

1G15-5 廃植物油資源を炭素源とする *Ashbya gossypii* によるリボフラビン生産における油変性の影響

○朴 龍洙¹, 佐藤 正康²
(¹ 静岡大農・応生化, ² 水澤化学工業)

【目的】植物油の精製工程において、活性白土を用い粗製植物油の植物由来の色素（クロロフィル、カロチン等）を除去する。この工程で、約40%以上の植物油を含んだ使用済みの廃白土が大量に排出され、適切な処理方法がなく処理に悩まされている。我々は、本研究では廃資源のバイオ変換の観点から、大量の植物油を含んだ廃棄物からリボフラビン生産が可能であることを既に報告した。そこで、本研究では、廃植物油資源を用いたリボフラビンの生産における廃白土含有植物油の変性による影響について検討を行い、得られた結果を報告する。

【方法及び結果】菌株は *Ashbya gossypii* ATCC 10895 を用い、CSL とゼラチン、微量金属イオンを含む培地を用い、炭素源として廃白土をそのまま添加して、培養温度 28℃、200 rpm の旋回振とう機を用いて 7 ～ 10 日間培養を行った。油変性の影響を調べるため、廃白土の保存期間、過酸化物質、ヨウ素化価及び油の重合度を変化させ、リボフラビン生産を調べた。その結果、油の重合度の影響が大きく、約 25% の重合度によりリボフラビン生産は半減した。本研究で得られた結果は、今後廃油資源の再利用やバイオ変換への大きな可能性を示唆するとともに保存による油の変質を解決する必要があると考えられる。

Effect of oil-denaturation on riboflavin production in the culture of *Ashbya gossypii* using waste vegetable oils

○ Enoch Y. Park¹, Masayasu Satoh²
(¹ Fac. of Agric., Shizuoka University, ² Mizusawa Ind. Chem. Ltd.)

Key words Activated bleaching earth, *Ashbya gossypii*, riboflavin, palm oil, recycle of oil, oil-denaturation

1G16-2 昆虫細胞を用いた GFPuv-β1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ 2 融合タンパク質の生産

○加藤 竜也, 村田 健臣, 朴 龍洙
(静岡大農・応生化)

【目的】昆虫細胞を用いた遺伝子発現系は 1) バキュロウイルスを用いた系、2) ノンウイルス系の 2 種類が存在する。一般的にバキュロウイルス系のほうが発現量は高いが、分泌タンパク質の場合、細胞内タンパクの蓄積により活性を失う恐れがある。GFPuv-β1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ 2 (β3GnT2) 融合タンパク質を用い、2 つの系において発現量を比較した。

【方法および結果】β3GnT2 遺伝子の細胞質、推定膜貫通領域を含む N 末端側 28 アミノ酸をコードする配列を除き、ミツバチのメリチン由来シグナル配列および GFPuv 遺伝子を融合させ、この遺伝子を有する組換え AcNPV を作製した。ノンウイルス発現用ベクター pXINSECT-DEST38 にこの遺伝子を挿入したプラスミドを用いて Tn-5 細胞にトランスフェクションし、安定に遺伝子発現する細胞を単離した。ウイルスを Tn-5 細胞に感染させた場合、細胞内外の最大 β3GnT 活性がそれぞれ 0.33, 0.68 mU/ml であった。しかしノンウイルス系の場合、細胞内外の最大活性がそれぞれ 1.19, 3.74 mU/ml であり、以前の結果より 5.5 倍活性が上昇した。SDS-PAGE では、感染での発現の場合、プロテアーゼで切断されたと考えられる低分子量の融合タンパクが認められたが、ノンウイルス系では低分子の融合タンパク質はほとんど認められなかった。

Efficient production of GFPuv-β1,3-N-acetylglucosaminyltransferase2 fusion protein in insect cells

○ Tatsuya Kato, Takeomi Murata, Enoch Y. Park
(Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University)

Key words insect cell, gene expression, baculovirus, GFPuv, β1,3-N-acetylglucosaminyltransferase2

1G16-1 非血清由来タンパク質加水分解物を用いた *Bombyx mori* Bm5 昆虫細胞の効率的培養

○權 美スン¹, 百嶋 崇², 朴 龍洙¹
(¹ 静岡大農・応生化, ² 科研製薬)

【目的】昆虫細胞-バキュロウイルス発現系を用いた異種タンパク質生産において大量タンパク質を生産するためにカイコ (*Bombyx mori*) を用いることは有望である。*Bombyx mori* 細胞を培養するためには 10% の血清を必要とし、培養時間も 10 日以上長時間を要しながらも最大 4.1×10^6 cells/ml 程度しか増殖できない。そこで、すでに我々は様々なタンパク質加水分解物が *B. mori* 細胞の高濃度細胞培養や異種タンパク質生産に有効であることを報告した¹⁾。本研究では血清代わりにタンパク質加水分解物を用いて高濃度細胞培養を試みたので報告する。

【方法及び結果】昆虫細胞 Bm5 と無血清培地 Sf900 II SFM を用い、100 ml 三角フラスコに血清、タンパク質加水分解物を添加し、20 ml として、27℃、100 rpm の条件で培養を行った。そこで、基質消費速度、副産物である乳酸やアンモニアの生成速度について検討を行った。様々な添加物中非動物性の HyPep 1510 が Bm5 細胞の増殖に有効であり、さらに 10 mM のグルタミンを添加することによって高濃度細胞培養が可能となった。Bm5 細胞はグルタミンが 30 mM 以上、アンモニアや乳酸濃度が 10 mM 以上になると細胞の増殖が阻害されることが分かった。

1) 權 美スン, 朴 龍洙, 日本農芸化学大会講演要旨集, p245 (2003)

Efficient culture of *Bombyx mori* Bm5 insect cells using the non-animal derived protein hydrolysates in serum free medium.

○ Mi-Sun Kwon¹, Takashi Dojima², Enoch Y. Park¹
(¹ Faculty of Agr. Shizuoka Univ., ² Kaken Pharmaceutical Co. Ltd.)

Key words *Bombyx mori*, Bm5, FBS, hydrolysates, baculovirus

1G16-3 酸化ストレスによる DNA 損傷の定量的評価

○田口 貴雄, 有村 直美, 西岡 求, 田谷 正仁
(阪大院基礎工・化工)

【目的】酸化的ストレスによる DNA 損傷は、変異、癌化、老化など様々な生理現象の主要因の一つと考えられており、特に活性酸素種による生体内での影響が、近年盛んに研究されている。本研究では、活性酸素種による DNA 損傷に対し、その分解過程に着目することで、DNA 分子全体の損傷を定量的に評価できる指標の提案を行う。

【実験方法および結果】モデル DNA として、大腸菌プラスミド pUC19 を制限酵素 *Bam* HI で直鎖状に切断したものを使用した。活性酸素種の発生源として二酸化チタン光触媒をブラックライト蛍光灯照射下で使用した。所定量の DNA を二酸化チタン粒子懸濁リン酸緩衝液に加え、各照射時間ごとに一定量をサンプリングした。二酸化チタン粒子を遠心分離により取り除き、イソプロパノール沈殿により DNA を濃縮後、アガロースゲル電気泳動に供した。DNA はエチジウムブロマイド染色によりその蛍光強度を Scion Image で数値化した。初期分子量の DNA 濃度の減少プロファイルに対し、1 ヒット性多重標的モデルを適用したところ、良好に表現できることがわかり、2 種の評価パラメーター L 値 (DNA 上の攻撃サイト数) と k 値 (DNA 損傷の時定数) が得られた。現在、各種反応条件における DNA 損傷を本モデルにより解析し、反応条件とモデルパラメーターとの相関について検討している。

Quantification of DNA damage caused by oxidant stress

○ Takao Taguchi, Naomi Arimura, Motomu Nishioka, Masahito Taya
(Grad. Sch. Eng. Sci. Osaka Univ.)

Key words DNA damage, oxidative stress, reactive oxygen species, titanium dioxide