスコ培養を中断することなくサンプリングできるシステムや CO_2 および O_2 濃度をモニタリングできる技術を開発し、フラスコの気相環境（O_2 だけでなく、特に CO_2）は培地と同様に重要な培養因子であることを明らかにしてきた。そこで、火炎殺菌操作が微生物の振盪フラスコ培養に及ぼす影響の解析を試みた。
【方法と結果】 サンプリングをおこなう際の火炎殺菌操作に注目し、独自のモニタリングデバイス（Circulation Direct Monitoring and Sampling System：CDMSS）を用いた結果、ブンゼンバーナーによって生じた燃焼ガスがフラスコ気相部の CO_2 濃度の上昇に寄与することが明らかとなった。また、Computational Fluid Dynamics（CFD）解析した結果、高濃度の CO_2 を有した燃焼ガスが三角フラスコの上部から流入する様子を捉えることができた。CDMSS による実測と CFD 解析によって得られた知見に基づき、火炎殺菌操作で生じる一時的な CO_2 濃度の上昇を模倣しながら（サンプリング過程に含まれるそれ以外の影響を完全に除去した系）、4 種類の微生物（*Escherichia coli*, *Pelomonas saccharophila*, *Acetobacter pasteurianus*, *Saccharomyces cerevisiae*）を振盪フラスコ培養した結果、今回の条件では、特に *P. saccharophila*, *A. pasteurianus* の増殖に影響を及ぼすことが明らかとなった。この結果、培養中の CO_2 の強制スパイク（フラスコ気相部への間欠的な短時間通気）は、従来と異なる培養条件の作成に応用できると考えられる。

Key words carbon dioxide, gaseous spike, headspace, shake-flask culture

G3H3 (0103) 電界放出形走査電子顕微鏡(FE-SEM)を用いた微生物の簡易的観察手法の検討

○松井 春美[1]*, 近藤 みずき[2], 高橋 美幸[2], 齊藤 信雄[2], 阿部 勝正[1]
([1]函館高専, [2]長岡技大)

Study of a simple observation method for microorganisms by field emission-type scanning electron microscope (FE-SEM)

○Harumi Matsui[1]*, Mizuki Kondo[2], Miyuki Takahashi[2] , Nobuo Saito[2], Katsumasa Abe[1]
([1]NIT Hakodate College, [2]Nagaoka Univ. Technol.)
matsui@hakodate-ct.ac.jp

走査電子顕微鏡（SEM）により微生物観察を行う際は，高真空下でも形状を保つために前処理が必要となり，一般的には，化学固定→脱水→置換→乾燥→導電処理という工程が適用される．特に脱水と置換の工程には，高額な機器，そして，1～2 日という多大な時間を要する．浜松医大の高久らは，粘性を持つ細胞外様物質で処理したボウフラなどに電子線を照射することで高真空下でも形状が損なわれることなく形態を電子顕微鏡観察できることを明らかにした[1]．これは細胞外様物質への電子線照射で形成されるごく薄い膜（ナノスーツ）が重要な役割をはたしており，本方法は「ナノスーツ法」と命名されている．このナノスーツ法による形態観察は高等真核生物を対象としたものが多く，微生物を対象とした詳細な条件検討事例はあまりない．
本研究では，簡易的な微生物観察手法を探るべく酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 観察にナノスーツ法を適用することとした．寒天培地で培養した酵母をカーボン両面テープ上に塗布し，0.1～1 wt%の Tween 20 水溶液を数滴滴下したのち，キムワイプで余分な溶液を除去した．FE-SEM 装置内で Tween 20 処理後の菌体に電子線を照射し，観察したところ，いずれの Tween 20 濃度においても形状を維持したままで形態観察可能であることが明らかになった．また，この観察結果が装置の性能で異なるのか検討した結果，全ての装置において良好な観察結果が得られたことから，本手法は微生物観察にも有効であると考えた．今後，バクテリアやアーキアを含む種々の微生物観察に適用し，観察条件の検討を行っていく予定である．

参考文献

[1] Yasuharu Takaku, Hiroshi Suzuki, Isao Ohta, Daisuke Ishii, Yoshinori Muranaka, Masatsugu Shimomura and Takahiro Hariyama, “A thin polymer membrane, nano-suit, enhancing survival across the continuum between air and high vacuum”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(19), 7631-7635, 2013

Key words microscopy, FE-SEM, nano-suit, scanning electron microscope

G3H3 (0104) 講演中止

G3H3 (0105) 液体培養下において増殖速度が接合菌 *Mucor lusitanicus* のペレットサイズに与える影響

○大澤亮[1]*, 村上周一郎[2]
([1]明治大院・農, [2]明治大・農)

Effects of growth rate on pellet size of *Mucor lusitanicus* during liquid cultivation.

○Ryo Osawa[1]*, Shuichiro Murakami[2],
([1] Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., [2] Sch. Agric., Meiji Univ.)
smura@meiji.ac.jp

【目的】微生物による有用物質の生産は一般的に液体培地で行われるが、その際糸状菌の多くは、液体培養下でペレット状（凝集）またはパルプ状（拡散）の二つの形態をとることが知られている。この形態変化は、栄養源、pH、通気、菌体接種濃度など様々な要因によって引き起こされる。物質生産の際に、ペレットを形成させることで培養液からの菌体の除去が容易になり、作業効率が向上するというメリットがあるが、ペレットが形成されるメカニズムは、完全には明らかにされていない。そこで本研究は、接合菌である *Mucor lusitanicus* における液体培養下での形態変化のメカニズムを、炭素源の違いに着目して解明することを目的とした。
【方法】*M. lusitanicus* ATCC1216B を培養した PDA プレートから胞子を回収し、生理食塩水に懸濁させることで、胞子懸濁液を調製した。唯一炭素源として各炭素源が終濃度 1%になるように調整した培地に、1.0×10^5 spores/mL になるように胞子懸濁液を接種し、30℃で 4 日振とう培養した。培養後、形態の観察およびバイオマス量を測定した。また、培養開始 0-12 時間における、胞子が発芽する様子を光学顕微鏡(400 倍)により観察した。
【結果と考察】炭素源の種類とペレットサイズの関係を調べたところ、D-glucose、D-xylose、D-fructose では比較的小さなペレットが形成され、maltose、trehalose、soluble starch ではペレットのサイズが大きくなった。次に、増殖量とペレットサイズの関係を調べたところ、増殖量とペレットサイズには相関が見られず、増殖量はペレットサイズに影響を与えないことが明らかになった。また、増殖速度とペレットサイズの関係を調べたところ、炭素源として D-glucose、D-xylose、D-fructose を用いたときに増殖速度は比較的速く、一方 maltose、trehalose では増殖速度が D-glucose 等と比較して遅かったことから、増殖速度がペレットサイズに影響を与えている可能性が示唆された。さらに、培養開始 12 時間後までの胞子が発芽する様子を光学顕微鏡により観察したところ、炭素源を D-glucose と maltose を用いた場合に、培養初期の発芽率や細胞の形態、増殖の様子が大きく異なっていることが明らかになった。
以上の結果から、本菌のペレットサイズの相違は増殖速度と培養初期における形態の影響を大きく受けている可能性が示唆された。今後は、これらの因子がどのようにペレットサイズに影響を与えているのかを調べていく必要がある。

Key words morphological change, growth phenotype, *Mucor lusitanicus*

G3H3 (0106) 微小液滴を用いた大腸菌 Persisters からの覚醒に関わる発現遺伝子の探索

○亀島礼美[1,2], 大田悠里[2], 千原康太郎[3], 森田雅宗[2], 野田尚宏[1,2]*
([1]東大院・新領域, [2]産総研・バイオメディカル, [3]ヘルムホルツ RNA 感染研究所)

Screening of gene expression associated with awakening from *Escherichia coli* persisters utilizing water-in-oil droplets

○Remi Kameshima[1,2], Yuri Ota[2], Kotaro Chihara[3], Masamune Morita[2], Naohiro Noda[1,2]*
([1] Grad. Sch. Frontier Sci., Univ of Tokyo, [2] Biomed. Res. Inst., AIST, [3] HIRI)
noda-naohiro@aist.go.jp

[背景と目的]抗生物質耐性による細菌感染症の難治化・慢性化は世界的問題であり，その一因として Persisters の存在が挙げられる。Persisters とは遺伝的変異を伴わずに，高濃度の抗生物質に対して一時的に耐性を示す細菌の亜集団である。すなわち，Persisters は遺伝子発現の変化による表現型の変異として表され，抗生物質存在下では死滅・増殖しない（休眠）が，抗生物質除去後に再増殖（覚醒）する。これまで，Persisters 形成に関する研究は，マイクロ流体デバイスを用いたシングルセル解析を代表に精力的に行われてきた。一方で，シングルセル解析のスループット性の低さや，Persisters の存在量の少なさが原因となり，Persisters の覚醒に関して未解明な課題が多い。本課題を克服するためには，よりハイスループットに Persisters を分取し，その後の覚醒に関わる遺伝子発現まで解析可能な技術が必須である。フッ素オイルの中に分散した微小水滴である Water-in-oil (w/o) ドロップレットは，マイクロ流路を用いることで 1 時間に数 100 万個スケールで作製できる。我々は先行研究において，細菌 1 細胞を w/o ドロップレットに封入することでシングルセルからのハイスループットな培養，及びセルソーティングによる細菌を含む w/o ドロップレットの回収技術を開発した [1]。本研究では，この w/o ドロップレット技術を利用して，抗生物質処理により濃縮した大腸菌 Persisters をシングルセルレベルで解析する技術を構築する。さらに，様々なプロモーター下流に蛍光タンパクが導入されたプラスミドを持つ大腸菌ライブラリーを利用し，覚醒時に活性化されるプロモーターをスクリーニングすることで，Persisters の覚醒に関わる遺伝子制御機構を明らかにする。
[実験方法と結果]大腸菌プロモーターライブラリーを一定時間培養後，抗生物質に曝しながら 1 時間おき培養液を回収し，プレート上に播種した。一定時間培養後プレート上のコロニー数をカウントし，抗生物質曝露前のコロニー数と比較して Persisters の割合を算出した。また，抗生物質処理 5 時間後の培養液を w/o ドロップレットに封入して一定時間培養後に蛍光の強い w/o ドロップレットのみを回収し，w/o ドロップレットに封入されている大腸菌が持つプラスミド上のプロモーター配列を同定した。同定したプロモーターの下流の遺伝子として，*serA*，*wrbA*，*lacZ* を特定できた。これらの遺伝子が休眠の状態から覚醒状態に入る際に発現し，何らかの機序に関与していることが示唆された。

1) Saito, K., *et al.*, *Sci. Rep.*, 11:9506 (2021)
Key words persister, water-in-oil droplet

G3H3 (0107) 食品添加物が腸内細菌やモデル複合系に及ぼす影響の解析

○芦沢 紬希[1], 青柳 秀紀[1]*
([1]筑波大院・生物資源科学学位 P)

Effect of food additives on the intestinal bacteria and model microbiota system

○Tsumugi Ashizawa[1], Hideki Aoyagi[1]*
([1]Grad. Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】 抗菌性などの機能を有する多様な食品添加物は“食”を通して日常的かつ複合的に体内に取り込まれるが、それらが腸内細菌に与える影響は十分に検討されていない。本研究では、培養可能な種々の単一の腸内細菌を用いた評価系と独自に構築した複数の腸内細菌で構成されるモデル複合系を用い、各種の食品添加物が腸内細菌（叢）に与える影響を比較解析し、その利用を試みた。
【方法・結果】 善玉菌、日和見菌、悪玉菌のモデルとしてそれぞれ *Lactobacillus gasseri*、*Bacteroides fragilis*、*Escherichia coli* を用い、これらの細菌の生育に食品添加物が及ぼす影響を検討した。単一系においての影響を評価するため、ソルビン酸カリウム（保存料）やアセスルファムカリウム（人工甘味料）など種々の食品添加物を適宜、添加した培地で各細菌を純粋培養し、増殖経過と培養終了時の生菌数を比較した。その結果、食品添加物の種類や作用する細菌種の違いにより、腸内細菌の生育に及ぼす影響が大きく異なることが明らかになった。また、乳化剤などの抗菌を目的としていない添加物も、その一部は腸内細菌の増殖を抑制する可能性が示唆された。さらに、腸内環境により近づけた条件にするために、上記の 3 菌株を任意の条件で混合・集菌し、簡易的に腸内細菌組成を再現したモデル複合（共培養）系を作製した。作製したモデル複合系に各種の食品添加物を添加し、培養終了時の生菌数を測定した結果、培養環境（共存する細菌種やその組成）に応じて食品添加物への感受性が変化する細菌種の存在が明らかとなった。
以上の結果より、食品添加物が腸内細菌叢に与える影響の評価において、多様な条件を任意に設定、操作できる腸内細菌の複合系モデルの構築の必要性が示された。現在、環境によって食品添加物への感受性が変化する細菌についてその性質の解明を進めるとともに、より有効なモデル複合系の構築を目指している。

Key words food additives, intestinal bacteria, mixed culture, pure culture

G3H3 (0108) 腸上皮細胞と腸内細菌の共培養法の開発（第2報）

○梅原 嘉宏[1], 遠藤 輪[2], 青柳 秀紀[2]*
([1]筑波大院・生物資源科学学位 P, [2]筑波大・生命環境系)

Development of co-culture method of intestinal epithelial cells and intestinal bacteria (part 2)

○Yoshihiro Umehara[1], Rin Endo[2], Hideki Aoyagi[2]*
([1]Grad. Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】
宿主の様々な疾患への腸内細菌の関与が示唆され、*in vitro* での腸管腔環境の再現を目指した宿主細胞と腸内細菌の共培養モデルが種々、提案され、研究されている。しかし、その多くは腸内細菌が宿主細胞に及ぼす影響に主眼がおかれ、実際の腸管腔に存在する様々な要素は十分に検討されていない。また、共培養モデルの多くは実験系や装置が複雑である等の問題がある。そこで我々は従来の共培養モデルの問題を解消した簡便な共培養系の構築を目指し検討を行ってきた(1)。本研究では、腸上皮モデル細胞の生育状態と共培養する微生物の増殖経過をモニタリングできると共に、腸管腔の各種要素の条件検討も可能な共培養法の開発を試みた。
【方法と結果】
腸上皮細胞のモデル細胞株として、MDCK（RCB0995）および Caco-2（RCB0988）を用いて実験を行なった。共培養系の構築にあたり、微生物との直接接触が腸上皮細胞の生存率やバリア機能に及ぼす影響を評価するために、腸上皮細胞の培養系にモデル微生物（*Escherichia coli* や *Lacticaseibacillus casei*）を添加して培養（24 h）を行った。その結果、菌体との接触により腸上皮細胞の生存率やバリア機能がコントロールと比較して *E. coli* では低下、*L. casei* では上昇する現象が認められた（なお、腸上皮細胞に影響を与えずに共培養微生物のサンプリング事は困難であった）。実際の腸管腔では腸上皮細胞と微生物の生育空間が隔離されている点に着目し、小型の微生物培養区画を設けた共培養系を構築した。構築した共培養系を用いて 1 種類の細菌（*E. coli* または *L. casei*）と腸上皮細胞の共培養（24 h）を行なった結果、腸上皮細胞のバリア機能と生存率や、微生物の増殖を経時的に測定し、両者が良好に生育していることを定量的に把握できた。以上の結果から、腸上皮細胞と微生物の共培養系構築にあたり、両者の物理的接触を考慮する必要性が示唆された。また、本共培養系の微生物培養区画は交換や粘膜を模したゲル層の設置も可能であり、現在、2 種類以上の微生物との連続的な共培養やゲル層が微生物および腸上皮細胞の生育に及ぼす影響について検討中である。

(1) R1 日本生物工学会要旨 p. 290.

Key words Caco-2, co-culture, intestinal bacteria, intestinal epithelial cell, MDCK

G3H3 (0109) 微生物平板培養の諸特性の解析と利用

○岡部 麻織[1], 原田 玲奈[2], 坂元 仁[3], 土戸 哲明[4], 青柳 秀紀[1,2]*
([1]筑波大院・生物資源, [2]筑波大・生命環境, [3]関西大・化学生命工学, [4] 大阪府大・微制研)

Analysis of various characteristics of microbial plate cultures

○Okabe Mao[1], Harada Reina[2], Sakamoto Jin[3], Tsuchido Tetsuaki[4], Aoyagi Hideki[1,2]*)
([1] Grad. Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba, [2] Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [4]Res. Ctr. Microorg. Control, Osaka Pref. Univ.)
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、これまで未解明であった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。この現状を踏まえ、演者らは、微生物培養に伴う AP 培地の pH 変化挙動の把握を目指し、基礎的検討を行ってきた(1)。本研究では、平板培地の pH 変化挙動と酸化レベル（微生物の酸化ストレス）を把握し、そこで示唆された問題を解消する新規培養法を提案した。

【方法と結果】 pH 指示薬の Bromothymol Blue（BTB）と R2A 培地（R2A）や 20 倍希釈した Davis 培地（0.05 Davis）を含む AP 培地（BTB-R2A-AP 培地、BTB-0.05Davis-AP 培地）と、ゲル化剤にグランガムを使用した BTB-R2A-GP 培地を作製した。実測した pH 値と色の RGB 値の重回帰分析により得られた回帰式を構築した結果、平板培地の写真を撮影し、RGB 値の解析を行うことで平板培地上の pH 値が推定可能となった。また、平板培地全体の培養に伴う pH 分布の定量化や、その変化を把握できる定量的な pH 分布図の作成法を開発した。実際に、各平板培地を用いて土壌試料を培養し、培地 pH の挙動を経時的に比較解析した結果、培養に伴って pH 分布が大きく変動（上昇あるいは低下）し、平板培地上で不均一な pH 分布が生じることが明らかとなった。現在、新たな培養環境評価として微生物の酸化ストレスに着目し、演者らが開発した大腸菌レシオメトリック酸化センサー(2)を用いて、平板培地で生じる培養環境を評価（微生物の酸化ストレスの評価）中である。また、大腸菌レシオメトリック酸化センサーを用いた評価の結果、演者らが開発したゲル化剤を使用しない SCF 法(3)は従来の平板培地に比べて酸化ストレスが低いことが示された。

(1) R1 日本生物工学会要旨 p.114, (2) H29 日本生物工学会要旨 p.217, (3) H29 日本生物工学会要旨 p.199.

Key words Agar plate, gellan gum plate, pH, oxidative stress

G3H3 (0110) 代謝経路の分断による 1,2-プロパンジオールの好気発酵生産技術の開発

○野中大輔[1], 藤原良介[2], 田中勉[1*], 近藤昭彦[3]
([1]神戸大院・工, [2]理研・環境資源, [3]神戸大院・科技イノベ)

Aerobic production of 1,2-propanediol in engineered *Escherichia coli* by dividing metabolic pathway

○Daisuke Nonaka[1], Ryosuke Fujiwara[2], Tsutomu Tanaka[1*], Akihiko Kondo[3]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]CSRS, RIKEN, [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

1,2-プロパンジオールは水溶性の有機化合物であり、様々な化合物を容易に溶解可能で、かつ毒性が低いという特長がある。他にも融点が低いなどの優れた特性により、冷媒や食品・医薬品などに広く用いられている。近年では生分解性プラスチックの原料としての利用可能性が示されており、需要が高まっている化合物の一つである。

微生物を用いた 1,2-プロパンジオールの生産は、1954 年に *Clostridium thermobutyricum* で報告されて以来、大腸菌や酵母をはじめとして多くの微生物を用いた研究が行われてきた。グルコースを基質とした 1,2-プロパンジオール生産に関する報告では Altaras らによって 2000 年に達成された 4.5 g/L が最高値であるが、その収率は 1g のグルコース当たり 0.19 g であり、対糖収率の低さが課題として残っている。1,2-プロパンジオールは解糖系の中間物質であるジヒドロキシアセトンリン酸から合成され、好気条件での発酵では菌体増殖に多くの炭素が奪われてしまう。そのため、これまでの発酵生産は酸素量を制限した条件でなされてきた。しかし、酸素量を減らすことによって菌体の生育が妨げられてしまうことが課題となっている。

本研究では、物質生産と菌体増殖に異なる糖を使い分けるように代謝経路をデザインする Parallel Metabolic Pathway Engineering で代謝経路の分断を行い、グルコースから 1,2-プロパンジオールを好気条件で効率よく生産する技術の開発を目指した。外来のキシロース資化経路を大腸菌に導入することで、物質生産と独立してキシロースを菌体増殖に利用することを可能にし、生育の課題を解決できる。

まず解糖系とクエン酸回路を繋ぐ経路を分断した大腸菌株 PM4(MG1655Δ*glo*AΔ*eno*Δ*eda*Δ*sdaA*Δ*sdaB*Δ*tdcG*)を作製した。その後、1,2-プロパンジオール生産経路の遺伝子とキシロース資化経路である Weimberg 経路の遺伝子を作製株に導入することによって、好気条件での 1,2-プロパンジオールの生産に成功した。大腸菌を用いた 1,2-プロパンジオールの好気発酵生産は本研究が初の報告である。

Key words *Escherichia coli*, 1,2-propanediol, metabolic engineering, Parallel Metabolic Pathway Engineering

G3H3 (0111) 非水系胞子変換反応による Progesterone 変換株の新規なスクリーニング法の開発

○白松李菜[1], 山本郁名[1], 小田忍[1*]
([1]金沢工大・ゲノム研)

Development of a novel screening method for progesterone converting fungi by nonaqueous spore bioconversion sytem

○Shiramatsu Rina[1], Yamamoto Kana[1], Oda Shinobu[1*]
([1]Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)
odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的】

ステロイド医薬品には抗リウマチ剤や抗炎症剤, 抗アレルギー剤や免疫抑制剤などの数多くの重要な薬剤が含まれている．これらを製造するうえで，カビなどの微生物を用いたステロイド骨格の位置・立体選択的な水酸化や C-17 位の側鎖切断反応は非常に重要である．Progesterone（PG）のような難溶性基質の溶解性を上げるには反応溶媒に中極性有機溶媒を用いることが望ましいが，基質溶解性の向上と溶媒毒性の抑制はジレンマに陥ってしまう．しかし，カビの胞子は多くのストレス，中でも中極性有機溶媒に対して優れた耐性を示すため，中極性溶媒の毒性に耐えて，このジレンマを克服できると期待される．

筆者らは，水にも疎水性溶媒にも難溶な基質を微生物変換できるシステムとして，有機溶媒耐性に優れるカビ胞子を中極性溶媒中で生体触媒として利用できる非水系胞子変換システムを報告した．本研究では，このシステムを利用したステロイド変換カビの新規なスクリーニングシステムを開発した[1,2]．

【方法と結果】

400 ml 容 polypropylene 製ビーカーに N 源半減修正サブロー培地を 35 ml 分注し，0.5% PG/methanol 溶液を 9 滴滴下した．滴下した部分にカビを 9 点植菌し，7 日間前培養を行った．形成されたカビ胞子を 10 ml の 0.01%Tween-20 溶液で回収し，胞子懸濁液を作製した．底部に穴を空けた 6 ウェルプレートの各ウェルに濾過版を設置して反応器に用いた．各濾過版表面に胞子懸濁液をチャージして胞子を固定した後，6 ウェルプレート底部が 5% glucose 溶液に接触するよう設置した．基質溶液（0.2% PG/isoamyl ether—dimethylsilicone oil（KF-96L-1CS；1:1）を 5 ml 重層し，反応を 5 日間行なった．基質溶液を全量回収し，濃縮したサンプルを用いて TLC 解析を行った．このスクリーニング法では，従来のスクリーニング法と比較して，胞子数及び有機層重層量を約 5 倍に引き上げることができ，産物の検出感度が大きく向上した．

TLC 解析を行った結果，新規なスクリーニング方法での 4AD ヒット率は 23%（78 株中 18 株）となり，従来の非水系胞子変換スクリーニング法の約 3 倍となった．ヒットした 4-androstene-3,17-dione（4AD）生産カビの中から優秀株 KIT-J2327B を選定し，カビ胞子を用いた新規界面バイオプロセスの構築も図った．

References

1) S. Oda, *et al*., Biosci. Biotechnol. Biochem., **78**, 1971–1974 (2014).

2) S. Oda, *et al*., J. Oleo Sci., **67**, 1123–1129 (2018).

Key words bioconversion, screening, bioreactor, progesterone

G3H3 (0112) カーボンブラックを用いた生物学的利用法の開発

○山本尚毅[1], 的場直樹[2], 沖野智也[2],中西昭仁[1,3*]
([1]東京工科大・応生, [2]関西熱化学株式会社, [3]東京工科大院・バイオニクス)

Development of biological use of carbon black

○Naotaka Yamamoto[1], Naoki Matoba[2], Tomoya Okino[2], Akihito Nakanishi[1,3*]
([1]Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol., [2]Kansai Coke and Chemicals Co., Ltd., [3]Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol.)
nakanishi@stf.teu.ac.jp

【目的】

カーボンブラックは多孔質性で導電性を有し、生産供給性に優れた機能材である。更にカーボンブラックは表面の化学修飾性に富み、優れた加工性を有する機能材でもある。そこで、カーボンブラックの多孔質性に基づく非特異的な吸着ではなく、加工済みカーボンブラック表面の官能基を足場にした、新たなタンパク質提示系の構築を目指した。関西熱化学株式会社より提供されたカーボンブラックは、表面にカルボキシ基が多くなるよう化学修飾されている。カルボキシ基をターゲットにビオチン標識し、ビオチンを介したタンパク質提示系の構築を試みた。更に、カーボンブラックの導電性の活用のため、酸化酵素ラッカーゼを表面提示し、バイオセンサーの構築も併せて目指した。

【方法】

カーボンブラックの表層をビオチン標識するために、一定量のカーボンブラックは 60 mM のビオチンヒドラジドの添加でビオチン標識された。この際、ビオチン標識はビオチンヒドラジドの添加量を変えて各々処理され、HRP 標識ストレプトアビジンの TMB に対する活性で間接的に評価された。一方で、カーボンブラック表面にラッカーゼを提示するために、ラッカーゼとストレプトアビジンの融合タンパク質が設計された。*Trametes* sp. Ha1 株由来ラッカーゼ I 遺伝子はストレプトアビジン遺伝子と DNA で融合後、発現プラスミド pET21b(+)に導入されて *Escherichia coli* BLR 株で発現を試みられた。

【結果・考察】

ビオチンヒドラジドによって処理されたカーボンブラックのビオチン標識化を評価した結果、添加したビオチンヒドラジドの量依存的に TMB 活性に変化が見られた。また、ある添加量でビオチンヒドラジドが飽和した様相が確認された。従って、ビオチンヒドラジドによるカーボンブラックのビオチン標識化がなされたこと、最適点が判明したことが示された。ラッカーゼ I とストレプトアビジン融合遺伝子が構築された後、pET21b(+)にサブクローニングされた。そこでラッカーゼ I の発現評価系を立ち上げ、反応評価系の最適化を図った。

Key words
protein-displaying carbon-black, avidin-biotin interaction

G3H3 (0113) 配列制御型酵素を用いたグリコール酸含有ポリヒドロキシアルカン酸の生合成

○穂積 侑伽[1], 冨田 宏矢[2], 荒井 修造[3], 榊原 早也果[3], Mareschal Robin[4], 大井 俊彦[2], Zinn Manfred[4], 松本 謙一郎[2*]
([1]北大工, [2]北大院・工, [3]北大院・総合化学, [4]HES-SO Valais-Wallis)

Biosynthesis of glycolic acid-containing polyhydroxyalkanoates using sequence-controlled enzymes

○Yuka Hozumi[1], Hiroya Tomita[2], Syuzo Arai[3], Sayaka Sakakibara[3], Robin Mareschal[4], Toshihiko Ooi[2], Manfred Zinn[4], and Ken'ichiro Matsumoto[2*]
([1] Eng., Hokkaido Univ., [2] Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3] Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [4] HES-SO Valais-Wallis)
mken@eng.hokudai.ac.jp

グリコール酸 (GL) ベースポリマーは、生体適合性と生体吸収性を有し、医療材料などへ応用されている有用な材料である。しかし、加水分解速度が非常に速いため生体内において炎症を惹起する、硬質な物性であるなどの問題点もあり、分解性及び物性の改善が望まれている。対照的に、微生物が生産する代表的な生分解性ポリマーであるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、高い生体適合性を有するが、生体吸収が非常に遅いことが知られている。そこで、GL ポリマーと PHA を組み合わせた共重合ポリマーを合成することで、適度な加水分解性と高い生体適合性を併せ持つ有用材料となることが期待された。これまでに、GL-CoA 重合酵素として PHA 合成酵素の人工改変体である PhaC1(ST/QK) を見出している (Matsumoto *et al.*, *J. Biotechnol.*, 2011)。本酵素により得られる GL と 3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) のランダム共重合ポリマーP(GL-*ran*-3HB)は、P(3HB)よりも高い加水分解性を示したが、GL 分率が 17 mol%以下に制限される問題があった。そこで本研究では、新たな GL-CoA 重合酵素を見出すことを目的とし、ブロック共重合体 PHA の合成能力を有するキメラ型改変酵素 $PhaC_{AR}$ を用い、GL ポリマーを合成することを試みた。

PhaC1(ST/QK) または $PhaC_{AR}$ と、基質となる 3HB-CoA、GL-CoA 供給のための CoA 転移酵素を発現する組換え大腸菌を作成、モノマー前駆体として 3HB、GL を添加した培地で培養しポリマー合成を行った。$PhaC_{AR}$ により得られたポリマーの ^{1}H NMR 測定の結果 23 mol%の GL が検出されたことから、$PhaC_{AR}$ が PhaC1(ST/QK)よりも高い GL ユニット取り込み能力を持つことが分かった。また、$PhaC_{AR}$ を用いて合成した共重合体は、GL ユニットが多く含まれるランダム共重合体 P(GL-*ran*-3HB)、および GL ユニットが全く含まれない 3HB ホモポリマー P(3HB) の 2 つのセグメントを含んだブロック共重合体 P(GL-*ran*-3HB)-*b*-P(3HB) であることが明らかとなった。すなわち、PhaC1(ST/QK) により得られる P(GL-*ran*-3HB) とは大きく異なり、GL ユニットがポリマー分子鎖中に偏って分布することが判明した。本研究は、同一分子内にランダム共重合体とホモポリマーの両構造を含む PHA の生合成に成功した初めての例である (Arai *et al.*, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020)。今後は、本研究で得られた GL を含有する PHA の加水分解性について検証する。

Key words glycolate, polyhydroxyalkanoate, PHA synthase, copolymer, biosynthesis

G3H3 (0114)

Identification of the enzymes involved in protein lipoylation in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○Jian-qiang Jin[1], Shin-ichi Hachisuka[1], Takaaki Sato[1], Tsuyoshi Fujiwara[1], and Haruyuki Atomi[1*]
([1]Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ.)

Identification of the enzymes involved in protein lipoylation in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○Jian-qiang Jin[1], Shin-ichi Hachisuka[1], Takaaki Sato[1], Tsuyoshi Fujiwara[1], and Haruyuki Atomi[1*]
([1]Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ.)
jin.jianqiang.26c@st.kyoto-u.ac.jp

Lipoic acid is a sulfur-containing cofactor, which participates in the glycine cleavage system (GCS) (***Microbiol. Mol. Biol. Rev.*** **80**:429 [2016]). It is covalently bound to the conserved lipoyl domain of the H-protein in GCS. Lipoyl synthase and lipoate-protein ligase are involved in the protein lipoylation. Lipoate-protein ligase can attach the lipoyl moiety to the H-protein, while lipoyl synthase catalyzes the insertion of two sulfur atoms to the C6 and C8 carbon atoms of the octanoyl moiety on the octanoyl-H-protein. The classical lipoyl synthase from the bacterium *Escherichia coli* (LipA) (***Biochemistry*** **39**:15166 [2000]) and its homolog in the acidothermophilic archaeon *Saccharolobus solfataricus* have been characterized (***Anal. Biochem.*** **351**:44 [2006]). However, a classical LipA gene homolog cannot be found on the genome of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. In this study, we aimed to identify the enzymes involved in protein lipoylation in this organism. Genome information analysis suggested that the TK2109 and TK2248 genes are involved in lipoic acid metabolism. The targeted disruption of these genes led to the lipoate auxotrophy in the absence of serine. In addition, *in vitro* analyses of the purified recombinant proteins showed that TK2109 and TK2248 proteins could cooperatively exhibit lipoyl synthase activity toward an octanoyl-octapeptide. These results indicated that TK2109 and TK2248 are a structurally novel lipoyl synthase (***Appl. Environ. Microbiol.*** **86**:e01359-20 [2020]). In addition, we also confirmed that the purified TK1234 and TK1908 recombinant proteins from *T. kodakarensis* catalyzed the ligase reaction of lipoate and octapeptide. Interestingly, the enzymes can also recognize octanoate as a substrate instead of lipoate, suggesting the presence of a previously unrecognized metabolic route for the lipoyl protein biosynthesis. The results obtained in this study provide an important step in understanding how lipoyl protein is synthesized in archaea.

Key words lipoic acid, lipoyl synthase, lipoate-protein ligase, hyperthermophile

G3H3 (0201)

サケ・マス類のレッドマウス病原因菌 *Yersinia ruckeri* の経皮感染モデルの構築

○中谷肇, 堀克敏
（名古屋大学工学研究科生命分子工学専攻）

Establishment of a percutaneous infection model using zebrafish and Yersinia ruckeri, a salmonid pathogen causing enteric redmouth

○Hajime NAKATANI, Katsutoshi HORI
(Graduate School of Engineering, Nagoya University)
khori@chembio.nagoya-u.ac.jp

魚病の防除における魚類表皮微生物叢の重要性を明らかにするために，レッドマウス病の原因菌である *Yersinia ruckeri* および,ゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）を用いた経皮感染実験モデルの構築と感染時における表皮細菌叢の分析を行った．温度変化や皮膚損傷のストレスを与えた魚と， ストレスを与えていない魚に *Y. ruckeri* を 6 時間浸漬暴露し，暴露後の魚の生存数を計測した．7 日間の実験期間中の死亡個体と最終日の生存個体をすべて回収し，表皮ゲノム DNA 中の細菌ゲノムより 16S rDNA を増幅し，増幅産物を次世代シーケンサーにより網羅的にシーケンスすることにより，菌叢解析をおこなった．その結果， *Y. ruckeri* の感染は水温 20℃の負傷した魚で観察され，ほとんどの魚は暴露後 7 日以内に死亡した．次に 20℃での表皮細菌叢を，28℃でのそれと比較したところ，生存個体の主要な細菌叢が温度変化によって交代していた．また，斃死魚の皮膚細菌叢は *Yersinia* 属に占有されていた．感染条件が表皮細菌叢の多様性に及ぼす影響を 28℃と 20℃のグループ間で比較した結果，20℃では主として病原菌暴露によりアルファ多様性が減少する傾向が観察された．また，*Y. ruckeri* が 20℃で分離された特定の表皮細菌の増殖を阻害することが示唆された．表皮細菌叢が抗生物質によって破壊された魚を，*Y. ruckeri* に浸漬暴露したところ，細菌叢が *Yersinia* 属に占拠された．これらの結果は温度変化による細菌叢の変化と傷の付加によって，*Y. ruckeri* の表皮への定着と感染が促されたことを示唆している．

Key words Infection model, bacterial flora, fish skin, fish pathogen, *Yersinia ruckeri*

G3H3 (0202)

抗菌性物質が皮膚常在菌の生理活性に与える影響の解析（第 3 報）

○藤野 亜琴[1], 菊田 実花[2], 青柳 秀紀[1, 2*]
（[1]筑波大院・生物資源科学学位 P, [2]筑波大・生命環境）

Influence of antibacterial substances on the physiological activities of indigenous skin bacteria (part 3)

○Aki Fujino[1], Mika Kikuta[2], Hideki Aoyagi[1, 2*]
([1]Grad. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba, [2] Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】
私達の皮膚は、化粧品や消毒剤、抗菌性樹脂などに含まれる抗菌性物質と日常的に接触している。抗菌性物質の抗菌対象の微生物への影響評価や、皮膚細胞に対する安全性評価は数多く報告されているが、抗菌性物質が皮膚常在菌に及ぼす影響や耐性菌の出現に関する検討は少なく、未解明な点が多い。これらの背景を踏まえ、演者らは、抗菌剤トリクロサン（TCS）の曝露による皮膚常在菌の TCS 耐性獲得と耐性の持続性を報告した[(1, 2)]。本研究では、近年、普及が急速に進んでいる抗菌剤である銀系抗菌剤（Ag）に着目し、Ag が皮膚常在菌や TCS 耐性を有する皮膚常在菌の生理活性に及ぼす影響の解析と、皮膚常在菌の Ag 耐性獲得の可能性の有無について検討した。
【方法と結果】
皮膚常在菌 2 菌株（*Staphylococcus epidermidis* [Se]、*S. aureus* [Sa]）の標準株と独自に取得した TCS 耐性株を用い、抗菌性試験の公定法（JIS Z 2801 法）を一部改変して実験を行った。市販の Ag フィルム（5 cm × 5 cm）に Se や Sa の標準株、または各菌の TCS 耐性株を播種し、ポリエチレンフィルム（4 cm × 4 cm）を被覆して任意の時間培養した（35℃、相対湿度 90%以上）。Control として、同じ面積のガラス片を使用した。培養後、試験片の洗い出し液を適宜希釈後、標準寒天培地や TCS 50 nM を添加した標準寒天培地（TCS50-標準寒天培地）に撒布して培養し、コロニー数を計測して試験片当たり（1 cm^2）の生菌数を算出した。Ag フィルム上で 1 h 培養後、Se 標準株、Sa 標準株、TCS 耐性 Se 株は、標準寒天培地と TCS50-標準寒天培地の両方で生存が認められた。これに対して、TCS 耐性 Sa 株は、両培地でコロニー形成が見られなかった。以上の結果から、皮膚常在菌の TCS 耐性は Ag フィルムとの接触後も失われないことが明らかとなった。また、標準株では培養前には無かった TCS 耐性を獲得しており、Ag フィルムとの短時間（1 h）の接触により、皮膚常在菌の他の抗菌剤に対する耐性やストレス耐性が上昇した可能性が示唆された。現在、Ag フィルム上で 1 h 培養後の生存株について、Ag 耐性や TCS 耐性の有無を検討中である。
(1) H30 日本生物工学会要旨 p. 265. (2) R1 日本生物工学会要旨 p. 258.

Key words
antibacterial substances, indigenous skin bacteria, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*

G3H3 (0203)

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（第2報）

増田 亜理沙[1], ○高津 あゆみ[2], 青柳 秀紀[1, 2*]
（[1]筑波大・生命環境, [2]筑波大・生物資源）

Effect of low shear and modeled-microgravity condition on the physiological activities of enteric useful bacteria and its application (part 2)

Masuda Arisa[1], ○Kozu Ayumi[2], Aoyagi Hideki[1, 2*]
([1]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Coll. Agro-Bio. Resour. Sci., Univ. Tsukuba)
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。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 環境が腸内有用細菌の諸特性に及ぼす影響の解析した結果、*Lactobacillus acidophilus* JCM1028 や *Bifidobacterium breve* JCM1192 の耐酸性が向上する新規現象を見出し、耐酸性プロバイオティクスの取得に利用できる可能性を示した[(1)]。プロバイオティクスが健康効果を示す上で、胃酸や胆汁を含む上部腸管のストレスが多い環境に耐性を示すことが重要である。本研究では、LSMMG 環境を活用することで、耐酸性、胆汁酸耐性に優れたプロバイオティクスの取得を試みた。
【方法と結果】 High Aspect-ratio Rotating wall bioreactor Vessel（Synthecon 社）を用い、LSMMG 培養や LSMMG 条件下での耐酸性試験を適切に活用することで、高い耐酸性を示す *L. acidophilus* や *B. breve* を取得できた（胆汁酸耐性を有する菌体の取得に対する LSMMG 環境の活用の有効性の有無についても検討中）。LSMMG 環境を活用することで取得した、高い耐酸性を示す *L. acidophilus* や *B. breve* を凍結保存（グリセロールストック）し、諸特性を種々解析した結果、凍結保存により酸耐性は安定に保持できることが明らかとなった。取得した耐酸性を有する *B. breve* の胆汁酸耐性を種々の条件で評価した結果、耐酸性や胆汁酸耐性に優れた *B. breve* を取得できる条件が明らかとなった。以上の結果より、LSMMG 環境を適切に活用することで、耐酸性（胃酸耐性）、胆汁酸耐性に優れた多様なプロバイオティクスを取得できる可能性が示唆された。
(1) R1 日本生物工学会要旨集 p. 258

Key words
acid tolerance, bifidobacterium, lactic acid bacteria, low shear and modeled-microgravity

G3H3 (0204) ウグイス糞の諸特性と細菌叢の解析とその利用【第 2 報】

○石本 弥子, 青柳 秀紀*
（筑波大院・生物資源科学学位 P）

Analysis of characteristics and bacterial flora of *Horornis diphone* feces and it's utilization (Part 2)

○Yako Ishimoto, Hideki Aoyagi*
(Grad. Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba)
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古くは平安時代から近年まで利用されてきた。しかし、鳥獣保護管理法の施行により糞の入手が困難となり、現在は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）も未解明な部分が多い。この現状を踏まえ、演者らはウグイス糞が化粧品的効能を示す機構の解析とその利用を最終目的とし、これまでウグイス糞の諸特性や細菌群集構造の解析を初めて行った [(1)]。今回は、ウグイスの糞の細菌叢の詳細な挙動解析や他の鳥類の細菌叢との比較解析を行うと共にウグイスの糞からの微生物の培養化を試みた。
【方法と結果】
次世代シーケンサー（MiSeq）を用いて、ウグイスや他のスズメ目の鳥類（ルリビタキ、ジョウビタキ等）の糞の細菌群集構造を解析した。属レベルでの解析において、*Weissella* 属（存在比の平均値：ウグイス 22.4%、ジョウビタキ 18.79%、ルリビタキ 16.58%）、*Lactococcus* 属（存在比の平均値：ウグイス 18.84%、ジョウビタキ 11.03%、ルリビタキ 13.75%）は今回検討した全ての糞試料で多く検出された。一方、*Acinetobacter* 属（存在比の平均値：ウグイス 4.42%、ジョウビタキ 31.51%、ルリビタキ 20.87%）はウグイス以外の鳥の糞試料で多く検出された。ウグイスの餌に比べてウグイスの糞の窒素の含有率が高くなっていたことから、尿酸などの成分に着目した。ウグイス、ジョウビタキ、ルリビタキの糞試料を、尿酸を含む寒天培地で培養した結果、halo を形成する複数種の細菌（ウリカーゼ産生菌）が単離培養できた（糞試料の違いにより得られた細菌は一部異なった）。現在、尿酸や化粧品成分である Allantoin、尿素の定量について検討中である。（1）R1 生物工学会要旨 p.257

Key words bacterial community, cosmetics, fecal sample, *Horornis diphone*

G3H3 (0205) 新規ギ酸資化菌の探索方法の開発

○柴田 和紘 [1*], 伊原 正喜 [1,2]
（[1] 信州大院・総理工研, [2] 先鋭領域融合研究群バイオメディカル研）

A new screening method for isolating novel formate-utilizing bacteria

○Shibata Kazuhiro[1*], Ihara Masaki[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Shinshu Univ., [2]Inst. Biomed. Sci.)
20bs107a@shinshu-u.ac.jp

脱炭素社会の実現に向けて、再生可能エネルギーを利用したカーボンリサイクルが注目されている。カーボンリサイクルとは、二酸化炭素をプラスチックなどの有用物質に変換する技術である。二酸化炭素は安定な物質であることから、カーボンリサイクルには大きなエネルギーが必要であり、実現は困難とされてきたが、近年の再生可能エネルギーの普及と低コスト化により実現可能性が高まっている。我々はさらに環境負荷の低いカーボンリサイクルを模索するため、電気化学的手法と微生物工学的手法のハイブリッド法を検討している。本ハイブリッド法では、再生可能エネルギー電力を用いた電気化学的手法によって二酸化炭素を 2 電子還元することでもっともシンプルな有機物である“ギ酸”を生成した後、ギ酸資化菌に給餌し細胞内で高分子化合物にまで一気に生合成させるという 2 段階からなる。これによって、低分子合成が得意な電気化学と、高分子合成が得意な微生物工学の“良いとこ取り”ができると考えている。

代表的なギ酸資化菌である *Methylobacterium extorquens AM1*（*M. extorquens*）では、ギ酸由来炭素は、セリン回路と呼ばれる代謝経路へ供給され、アセチル CoA に変換される。アセチル CoA は中央代謝の鍵物質であり細胞構成成分の原料となるが、*M. extorquens* 内では、2 分子のアセチル CoA から 3-ヒドロキシブチリル CoA が生成され、さらにそれらが重合されてポリヒドロキシ酪酸（PHB）として蓄積されることが知られている。しかし、ギ酸資化培養における *M. extorquens* の到達濁度は、メタノール資化培養時などと比較して著しく低く、培養液あたりの PHB 生産能は実用化に程遠いレベルであった。そこで本研究では、まず培養条件の最適化を目指した。また、これまでに研究等に用いられてきたギ酸資化菌は *M. extorquens* 1 株のみと少ないことから、ギ酸資化菌探索方法を確立することで、PHB 高生産株などの多様な新規株の収集を試みた。

ギ酸を炭素源とする Batch 培養におけるバイオマス収量は、5 日間で 10 mg dry cell weight/L 以下であった。培養 5 日後の培養液の pH を調べたところ、9 程度まで上昇していることが判明し、pH 上昇が生育阻害の原因であることが考えられた。そこで、pH の上昇に合わせたギ酸逐次投入装置を実装したギ酸 Fed-Batch 培養を行った結果、3 日間培養の収量が、約 1.8 g dry cell weight/L と大幅に改善した。現在、塩酸による pH 自動調節培養を実施し、真の生育阻害の原因が pH 上昇であることの検証とともに、培養条件と PHB 生産性の関係について調査している。

新規ギ酸資化菌の探索については、ギ酸 Fed-Batch 培養による集積培養と、それに続くメタノール平板培地培養、およびセリン回路に特徴的な酵素、ヒドロキシビルビン酸レダクターゼの活性評価による同定を予定している。メタノール平板培地を用いる理由は、メタノール資化においてもセリン回路が利用されることが多いことと、pH 変化が少ないために pH 自動調整が不要であることであり、セリン回路保有株がクローニングできると考えられる。現在、土壌、植物やアリなどの昆虫、湖水や海水などのサンプルをこのスクリーニング系に供しており、その成果を本大会にて発表する。

Key words Carbon recycling, Formate-utilizing bacteria, PHB production, Screening methods

G3H3 (0206) *Clostridium ragsdalei* を用いた微生物電気合成による CO_2 からエタノールへの変換

○任歓 [1], 仁宮一章 [2] *
（[1] 金沢大院・新学術科, [2] 金沢大・新学術）

CO_2 conversion to acetate and ethanol by microbial electrosynthesis using *Clostridium ragsdalei*

○REN HUAN [1], Kazuaki NINOMIYA [2]*
([1] Grad. Sch. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ, [2] Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ)
ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【Objective】 Recently, CO_2 recycling into chemicals has been paid great attention. It is challenging to produce chemicals from CO_2 directly, instead of producing chemicals from CO_2 indirectly using plant biomass. Microbial electrolysis is a combination of electrolysis of water (O_2 generation by oxidation of H_2O at the anode and H_2 generation by reduction of H+ at the cathode) and cultivate hydrogen-oxidizing bacteria (chemoautotrophic bacteria that grow with CO2 as a carbon source and H_2 as an energy source) on the cathode. In the microbial electrosynthesis, that hydrogen-oxidizing bacteria produce organic compounds by using CO_2 as a carbon source and electricity as an energy source. In this study, microbial electrosynthesis was conducted to convert CO_2 into ethanol, using ethanologenic acetogen (an anaerobic hydrogen-oxidizing bacteria that mainly produce acetate).
【Methods and results】 Microbial electrosynthesis was conducted at 30ºC using an H-type electrochemical reactor, where anode and cathode chamber was separated with proton exchange membrane. Pt plate and carbon felt were used as anode and cathode electrodes, respectively. The cathode was poised with potentiostat at -800 mV versus Ag/AgCl. PETC medium was used for both anode and cathode. Ethanologenic acetogen, *Clostridium ragsdalei*, was cultured in the cathode chamber (50 mL) of the electrochemical reactor, in which CO_2 gas was flowed at 1 vvm. Acetate was detected in the broth, and ethanol was detected in the recovered liquid obtained by condensing exhaust gas from the cathode of electrochemical reactor. Faraday efficiency was calculated to evaluate the microbial electrosynthesis. Faraday efficiency indicates the percentage of current that contributed to produce the ethanol and acetate. Faraday efficiency was 54.1% 15.6% for acetate and ethanol, respectively.

Key words Microbial electrosynthesis, CO_2 Recycling, Ethanol

G3H3 (0207) ダイズの成長に伴う根圏微生物叢の変動解析

○木伏真子 [1], 西川洋平 [2,3], 細川正人 [1], 井手圭吾 [1,3], 小川雅人 [2,3], 穴井豊昭 [5], 竹山春子 [*1,2,3,4]
（[1] 早大院・先進理工, [2] 早大・ナノライフ創新研, [3] 産総研・早大 CBBD-OIL, [4] 早大・生命動態研, [5] 九大院・農）

Analysis of soil microbiome variation in soybean (*Glycine max*) rhizosphere during soybean growth

○Masako Kifushi[1*], Yohei Nishikawa[2,3], Masahito Hosokawa[1], Keigo Ide[1,3], Masato Kogawa[2,3], Toyoaki Anai[5], Haruko Takeyama[1,2,3,4]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [3]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [4]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [5]Fac. Agric., Kyushu Univ.)
haruko-takeyama@waseda.jp

植物根やそこから分泌される成分の影響を強く受ける近傍の土壌は根圏と呼ばれる．根圏には周辺土壌とは異なる微生物が定着し，植物と活発に相互作用することが知られているが，その詳細については未解明な部分が多い．99%が培養困難とされる土壌微生物の特徴の解明に向け，16S rDNA 解析やショットガンメタゲノム解析などのゲノム情報を基にした研究手法が広く用いられている．前者は微生物の系統を特定することに適し，サンプル間の微生物叢構造の比較が可能である一方，16S rDNA の配列が同じでも植物体との相互作用が異なる微生物株が存在する．また，後者は微生物叢の遺伝子情報から群衆全体の機能を推測することに用いられるが，多様性の高い土壌微生物にはまだ全ゲノム情報が明らかになっていない未知の株も多く含まれる．そこで我々は，土壌の作物生産力の向上につながる植物-微生物相互作用の解明を目標に掲げ，ダイズ根圏の微生物叢から網羅的に獲得したシングルセルゲノムを詳細に解析し，根圏微生物の時空間的な変動を評価している．本発表では，佐賀大学圃場の土壌を用いたポット栽培のダイズ根圏におけるダイズの品種・成長段階・植物体からの距離に応じた微生物叢の変化について，16S rDNA 解析およびシングルセルゲノム解析によって株レベルのゲノム情報を取得し，微生物叢の詳細な変動を解析した．

16S rDNA 解析の結果，根圏微生物叢の構造に影響を与える要因として，植物体からの距離が最も大きく，次に植物の成長段階による影響が確認された．一方，ダイズ 2 品種間で微生物叢構造に大きな差は見られず，周辺土壌，根圏土壌，植物体内部と，植物体に近いほど微生物種の多様性が低下していた．シングルセルゲノム解析では，ダイズの 3 つの成長段階で採集した根圏土壌と根粒から，シングルセルゲノムを 3796 個獲得した．根圏土壌からは 347 属にわたる多様な微生物ゲノムが獲得され，根粒からはダイズの生育に必須となる根粒菌 *Bradyrhizobium* 属のゲノムが多数取得された．さらに，植物の成長段階によって，16S rDNA の系統は同じでも保有する遺伝子の相同性が異なる根粒菌の存在を確認した．16S rDNA 解析とシングルセルゲノム解析の組み合わせにより，変動が見られた微生物種における個々の微生物の機能評価が可能となり，有用な根圏微生物の網羅的探索が可能になると期待される．

＊本研究は，内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業によって実施されました．

Key words single-cell genome analysis, soybean, metagenomic libraries, rhizosphere

G3H3 (0208) セルロースメンブランプレートを用いた植物生育促進細菌の獲得と評価

○藤原 優人[1], 秋本 千春[2], 青柳 秀紀[1]*
([1]筑波大院・生物資源科学学位プログラム, [2]農研機構・生物研)

Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria using cellulose membrane plate

○Fujiwara Yuto[1], Akimoto-Tomiyama Chiharu[2], Aoyagi Hideki[1]*
([1]Grad. Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba,
[2]Inst. Agrobiological. Sci., NARO)
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）は持続可能な農資源利用に重要である。しかしながら、従来の植物生育促進活性(Plant Growth Promoting Activity: PGPA)の評価は操作が煩雑で、PGPB の獲得には多大な労力と時間を要していた。この現状を踏まえ本研究では、簡便な操作で PGPA の効率的な評価が可能なセルロースメンブランプレート（UCM Plate）培養・評価・取得法を開発し、イネに対して生育促進効果を示す PGPB の獲得を目指した。

【方法・結果】

液体培地を含浸させた不織布上に設置した100穴のUCM Plateを用いて、イネ試料由来の細菌を培養化後、UCM Plateを種々のPGPAの評価寒天培地に適宜移動することで複数のPGPAを定性的に評価し、PGPBを取得する系（UCM Plate培養・評価・取得法）を開発した。UCM Plate培養・評価・取得法で獲得したシデロフォア（S）生産能、リン酸（P）可溶化能およびインドール-3-酢酸（IAA）生産能の３種類のPGPAを持つPGPBの数と、従来の寒天平板培養法やUCM Plate培養法で獲得した数を比較した結果、3種類のPGPAを有するPGPBを効率的に獲得できた。また、*Rhodococcus*属や*Acidovorax*属などに属する異なる種類のPGPBが獲得できた。本法を用いて獲得したPGPBをイネの種子に接種し、簡易的な試験を行った結果、無菌処理と比較してイネの地上部の生育が優位に促進した（イネの生育を評価する他の項目についても検討中)。現在、獲得した種々のPGPBのS生産能、P可溶化能、IAA生産能の定量的評価を実施中である。

Key words cellulose membrane plate, *Oryza sativa*, plant growth promoting activity, plant growth promoting bacteria

G3H3 (0209) Effect of light condition on fungal pigment mediated silver nanoparticles biosynthesis and its characterization

○Nobchulee Nuanaon[1], Sharad Bhatnagar[2] and Hideki Aoyagi[2]*
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Effect of light condition on fungal pigment mediated silver nanoparticles biosynthesis and its characterization

○Nobchulee Nuanaon[1], Sharad Bhatnagar[2] and Hideki Aoyagi[2]*
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

The presence of light is known to influence the metal nanoparticles biosynthesis. However, the effect of different wavelengths of light on nanoparticles biosynthesis has not been studied widely. This research aimed to utilize the light emitting diodes (LEDs) at different wavelengths for silver nanoparticles (AgNPs) biosynthesis using *Talaromyces purpurogenus* pigment as a reducing agent. Firstly, the mixture solution of the pigment and $AgNO_3$ was exposed to different wavelength LEDs: blue (450 nm), green (525 nm), orange (590 nm), red (660 nm), and infrared light (850 nm) for 24 h. White light and dark conditions were used as control. All treatments exhibited an increase in the yield of AgNPs with time, but nanoparticles synthesized by exposure to green light (G-AgNPs), blue light (B-AgNPs) and infrared light (I-AgNPs) showed a significantly higher yield. Next, G-AgNPs, B-AgNPs and I-AgNPs synthesis were conducted to evaluate the optimum precursor concentration (2 mM～20 mM) and reaction rate of AgNPs synthesis. Among the tested concentrations, 5 mM $AgNO_3$ was found to be optimum concentration whereas exposure to blue light resulted in a higher reaction rate compared to green and infrared light. Dynamic light scattering and transmission electron microscopy were employed to determine the AgNPs characteristics. The particles were prominently non-spherical ranging between 20 nm～60 nm. Further, different concentrations of AgNPs: 100, 200, and 500 μg/mL were used to evaluate the antimicrobial activity against gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria by well diffusion method. A zone of inhibition was observed in all the treatments over 200 μg/mL. LEDs assisted AgNPs synthesis not only enhanced the synthesis reaction rate but also provided an inhibition potential against both gram-positive and gram-negative bacteria. G-AgNPs exhibited a higher antimicrobial ability compared to I-AgNPs and B-AgNPs, respectively.

Key words light emitting diode, nanoparticles biosynthesis, silver nanoparticles, *Talaromyces purpurogenus*

G3H3 (0210) 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（第 2 報）

○小鷹 健太[1], 名取 暁[1], 小山 純弘[2], 青柳 秀紀[1]*
([1]筑波大院・生物資源科学学位 P, [2]エイブル)

Development of culture method for uncultured microbes using ITO electrode system and sample pretreatment (part 2)

○Kenta Odaka[1], Akira Natori[1], Sumihiro Koyama[2], Hideki Aoyagi[1]*
([1]Grad.Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba, [2]ABLE Co.)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】 未知微生物の遺伝子資源や有用代謝産物の獲得、機能解明する上で、培養化は重要である。近年、従来の培養法では、自然界に存在する全微生物の中の 1%程度しか培養できないことが指摘され、残された 99%の未培養微生物の培養化を目指し、新たな方法論の開発が求められている。我々は、独自に開発した酸化インジウムスズ（ITO）電極システムと試料の前処理を有効に活用することで、培養微生物叢が変化し、未培養微生物の培養化につながる可能性を示唆した(1)。本研究では、ITO 電極システムにおける微生物の「分離、選抜」や「刺激」プロセスの機構を解析すると共に、種々の環境試料から未培養微生物の単離培養を試みた。

【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試料を、孔径 0.8 μm のフィルターで濾過する等の前処理を行い適宜、調製した。調製した試料を、ITO 電極（作用電極）、白金電極（対電極）、銀/塩化銀電極（参照電極）から構成されるチャンバーに投入後、定電位（−0.4 V）を印加し、ITO 電極上に微生物を集めた（プロセス 1)。続いて、任意の条件で高周波電位を印加した後（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バーを用いて回収)。プロセス 1 で得られた微生物を R2A 寒天培地で培養し、PCR-DGGE 法などを用いて培養細菌叢を解析した結果、定電位を印加した ITO 電極上に特異的に引き寄せられている細菌の存在が認められた（特定の微生物を分離、選抜できる可能性が示唆された)。また、同じ環境試料を用いた場合でも、高周波電位（プロセス 2）とその前プロセス（プロセス 1）を組み合わせることで、培養細菌叢の変化が認められた（高周波電位に感受性のある微生物が刺激され、培養化が促進される可能性が示唆された)。本プロセス（プロセス 1＋プロセス 2）により得られた微生物叢からの単離培養を試みた結果、既知微生物と相同性の低い（95%以下）細菌や、限定的な条件でしか培養が報告されていない細菌が複数得られた。以上の結果、本手法は未培養微生物の培養化に有効であることが示唆された。 (1) R1 日本生物工学会要旨 p. 289.

Key words ITO electrode, microbial dark matter, PCR-DGGE, pretreatment

G3H3 (0211) 微生物を利活用したカセット型「泥の電池」の開発

○成瀬 茂[1]、牟田裕二[2]、大薮隆樹[2]、冨永昌人[1]*
[1]佐賀大院・理工、[2]ニシム電子工業（株）

Development of cassette-type “mud battery” for utilizing microorganisms

○Shigeru Narise[1], Yuji Muta[2], Takaki Oyabu[2], Masato Tominaga[1]*
([1] Saga Univ.,[2] Nishimu Electronics Ind. Co., Ltd.)
*masato@cc.saga-u.ac.jp

【緒言】

アノードを泥中に埋め、嫌気条件にした微生物燃料電池を本研究室では「泥の電池」と呼んでいる。「泥の電池」は農地におけるインフラの独立電源としての利用が期待できる。しかし、淡水系である農地では泥中のイオン濃度が低いため、海水系の干潟のそれに比べてアノードとカソード間の抵抗が高く発電量が小さい。また、従来の「泥の電池」はアノードとカソードが一体化していなかったため、デバイスとしての簡便性に欠けていた　v。そこで、本研究室ではアノードとカソードが一体化したカセット式「泥の電池」を開発した。

【方法および結果】

カセット式「泥の電池」は以下のように作製した。プラスチック製の円柱状メッシュ（直径 2.8 cm、高さ 8.5 cm）をフレームにして、そのフレームをゲル（厚さ 0.5 cm）で覆った。この円筒の外側にアノード（3×10 cm）を巻き、内側にカソード（5×4 cm）を設置し、アノードとカソードが一体化したカセット式のセルを作製した。円筒の中には飽和 NaCl 溶液を入れた。アノードとカソードにはカーボンフェルトをケッチェンブラックで表面修飾したものを使用した。直径 4.5 cm、高さ 8.5 cm の容器に佐賀市内のクリークから採取した泥を深さ 5 cm まで加え、セルを泥中に挿入した。

カセット式「泥の電池」の発電量を測定したところ、3 日目に 18 mWm^{-2} の発電量を示し約 20 日まで上昇した。最大発電量は 30 mWm^{-2} を示した。

外部抵抗を 100 k、10 k、5 k、1 k、100 Ω に変えて発電量を測定した。100 kΩ の場合では約 250 mV、10 kΩ の場合では約 50 mV の最大電圧を示した。また、42 日間ほぼ一定の電圧を示し続けた。これにより 10 kΩ 以上の外部抵抗の場合に、閉回路の状態で一定の電流が流れ続け、電位差が維持できることが解った。以上のことより「泥の電池」長期稼働が可能になり、カセット式「泥の電池」の開発に成功した。

Key words microbial full cell, electrode, electricity generation, cassette-type

G3H3 (0212) 微生物の平板培養における培地 pH の挙動解析とその利用（第 2 報）

原田 玲奈[1], ○小澤 拓真[2], 青柳 秀紀[1,2*]
([1]筑波大・生命環境, [2]筑波大・生物資源)

Monitoring the pH changes on the plate medium during microbial culture and its application (part 2)

Harada Reina[1], ○Kozawa Takuma[2], Aoyagi Hideki[1,2*]
([1]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Coll. Agro-Bio. Resour. Sci., Univ. Tsukuba)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】寒天平板（AP）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。この問題を解消し、残された 99%の未培養微生物の培養化を目指すためには、その基礎として、これまで未解明であった、微生物培養に伴う AP 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。この現状を踏まえ、我々は、微生物の培養に伴う AP 培地の pH 変化挙動の把握を目指し、基礎的検討を行ってきた[(1)]。本研究では、詳細な AP 培地の pH 変化挙動を解析すると共に、得られた知見を活用した新規培養手法の開発と評価を行った。
【方法と結果】 種々検討した結果、Bromothymol Blue（pH 指示薬）を添加した AP 培地を用いることで、AP 培地の pH の変化を可視化すると共に、RBG 値に基づき pH 値の推算が可能となった。モデル環境試料として筑波大学構内で採取した土壌試料を用い、種々の AP 培地で培養した結果、培養経過に伴う AP 培地の pH 変化挙動を把握できた。また、培養の経過と共に微生物コロニー周辺の AP 培地の色が変化したことから、コロニーの形成が速く、pH 変化をもたらす菌が、pH 分布の不均一化を生じさせていることが示唆された。そこで、培養中に pH 変化を生じさせるコロニーを排除しながら培養することで、AP 培地における pH 変化の抑制や均一性の維持ができると考え、Colony removal method（CR 法）を考案・開発した。種々検討した結果、CR 法により、pH を変化させるコロニーを排除し、pH を均一に保ちながら培養することができた。また、次世代シークエンサー（MiSeq）を用いて比較解析した結果、CR 法を適用した AP 法とコントロール（CR 法を適用しない AP 法）で得られた培養微生物群集構造は大きく異なった。一般的に、培地 pH を維持するためには緩衝剤が使用されることを踏まえ、緩衝剤（MOPS）を添加した AP 法についても同様な検討を行った。得られた培養微生物群集構造を解析し、上述の結果と併せて比較した結果、CR 法により培養化が可能になる未培養微生物が複数存在し、CR 法の有用性が示唆された。

Key words microbial dark matter, pH, plate culture, screening

G3H3 (0213) 好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* による外来性たんぱく質の分泌生産

○荻野 千秋[1], 齊藤 朱音[1], 太田 勝己[1], 屋良 みなみ[1], 小林 友哉[1], 近藤 昭彦[2]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大・工, [3]神戸大院・科技イノベ)

Secretory production of exogenous proteins by thermophilic actinomycete *Streptomyces thermoviolaceus*

○ Chiaki Ogino[1]*, Akane Saitoh[1],Katsumi Oota[1], Minami Yara[2], Yuya Kobayashi[1], Akihiko Kondo[3]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Fac. Eng., Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
* ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】 近年、環境問題への意識の高まりから、石油化学プロセスに代わる物質生産としてバイオプロセスが注目されている。その中でも Consolidated bioprocess(CBP)は、微生物が原料となるセルロースを用いて自ら糖化・発酵する一貫したプロセスであり、低コスト・高効率であることからその開発が進められている。我々は CBP 宿主として、好熱性放線菌の *Streptomyces thermoviolaceus* (*S. thermoviolaceus*)に着目した。培養特性解析の結果、*S. thermoviolaceus* は 28-55℃という幅広い温度で生育可能であり、そのうち 45℃において非常に高い比増殖速度(μ=1.60)を有していることが分かった。これより、*S. thermoviolaceus* が、高温条件下での迅速な培養が可能であり、高効率 CBP 宿主に求められる条件に適した宿主であることが示された。一方、この宿主は物質生産への応用例が無く、遺伝子組換え法が確立されていない。そこで我々は、*S. thermoviolaceus* を用いた遺伝子組換え法の確立とツールの拡充を図り、CBP に適した新たな宿主として確立することを目指した。

【方法・結果】 始めに遺伝子組換え系の確立を目的として、導入方法の異なる複数のプラスミドを用いることにより、*S. thermoviolaceus* でのレポータータンパク質 GFP の生産を試みた。その結果、ゲノム組み込み型プラスミド pTYM18 導入株、保持型 pL99 導入株の 2 種において形質転換体の取得に成功したが、タンパク生産は pTYM18 導入株においてのみ確認された。
次に、セルロース分解に関与する酵素の一種である β-glucosidase (Tfu0937: *Thermobifida fusca* 由来)の生産を試みたところ、Tfu0937 生産株でも GFP と同様の結果が示された。そこで Tfu0937 生産株を用いてプロモーターの検討を行った結果、*S. coelicolor* M145 由来の *kasOp* 使用株において、培養開始から 24h 後に最大酵素活性 595.3 [Unit/L] を確認することが出来た。本発表では、*S. thermoviolaceus*-CBP 株によるセルロース分解系確立に向けて、必要とされる EG、CBH 生産株の構築と、複数インテグラーゼを用いたセルロース分解酵素の同時発現系開発に関しても併せて発表を行う計画である。

Key words *Streptomyces thermoviolaceus, consolidated bioprocessing, biomass*

G3H3 (0301) 噴霧凍結造粒乾燥法による乳酸菌粉体の特性評価

○川口晋也[1]*, 三隅雄一[1], 高橋雅人[1], 小林祐介[1]
([1]プリス)

Characterization of lactic acid bacteria powder by spray freeze granulation drying

○Shinya Kawaguchi[1]*, Yuichi Misumi[1], Masato Takahashi[1], Yusuke Kobayashi[1]
([1]PRECI Co., Ltd.)
kawaguchi@preci.co.jp

【緒言】
噴霧凍結造粒乾燥法(SFGD)とは、原液を噴霧し、微細液滴を急速冷却により凍結顆粒を作製、後工程の真空凍結乾燥にて乾燥粉体を得る方式である。SFGD は低温乾燥のため、高感熱物性体の製造に適している。本研究では、ヨーグルトをモデル検体とし、SFGD、加熱乾燥の噴霧乾燥法(SD)、冷凍庫で凍結し凍結乾燥後、粉砕した各種粉体を評価した。
【実験】
サンプルに市販ヨーグルトを使用した。製造装置に SFGD 装置 CS30（プリス）、SD 装置 P260（プリス）、凍結乾燥装置 FDU2110（東京理化器械）を使用した。運転温度条件は、SFGD は入口ガス温度 −15℃、−30℃、−60℃、−90℃とした。SD は入口ガス温度 180℃、120℃、90℃とした。評価として、外観、乳酸菌生菌数(MRS 寒天平板嫌気培養法)、静かさ密度、SEM を確認した。
【結果及び考察】
外観は、SD では高温条件程、黄色粉体となった。SFGD は全て白色粉体となり、SD の高温の熱風ガスによる影響が着色の原因と考えられる。乳酸菌生菌数は、SFGD の最高入口ガス温度条件の−15℃が最も生菌数が高い結果となり、SFGD の高温条件は、他の製造条件と比較し、乳酸菌の生菌数を高く保った粉体が得られた。静かさ密度・SEM は SD と比較して SFGD はかさ密度が 1/9 程度となり、SEM 画像からは、SD は顆粒表面が密に詰まった構造であることに対し、SFGD は多孔質なスポンジのような構造が確認できた。SD は熱風による瞬間乾燥の際、溶媒の蒸発に伴い液滴が収縮、固形物の移動が起こるため、顆粒密度が上昇することに対し、SFGD は瞬間凍結時に溶媒を含有したまま顆粒構造を保持し、凍結乾燥による昇華は長時間の溶媒乾燥となるため、固形物の移動・収縮が起こらないことが要因と考えられる。
【謝辞】
本研究は、経済産業省関東経済産業局による令和 2 年度予算「戦略的基盤技術高度化支援事業」の採択計画「高機能ファインセラミックス用噴霧凍結造粒乾燥装置の研究開発」の一環として実施しました。関係者各位に感謝の意を表します。

Key words spray freeze granulation drying, freeze drying, lactic acid, lactobacillus

G3H3 (0302) 耐酸性細菌を利用した有用金属リサイクルシステムの開発

○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)

Development of a valuable metal recycling system using acid-tolerant bacteria

○Chikara Takano[1], Kouichi Murayama[2], Hideki Aoyagi[1]*
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Futamura Chemical Co., Ltd.)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【緒言】5G 通信技術を基幹とし、Internet of Things を活用したスマート社会を実現するため、通信基盤や電気自動車等に使用される電子機器、部品の需要は急速に拡大している。これに加えて、SDGs に掲げる持続可能な社会実現の観点からも、廃棄される機器、部品類のリサイクルの重要性が高まっている。環境親和性の高いリサイクル技術として、好酸性細菌を用いたバイオリーチングの研究が進んでいる。一方で、浸出液から金属を分離回収する工程は、中和工程を必要とする中性条件での検討が主である。本研究では、強酸性条件下で浸出液から金属を分離回収することが可能な、耐酸性細菌を用いた有用金属リサイクルシステムの開発を試みた。
【方法と結果】独自に開発した耐酸性細菌スクリーニング法「pH 変動培養法 [1)]」を用いて、種々の環境試料から Co, Cu, Mn, Ni, Li のいずれかの金属に耐性を持つ耐酸性細菌を単離した。各単離菌株について、模擬電子廃棄物浸出液 (Co, Cu, Mn, Ni, Li 各 100 mg/L、pH 1.5) からの各金属の回収能力と選択性を評価した。各金属に対して高い回収能力を示した菌株を選抜し、逐次回収処理を行うことで、模擬浸出液からの金属分離回収システムを構築した。回収処理に用いる菌株の添加順序や処理時間について検討し、回収効率、分離能力の向上を試みた。
活性汚泥や河川水等の中性試料から、pH 1.5 の条件で金属回収能力を持つ耐酸性細菌を 5 株単離した。各単離菌株の 16S rRNA 遺伝子シーケンス解析を行った結果、*Bacillus, Comamonas, Pseudomonas* の各属と高い相同性（99.9～100%）を示した。単離菌株はいずれも、模擬浸出液から複数の金属を有意に回収したが、Mn 回収能力を持つ菌株は獲得できなかった。そこで、中性条件で金属回収能力があることが報告 [2)]されている種で、本研究において模擬浸出液から Mn を有意に回収した *Micrococcus luteus* JCM1464 株を Mn 回収細菌として用いた。
各菌株の金属回収量の経時変化から、金属分離回収システムにおける処理順序、処理時間を決定し、模擬浸出液から金属分離回収を行った結果、全体での各金属の回収率は Co 6.4%, Cu 11.5%, Mn 7.3%, Ni 6.1%, Li 4.5%となった。各菌株の金属回収量に対する、対象金属の割合は Co 22.7%, Cu 45.5%, Mn 32.9%, Ni 22.2%, Li 22.3%であった。
本研究で提案する、耐酸性細菌を用いた強酸性条件下での金属分離回収システムは、中和や溶媒抽出を伴う従来の手法 [3)]と比べて回収率は低かったが、(a) 浸出液中の金属濃度を低減することによる中和剤の使用低減、(b) 特定の金属の存在割合の低下、などの長所があり、金属リサイクルの環境負荷やコストの低減に貢献できる。今後、更なる耐酸性金属回収菌株の探索や育種、処理系の改良による、回収効率や分離能力の向上が期待される。
1) 高野ら：日本生物工学会要旨, p.161 (2017). 2) Martin, P. *et al.*: *Radiochimica Acta*, **106**, 217-228 (2017). 3) Leung, W. *et al.*: *Water Science & Technology*, **41**, 233-240 (2000).
Key words acid tolerance, environmental bacteria, metal recycle, waste

G3H3 (0303) 緑藻と枯草菌との共培養による増殖特性の変化

○大山遥行[1]，山田亮祐[1*]，松本拓也[1]，荻野博康[1]
（[1]阪府大院・工・化工）

Effect of co-cultivation of microalgae and *Bacillus subtilis* on growth

○Oyama Haruyuki[1], Yamada Ryosuke[1*], Matsumoto Takuya[1], Ogino Hiroyasu[1]
（[1]Dept. Chem. Eng. Grad. Sch. Eng. Osaka Pref. Univ.）
yamada@chemeng.osakafu-u.ac.jp

【背景と目的】

地球温暖化などの環境問題を背景に，温室効果を有する二酸化炭素の固定化や排出抑制が求められている．光合成を行う独立栄養微生物である緑藻は，大気中の二酸化炭素を炭素源とし，少ない栄養源から増殖することが可能であるため，緑藻を培養することにより二酸化炭素の固定化が可能である．しかし，緑藻は他の微生物と比較して増殖速度が低いため，特に二酸化炭素の希薄な大気雰囲気下において，二酸化炭素固定化の速度が遅いという問題がある．既往の研究で，緑藻と，光合成を行わない従属栄養微生物とを共培養することで，緑藻の増殖能および二酸化炭素固定化の速度が向上することが報告されている．本研究では，緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* と，安全性の高い従属栄養微生物である枯草菌 *Bacillus subtilis* との共培養を行い，単培養時との増殖特性の変化について検討した．

【方法と結果】

緑藻 *C. reinhardtii* NIES-2238 および枯草菌 *B. subtilis* RIK1285 を用い，pH 5.0，60 μmol/m^2/s，30ºC，120 rpm の条件で，大気雰囲気下で培養を行い，乾燥細胞質量，細胞数，クロロフィル濃度の経時変化を測定した．共培養時の最大乾燥細胞質量，最大緑藻細胞数，最大クロロフィル濃度はそれぞれ，3.35 g/L，7.63×10^9 cells/L，62.5 mg/L となり，単培養時と比較してそれぞれ 121%，172%，326%に増加した．この結果より，*B. subtilis* との共培養により，*C. reinhardtii* の増殖能が向上することが確認された．以上より，緑藻と枯草菌との共培養は，希薄な二酸化炭素の固定化に有用であることが示唆された．

【謝辞】

本研究の一部は，公益信託 ENEOS 水素基金および JSPS 科研費国際共同研究加速基金（国際共同研究強化（A））（JP18KK0413）の助成を受けて実施した．

Key words microalgae, *Bacillus subtilis*, mixed culture, carbon dioxide

G3H3 (0304) 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* に対する UV 照射時代謝フロー応答の間接的評価

○小澤七海[1]，渡邊雅彦[2]，中西昭仁[1,2*]
（[1]東京工科大院・バイオニクス，[2]東京工科大・応生）

Estimation of responses on metabolic flow in green alga *C. reinhardtii* for UV-irradiation

○Nanami Ozawa[1], Masahiko Watanabe[2], Akihito Nakanishi[1,2*]
([1]Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol., [2]Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol.)
nakanishiah@stf.teu.ac.jp

【目的】

本研究は、緑藻細胞を直接的に用いることによる、細胞内代謝物の簡便な利用系の構築を目指している。植物系の二次代謝産物には抗酸化物質をはじめ化粧品や食品分野において有用な物質が多く、化粧品や食品の生産分野において注目を集めてきた。ただ本株は強固な細胞構造をしており内容物の抽出に難があり、細胞をそのまま用いて内容物を利用できる技術があれば意義があると考えた。そこでまず環境への微生物コンタミネーションを避けるため、UV-C を用いた簡便な細胞の殺処理の条件の検討を行った。更に細胞内の油脂組成の変化の根拠を qRT-PCR にて評価し、UV-C の細胞内代謝物への影響を示すことを目的とした。

【方法】

C. reinhardtii は光培養条件下（通気速度 0.1 vvm; 通気ガス 0.8% CO_2; 光強度 100 μmol·m^{-2}·s^{-1}; 温度 23℃; 培地: 独立栄養培地 Modified Bold's Basal Medium）で培養された。窒素源枯渇当日、6 日後、9 日後の細胞を回収し、細胞数が 2 mL あたり 1.0×10^6 cells になるように希釈をした。その後、UV-C (253.7 nm) の照射時間を 1～10 分で処理し、ニュートラルレッド法により細胞の生死判定をした。細胞内代謝物としての油脂を鹸化後、GC/FID で定性・定量評価した。mRNA の転写量評価のため、□□CT 法に基づいた解析を行った。

【結果・考察】

培養細胞への UV-C の影響を調べたところ、生存率は長期間培養された細胞ほど生存率が低下すること、今回の照射条件であれば UV-C の 10 分間照射で生存率を 0%とできることが明らかになった。簡便な殺処理条件を提案した。また、UV-C 照射後の細胞は、培養日数が長い細胞程細胞の外殻が不明瞭となること、照射時間が長いほど細胞内に顆粒状の構造が確認できることも判明した。さらに、細胞内代謝物である油脂の細胞内含有率は変わらないが、油脂組成が変化することを研究室内の別の研究で明らかにしている。そこで、UV-C 照射における細胞内の代謝の挙動を明らかにするため、まず、本研究で用いた *C. reinhardtii* のハウスキーピング遺伝子を 2 種類選抜した。次に、油脂の代謝フローに関連する酵素の mRNA 転写量を解析した。結果、2 種のハウスキーピング遺伝子が安定して用いられること、油脂代謝フローに関連する酵素の mRNA 転写量を解析できることが明らかになった。

Key words *Chlamydomonas reinhardtii*, UV-C irradiation, viability, real time PCR

G3H3 (0305) *Chlamydomonas reinhardtii* UV-C 照射株の油脂組成変化についての評価

○渡邊 雅彦[1]，小澤 七海[2]，中西 昭仁[1,2*]
（[1]東京工科大・応生，[2]東京工科大院・バイオニクス）

Evaluation of shift of lipid-composition in UV-C irradiated strain of *Chlamydomonas reinhardtii*

○Masahiko Watanabe[1], Nanami Ozawa[2], Akihito Nakanishi[1,2*]
([1] Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol., [2] Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol.)
nakanishiah@stf.teu.ac.jp

【目的】

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の細胞培養法は確立されており、安定的なバイオマスの生産が可能である。また光合成産物としての炭素源の貯蓄能にも優れ、炭水化物や油脂を細胞内に高含有する特性があって、安定的に物質生産できる。現在までに、生産された細胞内容物を細胞ごと直接的に利用するための研究が進められており、UV-C による細胞の殺処理条件が最適化されてきた。UV-C 照射は細胞内容物に影響を与える可能性が高いことから、代表的な炭素代謝産物である油脂を対象に評価することを目的とした。また、UV-C 照射を受けた細胞群の物質生産の評価も UV-C 照射の細胞への影響を知る上で重要と考えて、油脂を評価することも併せて目的とした。

【方法】

C. reinhardtii は光培養条件下 (通気速度 0.1 vvm; 通気ガス 0.8% CO_2; 光強度 170 μmol·m^{-2}·s^{-1}; 温度 23°C; 培地: 独立栄養培地 Modified Bold's Basal Medium) で培養された。培地中の窒素源欠乏条件下にて、細胞は遠心分離 (12,500×g; 4°C; 7 min) で 2.0×10^7 cells となるよう回収された後、直径 35 mm のガラスシャーレに深さ 5 mm で塗布され、10 分間 UV-C を照射された。照射後、細胞から油脂の抽出と脂肪酸エステル化がなされ、GC/FID (カラム: DB-23) にて脂肪酸エステルの定性・定量評価がなされた。また、UV-C 照射を受けた細胞群を供出するため、UV-C を一度だけ照射された細胞群と、継代培養時に毎回照射された細胞群の二系統を用意した。培地中の窒素源欠乏条件下で、これら二系統の細胞群は油脂の脂肪酸エステル化がなされ、定性・定量評価された。

【結果・考察】

細胞に UV-C を照射することで、細胞内の油脂組成が特定の傾向をもって変化することが明らかとなった。しかし、UV-C 照射により油脂関連の代謝の変化が引き起こされたか、照射で直接的に油脂の変化が引き起こされたのか不明であったため、細胞から抽出された油脂に UV-C を照射し、油脂組成の変化を調べる必要性が示された。また UV-C 照射された細胞群については、照射を受けた細胞群は野生株に比べ、細胞における油脂含有率が低いことが分かった。脂肪酸組成も併せて解析した結果、特に UV-C 照射を継代ごとに受けた細胞群は野生株に比べ組成が異なり、特定の傾向を示すことが分かった。以上から、UV-C 照射が細胞の油脂生産の代謝反応を変化させた可能性が示唆された。

Key words *Chlamydomonas reinhardtii*, lipid, UV-C irradiation, artificial evolution

G3H3 (0306) 疎水化アガロースゲルの薬剤吸着挙動および熱力学的評価

○森滿優斗[1]，吉田昌弘[1]，武井孝行[1*]
（[1]鹿児島大院・理工）

Thermodynamic evaluation of hydrophobically-modified agarose hydrogel as hydrophobic drug release carriers

○Yuto Morimitsu[1], Masahiro Yoshida[1],Takayuki Takei[1*]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ.)
takei@cen.kagoshima-u.ac.jp

【本研究の目的】

高分子を用いたヒドロゲルはその生体適合性から薬剤徐放担体としての応用が期待されている。しかし、ヒドロゲルはその性質上、親水性が強いため、疎水性薬剤との親和性が低く、疎水性薬剤の徐放が難しいといった問題を抱えている。疎水性薬剤には、抗がん剤をはじめとして有用なものが数多くある。そのため、疎水性薬剤の徐放担体の需要は非常に高いといえる。

本研究グループでは、タンパク質であるゼラチンに疎水基を修飾し、疎水性薬剤との親和性を高めた疎水化ゼラチンを作製した。これまでにその疎水化ゼラチンゲルが親水性薬剤だけでなく、疎水性薬剤の徐放担体として有望であることを明らかにしている(T. Takei, *et al*., *Int. J. Biol. Macromol.*)。ゼラチン以外の高分子に疎水基を修飾しても、そのゲルは疎水性薬剤の徐放担体として期待できる。そこで本研究では、アガロースを高分子として選択し、ゼラチンと同様の検討を行った。

【実験方法および結果】

アガロースにアルキル基を修飾して疎水化アガロースを合成した。合成した疎水化アガロースは水に溶解しなかったため、一度ジメチルスルホキシドに溶解させた後、ジメチルスルホキシドを水で置換することによってヒドロゲルを作製した。疎水性薬剤のモデルとして染色色素であるエオシン Y(logP_{ow} : 5.37)を使用し、水相における疎水化アガロースゲルとアガロースゲルの吸着量の比較を吸光分析にて行った。その結果、アガロースゲルに比べて、疎水化アガロースゲルの方がより多くのエオシン Y を吸着した。また、エオシン Y 吸着後のゲルをリン酸緩衝生理食塩水に浸漬し、体液の交換を模した浸漬液交換を行いながら、薬剤放出率を定量化した。結果として、疎水化アガロースゲルはアガロースゲルに比べて放出率が低く、エオシン Y を浸漬液の交換ごとに段階的に放出することが分かった。さらに、疎水化アガロースゲルの詳細な吸着メカニズムを明らかにするために吸着速度定数や吸着平衡定数を算出した。また、得られた吸着平衡定数から熱力学的パラメータを求め、熱力学的評価を行った。その結果、疎水化アガロースゲルにおける吸着は発熱反応であり、4℃～37℃の温度条件下で自発的に進行することが分かった。また、吸着における吸着分子と疎水化アガロースゲルとの相互作用は、物理的相互作用であると推察された。以上の結果から、疎水化アガロースゲルは疎水性薬剤の徐放担体として有望であるといえる。

Key words agarose, adsorption, hydrophobic, drug delivery system

G3H3 (0307) 低濃度オゾン曝気の飼育環境維持効果および飼育魚への影響

○奥村鈴音[1], 松郷誠一[2], 滝口昇[3*]
([1]金沢大院・自科, [2]金沢大・名誉, [3]金沢大･理工)

Effect of low-concentration ozone aeration on the maintenance of aquarium environment and on fish

○Suzune Okumura[1], Seiichi Matsugo[2], Noboru Takiguchi[3*]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Kanazawa Univ., [3]Coll. Sci., Eng., Kanazawa Univ.)
tackey@se.kanazawa-u.ac.jp

本研究では低濃度オゾンの水槽内環境維持への適用を目的とし，その水質浄化・環境維持効果及び観賞魚への影響を評価した．観賞魚としてニシキゴイを飼育中の水槽に低濃度オゾンを曝気して，飼育水中のアンモニア濃度及び濁度（OD_{600}）を測定したところ，濁度はオゾン曝気・通常空気のみを曝気した水槽（コントロール）のどちらの水槽において飼育開始後徐々に増加したが，オゾン曝気した水槽は増加が緩やかで，15 日目においてコントロール水槽に比べておよそ 10 分の 1 であった．アンモニア濃度については，飼育開始後 30 日間はオゾン曝気水槽の方が水中のアンモニア濃度が低く，低濃度オゾン曝気によりアンモニアが分解されていることが示唆された．一方，ニシキゴイについてはオゾン曝気の有無では体長や体重に有意差は見られなかった．また，行動解析を行ったところ，飼育魚の平均移動速度はオゾン曝気水槽の方が大きかったものの，個体差がありオゾン曝気の有無による有意差は見られなかった．ただし，オゾン曝気水槽で飼育したニシキゴイは散気管より上部にいる割合が大きいこと，いずれの水槽においても散気管部分に隠れている時間における移動が少ないことから，オゾン曝気水槽で飼育したニシキゴイの方が活発に運動していると考えられる．気泡による影響を排除するため曝気を 5 分間停止させたときの挙動を解析したところ，いずれの水槽においてもすべての時間で水槽の半分より下部に存在していた．オゾン曝気水槽では散気管より上に存在している割合は 29.7%であり，およそ 7 割の時間は散気管の陰に隠れていた．一方コントロール水槽ではほとんどの時間散気管の陰に隠れており，更にニシキゴイの位置はほとんど変化しておらず，曝気を停止した 5 分間で移動した距離はわずかであることがわかった．これらのことから，オゾンを曝気している水槽ではニシキゴイの運動の活発化が見られ，曝気を停止している間でも活発ではないものの移動の様子が見られた．以上より低濃度オゾン曝気による水槽内環境維持の可能性が示唆されるとともに，観賞魚の活動度の向上が見込まれることが示された．

Key words low concentration ozone water, aquarium fish, aquarium environment

G3H3 (0308) 肝臓様三次元組織との共培養による筋芽細胞の無血清培養

○猪嶋理登[1], *仁宮一章[2]
([1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術)

Serum-free monolayer culture of myoblast cells by co-culture with 3D hepatic tissue

○Masato INOSHIMA[1], * Kazuaki NINOMIYA[2]
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2] Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)
ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】地球上の人口は増加の一途であり、今後、タンパク質供給に問題が発生するといわれている。また、畜産では、食肉の数倍量の穀物が必要であり、森林破壊や水資源枯渇といった環境問題につながっている。そこで近年、食用を前提とした細胞からなる三次元組織（培養肉）の生産が注目されている。現在、培養肉を構成する動物細胞の培養に用いる培地は、無機塩・糖・アミノ酸・ビタミンからなる基礎培地に、細胞増殖因子タンパク質を含む牛胎児血清(FBS)を添加したものである。しかし FBS の獲得には牛の飼育が必要であり、牛が穀物を消費するため、上記の森林破壊や水資源枯渇といった環境問題の解決に至らない。そこで本研究では、FBS に含まれる細胞増殖因子タンパク質を分泌する肝臓細胞を用いて三次元組織を作成し、この三次元組織を筋芽細胞（培養肉を構成する）の培養中に共存させることにより、筋芽細胞を無血清培地中で増殖させる方法を検討した。
【方法および結果】アルブミン・トランスフェリン等生産性のヒト肝臓がん細胞株(HuH-7)とコラーゲン生産性のマウス線維芽細胞株(3T6)を 1:1 で混合し、U 底 96 well プレートを用いて直径約 550 μm のスフェロイドを作製した。この作成したスフェロイド 162 個を、スフェロイド積層型のバイオ 3D プリンターを用いて、(9×18×1)となるよう剣山上に積層した。剣山上のスフェロイド積層物は、無血清の基礎培地（微量金属成分を補充した RPMI-1640 培地）で 14 日間振とう培養することにより、肝臓様三次元組織を作製した。次に、剣山上に作製した肝臓様三次元組織を共存させた状態で、マウス筋芽細胞株(C2C12)の単層培養を、上記の無血清の基礎培地を用いて 6 well プレートで行った。C2C12 細胞播種後、3 日間培養し、顕微鏡観察および培養終了時のセルカウントにより C2C12 の増殖を評価した。その結果、無血清培地では細胞が死滅したにもかかわらず、肝臓様三次元組織との共存下では C2C12 細胞のコンフルエントまでの増殖が確認できた。

Key words myoblast, 3D hepatic tissue, serum-free co-culture

G3H3 (0309) CHL-YN 細胞の重力沈降型小型灌流培養

○國田 紘夢[1], Sukwattananipaat Puriwat[1], 古賀 雄一[1,2], 山野-足立 範子[1,2], 大政 健史[1,2*]
([1]阪大院・工, [2]阪大 OTRI)

Small scale perfusion CHL-YN cell culture by gravity separation

○Kunita Hiromu[1], Sukwattananipaat Puriwat[1], Koga Yuichi[1,2], Yamano-Adachi Noriko[1,2], Omasa Takeshi[1,2*]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]OTRI, Osaka Univ.)
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景】
抗体医薬品の市場は年々拡大しており、生産プロセスの開発は急務である。近年、生産効率向上を目的とした連続生産プロセスの開発が進んでいる。このプロセスの培養段階は灌流培養を使用しており、従来の回分培養や流加培養と比較して、高い生細胞濃度と長期培養が実現できる連続生産が可能であると期待されている。CHL-YN 細胞は、抗体医薬品製造における主な宿主細胞である CHO 細胞と比較して、高い増殖能を持ち、新たな宿主細胞として期待されている。本研究では、CHL-YN 細胞を連続生産プロセスに適用するため、CHL-YN 細胞の灌流培養条件として灌流速度 1 RV/day で細胞生存率 95%、2 週間の長期培養を目指した検討を行った。
【実験材料・方法】
培養条件の検討にあたり、ABLE の小型灌流培養装置 BWB-05NA2-C を使用した。本装置は、培養容量が 30 mL であり、小容量で灌流培養が実現可能である。また、細胞保持には遠心沈降槽を使用し、培養液中の細胞を沈降させることで細胞分離を可能にしている。本装置における bleeding は、沈降させる細胞の割合を変化させ、harvest として細胞を排出することで実現される。
【結果・考察】
上記の装置を使用して培養 5 日目から生細胞濃度を 250 cells/mL に維持した灌流操作を行った。その結果、細胞生存率が 4 日目に 96.6%、8 日目に 88.0%まで減少し、培養を 8 日目に終了した。代謝産物を解析した結果、6 日目に重要な基質であるグルタミンが枯渇した。CHL-YN 細胞は、グルタミンが枯渇するとグルタミン酸とアンモニアからグルタミンを生産する代謝シフトが報告されており、この代謝シフトが細胞生存率に影響していると示唆された。そこで、グルタミン濃度を 2.0 mM で維持すると、8 日目の細胞生存率の低下を改善できた。しかし、4 日目の細胞生存率の低下は改善されなかった。今後、維持する生細胞濃度やグルコース等の基質濃度の条件を検討し、さらなる長期培養を目指す予定である。

Key words mammalian cell, perfusion culture, recombinant protein production, continuous manufacturing

G3H3 (0310) セルサイズゼラチン微粒子をキャリアとする CHO 細胞の振とう培養系

○長谷部友権*, 山田真澄*, 鵜頭理恵, 関 実
([1]千葉大学大学院・融合)

Shake culture of CHO cells using cell-sized gelatin microparticles as a carrier

○Yuken Hasebe[1]*, Masumi Yamada[1]*, Rie Utoh[1], Minoru Seki[1]
([1]Chiba University)
m-yamada@faculty.chiba-u.jp

抗体医薬品はがんや自己免疫疾患の治療薬として極めて重要であり，2020 年における世界の薬剤売上高上位 10 品目のうちの 5 品目を占めている．抗体医薬品の多くは CHO 細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）を用いて製造されている．そのため，抗体医薬品の生産において CHO 細胞を大量かつ効率的に培養する必要があり，そのための手法として，直径数百マイクロメートルのキャリア粒子に細胞を接着させる「マイクロキャリア培養」が挙げられる．しかし，従来のキャリア粒子の多くは，細胞と比べて大きく比表面積が小さいため，十分な細胞の増殖効果が得られないという問題があった．さらに，一般的なキャリアの材料である合成ポリマーに対して，細胞が接着しにくい場合もあった．そこで本研究では，比較的安価な細胞接着材料であるゼラチンを用いて細胞と同程度の大きさ（10〜20 μm）の微粒子を作製し，CHO 細胞と混合して振とう培養を行い，細胞の増殖性および抗体産生量を評価することとした．まず乳化溶媒抽出法及び化学架橋によってゼラチン微粒子を調製した．界面活性剤として span80 を含有するオリーブ油に対し，攪拌しながら 5%ゼラチン水溶液を滴下して液滴を形成した．続いて，温度を下げることで液滴をゲル化させた後，アセトンを加えて脱水させた．グルタルアルデヒドによってゼラチンを架橋し，最後に洗浄することでゼラチン微粒子を得た．攪拌速度が 600 rpm の場合，得られた粒子の粒径は 27.0±10.1 μm であった．次に，培養液の入ったフラスコに CHO 細胞とゼラチン微粒子を個数比 1:0（コントロール）及び 1:5 で導入し，ロータリーシェイカーを用いて振とう培養を行った．その結果，CHO 細胞がゼラチン微粒子に対して接着し，ゼラチン微粒子と細胞が複数個集合した数十 μm 程度のサイズのクラスターを形成する様子が観察された．7 日間の培養後，細胞核をクリスタルバイオレットによって青く染色し，細胞数をカウントしたところ，粒子を混合した条件下では粒子を混合しない条件下と比較して細胞密度が約 1.5 倍に増加することが確認された．また，ELISA によって抗体産生量を評価した結果，抗体産生量が約 1.3 倍に増加することが確認された．これらの結果から，本研究で用いた細胞と同程度の大きさのゼラチン微粒子は，細胞に対して増殖の足場となる表面を提供するため，振とう培養において細胞の増殖性および抗体産生量を向上する有用な材料となりうることが示唆された．

Key words CHO cell, microcarrier, gelatin, shake culture

G3H3 (0311) 燐光消失式酸素センサーの活用による k_La 値測定法の検討

○佐藤貴志, 長森英二*
（大阪工大・院）

Investigation of a method for measuring k_La using a phosphorescence vanishing oxygen sensor

○Takashi Sato, Eiji Nagamori*
(Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol.)
eiji.nagamori@oit.ac.jp

k_La 値（総括酸素移動容量係数）は培養槽のスケールアップ指標として利用されており，その測定には，従来から複数種の測定法が用いられてきた．Gassing out 法は簡便な測定法として広く用いられているが，高 k_La 値の条件では，溶存酸素（DO）濃度が数十秒程度でゼロ付近から飽和濃度に達するため，測定に用いる DO センサーには遅延の少ない高速な応答が要求される．従来のプローブ式（ガルバニ電池式等）の DO センサーは測定原理上，応答遅延を生じてしまい，測定可能な k_La 値に上限がある．本研究ではプローブ式のような酸化還元反応を伴わない，高速な応答速度が期待される燐光消失式 DO センサーを，gassing out 法による k_La 値測定に活用する有用性を検証することを目的とした．

まず培養細胞が存在しない系で全容 1 L 通気攪拌型培養槽における k_La 値の測定を行った．従来のプローブ式 DO センサーを用いた測定では，k_La = 150 /h 程度で測定上限を迎えるのに対し，燐光消失式 DO センサーでは k_La = 300 /h 以上においても測定が可能であり，高 k_La 値条件下においても応答遅延による影響を受けにくいことが明らかとなった．一方で，従来から k_La 値測定法の一つとして用いられてきた亜硫酸ナトリウムの酸化速度を利用した測定法による測定値と比較を行った．亜硫酸ナトリウム酸化法では，燐光消失式 DO センサーを用いた測定値よりも大幅に高い値が計測された．Gassing out 法と亜硫酸ナトリウム酸化法の k_La 値が互いに一致しないこと（スケールアップ指標としては，同じ方法で測定された値同士で相関を得ることが欠かせないこと）は古くから指摘されてきたが，燐光消失式 DO センサーでもそのギャップは埋まらなかった．測定値の確からしさを検証するために，パン酵母の酸素消費速度を利用し，液中の酸素供給速度と酸素消費速度の平衡から k_La 値を求める測定を実施した．平衡状態を利用した算出法による測定値は，燐光消失式 DO センサーを用いた測定値と概ね一致した．以上より，燐光消失式 DO センサーを用いた gassing out 法は，現状技術の中では，最も簡便かつ信頼性の高い測定が可能であると考えられた．亜硫酸ナトリウム酸化法は，例えば高性能攪拌機の開発など，非常に高い k_La 値条件において有意な差を検出するための方法として広く使われており，適材適所の活用が好ましい．

Key words k_La

G3H3 (0312) 高い正電荷数を有する分岐鎖ポリアミンを用いた抗菌剤の開発

○廣田 裕介 [1], 福田 青郎 [1,2], 山内 光陽 [2], 増尾 貞弘 [2], 岡本 裕也 [3], 柳原 格 [3,4], 林 翰佳 [5], 藤原 伸介 [1,2*]
([1] 関西学院大院・理工, [2] 関西学院大・生命環境, [3] 大阪母子医療セ・臨床検査, [4] 大阪母子医療セ研・免疫, [5] 台湾海洋大・生命工学)

Development of antimicrobial agents using branched-chain polyamine with high positive charge number

○Hirota Yusuke[1], Fukuda Wakao[2], Yamauchi Mituaki[2], Masuo Sadahiro[2], Okamoto Yuya[3], Yanagihara Itaru[4], Lin Hanjia[5], Fujiwara Shinsuke[1,2*]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2] Sch. Biol. Environ. Sci., Kwansei Gakuin Univ., [3]Clin Lab, [4]Res Inst, Osaka Women's and Children's Hosp., [5]Sch. Life Eng., Taiwan Ocean Univ.)
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

【背景】正電荷を帯びた小分子は微生物の膜電位を変動させ生育を阻害する。本研究では正電荷を有するポリアミンに着目し抗菌活性の評価を行った。また安定状態で利用するため、高温でカーボン量子ドット化(CQD 化)[1] し、その抗菌活性を評価した。

【実験操作】正電荷数の異なるカダベリン (+2)、スペルミジン (SPD, +3)、スペルミン (+4)、分岐鎖ポリアミン(BCPA ,+5) を用いて抗菌活性 (1, 10, 100 ppm) の評価を行った。米国薬局法に基づく段階希釈法に従い、バイオフィルムを形成する *Pseudomonas aeruginosa* を含むグラム陽性菌 4 株、薬剤耐性を獲得した *Staphylococcus aureus* を含むグラム陰性菌 4 株の計 8 株に対して抗菌活性を評価した。SPD または BCPA は 240 または 300 ℃で加熱することで CQD 化した。

【結果及び考察】抗菌活性評価の結果、帯電する価数が多いほど高い抗菌活性を示した。特に BCPA は *P. aeruginosa* や *S. aureus* 等に対して銀と同程度の高い抗菌活性を示した。また今回解析した多くの株では BCPA を CQD 化することで抗菌活性が上昇する傾向が見られたが、CQD 作成温度や菌株によって抗菌活性が下がるものもあった。また CQD 化に関わらずポリアミンの抗菌活性は銀と同程度であるが、銀とは異なり時間経過と共に菌体の増殖が確認された。上記の結果からポリアミンの抗菌活性は静菌的と考えられる。CQD 化により様々な菌に抗菌活性を示すが、時間経過と共に分解され、抗菌活性は低下した。生分解性から環境低負荷型の抗菌剤になりうると思われる。

Key words antibacterial activity, branched-chain polyamine, carbon quantum dots

(1) Jian, HJ. *et al*., ACS Nano., 11.6703-6716 (2017)

G3H3 (0313) 新薬開発に向けた抗菌ペプチド・ダブルコオペラティブ効果の原理解明

○杉原加織 [1]*, エバドラブ [2]
([1] 東大生研, [2] ジュネーブ大)

Mechanism of antimicrobial peptide cooperativity towards development of new antibiotics

○Kaori Sugihara[1]*, Ewa Drab[2]
([1]Univ. Tokyo, IIS, [2]Univ. Geneva)
kaori-s@iis.u-tokyo.ac.jp

２０２０年に私たちの研究室が発見した、異種の抗菌ペプチドを混合することでバクテリアに対する毒性が上り、人間細胞に対する毒性が下がるという「ダブル・コオペラティブ効果」(Biophysical Journal 2020) [1]を報告する。

新型コロナ感染症と同様の感染力で致死率がずっと高い、既存の抗生物質が効かない耐性菌パンデミックが近い将来起こるのではと危惧されている。バクテリアに感染したときに免疫の一環として私たちの体が作り出す天然の抗生物質、抗菌ペプチド[2]は、その対抗策として期待されているが、副作用が重いことが汎用性を阻んでいる。ダブル・コオペラティブ効果を活用することで、この欠点を乗り越え効能が高く副作用が低い抗菌・抗ウィルス薬開発への道を開くことができる可能性がある。本発表では円偏光二色性(CD)、等温滴定カロリメトリー(ITC)、誘電分光(EIS)、直流電圧によるシングル・チャネル測定などの物理化学的手法を用いて、原理解明へ向けたこれまでの結果を話す。

参考文献

1. Drab, E.; Sugihara, K., Cooperative Function of LL-37 and HNP1 Protects Mammalian Cell Membranes from Lysis. *Biophys. J.* **2020,** *119* (12), 2440-2450.
2. Matsuzaki, K.; Mitani, Y.; Akada, K.; Murase, O.; Yoneyama, S.; Zasloff, M.; Miyajima, K., Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa. *Biochemistry (Mosc).* **1998,** *37* (43), 15144-15153.

Key words antimicrobial peptides, lipid bilayers

G3H4 (0101) マイクロ流体デバイスで示す外部環境に応じた糸状菌の伸長方向制御

○山本里穂, 福田紗弓, Utada A. Shinichi, 高谷直樹, 竹下典男*
（筑波大学 微生物サステイナビリティ研究センター (MiCS)）

Analysis of hyphal chemotropism using microfluidic devices

○Riho Yamamoto, Sayumi Fukuda, Utada A. Shinichi, Naoki Takaya, Norio Takeshita*
(Tsukuba Univ. MiCS)
s2121072@s.tsukuba.ac.jp

糸状菌は菌糸と呼ばれる管状の細胞の先端を伸ばして生長し、先端生長と分岐によりネットワーク状の菌糸体を形成します。生長の際、多くの酵素を細胞外に分泌して有機物を分解し、栄養を吸収します。糸状菌はより良い環境を探すため、外部シグナルを感知して菌糸の生長速度や方向、分岐を制御する「屈性」を示すと考えられていますが、その機構はほとんど明らかになっていません。

本研究では菌糸の栄養源に対する屈性を細胞レベルで調べるために目的に合わせたマイクロ流体デバイスを構築し、液体培地を流した流路内で糸状菌を培養しながら、菌糸生長を顕微鏡で観察を行いました。デバイスの 2 つの入り口から出口に向かって異なる溶液を適当な速さで流すと溶液が合流した流路では 2 つの溶液が混ざることなく、2 層に分かれます。このうち、一方の培養液は炭素源、窒素源などを含み、他方は含まないように設定して菌糸を生育させ、その伸長速度、方向変化、分岐を測定しました。

ライブイメージングの結果、*Aspergillus nidulans* の菌糸が培地中に含まれる栄養源や異なる pH に対してその方向に向かう屈性を示すことを初めて明らかにしました。菌糸はグルコースやリン酸、ミネラルに対して正の屈性を示し、一方で硝酸イオンやアンモニウムイオンに対しては、それを避けるように生長する負の屈性を示しました。さらに、低 pH に対して顕著な屈性を示すことが明らかとなり、形質膜上にあるプロトンポンプをコードする *pmaA* のノックダウン株ではその屈性が見られなくなりました。植物病原糸状菌である *Fusarium oxysporum* でも同様に解析を行ったところ、屈性が見られるものの *A. nidulans* と異なる応答を示しました。

糸状菌の屈性の理解と制御は、菌糸状の生長様式と密接に関連するバイオ産業や医学、農業分野への貢献が期待されます。

Key words 糸状菌，菌糸，マイクロ流体デバイス，屈性

G3H4 (0102) マイクロ流体デバイスで示す糸状菌の菌糸生長における可変性と伸長速度のトレードオフ

○竹下典男[1]*, 山本里穂[1], 柳沢直樹[2], 佐藤良勝[2], 高谷直樹[1], 福田紗弓[1]
([1]筑波大学 MiCS, [2]名古屋大 ITbM)

Trade-off between Plasticity and Velocity in Mycelial Growth shown by microfluidic device

○Norio Takeshita[1]*, Riho Yamamoto[1], Naoki Yanagisawa[2], Yoshikatsu Sato[2], Naoki Takaya[1], Sayumi Fukuda[1]
([1]Tsukuba Univ. MiCS, [2]Nagoya Univ. ITbM)
takeshita.norio.gf@u.tsukuba.ac.jp

糸状菌は菌糸と呼ばれる管状の細胞から成り、宿主細胞などの基質に、菌糸の先端を侵入させて生長・分岐し、バイオマスの分解や動植物への寄生・共生、発酵などに関わります。その際、自身の直径よりも狭い空間に入るには、その形態を変化させる必要があります。しかしこれまで、数 μm という小さな菌糸細胞の可変性（あるいは柔軟性）を解析することは困難でした。

本研究では、菌糸直径より細い、幅 1 μm の流路を持つマイクロ流体デバイスを作製し、そこに菌糸を生育させて菌糸細胞の可変性を解析しました。顕微鏡によるライブイメージング解析の結果、糸状菌の中には、細い流路を通過して生長を続けるものと、そうではないものがあることが分かりました。そこで、異なる系統の 7 種の糸状菌について、同様の解析を行ったところ、細い流路を通過できるかどうかは、菌糸幅や系統分類上の近さではなく、菌糸の生長速度と相関があることを発見しました。つまり、生長の遅い菌糸は、可変性が高く細胞の形を変えて流路を通過できるのに対して、生長の速い菌糸は、細胞の膨圧が高いために可変性が低く、細い流路を通過しにくくなります。このことは、生長が速いと、新たな栄養源や空間を素早く占領できる一方、微小空間への侵入が難しくなるという、細胞形態の可変性と生長速度の間のトレードオフ関係を示唆しています。

糸状菌が微小空間に菌糸を侵入させて生長するメカニズムを理解することにより、糸状菌が関わる生態学的役割、病原性、バイオテクノロジー、カビ汚染の制御などにつながると期待できます。

Key words 糸状菌, 菌糸, マイクロ流体デバイス, 可変性, 柔軟性

Trade-off between Plasticity and Velocity in Mycelial Growth.
Fukuda S, Yamamoto R, Yanagisawa N, Takaya N, Sato Y, Riquelme M, Takeshita N.
mBio. 2021, 12, e03196-20.

G3H4 (0103) 低温性接合菌の胞子形成に与える環境因子の影響

○秋葉奏汰[1], 高橋結[2], 村上周一郎[2,3]*
([1]明治大学大学院・農, [2]ミートエポック, [3]明治大学・農)

Effects of environmental factors on sporulation of psychrophilic zygomycetes

○Sota Akiba, Yui Takahashi, Shuichiro Murakami
([1]Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., [2]Meat epoch [3]Sch. Agric., Meiji Univ.)
smura@meiji.ac.jp

【背景・目的】ある種の接合菌は、広く熟成肉の製造に利用されている。当研究室では、これらの接合菌を用いて効率的に熟成肉が製造できるエイジングシートを開発した。エイジングシートには、当研究室で分離された *Helicostylum* sp. JW-1 株、および *Thamnidium elegans* NBRC5429 株の胞子が付着されている。両接合菌は比較的類縁種であるが、胞子嚢の形状は、JW-1 株では胞子嚢柄に球状の大胞子嚢が一つ形成されるのに対し、5429 株ではそれに加え、分岐した胞子嚢柄に数個の胞子を形成することが知られている。従って、安定して胞子を得るためには、胞子嚢柄形成のメカニズムを理解し、菌種に応じた培養方法を確立する必要がある。そこで本研究では、各種培養条件を検討し、両菌の生育、胞子嚢柄の形状、および胞子形成量を比較した。

【方法】両菌が生育した PGY 培地（1%ポリペプトン、2% D-グルコース、0.5%酵母エキス、1.5%寒天）に、蒸留水を加えて懸濁することで胞子懸濁液を調製した。シャーレ 1 枚あたりの胞子接種量が 1.1×10^5 個になるように PGY 培地に胞子を接種し、4、15、および 24℃でそれぞれ培養した。経日的に目視で観察した後、十分に生育した菌体を 50 mL の蒸留水に PGY 培地ごと加え、懸濁することで胞子懸濁液を調製した。胞子の形態は光学顕微鏡（400 倍）で観察し、胞子数は光学顕微鏡下で血球計算盤を用いて計測した。また、PGY 培地のポリペプトン濃度を変化させて培養した。

【結果・考察】PGY 培地で培養した場合、JW-1 株では、培地中のポリペプトン濃度と回収できる胞子数に正の相関が見られた。一方 5429 株では、培地中のポリペプトン濃度と回収できる胞子数に負の相関が見られた。しかし、4℃での培養では例外的に中量の濃度（1%ポリペプトン）で最も多くの胞子を回収できた。培養温度の影響について調べたところ、JW-1 株は 15℃で最も多く胞子が回収され、5429 株では、4℃において最も多く胞子を回収することができた。また、5429 株は 4℃の培養条件下で球状の大胞子嚢を多く形成し、24℃の培養では分岐した胞子嚢柄を多く形成した。以上の結果から、JW-1 株は大胞子嚢のみを形成するため、最も生育に適した 15℃において胞子が多く形成されたのに対し、5429 株では、大胞子嚢を多く形成する 4℃で多くの胞子が得られたと結論した。

Key words *Helicostylum* sp., *Thamnidium elegans*, psychrophilic zygomycetes, sporulation

G3H4 (0104) 糸状菌における撹拌翼形状とタンパク質分泌生産の相関解析

○小野 太暉[1], 鈴木 智大[2], 加戸 悠[3], 坪井 宏和[3], 坊垣 隆之[3], 幸田 明生[3], 辻野 義雄[4], 近藤 昭彦[4], 荻野 千秋[1]*
([1]神戸大院・工, [2]神戸大・工, [3]大関総研, [4]神戸大院・技イノベ)

Correlation analysis of stirring blade shape and secreted protein production in filamentous fungi

○Taiki Ono[1], Tomohiro Suzuki[2], Haruka Kado[3], Hirokazu Tsuboi[3], Takayuki Bogaki[3], Akio Koda[3], Yoshio Tsujino[4], Akihiko Kondo[4], Chiaki Ogino[1]*
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Fac. Eng., Kobe Univ., [3]Gen. Res. Lab., Ozeki Corp., [4]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
* ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【目的】 近年、微生物培養により有用物質を作り出すバイオプロセスを効率化する事は、工学的立場から非常に重要である。工業的なバイオプロセスにおいて、撹拌操作は微生物の培養環境における不均一性をできるだけ小さくするために非常に重要な操作である。本研究では酸化還元酵素を分泌生産する糸状菌をモデル評価系として用い、撹拌翼によるタンパク質の分泌生産への影響の相関関係を検討する。

本研究で用いる糸状菌は、培養経過に応じて生産物が蓄積し、培養液の粘度が上昇することによって、撹拌槽内の均一な混合が難しくなる問題がある。そのため、一般的なバイオプロセスに用いられるディスクタービン翼を用いた培養槽の混合では、より均一な混合を達成させるためには、撹拌翼の回転数を上げる必要があるが、せん断応力により麹菌が損傷するため酵素生産性が低下してしまう。一方、大型撹拌翼は低い回転数で、高粘度域の培養液において高い混合効率が期待できる。そのため、MaxBlend (MB)翼と Fullzone (FZ)翼を代表とする様々な形状や混合特性を持つ大型撹拌翼が開発されてきている。しかしながら、大型撹拌翼による化学反応への撹拌特性解析の研究報告はあるが、その混合特性がどのように糸状菌の酵素生産に影響を及ぼすのか調べた研究例は少ない。

【実験方法】 本研究では、撹拌操作に着目しディスクタービン翼、MaxBlend (MB)翼、そして Fullzone (FZ)翼を用いた培養の比較を行い、撹拌翼の形状による培養特性の外来性酸化還元酵素の分泌生産性への影響を検討した。

【結果】 ３つの撹拌翼を同回転数条件下で培養の比較検討した結果、それぞれの撹拌翼で異なる酵素生産性が確認された。中でも Fullzone (FZ)翼を用いた培養では約 1.5 g/L 程度の外来性酸化還元の生産が見られ、小型撹拌翼であるディスクタービン翼を用いた培養よりも最終酵素濃度は二倍程度高い酵素生産を示した。

今後は混合特性による酵素生産への影響を調べるために、酸素移動容量係数(K_La)を同一にして各撹拌翼を用いた培養を行い、本発表にて報告する予定である。

Key words shear stress, filamentous fungi, protein

G3H4 (0105) 麹菌の菌糸分散株における培養液粘度低下がもたらす生産性への影響

○薄田隼弥[1], 武藤清明[2], 市川暉[2], 宮澤拳[2], 古明地敬介[2], 吉見啓[3,4], 加藤好一[5], 阿部敬悦[2,4]*
([1]東北大・農, [2]東北大院・農, [3]京大院・農, [4]東北大・未来研, [5]佐竹化学・攪拌研)

Effects of low culture viscosity on productivity by the hyphal dispersed Aspergillus oryzae mutant in a lab-scale bioreactor

○Shunya Susukida[1], Kiyoaki Muto[2], Hikaru Ichikawa[2], Ken Miyazawa[2], Keisuke Komeiji[2], Akira Yoshimi[3,4], Yoshikazu Kato[5], Keietsu Abe[2,4]*
([1]Dept. Agric., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]NICHe, Tohoku Univ., [5]Satake Ltd.)
keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp

糸状菌の液体培養では，菌糸形態で生育が進むと混合状態が悪化することが知られている[1]．我々はこれまでに，麹菌 *Aspergillus oryzae* の細胞壁多糖 α-1, 3-グルカンとガラクトサミノガラクタン（GAG）の二重欠損（AGΔ-GAGΔ）株がフラスコスケールでの組換え酵素生産に適していることを示してきた[2]．AGΔ-GAGΔ株の生産性をジャー型発酵槽において評価したところ，培養 48 時間目以降の酵素生産量は野生株の 2 倍近くに達していた[3]．また，AGΔ-GAGΔ株は培養液の粘度が低下したことが明らかになった[3]．更に Computational Fluid Dynamics (CFD) シミュレーションを用いて，粘度データから槽内での培養液の流動性について CFD シミュレーションを実施した結果，AGΔ-GAGΔ株は野生株に比べて培養液の流動性が高いことが示唆された[4]．以上の結果を踏まえ，本研究ではジャー型発酵槽における AGΔ-GAGΔ株の流体特性が酵素生産量の増加をもたらす要因を解明することを目的とした．具体的には，野生株と AGΔ-GAGΔ株を 681 rpm で 60 時間培養し，グルコース消費量を測定した．加えて，培養液の溶存酸素（DO）濃度および排出ガス中の O_2 および CO_2 濃度変化を経時的に分析した．その結果，AGΔ-GAGΔ株は培養 36 時間目までのグルコース消費量が野生株より 2 倍高く，排出 CO_2 濃度は 30 時間目から 48 時間目まで AGΔ-GAGΔ株で野生株よりも断続的に増加した．DO は，両株間で顕著な差異は認められず，24 時間目以降徐々に減少し，培養 48 時間前後で枯渇した．排出 O_2 濃度は培地に流入する通気ガスの酸素濃度に対して大きく変化しなかった．以上をまとめると，AGΔ-GAGΔ株では培養液粘度の低下により撹拌性が向上し，結果としてグルコース消費量の増加とそれに伴う排出 CO_2 濃度の上昇が酵素生産量の向上に帰結したと考えられる．1) Cairns et al. ***Biotechnol. Biofuels*** (2019) 12:77; 2) Miyazawa et al. ***Front. Microbiol.*** (2019) 10:2090; 3) 古明地ら，日本生物工学会大会講演要旨集，p.146 (2018)； 4) 市川ら，日本生物工学会大会要旨集，p.129 (2019)

Key words *Aspergillus oryzae*, bioreactor, recombinant protein production, computational fluid dynamics

G3H4 (0106) 培地中へのエタノールの添加が *Euglena gracilis* に与える影響

○髙橋優，島本航輔，小山内崇*
（明大院・農・農化）

Effect of ethanol added to the culture medium on *Euglena gracilis*

○Yu Takahashi, Kosuke Shimamoto, Takashi Osanai*
(Graduate School of Agriculture, Meiji University)
tosanai@meiji.ac.jp

【目的】
Euglena gracilis (以後ユーグレナと記載)は、真核微細藻類の一種である。ユーグレナは、他の光合成生物と同様に光合成による独立栄養条件で生育できるが、グルコースやエタノールをはじめとした様々な物質を炭素源として利用し、従属栄養条件でも培養することができる。また、ユーグレナは特有の貯蔵多糖であるパラミロンという糖を細胞内に蓄積する。これまでに、培養の際にエタノールを添加すると、ユーグレナ体内のパラミロンの蓄積量が多くなることが分かっている。本研究では、培地へのエタノールの添加がユーグレナの形態に与える影響を調べることを目的とする。
【方法・結果】
本研究で用いた菌株は *Euglena gracilis* NIES48 である。ユーグレナの培養に用いた培地は合成培地である CM 培地である。1 L の CM 培地でユーグレナを育てた条件をコントロール条件とし、980 mL の CM 培地と 20 mL の 99.5% EtOH の混合液で培養した条件を 2%エタノール条件 (以下エタノール条件とする)とした。温度 25℃、50 μmol photons m^{-2} s^{-1} の光照射、1% (v/v)の CO_2 (in air)の通気下で培養した。この条件でユーグレナを 8 日間培養した後、細胞の大きさの測定、生細胞数の測定、パラミロン定量を行った。その結果、エタノール条件における細胞の大きさの平均は、コントロール条件と比較して大きく、細胞の大きさのばらつきも大きくなることが分かった。また、この際、細胞内パラミロン含有量もエタノール条件の方が高くなった。これらの結果から、ユーグレナの細胞の大きさは細胞内のパラミロン含有量と関係している可能性がある。

Key words *Euglena gracilis*, ethanol, cell size, paramylon

G3H4 (0107) *Streptococcus zooepidemicus* が生産するヒアルロン酸の分子量に鉄が及ぼす影響

○山本 晶穂[1]，丸山 夏歩[1]，山下 大悟[2]，成田 琴美[3]，武内 章[3]，山崎 思乃[2]，片倉 啓雄[2]*
([1]関西大院・理工，[2]関西大・化生工，[3]キユーピー)

The effect of iron on the molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepizemicus*

○Akiho Yamamoto[1], Kaho Maruyama[1], Daigo Yamashita[2], Kotomi Narita[3], Akira Takeuchi[3], Shino Yamasaki[2], Yoshio Katakura[2]*
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Fac. Chem. Master. Bioeng., Kansai Univ., [3]Kewpie Co.)
katakura@kansai-u.ac.jp

【背景と目的】ヒアルロン酸（HA）は、高分子であるほど保水性が高く、その特性から関節治療などの医療分野において利用されている。HA は生産性の高さから微生物による生産が主流となっており、本研究室では *Streptococcus zooepidemicus* に、より高分子の HA を生産させることを目標としている。HA を高分子化するには、その重合を持続させた上で、生産された HA の分解を防ぐ必要がある。HA の低分子化の要因として、pH を維持するために添加するアルカリによる加水分解や、鉄イオンの存在下で過酸化水素から発生するヒドロキシラジカルによる分解が考えられた。予備的な検討で鉄イオンが低分子化に関与することが示唆されたため、本研究では HA 分子量にフェントン反応が及ぼす影響について検討した。
【方法】Looijesteijn ら（1999）の合成培地を改変して用いた。pH は、フラスコ培養では培地に炭酸カルシウムを添加して維持し、3 L 容ジャーファーメンターでは NaOH で制御した。菌体濃度は OD_{660} で、HA の分子量はアガロースゲル電気泳動で分離し、Stains-all（Sigma-Aldrich）で染色して調べた。
【結果と考察】フラスコスケールでの予備検討では、合成培地から鉄イオンを除去しても菌体濃度や HA 生産に影響はなかった。各種濃度の鉄を添加した培地では、培養 27 時間後の HA の分子量は培養 8 時間目に比べて明らかに低下したが、鉄を添加しない培地では分子量の低下は認められなかった。そこで、この分解がフェントン反応によるものであるかを確認するために HA 標品に塩化第二鉄と過酸化水素を作用させた。その結果、pH 3～8 の広い範囲において過酸化水素濃度に依存した HA の低分子化がみられ、鉄濃度が 0.01 mM でも HA が低分子化した。次に、ジャーファーメンターを用いて溶存酸素濃度を維持し pH も制御した状態で、アミノ酸欠乏により菌体濃度を制限し、鉄イオンの除去効果を検討した。その結果、鉄の有無にかかわらず培養開始から 8 時間後に OD_{660} は 1 前後に達して増殖は停止した。HA の生産はその後も続いたが、鉄を添加した場合、24 時間後の HA は 8 時間後のそれに比べて明らかに低分子化していたのに対して、鉄を添加しない場合、低分子化は見られなかった。

Key words *Streptococcus zooepidemicus*, hyaluronic acid, Fenton reaction, polymer-degradation

G3H4 (0108) ポリ-γ-グルタミン酸とキトサンを用いた微生物凝集法の開発とその利用

○土井 健生, Parra Gabriel, 尾島 由紘, 東 雅之*
（阪市大院・工・化生系）

Development of a microbial aggregation method using poly-gamma-glutamic acid and chitosan and its application

○Doi Takeru, Parra Gabriel, Ojima Yoshihiro, Azuma Masayuki*
(Dept. Appl. Chem. Bioeng. Grad., Sch. Eng., Osaka City Univ.)
azuma@osaka-cu.ac.jp

ポリ-γ-グルタミン酸（以下 γ-PGA）は枯草菌などの微生物が生産する天然高分子で、アニオン性の高分子凝集剤として利用されている。本研究では、γ-PGA とカチオン性高分子であるキトサンの併用による微生物の凝集体形成について解析した。今回は *Escherichia coli*、*Streptomyces griseus*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Aureobasidium pullulans*、*Aspergillus oryzae* を用い、各菌体懸濁液に対してキトサンと γ-PGA を添加した。凝集は目視と吸光度測定による濁度の変化で判断した。その結果、*A. oryzae* を除くすべての菌種で、凝集の様子は少し異なるものの、菌体の凝集を確認できた。*A. oryzae* については培養後に菌糸がすでに大きく絡まり凝集した状態にあり、さらにそれらを絡めるのは難しいと考えられた。また、キトサンと γ-PGA の最適な添加量は微生物の種類によって異なっており、これは微生物によって形態や表面電荷が異なることが影響したと考えられる。次に、mRFP1 を発現させた *S. cerevisiae* と GFP を発現させた *E. coli* の 2 菌種を用いて共凝集を検討した。菌体混合液を用意し、キトサンと γ-PGA を添加した。共凝集の確認は目視で行い、凝集体内部の様子は共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、mRFP1 と GFP の観察から、凝集体内に 2 種の菌種が存在することが確認できた。さらに、*S. cerevisiae* が *E. coli* に囲まれる形で共凝集が生じていることが分かった。その他に *S. cerevisiae* と *Lactobacillus plantarum* においても凝集剤添加直後に共凝集誘導が可能であった。γ-PGA とキトサンは細胞毒性が低い高分子材料と考えられるため、現在異種細胞が密に接触する共凝集体の培養とそれらによる物質生産について検討している。

Key words Poly-gamma-glutamic acid, Chitosan, Aggregation, Co-aggregation

G3H4 (0109) 土壌より単離した *Bacillus licheniformis* RK14 株の自発的な凝集体形成

○俣野沙月，尾島由紘*，東雅之
（阪市大院・工）

Self-aggregation of *Bacillus licheniformis* RK14 strain isolated from soil

○Satsuki Matano, Yoshihiro Ojima*, Masayuki Azuma
(Grad. Sch. Eng., Osaka City University)
ojima@osaka-cu.ac.jp

【背景と目的】
環境中の微生物はほとんどがバイオフィルムや凝集体等の微生物群集を形成して存在している。微生物凝集体の一つである活性汚泥は、排水処理等で応用され産業的にも有用である。しかし、凝集するメカニズムや微生物群集の機能に関連する要因には未だ謎が多く、その制御は困難を極めるため、微生物の凝集体に関する知見の蓄積が求められている。
本研究グループは、γ-ポリグルタミン酸(γ-PGA)生産菌として土壌より単離した *B. licheniformis* RK14 株を液体培地で培養したところ、特定の条件下で自発的な浮遊性凝集体を形成することを明らかにした。これは *B. licheniformis* や *B. subtilis* の実験室株では見られない現象である。そこで本研究では、RK14 株の凝集体に関する特徴を探ることを目的とした。
【方法と結果】
RK14 株を LB 培地 4 mL を入れた試験管内で、37℃で一晩振とう培養したところ、1 mm 程度のサイズの凝集体が多量に観察された。そこで、培地をバシラス属細菌の培養に用いるいくつかの培地に変更し同条件で培養したところ、凝集体の形成量が著しく低下した。また、LB 培地を用いた場合でも、30℃や 50℃では凝集体の形成量が低下した。次に、*B. licheniformis* の一般的な実験室株である ATCC14580 株、及び γ-PGA 生産株として知られる ATCC9945 株において、RK14 株が凝集体を形成する条件下で培養したところ、ATCC14580 株では凝集が全く起こらず、ATCC9945 株では少量の凝集形成が見られた。γ-PGA の凝集体形成への関与を調べるため、LB 培地に RK14 株由来の γ-PGA を任意の濃度で加えた培地で、ATCC14580 株を 37℃で一晩振とう培養したが、ATCC14580 株は凝集体を形成しなかった。
RK14 株の凝集体を生理食塩水で洗浄した後に Calcein-AM 及び PI で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、菌体同士が寄り集まった様子が観察され、そのほとんどが生細胞であることが分かった。また、凝集体形成開始後、1 時間毎に顕微鏡で凝集体を観察したところ、凝集体を構成する個々の細胞が培養開始後に長く伸び、その後時間経過とともに元の長さに戻る様子が観察され、凝集体形成機構への何らかの関与が考えられた。

Key words *Bacillus licheniformis* RK14 strain, cell aggregation, LB medium, Shake culture

G3H4 (0110) 三次元培養ヒト表皮の角層代謝物解析

○田中 彩衣, 横田 壮眞, 青木 元秀, 熊田 英峰, 梅村 知也, 内田 達也*
(1 東薬大院・生命)

Metabolite analysis of stratum corneum in reconstructed human epidermis

○Sae Tanaka, Soma Yokota, Motohide Aoki, Hidetoshi Kumata, Tomonari Umemura, Tatsuya Uchida*
(Dept. Life Sciences, Tokyo Univ. Pharm. and Life Sci.)
uchi@toyaku.ac.jp

【背景・目的】
皮膚の最外層である表皮は，様々な代謝物を産生し，バリア機能を発現することで生体の恒常性を維持している．表皮バリア機能の低下は，恒常性の破綻に繋がる可能性がある．表皮バリア機能に不可欠なタンパク質代謝物として天然保湿因子 (NMFs: Natural Moisturizing Factors)，脂質代謝物としてセラミドが知られている．NMFs は，ヒスチジン，チロシンなどのアミノ酸と，これらの一部がさらに代謝されることで産生されるピロリドカルボン酸やウロカニン酸などで構成され，保水性に寄与する．セラミドは，脂肪酸とスフィンゴ塩基のアミド結合体であり，角層の保水性と強度の双方に関与する．これら代謝物を一斉定量分析することで，表皮バリア機能の分子レベル評価が可能と考える．本研究では，三次元培養ヒト表皮 (RHE; Reconstructed Human Epidermis)を独自に作成し，種差，個体差がないヒトの表皮代謝物分析の実現を図った．角層の代謝物を分析することで表皮バリア機能の評価を試みた．特に，湿度が表皮バリア機能に及ぼす影響を角層の代謝物量から評価した．

【実験方法】
37℃, 相対湿度 100%で気液界面培養した RHE を対照試料，気液界面培養 8 日目から相対湿度を約 45%に下げて 5 日間培養したものを低湿度 RHE とした．培養後，トリプシン/EDTA 溶液で角層のみを RHE から剥離採取した．角層のアンモニア水抽出画分から NMFs を逆相 HPLC で分析, アルコール抽出画分からセラミド類を順相 LC/MS で一斉分析した．

【結果・考察】
蛍光免疫染色法によって，NMFs の前駆体タンパク質であるプロフィラグリンの局在を確認したところ，低湿度 RHE において顕著なプロフィラグリンの発現を角層直下の顆粒層に確認した．プロフィラグリン代謝物である各 NMFs 量をチロシン量で標準化し，低湿度 RHE と標準試料で比較した．NMFs 成分によっては両試料に有意な差を確認した．培養時に低湿度に晒されることで，プロフィラグリンの発現量および代謝が変化することが示唆された．セラミド類に関する網羅的解析の結果を踏まえて，代謝物解析による表皮バリア機能の評価の有効性について議論する．

Key words human epidermis equivalents, metabolite analysis, natural moisturizing factors, ceramide, simultaneous quantitative analysis

G3H4 (0111) 臓器特異的 ECM ゲルを使用したチャイニーズハムスター腎臓由来幹細胞からの嚢胞様組織形成

○堺裕輔 [1], 久保善弘 [1], 河邉佳典 [1], 上平正道 [1], 井嶋博之 [1]*
([1] 九大院・工)

Cyst formation from Chinese hamster kidney-derived stem cells using organ specific ECM gel

○Yusuke Sakai[1], Yoshihiro Kubo[1], Yoshinori Kawabe[1], Masamichi Kamihira[1], Hiroyuki Ijima[1]*
([1]Fac. Eng., Kyushu Univ.)
ijima@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

【緒言】チャイニーズハムスターの腎臓から樹立した新規細胞株（Chinese Hamster Kidney 細胞; CHK 細胞）は、腎幹細胞に特徴的な遺伝子発現を示し、自己複製することが明らかとなっている。しかしながら、CHK 細胞の足場依存的な三次元組織体形成や腎臓分化は未だ実施されていない。本研究では、腎臓等から調製した臓器特異的細胞外マトリックス（ECM）を用い、CHK 細胞形態と腎臓分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。
【実験方法】ブタ腎臓及び肝臓を 1% Triton X-100 で脱細胞化・凍結乾燥し、臓器特異的 ECM（K-ECM 及び L-ECM）を調製した後、0.01 N HCl で可溶化した。市販のコラーゲンタイプ I のみのゲル、及び各臓器特異的 ECM とコラーゲンを 1 : 3 で混合したゲルを作製した。CHK 細胞を 1.7×10^5 cells/cm^2 で播種し、ゲルで包埋してサンドイッチ培養した。F-actin 染色による三次元細胞形態評価、及びリアルタイム RT-PCR 解析による細胞特徴解析を行った。
【実験結果・考察】ゲルサンドイッチ培養では、細胞増殖が劇的に制限され、立体的な嚢胞様組織（Cyst）を形成した。培養後数日で Cyst を形成し、培養経過に伴い融合して Cyst サイズが拡大した。コラーゲンコートディッシュ上での二次元培養と比較し、ゲルサンドイッチ培養では中胚葉、尿管芽、腎臓前駆・後腎間充織等の腎臓発生に関連する遺伝子群が培養 3 日目までに高発現した。尿細管や集合管等の腎臓成熟マーカーも Cyst の形成によって発現上昇が見られた。特に、Aqp1 等のトランスポーター に関連する遺伝子発現の上昇が顕著であった。三次元的な足場の提供は、CHK 細胞の極性獲得を支持すると共に腎臓分化へのシグナルを活性化したと考えられる。さらに、K-ECM は迅速な Cyst 形成と Cyst 間の融合を促進した。近位尿細管（Slc5a1）や中間尿細管・集合管（Kcnj1）遺伝子が強発現しており、腎臓への成熟が示唆された。このように、K-ECM は CHK 細胞由来 Cyst が獲得した腎臓特異的な機能を増強することに成功した。一方、L-ECM は、多くの Cyst が形成したものの、Cyst 間の融合は限定的で、腎臓に関連する遺伝子発現への影響はほとんど見られなかった。
【結言】K-ECM ゲルを基盤とした CHK 細胞由来 Cyst は、トランスポーター等の腎臓に関連する多くの遺伝子が高発現しており、薬剤等の取り込みや蓄積、細胞毒性等を効率的かつ正確に評価する新しい臓器モデルとして今後の発展が期待される。
【謝辞】本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）（JP20ae0101063）の助成を受けて実施した。
Key words three dimension, tissue engineering, extracellular matrix, gene expression

G3H4 (0112) マイクロキャリア表面電荷による歯髄由来間葉系幹細胞の増殖およびタンパク産生能評価

○大木悠一朗 [1], 原納弘大 [2], 原雄一 [2], 笹島義志 [2], 佐々木亮 [2], 伊藤隆徳 [3], 藤城光弘 [3], 伊藤大知 [1,4]*
([1] 東大院・工, [2] 旭化成, [3] 名大院・医, [4] 東大院・医)

Effect of surface charge on proliferation and protein production of dental pulp stem cells in microcarrier culture

○Yuichiro Oki[1], Kodai Harano[2], Yuichi Hara[2], Yoshiyuki Sasajima[2], Ryo Sasaki[2], Takanori Ito[3], Mitsuhiro Fujishiro[3,4], Taichi Ito[1,4]*
([1]Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, [2]Asahi Kasei Corp., [3]Grad. Sch. Med., Nagoya Univ., [4]Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)
taichi@m.u-tokyo.ac.jp

【緒言・目的】再生医療応用のための間葉系幹細胞の大量培養法としてマイクロキャリア培養法が期待されているが、マイクロキャリア表面の荷電が細胞増殖に与える影響を検討した例はほとんどない。本研究では DEAE 基の表面修飾密度の異なるマイクロキャリアを用いて表面荷電の違いが歯髄由来間葉系幹細胞(DPSC)の増殖に与える影響を検討した。また DPSC は抗炎症性タンパクを分泌することから、培養上清による炎症性疾患治療への応用も見据え本マイクロキャリア上での DPSC のタンパク産生能についても検討した。
【実験方法】セルロースポーラスビーズ(CPB)に対しジエチルアミノエチルクロライド塩酸塩を反応させることで DEAE の修飾度の異なるセルロースポーラスビーズ(CPB-DEAE)を作製した。CPB-DEAE についてイオン交換容量を測定し表面荷電を評価した。次に 4 種の CPB-DEAE 上で DPSC の培養を行った。生細胞を染色することで細胞接着及び増殖を経時的に評価した。またマイクロキャリアから細胞をトリプシンにより回収し生細胞数を経時的に評価した。また培養 10 日目に血清フリーの培地に交換し 2 日培養を行い培養上清を回収することで、培養上清中の総タンパク量および抗炎症性タンパク量を定量評価した。
【結果および考察】イオン交換容量測定により、0.55、1.03、1.82、2.50 meq/g の表面電荷の異なる 4 種の CPB-DEAE の作製に成功した。また生細胞染色により全ての CPB-DEAE 上で DPSC の接着及び増殖が観察された。また CPB-DEAE 上における生細胞数の経時変化より、表面電荷として 0.5-1.82 meq/g の範囲では DPSC の増殖能が向上した。しかしながら表面電荷が 2.50 meq/g においては DPSC の増殖能が低下した。これは表面のカチオン性が高すぎたことで細胞毒性を生じたためと推察される。以上のことから、DPSC 細胞増殖に最適な表面電荷は 1.82 meq/g であると示唆された。また培養上清中の総タンパク量は、平面培養と比較してマイクロキャリア培養により増加した。さらに抗炎症性タンパクの一種である HGF がマイクロキャリア上においても DPSC から分泌されることが明らかとなった。今後バイオリアクターを用いた CPB-DEAE マイクロキャリア培養による DPSC および培養上清の大量製造が期待される。

Key words DEAE modified microcarrier, dental pulp stem cell, cell proliferation, protein production

G3H4 (0113) 半導体加工技術で作製した微細な「ざる」を用いた培地-細胞分離

○九鬼真奈絵 [1], 長森英二 [1*], 四辻史也 [2], 田中和真 [2], 西川美和 [3], 近藤孝志 [3]
([1] 大阪工大・院, [2] 大阪工大・工, [3] 村田製作所)

Medium-cell separation using a fine "zaru" produced by semiconductor processing technology

○Manae Kuki [1], Eiji Nagamori *[1], Fumiya Yotsuji[2], Kazuma Tanaka [2], Miwako Nishikawa[3], Takashi Kondo [3]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol., [2] Fac. Eng., Osaka Inst. Technol., [3] Murata Manufacturing Co., Ltd.)
eiji.nagamori@oit.ac.jp

CHO 細胞(Chinese Hamster ovary cell)など浮遊細胞の培養の培地交換において、細胞と培地の分離は課題である。例えば灌流培養プロセスの構築では、クロスフロー型中空糸限外ろ過モジュールが組み込まれた ATF システム等が実装されているが、非常に高価な上、目詰まりの問題は悩ましい。一方、実験室操作のレベルでは、細胞と培地分離には遠心分離の他に、ナイロンメッシュフィルターを用いた方法などが用いられてきた。細胞製造などで用いられるアイソレータなど閉鎖空間で細胞と培地の分離を行う際は、遠心機を必要としないメッシュフィルターを活用できれば有益に思えるが、従来のナイロンメッシュフィルター（編み込み式）は開口度が約 15 %等と低く目詰まりを起こしやすく、また穴の形状が不均一であるため精緻な分離ができない（漏れが生じやすい）。本研究では半導体加工技術によって作製された、金属製多孔膜を細胞-培地分離に活用する検討を行った。この金属製多孔膜は開口度が約 50 %と高く、貫通孔で穴の形状が均一であり、またフィルターの厚みが小さいという特徴を有する。
まずナイロンメッシュフィルターと金属製多孔膜を用い、細胞分離に適したメッシュサイズ（穴径）の探索を行った。実験には CHO 細胞を用いた。金属製多孔膜（村田製作所、格子径 4, 10, 15, 20 μm）に 10^6 個/mL の細胞懸濁液 4 mL を通過させ、評価した。比較対象として、同程度の処理面積を有する市販の繊維編込み式のナイロンメッシュフィルター（カタログ上の穴径 5, 10, 20 μm）を用いた。編込み式フィルターでは、穴径 5 μm では低開口度に起因する目詰まりが顕著でろ過が完了できず、10 μm では穴径の不均一性に由来した細胞漏出（透過）が観られたため、分離に適した穴径を選ぶことが出来なかった。一方、金属製フィルターでは 4 μm, 10 μm で速やかな分離が可能であった。このろ過処理で死細胞率が低下することが明らかになった。さらに懸濁液量を増やしケーク形成された状態では、10 μm では漏出が顕著となった。4 μm ではろ過速度はケーク形成量に反比例することが確認された。逆洗浄操作を検証したが、一旦付着したケークを除去することは困難であった。目詰まりを防ぎつつ、大きな液量を処理できる方法を開発する必要がある.

Key words cell separation, Chinese Hamster ovary cell, semiconductor processing technology

G3H4 (0201) 乳酸発酵における機械学習を用いた天然培地設計

○佐藤 美優[1]*, 中島 拓都[1], 邱 泰瑛[1], 小西 正朗[1]
([1]北見工大・工)

Optimization of natural medium composition in lactic acid fermentation by machine learning

○Sato Miyu[1]*, Nakajima Takuto[1], Chiou Tai-Ying[1], Konishi Masaaki[1]
([1] Kitami Inst. Technol)
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

【背景・目的】乳酸菌は乳酸の工業生産や健康食品原料として利用されている。多くの乳酸菌は栄養要求性が高く，アミノ酸やビタミンを培地に添加する必要がある。工業的な乳酸培養においては，これらの成分を含むペプトンや酵母エキス等を加えた天然培地が利用される。しかし，天然培地の組成はすべて明らかになっておらず添加する成分のブランドやロットによって乳酸菌の培養結果が変動することが知られている。乳酸菌の天然培地中の挙動を解析するため，ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS/MS)による培地プロファイリングデータと乳酸生産量の関係を機械学習により解析した。
【方法】成分組成の標的分析は GC-MS/MS を使用し，47 成分を定量した。研究室所有のペプトン 22 種類の分析値から得られた主成分解析で異なるクラスターに属したペプトン 5 種類(Trypton，Protease Pepton (BD 社)，ハイポリペプトン SN，ハイカザミノ酸(ダイゴ) (日本製薬)，ポテトペプトン CP(極東製薬))および BD 社の Bacto yeast extract(YE)を添加した MRS 改変培地(11 条件)を用い，*Lactobacillus lactis* NBRC 100933 株を培養した。pH 調整のため，40 g/L の炭酸カルシウムを添加した。生産した乳酸量は F-kit により評価した。YE および Pepton の分析値を独立変数，乳酸生産量(24 h)を従属変数とし，12 種の異なる機械学習アルゴリズムを用いて機械学習モデルを構築し，学習・予測精度を比較した。また，
AI モデルを未知関数とするベイズ最適化を用いて，最適な培地組成を予測した。
【結果および考察】培地組成の違いにより，乳酸生産量に最大 34%の差(3.76 g/L〜11.1 g/L)がみられた。また，YE 添加により最大 56%の差(8.00 g/L〜16.8 g/L)がみられた。複数の AI モデルを比較すると，線形回帰に比べ非線形回帰を用いたモデルの方が高精度な予測を示した。また，決定木, Gradient Boosting Regressor は過学習傾向が認められた。Random Forest Regressor(RF)や深層学習(DNN)が良好な学習・予測結果を示した。一方，相互作用を考慮した場合，線形回帰モデルへの適合性が大幅に改善した。独立変数間の相互作用の影響により線形モデルは非線形モデルと比べ，培養データへの適合性が低かった可能性が考えられた。また，学習済み DNN を用いたベイズ最適化により，最適培地組成を検討した。予測した最適培地では，学習用データの含まれる乳酸生産量の最高値よりも 1.74 倍の乳酸生産(29.3 g/L)が見込まれた。

Keywords: lactic acid; *Lactococcus lactis*; machine learning; optimization; peptone; yeast extract

G3H4 (0202) エタノールアミンを原料としたグリコール酸の微生物合成における実験計画法による反応条件の最適化

○林田 宗記[1], 近江　翼, 村主　渉[1], 三浦　靖[1],杉森 大助[2], 山田 美和[1]*
([1]岩手大・農, [2]福島大・理工)

Optimization of reaction conditions for microbial production of glycolic acid from ethanolamine by experimental design

○Munenori Hayashida [1], Tsubasa Omi [1], Wataru Muranushi [1], Makoto Miura [1], Daisuke Sugimori [2], Miwa Yamada [1]*
([1]Dept. Biolog. Chem. Food Sci., Iwate Univ., [2]Dept. Symbio. Syst. Sci. Technol., Fukushima Univ.)
myamada@iwate-u.ac.jp

【背景・目的】エタノールアミン（Etn）は、リン脂質のリン酸に結合するアルコールの一種であり、様々な生体膜から獲得することが可能である。本研究では、未利用生物資源を原料とした有用物質の合成を目指している。我々はこれまでに、糸状菌 *Synecephalastrum racemosum* 由来 Etn オキシダーゼ (EAO) 遺伝子[1] と大腸菌由来ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (AldA) 遺伝子を組換え大腸菌内に共発現させ、2 段階の酵素反応によって、Etn を出発原料として有用有機酸であるグリコール酸 (GA) の合成系を構築した。本研究では、上記 2 種の酵素を共発現した組換え大腸菌休止菌体を用いた GA 生成反応における最適反応条件を決定することを目的とした。
【方法】*eao*, *aldA* 遺伝子を含む共発現用プラスミド pET24a-eao-aldA を大腸菌 BL21(DE3) に導入した。得られた形質転換体を $CuCl_2$ 含有 LB 培地で培養し、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシドによる遺伝子の発現誘導を行った。Etn を含むバッファー中で培養菌体を懸濁し、振盪することによって休止菌体反応を行った。その後、反応液を高速液体クロマトグラフィーに供して生成 GA 濃度を定量した。グリコール酸合成量が理論上最大となる反応条件は、応答曲面法によって回帰モデルを作成して推定した。
【結果】応答曲面法により作成した回帰モデルを用いて、GA 収率が最大となる休止菌体反応条件を推定した結果、GA 収率が最大となる反応条件は 25 μM Cu^{2+}、0.63 M Etn、pH 9.4、19.5℃、8.7 d 反応させた場合と推定され、その推定 GA 生成量は 38.1 mM と見積もられた。実際に、推定された最適反応条件での休止菌体反応を行った結果、GA 生成量は 38.3 mM であり、応答曲面法による推定 GA 生成量の 95%信頼区間 (29.6 - 45.9 mM) の範囲内であった。この結果から、応答曲面法回帰モデルは本合成反応系の最適反応条件を推定するツールとして有効であると判断した。以上、本研究により休止菌体反応における Etn を出発原料とした GA 合成の最適条件を決定できたと結論づけた。
【参考文献】
1. Y. Hirano et al., Applied Microbiology and Biotechnology, 100, 3999-4013 (2016)

Key words ethanolamine, glycolic acid, response surface methodology, resting cell reaction

G3H4 (0203) Effect of processing conditions on *Talaromyces purpurogenus* extracellular pigment: Thermal and UV stability kinetics

○Sharad Bhatnagar[1] and Hideki Aoyagi[1*]
([1]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Effect of processing conditions on *Talaromyces purpurogenus* extracellular pigment: Thermal and UV stability kinetics

○Sharad Bhatnagar[1] and Hideki Aoyagi[1*]
([1]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

Recently, fungal pigments are being explored as a source of colourants as an alternative to conventional synthetic pigments due to their environmentally friendly production. However, the use of these pigments in industrial processes is restricted due to their limited thermal stability, since biological pigments are generally heat labile in nature. Therefore, it is necessary to explore their stability under thermal processing conditions to ensure that pigment can withstand traditional pasteurisation and sterilisation processes. To this end, *Talaromyces purpurogenus* extracellular pigment was exposed to various temperatures (30, 50, 70, and 90 °C) and pH (4, 6, and 8) regimes. Since the thermal degradation of fungal pigments are known to follow the first order kinetics, Arrhenius and Ball models were used to understand the kinetics of degradation. Second-order model was used to explain the degradation at higher temperatures. UV stability of the pigment can reflect the stability under storage conditions, as well as the possibility of UV sterilisation as an alternative to thermal sterilisation processes. For this, UV-A and UV-C destruction kinetics of the pigment were established using first-order and Weibull models. The data indicated that pigment was stable at ambient temperatures, and thermal stability was enhanced in basic pH range. UV assisted degradation was found to be dependent upon exposure dosage. The pigment was robust enough to tolerate the thermal and UV exposure routinely encountered during food processing, and has the potential to serve as a food colourant.

Key words Extracellular pigment, non-thermal stability, *Talaromyces purpurogenus*, thermal stability.

G3H4 (0204) CO_2 を再資源化する Gas-to-Lipids バイオプロセスの開発

○奥田 源己[1], 渡邉 研志[1], 中瀬 玄徳[1], 廣谷 蘭[1], 石垣元務[1], 中島田 豊[1], 松浦 将吏[2] 松山恵介[3], 秋 庸裕[1]
([1]広島大院・統合生命, [2]中国電力株式会社, [3]長瀬産業株式会社)

Development of Gas-to-Lipids bioprocess for CO_2 recycling

○Genki Okuda[1], Kenshi Watanabe[1], Gentoku Nakase[1], Ran Hirotani[1], Motomu Ishigaki[1], Yutaka Nakashimada[1], Masashi Matsuura[2], Keisuke Matsuyama[3], and Tsunehiro Aki[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, [2]Chugoku Electric Power Co., Inc., [3] NAGASE & CO., LTD.)
aki@hiroshima-u.ac.jp

【背景・目的】多様な有用脂質を生産するラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属は健康食品、化粧品、化成品や燃料など幅広い分野における産業微生物として利用が期待される。当研究グループでは従属栄養性であるオーランチオキトリウムを用いたバイオリファイナリー技術の確立を進めており、近年実施した大型藻類コンブの主要糖質の一つであるアルギン酸を活用する研究において、酢酸などの有機酸を旺盛に資化する条件を新たに見出した。そこで本研究では、CO_2 から嫌気的に酢酸を生成する酢酸生成菌と好気性のオーランチオキトリウムを組み合わせた二段階発酵により、カーボンリサイクルと有用脂質生産を同時に実現する Gas-to-Lipids バイオプロセスの確立に向けた諸条件の検討を目的とした。
【結果】トリグリセリド高生産性の *Aurantiochytrium limacinum* SR21 株について標品酢酸を基質とした培養条件を検討したところ、3−4% (v/v)の酢酸を含む培地で特に顕著な細胞増殖と脂肪酸生産が認められた。そこで、酢酸生成菌 *Acetobacterium woodii* DSM1030 株の CO_2-H_2 混合ガスを基質とした培養で得られた 29.3 g/L 酢酸と菌体を含む *A. woodii* 培養液、同培養液の遠心分離上清、および標品酢酸を 3% (v/v)となるよう添加した *A. woodii* 用培地にそれぞれ SR21 株を接種して培養したところ、*A. woodii* 培養液で最大となる脂肪酸生産（4.5 g/L）が認められた。次にオーランチオキトリウムの流加培養条件を検討するため、アスタキサンチン高生産性の *Aurantiochytrium* sp. RH-7A-7 株を pH スタット法で培地中の酢酸濃度を 10 g/L に維持して培養した。その結果、144 時間の培養で細胞収量は 37.8 g/L、対酢酸収率は 16%であった。細胞収率のさらなる向上と脂質蓄積誘導条件について検討を進めている。

Key words *Aurantiochytrium* sp., lipid production, carbon dioxide fixation

G3H4 (0205) *Ideonella sakaiensis* による PET を発酵原料としたポリヒドロキシアルカン酸の生産

○藤原涼雅[1], 佐貫理佳子[2], 網代広治[3], 福居俊昭[4], 吉田昭介[1]*
([1]奈良先端大・バイオ, [2]京都工繊大・応用生物, [3]奈良先端大・物質創成, [4]東工大・生命理工)

Direct fermentative conversion of poly(ethylene terephthalate) into polyhydroxyalkanoate by *Ideonella sakaiensis*

○Ryoga Fujiwara[1], Rikako Sanuki[2], Hiroharu Ajiro[3], Toshiaki Fukui[4], Shosuke Yoshida[1]*
([1]NAIST Biol. [2]Kyoto Inst. Tech. [3]NAIST Mater. [4]Tokyo Tech.)
ssk-yoshida@bs.naist.jp

石油由来のプラスチックは軽量かつ丈夫で加工に優れ、利便性をもたらす素材として幅広く利用されている。しかし一方で、生分解性を持たないために環境中に蓄積し、深刻な環境汚染を引き起こしている。そのため、廃棄後は微生物により分解される生分解性プラスチックが開発されてきた。その一つが微生物が産生する polyhydroxyalkanoate(PHA)である。現在、PHA 工業生産の発酵原料には植物油や糖が用いられているが、その末端価格が普及の障壁となっている。そこで安価な代替原料として、poly(ethylene terephthalate)(PET)の熱分解物(Kenny *et al.*, 2008)、酵素による加水分解産物(Tiso *et al.*, 2020)を用いた *Pseudomonas* 属細菌による PHA 生合成が報告されている。

Ideonella sakaiensis 201-F6 株は PET を分解・代謝することができる細菌である(Yoshida *et al.*, 2016)。我々は、ゲノム解析により、*I. sakaiensis* が、PHA 高生産菌として知られる *Cupriavidus necator* H16 株の PHA 生合成遺伝子クラスターと相同性の高い領域を有することを見出した。そこで、PET を炭素源とした培地で生育させた *I. sakaiensis* を親油性蛍光色素 Nile Red で染色したところ、細胞内に蛍光染色された顆粒が観察された。同様の顆粒は、透過型電子顕微鏡(TEM)による観察でも確認された。次に、菌体のクロロホルム抽出画分を ^{1}H NMR により測定したところ、PHA の一種である poly(3-hydroxybutyrate)(P3HB)の帰属と一致した。また、サイズ排除クロマトグラフィーにより、重量平均分子量(M_w)8.0×10^5、数平均分子量(M_n)3.2×10^5の高分子を含むことがわかった。これは、*C. necator* の生産する P3HB(M_w, 1.0×10^6; M_n, 4.0×10^5)と類似している(Fukui *et al.*, 1998)。次に、凍結乾燥菌体をメタノリシス処理し、ガスクロマトグラフィーにより PHA の組成分析と定量を行った。メチル化された PHA モノマーには、メチル 3HB (99 mol%以上)と微量のメチル 3-hydroxyvalerate (3HV) (1 mol%未満) が検出された。このことから、合成された PHA はわずかに 3HV を含む poly(3HB-*co*-3HV)であることがわかった。PHA 最大蓄積量は乾燥菌体重量あたり 58±0.7w/w%を占め、培養液当たりの PHA 最大生産量は 1.5g±0.1 g/L であった。これは、PET 分解物を発酵原料として用いた Kenny ら、Tiso らの研究における PHA 生産量のそれぞれ 6 倍、9.4 倍、*C. necator* の植物油を原料とした PHA 生産 (3.2 g/L) と同レベルであった。

本研究により、*I. sakaiensis* は難分解性である PET を著量の PHA に直接発酵変換可能であることが明らかとなった。

Key words poly(ethylene terephthalate) (PET), *Ideonella sakaiensis*, polyhydroxyalkanoate (PHA), poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB), poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-*co*-3HV)]

G3H4 (0206) 新規フラクトオリゴ糖生産酵母 *Zalaria* sp. Him3 の単離とフラクトオリゴ糖生産

○吉川　潤[1]*, 本田　喜克[1], 齋藤　佑衣[1], 佐藤　大斗[1], 岩田　寛[2], 眞榮田　麻友美[1], 柏木　豊[1,2], 前橋　健二[1,2]
([1]東農大・応生科, [2]東農大院・応生科)

Isolation of *Zalaria* sp. Him3 as a novel fructooligosaccharides-producing yeast and its production

○Jun Yoshikawa[1]*, Yoshikatsu Honda[1], Yui Saito[1], Daito Sato[1], Kan Iwata[2], Mayumi Maeda[1], Yutaka Kashiwagi[1,2], Kenji Maehasi[1,2]
([1]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)
Jy207183@nodai.ac.jp

（諸般の事情により、プログラム記載の菌名表記から変更させていただきました）

フラクトオリゴ糖（FOS）は，ショ糖のフルクトース残基に 1～3 個のフルクトースが結合した構造を持つオリゴ糖であり，摂取後に大腸でビフィズス菌などの有用菌に資化されることでその増殖を促し，整腸効果といった生理機能を発揮することが知られている．FOS の生産には，微生物由来 β-フラクトフラノシダーゼ（FFase）によるフルクトース転移反応が効果的であり，国内では黒色酵母 *Aureobasidium pullulans* や糸状菌 *Aspergillus japonicus* による実生産例が知られている．それ以外にも転移活性の高い微生物由来 FFase が報告されているが，酵母においては *Aureobasidium* 属に限られている．そこで本研究において新たな FOS 生産酵母を探索したところ，新たに *Zalaria* sp. Him3 を見出すに至り，その FOS 生産性について検討した．

花や食品，ハチミツなど 29 の供試源を高グルコース濃度で集積培養し，スクロースを基質とした評価用培地にて FOS の生産を確認した．その結果，干芋から単離した 5 株の内で Him3 株のみが FOS 生産能を有していた．Him3 株は，ポテトデキストロース寒天培地上で 7 日間培養することで黒い色素を産生したが，*A. pullulans* などで見られる偽菌糸形態をほとんど示さなかった．ITS 配列の相同性解析では *Zalaria* 属と *Aureobasidium* 属が混在していたが，β-チューブリン部分配列の相同性は 99.0 %と *Zalaria obscura* が最も高かった．さらに，本菌のゲノム解析における参照ゲノムとして *A. pullulanas* EXF-150 のゲノム情報を用いたところ，そのマッピング率は約 4 %と著しく低かった．これらのことから，本菌株を *Zalaria* sp. Him3 と同定した．Him3 株は液体培養時に菌体が塊を形成せず，細胞懸濁液をそのまま酵素として利用することができた．FFase の生産性は 15 %スクロース培地で培養した時に最も高く，元の培養液と同濃度の懸濁液で 5.51 U/mL であった．この菌体懸濁液を用いた FOS の生産性は，約 500 g/L のスクロースから 30 ℃，72 時間で 309 g/L を示し，消費スクロース当たり 63.7 %の高収率を示した．

本研究によって新たな FOS 生産菌として見出された *Zalaria* sp. Him3 は，これまでに実用化されている *Aureobasidium* 属や *Aspergillus* 属と遜色ない FOS 生産能を示し，今後の実用性が十分に期待できる．

Key words fructooligosaccharides, *Zalaria*, beta-fructofuranosidase, black yeast

G3H4 (0207) 藍藻培養における黄金色藻 *Poterioochromonas* の捕食被害低減の試み：亜リン酸による抑制効果の検討

○戸田成美, 村上博紀, 石田丈典, 池田丈, 舟橋久景, 黒田章夫, 廣田隆一*
（広島大院・統合生命科学）

Reducing predation impact of golden algae Poterioochromonas on cyanobacterial culture using phosphite

○Narumi Toda, Hiroki Murakami, Takenori Ishida, Takeshi Ikeda, Hisakage Funabashi, Akio Kuroda, Ryuichi Hirota*
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)
hirota@hiroshima-u.ac.jp

微細藻類の実用規模培養では、原生生物のコンタミネーションとその捕食による藻類の生産性低下が大きな課題となっている。黄金色藻 *Poterioochromonas malhamensis* は藍藻培養に壊滅的な被害を及ぼす捕食性原生生物として知られているが、その被害を抑制する有効な方法は開発されていない。本研究室では、藍藻 *Synechococcus elongatus* をはじめとする宿主微生物に対して亜リン酸資化能を付与し、リン源を競合する雑菌に対して増殖の優位性を発揮させるコンタミネーション抑制技術を開発している。しかし、これまでに捕食性原生生物に対する亜リン酸の影響は調べられていない。そこで本研究では、亜リン酸が *P. malhamensis* による捕食被害の抑制に有効であるかどうかを検討した。

まず、藍藻培養における捕食被害を実験室環境で再現するため、河川や池から採取した環境水（未滅菌）を用いて *S. elongatus* PCC 7942 (*Syn* 7942)の培養を行った。その結果、ほぼすべての環境水において *Syn* 7942 は一時的に増殖するものの、黄金色藻とみられる原生生物が高頻度で出現し、藍藻の細胞数が激減する様子が観察された。限界希釈法により捕食者の単離を行い、18S rDNA を対象としたシーケンス解析を行った結果、複数の環境水から *P. malhamensis* が同定された。次に、*P. malhamensis* の捕食に対する亜リン酸の影響を調べるため、*Syn* 7942 と *P. malhamensis* の共培養系に、リン酸または亜リン酸を最終濃度 0.2, 2.0, 10, 20 mM で添加して培養を行った。リン酸を添加した場合はいずれの濃度においても捕食を抑制することはなかった。一方、亜リン酸を添加した場合は、低濃度（0.2, 2.0 mM）では捕食は抑制できなかったものの、20 mM では再現良く捕食を抑制することができた。次に、複数の環境水に対して同様の実験を行ったところ、使用する環境水によって亜リン酸による捕食抑制効果が異なることがわかった。この原因を調べるため、培養液の 18S rDNA を対象とした菌叢解析を行った結果、亜リン酸で捕食が抑制されなかった培養液では、*P. malhamensis* ではなく系統的に異なる黄金色藻 *Paraphysomonas* が優占していた。すなわち、*P. malhamensis* と *Paraphysomonas* は亜リン酸に対して異なる感受性を示すことが示唆された。これらの知見は、商業規模の微細藻類培養において、捕食被害を軽減する方法を開発するための手がかりになると考えられる。

Key words cyanobacteria, contamination, predation, phosphite

G3H4 (0208) 大腸菌亜リン酸依存性株の生存性長期化と緊縮応答シグナル分子(p)ppGpp 合成促進因子 YtfK の関係

○百川直輝[1], 石田丈典[1], 池田丈[1], 舟橋久景[1], 渡辺智[2], 黒田章夫[1], 廣田隆一[1]*
([1]広島大院・統合生命科学, [2]東農大・生命科学部)

The involvement of a (p)ppGpp synthesis activator YtfK in the long-term survival phenotype of a phosphite-dependent *Escherichia coli* strain

○Naoki Momokawa[1], Takenori Ishida[1], Takeshi Ikeda[1], Hisakage Funabashi[1], Satoru Watanabe[2], Akio Kuroda[1], Ryuichi Hirota[1]*
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. Agric.)
hirota@hiroshima-u.ac.jp

遺伝子組換え技術の発展に伴う組換え体の産業利用への期待とともに，生物学的封じ込めという組換え体の拡散防止技術に対する注目が高まっている．我々は，環境中にほとんど存在しない還元型のリン化合物である亜リン酸（HPO_3^{2-}）に，宿主細胞の生育を依存させる手法を開発している．本手法を適用した大腸菌株（RN1008）に関するこれまでの研究過程で，最大到達菌体濃度の低下や細胞外多糖分泌の亢進といったいくつかの特異的な表現型が見出されてきた．本手法の実用化を目指す上で，亜リン酸依存性を付与して封じ込めた宿主細胞にどのような変化が生じているのか理解しておくことは，非常に重要である．そこで本研究では，RN1008 に特異的な表現型の一つとして見出された生存の長期化の原因となる因子について解析を行った．

RN1008 では，Pho レギュロン（リン酸飢餓時に発現が活性化される遺伝子群）の抑制因子である PhoU の遺伝子を破壊しており，Pho レギュロンの活性化が予想された．次世代シークエンサーによる RNA-seq 解析を行った結果，Pho レギュロンに属する複数の遺伝子が RN1008 で過剰発現していることが確認された．そこで，Pho レギュロンの過剰発現と生存の長期化との関係を調べるために，Pho レギュロンのセンサータンパク質 PhoR の遺伝子を破壊し，Pho レギュロンの抑制を試みた．*phoR* 破壊株の培養経過に伴う生存の変化を調べた結果，通常の RN1008 で見られた生存の長期化は見られなかったことから，RN1008 における生存の長期化は Pho レギュロン下流の因子により生じている可能性が示唆された．そのため，RNA-seq 解析の結果を基に，生存の長期化を生じる可能性が考えられる遺伝子を絞り込んだところ，緊縮応答シグナル分子(p)ppGpp の合成・分解酵素 SpoT の合成活性を高める YtfK という因子の関与が予想された．そこで，*ytfK* を破壊した亜リン酸依存性株を作製し，培養経過に伴う生存の変化を通常の RN1008 と比較した．その結果，*ytfK* 破壊株では生存の長期化は見られなかった．したがって，RN1008 における生存の長期化は，YtfK の過剰発現が原因であることが示唆された．

Key words phosphite, viability, biocontainment, signal transduction

G3H4 (0209) 亜リン酸依存性による生物学的封じ込めを適用した藍藻の pH 依存的増殖メカニズムの解析

○日野智仁[1], 石田丈典[1], 池田丈[1], 舟橋久景[1], 渡辺智[2], 黒田章夫[1], 廣田隆一[1]*
([1]広島大院・統合生命科学, [2]東農大・生命・バイオ)

Characterization of the pH-dependent growth mechanism of a biologically contained cyanobacterial strain strictly dependent on phosphite

○Tomohito Hino[1], Takenori Ishida[1], Takeshi Ikeda[1], Hisakage Funabashi[1], Satoru Watanabe[2], Akio Kuroda[1], Ryuichi Hirota[1]*
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. Agric.)
hirota@hiroshima-u.ac.jp

【目的】生物学的封じ込めは遺伝子組換え体の漏出リスクを低減する方法論であり、屋外開放条件での組換え体の利活用を可能にする技術として期待されている。当研究室では、通常の生物が利用できず、環境中に有効な濃度で存在しないリン源である亜リン酸に生育を依存するようにリンの代謝を改変する技術を開発している。我々は本手法を利用した生物学的封じ込め技術を藍藻(*Synechococcus elongatus* PCC 7942)に適用し、その有効性を実証してきた。今回、我々は本手法を適用した亜リン酸依存性株に、親株とは異なり培地の pH に感受性を示し、緩衝液を使用しなければ培養できないという表現型があることを見出した。しかし、緩衝液の使用は実用的な大規模培養を想定した際にコストの面から改善が必要である。そこで本研究は、亜リン酸依存性株において pH 感受性が生じる原因を解明し、緩衝液を使用せずに効率良く培養する手法の確立を目的とした。
【方法・結果】pH 感受性の原因を調べるため、培養時の培地の pH を調べたところ、特定の pH (6.5 以下)になると増殖が著しく抑制された。また初期の培地の pH をアルカリ側に調整することで、この現象は改善された。次に、亜リン酸依存性株の継代培養を続けたところ、緩衝液や pH の調整を必要とせずに増殖する変異株(NBM 株）が得られた。NBM 株の解析を行ったところ、亜リン酸輸送体である HtxBCDE 遺伝子の導入領域付近がタンデム化しており *htxBCDE* が倍加していることが確認された。この *htxBCDE* が倍加した遺伝子型と緩衝液のない条件での増殖に相関が見られたことから、pH 変動による増殖抑制は HtxBCDE の亜リン酸の取り込みに影響が生じているためだと考えられた。これらのことから、培養の経過に応じた pH 調整が封じ込め株の培養に有用であることが確認された。また、これらの結果から、pH 感受性を改善するためには HtxBCDE の発現量を増加させることが有効であると考えられたため、現在 HtxBCDE 発現量を調節した株の作製を行っている。

Key words phosphite, cyanobacteria, pH, transporter

G3H4 (0210) CHO 細胞培養プロセスに発生する非天然構造抗体の分離と特性解析

○伊藤優花[1], 鬼塚正義[2]*,天羽宏枝[2], 本田真也[3]
([1]徳島大院・創成科学研究, [2]徳島大院・社会産理工, [3]産総研)

Separation and characterization of non-native antibody in CHO cells culture process

○Yuka Ito[1], Masayoshi Onitsuka[2]*, Hiroe Amou[2], Shinya Honda[3]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Tokushima Univ., [2]Grad. Sch. Biosci. Bioind, Tokushima Univ., [3]AIST)
onitsuka@tokushima-u.ac.jp

【背景・目的】抗体医薬品の生産プロセスにおける凝集体形成は、収量低下や免疫原性の点で問題となっている。このことから、凝集化の原因である非天然構造抗体の特性を解明し、凝集抑制法を確立することが望まれている。抗体医薬品はチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などの動物細胞宿主を用いて生産されており、中でも培養プロセスにおける凝集体形成のメカニズムは明らかにされていない。本研究では、凝集化抗体・非天然構造抗体と特異的に結合する人工タンパク質 AF.2A1 を用いて、CHO 細胞からの非天然構造抗体の分泌を検出し、その構造的特徴を明らかにすることを目的とした。

【実験方法】AF.2A1 配列に、精製用の 6×His 配列、検出用のルシフェラーゼ相補アッセイで使用するルシフェラーゼ断片配列を融合した HiBiT-AF.2A1(6×His)発現ベクターを調製した。AF.2A1 発現ベクターと IgG1 抗体配列を安定導入した CHO 細胞（CHO AF.2A1-IgG1-No.18）を樹立し、バイオリアクター培養を実施した。培養上清から固定化金属親和性クロマトグラフィー（IMAC）、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって非天然構造抗体を精製した。精製抗体を用いてルシフェラーゼ相補アッセイ、SDS-PAGE を行い、非天然構造抗体の特性を解析した。

【結果ならびに考察】コントロール群と比較して CHO AF.2A1-IgG1-No.18 株の培養上清では、ルシフェラーゼ相補アッセイで優位な発光強度の増加が観測された。即ち、培養上清に分泌性の非天然構造抗体を検出することができた。このことから、CHO 細胞内で形成された非天然構造抗体が細胞外へ分泌されていることが示唆された。また IMAC と SEC によって非天然構造抗体の分離に成功した。精製した非天然構造抗体は主に高分子量の凝集体であり、ルシフェラーゼ相補アッセイで高い発光強度がみられた。SDS-PAGE の結果より、非天然構造抗体の主な成分は IgG1 抗体の重鎖であった。以上の結果より、精製した非天然構造抗体は CHO 細胞内で軽鎖とアセンブリー出来なかった重鎖成分が凝集化したものであり、凝集体の分子表面に AF.2A1 が結合した状態であると推測された。今後、精製した非天然構造抗体の特性解析を進める予定である。

Key words non-native antibody, CHO cell, cell culture process

G3H4 (0211) サメ由来 IgNAR 抗体配列の融合による新規定常領域創製の試み

○吉岡由真[1], 天羽宏枝[2], 鬼塚正義[2]*
([1]徳島大院・創成科学研究, [2]徳島大院・社会産理工)

Attempt to create a new constant region of antibody by fusing shark-derived IgNAR

○Yuma Yoshioka[1], Hiroe Amou[2], Masayoshi Onitsuka[2]*
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Tokushima Univ., [2]Grad. Sch. Biosci. Bioind, Tokushima Univ.)
onitsuka@tokushima-u.ac.jp

[背景・目的] 近年、ヒト由来 IgG1 抗体と構造フォーマットが異なる重鎖抗体が注目されている。サメ由来重鎖抗体 IgNAR は、タンパク質変性剤である尿素を多く含む血中環境下でも立体構造を保持していることから、構造安定性が高いことが示唆されている。この高い構造安定性は IgNAR 型新規中分子抗体など、抗体エンジニアリングに利用できる可能性がある。本研究では IgNAR の定常領域（C2-C5 ドメイン）をヒト由来 IgG1 抗体の配列と融合させた新規抗体を創製することを目的とし、動物細胞を用いて抗体発現量や分子特性を検証した。

[実験方法] IgNAR 由来の V ドメインを含む 5 種類の抗体配列（C_H2-C_H3,C2-C3,C2-C_H3,C4-C5,C4-C_H3）の発現プラスミドを調製し、Chinese Hamster Ovary(CHO)細胞による一過性発現をおこなった。抗体の発現はキャピラリー電気泳動により確認した。培養上清からの抗体精製後、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）分析、ANS 蛍光スペクトル測定、CD スペクトル測定、熱変性測定し、抗体構造や安定性を評価した。

[結果及び考察]細胞内および培養上清におけるキャピラリー電気泳動の結果、C4-C5 は細胞内でのみ発現が検出され、細胞内凝集体の形成を示唆する高分子量バンドが確認された。精製抗体の SEC 分析の結果、IgNAR 配列を含む抗体は全て会合体（二量体～凝集体）を形成していた。蛍光スペクトル測定では、C2-C3 と C4-C5 で大きな蛍光強度の増大が見られたことから、これらは疎水性アミノ酸が抗体分子の表面に露出した不安定な構造であることが示唆された。CD スペクトル測定の結果、C4-C5 以外の抗体配列では、抗体の Ig ドメインに特徴的なβ-ストランド構造を多く含むスペクトル形状であったため、CHO 細胞内で適切にフォールディングして分泌発現されたと考えられる。一方、C4-C5 は形状が異なる CD スペクトルを示し、また分泌発現量が非常に少なかったことから、細胞内でのフォールディングが困難な配列であることが推測された。IgG1 抗体定常領域である C_H2-C_H3 が最も熱安定性に優れていたが、これは C_H2 ドメインに付加されている N-型糖鎖による効果が大きいことが示唆された。そこで現在、C2-C_H3 の C2 ドメインに N-型糖鎖を付加させた C2-C_H3(N-Glyc.)を調製しており、今後、分子特性の評価を行う。

Key words IgNAR, CHO cell, Transient expression, Antibody engineering

G3H4 (0212) 組換え CHO 細胞の培養プロセスで生じる凝集化抗体の構造的特徴

○鬼塚正義[1]*, 天羽宏枝[1]
([1]徳島大院・社会産理工)

Structural properties of aggregated antibody produced in recombinant CHO cell culture process

○Masayoshi Onitsuka[1]*, Hiroe Amou[1]
([1]Grad. Sch. Biosci. Bioind, Tokushima Univ.)
onitsuka@tokushima-u.ac.jp

【背景・目的】抗体医薬品の多くはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を宿主とした組換えタンパク質として生産されている。生産培養プロセスで凝集化抗体が発生することは早くから知られていたものの、その原因は長らく解明されていなかった。近年、当グループは細胞内で形成された凝集化抗体・ミスフォールディング抗体が分泌される仮説を提唱している（Onitsuka *et.al.*, 2019）。真核生物が保有するタンパク質品質管理機構を通過する凝集化抗体・ミスフォールディング抗体の特徴を明らかにすれば、複雑な分子構造を有する次世代型抗体の安定化設計や生産量向上に有用である。本研究では CHO 細胞培養過程で発生する凝集化抗体の構造的特徴の解明を目的とした。

【実験方法】バイオリアクター培養で調製した培養上清（IgG1 抗体 1g/L）から、部位特異的結合を利用した親和性クロマトグラフィー（Protein A, Fc receptor）により IgG1 を精製した。凝集化抗体、単量体抗体に対してトリプシンを用いたプロテアーゼ限定分解実験を行い、ペプチド断片を MALDI-TOF-MS で解析した。さらに変異体抗体を一過性発現により調製した。

【結果及び考察】親和性クロマトグラフィーの結果、Protein A カラムと比較して、Fc receptor カラムでは凝集抗体の含有量が低減した。Fc receptor は抗体のヒンジ領域～CH2 ドメインに結合するので、この領域の立体構造変化が凝集体で生じているために Fc receptor カラムでは凝集抗体の結合量が低下したと考察された。さらにプロテアーゼ限定分解実験の結果、凝集化抗体では Fc receptor 結合部位と同じ領域がプロテアーゼ切断を受けにくくなっていた。この結果より、抗体凝集化ではヒンジ領域～CH2 ドメイン領域で立体構造変化が生じており、凝集化の核として分子表面ではなく内部に埋もれるように凝集化抗体を形成することが予想された。CH2 ドメインには N-型糖鎖が付加され、抗体の立体構造の安定化に寄与していることが知られている。そこで N-型糖鎖が付加されないようにアミノ酸変異を施した IgG1 抗体を CHO 細胞一過性発現システムで調製した結果、生産された抗体は凝集化抗体を形成しやすい結果を示した。細胞内で一部の抗体ポリペプチドには N-型糖鎖が付加されないことが、培養プロセスにおける凝集化抗体の原因となりうることが示唆された。

Key words Antibody aggregation, misfolding, CHO cells, aglycosylation

G3H4 (0213) 新規の不純物吸着剤を用いたシンプルで効果的な生物学的製品の精製方法

○西八條　正克[1,2*], 鴻池　史憲[1,2], 平山　翔太[1,2], 末岡　拓馬[1,2], 八浦　妃佐子[1,2], 水口　和信[1,2],
([1]株式会社カネカ, [2]次世代バイオ医薬品製造技術研究組合)

A Simple and Effective Method for Purification of Biological Products by a Novel Impurity Adsorbent

○Masakatsu Nishihachijo[1,2*], Fuminori Konoike[1,2], Shota Hirayama[1,2], Takuma Sueoka[1,2], Hisako Yaura[1,2], Kazunobu Minakuchi[1,2]
([1] Kaneka Corporation, [2] Manufacturing Technology Association of Biologics)
連絡先の E-mail アドレス Masakatsu.Nishihachijo@kaneka.co.jp

遺伝子組換えタンパク質やウイルス粒子などの生物学的製品は、医薬品や医薬品製造、診断などの分野で幅広く使用されており、多様化、複雑化している。生物学的製品は、一般的に動物細胞や微生物の培養により生産され、細胞分離や細胞破砕の工程（ハーベスト工程）を経て、クロマトグラフィーや膜分離などにより高度に精製されて製造される。精製工程の初期段階であるハーベスト工程で細胞由来の多様な不純物（宿主由来タンパク質（HCPs）や DNA、細胞残渣など）を効率良く除去することが精製工程全体のプロセスの強化には重要である。我々は、抗体医薬品の精製プロセス開発研究において、新規の不純物吸着剤を用いた HCPs や DNA 等の効果的な除去技術の開発に成功した。本研究では、この新規不純物吸着剤の各種生物学的製品への応用の可能性を明らかにし、製造プロセスに実装可能な使用方法の開発を目的とした。

まず、種々のポリペプチドに対する不純物吸着材の吸着特性を調べた。インスリンやアルブミンなど 5 種類のポリペプチド溶液（培養液もしくは緩衝液に溶解された状態）に吸着剤を混合後、遠心上清中の各ポリペプチドの濃度を測定した結果、いずれも 90%以上の高回収率が得られ、本吸着剤が広範なポリペプチドの精製に利用可能であることを確認した。また、遺伝子治療における有望なウイルスベクターであるアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターへの応用も評価した。AAV ベクターは、高価な核酸分解酵素を用いた DNA 断片化、細胞溶解後残渣のデプスフィルターろ過、限外ろ過膜による HCPs などの不純物のタンジェンシャルフローろ過（TFF）除去などの煩雑な工程を経て、クロマトグラフィー精製されるのが一般的である。今回、我々が開発した不純物吸着剤の適用により、高価な核酸分解酵素の使用量を 1/10 に削減し、TFF 工程を省略しても、HCPs や DNA 等の不純物を効率的に除去し、高収率で AAV ベクターを精製できた。以上、上記新規不純物吸着剤は、組換えタンパク質医薬品からウイルスベクターなどの新しいモダリティーを含め、幅広く生物学的製品の精製プロセスを強化に適用可能であることが分かった。

Key words biological product, antibody, viral vector, purification

G3H4 (0301) 配列解析のすすめ

○伊藤創平*[1], 小塚康平[1], 川崎真由[1], 高木 啓詞[1], 本山智晴[1], 中野祥吾[1]（[1]静県大院・薬食生命）

An Encouragement of Sequence Analysis

○Sohei Ito[1]*, Kohei Kozuka[1], Mayu Kawasaki[1], Hiroshi Takagi[1], Motoyama Tomoharu[1], Shogo Nakano[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka)
E-mail : itosohei@u-shizuoka-ken.ac.jp

生命科学を志す研究者は、生物に潜む共通性に魅せられます。圧倒的に多様な姿を持つにもかかわらず、すべての生物は細胞から成り、世代から世代へ共通性を伝達します。共通性の伝達役である遺伝子と、遺伝子から転写・翻訳という過程で作られる RNA やタンパク質は、限られた共通の部品から構成され、単純な文字配列で定義できます。しかし、これらの文字配列は、極めて不規則な領域が大半であり、直接解読することは困難です。そのため、様々なアイデアとデータを元に、規則性のある配列部分を解析し利用してきたのが生命科学の現状でした。

生物学の中で重要かつ困難な問題の一つであったタンパク質構造予測は、AlphaFold2 と RoseTTAFold という 2 つの歴史的なマイルストーンで解決されつつあります。すべての研究者が、圧倒的に広い範囲の配列に対応する立体構造を利用できる時代が到来しました。人類が、生物の多様性と共通性を直接解析できる時代が近づいているのかもしれません！

私達の研究グループは、タンパク質の配列情報の中でも、不規則で解析することが困難であると考えられた領域に注目し、タンパク質の機能を向上させる技術の構築を行ってきました。2 年前の日本生物工学会大会シンポジウムにて技術紹介して以来、多くの企業・大学との共同研究に発展しています。多くの研究者が、立体構造が得られるタンパク質について、合理的かつ効果的な改変を試みてきました。しかし、生物が容易に改変できる、蛋白質の安定性、可溶性などの機能を合理的に理解し改変するのは未だに困難です。私達は、この矛盾を解消しタンパク質の機能を最大限引き出すことで、タンパク質の社会実装を加速し世界を変えたいと考えてきました。紹介できる研究成果がいくつか出てきました。本大会において、学生がいくつか発表を行います(1-9)。私は、その背景にある配列解析のおもしろさについて紹介したいと思います。配列解析は面白い！皆さんも挑戦しませんか？

1) S. Nakano, *App.l Environ. Microbio.* **2018**, *85* (12), 2) S. Nakano, *Biochemistry* **2018**, *57* (26), 3) S. Nakano, *ACS Catalysis* **2019**, *9* (11), 4) T. Motoyama, *Biochemistry* **2020**, *59* (40), 5) K. Kido, *eLife*, **2020**, 9, e54983, 6) S. Nakano, *Com. Chem* **2020**, *3* (181), 7) K. Kozuka, *Biochemistry* **2021**, *60* (29), 8) T. Motoyama, *Com. Chem* **2021**, *4* (108), 9) S. Sugiura, *J. Biol. Chem.* **2021**, in press.

Key words Protein engineering, Enzyme, Machine learning, Sequence analysis

G3H4 (0302) 生体内抗原を標的にした天然構造特異的モノクローナル抗体の作製

○磯﨑　勇志、湊元　幹太、冨田　昌弘*
(三重大学・大学院工学研究科・分子生物工学)

Production of native structure-recognizing monoclonal antibodies against intact proteins

○Yushi Isozaki, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita*.
(Division of Chemistry for Materials, Graduate School of Engineering, Mie University)
tomita@chem.mie-u.ac.jp

モノクローナル抗体は高い特異性および親和性を有しているため、近年、分子標的治療薬 (抗体医薬) として非常に注目されている。多くのモノクローナル抗体は目的抗原の一次配列を認識しているが、分子標的治療薬として利用する場合、目的抗原の天然構造を認識することが極めて重要になる。しかし、天然構造を認識するモノクローナル抗体の作製は非常に困難である。そこで、本研究では、目的抗原の天然構造を特異的に認識するモノクローナル抗体の高効率作製をめざした。

標的タンパク質として、G タンパク質共役受容体 (GPCR) の一つである human corticotropin-releasing hormone receptor 1 (huCRHR1) に対する立体構造認識モノクローナル抗体の作製を試みた。本研究室で開発された「立体構造特異的ターゲティング (SST) 法」に基づき研究を進めた。マウスに対して huCRHR1 遺伝子をコードした組換えプラスミド DNA を用いて免疫化を行い、感作 B 細胞を得た。感作 B 細胞を、huCRHR1 発現ミエローマ細胞を用いて B 細胞受容体を介した抗原抗体反応によって選択し、複合体を形成した。最終的に B 細胞-ミエローマ細胞複合体を電気パルスによって選択的融合を行い、目的の抗体産生ハイブリドーマを作製した。

SST 法に基づき細胞融合を行った結果、多くのハイブリドーマを獲得することができた。目的の抗体産生ハイブリドーマを限界希釈法によってクローン化を行い、ハイブリドーマ上清中のモノクローナル抗体をアフィニティーカラムを用いて精製した。精製モノクローナル抗体を Cell-ELISA 法によって評価したところ、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞に特異的な結合を示し、EphA2 を高発現する MDA-MB-231 細胞には親和性を示さなかった。さらに、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞を用いた免疫蛍光染色法では、細胞表面上に精製モノクローナル抗体の特異的結合を確認することが出来た。一方、変性 huCRHR1 を用いたウェスタンブロッティング解析では、一次配列認識の抗 CRHR1 抗体では特異的なバンドを確認できたが、精製モノクローナル抗体においては特異的な結合を認めることができなかった。また、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞を 4 %パラホルムアルデヒドによって部分変性させた後、フローサイトメトリー解析を行った結果、蛍光ピークがコントロール側にシフトし、精製モノクローナル抗体の結合の低下が示唆された。

これらの結果から、SST 法によって作製されたモノクローナル抗体は、目的抗原の立体構造エピトープを認識している可能性が極めて高く、分子標的治療薬への新たな応用が期待される。

Key words B-cell receptor (BCR), DNA immunization, GPCR, hybridoma technology, native structure, stereospecific monoclonal antibody.

G3H4 (0303) 新規架橋型高親和性低分子ペプチドを使った抗体医薬品の精製技術

○伊東祐二*, 大迫奈菜, 嶋本亮輔, 寺西広翼, 早田光希, アブドゥール ラフィーク
（鹿児島大院・理工）

Purification technology of antibody therapeutics employing high-affinity small peptide stabilized by novel crosslinking form

○Yuji Ito*, Nana Osako, Ryosuke Shimamoto, Kosuke Teranishi, Koki Hayata, Rafique Abdur
(Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ.)
yito@sci.kagoshima-u.ac.jp

抗体医薬品は、ガンや自己免疫疾患をはじめ、様々な疾患に対する極めて有効な治療薬として、多くの臨床の現場で使用されており、今後も多くの抗体医薬品の開発が進んでいくと考えられる。この抗体医薬品の製造において、*Staphylococcus* 由来のプロテイン A を固定化したプロテイン A カラムは、現在、必要不可欠な抗体の精製技術となっている。しかし、これに用いるプロテイン A は、エンドトキシンの混入やそれ自身の持つ抗原性のため、高度な精製が必要であり、精製用のリガンドとしては高価であるという課題を持つ。

我々は、このプロテイン A の課題を克服した抗体精製用の低分子リガンドを開発するため、T7 ファージディスプレイ技術を用いたランダムペプチドライブラリから、ヒト IgG の Fc に特異的な 1 7 残基からなるペプチド IgG-BP を単離した。このペプチドは、約 10 nM の K_d 値でヒト IgG1-Fc に結合し、このペプチドを固定化したカラムは、人血清から 97%の純度で IgG の精製を可能にした。しかし、この IgG-BP には、分子内に SS 結合が存在し、この SS 結合の化学的脆弱性により、還元剤やアルカリ pH に対する耐性が弱いことが課題であった。本発表では、この化学的脆弱性を克服し、かつ抗体に対する親和性を維持できる架橋方法の開発について報告する。IgG-BP の分子内 SS 結合は、結合活性に必須であり、2 つの Cys の Ser 置換体では、親和性は欠落する。そこで、ペプチドの SS 結合を還元後、Cys のチオールを 1, 3-dichloroacetone で架橋したが、この架橋ペプチドは、高いアルカリ耐性を有するものの、K_d が 4900 nM と大きく低下し、精製リガンドとしての機能は低下した。そこで、種々の架橋構造を検討した結果、1, 1-dichloroacetone で架橋することで、K_d が 45.6 nM と親和性が高く維持されるとともに、高いアルカリ耐性を示すことが分かった。

発表では、1, 1-dichloroacetone 架橋 IgG-BP（IgG-BPA）固定化カラムによる抗体の精製、アルカリ処理後のカラムの結合容量の保持の評価結果について報告する。これらの結果は、IgG-BPA が、抗体精製に必要な物理化学的特性を十分満たしていることを示しており、新たな抗体医薬品精製用のリガンドとしての開発が期待される。

Key words antibody, peptide, affinity chromatography, Protein A

G3H4 (0304)

High functionality of antibody therapeutics for drug-delivery system using site-specific covalent modification with affinity peptide

○Md Abdur Rafique, Nana Osako, Ryosuke Shimamoto, Kosuke Teranishi, Koki Hayata, Yuji Ito*
（Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ.）

High functionality of antibody therapeutics for drug-delivery system using site-specific covalent modification with affinity peptide

○Md Abdur Rafique, Nana Osako, Ryosuke Shimamoto, Kosuke Teranishi, Koki Hayata, Yuji Ito*
(Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ)
yito@sci.kagoshima-u.ac.jp

Antibody-drug conjugates (ADCs) have been getting attention as a highly functional antibodies by chemical modification. It is relatively a new class of designated anticancer therapy by the combination of tumor-specific monoclonal antibody with cytotoxic molecules that can selectively binds with cancer cells and kills efficiently. The current major ADC research trend is to improve the therapeutic index of antineoplastic agents by restricting with a site-specific amount of drug without impairing antibody functions specially keep concern on antigen binding site and Fc functions.

In this work, we have established a method for producing ADC by site-specific modification technology (CCAP method) using an affinity peptide specific to Fc fragment of antibody, that we have developed as an example of application to enhancement of antibody function with various functional molecules as well as suitable number of targets and novel payloads.

This research work focuses on the selective and sustain amount of site-specific cytotoxic drug delivery without impairing antibody functions with a convenience platform.

In conclusion, we have tried to control binding site barrier effect and biodistribution by maintaining individual conjugation sites and maintaining amount of cytotoxic drug conjugation using affinity peptide specific to fragment crystallization (Fc) portion of an antibody.

Key words antibody, affinity, peptide, conjugation, modification, site-specific, cytotoxicity

G3H4 (0305)

がん抑制タンパク質の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製

○田中 基博, 磯﨑 勇志, 森 宏太, 湊元 幹太*, 冨田 昌弘
（三重大・院工・分子生物工学）

Generation of stereospecific monoclonal antibodies against a tumor - suppressing protein

○Motohiro Tanaka, Yushi Isozaki, Kota Mori, Kanta Tsumoto*, Masahiro Tomita
(Division of Chemistry for Materials, Graduate School of Engineering, Mie University)
tsumoto@chem.mie-u.ac.jp

【背景・目的】現在、モノクローナル抗体は分子標的治療薬（抗体医薬）として着目されており、その目的のために、生体内の抗原タンパク質の立体構造エピトープを特異的に認識することが極めて重要であると考えられる。当研究室では、立体構造特異的ターゲティング（SST）法を開発し、膜タンパク質（受容体）に対する立体構造認識モノクローナル抗体の作製に成功している。そこで、本研究では、全てのタンパク質に SST 法を応用することを目的として、がん抑制可溶性タンパク質である p53 を抗原として立体構造特異的モノクローナル抗体の作製を目ざした。まず、SST 法に必要な p53 組換えミエローマ細胞と抗体評価と細胞免疫に使用する p53 組換え CHO 細胞を作製するために、トランスフェクション用の組換えプラスミドベクターを構築した。さらに、 SST 法も試みた。

【方法】p53 が細胞膜上に発現されるように、p53 遺伝子、CDH2 遺伝子（膜貫通領域）および GFP 遺伝子（蛍光標識）を 5’ 末端からタンデムに連結した組換えプラスミドベクターを、PCR 法および In-Fusion cloning 法により構築した。制限酵素処理によって組換えプラスミドベクター内の目的遺伝子を確認した。次に、トランスフェクション法により p53 発現 CHO 細胞および p53 発現ミエローマ細胞を作製した。作製された組換え細胞は蛍光解析とウェスタンブロッティング（Wb）法により評価した。また、p53 遺伝子を含む組換えプラスミドベクターを用いて DNA 免疫を行った後、 SST 法に基づき p53 発現ミエローマ細胞と感作 B 細胞との複合体を形成させ、電気パルス融合によって目的の抗体産生ハイブリドーマを作製した。作製されたハイブリドーマが p53 立体構造特異的モノクローナル抗体を産生するかを Cell-ELISA 法によって評価した。

【結果・考察】制限酵素処理後、 DNA 電気泳動を行ったところ、目的の位置にバンドが検出されたことから、組換えプラスミドベクターの構築に成功した。トランスフェクション法によって作製された 2 種類の p53 組換え細胞である p53 発現 CHO 細胞および p53 発現ミエローマ細胞 は、細胞膜近傍に GFP 蛍光が確認され、Wb 法に基づき抗 p53 抗体および抗 GFP 抗体によって特異的なバンドが検出された。さらに、SST 法において重要なステップである感作 B 細胞−p53 組換えミエローマ細胞の複合体形成を確認することができた。 SST 法によって作製されたハイブリドーマの中で、Cell-ELISA 法陽性を示すインタクトな p53 に特異的な結合特性をもつ目的の抗体産生ハイブリドーマを得た。

Key words conformational epitope, conformation-specific monoclonal antibody, DNA immunization, p53, stereospecific targeting (SST) technique

G3H4 (0306)

抗 HTLV-1 ヒトモノクローナル抗体の HTLV-1 感染者血液からの探索

○岡澤 歩夢[1], 木原 もなみ[2], 田中 勇悦[3], 福島 卓也[4], 兒島 孝明[5], 中野 秀雄[6]*
（[1]名大院・生命農学, [2]名大院・生命農学, [3]琉球大学・医学, [4]琉球大学・医学, [5]名大院・生命農学, [6]名大院・生命農学）

Screening of Anti-HTLV-1 Human Monoclonal Antibodies from the Blood of HTLV-1 Infected Patients

○Okazawa Ayumu [1] , Kihara Monami [2], Tanaka Yuetsu [3], Hukushima Takuya [4], Kojima Takaaki [5], Nakano Hideo [6]*,
([1] Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ. [2] Grad. Sch. Bioagric. Sci. Nagoya Univ. [3] Sch. Med. Ryukyu. Univ. [4] Sch. Med. Ryukyu. Univ. [5] Grad. Sch. Bioagric. Sci. Nagoya Univ. [6] Grad. Sch. Bioagric. Sci. Nagoya Univ.)
nakano@molbiotech-nagoya.org

成人 T 細胞白血病(ATL)は、HTLV-1 の感染により引き起こされ、日本では主に九州、沖縄など中心に約 100 万人の患者が存在するが、特効薬やワクチンは未だ開発されていない。近年、HTLV-1 の中和活性を持つラットモノクローナル抗体が取得され、そのエピトープは gp46 蛋白の 191 番目から 196 番目であることが判明している。しかしながらラット由来の抗体はそのままでは治療薬にすることができないため、中和活性を有するヒトモノクローナル抗体が望まれている。そこで本研究では、当研究室で開発された抗体取得技術である Ecobody 法を利用し、ATL 患者の B 細胞からの HTLV-1 中和ヒトモノクローナル抗体の取得を目指し、エピトープペプチドに対するヒトモノクローナル抗体の取得を試みた。

沖縄 HTLV-1/ATL バイオバンク試料より B 細胞分離キットを用いて B 細胞を濃縮後、gp46 エピトープペプチドに結合する B 細胞を選別した。得られた細胞を 1 細胞ずつ分注し、それぞれの細胞から得られた mRNA を鋳型として遺伝子増幅を行い、抗体遺伝子の増幅を試みた。その結果、複数の細胞から軽鎖、重鎖双方の遺伝子の取得に成功した為、これらを用いて CFPS による抗体発現を行った。発現した抗体の gp46 エピトープペプチドに対する結合活性を ELISA 法によって測定したところ、全ての抗体において抗原結合活性を確認した。今後より詳細な解析を行う予定である。

Key words antibody, CFPS

G3H4 (0307)

大腸菌再構成無細胞タンパク質合成系を用いたリボソームディスプレイによる抗体親和性熟成技術の開発

○奥田理央[1]*, 伊藤玲奈[1], 兒島孝明[1], 中野秀雄
（[1]名古屋大学大学院生命農学研究科）

Development of antibody affinity maturation technology using *E. coli* reconstituted cell-free protein synthesis system

○Rio Okuda[1]*, Reina Ito[1], Takaaki Kojima[1], Hideo Nakano[1]
([1]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)
okuda.rio@molbiotech-nagoya.org

従来のポリクローナル抗体と比較して、モノクローナル抗体(mAbs)は単一の B 細胞から得られる抗体であり、特定の抗原に対する高い特異性を有し、バイオ医薬品などの用途でその需要が増加している。しかし、生体内で一定の治療効果を得るために必要な抗体の親和性を達成するには、非常に長い時間と労力を必要とする。そのため現在、mAbs の親和性を向上させる抗体親和性熟成技術の開発が注目を浴びている。本研究では大腸菌再構成無細胞タンパク質合成リボソームディスプレイ(PURE RD)を使用し、抗 PA タグ抗体のさらなる親和性向上を試みた。

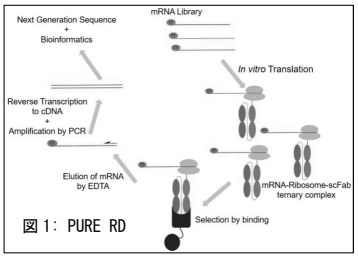


図 1: PURE RD

PURE RD(図 1)に用いる PURE RD に用いる抗体として抗 PA タグ抗体のアミノ酸配列情報をもとに、単鎖抗原結合部位(scFab)として発現可能な遺伝子と、そのパラトープの一部に変異を導入した変異型 scFab の 2 種類をそれぞれ設計・構築した。これらを鋳型とした再構成型無細胞タンパク質合成系(PURE Flex ジーンフロンティア社)によって scFab を発現し、ELISA によってその抗原結合活性評価を行った。その結果、変異 scFab 野生型における抗原結合能の顕著な低下が観察された。

次に、モデル実験としてこの野生型 scFab と変異型 scFab の mRNA を mol 比で 1:10 に混合したものを鋳型として PURE RD を行った。回収された mRNA 配列は逆転写反応と PCR により遺伝子を増幅し、変異型 scFab のみを切断する制限酵素により解析したところ、わずか 1 回のパニングによって野生型 scFab 遺伝子が濃縮されていた。

次に、PA タグペプチドと抗 PA タグ抗体複合体の結晶構造をもとに、その CDR 配列の中から、抗原ペプチドの近傍に存在し、かつ分子間相互作用に寄与しないアミノ酸を標的とした変異ライブラリーを作製した。現在、このライブラリーを用いて PA タグペプチドを標的とした PURE RD を行い、得られた cDNA 配列から次世代シーケンシングとバイオインフォマティクス技術により、濃縮された DNA 配列の解析を行っている。

Key words Antibody, Ribosome Display, Next Generation Sequencing, Bioinformatics

G3H4 (0308) CHO 細胞を利用した抗体生産システムにおけるトレハロース添加の影響

○中野美貴子[1], 三崎亮[1], 新勇介[1], 梶浦裕之[1], 藤山和仁[1*]
([1]阪大・生工国際セ)

Effect of trehalose addition on antibody production system in Chinese hamster ovary cells

○Mikiko Nakano[1], Ryo Misaki[1], Yusuke Atarashi[1], Hiroyuki Kajiura[1], Kazuhito Fujiyama[1*]
([1]ICBiotech, Osaka Univ.)
nakano_mikiko@icb.osaka-u.ac.jp

【背景】
近年、医薬市場におけるバイオ医薬品の占める割合は増加傾向にあり、中でも抗体医薬品は疾患の原因物質に高い特異性で結合することから、副作用が少ない画期的な治療薬として注目を集めている。しかし、治療に際し投与量が多いこと、細胞培養等に製造コストを要し高価になることが抗体医薬品の大きな課題となっている。そこで本研究は、抗体生産の主流な宿主であるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用い、抗体医薬品の安定的で安価な供給を目指した。トレハロースは培地中に分泌された抗体の凝集を抑制し安定化することが立証されている一方で、細胞に浸透圧等の負荷がかかるため抗体の生産量や性能が変化することが懸念される。そこでトレハロース存在下で細胞を培養することによる抗体生産能の変化を調査した。さらに、分泌生産された抗体の性能に与える変化を、抗体依存性細胞傷害活性に影響を与える Fcγ 受容体への抗体の結合力と抗体が持つ糖鎖構造から評価した。
【方法・結果】
ヒト IgG 抗体を安定発現する CHO 細胞をトレハロースの終濃度が 100 mM となるように一過的に添加した培地で培養した後、抗体生産量を ELISA で定量した結果、トレハロース非存在下で培養したものと比較して抗体の比生産速度が減少した。一方、培地中のトレハロース濃度を段階的に増加し、最終的に 100 mM のトレハロースを含む培地に馴化した抗体生産 CHO 細胞を樹立した。この細胞はトレハロース非存在下で培養したものと比べ抗体の比生産速度に増加が見られた。培養後の培地から Protein G カラムを用いて抗体を精製し、Fcγ 受容体への結合力を TSKgel® FcR-IIIA-NPR (TOSOH 社製) を用いて調査したところ、Fcγ 受容体への結合力はトレハロース非存在下で培養した細胞で生産した抗体と比べて低下した。また、抗体の糖鎖構造にも変化が見られた。これらのことから、CHO 細胞への一過的なトレハロースの添加は抗体生産能を低下させてしまうのに対し、トレハロースに馴化させた細胞は高分泌生産量を得られること、またトレハロースを培地に添加することで分泌される抗体の糖鎖構造が変化することが明らかとなった。

Key words Antibody, Chinese hamster ovary cells, Trehalose, Glycosylation

G3H4 (0309) 酵母提示系を用いたナノ抗体由来の蛍光免疫センサ“mini Q-body”選択法の開発

○井上暁人[1], 安田貴信[1], 北口哲也[2], 村上明一[3], 上田宏[2*]
([1]東工大・生命理工, [2]東工大・化学生命研, [3]徳島大院・医歯薬)

Development of selection method for a nanobody-based fluorescent immunosensor "mini Q-body" by yeast surface display

○Akihito Inoue[1], Takanobu Yasuda[1], Tetsuya Kitaguchi[2], Akikazu Murakami[3], Hiroshi Ueda[2*]
([1]Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech, [2]CLS, IIR, Tokyo Tech, [3]Grad. Sch. Biomed. Sci., Tokushima Univ.)
ueda@res.titech.ac.jp

Quenchbody (Q-body) [1] は、抗体断片(single-chain Fv または Fab 断片)の抗原結合部位近傍に蛍光色素を部位特異的に修飾した蛍光免疫センサであり、近年、より安定性が高く、大腸菌での発現が容易なナノ抗体(VHH)断片を用いても Q-body の構築が可能であることが示された [2](以下、mini Q-body と呼称)。Q-body は従来の免疫測定法と比べて、迅速・簡便・高感度に検出できる点に優れており、mini Q-body の場合にはより高い安定性と収率が期待される。一方で Q-body の蛍光応答は使用する抗体断片に大きく依存することが知られており、高い応答を示す Q-body の構築には条件検討に伴う時間と労力が必要であった。
本研究では高い応答を示す Q-body 用抗体を迅速に選択する実験手法の開発を目的とし、酵母細胞表層提示系と E4/K4 ペプチドの利用した部位特異的修飾法 [3] を組み合わせて、酵母細胞表層において Q-body を構築することを試みた。まず MTX 認識ナノ抗体をモデルとし、FRET を示す FITC と TAMRA を標識した K4 ペプチドを用いて酵母細胞表層で mini Q-body を構築した結果、フローサイトメトリーで抗原依存的な蛍光応答を確認することに成功した。さらに約 30 種の HSA 認識ナノ抗体群をモデルとして選択実験を行った結果、約 2.4 倍の蛍光応答を示すナノ抗体が選択された。また選択された抗体を用いて、大腸菌発現による mini Q-body の構築を行った結果、約 1.4 倍の蛍光応答を示し、選択された抗体断片は Q-body として機能することが確認された。さらに大腸菌発現系と酵母細胞表層間での環境依存的な Q-body の蛍光応答の変化に着目し、精製用ビーズ上で mini Q-body を多量体化させた結果、酵母細胞表層と同等の応答を示すことが確認された。
以上から、本研究で構築した Q-body 選択法により、高い応答を示す mini Q-body 用抗体を選択しうることが示された。今後、Q-body に適したライブラリを新たに設計することで、従来法では見つけられなかった Q-body に最適な抗体断片の選択が可能になると考えられる。
【Reference】1) Abe, R., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 17386–17394 (2011) 2) Inoue, A., *et al.*, *ACS Sensors* **5**, 3457–3464 (2020). 3) Yasuda, T., *et al.*, *Chem. Commun.* (2021)

Key words antibody, biosensor, yeast, flow cytometry

G3H4 (0310) 細胞選択的 RNAi を誘発する抗体-膜貫通ペプチド酵素的架橋設計

安藤 優, ○中澤 光*, 三浦 大輔, 大竹真帆, 梅津 光央*

(東北大学院工・バイオ工)

Enzymatic ligation of antibody and arginine 9 peptide for efficient and cell-specific siRNA delivery

Yu Ando, ○Hikaru Nakazawa*, Daisuke Miura, Maho Otake, Mitsuo Umetsu*
(Tohoku Univ, tech)
hikaru@tohoku.ac.jp

核酸医薬の 1 つである低分子干渉 RNA(siRNA)は，細胞内の mRNA を標的とするモダリティであるが細胞特異性を持たないことから、投与量の増加に伴う副作用が問題になっている。その中で近年，抗体などの分子標的タンパク質に siRNA と静電相互作用できるカチオンペプチドを融合した組換えタンパク質を利用することで siRNA を特異的に細胞まで運搬する研究が報告され始めている。しかしながら、カチオンペプチドを融合すると発現タンパク質を可溶性画分として取得できない傾向が報告されている。そこで本研究では、抗 EGFR 低分子抗体 Nanobody を分子標的素子として、微生物トランスグルタミナーゼ(MTG)による酵素的ペプチド連結を利用することでカチオンペプチドとの融合低分子抗体を作製し、細胞特異的 siRNA 運搬を行った．その結果、大腸菌を宿主として可溶性画分に発現させることに成功した。反応効率は 83%と算出され，難発現な R9 ペプチドをもつ Nanobody を高効率で作製できた． 共焦点顕微鏡により、Cy5 ラベルした siRNA と作製した抗体により A431 細胞への特異的送達を調べたところ、細胞内部に傾向が観察されたため、送達できていることが判明した。最後に A431 細胞を用いてモデルとして GAPDH のサイレンシングを行った。Nanobody-R9／siRNA を作用させたのち GAPDH 抗体で A431 細胞内の GAPDH 発現量を調べたところコントロールに比較して 35.4%の発現抑制を示した.

Key words: 抗体, siRNA, タンパク質工学, トランスグルタミナーゼ

G3H4 (0311) Q-body 技術によるがん抑制タンパク質 p53 の細胞内検出

○Yancen Dai[1], 泉谷篤史[1], 安田貴信[1], 北口哲也[2], 上田宏[2*]
([1]東工大・生命理工, [2]東工大・研究院化生研)

Intracellular Detection of Tumor Suppressor Protein p53 by Q-body Technology

○Yancen Dai[1], Atsushi Izutani[1], Takanobu Yasuda[1], Tetsuya Kitaguchi[2], Hiroshi Ueda[2*]
([1]Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech, [2]CLS, IIR, Tokyo Tech)
ueda@res.titech.ac.jp

Quenchbody (Q-body)[1] is a newly developed fluorescent immunosensor. It is a site-specifically fluorescence dye(s)-labeled antibody fragment that shows antigen-dependent fluorescence enhancement. In the absence of antigen, fluorescence is quenched by intrinsic tryptophan residues through photoinduced electron transfer. However, the quenched dye surrounding the antigen-binding site is de-quenched due to displacement to generate fluorescence after antigen-binding. Q-body is a turn-on type and reagentless (all-in-one) biosensor with the advantages of rapid reaction, high sensitivity, and specificity. Several Q-bodies targeted to cell surface antigens have been successfully developed[2, 3]. However, Q-bodies targeting intracellular antigens have not been reported.

In this study, to explore the applicability of Q-body technology in detecting and visualizing intracellular antigens, the transcription factor p53 was chosen as a target, due to its potential use in cancer diagnosis. To this end, we used an antibody DO1 to establish the system. First, the productivity of the DO1 single-chain Fv fragment was improved by phage display selection to obtain better secretive expressing mutant C11. The Fab fragment of C11DO1 with sortag (GGGTG) at the N-terminus of both heavy and the light chains was made, and double-labeled with TAMRA by using Sortase A to make a Q-body. The dose-response curve of the Q-body showed the maximum response of 10.8-fold upon adding p53 peptide. The LOD and EC_{50} were determined as 34.9 nM and 83.3 pM, respectively. Moreover, the cell staining assay was performed to visualize p53 in fixed colon cancer cells HCT116 with and without p53 expression. The results showed that the signals were only observed in p53+/+ cells even without washing unbound Q-bodies out, indicating that in the absence of p53, Q-body is in an “off” state and showed low fluorescence.

The results indicate that this Q-body can be used to locate intracellular p53 in fixed cells in a sensitive, simple, and quick manner. We are now trying to deliver this Q-body into live cells by the applicable methods for live-cell imaging to assist in cancer-related research and screening for novel anti-cancer drugs.

Acknowledgment We thank Dr. Farid J. Ghadessy in A*Star, Singapore for kindly providing the DO1 gene and HCT116 cells.

Key words Quenchbody, live-cell imaging, p53 protein, reagentless immunosensor

Reference

1. Klein, A. et al. *Chem. Sci.* **9**, 7835-7842 (2018). 2. Jeong, H.J. *et al. Anal. Chem.* **89**, 10783-10789 (2017). 3. Dong, J. et al. *Biotechnol. Bioeng.* **117**, 1259-1269 (2020).

G3H4 (0312) SpyTag/SpyCatcher システムを用いたナノボディ変異体ライブラリの酵母表層提示

○高市裕基[1]、梶原果穂[1]、青木航[1,2,3,4,5,*]、植田充美[1,2,3,4]
([1]京大院・農・[2]JST CREST・[3]JST COI-NEXT・[4]京都バイオ計測センター・[5]JST FOREST)

Yeast Surface Display of Nanobody Libraries Using the SpyTag/SpyCatcher System

○Yuki Takaichi[1], Kaho Kajiwara[1], Wataru Aoki[1, 2, 3, 4, 5,*], Mitsuyoshi Ueda[1, 2, 3, 4]
([1] Grad Sch of Agri, Kyoto University・[2] JST CREST・[3] JST COI-NEXT・[4] KIST-BIC・[5] JST FOREST)
*aoki.wataru.6a@kyoto-u.ac.jp

【背景】

ナノボディ（Nb）はラクダ科由来の重鎖交代の可変領域であり、通常の抗体の 10 分の 1 の大きさで機能する。指向性進化による Nb の変異体スクリーニングには酵母表層提示が用いられることが多いが、変異体ライブラリの構築と親和性評価のプロセスが分断されているため、時間とコストを要するという課題がある。

近年、細胞を培養するだけで迅速に目的遺伝子を進化させられる *in vivo* 変異導入法が注目されており、この手法の導入により時間とコストを削減する高効率な指向性進化の実現が期待される。しかし、酵母表層提示で必要とされる足場タンパク質にも変異が導入されるため実用的でなかった。

本研究では、異なる遺伝子カセットから発現させた Nb と足場タンパク質を細胞内で結合させ、酵母表層に提示する手法を開発した。具体的には、Nb と足場タンパク質それぞれの末端に、SpyTag/SpyCatcher と呼ばれる不可逆的なイソペプチド結合を形成する配列[1]をそれぞれ付加することで、別々に発現した 2 つのタンパク質を細胞内で結合させて提示することに成功した。

【方法と結果】

モデルとして、SpyTag およびエピトープタグを付加した抗リゾチームナノボディと、SpyCatcher を付加した足場タンパク質を産生する酵母株を作製した。この酵母株を培養したところ、93%の細胞が抗リゾチーム Nb を表層に提示していた。酵母細胞間のクロストークの可能性を調べるために、異なる Nb とエピトープタグを産生する 2 つの酵母株を共培養し、抗エピトープ抗体と蛍光標識リゾチームで染色して顕微鏡観察を行った。その結果、2 つの酵母株の間にクロストークは見られなかった。また、本方法のライブラリースクリーニングへの適用可能性を確認するために、抗リゾチーム Nb（0.1％）または非機能性 Nb（99.9％）を発現させた酵母株を混合し、リゾチームに結合する酵母細胞を FACS で選別した。その結果、一回のラウンドで抗リゾチーム Nb 提示酵母を約 94％まで濃縮することに成功した。本技術は、*in vivo* 変異導入法との統合可能な酵母表層提示プラットフォームになると期待される[2]。

[1] Anthony. et al. *PNAS*, 2019, 116, 26523
[2] Kajiwara et al. *Sci. Rep.*, 2021, 11, 11509

Key words Nanobody, Yeast surface display, SpyTag/SpyCatcher, *In vivo* evolution

G3H4 (0313) 遊離ナノボディのアフィニティをハイスループットに評価可能とするペプチドバーコーディング

○宮崎拓己[1]、松崎友星[1]、青木航[1, 2, 3, 4, 5,*]、植田充美[1, 2, 3, 4]
([1] 京大院・農・[2] JST CREST・[3] JST COI-NEXT・[4] 京都バイオ計測センター・[5] JST FOREST)

Peptide barcoding for high-throughput evaluation of free nanobody affinities

○Takumi Miyazaki[1], Yusei Matsuzaki[1], Wataru Aoki[1, 2, 3, 4, 5,*], Mitsuyoshi Ueda[1, 2, 3, 4]
([1]Grad Sch of Agri, Kyoto University・[2]JST CREST・[3]JST COI-NEXT・[4]KIST-BIC・[5]JST FOREST)
*aoki.wataru.6a@kyoto-u.ac.jp

【背景】 ナノボディとはラクダ科由来の重鎖抗体の可変領域であり、通常の抗体の 1/10 程度の大きさである。その分子量の小ささから組織浸透性・微生物による生産性などに優れており、次世代抗体のひとつとして評価されている。ナノボディの結合力をハイスループットに評価するために、ファージディスプレイや酵母ディスプレイなどが一般的に用いられる。しかし、担体層に固定化したナノボディは遊離状態のナノボディと異なる結合力を示すことがあるため、結合力を正確に定量するには適していない。そこで Egloff らと我々は独立に、遊離型ナノボディの結合力をハイスループットに評価可能なペプチドバーコーディング技術を開発した[1, 2]。Egloff らはセミランダム化したペプチドバーコードをオービトラップ質量分析により検出する NestLink を開発した。一方、我々はあらかじめ最適化されたペプチドバーコードを選択反応モニタリング（selected reaction monitoring; SRM）により検出する方法を開発した。本研究では、ナノボディのわずかな結合力の変化をペプチドバーコーディング法で評価できるかどうかを検証した。

【方法】 Anti-GFP nanobody をモデルとして、網羅的なアラニン置換体ライブラリを構築し、各変異体にユニークなペプチドバーコードを付与した。次に、全ナノボディ変異体を一斉に *Pichia pastoris* に発現させ、その混合物を調製した。ナノボディ変異体混合物を GFP 抗原と反応させ、ナノボディを結合力の違いで分離するためにゲル濾過クロマトグラフィで分子量依存的に分画した。ナノボディのみを含む画分とナノボディ抗原複合体を含む画分を回収し、トリプシンでペプチドバーコードを遊離させ、質量分析に供した。

【結果と考察】 ナノボディのみを含む画分から 5 つのペプチドバーコードを検出した。5 つのナノボディ変異体と WT の解離定数を表面プラズモン共鳴で計測したところ、変異体 1、変異体 2、そして WT の解離定数（K_D）はそれぞれ 1.6×10^{-8}、7.2×10^{-10}、1.2×10^{-11} であった。この結果から、ペプチドバーコーディング法は結合力のわずかな変化を検出できることを示した[3]。

[1] Egloff et al., Nat Methods, 16, 421–428, 2019 [2] Miyamoto et al., PLOS ONE, 14(4): e0215993, 2019 [3] Matsuzaki et al., submitted

Key words nanobody, peptide barcoding. mass spectrometry

G3H5 (0101) ヒト腸内細菌 *Bacteroides cellulosilyticus* による海藻多糖 β-1,3-キシランの資化機構 ー 分泌型 β-1,3-キシラナーゼの機能解析 ー

○堀 沙那恵[1], 岡崎 文美[1,2]*
([1] 三重大院・生資, [2] 三重大・先端科学研支セ)

Assimilation system of seaweed polysaccharide β-1,3-xylan in the human gut bacterium *Bacteroides cellulosilyticus*
- Functional characterization of extracellular β-1,3-xylanases -

○Sanae Hori[1], Fumiyoshi Okazaki[1,2]*
([1]Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [2]Adv. Sci. Res. Support Center, Mie Univ.)
okazaki@bio.mie-u.ac.jp

【背景・目的】β-1,3-キシランは、D-キシロースが β-1,3-結合した直鎖構造のホモポリマーであり、紅藻類および緑藻類の細胞壁にのみ存在する海藻特有の多糖である。β-1,3-キシラナーゼ（1,3-β-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.32）は、β-1,3-キシロシド結合をランダムな位置で加水分解し、種々のオリゴ糖を生ずるエンド型の酵素である。現在までに酵素機能が解明されている β-1,3-キシラナーゼは、海洋性細菌由来のものみである。近年、ヒト腸内細菌が海藻多糖類の資化能力を持つことが明らかとなってきた。しかし、これまでに β-1,3-キシランを資化するヒト腸内細菌は報告されていない。我々はヒト腸内細菌 *B. cellulosilyticus* のゲノム中に推定 β-1,3-キシラン資化遺伝子クラスターを見出した。本研究では、ヒト腸内細菌による β-1,3-キシランの資化機構を明らかにすることを目的として、本遺伝子クラスターに含まれる 2 種類の分泌型 β-1,3-キシラナーゼの機能解析を行った。

【方法・結果】既報の海洋性細菌由来 β-1,3-キシラナーゼ遺伝子と配列相同性を示す遺伝子をヒト腸内細菌ゲノム情報から探索したところ、*B. cellulosilyticus* のゲノム配列中に分泌型 β-1,3-キシラナーゼをコードすると推定される 2 つの遺伝子（*xyn26A* および *xyn26B*）がクラスターを形成していることを見出した。これらの遺伝子は海洋性細菌からの水平伝播により獲得したことが推定された。両遺伝子の塩基配列をコドン最適化後に全合成し、大腸菌 BL21(DE3)を発現宿主として組換えタンパク質を発現、精製し、組換え酵素 *Bc*Xyn26A および *Bc*Xyn26B を得た。両酵素は β-1,3-キシランに特異的に作用したことから、いずれも β-1,3-キシラナーゼであることが明らかになった。*Bc*Xyn26B は β-1,3-キシロビオースを主生成物とする種々の重合度の β-1,3-オリゴ糖を生成し、典型的なエンド型の作用様式を示したが、*Bc*Xyn26A は β-1,3-キシロビオースのみを生成した。さらに両酵素の酵素化学的諸性質には差異がみられた。これらの結果から、*B. cellulosilyticus* は作用様式の異なる 2 種類の β-1,3-キシラナーゼを菌体外に分泌生産し、その相乗的作用により β-1,3-キシランを効率的に分解していることが考えられた。本研究結果はヒト腸内における優勢菌群である *Bacteroides* 属細菌が、海藻特有の多糖である β-1,3-キシランの資化能力を有することを示すものである。今後、ヒト腸内細菌による β-1,3-キシラン資化機構の解明を進める。

Key words β-1,3-xylan, β-1,3-xylanase, *Bacteroides cellulosilyticus*, human gut bacteria

G3H5 (0102) *Phanerochaete chrysosporium* 由来新規ジオキシゲナーゼの機能・構造解析

○高橋泰志[1]*, 加藤大志[1], 鈴木裕満[1], 加藤雅士[1], 志水元亨[1]
([1]名城大院・農)

Functional and structural analysis of a novel dioxygenase from *Phanerochaete chrysosporium*

○ Yasushi Takahashi[1]*, Hiroyuki Kato[1], Hiromitsu Suzuki[1], Masashi Kato[1], Motoyuki Shimizu[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Meijo Univ.)
ytmeijobio@gmail.com

【緒言】白色腐朽菌は難分解性樹木成分であるリグニンを単独で完全に分解することができる。リグニンは白色腐朽菌により種々のリグニンフラグメントへ低分子化され菌体内へ取り込まれることが知られているが、リグニンフラグメントの分解経路およびそれらの変換酵素について、完全には解明されていない。そこで、代表的なリグニンフラグメントであるバニリンを添加した培地で白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* を生育させ、生産された細胞外タンパク質を網羅的に解析した。その結果、複数のタンパク質がバニリン誘導的に発現した。その中で、アミノ酸配列からジオキシゲナーゼであると推定されたタンパク質 (Putative dioxygenase) を見出した。本研究では Putative dioxygenase (PD) の機能及び構造を解析した。

【方法・結果】*P. chrysosporium* 由来の PD に His-tag を融合させたリコンビナントタンパク質を作製し、精製した。PD と種々の芳香族フラグメントを反応させ、反応生成物を GC-MS にて解析したところ、Methoxyhydroquinone (MHQ) および Dimethoxyhydroquinone (DMHQ) を酸化的に開裂することが分かった。MHQ に対する活性が最も高いことから、本酵素を Methoxyhydroquinone dioxygenase (MHQD) と命名した。
本研究により、白色腐朽担子菌において従来から提唱されていた 1,2,4-Trihydroxybenzene を経由する経路とは異なる、新たなリグニンフラグメントの開裂経路が明らかになった。現在 MHQD の機能および構造に関して、詳細な解析を進めている。

Key words *Phanerochaete chrysosporium*, Methoxyhydroquinone dioxygenase, Lignin

G3H5 (0103) 発酵法・酵素法を組み合わせたハイブリッド型バイオ変換システムの開発

○上杉尚輝[1], 佐藤悠[2], 岡野憲司[2,3], 木谷茂[2,3], Anastasia Kerbs[4], Volker Wendisch[4], 本田孝祐[2,3]*
([1]阪大院・工, [2]阪大・生工国際セ, [3]阪大・先導学研機, [4]CeBiTec, Bielefeld Univ.)

Development of a hybrid bio-production system by integrating in vivo fermentation and in vitro enzymatic conversion

○Naoki Uesugi[1], Yu Sato[2], Shigeru Kitani[2,3], Kenji Okano[2,3], Anastasia Kerbs[4], Volker Wendisch[4], Kohsuke Honda[2,3]*
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]ICBiotech, Osaka Univ., [3]OTRI, Osaka Univ., [4]CeBiTec, Bielefeld Univ.)
honda@icb.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】
Corynebacterium glutamicum を用いたアミノ酸発酵生産の歴史は古く、本菌を用いて様々なアミノ酸の商業生産が実現してきた。例えばL-リジンの場合、年間 260 万トンの生産が行われるなど、代謝改変による生産株の育種や、培養・分離プロセスの改良により、種々のアミノ酸をより効率的に大量生産することが可能となっている。一方、生産効率の向上に伴い、L-リジンに代表される大量生産型アミノ酸の市場価格の低下が問題化しつつある。そこで、これらのアミノ酸をさらに変換し、より機能的で高付加価値である誘導体を生産することが試みられている。発酵法によるアミノ酸誘導体の生産では、アミノ酸生産株由来の内在性酵素による誘導体の分解の抑制や、細胞内での誘導体の過剰蓄積を防ぐための排出ポンプ類の整備といった課題を解決する必要がある。本研究では、こうした課題を伴わない新たなアミノ酸誘導体の生産手法として、発酵法・酵素法を組み合わせたハイブリッド型バイオ変換システムの開発を行うこととした。
【方法と結果】
本システムの開発のモデルケースとして、L-リジンの誘導体化による L-ピペコリン酸（L-PA）の生産に取り組んだ。本システムでは、*C. glutamicum* による中温域（30℃）での L-リジン発酵ステップと、これに続く高温（50℃以上）でのアミノ酸誘導体化ステップを温度シフトにより切り替えることで、アミノ酸誘導体の生産を行う。まず初めに、高温での活性を有する L-リジン変換酵素の探索を行った。その結果、*Geobacillus* sp. 30 由来の L-リジン 6-デヒドロゲナーゼ（Lys6DH）、および *Desulfurobacterium thermolithotrophum* 由来の 1-ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ（ProC）を用いることで、50℃にて L-リジンから L-PA への変換が可能であることを確認した。次に、これらの酵素遺伝子を導入した *C. glutamicum* を用いて、L-リジンの発酵生産を行なった後、培養槽の温度を 30℃から 50℃へとシフトすることで、Lys6DH、ProC による L-リジンから L-PA への変換を行った。本アプローチにより現在までに 24 mM の L-PA の生産が確認できており、反応条件のさらなる改善を進めている。

Key words *Corynebacterium glutamicum*, thermostable enzyme, enzymatic conversion, fermentation

G3H5 (0104) *Exophiala jeanselmei* KUFI-6N 株由来シクロアルカノンモノオキシゲナーゼの解析

○小林健人, 山本泰誠, 長谷川喜衛, 岩木宏明*
（関西大・化学生命工）

Cloning, expression, and characterization of Baeyer-Villiger monooxygenases from eukaryotic *Exophiala jeanselmei* strain KUFI-6N

○Kento Kobayashi, Taisei Yamamoto, Yoshie Hasegawa, Hiroaki Iwaki*
(Dept. Life Sci. & Biotechnol., Kansai Univ.)
iwaki@kansai-u.ac.jp

真核微生物である *Exophiala jeanselmei* KUFI-6N 株由来のシクロアルカノンモノオキシゲナーゼ（ExCAMO）は、4-10 員環ケトンに対して活性を有する特異な Baeyer–Villiger モノオキシゲナーゼ（BVMO）である。我々はこれまでに、ExCAMO 発現大腸菌を構築し、更に本菌株が ExCAMO 以外にも少なくとも 5 つの BVMO 様遺伝子を有することを明らかにしている。本研究では、大腸菌で発現した ExCAMO の特性を解析するとともに、他の 5 つの BVMO 様遺伝子発現大腸菌を構築した。

ExCAMO は、4-10 員環ケトンを含む広範なケトンに対し活性を有するだけでなく、チオアニソールなどに対しても活性を有することがわかった。反応速度論的解析を行った結果、5-8 員環ケトンに対する K_m 値はそれぞれ 83、1.1、7.2、97 μM であった。ExCAMO と最も近縁であり、同様に広範な化合物を基質とする *Cylindrocarpon radicicola* ATCC 11011 株の CAMO（CrCAMO）の K_m 値（470、40、880、1000 μM）や、機能解析がなされている BVMO の中で最も良く研究されている BVMO の 1 つである *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871 株のシクロヘキサノンモノオキシゲナーゼ（AcCHMO）の K_m 値（3600、6.3、200、1800 μM）と比較して、ExCAMO の K_m 値は非常に低い数値であった。シクロウンデカノンに対する K_m 値(2700 μM)は、11 員環以上のケトンに対して活性を有する *Pseudomonas* sp. HI-70 株のシクロペンタデカノンモノオキシゲナーゼ（CPDMO、91 μM）と比較して非常に高い値となったが、置換シクロヘキサノンに対する K_m 値は CPDMO のものより非常に低い値であった。次に、ExCAMO を各温度で 5 分間保温し、活性が 1/2 になる温度を検討した結果、41℃となり、CrCAMO（28℃）、AcCHMO（36℃）よりも安定であることがわかった。さらに、ExCAMO 以外に本菌株が有する 5 つの BVMO 様遺伝子の全塩基配列を決定、発現大腸菌を構築し、それら全てが BVMO 活性を有することが明らかになった。

Key words Baeyer–Villiger monooxygenase, cycloalkanone monooxygenase, Fungus, *Exophiala jeanselmei*

G3H5 (0105) 時間分割 X 線結晶構造解析に向けた Co 型 Nitrile Hydratase の変異体作製及び酵素活性比較

○福田 拓都[1], 仲本 和義[1], 松村 洋寿[1], 野口 恵一[2], 養王田 正文[2], 尾高 雅文[1]*
([1]秋大院・理工, [2]東農工大院・工)

Mutation of cobalt-containing nitrile hydratase from *Pseudonocardia thermophila* for time-resolved crystallography

○Takuto Fukuda[1], Kazuyoshi Nakamoto[1], Hirotoshi Matsumura[1], Keiichi Noguchi[2], Masafumi Yohda[2], Masafumi Odaka[1]*
([1]Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. of Agri. and Tech.)
modaka@gipc.akita-u.ac.jp

Nitrile Hydratase (NHase)は、ニトリル化合物からアミド化合物への水和反応を触媒する酵素であり、αとβサブユニットからなるヘテロ二量体構造をとる。NHase の反応中心は非ヘム Fe (III)または非コリン Co (III)にシステインスルフェン酸(Cys-SO$^-$)及びシステインスルフィン酸(Cys-SOO$^-$)が配位した特異的な構造を形成しているため、詳細な反応機構は未解明である。これまでに我々は、酵素反応速度を低下させた Fe 型 NHase βR56K 変異体を用いた時間分割 X 線結晶構造解析を行い、環状中間体構造を報告している。しかし、後の計算化学の結果から、R56 は環状中間体の形成以降の反応に重要な反応中心への水素授受に直接的に関与するため、βR56K 変異体では環状中間体以降の反応が進行しないことが示唆された。そこで、水素授受に直接的な影響を及ぼさないと予想される箇所へのアミノ酸変異導入を試みたが、Cys-SO$^-$の酸化失活が起こり、解析に用いることができなかった。そこで、本研究では、酸化失活に対する安定性の高い Co 型 NHase の変異体を作製し、時間分割 X 線結晶構造解析により反応中間体を捕捉することとした。ここでは、αS112A/βY68F 変異体の作製、精製及び活性測定の結果を報告する。野生型 Co 型 NHase-pUC18 ベクターを鋳型とした Quik Change 法により、αS112A 及びβY68F の変異を導入した。αS112A/βY68F 発現ベクターを用いて形質転換した大腸菌 BL21(DE3)を、LB 培地で OD_{600}=0.6 となるまで 37 ℃で培養した後、終濃度 100 μM IPTG、250 μM $CoCl_2$ を添加し、25 ℃で 24 時間発現誘導を行った。菌体破砕後、種々のカラムを用いて精製を行った。基質にメタクリロニトリルを用いて、αS112A/βY68F 変異体の酵素反応速度論的解析を行ったところ、K_m=9.5×10^{-2} mM、k_{cat}= 63 s^{-1} であった。αS112A/βY68F 変異体は、野生型と比較して(K_m=7.2×10^{-1} mM、k_{cat}=960 s^{-1})、k_{cat} は 15 倍小さく、K_m は 7.5 倍小さかった。時間分割 X 線結晶構造解析には、より反応速度を低下させた変異体が望まれることから、現在、αS112A/βY68F 変異体の別箇所への変異導入を行っている。

Key words nitrile hydratase, enzyme activity, crystallography

G3H5 (0106) *Aeropyrum pernix* K1 由来のメチル化酵素 M.ApeKI の特性評価とその応用

○林真央[1], 菅原啓亮[2], 飯田泰広*[1,2]
([1]神奈川工大院・工, [2]神奈川工科大・応用バイオ)

Evaluation of DNA methyltransferase M.ApeKI from *Aeropyrum pernix* K1 and the application of the enzyme

○Mao Hayashi[1], Keisuke Sugahara[2], Yasuhiro Iida*[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Kanagawa Inst. Technol., [2]Dept. Appl. Biosci., Kanagawa Inst. Technol.)
iida@bio.kanagawa-it.ac.jp

メチル化された DNA として、N6-methyladenine (m6A), N4-methylcytosine (m4C), 5-methylcytosine(m5C) などが報告されている。ヒトでは、DNA (cytosine-5) methyltransferase である Dnmt family によって、CpG site のシトシンがメチル化され、m5C を形成する。近年、ヒトにおけるメチル化異常はがん、精神疾患、アレルギー性疾患等に関与することが明らかとなりつつある。一方、メチル化部位を配列レベルで正確に解析する方法は確立されていない。我々は、CpG site を認識する耐熱性 DNA (cytosine-5) methyltransferase が、メチル化解析技術等の開発に有用であると考えている。しかし、耐熱性の DNA (cytosine-5) methyltransferase の報告はない。そこで本研究では、超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 のメチル化酵素 M.ApeKI に着目した。M.ApeKI は、ホモロジー解析より、DNA (cytosine-5) methyltransferase であることが推測されているが、特性を評価した報告はない。本研究では、M.ApeKI の特性を評価することを目的とした。さらに M.ApeKI を用い、CpG site を認識する耐熱性 DNA (cytosine-5) methyltransferase の開発を試みた。

はじめに M.ApeKI の特性評価を行った。人工合成した M.ApeKI の ORF 配列を His-tag を含む pYES2 vector へ組込んだプラスミドを作製し、*Saccharomyces cerevisiae* BY24036 へ形質転換を行った。前培養後、発現誘導し、タンパク質を抽出、His-tag 精製を行った。精製した M.ApeKI に対し、Bisulfite sequencing で認識配列の特定、HPLC で修飾する塩基の決定、MTase-Glo™ Methyltransferase assay(Promega)を用いて至適温度、至適 pH、耐熱性の評価を行った。次に M.ApeKI のターゲット認識の領域について CpG methylase M.Mpe のアミノ酸配列に改変することを試みた。改変した配列を人工合成し、pCold I vector へ組込み、*E. coli* TOP10, DH5α, *dam*-/*dcm*-HST04, JM109 へ形質転換した。

精製した M.ApeKI を用いてその特性を評価した結果、5’-GCWGC-3’ の C-2 にメチル基を修飾する耐熱性では初の DNA (cytosine-5) methyltransferase であることが明らかとなった[1)]。また、組換え型 M.ApeKI を *E. coli* へ形質転換した結果、*E. coli* JM109 でのみ、目的配列を含むプラスミドを保持する形質転換体を得られた。今後、組換え型 M.ApeKI についてその特性を評価する予定である。

1). Hayashi M., Sugahara K., Yamamura A. Iida Y., “Evaluation of the properties of the DNA methyltransferase from *Aeropyrum pernix* K1”, Microbiology Spectrum (in press)

Key words epigenetic, DNA methyltransferase, archaea, *Aeropyrum pernix* K1

G3H5 (0107) ゼブラフィッシュ器官形成におけるタンパク質チロシン硫酸化の機能解明

○黒木勝久[1*], 奥田菜月[1], 上地珠代[2], 剣持直哉[3], Ming-Cheh Liu[4], 榊原陽一[1], 水光正仁[1]
([1]宮崎大・農, [2]宮崎大・医, [3]宮崎大・フロンティア, [4]トレド大・薬)

English title <Bold, 13.5pt, 左揃え>

○Katsuhisa Kurogi[1*], Natsuki Okuda[1], Tamayo Uechi[2], Naoya Kenmochi[3], Ming-Cheh Liu[4], Yoichi Sakakibara[1], Masahito Suiko[1]
([1]Fac. Agric., Univ. Miyazaki, [2]Fac. Med., Univ. Miyazaki, [3]Front. Sci. Res. Center., Univ. Miyazaki, [4]Dept. Pharmacol. Univ. Toledo)
katsu1982@cc.miyazaki-u.ac.jp

翻訳後修飾反応の一つであるチロシン硫酸化はタンパク質間相互作用を制御することで血液凝固や免疫などに機能する。全タンパク質の 5%程度がチロシン硫酸化を受けていると考えられているが、実際にチロシン硫酸化が確認されているタンパク質は少ないため、チロシン硫酸化の生理機能はよく理解されていない。その一つに、胚発生および器官形成における機能がある。そこで、我々は、胚発生と器官形成研究に良く用いられているモデル脊椎動物であるゼブラフィッシュを用いた遺伝子機能阻害実験を行った。ゼブラフィッシュには、タンパク質チロシン硫酸転移酵素遺伝子(*TPST*)が 3 種類存在する。そのため、それぞれの遺伝子配列特異的なモルフォリノアンチセンスオリゴを 1-2 細胞期の胚にインジェクションし、27hpf(受精後 27 時間胚)の形態観察と二次元電気泳動を行った。3 種類の酵素の内、TPST1 と TPST1L のノックダウン稚魚には軽度の脳浮腫が確認され、TPST1L と TPST2 のノックダウン稚魚には軸索や尾の湾曲が確認された。ノックダウン稚魚のタンパク質抽出液を蛍光二次元電気泳動にて分離し、タンパク質発現変動解析を行った結果、代謝やタンパク質輸送、胚発生・器官形成に関わるタンパク質など、合計 50 種類のタンパク質に発現変動が確認できた。その中でも、胚発生・器官形成に関わる Wnt タンパク質には、硫酸化を受けるチロシン部位が存在することが明らかになった。更に、3 種類の TPST の酵素活性の比較解析を行ったところ、TPST1 と TPST1L は広い基質特異性をもつことが明らかとなった。一方、器官形成に最も大きい影響を示した TPST2 の基質は未だ同定できないことから、その基質特異性は極めて高いことが考えられた。この結果から、チロシン硫酸化は胚発生・器官形成に重要な役割を果たすことが想定された。

Key words tyrosine sulfation

G3H5 (0108) クライオ電子顕微鏡で観るタンパク質の立体構造と生物工学応用

○谷　一寿[1*]
([1]三重大学・院医)

Structure-function relationships of proteins at near atomic resolution using cryo-electron microscopy to apply biological engineering

○Kazutoshi Tani[1*]
([1]Med. Mie Univ.)
ktani@doc.medic.mie-u.ac.jp

日本医療研究開発機構(AMED)・創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム（BINDS）の活動一環として行っている、クライオ電子顕微鏡(Cryo-EM)による蛋白質の立体構造決定に関する支援の結果を発表する。最近の測定・解析技術の向上により、測定サンプルが適切で純度が高ければ、タンパク質溶液を用いた 1 ～ 3 日間のデータ収集により近原子分解能(4~2Å分解能)へ到達することができる。今回、論文報告した病原性カンジダ菌由来の代謝系酵素であるイソクエン酸リアーゼ(ICL)や光合成細菌(Rsp. rubrum, Rba. sphaeroides)由来の光合成膜タンパク質であるコア光捕集集合体(LH1-RC)の立体構造情報とそれに基づく機能相関研究の結果を中心に紹介したい。
その他の支援結果に関しては、https://www.cryoem-tokai.jp/を参照して頂きたい。
【ICL】（共同：兵庫県立大学・水島先生、理化学研究所・米倉先生らグループ他）
Ref. Hiragi et al., J. Struct. Biol. (2021) 213: 107748.
・X 線結晶化条件とは異なる非常に薄い阻害剤濃度（タンパク質安定化の最小濃度）により、cryo-EM により apo 状態に近い立体構造を 2.6Å分解能で決定。
・apo と X 線により決定した阻害剤結合 ICL の構造から、ユビキチンリガーゼ酵素の作用から逃れる仕組みが明らかになり、病原性の理由を示唆。
【Rsp. rubrum LH1-RC】（共同：茨城大学・大友先生、沖縄科学技術大学院大学(OIST)・Humbel 先生らグループ他）　*Ref. Tani et al., Biochemistry (2021) 60:2483.*
・20 年近く前に注目された Ca^{2+}がなくても光合成を安定的に行える構造的仕組みが cryo-EM により 2.8Å分解能で解明。
・ユビキチンの 1 種であるロドキノンも可視化に成功し、嫌気性条件下での光合成に必要な理由とも合致。
【Rba. sphaeroides LH1-RC】（共同：茨城大学・大友先生、OIST・Humbel 先生らグループ他）*Ref. Tani et al.,* https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.20.449127v1
・cryo-EM で決定した 2.9Å分解能の構造では、カロテノイドが各 LH1 に 2 個結合している様子や、8Å分解能の X 線構造解析より提唱されてきた PufX のコンフォメーションや位置とは大きく異なった。これらは生化学実験とよく一致。
・マススペクトルや電気泳動結果でも見つけることができなかった新奇膜タンパク質（命名 protein-U）を cryo-EM のデンシティマップから発見し、protein-U ノックアウト株からダイマー形成時の安定化に寄与していることを示唆。

Key words photosynthetic bacteria, Candida albicans, cryo-electron microscopy, structural analysis

G3H5 (0109) *Bacillus* sp. OxdB-1 由来アルドキシム脱水酵素の結晶構造解析：結晶化に適した表面に位置するアミノ酸残基の重要性

○松井大亮[1,2], 村木則文[3,4], Ke Chen[1,5], 森智也[1], Aaron Ingram[6], 大池敬子[6], Harald Gröger[6], 青野重利[3,4], 浅野泰久[1*]
([1]富山県大工・生工研セ, [2]立命館大, [3]ExCELLS, [4]分子研, [5]Zunyi Med. Univ., [6]ビーレフェルト大)

Crystal structural analysis of aldoxime dehydratase from *Bacillus* sp. OxB-1: Importance of surface residues in the optimization for crystallization

○Daisuke Matsui[1,2], Norifumi Muraki[3,4], Ke Chen[1,5], Tomoya Mori[1], Aaron Ingram[6], Keiko Oike[6], Harald Gröger[6], Shigetoshi Aono[3,4], and Yasuhisa Asano[1*]
([1]Toyama Pref. Univ., [2]Ritsumeikan Univ., [3]ExCELLS, [4]Inst. Mol. Sci., [5]Zunyi Med. Univ. [6]Bielefeld Univ.), asano@pu-toyama.ac.jp

【目的】アルドキシム脱水酵素（Oxd）はアルドキシム化合物の脱水反応を触媒し，シアンを使用せずにニトリル化合物を合成できる有益な酵素である．様々な微生物から得られた Oxd で光学活性ニトリルの合成を行った結果，特に *Bacillus* sp. OxdB-1 由来 Oxd（OxdB）は，複数のアルドキシムに対し優れたエナンチオ選択性を示すことを明らかにしてる．これまでに様々な条件で結晶化を試みたが結晶の形成が見られていない OxdB の結晶化と構造解析を目的として，タンパク質表面の Lys や Glu 残基に変異導入した酵素を用いた結晶化を検討した．
【方法】OxdB 遺伝子を pET22b (+) ベクターに挿入し，得られた発現プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) に挿入した．培養後，菌体を超音波破砕し，遠心分離で得られた上清をニッケルアフィニティークロマトグラフィーで精製した．精製酵素をホルムアルデヒドおよびジメチルアミンボラン複合体を用いて Lys 残基をメチル化修飾した．OxdB の一次配列を用いて SWISS-MODEL で立体構造を予測し，そのタンパク質表面に位置する Lys や Glu 残基に対し，他の Oxd において保存性の高いアミノ酸に置換した．得られた変異型酵素遺伝子の発現系を上記と同様に構築し，培養と精製を行った．各種結晶化スクリーニングキットで 20ºC の条件で結晶化を検討した．
【結果と考察】OxdB の Lys 残基をメチル化修飾後，結晶の形成が見られたことから，タンパク質表面に位置するアミノ酸側鎖のエントロピー値が高い Lys 残基が結晶化に影響していることが示唆された．そこで X 線結晶構造解析に最適な単結晶を得るために，Lys や Glu 残基を他の Oxd でよく保存されているアミノ酸に置換した 26 種類の変異型酵素を調製し，各々精製後，CD で熱安定性を比較した結果，野生型酵素よりも上昇した変異型酵素 K104A と E85A を見出した．変異型酵素 E85A を用いて単一結晶を得，X 線結晶構造解析で 1.55 Å の回折データの取得に成功した．さらに基質の一つである *Z*-2-(3-ブロモフェニル)プロパナールオキシムとの共結晶体の構造解析にも成功し，基質認識に関与する残基 Ala12, Ala14 を見出すことが出来た．Glu85 を置換した Ala 残基はタンパク質表面に位置しており，変異導入による立体障害の減少で結晶の形成が可能となったと推測でき，このような表面の折り畳みと安定性に重要な役割を果たす残基への変異導入による結晶化法は，今後結晶化が難しいタンパク質の構造解析に重要な方法の一つとなる．

Key words aldoxime dehydratase[1], mutagenesis[2], crystallographic study[3], nitrile[4]

G3H5 (0110) 分子動力学的解析による高接着タンパク質の水中接着配向推定

○笹原 純[1*], 鈴木淳巨[1], 藤本和士[1], 岡崎 進[2], 堀 克敏[1]
([1]名大院工, [2]東大院新領域)

Estimation of adhesion orientation of a highly adhesive protein in water by molecular dynamics simulation

○Jun Sasahara[1*], Atsuo Suzuki[1], Kazushi Fujimoto[1], Susumu Okazaki[2], Katsutoshi Hori[1]
([1]Graduate School of Engineering, Nagoya University, [2]Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)
E-mail: khori@chembio.nagoya-u.ac.jp

【研究背景】
当研究室で発見された高接着ナノファイバータンパク質 AtaA は、様々な材料表面に対し水中で高い接着性を示す。こうした接着機能はファイバー先端ドメインの Nhead に由来することが分かっているが、Nhead がなぜ水中で様々な材料表面に対し強固に接着するかは未解明であった。接着メカニズムの解明のためには、Nhead の材料表面への接着挙動を分子レベルで理解する必要があるが、高い時空間分解能が必要であり測定手法が限られていた。

【研究目的】
本研究では、分子動力学(MD)計算を用いることで、材料表面に対する Nhead の水中接着配向を推定することを目的とした。

【研究方法】
Nhead がどのような配向で材料表面に接着するかを明らかにするため、材料表面に対して横向き、縦向きで接着する場合について MD 計算を行った。接着材料表面としては、これまで Nhead の接着評価試験によく使用されてきた疎水性のポリスチレン(PS)表面を選択した。接着材料、Nhead、水分子、イオンを含む全原子系を構築し、Nhead の水中接着過程を MD 計算によって解析した。熱力学積分法により、各配向で接着する際の接着自由エネルギーを算出した。

【研究結果】
PS 表面に対し、横向き、縦向きいずれの配向で接着する場合も、接着自由エネルギーが負であり、その接着自由エネルギー差は同程度であった。これより、Nhead は PS 表面に対して、横向き、縦向きの配向に関係なく接着可能であることが明らかとなった。これより Nhead が高い水中接着性を示す理由の一端が示唆された。

Key words *Acinetobacter*, adhesion, protein, MD simulation

G3H5 (0111) インバースオートトランスポーターによる大腸菌表層ディスプレー

○牧野 祥嗣[1]*, 金井 保[1], 伊藤 伸哉[1]
([1]富山県大・生医工研セ)

Protein display on *Escherichia coli* cells by an inverse autotransporter

○Yoshihide Makino[1]*, Tamotsu Kanai[1], Nobuya Itoh[1]
([1] Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)
makino@pu-toyama.ac.jp

大腸菌表層でのタンパク質提示技術は、機能性タンパク質のスクリーニング、酵素による物質変換等、様々な分野で活用される。本研究では、これまでに表層ディスプレーでの応用の報告がないインバースオートトランスポーターを用いた、大腸菌表層へのタンパク質提示を評価したので報告する。

微生物細胞表層での外来タンパク質提示技術は、酵素変換、結合タンパク質スクリーニング等の目的で広く研究されている。結合タンパク質の探索目的においては、他のディスプレー技術と比較して、セルソーター等を用いてクローンを選別することで、高い S/N 比での選択が可能となる、などの利点がある。担体となる微生物については、酵母や大腸菌等が多く用いられ、多様な提示担体タンパク質が検討されてきた。大腸菌においては、外膜に局在するオートトランスポータータンパク質を用いた提示で良好な結果が報告されている。例えば、Antigen 43 では、N 端側にパッセンジャータンパク質を組み込んで発現させ、C 端側に位置する β バレルタンパク質に貫通する形で外膜表面に外来タンパク質が提示される (e.g., B. Ramesh, et al, (2012) *J Biol. Chem.* **287** (46), 38580-38589.)。近年、N 末端側にバレル、C 末端側にパッセンジャータンパク質を持つ、インバースオートトランスポーター (IAT) と呼ばれるタイプが見いだされたが、大腸菌由来 YeeJ タンパク質が、バイオフィルム形成に関与する機能を持つ IAT であることが明らかになった (M. Martinez-Gil, et al. (2017) *Sci. Rep.*, **7**: 11326.)。本研究で我々は、この YeeJ を用いた大腸菌表層ディスプレーについての検討を行った。

大腸菌ゲノムをテンプレートに、*yeeJ* 遺伝子の N 末端側について、提示タンパク質部分の長さが異なる 4 種類の PCR 産物を調製した。提示モデルタンパク質として我々が独自に開発した TNF-α 結合活性を持つタンパク質 TD65 遺伝子を調製し、これがパッセンジャーとなるように、*yeeJ* 増幅産物とともに pBAD18 に連結した。組換え菌体について、提示率を最適化後、TNF-α を固定したマイクロウェルを用いた親和性選択を行ったところ、特定長さの提示タンパク質の C 端部分に連結した TD65 クローンにおいて、TNF-α の固定化に伴う有意なタイターが測定された。さらに、骨格タンパク質にランダム変異を導入したライブラリを作成して、TNF-α への親和性選択を行ったところ、TNF-α への結合に伴うと考えられる有意なタイターが測定された。今後は、濃縮を進めた結果のクローンについて TNF-α への親和性解析を行うこと、および、セルソーターを用いた特異的親和クローンの直接選択を検討する予定である。

Key words protein engineering, *E.coli* surface display, inverse transporter

G3H5 (0112) Purification and characterization of norovirus-like particle and its SpyTag-variants from silkworm (*Bombyx mori*)

○Jirayu Boonyakida[1], Doddy Irawan Setyo Utomo[1], Jian Xu[2], and Enoch Y. Park[1,3]*
([1] Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2] Inst. Biol. Info. Sci., Biomed. Syn. Biol. Res. Center, Sch. Life Sci., East China Normal Univ., [3] Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Purification and characterization of norovirus-like particle and its SpyTag-variants from silkworm (*Bombyx mori*)

○Jirayu Boonyakida[1], Doddy Irawan Setyo Utomo[1], Jian Xu[2], and Enoch Y. Park[1,3]*
([1] Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2] Inst. Biol. Info. Sci., Biomed. Syn. Biol. Res. Center, Sch. Life Sci., East China Normal Univ., [3] Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

Recombinantly expressed VP1 of norovirus can lead to self-assembly of norovirus-like particles (NoV-LPs). The VLP shows an attractive possibility of displaying foreign amino acid sequences on the exposed surface. By combining NoV-LP with SpyTag/SpyCatcher bioconjugation system, we intended to develop a modular display platform for antigen presentation. SpyTag peptide was introduced to the two most outer loops of VP1, such as VP1(ST-A) and VP1(ST-B), and to the C-terminal of VP1, VP1(c-ST). These native VP1 and SpyTag-variants VP1 were expressed using *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) bacmid expression system in silkworm. The NoV-LPs were collected from silkworm fat body lysate by density gradient centrifugation. We observed a formation of protein aggregates from VP1(ST-A) and VP1(ST-B) while native VP1 and VP1(c-ST) were solubilized in the solution. To improve the purity of the NoV-LP and NoV-LP(c-ST), the proteins were further purified using Ni-NTA column based on the surface exposed side chain of histidine residues. The additional purification led to a highly purify VLP. The morphology and size of the purified VLPs were examined using TEM and DLS.

In this study, we express the native norovirus-like particle and its SpyTag-variants using a silkworm expression system and purified from a silkworm's fat body using a two-step purification method which could improve the purity of the VLP. The morphology and size of the purified VLPs were examined using TEM and DLS.

We demonstrated that VP1 and SpyTagged-VP1 of norovirus formed the VLP when recombinantly expressed and purified from silkworm and high quality NoV-LPs can be obtained from the two-step purification.

Key words Silkworm, *Bombyx mori*, Norovirus, VLP

G3H5 (0113) 新規 L-リジン-α-オキシダーゼの同定と反応機構の解明

○杉浦紗也加[1], 中野洋吾[1,2*], 丹羽正純[1], 長谷部文人[1], 松井大亮[3], 伊藤創平[1]
([1]静県大院・薬食生命, [2]JST さきがけ, [3]立命館大)

Identification of a novel L-Lysine-alpha-oxidase and elucidation of its reaction mechanism

○Sayaka Sugiura[1], Shogo Nakano[1,2*], Masazumi Niwa[1], Fumihito Hasebe[1], Daisuke Matsui[3], Sohei Ito[1]
([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]PRESTO JST, [3]Ritsumeikan Univ.)
Email : snakano@u-shizuoka-ken.ac.jp

【背景】L-アミノ酸を代謝する酵素は生物において普遍的に存在しており、中でも、基質特異性の高い L-アミノ酸酸化酵素 (LAAO) は、食品および生体試料などのサンプル中における L-アミノ酸の濃度定量や酵素センサーとして工業的・医薬的応用が期待されている。本研究では、近年拡大を続ける配列データベースより基質特異性の異なる LAAO を探索することを目的とした。独自のインシリコ酵素探索法と祖先型設計法 (ASR) を組み合わせることで、L-Lys に対して高い特異性を示す祖先型 L-リジン酸化酵素 (AncLLysO) を同定、加えて AncLLysO の反応機構を構造機能相関解析により明らかにしたので報告する。

【方法】先行研究で見出した FAD 依存性酸化酵素(1)を鋳型とし、独自のインシリコ酵素探索法を適用した。結果、データベースより LAAO スーパーファミリーに属する、28 配列を選抜した。選抜した配列群の祖先配列を FastML で推定したのち、それを実際に発現・精製した。20 種の L-アミノ酸を基質とし酸化反応を触媒するか調べたところ、L-Lys を特異的に酸化できる酵素を同定し、AncLLysO と名付けた。本酵素の酵素学的諸性質を決定するとともに、ヨウ素 SAD 法を用いて X 線結晶構造を決定、変異体と基質との共結晶の解析を行った。

【結果・考察】反応速度論解析より、L-Lys への k_{cat}/K_m 値は、その他 L-アミノ酸の k_{cat}/K_m 値より約 20–70 倍高い値を示していた。また、AncLLysO は報告例のある L-Lys 酸化酵素よりも高い $T_{1/2}$ 値 (71℃) を示すなど、高い熱安定性を有していた。AncLLysO 失活変異体と L-Lys の共結晶の構造解析から、L-Lys と水素結合をしていた R76 と E383 が、AncLLysO の特殊な基質特異性を生み出していることを突き止めた。また L-Lys の結合の有無で、AncLLysO の 251-254 残基で形成されるプラグループに構造変化が生じることも見出した。特に G251P と Y253A 変異体は、基質との相互作用形成に直接的な影響は与えない位置に存在するにも関わらず、k_{cat}/K_m 値は変異導入前と比較して約 800-1800 倍低下した。この結果は、基質結合に伴うプラグループの構造変化が、AncLLysO が高い活性を発揮する上で必須であることを証明した。以上のように、本研究では新規に取得・設計した AncLLysO の基質認識と反応機構を分子レベルで解明することに成功した(2)。

Key words L-amino acid oxidase, crystal structure, ancestral sequence reconstruction, enzyme mechanismord

Ref. 1. S. Nakano *et al.*, *ACS Catal*. **2019**, *9* (11), 2. S. Sugiura *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2021**, 10143

G3H5 (0201) 超耐熱性 L-アミノ酸酸化酵素の開発と D-アミノ酸光学分割への応用

○石田千晴[1], 中野洋吾[1*], 南野優季[1], 伊藤創平[1]
([1]静県大院・薬食生命)

Development of highly thermostable L-amino acid oxidase for deracemization and stereoinversion of amino acids

○Chiharu Ishida[1], Shogo Nakano[1*], Yuki Minamino[1], Sohei Ito[1]
([1] Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka)
snakano@u-shizuokaken.ac.jp

【背景・目的】

L-アミノ酸酸化酵素 (LAAO) は、L-アミノ酸の主鎖アミノ基を酸化することで、イミノ酸及び過酸化水素 (H_2O_2) を産生する FAD 依存型酵素である。LAAO は、希少アミノ酸であり、医薬品や抗生物質の原料でもある D-アミノ酸の合成に利用できる。近年、いくつかの D-アミノ酸がヒトにおいて生理機能を持つことが明らかとなっており、そのニーズが高まっていることから LAAO は多様な分野において役立つ可能性がある。

ラセミ体アミノ酸を原料とし、D-アミノ酸酸化酵素 (DAAO) と還元剤を作用させることで、L-アミノ酸をワンポッドで合成できる。この方法は、酵素の性質に依存するが、光学純度の高いラセミ体を理想収率 100%で光学分割できる。D-アミノ酸の合成は、DAAO を LAAO に置き換えることで達成することができる。しかし、大量調整可能な LAAO は、我々が報告した AncLAAO 以外に報告が無く、また AncLAAO においても熱安定性・耐久性の問題が残されていた。そこで本研究では、先行研究で見出したアルギニン酸化酵素(1)を鋳型とし、独自のインシリコ酵素探索法(2)を適用、得られた 11 配列から祖先型 LAAO を作製し、その酵素学的諸性質の検討と D-アミノ酸誘導体の光学分割への適用を検討した。なお、本酵素は、極めて高い耐熱性を持っていたため、Highly thermostable ancestral LAAO (HTAncLAAO) と名付けた。

【結果・考察】

HTAncLAAO について酵素学的諸性質の検討を行った。HTAncLAAO は従来の LAAO と比べて、極めて高い熱安定性 (T1/2 : 97℃) を有していた。さらに 30℃における耐久性を調べたところ、HTAncLAAO は 168 時間後でも活性を 90%以上保持していた。以上のことから、HTAncLAAO は長時間の反応に必要な熱安定性や耐久性が極めて高いことが明らかとなった。そこで、HTAncLAAO を用いて D-アミノ酸の光学分割を試みた。DL-Phe、DL-Phe 誘導体、DL-Ile に関して脱ラセミ化を行い、4 つの DL-Phe 誘導体、DL-Ile に対して、高い光学純度 (> 99% ee) で D 体を得ることができた。また、従来報告されている LAAO と比べ、少ない酵素量で光学分割を行うことができた。以上の結果より、HTAncLAAO は、D-アミノ酸光学分割への有用性が高いと判明した。

1) S. Nakano, *Appl Environ Microbiol.* **2018**, *85* (12), 2) T. Motoyama, *Biochemistry* **2020**, *59*

Key words L-amino acids oxidase, dynamic kinetic resolution, Sequence based protein design, Ancestral reconstruction

G3H5 (0202) 手足口病のためのチャイニーズハムスター卵巣由来細胞を用いたウイルス様粒子の生産

○松嵜 日南[1], Thao Bich Nguyen[1], 金井 貴蓉[1], 山野-足立 範子[1,2], 古賀 雄一[1,2], 大政 健史[1,2*]
([1]阪大院・工, [2]OTRI, Osaka Univ.)

Virus-like particle production using Chinese hamster ovary cells for Hand, foot and mouth disease

○Hina Matsuzaki[1], Thao Bich Nguyen[1], Guirong Kanai[1], Noriko Yamano-Adachi[1,2], Yuichi Koga[1,2], Takeshi Omasa[1,2*]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]OTRI, Osaka Univ.)
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】
手足口病は、夏季に乳幼児を中心に流行する急性ウイルス性感染症であり、年間国内感染者本疾患数は約 40 万人に上るが、本疾患に対する国内で承認されたワクチンは未だ開発されていない。また、手足口病ウイルスのゲノムは、P1、P2 および P3 遺伝子領域からなり、P1 は P3 領域に存在する 3CD プロテアーゼによって切断され、サブユニットタンパク質 VP0、VP1、VP3 が生成される。これら 3 つのサブユニットタンパク質が自己集合することで正二十面体のカプシドが形成される。
現在上市されているワクチンの 1 つに Virus-Like Particle (VLP) ワクチンがある。VLP はウイルスとほぼ同様の表面タンパク質構造を取るため、強力に中和抗体を誘導することができ、更にウイルスの遺伝情報を持たないため、感染力がない。これらの特徴から、VLP は画期的なワクチン剤型として注目されている。そこで本研究では、タンパク質の適切なフォールディングや翻訳後修飾が可能な Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞を用いて、手足口病の VLP の発現を試みた。
【実験手法】
P1 と 3CD を 1 つの発現用ベクターに挿入し、これを無血清馴化 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することで、VLP 安定発現細胞を取得した。この細胞を 1 L バイオリアクタースケールでバッチ培養し、得られた細胞溶解液と培養上清を Tangential Flow Filtration (TFF) と超遠心分離によって約 200 倍に濃縮した。次に、ショ糖密度勾配遠心法を用いて夾雑タンパク質と VLP を分離し、各画分について抗 VP1 抗体を用いた Western-Blotting を行うことで、VLP が含まれる画分を回収した。この画分を透過型電子顕微鏡を用いて観察し、実際に粒子が形成されているかを確認した。
【結果・考察】
Western-Blotting で予想される分子量の位置にバンドが確認できた画分を電子顕微鏡で観察した結果、直径約 30 nm の VLP の形成が確認できた。しかし観察された粒子の数は僅かであり、産業応用に必要とされる発現量を満たしていないことが示唆された。現在、VLP 安定発現細胞の生産性をより向上させるために、P1 と 3CD の発現量比の検討を行っている。

Key words virus-like particle, hand, foot and mouth disease, Chinese hamster ovary (CHO) cell, vaccine

G3H5 (0203) CHO-K1 細胞株を用いた SARS-CoV-2―VLP 生産系の構築

○保木本達也[1], 松嵜日南[1], Thao Bich Nguyen[1], 金井貴蓉[1], 山野-足立範子[1,2], 古賀雄一[1,2], 大政健史[1,2*]
([1]阪大院・工, [2]阪大 OTRI)

Construction of CHO-K1 cell line expressing SARS-CoV-2-VLP

○Tatsuya Hokimoto[1], Hina Matsuzaki[1], Thao Bich Nguyen[1], Guirong Kanai[1], Yuichi Koga[1,2], Noriko Yamano-Adachi[1,2], Takeshi Omasa[1,2*]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]OTRI, Osaka Univ.)
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

中国武漢で発生した COVID-19 は現在、世界中で猛威を振るっている。2021 年 8 月までの感染者数は 2 億人を超えており死者数は 420 万人にのぼる。そこで COVID-19 の終息を目指して世界中で様々なワクチン開発が行われている。ワクチンはウイルスや細菌などの病原微生物をもとに開発されており、主に生ワクチン、不活化ワクチンに分類される。近年では、技術の進歩により核酸ワクチン、組換えタンパク質ワクチンが台頭しており、これらのワクチンはそれぞれ、病原微生物の遺伝子とタンパク質を人工的に合成することによって製造される。しかし、核酸ワクチンは導入した遺伝子の細胞内への取り込みに課題が残る。そこで本研究では、組換えタンパク質ワクチンの一種である VLP (virus-like particle)ワクチンに注目した。VLP はウイルスの外部構造を模倣しているため、効果的な免疫応答が期待されており、さらにウイルスの遺伝情報を欠いているため感染力を保持しない。したがって本研究では、チャイニーズハムスターの卵巣由来(CHO)細胞を用いて SARS-CoV-2-VLP の生産系構築を試みた。まず、対象ウイルスを構成しているタンパク質の遺伝子 Spike (S), Membrane (M), Envelope (E), Nucleocapsid (N)を遺伝子合成することで調製した後、M,E をそれぞれ pEHX1.2 と pELX2.2 ベクターに導入した後、制限酵素処理により一つのベクターとし、S および N を pBudCE4.1 ベクターに導入することで二つのベクターからなる SARS-CoV-2-VLP 発現ベクターを構築した。次に、標的ウイルスの VLP 構築の第一歩として、構築した pBudCE4.1-S.N ベクターをエレクトロポレーション法によって CHO-K1 株にトランスフェクションし、ウェスタンブロッティングによって S タンパク質に対する一次抗体を用い発現確認を行った。その結果、S タンパク質の分子量である 180 kDa 付近にバンドを確認した。発現が確認された S タンパク質は、構造タンパク質の中で最も分子量が大きく、糖鎖修飾が複雑なタンパク質である。したがって、この研究結果は、CHO 細胞を用いた SARS-CoV-2-VLP 形成に向けて一歩前進したと結論付けることができる。今後、その他の構造タンパク質(M,E,N タンパク質)の発現を確認し、SARS-CoV-2-VLP を恒常的に発現する CHO 細胞株構築を行う。

Key words Chinese hamster ovary, SARS-CoV-2, vaccine, virus-like particle

G3H5 (0204) シリカ粒子形成促進タンパク質"グラシン"のシリカ吸着における kinetics 解析

○坂手 勇斗[1], 門田 啓吾[2], 美藤 友博[1], 清水 克彦[3], 有馬二朗[1*]
([1]鳥取大院・農, [2]鳥取大・農, [3]鳥取大・CoRE)

Kinetics analysis in silica adsorption of silica particle formation promoting protein "glassin"

○Yuto Sakate[1], Keigo Monden[2], Tomohiro Bito[1], Katsuhiko Shimizu[3], Jiro Arima[1*]
([1]Tottori graduate school Agriculture, [2]Tottori university Agriculture, [3]Tottori university CoRE)
arima@tottori-u.ac.jp

カイロウドウケツのシリカ骨格由来タンパク質グラシンは，ケイ酸からのシリカ形成を促進する機能を有する。グラシンは，His-Asp に富む領域（HD 領域），Pro に富む領域（P 領域），His-Thr に富む領域（HT 領域）がスペーサーを挟んで繰り返されるタンデムリピート構造をなし， HD 領域がシリカ形成促進に寄与する。一方で、グラシンにはシリカに対して強く吸着する機能も有しており、その吸着特性は、グラシンの可溶性タンパク質固定化タグとしての利用に好都合である。そこで本研究では，グラシンのシリカ表面への吸着能に着目し，グラシンと GFP，及びグラシン及び各領域とグルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質を用いて，領域ごとのシリカへの吸着特性を評価するとともに，可溶性タンパク質固定化のためのタグとしての利用可能性を評価した。評価に使用するため，グラシンと GFP との融合タンパク質（グラシン-GFP），グラシン及び各領域と GST との融合タンパク質（GST-グラシン，GST-HD2，GST-HT2，GST-P2）を調製した。GST との融合タンパク質を使用し，グラシン及び各領域のシリカへの吸着能について，GST をコントロールとして SDS-PAGE と GST 活性を指標に評価した。pH 7.0 で吸着試験を行った結果，GST と比較して融合タンパク質は優位にシリカに対して吸着特性を示したが，GST 自身も約 40%の吸着が見られ，GST-グラシンと GST-HT2 はグラシン領域の分解が確認された。吸着時の pH を 9 まで上げることで，GST のシリカ吸着は解消されたと共に，GST-グラシンと GST-HD2 が pH 9 においても特異的な吸着能を示し，GST-HD2 にいたってはタンパク質分解も確認されなかった。本実験結果から，HD 領域のみでタンパク質固定化タグとして利用できる可能性が高いことが示された。続いて，グラシン-GFP を使用し，グラシン全長のシリカに対する解離定数（K_d）をスキャッチャードプロットで算出した。その結果，pH 7.0 での K_d 値は約 4 nM で，pH が上昇すると K_d 値が 8 nM まで上昇した。現在は，各領域におけるシリカに対する吸着能の比較のため，シリカとグラシンや HD 領域との K_d 値の算出を試みている。

Key words immobilized enzyme, peptide

G3H5 (0205) チリメンアオジソのアミロイド β 凝集阻害活性を向上させる栽培条件

○島森圭弥[1], 南部智彦[1], 川又大輝[1], 倉賀野正弘[1], 飯森俊文[1], 山中真也[1], 上井幸司[1], 徳樂清孝[1*]
([1]室工大院・工)

Cultivation conditions to enhance amyloid beta aggregation inhibitory activity of *Perilla frutescens var. crispa 'Viridi-crispa'*

○Keiya Shimamori[1], Tomohiko Nanbu[1], Daiki Kawamata[1], Masahiro Kuragano[1], Toshifumi Iimori[1], Shinya Yamanaka[1], Koji Uwai[1], Kiyotaka Tokuraku[1*]
([1]Muroran Inst. Technol.)
tokuraku@mmm.muroran-it.ac.jp

アルツハイマー病の予防策として、脳内で引き起こされるアミロイドβ（Aβ）の凝集を阻害することが有効であると考えられている。我々は以前、量子ドットを用いた Aβ 凝集体のイメージング技術と、それを応用した Aβ 凝集阻害活性の微量ハイスループットスクリーニング（MSHTS）法を開発し、本手法を用いてシソ科香辛料が高い活性を示すことを明らかにした（Ishigaki *et al*., 2013）。その後、チリメンアオジソ（*Perilla frutescens var. crispa 'Viridi-crispa'*）の EtOH 抽出物が著しく高い Aβ 凝集阻害活性を有するとして特許出願したが（特許第 6707251 号）、収穫時期や栽培地域により活性が大きく変動することが分かってきた。そこで、本研究では、チリメンアオジソを栽培し、Aβ 凝集阻害活性に影響を与える環境因子を調査した。
各条件でチリメンアオジソを栽培し、収穫する際に土壌成分を分析した。収穫したシソを洗浄後、葉重量の 5 倍量の EtOH で 24 h 浸漬し、ろ過した抽出液をエバポレータにより減圧下で濃縮乾固させ粗抽出物サンプルを得た。従来法より正確かつ迅速に、粗抽出物の活性の評価を可能にした自動化 MSHTS 法を使用し（Sasaki *et al*., 2019）、各サンプルの Aβ 凝集阻害活性を評価した。
標準的な最低限の施肥条件（Std）で栽培した場合は、開花直前に最も活性が高くなった。また、Std と同じ土壌条件にも関わらず、風を遮り栽培した条件では活性が 5 倍低下した。その他、約 30 の施肥条件で栽培した全てのサンプルの活性を土壌成分ごとにプロットすると、窒素由来成分量が活性と正の相関を示した。また、土壌含水率が 20%付近で、最も高い活性を示した。そこで、次年度では窒素成分の施肥量を大幅に変動させた 6 条件で栽培したところ、特定の成分量のとき活性が最も高くなった。また、土壌含水率を 20%に近づけるため、収穫日前日から 1、2、3 週間、水やりを終止し栽培した条件では、前日に水やりを行った条件よりも活性が向上した。
以上より、風量、窒素由来成分、土壌含水率が Aβ 凝集阻害活性に影響を与える栽培条件であり、これらの因子をコントロールすることで高い活性を有するチリメンアオジソを栽培することが可能であることが示された。加えて、開花直前が最も効率よく高活性のチリメンアオジソを収穫できることが明らかになった。本発表では、Aβ 凝集阻害剤としてよく知られるポリフェノールと植物の環境因子に関する知見を踏まえて、これらの結果を考察する。

Key words Alzheimer's disease, amyloid beta, high-throughput screening, Perilla

G3H5 (0206) Developing a platform for novel binding scaffolds based on a β-sandwich domain

○Chukwuebuka Maxwell Ononugbo[1], Mashide Nagao[1], Hidekazu Kishi[1], Noriko Yamano-Adachi[1], Yuichi Koga[1*], Takeshi Omasa[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Developing a platform for novel binding scaffolds based on a β-sandwich domain

○Chukwuebuka Maxwell Ononugbo[1], Mashide Nagao[1], Hidekazu Kishi[1], Noriko Yamano-Adachi[1], Yuichi Koga[1*], Takeshi Omasa[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
kogay@mls.eng.osaka-u.ac.jp

Binding scaffolds are small-sized, single domain proteins designed for binding functions, usually to fill in the limitations of antibodies. The sandwich domain 1 of a thermostable protease islandisin (SD1), possess the general features of binding scaffolds, including structural stability for engineering for novel binding, for useful applications in biomedicine. However, insoluble expression of SDI in *E. coli,* limits its usefulness to binding applications. Therefore, this study focuses on engineering SD1 for soluble expression in *E. coli,* for developing a new platform of novel binding scaffolds, using directed evolution. Error-prone PCR was used to generate SD1 mutant variants. Prior to SD1 library construction, a screening assay to detect even the smallest solubility improvement of SD1 was constructed. This screening system was based on the *E. coli* twin-arginine transport (Tat) pathway, previously described (1). This pathway allows transport of only well-folded proteins from the cytoplasm to the periplasm of *E. coli*. For the screening assay, two proteins (RNaseHI [soluble] and Tk-subtilisin [insoluble]) was used as control. On spot plating, cells expressing RNaseHI was resistant to the ampicillin in the medium, even on the highest concentration used (1000 μg/ml). Whereas, Cells expressing Tk-subtilisin and SD1 could not confer resistance as the concentration of ampicillin in the medium increased. Also, cells expressing RNaseHI became less resistant to ampicillin when expressed in *E. coli* B1LK0 (TatC mutant). Based on the phenotypic differences between cells expressing RNaseHI, Tk-subtilisin and SD1 on the ampicillin plates, a 100 ug/ml of ampicillin was selected for screening and selection of soluble SD1 mutants. A library size of 1.03 x 10^6 with an error rate of ~2% was screened. On screening, one mutant, number 49 was identified with the following amino-acid changes; S27P, V71A, R82G, V96I. This mutant on SDS-PAGE showed little improvement in solubility when compared with the wild-type. This suggests that the screening system could enable the selection of SD1 variants with improved solubility.

Reference

1. Fisher *et al*. (2006). *Protein Science, 15*, 449-458.

Key words: Binding scaffolds, SD1, directed evolution, soluble expression, *E. coli*.

G3H5 (0207) マイクロ・ナノプラスチックの検出に向けたタンパク質プローブの開発

○黒田空来, 石田丈典, 舟橋久景, 廣田隆一, 黒田章夫, 池田丈*
（広島大院・統合生命科学）

Development of a protein-based fluorescent probe for micro- and nanoplastics detection

○Soara Kuroda, Takenori Ishida, Hisakage Funabashi, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Takeshi Ikeda*
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)
ikedatakeshi@hiroshima-u.ac.jp

近年、環境中に蓄積したマイクロプラスチック（5 μm 未満のプラスチック片）やナノプラスチック（100 nm 未満）が生態系に悪影響を及ぼす危険性が懸念されている。しかし、既存の検出法であるフーリエ変換赤外分光法（FT-IR）やラマン分光法などでは、可視光の波長よりもサイズが小さいナノプラスチックは原理的に検出できないため、実態の解明が進んでいない。そこで本研究では、ナノプラスチックを含む微細なプラスチック片を簡便に検出・識別するために、各種プラスチックに特異的に結合するタンパク質プローブの開発を目指した。

その第一歩として、既報のポリスチレン（PS）結合ペプチドをビオチンで標識し、蛍光標識ストレプトアビジンと混合することで、蛍光標識タンパク質プローブを調製した。本プローブと PS ナノ粒子を混合したところ、直径 50 nm の PS 粒子を検出できたことから、タンパク質プローブを用いた蛍光検出法の有効性が示された。しかしながら、本ペプチドは PS への特異性が低く、PS 粒子以外にもポリエチレン、ポリプロピレン粒子にも結合したため、種類の識別は困難であった。

そこで、より特異性の高いタンパク質プローブの開発に向けて、PS に特異的に結合するタンパク質のスクリーニングを行った。大腸菌破砕液上清と PS 粒子を混合し、PS 粒子に結合したタンパク質を SDS-PAGE で検出した。PS に特異的に結合したタンパク質のバンドを切り出し、トリプシン消化後に質量分析に供することで、タンパク質を同定した。本タンパク質の組換え体を細胞内でビオチン標識し、蛍光標識ストレプトアビジンと混合することで、蛍光標識タンパク質プローブを調製した。得られたプローブはポリエチレンやポリプロピレンには結合せず、PS を特異的に検出することができた。これらの結果から、本検出法はプラスチックの検出だけでなく、種類の識別も可能であることが示された。

Key words fluorescent microscopy, fluorescent probe, microplastics, polystyrene

G3H5 (0208) メタゲノム由来酵素 LC クチナーゼの PET 加水分解活性の向上

○清水 敬太, Sulaiman Sintawee, 山野-足立 範子, 古賀 雄一*, 大政 健史（大阪大院・工）

Protein engineering study for improvement of PET degradation activity of metagenome-derived cutinase

○Keita Shimizu, Sintawee Sulaiman, Noriko Yamano-Adachi, Yuichi Koga*, Takeshi Omasa
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ)
kogay@mls.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】

現在、プラスチックの多くが正しく処理されず、自然環境に投棄されていることが社会課題となっている。解決策として酵素によるリサイクルの研究が 20 年以上に渡って進められている。中でも主要なプラスチックの 1 つであるポリエチレンテレフタレート（PET）の分解用酵素として、クチナーゼが現在注目されている。大阪府の万博記念公園の枝葉コンポストからメタゲノム法によって単離された酵素 LC クチナーゼ（Leaf Compost-cutinase、LCC）は耐熱性が高く、他の PET 加水分解酵素に比べて高い PET 加水分解活性を示す。しかし現在、処理用酵素の活性が不十分であるため、酵素を用いた PET 廃棄物の処理は実用化されていない。そのため、クチナーゼのさらなる機能向上が求められている。本研究では指向性進化法を用いて、LC クチナーゼの PET 加水分解活性を向上させることを目的とした。

【方法・結果】

LC クチナーゼ発現用プラスミド pCold PelB-wtLCC-6xHis を用いて、大腸菌 *E. coli* BL21 を形質転換し、発現させた。本株を LC クチナーゼの基質の一つであるトリブチリンを含む寒天培地にて培養した結果、培地中の基質が分解されることで、コロニー周辺に透明なハローが形成された。これにより、ハローの大きさを活性の基準として、ライブラリーのスクリーニングを実施出来ることが示唆された。次に、wtLCC 遺伝子に Error-prone PCR を用いてランダムに変異を導入し、変異ライブラリーを構築した。このライブラリーを用いて同様に、大腸菌 *E. coli* BL21 を形質転換し、基質入りのプレートにて培養した。その結果、野生型よりも大きなハローを形成したコロニーが 21 個得られた。さらなる絞り込みを行うために、二次スクリーニングとして 21 個の変異体の粗酵素液を用いて活性測定を行い、野生型と比較して 1.47 倍以上に活性が向上した上位 6 クローン（#21、28、41、44、45、46）を単離した。各変異体のシークエンス解析の結果、#21（A49T、T198S）、#28（H218P、A219S）、#41（A49T、S228T）、#45（T80S、A156T、S165P、M166L、P179S、K194R、T198S）、#46（S199L）の変異が観察され、#41 と#44 は同じ変異が観察された。同じ変異が見られた原因として、クローニングの過程で大腸菌ライブラリーを生育した際に、変異体ごとに増殖に偏りが出たためだと考えられた。本発表では、各変異体の PET 加水分解活性などの特性解析について報告する。

Key words protein engineering, enzyme activity, *Escherichia coli*, lipase, cutinase

G3H5 (0209) ヒト CutA とヒドロキシクロロキンの相互作用解析

○今野 雅大[1], 尾高 雅文[1], 涌井 秀樹[1], 松村 洋寿[1*]
（[1]秋大院・理工）

Interaction analysis of human CutA and hydroxychloroquine

○Masahiro Konno[1], Masafumi Odaka[1], Hideki Wakui[1], Hirotoshi Matsumura[1*]
([1] Grad. Sch. Eng. Sci., Akita Univ.)
matsumuh@gipc.akita-u.ac.jp

ヒドロキシクロロキン(HCQ)は抗マラリア薬として開発されたが、その後自己免疫疾患に対しても有効であることが判明し、2015 年に本邦でも全身性エリテマトーデス(SLE)の治療薬として認可された。しかし、HCQ の免疫調節における作用機序は未だ不明である。これまでに我々は、HCQ の SLE に対する作用機序の解明を目的として、HCQ の新規標的タンパク質を探索し、標的タンパク質の候補の一つとして CutA を同定した。CutA は原核生物から真核生物まで普遍的に存在するタンパク質である。ヒト CutA には 3 つのアイソフォームが存在し、その一部は結晶構造が明らかになっている。ヒト CutA は哺乳類の脳アセチルコリンエステラーゼ(AChE)の膜アンカーの探索で発見されたため、アルツハイマー病で重要なアセチルコリンエステラーゼ活性と銅の恒常性を調節する働きが提案されているが、CutA の生理的な役割の詳細は未だ不明である。また、近年 CutA の立体構造が、古細菌、原核生物、植物において窒素代謝制御に関与するシグナル伝達分子 PII タンパク質に類似していることから、CutA がシグナル伝達分子としての働きを有することが指摘されている。そこで本研究では、HCQ の SLE に対する作用機序の解明を目的として、ヒト CutA 組換え体を作製し、HCQ との相互作用解析を行った。ヒト CutA の 3 つのアイソフォーム(CutA4、CutA5、CutA6)と、結晶構造が明らかになっている CutA4 の 44-179 残基($CutA4^{44\text{-}179}$)の遺伝子をそれぞれ pET21b ベクターに挿入し、大腸菌 BL21 (DE3)でそれぞれ発現させた。各ヒト CutA 粗精製液を用いた Pull-down assay により、各 CutA と HCQ との相互作用解析を行ったところ、$CutA4^{44\text{-}179}$ の HCQ への結合が確認された。このことから、HCQ への結合には CutA4 の 44 番目以降のアミノ酸残基が重要であることが明らかになった。そこで、$CutA4^{44\text{-}179}$ の単一精製を行い、生化学的性質を調べた。ゲル濾過カラム–多角度光散乱(SEC-MALS)測定を行ったところ、溶液中で $CutA4^{44\text{-}179}$ は三量体構造を形成していることが明らかになった。現在、$CutA4^{44\text{-}179}$ の HCQ に対する親和性の定量測定を行っている。

Key words hydroxychloroquine, systemic lupus erythematosus, CutA, drug-protein interaction

G3H5 (0210) 麹菌界面活性タンパク質ハイドロフォビン RolA の Langmuir 膜に対するポリエステラーゼ CutL1 特異的吸着の可視化技術の開発

○齋藤有美[1],寺内裕貴[2],吉見啓[3],田中拓未[4,5],石崎裕也[6],三ツ石方也[6],藪浩[7,8],阿部敬悦[1*]
([1]東北大院・農,[2]京大院・学堂,[3]京大院・農,[4]農研機構,[5]農環研,[6]東北大院・工,[7]東北大・WPI-AIMR,[8]東北大・多元研)

Development of visualization technology for polyesterase CutL1-specific adsorption to Langmuir membrane of the surfactant hydrophobin RolA produced by *Aspergillus oryzae.*

○Yumi Saito[1],Yuki Terauchi[2],Akira Yoshimi[3],Takumi Tanaka[4,5],Yuya Ishizaki[6],Masaya Mitsuishi[6],Hiroshi Yabu[7,8],Keietsu Abe[1*]
([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.,[2]Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ.,[3]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.,[4]NARO,[5]NIAES,[6]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.,[7]WPI-AIMR, Tohoku Univ.,[8]IMRAM, Tohoku Univ.)
keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp

【目的】 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が産生する界面活性タンパク質 hydrophobin RolA[1]は界面で自己組織化し、β-amyloid 様の分子膜を形成する[2]。また、RolA は生分解性ポリエステル polybutylene succinate-co-adipate（PBSA）に吸着後、PBSA 分解酵素である polyesterase CutL1 を PBSA 表面にリクルートすることで PBSA の分解を促進する[1,3]。我々は RolA がイオン的相互作用により CutL1 をリクルートすることを明らかにしたが[3]、RolA 分子膜の下層に位置する PBSA 表面へ CutL1 が到達する分子機構は不明である。RolA-CutL1 間相互作用機構の可視化を目指し、前任者は Langmuir 膜(L 膜)作製法で RolA の L 膜を作製した[2]。本研究では、RolA L 膜に CutL1 を反応させ、吸着した CutL1 の可視化方法の構築を行なった。

【方法・結果】 まず、L 膜作製装置を用いて作製した RolA L 膜を、親水化又は疎水化した SiO_2 基板に転写した。次に、L 膜転写基板を CutL1 溶液に浸漬し、基板と CutL1 を反応させた。その後、発色基質 pNP-butyrate により、基板上の CutL1 の存在を基質分解産物の吸光度(A_{415})により確認した。この結果、CutL1 を作用させた親水化又は疎水化基板+RolA L 膜には共に pNP-butyrate 分解活性があり、基板上に CutL1 が存在することが定性的に示された。次に、原子間力顕微鏡で RolA L 膜上の CutL1 の可視化を試みた。親水化基板+RolA L 膜上には CutL1 と思しき無数の粒状物体が観察され、その数は CutL1 濃度に依存した。一方、疎水化基板+RolA L 膜上には、長時間の CutL1 浸漬あるいは高 CutL1 濃度条件のみで粒状物体が見られた。現在、観察された粒状物体が CutL1 かどうかを検証するため、蛍光修飾等による RolA L 膜基板上の CutL1 の直接検出を試みている。

[1] Takahashi et al, *Mol. Microbiol.*, **57**, 1780-96 (2005); [2] Terauchi et al, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **84**, 678-685 (2020); [3] Takahashi et al, *Mol. Microbiol.*, **96**, 14-27 (2015).

Key words hydrophobin, polyesterase, protein interaction

G3H5 (0211) カルボニル化した加齢毛髪タンパク質の修復方法の開発

○礒辺真人, 布施直也, 松江由香子
（クラシエホームプロダクツ（株）ビューティケア研究所）

Development of a method for repairing carbonylated aging hair protein

○Masato Isobe, Naoya Fuse, Yukako Matsue*
(Kracie Home Products Ltd. Beauty Care Labolatory)
m.isobe@kracie.co.jp

【緒言】ヒトは加齢すると肉体に様々な変化がおきるが、視点をタンパク質においても加齢により変化がおきている。その特徴として塩基性残基のカルボニル化が挙げられるが、一度カルボニル化したタンパク質は戻すことはできないと考えられている。この酸化的脱アミノ化反応を修復する手法として逆反応である還元的アミノ化反応があるが、あくまで有機化学的手法であり生体タンパクに適用するのは環境・生体親和性が低く困難であった。

しかしながら試料を毛髪に限るとこれらの問題は解決する。毛髪も加齢によりカルボニル化が進行することが知られているが[1]、ヒト組織の中でも薬剤耐性が強い、薬剤を直接塗布可能であるなど他の組織とは異なった特徴を持つ。そこで本研究では加齢してカルボニル化した毛髪をターゲットに還元的アミノ化反応を施し、さらに生体・環境親和性の高い反応条件の検討を行った。

【実験】試料として化学的ダメージを受けていない 60 代女性から採取した毛髪の根元部分を用いた。10%酢酸-メタノール溶媒に還元剤 (0.5 M)、窒素源 (0.5 M) 及び細断した試料毛髪を順次投入し、室温にて 4 日間攪拌した。その後、試料毛髪を取り出しメタノール及び水で十分洗浄し風乾した。評価は毛髪の切片を 5-FTSC により蛍光染色を行い、その蛍光輝度にてカルボニル化タンパク量を評価した。

還元剤; PEMB:5-Ethyl-2-Methylpyridineborane complex (Aldrich 社), Hantzsch ester: Diethyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3,5- pyridinedicarboxylate (Merck 社),
窒素源; アンモニア水 (ナカライテスク社), DBD-ED: 4-(N,N-Dimethylaminosulfonyl)-7-(2-aminoethylamino)-2,1,3-benzoxadiazole (東京化成社)
蛍光試薬;5-FTSC: Fluorescein-5-thiosemicarbazide(Adipo Gen 社)

【結果と考察】まず還元的アミノ化反応に汎用される有機ボラン錯体の PEMB[2)]を選択し、窒素源にアンモニア水を用いて反応を行ったところ、蛍光輝度の減少を確認することができた。次いで窒素源に反応部にアミノ基を有する蛍光試薬の DBD-ED を用いたところ、輝度の上昇を確認できた。これらから本反応は正しくアミノ化が進行していると考えられる。さらに日常使用できる商品を目指して還元剤に Hantzsch ester を用いた反応を検討したところカルボニル基の減少を確認することができた。Hantzsch ester は生体内電子伝達物質である NAD(P)H のモデル物質であり、環境・生体親和性が高いと考えられる。生体成分そのものである NAD(P)H での反応は未だ確認できていないが更なる条件検討により、環境・生体安全性の高い反応が見いだされることが期待される。

【参考文献】
1) 布施直也ら, *SCCJ 研究討論会講演要旨集*, **85**, 4-5.
2) Elizabeth R.Burkhardt et al., *Tetrahedron Letters*, **49**, 5152-5155.

Key words Hair, Protein, Carbonylation, Aging, Reductive amination

G3H5 (0212) 麹菌由来界面活性タンパク質 Hydrophobin RolA の自己組織化メカニズムおよびその界面科学的諸性質の解明

○井田 大輝[1], 齋藤 有美[1], 寺内 裕貴[2], 田中 拓未[3], 吉見 啓[4], 石崎 裕也[5], 三ツ石 方也[5], 藪 浩[6,7], 阿部 敬悦[1*]
([1]東北大院・農,[2]京大院・地球環境学,[3]農研機構,[4]京大院・農,[5]東北大院・工,[6]東北大・多元研,[7]東北大・WPI-AIMR)

Revealing the self-assembly mechanism and interface science properties of the fungal hydrophobin RolA.

○Ida Daiki[1], Saito Yumi[1], Terauchi Yuki[2], Tanaka Takumi[3], Yoshimi Akira[4], Ishizaki Yuya[5], Mitsuishi Masaya[5], Yabu Hiroshi[6,7], Abe Keietsu[1*]
([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Glob. Environ. Stud., Kyoto Univ., [3]NARO., [4]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [5]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [6]IMRAM, Tohoku Univ., [7]WPI-AIMR, Tohoku Univ.)
keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp

Hydrophobin は糸状菌が産生する低分子量（＜20 kDa）の界面活性タンパク質であり、分子内に保存された 8 つの Cys 残基によるジスルフィド結合を有する。それらは 4 つの Cys-Cys loop を形成し、hydrophobin を特徴づける。麹菌 *Aspergillus oryzae* が産生する Hydrophobin RolA は界面に集合して両親媒性単分子膜を形成後、rodlet と呼ばれるアミロイドβ様の棒状構造へと自己組織化する(1)。本研究では、RolA の rodlet 構造への自己組織化メカニズムの解明並びに、自己組織化と RolA の界面科学的性質との関係を明らかにすることを目指した。

私達は RolA の Cys-Cys loop のうち、Cys7-Cys8 loop 内の 2 つの疎水性アミノ酸残基を親水性アミノ酸残基 Ser に置換した RolA 二重変異体 L137S/L142S に着目した。精製 RolA を用いて水面上単分子膜（Langmuir 膜）を作製し、原子間力顕微鏡（AFM）でその表面構造を観察した。RolA WT は密集した rodlet 構造を形成した一方で、RolA 二重変異体 L137S/L142S では rodlet が見られず、球状構造が密集しており、rodlet 形成能が失われていることが示唆された。また、L137S、L142S 各単独変異体を用いて同様に解析したところ、rodlet の形成率、形成速度の一方または両方が WT よりも低下したが、各単独変異体は共に rodlet を形成した。以上より、L137 と L142 の両残基が RolA の自己組織化に協奏的に寄与することが示唆された。さらに、両 Leu 残基を介した RolA 分子間の疎水性相互作用が rodlet 形成における重要な駆動力であることも示唆された。

次に、Pendant Drop 法による RolA の界面張力測定実験を行った。RolA WT は「拡散」と「自己組織化」の二段階のメカニズムを経て、表面張力が 30 mN/m まで低下した。一方、RolA L137S/L142S は「拡散」のみによって表面張力が 45 mN/m まで低下するに留まった。従って、RolA が単分子膜から rodlet 膜への自己組織化を引き起こす意義は、単分子膜状態よりも界面張力を低下させられる点だと考えられる。すなわち、RolA の自己組織化は、*A. oryzae* の水中からの分生子の立ち上げや胞子の拡散といった生物学的機能において重要な役割を果たすことが示唆された。

(1) Terauchi Y. et al., (2020) *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 84(4): 678–685

Key words hydrophobin, self-assembly, Langmuir film, interface science

G3H5 (0213) HLA クラスⅡ組織適合性抗原γ鎖細胞外部位組換え体の発現系構築及び精製

○太島 奈々, 江澤 理徳, 尾高 雅文, 涌井 秀樹, 松村 洋寿*
(秋大院・理工)

Expression and purification of the extracellular domain of HLA class II histocompatibility antigen gamma chain

○Nana Tajima, Toshinori Ezawa, Masafumi Odaka, Hideki Wakui, Hirotoshi Matsumura*
(Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ.,)
matsumuh@gipc.akita-u.ac.jp

【緒言】マクロファージ遊走阻止因子(MIF)は、多くの炎症性疾患に関わる重要な炎症性サイトカインであることから、創薬ターゲットとして注目を集めている。炎症反応のシグナル伝達における MIF の受容体は、HLA クラスⅡ組織適合性抗原γ鎖(CD74)であることが明らかになっている。創薬に向けて、MIF–CD74 複合体の構造情報は望まれているが、現時点では MIF の X 線結晶構造と、NMR 構造解析から得られた CD74 細胞外部位(sCD74)の一部の構造を用いて行われたドッキングシミュレーションの構造結果に留まっている。そこで、本研究では、構造解析により MIF と CD74 との相互作用様式を分子レベルで決定することを目的とした。構造解析には、大量のタンパク質試料が必要となるが、CD74 は膜タンパク質であるため組換え体の発現が難しい。本発表では、融合したタンパク質の溶解性を向上させるマルトース結合タンパク質(MBP-tag)を付加した sCD74 の発現系の構築を行ったので報告する。

【実験方法】sCD74 の N 末端と C 末端に、それぞれ His タグを付加した MBP-His-sCD74 と MBP-sCD74-His の大腸菌発現ベクターを構築した。大腸菌 BL21 (DE3)を用いて、MBP-His-sCD74 と MBP-sCD74-His をそれぞれ発現させた。破砕した菌体上清を、弱陰イオン交換カラム、MBP Trap HP カラムにより精製した。精製したサンプルに Factor Xa を添加し、プロテアーゼ処理を 24 時間行った。処理後の sCD74 を Ni-NTA アフィニティーカラムを用いて精製した。

【結果及び考察】Factor Xa 処理による MBP-tag の切断後、Ni-NTA カラムを用いて sCD74 と MBP-tag の分離精製を行った。SDS-PAGE 解析の結果、洗浄画分の 45 kDa 付近に MBP-tag に対応するバンド、溶出画分の 15 kDa 付近に sCD74 に対応するバンドをそれぞれ確認することができた。このことから、MBP と sCD74 の分離に成功したことが示された。しかし、溶出画分において、sCD74 以外のバンドも検出されたことから、現在、sCD74 の単一精製を進めている。

Key words protein expression, protein interaction, membrane protein, inflammatory response

G3H5 (0301) 二次構造依存的なコンセンサス変異による酵素機能の強化

○小塚康平[1], 中野祥吾[1], 浅野泰久[2], 伊藤創平*[1]（[1]静県大院・薬食生命, 2 富山県大・生物工）

Modification of Enzyme Function by Secondary Structure-Guided Consensus Mutations

○Kohei Kozuka[1], Shogo Nakano[1], Yasuhisa Asano[2], Sohei Ito[1]*
([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Biotech. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)
E-mail : itosohei@u-shizuoka-ken.ac.jp

フルコンセンサス設計 (FCD) は、タンパク質配列データの単純な分析結果をもとに分子全体に変異を導入し、酵素の機能を改変しうる、配列ベースのタンパク質設計法である。これまでに FCD 法を用いてタンパク質の耐熱性を 20~30℃強化したという例が複数報告されている。しかし、①繰り返し配列を持つ蛋白質、比較的単純な反応を行う分子量が小さい酵素などの報告が多い、②FCD 法で多くの変異を入れた場合、耐熱性等の機能が向上しても、酵素活性など、別の機能が低下するトレードオフが生じる事が多い、などの課題がある。これらの課題を解決するためには、配列データの分析から同定されるコンセンサス変異を、何らかの方法で識別し、タンパク質の機能向上に適した変異を取捨選択する必要がある。

本研究では、フルコンセンサス設計法 (FCD) を改変した方法として、部分コンセンサス設計法 (PCD) を検証した。PCD 法は FCD 法で分子全体に導入される変異を二次構造 (α-helix : H 領域, β-sheet : E 領域, loop : C 領域) に分割して導入するという単純な設計法であるが、おそらく世界初の検証実験である。PCD 法の評価にはモデル酵素として L-スレオニン脱水素酵素 (TDH) と、フルコンセンサス L-スレオニン脱水素酵素 (FcTDH) を利用した。FcTDH は、独自の配列解析法により、設計に適した配列を選抜することで TDH の高機能化を達成した酵素[1,2]であり、立体構造も解析済である。1st デザインとして H、E、C 領域をそれぞれコンセンサス配列 (変異数 H : 45 点, E : 9 点, C : 45 点) に置き換えた PcTDH を、2nd デザインとして H と E、H と C、E と C の領域をコンセンサス配列に置き換えた PcTDH を設計した。これら 6 種類の PcTDH は、大腸菌発現系にて、可溶性画分 (10 mg/L 以上) に、TDH 活性を持つ酵素として発現した。耐熱性、pH 依存性、反応速度パラメータ等を決定、2 種類の X 線結晶構造解析を行った。

解析結果から、コンセンサス変異が天然型 TDH の C 領域に導入された場合、熱安定性が独立して改善されることを示唆した。また、マイナスの効果を示した H や E 領域へのコンセンサス変異も C 領域へのコンセンサス変異と組み合わせることで相加的に熱安定性の向上が確認された。酵素反応速度パラメータ (k_{cat}/K_m) や生産性については、天然型 TDH の一つの領域 (H, E, C 領域) にコンセンサス変異が導入された場合にはマイナスの効果しか得られなかった。一方で二つの領域に同時に変異を導入し、その領域の組み合わせを変更すること (H+C 領域や E+C 領域など) でマイナスの効果が無効になり相乗的に機能が強化された。今後は、他のタンパク質への PCD 法の適用や別の要素ごとに分割する方法の開発などを検討していく。

1) S. Nakano, *Biochemistry* **2018,** *57* (26), 2) T. Motoyama, *Biochemistry* **2020**, *59* (40), 3) K. Kozuka, *Biochemistry* **2021,** *60* (29).

Key words consensus design, secondary structure, PCD, thermostability

G3H5 (0302) H^+ポンプ能向上を目的とした微生物ロドプシンの改変

○佐藤良樹[1], 川崎 真由[1], 弘埜 陽子[2], 菊川 寛史[2], 中野 祥吾[2], 石井 純[3], 松田 史生[4], 戸谷 吉博[4], 伊藤 創平[2] 原 清敬[2]*
([1]静県大院・薬食生命, [2]静県大・食栄, [3]神戸大院・科技イノベ [4]阪大院・情報）

Bacterial Rhodopsin reconstruction for improving proton pump activity

○Yoshiki Sato[1], Mayu Kawasaki[1], Yoko Hirono[2], Hiroshi Kikukawa[2] Syogo Nakano[2], Jun Ishii[3], Fumio Matsuda[4], Yoshihiro Toya[4], Souhei Ito[2], Kiyotaka Hara[2]*
([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [4]Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)
k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp

【背景】現在盛んに行われている、微生物の有用物質生産性の向上を目的とした研究開発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、生育の低下が問題となることがある。以前に我々は、高度好塩菌 *Haloterrigena turkmenica* 由来の膜タンパク質であるデルタロドプシンの光駆動 H^+ポンプ機能によって、細胞内外の H^+濃度勾配依存的に ATP 再生活性が向上することを報告した。そこで本研究では ATP 再生活性の改良を目的とし、大きな性質の変化が期待できる祖先型設計法を用いたロドプシンの改変を行った。本発表では、祖先型ロドプシンとその他のロドプシンを比較して得られた知見について報告する。

【方法】高い H^+輸送能をもつロドプシンの遺伝子配列をベースに、独自の選抜方法を用いた祖先型設計法により 3 つの有望な祖先型ロドプシンを設計した。この祖先型ロドプシン遺伝子をプラスミドに組み込み、大腸菌 MG1655(DE3)株に導入した。M9 培地で培養を行い細胞濃度（OD_{600}）が 0.6 付近に達した後、IPTG を添加してロドプシンを誘導発現し、光受容分子である all-*trans*retinal を添加してさらに培養を継続した。光による影響を評価するために、明条件と暗条件の２つの条件下で培養を続けた。誘導開始から一定の時間間隔でサンプルを採取し、OD_{600} と ATP 再生活性依存的に濃度が向上するグルタチオン（GSH）濃度を測定した。

【結果】祖先型ロドプシンを発現した株は、設計のベースとしたロドプシンを発現した株や vector コントロール株と比べて、細胞の生育が大幅に改善され、数倍高い GSH 濃度を示した。本結果より、ロドプシンの祖先型への改変は、ATP を多く必要とする細胞の生育や GSH の生産に大きな変化をもたらすことが示された。

Key words *Escherichia coli*, Bacterial Rhodopsin, ATP, GSH

G3H5 (0303) カルボキソーム外殻タンパク質 CcmO の三量体界面に位置するアミノ酸への変異導入が CcmO 集合体形成に与える影響

○杉山 由花[1], 大久保 詠一郎[1], 大畠 昌也[1], 松村 洋寿[1], 野口 恵一[2], 養王田 正文[2], 尾高 雅文[1]*
([1]秋大院・理工, [2]東農工大院・理工）

Effects of mutations of amino acid residues located at the CcmO trimer interface on its self-assembly

○Yuka Sugiyama[1], Eiichiro Okubo [1], Masaya Ohata,[1] Hirotoshi Matsumura [1], Keiichi Noguchi [2], Masafumi Yohda [2], Masafumi Odaka [1]*
([1]Grad. Sch. Eng. Sci., Akita Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. of Agri. and Tech.)
modaka@gipc.akita-u.ac.jp

カルボキシソームは、シアノバクテリアに存在する直径 150 nm で正二十面体のタンパク質量分子であり、選択的透過性を持つ外殻により RuBisCO を内包することで、炭素固定を促進すると考えられている。カルボキシソームの外殻構造は最大 7 種類のタンパク質から構成され、いずれも BMC ドメインという共通の構造単位を有している。五角形もしくは六角形の単位構造が規則的に自己集合することで、外殻構造を形成していると考えられているが、外殻形成過程には未だ不明な点が多い。先行研究において、組換え体として外殻タンパク質を発現させると単位構造は形成されるが、外殻構造に見られるような自己集合体が形成されるという報告はなかった。我々はこれまでに、シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来のカルボキシソームの外殻タンパク質 CcmO の組換え体が、単独でハイドロゲル状の集合体を形成することを明らかにしている。本研究では、CcmO の集合体形成の要因として、PRPX モチーフに注目した。PRPX モチーフは、カルボキシソーム外殻タンパク質に類似するシェルタンパク質の構造解析により明らかになったモチーフであり、単位構造間の相互作用に重要であると考えられている。本発表では、PRPX モチーフの Arg85 及び Arg190 を、それぞれ Ala に置換した CcmO 変異体の大腸菌発現系の構築について報告する。野生型の CcmO のベクターを鋳型とした Quik change 法により、CcmO の 85 番目及び 190 番目の Arg を Ala にそれぞれ置換し、CcmO 変異体(CcmO R85A および CcmO R190A)の発現ベクターを作製した。DNA シーケンスにより、R85A および R190A の変異導入を確認した。各発現ベクターを用いて、大腸菌 BL21 (DE3)を形質転換し、LB 培地で培養することで、各 CcmO 変異体のタンパク質発現を行った。15% SDS-PAGE 解析により発現確認を行ったところ、CcmO R85A と CcmO R190 A のそれぞれの可溶性画分において、CcmO の分子量にあたる 26 kDa 付近に濃いバンドがみられた。このことから、大腸菌による CcmO の変異体の発現確認に成功したことが示された。現在、各 CcmO 変異体を陰イオン交換カラム(DEAE-650S toyopearl)により精製し、集合状態についての解析を進めている。

Key words carboxysome, self-assembly, protein interaction, protein expression

G3H5 (0304) The eliciting capability a humoral immune response in a mouse model induced with dengue virus-like particles serotypes 1 and 4 produced in silkworm larvae.

○Doddy Irawan Setyo Utomo[1*], Sabar Pambudi[2], Enoch Y Park[1,3]
（[1]Laboratory of Biotechnology, Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Shizuoka 422-8529, Japan, [2]Center of Pharmaceutical and Medical Technology, Agency for the Assessment and Application of Technology, Jl. Kawasan Puspiptek, Gedung I LAPTIAB, Kota Tangerang Selatan, Banten 15314, Indonesia, [3]Laboratory of Biotechnology, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, Shizuoka 422-8529, Japan）

The eliciting capability a humoral immune response in a mouse model induced with dengue virus-like particles serotypes 1 and 4 produced in silkworm larvae

○Doddy Irawan Setyo Utomo[1]*, Sabar Pambudi[2], Enoch Y Park[1,3]
([1] Laboratory of Biotechnology, Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Shizuoka 422-8529, Japan, [2] Center of Pharmaceutical and Medical Technology, Agency for the Assessment and Application of Technology, Jl. Kawasan Puspiptek, Gedung I LAPTIAB, Kota Tangerang Selatan, Banten 15314, Indonesia, [3]Laboratory of Biotechnology, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, Shizuoka 422-8529, Japan)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

Dengue is an arboviral disease, which threatens almost half the global population, and has emerged as the most significant of current global public health challenges. In this study, we prepared dengue virus-like particles (DENV-LPs) consisting of Capsid-Premembrane-Envelope (CprM/E) and Premembrane-Envelope (prM/E) polypeptides, which were expressed in the silkworms using *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) bacmid. We observed the formation of VLPs and confirmed the elicitation of antibody production in a mouse model. 1CprM/E, /1prM/E, 4CprM/E and /4prM/E expressed proteins were collected from hemolymph at its estimated molecular weights of 55 kDa, respectively. The purified DENV-LPs with a diameter of approximately 30–55 nm were observed. The immunoelectron microscopy (IEM) images revealed antigens to the surface of a lipid bilayer of spherical DENV-LPs. The heparin-binding assay shows a positive relationship between absorbance and the quantity of E protein. This result shows that 1CprM/E, /1prM/E, 4CprM/E, and /4prM/E contain the EDIII on the surface of their DENV-LPs. The 1CprM/E, /1prM/E, 4CprM/E, and /4prM/E were capable of generating IgG antibodies and specific binding to their antigens.

Key words Dengue, Virus-like particles, Capsid, Premembrane, Envelope, Silkworm

G3H5 (0305) トランスグルタミナーゼ基質特異性の迅速スクリーニングのための cDNA ディスプレイプラットフォームの開発

○大嶽七菜[1]*,ダムナニョヴィッチ・ヤスミナ[1],兒島孝明[1],根本直人[2],人見清隆[1],中野秀雄[1]
([1]名古屋大学大学院・農, [2]埼玉大学・工, [3]名古屋大学大学院・薬)

Development of a cDNA display platform for rapid screening of transglutaminase substrate specificity

○Nana Odake[1]*, Jasmina Damnjanović[1], Takaaki Kojima[1], Naoto Nemoto[2], Kiyotaka Hitomi[3],Hideo Nakano[1]
([1]Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.,[3] Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)
odake.nana@molbiotech-nagoya.org

本研究では，酵素活性に基づいてタンパク質やペプチドの変異体を選択するための cDNA ディスプレイプラットフォームの開発を目指した．ワークフローは，DNA ライブラリの作成，酵素活性に基づいた cDNA ディスプレイによるペプチドの選択，NGS(NextSeq550)による濃縮 DNA プールの解析，データのバイオインフォマティクス解析である．ターゲットは，医療診断，食肉加工など幅広い分野でタンパク質修飾や架橋に有用なトランスグルタミナーゼ（TGase）反応である．マウス TGase2 とその既知の基質である T26 ペプチドを標的とした TGase 基質スクリーニングシステム構築において，精製翻訳成分を用いた大腸菌ベースの無細胞タンパク質合成システム「PURE システム」を導入した．また，T26 ペプチドは短く，可溶性を維持しているためか，タンパク質タグを付けずに表示することで，より効率的に表示できることを実証した．表示形成条件と選択条件を確立した後，オリジナル T26 配列と QA T26 変異体（ネガティブコントロール（NC）; TGase の基質ではない）からなる二元モデルライブラリから，オリジナル T26 配列の濃縮を確認した．次に，反応性 Gln が NNK コドンの導入によりランダム化されたセミランダムな T26 ライブラリ(ランダム Q ライブラリ)と，反応性 Gln に最も近い 4 つの残基（-1,1,2,3）が NNK コドンの導入によりランダム化されたセミランダムな T26 ライブラリ(ランダム 4 ライブラリ)の選択を行った．その結果，ランダム Q ライブラリにおいて，反応性 Gln の濃縮が確認できた(濃縮率：約 3 倍)．ランダム 4 ライブラリにおいては，野生型 T26 配列は濃縮率約 2 倍で濃縮が確認され，各残基毎に，野生型アミノ酸とそれに化学的性質の似ているアミノ酸が高い濃縮率を示し，スクリーニングの正確性を示した．この新しい in vitro 選択システムは，TGase の基質特異性の迅速なスクリーニングや，様々な酵素工学に応用できると考えられる．

Key words cDNA display, in vitro display, Transglutaminase

G3H5 (0306) 新規 2 次元分離プロテオミクスによる自己抗体バイオマーカー探索法の開発

○益井実鈴[1]*，塩川つぐみ[2]，多田宏子[2]，二見淳一郎[1]
([1]岡山大院統合科学，[2]岡山大自然生命支援セ)

A novel two-dimensional electrophoresis technique for the screening of autoantibody

○Mirei Masui[1]*, Tsugumi Shiokawa[2], Hiroko Tada[2], Junichiro Futami[1]
([1]Grad. Sch. ISEHS., Okayama Univ., [2]Dept. Inst. Anal. , Okayama Univ.)
futamij@okayama-u.ac.jp

従来のがんの 3 大治療法（化学療法・外科療法・放射線療法）に加え，現在，がん免疫療法が新しい柱として注目されている．特に免疫チェックポイント阻害剤は，一部の進行がんに対して従来の治療成績を大幅に上回る著効例を示す一方で，個人差も大きく，奏効率の予測と，この治療が効かない患者群への対応が大きな課題となっている． この課題突破には，がん免疫応答をプロファイリングし，がん免疫サイクルの活性化レベルをモニタリングする技術で現場をサポートしなければならない．当研究室ではがん免疫サイクルの活性化に伴って上昇する各種の「がん抗原に対する自己抗体群」をバイオマーカーとして定量評価する抗体検査診断技術（MUSCAT-assay）の開発を進めている．本研究では，このバイオマーカー網の強化を目的に，各種の臨床検体の血清中に含まれる自己抗体バイオマーカーをプロテオミクスで同定・拡張する作業も進めている．この過程で，プロテオミクスの効率化をはかるため，新規の 2 次元電気泳動法を開発した．ヒト培養細胞内の総タンパク質は核酸を完全に除去すると，変性状態でも高い溶解性を示す知見(1)を活用して lysate を調製し，逆相 HPLC で分画することで疎水性度に応じた総タンパク質が分画できた．逆相 HPLC 分画サンプルをさらに SDS-PAGE で分子量別に分画することで，高い再現性で HYD/MM による 2 次元分離が可能であり，自己抗体の血清学的プロテオーム解析・同定が加速できることが確認された．また，この HYD/MM による 2 次元分離技術は，従来の pI/MM による分離と比較して，逆相 HPLC でサンプルを分画さえすれば，あとは市販のゲルを用いることで均質なレプリカを大量に調製できる点が秀逸であり，多検体の測定を「安価かつ高解像度」で実施できる画期的な方法と考えている．現在，この手法で同定されている自己抗原の特徴についてもご紹介したい．

（1）*PLoS One*（2014）e113295

Key words protein engineering, 2D electrophoresis, proteomics, antibody

G3H5 (0307) 部位特異的変異による哺乳類嗅覚受容体の機能発現向上

○宮良　俊汰[1]、福谷　洋介[1]、中村　祐子[1]、池上 健太郎[1]、松波 宏[2]、養王田　正文[1]
[1]農工大・院工・生命工、[2]Duke 大学・医・MGM

Improvement of mammalian olfactory receptor function expression by site-specific mutation

○Shunta Miyanaga[1] , Yosuke Fukutani[1] , Yuko Nakamara[1] , Kentaro Ikegami [1], Hiroaki Matsunami[2] , Masafumi Yooda[1]
([1]Dept. of Biotechnol. Tokyo Univ. of Agric. and Technol, [2] Dept. of MGM, Duke Univ Sch. of Med.)
shunta.miyanaga@yohda.net

哺乳類嗅覚受容体(Odorant receptor, 以下 OR)は、匂い分子と結合し嗅覚応答の基盤となる GPCR であり、ヒトでは約 400 種類、マウスでは約 1200 種が存在する。多くの OR は異種細胞で発現させた場合、小胞体で停留し細胞膜に局在することができない。そのため、OR のリガンドの同定や匂い分子結合に関する生化学的解析、さらに OR を用いたセンシング技術開発は進んでいない。その中で、我々は異種細胞における機能発現の良いマウス OR の発見に成功した（1)。そこで、本研究では、多くの OR の異種細胞における機能発現向上を目的に、OR の機能発現に直接影響するアミノ酸の同定と部位特異的変異導入による OR の機能発現向上を試みた。

まず、異種細胞での発現性の高いマウス OR 間で良く保存されているアミノ酸部位を選抜した。同部位で異なるアミノ酸を使用しているマウス OR に対し変異導入を行い、異種細胞における膜発現性を FACS 解析によって評価した。その結果、OR の第 3 膜貫通ヘリックスの中間付近に位置する BW3.39/3.43 部位にそれぞれグルタミン酸とロイシンを置換することで OR の発現性が向上することが分かった。さらに、この 3.39E/3.43L 変異体の匂い分子応答をルシフェラーゼレポータージーンアッセイにより評価したところ、野生型に比べ匂い応答が大きくなる一方で、リガンド選択性は変化しないことが分かった。さらに、同様の変異をヒト OR に対して導入したところ、ヒト OR であっても細胞膜発現性とアゴニスト応答性ともに向上させた。同定したアミノ酸変異は、機能未知の OR のリガンド探索などの機能解析や、OR を用いたニオイセンサー開発などの応用研究の進展に有益となる可能性がある。

（1）Ikegami et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2020)

Key words Odorant receptor、 Membrane traffic、FACS, Reporter gene assay、Odor sensor

G3H5 (0308) 大腸がん幹細胞における嗅覚受容体 OR7C1 の機能解析

○神津　涼奈[1]、福谷　洋介[1]、越澤　知世[1]、廣橋　良彦[2]、鳥越 俊彦[2]、養王田　正文[1]
([1]農工大・院・工・生命工、[2]札幌医大・医・病理)

Functional analysis of the olfactory receptor OR7C1 in colorectal cancer stem cells

○Suzuna Kozu[1], Yosuke Fukutani[1], Tomoyo Koshizawa[1], Yoshihiko Hirohashi[2], Toshihiko Torigoe[2], Masafumi Yohda[1]
([1]Dept. of Biotechnol. Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]Dept of Pathol. Sapporo Med. Univ.)
s210689s@st.go.tuat.ac.jp

腫瘍を形成する細胞集団の中で、自己再生能や多分化能、造腫瘍能を有する一部の細胞集団はがん幹細胞と呼ばれる。哺乳類嗅覚受容体（Olfactory receptor, OR）である OR7C1 は大腸がん幹細胞に特異的に発現し、大腸がん細胞の増腫瘍性に影響を及ぼすことから、OR7C1 を利用した新規がん治療法の開発が期待されている。しかし、OR7C1 の大腸がん幹細胞における具体的な機能は分かっていない。そこで本研究では、大腸がん幹細胞における OR7C1 の機能解析を目的とした。がん関連遺伝子情報データベース DepMap によると、大腸がん細胞株に共通して OR7C1 のアミノ酸翻訳が途中で停止する変異型アレルが存在することが分かった。そこで、大腸がん細胞 SW480 株の 2 つの OR7C1 遺伝子型（OR7C1_FL、OR7C1_H176fs）をそれぞれ SW480 に安定過剰発現させた細胞株 SW480_7C1FL と SW480_7C1H176fs を樹立した。細胞中のアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性からがん幹細胞量を評価できる ALDEFLOUR Assay を行ったところ、SW480 株に比べ SW480_7C1FL ではがん幹細胞の割合が著しく増加し、SW480_7C1H176fs では減少したことから、全長の OR7C1 ががん幹細胞で機能しているアレルであると示唆された。HEK293T 細胞を用いたルシフェラーゼレポータージーンアッセイによって SW480 由来 OR7C1 は既知アゴニストであるアンドロスタジエノンには応答を示さないことが分かった。そこで、複数の OR7C1 バリアントにおけるアンドロスタジエノン応答を調べたところ、バリアント間でアンドロスタジエノン応答が異なることが分かった。大腸がん幹細胞に発現する OR7C1 は未知のアゴニストに対して応答し、大腸がん幹細胞に作用している可能性が示唆された。現在、SW480 由来 OR7C1 のアゴニスト探索と OR7C1 と大腸がん増殖について解析を進めている。

Key words colon cancer, cancer stem cell, olfactory receptor

G3H5 (0309) 高分子溶液中での酵素反応によるタンパク質集合体の形成促進と機能評価

○佐藤 崚[1], 南畑 孝介[1], 若林 里衣[1], 後藤 雅宏[1,2], 神谷 典穂[1,2,*]
([1]九大院・工, [2]九大・未来化セ)

Promotion of protein assembly formation in polymer solution and the functional evaluation

○Ryo Sato[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2], Noriho Kamiya[1,2,*]
([1]Fac. Eng., Kyusyu Univ., [2]CFC, Kyushu Univ.)
*kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

【緒言】
生体内外におけるタンパク質の集合化制御は、タンパク質の特異な機能発現における戦略の一つと考えられる。集合体形成の手段として、部位特異的な共有結合形成反応を利用することで、タンパク質の機能維持と安定性の担保が期待される。

本研究では共有結合型タンパク質集合体を調製するために、微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) を選択した。MTG は特定のグルタミン (Q) 及びリジン (K) 残基間でイソペプチド結合形成反応を触媒する酵素である。これまでの研究において、MTG の反応点を共存させたペプチドタグ (PolyTag, HKRWRHYQRGG) 融合タンパク質と MTG 反応を組み合わせることで、タンパク質架橋集合体の調製に成功した。

一方、天然においてタンパク質が機能する環境に目を向けると、高濃度の高分子が存在している溶液環境 (クラウディング環境) にある。通常、生命分子の機能解析は緩衝溶液で行われるが、クラウディング環境では解析対象タンパク質の見かけの濃度が向上するため、緩衝溶液とは異なる挙動を示す。そこで、クラウディング環境を模倣した条件下で MTG による架橋反応を実施したところ、PolyTag 融合タンパク質の集合化が顕著に促進される現象を確認した。本研究では、この新たな知見に基づき、がん細胞表面に過剰発現している抗原タンパク質 (HER2) に結合する Affibody 融合タンパク質からなる集合体を調製し、その機能評価を行なった。

【実験及び結果と考察】
遺伝子工学的手法により、Affibody と緑色蛍光タンパク質 (EGFP) および、PolyTag を融合した PolyTag-EGFP-Affibody を調製した。クラウディング剤として、平均分子量が 500,000 の Dextran (Dex 500k) を利用した。当該タンパク質 (10 μM) を 15 wt% の Dex 500k を含む PBS 水溶液中で MTG (0.5 U/mL) と混合し、得られた産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分析したところ、Dex 500k を含む水溶液中において、PBS 水溶液中での対照実験と比較して、架橋集合体の高分子量化が大幅に促進されることが確認された。また、得られた架橋集合体を用いて、HER2 提示がん細胞の蛍光染色を試みたところ、架橋集合体の調製条件の違いにより、細胞表面の EGFP 由来の蛍光観察領域と強度が変化する挙動が確認された。

Key words Protein assembly, Microbial transglutaminase, Crowding environment

G3H5 (0310) 哺乳類嗅覚受容体のコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系における Receptor transporting protein の効果

○佐野聖友[1]、福谷　洋介[1]、養王田　正文[1]*
([1]農工大・院工・生命工)

Effect of the Receptor transporting protein in the expression of mammalian olfactory receptors using the wheat germ protein expression system.

○Masatomo Sano[1]、Yosuke Fukutani[1]、Masafumi Yohda[1]*
([1] Dept. of Biotechnol. Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)
s217254z@st.go.tuat.ac.jp

哺乳類の嗅覚受容体 (OR) は嗅神経細胞に発現する 7 回膜貫通タンパク質である。多くの OR は異種細胞で発現すると、小胞体で停留し細胞膜に局在できない。OR の細胞膜輸送にはシャペロンタンパク質 Receptor transporting protein 1S(RTP1S)の補助が必要であるが、RTP1S による OR の細胞膜輸送機構は分かっていない。RTP1S 自身も 1 回膜貫通タンパク質であり、立体構造や OR との相互作用部位などの生化学解析が遅れている。我々は OR を利用したセンシングデバイス応用に向け、小麦胚芽無細胞合成系を用いた OR 合成法の最適化を進めている。本研究では、OR の無細胞合成時の RTP1S の効果、ならびに OR-RTP1S 相互作用解析を目的とした。RTP1S 依存性が異なるマウス由来 OR を無細胞合成によりプロテオリポソーム膜上に発現させた。合成時の RTP1S 共発現の有無による OR の発現量比較、免疫沈降による相互作用解析をウエスタンブロットにより行った。培養細胞の細胞膜局在には RTP1S の共発現が必要な OR であっても RTP1S を共発現しなくとも単独でリポソーム膜上に発現した。また、OR を共発現すると RTP1S のリポソーム膜挿入量が増加した。さらに、免疫沈降によって、OR と RTP1S が同じリポソーム膜上に共存していることを確認した。現在、合成した OR のリガンド結合活性試験などを行っており、本発表では、これらの最新の知見についても報告する。今後、無細胞系で OR が機能活性を持つことが判明した場合、OR を使用した匂いセンサーへの応用が期待される。

Key words Olfactory receptors, RTP1S, wheat germ cell-free system

G3H5 (0311) 人工脂質修飾タンパク質の膜ドメイン選択的局在化技術の応用

○内田 和希[1], 大林 洋貴[1], 南畑 孝介[1], 若林 里衣[1], 後藤 雅宏[1,2], 下川 直史[3], 高木 昌宏[3], 神谷 典穂[1,2*]
([1] 九大院・工, [2] 九大・未来化セ, [3] 北陸先端大・マテリアル)

Selective localization of artificial lipid-modified proteins to membrane domain and its application

○Kazuki Uchida[1], Hiroki Obayashi[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2], Naofumi Shimokawa[3], Masahiro Takagi[3], Noriho Kamiya[1,2*]
([1] Fac. Eng., Kyushu Univ., [2] CFC, Kyushu Univ., [3] School of Materials Science, JAIST)
kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

【概要】
生体内でパルミトイル化などの脂質修飾を受けたタンパク質は、細胞膜上のラフトと呼ばれる機能性ドメインに局在し、シグナル伝達機構に関与すると考えられている。本研究では、酵素反応を利用して人工的に脂質修飾されたタンパク質を調製し、これを細胞サイズの脂質二分子膜である Giant Unilamellar Vesicle (GUV) と組み合わせることで、脂質膜上に形成された相分離ドメイン構造への選択的アンカリングと局在挙動の評価を行った。また、生細胞を用いた基礎検討も実施した。

【実験方法】
微生物由来トランスグルタミナーゼが触媒する架橋反応を利用し、緑色蛍光タンパク質 EGFP の C 末端に LQ-tag (配列: LLQG) を融合した EGFP-LQ と、脂質導入基質ペプチド Palmitoyl-G_3SRHK もしくは Oleyl-G_3SRHK を架橋し、人工脂質修飾タンパク質 EGFP-Pal、EGFP-Ole を得た。これらを、流動性の高い非ラフト相モデルである Liquid disordered (Ld) 相と、流動性の低いラフト相モデルである Liquid ordered (Lo) 相からなる Ld/Lo 相分離 GUV ([DOPC]:[DPPC]:[Cholesterol] = 4:4:2) の水分散溶液と混合し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて脂質ドメインおよび EGFP 由来の蛍光の観察を行なった。その後、EGFP-Pal、EGFP-Ole を Ld 相 GUV (DOPC のみ) と Lo 相 GUV ([DPPC]:[Cholesterol] = 6:4) の水分散溶液と混合し、flowcytometry を用いた定量解析を行った。

【結果及び考察】
Rhodamine で Ld 相を標識した Ld/Lo 相分離 GUV の CLSM 観察の結果、EGFP-Ole は非ラフト相モデルである Ld 相に、EGFP-Pal はラフトモデル相である Lo 相に選択的に局在することを視覚的に確認した。次に、単一相からなる GUV の flowcytometry を用いた解析から、Ld 相には EGFP-Ole、Lo 相には EGFP-Pal がより強くアンカリングすることを定量的に評価することに成功した。以上の結果より、相分離 GUV 上での EGFP-lipid の局在には、Lo 相を構成する飽和脂質 DPPC および Cholesterol と EGFP-Pal 間の親和性、Ld 相を構成する不飽和脂質 DOPC と EGFP-Ole 間の親和性が、それぞれ寄与していると考察された。発表では、生細胞を用いた人工脂質修飾タンパク質のラフトへの局在化に関する基礎検討の結果についても併せて報告する。

Key words Protein, Lipid, Enzymatic conjugation, Lipid raft

G3H5 (0312) 低分子化合物を用いたタンパク質変異耐性のダイナミック調節

○塚田美結[1], 河合(野間)繁子[1],梅野太輔[1,2]*
([1]千葉大院・融合, [2]早大・先進理工)

Modulation of enzyme mutability via small molecule binding

○Miyu Tsukada[1], Shigeko Kawai-Noma[1],Daisuke Umeno[1,2]*
([1]Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., [2]Sci Adv. Sci. Eng.,Waseda Univ.,)
tsukada.23.my@gmail.com

【背景と目的】
タンパク質の機能改変にはアミノ酸変異の導入が必須であるが, 特にタンパク質機能を変化させる変異には, タンパク質構造の不安定化をもたらし有害となるものが多い. 分子シャペロンの発現/非発現による一過的な安定性補償によって, 獲得可能な変異のバリエーションは増えるとされている. 我々は, 基質やリガンドとしてはたらく低分子化合物との結合によって, タンパク質構造が安定化することに着目した. 特に変異蓄積下において, リガンド結合は, ケミカルシャペロンとしてタンパク質の安定化に寄与するはずである. そしてそれは, タンパク質の安定性, ひいては進化能を高める効果をもたらすと期待される. そこで本研究では, 低分子結合タンパク質を融合することで, 進化工学の対象となるタンパク質の安定性をダイナミック調節する技術の可能性を検討した.

【結果および考察】
1. 酵素と低分子結合タンパク質との融合：クロラムフェニコールアセチル転移酵素 (CAT) と L-arabinose 応答性転写因子タンパク質 AraC を融合した. 得られた CAT-AraC 融合タンパク質の CAT 機能（宿主のクロラムフェニコール耐性）は, L-arabinose の添加によって有意に向上した. またその AraC 転写亢進活性からは, L-arabinose の添加に応答した転写の亢進が確認できた. これは, L-arabinose と AraC ドメインとの結合によって, 融合パートナーである CAT の安定性向上が起こっていることを示している.

2. L-arabinose 添加にともなう CAT の変異許容度向上：CAT-AraC の機能選抜実験を行うと, L-arabinose の有無によって, その変異許容度に有意な差がみられた. そしてその CAT 活性は, 1 ラウンドの進化工学によって大きく改善した. 本講演では, L-arabinose の有・無条件によって, 複数世代におよぶランダム変異/機能選抜の繰り返し実験の経過について報告する.

Key words mutation, stability, chemical chaperon

G3H5 (0313) 組換え大腸菌を用いた酢酸菌由来セルロース合成酵素複合体の調製および機能解析

○岡睦基[1], 二之湯寛子[1], 今井友也[2], 磯野拓也[3], 山本拓矢[3], 佐藤 敏文[3], 姚閔[4], 田島健次[3]*
([1]北大院総化, [2]京大生存圏, [3]北大院工, [4]北大院先端生命)

Preparation and functional analysis of terminal complex from *Gluconacetobacter* using recombinant *Escherichia coli*

○Mutsuki Oka[1]*, Hiroko Ninoyu[1], Tomoya Imai[2], Takuya Isono[3], Takuya Yamamoto[3], Toshifumi Satoh[3], Min Yao[4], Kenji Tajima[3]*
([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]RISH, Kyoto Univ., [3]Fac. Eng., Hokkaido Univ., [4]Fac. Adv. Life Sci., Hokkaido Univ.)
mukimukiman@eis.hokudai.ac.jp, ktajima@eng.hokudai.ac.jp

セルロースは主に植物によって合成されるが、酢酸菌などの一部の微生物もセルロースを合成することが知られている。酢酸菌はグラム陰性、絶対好気性の桿菌であり、セルロース合成菌として最も代表的な菌の一つである。酢酸菌においてセルロースは、細胞膜中に直線的に局在するセルロース合成酵素複合体 [Terminal Complex; (TC)] によって合成され、少なくとも 4 つのタンパク質 (CeSABCD) が含まれていると推定されているが、酢酸菌由来 TC の全体構造は明らかとなっていない。本研究では、酢酸菌由来 TC の全体構造解明を最終目標とし、組換え大腸菌を用いた TC の調製および機能解析を行った。

cesA 遺伝子欠損大腸菌 [*Escherichia coli* BL21_CAD] に対し TC 発現用プラスミド pQE80-*cesABCD::gfp::his*$_{12}$ を導入した組換え大腸菌 BL21_CAD (pQE80-*cesABCD::gfp::his*$_{12}$) を培養し、自動誘導により TC を発現させた。フレンチプレスによる菌体破砕、超遠心による膜画分の調製、界面活性剤による膜タンパクの可溶化、His-tag を利用したアフィニティークロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーによる精製を行なった。最終精製画分における CeSA (83 kDa)、CeSB (93 kDa)、CeSD-GFP-(His)$_{12}$ (47 kDa) の存在が SDS-PAGE および Western Blotting によって確認され、CeSD-GFP-(His)$_{12}$ が CeSA および CeSB と複合体を形成していることが示唆された。

セロビオース、ウリジン二リン酸グルコースおよび活性化因子 (環状ジグアニル酸一リン酸) を含む反応液に精製 TC を加え、30 °C でインキュベートした (in vitro assay)。この In vitro assay において、時間の経過とともに白色の沈殿が生成した。この白色生成物を回収し、走査型プローブ顕微鏡観察および蛍光増白剤で染色後蛍光顕微鏡観察を行なったところ、粒状凝集体が含まれていることが確認された。また、赤外吸収スペクトルから、白色生成物にセルロースが含まれている可能性が示唆された。

以上のように、組換え大腸菌を用いた酢酸菌由来セルロース合成酵素複合体 [CeSABD-GFP-(His)$_{12}$]の調製に成功した。

Key words Bacterial cellulose, terminal complex, *Escherichia coli*, *Gluconacetobacter*, recombinant

G3H6 (0101) 合成代謝経路を導入した大腸菌によるリコペン生産の基礎的検討

○清水絵理華[1], 野間智也[1], 濱田浩幸[1], 原田尚志[2], 花井泰三[1]*,
([1]九大院・農, [2]鳥取大・工)

Basic research on *Escherichia coli* introducing a synthetic metabolic pathway for lycopene production

○Erika Shimizu[1], Tomoya Noma[1], Hiroyuki Hamada[1], Hisashi Harada[2], Taizo Hanai[1]*
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Fac. Eng., Tottori Univ.)
taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

リコペンはカロテノイドの一種であり、その強い抗酸化力から栄養補助食品等として需要がある。しかし、カロテノイド生産には、材料となる植物の栽培が必要となるため、長い時間を必要とする。そのため、より短期間で生産できると考えられる微生物によるカロテノイド生産に注目が集まっている。本研究では、大腸菌に外来生物由来のカロテノイド生産遺伝子を導入し、大腸菌内在の非メバロン酸経路を利用したリコペン生産合成代謝経路を構築した。この合成代謝経路では、解糖系の中間代謝産物をもとに、ATP を消費する反応を含む、複数の代謝反応を経て、リコペンが生産される。一方、解糖系から TCA 回路を経て生産されるアミノ酸や ATP は菌体増殖において必要不可欠である。そのため、リコペン生産量を増加させるためには、菌体増殖とリコペン生産の間で適切なバランスをとることが鍵となる。

本研究では、*lacI*^{q} 遺伝子をゲノムに導入した BW25113 由来の大腸菌に以下の二つのプラスミドを導入することで、リコペン生産株を作製した。第一のプラスミドは、IPTG 誘導型プロモータの下流に、大腸菌由来の *dxs*、*Archaeoglobus fulgidus* 由来の *gps*、*Pantoea ananatis* 由来の *crtE*、*crtI* が発現する Low copy プラスミドとした。第二のプラスミドは、同じく IPTG 誘導型プロモータの下流に、大腸菌由来の *idi* が発現する Medium copy プラスミドとした。培養は、M9 培地を用い、本培養には特に 40 mM MOPS を加え、三連のフラスコで行うこととした。IPTG の添加タイミング、添加量の検討を行うため、IPTG は培養開始から 0、4、8、12 時間目に終濃度が 0、0.01、0.1、1 、2.5 、5 mM となるように添加した。

IPTG を添加してから 24 時間後のリコペン量を測定した結果、最大のリコペン生産量は 6.33 mg/L であった。このときの培養条件は、培養開始から 8 時間目に 5 mM の IPTG を添加した条件であった。この結果より、OD_{600} で 2.5 程度に菌体増殖した後に、リコペン生産遺伝子を強く発現させることが、リコペン生産に重要であると考えられた。今後は、メタボローム解析による律速反応の解明、それに基づいた代謝改変、さらには、人工遺伝子回路を利用するなどして、生産量の増加を目指す予定である。

Key words Escherichia coli, Synthetic biology, Synthetic metabolic pathway, Lycopene

G3H6 (0102) 講演中止

G3H6 (0103) *Saccharomyces cerevisiae* と *Latilactobacillus sakei* の特異的バイオフィルム形成

森村一貴、清水悠平、井上峻雅、門口将己、藤井清矢、田邊公一、
○島 純*
(龍谷大・農)

Specific biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Latilactobacillus sakei*

Kazuki Morimura, Yuhei Shimizu, Ryoga Inoue, Masaki Monguchi, Seiya Fujii, Koichi Tanabe, ○Jun Shima* (Faculty of Agriculture, Ryukoku University)
shima@agr.ryukoku.ac.jp

【背景と目的】
酵母と乳酸菌は、その生育環境が類似しており、様々な発酵食品において共存関係や相互作用が経験的な観点から示唆されている。鹿児島県福山町で伝統的に生産される福山酢のもろみから単離された酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* を共培養することでバイオフィルムを形成することが報告されている。また、酵母と乳酸菌の相互作用が発酵産物の特性に影響を与えている可能性が示唆されつつある。本研究では、*S. cerevisiae* と特異的にバイオフィルムを形成する乳酸菌の探索及びバイオフィルムの特性解析を目的とした。
【結果と考察】
京滋地域の発酵食品等から分離した *S. cerevisiae* 21 株及び乳酸菌 55 株を用いた。全ての組み合わせで共培養を行い、バイオフィルム形成を評価した。バイオフィルムの形成は、クリスタルバイオレットによる染色を行った後、光の透過度と被覆面積に基づく 5 段階の評価付けにより行なった。その結果、7 種類の特異的なバイオフィルム形成が生じる *S. cerevisiae* と乳酸菌の組み合わせを見出した。
S. cerevisiae と複合的にバイオフィルムを形成する乳酸菌の同定を行った。その結果、特異的なバイオフィルム形成に関わる主な乳酸菌は、*Latilactobacillus sakei* に属する株であることが示唆された。
また、マンノースの添加がバイオフィルム形成に与える影響を観察したところ、バイオフィルム形成が有意に阻害されていることが示された。これらの結果から、マンノースを含むマンナンあるいはマンノプロテインがバイオフィルム形成に関与している可能性が考えられた。
本研究により、*S. cerevisiae* と *L. sakei* が特異的なバイオフィルムを形成する可能性が示唆された。*L. sakei* は日本酒の発酵過程において検出される乳酸菌であり、日本酒醸造に与えるバイオフィルム形成の影響について検討を行なっている。

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, *Latilactobacillus sakei*, biofilm

G3H6 (0104) 酵母 *Scheffersomyces stipitis* を宿主とした新規レスベラトロール生産酵母によるバイオマス由来の多様な糖類からのレスベラトロール生産

○小林優真[1], 猪熊健太郎[1], 蓮沼誠久[1,2*]
([1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大・先端バイオ工学研究セ)

Resveratrol production from several types of saccharide sources by a recombinant *Scheffersomyces stipitis* strain

○Yuma Kobayashi[1], Kentaro Inokuma[1], Tomohisa Hasunuma[1,2*]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Eng. Bio. Res. Center, Kobe Univ.)
174p007p@stu.kobe-u.ac.jp

【背景および目的】レスベラトロールは植物由来のスチルベノイド化合物の一種で、高い抗酸化力や細胞の老化抑制効果をもち、サプリメントや食品添加物として広く利用されている。近年では微生物にレスベラトロール生産経路を導入することで、安価で高収率なレスベラトロール製造法の構築が進められており、我々の研究グループでも幅広い基質資化性を持つ酵母 *Scheffersomyces stipitis* を宿主とするレスベラトロール生産株の創出に成功している。今後レスベラトロールの発酵生産が商用化する上で、原料となりうる様々な糖類がレスベラトロール生産に与える影響を調べることは非常に重要になるといえるが、そのような糖類によるレスベラトロール生産への影響を調査した報告は未だない。そこで本研究では、*S. stipitis* を用いてバイオマス由来の代表的な 8 種の異なる糖類を原料としたレスベラトロール生産試験を行うことで、基質によるレスベラトロール生産性への影響を評価した。更に各糖を用いた発酵時における細胞内代謝物の変化を解析することで糖類の違いが *S. stipitis* の細胞内代謝動態へ与える影響を明らかにした。
【手法および結果】*Herpetosiphon aurantiacus* 由来 Tyrosine ammonia-lyase、*Arabidopsis thaliana* 由来 4-coumaroyl-CoA ligase、*Vitis vinifera* 由来 resveratrol synthase をコードする遺伝子を導入して構築したレスベラトロール生産 *S. stipitis* 株(Ss-T4V)に対して *S. stipitis* 由来の Chorismate mutase をコードする遺伝子(*ARO7*)のフィードバック阻害を解除した変異型遺伝子($ARO7^{G139S}$)を導入した。得られた株（Ss-T4V-aro7m）は親株(Ss-T4V 株)に対して 1.3 倍のレスベラトロール生産量を示した。続いて、8 種類の糖類(グルコース、ガラクトース、フルクトース、キシロース、*N*-アセチルグルコサミン、マルトース、セロビオース、スクロース)それぞれ 50g/L を単一の炭素源としてこの Ss-T4V-aro7m を用いた微好気発酵を行った。その結果、用いた全ての糖類からレスベラトロールの生産が確認できた。中でも二糖類であるセロビオースとスクロースを炭素源としたときに他の糖類に比較して 2 倍以上の高いレスベラトロール生産性を示した。更にレスベラトロール生産量の向上が見られたセロビオース、スクロース発酵と生産量の向上が見られなかったマルトース発酵条件下での酵母菌体を回収し、細胞内代謝物の蓄積動態を調べたところ、特に生産性の高かったスクロース、セロビオース培養時において解糖系ホスホエノールピルビン酸より上流の化合物とチロシンが顕著に蓄積していることが明らかとなった。

Key words *Scheffersomyces stipitis*, Resveratrol, Disaccharide

G3H6 (0105) 清酒酵母におけるオルニチン高生産メカニズムの解明

○大橋正孝[1*], 那須野亮[2], 磯貝章太[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)

Elucidation of a mechanism of high level of ornithine in the sake yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○Masataka Ohashi[1*], Ryo Nasuno[2], Shota Isogai[2], Hiroshi Takagi[2]
([1] Nara Pref. Inst. Ind. Dev., [2] Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST)
m-oha-niid@von.jp

我々は、日本の伝統的なアルコール飲料である清酒のエタノール生産性を向上させることを目的として、清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の二倍体株から突然変異原処理によって、細胞内にプロリンを高生産する変異株を多数取得した。それらの中から、プロリンだけでなく、親株（きょうかい酵母 K901）よりも、細胞内のオルニチン含量が 10 倍以上に増加した変異株（A902-4）を取得した。オルニチンは、アルギニンやプロリンの前駆物質で、肝機能の促進や睡眠の質の改善などの生理機能を有するアミノ酸である。A902-4 の全ゲノム解析を行った結果、*N*-acetyl glutamate kinase（NAGK）をコードする *ARG6* 遺伝子にアミノ酸残基置換（Thr340Ile）を伴う新規なホモ変異を見出した。NAGK はアルギニン生合成経路の律速酵素の一つで、その活性はアルギニンによってフィードバック阻害を受ける。新規に見出した変異がオルニチンの生産性に与える影響を調べるために、野生型 $ARG5,6^{WT}$ 遺伝子と変異型 $ARG5,6^{T340I}$ 遺伝子の発現プラスミドを構築し、実験室酵母の *ARG5,6* 遺伝子破壊株（BY4741 *arg5,6*Δ）に導入した。得られた形質転換体の細胞内アミノ酸含量を測定したところ、変異型遺伝子導入株では、野生型遺伝子導入株に比べてオルニチン含量が 7.4 倍に増加した。また、大腸菌から組換え酵素として精製した野生型（NAGK-WT）及び変異型 NAGK（NAGK-T340I）を用いて、アルギニン存在下での NAGK 活性を測定した。その結果、アルギニン非存在下で変異型 NAGK-T340I の活性（1.57 U/mg）は、野生型 NAGK-WT（1.73 U/mg）より若干低下したが、野生型 NAGK の活性はアルギニンを 0.2 mM 添加すると急激に低下し、1 mM 添加するとほぼ消失するのに対して、変異型 NAGK-T340I では、ほとんど活性が低下しなかった。これらの結果から、*ARG6* 遺伝子の変異によって、NAGK のアルギニンによるフィードバック阻害が解除され、オルニチンが高生産されることが明らかになった。

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, sake yeast, ornithine, *N*-acetyl glutamate kinase Arg5,6, feedback inhibition

G3H6 (0106) 分裂酵母を用いたイタコン酸生産技術の開発

○藤江 直史[1], 伊藤 美紀[1], 田中 勉[1*], 近藤 昭彦[2]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大院・科技イノベ)

Metabolic engineering of *Schizosaccharomyces pombe* for itaconic acid production

○Naofumi Fujie[1], Miki Ito[1], Tsutomu Tanaka[1*], Akihiko Kondo[2]
([1] Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2] Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

イタコン酸は、バイオポリマーや医薬品、食品添加物の原料となるなど、幅広い用途を持つ非常に有用な化学物質である。分裂酵母は元来イタコン酸の生産経路を持たないが、他の微生物と比べて酵素を合成する能力が高く、耐酸性を有するためイタコン酸の生産に潜在的に有利であると考え、本研究では分裂酵母をイタコン酸生産宿主として選択した。本研究の目的は、代謝工学的手法を用いることで分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)におけるイタコン酸生産技術を確立することである。

分裂酵母でイタコン酸生産を可能にするためには、酵素 *cis* -アコニット酸デカルボキシラーゼ(CAD)を *S. pombe* 内で過剰発現する必要がある。前駆体の消費を抑制するために *idh2* 遺伝子を破壊した株を作製し、hsp プロモーター下で *cad* を過剰発現することで、グルコースからのイタコン酸生産に成功した。イタコン酸生産量を改善するために、本研究では酵素の局在箇所に着目した。イタコン酸の前駆体である *cis* -アコニット酸は TCA 回路の中間体であり、ミトコンドリアマトリックスに局在していると考えられる。CAD をミトコンドリア内に局在化させるため、ミトコンドリア移行シグナル(MTS)を付与した mt-CAD を過剰発現することで、イタコン酸生産量を大幅に向上させることができた。また、イタコン酸への炭素フラックスを強化するため、内在遺伝子 *acl2*, *mae1* を破壊することにより、イタコン酸生産量の向上が確認できた。さらに、イタコン酸を細胞外に排出するとされている輸送体 ITE を tdh1 プロモーター下で過剰発現することにより、本研究における最高値 945 mg/L のイタコン酸を生産することに成功した。

本研究では、*S. pombe* おいてグルコースからのイタコン酸合成経路を確立することに成功した。*S. pombe* でのイタコン酸生産は未だ報告されておらず、本研究が初めての例である。本研究は、工学的な物質生産宿主としての *S. pombe* の大きなポテンシャルを示すものである。

Key words *Schizosaccharomyces pombe*, Metabolic engineering, Itaconic acid, TCA cycle

G3H6 (0107) 針葉樹サルファイトリグニンのアルカリ水酸化銅酸化分解物からのバニリン酸生産

○樋口 雄大[1], 石丸 裕也[2], 坂本 千穂[1], 吉川 琢也[2], 上村 直史[3], 政井 英司[3], 増田 隆夫[2], 園木 和典[1*]
([1]弘前大・農生, [2]北大院・工, [3]長岡技科大院・工・生物)

Production of vanillic acid from softwood lignosulfonate via alkaline oxidation using copper hydroxide and biological funneling

○Yudai Higuchi[1], Hiroya Ishimaru[2], Chiho Sakamoto[1], Takuya Yoshikawa[2], Naofumi Kamimura[3], Eiji Masai[3], Takao Masuda[2], Tomonori Sonoki[1*]
([1]Fac. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., [2]Fac. Eng., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Nagaoka Univ. Technol.)
sonoki@hirosaki-u.ac.jp

木質, 草本系バイオマスの主要成分であるリグニンの有効利用法の一つとして, 近年リグニンを化学的に低分子化して得られる多様な芳香族化合物を, 微生物の代謝機能を利用してポリマー原料等の特定の化合物に集約する “Biological funneling”が期待されている。しかしこれまでの研究事例では, リグニンが元来持つ芳香環構造を残さずに, 脂肪族化合物等に集約するものがほとんどであった。本研究では針葉樹サルファイトリグニンのアルカリ酸化分解によって得られる分解物から, 耐熱性ポリマー原料として利用可能なバニリン酸 (VA) を生産するプロセスの構築を目的とした。

先ず, 水酸化銅を触媒としたアルカリ酸化分解反応により針葉樹サルファイトリグニンを低分子化した。条件検討から, 反応温度 180°C, 反応時間 0.5 時間, 酸素分圧 300 kPa としたときに, バイオ変換に適した芳香族モノマー類 [VA, バニリン (VN), アセトバニロン (AV) など] が最大収率で得られた。次に, 精密ろ過膜, 限外ろ過膜を組み合わせた膜分離によって, 分子量 1,000 以下の分解物を得た。そして, 多様なリグニン由来芳香族化合物を代謝可能である *Sphingobium* sp. SYK-6 株の代謝系を利用して, 分解物から VA を生産した。SYK-6 株由来の VA *O*-デメチラーゼ遺伝子 (*ligM*) とシリンガ酸 *O*-デメチラーゼ遺伝子 (*desA*) の破壊株 (*ligM::bla desA::kan*) は, VA 変換能を欠損する (1)。そこでマーカーレス遺伝子破壊で新たに得た Δ*desA ligM* 株を前記アルカリ酸化分解, 膜分離を経て得た分解物 (主成分として VA, VN, AV が 25 : 60 : 15 のモル濃度比で含まれる) の存在下で培養した結果, 培養 72 時間において理論収率を超える収率 (116 mol%) で VA を生産できることを明らかにした。培養上清の LC-MS 分析から, 理論収率以上の VA が生成したのは, VN 及び AV 以外に含まれる微量の芳香族モノマーや芳香族ダイマーが VA に変換されたためであることが示唆された。

本研究は JST 未来社会創造事業 (JPMJMI19E2) の支援を受けて実施した。

参考文献

1. Abe et al., *J. Bacteriol.,* 2005, 187(6):2030-2037

Keywords lignin, alkaline oxidation, *Sphingobium*, vanillic acid

G3H6 (0108) 大腸菌によるグルコースからのヒドロキシチロソールの発酵生産

○藤澤誠[1]，駒大輔[2]*，大橋博之[2]，森芳邦彦[2]，山中勇人[2]，長森英二[1]，大本貴士[2]
（[1]大阪工大・院，[2]大阪技術研）

Fermentation of hydroxytyrosol from glucose by *Escherichia coli*

○Makoto Fujisawa[1],Daisuke Koma[2]*, Hiroyuki Ohashi[2], Kunihiko Moriyoshi[2], Hayato Yamanaka[2], Eiji Nagamori[1], Takashi Ohmoto[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol., [2]ORIST)
koma@omtri.or.jp

オリーブに含まれるヒドロキシチロソール（HT）は高い抗酸化作用を持ち，化粧品やサプリメント等に利用されている．しかし，オリーブ由来の HT は非常に高価なため、安価な製造方法の開発が望まれている．HT は化学合成により製造することも可能であるが，化学合成法は化石資源を原料とした環境負荷の高い方法である．そこで本研究では，環境に低負荷な新たな製造法として，微生物を用いた HT の発酵生産技術の開発に取り組んだ．

チロシン（Tyr）高生産性の大腸菌（M-PAR-121 株，Koma et al., Appl. Environ. Microbiol. 86:e00525-20, 2020）の染色体 DNA を改変することで，HT 生産菌を作製した．染色体の改変には，λ-Red 相同組換え法，P1 形質導入法，FLP/FRT 部位特異的相同組換え法を用いた．なお，染色体 DNA に導入した遺伝子は T7 プロモーターで制御した．まず，M-PAR-121 株の染色体 DNA の *feaB* 座位を欠失させ，*Azospirillum brasilense* 由来のフェニルピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子（*pdc*），大腸菌由来のアルデヒドリダクターゼ遺伝子（*yahK*）を導入した後，*pheA* 座位に大腸菌 BL21 株由来の 4-ヒドロキシフェニル酢酸モノオキシゲナーゼ遺伝子（*hpaBC*）を導入することで HT 生産菌 HTY9 株を作製した．最小培地を含む試験管で HTY9 株を培養した結果，48 時間で HT を 1 g/L 以上生産した．そこで，ジャーファーメンターを用いた本菌株の培養を試みたが，培養後の菌体濃度が低く，HT の収量も低かった（3 g/L 以下）．この原因として，培養液中に添加したフェニルアラニン（Phe）が 2-フェニルエタノール（2PE）に変換され，生育に必要な Phe が不足しているためだと考えられた．そこで，Phe の 2PE への変換の初発反応に関与する *tyrB* 遺伝子を欠失した菌株 HTY19 株を作製した．本菌をジャーファーメンターで培養したところ，増殖は大幅に改善されたが，HT の生産量が低く（2 g/L 以下），HT の前駆体化合物であるチロソールが蓄積していることが確認された（7 g/L 以上）．そこで，チロソールの HT への酸化反応に関与する *hpaBC* 遺伝子をさらに 1 コピー染色体 DNA に導入した．また，HTY19 株では遺伝子発現誘導剤の IPTG を添加する前にチロソールの蓄積が見られたことから，高発現型の *lacI* 遺伝子（$lacI^{q}$）を染色体に導入することで，各遺伝子の基底発現レベルの低下を試みた．得られた HTY25 株をジャーファーメンターで培養したところ，チロソールの蓄積量が低下し，HT の生産量が向上した（5 g/L 以上）．最終的に，培地成分を検討し，グルコースを原料として 7 g/L 以上の収量で HT を生産することに成功した．

Key words hydroxytyrosol, *Escherichia coli*, fermentation

G3H6 (0109) *Citrobacter* 属細菌バイオ凝集剤の *wspR* 遺伝子導入による生産促進

○森茂真菜，プリヤンカバランワル，松尾友梨子，武尾正弘*
（兵庫県大院・工）

Enhanced production of the bioflocculant of *Citrobacter* strains by the addition of *wspR* gene

○Mana Morishige, Priyanka Baranwal, Yuriko Matsuo, Masahiro Takeo*
(Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo)
takeo@eng.u-hyogo.ac.jp

Citrobacter 属細菌の多くの菌株は、酢酸からグルコサミン及び N-アセチルグルコサミンからなるアミノ多糖を培地に分泌生産する。この多糖は、本来バイオフィルムを構成する EPS の一種と考えられるが、酸性から弱アルカリ性の水溶液中で懸濁質に対して強い凝集作用を示すことから、バイオ凝集剤として生産させることを検討している。既にいくつかのバイオ凝集剤生産菌のゲノム配列を決定し、その情報や遺伝子破壊などの研究から、本多糖の多糖化・膜分泌系の遺伝子群 *bfpABCD* を *C. freundii* IFO13545 株から獲得している。また、本遺伝子群からタンパク質を個別に発現させ、大腸菌の膜画分とそれらの精製タンパク質を用いて in vitro で本多糖の合成に成功しているが、その際、cyclic-di-GMP が必要であった。そこで、この情報に基づき、凝集剤の生産を促進するために、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株由来のジグアニレートシクラーゼ（２分子の GTP から c-di-GMP を合成する酵素）をコードする遺伝子 *wspR* 及び生産物阻害を回避するその変異酵素（R242A の変異）の遺伝子 *wspR**を大腸菌ベクターpMD20 を介して *C. freundii* IFO13545 株に導入したところ、凝集活性が元株に比べてそれぞれ 1.2 倍及び 1.5 倍上昇した。また、これらの遺伝子を大腸菌のアラビノース代謝制御系プロモーター（*araC*-P_{BAD}）下流に接続し、我々が独自に開発した染色体埋め込みベクターpKTLOF を用いて IFO13545 株の染色体に埋め込んだところ、アラビノースでの誘導下でそれぞれ 1.2 倍及び 1.9 倍凝集活性が上昇した。一方、アラビノース非誘導下では元株の活性と同等であった。これらの結果から、*wspR* 及び *wspR**がバイオ凝集剤生産の促進に寄与できることが明らかとなった。

Key words bioflocculant, *Citrobacter*, *wspR*, cyclic-di-GMP, EPS

G3H6 (0110) 組換え *Cupriavidus necator* による高性能バイオプラスチックの生合成

○岡本沙樹[1]，板倉真優[2]，久永理央[2]，西愛美[2]，西上明花[2]，河原あい[1]，田中賢二[3]，田口精一[4]，松崎弘美[1,2]*
（[1]熊本県大院・環境共生，[2]熊本県大・環境共生，[3]近畿大・産理工，[4]東農大・生命科学）

Biosynthesis of high-performance bioplastics by recombinant *Cupriavidus necator* strains

○Saki Okamoto[1], Mahiro Itakura[2], Rio Hisanaga[2], Aimi Nishi[2], Haruka Nishigami[2], Ai Kawahara[1], Kenji Tanaka[3], Seiichi Taguchi[4], Hiromi Matsusaki[1,2]*
([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Fac. Humanity-Oriented Sci. Eng., Kindai Univ., [4]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. Agric.)
matusaki@pu-kumamoto.ac.jp

【背景および目的】化石燃料由来プラスチックはあらゆる場面に利用されているが、難分解性のため、環境問題を引き起こしている。微生物が菌体内に合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、生分解性プラスチックとして期待されている。PHA は炭素数 4 の 3-ヒドロキシブタン酸（3HB）からなる P(3HB)ホモポリマーと炭素数 6～14 の 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）からなる P(3HA)コポリマーに大別されるが、野生株が合成する PHA は、一般的に物性に難があり、実用的ではない。本研究では、*Cupriavidus necator* を宿主とした組換え株を作製し、実用的な高性能バイオプラスチックを合成することを目的とした。

【方法および結果】*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1*）あるいはその改変体[*phaC1(STQK)*]、および乳酸（LA）ユニットを供給する *Lactobacillus acetotolerans* HT 由来の D-乳酸脱水素酵素遺伝子（*ldhD*）、プロピオニル CoA トランスフェラーゼ遺伝子（*pct*）、3HB ユニットを供給する β-ケトチオラーゼ遺伝子（*phbA*）とアセトアセチル CoA リダクターゼ遺伝子（*phbB*）、中鎖長 3HA ユニットを脂肪酸合成経路から供給する(*R*)-3-ヒドロキシアシル ACP チオエステラーゼ遺伝子（*phaG*）と *Pseudomonas aeruginosa* PAO 由来の(*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子(PA3924)を適当な組合わせで導入した *C. necator* の組換え株をいくつか作製し、糖を炭素源として培養を行った。その結果、3HB および中鎖長 3HA ユニット(C_8-C_{12})からなる共重合バイオプラスチック P(3HB-*co*-3HA)や LA ユニットを含む P(LA-*co*-3HB)が合成された。現在、P(3HB-*co*-3HA)および P(LA-*co*-3HB)の蓄積率の向上やポリマー鎖のモノマー組成比について検討している。

Key words biodegradable plastic, polyhydroxyalkanoate, biodegradable polymer, *Ralstonia eutropha*

G3H6 (0111) *Rhodobacter sphaeroides* におけるポリヒドロキシ酪酸を介した代謝調節機構の解析

○清水　哲[1]，寺本陽彦[1]，乾　将行[1,2]*
（[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

Analysis of the metabolic regulation mediated by polyhydroxybutyrate in *Rhodobacter sphaeroides*

○Tetsu Shimizu[1], Haruhiko Teramoto[1], Masayuki Inui[1,2]*
([1]RITE, [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)
inui@rite.or.jp

【背景および目的】我々はバイオマスを原料とした微生物による水素生産プロセス開発の一環として、光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の遺伝子改変による酢酸からの光発酵水素生産能力の向上を目的とした検討を進めている。これまでに我々は i) 細胞内炭素貯蔵物質ポリヒドロキシ酪酸（PHB）生合成遺伝子（*phaC1*）の破壊が *R. sphaeroides* の酢酸資化能を著しく損なうこと、ii) *phaC1* 破壊による酢酸資化能の低下は PHB 蓄積に応じて標的遺伝子の発現を制御する転写制御因子 *phaR* の破壊により回復すること、iii)水素生産株において PHB 生合成能の有無にかかわらず *phaR* の破壊により酢酸からの水素生産能が向上することを見出している。これらの結果は *R. sphaeroides* において *phaR* が PHB 代謝だけではなく、酢酸代謝に関わる遺伝子の発現制御に関わることを示唆する。*R. sphaeroides* は PHB 生合成と経路の前半部を共有するエチルマロニル-CoA(EMC)経路により酢酸を資化することが知られているが、EMC 経路を担う遺伝子の発現制御に関しては不明な点が多く、*phaR* が関与する可能性も考えられた。そこで本研究では、*phaR* の破壊によって発現量が変化する遺伝子を RNA-Seq 解析によって網羅的に探索し、*phaR* の制御下にある酢酸代謝に関わる遺伝子の特定を試みた。

【方法と結果】*R. sphaeroides* の *phaC1* 破壊株（Δ*phaC1*）、および *phaC1*/*phaR* 二重破壊株（Δ*phaC1R*）をそれぞれ酢酸を単一炭素源とした無機塩培地で培養し、対数増殖期の菌体より RNA を抽出して RNA-Seq 解析に供した。株間での発現変動解析の結果、Δ*phaC1* 株と比較して Δ*phaC1R* 株では既知の *phaR* 制御下遺伝子である *phaP* に加えて、*ccrA*、*meaA*、*mcl-1* といった EMC 経路の後半部を担う複数の遺伝子の発現量の増加が観察された。一方、EMC 経路と PHB 生合成経路の重複部分を担う *phaA*、*phaB* の発現量に有意な差は観察されなかった。発現量の増加が認められた各遺伝子の 5'-UTR 領域の配列を精査した結果、*phaP*、*ccrA* の 5'-UTR 領域に既知の PhaR 認識配列が存在することが明らかとなった。以上の結果から *R. sphaeroides* において *phaR* は PHB 代謝だけではなく EMC 経路の制御にも関わることが示された。このことから、*R. sphaeroides* においては PHB が炭素貯蔵物質としてだけではなく、酢酸代謝関連遺伝子の発現制御を媒介するシグナル分子として機能することが示唆された。

Key words *Rhodobacter sphaeroides*, acetate, polyhydroxybutyrate, hydrogen, ethylmalonyl-CoA

G3H6 (0112) ストレス誘導性突然変異によるバイオエンジニアリングは可能か？

○米山 裕[1]*, 三嶋玄隆[1], 渡邉裕一[1], 内ヶ崎 啓[1], 下田 蒼[1], 関翔太[1], 熊谷俊高[2], 野地智法[1], 安藤太助[1]
([1]東北大院・農, [2]ファームラボ)

A novel bioengineering approach through stress-induced mutagenesis

○Hiroshi Yoneyama[1]*, Harutaka Mishima[1], Hirokazu Watanabe[1], Kei Uchigasaki[1], So Shimoda[1], Shota Seki[1], Toshitaka Kumagai[2], Tomonori Nochi[1], Tasuke Ando[1]
([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Farmlab Inc.)
E-mail: hiroshi.yoneyama.4@tohoku.ac.jp

【背景と目的】 現在のライフサイエンスの著しい発展を支える知識と技術の基盤は細菌の基礎研究にあると言っても過言ではない。アミノ酸代謝も例外ではなく、アミノ酸生合成経路のほぼ全ては細菌の栄養要求性変異株の分離とその遺伝学的・生化学的研究から解明されてきた。しかし、解糖系産物であるピルビン酸の一段階アミノ化反応で生成する L-alanine (L-Ala)の大腸菌における生合成経路は 21 世紀に至るまで L-Ala 要求性変異株が分離されていなかったことから不明であった。我々は遺伝学的な手法で L-Ala 要求性変異株の分離に成功し、大腸菌の L-Ala 合成酵素は３つのアイソザイム（AvtA, YfbQ, YfdZ）であることを明らかとした。この研究過程で L-Ala 要求性変異株から出現する L-Ala 非要求性サプレッサー変異株の出現頻度は、自然突然変異より高いことを偶然見いだした。そこで、本研究ではこのサプレッサー変異株のゲノム解析を行い L-Ala 非要求性サプレッサー出現の要因の解明を試みた。
【方法】 独立に分離したサプレッサー40 株のゲノムを解析し、親株のゲノム情報と比較することによって個々の突然変異を探索した。同定した変異のうち、２つの遺伝子（*pta*, *aceE*）に存在した点変異を相同組換えで親株の L-Ala 要求変異株 HYE032 に導入した isogenic mutants を構築し、それらの生育特性および酵素活性を評価した。
【結果と考察】 40 株のサプレッサー変異株ゲノムを解析した結果、ピルビン酸脱水素酵素（16 株）と酢酸生成（PTA-ACK）経路（18 株）を構成する酵素遺伝子に点変異をもつクローンが大半を占めた。次いで、これらのうち複数の *pta*（14 株）と *aceE*（2 株）遺伝子内に同定された個々の点変異 D656A (*pta*)と G147D (*aceE*)を導入した isogenic mutants の L-Ala を含まない最少培地での生育は、それぞれの親株であるサプレッサー変異株と同様 L-Ala 非要求性を示した。また、これらの変異をもつサプレッサー変異株および isogenic mutants の PTA 活性とピルビン酸脱水素酵素は著しく低下していた。以上より、これらのサプレッサー変異株は、L-Ala 飢餓ストレスを感知後突然変異頻度の上昇が起こり、細胞内ピルビン酸レベルの上昇をきたす突然変異導入の結果、本来 L-Ala 合成に寄与しない promiscuous enzyme が関与した multicopy suppression に関連した現象によって出現したことが明らかとなった。

Key words *Escherichia coli*, mutation, stress response, amino acid

G3H6 (0201) 磁性細菌の脂質代謝制御によるマグネトソーム膜改変とマグネタイト形成能への影響評価

○巴瞭斗, 藤本一嗣, 新垣篤史, 田中剛, 吉野知子*
（東京農工大院・工）

Modification of magnetosome membrane by controlling lipid metabolism in magnetic bacteria and evaluation of its effect on magnetite formation

○Ryoto Tomoe, Kazushi Fujimoto, Atsushi Arakaki, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino*
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)
y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

【目的】磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* は細胞内にマグネタイトをコアとするリン脂質膜で被覆された磁気微粒子 (マグネトソーム)を生合成する。当研究室ではマグネトソーム膜にヒト由来の膜受容体を発現させ、創薬研究への応用を試みている。さらに、ヒト細胞膜の主要な脂質であるホスファチジルコリン (PC)の生合成経路を磁性細菌に導入することで、マグネトソーム膜改変を行い、膜受容体の機能向上を示している。一方で、PC の生合成によるマグネタイト形成能への影響は明らかとなっていない。そこで、本研究では磁性細菌の脂質代謝制御により、異なる PC 含有率のマグネトソームを作出し、マグネタイト形成能への影響を評価した。
【方法】PC 生合成経路として 2 種の PC 合成遺伝子 (*pcs, pmt*)をそれぞれ *M. magneticum* の野生株 (WT 株)に導入した PCS 株及び PMT 株に加え、空ベクター導入株 (EV 株)を評価に用いた。これらの株を培養後、菌体膜及びマグネトソーム膜の脂肪酸組成、脂質組成を解析した。また、各株から得られたマグネタイトの粒径を計測し、PC 含有量との相関を評価した。
【結果と考察】*M. magneticum* への PC 合成遺伝子の導入により、菌体膜の PC 含有量は PCS 株で 33%、PMT 株で 19%であった。続いて、各 PC 合成株のマグネタイト粒径を評価したところ、非 PC 合成株である WT 株や EV 株と比較して有意に増大していることが明らかとなった。特に、PC 合成株では 10-20 nm の粒子数が減少し、50-60 nm の粒子数が増加していた。そこで、PC 合成株における脂肪酸組成を評価した結果、WT 株と比較してオレイン酸 (18:1)の割合が増加し、パルミトレイン酸 (16:1)の割合が減少していることが示された。長鎖の脂肪酸の割合が増加したことで、膜の流動性が変化し、マグネタイト粒径を制御する小胞サイズが増大したことが示唆された。そこで、PCS 株において PC 合成に必須なコリンの添加濃度を調節することにより、異なる PC 含有率のマグネトソームを作出した。各脂質組成におけるマグネタイト粒径を評価したところ、PC 含有率に依存したマグネタイト粒径の変化が示された。したがって、脂質組成の調節によってマグネタイト粒径の制御が可能であることが示唆された。

Key words magnetotactic bacteria, phosphatidylcholine, magnetosome

G3H6 (0202) ターゲットプロテオミクスの改良と酵素発現量に基づく細胞株の代謝評価

○高橋遼[1], 西本和生[1], 岡橋伸幸[1],松田史生[1]*
([1]大阪大学大学院情報科学研究科)

Improvement of targeted proteomics assay and metabolic evaluation of cell lines based on enzyme expression levels

○R.Takahashi[1]*, K.Nishimoto[1], N.Okahashi[1], F.Matsuda[1]
([1]Graduate School of information Science and Technology, Osaka University)
ryo_takahashi@ist.osaka-u.ac.jp

【背景および目的】
ターゲットプロテオミクスは標的タンパク質を高感度かつ高選択的に検出、定量する分析手法であり、細胞株間の代謝の違いを酵素量の観点から比較できる。標的タンパク質の検出には、サンプル調製方法の最適化、および LC-MS で検出するトリプシン消化ペプチドの選抜が必要であり、検討の余地が残されている。本研究では、ヒト乳がん細胞株間での中心炭素代謝酵素発現量の比較を目指し、サンプル調製法とペプチド選抜法の改良を行った。
【方法】
ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 と MCF-7 を直径 10 cm のディッシュに 1.0×10^6 cell/plate となるように播種し、37℃、5%CO_2 の条件で 23 時間静置培養した。細胞の可溶化剤に SDS を含み、破砕にソニケーターを用いるペプチドサンプル調製キット FMR003 のプロトコルに基づき、細胞溶解液を得た。この溶解液に対してキットのプロトコルを採用する方法と脱塩操作を伴う先行研究のプロトコルを組み合わせた方法でそれぞれペプチドサンプルを調製した。分析には液体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析装置を用い、解析には Skyline ver 20.2 を使用した。
【結果】
まず、MDA-MB-231 と MCF-7 の中心炭素代謝酵素 47 種類を標的として、ペプチドサンプルを分析したところ、MDA-MB-231 では 17 種類、MCF-7 では 18 種類の酵素に由来するピークを検出することができた。酵素発現量を株間で比較したところ、ペントースリン酸経路では MDA-MB-231 の方が MCF-7 よりも全体的に低い傾向にあった。特にグルコース 6 リン酸脱水素酵素 G6PD の発現量は 0.15 倍に減少していた。一方、乳酸脱水素酵素 LDHA の発現量は MDA-MB-231 では MCF-7 の 1.5 倍に増加していたことから、MDA-MB-231 は MCF-7 と比べて解糖系の活性が高いことが示唆された。
次に検出可能なトリプシン消化ペプチドの数を増やすため、MCF-7 の中心炭素代謝酵素 47 種類を対象とし、異なる方法で調製したペプチドサンプルを分析した。キットのプロトコル通りの方法、脱塩操作を伴う論文のプロトコルを組み合わせた方法でそれぞれ 14 種類、33 種類の酵素のトリプシン消化ペプチドを検出できたことから、サンプル調製は二つのプロトコルを組み合わせて実施するのが有効だと考えられた。またサンプル調製法の最適化を経てもペプチドのピークが検出されなかった 14 種類の酵素に対して選抜するペプチドを変更したところ、新たに ALDOC の分析が可能となった。

Key words proteomics, breast cancer, energy metabolism

G3H6 (0203) ^{13}C 代謝フラックス解析を用いたマクロファージの分化に伴う代謝変化の解析

○本谷真奈, 谷口赳夫, 岡橋伸幸, 松田史生*
(大阪大学 大学院情報科学研究科)

Analysis of metabolic changes during macrophage differentiation using ^{13}C metabolic flux analysis

○Mana Hontani, Takeo Taniguchi, Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda*
(Grad. Sch. IST., Osaka Univ.)
Mana_hontani@ist.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】
細胞分化の制御技術は細胞医薬品の発展に不可欠である。近年、細胞の分化と代謝に密接な関係が示唆されており、代謝変化の観測は細胞制御の手がかりを与えると期待される。そこで本研究では、中心炭素代謝流束（フラックス）の測定法である ^{13}C 代謝フラックス解析を分化前後の細胞である単球とマクロファージに適用することで、単球の分化制御に繋がる知見の獲得を目指した。

【材料・方法】
単球性白血病細胞株 THP1 を[1-^{13}C]グルコース含有 RPMI 培地で培養した。200 nM ホルボール 12-ミリスタート 13-アセテート (PMA) を培地に添加し、3 日間培養することで分化誘導した。分化前後の細胞について、細胞数、培地成分の経時変化と、細胞内代謝物の ^{13}C 標識割合を測定し、専用のソフトウェアである”mfapy”を用いて代謝フラックス分布を推定した。

【結果】
分化誘導前の THP1 は RPMI 培地中で対数増殖したのに対し(比増殖速度:0.012 /h)、PMA 処理による分化誘導後の THP1 はディッシュの底面に接着し、増殖しなかった。培地中成分の経時変化から物質の取り込みと排出比速度を調べた。その結果、分化後 THP1 ではグルコースとグルタミンの比消費速度がそれぞれ 5.2 倍と 7.2 倍に、乳酸の比生産速度は 7.2 倍に増加したことから、分化後 THP1 は、増殖しないにも関わらず代謝が活性化していると推測された。
続いて、[1-^{13}C]グルコースを添加してから 48 時間後の細胞内代謝物の同位体比を用いて、^{13}C 代謝フラックス解析法で分化前後の THP1 の中心炭素代謝フラックス分布の推定に成功した。その結果、酸化的ペントースリン酸経路の代謝フラックスは、分化に伴い、0.1 nmol/10^6 cells/h から 181.6 nmol/10^6 cells/h へと大幅に増加していた。そこで、PMA とペントースリン酸経路阻害剤である 6-アミノニコチンアミドを同時に培地へ添加し、3 日間培養した。分化誘導後の CD11c 陽性細胞の割合を評価したところ、阻害群でその割合が減少したことが明らかとなり、本経路がマクロファージへの分化を正に制御する可能性が示唆された。
本研究の一部は JSPS 科研費 20K15100 の助成を受けた。

Key words metabolic flux analysis, differentiation

G3H6 (0204) 油性酵母 *Yarrowia lipolytica* における Ehrlich 経路工学による短鎖分岐脂肪酸生産

○奥浜 真乃助[1], 番場 崇弘[1], 湯川 貴弘[1], 雲北 涼太[1], Christopher Johnavricka Jr.[1], Gazi Sakir Hossain[3], Ling Hua[3], Matthew Wook Chang[2,3], 蓮沼 誠久[1,4*], 近藤 昭彦[1,4,5]
([1]神戸大学大学院・科学技術イノベーション研究科, [2]シンガポール国立大学・ヨンルーリン医学部・生化学科, [3]シンガポール国立大学・生命科学研究所・SynCTI, [4]神戸大学・先端バイオ工学研究センター, [5]理化学研究所・環境資源科学研究センター)

Short branched-chain fatty acid production through Ehrlich pathway engineering in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*

○Shinnnosuke Okuhama[1], Takahiro Bamba[1], Takahiro Yukawa[1], Ryota Kumokita[1], Christopher Johnavricka Jr.[1], Gazi Sakir Hossain[3], Ling Hua[3], Matthew Wook Chang[2,3], Tomohisa Hasunuma[1,4*], Akihiko Kondo[1,4,5]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Dept. Biochemistry, Yong Loo Lin School of Medicine, NUS, [3]NUS Synthetic Biology for Clinical and Technological Innovation (SynCTI), Life Sciences Institute, [4]Engineering Biology Research Center, Kobe Univ., [5]Biomass Engineering Program, RIKEN)
[*] Tomohisa Hasunuma: hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

昨今、CO_2排出による地球温暖化問題や石油原料による化成品製造などの枯渇資源問題に対して、持続可能社会の構築に向けたバイオテクノロジーの工業的応用が世界的に求められている。例えば，イソ酪酸などの短鎖分岐脂肪酸(SBCFAs)は 2027 年には世界で約 30 億USD もの経済効果を生むと予想される優れた化成品原料である一方で、現在石油原料を用いた Koch 反応によって製造されている。現在、SBCFAs の中でもイソ酪酸(IBA)やイソ吉草酸(IVA)，2-メチル酪酸(2MBA)について主に研究が進められており，これまでに出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では 3 化合物合計で 387.4 mg/L の生産量が報告されている(Ai-Qun Yu, 2016)。既報の課題は，EtOH 生産による脂肪酸合成阻害が示唆されており，生育のために EtOH 生産が必要な *S. cerevisiae* の性質上，更なる生産量は見込まれにくい。そこで，本研究では好気条件下で EtOH を生産しない，油脂酵母 *Yarrowia lipolytica* を宿主とした SBCFAs の高生産株の開発を目的とした。SBCFAs は、バリン，ロイシン，イソロイシンのそれぞれのアミノ酸を起点に Ehrlich 経路内でアミノ基転移酵素(BAT1)と脱炭酸酵素(ARO10)，アルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALD2, 5)を経て生産されている。高生産化に向け、はじめに①既報で実績のある *S. cerevisiae* 由来の 4 遺伝子を *Y. lipolytica* で過剰発現させた変異株を調製した。次に②各遺伝子が *Y. lipolytica* 細胞内で正常に発現しているかを酵素活性によって調査した。更に、③中間代謝物解析によって中間化合物の生産量を確認し、Ehrlich 経路内での律速段階を特定した。最終的には代謝工学的アプローチのみに留まらず、Ehrlich 経路の改変による SBCFAs 高生産を目指す。

Key words *Yarrowia lipolytica*, Short Branched-Chain Fatty Acid, Ehrlich pathway

G3H6 (0205) 光駆動プロトンポンプを発現させたメバロン酸生産大腸菌の代謝解析

○松山千夏[1], 清家泰介[1], 岡橋伸幸[1], 戸谷吉博[1], 弘埜陽子[2], 平山英伸[3], 石井純[3], 清水浩[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)

Metabolic analysis of mevalonic acid-producing *Escherichia coli* expressing a light-driven proton pump

○Chinatsu Matsuyama[1], Taisuke Seike[1], Nobuyuki Okahashi[1], Yoshihiro Toya[1], Yoko Hirono[2], Hidenobu Hirayama[3], Jun Ishii[3], Hiroshi Shimizu[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.)
fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】微生物の増殖や生存維持には ATP が必要であり、大腸菌では糖を TCA 回路で CO_2 に酸化する過程でその多くを獲得している。このため、大腸菌代謝工学株では、ATP 再生の活性化は、目的物質の収率低下につながる。我々は、光駆動型のプロトンポンプであるロドプシンを大腸菌に発現させ、光エネルギー依存型の ATP 再生能を付与することで、本問題の解決を試みてきた。本研究は、ロドプシン発現メバロン酸生産大腸菌株のメタボローム解析を行い、光照射時の代謝状態の変化の解析を試みた。
【方法】メバロン酸合成およびロドプシンの機能発現に必要な遺伝子を発現した大腸菌株を用いた。グルコースを単一炭素源とする最少 M9 培地、37℃、200 rpm、好気条件下で培養した。培養は明条件と暗条件の 2 条件で行い、明条件では 100 μmol/m^2/sec の白色光を照射し、暗条件では遮光して培養を行った。培養中の培地上清を HPLC で、細胞内代謝物をメタノール・クロロホルム・水抽出法により抽出した後誘導体化して GC-MS で調べた。
【結果と考察】メバロン酸生産大腸菌にロドプシンを発現させたところ菌体ペレットがロドプシンに特徴的な色である紫色に変化していた。最少 M9 培地において明条件と暗条件で培養したところ 72 時間後のメバロン酸の収率は明条件において 1.06 倍向上した。培養開始 15 時間後の菌体から代謝物を抽出し、GC-MS を用いたメタボローム分析法に供した結果、13 種類の細胞内代謝物を測定することに成功した。主成分分析から、代謝物プロファイルは明条件と暗条件で異なり、暗条件と比較して明条件では TCA 回路上流のピルビン酸とクエン酸が 1.07 倍と 1.09 倍向上し、TCA 回路下流のコハク酸とフマル酸がそれぞれ 0.78 倍と 0.86 倍に減少する傾向が見出された。ロドプシン発現メバロン酸生産大腸菌株では、光照射により、TCA 回路の代謝に変化が生じると考えられた。

Key words *Escherichia coli*, rhodopsin, ATP regeneration

G3H6 (0206) アンチセンスペプチド核酸を用いたマイクロバイオータ改変技術の開発

○日詰達哉[1], 岡野憲司[2,3*], 佐藤悠[2], 本田孝祐[2,3]
([1]阪大院・工, [2]阪大・生工国際セ, [3]阪大・先導学研機)

Construction of artificial microbiota by using antisense peptide nucleic acids

○Tatsuya Hizume[1], Kenji Okano[2,3*], Yu Sato[2], Kohsuke Honda[2,3]
([1] Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2] ICBiotech, Osaka Univ., [3] OTRI, Osaka Univ.)
okano@icb.osaka-u.ac.jp

種々のオミックス解析技術の登場により、ヒト体内や環境中の微生物菌叢（マイクロバイオータ）の働きが、ヒトの健康改善や地球上の元素循環に重要であることが明らかとなってきている。菌叢機能のさらなる解明や制御の実現には、メタ解析データから得られた知見を基に、人工菌叢を構築したり、菌叢の群衆構造を自在に改変したりする技術が求められるが、そのような手法は不在である。そこで、本研究ではペプチド核酸（PNA）を用いたマイクロバイオータ改変技術の開発を目指す。
PNA とは、DNA の糖リン酸からなる主鎖構造を *N*-(2-aminoethyl)glycine ポリマーで置換した核酸類似体である。PNA は DNA や RNA に対して DNA/DNA、DNA/RNA よりも強く結合し、ヌクレアーゼに耐性を有する。これらの特性から、アンチセンス PNA を微生物の必須遺伝子 mRNA 配列に結合させ、その発現を抑制することで細胞死の誘導が可能である。また、PNA に膜透過ペプチドである$(KFF)_3K$ 配列を付加することで、PNA の細胞透過性が向上し、微生物細胞内への導入が促進されることが知られている。
以上の背景を踏まえ、我々は微生物に固有な配列を標的とするアンチセンス PNA を微生物菌叢に導入することで特定微生物を死滅させることができるというアイデアのもと、3 種の微生物（*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、*Pseudomonas putida*）からなる共培養系を用いた検証実験を行った。まず、3 種の微生物の生育の個別計測を可能にするために異なる抗生物質への耐性を賦与した。その後、各微生物の初期菌体量が 1.0×10^5 CFU/mL となるように培養液 200 μL を調製し、各微生物の必須遺伝子を標的とする$(KFF)_3K$-PNA を添加した。経時的に培養液を採取した後、LB 寒天培地に塗布し、各微生物が有する抗生物質耐性の違いから CFU を個別評価した。*E. coli* の必須遺伝子である *acpP* を標的とした$(KFF)_3K$-PNA を 3 菌共培養系に添加した結果、6 μM の添加で *E. coli* の細胞死が誘導され、培養 5 時間で完全に死滅した。一方、非標的菌である *B. subtilis* および *P. putida* は培養 34 時間後にそれぞれ 4.0×10^5 CFU/mL、1.5×10^7 CFU/mL まで増殖し、PNA 非添加時と同等の増殖を示した。同様に *B. subtilis* の必須遺伝子である *ftsZ* を標的とした$(KFF)_3K$-PNA を 5 μM 添加した結果、*B. subtilis* のみを不活化することに成功した。以上の結果は、アンチセンス PNA がマイクロバイオータの群衆構造改変のための強力なツールになることを示している。現在は *P. putida* に関しても、必須遺伝子を標的する$(KFF)_3K$-PNA を作成し、選択的な細胞死誘導が可能であるかを検討しているところである。

Key words peptide nucleic acid, cell penetrating peptide, artificial microbiota

G3H6 (0207) Isopropanol production with CO_2 reutilization by engineered *Ralstonia eutropha*

○Dyah Candra Hapsari Subagyo[1], Rie Shimizu[1], Izumi Orita[1], Toshiaki Fukui[1]

([1]School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

Isopropanol production with CO_2 reutilization by engineered *Ralstonia eutropha*

○Dyah Candra Hapsari Subagyo[1], Rie Shimizu[1], Izumi Orita[1], Toshiaki Fukui[1]

([1] School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

tfukui@bio.titech.ac.jp

In chemolithoautotrophic bacterium *Ralstonia eutropha*, Calvin-Benson-Bassham (CBB) cycle is functional even during the heterotrophic growth leading to reutilization of CO_2 emitted through sugar metabolisms into storage polyhydroxyalkanoate (PHA) by using the remaining energy and reducing equivalent. *R. eutropha* with intact CBB cycle genes accumulated 1.22-fold PHA on hexose when compared to the strains lacking functional CBB cycle.

Isopropanol is one of the bulk chemicals which is possible to synthesize microbially; however, its carbon yield on hexoses is low because only half of the six carbons in hexoses could be converted to the target compound due to three decarboxylation reactions though the biosynthesis. This study focused on isopropanol production from glucose by engineered strains of *R. eutropha* having CBB cycle functional during the heterotrophic conditions. Although the isopropanol production from glucose was low when clostridial isopropanol synthesis genes were introduced into a PHA-negative and glucose-utilizable strain of *R. eutropha*, quadruple deletion of genes for acetoacetyl-CoA reductases and (*S*)-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenases were effective for improving the solvent production. Replacement of the promoter for the clostridial genes by a strong synthetic promoter resulted in further higher isopropanol titer with low by-production of acetone. The reutilization of glucose-derived CO_2 was confirmed by higher ^{13}C-abundance of isopropanol produced on [1-$^{13}C_1$]-glucose. The overall yield of isopropanol reached up to 0.6 mol/mol-glucose, which was one of the highest when compared to those obtained by previous wild and recombinant bacteria.

G3H6 (0208) シロイヌナズナにおいて狭帯域の 280 および 310 nm UV-B は特有の応答を誘発する

○鶴本智大 [1,2]，藤川康夫 [1]，太田大策 [2]，岡澤敦司 [2*]
（[1] 日亜化学工業㈱，[2] 阪府立大院・生命環境）

Narrowband 280 and 310 nm UV-B induce distinctive responses in Arabidopsis

○Tomohiro Tsurumoto[1], Yasuo Fujikawa[1], Daisaku Ohta[2], Atsushi Okazawa[2*]
([1]Nichia Co., Ltd., [2]Osaka Pref. Univ.)
tomohiro.tsurumoto@nichia.co.jp

植物では、UV-B 光受容体 UV RESISTANCE LOCUS8（UVR8）が UV-B を認識し，アントシアニンなどの UV-B（280～315 nm）を吸収するフェノール性化合物の生合成を含む UV-B 応答を誘発する．UVR8 は UV-B を含む広範囲の紫外光（260～335 nm）を吸収するが，UV-B 内の各波長に対する植物の応答性の解析例は少ない．そこで，ピーク波長が 280 および 310 nm の UV- LED を 2.5 μmol/m^2/s の照度でシロイヌナズナの実生に照射し、波長による UV-B 応答の違いをトランスクリプトームおよびメタボロームの変化として解析した．280 および 310 nm の UV-LED 照射はともに，UVR8 シグナル伝達経路で中心的な役割を果たす転写因子 ELONGATED HYPOCOTYL 5（HY5）の遺伝子発現を誘導したが，トランスクリプトームおよびメタボロームの応答は両者で大きく異なっていた．サリチル酸，ジャスモン酸、ならびに、防御関連遺伝子など，既知の UV-B 応答性遺伝子のほとんどは 280 nm の UV-LED 照射にのみ有意な応答を示した．また，アントシアニン生合成上流のフェニルプロパノイド経路に関与する酵素遺伝子の発現も，280 nm の UV-LED 照射によってのみ有意に増加した．脂質，ポリアミン，および有機酸などの代謝物の含量は，280 nm の UV-LED 照射によって大きな影響を受けたが，310 nm の UV-LED 照射により影響を受ける代謝物は少なかった．これらの結果は，280 と 310 nm の UV-B に対するシロイヌナズナの応答性が大幅に異なることを示しており，UV-B シグナル伝達が HY5 を主要な因子とする現在のモデルよりも複雑な経路によって媒介されていることを示唆している．

Key words UV-B, LED, transcriptome, metabolome, Arabidopsis

G3H6 (0209) シングルオリジンチョコレートの製造過程における代謝物プロファイリング

○木谷友香 [1]，Sastia Prama Putri [12]，福崎英一郎 [123*]
（[1] 阪大院・工，[2] 大阪大学先導的学際研究機構，[3] 大阪大学島津分析イノベーション協働研究所）

Metabolite profiling of single origin chocolate during bean-to-bar process

○Yuka Kitani[1], Sastia Prama Putri [12], Eiichiro Fukusaki[123*]
([1]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., [3]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

シングルオリジンチョコレート (Single origin chocolate; SOC) は単一の産地のカカオ豆のみを使用した高カカオ含有量製品である．その製造工程はチョコレートの品質に大きく関わっており，その影響を調べるには各工程で味や香りに関連する成分の変化を調べる必要がある．メタボロミクスとは代謝物の網羅的解析に基づくオーム科学であり，食品の味や香りに関わる多くの親水性低分子成分を分析対象とすることができるため，食品工学にも応用されている．現在，メタボロミクスを用いた SOC の製造工程に関する研究例は少なく，SOC の品質向上のためにはカカオ豆からチョコレートになる過程における成分変化を調査することが必要だと考えられる．そこで本研究では，SOC の製造過程における代謝物プロファイリングを目的とした．
異なる 5 産地の SOC 製造工程の中間産物及び最終産物を GC-MS で分析し，主成分分析を行った結果，主に製造工程ごとに分類され，カカオ豆の産地の違いによる影響より製造工程の影響が大きいということが明らかになった．また，カカオ豆に含まれる代謝物自体の変化を観察するため焙煎によって変化した代謝物に着目したところ，アミノ酸や糖など，食品の味に影響する化合物や香りの前駆体になると言われている成分に変化が見られた．これによりチョコレートの製造過程において焙煎が重要な段階の一つであることが裏付けられた．

Key words metabolomics, cacao beans, SOC, GC/MS

G3H6 (0210) 線虫 *Caenorhabditis elegans* の神経細胞種特異的なプロテオミクス解析

○油屋　駿介 [1,2,3]、山内　悠至 [3,4]、馬場　健史 [1]、植田　充美 [3,5,6,7,8]、青木　航 [3,5,6,9*]
（[1] 九大・生体防御医学研究所，[2] 学術振興会特別研究員 PD，[3] 京大院・農，[4] 学術振興会特別研究員 DC1，[5] 京都バイオ計測センター，[6]JST-CREST，[7]JST-COI-NEXT，[8] 京大・産官学連携本部，[9]JST-PREST）

Neuronal subclass-selective proteomic analysis in *Caenorhabditis elegans*

○Shunsuke Aburaya[1,2,3], Yuji Yamauchi[3,4], Takeshi Bamba[1], Mitsuyoshi Ueda[3,5,6,7,8], Wataru Aoki[3,5,6,9*]
([1]Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., [2]Research Fellowship for Young Scientists (PD), JSPS, [3]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Research Fellowship for Young Scientists (DC1), JSPS, [5]Kyoto Integrated Science & Technology Bio-Analysis Center, [6]CREST, JST, [7]COI-NEXT, JST, [8]Office of Society Academia Collaboration for Innovation, Kyoto Univ., [9]PRESTO, JST)
Mail : aoki.wataru.6a@kyoto-u.ac.jp

【背景】線虫 *Caenorhabditis elegans* は 118 の神経細胞種から構成される 302 個の神経細胞を持つ。各神経細胞種のタンパク質発現プロファイルを取得できれば、神経細胞が機能を発揮するために重要なタンパク質を同定できると期待される。そこで本研究では、cell-selective bio-orthogonal non-canonical amino acid tagging (cell-selective BONCAT)法 (Yuet et al, *PNAS*, 2015) を用いて、単一神経細胞種レベルのプロテオミクス解析を実現しようと試みた。
【方法】cell-selective BONCAT 法では、アジドフェニルアラニンをタンパク質に取り込める変異型 tRNA 合成酵素を目的細胞に発現させ、目的細胞のタンパク質のみをアジド基で標識する。アジド標識タンパク質はアルキン基によって染色・回収できる。本研究では、全神経細胞もしくは AFD 神経細胞特異的に変異型 tRNA 合成酵素を発現させ、それぞれの線虫からアジド化タンパク質を回収してプロテオミクス解析を行った。
【結果】神経細胞特異的な *rab-3* promoter もしくは AFD 神経細胞特異的な *gcy-8* promoter を用いて、変異型 tRNA 合成酵素を発現させた。続いて、アジドフェニルアラニンを含む餌でそれぞれの線虫株を培養した。培養した線虫を破砕し、アジド標識されたタンパク質をアルキンアガロースで回収した。回収したタンパク質をトリプシン消化した後に分析することで、線虫の全神経細胞から 3461 タンパク質、AFD 神経細胞から 1834 タンパク質をそれぞれ同定した。同定されたタンパク質の中には、神経細胞もしくは AFD 神経細胞で発現することが知られているタンパク質が含まれていた（Aburaya et al, *Sci Rep*, 2020）。今後、線虫の 118 神経細胞種それぞれで変異型 tRNA 合成酵素を発現する株を作製し、線虫神経細胞プロテオームマップの構築を目指す。

Key words *Caenorhabditis elegans,* neuronal subclass-selective proteomic analysis

G3H6 (0211) HEC1B において Transforming growth factor-β1 による上皮間葉転換誘導時の代謝変化の調査

○土岐 弥生 [1]，大島 健司 [4]，森井 英一 [4]，福崎 英一郎 [1,2,3*]（[1] 阪大院・工・生物工学，[2] 大阪大学先導的学際研究機構，[3] 大阪大学島津分析イノベーション協働研究所，[4] 阪大院・医・病態病理学）

Transforming growth factor-β1 -induced metabolic profile during epithelial-to-mesenchymal transition in HEC1B

○Yayoi Toki [1], Kenji Ohshima[4], Eiichi Morii [4], Eiichiro Fukusaki[1,2,3*]
([1]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ, [3]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, [4]Department of Pathology, Osaka University Graduate School of Medicine）
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

転移は上皮系癌細胞から間葉系癌細胞に変化する上皮間葉転換 (EMT) という現象と密接に関係している．EMT によりがん細胞は，細胞間接着能力を失い，移動能力が高まる．EMT を誘導する代表的な因子として Transforming growth factor-β1（TGF-β1）がある．がん細胞では，細胞内の代謝機構が変化していることが大きな特徴であると広く知られているが， TGF-β 誘導性のがんの浸潤（EMT）と細胞内代謝との関連性は未だ不明な点が多い．非小細胞肺癌では TGF-β1 によりアミノ酸代謝が再プログラムされることが知られているが，子宮内膜がんでは TGF-β 誘導性のがんの浸潤と細胞内代謝との関連性は報告されていない．
そこで本研究では，子宮内膜がんの一つである HEC1B を用いて，TGF-β1 が代謝に及ぼす影響を調べることを目的とした．具体的には，TGF-β1 を培養過程で添加した TGF-β1 群（TGF-β1 刺激あり）と対象群：Vehicle 群（TGF-β1 刺激なし）の細胞形態と TGF-β シグナル伝達因子の発現を調べた．次に，TGF-β1 群と Vehicle 群の経時的な細胞内代謝物を LC/MS により測定し，TGF-β1 群に特徴的な代謝物を統計的に判定した．さらに，TGF-β1 刺激により発現が変動したタンパク質をショットガンプロテオミクス解析で調査した（CoMIT Omics Center に依頼）．
TGF-β1 群では Vehicle 群に比べ紡錘形の細胞が多く，TGF-β シグナル伝達因子の発現も増加していたことから，TGF-β1 刺激による TGF-β シグナル伝達の誘導効果が確認された．LC/MS の結果，Vehicle 群に比べ TGF-β1 群では乳酸が有意に増加していた．ショットガンプロテオミクス解析の結果，ピルビン酸キナーゼが TGF-β1 群では検出されたが，Vehicle 群では検出されなかった．TGF-β1 群で有意に増加した乳酸とピルビン酸キナーゼは解糖系に属している．以上の結果より，HEC1B において TGF-β1 刺激により解糖系が影響を受けると示唆された．

Key words transforming growth factor-β1, HEC1B, metabolic profile, epithelial-to-mesenchymal transition

G3H6 (0301) Comparative metabolomics and sensory evaluation of pineapple from different cultivar and ripening stage

○Muhammad Maulana Malikul Ikram[1], Reo Mizuno[1], Sastia Prama Putri[12], Eiichiro Fukusaki[123]*
([1]Dept. of Biotech., Grad. Sch. of Eng., Osaka University, Suita, Japan, [2]Industrial Biotech. Div., Inst. for Open and Transdisciplinary Res. Init., Osaka University, Suita, Japan, [3]Osaka University-Shimadzu Omics Innov. Res. Lab., Osaka University, Suita, Japan)

Comparative metabolomics and sensory evaluation of pineapple from different cultivar and ripening stage

○Muhammad Maulana Malikul Ikram[1], Reo Mizuno[1], Sastia Prama Putri[12], Eiichiro Fukusaki[123]*
([1]Dept. of Biotech., Grad. Sch. of Eng., Osaka University, Suita, Japan, [2]Industrial Biotech Div., Inst. for Open and Transdisciplinary Res. Init., Osaka University, Suita, Japan, [3]Osaka University-Shimadzu Omics Innov. Res. Lab., Osaka University, Suita, Japan)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Pineapple is an important tropical fruit that mainly sold in green ripe (C1) stage. Nowadays, pineapple also sold on the yellow ripe (C4) stage due to its sweetness. Pineapple also has many cultivars with different appearances and taste profile. Main pineapple cultivars in the market are Smooth Cayenne, Queen, and Red Spanish. However, limited studies have been conducted regarding characteristics of these pineapple differences (cultivar and ripening stages). Therefore, the objective of this study was to investigate metabolite and sensory profile of pineapple from different cultivars and ripening stages by means of metabolomics approach. Combination of GC/MS based metabolic profiling and sensory evaluation enabled the determination of metabolites that contribute to sourness and firmness in C1 fruits (isocitric acid+citric acid, ascorbic acid, malic acid, quinic acid) and metabolites that probably contribute to sweetness, juiciness, and high acceptability in C4 fruits (serine, glycine, sucrose, asparagine, threonic acid, and 5-hydroxytryptamine). GC/MS analysis also able to show characteristic metabolites that accumulate differently among cultivars. This information is useful as a basis to improve pineapple cultivars related to its sensory quality and metabolites, depending on the cultivar and ripening stage.

Key words pineapple, comparative metabolomics, sensory evaluation, cultivar and ripening stage

G3H6 (0302) Metabolomics study of different mixing process of mixed tempe powder (Indonesian fermented food) from soybean and red kidney bean

○Della Rahmawati[1,2], Made Astawan[3], Sastia Prama Putri[1,4], Eiichiro Fukusaki[1,4,5*]
([1]Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita, Japan , [2]Department of food technology, Swiss German University, Tangerang, Indonesia, [3]Department of Food Science and Technology, IPB University, Bogor, Indonesia, [4]Industrial Biotechnology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, Suita, Japan, [5]Osaka University-Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka University, Suita, Japan)

Metabolomics study of different mixing process of mixed tempe powder (Indonesian fermented food) from soybean and red kidney bean

○Della Rahmawati[1,2], Made Astawan[3], Sastia Prama Putri[1,4], Eiichiro Fukusaki[1,4,5]*
([1]Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita, Japan, [2]Department of food technology, Swiss German University, Tangerang, Indonesia, [3]Department of Food Science and Technology, IPB University, Bogor, Indonesia, [4]Industrial Biotechnology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, Suita, Japan, [5]Osaka University-Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka University, Suita, Japan)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Tempe is Indonesian traditional fermented food produced from soybean. *Tempe* is also known as one of the plant-based protein sources. Combining different legumes in addition to soybean as raw materials may improve the amino acid profile of *tempe.* In this study, we prepared tempeh using a combination of red kidney bean and soybeans as raw materials and conducted a metabolome analysis to investigate the possibility of producing secondary products derived from tempeh. Legume was mixed before fermentation, and another one mixed after fermentation of each legume was done. The result showed that different mixing processes resulted in different amino acid profiles. Moreover, both mixing processes and the use of red kidney bean and soybean as mix raw materials of *tempe* resulted in the increase of amino acid levels in *tempe* compared with single legume *tempe*.

Keywords Tempe, legumes, metabolomics, mixing process, fermented food

G3H6 (0303) The metabolic profiling of coffee obtained from various altitude, geographical origin, and postharvest processes in Indonesia

○Fitri Amalia[1], Pingkan Aditiawati[2], Yusianto[3], Sastia Prama Putri[1,2,4], Eiichiro Fukusaki[1,4,5]*
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., Japan, [2]Sch. Life Sci. Tech., Institut Teknologi Bandung, Indonesia, [3]Indonesian Coffee and Cocoa Res. Inst., Indonesia, [4]Industrial Biotechnol. Div., Inst. for Open and Transdiscip. Res. Initiatives, Osaka Univ., Japan, [5]Osaka Univ.-Shimadzu Omics Innov. Res. Laboratories, Osaka Univ., Japan)

The metabolic profiling of coffee obtained from various altitude, geographical origin, and postharvest processes in Indonesia

○Fitri Amalia[1], Pingkan Aditiawati[2], Yusianto[3], Sastia Prama Putri[1,2,4], Eiichiro Fukusaki[1,4,5]*
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., Japan, [2]Sch. Life Sci. Tech., Institut Teknologi Bandung, Indonesia, [3]Indonesian Coffee and Cocoa Res. Inst., Indonesia, [4]Industrial Biotechnol. Div., Inst. for Open and Transdiscip. Res. Initiatives, Osaka Univ., Japan, [5]Osaka Univ.-Shimadzu Omics Innov. Res. Laboratories, Osaka Univ., Japan)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Coffee is popular beverage with high demand. Arabica coffee is one of coffee species that has superior quality with pleasant aroma and flavor. The quality of Arabica coffee is thought to be influenced by altitude, geographical origin, and postharvest process. The influence of these factors could be reflected in the Arabica coffee metabolome profile. This study investigated the most influential factor to the coffee metabolome profile of Arabica coffee from Indonesia by means of GC/MS-based metabolite profiling approach. Seventeen specialty grade Arabica coffee beans from Indonesia were analyzed and 79 metabolites were detected. The detected metabolites subjected to multivariate analysis. The result showed postharvest process as the most influential factor, followed by geographical origin and altitude. Several metabolites found to be associated with each factor. Glycine, lysine, sorbose, fructose, glyceric acid, and glycolic acid found to be correlated with dry process method while glutamic acid and galactinol found to be associated with washed and honey process method. Furthermore, inositol and serotonin also found correlated with altitude. The simultaneous analysis of coffee obtained from various altitude, geographical origin, and postharvest process by means of metabolome analysis of coffee provides the deeper insights of Arabica coffee quality that might be beneficial for further studies and coffee industry in general.

Key words Arabica coffee, metabolite profiling, geographical origin, altitude, postharvest process

G3H6 (0304) 歯周病菌 *Prevotella intermedia* と *Porphyromonas gingivalis* の相互作用解析

○青木 雄太[1], 久保庭 雅恵[2], 坂中 哲人[2], 眞弓 昌大[2], 天野 敦雄[2], 福崎 英一郎[1,3,4*]
([1]阪大院・工, [2]阪大院・歯・予防歯科学, [3]大阪大学先導的学際研究機構, [4]大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)

Investigation of interaction between *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis*

○Yuta Aoki[1], Masae Kuboniwa[2], Akito Sakanaka[2], Shota Mayumi[2], Atsuo Amano[2], Eiichiro Fukusaki[1,3,4*]
([1]Department of Biotechnology, Osaka University Graduate School of Engineering, [2]Department of Preventive Dentistry, Osaka University Graduate School of Dentistry, [3]Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ, [4]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

歯周病は歯の喪失のみならず，糖尿病などの全身疾患にも影響を及ぼす疾患であり，口腔内バイオフィルムに存在する細菌によって引き起こされる．口腔環境において，好気環境である歯肉縁上は糖が豊富に存在するのに対して，嫌気環境である歯肉縁下はアミノ酸やペプチドが豊富な環境であることが知られている．多くの歯周病菌は，これらのアミノ酸やペプチドを代謝し，歯肉縁下に生息している．今回着目した，歯周病菌 *Prevotella intermedia* は，糖が豊富な歯肉縁上，アミノ酸が豊富な歯肉縁下の両方に生息可能であることが報告されている．また，*P. intermedia* は糖とアミノ酸の双方を代謝できる性質を持つため，歯肉縁上の糖を，アミノ酸などに代謝し，*Porphyromonas gingivalis* など，口腔内細菌叢の状態を悪化させる歯周病菌に有利な環境へと変化させる役割を持つ可能性が示唆された．

そこで，本研究では，グルコースを唯一のエネルギー源とする培地を用い，*P. intermedia* を培養した際に，細胞外に放出される代謝物プロファイルを調べた．また，代表的な歯周病菌である *P. gingivalis* との共培養を行い，*P. gingivalis* の菌体内・外代謝物プロファイル，およびバイオフィルム表現型変化に及ぼす *P. intermedia* の影響を調べた．代謝物分析の結果，*P. intermedia* はポリアミンやアミノ酸を活発に放出することが明らかとなり，*P. intermedia* はこれらの代謝物を介して *P. gingivalis* のバイオフィルム形成を亢進している可能性が示唆された．

Key words periodontal disease, metabolic profile, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*

G3H6 (0305)

Bifidobacterium longum subsp. *longum* における 1-Kestose 代謝メカニズムの解明

○難波 有希[1]，山口 颯人[1]，吉田 佳鼓[1]，後藤 恭宏[2]，門田 吉弘[3]，栃尾 巧[3]，小椋 義俊[4]，林 哲也[2]，横田 篤[1]，吹谷 智[1]*
（[1]北大院・農, [2]九大院・医, [3]物産フードサイエンス, [4]久留米大・医）

Elucidation of the metabolic mechanism of 1-Kestose in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*

○Yuki Namba[1], Kako Yoshida[1], Hayato Yamaguchi[1], Yasuhiro Gotoh[2], Yoshihiro Kadota[3], Takumi Tochio[3], Yoshitoshi Ogura[4], Tetsuya Hayashi[2], Atsushi Yokota[1], Satoru Fukiya[1]*
([1]Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ., [2]Fac. Med. Sci., Kyushu Univ., [3]B Food Sci. Co., Ltd., [4]Sch. Med., Kurume Univ.)
s-fukiya@chem.agr.hokudai.ac.jp

【背景と目的】
ビフィズス菌はヒトの消化管に生息し，整腸作用や免疫賦活化作用などの健康に有用な効果を示す．一方で腸内環境下におけるビフィズス菌の生存や定着に関する分子機構には不明な点が多い．これを明らかにするために，我々は *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A（105-A 株）の通常飼育マウスにおける長期定着に有効な糖質として，三糖類のフルクトオリゴ糖である 1-Kestose (Fruf(β2-1)Fruf(β2-1α)Glc) を見出した．ビフィズス菌における 1-Kestose の代謝機構は不明な点が多いため，本研究では，105-A 株を用いて，D-Glucose, Sucrose, 1-Kestose 存在下における RNA-seq 解析および，特定の環境下における細菌の生存に寄与する遺伝子を網羅的に同定する手法である insertion-sequencing（以下 INSeq）法[1]を用いて，ビフィズス菌の 1-Kestose 代謝機構の解明を目指した．
【方法と結果】
①RNA-seq 解析：105-A 株を D-Glucose, Sucrose, 1-Kestose のいずれかを 1%含む 1/2MRSCS 液体培地で培養し，対数増殖期で菌体を回収した（n=3）．回収した菌体から RNA を抽出し rRNA を除去後，ランダムプライマーおよび逆転写酵素による逆転写を行い，cDNA を得た．cDNA を次世代シークエンス解析に供し，得られた各リードを 105-A 株のゲノムにマッピングすることで遺伝子ごとの発現量を算出し，「1-Kestose 存在下で発現変動する遺伝子」を同定した．その結果，1-Kestose 存在下での発現変動遺伝子(DEG)として，127 個の遺伝子が同定された．そのうち 25 個が 1-Kestose 群特異的であり，102 個は Sucrose 群の DEG と共通していたことから，1-Kestose の代謝経路は Sucrose の代謝経路と大半が共通していることが示唆された．
②INSeq 解析：105-A 株のトランスポゾン変異株集団を D-Glucose, 1-Kestose のいずれかを 1%含む 1/2MRSCS 液体培地で培養し，菌体を回収した．それぞれについて，ゲノム DNA 抽出と INSeq 解析用サンプルの調製を行い，次世代シークエンス解析に供した．得られたデータを元に，「1-Kestose 利用時の生存に重要な遺伝子」の同定を現在進めている．
【参考文献】1) Goodman *et al*., *Cell Host Microbe*, **6**: 279-289 (2009).

Key words oligosaccharide, *Bifidobacterium*, transcriptome, transposon mutagenesis

G3H6 (0306)

Metabolomics-based approach to predict the quality of commercial sized tropical farmed-shrimp

○Safira Latifa Erlangga Putri[1], Gede Suantika[2], Magdalena Lenny Situmorang[2], Sastia Prama Putri[13], Eiichiro Fukusaki[134]
([1]Dept. of Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., Japan, [2]Schl. of Life Science and Technology, Institut Teknologi Bandung, [3]Industrial Biotechnology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., Japan, [4]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka Univ., Japan)

Metabolomics-based approach to predict the quality of commercial sized tropical farmed-shrimp

○Safira Latifa Erlangga Putri[1], Gede Suantika[2], Magdalena Lenny Situmorang[2], Sastia Prama Putri[13], Eiichiro Fukusaki[134]*
([1]Dept. of Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., Japan, [2]Schl. of Life Science and Technology, Institut Teknologi Bandung, [3]Industrial Biotechnology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., Japan, [4]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka Univ., Japan)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Farmed shrimp, an important aquaculture commodity has shown growing popularity over the years due to its sustainable production. Currently, the selling and grading of shrimps use the body size that would represents the edible portion of shrimp. In general, consumers perceive large shrimps as a luxurious delicacy and therefore command higher prices. It leads to a concern where the pricing based on the size might not surely justify the shrimp quality. The previous metabolomics study successfully demonstrated a strong correlation between the size of white leg shrimp and its metabolite profile. Metabolite features along to shrimp size associated the quality of shrimp at the molecular level. The results suggested the validity of using size as a possible parameter for assessing shrimp quality. This study further investigated the predictability of metabolomics-based shrimp quality prediction models by expanding the range of metabolites coverage and sample sets. The validation of the OPLS model built from white leg shrimp was carried out using commercially obtained black tiger shrimp. Both species are known as the most important farmed shrimp commodity that represents the situation on the market. This finding can be a promising tool to justify the overall quality of tropical shrimp concerning market price.

Key words white leg shrimp, black tiger shrimp, commercial size, metabolomics

G3H6 (0307)

Correlation between metabolite profile and sensory profile of single-origin chocolates

○Abu Hanifah[1], Tissa Aunilla[2], Sastia Prama Putri[1,3], Eiichiro Fukusaki[1,3,4*]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Pipiltin Cocoa, [3]Industrial Biotechnol. Div., Inst. for Open and Transdiscip. Res. Initiatives, Osaka Univ., [4]Osaka Univ.-Shimadzu Omics Innov. Res. Laboratories, Osaka Univ.)

Correlation between metabolite profile and sensory profile of single-origin chocolates

○Abu Hanifah[1], Tissa Aunilla[2], Sastia Prama Putri[1,3], Eiichiro Fukusaki[1,3,4*]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Pipiltin Cocoa, [3]Industrial Biotechnol. Div., Inst. for Open and Transdiscip. Res. Initiatives, Osaka Univ., [4]Osaka Univ.-Shimadzu Omics Innov. Res. Laboratories, Osaka Univ.)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

The demand for single-origin chocolates (SOC) as premium chocolates is increasing. Each SOC has different flavors and tastes depending on the origin of cocoa beans used. To understand how the metabolite profile of SOC affects its sensory profile, the Indonesian SOC from different origins was evaluated. Gas chromatography/mass spectrometry-based analysis was used to analyze the metabolite profile followed by the Rate-All-That-Apply (RATA) test to analyze the sensory profile of the SOC. Results highlight the role of sugars and amino acids as differentiating factors in both profiles of SOC. Thereafter, the correlation between metabolite profile and sensory profile was assessed. The analysis revealed sugars, amino acids, and organic acids to be correlated with the sensory profile. This finding might be useful for improving the SOC production that focuses on sensory profile.

Key words chocolate, metabolomics, sensory evaluation, correlation

G3H6 (0308)

ノンターゲットリピドミクスを用いた腸内細菌脂質の計測と同定

○岡橋伸幸[1,2]，安田柊[2]，津川裕司[2,3,4,5]，池田和貴[2,6]，有田誠[2,5,7*]
（[1]阪大院・情報, [2]理研・IMS, [3]理研・CSRS, [4]東農工大院・工, [5]横市大院・生命医, [6]かずさ DNA 研, [7]慶大院・薬）

Measurements and identification of gut microbial lipids using untargeted lipidomics

○Nobuyuki Okahashi[1,2], Shu Yasuda[2], Hiroshi Tsugawa[2,3,4,5], Kazutaka Ikeda[2,6], Makoto Arita[2,5,7]
([1]Osaka Univ., [2]Riken IMS, [3]Riken CSRS, [4]Tokyo Univ. of Agricul. Technol., [5]Yokohama City Univ., [6]Kazusa DNA Res. Inst., [7]Keio Univ.,)
n-okahashi@ist.osaka-u.ac.jp

腸内細菌は宿主に無い代謝酵素遺伝子を有し、特殊な構造の脂質を産生することで宿主の生体恒常性や疾患の発症進展に関わる。しかし、構造の多様性ゆえに、従来の計測対象を指定した質量分析法では、未知分子を含む腸内細菌由来の脂質の全体像をとらえるのは困難であった。そこで、本研究ではあらかじめ標的を限定せず、アンバイアスな解析が可能なノンターゲットリピドミクスと、類似 MS/MS スペクトルを結び付けることで効率的な構造推定を可能とする Molecular spectrum networking 技術を組み合わせることで、腸内細菌脂質の包括的計測と同定に取り組んだ。
野生型マウスの糞便の総脂質画分を抽出し、液体クロマトグラフィー−四重極飛行時間型質量分析装置を用いてノンターゲットリピドミクスを実施した。10818 個のイオンが観測され、そのうち既存のライブラリで同定できたのは全イオンの内の 7.9%（855 種）と、多くの未同定化合物が存在することが分かった。これらの未同定分子の構造を効率よく推定するために、類似した MS/MS スペクトルをつなぎ合わせる Molecular spectrum networking 技術を適用し、構造類似化合物と推定される MS/MS スペクトルネットワークを作成した。ここに抗生物質カクテル投与で腸内細菌を極端に減少させたマウスの糞便の分析結果も統合し、抗生物質投与群で減少したイオン群を絞り込んだ。これらの MS/MS スペクトルから構造を推定したところ、エーテル結合をもつグリセロ脂質、極性頭部にホスホエタノールアミンやホスホイノシトールなどの修飾を有するセラミド、脂肪酸のβ位にヒドロキシ基があるセラミド、炭素—硫黄原子が直接結合したスルホノリピド、グリシンやセリンで抱合された脂肪酸代謝物など、哺乳類にはほとんど見られない多様な構造の脂質分子群の存在とそれらの腸内細菌との関連が明らかとなった。
さらに、抗生物質投与によってイオン強度が 1/10 以下に減少するクラスターの中に従来宿主によって産生されると報告のある Fatty Acid esters of Hydroxy Fatty Acid (FAHFA) を見出した。既報の FAHFA は長鎖脂肪酸とヒドロキシ長鎖脂肪酸がエステル結合しているのに対し、今回見出した FAHFA は短鎖脂肪酸(C2-C5)とαヒドロキシ極長鎖脂肪酸 (C20-C26) がエステル結合したユニークな構造と推定された。同一構造の化合物を有機合成し、同等の分析結果を得たことから推定構造が正しいことを実証し、この新規脂質を Acyl-Alpha Hydroxy Fatty Acid (AAHFA) と名付けた。

Key words untargeted lipidomics, gut microbiome, molecular spectrum networking

G3H6 (0309) トランスクリプトーム比較によるヒザラガイ類の超硬質歯形成関連遺伝子の探索

○岡田航輝[1], 伊藤孝祐[1], 田村隆[1], 稲垣賢二[1], 守屋央朗[1], David Kisailus[2], 大越健嗣[3], 小布施祈織[1], 根本理子[1]*
（[1]岡山大院・環境生命, [2]カリフォルニア大・アーバイン校, [3]東邦大・理）

Exploration of genes involved in ultrahard teeth formation in chitons by transcriptome comparison

○Koki Okada[1], Kosuke Ito[1], Takashi Tamura[1], Kenji Inagaki[1], Hisao Moriya[1], David Kisailus[2], Kenji Okoshi[3], Kiori Obuse[1], Michiko Nemoto[1]*
([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Univ. California-Irvine, [3]Fac. Sci., Toho Univ.)
mnemoto@okayama-u.ac.jp

【目的】ヒザラガイ類は，大側歯の歯冠部に磁鉄鉱(Fe_3O_4)が沈着した歯舌と呼ばれる摂餌器官を有する。ヒザラガイ類の歯は生物が形成するバイオミネラルの中で最も高い耐摩耗性を示す。従って，ヒザラガイ類の歯の形成機構を解明することが出来れば，その原理を模倣し，新規耐摩耗性材料の合成に応用できる可能性がある。我々はこれまでの研究で，オオバンヒザラガイ *Cryptochiton stelleri* の歯舌組織のトランスクリプトームデータを利用した解析から，磁鉄鉱の沈着した歯冠部に特異的に含まれ，その形成に関与していると考えられる 22 個の歯冠部特異的タンパク質を同定した。本研究では，複数種のヒザラガイ類の歯舌組織のトランスクリプトームデータを比較することで，ヒザラガイ類において普遍的に存在する歯の形成関連遺伝子を明らかにすることを目的とした。【方法】まず，ヒザラガイ *Acanthopleura japonica*，ヒメケハダヒザラガイ *Acanthochitona achates*，ババガセ *Placiphorella stimpsoni* の歯舌組織から RNA を抽出し，次世代シーケンサーで RNA-seq 解析を行った。得られたリードを De novo アセンブルし，3 種のヒザラガイ類の歯舌組織のトランスクリプトームデータを構築した。以降は上記 3 種のトランスクリプトームデータに加え，*C. stelleri* のデータを用いて解析を行った。BLAST による相同配列検索により，*C. stelleri* で同定された 22 個の歯冠部特異的タンパク質が他のヒザラガイ類でも保存されているかどうか調査した。次にオーソログ解析により，4 種のヒザラガイ類で共通のオーソロググループを同定した。また，4 種のヒザラガイ類で共通だったオーソロググループについてドメイン検索を行い，発現量が特に高いグループで高頻度で出現するドメインを調査した。【結果】BLAST による相同配列検索の結果，*C. stelleri* で同定された 22 個の歯冠部特異的タンパク質が *A. japonica*，*A. achates*，*P. stimpsoni* でも保存されていることが明らかとなった。OrthoFinder によるオーソログ解析の結果，今回解析したヒザラガイ類の間で 9400 個のオーソロググループが共通であった。この 9400 個のオーソロググループについてドメイン検索を行った結果，特に発現量が高いグループにはChtBD2 などの，キチン結合に関するドメインをコードする遺伝子が高頻度で出現した。同定した遺伝子について，歯の形成に伴う発現量変化を解析し，その機能を考察した。

Key words biomineralization, RNA-seq, chiton

G3H6 (0310) Possible existence of a non-mevalonate-like pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica*

○Sastia Prama Putri[12], Sivamoke Dissook[1], Tomohiza Kuzuyama[3], Shigeru Kitani[4], Eiichiro Fukusaki[125]

([1]Dept. of Biotech., Grad. Sch. of Eng., Osaka University, Suita, Japan, [2]Industrial Biotech. Div., Inst. for Open and Transdisciplinary Res. Init., Osaka University, Suita, Japan, [3]Grad. Sch. of Agr. Life Sci., Univ of Tokyo, Tokyo, Japan, [4]ICBiotech., Osaka University, Suita, Japan, [3]Osaka University-Shimadzu Omics Innov. Res. Lab., Osaka University, Suita, Japan)

Possible existence of a non-mevalonate-like pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica*

○Sastia Prama Putri[12], Sivamoke Dissook[1], Tomohiza Kuzuyama[3], Shigeru Kitani[4], Eiichiro Fukusaki[125]

([1]Dept. of Biotech., Grad. Sch. of Eng., Osaka University, Suita, Japan, [2]Industrial Biotech. Div., Inst. for Open and Transdisciplinary Res. Init., Osaka University, Suita, Japan, [3]Grad. Sch. of Agr. Life Sci., Univ of Tokyo, Tokyo, Japan, [4]ICBiotech., Osaka University, Suita, Japan, [3]Osaka University-Shimadzu Omics Innov. Res. Lab., Osaka University, Suita, Japan）
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Through a metabolite analysis study, an unprecedented observation was found in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*, in which one of the chromatographic peaks was annotated as MEP (2-*C*-methylerythritol 4-phosphate) when cultivated in the nitrogen limiting condition. This finding raised an interesting hypothesis of whether *Y. lipolytica* utilizes the MEP pathway for isoprenoid biosynthesis or not, because there is no report of yeast harboring the MEP pathway. Three independent approaches: a) spiking of the authentic standard, b) the MEP pathway inhibitor, and c) the 13C labeling incorporation analysis suggested that the mevalonate and MEP pathways co-exist in *Y. lipolytica* under nitrogen limiting condition.

Key words yeast, *Yarrowia lipolytica*, MEP, nitrogen limiting

G3H6 (0311) 比較トランスクリプトーム解析による *Nitratireductor* sp. OM-1 の窒素感受性脂質合成経路の解明

○平田悠人, 山下瀬菜, 高橋宏和, 秋庸裕, 渡邉研志, 岡村好子*
（広島大院・統合生命科学）

Elucidation of nitrogen-sensitive oil synthesis pathway by comparative transcriptome analysis

○Yuto Hirata, Sena Yamashita, Kazuhiro Takahashi, Tsuneshiro Aki, Kenshi Watanabe, Yoshiko Okamura*
(Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University)
okamuray@hiroshima-u.ac.jp

【目的】当研究室で取得された *Nitratireductor* sp. OM-1（以下 OM-1）は，窒素欠乏条件下で油脂を高蓄積することができる．その油脂はクロトン酸(2-trans-ブテン酸)及びそのエステルであり，また廃液中の有機酸を使用できることから，安価に化成品原料やバイオディーゼル燃料が生産できることが期待されている．しかしその生合成経路は未同定である．そこで，本研究では，OM-1 株の遺伝子発現を窒素源有無の間で比較し，窒素欠乏条件下で高発現する脂質合成関連遺伝子を探索し窒素感受性脂質合成経路を解明することを目的とした．
【方法】OM-1 を NH_4Cl の濃度を 0 あるいは 344 mg/L に調整した油脂合成培地中でそれぞれ 36 時間本培養を行なった．各培養液に 2 倍量の RNA protect reagent を添加し，RNAzol® RT を用いて全 RNA 抽出した．その RNA を用いて比較トランスクリプトーム解析を行い，窒素欠乏条件で高発現する油脂合成関連遺伝子を探索した．また，PHB (polyhydroxy butyrate)合成が推定されたため，細胞を硫酸分解して得られたクロトン酸量から PHB の蓄積量を見積もった．
【結果・考察】比較トランスクリプトーム解析の結果，窒素欠乏下で高発現している遺伝子として，窒素取り込み関連遺伝子，脂肪酸分解関連遺伝子，PHB 蓄積に関与する phasin 合成遺伝子が発見されが，窒素感受性脂質合成経路内の既知遺伝子に変化は見られず，新規遺伝子の発見には至らなかった．一方，KEGG 代謝パスウェイマップを用いて，ゲノム情報をもとに OM-1 の持つ遺伝子を割り付けたところ，アセチル-CoA からアセトアセチル-CoA，(R)-3-ヒドロキシブタノイル-CoA を経て PHB を合成する経路を持つことが推定された．PHB が窒素欠乏条件で OM-1 細胞内に蓄積されていると仮定し，細胞の硫酸分解後のモノマーであるクロトン酸を定量した結果，硫酸分解前に抽出したクロトン酸量は 46.2 mg/g-DCW であったのに対し，分解後のクロトン酸量は 322 mg/g-DCW であった．このことから，80%のクロトン酸が PHB として蓄積していることが示唆された．また PHB を蓄積した細胞を培地交換によって，炭素原欠乏条件下においたところ，PHB は３日目には完全に消費されていることが示された．今後は窒素感受性脂質合成経路に関与する遺伝子を探索するとともに，ポリマー分解に関わる遺伝子も探索する予定である．

Key words crotonic acid, polyhydroxy butyrate, comparative transcriptome

G3H7 (0201) 細胞サイズリポソームの動的形態変化における酒の吟醸香成分の影響と清酒の吟醸香評価の可能性

○依田毅[1]*
（[1]青森産技八工研）

The effect of flavors on dynamic transformation of cell-sized liposomes: potential quality evaluation of Sake containing flavors

○Tsuyoshi Yoda[1]*
([1]AITC, Hachinohe Industrial Research Institute)
tsuyoshi_yoda@aomori-itc.or.jp

【背景】
カプロン酸エチル (EC) と酢酸イソアミル (IA) は、清酒の主要な香り成分であり吟醸香として知られる。カプロン酸(CA)とイソアミルアルコール(IAA)はそれぞれ EC と IA の前駆体であり、酒造りにおいて欠点となる重要な匂い成分である。我々はこれまで、これらの成分と不飽和リン脂質である Dioleoyl-phosphatidylcholine(DOPC)を有機溶媒中で混合させて、静置水和法による細胞サイズリポソームの作製を試みた。これらの成分は、膜中に取り込まれること、膜の流動性に影響を及ぼすこと、その結果形成されるリポソームのサイズを小さくさせる効果が有ることなどを発見していた[1,2]。
【目的と方法】
本研究では、DOPC のみからなる細胞サイズリポソームにこれらの成分を含む溶液を加えたときの動的構造変化を明らかにすることにした。はじめに EC、CA、IA または IAA のメタノール溶液およびエタノール溶液を作製した。 次に静置水和法で作製した細胞サイズのリポソーム溶液と混合させた。位相差顕微鏡を用いた直接観察を行って、動的構造変化を調べた。
【結果および考察】
それぞれの成分の溶液と、膜の動的形態変化に差異が観察できた。さらにメタノールもしくはエタノールという溶媒の違いによっても動的形態変化の出現頻度が異なることが分かった。このことは、脂質膜と吟醸香成分や前駆体がそれぞれの化学構造に基づいて相互作用した結果であると考察した。将来的にこの動的形態変化頻度を基に、清酒の商品価値に重要な影響を及ぼす香りや匂いを評価・分析できる可能性が示唆された。
【参考文献】
[1] Yoda T.et al., Biomimetics, 5(16), 1-13 (2020)
[2] Yoda T and Saito T, Membranes,10(440),1-16 (2020)
【謝辞】
日本学術振興会(科研費若手研究(20K19699))、松籟科学技術振興財団、コニカミノルタ科学技術振興財団、インテリジェント・コスモス学術振興財団、また所属する青森県産業技術センターより研究費をいただくことで、研究を遂行できたので深く感謝する。

Key words liposomes; ethyl caproate; isoamyl acetate; flavors； Sake

G3H7 (0202) 清酒醸造過程における酵母由来 peptidylprolyl *cis-trans* isomerase (PPIase)の挙動と機能に関する研究

山田　宏樹[1]，二枝　紗理奈[1]，岸　ひかり[1]、藤原　久志[2]，若井　芳則[2]，井沢　真吾[3]、○渡部　邦彦[1]*（[1]京都府大・院・生命環境，[2]黄桜，[3]京都工繊大・院・工芸科学）

Study on behavior and function of yeast peptidylprolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) in sake brewing

Hiroki Yamada[1], Sarina Nieda[1], Hikari Kishi[1], Hisashi Fujiwara[2], Yoshinori Wakai[2], Shingo Izawa[3], ○Kunihiko Watanabe[1]*
([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Kizakura Co., Ltd., [3]Kyoto Inst. Technol.)
kwatanab@kpu.ac.jp

＜背景・目的＞

清酒は日本の伝統的なアルコール飲料であると共に様々な研究が行われている．その中で，清酒醸造の最終産物である酒粕中のタンパク質解析が行われ，酒粕に特有なタンパク質として酵母由来のシャペロンである peptidylprolyl *cis-trans* isomerase（PPIase）が確認・同定された．この酵素はプロリン残基の *cis-trans* 間の異性化を触媒し，タンパク質のフォールディングを促進するが，醸造過程における挙動や機能についての知見はない．そのため本研究では，醸造中における PPIase の挙動を明らかにし，異なる清酒の醸造サンプルを比較することで，PPIase の挙動やその機能を解明し、新たな清酒開発に繋げることを目的とする．

【方法】黄桜株式会社で醸造された清酒の醪サンプル (留仕込み後 5，10，15，25 日目) を得て，ガラスビーズ破砕により細胞外画分，細胞内画分を調製した．実験室酵母 *S. cerevisiae* S288C 株由来の PPIase 遺伝子 *CPR1* を大腸菌で発現・精製し，ウサギで抗 PPIase 抗体を作製した．この抗体を用いて Western blotting 法と ELISA で PPIase の検出と定量を行なった．PPIase の標的タンパク質の同定には，醪由来酵母 cell free extract（CFE）と抗体を結合させたビーズを反応させ、免疫沈降を行った。その後、ビーズ上に結合した PPIase-標的タンパク質複合体を SDS-PAGE に供し、得られたタンパク質バンドの MALDI-TOF MS 解析から標的タンパク質の同定を試みた。実験室酵母の PPIase と標的タンパク質の検討には BY4742 株を用いた．

【結果・考察】まず醪サンプルを凍結融解した後，Western blotting および ELISA 法で PPIase を調べると，総量の 8 割以上が細胞外で確認されたことから，凍結融解により細胞が破裂し，細胞外に移行することが判った．凍結融解をしないで調製した細胞外と細胞内の PPIase 総量と酵母細胞当たりの PPIase 量は，5 日目から 25 日目にかけて顕著に増加し，異なる酒米，精米歩合，酵母を使用した醪サンプルについても類似した挙動が見られ，醸造過程のエタノール濃度の増加と強い相関が見られた．発酵が進み，エタノールの濃度が上昇すると共に，酵母が生産するタンパク質のフォールディングを促進するために PPIase 量を増加させていることが示唆されたが、PPIase の標的タンパク質を得ることは出来なかった．そこで、この抗体が実験室酵母でもエタノール濃度の増加と共に増加することおよび標的タンパク質の調査を行なっている。

Key words　peptidyl *cis-trans* isomerase, sake brewing, moromi, *CPR1*

G3H7 (0203) 植物発酵物(FBP)のスギ花粉症抑制効果とその作用機序

○河本正次[1]*，藤村孝志[1]，西岡祐起[1]，堀采音[1]，鳥居英人[2]，藤岡耕太郎[2]，岸田晋輔[2]
（[1]広島大院・統合生命科学，[2]万田発酵株式会社）

Suppressive effect of fermented botanical product (FBP) on Japanese cedar pollinosis and its mechanism of action

○Seiji Kawamoto[1]*, Takashi Fujimura[1], Yuuki Nishioka[1], Ayane Hori[1], Hideto Torii[2], Kotaro Fujioka[2], Shinsuke Kishida[2]
([1]Hiroshima Univ., [2]Manda Fermentation Co., Ltd.)
skawa@hiroshima-u.ac.jp

【目的】

植物由来の発酵食品が多彩な保健作用を示すことは我々の食経験、ならびに基礎・臨床両面での知見からも広く認識されているところであるが、その作用機序については不明な点も多い。本研究にて我々は、果樹類・海藻類・穀類・野菜類の長期発酵・熟成により得られた植物発酵物（fermented botanical product, FBP）のスギ花粉症に対する抑制効果を見出すと共に、その作用機序を明らかにしたので報告する。

【方法および結果】

スギ花粉主要アレルゲン Cry j 1 および Cry j 2 からなるスギ塩基性タンパク質の腹腔内投与と経鼻感作を基調とするスギ花粉症モデルマウスに対して FBP の経口投与を試みたところ、花粉症症状（くしゃみ行動）の進展が有意に抑制されることが判明した。一方、FBP の経口投与は本病態モデルにおけるアレルゲン特異的な IgE 抗体価および IgG・IgA 抗体価のいずれにおいても影響を及ぼしておらず、同投与群におけるヘルパーT 細胞サイトカイン産生プロファイルも対照群のそれと間に有意な差異を認めなかった。他方で FBP の投与群では肥満細胞活性化のバイオマーカーである mast cell protease（MMCP1）の血中レベルが抑制傾向にあり、FBP の抗アレルギー作用点が肥満細胞にあることが示唆された。この可能性を検証すべく、受動皮膚アナフィラキシー (PCA) モデルマウスに対する本品の経口投与試験を実施したところ、FBP の投与により PCA 反応が有意に抑制された。更に FBP は *in vitro* における IgE 抗体依存的な脱顆粒反応も有意に抑制した。

【総括】

以上の結果から、FBP がスギ花粉症の病態進展を抑制すること、また、その作用機序として、本植物発酵食品が獲得免疫系に影響を及ぼすことなく、肥満細胞を作用点として IgE 抗体依存的な I 型アレルギー反応を抑制することが明らかとなった。

Key words　allergy, cedar pollinosis, fermented botanical product (FBP), food factor

G3H7 (0204) 呈味成分及び香気成分プロファイルによる甘酒の分類化

○小平一也[1]*，村山芳香[1]，倉橋敦[1]
（[1]八海醸造）

Classification of *amazake* with taste and aroma ingredient profile

○Kazuya Kodaira[1]*, Yoshika Murayama[1], Atsushi Kurahashi[1]
([1]Hakkaisan Brew)
k.kodaira@hakkaisan.jp

【背景・目的】

甘酒は米麹からつくられる麹甘酒と酒粕からつくられる酒粕甘酒、さらにはその両者を原料としてつくられる甘酒があり、原料と製法が異なるためその香味は大きく異なる。しかしながら一括して「甘酒」と呼ばれることがあるため、消費者からはその違いが分かりにくいという声がある。そこで、市販甘酒製品に含まれる糖、アミノ酸、有機酸及び香気成分分析と官能評価を組み合わせて分類化を試みた。

【方法・結果】

市販されている甘酒のうち米麹または酒粕を原材料とするもの 23 点を試験に用いた。糖及び遊離アミノ酸は HPLC、有機酸はキャピラリー電気泳動を用いて定量した。香気成分は SPME-GCMS で検出されたピークを RI と類似度よりアノテーションし、その面積値を算出した。官能試験は、3 点評価とプロファイル形式で評価した。

麹甘酒はグルコースが主成分であり、イソマルトースなどのグルコオリゴ糖が含まれるのに対し、酒粕甘酒はスクロースが主成分であった。麹甘酒では麹のみを原料とする甘酒と米を含む麹甘酒を比較して、麹使用量の多い麹甘酒の方が遊離アミノ酸、有機酸量が高い傾向を示した。これは麹が多くなることでタンパク質分解酵素量が増えることと麹から持ち込まれる有機酸によると考えられた。総遊離アミノ酸量は麹甘酒で 224 ~ 843 mg/100 g であり、酒粕甘酒の 29.1~191 mg/100 g と比べて有意に高く、そのアミノ酸組成は麹甘酒が Arg, Glu, Leu（13 %, 9 %, 8 %）の順位高い組成であるのに対し、酒粕甘酒は Arg が全体の 22 %の組成比であった。有機酸は麹甘酒で最も多いのはクエン酸（21 ~ 61 mg/100g）であり、酒粕甘酒では乳酸（17 ~ 48 mg/100 g）であった。

GCMS 分析からは、麹甘酒は米と麹に由来する化合物が多いことがわかった。麹甘酒の特徴香として「麹の香り（フェニルアセトアルデヒドなど）」や原料米に由来する「糠臭（ヘキサノールなど）」があるが、加熱時に生じるメイラード反応により生成する「カラメル・焦げ臭（フラン、ピリジン、ピラジン類など）」の指摘が多い製品では「麹の香り」が薄くなることがわかった。酒粕甘酒は、麹甘酒には含まれていない酵母由来の脂肪酸エステル類が多く、使用する酵母や清酒の発酵環境によって酒粕甘酒は脂肪酸（カプロン酸、カプリル酸など）とそのエステル類（エチルエステルなど）が製品間で異なる傾向を示すなど清酒製造時の発酵の特徴が加わると考えられた。

呈味成分と香気成分プロットより、麹甘酒と酒粕甘酒とでは香味を構成する成分が全く異なることを示した。これまであまり分析されてこなかった甘酒の香気成分によって、市販甘酒のより詳細な分類が可能となった。

Key words　*amazake*, *koji*, sake lees

G3H7 (0205) 糖セラミドの腸内細菌への影響の *in vitro* 解析

○大塚輝[1]，戴鳳凰[1]，永留真優[1]，満生萌水[1]，田中猛豪[1]，中山二郎[2]，北垣浩志[1]*
（[1]佐賀大学院・先進健康科学，[2]九大院・農）

Effect of glycosylceramide on the intestinal bacteria *in vitro*

○Akira Ootsuka [1], Huanghuang Dai[1], Mayu Nagatome[1], Moemi Mansho[1], Taketoshi Tanaka[1], Jiro Nakayama[2], Hiroshi Kitagaki[1]*
(1 Grad. Sch. Adv. Health Sci., Saga Univ., 2 Fac. Agric., Kyushu Univ.)
ktgkhrs@cc. saga-u. ac. jp

【背景・目的】これまでに日本の発酵食品に含まれる麹の糖セラミドをマウスに摂取させたところ糞便中の二次胆汁酸(DCA)が増加し、腸内の善玉菌である *Blautia coccoides* が増加することを見出した。しかし糖セラミドが腸内細菌に与える影響を調べた報告はこれまでない。そこで本研究では腸内細菌に対する糖セラミドの影響を調べるため、*in vitro* で腸内細菌に糖セラミドおよび二次胆汁酸(DCA)を加え、メタボローム解析と NGS 解析を行った。

【方法】マウス腸内細菌 (C57BL/6N マウスの糞便から培養) を糖セラミドおよび DCA と共に腸内細菌の培地である YCFA 培地を用いて嫌気培養し、GC-FID で代謝物を網羅的に分析した(n=5)。検出された 20 個のピーク面積値を定量し、内部標準のピーク面積値で除して標準化した。この値を説明変数とし、SIMCA-P による PLS-DA を行った。次に、モデル腸内細菌を一定の割合で含んでいる菌体カクテル(Cell-Mock-001)を糖セラミドおよび DCA と共に YCFA 培地を用いて嫌気培養した。NGS 解析を行い、OTU の値を用いて各群で腸内細菌の菌量を定量した(n=5)。さらに、菌体カクテルを糖セラミドおよび DCA と共に培養し、GC/MS で代謝物を網羅的に分析した。上記と同様の方法で標準化したデータを用いて SIMCA-P による PLS-DA を行った(n=5)。

【結果】はじめに、マウス腸内細菌と糖セラミドを嫌気培養し GC-FID 分析を行った結果、Score Plot において穀物由来糖セラミド添加群及び糖セラミド無添加群は概ね分離した。また、糖セラミド添加群では leucine、fumarate が正に寄与した。次に、菌体カクテルと糖セラミドを培養し NGS 解析を行った結果、糖セラミド添加区は *Lactobacillus* 属, *Staphylococcus* 属などの割合が有意に増加した。さらに、菌体カクテルと糖セラミドを培養し、GC/MS 分析を行った結果、Score Plot において糖セラミド添加群と糖セラミド無添加群は概ね分離していた。また、糖セラミド添加群において valine、threonine などと負の相関を示した。しかし、Permutation 検定により PLS-DA モデルを評価すると GC-FID を使った解析では R^2=0.499 Q^2=0.011、GC-MS を使った解析では R^2=0.585 Q^2=-0.0178 となり R^2 値の切片 > 0.30、Q^2 値の切片 > 0.05 の基準により、今回行った PLS-DA は過剰適合モデルであると考えられたことから今後モデルの精度を向上する必要があると考えられた。以上の結果より、糖セラミドは腸内細菌に対して valine や threonine などの資化を促進し、*Lactobacillus* 属などの善玉菌を増加させるなどの効果があることが示唆された。本研究は糖セラミドが腸内細菌へ与える影響の初めての研究であり糖セラミドは発酵食品や穀物に多く含まれていることからこれらを食べる意義の解明にもつながる可能性がある。

Key words　glycosylceramide, intestinal bacteria, fermented food

G3H7 (0206) 麹甘酒は健康成人の便通を改善する

倉橋 敦[1*], 小黒 芳史[1], 小島 彩奈[1], 小平 一也[1], ○榎本 利彦[1], 渡辺 賢一[2], 尾崎 伸紘[3], 後藤 博[4], 平山 匡男[4],
[1]八海醸造・研究開発室, [2]新潟大学・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

Intake of *koji amazake* improves defecation frequency in health adult

Atsushi Kurahashi[1*], Yoshifumi Oguro[1], Ayana Kojima[1], Kazuya Kodaira[1], ○Toshihiko Enomoto[1], Kenichi Watanabe[2], Nobuhiro Ozaki[3], Hiroshi Goto[4], Masao Hirayama[4]
([1]R&D 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.)
a.kurahashi@hakkaisan.jp

【背景・目的】 麹甘酒は，米麹（もしくは米麹と蒸米)と水から造られる，日本の伝統的な甘味飲料である．2015 年頃の甘酒ブームを皮切りに，麹甘酒の健康食品としての認知度は高まっている．しかしながら，麹甘酒に含まれている 300 種類以上の成分の中で，どの成分が，どのような健康効果に寄与しているのかを明らかにした報告例はない．過去の報告においても，麹甘酒の摂取による便通改善効果が確認できたが，その機能性成分の同定はなされていない．そこで本研究では，麹甘酒摂取による便通改善効果の再検証と，麹甘酒含有成分のなかでプレバイオティクスの効果が報告されているグルコオリゴ糖とグルコシルセラミド（GlcCer）の 2 成分の定性・定量解析を行った．そして，麹甘酒と対象品との便通改善効果，機能性成分の含有量を比較することで，便通改善メカニズムを明らかにしようと試みた．
【方法】 本研究は新潟バイオリサーチパーク倫理委員会の認可を得て，UMIN-CTR に事前登録のもと実施された（UMIN000038520）．事前検査によって選抜された 44 名の成人を被験者とし，無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を行った．被験者を 2 群に分け，一方には試験品として麹甘酒 118 g（八海醸造）を，一方にはプラセボ品として麹甘酒の原料である蒸米を酵素により糖化させた米糖化液 118 g を 1 日当たり 1 本，3 週間連続で摂取させた．試験期間は，1 週間の観察期間，3 週間の摂取期間，2 週間の追跡期間の計 6 週間から構成され，便通頻度や便のタイプ，便中の短鎖脂肪酸（SCFA）や腸内細菌叢の測定を行った．麹甘酒中に含まれるプレバイオティクスの定性・定量分析は，HPLC-MS を使用した外部標準法により行った．
【結果】 麹甘酒摂取 2 週間目から，追跡期間 1 週間目の範囲において，麹甘酒の摂取群は，プラセボ品摂取群に比べて便通頻度が優位に増加しており，麹甘酒の便通改善効果を再確認した．便通改善効果の機能性関与成分候補のグルコオリゴ糖の含有量は麹甘酒とプラセボ品とで大差が無かった。もう一つの候補成分である GlcCer はプラセボ品に比べて麹甘酒は約 3.8 倍（1.39 mg/118 g）多く含んでいること，その主成分が麹由来の GlcCer であることを明らかにした． また，観察期間と摂取期間の腸内細菌叢の存在比変化量を両群間で比較したところ，麹甘酒摂取群では *Blautia* 属が減少し，*Bacteroides* 属が増加することが示されたが，糞便中の各種 SCFA の量は両群間で差が無かった．今回の結果より，麹甘酒中に含まれている麹由来 GlcCer のプレバイオテッィク作用により腸内細菌叢の変化がもたらされ，便通改善の効果が発揮されたと考えた．

Key words *koji*, *amazake*, glucosylceramide, defecation frequency

G3H7 (0207) 酢酸菌由来の外膜小胞の産生条件の検討

○桑原直之[1], 松元太一[2], 橘口周平[3], 橋本雅仁[4*]
([1234]鹿児島大院・理工 Grad. Sch. Sci Eng., Kagoshima Univ.)

Studies on production of outer membrane vesicles derived from acetic acid bacteria

○Naoyuki Kuwahara[1], Taichi Matsumoto[2], Syuhei Hashiguchi[3], Masahito Hashimoto[4*]
([1234]Grad. Sch. Sci Eng., Kagoshima Univ.)
連絡先の E-mail **アドレス**
1014.naoyuki.k@gmail.com
hassy@eng.kagoshima-u.ac.jp

こちらから本文をご記入ください．
酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 は外膜小胞（OMV）を産生する。OMV は、グラム陰性菌から分泌されるナノサイズの球状構造体である。最近、OMV が Toll 様受容体（TLR）を介して免疫調節作用からワクチン担体として利用されている。しかし、OMV は、リポ多糖（LPS）と病原性因子に由来する強い毒性が問題となる。最近我々は、酢酸菌由来の OMV が、毒性が低くかつ免疫調節能があることを明らかにした。しかし、超遠心分離とゲル濾過クロマトグラフィーを使用した一般的な方法で得られた OMV の収量は非常に少ない。酢酸菌由来 OMV のさらなる機能性の評価のために、OMV の回収効率を改善する必要があった。そこで本研究では、酢酸菌由来 OMV の回収量向上を目的として、ストレス条件下での培養について検討した。

酢酸菌は *A. pasteurianus* NBRC 3283 を使用し、804 培地で培養した。培養液を遠心分離し、上清をフィルター濾過して回収した。また、ストレス条件下での OMV の回収量を検討するために、Mitomycin C（MMC）とエタノール（EtOH）を加え、同様の方法で培養上清を得た。回収上清を硫酸アンモニウム（硫安）沈殿法で処理し、洗浄後、得られた沈殿物を crude OMV とした。crude OMV はゲル濾過クロマトグラフィーにより分離、精製した。ヘキソース量はアントロン硫酸法で比色分析し、膜脂質量は、蛍光試薬 FM4-64 を用いて比較した。OMV は透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて観察した。

TEM で OMV を観察した結果、MMC と EtOH の添加の有無にかかわらず、同様な球形の構造体を確認できた。MMC と EtOH を添加したものは、添加していないものと比べ、検出された LPS 由来タンパク質のバンドパターンは類似することが分かった。OMV の産生能は、OMV の含まれる膜脂質の蛍光強度と、ヘキソースの吸光度から評価した。MMC を添加していない場合と比べ、MMC を添加した場合では OMV 産生能が１０倍以上に増加した。1%の EtOH を添加して培養した場合では、EtOH を添加していない培養と比べ OMV 産生能が２倍以上に増えた。また、５%の EtOH を添加した場合、1%と５%を比べると、OMV の産生量はさらに向上することが示唆された。以上のことから、酢酸菌をストレス条件下で培養した場合、OMV 回収量が向上することがわかった。

Key words
Acetic acid bacteria, Membrane vesicles

G3H7 (0208) 麹菌そのものおよび麹菌を利用した食品の摂取による大腸炎緩和について

○野村亮[1], 都築翔[1], 兒島孝明[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)

***Aspergillus oryzae* administration suppresses DSS-induced colitis**

○Ryo Nomura[1], Sho Tsuzuki[1], Takaaki Kojima[2], Motoyuki Shimizu[1], Masashi Kato[1*]
([1] Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., [2] Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)
mkato@maijo-u.ac.jp

【緒言】麹菌は、清酒、醤油、味噌、甘酒、塩麹など、我が国の発酵・醸造にとって不可欠の存在である。麹菌が生産する種々の酵素や代謝産物は、これらの発酵食品に味や香りを与えるだけでなく、それらの摂取を通じて我々ヒトに様々な健康効果をもたらすことが明らかになってきている。しかしながら、麹菌そのものを摂取することが宿主にどのような影響を及ぼすのかは、ほとんど解明されていない。本研究では、麹菌そのものおよび麹菌を利用して製造した食品の摂取が宿主の腸内環境に及ぼす影響について検討した。

【方法・結果】麹菌の摂取が腸内細菌叢にどのような影響を及ぼすかを明らかにするために、加熱滅菌した麹菌の胞子 5.0×10^4 個をマウスに 14 日間毎日経口投与した。メタゲノム解析の結果、滅菌した麹菌の胞子を摂取することで Firmicutes 門の細菌の割合が減少し、Actinobacteria 門 (*Bifidobacterium* 属) の細菌の割合が 2 倍増加した。これまでに、*Bifidobacterium* 属細菌が生産する短鎖脂肪酸が大腸炎を緩和すると報告されている。そこで次に、麹菌の摂取が大腸炎を緩和するかを検討した。デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を用いて人為的に大腸炎を誘発させたマウスに、麹菌の胞子 (5.0×10^4 個; 0.13 mg) および麹菌胞子から調製した細胞壁画分 (0.10 mg) を 19 日間毎日投与したところ、投与しないマウスと比較して大腸炎による大腸の萎縮や組織の損傷が有意に改善された。さらに、麹菌を利用して製造された食品 0.4% を含む餌を大腸炎マウスに与えたところ、同様に大腸炎が緩和された。以上の結果から、麹菌とその細胞壁画分、ならびに麹菌を利用して製造した食品がプレバイオティクスとして利用できることが示された。

Key words *Aspergillus oryzae*, *Bifidobacterium pseudolongum*, DSS-induced colitis, Prebiotics

G3H7 (0209) β-フェネチルアルコールを高生産する酵母への育種

○長谷川哲哉[1],大谷里菜[1],塩谷瑞紀[1],松尾啓史[1],大西徹[1],古家美紀[1], 髙木敬信[1],大橋正孝[2],倉田淳志[3],上垣浩一[3*]
([1]近大院農, [2]奈良産振セ・バイオ・食品グループ, [3]近大農)

Breeding of yeasts for increasing production of beta-phenethyl alcohol

○Tetsuya Hasegawa[1],Rina Otani[1],Mizuki Shiotani[1],Yoshifumi Matsuo[1],Toru Onishi[1],Miki Furuie[1],Hironobu Takagi[1], Masataka Ohashi[2],Atsushi Kurata[3],Koichi Uegaki[3*]
([1]Grad.Sch.Agric.Kinki.Univ., [2]Nara.Pref.Inst.Ind.Dev.,[3]Kindai.Univ.)
2133670015x@nara.kindai.ac.jp

【目的】我々の研究室では醸造に用いることを目標に、近畿大学構内の花々から野生酵母をスクリーニングし、清酒小仕込み試験で評価の良かった酵母株の育種を行っている。本発表では、バラの花由来の酵母を用いてバラ様の香りである β-フェネチルアルコールを高生産する育種株を取得し、フィードバック制御に関与する *TYR1* 遺伝子に新規の変異を発見したことを報告する。
【方法】*Saccharomyces cerevisiae* において、β-フェネチルアルコールはシキミ酸経路やエールリッヒ経路から生成されるが、芳香族アミノ酸によるフィードバック制御によって生成が抑制されることが知られている。フェニルアラニンのアナログである *p*-フルオロフェニルアラニンに耐性を持つ変異株は、フェニルアラニンによるフィードバック阻害が解除され、β-フェネチルアルコールを高生産する。本研究では EMS 処理によって *p*-フルオロフェニルアラニンに耐性を持つ変異株を取得し、変異個所の同定、及び、清酒小仕込み試験とフルーツワインの醸造試験を行い、香気成分分析を行った。
【結果】EMS 処理によって、*p*-フルオロフェニルアラニンに耐性を持つ変異株を、計 4 株取得した。YPD10 の醸造試験の結果、4 つの変異株は 10 倍以上、β-フェネチルアルコールを親株よりも生成していた。変異株の細胞内アミノ酸を測定したところ、親株よりもフェニルアラニンの蓄積が確認され、フィードバック阻害が解除されていることが示唆された。取得した変異株のうち３株を用いて、清酒小仕込み試験とフルーツワインの醸造試験を行った。清酒小仕込み試験では親株と比較して β-フェネチルアルコール生成量には顕著な差が見られなかった。一方、フルーツワインの醸造試験では顕著に β-フェネチルアルコール生成量を含め、香気成分が増強していることが確認された。*TYR1* 遺伝子の塩基配列を調べ、新たに３つの新規変異を見出したので合わせて報告する。

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, phenylalanine, alcohol, fermentation

G3H7 (0210) チロソールを高生産する高香気清酒酵母の取得

○川崎博資*, 山田翼
（菊正宗酒造株式会社）

Isolation of high aroma sake yeast mutants that produce high concentration tyrosol

○Hiroshi Kawasaki*, Tasuku Yamada
(Kiku-Masamune Sake Brewing Co.,Ltd.)
h-kawasaki@kikumasamune.co.jp

【背景・目的】清酒の製法品質表示基準において特定名称の清酒が規定され、これらの清酒は比較的高い単価で流通している。その中の吟醸酒や大吟醸酒にはカプロン酸エチルなどの香気成分が多く含まれているものが多いことが知られており、それらの香気成分を高生産する酵母も多く開発されている一方で味の成分に関しての開発例は多くない。そこで、吟醸酒などの比較的単価が高い特定名称酒の酒質に寄与している香気成分以外の味に関する成分を特定し、その成分を高生産する酵母を開発することで、単価が安くても高級酒に近い味わいの清酒を醸造できると考え検討を行った。【方法、結果、考察】(1) 自社の市販商品を対象に GC/MS によるメタボロミクスにより、吟醸酒や大吟醸酒などの比較的単価が高い特定名称酒の酒質に寄与している成分を探索したところ、チロソールが特定された。チロソールは清酒中では苦味を与える物質であるが、抗酸化物質でもある。よって、本物質を高生産する酵母を育種すれば、目的の味わいに近い清酒を安価に醸造でき、更に機能性も期待できると考えた。(2) そこで、当社所有高香気清酒酵母 hec2 を親株として EMS 変異処理を行い 2-フルオロフェニルアラニン耐性を指標として、チロソール高生産酵母の育種を試みた。小仕込試験にて生成酒中のチロソール量を測定したところ、親株の 3 倍量に当たる 206ppm のチロソールを生産する変異株（2C-1）を取得した。(3) 2C-1 株のチロソール高生産機構を調べるために芳香族アミノ酸生合成経路での遺伝子発現量を RT-PCR によって解析した。比較的初期の反応に関わり、チロシンやフェニルアラニンによって発現が抑制されることが知られているデオキシ-*arabino*-ヘプツロン酸リン酸シンターゼをコードする *ARO3* が親株と比べて高発現していたので、*ARO3* 高発現が 2C-1 株のチロソール高生産に関与している可能性が示唆された。

Key words sake yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, tyrosol

G3H7 (0211) 麹菌で利用可能なイトラコナゾール耐性マーカーの構築

○渡嘉敷直杏 [1], 外山博英 [1], 水谷治 [1]*
（[1] 琉球大学 農学部）

Development of an itraconazole resistance marker gene for transformation in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus luchuensis*

○Jikian Tokashiki[1], Hirohide Toyama[1], Osamu Mizutani[1]*
([1]Fac. Agric., Univ. Ryukyus)
mizutani@agr.u-ryukyu.ac.jp

【目的】
麹菌は味噌や醤油といった醸造食品から酵素剤の生産などといった産業利用まで幅広く利用されている重要な産業微生物である。麹菌は種々の抗生物質に対して強い耐性を持つためセレクションに利用可能な薬剤と耐性マーカー遺伝子に制限があり、遺伝子組換え等の実験には一般的に栄養要求性のある実験室株を用いることが多い。しかしながら、全ての糸状菌に栄養要求性株が取得されているわけではないため、薬剤耐性マーカー遺伝子の開発は重要である。そこで本研究では、エルゴステロール生合成を阻害するアゾール系薬剤とその耐性遺伝子の開発を行い、麹菌用マーカーとして機能するかどうかを検討した。
【方法・結果】
はじめに野生型の黒麹菌・黄麹菌がアゾール系薬剤であるイトラコナゾール感受性であることを確認した。次に、黒麹菌由来の 14 alpha demethylase をコードする *cyp51A* を麹菌高発現プロモーター下にクローニングした。*A. fumigatus* のアゾール薬剤耐性株に関する報告でみられる Cyp51A の変異を参考にし、黒麹菌 Cyp51A の 52 番目のグリシンをコードする塩基配列をアルギニンをコードするよう塩基置換する処理をこのプラスミドに対して行い、イトラコナゾール耐性マーカー (*itrA*) として機能することを狙った。変異 *cyp51A* 配列を搭載するこのプラスミドを pNitrA とした。作成したイトラコナゾール耐性遺伝子の機能確認の為に、pNitrA を硝酸資化遺伝子 (*niaD*) を部分欠損し、イトラコナゾール感受性である黄麹菌株 (niaD300) へ硝酸資化能相補を指標に導入した。その結果、イトラコナゾール耐性マーカー遺伝子を導入した株では野生株の生育ができない濃度のイトラコナゾールを含む培地上で生育した。次に、イトラコナゾール耐性のみを指標に、形質転換体を選抜することが可能であるのかを調べた。pNitrA プラスミドを用いて、上述と同様に *niaD* をターゲットに形質転換を行い、イトラコナゾールを含有する培地上でセレクションし、生育した候補株に対して、PCR を用いて染色体上に組込まれたかの確認を行った。その結果、イトラコナゾール耐性を示す候補株では目的位置で相同組換えされた事が確認された。以上の事から、*itrA* 遺伝子がイトラコナゾール耐性マーカーとして黄麹菌で機能することを明らかとした。また、黒麹菌においても本マーカー遺伝子がイトラコナゾール耐性を付与すること事が可能か調べる為、耐性マーカー遺伝子をアグロバクテリウム法により黒麹菌へ導入した。その結果、イトラコナゾール耐性マーカー遺伝子として機能する事を確認した。

Key words *Aspergillus*, azole, transformation

G3H7 (0212) 扁平精白米の醸造特性と製成酒への貯蔵劣化臭低減効果

○山崎梨沙 [1]*, 大場健司 [1], 荒瀬雄也 [1], 平田悠達 [2], 梶原一信 [2], 川上晃司 [2],大土井律之 [1]
（[1] 広島総合技術研・食品工業技術セ, [2] 株式会社サタケ）

Brewing characteristics of flat polished rice and the production of the deterioration flavor during the storage.

○Risa Yamasaki[1]*, Kenji Oba[1], Yuya Arase[1], Yutatsu Hirata[2], Kazunobu Kajihara[2], Koji Kawakami[2], Ritsushi Ohdoi[1]
([1] Food Technol. Res. Center, Hiroshima Prefectural Technol. Res. Institute, [2] Satake Corporation)
r-yamasaki88852@pref.hiroshima.lg.jp

【背景・目的】清酒製造工程において，精米は，米粒外層部に局在する清酒の雑味や着色の原因成分である粗タンパク質や脂質を除去する工程である。通常，精米歩合が低いほど粗タンパク質含有量が下がり，雑味の少なさや香りの良さの面での製成酒の品質向上が期待される。扁平精米技術は齋藤らによって 1990 年代初期に研究された技術[1, 2]であるが，従来の精米機では米の割れやすさや，精米時間が長くかかるなどの多くの課題があり，一部の酒造会社のみが採用している技術であった。近年，cBN（立方晶窒化ホウ素）砥石を搭載した新型精米機を開発したことによって，従来の精米機と比較し，短時間で効率的な扁平精米が可能となった。このことを機に，今後，扁平精白米を清酒原料として実用的に使用する酒造会社が増えることが予想されるが，本研究では，扁平精白米の醸造特性の把握及び，扁平精白米を使用した際の付加価値の探索を目的として研究を行った。
【方法・結果】通常の精白米を対照とし，扁平精白米の小仕込み試験及びパイロットスケール醸造試験を行い，醸造特性を調べた。発酵経過を比較したところ，扁平精米区で有意に発酵が亢進する傾向があり，製成酒のアミノ酸度は，対照である通常精米区と比較して，扁平精米区では約 4 割減という結果が得られた。さらに，アミノ酸組成は対照と比較してアルギニン，リジン，バリン等の特定のアミノ酸の比率が扁平精米区で大きく減少しており，醪中での酵母によるアミノ酸代謝に変化が起こっていることが示唆された。それらの原因については，原料米の胚芽残存と粗タンパクの低さによる影響であると推察している。一方，清酒の貯蔵劣化臭である老香の主要成分であるジメチルトリスルフィド（DMTS）の生成し易さについて比較したところ，扁平精米区で閾値以下への低減効果が確認された。扁平精米区での DMTS 生成ポテンシャルが低い原因については，醪中での酵母の死滅率の低下によるものであると推察しており，現在，残存する胚芽を中心とした扁平精米区特有の成分の醪中の酵母に及ぼす影響について調査を行っている。

[1] 斎藤富男 日本醸造協会誌 88(3), 170-177 (1993)
[2] 斎藤ら 日本醸造協会誌 89(6), 489-491 (1994)

Key words sake rice, flat polished rice, amino acid, dimethyl trisulfide

G3H7 (0213) 玄米を用いた泡盛醸造における FA および 4VG の生成過程の解析

○杉江雄貴 [1], 眞榮田麻友美 [2], 上地敬子 [1], 渡嘉敷建孝 [3], 平良東紀 [1]*
（[1] 琉球大・農, [2] 東農大・応生科, [3] 石川種麹店）

Analysis of the production process of FA and 4VG during Awamori brewing using brown rice

○Yuki Sugie[1], Mayumi Maeda[2], Keiko Uechi[1], Tatsunori Tokashiki[3], Toki Taira[1]*
([1]Fac. Agric., Univ. Ryukyus, [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric. , [3]Iahikawa Tanekouji)
tokey@agr.u-ryukyu.ac.jp

泡盛古酒の特徴香バニリンの前駆体 4-ビニルグアヤコール（4VG）は，黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の生産する各種酵素によって，泡盛醸造中に以下のような過程で生成されると推定されている。1）米細胞壁からキシラナーゼ（Xln）等によってフェルロイルオリゴ糖（FAO）が遊離する。2）フェルラ酸エステラーゼ（FAE）によって FAO からフェルラ酸（FA）が遊離する。3）FA が黒麹菌菌体内に取り込まれ，フェノール酸脱炭酸酵素（PAD）によって 4VG に変換された後，菌体外に放出される。バニリン香に富む古酒の原酒を製造するには，これらの過程を明らかにし制御する必要がある。しかしながら，これらの事象が泡盛醸造工程のどのタイミングで起こっているのかは明らかで無かった。本研究では，細胞壁成分を多く含む二分搗き玄米（IB）を用いて醸造を行い，麹およびモロミ中の Xln および FAE 活性の測定と，FAO，FA および 4VG の定量を経時的に行い，その生成過程の解析を行った。比較として精白米（IW）を用いた。

製麹は，インディカ米を原料として *A. luchuensis* var. *awamori* ISH1 株を用いて行った。製麹時間 30，42，54 および 66 時間の麹でモロミの仕込みを行い，0，1，2，3，7 および 14 日目のモロミをサンプリングした。麹およびモロミ中の FA および 4VG の定量は HPLC を用いて行った。FAO はアルカリ処理によって得られた総 FA から遊離 FA を引いた値とした。麹中の FAE 活性は，インディカ米から調製した FAO を基質とし，一定時間の酵素反応によって生成した遊離 FA 量とした。麹中の Xln 活性は，キシランを基質とし，一定時間の酵素反応によって生成した還元糖量とした。

IW と比較して，IB は麹中の FAE 活性が高く，モロミ中の FAO，FA および 4VG 量も多かった。また，麹中の菌体量あたりの FAE 活性は製麹 30 時間で最も高かった。FAO および FA はどの製麹時間の麹で仕込んだモロミ中でも同定度生成されるが，4VG は製麹 42 時間以上の麹で仕込んだモロミ中で生成され，その量は製麹時間の長い麹で仕込んだモロミほど高いことが分かった。一方，製麹 30 時間の麹で仕込んだモロミ中では，FA が他の麹で仕込んだモロミと同定度存在しているにも関わらず，4VG がほとんど生成されなかった。先行研究において，PAD は製麹 42 時間以降に麹中で発現するが，麹中では 4VG はほとんど生成されないことが報告されている。これらの知見と今回の結果から，モロミ中では FA の有無に関わらず PAD の発現は誘導されず，製麹中に既に発現・蓄積されていた PAD によって，モロミ中の FA が 4VG に変換されていることが示唆された。

Key words フェルロイルオリゴ糖（FAO），フェルラ酸（FA），4-ビニルグアヤコール（4VG）

G3H7 (0214) 白麹菌における MAP キナーゼを介したクエン酸生産制御機構の解析

○林那波[1], 池田萌[1], 門岡千尋[2], 奥津果優[1], 吉﨑由美子[1], 髙峯和則[1], 後藤正利[3], 玉置尚徳[1], 二神泰基[1]*
([1]鹿大院・農林水産, [2]崇城大・生物生命, [3]佐賀大・農)

Analysis of MAP kinases in the white koji fungus

○Nanami Hayashi[1], Moe Ikeda[1], Chihiro Kadooka[2], Kayu Okutsu[1], Yumiko Yoshizaki[1], Kazunori Takamine[1], Masatoshi Goto[3], Hisanori Tamaki[1], Taiki Futagami[1]*
([1]Grad. Sch. Agric., Kagoshima Univ.; [2]Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.; [3]Fac. Agric., Saga Univ.)
k2130730@kadai.jp

焼酎製造に用いられる白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は、米や大麦、蕎麦、サツマイモなどの原料に含まれるデンプンを分解する糖質加水分解酵素に加えて、多量のクエン酸を生産することで醪の pH を酸性に保ち、雑菌汚染を防ぐ役割がある。先行研究において、クエン酸の生産にはクエン酸輸送体 CexA の発現が重要であり、*cexA* 遺伝子の発現レベルは推定メチルトランスフェラーゼ LaeA によりエピジェネティックに制御されることを報告した（1,2）。しかし、LaeA の上流にある制御因子については明らかになっていない。また、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* では、LaeA の発現に MAP キナーゼ MpkB が関与することが報告されている（3）。そこで本研究では、白麹菌における MAP キナーゼとクエン酸生産制御機構の関連性について解析した。

まず、白麹菌において MAP キナーゼをコードする *mpkA*、*mpkB*、および *mpkC* の単独破壊株を構築し、表現型を観察した。それぞれの破壊株を最少培地において 30℃で培養したところ、*mpkA* 破壊株および *mpkB* 破壊株はコントロール株よりも顕著に生育が遅延した。また、*mpkA* 破壊株は、高温ストレス（37℃、42℃）、浸透圧ストレス（0.8 M NaCl あるいは 0.6 M KCl ）、細胞壁合成阻害ストレス（コンゴレッド、カルコフルオロホワイト、あるいはミカファンギン）に対して、コントロール株よりも高い感受性を示した。これらの結果から、白麹菌において、MpkA は熱ストレス応答、浸透圧応答、ならびに細胞壁合成・維持機構に関与することが示唆された。次に、乾燥菌体重量あたりのクエン酸生産量を測定した結果、*mpkA* 破壊株および *mpkB* 破壊株のクエン酸生産量は、コントロール株と比べて有意に減少した。さらに、クエン酸輸送体遺伝子である *cexA* の転写量をリアルタイム RT-PCR により測定したところ、*mpkA* 破壊株および *mpkB* 破壊株において、*cexA* の発現量が有意に減少していた。これらの結果から、白麹菌において MAP キナーゼである MpkA および MpkB がクエン酸生産と *cexA* の遺伝子発現制御に必要であることが明らかになった。

1) Kadooka, C. et al., Appl. Environ. Microbiol., 2020;86:e01950-19.
2) Nakamura, E. et al., J. Biosci. Bioeng., 2021;131:68-76.
3) Atoui, A. et al., Appl. Environ. Microbiol., 2008;74:3596-600.

Key words *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*, shochu, MAP kinase, citrate exporter

G3H7 (0215) ノンターゲットリピドミクスを用いた酵母の産業特性を実現する脂質組成の解析

○小森柊花[1], 岡橋伸幸[1,2,3], 小倉泰郎[4], 飯田順子[3,4], 松田史生[1,2,3*]
([1]大阪大学大学院情報科学研究科, [2]大阪大学/島津分析イノベーション協働研究所, [3]大阪大学先導的学際研究機構, [4]島津製作所)

Analysis of lipid molecules contributing to industrial yeast phenotypes by untargeted lipidomics

○Shuka Komori[1], Nobuyuki Okahashi[1,2,3], Tairo Ogura[4], Junko Iida[3,4], Fumio Matsuda[1,2,3*]
([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ. [2]Omics. Innov. Res. Lab, Osaka Univ. Shimadzu Corp. [3]OTRI, Osaka Univ. [4]Shimadzu Corp.)
shuka_komori@ist.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】
出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 実用株が持つ、ストレス耐性能や風味産生能などの特性と、脂質組成の関連が示唆されている。ノンターゲットリピドミクス法は、多様かつ複雑な構造の全容を解明できる分析手法である。そこで、出芽酵母実用株計 10 株（ワイン株、パン株、清酒株、実験室株）のノンターゲットリピドミクス解析を行い、産業特性と脂質組成の関連を検討した。
【方法】
S. cerevisiae の二倍体 10 株（ワイン株、パン株、清酒株各 3 株、実験室酵母 1 株）を 50 mL の SD 培地中で 30℃、120rpm で回分培養した。対数増殖期の菌体から Folch 法によって脂質を抽出した後、液体クロマトグラフィー四重極飛行時間型質量分析装置（島津製作所 LC-MS9030）の Data dependent acquisition モードでデータを取得した。脂質の同定には MSDIAL ver 4.31 を使用し、定量はサンプルに添加した重水素標識内部標準物質 EquiSPLASH（Avanti）のピーク面積比から算出した。
【結果・考察】
出芽酵母 10 株からデータを取得し、Glycerophopholipids、Sphingolipids、Glycerolipids などの 28 クラスに属する 404 分子種を同定することに成功した。主成分分析から、産業用途ごとに、Phosphatidylinositol (PI) 、Cardiolipin (CL)、Triacylglycerol (TAG) の組成が大きく異なる傾向があった。清酒酵母は PI 含量が高く、PI から生合成される PIP_2 を介した Cell Wall Integrity (CWI) 経路の活性化と、醸造時の低温ストレス耐性との関連が示唆された。また、ミトコンドリアでの呼吸活性に関与する CL はワイン酵母と清酒酵母で多く、TCA サイクルの活性化を介した有機酸の産生が酒類への香り成分の付与を担っていると考えられた。TAG はパン酵母で多く、乾燥・冷凍・脱水というパン製造時のストレスへの耐性への寄与が示唆された。本研究の一部は JST ACT-X(JPMJAX20B2)の助成を受けた。

Key words industrial yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, lipid, untargeted lipidomics

G3H7 (0301) 全ゲノム情報を用いた系統解析による戦前の泡盛麹に含まれる黒麹菌類の菌叢の推定

○塚原正俊[1]*, 東春奈[1], 久貝樹幹[1], 外山博英[2]
([1]バイオジェット, [2]琉球大・農)

Estimating the flora of black aspergilli contained in prewar Awamori koji by phylogenetic analysis using whole genome data

○Masatoshi Tsukahara[1]*, Haruna Azuma[1], Tatsumoto Kugai[1], Hirohide Toyama[2]
([1]Biojet, [2]Fac.Agric., Univ. Ryukyus)
tsuka@biojet.jp

泡盛は、約 600 年の歴史を有する沖縄県の特産品である。泡盛醸造の特徴の 1 つは、伝統的に黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* が用いられていることであり、*A. luchuensis* は酵素活性の高さやクエン酸生産性など産業的に有用な特性を有している。現在の一般的な泡盛醸造では、それぞれ異なる特性を有する 2 株の *A. luchuensis* が利用されており、これらの特性を最大限活用する目的で 2 株を混合した種麹が用いられている。従って、*A. luchuensis* にはこれらの株以外にも様々な醸造特性を有する株が存在すると考えられ、*A. luchuensis* の種内系統関係を詳細に解析し、それぞれの系統的位置を明確にする意義は大きいと考えられる。我々は、複数の黒麹菌株の全ゲノム情報を用いた系統解析手法を構築し、*A. luchuensis* の種内の詳細な系統関係を解析した。その結果、大きな 2 グループ（A、SK）、およびこれらに属さない株が存在することが明らかとなった。

一方、沖縄では第 2 次世界大戦により泡盛酒造所を含め壊滅的な被害を受け、その後泡盛が復興する過程で現在の黒麹菌株が選抜され種麹として広く利用されるようになった歴史的背景がある。戦前の黒麹は、友麹で製麹され複数の菌株が混在していた。これらの菌株に関して、発酵能や形態により分類された報告があるものの、現在の分類でどのような系統の株が含まれていたのかなどの考察は難しい。今回、主に中澤らの報告[1)]に基づき採取場所および過去の分類結果などを再検討し、それらの菌株と菌株保存機関の株との紐付けを検討するとともに、全ゲノム情報を用いた系統解析結果と相互比較することで、戦前の黒麹の菌叢に関する情報の一端を明らかにする試みを行った。

その結果、1933 年当時の黒麹は、沖縄県南部（那覇、首里）、名護、離島（宮古、八重山）の地域ごとにそれぞれの傾向が観察され、黒麹菌株が酒造所ごとではなく地域で保持されていたと考えられた。このことは、他の文献にも黒麹は地域の酒造所間で相互に譲り合っていたとの記載があることと符合する。また、沖縄県南部の黒麹には、2 グループ（A、SK）に属さない株が広く含まれていたと推測され、現在の泡盛醸造で用いられている株が属する 2 グループ（A、SK）に含まれない株が当時の泡盛醸造に寄与していたことが示唆された。

1) 中澤亮治ら：農化誌，12，61-104（1936）

Key words *Aspergillus luchuensis*, Awamori, Koji making

G3H7 (0302) 酵母のイソアミルアルコール生成に関与する遺伝子の探索

○小橋有輝[1], 吉﨑由美子[1,2], 奥津果優[2], 二神泰基[1,2], 玉置尚徳[1,2], 髙峯和則[1,2]*
([1]鹿児島大院・連農 [2]鹿児島大・農)

Research for genes involved in isoamyl alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*

○Yuki Kobashi[1], Yumiko Yoshizaki[1,2], Kayu Okutsu[2], Taiki Futagami[1,2], Hisanori Tamaki[1,2], Kazunori Takamine[1,2]*
([1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ, [2]Fac. Agric., Kagoshima Univ)
k6943994@kadai.jp

【背景と目的】酵母が生成する高級アルコールの代表的なものにイソアミルアルコール (i-AmOH) がある. 酵母は i-AmOH をロイシン生合成の際の副反応であるアミノ酸生合成経路と, 菌体外から取り込んだロイシンを出発点とするエールリッヒ経路の 2 つの経路によって生成する. これまでに, 酵母の *THI3* 遺伝子を破壊すると i-AmOH 生成量が著しく低下することが報告されていた[1)]. しかし, 我々のこれまでの研究で *THI3* 遺伝子破壊株の i-AmOH 生成量は, ロイシンのみをアミノ酸源とした培地で培養した場合に親株の約 6%まで低下するのに対し, 麹汁培地で培養した場合に親株の 2 倍以上に増加することが確認された. 本結果より, 酵母の i-AmOH 生成に関与する遺伝子は栄養条件によって変化することが示唆された. そこで本研究では, *THI3* 遺伝子破壊株を用いて, 麹汁培地において i-AmOH 生成に関与する遺伝子の探索を目的とした.
【方法】焼酎酵母 (C4 株) とそれを親株として取得した *THI3* 遺伝子破壊株 (Δ*THI3* 株) を麹汁培地で培養し, 両株の遺伝子発現量を次世代シーケンサーによる RNA-seq で測定した. RNA-seq の結果より選抜した遺伝子について *THI3* 遺伝子との二重破壊株を構築した後, 麹汁培地で培養し, GC/MS 分析によって i-AmOH 生成量を測定した.
【結果と考察】RNA-seq より 1505 遺伝子について, 麹汁培地で培養した際の Δ*THI3* 株で, C4 株と比較して発現量の増加が確認された. その中でも, すでに i-AmOH 生成への関与が報告されている *PDC1*, *PDC5*, *ARO10*, *ARO8*, *ARO9* の 5 つの遺伝子について, 約 3～40 倍の発現量の増加が確認された. これら遺伝子に加えて, 発現の増加はなかったが同様に i-AmOH 生成への関与が報告されている *PDC6* を、*THI3* 遺伝子と共に破壊し計 6 株の二重破壊株を構築した. 麹汁培地で培養した際の i-AmOH 生成量について, Δ*THI3* 株はこれまでと同様に C4 株の 2 倍以上の生成量を示した. Δ*THI3* 株と二重破壊株の i-AmOH 生成量を比較すると, Δ*THI3* 株に比べて最も減少したものは, Δ*ARO8*Δ*THI3* で約 19%の減少であったが, C4 株の 2 倍程度の生成量を保持したままであった. 本結果より, 麹汁培地での *Saccharomyces cerevisiae* の i-AmOH 生成には, *THI3*, *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10*, *ARO8*, *ARO9* 以外の遺伝子の関与が示唆された.

1) Dickinson *et al*, J. Biol. Chem., 1997, 273:25751–25756

Key words *saccharomyces cerevisiae*, isoamyl alcohol

G3H7 (0303) 試験製麹法における米麹の構造観察と乾燥の影響

○伊藤一成[1]*, 谷野有佳[1], 五味勝也[2], 狩山昌弘[3], 三宅剛史[1]
([1]岡山県工技セ, [2]東北大院・農, [3](株)フジワラテクノアート)

Observation of rice *koji* structure and influence of *koji* drying on *koji* making test

○Kazunari Ito[1]*, Yuka Tanino[1], Katsuya Gomi[2], Masahiro Kariyama[3], Tsuyoshi Miyake[1]
([1]Ind. Technol. Center, Okayama Pref., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [3]Fujiwara Techno-Art Co., Ltd.)
kazunari_itou@pref.okayama.lg.jp

【目的】清酒製造における麹造り（製麹）は、その後の酵母によるアルコール発酵の型や製成酒の品質に大きく影響を与える。麹の品質評価指標の 1 つとして、麹菌が増殖して菌糸を伸ばし白く見える現象である破精がある。破精は米表面に菌糸が広がる破精回りと、米内部に菌糸が入り込む破精込みの 2 つに分けられ、これらは加水分解酵素の生産やそれらのバランスに影響すると言われている。一般的に製麹中期から後期にかけて品温を上げ、水分の発散を促し乾燥させる操作により、糖化力は高めでタンパク質分解力は抑えられた麹になることが認識されており、概ねこの様な麹は、破精回りはまばらで破精込みが多くなっている。そして、こうした破精込みの多い麹を電子顕微鏡で観察すると、麹表面の菌糸が太く消化が良いことが報告されている。そこで本研究では、製麹工程における乾燥がこれらの構造にもたらす影響について確認するため、試験製麹法により、乾燥の仕方の異なる麹を取得し、その構造を詳細に観察した。
【方法・結果】精米歩合 60%の雄町 200g を、蒸し上げ後水分約 32%になるように調製した。これに *Aspergillus oryzae* RIB128 株の胞子懸濁液を混ぜ込み、NAB 法で試験製麹を行った。製麹条件は 95%RH 環境下で、30℃で 24 時間、その後 12 時間かけて 40℃まで上昇させ、さらに 40℃で 12 時間、計 48 時間の製麹経過をベースとした。そして製麹工程中に麹を乾燥させるために、開始 30 時間後から相対湿度を低下させる経過と、36 時間後から相対湿度を低下させる経過で製麹を実施し、計 3 パターンの麹を得た。時間経過ごとに低真空走査電子顕微鏡により菌糸や米組織の様子を詳細に観察したところ、製麹工程中に麹を乾燥させることにより、菌糸が太くなっている様子と、米組織の消化残渣が少なくなっている様子が確認できた。そして、乾燥させるタイミングの違いでこれらの構造に違いが生じていることが明らかとなった。

Key words *Aspergillus oryzae*, *Koji* making, Mycelia

G3H7 (0304) 粕床による食材へのエチル α-D-グルコシド(α-EG)移行研究

○山川 達也*, 久保田 和樹, 柳田茉子, 尾関 健二
（金沢工業大学・ゲノム生物工学研究所）

Study on the transfer of ethyl α-D-glucoside (α-EG) to foodstuffs by *Kasudoko*

○Tatsuya Yamakawa*, Kazuki Kubota , Mako Yanagida , Kenji Ozeki
(Kanazawa Institute of Technology Genome Biotechnology Research Institute)
b1724101@planet.kanazawa-it.ac.jp

【目的】
α-EG はヒトでの経口摂取により皮膚のコラーゲン量が増加することが報告されている[1]。また、α-EG 高含有みりん（3.1%α-EG）を使った食事試験では、α-EG 高含有みりんを調理の際に加熱処理しても α-EG が残存し、ヒトの肌のコラーゲン量が増加することが確認されている。このことから α-EG を調味料や食材に応用し活用することができると考えられる。そこで本試験では、食材に α-EG を移行し、α-EG の有効摂取量 320 mg/day に達する浸透条件、食材を探すことを目的とした。
【材料・方法】
酒粕、市販みりん、84% Ethanol、清酒濃縮液（α-EG）を調理バックにいれ、電子レンジで加熱し、撹拌後冷却した。再度同一条件で加熱、冷却し粕床を作製した。真空シーラーで粕床を使用する際は、調理バックで作成した粕床を真空シーラーに移し使用した。本実験では、粕床を入れた真空シーラー（減圧）と調理バック（常圧）に、食材（切り干し大根、大根、ニンジン、サケ）を入れて α-EG の浸透と微生物安全性ついて確認を行った。
【結果】
真空シーラーまたは調理バックを用いて、粕床に各食材をそれぞれ 2 回漬け込む処理を行った後、微生物試験を行った。真空シーラーでの結果は、どの食材でも微生物衛生基準を超えなかったため、粕床による漬け込み処理での安全性が確認された。しかし、調理バックでの結果は、大根とニンジンで微生物衛生基準を超えてしまうことが確認された。このことから微生物試験では、真空シーラーによる減圧処理を行うことで、微生物の増殖を抑えることが確認された。次に、真空シーラーまたは調理バックによる α-EG の浸透についてである。真空シーラーによる α-EG の浸透は切り干し大根、大根、サケ、ニンジンの順番で高い結果となった。調理バックによる α-EG の浸透についても真空シーラーと同じ順番で高い結果なった。真空シーラーと調理バックでは、真空シーラーの方が α-EG の浸透率が良く、食材への α-EG 移行が進むことが確認された。
真空シーラーを用いた漬け込みの結果、各食材の α-EG 有効摂取量は切り干し大根 20 g、大根 20 g、サケ 30 g、ニンジン 40 g であった。数値が示す通り、どの食材でも少量で α-EG の有効摂取量に達する。このことより清酒が苦手な方、女性でも α-EG を食材から有効量摂取することができると考えられる。

Key words ethyl-alpha-D-glucoside, sake less, vacuum cooking, microorganisms

参考文献 1)尾関 健二. 2021. 醸造の事典, pp. 222-225. 朝倉書店.

G3H7 (0305) *Lactobacillus plantarum* PUK6 の特性評価および多成分バクテリオシン生合成関連遺伝子の解析

○河原 あい[1], 林 里帆[2], 志賀 梨沙[2], 松田 明香里[2], 善藤 威史[3], 松崎弘美[1,2*]
([1]熊本県大院・環境共生, [2]熊本県大・環境共生, [3]九大院・農)

Characterization of *Lactobacillus plantarum* PUK6 and analysis of the biosynthesis genes of the multiple bacteriocins produced.

○Ai Kawahara[1], Riho Hayashi[2], Risa Shiga[2], Akari Matsuda[2], Takeshi Zendo[3], Hiromi Matsusaki[1,2*]
([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci. Pref. Univ. Kumamoto, [3]Fac. Agric., Kyushu Univ.)
matusaki@pu-kumamoto.ac.jp

【目的】食経験豊富な乳酸菌が生産する抗菌ペプチドのバクテリオシンは、食品の風味に影響を与えず、ヒトの腸管内の消化酵素で分解されるなど安全性が高いことから、天然の食品保存料として期待されている。本研究では、熊本県球磨地方の伝統的発酵食品「味噌漬け豆腐」から分離した *Lactobacillus plantarum* PUK6 の特性評価および PUK6 株が生産する多成分バクテリオシンを精製・同定し、バクテリオシン生合成関連遺伝子群の塩基配列決定ならびに機能解析を行うことを目的とした。
【方法および結果】*L. plantarum* PUK6 のプロバイオティクス特性を調べた結果、胃酸および胆汁酸耐性を示した。さらに、PUK6 株の培養液上清について、70%飽和硫安分画、透析（MWCO 1,000）、逆相 HPLC を用いてバクテリオシンを精製した。HPLC による活性ピークのアミノ酸配列分析と相同性を示すバクテリオシン遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行った結果、plantaricin A, NC8 および EF の構造遺伝子を見出した。さらにプライマーウォーキングによって、PUK6 株の plantaricin 生合成関連遺伝子群 *pln* locus（約 20 kb）の塩基配列を決定した。次に、PUK6 株 *pln* locus 上の遺伝子について、相同性検索および InterPro を用いたドメイン解析を行った結果、複数の推定 plantaricin 生合成関連遺伝子を見出した。その中の推定バクテリオシン様遺伝子（*orf1* および *orf2*）の発現を RT-PCR により確認し、さらには、化学合成ペプチドを用いた抗菌活性試験により、それらを 2 分子ペプチドバクテリオシン遺伝子と同定した。

Key words bacteriocin, lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*

G3H7 (0306) HepG2 における発酵食品中 D-アミノ酸組成の抗脂肪肝効果

○佐藤友紀[1]*, 梅川結[1], 進藤昌[1]
([1]秋田県総合食品研究センター)

Anti-hepatic steatosis effect of D-amino acid composition in the fermented food.

○Tomonori Sato[1]*, Yui Umekawa[1], Sho Shindo[1]
([1] Akita Research Institute of Food & Brewing)
tomonori@arif.pref.akita.jp

通常、食品中の D-アミノ酸量は多くないが、発酵食品には D-アミノ酸が高含有されている。D-アミノ酸は食品添加物認定されていないものが多いため、D-アミノ酸を効率的に摂取する手段としては、発酵食品の摂取が有効である。他方で、最近まで D-アミノ酸の一斉分析技術が確立されていなかったこともあり、L-アミノ酸と比べて D-アミノ酸研究は遅れている。本研究では、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いて D-アミノ酸の抗脂肪肝効果を L-アミノ酸と比較して検証し、さらに生酛清酒、味噌、醤油、黒酢の D-アミノ酸組成が脂肪肝に及ぼす影響を検討した。
HepG2 細胞を脂肪酸処理して脂肪蓄積を誘導し、脂肪肝モデル化した。脂肪肝モデル化した HepG2 細胞を各 D/L-アミノ酸または発酵食品中 D-アミノ酸組成を再現した mixture で処理した。細胞内への脂肪蓄積を Oil Red O やキットで評価し、脂質蓄積抑制効果を評価した。作用機序については、RNA-seq と GO 解析で評価した。
その結果、D-アミノ酸のうち、D-Ala と D-Ser は L 体と比べて高い脂質蓄積抑制効果を有しており、作用機序についても一部示唆した。生酛清酒、味噌、醤油、黒酢の D-アミノ酸組成のうち、D-Ala を多く含む醤油と黒酢組成で優れた脂質蓄積抑制効果が見られた。
以上の結果より、D-Ala を多く含む発酵食品には抗脂肪肝効果が期待されることが細胞レベルで示唆された。

Key words D-Amino Acids, Fermented Food, Fatty Liver

G3H7 (0307) 食用担子菌発酵ダイズのポリフェノール量および抗酸化活性

○澤田雄太,福士涼介,新井博文,佐藤利次
（北見工大）

Total phenolic content and antioxidant activity of edible basidiomycete fermented soybean

○Yuta Sawda, Ryosuke Fukushi, Hirohumi Arai, Toshitsugu Sato*
(Kitami Inst. Technol)
tosisato@mail.kitami-it.ac.jp

研究背景）木材腐朽菌に属するヒラタケやシイタケなどの食用担子菌類は、食品や医薬品の原料など多様な用途に利用されている糸状菌である。また、これらの食用担子菌は木材の構成成分である高分子ポリフェノール性化合物のリグニン分解能が高く、ポリフェノール類を酸化分解、あるいは重合する活性が高いという特徴を有している。一方、ダイズは、機能性成分としてポリフェノールの一種であるイソフラボンを含む農作物であり、女性ホルモン様作用、抗酸化作用を有することから、更年期障害緩和や骨粗しょう症予防、乳癌の予防などの効果が期待されている。そこで、本研究では、食用担子菌でダイズを発酵することにより新規の生理機能性を有したポリフェノールが生成する可能性に関して検討するために、タモギタケ（*Pleurotus cornucopiae var. citrinopileatus*）とヒラタケ(*Pleurotus ostreatus*)でダイズを発酵させ、総ポリフェノール量、抗酸化活性の発酵に伴う変動に関して解析した。
方法）ダイズ 25ｇを 200ml の三角フラスコに加え、イオン交換水添加後、オートクレーブ滅菌し、タモギタケもしくはヒラタケを接種し、25℃、湿度 70%で培養し、培養 10 日目から 10 日間隔で 80 日目まで食用担子菌発酵ダイズを調製した。総ポリフェノール含量は Folin-Ciocalteu 法、抗酸化活性は DPPH ラジカル消去能および ABTS ラジカル消去能によって測定した。
結果）総ポリフェノール量は、発酵に伴って増加し、タモギタケ発酵ダイズは 40 日目、ヒラタケ発酵ダイズは 30 日目で最大となり、それぞれ未発酵ダイズの 4.3 倍、3.9 倍となった。抗酸化活性に関しても、発酵に伴って増加し、タモギタケ発酵ダイズでは DPPH ラジカル消去活性は 30 日目、ABTS ラジカル消去活性は 40 日目で最大となり、それぞれ未発酵ダイズの 6.8 倍、6.3 倍となった。ヒラタケ発酵ダイズでは DPPH ラジカル消去活性は 30 日目、ABTS ラジカル消去活性は 20 日目で最大となり、それぞれ未発酵ダイズの 2.0 倍、2.9 倍となった。以上の結果は、ダイズを食用担子菌で発酵させることにより、特にタモギタケ発酵ダイズにおいて生理機能性成分が新たに生成される可能性を示している。現在、タモギタケ発酵ダイズから機能性物質の分離、精製および同定を試みている。

Key words mushroom, soybean, antioxidant activity, polyphenol

G3H7 (0308) 米糀甘酒の血糖値上昇抑制効果

○山田南実 [1]*, 多田孝清 [2], 田川進也 [2], 北川学 [1], 倉石徹 [1], 伊藤成輝 [1]
（[1] マルコメ, [2]KRI）

Effects of Koji Amazake on suppressing elevation of blood glucose levels

○Minami Yamada[1]*, Takakiyo Tada[2], Shinya Tagawa[2], Manabu Kitagawa[1], Tooru Kuraishi[1], Seiki Itou[1]
([1]Marukome Co., Ltd., [2]KRI Inc.)
minami_yamada@marukome.co.jp

【背景】食後の高血糖は、糖尿病の原因とされ、砂糖などの糖質摂取制限をされる方が多い。近年、砂糖代わりの発酵甘味料として「糀甘酒」や「糀みつ」が使用される。糀甘酒は、米と米糀を糖化したもので、糀みつは、糀甘酒を濃縮したものである。糀甘酒の健康機能として、肌の保湿効果や疲労改善効果、整腸作用などが報告されている。更に、血糖値上昇抑制効果についても報告があるが、詳細なメカニズムについては明らかではない。
【目的】本研究では、血糖値上昇抑制効果の検証とそのメカニズムの解明を目的とした。血糖値上昇抑制のメカニズムとして、炭水化物の吸収阻害、インスリン分泌促進、細胞への糖取り込み促進が上げられる。そこで、炭水化物の吸収阻害の評価として、αアミラーゼ及びαグルコシダーゼ阻害活性の測定、インスリン分泌促進の評価として、DPPIV阻害活性の測定、細胞への糖取り込み促進の評価として、脂肪細胞を用いた糖取り込み試験と遺伝子発現解析を実施した。
【方法】サンプルは、市販の糀甘酒、市販の糀みつ、全量糀甘酒、焼酎糀甘酒、酒米糀甘酒の 5 点とした。αアミラーゼ、αグルコシダーゼ、DPPIV阻害活性の測定は、既報またはキット記載の方法に従って実施した。糖取り込み試験は、マウス 3T3-L1 細胞を D-MEM 培地で培養した。コンフルエントに到達してから 2 日後に、insulin10μg/mL 、 dexamethasone0.25mM 、 3-isobutyl-1-methylxanthine0.5mM 及び Troglitazon（陽性対照）5μM またはサンプル 120～240mg/L を添加した D-MEM 培地に交換し、2 日間培養することで、分化誘導した。この後、2 日毎に培地を交換し、培地中のグルコース濃度を測定した。遺伝子発現解析は、分化誘導後 2 日目の細胞を用いた。totalRNA を抽出し、標識サンプルを作製後、ハイブリダイゼーション及びスキャニングを実施した。
【結果】酵素阻害活性について、全てのサンプルにおいて、穏やかながらも、αアミラーゼ、αグルコシダーゼ、DPPIV阻害活性を有することを確認した。阻害率は、32～49%であった。糖取り込み試験について、市販糀甘酒、市販糀みつ、全量糀甘酒、焼酎糀甘酒を添加した細胞にて、分化誘導後 4 日目で、グルコース取り込みが亢進した。遺伝子発現解析について、市販糀甘酒または焼酎糀甘酒を添加した細胞で実施したところ、adiponectin receptor1 の遺伝子発現亢進が見られた。
【結論】糀甘酒及び米糀みつは、血糖値上昇抑制効果を持ち、そのメカニズムには、炭水化物の吸収阻害、インスリン分泌促進、細胞への糖取り込み促進が関与している可能性が示唆された。

Key words koji, amazake, blood glucose, diabetes

G3H7 (0309) エビの代謝物プロファイルとテクスチャープロファイルに影響を与える要因の調査

○島本直輝 [1], Sastia Prama Putri [12], 福崎英一郎 [123]*
（[1] 阪大院・工, [2] 大阪大学先導的学際研究機構, [3] 大阪大学島津分析イノベーション協働研究所）

Investigation of factors affecting the shrimp metabolite profile and texture attributes

○Naoki Shimamoto[1], Sastia Prama Putri [12], Eiichiro Fukusaki[123]*
([1]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., [3]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

エビは非常に腐敗しやすく，保存方法に注意を払う必要がある．また，様々な調理法が用いられる食品でもある．保存や調理といった過程でエビのテクスチャーは大きく変化し，消費者の嗜好にも影響を与えうる．料理のおいしさには様々な感覚特性が関与しており，中でもテクスチャーは最も重要な特性のうちの一つである．保存期間と調理過程において，物理的・化学的変化が起こり，成分やテクスチャーが変化する．また，この変化はエビの品種によっても異なると予想される．しかし，こういったエビの消費までの過程においてどの要因が最もエビのテクスチャーに影響を及ぼすかは不明なままである．そこで，メタボロミクスおよびテクスチャープロファイル分析を用いることを考えた．本研究の目的は，エビのテクスチャーに影響を与える要因を調査するための初段階として，品種，保存条件，調理過程が異なるエビの代謝物プロファイルとテクスチャープロファイルを比較し，それぞれに対し最も影響を及ぼす要因を明らかにすることとした．

Key words metabolomics, shrimp, texture profile analysis, GC/MS

G3H7 (0310) 焙煎豆と抽出コーヒーのメタボローム解析に基づくスペシャルティコーヒーの品質に関与する化合物の調査

○竹上哲司 [1], Sastia Prama Putri [12], 福崎英一郎 [123]*
（[1] 阪大院・工, [2] 大阪大学先導的学際研究機構, [3] 大阪大学島津分析イノベーション協働研究所）

Investigation of key compounds for specialty coffee quality using roasted beans and brewed coffee by metabolomics approach

○Tetsuji Takegami[1], Sastia Prama Putri [12], Eiichiro Fukusaki[123]*
([1]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., [3]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

スペシャルティコーヒーとは，資格を持つ専門家による官能評価により，100 点満点中 80 点以上の得点が付けられて品質が定められたコーヒーである．コーヒーの品質を決める味や香りは，コーヒーに含まれている成分が関係していると考えられており，これまでにスペシャルティコーヒーの生豆や焙煎豆を用いてコーヒーの品質に関与する化合物が調査されてきた．しかしながら，官能評価に最も近い状態である抽出コーヒーを用いた研究は少ない．そこで本研究では，スペシャルティコーヒーの焙煎豆だけでなく抽出コーヒーにも注目した．コーヒーに含まれる成分の分析にはメタボロミクスを用いた手法が適しており，得られた代謝物プロファイルと官能評価得点を組み合わせて解析を行うことを考えた．したがって本研究の目的は，メタボロミクスの手法を用いて，焙煎豆と抽出コーヒーのそれぞれの代謝物プロファイルからスペシャルティコーヒーの品質に関与する化合物を調査し，その結果を比較することとした．

Key words metabolomics, specialty coffee, GC/MS

G3H7 (0311) Metabolic visualization reveals the distinct distribution of sugars and amino acids in rice *koji*

○Adinda Putri Wisman[1], Yoshihiro Tamada[2], Shuji Hirohata[2], Eiichiro Fukusaki[1,3,4], Shuichi Shimma[1,3,4*]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., Japan, [2]Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd., [3]Industrial Biotechnology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., Japan, [4]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka Univ., Japan)

Metabolic visualization reveals the distinct distribution of sugars and amino acids in rice *koji*

○Adinda Putri Wisman[1], Yoshihiro Tamada[2], Shuji Hirohata[2], Eiichiro Fukusaki[1,3,4], Shuichi Shimma[1,3,4*]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., Japan, [2]Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd., [3]Industrial Biotechnology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., Japan, [4]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka Univ., Japan)
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Rice *koji* is considered as an essential material in the world of *sake* brewing. As such, many research has been conducted to investigate the content of rice *koji* and the factors affecting it. While increase of sugars, sugar alcohols and amino acids were observed in previous studies, many aspects are still not well understood. Observing the spatial distribution of metabolites may provide another perspective to generate new hypothesis related to the rice *koji*-making process. This study investigated the spatial distribution of sugars, sugar alcohols and amino acids inside rice *koji* by performing mass spectrometry imaging analysis.
Most of the detected sugars showed an even distribution in rice *koji*. Exception can be seen for erythritol and arabitol/xylitol, which were accumulated around the surface of rice *koji*. Detected amino acid peaks also differed into two patterns; either evenly distributed inside or accumulated on the surface. These results revealed unique spatial distribution depending on the metabolites observed, a new finding that could not be obtained using conventional methods. Furthermore, the distribution profile seemed to be related to the different structure of rice *koji*. The fresh perspective provided by the imaging results opened new ways to understand the processes happening during rice *koji*-making process.

Key words rice *koji*, mass spectrometry imaging, amino acids, sugars

G3H7 (0312) ノンターゲットメタボロミクスを用いた，テンペの保存状態の評価

○環宏太朗 [1], Sastia Prama Putri [12], 福崎英一郎 [123] *
([1] 阪大院・工, [2] 大阪大学先導的学際研究機構, [3] 大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)

Evaluating tempe storage condition through untargeted metabolomics

○Kotaro Tamaki[1], Sastia Prama Putri [12], Eiichiro Fukusaki[123]*
([1]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., [3]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

テンペはインドネシア発祥の発酵大豆食品である．テンペは栄養価が高く，たんぱく質を多く含んでいる．そのため，世界中のヴィーガンやベジタリアンを中心に，肉類の代替食品として注目されている．テンペは多くの国で食べられているが，国によって消費量が異なるため，消費されるまでの保存方法も異なる．消費量が多い国では，購入後すぐに消費されるため，テンペは常温で保存され販売されている．一方，消費量が少ない国では，注文が入るまで一般的にテンペは冷凍庫で保存される．注文が入ると，冷凍車等を使って消費者に届けられることが多い．それぞれの国によって保存方法が異なるにもかかわらず，テンペの保存状態に対する詳細な研究例は少ない．食品の状態により，食品中の代謝物(アミノ酸，糖等)が変化するため，保存状態を評価するためには代謝物の変化が重要である．メタボロミクスは，成分を包括的に分析するための優れたツールであり，他の食品の保存状態の評価にも用いられている．そのため，メタボロミクスを用いてテンペの保存状態による違いを評価することで，テンペの保存方法の最適化に貢献することが可能となる．そこで本研究では大豆・水・テンペスターターからテンペを作成し，異なる温度（25 ℃，4 ℃，−18 ℃，−30 ℃）で最長 4 週間保存した．それぞれ 1 週間毎にサンプリングを行い，そのサンプルをガスクロマトグラフィー/質量分析計(GC/MS) 分析により調査した．結果として，この 4 つの保存条件のうちテンペの代謝物を変化させずに保存するために最も適した温度は-30 ℃であることが判明した．

Key words metabolomics, tempe, storage condition, GC/MS

G3H7 (0313) 好熱菌発酵産物給与による養殖魚サクラマスのプロテオーム解析

○碓井茉依 [1], 佐野広明 [2], 西内巧 [3], 宮本浩邦 [1,4,5,6], 児玉浩明 [1*]
([1] 千葉大院・園芸, [2] マルハニチロ, [3] 金沢大・研究基盤, [4] 日環科学, [5] サーマス, [6] 理研生命医科学)

Proteome analysis of farmed fish *Oncorhynchus masou* by feeding thermophile-fermented products

○Mai Usui [1], Hiroaki Sano [2], Takumi Nishiuchi [3], Hirokuni Miyamoto [1,4,5,6], Hiroaki Kodama [1*]
([1] Grad. Horticul., Chiba Univ., [2] Maruhanichiro, [3] Inst., Kanzawa Univ., [4] Japan Eco-science, [5] Sermas, [6] IMS,RIKEN)
kodama@faculty.chiba-u.jp

未利用の海産資源を高温・好気条件下で発酵させて得られる好熱菌発酵産物（以下、発酵産物）を家畜や養殖魚に給与すると、成長促進、筋肉中の脂肪量の減少、死亡率の低下などの効果が確認されている。また発酵産物から単離された *Bacillus hisashii* をブタに給与すると、発酵産物と同様な生産性の向上が観察される。そこで、本研究では、魚の生産性や品質に与える分子機序の一端を明らかにするために、モデル養殖魚としてサクラマスを用いて発酵産物給与試験を実施し、肉質に与える影響をプロテオーム解析によって評価した。専用水槽内で 80 日間、*B. hisashii* を加えた発酵産物(10^4 cfu / g)を含有した飼料を給与した結果、魚体の増体率は順調に推移した。そこで可食部である遅筋を対象として検出された分子群をプロファイリングした結果、非給与群と比較して、perilipin タンパク質が減少することが明らかとなった。perilipin は脂肪細胞の脂肪滴に局在するタンパク質であり、perilipin に囲まれた脂肪滴は分解が抑制されることが知られている。興味深いことに、*B. hisashii* を給与したブタにおいても perilipin タンパク質の減少が確認されている。したがって今回、魚の遅筋で観察された perilipin の減少は、発酵産物中に含有する *B. hisashii* の影響であり、動物種を超えた脂肪代謝の分子機序の一端に作用している可能性があることが示唆された。

Key words *Oncorhynchus masou*, compost , perilipin

G3H7 (0314) 白カビ熟成チーズの細菌相と成分の相関と非スターター菌種の風味形成能の検証

○海野良輔 [1], 大崎友美加 [1], 松谷峰之介 [2], 鈴木敏弘 [1], 石川森夫 [1*]
([1] 東農大院・応生科, [2] 東農大・ゲノムセ)

Correlation between bacterial communities and metabolites using omics-approach in surface ripened cheese and verification of the flavor forming capability of non-starter bacterial isolates

○Ryosuke Unno[1], Yumika Osaki[1], Minenosuke Matsutani[2], Toshihiro Suzuki[1], Morio Ishikawa[1*]
([1]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]NODAI Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric.)
m1ishika@nodai.ac.jp

【背景と目的】白カビ熟成チーズは表面が白カビに覆われたチーズである．一般的な製法としては，スターター乳酸菌を人為的に添加して乳の凝固を促し，成形後，風味や状貌を形成させるために白カビを噴霧・繁殖させ熟成させる．この工程では，白カビだけでなく，多様な細菌 (非スターター菌種) が自然発生的に増殖することが知られており，チーズの特徴的な風味の形成に関与していると考えられている．そのため，同系統のチーズであっても，原産国や製造社の違いにより，それぞれの細菌相やチーズを特徴付ける成分の構成は異なる．しかし，細菌相や成分の複雑さ故に，熟成中に増殖する細菌がどのような成分の生成に関与しているかについては未解明の点が残されている．そこで，本研究では白カビ熟成チーズの細菌と風味の関連をメタゲノム解析とメタボローム解析により明らかにし，得られた相関関係について，分離株を用い実証を試みた．
【方法と結果】国産とフランス産の白カビ熟成チーズを対象に，Illumina Miseq による細菌相解析を行ったところ，乳酸菌だけでなく，*Actinobacteria* 門や *Proteobacteria* 門の細菌が高い占有率を示し，原産国に依らず，個々のチーズで特有の細菌相を形成することが明らかになった．さらに，HS-GC/MS による成分分析を行い，細菌と香気成分の相関関係を検証したところ，*Actinobacteria* 門や *Proteobacteria* 門の細菌がケトン類や硫黄化合物などと有意な相関を示した．これらの関連について詳細に検証するため，チーズ成分と相関が見られた非スターター菌種を標的に国産熟成チーズから単離を行い，それらをチーズに接種し模擬的な熟成を行った．その結果，*Actinobacteria* 門や *Proteobacteria* 門を接種したチーズにおいて，2-ブタノンやジメチルジスルフィドなどの成分が検出され，白カビ熟成チーズで見られたケトン類や硫黄化合物との相関傾向と一致した．特に *Proteobacteria* 門の *Pseudoalteromonas prydzensis*, *Psychrobacter alimentarius* はチーズ中で他の細菌よりも多様な香気成分を生成した．以上より，乳酸菌だけでなく，熟成中に増殖する *Actinobacteria* 門や *Proteobacteria* 門の非スターター菌種がチーズの風味生成に関与し，チーズの特徴形成に重要であることが示唆された．

Key words cheese, non-starter bacteria, flavor formation, omics analysis

G3H7 (0315)

Investigating the effect of adding Soy Hull to *Tempe*, an Indonesian fermented food

○Hadi Akbar Dahlan[1], Sastia Prama Putri[12], Eiichiro Fukusaki[123*]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., Japan, [2]Industrial Biotechnology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., Japan, [3]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka Univ.,Japan)

Investigating the effect of adding Soy Hull to *Tempe*, an Indonesian fermented food

○Hadi Akbar Dahlan[1], Sastia Prama Putri[12], Eiichiro Fukusaki[123*]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., Japan, [2]Industrial Biotechnology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., Japan, [3]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka Univ.,Japan)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Tempe is a solid-state fermented soybean food that is famous for its ability to provide complete amino acid nutrition at a low cost. *Tempe* is usually produced with dehulled soybeans, and the removed soy hull is commonly discarded. In the agriculture industry, soy hull had been found to be nutritious for ruminant livestock. Ruminant microflora can ferment soy hull to produce more microbial proteins to be utilized as nutrients. As such, discarded soy hull had been reprocessed into ruminant feed. Based on the idea, it is possible that adding soy hulls into soybeans prior to *tempe* fermentation could modify the *tempe* metabolite profile. In this study, we investigate the metabolite profiles of wet and dried soy hulls. We also discuss the metabolite profiles differences between soy hull and soybeans. Lastly, we analyzed the metabolites of *tempe* with added soy hull. Our results show that adding soy hulls to *tempe* does not improve the metabolite profile of the *tempe*. The discussion and results of the study would be an interest to researchers contemplating utilizing soy hull as food additives.

Key word: *tempe,* metabolomics, soy hull, physical characteristics

人名索引

A

Adams Eri S3H2-1503
Aditiawati Pingkan G3H6-0303
Akhmaloka G2H3-0104
Alawi Aseel G3H2-0210, G3H2-0211
Altaib Hend G2H5-0106
Amalia Fitri G3H6-0303
Anand Ajeeta G2H7-0106
Anju Pilakka Veedu G3H1-0207
Aoyagi Hideki G2H7-0106, G3H3-0209, G3H4-0203
Araki Kiwako S. G3H2-0113
Astawan Made G3H6-0302
Atomi Haruyuki G3H3-0114
Aunilla Tissa G3H6-0307
Azuma Kento G3H1-0213

B

Badr Yassien G2H5-0106
Bhatnagar Sharad G3H3-0209, G3H4-0203
Boonyakida Jirayu G3H5-0112
Budhijanto Wiratni G3H1-0304

C

Cai Hao-Liang G2H6-0105
Chen Ke G3H5-0109
Chen Yamin G2H1-0306
Chen Yujia G3H2-0207
Choi Jeong-Woo S2H6-1201
Choi Jonghoon S2H6-1207
Choi Yong Keun G3H2-0108
Choi Yonghyun S2H6-1207
Choi Yong-Keun G3H1-0311
Choi Youn Hee S2H6-1204
Christopher Johnavricka Jr. G3H6-0204

D

D.Prijambada Irfan G3H1-0304
Dahlan Hadi Akbar G3H7-0315
Dai Yancen G3H4-0311
Dissook Sivamoke G3H6-0310
Doi Ryohei G2H6-0105

E

El-Nouby Mahmoud A. M. G2H5-0106

F

Fardous Jannatul G2H7-0107
Fujiwara Tsuyoshi G3H3-0114
Fujiyama Kazuhito G2H6-0315
Fukui Toshiaki G3H6-0207
Fukusaki Eiichiro G3H6-0301, G3H6-0302, G3H6-0303, G3H6-0306, G3H6-0307, G3H6-0310, G3H7-0311, G3H7-0315

G

Gangganboina Akhilesh B. G2H4-0311
Gazi Sakir Hossain G3H6-0204
Groeger Harald G3H5-0109

H

Hachisuka Shin-ichi G3H3-0114
Hamdy Sherif Ahmed Muhammed Ahmed G2H5-0311
Hanifah Abu G3H6-0307
Hayakawa Takashi G2H6-0105
Hayata Koki G3H4-0304
Hiranya Nawarathna G3H1-0206
Hirohata Shuji G3H7-0311
Honda Kohsuke G2H6-0206

I

Ingram Aaron G3H5-0109
Islam Zakirul G3H2-0113
Ito Yuji G3H4-0304
Iwatani Tomoka G2H6-0206
Izutani Atsushi G3H4-0311

J

Jang Jae-Hyung S2H6-1205
Jia Beixi G2H6-0306
Jin Jian-Qiang G3H3-0114
Jo Jeong Wook G3H1-0311, G3H2-0108
Jung Dawoon S3H2-1603

K

Kajiura Hiroyuki G2H6-0315
Kamihira Masamichi G2H7-0203
Katayama Takuya G2H1-0303
Kawabe Yoshinori G2H7-0203
Kerb Anastasia G3H5-0103
Khin Thandar G3H2-0212
Khoris Indra M. G2H4-0311
Kim Hyung Joo G3H1-0311, G3H2-0108
Kisailus David G3H6-0309
Kishi Hidekazu G3H5-0206
Kitaguchi Tetsuya G3H4-0311
Kitamoto Katsuhiko G2H1-0303
Kitani Shigeru G2H6-0206, G3H6-0310
Koga Yuichi G3H5-0206
Kojima Takaaki G2H1-0303, G2H6-0306
Kozakai Tomoya G2H5-0106
Krebs Anastasia G2H3-0104
Kubo Motoki G3H2-0113
Kuragano Masahiro G3H1-0213
Kuzuyama Tomohisa G3H6-0310

L

Lan John Chi-Wei S2H6-1202
Le Pioufle Bruno S2H6-1206
Lee Ju Yeon G3H1-0311, G3H2-0108
Lin Xuguang G3H1-0213
Lin Yu-Sheng S2H6-1206
Ling Hua G3H6-0204
Liu Zhiyuan G3H1-0305, G3H2-0207

M

Malikul Ikram Muhammad Maulana G3H6-0301
Marbelia Lisendra G3H1-0304
Mareschal Robin G3H3-0113
Maruf Ilma Fauziah G2H3-0104
Maruyama Jun-ichi G2H1-0303
Matsumoto Mizuki G3H2-0211
Matsuzaki Shinji G3H1-0213
Matthew Wook Chang G3H6-0204
Mellyanawaty Melly G3H1-0304
Minagawa Haruka G2H1-0303
Ming Jie G3H1-0305
Ming-Cheh Liu G3H5-0107
Misaki Ryo G2H6-0315
Mizuno Reo G3H6-0301
MO Brian King Himm G2H5-0105

N

Nagao Masahide G3H5-0206
Nakagawa Tomoyuki G2H6-0105
Nakajima-Kambe Toshiaki G3H2-0211
Nakakoji Sumire G3H1-0304
Nakano Hideo G2H1-0303, G2H6-0306
Nakao Hazuki G2H5-0106
Nakayama Hideki G3H2-0304
Narita Takuma G3H2-0211
Nguyen Bich Thao G3H5-0202, G3H5-0203
Nguyen Dua G2H6-0315
Nieber Jochen G2H3-0104
Ninomiya Kazuaki G3H3-0206
Nomura Izumi G2H5-0106
Nuanaon Nobchulee G3H3-0209

O

Ogawa Masahiro G2H1-0303
Oh Kyung Bin G3H1-0311, G3H2-0108
Oka Hiroya G2H1-0303
Okano Kenji G2H6-0206
Okochi Mina S2H6-1208
Omasa Takeshi G3H5-0206
Ononugbo Chukwuebuka Maxwell G3H5-0206
Orita Izumi G3H6-0207
Osako Nana G3H4-0304

P

Pambudi Sabar G3H5-0304
Park Enoch Y. G2H4-0311, G3H5-0112, G3H5-0304
Parra Gabriel G3H4-0108
Peddha Muthukumar Serva G2H7-0106
Perez Charose G2H5-0203
Perez Rodney Honrada G2H6-0305
Perez Rodney A3H7-0001
Prihardi Kahar G2H2-0301, G3H3-0101
Putri Safira Latifa Erlangga G3H6-0306
Putri Sastia G3H6-0310
Putri Sastia Prama G3H6-0209, G3H7-0309, G3H6-0301, G3H6-0302, G3H6-0303, G3H6-0306, G3H6-0307, G3H7-0315

R

Rafique Md Abdur G3H4-0304
Rahmawati Della G3H6-0302
Ren Huan G3H3-0206
Restiawaty Elvi G2H3-0104

S

Samy Andrew G2H7-0302
Sarto G3H1-0304
Sastia Prama Putri G3H7-0310, G3H7-0312
Sato Takaaki G3H3-0114
Setyo Utomo Doddy Irawan G3H5-0112
Shimada Masaya G2H6-0105
Shimamoto Ryosuke G3H4-0304
Shimizu Rie G3H6-0207
Shimma Shuichi G3H7-0311
Situmorang Magdelena Lenny G3H6-0306
Song Hak Jin G3H1-0311, G3H2-0108
Souvervielle Manuel G2H2-0311
Suantika Gede G3H6-0306
Subagyo Dyah Candra Hapsari G3H6-0207
Sukwattananipaat Puriwat G3H3-0309
Sulaiman Sintawee G3H5-0208
Sun Xueyan G2H1-0303
Suryatin Alim Gladwin G2H6-0206
Suzuki Tohru G2H5-0106

T

Takagi Masahiro S2H6-1203
Tamada Yoshihiro G3H7-0311
Tatara Masahiro G3H1-0304
Teranishi Kosuke G3H4-0304
Theeragool Gunjana S3H3-1702
Thinh Tran Quoc G3H2-0113
Tokuraku Kiyotaka G3H1-0213
Tran Quoc Thin G3H2-0111
Tran Quoc Thinh G3H1-0203, G3H1-0204, G3H1-0205, G3H1-0307, G3H2-0110, G3H2-0112
Tusher Tanmoy Roy G3H1-0209

U

Ueda Hiroshi G3H4-0311
Ueno Yoshiyuki G3H1-0304
Utada Andrew G3H2-0109
Utada Andrew Shinichi G3H4-0101
Utomo Doddy Irawan Setyo G3H5-0304
Uwai Koji G3H1-0213

W

Wang Hsiang-Yu S2H6-1206
Wendisch Volker G3H5-0103
Wisman Adinda Putri G3H7-0311
Wu Chih Chan G2H6-0309

X

Xu Jian G3H5-0112

Y

Yamanaka Shinya G3H1-0213
Yamano-Adachi Noriko G3H5-0206
Yanase Emiko G2H5-0106
Yang Yingnan G3H1-0305, G3H2-0207
Yasuda Takanobu G3H4-0311
Yusianto G3H6-0303

Z

Zhang Cheng G3H1-0305
Zhang Min G3H1-0302
Zheng Feiyang G2H7-0203
Zhu Na G3H1-0213
Zhu Yunxin G3H1-0305, G3H2-0207
Zinn Manfred G3H3-0113
Zou Ziyan G3H2-0304

あ

相澤 康則 S1H2-0204
相原 惇也 G2H2-0203
青井 議輝 G2H5-0108, G2H5-0204, G2H6-0110, G2H6-0111, S3H2-1603
葵 理恵 G2H3-0206
青木 慎一 S2H1-0701
青木 元秀 G3H4-0110
青木 雄太 G3H6-0304
青木 航 G3H4-0312, G3H4-0313, G3H6-0210
青野 重利 G3H5-0109
青柳 秀紀 G3H3-0102, G3H3-0107, G3H3-0108, G3H3-0109, G3H3-0202, G3H3-0203, G3H3-0204, G3H3-0208, G3H3-0210, G3H3-0212, G3H3-0302
青柳 裕之 S2H1-0701
赤井 元気 G2H4-0201
赤尾 健 G2H3-0303
赤坂 直紀 G2H4-0212, G2H4-0213
赤田 倫治 G2H2-0203, G2H2-0302, G2H2-0307
秋 庸裕 G2H5-0203, G2H6-0110, G3H2-0307, G3H4-0204, G3H6-0311
秋葉 奏汰 G3H4-0103
秋本 誠志 G2H3-0304
秋本 千春 G3H3-0208
秋山 立幹 G2H2-0210
秋山 裕和 G2H7-0207, G2H7-0213, G2H7-0304
秋山 正行 S3H1-1302
阿座上 弘行 G2H1-0204
朝田 良子 G2H4-0313
浅野 輝 G2H6-0312
浅野 泰久 G3H5-0109
芦沢 紬希 G3H3-0107
網代 広治 G3H4-0205
東 春奈 G3H7-0301
東 雅之 G2H5-0109, G2H5-0110, G2H5-0306, G2H6-0307, G2H6-0308, G3H4-0108, G3H4-0109
畔上 純也 G2H5-0101
足立 光 G3H2-0311
新 勇介 G3H4-0308
跡見 晴幸 G2H3-0106
穴井 豊昭 G3H3-0207
阿野 貴司 G2H2-0308, G2H2-0309, G3H1-0312, G3H2-0312
アブドゥール ラフィーク G3H4-0303
油井 信弘 G3H2-0201, G3H2-0202, G3H2-0203
油谷 幸代 G2H6-0205
油屋 駿介 G3H6-0210

阿部　勝正 G3H3-0103
阿部　敬悦 G3H4-0105, G3H5-0210, G3H5-0212
阿部　慈旺里 G2H1-0209
阿部　汐里 G2H2-0207, G3H2-0305
阿部　雅司 G2H4-0302
阿部　優依奈 G2H6-0107
天野　敦雄 G3H6-0304
天野　光喜 G3H2-0103, G3H2-0104
天羽　宏枝 G3H4-0210, G3H4-0211, G3H4-0212
荒　学志 G2H6-0205
荒井　修造 G3H3-0113
新井　博文 G3H7-0307
新井　博之 S3H2-1504
新垣　篤史 G3H6-0201
荒木　希和子 G3H1-0203, G3H1-0204, G3H1-0205, G3H1-0307, G3H2-0110, G3H2-0111, G3H2-0112
荒木　幸次 G2H2-0307
荒木　道備 G2H5-0309
荒木　秀雄 G2H6-0205
荒木　英樹 S1H3-0402
荒木　勇登 G2H6-0111
荒瀬　雄也 G3H7-0212
有川　浩司 G2H1-0304, G2H3-0301
有川　尚志 G2H2-0306
有澤　美枝子 G2H7-0202
有路　友一 G3H1-0315
有田　誠 G3H6-0308
有馬　二朗 G3H5-0204
有吉　真知子 S1H3-0402
アンカン　ダッタ チョードリー G2H4-0306
安藤　晃規 G2H5-0105
安藤　翔太 G3H2-0301
安藤　太助 G3H6-0112
安藤　優 G3H4-0310
安藤　友理 G2H4-0109

い

飯島　信司 G2H7-0306
飯塚　哲也 G3H1-0310
飯田　順子 G3H7-0215
飯田　泰広 G3H5-0106
飯田　亮平 G2H1-0204
飯塚　晃 S1H2-0304
飯森　俊文 G3H5-0205
庵原　啓司 G2H1-0207
五十嵐　圭日子 S2H2-0901
生田　宗一郎 G2H3-0201
生田　昴 G2H4-0312
井口　亮 G2H4-0102
井口　貴博 G2H5-0111
池　道彦 G3H1-0214, G3H1-0309
池添　浩輝 G2H4-0101
池田　彩 G2H6-0302
池田　歩 G2H5-0307
池田　和貴 G3H6-0308
池田　卓史 G2H1-0209
池田　丈 G2H4-0204, G3H4-0207, G3H4-0208, G3H4-0209, G3H5-0207
池田　萌 G3H7-0214
池田　麗 G3H2-0103
池原　万由 G2H3-0306
池本　裕之 G2H5-0105
井沢　真吾 G2H2-0304, G3H7-0202
石井　香菜子 G3H1-0202
石井　純 G2H5-0205, G2H6-0204, G3H5-0302, G3H6-0205
石井　伸佳 G2H5-0111
石井　正治 S3H2-1504
石井　義孝 G2H4-0113
石垣　元務 G3H4-0204
石川　論史 S2H2-0904
石川　聖人 G2H2-0204
石川　森夫 S3H3-1702, G3H7-0314
石倉　優大 G3H2-0201
石崎　裕也 G3H5-0210, G3H5-0212
石澤　秀紘 G3H2-0103, G3H2-0104
石塚　千晃 S2H2-0903
石田　葵 G2H3-0101
石田　丈典 G3H4-0207, G3H4-0208, G3H4-0209, G3H5-0207
石田　千晴 G3H5-0201
石田　亘広 G3H1-0310
石塚　寛子 G2H3-0206
井嶋　博之 G2H7-0107, G3H4-0111
石丸　隆行 G2H1-0204
石丸　裕也 G3H6-0107
石丸　泰寛 G2H7-0202
石本　弥子 G3H3-0204
石谷　孔司 G2H6-0205
磯貝　章太 G3H6-0105
磯﨑　勇志 G3H4-0302, G3H4-0305
磯野　拓也 G3H5-0313
磯部　紀之 G3H1-0210
礒辺　真人 G3H5-0211
井田　大輝 G3H5-0212
板倉　真優 G3H6-0110
板谷　かえで G2H3-0207
市川　夏子 S2H2-0804
市川　暉 G3H4-0105
一色　衣香 G2H5-0212
井手　圭吾 G3H1-0314, G3H3-0207
井出本　貴宏 G3H1-0302
伊藤　一成 G3H7-0303
伊藤　喜龍 G3H1-0301
伊東　謙吾 G3H2-0315
伊東　昂希 G2H4-0107
伊藤　孝祐 G3H6-0309
伊藤　耕三 S3H3-1802
伊東　昇紀 G2H3-0203
伊藤　成輝 G3H7-0308
伊藤　創平 G2H3-0103, G2H5-0305, G3H4-0301, G3H5-0113, G3H5-0201, G3H5-0301, G3H5-0302
伊藤　大知 G2H7-0101, G3H4-0112
伊藤　隆徳 G3H4-0112
伊藤　貴文 G2H4-0101
伊藤　伸哉 G3H5-0111
伊藤　美紀 G3H6-0106
伊藤　優花 G3H4-0210
伊藤　優吾 G3H1-0211
伊東　祐二 G3H4-0303
伊藤　玲奈 G3H4-0307
糸川　未来 G2H5-0105
稲垣　賢二 G2H4-0112, G2H4-0201, G3H6-0309
稲福　隆之 G2H4-0211
乾　将行 G2H5-0207, G3H6-0111
猪野　椋太 G3H1-0212
井家　益和 S1H2-0304
井上　暁人 G3H4-0309
井上　瑛介 G2H2-0305
井上　謙吾 S2H1-0603
井上　茂樹 G2H3-0107
井上　大介 G3H1-0214, G3H1-0309
井上　千弘 G3H1-0208, G3H1-0209
井上　真緒 G2H5-0301
井上　雄太 G2H7-0107
井上　崚雅 G3H6-0103
猪熊　健太郎 G3H6-0104
猪嶋　理登 G3H3-0308
猪又　俊輔 G2H1-0206
猪股　亮佑 G2H7-0308
井原　邦夫 G2H1-0302
伊原　正喜 G3H3-0205
今井　友也 S3H3-1704, G3H5-0313
今井　祐太 G2H7-0208
今久保　友則 G3H2-0309
今田　勝巳 G2H4-0201
今中　忠行 G2H1-0306
今村　健志 S3H1-1401
井村　和茉 G3H2-0215
巖　流征 G2H7-0309
岩河　佑平 G2H6-0312
岩木　宏明 G3H5-0104
岩﨑　清隆 G2H7-0305
岩崎　祐樹 G2H5-0204
岩下　真子 G3H2-0315
岩田　寛 G3H4-0206
岩藤　秀直 G2H4-0208
岩橋　暁成 G3H2-0204
岩橋　均 G3H1-0315
岩本　悟志 G2H6-0106

う

宇井　伸一 S1H1-0101
上垣　浩一 G3H7-0209
植木　瞭生 G2H7-0104
上里　新一 G2H5-0312
上杉　尚輝 G3H5-0103
上田　啓次 G2H6-0313, G2H6-0314

上田　大次郎　G2H5-0301
上田　太郎　G2H7-0311
上田　宏　G3H4-0309
植田　充美　G3H4-0312, G3H4-0313, G3H6-0210
上田　悠加　G2H4-0201
上田　優弥　G3H1-0309
上地　敬子　G2H4-0211, G3H7-0213
上地　珠代　G3H5-0107
上野　航一郎　G2H6-0208
植野　嘉文　G2H3-0304
上原　悠太郎　G3H2-0106
上間　長亮　S1H3-0506
上村　真理子　G2H3-0113
魚住　信之　G2H7-0202
宇佐美　徹　G2H5-0303
碓井　茉依　G3H7-0313
臼倉　雄紀　G2H6-0311
臼田　隆亮　G2H2-0211, G2H2-0212, G2H3-0307
内ヶ崎　啓　G3H6-0112
内倉　寛斗　G2H6-0109
内田　和希　G3H5-0311
内田　寛大　G3H1-0309
内田　幸希　G2H7-0311, G2H7-0312
内田　達也　G3H4-0110
内堀　孝博　G3H1-0306
内山　駿　G2H5-0311
鵜頭　理恵　G3H3-0310
鵜殿　彩　G3H1-0306
宇野　晴香　G2H4-0310
馬倉　朋奈　G2H6-0102
梅川　碧里　G3H2-0213
梅川　結　G3H7-0306
梅木　智哉　G2H3-0113
梅津　光央　G3H4-0310
梅野　太輔　G2H5-0308, G2H5-0309, G3H5-0312
梅林　勇気　G2H2-0207
梅原　嘉宏　G3H3-0108
梅村　知也　G3H4-0110
浦瀬　太郎　G3H2-0107
上井　幸司　G3H5-0205
海野　伊吹　G2H3-0103
海野　良輔　G3H7-0314

え

江口　諒　G2H4-0302
江澤　理徳　G3H5-0213
榎本　亜希代　G2H5-0112
榎本　利彦　G3H7-0206
江邉　正平　G3H1-0312, G3H2-0312
遠藤　輪　G3H3-0108

お

老川　典夫　G2H5-0302
近江　翼　G3H4-0202
大井　俊彦　G3H3-0113
大池　敬子　G3H5-0109
大池　達矢　G3H1-0312, G3H2-0312
大垣内　誠　G3H2-0314
大川　敦司　G2H4-0112
大川　将志　G2H7-0101
大木　悠一朗　G3H4-0112
大久保　愛理　G3H2-0212
大久保　詠一郎　G3H5-0303
大熊　盛也　G2H2-0205
大河内　美奈　A1H1-0004
大越　健嗣　G3H6-0309
大崎　友美加　G3H7-0314
大迫　奈菜　G3H4-0303
大澤　亮　G3H3-0105
大島　健司　G3H6-0211
大島　敏久　G2H4-0103, G2H4-0206
大城　隆　G2H2-0206
大隅　早紀　G2H7-0304
太田　勝巳　G2H6-0210
太田　勝己　G3H3-0213
太田　誠一　G2H7-0101
太田　大策　G3H6-0208
大田　悠里　G3H3-0106, G2H2-0202
大滝　世和　G3H1-0212
大嶽　七菜　G3H5-0305
大谷　里菜　G3H7-0209
大塚　輝　G3H7-0205
大塚　光雄　G3H2-0212
大土井　律之　G3H7-0212
大西　徹　G3H7-0209
大西　康夫　G2H6-0104
大貫　喜嗣　G2H7-0211
大野　莉歩　G2H7-0206
大場　健司　G3H7-0212
大橋　博之　G3H6-0108
大橋　正孝　G3H6-0105, G3H7-0209
大畑　駿一郎　G2H2-0308
大畠　雅也　G3H5-0303
大浜　友子　S1H3-0404
大林　洋貴　G3H5-0311
大堀　沙貴子　G2H3-0110
大前　貴裕　G3H2-0105, G3H2-0301, G3H2-0302
大政　健史　G2H3-0210, G2H3-0212, G2H7-0302, G2H7-0303, G3H3-0309, G3H5-0202, G3H5-0203, G3H5-0208
大本　貴士　G3H6-0108
大谷　亨　G2H7-0111
大藪　隆樹　G3H3-0211
大山　遥行　G3H3-0303
岡　大椰　G2H1-0302, G2H3-0302
岡　睦基　G3H5-0313
岡崎　進　G3H5-0110
岡﨑　文美　G3H2-0213, G3H5-0101
岡澤　敦司　G3H6-0208
岡澤　歩夢　G3H4-0306
小笠原　隆広　S1H2-0304
小笠原　豪　G3H2-0306
小笠原　渉　G2H6-0205
岡島　孝雄　G2H1-0201
岡田　航輝　G3H6-0309
岡田　拓也　S1H2-0304
岡南　政宏　G2H2-0308, G2H2-0309, G3H1-0312, G3H2-0312
岡野　憲司　G2H3-0104, G3H5-0103, G3H6-0206
岡橋　伸幸　G2H3-0310, G2H3-0311, G2H6-0207, G2H6-0211, G3H6-0202, G3H6-0203, G3H6-0205, G3H6-0308, G3H7-0215
岡部　弘基　S2H3-1004
岡部　拓真　G2H3-0206
岡部　麻織　G3H3-0109
岡村　好子　G2H1-0211, G2H5-0203, G3H1-0215, G3H2-0306, G3H2-0307, G3H6-0311
岡本　沙樹　G3H6-0110
岡本　裕也　G3H3-0312
小川　順　G2H5-0105
小川　翔大　G2H3-0202
荻野　千秋　G2H2-0301, G2H6-0104, G2H6-0210, G2H7-0111, G2H7-0112, G3H3-0101, G3H3-0213, G3H4-0104
沖野　智也　G3H3-0112
荻野　博康　G3H3-0303
荻原　淳　G2H6-0101
奥嵜　雄也　S1H2-0302, G2H7-0306
奥田　源己　G3H4-0204
奥田　知生　G2H5-0105
奥田　菜月　G3H5-0107
奥田　将生　S1H3-0401
奥田　理央　G3H4-0307
奥津　果優　G3H7-0214, G3H7-0302
奥野　琴音　G2H5-0301
奥浜　真乃助　G3H6-0204
奥村　鈴音　G3H3-0307
小倉　泰郎　G3H7-0215
小椋　義俊　G3H6-0305
小黒　芳史　G3H7-0206
刑部　敬史　G2H1-0309
刑部　祐里子　G2H1-0309
尾崎　伸紘　G3H7-0206
小笹　彰宏　G2H4-0101
長田　裕之　S3H2-1601
小山内　崇　G2H3-0203, G2H4-0209, G2H6-0112, G3H4-0106
小澤　七海　G3H3-0304, G3H3-0305
尾島　匠　G2H5-0308
尾島　由紘　G2H5-0109, G2H5-0110, G2H5-0306, G2H6-0307, G2H6-0308, G3H4-0108, G3H4-0109
尾関　健二　G3H7-0304
小田　忍　G3H3-0111
小田　龍佑　G2H4-0104
小鷹　健太　G3H3-0210

尾高　雅文　G2H4-0110, G2H4-0208, G3H2-0114, G3H5-0105, G3H5-0209, G3H5-0213, G3H5-0303
尾高　伶　G2H3-0109
越智　健太郎　G2H2-0205
越智　浩　A1H1-0004
乙黒　美彩　S2H3-1103
鬼塚　正義　G3H4-0210, G3H4-0211, G3H4-0212
小野　絵里香　G3H2-0109
小野　太暉　G3H4-0104
小野　文靖　G2H7-0107
小野木　奈々　G2H6-0201
小野里　由実　G2H5-0309
小幡　宏志郎　G2H1-0208
小布施　祈織　G3H6-0309
折田　和泉　G2H1-0306, G2H2-0306
折田　亮　S2H3-1102

か

甲斐　美花　G3H2-0205
加川　雄介　G3H2-0310
垣田　浩孝　G2H4-0102
柿原　嘉人　G2H5-0301
筧　太心　G2H7-0202
景山　裕也　G2H6-0204
掛井　佳那　G2H6-0107
梶浦　裕之　G2H6-0309, G2H6-0312, G2H6-0313, G2H6-0314, G3H4-0308
梶原　一信　G3H7-0212
梶山　慎一郎　G2H5-0303, G2H5-0304
柏木　豊　G3H4-0206
梶原　果穂　G3H4-0312
梶原　尚之　G3H1-0203
春見　隆文　G2H6-0101
粕谷　健一　S3H3-1803
片岡　尚也　G2H5-0206
片岡　正和　G2H1-0205, G2H1-0206, G2H2-0211, G2H2-0212, G2H3-0307, G2H3-0308
片桐　美紀　G3H2-0105
片倉　啓雄　G3H4-0107
片山　徳賢　G2H3-0203
香月　康宏　S1H2-0203
加戸　悠　G3H4-0104
加藤　晃　G2H1-0212, G2H1-0301, G2H1-0312
加藤　聡　S1H1-0103
加藤　淳也　G2H5-0204, G2H6-0110
加藤　節　G2H5-0108, G2H5-0204, G2H6-0110, G2H6-0111
加藤　竜也　G2H5-0101
加藤　智江　G2H4-0106
加藤　大志　G3H5-0102
加藤　歩並　G2H3-0107
加藤　雅士　G2H1-0307, G2H3-0110, G2H4-0107, G2H4-0202, G3H5-0102, G3H7-0208
加藤　悠一　G3H1-0301
加藤　好一　G3H4-0105
加藤　竜司　G2H1-0302, G2H3-0305, G2H7-0208, G2H7-0209, G2H7-0210
加藤　瑠華　G2H5-0206
門岡　千尋　G3H7-0214
門田　吉弘　G3H6-0305
門屋　亨介　G2H2-0303
金井　貴蓉　G3H5-0202, G3H5-0203
金井　保　G2H6-0201, G3H5-0111
金井　宗良　A2H1-0001
金川　怜美　G2H1-0207
蟹江　慧　G2H3-0305, G2H7-0208, G2H7-0209, G2H7-0210, S3H1-1402
金岡　英徳　G2H7-0306
金子　和彦　S1H3-0402
金子　達雄　S3H3-1804, G3H1-0210
金田　弘挙　S3H1-1301
狩野　麻衣　G2H5-0101
鎌田　健太郎　G2H5-0205
上條　達哉　G2H2-0201
上平　正道　G2H2-0210, G2H2-0311, G2H7-0309, G3H4-0111
上村　直史　G3H6-0107
神谷　典穂　S3H1-1403, G3H5-0309, G3H5-0311
亀井　雄平　G2H7-0207
亀島　礼美　G3H3-0106
亀田　恒徳　G3H1-0310
亀谷　将史　S3H2-1504
亀山　綾音　G2H3-0110
茅　元司　S2H3-1003
唐鎌　翔大　G2H3-0204, G2H3-0205
狩山　昌弘　G3H7-0303
河合　盛進　G2H2-0207, G3H2-0305
河合（野間）　繁子　G2H5-0308, G2H5-0309, G3H5-0312
川井　隆太郎　G2H5-0210, G2H5-0211
川上　晃司　G3H7-0212
川上　比奈子　G3H2-0204
川口　晋也　G3H3-0301
川口　剛司　G2H2-0312
川口　はるか　G2H5-0102
川口　秀夫　G2H6-0104
川越　幸奈　G2H5-0301
川﨑　了　G3H1-0206, G3H1-0207
川崎　大志　G2H4-0104
川崎　博資　G3H7-0210
川﨑　寛也　S3H1-1303
川崎　真由　G3H4-0301, G3H5-0302
川島　花雪　G2H6-0310
川名　秀明　G2H3-0102
川端　千翔　G2H4-0108
川畑　龍司　G2H5-0108, G2H6-0111
河原　あい　G3H6-0110, G3H7-0305
河原　正浩　G2H7-0204
川邉　徹弥　G3H1-0206
川邊　陽文　G2H1-0212, G2H1-0301, G2H1-0312
河邉　佳典　G2H2-0210, G2H2-0311, G2H7-0309, G3H4-0111
川又　大輝　G3H5-0205
河股　優輔　G2H6-0108
川村　弘樹　G2H3-0106
川村　和佳菜　G2H5-0201
川元　皓貴　G2H7-0111, G2H7-0112
河本　正次　G3H7-0203
河本　亮　G3H2-0303
河原崎　泰昌　G2H1-0210, G2H2-0209
韓　凝　G3H1-0208
簡　梅芳　G3H1-0208, G3H1-0209
ガンガンボイナ　アキレッシュ バブ　G2H4-0303
神戸　友美　G2H4-0113

き

菊川　寛史　G2H5-0105, G2H5-0209, G2H6-0204, G3H5-0302
菊田　実花　G3H3-0202
菊地　淳　G3H1-0208
岸　千紘　G2H5-0310
岸　ひかり　G3H7-0202
岸田　晋輔　G3H7-0203
岸本　真奈　G2H4-0111
喜多　晃久　G3H2-0306, G3H2-0307
北垣　浩志　G3H7-0205
北川　学　G3H7-0308
北口　哲也　G3H4-0309
木谷　茂　G2H3-0104, G3H5-0103
木谷　友香　G3H6-0209
北野　裕之　G2H2-0311
北堀　智希　G2H5-0203
木野　邦器　G2H3-0204, G2H3-0205, G2H3-0211
木下　葵子　G2H5-0309
木下　怜実　G2H6-0304
木原　もなみ　G3H4-0306
木伏　真子　G3H3-0207
木村　和恵　G2H7-0210
木村　圭　S2H3-1102
木村　太紀　G2H4-0203
木村　凡　G2H1-0207
木村　元彦　G3H2-0103, G3H2-0104
木村　行宏　G2H3-0111, G2H3-0112, G2H3-0113
邱　泰瑛　G3H4-0201
清　啓自　S2H3-1101, G3H1-0211
桐村　光太郎　G2H1-0310, G2H4-0113
桐本　豊　G2H7-0302, G2H7-0303
金　良鏡　G2H1-0209
金原　和秀　G2H2-0201, G2H2-0202, G2H2-0205

く

久貝　樹幹　G3H7-0301

九鬼　真奈絵　G3H4-0113
日下　勝弘　G2H4-0208
草間　翔子　G2H4-0304
楠　香奈　G2H4-0307
久田　孝　G2H1-0207
工藤　宏史　G3H1-0208
工藤　優輝　G3H2-0301, G3H2-0302
國井　沙織　G2H7-0211
國田　紘夢　G3H3-0309
久野　航裕　G2H2-0205
久能　樹　G3H2-0109
久保　智里　A1H1-0004
久保　幹　G3H1-0203, G3H1-0204, G3H1-0205, G3H1-0307, G3H2-0110, G3H2-0111, G3H2-0112
久保　善弘　G3H4-0111
久保田　朝美　G3H2-0107
久保田　和樹　G3H7-0304
久保庭　雅恵　G2H4-0305, G3H6-0304
窪野　一郎　G3H2-0105, G3H2-0301, G3H2-0302
熊谷　孝則　G2H1-0311
熊谷　俊高　G3H6-0112
熊澤　茂則　G2H5-0305
熊田　佳菜子　G2H7-0202
熊田　英峰　G3H4-0110
熊野　祐香　G2H3-0210
隈元　拓馬　S1H2-0303
汲田　幹夫　G3H2-0115
雲川　雄悟　G3H1-0204
雲北　涼太　G3H6-0204
倉石　徹　G3H7-0308
倉賀野　正弘　G3H5-0205
倉敷　凌太　G2H2-0206
倉田　淳志　G3H7-0209
倉橋　敦　G3H7-0204, G3H7-0206
栗栖　太　G3H2-0106
栗田　涼子　G2H2-0209
栗本　昌樹　A1H1-0004
黒木　勝久　G3H5-0107
黒木　佑真　G2H4-0307
黒澤　尋　G2H7-0211
黒田　章夫　G2H4-0204, G2H4-0309, G2H6-0303, G3H4-0207, G3H4-0208, G3H4-0209, G3H5-0207
黒田　俊一　G2H7-0102
黒田　空来　G3H5-0207
黒田　照夫　G2H1-0311
桑原　直之　G3H7-0207

け

剣持　直哉　G3H5-0107

こ

小池　里佳　G2H1-0207
小泉　史明　G2H7-0310
江　雨濃　G2H3-0206
黄　冠　G2H2-0210
高　相昊　G2H2-0303
纐纈　智也　G2H1-0207
幸田　明夫　G3H4-0104
高津　あゆみ　G3H3-0203
神津　涼奈　G3H5-0308
河野　優　G2H7-0202
鴻池　史憲　G3H4-0213
古賀　雄一　G2H3-0210, G2H3-0212, G2H7-0302, G2H7-0303, G3H3-0309, G3H5-0202, G3H5-0203, G3H5-0208
小川　雅人　G2H3-0301, G3H1-0314, G3H3-0207
小久保　晋　G2H6-0102, G2H6-0103
小倉　太一　G3H2-0314
小﨑　一功　G2H6-0304
小澤　拓真　G3H3-0212
越澤　知世　G3H5-0308
小島　彩奈　G3H7-0206
小島　桂　G3H1-0310
兒島　孝明　G2H1-0302, G2H3-0302, G3H4-0306, G3H4-0307, G3H5-0305, G3H7-0208
小島　史基　G3H2-0107
小関　卓也　G2H4-0106
小平　一也　G3H7-0204, G3H7-0206
兒玉　徹　S3H2-1504
児玉　浩明　G2H3-0207, G3H7-0313
小塚　康平　G2H3-0103, G3H4-0301, G3H5-0301
後藤　杏香　G2H6-0203
後藤　知　G2H3-0107
後藤　慧史　G2H4-0206
後藤(山本)　奈美　S1H3-0404
後藤　博　G3H7-0206
後藤　正利　S2H3-1102, G3H7-0214
後藤　雅宏　G3H5-0309, G3H5-0311
後藤　恭宏　G3H6-0305
後藤　佑樹　S2H3-1001
古徳　純一　G2H7-0108
小西　正朗　A3H1-0001, G3H4-0201
小橋　有輝　G3H7-0302
小林　元太　S2H3-1102
小林　健人　G3H5-0104
小林　俊介　G2H5-0111
小林　侃　G2H7-0310
小林　友哉　G2H6-0210, G3H3-0213
小林　史尚　G3H1-0313
小林　祐介　G3H3-0301
小林　優真　G3H6-0104
小林　吉生　G2H1-0307
小間　聡　S1H1-0104
駒　大輔　G3H6-0108
五味　勝也　A1H1-0002, S2H3-1105, G3H7-0303
古明地　敬介　G3H4-0105
小森　柊花　G3H7-0215
小山　和哉　S1H3-0404
小山　幸祐　G2H2-0206
小山　純弘　G3H3-0210
小山　悠孝　G2H7-0212
古渡　翔　G2H3-0211
今　壮太　G2H5-0107
近藤　昭彦　G2H2-0301, G2H5-0201, G2H5-0202, G2H6-0104, G2H6-0210, G2H7-0111, G2H7-0112, G3H3-0101, G3H3-0110, G3H3-0213, G3H4-0104, G3H6-0106, G3H6-0204
近藤　孝志　G3H4-0113
近藤　哲男　S3H3-1705
近藤　永遠　G2H1-0311
近藤　みずき　G3H3-0103
近藤　佑哉　G2H3-0310
今野　雅大　G3H5-0209

さ

齊藤　朱音　G3H3-0213
斉藤　康平　G2H1-0301
斉藤　大輔　G2H3-0111
齊藤　信雄　G3H3-0103
斉藤　遥　G2H4-0302
齋藤　悠香　G3H2-0310
齋藤　雅哉　G2H4-0201
齋藤　保久　G3H2-0104
齋藤　佑衣　G3H4-0206
齋藤　有美　G3H5-0210, G3H5-0212
佐伯　達也　G2H3-0301
酒井　杏匠　G2H4-0107
酒井　謙二　S2H1-0604, G3H1-0302
境　紘洋　G2H7-0309
酒井　仁　G3H1-0206
酒井　敬史　G2H7-0103
坂井　千紗　G2H2-0306
堺　裕輔　G2H7-0107, G3H4-0111
榊原　早也果　G3H3-0113
榊原　誠也　G2H1-0307
榊原　陽一　S2H3-1101, G3H5-0107
坂口　勝久　G2H7-0305
阪田　奈津枝　G2H1-0202
坂手　勇斗　G3H5-0204
坂中　哲人　G2H4-0305, G3H6-0304
坂元　仁　G2H4-0313, G3H3-0109
阪本　鷹行　G2H5-0105
坂本　千穂　G3H6-0107
坂元　博昭　G2H4-0103, G2H4-0206
坂本　寛　G2H4-0301
佐久間　哲史　G2H5-0203
櫻井　惇　G2H6-0109, G2H6-0209
櫻谷　英治　G2H5-0105
櫻庭　春彦　G2H4-0103, G2H4-0206
佐々木　匠　G3H1-0204
佐々木　由佳　G2H3-0104
佐々木　亮　G3H4-0112
佐々木　良平　G2H7-0112
笹島　義志　G3H4-0112

笹野　佑　G2H1-0308
笹原　純　G3H5-0110
佐塚　隆志　G2H6-0104
佐戸　翔太　G2H6-0305
佐藤　樹　G3H2-0313
佐藤　奏音　G2H7-0202
佐藤　聖　G3H1-0306
佐藤　俊輔　G2H2-0306, S3H2-1604
佐藤　大斗　G3H4-0206
佐藤　喬章　G2H3-0106
佐藤　孝明　G2H3-0309
佐藤　貴志　G3H3-0311
佐藤　岳大　G3H1-0207
佐藤　努　G2H5-0301
佐藤　利次　G3H7-0307
佐藤　敏文　G3H5-0313
佐藤　友紀　G3H7-0306
佐藤　美優　G3H4-0201
佐藤　悠　G2H3-0104, G3H5-0103, G3H6-0206
佐藤　佑香　G2H3-0108
佐藤　良勝　G3H4-0102
佐藤　良樹　G3H5-0302
佐藤　里佳子　G2H6-0205
佐藤　梨奈　G3H1-0201
佐藤　崚　G3H5-0309
里村　武範　G2H4-0103, G2H4-0206
佐貫　理佳子　G3H4-0205
佐野　絢子　G2H2-0304
佐野　輝男　G3H1-0313
佐野　広明　G3H7-0313
佐野　聖友　G3H5-0310
佐野　海瑚人　G2H5-0205
佐野　観月　G2H7-0306
サミー　アンドルー　G2H7-0303
猿渡　雄哉　G2H1-0211
澤田　和敬　S2H3-1102
澤田　将吾　G2H5-0208
沢田　健　G2H6-0110
澤田　武志　G2H7-0310
澤田　雄太　G3H7-0307
澤邊　朋美　G2H6-0307, G2H6-0308

し

施　欣馳　G2H5-0212
塩入　壮馬　G2H6-0102
塩川　つぐみ　G3H5-0306
塩谷　瑞紀　G3H7-0209
塩野　義人　G2H4-0106
塩見　尚史　G2H7-0205
塩谷　格　G2H7-0308
志賀　梨沙　G3H7-0305
重藤　元　G2H4-0308
志田　洋介　G2H6-0205
篠原　恭介　G2H7-0103
柴田　和紘　G3H3-0205
柴田　貴広　G2H6-0304
島　純　G3H2-0311, G3H6-0103
嶋川　銀河　G2H4-0304
島田　昌也　G2H6-0106
島本　航輔　G3H4-0106
島本　直輝　G3H7-0309
嶋本　亮輔　G3H4-0303
島森　圭弥　G3H5-0205
清水　絵理華　G3H6-0101
清水　一憲　G2H3-0202, G2H6-0302, G2H6-0304, G2H7-0207, G2H7-0213, G2H7-0304
清水　克彦　G3H5-0204
清水　敬太　G3H5-0208
清水　達也　G2H7-0305
清水　哲　G2H5-0207, G3H6-0111
清水　浩　G2H3-0304, G2H3-0306, G2H4-0105, G2H5-0205, G2H5-0208, G2H5-0210, G2H5-0211, G2H5-0212, G2H6-0202, G2H6-0208, G3H6-0205
清水　雅士　S2H2-0902
志水　元亨　G2H1-0307, G2H3-0110, G2H4-0107, G2H4-0202, G3H5-0102, G3H7-0208
清水　悠平　G3H6-0103
下川　直史　G3H5-0311
下田　蒼　G3H6-0112
下平　潤　G2H1-0207
下段　千尋　G2H1-0203
下畑　宣行　G2H7-0110
下村　亜依　G2H6-0303
下山　達　G2H7-0310
シャロンマリエガリド　S1H3-0404
ジャン　イェンジン　G2H4-0303
白川　和輝　G2H2-0210
ジラポンパイロ　ワリッサラ　G2H1-0207
白松　李菜　G3H3-0111
志波　勇介　G3H2-0309
新里　海咲　G2H6-0111
新谷　政己　G2H2-0201, G2H2-0202, G2H2-0205, G2H4-0111
進藤　昌　G3H7-0306
新間　秀一　G2H3-0201, G2H3-0208, G2H4-0305, G2H7-0104

す

水光　正仁　A1H1-0001, S2H3-1101, G3H5-0107
末　信一朗　G2H4-0103, G2H4-0206
末岡　拓馬　G3H4-0213
末次　正幸　S1H2-0202
菅原　啓亮　G3H5-0106
杉浦　紗也加　G3H5-0113
杉浦　悠毅　G2H3-0208
杉江　雄貴　G3H7-0213
杉木　創　G2H4-0105
杉原　加織　G3H3-0313
杉村　政彦　G2H6-0211
杉本　真也　G3H2-0109
杉森　大助　G2H3-0108, G3H4-0202
杉山　葵　G3H2-0204
杉山　夏緒里　G2H1-0305
杉山　由花　G3H5-0303
鈴木　淳巨　G3H5-0110
鈴木　淳　G2H4-0102
鈴木　絢子　G2H2-0203
鈴木　快　G2H5-0207
鈴木　喬太　G2H7-0202
鈴木　研志　G3H2-0104, G3H2-0106
鈴木　咲紀　G2H7-0301
鈴木　伸　G2H3-0204, G2H3-0205
鈴木　利雄　G2H5-0109
鈴木　敏弘　G3H7-0314
鈴木　智大　G3H4-0104
鈴木　直子　G2H1-0304, G2H1-0305
鈴木　秀幸　S2H1-0702
鈴木　宏昭　G2H2-0207, G3H2-0305
鈴木　宏和　G2H2-0206
鈴木　裕満　G2H3-0110, G2H4-0107, G2H4-0202, G3H5-0102
鈴木　優衣　S1H2-0304
鈴木　祥夫　G2H4-0308
薄田　隼弥　G3H4-0105
須藤　雅己　G2H2-0211, G2H2-0212, G2H3-0307
住田　和弥　G2H3-0307, G2H3-0308
澄田　智美　S3H2-1502
炭谷　順一　G2H2-0312
陶山　哲志　G2H2-0202
諏訪　宏紀　G2H5-0304

せ

清家　泰介　G2H1-0202, G2H6-0207, G2H6-0211, G3H6-0205
関　翔太　G3H6-0112
関　実　G3H3-0310
関口　喜則　G2H5-0307
瀬筒　秀樹　G2H6-0312, G3H1-0310
瀬溝　人生　G3H2-0205
仙田　貴大　G2H4-0305
善藤　威史　G2H6-0305, G3H7-0305
仙波　弘雅　G2H3-0112

そ

曹　偉　G2H4-0113
曽我　亜由美　G2H5-0307
曽田　匡洋　G2H6-0109
園木　和典　G2H6-0203, G3H6-0107
園元　謙二　G2H6-0305
曽宮　正晴　G2H7-0102

た

戴　凰凰　G3H7-0205
大長　薫　G2H5-0209
平　順一　G2H4-0301
平良　東紀　G2H4-0211, G3H7-0213
平　敏彰　G2H5-0307
多賀　直彦　G2H5-0103

高市　裕基　G3H4-0312
高岡　勝吉　G2H7-0103
髙木　妙子　G2H2-0202
高木　博史　S1H3-0504
高木　啓詞　G2H3-0103
高木　博史　G3H6-0105
髙木　敬信　G3H7-0209
髙木　昌宏　G3H5-0311
高木　睦　G2H7-0307, G2H7-0308
高木　豊　G2H1-0201
高久　洋暁　G2H6-0205
高須賀　太一　G2H4-0107
高杉　早紀　G2H2-0308
髙田　真穂　G2H5-0110
髙塚　由美子　G2H4-0108
高野　力　G3H3-0302
高橋　肇　G2H1-0207
高橋　宏和　G2H1-0211, G2H5-0203, G3H2-0307, G3H6-0311
高橋　将人　G3H3-0102
髙橋　雅人　G3H3-0301
高橋　正之　G2H3-0303
高橋　美幸　G3H3-0103
高橋　泰志　G3H5-0102
高橋　結　G3H4-0103
髙橋　優　G3H4-0106
高橋　欄　G2H4-0102
高橋　遼　G3H6-0202
高部　響介　G2H1-0203
髙峯　和則　G3H7-0214, G3H7-0302
髙村　映一郎　G2H4-0103
高村　映一郎　G2H4-0206
高谷　直樹　G3H4-0102
高山　郁美　G2H4-0312
寶田　雅治　S2H3-1004
田川　進也　G3H7-0308
多喜　俊介　G2H4-0103
滝口　昇　G3H2-0115
瀧田　千温　G2H5-0112
田口　翔太　G3H2-0313
田口　精一　G2H2-0303, G3H6-0110
田口　朋之　G2H4-0310
田口　久貴　G2H1-0308
田口　萌恵　G2H3-0212
武井　孝行　G3H3-0306
武井　大翔　G3H2-0313
武内　章　G3H4-0107
武内　日陽里　G2H4-0310
竹内　友里　G2H6-0302
竹内　諒　G3H1-0203, G3H1-0307
竹尾　映美　G2H3-0208
武尾　正弘　G3H1-0212, G3H6-0109
武方　宏樹　G2H1-0202
竹上　哲司　G3H7-0310
竹川　薫　G2H5-0104
竹下　典男　G3H4-0101, G3H4-0102
武田　明子　G2H5-0112
武田　和宏　G3H2-0104
武田　穣　G2H3-0213
竹中　慎治　G2H3-0111, G2H3-0112, G2H3-0113
竹中　武藏　G2H6-0210
竹原　宗範　G2H3-0107
武部　夏実　G2H5-0304
竹村　海生　G2H5-0204
竹村　謙信　G2H4-0303
竹本　訓彦　G2H6-0209
武本　美沙希　G2H4-0301
竹本　有貴　G2H5-0105
竹本　悠人　G2H3-0305, G2H7-0209
竹山　春子　A1H1-0003, G2H1-0304, G2H1-0305, G2H3-0301, G3H1-0314, G3H3-0207
田澤　寿明　G2H4-0302
田島　健次　S3H3-1703, G3H5-0313
太島　奈々　G3H5-0213
田島　木綿子　G2H5-0301
田島　遼太郎　G2H3-0306
田代　幸寛　S2H1-0604, G3H1-0302
田代　陽介　G3H2-0103, G3H2-0104, G3H2-0105, G3H2-0301, G3H2-0302
田添　佳歩　G2H3-0202
多田　彩華　G3H1-0211
多田　孝清　G3H7-0308
多田　宏子　G3H5-0306
蓼沼　崇　G2H4-0310
立松　謙一郎　G2H6-0312
田中　瑛子　G2H4-0205
田中　和明　G3H1-0313
田中　和真　G3H4-0113
田中　賢二　G3H2-0315, G3H6-0110
田中　健二郎　G2H3-0305
田中　謙也　G2H4-0304
田中　恒作　G2H6-0202
田中　彩衣　G3H4-0110
田中　拓未　G3H5-0210, G3H5-0212
田中　勉　G2H5-0201, G2H5-0202, G3H3-0110, G3H6-0106
田中　剛　G2H2-0208, G2H4-0310, G2H7-0310, G3H6-0201
田中　智大　G2H2-0310
田中　誠　G2H6-0203
田中　祐圭　S3H1-1404
田中　瑞己　G2H1-0210, G2H2-0209
田中　基博　G3H4-0305
田中　勇悦　G3H4-0306
田中　涼　G2H5-0205
田部　亜季　G2H7-0101
田邊　公一　G3H2-0311, G3H6-0103
谷　明生　G2H6-0106
谷　一寿　G3H5-0108
谷　修治　G2H2-0312
谷井　沙織　G2H7-0202
谷口　和彌　G2H5-0206
谷口　赳夫　G2H3-0311, G3H6-0203
谷口　博範　G2H3-0104
谷野　有佳　G3H7-0303
谷畑　友基　G2H5-0306
谷村　あゆみ　G3H2-0311
谷村　那子　G3H2-0107
谷本　悟　G2H5-0109
田端　和仁　S2H3-1006
多葉田　菜月　G2H2-0302
田原　滉大　G2H7-0305
田原　悠平　G2H6-0307, G2H6-0308
環　宏太朗　G3H7-0312
玉置　尚徳　G3H7-0214, G3H7-0302
玉田　太郎　G2H4-0208
田丸　浩　G2H1-0208, G3H2-0213
ダムナニョヴィッチ　ヤスミナ　G3H5-0305
田村　謙太郎　G2H5-0209
田村　隆　G2H4-0112, G2H4-0201, G3H6-0309
田村　綾子　S2H1-0701
垂水　遼真　G2H7-0307

ち

近岡　花菜子　G2H5-0301
千頭　康彦　G2H5-0102
千原　康太郎　G3H3-0106
張　ヨンチョル　G3H2-0214, G3H2-0215
張　怡　G2H7-0107
張　乃睿　G3H7-0205
張　譯云　G2H1-0203

つ

塚田　美結　G3H5-0312
塚田　祐子　G3H1-0314
塚谷　京　G3H1-0210
塚原　正俊　S1H3-0502, G3H7-0301
津川　裕司　S2H2-0802, G3H6-0308
柘植　陽太　G2H5-0111, G2H6-0109, G2H6-0209
辻　茜　G2H6-0108
辻　雅晴　S3H2-1602
辻井　啓夢　G2H4-0208
辻上　誠也　G2H1-0307
辻野　義雄　G3H4-0104
辻村　久　G2H1-0201
土坂　享成　G2H5-0112
土戸　哲明　G2H4-0313, G3H3-0109
土橋　大地　G2H2-0308, G2H2-0309
土屋　成輝　G2H1-0201
都築　翔　G3H7-0208
堤　丈瑠　G3H2-0204
常田　聡　G2H3-0206
角田　悠　G2H7-0303
壷井　ひかり　G2H2-0301, G3H3-0101
坪井　宏和　G3H4-0104
坪倉　美紗　G3H2-0110
湊元　幹太　G3H4-0302, G3H4-0305
津本　浩平　G2H7-0101
露木　七菜子　G2H6-0103
敦賀　健太　G2H4-0306

鶴田　茜　G3H2-0208
鶴田　猛彦　G3H2-0313
鶴本　智大　G3H6-0208

て

手嶋　琢　G2H4-0112
寺内　裕貴　G3H5-0210, G3H5-0212
寺西　広翼　G3H4-0303
寺本　陽彦　G3H6-0111
寺本　英敏　G3H1-0310
照山　拓海　G2H1-0212

と

土井　健生　G3H4-0108
土居　幹治　G2H3-0111, G2H3-0112, G2H3-0113
土肥　義治　S3H3-1801
道家　美紗　G2H5-0202
渡嘉敷　直杏　G3H7-0211
渡嘉敷　建孝　G3H7-0213
土岐　富士緒　G2H7-0108
土岐　弥生　G3H6-0211
常盤　豊　G3H1-0308
徳田　真穂　G2H2-0205
徳永　哲夫　S1H3-0402
戸倉　隆人　G3H1-0205
徳樂　清孝　G3H5-0205
戸田　成美　G3H4-0207
戸田　弘　G2H6-0201
栃尾　巧　G3H6-0305
利根川　聡史　G3H1-0202
冨田　宏矢　G3H3-0113
冨田　昌弘　G3H4-0302, G3H4-0305
富田　因則　G2H7-0201
冨永　昌人　G2H4-0206, G3H3-0211
富永　依里子　G3H1-0215
巴　瞭斗　G3H6-0201
戸谷　吉博　G2H3-0304, G2H3-0306, G2H4-0105, G2H5-0205, G2H5-0208, G2H5-0210, G2H5-0211, G2H5-0212, G2H6-0202, G2H6-0204, G2H6-0208, G3H5-0302, G3H6-0205
外山　博英　S1H3-0501, G3H7-0211, G3H7-0301
外山　二卯佳　G2H4-0203
豊島　正和　G2H3-0304, G2H6-0210
豊竹　洋佑　G2H4-0101, G2H6-0108, G3H2-0314
豊留　あいり　G2H1-0308
豊福　雅典　G2H6-0310, G2H6-0311
ドラブ　エバ　G3H3-0313
鳥居　英人　G3H7-0203
鳥越　俊彦　G3H5-0308

な

永井　裕崇　G2H7-0104
仲尾　日菜子　G3H2-0114
中尾　洋一　S3H2-1603
中川　拓郎　G2H4-0212
中川　智行　G2H6-0106
中川　博之　G3H1-0201
中川　真緒　G2H6-0307, G2H6-0308
中川　洋史　G2H6-0102, G2H6-0103
永久保　利紀　G2H6-0310
永倉　佑真　G3H2-0308
中澤　光　G3H4-0310
中澤　昌俊　G3H1-0214
中澤　慶久　G2H3-0309
中島　一紀　G3H1-0206, G3H1-0207
中嶋　恭子　G2H7-0204
中島　拓都　G3H4-0201
長島　拓則　G2H7-0304
仲嶋　翼　S2H2-0801
中島　敏明　G3H1-0306, G3H2-0210, G3H2-0212
長嶋　美乃里　G2H2-0209
中嶋　優　G2H5-0311
中島田　豊　S2H1-0704, G2H5-0108, G2H5-0203, G2H5-0204, G2H6-0110, G2H6-0111, G3H2-0306, G3H2-0307, G3H4-0204
中杉　行秀　G2H4-0204
中瀬　玄徳　G3H4-0204
長田　あかね　G2H7-0313
永田　隆平　G2H3-0106
中谷　肇　G3H2-0213, G3H3-0201
中辻　諒平　G2H5-0105
長門石　暁　G2H7-0101
永留　真優　G3H7-0205
中西　昭仁　G3H2-0208, G3H2-0209, G3H3-0112, G3H3-0304, G3H3-0305
中西　周次　G2H4-0304
中西　真人　S1H2-0301
中根　修平　G2H5-0112
中野　祥吾　G2H3-0103, G2H5-0305, G3H4-0301, G3H5-0113, G3H5-0201, G3H5-0301, G3H5-0302
中野　秀雄　G2H1-0302, G2H3-0302, G3H4-0306, G3H4-0307, G3H5-0305
中野　美貴子　G3H4-0308
永野　幸生　S2H3-1102
中平　創　G3H1-0307
長峯　美季　G2H6-0313
中村　史　G2H7-0311, G2H7-0312, G2H7-0313
中村　隼人　G2H3-0309
中村　美紀子　G2H2-0203
中村　優里　G2H2-0301
仲本　和義　G2H4-0110, G2H4-0208, G3H5-0105
長森　英二　G3H3-0311, G3H4-0113, G3H6-0108
中山　二郎　G2H6-0305, G3H7-0205
仲山　英樹　G3H2-0303
那須野　亮　G3H6-0105
夏井　望　G2H1-0209
名取　暁　G3H3-0210
成瀬　茂　G3H3-0211
成田　琴美　G3H4-0107
成田　拓真　G3H2-0210
難波　大輔　G2H7-0108
難波　有希　G3H6-0305
南部　智彦　G3H5-0205

に

新岡　宏彦　G2H3-0309
二井手　哲平　G2H4-0105, G2H5-0210
新美　輝幸　G2H5-0102
二枝　紗里奈　G3H7-0202
西　愛美　G3H6-0110
西井　麻貴　G2H3-0203
西内　巧　G3H7-0313
西岡　祐起　G3H7-0203
西上　明花　G3H6-0110
西川　有咲　G2H3-0112
西川　宏　G3H1-0309
西川　美和子　G3H4-0113
西川　洋平　G2H3-0301, G3H1-0314, G3H3-0207
西島　謙一　G2H7-0306
西八條　正克　G3H4-0213
西原　大智　G3H2-0112
西原　宏史　S2H1-0705
西峯　隆悟　G3H1-0214
西村　栄美　G2H7-0108
西村　仁　G3H2-0205
西村　勇哉　G2H7-0111, G2H7-0112
西村　侑美　G2H1-0212, G2H1-0301
西本　和生　G3H6-0202
西矢　芳昭　G2H4-0104, G2H4-0203
似田　優太　G2H7-0312
二塚　美紀　G2H5-0110
仁宮　一章　G2H7-0105, G2H7-0206, G3H3-0308
二之湯　寛子　G3H5-0313
丹羽　正純　G3H5-0113

ね

根岸　諒　G2H7-0310
根本　直人　G3H5-0305
根本　理子　G2H4-0201, G3H6-0309
根本　侑知　G2H6-0106

の

野口　恵一　G2H4-0110, G3H5-0105, G3H5-0303
野口　拓也　G3H2-0310
野崎　正汰　G3H2-0202
野尻　秀昭　G2H2-0205, G3H2-0106
野田　健一　G2H6-0303
野田　尚宏　G2H2-0202, G2H3-0206,

G3H3-0106
野地　智法　G3H6-0112
野中　大輔　G3H3-0110
野間　智也　G3H6-0101
野牧　秀隆　G3H1-0210
野村　純平　S2H1-0701
野村　隆臣　G2H3-0209
野村　暢彦　G2H1-0203, G2H6-0310, G2H6-0311, G3H2-0109
野村　亮　G3H7-0208
乗富　和寿　G2H6-0305

は

朴　龍洙　G2H4-0303, G2H4-0306, G2H5-0101
橋口　周平　G3H7-0207
橋本　雅仁　G3H7-0207
羽城　周平　G2H5-0102
蓮池　祐紀　G2H2-0211, G2H2-0212
蓮沼　誠久　G2H4-0304, G2H6-0104, G3H1-0301, G3H6-0104, G3H6-0204
蓮沼　直貴　G2H7-0113
長谷川　哲哉　G3H7-0209
長谷川　真由　G2H5-0112
長谷川　喜衛　G3H5-0104
長谷部　文人　G2H5-0305, G3H5-0113
長谷部　友権　G3H3-0310
畑　浩介　G2H5-0203
畠中　孝彰　G3H1-0310
秦野　琢之　G3H2-0309
波多野　浩也　G2H4-0309
花井　泰三　G3H6-0101
花原　薫　G3H2-0115
馬場　嵩一朗　S2H3-1102
馬場　俊輔　G2H3-0309
馬場　知哉　G2H1-0209
馬場　将弘　G2H3-0109
馬場　康浩　G2H3-0109
羽部　浩　G3H1-0202
濱口　悠　G2H1-0305
濱治　百々子　G2H1-0204
濱田　博司　G2H7-0103
濱田　浩幸　G2H7-0109, G3H6-0101
浜田　道昭　G2H1-0305
濱野　吉十　G2H5-0310, G2H5-0311
早川　享志　G2H6-0106
早川　正幸　G2H6-0102, G2H6-0103
林　峻輔　G2H3-0105
林　大久生　G2H1-0304
林　哲也　G3H6-0305
林　那波　G3H7-0214
林　大暉　G2H3-0208
林　真央　G3H5-0106
林　里帆　G3H7-0305
林　稜也　G3H2-0105, G3H2-0302
林田　宗記　G3H4-0202
早瀬　伸樹　G3H2-0306
早田　光希　G3H4-0303
原　清敬　G2H5-0205, G2H5-0209, G2H6-0204, G3H5-0302, G3H6-0205
原　崇　G2H5-0301
原　富次郎　G2H4-0108
原　正之　G2H7-0212, G2H7-0301
原　雄一　G3H4-0112
原田　尚志　G3H6-0101
原田　雄斗　G2H6-0106
原田　玲奈　G3H3-0109, G3H3-0212
原納　弘大　G3H4-0112
バランワル　プリヤンカ　G3H6-0109
番場　崇弘　G3H6-0204
馬場　健史　G3H6-0210

ひ

東浦　優希　G2H4-0104
東森　義和　S1H1-0105
樋口　昌也　G2H7-0213
樋口　裕次郎　G2H5-0104
樋口　雄大　G2H6-0203, G3H6-0107
久永　理央　G3H6-0110
日詰　達哉　G3H6-0206
美藤　友博　G3H5-0204
人見　清隆　G3H5-0305
日野　智仁　G3H4-0209
日弄　隆雄　G2H4-0101
平井　佑治　G3H2-0111
平川　祐子　G2H4-0310
平田　悟史　S3H3-1701
平田　さや　G3H2-0306
平田　風子　G2H4-0211
平田　悠達　G3H7-0212
平田　悠人　G3H6-0311
平田　佳之　G2H5-0312
平中　佑磨　G2H4-0103
平松　紳吾　G3H2-0310
平山　翔太　G3H4-0213
平山　英伸　G3H6-0205
平山　匡男　G3H7-0206
弘瀬　拓矢　G2H7-0108
廣田　裕介　G3H3-0312
廣田　隆一　G2H4-0204, G3H4-0207, G3H4-0208, G3H4-0209, G3H5-0207
廣谷　蘭　G3H4-0204
弘埜　陽子　G2H5-0205, G2H5-0209, G2H6-0204, G3H5-0302, G3H6-0205
廣橋　良彦　G3H5-0308

ふ

深浦　恵梨　G2H7-0307
深田　悠太　G2H1-0205, G2H1-0206, G2H3-0307, G2H3-0308
吹谷　智　G2H5-0107, G3H6-0305
福井　健太郎　G2H2-0309
福居　俊昭　G2H1-0306, G2H2-0306, G3H4-0205
福﨑　英一郎　G2H3-0201, G2H3-0208, G2H4-0305, G2H4-0307, G2H7-0104, G3H6-0209, G3H6-0211, G3H6-0304, G3H7-0309, G3H7-0310, G3H7-0312
福士　涼介　G3H7-0307
福島　卓也　G3H4-0306
福田　紗弓　G3H4-0101, G3H4-0102
福田　真嗣　S2H2-0803
福田　拓都　G3H5-0105
福田　萌子　G2H4-0210
福田　青郎　G2H4-0109, G2H4-0210, G2H4-0212, G2H4-0213, G3H3-0312
福谷　洋介　G2H4-0302, G2H4-0312, G3H5-0308, G3H5-0310
福永　圭佑　G2H6-0301
福田　青朗　G2H2-0305
藤井　克彦　G3H2-0201, G3H2-0202, G3H2-0203
藤井　清矢　G3H6-0103
藤井　大河　G2H2-0208
藤井　達也　G2H5-0204
藤井　康年　G2H4-0208
藤江　直史　G2H5-0201, G3H6-0106
藤岡　耕太郎　G3H7-0203
藤川　康夫　G3H6-0208
藤澤　綾乃　G3H1-0312
藤澤　誠　G3H6-0108
藤澤　悠　G2H6-0314
藤城　光弘　G3H4-0112
藤田　大勢　G2H3-0108
藤田　剛嗣　S1H3-0403
藤田　嵩之　G2H3-0106
藤田　雄大　G3H2-0309
藤野　亜琴　G3H3-0202
藤野　紗代　G2H6-0204
藤橋　雅宏　G2H3-0106
藤巻　篤史　G2H1-0312
藤村　孝志　G3H7-0203
藤本　和士　G3H5-0110
藤本　一嗣　G3H6-0201
藤山　和仁　G2H6-0309, G2H6-0312, G2H6-0313, G2H6-0314, G3H4-0308
藤原　伸介　G2H2-0305, G2H4-0109, G2H4-0210, G2H4-0212, G2H4-0213, G3H3-0312
藤原　久志　G3H7-0202
藤原　政司　G2H7-0307, G2H7-0308
藤原　優人　G3H3-0208
冨士原　由貴　G2H7-0205
藤原　涼雅　G3H4-0205
藤原　良介　G3H3-0110
布施　直也　G3H5-0211
二神　泰基　G3H7-0214, G3H7-0302
二又　裕之　S2H1-0601, G3H2-0103, G3H2-0104, G3H2-0105,

G3H2-0301, G3H2-0302
二見　淳一郎　G3H5-0306
船津　高志　S2H3-1004
舟橋　久景　G2H4-0204, G2H4-0309, G3H4-0207, G3H4-0208, G3H4-0209, G3H5-0207
船山　典子　S2H3-1002
古家　美紀　G3H7-0209
古澤　力　G2H1-0202, G2H5-0211
古関　智樹　G3H2-0206
古田　雅一　G2H4-0313
古橋　佑真　G2H1-0207
古屋　俊樹　G2H3-0101, G2H3-0102, G3H1-0201, G3H1-0202
古屋敷　智之　G2H7-0104

へ

別役　重之　S2H3-1005

ほ

坊垣　隆之　G3H4-0104
保木　健宏　S1H3-0405
保木本　達也　G3H5-0203
星田　尚司　G2H2-0203, G2H2-0302, G2H2-0307
保科　涼　G2H3-0207
星野　孝仁　S2H1-0703
細川　正人　G2H1-0304, G2H3-0301, G3H1-0314, G3H3-0207
細川　洋一　G3H1-0310
穂積　侑伽　G3H3-0113
堀　采音　G3H7-0203
堀　克敏　G2H2-0204, G2H7-0311, G3H2-0213, G3H3-0201, G3H5-0110
堀　沙那恵　G3H5-0101
堀　千明　G2H4-0107
堀尾　京平　G3H2-0306, G3H2-0307
堀川　万優子　G2H7-0310
堀口　博文　G2H3-0109
堀口　芽衣　G2H3-0107
堀越　妃乃　G2H3-0209
堀之内　貴明　G2H5-0211
本荘　雅宏　G3H2-0103, G3H2-0104
本田　孝祐　G2H3-0104, G3H5-0103, G3H6-0206
本田　真也　G3H4-0210
本田　拓也　G2H3-0107
本田　知之　G2H6-0313, G2H6-0314
本多　裕之　A1H1-0004, G2H3-0202, G2H6-0302, G2H6-0304, G2H7-0207, G2H7-0213, G2H7-0304
本田　裕樹　G2H3-0102
本田　友音　G3H2-0114
本田　喜克　G3H4-0206
本谷　真奈　G3H6-0203
本間　順　G2H7-0305

ま

前田　謙太郎　G2H2-0308, G2H2-0309
前田　紗香　G2H6-0309
前田　憲成　S2H1-0602
前田　智也　G2H5-0107, G2H5-0211
眞榮田　麻友美　S1H3-0503, G3H4-0206, G3H7-0213
前田　義昌　G2H2-0208, G2H4-0310
前橋　健二　G3H4-0206
前橋　兼三　G2H4-0312
牧田　芳隆　G2H7-0306
牧野　祐樹　G2H1-0305
牧野　祥嗣　G3H5-0111
政井　英司　G3H6-0107
益井　実鈴　G3H5-0306
増尾　貞弘　G3H3-0312
増沢　望　G2H3-0213
増田　亜理沙　G3H3-0203
増田　隆夫　G3H6-0107
増永　莉奈　G2H6-0305
俣木　歩実　G3H2-0102
俣野　沙月　G3H4-0109
町　環多　G3H1-0315
町田　光史　S3H2-1603
松井　杏美　G2H5-0303
松井　健二　G2H4-0112
松井　大亮　G2H4-0101, G2H5-0312, G2H6-0108, G3H2-0314, G3H5-0109, G3H5-0113
松井　徹　G3H2-0107
松井　春美　G3H3-0103
松井　萌　G2H3-0108
松浦　勝久　G2H7-0305
松浦　俊一　G2H1-0209
松浦　将吏　G2H6-0110, G3H4-0204
松江　由香子　G3H5-0211
松尾　有紗　G2H6-0207
松尾　康光　G3H2-0204, G3H2-0205, G3H2-0206
松尾　友梨子　G3H6-0109
松尾　啓史　G3H7-0209
松川　哲也　G2H5-0303, G2H5-0304
松嵜　日南　G3H5-0202
松崎　浩明　G3H2-0309
松崎　弘美　G3H6-0110, G3H7-0305
松崎　友星　G3H4-0313
松沢　弘貴　G2H6-0209
松鹿　昭則　G2H5-0204
松下　一信　G2H5-0206, S3H3-1702
松瀬　一平　G3H2-0312
松田　明香里　G3H7-0305
松田　史生　G2H1-0202, G2H3-0310, G2H3-0311, G2H5-0205, G2H5-0208, G2H6-0204, G2H6-0207, G2H6-0211, G3H5-0302, G3H6-0202, G3H6-0203, G3H6-0205, G3H7-0215
松田　真実　G2H4-0304
松田　崚汰　G2H4-0201
松谷　峰之介　G2H5-0206, S3H3-1702, G3H7-0314
松永　是　G2H4-0310
松永　浩子　G2H1-0304, G2H1-0305
松波　宏明　G2H4-0302
松嵜　日南　G3H5-0203
松村　洋寿　G2H4-0110, G2H4-0208, G3H2-0114, G3H5-0105, G3H5-0209, G3H5-0213, G3H5-0303
松村　吉信　G3H2-0101, G3H2-0102
松本　晶　G3H2-0305
松本　謙一郎　G3H3-0113
松元　太一　G3H7-0207
松本　拓也　G3H3-0303
松本　光史　G2H2-0208
松本　侑也　G2H4-0201
松山　恵介　G2H5-0203, G3H4-0204
松山　千夏　G3H6-0205
的場　直樹　G3H3-0112
馬淵　幹　G2H3-0212
眞弓　昌大　G3H6-0304
丸井　和也　G2H1-0309
丸山　明子　G3H1-0302
丸山　夏歩　G3H4-0107
丸山　千登勢　G2H5-0310, G2H5-0311
満生　萌水　G3H7-0205

み

三浦　綾夏　G2H1-0307
三浦　大輔　G3H4-0310
三浦　靖　G3H4-0202
三木　邦夫　G2H3-0106
三木　健夫　G2H2-0304
三﨑　亮　G2H6-0309, G2H6-0312, G2H6-0313, G2H6-0314, G3H4-0308
三嶋　玄隆　G3H6-0112
水谷　治　G3H7-0211
水谷　友香　G2H3-0302
水谷　涼　G2H7-0105
水谷　嶺太　G2H3-0202
水野　洸介　G2H6-0106
水野　太郎　G2H7-0202
三隅　雄一　G3H3-0301
溝脇　朱音　G2H1-0205
三田　芽実　G3H1-0201
三井　亮司　G2H6-0106
三ツ石　方也　G3H5-0210, G3H5-0212
満倉　浩一　G2H3-0105
三橋　麻由　G2H5-0102
水口　和信　G3H4-0213
水口　千穂　G2H2-0205
南薗　洸佑　G3H1-0214
南野　優季　G3H5-0201
南畑　孝介　G3H5-0309, G3H5-0311
美馬　未紗希　G2H5-0302

宮川　寛希　G3H1-0207
三宅　克英　G3H2-0308
三宅　淳　G2H3-0309, G2H7-0312
三宅　剛史　G3H7-0303
宮崎　拓己　G3H4-0313
宮里　匠　G3H2-0313
宮澤　拳　G3H4-0105
宮下　尚之　G2H1-0309
宮田　真人　G2H6-0307, G2H6-0308
宮田　椋　G2H5-0305
宮良　俊汰　G3H5-0307
宮本　浩邦　G2H3-0207, G3H7-0313
宮本　宗周　S1H3-0505
宮本　萌衣　G2H1-0210
三好　勝之　G3H2-0303
三吉　健太　G2H5-0210
三好　規之　G2H5-0305

む

牟田　裕二　G3H3-0211
ムタイリプ　カイヤ　G2H7-0307
武藤　清明　G3H4-0105
村上　明一　G3H4-0309
村上　愛美　G2H1-0309
村上　克治　G2H5-0204
村上　慶多　G2H3-0310
村上　周一郎　G2H4-0205, G2H6-0107, G3H3-0105, G3H4-0103
村上　智哉　G3H1-0215
村上　博紀　G3H4-0207
村上　將和　G3H2-0101
村上　茉奈美　G2H5-0211
村上　雅　G2H4-0209
村上　優衣　G2H4-0213
村上　義彦　S3H1-1405
村木　則文　G3H5-0109
村田　資治　S1H3-0402
村主　渉　G3H4-0202
村松　和明　G2H7-0113
村山　晃一　G3H3-0302
村山　芳香　G3H7-0204

も

毛利　智海　G2H3-0213
望月　誉志幸　G2H5-0307
元岡　大祐　G2H6-0309
元木　大介　G2H7-0202
本山　智晴　G2H5-0305, G3H4-0301
百川　直輝　G3H4-0208
森　浩二　S3H2-1501
森　孝輔　G2H2-0312
森　宏太　G3H4-0305
森　智也　G3H5-0109
森　英樹　G2H7-0212, G2H7-0301
森　浩禎　G2H3-0307, G2H3-0308
森　康暢　G2H3-0106
森　陽子　G2H3-0202
森　玲香　G2H4-0202
森井　英一　G3H6-0211
盛尾　美和　G2H5-0202
森川　佳奈　G2H3-0303
森茂　真菜　G3H6-0109
森下　琢麻　G2H7-0111, G2H7-0112
森島　輝　G2H7-0308
森田　健太　G2H7-0111, G2H7-0112
森田　大地　G2H1-0311
森田　拓弥　G2H5-0103
森田　友岳　G2H5-0204
森田　洋行　G2H5-0311
森田　雅宗　G3H3-0106
守田　湧貴　G2H5-0104
森田　令一　G3H2-0203
森滿　優斗　G3H3-0306
森村　一貴　G3H6-0103
森本　康一　G2H7-0211
守谷　郁　G2H7-0113
守屋　央朗　G3H6-0309
森谷　大樹　G3H2-0305
森芳　邦彦　G3H6-0108
諸星　知広　A2H2-0001
門口　将己　G3H6-0103
門田　啓吾　G3H5-0204

や

八浦　妃佐子　G3H4-0213
姚　閔　G3H5-0313
矢追　克郎　G2H6-0205
薬師　寿治　G2H5-0206, S3H3-1702
屋須　雅人　G3H2-0313
安池　一貴　G3H2-0105
安枝　寿　G2H5-0102
保川　清　G2H2-0305, G2H4-0109
安田　柊　G3H6-0308
安田　貴信　G3H4-0309
保田　友晶　S1H1-0102
柳沢　直樹　G3H4-0102
柳田　茉子　G3H7-0304
柳原　格　G2H2-0305, G2H4-0109, G3H3-0312
柳谷　洸輔　G2H2-0205
矢野　剛久　G2H1-0201
藪　浩　G3H5-0210, G3H5-0212
山内　光陽　G3H3-0312
山内　悠至　G3H6-0210
山内　夢乃　G2H4-0211
山川　達也　G3H7-0304
山川　ひとみ　G2H7-0310
山岸　彩奈　G2H7-0311, G2H7-0312, G2H7-0313
山岸　純一　G2H4-0108
山口　有朋　G2H1-0209
山口　鳳大　G3H2-0210
山口　颯人　G3H6-0305
山崎　思乃　G3H4-0107
山﨑　将太朗　G2H1-0212, G2H1-0301, G2H1-0312
山崎　千秋　G3H1-0301
山崎　晴丈　G2H6-0205
山崎　美輝　G2H1-0304, G2H1-0305
山崎　由美子　G2H5-0304
山﨑　梨沙　G3H7-0212
山崎　竜杜　G3H1-0211
山下　瀬菜　G3H6-0311
山下　大悟　G3H4-0107
山城　裕孝　G2H1-0308
山田　勝成　G3H2-0310
山田　紗里奈　G2H1-0208, G3H2-0213
山田　翼　G3H7-0210
山田　格　G2H5-0301
山田　宏樹　G3H7-0202
山田　真澄　G3H3-0310
山田　南実　G3H7-0308
山田　美和　G2H2-0207, G3H2-0305, G3H4-0202
山田　佑樹　G2H6-0109
山田　亮祐　G3H3-0303
大和　勝幸　G2H5-0304
山中　一也　G2H5-0302, G2H5-0310
山中　真也　G3H5-0205
山中　勇人　G3H6-0108
山野 - 足立　範子　G2H3-0212, G2H3-0210, G2H7-0302, G2H7-0303, G3H3-0309, G3H5-0202, G3H5-0203, G3H5-0208
山原　研一　G2H7-0308
山辺　陽太　G2H5-0301
山村　昌平　G2H4-0308
山村　英樹　G2H6-0102, G2H6-0103
山本　晶穂　G3H4-0107
山本　一貴　G2H7-0207, G2H7-0213, G2H7-0304
山本　郁名　G3H3-0111
山本　啓介　G2H5-0112
山本　省吾　G2H6-0109
山本　翔太　G2H6-0108
山本　泰誠　G3H5-0104
山本　卓　G2H5-0203
山本　拓矢　G3H5-0313
山本　達也　G3H2-0109
山本　千晶　G2H3-0304
山本　尚毅　G3H3-0112
山本　雪絵　G2H2-0202
山本　里穂　G3H4-0101, G3H4-0102
屋良　みなみ　G2H6-0210, G3H3-0213
八幡　悟史　G2H6-0303
八幡　穣　G2H1-0203

ゆ

湯川　貴弘　G3H6-0204
湯川　英明　S3H2-1504
雪　真弘　G2H2-0205

よ

養王田　正文　G2H4-0110, G2H4-0302, G2H4-0312, G3H5-0105, G3H5-0303, G3H5-0308,

G3H5-0310
横田　亜紀子　G2H3-0206
横田　篤　G2H5-0107, G3H6-0305
横田　仁子　G2H3-0111, G2H3-0112, G2H3-0113
横田　直紀　G2H5-0306
横林　正雄　G2H4-0205
横林　洋平　G2H6-0301
横山　大稀　G3H1-0208
吉井　智哉　G2H4-0312
吉岡　育哲　G2H1-0310
吉岡　慶太郎　G2H6-0304
吉岡　美紗　G2H4-0212, G2H4-0213
吉岡　由真　G3H4-0211
吉川　潤　G3H4-0206
吉川　琢也　G3H6-0107
吉国　靖雄　S1H2-0201
吉﨑　由美子　S2H3-1104, G3H7-0214, G3H7-0302
吉田　江里菜　G3H1-0301
吉田　佳鼓　G3H6-0305
吉田　昭介　G3H4-0205
吉田　智尋　G2H6-0112
吉田　豊和　G2H3-0105
吉田　ナオト　G3H1-0211
吉田　信行　G2H4-0111
吉田　昌弘　G3H3-0306
古田　未有　G2H7-0202
吉竹　彰虎　G2H6-0101
吉野　知子　G2H2-0208, G2H4-0310, G2H7-0310, G3H6-0201
吉見　啓　G3H4-0105, G3H5-0210, G3H5-0212
吉本　将悟　G2H7-0311
依田　卓也　G2H3-0301
依田　毅　G3H7-0201
四辻　史也　G3H4-0113
米澤　優希　G2H7-0211
米田　大貴　G2H4-0213
米谷　舞衣　G2H1-0306
米元　舞　G3H2-0315
米山　裕　G3H6-0112

り

李　天成　G2H4-0303
リュウ　ロ　G3H2-0101
林　翰佳　G3H3-0312

わ

若井　暁　G3H1-0210
若井　芳則　G3H7-0202
我妻　竜太　G2H1-0305, G3H1-0314
若林　里衣　G3H5-0309, G3H5-0311
若松　明良　G2H6-0314
若山　守　G2H4-0101, G2H6-0108, G3H2-0314
涌井　秀樹　G3H5-0209, G3H5-0213
鷲尾　周　G2H7-0111, G2H7-0112
和田　圭介　G2H5-0204
和田　直樹　G2H1-0309
和田　大　G2H5-0107
和田　凌太郎　G2H4-0110
渡邉　かほり　G2H2-0208
渡部　邦彦　G3H7-0202
渡辺　賢一　G3H7-0206
渡邉　研志　G2H5-0203, G3H2-0307, G3H4-0204, G3H6-0311
渡辺　智　G3H4-0208, G3H4-0209
渡邉　翔介　G3H2-0309
渡邉　泰祐　G2H6-0101
渡辺　直己　G2H6-0110
渡邊　直揮　G2H6-0210
渡邉　裕一　G3H6-0112
渡邊　雅彦　G3H3-0304, G3H3-0305
渡邊　真吏菜　G3H2-0209
渡邊　洋平　S3H2-1605

ランチタイムセミナー

各日の昼休憩を利用して開催を予定しています．事前登録不要・参加費無料です．参加される場合は直接会場へアクセスください．

《大会1日目》10月27日（水）12：00～13：00

L1H5-0001（H5会場）　株式会社ワイエムシィ

画期的な精製技術を用いたバイオ医薬品・中分子医薬品の精製プロセス

L1H7-0001（H7会場）　ベックマン・コールター株式会社

BioLectorマイクロバイオリアクターによる微生物のバイオプロセス評価

《大会2日目》10月28日（木）12：00～13：00

L2H5-0001（H5会場）　天野エンザイム株式会社 / 株式会社樋口松之助商店

麹・酵素による日本酒の復興

L2H7-0001（H7会場）　国立研究開発法人 科学技術振興機構（JST）

環境調和型ものづくり - 発酵技術の高度化 -

《大会3日目》10月29日（金）12：00～13：00

L3H5-0001（H5会場）　株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ

生物工学的応用に向けた微小ハイドロゲルビーズの調製と機能化

第 73 回日本生物工学会大会

株式会社ワイエムシィ

ランチタイムセミナー

10月27日（水）12:00 ～ 12:50　**L1H5-0001**

画期的な精製技術を用いた バイオ医薬品・中分子医薬品の精製プロセス

演者：武藤 英吾（株式会社ワイエムシィ 連続プロセス事業部 部長 兼 京都研究所 部長）

ワイエムシィでは、バイオ医薬品・中分子医薬品向けの画期的な精製プロセスとして、ツインカラム連続クロマトグラフィーを提供しています。このプロセスでは、2本のカラムを用いた独自の技術により、以下の効率的な精製を連続的に行うことができます。

本セミナーでは、ツインカラム連続クロマトグラフィーの原理やプロセスの紹介に加え、従来の単カラムによるバッチ精製と比較して、どのように効率化できるのか、最新の実施例を交えて具体的に説明します。

アフィニティクロマトグラフィー（CaptureSMB）

高流速での精製やカラム利用効率を高めることができ、生産性の向上、および、プロテイン A 樹脂量や溶媒消費量の削減が可能です。

イオン交換＆逆相精製（MCSGP）

高回収率でプロダクトが取得でき、より多くの精製体を得ることが可能なため、精製原料の必要量削減が期待できます。

その他

異なる 2 種類の精製プロセスの連続実施や、不純物の分取・精製の自動化が実現できます。

GMP 対応生産機
Contichrom TWIN LPLC（CaptureSMB 用）

YMC　株式会社ワイエムシィ
〒600-8106 京都市下京区五条通烏丸西入醍醐町284
https://www.ymc.co.jp

お問い合わせ先 営業本部
京　都　TEL.(075)342-4503
東　京　TEL.(03)5439-9790

第73回日本生物工学会　ランチタイムセミナー

日　時　2021年10月27日［水］12：00～12：50

会　場　L1H7-0001

タイトル　**BioLectorマイクロバイオリアクターによる微生物のバイオプロセス評価**

演　者　北川　哲平
ベックマン・コールター ライフサイエンス
m2p-labsプロダクトマネージャー

BioLector XT

要　旨

微生物は医薬、食品、環境分野において大きく貢献してきました。急速なバイオテクノロジーの発展とともに、微生物を用いたバイオプロダクションの重要性は益々大きくなると考えられます。こうした理由から、微生物を用いた研究・開発が世界中で激化すると考えられます。

本セミナーではBioLectorマイクロバイオリアクターを用いた微生物のバイオプロセスにおけるデータ、アプリケーションをご紹介します。BioLectorが取得するデータの有用性、少量培養による迅速な細胞株のスクリーニング、培地の最適化に焦点を当てます。

本セミナー後半において、新製品BioLector XTをご紹介いたします。この装置が有する特長の一つである嫌気培養のアプリケーションを説明いたします。

Beckman CoulterおよびBeckman Coulterロゴは、Beckman Coulter, Inc.の登録商標です。

ベックマン・コールター株式会社

本　　社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 0120-566-730　☎ 03-6745-4704　FAX 03-5530-2460
e-mail bckkcas@beckman.com　URL https://www.beckman.jp

BECKMAN COULTER Life Sciences

MAPSS-LS-202108-39

第73回　日本生物工学会大会　ランチタイムセミナー

天野エンザイム株式会社 / 株式会社樋口松之助商店

麹・酵素による日本酒の復興

令和3年 **10月28日(木) 12:00**- 12:50 **【L2H5-0001】**

清酒成分α-エチルグルコシド（α-EG）の飲用によるヒト肌コラーゲンスコアへの効果

金沢工業大学　バイオ・化学部　応用バイオ学科　教授　**尾関健二**先生

日本酒のα-EGはエタノール、グルコースに次ぐ第3成分で、純米酒に多く0.6-0.8%含有する。この成分を高める醸造法は発酵初期からα-グルコシダーゼ剤（TG-B;天野エンザイム）を添加し、エタノールとマルトース以上のオリゴ糖の糖転移反応、すなわち日本酒の並行複発酵方式により生産する機能性物質（UVによる荒れ肌改善効果など）である。1.7% α-EG純米酒を9名の学生パネラー（22歳）で180mL（α-EGで3.1g）/日を8日間飲用（通常の食生活）し、7日目からコラーゲンスコアが8ポイント高まり、4週目まで20ポイント高い状態を維持した。5名の女性パネラー(20-40代)では、1.1% α-EG日本酒を50mL（α-EGで550㎎）/日を6日間飲用すると、7日目で6ポイント高まり6週目では7ポイント高い状態が継続することが分かった。TG-Bを添加すると3.1% α-EGのミリンが醸造できた。このミリン40-80mL調理に利用した6日間の昼食だけの食事試験（20-60代パネラー9名で、α-EGで1.24-2.48g）では、1週目でパネラー全員が平均10ポイント高まった。線維芽細胞実験の結果と合わせると日本酒中のα-EGが肌の線維芽細胞を賦活化し、コラーゲン生産を高めることを解明した。

麹菌と麹酵素について　http://www.higuchi-m.co.jp

株式会社　樋口松之助商店　研究室　室長　**山下秀行**

日本には微生物を使った発酵発酵食品が多いが、その中で、麹菌は、清酒や本格焼酎のような酒類から、みそ・醤油・みりんなどの調味料、そして甘酒のようなソフトドリンクの製造まで幅広く利用され、長年に亘り日本人の食生活に貢献してきた。麹は、穀物などを原料として麹菌を増殖させたものであり、使用する麹菌によって麹の外観や、味やかおりも異なる。また、麹菌株間の酵素産生能は異なり、さらに、基質の種類、初発水分量の差、製麹品温経過の違いにより麹の酵素活性は変化する。国菌として提唱されている麹菌は、Aspergillus (A.) oryzae, A. sojae, A. luchuensisの3種のみであるが、麹菌株と麹の多様性が、メーカー間の商品の差別化を可能とし、個性豊かな伝統的発酵食品が作られている。 麹の最大の特徴は、多種類のそして大量の酵素を含む事であり、これにより穀物の複雑な細胞組織を溶解し、さらに、グルコースやアミノ酸などの低分子成分まで分解することで、食品の味・かおり・色を形成する。その中で、酵母によるアルコール生成の基質ともなるグルコースの生成には、α-アミラーゼ、グルコアミラーゼ、α-グルコシダーゼが大きく関与することが知られているが、ここでは、麹菌のα-グルコシダーゼ活性を中心としてお話したい。

天野エンザイムの醸造用酵素製剤の紹介　https://www.amano-enzyme.co.jp

天野エンザイム株式会社　開発一部　**高山宗幸**

天野エンザイムは、多様な酵素製品を有するメーカーであり、名古屋に本社を置き、創業から120年以上の歴史を持つ。また、海外事業所は、米国、英国、中国、タイ、ベトナムに広がる。ランチタイムセミナーでは短い時間ながら、清酒醸造用酵素剤を中心に新製品や最近の話題に関してご紹介する。

ACT-X

ＪＳＴ戦略的創造研究推進事業

ＡＣＴ－Ｘ「環境とバイオテクノロジー」領域
ランチタイムセミナー

ACT-Xは、我が国が直面する重要な課題の克服に向けて、若手研究者が失敗を恐れずチャレンジする個人型研究であり、独創的・挑戦的なアイデアを持つ若手研究者を発掘して育成し、研究者としての個の確立を支援することを目的とするJSTのプログラムです。所属はアカデミア、民間を問いません。本セミナーでは、2020年度採択者の研究の一端をご紹介するとともに、来年度の公募に向けて、研究総括と領域アドバイザーから、若手研究者に挑戦状を送ります。アカデミア、企業研究者を問わず、斬新なアイデアをお持ちの若き挑戦者のみなさま、また若者の挑戦を応援したい目利きのみなさまには、是非、ご聴講下さい！お待ちしています。

日 時 ：　10月28日（木）12:00 - 12:50

講演番号：　L2H7-0001

基調講演「環境調和型ものづくり-発酵技術の高度化-」
清水 浩 先生　（領域アドバイザー）

大阪大学 大学院 情報科学研究科　教授

微生物の代謝を利用した有用物質生産は環境調和型ものづくりの方法として注目を浴びています。私たちの研究室では生物工学と情報科学を融合し、微生物代謝のデザインと実験的代謝解析を行っています。代謝工学による発酵技術の進展について、紹介します。

ACT-X研究者からの研究のご紹介

「自動培養装置と機械学習による細胞状態のフィードバック制御系の開発」
芝井 厚 氏　（理化学研究所 生命機能科学研究センター　研究員）

「シングルゲノム情報を用いた水圏ファージ-宿主間の相互作用解析」
西川 洋平 氏　（早稲田大学 ナノ・ライフ創新研究機構　次席研究員）

「野生イネ種子における二次代謝産物を介した植物-微生物間相互作用の分子基盤の解明」
吉田 悠里 氏　（国立遺伝学研究所 ゲノム・進化研究系　特任研究員）

来年度公募への誘い：

野村 暢彦 研究総括（筑波大学 生命環境系 教授／微生物サステイナビリティ研究センター 副センター長）

JST 科学技術振興機構

https://www.jst.go.jp/kisoken/act-x/research_area/ongoing/bunya2020-2.html

第 73 回日本生物工学会大会　ランチタイムセミナー

日時：10 月 29 日（金）　12：00〜12：50

講演番号：L3H5-0001　株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ

生物工学的応用に向けた微小ハイドロゲルビーズの調製と機能化

演者　（30 分）
九州大学 大学院工学研究院 応用化学部門
九州大学 未来化学創造センター バイオテクノロジー部門
神谷典穂先生

生物の基本単位である細胞は、物質生産のための反応場あるいは生体反応解析のための分析場を提供する水系の天然区画と見做すことができる。一方、天然脂質や合成界面活性剤により人工区画を作製することもできる。Water-in-Oil (W/O) 型エマルションは、ホモジナイザーを用いて簡便に調製可能であるが、粒径に分布が生じる。一方、マイクロ流路系を利用すると、均一サイズの W/O エマルションが得られることから、その適用範囲が広がる。我々は、末端チオール基を有する分岐型ポリエチレングリコールと西洋わさび由来ペルオキシダーゼ（HRP）を組み合わせ、外部からの酸化剤（HRP の基質となる過酸化水素）の添加を必要とせずにハイドロゲル化が進行する現象を見出した。得られるハイドロゲルは、ジスルフィド結合を架橋点とすることから、還元条件下で架橋点を開裂し、内包物の回収が可能である。本手法は、W/O エマルション内水相のハイドロゲル化にも適用可能であり、On-chip Droplet Generator と組み合わせることで、均一サイズの酸化還元応答型ハイドロゲルビーズ（HB）を調製できる。本発表では、無細胞タンパク質合成と HB の組合せの可能性と、細胞選抜系の構築に向けた HB の機能化に関する基礎検討の成果を報告する。

オンチップ・バイオテクノロジーズ製品技術紹介・新製品紹介

※神谷先生の御講演の前後にて製品紹介をさせて頂きます。

第73回　日本生物工学会大会講演要旨集

二〇二一

日本生物工学会

第 73 回日本生物工学会大会講演要旨集

2021 年 10 月 13 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