

2F14-5 ホモジナイザーを用いたハナビラタケ菌糸体の効率的生産方法の開発

○山下 祐哉, 佐々木 千鶴, 櫻庭 春彦, 中村 嘉利
(徳島大・工・生物工)

近年の健康志向の高まりから、抗腫瘍活性など様々な免疫賦活作用を示す β -1,3-グルカンが脚光を浴びている。 β -1,3-グルカンは食用キノコに多く含まれており、ハナビラタケは中でも β -1,3-グルカンの含有量が最も多い。一般にキノコの子実体培養は環境維持や長期間培養などの種々の問題があるので、本研究では菌糸体培養により β -1,3-グルカンを迅速かつ高効率に生産する方法について検討した。菌糸体培養方法としてホモジナイザーを用いた菌糸塊破壊培養、培地へのオリーブオイルの添加培養およびそれらの併用培養を試み、それらの有効性を明らかにした。ホモジナイザーを用いた培養では、菌糸塊が破壊されて培養液中の溶存酸素が吸収され易くなることにより菌糸の成長が促進され、菌糸体の増殖速度が増大した。また、1%(v/v)のオリーブオイルの添加培養は菌糸体細胞膜の基質や酸素の透過性に大きな影響を与えるので、菌糸体の生産性が向上した。さらに、1%(v/v)のオリーブオイルの添加とホモジナイザーによる菌糸塊破壊の併用培養を行った結果、菌糸体生産性の著しい向上が見られた。

Development of effective production method of *Sparassis crispa* mycelia with a homogenizer

○Yuya YAMASHITA, Chizuru SASAKI, Haruhiko SAKURABA,
Yoshitoshi NAKAMURA
(Dept. Biol. Sci. Tech., Fac. Eng., Univ. Tokushima)

Key words *Sparassis crispa*, homogenizer, olive oil

2F15-1 担子菌系酵母 *Cryptococcus* sp S-2 による酵素分泌高生産系の開発

○平野 拓也^{1,2}, 正木 和夫², 土岡 宏彰^{1,2}, 藤井 力²,
家藤 治幸^{1,2}
(¹広島大院・生物圏,²酒総研)

酒総研所有の *Cryptococcus* sp S-2(以下CS2株)は担子菌系に属する酵母であり様々な特徴的な酵素を生産する。本酵母の生産するリパーゼはポリ乳酸をはじめとする各種生分解性プラスチックの分解に有効であることがこれまでの研究より明らかになっている。CS2株由来酵素の大量生産を行ううえで、CS2株における宿主-ベクター系を確立することは大きな意義を持つ。さらに異種タンパク質発現においても従来の発現系では困難とされてきた担子菌由来の酵素の大量生産が期待できる。本研究ではCS2株を宿主とした組み換えタンパク質分泌高生産系を確立することを目的としてCS2株由来リパーゼの大量生産を行った。

形質転換のための宿主としてCS2株のウラシル要求性株を利用し、また選択マーカーとしてCS2株のURA5遺伝子を持つプラスミドを作成した。このプラスミドにCS2株が多量に生産するキシラナーゼ遺伝子のプロモーター領域を組み込みCS2株を宿主とする高発現ベクターを開発した。このキシラナーゼプロモーターの下流にCS2株由来のリパーゼ遺伝子を組み込んだ遺伝子発現プラスミドを作成し、CS2株に導入した。その株を誘導源かつ唯一の炭素源としてキシロースを含む培地で培養しリパーゼの発現量を測定した。その結果、野生株と比較してキシラナーゼプロモーター依存的に最高でおよそ50倍の発現量増加が確認できた。

Development of a high expression system for enzymes in basidiomycetes yeast *Cryptococcus* sp S-2

○Takuya HIRANO^{1,2}, Kazuo MASAOKI², Hiroaki TSUCHIOKA^{1,2},
Tsutomu FUJII², Haruyuki IEFUJI^{1,2}
(¹Grad. Sch. Bio. Sci., Hiroshima Univ, ²Natl. Res. Inst. Brewing)

Key words basidiomycetes, expression system, recombinant protein production, lipase

2F15-2 動物細胞培養への抗体精製後廃液の利用

○小川 亜希子¹, 高田 直樹², 寺田 聡²
(¹鈴鹿高専,²福井大院・工)

【緒言】ガンの効果的な治療法として注目されている抗体医薬は、動物細胞培養で生産される。動物細胞は、微生物と比べて培養コストが格段に高く、そのコストの大部分を培地が占めている。中でも細胞増殖や抗体生産性の増加を目的として添加される、インスリンやトランスフェリンをはじめとした増殖因子は、培地コストの4割を占めている。これらの添加因子は、培養終了時点でも一部が消費されずに培養液中に残存しているが、抗体精製後に廃液として処分されている。本研究では、抗体精製で生じる廃液からこれらの添加因子を回収・再生し、動物細胞培養に対する有効性を評価した。

【方法】マウスハイブリドーマ2E3-Oを無血清培地ASF104(味の素)で培養し、培養上清を回収後、アフィニティーGカラム(GEヘルスケア)にかけて抗体を精製した。ここで、カラムに捕獲されずに溶出された液を抗体精製廃液として回収し、限外ろ過膜(分画5kDa、ミリポア)で濃縮した。続いて、必要な添加剤量を減らしたASF104にこの濃縮液を加えて培養し、細胞増殖および抗体生産性に対する効果を評価した。

【結果】添加剤量を減らし、そこに濃縮液を加えて培養した場合、培養3日目における生細胞密度は、完全培地(通常の添加剤量を使用)で培養した場合と同等であった。さらに、この時点の抗体産生量は、完全培地で培養したものを上回っていた。また、この濃縮液をSDS-PAGEで分離したところ、トランスフェリンの存在が確認された。これらの結果から、抗体精製廃液中には再生可能な増殖因子が存在しており、廃液を利用した動物細胞培養が可能であることが示唆された。

Application of spent medium to mammalian cell culture

○Akiko OGAWA¹, Naoki TAKADA², Satoshi TERADA²
(¹Suzuka Col. Tech., ²Grad. Sch. Eng. Fukui Univ.)

Key words antibody, transferrin, serum-free culture, hybridoma

2F15-3 光応答性細胞培養基材で構築したパターン共培養系による細胞機能の向上

○菊池 鏡子, 須丸 公雄, 枝廣 純一, 高木 俊之, 金森 敏幸
(産総研)

【目的】細胞を任意のパターンに配置する「セルパターンニング」は、従来は予め所定のパターンに細胞接着領域を形成した細胞培養基材が用いられ、細胞播種後にパターンを追加することは不可能であった。我々は培養表面に担持された細胞接着阻害ポリマーを、照射光によって除去することの出来る光応答性培養基材を開発、これを用いて複数種の細胞からなるパターン共培養系を構築し、パターン共培養が細胞に及ぼす影響を遺伝子発現の変化で評価した。

【方法・結果】パターン共培養系の構築には、ニトロスピロピラン色素を側鎖に有するPMMA(pNSpMMA)を介して、ポリエチレングリコール(PEG)を表面固定した基材を用いた。細胞接着領域の形成は、PC制御型微小パターン照射システムを用い、新たに追加する細胞の播種前に波長365nmの紫外光を所定のパターンに照射することによって行った。本研究ではHepG2のスフェロイドを形成後に3T3を追加、パターン共培養系を構築し、2週間培養後、CYPIA2とアルブミンの発現量をリアルタイムPCRにて定量した。スフェロイド状態で共培養したHepG2のCYPIA2発現量はHepG2単層培養と比較して16倍、アルブミンは2.5倍に増加し、パターン共培養によって細胞機能が向上する可能性が示唆された。

Cell function enhancement by making patterned co-culture developed with photo-responsive cell culture substrate

○Kyoko KIKUCHI, Kimio SUMARU, Jun-ichi EDAHIRO,
Toshiyuki TAKAGI, Toshiyuki KANAMORI
(AIST)

Key words photo-responsive cell culture substrate, patterned co-culture, gene expression, P450