

バイオテクノロジー研究開発の現状と展望

Research and Development of Biotechnology "Present and Future"

佐々木 修 一*・江 口 信 彦**

Shuichi Sasaki Nobuhiko Eguchi

1. はじめに

バイオテクノロジーとは、生体（微生物・細胞）の有する生合成・物質代謝等の機能を化学物質の生産等に合理的に利用する技術であり、その主要な技術としては、バイオリクター、細胞大量培養技術、遺伝子組換え技術、細胞融合技術等がある。

このような技術に係る研究開発は、1970年代当初にDNAの人為的組換え操作に初めて成功して以来、急速な進展をみている。欧米諸国では、産・学・官が一体となって基礎的な研究から応用技術の開発に至るまでの広い分野で技術開発が進められており、それぞれ自国の次世代の産業基盤を担う重要技術として激しい技術開発競争が行われている状況にある。

このような情勢の中で、我が国においても、通商産業省が昭和56年度に「次世代産業基盤技術研究開発制度」を発足させ、次世代産業に必要不可欠な基盤技術研究開発に着手した。本制度では、3分野12テーマ（昭和60年度から1テーマ追加し、13テーマ）が選定され、その中にバイオテクノロジー分野3テーマがある。

本稿では、本制度の下で実施されているこの3テーマに係る研究開発状況について、ご紹介することとしたい。

2. 次世代産業基盤技術研究開発制度の概要

(1) 本制度は、1990年代に発展が期待される航空・宇宙、情報処理、バイオインダストリー等の次世代産業の確立に必要な基盤技術として、

- ① 革新性が極めて強い技術であり、その波及効果も大きく、かつ、広範囲に及ぶ。
- ② 研究開発に長期間（概ね10年間）を要し、また、研究開発資金も多額なため、研究開発リスクが高

表1 次世代産業基盤技術研究開発テーマ一覧

(新材料)	(バイオテクノロジー)
ファインセラミックス	バイオリクター
高効率高分子分離膜材料	細胞大量培養技術
導電性高分子材料	組換えDNA利用技術
高結晶性高分子材料	(新機能素子)
高性能結晶制御合金	超格子素子
複合材料	三次元回路素子
光反応材料(60年度新規)	耐環境強化素子

い。

③ 欧米先進国において既に積極的に研究開発が開始されており、その研究に緊急に着手すべきである。等の要素を持つ新材料、バイオテクノロジー、新機能素子の3分野から12テーマ（60年度から13テーマ）を選び、研究開発を進めている。

本制度では、これらの技術について、理論的ないし実験的に革新的な産業技術として、その実用化の可能性が明らかにされた時点<双葉の段階>で研究開発に着手し、産業技術として実用化のメドがつくまで<若木の段階>研究開発を行うこととしている。

(2) 研究開発に当たっては、産・学・官の強力な連携の下に進めることとし、とりわけ、我が国における研究者の約6割を占める民間のポテンシャルを積極的に活用するため、民間企業への委託を柱とし、同時に、国立試験研究所においても、これまでの実績を生かして研究開発を行うほか、研究内容によって大学等からも協力を得ている。

また、研究開発を効率的に進めるため、複数の研究開発方式を同時に進める並行開発方式を採用するとともに、概ね10年という全体計画を3段階程度に区切り、それぞれの段階に一定の目標を設定する段階別目標設定方式を採用し、各段階ごとに各研究開発状況や成果を評価して最適な開発方式を選定していくこととしている。

(3) 本制度の実施体制としては、④ 本制度を通産省の

* 通商産業省工業技術院次世代産業技術開発官

〒100 東京都千代田区霞が関1-3-1

** 通商産業省工業技術院次世代産業技術企画官室

産業政策と連携させて推進していくため、重要事項の審議・決定を行う次世代産業基盤技術研究開発推進本部、㊸重要事項の決定に際して有識者からの意見を聴くための場である産業技術審議会、㊹国立試験研究所と民間委託先とで進められている研究開発の調整と研究実施者レベルでの討論を行う推進委員会、㊺研究開発を長期にわたり指導し、その方向づけを行う研究開発コーディネーター、㊻研究開発の各段階ごとの評価を行う評価委員会等を設置し、国の政策の方向との整合性を保ちつつ、効率的かつ円滑に研究開発を実施して行くこととしている。

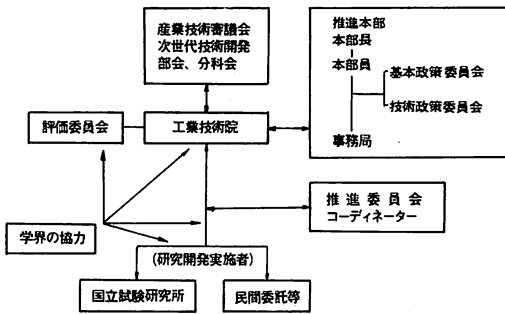


図-1 次世代産業基盤技術研究開発制度の実施体制

3. バイオテクノロジーの研究開発状況

本制度におけるバイオテクノロジー分野の研究開発は、表2に示すとおり、①バイオリクター、②細胞大量培養技術、③組換えDNA利用技術の3テーマについて研究を進めており、既に3テーマとも第一段階の評価を終了し、現在、第二段階の研究を進めている。以下、各テーマごとに研究開発の内容等についてご

紹介することとした。

3.1 バイオリクター

(1) 研究開発の目的

化学工業の主要反応のうち、エネルギーを多量に消費するもの（例えば、酸化反応、合成反応等）を大幅に省資源、省エネルギー化するため、在来の化学プロセスに代る酵素や微生物の生態機能を利用した、新プロセスである省エネルギー型バイオリクターの開発を行う。

(2) これまでの研究開発成果の概要

① 固定化材料・固定化方式の研究

酵素は、水に溶けた状態で働いているため、一度使用すると失われてしまうのが通常である。高価な酵素の有効利用を図るためには、固定化により再使用等効率的応用を図ることが必要となる。

このテーマでは、バイオリクターに用いる酵素や微生物を固定化する担体としてポリビニルアルコール（PVA）系細繊維化繊維状担体を用いた物理的吸着方式及びイオン吸着方式を主に検討した。

その結果、PVA系細繊維化繊維にジメチルアミノ基を導入したアニオン交換型担体を合成し、酵素及び酵母の固定化担体としての有効性が確認された。

また、スチルバゾリウム基を導入したPVA系感光性高分子担体が、酵素及び酵母の包括固定化材料として利用できることを明らかにするとともに、現在、この担体にリパーゼを固定化し、非水系反応への適応を図るための検討を行っている。

② 酵素の機能向上に関する研究

酵素の化学修飾剤として、N-ヒドロキシスクシンイミドモノカルボン酸エステル及びジカルボン酸エス

表2 次世代産業基盤技術研究開発制度におけるバイオテクノロジー研究開発の実施体制

テーマ名	研究開発実施計画(年度)				民間実施主体	国立試験研究所
	第Ⅰ期	第Ⅱ期	第Ⅲ期	第Ⅳ期		
バイオリクター	56	60	63	65	バイオテクノロジー開発技術研究組合	微生物工業技術研究所 繊維高分子材料研究所 化学技術研究所
細胞大量培養技術	56	59	62	64	(同上)	微生物工業技術研究所
組換えDNA利用技術	56	60	64	65	(同上)	微生物工業技術研究所 繊維高分子材料研究所 化学技術研究所

テルを合成し、乳酸脱水素酵素、グリセロール脱水素酵素及びリポキシゲナーゼとの反応特性を検討した結果、酵素の疎水性部分と修飾剤との相互作用が修飾反応速度、酵素活性等に影響を及ぼしていることを明らかにした。

③ 補酵素再生系固定化反応バイオリアクター

① 酵素の利用技術は、補酵素を持たない酵素の利用から補酵素が関与する酵素群の利用へと進んでいる。このテーマでは、酸化還元酵素に的を絞る、これの工業的利用を目指しているが、これに必要な補酵素 NAD 等は高価であるために再生利用が前提になる。ここでは、ゲル型リアクター形式を用いて、酵素・補酵素の同時固定化を図った。モデルゲル型リアクターを作製、連続運転し、評価を行ったところ、酵素・高分子化補酵素は満足し得る活性を示した。これに基づき、本手法を工業的応用に適した形態に改良するために、種々の検討を行っているが、その一例をご紹介します。酵素と NAD を同時に固定化したゲル型リアクターを、新たに合成した NAD 含有重合性単量体、アクリルアミド及びメチレンビスアクリルアミドを用いて構築し、L-リンド酸の連続生産を行った。また、酵素及び電気化学的方法による NAD 還元システムの開発のため、グラッシーカーボンピーズ、メチルピオローゲン、NAD、ジアホラーゼ及びマレイン酸脱水素酵素から成る電解共役反応系を構築し、L-リンド酸を生産した。

② 補酵素を必要とする還元反応をバイオリアクターで効率的に行うシステム化の研究開発を進めている。これは図-2に示すごとく、還元反応酵素・補酵素及び酸化させた補酵素を還元型に戻す再生反応系酵素の3要素から成る。

このバイオリアクター化のために、主反応酵素モデルとして、アルドースレダクターゼ（グリコース→ソルビトールの反応に関与）を用い、補酵素との組合せで検討を行った。これまでに得られた主な成果は次のとおりである。

有効なアルドースレダクターゼ産生株のスクリーニングを行い、ソルビトール高生産株を取得するとともに、アルドースレダクターゼの精製法を確立し、その性質を明らかにした。また、アクリルアミドを主成分

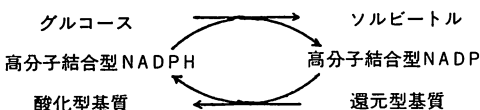


図-2 補酵素再生系還元反バイオリアクターシステム

とする共重法により、種々の高分子化 NADP を合成した。これらの系を用いて膜型のミニモデルリアクターを試作し、連続運転（300時間）を行いグルコースからソルビトールとグルコン酸を併産させることに成功した。

なお、60年度から新たなリアクター用主反応酵素を得るため、有用微生物のスクリーニングも並行的に進めている。

④ 酸化反応プロセス代替バイオリアクター

① 酸化反応プロセス代替バイオリアクターは、現在、化学工業で使用されている触媒の代わりに微生物・酵素を触媒として用い、酸化反応を行わせようというものである。本研究では、反応を行う微生物・酵素、その固定化方法、原料、反応生成物、リアクターシステム等が主な検討項目である。これまでに、バイオリアクター作製に最適な微生物の反応を選択すべく、土壌等から採取した有用微生物のスクリーニングを行い、これまで知られていなかった化学反応を行う微生物が多数分離、同定された。しかしながら、これらの中から絞り込まれた有用菌株は未だ工業用バイオリアクターに用いるには不十分な活性であり、現在、これら有用微生物の育種改良、培養条件等の検討を行うとともに微生物の特性を踏まえた最適反応方式の検討も行っている。更に、今後は、精製・抽出技術及び化学工学的技術を含む多くの技術開発課題に取り組んで行くこととしている。

② これまで得られた主な成果は次のとおりである。

- 安息香酸の高度利用菌株を取得し、これを親株として変異処理を行った結果、安息香酸をほぼ定量的に変換してシス・シス・スームコン酸（機能性樹脂原料等への利用が期待されている。）を著量（30g/l/3日）蓄積する変異株を得ることができた。
- 炭酸ガスと水素から酢酸を生産する高濃度生産菌株を取得し、変異育種、培養条件（加圧培養）等を検討した結果、著しく酢酸生産速度（13.4 g/l/日）の向上が図られた。
- フェノールからヒドロキノンを生産する優良菌株を取得し、種々の反応条件等の検討を行った結果、フェノールの逐次添加法によってヒドロキノンを著量（9.5g/l/10日）蓄積することを見出した。また、ニトロソグアニジンを用いた変異処理によってヒドロキノンを耐性株が得られつつあり、高活性でヒドロキノンを耐性を有する変異株取得の可能性がでてきている。

3.2. 細胞大量培養技術

(1) 研究開発の目的

化学工業の高付加価値化を図るため、従来の合成法によっては、工業的生産が不可能であったファインケミカル製品を、動物細胞の生体機能を活用し、現在、動物細胞の培養に不可欠となっている牛胎児血清の代替物等を開発し、大量かつ安定的に供給することができる動物細胞の高密度培養による有用物質の工業生産方式を開発する。

(2) これまでの研究開発成果の概要

① 細胞の増殖制御要因に関する基礎的研究

本テーマでは、ヒト血管細胞等における細胞自身の増殖制御因子を探索し、解析する。また、永久株化細胞と有限増殖細胞の増殖に対する増殖制御因子の作用を比較検討することによって、有限増殖細胞の長期培養化と増殖を制御する機構解明を図り、細胞の大量培養ひいては有用活性物質の生産に資することを目的として昭和60年度から研究を開始した。これまでにヒトを含む哺乳類動物の血管から、内皮細胞を選択的に単離し、その長期継代培養技術を確立した。

② 無血清培地・培養工学等を主体とする最適培養法による工業的物質生産法

ウイルス誘導インターフェロン産生株としてナマルバ細胞を用い、無血清培地の改良を目的として各種添加物の効果を検討し、基礎培地にインシュリン、トランスフェリン、ピルビン酸、亜セレン酸、ガラクトースを添加したいわゆるITPSG培地を開発した。また、白血病由来細胞株の産生する増殖因子(LGF: Leukemia derived Growth Factors)について、最適生産法、精製法等を明らかにするとともに精製及びアミノ酸の部分配列の決定を行った。

培養装置に関しては、逆円錐型細胞沈殿管付連続灌流培養装置を開発し、栄養物供給、老廃物除去、pHコントロールすることにより、 1×10^7 cells/mlまで細胞を無血清で培養することができた。また、更に高密度にするために透析膜を利用した透析培養装置を作製し、モデル実験を試みた結果、 3×10^7 cells/mlまでナマルバ細胞を高い生存率で増殖させることができた。

③ 細胞高密度培養法・無血清培地開発等を主体とする工業的物質生産法

ヒト・インターフェロン自発産生株を素材として、高密度細胞培養用無血清培地の改良を行い、細胞増殖性の高い加熱滅菌可能な新規無血清培地を開発した。

また、無血清培地を用いる灌流培養法により、 1×10^7 cells/mlの細胞密度を達成し、連続培養を可能にした。更に、細胞高密度維持因子の精製を行った。

④ 浮遊細胞系・準浮遊細胞系を用いた工業的物質生産法

無血清培地(工業用培地)として、インシュリン等を含む基礎培地に動物血清の硫安画分(GFS)を添加した培地(GI培地)の検討を行い、最適培地を作製した。また、GFSの原料として、各種大動物由来の多ロット血清の有効性を確認し、その滅菌法の最適化、大量試製の基本技術を検討した。

一方、ヒトモノクローナル抗体産生株取得のための各種ハイブリドーマ系の比較検討を行い、(マウス・ヒト)ーヒトハイブリドーマ系の有用性を確認し、この系を用いた抗B型肝炎ウイルス表面抗原ヒトモノクローナル抗体産生株及び抗破傷風トキソイドヒトモノクローナル抗体産生株を取得した。更に、ヒトリンパ球との細胞融合効率が優れている新規親株も取得した。

⑤ 骨髄由来細胞を用いた工業的物質生産法

分化の途中で腫瘍化した骨髄性白血病細胞の増殖能を活用して大量培養(増殖工程)、これを人為的にマクロファージ様細胞等に分化誘導(変換工程)、適当な条件で培養を続け有用物質を生産する(生産工程)三つの工程からなる分化誘導法を提案した。まず、検討モデルとしてマウス骨髄性白血病細胞を人為的にマクロファージに変換させた細胞から有用物質(分化誘導因子)を産生する現象を認め、分化誘導法の可能性を見出した。

また、この分化誘導培養方式を各種ヒト骨髄性白血病細胞に応用し、細胞分化誘導因子(DAF)等の生理活性物質を産生する細胞株を選定し、無血清培地への馴養を行い、増殖優良株を育種するとともに、この細胞に最適な完全無血清培地を試作した。また、馬血清由来の増殖促進物質の単離・精製に成功し、アミノ酸配列の解析を行った。

⑥ 上皮細胞由来細胞を用いた工業的物質生産法

ヒト上皮系癌組織を対象に細胞分化増殖因子(CSF)産生細胞を検索し、長期間安定したCSF産生能の強い細胞の株化樹立に成功した。この株化細胞を用いて無血清培養に必要な培地成分を解析し、無血清培地を試作するとともに、無血清培養に適した細胞育種を行い、親株と同等のCSF産生能をもつ無血清馴化株を作製した。

また、付着依存性細胞のマイクロキャリア培養法の

基礎的条件等の検討を行い、高付着率で、かつ付着の均一性が著しい細胞付着技術を確立した。

一方、ヒトCSF産生細胞として新たに細胞株を樹立し、長期間の生産性と細胞生物学的特性を明らかにした。

3.3 組換えDNA利用技術

(1) 研究開発の目的

DNA実験指針で認められている宿主ベクター系又は新たに開発する安全性の高い宿主ベクター系を用いて、工業的に利用可能な物質生産機能（例えば、石油以外の原料から含酸素化合物を効率的に生産する機能、高効率の酸化機能等）を有する新規微生物をDNAの組換え操作により創製する技術を開発する。

(2) これまでの研究開発成果の概要

① 組換えDNA基礎技術

① 新規宿主ベクター系の開発に関する研究

常温では生育せず、腸内寄生性のない好熱性微生物は、その耐熱性機能や雑菌汚染の少ない高温発酵プロセスの観点から注目される。ここでは、高度好熱菌、中等度好熱菌における宿主ベクター系開発を目標として、分離したプラスミドの基本的性質、複製能、耐性遺伝子の温原依存性、形質転換法等の検討を行った。

現在までに、高度好熱菌（*Thermus* 属）より多数のプラスミドを単離し、詳細な制限酵素切断地図を作成した。また、中等度好熱菌由来の薬剤耐性プラスミドを分離し、構造解析を行うとともに宿主内での温度特性を解析し、複数のクローニング部位及び挿入失活部位を保持する3剤耐性ベクターを作製し、宿主内での安定機能を実証した。

② 遺伝子の配列・分子設計に関する研究

組換えDNAによる外来遺伝子の発現には、宿主内で機能し得るプロモーター遺伝子の存在が不可欠であるが、大腸菌のジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子を利用して、遺伝子のプロモーター活性推定法を確立するために、プロモーターを導入することによって、トリメトプリム耐性が発現するプロモーター・クローニング用プラスミドベクターを作製した。更に、プロモーター強度の正確な測定及びプロモーターの性質の推定が可能なベクターに改良した。また、ターミネーター・クローニング用プラスミドの開発も行った。

③ DNAの機器分析法による構造解析

DNAの構造解析において、従来の一次構造（塩基配列）の解析から更に進んだ高次構造の解析を目的に機器分析の検討を行っている。

現在までに、核磁気共鳴法を用いて、 ^{13}C 、 ^{15}N 、及び ^{31}P -NMRスペクトル測定の標準化を行い、低分子DNA及びその関連化合物の ^{13}C -NMRスペクトルを測定・解析し、スペクトルデータを蓄積した。また、SV40ウイルスの合成プロモーターの ^{13}C -NMRスペクトルを解析し、プロモーター部分の立体的相互作用を解明した。

④ 高酸化反応性プロセス用菌株の創製法

肝ミクロソームに局在するチトクロームP-450依存性の酸素添加酵素は、P-450とNADPH-P-450還元酵素（Fpt）から成る複合酵素系で、種々の脂溶性化合物に対して一原子酸素添加反応を示す。本テーマは、この酸素添加酵素を構成する酵素の遺伝子をクローニングし、酵母などの微生物に賦与・発現させることにより、高酸化活性を有する新規菌株を創製することを目標としている。これまでの主な成果は、次のとおりである。

① ラットの肝ミクロソームから精製したチトクロームP-450を用いてウサギ抗体を調製し、試験管内翻訳系でmRNAから生成した目的酵素蛋白質を免疫化学的に検定する方法を確立した。

② チトクロームP-450 cDNAのクローニングを行い、得られた完全長cDNAの全塩基配列を決定した。

③ 大腸菌の特定プロモーターの下流にP-450の構造遺伝子を連結した発現プラスミドを構築して大腸菌に導入し、P-450蛋白質の発現を確認した。

④ 酵母プロモーターとターミネーターの間にP-450の構造遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを構築して酵母に導入し、P-450蛋白質の発現を確認した。また、得られたP-450発現酵母菌株は、高活性な酸化反応性を示した。

⑤ 得られたP-450発現遺伝子とアミノ酸配列の類似しているP-450 d 遺伝子とのキメラ遺伝子の構築に成功し、従来より2.5~3倍高い酵素活性をもつP-450発現酵母菌株が得られた。

⑥ P-450とFptとの同時発現酵母菌株を創製し、それぞれ 4×10^5 分子のP-450及び 1×10^4 分子のFptの発現を確認するとともに、この酵母菌株による酸化活性をP-450単独発現菌株の2倍に増大させた。

⑦ 枯草菌系高効率分泌菌株の創製法

枯草菌（*ナットウ菌*）は優れた安全性と多量の蛋白質を菌体外に分泌する能力をもっている。枯草菌のこれらの特徴を生かした異種蛋白質の高効率発現・分泌系の開発は、工業的にも期待されている。本テーマは、

工業的に使用可能な枯草菌分泌宿主ベクター系を創製することを目標としている。これまでの主な成果は、次のとおりである。

- ㊸ 強力なプロモーターの効率の高いシグナル配列DNAを有すると考えられているバチルス属細菌の中性プロテアーゼ遺伝子のクローニングに成功し、このプロモーター、シグナル配列DNA、N末端のアミノ酸配列に対応するDNA塩基配列を決定した。また、アミラーゼ遺伝子についてもクローニングに成功し、プロモーター及びシグナル領域の塩基配列を決定した。
- ㊹ 中性プロテアーゼ遺伝子のシグナル配列を利用した分泌ベクターを創製し、枯草菌からヒト β -インターフェロンを培地中（菌体外）に分泌させることに成功した。
- ㊺ 菌体外へのプロテアーゼ分泌を促進するDNA配列をクローニングし、全塩基配列を決定した。
- ㊻ 宿主として、中性プロテアーゼ欠損株を造成した。
- ㊼ 本研究で創製した分泌ベクター改良してその発現、分泌効果を調べるために、複数の目標異種遺伝子を選定し、枯草菌系における分泌を試みた結果、5~30mg/lのヒト成長ホルモンを培地中に分泌させることに成功した。
- ㊽ 高分泌酵母系菌株の創製法

本テーマは、新たな原料資化性、酵素の分泌性等、化学工業原料代替の機能を有する酵母分泌宿主ベクター系を創製することを目標としている。これまでの主な成果は、次のとおりである。

- ㊸ *B.circulans* のアミラーゼ遺伝子、*Saccharomyces* 属酵母の性因子遺伝子及び *Kluyveromyces lactis* の β -ガラクトシダーゼ遺伝子をクローン化し、構造解析を行った。
- ㊹ 取得した各種遺伝子を利用した発現・分泌ベクターを構築し、これらを用いて、アミラーゼや β -エンドルフィン培地中に分泌させることに成功した。
- ㊺ *S.cerevisiae* の α 因子の前駆体のリーダー配列中に含まれる糖鎖の分泌に対する影響を調べ、糖鎖の機能を明らかにした。

4. バイオインダストリーの将来展望

バイオテクノロジーは、その研究方法や応用技術が十分確立されておらず、不透明な要因が多く、その見通しは当分の間かなり変化を繰り返すものと考えられ、常に最新の技術情報を収集し、技術予測を行っていく必要があると指摘されているところである。

一般的に言えば、バイオテクノロジーは多くの可能性を秘めた基盤的・先端的技術であり、長期的には、産業、社会等全般にわたって大きなインパクトを及ぼすものと予測される。即ち生産プロセスや原料及びエネルギー需給構造の変化による産業構造の変容、農業の工業化、予防医学の普及、更には新たな産業構造、国民ニーズに応じた社会制度の変化等バイオテクノロジーのインパクトは極めて大きなものになるといわれている。

一方、(財)発酵工業協会バイオインダストリー振興事業部(BIDEC)が行った将来予測によれば、西暦2000年におけるバイオインダストリーの生産規模は15兆円にもものぼるという結果が得られているが、重要なことは、こういった将来の市場が無条件にもたらされるものではなく、多くの課題を克服した上ではじめて達成されるということである。このようなことから、次世代産業基盤技術研究開発の成果が課題克服の1つのカギとなることを期待しているものである。

5. おわりに

本稿では、「次世代産業基盤技術研究開発制度」の下で実施されているバイオテクノロジー3テーマの研究開発の現状を中心にご紹介した。

3テーマとも、第1期の基礎研究は順調に進展したが、第2期以降、工業技術として“実りある若木”にまで展開するには、多くの技術的課題、例えば

- ・バイオリアクターでは、得られた微生物の生産能力の向上、微生物の固定化や生産物の回収技術の確立等。
- ・細胞大量培養技術では、無血清培地の汎用性(各種細胞への適用)の向上、高密度化、培養規模のスケールアップ化等。
- ・組換えDNA利用技術では、組換え体の発現能力の飛躍的向上、宿主ベクター系の改良や目標異種遺伝子の構造改変等。

の解決が必要であり、一層の研究開発努力が望まれているところである。