

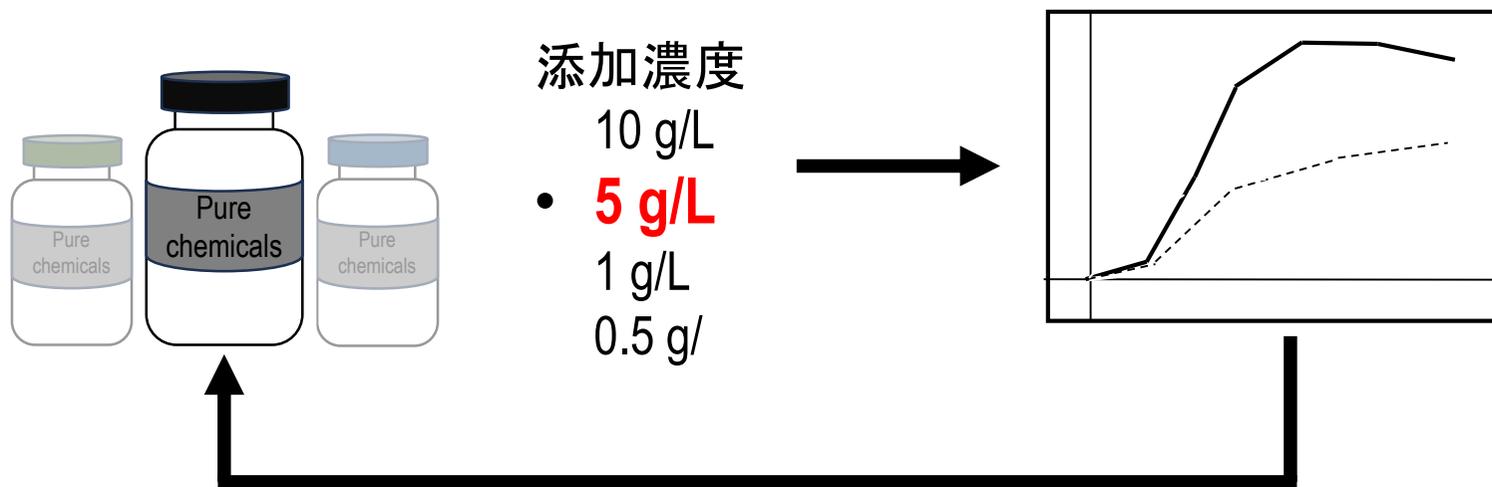
人工知能および機器分析を活用した 微生物合成培地の設計手法

北見工業大学 工学部 地域未来デザイン工学科・バイオ食品工学コース
教授 小西 正朗

2024年3月7日

微生物培地の種類と特徴

	天然培地	合成培地
成分	培養基材(酵母エキス(YE)やペプトン(PP)など)	化学物質
特徴	雑多な成分, 高い栄養価, 組成が不明	生育に不可欠な栄養素量, 組成が明確
メリット	広範な微生物に対して生育支持, 安価	培養への影響成分の特定が容易, 再現性が高い
デメリット	再現性が低い ^(1, 2) , 未特定成分の影響が介在	培地の設計には多大な労力, 使用が限定的, 高価

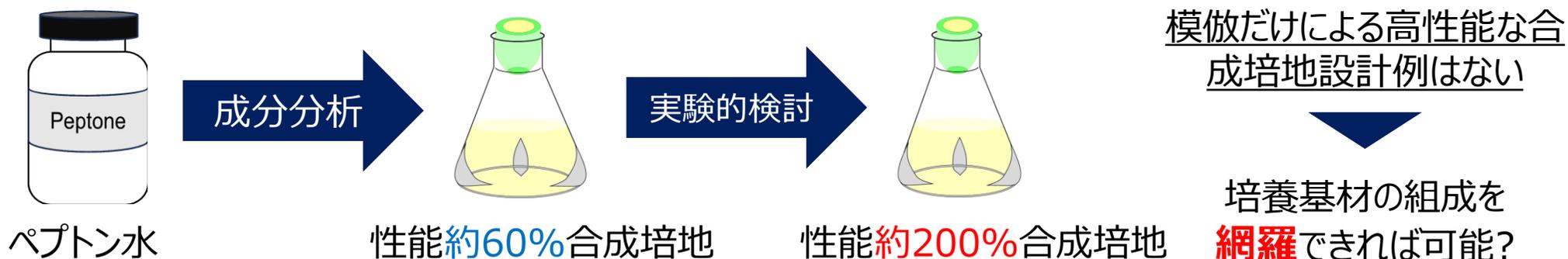


実験的検討を繰り返して
栄養要求性などのスクリーニング

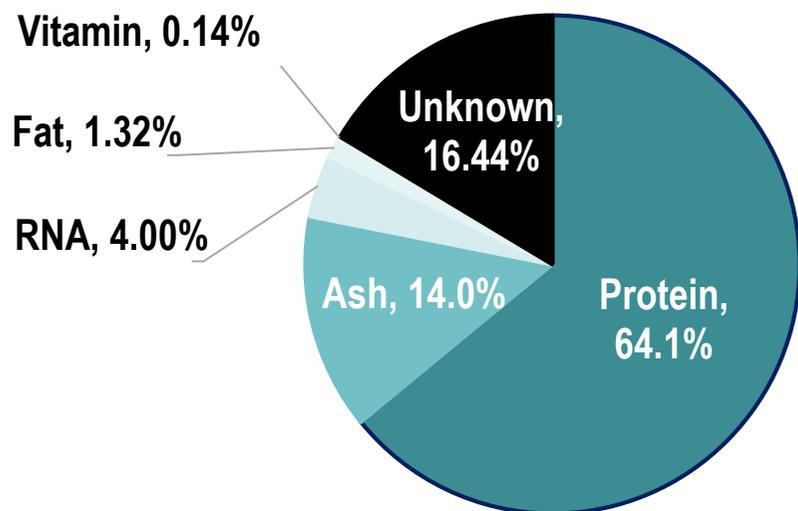
従来の方法では天然培地を上回る性能の合成培地を設計することは困難

先行研究事例

Gibco Bacto CD Supreme Fermentation Production Medium -ペプトン水を元にした合成培地-(1)



VieiraらのYE分析結果(2)



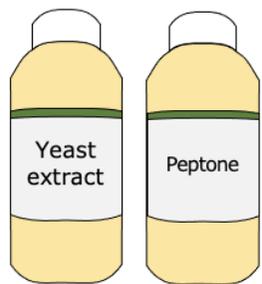
培養基材の定量分析の現状と課題

- ✓ 多くて50成分が対象(メーカーの公表は30成分未満)
- ✓ 単一の分析手法では網羅不可
- ✓ 成分を特定しない分析・評価(Ashなど)も一般的

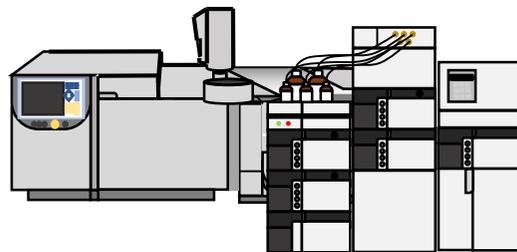
培養基材には多くの成分が含まれるため、**網羅的な定量**には**複数の分析手法**

(1)Sengupta N. *et al.*, (<https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FBDP%2Fposters%2Fchemically-defined-medium-e-coli-poster.pdf>, 閲覧日: 2022年2月), (2)Vieira *et al.*, *J. Food Compos. Anal.*, 52, 44-51(2016)

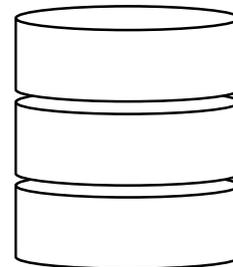
高解像度成分プロファイリング手法の開発



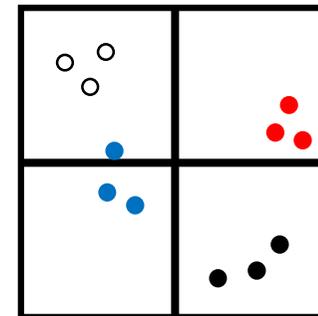
13種のYEと
24種のPP



GC-MS/MS, LC-MS, PCD-HPLC,
IC, ICP-MSで網羅的に定量



組成のデータベース



主成分分析

酵母エキスとペプトン中の成分を網羅的に定量し，定量値から組成をデータベース化

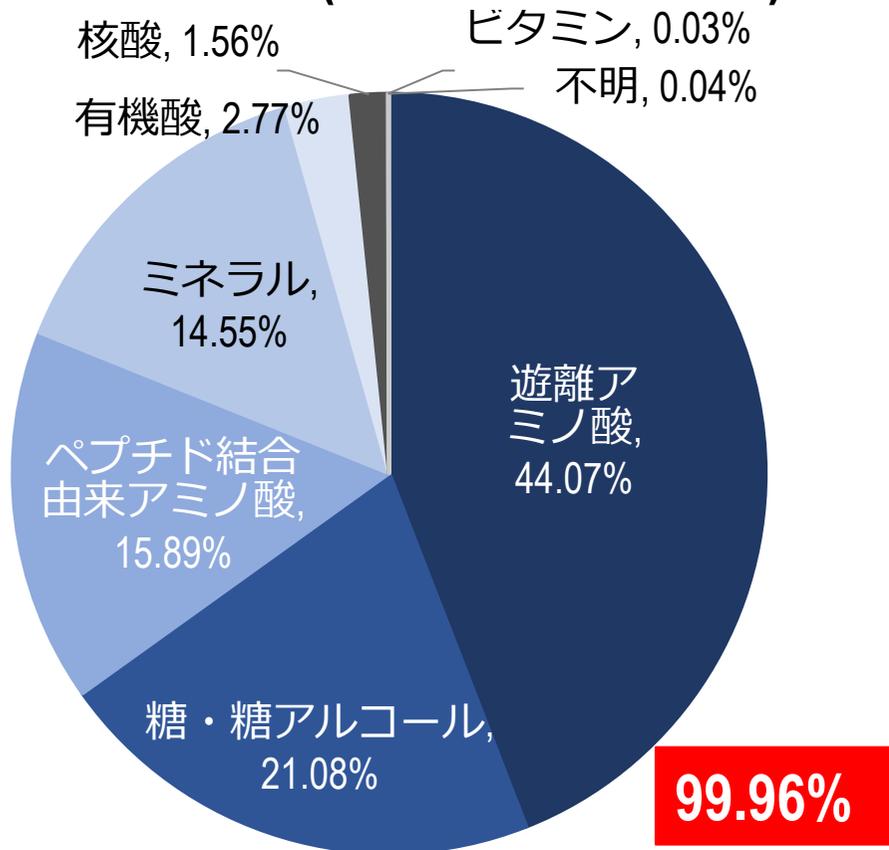
Table 分析対象成分

Analytical apparatuses	Component
GC-MS/MS	Adenine, Adenosine, Ascorbic acid, Citric acid, Cytosine, D-fructose, D-galactose, D-mannose, D-xylose, Fumaric acid, Gamma-aminobutyric acid, Glucose, Glycerol, Isocitric acid, L-lactic acid, Ornithine, Malic acid, Maltose, Myo-inositol, Oxalic acid, Phosphoric acid, Putrescine, Sorbitol, Succinic acid, Sucrose, Thymine, Trehalose, Tryp, Uracil, Urea, Xanthine
LC-MS	Biotin, Niacin, Pantothenic acid, Thiamine, Riboflavin
PCD-HPLC	Ala, Arg, Asp, Cystine, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val, Trp, Asn, (Gln, O-phosphoserine, Taurine, O-phosphoethanolamine, Hydroxyproline, Sarcosine, Citrulline, 2-aminobutyric acid, Cystathionine, Beta-alanine, 3-aminobutyric acid, 4-aminobutyric acid, 3-methylhistidine, 1-methylhistidine, Carnosine, Anserine, Hydroxylysine, Ornithine)
ICP-MS	B, Na, Mg, Al, Si, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Rb, Sr, Mo, Cd, Pb
IC	F ⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , Br ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NH ₄ ⁺

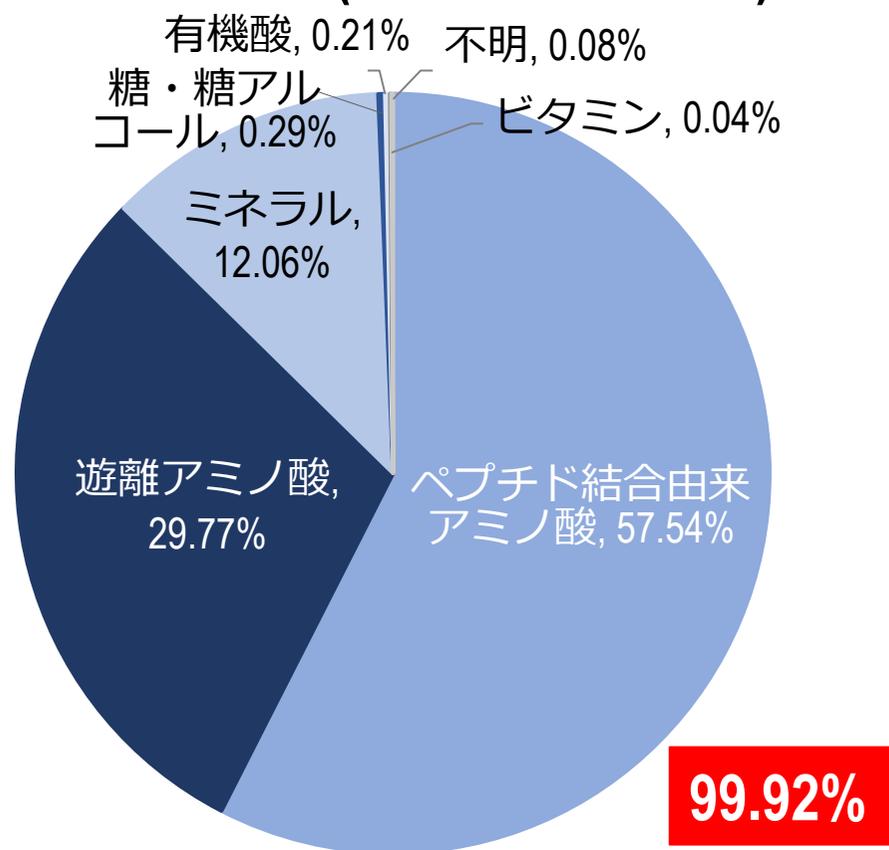
103成分(既往研究の**2倍以上**)を対象に定量分析を実施

高解像度成分プロファイリング手法の開発

YEの定量例(パン酵母由来YE)

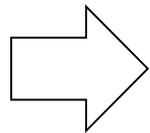
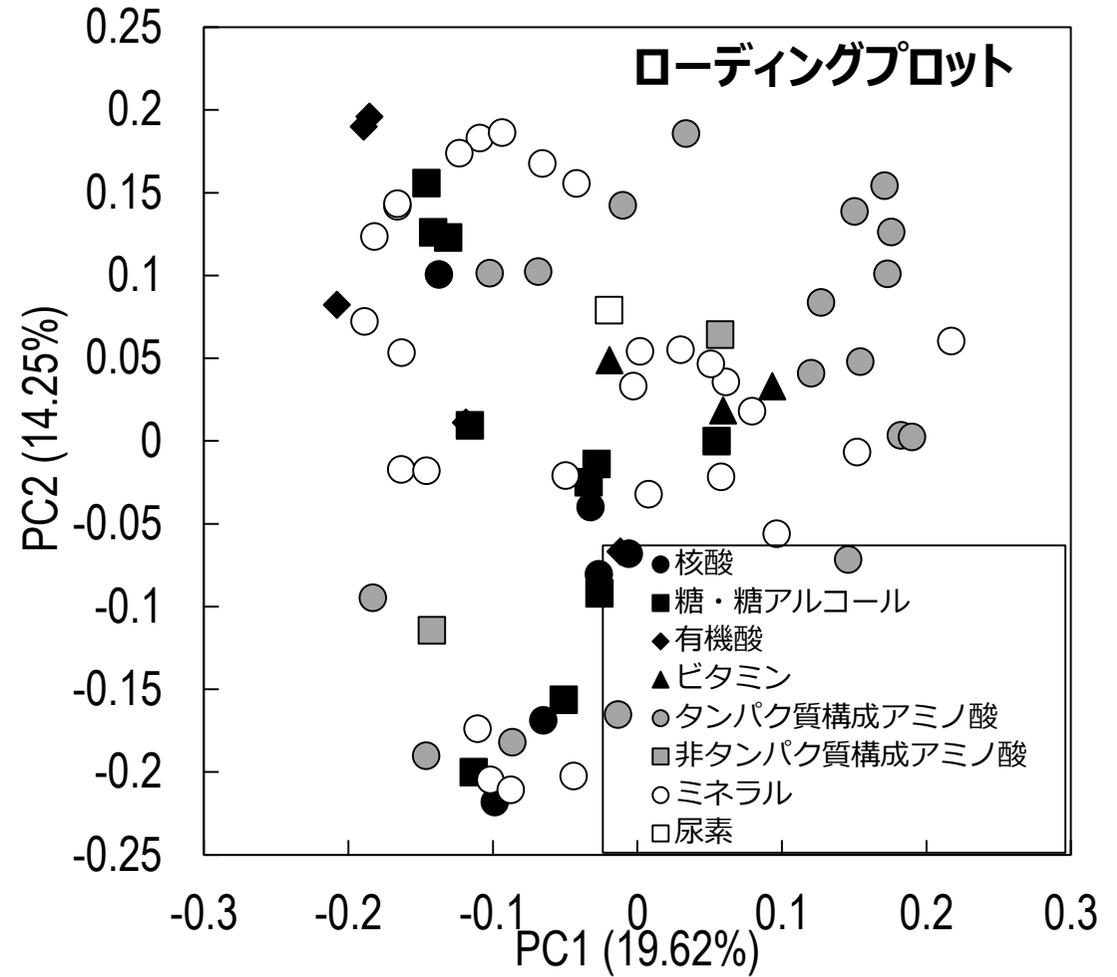
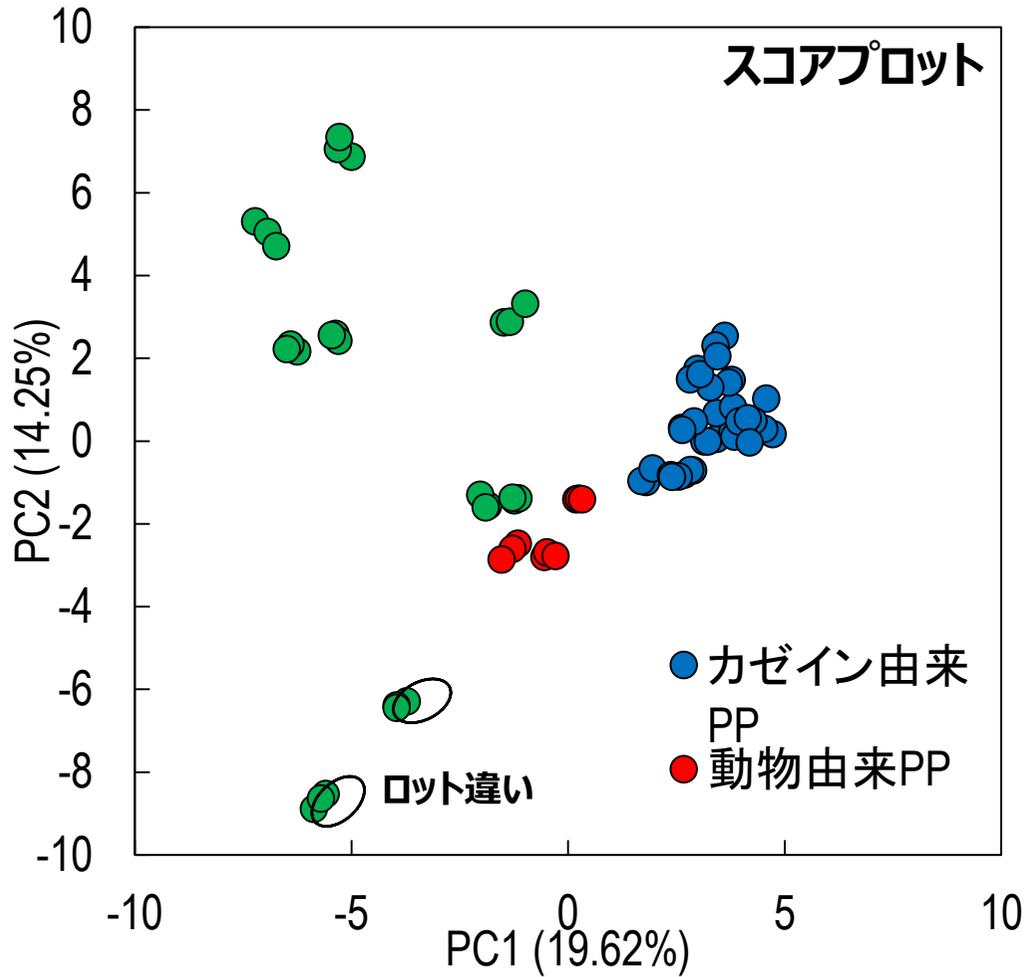


PPの定量例(カゼイン由来PP)



5種類の分析機器を用いることで培養基材中の99.9%以上の組成が定量可能

高解像度成分プロファイリング手法の開発



このデータを使用して合成培地を設計できるか？

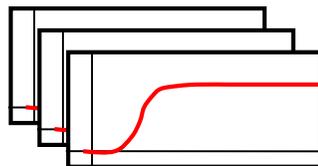
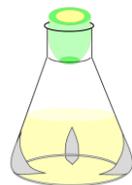
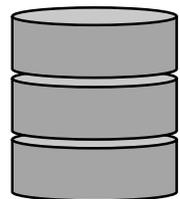
天然培地組成を模倣した合成培地設計

1. 天然培地と合成培地の性能比較

モデル微生物: *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS / pRSET-EmGFP (Invitrogen)

培養条件

50 mL, 37 °C, 200 rpm, 2時間目にIPTG添加



定量値をLB培地組成に換算して培地作成(CDM-LB)
濁度, 緑色蛍光タンパク質(GFP)由来の蛍光強度を測定

培地	説明
M9最少培地	合成培地
LB培地	天然培地
CDM-LB-FAA	遊離アミノ酸量を参考
CDM-LB-TAA	全アミノ酸量を参考

2. 重要成分探索して合成培地を簡素化

2.1. 成分グループ単位での探索



- Proteinogenic amino acids (PAAs)
- Non-proteinogenic amino acids (NPAAs)
- Sugars and sugar alcohols
- Nucleic acids
- Organic acids
- Vitamins
- Minerals

培養条件

1 mL, 37 °C, 1200 rpm,
2時間目にIPTG添加

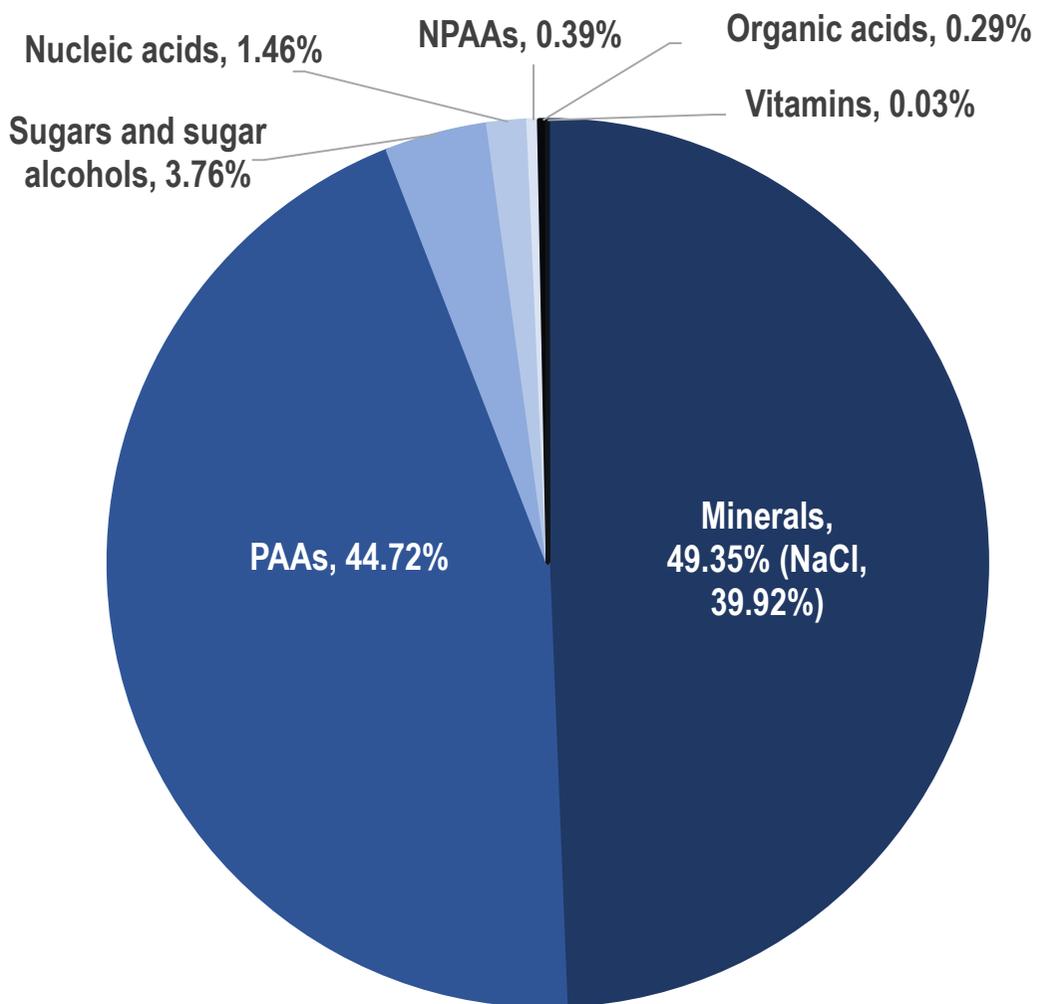
CDM-LBから1グループずつ
抜いて**重要な成分グループ**
を探索

2.2. 成分単位での探索



CDM-LBから1成分ずつ抜いた培地で**重要な成分を探索**

天然培地組成を模倣した合成培地の組成〔概要〕



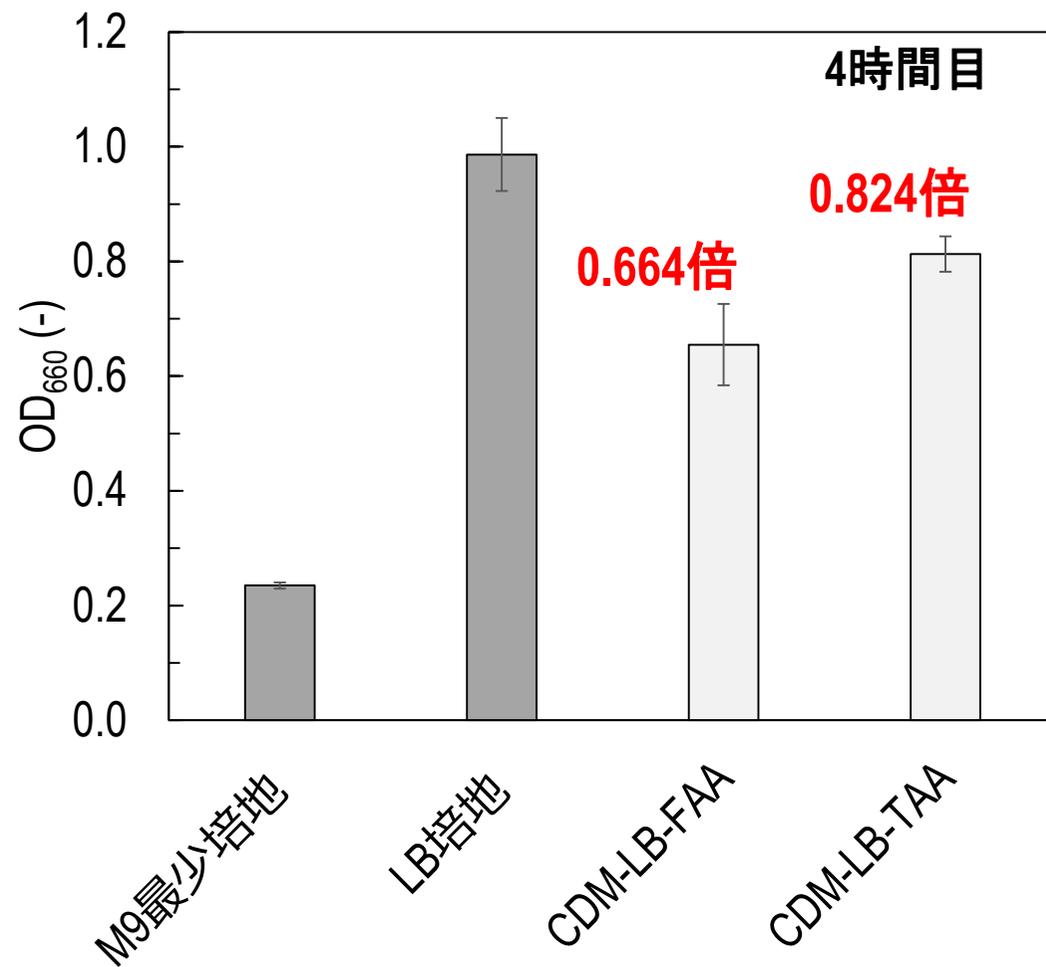
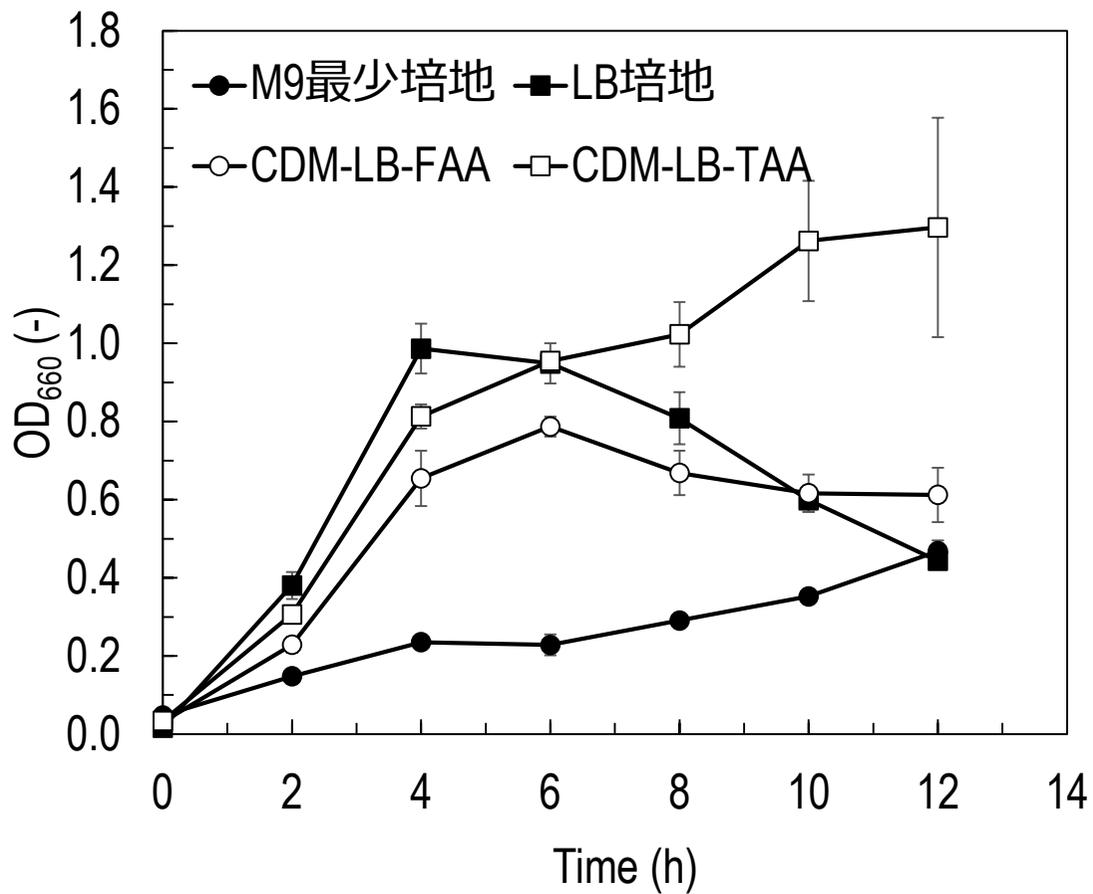
CDM-LBの組成と特徴

- 72成分を定量
- 培地には**69種の化学薬品**を使用
- 1 Lの超純水にYE 5 g, PP 10 g, NaCl 10 g分の試薬を溶解
- **ペプチド・プロテインフリー**
- 成分数はミネラルとタンパク質構成アミノ酸が全体の半分以上

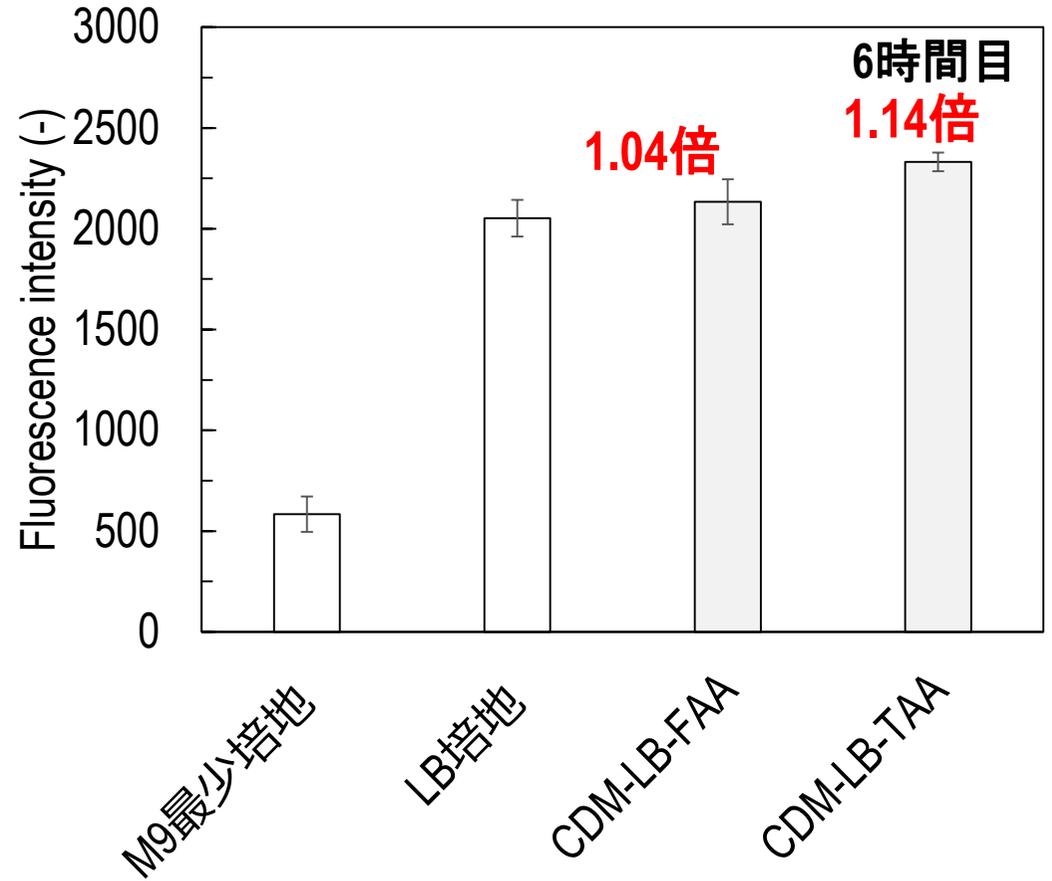
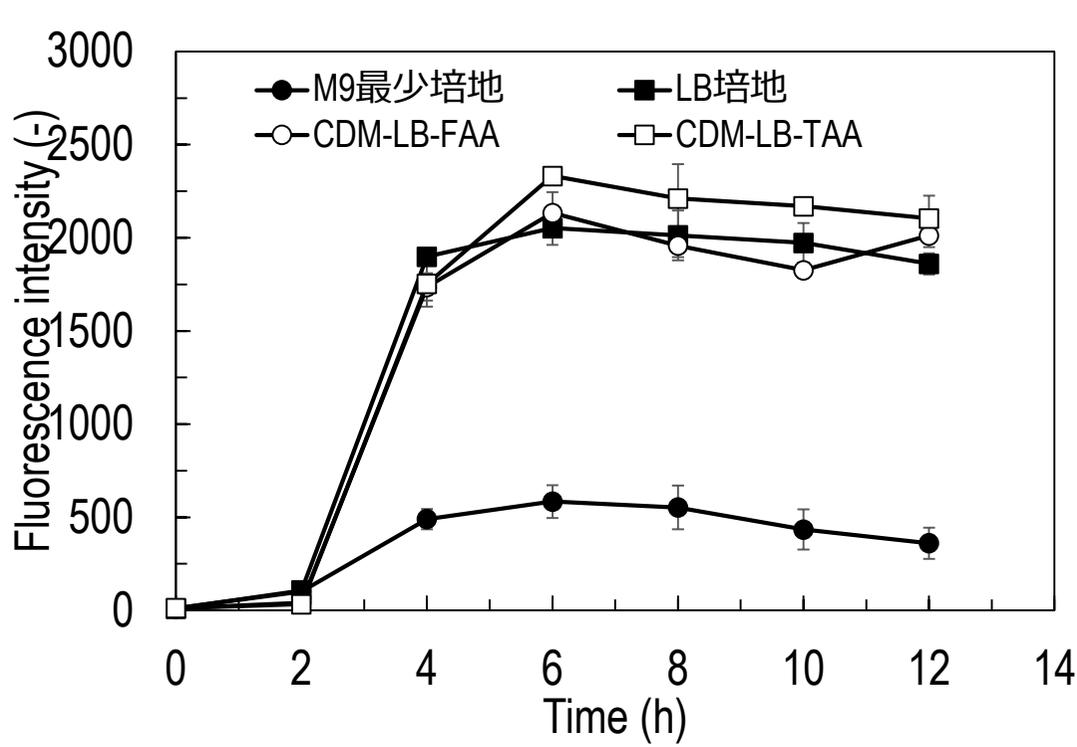
CDM-LBの調製方法

- 1 M NaOHでpH = 7.0に調製
- **NaとClは±5%の範囲で調製**
- フィルターにて滅菌

LB培地を模倣した合成培地の性能〔大腸菌増殖〕



LB培地を模倣した合成培地の性能〔GFP発現〕



不要成分の削減

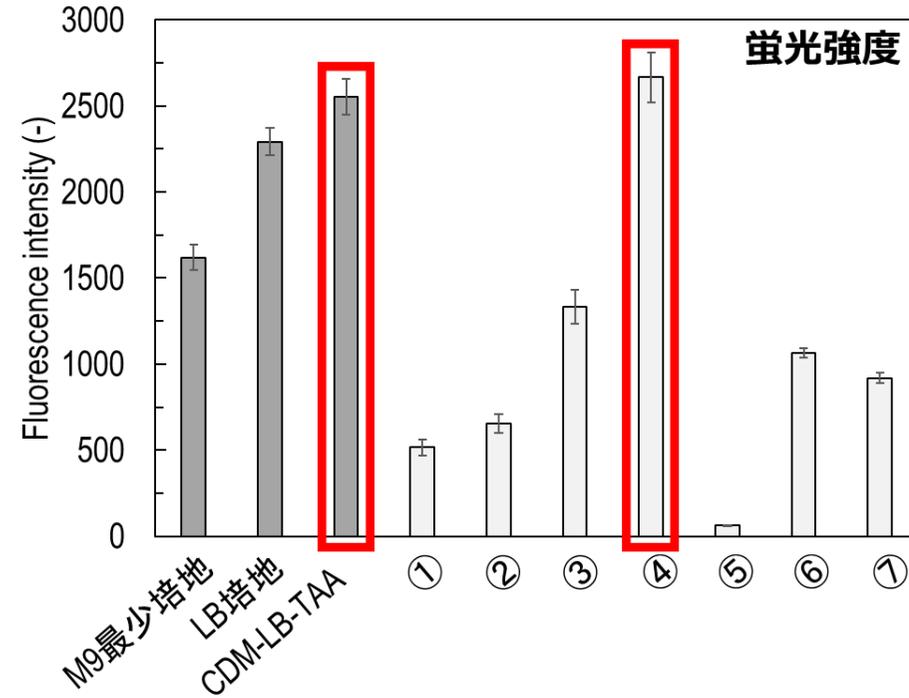
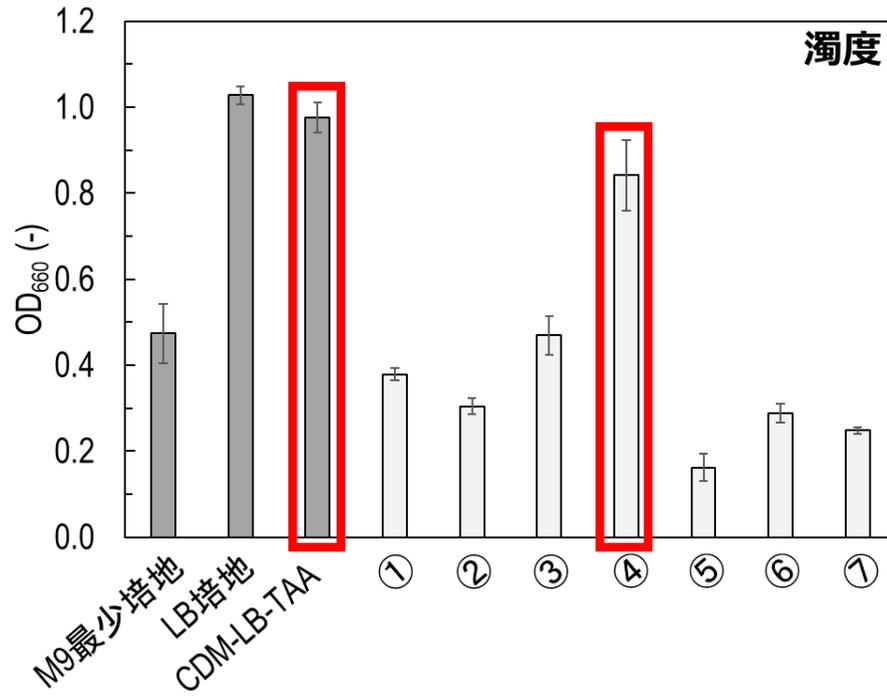
Table 各培地とCDM-LB-TAAとの濁度比

培地	濁度比(%)	蛍光強度比(%)
CDM-LB-TAA	100	100
w/o PAAs (タンパク質構成アミノ酸)	36.8	22.8
w/o NPAAs (非タンパク質構成アミノ酸)	98.7	106
w/o Nucleic acids	88.9	89.0
w/o Sugars and sugar alcohols	61.7	70.2
w/o Organic acids	105	108
w/o Vitamins	95.2	97.0
w/o Minerals	21.6	7.00

NPAAs, Organic acids, Vitaminsを除いて
69成分から56成分へ削減

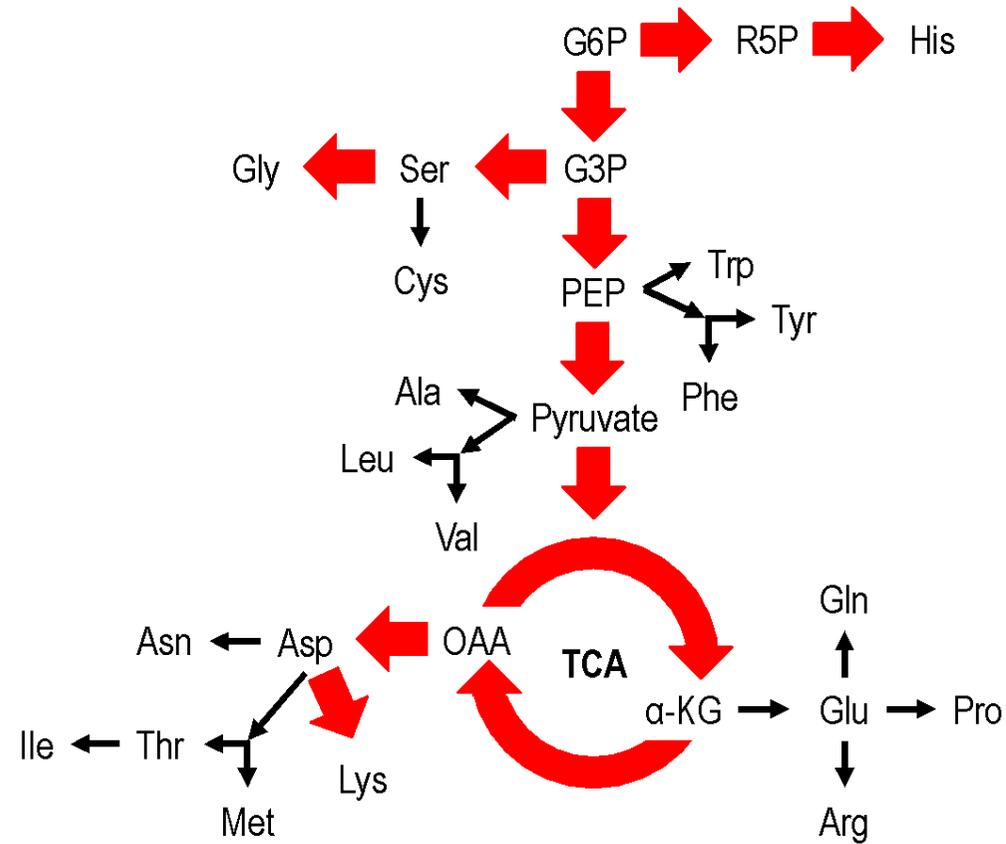
不要成分の削減

Nucleotide							
Adenine	■	■	■	■	■	■	
Adenosine	■	■	■	■	■	■	
Thymine	■	■	■	■	■	■	
Uracil	■	■	■	■	■	■	
Sugar, Sugar alcohol							
D-Fru	■	■	■	■	■	■	
D-Man	■	■	■	■	■	■	
D-Glc	■	■	■	■	■	■	
Glycerol	■	■	■	■	■	■	
Mai	■	■	■	■	■	■	
myo-Inositol	■	■	■	■	■	■	
Treharose	■	■	■	■	■	■	
Suc	■	■	■	■	■	■	
Amino acids							
L-Asp	■	■	■	■	■	■	
L-Thr	■	■	■	■	■	■	
L-Ser	■	■	■	■	■	■	
L-Glu	■	■	■	■	■	■	
L-Pro	■	■	■	■	■	■	
Gly	■	■	■	■	■	■	
L-Ala	■	■	■	■	■	■	
L-Val	■	■	■	■	■	■	
L-Met	■	■	■	■	■	■	
L-Ile	■	■	■	■	■	■	
L-Leu	■	■	■	■	■	■	
L-Tyr	■	■	■	■	■	■	
L-Phe	■	■	■	■	■	■	
L-His	■	■	■	■	■	■	
L-Lys	■	■	■	■	■	■	
L-Arg	■	■	■	■	■	■	
L-Asn	■	■	■	■	■	■	
L-Trp	■	■	■	■	■	■	
Cystine	■	■	■	■	■	■	
Nitrogen sources w/o Amino acids							
NH ₄ Cl	■	■	■	■	■	■	
NaN ₃	■	■	■	■	■	■	
KNO ₃	■	■	■	■	■	■	
Inorganic phosphate							
Phos.	■	■	■	■	■	■	
Minerals							
NaCl	■	■	■	■	■	■	
NaF	■	■	■	■	■	■	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	■	■	■	■	■	■	
H ₂ SO ₄	■	■	■	■	■	■	
KBr	■	■	■	■	■	■	
KCl	■	■	■	■	■	■	
CrO ₃	■	■	■	■	■	■	
Na ₂ SeO ₄	■	■	■	■	■	■	
MnSO ₄ ·5H ₂ O	■	■	■	■	■	■	
RbCl	■	■	■	■	■	■	
Pb(NO ₃) ₂	■	■	■	■	■	■	
AlCl ₃	■	■	■	■	■	■	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	■	■	■	■	■	■	
SrCl ₂	■	■	■	■	■	■	
CoCl ₂ ·H ₂ O	■	■	■	■	■	■	
MoO ₄	■	■	■	■	■	■	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	■	■	■	■	■	■	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	■	■	■	■	■	■	
CaCl ₂	■	■	■	■	■	■	
ZnCl ₂	■	■	■	■	■	■	
V ₂ O ₅	■	■	■	■	■	■	
C	1	2	3	4	5	6	7



アミノ酸生合成の律速段階を推定(良好な増殖時の解析)

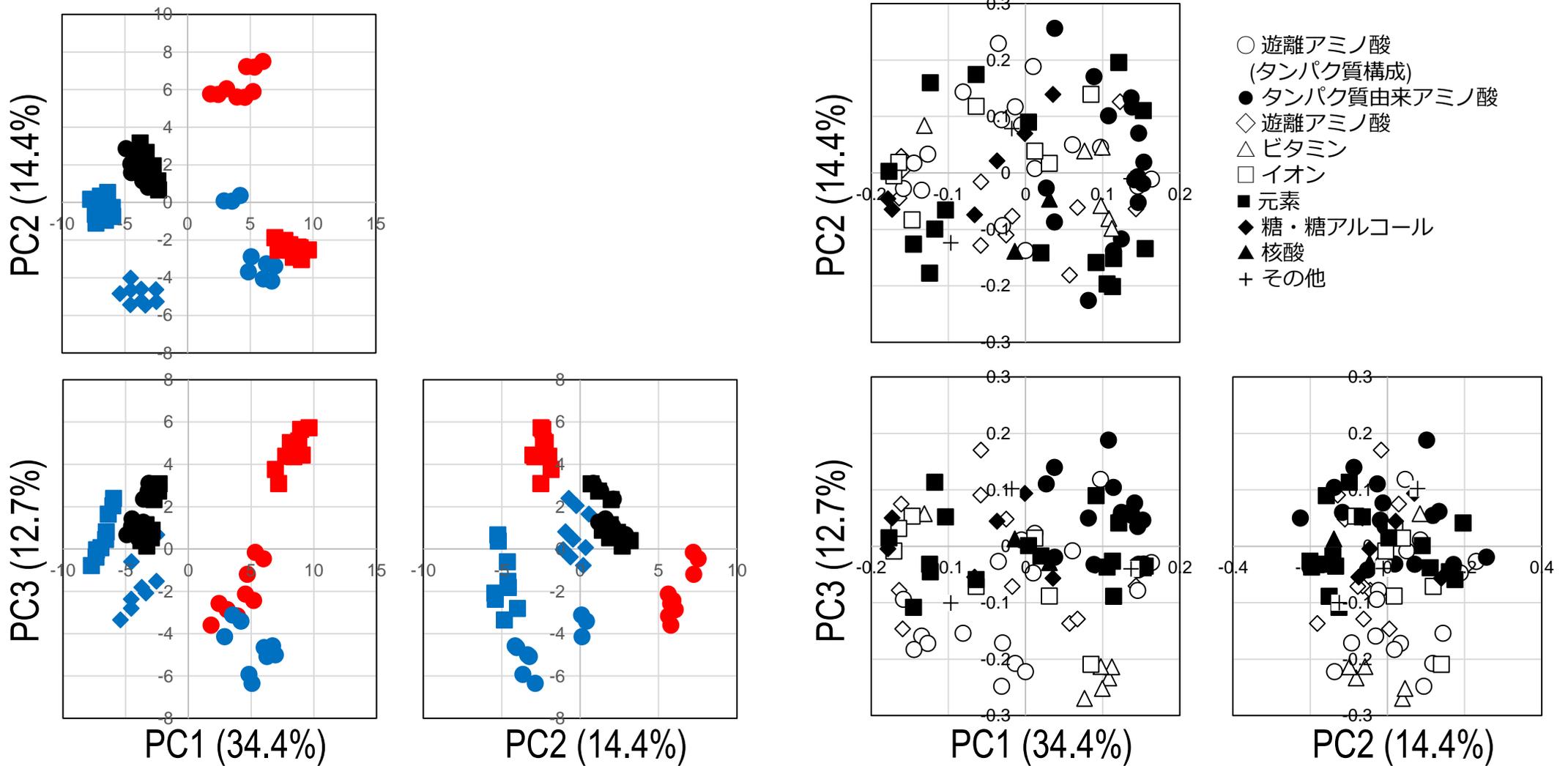
Nucleotide	
Adenine	■
Adenosine	■
Thymine	■
Uracil	■
Sugar, Sugar alcohol	
D-Fru	■
D-Man	■
D-Glc	■
Glycerol	■
Mai	■
myo-Inositol	■
Treharose	■
Suc	■
Amino acids	
L-Asp	■
L-Thr	■
L-Ser	■
L-Glu	■
L-Pro	■
Gly	■
L-Ala	■
L-Val	■
L-Met	■
L-Ile	■
L-Leu	■
L-Tyr	■
L-Phe	■
L-His	■
L-Lys	■
L-Arg	■
L-Asn	■
L-Trp	■
Cystine	■
NH ₄ Cl	■
NaNO ₂	■
KNO ₃	■
Inorganic phosphate	
Phos.	■
Minerals	
NaCl	■
NaF	■
MgSO ₄ ·7H ₂ O	■
H ₂ SO ₄	■
KBr	■
KCl	■
CrO ₃	■
Na ₂ SeO ₄	■
MnSO ₄ ·5H ₂ O	■
RbCl	■
Pb(NO ₃) ₂	■
AlCl ₃	■
FeCl ₃ ·6H ₂ O	■
SrCl ₂	■
CoCl ₂ ·H ₂ O	■
MoO ₄	■
CaCl ₂ ·2H ₂ O	■
CuSO ₄ ·5H ₂ O	■
CdCl ₂	■
ZnCl ₂	■
V ₂ O ₅	■



栄養豊富な培地中での栄養学的解釈

プロファイリング技術活用例

ロットが異なる天然成分の主成分分析(K社-北見工大共同研究)

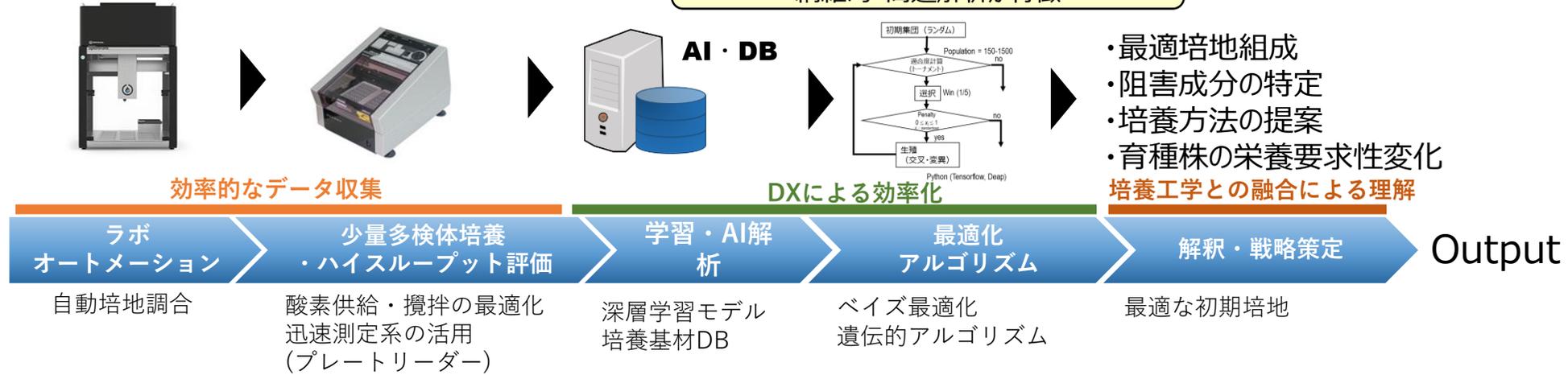


物質生産に関連する物質を特定(成分名等の情報は開示不可)

AI支援培地最適化について(NEDOバイオものづくりPJ)

培地AI解析の手順 (データ収集~AI解析~提案)

データ収集・解析技術を組合せた新システム
網羅的・高速解析が特徴



- ・最適培地組成
 - ・阻害成分の特定
 - ・培養方法の提案
 - ・育種株の栄養要求性変化
- 培養工学との融合による理解

One factor at a time (OFAT)
= One-by-one method



- ・ 実験的に決める方法では時間がかかりすぎる。
- ・ 成分同士の相互作用を考慮できない = 真の最適値にたどりつかない

Statistical method (PBD, CCD, RSM)
often published



応答曲面法で扱う因子数は3-4が限界 = 因子削減や最適化の繰り返しが必要

Singh et al., *Front. Microbiol.* 7, Article 2087 (2017)

Abbr.:
PBD, Plackett-Burman Design;
CCD, Central Composite Design
RSM, Response Surface
Methodology

Our method
Deep learning supported
(OA - DL - BO/GA)



- ・ 全ての成分の一斉最適化が可能
- ・ トータルの開発期間を短縮

Abbr.: OA, orthogonal array; DL, deep learning; BO, Bayesian optimization; GA, genetic algorithms

Yoshida et al. *J. Biosci. Bioeng.* 135: 127-133 (2023)
Kobayashi et al. *Biosci. Biotech. Biochem.* 87: 1068 - 1076 (2023)

研究開発期間





AI支援培地最適化について(NEDOバイオものづくりPJ)

培地最適化手法比較

独自技術

	一因子探索	因子削減/応答曲面	アンサンブル決定木-網羅探索	深層学習-最適化アルゴリズム
	OFAT	PBD/RSM	Gradient boosting decision tree	DNN-BO/DNN-GA
最適化できる因子数	1	3-4	<31	<31
因子間相互作用	×	△	○	○
必要実験数(例)	水準数×因子数	12条件(PDB)+ (RSM)+ 検証実験	232×3~4条件(学習)+ 2×2(検証)	64~81×3~4条件(学習)+ 32~64×3条件(検証)
スループット	×	△	○	◎
予測精度	-	○	◎	○
可読性	◎	○	△	△
解析コスト	低	中	高	中
最適化計算量		1	(最適値探索にスパコン使用) 10,000,000	900
参考文献		(1)	(2)	(3, 4)

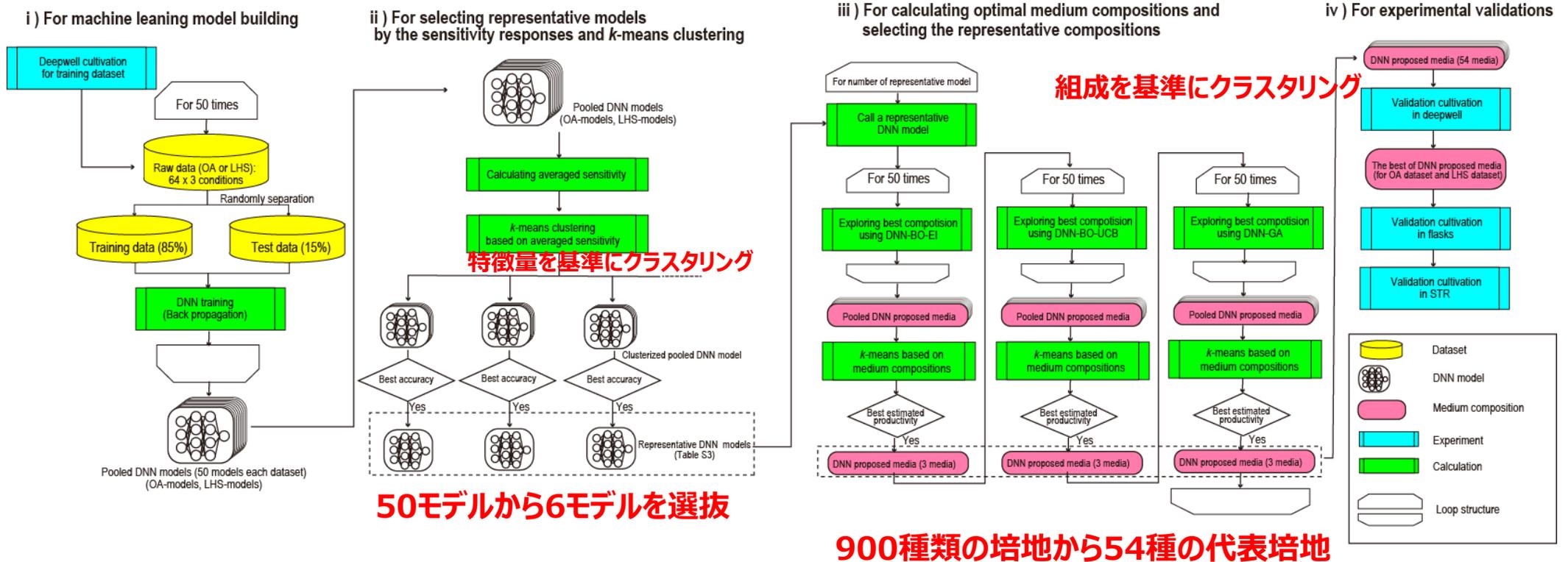
- (1) Singh et al., *Front. Microbiol.* 7, Article 2087 (2017)
- (2) Hashizume et al. *NPJ Syst. Biol. Appl.* 9: 20 (2023)
- (3) Yoshida et al. *J. Biosci. Bioeng.* 135: 127-133 (2023)
- (4) Kobayashi et al. *Biosci. Biotech. Biochem.* 87: 1068-1076 (2023)

・網羅探索にはベクトルコンピューター
(スパコン)が必要

・少ない実験量かつ迅速に
・適切な培地組成を探索可能
ワークステーションで実行可能

AI支援培地最適化について(NEDOバイオものづくりPJ)

New pipeline for proposing medium composition based on multipul deep neural network models and optimization algorithms with small dataset



大腸菌による組換えタンパク質生産培地の最適化¹⁾

乳酸菌によるヒアルロン酸生産用培地の最適化 (2022年度旗影会研究助成)

コリネ菌(芳香族化合物変換)の細胞生産培地の最適化²⁾

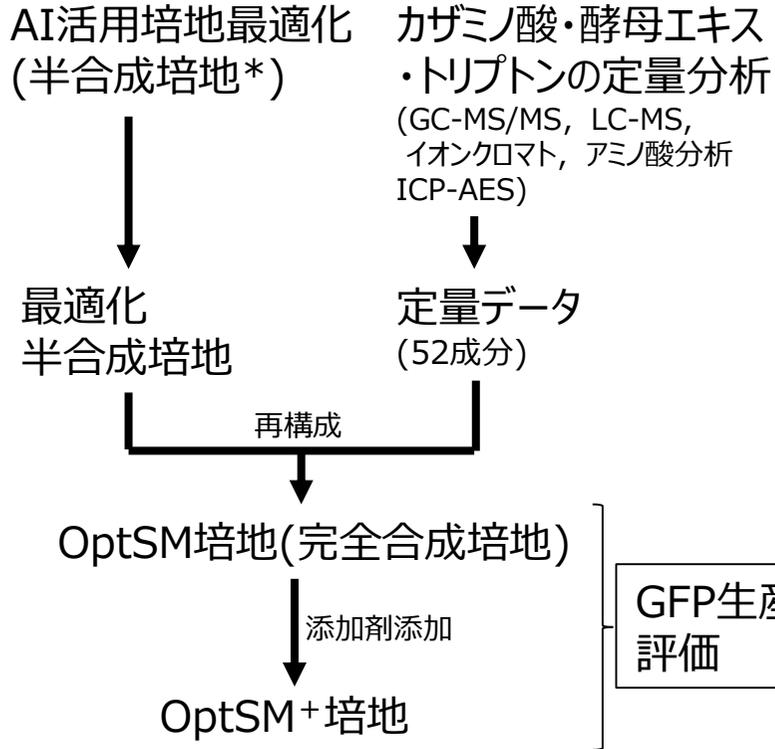
油脂生産酵母による油脂生産用培地の最適化 (NEDO PJ)

(1) Watanabe K. (2024) J. Biosci. Bioeng. (accepted)

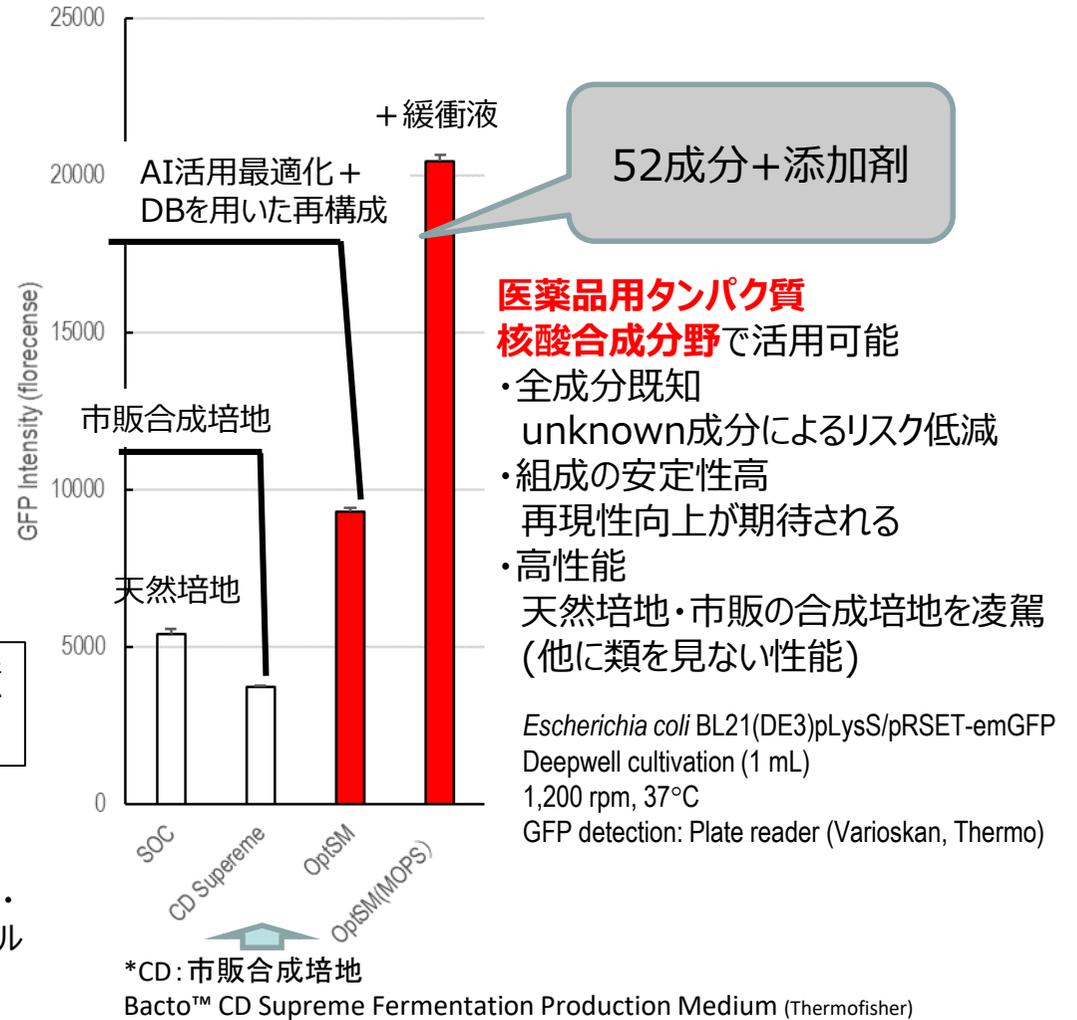
(2) Konishi M. (2024) J. Biosci. Bioeng. (accepted)

新規合成培地作成手順 2 (AI支援培地最適化と培地DBの組合せ)

大腸菌合成培地設計手順



*カザミノ酸・トリプトン・酵母エキス・グルコース・グリセロール・硫酸・リン酸緩衝液・無機塩類等19種類の成分で構成されるオリジナル半合成培地



企業への期待

プロファイリング技術

- ・ 製造現場での培地トラブルを解決できる可能性があります。

天然培地模倣培地

- ・ 製剤化技術を開発すれば試薬等として販売可能

協業・提携先募集中

本技術に関する知的財産権

発明の名称：合成培地の製造方法、大腸菌の培養方法、及びタンパク質、核酸、又は代謝物の合成方法

出願番号：特願2023-016849

出願人：国立大学法人北海道国立大学機構

発明者：小西正朗、中島拓都、渡辺一樹

お問い合わせ先

北見工業大学 知的財産センター（研究協力課）

T E L 0157-26-9152

F A X 0157-26-9155

e-mail chizai@desk.kitami-it.ac.jp