

令和4年度地球観測技術等調査研究委託事業
「バイオ有機素材の宇宙リサイクルシステム開発」
委託業務成果報告書

令和5年5月
国立大学法人 東京大学

本報告書は、文部科学省の地球観測技術等調査研究委託事業による委託業務として、国立大学法人東京大学が実施した令和4年度「バイオ有機素材の宇宙リサイクルシステム開発」の成果を取りまとめたものです。

目次

1	はじめに	1
1.1	委託業務の目的	1
1.2	業務の方法	1
1.3	当該年度における委託業務の結果概要	3
2	実施内容	4
2.1	酵素合成技術開発	4
2.1.1	酵素学的な開発	4
2.1.2	宇宙実験に関わる開発	6
2.2	微生物合成技術開発	17
2.2.1	微生物学的な開発	17
2.2.2	宇宙実験に関わる開発	25
2.3	バイオ素材評価研究	32
2.4	基盤形成活動	36
2.4.1	基盤ホームページの拡充	36
2.4.2	学生、企業向け研究会	36
3	まとめ	38
3.1	酵素合成技術開発	38
3.2	微生物合成技術開発	38
3.3	バイオ素材評価研究	39
3.4	基盤形成活動	39
4	添付資料	40

1 はじめに

1.1 委託業務の目的

本提案課題では、微小重力下でのバイオ有機素材の生産を試みる。自然界で最も豊富に存在するが人類が未だにその生産を制御できていないセルロースを中心に、水系かつ微小重力下で合成される素材の構造的、力学的な性質を明らかにし、それらを利用した産業をデザインすることを目的とする。これまでお互い独立してセルロース合成に関する研究を行ってきた東京大学、北海道大学、京都大学と、これまで数々の宇宙実験を展開してきたコンフォーカルサイエンス、JAMSS が協力し、「バイオ有機素材の宇宙リサイクルシステム開発拠点」の形成に向けて、お互いのノウハウや研究技術のシェア、人材育成を行うためのプラットフォーム構築を目指す。本拠点で得られたセルロースおよび各種バイオ素材の力学的性質、分解性などの情報は、宇宙船内でいかに素材を合成し、利用し、リサイクルするかをデザインするために用いられるとともに、地上においてもどのような生産プロセスによって微小重力下と同様の均一なマテリアル生産を再現するかなどを評価し、新規素材産業へ展開していくことを目標とする。

本事業終了後は、拠点としての役割を東京大学 One Earth Guardians 育成プログラムおよび東京大学未来ビジョン研究センター (IFI) 内グローバルcommonsセンターに移し、企業からの寄付・投資によって継続させていくプランを立てている。

このうち、東京大学ではプロジェクトの総合的推進及びバイオセルロースの酵素合成に関わる技術開発、北海道大学ではバイオセルロースの微生物合成に関わる技術開発、京都大学ではこれらのバイオ素材の評価技術開発、株式会社コンフォーカルサイエンスではこれらの宇宙実証実験に係る技術開発を実施する。

1.2 業務の方法

令和4年度における実施内容は、以下の通りである。

①酵素合成技術開発

a. 酵素学的な開発

令和3年度に生産したセルロースナノクリスタルの素材材料としての評価を可能にするため、より大型の容器内でのセルロースナノクリスタルの生産条件を検討する。またこの大型化に伴い、従来の小型容器下で用いていた基質(グルコース-1-リン酸)が使用できなくなる可能性がある為、新たにスクロース加リン酸分解酵素(SP)とセロデキストリン加リン酸分解酵素(CDP)の複合反応系によるセルロースナノクリスタルの生産条件を検討する。

b. 宇宙実験に関わる開発

前項a.にて言及した通り、より大型の容器内でのセルロースナノクリスタルの生産を実現する為、新規の反応容器の開発を行う。容器の大型化に伴い、従来の小型容器にて採用していた反応開始機構を用いることが出来なくなるため、微小重力下実験における新規の反応開始機構の開発、および新規機構に適合した酵素反応条件の検討を行う。

②微生物合成技術開発

a. 微生物学的な開発

これまでに検討してきた微小重力環境実験の環境に適合するセルロース生産菌(酢酸菌、エンテロバクター)の選別、培養条件検討を継続して進めていく。また得られた最適条件を基にして、本年度に新規に開発される予定である打ち上げ実験用反応容器を用いたセルロース生産条件の検討を進める。

b. 宇宙実験に関わる開発

微小重力下での微生物によるセルロース生産実験に適合した反応容器開発、および微小重力下実験における新規の反応開始機構の解析を行う。また温度や酸素の利用等、宇宙実験環境特有の制限条件に関して、宇宙実験(KIRARA プログラム)を運営する JAMSS と連携し、実現可能な実験要件の構築を行う。

③バイオ素材評価研究

上記①および②にて合成されたセルロースの評価系の構築を進める。特にこれまでの顕微鏡的な形態観察に加え、①にて作成予定の大型サンプルの材料特性評価に適した分析手法(小角および広角 X 線散乱解析)を検討する。

④基盤形成活動

a. 基盤ホームページの充実

昨年度立ち上げたホームページの内容の充実を図ると共に、HP の広報を進めていく。昨年度作成した事業を紹介するパネルを用いて学会などでのアウトリーチ活動を進める。

b. 学生、企業向け研究会

本年度もこれまでと同様に東京大学農学部 One Earth Guardians (地球医)プログラムと協調し、宇宙および関連事象をテーマとしたレクチャーやセミナーを定期的で開催する。また昨年度より検討を進めている、バイオセルロースをテーマとした簡単な実験キットの実現に向けて引き続き検討を進める。

1.3 当該年度における委託業務の結果概要

令和4年度における業務の結果概要は、以下の通りである。

①酵素合成技術開発

a. 酵素学的な開発

令和3年度に生産したセルロースナノクリスタルの素材材料としての評価を可能にするため、より大型の容器内でのセルロースナノクリスタルの生産条件を検討した。またこの大型化に伴い、従来の小型容器下で用いていた基質(グルコース-1-リン酸)が使用できなくなる可能性がある為、新たにスクロース加リン酸分解酵素(SP)とセロデキストリン加リン酸分解酵素(CDP)の複合反応系によるセルロースナノクリスタルの生産条件を検討した。

b. 宇宙実験に関わる開発

前項a.にて言及した通り、より大型の容器内でのセルロースナノクリスタルの生産を実現する為、新規の反応容器の開発を行った。容器の大型化に伴い、従来の小型容器にて採用していた反応開始機構を用いることが出来なくなるため、微小重力下実験における新規の反応開始機構の開発、および新規機構に適合した酵素反応条件の検討を行った。

②微生物合成技術開発

a. 微生物学的な開発

これまでに検討してきた微小重力環境実験の環境に適合するセルロース生産菌(酢酸菌、エンテロバクター)の選別、培養条件検討を継続して進めた。また得られた最適条件を基にして、本年度に新規に開発される予定である打ち上げ実験用反応容器を用いたセルロース生産条件の検討を行った。

b. 宇宙実験に関わる開発

微小重力下での微生物によるセルロース生産実験に適合した反応容器開発、および微小重力下実験における新規の反応開始機構の解析を行った。また温度や酸素の利用等、宇宙実験環境特有の制限条件に関して、宇宙実験(KIRARAプログラム)を運営するJAMSSと連携し、実現可能な実験要件の構築を行った。

③バイオ素材評価研究

上記①および②にて合成されたセルロースの評価系の構築を進めた。特にこれまでの顕微鏡的な形態観察に加え、①にて作成予定のサンプルの材料特性評価に適した分析手法(小角 X 散乱測定)を検討し予備実験として実施した。

④基盤形成活動

a. 基板ホームページの充実

昨年度立ち上げたホームページの内容の充実を図ると共に、HPの広報を進めた。昨年度作成した事業を紹介するパネルを用いて学会などでのアウトリーチ活動を行った。

b. 学生、企業向け研究会

本年度もこれまでと同様に東京大学農学部 One Earth Guardians (地球医)プログラムと協調し、宇宙および関連事象をテーマとしたレクチャーやセミナーを定期的に開催した。また昨年度より検討を進めている、バイオセルロースをテーマとした簡単な実験キットを完成させた。

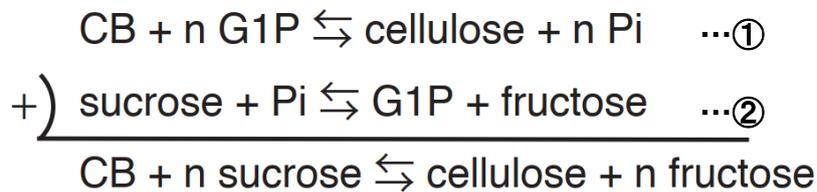
2 実施内容

2.1 酵素合成技術開発

2.1.1 酵素学的な開発

(1) CDP と SP を用いた複合反応系によるセルロースナノクリスタルの生産条件の検討

本年度は令和3年度に生産したセルロースナノクリスタルの素材材料としての評価を可能にするため、より大型の容器内でセルロースナノクリスタルの合成を行った。CDP の基質となる α -D-グルコース-1-リン酸 (α G1P) は高価な試薬であり、大容量の反応では基質を十分に用意する事が困難だと考えられた。そこで CDP によるセロビオースからのセルロース合成反応(下図 1、①)と、スクロース(ショ糖)を基質として α G1P を生産可能な酵素スクロースフォスホリラーゼ(SP)の反応(下図 1、②)を組み合わせた複合反応系によるセルロースナノクリスタルの生産を実施した。



CB: セロビオース、G1P: α -D-グルコース-1-リン酸、Pi: 無機リン酸

図 1: CDP と SP を用いた反応のスキーム

本複合反応系実験には以前より用いてきた *Clostridium thermocellum* YM4 株由来 CDP と *Bifidobacterium longum* 由来 SP、また CDP の反応プライマーとなるセロビオースを供給する為のセロビオースフォスホリラーゼ (CBP) を用いた。それぞれの酵素は遺伝子組換え大腸菌を用いて生産し、his-tag アフィニティー精製を行い、これを用いた。反応条件には以下の表の反応液を用い、反応を促進させるため温度 40°C、攪拌条件下での反応を実施した。

表 1. 複合反応系 反応溶液組成

Sucrose	500 mM
Glucose	50 mM
Tris-HCl pH7.5	10 mM
Na-Phos pH8.0	10 mM
SP	60 mg
CBP	10 mg
CDP	30 mg
総量	3 L

反応中の反応槽写真を下記に示す。



左から: 反応 1 日目、反応 2 日目、反応 17 日目

図 2 複合反応反応系によるセルロースナノクリスタルの合成

図 2 より作成した複合反応系では良好なセルロースナノクリスタル合成が進行しており、反応 17 日目の時点で約 40 g のセルロースが得られることを確認した。この結果は反応系に加えたスクロース(513.45 g)の約 10% がセルロースへと転換されたことを示している。またこのセルロースの量は反応 17 日目の段階では未だ直線的に増加しており、反応時間を伸長する事でより多くのセルロースナノクリスタルを合成可能であると推定された。

また得られたセルロースを取り出し、遠心分離にて回収・洗浄を行ったところペースト状の物性が確認された。加えてこのペースト状のセルロースを凍結乾燥にかけたところ下図の様な自立するスポンジ状のブロックが得られた。



図 3 複合反応系から得られたセルロースから成るブロック

これらの結果から、CDP の基質となる物質を大量に用いる事でセルロースナノクリスタルの生産量を増大する事が可能であり、高濃度のセルロースは一定の構造を形成する事が可能である事が確認された。

2.1.2 宇宙実験に関わる開発

(1) 微小重力下実験における新規の反応開始機構の開発(CDP およびアルカン層の安定性の確認)

本プロジェクトでは、微小重力空間の民間利用システムを利用して宇宙実験を実施する。現在のところ、国内で利用できるシステムは、有人宇宙システム株式会社(JAMSS)の Kirara のみであるため、以下はこのシステムに適合する宇宙実験を開発する。

昨年度の実験で、ヘキサデカン:ヘプタデカン=9:1 のアルカン隔壁を使って酵素反応の開始が再現性良く抑止されること、宇宙実験の搭載容器にセットされることによる昇温によって反応が開始されることが色水を使って検証できた。また、アルカン隔壁の使用は、CDP によるセルロース合成を阻害しないことを確認した。さらに、酵素実験容器の改良を行い、容器の内側に 3D プリンターで作製した硬い骨組みを入れることを試みた。

今年度は、当初、硬い骨組みを入れた酵素実験容器を使って実験を進め始めたが、この骨組みはアルカン隔壁との相性がよくないことがわかった。したがって、硬い骨組みを入れずに形が保てるような酵素実験容器の開発が必要となった。この新大型容器とアルカン隔壁を使って酵素反応を微小重力環境で開始させるが、宇宙実験のためにはISSで温度を20℃に制御できる専用箱(ICE CUBE)に詰める必要があり、その際に圧迫されてアルカン隔壁が崩されない作りと大きさであることが求められる。コンフォーカルサイエンス社では試行錯誤を重ね、これらの条件をクリアする大型容器を開発した。素材は三菱ケミカル製テックバリア HX 厚さ 0.07 mm を用いた。新しい大型容器は容器のヘムを広くとり、容器と同じ幅で折り曲げて、大型容器 2 個を組み合わせたときに互いに強度を持たせられる作りにした。この新しい大型容器で以下の検討を行った。



図はセルを下底面からみたところ

左は新しい大型容器 1 個、右は大型容器 2 個を組み合わせたところ



写真はセルを正面から見たところ

左から

新しい大型容器

大型容器 2 個を組み合わせたところ

組み合わせた大型容器 2 個と外袋

外袋に大型容器 2 個を収納

図 4 設計した宇宙実験用大型容器の概要

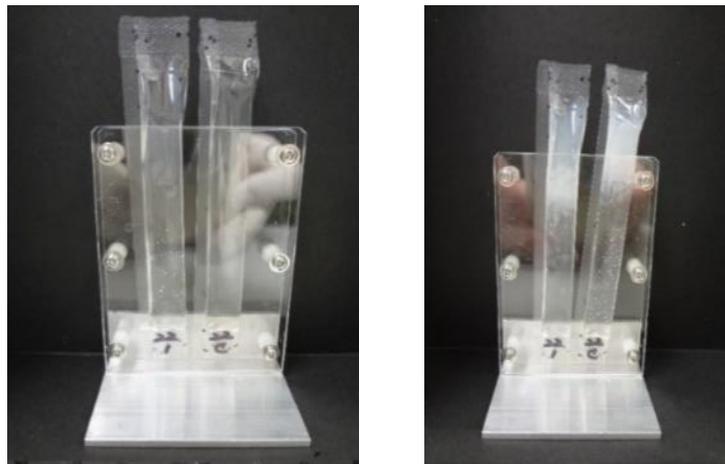
① CDP の 20°Cでの安定性

宇宙実験では打上げ前に 20°Cで 3 日～1週間程度置かれることになるが、それにより CDP の合成能に影響はないかどうか確認する

【方法】

1. 反応条件は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDP, 200 mM α G1P, 5 mM cellobiose, 500 mM HEPES (pH 7.5) 2000 μL 20°C。
2. 1.の条件の cellobiose を抜いた状態で、20°Cに 6 日間おいた。
3. 2.に 5 mM cellobiose を加えて 20°Cで 7 日間反応させる。コントロールとして、はじめから 1.の条件で混合されたものを作製した。
4. 7 日後に両者のセルロースナノクリスタル合成状況を目視で確認した。

【結果】



左: 反応開始直後 右: 7 日後

図 5 設計した大型容器を用いて 20°C条件にて合成されたセルロース

写真内は、左のセルが CDP を 20°Cで 6 日間おいたもの、右のセルがコントロールを示す。これらを目視で観察したところ、両者の外観に差は見られなかった。以上の結果から、20°Cで 6 日程度置かれることによる CDP の合成能の変化はないと結論した。

② CDP の 4°Cでの安定性

宇宙実験のために射場へ輸送する際 4°Cで輸送することになるが、それにより CDP の合成能に影響はないかどうか確認する

【方法】

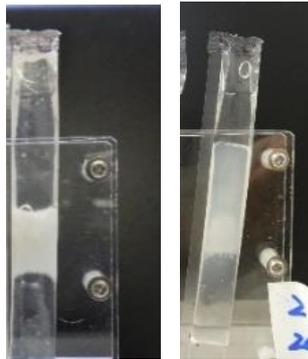
1. 反応条件は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDP, 200 mM α G1P, 5 mM cellobiose, 500 mM HEPES (pH 7.5) 1600 μL 20°C。
2. アルカンで分離して、4°Cで 2 週間置いた。
上層: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDP, 10 mM cellobiose (800 μL)
隔壁: ヘキサデカン, ヘプタデカン (9:1) (400 μL)
下層: 400 mM α G1P (800 μL)
3. 2.を 20°Cに移すと、アルカンが融解して上下の溶液が混ざり、セルロースナノクリスタル合成が始まる。
4. 3 週間後にセルロースナノクリスタル合成状況を目視で観察した。

【結果】

下図左の写真は 20°Cに移した直後で、白い層がアルカンである。アルカンはまだ融解していない。

右の写真は 21 日後である。上の透明な層が融解したアルカン、その下の白濁部分が合成されたセルロースナノクリスタルである。目視で観察したところ、セルロースナノクリスタル合成は①のコントロールと差はなかった。

したがってアルカン隔壁で反応を停止させた状態で、2 週間程度 4°Cに置かれることによって、CDP の合成能に変化はなかった。



反応開始直後 21 日後

図 6 4°C保管後のサンプルを用いた反応試験

③ 凍結 CDP の安定性

大型容器利用により、従来よりも使用する CDP 量が多くなる。今年度の宇宙実験のために大量調製された試料を凍結保存する必要があるが、それにより CDP の合成能に影響はないかどうかを確認する

【方法】

1. 反応条件は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDP, 200 mM α -G1P, 5 mM cellobiose, 500 mM HEPES (pH 7.5) 1300 μL 20°C。CDP は-80°Cで凍結保存して解凍したものと凍結保存していないもの。
2. 経時的にサンプリングしてリン酸濃度を測定してセルロースナノクリスタル合成能を比較した。リン酸濃度は、Malachite Green Phosphate Assay Kits (BioAssay Systems)を使って定量することで解析した。マラカイトグリーン、モリブデン酸、リン酸三ナトリウムによる発色は、プレートリーダー (Multiskan SkyHigh、サーモフィッシャー) で OD620 を測定した。既知濃度のリン酸溶液 (リン酸ナトリウム) の発色から作成した検量線を用いて、セルロース合成に使われた α -G1P の反応容量を計算した。

【結果】

表 2 凍結・非凍結による CDP 活性の変化 (リン酸濃度: mg/mL) (n=3)

酵素反応時間	3 時間	6 日	25 日
凍結酵素	13.67 \pm 0.14	36.55 \pm 0.25	45.49 \pm 1.59
非凍結酵素	12.73 \pm 0.46	30.65 \pm 0.85	40.19 \pm 3.94

CDP のセルロースナノクリスタル合成能は、凍結により失われないことがわかった。

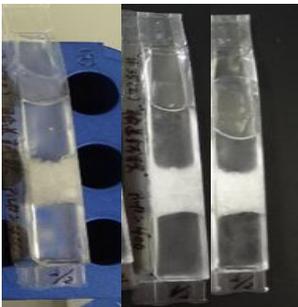
④ 航空機輸送試験

宇宙実験では航空冷蔵輸送で日本から米国まで、拡散抑止をしたサンプルを輸送するが、航空輸送をする際の振動等により、アルカン隔壁の保持に影響はないかどうか確認する

【方法】

1. 反応条件は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDP, 200 mM α G1P, 5 mM cellobiose, 500 mM HEPES (pH 7.5) 1300 μL 。
上層: 400 mM α G1P, 500 mM HEPES (pH 7.5) (650 μL)
隔壁: ヘキサデカン, ヘプタデカン(9:1) (400 μL)
下層: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDP, 10 mM cellobiose, 500 mM HEPES (pH 7.5) (650 μL)
2. 4°C航空便(クール宅急便)で北海道大学へ輸送し、返送してもらう。輸送時には縦置き・横置きにして置き方の違いによる影響があるかどうか確認した。温度は計測器を同梱して記録した。
3. 受取時の溶液の状態を観察し、航空輸送中の振動等によりアルカン隔壁に影響があるかどうかを目視で確認した。

【結果】



左: 航空輸送前
中: 航空輸送後(縦置き輸送)
右: 航空輸送後(横置き輸送)
輸送中の温度は 2.4~10.2°Cに保たれていた。

航空輸送で縦置き・横置き輸送いずれでもアルカン隔壁は保たれ、反応抑止機構に問題は生じなかった。

図 7 航空機輸送を経たサンプルを用いた反応テスト

(2) 新規機構に適合した酵素反応条件の検討

容器の大きさや材質が異なると、また、CDP 試料のロットが異なると、セルロースナノクリスタル合成条件も異なる。新しい大型容器で、東大であたらしく宇宙実験用に調製された CDP を使って、CDP の濃度を振り、宇宙実験に適したセルロースナノクリスタル合成条件の検討を行う。

【目的】宇宙実験では、打上げ前に 20°Cに置かれるために、セルロースナノクリスタル合成反応が早く進むような条件は望ましくない。そのために、セルロースナノクリスタル合成が反応開始後に急激に進まず、しかしセルロースナノクリスタル収量が多いような条件を検討する。

【方法】

1. 反応条件:
0.45~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDP; 200 mM α G1P; 5 mM cellobiose; 500 mM HEPES (pH 7.5)
容量 1300 μL 。 20°C
2. 経時的にサンプリングし、リン酸濃度を測定してセルロースナノクリスタル合成状況を確認した。

【結果】

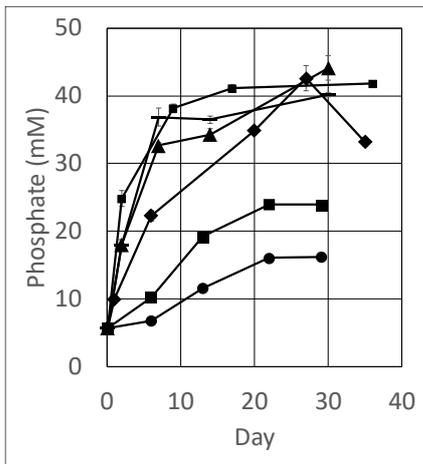
下図に示したように、CDP 濃度が上がるにつれ、

- 反応開始後 1 週間でのリン酸濃度上昇の速度が速くなった。
- CDP 濃度が上がるにつれ 4 週間後のリン酸は高くなったが、CDP 濃度が 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上では 4 週間後のリン酸濃度はほぼ同等であった。

CDP 濃度が 0.45, 0.7, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合、

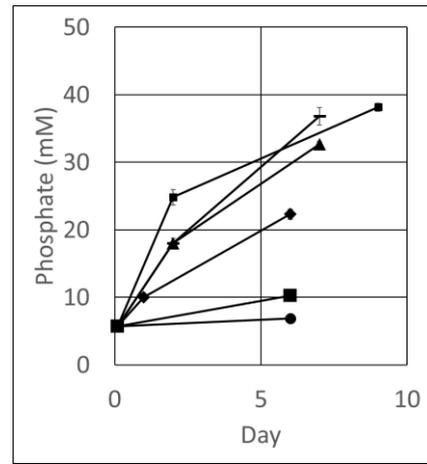
- 4 週間後のセルロースナノクリスタル合成量が低く、宇宙実験での目的に合致しない。
- 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDP の場合、1 か月後のリン酸濃度は、3, 6, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDP の場合の約 8 割程度であった。

CDP 濃度が 3.0, 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合、



●0.45, ■0.7, ◆1, ▲3, —6, ■10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDP

図 8: CDP 濃度の違いによるリン酸濃度変化の違い(n=3-6)



●0.45, ■0.7, ◆1, ▲3, —6, ■10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDP

図 9: 反応開始後約 1 週間での CDP 濃度の違いによるリン酸濃度変化の違い(n=3-6)

- 4 週間後のリン酸の濃度は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDP の場合とほぼ同等だが、はじめの 1 週間での濃度上昇は若干緩やかだった。

また下図のように、 α G1P 濃度、セロビオース濃度を 0.1 倍、0.01 倍に低くすると、リン酸濃度は減少し、セルロースナノクリスタル合成量が低くなり、宇宙実験条件には適さないことがわかった。

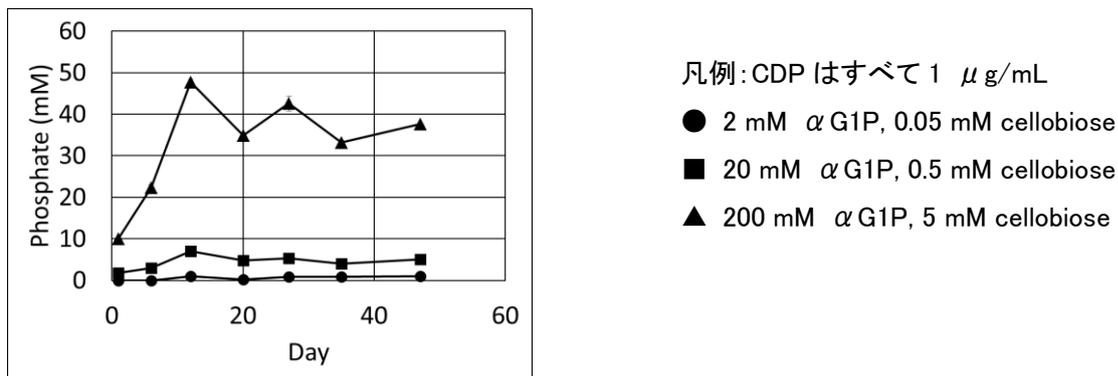


図 10: α G1P とセロビオース濃度の違いによるリン酸濃度変化の違い(n=3)

したがって、以下の条件を宇宙実験に適用することとした。

3 および 6 μ g/mL CDP, 200 mM α G1P, 5 mM cellobiose, 500 mM HEPES (pH 7.5)

(3) 宇宙実験に関わる安全性試験と反応開始機構の確認

宇宙実験を模擬した振動試験を実施した。

【目的】

宇宙実験のために米国へ輸送する際、20°C付近で融解するアルカンを真ん中に配置して、酵素と基質等の成分を分離した状態で輸送する予定である。搭載準備のために打上げ前に 20°Cに置かれてアルカンが融解する。この時に、打上げの振動で酵素と基質等がどの程度混合するか、また、新型容器の振動耐久性は十分であることを確認するために、打上げの振動を模した振動試験を行った。

【実施】

実施日: 2022年10月19日(水)10:00-11:30

場所: JAPAN TESTING LABORATORIES 株式会社 神奈川事業所

① 供試体の準備と輸送



- ① 8 mm 幅容器、② 外袋に 8 mm 幅容器を 2 個ずつ収納、
- ③ 外袋2つをカプトンテープでつなげ、タブをつけた

図 11 試験サンプルの輸送形態

●試験試料

セルロースナノクリスタル合成試料と溶液の混合具合を目視で確認するための色水試料を準備した。これらの試料は PET 製の 8 mm 幅の容器に密閉し、2 容器ずつ PET 製の外袋に収納し密閉した。外袋は 2 つをカプトンテープでつなげ、カプトンテープでタブをつけた。

●供試体

JAMSS Kirara 宇宙実験で使用している、蓋つき発泡スチロール製でスロットが 6 つある箱を JAMSS より借用し、振動試験の供試体として試験試料を収納した。

供試体の蓋はカプトンテープで固定し、X、Y、Z 軸方向をカプトンテープの上に書いた。

●コントロール試料

試験試料と同等のものを用意した。透明プラスチック箱に入れ、輸送により試料が動かないように固定した。



図 12 コントロール試料

●温度データの記録

センサーを供試体内部に置き、供試体の中の温度を記録した。

●輸送

クール便で振動試験実施場所に輸送した。供試体の内部が振動試験時に 20℃になりアルカンが融解している必要があるため、試験場所に前日着になるように輸送した。供試体はバブルラップに包み、その上にコントロール試料を載せて、保冷材の入った発泡スチロール箱に入れ、クール便で低温輸送した。試験試料とコントロール試料の向きは同じになるように配置した。

② 振動試験(振動試験は弊社から株式会社日立ハイテックに依頼し、弊社立会いのもと実施した)

●試験前日

供試体は試験前日に試験場所に到着し、そのまま環境温度(20°C程度)に置き、供試体内部の温度を環境温度にした。

●振動試験

供試体内部の温度が 20°C以上になっていることを確認した。供試体内部:21.6°C 環境温度:22.2°C

振動試験実施前にコントロール試料の写真を撮影した。色水で見ると、アルカンは融解しているが、溶液はあまり混合していない。

JAMSS より提供された振動プロフィールなどの条件で振動試験を行った。

●振動試験後

次の写真は、振動試験直後に、試験試料とコントロール試料を水平に寝かせた状態で写真撮影した。振動させていないコントロール試料を見ると、アルカン融解後もアルカンが中央部に留まっているものが多かった。一方、振動試験を行った試験試料は、振動によって溶液が均一に混合していた。

アルカンで拡散抑止し低温で射場まで輸送した場合、打ち上げ前に 20°Cになるとアルカンが融解するが、ロケット打ち上げの振動がかかるまでは溶液はあまり混合せず、打ち上げの振動によって溶液が混合してからセルロースナノクリスタル合成が本格的に始まることが期待できる。



赤枠左:セルロース合成試料

赤枠右:色水試料

図 13 振動試験前の試料の様子



試験試料

左:セルロース合成試料

右:色水試料

コントロール試料

左:セルロース合成試料

右:色水試料

図 14 振動試験後の試験試料と比較のためのコントロール試料

③ 振動試験結果

打上げ時の振動を模して振動試験を行った結果、試料は振動でよく攪拌され、また、振動を加えても、8 mm 幅容器と外袋は破損することなく安定で、耐久性が確認された。

(4) 宇宙実験試料の調製と JAMSS への引き渡し

① 宇宙実験条件

「(2) 新規機構に適合した酵素反応条件の検討」で検討の結果、宇宙実験条件は

3 および 6 $\mu\text{g/mL}$ CDP、200 mM α G1P、5 mM cellobiose、500 mM HEPES (pH 7.5) とすることとなった。

上層: 6 or 12 $\mu\text{g/mL}$ CDP, 500 mM HEPES (pH 7.5) (420 μL)

分離隔壁: ヘキサデカン, ヘプタデカン (9:1) (400 μL)

下層: 400 mM α G1P, 10 mM cellobiose, 500 mM HEPES (pH 7.5) (420 μL)

充填時のコンフィギュレーションは上記の通りで、アルカンが融解後、上液と下液が混合して、上記の条件になる。試料が搭載準備で昇温された後に、打ち上げが遅延した場合に備えて、1 条件当たり宇宙・地上・宇宙バックアップ・地上バックアップ・地上(打上げ時のコントロール)・地上バックアップ(バックアップ打上げ時のコントロール)の 6 試料を用意した。

② 充填

実施日: 2023 年 2 月 16 日

【充填手順】

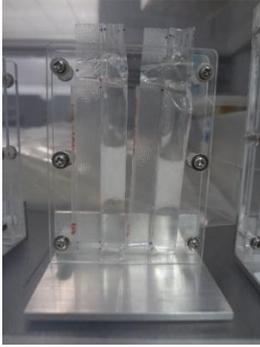
- 0 アルカンは室温で融解しておく
- 1 大型容器を厚み 4 mm の容器立てに立てる(厚くなりすぎないようにするため)
- 2 下液を調製し、大型容器に注入する
- 3 中液を静かに重層する(下液とは分離して下液の上層にくる)
- 4 冷蔵庫で中液のアルカンを凍らせる(30 分程度)、同時に上液も冷蔵庫で冷やしておく
- 5 COOL PLATE 等で冷やした場所で、中液の固化したアルカン層の上に冷えた上液を静かに重層する

6 大型容器の上端を圧力がかからないように気をつけながらシーラーで2度シールする

以下は、JAMSS に依頼して実施した。JAMSS は、本作業と並行して、シールが完全に行われているかなどの安全性検査を実施しながら作業を進めた。

7 シールした面を 2 mm 程度残して切り取り、大型容器を 2 つ組合わせて、外袋に収納し、その上端をシーラーで2度シールする

8 輸送するまで 4°C に保管する



シーラーで上端をシール後、冷蔵庫に保管したところ



大型容器2つを外袋に収納して、上端をシーラーでシールしたところ

図 15 作成した打上げサンプルの外観

③ 射場への輸送(この部分は、JAMSS に委託して実施した)

2023 年 2 月 28 日：宇宙実験用発送、2023 年 3 月 7 日：宇宙実験バックアップ用発送

宇宙実験用試料は、JAMSS Kirara#4 宇宙実験に供される他のサンプルと同梱され、ケネディ宇宙センターに低温輸送された。宇宙実験の遅延に対応するためのバックアップ用試料は、酢酸菌によるセルロース合成サンプルの宇宙実験バックアップ用試料とともに、一週間後発で低温輸送された。これらは搭載準備まで、4°Cで管理された。

④ 宇宙実験の実施

米スペース X 社ファルコン9ロケットによる ISS への商用補給機ドラゴン 27 号機 (SpaceX CRS-27(SpX-27)/Dragon)で、2023 年 3 月 15 日 9 時 30 分 (JST) にフロリダ州ケネディ宇宙センターから打上げられた。16 日 20 時 31 分 (同) に ISS にドッキングし、18 日に Space Applications Services 社の ICE Cubes Facility に搭載された。地上への帰還は 4 月半ばの予定である。

2.2 微生物合成技術開発

2.2.1 微生物学的な開発

本プロジェクトでは微小重力空間(国際宇宙ステーション(ISS))におけるバクテリアセルロース(BC)の合成を行い、その構造解析を行うことを目標としている。今年度は昨年度に引き続き、ISSの室温(20℃)で生育、セルロースを合成可能なセルロース合成菌を選抜することと、培養条件について検討を行うことを目的とした。

(1) 実験方法

酢酸菌(L34(NEDO-01)、ATCC23769、ATCC53582)、*Enterobacter*(腸内細菌科バクテリア)のフリーズストックをHSあるいはLBプレートに直接播種し、30℃あるいは37℃で1~3日間培養することによってコロニーを形成させた。コロニーを10mLのHS液体培地(50mL三角フラスコ中)あるいはLB液体培地(50mL三角フラスコ中)に爪楊枝を使って植菌し、30℃で3日間培養した。生成したセルロース膜を爪楊枝で搾り、得られた菌液を1mLずつHS液体培地に植菌した(各株5本ずつ)。その後、各酢酸菌を20℃と30℃で1か月培養を行った。生成したセルロースの分析を以下の方法で行った。

① セルロース収量の測定

セルロースを培養温度と菌種ごとに三角フラスコにまとめて回収し、それぞれRO水で表面を洗浄した後、1%NaOHを300mLずつ加え、121℃、15分間でオートクレーブ処理を行った。冷却後、RO水に置換し、121℃、15分間オートクレーブ処理を行った。この操作をさらに2回行い、最終的に中性になるまでRO水での洗浄を行った。各菌につき4枚ずつのセルロース膜をテフロン板に置き、30℃の恒温槽中で乾燥した。乾燥後、デシケーター中減圧下で2hr乾燥させ、それぞれの重量を測定した。

② セルロース収量に対する菌体保存方法の影響

植菌前の菌体の保存方法について検討をおこなった。前培養液(膜を搾って菌体を膜から取り出した後のもの)を以下の条件で保存し、培養液のまま、ペレット、10倍濃縮、保存温度4℃、保存期間1週間、それを通常のHS培地に菌体量が同じになるように植菌した。収量測定については上述の方法に従って行った。

③ セルロース収量に対する窒素源(Yeast extract)源濃度の影響

Gluconacetobacter xylinus ATCC53582のセルロース収量に与える窒素源(Yeast extract)の影響を確認するために、濃度を0.5、1.0、1.5、2.0、2.5(w/v)%としたHS培地を調製した。植菌方法、収量測定については上述の方法に従って行った。

④ セルロース収量に対する炭素源の影響

Gluconacetobacter xylinus ATCC53582のセルロース収量に与える炭素源の影響を確認するために、グルコース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、グリセロールを炭素源としたHS培地を調製した。植菌方法、収量測定については上述の方法に従って行った。

(2) 実験結果

① *Enterobacter* によるセルロース生産(菌株の選択)

Enterobacter 培養物の外観を以下に示す。

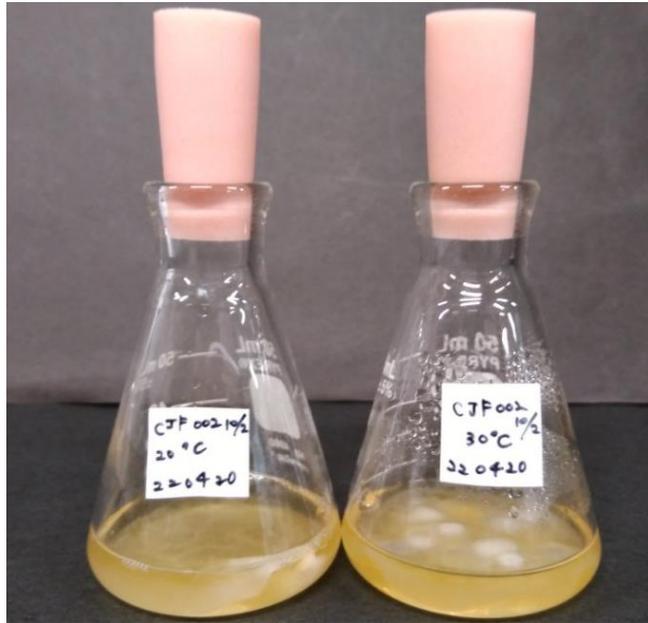


図 16 *Enterobacter* 植菌後 2 日目の様子(LB 培地、培養温度: 左 20°C、右 30°C)

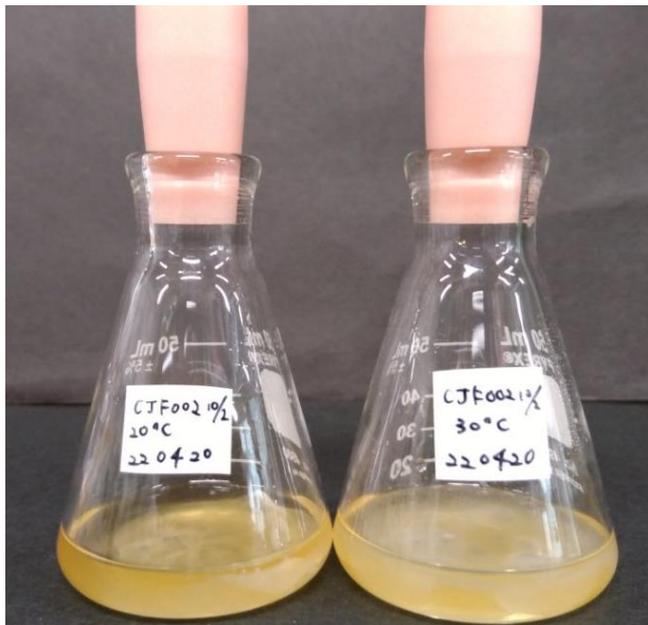


図 17 *Enterobacter* 植菌後 7 日目の様子(LB 培地、培養温度: 左 20°C、右 30°C)

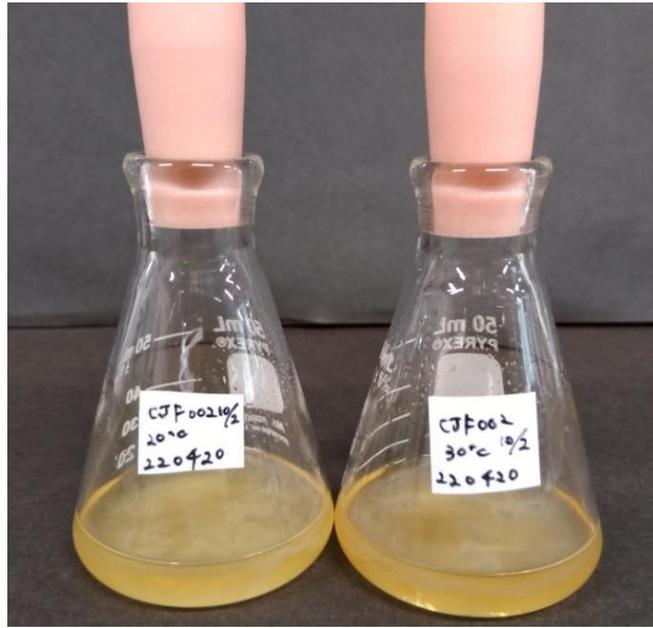


図 18 *Enterobacter* 植菌後 12 日目の様子 (LB 培地、培養温度: 左 20°C、右 30°C)

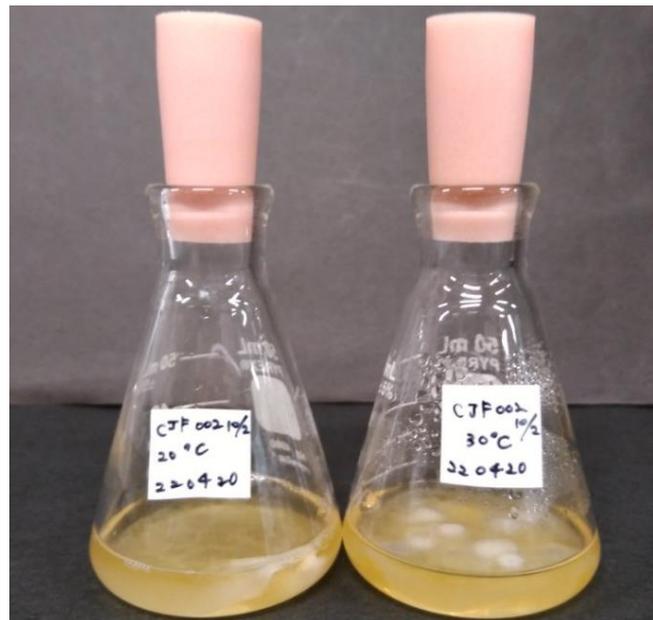


図 19 *Enterobacter* 植菌後 28 日目の様子 (LB 培地、培養温度: 左 20°C、右 30°C)

酢酸菌培養物の外観を同様に以下に示す。

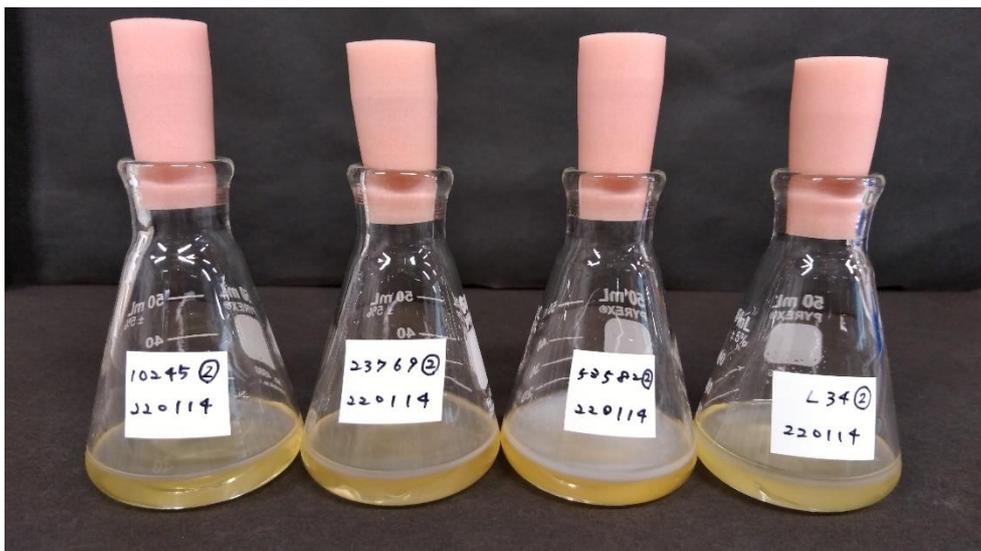


図 20 酢酸菌植菌後 28 日目の様子(HS 培地、培養温度:20°C)



図 21 酢酸菌植菌後 28 日目の様子(HS 培地、培養温度:30°C)

Enterobacter の培養により得られたセルロース膜の収量を下記に示す。

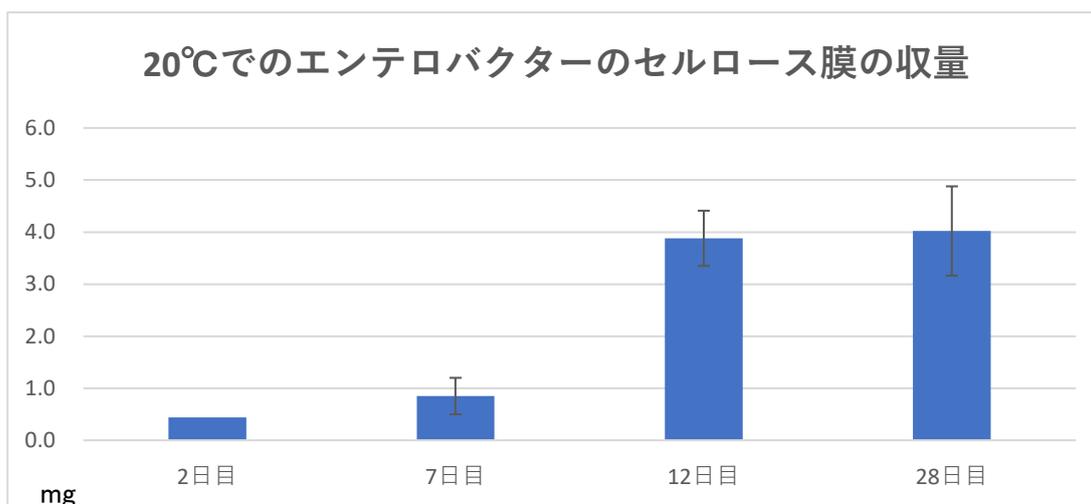


図 22 培養、2、7、12、28 日目におけるセルロース収量(LB 培地、培養温度 20°C)

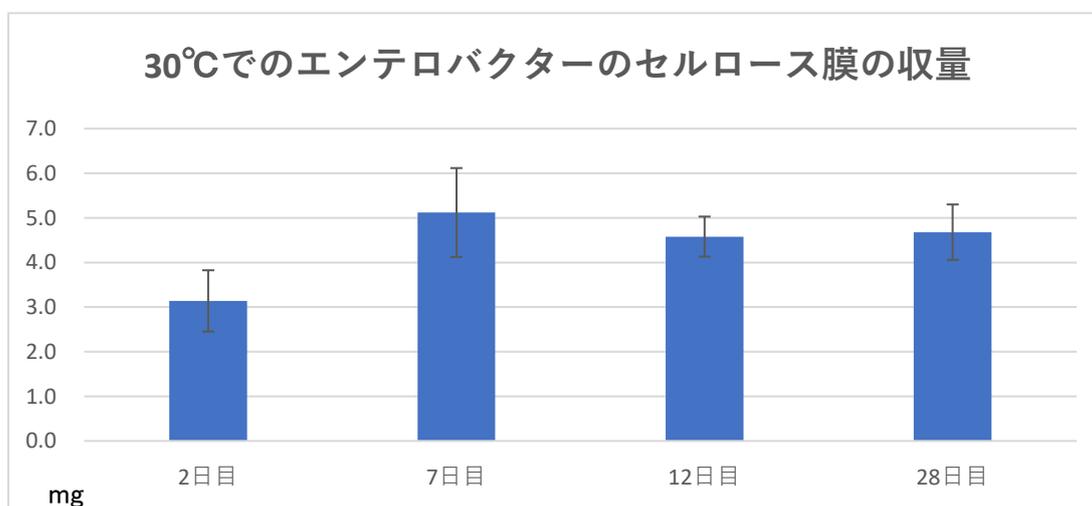


図 23 培養、2、7、12、28 日目におけるセルロース収量(LB 培地、培養温度 30°C)

生産速度は 20°C に比べて 30°C の方が早く、培養 7 日目 20°C においては培養 12 日目以降で一定となった (図 3、4)。得られた膜の形態は酢酸菌のもの (図 5、6) に比べると不均一になっており、嫌気発酵によって生成したと考えられる炭酸ガスによる気泡が膜内に観察された。20°C における生産量はかなり少なく (図 7、8) 生産速度、生産量、均一性を考慮し、今回検討を行った数種のセルロース合成菌の中で酢酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53582 が微小重力空間でのセルロース合成に最も適していると結論した。

② セルロース収量に対する菌体保存方法の影響

ロケットはアメリカで飛ばすため、日本から 1 週間程度かけて輸送(4°C)する必要がある。セルロース合成は地上では起こらないことが望ましく、4°Cで保存する場合のような保存方法が適しているのかを調べるために、菌体の保存方法を変化させ、セルロース収量に与える影響を調べた。

保存条件

- ・ そのまま: 培養液のまま 保存温度 4°C、保存期間 1 週間
- ・ ペレット: 培養液を遠心、ペレット形成 保存温度 4°C、保存期間 1 週間
- ・ 10 倍濃縮: 培養液を遠心、10 倍濃縮 保存温度 4°C、保存期間 1 週間

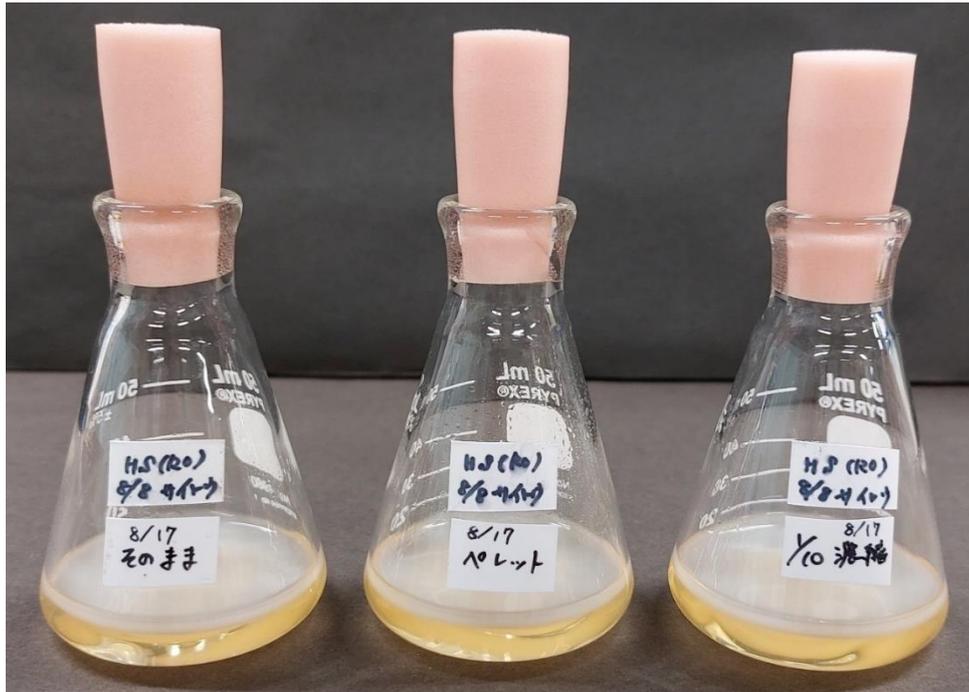


図 24 様々な方法で保存した酢酸菌を植菌した後 34 日目の様子 (HS 培地、培養温度:20°C)

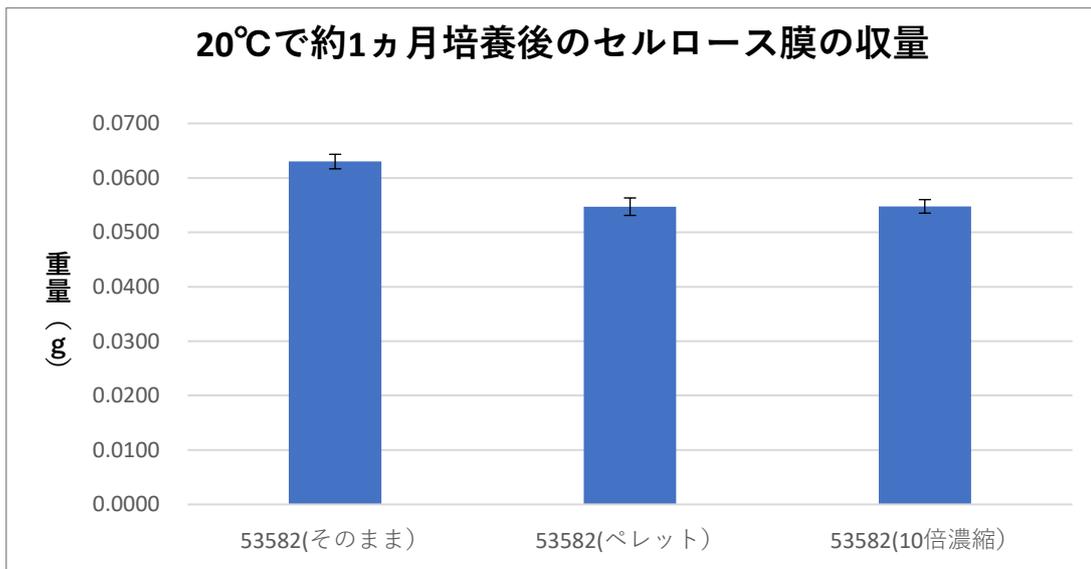


図 25 各保存条件におけるセルロース収量(培養温度:20°C)

ペレット、10倍濃縮では若干の収量の減少が見られたが、収量に大きな差は見られなかった(図9、10)。また、4℃で1週間保存した場合についても、保存無しでそのまま植菌した場合の収量との差はあまり見られず、菌の活性が保持されていることが確認された。

③ セルロース収量に対する窒素源(Yeast extract)源濃度の影響

HS培地の中には窒素源として酵母エキス(Yeast extract)とバクトペプトンが入っている。特にYeast extractには、窒素源だけでなく酢酸菌の増殖に働く様々な物質が含まれており、他の株においてはYeast extractの添加量を増やすことでセルロース収量が増加することが報告されている。そこで、HS培地中のYeast extractの濃度は変化させ、セルロース収量に与える影響を調べた。

これまで別の酢酸菌の株で報告されている結果と異なり、*Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53582ではYeast extract濃度の増加に伴って収量が減少する傾向が見られた(図11、12)。原因については不明であるが、ATCC 53582においてはYeast extract添加濃度を増やすことによる収量増加は見込めないことが確認された。



図 26 様々な Yeast extract 濃度の HS 培地で培養した際の様子(培養温度:20℃)

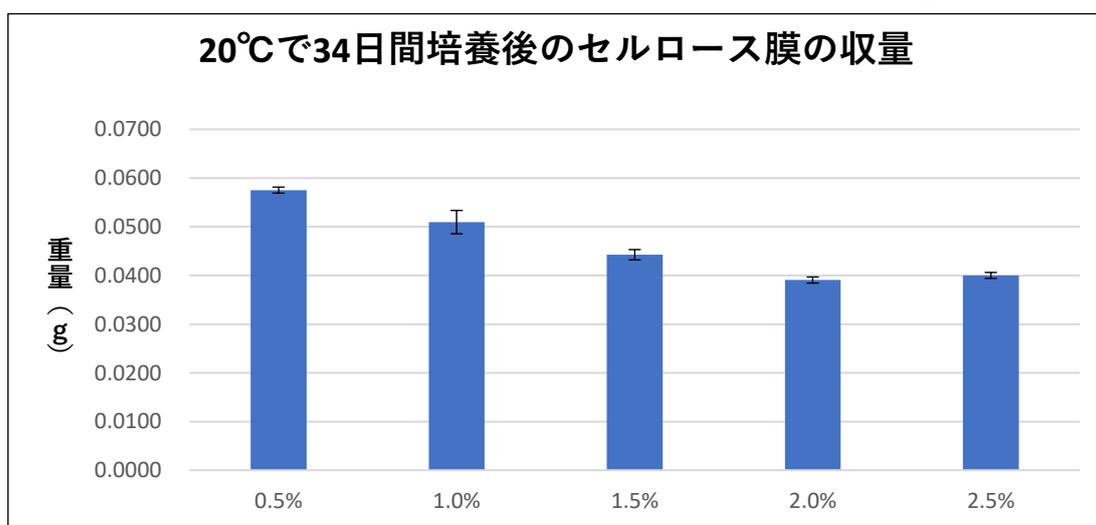


図 27 各 Yeast extract 濃度におけるセルロース収量(培養温度:20℃)

セルロース収量に対する炭素源の影響

一般的に酢酸菌におけるセルロース合成はグルコースを用いるが、炭素源によって収量が大きく変化することが知られている。ここではグルコース以外に、フラクトース、スクロース、マンニトール、グリセロールを炭素源として、セルロース合成を行った。

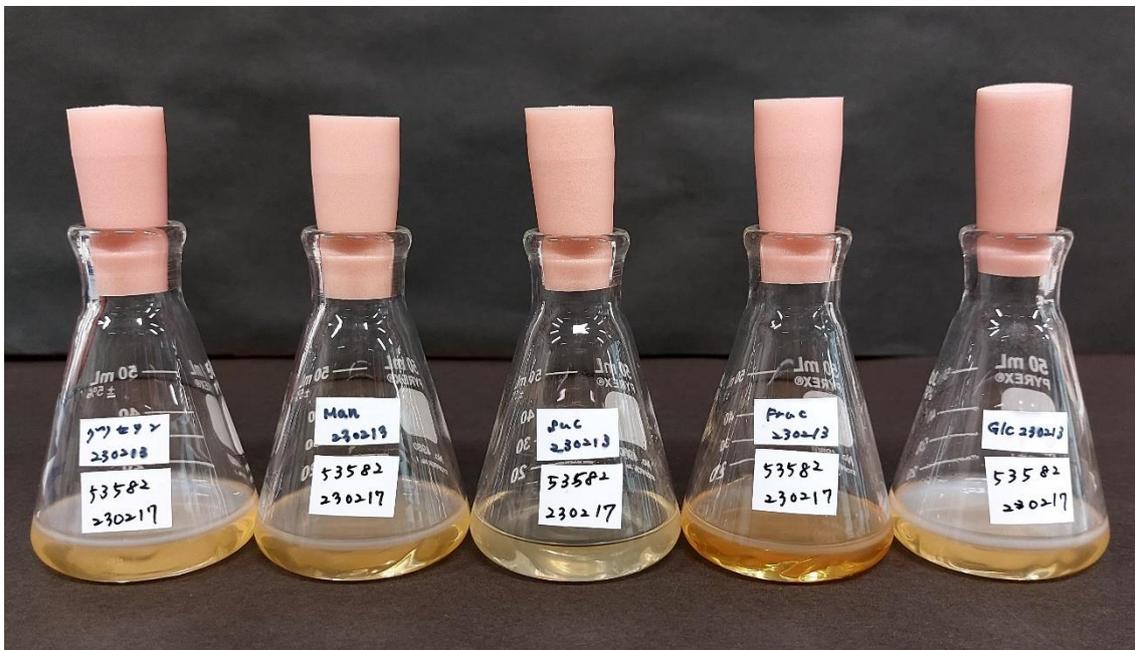


図 28 様々な炭素源を含む HS 培地で培養した際の様子(培養温度:20°C)

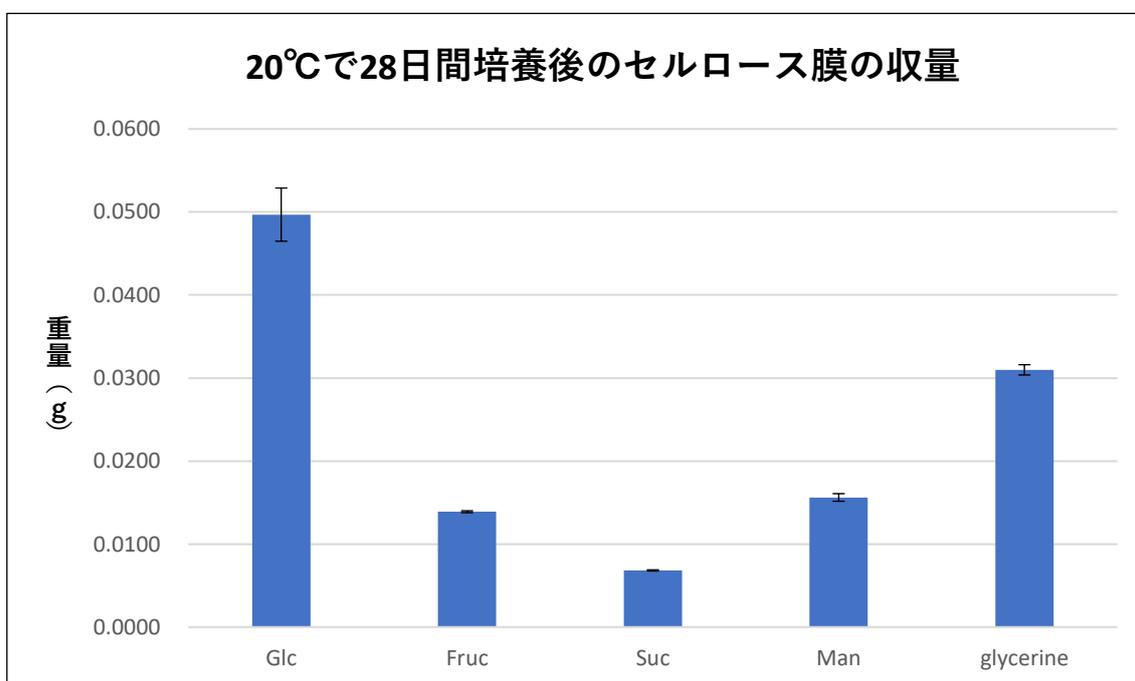


図 29 各炭素源 (2 (w/v)%)におけるセルロース収量(培養温度:20°C)

グルコースに対し、グリセロールでは6割、フラクトースとマンニトールでは3割程度、スクロースでは1.5割くらいの収量となった(図13、14)。今回用いた炭素源における収量はいずれも低く、グルコースが炭素源として適していることが確認された。

2.2.2 宇宙実験に関わる開発

(1) 微小重力下での微生物によるセルロース生産実験に適合した反応容器開発

2.1.2で述べたように、Kiraraによる宇宙実験に適合するように、以下の実験系を開発した。昨年度研究の成果から、含酸素容器を封入した容器内で ATCC53582 を HS-Glucose 培地で培養することで、宇宙でのバクテリアセルロース(BC)生産が可能であることが分かった。しかし、この系をそのまま宇宙にもっていくと、微小重力環境では重力がある地上の現象とは異なり、菌体が下方に集まることはなく、セルロースが容器内全体に薄く付着して物性確認が難しくなることが容易に予測される。また、昨年度の酸素透過性膜の実験結果から、ポリエチレン製の膜が酸素透過性の膜として BC 生産に利用できることがわかっている。そこで今年度の宇宙実験では、生産されるセルロースを回収しやすくするために、酢酸菌の方を酸素透過性の膜に入れて、宇宙実験容器に密閉する培養実験系を開発した。

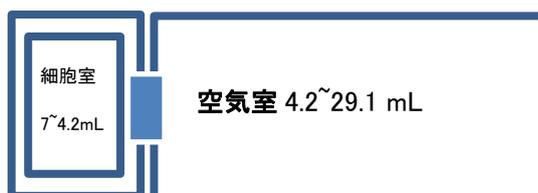


図 30 実験のイメージ

① 酸素投与実験

[実験方法] ポリエチレン製シートで作った 4.4 x 4.4 cm の袋(事前に 60 min UV 照射)に希釈した前培養(最終菌濃度 OD=0.001)7 mL を封入する。これを、隔壁を隔てて、細胞室・空気室からなる下図のような長方形のテックバリア製の袋(4 mm厚がある立体成型)に封入する。空気室は 4.2、9.5、19.6、29.1 mL の純酸素を封入したサイズの異なる4種の袋からなっている。培養開始時に空気室を押しつぶすことで隔壁を破壊して、細胞室側に気体を集めて膨らませ、20°Cで培養する。コントロール培養として、ポリエチレン製の袋に入れた培養液をそのまま空気中で培養した。各酸素量に対して2試料ずつ培養し、実験全体は2回繰り返した。

[実験結果] 2回の実験いずれも、コントロール培養は培養後5日で白色となり、セルロース生産が確認された。

1回目実験:2週間後に1組4種の培養容器を開けて観察すると、どの条件の培養でも培地は調製時と同じ pH 6 であった。また、4.2 mL 酸素培養だけに 0.5 mL 程度の BC 塊が観察され、他はすべて液体のみで BC 生産は確認できなかった。この時の酢酸菌の生存を確認するため、もう一組の細胞室をテックバリアから空気中に出してさらに2週間培養したところ、4.2 mL 酸素培養のみが白色となり BC を生産した。これらのことから、高濃度の酸素中では ATCC53582 は死滅することが分かった。

2回目実験:上記のような、4濃度の酸素を含んだテックバリア容器2つずつを、4週間20°Cで培養した。4.2 mL の酸素を入れた培養容器では、2容器とも小さな BC 塊が形成されていたが、他の容器内はすべて液体であった。

【結論】 これらのことから、高濃度の酸素中では ATCC53582 は生育できないことが分かった。宇宙での培養容器には、酸素でなく空気を供与することにした。

② 空気投与実験

【実験方法】 ポリエチレン製シートで作った 4.4 cm 幅の袋(事前に 60 min UV 照射)に希釈した前培養(最終菌濃度 OD=0.0006)4.2 mL を封入する。これを、隔壁を隔てて、4.2、9.5、19.6、29.1 mL の空気を封入したテックバリア製の袋に入れる。培養開始時に隔壁を破壊して、培地側に気体を集めて膨らませて、20°C で培養する。コントロール培養として、ポリエチレン製の袋に入れた培養液をそのまま空気中で培養した。各空気量に対して 2 容器ずつ培養した。

【実験結果】 培養 4 週間後に、BC をハーベストし、アルカリ処理後、水洗中和し、オートクレーブ処理した。各 1 試料を京大での電顕観察に提供し、他の 1 試料を半分に切断して東大での張力観察に供与した。切断した残りを 65°C で減圧乾燥し、乾燥重量を測定した。

下図のように、4.2 mL 培養当たりの乾燥重量は、1 mg、2.8 mg、5.2 mg、7.6 mg となった。コントロールとしてポリエチレン製の袋を空気中で培養した培養容器内の BC は、34.4 mg であった。

【結論】 宇宙実験の培養容器で 0.4 mL 程度の培養液と空気 1.6 mL を入れた状態の BC 生産量を右図の近似式から予想すると、乾燥重量 0.4 mg 程度の BC が生産できることが予測できた。京大での電顕観察から、この試料はやや疎な表面構造を持つ BC であり、酸素分圧の低下が BC の構造に影響していると考えられる。

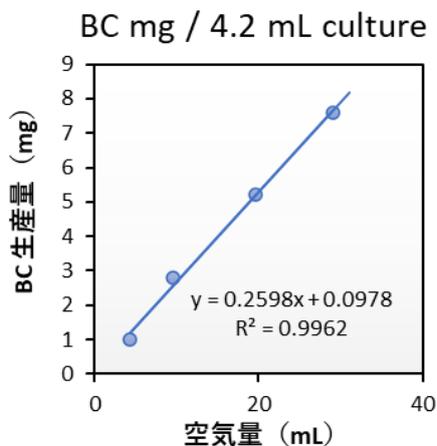


図 31 試験容器内に封入した空気量と BC 生産量との相関

(2) 微小重力下実験における新規の BC 生産開始機構の解析

Kirara を使った宇宙実験では、試料を米国に発送後、1～2週間してからケネディ宇宙基地で打ち上げ用のコンテナ(ICE CUBE)に搭載され、その後は 20°C 保管となり、順調であれば数日後には微小重力空間へ打ち上げられる。微小重力空間に到達するまでは BC 生産が起きず、かつ酢酸菌にダメージが少ない輸送方法と、射場で試料を搭載する時に BC 生産が開始できる条件を検討した。前項(1)の実験から酸素がない条件では、BC 合成が進まないことが予想されたので、反応開始(BC 生産開始)の因子として、温度の 4°C から 20°C への昇温と、酸素の供給の 2 通りについて検討した。

【実験方法】 ポリエチレン製シートで作った 5 cm 角の袋(事前に 60 min UV 照射)に希釈した前培養(最終菌濃度 OD=0.002) 1 mL を封入する。これを、5 cm 幅のテックバリア製の 4 mm 厚袋に入れ、5 または 20°C で 2 週間インキュベートする。この時、コントロール培養はポリエチレン製の袋に入れた培養液をテックバリア製袋に入れ開封した状態で、サンプル培養は脱酸素剤とともにテックバリア製袋に密封してインキュベートした。

各、2 試料ずつ作成して、4 種類の条件で 2 週間保管後に開封して空気を与え、同時に 20°C に昇温して反応を開始した。3 週間培養後に生産された BC をハーベストし、アルカリ処理、水洗中和、オートクレーブ処理し、65°C で減圧乾燥し、乾燥重量を測定した。

【実験結果】 脱酸素の状態では保管温度に関わらず BC 生産が起きず、培養開始後の BC 生産は活発であった。脱酸素による反応停止と、酸素供与による反応開始が、酢酸菌の保管・BC 生産開始には好適であることが分かった。また、5°C での保管によっても BC 生産は抑えられるが、脱酸素状態にした方が酢酸菌へのダメージが少ないらしく、短時間で BC 生産の開始が観察されることが分かった。また、いずれの方法で BC を生産させても、十分に長期間(3 週間)の培養後には、ほぼ同じ量の BC が生産された。

【結論】 今回の Kirara#4 での実験では、完全な脱酸素状態でケネディ宇宙基地に送付し、脱酸素剤を取り外して実験開始をセットすることは難しい。そこで、できるだけ脱酸素状態とするために拡散抑止装置を装着して酢酸菌層と空気層を遮断して、4°C で輸送と保管をする。ICE CUBE 搭載時に、拡散抑止装置を外して酢酸菌に空気を与え、かつ 20°C に昇温することで反応を開始し、宇宙実験に供することにした。

表 3 BC 生産開始機構の検討結果

	2週間の保管後	20°C1週間後	20°C3週間後 平均乾燥重量 (mg)
20°C Open	BSが白く固化	—	6.1
20°C 脱酸素	液体のみ	BSが白く固化	6.7
5°C Open	液体のみ	BSは中央に少量	6.9
5°C 脱酸素	液体のみ	BSが白く固化	6.6

(3) 実現可能な宇宙実験要件の構築

① 概要

酢酸菌を宇宙で培養するための実験容器は下図のように 8 mm x 4 mm x 58 mm(内容積 2 mL)の三菱ケミカル製テックバリア HX 厚さ 0.07 mm 製の容器の中に、酢酸菌と培地を封入した 0.3 mL のポリエチレン製内袋を封入したものとする(次図では、青色色を付けた)。

実際の宇宙実験では、この容器 2 本を組み合わせ、テックバリアでできた外装容器に封入する。この状態で、JAMSS から借用した拡散抑止装置を用いて、酢酸菌が入っているエリアと空気層を遮断する。抑止装置ごと 4°C で保管し、4°C のまま輸送する。射場では、打ち上げの 2-3 日前に、JAMSS 担当者が 4°C インキュベータから取り出し、拡散抑止装置から外す。さらに他の容器と組み合わせて、ICE CUBE 中のスロットに挿入する。



図 32 作成した BC 合成用容器と系の外観

② 振動試験による安全性の確認

上記のポリエチレン製袋、8 mm 袋、外装袋の打ち上げ時の振動に対する安全性を確認するために、Kirara での標準条件を用いて、振動試験を行った。(詳細は 2.1.2(3))振動後も、これらの容器には変化が見られず、安全性が確認できた。

③ 宇宙実験の培養条件検討

宇宙実験では、4°C で射場に輸送した後、搭載準備がされると 20°C 保存となる。天候などの状態が悪く打ち上げが遅延すれば、その状態で 1 週間は地上に置かれることになる。そこで、20°C 培養時の、1 週目と 5 週目の BC 生産量を比較し、「1 週間は BC を生産せず 5 週目には最大量の BC を生産する」最適な植菌量を決定した。

[実験方法] 上記の容器を用いて宇宙実験と同様に培養して BC を生産させ、アルカリ処理、水洗い、オートクレーブ後に、65°C で減圧乾燥して乾燥重量を測定する。

[実験結果] まず 2、4、8 mL 容器を作成して OD=0.002 の酢酸菌 0.3mL を培養したところ、容器を大きくすると BC の生産量が増え、容器内の酸素量が BC 生産量の制限要因になっていることが確認された。0.3 mL の培養液から生産される BC の乾燥重量は、酸素の供給が十分な時には 1.5~2 mg 程度であるが、全容量 2 mL の培養容器では 0.5 mg 程度であると予想された。また、別途、植菌量が多すぎても、BC 生産量が少なくなることが分かった。

次に同様な細胞濃度で植菌し、4℃で2週間または4週間保存後に、20℃で培養した。想定どおり0.5 mg程度のBC生産が確認できた。したがって、この濃度で植菌すればケネディ宇宙基地からの打ち上げに遅延が起きてもBC生産実験が可能である。しかし、この条件では、4℃保管2週間後に20℃1週間培養した時に、最終生産量の半分以上(0.3 mg)のBCを生産してしまい、地上での打ち上げ前の期間のBC生産量が高すぎるということがわかった。

培養の再現性を上げるために、4℃保管中に拡散抑止をかけて4℃保管中の酸素量を減らした実験をした。拡散抑止をすると保管中の菌の生存率が高く、OD=0.0003まで植菌量を下げると1週間後のBC生産量は5週間後の生産量の1/3量となることが分かった。そこで、さらに植菌量を下げたところ、OD=0.00008や0.000016の植菌量では10日間の4℃保管中に菌が死滅することがわかった。

BC生産菌はトランスポゾンが入っていて、ゲノムが不安定であることが知られている。そこで次の実験からは、ATCCから送られてきた菌を増殖後すぐに凍結した初代培養を使用してBC生産量を検討した。2回の実験の結果を平均して右図にまとめた。図に示すように、植菌量に関わらず、5週間培養した後のBC生産量(乾燥重量)は約0.5 mg程度であった。植菌をOD=0.00002で行えば1週間後のBC生産量は測定限度(0.1 mg)以下であるが、この植菌で4℃保存期間が24日になると、図中の●-で示したように菌が完全に死滅してBC生産がなくなることがわかった。そこで、宇宙実験では、OD0.0002と0.00004の2濃度で植菌をすること、天候やロケットの不具合による打ち上げ遅延時の菌体死滅に対応するために、1週間後にバックアップ試料を送付することに決定した。

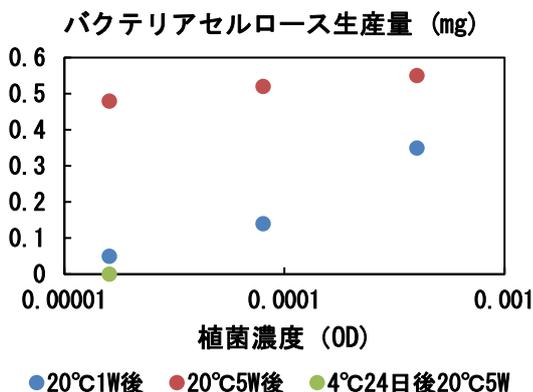


図 33 酢酸菌植菌濃度とBC生産量の相関

(4) 宇宙実験試料の調製とJAMSS引き渡し

① 宇宙実験試料

ATCC53582(初代培養)をHS-Glucose培地、30℃で2晩、前培養する。これを、HS-Glucose培地でOD0.0002または0.00004に希釈し、0.3 mLをポリエチレン製袋(2時間UV照射)に無菌的に封入する。

8 mm x 4 mm x 58 mm(内容積2 mL)の三菱ケミカル製テックバリア HX 厚さ0.07 mm 製(側面2重張り)の容器の底に、酢酸菌と培地を封入したポリエチレン製内袋を封入する。テックバリア容器で一重梱包した状態で、酢酸菌の内袋を空気層から遮断するように拡散抑止装置で抑止をかけ、4℃に保管する。

試料は、1条件当たり宇宙・地上・地上(打上げ時のコントロール)・地上(地上帰還時のコントロール)の4つを調製した。また、酢酸菌希釈液を30℃でそのまま2晩培養し、白濁により菌の増殖を確認した。

② 本番試料充填

(本番):2023年2月25日、(予備):2023年2月23日

細胞実験であるため、本番充填に失敗したときにすぐにやり直すことはできない。そこで、上記のように、実験前々日に予備試料の調製を行った。試料は前述のように、拡散抑止装置で酢酸菌と空気層を遮断した後、4°Cで保管した。

どちらの宇宙実験試料でも酢酸菌の生存が確認できたので、本番試料を2023年2月27日にJAMSSに引き渡した。JAMSSは、シールが完全に行われているかなどの安全性検査を並行して実施しながら、下記の作業を進めた。

酢酸菌試料を抑止装置から外して、開口部を再シールする。一重梱包容器を2つ組み合わせて、外袋に収納し、その上端をシーラーで2度シールする。その後、再度、拡散抑止装置で図のように酢酸菌と空気層を遮断した後、4°Cで保管した。

これら試料は、2月28日に、他の試料と同梱でケネディ宇宙基地に向けて4°Cで発送された。(低温輸送・管理は弊社からJAMSSに委託して実施した。)



図 34 宇宙実験に供される BC 合成サンプル外観

③ バックアップ試料充填

(本番):2023年3月4日、(予備):2023年3月3日

天候やロケットの不具合があったときには、射場で長期間4°Cまたは20°Cで保管される場合がある。前者は酢酸菌の死滅が、後者は地上でのBC合成がおき、不都合である。そこで、本番試料から1週間遅れて、バックアップ試料とバックアップ予備試料を調製した。試料は拡散抑止装置で酢酸菌と空気層を遮断した後、4°Cで保管した。

どちらの宇宙実験試料でも酢酸菌の生存が確認できたので、バックアップ本番試料を2023年3月6日にJAMSSに引き渡し、本番試料と同様に処理を進めた。本試料は、3月7日に、CDP試料と同梱でケネディ宇宙基地に向けて発送した。(低温輸送管理は弊社からJAMSSに委託して実施した。)

④ 宇宙実験の実施

米スペース X 社ファルコン9ロケットによる ISS への商用補給機ドラゴン 27 号機 (SpaceX CRS-27(SpX-27)/Dragon) で、2023 年 3 月 15 日 9 時 30 分 (JST) にフロリダ州ケネディ宇宙センターから打上げられた (2.1.2 参照) (この部分は、北大から JAMSS に委託して実施した)。

当初の打ち上げ予定は、3 月 11 日であったが、器具の不具合と天候の不順によって、打ち上げスケジュールが遅延した。しかし、遅延が 4 日間だったため、バックアップ試料は宇宙実験に使用しなかった。バックアップ試料は、本番試料と同じタイムスケジュールで BC を生産させ、打ち上げ時、地上帰還時、試料帰還時に、ハーベストして生産される BC の乾燥重量を測定する。また、本番予備の試料も同様に調製して、各種測定の条件検討用に供する。

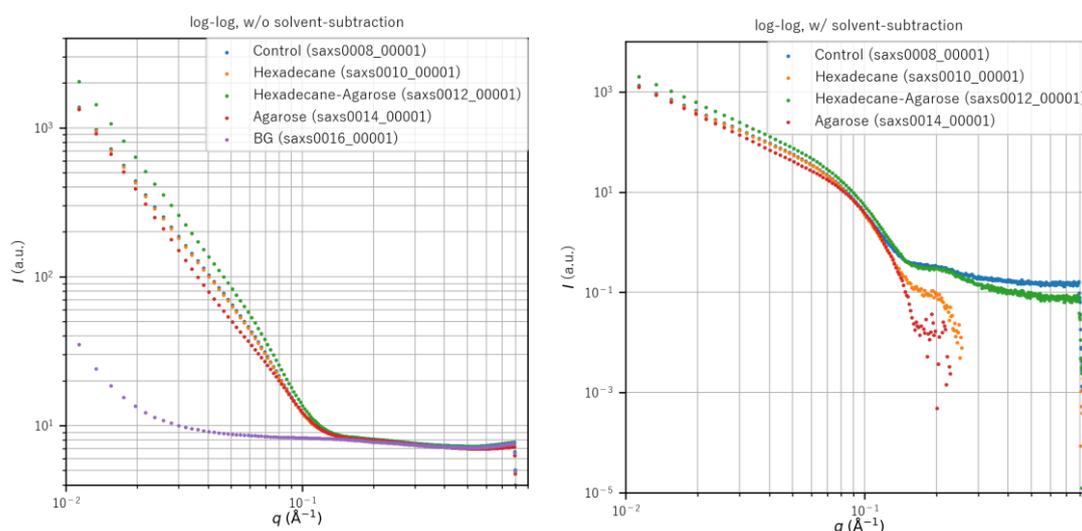
2.3 バイオ素材評価研究

昨年度に引き続き、他グループで合成したセルロースの評価研究を行った。

(1) GDP (セロデキストリンホスホリラーゼ) 合成セルロース

既報に従い GDP により合成したセルロースの構造解析を引き続き行った。今年度は特に小角 X 線散乱測定を行った。ロケットの打ち上げ延期により、今年度予定していた微小重力下で合成したセルロースの測定はできなかったが、前年度に反応容器の開発時に合成したセルロースの測定を行った。

反応液をロケットで ISS に輸送後にセルロース合成反応を開始できるよう、地上では酵素と基質液を隔壁で分離し、ISS 到着後に宇宙飛行士の手で簡単に隔壁を除去して反応開始できる反応容器として、融点 18.2°C のヘキサデカン、あるいは手で容易につぶすことができるアガロースゲルを隔壁とする容器が、共同研究先のコンフォーカルサイエンス社により開発された。そのテストとして合成したセルロースを、SPring-8 の BL40B2 に持ち込み小角 X 線散乱(SAXS)測定を行った(図1)。なお SAXS 測定条件として、より微細な構造情報を得ることを目的として、波長 1 Å、カメラ長 1.2 m を採用して実験を行った。



(左) 溶媒減算前; (右): 溶媒減算後。

図 35 酵素-基質分離隔壁の条件検討試験で合成されたセルロースの小角 X 線散乱測定データ(散乱ベクトル q を横軸、散乱強度 I を縦軸に取った両対数での q - I プロット)

酵素と基質の隔壁として、ヘキサデカンと使った場合、アガロースを使った場合、両者を使った場合と、隔壁なしで合成を行った場合の 4 点について測定を行った。左には溶媒である水からの散乱データも示した。

またもう一つの予備実験として、GDP 濃度を振ってセルロース合成を行い、得られた合成産物の測定を行った。その結果を図 2 に示す (200mM Glucose-1-phosphate, 5 mM cellobiose)。

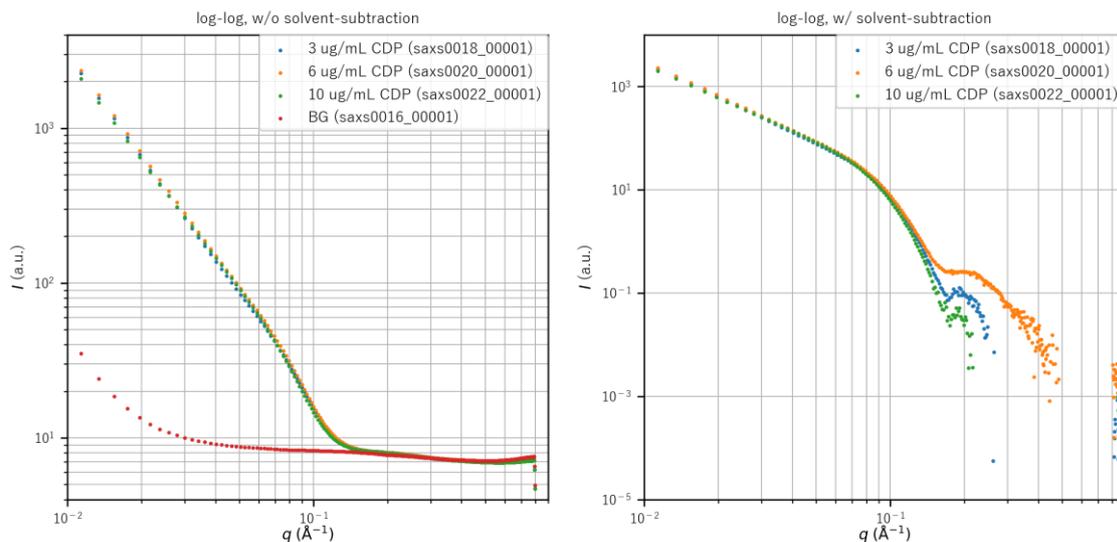


図 36 小角 X 線散乱測定データの q - I プロット: (左)溶媒減算前; (右):溶媒減算後

酵素と基質の隔壁として、ヘキサデカンと使った場合、アガロースを使った場合、両者を使った場合と、隔壁なしで合成を行った場合の 4 点について測定を行った。左には溶媒である自らの散乱データも示した。0.2 \AA^{-1} 以上のシグナルが極めて弱いことが分かる。

以上の予備測定の結果から次の二点を明らかにした。

- 今回の測定では 0.7 \AA^{-1} までの比較的高い q 領域までのデータを取得したが、0.3 \AA^{-1} 以上にはあまり目立った特徴がないこと
- 測定に用いた溶液セルが汚れていたため、散乱強度の弱い高角側の散乱強度が溶媒減算すると消えてしまう(負になってしまう)こと

以上を踏まえて、次年度に計画している、ISS から帰還した微小重力下で合成したセルロース試料についてはカメラ長 2 m で小角散乱測定を行うことを決定した。また、溶液セルの窓材について、細心の注意を払って次回の本番の測定を行うこととした。

合成反応産物の電子回折撮影を行い、高結晶性のセルロース II 由来のパターンの撮影に成功した(図3)。今までの報告済みのものよりも高角側の散乱まで撮影することができた。

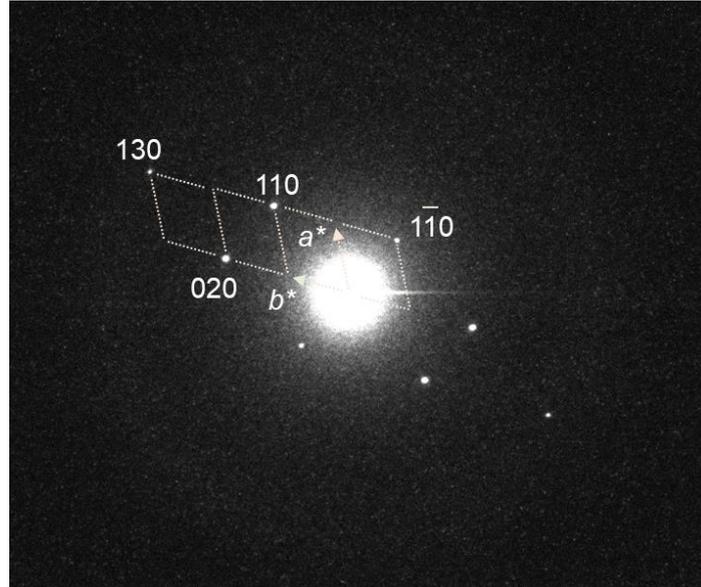


図 37 CDP により地上で合成したセルロースの電子回折パターン。130 回折点(面間隔 2.205 Å)まではっきり見えている。

(2) 酢酸菌によるバクテリアセルロース合成

バクテリアセルロース合成についても、コンフォーカルサイエンス社で開発した容器および合成条件による酢酸菌培養で作ったバクテリアセルロースの構造解析を、複屈折検出器を使った顕微鏡観察、SEM 観察、SAXS 測定により行った。その結果から、セルロースの構造が大きく変化することはないことを確認し、宇宙実験で利用可能であることを示した。

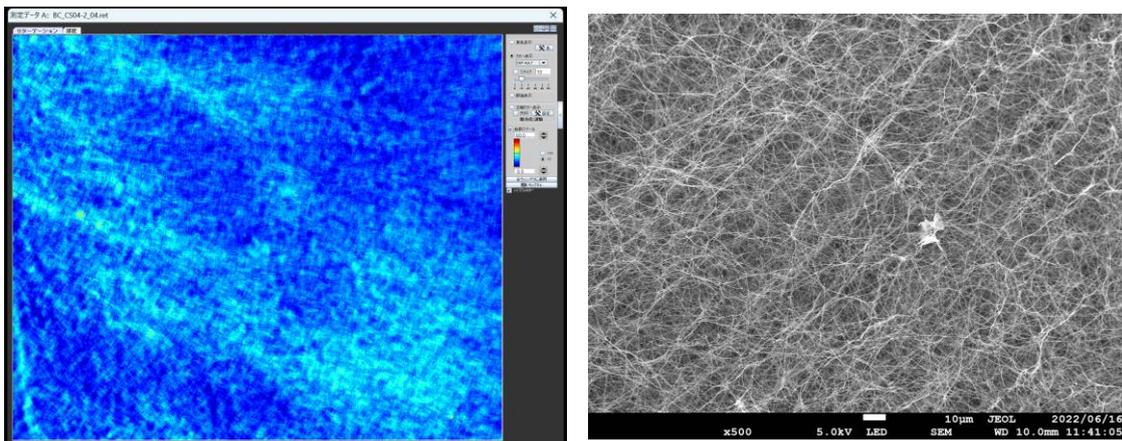


図 38 宇宙実験用容器で生産したバクテリアセルロースの構造解析

(左) 複屈折カメラによる光学顕微鏡画像: レターデーション値を pseudocolor 表示

(右) SEM 観察データ

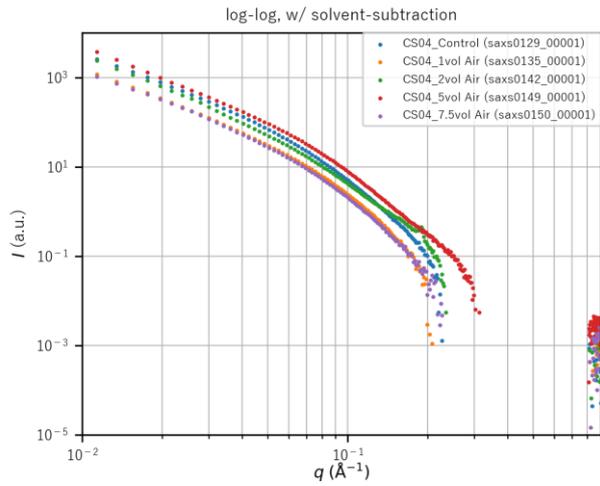


図 39 宇宙実験用容器で生産したバクテリアセルロースの SAXS 測定結果。CDP による合成セルロースと同様、 0.2 \AA^{-1} 以上のシグナルが極めて弱い。

2.4 基盤形成活動

2.4.1 基盤ホームページの拡充

昨年度立ち上げたホームページに以下を掲載した(News & Events 本年度行ったセミナー、シンポジウム、教育活動、および宇宙実験実施の告知)。

2.4.2 学生、企業向け研究会

(1) 宇宙および関連事象をテーマとしたレクチャーやセミナーの実施

- 2022年6月11日に宇宙連携拠点形成プログラムセミナー「地球から宇宙へ 宇宙から地球へ」を北海道大学の主催でオンライン開催した。[添付資料 2.4.2-1](#)
- 2022年11月19日に宇宙連携拠点形成プログラムシンポジウム「宇宙で持続可能性を考える」(第477回生存圏シンポジウム・第16回生存圏フォーラム特別講演会)を京都大学およびオンラインでハイブリッド開催した。(Zoom参加者 34名、現地参加者 29名、合計:63名)[添付資料 2.4.2-2](#)
- 2023年3月22日に東京大学 One Earth Guardians 育成プログラムとの共催で LUC Lecture「アート×サイエンスで語る、バイオ素材の可能性 -宇宙で作って宇宙でこわす 持続可能なものづくり-」を東京大学およびオンラインでハイブリッド開催した。(Zoom参加者 52名、現地参加者 10名、合計:42名)[添付資料 2.4.2-3](#)

(2) バイオセルロースをテーマとした簡単な実験キットの開発と活用

2023年3月22日に東京大学 One Earth Guardians 育成プログラムとの共催で行われた、LUC Lecture「アート×サイエンスで語る、バイオ素材の可能性 -宇宙で作って宇宙でこわす 持続可能なものづくり-」で、レクチャー実施中に参加者が手元でセルロースナノクリスタル合成を体験できるキットを作製し、希望者に配布した。

キットは、器具を使わずに安全で簡単に操作できること、目視でセルロースナノクリスタル合成が観察できること、レクチャーの時間内にセルロースナノクリスタル合成が観察できること、の3点を満たしたものを作製した。

① キット容器によるセルロースナノクリスタル合成反応開始の仕組み

容器内には CDP と基質等を分けるために、軟弱接着部位による仕切りを設けた。指などで圧迫するだけで仕切りが開放でき、2液が混合する仕組みにした。容器は透明素材を使用し、容量は2室合計約1 mLとして、容易に目視確認できるようにした。



←小室に CDP 酵素を入れる

←指による圧迫で開放される仕切り

←大室に基質等を入れる

図 40 教育セミナー用に新規開発した CDP によるセルロース合成実験キット

② セルロースナノクリスタル合成条件

約 1 時間半のレクチャーの時間内にセルロースナノクリスタル合成反応が目視で確認できる条件を探索し、以下の条件を採用した。

小室(350 μ L): 428 μ g/mL CDP, 571 mM HEPES pH 7.5

大室(650 μ L): 462 mM α G1P, 15.4 mM cellobiose, 462 mM HEPES pH 7.5

混合後の反応条件(1000 μ L): 150 μ g/mL CDP, 300 mM α G1P, 10 mM cellobiose, 500 mM HEPES pH 7.5

体温等の、室温よりも少し暖かいところで反応させると、1 時間～1 時間 15 分程度でセルロースナノクリスタル合成が確認された。

③ キットの作成と送付

1. 小室に CDP 溶液を入れ、シーラーで 2 度封止する。その際、袋がつぶれないように内側にひだをいれるために、ひだをポイントシーラーで固定してからシーラーで密封する。
2. 大室に基質等溶液を入れ、1.と同様に封止する。
3. キット容器は、送付時に圧力がかかることを防ぐために、エアーを入れた袋に封入し、レターパックで約 40 名の希望者に個別送付した。

3 まとめ

3.1 酵素合成技術開発

a. 酵素学的な開発

今年度は大型容器中で充分量のセルロースを合成する事を目標として、CDPとSPの複合酵素反応系を用いたスクロースからのセルロース合成を試みた。複合酵素反応系では良好にセルロースの合成が進行する事が確認し、数 g/L-反応液程度の生産性が得られた。また高濃度になった CDP 合成セルロースはペースト状の形態を示し、これを乾燥させることによってブロック状の構造体を得る事が出来る事を確認した。

一方で、複合酵素反応系では検討すべきパラメータが多岐に渡る為、宇宙実験の実施条件を満たす様な反応液組成を見出す事が出来ず宇宙実験への搭載は見送る事になった。

b. 宇宙実験に関わる開発

令和3年度に開発した宇宙実験容器の改良を行い、CDPによるセルロース合成反応およびアルカン隔壁を用いた反応開始機構が宇宙実験に利用可能なことを確認した。航空機輸送に供してもアルカン隔壁が保持されることを確認した。打上げ時の振動を模した振動試験を行い、新しい大型容器の耐久性が確認された。

東大グループより分与された打上げに供するロットの Δ Cys-CDP と新しい大型容器を用いて、宇宙実験条件を確定した。条件を検討した3~10 μ g/mL CDPの範囲では、最終的なセルロースナノクリスタル収量が同程度に多かったが、比較的最初の1週間のセルロースナノクリスタル合成速度が緩やかだった、3 および 6 μ g/mL CDP、200 mM α G1P、5 mM cellobiose、500 mM HEPES pH 7.5 を宇宙実験条件として採用した。試料は、JAMSS の Kirara#4 宇宙実験に搭載した。

3.2 微生物合成技術開発

a. 微生物学的な開発

今年度は宇宙実験に搭載する為の微生物種の選定、輸送条件、培養条件の検討を実施した。実験に用いる微生物種についてはエンテロバクター属細菌、酢酸菌に対して検討を実施し、セルロース生産量、生産速度、得られるセルロースの均一性などの観点から酢酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53582 を用いる事とした。

実験に用いるまでの菌体保存条件としては、培養液のまま、ペレット状菌体、10倍濃縮菌体のいずれの形態でも4°C、1週間の保管に耐える事を確認した。培地組成についてはHS-Glucose 培地が最適であると結論し、これを用いる事とした。

b. 宇宙実験に関わる開発

今年度は、微小重力環境で生産されるバクテリアセルロース(BC)を回収しやすくするために、酢酸菌の方を酸素透過性の膜に入れて、宇宙実験容器に密閉する培養実験系を開発した。BC 高生産菌 ATCC53582 は、高濃度の酸素中では生育できないことが分かったので、宇宙での培養容器には酸素でなく空気を供与することにした。BC 生産反応開始の因子として、温度の4°Cから20°Cへの昇温と、酸素の供給の2通りがあることがわかり、本年度は後者を利用することにした。

振動試験やBC生産量などの検討の結果、宇宙実験試料は、ATCC53582をOD=0.0002と0.00004の2濃度でHS-Glucose 培地に植菌し、それぞれ0.3 mLを酸素透過性のポリエチレン製培養袋に入れたのち、全容2

mL の容器に密閉した。これを二重梱包した後に、JAMSS の ICE CUBE (20°C) に搭載し、Kirara#4 宇宙実験に供した。

3.3 バイオ素材評価研究

今年度は昨年度に引き続き、他グループで合成したセルロースの評価研究を行った。ロケットの打ち上げ延期により今年度予定していた微小重力下で合成したセルロースの測定が出来なかった為、開発されたヘキサデカンを隔壁として用いる反応系により酵素合成されたセルロースの小角 X 線散乱(SAXS)測定による評価を実施した。測定の結果から、より微細な構造情報を得る為に必要な測定条件が見いだされ、これを ISS から帰還したサンプルの測定条件に用いる事とした。また微小結晶である酵素合成セルロースに対して電子回折測定を実施し、電子回折パターンを得、結晶型を確認する事が出来た。

微生物合成セルロースについても、本年度の宇宙実験用に開発された容器、および合成条件で合成されたセルロースを用い、顕微鏡観察、走査型電子顕微鏡(SEM)観察、SAXS 測定による評価を実施した。結果から、宇宙実験用の条件にて合成された微生物セルロースは、従来の地上実験にて合成されたセルロースと構造的に大きく変化が無いことを確認し、宇宙実験で利用可能であることを示した。

3.4 基盤形成活動

a. 基盤ホームページの拡充

昨年度立ち上げたホームページを改訂し充実させた。

b. 学生、企業向け研究会

本年度は、令和 4 年 6 月 11 日に北海道大学で、11 月 19 日には第 477 回生存圏シンポジウム・第 16 回生存圏フォーラム特別講演会と共催で京都大学で、令和 5 年 3 月 22 日には東京大学農学部の One Earth Guardians(地球医)育成プログラムと共催で研究会を開催した。

東京大学と共催した研究会では、セルロース酵素合成の簡単なキットを作製し、参加者に事前に配布して、研究会の開始とともに合成反応を開始させた。時間内にそれぞれの手元でセルロースナノクリスタルの合成が体験でき、事後のアンケートでは受講者から大変に好評であった。

4 添付資料

添付資料 2.4.2-1

2022年6月11日に宇宙連携拠点形成プログラムセミナー「地球から宇宙へ 宇宙から地球へ」

文部科学省・宇宙航空科学技術推進委託費宇宙連携拠点形成プログラムセミナー

URL

<http://spacecellulose.jp>

地球から宇宙へ 宇宙から地球へ

開催日：令和4年6月11日（土）

開催時間：9:30 - 12:00

開催方法：オンライン（要事前登録）

ご登録は
こちらから→



1.はじめに 09:30 -

2.ご講演（座長：田島健次）09:35 -

北海道大学 大学院工学研究院 永田 晴紀 教授

「相乗り小型宇宙機用

ハイブリッドキックモーターの開発」

北海道大学 大学院理学研究院 高橋 幸弘 教授

「北大超小型衛星が拓く新しい宇宙利用」

3.プロジェクト紹介（座長：今井友也）11:30 -

北海道大学 大学院工学研究院 田島 健次 准教授

「生体触媒（酵素・菌体）を使った

モノづくり」

4.閉会挨拶 11:55 -

東京大学 大学院農学生命科学研究科 五十嵐圭日子 教授

演者紹介 永田 晴紀（ながた はるのり）

1994年、東京大学大学院工学系研究科航空宇宙工学専攻博士課程修了、博士（工学）。1996年、北海道大学宇宙環境システム工学研究室、助教授。2006年より教授。2020年6月、ハイブリッドキックモーターの事業化を目指して卒業生らと共に Letara（レタラ）（株）を設立。

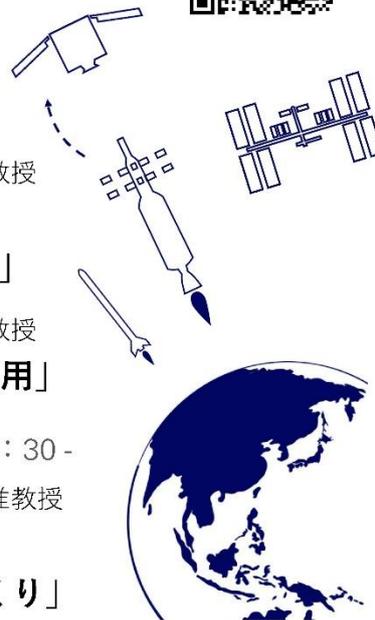
田島 健次（たじま けんじ）

1993年日本学術振興会特別研究員DC1、1995年北海道大学大学院工学研究科博士課程中退、1995年北海道大学工学部助手、2002年北海道大学大学院工学研究科助教授、2010年北海道大学大学院工学研究科准教授、微生物におけるセルロース合成機構の解明、バクテリアセルロースの量産化と応用に関する研究を長年行っている。

高橋 幸弘（たかはし ゆきひろ）

1991-93年、日本南極地域観測隊に参加（東北大学大学院理学研究院博士課程1年時）、昭和基地でオーロラ観測を行う。1995年、中層・超高層放電現象（スプライトなど）の研究を開始、2009年、その観測のための超小型衛星を開発、打ち上げ。6機の北大衛星プロジェクトを牽引。フィリピン、ミャンマー両国が開発する初の衛星を、留学生とともに開発、運用し、フィリピン宇宙庁の設立に貢献。東南アジアの途上国を中心としたアジア・マイクロサテライト・コンソーシアムを立ち上げ、学術とビジネス両面で世界をリードできる新しい宇宙利用を目指している。

【問合せ先】宇宙連携拠点形成プログラム事務局
info@spacecellulose.jp



2022年11月19日に宇宙連携拠点形成プログラムシンポジウム「宇宙で持続可能性を考える」(第477回生存圏シンポジウム・第16回生存圏フォーラム特別講演会)

第477回生存圏シンポジウム
第16回生存圏フォーラム特別講演会
文部科学省・宇宙航空科学技術推進委託費「宇宙連携拠点形成プログラム」シンポジウム

「宇宙で持続可能性を考える」

生存圏フォーラムでは、持続的発展が可能な生存圏を構築すべく、情報交換・人的交流・教育・啓発活動の一環として特別講演会を開催しています。

日時：令和4年11月19日（土） 14:30 - 17:35
会場：京都大学宇治地区おうばくプラザ・きはだホール（聴講無料）

- 会場での聴講は申し込み不要ですが、入場制限・会場閉鎖の可能性があります
- 同時WEB配信をフォーラム会員限定で行います。入会手続き等詳細は下記まで。

プログラム

14:30-14:40 開会の辞
林 知行（秋田県立大学名誉教授・生存圏フォーラム会長）
五十嵐 圭日子（東京大学教授・宇宙連携拠点形成プログラム「バイオ有機素材の宇宙リサイクルシステム開発」代表）

14:40-15:20
「宇宙太陽発電ー持続可能なエネルギーシステムの開発ー」
田中 孝治（JAXA 宇宙科学研究所・准教授）

15:20-16:00
「人類の活動の場としての月面環境 ～月ダストに関わる学理を中心に～」
三宅 洋平（神戸大学大学院システム情報学研究科・准教授）

16:10-16:50
「酵素を用いた宇宙空間でのセルロース合成」
砂川 直輝（東京大学大学院農学生命科学研究科・特任講師）

16:50-17:30
「宇宙環境下での人への影響～宇宙医学とは？」
寺田 昌弘（京都大学宇宙総合学研究ユニット・特定准教授）

17:30 閉会の辞
山中 大学（神戸大学名誉教授・生存圏フォーラム副会長）

お問い合わせ・生存圏フォーラム入会申込先
京都大学生存圏研究所
生存圏フォーラム事務局

e-mail: forum@rish.kyoto-u.ac.jp
Tel: 0774-38-4609, Fax: 0774-31-8463
HP: <https://www.rish.kyoto-u.ac.jp/?lang=forum>



添付資料 2.4.2-3

2023年3月22日 LUC Lecture「アート×サイエンスで語る、バイオ素材の可能性 -宇宙で作って宇宙でこわす 持続可能なものづくり-



LUC Lecture

Learn and Unveil through Conversation

LUCには「光」という意味があります。講師の話を聞き、対話することで、これまで見えていなかったこと・知らなかったことに目を向け、考える「=光をあてる」ための学びの場です。

アート×サイエンスで語る、 バイオ素材の可能性

- 宇宙でつくって宇宙でこわす 持続可能なものづくり -

田羅 義史 氏

科学美術者/東京藝術大学美術学部デザイン科・教育研究助手

田島 健次 氏

北海道大学大学院工学研究科・准教授

五十嵐 圭日子 氏

東京大学大学院農学生命科学研究科・教授

砂川 直輝 氏

東京大学大学院農学生命科学研究科・特任講師

日時 2023年3月22日 水
17:00~19:00

参加方法 要参加登録
参加登録された方にZoomの
URLをお送りします



開催方式 オンライン

登録バッチ 3月10日 金

参加される方には事前に簡単な実験キットをお送りし、イベント中にセルロース合成をお手元で体験していただけます。どうぞお楽しみください。
郵送を希望される方には登録フォームにて郵送先のご住所をお伺いします。

セルロースは、木や草など植物の細胞壁に最も多く含まれる成分で、私たちの衣食住を支える大切な物質です。例えば、生活の中ではコットンや麻等の“衣”類として幅広く使われるだけでなく、野菜やナタデココとして“食”べてもいますし、木造住宅が多く建てられる日本で“住”宅を支えるのも、木材中で力学的強度を発揮しているセルロースです。セルロースは、CO₂と水から光合成によって持続的に作られ、しかも微生物などによって分解される素晴らしい素材なのですが、一方で私たちはセルロースの工業レベルでの人工合成に成功しておらず、天然で作られたセルロースを抽出して、形を変えて使うことしかできません。将来的には、地球上、宇宙船内、さらに地球以外の惑星においても、いかにセルロースを作り、構造を制御し、分解し、また作るかが重要になってきます。

このLUC Lectureでは、参加者が実際に宇宙実験で行われたセルロース合成システムを体験し、また、アート作品に触れることで、バイオ素材としてのセルロースの可能性に思いをめぐらせてもらえたらと考えています。

※この企画は文部科学省 地球観測技術等調査研究委託事業
「バイオ有機素材の宇宙リサイクルシステム開発」と
東京大学 One Earth Guardians 育成プログラムによる共催です



ONE EARTH GUARDIANS
育成プログラム



©Yoshifumi Tara



©Yoshifumi Tara



©Yoshifumi Tara

学会等発表実績

委託業務題目「バイオ有機素材の宇宙リサイクルシステム開発」

機関名 国立大学法人 東京大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果 (発表題目、口頭・ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所 (学会等名)	発表した時期	国内・外の別
酢酸セルロース/ポリカプロラクトンプレンドに対する新規相溶化剤の開発 口頭発表	辻 悠希、勝原 哲、砂川 直輝、五十嵐 圭日子、山本 拓矢、磯野 拓也、田島 健次、佐藤 敏文	第 71 回高分子学会年次大会、オンライン	2022 年 5 月	国内
酢酸セルロースの物性改善を目指した新規相溶化剤の開発 ポスター発表	辻 悠希、勝原 哲、砂川 直輝、五十嵐 圭日子、山本 拓矢、磯野 拓也、田島 健次、佐藤 敏文	セルロース学会第 29 回年次大会 金沢	2022 年 7 月	国内
宇宙で酵素合成した II 型セルロースの構造解析	久我 友大、砂川 直輝、五十嵐 圭日子	セルロース学会第 29 回年次大会 金沢	2022 年 7 月	国内
セロビオース加リン酸分解酵素のシステイン残基変異とクライオ電子顕微鏡による単粒子解析	入矢 頌仁、久我 友大、砂川直輝、五十嵐圭日子	セルロース学会第 29 回年次大会 金沢	2022 年 7 月	国内
相溶化剤への応用を目指した酢酸セルロース-ポリ(ε-カプロラクトン)ブロック共重合体の合成 ポスター発表	辻 悠希、勝原 哲、砂川直輝、五十嵐圭日子、高橋憲司、山本 拓矢、磯野 拓也、田島 健次、佐藤 敏文	第 37 会高分子学会北海道支部 若手研究会	2022 年 8 月	国内
Enzymatic synthesis of cellulose in space.	Tomohiro Kuga 、Naoki Sunagawa 、Kiyohiko Igarashi.	LignoBiotech 2022	2022 年 8 月	海外(カナダ)
酢酸セルロース含有海洋生分解性プレンドに対する新規相溶化剤の開発 口頭発表	辻 悠希、勝原 哲、砂川直輝、五十嵐圭日子、高橋憲司、山本 拓矢、磯野 拓	第 71 回高分子討論会	2022 年 9 月	国内

	也、田島 健次、佐藤 敏文			
置換度の異なるセルロース含有ブロック共重合体の合成と自己組織化挙動 口頭発表	勝原 哲、砂川直輝、五十嵐圭日子、山本拓矢、磯野拓也、田島健次、佐藤敏文	第71回高分子討論会	2022年9月	国内
ホスホリラーゼ酵素を利用したオリゴ糖合成と高分子デザインへの活用	砂川直輝、久我友大、勝原哲、高木靖子、山本拓矢、磯野拓也、田島健次、佐藤敏文、五十嵐圭日子	第71回高分子討論会	2022年9月	国内
酢酸セルロース-ポリカプロラクトンブロック共重合体の合成と相溶化剤への応用	辻 悠希、勝原 哲、砂川直輝、五十嵐圭日子、高橋憲司、山本拓矢、磯野拓也、田島健次、佐藤敏文	第12回71CSJ化学フェスタ	2022年10月	国内
セロビオース加リン酸分解酵素のシステイン残基変異とクライオ電子顕微鏡による単粒子解析	入矢 頌仁、久我友大、砂川直輝、五十嵐圭日子	細胞壁研究者ネットワーク・第16回定例研究会	2022年10月	国内
Stabilization and structural analysis of cellodextrin phosphorylase from <i>Clostridium thermocellum</i>	Tomohiro Kuga、Naoki Sunagawa、Kiyohiko Igarashi.	International symposium on "Plant-Structure-Optimization.	2022年11月	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所(学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Enzymatic synthesis of cellulose in space: gravity is a crucial factor for building cellulose II gel structure	Tomohiro Kuga、Naoki Sunagawa、Kiyohiko Igarashi.	Cellulose	2022年4月	国外
セロデキストリンホスホリラーゼの逆反応を活用したセルロース合成と、その制御に向けた取り組み	砂川直輝、久我友大、五十嵐圭日子	応用糖質科学	2022年12月	国内

(注)発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。