

3P-213 アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの新規抽出法開発

○坂本 修平, 川野 泰広, 西江 敏和, 榎 竜嗣, 蝶野 英人
(タカラバイオ株式会社 CDMセンター)
sakamotosy@takara-bio.co.jp

概要

アデノ随伴ウイルスベクター (rAAV) は安全性が高く、取扱いが比較的容易である。また、非分裂細胞へ導入された場合は導入遺伝子の長期発現が期待でき、研究用のツールとしては元より、近年は遺伝子治療用のベクターとして有望視されている。一方で動物個体や人体へ投与可能な精製度の高い rAAV を大量に調製する手法については、技術の蓄積が待たれる段階である。rAAV は産生細胞を破壊して回収する方法が一般的であり、大量のサンプルを処理するには専用の装置を使用するか、煩雑な操作を繰り返す必要があった。本研究では rAAV を産生細胞から簡便に抽出する溶液を開発し、大量生産法への応用を行った。

方法

293T 細胞にプラスミドを共導入し、アデノ随伴ウイルス 2 型 (rAAV2) を産生する細胞を作製した。この細胞から、一般的な rAAV2 抽出法である凍結融解法・超音波細胞破砕法と、今回開発したクエン酸緩衝溶液を用いた抽出法にてベクター抽出を行った。これらのベクター溶液のベクターゲノム数を qPCR 法により測定し、不純物量を吸光法により測定した。

結果

クエン酸緩衝溶液で抽出された rAAV2 のベクターゲノム数は、従来の凍結融解法・超音波細胞破砕法と比較して約 2 倍高かった。また、不純物の量は従来法と比較して 1/2 程度に抑えられていた。

応用

本抽出法を一般的な精製手法と組み合わせることで rAAV を大量製造・精製し純度・力価などの品質を測定した結果、人体への直接投与が可能と推察される水準のベクターが生産できていることが確認された。

Development of new method for adeno-associated virus(AAV) extraction and purification

○Sakamoto Shuhei, Kawano Yasuhiro, Nishie Toshikazu, Enoki Tatsuji,
Chono Hideto
(CDM Center, Takara Bio Inc.)

Key words adeno-associated virus vector, gene therapy, gene delivery, purification

3P-214 実用的な同時糖化併行複発酵プロセスの開発

○沖野 祥平¹, 池應 真実¹, 赤松 隆², 種田 大介¹
(¹日揮, ²崇城大・生物生命)
taneda.daisuke@jgc.com

【背景・目的】 非食糧系バイオマスからのエタノール製造技術開発を目的に、酵素反応の生産物阻害抑制、及びシンプルなプロセス構築が可能な、同時糖化併行複発酵(SSCF: Simultaneous saccharification and co-fermentation) の技術開発を進めている。

エタノール製造においては、蒸留コストの点からエタノール濃度 5 w/v%以上であることが必須であるため、結果的に反応槽内の基質仕込み濃度が 20 w/v%を超える高濃度スラリー系となる。この高濃度スラリーのハンドリングを主眼としてフラスコレベルで SSCF 条件検討を行い、さらにベンチスケールへのスケールアップを検討した。

【方法・結果】

アルカリ前処理バガス、及び水蒸気爆砕処理バガスを基質とし、最終エタノール濃度が 5%以上になることを想定し、それぞれ 20、25 dry-(w/v)の基質濃度で、C5C6 質化性遺伝子組換え酵母を用い、フラスコスケールにて SSCF 条件を検討した。当該基質濃度では、仕込み時のスラリーの流動性はほぼ無い状態であったが、基質を適切に分割添加することによって、仕込み時から反応終了時の間、スラリーの流動性が維持された状態で SSCF が可能となることを見出した。得られた結果を基に、30L スケールにて SSCF 試験を行ったところ、フラスコレベルとほぼ同様な結果が得られた。

本研究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)の委託研究として実施した。

Development of a practical process for simultaneous saccharification and co-fermentation

○Shoehi Okino¹, Makoto Ikeo¹, Takashi Akamatsu², Daisuke Taneda¹
(¹JGC Corp., ²Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words cellulosic biomass, simultaneous saccharification and co-fermentation, steam explosion

3P-215 微細緑藻 *Parachlorella kessleri* のシステイン要求性変異体はオイルとデンプンの蓄積動態に異常を示す

○山崎 誠和^{1,2}, 鴻巣 絵梨香¹, 竹下 毅¹, 大田 修平^{1,2}, 平田 愛子¹, 風間 裕介³, 阿部 知子³, 河野 重行^{1,2}
(¹東大院・新領域・先端生命, ²JST・CREST, ³理研・仁科センター)
yamazaki@ib.k.u-tokyo.ac.jp

微細緑藻 *Parachlorella kessleri* の野生型とシステイン要求性株 (Srp1, Srp2) のオイルとデンプンの蓄積動態を解析した。野生型は、硫黄源を含まない培地で細胞増殖が抑制され、オイルの蓄積量が全培養期間に渡って増加し、デンプン蓄積量は減少した。Srp1 と Srp2 は硫黄源としてシステインを含む培地で増殖できるが、硫酸イオンを含む培地で増殖できず、硫黄源を含まない培地と同程度オイルが蓄積するだけでなく、デンプンが高度に蓄積した。産生するオイルの脂肪酸組成を解析したところ Srp1 はエルカ酸、Srp2 はオレイン酸の割合が顕著に高かった。以上の結果から、本藻では、含硫アミノ酸の枯渇によってオイル蓄積が誘導され、硫酸イオンはデンプン蓄積を促進することが示唆される。

Cysteine-requirement mutants of the green alga *Parachlorella kessleri* show extraordinary accumulation of lipids and starch

○Tomokazu Yamazaki^{1,2}, Erika Kounosu¹, Tsuyoshi Takeshita¹, Shuhei Ota^{1,2}, Aiko Hirata¹, Yusuke Kazama³, Tomoko Abe³, Shigeyuki Kawano^{1,2}
(¹Integrated Biosciences, Grad. Sch. Frontier. Sci., Univ. Tokyo, ²CREST, JST, ³Cent., RIKEN Nishina)

Key words *Chlorella*, oil, starch, Sulfur starvation

3P-216 赤潮プランクトンの毒性因子に関する比較研究

金 大景¹, 竹下 哲史², 山崎 康裕³, 山口 健一⁴, 小田 達也⁴
(¹Jeju Center, KBSI, Korea, ²長崎大 産連戦略本部, ³水大校, ⁴長大水)
t-oda@nagasaki-u.ac.jp

目的) 赤潮原因プランクトンが魚介類に対して毒性を発現する事が知られている。これまで我々は強い魚毒性を有する事が知られているラフィド藻類に属するシャットネラ種研究に取り組み、本種が通常の培養条件下で常に活性酸素を産生放出している事を見出している。一方、渦鞭毛藻類に属するヘテロカプサ・サーキュラリスカーマは魚類に対しては無毒であるが、貝類に対して強い致死作用を示し、これまでの研究で溶血活性を示す事を見出している。本研究では、シャットネラやヘテロカプサに加え、その他の主要な赤潮原因プランクトンの活性酸素産生と溶血活性について比較検討した。(結果及び考察) シャットネラ・マリーナ及びシャットネラ・アンティオカは高いレベルの活性酸素を産生している事が確認された。一方、さまざまな赤潮被害をもたらす、ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ、カレニア・ミキモトイ、アレキサンドリウム・タニヤバニチでは活性酸素産生は検出されなかった。従って、活性酸素産生はシャットネラ種に特有な毒性因子であると推定された。溶血活性の比較実験により、これらの赤潮プランクトンは4つのカテゴリーに分類される事がわかった。すなわち、(1) 溶血活性をほとんど示さない種; シャットネラ、(2) 溶血因子を細胞表層に有する種; カレニア、(3) 溶血因子を細胞外に放出する種; アレキサンドリウム、(4) 溶血因子を細胞表層と細胞外放出の両方を有する種; ヘテロカプサ。

Comparative study on the toxic factors of red tide phytoplankton

Daekyung Kim¹, Satoshi Takeshita², Yasuhiro Yamasaki³, Kenichi Yamaguchi⁴,
○Tatsuya Oda⁴
(¹Jeju Center, KBSI, Korea, ²J. Res. Ce., Nagasaki Univ., ³Dept. App.Aqua., Nat. Fish. Univ., ⁴Div. Biochem. Fac. Fish., Nagasaki Univ.)

Key words plankton, red tide, toxicity, toxin