特集

「バイオものづくり」のための共通基盤技術　4

糸状菌の液体培養におけるスケールアップに資する細胞表層改変

薄田隼弥 Shunya SUSUKIDA　渡嘉敷直杏 Jikian TOKASHIKI
阿部敬悦 Keietsu ABE

麹菌をはじめとする糸状菌は，酵素や化成品の発酵生産に広く利用される一方，液体培養時の形態多様性と培養液物性の悪化が生産効率を制限する。本稿では，細胞表層改変による培養形態の制御と物性改善および生産菌株の改良とスケールアップへの応用を紹介する。

糸状菌を宿主とする物質生産の現状と課題

糸状菌による有用物質生産では，栄養源，誘導基質および酸素の供給を制御しやすい気-液の通気撹拌培養が広く用いられ，その生産規模は数十から数百 kL に及ぶ[1]。液体培養中の糸状菌は，菌種や培養条件に応じて菌糸が接着・交絡したペレット状から菌糸が液中に分散したパルプ状まで多様な形態を示す[2]。ペレット状形態では内部への酸素や栄養素の供給が制限され，生産性の低下を招くことがある[2]。ゆえに多くの産業現場においてパルプ状形態が主流だが，パルプ状形態は菌体濃度の上昇に伴って流動抵抗が増大し，培養液の粘度が上昇して顕著な非ニュートン性を呈する[2]。高粘度かつ非ニュートン性を示す培養液では，撹拌・混合や通気気泡分散が不均一となり，酸素移動が制限されるため，目的物質の生産性が低下し得る。

液体培養を用いる工業生産ではペレット形態を占有させて粘度を下げることや低粘度性を有するパルプ形態が望まれるが，そのための形態制御は容易ではない。これまで，撹拌速度，温度，pH および接種分生子数の調節，微粒子の添加等により，菌糸の凝集やペレット形態を制御する試みが行われてきた[2]。しかし，これらは主として培養条件から形態を操作する方法であり，菌糸が接着・凝集してペレットを形成する生物学的機構と，菌糸および細胞表層構造が培養液を高粘度化する機構は，いずれも十分には解明されていなかった。

菌糸接着因子の発見と菌糸分散糸状菌の開発

筆者らは，麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム情報を活用した一連の研究の中で，環境ストレス応答とそのシグナル伝達に関する研究，特に細胞壁構築に関与する cell wall integrity MAP kinase（CWI）経路の解析とそれを応用した抗真菌剤開発研究を行ってきた[3]。細胞壁は細胞形態の維持や細胞の保護，細胞外情報の細胞内への伝達など，生育に必須の役割を担う[3]。糸状菌の細胞壁は α-グルカン（α-1,3-グルカン[AG]および少量の α-1,4-グルカン）や β-グルカン（β-1,6 分岐 β-1,3-グルカン[BG]），キチン，ガラクトマンナンなどの多

すすきだ・しゅんや
東北大学大学院農学研究科　博士後期課程 3 年
〔経歴〕2024 年東北大学農学研究科修士課程修了，同年より現課程。〔専門〕応用微生物学。〔趣味〕ランニング，DIY。
E-mail: shunya.susukida.p2@dc.tohoku.ac.jp



とかしき・じきあん
東北大学大学院農学研究科　助教
〔経歴〕2021 年鹿児島大学大学院連合農学研究科博士後期課程修了，博士（農学）。22 年より現職。〔専門〕発酵微生物学。〔趣味〕掃除，お茶。
E-mail: jikian.tokashiki.b2@tohoku.ac.jp



あべ・けいえつ
東北大学大学院農学研究科　教授
〔経歴〕1981 年東北大学農学部卒業，同年キッコーマン株式会社研究員，93 年 Johns Hopkins 大学研究員，99 年東北大学大学院農学研究科准教授を経て，2009 年より現職。19～21 年同大学農学研究科長・農学部長，24 年より同大学副理事（人事戦略担当）。1991 年博士（農学）（東京大学）。〔専門〕応用微生物学。〔趣味〕山登り，自転車。
E-mail: keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp



糖より構成され，その外層は主に水溶性多糖から構成される細胞外分泌マトリックスで覆われている[3]。

出芽酵母のCWI経路は細胞壁多糖のBGおよびキチンの生合成関連遺伝子の転写を制御することが知られていた。一方，筆者らはモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* を用いた解析から糸状菌のCWI経路が出芽酵母が有しないAGの合成酵素遺伝子の転写を制御することを明らかにした[4]。またその後，ヒト感染性の二形性真菌では細胞壁外層に局在するAGが免疫刺激性の高い内層BGを被覆することで宿主免疫応答を回避して感染を成立させる機構（AGのステルス機能）が明らかとなった[5]。これらの知見から，AGの生合成機構は抗真菌剤標的となり得ると考え，*Aspergillus* 属菌のAG合成酵素遺伝子の機能解析を進めた。

A. nidulans が有するAG合成酵素遺伝子（*agsA*，*agsB*）について遺伝子破壊株を作製して表現型を解析した結果，液体培養において野生型株は菌糸ペレットを形成しながら生育するが，AGを欠損した株（AGΔ）では菌糸が培地中に均一分散する顕著な表現型が観察された[3]。生存には必須でないAGは抗真菌剤標的の対象から外れることとなったが，AGの菌糸接着機構という新たな研究領域を切り開いた。

AGΔ株の菌糸分散性は液体培養における撹拌効率と酵素生産性を大きく改善する技術となることが予測された[1]。そこで産業菌として酵素生産に広く用いられる麹菌 *A. oryzae* についてAGΔ株を作製した。ところが，AGΔ株は野生型株より小型のペレットを形成したが，完全分散には至らなかった（図1，AGΔ株）[6]。そのため麹菌にはAG以外にも菌糸接着に関与する第二の菌糸接着因子の存在が想定された。

ヒト感染性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* では，感染因子となるバイオフィルムとしてガラクトサミノガラクタン（GAG）が分泌されることが知られていた[7]。麹菌のゲノムにもGAG生合成遺伝子クラスターが保存されていたことからGAGが第二の菌糸接着因子であると予測し，麹菌のAGΔ株を親株としてGAG生合成遺伝子の一部を破壊したところ，得られた株（AGΔ-GAGΔ）の菌糸は液体培養において完全分散した（図1，AGΔ-GAGΔ株）[8]。この結果から，麹菌においてはAGに加えてGAGも菌糸凝集に寄与しており，麹菌における菌糸完全分散にはAGとGAGの生合成遺伝子両方の欠損が必要であることが示された[8]。

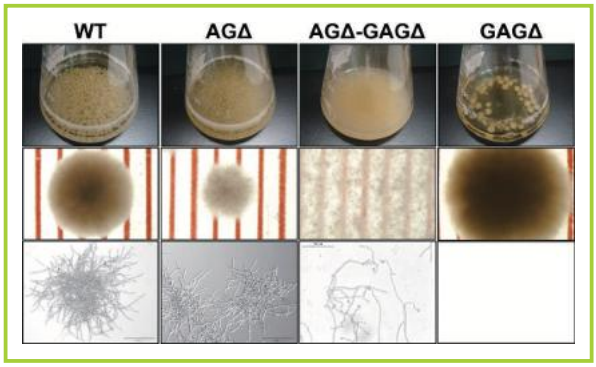


図1　細胞表層多糖の欠損による麹菌の菌糸分散性

菌糸分散株を用いた物質生産

筆者らはAGΔ-GAGΔ株を酵素生産宿主として利用するため，宿主改良と培養技術の開発を進めてきた。ポリエステル分解酵素クチナーゼをモデル組換え酵素としてフラスコスケールで培養したところ，AGΔ-GAGΔ株の酵素分泌生産量は野生型株に比べて約4倍に増加した[9]。櫻川らによるメタボローム解析からAGΔ-GAGΔ株では中央代謝経路のフラックスが活性化したことが示された[10]。さらに筆者らは，ラボスケールの発酵槽（5 L）においてAGΔ-GAGΔ株が野生型株比で2倍の酵素生産性を示すことを明らかにした[9]。

発酵槽内の高粘度化した培養液において，流動状態やそれに対する細胞の応答を外部から直接観察することは難しい。そこで筆者らは発酵槽内で生じる現象を，流動・物質移動を対象とする巨視的解析と，細胞内代謝を対象とする微視的解析の両面から検討した。

巨視的解析では，まず培養液粘度の測定と色素トレーサーを用いた混合試験により，AGΔ-GAGΔ株の培養液が野生型株より低粘度であり，混合性に優れることを確認した[9]。さらに，溶存酸素（DO）濃度および排気ガスの分析から総括酸素移動容量係数（k_La）を求め，同株では槽内の酸素移動が改善されたことを示した。実測した培養液粘度を物性値として用いた数値流体力学（computational fluid dynamics: CFD）解析では，野生型株の高粘度培養液では流動が撹拌翼近傍に偏り，気泡が十分に分散せずに滞留するのに対し，AGΔ-GAGΔ株では滞留域が縮小し，槽内循環と気泡分散が改善することが予測された（図2）[11]。この結果は，k_La の実測結果や槽内に配置した多数の熱電対を用いた多点温度測定法による混合試験結果と整合した[11]。

一方，微視的解析として，バイオリアクター培養中のトランスクリプトーム，細胞内メタボロームおよび培養上清中の代謝物を解析した。野生型株では，菌体量の増加と培養液の高粘度化に伴って混合と酸素供給が制限され，TCA回路関連遺伝子の発現低下と中間代謝物の細胞外への蓄積が認められた。このことから，好気的なエネルギー代謝が制限され，解糖系への依存度が高い代謝状態に移行していると考えられた[11]。これに対し，酸素移動に優れるAGΔ-GAGΔ株では解糖系

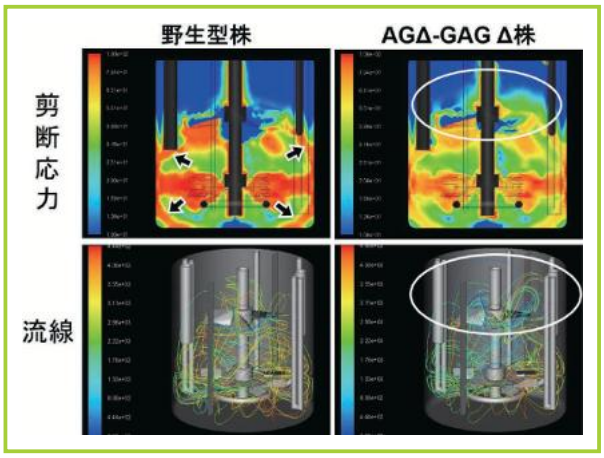


図 2　麹菌野生型株と AGΔ-GAGΔ株の培養液の CFD 解析

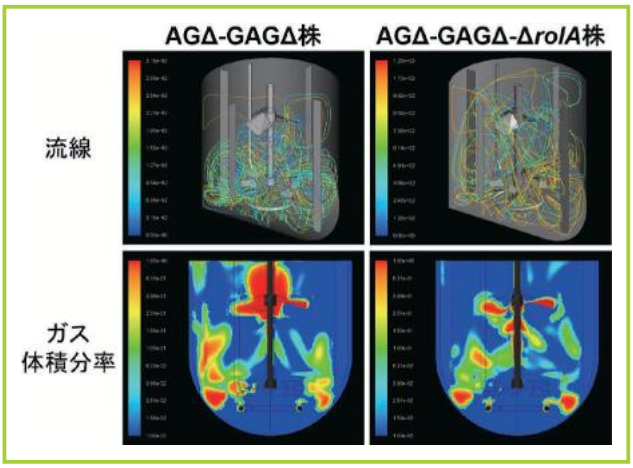


図 3　AGΔ-GAGΔ-Δ*rolA* 株の CFD 解析（200 L 槽）

から TCA 回路に至る遺伝子群の発現が高く維持され，代謝中間体の蓄積も抑えられていた。また，タンパク質合成の基質となる細胞内アミノ酸プールが増加しており，組換え酵素生産に適した代謝状態が維持されていることが示唆された[11]。

以上の巨視的・微視的解析から，AG および GAG の欠損による菌糸分散と培養液粘度の低下が，槽内の循環，気泡分散および酸素移動を改善し，その結果としてタンパク質生産に適した細胞状態が維持されるという，一連の機構が示された。

スケールアップに向けた応用技術

培養液の粘度が低下した AGΔ-GAGΔ 株であっても，菌体密度の上昇に伴って物性が悪化し，菌体が槽壁内面やユーティリティへ付着することで生産効率が低下するなど，スケールアップ上の課題を抱えている。糸状菌の細胞表層にはハイドロフォビンと呼ばれる界面活性タンパク質が局在し，細胞表層の疎水化と固体基質への接着などの機能を有する[12]。筆者らはハイドロフォビンの欠損が培養性状改善につながるのではと着想し，麹菌が有するハイドロフォビンの 1 つである RolA を欠損させた AGΔ-GAGΔ-Δ*rolA* 株を作出してその培養性状を評価した。AGΔ-GAGΔ-Δ*rolA* 株はフラスコ，ラボスケール発酵槽の培養において壁面への菌体付着量が低下し，組換え酵素生産性が増加した[13]。200 L のパイロットスケール試験では，CFD 解析によって AGΔ-GAGΔ-Δ*rolA* 株が AGΔ-GAGΔ 株よりも撹拌所要動力が低下し流動性やガス分散性が向上することが示された（図 3）。同株のスケールアップ実証は 3000 L まで成功し，撹拌所要動力をスケールアップファクターとする場合に生産性が低下することなくスケールアップが可能なロバストな菌株であることが示された[13]。

おわりに

糸状菌の液体培養では菌体形態や培養液粘度を制御する様々な試みがなされてきたが，産業規模の発酵槽内で生じる流動現象と細胞応答の関係は十分に理解されていない。筆者らが見いだした細胞表層構造の改変技術は，菌糸形態と培養液粘度を制御し，撹拌・混合プロセスの改善を通じて栄養素や酸素の供給を高め，物質生産性の向上をもたらす。また，改変株の性能を評価するために巨視的・微視的現象を多角的に解析することで，槽内現象の理解を進めるとともに，生産プロセスの省エネルギー化，コスト低減および培養設備のフットプリント縮小等に寄与する可能性がある。AGΔ 株および AGΔ-GAGΔ 株を用いた生産技術はすでに特許化され，国内外への技術移転も始まっている[14, 15]。今後も，多様な糸状菌と工業培養プロセスに適用可能な基盤技術への発展を目指したい。

この成果は，科研費基盤（B）20H02895 および 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」JPNP20011 の支援を受けた研究成果を含む。スケールアップ試験は合同酒精（株），佐竹マルチミクス（株）と共同で実施した。感謝申し上げる。

1）吉見　啓, 宮澤　拳, 阿部敬悦, 技術情報協会 **2021**, 178.
2）T. Wucherpfennig et al., in *Adv. Appl. Microbiol*., Elsevier, **2010**, 72, 89.
3）A. Yoshimi et al., *J. Fungi* **2022**, *8*, 435.
4）T. Fujioka et al., *Eukaryot. Cell* **2007**, *6*, 1497.
5）C. A. Rappleye et al., *PNAS USA* **2007**, *104*,1366.
6）K. Miyazawa et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2016**, *80*, 1853.
7）T. Fontaine et al., *PLoS Pathog*. **2011**, *7*, e1002372.
8）K. Miyazawa et al., *Front. Microbiol*. **2019**, *10*, 2090.
9）H. Ichikawa et al., *J. Biosci. Bioeng*. **2022**, *133*, 39.
10）T. Sakuragawa et al., *J. Biosci. Bioeng*. **2021**, *132*, 140.
11）S. Susukida et al., *Biotechnol. Bioeng*. **2025**, *122*, 2389.
12）T. Tanaka et al., *Microorganisms* **2022**, *10*, 8.
13）S. Susukida et al., *bioRxiv* **2026**, 739278.
14）阿部敬悦ほか, 特許第 6132847, USPT11015175, EP2918682.
15）阿部敬悦ほか, 特許第 6647653, USPT11021725, EP3620509.

© 2026 The Chemical Society of Japan