

令和 5 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 6 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5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
1.2.1 酵素合成技術開発	1
1.2.2 微生物合成技術開発	1
1.2.3 バイオ素材評価研究	2
1.2.4 基盤形成活動	2
1.2.5 自発的な研究活動等	2
1.3 当該年度における委託業務の結果概要	2
1.3.1 酵素合成技術開発	2
1.3.2 微生物合成技術開発	2
1.3.3 バイオ素材評価研究	2
1.3.4 基盤形成活動	3
1.3.5 自発的な研究活動等	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	12
2.2.1 微生物学的な開発	12
2.2.2 宇宙実験に関わる開発	17
2.3 バイオ素材評価研究	20
2.3.1 酵素合成セルロースの評価系の構築	20
2.3.2 微生物合成セルロースの評価系の構築	23
2.4 基盤形成活動	26
2.5 自発的な研究活動等	26
2.5.1 セルローゼ等分解酵素による酵素合成セルロースの分解	26
3 まとめ.....	29
3.1 酵素合成技術開発	29
3.1.1 今年度のまとめ	29
3.1.2 3年間のまとめ	30
3.2 微生物合成技術開発	31
3.2.1 今年度のまとめ	31
3.2.2 3年間のまとめ	31
3.3 バイオ素材評価研究	32
3.3.1 今年度のまとめ	32

3.3.2	3 年間のまとめ	32
3.4	基盤形成活動	33
3.4.1	今年度のまとめ	33
3.4.2	3 年間のまとめ	33
3.5	自発的な研究活動等	34
4	添付資料	35

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) 内グローバルコモンズセンターに移し、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

1.2.1 酵素合成技術開発

a. 酵素学的な開発

令和 4 年度に打上げを実施した大型反応容器内で合成したセルロースナノクリスタルについて、解析を実施する。宇宙空間でのセルロースナノクリスタルおよびセルロースナノファイバーの分解実験に関してはカメラ等の観察機器を宇宙空間に共に打上げる事は困難であることから、分解物組成を分析する事によって微小重力下でのセルロース酵素合成と分解を証明可能な反応系を構築する。

令和 4 年度までに実施したセルロース合成反応系が他の物質生産に適応可能であるかを調べる為、同反応系を用いたグリコーゲン加リン酸分解酵素による α -1,4-グルカンの生産を検討する。

b. 宇宙実験に関わる開発

前項 a. にて言及した、セルロースの合成と酵素分解を微小重力下にて実現可能な時間差リアクションチャンバー(二段階セルロース合成実験デバイス)の検討を行う。また新規反応機構に適合した酵素反応条件の検討を行う。

1.2.2 微生物合成技術開発

a. 微生物学的な開発

令和 4 年度に打上げを実施した結果を踏まえ微生物由来セルロースナノファイバーについて、解析を実施し、スケールアップに関する検討を行う。

b. 宇宙実験に関わる開発

ここまで得られた培養条件の最適化を進めると共に、微小重力下での培養のスケールアップに取り組む。

1.2.3 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①にて実施予定のセルロースナノクリスタルの分解過程の解析に適した分析手法(時分割小角 X 線散乱解析)構築を検討する。

1.2.4 基盤形成活動

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、学生を含めたセミナーの開催を企画する。

1.2.5 自発的な研究活動等

自発的な研究活動等に関する実施方針に基づき、所属機関が認めた範囲で自発的な研究活動等を推進する。

1.3 当該年度における委託業務の結果概要

1.3.1 酵素合成技術開発

a. 酵素学的な開発

令和 4 年度に打上げを実施した大型反応容器内で合成したセルロースナノクリスタルについて、解析を実施した。宇宙空間でのセルロースナノクリスタルおよびセルロースナノファイバーの分解実験に関してはカメラ等の観察機器を宇宙空間に共に打上げる事は困難であることから、分解物組成を分析する事によって微小重力下でのセルロース酵素合成と分解を証明可能な反応系を構築した。

令和 4 年度までに実施したセルロース合成反応系が他の物質生産に適応可能であることを調べる為、同反応系を用いたグリコーゲン加リン酸分解酵素による α -1,4-グルカンの生産を検討し、適応可能であることを確認した。

b. 宇宙実験に関わる開発

前項 a にて言及した、セルロースの合成と酵素分解を微小重力下にて実現可能な時間差リアクションチャンバー(二段階セルロース合成実験デバイス)の検討を行い、開発した時間差リアクションチャンバーを実験に活用した。また新規反応機構に適した酵素反応条件の検討探索を酵素濃度に関して 5 条件、バッファ濃度に関して 2 条件を行い、2 種の反応条件に絞り込んで宇宙実験を実施した。

1.3.2 微生物合成技術開発

a. 微生物学的な開発

令和 4 年度に打上げを実施した結果を踏まえ微生物由来セルロースナノファイバーについて、解析を実施し、スケールアップに関する検討を行い、b. 宇宙実験に関わる開発へ繋げた。

b. 宇宙実験に関わる開発

ここまで得られた培養条件の最適化を進めると共に、微小重力下での培養のスケールアップに取り組み、打上げ容積の 100%をセルロース生産のための培養液とした好気条件での培養が可能となった。セルロースの乾燥重量として昨年度のおよそ 10 倍の生産性が得られた。

1.3.3 バイオ素材評価研究

上記 1.3.1 および 1.3.2 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 1.3.1 にて実施予定のセルロースナノクリスタルの分解過程の解析に適した分析手法(時分割小角 X 線散乱解析)構築を検討した。

1.3.4 基盤形成活動

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、学生を含めた自由参加のセミナーを1回開催した。

1.3.5 自発的な研究活動等

自発的な研究活動等に関する実施方針に基づき、所属機関が認めた範囲で自発的な研究活動等を進めた。

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) 宇宙で生成したセルロースナノクリスタルの解析

Kirara#4 にて打上げを実施した大型反応容器内で合成したセルロースナノクリスタルについて、解析を実施した。Kirara#4 では合成したセルロースナノクリスタル構造体の物理的特性を明らかにする事を目標としていたが、構造体の形成に十分なセルロースを得る事は出来なかった(図 2.1.1-1)。これは主にロケット打ち上げまでの地上作業期間に合成が開始しない条件と、約 30 日間のフライト中に十分量のセルロースが合成される事の両立が困難である事が原因であると考えられた。(本サンプルの詳細な分析は 2.3.1 に記載した)

> 宇宙条件

K4-1XS 03



K4-1YS 03



> 地上条件

K4-1XG 03



K4-1YG 03



・黄緑に見える部分は画像合成時のデータ欠損部位です
・再表面に紫色のキラキラしたドットが見えるのは容器の反射です

図 2.1.1-1 令和 4 年度打ち上げにて合成した酵素合成セルロース

(2) 宇宙で分解したセルロースナノクリスタルの解析

2.1.2-(2)において作製した、宇宙空間でのセルロース分解試験用デバイスについて分解の実証を検討した。下記図 2.1.1-2 の通り、作成したデバイスにおいては反応開始後 50 時間後辺りからセルロースの合成に伴う白濁が進行し、127 時間付近にて白濁がピークに達した後、以降は内蔵したセルラーゼの作用により分解が進行し、白濁から透明な溶液に変化していく様子が観察された。

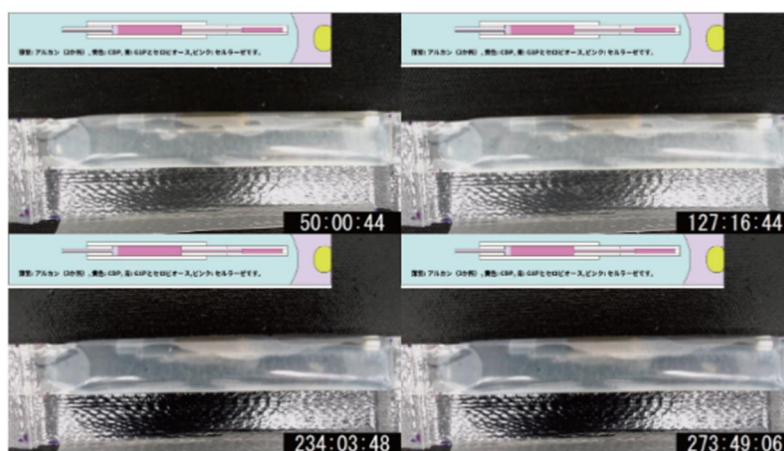


図 2.1.1-2 分解試験用容器におけるセルロースの合成と分解の様子

一方で、実際の宇宙空間でのセルロースナノクリスタルおよびセルロースナノファイバーの分解実験に関して、今回の Kirara 宇宙実験系ではカメラ等の観察機器使用は困難であったため、生成→分解のプロセスを観察することはできなかった。しかしながら、インキュベーション前の基質と分解物の組成分析などを詳細に行うことで宇宙空間での合成と分解を立証することができるため、本研究に関しては実験系構築を進めており、今後も検討を進める予定である。

(3) セルロース合成反応系の他の物質生産への適応

令和4年度までに実施したセルロース合成反応系が他の物質生産に適応可能であるかを調べる為、グリコーゲン過リン酸分解酵素による α -1,4-グルカンの合成反応を利用して、セルロース合成反応系と同様にアルカンを利用して、物質生産の阻害・開始が可能かどうかを検討した。

まず、Kimble 社製 Disposable Culture Tube (6 x 50 mm) に α -グルコース-1-リン酸(グリコシルドナー)、マルトテトラオース(グリコシルアクセプター)、Tris バッファーの混合液 120 μ L、アルカン(ヘキサデカン:ヘプタデカン=9:1)溶液 150 μ L(上層)を充填し、4℃でアルカン層(中層)を凍らせた後、グリコーゲン過リン酸分解酵素(ウサギ筋肉由来、Sigma-Aldrich 社 P6635-25MG)溶液 180 μ L(下層)を重ねた。

上層と下層のアルカンによる分離を確認後、20℃インキュベータに移した。アルカンは約 10 分で融解し、約 30 分後には上層と下層が混合した。混合後の反応条件は以下のとおりである。

200 μ M グリコーゲン過リン酸分解酵素
200 mM α -グルコース-1-リン酸(α -G1P)
10 mM マルトテトラオース
50 mM Tris-HCl pH 6.8

アルカン融解後 1 日で、 α -1,4-グルカンの生成を目視で観察することができた。

これより、セルロース合成反応系と同様の系を用いて、グリコーゲン過リン酸分解酵素による α -1,4-グルカンの生産を確認することができ、セルロース合成反応系が他の物質生産にも適応可能であることが示された。

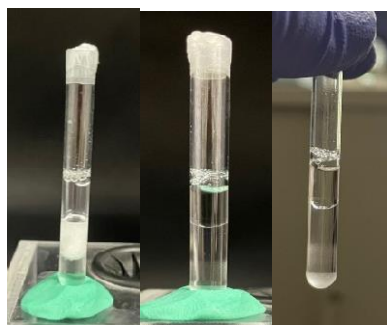


図 2.1.1-3 グリコーゲン過リン酸分解酵素による α -1,4-グルカンの生産

左: 4℃でアルカンが凍結し、上層と下層が分離

中: 20℃でアルカンが融解し、上層と下層が混合

右: 1 日後、 α -1,4-グルカンの生成を目視で観察

2.1.2 宇宙実験に関わる開発

(1) Kirara#4 宇宙実験の帰還

2023 年 3 月 15 日に打上げられた Kirara#4 宇宙実験の試料は、4 月 16 日に地球に帰還した。宇宙と地上の実験試料を偏光顕微鏡で観察したところ、いずれの条件でも、宇宙・地上環境ともに酵素セロデキストリンホスホリラーゼ(CDP)によりセルロースが合成されていたことが目視で確認された。

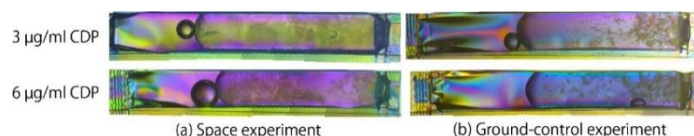


図 2.1.2-1 Kirara#4 宇宙実験および地上対照実験の帰還後試料

(2) 微小重力下実験における時間差リアクションチャンバーの設計

令和 3 年度には、時間差リアクションチャンバーのセルラーゼ排出用にアガロース層の利用を考えたが、バイオ素材評価研究結果より、アガロースがセルロース合成に影響を及ぼす懸念があることがわかり、別の方法を考案する必要があった。そこで今年度は、種々の構造を検討した結果、セルラーゼ排出用にシリコンチューブの水浸透性を利用した遅延型溶液排出のしくみを検討することとした。

セルロース合成系の開始機構は Kirara#4 宇宙実験と同様にアルカンの相転移による隔壁を利用することとしたが、セルロース分解系の開始機構を Kirara#4 と同じ容器(三菱ケミカル製テックバリア HX 厚さ 0.07 mm とし、内寸幅 8 mm、高さ 58 mm、奥行き 4 mm(内容積 1.85 mL)、外寸幅 13 mm、高さ 82 mm、奥行き 4.14 mm の直方体容器)に、アルカン層を跨がないように仕込むために(図 2.1.2-2a)、セルロース合成系の各溶液の量や濃度を、再度最適化する必要があった。セルラーゼ溶液は、長さ 30 mm、内径 1 mm のシリコンチューブ内に充填し、開口部にはアルカンを入れた長さ 5 mm のシリコンチューブを装着し、セルロース合成系の α -G1P およびセロビオースの入った溶液層に入れた。セルラーゼは外液とのモル濃度差を大きくするために高濃度バッファーに溶解した(図 2.1.2-2a)。

20°Cでアルカン融解後、外側の溶液ではセルロース合成反応が始まる。一方、シリコンチューブ内のセルラーゼは、出口付近のアルカンの排出に時間がかかり、チューブ内に留まっている。時間経過とともに、シリコンチューブを介した外側からの水の透過によりセルラーゼ溶液の体積が増し、セルラーゼはシリコンチューブの出口方向に移動する(図 2.1.2-2b)。アルカンとエアの排出に続きセルラーゼも排出されはじめ、合成されたセルロースの分解が始まる(図 2.1.2-2c)。適当な時間をかけてチューブ内のセルラーゼが排出され、セルロースの分解が進む(図 2.1.2-2d)。

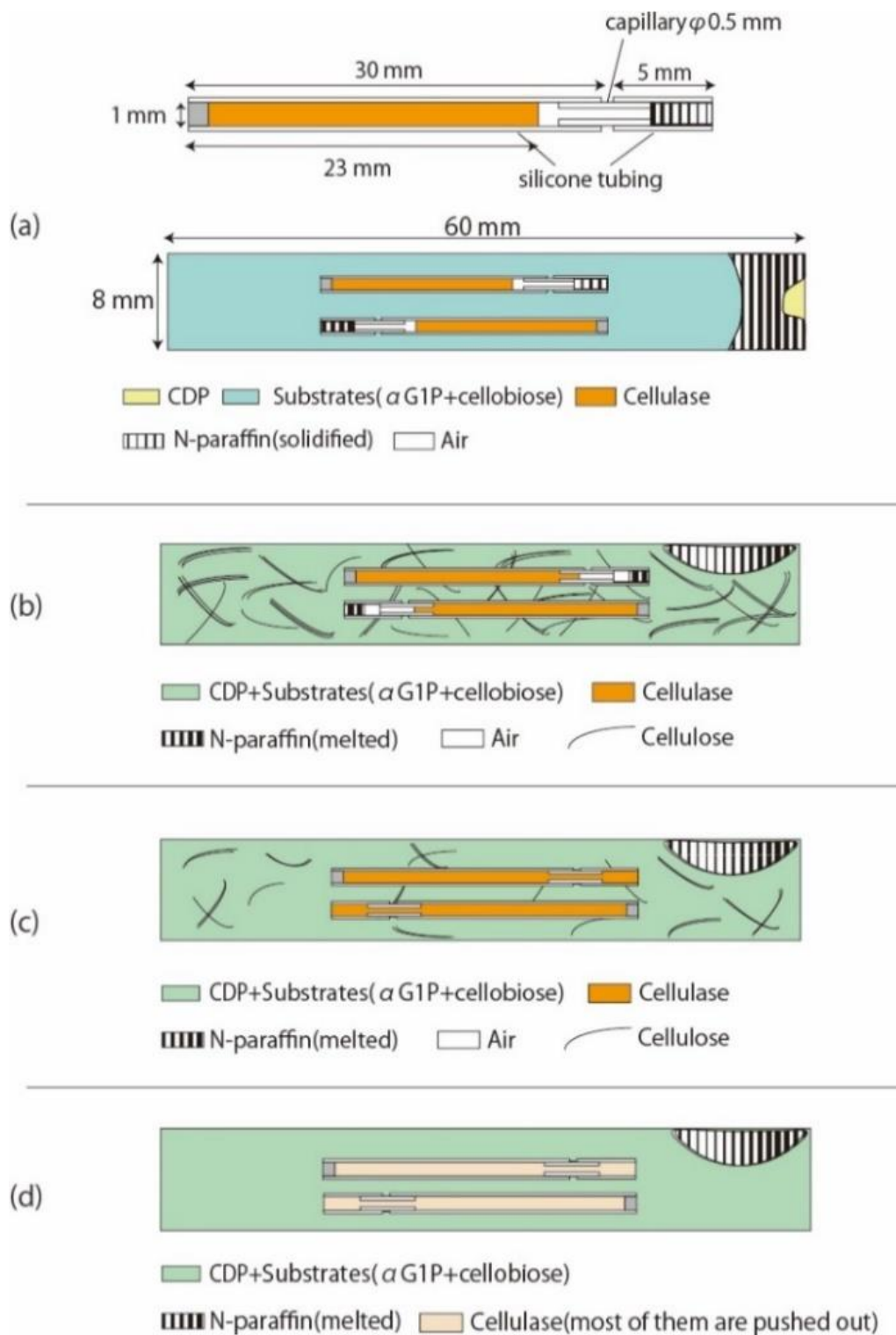


図 2.1.2-2 時間差リアクションチャンバーのしくみ

この方法を用いて、宇宙実験に向けた以下の安全性試験および酵素反応条件の検討を行った。また、リアクションチャンバーは、令和4年度に開発した内容器、外容器に収納して使用した。新規に、内容器 56 個、外容器 18 個を作製して、下記の各種準備実験と宇宙実験に供した。

(3) 宇宙実験に関わる安全性試験

① 振動試験

時間差リアクションチャンバーを使う宇宙実験を模擬した振動試験を JAPAN TESTING LABORATORIES 株式会社神奈川事業所で実施し、容器の耐久性を確認した。

●供試体の準備

Kirara#4 と同様の宇宙実験容器(PET 製 8 mm 幅)を使用し、アルカン隔壁で色水層と水層を隔離した。シリコンチューブには水を充填し、水層に装填した。同容器 2 個を組合せて宇宙実験用外袋(PET 製 C-BagK)に収納した。振動試験用の外側容器には、透明プラスチックボックス(120 mm×120 mm×32 mm)を使用した。外側容器の蓋はカプトンテープで固定し、X、Y 軸方向を蓋の上に明記した。外側容器はバブルラップに包み、保冷材の入った発泡スチロール箱に入れ、クール便で振動試験実施場所に試験前日着で輸送した。アルカンを融解させるために、到着後は環境温度(20℃以上)に静置した。



図 2.1.2-3 振動試験用供試体の準備

(i)試験試料入り宇宙実験容器 (ii)C-BagK に容器 2 つを収納 (iii)外側容器

●振動試験

振動試験はコンフォーカルサイエンス社から株式会社日立ハイテックに依頼した。外側容器内部の温度が約 20℃になりアルカンが融解していることを確認した後、JAMSS より提供された振動プロファイルなどの条件で振動試験を行った。おんどりのセンサーで外側容器内外の温度を測定・記録した。

●結果



図 2.1.2-4 振動試験後の供試体

振動後に宇宙実験容器を目視観察した。破損等は見られなかったため、振動を加えても、時間差リアクションチャンバーの入った宇宙実験容器を破壊することがないことがわかり、容器の耐久性が確認された。

② 航空機輸送試験

時間差リアクションチャンバーの入った宇宙実験容器を使って、航空機の振動がアルカン隔壁に影響を及ぼさないことを確認するために、航空機輸送試験を実施した。

●供試体の準備

宇宙実験容器、および C-BagK への試料の充填は、振動試験と同様に行った。外側容器は、透明プラスチックボックス(100 mm × 65 mm × 28 mm)を使用した。外側容器の蓋はテープで固定した。



図 2.1.2-5 航空機輸送実験用供試体の準備

(i)宇宙実験容器 2 つを C-BagK に収納 (ii)外側容器

●輸送

外側容器はバブルラップに包み、保冷材の入った発泡スチロール箱に入れ、クール便で輸送した。輸送日程は以下の通り。

2023 年 7 月 24 日(月)16 時 コンフォーカルサイエンス社(東京都世田谷区)からクール便で出荷

2023 年 7 月 26 日(水)12 時 北海道大学に到着し低温室に保管

2023 年 7 月 28 日(金)16 時 北海道大学からクール便で出荷

2023 年 7 月 31 日(月)12 時 コンフォーカルサイエンス社に到着



図 2.1.2-6 航空機輸送試験後の供試体

●結果

航空機輸送による振動等に関わらず、アルカン隔壁は崩れていなかった。航空機の振動がアルカン隔壁に影響を及ぼさないことが確認された。輸送中の温度は、4.7～12.3℃の間に保たれていた。

(4) 時間差リアクションチャンバー向け酵素反応条件の検討

●実験条件の検討

Kirara#5 宇宙実験に向けた溶液条件の検討を行った。

セルロース合成条件は、Kirara#4 宇宙実験の条件をベースとしたが、水浸透性の駆動力を高めるために、セルロース合成条件の HEPES と α -G1P の濃度を低くし、シリコンチューブ内外のモル濃度差を大きくした。一方、シリコンチューブに入れたセルラーゼ溶液条件は、シリコンチューブ内外のモル濃度差を高くするために高濃度バッファー(1000 mM HEPES pH7.5)に溶解した。Cellulase Onozuka が 1000 mM HEPES pH7.5 下で活性を保持していることは確認した。

また、合成したセルロースを分解するには、1 本のシリコンチューブに含まれるセルラーゼ溶液量(200 mg/mL で 12.5 μ L)で十分だったが、セルラーゼがチューブから確実に排出されるように、宇宙実験容器にシリコンチューブを 2 本装填することにした。チューブ内のアルカン量を最適化し 2 μ L とした。

上記実験条件で、セルロース合成は約 1～2 週間で飽和に達し、セルラーゼ排出までに約 2 週間かかることがわかった。したがって、宇宙実験実施中にセルロースの合成と分解が時間差で開始し、宇宙実験実施期間中に終了できると予測できた。セルラーゼのセルロース分解反応の指標として、分解産物であるグルコース濃度を測定(LabAssay Glucose (FUJIFILM Waco Chemicals))した。

(5) Kirara#5 宇宙実験の実施

●宇宙実験条件

時間差リアクションチャンバー向けセルロース合成反応の実験条件は、バッファー濃度の異なる以下の 2 条件とした。

- 6.7 $\mu\text{g/mL}$ Δ Cys-CDP、100 mM α -G1P、5 mM cellobiose、200 mM HEPES pH7.5
- 6.7 $\mu\text{g/mL}$ Δ Cys-CDP、100 mM α -G1P、5 mM cellobiose、500 mM HEPES pH7.5

アルカンが融解後にこれらの溶液条件になるように、宇宙実験容器内の各層の溶液条件は、

- 上層(1000 μL): 104 mM α -G1P、5.2 mM cellobiose、200 or 500 mM HEPES pH 7.5
- アルカン(90 μL): 90 % hexadecane、10 % heptadecane
- 下層(40 μL): 175 $\mu\text{g/mL}$ Δ Cys-CDP、200 or 500 mM HEPES pH 7.5
- シリコンチューブ内(12.5 μL が 2 本): 200 mg/mL Cellulase Onozuka R-10、1000 mM HEPES pH 7.5、2 μL アルカン

とした。試料が搭載準備で昇温された後に、打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・地上バックアップの 4 試料を用意した。

●試料の充填

【充填手順】

- 1 宇宙実験容器への下層、アルカン、上層の充填を、2022 年度成果報告書の Kirara#4 の手順と同様に行う
- 2 長さ 30 mm、内径 1 mm のシリコンチューブにセルラーゼ溶液 12.5 μL を充填したもの 2 本を、宇宙実験容器内の上層に装填し、容器を密封する
- 3 宇宙実験容器 2 つを組合わせて C-BagK に装填し、安全性検査を実施しながら密封する

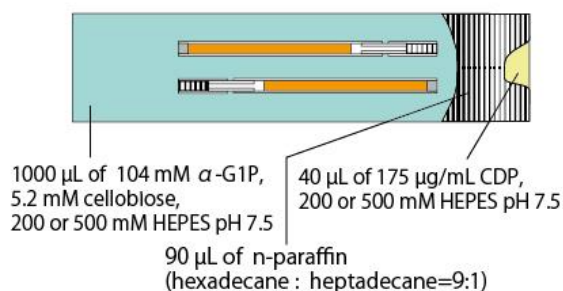
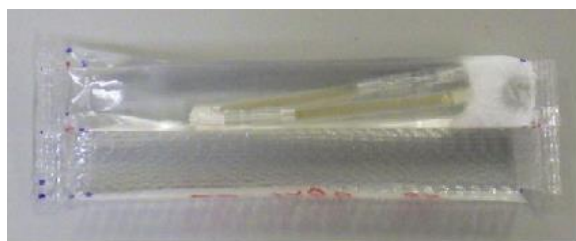


図 2.1.2-7 宇宙実験容器に充填

●射場への輸送(コンフォーカルサイエンス社から JAMSS に委託して実施)

宇宙実験用試料は、宇宙実験の遅延に対応するためのバックアップ用試料とともに、ケネディ宇宙センターに低温輸送された。これらは搭載準備まで、4℃で保管された。

●宇宙実験の実施

米スペース X 社ファルコン 9 ロケットによる国際宇宙ステーション(ISS)への商用補給機ドラゴン 29 号機 (SpaceX CRS-29 (SpX-29) /Dragon)で、2023 年 11 月 10 日にフロリダ州ケネディ宇宙センターから打上げられた。11 日に ISS にドッキングし、13 日に Space Applications Services 社の ICE Cubes Facility に搭載され 20℃ で合成・分解反応が進み、12 月 23 日に帰還した。

●宇宙実験結果

帰還後、宇宙試料と地上試料を偏光顕微鏡で観察したところ、いずれも 2 本のシリコンチューブのうち少なくとも 1 本のセルラーゼのみが排出されていたが、宇宙実験、地上実験ともに、容器内の溶液は目視でほぼクリアだった。

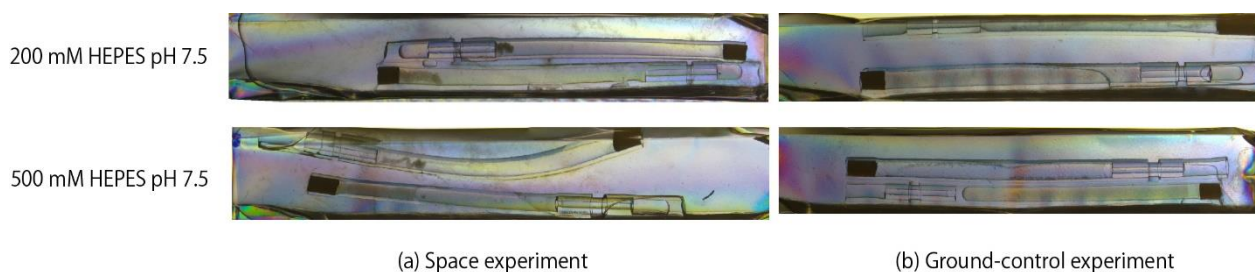


図 2.1.2-8 Kirara#5 宇宙実験および地上対照実験の帰還後試料

宇宙実験では「合成→分解」過程を目視観察できないので、宇宙でセルロースが合成・分解されたかどうかは生化学的に分析する必要があるが、反応が進んでいれば、宇宙実験実施中にセルロースの合成と分解が開始し終了したと考えられる。

また、本研究で開発した二段階反応などの宇宙実験技術に関して、広く共有するために論文にまとめた。

2.2 微生物合成技術開発

2.2.1 微生物学的な開発

令和4年度の宇宙実験で生成した微生物由来セルロースナノファイバー(バクテリアセルロース(BC))の解析を行い、スケールアップに関する検討を行った。

(1) スケールアップの検討

令和4年度に打上げを実施した結果を踏まえ、生産の拡張性を確認するため、炭素源、窒素源を変えて培地を調製し、生産性の比較を行った。また、ISS 内での培養温度(20℃)と通常の培養温度である 30℃における合成速度の違いを調べた。

異なる炭素源、窒素源を用いたセルロースの生産性の比較

●実験方法

酢酸菌(*Komagataeibacter hansenii* ATCC53582)のフリーズストックを HS 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)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 ずつ以下の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。

HS 培地: 炭素源-グルコース(2%), 窒素源-バクトペプトン、イーストエキストラクト

GF 培地: 炭素源-グルコース+フラクトース(各 1%), 窒素源:バクトペプトン、イーストエキストラクト

HS (Csl) 培地 炭素源-グルコース(2%), 窒素源:コーンステーパーリカー、イーストエキストラクト

GF (Csl) 培地 炭素源:グルコース+フラクトース(各 1%), 窒素源:コーンステーパーリカー、イーストエキストラクト

※コーンステーパーリカー:コーンスターチ製造時の副生成物

生成したセルロースの分析は以下の方法で行った。

i. 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 300 mL 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 2 時間乾燥させ、それぞれの重量を測定した。

ii. 走査型電子顕微鏡(SEM)によるセルロースの形態観察

凍結乾燥したセルロース膜を導電性両面テープで試料台の上に固定した。イオンコーターを用いて 2 nm 程度の厚さで金をコーティングし、導電性処理を行った。加速電圧 5 kV で観察を行った。Image-J を用いて繊維幅の測定を行った。

●実験結果

各培地での培養物の外観を下記に示す。



図 2.2.1-1 植菌後 30 日目のセルロース合成の様子 (左: 培養温度 20°C、右: 培養温度 30°C)

各培養により得られたセルロース膜の収量を下記に示す。

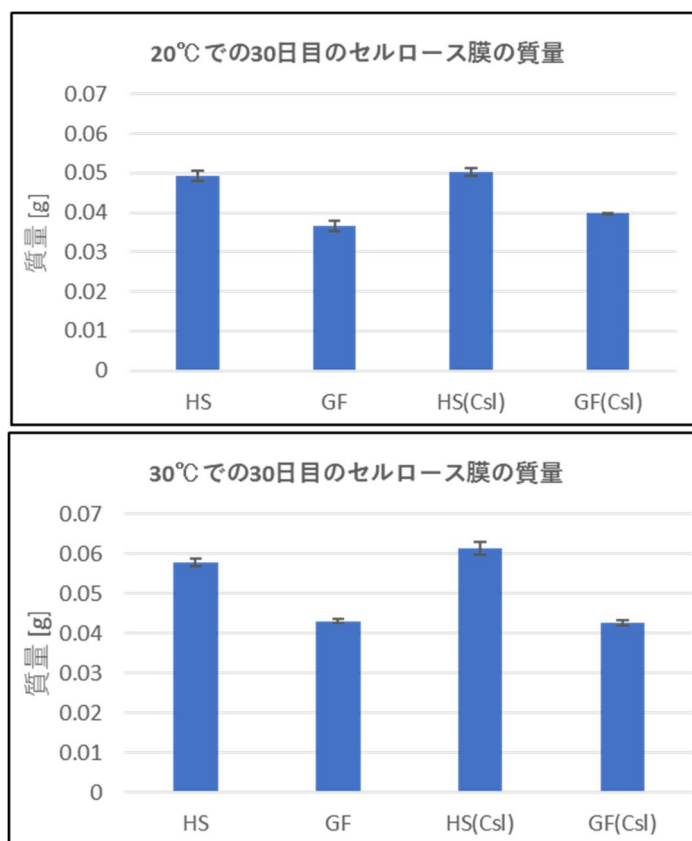


図 2.2.1-2 植菌後 30 日目のセルロース合成量 (上段: 20°C、下段: 30°C)

各培養により得られたセルロース膜の走査型電子顕微鏡観察結果を下記に示す。

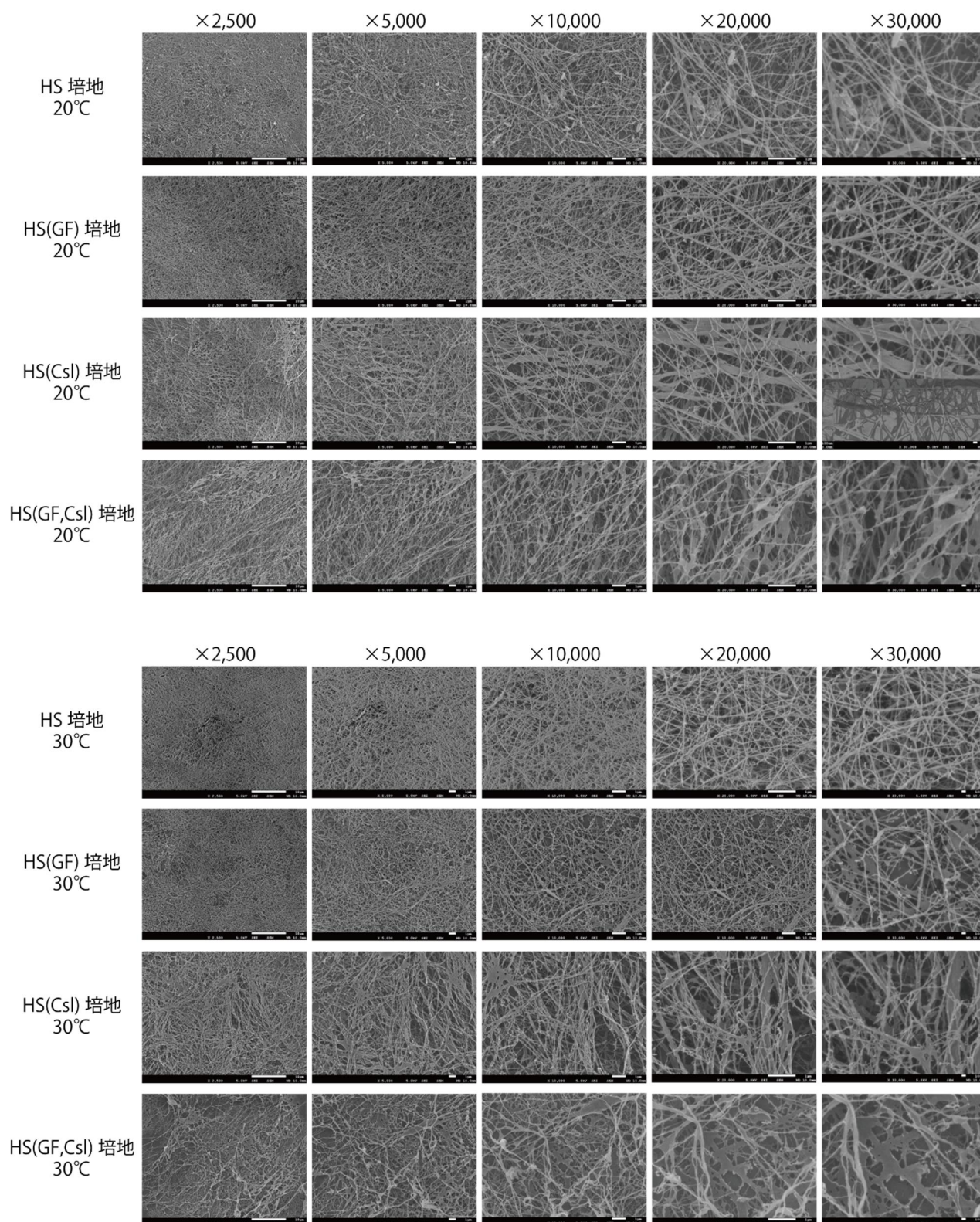


図 2.2.1-3 各培地にて合成したセルロースの SEM 観察像（上段：培養温度 20℃、下段：培養温度 30℃）

図 2.2.1-3 の SEM 観察結果から画像解析によって求めた繊維幅ヒストグラムを以下に示す。

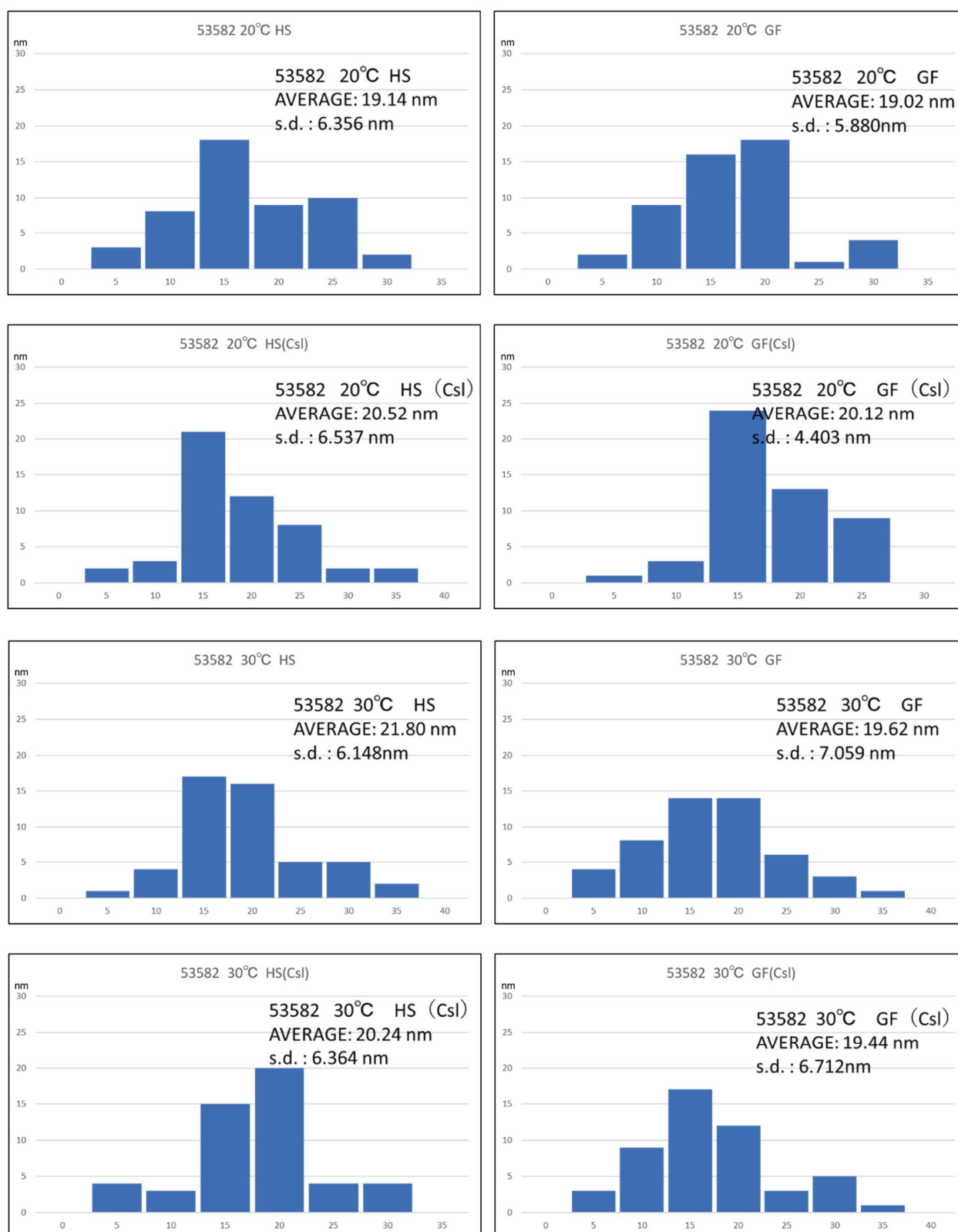


図 2.2.1-4 各条件にて合成したセルロースの繊維幅解析結果

培地における収量、繊維形態、繊維幅には大きな差は認められなかった(図 3～21)。コーンステーパーリカーはコーンスターチを製造する際の副生成物であり、様々な成分を含んでいることから発酵培養によく用いられる窒素源である。バクトペプトンに比べると安価であり、今後宇宙でのセルロース製造を行う際は、様々な炭素源、窒素源を含む培地について検討を行う必要がある。

20℃と30℃におけるセルロースの合成速度

●実験方法

酢酸菌 (*Komagataeibacter hansenii* ATCC53582) のフリーズストックを HS 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 10 mL の HS 液体培地(50-mL 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 500 μ L ずつ 5 mL の HS 培地(50 mL 遠沈管中)に植菌し、30℃、150 rpm で OD600 が約 1 になるまで培養した。10 μ L の懸濁液を底面がガラスになっているシャーレに入れ、上からシリコンチャンバーで覆うことによって乾燥を防いだ状態とし、倒立顕微鏡下で 5 分間一定間隔で撮影を行った。得られた画像から、TrackMate(ImageJ plugin)を用いてセルロース合成(移動)速度を求めた(N=3)。

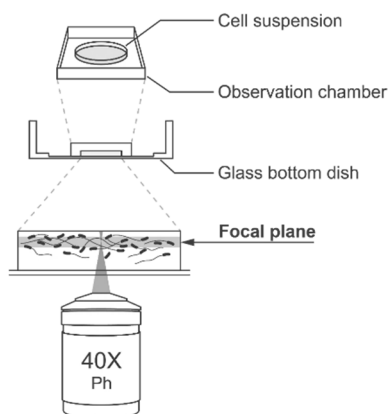


図 2.2.1-5 合成速度測定実験のセットアップ

●実験結果

酢酸菌はセルロースを排出しながら移動することが知られており、顕微鏡で菌の動きを調べることによって生産速度を評価することが可能である。20℃と30℃における合成速度を図 22～24 に示した。

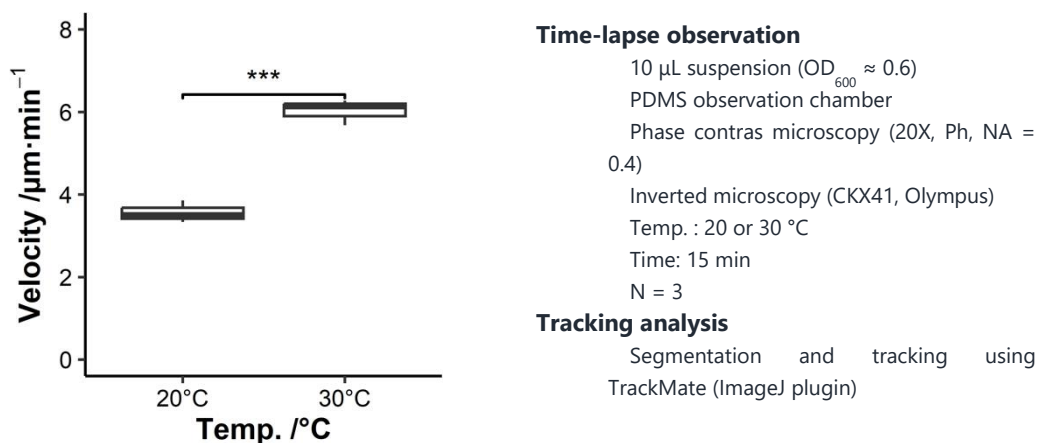


図 2.2.1-6 箱ひげ図にて表した合成速度測定結果

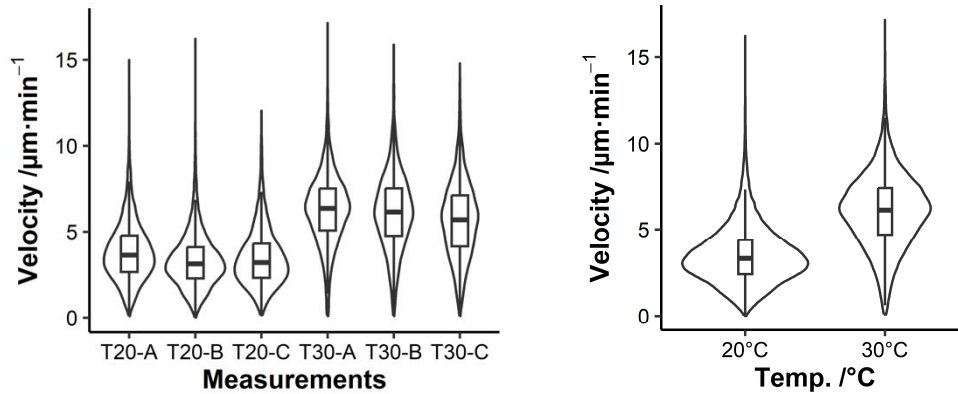


図 2.2.1-7 バイオリンプロットにて表した合成速度測定結果（左：全データ、右：統合プロット）

各温度におけるセルロース合成速度（移動速度）は、20° C 条件下で $3.5 \pm 1.7 \mu\text{m}/\text{min}$ 、30° C 条件下で $6.0 \pm 2.1 \mu\text{m}/\text{min}$ であり、温度の低下によって合成速度が低下していることが確認された。これまでの検討から ISS で調製されたセルロースでは 1β が若干多くなる傾向があり、この合成速度の違いが影響しているかもしれないと考察した。

2.2.2 宇宙実験に関わる開発

(1) 帰還試料の受け取りと東大への受け渡し

Kirara#4 宇宙実験試料は、4 週間の培養期間を経て、地球に帰還した。

●結果

図 2.2.2-1 に、Kirara#4 宇宙実験で実施した微小重力下および通常重力下で成長したバクテリアセルロース (BC) サンプルを示す。BC による白いペリクルは、 $\text{OD}_{600} = 0.0002$ で接種された宇宙培養（左のサンプル）でのみ観察され、 $\text{OD}_{600} = 0.00004$ で接種された宇宙培養（右のサンプル）では観察されなかった。後者の培養液の pH は 6.0 であり、グルコース代謝が見られないため、打ち上げ前の厳しい輸送条件によって細胞死が起きたと考えられた。図 2.2.2-1 に示すように、2 本の地上対照サンプルには白色の BC ペリクルが含まれていた。宇宙および地上で作成されたペリクルはすべて閉じた袋状であり、対応する地上対照サンプルの乾燥重量は 0.55 mg だった。打ち上げ当日（温度上昇後 1.5 日）に開封した地上対照培養には BC ペリクルが含まれていなかったことから、今回の実験で得られた BC 生成物はすべて打ち上げ後に生産されたことが示された。

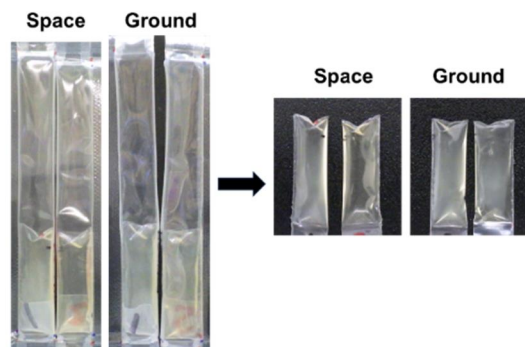


図 2.2.2-1 Kirara#4 プロジェクトおよび地上対照実験で合成したバクテリアセルロース
外側の容器に入ったサンプル（左）、取り出して内側の容器のみに入ったサンプル（右）。

各写真の左側のサンプルは $OD_{600} = 0.0002$ で接種された試料、右側のサンプルは $OD_{600} = 0.00004$ で接種された試料。

(2) Kirara#5 宇宙実験でのスケールアップとガス透過性容器の開発

宇宙で BC を大規模に生産するために、ガス透過性容器内での酢酸菌の培養法を開発した。これにより、細菌が ISS 内の豊富な空気を利用して増殖し、BC を生産できる。宇宙実験の実施のために、容器に対する加圧試験に耐える材質形状の容器の開発と、実験条件の確認、宇宙実験時に培養の臭気が漏れないことの確認実験を行った。

●結果

何種類もの容器を作成し、打上げ業者に加圧試験を依頼した結果、LDPE 製(厚さ 0.1mm)の三方シール袋に十分な強度があった。内容器は 16×29 mm の LDPE 袋で、2 個の内容器を収納する外容器は 17×64 mm の LDPE 袋とした。完成形の内容器約 40 個、外容器約 20 個を作製して、以下の準備実験と宇宙実験に供した。内容器と外容器を使用した予備培養試験は、宇宙用インキュベータの地上モデルを使って、 20°C で実施した。培地や植菌密度 ($OD_{600} = 0.0002$ および 0.00004) は、Kirara#4 プロジェクト実験と同じにした。ただし、内容器には 0.9 mL の培養液が含まれ、外容器には 2 個の内容器が入れられた。4 週間の培養後、内容器には植菌密度に関係なく約 4.8 ± 0.4 mg の乾燥 BC ($n = 4$) が含まれていた。培地の pH は約 4 であり、その時点で細菌の増殖がほぼ停止していることが示された。

ガス透過性容器での宇宙培養の次の課題は、培養物からの臭気もれである。Kirara#5 宇宙実験の実験スケジュールに従って、ハンドヘルド臭気計 OMX-SRM および OMX-ADM を使用して培養物の臭気を測定した。植菌された培養液は、最初に 4°C で 18 日間インキュベートされ、その後 20°C に昇温し、宇宙用インキュベータの地上モデル内にセットした。6 セットのサンプルを調製し、0 日目、18 日目、22 日目、27 日目、36 日目、および 47 日目に臭気測定を実施した。各測定では、最初に内側と外側の容器に二重梱包された培養液の匂いを測定し、続いて外側の容器から内容器に入った培養液を取り出し内容器のみに入った状態で測定し、最後に小皿に注いだ培養液を測定した。LDPE 製の二重梱包状態では、臭気が完全に遮断されたので、下表には、梱包なしの培養液と、内容器のみに入った培養液について、代表的な日時での臭気データをまとめた。

Komagataeibacter hansenii ATCC53582 は 30°C で前培養したが、宇宙実験の濃度に希釈した状態でも強い臭気を発生した(0 日目)。 4°C での休眠期間後(18 日目)、培養液の臭気はほぼ減少した。その後、培養物は 20°C でわずかな臭気を伴いながらゆっくりと増殖した。すべての場合において、単一の LDPE 膜での梱包で、ほとんどの臭気を遮断したが、二重の LDPE 膜は臭気を完全に遮断した。したがって、ISS 内の細菌培養物の臭気をブロックするには、LDPE 膜での二重梱包で十分であると結論付けた。

表 2.2.2-1 培養液の臭気測定（代表値）

		SRM	ADM	
Day 0	Culture ¹	6.4 ± 1.7	27.4 ± 7.7	
	in LDPE ²	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
4 °C Day 18	Culture	2.9 ± 3.5	3.7 ± 1.7	
	in LDPE	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
20 °C Day 9	Culture	0.2 ± 0.6	0.0 ± 0.5	
	in LDPE	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.3	
20 °C Day 29	Culture	0.5 ± 1.1	2.0 ± 1.2	¹ 培養液(接種 OD ₆₀₀ =0.0002)の臭気
	in LDPE	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.5	² 内容器にいれた培養液の臭気 (n = 10)

(3) Kirara#5 宇宙実験の実施

Kirara#5 の実験計画は、内容器と外容器を除いては Kirara#4 と同様であった。植菌密度が異なる 2 種の培養試料を内容器に入れ(図 2.2.2-2a)、これらを外容器（図 2.2.2-2b）に収納した。脱酸素剤を入れた袋に外容器を入れ密封した(図 2.2.2-2c)。ガス透過性の培養袋の使用により、希釈した細胞を嫌氣的に保存し、損傷することなくケネディ宇宙センター(KSC) に 4 °C で輸送することができた。打ち上げの 1.5 日前に、外容器を嫌気性バッグから取り出し、宇宙用インキュベータにセットし、室温まで昇温させた。その後、11 月 10 日にサンプルが ISS へ打ち上げられた。

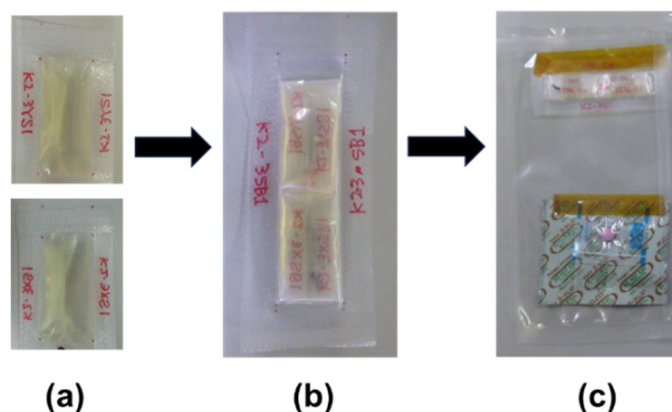


図 2.2.2-2 Kirara#5 プロジェクトのサンプル準備

2 つの内容器 (a) を外容器にいれた(b)。

安定した低温輸送のため、サンプルはさらに、嫌気性バッグに収納した(c)

●結果

試料は、6 週間の宇宙培養を経て、地上に帰還した。図 2.2.2-3 に Kirara#5 宇宙実験で得られた BC サンプルと通常の重力下で成長させた BC サンプルを示す。すべての培養サンプルには、袋状の BC ペリクルが含まれていた。打ち上げ日(昇温日の 1.5 日後)に開封された地上対照培養容器には BC は含まれていなかった。すべての BC が打ち上げ後に生産されたことを示し、微小重力下での BC の大量合成に成功したことが解った。宇宙 BC は、詳細な解析のために東大へ送付した。

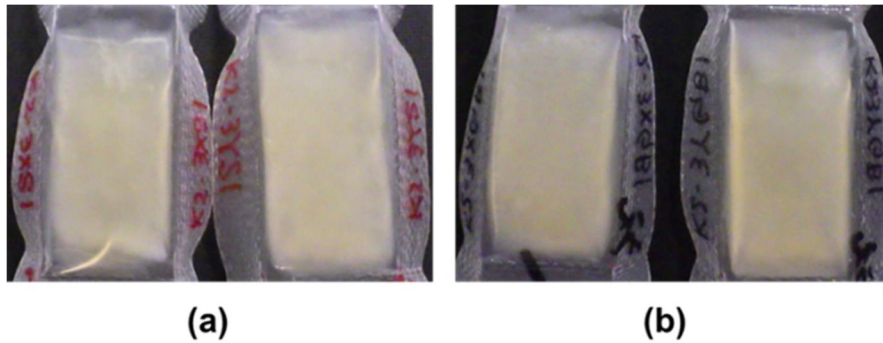


図 2.2.2-3 バクテリアセルロース 宇宙培養 (a) と地上対照 (b)

打ち上げ容積の 100%をセルロース生産のための培養液とした好気条件での宇宙培養が可能となったため、セルロースの乾燥重量として昨年度のおよそ 10 倍の生産性が得られた。

本報告書で開発したプロトコルと培養容器は、将来、宇宙でのセルロースの大量生産を実施する場合に、そのまま応用できる。調査した範囲では、セルロースの生産を目的とした宇宙実験は報告されておらず、本研究は世界初の宇宙バクテリアセルロースの報告となる。

そこで、本研究で開発した酢酸菌宇宙実験のための技術に関して、広く共有するために論文にまとめた。

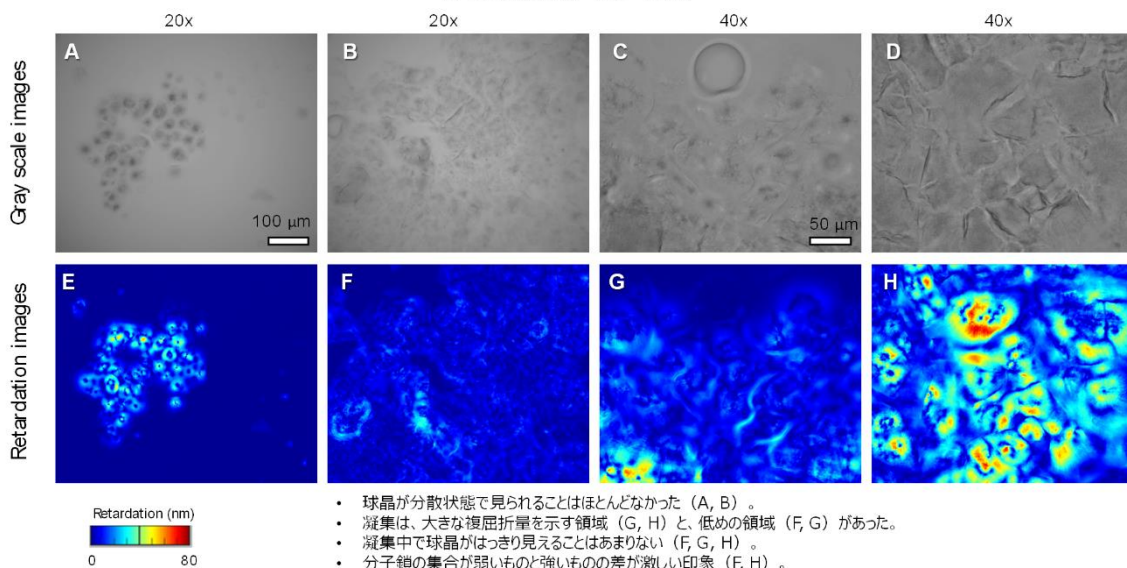
2.3 バイオ素材評価研究

2.3.1 酵素合成セルロースの評価系の構築

令和 4 年度に ISS で酵素合成したセルロースの分析を行った。まず水懸濁状態での測定として複屈折イメージングを行った。

2024/2/7 PA-micro S on Zeiss Axio Plan顕微鏡

地上対照実験 (K4-IXG)



微小重力実験 (K4-IXS)

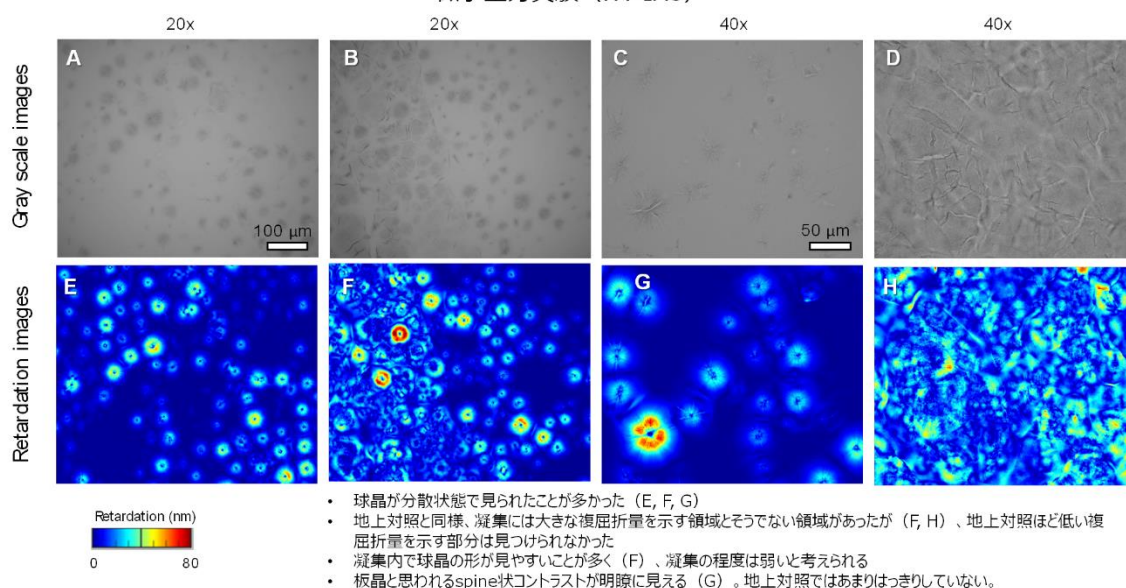


図 2.3.1-1 酵素合成したセルロースの複屈折イメージングの結果:

(上)地上対照実験;(下)微小重力実験 両図とも上段が明視野像、下段が位相差像を示す

両者とも球晶構造が光学顕微鏡で見える限りは単位構造であったが、宇宙実験で合成した場合、球晶がより分散した状態で存在していた。また、この球晶は透過型電子顕微鏡(TEM)で観察される板状結晶が同心円状に並ぶことで形成されているが、その板状結晶が宇宙実験の方では比較的独立して見えており、地上では板状結晶が癒合する傾向が強いのではないかと推測された。

また SEM による観察結果を図 2.3.1-2 に示す。

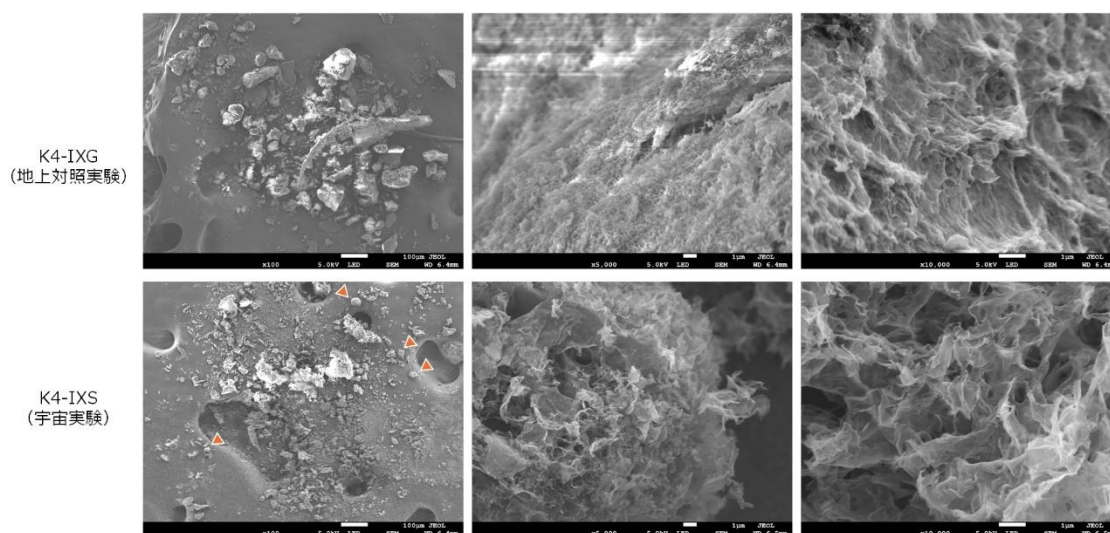


図 2.3.1-2 酵素合成したセルロースの SEM 像

(上)地上対照実験;(下)微小重力実験 矢頭で示したのは単独で存在している球状構造

宇宙実験で合成したセルロースは、球状構造の凝集が比較的少なく、単独で存在する球状構造がしばしばみられること(下段左の矢頭)、高倍で見たときに層状構造が比較的空隙を持って見えているなど、図 2.3.1-1 の複

屈折イメージングの結果に一致する結果を示していた。なお複屈折イメージングおよび SEM 両方とも、球晶構造で重なりが激しいことから、計画していた厚みの測定は不可能であった。

次に 2%酢酸ウランによる負染色を行った試料を、120 kV の加速電圧で TEM 観察した結果を図 2.3.1-3 に示す。

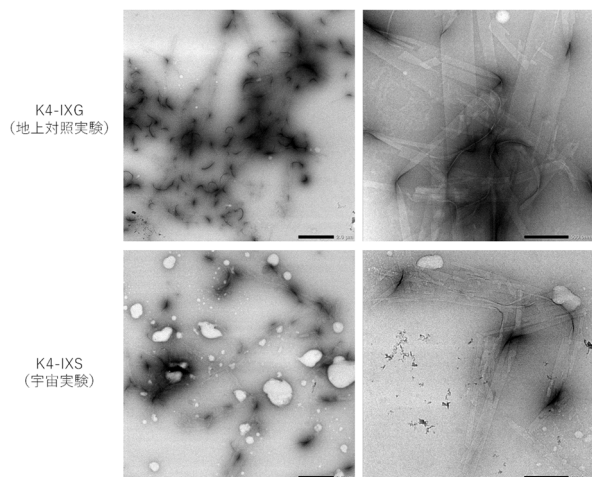


図 2.3.1-3 酵素合成したセルロースの TEM 像
(負染色法による観察)
(上)地上対照実験;(下)微小重力実験

TEM で観察しているのは、複屈折イメージングや SEM で観察された球状構造とは分離して存在する、より小さな構造体に相当し、球状構造の要素構造に相当すると考えられる。地上実験でも宇宙実験でも、板晶が観察されたが、その集合の程度が地上実験法でより顕著に見えた。従って要素構造である板状結晶の凝集が宇宙では弱くなることが推測された。基本的には複屈折イメージングや SEM の結果と一致していると考えている。

また SPring-8 の BL40B2 にて、波長 1 Å、カメラ長 1.7m、Pilatus2S を検出器として利用して、SAXS 測定を水懸濁状態の試料について行った(2023A1480)。試料は容器からスパチュラで層状構造を崩さないように取り出し、カプトンフィルムに挟んで測定を行った。

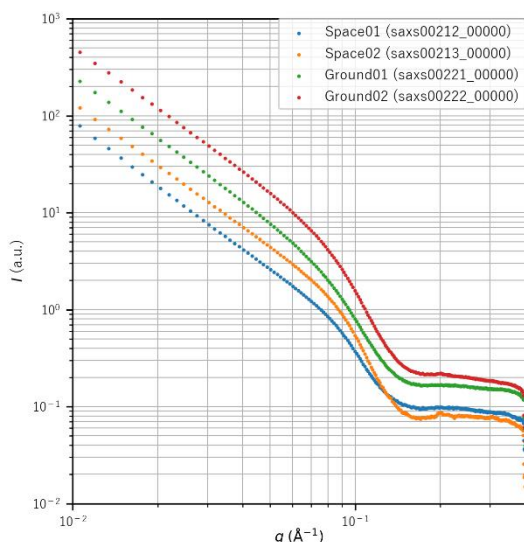


図 2.3.1-4 酵素合成したセルロースの一次元化 SAXS プロファイル
試料上の 2 か所から測定を行った。

散乱強度の違いは試料濃度によるものと推測される。現在、モデルをあてはめて定量的解析を進めているが、信頼に足る結果を得るためには今しばらくデータ解析が必要であり、現在も解析を継続中であるが、大きな構造の違いは今回の実験データには見られないと考えられる。

2.3.2 微生物合成セルロースの評価系の構築

(1) 小角 X 線散乱法による微生物合成セルロースの解析

●実験方法

宇宙空間にて合成した微生物合成セルロースの評価として、まず Kirara#4 宇宙実験の試料を用いてアルカリ精製による菌体と培地成分の除去のみを行った湿潤ゲルサンプルに対するX線散乱測定を試みたが、水の散乱に伴うバックグラウンドが大きく、これを断念した。そこで Kirara#5 宇宙実験サンプルに対しては、0.1%水酸化ナトリウム水溶液によって精製後、*t*-ブチルアルコール凍結乾燥法によって乾燥したフィルム状試料を X 線散乱測定に用いた。小角 X 線散乱測定はあいち SR の BL8S3 にて波長 0.92 Å、カメラ長 2 m、PILATUS 2M 検出器を用いて実施した。各サンプルの散乱スペクトルは膜サンプルを挟まない、空気のみをブランク散乱データの一次元散乱強度に基づき規格化を行った後、試料の散乱スペクトルからブランク散乱スペクトルを差し引いたものを正味の試料散乱スペクトルとした。

●実験結果

小角散乱測定の結果、バクテリアにより生合成されたセルロースは酵素合成されたセルロースと異なり、微小重力条件と地上条件の双方で測定位置の違いによる散乱スペクトルの差異は確認できなかった。一方、微小重力条件と地上条件間の比較では地上条件の散乱スペクトルでは $Q \approx 0.08 \text{ \AA}^{-1}$ 付近から散乱強度が低下するのに対して、微小重力条件の散乱スペクトルでは同様の散乱強度低下が軽微であった。この結果から、重力条件が合成されるセルロースの結晶化あるいは結晶単位の凝集に影響を及ぼす可能性が示唆された。

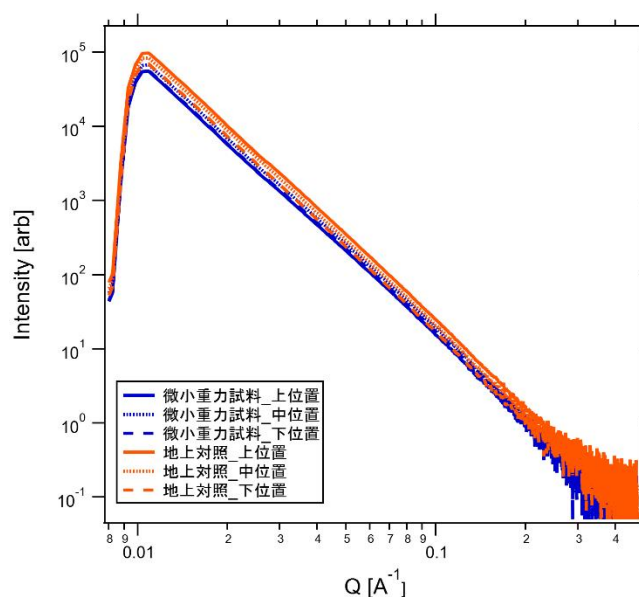


図 2.3.2-1 微小重力下で合成した微生物合成セルロースの小角 X 線散乱スペクトル

(2) SEM観察による微生物合成セルロースの解析

走査型電子顕微鏡(SEM)によって観察した微生物合成セルロースの観察結果を以下に示す。

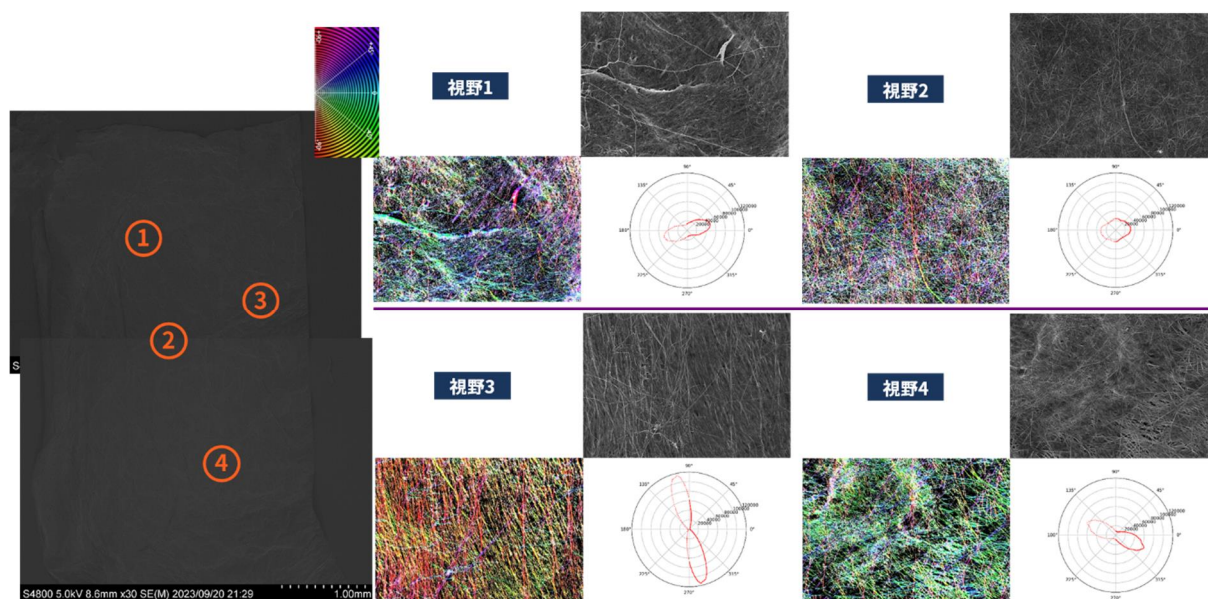


図 2.3.1-2 宇宙条件下で合成した微生物合成セルロースの SEM 観察結果

左図: サンプル全体図(数字は右の各観察視野の位置に対応)、各視野図_白黒写真: サンプルの拡大観察図、
同_着色カラー写真: 画像解析による繊維角度カラーを着色した拡大観察図 (虹色箱図は角度とカラースケールの関係性)、
同_角座標グラフ: 画像解析より得られた繊維角度ヒストグラム

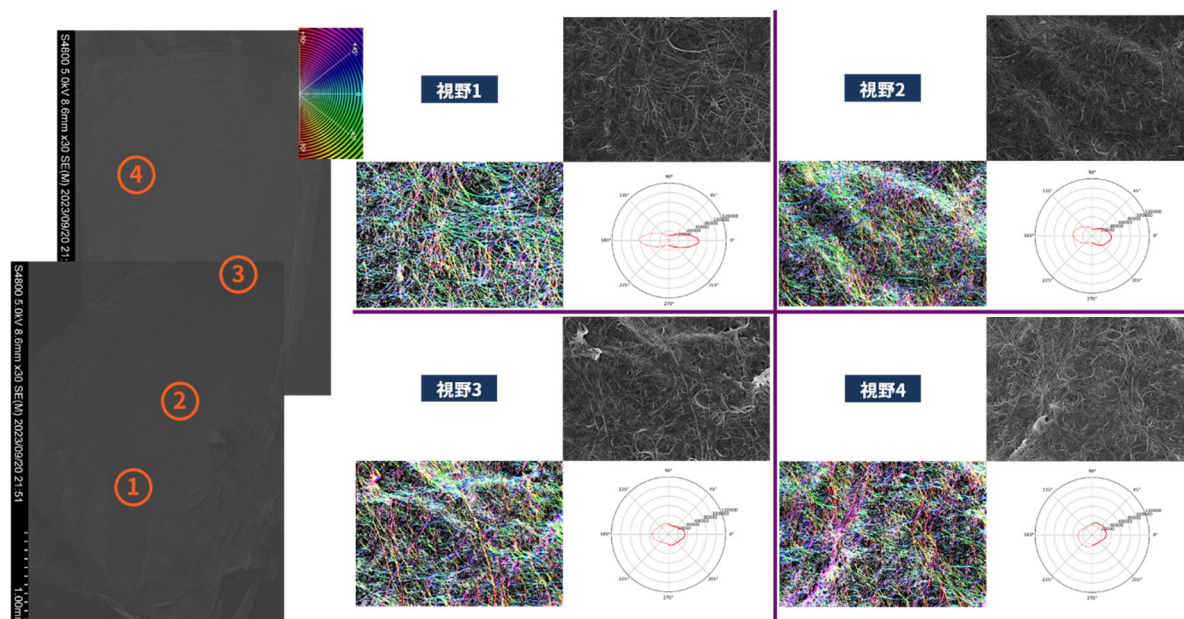


図 2.3.1-3 地上条件下で合成した微生物合成セルロースの SEM 観察結果

各図は図 2.3.1-2 と同様

SEM による表面観察の結果、宇宙で合成した微生物セルロースは地上対照サンプルと比較して繊維が配向傾向を有する視野が多く観察された。しかしながら、これら繊維の配向は必ずしも 1 方向では無く、また視野によっては配向が見られない箇所も存在した。加えて、地上対照サンプルでも解析の結果、一部配向を示す視野が存在していたことから、微小重力による繊維配向への影響に関してはより多くのデータを解析する必要があると考えた。

(3) X線 CT 撮影による微生物合成セルロースの解析

目視観察の結果より、宇宙実験用容器にて合成された微生物合成セルロースは一部が内部で癒合しているもののおよそ袋状の形状を有していた。SEM による観察ではサンプルの表面に位置する繊維しか観察する事は出来ず、また細部の観察には袋状サンプルを開封する必要がある、作業に伴う構造の破壊が危惧された。そこで本実験ではマイクロ X 線 CT 撮影による微生物合成セルロースの解析を試みた。

実験サンプルには SAXS 測定と同様の、アルカリによる精製と トーブチルアルコール凍結乾燥による乾燥処理を施したサンプルを用いた。

試料の CT 像からは幅約 50 nm 程度から成るセルロースの繊維 1 本 1 本を像として得る事は出来なかったが、繊維が密集している領域に関する像が得られた。解析の結果、作製した BC ゲルは目視観察の通り、2 枚のゲルにより挟まれた袋状の構造をしており、ゲルに挟まれた中央部には明確な CT 像は得られなかった。容器に面した領域付近には X 線の吸収が密な層状の像が現れ、この 2 枚のゲルに相当すると思われる像は、さらに厚さ 80~100 μm から成る層が 8~10 層程度積み重なった構造を有していた。この層状構造の出現は宇宙サンプルと地上対照間の双方で確認されたが、程度に差異が見られるため詳細な解析を進めている。

また CT 像から、微生物合成セルロースサンプルには X 線の吸収領域が厚い面と、薄い面の裏表が存在する事が確認された。これは本研究プロジェクトにて作成した宇宙実験用容器は通気性の膜素材で作られており、酸素の供給が良好である一方、実験用容器を温調チャンバーに詰める際にはスペースの関係上、密になって搭載される為、容器同士が触れ合う面と空気との接触面で表裏が生じたと考えられた(図 2.2.2-1 参照)。

(4) FT-IR による微生物合成セルロースの解析

Kirara#5 宇宙実験の試料が 12 月に戻ってきたため、まず FTIR 測定を行った。また FTIR 測定によりセルロース I α 比(f_{α})を求めた。

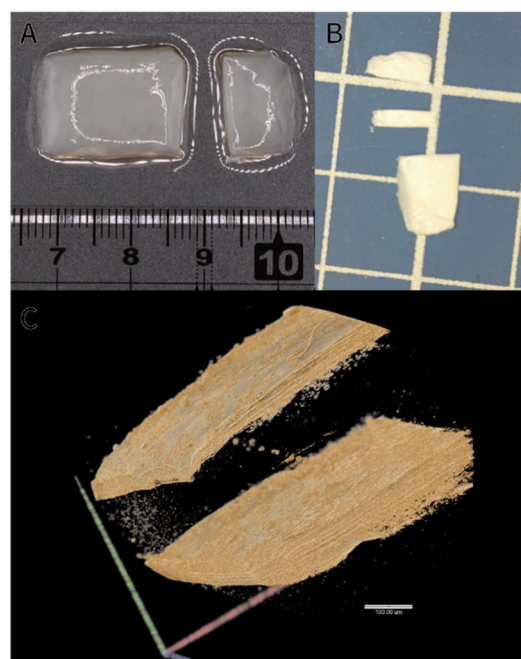


図 2.3.1-4 微生物合成セルロースの X 線 CT 像

(A): 微生物合成セルロース湿潤ゲル,

(B) 精製・乾燥後の微生物合成セルロース

(C) 宇宙で合成した微生物合成セルロースの CT 像

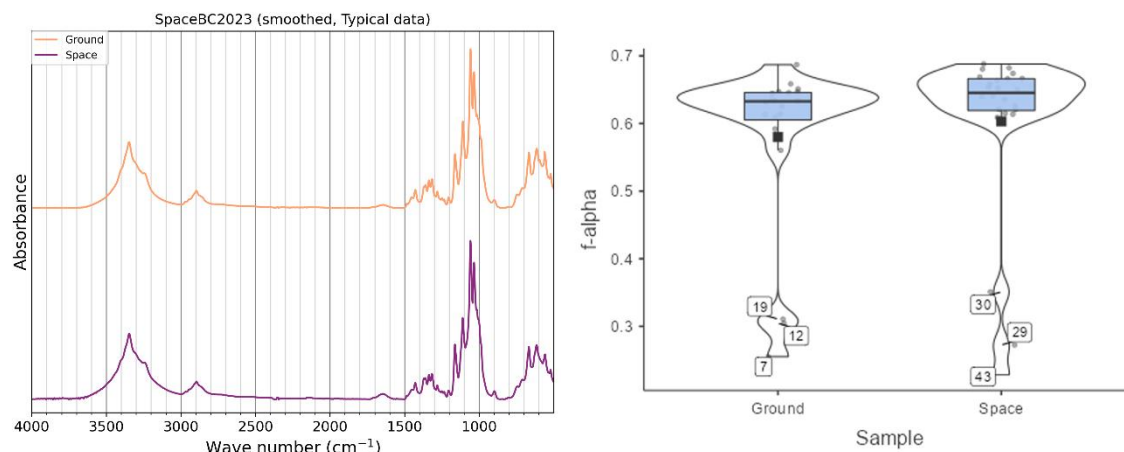


図 2.3.2-1 地上対照実験と宇宙実験で合成したセルロースの ATR-FTIR スペクトル(左)から求めた f_{α} の比率(右)

約 0.3 の値の外れ値はカーブフィッティングの結果がうまく収束しなかった場合に得られた値であることから、真値ではないと考えている。

湿潤状態の BC のペリクルを ATR プローブ上に載せ、窒素ガス吹付で乾燥させた後に FTIR スペクトルを測定した。その後、得られたデータを吸収に変換したのちに、750–608 cm⁻¹ の領域を 6 つのガウス関数でフィッティング計算を行った。

その結果、地上対照実験と宇宙実験で合成した BC の f_{α} 比間には t-検定上で有意差は認められたが (Student の t-検定で $P=0.046$)、その差は小さく(地上:0.631;宇宙:0.649)、微小重力は分子配置の秩序性に影響を与えるとしてもごくわずかであり、重大な影響を与えないと判断した。

2.4 基盤形成活動

(1) 基盤ホームページの拡充

ホームページの News & Events に、本年度行ったセミナー、および宇宙実験実施の告知を掲載した。尚、令和 6 年度以降は、本 HP は東京大学大学院農学生命科学研究科 森林化学研究室ホームページ内に移動予定となった。

(2) 学生、企業向け研究会

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 1 回実施した。

■ 宇宙連携拠点形成プログラムセミナー「宇宙でのモノ創り」(添付資料 1)

令和 5(2023)年 12 月 12 日に北海道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 15 名、現地参加者 16 名、合計:31 名)。

2.5 自発的な研究活動等

2.5.1 セルラーゼ等分解酵素による酵素合成セルロースの分解

自発的な研究活動として、宇宙実験でも用いている酵素合成セルロースの酵素分解性を調査した。

実験ではスクロースホスホリラーゼと CDP の複合反応系により大量合成した酵素合成セルロースを洗浄、凍結乾燥後に改めて水懸濁液とし、そこに各種酵素を添加して分解性を調査した。分解の様子と分解物の SAXS プロファイルを下図に示す。

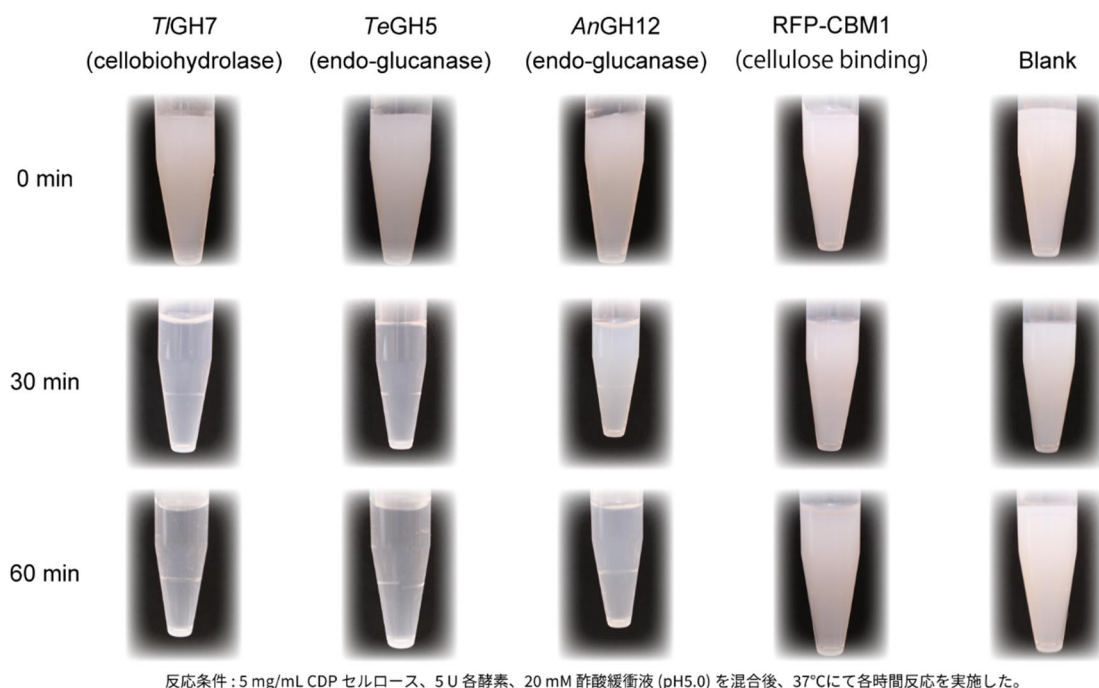


図 2.5.1-1 酵素合成セルロースの酵素分解の様子

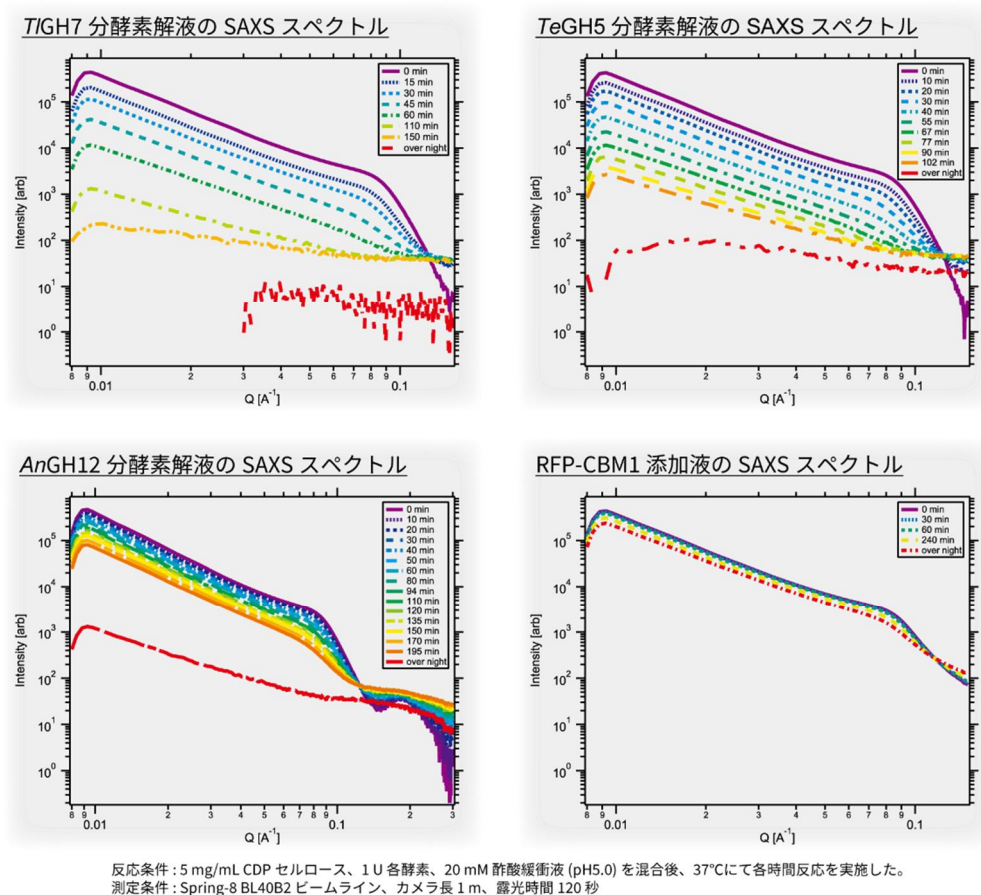


図 2.5.1-2 酵素合成セルロースの酵素分解の様子

目視観察の結果より、酵素合成セルロースは自然界で結晶性セルロースの分解を担うセロビオヒドロラーゼ (*TiGH7*)によって分解される他に、線維性の結晶性セルロースは分解しないエンドグルカナーゼ (*TeGH5*、*AnGH12*)によっても容易に分解されることが明らかになった。また目視レベルでは不明瞭だが、SAXS 測定の結果より、酵素活性を持たないセルロース結合ドメイン (CBM1)によっても酵素合成セルロース粒の溶解が生じる事が確認された。

3 まとめ

本提案課題では、微小重力下でのバイオ有機素材の生産として酵素的・微生物的なセルロースの合成を実施した。課題研究を通じて、微小重力下で紙などとして利活用されるセルロースを人の手が介在しない自動反応容器により合成する事に成功し、得られた試料を用いてセルロース合成の構造的な性質を明らかにした。さらには、宇宙での素材のリサイクルを想定して、宇宙で酵素合成したセルロースを宇宙で分解する試みも行った。本課題にて作製した酢酸菌によるセルロース生産のプロトコルと培養容器は、将来、宇宙でのセルロースの大量生産を実施する場合にそのまま応用出来ると考えられる。またセルロースを2種類の酵素で「宇宙で作って宇宙で壊す」実験は、バイオ有機素材を宇宙で合成しそれをリサイクルする、宇宙での物質循環システム構築への端緒となるものである。

本課題では東京大学、北海道大学、京都大学と、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セミナー開催など、プラットフォーム構築を行った。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した。本拠点で得られたセルロース素材の合成、構造的性質に関する情報は、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有用な情報となる。本事業終了後は、拠点としての役割を東京大学に移す。

今後、人類が宇宙空間で経済活動を実施する際には、建材や生活用資材としての多数の素材が要求される。本提案で得られた、より安価にセルロースを大量合成する為の複合酵素反応系によるセルロース合成や、安価で生産性の高い微生物セルロース合成条件の検討による情報は、来る時代に向けた有用な基礎技術になり得る。また本課題では東京大学 One Earth Guardians 育成プログラムと連携して、複数回の教育セミナーを実施しており、セミナーには理系・文系を問わない大学生、企業関係者、高校生の参加が得られ、実際にセルロースの酵素合成が体験できるキットを全参加者に配布するなど、啓蒙活動にも努めた。本課題で得られた成果を引き続き社会に発信することで、宇宙開発の裾野が広がることが期待される。

以下、当該年度が最終年度となるため、今年度のまとめと3年間のまとめを研究業務ごとに記載する。

3.1 酵素合成技術開発

3.1.1 今年度のまとめ

酵素的な開発: 本年度は Kirara#4 宇宙実験 (2023 年 3 月打上げ)より得られた大型容器での酵素合成セルロース合成実験を通じて得られたサンプルから、酵素合成セルロース構造体の力学的な機能を明らかにする予定であったが、セルロース合成量の不足からこれを実施する事は叶わなかった。しかしながら、容器内で合成されたセルロースは明確に地上対照と比較して均一な様相を示しており、キャピラリーを用いた小型試験系での実験結果の正当性が確認できた。また Kirara#5 宇宙実験(2023 年 11 月打上げ)にて実施した酵素合成セルロースを作って壊す実験については、地上検討を通じてセルロースが合成された後にセルラーゼによって分解されていく様子が観察できた。実際にカメラ等の機材を用いることが出来ない宇宙空間で反応を行ったサンプルに対して、作って壊す反応を科学的に立証する事は未だ困難であるが継続して検討を進める予定である。また本課題で作成された実験系のセルロース以外の物質合成への適用性を見る為、グリコーゲン過リン酸分解酵素を用い

た澱粉の合成を試みた。実験の結果、宇宙実験を模した簡易実験系による澱粉の蓄積が確認され、本系が多様な糖質材料の合成に流用可能である事を示した。

宇宙実験に関わる開発： Kirara#4 宇宙実験から帰還した試料を偏光顕微鏡で観察したところ、宇宙・地上環境ともにセルロースが合成されていたことがわかった。その結果を受けて、Kirara#5 宇宙実験に向けて、時間差リアクションチャンバーを設計するために、アルカンの相転移による隔壁とシリコンチューブの水浸透性を利用した遅延型溶液排出のしくみを検討し、セルロース分解酵素であるセルラーゼ溶液をシリコンチューブ 2 本に充填し、Kirara#4 と同様の、アルカンを利用したセロデキストリンホスホリラーゼ(CDP)によるセルロース合成系に装備し、時間差をつけて排出させるしくみを考案した。溶液条件は、微小重力環境下でセルロースが合成後、分解されるように設定した。その結果、Kirara#5 宇宙実験帰還後の宇宙試料と地上試料を偏光顕微鏡で観察したところ、いずれもセルラーゼがシリコンチューブから排出されており、宇宙実験、地上実験ともに、容器内の溶液は目視でほぼクリアであった。詳細については、今後の生化学的分析を待つ必要があるが、これまでの予備実験の結果からは、宇宙実験実施中に宇宙でセルロースが合成され分解されたと考えられる。

3.1.2 3 年間のまとめ

酵素学的な開発： 宇宙環境での酵素合成セルロースについて解析を進めたところ、宇宙環境は CDP を用いたセルロース合成におけるマイクロオーダーのセルロースネットワーク形成に影響を与え、凝集や部分的な沈降の無い、均一なセルロース系ゲルの形成を引き起こすことを確認した (<https://doi.org/10.1007/s10570-021-04399-0>)。また、宇宙空間で合成されたセルロースゲルは地上帰還時に生じる衝撃や重力によっても構造が破壊されていなかった事からある程度の強度を有しており、新しい材料創生手法としての可能性が示されたと考えられる。

次に、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 とスクロースホスホリラーゼ(SP: スクロースを基質として α -G1P を生産する酵素)の複合酵素反応系を用いたショ糖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を確認し、地上検討では数 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、期間内に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。また複合反応系を用いた宇宙実験を見送った事に関連して、宇宙空間で合成したセルロース構造材の力学的な解析にも至る事は出来なかった。これらの解決には複合反応系に最適なパラメータを見出す事と共に、打上げ待機中の期間に反応を抑制し、打上げ後に反応を開始する為の、より高度なシステムを開発する必要があると考えられた。

宇宙実験に関わる開発： Kirara#4 宇宙実験に向けて、セルロース収量を増やすために容器を大型化し、アルカン隔壁を使用した反応抑制・開始機構を検討した。さらに、骨組みを入れずにアルカンの形状を安定に保てるような実験容器の構造を工夫した。また、宇宙実験期間中にセルロースが十分量合成されるように、酵素反応条件を検討した。帰還後の観察で、宇宙・地上環境ともにセルロースが合成されていたことがわかった。

Kirara#5 宇宙実験では、セルロースを「宇宙で作って宇宙で壊す」を目標に、2 種類の酵素を 1 つの容器で時間差をつけて作用させる、「時間差リアクションチャンバー」を考案した。そのために、アルカンの相転移による隔壁とシリコンチューブの水浸透性を利用した遅延型溶液排出の 2 つのしくみを同一容器に装備した。宇宙でセルロース合成反応が起こり、そのセルロースの分解反応が終わるように、溶液条件を検討した。帰還後の観察で、

セルラーゼがシリコンチューブから排出されており、また、宇宙・地上実験ともに、容器内の溶液にはセルロースはほぼ残っておらず、目視でクリアであった。結論を述べるのは生化学的分析を待つ必要があるが、これまでの予備実験の結果から、宇宙実験実施中にセルロースの合成と分解が開始し終了したと考えられた。

3.2 微生物合成技術開発

3.2.1 今年度のまとめ

微生物学的な開発：宇宙実験で酢酸菌 (*Komagataeibacter hansenii* ATCC53582) によるバクテリアセルロース (BC) の生産性を高めるために、異なる炭素源 2 種類、窒素源 2 種類を利用して収量、繊維形態、繊維幅を比較したところ、大きな差は認められなかった。今後宇宙での BC 製造が大きな規模で行われる際には、さらに様々な炭素源、窒素源を含む培地について検討を行い、より安価で生産性の高い培養条件を決定することになる。

次に、ISS の室温 (20℃) と通常の培養温度である 30℃ における合成速度の違いを、菌の動きを調べることでより評価したところ、温度の低下により合成速度が低下していることが確認された。ISS で調製された BC は 1β が若干多くなる傾向があるが、この合成速度の違いが影響している可能性があると考えられた。

宇宙実験に関わる開発：Kirara#4 宇宙実験試料は、OD600 = 0.0002 で接種された宇宙培養でのみペクリルの生成が観察された。薄い条件では、打上げ前の厳しい輸送条件によって細胞死が起きたと考えられた。宇宙培養の BC 生成物はすべて打ち上げ後に生産されたことが示された。

Kirara#5 に向けて、スケールアップした BC 生産に向けて、ガス透過性容器内での同菌の培養法を開発した。その結果、LDPE 製の内容器と外容器が、加圧試験に耐え、培養臭気を漏らさないことがわかった。内容器と外容器を除いては Kirara#4 と同様の条件とし、帰還後の観察で、すべての培養サンプルに袋状の BC ペリクルが生成していた。地上対照実験の観察から、これらはすべて打上げ後に生産されたことがわかった。打上げ容積の 100% をセルロース生産のための培養液とした好気条件での培養が可能となり、セルロースの乾燥重量として昨年度のおよそ 10 倍の生産性であった。

3.2.2 3 年間のまとめ

微生物学的な開発：3 種の酢酸菌および *Enterobacter* (腸内細菌科バクテリア) の BC 生産の様子と収量を比較し、宇宙実験温度 (20℃) で生育し、BC を合成可能なセルロース合成菌を検討した。また、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で培養液を分析し、SEM で BC 繊維の形態観察を行った結果、*Komagataeibacter hansenii* ATCC53582 株が宇宙実験に適していると判断した。また同菌は宇宙実験に供するための輸送条件である 4℃ で 1 週間の保存条件下においても、保存条件下に置かないサンプルと比較して収量に差がないことを確認した。さらに培養液の窒素源としての Yeast extract 濃度の最適化を行い、また炭素源としてはグルコースが最適であることを確認した。今後の宇宙でのスケールアップ生産の可能性を見据えて、異なる炭素源 2 種類、窒素源 2 種類を利用して収量、繊維形態、繊維幅を比較したところ、大きな差は認められなかった。将来、宇宙でスケールアップした BC 生産を行う場合には、さらに様々な炭素源、窒素源を含む培地について検討を行い、より安価で生産性の高い培養条件を決定することになると考えられた。

ISS の室温 (20℃) と通常の培養温度である 30℃ における合成速度の違いを評価したところ、温度の低下によって合成速度が低下していることが確認され、ISS で調製されたセルロースでは 1β が若干多くなる傾向があるのは、この合成速度の違いが影響しているかもしれないと考えられた。

宇宙実験に関わる開発：Kirara#4 宇宙実験に向けて北大グループが選定した BC 産生性の酢酸菌である *Komagataeibacter hansenii* ATCC53582 について、同菌のペクリル形成は重力の影響を受けず、細菌の周囲の

酸素濃度のみに依存し、十分な酸素が供給されると BC を生成すること、また、宇宙に打上る前に BC が生成してしまわないように培養液の希釈度を非常に薄くすることも可能であることがわかり、宇宙実験の植菌密度は、 $OD_{600} = 0.0002$ および 0.00004 と決定した。微小重力下での BC 生産には、0.3 mL の培養を含む内側容器と、分離装置で分離した 1.7 mL の空気を含む外側容器が適切であることが解った。Kirara#4 宇宙実験試料は、 $OD_{600} = 0.0002$ で接種された宇宙培養でのみペクリルの生成が観察された。薄い条件では、打上げ前の厳しい輸送条件によって細胞死が起きたと考えられた。

Kirara#5 では、スケールアップしてガス透過性のある LDPE 製の内容器と外容器を作製し同菌の宇宙での培養に供した。すべての培養サンプルに袋状の BC ペリクルが生成しており、地上対照実験の観察から、これらはすべて打上げ後に生産されたことがわかった。開発したプロトコルと培養容器は、将来、宇宙でのセルロースの大量生産を実施する際にそのまま応用できるものでありと考える。

3.3 バイオ素材評価研究

3.3.1 今年度のまとめ

酵素合成セルロース: Kirara#4 宇宙実験より得られた宇宙・地上対照セルロースの分析を行った。光学顕微鏡での観察により、宇宙セルロースでは球晶がより分散した状態で存在していること、また、透過型電子顕微鏡で見る球晶を形成する板状結晶が、宇宙セルロースでは比較的独立しており、地上セルロースの場合は癒合する傾向が強いと推測された。SEM による観察でも同様の結果を示していた。SAXS 測定も行い現在解析中であるが、大きな構造の違いは見られないと推測している。

微生物合成セルロース: Kirara#4 および#5 宇宙実験で生成したセルロースの分析を行った。SAXS 分析結果より、宇宙空間で合成した微生物合成セルロースはセルロースの分子配向や凝集のレベルで地上対照との差異がある可能性が示された。X 線 CT 観察の結果からは、宇宙実験用容器内で合成されたセルロースは多層構造を形成している事、SEM 観察の結果からは微小重力が繊維配向に影響している可能性がある事を明らかにした。FTIR 測定によるセルロース I_{α} 比 (f_{α}) の導出からは、宇宙と地上対照セルロースの I_{α} 比には、 t -検定上では有意差が認められたが、その差は小さく、微小重力は分子配置の秩序性に影響を与えるとしてもごくわずかであり、重大な影響を与えないと判断したが、SAXS 測定の結果と合わせてより詳細な分析が必要だと考えた。

3.3.2 3 年間のまとめ

酵素合成セルロース: 宇宙実験に先立ち、地上での予備実験で CDP により酵素合成されたセルロースを用いて、FTIR、複屈折カメラ、電子顕微鏡 (TEM, SEM) などでの構造を調べたところ、10 μm 程度の負の球晶構造体で、重合度は 12 程度であった。また、セルロースの激しい積み重なりが観察されたため、酵素濃度の調節が必要であることが示唆された。

さらに、時間差リアクションチャンバーの開発のために、アルカンおよびアガロースの存在が合成セルロースへ及ぼす影響を MALDI-TOF-MS による分析や複屈折カメラで調べたところ、アガロースはセルロースの重合度やセルロース構造に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、アルカンおよびアガロース存在下で合成されたセルロース、および CDP 濃度を振った条件で合成されたセルロースを SAXS (@SPRing-8 BL40B2) で詳細に測定し $0.7 \text{ \AA}^{-1}$ までの比較的高い q 領域までのデータを取得したが、 $0.3 \text{ \AA}^{-1}$ 以上にはあまり目立った特徴がないこと、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)ことが明らかになり、異なる解析条件の開発が必要なことを確認した。

酵素合成セルロースの電子回折撮影では、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。これは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、130 回折点(面間隔 2.205 Å)まではっきり見えた。

これらの結果を踏まえて、Kirara#4 宇宙実験で生成したセルロースの分析を、複屈折イメージングおよび SEM で行ったところ、宇宙セルロースは地上セルロースと比較して大きな構造の違いはないが、宇宙セルロースでは球晶がより分散した状態で存在していること、また、球晶を形成する板状結晶が宇宙セルロースでは比較的独立しており、地上セルロースの場合は癒合する傾向が強いことが示唆された。

微生物合成セルロース: 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 測定により行った結果、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。

これらの結果を踏まえ、Kirara#5 宇宙実験で生成したセルロースの分析を実施し、SEM 観察、X 線 CT 観察、SAXS 測定、FTIR 測定による分析を実施した。

3.4 基盤形成活動

3.4.1 今年度のまとめ

引き続き、本年度行ったセミナー、および宇宙実験実施の告知を掲載した。また、令和 5 年 12 月には、北海道大学の主催で、宇宙連携拠点形成プログラムセミナー「宇宙でのモノ創り」をハイブリッド開催した。

3.4.2 3 年間のまとめ

基盤のホームページを令和 3(2021)年 11 月 11 日に立ち上げ、社会への発信を始めた(<http://spacecellulose.jp/>)。本事業や参加研究者の紹介のほか、セルロースに関する学術的な知見や、微小重力環境での科学・ライフサイエンス研究に関する現状と今後の展開をまとめた。News & Events には、各年度に行ったセミナーや宇宙実験実施の告知を掲載した。

期間中に行った研究会は以下の通り。

日にち	タイトル	開催方式・参加者
令和 4 年 3 月 28 日	キックオフ研究会	Web 開催 企業 40 名、大学・教育機関 27 名、大学生・大学院生 12 名、省庁等 5 名、その他研究機関等 8 名
令和 4 年 3 月 1 日	第 8 回 LUC Lecture「宇宙の SDGs と地球の SDGs～宇宙でつくって宇宙でこわす持続可能なものづくり～」	東京大学農学部の One Earth Guardians (地球医)育成プログラムとの共催で Web 開催 東大学生 41 名、企業・NPO 等関係者 17 名、大学教職員他 26 名
令和 4 年 6 月 11 日	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」	北海道大学主催でオンライン開催

令和 4 年 11 月 19 日	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」	京都大学およびオンラインでハイブリッド開催。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の共催 Zoom 参加者 34 名、現地参加者 29 名
令和 5 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-」	東京大学およびオンラインでハイブリッド開催。東京大学 One Earth Guardians 育成プログラムとの共催 Zoom 参加者 52 名、現地参加者 10 名
令和 5 年 12 月 12 日	宇宙連携拠点形成プログラムセミナー「宇宙でのモノ創り」	北海道大学およびオンラインでハイブリッド開催 Zoom 参加者 15 名、現地参加者 16 名

この 3 年は、コロナウイルスの影響で、研究会はオンラインでの出席者が多かったが、計 5 回の研究会を通じて、主管実施機関や共同参画機関に所属する学生を中心とした若い世代、およびこれらの機関以外の研究者や企業関係者等に対しても、宇宙における物質リサイクルシステム構築の試みの重要性を発信することができた。また、令和 5 年 3 月の研究会では、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製作し、約 40 名の希望者に個別送付し、レクチャー実施中に実際にセルロースナノクリスタルを合成し目視で観察することができた。実際に、宇宙実験で使用する試料を宇宙実験で使用する材質の容器に入れて提供することで、若い世代の学生や研究者に、宇宙での持続可能なものづくりを実感してもらい、宇宙での物質リサイクルに対する興味の裾野を広げることができた。

3.5 自発的な研究活動等

自発的な研究活動として酵素合成セルロースの分解酵素による分解試験を実施した。実験の結果、酵素合成セルロースは結晶性を有するにも関わらずエンドグルカナーゼの様な通常結晶性セルロースを分解しないとされる酵素によっても容易に分解され、更にセルロース結合性ドメインの様な分解酵素活性を持たないタンパク質を添加した場合にも酵素合成セルロースの結晶粒が溶解していく様子が確認された。この結果から、酵素合成セルロースは天然のセルロースを比較して容易にリサイクル活用できる可能性が示された。

4 添付資料

●添付資料 1

2023 年 12 月 12 日開催 宇宙連携拠点形成プログラムセミナー「宇宙でのモノ創り」

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

「宇宙でのモノ創り」

開催日：令和5年12月12日（火）

開催時間：13時00分～16時45分

開催場所：北海道大学工学部

フロンティア応用科学研究棟2階 セミナーホール

1. はじめに 13:00～13:10

東京大学大学院農学生命科学研究科

教授 五十嵐 圭日子 先生

2. ご講演

13:10～14:10（座長：田島 健次）

北海道大学 大学院工学研究院

准教授 久保田 浩司 先生

「メカノケミカル法による化学合成の進展と展望」

14:15～15:15（座長：田島 健次）

北海道大学 大学院工学研究院

教授 川崎 了 先生

「ビーチロックに学ぶ地盤材料のバイオセメンテーション」

15:15～15:30 休憩

15:30～16:30（座長：今井 友也）

東京大学 大学院農学生命科学研究科

講師 砂川 直輝 先生

「バイオ有機素材の宇宙リサイクルシステム開発」

3. おわりに 16:30～16:40

京都大学生存圏研究所

教授 今井 友也 先生

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 東京大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表(3 年分、★は今年度)

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ブレンドに対する新規相溶化剤の開発	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	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	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ブレンドに対する新規相溶化剤の開発	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 71 回高分子討論会	2022 年 9 月	国内
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	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
ホスフォ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	第 71 回高分子討論会	2022 年 9 月	国内

	也、田島健次、佐藤敏文、五十嵐圭日子			
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
★宇宙における微生物を用いたバイオ有機素材(セルロース)合成の試み (口頭発表)	田島 健次、田仲 昭子、砂川直輝、今井 友也、高橋 幸子、齊藤 依里、田仲 広明、五十嵐 圭日子	第 30 回セルロース学会年次大会	2023 年 9 月	国内
★セロデキストリンホスホリラーゼにより合成されたセルロースⅡ型結晶の酵素分解特性	砂川 直輝、久我 友大、今井 友也、五十嵐 圭日子	第 30 回セルロース学会年次大会	2023 年 9 月	国内
★ Enzymatic synthesis of crystalline cellulose <i>in vitro</i> : protein mould for anti-parallel packing	Tomohiro Kuga, Naoki Sunagawa, Kiyohiko Igarashi	The 5 th International Cellulose Conference	2023 年 9 月	国内
★CDP により合成されたオクチルセルロースのマルチスケール構造解析	朱 世奇; 今井 友也; ペンティラ パーボ	第 74 回日本木材学会大会	2024 年 03 月	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載(3 年分、★は今年度)

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
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	海外
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	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

ース合成と、その制御に向けた取り組み				
Effect of degree of substitution on the microphase separation and mechanical properties of cellooligosaccharide acetate-based elastomers	Satoshi Katsuhara, Naoki Sunagawa, Kiyohiko Igarashi, Yutaka Takeuchi, Kenji Takahashi, Takuya Yamamoto, Feng Li, Kenji Tajima, Takuya Isono, Toshifumi Satoh	Carbohydrate Polymers	2023 年 9 月	海外
★Acetyl Cellooligosaccharide-Based Block Copolymers for Toughening Cellulose Triacetate/Poly (ϵ -caprolactone) Biodegradable Blends	Satoshi Katsuhara, Yuki Tsuji, Naoki Sunagawa, Kiyohiko Igarashi, Kenji Takahashi, Takuya Yamamoto, Feng Li, Kenji Tajima, Takuya Isono, Toshifumi Satoh	ACS Sustainable Chemistry and Engineering	2024 年 2 月	海外
★ Bacterial Cellulose Production in Space	Akiko TANAKA, Tomoya IMAI, Misako KOGA, Naoki SUNAGAWA, Kiyohiko IGARASHI, Kenji TAJIMA, and Hiroaki TANAKA	International Journal of Microgravity Science and Application	2024 年 5 月受理	国内
★ A mechanism for two-step enzymatic reactions in a single container for space experiments	Sachiko TAKAHASHI, Tomohiro KUGA, Misako KOGA, Bin Yan, Naoki SUNAGAWA, Akiko TANAKA, Kiyohiko IGARASHI and Hiroaki TANAKA	Int. J. Microgravity Sci. Appl.	投稿済み	国内
★Acetyl Cellooligosaccharide-Based Block Copolymers for Toughening Cellulose Triacetate/Poly (ϵ -caprolactone) Biodegradable Blends	Satoshi Katsuhara, Yuki Tsuji, Naoki Sunagawa, Kiyohiko Igarashi, Kenji Takahashi, Takuya Yamamoto, Feng Li, Kenji Tajima, Takuya Isono, Toshifumi Satoh	ACS Sustainable Chemistry & Engineering	2024 年 2 月	海外
★ Enzyme-directed assembly of anti-parallel Cellulose II nanocrystals: unraveling the mechanism beyond spontaneous crystallization	Tomohiro Kuga, Naoki Sunagawa, Keisuke Kobayashi, Hirofumi Yamada, Tomoya Imai, Takayuki Uchihashi, Kiyohiko Igarashi	<i>Journal of Molecular Biology</i>	投稿予定	海外
★ The substrate-induced opening and closing motion of cellobiose phosphorylase, a	Shohito Iriya, Tomohiro Kuga, Naoki Sunagawa, Kiyohiko Igarashi	<i>Journal of Biological Chemistry</i>	投稿予定	海外

downstream enzyme of cellulose metabolizing, revealed by cryo-EM				
--	--	--	--	--