3P-187 顕微ラマン分光法を用いた *Streptomyces nodosus* 内における二次代謝産物の *in vivo* 検出

○宮岡 理美¹, 安藤 正浩², モリ テツシ², 濱口 宏夫^{2,3}, 竹山 春子^{1,2}
(¹早大・先進理工・生医, ²早大・ASMEW, ³台湾国立交通大) haruko-takeyama@waseda.jp

自然界には抗生物質や生理活性物質などとして非常に有用な二次代謝産物を産生する微生物が多く存在する。しかし、それらの99%は難培養性であり、有用代謝物産生菌を取得するためには効率的なスクリーニング手法が必要とされている。顕微ラマン分光法は非侵襲的に物質の分子構造を明らかにできるため、代謝物を産生している菌体をシングルセルレベルで同定できると同時に、高い空間分解能により菌体内の代謝物の分布を検出できる。本研究では *Streptomyces nodosus* が産生する抗真菌性抗生物質アムホテリシン B に注目し、シングルセルレベルでの二次代謝産物の *in vivo* 検出を顕微ラマン分光を用いて行った。

Streptomyces nodosus をプレート培養した後、コロニーから菌体を集め 633 nm 励起ラマン分光顕微鏡 (面内空間分解能 410×10^9 m) を用いて観察した。その結果、1450 cm^{-1} に菌体由来の脂質のバンドとともに 1155 cm^{-1} および 1557 cm^{-1} に 2 本のバンドが確認された。このバンドはアムホテリシン B のラマンスペクトルと一致しており、菌体中におけるアムホテリシン B の蓄積を *in vivo* で検出することに成功した。この手法を様々な菌体について用いれば、有用代謝物を産生している微生物のスクリーニング系に応用できると期待される。

***In vivo* detection of secondary metabolites in *Streptomyces nodosus* by using Raman microspectroscopy**

○Rimi Miyaoka¹, Masahiro Ando², Tetsushi Mori², Hiro-o Hamaguchi^{2,3}, Haruko Takeyama^{1,2}
(¹Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²ASMEW, Waseda Univ., ³NCTU)

Key words Raman microspectroscopy, *Streptomyces nodosus*, Amphotericin B, single cell

3P-189 D-アミノ酸処理による *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株バイオフィルムの構造変化の解析

大田 隼矢¹, Sanchez Zoe¹, 青木 真央¹, 谷明生², 新谷 政己¹, 金原 和秀¹
(¹静大院・工・化学バイオ, ²岡山大学・資源植物科研) tkkimba@ipc.shizuoka.ac.jp

自然環境中の多くの細菌は、水分を含む基質表面にバイオフィーム (BF) という、細胞とマトリックス (細胞外多糖・タンパク質・DNA) からなる粘性の集合体を形成して生息している。BF は環境浄化に役立つ一方、工業・医療分野では多くの問題を引き起こす。特に、感染菌は BF を形成して、様々な薬剤耐性を獲得することが知られており、BF 形成を制御することは重要な課題である。最近、様々な微生物が生成する D-アミノ酸が、静置条件下で形成された BF の脱離を引き起こすことが報告された¹⁾。本研究は、フローセル内に形成した *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株の BF に対する D-アミノ酸添加の影響を調べることを目的とし、BF 内の細胞の生存性と、マトリックス量の変化を時系列ごとに解析した。

【方法と結果】我々の開発した multichannel microdevice に 1/3 希釈 LB 培地を供給し、PAO1 株の連続培養を行った²⁾。2 日間の培養後、形成した BF に D-アミノ酸混合物 (D-leucine, D-tyrosine, D-methionine, D-tryptophan) を 16 h 供給し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡と COMSTAT ソフトウェアで解析し、生死細胞・EPS マトリックスの観察・定量を行った。その結果、D-アミノ酸処理により、BF 中の生細胞数は 75% 減少した。一方、EPS マトリックス量は 30% 増加し、厚さも微量ながら増加した。現在、この D-アミノ酸混合物の最適な処理時間を検討している。

1) Kolodkin-Gal, I. et al., Science 328, 627-629(2010) 2) Sanchez et al., J. Biosci. Bioeng. 115, 326-331 (2013)

Effect of D-amino acid mixture on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm structure

Toshiya Ota¹, Zoe Sanchez¹, Mao Aoki¹, Akio Tani², Masaki Shintani¹, Kazuhide Kimbara¹
(¹Appl. Chem. Biochem. Eng. Grad. Sch. Eng. Shizuoka Univ., ²IPSR., Okayama Univ.)

Key words *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, D-amino acid, microfluidic device

3P-188 *Abisidia* 属糸状菌の酵母化およびエタノール生産への応用

○飯田 貴大¹, 高野 真希², 星野 一宏²
(¹富山大工・生命工, ²富山大院・理工) khoshino@eng.u-toyama.ac.jp

【目的】石油代替燃料であるバイオエタノールの生産において、食糧と競合しないソフトバイオマスの利用が注目されている。一般にソフトバイオマスはセルロース、ヘミセルロースなどを含んでいる。これらから Ethanol を生産させるため、我々は近年好気および嫌気条件下で 5 炭糖および 6 炭糖から効率良く Ethanol を生産する糸状菌を見出した。本菌株は二形成を示し、嫌気条件下で酵母化、好気条件下で糸状体化する。Xylose を有効利用し Ethanol の生産性を向上させるには好気条件下で酵母化する Ethanol 生産糸状菌が必要である。そこで、本研究ではこのような新規な特性を有する糸状菌を検索し、その Ethanol 生産を検討した。

【方法・結果】当研究室保有の糸状菌約 250 株を Glucose および Xylose を炭素源とし、それぞれ好気および嫌気条件下で培養し、菌体の形態および Ethanol の生産量を比較した。その結果、*Abisidia coerulea* NBRC 4435 が上記 4 条件で Ethanol を生産し、酵母化することを発見した。菌体増殖は嫌気培養で Glucose 1.42 g/dry/L, Xylose 2.89 g/dry/L, 好気培養で Glucose 6.04 g/dry/L, Xylose 8.22 g/dry/L であり、好気条件の方が良好であることがわかった。Ethanol 濃度は嫌気培養で Glucose 8.98 g/L, Xylose 6.77 g/L, 好気培養で Glucose 13.4 g/L, Xylose 19.0 g/L であり、好気条件の方が Ethanol 生産が良いことがわかった。また、糸状菌の形態は嫌気では糸状体であったが、好気では Glucose でも Xylose でも大半が酵母化した。これらのことから *A.coerulea* は好気条件下で酵母化し、Glucose および Xylose から Ethanol を生産できることがわかった。

Construction of yeast-like *Abisidia* sp. fungus and its application on ethanol production

○Takahiro Iida¹, Maki Takano², Kazuhiro Hoshino²
(¹Dept. Life Sci. Bioeng., Fac. Eng., Univ. Toyama, ²Grad. Sch. Sci. Eng., Univ. Toyama)

Key words ethanol, yeast-like cell, *Abisidia*

3P-190 マイクロバブルスパージャーを用いたメタノール資化性酵母でのタンパク質生産

○千葉 靖典¹, 高岡 友紀¹, 富樫 秀彰², 田原 直樹², 久木崎 雅人³
(¹産総研・生物プロセス, ²日揮, ³宮崎県工技セ) y-chiba@aist.go.jp

メタノール資化性酵母はメタノール誘導性の強力なプロモーターをタンパク質発現に利用することができるが、誘導時に炭素源として添加するメタノールの代謝には多量の酸素を必要とするため、培養の際に効率よく空気を供給するマイクロバブルスパージャー (MBS) の活用が期待できる。通常のスパージャーに比べ、MBS はマイクロメートルスケールの微小な気泡として空気を供給する。また MBS を利用し酵母や大腸菌を生育させると、その生育が早くなるのがこれまでに示されている。本発表ではメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* の生育とタンパク質生産に対する MBS の効果を検討した。

東京理化工械製の 5 L のベッセルと培養装置を用い、リングスパージャーでは 5 L air/min で、MBS では培地の泡立ちが激しいため半量の 2.5 L air/min でそれぞれ通気を行ない、ヒト由来のタンパク質を発現するように遺伝子組換えを行なった *O. minuta* 株を培養した。メタノール誘導前の前培養時の菌体重量は両者とも変わらなかったものの、炭素源のグリセロールが枯渇するまでの時間は MBS の方が約 2 倍程度速かった。またメタノール誘導 72 時間後では、リングスパージャーの場合と菌体重量はほぼ同等であるのに対し、MBS を使用した場合には AOX プロモーターを用いて発現させたヒト由来タンパク質の生産量は 2.7 倍ほど高かった。以上より、メタノール資化性酵母でのタンパク質生産において、MBS による通気が効果的である事が示された。

Production of heterologous protein in the methylotrophic yeast *Ogataea minuta* with microbubble sparger

○Yasunori Chiba¹, Yuki Takaoka¹, Hideaki Togashi², Naoki Tahara², Masato Kukizaki³
(¹BRI, AIST, ²JGC Corporation, ³Miyazaki Pref. Ind. Technol. Ctr.)

Key words methylotrophic yeast, protein expression, aeration, microbubble sparger