

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)

「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」事業 データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム(Data-driven iBMS)の研究開発

「バイオサイエンスとインダストリー」(B&I) 抜粋版 (2024 年～ 2026 年)

CONTENTS

カーボンリサイクル実現を加速する「バイオものづくり」関連技術開発.....	峯岸 芙有子	01
バイオものづくりに資するテンプレート酵素の探索と応用	蓮沼 誠久	05
関西圏バイオファウンドリ ―大阪工大・大阪大学拠点―.....	長森 英二・本田 孝祐・大政 健史	08
機械学習による培養状態の把握と最適化	河合 哲志	11
バイオものづくりを担うバイオファウンドリについて	古城 敦	13
バイオものづくり技術 麹菌プラットフォームの開発.....	阿部 敬悦・加藤 好一・堀口 博文	16
バイオファウンドリにおける微生物培地最適化ツール開発	小西 正朗	19
バイオものづくりの社会実装を支援する基盤技術開発 データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステムの研究開発	小川 順	21
バイオものづくりに役立つメタボローム分析技術の開発.....	松田 史生・馬場 健史・福崎 英一郎	24
バイオものづくりプロジェクトから植物バイオファウンドリ事業化へ向けての挑戦....	西田 尚子	27
バイオプロセスを用いたローズ香料の生産システム実証.....	青木 宏和・北出 幸広・乾 将行	30
植物を用いた大規模有用物質生産のための一貫システムの開発	福澤 徳穂	33
高吸収型天然カロテノイドの大量生産システム実証	日尾野 隆・渡邊 彰・中村 健人・乾 将行	36
ミリオンスクリーニング技術 ―世界最高の探索・育種技術を目指して	小笠原 渉・鈴木 義之	39
サステナブルな食の未来の実現に向けた油脂酵母を用いた持続可能な油脂生産技術の構築	柴田 雅之・荒 学志・高久 洋暁	42
大腸菌 <i>Escherichia coli</i> によるグルタチオン発酵生産	松井 美里・小林 新吾	45
オプトバイオものづくり技術の開発.....	原 清敬	48



カーボンリサイクル実現を加速する 「バイオものづくり」関連技術開発



峯岸 美有子

はじめに

脱炭素に向けた動きは世界的に加速しており、日本を含む多くの国で2050年等の年限を切ったカーボンニュートラル（温室効果ガス排出量実質ゼロ）実現が表明されている。投資の観点では環境・社会・ガバナンスに配慮した企業を重視する「ESG投資」が拡大しており、企業にとって環境への配慮はこれまで以上に重要な課題である。

パリ協定やSDGsの提言を受けて、国内外ではCO₂削減、炭素循環型社会の実現等「社会課題の解決」と「持続的経済成長」の両方が求められており、この両立に資するバイオエコノミーへの期待が高まっている。

。特にものづくりの世界では、従来の化石資源に依存したものづくりから脱却する手段として「原料のバイオ化」や「プロセスのバイオ化」に踏み出す企業が増えてきている。例えば、プラスチックの原料を化石資源から生物由来の再生可能な資源「バイオマス」に転換できれば、ものづくりへの変革と持続的経済成長の両立が期待できる。また、近年の合成生物学（組織、細胞、遺伝子のような生物の構成要素を部品と見なし、生物システムを構築する分野）などの発展に伴いバイオものづくり実現の可能性が拡大し、バイオプロセス（生物の機能を活用した物質生産工程）への転換に注目が集まっている。

2019年に政府は「バイオ戦略」¹⁾を発表した。当該

戦略では、2030年に世界最先端のバイオエコノミー社会を実現することを目標に、目指すべき4つの社会像や担うべき9つの市場領域といったグランドデザインが提示されている。の中で、重点的に取組強化すべきものとして、バイオとデジタルの融合を基盤とする環境・技術・人材の整備が求められている。

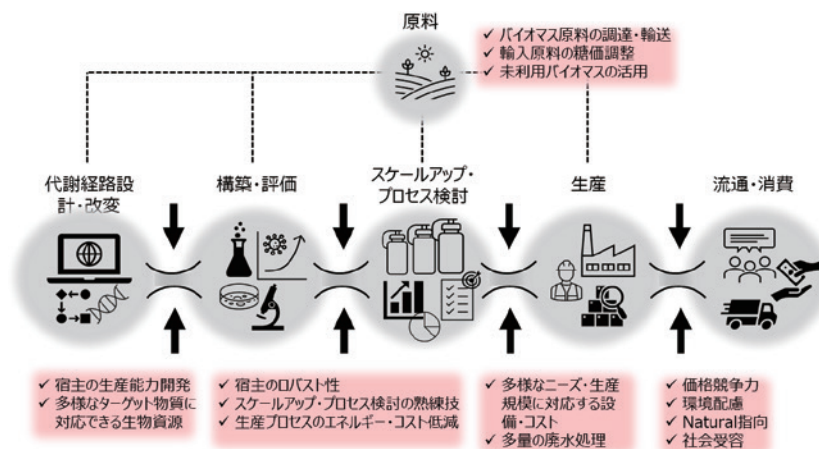


図1 バイオものづくりにおけるボトルネック

筆者紹介：みねぎし・ふうこ（MINEGISHI, Fuko）（国研）新エネルギー・産業技術総合開発機構（New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO)）主任 2020年東京農工大学大学院生物システム応用科学府博士前期課程修了
連絡先：〒212-8554 神奈川県川崎市幸区大宮町1310 E-mail: bioproduction@ml.nedo.go.jp（勤務先）

1. NEDO が推進する「バイオものづくりプロジェクト」

このような背景の下、NEDO では 2016 年度から 2021 年度まで「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」プロジェクト（スマートセルプロジェクト）²⁾ を推進してきた。スマートセルとは、微生物や植物等の生物細胞が持つ物質生産能力を人工的に最大限まで引き出し、最適化した生物（細胞）のことである。このプロジェクトではスマートセルを短期間で高効率に作り出すための我が国独自の基盤技術を確立することを目的として、要素技術の開発とその有効性検証を進めてきた。

一方で、実際に産業界でバイオものづくりが実現されるためには、ラボレベルの研究と実生産レベルの開発の間に存在する様々なボトルネックを解決していく必要がある（図 1）。例えば、大スケールでの培養生産においては小スケールからのスケールアップを行った際に期待通りの生産性が実現されない（小スケールの生産性が再現されない）ことが課題として指摘されている。解決に向けては、大型発酵槽で最大の生産性を発揮する宿主（産業用スマートセル）を開発する、スケールに合わせた培養条件をより効率的に最適化できるようにする等、多面的な解決手段が考えられるが、それらを 1 つずつ全て 1 企業で取り組んで社会実装までたどり着くのは技術的にもコスト的にも難しい

ケースが多い。また、企業の経験値に応じてハードルの高さや数は異なることから、新規参入企業の拡大には技術・設備・人材育成など多面的な基盤が必要だと考えている。

そこで NEDO では、原料から最終製品に至るボトルネックの解消を目的として 2020 年に「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」プロジェクト（バイオものづくりプロジェクト）を立ち上げ、主に以下の 3 つのポイントで基盤的研究開発を推進している（図 2）。

①バイオものづくりに関わる各種技術

スケールアップや回収・破碎・分離・精製等までを含む工業化に向けた生産プロセスに関わる次世代生産技術、生産プロセスパラメーターと育種を関連づけさせることができる統合解析システム、バイオ資源の活用を促進するための各種技術に加え、有用な生物情報・資源を蓄積する。

②生産実証拠点

実生産との橋渡しをより効率的に行うために必要となる規模のバイオ生産実証拠点（バイオファウンドリ拠点）を確立することで、原料やプロセスをバイオに転換しバイオによるものづくりを取り入れたい企業を後押しするとともに、アカデミアやスタートアップのシーズを実用化につなげる研究促進効果を促す。

NEDO 広報誌「focus NEDO 92 号」にて、それぞれ特徴を持つ 4 つの拠点の取組みを紹介しているため参照いただきたい。

③人材育成

本分野で先端研究と産業界の橋渡しをできる人材を育成する。バイオものづくりに関わる基礎・応用の理論やバイオプロセスのためのライフサイクルアセスメントの考え方を座学で学べるだけでなく、設備を用いた実技実証のメニューも用意されている。

本誌では「NEDO バイオものづくりプロジェクト特集」として、このプロジェクトで取り組んでいる基盤技術開発およびバイオファウンドリ拠

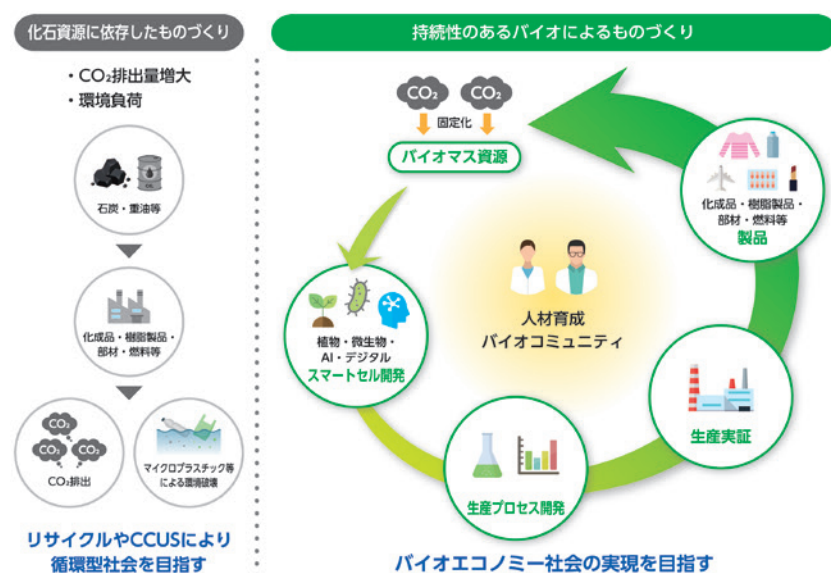


図 2 バイオものづくりプロジェクト概要図

点の詳細な内容を担当の先生方に紹介していただく予定である。

2. 微生物を利用したものづくり

微生物を利用したものづくりは、古くは味噌・醤油・酒のような発酵食品として現代に至るまで私たちの生活に浸透している。特に日本は、麹菌というたった1種類のカビを使いこなすことで食卓を彩ってきた文化がある。食品分野を中心として歴史的に培われてきた「発酵技術」は、まさに日本が強みを持つ分野であるといえる。

これに対し、スマートセルを活用した近年のバイオものづくりにおいては、最先端の遺伝子工学やゲノム編集等の技術を用いて細胞を人工的に改変できるため、食品等にとどまらない多様な有用物質の生産に適用範囲を拡大する可能性、生産効率を短期間で飛躍的に高められる可能性がある。このような近年のバイオものづくりは、高温高压条件下でものづくりが行われる場合が多い化学プロセスと比較すると、常温常圧下でのものづくりが可能であるためCO₂排出量削減が期待できる。また、一般的に多段階の反応を重ねる必要がないため、炭素数の多い複雑な物質生産に強みを持つ。

化成品代替の生産技術開発の事例として、東レ(株)が開発を進める100%バイオ由来アジピン酸の合成があげられる³⁾。アジピン酸は衣料品や自動車部品などに用いられるポリアミド66(ナイロン66)の原料となる物質であり、同社は微生物発酵による糖を原料とした合成技術の開発に取り組んでいる。これまでに遺伝子工学技術や、微生物を用いた中間体の合成に最適な発酵経路を設計するための情報生命科学技術といったスマートセル基盤技術を活用したことで、微生物が生成する中間体の合成効率を飛躍的に向上させることに成功している。バイオ由来のアジピン酸は、石油由来アジピン酸の製造工程で発生する温室効果ガス[一酸化二窒素(N₂O)]を全く発生させないため、地球温暖化の抑制が期待できる。

高機能品の生産技術開発の成果として、長瀬産業(株)が実施した希少アミノ酸エルゴチオネイン(EGT)の発酵生産法が挙げられる⁴⁾。これは食品・化粧品・医薬品などの幅広い分野での利用が期待されている物質で、もともとは天然物からの抽出法・化学合成法などの製造方法が主流であったところ、微生物を用いた発

酵法で安価なEGTを安定供給できる環境配慮型バイオ生産プロセスへの転換を目指して開発がスタートしたものである。スマートセル基盤技術を複数活用したことで従来比約1,000倍の生産性向上に成功し、微生物を用いて世界最高レベルの生産効率を達成した。開発したスマートセルおよび同社開発の高度性製法を用いて、事業化を目指した検討が現在進められている。

地球上に存在する微生物の種類は非常に多種多様であるにも関わらず、これまで獲得されてきた微生物はごくわずかである。今後、利用可能なバイオ資源が拡大し、微生物を工業的に活用するための技術開発がさらなる進化を遂げると、微生物を利用したものづくりの世界がさらに拡大する可能性がある。

3. 植物を利用したものづくり

微生物の力を利用するバイオものづくりが進行する一方、植物の潜在機能を引き出すバイオものづくりの期待も高まっている。植物は水とCO₂と太陽の光とわずかな栄養で成長するため、非常に省エネルギーで物質生産できる可能性がある。その他にも、動物や微生物等由来の病原体混入リスクが低い、拡大生産が容易、施設やランニング費用面の低コスト性など様々なメリットがあり、特に欧米や中国などでは既に植物を用いた試薬や化粧品・医薬品原材料の生産技術が実用化および上市されている。

国内においても植物を活用したバイオものづくりで実用化を実現している例がある。ホクサン(株)と共同研究機関は、イヌインターフェロン α を産生する遺伝子組換えイチゴの果実を原料とした犬および猫歯肉炎の症状の軽減剤を開発した⁵⁾。このような医療用成分を産生する遺伝子組換え植物そのものを原薬とする医薬品の承認は世界で初めてである。

このように国内でも実用化事例ができつつあるが、まだ数として多くはないのが現状である。加えて、日本国内で世界トップレベルの要素技術研究開発は行われているものの、それらを組み合わせた一貫通貫の製造プロセスを実証できる場が存在しないという課題がある。また、植物を利用して大量の物質生産を行うためには遺伝子組換え操作や栽培環境制御が必要になるが、そのような試験を行う大規模な設備を各社が開発段階で保有することは難しい。

そこで、本プロジェクトでは、高付加価値なタンパク質を生産ターゲットとして、宿主改変・大量栽培・

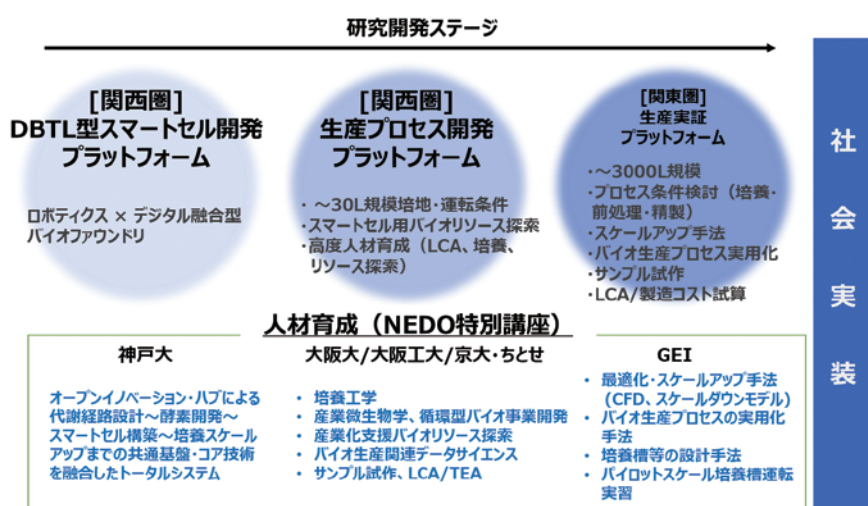


図3 バイオファウンドリ拠点

大規模抽出・精製の各種プロセスに必要な要素技術開発、そしてそれらを集積・統合した一貫通貫システムの開発を進めている。今後、研究や試作ができる場所の整備が進められれば、植物バイオものづくりの実用化の一助となることが期待できる。

お わ り に

本プロジェクトは2024年度で5年目を迎え、最終年度である2026年度まで残すところあと3年となった。微生物利用においては、実生産への橋渡し機能を持つ一連のバイオファウンドリ拠点の整備も進みつつある（図3）。

バイオものづくりへの参入障壁を下げることを目的として、共通基盤技術の開発や拠点整備を進めている。この目的を達成するためには、プロジェクト終了後にこれらの成果を多くの企業・アカデミア等が利用しやすいような仕組み、そしてバイオに関わる人と人とが緩やかにつながりお互いに情報交換しあえる環境があることが重要と考える。本誌での連載から、各プレイヤーが情熱を持って開発を進めている共通基盤技術をこれまで以上に多くの企業・アカデミアに知っていただくことで、バイオものづくり全体のプレイヤー群の拡大と、バイオ由来製品のさらなる創出に向けた後押しになれば幸いである。

参 考 文 献

- 1) 内閣府：バイオ戦略 <https://www8.cao.go.jp/cstp/bio/index.html>
- 2) NEDO スマートセルプロジェクト https://www.jba.or.jp/nedo_smartcell/
- 3) NEDO：100 % バイオ由来アジピン酸の合成方法を開発 —環境配慮型ポリアミド66の実用化に向けたスケールアップ検討を開始—(2022年8月24日) https://www.nedo.go.jp/news/press/AA5_101563.html
- 4) NEDO、長瀬産業(株)：希少アミノ酸「エルゴチオネイン」の生産性を従来比約1000倍に向上 —スマートセル技術を活用し、世界最高レベルの生産効率達成—(2020年9月30日) https://www.nedo.go.jp/news/press/AA5_101361.html
- 5) ホクサン(株)：動物用医薬品犬及び猫歯肉炎軽減剤「インターベリーα」 <https://hokusan-kk.com/item/>

NEDO バイオものづくりプロジェクトポータルサイトのご紹介

個別技術紹介、技術活用事例、人材育成講座等の最新情報を掲載しています。



<https://www.jba.or.jp/b-production/>



NEDO 広報誌
「focus NEDO 92号
バイオものづくり拠点ととうのう！」
はこちら



https://www.nedo.go.jp/library/ZZ_focus_92_index.html



バイオものづくりに資するテンプレート酵素の探索と応用



蓮沼 誠久

はじめに

バイオプロセスを構築する上で、標的物質の生合成系を構成する酵素の開発は重要である。優れた性能を持つ酵素の選定や酵素工学による機能の改変は産業競争力になる。酵素に求める性能としては、触媒効率や基質特異性、安定性等のほか、酵素生産媒体となる宿主株での機能発現のしやすさも重要である。

最近では、酵素の基質寛容性 (Promiscuity) を利用して未知の生合成経路を具現化する試みも期待されている¹⁾⁻³⁾。生合成経路が不明の生産ターゲットや生物がもともと生産しないターゲットであっても、酵素の基質認識の曖昧さを利用すれば生成することが可能である。

本稿では新規の生合成経路構築に有用な酵素の選定

に焦点を当て、データ駆動型研究の成果と NEDO プロジェクトで開発中のテンプレート酵素選定技術を紹介したい。

1. 機械学習による未知生合成酵素の選定

植物由来天然物であるベンジルイソキノリンアルカロイド類 (BIAs、レチクリンなど) には鎮痛剤等の医薬品原料として有用な化合物が含まれ、微生物による大量製造技術の開発が期待されている。筆者らは未知代謝経路を設計可能な情報解析ツール M-path を用いて 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) を 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde (DHPAA) に変換するカイコ由来 DHPAA 合成酵素 (DHPAAS) を見出し、人工生合成経路 (図 1) での大腸菌によるレチクリン増産に成功した¹⁾。しかし、植物での生合成経

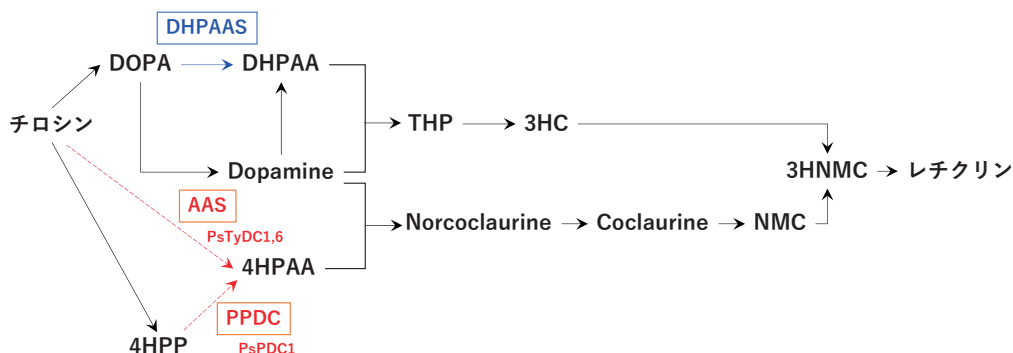


図 1 レチクリン生合成経路

本研究で明らかにした未知酵素の反応を赤破線矢印で示す。化合物の略称: DOPA 3,4-dihydroxyphenylalanine, DHPAA 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde, THP, 3-hydroxynorcoclaurine, 3HC 3-hydroxycoclaurine, 3HNMC 3-hydroxy-N-methylcoclaurine, 4HPP 4-hydroxyphenylpyruvate, 4HPAA 4-hydroxyphenylacetaldehyde, NMC N-methylcoclaurine

筆者紹介: はすぬま・ともひさ (HASUNUMA, Tomohisa) 神戸大学 先端バイオ工学研究センター (Eng. Biol. Res. Center, Kobe Univ.) センター長/教授 2004 年大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了 博士 (工学) 専門: 代謝工学
連絡先: 〒657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1 E-mail: hasunuma@port.kobe-u.ac.jp (勤務先)

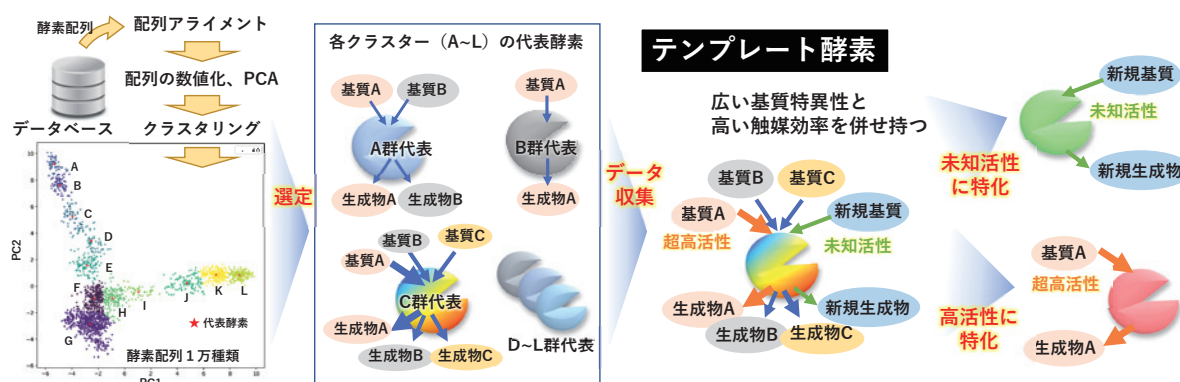


図2 テンプレート酵素の選定ワークフローの例

路が一部不明であったため、昆虫由来の酵素で補う形であった。

そこで BIA 生産植物であるケシ (*Papaver somniferum*) の生合成経路解明を試みた²⁾。中間体である norcoclaurine は 4-hydroxyphenylacetaldehyde (4HPAA) とドーパミンの重合を経て生合成される (図 1) が、チロシンから 4HPAA を生成するケシ由来芳香族アルデヒド合成酵素 (AAS) は未知であったため、AAS が芳香族アミノ酸脱炭酸酵素と配列相同性が高いことに着目し、チロシン脱炭酸酵素としてアノテートされているケシ由来ホモログ (PsTyDC1-8) から目的 AAS を探索した。具体的には上述のカイコ由来 DHPAAS やバセリ由来 4HPAA 合成酵素に高い相同性を有する 360 個および 9,412 個のポジティブおよびネガティブトレーニング配列を用いて Support vector machine (SVM) モデルを構築し、解析を行った。その結果、PsTyDC1 と PsTyDC6 はチロシン脱炭酸酵素というよりもむしろ AAS であることが示唆され、活性測定でこの反応特異性は裏付けられた²⁾。

同様の機械学習アプローチは 4HPP を 4HPAA に変換するフェニルピルビン酸脱炭酸酵素 (PPDC) の特定にも有効であった。従来、植物由来の PPDC は未知だったが、乳酸菌や酵母由来の配列を用いた SVM モデルから、ケシ由来ピルビン酸脱炭酸酵素 (PsPDC1) は基質特異性が寛容 (promiscuous) でフェニルピルビン酸も認識し、PPDC 活性を有することが確認された²⁾ 一次代謝酵素であるピルビン酸脱炭酸酵素が BIA 生合成のような二次代謝に関与していることは興味深い。

このように、データ駆動型の未知酵素探索により、レチクリン生合成経路のミッシングリンクは解消さ

れ、これらの酵素の高活性化を経て大腸菌のアルカロイド生産は増大した²⁾。

2. テンプレート酵素選定技術の開発

Promiscuous な酵素は非天然物質の生合成に有用である。ムコン酸は大腸菌への異種生物由来酵素の導入により生合成されるが、森らはカビ由来フェルラ酸脱炭酸酵素 (FDC) が、ムコン酸から非天然物質であるブタジエンへの変換反応も有することを見だし³⁾、Promiscuous な酵素と基質の新しい“組合せ”による非天然物質の生成が実現し、その後、の酵素工学改良により活性は 100 倍以上増加した。こうしたアプローチは石油化学で製造されてきた標的物質のバイオ生産を可能にしている。

一方、このような組み合わせの発見は容易ではない。従来、酵素の選択は既知情報から人間の頭脳で行われており、酵素配列が大幅に増加したとはいえ、その中から最適な酵素と基質の組合せを選択することは困難である。UniPlot や BRENDA 等のデータベースは酵素選択を支援するが、アノテーションに依存した探索では Promiscuous な酵素を選択肢に含めることができない。

筆者らは広い基質特異性と高い触媒効率を併せ持つテンプレート酵素を探索する情報解析手法「ムサシメソッド」(特願 2023-053557) を開発し、その検証を進めている。この手法では、一定の相同性を有する酵素群に対し、アミノ酸配列を数値・行列化した後に行列情報の解析を行い、酵素のグループ分けを行う。アルコール脱水素酵素等を題材に数十種類の基質に対する触媒効率を評価したところ、狙ったテンプレート酵素が特定のグループに集約され、選定を容易にした

(図2)。基質特異性が広い場合、想定しない基質との接触を招き、代謝に悪影響を及ぼすことがあるため、現在は認識対象を標的基質に特化するための酵素工学を進めている。標的基質に対する触媒効率を落とさずに特異性を向上させることに成功しつつあり、またの機会に紹介したい。

おわりに

バイオ生産のポテンシャルを拡大し、産業競争力を得るためには高活性だけでなく未知活性を発揮する酵素の収集が重要である。既知情報に依存した酵素選定はその可能性を限定していることに他ならない。本稿ではデータ駆動型アプローチに軸足を置いたが、この方法論を実践するには正確なデータ収集が必須であ

る。そのためにはラボラトリーオートメーションの開発と拡充がもう1つの勝負どころになるため、鋭意開発を進めている。AIと自動化を活用した先端バイオ工学の進展に目が離せない状況である。

参考文献

- 1) 蓮沼誠久ら：情報解析と先端計測を組合わせたアルカロイド高生産技術の開発, 本誌, 78(1), 32(2020)
- 2) Vavricka, C.J. *et al.*: Machine learning discovery of missing links that mediate alternative branches to plant alkaloids, *Nat. Commun.*, 13(1), 1405(2022)
- 3) Mori, Y. *et al.*: Direct 1,3-butadiene biosynthesis in *Escherichia coli* via a tailored ferulic acid decarboxylase mutant, *Nat. Commun.*, 12(1), 2195(2021)



関西圏バイオファウンドリ —大阪工大・大阪大学拠点—



長森 英二



本田 孝祐



大政 健史

はじめに

フードテックやバイオものづくり、医療・ヘルスケアの分野を中心に、バイオ生産プロセス開発に新たに着手する企業は、年々増加している印象である。一方で、バイオ生産技術の開発は、非常に複雑な事象を扱うがゆえの困難が多く、新規参入への障壁が高いことは、歴史的に、当事者間では周知である。

バイオものづくりに新規参入する企業は、当初の情報収集に始まり、使用菌株の選定、代謝工学に基づいた改変育種、培養プロセス開発、分離精製プロセス開発、スケールアップ、試作・製造に至るまで、多岐にわたる開発を推進する必要がある。開発経験を有さない企業には、そのハードルは決して低くない。加えて、スピーディな製品化を実現するには、川上から川下まで同時並行的に開発を進めなければならないものの、おのおの要素技術導入のため全ての研究機関や大学にアクセスするには膨大な手間やコストを要し、また全体を見通した最適化の視点が欠如しがちになる。特に、生産時に回避できない制約を考慮しない育種を行った結果、実証・製造の段階で育種に立ち戻らねばならないケースが散見され、これを繰り返していると数年があつという間に過ぎてしまいかねない¹⁾。

1. 産業のバイオ化を加速する拠点の形成

プロセス全体を見通した育種・実証を新規参入企業においても可能とし、開発期間を大幅に短縮する仕組みが、産業のバイオ化の加速には欠かせない。(国研)新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発(以下、NEDO バイオものづくりPJ)」事業²⁾では、新規参入の障壁を取り除き、バイオものづくりの社会実装を加速させることを目的として「新規参入企業のバイオものづくり開発をワンストップで支援する体制の構築」を目指した要素技術開発を推進している。このワンストップ体制を実現するための1つの手段として、育種から培養検討、試作に至るまでの開発支援機能と、開発や生産の現場を担う生産技術者育成機能を備えた拠点施設(=バイオファウンドリ)の整備を進めている。

大阪工業大学に設置された拠点“バイオものづくりラボ”(図1)には、0.25 L 小型培養槽を32連、流加培養が可能な1 L 培養槽を12連、加圧培養が可能なステンレス槽の5 L 培養槽を4連、そして30 L の蒸煮滅菌型培養槽が整備されている。全培養槽にオートサンプラーが設置され、昼夜を問わず省力的に等時間

筆者紹介：ながもり・えいじ (NAGAMORI, Eiji) 大阪工業大学工学部生命工学科 (Inter. Cent. for Biotechnol., Osaka Inst. of Technol.) 教授 2001 年名古屋大学大学院工学研究科博士課程修了 博士(工学) 専門：生物化学工学、バイオプロセス
連絡先：〒535-8585 大阪市旭区大宮 5-16-1 E-mail: eiji.nagamori@oit.ac.jp (勤務先)

ほんだ・こうすけ (HONDA, Kohsuke) 大阪大学生物工学国際交流センター (Dept. of Biomed. Eng., Osaka Univ.) 教授 2003 年京都大学大学院農学研究科博士課程修了 博士(農学) 専門：応用微生物学、合成生物学
連絡先：〒565-0871 吹田市山田丘 2-1 E-mail: honda.kohsuke.icb@osaka-u.ac.jp (勤務先)

おおまさ・たけし (OMASA, Takeshi) 大阪大学生物工学工学研究科 (Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ.) 総長参与・工学研究科長・教授 1992 年大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了 博士(工学) 専門：生物化学工学・動物細胞工学
連絡先：〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1 E-mail: omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp (勤務先)

2. 培養データ解析支援 DX アプリの開発と実装

図1のような多連培養槽と自動化されたサンプリングおよび分析機器を備えた施設では、大量の培養データ（培養ビックデータ）が省力的に得られる一方で、その整理や解析には膨大な時間と手間を要することとなる。そこで大阪工業大学拠点では、培養データ解析を支援するシステム（バイオものづくりラボデータ解析支援システム、BMDS）を開発・実装している（図2）。BMDSでは、培養検討で生じる複数のデータファイル（装置側、培養作業者、分析作業者）をクラウド上で統合し、解析エンジンがグラフ化（多軸表示、パネル表示）や各種比速度解析を担い、作業者の負担を軽減する。統一されたひな型によるデータ保管やクラウド上での共有は、熟練技術者退職時のデータ散逸の問題の解決（属人的データ管理からの脱却）や、誰でも気軽に過去データを閲覧・編集できる等の利点がある。現在は実験計画法（DoE）や代謝フラックス解析を省力化するDXツールを開発中である。このアプリは一般公開を予定しているので、ご興味の方はアクセスと登録をお願いしたい³⁾。

3. 産業バイオ人材の育成（NEDO 特別講座）

新規参入企業が研究開発に着手する際に、適切にバイオプロセス開発を推進できる人材を見つけられないことも参入障壁になっている。NEDO バイオものづ

くりPJでは、NEDO 特別講座⁴⁾として、産業バイオ人材を育成する技術者セミナーを、大阪工大拠点（製造実務者育成）と大阪大学拠点（生物化学工学の体系的な学習）に順次開講してきた。大阪工大拠点の実技セミナー基礎編は、2024年3月末までに85社、12機関、7大学から計210名の受講者を集めるなど好評を得ている。受講の申込みはHPから随時可能である。

お わ り に

新規参入企業が、バイオ由来製品の開発と社会実装を次々に成し遂げられる将来を目指して、バイオものづくり技術の実務を教育し、生産プロセス開発を強力に支援することができる拠点の形成を進めた。既に数多くの企業が活用を始めており、ご興味をいただける場合には早期のアクセスをお勧めする。

参 考 文 献

- 1) 長森英二：培養技術社を過重労働から解放する！！バイオものづくりラボの取組み, 本誌, 81(3), 362~363(2023)
- 2) NEDO「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」プロジェクト概要
https://www.nedo.go.jp/activities/ZZJP_100170.html
- 3) 大阪工業大学工学部生命工学科生物プロセス工学研究室
<https://www.oit.ac.jp/bio/labo/~nagamori/app.html>
(2024/03/22)
- 4) NEDO：バイオものづくり分野の人材育成プログラムを順次開講(2022年7月1日付ニュース)
https://www.nedo.go.jp/news/press/AA5_101556.html
(2023/10/22)



機械学習による培養状態の把握と最適化



河合 哲志

はじめに

(株)ちとせ研究所は、(国研)新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 事業で AI を活用した培養制御技術の開発を進めており、開発拠点として京都大学に 30L 培養設備 10 台と 0.8L 培養設備 6 台を設置した (図 1)。この培養装置は、通常の培養装置とは異なるデータの入出力仕様を有し、AI による培養装置のコントロールが可能である。共同実施先企業にこの AI 制御システムを導入し、性能を評価した結果、生産性の改善や安定性の向上が実証され、その成果は 2023 年度に公表された*。さらに、この拠点は開発機能に加え、2023 年度からは公共のバイオフィoun드리としての役割も果たしており、NEDO 事業に参加していない企業でも AI の検討や試作が可能となった。このような拠点の存在を広く知っていただくために、2023 年度には 3 回の見学会を実施し、合計 42 社 65 名が参加した。本稿ではこの AI 技術について紹介する。

1. 培養状態を把握する技術

従来の培養制御手法は、制御条件とアウトプット情報 (生産量など) をひも付けながら制御条件の検討や生産制御が実施されてきた。つまり、培養液や細胞の状態は注目されておらず、トライアンドエラーによる入力 (制御) と出力 (生産量) を総当たりで検討し、これを積み重ねることで経験値を貯め、制御条件を決



図 1 関西圏のバイオフィoun드리 京都大学／ちとせ研究所拠点

NEDO 事業に参画する企業に実機で制御可能な範囲をヒアリングし、それらの仕様を反映した標準培養装置を導入した。培養条件は好気から嫌気まで対応可能。種類の異なる培養装置を一括管理可能な AI 制御システムを導入した。

定してきた。一方、(株)ちとせ研究所は機械学習を利用して培養状態を把握しながら制御する手法を開発した。この開発のポイントは、培養状態を把握するためのデータ取得である。機械学習の開発となると AI モデル作成が重要と思われがちだが、実際にはデータの質が最も重要である。ただし、どのデータが培養状態を把握するのに重要かは明らかではない。そのため、従来取得してこなかった様々な新規データを取得するためのセンシングデバイス群を開発し、機械学習専用

* NEDO ニュースリリース：AI による自動培養制御システムを開発 ―微生物による機能性食品素材の生産で熟練者を約 10 % 上回る生産量を達成― (2023 年 9 月 4 日)
https://www.nedo.go.jp/news/press/AA5_101685.html
ちとせグループプレスリリース：AI による自動培養制御システムの開発に成功！ ―微生物を活用した機能性食品素材開発において人では不可能な高精度な培養制御を実現― (2023 年 9 月 4 日)
<https://chitose-bio.com/jp/news/5747/>

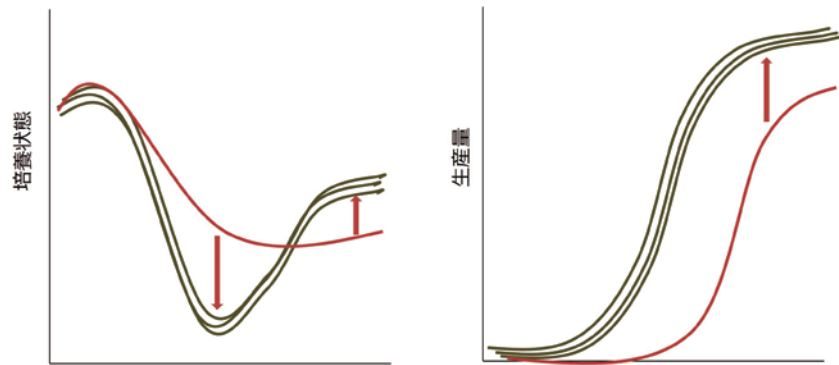


図2 培養状態把握による培養安定化のイメージ

左図の縦軸は培養状態を数値化したものであり、右図の生産量が低下している場合は培養状態が通常と異なることを模式的に表している。培養状態を通常状態に近づくような制御をすることで、生産量を改善することが可能である

の培養データ（コンボリューショナルデータ[®]）を取得するシステムを開発した。例えば、培養中の電位情報は、これまで溶存酸素の情報を得るために白金電極を利用した酸化還元電位データのみが利用されていた。培養状態の把握には、酸素以外にも培養液中の様々な代謝情報を得ることが重要になると考えられる。ただし、どのような電極が有効かは検証するまで分からず、培養の種類によっても異なることが予想される。そこで、多次元の酸化還元情報を取得するマルチ電位センサーを開発した（特許第 6606625 号）。その他にも、光学系やガス情報など、多様な情報を連続的に取得し、このデータを活用することで、人では区別できない培養状態の差異を把握することが可能となった。

2. 培養状態に基づく培養制御技術

培養状態を定量情報として把握できるようになれば、その情報を制御値やアウトプット値といった他の定量情報と組み合わせて学習が可能となる。このような培養状態に基づく制御が可能になれば、生産量の最大化、生産時のリアルタイム情報取得、生産の安定化、自律的な培養制御など、培養に関連する課題に対して広く応用できる技術となる。例えば、微生物培養で同じ条件でも異なる結果が出るのが一般的であり、生産時の培養不安定性は大きな課題の 1 つである。この原因は、人が感知できない環境や生物学的差異にあるため、データとして把握することは不可能だった。そのため、これまでは「匠」と呼ばれる経験豊富な技術者が、見た目や匂いから培養状態を感覚的に把握していた。このような人依存の状態を維持するためには、開

発環境を長期間維持することで初めて可能となるが、バイオエコノミーの急速な拡大が求められている現状には適していない。AI 技術を活用した培養状態の把握技術に応用することで、生産性が高い状態や低い状態をデータで把握し、そのデータを制御情報にひも付けて学習することで、生産性が低下するような培養状態を避ける制御が可能となる（図 2）。AI 制御技術を他の課題にも同様に応用することで、ノウハウではなくデータを基に培養課題を改善することが可能となる。

おわりに

（株）ちとせ研究所は産業株の性能を改善する独自の育種技術「不均衡変異導入法」を活用した育種サービスから創業した企業だが、発酵生産を行う様々な企業とのやり取りを通じて共通の培養課題も認識してきた。これに対応するため新たに AI 制御技術を開発し、育種と培養という両輪揃った価値を提供できる環境が整った。これは多くの方々の支援があったからこそ実現できたことであり、現在進めている NEDO 事業でも多数の企業と連携しながら開発を推進している。今後も、日本のバイオエコノミー拡大に貢献するために尽力していきたい。

謝辞

この成果は、（国研）新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託事業「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」の結果得られたものです。



バイオものづくりを担う バイオフィアウンドリについて

古城 敦

はじめに

生物の能力を活用して有用化合物等を作り出す「バイオものづくり」は化石資源を原料としないことから、カーボンニュートラル実現のキーテクノロジーとして大きな期待が寄せられている。これまでに細胞が持つ物質生産能力を人工的に最大限まで引き出し、最適化したスマートセルと呼ばれる細胞が国内外で多数開発され、フラスコや数L程度の培養槽では目的物質の生産性が確認されている。しかし、事業化を目指す際に多額の設備投資を必要とすることが実用化の障壁になっていると考えられている。

このような背景を踏まえ、「バイオものづくり」の実用化に必要なスケールアップやバイオ生産プロセスの最適化を担うバイオフィアウンドリと呼ばれる組織・機能の構築が必要と考えられたことから、(国研)新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」(以下、バイオものづくりプロジェクト)の一環として、Green Earth Institute (株)では関東圏に



写真1 バイオフィアウンドリ研究所外観(千葉県茂原市)

バイオフィアウンドリ拠点(写真1)を構築する事業を進めている。

1. スケールアップの効率化

従来、微生物による培養生産ではラボスケールで数L程度のタンク培養で生産性を確認した後、数十～数百Lのベンチ設備、数百～数千Lのパイロット設備を経て数千L～数百 m^3 の実機設備でそれぞれ生産性を確認することで実用化の検討を進めてきた。しかし、培養規模をスケールアップするたびに生産性が低下したり、不純物が増加したりする等の問題点が発生することが多く、各段階で発生する問題点を一つ一つ解決するために多くの時間と各設備を構築する費用が必要となっていた。これらの問題点の多くは、スケールアップに伴って培養槽内の溶存酸素や温度等の培養条件が不均一となり、小スケールでは想定できなかった培養条件下に微生物が曝されることが原因であると考えられている。そこで当社は、まず①想定される実機設備のタンク内部で起こり得る分布を数値流体力学解析(Computational Fluid Dynamics、CFD解析)にて予想し、②生産性に影響の少ない培養条件の範囲(デザインスペース)を確認した上で、③大型の培養槽における溶存酸素やpH分布、圧力等を30L培養槽で再現できるスケールダウンモデルにて実際に培養し、実機スケールと同条件で生産性を確認可能とするシステムを構築している。

2. CFD解析

実機スケールの培養生産では直径が3～4m、高さ10～20mにもなる巨大タンク(数百 m^3)で培養を行うことが多い。酸素供給としてはタンク下部からの通気、栄養源やpH調整剤の供給としてはタンク上部からの滴下となるため、特に上下方向での分布が発生す

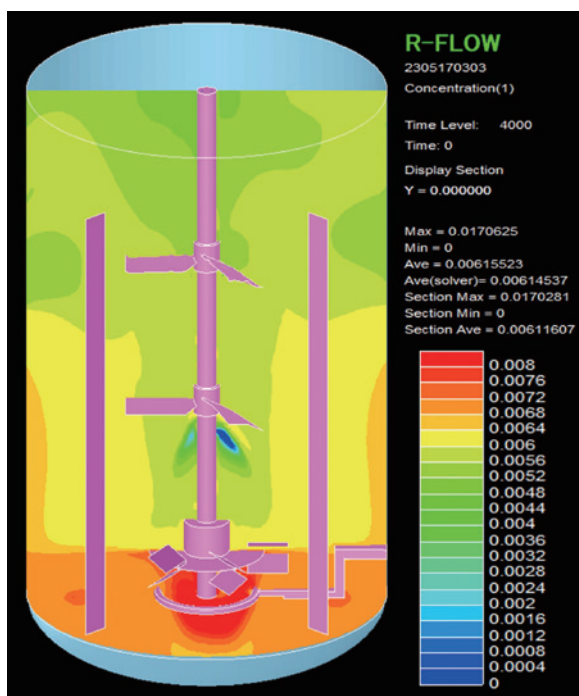


図1 CFD解析例（溶存酸素）

るが、これらをコンピュータシミュレーションによるCFD解析によって予想している（図1）。当社では（株）アールフローのソフトウェアを用いて、溶存酸素の分布や攪拌動力の予想等、培養に特化した解析式を組み込んでおり、様々な培養条件やタンク形状に対応できるよう開発を進めている。

3. 培養条件の最適化

微生物の培養条件で一定以上の生産性を維持する培養条件を決定するためには培地成分の組成や温度、pH、攪拌速度等、それぞれの項目について検討が必要となるが、微生物の培養は1回の実験で数日～数週間を必要とするため、これらの各条件を確認するだけでも多くの時間が必要となる。そこで統計学における応用分野の1つである実験計画法を採用した最適化実験を進めている。具体的な方法としては、まず培養に関係する様々な条件をL8直交表等で設定し、得られた培養結果を相関解析と分散解析することで特に培養に影響のある重要因子を抽出する。次に当該因子について、決定的スクリーニング計画法で設定した条件で、最適化を目的とした培養実験を行い、応答曲面法という計算手法でコスト採算性がある条件範囲（デザインスペース）を決定している（図2）。最終的には

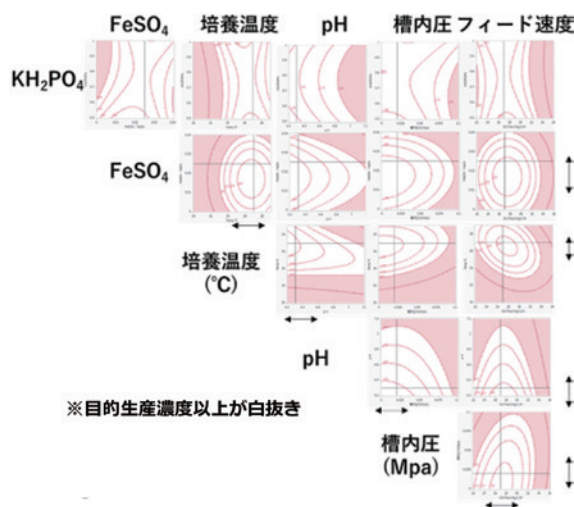


図2 培養条件の最適化（デザインスペース）

確認実験を2回ほど実施するが、現在ではプロセスによっては、重要因子の抽出から最適化、確認試験までを2～3カ月で完了することも可能となっている。

4. スケールダウンモデル

最適化実験で確認したデザインスペースを反映した、大型培養槽の内部分布を30Lの培養槽で再現するため、攪拌速度や通気量等を変更せずにpHや温度、圧力、溶存酸素等の培養条件を一定間隔で周期的に変更可能とする制御システムを導入したスケールダウンモデルを構築している（写真2）。本制御システムはiFix社のソフトウェアDCSを採用しており、当社オリジナルの制御プログラムの構築を可能としている。また、本モデルは培養条件だけではなく、滅菌工程においても大型の培養槽と同様の加熱・冷却時間をプログラム設定できるため、特に加温時における培地成分の劣化による影響も確認することを可能としている。このシステムにより、大型培養槽と同じ条件での生産性を確認できることから、ベンチおよびパイロット設備でのスケールアップ検証を省略することが可能になると考えている。

5. コスト・LCA試算

原料、培養、精製におけるコストや二酸化炭素排出量の概算を算出可能とする計算シートを作成している。これまでではすべての工程が確定した後にコストの算出やLCA解析を行っていたが、開発途中で計算することにより、コストや二酸化炭素排出量の削減に大



写真2 スケールダウンモデルシステム

大きく影響する工程や資材等の把握が可能となる。特に精製については、各工程について順番等も自由に設定できることから様々な工程に対応できるような汎用性を備えている。

6. 前処理および精製設備の導入

培養の原料となる糖質を未利用のバイオマスから取

得するための検討も進めている。国内外の様々な未利用バイオマスについて排出量や価格等を調査し、有望な候補バイオマスについては、二軸同方向押出加熱機による加熱処理と酵素処理によって得られる糖液を、培養の原料に供給することを考えている。また培養後の培養液から最終目的物を精製する設備として樹脂塔や晶析槽、濃縮、膜分離等の装置も備えており、原料から培養、精製までのプロセス全体の検討を可能としている。

お わ り に

バイオものづくりの実用化のため、関東圏バイオファウンドリ拠点では、スケールアップや原料となる糖質を確保するための技術開発、培養からの精製までを検討可能とする機能を構築してきた。2023年度には4件、2024年度においてはさらに多くの生産実証を並行して進めており、最大 3,000 L 培養槽で生産性確認や kg オーダーのサンプル製造も対応中である。今後も多くの案件を進めることで我が国のバイオものづくりの実用化に貢献していきたいと考えている。



バイオものづくり技術 麹菌プラットフォームの開発



堀口 博文



加藤 好一



阿部 敬悦

はじめに

国内のバイオ生産は100年以上の歴史があり、今日ではバイオ由来製品も酒類、食品、酵素、医薬、農薬、化粧品、飼料および工業製品素材など範囲を拡大させ、大きな発展を遂げてきた。近年のバイオ生産は遺伝子組換え製造が主流となりつつあり、宿主は多種多様な有用物質を効率的に生産できる麹菌が世界でも多く利用されている。その一方、国内における麹菌の開発はスケールアップの難しさから海外競合メーカーにリードされる状況となっている。この状況を打開するために菌株開発から培養技術さらに生産実証までを包含した麹菌プラットフォームを開発し社会実装を目指している。本稿では核となる技術として、(国研)新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)のバイオものづくりプロジェクト¹⁾での取り組みについて紹介したい。

1. 麹菌菌糸分散株について

糸状菌の液体培養法は酵素や化成品の生産に利用され、その生産スケールは数十～数百kLにも及ぶ。糸状菌の液体培養条件下の形態の違いは菌種と培養条件に依存しており、産物の生産性と強い相関がある。菌糸ペレット形成時にはその直径が数mmにもなり、ペレット内部への栄養や酸素供給が制限されるため物質生産の制限要因となるが、培養液は比較的低粘度の

状態を示す²⁾。一方、菌糸が分散状態の場合には、菌糸表面積が増えるが培養液粘度が上昇し攪拌効率が低下する場合もある。一般的に、糸状菌の大規模工業培養では、ペレット形態であっても菌体量の増加に伴い培養液粘度が上昇し、培養槽内の酸素の対流移動が制限されて物質生産性の低下につながる。以上の背景から、工業生産では極微小ペレットの形態か低粘度性を保持する菌糸分散形態が望まれるが、そのための形態制御は容易ではない。これまで糸状菌における菌糸ペレット形成の生物学的な機構やその形成因子については不明であり、生物側からの汎用的なペレット制御技術は存在しなかった。

筆者らは細胞壁を標的とした抗真菌剤の開発過程においてモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁多糖 α -1,3-グルカン (AG) が菌糸細胞接着因子であることを見だし、本菌の AG 合成酵素欠損株 (AG 欠損株) の菌糸が液体培養で完全分散することを示した²⁾。産業糸状菌の麹菌 *Aspergillus oryzae* においては、AG に加えガラクトサミノガラクトン (GAG) が第2の菌糸接着因子であることを見だし、AG と GAG の二重欠損株 (AG-GAG 欠損株) を育種して、麹菌の菌糸完全分散に世界で初めて成功した (図1)³⁾。麹菌 AG-GAG 欠損株は低酸素条件でも溶菌せず、野生型株および AG 欠損株よりも優れた酵素生産性を示し、ジャー型発酵槽 (3L) においても AG-GAG 欠損

筆者紹介：ほりぐち・ひろふみ (HORIGUCHI, Hirofumi) 合同酒精(株) 酵素医薬品研究所 (Enzymes & Pharmaceuticals Lab., Godo Shusei Co., Ltd.) 所長 2001 年京都大学大学院農学研究科博士後期課程修了 博士 (農学) 専門：応用微生物学
連絡先：〒271-0064 千葉県松戸市上本郷字仲原 250 番地 E-mail: h-horiguchi@oenon.jp (勤務先)
かとう・よしかず (KATO, Yoshikazu) 佐竹マルチミクス(株) (SATAKE MultiMix Corp.) 常務取締役 1995 年東海大学工学部機械工学科卒業 専門：化学工学・流体工学 連絡先：〒335-0021 埼玉県戸田市新曽 66 E-mail: kato01@satake.co.jp (勤務先)
あべ・けいえつ (ABE, Keietsu) 東北大学大学院農学研究科農芸化学専攻 (Dept. of Agr. Chem., Tohoku Univ.) 教授 1981 年東北大学農学部農芸化学科卒業 博士 (農学) 専門：応用微生物学
連絡先：〒980-8572 仙台市青葉区荒巻字青葉 468-1 E-mail: keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp (勤務先)

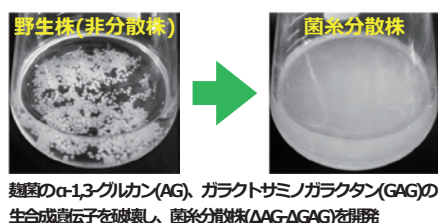


図1 菌糸分散株の培養性状

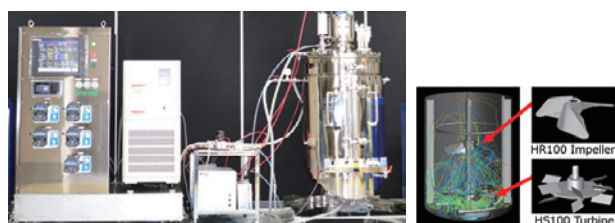


図2 高効率シングルユースバイオリアクター

株は野生型株に比べて酵素生産性が約2倍高かった⁴⁾。Computational Fluid Dynamics (CFD) シミュレーションによる培養槽内の流動解析の結果、野生型株はその高粘度性のために攪拌翼周辺と槽外部で流動が分断されるのに対して、低粘度の AG-GAG 欠損株の培養液は培養槽内全域にわたる流動を形成し高いガス分散性を有することが示された^{4), 5)}。AG-GAG 欠損株では、低粘度性と菌糸分散が菌体の高い酸素利用につながり、酵素の高生産性に寄与した⁴⁾。多くの糸状菌が AG と GAG の一方または両方を有しており、本技術は多様な産業糸状菌に適用可能であり、産業界で育種改良を重ねてきた株への導入も可能な技術として、広範な利活用が考えられる⁶⁾。

2. 高効率バイオリアクターの開発とシングルユース化

糸状菌の培養は高粘性の非ニュートン流体であることから、商用生産として大量培養を行う上で流動性、均一分散性の改善が求められてきた。前項では、麹菌菌糸分散株の研究成果として、粘性の低減と共に流動性の向上を明らかにした。一方、これを攪拌培養するためのリアクターの改善も重要であり、従来の槽内分割型フローパターンを形成する6枚フラットタービン(6FT)の多段取り付けでは、多くの問題を抱えていた。6FTは、通気培養条件下において、翼背面の負圧部の影響により吐出能力、ガス分散能力が著しく低下する。さらに、高粘性非ニュートン流体を小翼径にて高速回転させることで、翼周りのみ流動し、槽外周に向かってより流動性が悪化する。攪拌技術的には、このような物性の液体を扱う場合は広幅の大型翼を低速で用いるが、前項で述べた通り、産業化における生産スケールは数十～数百kLにも及ぶ。このような大スケールでの大型広幅翼の運用は、コスト面で有用とはいえない。このため、翼背面の負圧を抑制し、よりガス分散性が高く、低動力特性を有し、大翼径での運用

を可能とする HS100 タービンと、上段翼は垂直方向の流動性を強化した高吐出型の軸流翼 HR100 インペラを組み合わせた HSF リアクターを用い、CFD シミュレーションと実培養を繰り返し、本培養系に最適な諸条件を確立した。同時に、NEDO 事業の最大の目的でもある社会実装に向け、新規参入の障壁となる初期検討段階でのコスト抑制を目指し、通常パイロットスケールのバイオリアクターに求められる滅菌・洗浄工程を極力簡素化したシングルユースバイオリアクター (SUB) を開発し、パイロットスケール (全容 200L) におけるバイオリアクター的大幅なインシャルコスト削減を果たした。なお、SUB では、従来のステンレス製培養槽に変わり、溶出証明を取得した USP クラス VI (米国薬局方の貿易機関が定めた要件を満たす純度の化学物質の最も厳しいグレード) 医療プラスチック材・ビニール材を、ガンマー滅菌した使い捨てバッグが用いられるが、このバッグが非常に高額であり、ランニングコスト面で不利となる。これを解決するため、新たなオゾン滅菌法⁷⁾を開発し、コストのかかるタービンやインペラ、軸、バッフル等の付帯設備はリユースとし、培養槽のみ使い捨てバッグとしたハイブリッド型の SUB として製品化した (図2)。これにより、従来必要設備であったユーティリティ (スチーム滅菌設備等) が不要となり、半固定でどこでも移動可能な装置として、設備のない部屋での運用が可能となった。

以上、筆者らが開発した麹菌菌糸分散株により流動性を向上させ、装置面からも低動力で流動性、ガス分散性 (ガス吸収性) に優れた HSF リアクターにより、極めて効率的な培養生産の可能性を得た。同時に、ハイブリッド型の SUB を開発することで、バイオリアクター導入コストを大幅に抑制することに成功した。

3. 麹菌プラットフォームについて

冒頭にも述べたが、麹菌をはじめとする糸状菌は世

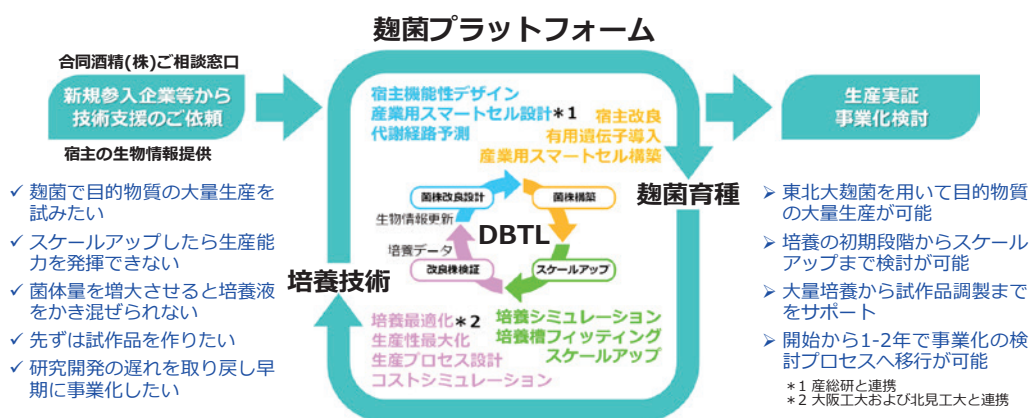


図3 麹菌プラットフォームの構成

界的にも様々な有用物質の商用生産に利用されている一方、新規参入を考えている事業者にとっては小スケールでの研究開発はもとより、スケールアップに至っては非常にハードルが高く容易ではない。本事業の麹菌プラットフォーム構築（図3）においては、前述の菌系分散株のさらなる高度化や活用の促進、また、ハイブリッド型高効率 SUB を例とした最適培養法の適用や低コスト化による参入障壁の低減を進めていきたいと考える。さらに、筆者らは麹菌をはじめとした糸状菌での商用実機による有用物質の実製造を年間数十バッチで実施するとともに、長きにわたる糸状菌ものづくりでの商用化プロセス開発経験を有するため、利用者の目的・要望に沿った初期開発から生産プロセス設計に至るまで支援できる体制が構築可能であると考えている。

加えて、本事業で開発を進めている産業用スマートセル構築に資する情報解析技術（主として（国研）産業技術総合研究所）との連携や、同じく事業内での大阪工業大学バイオものづくりラボや北見工業大学の AI による培地最適化システムとの親和性についても実証を進めており、筆者らの枠内に留まることなくプラットフォームを高度化し、利用者の具体的要請に応えられる体制の構築を進めている。

おわりに

バイオものづくりプロジェクトの研究開発は様々な要素技術が完成を迎えつつある。筆者らは、今回紹介した要素技術を核とした麹菌プラットフォームを確立

し、バイオ由来製品の社会実装を推進するためのバイオものづくり技術拠点（麹菌ものづくりベース）の形成を目標とする。拠点形成の使命は、多くの産業分野と交流し多様化を進めることであり、本技術をバイオ生産に幅広く利活用していただくことで酵素をはじめとした有用物質の大量生産、未来の食糧源、革新的な医薬開発、農薬の給源など日本のバイオものづくり産業の発展へ貢献することを目指す。

参考文献

- 1) NEDO バイオものづくりプロジェクト <https://www.jba.or.jp/b-production/>
- 2) Yoshimi A. *et al.*: Functional analysis of the α -1,3-glucan synthase genes *agsA* and *agsB* in *Aspergillus nidulans*: *agsB* is the major α -1,3-glucan synthase in this fungus, *PLoS ONE*, 8(1), e54893(2013)
- 3) Miyazawa K. *et al.*: Both galactosaminogalactan and α -1,3-glucan contribute to aggregation of *Aspergillus oryzae* hyphae in liquid culture, *Front. Microbiol.*, 10, 2090(2019)
- 4) Ichikawa H. *et al.*: Improved recombinant protein production in *Aspergillus oryzae* lacking both α -1,3-glucan and galactosaminogalactan in batch culture with a lab-scale bioreactor, *J. Biosci. Bioeng.*, 133(1), 39~45 (2022)
- 4) 薄田隼弥ら：麹菌菌系分散株の通気攪拌培養における混合時間の測定，日本生物工学会 2023 年度大会要旨集，275(2023)
- 5) 阿部敬悦ら 特許第 6647653 号，米国特許 USPT11021725 B2，欧州特許 公開番号 3620509(登録中)
- 6) 加藤好一 特許第 7422925 号



バイオフィアウンドリにおける 微生物培地最適化ツール開発



小西 正朗

はじめに

微生物によるバイオ生産プロセスにより製品を製造する場合、目的物質を効率的に生産するスマートセル（代謝設計された細胞）を育種することに加えて、培養工程（生産プロセス）を設計し、製造設備で現実的な生産効率を安定的に達成することが重要である。微生物を培養するためには、栄養成分が含まれる培地を調合し、その培地に無菌的に微生物を植え付け、目的物が最大化する物理化学条件で培養する必要がある。よって培地は微生物を培養する際に最も基礎的な条件の1つを構成していると言える。微生物の探索や育種に使用する培地が必ずしも生産に向いているとは限らない。製造プロセスで用いるバイオリアクターは、微生物探索や育種で用いる試験管やフラスコと比べて、通気効率が高く、制御により、培地の pH や溶存酸素を適正值付近で維持し、培地の流加ができることから、小スケール培養では問題になりにくい栄養成分の枯渇が生じやすい。効率的に培養工程を開発するためには、製造プロセス開発の初期段階で目的物質生産に適した培地を迅速に設計するとともに当該スマートセルの培養特性を把握することが重要である。

1. 人工知能支援培地最適化システムの開発

（国研）新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）のカーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発では、微生物探索、育種、プロセス開発を含むバイオ生産プロセス開発の各開発

工程におけるボトルネックを解消する技術開発ならびに体制構築を進めている。

筆者らの研究グループはプロセス開発の初期段階における培地最適化を加速する手法およびシステムの開発を推進している。特に育種されたスマートセルや新たに分離された株は培地特性が十分に把握できていないことが多い。従って株ごとに適切な培地を設計することが望ましい。しかしながら、培地は多数の成分で構成され、調合し得る培地の多様性はその成分数のべき乗で増加するため、短時間で全ての条件を網羅して実験的に評価できない。また、異なる微生物宿主や目的物質の間の培地の共通性が低い。すなわち、株ごとに実際に培養し、その特性を把握した上で最適な培地組成を見いだす必要がある。多変量の培地組成と増殖や物質生産との関係は、従来の演繹的な数学モデルで説明することが難しく、データ駆動型（帰納的な）人工知能（AI）での課題解決が適している。

一般的に、AI は質が高く（再現性が良く）、多様性に富んだ学習データが大量に存在している場合に精度が高いモデルが構築できる。その必要量はデザインスペースの大きさ（目的変数に影響を与える変数の数や探索範囲の幅）によって変動し、それが大きいほど、多量のデータが必要である。一方でバイオプロセス開発の初期段階における培地最適化において、データ収集に投入できる人的、時間的資源は限られる。従って、現実的には、短期間でかつ少ない労力で AI 学習に必要な培養データを収集する必要がある、学習データ量が不足する状態でも AI モデルを構築し、対象微生物

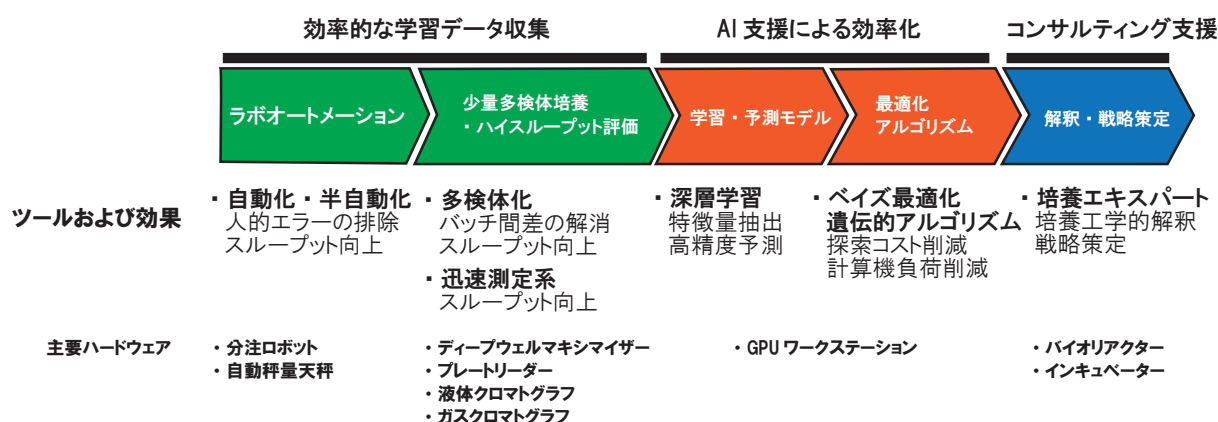


図1 AI支援培地最適化システムの構成

の培地特性や適正な培地組成を見いだす必要がある。筆者らのグループでは、このような状況で効率的な培地最適化を達成するためのシステムとして、培地調合の自動化、培養試験に小スケール多検体培養法、深層学習モデルおよび最適値探索アルゴリズムによる最適培地探索システムを提案している（図1）。本システムの概念実証をするため、組換え大腸菌による緑色蛍光タンパク質（GFP）生産系をモデルとして、M9合成培地にアミノ酸やビタミンを加えた計31成分の培地組成の最適化を試みた¹⁾。81条件の培養実験データを学習データとする深層学習モデルを構築したところ高い予測精度が得られた。またベイズ最適化を用いて最適な培地組成を探索すると、複数の候補が得られた。実際に予測された培地を調合し検証したところ、当初培地より2倍高い生産性を示す培地が見いだされた。コリネ菌の増殖の最適化にも活用し初期培地を設計するとともに、得られた培養特性情報ならびに従来の物質収支モデルによる演繹的設計を併用し、流加培養法を提案した。その結果、短期間で菌体生産効率が高い高密度培養法を提案できた²⁾。さらに、学習データ不足から生じる不適切な予測モデルの発生に対応するため、学習モデルの多様性の評価を含めた計算フレームワークも提案している³⁾。

2. 社会実装に向けた取組み

本プロジェクトでは、共通基盤技術をバイオ生産プロセス開発企業（開発企業）が利用できる研究開発支援体制の構築を最終目標としており、AI支援培地最適化技術も開発企業が自由に活用できる体制を目指している。本年度からデモソフトを体験可能なWebツ

ルの開発も始めており、2025年度中にはデモデータでAIモデルの計算を体験できるように整備する計画である。一方、これまでの概念実証研究において、宿主や目的とする生産物によって定量法を変更する必要がある他、データサンプリングのタイミング、培地組成や探索の範囲など研究計画全体の設計において、培養工学的なノウハウに基づいた工夫や検討が必要であることがわかっている。開発経験が少ないベンチャー企業などの支援においては、技術コンサルティング機能を備えたサテライト拠点の形成を検討している。

おわりに

AIを活用した培地組成の最適化により生産性が改善するだけでなく、重要成分分析により、培養特性が明らかになる。このことは後段のプロセス開発のみならず、育種においても重要な情報を与えることもある。培地最適化は上流の微生物スクリーニングや育種と下流のプロセス開発をつなぐハブ的な役割を果たす。

参考文献

- 1) Yoshida K. *et al.*: High throughput optimization of medium composition for *Escherichia coli* protein expression using deep learning and Bayesian optimization, *J. Biosci. Bioeng.*, 135(2), 127~133(2023)
- 2) Konishi M.: High cell density cultivation of *Corynebacterium glutamicum* by deep learning-assisted medium design and the subsequent feeding strategy, *ibid.*, 137(5), 396~402(2024)
- 3) Watanabe K. *et al.*: Optimization of medium components for protein production by *Escherichia coli* with a high-throughput pipeline that uses a deep neural network, *ibid.*, 137(4), 304~312(2024)



バイオものづくりの社会実装を支援する基盤技術開発 データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステムの 研究開発



小川 順

はじめに

バイオものづくりの社会実装による、カーボンリサイクルの実現とバイオエコノミーの振興が期待されている。この機運の端緒となったスマートセルプロジェクト（「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」（国研）新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）：2016-2020 年度）では、デジタル技術等の活用により生物機能が最適化された細胞“スマートセル”の技術構築が行われた。これを受け、スマートセル技術等を実生産規模へ適用すべく、「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発（以下、NEDO バイオものづくり PJ）」¹⁾にて、培養・スケールアップに関連する様々なボトルネックを克服すべく、「データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム（Data-driven iBMS (integrated Bioproduction Management System)）」の研究開発（以下、本 PJ）」が進められている。2020～2026 年度の実施となる本 PJ について、その成果と課題についてまとめる。

1. バイオプロセス開発過程の連結を目指して

本 PJ では、バイオものづくりプロセス開発の期間短縮を目指し、これまで乖離傾向にあったバイオプロセス開発過程「探索・育種・培養・生産」を、培養技術を核として連結する試みが実施されている。図 1 に、バイオ技術の社会実装に想定されるボトルネックを解決するために組織された本 PJ の構成、ならびに

現時点の成果の例を示した。

本 PJ には、多数の企業、大学、国立研究機関等が参加することから、連携の根底をなす解析基盤・データ基盤の構築を目指して、培養装置情報の共有やデータ形式の統一が議論されてきた。また、新規参入企業が活用しやすい基盤情報を提供すべく、情報共有可能なモデル株を用い、標準的な培養装置を活用した培養起点のバイオプロセス開発が実施されている。

例えば、大阪大学、大阪工業大学、北見工業大学が主導した油脂酵母モデル株を用いた取組みにおいて、最適培地組成の決定法、培養制御の方法論が示されるとともに、「培養・育種・探索」を連結すべく、培養データからの育種対象遺伝子抽出、優良遺伝子探索といった、一連の連携研究が行われた。他にも、汎用宿主大腸菌の培養特性比較データといった培養側からの情報を起点に、バイオプロセス開発過程の連結が模索されている。加えて、これらの研究開発過程のワークフロー化、知財を配慮した上でのデータ公開による開発支援が試みられている。

2. バイオものづくりを支援する基盤技術開発

統合される個々の基盤技術についても、先進的コア技術・ツール群の開発が進んでいる。以下に、「探索・育種・培養・生産」における、開発事例を挙げる。

【探索技術：研究項目 1】

1) 機能探索用微生物パウダー活用技術（京都大学、

筆者紹介：おがわ・じゅん（OGAWA, Jun） 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻（Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto University）教授 1995 年京都大学大学院農学研究科博士課程修了 博士（農学） 専門：発酵生理および醸造学・応用微生物学 連絡先：〒606-8502 京都市左京区北白川追分町 E-mail：ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp（勤務先）

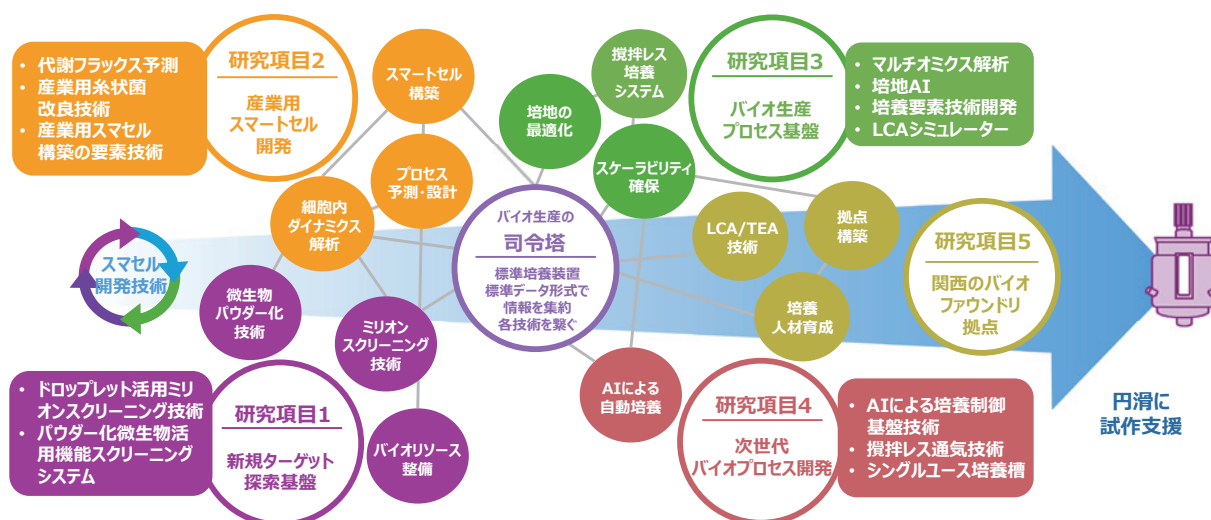


図1 「データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステムの研究開発」PJの構成と成果例

(独)製品評価技術基盤機構 (NITE) など)

培養工程をスキップでき、一次スクリーニングに適した菌株多様性を有する探索ライブラリーの構築と、複合酵素系探索などへの応用レシピの開発

2) ドロップレットを用いた迅速・高効率なスクリーニング技術 (ミリオンスクリーニング技術) (長岡技術科学大学、(国研)産業技術総合研究所 (産総研)・(株)オンチップ・バイオテクノロジーズ、(株)ニコンソリューションズなど)

ドロップレットを用いた微生物培養とドロップレットソーティングによる高速選抜の実現、ならびに、複合微生物系への展開による未培養・難培養微生物の可培養化技術の向上。

【育種技術：研究項目2】

1) 情報解析に基づくロバスト産業微生物の設計技術 ((国研)理化学研究所 (理研)、産総研など)

- i) 代謝ダイナミクス予測を用いた改変すべき反応の提案
- ii) 発酵槽における培養生産安定化のための遺伝子発現解析技術
- iii) AI代謝予測にもとづく高生産性を担保する培養キープ因子・条件の提案
- iv) 可溶性効率やロバスト性の向上を実現するタンパク質デザインによる酵素の高機能化・活性化

2) 宿主特化型基盤技術開発

- i) 高機能コリネ菌の活用 ((公財)地球環境産業技術

研究機構 (RITE) など)：未利用資源由来原料の利用能力、毒性を示す物質への耐性能力に長けた、コリネ菌の育種・利用技術開発

- ii) 麹菌の育種・培養技術の開発 (東北大学・合同酒精(株)・佐竹マルチミクス(株)など)：大量培養で菌糸塊を作りにくい菌糸分散株を作製する麹菌育種技術の開発とタンパク質高生産への応用、ならびに、高粘性糸状菌培養に対応した高効率シングルユースパイオリクターの開発

【培養・プロセス開発支援技術：研究項目3】

1) 培養データに基づくプロセス開発技術 (大阪大学、九州大学、大阪工業大学など)

培養視点からのバックキャスト、ならびにプロセスデザインからのバックキャストによる、探索・育種から培養までの総合開発支援技術

- i) 培地のターゲット分析技術開発とルーティーン化
- ii) 細胞内の高深度メタボローム分析技術 (ターゲット分析)
- iii) 排ガスによるリアルタイム培地モニタリング技術
- iv) ノンターゲット分析技術 (培地成分のカタログ化、AI制御対応データの集積)

2) LCA/TCA シミュレーター (東京大学など)

将来の課題を現時点で先取りして未来戦略を設計するための技術

- i) シミュレーター：Hot spot 分析、感度解析、排出原単位/使用電力などのデータベース構築

- ii) スケールアップ時の予測：設備／ユーティリティの変化の見える化

【次世代生産技術開発：研究項目 4】（㈱ちとせ研究所など）²⁾

機械学習による培養状態の把握と最適化技術。AI 自動制御を究極の目標とする次世代培養技術の構築。

- i) 新規センサーデバイス群の開発
- ii) 多次元データの機械学習への落とし込みと、培養の予測技術（ソフトセンサー）・最適制御技術（制御モデル）の開発

上記以外にも、大腸菌・油脂酵母・タンパク質高生産糸状菌の育種技術開発（UBE ㈱、不二製油㈱、花王㈱）や、AI 支援培地最適化技術（北見工業大学）、ロドプシンを活用する光駆動 ATP 生産系のバイオものづくりへの導入（㈱ 396 バイオ）など、様々なバイオものづくりを支援する基盤技術が開発されている。

3. データ連携の課題とデータ駆動の実現に向けた取組み

本 PJ では、データ連携によるバイオプロセス開発工程の統合を目指した取組みが展開されているが、多機関を巻き込んだ解析基盤の共有、データ連携の難しさに直面している現実もある。この状況を克服し、新規参入企業等が活用しやすい解析基盤の構築と、それを介したデータ共有の可能性を模索すべく、利用障壁が低いアプリの開発や共有が容易なデータ基盤の導入が企画されている。

1) 培養データ解析、表示支援アプリ（BMDS）（大阪工業大学）³⁾：培養データの収集、解析、図示を省力化し、実験条件最適化を実験計画法およびベイズ最適化のアルゴリズムにより提案することで、開発期間短縮につなげるアプリ。

2) 微生物探索のためのデータ基盤・解析アプリ（NITE、九州大学）

- i) ScreenHit：スクリーニング実験およびスクリーニングで見いだされた菌株とゲノムの情報を共有するデータ基盤
- ii) 微生物選定支援アプリ：既知の微生物の培養条件から、新規微生物のおよその培養条件を検討できるアプリ。微生物を培養条件から検索するアプリ。

3) 培地最適化支援アプリ（北見工業大学）：パラメータの多さからハードルが高い DX を活用した培地最適化を体験できるアプリ。

このほかにも、新規参入企業にはハードルが高いフラックスバランス解析をプログラミングなしに体験できるアプリも企画されている（理研、産総研）。

データの集積に関して、現時点では、柔軟な対応が開発の阻害因子の排除に機能すると考え、既存共有基盤と各アプリに紐づいた独自基盤とを、おのおのの開発者・利用者が選択できる方向で議論を進めている。

おわりに — バイオものづくりの社会実装確率向上に向けて —

バイオものづくりを支援する技術はこれまでも様々なに開発されてきたが、開発された装置、微生物などの有形物や、特に技術やノウハウ等の無形の成果が属人的になりがちな傾向があった。これらの技術を広く活用するための仕組み作りも重要であり、他の NEDO 事業とも連携した事業化、拠点化のデザインが、NEDO との協議のもとに試みられている。

加えて、提供される技術を使いこなせる人材の育成、教育現場や試作実施の場となるファウンドリの構築も重要である³⁾。

さらには、それぞれの開発技術に興味があるユーザーに、適確に技術を紹介する窓口の整備も重要となる。本 PJ の成果で「何を解決できるか」、それが「どのような形で提供されるか」を積極的に発信すべく、ユーザーが手軽に使用できるアプリの開発機関（大阪工業大学など）を窓口に、また、開発技術情報を公共性を持って効率的に収集できる機関（（一財）バイオインダストリー協会（JBA）など）を軸に、本 PJ で開発される最先端の基盤技術を統合し技術の提供を支援する、総合的なバイオ生産マネジメントシステム（iBMS）の構築が模索されている。

参考文献

- 1) 峯岸美有子：カーボンリサイクル実現を加速する「バイオものづくり」関連技術開発、本誌、82(3)、336～339 (2024)
- 2) 河合哲志：機械学習による培養状態の把握と最適化、本誌、82(5)、517～518 (2024)
- 3) 長森英二ら：関西圏バイオファウンドリ — 大阪工大・大阪大学拠点一、本誌、82(4)、435～437 (2024)



バイオものづくりに役立つ メタボローム分析技術の開発



松田 史生



馬場 健史



福崎 英一郎

はじめに

NEDO バイオものづくりプロジェクト¹⁾では、バイオ生産プロセスの開発期間短縮化を目指し、生産規模が拡大した研究開発ステージに進んだ段階で、根本的な技術変更が求められる「手戻り」を防ぐための技術群の開発が進められている。特に、開発段階のスマートセルを、産業スケールでの培養を想定した培養装置・培養条件で評価し、手戻りの原因となる問題を早期に発見する必要がある。それには細胞外の培地中成分を測定する様々な分析技術が必要となる。

そこで、バイオ生産プロセスの評価・最適化の高度化に資するメタボロミクス分析技術として、1) 高精度培養計測技術、2) 発酵モニタリング技術、3) 培地成分ノンターゲットメタボロミクス技術の開発を進めているのでその概要を紹介する。

1. 高精度培養計測技術の開発

産業スケールでの培養では細胞が高密度化すると、細胞が消費する培地中基質（無機塩、糖、アミノ酸など）の枯渇が起きる可能性がある。また、産業スケールでの培養では様々なストレスが加わることから、細胞が目的物以外の副産物（有機酸など）を生産することもあり得る。これらの問題発見には、事前に測定対

象として定めた数十種の無機塩、糖、アミノ酸等の培地中濃度を測定するターゲット分析技術が必要とされる。特に細胞の物質収支を明らかにするには、培地中ターゲット化合物の濃度の正確な定量が求められる。また、正確な濃度定量データは、複数の研究機関や時期の間で比較可能となることから、データとしての利用価値が高まる。さらに、このようなターゲット分析技術は、スマートセルの開発初期段階から産業スケールでの培養まで全ての段階で必要となるルーティーン of 分析項目とことから、バイオものづくりへの参入を目指す企業などが導入しやすい計測技術であることが望まれる。

そこで、目的とするデータを取得するために最も好適な高速液体クロマトグラフィー（HPLC）と各種分光検出器を組み合わせたシステムの構築を試みた。九州大学では、無機塩、有機酸、アミノ酸などをターゲットとする4種の分析条件を培地分析用に最適化し、全42種培地成分の定量を可能とした（図1）。大阪大学でも同等の分析系を構築した。次に、本プロジェクトで共同研究を実施している大阪工業大学拠点で実施した油脂酵母（*Lipomyces starkeyi*）野生株を24連ジャーで培養した培地サンプルの計277サンプルの分析を九州大学、大阪大学で別個に行い、結果を比較することで定量値の妥当性を確認した。さらに、

筆者紹介：まつだ・ふみお（MATSUDA, Fumio）大阪大学大学院情報科学研究科（Grad. Sch. of Info. Sci. and Technol., Osaka Univ.）教授 2002年京都大学大学院農学研究科博士課程修了 博士（農学）専門：代謝計測

連絡先：〒565-0871 吹田市山田丘1-5 E-mail: fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp（勤務先）

ばんば・たけし（BAMBA, Takeshi）九州大学生体防御医学研究所（Med. Inst. of Bioregulation, Kyushu Univ.）教授 2001年大阪大学大学院工学研究科博士後期課程単位取得退学 博士（工学）専門：分析化学・メタボロミクス

連絡先：〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1 E-mail: bamb@bioreg.kyushu-u.ac.jp（勤務先）

ふくさき・えいいちろう（FUKUSAKI, Eiichiro）大阪大学大学院工学研究科（Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ.）教授 1985年大阪大学大学院工学研究科博士前期課程修了 博士（工学）専門：メタボロミクス

連絡先：〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1 E-mail: fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp（勤務先）

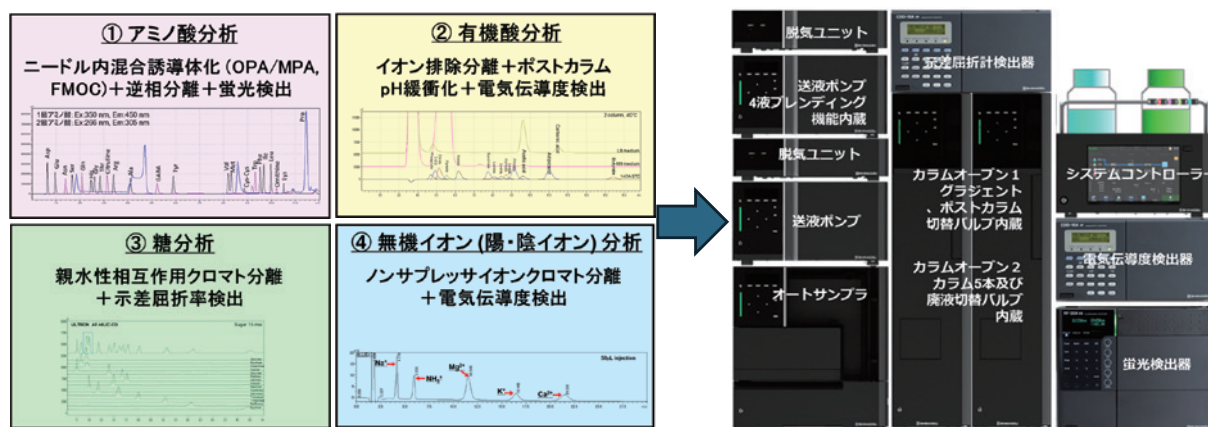


図1 4種の培地分析法を統合したHPLCシステムの概要

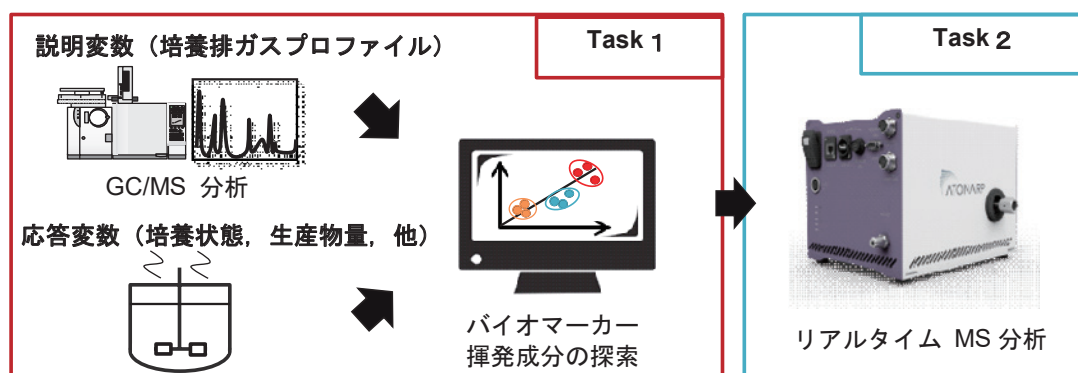


図2 発酵モニタリング技術の概要

L. starkeyi 野生株の高密度培養時に枯渇する制限基質の特定にも成功した。

また、九州大学でこれらの計測法とノウハウを1台の分析装置に詰め込んだ培地分析用マルチHPLCシステムを(株)島津製作所と共同で開発し、上市を目指した検討を進めている(図1)。バイオものづくりへの参入を目指す企業は、本システムを導入することで、開発したノウハウも含めた高精度培養計測技術が利用可能になると期待される。

2. 発酵モニタリング技術の開発

産業スケールでの培養プロセスでは、発酵状態を濁度、pHセンサーなどを通じて常時モニタリングして、効率的に運転するための指標として用いられている。そこで、発酵モニタリングの新たな対象として、排気ガスに着目した。産業スケールでの培養プロセスでは、培地への酸素供給のため通気および排気が行われ

る。また、排気ガスには独特の臭気があり、発酵状態を反映して変化することが経験的に知られている。そこで、培養排ガスプロファイルを取得し、これを説明変数として培養状態や、生産物濃度を応答変数とする回帰モデルを構築して、バイオマーカー成分を同定し、ついで小型の質量分析装置を用いたリアルタイム計測法でこれを測定する技術の開発を進めている(図2)。これまでに、連続抽出したストリップングガスを濃縮して測定することに成功し、オフラインサンプルからの培養排ガスプロファイル取得を可能として、*L. starkeyi* 野生株の油脂生産量や、タンパク質生産組織換え大腸菌のタンパク質生産量を予測するバイオマーカー成分の同定に成功している。現在、培養排ガスをリアルタイム計測するための高感度化および質量分析装置の小型化に取り組んでいる。将来的には、知財化した要素技術をバイオものづくり企業やバイオファンドリに展開してバイオものづくりの社会実装の底上げ

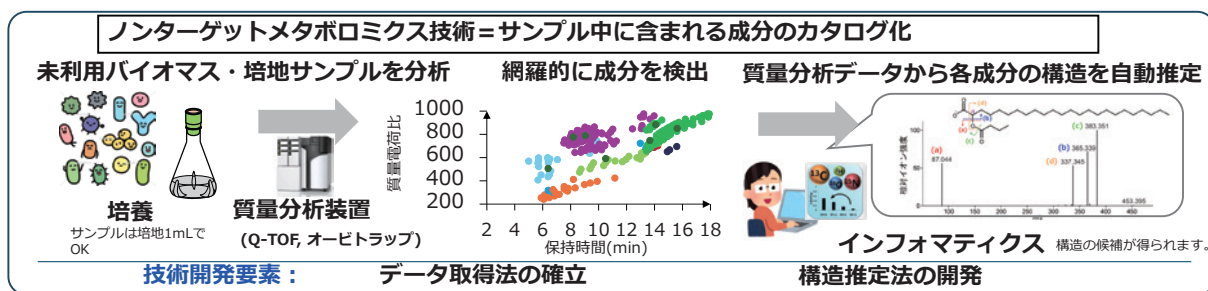


図3 培地成分ノンターゲットメタボロミクス技術の概要

につなげたいと考えている。

3. 培地成分ノンターゲットメタボロミクス技術

産業スケールでの培養では、プロセス中の未知の要因により、細胞の生育、発酵阻害が生じることがある。また、未利用バイオマス資源の前処理過程で未知の発酵阻害物質が生成することもある。これらの問題の解決には、発酵阻害が生じる培地中に特異的に含まれる成分を探索し、その構造を推定するノンターゲット型のメタボロミクス分析技術が必要となる。一方、培地中の未知成分の探索はワンポイントリリーフ的に行われることが想定される。また、ノンターゲット型のメタボローム分析技術に必要なタンデム型質量分析装置は高価かつオペレーションの難度も高いことから、高性能装置が拠点に設置され各企業・大学からの受託分析が行われると想定した。そこで、親水性他代謝物と疎水性代謝産物を検出、構造情報を網羅的に取得するノンターゲットメタボロミクス法を未利用バイオマス分析用に最適化する作業を進めている。また、企業ユーザーが解釈しやすくするため、得られたプロダクトイオンスペクトルから、化合物名を推定し、さらに

化合物構造として可視化するデータ解析パイプラインの構築を進めている (図3)。

おわりに

バイオものづくりの社会実装には、「育種」、「培養の良し悪し」などのプロセス最適化が必須となるが、バイオものづくり企業では、必要なメタボローム解析を実施してみたいが技術的障壁・導入コスト・維持費が高く、人材もない、最新装置でのメタボローム情報を取ってみたいが、そのようなサービスがない、未知の機能性代謝物を見つけるためにノンターゲット解析に挑戦してみたいがデータ解析の知識がない、などの課題がある。それには、人材育成・技術移転サービスや、受託分析を担う“代謝計測ラボ”のような拠点施設を半官半民で構築していく必要があると思われる。本プロジェクトで開発した技術は、装置の市販化や拠点化拠点を通じて、バイオものづくり産業の創出と発展に寄与することが期待される。

参考文献

- 1) NEDO バイオものづくりプロジェクト HP
<https://www.jba.or.jp/b-production/>



バイオものづくりプロジェクトから 植物バイオファウンドリ事業化へ向けての挑戦



西田 尚子

はじめに

(国研)新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」(以下、本事業)において、千代田化工建設(株)は2022年度から、植物を用いて有用タンパク質を生産する大量生産技術の開発を進めており、その実証運転のための設備を建設した。本稿では、当社が本事業に応募した背景、現在の開発概要、および今後の「植物バイオファウンドリ」事業化の構想を紹介する。

1. 社会課題をとらえて

当社は開発着手前の探索活動の中で、生物機能を活用して物質を生産する「バイオものづくり」技術と、その技術が支えるバイオインダストリーの発展に将来性を見だし、遺伝子組換え生物による物質生産で用いる宿主として、植物が持つ可能性に魅力を感じていた。動物細胞と同じ高等生物である植物は、微生物では生産が困難な高分子タンパク質も作ることができ、アニマルフリーで生産できることや、動物細胞と比して生産コストの低減が可能であることなどを示唆する開発成果が、様々な研究機関等から多数発表されている。その一方で、植物を用いたバイオものづくりの産業化が進んでいない現状から、ラボ規模の成果を社会実装まで進める過程にハードルがあり、いわゆる「魔の川」「死の谷」と呼ばれる難関を超えるサポートができる仕組みを提供できれば、この社会課題を解決す

る一助になるのではないかと考えた。その頃、NEDO主導による微生物バイオファウンドリが着々と実装されつつあり、植物でも同様のコンセプトが成立するのでは、と背中を押されたのも事実である。

当社はプラントエンジニアリング企業として、様々な産業分野のプラント設計・施工に長年携わってきた。その中で商用化に向けてのスケールアップ検討業務に関わることも多く、ラボ～パイロット～商用化に至るスケールアップを円滑に進めることが顧客の商用化を加速化するために重要であることを認識している。一方、技術開発については、とりわけ植物を用いたバイオ分野の開発については経験が浅く、前述の社会課題の解決に手を挙げるには、開発部門も強化する必要があると考え、2022年度に本事業の追加公募に応募した次第である。

2. 開発内容

本事業では、これまで遺伝子組換え植物で事業化されてこなかった、翻訳後に種々の細胞内修飾が必要なヒト由来タンパク質を実証モデルタンパク質に設定し、タバコ葉の一過性発現系を用いた大量生産技術の開発および検証を行うこととした。このタンパク質の生産には、高分子量のタンパク質や、タンパク質上で起こる翻訳後修飾に必要な複数遺伝子を同時導入・発現させる高度な遺伝子技術が必要である。さらに、生産されたタンパク質を植物体から効率よく抽出し精製する技術、およびその分析評価技術の開発が必要となる。

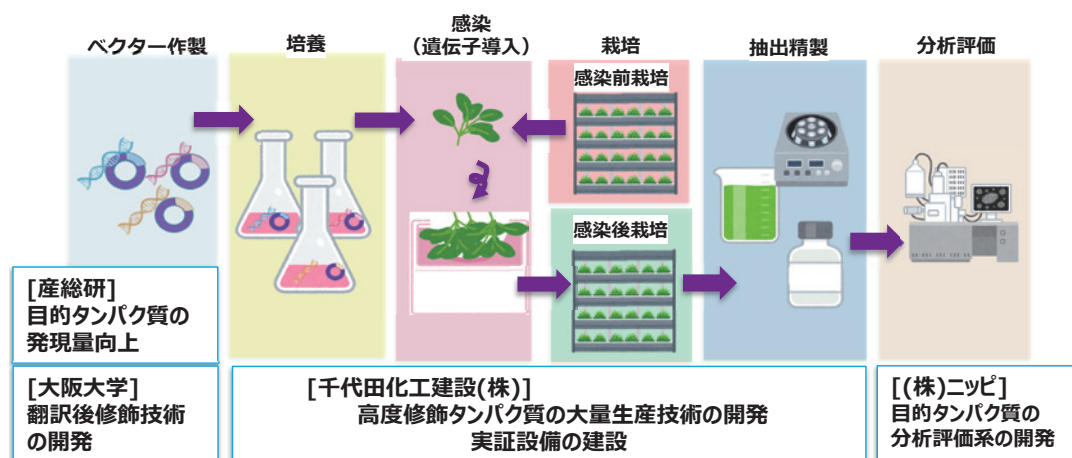


図 1 研究内容

開発項目として、植物による高度修飾タンパク質の、(1) 発現技術の開発、(2) 翻訳後修飾制御技術の開発、(3) 大量生産技術の開発、(4) 評価システムの開発、を設定した。(1) は、植物による有用物質生産の実績を有する (国研)産業技術総合研究所、(2) は、翻訳後修飾などに多くの研究実績を有する大阪大学、(3) は食品・医薬品製造工場・植物工場の設計・建設に多数の実績を有する千代田化工建設(株)、また (4) は食品からバイオ製品まで多くの商品を開発・上市する(株)ニッピが、それぞれ担当し連携しながら開発を進めている。

3. 社会実装をサポートする生産実証基盤 「植物バイオファウンドリ」の構築

本事業における実証モデルタンパク質の実証生産用

設備を当社敷地内に建設、2025 年 1 月末に建屋完成、2 月末に機器試運転完了、3 月～5 月の期間で実証運転を実施する予定である。

この実証設備は延床面積約 490 m² の鉄骨 2 階建てとしており、1 階では栽培～粗精製までの一連のプロセスを、数百 g～数十 kg (1 回処理量として) のタバコ葉栽培規模範囲で柔軟にスケールアップの検討をすることが可能で、カルタヘナ法対応の設備としている。また 2 階には精製専用エリア (室内清浄度 ISO8 クラス管理) を設け、さらに高度な精製が必要なケースに対応可能としている。また、2 階に開発受託室を設け、様々なラボ試験開発を実施し、その結果を 1 階の栽培規模でのスケールアップにスムーズにつなげることができるようにしている。

本事業は 2025 年 6 月末までで終了となり、それ以



図 2 実証設備外観

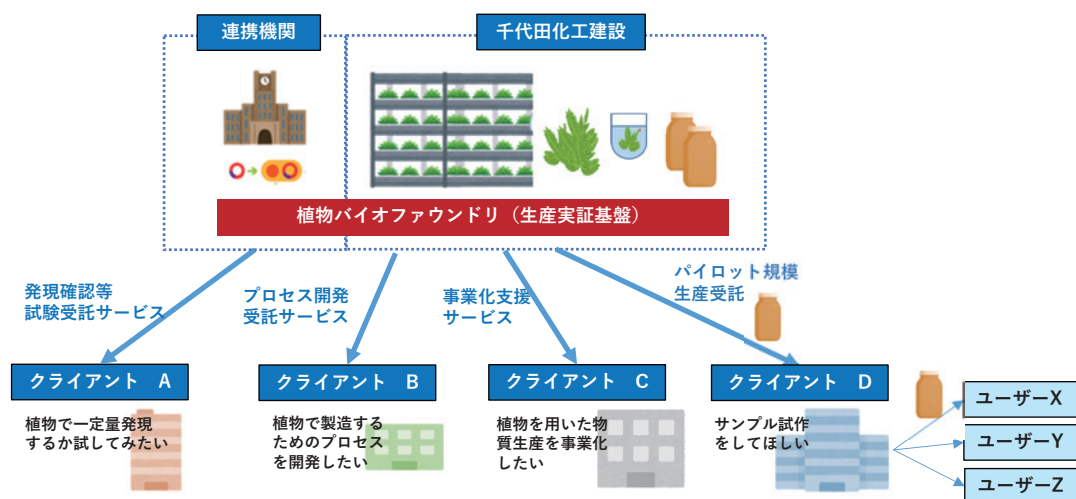


図3 植物バイオファウンドリ事業コンセプト

降は、本事業での開発成果として導入する、タバコ葉の一過性発現系システムを用いた「植物バイオファウンドリ」として、様々な企業の植物バイオものづくりをサポートする基盤施設としていく。

おわりに

2022年度から始めた本事業における生産技術開発を足掛かりに、植物バイオファウンドリと謳う生産実証設備を立ち上げるに至った。本設備を最大限に活用し、遺伝子の設計から生産プロセス開発までをシームレスに統合したサービス提供を実現するべく、今後も設備の整備と拡充を進めていきたい。植物を用いた生産が有効なケースとして、アニマルフリーを志向する製品群、例えば、機能性化学品・化粧品・医薬品原材料・再生医療等製品原材料などの領域に貢献できるの

ではないかと考えている。植物バイオファウンドリに興味・関心をお持ちの方に、ぜひお問い合わせいただきたい。

謝辞

今回の開発は、NEDO 事業「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発（産業用物質生産システム実証）」において「植物による高度修飾タンパク質の大量生産技術の開発」に対する補助金助成により遂行した。また、共同研究先機関である（国研）産業技術総合研究所の松尾幸毅博士、大阪大学生物工学国際交流センターの藤山和仁教授と梶浦裕之博士、および㈱ニッピ バイオマトリックス研究所の水野一乗所長と所属研究員の皆様に、この誌上をもって改めて感謝の意を申し上げる。



バイオプロセスを用いたローズ香料の 生産システム実証



青木 宏和



北出 幸広



乾 将行

はじめに

香料の歴史は古く、紀元前から珍重されていたが、19世紀までの香料産業においては、精油や天然抽出物を用いていた。19世紀後半の化学技術の著しい進歩に伴い、それら天然成分の化学構造が解明され、化学的に合成されたのをきっかけに、産業的に合成香料が開発された。同時にコストも下がり、一般の消費者にも手の届くものとなり、今では人々の生活にとって欠かせないものとなっている。

20世紀には化学技術の進歩により、化石由来の原料を用いた素材開発が進められてきたが、産業が拡大すると同時に大量生産、大量消費によって二酸化炭素排出量も増え、また環境への負担を強いてきたことも

否めない。

21世紀も四半世紀を過ぎようとする現在、SDGsの観点からも再び19世紀以前の炭素循環社会への回帰、さらにバイオエコノミー社会の実現のため、香料産業界における喫緊の課題として、合成生物学の活用は必須である。特に、香料素材は、その多くが、植物二次代謝産物であるテルペノイドやフェニルプロパノイドをはじめとする天然精油に含まれる天然物を手本として、それらに含まれる天然有機化合物やそれらの類縁体を化学的に製造し、活用してきた。従って、香料素材の多くは、生合成する遺伝子が明らかにされている場合が多く、合成生物学的アプローチによる産業化への障壁が最も低い分野であると考えられる(図1)。加えて、ターゲットとする価格帯も、製薬産業とバルク化

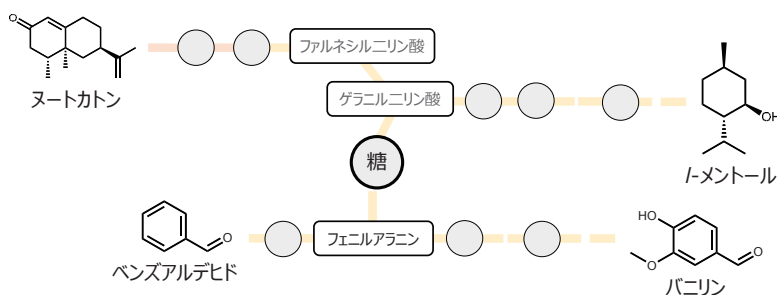


図1 香料素材と生合成ルート

筆者紹介：あおき・ひろかず (AOKI, Hirokazu) 高砂香料工業(株) (TAKASAGO International Corp.) 専任研究員 2000年東京工業大学大学院総合理工学研究科修士課程修了

連絡先：〒247-0014 神奈川県平塚市西八幡1-4-11 E-mail: hirokazu_aoki@takasago.com (勤務先)

きたで・ゆきひろ (KITADE, Yukihiko) (公財)地球環境産業技術研究機構 バイオ研究グループ (Molecular Microbiology and Biotechnology Group, Research Institute of Innovative Technology for the Earth) 主任研究員 2000年東海大学大学院海洋学研究科博士後期課程修了 博士(水産学) 応用微生物学

連絡先：〒619-0292 京都府木津川市木津川台9-2 E-mail: kitade@rite.or.jp (勤務先)

いぬい・まさゆき (INUI, Masayuki) 同上 グループリーダー、主席研究員 1988年広島大学大学院工学研究科博士前期課程修了 博士(工学) 微生物代謝工学・微生物発酵生産・バイオリファインリー・遺伝子発現制御

連絡先：〒619-0292 京都府木津川市木津川台9-2 E-mail: inui@rite.or.jp (勤務先)

学産業の中間に位置していることから、合成生物学を産業的に適用できる最適な分野である。

しかし、国内における合成生物学は特にゲノムライブラリー分野において、欧米に立ち遅れており、合成生物学を活用した国産の香料素材製造の産業化はいまだ実施されていない。

本稿では、高砂香料工業㈱が、NEDO プロジェクト「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」（以下、バイオものづくりプロジェクト）で2022年から開発に取り組んでいる産業用スマートセルおよび連続培養・連続精製法による三大フローラル素材の1つであるローズ系天然香料素材の高効率的生産システムの実証についてご紹介する。

1. 香料素材のバイオへの期待

香料素材は使用原料（資源）および製法により、主に①石油原料から化学合成で製造される香料素材、②天然原料や再生可能バイオマスから化学合成で製造されるバイオベース素材、③欧米の認可による食品添加物を目的としたナチュラルフレーバー素材、④精油や自然界からの単離抽出物に代表される天然香料、の4つのカテゴリーに分類される。それぞれ目的に応じ取引されているが、①を主とした現在の石油原料に依存した経済状況から、非石油原料から製造される②・③・④に切り替える社会的もしくは顧客要望は顕著に増加している。しかしながら、④天然香料を製造するためには大量の原料植物が必要であり、大幅な増産は困難である。また、天候などの影響による供給の安定性や価格変動に対する懸念が残る。一方、②・③では未利用資源や資源作物であるバイオマスを原料とするため、サステナビリティの考えに沿った大量生産が可能であり、①の代替として期待されている。さらに、エネルギー負荷・環境負荷の低い発酵法によるバイオものづくりを③に利用することは、サステナビリティ推進の観点から特に注目されている。

食品香料分野では、欧米を中心にナチュラルフレー

バー素材が求められており、2018年時点にて全世界で5,160百万米国ドルのナチュラルフレーバー市場があるとされ、今後も毎年5.2%の伸長が予測されている¹⁾。香粧品分野においても、化学合成に伴う環境問題や石油原料枯渇の問題はバイオベース製品への期待となり、その市場は2016年の6,474百万ドルから2025年には23,976百万ドルに増加すると見込まれている。特に化粧品顧客を中心にバイオベース製品が求められており、市場の拡大が予想される^{2), 3)}。

本事業により、再生可能なバイオマスから発酵法を利用してローズ系天然香料素材を開発できれば、ナチュラルフレーバー素材としての市場投入に加えて、バイオベース製品としても市場投入することが可能となる。

2. バイオプロセスによるローズ香料の生産システム実証への取組み

先に記した理由により、再生可能なバイオマスから発酵による香料素材の生産は強く望まれている。しかし従来、香料素材となる物質の多くはそのものが有する強力な抗菌作用により、微生物の生育は阻害される⁴⁾。そのため、微生物が香料素材の生成を開始すると、その後は十分に菌体が増殖することができず、このことが発酵法による生産を極めて困難にしている。

高砂香料工業㈱が取り組むNEDOバイオものづくりプロジェクトでは、この産業的障壁に挑戦し、ローズ香料の生産実証を行うため、(公財)地球環境産業技術研究機構(RITE)と協力した早期の事業化を目指している(図2)。

具体的には、RITEで開発された産業用スマートセルを用いた増殖非依存型バイオプロセスと、生産された香料素材による微生物生育阻害を回避するために高砂香料工業㈱で開発されたフロー連続単離法を組み合わせたプロセスを実施している。

増殖非依存型バイオプロセスは、菌体触媒(微生物)を調製する「培養フェーズ」と糖を目的物質に変換す

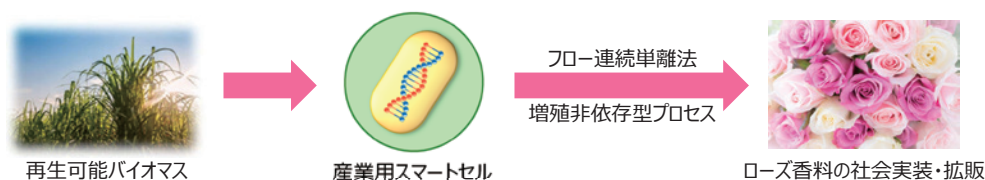


図2 事業化イメージ

る「生産フェーズ」を分けるコンセプトに基づいたバイオプロセスである。本プロセスは、微生物の増殖を抑制した状態で生産させるため細胞毒性の強い物質に対しても影響を受けにくい、菌体リサイクルができるため製造コストを下げられるというメリットを有する。また、これまでにエタノールやブタノールなどのバイオ燃料、乳酸やコハク酸などの有機酸、アラニンやバリンなどのアミノ酸、近年ではシキミ酸や4-ヒドロキシ安息香酸などの芳香族関連化合物の生産にも適用されている⁵⁾。

フロー連続単離法は、系内より生産物を連続的に単離する一連の生産プロセスシステムであり、弊社に蓄積された香気物質回収技術を応用した連続プロセスである。本プロセスを用いることで、スマートセルによる香料素材の高生産性を維持したまま、培養液中の香料素材濃度を極めて低い水準に抑えることができる。

2023年度までに、生産株の開発とフロー連続単離装置の改造によりローズ香料の生産性を飛躍的に高めることに成功した。2024年度は、生産株のさらなる改良、スケールアップ検討、生産条件の検討を進めている。

お わ り に

高砂香料工業(株)は「人にやさしく、環境にやさしく」を中長期ビジョン Vision 2040 に掲げている。本ビジョンを具現化するため「バイオものづくりプロジェクト」の中で「フロー連続単離法と増殖非依存型バイオプロセスによるローズ香料の生産システム実証」に取り組み、国産初の合成生物学による香料素材製造の社会実装を実現することで、バイオエコノミー社会に貢献する。

参 考 文 献

- 1) Perfumer and Flavorist 2018
- 2) Philp, J. C. *et al.*: Biobased chemicals: the convergence of green chemistry with industrial biotechnology, *Trends Biotechnol.*, 31 (4), 219~222 (2013)
- 3) Inkwood Research Press Release: Global bio-based chemicals market forecast, Bio-based News, 2017~2025 (2017)
- 4) 上田成子ほか：香辛料及び香料の抗微生物作用, 日本食品工業学会誌, 29 (2), 111~116 (1982)
- 5) Kogure T. *et al.*: Recent advances in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for bioproduction of value-added aromatic chemicals and natural products, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102, 8685~8705 (2018)



植物を用いた大規模有用物質生産のための 一貫システムの開発



福澤 徳穂

はじめに

遺伝子組換え技術により、植物では本来発現していない動物由来のタンパク質が植物で発現することが報告されてから、既に約 35 年が経過した。この間に、抗体、ワクチン用抗原、サイトカイン、動物由来酵素、細胞成長因子など、これまで大腸菌や哺乳類細胞で生産されてきた多様な組換えタンパク質が植物を用いて生産可能であることが示された。近年では植物を用いた一過性発現系による組換えタンパク質の生産方法が世界的にも主流になりつつある¹⁾。

1. 植物発現プラットフォームの重要性

植物は光と水を利用して大気中の二酸化炭素を固定し、有機物と酸素を生産できるエコシステムの生産者である。地球温暖化が加速する近年において、地球環境負荷を低減するバイオ製造への変革が一層望まれており、植物基材への注目が集まっている。植物は葉、種子、果実など、可食的な用途にも利用可能である。また、従来の培養プロセスにおけるエンドトキシンや人獣共通病原体の感染リスクはほとんどなく、安全性が高いと考えられている。加えて、栽培の拡張性が高く、需要に応じた生産規模の調整も比較的容易であり、初期設備投資費用を抑えることができるため、費用対効果の高い安価な生産系といえる。

2. 産業利用の停滞要因および日本における産業利用促進の課題

前述のような利点があるにもかかわらず、植物発現プラットフォームの産業利用は、世界的にもかなり限定されている。これは、大腸菌や哺乳類細胞を用いた組換えタンパク質生産に比べて、植物を用いた開発が数十年遅れてスタートしたことが大きな要因である。植物を活用する規制の枠組みや法整備も遅れをとったが、現在は整いつつある。また非科学的な背景から研究開発が中断される事象が繰り返し起きているとの報告もある。

このような背景があるにもかかわらず、米国等では、広大な土地と膨大な植物栽培により量産が可能となり、試薬や化粧品用途の組換えタンパク質が市販されている。一方、日本では、同様の立地条件を得ることが難しく、事業化規模の植物生産拠点が無い状況が続いている。日本において当該産業を定着させるには、日本の国土に適した敷地面積で、高効率な植物栽培と抽出・精製プロセスを開発し、質を重視した一貫生産システムを構築する必要があると考え、筆者らは「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」(以下、本事業)委託事業において 2020 年から研究開発を開始した²⁾。

3. NEDO バイオものづくりプロジェクトにおける大規模有用物質生産システムの開発

植物で目的タンパク質を発現する手法は、遺伝子組

筆者紹介：ふくざわ・のりほ (FUKUZAWA, Noriho) (国研)産業技術総合研究所 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)) 主任研究員 2004 年筑波大学大学院農学研究科博士課程修了 博士 (農学) 専門：植物分子工学・環境医学 連絡先：〒062-8517 札幌市豊平区月寒東 2 条 17 丁目 2-1 E-mail: noriho-fukuzawa@aist.go.jp (勤務先)

換え植物などの安定発現系を用いる方法と植物病原体の自己増殖能を活用した一過性発現系を用いる方法に大別される。本事業では、後者を用いて目的遺伝子を組み込んだ植物発現用ベクターをアグロバクテリウムに保有させ、その懸濁溶液を植物体全身に減圧浸潤させるアグロインフィルトレーション法を主に採用している。植物に物理的に菌体を注入することで、わずか3~7日程度で目的タンパク質を発現させることが可能である。現在この方法が適応可能な植物種は、ナス科のニコチアナベンタミアーナ (*Nicotiana benthamiana*) のほぼ一択となっている。

一過性発現系を用いた場合の製造プロセスについて、図1に示した。まず、植物を育成し、目的遺伝子注入のための減圧浸潤を行う。その後、植物体を数日間栽培し、収穫後、破碎/磨砕を行って、いわゆる青汁を作る。そこから、残渣分離、清澄化工程を経て、目的タンパク質を精製する。本事業では、これらの各プロセスにおいて、事業化規模のために解決が必要な課題について、6機関で研究開発を実施している。

まず、基盤植物となる *N. benthamiana* の改良を(国研)産業技術総合研究所(産総研)と北海道大学が実施し、一過性発現の効率化検討を横浜国立大学が行っている。人工環境下での高効率な栽培法の構築を産総研と東京大学が担当している。下流工程の抽出・精製プロセスの研究開発を鹿島建設㈱とデンカ㈱が行っている。これらの植物改変から抽出精製に至るまで一貫通貫で構築を進めることで、生産効率が向上すると考えられる。最終的には、これらの6機関から得られたデータを統合し、鹿島建設㈱が施設設計やシステムエンジニアリング事業の実用化を、デンカ㈱が実際のプ

ログタクト生産の実用化を、それぞれ目指している。

一連の物質生産のフローの中で、最上流工程の野生型 *N. benthamiana* の改変は世界的にも数少ない。植物改変は、例えば哺乳類細胞の細胞株開発と類似ステップであると考えられるが、植物体そのものを物質生産に使用するため、植物の高次機能を人為的改変することになる。一過性発現系では、植物病原体の機能を利用し、短期間で多量のタンパク質を生産することができる一方で、植物の抵抗性機構が発動し、植物病原体の感染効率の低下や外来由来RNAの分解、外来タンパク質の一部が異常タンパク質と認識され植物のオートファジーで分解されることで、結果的に発現量が低下すると想定される。本事業ではこれらを回避可能な改変植物を遺伝子組換え技術やゲノム編集技術を用いて作出し、産総研、北海道大学では、目的タンパク質の発現量を約3~5倍増加できることを見いだしている。

物質生産に使用する *N. benthamiana* の栽培には、比較的清浄度の高い環境で育成されたクリーンな植物体を季節変動なく安定して供給することが望まれ、特に医薬品原材料の生産を目的とする場合に重要な要素となる。本事業では、これらの背景から人工環境下での水耕栽培等を採用し、栽培面積あたりのバイオマス量を増加させるための栽培技術開発も実施している。産総研では、野生型 *N. benthamiana* におけるバイオマス増加を実現しただけではなく、改変植物においても、野生型植物と遜色ないバイオマス増加が確認できている。一方、人工環境下の植物栽培では、省エネの観点も重要である。東京大学では、光の照射方法等を工夫することで、消費電力量当たりの有用タンパク質

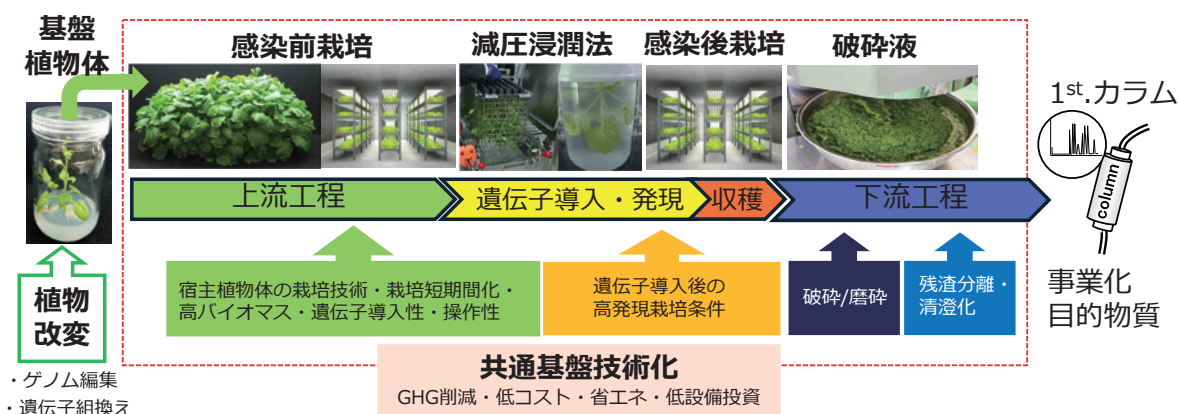


図1 一過性発現系を用いた組換えタンパク質の製造プロセスの開発概要

収量を高める技術開発にも取り組んでいる。

抽出・精製工程の技術開発は、世界的にほとんど進んでいない。欧米では数トン規模の植物体を1ロットとして処理するプロセスが一般的であった。しかし、日本の栽培規模に適合させると、植物体の処理規模は数十～数百 kg であり、これらの抽出精製工程を開発することが喫緊の課題であった。通常、ラボスケールでの葉の収穫量は数 g 程度であり、ビーズ破碎や乳鉢磨碎により遠心分離した上清を用いるが、商業生産規模ではこの方法は使用できない。本事業では、日本独自のプロセスを構築し、鹿島建設㈱にて植物 100 kg を 11 時間で精密ろ過まで処理可能なシステムが完成し、さらなる効率化の検討を進めている。また、この下流工程での 1st カラムまでの精製プロセスは、デンカ㈱が担っている。さらに、破碎工程を不要とする抽出精製システムの開発も行い、植物体からの夾雑物を減らして目的タンパク質のみを回収する技術も開発済みである。

4. 社会への発信および人材育成

当該分野の技術開発を進めるためには、農学・医学

／獣医学／薬学・工学分野の専門家による研究融合が必要である。特に人材育成の観点では、大学等での専門分野横断的な教育が必ずしも十分でない現状もあり、融合分野に精通する人材の確保が難しいことも、企業の新規参入への障壁となっている。このような現状を見据え、本事業では、人材育成拠点の整備を横浜国立大学において進めており、産学官協力の下、座学・実技セミナー等を開催予定である。

おわりに

当該分野における新規産業が根付くには、世界的にもあと一步のところまで達している。地球温暖化が加速する中、地球環境負荷を低減する『植物による有用物質生産』が近い将来、国内における新規産業創出につながることを期待したい。

参考文献

- 1) Fukuzawa, N. *et al.*: Plant-made pharmaceuticals, *Plant Biotechnol.*, 41, 243～260 (2024)
- 2) NEDO「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」プロジェクト概要 https://www.nedo.go.jp/activities/ZZJP_100170.html



高吸収型天然カロテノイドの大量生産システム実証



日尾野 隆



渡邊 彰



中村 健人



乾 将行

はじめに

リコペンをはじめとするカロテノイド類は色味成分として古くから食品や飼料添加物として用いられているが、近年、その高い抗酸化活性が注目され、生活習慣病予防やアンチエイジング効果が期待される機能性成分としての需要も高まっている (図1)。

カロテノイドは植物や藻類などに含まれるが、これら天然原料中のカロテノイド含量は総じて低く、天然

カロテノイドの供給量は限定的で製造にかかる環境負荷や製造コストが非常に高い。そこで現在流通しているカロテノイドの大半は化学合成品となっているが、カロテノイドの化学合成も反応が複雑かつ低収率で環境負荷が高い。カロテノイド市場の石油依存からの脱却は急務であり、近年、天然カロテノイドの有望な供給源としてカロテノイドを高生産する自然選抜株や遺伝子組換えスマートセルが報告されている。その一方で、事業実装においていくつかの課題解決が必要であ

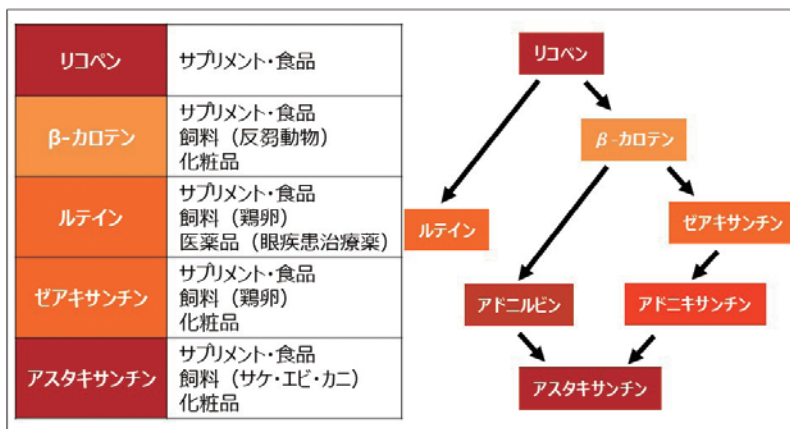


図1 カロテノイドの用途

筆者紹介：ひびの・たかし (HIBINO, Takashi) ハリマ化成(株) 先端技術開発室 (Adv. Technol. Dev., HARIMA CHEMICAL INC.) 室長付 1988 年京都府立大学大学院農学研究科修士課程修了 農学博士 専門：生物工学・植物生理学・遺伝育種学
連絡先：〒300-2635 茨城県つくば市東光台 5-9-3 E-mail: hibino-t@harima.co.jp (勤務先)

わたなべ・あきら (WATANABE, Akira) (公財)地球環境産業技術研究機構 バイオ研究グループ (Mol. Microbiol. and Biotechnol. Group, Research Institute of Innovative Technology for the Earth (RITE)) 主任研究員 2001 年東京大学大学院薬学系研究科博士後期課程修了 博士 (薬学) 専門：応用微生物学
連絡先：〒619-0292 京都府木津川市木津川台 9-2 E-mail: wata545@rite.or.jp (勤務先)

なかむら・けんた (NAKAMURA, Kento) ハリマ化成(株) 先端技術開発室バイオチーム (Biotechnol. Team, Adv. Technol. Dev., HARIMA CHEMICAL INC.) チームリーダー 2025 年大阪大学大学院工学研究科博士後期課程単位取得退学 専門：微生物代謝工学・タンパク質工学・遺伝子発現制御
連絡先：〒300-2635 茨城県つくば市東光台 5-9-3 E-mail: nakamura-k@harima.co.jp (勤務先)

いぬい・まさゆき (INUI, Masayuki) (公財)地球環境産業技術研究機構 バイオ研究グループ (Mol. Microbiol. and Biotechnol. Group, Research Institute of Innovative Technology for the Earth (RITE)) グループリーダー、主席研究員 1988 年広島大学大学院工学研究科博士前期課程修了 博士 (工学) 専門：微生物代謝工学・微生物発酵生産・バイオリファイナリー・遺伝子発現制御 連絡先：〒619-0292 京都府木津川市木津川台 9-2 E-mail: inui@rite.or.jp (勤務先)

る。カロテノイドには化学構造が直線状のオールトランス型と曲がった形状のシス型の異性体が存在し、化学合成や生合成によって製造されている現行のカロテノイドは全てオールトランス型が主成分である。しかしオールトランス型は人体への吸収が非常に悪く、バイオアベイラビリティが低いことが機能性成分としての利用において大きな課題となっている¹⁾。一方、シス型は人体への吸収性が高いことから、オールトランス型カロテノイドをシス型に変換するための高温処理や触媒による化学的異性化反応が検討されている¹⁾。しかし一般的にそれらの変換効率は高くなく、コストの増加や、工程の追加によるカロテノイドの劣化も問題である。

筆者らは、これまでに多くの実績を有するコリネ型細菌を用いたバイオものづくり技術を活用し、「オールトランス型リコペン」の効率的な製造方法を開発している²⁾。本稿では、前述の課題解決の一端としてさらなる付加価値創造を目指し、より有効な機能性成分を安定提供することを目的とした「シス型カロテノイド」のバイオものづくり技術による製造方法（シス型カロテノイド高生産株の獲得）と培養後のシス型カロテノイド抽出・精製方法に係る開発状況と、事業実装に向けた展望について紹介する。

1. シス型カロテノイド生産株の開発

シス型カロテノイドの比率が90%以上のスマートセルの開発を目標としている。光合成を行わない生物

ではカロテノイド前駆体のフィトエンはCrtIによってワンステップでオールトランス型リコペンに変換される。一方、光合成を行う植物やシアノバクテリアではフィトエンはPDS、Z-ISO、ZDS、CRTISOの4つの酵素で段階的に変換されて最終的にオールトランス型リコペンに変換される（図2）。ここで中間体であるζ-カロテンやプロリコペン（tetra-*cis*-リコペン）はシス型の構造となっている。天然においてはトマトや白菜などのごく一部の品種ではCRTISOへの変異に起因してζ-カロテンやプロリコペンなどのシス型カロテノイドを含量は低いものの蓄積している³⁾。

そこで筆者らは、光合成生物由来のリコペン生合成経路を利用して、プロリコペンをはじめとするシス型カロテノイドを特異的に高生産するスマートセルの開発を行った。筆者らは既にCrtIを利用したオールトランス型リコペン生産株を開発済みであったことから、本生産株をベースとしてCrtI遺伝子を削除し、光合成生物由来の経路と入れ替えた。その結果、まずシス型ζ-カロテン高生産株の開発に成功した。シス型ζ-カロテンもプロリコペンと同様に抗酸化活性、吸収性ともに高く、有効な機能性成分として利用し得る。その後経路の最適化を通してプロリコペンの生産にも成功し、その高生産化も進めている。

ジャーファーマンターによる培養条件の詳細検討時においては、将来の事業化を踏まえて、培養原料に用いる糖源として製紙パルプ由来のバイオマス糖を導入検討し、活用を目途を得ている（図3）。

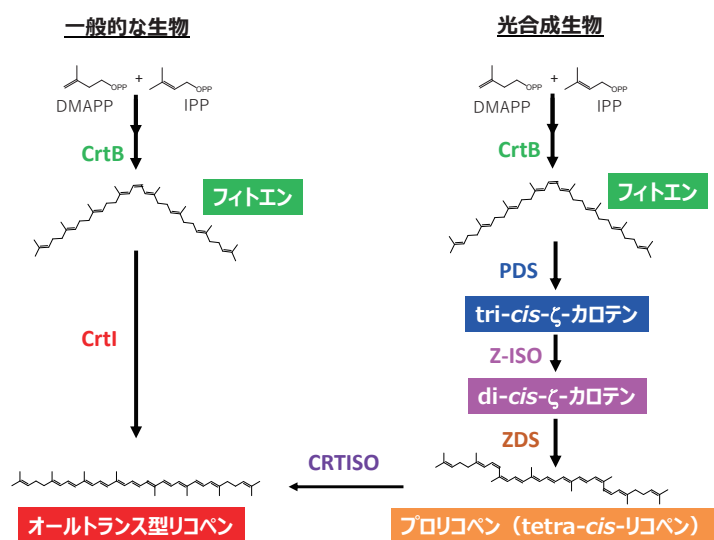


図2 リコペン生合成経路



図3 シス型リコベン類生産株の培養

今後はPDS、ZDSによるフィトエンからプロリコベンに至る変換反応のさらなる活性向上を目指して開発を進めていく。

2. リコベン精製方法の構築、およびサンプル試料の作製

シス型リコベン化合物類の精製において、前述の生産株を用いた培養の後、菌体破碎物後の抽出有機溶媒等の検討を行った。事業化を踏まえ、食品衛生法で抽出溶媒として認められている溶媒のうち、エタノールを用いることで、菌体細胞膜に由来するタンパク質等の不要物の混在を大きく低減可能なシス型リコベン抽出法（純度90%以上）確立のめどを得た。具体的には、培養後の回収菌体をリゾチームにより溶菌処理し、これを水洗により可溶物を除去、水洗後の残渣に対して99.5%エタノールで抽出作業を行い、カラム精製を行った。今後は、実用化を踏まえたコスト低減につなげるため、カラム精製方法の改善を含め、検討を継続していく。

また、各種賦形剤の検討を行い、水への分散性を有する粉体サンプルの作製、油状サンプルの作製に進め（図4）、これらについて2024年度の展示会（BioJapan 2024、第4回サステナブルマテリアル展、nanotech 2025）に出展、多数のメーカーより問い合わせをいただいた。

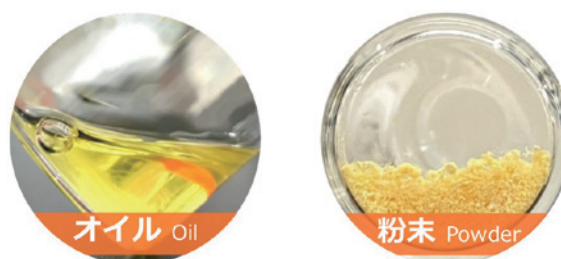


図4 試作サンプル

お わ り に

展示会での反響から、高吸収性を有するリコベンの上市は、食品、飼料添加物、サプリメント等の製造に関わる業界からの高い期待感を感じることができた。一方、今後の事業化においてはスケールアップ実証を通じて、製造コストのさらなる低減検討はもちろんのこと、地球環境保全に貢献するべく総括的な二酸化炭素削減効果についても考慮の上、できるだけ早期に商品サンプルの提供を実現することを目標に進め、我が国のサーキュラー・エコノミー政策の推進に貢献したい。

謝 辞

本稿記載の成果は、（国研）新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）が進めている事業（カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発）の支援（2022年度～2024年度）の下、得られたものです。

参 考 文 献

- 1) 本田真己：「カロテノイドの科学 ―基礎、研究の新展開、生理活性―」第15章 リコベン異性体：異性化方法と体内吸収性・生理活性、シーエムシー出版、165～175(2024)
- 2) 乾将行：RITE「革新的環境技術シンポジウム 2023」カーボンニュートラルの実現を目指したバイオものづくり技術の開発、講演資料(2023)
- 3) 渡辺満：「オレンジクイン」に含まれるプロリコペン（シスリコペン）と抗酸化能、タキイ最前線、夏号、23(2013)



ミリオンスクリーニング技術 —世界最高の探索・育種技術を目指して—



小笠原 渉



鈴木 義之

はじめに

バイオものづくりは、主に微生物を活用して多様な製品を創出する基盤技術として、世界的な研究開発・社会実装が進められている。産業のバイオ化には、多様なニーズに迅速かつ柔軟に答える研究開発・生産体制が必要不可欠である。しかし、バイオものづくりの生産プロセス開発過程「探索・育種・培養・生産」には、多くの課題と参入障壁が存在するため、バイオものづくりPJでは各段階のボトルネックの解消に取り組んでいる。特に、開発上流の「探索」プロセスにおいて、ニーズに対応可能な生物資源（有用遺伝子と微生物宿主）を迅速かつ効率的にスクリーニングする技術が重要である。しかし、産業上有用な生物資源のスクリーニングは高コストかつ高難易度であり、企業の

参入を阻む要因の1つになっている。そこで著者らは、「探索」に着目して、迅速かつ高効率な微生物スクリーニングシステムの開発に取り組んでいる。

1. バイオものづくりと微生物探索

バイオものづくりの起源は、発酵食品製造などの伝統的な発酵技術に遡る。現代では、遺伝子工学技術等を活用して微生物の機能を高度に設計・改変することで、目的物質の生産性向上や新規物質生産を可能にしている。バイオものづくりの開発スキームの生産株の設計・育種の段階では、「宿主の能力開発」と「多様なターゲット物質に対応できる生物資源」の確保が課題になっている（図1）。

微生物の活用範囲は、分離培養と機能解明を通じて利用可能になった宿主・遺伝子の数と質に依存する。

地球上の生物種数は1000万を超えると予測されているが、現在までに解析・命名できた微生物は、2万種弱に過ぎない。これは全微生物種の約99.98%の微生物が、機能や能力が未知で利用できない「未培養／難培養微生物」であることを示唆している。培養可能な微生物に

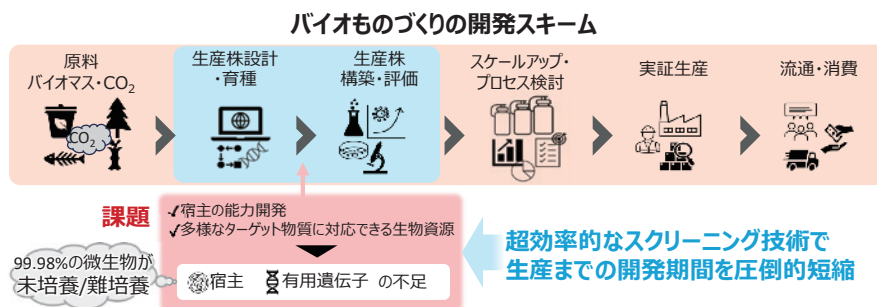


図1 バイオものづくりとスクリーニング技術

(文献¹⁾より改変転載)

筆者紹介：おがさわら・わたる（OGASAWARA, Wataru）長岡技術科学大学 技術科学イノベーション系（Dept. Sci. Technol. Innov., Nagaoka Univ. Technol.）教授 1996年度長岡技術科学大学大学院工学研究科博士後期課程修了 博士（工学）専門：応用微生物学 連絡先：〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 E-mail: owataru@vos.nagaokaut.ac.jp（勤務先）
すずき・よしゆき（SUZUKI, Yoshiyuki）長岡技術科学大学 研究戦略本部（Res. Strategy Div., Nagaoka Univ. Technol.）首席 URA/特任准教授 2012年度長岡技術科学大学大学院工学研究科博士後期課程単位取得退学 博士（工学）専門：応用微生物学 連絡先：同上 E-mail: yoshis@vos.nagaokaut.ac.jp（勤務先）

由来する偏った情報に基づいた生産株設計・育種には限界があるため、表現型に基づいた新規有用微生物の探索を通じて未培養／難培養微生物とその遺伝子を利用できるようになれば、バイオものづくり技術は飛躍的な発展を遂げると期待される。

2. ドロップレット培養スクリーニング技術とその可能性

有用微生物をスクリーニングするには、培養が必要不可欠である。新規微生物獲得には100万検体以上のスクリーニングが必要になる一方、従来技術は可培養化（可培養化率1%程度）と規模（100万検体には莫大な費用が必要）の点で効率不足であるため、培養技術の開発が急務である。また、培養化後の活性・機能スクリーニングにおいても、検出系の拡充とハイスループット化の両立が課題になっている。これは、育種や有用遺伝子同定にも重要である。

これらの課題を解決するために、直径100 μ m程度の微小液滴を培養容器とするドロップレット培養スクリーニング技術に着目した（図2）。本技術では、油中液滴（WODL）やゲルマイクロドロップレット（GMD）等で、微生物を1細胞レベルで区画化・培養する。マイクロ流体デバイスによる高速かつ均一なドロップレット生成と、フローサイトメトリー（FCM）による高速解析・選別を組み合わせ、1秒あたり数百以上のサンプルを処理するハイスループットスクリーニングが実現する。ドロップレット内の微生物や代謝産物を蛍光などで検出し、目的表現型を示すドロップレットを選抜・回収することで、100万検体以上の超高効率スクリーニング（ミリオンスクリーニング）が可能になる。しかし、本技術は発展途上であり、培養

条件最適化、多様な検出系開発およびさらなる効率化が求められている。本プロジェクトでは、これら3つの課題の解消を通じて、従来の1000倍以上の効率を有する世界最高のスクリーニング技術確立を目指して研究開発を進めてきた。

3. ミリオンスクリーニング技術の開発と応用

本プロジェクトでは、ミリオンスクリーニングの課題克服を目指す研究開発に取り組んでいる。培養技術開発では、ドロップレットベースの新規な可培養化技術を開発することで、複数の未培養・難培養微生物や新規微生物の獲得に成功した。さらに、難培養微生物の増殖促進微生物の探索技術も確立した。検出系開発では、新たな表現型に対応可能なドロップレット培養スクリーニング技術を開発した。例えば、低pH・耐浸透圧耐性の他、油脂生産性、複数の酵素活性、バイオポリマー生産能など、多様な表現型に対応する技術を構築した。さらに、微生物の膜成分を蛍光染色してドロップレット内部の微生物量を定量検出・分取可能な技術開発し、世界初の製品化に至った²⁾。スループットの向上では、産学連携体制の下、自動化・効率化・新規検出機搭載装置の開発も進めている。

バイオものづくりの現場を想定した実証も進めている。従来技術での育種には、目的物質の生産性が向上する一方で、増殖速度が低下してしまい、大規模生産に不向きな菌株が取得される課題がある。本プロジェクトでは、GMD内で増殖した油脂生産微生物の油脂量と増殖速度の同時検出により、物質生産性と増殖能を両立した育種に成功している（図3）。この技術は、従来困難だった高生産性かつ低増殖速度の株取得も可能にし、生育関連遺伝子資源の獲得も期待できる。そ



特徴 ①微小化 ②区画化 ③高効率

図2 ドロップレット培養スクリーニング技術の特徴

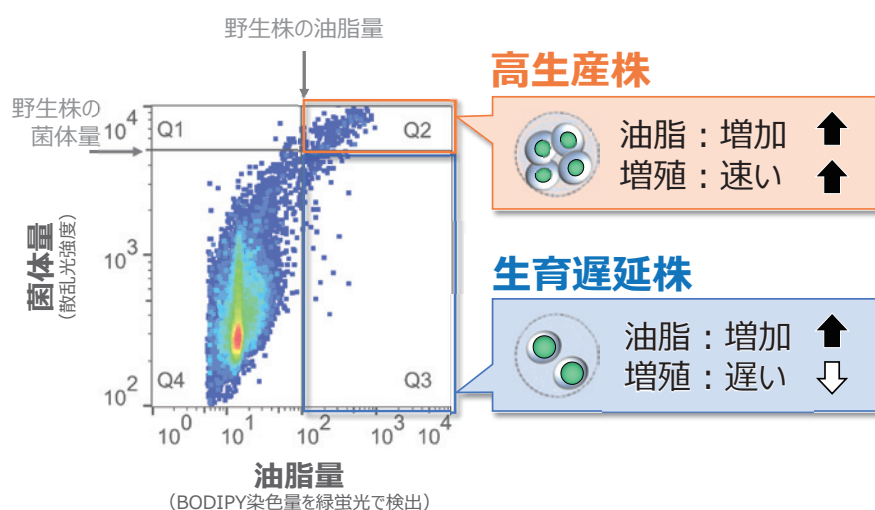


図3 物質生産性と増殖能の2軸スクリーニング

の他、糸状菌育種の育種技術開発や、セルラーゼ高生産菌の育種を通じた検証³⁾や麹菌への対応、バイオものづくり時代に適した育種技術開発など、日本の発酵産業に合わせた育種技術の開発も進めている。

おわりに

本プロジェクトの成果の社会実装は、製品化や論文発表、特許取得で着実に進んでいるが、効率的な実施には培養や解析に関する高度なノウハウと適切な装置

が必須である。新規参入者の促進のために、長岡技術科学大学のリージョナルGXイノベーション共創センター(2025年7月開所)にミリオンスクリーニング技術の利用を支援する拠点の整備を進めている。本拠点では常に世界最高の技術を開発しながら、産業界への技術展開を進めていく。

参考文献

- 1) 峯岸美有子：カーボンリサイクル実現を加速する「バイオものづくり」関連技術開発、本誌、82(3)、336～339(2024)
- 2) ㈱オンチップ・バイオテクノロジーズ プレスリリース：ドロップレット用微生物検出試薬「On-chip MiMe-Stain Green/Red」がリリースされました！(2024年9月26日)、<https://on-chip.co.jp/news/post-8384/>
- 3) Luu, X.C. *et al.*: Ultra-high-throughput screening of *Trichoderma reesei* strains capable of carbon catabolite repression release and cellulose hyper-production using a microfluidic droplet platform, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 87(11), 1393～1406(2023)



サステナブルな食の未来の実現に向けた油脂酵母を用いた持続可能な油脂生産技術の構築



柴田 雅之



荒 学志



高久 洋暁

はじめに

パーム油をはじめとする植物油は、食品用途に加え、工業製品やバイオディーゼル燃料などの非食品分野にも広く利用されており、現代社会において不可欠な資源である。一方で、世界人口の増加、新興国の経済発展、食生活の多様化に伴い、植物油の需要は年々増加しており、将来的な供給不足が懸念されている。その中でもパーム油の生産は、森林破壊、水資源の枯渇・汚染といった環境問題に加え、労働者の人権侵害などの社会的問題を引き起こしており、持続可能かつ倫理的な代替技術の開発が急務となっている。

そのような背景のもと、油脂酵母は新たな油脂生産技術として注目を集めている。油脂酵母は、デンプンや糖類を栄養源として増殖し、自身の細胞内に油脂を蓄えることができるユニークな微生物である。また、油脂酵母から得られる油はパーム油の代替油脂として高い可能性を有しており、体積当たりの油脂生産性もパーム油の100倍以上と非常に高い。

不二製油㈱は油脂酵母を用いた高効率な油脂発酵生産システムの構築に向けて、共同研究先の(学法)新潟科学技術学園 新潟薬科大学とともに取り組みを続けてきた¹⁾。本稿では、新潟薬科大学による「パーム

油代替油脂高生産株の育種」と不二製油㈱による「流加培養による油脂の高発酵生産システムの構築」という2つの課題に焦点を当てている。これらの取り組みは、NEDO((国研)新エネルギー・産業技術総合開発機構)プロジェクト「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」²⁾の支援のもとで実施されており、本稿ではその中で得られた成果について紹介する。

1. パーム油代替油脂高生産株の育種

筆者らが着目した油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* は、著名な油脂酵母 *Yarrowia lipolytica*, *Rhodospiridium toruloides* よりも生育は多少遅いが、細胞の油脂含有率が高いという利点を有する。さらに他の油脂酵母と異なり、糖化酵素を有しており、生デンプンから油脂の発酵生産が可能な魅力的な産業酵母である。これまでに油脂高生産株の分子育種の糸口として、変異育種を活用して多数の油脂高蓄積変異株を取得してきた。これらの油脂高蓄積変異株の原因因子を同定することにより、油脂高生産株の分子育種の基盤ができつつある。同定因子の中でも油脂合成に重要なアシル CoA 合成及びケネディ経路の遺伝子のプロモーターに直接結合し、発現を制御する転写活性化因子 LsSpt23p に

筆者紹介：しばた・まさゆき (SHIBATA, Masayuki) 不二製油㈱未来創造研究所 新原料・新技術創出部 (Research Institute for Creating the Future, New Resources & Technologies Creating dept., FUJI OIL Co., Ltd.) 副部長 2010年北海道大学院農学研究大学院博士前期課程修了 博士(農学) 専門：生化学、食品加工

連絡先：〒300-2497 茨城県つくばみらい市絹の台4-3 E-mail: shibata.masayuki@so.fujioil.co.jp (勤務先)

あら・さとし (ARA, Satoshi) 不二製油㈱研究開発本部 未来創造研究所 新原料・新技術創出部 植物資源研究課 (Plant Resources Res. Sect., New Resources & Technologies Creating dept., Res. Inst. Creating Future, Co., Ltd.) 2018年新潟薬科大学大学院応用生命科学研究科博士後期課程修了 博士(応用生命科学) 専門：応用生命科学

連絡先：同上 E-mail: ara.satoshi@so.fujioil.co.jp (勤務先)

たかく・ひろあき (TAKAKU, Hiroaki) 新潟薬科大学応用生命科学部 (Dept. of Applied Life Sci., Niigata Univ. of Pharmacy & Med. & Life Sci.) 学部長/教授 2002年東京大学大学院農学生命科学研究科博士後期課程修了 博士(農学) 専門：応用微生物学 連絡先：〒956-8603 新潟県新潟市秋葉区東島265-1 E-mail: htakaku@nupals.ac.jp (勤務先)

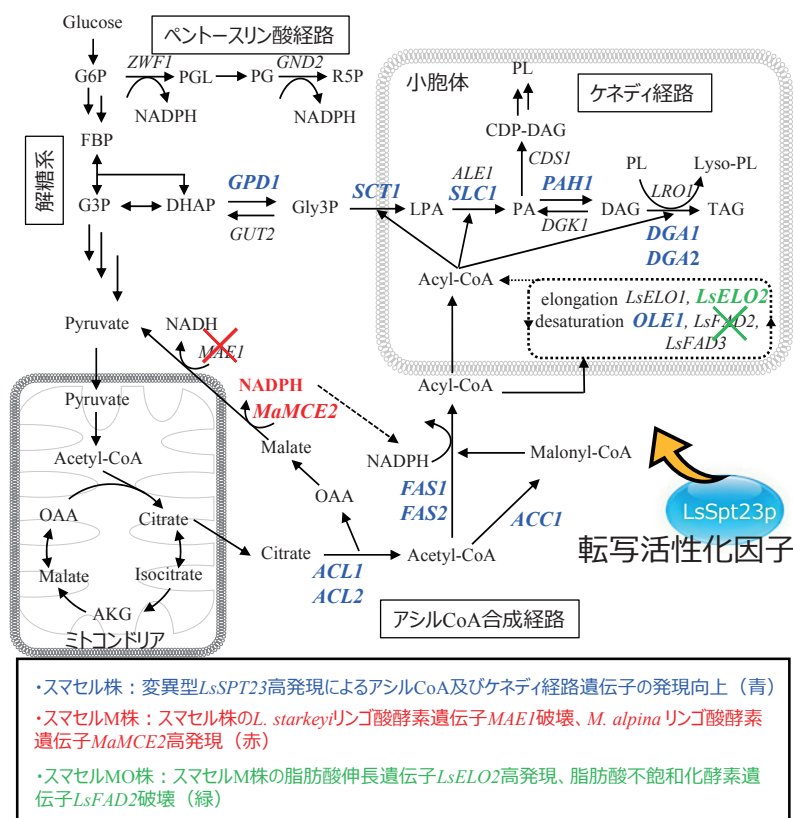


図1 *Lipomyces starkeyi* の分子育種による油脂の高生産及び高品質化

着目し、分子育種を行った。*LsSPT23* 遺伝子の高発現により、下流のアシル CoA 合成及びケネディ経路の遺伝子の発現が向上すると共に、油脂生産量も増加した。さらに変異株の油脂高蓄積原因となった変異型 *LsSPT23* 遺伝子を高発現させたスマートセル株(以下、スマセル株)は、*LsSPT23* 高発現株を超え、野生株と比較して約4倍の油脂生産量を示した²⁾。次にアシル CoA 合成経路における脂肪酸合成には補酵素 NADPH の還元力供給が必要であることに着目した。一部の油糧糸状菌 *Mortierella alpina* などでは、ATP-クエン酸リアーゼによりクエン酸からアセチル CoA とオキサロ酢酸が生成され、オキサロ酢酸のリンゴ酸への変換後、リンゴ酸酵素でピルビン酸に変換される過程で NADPH を生成し、脂肪酸合成時の還元力として利用される。*L. starkeyi* のリンゴ酸酵素は NADPH ではなく、NADH を生成するため脂肪酸合成のための還元力供給ができない。そこでスマセル株の *L. starkeyi* のリンゴ酸酵素遺伝子の代わりに *M. alpina* のリンゴ酸酵素遺伝子を導入した株(以下、スマセル M 株)を作製したところ、スマセル株と比較して生育は低下したが、細胞の油脂蓄積能が

向上し、油脂生産量は約1.5倍、対糖油脂収率は14%から20%に改善した。最後に生産油脂高品質化を考慮し、脂肪酸伸長及び不飽和化酵素遺伝子を改変した。具体的には、スマセル M 株にパルミチン酸からステアリン酸の変換に関与する *LsELO2* 遺伝子を高発現させるとともに、オレイン酸からリノール酸の変換に関与する *LsFAD2* 遺伝子を破壊した株(以下、スマセル MO 株)を作製した。スマセル MO 株はスマセル M 株と比較して生育及び油脂の生産速度は若干低下したが、最終的な油脂生産量及び対糖油脂収率は変わらなかった。加えて、さらに生産油脂のオレイン酸含有率は45%から59%まで上昇したことから、高品質なパーム油代替油脂を高生産できるスマセル MO 株の育種に成功した。

2. 流加培養による 油脂の高発酵生産システムの構築

パーム油代替油脂の高生産株である「スマセル MO 株」を用いた油脂の高発酵生産システムの構築にあたり、まずはスマセル MO 株の高密度培養条件の検討を行った。糖類、ミネラル、ビタミンを含む合成培地

油脂酵母の増殖に適した培地組成を検討し、2段階流加培養により
油脂生産性 90g/L/4日、対糖油脂収率 20% を上回る成果を達成

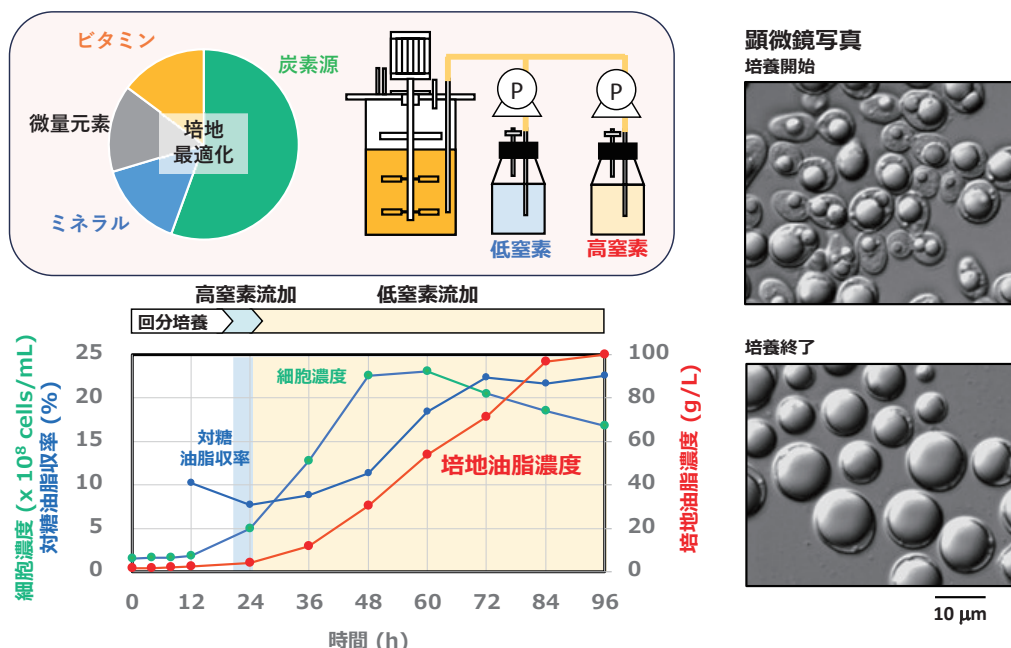


図2 JAR 流加培養による油脂の高発酵生産

を調整し、菌体密度の向上に寄与する培地成分を探索した。得られた培養条件を基盤として、油脂生産性のさらなる向上を目的に、糖の流加条件の最適化を試みた。油脂酵母は、環境中に糖類などの炭素源が豊富に存在する状況下で、増殖に必要な栄養素が枯渇すると細胞内に油脂を蓄積する性質を持つ。そこで、培地組成の異なる2種類の流加培地を用いた2段階流加を実施し、培養初期には増殖に適した条件を、培養後期には油脂蓄積に適した条件へと制御することで、効率的な油脂生産を実現した。さらに、流加培地の組成を最適化することで、油脂生産に適した菌体濃度を維持しつつ、油脂生産速度と変換効率の向上にも成功した。これらの検討により、流加培養によって90g/Lの油脂を含む培養液を4日間で製造することに成功した(図2)。特筆すべきは、糖から油脂への変換率が20%以上という非常に高い値を達成した点であり、これは代謝経路の観点から見ても極めて高効率な結果である。今後はスケール拡大に向けた検討と、より安価な炭素源を用いた培養条件の検討を進めていく予定である。

おわりに

不二製油㈱では、環境負荷の少ない持続可能な油脂

資源の創出を目指し、共同研究先の新潟薬科大学とともに油脂酵母を用いた油脂生産技術の研究開発に取り組んできた。本研究は、NEDO プロジェクト「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」の支援を受けて推進されており、油脂生産に適した産業用スマートセルの創出を目的として、油脂生合成経路の最適化、培養条件の検討、スケールアップ、油脂抽出および精製プロセスの確立に取り組んでいる。

今後は、これらの技術をさらに高度化し、酵母油の市場展開を図ることで、サステナブルな循環型社会の構築に貢献していきたい。

参考文献

- 1) 不二製油㈱: News Release (2022.10.4)
https://www.fujioil.co.jp/pdf/news/2022/20221004News_release.pdf
- 2) NEDO: カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発 事業紹介,
https://www.nedo.go.jp/activities/ZZJP_100170.html
- 3) Takaku, H. *et al.*: LsSpt23p is a regulator of triacylglycerol synthesis in the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 107 (4), 1269~1284 (2023)



大腸菌 *Escherichia coli* による グルタチオン発酵生産



松井 美里



小林 新吾

はじめに

グルタチオンは、グルタミン酸、システイン、グリシンから構成されるトリペプチドであり、生物に普遍的に存在する天然の抗酸化物質である。グルタチオンは細胞内の酸化還元バランスの維持に寄与し、細胞保護作用や解毒機能を有することが知られている。特に還元型グルタチオン（GSH）は、医薬品、食品、化粧品など多様な産業分野において、高い付加価値をもつ物質として利用されている。

GSHが二量体化した酸化型グルタチオン（GSSG）はバイオスティミュラントとしての機能をもつ。バイオスティミュラントは、高温や高日照などの非生物学的ストレスを低減することで植物の本来もつ力を引き出す素材であり、気候変動が大きな社会課題である昨今、持続可能な農業生産を実現する手段として注目を集めている。㈱カネカでは、天然由来の安全・安心な素材であるGSSGに着目し、これを配合した高機能性肥料カネカファーターライザー™、カネカ ペプチド®の販売を国内外で進めている。（図1）。これらは水に溶かして散布する肥料であり、幅広い作物にご使用いただいている。さらに直近では、新たな剤形として種子処理剤カネカファーターライザー™ STを上市した。

現在、グルタチオンは主に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた発酵法によって生産されている。この方法では、培養中にグルタチオンを菌体内に蓄積



図1 ㈱カネカで販売中のGSSGを含む農業資材
水に溶かして使用するカネカファーターライザー™ およびカネカ ペプチド®と種子処理剤カネカファーターライザー™ ST。

させ、培養後に抽出、精製する。これまでに酵母の代謝改変や培養条件の最適化によって生産性を向上した例が多数報告されているが、その培養生産性は最高でも6 g/Lにとどまっている¹⁾。これは、酵母の細胞容積により細胞内への蓄積量が制限されるためと考えられる。

一方、大腸菌を用いたグルタチオン生産についても古くから研究されており、近年は中国のグループを中心に多数の文献が発表されている。しかし、そのほとんどが、グルタチオン合成酵素遺伝子を高発現させた大腸菌に、グルタミン酸、システイン、グリシンを添加し培養するという、酵素変換に近い方法である。この方法では約20 g/Lと高生産性を得られるが²⁾、システインが高価なため、製造コストが課題となる。

筆者紹介：まつい・みさと（MATSUI, Misato） ㈱カネカ アグリバイオリサーチセンター（Agri-Bio Res. Ctr., Kaneka Corp.）主任 2011年東京大学大学院農学生命科学研究科修士課程修了 専門：応用微生物学
連絡先：〒676-8688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 E-mail：Misato.Matsui@kaneka.co.jp（勤務先）
こばやし・しんご（KOBAYASHI, Shingo） 同上 幹部職 2012年東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了 博士（農学）
専門：応用微生物学 連絡先：同上 E-mail：Shingo.Kobayashi@kaneka.co.jp（勤務先）

大腸菌はアミノ酸などの発酵生産に広く利用されてきた実績がある。特に細胞外への代謝物排出能力に優れ、例えばシステイン発酵では菌体外排出によって高生産性を達成できたことが報告されている³⁾。そこで、大腸菌を用いてグルタチオンを菌体外に蓄積できれば、高生産性を実現できると考えた。

これらの背景を踏まえ、筆者らは、大腸菌を宿主とし、システインを添加せず、かつグルタチオンを菌体外に蓄積するグルタチオン革新製法の構築を目標として研究を行った⁴⁾。

大腸菌によるグルタチオン発酵生産

まず、システインを添加せずにグルタチオンが生産可能かを検証するため、グルタチオン合成酵素遺伝子 *gshA* および *gshB* を過剰発現する菌株を構築し、無機塩培地を用いて培養を行った。その結果、連続的にグルコース、グリシン、硫酸アンモニウムを供給することで、還元型・酸化型合わせて 4.3 g/L のグルタチオンを生産することに成功した。また、当初期待した通り、グルタチオンの 62 % が菌体外に蓄積した。

次に、生産性向上に向けて菌株改良を行った。遺伝子組換えにより、グルタチオン分解酵素、還元酵素、菌体外グルタチオンのインポーターを欠損させた結果、グルタチオンの培養生産性は 12.3 g/L まで向上した。さらに、システイン合成酵素遺伝子 *cysE* の発現強化により生産性は 19.0 g/L と大きく向上した。こ

のことから、システイン合成がグルタチオン生産の律速である可能性が示唆された。さらに、解糖系の部分遮断によりシステイン合成を強化した結果、生産性が 19.6 g/L まで向上した。また、同株ではグルタチオンの 93 % が培養上清中に回収されたことから、菌体外への蓄積が高生産に寄与したと考えている。

代謝解析による律速の同定

培養生産性をさらに向上すべく、代謝律速同定のため、代謝フラックス解析およびメタボローム解析を行った。その結果、システイン合成中間体 *O*-アセチルセリン (OAS) に由来する *N*-アセチルセリン (NAS) の蓄積が観察され、セリンからシステインへの変換反応が代謝律速であることが強く示唆された。そこで、システイン合成強化を目的として、硫黄源を硫酸からチオ硫酸に変更したところ、生産性は 22.0 g/L まで向上した。硫黄源変更によって NAS 蓄積量は減少し、代謝律速の部分的な解消が確認された。

おわりに

本研究では、大腸菌を宿主として、システイン添加を必要としない高効率なグルタチオン発酵生産系を確立した。特に *cysE* の発現強化は、セリンから OAS の変換を加速し、グルタチオン生産性の向上に大きく寄与した。さらに、精密な代謝解析により代謝律速点を同定し、その解消により生産性を向上した。本研究

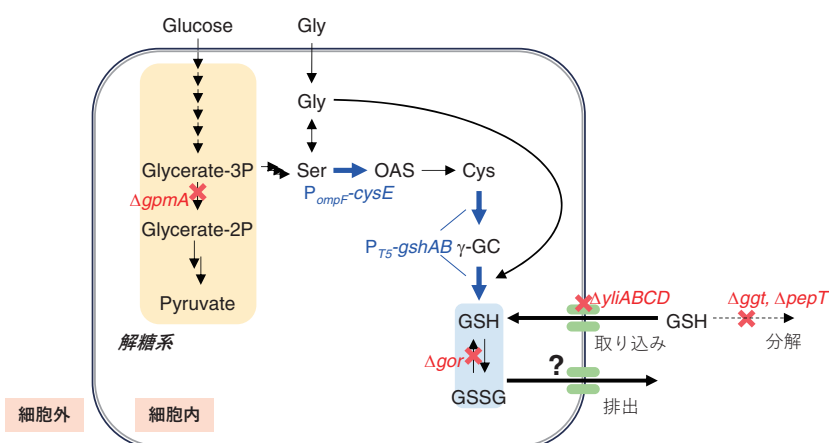


図2 大腸菌におけるグルタチオン合成の概略図

グルコースは、glycerate 3-phosphate、セリン、*O*-acetylserine を経てシステインへと変換される。システインはグルタミン酸およびグリシンと結合して還元型グルタチオン (GSH) を合成し、その後、未知のトランスポーターによって細胞外へ排出される。グリシンは細胞外から供給され、一部は直接 GSH に変換され、残りはセリンへと変換される。グルタチオン生産を促進するための遺伝子改変が示されており、赤色で示された遺伝子は欠損、青色で示された遺伝子は過剰発現を表している。
(文献⁴⁾より改変転載)

は、代謝解析が生産性向上に機能した好例であり、バイオものづくりにおける代謝解析の有用性を裏付けるものである。

今後の課題としては、グルタチオン排出トランスポーターの同定と強化が挙げられる。また、NASがまだ蓄積しているため、代謝効率化による生産性向上も検討したい。

大腸菌によるグルタチオン発酵生産は、安価原料から高生産性を得られるため、工業的にも有望である。(株)カネカでは、適用作物拡大や剤形の多様化を通じて、国内外における GSSG 配合肥料の事業拡大を推進している。現在は酵母法で生産したグルタチオンを用いているが、市場の成長を追い風に、今後本稿で紹介した革新技術の実装に向けて取り組んでいきたい。

謝 辞

本研究を共同で行った大阪大学・清水浩教授、神戸

大学・蓮沼誠久教授および本研究に携わった多くの方々に御礼申し上げます。本研究は (国研)新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」プロジェクトの助成を受けて実施しました。

参 考 文 献

- 1) Chen, H. *et al.*: A stepwise control strategy for glutathione synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* based on oxidative stress and energy metabolism, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 36(8), (2020)
- 2) Wang, C. *et al.*: Heterologous gshF gene expression in various vector systems in *Escherichia coli* for enhanced glutathione production, *J. Bacteriol.*, 214, 63~68(2015)
- 3) Ohtsu, I. *et al.*: The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 285, 17479~17487(2010)
- 4) Mori, H *et al.*: Engineering *Escherichia coli* for efficient glutathione production, *Metab. Eng.*, 84, 180~190(2024)



オプトバイオものづくり技術の開発

原 清敬

はじめに

大腸菌や酵母などのバイオものづくりによく用いられる化学合成従属栄養微生物は、取り込んだグルコースなどの炭素源を、原料にもエネルギー源にもするため、物質合成系とエネルギー合成系が競合するという根本的なジレンマが存在する。そこで筆者らは、これらの微生物にソーラープロテイン（学術的には Rhodopsin、以下 SP と記す）を導入することで、光合成生物のように光エネルギーを利用できる細胞^{1), 2)} (Vmax 細胞と呼ぶ) を作製している (図 1)。

1. Vmax 細胞を用いたバイオものづくりの特長

微生物を用いたバイオものづくりでは、主に呼吸にてエネルギー (ATP) を合成するため、溶存酸素濃

度を高める必要があり、攪拌に大量の電気エネルギーを消費する。一方、藻類・植物および Vmax 細胞では、光にて ATP 再生が可能である。さらに、Vmax 細胞の SP は光合成とは異なり、弱い光でも駆動できるため³⁾、Vmax 細胞への光照射に必要な電気エネルギーは、攪拌に較べて低いと見積もれる。また、代謝工学や合成生物学を駆使してターゲット物質の微生物生産性を向上させていくと、いずれ ATP 合成力が律速になることがあり、SP の導入で ATP 合成力を強化すれば、ターゲット物質の生産性のさらなる向上が可能である³⁾。

2. ソーラープロテインの探索

(国研)新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」(バイオものづくり PJ) に

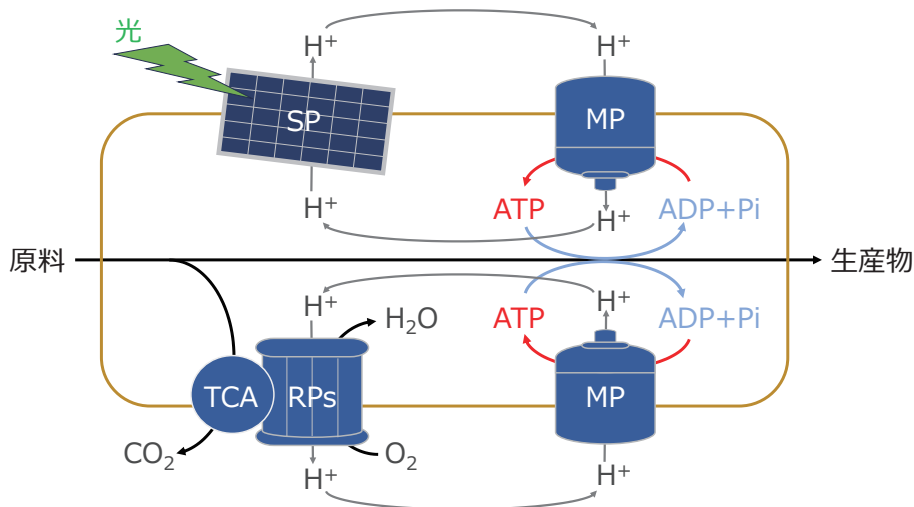


図 1 Vmax 細胞の概要図

SP: ソーラープロテイン (ロドプシン)、MP: モータープロテイン (ATP 合成酵素)、TCA: TCA 回路構成酵素群、RPs: 呼吸鎖複合体群、図は大腸菌などの原核細胞の場合³⁾ であり、酵母等の真核細胞の場合はオルガネラに SP を発現⁴⁾ する。CO₂ 排出を伴う TCA-RPs および CO₂ 排出を伴わない SP がプロトンを排出することで形成された膜内外のプロトン濃度勾配を駆動力として、MP が ATP を合成する。ただし、図には物質質量比の情報は含めていない。

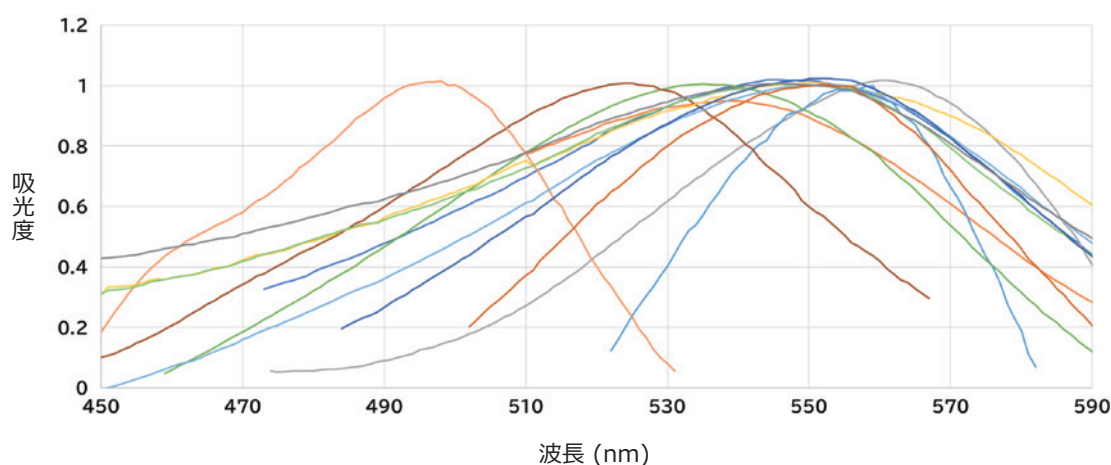


図2 獲得した高活性ソーラープロテインの吸収スペクトル

て、筆者らは高活性 SP の探索を行った。(一財)マリンオープンイノベーション機構 (MaOI 機構) の協力を得て探索対象として National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベース、(独)製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター (NBRC) 株ライブラリ、駿河湾由来メタゲノム、紅海由来メタゲノムを用いた。大腸菌に各種 SP を発現し、光照射時の細胞外 pH の低下速度からプロトン輸送活性を見積もった。その結果、これまで用いてきたスタンダード SP に比べて 1.2~1.9 倍のプロトン輸送活性を示す高活性 SP を複数獲得することができた。さらに、ランダム変異の導入で、2.2~3.7 倍のプロトン輸送活性を示す高活性 SP を獲得することに成功した。

また、麴菌など微生物によっては、光をすでに細胞制御に使用していることがある。その場合には、光細胞制御に関わる光受容体が感知する波長を避けた SP を利用する必要がある。そこで、獲得した 10 種類以上の高活性 SP の吸収波長をヒドロキシアミンプリーチ法を用いて分析したところ、さまざまな吸収スペクトルを示し、多様なバイオものづくり宿主への SP の適用の可能性を示した (図 2)。

お わ り に

Vmax 細胞については、著者の独自研究の後、(国

研)科学技術振興機構未来社会創造事業 (2017~2021 年度) にて静岡県立大学、大阪大学、神戸大学にて共同研究開発した基盤的な技術を、静岡県立大学発ベンチャーである(株)396 バイオが実用化を目指し、研究開発を継続して行っている。現在、NEDO バイオものづくり PJ の成果を含め、「オプトバイオものづくり拠点 (仮称)」の整備を進めている。京都大学拠点、大阪工業大学拠点とも連携し、バイオものづくりのエネルギー (ATP) 不足が課題となっているユーザーからの相談への対応や、ユーザーの使用微生物の Vmax 細胞化を支援する計画である。また、Vmax 細胞用光培養設備の整備も進めている。

参 考 文 献

- 1) 原清敬：ロドプシンを活用したオプト微生物モノづくり, 生物工学会誌, 103(7), 296~300(2025)
- 2) 原清敬：Optoenergetic Cell Factory の創製, 環境バイオテクノロジー学会誌, 25(1), 29~32(2025)
- 3) Toya, Y. *et al.*: Optogenetic reprogramming of carbon metabolism using light-powering microbial proton pump systems, *Metab. Eng.*, 72, 227~236(2022)
- 4) Daicho, K. M. *et al.*: Engineering yeast with a light-driven proton pump system in the vacuolar membrane, *Microb. Cell Fact.*, 23, 4(2024)

■ NEDO バイオものづくりプロジェクト ■

NEDO バイオものづくりプロジェクト

<https://www.jba.or.jp/b-production/>



■ 技術要旨集 ■

バイオものづくりプロジェクト 技術集

カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発

https://www.jba.or.jp/b-production/asset/pdf/JBA_pamphlet.pdf



NEDO バイオものづくりプロジェクトに関するお問い合わせはこちら

<https://www.jba.or.jp/b-production/contact/>

E-mail : ibms-jba@jba.or.jp



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）
「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」事業
データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム（Data-driven iBMS）の研究開発
「バイオサイエンスとインダストリー」（B&I）抜粋版（2024 年～2026 年）掲載

発行元 （一財）バイオインダストリー協会
〒100-0005東京都千代田区丸の内1-7-12
TEL：03-6665-7950
<https://www.jba.or.jp/>

●本別刷の複写、複製および引用・転載のご希望につきましては、下記よりお問い合わせ下さい。
<https://www.jba.or.jp/b-production/>