



# タンパク質・化合物を 大量に生産する微生物を 高速・低コストにスクリーニングする

金沢工業大学 大学院工学研究科  
バイオ・化学専攻  
教授 町田雅之

2022年12月2日



# バイオテック産業への貢献の戦略

## 概要

- 生産コスト(競争力)に直結する、微生物・細胞の物質生産性を、迅速・低コストに向上する。
- 対象分野: バイオテクノロジー産業全般

## 現状

- 育種による迅速な高生産化は業界の長年の悲願
- 決定的な方法は無く、ケースバイケースで対応  
(職人芸的に行うか、膨大なコストをかけるか)

## ソリューション

- 高生産株の大規模・迅速・低コストなスクリーニングを実現  
(定量的「高生産化株選別」、及び、定性的「生産株獲得」)
- 大規模・迅速・低コストなGMD技術で統一・汎用化する

# GMDによる細胞・微生物のスクリーニング

GMDを微小な反応空間とすることで、**これまでになく大規模なスクリーニング**が可能となる。

## プレート法 1万サンプル



96ウェル プレート  
104枚

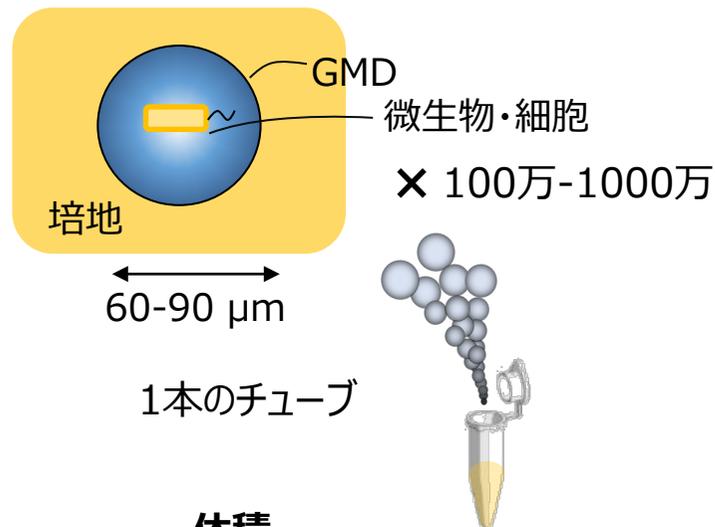
**体積**  
数十 $\mu$ L/well

**培養**  
大量の培地

**人手・時間**  
数名 数日

新たな発見は運次第  
(見逃す可能性が高い)

## GMD法 100万サンプル



1本のチューブ

**体積**  
pL/GMD

**培養** 培養可能  
少量の培地

**人手・時間**  
1名 1日

新たな発見はほぼ確実  
(大規模に探索できる)

100倍

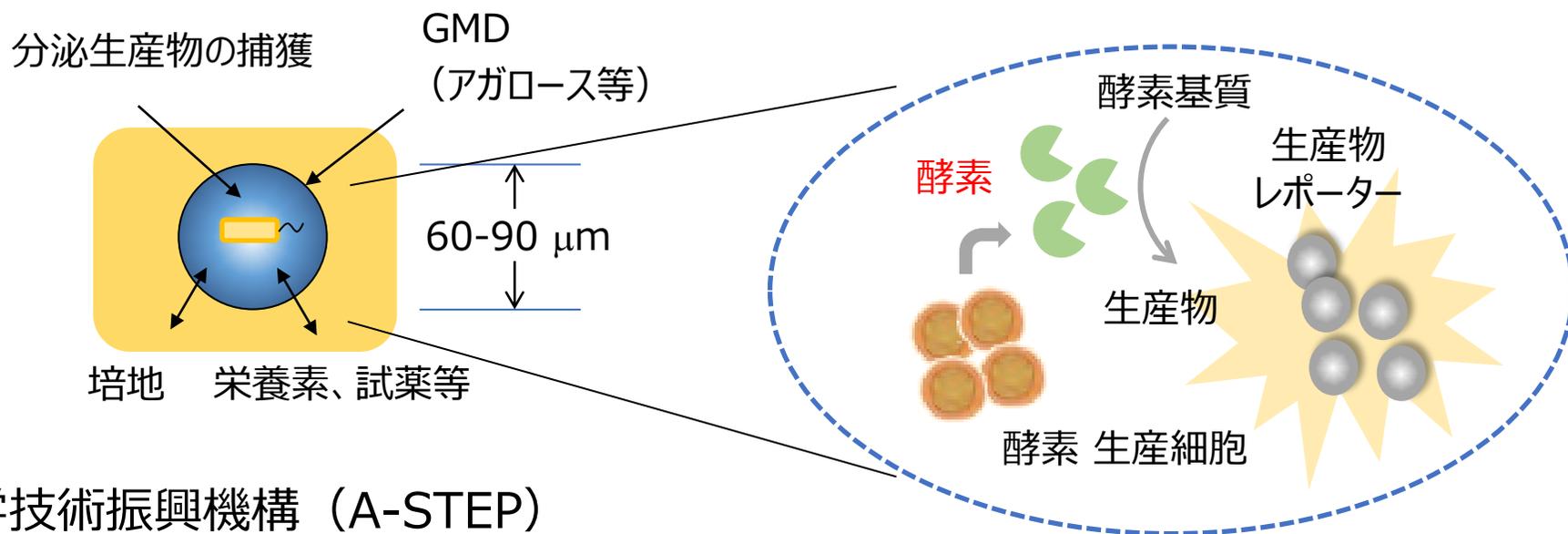
1/1,000,000以下

1/10以下に

# 技術の概要とポイント

レポーター株を用いることで、GMD内で化合物の検出が可能になる

1. **高速・低コスト**な分泌生産向上微生物スクリーニングを実現
2. 従来の**タンパク質**だけでなく、GMD内での**化合物の検出**を可能に
3. 生産化合物検出で**酵素活性の検出**に対応
4. レポーター株の変更で化合物・酵素スクリーニングを含めて**汎用化**

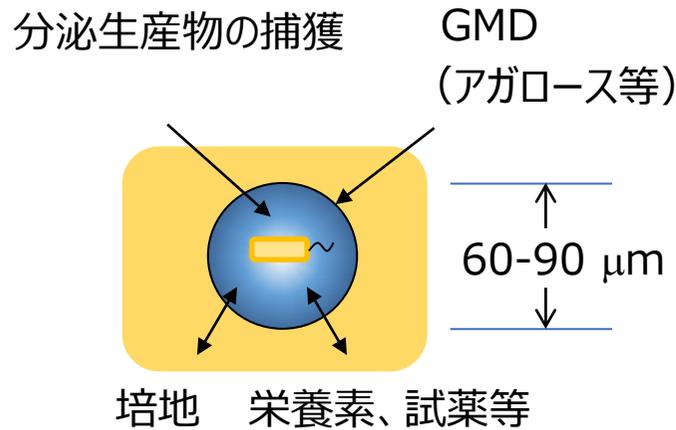


科学技術振興機構 (A-STEP)  
株式会社オンチップバイオテクノロジーズ  
\* 本研究は上記の支援を受けています。

GMD内での化合物・酵素活性の検出方法  
(タンパク質の直接蛍光標識による検出も可能)

# GMDの原理と特徴、 およびマイクロ流路を用いた作製方法

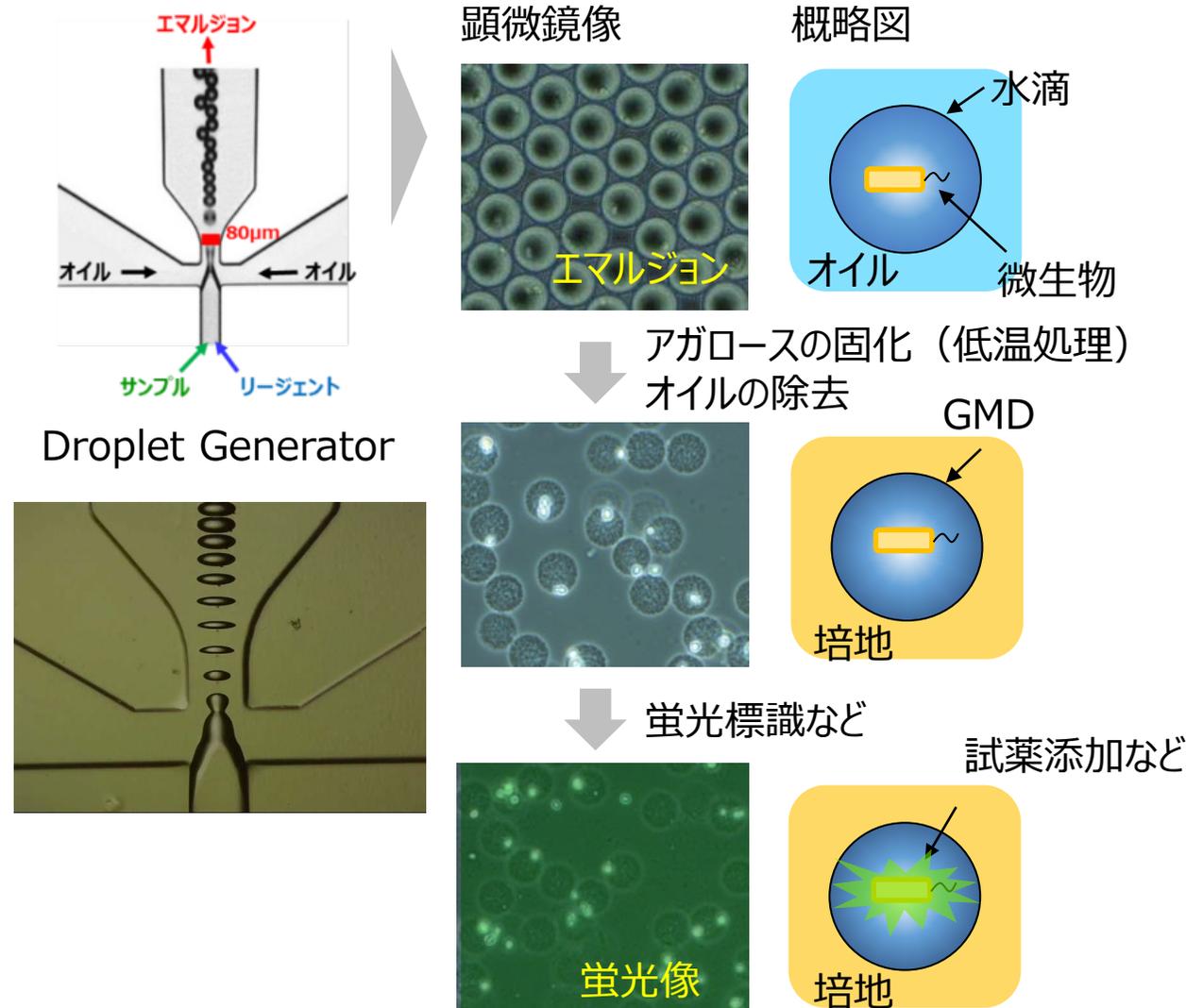
## 原理



GMD (ゲルマイクロドロップ)

- $\leq 1$  細胞/GMDに調製  
(エマルジョン作製時に限界希釈)
- 1本のチューブで $10^6$ - $10^7$   
(384穴マイクロプレートで2,600-26,000枚分に相当)

## 作製方法



# 従来技術とその問題点

## スクリーニングの重要性

- カーボンニュートラル実現が最重要課題となり
- 「バイオものづくり」（バイオプロセス化）が更に必要不可欠に
- 情報科学的解決は未だ困難で、スクリーニングが不可避
- → 迅速・低価格な大規模（ミリオン）スクリーニングが必要不可欠

## しかし、従来は以下のいずれかの二択しかなかった。

- 手作業によるプレートアッセイ等：時間と手間が必要
- ハイスループットスクリーニング等：大がかりで高コスト

→ 「短時間・低コストで大規模なスクリーニング」の方法の欠除

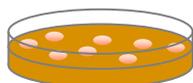
（バイテクの基盤技術にも関わらず、大規模スクリーニングは製薬など大企業しか行えない）

# 新技術の特徴・従来技術との比較①

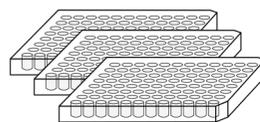
	従来技術 (手作業・小型機器)	従来技術 (大規模機器)	新技術 (GMD)
サンプル規模	× $\sim 10^4$	× $10^5 \sim 10^6$	○ $10^6 \sim 10^8$
時間・コスト	× 手間と時間が必要	× 大がかり・高コスト	○ 短時間・低コスト
効果	△ 優れた高生産株は限られたケースのみ	○ 優れた高生産株を取得できる	○ 優れた高生産性株を取得できる
適用範囲	○ 広い	○ 広い	○ 広い
対象生産物	化合物、酵素、抗体 (タンパク質) 等	化合物、酵素、抗体 (タンパク質) 等	化合物、酵素、抗体 (タンパク質) 等
対象業種	化成品企業、製薬企業、 食品会社、酵素メーカー、 農薬メーカー等	大手製薬企業、大手化学系企業のみ	化成品企業、製薬企業、 食品会社、酵素メーカー、 農薬メーカー等

## 新技術の特徴・従来技術との比較②

手作業・小型機器  
(寒天平板培養など)



大規模機器  
(ハイスループットスクリーニング)



GMD+チップ型ソーター  
(本技術による方法)



### 特徴的性能の比較

スクリーニング規模*1	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup> ~10 <sup>6</sup>	<b>10<sup>6</sup>~10<sup>8</sup></b>
スクリーニング時間*2	1~2日	1~10日*3	<b>1~数時間</b>
ランニングコスト*4	数万円	100~1000万円程度*3	<b>数万円</b>

\*1 現実的な母集団の大きさ。致死性スクリーニングなど特別なスクリーニング手段がある場合を除く。

\*2 培養に要する時間を除いた一般的な時間。 \*3 機器の性能・規模に依存。

\*4 試薬代、人件費などを考慮した一般的な推定価格。

### 実施性能の比較 (一般的と考えられる推定値)

	手作業・小型機器	ハイスループットスクリーニング	GMD+チップ型ソーター
スループット (1時間)	10 <sup>4</sup> 程度	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup> 程度 (ELISA)	10 <sup>6</sup> 程度
変異株取得のコスト(10 <sup>6</sup> から)	限られたケース以外困難	数百万円程度 (ELISA)	10万円程度*1
培地交換・誘導物添加	◎	◎	◎
結合・洗浄検出	◎	◎	◎
長時間培養	◎	◎	◎
簡便性	×	×	○

\*1 変異処理とスクリーニング1回、人件費含む (準備の中でレポーターを作製しておく: 1ヶ月程度)

従来の方法を代替する高速・安価な「変異株スクリーニング」技術を提供する

## 新技術の特徴・従来技術との比較③

- 本技術の適用により、数万円程度で $10^6$ 以上に達する大規模スクリーニングの実施が可能になる。
  - 研究開発コストを1/10程度に削減する。
  - 従来より優れた高生産株の獲得により、生産コストの更なる削減が期待できる。

# 想定される用途

業種	これまでにない特徴
化学会社、農薬会社 酵素メーカー	「低コスト」、「迅速」に優れた高生産株を獲得する
食品会社、化粧品会社	「低コスト」、「迅速」に優れた突然変異（非遺伝子組み換え）高生産株を獲得する
製薬会社	「迅速」、「低コスト」に大規模スクリーニングを達成する

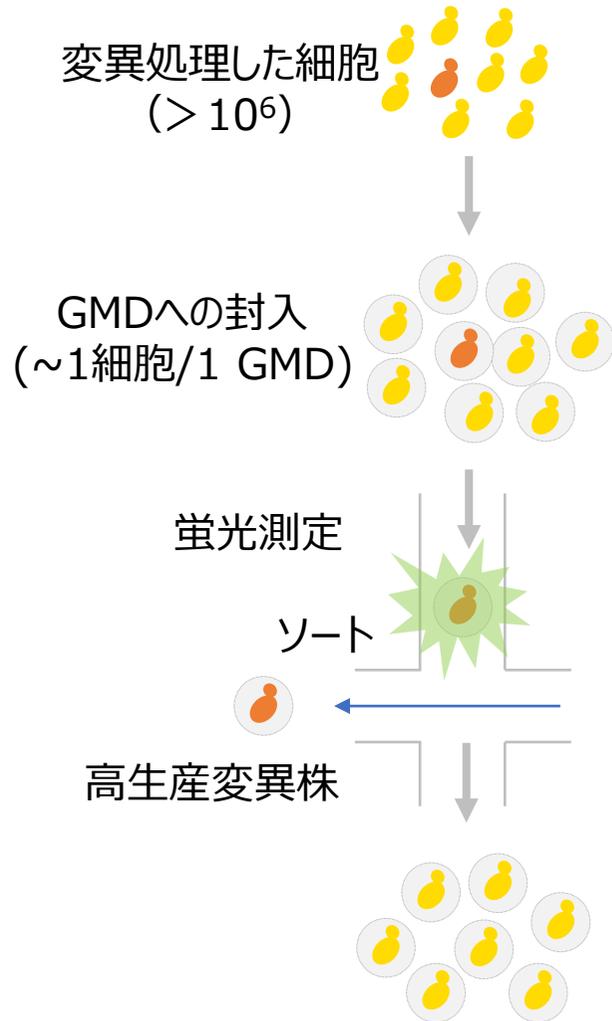
## その他の特徴

- 組換え生産細胞の更なる高生産化にも有効
- 定性的スクリーニングである「新規な物質生産微生物」の探索にももちろん利用可能。

# GMD技術の特徴

10<sup>6</sup>以上の変異処理細胞から、高生産細胞を高速にスクリーニングする

## GMDの使用例

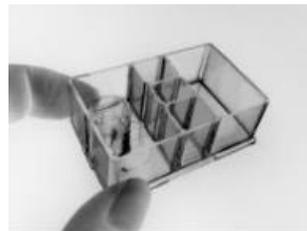


## GMDの優位性



- ~10<sup>7</sup> 個の細胞を1本のチューブで扱える
- 高い柔軟性
  - 細胞の培養可能
  - 簡単に培地交換できる
  - 化合物等で誘導可能
  - いつでも蛍光標識可能
  - GMD内の細胞は簡単に回収できる
- 低ランニングコスト
  - 試薬を大幅に節約できる
  - プラスチック廃棄物が少ない

## マイクロ流路型ソーターとの組合せの利点

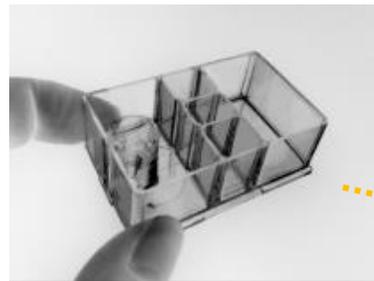
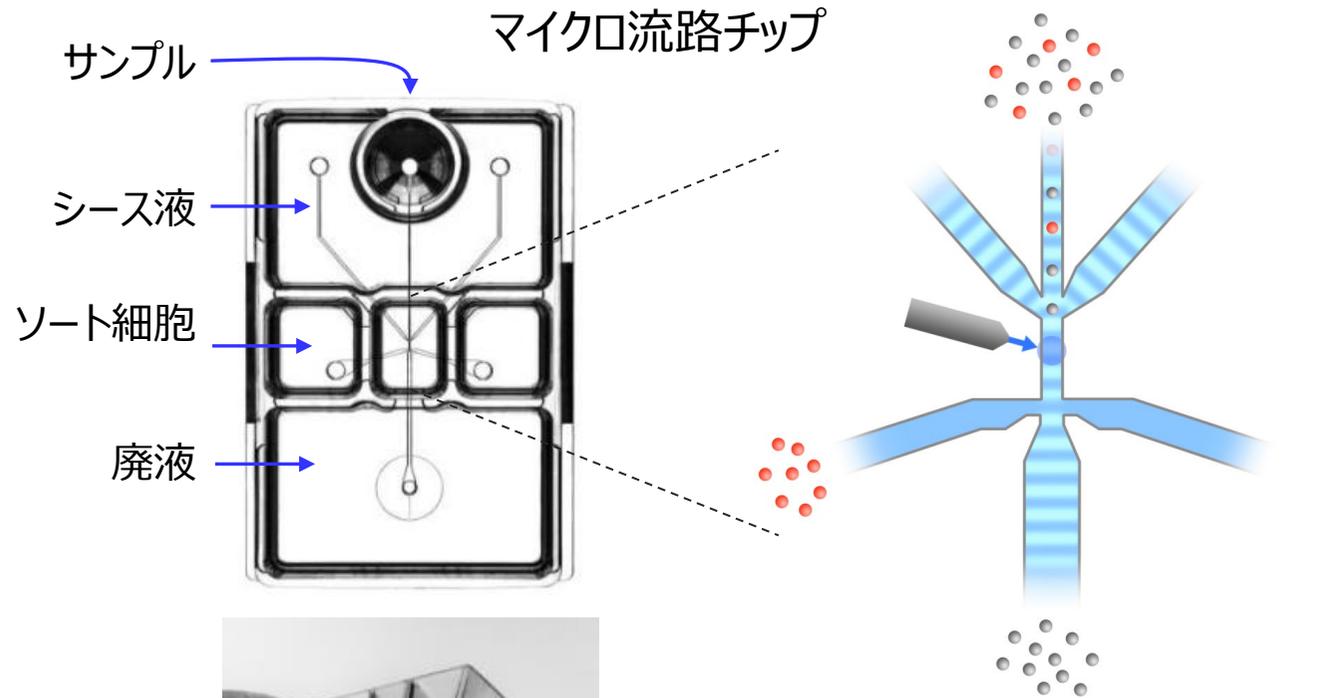
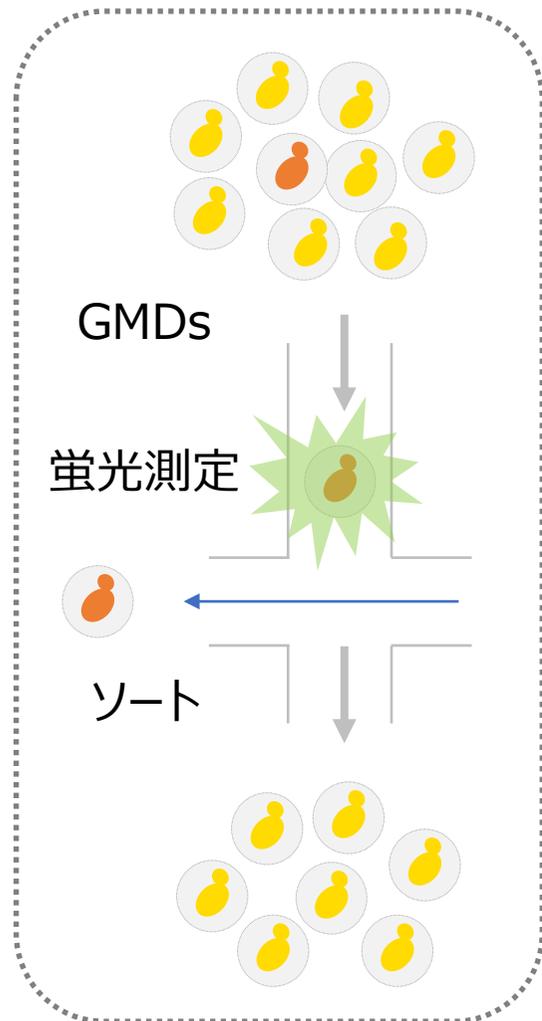


### 柔軟・簡便な操作

- 回収物を直接顕微鏡観察できる
- 高濃度で回収できる
- 迅速にソート情報を蓄積できる

# マイクロ流路型ソーターによる簡便・迅速化

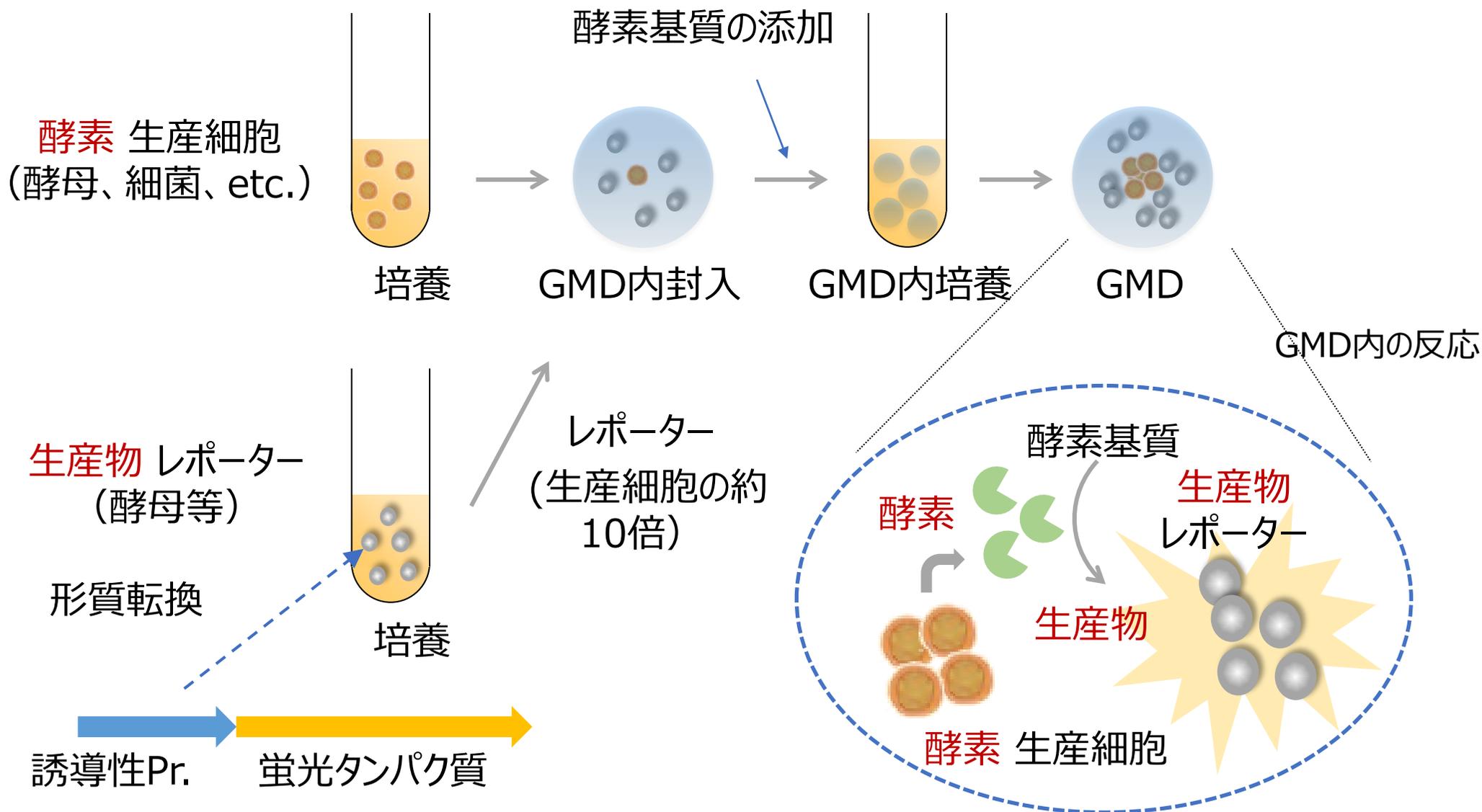
~ $3 \times 10^5$  個のGMD (細胞) は30分程度以内にソートが完了する



オンチップ・バイオテクノロジーズ社製 "On-chip Sort"

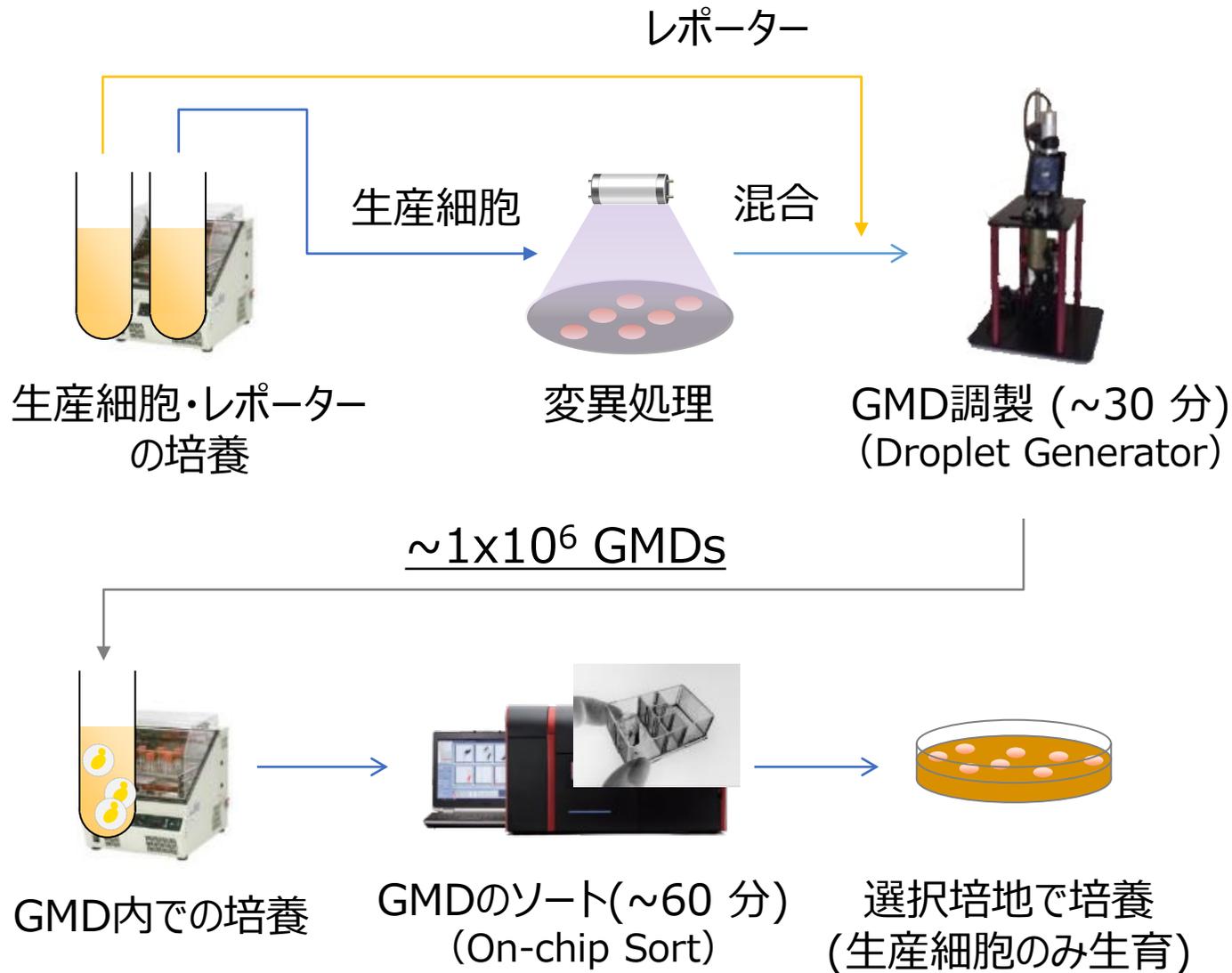
# GMD内での酵素活性の検出方法

酵素生産細胞とレポーターを封入し、GMD内で酵素活性を検出する

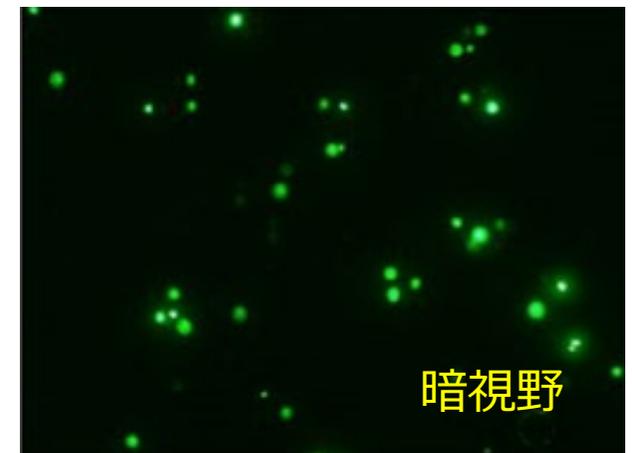
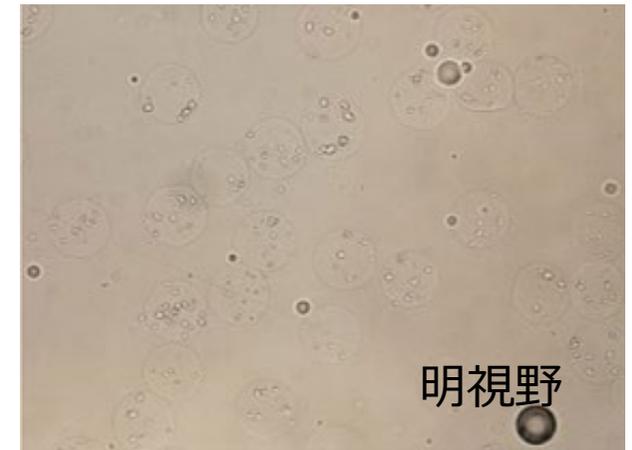


# GMDによるスクリーニングの工程

## スクリーニングの概要



## ソート前GMDの顕微鏡像



## 性能評価と取組中の課題

高生産株の高濃縮率達成、レポーター構築で様々な生産物に迅速に対応

### **β-ガラクトシダーゼ**を分泌生産する組換え体酵母の高生産化

- UV照射とスクリーニングを2回繰り返し  
取得した変異株15株で、半数以上の8株で2倍以上に高生産化  
(濃縮率は約1,000倍と推定される)  
最大約3.5倍の高生産株取得に成功
- UV照射とスクリーニングを3回繰り返し  
最大約7倍の高生産株取得に成功  
約3週間、20万円程度 (レポーター構築は別途1ヶ月程度)

### **Tryptophan**分泌生産する大腸菌の高生産化

- 多数の2~5倍の高生産株取得に成功 (詳細な解析を実施中)

**GABA**に対するレポーター作製完了など実施例を拡充中。

貴社の微生物スクリーニングのニーズをお聞かせください！

# 実用化に向けた課題

- 現在、以下が可能なところまで開発済み。
  - 化合物（主に代謝物）の分泌生産量の向上
  - 酵素・タンパク質の分泌生産量の向上
  - 対象として、バクテリア、酵母などの単細胞微生物
- 以下の点が未解決の課題・改良点である。
  - 酵素活性を持たないタンパク質は遺伝子組換えが必要  
→ 対応策は考案済、近く実証予定
  - 糸状菌(カビ)はGMDから突き出た菌糸がソートの障害になる  
→ 対策済、現在実証中
- 今後、多数の課題を実施して機能向上を計る。
  - 実際の産業課題に適用して実証し技術の周知を計る。

# 企業への期待

分野	主な対応状況・実績	主な課題
酵素メーカー	β-ガラクトシダーゼ活性検出による高生産化 (2~7倍)	様々な酵素・生産生物種への対応
化学系企業	トリプトファンの高生産化 (詳細解析中)	様々な化合物への対応
食品メーカー	GABAの高生産化 (実施中)	様々な生産物・生産生物種への対応
農薬メーカー	二次代謝物質の高生産化 (実施中)	様々な生産物・生産生物種への対応
製薬企業	二次代謝物質の高生産化 (実施中)	様々な生産物・生産生物種への対応

利用範囲の拡大と汎用化に向けて、種々企業からの受託・共同研究を希望します。

## 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 細胞のスクリーニング方法
- 出願番号 : 特願2022- 33964
- 出願人 : 金沢工業大学、東北大学
- 発明者 : 町田雅之、佐野元昭  
阿部敬悦

## 産学連携の経歴

- 2018年-2022年 オンチップバイオテクノロジーズ社と共同研究実施
- 2020年-2022年 JST A-STEP(育成型)事業に採択

# お問い合わせ先

金沢工業大学

金沢工業大学 産学連携局 研究支援推進部

T E L 076-294-6740

F A X 076-248-9508

e-mail [kitor@neptune.kanazawa-it.ac.jp](mailto:kitor@neptune.kanazawa-it.ac.jp)