

アルギン酸ハイドロゲル固定化パン酵母の代謝物質測定系の構築

理工学研究科自然科学専攻 ○張 明浩
生命科学部生物科学科 松浦宏治
岡山大学

概要：市販のパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) をアルギン酸カルシウムハイドロゲルビーズに固定化し、そのゲルビーズをグルコース水溶液内に入れた際の①アルコール発酵におけるエタノール生成と二酸化炭素発生タイミングの評価、②アルコール発酵以外の揮発性物質の生成評価を行った。生成物の分析に基づいて、代謝物質の生産管理と反応系の開発につなげることを目指す。

1. 研究目的

酵母はその代謝によってアルコールやアミノ酸を産生する。最近は食品だけではなく工業的にもこれらの物質が使用される。酵母のリサイクルを行い、かつ反応効率を増すために、アルギン酸カルシウムなどのハイドロゲル内に酵母を固定化する。代謝反応実験の最適化を目的として、市販のパン酵母を用いて固定化と反応実験を行うことにより、反応系を低コストで構築できると考える。本研究ではグルコースを出発物質とした分析において、①アルコール発酵におけるエタノール生成と二酸化炭素発生タイミングの評価、および②アルコール発酵以外の揮発性物質生成評価の2点に着目した。生成物の分析によって、代謝物質生産管理と反応系の開発につなげる。

2. 実験方法および結果

市販のパン酵母 3 g (ニッポン社製) を 24 mL の精製水に分散させ、2.5% (w/v) アルギン酸ナトリウム水溶液 24 mL と混合し、1% (w/v) 塩化カルシウム水溶液に 1 滴ずつ滴下することでアルギン酸カルシウムハイドロゲルビーズを作製した。グルコース 10 g を溶解した 90 mL 精製水に上記の固定化酵母ゲル全量を添加し、5 分ごとに反応溶液上の気相を注射器で採取し、電気化学式アルコールチェッカーおよび CO₂ センサを用いて検出を行った。その結果、反応開始から 20 分程度は両方のセンサともに検出量に変化はなかった。25 分後以降にアルコールセンサと CO₂ センサの検出量の上昇が見られた。両センサともにその上昇タイミングが同じであり、1 日間はアルコール発酵が継続していた。GC/MS 分析の結果、反応開始から 6 時間後のエーテル抽出液において 3-メチル-1-ブタノールの生成が認められ、反応開始から 1 日後 (Day 1) でのみ脂肪酸 (パルミトリン酸・オレイン酸) などの生成が見られた。Day 2 では Day 1 ほどの生成物が見られなかったが、グルコースは多く消費されていた。

3. 応用の可能性

市販のパン酵母およびアルコールチェッカーを用いて、酵母のアルコール発酵を検出することが可能であり、酵母固定化条件、反応条件や装置の最適化を低コストで進めることができる。揮発性物質の検出もあわせて行うことにより、脂肪酸代謝の計測も同時に行い、反応経路の制御についても研究を進めることが可能である。最終的には、物質生産条件を見出すためのパイロットプラントへの応用展開が見込まれる。

ヒト精子の保存温度・培養液と運動性の関係

理工学研究科自然科学専攻 ○ 莊 雅洪
生命科学部生物科学科 松浦宏治

概要：ヒト精液内での精子の運動性は1日程度維持されるが、長期保存においては精液洗浄が必要となる。洗浄後のヒト精子を異なる温度条件および培養液で保存し、運動率と曲線速度を評価した。その結果、HTF 群では37℃保存で運動性が著しく低下した一方、Sperm Wash 群ではその低下が抑制された。保存温度と培養液組成が精子運動性の維持に重要であることが示唆された。

1. 研究目的

ヒト精液内においてその運動性は長くても1日しか継続しない。その理由は精液内に運動を阻害する物質が含まれているためである。そのため、長期間の保存においては精子洗浄が必要となる。洗浄後のヒト精子の運動性は保存条件によって変化することが知られているが、長期間の保存に適した温度条件については十分に明らかになっていない。そこで本研究では、ヒト精子を異なる温度条件（37℃、25℃、15℃）で保存し、運動率および曲線速度を比較することで、精子運動性を長期間維持するために適した保存温度を検討した。また、HTF および Sperm Wash を用いて精液を調製し、培養液の違いが保存後の精子運動性に及ぼす影響についても評価した。

2. 実験方法および結果

本研究は岡山理科大学「人を対象とする研究倫理審査」の承認を得ている。射出後のヒト精液0.2 mLをHuman Tubal Fluid (HTF)またはSperm Washを0.8 mL添加し遠心処理を行った。その沈降物を0.6 mLの同じ培養液で分散して3分割した後に、指定した温度下で保存した。保存開始時、2時間後、1日後および2日後にSperm Motility Analysis System (SMAS)を用いて運動率および曲線速度を測定した。その結果、HTF 群では37℃保存後に運動率および曲線速度が32%（2時間後）、7%（1日後）、3%（2日後）と著しく低下した(N=4, ANOVA $P<0.05$)のに対し、Sperm Wash 群では38%（2時間後）、28%（1日後）、8%（2日後）とその低下が抑制された(N=4, ANOVA $P<0.05$)。また、運動率と曲線速度との間には弱い正の相関が認められた($R^2=0.55$)。これらの結果から、ヒト精子の運動性維持には保存温度だけでなく培養液組成も重要であり、Sperm Washでの保存はHTFでの保存よりも長時間運動性を維持できた。

3. 応用の可能性

本研究で得られた知見は、ヒト精子の保存条件の最適化に活用できると考えられる。特に、保存温度や培養液組成が精子運動性の維持に与える影響を明らかにすることで、生殖補助医療における精子の短期保存や精液調製条件の改善に役立つ可能性がある。また、本研究結果は培養液成分と精子機能との関係を解析するための基礎データとして利用できる。今後、温度処理がミトコンドリア活性に及ぼす影響を評価することで、精子機能を維持する新たな保存法の開発につながる。

顕微画像解析による哺乳類精子鞭毛運動と頭部運動の関係

理工学研究科自然科学専攻 ○張 成博
生命科学部生物科学科 松浦宏治

概要：本研究では、ブタとヒト精子の動画から頭部長さと鞭毛角度を測定し、それぞれの運動の関係を調べた。その結果、一部の精子では頭部運動と鞭毛運動に関連がみられた。哺乳類精子の運動機構についてさらに検討していく。

1. 研究目的

ブタ精子やウシ精子においては、鞭毛運動だけではなく、頭部回転運動が顕微鏡下で観察されている。特に、ブタ精子の頭部が扁平であるために、顕微観察像から回転運動を定量化できると考えた。本研究では、哺乳類精子の頭部回転運動と鞭毛運動の関連性を明らかにするために、顕微画像解析を用いて鞭毛および精子頭部回転運動を示す特徴量を抽出した。精子の運動における生物種間の違いについて理解を深められる。

2. 解析方法および結果

本研究は岡山理科大学「人を対象とする研究倫理審査」の承認を得ている。200fps で撮影したブタ精子(N=8)とヒト精子(N=9)の顕微動画を用いて運動解析を行った。動画から 10 フレームごとの画像を抽出し、ImageJ を用いて、①精子鞭毛の根元、中央および末端の座標を取得し、鞭毛を三角形として近似し余弦定理を用いて鞭毛角度を計算した(Fig. 1 左)。次に、②頭部中央の幅を抽出した(Fig. 1 右)。得られた 2 つの特徴量 (①鞭毛角度、②頭部中央の幅) の時間変化(50 ms ごと)を解析し、頭部回転運動と鞭毛運動の関連について調べた。

ブタ精子においては②頭部中央の幅が小さい場合に①鞭毛角度が大きくなる傾向があった。特に精子頭部が水平面に対して垂直の場合①鞭毛角度は 130 度以上であった。ヒト精子においては①と②の値の散らばりがブタ精子よりも大きくなった。精子頭部が水平面に対して垂直になっても鞭毛が曲がっていたケースが、ヒト精子のほうがブタ精子よりも多くなっていた。頭部回転運動と鞭毛運動間の関係がブタ精子では顕著であった。

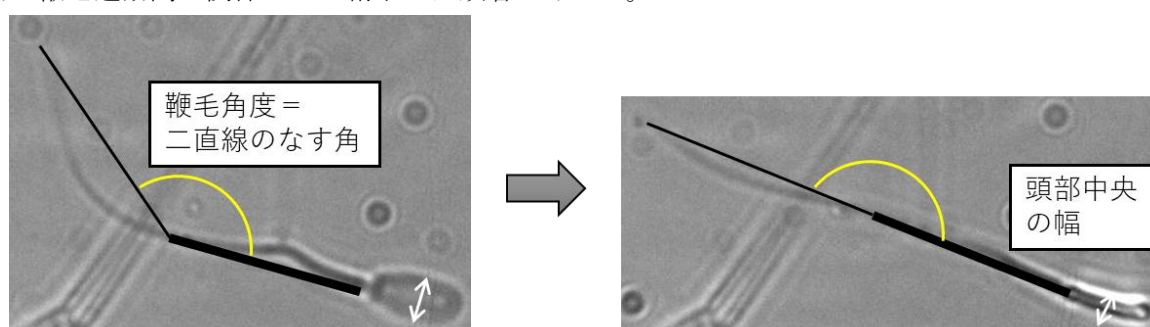


Fig. 1: ブタ精子の鞭毛・頭部回転運動と今回計算した 2 つの特徴量

3. 応用の可能性

現時点では、頭部回転運動と精子の品質との関係は見出されていないが、精子頭部回転運動と微細構造との関係や卵管内での精子頭部運動の理解を深めることで、ウシやブタ精子の人工授精に適した精子の発見につながる。

味覚変換タンパク質ミラクリンの立体構造解析

理工学研究科自然科学専攻 ○池川心穂
理学研究科臨床生命科学専攻(了) 市川明日香
理工学研究科自然科学専攻(了) 中 木凛
生命科学部生物科学科 山口 悟
兵庫県立大学

概要：pH により甘味、酸味の変化がおきるタンパク質：ミラクリンの作用機序解明を目的として、中性条件と酸性条件でのミラクリンの結晶化を行い、X 線結晶構造解析を行った。中性条件で得られた結晶は良い解析像を与え、1.8 Å で構造解析が出来た。

1. 研究目的

ミラクリン(MCL)は酸味を甘味に変化させる味覚修飾作用を持つ可溶性のタンパク質である。しかし、分子レベルでの作用のメカニズムの解析は未だに達成されていない。MCLの味覚修飾の作用機序解明にはMCLと甘味受容体の立体構造の情報が不可欠である。そこで本研究では、中性、酸性の2つの条件下でMCLの単結晶の作成し、X線結晶構造解析を行った。

2. ミラクリンの構造解析

ミラクルフルーツの果肉に PVPP(polyvinylpyrrolidone)を加え可溶性の不純物やポリフェノール類の除去を行った。その後、NaCl を含む緩衝液を用いて MCL を抽出し、抽出液に 50%飽和となるように硫酸アンモニウムを加えた。遠心分離後、NaCl を含む緩衝液で懸濁を行い、Ni-NTA カラムを用いてアフィニティークロマトグラフィーを行った。イミダゾールを含む緩衝液で溶出させたのち、シッティングドロップ法で結晶化を行った。

7,893 条件のうち 11 種類で結晶が確認された。この結晶を用いて大型放射光装置 Spring-8 の BL44XU ビームラインで回析強度データの収集を行った。1.25 M Ammonium sulfata, 0.025 M HEPES pH 7.5 の沈殿剤溶液を用いた結晶で 1.8 Å の分解能でデータ収集を行うことが出来た。

酸性条件ではシート状の結晶が得られた。これらの結晶はサイズ、品質の観点から X 線結晶構造解析には不十分である。最も結晶が観察された 30 mM クエン酸、1.25 M 硫酸マグネシウム、MCL 濃度 4 mg/mL の条件周辺に最適な結晶化の条件があると考え細かく条件を検討していく。

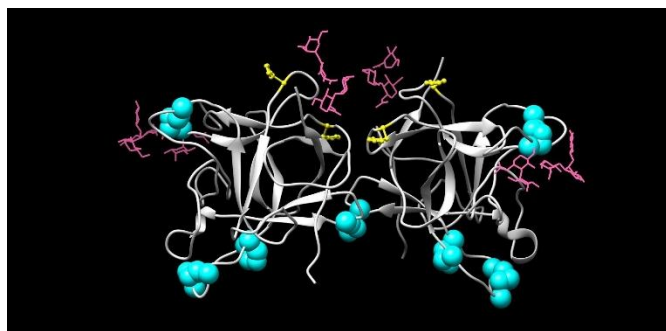


図1 中性条件でのミラクリンの構造

図2 30 mM クエン酸
1.5 M 硫酸アンモニウム
pH 5.0

3. 応用の可能性

味覚変化の作用が解明されることによって、新たな機能性食品の開発への可能性が示唆された。

味覚変換タンパク質ミラクリンの精製方法

理工学研究科自然科学専攻 ○塩崎愛佳

生命科学部生物科学科 山口 悟

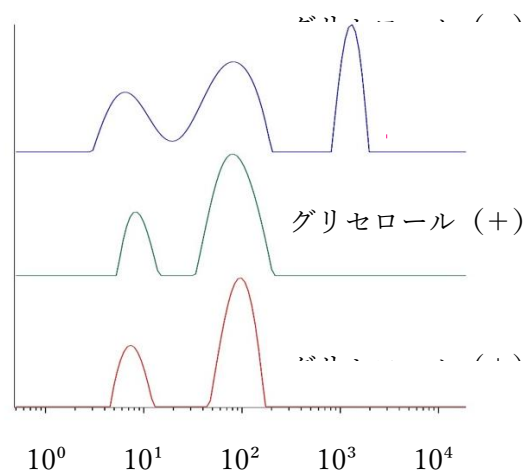
概要：pHにより味覚の変化がおきるタンパク質：ミラクリンの立体構造を解析するために単結晶が必要だが、結晶化には高純度の試料が必要となる。これまで報告されている精製方法を見直し、一度生成されたMCLが適切な処理を行うことで保存できることを示すことができた。

1. 研究目的

pH変化に応じて味覚修飾作用を示すタンパク質「ミラクリン (MCL)」の構造解析を行うためには、単結晶の取得が前提条件となる。そして、良質な結晶を得るためには、試料の高純度化が不可欠である。そこで本研究では、既存の精製法を再検討し、天然型のミラクリンをNiアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。また生成されたMCLを保存できることを示した。

2. 方法と結果

ポリフェノールが多量に含まれることが知られており、これらは精製過程において夾雑物として混入し、後続の分析や精製操作に悪影響を及ぼす可能性がある。そこで本実験では、ポリフェノールを除去する目的で polyvinylpyrrolidone (PVPP) を用いた処理を行った。加えるタイミング、量を検討した。さらに、目的タンパク質の濃縮および粗精製を目的として、硫酸アンモニウムを用いた塩析(硫酸沈殿)を複数の段階に分けて実施し、各飽和度における沈殿画分を回収し純度をチェックした。さらに一度精製したMCLの保存について光散乱法を用いて評価した。



	精製直後	凍結4回
Crystal		
Precipitation		

3. 応用の可能性

タンパク質の活性を持ったまま保存できることが示された。

100℃でタンパク質を分解できる酵素(Tk-SP)を用いた

丈夫な基質の分解評価と資源循環への応用

理工学研究科システム科学専攻 ○西野晃基 工学部応用化学科 古賀雄一
サラヤ株式会社

概要：超好熱菌から単離された 100℃でタンパク質分解活性を示す酵素(Tk-SP)を用いて、難分解性タンパク質である Keratin を分解し、毛髪や羽毛などの再処理を試みた。高温下で基質が作用することで、機能性ペプチドの生産が期待される。

1. 研究目的

動物の外皮から生産される羽毛や鱗、羊毛などは外界の過酷な環境下でも維持できるように強固な構造を取った難分解性タンパク質であるKeratinで構成される。強固な構造であるために、土壌処分の際に微生物が生産する酵素での分解には長い年月がかかる。そこで、本研究では基質に熱をかけながら分解することができる酵素Tk-SPにて、これらの難分解性タンパク質の分解能評価を行った。また本酵素は100℃でも失活しない構造の安定性や化学変性剤耐性があることから、産業用途での使用が期待される。

2. Keratin Azure を例とした外皮由来難分解性タンパク質(Keratin) の分解能の評価

羊毛などの難分解性タンパク質を分解する耐熱性酵素として、Fervidolysin という酵素が挙げられるが、この酵素と Tk-SP 分子の立体構造を重ね合わせると RMSD 値は 1.555 Å となり構造的に似ている結果となった(Fig 1)。従って Tk-SP でもこのような難分解性タンパク質を分解できるかを検証した。

本酵素で、外皮由来難分解性タンパク質の 1 つである α -keratin の分解能を Keratin Azure で分解評価をした (Fig 2)。この基質は α -keratin に分類される羊毛をレマゾールブリリアントブルーR (RBBR) によって染色した基質であり、羊毛が分解されることで RBBR ($\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$) が基質から離れて溶液が青色に染まる。添加直後から RBBR が遊離したため、Tk-SP は外皮由来難分解性タンパク質の一種である α -keratin の分解能があると評価した。

3. 応用の可能性

羊毛などの哺乳類が持つ毛は α -Keratin で構成されており、分解物の中には抗酸化物質が豊富に含まれていることが知られているためシャンプーや化粧水など様々な製品に応用されている。また基質を熱で変性させながら分解するため、既存の分解酵素とは異なる機能性ペプチドが得られることが期待される。

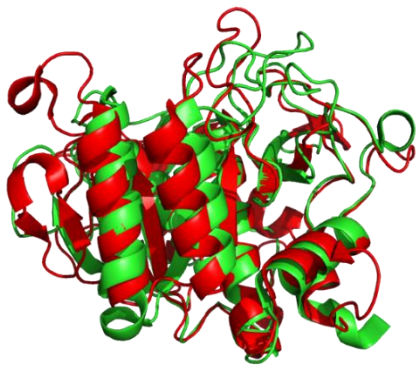


Fig 1 Tk-SP と Fervidolysin の重ね合わせ
緑：Tk-SP、赤：Fervidolysin

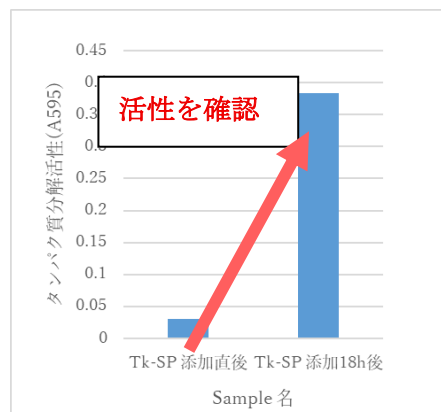


Fig2 Keratin Azure を用いた活性測定

耐熱性タンパク質ドメインからの Binding scaffold(人工抗体)の開発

理工学研究科システム科学専攻 ○大平朋季 工学部応用化学科 古賀雄一

概要：(概要の記載内容)

近年「Binding scaffold」(人工抗体)の作製が盛んに行われている。そこで本研究では耐熱性タンパク質である SD1 を用いた「Binding scaffold」の開発を目標としている。

「Binding scaffold」を作製する上の操作として、ファージディスプレイ法と呼ばれる抗体選別法がある。その中でもファージディスプレイ法におけるバイオパニングは、提示タンパク質と特異的に結合する分子を用いて目的ファージを選抜する有効なスクリーニング手法である。このことからバイオパニング操作の最適化を目指す。

1. 研究目的

近年タンパク質の相互作用を利用した技術が普及している。その中でも特に抗体医薬品の分野で用いられていることが多い。しかし、抗体医薬品を作るには莫大なコスト、時間がかかってしまう問題がある。このような問題から現在、抗体と同等の機能をもつ人工タンパク質「Binding scaffold」が注目されている。

本研究では「Binding scaffold」の作製を目的として、超好熱菌由来の酵素から単離されたタンパク質 SD1 を利用する。SD1 を利用した理由として、SD1 はラクダ科動物抗体である VHH と高い構造類似性をもつことが報告されているからである。また SD1 は高い安定性と小型構造をしており、このことから結合部位となるループ構造のアミノ酸配列を改変させることで、多様な標的分子に対応可能な「Binding scaffold」として利用できると考えた。

2. Binding Scaffold 作製に向けたバイオパニング条件の検討

「Binding scaffold」の作製を行うにあたって、ファージを用いたファージディスプレイ法が重要である。その中でもファージディスプレイ法におけるバイオパニングは、提示タンパク質と特異的に結合する分子を用いて目的ファージを選抜する有効なスクリーニング手法である。本研究では、このバイオパニング過程におけるスクリーニング条件の最適化に着目し、選択効率および特異性の向上を目指す。具体的には、ビオチン化分子の固定化条件、洗浄条件、結合・解離条件などを系統的に検討し、再現性の高い選抜系の構築を行う。

3. SD1 の応用

「Binding scaffold」をSD1で作製できた時、SD1は熱に強いことから停電や輸送中の温度変化に強く、発展途上国や災害現場でも利用しやすく、さらに冷蔵庫や冷凍庫への依存が減ると考えている。またそれに伴い、医療コストの削減もできると考えている。

バイオパニングのスクリーニング条件の最適化がかなった場合、更なる時間の短縮につながる。最適化による選択効率および特異性の向上が見込めるだけでなく、再現性の高い選抜系が行えるようになる。また新規の抗体医薬品の作製が容易になると考える。

藍染め染料インジゴの大腸菌による大量生産の試み

生命科学部生物科学科 南 善子
理工学研究科自然科学専攻 ○草場 隆

概要：藍染料インジゴは、現在、工業的に大量生産されている。しかしながら、環境的負荷の観点から生物体での生産が見直されている。本研究では、大腸菌で、インジゴの大量生産を試みた。

1. 研究目的

インジゴは古来より、タデ科植物のアイを原料として生産されてきた藍染の染料である（図 1）。しかしながら、植物を用いて染料を製造する方法は非常に手間がかかり、天然染めは高価である。一方で、安価で大量生産が可能な化学合成が現在まで主流として用いられてきた。しかし、その製造プロセスにおいて、合成原料や廃液などの問題から環境に大きな負荷がかかっており、近年では生物体を用いた大量生産への関心が高まっている。そこで本研究では、大腸菌を用い、インジゴの大量生産を試みることにした。

2. 方法、結果

タデアイ由来のインドール水酸化酵素（フラビン含有モノオキシゲナーゼ：FMO）遺伝子が大腸菌内で発現させた。培地に添加したトリプトファンを、大腸菌の内在性トリプトファナーゼによりインドールにし、FMO でインドキシルを生成させた。続いて、空気酸化によりインジゴを生産した。条件をいくつか検討した結果、現在、培地 1 L あたり約 35 mg のインジゴ生産が可能となっている（図 2）。

また、不溶性インジゴの蓄積が大腸菌の増殖の妨げになることも考えられるため、その前駆体である可溶性インジカンの生産も試みた。タデアイ由来のインジカン合成酵素（IGS）遺伝子を、FMO 遺伝子とともに大腸菌内で共発現させ、インジカンを生産させたが、その生産量は低く、現在、検討中である。

3. 応用の可能性

培地コストなどを考慮すると、現時点ではまだ大量生産が達成されたとは言えない段階であり、さらなる検討が必要である。しかしながら、本手法は安価かつ容易に、時期に関係なく、そして環境に有害な有機廃液を排出することなくインジゴを生産できる可能性を秘めている。また、大腸菌を用いることで、インジゴ誘導体であるインジルビン（赤色）などへの誘導も可能であり、微妙な色合いを表現できる染料の生産が期待される。

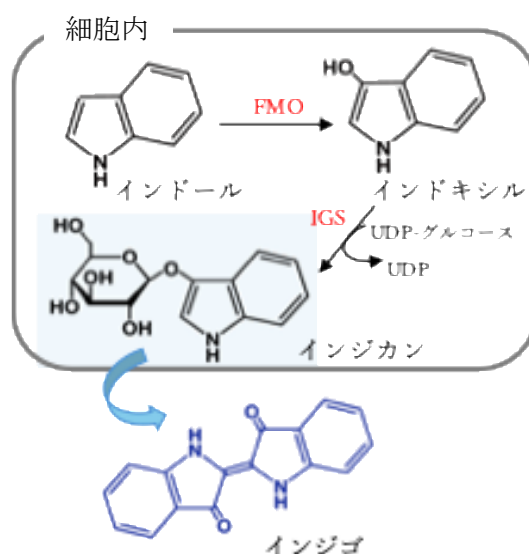


図 1 インジゴ生成の仕組み

細胞を破碎後、インジカンは酵素的に分解、空気酸化され、インジゴとなる

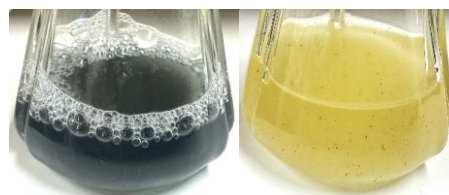


図 2 大腸菌によるインジゴ生産

左は FMO が発現しインジゴを生産している大腸菌。右はコントロール

マルチモーダル赤外超解像顕微鏡による毛髪内ケラチタンパク質の観察

理工学研究科自然科学専攻 ○三船心花

理学部化学科（卒） 片岡大地

理学部化学科 高橋広奈, 酒井 誠

概要：複数の手段によるマルチモーダル赤外超解像顕微鏡を駆使して、生体試料内部におけるタンパク質二次構造の選択的な分布観察に成功した。また、偏光依存性測定により、その分子配向も明らかにした。

1. 研究目的

毛髪にヘアアイロンやカラーリングなどを用いて熱処理、化学処理を行うと、毛髪がダメージを受け外観や性質が変化する。毛髪の性質を決めるのは 85~90% を占めているコルテックス領域である。この部分は α -ヘリックス構造を有したケラチタンパク質 (α -ケラチン) が繊維状に集まり、S-S 結合で結びつき形成されている。本研究では毛髪のダメージを明らかにするために、複数の手段によるマルチモーダル赤外超解像顕微鏡を用いて毛髪の内部構造観察を試みた。

2. マルチモーダル赤外超解像顕微鏡による観察

本研究では2種類の赤外超解像顕微鏡技術を駆使する。1つ目は振動和周波発生 (VSFG) 法を利用したものである。VSFG は二次の非線形光学過程で、反転対称性のない界面近傍の分子のみを観察できる。2つ目は四光波 (4-wave) 法を利用したものである。4-wave は三次の非線形光学過程で、界面から離れたバルクの分子も観察できる。図1はチップから切り出した薄片化試料の0分試料、120分処理試料（試料を分割し一方を未処理の基準試料とした）に対してVSFG観察を行った結果である。透過像同士を比較すると、0分試料における同一毛髪の横断面(a)と(b)では変化は見られないが、120分処理試料において基準試料(g)より処理試料(h)では空洞が増加した。VSFG像を比較すると、0分試料では(c)と(d)で強度変化はほとんど見られないが120分処理試料では基準試料(e)に比べ処理試料(f)の強度が増加した。この原因として毛髪に対して化学処理を行うと α -ケラチン内のS-S結合の開裂が起こる。VSFGは二次の非線形光学過程であり、反転対称性が崩れた界面近傍の分子を選択的に観察している。そのため界面近傍に配向した α -ケラチンの割合が増え、強度が増加したと考えられる。

図2は0分、30分、60分、120分処理試料に対しVSFG観察を行い、強度比を時間に対してプロットしたものである。これによると、時間に比例して強度比が増加しており、S-S結合の開裂が処理時間に比例していると考えられる。

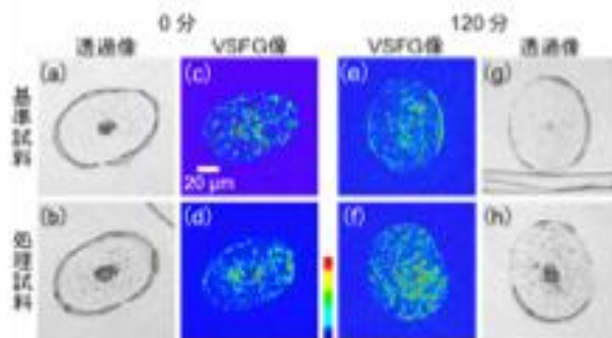


図1. 化学処理試料の基準及び処理試料の透過像とVSFG像

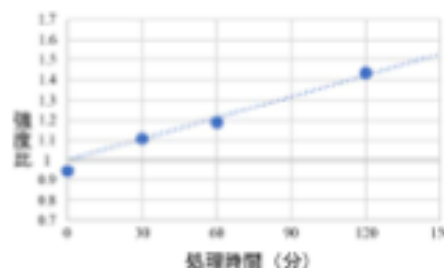


図2. 各処理時間における強度比

3. 応用の可能性

マルチモーダル赤外超解像顕微鏡は、生体の内部構造(ナノ構造)で見た目の形状(マクロな性質)が決まるのを見ることができると考えている。加えて、本手法は色素染色・プローブなしの分子イメージング技術であり、生細胞の内部でさえも分子レベルで観察し、かつ、生命現象ダイナミクスを可視化できる強力なツールになると期待する。

バブリングによるオゾン水の作製方法の検討

生命科学部生物科学科 内貴 猛 理工学研究科自然科学専攻 ○劉 沢西
宮崎大学, 株式会社 ULAS

概要：オゾンガスを超純水にバブリングしてオゾン水を作製し、オゾンガス濃度、水温、オゾンガス流量、気泡の大きさが溶存オゾン濃度におよぼす影響を調べ、1 ppm のオゾン水を作製する方法を検討した。

1. 研究目的

オゾン発生器で生成したオゾンガスを水中に吹き込み、オゾン水を作製できる。しかし、どのような条件が溶存オゾン濃度を決定しているのかしっかりとわかっていない。そこで、本研究では溶存オゾン濃度におよぼすオゾンガス濃度、水温、オゾンガス流量、気泡の大きさの影響を調べ、1 ppm のオゾン水を作製する方法を検討した。

2. 実験方法

オゾン発生器（ジェネテック、AZ291K）を密閉したガラス水槽内（0.6×0.3×0.36 m）に設置した。シリコンチューブを用いてエアポンプと水槽、エアストーンを接続し、超純水を入れたビーカー内にエアストーンを設置した。オゾン濃度測定計（Safegas 社、SKY-O3-50）でオゾンガス濃度を測定し、防水溶存オゾン計（カスタム、DOZ-1000PE）で水中の溶存オゾン濃度を測定した。

3. 実験結果

- ① オゾンガス濃度が溶存オゾン濃度におよぼす影響を検討するため、オゾン濃度がほぼ一定のオゾンガスをバブリングした。約 20、40 ppm のオゾンガスをバブリングした結果、それぞれ 0.01、0.03 ppm の溶存オゾン濃度のオゾン水を作製できた。これらの結果から、オゾンガス濃度が高いほど、溶存オゾン濃度が高くなることがわかった。
- ② 水温が溶存オゾン濃度におよぼす影響を検討するため、冷蔵庫に入れて 6℃にした超純水にオゾンガスをバブリングした結果、溶存オゾン濃度は 0.45 ppm となり、同じ濃度のオゾンガスを 19.7℃の水にバブリングしたときの溶存オゾン濃度（0.39 ppm）より 0.06 ppm 高く、水温が低いほど、溶存オゾン濃度が高くなることがわかった。
- ③ 流量が溶存オゾン濃度におよぼす影響を検討するため、100、400、600 mL/min の流量でオゾンガスを送気した結果、流量が高いほど、溶存オゾン濃度が高くなり、600 mL/min の送気流量で最大 1.17 ppm の溶存オゾン濃度になることがわかった。
- ④ 気泡の大きさが溶存オゾン濃度におよぼす影響を検討するため、3 種類のエアストーンを使用した。平面エアストーン、円柱エアストーン、丸エアストーンでは発生する気泡の大きさが異なり、気泡の平均直径は、それぞれ 1.22 ± 0.68 、 1.54 ± 0.82 、 2.38 ± 1.20 mm であり、作製されたオゾン水の溶存オゾン濃度はそれぞれ 1.17、0.92、0.69 ppm であった。小さい気泡にするほど溶存オゾン濃度が高くなることがわかった。

4. まとめ

本研究によりオゾンガス濃度が高いほど、水温が低いほど、オゾンガスの流量が高いほど、気泡が小さいほど溶存オゾン濃度が高くなることがわかり、使用しているオゾン発生器、室温の水でも 600 mL/min の送気流量で平面エアストーンを使用すれば 1 ppm のオゾン水を作製できることがわかった。

より高い溶存オゾン濃度のオゾン水を作製するために、より高い濃度のオゾンガスを発生できるオゾン発生器および送気流量をさらに高くしたらどうなるのかを今後検討する予定である。

オゾン水噴霧によるオゾン濃度低下要因の検討

生命科学部生物科学科 内貴 猛

理工学研究科自然科学専攻 ○胡 俊哲, 肖 振翼

宮崎大学, 株式会社 ULAS

概要：オゾン水を噴霧すると溶存オゾン濃度が低下し、殺菌効果が弱まる。そこで、本研究では噴霧により溶存オゾン濃度が低下する要因を明らかにし、オゾン濃度の低下を最小限に抑える最適な噴霧方法を探索している。今回は、スプレー容器の容量、内面の粗さ、材質がオゾン濃度に与える影響を明らかにした結果を報告する。

1. 研究目的

オゾン水を噴霧した際のオゾン濃度低下の要因を調べるために、本研究ではプラスチック容器の容量、容器表面の粗さ、容器の材質が溶存オゾン濃度におよぼす影響について検討した。

2. 実験方法および結果

①PP 製容器の容量が溶存オゾン濃度におよぼす影響の検討

オゾン水作製装置(日機装、ハンドレックス)で作製したオゾン水を容量の異なる3種類のPP(ポリプロピレン)製ビーカー(300、500、1000 mL)に入れ、溶存オゾン計(東亜ディーケーケー、OZ-20)により溶存オゾン濃度を測定し、濃度の経時変化を $c(t) = c_0 e^{-kt}$ で近似し、溶存オゾン濃度の減衰速度の指標として減衰係数 k を求め、9回の実験の平均値を比較した。その結果、300 mL および 500 mL のビーカー間では有意差はなかった。一方、1000 mL のビーカーの溶存オゾン濃度の減衰係数が300 mL および 500 mL のビーカーより有意に大きかった(図1)。減衰係数は液面面積と相関があり、液面からのオゾンの放出により溶存オゾン濃度が低下することが明らかになった。

②PP 容器内面の粗さが溶存オゾン濃度におよぼす影響の検討

PP製ビーカーの内面を粒度の異なる耐水研磨紙(#240、#600、#2000)で研磨し、オゾン水を入れ、溶存オゾン濃度の減衰係数($n = 4$)を比較した。その結果、表面粗さが異なっても、溶存オゾン濃度の減衰係数に有意な差はなかった。

③ビーカーの材質の違いが溶存オゾン濃度におよぼす影響の検討

オゾン水を HDPE 製、PP 製、PTFE 製、TPX 製、ステンレス製、ガラス製のビーカーに入れ、溶存オゾン濃度を測定し、濃度の減衰係数の平均値($n = 9$)を比較した。その結果、TPX 製ビーカーでは減衰係数が他のビーカーより有意に大きかった($p < 0.001$)。PTFE 製、PP 製、HDPE 製およびステンレス製のビーカーに入れたオゾン水では、溶存オゾン濃度の減衰係数に有意な差は認められなかった($p > 0.05$)が、PTFE 製ビーカーの減衰係数が最も小さかった。

3. 今後の研究

本研究により、TPX 以外の材料で液面面積をできるだけ小さくしたスプレーを作製すれば、オゾン水中の溶存オゾン濃度の低下を抑えられることがわかった。

今後は、噴霧粒径の大きさが溶存オゾン濃度におよぼす影響を検討し、オゾン水噴霧時における溶存オゾン濃度の低下を最小限に抑える最適な噴霧方法の探索を継続する。

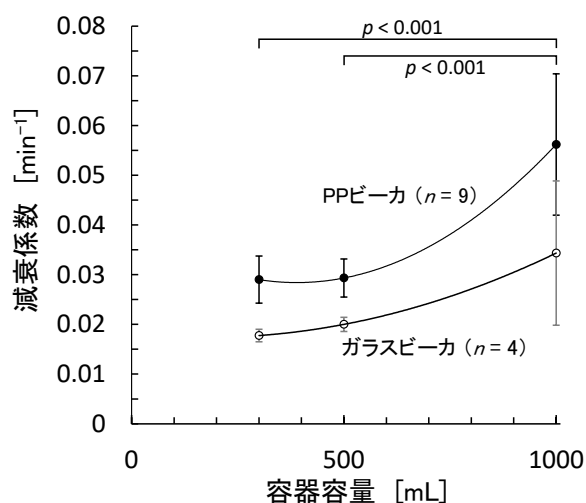


図1 PP 製ビーカーの容量が溶存オゾン濃度の減衰係数におよぼす影響

野生酵母の探索と醸造への応用

研究・社会連携機構ワイン発酵科学センター ○金子明裕

理工学研究科自然科学専攻 榎田実来

生物地球学部生物地球学科 田口未佳

嘉美心酒造株式会社

概要：自然界の花や果実等から野生酵母の単離を行い、ワイン醸造を行った。

単離野生酵母を用いて日本酒を醸造・製品化した。

1. 研究目的

ワイン発酵科学センターでは岡山県内を中心に自然界から酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を単離し、ワイン、ビール、日本酒、パンといった発酵食品への応用を検討している。

本研究では、酒類・食品への利用が可能な酵母 *S. cerevisiae* を岡山県内外の植物・花・果実、昆虫等から採取し、アルコール発酵力、亜硫酸耐性、香気生産能の優れた酵母を単離・選抜、ワイン醸造を行った。また、糖資化性試験を実施し、ビール、パン等の発酵食品への応用の可能性を検討した。

2. 花、果実からの酵母の単離とワイン醸造

岡山理科大学構内をはじめ、岡山県内外の植物の果実・花・葉・樹皮・樹液、昆虫等を分離源として、ワイン醸造に適した野生酵母の分離を試みた。約800の菌株の中から、亜硫酸耐性、アルコール発酵能を指標にスクリーニングを行い、果実（マスカット・オブ・アレキサンドリア、ピオーネ）、花（ユチャ2株、ビワ、モチツツジ）から6株を選抜した。単離菌は、rDNA 5.8S-ITS領域と26S D1/D2領域の遺伝子解析により、*S. cerevisiae* と同定した。

単離・選抜した酵母6株について、マスカット・オブ・アレキサンドリアを用いた白ワイン醸造を行った。アルコール度数10%以上のワイン醸造が可能であった。分離された株のなかでマスカット・オブ・アレキサンドリアから分離されたAK酵母（Fig.1）は優れたアルコール発酵能に加え、酢酸イソアミル、 β -フェネチルアルコールといった吟醸香が高く、アルコール生産性も12%以上が見込めることから、嘉美心酒造株式会社（浅口市）と共同開発を行い、フルーティーな香りの高い純米酒「eme」（Alc. 12%）を製品化した（Fig. 2）。

また糖資化性試験により、マルトース資化性を有する株が2株確認され、パンやビール醸造への応用の可能性が示唆された。

3. 応用の可能性

高香気成分生産性酵母の育種、各種ワイン醸造、日本酒、ビール醸造、パン等への応用。

- 1) 自然界、果実・野菜等からの微生物の単離・同定。
- 2) ワイン、日本酒・蒸留酒等酒類、発酵食品の成分分析、発酵方法、精製等の検討が可能。

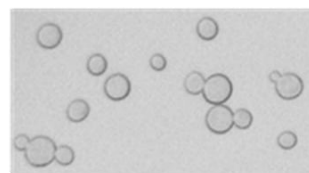


Fig. 1 *Saccharomyces cerevisiae* AK株



Fig. 2 純米無濾過生原酒「eme」（嘉美心酒造）

天敵臭化合物の忌避剤への応用を目指した基礎的検討：マウスでの行動解析

理工学研究科自然科学専攻 ○中村隆聖

理学部動物学科 水野信哉

概要：キツネ肛門腺由来物質(チアゾリン誘導体)の各種修飾体を用いて齧歯類での忌避行動を解析している。今回、忌避の過程で恐怖反応を伴う誘導体と伴わない誘導体が存在する事を見出した。以上の所見に基づき、動物の特性による忌避剤の使い分けの可能性を示したい。

1. 研究目的

マウスなどの小型齧歯類の天敵であるアカキツネの肛門腺由来天然化合物(チアゾール化合物, TMT)は齧歯類に恐怖反応(竦み)を誘導する事が知られている。竦みは学習ではなく捕食者を回避するための生得的行動(本能)と考えられている。当研究室では TMT 類似の合成誘導体を用いて、マウスでの餌掘り起こし時間を指標として忌避効果の解析を進めている。近年、TMT とその誘導体のセンサーはワサビ受容体 (TRPA1) である事が実証されている。野生動物と人間の共存を考える際、棲み分けは重要な生態学的意義を持つ。また、殺鼠剤ではなく忌避剤を用いる事は動物福祉の観点からも重要であると考えている。そこで今回、TRPA1 受容体のリガンド候補とされる複数の化合物を用いて、マウスに対する竦みと忌避の行動を評価する事とした。

2. 方法

Slc 社(浜松)より購入した ICR マウスを実験に用いた。(1)掘り起こし試験：動物を 24 時間絶食させ、以下の解析を行った。空腹時の求食行動を視覚ではなく嗅覚に依存した評価として行うため 2cm の深さのオガクズに固形食(MF, オリエンタル酵母)を埋めて隠し、餌を掘り起こしてかじるまでの時間を計測した。(2)候補化合物：TMT 誘導体である 2,4,5-トリメチルチアゾール(245TMO, サンタクルズ社), 4-メチルチアゾール(4MTO, 東京化成), 2,4-メチルチアゾール(24DMTO, 東京化成)および 2-メチル-2-チアゾリン(2MT, 東京化成)を評価に用いた。それぞれの化合物は 3%濃度となるように希釈して固形食に塗り、掘り起こし時間を計測した。

3. 結果

今回のマウスでの解析に用いた 4 つの候補化合物の全てにおいて対照群(蒸留水)と比較して掘り起こし時間の顕著な延長が観察された。マウスへの竦みの誘発は 2MT で最も強く、3%濃度では 13 例中 11 例で強い竦みに一致して、餌周囲に近づくそぶりを殆ど見せなかった。そこで 2MT における竦み発現濃度を検討するために階段希釈を行った結果、1%濃度でも竦みに一致した忌避行動を確認する事ができた。これに対し、2MT の 0.3%濃度では餌の掘り起こし時間は延長するものの、竦みの発現が安定しない個体も散見された。高濃度 2MT で観察された竦みに依存する忌避効果は 3%濃度の 24DMTO でも概ね再現される事が判明した。一方、マウスは 3%濃度の 4MTO と 245TMO に対して殆ど竦み行動を示さず、餌周囲にいったん集まるが餌の上にオガクズを掛けて敬遠する、といった奇異行動が比較的頻繁に観察された。

4. まとめ

今回の解析により、アカキツネ肛門腺由来チアゾール化合物(TMT)の修飾化合物が齧歯類に対する忌避剤に利用できる可能性が浮上した。とりわけ、生得的行動とされる竦み(恐怖心)を誘導する 2MT と 24DMTO は即効性の高い強力な忌避剤として有望であると考えている。一方、竦みを誘導しない 4MTO や 245TMO は恐怖心ではなく警戒心を誘発する事から、野生動物との棲み分け(ゾーニング)や馴れ学習の際に負の強化因子として活用できるかもしれない。私達はキツネよりも出現が早いハムスターでは 2MT に対する竦みが欠落している事を見出しており、捕食者が放つ天敵臭が被食者の進化や適応の道筋を検証する基盤ツールになる事も期待される。

自己免疫疾患関連抗原 Caspr2 と MuSK の TAPS 化処理による特性変化の検討

理工学研究科自然科学専攻 ○施 雲琦, 加茂聖也, 徳永凌山
生命科学部生物科学科 二見 翠

概要：自己免疫疾患に対する抗原特異的吸着療法への応用を目的として、自己免疫疾患関連抗原 Caspr2 と MuSK をモデルとして固定化した担体を作成した。これらの作成条件の検討と、ウサギ抗血清中の抗体吸着評価について発表する。

1. 研究目的

特に重篤な自己免疫疾患は標準的な治療プロトコルが確立されておらず、治療方法の選択肢拡充が望まれる。患者血液から体外循環で病原性自己抗体を除く方法は、内科的薬物療法と比べて速やかに病原性抗体を除去できる、血漿交換法と比べて他人の血漿の補充からくる炎症や感染症のリスクが少ないことが利点であるが、本邦では新しい吸着器開発は長期間滞っている。本研究室では大腸菌宿主で変性タンパク質を大量発現し、これを変性状態で可溶化するカチオン化化学修飾をベースとした、自己抗体吸着担体作成におけるプラットフォームを考案した（下図参照）。自己抗体の抗原タンパク質を変性状態で担体に高密度で固定化すれば、自己抗体の特異的吸着が可能であることに加え、製品組み立て終了後に滅菌処理が可能という医用材料に必須な可滅菌性も兼ね備えると考えており、本日はこれらの検証結果について報告する。

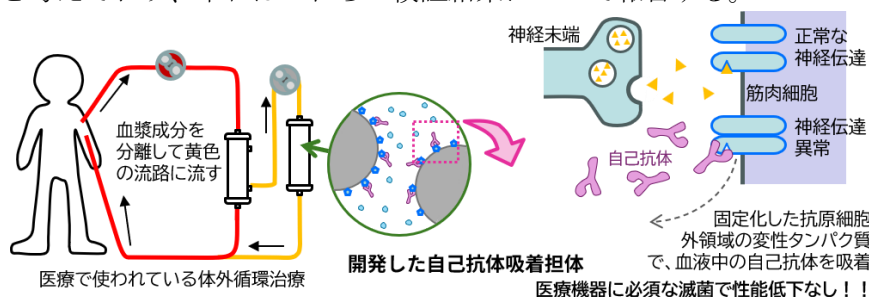


Fig. カチオン化をベースとした抗原固定化担体による自己抗体吸着イメージ

2. 重症筋無力症と自己免疫性辺縁系脳炎をモデルとした自己抗体吸着器の作成と評価

重症筋無力症と自己免疫性辺縁系脳炎の抗原膜タンパク質の細胞外ドメインを、大腸菌を宿主として変性状態で発現させ、宿主抽出液の不溶性画分をカチオン化化学修飾により可溶性とした。自己抗体の吸着性能の向上を目指して担体への抗原の高密度固定化を行うため、変性カチオン化抗原を限外ろ過法により濃縮したところ、20~40 mg/ml まで濃縮可能であることが示された。すなわち抗体を捕捉するリガンドとして変性カチオン化抗原を用いることで、抗体の高い吸着性能と、この担体充填した吸着器の小型化が見込める。これらの抗原を固定化した磁気ビーズを作成し、医療機器製品に用いられる滅菌方法3種（高圧蒸気滅菌、EOG 滅菌、 γ 線照射）を行って、各抗原に対するウサギ抗血清中の抗体吸着能の評価と可滅菌性を調べた。その結果、作成した担体の抗体吸着能は滅菌処理に影響を受けないこと、そして抗 MuSK 抗体については、学術論文で公表されている患者体内の自己抗体量を参考にすると、成人一人当たりの治療に必要な担体量が数 ml 程度であると見積もられ、既存の自己抗体吸着器より大幅に小型化できる可能性が示された。

3. 応用の可能性

カチオン化抗原の高密度固定化担体は、病原性自己抗体を高効率かつ選択的に除去できる免疫吸着材の開発につながることを期待される。また、本研究で確立する抗原調製および固定化技術は、重症筋無力症だけでなく、他の自己免疫疾患関連抗原にも応用可能であり、将来的には高選択的かつ低侵襲な抗原特異的免疫吸着療法の実現に貢献すると思われる。

間葉系幹細胞培養上清が皮膚線維芽細胞に及ぼす影響と老化との関係

理工学研究科自然科学専攻 ○劉 金燦, 李 澄陽
生命科学部生物科学科 神吉けい太

概要：皮膚線維芽細胞の加齢に伴う ECM 産生低下に着目し、MSC 培養上清 (MSC-CM) による回復効果を検討した。MSC-CM は老化細胞で減弱したコラーゲン発現を回復したが、老化細胞では MSC-CM に対する応答が著しく減弱していた。老化細胞の感受性低下の改善が重要と考えられた。

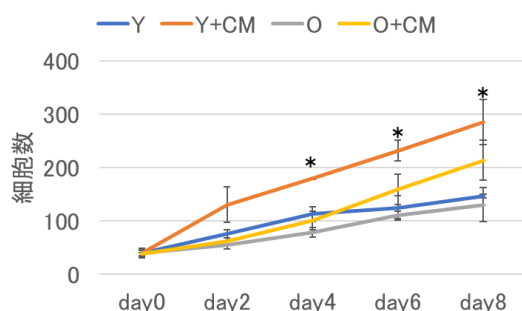
1. 研究目的

皮膚の老化に伴い、真皮線維芽細胞 (NHDF) によるコラーゲンやエラスチンなどの細胞外マトリクス (ECM) 産生能は著しく低下する。これまでの研究において、間葉系幹細胞培養上清 (MSC-CM) は NHDF 細胞の細胞増殖を強力に促進し、老化指標を低減させる効果が示されている。しかし、加齢によって一度低下した ECM 産生能を MSC-CM の作用によって実際に回復・反転させられるか、またその際の細胞応答性が若い細胞と老化細胞でどのように異なるかについては依然として不明な点が多い。そこで本研究では、老化した NHDF 細胞における ECM 産生能の回復アプローチを確立することを目的とし、若い細胞と老化細胞における ECM 関連遺伝子の発現比較、および由来組織の異なる MSC-CM を処理した際の発現動態の定量的評価を行った。

2. 実験方法および結果

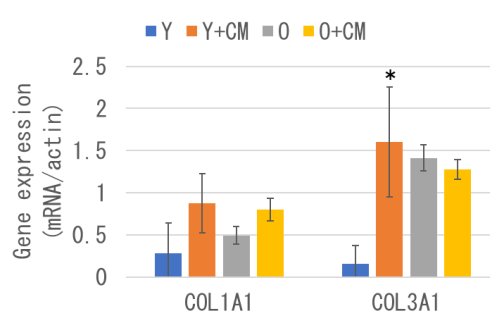
継代数の若い NHDF 細胞と継代数の多い老化 NHDF 細胞を対照培地および MSC-CM 培地を含む培地で培養した。8 日目まで 2 日おきに DAPI 染色で細胞数を比較した結果、対照群 (NM) に比べて MSC-CM (CM) 添加群ではどちらの細胞でも細胞量の増加が確認されたが、老化細胞では 8 日目まで有意差は認められなかった (Fig. 1)。

次に、若い NHDF 細胞および老化 NHDF 細胞に対して脂肪由来 (AT) の MSC-CM を用いて処理を行い、コラーゲン遺伝子 (COL1A1・COL3A1) の発現レベルを qPCR 法により比較定量した。その結果、若い細胞では MSC-CM 処理により COL3A1 の発現が有意に上昇した (Fig. 2)。一方、老化細胞では応答が乏しく、若い細胞に比べて MSC-CM に対する感受性が低いことが示唆された。さらに MSC-CM に含まれると考えられる成長因子に対する受容体の発現低下も認められた。



(Fig. 1) UC-CM 培養上清を用いた NHDF 増殖実験

Y: 若い NHDF、O: 老化 NHDF、CM: 培養上清



(Fig. 2) AT-CM 培養上清を用いた ECM 発現実験

3. 応用の可能性

MSC-CM による ECM 産生促進は、皮膚老化改善や再生医療・化粧品分野への応用が期待される。しかし本研究では、老化細胞では MSC-CM への応答性が低下していることが明らかとなった。今後は、成長因子やサイトカイン受容体の発現変化に着目し、MSC-CM 感受性低下の分子機構を解析する。これにより老化細胞の成長因子感受性を高めるような皮膚抗老化技術の確立を目指す。

栄養欠乏環境における細胞死とヒアルロン酸による細胞保護効果の検討

理工学研究科自然科学専攻 ○陳 昊宇
生命科学部生物科学科 神吉けい太

概要：細胞凝集体内部では細胞死が起こりやすい。立体組織内の細胞生存率を向上するために、栄養欠乏、虚血条件に対して、ヒアルロン酸による細胞保護効果を利用して細胞生存を高められるかについて、最適な処理濃度等について検討した。

1. 研究目的

立体組織は細胞治療の有効な手段として注目されているが、周辺の細胞と比較して、立体組織内部の細胞は酸素、栄養分の不足により細胞死を引き起こす。より高機能な細胞凝集体を作るためには組織体内部の細胞死を押さえる必要がある。ヒアルロン酸は低栄養環境などで起こる細胞死を抑制することができると報告されている。本研究では、ヒト皮膚繊維芽細胞を対象に実験を行い、低グルコース、低血清、低酸素の虚血条件で細胞生存を高めることを目指し、ヒアルロン酸の細胞死抑制効果を検討した。

2. 方法と結果

ヒト皮膚繊維芽細胞 (NHDF) は虚血環境 (低グルコース、低血清、低酸素) で細胞死を起こすが、ヒアルロン酸を低濃度から高濃度まで幅広く処理 (0~100 $\mu\text{g/mL}$) して細胞保護効果を検討した。その結果、平面培養条件においては一定の濃度処理で細胞の接着率が高めることが分かった (Fig. 1)。一方、ヒアルロン酸の濃度が高すぎると本来の保護効果が失われてしまうことから、ヒアルロン酸の処理濃度は重要なポイントであることが示された (Fig. 2)。ヒアルロン酸は細胞外マトリクスとして機能するだけでなく、細胞膜との結合により細胞内シグナル伝達に関与することが考えられることから、栄養欠乏環境における細胞生存に有効である可能性が示唆された。

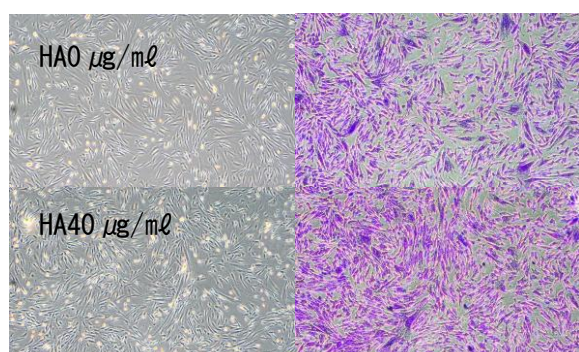


Fig. 1 ヒアルロン酸処理による細胞接着量の増加

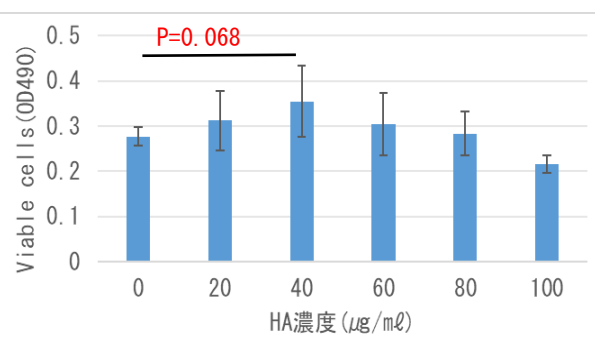


Fig. 2 異なる処理濃度による細胞接着効果

3. 応用の可能性

ヒアルロン酸の足場材料としての機能に加えて、細胞保護効果を利用して細胞生存を高めることが期待でき、組織工学において皮膚線維芽細胞だけでなく異なる細胞にも応用できると考えられる。ヒアルロン酸の分子量と使用濃度を適切に把握することで、三次元組織における細胞の生存率を高める技術に繋がる可能性がある。