

「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」

事業原簿

担当部	国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 材料・ナノテクノロジー部
-----	---

目次

概要	概要-1
プロジェクト用語集	用語集-1
1. 事業の位置付け・必要性について	1-1
1.1. 事業の背景・目的・位置づけ	
1.2. NEDO の関与の必要性・制度への適合性	
1.2.1 NEDO が関与することの意義	
1.2.2 実施の効果（費用対効果）	
2. 研究開発マネジメントについて	2-1
2.1. 事業の目標	2-1
2.2. 事業の計画内容	2-3
2.2.1 研究開発の内容	
2.2.2 研究開発の実施体制	
2.2.3 研究開発の運営管理	
2.2.4 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性	
2.3. 情勢変化への対応	2-9
2.4. 中間評価結果への対応	2-10
2.5. 評価に関する事項	2-10
3. 研究開発成果及び実用化に向けた取組及び見通しについて	
3.1. 事業全体の成果及び実用化に向けた取組及び見通し	3.1-1
3.2. 研究開発項目毎の成果及び実用化に向けた取組及び見通し	
3.2.1 研究開発項目①植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発【委託】	
3.2.1.1 ゲノム編集技術	3.2.1.1-1
3.2.1.2 代謝系遺伝子発現制御技術	3.2.1.2-1
3.2.1.3 代謝系遺伝子発現制御技術/栽培・生育環境発現制御技術	3.2.1.3-1
3.2.2 研究開発項目②植物による高機能品生産技術開発【助成】	
3.2.2.1 高機能組換え植物組織培養によるビタミン D3 高効率生産技術の開発	3.2.2.1-1
3.2.2.2 医薬品中間体原料植物の代謝変換によるアルカロイド製造技術の開発	3.2.2.2-1
3.2.2.3 組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	3.2.2.3-1
3.2.2.4 イチイ細胞培養技術を用いたタキサン系医薬中間体 10-DAB の効率生産法開発	3.2.2.4-1
3.2.2.5 シソ代謝系制御技術による健康機能性成分の高効率増産技術開発	3.2.2.5-1
3.2.3 研究開発項目③高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発【委託】	3.2.3-1

3.2.4 研究開発項目④微生物による高機能品生産技術開発【助成】

- 3.2.4.1 ポリアミド原料の発酵生産技術開発……………3.2.4.1-1
- 3.2.4.2 組換え Burkholderia stabilis 由来コレステロールエステラーゼ開発……………3.2.4.2-1
- 3.2.4.3 希少アミノ酸エルゴチオネイン高生産スマートセルの開発……………3.2.4.3-1
- 3.2.4.4 スマートセル技術を応用した天然ヒト型長鎖セラミド高含有醤油麹菌の開発……………3.2.4.4-1
- 3.2.4.5 生体触媒の反応機構推定に基づく高付加価値化成品の製造法開発……………3.2.4.5-1

(添付資料)

- ・プロジェクト基本計画
- ・プロジェクト開始時関連資料（事前評価結果、パブリックコメント募集の結果）
- ・特許論文等リスト

概要

		最終更新日	2021年9月24日
プロジェクト名	植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発	プロジェクト番号	P16009
担当推進部/ PMまたは担当者	材料・ナノテクノロジー部 PM 梅田 到 (2016年4月～2016年7月) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 後藤 謙太 (2016年4月～2017年3月) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 中井 岳 (2016年4月～2016年7月) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 尾野 直紀 (2016年9月～2017年3月) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 大竹 淳之 (2016年4月～2020年3月) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 河辺 智康 (2016年5月～2020年4月) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 齋藤 貴博 (2017年4月～2019年3月) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 尾上 尚子 (2017年4月～2019年9月) 材料・ナノテクノロジー部 PM 林 智佳子 (2016年8月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 金田 晃一 (2019年4月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 秋葉 幸範 (2019年10月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 伊藤 雅人 (2020年4月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 土谷 浩史 (2020年4月～現在)		
0. 事業の概要	<p>本プロジェクトでは、植物等の生物が持つ物質生産能力を人工的に最大限引き出した細胞“スマートセル”を構築し、化学合成では生産が難しい有用物質の創製、又は従来法での生産性を凌駕することを目的に、必要となる基盤技術を開発するとともに、特定の生産物質における実用化技術を確認する。なお、物質生産に係るコストや安全性の面から、本プロジェクトでは植物と微生物による生産技術を対象とし、それぞれの特性を踏まえて技術開発を実施する。これにより、持続可能な社会の構築に資するスマートセルによるものづくり“スマートセルインダストリー”の実現を目指す。</p> <p>研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」(委託) 研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」(助成) 研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」(委託) 研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」(助成) (2019年度開始)</p>		
1. 事業の位置付け・必要性について	<p>バイオテクノロジーは、経済活動の様々な分野で利用される技術体系となっており、近年欧米を中心にバイオテクノロジーを用いた経済活動をバイオエコノミーと称して政策提言に取り上げている。OECDでは2030年にはバイオエコノミー市場が成長すると予想し、これまで中心であった健康・医療分野での利用から工業利用の市場が拡大していくと見込んで、取組を先行している。一方で、2015年に国連本部が掲げた持続可能な開発目標(SDGs)が採択され、深刻化する環境課題などへの解決に向けて世界的に持続可能な社会の構築を目指す必要がある。</p> <p>技術面では、次世代シーケンサーをはじめとした各種解析装置が急速に進化しゲノム解読技術の進展・IT/AI技術の進展・ゲノム編集技術等の最先端バイオ技術の進展により、生物による高効率物質生産技術に基づく新たな市場拡大の期待が高まっている。我が国としても同分野での競争力強化が急務である。現状は、基礎学理が構築されコンセプト形成ができてきた段階で実用化に向けた課題が多くあることから、国として生物機能を活用した高機能品生産技術の開発に取り組むことが重要である。</p>		
2. 研究開発マネジメントについて			
事業の目標	<p>研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」(委託)</p> <p>【中間目標】(2018年度末)</p> <p>(1)ゲノム編集技術</p> <ul style="list-style-type: none"> 既存のゲノム編集技術では対応できない独自の新しい機能を有するゲノム編集関連技術(対象領域、精密性、ゲノム設計、細胞毒性、導入効率等)の基本技術を確認し、その新規性、有用性を検証する。 開発した成果の産業利用に向けて、他国の動向も踏まえた知財戦略を策定する。 <p>(2)代謝系遺伝子発現制御技術</p> <ul style="list-style-type: none"> メチル化誘導、遺伝子発現制御因子解析等の基本技術を確認する。 目的代謝系遺伝子の発現を2倍以上増強又は1/5以下に抑制する。 <p>(3)栽培・生育環境による発現制御技術</p> <ul style="list-style-type: none"> 栽培環境因子と代謝系主要遺伝子の半数の解析を終了させる。 		

【最終目標】（2020年度末）

(1)ゲノム編集技術

- ・植物等による物質生産機能の制御・改変において、既存のゲノム編集では対応できない新しい機能を有する国産のゲノム編集関連技術（対象領域、精密性、ゲノム設計、細胞毒性、導入効率等）を確立する。
- ・研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した新規の国産ゲノム編集技術の有効性を示す。
- ・ゲノム編集を産業利用するために必要な要素技術を戦略的に集約し、国産ゲノム編集技術基盤を確立する。

(2)代謝系遺伝子発現制御技術

- ・目的代謝系遺伝子の発現を5倍程度増強又は1/10以下に抑制する技術を確立する。
- ・研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した遺伝子発現制御技術の有効性を示す。

(3)栽培・生育環境による発現制御技術

- ・目的代謝系における主要遺伝子/産物の発現を5倍程度増強させる技術を確立する。
- ・研究開発項目②で対象とする実用植物において、栽培・生育環境による発現制御技術の有効性を示す。

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」（助成）

【中間目標】（2018年度末）

- ・対象とする実用植物の栽培、培養系の確立及び遺伝子組換え技術を確立する。
- ・生産性向上に寄与する遺伝子を明らかにし、コスト、性能等の面で総合的に競争力があるとの見通しを得る。

【最終目標】（2020年度末）

- ・化学合成等による競合品と比較して、コスト、性能等の面で総合的に競争力があることを示す。

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」（委託）

【中間目標】（2018年度末）

(1)ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

- ・30kb超のDNA合成時間を従来の1/2に短縮する技術を確立する。
- ・LC-MSのハイスループット化により、現状と比較して10倍の分析速度を実現する。
- ・その他、高生産性微生物設計システムを効率的に運用するために必要となるハイスループット評価技術を確立する。

(2)高生産性微生物設計システムの開発

- ・階層内、階層間の制御ネットワークを推定する階層縦断的な情報解析手法を開発する。
- ・上記解析手法や代謝流束推定、人工酵素設計技術等を統合し、特定物質の生産性向上に資する重要因子、改変すべき遺伝子配列を提示する汎用的な設計システムを構築する。

(3)高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

- ・(1)(2)で開発したシステムを用いて、生産性の大幅な向上に資することを最低1つのターゲットで実証する。
- ・各国の類似事業・研究開発動向を調査し、我が国の優位性を生かした独自の知財戦略及び事業化モデル（案）を策定する。

【最終目標】（2020年度末）

- ・(1)(2)で開発したシステムを用いることにより、従来育種と比較し、物質生産株の開発期間を1/10に短縮することを実証する。また、微生物ライブラリーの構築プロセスの自動化により、さらなる開発期間の短縮化を図る。
- ・(1)(2)で開発した要素技術、システムを維持・運営するための事業化モデルを策定する。

研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」（助成）（2019年度開始）

【最終目標】（2020年度末）

- ・化学合成等による競合品と比較して、コスト、性能等の面で総合的に競争力があることを示す。

事業の計画内容	主な実施事項	2016fy	2017fy	2018fy	2019fy	2020fy	2021fy	
	研究開発項目① 「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」							
	研究開発項目② 「植物による高機能品生産技術開発」							
	研究開発項目③ 「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」							
	研究開発項目④ 「微生物による高機能品生産技術開発」							
事業費推移 (単位:百万円)	会計・勘定	2016fy	2017fy	2018fy	2019fy	2020fy	2021fy	総額
	一般会計	-	-	-	-	10	60	70
	特別会計 (電源・需給の別)	1,613	2,007	2,273	2,386	2,489	-	10,768
	開発成果促進財源	-	-	-	-	-	-	-
	総 NEDO 負担額	1,613	2,007	2,273	2,386	2,499	60	10,838
	(委託)	1,433	1,815	2,086	1,994	2,156	60	9,544
	(助成) : 助成率 2/3, 1/2	180	192	187	392	343	-	1,294
開発体制	経産省担当原課	商務・サービスグループ 生物化学産業課						
	プロジェクトリーダー	PL: 国立大学法人九州大学 名誉教授 久原 哲 SPL: 国立研究開発法人産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 植物分子工学研究グループ長 松村 健						
	プロジェクトマネージャー	材料・ナノテクノロジー部 主査 林 智佳子						
	委託先	<p>研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」</p> <p>(1)ゲノム編集技術 【委託先】徳島大学、明治大学、理化学研究所、九州大学、東京医科歯科大学、神戸大学、広島大学、東京大学、(国研)産業技術総合研究所、エディットフォース(株)、知的財産ネットワーク(株)(~2018年度)、筑波大学 【委託先(2019年度~)】近畿大学 【再委託先】近畿大学(~2018年度)</p> <p>(2)代謝系遺伝子発現制御技術 【委託先】(公財)かずさDNA研究所、京都大学、(国研)産業技術総合研究所、北海道大学、奈良先端科学技術大学院大学、横浜国立大学 【再委託】東北大学 【再委託先(2019年度~)】(株)アミノアップ</p> <p>(3)栽培・生育環境による発現制御技術 【委託先】千葉大学、(公財)北海道科学技術総合振興センター</p>						

		<p>研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」 【助成先】 竹中工務店(株)、キリン(株)、神戸天然物化学(株)、味の素(株)、ホクサン(株)、北海道三井化学(株)、(株)アミノアップ化学 【共同実施】 北海道医療大学、大阪府立大学、大阪大学、神戸大学、京都大学、千葉大学(～2018年度)、玉川大学、(国研)産業技術総合研究所、(公財)北海道科学技術総合振興センター 【共同実施(2019年度～)】 徳島大学、北海道大学(～2019年度)</p> <p>研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」 【委託先】 神戸大学、(国研)産業技術総合研究所、旭化成ファーマ(株)(～2018年度)、味の素(株)、江崎グリコ(株)、神戸天然物化学(株)、JSR(株)、(株)島津製作所、長瀬産業(株)(～2018年度)、日本テクノサービス(株)(～2018年度)、不二製油グループ本社(株)、プレジジョン・システム・サイエンス(株)(～2018年度)、三菱ケミカル(株)、(公財)地球環境産業技術研究機構、(国研)理化学研究所、石川県立大学、東北大学、長岡技術科学大学、新潟薬科大学 【委託先(2017年度～)】 京都大学、九州大学、日立製作所(株)、東京大学、Spiber(株)(～2018年度)、筑波大学、(株)ニコインステック 【委託先(2019年度～)】 (独)製品評価技術基盤機構、(一財)バイオインダストリー協会 【再委託】 岡山大学、千葉大学、慶應義塾大学(～2018年度)、大阪大学、(株)インテック(～2017年度)、(株)バイオジェット、信州大学、鹿児島大学、九州大学(～2018年度)、(一財)バイオインダストリー協会(～2018年度)、花王(株)、 【再委託(2017年度～)】 東京大学(～2018年度)、(独)製品評価技術基盤機構(～2018年度)、(国研)理化学研究所(～2018年度) 【再委託(2020年度～)】 (国研)国立健康・栄養研究所</p> <p>研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」(助成) 【助成先】 東レ(株)、旭化成ファーマ(株)、長瀬産業(株)、福岡県醤油醸造組合、天野エンザイム(株) 【共同実施】 (国研)産業技術総合研究所、(国研)理化学研究所、奈良先端科学技術大学院大学、神戸大学、東北大学、九州大学、京都大学</p>
<p>情勢変化への対応</p>		<ul style="list-style-type: none"> 調査事業等により、高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発は欧米が先行、「学習(AI)」による高度な制御を取り込んだ工業プロセスは開発段階であることを把握。2017年度の追加公募で、AI基盤開発等の実施者を新たに採択し研究体制を強化した。また、先行技術調査・解析を精力的に進め、現行実施体制の強み・弱みを明確にした上で開発戦略を策定した。 調査事業等により、ゲノム編集技術に関して欧米の出願数増加、周辺技術である導入技術の出願数増加、国内外での特許成立状況の動向を把握。2017～2018年度に新規ゲノム編集技術、導入技術等の開発内容に予算を重点配分した。また、関連情報はプロジェクト内事業者に速やかに情報共有され、開発戦略へ反映した。 年1回NEDOが技術推進委員会を主催し、外部有識者に、海外の技術動向も踏まえた評価を受け、各研究開発項目の目標達成の見通しを常に把握するとともに、必要に応じて研究開発の加速、中止を行った(計10回実施)。さらにテーマ間連携を目的としたテーマ連絡会議(3回)、テーマ代表者会議(23回)実施した。 プロジェクトの後半、成果の特許出願、成果普及、技術利用につながる取組に加速財源を投入。プロジェクト終了後に基盤技術が広く利用できる環境・仕組みを構築した。 2018年度：スマートセルによる物質生産に関して、知識ベース基盤や環境要因DBのオープン化を目的とした研究開発に重点配分 2019年度：実証試験効率化を目的とした、開発した装置類の集約等に重点配分。 2020年度：研究開発成果の実用化に向けたPJ取得データの活用環境の整備、動画等アウトリーチツールの拡充等に重点配分
<p>中間評価結果への対応</p>		<p>2018年8月に中間評価を実施。以下指摘事項について対応した。</p>

	<p>【1】 参画機関が多く、実施体制の見直しが必要。進捗状況を精査し、予算規模に応じた選択と集中を行っていくこと。→実用化の可能性が高い技術への集中やテーマの集約を行い、実施計画と実施体制の見直しを行った。</p> <p>【2】 知的財産について、国内外での技術利用に関する考え方を明示するとともに、国際競争力が確保できる戦略を考えること。→プロジェクトで国産技術開発に取組みつつ、海外の有力な技術の利用も考慮しながら実用化・事業化の検討を行った。また、内外の政策、技術開発、市場動向等について調査し、技術の普及方策を検討した。</p> <p>【3】 今後は植物及び微生物のテーマの融合を検討すること。→事業者間での連携を通じて、開発技術の相互利用を促進、実用面での有効性検証や汎用性向上の観点での取組を行った。</p> <p>【4】 情報解析ビジネスやライセンスビジネスの展開方針を具体的に示し、様々な製造ビジネスが立ち上がる可能性があることを、より積極的にアピールしていくこと。→事業者が検討している将来的な実用化・事業化の方向性を技術推進委員会等で定期的に確認。量産化に課題があるテーマについては、後継プロジェクトにて開発継続中。プロジェクト終了後に向けた共通基盤技術プラットフォーム活用の仕組みを構築し、展示会等で、ユーザーとなる企業等にアピールを行った。</p>			
評価に関する事項	事前評価	2015 年度実施 担当部 電子・材料・ナノテクノロジー部		
	中間評価	2018 年度 中間評価実施		
	事後評価	2021 年度 事後評価実施		
3. 研究開発成果について	研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」			
	研究開発項目	目標	成果	達成度
	(1)ゲノム編集技術	<ul style="list-style-type: none"> 植物等による物質生産機能の制御・改変において、既存のゲノム編集では対応できない新しい機能を有する国産のゲノム編集関連技術（対象領域（標的配列認識）、精密性、ゲノム設計、細胞毒性、導入効率等）を確立する。 研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した新規の国産ゲノム編集技術の有効性を示す。 ゲノム編集を産業利用するために必要な要素技術を戦略的に集約し、国産ゲノム編集技術基盤を確立する。 	<ul style="list-style-type: none"> 複数の独自の認識モジュールの開発、高度なゲノム改変技術の開発、様々な動作原理の導入技術の開発、ゲノム編集ツールおよびゲノム編集生物の評価アッセイ系の確立、これら要素技術を連結させた技術パッケージの開発、および利用を促進させるためのゲノム編集産業化ネットワーク/実証拠点の基盤構築を行った。 	○
	(2)代謝系遺伝子発現制御技術	<ul style="list-style-type: none"> 目的代謝系遺伝子の発現を5倍程度増強又は1/10以下に抑制する技術を確立する。 研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した遺伝子発現制御技術の有効性を示す。 	<ul style="list-style-type: none"> 世界初の標的DNA配列特異的な脱メチル化技術開発成功、一方、植物防御メカニズムにより、実用植物利用に関して一部残課題もある。 	◎ /一部△
	(3)栽培・生育環境による発現制御技術	<ul style="list-style-type: none"> 目的代謝系における主要遺伝子/産物の発現を5倍程度増強させる技術を確立する。 研究開発項目②で対象とする実用植物において、栽培・生育環境による発現制御技術の有効性を示す。 	<ul style="list-style-type: none"> 栽培インデックスにより目標の5倍を上回る10倍程度の発現増強を達成した。 研究開発項目②の複数の企業において試用、いずれも顕著な効果を示した 	◎
研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」				
研究開発項目	目標	成果	達成度	

植物による高機能品生産技術開発	<ul style="list-style-type: none"> ・化学合成等による競合品と比較して、コスト、性能等の面で総合的に競争力があることを示す。 	<ul style="list-style-type: none"> ・半数以上の課題において、コスト面において大きな優位性を示される結果が得られた。一部の課題においては、化学合成等による製造よりも効果・効能面で優位性を示す結果も得られつつある。既に最終目標値を達成している課題においては、ラボ/実証スケールからパイロット/実生産スケールへの拡大展開を図るフェーズに移行している。 	◎ /一部△
-----------------	--	---	-----------

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」

研究開発項目	目標	成果	達成度
高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・(1) ハイスループット合成・分析・評価手法の開発, (2) 高生産性微生物設計システムの開発によって開発されたシステムを用いることにより、従来育種と比較し、物質生産株の開発期間を短縮する。 ・(1)(2) で開発した要素技術、システムを維持・運営するための事業化モデルを策定する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・菌株構築では長鎖DNA合成技術、シャーシ株開発技術を開発、育種開発ではOMICS解析技術、センサー開発技術、排出輸送体解析技術、自家蛍光プロファイル解析技術を開発し、これらを統合したハイスループット評価系の構築を行い、(2) のシステムとの統合により従来にない速度での開発が可能となった。 ・代謝設計・最適化、ネットワーク構築技術、タンパク質・酵素設計技術、知識ベース開発の技術開発、およびデータベース開発を行い、新奇代謝物の合成、生産性の向上、生産ボトルネックの解消、情報集積・整理の各問題に対して解決できる技術を開発し、それらを統合することにより、問題に統合的に対処できるシステムを構築した。 ・実際に「応用問題」を解くことで、様々な問題点を抽出。DBTL サイクルをまわすことで、システム自体の高度化に貢献した。 ・事業化を目指すターゲットで有効性を検証。本プラットフォームによる高速育種に成功した。従来育種で限界レベルの微生物に対しても有効性が示された。微生物生産が実現していないターゲットの生産が実現した。 	○

研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」(助成)

研究開発項目	目標	成果	達成度
微生物による高機能品生産技術開発	<ul style="list-style-type: none"> ・化学合成等による競合品と比較して、コスト、性能等の面で総合的に競争力があることを示す。 	<ul style="list-style-type: none"> ・全ての企業でコスト、性能面で競争優位性が認められ、2030年までの事業化スケジュールが確立している。既に最終目標値を達成している課題においては、ラボ/実証ス 	○

		ケールからパイロット/実生産スケールへの拡大、顧客へのサンプル調査、事業化判断に移行。
	投稿論文	2016年度：査読付き 8 件、その他 1 件 2017年度：査読付き 16 件、その他 4 件 2018年度：査読付き 41 件、その他 27 件 2019年度：査読付き 42 件、その他 15 件 2020年度：査読付き 78 件、その他 17 件
	特 許	2016年度：国内出願 1 件、外国出願 0 件、PCT 出願 0 件 2017年度：国内出願 6 件、外国出願 0 件、PCT 出願 0 件 2018年度：国内出願 26 件、外国出願 3 件、PCT 出願 6 件 2019年度：国内出願 25 件、外国出願 2 件、PCT 出願 14 件 2020年度：国内出願 38 件、外国出願 12 件、PCT 出願 10 件 特記事項：なし
	その他の外部発表 (プレス発表等)	2016年度：プレス発表 1 件、学会発表・講演 61 件、新聞等掲載 6 件 2017年度：プレス発表 0 件、学会発表・講演 158 件、新聞等掲載 17 件 2018年度：プレス発表 3 件、学会発表・講演 197 件、新聞等掲載 20 件 2019年度：プレス発表 1 件、学会発表・講演 221 件、新聞等掲載 22 件 2020年度：プレス発表 15 件、学会発表・講演 165 件、新聞等掲載 43 件
4. 成果の実用化に向けた取組及び見通しについて	<p>研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」（委託）</p> <ul style="list-style-type: none"> ゲノム編集技術については、実証拠点を基盤としたゲノム編集試験研究の拡大、関連ベンチャー（4社）を軸とした実用化推進を実行中。 遺伝子発現制御技術については、開発した基盤技術の企業等への活用、取組を開始した。2021年度現在、実用植物利用については、検討継続中。 栽培環境制御技術については、複数の助成事業実施企業において、成果を活用した製品化・事業化への取組が継続して行われている。 <p>研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」（助成）</p> <ul style="list-style-type: none"> 既に最終目標値を達成している課題においては、ラボ/実証スケールからパイロット/実生産スケールへの拡大展開を図るフェーズに移行している。 一方、一部最終目標値未達の課題においては、引き続き実質的な共同研究体制等を維持しつつ、目標到達への取組を継続している。 <p>研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」</p> <ul style="list-style-type: none"> スマートセル創出プラットフォームを基にした事業化モデルのうち、技術移転をして商用サービス展開を目指してスタートアップを起業・資金調達が進んでいる状況。 事業化モデルのうち、技術コンサルティングについては3つの技術ですでに開始している。技術ライセンスについては長鎖DNA合成技術を受託合成事業に導出している。またメタボローム解析技術、自家蛍光顕微鏡については事業者から発売を開始している。最後に統合型受託に関してはバイオファウンドリー型ベンチャー企業を起業しており、今後の発展が期待できる。 <p>研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」（助成）</p> <ul style="list-style-type: none"> 既に最終目標値を達成している課題においては、ラボ/実証スケールからパイロット/実生産スケールへの拡大展開を図るフェーズに移行している。 一方、解決すべき課題が残ったテーマについては引き続き実質的な共同研究体制等を維持しつつ、目標到達への取組を継続している。 	
5. 基本計画に関する事項	作成時期	2016年3月 制定
	変更履歴	<ul style="list-style-type: none"> 2016年8月、プロジェクトマネージャー交代 改訂 2018年3月、研究開発項目③の細目順序入替え及び記載表現の見直し等 改訂 2020年10月、西暦表記変更及び研究開発項目③の実施期間を、2016年度から2021年度までの最長6年間に変更 改訂

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」【委託】
(ゲノム編集技術)

用語	説明
オルガネラゲノム	オルガネラであるミトコンドリアと葉緑体が有する環状のゲノムを指す。それぞれのオルガネラには複数コピー存在している。
ジンクフィンガー (ZF)	真核生物に広く存在する DNA 結合蛋白質。約 30 アミノ酸からなるモチーフの繰り返し構造で構成される。1つのモチーフで3塩基を認識する。DNA と結合する α ヘリックス中の3つのアミノ酸 (-1、3、6 番目) が塩基識別に働くが、後述の TAL effector と異なり、アミノ酸の種類と結合塩基との間に明確な認識コードはない。そのため、カスタム DNA 結合蛋白質の構築には、酵母などでのスクリーニングが必要である。最初のゲノム改変テクノロジーとして、1990年代から実用化されている。
ノックイン	ゲノムの特定の領域に外来遺伝子を挿入する方法であり、広義にはゲノム編集と定義される。外来遺伝子の両末端に標的とするゲノム領域と相同の配列を付加することで、相同組換えによって外来遺伝子を挿入することができる。高等植物の核ゲノムでは、相同組換えはほとんど生じないため、ノックインは非常に難しい技術となる。一方で、オルガネラでは外来遺伝子を送達することができれば、ノックインが生じる。
融合ペプチド	カチオン性のペプチドに様々な細胞内局在シグナルを融合したペプチド。カチオン性のペプチドが核酸に結合し、融合した細胞内局在シグナルにより目的のオルガネラへ核酸を送達する。例えば、ミトコンドリア局在シグナルを持つ融合ペプチドは、ミトコンドリアへ送達が可能となる。
CRISPR/Cas9	原核生物でファージやプラスミドに対する免疫機構として働く。2012年にゲノム編集への適用が確立した。ヌクレアーゼ活性を持つ Cas9、ガイド RNA を導入することで、ガイド RNA の配列に依存した低コストかつ簡便なゲノム編集ツールの構築が可能である。正式名称は Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated protein。
FokI	ゲノム編集で DNA 切断酵素ドメインとしてよく利用されている。本来は 5'-GGATG-3' を認識して切断する制限酵素だが、N 末端側の DNA 結合ドメインと C 末端側の配列非特異的な DNA 切断ドメインで構成される。ゲノム編集では C 末端側のみを利用することで、ZF、TALE、CRISPR などが認識する DNA 配列に依存した DNA の切断に用いることができる。

用語	説明
PODiR システム	細菌の抗生物質耐性機構の一つとして見いだされた自己ゲノム編集機構であり、ある条件を満たす重なり合ったダイレクトリピート配列で、特異的に配列が欠失する。このシステムを利用して細菌は抗生物質耐性能を獲得している。PODiR とは、Partly Overlapped Direct Repeat の略。
PPR	植物に豊富に存在する DNA または RNA 結合タンパク質。植物ではミトコンドリアや葉緑体の遺伝子発現制御に働く。35 アミノ酸の繰り返しで構成され、1つのモチーフで1塩基を認識する。35 アミノ酸のうち3つのアミノ酸（1, 5, 35 番目）の組み合わせにより、結合塩基が決まるため、所望の DNA または RNA 配列に結合する人工タンパク質の構築、ゲノム編集等への利用が可能である。我が国独自の技術として知財が成立している。
Tal effector (TALE)	植物に感染する病原菌から発見された DNA 結合蛋白質。34 アミノ酸からなるモチーフが約 17.5 回繰り返されており、1つのモチーフで1塩基を認識する。34 アミノ酸のうち2つのアミノ酸（12, 13 番目）の組み合わせにより、結合塩基が決まる。アミノ酸配列と対応する塩基配列は予測可能であり、2010 年に DNA 認識コードが発見された後、蛋白質工学の材料として注目され、ゲノム改変技術として、TALEN、Precision TALs という名称で実用化されている。

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」【委託】
 (代謝系遺伝子発現制御技術／栽培・生育環境による発現制御技術)

用語	説明
EYFP	黄色蛍光タンパク質。
IPP	=イソペンテニル二リン酸。
BY-2 細胞	葉タバコ由来の培養細胞。倍加時間が早く、形質転換が容易である特徴を持つ。
PDS 遺伝子	カロテノイド生合成遺伝子のひとつで、フィトエン不飽和化酵素 (phytoene desaturase) をコードする遺伝子。
アクチノマイシン	放線菌がつくるポリペプチド系抗生物質。
アグロインフィルトレーション	特定の遺伝子を組み込んだアグロバクテリウムを植物に一過的に感染させ、目的とするタンパク質を植物細胞で発現させる技術。
アグロバクテリウム	土壌細菌の一種 (リゾビウム属) の内、植物に対する病原性をもつものの総称。植物細胞に遺伝子を導入する際に広く用いられる。
アゴニスト	生体内の受容体分子に働いて神経伝達物質やホルモンなどと同様の機能を示す作動薬。
アプロチニン	タンパク分解阻害剤の一種。
アポプラスト	細胞膜の外を指す言葉で、植物では細胞壁及び細胞間隙などのスペースを指す。
アンチセンス鎖	ある配列の DNA や RNA に対して相補的な配列をもつ DNA 断片や RNA 断片を指す。
イソプレノイド	化学構造がイソプレンの炭素骨格の単位から形成されているテルペン類の内、カルボニル基やヒドロキシ基などの官能基を持つ誘導体の総称。
ウイルスベクター	ウイルスに目的の DNA 断片を挿入し、ウイルスの感染・複製系を利用して目的 DNA 断片を細胞内に導入するベクターのこと。
エピジェネティック	DNA の配列変化によらない遺伝子発現を制御・伝達するシステムのこと。
エピトープタグ	特定の抗体と特異的に結合する短いアミノ酸配列 (抗原) のこと。
カタルポール	地黄 (ジオウ) の主要成分。
カナマイシン	アミノグリコシド系抗生物質。
カルス	分化していない (未分化、脱分化) 状態の植物細胞の塊のこと。通常、固形培地上で培養されている状態のものを指す。
クロマチン	真核細胞の核内に存在する、DNA やヒストンタンパク質などで構成される複合体のこと。

用語	説明
シコニン	ムラサキの根(紫根)から得られるナフトキノンの赤色化合物。紫根の薬効本体とされる。また、染料としてもつかわれる。
ジャスモン酸メチル	植物において傷害ストレス応答などを誘導する、植物ホルモンの一種。
テルペノイド	イソプレネユニットを構成単位とする天然物化合物の総称で、特にテルペンの内、カルボニル基やヒドロキシ基などの官能基を持つ誘導体の総称。
テロメラーゼ	染色体にテロメアの反復配列を追加する酵素。
トライコーム	植物の茎や葉に覆われている毛状突起のこと。
トランスクリプトーム	転写産物(mRNA)の全体像を把握することによって、目的の遺伝子発現の全体像を判断する手法。
トランスポゾン	細胞内においてゲノム上の位置を転移することのできる塩基配列のこと。薬剤耐性決定遺伝子をもつものも多く見つかっている。
バイサルファイトシーケンス法	バイサルファイト処理を施したDNAを次世代シーケンサーを用いて配列決定し、シトシンのメチル化を検出する方法。
パクリタキセル	タイヘイヨウイチイなど、イチイ属樹木の樹皮から単離された物質で、商品名「タキソール」として世界中で流通。抗ガン作用があり、種々の悪性腫瘍に対して臨床の現場で使われる天然物。
プロトプラスト	植物細胞から細胞壁を取り除いた細胞のこと。
ホモログ	同一の祖先から派生した類似配列をもつ遺伝子、また類似の機能を持つ遺伝子。広義では、類似性の高い組織や器官をさす。
モノクローナル抗体	単一の抗体産生細胞に由来するクローンから得られた抗体(免疫グロブリン)分子のこと。
リファンピシン	抗生物質の一種。他の抗生物質に比べて自然体制を持たれやすい特徴を持つ。
根圏部	植物の根からの分泌物と土壌微生物とによって影響されている土壌の領域のこと。
白化	植物の葉中のクロロフィル濃度が低下し、葉が黄色から白色となっている状態。
耐性遺伝子	特定あるいは複数の薬剤に対する耐性を細菌や細胞に与える遺伝子。
腺鱗	トライコームの一形態で、植物の葉の表面に発達する器官。精油等を蓄積する。
野生型	生物において、野生の集団に最も多くみられる型のこと。

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」【助成】

用語	説明
10-DAB	10-deacetylbaccatin III の略称。
10-deacetylbaccatin III	タキサン骨格を有するジテルペノイド化合物であり、paclitaxel よりも樹木中の含有量が多いことからタキサン系抗がん剤を製造する際の間体として利用される。10-deacetylbaccatin III の C-13 位に側鎖を人工的に付加するなどして抗がん剤 paclitaxel や docetaxel が生産される。
ALSV	リンゴ小球型潜在ウイルス (Apple latent spherical virus, ALSV) リンゴから分離された小球型ウイルス、リンゴには病気を引き起こすことなく潜在感染する。リンゴ以外にナス科、ウリ科、マメ科等の植物種への感染が報告されている。
CD スペクトル解析	物質が円偏光を吸収する際に左円偏光と右円偏光に対して吸光度に差が生じる現象を円偏光二色性 (circular dichroism, CD) といい、円偏光の波長に対して CD の大きさをプロットしたものを CD スペクトルという。物質の立体配置を調べるために用いられる手法。
FW	含水状態の植物組織重量。 単位植物組織当たりの成分含有量を示す時に用いられ $\mu\text{g/g FW}$ などと表記する。
GFP	Green Fluorescent Protein (緑色蛍光タンパク質) は、オワンクラゲが持つ蛍光タンパク質である。GFP は細胞を破壊しなくても検出可能であることや他のタンパク質との融合タンパク質としても機能することから、レポーター遺伝子として広く利用されている。
GUS	β -glucuronidase の略称である。大腸菌由来の酵素で、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル β -D-グルクロニド (X-Gluc) を含む発色反応液で処理することによりインジゴン色素生成・蓄積するため、GUS 遺伝子の導入・発現を確認できる。
LC-MS/MS 分析	1 つ目の質量分離部で特定のイオンを選択し、続くコリジョンセルで不活化ガスと衝突させてフラグメンテーションを生じさせ、これを 2 つ目の質量分離部で分離し検出する手法。プリカーサーイオンとプロダクトイオンを検出することができる。
LC-MS 分析	高速液体クロマトグラフ (HPLC) の一種に分類され、液体中の成分を固定相と液体相の相互作用の差を用いて分離し、質量検出器で検出する手法。
MIA	モノテルペンインドールアルカロイドの略称。炭素数 10 の環を有するイソプレノイドとトリプトファンに由来するインドール環が結合したモチーフを有するアルカロイドの総称。

用語	説明
paclitaxel	タキサン骨格を有するジテルペノイド化合物であり、含有量が多いとされるイチイ樹木の樹皮でさえ 400ppm 以下である。細胞分裂において、微小管を安定化することによる微小管脱重合阻害作用を示すことから抗がん剤として用いられている。複雑な構造を有することから化学合成による産業供給は困難であり、10 年にわたる栽培や細胞培養法により生産されている。
PPFD	光合成有効光量子束密度 (Photosynthetic photo flux density) の略。単位時間に単位面積を通過する光量子のうち、光合成に有効な 400 nm から 700 nm までの波長域の光量子数を示す。
PTX	paclitaxel の略称。
shoot	植物の細胞塊 (カルス) から再生する茎葉を指す。
VD3	血中のカルシウム濃度を調節するビタミン D の一種。本事業において生産対象とする活性型ビタミン D3 の前駆体
アグロインフィルトレーション	弱い減圧下で植物体を直接アグロバクテリウム菌液に浸し感染させる方法である。感染させたアグロバクテリウム目的遺伝子の一過性発現等を可能にする方法である。
アグロバクテリウム	グラム陰性菌に属する土壌細菌であるリゾビウム属に内、植物に対する病原性を持つものの総称。植物細胞に感染して DNA を導入する性質があることから、植物の形質転換によく利用される。
イチイ	イチイ科イチイ属の常緑針葉樹。北海道、本州の日本海側の寒冷地に分布し、生長が極めて遅い。1960 年代に米国国立がん研究所が植物由来品の抗腫瘍活性スクリーニングを行い、同属のタイヘイヨウイチイ樹皮よりタキソール (一般名: paclitaxel) が見出され、ニホンイチイ (<i>Taxus cuspidata</i>) にも含まれることが明らかとなっている。
一過性発現、一過性抑制	物理的あるいは電気的方法により遺伝子を大量に細胞内に導入すると、細胞内の RNA ポリメラーゼや転写因子が導入遺伝子のプロモーターに結合することにより一時的に急激な遺伝子発現が起こる。これにより導入した遺伝子の効果を評価することが出来る。
遺伝子ノックアウト	ゲノム編集などの技術により、遺伝子コードを変更することで特定遺伝子の機能を欠損させる遺伝子工学の技法。
遺伝子ノックダウン	RNA 干渉 (RNAi) により配列特異的に遺伝子の発現を阻害し機能を抑制する遺伝子工学の技法。
活性型 VD3	生体への活性を高めたビタミン D3 の形態。
カナマイシン	アミノグリコシド系抗生物質。植物や微生物においては、カナマイシン耐性遺伝子を細胞内に導入した後、カナマイシンを含む培地で選抜を行うことで、カナマイシン耐性遺伝子が導入された細胞を効率よく選抜することができる。

用語	説明
カルス	分化した植物組織（外植片）の一部を適当な培地に移して培養すると、脱分化が起こり、細胞分裂を繰り返して無定形の組織塊を生ずる。これをカルスという。
グロースチャンバー	温度、湿度、照度、明暗サイクル等を人工的に環境制御し、植物等を栽培するための箱型の栽培装置。
形質転換（体）	細胞外部から DNA を導入し、その遺伝的性質を変えること。また、遺伝的性質が変化した植物を形質転換体という。
ジャガイモシストセンチュウ（potato cyst nematode: PCN）	ジャガイモの難防除病害虫。卵を内包するシストを形成し、このシストの薬剤耐性が高いため、防除が困難である。
ジャガイモシロシストセンチュウ	ジャガイモシストセンチュウと同じく、ジャガイモの難防除病害虫。これまで日本では未発生だったが、平成 27 年 8 月に北海道で初めて発生が確認された。
ジャスモン酸メチル	植物の病害虫への防御反応や種子発芽、根の伸長、開花、果実の熟成、老化といった種々の生理活性を有する植物ホルモンであり、またジャスミンの香りの主成分であることから香料としても利用される。植物によるファイトアレキシン、ニコチンなど様々な種類の防御化学物質の産生を誘導することが知られている。
植物細胞培養技術	植物細胞を未分化の状態が無菌的に培養する技術。有用成分の高生産が可能であるだけでなく、Ecology、Traceability、Sustainability の点でも優位性がある。ムラサキ細胞培養によるシコニン生産、オタネニンジン細胞培養によるジンセノサイド含有エキス生産、ヤマブドウ細胞培養によるレスベラトロール生産などの実用化例がある。
ストレス栽培	光、温度、栄養、水分等の条件を植物に対して不適な環境条件下（ストレス）にして栽培し、植物が持つ環境適応能力を誘導する技術である。環境条件の変化への適応に伴い植物の代謝経路が変動することを利用し、有用な物質生産を意図する。
セージ	シソ科アキギリ属の多年草または常緑低木で、抗酸化作用を持つハーブとして食品、機能性素材に利用されている。
タイタン	ニチニチソウの栽培種の一つ。F1 品種（特定の両親の交配によって生産したハイブリッド種）。
タキサン化合物	タキサン骨格を有するジテルペノイド化合物。
丹参（たんじん）	シソ科アキギリ属の多年草で、血流改善や抗酸化作用があり、生薬として日本薬局方に収録されている。
土壌改良資材	地力増進法にて「植物の栽培に資するため土壌の性質に変化をもたらすことを目的として土地に施される物」
トリプトファン代謝	トリプトファンはアミノ酸の一種で、側鎖にインドール環を持つ。コリスミン酸からアントラニル酸を経て合成される。通常、

用語	説明
	トリプトファン含量はフィードバック阻害作用により調節されている。
トリプル四重極 LC/MS システム	質量分析計の1種で、2つの四重極質量分析計の間に衝突室を挟み、連結した構造の測定装置である。前処理装置として、液体クロマトグラフが連結されており、高精度な定量分析と同時に定性分析が可能である。
バイアレリック(変異)	基本的に生物は2つで1組の染色体を有するが、その2つの染色体双方に変異がみられる状態。
バイオリアクター	生体触媒を用いて生化学反応を行う装置の総称。植物細胞の場合、細胞を容器内で培養液中に浮遊させ、酸素を供給しながら無菌的に培養を行う。従来からのステンレス製培養装置の他、近年ではポリエチレン製の袋型培養装置が開発されている。
パシフィカ XP	ニチニチソウの栽培種の一つ。固定種。
孵化促進物質 (hatching factors: HF)	シスト内の卵の孵化を促進させる物質
不定芽	不定芽とはカルスや葉片など培養組織から分化した芽である。
マイクロチューバー (microtuber: MT)	組織培養条件下で形成される小塊茎(ジャガイモ)
ムラサキ	ムラサキ科の多年草である。抗炎症作用、創傷治癒促進作用があり、生薬として日本薬局方に収録されている。
メロペネム	細菌の細胞壁の合成を阻害して殺菌作用を示し、細菌による感染症を治療するカルバペネム系抗生物質。グラム陰性菌のアグロバクテリウムの生育を阻害することから、感染後のアグロバクテリウムの除菌に利用される。

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」【委託】

用語	説明
13C flux 解析	代謝フラックスを直接測定することができるほぼ唯一の解析手法。 ¹³ C 同位体標識した炭素源を培地に添加し、各代謝物に蓄積される ¹³ C 量を、質量分析計を用いて測定する。これにより、代謝経路上の代謝物量の流れ、分岐を解析することができる。
azaphilone 骨格	PubChem CID: 57384025。分子式 C ₂₁ H ₂₂ O ₇ で示される化合物。紅麴色素はいずれもこの骨格を持つ。
DBTL ワークフロー	目的の遺伝子組換え微生物株を開発するための、設計 (Design)、構築 (Build)、試験 (Test)、学習 (Learn) から成るワークフロー。
MRM アッセイメソッド	定量プロテオミクスでタンパク質毎に作成する定量用のメソッド。三連四重極質量分析装置の多重反応モニタリング (Multiple Reaction Monitoring、MRM) モードに由来する。
OGBA 法	Ordered Gene Assembly in Bacillus subtilis 法の略であり、枯草菌のプラスミド形質転換系を利用した多重 DNA 断片集積法である。材料となる各 DNA 断片を、Type IIS などの制限酵素を用いて 3~4 塩基の特異的な突出末端を持つように準備し、その突出末端の相補性を利用して、連結する DNA 断片の順序や向きを指定して連結し、最終的に環状プラスミド DNA として連結した DNA を得る方法である。
ORF	オープンリーディングフレーム (Open Reading Frame)。DNA または RNA 配列で、アミノ酸 (タンパク質) に翻訳される可能性がある塩基配列。
P450	シトクロム P450 は細菌から植物、哺乳動物に至るまでのほとんどすべての生物に存在する酸化還元酵素ファミリーに属する酵素の総称である。様々な基質を酸化し、薬物代謝、ホルモンの生合成、脂肪酸の代謝や植物の二次代謝など多くの役割を果たしている。
QConCAT	タンパク質定量法的一种。測定したいタンパク質の定量ペプチドを複数つないだ人工タンパク質 (QConCAT タンパク質) を設計する。QconCAT タンパク質を発現する大腸菌を構築し、安定同位体標識 QConCAT タンパク質を調製する。安定同位体標識 QConCAT タンパク質と測定したいサンプルと混合した後、トリプシン消化により断片化して質量分析を行うことで、複数のタンパク質の濃度比を簡便に相対定量する方法。
RPKM	RNA-seq による発現頻度解析に用いられる用語で、遺伝子産物鎖長を考慮した発現頻度の数値表記。reads per kilobase of exon per million mapped の略。

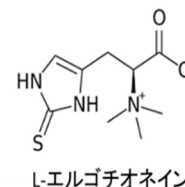
用語	説明
SFE-LC-MS/MS オンラインシステム	SFE と LC-MS/M をオンラインで連結することにより、スループットと操作性の向上を目指すシステム。SFE の特徴として煩雑な試料前処理が不要であり、MS/MS 測定までを完全自動化できる。さらに、全行程が遮蔽された流路内で完結する事で酸化などによる代謝物の劣化が抑制され、確度の向上が見込まれる。
TATA-box	真核生物のシス基本転写因子の一つ。TATAA に類似するコンセンサス塩基配列で、真核生物に共通する TATA-Binding Protein (TBP) が結合することにより転写が開始される。
xcp マシナリー	細菌が細胞外にタンパク質を分泌するためのシステムの一つで、複数のタンパク質が会合した巨大な複合体（分子装置）として細胞膜を貫通するように存在する。グラム陰性菌に 3 種類存在すると考えられており、xcp マシナリーは Type II 型の分泌装置として知られている。
アイソザイム	酵素（enzyme）としての活性がほぼ同じでありながら、タンパク質分子としては別種である（アミノ酸配列が異なる）ような酵素のこと。
イオンペア剤	逆相分配クロマトグラフィーにおいて、イオン性化合物の保持を高めるために移動相へ添加する試薬。目的化合物イオンとは異符号のイオン性試薬でイオン対を形成させることで目的化合物イオンの電荷を中和・疎水性を高め、ODS 等の逆相系充填剤への保持を高める。
オイルリファイナリー	化石資源を原料源とする物質生産技術
オーミクス解析	生体内のゲノム、転写物、タンパク質、ペプチド、脂質、糖、代謝物と臨床情報とを網羅的に解析する方法。ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなど。
オペロン	2 つ以上の遺伝子が一度に転写される場合、それらの遺伝子を一つにまとめた単位。
カタボライト抑制	生物の代謝調節機構の一種。一連の代謝反応により生産された化合物が、特定の酵素反応を抑制して代謝を調節する機構。
カラムクロマトグラフィー	化合物の精製法のひとつ。例) イオン交換樹脂をつめた筒状の容器(カラム)に緩衝液に溶かした CEN 流し、CEN とイオン交換樹脂のイオン結合の差を利用して利用して分離を行う。
形質転換	細胞外部から DNA を導入し、その遺伝的性質を変えること。またその操作のこと。
コドン	遺伝子を構成する 4 種の核酸の 3 つの順列によって定義されるものであり、1 つのアミノ酸と対応関係にある。
湿菌体重量	高密度菌体反応において回収、再懸濁した際の菌体の濃度 (g/100 ml)。

用語	説明
シャーシ株	バイオ産業で求められる有用物質の多くは細胞内で共通の代謝前駆体から生合成されているため、この前駆体を「ハブ化合物」とし、ハブ化合物の生産性が高い株を「シャーシ株」と定義する。
人工内部標準タンパク質	定量プロテオミクス用に設計された人工（非天然型）の内部標準タンパク質。これを安定同位体標識したものを、内部標準として同位体希釈法による定量を行う。
スパイクイン	未定量試料における特定の物質質量に対して一定程度の定量性を持たせるための高い精度で定量された物質を添加すること。
代謝フラックス	細胞内の代謝の流れを、時間当たりの化学反応量としてあらわすこと。各代謝反応へどれだけの代謝物が流れているかを把握する事は、スマートセルをデザインする上で重要であるが、遺伝子発現量、タンパク質量、代謝物量だけでは間接的な推定にとどまる。直接的に代謝フラックスを得るには、 ¹³ C flux 解析を用いた測定が必要となる。
超臨界流体抽出 (SFE)	超臨界流体の CO ₂ を媒体に用いた物質抽出方法。超臨界流体の CO ₂ は脂溶性物質の溶解度が高く、細胞内の水溶性/脂溶性成分を効率よく分離することができる。また、超臨界流体の CO ₂ の極めて高い拡散性により、破碎操作なしに細胞内の代謝物を抽出できる。CO ₂ の臨界温度が 31℃ と低いことも、生体物質の解析に対して有利な点である。
定量プロテオミクス	タンパク質を定量する方法の一つ。タンパク質をトリプシン消化し、分解生成したペプチドを液体クロマトグラフで分離し、三連四重極質量分析装置の多重反応モニタリング (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 法で検出する。
バイオマス糖化率	バイオマス酵素糖化で完全分解された場合の単糖量を 100% として、そのうちの何%の単糖が得られたのかを示す指標。酵素糖化反応が進行すると難分解性の部分が残存するため、高い糖化率を達成するために必要な酵素量は飛躍的に増加する。
ドミナントネガティブ法	活性部位や相互作用部位を欠損した機能欠損変異体を高発現することにより、野生型の遺伝子産物の機能をノックダウンする方法。
トラップカラム	SFE と LC をオンラインで連結する際に両者の間に配置し、SFE からの抽出物を一旦保持する構成要素。SFE と LC は移動相の組成が全く異なるため、SFE 条件下 (CO ₂ /メタノール) では抽出物を保持し、LC 条件下 (水/アセトニトリル) では溶出する性質を持つ新規充填剤を用いた。
バイオリファイナリー	生物由来の資源を原料源とする物質生産技術

用語	説明
非可食バイオマス	食料として利用できない生物由来の再利用可能資源。ここでは植物由来で、分解することで糖類を生成し得るものを指す。
フィードバック阻害	ある酵素の反応産物もしくは代謝系で下流の反応産物が、その酵素に作用し活性を抑制する現象。反応が進み産物が蓄積すると反応がそれ以上進まないように阻害がかかる。
複数遺伝子制御因子	複数の糖質加水分解酵素遺伝子の発現を個別に制御するタンパク質。既知の転写調節因子はセルラーゼ群やヘミセルラーゼ群の発現を一括で制御するのに対し、複数遺伝子制御因子は一部の酵素の発現を個別に制御する。
プロトプラスト	植物や糸状菌の持つ細胞壁を酵素等で分解し、細胞膜が露出した状態の細胞をいう。球形で、浸透圧変化により破壊されるが、外来遺伝子を導入することが可能になる。
プロモーター	転写（DNA から RNA を合成する段階）の開始に関与する遺伝子上流領域を指す。プロモーターに基本転写因子が結合して転写が始まる。
ペリプラズム	グラム陰性菌において、細胞膜と細胞外膜の間の空間。細胞質内に物質を取り込んだり、排出したりするためのタンパク質が存在する。
ポイントオブケアテストイング	Point of Care Testing。検査室の無いクリニックや診療所内で、医療従事者が行う検査。検査時間が短縮でき、その場での判断が期待できる。
ホスホトランスフェラーゼシステム	ここではホスホエノールピルビン酸依存ホスホトランスフェラーゼシステムを指しており、グルコースをグルコース-6リン酸に変換して細胞内に取り込む際にグルコースと等モルのホスホエノールピルビン酸をリン酸基供与体として消費する。
誘導発現プロモーター、構成発現プロモーター	DNA から RNA の合成（転写）が開始される遺伝子上流にある配列領域をプロモーターと呼ぶ。直下の遺伝子を特定の物質の存在下や条件化でのみ転写するプロモーターを誘導発現プロモーターといい、恒常的に転写するプロモーターを構成発現プロモーターという。

研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」【助成】

用語	説明
17, 18-EpETE	17, 18-エポキシエイコサテトラエン酸の略称
19, 20-EpDPE	19, 20-エポキシドコサペンタエン酸の略称
ALSD シミュレーション	産総研が開発した MD シミュレーション技術で、構造サンプリングを高速に行うことでドッキングシミュレーションを効率的に行うことができる
ALSD 法	「Adaptive Lambda Square Dynamics 法」の略。選択した領域（基質周辺）の構造変化を促進させた改良 Molecular Dynamics (MD) 手法。
<i>B. stabilis</i>	<i>Burkholderia stabilis</i> の短縮形
CEN	本プロジェクトで取り扱う <i>Burkholderia stabilis</i> が分泌するコレステロールエステラーゼ (cholesterol esterase) の名称。
Closed 構造	酵素の全体構造が変化して酵素-基質の複合体で酵素のポケット構造が閉じたようになっている構造
DHA	ドコサヘキサエン酸の略称
EPA	エイコサペンタエン酸の略称
ORF	Open Reading Frame DNA または RNA 配列をアミノ酸に翻訳した場合に終了コード配列 (termination codon; 終止コドン) を含まない読み取り枠 (Reading Frame) がオープンな (Open) 状態にある (タンパク質に翻訳される可能性がある) 塩基配列を指す。
P450	シトクロム P450 は細菌から植物, 哺乳動物に至るまでのほとんどすべての生物に存在する酸化還元酵素ファミリーに属する酵素の総称
RNA	DNA 情報からタンパク質が作られる過程で作られる核酸。DNA を鋳型に転写という反応により合成される。さらに翻訳という反応により RNA の配列に対応したタンパク質が合成される。
RNAseq 解析	次世代シーケンサー (NGS) により RNA の塩基配列を決定し、得られた情報を解析する手法。
エルゴチオネイン (EGT)	キノコなど一部の微生物が生産できる希少アミノ酸 (下図、構造式)。近年の研究で、ヒトには EGT を利用するための仕組みが備わっていることが明らかになった。食事から摂取した EGT が脳機能の改善、皮膚、眼、各種臓器における酸化ストレスから細胞を保護することが示唆されている。
ゲノムスケールモデル (GSM)	利用生物 (宿主) の全代謝反応をコンピュータ上で記述したもの。
酵素	さまざまな化学反応を触媒するタンパク質。



用語	説明
コレステロールエステラーゼ	コレステロールエステルの加水分解反応を触媒する酵素。
タグ配列	転写を促進するためにつける塩基配列であり、コドン最適化により二次構造を作らない様に設計されている。
バークホルデリア・スタビリス (Burkholderia stabilis)	グラム陰性のバクテリアの一種。
ヒト型長鎖セラミド	ヒトの角質層に存在するセラミドであって、スフィンゴ塩基が4-ヒドロキシスフィンガニン（フィトスフィンゴシン）であり、脂肪酸部分がノンヒドロキシ脂肪酸のセラミド NP と脂肪酸部分が α -ヒドロキシ脂肪酸のセラミド AP であり、脂肪酸の炭素数が 24 のもの
部位特異的変異導入	タンパク質を構成する特定のアミノ酸残基に変異を導入する実験手法
フラックスバランス解析 (FBA)	GSM を使って行う計算手法の一つ。計算科学的に線形計画法を用いて行う。 ある環境における細胞内代謝反応量（フラックス）を予測することができる。
ポイントオブケアテストティング (POCT) 試薬	医療現場で迅速に実施される検査を POCT とよび、それに使用される試薬のこと。
リパーゼ	脂質などのエステル結合を加水分解する酵素群の総称

1.事業の位置付け・必要性について

1.1. 事業の背景・目的・位置づけ

事業の背景・目的

バイオテクノロジーは、経済活動の様々な分野で利用される技術体系となっており、近年欧米を中心にバイオテクノロジーを用いた経済活動をバイオエコノミーと称して政策提言に取り上げている。OECD では 2030 年にはバイオエコノミー市場が成長すると予想し、これまで中心であった健康・医療分野での利用から工業利用の市場が拡大していくと見込んで取組を先行している。一方で、2015 年に国連本部が掲げた持続可能な開発目標 (SDGs) が採択され、深刻化する環境課題などへの解決に向けて世界的に持続可能な社会の構築が求められ、サステナブルなものづくりを加速する技術等により、我が国のバイオエコノミー (図 1) を活性化させる必要がある。



図 1.1-1 我が国のバイオエコノミー俯瞰図

(出所：平成 28 年度 NEDO 委託調査「バイオエコノミーの現状分析とスマートセルが変える未来像に関する調査」)

このようなバイオエコノミー成長見込みの背景には、次世代シーケンサーをはじめとした各種解析装置が急速に進化し、遺伝子情報や生産物情報を正確かつ高速に入手できるようになったこと、及び 2000 年代前半からゲノム上の遺伝子を能動的に組み替える、いわゆるゲノム編集技術が開発されたことが挙げられる。これらの技術により、例えば特定の物質の生産量が最大になる条件など、目的に適した遺伝子配列をコンピュータ上で設計し、更にその設計に基づき、様々な生物の遺伝子を能動的に操作することが可能になってきたことで、様々な物質生産への適用拡大に期待が高まっている。しかしながら、このような取り組みは欧米が先行しており、我が国としても同分野での競争力強化が急務である。また、現状は基礎学理が構築され、コンセプトが上がってきた段階であることから、国として生物を利用した高機能品生産に寄与することを実証していくことが重要である。

国内外の状況

①我が国の状況

2010年度まで経済産業省で実施した「植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発」の成果により、ホクサン株式会社が世界で初めて遺伝子組換え植物による医薬品原料生産の事業化に成功するなど、組換え植物の栽培に必要な密閉型植物工場における生産技術を大きく進展させてきた。また、2012年度から開始した経済産業省の「革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発」において、目的に応じた最適な遺伝子配列デザインに資する解析、合成手法等を開発し、要素技術を構築してきたところである。

しかし、前述のとおり、特定遺伝子の編集が容易なゲノム編集技術は米国に後れを取っている状況であり、また、遺伝子情報やその発現情報、生産物情報を統合的に解析する技術も未確立であることなど、実用化に向けた課題は多い。

②世界の取組状況

米国では、遺伝子配列の設計、構築、評価、学習に係るサイクルを圧縮するツール開発と、そのツールを用いて全く新しい物質の創製、既知物質の高効率生産を狙った Living Foundries program を立ち上げ、160 億円もの研究投資を行っている。また、EU においても、Horizon2020 の枠組み等を活用し、生物資源の持続可能な活用による材料、化学薬品等の加工・生産に関する研究開発を産官学連携で推進しているところである。加えて、英国では、生物学的デザインに係る研究推進の場として 30 もの機関・企業が集まるセンターを設立し、最重要政策課題として本分野を推進している。

事業の位置づけ

2017年6月に閣議決定された「科学技術イノベーション総合戦略 2017」において、新たな経済社会としての「Society 5.0」を実現するプラットフォームを支える基盤技術として「生物機能の高度活用による新たな有用物質の生産システムによる、革新的なものづくり体系・バイオ産業を構築するため、技術基盤を構築する」と明記されている。

また、「未来投資戦略 2017」においても、「生物を活用した機能性物質生産のための産学官による技術開発を推進するとともに、革新的なバイオ素材等による炭素循環型社会や食による健康増進・未病社会の実現等に向け、本年度中を目途に我が国のバイオ産業の新たな市場形成を目指した戦略を策定し、制度整備も含めた総合的な施策を推進する」として当該分野について我が国が戦略を策定し総合的な取組を進める方向性が示されている。

そして、2018年6月に閣議決定された「統合イノベーション戦略」において、革新的新素材・製品の創出に向けて、「ゲノム情報等のビッグデータの解析をもとに機能をデザインし、ゲノム編集技術、長鎖DNA合成技術等により機能の発現を制御した「スマートセル」によって、化学合成が困難な新規の有用化合物等を工業生産するための技術の開発」が主要な施策として位置づけられている。

さらに、2019年6月に閣議決定された「統合イノベーション戦略」において、「バイオとデジタルの融合を全ての土台とし、生物活動のデータ化等も含めてデータ基盤を構築しそれを最大限活用することにより産業・研究を発展させることで、世界最先端のバイオエコノミー社会を実現」することを目指すことが示されている。

加えて、2020年7月に閣議決定された「統合イノベーション戦略」において、「バイオ由来製品の完全国産化を促進するため、原料供給から製造プロセス、製品化に至るまで一貫した研究開発を推進」する取り組みを行うことが述べられている。

1.2. NEDOの関与の必要性・制度への適合性

1.2.1. NEDOが関与することの意義

本プロジェクトで推進する生物機能を活用した高機能品生産技術の開発は、環境負荷低減・CO₂排出量の削減・炭素循環社会の構築等の地球規模の課題解決に貢献するものである。特に、工業（モノづくり）産業の競争力強化に貢献することを目指しているが、開発する基盤技術は医療・ヘルスケア分野、エネルギー分野、農林畜水産分野へも展開が可能なことから汎用的な技術を創出する事業として国が取り組む意義がある。そして、生物工学、化学工学、情報科学等の複数分野の融合が必要であり、課題解決のための様々な要素技術を実用システムとして機能させるために産学官連携体制でプラットフォーム化を進める必要があることが一社単独での研究開発は困難であり、NEDOのこれまでの知識や実績を活かして推進すべき事業である。

1.2.2. 実施の効果（費用対効果）

本プロジェクトは事業期間5年間、総事業規模約86億円の計画で開始している。化合物を植物や微生物を用いて生産した場合、化学合成に比べて大幅なエネルギー使用の合理化・二酸化炭素の排出削減が可能となることから、本プロジェクトの成果により、化学プロセスから植物等による生産に代替されることで、2030年時に85.8万k1相当の原油削減に貢献することをアウトプット目標としている。また、OECDにおいて、2030年にバイオテクノロジーを用いたものづくり等の工業関連市場は世界で70兆円に拡大すると予想されている。本プロジェクトでは開発する技術がその内1割となる7兆円の市場に貢献することを目指している。

2. 研究開発マネジメントについて

2.1. 事業の目標

アウトプット目標

本プロジェクトを通じて、化学合成では生産が難しい有用物質の創製、又は従来法を凌駕する生産性の実現に資する基盤技術及び実用化技術の確立を目指す。

生物機能を活用した物質生産において、植物を活用する場合「ターゲット化合物の生産量がごく微量」「植物体の生長時間が長いものや栽培技術が未確立のものがある」「国内生物資源・供給量が不十分」「個々の代謝系の詳細が未解明」等の産業利用上の課題がある。また、特定遺伝子の編集が容易なゲノム編集技術に関しては、海外技術に席卷されていることから産業利用には莫大な特許実施料が必要となることが考えられる。また、微生物を活用する場合にもその育種において「試行錯誤の要素大」「開発時間が長い」「コストが莫大」「生産できない物質がある」といった課題を抱えていることは事実である。

このことから、これらの課題解決に資する技術を開発するため、以下の研究開発項目を設定し目標を設定している。

研究開発項目毎の目標は以下の通り。

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」

【中間目標（2018年度）】

（1）ゲノム編集技術

- ・既存のゲノム編集技術では対応できない独自の新しい機能を有するゲノム編集関連技術（対象領域、精密性、ゲノム設計、細胞毒性、導入効率等）の基本技術を確立し、その新規性、有用性を検証する。
- ・開発した成果の産業利用に向けて、他国の動向も踏まえた知財戦略を策定する。

（2）代謝系遺伝子発現制御技術

- ・メチル化誘導、遺伝子発現制御因子解析等の基本技術を確立する。
- ・目的代謝系遺伝子の発現を2倍以上増強又は1/5以下に抑制する。

（3）栽培・生育環境による発現制御技術

- ・栽培環境因子と代謝系主要遺伝子の半数の解析を終了させる。

【最終目標（2020年度）】

（1）ゲノム編集技術

- ・植物等による物質生産機能の制御・改変において、既存のゲノム編集では対応できない新しい機能を有する国産のゲノム編集関連技術（対象領域、精密性、ゲノム設計、細胞毒性、導入効率等）を確立する。
- ・研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した新規の国産ゲノム編集技術の有効性を示す。
- ・ゲノム編集を産業利用するために必要な要素技術を戦略的に集約し、国産ゲノム編集技術基盤を確立する。

(2) 代謝系遺伝子発現制御技術

- ・ 目的代謝系遺伝子の発現を 5 倍程度増強又は 1/10 以下に抑制する技術を確立する。
- ・ 研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した遺伝子発現制御技術の有効性を示す。

(3) 栽培・生育環境による発現制御技術

- ・ 目的代謝系における主要遺伝子/産物の発現を 5 倍程度増強させる技術を確立する。
- ・ 研究開発項目②で対象とする実用植物において、栽培・生育環境による発現制御技術の有効性を示す。

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」

【中間目標（2018年度）】

- ・ 対象とする実用植物の栽培、培養系の確立及び遺伝子組換え技術を確立する。
- ・ 生産性向上に寄与する遺伝子を明らかにし、コスト、性能等の面で総合的に競争力があるとの見通しを得る。

【最終目標（2020年度）】

- ・ 化学合成等による競合品と比較して、コスト、性能等の面で総合的に競争力があることを示す。

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」

【中間目標（2018年度）】

(1) ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

- ・ 30kb 超の DNA 合成時間を従来の 1/2 に短縮する技術を確立する。
- ・ LC-MS のハイスループット化により、現状と比較して 10 倍の分析速度を実現する。
- ・ その他、高生産性微生物設計システムを効率的に運用するために必要となるハイスループット評価技術を確立する。

(2) 高生産性微生物設計システムの開発

- ・ 階層内、階層間の制御ネットワークを推定する階層縦断的な情報解析手法を開発する。
- ・ 上記解析手法や代謝流束推定、人工酵素設計技術等を統合し、特定物質の生産性向上に資する重要因子、改変すべき遺伝子配列を提示する汎用的な設計システムを構築する。

(3) 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

- ・ (1) (2) で開発したシステムを用いて、生産性の大幅な向上に資することを最低 1 つのターゲットで実証する。
- ・ 各国の類似事業・研究開発動向を調査し、我が国の優位性を生かした独自の知財戦略及び事業化モデル（案）を策定する。

【最終目標（2020年度）】

- ・（１）（２）で開発したシステムを用いることにより、従来育種と比較し、物質生産株の開発期間を1/10に短縮することを実証する。また、微生物ライブラリーの構築プロセスの自動化により、さらなる開発期間の短縮化を図る。
- ・（１）（２）で開発した要素技術、システムを維持・運営するための事業化モデルを策定する。

研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」（2019年度から開始）

【最終目標（2020年度）】

- ・化学合成等による競合品と比較して、コスト、性能等の面で総合的に競争力があることを示す。

2.2. 事業の計画内容

2.2.1. 研究開発の内容

本プロジェクトでは以下4つの研究開発項目を実施する。

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」

（１）ゲノム編集技術

植物等による物質生産機能の制御・改変及びその産業化に向けて、既存のゲノム編集では対応できない新規の国産のゲノム編集関連技術を開発し、生物を利用した物質生産における我が国の産業競争力を向上させるための新たな技術基盤の形成を目指す。また、研究開発項目②と連携し、開発した技術の有効性を検証する。研究開発と並行して、他国の特許動向等を調査し、開発した成果の実用化を睨んだ知財戦略を策定する。

（２）代謝系遺伝子発現制御技術

生産効率の向上、コスト低減に向けて、目的遺伝子メチル化誘導技術や遺伝子発現の抑制を効率的に複数の遺伝子で制御する技術、目的代謝産物の蓄積機構を制御する技術等を開発する。また、研究開発項目②と連携し、開発した技術の有効性を検証する。

（３）栽培・生育環境による発現制御技術

複数の栽培環境要因が代謝主要経路群に与える影響を各代謝系の主要遺伝子の発現レベルで解析し、目的代謝産物の効率的生産に効果的な栽培環境条件を利用可能にする技術を開発する。また、研究開発項目②と連携し、開発した技術の有効性を検証する。

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」

特定の生産ターゲットを設定した上で、生産させる実用植物の栽培、培養系の確立及び遺伝子組換え技術を開発するとともに、生産性向上に寄与する遺伝子の特定・改変、環境条件の最適化を行い、実用に資する生産性を実現する。

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」

(1) ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

(2) において情報解析技術を用いて構築するシステムで提示される遺伝子配列の効率的な導入のために、DNA断片の合成からプラスミドの構築、精製、長鎖DNA合成までをハイスループットで行う長鎖DNA合成技術を開発する。

また、メタボロームを高速に取得するために、前処理や解析の自動化、分析装置の改良等を行い、ハイスループット化したLC-MSを開発する。

その他、高生産性微生物設計システムを効率的に運用するために必要となるハイスループット評価技術を開発する。

(2) 高生産性微生物設計システムの開発

同一サンプル、同一条件での各オミクス情報を体系的に取得・蓄積し、そのビッグデータから機械学習等の情報解析技術を用いてDNA、mRNA、タンパク質、代謝物の階層内、階層間の制御ネットワークを推定する手法（方法論、アルゴリズム）を開発する。併せて、酸化還元バランス等も考慮した代謝流束推定手法や人工酵素設計手法を開発する。これらの解析手法を統合し、特定物質の飛躍的な生産性向上に資する重要因子、改変すべき遺伝子配列を提示する汎用的な設計システムを構築する。

また、上記システム構築のために、測定データの規格化、体系化されたデータベースの構築、公開データからの知識整理等も併せて実施する。

(3) 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

(1)(2) で開発したシステムを用いて、将来事業化を想定する対象物質を設定の上、その大幅な生産性向上及び従来育種（例：5年）と比較して開発期間の短縮化に資することを実証する。また、プロジェクト終了後も維持・運営するために必要となる知財戦略及び事業化モデルを検討する。

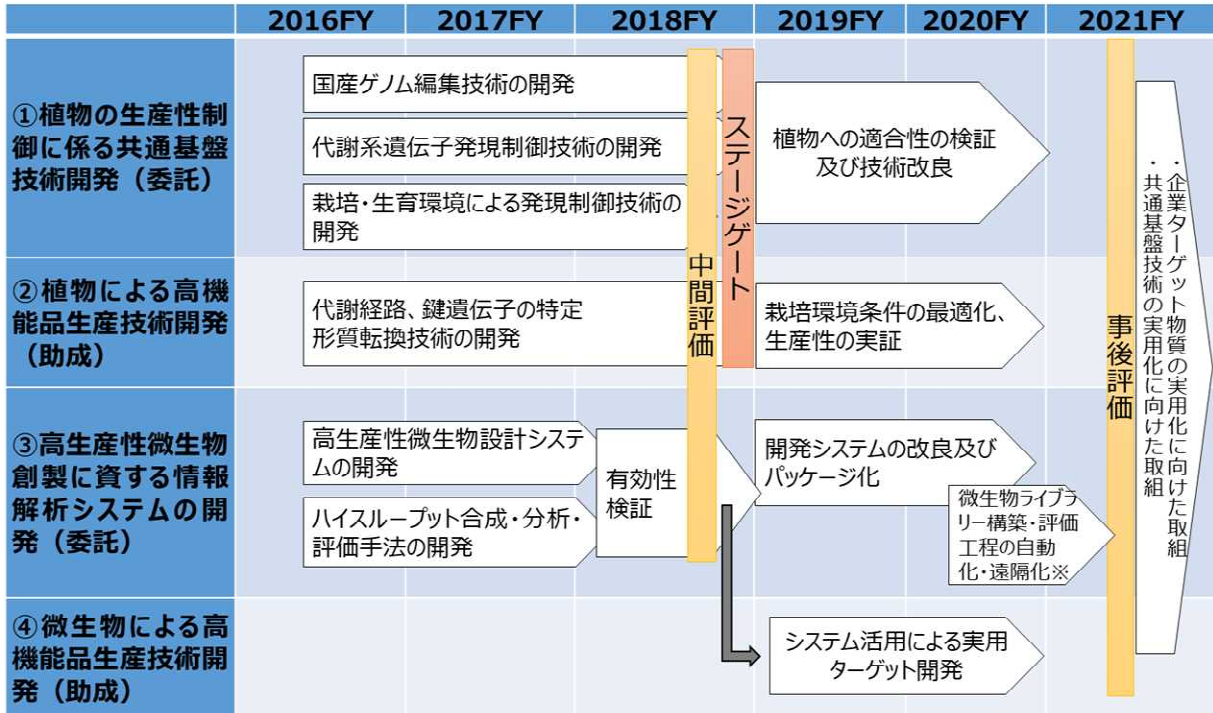
研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」（2019年度から開始）

特定の生産ターゲットを設定したうえで、研究開発項目③で開発した高生産性微生物設計システム等を用い、目的物質の生産性向上を狙うとともに、量産化を見据え、宿主となる微生物の培養条件等を最適化する。

事業の計画

全体の研究スケジュールは以下のとおり。

図 2-1 プロジェクト全体スケジュール



※内閣府PRISM事業(バイオ領域)において追加実施による効果が期待されるテーマとして選定されたもの。事業期間：2020年9月～2021年9月

表 2-1 研究開発予算

(百万円)

研究開発項目	2016年	2017年	2018年	2019年	2020年	2021年
①植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発 (委託)	519	618	725	777	841	0
②植物による高機能品生産技術開発 (助成)	180	192	187	184	172	0
③高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発 (委託)	885	1,187	1,227	1,119	1,266	60
④微生物による高機能品生産技術開発 (助成)	0	0	0	209	220	0
その他 (調査研究等)	29	10	134	97	0	0
合計	1,613	2,007	2,273	2,386	2,499	60

2.2.2. 事業の実施体制

プロジェクトマネージャー (PM) に NEDO 材料・ナノテクノロジー部 林 智佳子 主査を任命し、公募によって研究開発テーマ及び研究開発実施者を選定するとともに、実施体制の構築、予算配分、プロジェクトの実施等、プロジェクトの進行全体を企画・管理して、プロジェクトに求められる技術的成果及び政策的効果を最大化させた。

九州大学 名誉教授 久原 哲 氏をプロジェクトリーダー（PL）、産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 植物分子工学研究グループ長 松村 健 氏をサブプロジェクトリーダー（SPL）とし、以下の体制で研究開発を実施した。

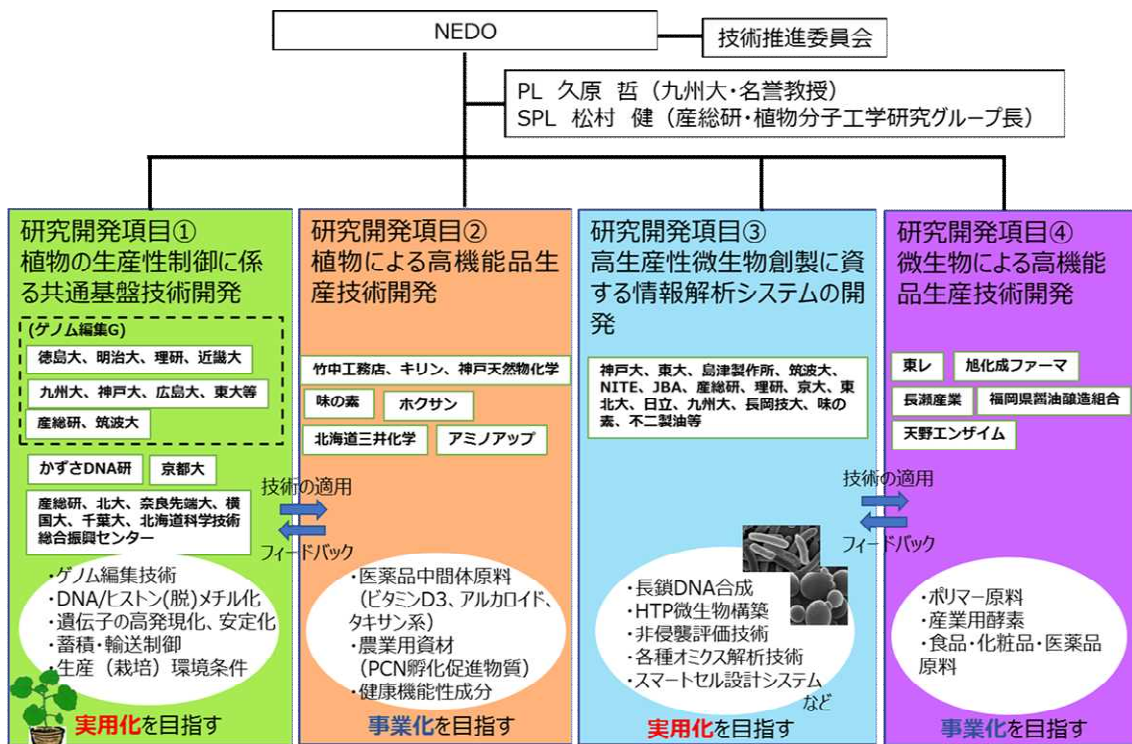


図 2-2 プロジェクト体制図

2.2.3. 研究開発の運営管理

① 研究開発の進捗把握・管理

PMは、プロジェクトリーダー、サブプロジェクトリーダーとの間で、プロジェクトの方向性や管理体制、問題点の解決にあたって指示・協議にて対応を決定し、研究開発に反映させた。また、研究開発実施者と緊密に連携し、研究開発進捗状況、資産管理状況、予算執行状況、実用化検討推進状況等を都度確認、プロジェクトリーダー、サブプロジェクトリーダーと連携して指示を行い、活動を推進した。さらに、年1回NEDOが技術推進委員会を主催、外部有識者に、海外の技術動向も踏まえた評価を受け、各研究開発項目の目標達成の見通しを常に把握するとともに、必要に応じて研究開発の加速、中止を行った（計10回実施）。さらにテーマ間連携を目的としたテーマ連絡会議（3回）、テーマ代表者会議（23回）実施した。

② 技術分野における動向の把握・分析

PMは、プロジェクトで取り組む技術分野について、内外の技術開発動向、政策動向、市場動向等について調査し、技術の普及方策を分析、検討を行った。なお、研究開発推進のための特許・先行技術調査などの予算を追加し、実施者自らが周辺動向調査することを推奨した。得られた技術動向は、プロジェクト実施者へ情報共

有を行い、実施体制の強化を目的とした補完技術の開発について追加公募を実施した。また、成果の特許出願、成果普及、技術利用につながる取り組みに予算を増額し実用化を促進した。

③ 研究開発テーマの評価

研究開発を効率的に推進するため、研究開発項目①及び②を対象として、ステージゲート方式を適用した。PMは、外部有識者による審査を活用し、2019年度以降の研究開発テーマの継続是非を2018年12月に決定した。決定内容は以下の通り。植物テーマのうち、9テーマを継続、1テーマの一部実施内容の終了、1テーマの計画・予算の大幅な縮減を行った。

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDOは、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な関係を維持しつつ、事業の目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施した。

表 2-2 研究開発の進捗管理

方法	概要	頻度	備考
研究開発目標の見える化 (達成指標の作成)	中間目標、最終目標に関して各研究開発項目ごとに具体的な達成指標を作成。	都度	2017年までに研究開発15項目について達成指標を作成し、NEDOと事業者で共有。
実務者会議 (個別テーマ/ チーム単位)	PM/PL/SPLによるテーマ/チーム単位での研究進捗確認、研究計画の軌道修正指示等。	1-2回/ 年度	毎年、各テーマについて進捗確認と軌道修正を実施。
個別ヒアリング	個々の検討課題に応じて、PM/PL/SPLによる個別ヒアリングを実施。研究現場確認、課題解決に向けた協議・指導等。	随時	2017年度までに全委託と助成の58機関を訪問。
技術推進委員会	外部有識者による研究進捗確認及び委員コメントを受けて次年度計画に反映。該当年度にステージゲートを実施。	1回/ 年度	植物テーマ技術推進委員：6名 (植物分野・規制動向などに知見がある企業・アカデミアの外部有識者で構成) 微生物テーマ技術推進委員：5名 (微生物分野・生物工学分野などに知見がある企業・アカデミアの外部有識者で構成)

表 2-3 研究開発成果の普及取組み

方法	概要	頻度	備考
植物テーマ連携推進会議	研究開発項目①と②の連携推進を目的とした会議。	1回/ 年度	研究開発項目①と②の全事業者が参加。研究開発項目③の代表者も参加し情報共有。
シンポジウム開催、イベント 出展 (BioJapan等)	本プロジェクトの成果発信とマッチングを目的に、NEDOセミナー、展示を実施。	1~2回/ 年度	初年度、一般向けにキックオフシンポジウムを実施。2017年度からは、BioJapanに出展。今年度は技術相談スペースを設置予定。

2.2.4. 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」及び研究開発項目③「高生産性微生物創成に資する情報解析システムの開発」は、共通基盤技術開発に関する項目であり、以下の実用化を目指している。

「実用化」の考え方

本事業における実用化とは、開発する共通基盤技術が植物、微生物、培養細胞等の物質生産能力を引き出す技術として有効であることを示し、広く利用可能な形を構築することで、共同研究等により利用が開始されること。

また、研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」及び研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」については、以下の実用化を目指している。

「実用化」の考え方

本事業における実用化とは、企業が設定するターゲット化合物に関して、目標とする生産性を実現した生産株（植物体、植物培養細胞、微生物）もしくは生育条件を獲得し、ターゲット化合物を試作し顧客等の評価を受けること。

上記のような考え方のもと、以下の取組を進めている。

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」（委託）

個々の物質生産目的に特化したものではなく、植物を利用した有用化合物高効率生産に資する共通・基盤技術の開発を行っており、個々の技術開発要素において以下の取組を行っている。

- ・基本的に特許等の知財化を前提に、技術の優位性、有効性を学会・シンポジウム等々において広く周知する活動を実施していく。
- ・上記の結果から、実用化・事業化を担う企業等との新たな連携・共同研究等を開始、個々の事業目的物質において当該開発技術の有効利用を図る。

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」（助成）

各実施企業において、事業目的とする個々の物質生産目的に特化した技術開発を行っており、個々の事業化目的有用化合物生産において以下の取組を行っている。

- ・基本的に特許等の知財化を前提に、公開がそぐわない場合は、企業のノウハウとして蓄積する。
- ・プロジェクト内基盤技術開発で有用な技術・知見があれば、積極的に活用していく。必要に応じて、新規の共同研究・MTA締結による先行利用等々。

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」

先行技術調査とその分析により、D (Design) B (Build) T (Test) L (Learn) の領域ごとに以下の方針で取組み、実用化の核とする。

- ・DL領域：ノウハウとして保全し実用化レベルとする。
- ・BT領域：本プロジェクトにおいても出願、公開化を積極的に推し進める。

また、海外のベンチマーク企業 17 社を公開情報等に基づき詳細に調査。一部の企業については、国内においてキーマンインタビューと米国企業 5 社を抽出して現地訪問調査を実施。それらの知見に基づき、我が国の優位性を生かし得る複数のビジネスモデルの抽出と分析を行い本研究開発項目の事業化を見据えて技術の実用化を進める取組をしている。

研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」

各実施企業において、事業目的とする個々の物質生産目的に特化した技術開発を行っており、個々の事業化目的有用化合物生産において以下の取組を行っている。

- ・基本的に特許等の知財化を前提に、公開がそぐわない場合は、企業のノウハウとして蓄積する。
- ・プロジェクト内基盤技術開発で有用な技術・知見があれば、積極的に活用していく。必要に応じて、新規の共同研究・MTA 締結による先行利用等々。

本件に関して NEDO がマネジメントを行ったのは以下の点。

- ・「NEDO プロジェクトにおける知財マネジメント基本方針」に基づき、参画機関において「知財の取扱いに関する合意書」を策定させた。合意書では、知財運営員会や知財の帰属、秘密の保持等、プロジェクトの出口戦略において、重要となる知財ルールを整備した。
- ・また研究開発項目③において独立行政法人 工業所有権情報・研修館の知財プロデューサー派遣事業を活用して知財マネジメント支援を強化した。

2.3. 情勢変化への対応

- ・調査事業等により、高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発は欧米が先行、「学習 (AI)」による高度な制御を取り込んだ工業プロセスは開発段階であることを把握。これを受け、2017 年度の追加公募で、AI 基盤開発等の実施者を新たに採択し研究体制を強化した。また、実施者に先行技術調査・解析を精力的に進めるよう促し、現行実施体制の強み・弱みを明確にした上で開発戦略を策定した。
- ・調査事業等により、ゲノム編集技術に関して欧米の出願数増加、周辺技術である導入技術の出願数増加、国内外での特許成立状況の動向を把握。2017～2018 年度に新規ゲノム編集技術、導入技術等の開発内容に予算を重点配分した。また、関連情報はプロジェクト内事業者に速やかに情報共有され、開発戦略へ反映した。
- ・政策サイドとの情報交換を密に行い、他省庁事業との連携可能性による成果の最大化を意識して必要に応じて対応を行った。
- ・プロジェクトの後半、成果の特許出願、成果普及、技術利用につながる取り組みに加速財源を投入。プロジェクト終了後に基盤技術が広く利用できる環境・仕組みを構築した。

2018 年度：スマートセルによる物質生産に関して、知識ベース基盤や環境要因 DB のオープン化を目的とした研究開発に重点配分

2019 年度：実証試験効率化を目的とした、開発した装置類の集約等に重点配分。

2020年度：研究開発成果の実用化に向けたPJ取得データの活用環境の整備、動画等アウトリーチツールの拡充等に重点配分

- ・地震、水害等の自然災害やコロナ禍での研究への影響などを逐次確認し、研究者・事務部門との情報共有を円滑に行った。

2.4. 中間評価結果への対応

本プロジェクトは2018年8月に中間評価を実施。以下指摘事項について対応した。

【1】参画機関が多く、実施体制の見直しが必要。進捗状況を精査し、予算規模に応じた選択と集中を行っていくこと。→実用化の可能性が高い技術への集中やテーマの集約を行い、実施計画と実施体制の見直しを行った。

【2】知的財産について、国内外での技術利用に関する考え方を明示するとともに、国際競争力が確保できる戦略を考えること。→プロジェクトで国産技術開発に取り組みつ、海外の有力な技術の利用も考慮しながら実用化・事業化の検討を行った。また、内外の政策、技術開発、市場動向等について調査し、技術の普及方策を検討した。

【3】今後は植物及び微生物のテーマの融合を検討すること。→事業者間での連携を通じて、開発技術の相互利用を促進、実用面での有効性検証や汎用性向上の観点での取り組みを行った。

【4】情報解析ビジネスやライセンスビジネスの展開方針を具体的に示し、様々な製造ビジネスが立ち上がる可能性があることを、より積極的にアピールしていくこと。→事業者が検討している将来的な実用化・事業化の方向性を技術推進委員会等で定期的に確認。量産化に課題があるテーマについては、後継プロジェクトにて開発継続中。プロジェクト終了後に向けた共通基盤技術プラットフォーム活用の仕組みを構築し、展示会等で、ユーザーとなる企業等にアピールを行った。

2.5. 評価に関する事項

NEDOは(1)事業の位置付け・必要性、(2)研究開発マネジメント、(3)研究開発成果、(4)実用化に向けた見通し及び取組の4つの評価項目について、外部有識者によるプロジェクト評価を実施する。評価の時期は、中間評価として2018年度、事後評価を2021年度に実施する。

なお、中間評価結果を踏まえ必要に応じて事業の加速・縮小・中止等の見直しを迅速に行った。評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、事業実施を前倒しする等、適宜見直しを行った。

3. 研究開発成果について

3.1. 事業全体の成果及び実用化に向けた取組及び見通しについて

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」

研究開発項目	目標	成果	達成度	実用化に向けた取組及び見通し
(1) ゲノム編集技術	<ul style="list-style-type: none"> 植物等による物質生産機能の制御・改変において、既存のゲノム編集では対応できない新しい機能を有する国産のゲノム編集関連技術（対象領域（標的配列認識）、精密性、ゲノム設計、細胞毒性、導入効率等）を確立する。 研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した新規の国産ゲノム編集技術の有効性を示す。 ゲノム編集を産業利用するために必要な要素技術を戦略的に集約し、国産ゲノム編集技術基盤を確立する。 	<ul style="list-style-type: none"> 複数の独自の認識モジュールの開発、高度なゲノム改変技術の開発、様々な動作原理の導入技術の開発、ゲノム編集ツールおよびゲノム編集生物の評価アッセイ系の確立、これら要素技術を連結させた技術パッケージの開発、および利用を促進させるためのゲノム編集産業化ネットワーク/実証拠点の基盤構築を行った。 	○	実証拠点を基盤としたゲノム編集試験研究の拡大、関連ベンチャー（4社）を軸とした実用化推進を実行中。
(2) 代謝系遺伝子発現制御技術	<ul style="list-style-type: none"> 目的代謝系遺伝子の発現を5倍程度増強又は1/10以下に抑制する技術を確立する。 研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した遺伝子発現制御技術の有効性を示す。 	世界初の標的DNA配列特異的な脱メチル化技術開発成功、一方、植物防御メカニズムにより、実用植物利用に関して一部残課題もある。	◎ /一部 △	開発した基盤技術の企業等への活用、取組を開始した。2021年度現在、実用植物利用については、検討継続中。
(3) 栽培・生育環境による発現制御技術	<ul style="list-style-type: none"> 目的代謝系における主要遺伝子/産物の発現を5倍程度増強させる技術を確立する。 研究開発項目②で対象とする実用植物において、栽培・生育環境による発現制御技術の有効性を示す。 	<ul style="list-style-type: none"> 栽培インデックスにより目標の5倍を上回る10倍程度の発現増強を達成した。 研究開発項目②の複数の企業において試用、いずれも顕著な効果を示した 	◎	複数の助成事業実施企業において、成果を活用した製品化・事業化への取組が継続して行われている。

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」

研究開発項目	目標	成果	達成度	実用化に向けた取組及び見通し
植物による高機能品生産技術開発	<ul style="list-style-type: none"> 化学合成等による競合品と比較して、コスト、性能等の面で総合 	<ul style="list-style-type: none"> 半数以上の課題において、コスト面において大きな優位性を示される結果が得られ 	◎ /一部 △	<ul style="list-style-type: none"> 既に最終目標値を達成している課題においては、ラボ/実証スケー

的に競争力があることを示す。	た。一部の課題においては、化学合成等による製造よりも効果・効能面で優位性を示す結果も得られつつある。既に最終目標値を達成している課題においては、ラボ/実証スケールからパイロット/実生産スケールへの拡大展開を図るフェーズに移行している。		ルからパイロット/実生産スケールへの拡大展開を図るフェーズに移行している。 ・一部最終目標値未達の課題においては、引き続き実質的な共同研究体制等を維持しつつ、目標到達への取組を継続している。
----------------	---	--	--

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」

研究開発項目	目標	成果	達成度	実用化に向けた取組及び見通し
高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・(1) ハイスループット合成・分析・評価手法の開発, (2) 高生産性微生物設計システムの開発によって開発されたシステムを用いることにより、従来育種と比較し、物質生産株の開発期間を1/10に短縮する。 ・(1)(2)で開発した要素技術、システムを維持・運営するための事業化モデルを策定する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・菌株構築では長鎖 DNA 合成技術、シャーシ株開発技術を開発、育種開発では OMICS 解析技術、センサー開発技術、排出輸送体解析技術、自家蛍光プロファイル解析技術を開発し、これらを統合したハイスループット評価系の構築を行い、(2)のシステムとの統合により従来にない速度での開発が可能となった。 ・代謝設計・最適化、ネットワーク構築技術、タンパク質・酵素設計技術、知識ベース開発の技術開発、およびデータベース開発を行い、新奇代謝物の合成、生産性の向上、生産ボトルネックの解消、情報集積・整理の各問題に対して解決できる技術を開発し、それらを統合することにより、問題に統合的に対処できるシステムを構築した。 ・実際に「応用問題」を解くことで、様々な問題点を抽出。DBTL サイクルをまわすことで、システム自体の高度化に貢献した。 ・事業化を目指すターゲットで有効性を検証。本プラットフォームによる高速育種に成功した。従来育種で限界レベルの微生物に対しても有効性が示された。微生物生産が実現していないターゲットの生産が実現した。 	○	<p>スマートセル創出プラットフォームを基にした事業化モデルのうち、技術移転をして商用サービス展開を目指してスタートアップを起業・資金調達が進んでいる状況。</p> <p>事業化モデルのうち、技術コンサルティングについては3つの技術で既に開始した。技術ライセンスについては長鎖 DNA 合成技術を受託合成事業に導出した。またメタボローム解析技術、自家蛍光顕微鏡については事業者から発売を開始した。最後に統合型受託に関してはバイオファウンドリー型ベンチャー企業を起業しており、今後の発展が期待できる。</p>

研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」（助成）

研究開発項目	目標	成果	達成度	実用化に向けた取組及び見通し
微生物による高機能品生産技術開発	<p>・化学合成等による競合品と比較して、コスト、性能等の面で総合的に競争力があることを示す。</p>	<p>・全ての企業でコスト、性能面で競争優位性が認められ、2030年までの事業化スケジュールが確立している。既に最終目標値を達成している課題においては、ラボ/実証スケールからパイロット/実生産スケールへの拡大、顧客へのサンプル調査、事業化判断に移行。</p>	○	<p>既に最終目標値を達成している課題においては、ラボ/実証スケールからパイロット/実生産スケールへの拡大、顧客へのサンプル調査、事業化判断に移行。解決すべき課題が残ったテーマについては引き続き実質的な共同研究体制等を維持しつつ、目標到達への取組を継続。</p>

3.2. 研究開発項目毎の成果及び実用化に向けた取り組み及び見通し

3.2.1 研究開発項目① 植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発【委託】

3.2.1.1 ゲノム編集技術

(1) 背景と目的

本事業で開発を目指す技術の全体像

近年、革新的なDNA操作技術であるゲノム編集技術が確立し、精密なゲノム改変を施した様々な実用生物が作出されている。ゲノム編集技術は遺伝子改変生物作出の期間を1/5程度に短縮する生産性革命技術でもあり、本プロジェクトで目標とする「植物等の生物を用いた高機能品生産技術」を含む様々な生物系産業での利用が開始されつつある。生物にゲノム編集技術を適用するための要素技術は以下の3つに大別できる。

- ・ 数十億塩基対のゲノムから1つの遺伝子を選択的に認識する「A. DNA認識モジュール」。
- ・ DNA認識モジュールと様々なエフェクターモジュール（酵素ドメイン）を融合させたゲノム編集ツールを用いることによる様々な「B. ゲノム改変技術」。
- ・ 目的の生物への「C. ゲノム編集ツールの導入技術」。

プロジェクト開始時点での世界的な状況を鑑みるに、「A. DNA認識モジュール」に関してはZF、TALE、CRISPRなどの既存のゲノム編集の基本技術はほとんど全て海外で開発されている状況であり、我が国での産業利用においては、その知的財産所有権の問題が顕在化していた。また、「B. ゲノム改変技術」として用いられているのは、FokIを用いたDNA切断による遺伝子破壊が主流であった。DNA切断によるゲノム編集の場合、DNAを切断したあとの修復過程は生物の内在機構に依存しており、生物種ごとの効率の違い、および最終的なDNA配列を制御できないことなどから、高度なゲノム改変を可能とする新たな酵素ドメインが開発されつつあった。また、植物でのゲノム編集の適用においては、効率良くゲノム編集ツールを植物に送達する「C. デリバリー技術」が大きな技術的な障害になっていた。こうした世界的な動向の中、DNA認識モジュールとしてのdPPR、ゲノム改変技術としてのdeaminaseや高効率ノックイン、導入技術としての膜透過ペプチド、などの、いくつか日本独自の技術が開発されていた。

ゲノム編集は今後の生物学および品種改良の基盤技術となると予想されており、我が国の生物系産業の国際的な競争力を保つためには、海外の技術に抵触せずに産業利用が可能な我が国独自のゲノム編集の技術体系の確立を戦略的に推し進める必要がある。

そこで本事業では、すでに特許が成立している日本独自の技術であるdPPR技術の実用化、およびガイドRNA性の新たな認識モジュールの開発を試みることで、既存技術とは異なる認識モジュール（特に新規核酸性ツール）を開発するとともに、切断による遺伝子破壊でなく、高度なゲノム改変を可能にするゲノム改変技術群の開発を目的とした。また植物でのゲノム編集の技術的障壁となっている導入技術について新しい動作原理の技術を開発することで、海外技術に依存せずに産業利用できるゲノム編集技術群の開発を目的とした。また、研究開発を加速させるための「D. インフォマティクスによる支援」により計算科学的なゲノム編集モジュールの探索、およびゲノム編集生物の評価系の構築を進めた。研究開発と並行して競合特許動向等を調査し、開発した成果の実用化を促進するための「E. 知財戦略」を策定した。

最終的な仕上がりイメージ

「A. DNA認識モジュール」においては、我が国独自のシーズであるPPR技術の実用化に加えて、

既存の技術より優位な特性をもつ新規モジュール（特にCRISPRのような簡便かつ安価な運用が可能な核酸性モジュール）を開発し、ゲノム編集における基幹技術を確立、拡充する。

「B. ゲノム改変技術」においては、既存のゲノム編集では対応できない独自の新しい機能を有する改変技術（改変方法、精密性、ゲノム設計、対象領域）を開発する。

「C. ゲノム編集ツールの導入技術」においては、既存のゲノム編集では対応できない独自の新しい機能を有する導入技術（細胞毒性、導入効率）を開発する。

「E. 知財戦略」においては、上記A～Cの要素技術について、競合特許調査を踏まえた効果的な知財化を促進する。各機関知財管理部門と協力して、バックグラウンドIP、フォアグラウンドIPの仮想的な集約を行い、産業化に即したライセンスアウトまでを含めた知財戦略を策定し、実効性のある枠組みを構築するための必要要素の抽出を行う。

さらに、本共同申請で推進するゲノム編集基盤技術の研究開発については、研究開発項目2等と連携して実用植物での高機能品生産に適用することで、開発する技術の有用性を実証する。

開発する技術の利用されるイメージ

本プロジェクトで開発されるゲノム編集基盤技術群は、「E. 知財戦略」の成果を基に構築するゲノム編集技術基盤プラットフォームを介して企業へライセンスアウトを行うことで、我が国の生物系産業の国際的な競争力の向上に貢献する。また、新たに開発されるゲノム改変関連技術をプラットフォームに取り込み、関連技術の持続的な発展に貢献する。

この目的のため、「ゲノム編集グループ」では、A. 認識モジュール、B. ゲノム改変技術、C. 導入技術、D. インフォマティクスによる支援、E. 知財戦略の5つの重点領域を設定するとともに、F. 研究開発支援に関する課題を設定し、合わせて17の個別開発課題を推進した。

A. 認識モジュール（数十億塩基対のゲノムから一箇所の配列を認識）

A-1 DNA 結合型 PPR によるゲノム編集の実用化（エディットフォース株式会社・八木祐介）

A-2 日本発新規ゲノム編集技術の研究開発（産業技術総合研究所・間世田英明、筑波大学・鈴木石根）

A-3 新規ゲノム編集モジュールの開発（東京医科歯科大学（広島大学）・野村渉、神戸大学・西田敬二、産業技術総合研究所・加藤義雄、宮岸真、東京大学・谷内江望、九州大学・中村崇裕）

A-4 進化工学のおよび分子動力学的手法による新規ゲノム編集システムの創出（徳島大学・刑部敬史、理化学研究所・岡田康史、近畿大学・宮下尚之、明治大学・矢野健太郎）

B. ゲノム改変技術、の開発（様々な酵素ドメインを付加することによるゲノムの改変；切断、修飾など）

B-1～3 多様なゲノム改変技術の開発（神戸大学・西田敬二）

B-4 精密なゲノム設計技術の開発（東京医科歯科大学（広島大学）・野村渉）

B-5 DNA 切断ドメインの改良、および1塩基置換基盤技術の開発（広島大学・山本卓）

B-6 オルガネラゲノムの編集技術の開発（高崎健康福祉大学（理化学研究所）・吉積毅）

B-7 RNA 結合型 PPR によるゲノム機能編集技術の開発（九州大学・中村崇裕）

C. 導入技術、の開発

C-1 高効率かつ低毒性のゲノム編集モジュール導入技術の開発（産業技術総合研究所・加藤義雄）

C-2 ナノニードルを用いたゲノム編集モジュールの植物個体へのデリバリー技術の開発（産業技術総合研究所・中村史）

D. インフォマティクスによる支援

D-1 インフォマティクスコア（東京大学・谷内江望）

E. 知財戦略

E-1 各要素技術の知財戦略およびパッケージ化」（知的財産戦略ネットワーク株式会社・秋元浩、九州大学・中村崇裕）

F. その他研究開発支援

F-1 研究開発の戦略策定および企画・運営（九州大学・中村崇裕、エディットフォース株式会社・八木祐介、広島大学・山本卓）

F-2 ゲノム編集技術、およびゲノム編集植物の共通評価基盤整備」（九州大学・中村崇裕、神戸大学・西田敬二、広島大学・山本卓、徳島大学・刑部敬史、理化学研究所・岡田康史、近畿大学・宮下尚之）

(2) 位置づけ、目標値

位置づけ

ゲノム編集の基幹技術である認識モジュールに関しては、海外で競合技術が開発され、著しい速度で産業利用が展開されつつある。ゲノム編集技術はこれからの生物学および生物系産業の基盤技術になると想定されている。また、産業利用には、莫大な特許実施料（数十～数百億円）が要求される。我が国の産業競争力確保のため、独自のゲノム編集関連要素技術を開発する必要がある。

ゲノム編集の運用には、ゲノム編集の運用には、認識モジュール、酵素ドメイン（エフェクター）、導入技術の全てが必須であるため、これらをパッケージ化することが重要である。

本事業では、開発したゲノム編集技術が植物等における高機能品の生産に有用な技術であることを実証することを目的とする。

目標値

（中間目標）

・既存のゲノム編集技術では対応できない独自の新しい機能を有するゲノム編集関連要素技術（対象領域、精密性、ゲノム設計、細胞毒性、導入効率等）を開発しモデル植物で実証する。

（最終目標）

・植物等による物質生産機能の制御・改変において、既存のゲノム編集では対応できない新しい機能を有する国産のゲノム編集関連技術の確立

・開発項目②の実用植物において、開発した国産ゲノム編集技術の有効性を示す

・ゲノム編集を産業利用するために必要な要素技術を戦略的に集約し、国産ゲノム編集技術基盤を確立する

(3) 全体計画

ゲノム編集グループでは、A 認識モジュール、B. ゲノム改変技術、C. 導入技術、D. インフォマティクスによる支援、E. 知財戦略、F. 研究開発支援、に大別して各課題を推進した。

研究開発は、①基礎原理の確立、②概念実証、③改良、④植物での適用、の順に進めたが、バックグラウンド IP を保有する課題に関しては、②から開始した。すべての課題において、中間目標として、概念実証の完了、植物での適用に着手、を進捗スケジュールとした。

中間評価結果への対応

【1】参画機関が多く、実施体制の見直しが必要。進捗状況を精査し、予算規模に応じた選択と集中を行っていくこと。

対応：いくつかの課題について、研究課題の統廃合を行うとともに、重要課題については、加速予算を用いて戦略的に研究開発を進めた。

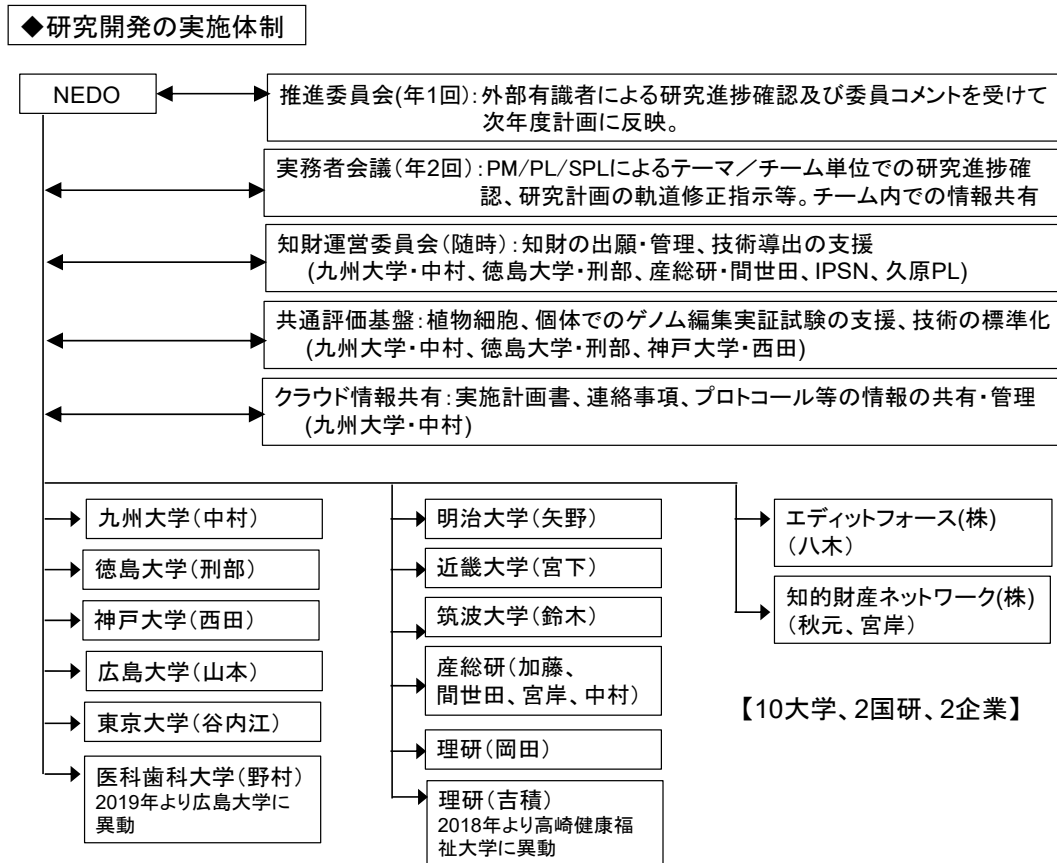
【2】知的財産について、国内外での技術利用に関する考え方を明示するとともに、国際競争力が確保できる戦略を考えること。

対応：基盤技術について、海外技術に抵触しない基礎特許獲得を行うことで、国際産業競争力を確保する戦略を採用した。合わせて、知財活用のための事業化についての戦略を立案し、準備を進めた（詳しくは「(12)成果の実用化・事業化に向けた具体的な取組み」に記載）。

【4】情報解析ビジネスやライセンスビジネスの展開方針を具体的に示し、様々な製造ビジネスが立ち上がる可能性があることを、より積極的にアピールしていくこと。

対応：すでに複数のベンチャー企業が設立され、プロジェクトに関わるバックグラウンド・フォアグラウンド IP を基盤とした事業化・実用化を推進している。

(4) 実施体制



(5) 運営管理

- ・年一回の推進委員会の開催：外部有識者による研究進捗の確認、及び委員コメントを受けて次年度計画に反映した。該当年度（2018年）にステージゲートを実施した。
- ・年二回の実務者会議の開催：PM、PL、SPLによるテーマ・チーム単位での研究進捗の確認、研究計画の軌道修正等を指示した。チーム内での情報共有、課題間連携の調整、などを行った。
- ・グループメールによる連絡網、クラウドを利用したファイル共有システム（書類、プロトコール等）
- ・知財運営委員会による組織的な知財戦略の実施（詳しくは、「知的財産権などの確保に向けた取り組み」で記述）
- ・共通評価基盤の整備による開発した技術の検証、および植物への適用の促進

(6) 実施の効果

ゲノム編集市場の市場規模は2014年時点で2千億円と報告されている。各技術の市場占有率はCRISPR/Cas9が48%、TALEが23%、ZFが12%、その他アンチセンス等で18%とされている。ゲノム編集市場の市場規模は2025年に1兆円に達すると予想されており、本事業で開発する独自のゲノム編集技術により2033年時点でのシェア5%（500億円/年）獲得を目指す。本事業の経費（11億円/5年）から鑑みるに、その費用対効果は著しく高い。

また、本プロジェクト「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」全体での省エネルギー効果は、2033年度（平成45年度）の推定値として、85.8万キロリットル/年の原油削減、CO₂削減効果は227万トンCO₂/年と試算している。

ゲノム編集市場

(百万ドル)

	2014	(%)	2019	(%)
ZF	226	12	404	14
TALE	420	23	786	28
CRISPR	879	48	1,084	39
antisense	102	6	157	6
その他*	218	12	383	14
合計	1,845		2,814	

*piggy bac, flip-in, jump-inなど

(7) 最終目標の達成度

本研究開発では、以下の最終目標を計画通りに達成した。一部の課題では当初設定した目標を上回る成果を得られた。

[最終目標]

- ・植物等による物質生産機能の制御・改変において、既存のゲノム編集では対応できない新しい機能を有する国産のゲノム編集関連技術の確立
- ・開発項目②の実用植物において、開発した国産ゲノム編集技術の有効性を示す
- ・ゲノム編集を産業利用するために必要な要素技術を戦略的に集約し、国産ゲノム編集技術基盤を確立する

得られた成果

A. 認識モジュール（達成度 100%）

- A01. dPPR の高効率化、植物細胞でのゲノム編集を達成
- A02. 高効率の新規核酸性ツールの確立、植物、実用藻類でのゲノム編集を達成
- A03. 小型の新規核酸性ツールの確立、新規タンパク質製ツール候補の同定
- A04. 大規模欠損が可能な新規核酸性ツールの確立、実用植物でのゲノム編集を達成

B. ゲノム改変技術（達成度 100%）

- B01. 植物細胞で目標とする組換え効率を達成
- B02. イネで高効率な局所変異を達成
- B03. イネ葉緑体組換えを世界で初めて実証
- B04. リコンビナーゼの配列要求性を解除
- B05. 新規ヌクレアーゼを開発
- B06. ミトコンドリア編集を世界で初めて実証

B07. RNA 操作技術を植物に適用

C. 導入技術（達成度 100%）

C01. DIVE により国産ツールが植物に送達可能であることを実証。効率を上げる化合物を同定

C02. ナノニードルにより国産ツールを植物に送達、ゲノム編集を達成

D. インフォ支援（達成度 100%）

D01. in silico 解析で新規ツール候補を複数同定

D02. 編集生物の on/off target の高速評価系を確立

E. 知財戦略（達成度 90%）¹

- ・基礎出願 21 件、PCT 出願 8 件（PCT 出願が目標値に未達）

- ・先行特許調査の実施、研究開発計画への反映

- ・関連市場の調査

（¹達成度が 90%だったのはプロジェクト開始時点（2016 年度）での知財戦略のチーム構成に問題があったためと考えており、2019 年度よりチーム構成を再構築した。基礎出願においては目的とした研究開発の戦略目標に沿った権利化が達成できた）

F. 支援（達成度 100%）

- ・課題間連携の促進

- ・技術導出のためのプラットフォーム（ゲノム編集産業化ネットワーク）の立ち上げ

- ・共通評価基盤の整備、ゲノム編集ツールの評価アッセイ系の構築

(8) 研究開発の成果と意義

- ・「A 認識モジュール」については、バックグラウンド IP がすでに登録されている dPPR の改良（課題 A01）、複数の新規の核酸性ツールの開発（課題 A02、A03、A04）を行い、開発したゲノム編集ツールが既存の技術より優れた編集効率、または異なる編集特性を有することを示した。これらの研究成果は、プロジェクト開始以前で大きく出遅れていた我が国の当該技術領域の状況を大きく変えるものであり、我が国におけるゲノム編集を利用した産業の国際的な競争力の向上に資するものとなることが期待される。

- ・「B ゲノム改変技術」については、単純な切断でない高度なゲノム改変技術の開発（課題 B01、B02）、FokI に変わる新たなヌクレアーゼの開発（課題 B05）、イネ葉緑体やミトコンドリア編集に世界で初めて成功（課題 B02、B06）、ポストゲノム編集とされる RNA 編集の植物への適用（課題 B07）、などの成果を得ており、今後バイオ産業の基幹技術となるゲノム編集の多様な利用法、さらなる拡張性について我が国の優位性および先進性を確保するものである。

- ・「C 導入技術」については、DIVE（課題 C01）、ナノニードル（課題 C02）が植物に利用できることを示した。プロジェクト期間中の 2018 年に、ゲノム編集の利用により得られた生物について、外来遺伝子がゲノムに組み込まれていなければ、カルタヘナ規制対象外とする我が国の方針が定められた。本研究開発で開発した導入技術は、ゲノム編集ツールをタンパク質として導入

することを目的としており、これら利用により、生産段階においても非遺伝子組み換えの状態での新品種作出が可能となり、スムーズな産業利用、規制への対応、消費者受容、が期待される。

・また、プロジェクト期間中に、ゲノム編集のオフターゲット問題（標的としていないDNAの切断）が世界的な問題となってきた。これに対応するための新たな課題を設定し、ゲノム編集ツールおよびゲノム編集生物の on/off target の高速評価系を開発した（課題 A04、D01）。ゲノム編集の産業利用を加速するための品質評価、標準化試験法等を確立するための基盤技術となることが期待される。

・本プロジェクトの成果により、様々な産業分野での利用が可能なゲノム編集の要素技術、および要素技術を連結させた技術パッケージを開発し、それら技術の利用を促進させるための基盤技術プラットフォームとしてゲノム編集産業化ネットワークを構築した（詳細は後述）。

以上の得られた成果を基にした実用化・事業化を今後進めることで、バイオエコノミー、カーボンニュートラルにおけるバイオ産業の発展、および SDGs への貢献を通して、当初目標としていた 2033 年時点でのゲノム編集市場 1 兆円の 5%（500 億円/年）のシェア獲得を目指す。

以上の得られた成果を基にした実用化・事業化を今後進めることで、バイオエコノミー、カーボンニュートラルを含むバイオ産業の発展、および SDGs への貢献を通して、当初目標としていた 2033 年時点でのゲノム編集市場 1 兆円の 5%（500 億円/年）のシェア獲得を目指す。

（9） 成果の普及

2016～2020 年のプロジェクト期間中に以下の表に示すとおりの特許、論文、を含む研究成果の外部発表を行った。

特許		論文		その他外部発表			
基礎出願	PCT出願	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌への掲載	展示会への出展	受賞
16	5	38	22	112	29	32	3

（10） 知的財産権などの確保に向けた取り組み

ゲノム編集グループでは知財の効果的な権利化のため、各要素技術の開発に関する技術調査、知財戦略の策定、および知財の効果的な権利化の支援を行った。研究成果の権利化において、知財運営委員会を発足させ、その管理をおこなった。グループ全体に関わる広域市場調査、各実施機関で行われる研究開発についての競合特許調査、専門知識を有する知財コンサルや特許事務所の選定、などを実施し、研究開発成果の効果的な知財化をすすめる工程の構築、および実施体制の支援を行った。

研究者からのキーワードや競争相手等に関する意見聴取を基に、発表文献および特許について先行技術調査を実施し、「NEDO ゲノム編集プロジェクト先行技術調査報告書」を作成した。

ゲノム編集プロジェクト開始前及び開始後の関連する特許出願状況の調査を 2018 年度に行い、各技術の出願状況は大きく変わるものではないことを確認し、グループ内での情報の共有

化を図った。各研究者との協議を推進し、バックグラウンド及びフォアグラウンド IPs について、パテントプールの形成を含めて、具体的な知財戦略の策定を実施した。

ゲノム編集グループが関係する医薬品原料、バイオ燃料、バイオ繊維、バイオプラスチック、環境浄化の市場動向、およびゲノム編集の利用についての市場動向調査を実施した。また、ゲノム編集ツールおよびゲノム編集生物の品質評価、およびその試験法についての調査を行った。調査結果をグループ構成員に展開し、研究開発の出口戦略の明確化を行った。また、グループ構成員の個別の要素技術開発に関する先行技術調査について、調査に必要な標準フォーマットや契約書雛形の作成、受託業者（内山敏特許戦略事務所、日本技術貿易株式会社）の選定、などの作業フローを整備し、グループ構成員各自での産業化を目的とした研究開発計画の明確化、改善を促した。

知財運営委員会を通算 36 回開催し、新規出願 23 件、米国出願 3 件、PCT 出願 8 件、事業会社への研究成果の開示 11 件、研究成果の実施許諾または共同研究等の検討 5 件、実施許諾または共同研究の実施 4 件を承認した。

(11) 成果の実用化・事業化に向けた戦略

本プロジェクトの目的であるゲノム編集技術は世界的に激しい競争にさらされており、我が国の技術レベルは高くない状態であった。そこで、ゲノム編集を適用するに必要な 3 つの要素技術（認識モジュール、ゲノム改変技術、導入技術）それぞれに異なる戦略を設定した。認識モジュールについては海外技術の知的財産権に抵触しない技術群の開発、ゲノム改変技術に関しては DNA 切断による遺伝子破壊ではない高度な改変技術の開発、導入技術に関しては様々な動作原理に基づいた独自の導入技術開発、を進めることとした。また、開発した要素技術の連結、および他機関での評価、などを行うことで、実用化、事業化に必要な一般性、拡張性、動作安定性、などを検証することとした。プロジェクトで得られた成果は、開発者および開発者が関与するベンチャー企業が独自に実用化、事業化を進めることに加え、共通評価基盤として機能した九州大学、および広島大学を中核機関として仮想的に研究開発成果を集約するとともに、他のゲノム編集関連プロジェクトや地方自治体の活動とも連携し、企業とのフィージビリティ・スタディを行うオープンインキュベーション機能の枠組みづくりを進めることとした。

(12) 成果の実用化・事業化に向けた具体的な取組み

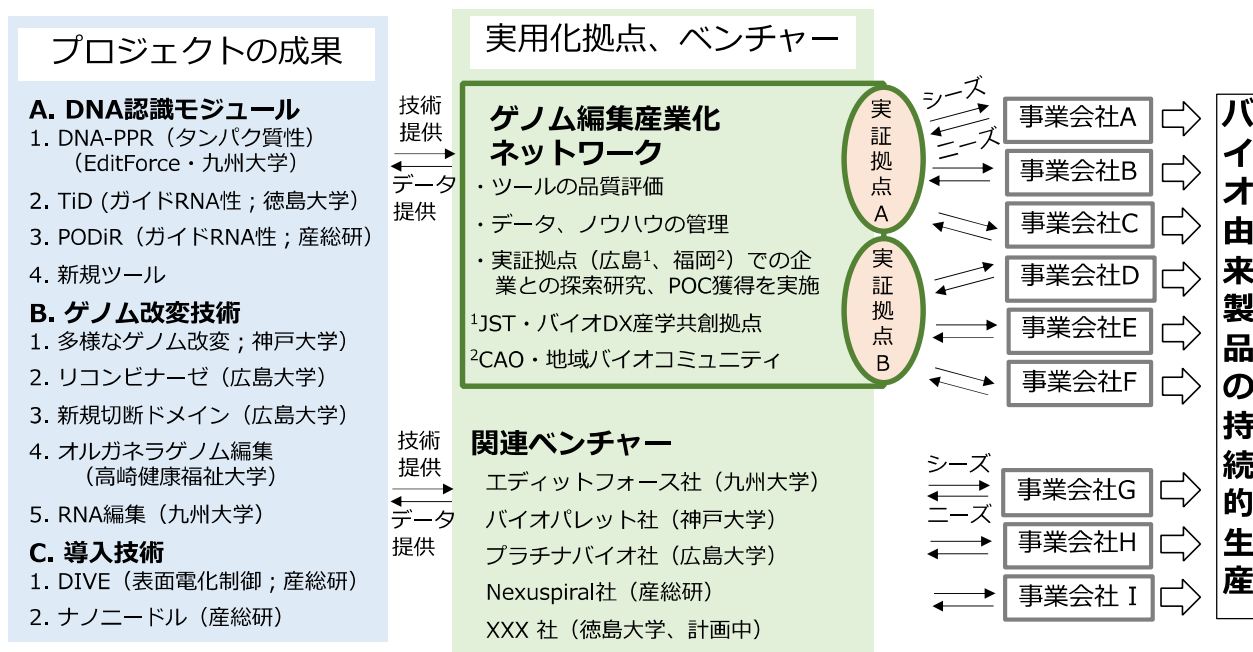
上記、「(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み」に記載のとおり、各要素技術に関する成果の効果的な権利化を行うとともに、事業会社への研究成果の効果的な導出を目的として、ゲノム編集技術の運用に必要な DNA の認識、ゲノム改変酵素（または技術）、導入の各要素技術のパッケージ化 11 件を企画、実施した。さらに、開発された技術の属人性、属環境性の依存度を検証するため、別機関に技術を共有し、評価を行った。

研究成果の評価、技術導出について、共通評価基盤を設置した広島大学、九州大学、および本プロジェクト関連ベンチャー（エディットフォース株式会社、プラチナバイオ株式会社、バイオパレット株式会社）を窓口としたライセンス体制、実証試験実施拠点の構築に係る準備活動を行った。共通評価に必要な分注ロボットなどの実験機器の導入、実験サンプルやプロトコル等の共有、サンプル調製やアッセイ等の実実験手順についての情報の標準化についての予備的な検討を行った。

アウトリーチ活動として、キックオフシンポジウム（2016年）、BioJapan（2016、2017、2018、2019、2020年）、関連プロジェクトであるSIPとOPERAとの共同の公開セミナー（2018年）等を企画、実施した。またゲノム編集技術を一般向けに理解してもらえるように、技術紹介動画を作成した。ゲノム編集技術の有用性を国民に正しく伝え産業での利用を促進するために、ゲノム編集技術紹介、ゲノム編集技術マップ、本プロジェクトの位置づけと開発したツール、作成した技術紹介動画等を紹介することを目的とし、WEBページ「ゲノム編集産業化ネットワーク」（<https://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/smg/GEIN/index.html>）を作成、公開した。

ゲノム編集グループでは、複数のベンチャー企業が設立されている（エディットフォース株式会社（課題A-1、B-7；九州大学発、2015年設立）、バイオパレット株式会社（課題B-1～3；神戸大学発、2017年設立）、プラチナバイオ株式会社（課題B-5；広島大学発、2018年設立）、Nexuspiral株式会社（課題A-2；産業総合技術開発研究所発、2019年設立）、その他徳島大学（課題A-4）がベンチャー設立を検討中）。当該ベンチャーを介した個別の実用化・事業化の活動を展開している。

◆実用化に向けた戦略・取組み



開発されたゲノム編集技術を実証拠点に集約し、(1)探索研究によるPOC獲得、事業シーズの具体化、(2)属人性・属環境性を排した汎用性の実証、(3)品質に関する定量的な評価、(4)利用実績とブランド力の拡大、を得ることで、ゲノム編集技術を利用したバイオ由来製品生産のさらなる加速を図る。

(13) 成果の実用化・事業化の見通し

開発された新規技術の共通の技術体系での定量的な評価、先行技術との差別化、実施プロトコル含む共通評価基盤の整備、について、ほぼ目標を達成できたと判断している。特に分注ロボットを導入し、ゲノム編集ツールの活性評価プログラムを確立することで、さまざまなゲノム編集ツールを共通のアッセイ系で評価することを可能とした。しかしながら、covid-19影響のため、プロジェクト後期において、組織をまたぐ情報や有体物の共有について若干の遅延が見ら

れた。本事業で開発された国産技術が今後産業化されるに当たって、共通評価基盤を整備した中核機関の役割が期待される。

また、各研究者が個別にバックグラウンド IP、フォアグラウンド IP を基にベンチャーを設立、活動を開始しており、本プロジェクト成果の実用化、事業化が実体化しつつあるところである。

CRISPR/Cas9 の 2020 年ノーベル化学賞受賞にも示されるように、ゲノム編集は今後の生物系産業、ひいてはカーボンニュートラル社会の構築、SDGs の達成において、基盤技術として利用されることが予想される。本成果で得られた成果の産業利用を進める活動を継続する所存である。

3.2.1.1.1 「A. DNA 認識モジュールの開発」

A01 「DNA 結合型 PPR によるゲノム編集の実用化」 (エディットフォース株式会社・八木祐介)

(1) 研究開発の成果

【概要及び目的】

プロジェクトにおける位置づけ 日本発の DNA 結合モジュールである dPPR モチーフを用いて、事業化に向けたゲノム編集技術の開発を行う。本技術を用いて実用植物への適用を行い、植物における有用物質生産技術の実用化を目指す。

技術的な重要性 ゲノム編集ツールは、TALEN、ZNF に代表されるタンパク質ベースと核酸・タンパク質ハイブリッド型の CRISPR タイプ技術の 2 種類がある。現在、いずれのツールも海外で開発・知財化・ビジネス化されており、日本において、タンパク質ベースのツールとしてゲノム編集利用に必要な全ての要素を兼ね備えているシーズは他にない。我が国において、海外技術に頼らない独自のゲノム編集技術の構築が課題となっている。そこで、本課題において、既存のゲノム編集技術の代替技術としての有効性を示し、産業利用に耐えうる技術へ昇華させる必要がある。

実施概要 (解決する手法) すでに、植物ゲノムにコードされている PPR タンパク質遺伝子の中から、DNA に結合する PPR タンパク質の選抜が終了しているが、それらの配列特異性の解析及びそれらを用いて、任意の配列に特異的に結合する人工 DNA 結合タンパク質技術の構築が確立できていない。そこで本課題では、① 天然素材の解析とそのモチーフを利用して、任意の配列に結合する dPPR 構築技術の確立すること、及び②標的ゲノム DNA の効率的な切断技術の確立を行う。

最終目標 カスタム dPPR 蛋白質用いた、ゲノム編集効率 10% を達成する。最低 1 品目の高機能品産生株の作出を行う。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み 当社は本課題で取り扱う PPR 技術を基に設立したベンチャーであり、独自に実用化・事業化を進めている。また、九州大学発シーズプロジェクトで構築したゲノム編集ネットワーク、関連するベンチャー企業、または所属機関の産学連携部と共同して実用化、事業化を進める。ゲノム編集ネットワークの中核機関である広島大学、九州大学に設置した共通評価基盤等を活用し、企業とのフィージビリティスタディを促進させる。

【成果】

任意の配列に結合する dPPR 作製技術の確立

自在な標的設定が可能なゲノム編集技術の実現には、配列特異的に結合する DNA 結合タンパク質の構築理論が必要不可欠である。PPR タンパク質は、RNA へ配列特異的に結合する分子として発見され、その認識メカニズムが明らかになっている。我々はシロイヌナズナゲノムにコードされた PPR タンパク質遺伝子の中から DNA へ結合する PPR を複数見出した(dPPR)。得られた dPPR タンパク質らと DNA との結合特性（結合強度及び配列特異性）を明らかにするため、1. 組み換えタンパク質を用いた生化学解析手法の構築 2. 候補 DNA 結合 PPR と転写因子との複合体を利用した転写活性化システムの構築（大腸菌、動物培養細胞）を行った。20 種類の候補 dPPR を MBP, His-tag 融合タンパク質として発現・精製し、そのタンパク質をランダムな DNA 配列もしくは特定の DNA 配列が結合されているビーズに供し、結合するか否かを測定することで、DNA の結合性能を評価できる系を作製した。結果として、3 種類の天然 dPPR タンパク質 (dPPR4, 12, 30) が配列特異性を有していることが分かった。また、候補 dPPR と大腸菌転写因子 (ω サブユニット) もしくは、VP64 (核転写因子) を融合した遺伝子発現プラスミドを作成した。またルシフェラーゼ遺伝子発現プロモーターの上流に標的候補配列を搭載したプラスミドも作成し、dPPR 発現プラスミドと共導入した（大腸菌もしくは動物培養細胞）。結果、生化学の実験と同様の dPPR においてレポーターであるルシフェラーゼ遺伝子の発現上昇が認められた。この結果から、細胞内（大腸菌、動物培養細胞）で dPPR が標的 DNA へ結合することを示すことができた。さらなる dPPR を用いたゲノム編集実証試験は②で行った。

天然の dPPR タンパク質から配列特異性を有するタンパク質を同定できたが、全体としては配列特異性が低かった。そこで、様々な変異を導入し、DNA へ結合する PPR モチーフの探索を行った。既報の RNA に結合する PPR モチーフ (rPPR) は、DNA へ結合しなかったが、そのモチーフ内の複数箇所にある特定の amino 酸を変更することで、DNA へ結合しやすくなることが分かった。さらに、rPPR と共通の塩基認識 amino 酸をそれらのモチーフに導入することで、結合強度は低いものの配列特異性を付与できることが分かった(図 3.2.1.1.1-1)。一方で、天然型 dPPR から見出された塩基認識部位の amino 酸を導入した場合は、特異性がほとんど見られなかったが、DNA への結合力は向上することが分かった。

そこで、得られた新規 dPPR モチーフを連結し、HPRT 遺伝子または GFP 遺伝子をゲノム編集可能な標的配列に対する人工 dPPR タンパク質を作製し、評価を行った。GFP では 40%前後 (32/76)

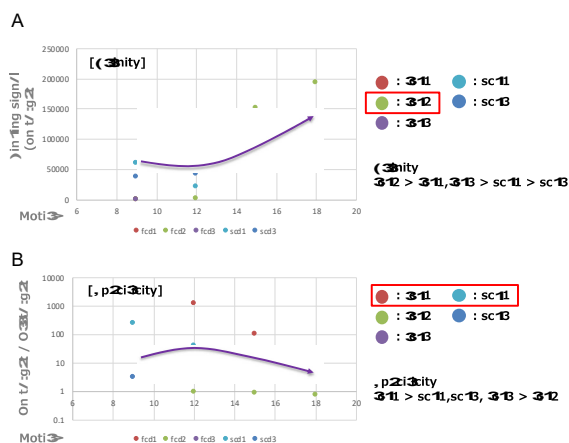


図 3.2.1.1.1-1-1 試作人工 dPPR モチーフの結合性能 連結モチーフ数と結合強度(A)もしくは、配列特異性(B)の関係

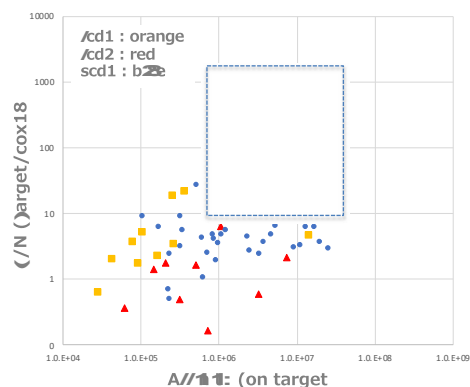


図 3.2.1.1.1-1-2 GFP 標的人工 dPPR の結合性能評価 各 dPPR 分子の X 軸に結合強度、Y 軸に S/N(特異性)をプロット。青枠は、配列特異性及び結合強度が高い dPPR

で配列特異性を有する dPPR が作製できた (図 3. 2. 1. 1. 1-1-2)。これらの結果から、目標である正常構築確率 10%は達成できた。

中間評価時に、PPR 分子の構築に関して自動化し、生産供給耐性を構築すべきとコメントがあったので、その課題に着手した。ここまでの解析で用いてきた PPR 遺伝子は、非常に相同性の高い配列が十数回繰り返した配列構造であるため、既存の遺伝子合成技術での合成は非常に難しい。そこで、任意の数を順番通りにシームレスに連結できるような 2PPR モチーフ単位のライブラリーを作成した。さらに、各モチーフ同士の塩基配列相同性を同義コドン配列を利用し減らしクローニングの成功確立を上げることに成功した。112 種類の 2xPPR モチーフのライブラリーを予め 2 枚の 96well プレートに分注しておき、自動分注機でプログラムしたとおり必要なサンプルをピックアップし混ぜ合わせることができるようにした。さらに、任意のモチーフをアセンブルし大腸菌に形質転換後、正確に連結された遺伝子を含むクローンの選抜についてもコロニーピッカーを用いて自動化することができた。

dPPR タンパク質を利用したゲノム編集技術の確立 開発初期段階では、作成した dPPR のゲノム編集効率は低いと考え、低頻度でも DNA 切断の検出可能な実験系の構築に取り組んだ。既存のレポーター遺伝子の回復により判断する SSA assay (single stranded annealing) はゲノム編集イベントを検出するために広く使われる手法であるが、バックグラウンドが高く、10%以上の編集効率がなければ検出するのが容易ではない。そこで、サロゲートシステムを用いたレポーターシステムを設計・構築した。ゲノム編集が起きると配列の挿入または欠失 (in/del) が

起こるため、遺伝子の翻訳の読み枠にずれが生じる (図 3. 2. 1. 1. 1-1-3A)。あらかじめレポーター遺伝子に STOP codon を挿入しておき、その下流でゲノム編集が起きれば in/del により、レポーター遺伝子が回復する。TALEN をポジティブコントロールとして系を作製していった結果、 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ の変異率を検出できる系が作成できた。そこで、②-1-1 で得られた 3 種類の天然型 dPPR と FokI を融合したタンパク質遺伝子発現ベクターを作成し、動物培養細胞 (HEK293T) で実験を行った。結果、特に dPPR4, dPPR12 において、標的配列特異的なレポーター遺伝子の活性化が認められ、ゲノム編集が起きて

いることが示唆された (図 3. 2. 1. 1. 1-1-3B)。さらに、それらプラスミド導入後の細胞から標的周辺配列を PCR で増幅し、次世代シーケンサーにより amplicon-seq 解析を行った。その結果、標的配列を挟む領域で塩基配列が欠損した断片を検出することに成功し、ゲノム編集されていることが実証された (図 3. 2. 1. 1. 1-1-3C)。また、天然型 dPPR4 と同じ標的認識を持つ人工 dPPR タンパク質を用いて、同様の解析を行った結果、天然型の場合と同程度の性能を有していた。

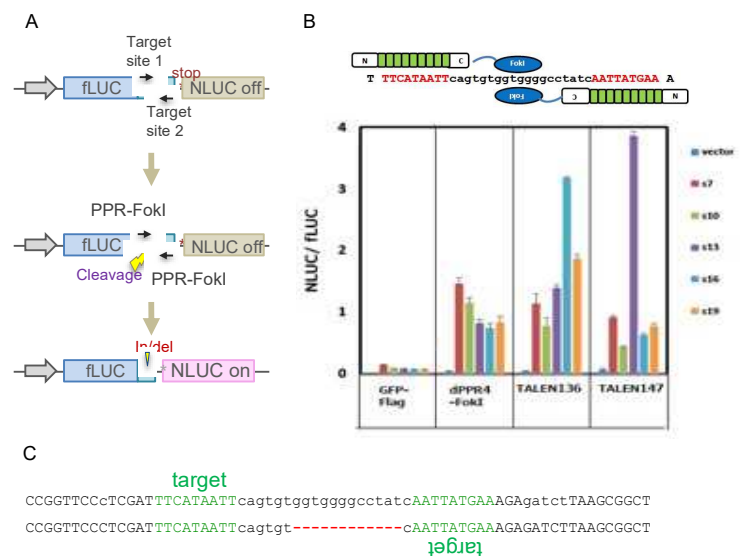


図 3.2.1.1.1-3 ゲノム編集レポーター系の開発と dPPR-FokI のゲノム編集活性測定 標的配列内に In/del がはいるとレポータータンパク質 (NLUC) のフレームが変わり発光する (A)。dPPR-FokI あるいは同じ標的配列をもつ TALEN を用いたゲノム編集活性測定結果 (B) 及び、dPPR-FokI による In/del 配列 (C)

次に、実際のゲノムの切断、編集について解析するため、あらかじめ GFP 遺伝子を 1 copy 挿入した HEK293 細胞、あるいは T87 植物細胞を作成し、検証試験を行った。GFP 遺伝子を標的する dPPR-FokI のペアをプラスミド DNA にそれぞれクローニングし、HEK293T 細胞へトランスフェクションした。ポジティブコントロールに TALEN を使用した(図 3.2.1.1.1-1-4)。GFP 陽性細胞数をセルソーターを用いて測定した結果、TALEN で 50%, dPPR-FokI で 30%得られた。さらに GFP 遺伝子の配列について次世代シーケンサーで解析した結果、dPPR-FokI を導入した細胞において In/del が確認された。dPPR では、2%, TALEN では 30%のゲノム編集効率であった。T87 細胞へはアグロバクテリウム法を用いて dPPR-FokI ペアを導入し、得られたカルスについてゲノムを抽出し T7E1 アッセイでゲノム編集を確認した結果、dPPR 挿入ラインにおいてゲノム編集時に認められる DNA 断片が検出されたが、in/del は確認されず、編集効率が非常に低かった。

さらにゲノム編集効率を高めるため、PPR モチーフ配列、PPR リピート周辺のアミノ酸配列、FokI や FokI と PPR の間のリンカーについて最適化を進めた。すでに取得されている結晶構造情報などから 15 種類の PPR モチーフ配列デザイン、リンカーは 10 種類の長さ、構造の異なるもの、PPR リピートの C 末側は 2 種類 (α ヘリックスが 1 つもしくは 2 つ) を組み合わせ、最もゲノム編集効率が高い分子構造をレポーター系を用いて解析した。初期プロトタイプ(2018 年度)の活性から最大で 10 倍程度活性の高い分子構造を決定することができた。また、広島大・山本らが開発した国産切断酵素 FirmCut (ND1, ND2)を用いた活性についても調べた。標的遺伝子によって異なる結果ではあったが、既存の FokI を用いた場合と比べて最大 2 倍の活性上昇が認められた(図 3.2.1.1.1-1-5)。今後、特に ND2 と dPPR を使用することはゲノム編集ツールとしてオプションのひとつになると考えられる。

最適化された dPPR 分子を用いて、植物でのゲノム編集実証について再度進めた。標的遺伝子はノックアウトされるとアリアルアルコール耐性を獲得する *ADH1* 遺伝子を選定した。*ADH1* 配列を標的に切断できる dPPR ペアをスクリーニングした。取得された dPPR ペアについて、アグロバクテリウム法での dPPR-FokI 形質転換体作成、DIVE 法またはエレクトロポレーション法での dPPR タンパク質直接導入、マイクロニードルを用いた植物個体への dPPR タンパク質直接導入を進めた。

アグロバクテリウム法では、dPPR-FokI が挿入されたラインの作成効率が悪く、また T1 ラインで生育遅延等が起きた。T1 ラインでの個体について、次世代シーケンシング(東大・谷内江)を用いて解析したが 0.1%以上の In/del は検出されなかった。

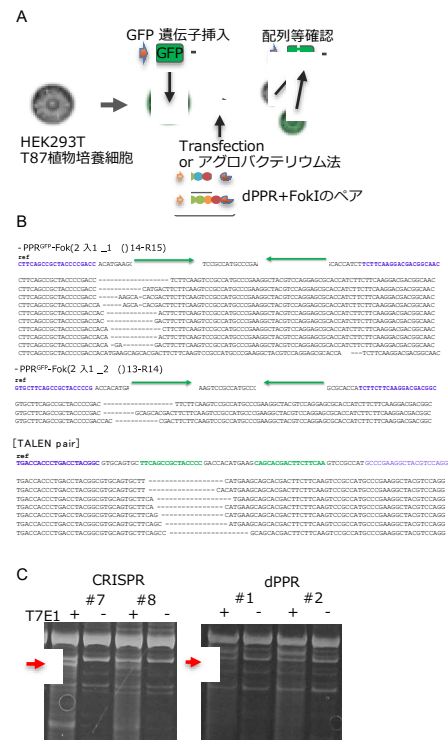


図 3.2.1.1.1-1-4 HEK293T 動物培養細胞、T87 植物培養細胞でのゲノム編集実証試験
GFP 遺伝子を挿入した細胞株を利用してゲノム編集実証試験を行った(A)。HEK293T 細胞での標的配列周辺に In/del パターン(B)と T87 での T7E1 アッセイでの結果(C)

dPPR タンパク質直接導入によるゲノム編集を実施するため、大腸菌での組み換えタンパク質作成用のベクターを作成した。タンパク質発現精製し、T87 細胞へ DIVE 法・エレクトロポレーション法（産業技術総合研究所・加藤）、またはシロイヌナズナへマイクロニードル法（産業技術総合研究所・中村）で導入した。T87 細胞は、タンパク質導入後 50 μ M アリルアルコール存在下で 2 週間培養し、導入していない細胞は死滅し、あらかじめ CRISPR で *ADH1* 遺伝子をノックアウトしている細胞株で生育することを確認した。dPPR タンパク質は、0.5 μ M または、1 μ M を導入し、2 週間後細胞が生存することが確認できた。また生存した細胞数は濃度依存的であり、アリルアルコール耐性を獲得していることが分かった。

マイクロニードルについては、植物個体へ導入した後に、導入部位のゲノム配列について次世代シーケンシングで確認し、1%の in/deI 出現率であった（産業技術総合研究所・中村）

これらの結果から、dPPR タンパク質の直接導入によるゲノム編集方法を実証することができた。アグロバクテリウム法では、成功しなかったがこの方法ではゲノム内に人工 dPPR 遺伝子が挿入され、常に発現することからゲノム編集ではなく遺伝子組み換えとなる。また、生育遅延といった影響がみられたことから DNA 切断酵素が常に発現することでの細胞へのストレスが大きいことが考えられた。一方で、タンパク質導入では一過的に細胞内に存在すると考えられ、次世代は伝わらない。切断しつづけることがないため、オフターゲットが起きる可能性も低いと考えられる。

(2) 目的に照らした達成状況

DNA 結合 PPR タンパク質 (dPPR) を用いたゲノム編集技術の開発を進めることで、任意の DNA 配列に結合する dPPR 蛋白質の設計理論を構築することができ、50%の構築成功確率となった。70%を最終目標としていたが、ゲノム編集活性を有する分子ペアの取得については、レポーターアッセイ等のスクリーニングによりさらに絞り込むという方法を採用したので、この構築確率で十分であると判断した。さらに、デザインした dPPR 遺伝子のハイスループットな作成方法を開発し、一度に 96 well plate 単位でクローニングできるようになった。目標であった 100 PPRs/week を達成できた。

ゲノム編集効率 10%を目指した開発を進め、dPPR 分子の改良及び導入方法の検討を精力的に進めた。分子については最大で CRISPR の 1/4 の活性がある分子を取得できたが、最終的に植物個体にタンパク質を直接導入した際は、1%のゲノム編集効率であった。一方で植物細胞へは効率的に dPPR タンパク質が導入でき、アリルアルコール耐性株を取得することができた。これらのことから、dPPR 分子を適切に導入することができれば切断効率が低くてもゲノム編集生物が作成できることが分かった。今後、標的の拡大や様々な植物種について試していくことで、dPPR タンパク質を使ったゲノム編集の適用例が広がり、産業利用が進むと期待される。

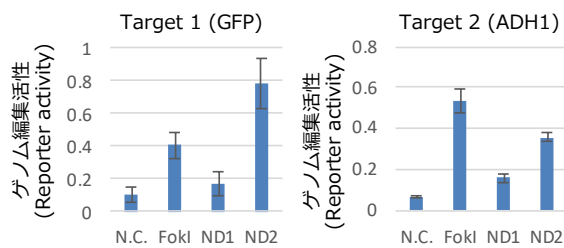


図 3.2.1.1.1-5. dPPR によるゲノム編集活性
開発期間中の dPPR-FokI 性能変遷(A). ND1, ND2 によるゲノム編集活性(B)

A-2 日本発新規ゲノム編集技術の研究開発（産業技術総合研究所・間世田英明、筑波大学・鈴木石根）

成果の概要 細菌の抗生物質耐性獲得機構で見いだされた自己ゲノム編集機構 PODiR システムを基にした、日本発の新規ゲノム編集法の開発を進めた。その結果、課題申請時目標として掲げていた、2n の藻類のゲノム編集を任意の配列において編集する方法の開発に成功した。しかも、①生細胞当たり実質約 70% 近くのゲノム編集効率を達成することができた。本法は、CRISPR-Cas9 を含む従来のゲノム編集法とは異なり、意図した配列を正確に編集することが可能であることから、正確性においても効率においても従来のゲノム編集法を圧倒的に凌駕するレベルに開発できたことになる。さらに、当初の開発目標にはなかった、②ターゲット遺伝子特異的メチル化法の開発にも成功し、特異的にゲノムを改変することなく長期にわたり目的遺伝子の発現を抑制する方法も達成した。このメチル化法は、環境生物のスマートセル化には特に有効で、組換えおよびゲノムの改変に当たらない方法であるため、カルタヘナに抵触せず、環境安全性に現時点でもっとも優れたスマートセル化法であると考えられる。また、やはり当初の目標になかった③高等植物シロイヌナズナの PODiR システムの稼働の確認にも成功した。このことは、今後開発を続けることで、藻類同様に高等植物においても従来のゲノム編集法を凌駕するゲノム編集法の実現可能であることを意味している。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み 本プロジェクト期間に PODiR システムを利用したゲノム編集を行うベンチャー企業（Nexuspiral 株式会社）の起業を成し遂げることに成功した。本企業は、先行していた動物細胞での PODiR システムによるゲノム編集法を社会実装を進めるべく設立したものであるが、本プロジェクトの成功により、動物細胞のみならず、藻類のスマートセル化も強力に推し進める礎となると確信している。上記の開発技術は、現時点では 3 つの知財として申請するに至っている。

(1) 研究開発の成果

1. PODiR システムの概要

緑膿菌はグラム陰性の桿菌であり、院内感染症の原因菌である。本菌は、抗生物質に曝露されると容易に耐性化する。耐性化の原因には様々な原因があるがその中でも抗生物質を細胞外に排出してしまう efflux system の発現による耐性化は重篤で、このような efflux ポンプの発現は様々な種類の抗生物質を認識し、一気に多剤耐性化してしまう。

その中の一つである多剤耐性株 *nfxC* は、驚いたことに自らゲノムに遺伝子 *mexT* を作りだし（自己ゲノム編集機構：PODiR システム）、ほとんどの抗生物質に耐性化する。ではどのように *mexT* 遺伝子がゲノムに現れるのであろうか？この *mexT* が出現する領域を調べてみると、一部重なり合ったダイレクトリピート (PODiR:Partly Overlapped Direct Repeat) が存在し、その重なっていない 8bp が特異的に欠失し、フレームシフトの結果、*mexT* 遺伝子が出現してくることがわかった (図 3.2.1.1.1-2-1)。更なる解析の結果、特異的な 8bp の欠失は、配列特異的でなく、あくまでも構造特異的であった。そこで、そのような（ある条件を満たす）一部重なり合ったダイレクトリピートをゲノム配列から探索するソフトウェアを作成し、50 以上の様々な生物のゲノムを調べてみると、探索した全ての株でそのような構造をとる配列の存在が確認された（その数はゲノムの大きさに依存することはなく、種ごとに異なっている）。次に、様々な

種由来のそのような構造特異的配列をランダムに選択し、クローニング後緑膿菌に導入してみると見事に、由来は違えどもその重なっていない領域の特異的欠失が全てで確認された。当然ヒトのゲノムにも数十万箇所の PODiR 配列が存在し、ヒト細胞においても同様の自己ゲノム編集機構が存在し、働いているものと考えられた。そこで、その可能性を確認するために、GFP 遺伝子内に PODiR 配列を埋め込み、その挿入により機能を無くさせた GFP 遺伝子カセットを作成し、ヒト細胞のゲノムに導入することで、アッセイ細胞を作成した。この細胞は、バクテリア同様自己ゲノム編集機構が発動し意図した欠失が起きたときのみ、GFP の機能が回復し緑色蛍光を発するようにデザインしている。アッセイ細胞を培養してみると予想通り、自己ゲノム編集が起こり、導入した PODiR 配列の重なり合っていないところが欠失され、緑色の蛍光を発する細胞が出現し、ヒト細胞においても PODiR システムが稼働することが確認された(図 3. 2. 1. 1. 1-2-1)。このように、真核生物においても、自己ゲノム編集機構である PODiR システムが機能していることが示されたことから、植物でも存在するものと考えられた。

解析を進めた結果、ある条件を満たす PODiR 配列では、特殊な核酸が生じ、それを利用して重なっていない部分の配列が欠失するという自己ゲノム編集が誘発されることがわかった。もしもこの特殊な核酸をミミックすることができれば、PODiR 配列の箇所はもちろん、それ以外つまりは任意の配列 (non-PODiR 配列) に対して、PODiR システムを誘導させ、ゲノム編集が可能になると考えられた。そこで、ミミック oligoDNA を作成、細胞に導入し、任意の配列に対して、ゲノム編集の可否について検討した。その結果、意図した箇所が意図した配列に編集されることが確認され、少なくとも細菌においては、PODiR 配列および任意の配列に対してもミミック oligo 核酸を導入することでゲノム改変を行えることが示された。このことは、真核生物 (ヒト細胞および植物) においても、同システムを利用して任意のゲノム配列を編集できることを意味している。

以上のことから、PODiR システムをミミックし、oligo 核酸を作製・導入することで PODiR 配列にとどまらず任意の配列においても、正確なゲノム改変可能であると考え、藻類をモデル生物として PODiR システムを基盤とする日本発のゲノム編集法の構築することとした。

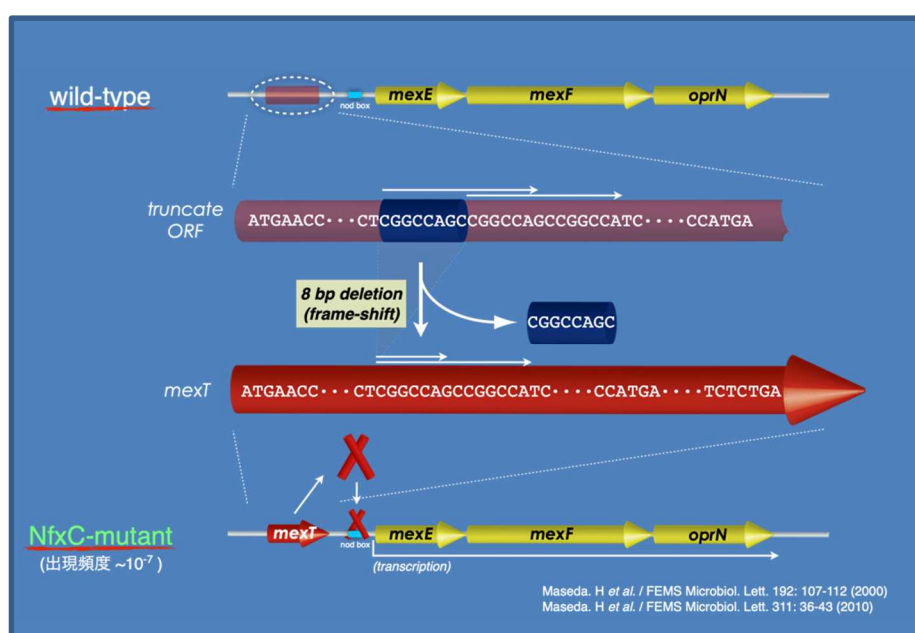


図 3. 2. 1. 1. 1-2-1 PODiR システムによる *mexT* 遺伝子の出現機構

2. PODiR システムの確認用植物・2n 藻類の作製と確認

PODiR システムが植物および藻類でも機能しているかどうか、調べるために、GFP 遺伝子上に 9bp の塩基を挿入しアッセイ用 GFP (GFP-POD) カセットを作製した。本カセットは付加した 9bp 塩基が欠失して始めて GFP が機能するように設計されている。次に GFP-POD カセットを緑膿菌に導入し、培養のみで導入した 9bp の欠失が正確に起き、それに伴って緑色に発色するコロニーが出現するか否か検討した。その結果、緑色コロニーの出現と 9bp の欠失が確認されたことから、本アッセイ GFP カセットの有効性が確認された。

(ア) 確認用シロイヌナズナ細胞の作製と確認

PODiR 配列によるゲノム編集が植物で起きるのか否か確認するために、シロイヌナズナの培養細胞 T87 を理研より購入し、まず、培養システム (LED 光源の選定と強度の最適化) を構築した。次に、PODiR 配列を導入により機能を欠損した GFP 遺伝子カセットを、アグロバクテリウムを介して T87 株に導入し、ゲノム中に GFP-POD カセットが導入されたアッセイ植物細胞を樹立した。当該アッセイ植物細胞を培養することにより、自己ゲノム編集機構が働き、機能型の GFP 遺伝子に変換されるか否か検討し、蛍光を発する細胞が出現することを確認した。次に、蛍光を発する細胞をカルス化することにより、クローンし、ゲノムを抽出した。抽出したゲノムを解析したところ、意図した 9bp の欠失を確認し、シロイヌナズナ細胞で PODiR システムが機能することを確認した。

(イ) 確認用シロイヌナズナ個体の作製と確認

シロイヌナズナの個体を用いて、2n 植物体での PODiR システムの有効性を実証した。PODiR 配列を導入により機能を欠損した GFP 遺伝子を、アグロバクテリウムを介して導入し、シロイヌナズナ個体 (T0) を作製した。本個体から種子 (T1) を取得した。本種子 (T1) を栽培し、GFP-POD を有するヘテロ体からホモ体のシロイヌナズナの種子 (T2) を取得した。T1 および T2 種子を栽培しゲノム編集により GFP の蛍光を発する細胞が出現するか検討した。アッセイでは緑色蛍光を確認する必要があるため緑色でない植物の組織である根のみを観察の部位として選

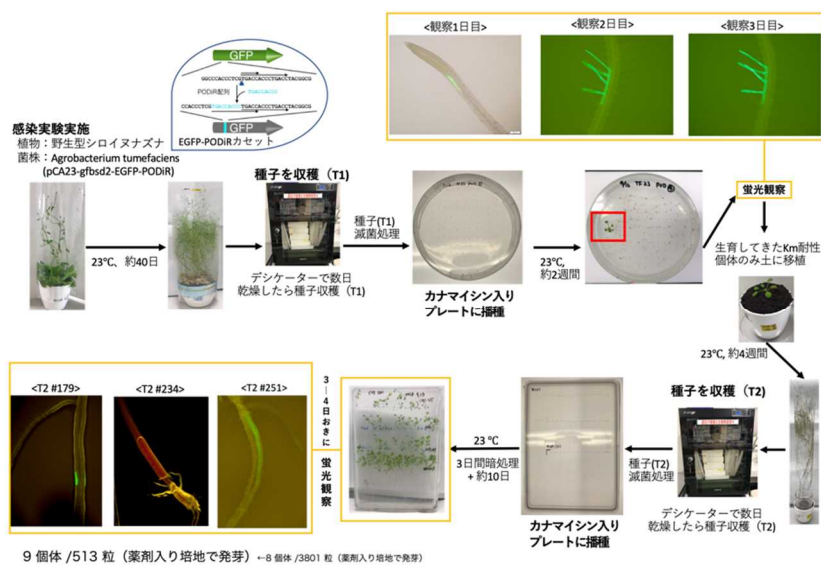


図 3. 2. 1. 1. 1-2-2 シロイヌナズナでの PODiR システム稼働の確認

んだ。その結果、緑の蛍光を発する根を有する多数の植物体を確認し、植物体でも PODiR システムが機能していることを確認した（図 3.2.1.1.1-2-2）。

（ウ） 確認用 2n 藻類の作製と確認

PODiR 配列によるゲノム編集が藻類で起きるのか否か確認するために、週齢 7-8 週の藻類（ハプト藻、*Pleurochrysis carterae*）の細胞をプロトプラスト化し、PODiR 配列の導入により機能を欠損した GFP-POD カセットを導入し、ゲノム中に GFP-POD カセットが導入された藻類を作製した。この変異株を長期間（4-6 週間）培養することにより、自己ゲノム編集機構が働き、機能型の GFP 遺伝子に変換されるか否か検討した。その結果、9bp の意図した配列の欠失が起き、自己ゲノム編集機構が 2n の藻類でも起こることが確認された。（図 3.2.1.1.1-2-3）

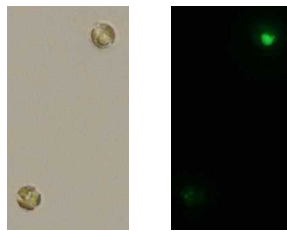


図 3.2.1.1.1-2-3 2n の藻類での自然発生型 PODiR システムの駆動確認実

- ・ 左下の細胞と比較して右上の細胞は明らかに強い蛍光を発している。
- ・ 明視野（左）では茶色の色彩（ハプト藻の通常の色）が確認できるため、死細胞ではないことが確認できる。

3. non-PODiR（任意の配列に対する PODiR）システムの確認用植物・2n 藻類の作製

PODiR システムは、PODiR 配列で意図した正確な自己ゲノム編集が起これ、それ以外の領域では現時点では起これない。しかし、我々は、PODiR システムの解析を通して、PODiR システムを模倣した核酸を作成し、細胞に導入することで、PODiR 配列を有していない領域、つまり非 PODiR (non-PODiR) 配列である任意の配列においても、意図したゲノム編集を起こさせることが可能であることを明らかにしている。そこで、本項目では、任意の配列でのゲノム編集が可能であるか検討することを目的とし、アッセイ用の GFP 遺伝子を作製・導入し、アッセイ細胞を作成し、任意の配列に対して PODiR 型の欠失を人為的に起こせるどうかの確認実験のためのアッセイ系を作成した。

（ア） non-PODiR システム確認用シロイヌナズナ細胞の作製

non-PODiR 配列によるゲノム編集が植物で起きるのか否か確認するために、シロイヌナズナの培養細胞 T87 を理研より購入した。次に、non-PODiR 配列の導入により機能を欠損した GFP 遺伝子（GFP-nonPOD）を、アグロバクテリウムを介して導入し、ゲノム中に GFP-nonPOD カセットが導入されたアッセイ植物細胞を樹立した。導入されていることを PCR と塩基配列の決定により確認した。

(イ) non-PODiR 確認用シロイヌナズナ個体の作製

シロイヌナズナの個体を用いて、2n 植物体での PODiR システムによる任意の配列のゲノム編集が可能であるか検討するためのアッセイ個体を作製した。9bp の塩基の導入により機能を欠損させた GFP 遺伝子 (GFP-nonPOD) を、アグロバクテリウムを介してシロイヌナズナに導入し、シロイヌナズナ個体 (T0) を作製した。本個体から種子 (T1) を取得した。本種子 (T1) を栽培し、GFP-nonPOD を有するヘテロ体からホモ体のシロイヌナズナの種子 (T2) を取得した。PODiR 配列を異なり、PODiR 配列自体から編集用の核酸が作られないことがない。そのために、ミミック oligo の導入が編集には必要になるが、植物個体の場合、oligo 核酸の導入は非常に難しい。そこで、nonPOD 核酸の導入に加え、本検討では、ミミック核酸を t-RNA と t-RNA の間に挟み込みミミック oligo 核酸のみ発現可能であるベクターも合わせて構築した。

(ウ) non-PODiR 確認用 2n 藻類の作製

non-PODiR 配列によるゲノム編集が藻類で起きるのか否か確認するために、週齢 7-8 週の藻類の細胞をプロトプラスト化し、non-PODiR 配列の導入により機能を欠損させた EGFP-nonPOD カセットを導入し、ゲノム中に EGFP-nonPOD カセットが導入された藻類を作製した。

(エ) 任意の配列 (non-POD) 配列のゲノム編集

委員会での話し合いで、ステージゲートを超えた時点で、non-POD 配列 (任意の配列) に対するゲノム編集を行わないことに決定した。そのため、本 NEDO プロジェクトでは 3(ア)–(ウ) に関しては、残念ながらアッセイ系の構築を完了した時点で中止となった。本プロジェクトではないが、ヒト細胞でのゲノム編集では、核酸のみの導入により、目的配列へのゲノム編集の効率が、生細胞あたり 10% を超えるところまで達成している。効率もさることながら、すでにその簡便性・正確性においても他のゲノム編集法を凌駕している状態にあり、PODiR システムを基盤とするゲノム編集の有効性が動物視細胞では確認されている。

4. 内在性リパーゼをターゲットにした 2n 藻類での PODiR によるゲノム編集

ハプト藻 *P. carterae* の Class 3 Lipase をコードする遺伝子は、コード領域中に 9 塩基欠失すると予想される PODiR 配列を有している (図 3.2.1.1.1-2-4)。

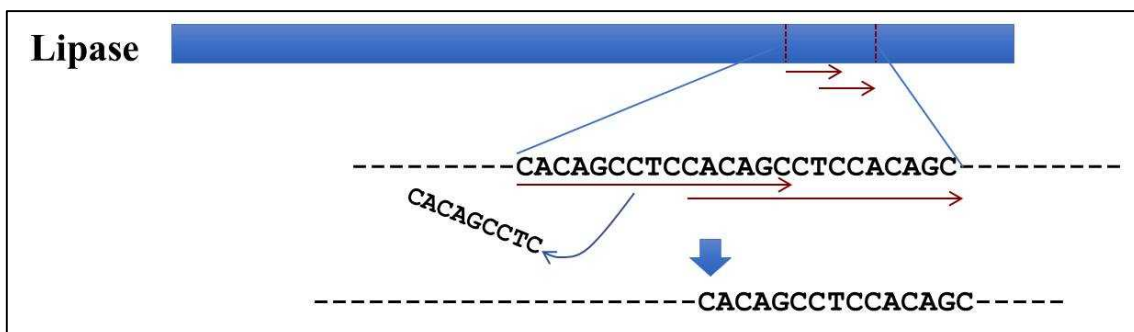


図 3.2.1.1.1-2-4 *P. carterae* のリパーゼ遺伝子中の PODiR 配列

そこで、このリパーゼ遺伝子をターゲットとして、5' 側の重なり合わない 9 塩基をあらかじめ欠失させた 120 mer の ssDNA を合成した (Lipase-PODiR ssDNA)。また、対照実験として

は、ssDNA を含まないミリ Q 水を用いて同様の操作を行った実験区を用意した。実験は 4 回独立して行い、それぞれ週齢 6 週、8 週、8.5 週、9.5 週の細胞をプロトプラスト化し、PEG（ポリエチレングリコール）を用いて ssDNA の導入を行った。なお、3、4 回目の実験では、下記の項目 7 「PODiR システムの 2n 藻類での効率化（発展的研究）と補足」で述べる因子 1、2 の導入も同時に行っている。導入操作後の細胞は、培地でよく洗った後、さらに 2 週間もしくは 4 週間培養を行い、全ゲノムを抽出した。さらに、抽出したゲノムを鋳型に当該領域を PCR で増幅し、精製後、次世代シーケンサーによる網羅的な配列解析を行い、編集が起こったフラグメント数の割合を調べた（表 3.2.1.1.1-2-1）。

表 3.2.1.1.1-2-1 NGS を用いた欠失割合

	欠失が見られたフラグメントの割合		ssDNA 導入による 編集効率の上昇率	細胞の週齢	導入からゲノム抽出 までの培養時間
	対照実験区	ssDNA 導入実験区			
1回目	0.03%	0.27%	9.0倍	6週	2週間
2回目	1.55%	16.89%	10.9倍	8週	4週間
3回目	31.82%	73.60%	2.3倍	9.5週	4週間
4回目	9.66%	34.37%	3.6倍	8.5週	4週間

その結果、ssDNA の導入により、標的遺伝子の編集効率は対照実験区の約 2 倍から 10 倍程度上昇することが示された。なお、対照実験区において予想通り自然発生型 PODiR システムの発動が起き、欠失が確認された。培養条件の違いにより、その頻度が毎回異なることも今回確認され、今回調べた範囲では、週齢の多い細胞、つまり古い細胞ほど自然発生型 PODiR による欠失が多い傾向が見られた。

5. PODiR システムによる藻類でのゲノム編集と相同組換えとの差別化に関する検討

「PODiR システムと相同組換えではないのか」との指摘を技術推進委員会で受けた。その疑問に対する検討を行った。①バクテリアにおいては、一般的に *recA* 依存的に相同組換えが起こるにも関わらず、*recA* 破壊株でも PODiR システムが発動する。②ミミック DNA のみならず、ミミック RNA、ミミック人工核酸でも PODiR システムによる欠失を高頻度で誘導できる（相同組換えでゲノムに人工核酸が導入された場合、複製不可能になり少なくとも高頻度のゲノムの編集結果は得られない）。ことから、少なくともバクテリアにおいては、相同組換えではないシステムでゲノムの改変が起きていると考えられている。しかし、藻類においては、相同組換えであるという可能性に関して検討しておらず、可能性を排除できていない。そこで、相同組換えの現象をだれも観察はできないことから、“一般的に相同組換えによるゲノムの改変効率は、相同領域 500 bp 以上の配列が必要と言われ、その効率は高くても生菌数あたり数%におよぶ例しか存在していない”ことを利用し、それよりも十分高い効率でゲノムの改変が起きるか否かで、相同組換えの可能性の低減をはかった。native 遺伝子の PODiR 配列に対し、ミミックオリゴ DNA によりゲノム編集を試みた。その結果、NGS 解析で生菌数あたり数十%の非常に高効率でゲノム編集が起こった。この値は、いままで相同組換えでは報告されたことのない高い編集効率であることから、PODiR システムによるゲノム編集が十分に相同組換えではない可能性を強く示唆するものである。さらに、PODiR 配列でない同遺伝子の上流領域（緑箇所）に対してもミミックオリゴ DNA による編集を試みた。その結果、生細胞当たりやはり数十%もの効率で意図した配列に正確にゲノム編集を起こすことに成功した。2n の高等藻類であることから考えるとその数十%の倍の

細胞においてゲノム編集を人為的に成し遂げた結果となる。こちらの効率も極めて高い効率で従来相同組換えではあり得ないような効率の高さであり、非相同領域においても本手法で高効率で正確なゲノム編集が藻類においては達成することに成功した。

6. 内在性遺伝子の PODiR システムによるゲノム改変細胞の分離の試み（発展的研究）

今回ターゲットとして選定したリパーゼは、脂質を代謝する酵素であるため、その変異株は脂質を多く蓄積していると予想され、産業的な応用へと結びつく可能性が考えられた。そこで、以下の手順でリパーゼ遺伝子変異株の取得を試みた。

まず、上記の項目 4「内在性リパーゼをターゲットにした 2n 藻類での PODiR によるゲノム編集」で述べた 2 回目の実験における ssDNA 導入実験区の細胞をさらに 2 か月間液体培地で培養後、گرانガムプレート培養により、細胞を単離した。単離したクローン株は、さらに液体培地で 4~6 週間培養し、個別にゲノム抽出を行い、当該遺伝子領域を PCR で増幅後、サンガー法による配列決定を行った。しかしながら、合計で 260 クローン株を解析したが、ゲノムが改変された株の取得には至らなかった。PODiR による編集技術の最適化を進め、再度取得することが望ましいと考えられた。

ssDNA 導入後、培養期間の伸長とともに、PODiR 配列の欠失がみられる割合が低下する現象が認められたので、この遺伝子の PODiR 配列に欠失が起こると生育速度が低下し、相対的に改変が起こっている細胞の割合が減少する可能性が考えられた。また、ssDNA 導入後一部の *P. carterae* の細胞をコロニーとして分離し、その細胞毎の DNA 構造も調べた。元のコロニー分離前の細胞集団にみられる PODiR 配列の編集効率から、編集が起こっているコロニーが取れて然るべき数のコロニーを解析したが、分離したコロニーからは編集の起こった細胞が得られなかった、この事柄からも上記の予測を示唆する結果であった。

7. PODiR システムの 2n 藻類での効率化（発展的研究）と補足

PODiR システムによる PODiR 配列の編集は、PODiR 内在性因子とミミック oligo 核酸により行われることが明らかになっている。そこで、キーとなる PODiR 内在性因子の導入による PODiR ゲノム編集の高効率化を試みた。

（ア）PODiR 因子のクローニングと精製

大腸菌のノックアウトライブラリーに対して、意図した欠失が起きた場合に初めて薬剤耐性を示すアッセイプラスミドを一つ一つ導入し、薬剤耐性株の出現率から PODiR 因子の同定を行い、既に PODiR システムに大きく関与する因子を同定している。その内、特に関与が疑われた因子の発現・導入による PODiR システムの効率化を試みた。その結果、因子の導入によりゲノム改変効率に影響を与えることが示された。

(2) 最終目標の達成度及び研究開発成果の意義

項目	研究内容	進捗度 (%)
PODiR システムの植物（藻類含）での稼働の確認	シロイヌナズナ個体のゲノムにアッセイ用 GFP を導入し、その編集を確認する	100%
	上記内容をシロイヌナズナ細胞で行う	100%
	2n 藻類のゲノムにアッセイ用 GFP を導入し、その編集を確認する	100%
	PODiR システムを転用し、発現抑制を藻類で行う	100%
ゲノム内 PODiR 配列箇所での人為的藻類ゲノム改変の実証	微生物で PODiR 因子を発現し、効果を測定する	100%
	PODiR 配列を有する有用遺伝子の検索	100%
	実用藻類での PODiR 配列でのゲノム編集の実証と産業上有用藻類の作出およびその効率化	90% 核酸を導入し、編集の確認とその編集効率の顕著な上昇を確認。編集細胞の単離中で期間終了
	PODiR システムによるゲノム編集と相同組換えとの差異 (2019 年度技術推進会議コメント対応) (2020 年度技術推進会議コメント対応)	100%
	実用ハプト藻類での PODiR 因子導入による効率化	100%

日本発のゲノム編集法の構築を目指し、研究を進めてきた。その結果、本プログラムにおいて、様々試行錯誤を行った結果、2n 藻類の PODiR 配列でのゲノム編集効率を最も高い場合で、生細胞あたり数十%以上もの驚くべく効率で人為的にゲノム編集を起こさせることに成功した。この値は、利用した藻類が 2n であることを考えると、ほぼ 100%に近い効率でゲノム編集できたことを意味する。このように、PODiR 箇所での編集に関して、日本発のゲノム編集法を構築することができた。今回のプログラムでは、残念ながら、任意の箇所での編集に関して、途中の段階で、相同組換えとの差別化が明確でないという議論から中止となってしまい、本来のゲノム編集である“任意の箇所での編集”を行うことを中止した。しかしながら、相同組換えとの差別の中で、幸運にも PODiR システムを基盤とする任意の配列に対するゲノム編集法を実現できた。最適化は行えなかったものの、効率において生細胞あたり実質数十%の効率を実現できた。今後改良を進めることで更なる効率が期待できる。他のプロジェクトで動物細胞の系においては、任意の配列を意図した配列へ核酸のみで数十%以上の効率でゲノム編集を達成し、CRISPR-Cas9 を圧倒的に凌駕できていることから、2n の藻類においても、任意の配列に対して PODiR 法を用いたゲノム編集が可能になったことから、高等生物でのゲノム編集も開発により実現できるものと期待される。現時点でゲノム編集に対する予算獲得のめどがつかないことから、高等植物におけるゲノム編集を進める目処はついていないが、予算獲得の暁には任意の配列に対するゲノム編集を実証したいと考えている。

ところで、研究途中で「相同組換えとの差別化が途中の段階では明確でない」の議論があり、研究目標を一部変更し、相同組換えとの差別化になくなくシフトせざる負えなかった。細胞内での編集イベントを直接観測することが現時点では科学的に不可能であることから、間接的に相同組換えでない証拠集めに終始した。その中で、相同組換えにおいてどの生物でも達成できていない驚異的な効率によるゲノム改変を達成できたことは、PODiR システムが、当初我々がモデルとして示していた通り、相同組換えによる編集でないことを十分に示すことができたのではないかとと思われる。

また、本研究開発を通して副次的に大きな研究成果も成し遂げることができた。すでに特許申請を終了しているように、藻類においてターゲット遺伝子特異的にメチル化の程度および部位の変動を誘導し、その後世代を経ても長期にわたり遺伝子発現をノックダウンできるという技術である。この新規手法によるメチル技術は強力な新たな育種法として考えることができる。すなわち、藻類は正に光エネルギーを利用してCO₂を固定し、同時に燃料を産生することができる。メチル化手法においては、ゲノムの配列変化を全く伴っていない、すなわち、遺伝子組換えでもゲノム編集でもないことから GM 生物の範疇でなく、カルタヘナ協定に全く抵触せず、夢の生物の育種法と位置づけられる。現時点でメチル化し、そのノックダウンの状態を一年近く継続している。GM 生物でないことで、十分な安全性を担保したまま、規制なく環境中で本メチル化誘導生物を利用することが可能であり、将来の新たな育種法の開眼となったものと自負している。

以上のように、本プログラムにおいて新たなターゲット遺伝子特異的メチル化法、および超高効率藻類ゲノム編集法の確立を達成できた。今後は動物細胞で達成している任意の配列での PODiR システムによるゲノム編集を高等生物にまで拡張できるよう、予算を獲得し進めていくだけでなく、PODiR 因子導入によるさらなる効率化の最適化なども検討していきたいと考えている。また、すでに本プログラム進行中に PODiR システムによるゲノム編集を行うベンチャー企業 (Nexusp spiral 株式会社) も設立を果たしたことから、本プログラムの成果を動物細胞での系と同様に広く社会に還元できるよう研究開発を続けていきたいと考えている。

A-3 新規ゲノム編集モジュールの開発（東京医科歯科大学（広島大学）・野村渉、神戸大学・西田敬二、産業技術総合研究所・加藤義雄、宮岸真、東京大学・谷内江望、九州大学・中村崇裕）

(1) 研究開発の成果

【概要及び目的】

プロジェクトにおける位置づけ 既存の技術より優位な特性をもつ新規モジュール（特にCRISPRのような簡便かつ安価な運用が可能な核酸性モジュール）を開発し、ゲノム編集における基幹技術を確立、拡充する。

技術的な重要性 ゲノム編集ツールは、TALEN、ZNFに代表されるタンパク質ベースと核酸・タンパク質ハイブリッド型のCRISPRタイプ技術の2種類がある。現在、いずれのツールも海外で開発・知財化・ビジネス化されており、海外技術に頼らない独自のゲノム編集技術の構築が課題となっている。そこで、本課題において、既存の技術より優位な特性をもつ新規モジュールを開発する。

実施概要（解決する手法） 2016～2018年の期間で、下記に示す4つの異なるアプローチ（a～d）により、新規モジュールの開発を行う。2019～2020年の期間では、前半の開発成果をもとに、知財性・有用性を基に2つの詳細課題（e、f）を選定し、集中的に開発を進める。

最終目標 既存のゲノム編集モジュールより優れた特性（標的配列選択の自由度、サイズ、もしくはオフターゲット）、および高い特許性をもつ、タンパク質性、もしくは核酸性の新規のゲノム編集モジュール（DNA認識部分）を最低1つ確立し、実用植物へ適用する。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み プロジェクトで構築したゲノム編集ネットワーク、関連するベンチャー企業、または所属機関の産学連携部と共同して実用化、事業化を進める。ゲノム編集ネットワークの中核機関である広島大学、九州大学に設置した共通評価基盤等を活用し、企業とのフィージビリティスタディを促進させる。

【成果】

a) 計算科学的手法を利用した新規タンパク質性ゲノム編集モジュールの開発

（東京医科歯科大・野村渉；2016～2018年）

タンパク質ドメインの配列がファミリーに分類されているデータベース Pfam から3回以上で繰り返し配列が出現する20-40アミノ酸の長さの配列を抽出し、それらを一次候補集団とした（各アミノ酸長で抽出された配列の総計が約720,000配列）。一次候補集団からの絞込みについて2種類の方法を適用した。一つめの方法では、候補配列は属するファミリーに分類されていることから、各ファミリーで100以上の配列を含むものについてマルチプルアラインメントをとり、代表配列の抽出を行った。また、核酸結合性能に関連するキーワードで機能分類を行い、標的配列候補を抽出した。二つめの方法では、機械学習を配列抽出に適用した。機械学習では Pfam に収蔵されている配列情報について DNA 結合に関連する配列群とそれ以外の配列群に分類し、配列の特徴からサポートベクターマシン（SVM）を作成した。ディープラーニングにおいてもディープニューラルネットワーク（DNN）を作成した。SVMにおける高いスコアと配列類似性の低さを基準に一次候補集団のフィルタリングを行い、繰り返し単位が25-30アミノ酸の配列

について SVM スコアが高く、かつ類似性の低い候補を抽出し、絞込みを行い、5 個の候補配列を選定し、それらについて DNA 結合機能を解析するために遺伝子構築を完了しタンパク質発現と精製を行った。

b) 進化工学と計算科学的手法を利用した新規核酸性ゲノム編集モジュールの開発

(神戸大・西田敬二；2016～2018 年)

新規モジュール候補として分子量が従来の SpCas9 よりも小さく、配列デザインの制約が小さいと予想される DNA に作用する RNA-タンパク質複合体に着目した。その機能性を評価するため、ガイド RNA および標的 DNA との結合性を試験管内について試験し、新たなゲノム編集モジュールとしての基本機能を確認した。さらに、候補複合体による試験管内での遺伝子機能調節を実証するとともに、エフェクター機能を付与して細胞内での発現および精製を行い、試験管内での活性試験を行った。

c) 核酸化学的手法を利用した新規核酸性ゲノム編集モジュールの開発

(産業技術総合研究所・加藤義雄；2016～2018 年)

核酸とタンパク質のハイブリッド分子を作成する手法を利用して、①核酸塩基をもつアミノ酸のタンパク質への導入、および②触媒ドメインとの融合によるゲノム編集モジュールの構築を行うことを目的とした。本目的のため、アデニン塩基、シトシン塩基またはグアニン塩基を側鎖として有するアミノ酸を合成し、タンパク質ポリペプチド鎖の目的位置へと導入する手法を開発した。

d) 人工核酸および核酸触媒を利用した新規核酸性ゲノム編集モジュールの開発

(産業技術総合研究所・宮岸真；2016～2018 年)

ゲノム編集技術に応用可能な、核酸認識モジュール、核酸触媒モジュールを開発することを目的とした。人工核酸および修飾核酸を用いた核酸認識モジュールを複数設計し、試験管内で核酸配列認識能、二本鎖核酸解離能を評価する系を複数構築し、核酸認識モジュールの動作について物理化学的な検証を行った。また、各核酸認識モジュールを細胞内で評価する系を構築し、各モジュールの細胞レベルでの評価を行ったところ、*in vitro* で活性を有する核酸認識モジュールのみではゲノム編集活性は見られず、核酸触媒等の核酸切断活性が必要であることが分かった。核酸触媒モジュールに関しては、複数のタイプの核酸触媒に関し、*in vitro* での触媒活性を検証し、スクリーニングによる最適化に使用する核酸触媒のタイプを決定した。この結果に基づき、修飾核酸を利用可能な核酸触媒ライブラリーを構築し、高活性の核酸触媒のスクリーニングを行った結果、複数の新規核酸触媒の取得に成功した。また、細胞でのゲノム編集効率の高感度測定のための細胞株の構築を行った。

e) 新規タンパク質性ゲノム編集モジュールの開発

(東京大学・谷内江望、広島大学・野村渉、産業技術総合研究所・宮岸真；2019～2020 年)

新規高効率リピート DNA 配列合成手法の開発 これまでに様々なリピート配列のアセンブリ手法が開発されているが、いずれも数個の DNA 断片によるアセンブリを繰り返す必要がある。さら

に、各アセンブリステップにおいて目的の産物が正しく合成されているか PCR 法やサンガーシーケンシング法による品質検査に要する手間や時間が大きくなる。新規タンパク質性ゲノム編集モジュールの候補となる遺伝子を効率よく調製するために、上記の問題を解決した新規 DNA アセンブリ手法を開発した。

タンパク質性ゲノム編集関連遺伝子候補の合成と DNA 結合試験 「開発課題(10) インフォマティクスコア」から得られたタンパク質性ゲノム編集関連遺伝子候補クラスター128 についてそれぞれの代表遺伝子ライブラリーについて、新規 DNA アセンブリ手法を開発し、55 候補遺伝子を合成した。

遺伝子作成された 55 種類のリピートタンパク質について、Nano-Luc 融合タンパク質として大腸菌で組み換えタンパク質を作成した。可溶性画分を回収し、ルシフェラーゼ発光を測定、さらに SDS-PAGE 後にゲル内でルシフェラーゼドメインを再構成し発光させることでタンパク質サイズを確認した。7 種類のタンパク質については発現しなかった。得られたタンパク質についてランダム配列を含む DNA との結合を確認するためプローブを作成した。50%の GC 含量の 150bp のプローブとの結合を調べた。プローブの末端にビオチン修飾をし、ストレプトアビジンのホワイトプレートへ吸着させた。そこへルシフェラーゼ融合候補タンパク質を各 well へ加えた。洗浄後、ルシフェラーゼ発光を測定した。プローブを加えていない well での発光量での値を分母に割り算した値(S/N)により DNA と結合しているかどうか判定した。全サンプルの平均+2xSD (3.56)以上の分子が 3 つ得られた(図 3.2.1.1.1-3-1)。配列特異性を有するかの解析まで行うことはできなかったが、新規ゲノム編集ツールとして利用できる可能性がある分子を取得することができた。

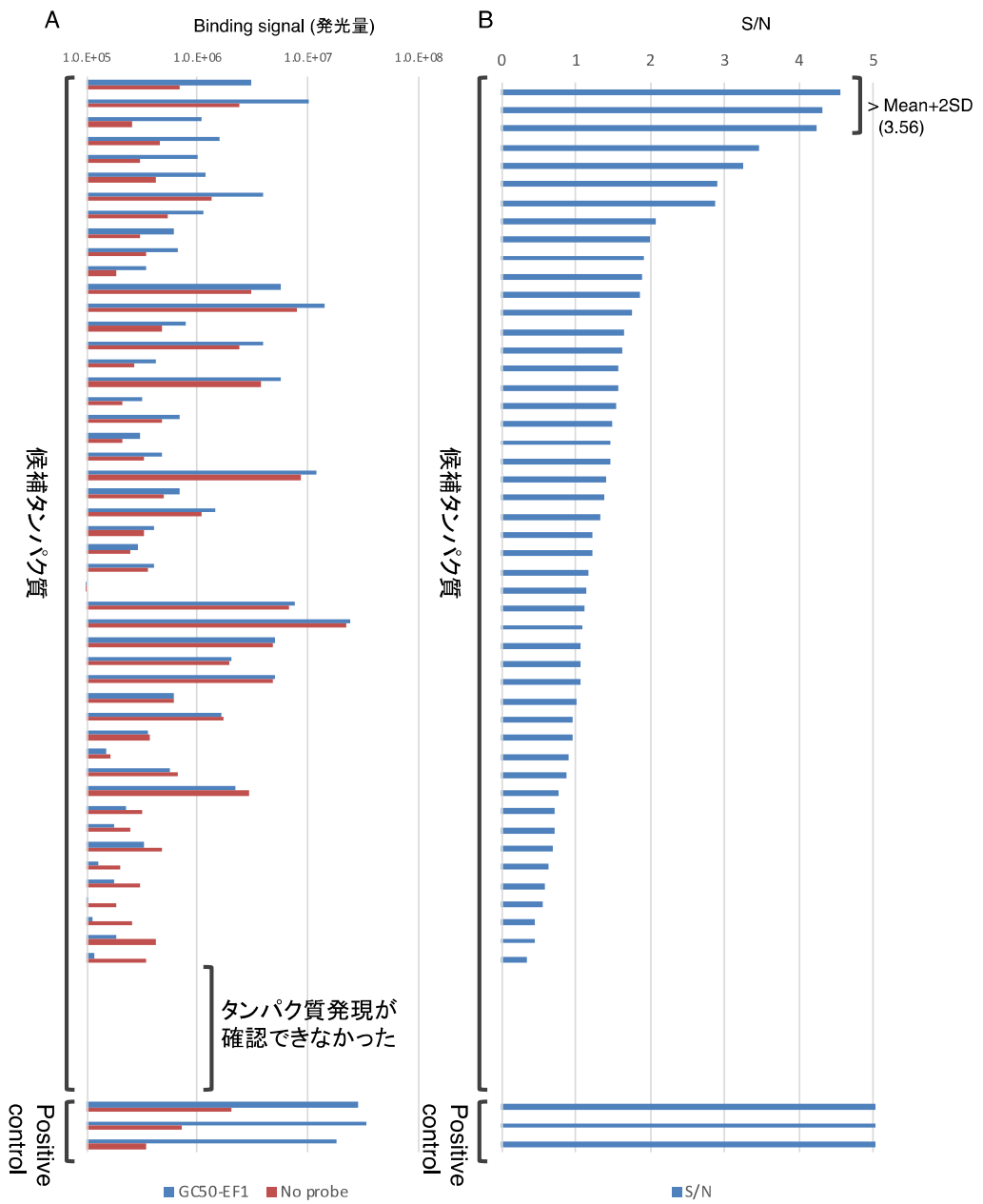


図 3.2.1.1.1-3-1. 新規 DNA 結合性タンパク質のスクリーニング. DNA プローブへの結合 (A) 及び S/N(B)の結果

f) 新規核酸性ゲノム編集モジュールの開発

(神戸大学・西田敬二、九州大学・中村崇裕、産業技術総合研究所・宮岸真；2019～2020年)

新規モジュール候補として分子量が従来の SpCas9 よりも小さく、配列デザインの制約が小さいと予想される Agronaute 類タンパク質についてデータベースおよび文献探索を行い、細菌由来の Ago タンパク質 (pAgo) を採用した (図 3.2.1.1.1-3-2)。

まずその機能性を評価するため、大腸菌内で発現して精製タンパク質を調整した。このタンパク質の活性を評価するべく、ガイド RNA および標的 DNA との結合性を試験管内について試験したところ、5'末端がリン酸化されたガイド RNA のみを特異的に取り込み、それと相補的な配列を持つ一本鎖 DNA と特異的に結合し、タンパク質-RNA-DNA 複合体形成することが確認でき

(図 3.2.1.1.1-3-3)、新たなゲノム編集モジュールとしての基本機能を実証できた。さらに、より生理的な条件での動作と、遺伝子発現への作用を検証するため、試験管内で遺伝子転写を行っている二重鎖 DNA への結合性を評価したところ、配列依存的に転写を阻害する効果が見出された (図 3.2.1.1.1-3-4)。これにより発現している遺伝子領域に結合し、その転写を抑制するような遺伝子機能操作が可能であることが示された。

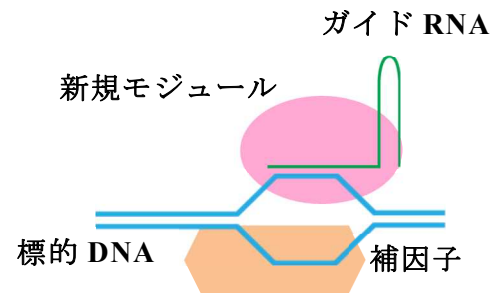


図 3.2.1.1.1-3-2. 新規核酸性モジュールの概念図

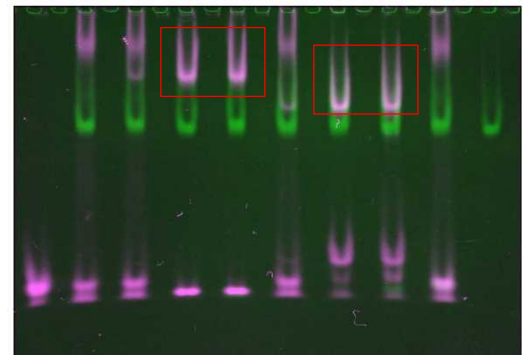
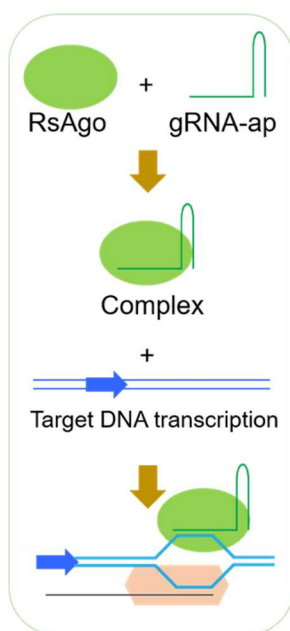
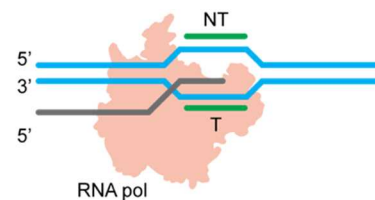


図 3.2.1.1.1-3-3. pAgo-RNA-DNA 複合体の形成

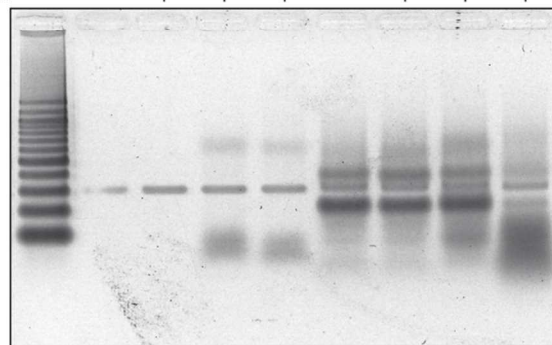


mRNAの転写によりDNAが開かれた部位に結合させる

Substrate:
T7 promoter + Target site



	T7 pro + gRNA trgt (300-bp PCR frag.)							
T7 RNA pol:	-	-	-	-	+	+	+	+
gRNA:	-	-	T	NT	-	-	T	NT
RsAgo:	-	+	+	+	-	+	+	+



RsAgo-gRNA
T7複合体
鑄型DNA
転写産物
中途転写産物?

2% agarose gel in TBE (stained w/ SYBR Gold)

図 3.2.1.1.1-3-4. RsAgo による遺伝子転写抑制

さらに、様々なゲノム編集機能を付与するためのエフェクター部位との融合形態を検討すべく、まず DNA 切断活性を有する FokI ヌクレアーゼドメインと、RNA アプタマーを介した複合体を構築した。大腸菌内での実験系構築として、ガイド RNA の発現には 5'-U からの発現を可能にする特殊な酵母由来のプロモーターを採用した。またレポーターとしては、標的配列の切断により相同組み換えが誘発され、薬剤耐性が発現するベクターを作成して試験した。実際にこれらの構成で種々の融合形態とプロモーターの組み合わせを試験し、特定の組み合わせにおいて、標的配列を有するベクターの組換え率が 30~100 倍に向上した (図 3.2.1.1.1-3-5)。

またさらに、異なるエフェクターとして点変異を誘導できるデアミナーゼおよびグリコシラーゼとの融合形態についても様々な構成を設計して検討を行った。一般性を示すべく、真核生物である酵母において、ゲノム上の遺伝子配列を標的として、薬剤耐性変異による検出系を用いて試験し、特定の形態において変異導入を示唆するデータを取得した (図 3.2.1.1.1-2-6)。これら一連の成果に基づいて、新たなゲノム編集モジュールとして特許出願を行った。

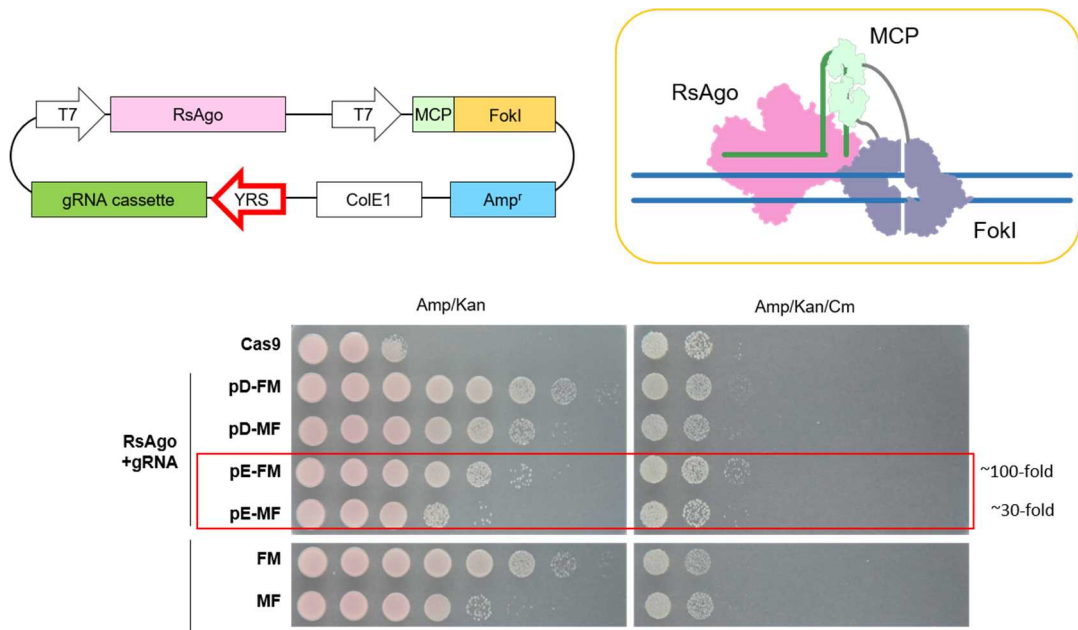


図 3.2.1.1.1-3-5. RsAgo とエフェクターとの融合形態 1

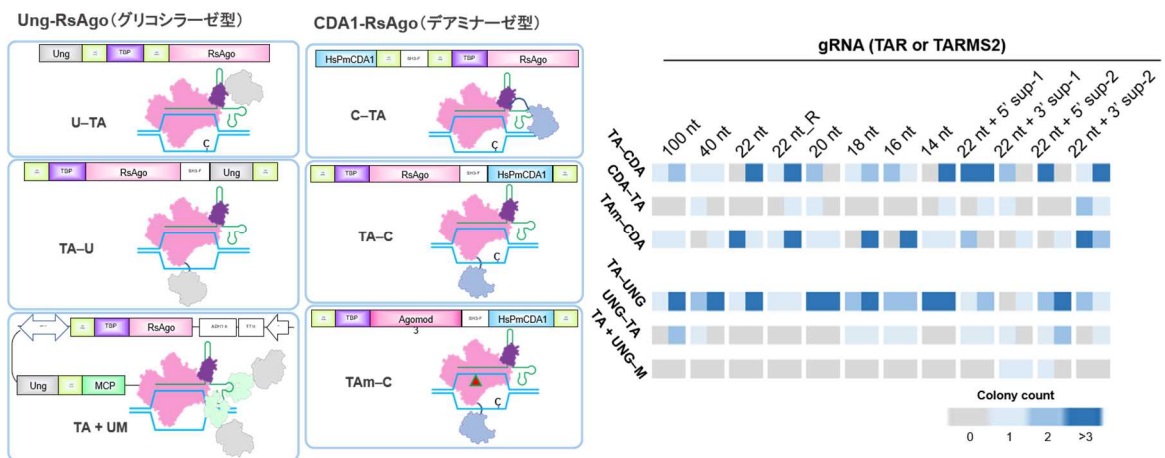


図 3.2.1.1.1-3-6. RsAgo とエフェクターとの融合形態 2 と編集効果の検証

(2) 最終目標の達成度及び研究開発成果の意義

既存のゲノム編集モジュールとは全く異なる、タンパク質性の新規のゲノム編集モジュールの複数候補、および核酸性の新規のゲノム編集モジュールを開発し、その一部において特許出願を行った。実用植物への適用には至らなかったが、ほぼ目標は達成できたと考える。今後は、開発したモジュールの動作特性を詳細に解析するとともに、様々なエフェクター機能を付加して幅広い生物種において実用的な用途を開発して提供していくことが重要である。

A-4 進化工学のおよび分子動力学的手法による新規ゲノム編集システムの創出

(徳島大学・刑部敬史、理化学研究所・岡田康史、近畿大学・宮下尚之、明治大学・矢野健太郎)

実施概要

事業項目 1: 進化工学的手法による新規ゲノム編集ツールの開発 (徳島大学)

微生物ゲノムから探索した未同定の新規ゲノム編集ツール候補 (TiD システムと命名) の標的認識特性および切断特性を明らかにし、TiD システムを用いた植物細胞における変異導入を実証する。また TiD システムを構成するタンパク質のアミノ酸置換やドメイン置換などの進化工学的手法によりゲノム編集ツールの機能性を高める。

事業項目 2: in silico 解析による新規ゲノム編集機能ドメインの探索 (明治大学)

微生物由来のゲノムからゲノム編集システムに利用できる新規機能ドメインを解析し、広範な知財権獲得の基盤を作る。

事業項目 3: 構造学的・分子動力学解析による新規ヌクレアーゼシステムの改変技術確立 (理化学研究所、近畿大学)

TiD システムのタンパク質結晶構造学および分子動力学解析を行い、TiD システムを構成するタンパク質因子の改変を行い、従来には存在しない高活性型新規ゲノム編集ツール基盤を構築する。

事業項目 4: ゲノム編集技術の共通評価基盤整備 (徳島大学、理化学研究所、近畿大学)

徳島大実施項目「ゲノム編集技術、およびゲノム編集植物の共通評価基盤整備」

理研実施項目「ゲノム編集技術の安全性評価基盤整備」

近畿大実施項目「分子動力学解析によるゲノム編集技術開発支援」

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み 本成果を基にしたベンチャー企業の設立を計画している。また、プロジェクトで構築したゲノム編集ネットワーク、関連するベンチャー企業、または所属機関の産学連携部と共同して実用化、事業化を進める。ゲノム編集ネットワークの中核機関である広島大学、九州大学に設置した共通評価基盤等を活用し、企業とのフィージビリティスタディを促進させる。

(1) 研究開発の成果

事業項目 1: 進化工学的手法による新規ゲノム編集ツールの開発 (徳島大学)

従来技術 ZFN、TALEN、および CRISPR-Cas9 とは異なる特徴を有する新規ゲノム編集システムとして、*Microcystis aeruginosa* 由来の CRISPR-Cas タイプ I-D を同定 (TiD システムと命名) し、TiD システムによる植物ゲノム上の標的遺伝子改変を検討した。まず、TiD が標的配列を認識するために必要なコンセンサス配列 (プロトスペーサー隣接モチーフ:PAM) の決定を行った。大腸菌内で TiD システムを発現させるスクリーニング系を構築し、標的配列コンセンサスを選抜したところ、PAM 配列は 5'-GTA-3'、5'-GTC-3'あるいは 5'-GTT-3'のいずれかが利用できることが分かった。また標的配列には、PAM に続くランダムな 35-36 塩基が利用できること

も明らかとなった（図 3.2.1.1.1-4-1）。TiD の標的配列長は、既存の CRISPR 技術である Cas9 や Cas12a の標的配列長と比較し、14~15 塩基長い配列を利用するため、TiD の標的認識は Cas9 や Cas12a よりも特異性が高いと考えられ、実際に *in silico* 解析から TiD における、標的配列に対する類似配列（オフターゲット）候補が Cas9 のオフターゲット候補数に比べ極めて少ないということが分かった。

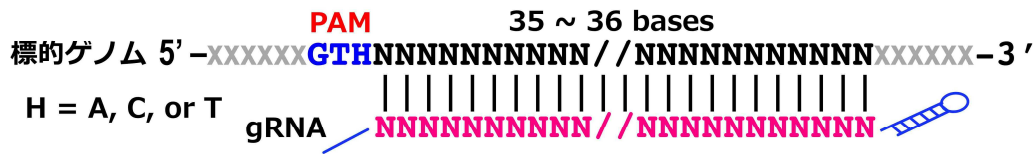


図 3.2.1.1.1-4-1. TiD における PAM および標的配列の構造

引き続き、植物における変異導入の実証を行うために、決定した PAM 配列に基づいて、TiD システムによるトマト標的遺伝子としてトマト *IAA9* 遺伝子 (*SlIAA9*) 上に変異導入を行うための gRNA を設計した。標的配列に相補的な gRNA 分子と TiD システムを構成する Cas タンパク質をトマト細胞において発現させるバイナリーベクターを構築し、遺伝子導入を行った。TiD システムを発現させたトマト葉片から増殖するカルス細胞および再分化個体から DNA を調製し、変異解析を行ったところ、設計した標的配列上に変異導入されていることが明らかとなった。TiD システムを導入した個体の約 20% で変異導入に成功しており、中間目標値である変異導入効率 10-20% を達成した（図 3.2.1.1.1-4-2）。

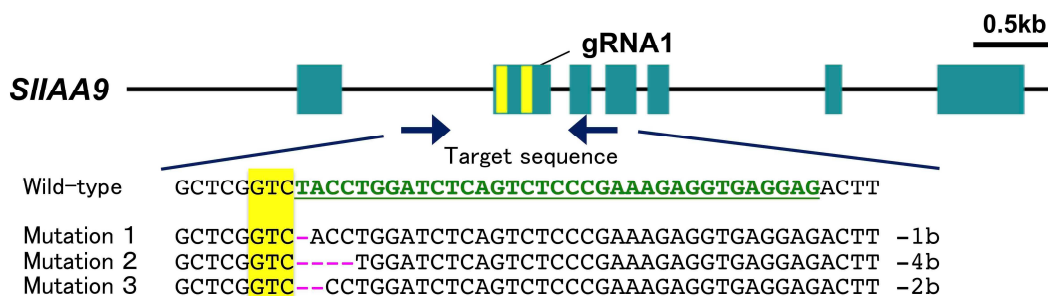


図 3.2.1.1.1-4-2. TiD によりトマト *IAA9* 遺伝子標的上に導入された短い遺伝子欠損変異

TiD システム発現ベクターの改良を行い、TiD を構成する Cas 遺伝子の発現プロモーターを高発現構成的プロモーターに変更し、継続して TiD による変異導入トマトの作出を進めたところ、TiD によるゲノム編集植物個体から 100% の体細胞変異を示すトマト植物体を得られた。また、得られた *sliaa9* ノックアウト個体は、期待される表現型である単為結果性を示した（図 3.2.1.1.1-4-3）。さらには、100% の体細胞変異を示すトマト植物体から得られた次世代植物体では、TiD により導入された変異が次世代に伝搬していることも確かめられ、最終目標値である変異導入効率 100% を達成した。

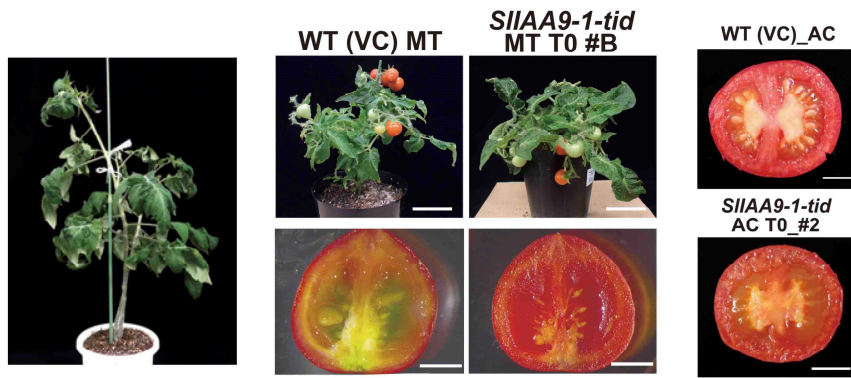


図 3.2.1.1.1-4-3. TiD により作出されたトマト *IAA9* ノックアウト植物体

TiD による変異導入について、さらに詳細に解析を進めたところ、図 3.2.1.1.1-4-2 に示した変異様式である短い塩基欠失だけでなく、標的箇所において数 kb 以上の長鎖ゲノム DNA 欠失の変異が導入されることが明らかとなった（図 3.2.1.1.1-4-4）。以上から、TiD は既存のゲノム編集技術である Cas9 と同様の短い塩基欠失に加え、Cas9 では誘導できない長鎖 DNA 欠失が可能であることが明らかとなった。

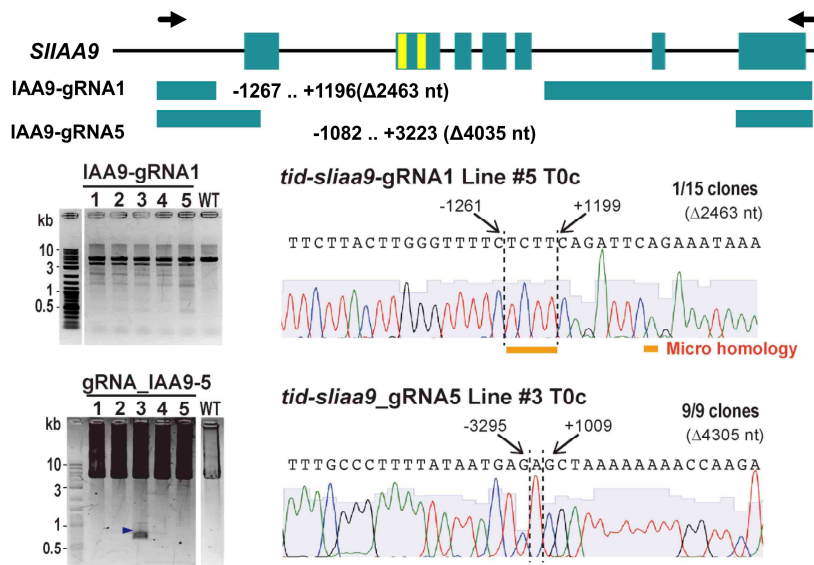


図 3.2.1.1.1-4-4. TiD による長鎖 DNA 欠失変異

パネル上段: *SIIAA9* 遺伝子構造と長鎖 DNA 欠失が生じた領域. パネル左中段および左下段: Long PCR による長鎖ゲノム DNA 欠失変異解析. パネル右中段および右下段: サンガーシーケンスによる長鎖ゲノム DNA 欠失変異解析.

図 3.2.1.1.1-4-2 および図 3.2.1.1.1-4-4 に示すような多様な変異の導入が、TiD を構成するいずれの Cas タンパク質因子の機能によるのか、解析を進めた。その結果、TiD が属する CRISPR-Cas タイプ I における切断因子である Cas3 ではなく、Cas10d が DNA 切断活性を示すことが明らかとなった（図 3.2.1.1.1-4-5）。Cas10d は、CRISPR-Cas システム中、唯一 TiD ファミリーに見出される Cas タンパク質因子であり、DNA 切断活性の他、PAM 配列の認識にも機能していることがわかった。また、Cas10d によるゲノム編集活性は、Cas10d の N 末端に位置す

る HD ドメインが重要な配列であり、HD ドメインにアミノ酸置換を導入した変異型 Cas10d によって、活性が失われることが明らかとなった。

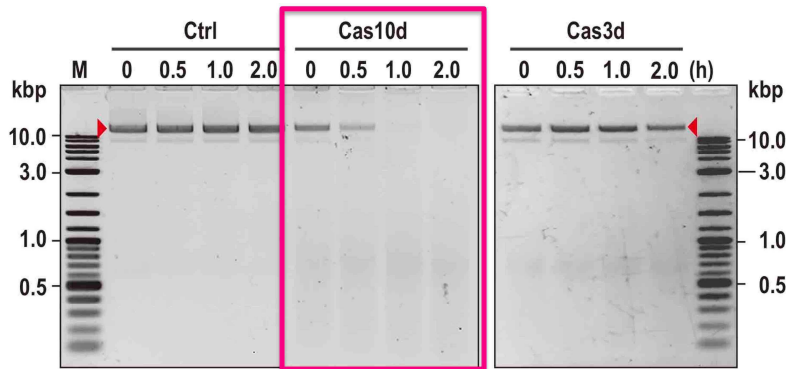


図 3.2.1.1.1-4-5. Cas10d における一本鎖 DNA 切断活性解析

変異型 Cas10d について、さらに解析を進めたところ、変異型 Cas10d を含む TiD 複合体はゲノム編集活性を失うが、Cas タンパク質複合体形成および PAM 配列認識の機能は失われないことがわかった。そこで、変異型 Cas10d を利用した TiD による塩基編集ツールの開発を進めることとした。変異型 Cas10d の C 末端側にシトシンデアミナーゼ遺伝子のデアミナーゼドメインを融合させたキメラタンパク質 (dCas10d-CD) を作製し、大腸菌内における塩基編集活性を解析した。その結果、TiD が塩基編集技術に利用できることが確認された。

Cas10d に加え、事業項目 3 における理化学研究所が実施したタンパク質構造学解析および近畿大学が実施した分子動力的解析から、TiD を構成する複数の Cas タンパク質の構造学的特徴が明らかとなってきた。そこで TiD における標的認識特性を改良するため、gRNA への結合と gRNA-標的 DNA の対合安定化に関与する Cas7d に注目して解析を行うこととした。それぞれ Cas タンパク質と RNA の結合に関わるアミノ酸配列に注目し、変異 Cas タンパク質を作製し機能の解析を行った。その結果、分子動力的に同定されたアミノ酸はすべて、Cas7d の RNA 結合特性に重要であり、いずれの変異型 Cas タンパク質を含む TiD システムでは、ゲノム編集活性が失われることが分かった。以上から、Cas7d における gRNA 作用アミノ酸種と部位が同定されたため、タンパク質構造学的改変によって高活性型 Cas6d および Cas7d への改変が期待できる。

特許出願を行った *M. aeruginosa* 由来の TiD の利用をさらに拡大させるため、明治大学が実施した事業項目 2 と連携し、明治大学が *in silico* 解析により見出した *M. aeruginosa* 由来 TiD とは異なる TiD 亜種、および TiD とは種類が異なる有用ツールの候補群から編集活性を有すると予測される新規ツール候補について、ゲノム編集活性の解析を行った。動物培養細胞におけるルシフェラーゼ遺伝子組換えレポーターアッセイにより解析したところ、TiD 亜種から 1 種、また TiD とは種類が異なる有用ツールの候補群から 1 種について、動物細胞内においてゲノム編集活性を示すことが明らかとなった。

事業項目 2: *in silico* 解析による新規ゲノム編集機能ドメインの探索 (明治大学)

微生物メタゲノムデータベースから広く新規ゲノム編集システムの検索を行うために、まず TiD ファミリーの網羅的探索が可能なアルゴリズムと解析パイプラインおよび Web 表示アプリケーションの開発を行った (図 3.2.1.1.1-4-6)。作成したアプリケーションにより網羅的な

TiD ファミリーの探索が可能となり、新たにゲノム編集ツールとして新規に利用可能と考えられる候補遺伝子群を 11 セット見出した (図 3.2.1.1.1-4-7: 中間目標達成)。

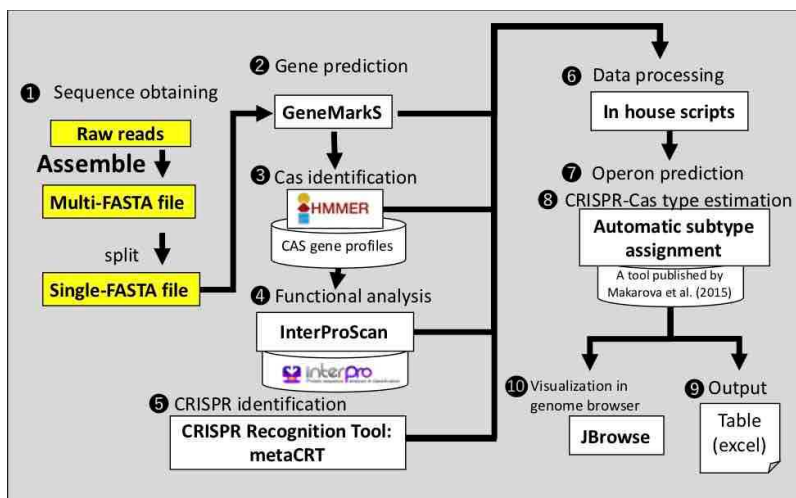


図 3.2.1.1.1-4-6. CRISPR ファミリーの網羅的探索が可能なアルゴリズムと解析パイプライン

CRISPR/CAS operon subtype prediction (新たな982 profiles)

Operon ID	Start	End	Num genes	Estimated type	Top 5 similar types
OPERON_1	513817	525304	9	I-D	I-D,I-D,I-D,I-D,I-D
OPERON_2	900690	902388	2	III-D	III-A,I-B,III-C,I-C,III-D
OPERON_3	2207279	2209789	2	I-C	I-C,I-C,I-C,I-C,I-C
OPERON_4	3196834	3203723	3	I-C	I-C,I-C,I-B,I-B,I-F
OPERON_5	4306737	4308031	2	I-B	III-A,I-F,III-C,I-B,I-B

CRISPR/CAS operon subtype prediction (以前の132 profiles)

Operon ID	Start	End	Num genes	Estimated type	Top similar types
OPERON_1	513817	523760	8	I-D	I-D,I-D,I-D,I-D,I-D

図 3.2.1.1.1-4-7. 構築した探索アルゴリズムと解析パイプラインにより探索した候補遺伝子群セット

次に、機能ドメインの探索を加速化するために、解析パイプラインに投入にする大規模微生物ゲノム配列情報の高品質化、ならびに、解析パイプラインでの TiD 候補の同定精度の向上を行った。その結果、大規模微生物ゲノム配列情報から約 340 個の TiD 候補配列を同定した。これらの候補配列群を用い、TiD の構成遺伝子である Cas3、Cas5、Cas7、Cas10 の翻訳配列がもつ保存性の高いドメイン領域を配列アライメントより探索した。その結果、多数の候補が共有する 6 個 (Cas3)、5 個 (Cas5)、5 個 (Cas7)、9 個 (Cas10) のドメイン候補を検出できた (2019 年度目標達成)。

多数の TiD 候補の中から高い編集活性を有すると予測される候補を効率的に同定するために、TiD 候補をカタログ化した。カタログ化に用いる主要情報として、各ゲノム配列情報の由来 (生

物種名)、ドメイン・パターン、CRISPR リポート配列を統合活用した。由来(生物種名)の情報は、マニュアル・キュレーションによって整備した高精度・高品質配列情報を用いて付与した。ドメイン・パターン情報は、上述の解析から決定したドメイン領域の配列解析に基づき取得した(図 3.2.1.1.1-4-8)。各ゲノム配列が内包する CRISPR リポート配列情報は、リポート検出プログラムを用いて取得した後に、リポート配列パターンに基づき TiD 候補群を分類した(図 3.2.1.1.1-4-9: 2019 年度目標達成)。



図 3.2.1.1.1-4-8. TiD 候補のカタログ化に活用したドメイン・パターン情報

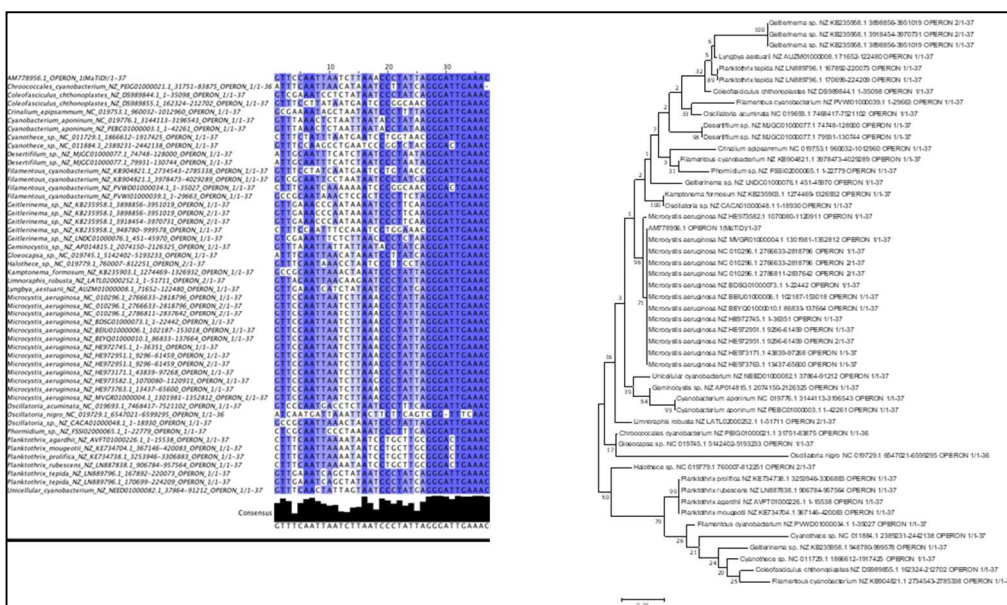


図 3.2.1.1.1-4-9. TiD 候補のカタログ化に活用したドメイン・パターン情報

新規ツール候補の有効性を評価するために、候補間の連関性を示すネットワークを構築した。ここでは、カタログ情報を用い、CRISPR リポート配列と特異的ドメイン配列のそれぞれについて候補間の連関性を算出し、ネットワークによる候補分類を可能とした(図 3.2.1.1.1-4-10)。そして、TiD、および、TiD とは種類が異なる有用ツールの候補群から編集活性を有すると予測される新規ツール候補を選抜した(2020 年度目標達成)。

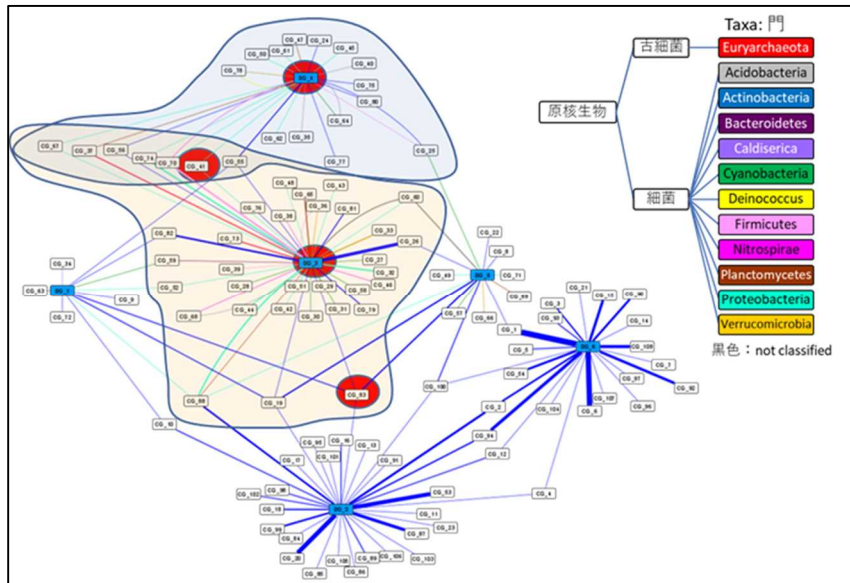


図 3.2.1.1.1-4-10 CRISPR リピート配列、特異的ドメイン配列情報から抽出した候補間のネットワーク解析に基づく候補分類

1-1-3-3. 事業項目 3: 構造学的・分子動力的解析による新規ヌクレアーゼシステムの改変技術確立 (理化学研究所、近畿大学)

(理化学研究所による成果)

新規ゲノム編集ツールとして見出した TiD システムを構成するタンパク質因子について、タンパク質結晶構造解析を行うために、大腸菌およびバキュロウィルスによるタンパク質大量発現系を構築し、タンパク質精製を行った。TiD 複合体の構造予測においてボトルネックとなっている Cas10d について、Cas10d タンパク質単独および Cas10d タンパク質を含む TiD システムを構成するタンパク質因子精製に成功し (図 3.2.1.1.1-4-11)、結晶化を進めた。

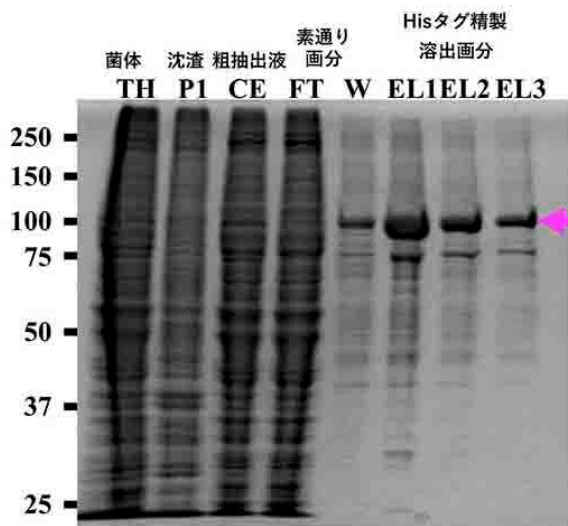


図 3.2.1.1.1-4-11. Cas10d タンパク質因子の異種発現と精製

TiD 複合体構成タンパク質因子のうち、Cas6d の構造解析については、高純度大量精製および結晶化に成功し、分解能 2.2~2.7 Å で 6 個の独立した構造を解くことが出来た (図 3.2.1.1.1-4-12)。これにより、分子動力学解析のベースとなる良質なデータセットを近畿大グループに提供することが出来た。さらに、既存の他の CRISPR (たとえば type 3B) の Cas6 の構造と比較した結果、バックボーンとなる部分の構造はよく保存されているが、crRNA が結合する部分に大きな構造的違いが認められ、機能改変の標的部位の候補を考える上での構造学的示唆が与えられた。



図 3.2.1.1.1-4-12. Cas6d タンパク質の結晶構造解析

Cas10d については、精製条件をさらに改良して電子顕微鏡で観察した結果、モノマーからヘキサマー、ポリマーまで多様な会合状態で存在することが示唆された（図 3.2.1.1.1-4-13）。さらに、クライオ電子顕微鏡法単粒子解析により 13Å の構造モデルが得られた。これを既知の他の CRISPR の Cas10 と比較した結果、TiD の Cas10d は、PAM 認識とヘリケース活性を担う中央ドメインで既知の Cas10 と異なるユニークな構造をとっていることが示され、TiD システムが他 CRISPR-Cas システムと異なる性質を示す要因であることが示唆された。

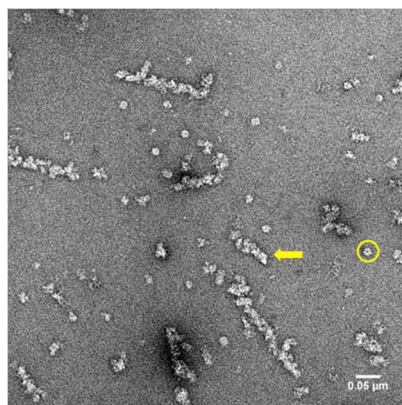


図 3.2.1.1.1-4-13. 電子顕微鏡による精製 Cas10d タンパク質の構造解析

(近畿大学の成果)

TiD システムを構成するタンパク質因子のうち、Cas10d を除く、Cas3d、Cas5d、Cas6d、Cas7d のタンパク質構造モデリングを実施し、予測構造モデルを構築した。また構造予測から考えられる複合体構造モデルを作成し（図 3.2.1.1.1-4-14）、分子動力的解析を進めた（中間目標達成）。

本研究では、TiD と gRNA との相互作用を安定化させることで DNA との結合力を上げ、オフターゲット結合を抑えるという考えのもとで、TiD と gRNA との相互作用を調べ、変異配列提案を行った。まず、TiD の複合体構造が解けていなかったため、その他 CRISPR の複合体構造（CRISPR-Cas type I-E および type I-F）の長時間分子動力学（MD）シミュレーションを実施した（図 3.2.1.1.1-4-15）。これにより DNA/gRNA と CRISPR-Cas type I システム（特に Cas7）との相互作用が明らかになり、拡散との結合に重要な部位が明らかになった。

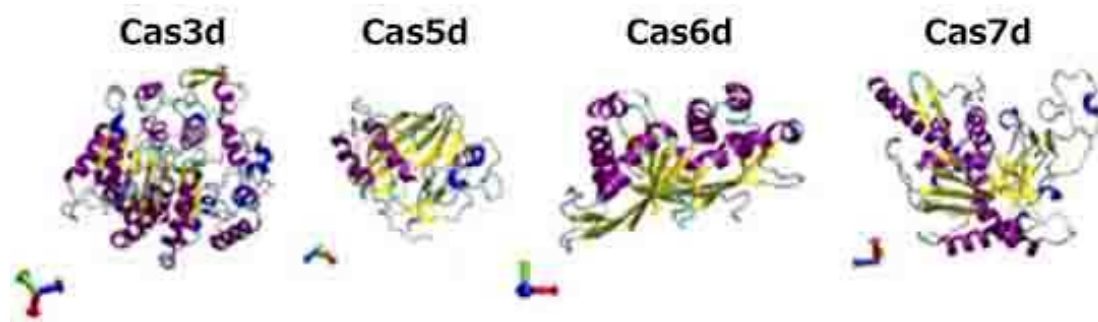


図 3.2.1.1.1-4-14. Cas3d、Cas5d、Cas6d および Cas7d のタンパク質構造モデリング

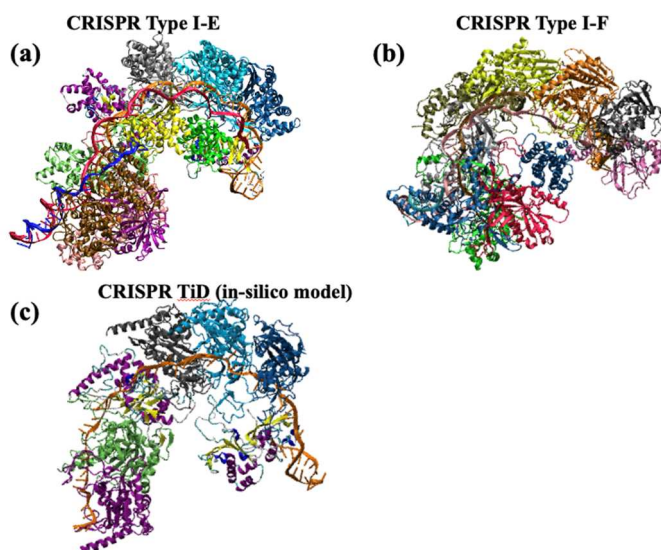


図 3.2.1.1.1-4-15. CRISPR-Cas type I-E、CRISPR-Cas type I-F および TiD の複合体構造モデルと分子動力学シミュレーション

これらの知見と、in-silico modeling した Cas7d と gRNA との TiD 複合体モデルの MD シミュレーションおよび解析を行い、Cas7d と gRNA との相互作用で重要なアミノ酸を特定した。また、改良のための変異配列を 5 件以上提案した。さらに、徳島大にその変異配列提案を行い、その検証実験結果を反映させながら、複数件の変異配列の提案を行った。

また、理化学研究所により Cas6d の結晶構造解析が行われ、候補構造が 6 つ得られた。これらの gRNA との複合体構造をモデリングし、MD 解析を行ったところ、そのうちの 1 つの構造が非常に安定した動力学を示すことがわかった。その構造についての動力学の詳細を調べることで、gRNA との相互作用をより安定にする変異候補を提案した。

(2) 最終目標の達成度及び研究開発成果の意義

本事業では、海外のゲノム編集技術知財に依存せず、日本国内の企業が有利に利用できる国産の RNA-DNA 標的認識型ゲノム編集技術の開発を進めた。

本事業の実施のために計画した各事業項目の成果について、目的に照らした達成状況は下記のとおりである。

事業項目 1: 進化工学的手法による新規ゲノム編集ツールの開発 (担当機関: 徳島大)

海外の知財に依存せずに利用できる新規の国産ゲノム編集技術として、*M. aeruginosa* 由来の CRISPR-Cas システム TiD を同定し、変異植物体が作出可能な新規の国産ゲノム編集技術として確立した。TiD を改変し、塩基編集技術として利用可能な技術の改良に成功した。理研-近畿大の構造学的解析から同定されたアミノ酸部位について、生体内における TiD の活性に必須であることを明らかにした。明治大グループが見出した、TiD とは異なる新規 gRNA 性ゲノム編集ツールのツール化を進め、大腸菌および動物細胞内でゲノム編集活性の検出に成功した。

事業項目 2: in silico 解析による新規ゲノム編集機能ドメインの探索 (担当機関: 明治大)

新規ゲノム編集システムを検索するシステムの構築に成功した。構築した検索システムを用いて、徳島大が解析している TiD システムの類縁ファミリーの探索を行い、新たなサブファミリーを見出した。さらに、メタゲノムデータベースより、TiD とは異なる新規 gRNA 性ゲノム編集ツール候補遺伝子群を複数見出した。

事業項目 3: 構造学的・分子動力的解析による新規ヌクレアーゼシステムの改変技術確立 (担当機関: 理研、近畿大)

新規ゲノム編集システム TiD を構成するタンパク質について、構造生物学的解析を進めた。精製 Cas タンパク質を用いて結晶化タンパク質の X 線回折、あるいはクライオ電子顕微鏡法単粒子解析を行い、データセットの取得に成功し、TiD を構成する重要な Cas タンパク質について構造モデルの作成に成功した (理研成果)。また in silico モデルの複合体構造を用いた TiD の分子動力学 (MD) シミュレーションを進め、TiD 複合体の特性改変に関わる構造モデルを予測し、重要な機能的アミノ酸部位を同定した (近畿大成果)。

事業項目 4: ゲノム編集技術の共通基盤整備 (担当機関: 徳島大、理研、近畿大)

NEDO スマートセルプロジェクトのゲノム編集開発グループ内で開発した新技術について、共通の評価系を確立し、プロジェクト全体にて互換性のあるゲノム編集ツールの共通評価・活用基盤の整備を行った (徳島大成果)。また、ゲノム編集開発グループにおいて開発を進めているツールについて、オフターゲット活性の評価を細胞レベルで行うため、視覚的計測するシステムを構築した (理研成果)。さらに、ゲノム編集開発グループ間の分子動力的解析の支援を実施した (近畿大成果)。

上記の達成状況に示したとおり、本事業は、各事業項目を担当する研究機関の成果および研究機関間の連携の成果により、十分に研究開発目標を達成できた。本事業で開発された新規国産ゲノム編集技術 TiD は、プロジェクト期間内の 2019 年度から、助成事業「シソ代謝系制御技術による健康機能性成分の高効率増産技術開発」(アミノアップ) および「医薬用中間体原料植物の代謝改変によるアルカロイド製造技術の開発」(味の素) との共同研究に活用され、両事業の成果達成に貢献した。また、TiD の技術移転による大学発ベンチャー設立の計画を進めており、ベンチャーを介した TiD 技術の事業化により TiD の産業利用が期待できる。事業項目 4 で開発された核内一分子イメージングによる安全性評価技術は、これまでのゲノム編集におけるオフターゲット評価とは異なるユニークな技術であり、生体内でのオフターゲット活性評価法として実用化を目指す。

以上、本事業の成果により、当初目標とした海外のゲノム編集技術知財に依存しない新規国産ゲノム編集技術の開発に成功した。今後は、TiD 技術を社会実装するためのスキームを検討していく。特に、TiD の変異効率のさらなる向上に加えて、TiD 技術の特徴である長鎖ゲノム DNA 欠失変異を利用した有用形質を示すゲノム編集生物の作出事例を増やし、産業上有効な実証結果の蓄積を行うことで、TiD の実用化、事業化の道筋を強化することを目指す。

B-1～3 多様なゲノム改変技術の開発（神戸大学・西田敬二）

(1) 研究開発の成果

【概要及び目的】

プロジェクトにおける位置づけ 既存の技術では対応できない、より高度で多様なニーズに対応できるゲノム改変技術群の確立、および実用植物への適用を行って産業応用を実現する。具体的には高効率育種を実現する標的バリエーション変異ライブラリ技術の構築、植物での物質生産性を高める新規ノックイン技術、多彩な生物材料を対象にできる多コピー改変技術、の開発を行う。

技術的な重要性 ①ゲノムの特定領域にバリエーションを生み出す世界で初めての植物変異導入法が確立できれば超高効率植物育種が実現できる（B01）。②高等植物での高効率ノックイン技術は物質生産等において必須の技術であり、これまで適用が困難であった様々な有用植物での実現が求められている（B02）。③葉緑体やミトコンドリアは物質生産の場としてあるいは雄性不稔に関わるため植物育種上重要なターゲットであるが、幅広く適用できる有効な技術はまだ確立できておらず、特にその多コピーオルガネラゲノムの純化が重要な課題である（B03）。

実施概要（解決する手法） ①微生物で実証された技術を植物に適用し、育種技術として確立する。②植物培養細胞への直接形質転換法を確立し、概念実証を行いながら実用化に必要な改変を施す。③選抜マーカー、導入手法、ゲノム編集技術等の要素技術を開発しながら組み合わせることで実用的な技術として完成させる。

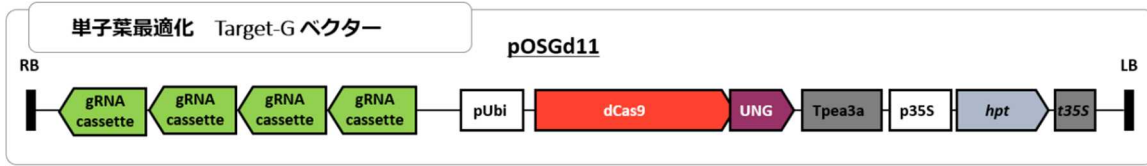
最終目標 ①Target-Gによってモデル植物において標的遺伝子変異ライブラリ（500塩基長変異率5%以上）を構築する。実用植物において標的遺伝子に変異導入を実現して、高機能品生産への有用性を実証する。②モデル植物において安定的なノックイン（従来の10倍以上、効率として数%）を確立し、実用植物においてノックインを実現し、高機能品生産に適用する。③オルガネラホモ化装置を確立して提供する（5%以上）。高倍数性実用植物のホモ化を実現する。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み すでに設立したベンチャー企業、バイオパレット株式会社で実用化・事業化を進めている。また、プロジェクトで構築したゲノム編集ネットワーク、関連するベンチャー企業、または所属機関の産学連携部と共同して実用化、事業化を進める。ゲノム編集ネットワークの中核機関である広島大学、九州大学に設置した共通評価基盤等を活用し、企業とのフィージビリティスタディを促進させる。

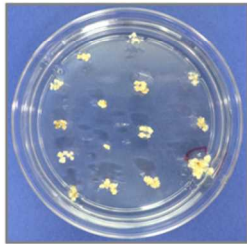
【成果】

① 標的バリエーション変異ライブラリの構築の実現 ゲノムの配列を人為的に操作する技術として、様々なバリエーションを導入するようなことはこれまで直接的に実現できず、特に植物育種分野において希求される技術であった。我々はこれまでにDNAグリコシラーゼを標的化するTarget-G技術によって、任意のゲノム特定領域のバリエーション化を行う技術を酵母において実証している。まず、この技術の植物細胞での適用可能性を検証すべくシロイヌナズナ T87細胞を用いて植物に最適化したTarget-G発現コンストラクトを導入した。その結果、標的としたゲノム領域周辺に様々な変異導入が確認された（図3.2.1.1.2-1-1）。

さらに、様々な変異を有する改変イネ個体を作成して育種技術としての確立と一般性を示すべく、以下の研究を進めた。イネに適用するため、まず単子葉最適化したTarget-Gベクターを構築し、アグロバクテリウム法にてイネカルスにベクター導入を行った。得られた形質転換体の標的配列をシーケンス解析したところ、周辺50塩基内外の領域に様々な変異が高頻度で検出された。



アグロバクテリウムによるイネカルスへのTarget-Gベクター導入



pOSGd11(d21)x4 HygR Calli Direct sequencing

OsClpP5 遺伝子

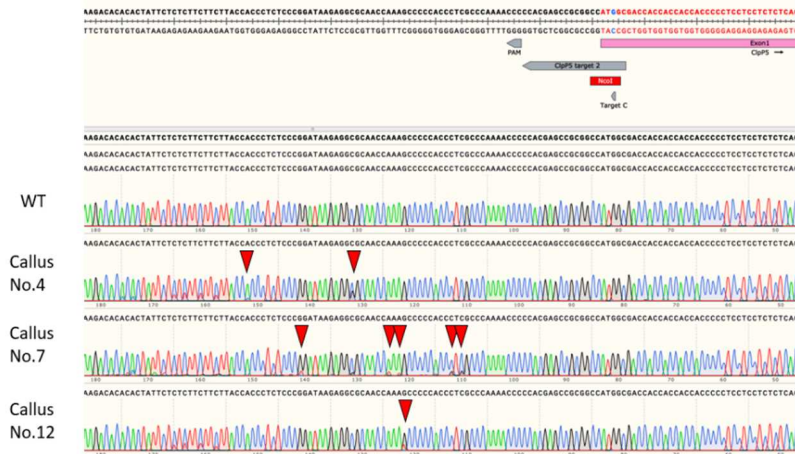


図 3.2.1.1.2-1-1. Target-G によるイネカルスでの変異導入

異なる 4 遺伝子の標的配列について、その変異導入効率を評価したところ、ベクター保持ラインにおいては、いずれも 50%前後の高効率の変異導入がみられた (図 3.2.1.1.2-1-2)。これら一連の成果について特許出願を行った。

②新規組み換え機構による高効率ノックイン技術の開発

高等植物は相同組み換え効率が低く、狙った通りの部位に精密に配列を挿入置換することは、多くの実用的な植物種では実質的にほぼ不可能であった。これに対して本プロジェクトでは植物細胞への導入手法の開発とともにゲノムへの新奇なノックイン機構を採用することで解決を図る。植物細胞は厚い細胞壁をもつことにより DNA 等の分子の細胞内へのデリバリーが困難である。これまでは細胞壁を消化酵素によって除去したプロトプラストが用いられたが、その場合はその後の再分化効率が悪く、かつ適用できる種が限られるなど、実用性の面で問題があった。近年では電気穿孔法において複雑なパルス进行操作するパラメーター設定が可能になってきたこと、またリポソーム技術についても改良が進んでいることから、前処理が容易でありかつ再分化可能な状態の植物細胞に直接導入する可能性を検討することとした。モデルとしてシロイヌナズナ T87 細胞を用いて、GFP 発現ベクターを導入すべく様々な条件を検討した結果、細胞壁を保持した状態での植物細胞に高効率に直接導入できる条件を見出すことができた (図 3.2.1.1.2-1-3)。

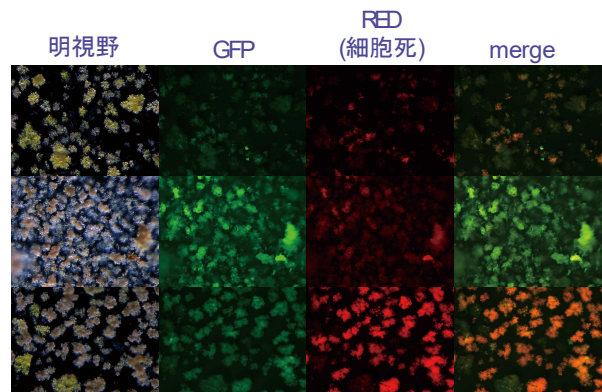


図 3.2.1.1.2-1-2. シロイヌナズナ培養細胞への遺伝子送達

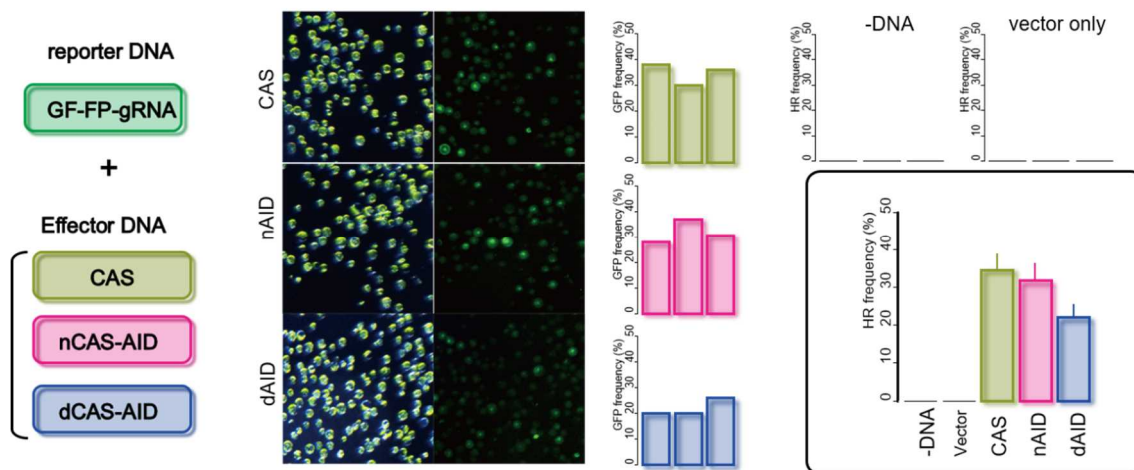


図 3.2.1.1.2-1-3. シロイヌナズナ培養細胞での新奇組換えの実証実験

次に、新奇な組換え機構として、脱アミノ化による相同組み換え誘発を植物において実証するため、レポーターとして相同組み換えによって GFP が発現する GF-GP ベクターと、Target-AID ベクターとを共導入し、GFP 蛍光を観察した。その結果、20%前後の細胞で組換えを示す GFP 蛍光が検出された。これらの結果から、植物細胞における新奇な組換え機構を実証することができた。

③多コピーゲノムをホモ化する技術の開発

植物は種によってゲノム倍数性が高いものがあり、またより一般に葉緑体やミトコンドリアといったオルガネラは多コピーのゲノムを有している。このため、遺伝的表現型の強化と安定性を得るには、すべての遺伝子コピーが均一に改変されることが望ましいが、そのような技術はまだ確立されていない。オルガネラゲノム改変においては、細胞内への送達からさらに二重膜を経てオルガネラ内に至る必要があることがあるが、それに加えて、多コピーゲノム内で純化させるには、①導入オルガネラのみ生存させる選抜マーカー、②非改変ゲノムの積極的排除が必要と考えられる。そのような中で、新たに採用した選抜マーカーとして脂質合成遺伝子とその阻害剤を試験してその有効性を確認した (図 3.2.1.1.2-1-4)。

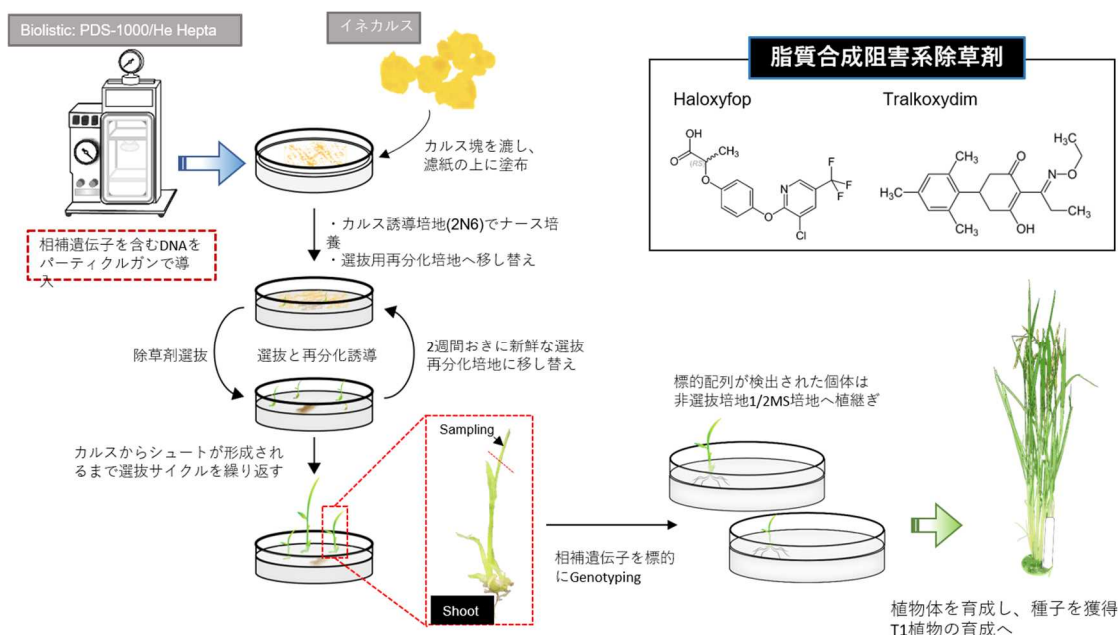


図 3.2.1.1.2-1-4. イネ葉緑体の安定的な改変手法

さらに、相同組み換えを促進するとともに、未編集ゲノムコピーを排除できる、ヌクレアーゼゲノム編集酵素 Cas9 を組み込んだ葉緑体ベクター (pACC-GD) を作成し、パーティクルガンによってイネカルスに導入した (図 3.2.1.1.2-1-4)。

得られた形質転換カルスを植物体に分化させて顕微鏡観察したところ、ベクターに仕込んだ RFP の蛍光シグナルが明瞭に見られ、特に Cas9 導入細胞において頻度が恒常していることが確認された (図 3.2.1.1.2-1-5)。

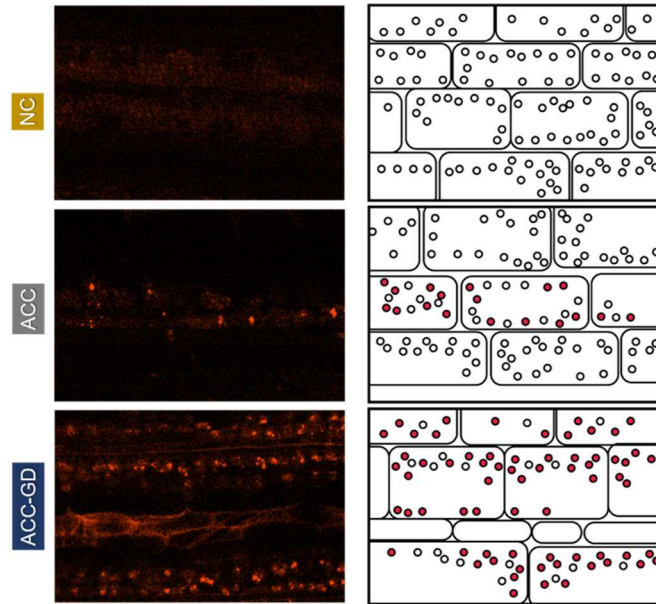


図 3.2.1.1.2-1-5. 組換え葉緑体の蛍光タンパク質発現

育種手法としての確立および形質転換体の安定性を示すため、改変植物体を育成し、種子を獲得した。次世代植物を発芽させたところ、組み込まれた遺伝子の PCR 断片が確認され、後代への伝播が確認された (図 3.2.1.1.2-1-6)。

一連の成果について特許出願を 2 件行った。

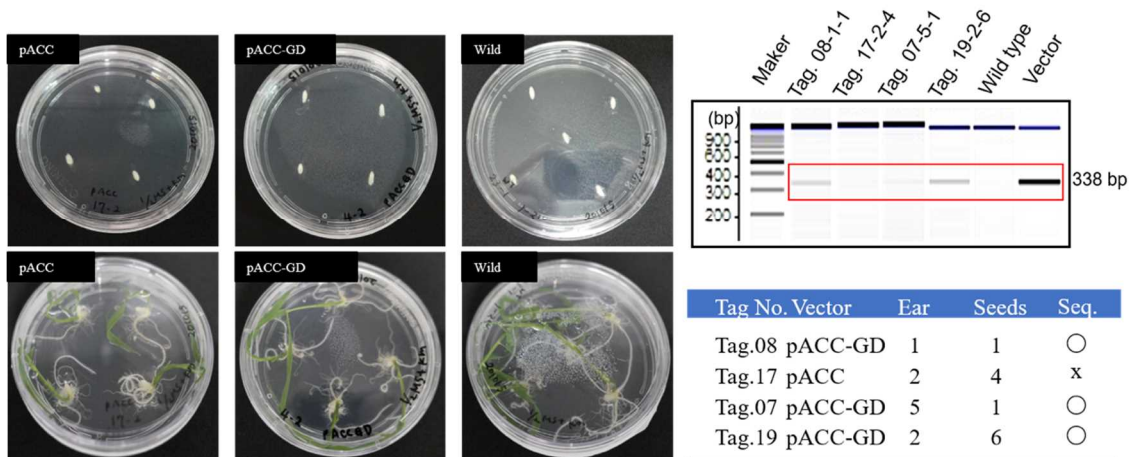


図 3.2.1.1.2-1-6. 葉緑体改変植物の次世代伝播

(2) 最終目標の達成度及び研究開発成果の意義

①標的バリエーション変異ライブラリの構築の実現： イネ植物体において、当初目標値を大幅に上回る変異導入効率を達成し、次世代への伝播も確認することができ、植物育種技術としての実証を完了、特許出願を行った。植物育種においてオンリーワン技術として波及することが期待される。

②新規組み換え機構による高効率ノックイン技術の開発： 新奇な組換え機構による植物細胞内での相同組み換えの実証を行い、当初目標値の組換え効率を達成した。今後は植物個体においての物質生産など実用的な運用へと進むことが想定される。

③多コピーゲノムをホモ化する技術の開発： イネにおいて葉緑体の安定的組換えを初めて実証し、幅広い植物種に適用できる技術として提示することができ、特許出願も複数行って目的を達成することができた。今後は葉緑体改変による新たな育種素材の開拓などへと展開することが期待される。

B-4 研究開発課題「(4) 精密なゲノム設計技術の開発」

(委託先：広島大学・野村渉；2016～2018年は東京医科歯科大学、権利義務承継して2019～2020年は広島大学で研究開発を実施)

(1) 研究開発の成果

【概要及び目的】

プロジェクトにおける位置づけ 標的配列に高い特異性と精密性で機能する DNA 組み換え酵素（リコンビナーゼ）を利用したゲノム編集技術として植物細胞での実証試験も含めて、TALEN、CRISPR とは異なる特長をもつ技術を開発する。DNA 結合モジュールは可変であるためプロジェクト内で実用化する DNA 結合モジュールとの組み合わせで新規性を有する技術を開発する。

技術的な重要性 組み換え反応に特有の巨大な遺伝子クラスターのゲノムへの組込みや広範囲にわたるゲノムの欠損などを生かすことでヌクレアーゼ型のゲノム編集技術とは一線を画す技術である。また細胞の修復系を利用しないことから最終的な反応後のゲノム配列を理論的に設計可能であり、精密な組み換え技術となる。

実施概要（解決する手法） 動物培養細胞の系で開発を進めている ZFR を利用し、①酵母を利用した高活性型酵素ドメインのスクリーニングと植物培養細胞への適用によって実用化に適した改良を施し、さらに②新規 DNA 結合モジュールと組み合わせた組換え酵素を開発することでより強力な技術体系を構築し、知的財産化する。

最終目標 ZFR による植物培養細胞を利用した植物ゲノム組み換え反応で 20%以上の反応効率を達成する。新規 dPPR リコンビナーゼを利用した組み換え反応において、大腸菌／酵母を用いた実験系で 10%以上の反応効率を得る。プロジェクト内で標的となる実用植物でのリコンビナーゼ技術の有用性の実証。dPPR リコンビナーゼについて実用植物での実証。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み プロジェクトで構築したゲノム編集ネットワーク、関連するベンチャー企業、または所属機関の産学連携部と共同して実用化、事業化を進める。ゲノム編集ネットワークの中核機関である広島大学、九州大学に設置した共通評価基盤等を活用し、企業とのフィージビリティスタディを促進させる。

【成果】

酵母を利用した大規模スクリーニングシステムの構築 セリンリコンビナーゼファミリーに属する組換え酵素は酵素活性を有するドメインと DNA 結合ドメインがタンパク質内で互いに独立したフォールディング構造を有するために、酵素ドメインと DNA 結合ドメインを自在に組み合わせることができる。すなわち、酵素ドメイン自体をより高活性なドメインとして進化させた場合、どのような DNA 結合ドメインとの組み合わせにおいても相対的に活性が高い融合酵素になりうる（図 3.2.1.1.2-2-1）。そのため、これまで最も研究が進んでいるジンクフィンガーを DNA 結合ドメインとする ZFR を利用して酵素活性向上のためのスクリーニングシステムの構築に取り組んだ。

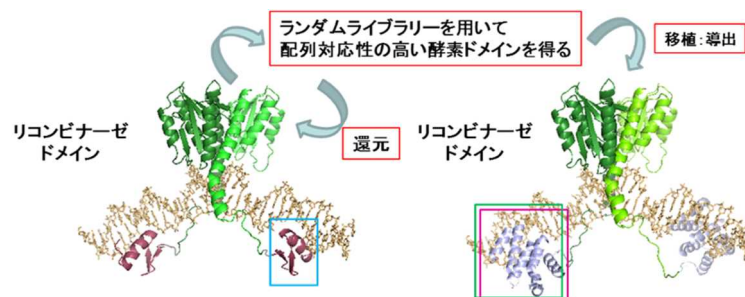
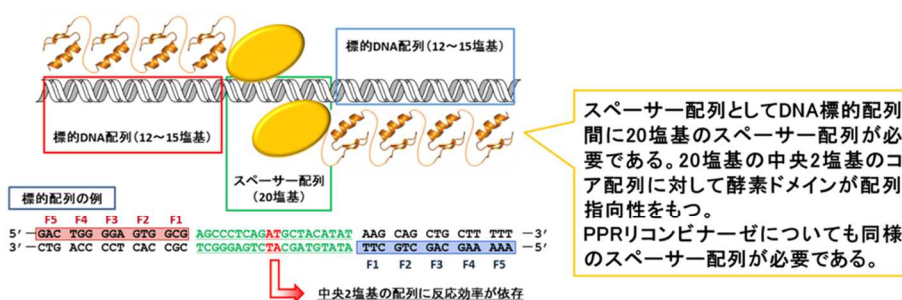


図 3.2.1.1.2-2-1. 融合型リコンビナーゼを高活性化させる戦略について

酵素活性の向上において重要となってくるのが標的配列で組換え酵素が2量体を形成した際に酵素ドメイン部分が相互作用してDNA切断を行う配列にあたるスペーサー配列への指向性であると考えられる。セリンリコンビナーゼファミリーに属するGinあるいはTn3は20塩基のスペーサー配列の長さが最適であることがこれまでに知られている。それらの酵素の本来標的とする配列におけるスペーサー配列は異なっており、構造的な相同性を有する場合においても酵素独自のスペーサー部分の塩基配列との相互作用が存在することが予測できる。また、スペーサー配列の中央に位置する2塩基はリコンビナーゼによる切断時に2塩基突出末端となることが知られているが、その配列にも指向性が存在することが知られており、一般にAT配列に対する反応性が高い。そのため、リコンビナーゼ型のゲノム編集技術の開発においてはその指向性の解除が重要な課題となる(図3.2.1.1.2-2-2)。

スペーサー配列の中央2塩基に対して酵素ドメインが配列指向性を持ち、他の配列の場合には反応効率が低下する場合が多い。



○Off-target効果抑制に正の効果をもたらす
DNA結合ドメインの選択性と酵素ドメインの選択性による相乗効果

○対策

- [1] 配列指向性をもたないドメインを取得する
- [2] 各2塩基コア配列に対応するドメインを必要数構築する
以上、2方向の開発が必要となる。

図 3.2.1.1.2-2-2. リコンビナーゼの反応における配列指向性について

以上のような課題を克服するためにはスクリーニングシステムを利用した分子進化による高活性型酵素の獲得が有用になると期待できる。これまでに大腸菌を利用したスクリーニング系が利用されてきているが、環状DNA上での反応になるため、スクリーニングによって獲得された高活性酵素を哺乳類細胞などのゲノムに対して反応させた場合に活性の低下が顕著に認められていた。そのため、スクリーニング過程をゲノム構造において実行することが重要であると考えられ、その対応策として酵母ゲノムに着目した。酵母はゲノム構造を有し、比較的容易に相同組換えによって外部配列をゲノム上に挿入することが可能であることが知られている。また、スクリーニングを行う際にはランダム化した多様な配列ライブラリーのサイズが重要となるが、そのライブラリーサイズを担保できる形質転換効率を示すことも知られている。さらに選択マーカーとして栄養要求性遺伝子を多数利用できる点においても優れている。本研究項目では酵母を利用したスクリーニングシステムを構築することとし、組換え反応後に栄養要求性マーカーによる選択が可能な仕組みを採用した(図3.2.1.1.2-2-3)。

まず、組換え反応によってHIS3遺伝子が再構成される系を検討したが、この方法ではバックグラウンドが高く出てしまい、未反応のリコンビナーゼを含む酵母も得られてしまうことが明らかになった。そのため、別の手法として図3.2.1.1.2-2-3に示すようなACT1イントロ

ンを利用する方法に変更を行った。この方法ではリコンビナーゼが未反応の状態ではイントロンとして機能しないが組換えによって ACT1 イントロン配列が近接した場合には mRNA からイントロン配列が切り出される。そのため、URA3 遺伝子が再構成されることで選択マーカーとして利用できる。このようなセレクションを行うための標的遺伝子を酵母ゲノムに相同組換えで組み込んだことを PCR およびシーケンス解析によって確認した。また、既知の ZFR 遺伝子を酵母用発現プラスミドに搭載し、形質転換後にタンパク質発現を誘導して培養を続け、組換え反応効率を評価した。HIS3 は ZFR 発現プラスミドに導入し、形質転換されている酵母の選択マーカーとして利用できる。この手法によって URA3 プレートを利用した場合に酵母での 100%の組み換え反応が得られることが明らかとなった（図 3.2.1.1.2-2-4）。配列解析によってもこの反応系では正確に組み換え反応を検出していることが確認された。

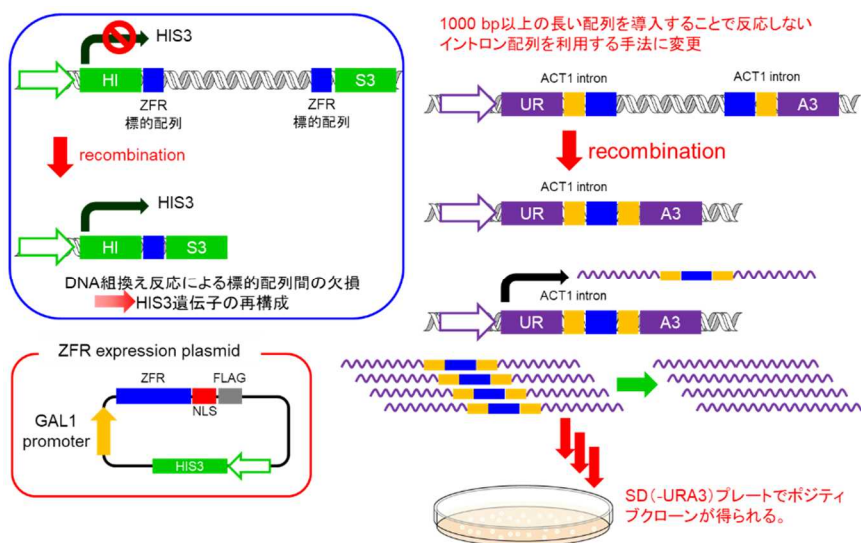


図 3.2.1.1.2-2-3. URA3 遺伝子におけるイントロン除去型スクリーニングシステムの構築

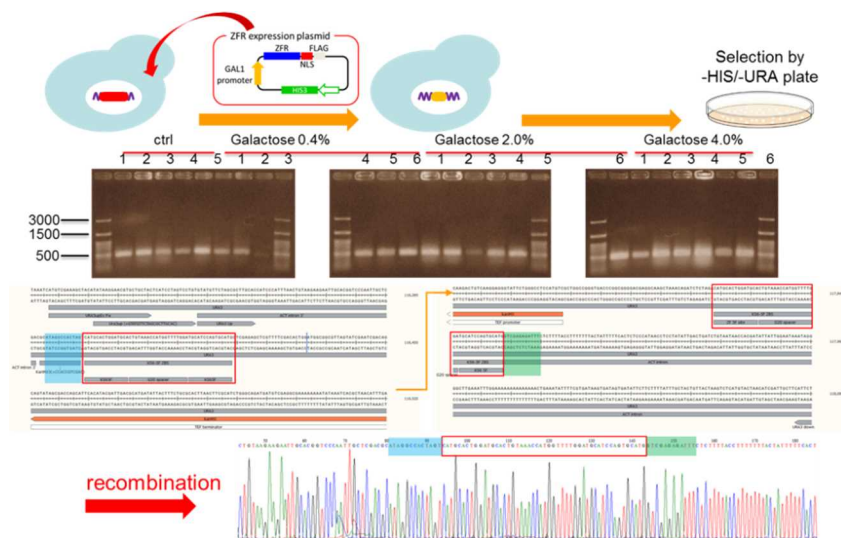


図 3.2.1.1.2-2-4. 栄養要求性マーカーによる選択で得られるクローンの解析とシーケンス解析について

スペーサー配列中央の選択性に関する検討

既知の ZFR としては酵素ドメインに Gin あるいは Tn3 を有する融合酵素を利用した。それぞれ Gin、Tn3 が指向性をもつスペーサー配列を有する標的配列を酵母ゲノム上に導入して、ZFR 発現ベクターの形質転換後にタンパク質発現を誘導した。その結果、Gin 融合 ZFR でより高い反応効率が示されたため、以降の検討においては Gin ドメインを利用した。酵母ゲノムにおける評価手法を利用して 20 塩基からなるスペーサー配列の中央 2 塩基について反応効率を検討することにした。図 3.2.1.1.2-2-5 に示すように元の中央に AT の 2 塩基を有する配列に対して該当箇所を TA、GG および GC の配列に置換した標的配列を作成し、酵母ゲノムに相同組換えによって導入した。これまでの報告から AT の配列に加えて、AA、TT の配列に対して反応性があることが知られていたが、本検討の結果、GG、TA に対しても十分に反応性を有することが示唆された。このことは今後の標的配列開拓において対象を大幅に拡大する成果であると考えられる。

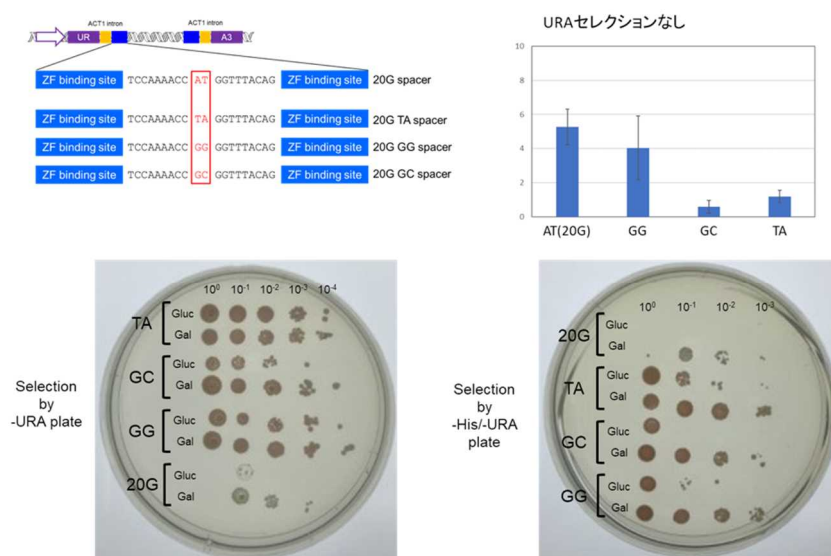


図 3.2.1.1.2-2-5. スペーサー配列への指向性に関する検討

リコンビナーゼドメインのライブラリー化とセレクション

上記に示した酵母を利用するセレクションシステムについて GG コア配列に対する高活性化ドメインの取得に適用した。リコンビナーゼドメインのライブラリー化には Diversify™ PCR, Random Mutagenesis Kit (Clontech 社) を利用した。酵母を利用するシステムにおいては栄養要求性マーカーによる強力な選択圧がかかるため、比較的少ないラウンド数でセレクションが進むことが期待された。すでに 1 ラウンド目のガラクトースによる誘導によって反応したバンドが検出されたことから性能が証明されていると考えられる (図 3.2.1.1.2-2-6)。

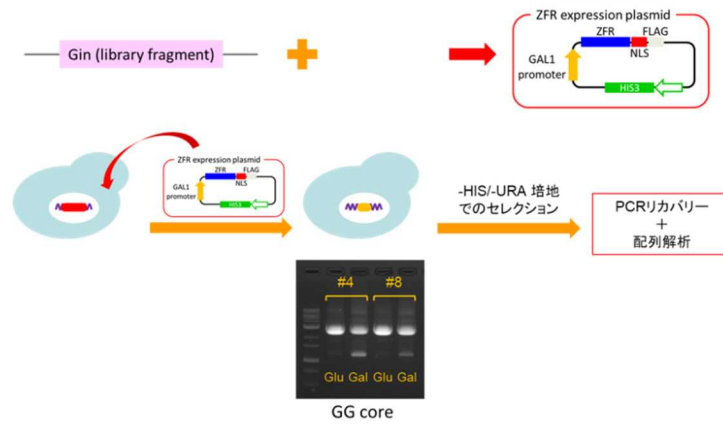


図 3. 2. 1. 1. 2-2-6. ランダム化したリコンビナーゼドメインの酵母システムによるセレクション

また、ランダムライブラリーからのセレクション方法に加えて、MD シミュレーションを利用した反応性予測を取り入れることにした。近畿大学宮下尚之准教授の協力によって、いくつかのアミノ酸部位で変異体の候補が得られた。今後はシミュレーションとランダムライブラリーを組み合わせることや、部位特異的なアミノ酸のランダム化によってより高精度な分子進化系を構築できると期待できる。

リコンビナーゼ型ゲノム編集技術の植物への適用 前述した高活性型リコンビナーゼは生物種を問わず相対的に高い活性を示すと期待されている。そこで、植物への適用を目的としてナズナゲノムに着目し、現時点で標的配列となりうる候補をゲノム配列から抽出した（図 3. 2. 1. 1. 2-2-7）。候補配列はスペーサー配列に大きく依存するため、スペーサー配列への指向性を解除することで標的配列の選択の幅が広がることが期待される。抽出された候補配列について結合するジンクフィンガードメインを有する ZFR を構築した。ジンクフィンガードメインの DNA 結合性は ELISA 法を利用して検討した。この結果から Chromosome5 に位置する標的部位を最終候補として選択した。ZFR による挿入反応ではナズナでの発現量が増強されることでアスタキサンチンの産生量が増加することが知られているクラミドモナス由来の β -カロテンケトラーゼ遺伝子をコードしているプラスミド遺伝子に ZFR の標的部位を導入し、植物発現用ベクターである pCambriNbar に ZFR をコードし、アグロバクテリウム感染を利用した遺伝子導入を行った。感染後に T0 から新規発生した脇芽を回収した。ナズナ細胞におけるアグロバクテリウム感染は明確な手法が確立されておらず感染効率などに問題があることが明らかになった。今後の遺伝子導入法の検討が必要とされる。

植物ゲノムからスペーサー類似配列の探索

20G spacer: TCCTAAACCATGGTTTACAG → Gin reactive
 20T spacer: CGAAATATTATAATTATCA → Tn3 reactive
 Z+4 spacer: ACGAATATTATAATTGCAT → Tn3 reactive



20Gスペーサーのコア配列(ACCATGGT)について全ゲノムから探索候補配列のうちZFをデザインできる配列を抽出

Chromosome 1/4/5から1箇所、Chromosome 3から2箇所を抽出



ELISAでZFのDNA結合を評価

dilution	cont.	1L	1R	3-1L	3-1R	3-2L	3-2R	4L	4R	5L	5R
1	0.0711	0.2333	0.1227	0.0772	0.3053	0.2535	0.3568	0.0707	0.3028	0.2303	0.4817
1/2	0.0949	0.1687	0.1134	0.0736	0.3148	0.2975	0.4004	0.0689	0.0765	0.2064	0.4362
1/4	0.0852	0.1277	0.0925	0.0868	0.2066	0.171	0.2901	0.0653	0.2211	0.162	0.3891
1/8	0.0765	0.1436	0.1101	0.0625	0.1562	0.1554	0.2033	0.0687	0.1573	0.1509	0.1348
1/16	0.0757	0.1185	0.1072	0.1384	0.1073	0.1146	0.1812	0.0798	0.106	0.1366	0.1449
1/32	0.0642	0.1209	0.112	0.0656	0.0963	0.129	0.1376	0.0651	0.0973	0.1123	0.1567
1/64	0.0742	0.1283	0.1043	0.0643	0.0784	0.1003	0.1122	0.0831	0.0906	0.1257	0.1645
1/128	0.0982	0.1664	0.1561	0.0764	0.093	0.1295	0.1135	0.0952	0.0971	0.1503	0.2104

図 3. 2. 1. 1. 2-2-7. ナズナゲノムから抽出した ZFR 標的候補配列と ELISA 法による DNA 結合性の検討について

新たな DNA 結合ドメインを有する融合型リコンビナーゼの構築

これまでに DNA 結合型 PPR ドメイン (dPPR) について、リコンビナーゼドメインとの融合タンパク質 (dPPR-recombinase) として構築し、酵母システムを利用した反応効率の検討を行った。dPPR リコンビナーゼの発現はウェスタンブロットによって確認された (図 3. 2. 1. 1. 2-2-8)。

引き続き、ZFR と同様に酵母ゲノム上に存在する標的配列に対する組換え反応効率を検討した。発現プラスミドの酵母への形質転換、ガラクトースでの発現誘導後に回収したゲノムからは反応を示す PCR 増幅が検出されなかったが、URA3 マーカーによる選抜の結果、得られるコロニーでガラクトース誘導サンプルで組換え反応を示す優位な差が確認された (図 3. 2. 1. 1. 2-2-9)。

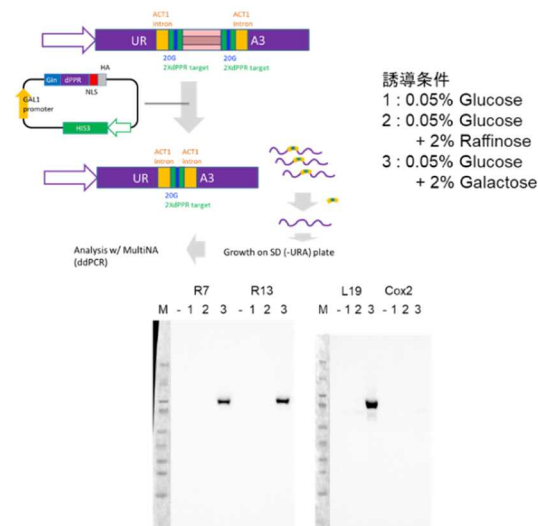


図 3. 2. 1. 1. 2-2-8. dPPR を DNA 結合ドメインとした dPPR-recombinase の構築と発現確認

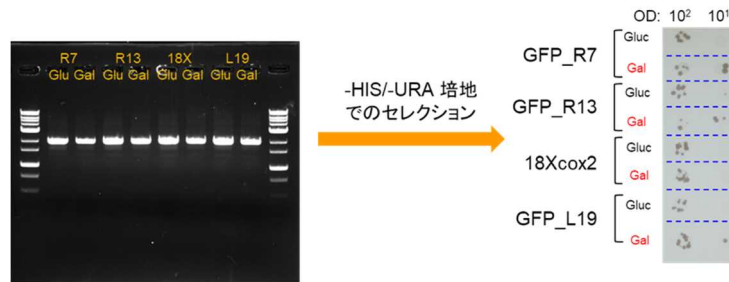


図 3.2.1.1.2-2-9. PCR による組換え反応検出と酵母プレート上での栄養要求成マーカーによる選択培養の結果

(2) 最終目標の達成度及び研究開発成果の意義

新たな組換え酵素の獲得のための方法として酵母でのスクリーニング手法、定量的な評価法が確立された。この手法の構築は当初の計画からさらに工夫を加えることで成功できた。また、当該手法では栄養要求性選択マーカーの利用によって組換え効率が 100%の酵母集団を獲得でき、分子進化スクリーニング手法だけでなく高い拡張性を期待できる。実際に、dPPR-recombinase の組換え反応検出は従来の手法では検出が困難であったと考えられるため、新規技術への適用が実証できた。リコンビナーゼの有用性に関して、植物における相同組換えは効率が非常に低く、T-DNA 技術を除いて実用的技術がまだにない、という点から標的とする配列の選択を自在にできる組換え反応を実現する技術であると言える。コア配列の解除については、これまで反応性が確認されていなかった配列に対しても適用できることが確認され、適用できる標的配列の選択性が大きく向上した。植物個体への適用についてもナズナゲノムに対する ZFR を構築し、アグロバクテリウムでの感染で導入した個体を得た。より効率的な組換え反応の実現には、デリバリーなどの周辺技術との融合が不可欠であり、今後より詳細な検討が必要となる。また、国産ゲノム編集技術の枠組みの中でエフェクターとしてのリコンビナーゼの有用性を高める工夫が必要である。植物バイオテクノロジーにおいて特に注目されるのは植物有用二次代謝産物であり、一般に植物由来天然物とされている。鍵となる半合成出発物質を効率的に生産できれば、原料輸入に頼っている医薬原料なども安定的に入手可能になる。あるいは有効成分含有量の高い植物を得ることで生産過程の効率化が望める。植物ゲノム編集による高度遺伝子組換え植物の実現は高い付加価値をもたらすと期待される。有用二次代謝産物の生産性を高めるための植物二次代謝工学はアグロバクテリウムを用いた遺伝子デリバリーなどによる RNAi や T-DNA の導入によってこれまで行われてきた。これらの既存技術よりも高度な組換え酵素によるゲノム編集技術の開発を行うことで植物バイオテクノロジーにおける諸課題をクリアできる可能性が十分に期待できる。

B-5 研究開発課題「(5) DNA 切断ドメインの改良、および 1 塩基置換基盤技術の開発」
 (委託先：広島大学・山本卓；2016～2020 年)

【概要及び目的】

プロジェクトにおける位置づけ 代表的な DNA 切断エフェクタードメインである FokI をベースに、配列特異性、高切断活性を付与するようなアミノ酸置換を半理論的に導入し、動物培養細胞で機能評価を行う。さらに改良を進めるとともに、一塩基置換技術を植物細胞のモデル実験系で確立する。最終目標として、実用植物への適用を行う。

技術的な重要性 ZF や TALE をはじめ、Cas9 に至るまで、DNA 結合ドメインの開発は進んでいるものの、DNA 切断ドメインについては FokI 以外のツールがほとんど開発されていない。FokI よりも高い機能性を有する新規ヌクレアーゼドメイン (ND) は、FokI に代わるスタンダードな技術となり得る。

実施概要 (解決する手法) 動物培養細胞で確立した基盤技術 (新規 ND) を植物細胞へ適用するとともに、実用化に適した改良を施す応用的利用例を拡大し、その有用性を示す。

最終目標 植物モデル実験系 (培養細胞) での新規 ND 技術の確立。①培養細胞での正常動作率 (30%) ; ②モデル植物での一塩基特異的切断制御 (既存技術の 5 倍以上の効率)

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み すでに設立したベンチャー企業、プラチナバイオ株式会社で実用化・事業化を進めている。プロジェクトで構築したゲノム編集ネットワーク、関連するベンチャー企業、または所属機関の産学連携部と共同して実用化、事業化を進める。ゲノム編集ネットワークの中核機関である広島大学、九州大学に設置した共通評価基盤等を活用し、企業とのフィージビリティスタディを促進させる。

【成果】

1. DNA 切断ドメインの改良、および 1 塩基置換基盤技術の開発

1-1. FirmCut nuclease の同定と機能性検証

FokI に代わる新規ヌクレアーゼドメインの探索と機能検証を実施した。FokI とは異なる種に由来する新規ヌクレアーゼドメイン 4 種 (ND1～ND4) を同定し、ジンクフィンガー (ZF) との融合体における機能性をレポーターアッセイおよび内在遺伝子座への変異導入効率によって検証し

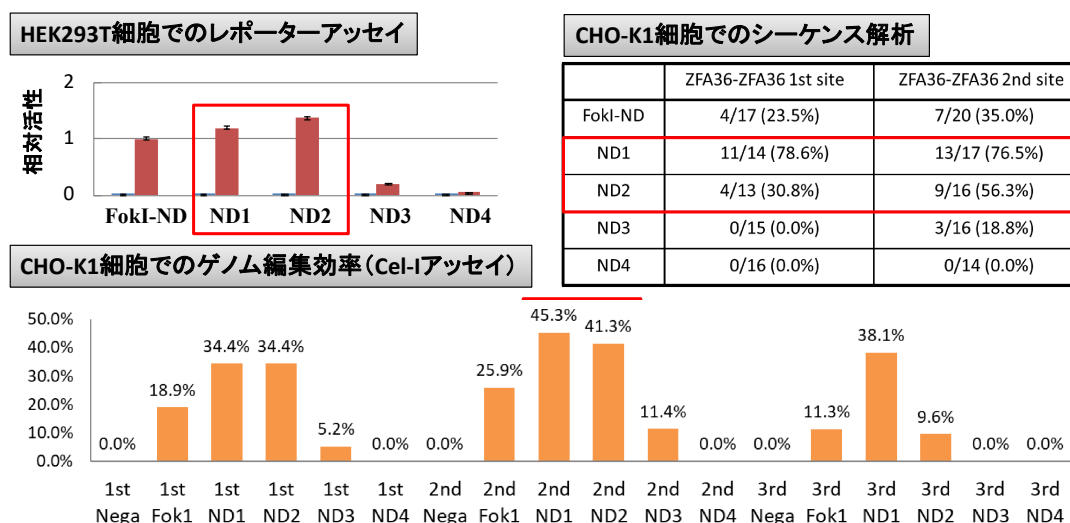


図 3.2.1.1.2-3-1. 新規高活性型ヌクレアーゼドメインの同定と機能性評価 (ZF との融合体)
 新規ヌクレアーゼ ND1 と ND2 において、従来の FokI-ND を上回る活性が認められた。

た結果、ND1 および ND2 が FokI よりも高い切断活性を有することが明らかとなった（図 3.2.1.1.2-3-1）。

更に、ZF-ND 間のリンカーを改変することで、従来の FokI では高い活性を得ることが難しかったスペーサー長でも、ND1 および ND2 を用いることで十分な切断活性が得られることが明らかとなり、これらの新規 ND が標的配列の選択性の面でも FokI を上回ることが示唆された。また、新規 ND の細胞毒性の解析や、ND1 へのアミノ酸置換の導入によるヘテロダイマー化、ND1 類似タンパク質とのキメラ化による高活性化メカニズムの検証などを進め、従来の FokI と比べて新規性・進歩性を有する新規 ND の技術基盤を確立した。本成果物を FirmCut nuclease と命名し、特許を出願した。

1-2. FirmCut Platinum TALEN 技術の確立

続いて、ZF 以外の DNA 結合ツールとして、広島大学が知財を保有する Platinum TALE を用いた解析を実施した。EL/KK 型、DDD/RRR 型、ELD/KKR 型の 3 つのタイプのヘテロダイマー型変異を ND1 および ND2 に導入し、SSA アッセイによる活性評価を行ったところ、ELD/KKR 型の Platinum TALE-ND1 において、ホモダイマー型を上回る活性が確認された（図 3.2.1.1.2-3-2）。

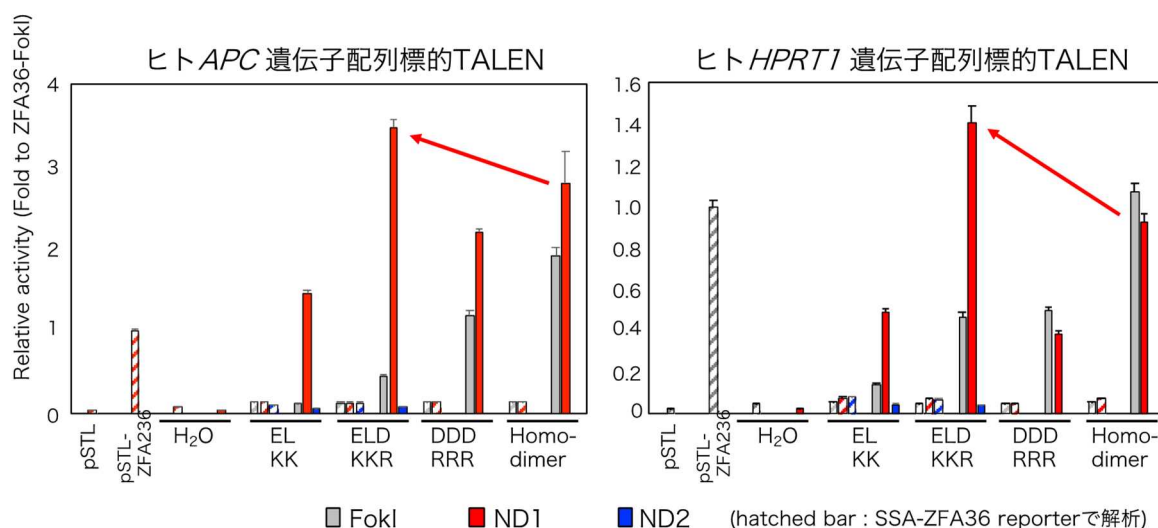


図 3.2.1.1.2-3-2. ヘテロダイマー型変異を有する FirmCut Platinum TALEN. 2 つの異なる標的配列での活性評価の結果、ELD/KKR 型変異体では、ホモダイマー型 ND1 よりも活性スコアが高値となることが示され（矢印）、高活性と高特異性を両立する TALE-ND1 技術（FirmCut Platinum TALEN）が確立された。

更に、Platinum TALE の C 末ドメインの長さを 47 アミノ酸から 0 アミノ酸に変更し、様々なスペーサー長での SSA アッセイによる活性評価を実施した結果、短縮型 Platinum TALE-ND1 が特定のスペーサー長（9~12 bp）でのみ安定的に高い活性を呈することを見出した（図 3.2.1.1.2-3-3）。

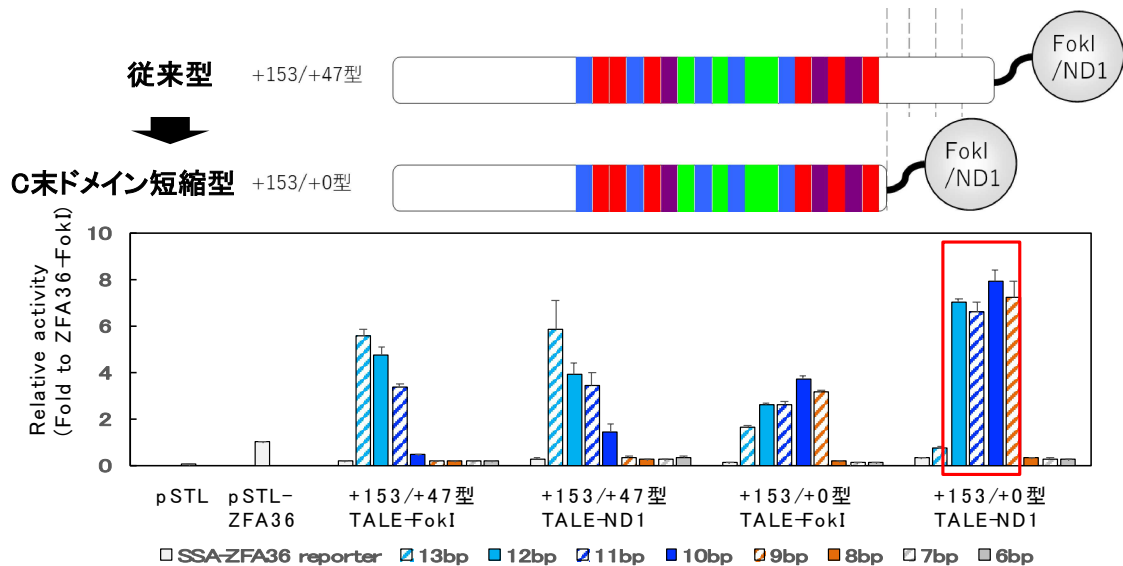


図 3.2.1.1.2-3-3. FirmCut Platinum TALEN の改良。TALE の C 末ドメインを短縮すると、9～12 bp の範囲内でのみ高い活性を示した。

この構造体は、内在ゲノム遺伝子に対しても同様に高いゲノム編集効率を呈することも明らかとなり (図 3.2.1.1.2-3-4)、これにより高安全性・高特異性・高活性の 3 拍子が揃ったゲノム編集ツール“FirmCut Platinum TALEN”の確立に成功した。

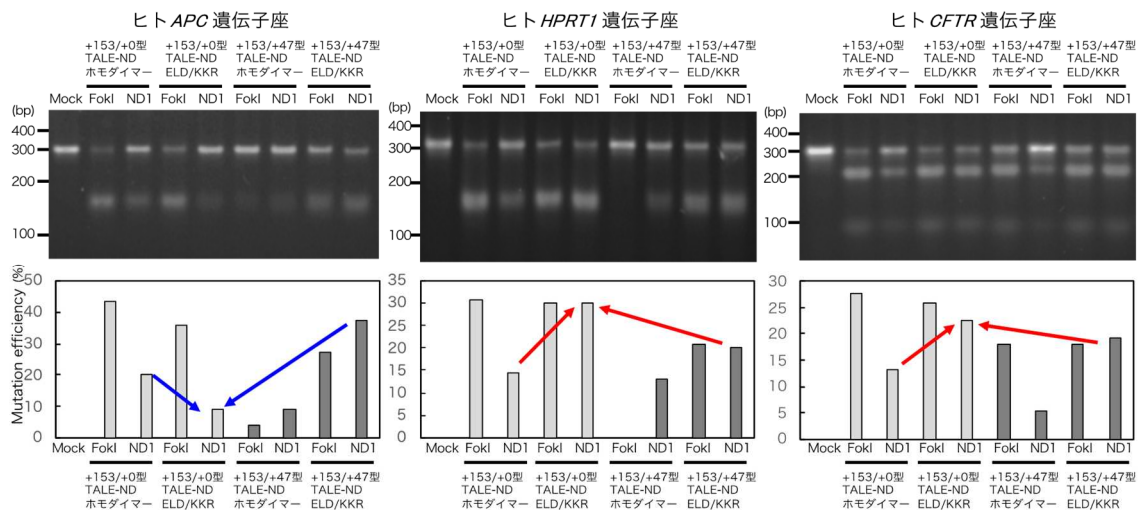


図 3.2.1.1.2-3-4.改良型 FirmCut Platinum TALEN によるゲノム編集効率の検証。改良型 FirmCut Platinum TALEN の活性を、内在遺伝子座での Cel-I アッセイにより評価した。3 遺伝子座中 2 遺伝子座で、「+0 型、10 bp スペース、ELD/KKR 型」の TALE-ND1 が、「+0 型、10 bp スペース、ホモダイマー型」や「+47 型、16 bp スペース、ELD/KKR 型」の TALE-ND1 の活性を上回る結果となった (矢印)。

1-3. モノマー型ヌクレアーゼの開発

新規モノマー型酵素として、これまでに用いられてきた I-TevI との相同性から、他種に由来する新規酵素 MND2・MND4 を同定し、ヒト細胞内での配列特異的 DNA 切断活性を検出した (図 3.2.1.1.2-3-5)。更に、特に MND4 において、従来型モノマー型酵素 (I-TevI) と比べて標的外配列での活性の著しい低下 (高特異性) を認めた (図 3.2.1.1.2-3-5)。加えて、これまでに報告されていないモノマー型ヌクレアーゼドメインの新たな特性を見出し、今後の新たな展開が期待される知見を得た。

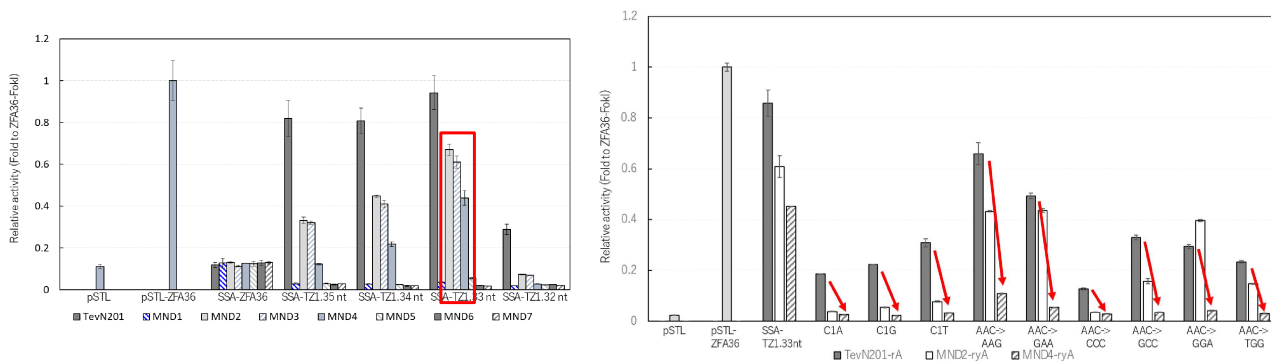


図 3.2.1.1.2-3-5. モノマー型新規酵素の開発。新規モノマー型酵素として MND2(≒MND3)・MND4 を同定し、ヒト細胞内での配列特異的 DNA 切断活性を検出した（左図赤枠）。更に、特に MND4 において、従来型モノマー型酵素（I-TevI）と比べて標的外配列での活性の著しい低下（高特異性）を認めた（右図赤矢印）。

(2) 最終目標の達成度及び研究開発成果の意義

従来技術である FokI とは異なる特性を有するヌクレアーゼドメインを確立し、国産知財を確保することを目的とした。野生型 FokI の特許は存在しないものの、高い特異性を担保するために必須となるヘテロダイマー変異を有する FokI については多数の特許が存在し、産業利用におけるハードルとなっていた。本研究開発項目にて開発した FirmCut nuclease は、FokI 変異体の海外特許を回避して利用可能なヘテロダイマー型ヌクレアーゼドメインとして唯一無二の技術であることから、当初の目的に合致する成果物が得られた。更に、課題間連携により、国産ツール（PPR）との融合体での機能性や、植物細胞における機能性、植物個体への導入等が証明されており、産業展開に向けてパッケージ化可能な技術として確立された。モノマー型ヌクレアーゼドメインについては、複数の候補分子を同定したものの、予期せぬ特性が見出されたことから、植物細胞での機能検証には至らなかった。しかしながら本研究により見出された新たな特性は、従来のモノマー型酵素の技術的制約を露呈するものであり、これを改善するための更なる技術開発の足掛かりとなる成果を得たと言える。

B-6 研究開発課題「オルガネラゲノムの編集技術の開発」

(委託先：高崎健康福祉大学・吉積毅；2016～2017年は理研、権利義務承継して2018～2020年は高崎健康福祉大で研究開発を実施)

(1) 研究開発の成果

「(6)-1 オルガネラゲノムの編集技術の開発」

【概要及び目的】

プロジェクトにおける位置づけ 植物を宿主とした物質生産を考えた場合、オルガネラ（葉緑体とミトコンドリア）ゲノムを編集（もしくは、組換え）することは多くの利点がある。本項目では、申請者らが開発したオルガネラ局在型融合ペプチドを利用することで、Cpのみならず、Mtゲノムを自在に編集する技術の開発を行う。

技術的な重要性 既存の遺伝子導入法は汎用性が乏しく、また、高等生物では未だMtゲノムを編集することには成功していない。標的とするオルガネラゲノムのみを編集できる選択性の高い技術を開発し、目標とする高機能品生産に資する基盤技術を整備する必要がある。

実施概要（解決する手法） 融合ペプチドを利用することで、シロイヌナズナでは両オルガネラゲノムの一過的な編集に成功している。他の植物種にもこの技術が適用可能か明らかにすると共に、安定的なオルガネラゲノム編集植物体の作出に必要な技術を開発する。具体的には、(1)複数のモデル植物種での一過的ゲノム編集の検証、(2)Mtゲノム編集に必要な相同配列長の決定、(3)安定的なオルガネラゲノム編集植物体の作出を中心に行う。

最終目標 本技術によるオルガネラゲノム編集が一過的に確認できた実用植物での安定的なオルガネラゲノム（CpもしくはMt）編集植物体の作出、さらに、ゲノム編集植物体による高機能品生産向上性の検証。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み プロジェクトで構築したゲノム編集ネットワーク、関連するベンチャー企業、または所属機関の産学連携部と共同して実用化、事業化を進める。ゲノム編集ネットワークの中核機関である広島大学、九州大学に設置した共通評価基盤等を活用し、企業とのフィージビリティスタディを促進させる。

【成果】

1. オルガネラゲノムの編集技術の開発」の成果

②-1 A04_B-4 オルガネラゲノムの編集技術の開発

②-1-1 選択的オルガネラゲノム編集技術の確立

CpやMtでは相同組換えが頻繁に生じる。そのため、これらオルガネラゲノムと相同な配列を有する外来遺伝子を導入することができれば、相同配列を足場としてゲノムへの挿入（knock-in）することが可能となる。しかし、これらオルガネラに外来遺伝子を選択的に送達する技術はなかった。そこで、本研究ではCpもしくはMt局在シグナルを結合したDNA結合ペプチドを利用することで、目標とするオルガネラゲノムを編集する技術の開発を行った。

本研究では、このknock-inをゲノム編集と定義している。挿入位置を制御できるため、PCR法により一過的なゲノム編集を評価することが可能である。この評価系を用いて、3種類のモデル植物（シロイヌナズナ、タバコ、およびイネ）を対象とした、オルガネラ局在型融合ペプチドによる選択的オルガネラゲノム編集を検証した。

本研究課題では、Cp局在型融合ペプチドを用いてタバコとイネのCpゲノム編集に成功した。また、本研究課題の開始以前にシロイヌナズナCpにおける編集にも成功しているため、本技術は双子葉植物や単子葉植物を問わずに適用可能なことが明らかになった。

次に、Mt 局在型融合ペプチドを用いて、上記のモデル植物の Mt ゲノム編集を行った。植物の Mt ゲノム編集はこれまでに報告されていないため、編集に必要な相同配列長は明らかにされていない。そこで、2.8、1.5、1.0、0.5、0.1、そして、0.05 kbp の相同配列を両端に持つレポーター遺伝子を PCR により調整し、Mt 局在型融合ペプチドを用いてシロイヌナズナの Mt ゲノム編集を試みた。結果、検証した全ての相同配列でゲノム編集が確認された。最短の相同配列長となる 0.05 が他の領域でも適用されるのか、シロイヌナズナ（上記と異なるゲノム領域への挿入）、タバコ、およびイネで検証した。いずれの領域および植物種においても効率の差はあるが、1.5 および 0.05 kbp の相同配列を用いてゲノム編集を行うことに成功した。

②-1-2 安定的オルガネラゲノム編集実用植物の確立

一過的な解析によるペプチドを用いた選択的オルガネラゲノム編集技術の確立を確認できたため、安定的なオルガネラゲノム編集への応を進めた。Cp ゲノム編集は、タバコなどでパーティクルガンを用いた方法が確立されている。そこで、パーティクルガンの代わりに Cp 局在型融合ペプチドを用いた

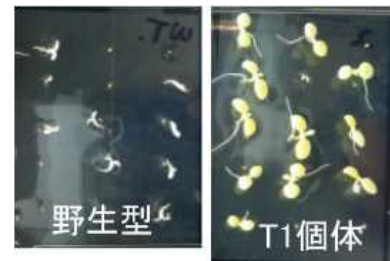


図 3.2.1.1.2-4-1 T1 世代における Cp ゲノム編集タバコのスペクチノマイシン耐性

タバコ Cp ゲノムを安定的に編集した個体の作出を試みた。Cp ゲノム編集は、スペクチノマイシン耐性遺伝子を目的遺伝子とともに導入する。そして、スペクチノマイシンを含んだ培地上で、選抜と再分化を行うことで、T0 世代の Cp ゲノム編集個体を作成する。本研究でも、同じ方法により T0 個体の選抜を行った。この研究から独立の 5 系統の Cp ゲノム編集タバコを作成した。すべての個体から T1 種子が得られたため、スペクチノマイシンを含む発芽培地上に播種し、生育を確認した。播種した全ての T1 種子においてスペクチノマイシン耐性を確認したことから（図 3.2.1.1.2-4-1）、ペプチドを用いた方法により安定的 Cp ゲノム編集が可能であることを示した。

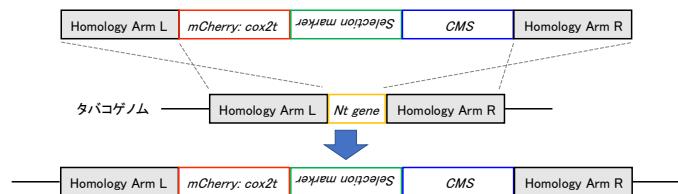


図 3.2.1.1.2-4-2 Mt ゲノム編集に用いたコンストラクト

上段が Mt ゲノム編集に用いたコンストラクトを示す。Homology Arm L: タバコミトコンドリアゲノム左腕相同配列; *mCherry:cox2t*: mCherry 蛍光タンパク質遺伝子; *Selection marker*: 抗生物質耐性遺伝子; *CMS*: *CMS* 遺伝子; Homology Arm R: タバコミトコンドリアゲノム右腕相同配列
中段はタバコゲノムを示す。Homology Arm L および R を相同配列として、上段のコンストラクトがゲノム編集(knock-in)される。*Nt gene*: 編集されるタバコミトコンドリア遺伝子
下段はゲノム編集後のタバコゲノムの構造を示す。

次に、安定的 Mt ゲノム編集個体の作出を試みた。これまで、Mt ゲノムを knock-in 型の編集は、酵母とクラミドモナスの 2 種類の単細胞生物でしか成功しておらず、植物のみならず動物でも報告されていない。この理由として、Mt はサイズが小さく、運動性があるため、Cp ゲノム編集で実績のあるパーティクルガンでは DNA を送達できないことが推測されている。加えて、植物で利用されている抗生物質は Mt の活性に直接影響しないため、薬剤選抜ができない問題もあった。そこで、様々な生物でミトコンドリア活性を阻害することが確認されている抗生物質とその耐性遺伝子を用いてゲノム編集したミトコンドリアゲノムを有するタバコの選抜・再分化を行った。

ところで、植物 Mt の農業上重要な形質として細胞質雄性不稔 (CMS) が挙げられる。この現象は核ゲノムと Mt ゲノムの「不親和」によって引き起こされ、CMS 遺伝子をコードする Mt ゲノムが他種の細胞質に移ることで引き起こされる。従来は CMS 遺伝子を供与する種と優良種を掛け合わせることで、優良種に CMS を付与する方法がとられてきた。しかし、この方法では近縁種にしか CMS を付与することができなかった。さらに、CMS 遺伝子は Mt ゲノムに存在することで機能することも知られており、knock-in 型の Mt ゲノム編集が確立していないことから、人工的な CMS の付加は報告されていなかった。本研究では、タバコ種に CMS を引き起こす遺伝子を実用遺伝子として抗生物質耐性遺伝子に結合したコンストラクト (図 3.2.1.1.2-4-2) を、Mt 局在型ペプチドでタバコ Mt へ送達した。複数の T0 抗生物質耐性個体が得られ、そのうち独立の 3 系統において不稔が確認された (図 3.2.1.1.2-4-3)。

この不稔が CMS であるのか確認するため、野生型の花粉を受粉させたところ種子が得られた (図 3.2.1.1.2-4-3)。不稔を示す系統における表現型を詳細に解析したところ、花糸 (やくのつけ根の部位) が短く (図 3.2.1.1.2-4-4)、やく内の花粉が少なかった。花糸が短い場合、野生型のように柱頭より上にやくが配置されず、受粉が正常に行われぬ。そのため、CMS が引き起こされることが推測される。花粉を単離し、花粉発芽培地で一晩静置したところ、野生型の花粉は独立した状態で観察でき、さらに一部の花粉では花粉管の伸長が認められた。一方で CMS 系統の花粉では凝集が生じ、個々の花粉を観察することができなかった。多くの花粉を調べたが、発芽を示す花粉は一つも観察できなかった (図 3.2.1.1.2-4-5)。

観察された表現型は、典型的な CMS である。T2 世代まで他家受粉による系統維持を行ったが、全ての系統で CMS を示すことを確認した。最後に、この CMS が編集した遺伝子に依存するのか、外来遺伝子の確認を行った。CMS を示す独立の T2 個体から DNA を



図 3.2.1.1.2-4-3 CMS を示す Mt ゲノム編集 T0 タバコ

糸がついているさや、野生型の花粉を受粉させた。自家受粉させた花では、稔性が認められずに、落花した。



図 3.2.1.1.2-4-4 CMS を示す Mt ゲノム編集 T0 タバコの花

上段は花全体を、下段は花弁を取り除き、柱頭とやくをむき出しにした。

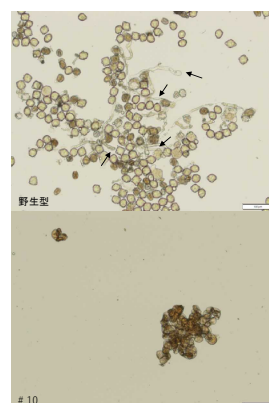


図 3.2.1.1.2-4-5 CMS を示す Mt ゲノム編集 T0 タバコの花

上段は野生型の花粉を、下段は CMS 系統 (#10) の花粉を示す。矢印は発芽した花粉管を表す。

抽出し、PCRにより解析した。この解析では、外来遺伝子特異的プライマーと挿入位置の外側に設定したプライマーを用いて外来遺伝子を増幅しているため、理論上ゲノム編集した遺伝子のみが増幅される(図 3.2.1.1.2-4-6 上段)。得られた PCR 産物には非特異断片も含まれているが、推定される位置に野生型では認められないゲノム編集を示す断片が全ての CMS 系統で増幅されていた(図 3.2.1.1.2-4-6 下段)。この PCR 断片の配列を解析したところ、導入したコンストラクトの配列が確認できた。この結果は、本研究から得られた CMS 系統は、ゲノム編集により CMS 遺伝子を Mt ゲノムの特定領域に編集した世界初の植物であることを意味する。本研究課題で確立した「Mt ゲノム編集による人工 CMS 導入技術」は、遠縁種にも適用可能であるため、育種を行う上で非常に重要な技術になる。そのため、多くの種苗会社の利用が見込まれる。

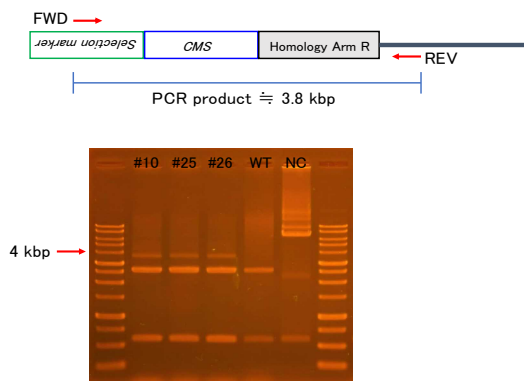


図 3.2.1.1.2-4-6 編集された Mt ゲノムの解析

上段は編集されたゲノムを増幅するプライマーの位置を表す。FWD: 外来遺伝子特異的プライマー; REV: 挿入位置の外側に設定した内在 Mt ゲノム特異的プライマー

下段は PCR 産物の電気泳動像となる。#10, #25, #26: CMS 系統; WT: 野生型; NC: 導入したコンストラクト
赤矢印は 4 kbp の位置を示す。特異的な PCR 産物は 3.8 kbp に現れる。CMS 系統には、特異的な断片が確認できる。

研究開発課題「(6)-2 導入」

【概要及び目的】

プロジェクトにおける位置づけ 本プロジェクトで開発されるゲノム編集技術に対応するため、独自の新しい機能を有する導入技術（細胞毒性、導入効率）を開発する。

技術的な重要性 組織培養法が確立されていない植物では遺伝子導入することができないため、結果としてゲノム編集を多くの植物に適用することが難しい。そこで、汎用性の高い技術の確立が必要であった。

実施概要（解決する手法） 産業技術総合研究所で開発されたナノニードル動作装置を用いて、植物の茎頂分裂組織(SAM)へ遺伝子を直接導入し、再分化した生殖器官から T1 形質転換種子を得る *in planta* 法の開発を行う。加えて、ナノニードルとペプチドを組み合わせることで、*in planta* 法を応用した Cp ゲノム編集技術も行う。

最終目標 ナノニードルを茎頂分裂組織に処理したダイズ芽生えに対して、ペプチドによる遺伝子送達を行うことで *in planta* 法で Cp ゲノムを編集した個体を最低 1 系統作出する。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み プロジェクトで構築したゲノム編集ネットワーク、関連するベンチャー企業、または所属機関の産学連携部と共同して実用化、事業化を進める。ゲノム編集ネットワークの中核機関である広島大学、九州大学に設置した共通評価基盤等を活用し、企業とのフィージビリティスタディを促進させる。

【成果】

②-2 A04_C-3 導入

現在のところ、植物を対象としたゲノム編集は遺伝子組換えに依存している。植物の遺伝子組換えは、外来遺伝子を導入した細胞を薬剤で選抜し、再分化させる組織培養技術が欠かせない。言い換えると、組織培養ができない植物にはゲノム編集を適用することができない。その

ため、本 NEDO プロジェクトから優れたゲノム編集技術が開発されても、現在のところ特定の植物にしか利用することができない。この問題を解決するため、2019 年度より本研究課題が新たに設定され、組織培養を介さない遺伝子導入法である *in planta* 法の開発を目指した。ところで、産業技術総合研究所ではナノサイズの針を用いて外来遺伝子を細胞へ導入するナノニードル法を開発している。植物は本葉や生殖器官に分化する細胞を供給する組織である茎頂分裂組織 (SAM) を有する。SAM の 2・3 層目が将来的に卵細胞や花粉に分化する細胞の元となると考えられており、これら層の細胞群へ遺伝子を導入することが出来れば、*in planta* 法の開発につながる。一般的な遺伝子送達法では、これら細胞群へ外来遺伝子を送達することが困難であった。そこで、ナノニードル法により外来遺伝子を SAM へ導入する *in planta* 法の開発を行った。これら細胞層へ到達するためには、ナノサイズの針では足りないため、実際には 100 μm の「マイクロ」ニードルを用いた。対象とする植物は、実用植物であるダイズとした。ダイズは、主要作物の一つであるが、組織培養が難しいため、ゲノム編集の適用が困難である。ダイズ SAM は、滅菌した種子を一晩水に浸した吸水種子から単離した。導入する遺伝子は過剰発現型プロモーターである CaMV35S で制御された GUS レポーター遺伝子となる。この遺伝子が核ゲノムに組み込まれた場合、染色することで細胞が青く染まる。単離した SAM の上に DNA 溶液を滴下し、マイクロニードルを穿刺することで、遺伝子導入を行った。処理した SAM はショ糖を含む発芽培地で生育させた (図

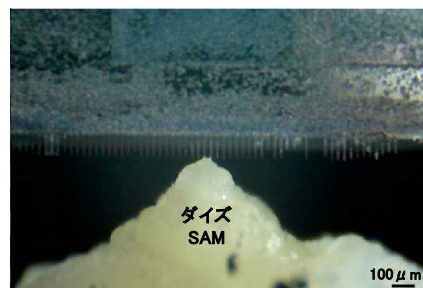


図 3.2.1.1.2-4-7 マイクロニードル穿刺直前のダイズ SAM
ダイズ SAM の直上にマイクロニードルが確認できる。

3.2.1.1.2-4-8)。新たに出現した本葉の一部を無作為に切り出してレポーター解析したところ、一部の個体で GUS 染色を確認することができた (図 3.2.1.1.2-4-9 左)。同様に PCR による外来 DNA の確認を行っており、複数の系統において外来遺伝子断片が増幅された (図

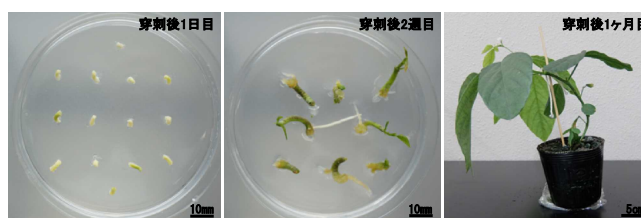


図 3.2.1.1.2-4-8 穿刺後のダイズの生育

3.2.1.1.2-4-9 右)。当初、この技術開発は導入効率を上げるために細胞膜透過型ペプチド (オルガネラ局在型と異なる融合ペプチド) を利用したペプチド法と組み合わせることを計画していた。しかし、ペプチドを組み合わせてもレポーターの陽性率は上がらなかった。そのため、T1 個体作出にはマイクロニードルを用いて外来遺伝子を SAM へ送達する単純な手法を用いた。SAM への遺伝子導入では一部の細胞しか組換えることができない。そのため、レポーターもしくは PCR で外来遺伝子の確認が得られな

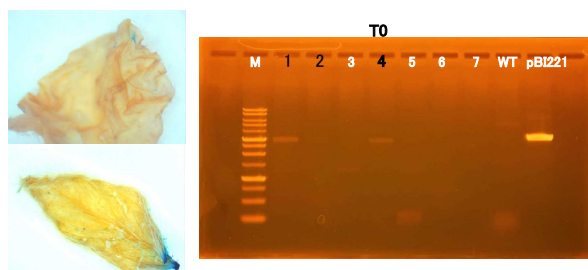


図 3.2.1.1.2-4-9 穿刺後のダイズにおける導入遺伝子の確認

左は GUS 染色された本葉を示す。本葉の一部だけが染色されており、組換えられた細胞がキメラで存在することがわかる。右は PCR により増幅した外来遺伝子断片の電気泳動図となる。赤矢頭は目的断片の位置を表す。

黒数字の系統番号 1、2、4 で目的の位置に断片の増幅が見られる。WT: 野生型ダイズ (対照); pBI121: 導入遺伝子 (陽性対照)

3.2.1.1.2-4-9 右)。当初、この技術開発は導入効率を上げるために細胞膜透過型ペプチド (オルガネラ局在型と異なる融合ペプチド) を利用したペプチド法と組み合わせることを計画していた。しかし、ペプチドを組み合わせてもレポーターの陽性率は上がらなかった。そのため、T1 個体作出にはマイクロニードルを用いて外来遺伝子を SAM へ送達する単純な手法を用いた。SAM への遺伝子導入では一部の細胞しか組換えることができない。そのため、レポーターもしくは PCR で外来遺伝子の確認が得られな

生えをレポーター解析を行ったところ、現在までに独立した2系統でGUS染色が認められた。これら結果は、マイクロニードルを用いたSAMへの*in planta*遺伝子導入法は、安定的な形質転換体作出にも十分に対応可能な方法であることを示している。この研究の供試材料であるダイズは組換えが難しい植物であり、Jackと呼ばれる特定の品種しか組換えできないと言われている。本研究で用いたダイズは鶴の子ダイズと呼ばれる栽培品種であり、この品種で*in planta*法を確立できたことは、ダイズのみならず、理論上全て植物において遺伝子組換え、さらにはゲノム編集が可能であることを意味している。また、ペプチド法との組み合わせでは相加効果が得られなかったが、マイクロニードルでDNA-ペプチド複合体の導入には成功している。そのため、マイクロニードルとオルガネラ局在型融合ペプチドを用いることで、*in planta*導入法を利用したオルガネラゲノム編集が可能になる。

(2) 最終目標の達成度及び研究開発成果の意義

研究開発課題「(6)-1 オルガネラゲノムの編集技術の開発」で達成した項目は以下となる。

- ・シロイヌナズナ以外の植物への応用
- ・安定的葉緑体ゲノム編集個体の作出
- ・安定的ミトコンドリアゲノム編集個体の作出
- ・実用遺伝子の導入

この研究課題の大きな目標として、これまで報告のなかった安定的ミトコンドリアゲノム編集が挙げられる。本研究課題は、この目標を達成し、かつ農業上重要なCMS遺伝子の編集にも成功している。これら2つの目標は、それぞれにおいて世界初の技術開発となる。そのため、達成状況を100%とする。

研究開発課題「(6)-2 導入」で達成した項目は以下となる。

- ・マイクロニードルによるSAMへの一過的導入
- ・マイクロニードルを用いた*in planta*法による安定的形質転換個体の作出

この研究課題では、ゲノム編集を様々な植物へ応用するために汎用性の高い形質転換技術開発である*in planta*法の開発が目標であった。そして、単離したSAMへマイクロニードルで遺伝子導入し、次世代形質転換種子を得ることに成功した。対象とした植物は、主要作物かつ形質転換が困難なダイズを用いているため、この技術の汎用性を証明することにつながっていると考えている。そのため、達成状況を100%とする。

得られた成果により、植物のゲノム編集を基盤とした産業化の加速が期待できる。

B-7 研究開発課題「(7) RNA 結合型 PPR によるゲノム機能編集技術の開発」

(委託先：九州大学・中村崇裕；2016～2020 年)

(1) 研究開発の成果

【概要及び目的】

プロジェクトにおける位置づけ ゲノム編集技術の発展型として、世界初の汎用的な RNA 編集を可能にする RNA 結合型 PPR (rPPR) の開発、および実用植物への適用を行う。①翻訳活性化、②スプライシング制御技術を利用する。

技術的な重要性 DNA を操作するゲノム編集と同程度の汎用的な RNA 操作技術は未だ確立していない。rPPR を利用した RNA 編集技術は世界のスタンダードになる可能性を秘めている。応用的利用例を拡大し、その有用性を示す必要がある。

実施概要 (解決する手法) 動物培養細胞で確立した基盤技術を植物細胞へ適用する。複数の mRNA (3 種) に技術を適用し、mRNA 全般に利用するための基盤を構築する。

最終目標 植物モデル実験系での rPPR 技術の確立 (①翻訳効率を 2 倍に向上、② スプライシング制御 20%)。様々な mRNA に適用するための運用ノウハウを蓄積する。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み すでに設立したベンチャー企業、エディットフォース株式会社で実用化・事業化を進めている。プロジェクトで構築したゲノム編集ネットワーク、関連するベンチャー企業、または所属機関の産学連携部と共同して実用化、事業化を進める。ゲノム編集ネットワークの中核機関である広島大学、九州大学に設置した共通評価基盤等を活用し、企業とのフィージビリティスタディを促進させる。

【成果】

1. 植物培養細胞でのシステム構築

植物でのゲノム編集の適用に関しては、植物個体への直接の適用例がほとんどである。かつゲノム編集ツールをコードする外来 DNA の導入効率は、動物等と比べて著しく低い (動物培養細胞、80%以上；植物培養細胞 10%以下)。そこで、PPR 技術を用いたゲノム機能の編集技術

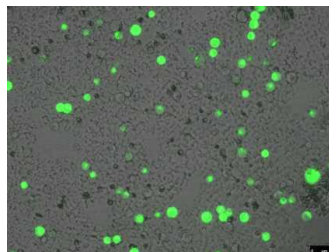


図 3.2.1.1.2-5-1. 植物培養細胞実験系の構築 開発するゲノム編集ツール等の評価および改良を高速かつ多検体で定量的に実施できる実験系を確立した。DNA 導入効率は約 50%、500 アッセイ/週が可能

の開発と並行して、本プロジェクトで開発するゲノム編集ツール等の評価および改良を高速かつ多検体で定量的に実施できる評価系の構築をシロイヌナズナ植物培養細胞 T87 株を用いて行った。PEG を利用した植物形質転換法、動物でよく利用されている多検体処理エレクトロポレータ (Lonza、nucleofector；96 サンプル同時処理が可能) について、詳細な反応の溶液や条件等を検討し、DNA 導入効率約 50%で 500 アッセイ/週の頻度で試験できる実験系を構築した (図 3.2.1.1.2-5-1)。合わせて、動物培養細胞での発現、大腸菌での組み換えタンパク質発現、植物形質転換等のベクター構築をゴールデンゲート法で統合的に行えるベクター構築システム、および植物用高感度レポーター遺伝子 (従来品と比べて感度 1000 倍向上) を整備した。プラスミドサイズと導入効率は逆相関関係であるため、植物で適用する際のプラスミドサイズの上限の特定、既存ゲノム編集ツールによる検証試験等を行い、植物培養細胞でのゲノム編集ツール等の開

発に資する実験評価系を確立した。本成果により、開発したゲノム編集等ツールの迅速かつ定量的な評価や改良が可能になった。

2. 植物培養細胞での翻訳制御技術の開発と動作検証

植物における翻訳活性化技術の開発のため、RNA 結合型 PPR (rPPR) の C 末端側に翻訳活性化に機能すると想定されるタンパク質ドメイン十数種を融合した人工遺伝子を構築した。5'非翻訳領域 (5'UTR) に PPR タンパク質の標的配列を搭載したレポータ遺伝子とともに、上記の植物培養細胞実験系で検証したところ、真核生物型の翻訳開始因子の一つである eIF4G を rPPR に融合したさいに 2~5 倍のレポータ活性、すなわち翻訳活性、の向上を観察できた (図 3.2.1.1.2-5-2)。

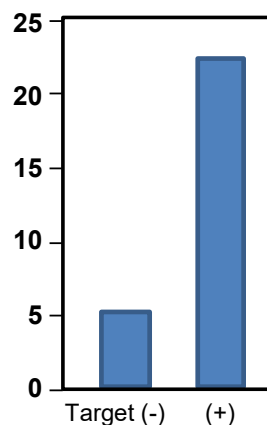


図 3.2.1.1.2-5-2. RNA 結合型 PPR を利用した翻訳制御ツールの開発
RNA 結合型 PPR と翻訳開始因子である eIF4G を融合させ、翻訳活性化ツール (PPR+4G) を構築した。5'非翻訳領域に PPR タンパク質の標的配列を搭載したレポータ遺伝子 (Target +/-) とともに、シロイヌナズナ培養細胞 T87 で電気穿孔法で導入し、レポータ遺伝子の nLuc 活性を測定した。

合わせて、実験系構築が容易な動物培養細胞を用いて、内在 RNA を標的とした同ツールの適用を行った。動物細胞として Hek293 細胞、標的遺伝子として RNA-X を選んだ。X はがん遺伝子として知られており、X 遺伝子発現の活性化、すなわち X タンパク質量の増加、により、細胞増殖の亢進が期待される。X mRNA 5' UTR (約 1,000nt) に対して、18 nt 認識の PPR タンパク質を 64 個作製し、それぞれに翻訳制御ドメインである eIF4G を融合させた後に Hek293 細胞にリポフェクション法で導入した。ELISA 法によって X タンパク質量を解析したところ、5'UTR 中央部を標的とした複数の PPR ツールにおいて、X タンパク質量の増加が観察できた (図 3.2.1.1.2-5-3)。X タンパク質量の増加が観察できた PPR_H について、PPR ツール導入後 48 時間の細胞数を計測したところ、翻訳活性化の効果がみられなかった PPR_N または_C と比べて細胞数が 2 倍に増加していた。PPR ツール導入時の X mRNA を RT-PCR で解析したところ、RNA 量に差がなかったことから、意図したとおり、PPR ツールによる内在 X mRNA の翻訳活性化、活性化に伴う細胞増殖亢進を制御できることを実証した。

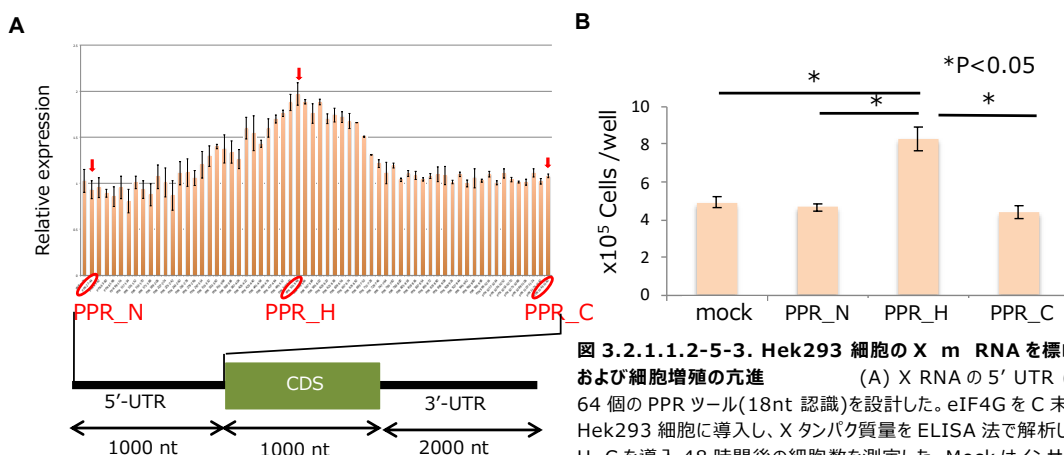


図 3.2.1.1.2-5-3. Hek293 細胞の X mRNA を標的とした翻訳制御、および細胞増殖の亢進 (A) X mRNA の 5' UTR (1160nt) に対して、64 個の PPR ツール (18nt 認識) を設計した。eIF4G を C 末端に融合させ、Hek293 細胞に導入し、X タンパク質量を ELISA 法で解析した。(B) PPR_N、H、C を導入 48 時間後の細胞数を測定した。Mock はインサートなしの空ベクター。6 回の実験の平均値と標準誤差を棒グラフで示した。

同じく、Hela 細胞中の Y RNA を標的として本ツールによる翻訳制御を検証したところ、p53 の翻訳の活性化にともなう細胞増殖阻害が観察された。p53 タンパク質量は 7 倍に増加していた (図 3.2.1.1.2-5-4)。以上の結果から、動物培養細胞において、複数の RNA を標的として本ツールを適用できることを示した。

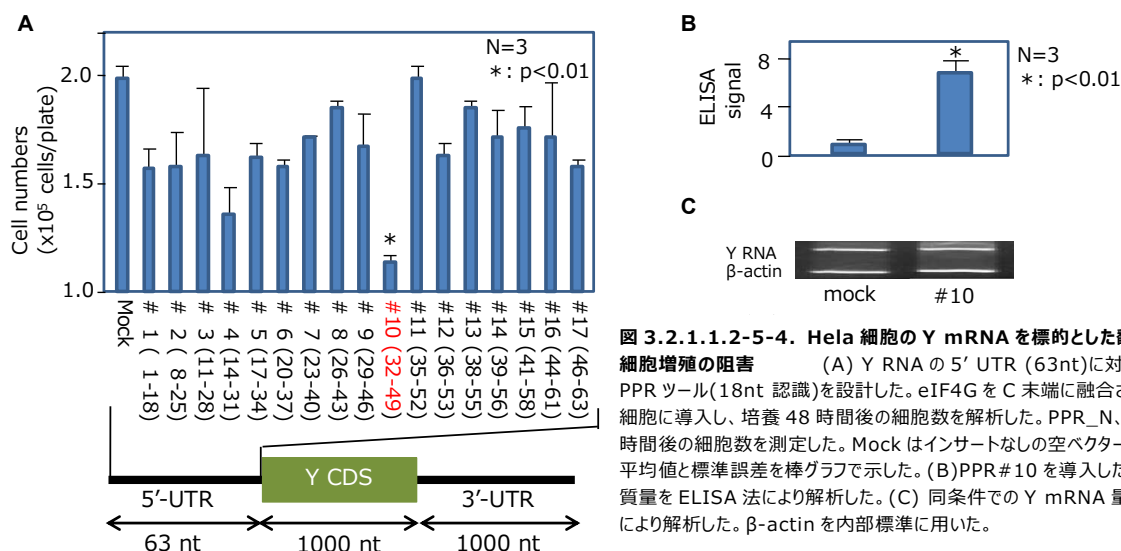


図 3.2.1.1.2-5-4. Hela 細胞の Y mRNA を標的とした翻訳制御、および細胞増殖の阻害 (A) Y RNA の 5' UTR (63nt) に対して、17 個の PPR ツール(18nt 認識)を設計した。eIF4G を C 末端に融合させ、Hela293 細胞に導入し、培養 48 時間後の細胞数を解析した。PPR_N、H、C を導入 48 時間後の細胞数を測定した。Mock はインサートなしの空ベクター。6 回の実験の平均値と標準誤差を棒グラフで示した。(B) PPR #10 を導入した際の、Y タンパク質量を ELISA 法により解析した。(C) 同条件での Y mRNA 量を RT-PCR 法により解析した。β-actin を内部標準に用いた。

3. 植物個体での翻訳制御技術の開発と動作検証

植物培養細胞でのレポーターRNA、および動物培養細胞での内在 RNA、を標的とした実験によって、PPR ツールによる翻訳活性化が達成できたため、植物個体中の内在 RNA を標的に同翻訳制御ツールを適用することとした。当初計画では、スマセルプロジェクト内で本技術を利用した有用物質生産を試みる想定だったが、2018 年段階で事業シーズとのマッチングが得られなかったこと、また、植物個体での実証試験が必要との推進委員会コメントをふまえて、植物個体において複数の mRNA (3 種) に本技術を適用し、RNA 種に依存せずに利用できる技術であることを実証するとともに、異なる mRNA に本技術を適用したさいの動作可動域や一般性の検証、運用ノウハウの蓄積、へと目的を変更した。また、トマトを材料に果実成熟に関する遺伝子を標的とし、2018~2019 年で実験系の整備をおこなったが、トマトにおける形質転換効率が低く、本ツールの定量的な比較ができないことが明らかとなった。そのため、2019 年 10 月よりシロイヌナズナを用いた実験に切り替えた。

シロイヌナズナを用いた実験では、3 つの遺伝子を標的とし、mRNA の 5' UTR に PPR タンパク質を設計した。

各 PPR タンパク質に eIF4G を融合させた人工遺伝子を作製し、グリーンゲート法を用いてバイナリーベクターに組み込み、アグロバクテリウムを介したフローラルディップ法にて、シロイヌナズナに人工遺伝子を導入した。得られた T0 植物とし、PCR 法により PPR-eIF4G 遺伝子が導入された個体を選抜した。選抜した T0 植物から得られた種子から芽生えた個体を T1 植物として、解析に用いた。

遺伝子 A を標的 mRNA とした試験では、とくに PPR1-eIF4G を導入した個体において、顕著な A タンパク質量の増加 (2.2~3.4 倍) が観察された (図 3.2.1.1.2-5-5)。特に PPR1 発現株で

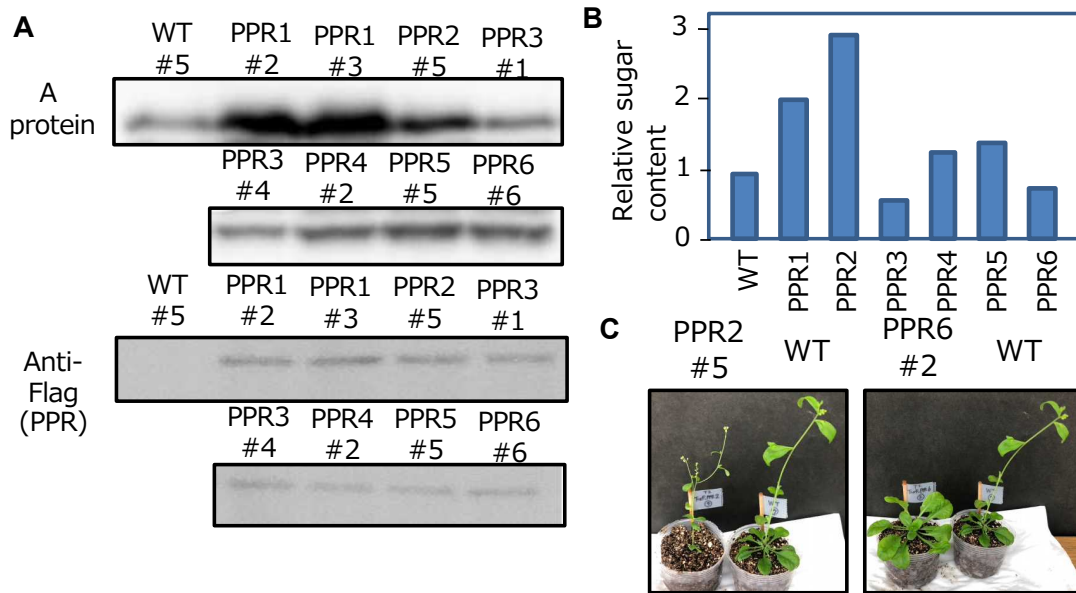


図 3.2.1.1.2-5-5. シロイヌナズナの遺伝子A mRNA を標的とした翻訳制御 (A) A mRNA の5'UTR を標的とした PPR1~6 を eIF4G と融合させた人工遺伝子をシロイヌナズナに導入し、T1 個体における A タンパク質量をウエスタンブロット法にて解析した。Flag 抗体を用いて植物個体で発現している PPR 人工遺伝子産物量も解析した。(B) PPR-eIF4G 人工遺伝子を導入した個体におけるデンプン量を解析した。(C) PPR-eIF4G 人工遺伝子を導入した個体の写真を一部掲載した。

はタンパク質量増加が再現良く観察された。一方、PPR3 発現株では、A タンパク質量の減少が観察され、標的とする位置によって、PPR ツールの効果が異なることが示唆された。PPR-eIF4G 人工遺伝子を導入した個体のいくつかで生育または形態異常が観察されたが、A 発現量との相関は見いだせなかった。タバコで A 遺伝子を過剰発現させたときでも、形態異常は観察されないが、デンプン量の増大が観察されると報告されているため、本実験における PPR-eIF4G 導入シロイヌナズナにおいても同様にデンプン量を解析したところ、PPR-eIF4G 導入植物で顕著なデンプン量の蓄積が観察された (図 3.2.1.1.2-5-5B)。以上の結果より、シロイヌナズナを用いた植物個体での実証試験に於いても、PPR 技術を用いて標的 RNA の翻訳活性化が達成できると結論づけた。

遺伝子 B を標的 mRNA とした試験では、PPR3-eIF4G を発現した株で植物体の成長阻害が観察された。遺伝子 B の過剰発現株でも同様の成長阻害の表現型が観察された (図 3.2.1.1.2-5-6)。さらに、各形質転換植物内の B タンパク質の蓄積量を解析したところ、野生型 (WT) に比

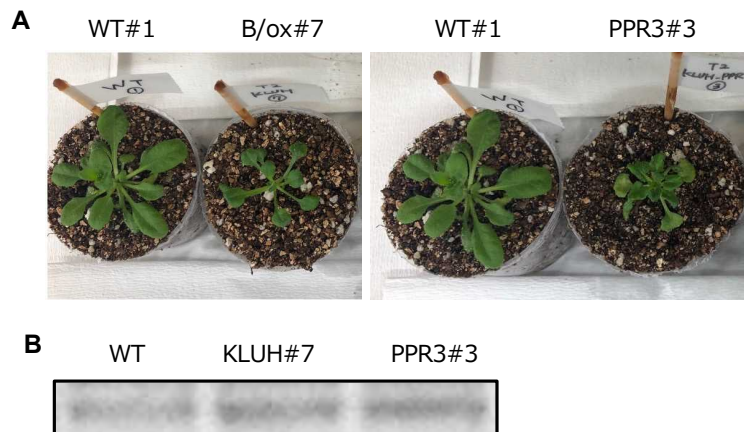


図 3.2.1.1.2-5-6. シロイヌナズナの遺伝子B mRNA を標的とした翻訳制御 (A) 遺伝子 B の過剰発現株、および BmRNA の5'UTR を標的とした PPR3-eIF4G 導入株の表現型。(B) 遺伝子 B の過剰発現株、PPR-eIF4G 導入株における B タンパク質のウエスタンブロット解析。

べて、B 遺伝子過剰発現株および PPR3-eIF4G 発現株で、B タンパク質量の増加が観察された。以上の解析から、B mRNA を標的としたときにも PPR 技術を用いて標的 RNA の翻訳活性化が達成できると結論づけた。

遺伝子 C を標的 mRNA とした試験では、PPR-eIF4G を導入した形質転換体の入手が困難であった。唯一入手できた PPR3-eIF4G を導入した植物個体に置いて、早咲きの表現型が観察できた。これは遺伝子 C を過剰発現した植物で観察できる典型的な表現型のため、想定通り、遺伝子 C の RNA を標的とした翻訳活性化が達成できていることが示唆されるが、C タンパク質量の解析などを行う必要がある。

以上、植物個体を用いた PPR による翻訳活性化の実証試験において、複数の mRNA で目的を達成できたことから、RNA 種に依存せずに本技術を適用できることを示した。

4. 植物培養細胞でのスプライシング制御技術の開発と動作検証

植物におけるスプライシング制御技術の開発のため、rPPR の C 末端側に植物でスプライシングに機能するとされるタンパク質ドメイン十数種を融合した人工遺伝子を構築した。PPR タンパク質の標的として、細胞死を誘導する遺伝子 D の mRNA の 5' UTR を利用したレポータ遺伝子を構築した (図 3.2.1.1.2-5-7)。本レポータ遺伝子では、下流の nLuc 遺伝子の発現によって選択的スプライシングの変化が解析できる。本レポータ RNA の 3'スプライシングサイト

(3'ss) を中心に 8 種の PPR タンパク質を設計した。②-1-1 で構築した植物培養細胞実験系を用いて、シロイヌナズナ T87 培養細胞にレポータ遺伝子、PPR 遺伝子を共発現させたところ、動物由来、植物由来、それぞれ一つずつのエフェクタードメインで有意な nLuc 活性の変動、すなわちスプライシング変化が観察された (図 3.2.1.1.2-5-7)。エフェクターとして動物 SD1 を用いた場合には、複数の標的部位で 2 倍程度の安定したスプライシング制御が、植物 SE1 を用いた場合には、rPPR5 で最も高い Luc 活性 (約 4 倍) が観察された。

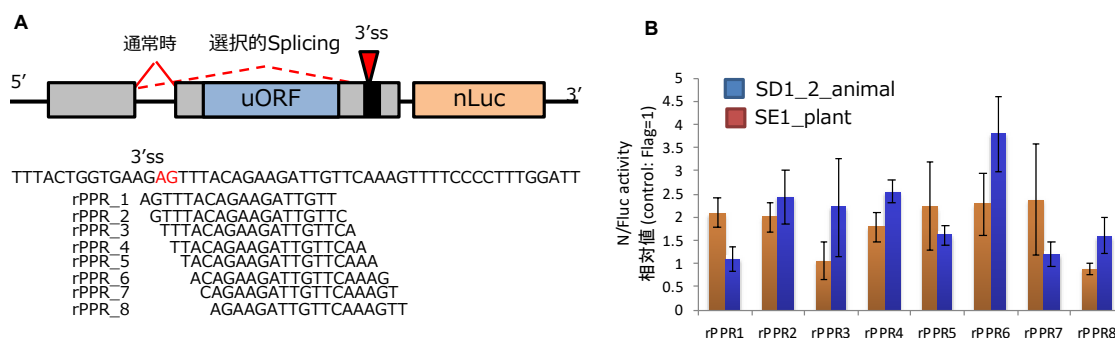


図 3.2.1.1.2-5-7. シロイヌナズナ培養細胞 T87 を用いたスプライシング制御ツールの開発 (A) レポータ遺伝子の模式図、および PPR 分子の標的配列。(B) T87 培養細胞におけるスプライシング制御の解析。空ベクター導入時を 1 として nLuc 活性の相対値で選択的スプライシング制御効率を測定した (N=3)。

次に、内在遺伝子 E の mRNA を標的として同ツールの適用を行った。遺伝子 E は抽台や花茎形成が同 RNA のスプライシングで制御されることが知られている。上述のレポータ遺伝子を用いた実験と同様に 11 種類の PPR 分子の設計を行うとともに、エフェクタードメインとしてはレポータ遺伝子で安定したスプライシング制御効率を示した SD1_2 を用いた。PPR 分子を植物培養細胞に電気穿孔法で導入した後、内在 RNA のスプライシング制御効率を RT-PCR で解析した (図 3.2.1.1.2-5-8) その結果、240nt の PCR 産物の最大 2.5 倍の増加が観察された。以上の

結果から、植物培養細胞において、レポータ RNA または内在 RNA を標的として本ツールを適用できることを示した。

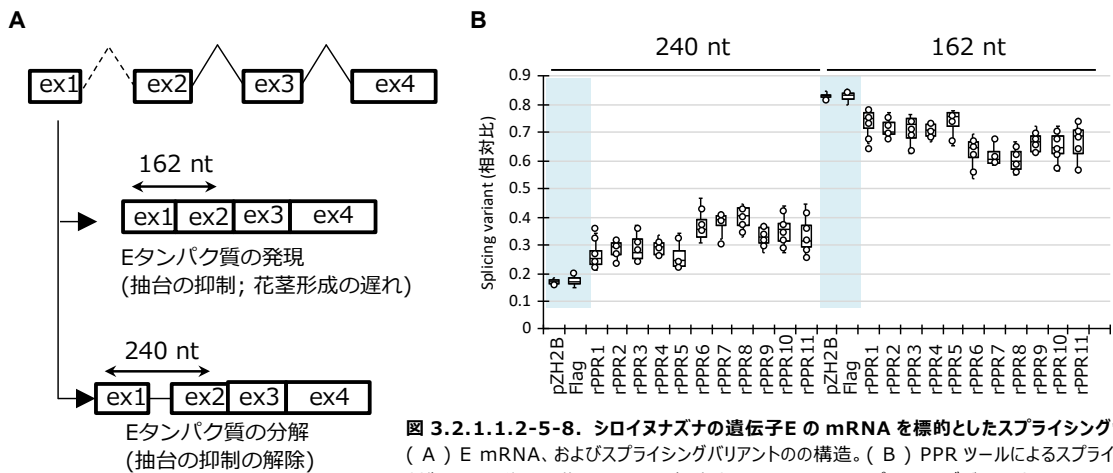


図 3.2.1.1.2-5-8. シロイヌナズナの遺伝子E の mRNA を標的としたスプライシング制御 (A) E mRNA、およびスプライシングバリエーションの構造。(B) PPR ツールによるスプライシング制御。PPR 分子を導入した T87 細胞中の E mRNA のスプライシングバリエーションを(A)に示したとおりに RT-PCR で解析した (N=3)。

5. 植物個体でのスプライシング制御技術の開発と動作検証

植物培養細胞での実験によって、PPR ツールによるスプライシング制御は達成できたため、植物個体中の内在 RNA を標的に同スプライシング制御ツールを適用することとした。翻訳制御ツールと同様、本テーマでも最終目標を当初の目標であった有用物質生産での適用から複数 RNA での適用に変更した。標的遺伝子として、図 3.2.1.1.2-5-7 で示した培養細胞でのレポータ実験系で用いた遺伝子 D の

RNA を選定した。rPPR にエフェクターとして SD1 を融合させた人工遺伝子をアグロバクテリウム法でシロイヌナズナに導入し、PPR-SD1 遺伝子が導入された個体を選抜し、得られた次世代である T1 植物を解析に用いた。RT-PCR により、細胞死を誘導するスプライシングバリエーションを解析したところ、標的とする位置によって、PPR ツールの効果が異なるが、いくつかの PPR 分子で統計的に有意なスプライシング制御が観察された (図 3.2.1.1.2-5-9)。予想した以外のスプライシングパターンが PCR 産物の電気泳動で観察されたが (図 3.2.1.1.2-5-

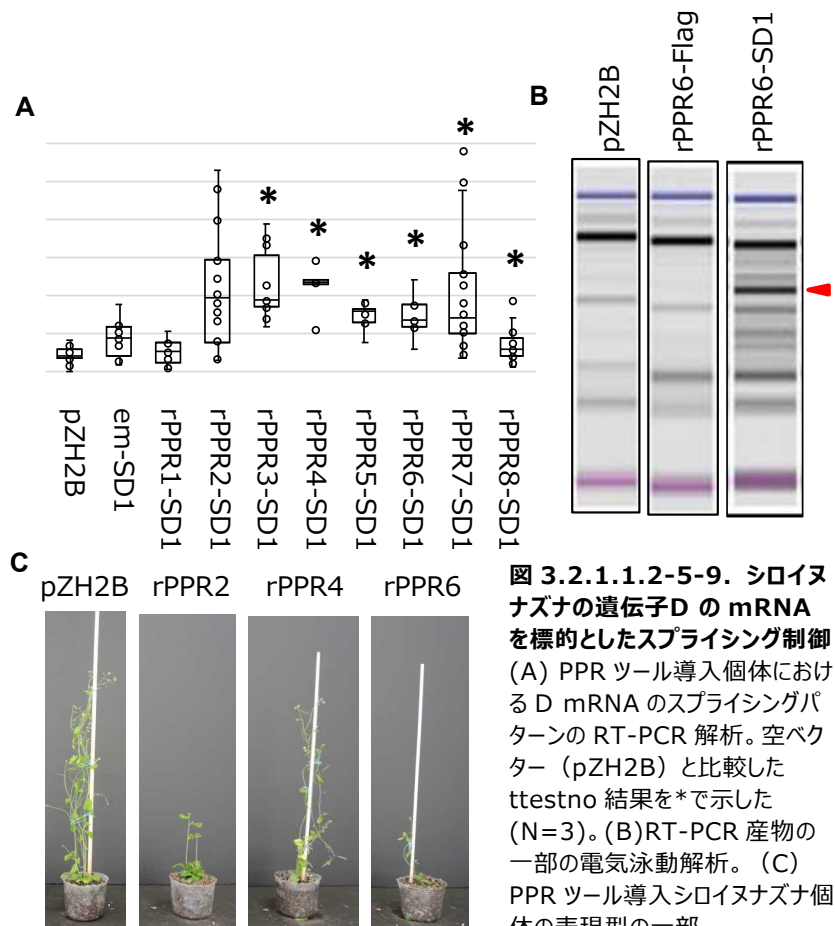


図 3.2.1.1.2-5-9. シロイヌナズナの遺伝子D の mRNA を標的としたスプライシング制御 (A) PPR ツール導入個体における D mRNA のスプライシングパターンの RT-PCR 解析。空ベクター (pZH2B) と比較した ttestno 結果を*で示した (N=3)。(B)RT-PCR 産物の一部の電気泳動解析。(C) PPR ツール導入シロイヌナズナ個体の表現型の一部。

9B)、その後のシーケンス解析では予想された以外のスプライシング産物は得られなかったため、目的通りのスプライシング制御が達成できたと判断した。PPR-SD1 人工遺伝子を導入した個体で生育異常が観察された。遺伝子 D の RNA スプライシング制御によって細胞死が誘導されるため、生育異常は合理的な表現型と考えられるが、スプライシング制御効率との間に定量的な相関関係を見いだすには至らなかった。スプライシング効率と個体表現型の関連性については、標的 RNA に依存する可能性もあり、他の RNA を対象に同技術を適用する必要があると考えられる。以上、植物培養細胞、および植物個体を用いた PPR によるスプライシング制御の実証試験において、複数の mRNA で目的を達成できたことから、RNA 種に依存せずに本技術を適用できることを示した。

(2) 最終目標の達成度及び研究開発成果の意義

翻訳制御技術の開発 本項目においては、最終目標としていた翻訳効率を 2 倍以上に向上、複数の mRNA での実証試験を達成したと判断している。実際に様々な RNA に適用できることは明らかとなったが、RNA の 5'UTR を標的とした複数の PPR 分子のうち、一部でしか翻訳活性化が観察されなかった。真核生物の翻訳開始では、キャップ結合タンパク質である eIF4A、足場タンパク質である eIF4G、RNA ヘリケースである eIF4E が三者複合体を形成し、リボソームを呼び込み、次に 5'から 3'方向に RNA をスキャンし、開始コドンを見つけることで翻訳が開始するとされているが、本研究開発で得られる成果は、既知の知見をそのまま適用することができず、新たな翻訳開始機構、もしくは PPR を介した特殊な翻訳開始機構の存在が示唆された。いまだ、PPR 標的配列・位置と翻訳活性化についてのメカニズムには基礎生物学的には不明な点が残されている。競合技術として、Cas13、PUF、SINEUP などが知られているが、どれも翻訳活性化効率は 1.3~2 倍程度である。本技術では c-myc を標的とした際に最大 7 倍の翻訳活性化が得られており、現存の方法論では一番効率良く翻訳活性化が可能な技術である可能性がある。

有用物質の産生を目的として、目的とする遺伝子を発現させたいときは、これまでは転写による活性化が用いられてきた。しかし、最近の研究で、多くの真核生物では、RNA とタンパク質量の蓄積量には 3 割程度の相関しかなく、転写された RNA が想定通りにタンパク質に翻訳されない可能性が示唆されている。本技術を適用することで、目的とする遺伝子の最終遺伝子発現産物であるタンパク質量を確実に増大させることが期待できる。人工的な転写制御系に本技術を組み合わせることで、より確実かつ効率的な発現制御系へと発展させることが次の課題と考えている。

スプライシング制御技術の開発 本項目においては、最終目標としていたスプライシング制御 20%、複数の mRNA での実証試験を達成したと判断している。しかし、翻訳ツールと同様、標的部位とアウトプットとなるスプライシング効率の変化についての学理を見出すことは出来なかった。アンチセンス核酸などを用いた競合技術が知られており、同一の標的 RNA を用いて、本技術の特性を詳細に検証し、差別化要因を見出す必要があると考えている。

近年、医療分野ではスプライシングの異常が様々な疾患の原因となることが明らかになっており、当該分野での利用が期待できる。本研究開発で目標とする植物等での有用物質生産に関しては、いまだ基礎生物学的な知見が不十分であり、まずは学術研究に本技術を利用することで、学術レベルを引き上げる必要があると考えている。

3.2.1.1.3. C 導入技術の開発

C-1 研究開発課題「(8) 高効率かつ低毒性のゲノム編集モジュール導入技術の開発」 (委託先：産業技術総合研究所・加藤義雄；2016～2020年)

(1) 研究開発の成果

【概要及び目的】

プロジェクトにおける位置づけ ゲノム編集モジュールとして使用されるタンパク質分子の性質を制御し、植物への導入方法の探索および最適化を行う。

技術的な重要性 動物細胞においては、遺伝子発現ベクターと比較してタンパク質を導入した場合に、オフターゲット等の副作用が少ないことを明らかにしてきた。しかし植物細胞の核内へタンパク質を導入する手法が確立されていない。

実施概要（解決する手法） 動物培養細胞の系で開発を進めてきたタンパク質の直接導入法と物理的な導入法の植物での有用性を示しつつ、実用化に適した改良を施す。

最終目標 植物個体へ国産ゲノム編集酵素を送達する技術を開発する（①植物培養細胞におけるゲノム編集の検証、②植物個体における国産ゲノム編集モジュールを送達する技術確立）。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み プロジェクトで構築したゲノム編集ネットワーク、関連するベンチャー企業、または所属機関の産学連携部と共同して実用化、事業化を進める。ゲノム編集ネットワークの中核機関である広島大学、九州大学に設置した共通評価基盤等を活用し、企業とのフィージビリティスタディを促進させる。

【成果】

1. 植物細胞等に導入する手法の開発

1-1. ゲノム改変タンパク質のエレクトロポレーション法による導入

細胞壁を有する植物においてタンパク質を直接導入する手法が世界的にも報告例がなかったため、動物細胞で実績のある手法を踏襲しつつ、従来型のゲノム改変酵素である Cre タンパク質をエレクトロポレーション法により導入することとした。Cre タンパク質が核内に導入された場合にのみ loxP 配列間で組換えを起こし、GUS 遺伝子が発現するようになるレポーター細胞株を樹立し、実験に使用した。Cre タンパク質は、His タグおよび NLS を融合した遺伝子を pET ベクターに搭載し、大腸菌にて発現精製を行なった。

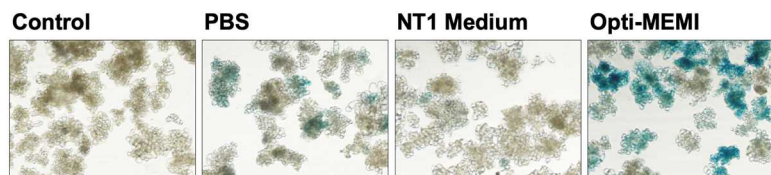


図 3.2.1.1.3-1-1. エレクトロポレーション法による Cre タンパク質の導入。ゲノム改変されると GUS が発現し青色に染色されるレポーター細胞を使用している。培地成分等の条件を最適化した。

詳細な実験条件等を網羅的に探索したところ、動物用の培養培地である、Opti-MEMI 培地が最も効率よく導入できることが判明した（図 3.2.1.1.3-1-1）。Cre タンパク質は、80%以上の効率で導入することが可能であった。パルス条件は、強い方が導入できるものの、細胞毒性が高くな

ることから、導入効率と細胞毒性はトレードオフの関係にあった。この成果は論文として発表した (Furuhata et al., *Sci. Rep.* 2019、Furuhata et al., *Protcol Exchange.* 2020)。

1-2. ゲノム改変タンパク質の DIVE

エレクトロポレーション法の研究過程において、電気的な刺激を与えていないネガティブコントロールのサンプルにおいて、GUS 染色されている細胞があることを見出した。この現象は、T87 培養細胞において、Cre タンパク質が細胞壁、細胞膜および核膜をくぐり抜け、ゲノム DNA にアクセス可能であることを示している。我々はこの現象を利用したタンパク質導入法を DIVE 法 (Delivery Independent of Vehicle or Equipment) と呼び、上述のエレクトロポレーション法とともに特許を出願した (特願 2018-193751)。

さらに植物個体での DIVE 法の検証を進めるために、レポーター遺伝子を組み込んだ形質転換植物個体を作成した (高崎健康福祉大学との共同研究)。種蒔から 5 日目の芽生え個体に対して、Cre タンパク質を添加したところ、特に根組織において強い GUS 染色が観察され、根組織への DIVE が示唆された。Cre を DIVE した根組織を Callus-Inducing Medium 上で培養してカルス化し、塊状カルスからゲノム DNA を抽出して PCR を実施したところ、Cre による組換えを示す DNA バンドが観測され、個体へと再生可能な組織に対して、タンパク質が導入され、なおかつゲノム改変可能であることを立証した (図 3.2.1.1.3-1-2)。

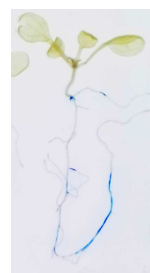


図 3.2.1.1.3-1-2. DIVE 法による Cre タンパク質の植物組織への導入。レポーター植物体を使用し、組織での導入を検証した。

1-3. 国産ゲノム編集モジュール・ND1 タンパク質の導入

広島大学で開発された、FokI 様のヌクレアーゼドメイン ND1 について、植物培養細胞での導入評価を行うため、ゲノム編集によって GUS 遺伝子が発現する SSA レポーター細胞株を樹立した。ZFA36 という配列を認識する Zinc-finger と FokI もしくは ND1 の融合タンパク質 (ZF-FokI/ZF-ND1) を大腸菌を利用して発現精製した。興味深いことに、ZF-ND1 タンパク質は、ZF-FokI よりも大腸菌内での可溶性タンパク質発現量が多いということが見出された。

ZF-FokI および ZF-ND1 タンパク質を、エレクトロポレーション法により上記細胞株に導入したところ、GUS 染色されている細胞が観測された。また、DIVE 法により導入した場合においても、エレクトロポレーション法よりは少ないながらも、GUS 染色されている細胞が観測された (図

3.2.1.1.3-1-3)。すなわち、国産モジュールを含むゲノム編集タンパク質が、細胞壁を有する植物細胞内に導入できたこと、さらには、標的遺伝子をゲノム編集可能であることが確認された。

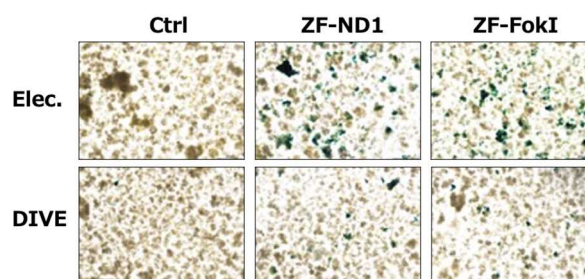


図 3.2.1.1.3-1-3. DIVE 法による国産モジュール・ND1 タンパク質の導入。ゲノム編集が生じると GUS が発現するレポーター植物細胞にて検証を実施した。エレクトロポレーション法および、DIVE 法にて、タンパク質が導入可能であることが検証できた。

1-4. DIVE 効率化のための化合物スクリーニング

DIVE 効率をより向上させられる様な低分子化合物の同定を目指してスクリーニングを実施した。スクリーニングの評価においては、Cre タンパク質が導入されると Firefly ルシフェラーゼが発現するようになる細胞株 (T87. xGxFL) を新規に樹立して実験に用いた。

東京大学創薬機構 BINDS より提供いただいた 9600 種類の化合物に対して 1 ウェルあたり 1 化合物 (80 種類 × 120 プレート) の 1 次スクリーニングを行い、上記レポーター細胞株と Cre タンパク質を添加し、ルシフェラーゼ値の向上した 150 種類の化合物を得た。さらに 2 次スクリーニングにおいて再現性 (n=4) を検証し、特に濃度依存性の高い化合物 26 種類を同定した (図 3.2.1.1.3-1-4)。またこの実験過程において、細胞死を誘導する化合物も発見しており、これらの化合物は除草剤候補化合物となると考えられる。

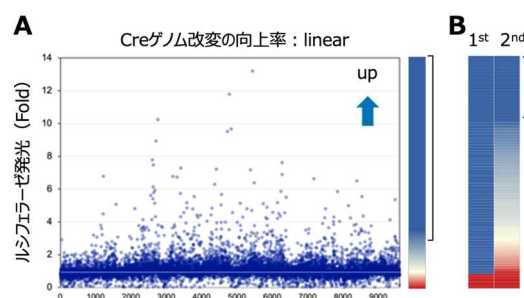


図 3.2.1.1.3-1-4. 導入効率を向上させる化合物のスクリーニング。(A) 9600 化合物に対して 1st スクリーニングを行い、150 候補化合物を取得。(B) 2nd で再現性の高い 26 化合物を同定した。

1-5. 動物細胞での導入効率化

タンパク質が細胞内に取り込まれる現象は、限定的な条件において誘起される。DIVE 法の開発過程においては、高濃度タンパク質の添加という条件に加えて、培地の溶液組成が極めて重要であることを見出してきた。動物細胞において、導入効率を向上させる化合物を添加したところ (化合物 X, Y)、Cre, ZFN, Cas9 等の種々のタンパク質において、最大で 10 倍のタンパク質導入効率向上が見られ、極めて細胞毒性が低い手法として特許を出願した (図 3.2.1.1.3-1-5; 特願 2021-005696)。

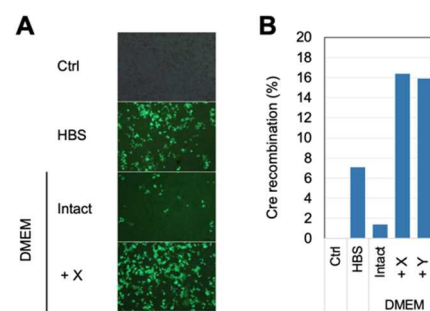


図 3.2.1.1.3-1-5. 動物細胞でタンパク質の導入効率を向上させる培地組成。(A) 導入されると GFP が発現する細胞での確認。(B) 化合物の添加により効率向上。

2. 植物個体における国産ゲノム編集モジュールの導入

2-1. SLC アッセイによる導入評価システムの確立

タンパク質が植物の細胞壁を乗り越えて、核まで到達することを別の角度で検証するために、我々は新たに、SLC レポーターシステムを構築した。この手法では、タンパク質が植物細胞内の特定オルガネラに局在すると、化学発光を生じる。

2-2. PPR-ND1 タンパク質の個体への導入評価

純国産のゲノム編集モジュールである PPR-ND1 融合遺伝子をエディットフォース社が設計・構築した。また核移行・導入の促進を狙って、3xNLS を融合した。このタンパク質モジュールを大腸菌にて発現精製し、レポーター培養細胞およびレポーター植物体へ添加して、その化学発光を検出した。SLC レポーター培養細胞では、タンパク質の添加から 30 後をピークとして化学発光が検出され、細胞内への取り込みが検出された。また、SLC レポーター植物体では、タンパク質の添加直後から、特に根組織において化学発光が検出された（図 3.2.1.1.3-1-6）。上記の結果から、植物個体において、PPR タンパク質モジュールを含めた国産のゲノム編集モジュールが導入可能であることを実証した。

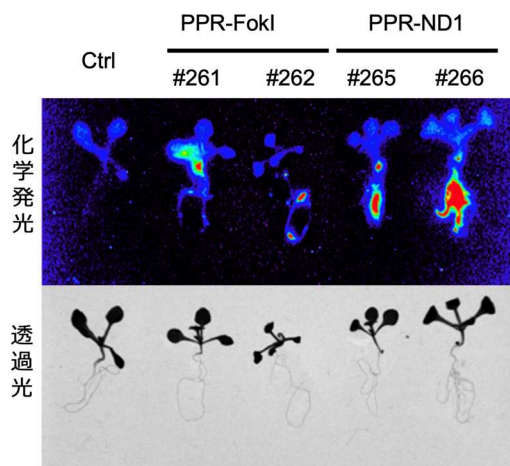


図 3.2.1.1.3-1-6.植物個体における国産モジュール・PPR-ND1 の導入検証。SLCレポーター植物個体を使用し、化学発光の検出により、タンパク質の核内導入を立証した。

(2) 最終目標の達成度及び研究開発成果の意義

本項目においては、500 種類以上の低分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行い、導入効率が 2 倍以上向上する化合物を取得すること、並びに、植物個体において、PPR タンパク質モジュールを含めた国産のゲノム編集モジュールを複数種類評価し、国産のゲノム編集モジュールが導入可能であることを実証することを最終目標とした。上記の結果の通り、培養細胞へのタンパク質導入に関しては、プロジェクト開始時点において、細胞壁を有する植物培養細胞に対して、タンパク質が自発的に取り込まれて核内に到達しうるかどうか、不明な状態であった。その状況下において、タンパク質を導入して植物でのゲノム改変を実証できたことは大きな成果であったと考えている。その上で、9600 種類の低分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行い、導入効率が 3 倍以上向上する化合物を 26 種類取得し、目標を上回る成果を得た。動物細胞でも導入効率を向上させる化合物を発見して特許を出願しており、高機能物質生産を目的とした細胞工学領域だけではなく、医療産業にも波及できると考えられる。植物個体への導入検証に関しては、定量的に評価する手法として SLC アッセイを新規に構築した点が大きな成果であると考えている。またこの SLC アッセイがクロスプラットフォームの導入評価系となりうることから、国内外のモジュール導入を対等な条件下で比較することができ、将来的にバイオ産業の基盤的な標準評価軸として、活用できることが期待できる。

ゲノム編集技術の植物産業への利用については、植物が有している細胞壁の突破という技術的な課題と、遺伝子組換え体としての規制に関する課題が、長年の命題となっていた。本課題で目指してきたモジュールタンパク質の直接導入は、この 2 つの課題を同時にクリアする可能性を有している。

C-2 研究開発課題「(9) ナノニードルを用いたゲノム編集モジュールの植物個体へのデリバリー技術の開発」(委託先:産業技術総合研究所・中村史;2019~2020年)

(1) 研究開発の成果

【概要及び目的】

植物細胞、植物組織に効率よく挿入可能なマイクロニードルの設計と挿入手法の開発を行った。フォトマスクの設計、エッチング条件等の微細加工プロセスの詳細を検討し、シロイヌナズナ葉組織に対して100%挿入可能なマイクロニードルアレイ(MNA)の作製に成功した。また1000チップ/月の生産が可能であることを実証した。

シロイヌナズナ、実用植物試料としてダイズ茎頂分裂組織に対するゲノム編集モジュール Cre リコンビナーゼ、Cas9、PPR-ND1 の導入法を開発した。植物 MNA 動作装置と自動化ソフトウェアを開発し、これらを用いて MNA を操作することで、シロイヌナズナの葉組織に対してゲノム編集モジュールの導入を行った。その結果、Cre リコンビナーゼ、PPR-ND1 で目標のゲノム編集効率を達成した。またダイズ茎頂分裂組織では標的遺伝子に変異が確認され、実用植物の内在性ゲノムの編集が可能であることが立証された。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み プロジェクトで構築したゲノム編集ネットワーク、関連するベンチャー企業、または所属機関の産学連携部と共同して実用化、事業化を進める。ゲノム編集ネットワークの中核機関である広島大学、九州大学に設置した共通評価基盤等を活用し、企業とのフィージビリティスタディを促進させる。

【成果】

本研究項目では、[1] ナノニードルアレイおよび挿入方法の開発、[2] 植物個体での適用実現の2つの課題において研究開発を行った。ナノニードルアレイという呼称はそのサイズからマイクロニードルアレイ(MNA)に変更し、課題名を除きこのように表記する。[2]では実用植物として高崎健康福祉大学で採用したダイズを標的とした。

[1] ナノニードルアレイおよび挿入方法の開発

植物細胞、植物組織に40%以上の効率で挿入可能なマイクロニードルの設計と挿入手法の開発を行った。茎頂分裂組織のL2層への到達、物質導入を目指し、長さ100 μm の長尺ニードルが配列したマイクロニードルアレイ(MNA)を作製することを目指した。新規に幅および厚さ1~2 μm 、長さ40~100 μm の角柱状マイクロニードルが1次元に配列したMNAを作製する微細加工プロセスを開発した。5mm角のシリコンチップの端面に10 μm 、30 μm 、60 μm の等間隔で、それぞれ500本、166本、83本が配列したアレイを設計した。図3.2.1.1.3-2-1は30 μm 間隔で配列した長さ100 μm のMNAである。一

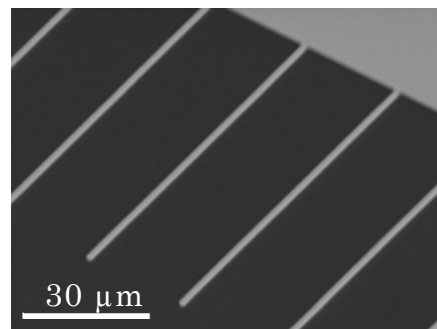


図3.2.1.1.3-2-1 MNAのSEM像

方、植物組織に対するMNAの挿入に特化した装置を新たに開発した。実体顕微鏡とUSBカメラ

を用いた2方向観察による位置合わせを行い、ピエゾモーターによりMNAステージを水平動作し、相対する試料ステージ上に固定された植物組織に接近させ、MNA挿入を行う仕様を設定した。MNAステージにはピエゾ素子が具備されており、5 kHz以下の任意の周波数でMNAの針軸方向の加振が可能である。また、全ての操作は専用に開発した動作制御ソフトウェアを用いて行うことが出来る。シロイヌナズナ培養細胞、シロイヌナズナ葉組織、ダイズ茎頂分裂組織の表面弾性率はそれぞれ2.6 MPa, 2.2 MPa, 4.9 MPaでありほぼ同程度であった。シロイヌナズナ葉組織を用いて無座屈で挿入可能な針形状を探索した。その結果、長さ100 μm ではいずれの針でも座屈が生じ葉組織に挿入出来ないことが判明し、シロイヌナズナ葉組織に対して100%挿入可能な最も細く長いマイクロニードルの仕様を決定した。このMNAは1000チップ/月で生産可能である。このMNAを使用し、ゲノム編集モジュールの導入を検討した。Cas9-GFP融合タンパク質をシロイヌナズナ葉組織に導入し、共焦点蛍光顕微鏡により導入タンパク質の画像解析を行った結果、少なくとも励起光が到達する12 μm の深さまでCas9-GFPが導入されていることが明らかとなった。

[2] 植物個体での適用実現

シロイヌナズナレポーター植物、ダイズ茎頂分裂組織に対するゲノム編集モジュールCreリコンビナーゼ、Cas9-GFP、PPR-ND1の導入法を開発した。シロイヌナズナレポーター植物に関して、CreリコンビナーゼではloxP配列に挟まれたGFP遺伝子が排除されると下流のGUS遺伝子が発現する構造を持つ。Cas9では色素合成に関連するphytoene desaturaseをコードしたPDS3を標的配列とした。PDS3配列がGUS遺伝子中央に挿入され、分断されたGUS遺伝子には0.5 kbpの重複があり、PDS3の切断により重複配列の相同組み換えが誘起され、正常なGUS遺伝子へと改変される。PDS3配列上の2箇所をgRNAを設計した。PPR-ND1ではCas9同様のレポーター遺伝子構造であり標的遺伝子としてGFP locus4を有している。いずれも葉組織を対象とした試験を行い、遺伝子改変された細胞数をGUS染色スポット数とし、使用したマイクロニードルの本数で除することにより効率を算出した。目標の1%は100本針を有するMNAで操作しGUS染色スポットが1つ観察される効率である。Creリコンビナーゼ導入に関して、導入の際にはシロイヌナズナ葉組織あるいはダイズ茎頂分裂組織をステージに固定しMNAを十分に接近させた上で、タンパク質溶液を滴下し、挿入を行った。静置時の加振は1 kHz、振幅0.5 μm で実施した。操作後の葉組織はB5寒天培地上で40 hインキュベーションした後に、GUS基質であるX-Glucにて染色した。

Creリコンビナーゼの結果を表1に示す。いずれの条件でも目標の1%を越える効率が達成されたが、ナズナ葉組織表面の撥水性が高いためにSILWETの効果が高いことが明らかとなった。酸化シリコンの表面とタンパク質の相互作用が高い場合に加振による剪断力でタンパク質の放出を促す目的であったが、Creリコンビナーゼに関しては加振の効果が無いことが分かった。本結果から、高い効率でタンパク質の直接導入が可能であることが示された。

Cas9/gRNA 複合体の導入を同様に行った。GUS 染色スポットは加振ありの場合のみ観察され、その効率は加振あり 0.6%、加振なし 0%であった。Cas9 はシリコン表面に強く吸着する傾向があるため加振を必要とすると考えられる。PPR-ND1 は ZFN、TALEN 等と同様に 2 量体形成を必要とする。試験の結果、加振あり 0.2%、加振なし 1.0%であった。これら

表 3.2.1.1.3-2-1 Cre リコンビナーゼによる組換

	0% SILWET	0.05% SILWET
挿入なし	N. T.	0%
挿入(加振なし)	2.9%	8.8%
挿入(加振あり)	2.5%	5.4%

の結果が Cre リコンビナーゼの効率と比較して低い理由として、二本鎖切断された染色体 DNA は非相同末端結合による修復が優先し、レポーター遺伝子の発現に必要な相同組換えの頻度が低いためであると推察される。PPR-ND1 でゲノム編集に成功したことから、本プロジェクトで開発された純国産ゲノム編集モジュールの直接輸送によってゲノム編集が可能であることを示した。

ダイズ茎頂分裂組織では、次世代シーケンス (NGS) 解析によって、改変遺伝子の解析を行った。PDS11/18 を標的として gRNA を設計し、Cas9/gRNA の導入を行った。ダイズ種子より胚軸を分離し茎頂分裂組織を調製した。加振ありの条件で、導入操作を行い MS 寒天培地上で 16~26 h インキュベーションした。その後、挿入部位近傍の組織を切り出し、染色体 DNA 抽出を行い、これを鋳型とし、切断箇所を挟む 400 bp の PCR 断片の増幅を行った。PCR 産物の NGS 解析を行った結果、MNA による導入操作を行った試料からのみ 11 bp の長鎖欠失を示す配列が確認され、Cas9/gRNA の導入により、実用植物試料においても染色体 DNA の切断とそれに伴う変異が確実に生じていることが確認された。

(2) 最終目標の達成度及び研究開発成果の意義

植物細胞・組織へのダメージを考慮するとニードルの幅と厚さは 2 μm 以下にするべきである。当初予定していた長さ 100 μm のマイクロニードルは上記太さのマイクロニードルでは座屈するため植物組織に挿入不可能であった。ニードル根本にかかる応力を考慮すると一体成形の材料であることが好ましく、単純にヤング率の高い材料を選択することは出来ない。加工プロセスの自由度、簡便さを考慮すると、本事業で開発したシリコン製 MNA は植物組織への挿入操作において最適な材料である。課題(1) ナノニードルアレイおよび挿入方法の開発では、目標値の 40%を上回る挿入効率 100%を達成し、かつ製造プロセスでは 400 チップ/月を上回る 1000 チップ/月を達成したので、達成度 100%と言える。課題(2) 植物個体での適用実現では MNA による国産ゲノム編集モジュール PPR-ND1 の直接送達により、目標の 1%の効率でゲノム編集が可能であることを実証した。これにより達成度 100%と言える。本技術は、植物種を選ばない物理的方法であるため、植物の分子育種における新規基盤技術として高い実用性が期待される。実用段階では、標的の植物種と使用するゲノム編集モジュールに合わせた導入方法のチューニングが必要となる。

3.2.1.1.4. 「D. インフォマティクスによる支援」

D-1 研究開発課題「(10) インフォマティクスコア」

(委託先：東京大学・谷内江望；2016～2020年)

(1) 研究開発の成果

【概要及び目的】

プロジェクトにおける位置づけ ①新規の国産ゲノム編集モジュールの開発のために、大規模なゲノム、メタゲノムリソースから高速でゲノム編集モジュール関連遺伝子候補群を高速で抽出するソフトウェアを開発し、遺伝子候補のリストアップおよび評価実験を行う。②さらにプロジェクト内で開発される新規ゲノム編集ツールの精度評価を大量に超並列で行うことのできる超並列シーケンシング評価およびデータ解析プラットフォームの開発を行う。

技術的な重要性 ①現在実用化されているジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZNF)、TAL エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、CRISPR といったゲノム編集ツールは全て生物がコードしている周期的リピート配列に由来している。ゲノムプロジェクト以降現在までに、リピート配列を評価するソフトウェアは多数開発されたが、汎用的に配列周期性を高速に評価するソフトウェアは開発されていない。ゲノムリソースから超高速で周期的リピート配列を発見し、汎用的に新規の国産ゲノム編集ツール候補を発見できるソフトウェアが必要である。②新規のゲノム編集ツールの開発過程においては、この性能評価を複数の生物種の複数のターゲットゲノム配列において評価する必要がある。またこれらが意図しないゲノム編集を引き起こさないか評価する必要がある。一方で、ゲノム編集ツールの評価パイプラインは効率化されておらず、超並列に多くのゲノム編集実験と評価およびその自動データ解析を可能にするプラットフォームの開発が必要である。

実施概要 (解決する手法) ①k-mer 周期性に基づいて大規模なゲノム・メタゲノムリソースから超高速でゲノム編集ツール候補をスクリーニングするソフトウェアを開発し、新規国産ゲノム編集関連遺伝子候補群を得る。②DNA バーコードによる複数サンプルのラベル化によって、100以上のサンプルについてゲノム編集のオンターゲット効果およびオフターゲット効果を一斉にアッセイできる超並列シーケンシングパイプラインおよびゲノム編集結果の自動評価ソフトウェアを開発する。

最終目標 ①DNA 結合性をもつ新規国産ゲノム編集関連遺伝子候補を1つ以上得る。②ゲノム編集評価超並列解析パイプラインを完成させる。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み プロジェクトで構築したゲノム編集ネットワーク、関連するベンチャー企業、または所属機関の産学連携部と共同して実用化、事業化を進める。ゲノム編集ネットワークの中核機関である広島大学、九州大学に設置した共通評価基盤等を活用し、企業とのフィージビリティスタディを促進させる。

【成果】

①新規ゲノム編集遺伝子候補スクリーニングソフトウェア SPADE の開発 現在実用化されているジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、TAL エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、CRISPR といったゲノム編集ツールは全て生物がコードしている周期的リピート配列に由来している。例

例えば、ジンクフィンガーや TAL エフェクターは DNA に二本鎖に結合するための周期的なアミノ酸リピート配列を有し、各リピートユニット内の一部のアミノ酸配列が特異的な DNA 配列との結合様式を定義している。また、原核生物の CRISPR システムにおける免疫獲得課程においても外来 DNA 由来の配列が周期的なリピート配列に挟まれる形で経時的にゲノム上に獲得される。ゲノムプロジェクト以降現在までに、リピート配列を評価するソフトウェアは多数開発されたが、汎用的に配列周期性を高速に評価するソフトウェアは開発されていない。この点に注目し、k-mer 評価によって周期的リピート配列を高速かつ教師なしで大規模ゲノムリソースから抽出するソフトウェア SPADE (Search for Patterned DNA Elements) を開発した。

周期的リピート配列捕捉アルゴリズム評価のために、NCBI で公開されている 7,006 の原核生物ゲノム全ておよびヒトゲノムを解析し、既知の CRISPR 領域および TAL エフェクター (図 3.2.1.1.4-1)、ジンクフィンガーのアミノ酸リピート配列を高い精度で捕捉できることを示した。DNA 性の周期的リピート配列として捕捉されたものの中には既知の CRISPR 領域、tRNA オペロンなどが含まれた (図 3.2.1.1.4-2)。これらの内、既存の CRISPR 予測ソフトウェアである CRISPRFinder を参考に、周期 58-81 bp およびスペーサー配列長 25-60 bp となるものを得た結果、これが CRISPRFinder および CRISPRDetect と同等の精度で既知の CRISPR 領域を再捕捉した (図

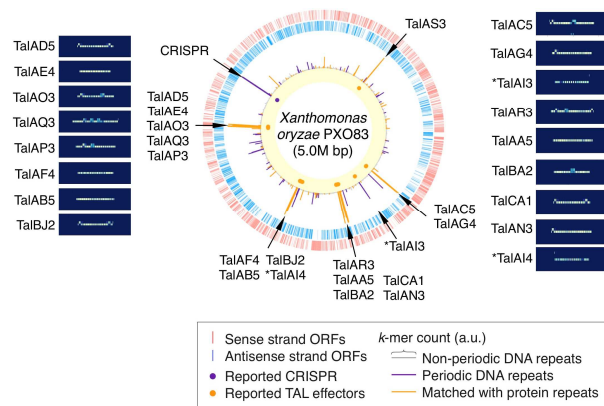


図 3.2.1.1.4-1. *Xanthomonas oryzae* PXO83 ゲノムにおける CRISPR 領域と TAL エフェクターの同時捕捉例

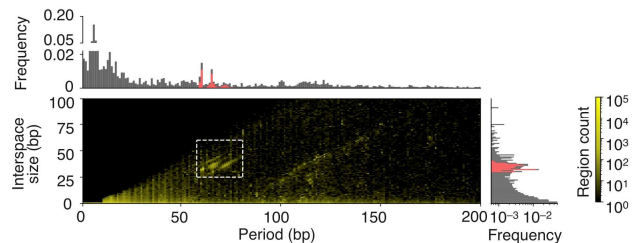


図 3.2.1.1.4-2. 7,006 原核生物ゲノムにおける CRISPR 領域の捕捉。点線は CRISPR と予測されるもの。

3.2.1.1.4-3)。TALE およびジンクフィンガーについては TPR、ANK、WD40 などを含めて、リピート配列を教師なしで予測する他のソフトウェア XSTREAM および TREKS と比較し、本アルゴリズムが最も高い精度を持つことを示した。また、他のソフトウェアと比較して SPADE は正確にリピート周期を捕捉した (図 3.2.1.1.4-4)。

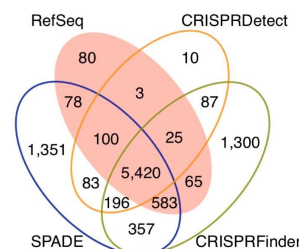


図 3.2.1.1.4-3. SPADE はその他の CRISPR 特化型ソフトウェアと同等の精度で既知の CRISPR 領域を捕捉できる。

SPADE をもちいて NCBI で公開されている全原核生物ゲノム 7,006 種をスクリーニングし、アミノ酸周期配列をもつ遺伝子として約 5.8 万遺伝子を得た。さらに配列クラスタリングによって、ここから 10,885 のアミノ酸周期配列クラスターを得た。新規国産ゲノム編

集ツールとしてタンパク質性のもものでは、特に細胞導入効率の高いコンパクトなものを得ることが目的であることなどから、これらのクラスターの内、リピート配列モチーフ長が 45 残基以下で、異なる DNA 配列に特異性を付与する可能性のある可変残基 1 残基以上と α ヘリックスを含み、クラスター内遺伝子群の繰り返し中央値が 10 以上のもの 128 クラスターを得た。これらの候補には TAL エフェクターおよび植物で同定されている PPR のホモログ遺伝子などが含まれた。これらの結果を受けて 128 の新規タンパク質性ゲノム編集候補遺伝子クラスターの評価実験を行うために 2019 年度より「(2-e) 新規タンパク質性ゲノム編集モジュールの開発」を立てて、これらの遺伝子合成実験および DNA 結合性評価試験をエディットフォース株式会社と協働して進めた。

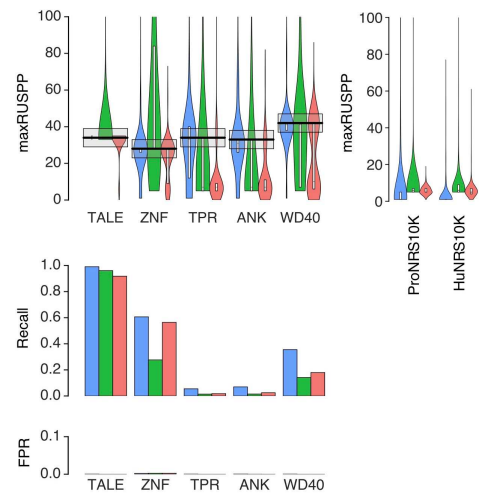


図 3.2.1.1.4-4. タンパク質リピート配列の捕捉精度。各種リピート配列のコントロールセットについてそれぞれのソフトウェアが捕捉したリピート周期の分布。太線が正しい周期。正しい ± 5 残基の範囲におけるリピート配列の再捕捉率と偽陽性率。ProNRS10K および HuNRS10K はネガティブコントロールセット。

②ゲノム編集評価超並列解析パイプラインの開発 ゲノム編集のオンターゲット評価とオフターゲット評価それぞれについて任意の細胞サンプルを用いて一斉に 100 例以上行うことのできる超並列 DNA シークエンシングのパイプラインとデータ解析パイプラインの開発を行った。はじめに、ゲノム編集のオンターゲット評価について DNA バーコード法を利用して大量の異なるサンプルを同時に解析できる次世代 DNA シークエンシングライブラリー調製法およびデータ解析手法を樹立した。このパイプラインでは、はじめに、任意の細胞サンプルが 96 ウェルプレートに準備され、それぞれのサンプルウェルにおいて異なるゲノム編集が行われる (図 3.2.1.1.4-5)。次に、それぞれのターゲット特異的な PCR プライマーを用いてゲノム編集オンターゲットサイトが増幅される。PCR プライマーは共通の配列を持ち、異なるサンプルウェルから得られる PCR 増幅産物が全て同様の配列長となり、また共通の配列をその両端に持つ。その後、異なる配列をターゲットとしたサンプル由来のサンプルは混合

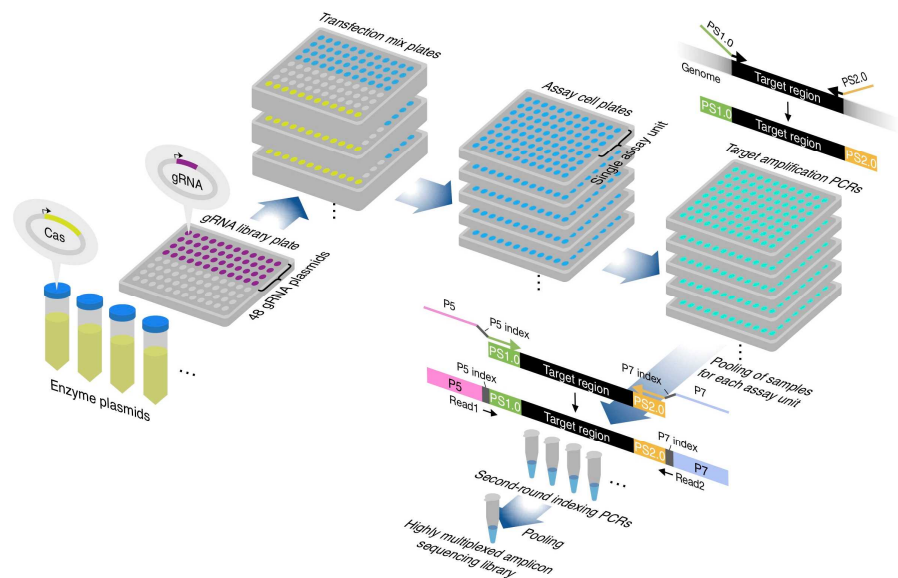


図 3.2.1.1.4-5 ゲノム編集オンターゲット超並列解析パイプライン (CRISPR-Cas9 を元に開発した異なるゲノム編集ツールと 48 種類の異なるゲノムをターゲットとする gRNA の組み合わせを一斉に試験する例)

してプール化される。さらに、PCRによって混合サンプルは特異的なバーコード配列を持つ超並列シーケンシングアダプターが付加されるように増幅される。これらのサンプルは全て混合され、1回の超並列DNAシーケンシングによって解析される。得られるそれぞれのシーケンシ



図 3.2.1.1.4-6 CRISPR 塩基編集ツールによる HEK293Ta 細胞の様々なゲノム配列のオンターゲット編集を一齐に評価した例 (一部)

ングリードは混合サンプル特異的なバーコード配列とターゲット配列の組み合わせからどのサンプルウェル由来のサンプルか同定することができるため、本手法によって一齐にゲノム編集のオンターゲット評価を数百種類以上のサンプルについて可能になる。それぞれのゲノム編集によって誘導される欠失、挿入、塩基置換などの定量的な評価が約 2000 サンプルについて 1 回の超並列シーケンシングで行えることを示した (図 3.2.1.1.4-6)。任意のゲノム編集が意図しない配列を編集するオフターゲット効果についてはこれまでに DNA 切断に依存したもの、生成された DNA の切断を評価するものなど様々なものが開発されている。一方で、塩基編集など DNA を切断しないゲノム編集の効果を細胞内で行う手法については開発されていなかった。このため、汎用的に様々なゲノム編集のオフターゲット効果を任意の細胞内で評価することができる手法の開発を進めた。また上記のデータ解析を含めた、ゲノム編集評価のための超並列 DNA シーケンシングデータを多角的に解析するためのパイプラインスクリプトをパッケージ化した。

(2) 最終目標の達成度及び研究開発成果の意義

大規模なゲノム・メタゲノムリソースから教師なしで超高速にゲノム編集ツール候補をスクリーニングするソフトウェアを開発し、これが汎用的に CRISPR 関連領域などリピート配列を探索するソフトウェアとして世界最高精度を達成した。また目標通りに新規タンパク質性ゲノム編集関連遺伝子候補を得ることができ、その内 3 つについて DNA 結合性を確認することができた。さらに DNA バーコードによる複数サンプルのラベル化によって、100 以上のサンプルについてゲノム編集のオンターゲット効果およびオフターゲット効果を一斉にアッセイできる超並列シーケンシングパイプラインおよびゲノム編集結果の自動評価ソフトウェアを開発、新規のゲノム編集ツール候補を高速に定量評価できるプラットフォームを確立した。

得られた成果により、新規ゲノム編集ツールの開発、ゲノム編集ツール候補およびゲノム編集生物の評価が可能になり、ゲノム編集を利用した産業の加速が期待できる。

3.2.1.1.5. 「E. 知財戦略」

E-1 各要素技術の知財戦略およびパッケージ化

(委託先：知的財産戦略ネットワーク株式会社・秋元浩、九州大学・中村崇裕；2016～2020年)

(1) 研究開発の成果

本課題では、各要素技術の開発に関する技術調査、知財戦略の策定、および知財の効果的な権利化の支援を行うとともに、およびビジネス展開を見据えた各要素技術の連結、研究成果の情報発信、導出体制の構築を行うことを目的とした。

研究成果の権利化に関しては、知財運営委員会を発足させ、その管理をおこなった。グループ全体に関わる広域市場調査、各実施機関で行われる研究開発についての競合特許調査、専門知識を有する知財コンサルや特許事務所の選定、などを実施し、研究開発成果の効果的な知財化をすすめる工程の構築、および実施体制の支援を行った。

2016～2018年度では知的財産戦略ネットワーク会社が本項目を主に担当し、研究者からのキーワードや競争相手等に関する意見聴取を基に、発表文献および特許について先行技術調査を実施し、「NEDO ゲノム編集プロジェクト先行技術調査第一次報告書」を作成した。ゲノム編集グループに属する研究者についても各出願計画の情報に基づき、知財戦略を検討した。本プロジェクトに関係する研究開発および市場領域についての先行調査を、研究者の研究実態に即した形で行い、それをもとに「NEDO ゲノム編集プロジェクト先行技術調査第二次報告書」を作成した。ゲノム編集プロジェクト開始前及び開始後の関連する特許出願状況の調査を2018年度に行い、各技術の出願状況は大きく変わるものではないことを確認・報告し、情報の共有化を図った。各研究者との協議を推進し、バックグラウンド及びフォアグラウンドIPsについて、パテントプールの形成を含めて、具体的な知財戦略の策定を実施した。

2016～2018年度において、ゲノム編集プロジェクトで生まれた研究成果について、知財運営委員会を9回開催して出願の可否を検討し、米国出願3件、基礎出願3件、PCT出願1件について出願処理を行った。

2019～2020年では九州大学が本項目を主に担当し、研究成果の効果的な権利化、導出に係る支援事業を実施した。知財戦略においては、ゲノム編集グループ全体が関係する医薬品原料、バイオ燃料、バイオ繊維、バイオプラスチック、環境浄化の市場動向、およびゲノム編集の利用についての市場動向調査を実施した。また、ゲノム編集ツールおよびゲノム編集生物の品質評価、およびその試験法についての調査を行った。調査結果をグループ構成員に展開し、研究開発の出口戦略の明確化を行った。また、グループ構成員の個別の要素技術開発に関する先行技術調査について、調査に必要な標準フォーマットや契約書雛形の作成、受託業者（内山敏特許戦略事務所、日本技術貿易株式会社）の選定、などの作業フローを整備し、グループ構成員各自での産業化を目的とした研究開発計画の明確化、改善を促した。また、各実施機関で開発される要素技術を連結させ、複合技術パッケージとして導出するための調整、実証試験、などを企画、実施した。2019～2020年の間で、通算27回の知財運営委員会を開催し、新規出願15件、PCT出願7件、事業会社への研究成果の開示11件、研究成果の実施許諾または共同研究等の検討5県、実施許諾または共同研究の実施4件を承認した。また、事業会社への研究成

果の効果的な導出を目的として、ゲノム編集技術の運用に必要な DNA の認識、ゲノム改変酵素（または技術）、導入の各要素技術のパッケージ化 8 件を企画、実施した。

研究成果の評価、技術導出については、JST-OPERA「ゲノム編集産学共創プラットフォーム（2016～2020 年度）の研究成果とともに、共通評価基盤を設置した広島大学、九州大学、および本プロジェクト関連ベンチャー（エディットフォース株式会社、プラチナバイオ株式会社、バイオパレット株式会社）を窓口としたライセンス体制、実証試験実施拠点の構築に係る準備活動を行った。

(2) 最終目標の達成度及び研究開発成果の意義

本項目においては、最終目標としていた知財戦略の策定、効果的な権利化の支援、ビジネス展開を見据えた各要素技術の連結、研究成果の情報発信、導出体制の構築について、ほぼ目標を達成できたと判断しているが、本項目の主たる実施機関の変更（知的財産ネットワーク株式会社→九州大学）のため、当初目標としていた PCT 出願数が達成できなかった。得られた知財により、ゲノム編集の産業化の加速が期待できる。

3.2.1.1.6. 「F. その他研究開発支援」

F-1 研究開発の戦略策定および企画・運営

(委託先：九州大学・中村崇裕、エディットフォース株式会社・八木祐介、広島大学・山本卓；2016～2020年)

本課題では、ゲノム編集開発に属する各機関の共同研究の促進、研究開発戦略策定、等を行うとともに、成果発表やアウトリーチ活動の企画運営を行うことを目的とした。

まず2016年開始時点で別々の申請単位であった採択テーマをゲノム編集グループとして一体化させるための情報共有体制の構築、クラウドデータ管理システムの導入、を行うとともに、研究成果の取り扱いについて、全参画機関で知財合意書を制定した。2018年度中間評価、および推進委員会からのコメントなどに対応するために、各申請単位での重複テーマの整理、当初目的の達成が困難な課題（の整理（特に新規認識モジュール課題の廃止、統合）、研究進捗に応じた新規課題の立ち上げ、等を実施した。また、「②-2 各要素技術の知財戦略およびパッケージ化」に記載したとおり、知財戦略における知財運営委員会委員長として、全体の方向性の管理運営を行った。また、要素技術のパッケージ化を実体化するための実施計画書における年度計画の改定、および研究の進捗に伴う新たな実施計画の企画・実体化を加速予算を通じて進めるとともに、年一度の技術推進会議で全体の研究進捗を確認、必要に応じて修正するとともに、実施機関間の共同研究加速を促した。

アウトリーチ活動としては、キックオフシンポジウム（2016年）、BioJapan（2016～2020年）、関連プロジェクトであるSIPとOPERAとの共同の公開セミナー（2018年）等を企画、実施した。また、ゲノム編集技術について、理解を深めてもらうための技術説明動画の作成を行った。タンパク質性分子、ガイドRNA性分子について、どのようにゲノムが切断、修復されゲノム編集が起きるのかを説明する内容にした。動画に含めるイメージ図、ナレーションの内容を吟味し、制作会社である凸版印刷と打ち合わせしながら完成させた。ゲノム編集技術の有用性を国民に正しく伝え産業での利用を促進するために、ゲノム編集技術紹介、ゲノム編集技術マップ、本プロジェクトの位置づけと開発したツール等を紹介することを目的とし、WEBページ「ゲ



図 3.2.1.1.6-1-1 「ゲノム編集産業化ネットワーク」ホームページ。ゲノム編集技術マップ、ゲノム編集技術カタログなどゲノム編集技術の産業化に係る情報が網羅されている。

ノム編集産業化ネットワーク」 (<https://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/smg/GEIN/index.html>) を作成し (図 3.2.1.1.6-1-1) 、上記動画はゲノム編集プラットフォームのホームページで公開することで広く見てもらえるようにした。

(2) 最終目標の達成度及び研究開発成果の意義

本項目においては、最終目標としていた共同研究の促進、研究開発戦略策定、成果発表やアウトリーチ活動の企画運営について、ほぼ目標を達成できたと判断しているが、2019、2020年は covid-19 影響のため、組織をまたぐ共同研究、研究成果の情報発信、導出体制の構築について、構想していた積極的な活動が出来なかった。

ゲノム編集技術を一般向けに理解してもらえるように、技術紹介動画を作成し、公開した。今後、さらに活用することで、産業界並びに一般社会に技術理解が広まり、本課題で構築したゲノム編集技術が産業利用につながることを期待される。また、ゲノム編集の産業化に関連するさまざまな情報を集約すると共に、本プロジェクトの成果を発信する WEB ページを公開した。今後、産業化を促進するプラットフォームとして活用されることが期待される。

F-2 「ゲノム編集技術、およびゲノム編集植物の共通評価基盤整備」

(委託先：九州大学・中村崇裕、神戸大学・西田敬二、広島大学・山本卓、徳島大学・刑部敬史、理化学研究所・岡田康史、近畿大学・宮下尚之；2016～2020年)

(1) 研究開発の成果

本課題では、各課題で開発される新規のゲノム編集技術を共通の技術体型で評価することで、先行技術との差異、開発される技術の優位点等を明確にすること、また、実施プロトコルを整備することで、助成事業者等への活用を可能にする基盤整備を行い、社会実装を加速することを目的とした。まず、共通評価基盤として機能すべき九州大学、神戸大学、徳島大学において、共通評価に必要な実験機器の導入を行うとともに、特に植物実験系に関わるプロトコルやプラスミドの共有を行った。九州大学においては、シロイヌナズナ培養細胞 (T87 株) を用いて、開発されるゲノム編集ツールを高速かつハイスループットで評価する実験系を構築した。徳島大学で稼働しているトマトを用いた形質転換系の立ち上げに取り組んだが、定量的な評価の結果、シロイヌナズナの形質転換系と比較して非常に効率が悪いこと、時間、労力、育成スペースを必要とすることが判明した。トマト実験系では、本研究開発で目的とする開発したゲノム編集ツールの定量的な評価は難しいと判断し、シロイヌナズナをモデル植物として利用することとした。構築した植物個体実験系を用いて、エディットフォース社が開発した dPPR ヌクレアーゼの植物個体でのゲノム編集効率の評価、広島大学が開発した ZF リコンビナーゼの植物個体での評価、などを実施した。また、2019 年に共通評価基盤として新たに広島大学を加え、九州大学と広島大学に試薬調製用自動化システムを導入し、プロトコル等の共有、サンプル調製やアッセイ等の実実験手順についての情報の標準化についての予備的な検討を行った。導入した試薬調製用自動化システムを用いて、レポーターアッセイの操作の自動化に成功した。自動化したプログラムを用いたアッセイの結果が、手動での実験結果を再現することも確認し (図 3. 2. 1. 1. 6-2-1)、研究成果の活用に係るゲノム編集ツールの評価系の基盤整備を完了した。

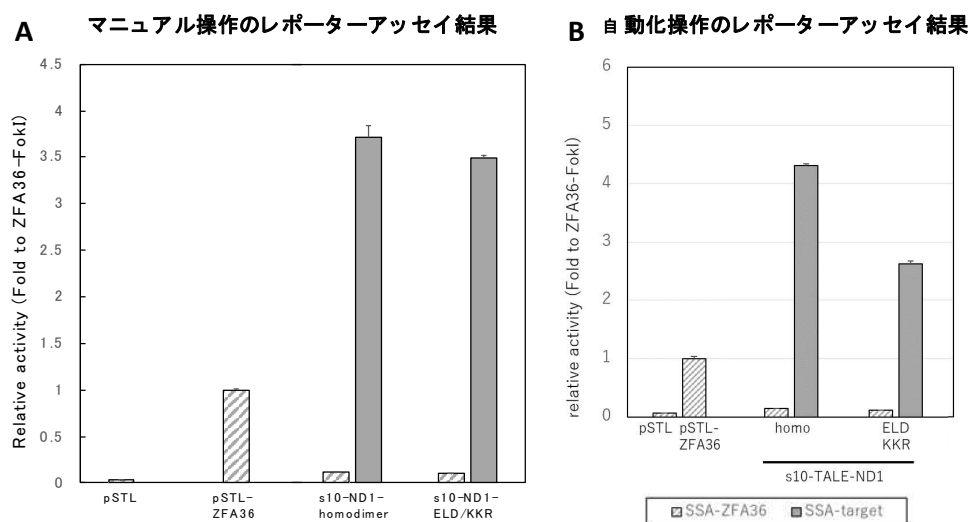


図 3.2.1.1.6-2-1 マニュアル操作によるレポーターアッセイ結果(A)と自動化操作によるレポーターアッセイ結果(B)の比較。 ZFN および TALE-ND1 の SSA アッセイによる活性評価の結果、自動化操作によってマニュアル操作の結果が概ね再現された。

プロジェクト期間中に各機関で作製したプラスミドなどの有体物の情報共有、および共通評価基盤への集約を継続して実施している。本プロジェクトで構築したシステムは、プロジェクト成果の産業利用促進を目的とした試験的研究、共同研究等に役立てることを想定している。

また、ゲノム編集技術の安全性評価技術の開発を行った。本技術は、核内でのゲノム編集ツール（CRISPR, TALEN, PPRP など）の動態を直接観察し、標的あるいは非標的 DNA に結合する様子をみれば、標的への特異性すなわちオフターゲット活性の評価が出来るという原理に基づく。

本事業項目では、イメージング技術を応用してゲノム編集ツール（CRISPR, TALEN, PPRP など）の観察により、オフターゲット活性の評価を行うというアイデアの実現に向けた取組を行った。まず、このアイデアの実証のために、TALE および dCas9 のイメージングを試みた結果、オフターゲット活性評価の指標となる計測結果が特定できた。

そこで、dCas9 を用いて、隣接した標的配列 3 個について、gRNA をそれぞれ作成し、本イメージング法によるオフターゲット活性の比較を行った。その結果、隣接する 3 つの標的配列の間でも、ほとんどオフターゲット活性を示さない gRNA、中等度のオフターゲット活性を示す gRNA、高頻度のオフターゲット活性を示す gRNA と結果が大きく分かれ、近接する標的配列であっても、gRNA によって特異性すなわちオフターゲット活性が大きく異なることが確認され、本手法の有効性が示され、知財化（特許申請：特願 2021-012474）を行った（図 3.2.1.1.6-2-2）。

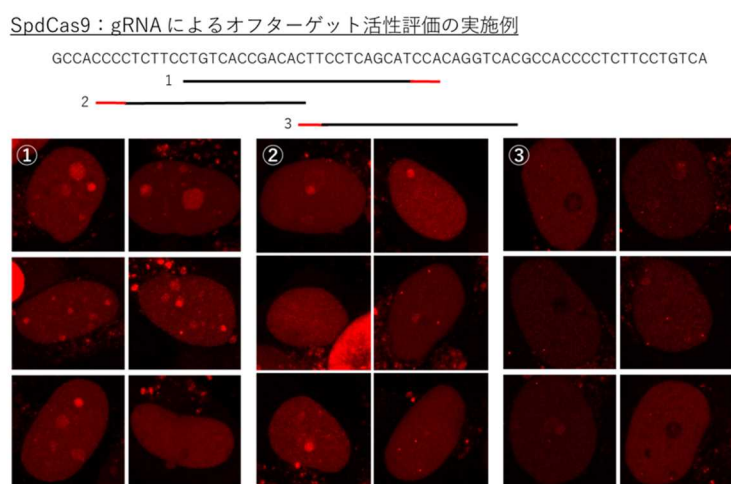


図 3.2.1.1.6-2-2. SpdCas9 を用いた標的化 gRNA のオフターゲット活性評価

さらに、本手法を安全性評価基盤技術として広く活用できるようにするため、ハイスループット計測の装置開発を進め、さらには、異なるゲノム編集ツール間でオフターゲット活性を比較するための共通プラットフォームとして、人工標的配列をノックインした細胞を樹立した。

（近畿大学の成果）

分子動学的解析によるゲノム編集技術開発支援

分子動学的解析（MD 解析）を用いる事で、生体分子の動学的に重要な箇所を特定することができる。また、仮想的に変異型生体分子を作ることができ、そのシミュレーションから得られた動力学から改変の提案ができる。そこで、本研究項目では本事業項目の TiD 研究で実施した方法と同様の方法を用いて、グループ外チームとの連携でその他のゲノム編集技術開発に繋がる生体分子の MD 解析と変異型の提案を実施した。主に以下の 2 つの研究を実施した。

(PPRP における MD 解析)

ゲノム編集開発グループのうち、エディットフォースとの共同研究として、DNA 結合型 PPRP (dPPRP) の性能向上に向けた配列提案を実施した。また、次の改良に繋げるため、新規配列を含む dPPRP などの性能・機能の起源を明らかにした。この際、通常の RNA 結合型 PPRP

(rPPRP) とエディットフォースで得られた 2 つの dPPRP の MD シミュレーションと、エディットフォースの X 線結晶構造解析で得られた最新の rPPRP および、その変異型の MD シミュレーションを実施した。その結果、dPPRP の性能・機能に重要な構造的特徴を明らかにし、改変型タンパク質配列の提案を 1 つ以上行った。

(セリンリコンビナーゼにおける MD 解析)

ゲノム編集開発グループのうち、広島大学との共同研究として、セリンリコンビナーゼの MD 解析を行なった。DNA との相互作用から、改変配列を 2 件以上提案した。

(2) 最終目標の達成度及び研究開発成果の意義

本項目においては、最終目標としていた開発される新規技術の共通の技術体系での定量的な評価、先行技術との差別化、実施プロトコール整備等の基盤整備による社会実装の加速、について、ほぼ目標を達成できたと判断している。特に分注ロボット導入し、ゲノム編集ツールの活性評価プログラムを確立することで、さまざまなゲノム編集ツールを共通のプロトコールで評価することを可能とした。本事業で開発された国産技術が今後産業化されるに当たって、評価の中核機関としての役割を担うための基盤整備を実現した。COVID-19 影響のため、組織をまたぐ情報や有体物の共有について若干の遅延が見られた。当初予定していなかった JST-OPERA「ゲノム編集コンソーシアム」成果との連動等も企画されたのは加点要素だと考えている。

CRISPR/Cas9 の 2020 年ノーベル化学賞受賞にも示されるように、ゲノム編集は今後の下の生物系産業、ひいてはカーボンニュートラル社会の構築において、基盤技術として利用されることが予想される。本成果で得られた成果の産業利用を進める活動を継続する所存である。

3.2.1.2 代謝系遺伝子発現制御技術

3.2.1.2.1 「ゲノム編集技術および代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発」（担当機関：かずさDNA 研究所）

(1) 背景と目的

遺伝子組換え作物を実用化する際の深刻な問題として、導入遺伝子の高発現が生長阻害をもたらす現象や、世代が進むにつれて導入した遺伝子発現が不安定化する現象が頻繁にみられることがよく知られている¹⁾（図3.2.1.2.1-1）。遺伝子組換え植物の商品化に際しては、多数の遺伝子組換え系統を作製し、それらを長期間にわたって検査し、安定な系統を選抜する必要があるため

に、時間がかかり、かつ、膨大な開発コストがかかることが問題となっている。組換え遺伝子発現の不安定化は、遺伝子導入部位でのクロマチン構造のエピジェネティックな修飾変化に起因すると推定されているが、未だに不安定化を防ぐ方法は確立されていない。また、従来の遺伝子組換え作物においては、単独あるいは数種類の遺伝子を組換えることに重点が置かれていたが、合成生物学の世界的な急展開を考えれば、代謝経路の全

・ 過剰発現による成長阻害回避



・ 世代を越えた安定発現の達成

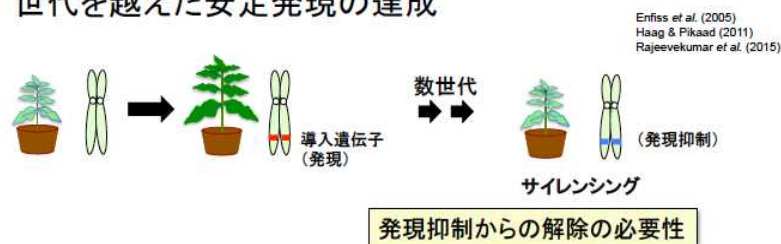


図 3.2.1.2.1-1 植物での遺伝子組換え体技術の課題

体を遺伝子導入するなど、数十の遺伝子セットを遺伝子導入し、安定的に発現させる新たな技術の需要が高まっている。さらに、開発した遺伝子組換え系統を、次のニーズに応じて、最小限の時間とコストで改変できることを可能とするために、「ゲノム編集」の機能を持たせた染色体領域の開発も急務である。遺伝子の発現抑制・サイレント化は、酵母やショウジョウバエ、哺乳動物では、詳細な解析がなされており、エピジェネティックなクロマチン構造変換によることが知られている。一般的には、遺伝子からの転写はオープンなクロマチン構造の場合にONになり、クローズなクロマチン構造（所謂ヘテロクロマチン構造）の場合には転写はOFF・サイレント化される（図3.2.1.2.1-2）。植物でも、導入遺伝子のクロマチンの構造を人為的に操作可能になると、前述の遺伝子組換え体における多くの問題も解決可能になる。

課題解決への着想



図 3.2.1.2.1-2 課題解決へ向けての着想

本技術開発は、染色体工学/クロマチン操作の手法と植物への長鎖 DNA 導入技術を組み合わせ、従来にはない独自の方法によって、複数のイソプレノイド合成経路遺伝子を組換え体植物内で安定に発現させる方法に関するものである。

本技術開発は、染色体工学/クロマチン操作の手法と植物への長鎖 DNA 導入技術を組み合わせ、従来にはない独自の方法によって、複数のイソプレノイド合成経路遺伝子を組換え体植物内で安定に発現させる方法に関するものである。

(2) 位置づけ、目標値

本技術開発では、染色体工学の手法^{2), 3), 4)}と植物への長鎖DNA導入技術を駆使し、「遺伝子発現制御カセット」を植物ゲノム上で構築を進めた(図3.2.1.2.1-3)。これをベースに「ゲノム編集」を行い、ここに多重連結^{5), 6)}した合成経路遺伝子群を導入し、植物内で安定的に発現させる方法を開発した。2018年度までに、複数の代謝系遺伝子を含む長鎖の遺伝子コンストラクトを植物に遺伝子導入し、数世代にわたって安定的に遺伝子を発現させる技術を確認することとした。その際、植物バイオテクノロジー分野での

有用性が高い代謝産物の多くがイソプレノイド経路で生合成されていることを鑑み、長鎖遺伝子コンストラクトにはイソプレノイド主要経路の7個ないし8個の遺伝子を発現制御可能な形で導入し、目的代謝系遺伝子を5倍以上発現させることを目標とした。2020年度までの最終目標は、「ゲノム編集」機能を有する染色体領域を確立し、目的代謝系遺伝子を20倍以上発現させること、世代を超えて遺伝子発現が安定的に維持されていることとした。具体的な中間目標値と最終目標値は以下に示した通りであった。

・中間目標値(2018年度)

①「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」の開発：「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」を開発し、この「プラットフォーム」導入タバコ BY-2 細胞で 50 系統、シロイヌナズナ植物体で 5 系統得る。レポーター遺伝子の発現量が 5 倍以上増減した BY-2 細胞を 5 系統得る。特許出願する。②「ゲノム編集ステーション」の開発：「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」を「ゲノム編集」が可能になる構築に改変する。③「ゲノム編集ステーションへ挿入した多重遺伝子の安定性評価」：BY-2 (5 系統)、シロイヌナズナ (5 系統) のゲノム挿入部位を決定し、シングルコピーで生育・増殖に影響のない系統を選抜する。④「イソプレノイド合成経路遺伝子群の発現制御技術の開発」：「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」ベクターにイソペンテニルニリン酸 (IPP) 生合成経路全遺伝子を連結挿入し、シロイヌナズナ植物体および細胞株へ導入する。導入遺伝子の発現が 5 倍変動し、かつ、IPP の下流代謝物量が 2 倍上昇した系統を 3 系統以上得る。

・最終目標値 (2020 年度)

①「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」をタバコ BY-2 細胞とシロイヌナズナ植物体で最適化し、レポーター遺伝子の発現量が 20 倍増減した系統をそれぞれ 5 系統得る。②「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」挿入部で組換えが可能であることを示し「ゲノム編集

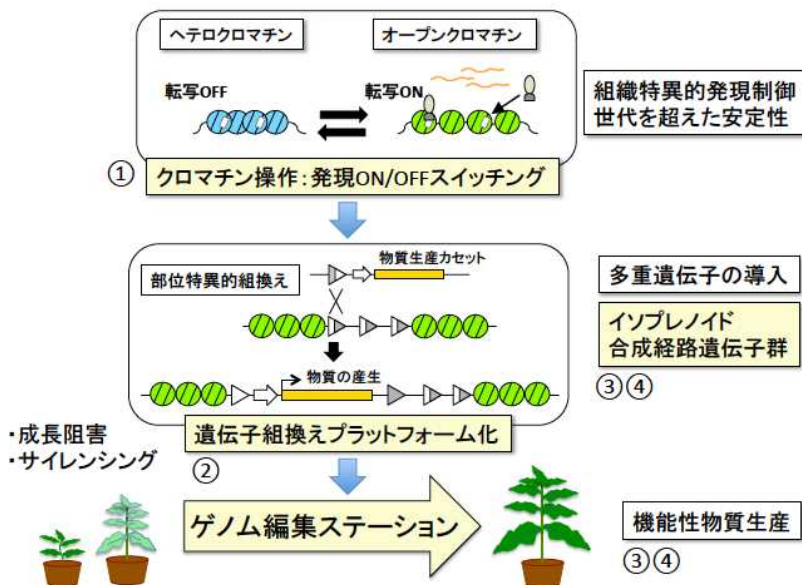


図 3.2.1.2.1-3 「ゲノム編集技術および代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発」 プロジェクト全体の構想

ステーション」化出来たことを示す。③「ゲノム編集ステーションへ挿入した多重遺伝子の安定性評価」のため、ゲノム、エピゲノム解析を行う。④「イソプレノイド合成経路遺伝子群の発現制御技術の開発」では、「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」に IPP 生合成経路に加え異種生物由来イソプレノイド合成酵素遺伝子を連結挿入する。これを導入したシロイヌナズナ植物体および細胞株を作製し、導入遺伝子の発現が 20 倍変動し、かつ、IPP の下流代謝物量が 5 倍上昇した系統を 5 系統得る。2 世代後のシロイヌナズナ形質転換体における mRNA 発現誘導率が 20%以上低下しない系統を得る。

(3) 全体計画

本計画では、以下の研究計画に従って研究開発を進めた。

①「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォームの開発」：遺伝子発現制御カセットをゲノムへ挿入するベクターの構築を進める。遺伝子発現制御カセットをレポーター遺伝子と共にタバコ培養細胞 BY-2 及びシロイヌナズナ植物個体へ遺伝子導入する。共焦点レーザー蛍光顕微鏡などにより異所的部位でのクロマチンの構造変換とレポーター遺伝子の発現を検出する。

②「ゲノム編集ステーションの開発」：遺伝子発現制御カセット挿入部位でゲノム編集をする。複数の遺伝子セットを配置するための多重遺伝子導入コンストラクトを作製する。100kb 前後のゲノム DNA 断片に複数の（代謝関連）遺伝子群を挿入することが可能な設計とする。

③「ゲノム編集ステーションへ挿入した多重遺伝子の安定性評価」：タバコ培養細胞と世代交代が早いシロイヌナズナを用いて導入遺伝子の発現を検討する。染色体構造への影響を調べる目的で組換え体シロイヌナズナのゲノムを解析する。

④「イソプレノイド合成経路遺伝子群の発現制御技術の開発」：高機能高付加価値なイソプレノイドを植物内で高生産させるために、全てのイソプレノイドの基本単位となるイソペンテニルニリン酸（IPP）を高生産させる IPP 生合成経路の全遺伝子を構成的プロモーターまたは誘導的プロモーターの制御下で発現できるように連結したコンストラクトを構築する。植物には細胞質の MVA 経路（7 遺伝子で構成される）と色素体内の非メバロン酸経路（MEP:8 遺伝子で構成される）という二種類の IPP 生合成経路があり、これらは転写レベル、転写後レベルで非常に厳密な制御を受けているので、経路の一遺伝子の過剰発現ではそれ以降の物質生産において十分な効果を得られないことが示されている。そこで、それぞれの経路の全遺伝子を、多重遺伝子導入コンストラクトに組み込み、植物に遺伝子導入し、評価する。

< 中間評価結果への対応 >

評価：

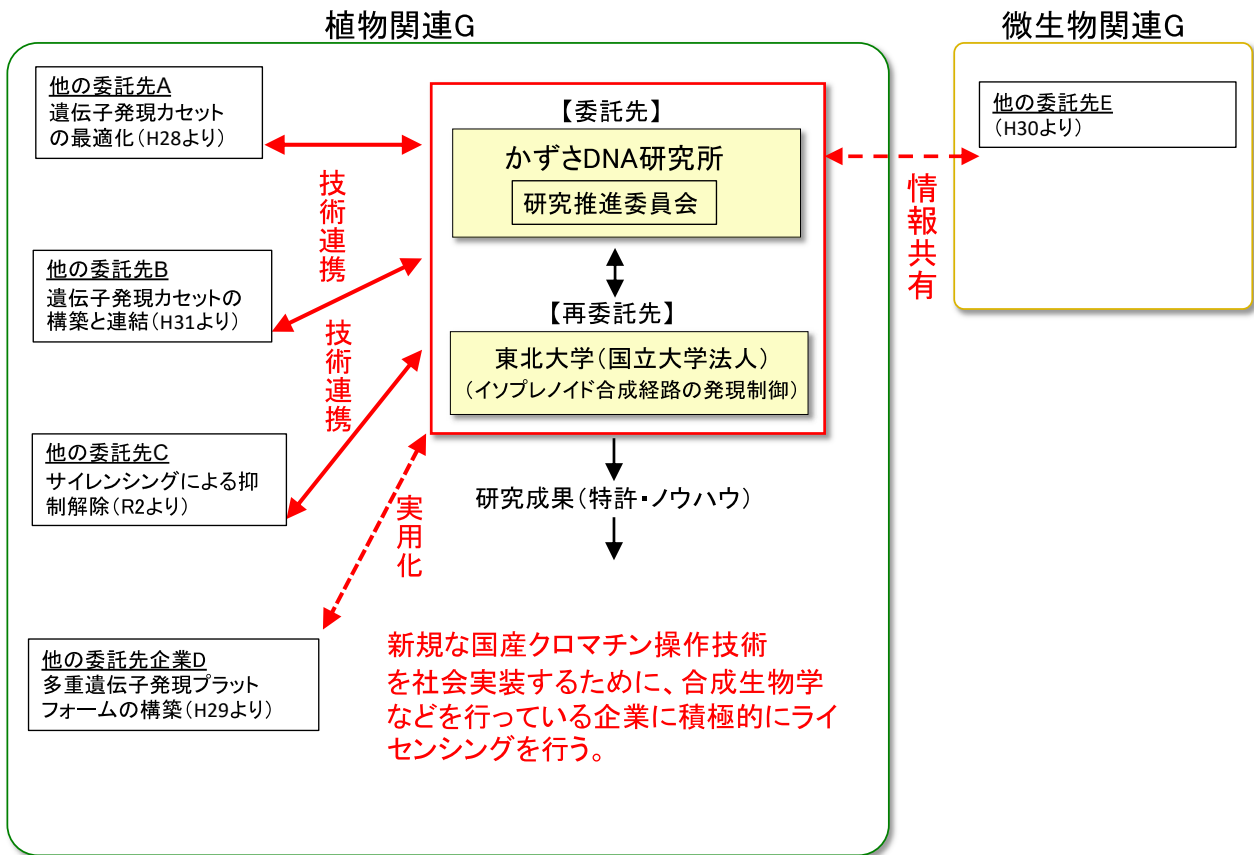
- ・後半計画、概ね妥当
- ・知財化とともに質の高いジャーナルでの論文化により技術のプレゼンスを高めることを期待する。

対応策：

- ・2018年度に知財出願したので、できるだけ質の高いジャーナルでの論文化を進め、技術のプレゼンスを高めるよう努力する。

(4) 実施体制

以下に示した実施体制のもとで委託先であるかずさDNA研究所と再委託先である東北大学がチームを組んで本研究開発を実施した。



(5) 運営管理

1～3ヶ月に一度、進捗と研究推進に対する会議を開催した。一年に一度、外部有識者と実施者による研究推進会議を開き、実施者による進捗報告を行い、有識者からの研究内容に対するコメントや今後の進め方に対するご意見を伺った。

(6) 実施の効果

本技術開発では、一旦「発現ON/OFFスイッチングプラットフォーム」系統、或いは「ゲノム編集ステーション」系統が作製できれば、数少ない遺伝子組換え系統の作製のみで、かつ、短期間に商品化が行える点で優位性が高く、今後の植物バイオテクノロジー分野で幅広くこの技術が利用されると期待できる。また、この基盤技術は、遺伝子組換えが容易な植物種はもとより、遺伝子組換えが容易でないことから従来では商品化までのハードルが高かった植物種でも、少ない組換え体系統の作製で商品化まで進めることが可能となる。植物を宿主とした合成生物学的アプローチによる有用物質生産の実用化において、多重連結遺伝子の一斉導入と、世代を超えて安定な発現制御の維持が課題となっている。本開発によりこれらの問題点が解消され、産業部門、特に非可食性植物由来原料による化学品製造の本格的実用化が促進されるため、2030年時における大きな省エネルギー効果、CO₂削減効果が期待出来る。

(7) 最終目標の達成度

実施項目	研究開発の最終目標	実施内容	達成度
①「発現ON/OFFスイッチングプラットフォーム」の開発（加速：実用化への改良）（かずさ）	プラットフォーム挿入系統からON/OFF制御可能株5系統）を選別する。クロマチン修飾因子によりマーカ-遺伝子の20倍以上のON/OFF誘導の差を得る。実用化への改良ベクターでも5倍の差を目指す。	プラットフォーム株を、BY-2、シロイヌナズナ、実用性の高いベンサムアナでも5系統以上取得。プラットフォームのクロマチン構造変換ができた（ON→OFF）。IPP合成経路遺伝子で20倍以上を達成。改良型ベクター導入BY-2株で5倍以上の発現誘導の差を得た。	100%
②「ゲノム編集ステップ」の開発（かずさ）	プラットフォーム株のVloxPとSloxP部位でのVCre, SCreによるマーカ-遺伝子の組換え実績を得て、「ゲノム編集ステップ」化を完成。IPP合成連結遺伝子を組込んだ3系統を得る。	組換えを示すPCRデータを得た。IPP合成連結遺伝子を組込んだ3系統以上を得た。	80%
③ 挿入多重遺伝子の安定性評価（かずさ）	プラットフォームのゲノム挿入部位を決定する。エピゲノム解析とメタボーム解析情報を得て、挿入遺伝子からのIPP代謝産物の蓄積を確認する。	BY-2細胞とシロイヌナズナのON/OFFプラットフォーム挿入部位のゲノム解析、エピゲノム解析データを得た。挿入遺伝子からのIPP代謝産物の蓄積を④で確認した。	100%
④ イソプレノイド合成経路遺伝子群の発現制御技術の開発（追加：実用植物への適用試験）（東北大）	ON/OFF制御で導入遺伝子の発現が20倍以上変動し、かつ、IPP（または下流テルペノイド）量が5倍以上上昇した組換えモデル植物を5系統以上得る。実用植物へ適用し、5倍変動し、かつ、IPP（または下流テルペノイド）量が2倍以上上昇することを検証する。	IPP合成経路遺伝子発現制御の条件を最適化した。連結7遺伝子を導入した植物で目標値の発現制御・代謝物制御を検証した。ON/OFF制御因子による20倍の発現制御が可能となった。実用植物において目標値の遺伝子発現変動を達成し、目的代謝物を確認した。	100%

(8) 研究開発成果の意義

①「発現 ON/OFF スwitchingプラットフォーム」の開発：

① - (1) アグロバクテリウムバイナリーベクターpRIBACの作製

合成DNAからなる「発現ON/OFFスイッチングプラットフォーム」上のマーカ-遺伝子には、薬剤選択マーカ-である *NPT II* 遺伝子、顕微鏡を用いた蛍光観察に適した *EYFP* タンパク質をコードする遺伝子、植物における組織染色に適した *GUS* タンパク質をコードする遺伝子の3つが配置されている（図3.2.1.2.1-4）。これらの遺伝子の上流にはプロモーター、下流にはターミネーターが配置された、遺伝子発現カセットとなっている。各遺伝子発現カセットのうち、*NPT II* と *GUS* 遺伝子カセットは pRI-201-AN-GUS ベクター（TAKARA）を、*EYFP* 遺伝子は pJET3 ベクター⁷⁾ を鋳型として、PCR法により作製した。また、3つの遺伝子カセットは、それぞれ共通の対合末端を持つ *NheI* と *SpeI* サイトを利用したライゲーションにより連結し、3つの遺伝子が連なったマーカ-遺伝子カセットを「発現ON/OFFスイッチングプラットフォーム」導入用アグロバクテリウムバイナリーベクター pRIBAC（TACベクターを参考に改良^{8), 9), 10)} の *NheI* と *SpeI* サイトへ挿入した（図3.2.1.2.1-5）。

次に、これらの大腸菌由来の「発現ON/OFFスイッチングプラットフォーム」ベクタープラスミドを *SpeI* で切断し、パルスフィールドドゲル電気泳動（PFGE）でサイズを確認した（図3.2.1.2.1-6A）。これらのプラスミドの泳動パターンには異常は観察されなかった。プ

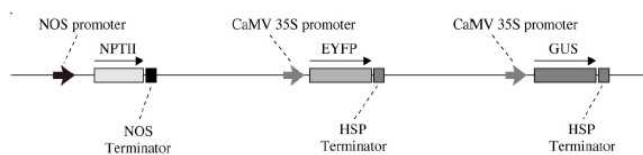


図 3.2.1.2.1-4 「発現 ON/OFF スwitchingプラットフォーム」上のマーカ-遺伝子

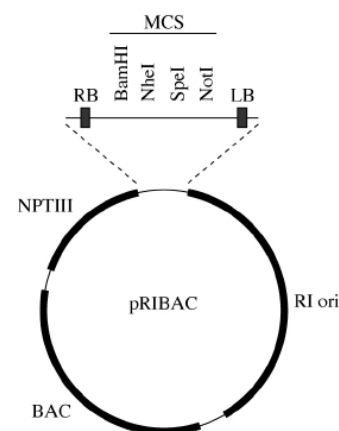


図 3.2.1.2.1-5 アグロバクテリウムバイナリーベクター pRIBAC の構築

ラスミドを大腸菌からアグロバクテリウムの細胞に導入し、T-DNAとして植物ゲノムに組み込ませる必要がある。このため、アグロバクテリウム細胞株LBA4404 (TAKARA) のエレクトロコンピテントセルを用いてプラスミドの導入を行った。プラスミドを導入したアグロバクテリウム細胞を、カナマイシン (30 μ g/ml) を含んだLBプレートに撒き、コロニーを形成させた。シングルコロニーを複数個拾い培養し、ここからDNAを回収してPFGE解析をした。アグロバクテリウムの持つプラスミドDNAは、大腸菌の場合と同様にアルカリ-SDS法で回収し、制限酵素NheIとXhoIで処理したのち、PFGEで解析した (図3.2.1.2.1-6B)。解析した半数以上の株で、導入したBACプラスミドと同じ泳動度のバンドが確認され、アグロバクテリウム細胞内においても、構築プラスミドは安定に維持されることが確認できた。

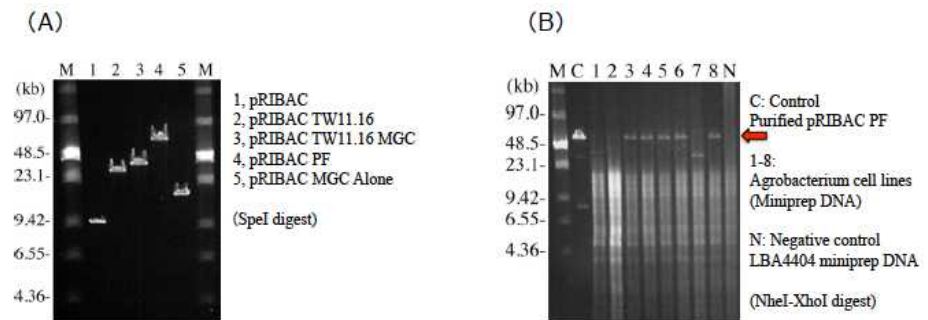


図 3.2.1.2.1-6 アグロバクテリウムバイナリーベクター-pRIBAC の大腸菌での構築 (A) とアグロバクテリウムでの安定性確認 (B)

①- (2) 「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」導入タバコ培養細胞 BY-2 の取得 タバコ培養細胞 BY-2 の培養

理化学研究所バイオリソース研究センター実験植物開発室から提供を受けた *Nicotiana tabacum* タバコ培養細胞 BY-2 (RPC00001) を使用した。培養は、細胞配布元の理化学研究所のプロトコールに従い以下の様に行った。培地は modified Linsmaier and Skoog (mLS) 培地 (Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (和光純薬), 1 μ g/ml Thiamine hydrochloride, 0.1 mg/ml *myo*-Inositol, 0.2 mg/ml KH_2PO_4 , 30 mg/ml Sucrose, 0.2 μ g/ml 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, pH 5.8) を使用した。暗所 28°C 130 rpm で振盪培養した。植え継ぎ後 7 日目に 1 ml の培養液を 95 ml の mLS 培地に植え継いだ。

タバコ培養細胞 BY-2 への「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」の導入

「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」の BY-2 染色体への挿入を、以下に示すアグロバクテリウムを利用した方法で行った。プラスミドを有するアグロバクテリウム LBA4404 のコロニーを 10 ml の抗生物質入り LB 培地 (50 μ g/ml リファンピシン、25 μ g/ml ストレプトマイシン、25 μ g/ml カナマイシン) に植菌し、26°C、120 rpm で一晩振盪培養した。1 ml の LB 培地で 3 回洗浄した後、OD₆₀₀ が 1.0 になるように LB 培地に懸濁した。mLS 培地中で対数増殖期の BY-2 細胞 (植え継ぎ後 3 日後の細胞) 5 ml を 10 cm シャーレに広げ、100 μ l のアグロバクテリウム懸濁液を加え、24 μ M アセトシリンゴン存在下で 2 日間 26°C で共培養を行った。細胞を回収し、10 ml の mLS 培地 (0.5 mg/ml セフォタックス入り) で 4 回洗浄した。0.5 mg/ml セフォタックスと選択薬剤 (100 μ g/ml カナマイシン) を含む寒天培地で、28°C で培養することでセレクションを行った。

EYFP 観察

EYFP 蛍光顕微鏡観察には、共焦点レーザスキャン顕微鏡 LSM800 (カールツァイス社) と Plan-NEOFLUAR 5 倍レンズまたは Plan-NEOFLUAR 20 倍レンズを用いた。

GUS 染色

BY-2 細胞を GUS 染色液 (1 mM X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide cyclohexylammonium salt), 50 mM Phosphate buffer pH7.2, 0.5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 0.5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$, 0.1% Triton X-100) に懸濁し、37°C で数時間インキュベートした。

ゲノム DNA の精製

細胞約 45 mg を凍結破砕用 2 ml チューブ (安井器械) に回収し、液体窒素で凍結した。メタルコーンを加え、マルチビーズショッカーを用いて、2800 rpm で 15 秒間細胞の破砕を行った。260 μ l の Cell Lysis buffer (Promega)、100 μ l の Tail Lysis buffer (Promega)、20 μ l の Proteinase K solution (Promega)、20 μ l の RNase A solution (Promega) を加え懸濁した後、室温 14000 rpm で 2 分間遠心した。上清を Maxwell RSC Plant DNA kit (Promega) のカセットにアプライし、自動核酸精製装置 Maxwell 16 (Promega) にセットし、植物 DNA 調製プロトコールを実行した。Qubit dsDNA HS assay kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して DNA の定量を行った。

qPCR

精製したゲノム DNA を CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad)、SYBR Premix Ex TaqII (Takara Bio)、挿入 DNA 増幅プライマーセットを用いて解析した。スタンダードサンプルとして精製した遺伝子発現制御カセットベクタープラスミドを用いた。ノーマライズにはゲノム DNA 定量値を用いた。

「発現 ON/OFF スイッチングプラットフォーム」を、アグロバクテリウムを利用してタバコ培養細胞 BY-2 に導入した。その結果、28 個の選択薬剤耐性カルスが形成された。さらに、0.5 mg/ml セフトタックスと選択薬剤 (100 μ g/ml カナマイシン) を含む寒天培地で 28°C で植え継ぎを繰り返した。最終的に 19 個のカルス (PF 株) について安定に培養維持することが出来た。

「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」には、*NPTII* (カナマイシン耐性)、*EYFP* (EYFP 蛍光)、*GUS* (β -グルクロニダーゼ) 遺伝子の3種類のマーカー遺伝子が連結されている (図 3.2.1.2.1-4)。取得した19株について、「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」の挿入を確認するために、EYFP 蛍光観察 (図 3.2.1.2.1-7, 8 高倍率)、GUS 染色 (図 3.2.1.2.1-9) を行った。その結果、L5 系統を除いたすべての系統で *EYFP* 遺伝子と *GUS* 遺伝子の発現を確認出来た (図 3.2.1.2.1-7, 8, 9)。

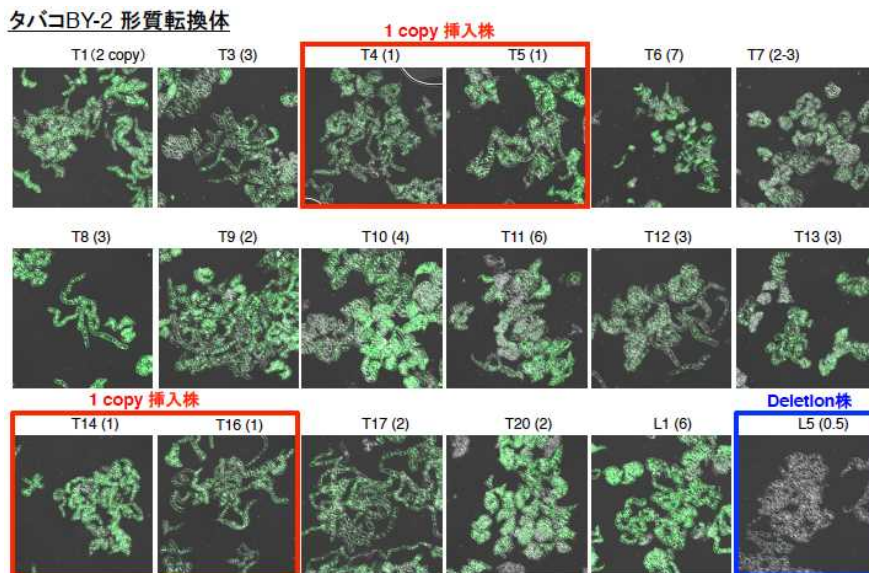


図 3.2.1.2.1-7 「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」導入タバコ BY-2 系統におけるマーカー遺伝子の発現 (EYFP 蛍光顕微鏡観察)

タバコBY-2 形質転換体

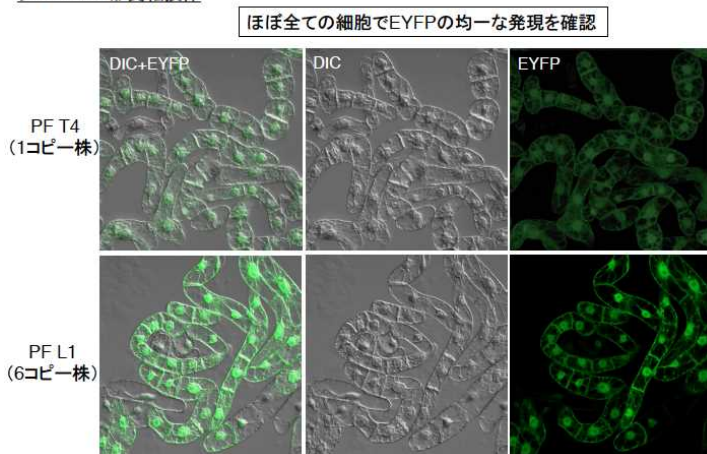


図 3.2.1.2.1-8 ON/OFF スwitchングプラットフォーム導入タバコ BY-2 系統における EYFP の発現 (高倍率)

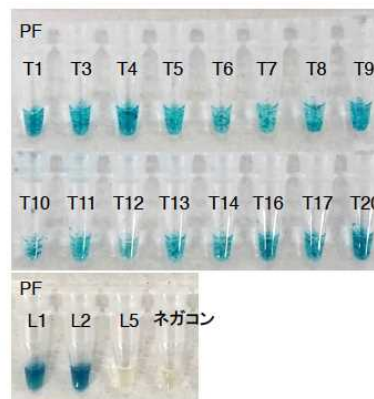


図 3.2.1.2.1-9 ON/OFF スwitchングプラットフォーム導入タバコ BY-2 系統の *GUS* 遺伝子の発現 (GUS 染色)

さらに、「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」の挿入コピー数を確認するために、ゲノム DNA を精製して qPCR による定量を行った (図 3.2.1.2.1-10)。その結果、1 コピーを含む株も4株取得できていることが確認できた (図 3.2.1.2.1-10)。唯一 EYFP 蛍光と *GUS* 活性を示さなかった L5 系統については、ゲノム当たりのコピー数が 0.5 以下と見積もられたことから、DNA 左側半分から *NPT II* (カナマイシン耐性を示す) までの T-DNA しかゲノム挿入されていない

と考えられる(図 3.2.1.2.1-7, 9, 10)。残りの全ての系統で EYFP 蛍光強度、GUS 活性、NPT II 耐性は、コピー数計測結果と比例しており、コピー数計測結果の信頼性の高さを示している。また、

「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」挿入系統ではコピー数に依存して *EYFP* 遺伝子からの発現量は増えるが、細胞ごとに非常に均一な発現を維持することが判明し、クロマチン構造の安定性が示唆された(図 3.2.1.2.1-8)。

その後も「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」の BY-2 細胞への形質転換操作を継続し、最終的に形質転換株 237 株を得た。挿入プラットフォームのゲノム当たりのコピー数を qPCR で解析した結果、最終的には 1 コピーの「ON/OFF スwitchングプラットフォーム」安定保持株 78 株を得た。

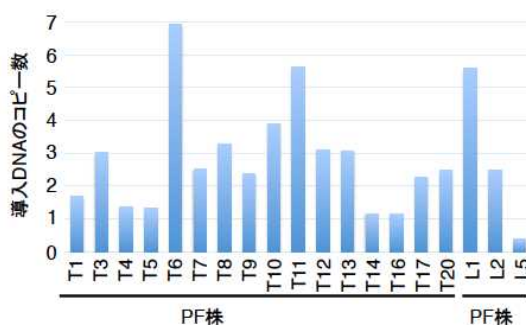


図 3.2.1.2.1-10 ON/OFF スwitchングプラットフォーム導入タバコ BY-2 系統の qPCR コピー数解析

①- (3) 「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」導入シロイヌナズナとベンサミアナタバコの取得

シロイヌナズナへの「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」の導入

「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」のシロイヌナズナ染色体への挿入を、以下に示すアグロバクテリウムを利用した方法で行った。プラスミドを有するアグロバクテリウム GV3101(pMP90)のコロニーを 20 ml の抗生物質入り LB 培地 (50 µg/ml リファンピシン、25 µg/ml ゲンタマイシン、25 µg/ml カナマイシン) に植菌し、25°C、120 rpm で一晩培養した。5 ml のアグロバクテリウム培養液を 150 ml の抗生物質入り LB 培地 (50 µg/ml リファンピシン、25 µg/ml ゲンタマイシン、25 µg/ml カナマイシン) に加え、25°C、120 rpm でさらに一晩培養した。150 ml のアグロバクテリウム培養液を遠心し、上澄みを除いた後、アグロバクテリウムを 30 ml のインフィルトレーションバッファー (1/2 濃度の Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (和光純薬), 5% Sucrose, Gamborg's Vitamin Solution (Sigma), 0.01 µg/ml 6-Benzylaminopurine, 0.02% Silwet L77) に懸濁した。種を蒔いて 16 時間明期、8 時間暗期の周期で、22°C で 2 ヶ月程度栽培したシロイヌナズナを懸濁液に 30 秒間浸した。シロイヌナズナをラップで包み横に寝かせ、一晩暗所に静置した。ラップを外し、16 時間明期、8 時間暗期の周期で、22°C で育成し、採種した。0.5 mg/ml セフトックスと選択薬剤 (30 µg/ml カナマイシン) を含む寒天培地 (Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (和光純薬), 3% Sucrose, 2.3 mM MES, pH 5.7, Gamborg's Vitamin Solution (Sigma), 0.8% Agar) に播種し、セレクションを行った。

ベンサミアナタバコへの遺伝子「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」の導入方法

アグロバクテリウムを用いて「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」をベンサミアナタバコ染色体へ挿入した。「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」プラスミドを有するアグロバクテリウム GV3101(pMP90)または LBA4404 のコロニーを抗生物質入り LB 培地に植菌し、

0.5~1.0 OD₆₀₀に達するまで一晩振盪培養を行った。Gamborg's B5 vitaminsを含むMurashige and Skoog (MS)培地 (MSB5 培地) で無菌的に生長させた *Nicotiana benthamiana* の葉をディスク状に切り出し、アグロバクテリウム液に10分間浸した。ディスク状の葉を共培養培地上に重ねた濾紙に載せ、3日間共培養を行った。葉のディスクを、カルス形成、シュート形成、および根形成を誘導するための選択的薬剤を含む一連のMSB5培地¹¹⁾に移した。分化した植物体 (T0世代) を土に移し、選択圧なしに生育させ、種子を得た (T1世代)。tetPFプラットフォームの存在は、マーカー遺伝子の表現型 (EYFP 蛍光) を観察することによって次世代 (T2、T3、T4) と qPCR を使用して確認した。

EYFP 観察

EYFP 蛍光観察には、EYFP 観察用モジュール付きの実体顕微鏡 (ライカ社) を用いて行った。

「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」を、アグロバクテリウムを利用してシロイヌナズナに導入した。約40000粒の種について選択を行い、9粒の種からカナマイシン耐性系統を取得できた。さらに、「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」の挿入を確認するために、マーカー遺伝子 EYFP の発現を EYFP 蛍光の観察により行った。その結果、その全てで EYFP の蛍光を確認できた (図 3.2.1.2.1-11)。6系統については、主に根で EYFP 蛍光が観察された。1系統については、植物体全体で強い EYFP 蛍光が観察された。

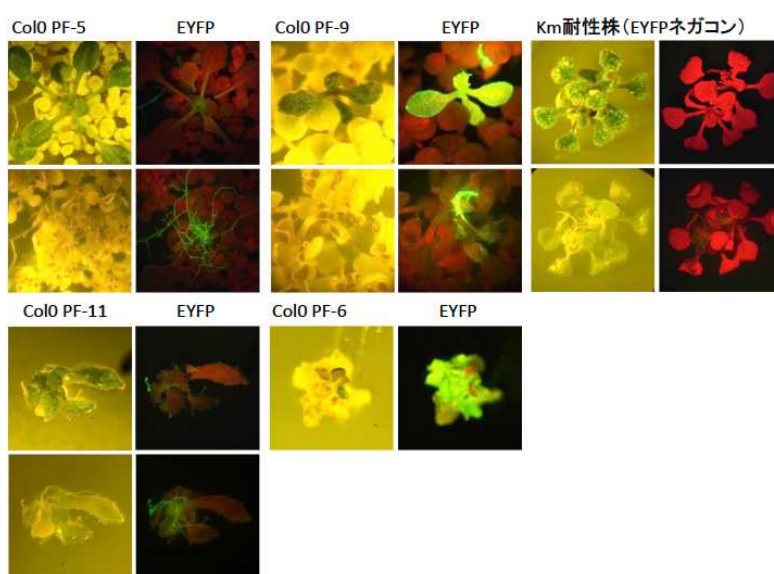
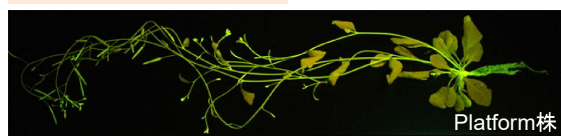


図 3.2.1.2.1-11 「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」導入シロイヌナズナにおける EYFP 蛍光観察の例
各系統上段が葉側からの観察 下段が根側から観察

この系統では、発現しやすく且つ発生や生育への影響の少ないゲノム領域にカセットが挿入された可能性がある。2系統については根などで EYFP 蛍光が観察されたが、異常な形態を示した。発生や生育に影響を及ぼす領域にカセットが挿入されたと考えられる。これらの結果から、少なくとも「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」がシロイヌナズナのゲノムに挿入された系統も多数取得することも可能であり、タバコ BY-2 細胞同様「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」上の EYFP 遺伝子からの発現も安定に維持されていることが判明した。

その後も、「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」をシロイヌナズナとベンサミアナタバコにアクロバクテリウムを用いて導入し、多数の形質転換体を得た（図 3.2.1.2.1-12）。プラットフォームの存在は、マーカー遺伝子の表現型（EYFP 蛍光）の観察と qPCR を使用して確認した。これまでにシロイヌナズナでは「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」1 コピーを維持する系統として 30 株を得た。一方、ベンサミアナタバコでは、1 コピーの「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」を維持する系統として、11 株を得た。また、シロイヌナズナとベンサミアナタバコ、何れの T4 世代においても、EYFP の蛍光を確認できていることから、世代を超えて「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」が安定に維持されて、EYFP の発現も安定に維持されていることが示された。

Arabidopsis thaliana



Nicotiana benthamiana



図 3.2.1.2.1-12 シロイヌナズナとベンサミアナタバコ ON/OFF スwitchングプラットフォーム株からの EYFP 安定発現

①- (4) BY-2「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」導入株のクロマチン免疫沈降 (ChIP) によるクロマチン構造の解析

BY-2 細胞からの粗核画分調製とクロマチンのクロスリンク

ムラシゲスクロウ培地（3%スクロース）で培養した BY-2 細胞を細胞容積と等しい量の氷冷した 50 mM リン酸カリウムバッファー（pH5.8）で 2 回洗い、等細胞容積の同バッファーで懸濁した。3 ml の懸濁液と 1 ml の氷冷した 75% (w/v) グリセロールを混和し、専用メタルコーンをいれて予め氷冷した 50 ml マルチビーズショッカー（安井機械）専用チューブに移し、1,000 rpm で 1 分の粉碎を 5 回繰り返した（各粉碎の合間に氷冷）。細胞粉碎液を 4 本のエッペンドルフチューブに分け、4℃で 400 x g（スイングローター）の遠心を 2 分行った。核を含む沈殿を氷冷した 1 ml の PBS で懸濁し、同様の遠心で 2 回洗った。沈殿（約 0.3 ml x4 チューブ）を 3 倍量の 2% ホルムアルデヒドを含む PBS で懸濁し、室温で 20 分の反応でクロマチンをクロスリンクした。60 μl の 2.5 M グリシンを含む PBS を混和し、クロスリンク反応を止めた。4℃で 400x g（スイングローター）の遠心を 2 分行き、沈殿を氷冷した 1 ml の PBS で同様の遠心により 2 回洗った。さらに沈殿を氷冷した 1 ml の TE（pH8.0）で同様の遠心により洗って上清を取り除いた後 -80℃に保存した。

クロマチン免疫沈降 (ChIP)

-80℃保存した粗核画分の沈殿（約 0.2 ml、約 0.4 g の細胞に由来）を 0.5 ml のソニケーションバッファー（20 mM トリス塩酸（pH8.0）、1 mM EDTA、0.025% SDS、0.5 mM DTT、1.5 μM アプロチニン、20 μM ロイペプチン、40 μM MG132）に懸濁し、ピコラプター（ダイアジェノード）の適当な条件で（例えば 30 秒 ON/30 秒 OFF のサイクルを 15 サイクル）核破壊とクロマチンの切断を行った。4℃で 20,000 x g（スイングローター）の遠心を 10 分行き、上清をクロ

マチン画分として回収した。クロマチン画分の容積が2～5倍量の範囲でそのバッファー組成が0.3 M NaCl、20 mM トリス塩酸 pH8.0、0.5 mM EDTA、5%グリセロール、0.05% SDS、1% TritonX-100、0.5 mM DTT、1.5 μ M アプロチニン、20 μ M ロイペプチン、20 μ M MG132 になるように整え、予め抗体を結合させた Protein G 磁気ビーズ (Dynabeads, サーマフィッシャー) を混合した。インプット DNA として免疫沈降反応に使った1/10のクロマチン画分を4℃に保持した。0.5mlの免疫沈降反応あたり1 μ gのモノクローナル抗体と5 μ lのProtein G 磁気ビーズを用いた。ローテーターで緩やかに攪拌しながら一晩4℃の反応をさせた後、ビーズを磁気で集め、0.3 mlの洗浄バッファー(0.55 M NaCl、20 mM トリス塩酸 pH8.0、1 mM EDTA、5% グリセロール、0.1% SDS、1% TritonX-100)で3回洗った。以後の処理はインプット DNA に対しても同様に行った。磁気ビーズを80 μ lの溶出バッファー(0.15 M NaCl、50 mM トリス塩酸 pH8.0、10 mM EDTA、0.5% SDS、0.1 mg/ml RNase A)で懸濁して37℃1時間以上の処理をした後、20 μ lの0.2 mg/ml Proteinase Kを加え、50℃で1時間以上蛋白質を消化した。その後65℃で一晩加熱してクロスリンクを外した。磁気でビーズを除いた溶液0.1 mlから、DNAをMinElute PCR Purification Kit (キアゲン)を用いて精製し、50 μ lのTEで溶出した。溶出したDNAの2.5 μ lをSYBR Green 蛍光色素を用いたリアルタイムPCRの鋳型に用いた。

免疫沈降に用いた抗体

normal mouse IgG (SantaCruz SC2025)
 anti-H3K9me2 (モノクローナル抗体研究所 MABI0307)
 anti-H3K27me3 (モノクローナル抗体研究所 MABI0323)
 anti-H3K36me3 (モノクローナル抗体研究所 MABI0333)
 anti-H3K4me3 (モノクローナル抗体研究所 MABI0304)

PCR に使用したプライマーセット

Target	配列 1 (5' →3')	配列 2 (5' →3')
TERT	AGAGAGGTTGGGTCATCTGT	TGAGATCATCCAGCACACTCA
NPTII	GCGCCCGGTTCTTTTGTCAA	TTCCCGCTTCAGTGACAACGT
EYFP	AGATCCGCCACAACATCGAGG	TCGTTGGGGTCTTTGCTCAGG
GUS	CGACGCTCACACCGATACCAT	CTCTGCCGTTTCCAAATCGCC
MITE	TCACGAGGACTAGGTACCGA	TACGCCATGAATCTCGACCA
1-94	ACCTTGTTGACTTGGTTTGGT	TGTTGGTGTGAAGAAATGAGAGT
g31i	TCGTTCCGGAGGTGATTTGGT	CCCGAGACCTCAACCAAACA

PCR 条件

2xSYBR premix ExTaq (Takara)	5 μ l
50 μ M プライマー 1	0.1 μ l
50 μ M プライマー 2	0.1 μ l
<u>鋳型 DNA</u>	<u>2.5 μl</u>
H ₂ O	to final 10 μ l

95°C, 60 秒の後、以下の 3 ステップを 40 サイクル。

95°C, 10 秒

62°C, 30 秒

72°C, 60 秒

インプット DNA の希釈系列で検量線を作製し、免疫沈降された DNA 中のターゲットのインプット DNA に対する相対量を算出した。

BY-2 「ON/OFF スイッチングプラットフォーム」導入株を 2 ヶ月間、挿入遺伝子の発現の選択圧であるカナマイシンを含まないムラシゲスクーグ培地で培養し、挿入領域である合成 DNA、カナマイシン耐性遺伝子 (*NPT II*)、蛍光マーカー遺伝子 (*EYFP*)、酵素マーカー遺伝子 (*GUS*)、およびゲノム上の発現遺伝子としてのテロメラーゼ遺伝子 (*TERT*)、ヘテロクロマチン化されている領域として 3 種のトランスポゾン (*MITE*, *I-94*, *g31i*) のヒストン修飾をクロマチン免疫沈降 (ChIP) で評価した。プラットフォームや挿入遺伝子は、いずれもオープンクロマチン型修飾であるヒストン H3 の 36 番目のリジンのトリメチル化 (H3K36me3) とヒストン H3 の 4 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3) のレベルは、共に必須遺伝子 *TERT* よりも高いレベルであった。一方、抑制型クロマチンであるトランスポゾン領域は、H3K36me3 や H3K4me3 修飾はほぼ検出できないのに対して、クロズドクロマチン (ヘテロクロマチン) 型修飾であるヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) とヒストン H3 の 9 番目のリジンのジメチル化

(H3K9me2) のレベルは非常に高いレベルで検出された。逆に、プラットフォームや挿入遺伝子は、抑制型の H3K27me3 や H3K9me2 修飾は殆ど検出されなかった。その後、独立に得られたプラットフォーム 1 コピー挿入株 7 株の ChIP による解析でもほぼ同様の解析結果が得られた。これらの解析結果から、クロマチン構造変換を誘導しない条件では、選択圧なしの長期間にわたって、「ON/OFF スイッチングプラットフォーム」は、オープンなクロマチン構造を安定に維持できることが判明した。

①- (5) 発現 ON/OFF スイッチングプラットフォームへの ON/OFF 制御因子の効果

BY-2 ON/OFF スイッチングプラットフォーム 1 コピー株への ON/OFF 制御因子の導入

ON/OFF 制御因子発現カセットを有するアグロバクテリウム LBA4404 のコロニーを 10 ml の抗生物質入り LB 培地 (50 µg/ml リファンピシン、25 µg/ml ストレプトマイシン、25 µg/ml カナマイシン) に植菌し、26°C、120 rpm で一晩振盪培養した。1 ml の LB 培地で 3 回洗浄した後、OD₆₀₀ が 1.0 になるように LB 培地に懸濁した。mLS 培地中で対数増殖期の BY-2 細胞 (植え継ぎ後 3 日後の細胞) 5 ml を 10 cm シャーレに広げ、100 µl のアグロバクテリウム懸濁液を加え、24 µM アセトシリンゴン存在下で 3 日間 26°C で共培養を行った。細胞を回収し、10 ml の mLS 培地 (0.5 mg/ml セフォタックス入り) で 4 回洗浄した。0.5 mg/ml セフォタックスと選択薬剤 (50 µg/ml ハイグロマイシン) を含む寒天培地で、28°C で培養することでセレクションを行った。

EYFP 観察

EYFP 蛍光観察には、EYFP 観察用ペンライト Handy Green Pro Plus for YFP (リライオン社) を用いた。

PCR 条件 :

2xSYBR premix ExTaq (Takara)	5 μ l
50 μ M プライマー 1	0.1 μ l
50 μ M プライマー 2	0.1 μ l
<u>鋳型 DNA</u>	<u>1.0 μ l</u>

H₂O to final 10 μ l

95°C, 60 秒の後、以下の 3 ステップを 40 サイクル。

95°C, 10 秒

62°C, 30 秒

72°C, 60 秒

DNA メチル化のシーケンス解析

NEBNext Enzymatic Methyl-seq Kit でライブラリを調製し、イルミナ MiSeq でシーケンスした。Trimmomatic で低品質データを除去し、Bismark と Bowtie2、Samtools で参照配列 (プラットフォーム) へのマッピングと DNA メチル化の検出を行った。

ON/OFF スイッチングプラットフォームへのクロマチン制御因子の結合

先ず初めに、クロマチン制御因子融合タンパク質が実際に ON/OFF スイッチングプラットフォームに結合可能かどうか調べた。クロマチン制御因子融合タンパク質と tag を融合したタンパク質を発現するアグロバクテリウムベクターを作製し、ON/OFF スイッチングプラットフォームを 1 コピーで持つ BY-2 細胞株 (185 株と 307 株) へ導入して形質転換体を得た。実際に共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察でこれら tag 付きクロマチン制御因子融合タンパク質が効率よく形質転換細胞で発現し主に細胞核内に集合することが判明した。次に、抗 tag 抗体を用いた ChIP 解析により、これら tag 付きクロマチン制御因子融合タンパク質がプラットフォームに結合しているかどうか調べた。その結果、185 株と 307 株のいずれの株でも tag 付きクロマチン制御因子融合タンパク質がプラットフォームに特異的に結合することが判明した。このようなクロマチン制御因子融合タンパク質を、④植物体での IPP の誘導とクロマチン構造変換の実験に用いた。

クロマチン制御因子融合タンパク質の結合によるプラットフォームクロマチン構造の変換

次に tag 付きクロマチン制御因子融合タンパク質を発現する、ON/OFF スイッチングプラットフォーム BY-2 細胞株 (185 株と 307 株) について、抗ヒストン修飾抗体を用いた ChIP 解析^{3), 4), 5), 12), 13)}を行い、プラットフォームのクロマチン構造に変換が起こるかどうか調べた。その結果、185 株と 307 株の各クローンによる多少のばらつきは認められるものの、いずれの株でも tag 付きクロマチン制御因子融合タンパク質の結合によりプラットフォームのクロマチン構造がオープン (ON) からクロズド側 (OFF) に変化することが判明した。

クロマチン制御因子融合タンパク質の結合によるプラットフォーム DNA のメチル化状態の変動

次に、クロマチン制御因子融合タンパク質が結合するとプラットフォーム DNA のメチル化状態に変化が起こるかどうかメチル化 DNA シークエンス解析で調べた。その結果、185 株と 307 株のいずれの株でもクロマチン制御因子融合タンパク質の結合によりプラットフォーム DNA のメチル化状態も大きく変動することが判明した。尚、コントロールの親株や tag 付き DNA 結合ドメインのみの結合ではプラットフォーム DNA のメチル化に変化は検出されなかった。以上の結果から、クロマチン制御因子融合タンパク質の結合によりプラットフォームのクロマチン構造変換と DNA メチル化レベルの変動を誘発し、植物細胞でもプラットフォームクロマチン構造を人為的にオープン (ON) からクローズド側 (OFF/ヘテロクロマチン) へ変換可能であること示し、当初の目標を達成した。

①- (6) 実用化を目指した融合型プラットフォームベクターの作製

発現誘導型プロモーターと ON/OFF プラットフォームとの融合型ベクターの構築

実用化を目指してレポーター遺伝子に発現誘導型プロモーターを組み込んで融合型プラットフォームベクター構築した。

ベンサミアナタバコへのアグロインフィルトレーション

アグロバクテリウム懸濁液を OD₆₀₀=0.1 に調整し、シリンジを使いベンサミアナタバコの葉の裏側から注入した。誘導型構築の遺伝子発現は、誘導剤 (+):10 μM, (-):DMSO を葉の全域に筆で塗布し、導入後 5 日目に mVenus の蛍光を観察した。

発現誘導型プロモーターを用いた ON/OFF スイッチングプラットフォームの改良

当初のプラットフォーム

フォーム内部には、

図 3.2.1.2.1-13 に示

すように強力な

CaMV35S プロモーター

に駆動されるマー

カー遺伝子を連結し

て挿入していた。組

換え遺伝子による有

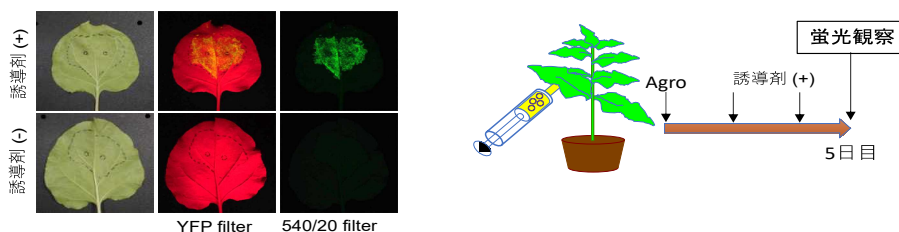


図 3.2.1.2.1-13 発現誘導プロモーターとの融合型プラットフォームベクターの構築

用代謝産物の恒常的な発現は生長障害を引き起こすことも多々報告されている。そこで、実用化を目指した改良型 ON/OFF プラットフォームでは、CaMV35S プロモーターから誘導型プロモーター駆動型マーカー遺伝子 (mVenus) に変更した。先ず、このような改良型ベクターをベンサミアナタバコの葉にアグロインフィルトレーションにより導入し、mVenus の発現が誘導されるかどうか蛍光顕微鏡で観察した。その結果、実際に誘導剤の添加が無い場合は発現しないが、誘導剤の添加により mVenus の発現が誘導されることを確認した (図 3.2.1.2.1-13)。

次にクロマチン操作と発現誘導が連動可能かどうか調べるために、この融合型プラットフォームベクターをアグロバクテリウムによりタバコ BY-2 培養細胞へ導入し、形質転換体を多数得た。これら BY-2 形質転換体を誘導剤の添加が無い培地で培養しても、全く mVenus の発現は起こ

らないが、誘導剤の添加培地での培養により 16 株中 10 株で *mVenus* の強い発現誘導が起こることを確認した。実際に共焦点レーザー顕微鏡を用いた同一条件での撮影でも初代プラットフォーム BY-2 株の CaMV35S プロモーター駆動型の EYFP に比べても融合型プラットフォーム BY-2 株 *mVenus* は強力に均一な発現誘導が起こることが確認できた。

改良融合型プラットフォームを用いたクロマチン操作と発現誘導の連動

そこで次にクロマチン操作と発現誘導は連動可能かどうかについて調べるために、BY-2 株 2 株にクロマチン制御因子融合タンパク質やコントロールの DNA 結合ドメインのみ、クロマチン制御因子のみの発現ベクターをアグロバクテリウム法で導入し形質転換体を多数得た。これら独立の形質転換体をそれぞれ 3 株ずつ、誘導剤存在下／非存在化で培養し *mVenus* の蛍光強度を測定した。誘導剤非存在化ではどの場合も全く *mVenus* の発現誘導は起こらないが、誘導剤存在化では DNA 結合ドメインのみやプラットフォームに結合しないクロマチン制御因子のみでは強い *mVenus* の発現誘導が起こるのに対し、プラットフォームに結合するクロマチン制御因子融合タンパク質の発現により *mVenus* の発現レベルが約 1/2 から 1/5 に抑制されることが明らかとなった。これらの結果と、クロマチン制御因子融合タンパク質の結合によりプラットフォームのクロマチン構造がヘテロクロマチン化されることを示した先の結果を合わせると、プラットフォームのヘテロクロマチン化操作が隣接する *mVenus* に及んで誘導剤による発現誘導効果を抑制した、つまり、クロマチン制御因子融合タンパク質の結合によるクロマチン操作と発現誘導は連動可能であると結論付けることができる。以上の成果により、クロマチン構造の ON から OFF 側への変換の目標は達成できた。

④植物体を用いてのイソプレノイド合成系 7 連結遺伝子の発現誘導とクロマチン操作の研究開発では、この改良融合型ベクターの *mVenus* 部分に代えて IPP 合成経路 7 連結遺伝子が挿入してあり、BY-2 細胞を用いての融合型プラットフォームと基本的には同様の構築と見なせる。④植物体を用いてのイソプレノイド合成系 7 連結遺伝子の発現誘導の研究開発では、クロマチン操作による OFF から ON 側への変換効果を示した。

②「ゲノム編集ステーション」の開発

②- (1) 発現ON/OFFスイッチングプラットフォーム上へのゲノム編集ステーションの組み込み

発現ON/OFFスイッチングプラットフォーム上のマーカー遺伝子の脇に、部位特異的な組換え酵素サイト（もしくはその変異型サイト）を適切に挿入することで、発現ON/OFFスイッチングプラットフォームに隣接したマーカー遺伝子カセットのそれぞれを、他の任意の遺伝子や配列とカセット交換反応により、別々に入れ替え可能となるような「ゲノム編集ステーション」化の開発を進めた。

②- (2) 発現ON/OFFスイッチングプラットフォームの「ゲノム編集ステーション化」

発現 ON/OFF スwitchingプラットフォーム上にある部位特異的な組換えサイトで実際に組換え反応を起こして「ゲノム編集ステーション」化できることを確認する必要がある。そこでアグロ

バクテリウムベクターに部位特異的組換えサイトと組換え酵素遺伝子^{14),15),16),17)}を挿入し、このベクターを保持するアグロバクテリウムを ON/OFF スイッチングプラットフォームを持つベンサミアナタバコ株に感染させた。感染後、ベンサミアナタバコ株ゲノムに T-DNA の挿入が起こり、組換え酵素活性による組換えが起こるかどうかについて PCR で解析した。その結果、特定プライマーセットで目的部位での組み換えが起こったことを示すバンドがベンサミアナタバコで検出された。この結果は、実際にベンサミアナタバコ ON/OFF スイッチングプラットフォームの部位特異的組換えサイトで組換え起こったことを意味し、ON/OFF スイッチングプラットフォームを「ゲノム編集ステーション」化する目標が達成できたことを示している。

③ 「ゲノム編集ステーションへ挿入した多重遺伝子の安定性評価」

③- (1) 挿入ゲノム編集ステーションの安定性

ゲノム挿入部位のシーケンス解析

KAPA HyperPrep Kit (for illumina)でライブラリを調製し、MiSeq でシーケンスした。Trimmomatic で低品質データを除去し、bwa で参照配列 (ゲノムとプラットフォーム) へマッピングした。Samblaster と Samtools でジャンクションリードを抽出し、IGV で挿入部位の特定と図の作製を行った。

シロイヌナズナの「ゲノム編集ステーション」 (発現 ON/OFF スイッチングプラットフォーム) 株の PCR 解析による 1 コピー挿入候補株 27 株のゲノム解析を行った。その結果、約半数の 13 株で「発現 ON/OFF スイッチングプラットフォーム」 T-DNA が構築どおりにほぼ完全長でゲノムの各部位に挿入されていることが判明した。この結果は、「ゲノム編集ステーション」のゲノム挿入部位での高い DNA 安定性を示している。またエピゲノム解析からも「ゲノム編集ステーション」 (発現 ON/OFF スイッチングプラットフォーム) へ挿入した遺伝子の安定性が示された。

④ 「イソプレノイド合成経路遺伝子群の発現制御技術の開発」 (再委託：東北大学)

高機能高付加価値なイソプレノイドを植物内で高生産させるプラットフォームを創出するために、全てのイソプレノイドの基本単位となるイソペンテニル二リン酸 (IPP) の生合成経路を一斉に発現制御させるシステムを構築した。従来、高等植物における IPP の増強のため、IPP 生合成経路における鍵酵素のみの過剰発現が試みられてきているが、IPP 生合成経路は、転写・翻訳・翻訳後レベルで厳密に制御されているため、その手法では IPP より合成される下流のイソプレノイドの蓄積量を十分に増強させることができていなかった。また、イソプレノイドには、植物ホルモン、光合成色素、電子伝達分子、膜脂質などとして植物の個体維持に重要な化合物が含まれるため、構成的な IPP の増強は代謝攪乱とそれによる生長抑制などを引き起こす可能性がある。そこで本開発では、内在のフィードバック制御機構を回避しながら IPP 生合成経路を植物内で増強することを目的として、外来生物由来の IPP 生合成経路の酵素遺伝子を発現 ON/OFF スイッチングプラットフォームによる厳密な制御下で発現可能とするシステムを構築した (図 3.2.1.2.1-

14) . 作製された IPP 高生産プラットフォームを植物に導入し、実際に植物内における誘導的な一斉発現を確認し、代謝物発現量の増強効果を検証した。

④- (1) MVA 経路遺伝子の取得

IPP 生合成経路には、メバロン酸 (MVA 経路) と非メバロン酸経路 (2-C-メチル-D-エリトロール 4-リン酸経路、MEP 経路) の 2 種類が存在する。一般に、真核生物、古細菌は MVA 経路を有しており、原核生物は MEP 経路を有している。高等植物は、主にサイトゾルで機能する MVA 経路と色素体内の MEP 経路を併せ持つ。また、原核生物の中でも、一部の放線菌は MEP の他に MVA 経路を有するものが存在する。植物内に異種生物由来 IPP 生合成経路を移植するにあたり、MEP 経路の最後の二段階は鉄-硫黄クラスターを有する還元酵素であり、

微生物由来の酵素を活性型として発現させることが困難であることが予想された。そこで、まずは異種生物由来 IPP 生合成経路の植物への移植として、2 つの非植物種由来の MVA 酸経を導入し、その効果を検証することとした (図 3. 2. 1. 2. 1-14) 。

MVA 経路は、3 分子のアセチル CoA を出発物質として、1 分子の IPP を生合成するまでに、Acetoacetyl-CoA thiolase (AACT)、HMG-CoA synthase (HMGS)、HMG-CoA reductase (HMGR)、Mevalonate-5-kinase (MK)、Phosphomevalonate kinase (PMK)、Mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase (PMD) の 6 種類の酵素が必要となるが、本研究ではさらに、IPP の異性体でありイソプレノイド生合成の初発段階で必須となるジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) を合成する IPP isomerase (IDI) も加えた 7 種類の酵素を植物に導入する。

④- (2) エストラジオール誘導型発現カセットの作製

ON/OFF スイッチングプラットフォームに導入する MVA 経路の各遺伝子は、エストラジオール発現誘導系で二重に制御することとした (図 3. 2. 1. 2. 1-15) 。

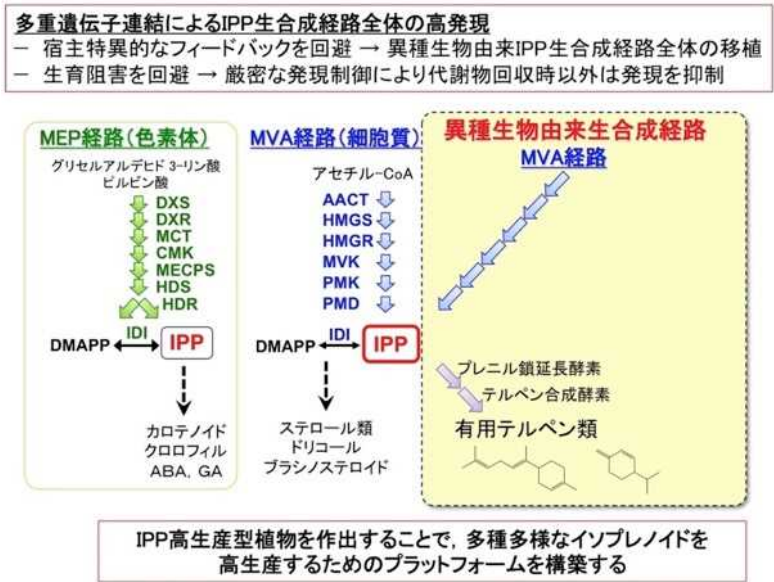


図 3. 2. 1. 2. 1-14 開発構想～イソプレノイド高生産プラットフォーム構築～

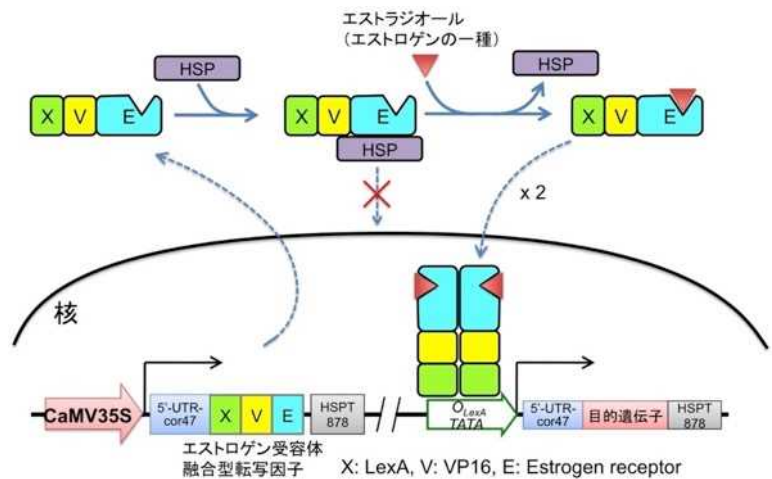


図 3. 2. 1. 2. 1-15 エストラジオール誘導型遺伝子発現システム

この系では、各遺伝子は *LexA-CaMV35S* ミニマルプロモーター (O_{LexA} TATA) 制御下にあり、 O_{LexA} TATA に対し結合する人工転写因子(XVE)を同時に発現させる。この XVE は、LexA-VP16 人工転写因子にヒトのエストロゲン受容体が融合されており、植物細胞内で発現させた場合、外部から添加されたエストロゲン依存的にコンフォメーション変化を起こし核内に移行するため、エストロゲン誘導的に O_{LexA} TAT 下流の遺伝子を発現させることが可能となる。まず、MVA 経路の各酵素のコード配列を、エストラジオール誘導系の個別の発現カセットに導入した。

④- (3) エストラジオール誘導型発現のための人工転写因子発現コンストラクトの作製

植物内で構成的に XVE を発現させるため、CaMV35S プロモーターの下流に XVE コード配列を導入したバイナリーベクターを作製した。

④- (4) エストラジオール誘導型発現カセットの多重連結

2 種の生物由来 MVA 経路の 7 つの酵素遺伝子の発現カセットを BAC ベクター上で連結した。ここで、カセットの連結順は、プロモーター側からターミネーター側に向かって、*AACT*、*HMGS*、*HMGR*、*MK*、*PMK*、*PMD*、*IDI* である。PCR により隣接する 2 つのカセット間を増幅し、その産物のサイズを確認することで、7 つの発現カセットが正しい向きに欠損なく導入されていることが確認された。

④- (5) MVA 経路発現用バイナリーベクターの作製

部位特異的組換え反応を利用し、2 種の生物種由来の MVA 経路の 7 つの酵素遺伝子の発現カセットが連結された配列を BAC ベクターから TAC バイナリーベクターに移した。TAC ベクターは、実施者(柴田)らがアグロバクテリウムを介して長鎖 DNA を植物に導入する目的で開発していたベクター^{8), 9), 10)}をベースとしたものである。

また、MVA 経路の 7 つの酵素遺伝子の発現カセットが連結された配列を、発現 ON/OFF スwitchングプラットフォームが導入されたバイナリーベクターに導入した。

④- (6) 植物内におけるエストロゲン誘導的遺伝子発現系の動作確認

上記の④-(2)、(4)、(5)で作製された、エストロゲン誘導的遺伝子発現系の植物内での動作を簡便に確認するため、*mVenus* を挿入したバイナリーベクターを作製し、それを導入したアグロバクテリウムをベンサミアナタバコ(*Nicotiana benthamiana*)の葉の表皮細胞へ感染させ、一過的に発現させた。このアグロインフィルトレーションから 48 時間後に、アグロバクテリウム懸濁液注入部を蛍光顕微鏡で観察した結果、XVE を導入しなかった系統や、エストラジオール処理をしなかった場合には有意な *mVenus* に由来する蛍光が検出できなかったため、今回作製した発現誘導系における制御の厳密性が示された。Real-Time RT-PCR による *mVenus* の発現レベルを定量分析した結果、エストラジオール処理を施したサンプルにおける *mVenus* の発現は、溶媒のみのコントロール(エストラジオール処理無)の 50 倍であった。これらの動作確認実験によって、今回作製したエストロゲン誘導系は厳密であることが明らかとなった。

④- (7) 原核生物由来 MVA 経路酵素の植物細胞内における局在性の確認及び局在改変

今回の開発で対象とした原核生物由来の MVA 経路の酵素タンパク質の一次配列は真核生物の酵素と異なる（同一性は 16%~36%）。また、シロイヌナズナの MVA 経路酵素の中で、HMGR は ER 膜局在、PMK、PMD はペルオキシゾーム、IDI の一部はミトコンドリアに局在性を示す（図 3.2.1.2.1-16）のに対し、原核生物の酵素タンパク質にはオルガネラ移行配列は存在しないはずであるため、植物細胞内でそれらを発現させた際の細胞内の挙動は未知であった。そこで、原核生物由来 MVA 経路の各酵素を蛍光タンパク質融合型としてベンサミサミアタバコ内で発現させ、細胞内局在性を解析した。

その結果、MK を除く全ての MVA 経路酵素がサイトゾルまたは核局在であることが明らかとなった。それらの真核生物内における機能を解析するため、出芽酵母の変異体を用いた機能相補解析を行った結果、いずれも、真核生物内で機能しうることが示された。

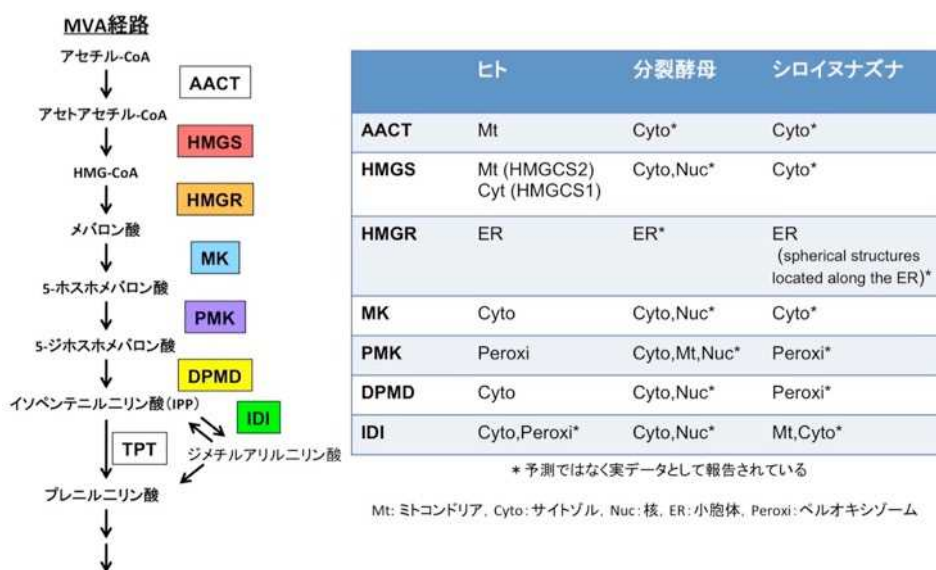


図 3.2.1.2.1-16 MVA 経路酵素の細胞内局在

④- (8) 植物内におけるエストロゲン誘導的な MVA 経路遺伝子発現系の確認

上記の④- (5) で作製したバイナリーベクターが導入されたアグロバクテリウムと、XVE が導入されたアグロバクテリウム株を混合し、④- (6) と同様の手法により、ベンサミアタバコの葉に対するアグロインフィルトレーションで一過的に発現させた。アグロインフィルトレーションと同時にエストラジオール処理を施してから 24、48 h 後に接種部位をサンプリングし、Real-Time PCR で各遺伝子のコピー数を定量した。その結果、各遺伝子の発現レベルに違いはあるものの、全ての遺伝子がエストラジオール依存的に一斉に発現誘導されていた。この際、エストラジオールによる発現誘導率は、3.7 倍から 61 倍であった。

④- (9) シロイヌナズナ培養細胞におけるエストロゲン誘導的な MVA 経路遺伝子発現系作製の試み

上記の④- (5) で作製したバイナリーベクターが導入されたアグロバクテリウム株でシロイヌナズナ T87 培養細胞株を形質転換したが、感染効率の低さから形質転換細胞がほとんど得られな

かった。アグロバクテリウムの株の変更なども行なったが顕著な改善は見られず、以降のモデル植物での解析は、培養細胞ではなくシロイヌナズナ植物体の形質転換株を用いて行うこととした。

④-(10) MVA 経路遺伝子が導入された形質転換シロイヌナズナの作製

上記の④-(5) で作製したバイナリーベクターが導入されたアグロバクテリウムの培養液を用いた花序浸し法によって、シロイヌナズナ (Col-0) を形質転換した。TAC バイナリーベクターを用いた際は、形質転換効率の低さから、2 種の MVA 経路遺伝子のうち原核生物由来 MVA 経路導入系統を作出することができなかった。発現 ON/OFF スwitchングプラットフォームが導入されたバイナリーベクターを用いた際は、いずれも複数の形質転換系統が得られ、その T2、あるいは T3 世代の植物を以降の交配に使用した。同様の手法で、*XVE* が導入されたアグロバクテリウムを用いてシロイヌナズナ (Col-0) を形質転換し、こちらも複数の系統を取得した。*XVE* 導入植物の T2 世代の花を種子親、MVA 経路の導入植物を花粉親として交配し、F2 種子まで取得した。

④-(11) 形質転換シロイヌナズナにおける MVA 経路遺伝子の発現誘導条件の最適化

XVE 導入系統と MVA 経路遺伝子導入系統を掛け合わせた系統 (*XVE*×MVA) の F1 種子を選抜用抗生物質を含む寒天培地に播種し、選抜された F1 植物の実生を用いてエストラジオールの処理方法の最適化を行なった。エストラジオールの濃度は最終濃度 10 μ M に固定し、Mock としては同量の溶媒 (ジメチルスルホキシド、DMSO) を添加した。各種条件で処理した同系統の植物体を 5 個体合わせて回収・磨砕し total-RNA を抽出したのち、転写物量を Real-Time RT-PCR で解析することで、MVA 経路遺伝子のエストラジオールによる一斉発現誘導を解析した。なお、ある遺伝子の発現について、エストラジオール処理植物における値を Mock 処理植物における発現レベルで除した値を発現上昇率と定義して評価を行なった。異なる 4 条件を比較検討した結果、エストラジオールを含む寒天培地上に実生を移植し、根から吸収させる処理方法が最も安定に遺伝子発現を誘導できることが分かった。

この処理方法を用いて、異なる 4 系統の *XVE* 導入株と交配させた F1 系統で発現誘導を解析したが、系統間で *XVE* の発現量には違いがあることがわかった。また、いずれの系統でも、Mock 処理に対してエストラジオール処理では遺伝子発現レベルが著しく誘導されており、非常に厳密な発現制御が達成されていることが明らかとなった。ここで、各遺伝子の発現レベルは、連結された発現カセットの連結位置によって違いが生じていた。この発現レベルの違いは、酵素遺伝子のコード配列 (CDS) の長さとの相関性は無く、連結の序列に関連しているように見られるが、連結カセットの数、序列、ボーダー配列からの距離、あるいは CDS の配列そのものなどとの関連性に関しては、今後のさらなる検証が必要となる。異なる 4 系統について、発現上昇率を比較すると、*XVE* の発現レベルに対する正の相関性があることが示された。

④-(12) 外来 MVA 経路遺伝子発現誘導による内在 MVA 経路遺伝子への影響の検証

植物において IPP 生合成経路は厳密に制御されているため、外来の MVA 経路の酵素遺伝子の過剰発現は、宿主植物の MVA 経路の酵素遺伝子の発現に影響が出る可能性がある。そこで、*XVE*×MVA の F1 植物について、エストラジオール処理による内在 MVA 経路の遺伝子の発現への影響を検証した。解析する Total RNA サンプルは、④-(11)における実験のものを使用した。先述の通り、

解析した植物体は異なる 4 系統の XVE 導入株と交配させた 4 つの F1 系統であり、各系統で誘導後の外来 MVA 経路遺伝子の発現レベルが異なっているが、今回解析した 5 つの内在 MVA 経路の遺伝子の発現はいずれも、明確な発現抑制を受けていないことが分かった。また、シロイヌナズナの内生の遺伝子の発現レベルに対して、異種発現させた MVA 経路酵素遺伝子のオルソログの発現レベルは同等から 4 倍程度であることが分かった。本解析により、異種生物由来オルソログの遺伝子発現が起きても、内在の MVA 経路に対しては顕著なネガティブフィードバック制御はかからないことが示された。

④-(13) 水耕系による形質転換シロイヌナズナ植物体の各組織における遺伝子発現誘導

根から吸い上げさせたエストラジオールが目的とする代謝物蓄積組織に到達し、効果的に遺伝子発現を誘導可能かどうか検証するため、水耕系を利用して根からエストラジオールを吸収させた形質転換植物について、各組織を分けて total RNA を抽出し、遺伝子発現誘導を解析した。

異なる 2 つの生物種由来の MVA がそれぞれ導入された F1 系統について、選抜用抗生物質を含む寒天培地上で育成させた実生を水耕栽培系に移植しさらに 12 日間育成させた。水耕液に β -Estradiol を添加し、誘導処理を行ったのち 7 日目の植物を根、ロゼッタ葉、主幹、側枝、茎生葉、花に分けてサンプリングし、遺伝子発現量を解析した。その結果、2 つの異なる MVA 経路が導入された系統のいずれにおいても、各組織で遺伝子発現が明確に誘導されていることが分かった。また、7 つの遺伝子カセット間での相対的な発現レベル（発現パターン）はどの組織でも同様であった。

④-(14) 形質転換シロイヌナズナにおける遺伝子発現誘導の世代を超えた安定性の検証

2 つの異なる MVA 経路が導入された F1 系統と、そこから得た F2 系統における遺伝子発現誘導を比較することで、プラットフォームの世代を超えた安定性を評価した。後代の F2 世代において XVE の発現レベルに最大で 10 倍程度の違いが生じたが、MVA 経路遺伝子の発現レベルはそれに応じたものとなっており、各遺伝子間での相対発現レベルも F1 世代と同様であった。いずれの MVA 経路導入系統においても、サイレンシングの様な著しい抑制等は見受けられず、その発現レベルの違いはエストラジオールの吸い上げ効率の実験誤差の範囲であると判断した。

④-(15) 形質転換シロイヌナズナにおけるイソプレノイド代謝物の解析

1. ステロールの解析

異種生物由来 MVA 経路を誘導的に発現させることで IPP の供給量が増大し、宿主植物内におけるイソプレノイド化合物の蓄積量が向上する可能性が考えられる。そこで、XVE×MVA の F1 系統におけるステロール量を測定した。解析した 4 系統では、MVA 経路の導入に相関した顕著な発現レベルの上昇が確認できなかったため、IPP 供給量の増強を、IPP から十数段階の変換を受けて生成するステロールの様なエンドプロダクトで評価するのはやはり困難であるということがわかった。

2. 外来酵素由来イソプレノイドの解析

高等植物ではイソプレノイドの共通前駆体である IPP の蓄積量はごく微量であり、それを定量分析するのは困難である。そこで本開発では、IPP 供給量の増強をより明確に検出するため、

異種生物由来のイソプレノイド生合成酵素を導入し、それによって生成した代謝物を解析した。なお、その代謝物はシロイヌナズナにおいて本来合成されないものである。

MVA 経路が導入された形質転換シロイヌナズナに、異種生物由来のイソプレノイド生合成酵素を追加導入し代謝物を解析した結果、MVA 経路の発現誘導により目的代謝物の蓄積量が 2 倍以上に増大することが分かった。また、異種生物由来イソプレノイド生合成酵素の基質供給酵素を追加で導入することで、目的代謝物の蓄積量は 7 倍まで増大した。さらに、その形質転換植物では、シロイヌナズナの内在酵素に由来するイソプレノイドの蓄積量も一斉に増大していた。これらの結果から、MVA 経路の導入により増強された IPP 供給により、異種発現酵素に由来するイソプレノイドだけでなく、宿主植物のイソプレノイドの生合成も増強可能であることが示された。

3. メタボローム解析

MVA 経路の増強が及ぼす効果をより俯瞰的に解析するため、メタボローム解析を行った。その結果、約 6000 の代謝物のピークが検出され、主成分分析で 2 種の異なる MVA 経路の発現で特徴的なピークを見出すことができた。

④-(16) 発現 ON/OFF スイッチングプラットフォームのスイッチング誘導因子による制御

発現 ON/OFF スイッチングプラットフォームに導入された MVA 経路遺伝子群のエストラジオールによる発現誘導は厳密に制御され、世代を超えて安定に維持されていることが明らかになったため、さらに、ヒストン構造の改変を誘導しうる酵素をプラットフォームに結合させることで、MVA 経路遺伝子の発現が制御可能かどうかを検証した。本開発で構築されたエストラジオール誘導系は非常に厳密に制御可能であり、エストラジオール非添加時の遺伝子発現は極めて低レベルに抑えられている。そこで本実験では、オープンクロマチン構造を誘発する酵素 (ON 側因子) を追加導入することで、さらなる発現レベルの増強が可能であるかを検証することにした。

これらの ON 側因子は、薬剤添加で標的配列からの脱離を可能とする制御ドメインとの融合タンパク質として発現させた。その結果、融合型 ON 側因子が結合することで、プラットフォーム内の遺伝子発現誘導が 2 倍程度まで上昇することが示唆された。さらに、この効果はプラットフォーム内で連結されたカセットの位置によっても影響されることが明らかとなった。プラットフォームに近い数個のカセットまでは上記の効果がみられるが、それ以降のカセットではその効果がみられなくなる。また、反対側の末端に位置するカセットでは ON 側因子の効果がみられないことから、少なくとも今回の構築においては ON 側因子の作用に方向性があることが示唆された。

④-(17) 形質転換タバコ (*Nicotiana tabacum*) における異種生物由来 MVA 経路の発現誘導

実用作物における異種生物由来 MVA 経路高発現の効果を解析するため、タバコ (*Nicotiana tabacum*) における実証実験を行った。異なる 2 種の MVA 経路が導入された T1 系統をそれぞれ獲得したのち、それらを XVE 導入系統を花粉親にして交配させることで F1 種子を得た。F1 植物の実生を 10 μ M エストラジオール (Mock 処理では DMSO) で 3 日間処理し遺伝発現解析を行った結果、いずれの MVA 経路導入系統においても、エストラジオール添加時において著しい一斉発現誘導が引き起こされることが示された。発現上昇率が最も低かった原核生物 IDI でも 9 倍であり、

それ以外ではいずれも 30 倍から数百倍の発現上昇率を示した。これらの結果から、本開発で構築した IPP 高生産プラットフォームが実用植物でも利用可能であることが実証された。

上記のエストラジオール誘導処理を施した実生のサンプルについて、4-(15)-1 と同様の手順でステロール量の分析を行った。しかし、シロイヌナズナにおける解析と同様に、検出されたステロール類のいずれも、エストラジオール処理において顕著な上昇は無いが、わずかに減少する傾向となった。この結果から、IPP 生合成の増強効果を十分に下流代謝物に流すためには、ハブ化合物であるオリゴプレニル二リン酸合成酵素と組み合わせる必要があることが想定される。

<テーマ間連携に向けた取り組み>

他の委託先 A と遺伝子発現カセットの最的化 (H28 より)、他の委託先 B と遺伝子発現制御カセットの構築と連結 (H31 より)、他の委託先 C と RNA サイレンシングサプレッサーによる抑制解除 (R2 より) について、それぞれ技術連携を進めた。他の委託先企業と多重遺伝子発現プラットフォーム構築の実用化についての話し合いを進めた (H29 より)。また、他の委託先 E と情報共有を行った (H30)。

(9) 成果の普及

研究発表・講演、文献、特許等、その他の公表（プレス発表等）は下記の通りである。

成果普及活動集計

年度	論文		その他外部発表				受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他（プレスリリース他）	
2016～2018	0	0	6	0	0	0	1
2019	0	0	6	0	0	0	0
2020	0	0	1	0	1	1	0
準備中	4	0	0	0	0	0	0
PJ 期間合計	0	0	7	0	1	1	1

特許出願実績（出願準備中含む）

年度	特許出願		
	国内	外国	P C T
2016～2018	1	0	0
2019	0	0	1
2020	1	1	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

本開発技術では、複数の遺伝子を導入し発現制御可能となるため、多様な遺伝子組換え技術に利用されるので、特許ライセンスを通して製品化に反映される。助成事業者や民間企業などとのライセンス契約を結び、産業化に貢献する。

(11) 成果の実用化・事業化に向けた戦略

本研究開発技術では、複数の遺伝子を導入し発現制御可能となるため、多様な遺伝子組換え技術に利用されるので、特許ライセンスを通して製品化に反映される。かずさ DNA 研究所受託事業を通して助成事業者や民間企業などとのライセンス契約を結び、産業化に貢献する。

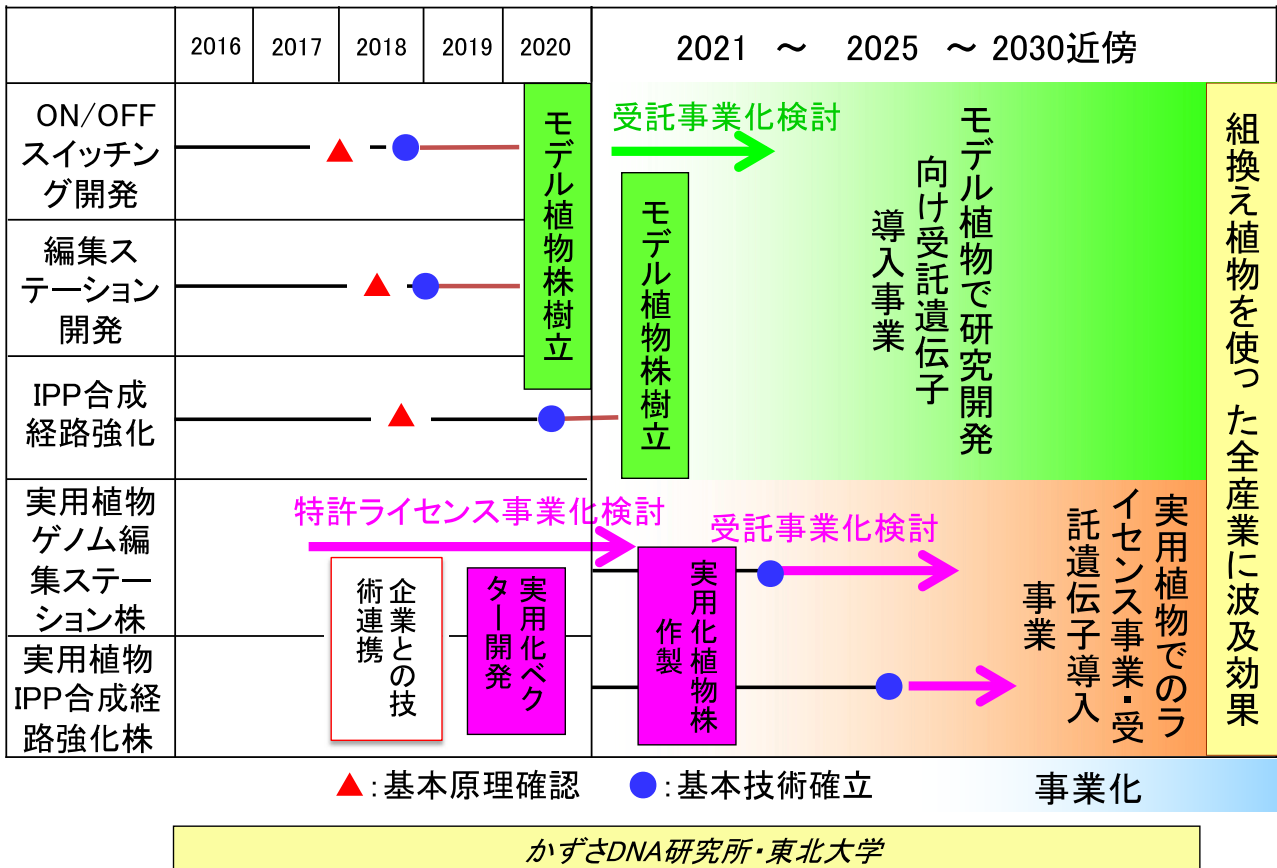
(12) 成果の実用化・事業化に向けた具体的取り組み

本事業で開発した新規な国産技術（クロマチン操作による遺伝子発現一斉制御技術）は、合成生物学による代謝系制御を植物体で実現し、産業化するための基幹技術である。具体的には、①

「ON/OFF スwitchングプラットフォーム」と ②「ゲノム編集ステーション」の開発を行うとともに、③「ゲノム編集ステーションへ挿入した多重遺伝子の安定性評価」により、組換え遺伝子のクロマチン操作による安定な発現制御を実現した。また、これら技術を、④「イソプレノイド合成経路遺伝子群の発現制御技術の開発」に応用することにより、有用中間代謝物の増産を可能にした。本技術開発において「発現 ON/OFF スwitchングプラットフォーム」系統、或いは「ゲノム編集ステーション」系統が作製できたことにより、植物バイオテクノロジー分野で幅広くこの技術が利用されることが期待できる。

植物を宿主とした合成生物学的アプローチによる有用物質生産の実用化において課題となっていた、多重連結遺伝子の一斉導入と世代を超えて安定な発現制御の維持が、本開発により実現可能となった。これにより、産業部門、特に非可食性植物由来原料による化学品製造の本格的実用化が促進されるため、2030年時における大きな省エネルギー効果、CO₂削減効果が期待出来る。

(13) 成果の実用化・事業化の見通し



引用文献

- 1) Stam, M, Mol, J. N. M. and Kooter J. M. The Silence of Genes in Transgenic Plants, *Annals of Botany* (1997) 79, 3–12 (Review)
- 2) Ikeno, M., Grimes, B., Okazaki, T., Nakano, M., Saitoh, K., Hoshino, H., McGill, N. I., Cooke, H. and Masumoto, H. Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nature Biotechnology* (1998) 16, 431–439
- 3) Okada, T., Ohzeki, J., Nakano, M., Yoda, M., Brinkley, W.R., Larionov, V. and Masumoto, H. CENP-B Controls Centromere Formation Depending on the Chromatin Context. *Cell* (2007) 131, 1287–1300
- 4) Nakano M, Cardinale S, Noskov VN, Gassmann R, Vagnarelli P, Kandels-Lewis S, Larionov V, Earnshaw WC, Masumoto H. Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers. *Dev Cell.* (2008) Apr;14(4):507–22.
- 5) Ohzeki J, Nakano M, Okada T, Masumoto H. CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA. *J Cell Biol.* (2002) Dec 9;159(5):765–75.
- 6) Takita E, Kohda K, Tomatsu H, Hanano S, Moriya K, Hosouchi T, Sakurai N, Suzuki H, Shinmyo A, Shibata D. Precise sequential DNA ligation on a solid substrate: solid-based rapid sequential ligation of multiple DNA molecules. *DNA Research* (2013) 20(6), 583–592 doi:10.1093/dnares/dst032
- 7) Ohzeki J, Bergmann JH, Kouprina N, Noskov VN, Nakano M, Kimura H, Earnshaw WC, Larionov V, Masumoto H. Breaking the HAC Barrier: histone H3K9 acetyl/methyl balance regulates CENP-A assembly. *EMBO J.* (2012) May 16;31(10):2391–402.
- 8) Liu, Y. G., Shirano, Y., Fukaki, H., Yanai, Y., Tasaka, M., Tabata, S. and Shibata, D. Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96, 6535–6540
- 9) Shibata, D. and Liu, Y. G. Agrobacterium-mediated plant transformation with large DNA fragments. *Trends in Plant Science* (2000) 5, 354–357
- 10) Hirose, Y., Suda, K., Liu, Y. G., Sato, S., Nakamura, Y., Yokoyama, K., Yamamoto, N., Hanano, S., Takita, E., Sakurai, N., Suzuki, H., Nakamura, Y., Kaneko, T., Yano, K., Tabata, S. and Shibata, D. The Arabidopsis TAC Position Viewer: a high-resolution map of transformation-competent artificial chromosome (TAC) clones aligned with the Arabidopsis thaliana Columbia-0 genome. *The Plant Journal* (2015) 83, 1114–1122
- 11) Clemente T. *Nicotiana* (*Nicotiana tobaccum*, *Nicotiana benthamiana*) In: Wang K, editor. *Agrobacterium Protocols*. Totowa: Humana Press; 2006. pp. 143–154.
- 12) Okamoto Y, Nakano M, Ohzeki J, Larionov V, Masumoto H. A minimal CENP-A core is required for nucleation and maintenance of a functional human centromere. *EMBO J.* (2007) Mar 7;26(5):1279–91

- 13) Ohzeki J, Shono N, Otake K, Martins NM, Kugou K, Kimura H, Nagase T, Larionov V, Earnshaw WC, Masumoto H. KAT7/HBO1/MYST2 Regulates CENP-A Chromatin Assembly by Antagonizing Suv39h1-Mediated Centromere Inactivation. *Dev Cell.* (2016) Jun 6;37(5):413-27.
- 14) Lee G, Saito I. Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene.* (1998) Aug 17;216(1):55-65.
- 15) Suzuki E, Nakayama M. VCre/VloxP and SCre/SloxP: new site-specific recombination systems for genome engineering. *Nucleic Acids Res.* (2011) Apr;39(8):e49.
- 16) 特許第5336592号：新規な部位特異的組換え酵素とその認識配列を用いた部位特異的組換え方法、中山学
- 17) 特許第5336676号：新規な部位特異的組換え酵素によって認識される配列及びその認識配列を用いた部位特異的組換え方法、中山学

3.2.1.2.2 植物における代謝産物の蓄積機構の制御技術の開発（担当機関：京都大学）

(1) 背景と目的

物質生産とは、目的物質に対する「生合成・代謝活性」と「蓄積能力」の積である。代謝酵素が目的の化合物を作る発電機とすると、それを使えるように貯めておく「蓄電装置」が必要で、その両方がきちんと制御されていてはじめて物質の「生産」が達成される。また、抗ガン剤として広く臨床利用されている植物アルカロイドのビンクリスチンは、20段階以上のステップを通して生合成される過程で、初期反応は師部細胞、中期は表皮細胞、最終数段階は乳管細胞というように、前駆体化合物が異なった細胞タイプ間で輸送されながら生合成が進み最終産物となることも知られ、植物は極めて高次元の生合成制御メカニズムを駆使してこれら有用物質を生産している。

近年の生物学の急速な進展から、生合成遺伝子を使った代謝工学や合成生物学による物質生産の試みが2000年頃以降特に活発になされてきた。しかしながら、酵母などのホストに生合成酵素を必要なだけ導入発現させても、期待したような生産には繋がらないという「壁」に多くの研究者が突き当たった。その過程で気づかれた事は、i) 遺伝子組換えにより高い生産性を獲得した細胞は、自らが初めて作る生理活性物質に対する抵抗性が無く、生産性の高い細胞ほど死滅し易いという点：ii) ヘテロな生物種では遺伝子組換えで作らせようとした化合物は、合成する端から分解されてしまい、安全に貯められない、という2点が少なからず高生産を阻む要因になっているという事である。生産させようとする化合物が生理活性物質である場合は特に、前者のホスト細胞に対する「自家中毒の回避」という配慮が必要である。後者の場合は、ホスト細胞がその物質を生体異物として分解しようとするメカニズムであり、この「化合物分解からの保護」という観点が必要となる。

上述のビンクリスチンや、イチイ属樹木が生産するパクリタキセルのような抗ガン剤は強い細胞分裂阻害活性を示すが故に有用であるが、こうした生理活性物質はそれを生産する植物細胞にとっても潜在的には有害である。ところがそれらを生産する植物はこうした活性物質に対する耐性機構を有するとともに、これら細胞毒性物質を大量に植物組織に蓄積する能力を有する。一方で、代謝工学や合成生物学では、専ら代謝酵素遺伝子のみを対象にした研究を展開しており、結果的に生産性は元の植物のレベルに追いつけない事が多い。それは、こうした生理活性物質を、ホスト生物にとっても化合物自体にとっても安全に蓄積させる制御技術の視点が欠けている事が一つの大きな要因と考える。

以上の背景から、植物細胞を有用物質の生産工場ととらえる本研究開発プロジェクトにおいて、本技術開発では植物において物質を蓄積させる制御技術を共通基盤技術として開発する事を目的とする。その方策として、大きく2つの戦略を打ち立てた。一つは、「蓄積の場」そのものを増やす事で、最終産物の植物当たり、または単位栽培面積当たりの生産量を向上させる戦略である。もう一方は、細胞内のレベルで化合物の動きを制御する輸送コンプレックスである「輸送カーゴ」マシナリーを利用した物質集積技術の開発である。

(2) 位置づけ、目標値

植物における機能性物質の蓄積制御技術の開発を目指す本事業において、「蓄積の場」を増やす技術と、「蓄積プロセス」そのものを制御する技術の2つに取り組む。

実施項目 1) 腺鱗の分化制御による蓄積技術：前者の「蓄積の場」を増やす技術開発は、多くの機能性成分が植物の組織表面に発達する「腺鱗」という生産と蓄積に特化した小さな組織のみに集約される事に着目し、転写因子とゲノム編集技術を用いるアプローチと、ケミカルを用いた汎用性の高いアプローチの両方を計画している。

実施項目 2) 輸送マシナリーによる蓄積機構の制御技術開発：後者の蓄積プロセスの制御に関しては、水溶性物質と脂溶性物質とで植物内での蓄積機構に大きな違いがある事に配慮し、特に医薬品原料や機能性食品の有効成分とされる化合物がいずれも脂溶性である事に着目して、脂溶性物質のアポプラスト蓄積を制御する技術を開発する。

プロジェクト 3 年目の中間目標値 (2018 年度) :

実施項目 1) に関しては、*TRY*、*CPC*、*ETC3* などに対する相同転写因子遺伝子のノックアウトによる腺鱗分化促進手法の有効性をトマトにおいて検証するとともに、もし有効性が低かった場合には、新規側方抑制関連遺伝子の同定へとつながる情報を得る。ケミカルライブラリのスクリーニングからは、腺鱗トライコーム増加に活性を示す化合物を、5 種類を目処に絞り込む。もし良い候補が見つからなかった場合には、植物ホルモンの誘導体を用い、腺鱗トライコーム分化を促進する組合せと濃度を見出す。

実施項目 2) に関しては、「輸送カーゴ」のメンバー候補に関して、細胞内局在解析や免疫沈降などの手法を用いて、分泌プロセスに関与すると考えられるタンパク質 5 個以内を目標に絞り込む。また、脂溶性物質の分泌に付随する膜脂質とマトリックス脂質分子を同定する。さらに脂溶性物質の細胞外蓄積において重要と考えられるアセチル化酵素遺伝子の解析を介し、プロジェクト成果の高度化を図る。

プロジェクト 5 年後の最終目標値 (2020 年度) :

実施項目 1) に関しては、転写因子からのアプローチでは、実用植物 5 種以上の RNA-Seq 解析をし、腺鱗分化促進に役立つ相同転写遺伝子のカタログ化を行い、遺伝子ノックアウトによる腺鱗分化促進法を、形質転換が可能な植物に用いることのできる一般的な技術として確立する。また、ケミカルライブラリを用いた腺鱗数分化誘導物質からのアプローチでは、シロイヌナズナのトライコーム分化誘導活性が高いと認められた化合物もしくは植物ホルモン誘導体の組合せを使って、実用植物 5 種以上に適用し、その適用スペクトラムと利用可能な濃度範囲を決定し、一般的な腺鱗数分化誘導技術として確立する。

実施項目 2) に関しては、タバコ植物体あるいはシロイヌナズナを宿主とし、輸送カーゴに必要な遺伝子を導入した組換え体を作成する。その組換え体を用い、内在性セスキテルペンを脂溶性物質の指標として、細胞外蓄積を 2 倍とする事を目標とする。

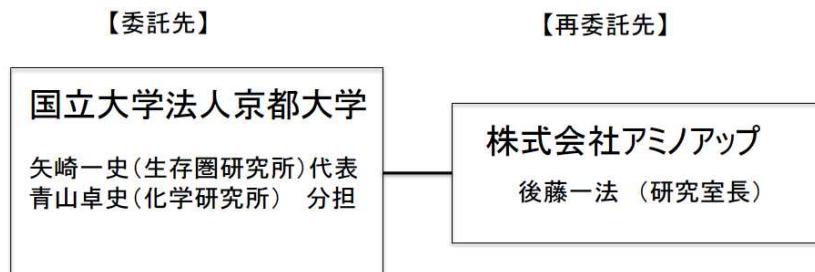
これら以外に、研究実施項目②の「植物による高機能品生産技術開発」においてと複数の企業と連携し、アルカロイドの蓄積に関して、開発した技術の有効性を検証する。

(3) 全体計画

事業項目	2016年度				2017年度				2018年度				2019年度	2020年度
	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期		
① 腺鱗の分化制御 による蓄積技術 開発	トマト転写因子の同定				トマトへの遺伝子導入と評価				実用植物の転写因子同定と応用					
	小分子ライブラリのプレスクリーニング				小分子ライブラリの本スクリーニング				小分子の実用植物への応用					
② 輸送マシナリー による蓄積機構 の制御技術開発	鍵酵素の抗体作成と評価				輸送カーゴメンバーの可視化・相互作用解析				モデル植物への応用展開					
	cDNAの整備と抗体準備				分泌脂質の分析				エステル化脂肪酸の エンジニアリング					
					アセチル化酵素の解析									

青字は加速化経費

(4) 実施体制
体制図



PJ内連携として、公益財団法人かずさDNA研究所と、共同研究を実施中

(5) 運営管理

本研究テーマの運営に当たっては、チーム内においては実施項目ごとに、2週間に1回、研究員と実施内容の進捗の報告や問題点などについて、情報共有を定期的に行っている。また助成事業に従事する研究員も含めて、半年に一度まとまった成果報告の機会を設けている。実施項目全体（チーム全体）の会議は、半年に1回、あるいは研究推進上情報交換が必要と考えられる機会にアドホックで開催している。チーム外の専門家や有識者からアドバイスを受けるミーティングは、年に3から4回個別に行っている。これら以外に、年に1回開催のNEDO主催の技術推進委員会に出席し、委員各位よりアドバイスを受け、研究開発の推進に役立てている。

(6) 実施の効果

本研究で開拓する技術からは、1-1) 遺伝子（転写因子）を用いた「蓄積の場」の制御技術、1-2) ケミカルを用いた「蓄積の場」を増産する技術、2) 脂溶性の生理活性物質に適した輸送・蓄積技術が開発される事が見込まれる。1-1) からは実用植物の転写因子とその利用法からのライセンス、1-2) からは広く様々な植物種をケミカルで処理する事で「蓄積の場」を増成するライセンス、2) からはこれまでメカニズムすら明らかでなかった脂溶性の生理活性物質の細胞外蓄積を制御するライセンスが得られる事が予想される。ここから得られる収入に加え、国内における機能性物質の生産に関わる雇用や、国民の健康維持に資する機能性物質の生産を通じ、2000億円規模の経済効果が期待される。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目	実施内容	最終目標値	達成度	成果
輸送マシナリーによる蓄積機構の制御技術開発	i. 転写因子を用いたゲノム編集による腺鱗数の制御技術の開発	実用植物の腺鱗分化促進に役立つ相同転写遺伝子のカタログ化を行いノックアウトによる腺鱗分化促進法を一般的な技術として確立する。	○	実用植物5種以上のRNA-Seq解析をし、腺鱗分化促進に役立つ相同転写遺伝子のカタログ化を行い、遺伝子ノックアウトによる腺鱗分化促進法を、形質転換が可能な植物に用いることのできる一般的な技術として確立した。
	ii. ケミカルライブラリを用いた腺鱗数増加物質の開拓	活性物質の適用スペクトラムと利用可能な濃度範囲を決定し、一般的な腺鱗数分化誘導技術として確立する。	○	シロイヌナズナのトライコーム分化誘導活性が高いと認められた化合物もしくは植物ホルモン誘導体の組合せを使って、実用植物5種以上に適用し、その適用スペクトラムと利用可能な濃度範囲を決定し、一般的な腺鱗数分化誘導技術として確立した。
腺鱗の分化制御による蓄積技術	i. 輸送カーゴによる脂溶性物質の分泌機構の要素化と応用	脂溶性物質のアポプラスト蓄積を制御する輸送カーゴのコンポーネントのメンバーを明らかにする。	○	タバコ植物体あるいはシロイヌナズナを宿主とし、輸送カーゴに必要な遺伝子を導入した組換え体を作成し、内在性セスキテルペンを脂溶性物質の指標として、細胞外蓄積を2倍以上となることを確認し有効性を検証した。また、複数の企業と連携し、アルカロイドの蓄積に関して、開発した技術の有効性を検証した。
	ii. 輸送コンプレックスコンポーネントの応用	上記コンポーネントのメンバーを他植物に応用し、化合物の細胞外分泌の促進を目指す。	○	

(8) 研究開発成果の意義

植物における機能性物質の蓄積制御技術の開発を目指す本事業において、「蓄積の場」を増やす技術と、「蓄積プロセス」そのものを制御する技術の2つに取り組んだ。

実施項目1) 腺鱗の分化制御による蓄積技術開発

植物機能性成分の多くが、植物の組織表面に発達するトライコームの一種である腺鱗という組織で生産、蓄積されている。そこで実施項目1)では、機能性成分を蓄積する「場所(腺鱗)を増やす」ための技術確立を目的とし、1-1)ゲノム編集による腺鱗分化促進技術の開発、そし

て 1-2) ケミカルライブラリスクリーニングによる腺鱗分化誘導化合物の探索、に取り組む (図 3.2.1.2.2-1-1 参照)。

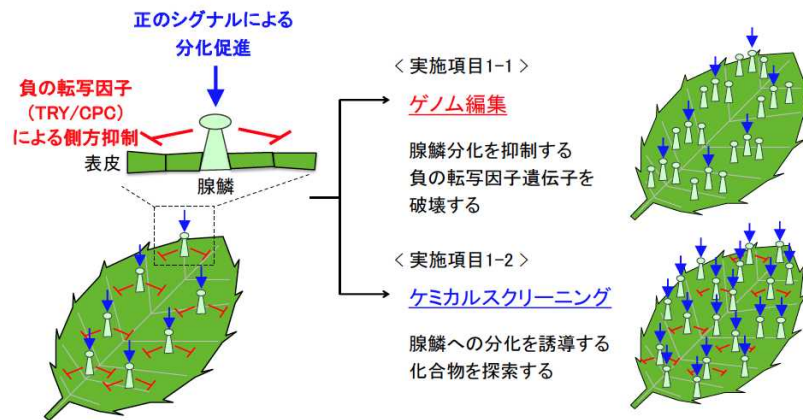


図 3.2.1.2.2-1-1 腺鱗分化の制御技術のストラテジー

1-1) ゲノム編集による腺鱗分化促進技術の開発

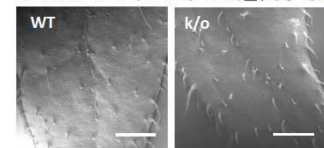
本実施内容においては、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *CPC*、*TRY*、*ETC3* などの R3-MYB 型の負の転写因子遺伝子 (*TRY/CPC* 遺伝子) に対するトマト (*Solanum lycopersicum*) の *TRY/CPC* 相同遺伝子を同定し、CRISPR/Cas9 系を用いたゲノム編集による遺伝子破壊を行うことで、腺鱗分化の促進を試みる。さらに、腺鱗に有用な化合物を蓄積する植物種から *TRY/CPC* 相同遺伝子を同定しカタログ化を行うとともに、形質転換が可能な植物種に対してはゲノム編集による遺伝子破壊株を行うことで腺鱗分化の促進を試みる (株式会社アミノアップに実施委託)。

1) トマト (Micro-Tom) の RNA-Seq 解析およびゲノム配列の *in silico* 解析により 2 つの *TRY/CPC* 相同遺伝子を同定し、それぞれに対して CRISPR/Cas9 系を用いて遺伝子破壊株を作出した。

2) それらの植物体を観察した結果、一方の遺伝子の破壊株で腺鱗を含むトライコームの数が増加する傾向が見られ、もう一方では腺鱗のサイズが大きくなる傾向が見られた (図 3.2.1.2.2-1-2 参照)。

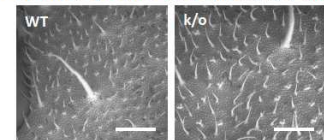
3) この腺鱗分化促進の手法を実用植物種へと適用するために、シソ科のエゴマ (*Perilla frutescens*) とスペアミント (*Mentha spicata*)、キク科のクソニンジン (*Artemisia annua*) とカワラヨモギ (*Artemisia capillaris*)、およびアサ科のホップ (*Humulus lupulus*) について RNA-Seq 解析により *TRY/CPC* 相同遺伝子を同定し、それらに既知の植物種のものを加えた *TRY/CPC* 相同遺伝子カタログを作成した (図 3.2.1.2.2-1-3 参照)。

トマト *TRY/CPC* ホモログ a の遺伝子破壊



破壊株 (k/o) において腺鱗の数が増加した。

トマト *TRY/CPC* ホモログ b の遺伝子破壊



破壊株 (k/o) において腺鱗のサイズが大きくなった。

Bar = 0.5 mm

図 3.2.1.2.2-1-2 トマト *TRY/CPC* ホモログ遺伝子破壊株の表現型

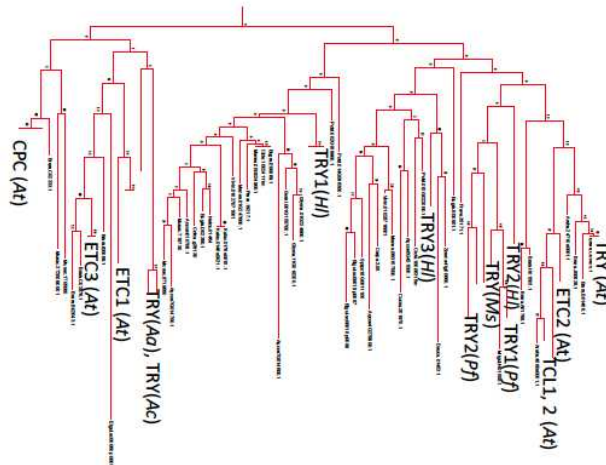


図 3.2.1.2.2-1-3 TRY/CPC 相同転写因子遺伝子のカタログ化
クソニンジン (*Aa*)、カワラヨモギ (*Ac*)、エゴマ (*Pa*)、スペアミント (*Ms*)、
ホップ (*H*)からTRY/CPC相同転写因子遺伝子を同定し、シロイヌナズ
ナ(*Aa*)のものとともに分子系統樹に当てはめた。

- 4) このカタログを利用することにより、他の様々な実用植物種における TRY/CPC 相同遺伝子が効率よく同定できるようになった。
- 5) さらに、エゴマについては同定された TRY/CPC 相同遺伝子が破壊された植物体を作成し (株式会社アミノアップ社への実施委託)、腺鱗の数が増加する傾向を確認した。

以上により、TRY/CPC 相同遺伝子の破壊による腺鱗分化促進の手法が多く植物種に対して適用できることが判明するとともに、TRY/CPC 相同遺伝子同定のための情報基盤が整えられた。

1-2) ケミカルライブラリスクリーニングによる腺鱗分化誘導化合物の探索

本実施内容においては、トライコームで強い活性を持つ GL2 遺伝子プロモーター制御下に GFP-GL2 融合遺伝子を配置したレポーター遺伝子 (GL2p-GFP-GL2) を導入した形質転換シロイヌナズナを用いて、トライコームの発生・分化に対して影響を及ぼす化合物を 5,000 種から成るケミカルライブラリスクリーニングにより同定する。得られたトライコーム分化誘導性化合物を腺鱗に有用な化合物を蓄積する植物種に処理し、腺鱗数増加効果および腺鱗に蓄積する化合物の量を評価する。

- 1) シロイヌナズナ幼苗における蛍光レポーター遺伝子の応答を指標にして、腺鱗分化誘導化

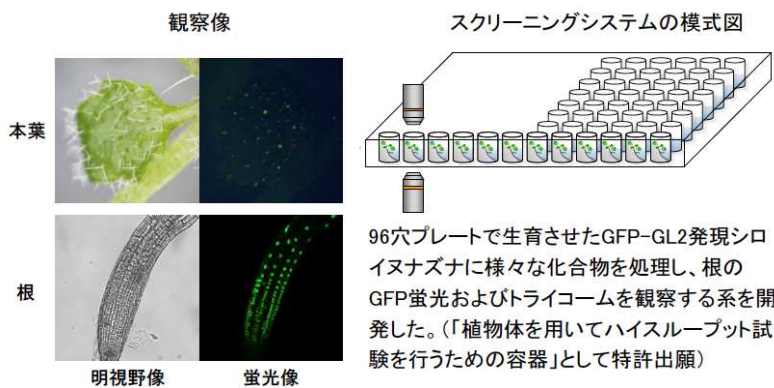


図 3.2.1.2.2-1-4 腺鱗分化誘導化合物のハイスループットスクリーニング系

- 化合物をハイスループットでスクリーニングする系を確立した（図 3.2.1.2.2-1-4 参照）。
- このスクリーニング系を用いて、様々なフォーカストライブラリーに含まれる計 5,000 種以上の化合物から 5 種類の候補化合物を選抜した。
 - それらを個別に評価した結果、植物ホルモン誘導体に相当する化合物が腺麟分化誘導の有意な効果を示すことが判明した（図 3.2.1.2.2-1-5 参照）。
 - この効果は、トマト、エゴマ、ペパーミント (*Mentha x piperita* L.)、クソニンジン、

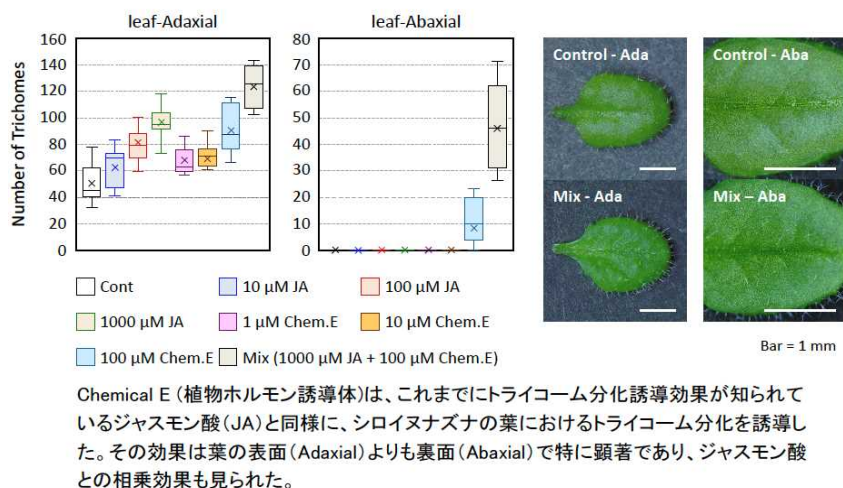
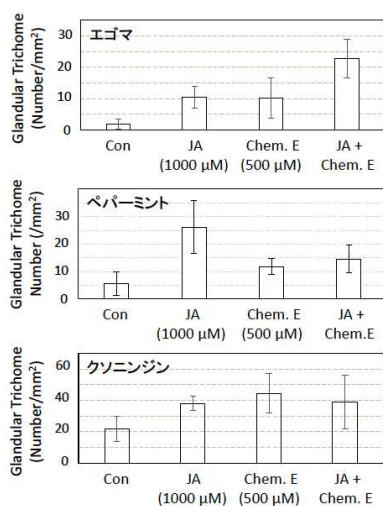


図 3.2.1.2.2-1-5 Chemical E (植物ホルモン誘導体)の処理によるトライコーム分化誘導

- カワラヨモギの腺麟分化に対しても有効であり、エゴマでは香気成分の、カワラヨモギでは薬効成分の蓄積量増加が確認された。
- さらに、その化合物の腺麟分化誘導における至適条件、および腺麟分化誘導作用が既に知られているジャスモン酸との相乗効果を調べた結果、至適条件と相乗効果は対象となる植物種によって大きく異なることが明らかとなった（図 3.2.1.2.2-1-6 参照）。



Chemical E (植物ホルモン誘導体)の腺麟(Glandular Trichome)分化誘導効果およびジャスモン酸(JA)との相乗効果は植物種によって異なった。

図 3.2.1.2.2-1-6 Chemical E (植物ホルモン誘導体)による植物種別の腺麟分化誘導効果

以上により、腺麟分化誘導に有意な効果を示す化合物が同定されるとともに、その実用植物への適応におけるノウハウが蓄積された。

実施項目 2) 輸送マシナリーによる蓄積機構の制御技術開発

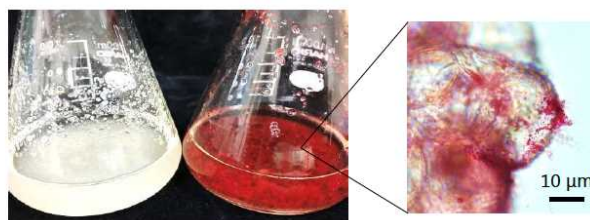
医薬品原料や機能性食品の有効成分とされる化合物がいずれも脂溶性である事に着目し、脂溶性物質のアポプラスト蓄積を制御する技術を開発する。実施項目 2) では、2-1) 細胞内輸送カーゴによる脂溶性物質の分泌機構の要素化と、2-2) 輸送コンプレックスコンポーネントの応用、に取り組んだ。

2-1) 細胞内輸送カーゴによる脂溶性物質の分泌機構の要素化

脂溶性物質の蓄積を担う「輸送カーゴ」のコンポーネントを明らかにするため、以下の項目を推進した。

1) 薬用植物ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) は、根の表皮細胞にて脂溶性の赤色素シコニンを生産し、細胞外に分泌している。また培養細胞や培養毛状根においてもシコニンを生産するが、培地組成や光条件によってその生産は制御される (図 3.2.1.2.2-2-1 参照)。

そこで、ムラサキ植物体 (根皮、根芯)、ムラサキ培養細胞 (明条件、暗条件) 及びムラサキ毛状根 (明条件、暗条件) のトランスクリプトームデータ (Takanashi *et al.*, Plant Cell Physiol., 2019) を用いて、シコニン生産に相関して発現上昇する候補遺伝子の選定を行った。並行して、ムラサキ培養細胞におけるプロテオームデータを用いて候補因子の探索に加えた。これらのオミクスデータを組み合わせ、シコニンの細胞外分泌に関わることが期待される輸送カーゴメンバーを 16 個選定した。この 16 個の輸送カーゴ候補メンバーの中には、小胞輸送に関わる ENTH ファミリー蛋白質、細胞骨格系のミオシン蛋白質、膜融合に機能する SNARE 蛋白質に加えて、ABC トランスポータ蛋白質や NPF ファミリー蛋白質といった輸送体蛋白質が含まれた (図 3.2.1.2.2-2-2 参照)。



生育培地 シコニン生産培地

図 3.2.1.2.2-2-1 脂溶性色素シコニンを生産・分泌するムラサキ培養細胞

de novo トランスクリプトーム解析

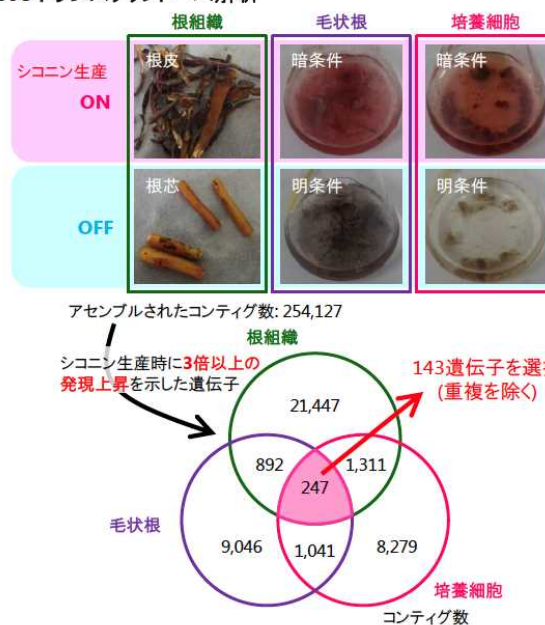


図 3.2.1.2.2-2-2 比較オミクス解析によるシコニン生産関連遺伝子の探索

2) 次いで、候補とした輸送カーゴメンバーの遺伝子発現解析と全長配列の取得を進めた。その結果、シコニンの細胞外蓄積とリンクすることが示唆された 16 個の遺伝子・蛋白質のうち、実際の細胞における遺伝子発現が検出限界程度であるなど、擬陽性と疑われたものを候補から除外した。全長 cDNA クローニングを改めて実施し、輸送カーゴ要素の候補 10 遺伝子

の全長 cDNA を取得した。

- 3) 絞り込んだ 10 個の輸送カーゴ要素候補の細胞内局在解析を行った。各候補遺伝子のオープンリーディングフレームをエントリークローンに挿入した後、GATEWAY システムを用いて GFP 等の蛍光マーカーとの融合蛋白質発現ベクターを作製した。輸送カーゴメンバーの局在膜の解析は、各 GFP 融合蛋白質をタバコ属植物 *Nicotiana benthamiana* の本葉にアグロインフィルトレーションにより導入発現させて行った。その結果、当初のリストに挙がっていた SNARE 分子 1 種と ARF 型 GTPase 蛋白質 1 種は、液胞膜に局在したことから候補から除外した。最終的に、細胞外への分泌経路における機能が期待される輸送カーゴメンバーとして 8 種を絞り込んだ。これらは、細胞膜、小胞、トランスゴルジネットワーク等に局在する。これらの細胞内局在性を基に、各輸送カーゴメンバーの細胞内マップを作製した（図 3.2.1.2.2-2-3 参照）。

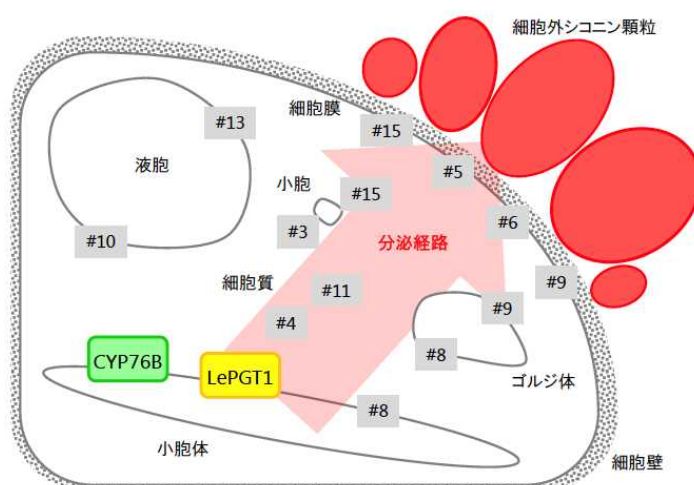


図 3.2.1.2.2-2-3 輸送因子の植物細胞内マッピング

- 4) 輸送カーゴメンバーのタンパク質間相互作用解析は、免疫沈降法により実施することにした。絞り込んだ 8 個の輸送カーゴメンバーの殆どは膜系に結合することが示唆されたため、ネイティブでかつ機能的なポリクローナル抗体を個別に作成することは現実的ではない。そこで GFP 及び HA タグを用いた融合蛋白質でこの項目を推進することとした。
- 5) 輸送カーゴメンバーの相互作用解析においては、シコニン生産における既知の関連蛋白質 2 個をその検証の候補に加えることとした。1 つ目は、シコニン生合成の鍵酵素である膜結合型プレニル化酵素 LePGT1 である。LePGT1 に GFP を付与した発現ベクターを作製した。アグロインフィルトレーションにより *N. benthamiana* 本葉において導入発現させ、その細胞内局在解析を行った結果、LePGT1 が局在する膜区画を同定した。
- 6) 相互作用解析に加えた 2 つ目の蛋白質は LeDI2 である。LeDI2 はシコニンの分泌や蓄積への正の関与が明らかにされている (Yazaki *et al.*, Plant Physiol., 2001)。そこで LeDI2 と GFP あるいは HA タグとの融合蛋白質を発現させるベクターを構築し、LeDI2-GFP 及び LeDI2-HA として解析を進めた。
- 7) 相互作用解析は *N. benthamiana* 本葉において相互作用の検証を行う 2 種類の蛋白質を導入発現させ、そこから抽出した蛋白質溶液を用いて、共免疫沈降を行った。上述の全 8 遺伝子

に対して GFP あるいは HA タグを融合させた発現ベクターを作成した。そのそれぞれと、LePGT1、LeDI2、アクチン、並びに微小管の4種との相互作用を、抗タグ抗体を用いた免疫沈降により調べた。その結果、1種類の組み合わせで明確な相互作用が認められた。

- 8) シコニンやサイトゾルや培地など水系では針状結晶となるが、分泌時には可溶状態である機構を理解する必要がある。そこで、ムラサキ培養細胞から培地面分に分泌される脂質を、LC-MS を用いたリポドミックス解析に供した。その結果、膜脂質としてはフォスファチジルコリン (PC) が、一方マトリックス脂質としてはトリグリセライド (TAG) がシコニン生産時に明確に含量が増えることを見出した。この内、TAG に関しては、GC-FID を用いた詳細な構造解析により、分泌される TAG を構成する脂肪酸には構造上の特徴があることが明らかになった。
- 9) 分泌されるマトリックス脂質は、貯蔵脂質として細胞内に蓄積する脂質分子とは構造上の特徴が異なることがわかった。これは、脂肪酸の修飾酵素が作用するステップであるため、植物細胞は脂質の化学修飾によって細胞外分泌に特化した分子を生産していることを示唆している。
- 10) 脂質輸送マシナリーメンバーの機能を本来のホストで評価するべく、ムラサキの高効率安定形質転換系の確立を行った。国産のアグロバクテリア (*Rhizobium rhizogenes* A13 株) と詳細なセレクション条件の検討を介し、高い効率で外来遺伝子を導入できる系を確立した。

2-2) 輸送コンプレックスコンポーネントの応用

本実施内容においては、実施項目 2-1) でムラサキを用いて同定した「輸送カーゴ」コンポーネントを他植物種に応用し、脂溶性物質の細胞外蓄積を向上することを目指す (図 3.2.1.2.2-2-4 参照)。

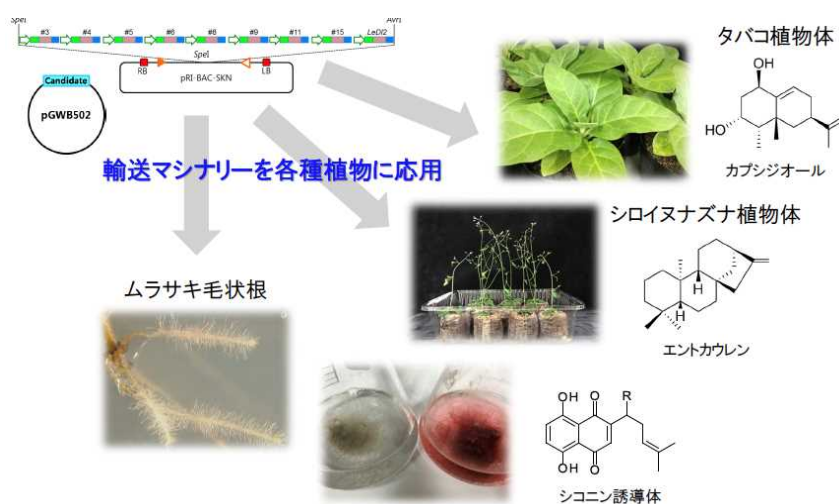


図 3.2.1.2.2-2-4 輸送機能の増強による有用物質生産能の向上

- 1) ムラサキにおいて脂質分泌に関係する輸送カーゴのコンポーネントとして絞り込んだ8候補の脂質分泌に対する貢献を調べるため、ヘテロなホスト植物としてシロイヌナズナとタバコ (*Nicotiana tabacum*) への導入を行った。
- 2) 作製した各コンポーネントの形質転換体について、ゲノム DNA の抽出とジェノタイピング

PCRの結果、タバコでは各8遺伝子について20系統以上の形質転換植物を確立した。この形質転換体から、コンポーネント遺伝子が高発現しているタバコ系統を選定した。

- 3) 各形質転換タバコ系統の本葉を用いて、クロロホルムディップによる細胞外脂質の抽出とGC-MS解析を行った。その結果、対照株において37種類の代謝産物が細胞外分泌化合物として検出された。対照株との比較解析により、候補遺伝子#4、#8それぞれの過剰発現により、細胞外に蓄積するニコチンの絶対量がそれぞれ5.9倍と3.5倍に増加した。また、候補遺伝子#3、#5、#6、#8、#9の過剰発現によって、より高分子で疎水性の脂溶性化合物の細胞外蓄積が亢進された。
- 4) 同様に、各コンポーネント導入シロイヌナズナ系統において、クロロホルムディップによる花茎からの細胞外脂質抽出とGC-MS解析を行った。対照株では、細胞外分泌代謝産物として25種類が検出された。対照株との比較解析の結果、ワックスの主要成分の一種が、候補遺伝子#3、#4、#5、#11の導入により1.8倍程度に増加した。また、候補遺伝子#3、#5、#11の導入により、C14化合物群の複数分子種の細胞外蓄積量が70倍、15倍、11倍にそれぞれ上昇した。さらに、候補遺伝子#3、#4、#5、#6、#11の導入により高疎水性のポリマー化合物の細胞外蓄積量が増加した。
- 5) 次に、植物細胞内で9コンポーネントの同時発現による「輸送カーゴ」の再構築を試みた。本項目では、チーム間連携としてA10グループのかずさDNA研究所が開発した多重遺伝子連結・発現制御技術を用いた。
- 6) 9個の輸送カーゴ・コンポーネント遺伝子を全て連結したベクターコンストラクトを構築した。この9遺伝子連結コンストラクトを国産のアグロバクテリアを介して、ムラサキ毛状根に導入した。作製したムラサキ毛状根をシコニン生産誘導培地でエストラジオール処理を行い、導入9コンポーネント遺伝子を発現させた。しかしながら、シコニン生産量に有意な差異は認められなかった。
- 7) ムラサキ細胞では、マトリックス脂質として細胞壁外に飽和脂肪酸を選択的に分泌している。脂肪酸の不飽和度を制御することによって脂溶性物質の細胞外集積を制御できるか検証すべく、ムラサキから脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を得て、過剰発現はエストラジオール誘導性、発現抑制はデキサメタゾン誘導性の発現ベクターをそれぞれ構築した。これらの発現コンストラクトを導入したムラサキ毛状根を作出し、エストラジオールあるいはデキサメタゾン処理を行い、毛状根において脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の過剰発現あるいは発現抑制を行った。毛状根のシコニン定量の結果、その生産量や分泌率に顕著な差異は認められなかった。

これまでの研究開発の成果より、植物脂質の分泌には膜交通系の遺伝子と膜輸送体の両方が関与していることが強く示唆された。植物は表皮細胞のように、脂質を分泌するようプログラムされた細胞タイプを有する。こうした細胞におけるワックスの分泌に、G-タイプのABCトランスポートが高発現することが知られていたが、低分子有機化合物の細胞外分泌にも特有のABCトランスポートが関与することが示唆された。また、植物種に特異的な高付加価値化合物の分泌においても、普遍的な脂質が共輸送されることを今回新たに見出した。これらの成果は、従前手付かずであった高付加価値化合物の細胞外高蓄積の基盤となる知見であり、広く物質生産へ応用され

ることが期待される。これらの成果に関係し、受賞歴が1件ある（2016年、第34回日本植物細胞分子生物学会学術賞受賞）。

(9) 成果の普及

成果普及活動実績を以下に示す。

年度	論文		その他外部発表				受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他（プレスリリース他）	
2016～2018	2	0	18	0	0	0	2
2019	3	0	13	1	0	0	0
2020	5	0	1	0	1	0	0
PJ期間合計	10	0	32	1	1	5	2

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

特許出願実績を以下に示す。

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2016～2018	1	0	0
2019	0	0	0
2020	1	0	0

これ以外、成果の内容により、知財の出願とするのが適当か、あえて公開を避けノウハウ登録とするかを検討しつつ研究開発を進める。

(11) 成果の実用化・事業化に向けた戦略

本プロジェクトでは、形質転換可能な実用植物においては、ゲノム編集技術の適用により腺鱗分化を促進した植物を作成するための、ターゲット遺伝子のカタログを作成することができた。これを利用することで、腺鱗に蓄積するモノテルペンやジテルペンなど有用物質の増産が可能となった。遺伝子導入のできない実用植物においては、ケミカルや植物ホルモン混合液を適用し、腺鱗分化誘導を介したテルペン類、フェノール性化合物、一次代謝産物など有用物質の増産に向けたノウハウを蓄積することができた。

脂溶性化合物の分泌を司る輸送カーゴの技術開発においては、有用性の高い脂溶性代謝産物の細胞外分泌を促進するコンポーネントを複数特定することができた。これにより、脂溶性化合物のアポプラスト集積能を向上させ、高付加価値脂溶性化合物の生産向上に資する技術の基盤ができた。これら、上記の基盤技術を関連企業に提供し、スマートセル植物による物質生産に貢献する。

(12) 成果の実用化・事業化に向けた具体的取り組み

すでに、スマートプロジェクトに参画していた企業のみならず、それ以外にも複数の企業と、本技術開発に関して連携をしている。今後共同開発を活発化させ、製品の製造販売に貢献する。

(13) 成果の実用化・事業化の見通し

医療費負担の高騰により、セルフメディケーションに対する国民の関心は高く、その傾向は右肩上がりである。天然物質による健康維持関連市場は、今後も成長が続くと予想されている。

3.2.1.3. 代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発、栽培・生育環境による発現制御技術の研究開発（担当機関：産業技術総合研究所、北海道大学、奈良先端技術大学院大学、横浜国立大学、千葉大学、北海道科学技術総合振興センター）

（1）背景と目的

本研究開発は、基本計画：研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」における

①-（2）「代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発」に関して以下の4つの個別研究開発テーマ、

研究開発テーマ 3.2.1.3-1

【CMVベクターとクロマチンリモデリングによる植物内在性遺伝子のメチル化制御技術開発】（国立研究開発法人産業技術総合研究所）

研究開発テーマ 3.2.1.3-2

【目的遺伝子の特異的メチル化解除による発現制御技術開発】
（国立大学法人北海道大学/国立研究開発法人産業技術総合研究所）

研究開発テーマ 3.2.1.3-3

【代謝系関連遺伝子の安定化技術開発】
（国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学）

研究開発テーマ 3.2.1.3-4

【転写・発現調節因子等による遺伝子発現制御技術】
（国立大学法人横浜国立大学）

①-（3）「栽培・生育環境による発現制御技術の研究開発」に関して2つの個別研究開発テーマ

研究開発テーマ 3.2.1.3-5

【環境ストレスを活用した植物の二次代謝系制御による高効率物質生産】
（国立大学法人千葉大学）

研究開発テーマ 3.2.1.3-6

【人工環境・栽培技術における代謝系遺伝子変動解析を利用した化合物高効率生産技術開発】（公益財団法人北海道科学技術総合振興センター）

から構成され、最終的に個々の技術開発要素を単独、もしくは、適宜組み合わせることで、目的代謝化合物の高生産を可能にする基盤技術を開発するものである。

以下に、各課題の詳細について記載する。

3.2.1.3-1. CMV ベクターとクロマチンリモデリングによる植物内在性遺伝子のメチル化制御技術開発

3.2.1.3-1

(担当機関：国立研究開発法人産業技術総合研究所)

植物は、他の生物種と異なり複雑・多様なメチル化・脱メチル化機構を有している。例えば、哺乳類等の DNA メチル化は CG メチル化が基本であるが、植物の場合は CG メチル化のみならず、CHG、CHH(H は、G 以外の塩基)のメチル化も行われ、これら塩基配列の変化を伴わないメチル化機構により遺伝子の発現が制御されている。しかしながら、現在、植物の特定の内在性遺伝子に対して DNA メチル化を誘導出来た例は数えるほどでしか無く、未だ効果的な手法は無い。そこで、本研究では、キュウリモザイクウイルス (Cucumber mosaic virus: CMV) ベクター、および DNA のメチル化・脱メチル化過程において重要なクロマチン構造を遺伝子操作により改変する技術の両方を融合させることで、新規の効率的な植物内在性遺伝子のメチル化誘導技術を開発するものである。

3.2.1.3-2. 目的遺伝子の特異的メチル化解除による発現制御技術開発

(担当機関：国立大学法人北海道大学/国立研究開発法人産業技術総合研究所)

植物の遺伝子発現はエピジェネティクスによって DNA やヒストンのメチル化調節を受けている。植物の機能性成分の蓄積レベルの調節もこのエピジェネティクスに依存している。DNA のメチル化や脱メチル化を自在に操作することができれば、植物由来の機能性有用成分の生産に大いに貢献する。本研究は DNA のメチル化を特異的に解除する技術開発であり、DNA メチル化を誘導する産総研の技術と対をなす。

3.2.1.3-3. 代謝系関連遺伝子の安定化技術開発

(担当機関：国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学)

植物の二次代謝系遺伝子を強化/改変する上で、植物へ導入した遺伝子を高発現させる技術(高転写：プロモーター、高翻訳：5' UTR)の幾つかは既に確立されている。しかし、導入した遺伝子由来の mRNA 蓄積量が意図せず極めて低い場合がしばしば報告されている(mRNA の不安定性)。仮に多量の mRNA が転写合成されても、不安定な場合は細胞内で速やかに分解され、残存する翻訳可能な mRNA 量が少ないものとなる。その場合には、目的代謝系の強化は十分には達成できない。そこで、植物 mRNA のどのような配列/構造が認識されて分解されているかをゲノムスケールでの解析とインフォマティクス解析を駆使することで明らかにし、植物へ導入する外来遺伝子由来の mRNA の不安定要因を特定するとともに、細胞へ導入する目的遺伝子内に想定される不安定要因をあらかじめ排除し、安定化できる技術の開発を目指す。

3.2.1.3-4. 転写・発現調節因子等による遺伝子発現制御技術

(担当機関：国立大学法人横浜国立大学)

「転写・発現調節因子等による遺伝子発現制御技術」では実施者らがこれまでに取り組んできた発光レポーターを用いた遺伝子発現制御モニタリング技術を中心として、各種遺伝子発現制御配列、転写調節因子の活性評価技術、低分子化合物等の生理活性物質探索技術のノウハウに関する技術的蓄積を活用・高度化し、植物の二次代謝関連遺伝子等の高効率同時発現制御(抑制/向上)を目的とした研究開発を行う。

3.2.1.3-5. 環境ストレスを活用した植物の二次代謝系制御による高効率物質生産
 (担当機関：国立大学法人千葉大学)

植物は環境変化に適応するための様々な能力を有している。この環境応答は、生育期間中の環境、特に物理環境要因（光、温度、水分、気流など）および化学環境要因（空气中ガス、培養液など）の変化で誘導され、要因によって応答する器官（葉、花、茎など）は異なる点が特徴である。そこで本テーマでは複合的な環境ストレスを与えて二次代謝系の生合成の挙動を解明し、目的とする有用成分の高発現を器官特異的に誘導する手法を確立し、植物工場で高効率物質生産を実証する。

3.2.1.3-6. 人工環境・栽培技術における代謝系遺伝子変動解析を利用した化合物高効率生産技術開発

(担当機関：公益財団法人北海道科学技術総合振興センター)

本テーマは、栽培環境や栽培技術をどのように変更すれば、目的とする二次代謝産物の生合成増加が期待できるかの情報提示・示唆が可能になる技術開発を目的とする。

一般的に、植物が生合成、蓄積する二次代謝産物は20万から100万種類に及ぶとも言われるが、気候条件や外的ストレス等の外的要因、生長段階や植物ホルモンなどの内的要因によって、その成分含量は大きく変化することが知られている。したがって、機能性を有する産業上有用な二次代謝産物を、栽培環境や方法を変えることで高生産を試みた研究例は数多くあるが、植物種や目的産物がそれぞれ異なり、当然関与する代謝系も異なっている。

そこで、迅速に植物二次代謝産物高生産の実用化に直結する技術を開発することを主目的として研究開発を実施する。

(2) 位置づけ、目標値

研究項目 (担当機関)	最終目標値 (2020年度)
①- (2) 「代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発」 (国立研究開発法人産業技術総合研究所、国立大学法人北海道大学、国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学、国立大学法人横浜国立大学)	<ul style="list-style-type: none"> 目的代謝系遺伝子の発現を5倍程度増強又は1/10以下に抑制する技術を確立する。 研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した遺伝子発現制御技術の有効性を示す。
①- (3) 「栽培・生育環境による発現制御技術の研究開発」 (国立大学法人千葉大学、公益財団法人北海道科学技術総合振興センター)	<ul style="list-style-type: none"> 目的代謝系における主要遺伝子/産物の発現を5倍程度増強させる技術を確立する。 研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した栽培・生育環境による発現制御技術の有効性を示す。

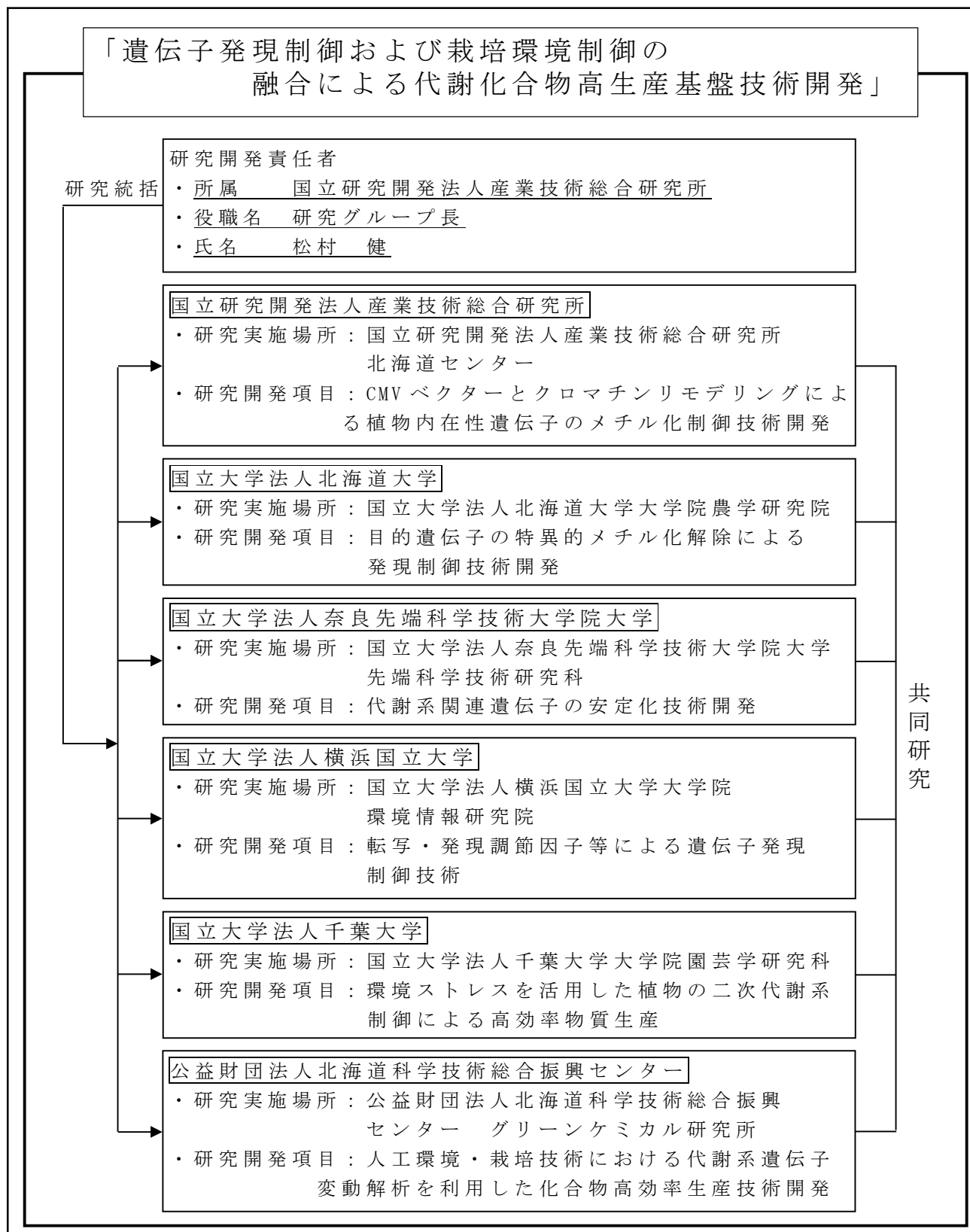
(3) 全体計画

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」

事業項目	2016年度				2017年度				2018年度				2019年度				2020年度			
	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期
①-（2）「代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発」（国立研究開発法人産業技術総合研究所、国立大学法人北海道大学、国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学、国立大学法人横浜国立大学）																				
①-（3）「栽培・生育環境による発現制御技術の研究開発」（国立大学法人千葉大学、公益財団法人北海道科学技術総合振興センター）																				

中間評価結果への対応 : 研究課題においては改善すべき点等の指摘は無かった。

(4) 実施体制



(5) 運営管理

これまでに以下の会議を実施している。

平成28年12月20日	全体会議	(横浜国立大学 みなとみらいキャンパス)
平成29年6月6日	全体会議	(産業技術総合研究所 北海道センター)
平成29年6月7日	テレビ会議	(参加機関：産総研、千葉大、ノーステック)
平成29年6月16日	テレビ会議	(参加機関：産総研、千葉大、ノーステック)
平成29年6月26日	テレビ会議	(参加機関：産総研、千葉大、ノーステック)
平成29年8月9日	会議	(産総研、北大、奈良先、ノーステック)
平成29年11月24日	テレビ会議	(参加機関：産総研、千葉大、ノーステック)
平成29年12月13日	全体会議	(千葉大学 松戸キャンパス)
平成30年1月9日	会議	(産総研、千葉大、ノーステック)
平成30年4月18日	テレビ会議	(参加機関：産総研、北大、奈良先)
平成30年5月11日	全体会議	(北海道大学 農学部)
平成30年5月16日	テレビ会議	(参加機関：産総研、北大)
平成30年11月6日	全体会議	(奈良先端科学技術大学院大学)
令和元年5月28日	全体会議	(ヘリオス関内ビル)
令和元年8月1日	個別会議	(九州大学、参加機関：産総研、ノーステック)
令和元年12月10日	全体会議	(千葉大学 松戸キャンパス)
令和2年5月19日	全体会議	(テレビ会議)
令和2年5月28日	全体会議	(テレビ会議)
令和2年7月30日	個別会議	(テレビ会議)
令和2年8月7日	全体会議	(テレビ会議)
令和2年12月15日	全体会議	(テレビ会議)

* ノーステック：公益財団法人北海道科学技術総合振興センターの略称

(6) 実施の効果

本課題(6課題)は、代謝系の新規遺伝子操作技術の開発・提供、および遺伝子操作を伴わない(対象植物種個々の代謝系情報・遺伝子情報に依らず)生育・栽培環境改変による目的代謝産物生合成増強を目指す基盤技術の開発である。

当該技術は、基本的に植物種・対象代謝産物を選ぶこと無く広範囲に応用・展開できるモノであるため、当該技術の産業利用上の効果は非常に大きいと期待できる。

例えば、植物由来代謝産物利用産業の一つとして容易に考えられる薬用植物を利用した漢方薬国内市場は、約1,610億円強⁽¹⁾、健康食品等国内市場は、約8,680億円⁽²⁾、薬用入浴剤や化粧品等の市場は約2兆6千億円規模⁽³⁾である(いずれも2020年度)。

当然、当該研究成果がいきなりこれら広範囲の産業において利用されるとは言い難いが、一方、生物由来(動物・植物)、合成による有用成分50品目の2021年市場規模は約2,793億円と予測され⁽⁴⁾、産業上主要な特定の代謝産物数種類においてでも実用化されれば、その費用対効果は非常に大きいと期待される。

(1) <https://www.tsumura.co.jp/ir/business/07/>

(2) https://www.yano.co.jp/press-release/show/press_id/2643

(3) <https://www.fuji-keizai.co.jp/file.html?dir=press&file=20094.pdf&nocache>

(4) <https://news.nissyoku.co.jp/news/KAWASAKI20170105094603347>

(7) 最終目標の達成度

研究項目 (担当機関)	最終目標値 (2020年度)	達成度	成果
①- (2) 「代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発」 (国立研究開発法人産業技術総合研究所、国立大学法人北海道大学、国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学、国立大学法人横浜国立大学)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 目的代謝系遺伝子の発現を5倍程度増強又は1/10以下に抑制する技術を確立する。 ・ 研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した遺伝子発現制御技術の有効性を示す。 	100%	<ul style="list-style-type: none"> ・ 開発した配列特異的DNAメチル化、脱メチル化技術により、目的代謝系遺伝子の発現を5倍以上の増強または1/10以下への抑制に成功した。 ・ 植物細胞内におけるmRNAの配列特異的切断傾向を予測するプログラムを開発、切断回避予測等の人工遺伝子設計技術を確立し、遺伝子発現量の大幅な増加 (190倍) を達成した。 ・ 開発したハイスループット解析技術により、代謝系を刺激する新規の化合物を7種類見出し、目的産物の高蓄積に有効であることを確認した。
①- (3) 「栽培・生育環境による発現制御技術の研究開発」 (国立大学法人千葉大学、公益財団法人北海道科学技術総合振興センター)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 目的代謝系における主要遺伝子/産物の発現を5倍程度増強させる技術を確立する。 ・ 研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した栽培・生育環境による発現制御技術の有効性を示す。 	100%	<ul style="list-style-type: none"> ・ 栽培・生育環境を制御することにより、目的代謝系における主要遺伝子/産物の発現を5倍以上増強させることに成功した。 ・ 各種栽培条件における遺伝子発現状況のインデックス化を行い、当該インデックスを用いることで、容易に目的代謝産物高蓄積を誘導する栽培条件の提示を可能とした。当該インデックスはノウハウ化した。
上記研究項目で開発した技術の融合	上記研究項目で開発された遺伝子制御技術と環境制御技術の融合	100%	m-RNAの配列情報、DNAメチル化による標的遺伝子発現抑制、および探索した新規化合物とインデックスから導き出した栽培方法を融合することで、単独技術よりもさらに高い高蓄積を実証できた。

(8) 研究開発の成果と意義

3.2.1.3-1. CMVベクターとクロマチンリモデリングによる植物内在性遺伝子のメチル化制御技術開発（担当機関：国立研究開発法人産業技術総合研究所）

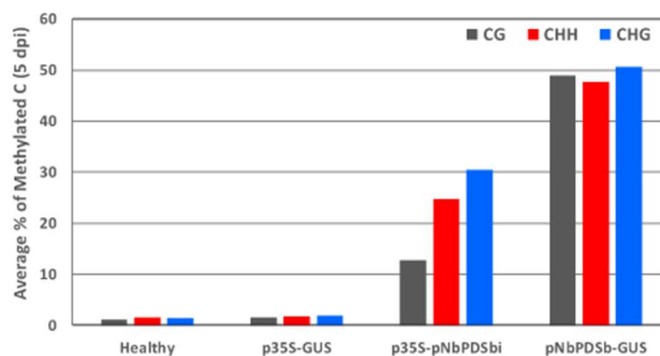
1. モデル遺伝子プロモーター領域の機能解析

これまで、植物において特定の遺伝子に対してメチル化誘導を行った研究は、35Sプロモーターなどの導入遺伝子を用いたものが多く、植物内在性遺伝子に対してメチル化誘導に成功した報告は少ない。本研究では、植物種としてタバコ的一种 *Nicotiana benthamiana*、内在性遺伝子のメチル化誘導モデル遺伝子として、フェノタイプとして判別しやすく、ゲノム編集研究などでもモデル遺伝子として多用され、また、容易に post transcriptional gene silencing (PTGS) を誘導しやすい一方で、transcriptional gene silencing (TGS) を誘導しにくいとされているフィトエン不飽和化酵素 (*PDS*) 遺伝子を用いた。

N. benthamiana から *PDS* 遺伝子の翻訳領域上流配列を単離し、その下流に β -グルクロニダーゼ (*GUS*) 遺伝子を挿入したコンストラクトを T-DNA ベクター上に構築した (pNbPDS-GUS)。本ベクターを用いて *N. benthamiana* における *GUS* 遺伝子一過性発現試験を行った結果、*GUS* 遺伝子の発現が認められたことから、今回単離した配列はプロモーターとして機能することを確認した。

2. アグロバクテリウムを用いた一過性発現によるメチル化誘導

上記 pNbPDS-GUS、あるいは *PDS* プロモーター配列の一部に対する逆反復配列を発現するベクター (p35S-pNbPDSi) を、アグロインフィルトレーション法により *N. benthamiana* に一過的に導入した。*PDS* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化状態を次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンス法により解析した結果、*PDS* 遺伝子プロモーター領域に DNA メチル化が誘導されることを明らかにした (図



3.2.1.3-1-1)。

図 3.2.1.3-1-1. アグロバクテリウムを用いた一過性発現による *PDS* 遺伝子プロモーター領域へのメチル化誘導

アグロインフィルトレーション 5 日目における *NbPDSb* プロモーター領域の

シトシンメチル化状態をパイサルファイトシーケンスで解析した。

また、*PDS* 遺伝子の mRNA 量をリアルタイム PCR により解析した結果、野生型植物体に比べ、pNb*PDS*-GUS 導入植物体で約 35%、p35S-pNb*PDS*i 導入植物体で約 20%へと発現量が低下していた（図 3.2.1.3-1-2）。次世代シーケンサーを用いた small RNA-seq による解析の結果、導入した *PDS* 遺伝子プロモーター配列特異的な small RNA の蓄積が認められた。以上から、導入した *PDS* 遺伝子プロモーター部分配列について特異的に生成された small RNA により、配列特異的に DNA メチル化が誘導され、その結果 *PDS* 遺伝子の mRNA 量が低下、すなわち、RNA-directed DNA Methylation (RdDM) が誘導されたと推察した。

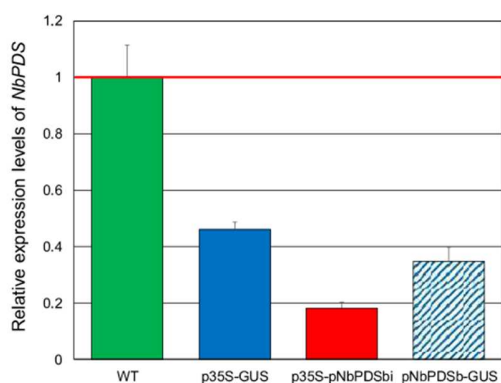


図 3.2.1.3-1-2. アグロバクテリウムを用いた一過性発現により *PDS* 遺伝子プロモーター領域へメチル化を誘導した個体における *PDS* 遺伝子の mRNA 量
アグロインフィルトレーション 5 日目における *PDS* 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で解析した

3. キュウリモザイクウイルス (CMV) ベクターを用いたメチル化誘導

これまで植物ウイルスベクターを用いたメチル化誘導 (virus induced transcriptional gene silencing: VITGS) の報告例は非常に少ないが、中でもキュウリモザイクウイルス (CMV) ベクターは、2b 遺伝子が siRNA を核内に移行させる機能を有していると推察されており、VITGS 誘導能が高いと推測した。

CMV ベクター、および比較としてタバコ茎えそウイルス (TRV) ベクターを用いて、*N. benthamiana* の *PDS* 遺伝子プロモーター領域を標的とした RdDM による TGS 誘導を試みた。対照として、*PDS* 遺伝子の mRNA の部分配列を標的とした PTGS の誘導も行った。その結果、両ベクターともに PTGS は効率よく誘導され、mRNA の減少・組織の白色化が見られた（図 3.2.1.3-1-3）。一方 TGS の誘導では、mRNA の減少は見られるものの、PTGS と比較してその減少程度は小さく、組織の白色化は認められなかった（図 3.2.1.3-1-3）。

CMVベクター感染植物

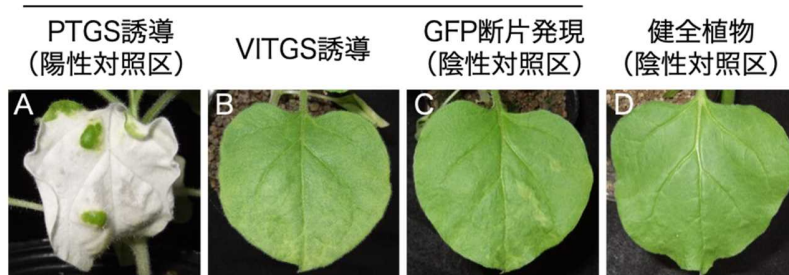


図 3.2.1.3-1-3. CMV ベクターによる *PDS* 遺伝子への PTGS または TGS の誘導写真は接種 21 日後の *N. benthamiana* の葉組織

これらの結果は、*PDS* 遺伝子は、メチル化誘導による遺伝子発現抑制が困難であるという当初の予想通りであり、内在性遺伝子のプロモーター領域を標的とした人為的な TGS 誘導が容易ではないことを示唆した。*PDS* 遺伝子に対する VITGS 誘導機構について詳細に解析するため、次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンスおよび Small RNA-Seq で解析した結果、CMV・TRV とともに標的領域特異的な CG, CHG, CHH のシトシンメチル化 (図 3.2.1.3-1-4A) および 21, 22, 24nt siRNA の蓄積が見られ、顕著な差異は認められなかった (図 3.2.1.3-1-4B)。

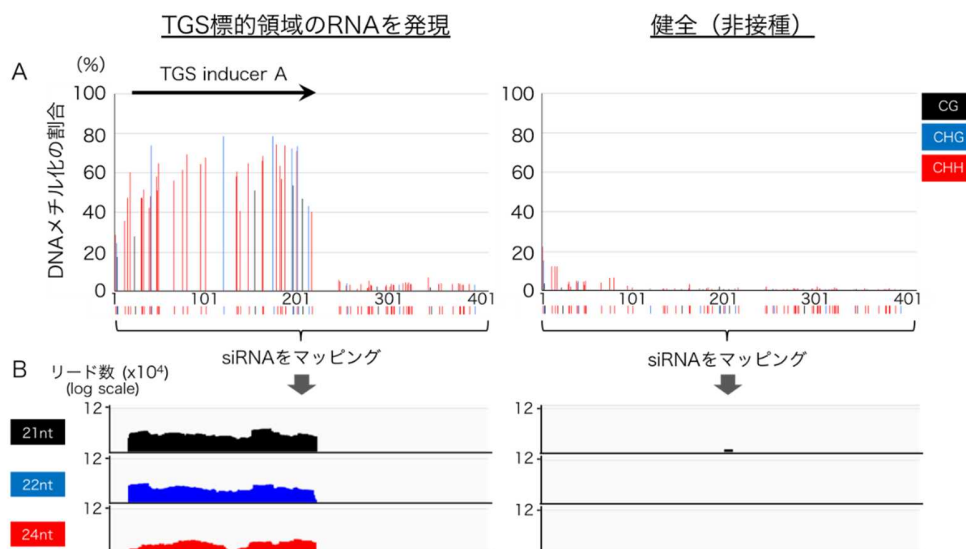


図 3.2.1.3-1-4. CMV ベクターによる *PDS* 遺伝子プロモーター領域を標的としたメチル化の誘導標的ゲノム領域周辺のシトシンメチル化状態 (A) および siRNA の蓄積状態 (B)

A, B はそれぞれ次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンス解析および small RNA-seq 解析にて実施した。

この結果を受けて、CMV と TRV の両ベクターから同じ TGS 誘導コンストラクトを同時に供給することで (double induction)、より高レベルのメチル化が誘導できないか検討したところ、単独での供給 (single induction) と比較してメチル化レベルの上昇が認められた (図 3.2.1.3-1-5)。

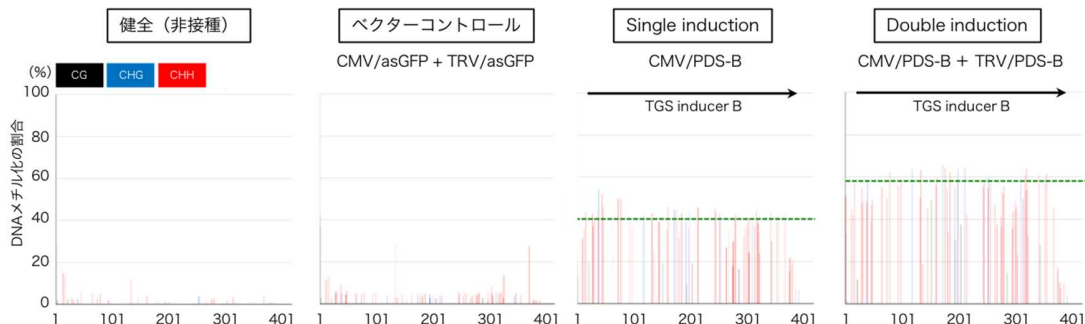


図 3.2.1.3-1-5. CMV と TRV ベクターの混合感染による *PDS* 遺伝子プロモーター領域への DNA メチル化の誘導標的ゲノム領域周辺のシトシンメチル化状態 (A) および siRNA の蓄積状態 (B)。

A, B はそれぞれ次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンスおよび small RNA-seq により解析した。

PDS 遺伝子へのメチル化誘導および mRNA 量の変動についてさらに詳細に解析した。*N. benthamiana* は *PDS* 遺伝子を 2 種類 (*NbPDSa*, *NbPDSb*) 持つため、*NbPDSa* と *NbPDSb* 由来の inducer (それぞれ inducer A, inducer B) について VITGS 誘導能を比較した。リアルタイム PCR により *NbPDSa* と *NbPDSb* をそれぞれ区別して定量したところ、いずれも inducer A を用いた方が mRNA の減少程度が大きかった (図 3.2.1.3-1-6A)。次に、バイサルファイトシーケンス法により DNA メチル化レベルを比較したところ、inducer A, inducer B いずれを発現した場合においても、*NbPDSa*, *NbPDSb* 両方の標的領域においてメチル化の誘導が認められた (図 3.2.1.3-1-6B)。

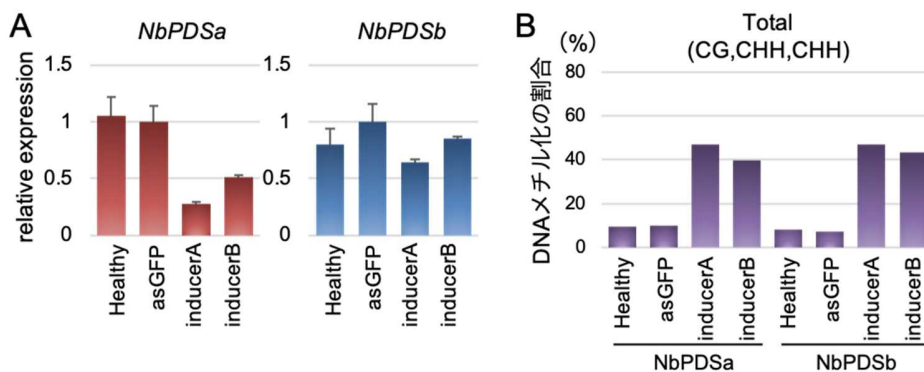


図 3.2.1.3-1-6. CMV ベクターでメチル化を誘導した個体における、*NbPDSa* および *NbPDSb* における mRNA 量・メチル化解析

NbPDSa 由来 inducer A または *NbPDSb* 由来 inducer B を発現させた個体における *PDS* 遺伝子の発現量 (A) とシトシンメチル化状態の解析 (B)

4. DNAメチル化誘導 inducer を供給する新規ウイルスベクターの構築

DNAメチル化の場である核内において複製し遺伝子を発現するジェミニウイルスを利用して、DNAメチル化誘導 inducer を核内で大量に供給する新規ウイルスベクターを構築した。ジェミニウイルスがコードする遺伝子 A の ORF 配列を欠失させ、シロイヌナズナ由来 U6 プロモーター・ターミネーター制御下で外来性配列を発現する遺伝子発現カセットを導入したウイルスベクターを構築した（図 3.2.1.3-1-7A）。*N. benthamiana* において、inducer 配列を導入したウイルスベクターを用いて接種試験を実施したところ、導入配列内に欠失が見られ、導入配列長に制限があることが示唆された。そこで、ターミネーター配列をより短い poly T 配列に変更し、さらに遺伝子発現カセット上流領域の欠失変異体を 6 種類検討した。その結果、100–150 塩基を欠失させることで、感染性を維持した上で導入配列の安定性の向上が認められた（図 3.2.1.3-1-7B）。当該ベクターを用いて、PDS 遺伝子のプロモーター領域にメチル化を誘導したところ、ターゲット領域特異的に DNAメチル化を誘導することができた。

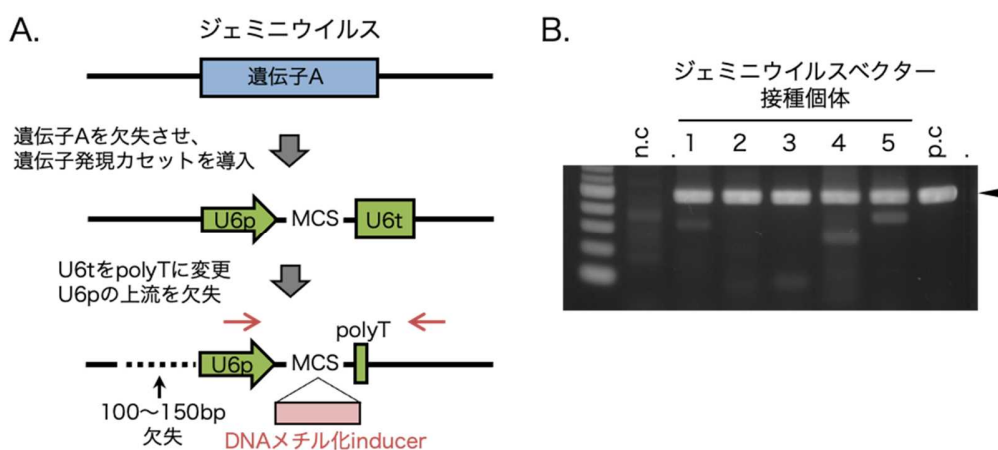


図 3.2.1.3-1-7. DNAメチル化誘導 inducer を供給するためのジェミニウイルスベクターの構築

(A) ジェミニウイルスベクター構築の概略。U6p=U6 プロモーター、U6t=U6 ターミネーター、MCS=マルチクロニングサイト、赤矢印=導入断片検出に使用したプライマーの位置。

(B) PCR によるウイルスベクター導入断片の検出。*N. benthamiana* に inducer を導入したウイルスベクター（U6 プロモーター上流 100 bp 欠失させ、polyT をターミネーターとしたベクター）を接種し、25 日後の上位葉から抽出した DNA を鋳型とした。プライマーは A の赤矢印を使用。矢頭=導入断片が維持されている場合の増幅位置。p. c.=接種に用いたプラスミド DNA を鋳型に PCR、n. c.=ウイルス非接種個体由来 DNA を鋳型に PCR。

5. クロマチンリモデリングを利用した発現制御技術

DNAメチル化の誘導・維持にはクロマチン構造が密接に関与していることが知られている。本研究ではクロマチン構造の変化を誘導しメチル化率の向上を期待できると推測されるクロマチンリモデリングファクター（CRF）遺伝子を、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）から単離した。単離した CRF 遺伝子をそれぞれ植物発現用 T-DNA ベクターに挿入後、当該ベクターで形質転換した *Agrobacterium tumefaciens* を用いて *N. benthamiana* の形質転換を実施し、多数の再分化個体を獲得し系統化した。これら作出した CRF 遺伝子発現 *N. benthamiana* を用いて、*PDS* 遺伝子プロモーター配列に対する DNA メチル化誘導試験を実施した。

・シロイヌナズナ CRF 関連 A 遺伝子発現植物体

DNAメチル化のゲノムワイドな維持に必要な CRF の一種である A 遺伝子（*AtA*）をシロイヌナズナから単離し、35Sプロモーターまたは MMVプロモーター制御下において *AtA* 遺伝子を過剰発現させた組換え植物体をそれぞれ 43 系統、113 系統作出した。いずれのプロモーターを用いた場合でも、組換え *N. benthamiana* では、生育異常が認められ、種子の発芽率の顕著な低下が確認されたが、この中でも比較的生育が良好な系統を用いて、*PDS* 遺伝子プロモーター配列に対する DNA メチル化誘導試験を実施した。TGS inducer として、CMV ベクターから inducer A（*NbPDSa* 由来）を、TRV ベクターから inducer B（*NbPDSb* 由来）を同時に発現させ、接種 21 日後の *PDS* 遺伝子の mRNA 量をリアルタイム PCR により解析した。その結果、野生型植物では、ウイルス非接種個体の約 40% までの減少であった一方、*AtA* 発現 4 系統（35S 2 系統、MMV 2 系統）では、約 17.5%~34.8% までの減少が認められ、試験に用いた 4 系統全てにおいて野生型より大きな mRNA 量の減少が認められた（図 3.2.1.3-1-8）。

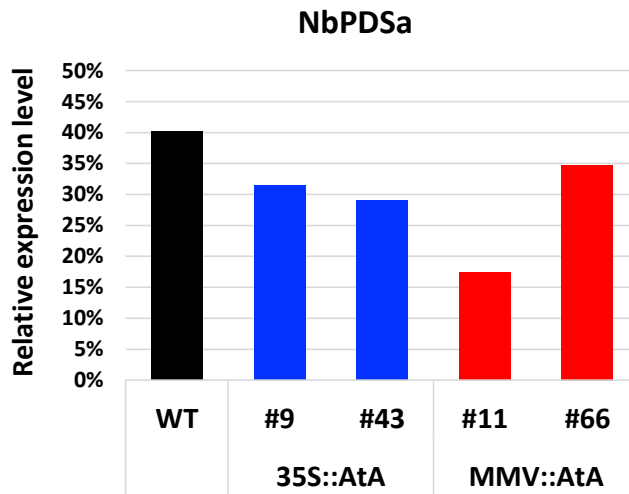


図 3.2.1.3-1-8. *AtA* 発現組換え体における TGS 誘導試験
野生型および *AtA* 発現組換え体 4 系統（35S::*AtA*, MMV::*AtA*）に、TGS inducer として、CMV ベクターから inducer A、TRV ベクターから inducer B を同時に供給し、*PDS* 遺伝子の mRNA 量をリアルタイム PCR により解析した。

・シロイヌナズナ Histone Deacetylase 6 (*AtHDA6*) 遺伝子発現植物体

CRF 遺伝子の一種である *AtHDA6* 発現する遺伝子組換え *N. benthamiana* を用いて、ウイルスベクターによる *PDS* 遺伝子プロモーター配列に対する DNA メチル化誘導試験を実施した。ウイルスベクターを接種した植物体より精製したゲノム DNA を用いて、バイサルファイトシーケンス法によって標的配列に対する DNA メチル化の程度を解析した結果、標的配列メチル化誘導ベクター接種個体において DNA メチル化の誘導が認められたが、野生型植物体と *AtHDA6* 発現植物体における明確な差は認められなかった (図 3.2.1.3-1-9)。また、各植物体における *PDS* 遺伝子の発現状況をリアルタイム PCR により解析した。その結果、標的配列メチル化誘導ベクター接種個体において DNA メチル化の誘導が認められたが、野生型植物体と *AtHDA6* 発現植物体における明確な差は認められなかった (図 3.2.1.3-1-10)。

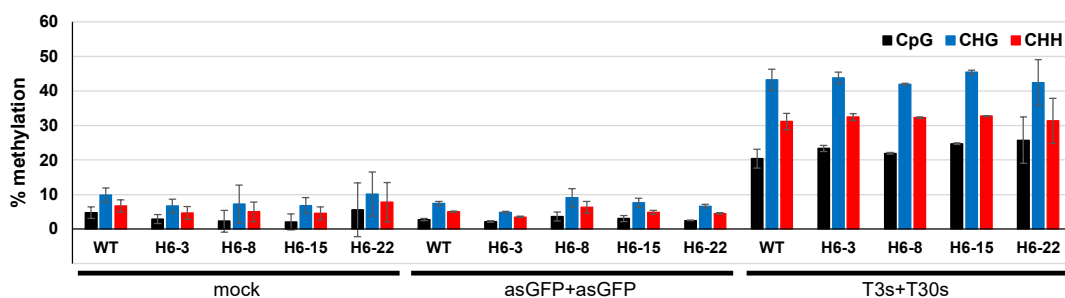


図 3.2.1.3-1-9. 標的配列における DNA メチル化解析結果

mock: 緩衝液接種区、asGFP+asGFP: コントロールベクター接種区、T3s+T30s: 標的配列メチル化誘導ベクター接種区、WT: 野生型植物体、H6-3, 8, 15, 22: *AtHDA6* 発現植物体

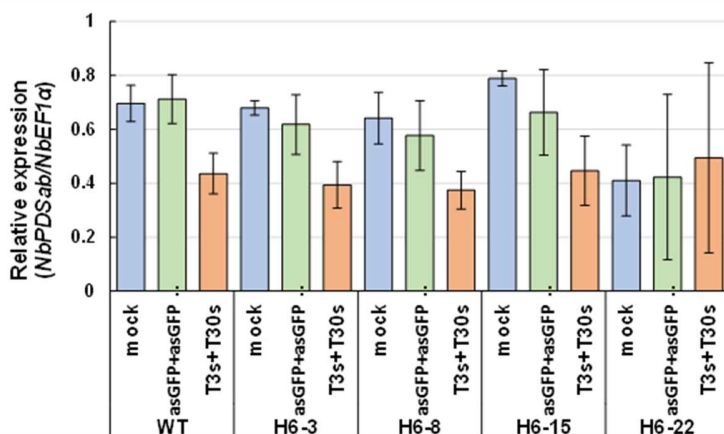


図 3.2.1.3-1-10. 各植物体における *PDS* 遺伝子の発現状況

mock: 緩衝液接種株、asGFP+asGFP: コントロールベクター接種株、T3s+T30s: 標的配列メチル化誘導ベクター接種株、WT: 野生型植物体、H6-3, 8, 15, 22: *AtHDA6* 発現植物体

6. DNA 脱メチル化関連遺伝子の発現抑制を利用した発現制御技術

植物では、DNA のメチル化は DNA 脱メチル化酵素によって取り除かれ、結果、遺伝子の発現が上昇し、また、ヒストンアセチル化（及びそれに伴う DNA の脱メチル化）は遺伝子の発現を正に制御することが知られている。そこで、*N. benthamiana* における DNA 脱メチル化酵素 *X* 遺伝子 (*NbX*)、及びヒストンアセチル化（および DNA の脱メチル化）を促進する複合体の因子のひとつ *Y* 遺伝子 (*NbY*) の発現を抑制することにより、inducer C による *PDS* 遺伝子の発現抑制効率が上昇するか検討した。

N. benthamiana において、CMV ベクターにより inducer C (TGS を誘導) を供給し、また、TRV ベクターにより *NbX* および *NbY* の発現抑制 inducer D (PTGS を誘導) を供給した。その結果、ウイルス接種 10 日後において、ウイルス非接種個体と比較して、*NbX* 及び *NbY* の mRNA 量は約 22%、約 36% へと減少し、その際 *PDS* 遺伝子の mRNA 量は約 9.6% までの減少が認められた (図 3.2.1.3-1-11)。

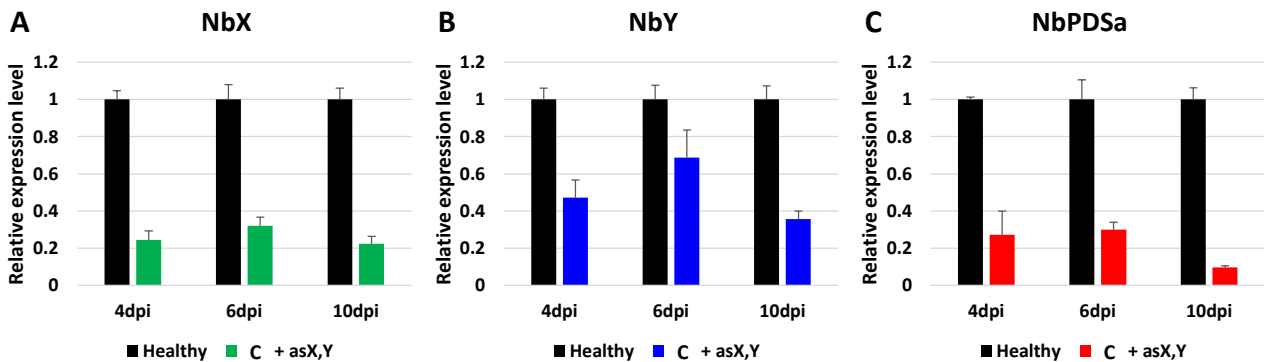


図 3.2.1.3-1-11. Inducer C の供給と同時に *NbX* 及び *NbY* の発現を一過的に抑制した個体における *NbX*、*NbY* および *NbPDSa* の mRNA 量解析
CMV および TRV 同時接種 4, 6, 10 日後 (dpi) において、ウイルス非接種個体 (Healthy) および接種個体 (C + asX,Y) の *NbX*、*NbY*、*NbPDSa* の mRNA 量をリアルタイム PCR により解析した。各タイムポイントの Healthy の mRNA 量をそれぞれ 1.0 とした。

3.2.1.3-2. 目的遺伝子の特異的メチル化解除による発現制御技術開発
(担当機関：国立大学法人北海道大学/国立研究開発法人産業技術総合研究所)

研究開発の成果

本研究は、DNA メチル化によって発現が制御されている遺伝子に対して特異的な脱メチル化を誘導し、その発現を人為的に制御する基盤技術を開発するものである。本研究では、最終的に標的とする配列の DNA メチル化レベルを、元の約 70% 以下にすることを目的とした。

1. メチル化解析モデルシステムの構築

本項目では特異的な脱メチル化誘導のモデル実験系を構築するため、35S プロモーターによって GFP 遺伝子を発現するシロイヌナズナおよびベンタミアーナに対し、VIGS などの手法により 35S プロモーターにメチル化が導入された系統をそれぞれ選抜した。

・ 35S プロモーターがメチル化された GFP を有するシロイヌナズナ系統の選抜

本研究では、トランスジーンによる脱メチル化誘導用のモデル植物の作出を目的とした。

35S プロモーターによって GFP 遺伝子を発現するコンストラクトを作製し、シロイヌナズナに形質転換後、自殖第 5 世代において自然に 35S プロモーターがメチル化され、GFP の発現が低下した系統を選抜した (2-NT-2, 5-NT-1)。この TGS を起こした形質転換体を、トランスジーンによる脱メチル化誘導のターゲットとした。

・ ベンタミアーナにおけるウイルスベクターを用いた 35S プロモーターのメチル化の誘導

本研究では、CMV ベクターによる脱メチル化誘導用のモデル植物の作出を目的とした。

CMV ベクターに 35S プロモーターの部分配列を導入し、35S プロモーターによって GFP を発現するベンタミアーナに感染させてメチル化を誘導した。メチル化の誘導により GFP の TGS を起こしたベンタミアーナの自殖後代 3 世代目 (208 S3 RED) を、脱メチル化誘導のターゲットとした。

2. リボザイム技術の開発

本項目では、植物の DNA のメチル化機構である RNA-directed DNA methylation (RdDM) の仕組みに着目し、脱メチル化を誘導する方法を開発した。RdDM の系では、ターゲットとなる配列から RNA polymerase IV を介して合成された RNA から siRNA が生じ、AGO4 に取り込まれる。一方、RNA polymerase V により同じ領域から scaffold RNA と呼ばれる RNA が合成されると、siRNA によってガイドされた AGO4 がこれに張り付き DNA メチル化酵素を呼び込む。この時、この AGO4-DNA メチル化酵素の足場となる scaffold RNA をリボザイムによって切断する、あるいは Short dummy RNA によって

siRNA との結合を阻害してしまえば RdDM は進行が抑制されるのではないかと考えた。

・トランスジーンによる脱メチル化誘導配列の発現と効果の検証

本研究では 35S プロモーターのメチル化部位から合成される scaffold RNA を標的とするリボザイムを設計した。GFP の TGS を起こしたアラビドプシス (2-NT-2, 5-NT-1) に対し、遺伝子組換えによってリボザイムを導入・発現させ、脱メチル化を誘導する系を構築した。リボザイムを導入したアラビドプシス (2-A2BC-1, 5-A2BC-1) において GFP の蛍光が確認され、GFP の発現レベルの増加が確認された。この GFP 蛍光が復帰した個体のメチル化レベルをバイサルファイトシーケンシングによって解析したところ、35S プロモーター全域にわたってメチル化が約 25% 減少していた (図 3.2.1.3-2-1)。

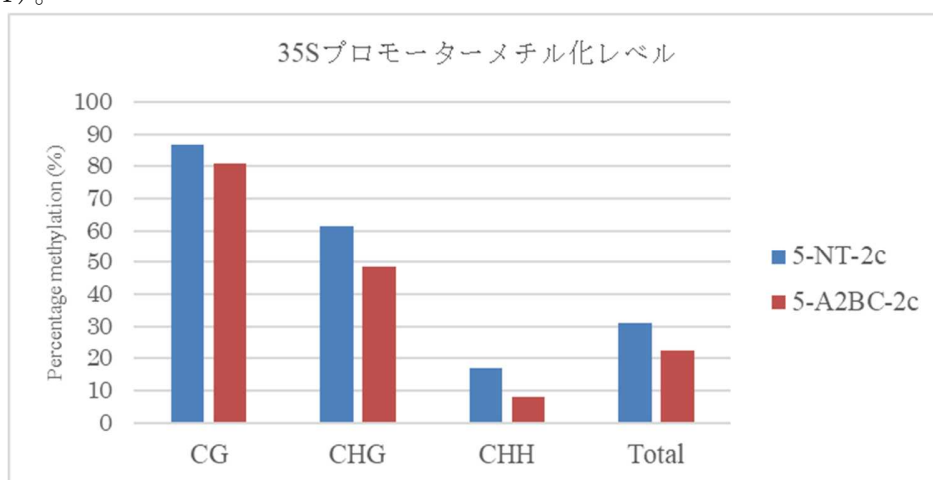


図 3.2.1.3-2-1. 35S プロモーターを標的とした、リボザイムを発現するトランスジーンによる脱メチル化

・ウイルスベクターによるリボザイムの発現と効果の検証

本研究では、35S プロモーターのメチル化部位から合成される scaffold RNA を切断するようにリボザイムを設計した。GFP の TGS を誘導したペンタミアーナ (208 S3 RED) にリボザイムを導入した CMV ベクターを接種し、感染個体の自殖後代 (208 S3 Rz) において、35S プロモーターの DNA メチル化レベルが対照区 (208 S3 RED) と比較して約 60% に減少し (図 3.2.1.3-2-2)、GFP の発現も復帰していることが確認された。

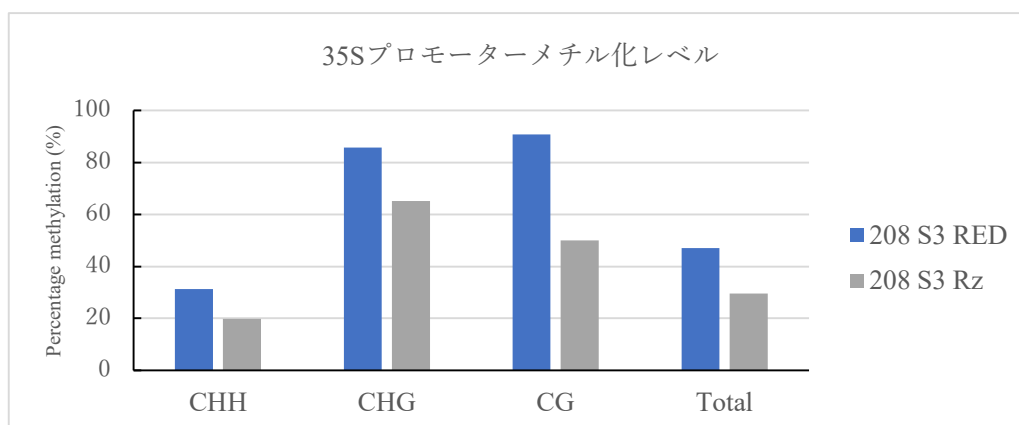


図 3.2.1.3-2-2. 35S プロモーター領域を標的とした、リボザイムを発現するウイルスベクターによる DNA 脱メチル化

・ 内在性遺伝子のプロモーターをターゲットとしたリボザイムによる脱メチル化実験
 ベンタミアーナのゲノムに存在するレトロトランスポゾン TNT1 はプロモーター領域のメチル化によって発現が抑制されている。本研究では、この TNT1 をターゲットに、脱メチル化の誘導を試みた。TNT1 プロモーター領域から生産される scaffold RNA をターゲットにリボザイムを設計し、これを CMV ベクターに組み込んだコンストラクトを作成し、ベンタミアーナに接種した。CMV に感染したベンタミアーナ (Rz-3-1, 2) において TNT1 プロモーター領域の DNA メチル化レベルを調べたところ、非接種個体 (Healthy) や、リボザイムを含まない CMV ベクター接種区 (A1) と比較して、DNA メチル化レベルが約 60% に減少していた (図 3.2.1.3-2-3)。それにともなって TNT1 の発現量が約 60 倍に増加し、トランスポゾンのタンパク質である GAG の発現も約 4 倍に増加した。

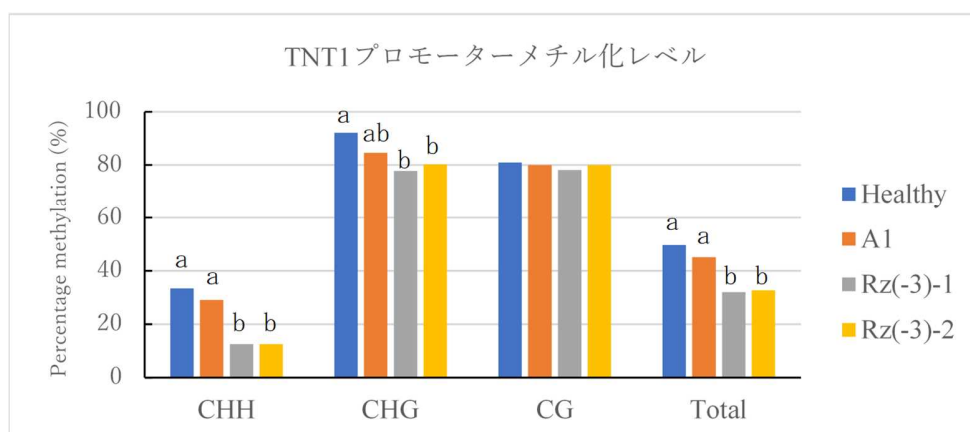


図 3.2.1.3-2-3. TNT1 プロモーター領域を標的としたリボザイムを発現する CMV ベクターによる DNA 脱メチル化 (異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを示す。Fisher's exact test with holm correction)

3. Short dummy RNA 技術の開発

・ウイルスベクターによる Short dummy RNA の発現と効果の検証

本研究では Short dummy RNA を供給する CMV ベクターを、脱メチル化モデル植物に感染させ、効果を検証した。GFP の 35S プロモーターにメチル化が誘導され、TGS を起こしたペンタミアーナ (208 S3 RED) と比較して、CMV ベクターにより Short dummy RNA を供給したペンタミアーナの自殖後代 (208 S3 SD51) において、35S プロモーターの DNA メチル化レベルが約 40% 以下に減少し (図 3.2.1.3-2-4)、GFP の発現も復帰していることが確認された。

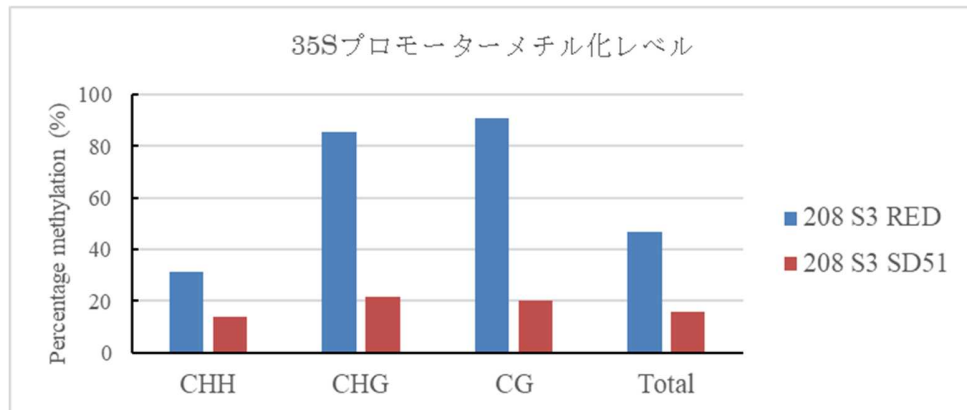


図 3.2.1.3-2-4. 35S プロモーター領域を標的とした Short dummy RNA による DNA 脱メチル化

4. 低メチル化ベースレベル組換え体の利用

・dCas-ROS1 組換え体の作製 (北大・産総研)

本項目では、ペンタミアーナを用いて脱メチル化酵素である ROS1 と、ゲノム編集に使われる dCas との融合タンパク質を発現する組換え体を作製し、ガイド RNA をウイルスベクターによって供給することで、配列特異的な脱メチル化誘導を試みることを目的とした。植物発現ベクターに dCas-ROS1 をクローニングし、ペンタミアーナの組換え体を目標としていた 3 ライン以上得ることができた。

本研究開発の意義

植物の遺伝子発現は、エピジェネティクス制御と呼ばれる DNA やヒストンタンパク質のメチル化によって調節されている。これは RNA サイレncing によって作られる 24 塩基の small RNA (sRNA) によって誘導される現象で、植物では転写後型 (PTGS) および転写型 (TGS) の 2 つに大別される。PTGS は転写された RNA が分解される現象であり、TGS は遺伝子の転写そのものが起きない。有用タンパク質の過剰発現を意図して作出した形質転換植物ではこのサイレンシングが大きな障害となってきた。もしサイレンシングを抑制することができれば、植物での物質生産は飛躍的に進歩する。また、植物は機能性成分 (代謝成分) の蓄積レベルの調節をエピジェネティクス制御に依存しており、これらの有用成分を植物に高レベルに蓄積させるためには、このエ

ピジエネティクスを自在に操る技術が必要となる。

本研究においては、ウイルスベクターから供給されるリボザイムあるいは、Short dummy RNA によって、メチル化部位で合成される RNA (ターゲット RNA) を阻害するという、DNA メチル化のステップを阻害することによって脱メチル化を誘導するというものであり、すでに付加されたメチル基を外すという常識的な考え方とは大きく異なっている。

本研究で開発したリボザイムや Short dummy RNA によって、標的とした配列の DNA メチル化レベルを特異的に、目標値であった元のレベルの約 70% 以下に低下させることに成功した。本開発技術は既に特許出願を行っており、基盤技術ながら、実用化の可能性が十分にあると考える。

3.2.1.3-3. 代謝系関連遺伝子の安定化技術開発

(担当機関：国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学)

1. mRNA 内部切断部位の網羅的解析手法の確立

mRNA 分解産物の 5' 末端解析は、miRNA のターゲット配列の同定などに重要な役割を果たしている。いくつかの先行研究が行われているが、これらは何れもポリ A 側から分解産物の 5' 末端を調べる方法であり、検出される部位が mRNA の 3' 側に偏ることや、切断部位が 2 か所以上存在した場合は正確に同定することができないなど問題があった。そこで本研究開発では、キャップ構造を有する完全長の mRNA (未分解の mRNA) の 5' 末端配列を解析する手法である CAGE (cap analysis gene expression) 解析を改良して、キャップ構造を持たない分解された mRNA の 5' 末端配列を 5' 側から解析できる Truncated RNA end sequencing (TREseq) 法を新たに開発した (図 3.2.1.3-3-1)。シロイヌナズナ T87 培養細胞の培養 3 日目の培養細胞から調製した全 mRNA から Ribo-Zero によりリボソーム RNA を取り除いた。その後、ランダムプライマーを用いて逆転写を行った。より切断部位の濃縮比率を高めるために、Cap trap によりキャップ構造が付加された mRNA を取り除き、次世代シーケンサーにより解析した。その結果、従来手法の結果と比較して (図 3.2.1.3-3-2 下段)、TREseq 法では、検出される部位の 3' 側への偏りを大きく軽減するとともに (図 3.2.1.3-3-2 上段)、精度の高いデータが取得できた。

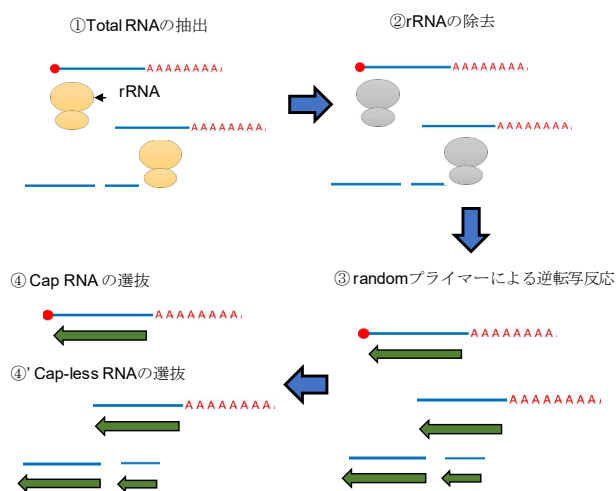


図 3.2.1.3-3-1. TREseq におけるライブラリー作製の概要図

Total RNA を抽出後、rRNA 除去キットを用い、rRNA を取り除いた。その後、random プライマーを用い逆転写反応を行った。より切断部位 (Cap-less RNA) の濃縮比率を高めるために、Cap-trap 法を用いて RNA を Cap、Cap-less RNA に分画した。

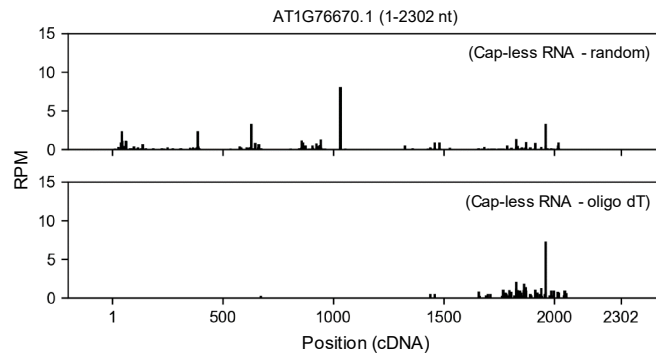


図 3.2.1.3-3-2. 個別遺伝子を対象とした各データの比較
 Cap-less RNA (random) と Cap-less RNA (oligo dT) の結果を示す。縦軸は RPM 値を示し、1 は TAIR10 に登録されている 5' UTR の 1 塩基目を示している。

2. 切断部位周辺での塩基の偏りと遺伝子内での切断部位の分布

これまでの先行研究では、ポリ A 鎖を保持している RNA を対象としていたため、検出される切断部位数が少なく、切断部位が mRNA の 3' 末端に偏っており、結果として各切断部位での切断のされやすさに関する情報を取得できていなかった。今回の解析では、先行研究での問題を解決した TERseq という手法を開発し、3' 末端側に切断部位が偏るバイアスを大きく軽減するとともに、12,340 遺伝子について 2,187,554 個の独立した切断部位情報を取得した。各切断部位に着目した場合、その部位でのリード数は mRNA の蓄積量に依存するため、各切断部位でのリード数を mRNA の蓄積量で補正し、各部位での切断のされやすさの指標値として Cleavage score (CS_{site}) を定義した。また、遺伝子単位での切断のされやすさとして、各遺伝子単位での CS 値を合計し、 CS_{gene} 値とした。 CS_{gene} 値が高い順、低い順からそれぞれ 10% ずつ遺伝子を選抜し、各遺伝子の半減期データと比較すると、 CS_{gene} 値が高ければ半減期が短いという結果となり、 CS_{gene} 値は mRNA の切断率、分解のされやすさを反映していた。次に、各切断部位に着目し、各切断部位周辺の塩基比率を解析した結果、G リッチな傾向が認められ、この傾向は CS_{site} 値が高い配列で顕著であった (図 3.2.1.3-3-3)。

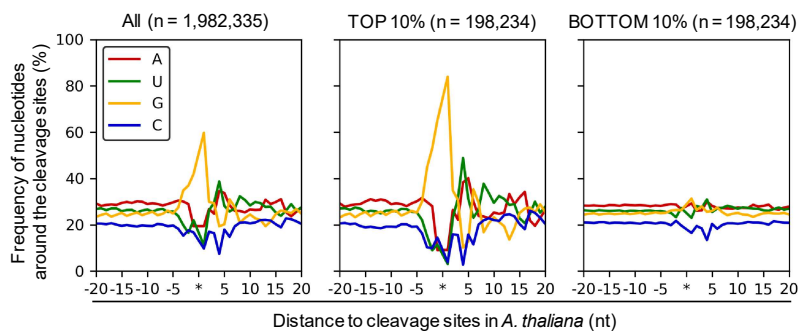


図 3.2.1.3-3-3. 切断部位周辺での塩基の偏り

シロイヌナズナを対象に切断部位周辺の配列情報を取得し、塩基比率を算出した。また、切断率を基に場合分けを行った場合の配列に関しても塩基比率を算出した。

さらに、 CS_{site} 値の高い切断部位の前後 20 塩基を用いてモチーフ検索を行ったところ、数十のモチーフが検出された。その中で最も顕著に検出されたモチーフは、GGGNKW であった (図 3.2.1.3-3-4)。

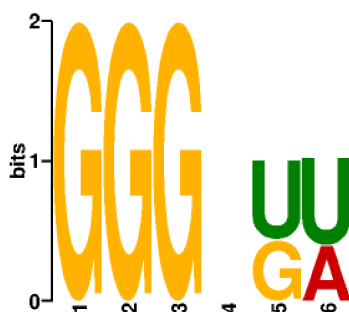


図 3.2.1.3-3-4. 切断部位周辺に頻出する配列モチーフ

CS_{site} 値の高い切断部位の前後 20 塩基を用いてモチーフ検索を行った。E-value = $5.8e-100$

次に、各切断部位の遺伝子内での分布に着目した。その結果、開始コドンおよび終止コドン近傍に非常に多くの切断部位が存在することが明らかとなった (図 3.2.1.3-3-5)。リボソームの翻訳伸長は開始、終止コドンで停滞しやすいこと、また、リボソームの停滞により mRNA が切断されるという酵母での知見から、これら開始コドンおよび終止コドン近傍で検出される切断部位には、翻訳過程が関与していることが考えられた。加えて、コード領域内で切断部位の 3 塩基単位での周期性が確認されたことから、この仮説が支持された。

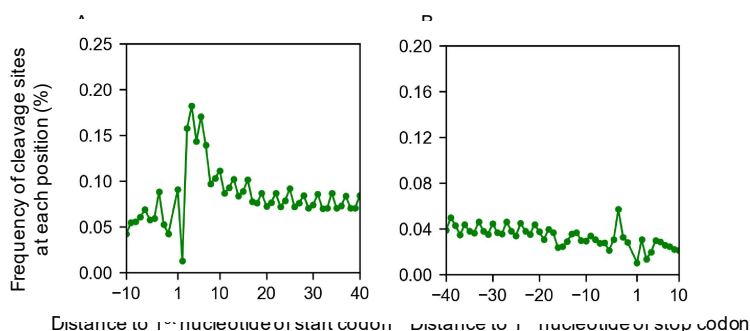


図 3.2.1.3-3-5. 開始コドン、終止コドン周辺の切断部位の分布

開始コドン、終止コドンからの相対距離を算出し、各位置における切断部位の出現頻度を算出した (A, B)。Y 軸は、各位置における切断部位の出現頻度を示し、X 軸は、開始コドン、終止コドンからの相対距離を示す。

3. 条件間および他の植物種を対象とした解析

植物の発達や生育環境によって mRNA の安定性が異なることが予想されることから、熱処理したシロイヌナズナ培養細胞 (35°C、1 時間)、発芽 2 日目の幼植物体、発芽 21 日目の成熟葉と未成熟葉を対象とした TREseq 解析も行った。最終的な解析対象は、成熟葉 (遺伝子数 14,365、切断部位数 1,442,074)、未成熟葉 (遺伝子数 14,860、切断部位数 1,438,847)、幼植物体 (遺伝子数 16,759、切断部位数 1,447,910)、熱処理 (遺伝子数 13,916、切断部位数 669,058) となった。また、植物種間の共通性 / 特殊性の情報を得るという観点から、別の植物種であるイネ培養細胞、レタス植物体、バラ植物体を対象としても TREseq 解析を行った。最終的な解析対象は、イネ (遺伝子数 15,883、切断部位数 2,017,282)、レタス (遺伝子数 14,025、切断部位数 1,147,840)、バラ (遺伝子数 6,735、切断部位数 251,558) となった。シロイヌナズナ培養細胞の場合と同様に、切断部位周辺の塩基比率の解析と CS_{site} 値の高い切断部位の前後 20 塩基について配列モチーフ検索を行ったところ、切断部位近傍の塩基の出現頻度は、条件間および植物種間で非常に似ており、抽出されたモチーフ配列も非常に類似したものであった。また、同様にコード領域内で切断部位の 3 塩基単位での周期性が確認された。進化的に大きく離れている植物種の系統間で類似した結果となったことから、シロイヌナズナで得られたデータを用いて構築する、各切断部位での切断のされやすさの指標値 (CS_{site} 値 / CS_{gene} 値) を mRNA の配列情報から予測できるインフォマティクス予測システム (Prediction model of Cleavage Score; PCS) は、広範な植物種で適用可能であると考えられる。

4. リボソームプロファイリングによるリボソーム停止位置の解析

翻訳過程、特にリボソームの停止・停滞と mRNA の内部切断に何らかの関係があることが明らかとなったことから、mRNA 上でのリボソームの存在量および停止・停滞位置を推定できるリボソームプロファイリング解析を行った。培養 3 日目のシロイヌナズナ培養細胞から調製した全 mRNA を RNase で処理した後、スクロース密度勾配上に重層し超遠心を行うことで、リボソームが 1 個ないし 2 個結合した画分を分画した。その後、タンパク質を除去することで、リボソームによって保護された RNA 断片を回収し、イルミナのキットを用いてライブラリーを構築し、次世代シーケンサーにより解析した。最終的な解析対象は遺伝子数 13,916、断片末端数 2,533,420 となった。また、リボソームによって保護された RNA 断片数 (リード数) は、mRNA の蓄積量に依存する可能性があるため、各 RNA 断片のリード数を mRNA の蓄積量で補正した値をリボソーム密度 (Ribosome Occupancy: RO_{site} 値) と定義し、各部位での RO_{site} 値を合計した RO_{gene} 値を遺伝子単位でのリボソーム密度とした。これら得られたリボソームの占有率に関するデータと切断のされやすさのデータについて遺伝子単位で比較すると (両解析で共通する 13,830 遺伝子)、非常に高い正の相関が認められ、リボソームが mRNA 上に多く存在するほど内部で切断されやすいことが明らかとなった (図 3.2.1.3-3-6)。

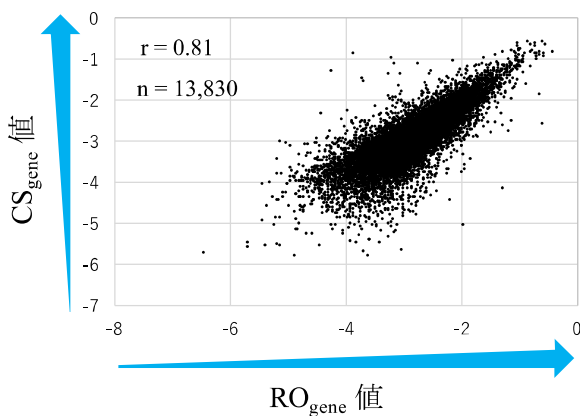


図 3.2.1.3-3-6. 切断のされやすさとリボソーム密度の相関、終止コドン周辺の切断部位の分布

遺伝子単位での切断のされやすさの指標値である CS_{gene} 値を縦軸に、遺伝子単位でのリボソーム存在量の指標値である RO_{gene} 値を横軸に示す。

5. リボソームの存在位置と切断部位の関係

リボソームにより保護された断片 (Ribosome Protected Fragment: RPF) の 5' 末端と切断部位の分布を比較すると、双方に 3 塩基単位の周期性は認められたが、5' RPF と切断部位の位相が異なるなど、両者に強い位置的な関係性は認められなかった (図 3.2.1.3-3-7)。そこで次に、CDS 領域に存在する切断部位の位置を基準とし、周辺の 5' RPF の存在量を算出した。リボソームの存在位置が切断部位の位置決定に重要であるならば、切断部位の周辺に 5' RPF の顕著な偏りが予想される。しかし、実際に 5' RPF の存在比率を調べてみると、切断部位周辺で 5' RPF の存在比率が顕著に高いわけではなく、リボソームの存在位置が切断部位の位置決定に大きく関与する傾向は認められなかった。

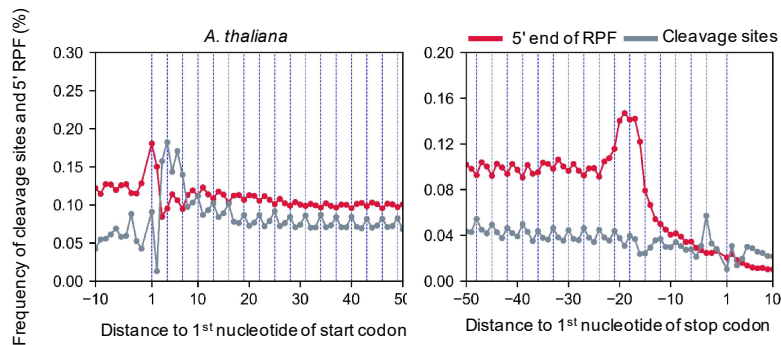


図 3.2.1.3-3-7. 開始、終止コドン近傍における切断部位とリボソームの分布

開始、終止コドンからの相対距離を算出後、各位置における切断部位、RPF 5' 末端の出現頻度を算出した。Y 軸は、各位置における切断部位と RPF の 5' 末端の出現頻度を示す。X 軸は、開始コドン、終止コドンからの相対距離を示す。

6. 他の生物種を対象とした切断部位解析とシロイヌナズナで得られた結果との比較
シロイヌナズナを用いた解析により、RNA 切断には複数の要因が関与することが示された。そこで、異なる生物種においても TREseq 法を行い、RNA 切断に関わる特徴を比較した。解析対象としては、ショウジョウバエおよび出芽酵母を使用した。シロイヌナズナと同様に RNA を抽出し、TREseq 法のライブラリー作製に従い、網羅的に切断部位情報をショウジョウバエ（切断部位数 859,572）、出芽酵母（切断部位数 621,891）について取得した。シロイヌナズナ培養細胞の場合と同様に、切断部位周辺の塩基比率の解析と CS_{site} 値の高い切断部位の前後 10 塩基について配列モチーフ検索を行ったところ、切断部位近傍の塩基の出現頻度は、植物のものと似ており、抽出されたモチーフ配列も非常に類似したものであった。また、同様にコード領域内で切断部位の 3 塩基単位での周期性が確認され、リボソームが mRNA 上に多く存在するほど内部で切断されやすい傾向が認められたが、リボソームの存在位置が切断部位の位置決定に大きく関与する傾向は認められなかった。このように、生物種間で類似した結果となったことから、mRNA の内部切断機構は生物種間で保存されており、シロイヌナズナで得られたデータを用いて構築するインフォマティクス予測システムは、広範な生物種で適用可能であると考えられた。

7. 内部切断への翻訳効率の影響と配列依存性の評価

これまでの解析から、mRNA 上のリボソーム存在量が各切断部位の切断率に正の影響を及ぼすが、切断、非切断部位の決定には大きく関与しないこと、そして、切断部位周辺の配列的特徴が切断、非切断部位の決定と切断率に重要であることが示されている。そこで、レポーター遺伝子として *Renilla luciferase* (*R-luc*) を用いて DNA 一過性発現実験にて切断部位周辺の配列、mRNA 上のリボソーム量が mRNA 切断に与える影響を評価した。この評価には、[1] 通常の *R-luc* 配列、[2] *R-luc* RNA の 5' UTR 配列を置換し、翻訳効率（RNA 上でのリボソーム存在量）を向上、[3] *R-luc* RNA 内の切断率が最も高い部位の G 塩基をアミノ酸置換が生じないように A 塩基に置換した 3 種類の発現カセットを用いた（図 3.2.1.3-3-8）。

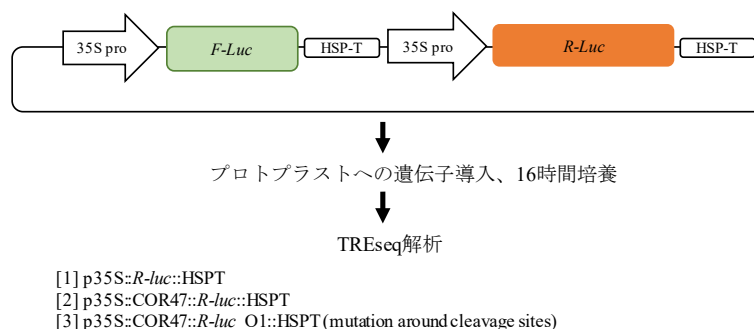


図 3.2.1.3-3-8. DNA 一過性発現実験に用いた発現カセット

これらの発現カセットを含むプラスミドをシロイヌナズナ培養細胞のプロトプラストに導入し、その後精製した mRNA を用いて TREseq 法を行った。その結果、5' UTR 配

列を置換し翻訳効率を上昇させた場合、切断部位の位置に大きな変動は認められなかったが、各切断部位での切断率は上昇していた。また、*R-luc* 内で最も切断される部位の+1位のG塩基をアミノ酸置換が生じないようにA塩基に置換した場合は、その部位での切断が50分の1程度まで大幅に減少した。これらの結果は、切断部位決定の配列依存性と翻訳過程が切断率に正に関与することを実証したものである。

8. インフォマティクス予測システム (PCS) の構築

構築した予測システムには、決定木を基礎とした機械学習法であり、より高精度のモデルが構築できることが多い Gradient boosting regression を使用した。mRNA 上の様々な特徴を評価し数値化し、数値化した特徴と切断のされやすさの指標値との間の関係性を説明する単純な決定木を構築した。単純な決定木なので説明がつかない部分も多いが、そのずれを説明する別の決定木を構築し、ずれを修正することを繰り返すことで最終的に複雑かつ高度な機械学習モデルを構築した。例えば、遺伝子の全体的な切断のされやすさの指標値である CS_{gene} 値を予測する機械学習モデルを構築した場合、完全に独立したデータを非常に高い精度で予測することに成功した ($r = 0.8720$, $R^2 = 0.7604$)。この中で、予測と実測値が大きく異なっている遺伝子についてデータを調べてみると、予測が間違っているのではなく、予測に用いた実測値や配列情報に不備がある可能性が高いものであった。例えば、データベースに登録されている ATG の位置がおかしく、転写開始点を正しく紐づけられなかったため、蓄積量が過小評価されている例、イントロンが 24 個もあり、予測に用いた mRNA 配列とは異なるスプライスバリエーションが存在している (全く検出されていないエキソンが複数ある) 例、隣り合う遺伝子とゲノム上の領域がほぼ重なっているため、両方の遺伝子由来のリードが混在することとなり、正しい評価ができていない例、などである。結果として、各部位ごとの切断のされやすさの違いを強調した新たな指標値を予測する機械学習モデルを構築し、完全に独立したデータを十分に高い精度で予測することに成功した。

9. 構築した PCS を用いた人工遺伝子の設計

構築したインフォマティクス予測システムは、切断効率を高精度で予測することが可能である。従って、目的遺伝子のアミノ酸配列に対応する全コドンの配列パターンについて予測を行えば、最も切断されにくい人工遺伝子の配列設計が可能となる。ただ、CDS 内の配列を改変することによって切断されにくい配列を設計する際に、改変した配列から意図しない転写開始 / スプライシング / 転写終結が起きる可能性がある。そこで、すでに取得している転写開始点に関する網羅的データから転写開始点周辺に典型的な配列パターンを (transcription start site: TSS)、ロングリードシーケンサーを用いた全長 mRNA 配列情報からポリ A 付加部位 (polyA addition site: PAS) やスプライシングサイト (5' splicing site: 5' SS、3' splicing site: 3' SS) に典型的な配列パターンをそれぞれ抽出した。

R-luc 遺伝子は比較的塩基数の少ない遺伝子であるが、それでも対応するアミノ酸数は 312、全コドンのパターン数は $10^{143.43}$ である。これは、1 無量大数 \times 1 無量大数より多いこととなり、全パターンについて予測値を算出するのは非現実的なため、遺伝的アルゴリズムを用いた配列の準最適化を行うこととした。遺伝的アルゴリズムとは、過酷な環境に適応するため、遺伝子が適したものに進化していく過程を模倣した最適化アルゴリズムである。それを更に発展させ、地域ごとの独自の進化と、移住の概念を取り入れた分散遺伝的アルゴリズムを用いて、上記配列パターンが出現しないように人工遺伝子を設計した（図 3.2.1.3-3-9）。

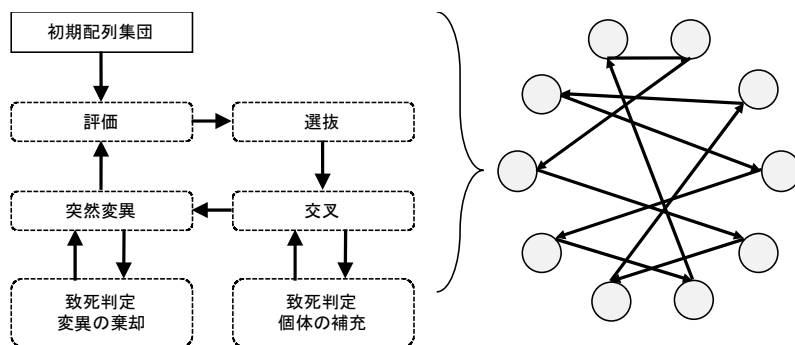


図 3.2.1.3-3-9. 分散遺伝的アルゴリズムを用いた人工遺伝子の設計

10. 設計した人工遺伝子の評価

設計した人工遺伝子を含む発現プラスミドをシロイヌナズナ培養細胞のプロトプラストに導入し、その後発現した R-Luc タンパク質量を活性値として評価した。その結果、アミノ酸配列を変化させることなく改変した人工遺伝子からの R-Luc 発現量は、未改変のものと比較して 190 倍であった。

本研究開発では、植物 mRNA のどのような配列／構造が認識されて分解されているかをゲノムスケールでの解析とインフォマティクス解析を駆使することで明らかにし、植物へ導入する目的遺伝子内に想定される不安定要因をあらかじめ排除し、安定化できる技術の開発を目指したものである。本研究開発では、mRNA の内部切断部位を網羅的に解析できる Truncated RNA End sequencing (TREseq) 法を確立することで、切断部位に関する大規模データを取得するとともに、実際に植物へ導入した遺伝子由来の mRNA について、TREseq を行うことで導入遺伝子発現の診断も可能となった。また、配列情報から mRNA の安定性および内部切断部位を予測できる Prediction model of Cleavage Score (PCS) の構築と PCS を活用した人工遺伝子設計法を開発した。これにより、短時間で導入遺伝子配列の適性を評価し、アミノ酸置換を伴うことなく高発現が期待できる人工遺伝子を設計することが可能となった。また、「植物へ導入する遺伝子の人工配列の設計システム」に関して特許出願を行った。

開発した技術のアウトリーチについては、学会発表、論文公表、イノベーション Japan やバイオ Japan などの機会を積極的に活用し、広くシーズを公開するとともに

に、NDA、MTA、共同研究、ライセンス契約等を通じて、事業化を目指す企業の取り組みを後押しする。

一方で、CDS内の配列を改変することによって切断されにくい配列を設計する際に、改変した配列から意図しない転写開始／スプライシング／転写終結が起きる可能性が想定され、今回、それらの典型的な配列パターンが生じないように排除したが、負の要因に関わる配列情報が不完全であるため、これらに関して大規模に関連データを取得し、その情報を活用することで人工遺伝子設計法を更に改良することが可能である。

3.2.1.3-4. 転写・発現調節因子等による遺伝子発現制御技術 (担当機関：国立大学法人横浜国立大学)

1. 新規介在配列付加による多重遺伝子導入発現系の高性能化

遺伝子組換え技術を用いて二次代謝産物の高効率な蓄積を達成するためには効率よい多重遺伝子導入発現技術が必要となる。そこで、本研究ではこれまでの実績を活かした IRES、イントロン等を用いた高効率多重遺伝子発現系研究開発に取り組んだ。先ず、96 穴プレートを用いたアグロインフィルトレーション法によりイントロン挿入型ルシフェラーゼ (iLUC) の発光モニタリングにより発現効率を評価する方法を用いて、RNA ウイルス由来のサイレンシングサプレッサー (RSS) を IRES で連結して発現させ、外来遺伝子の高効率発現に使用可能な宿主植物としての応用について検討した。さらに、成葉を用いた方法により、その有効性について検証した。具体的には、各種 RSS を導入したタバコ葉にシリンジを用いて iLUC を発現するアグロバクテリウムを注入し、経時的にその発現誘導活性を発光モニタリング法により評価し、高効率発現系に有効であることを明らかにした (図 3.2.1.3-4-1)。

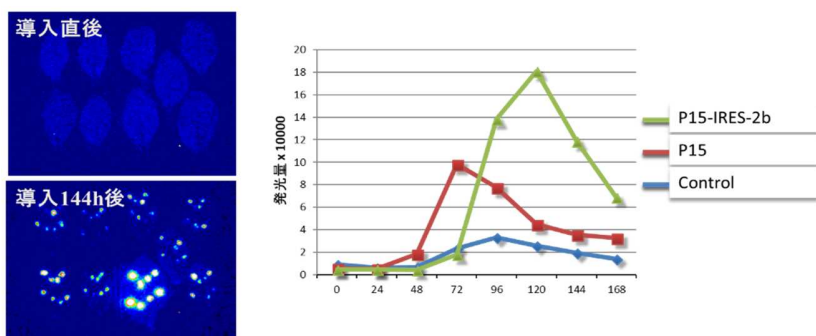


図 3.2.1.3-4-1. アグロインフィルトレーション法による RSS 発現タバコ葉における発光レポーターの一過性発現
左：導入直後および導入 144h 後の発光の様子。
右：発光定量の経時的観察。

一方、多重遺伝子発現評価に応用可能な新規レポーターアッセイ系として、共通した発光基質としてルシフェリンを用いるホタルルシフェラーゼ、緑色発光型および赤色発光型ヒカリコメツキルシフェラーゼ (Click beetle luciferase: CBG および CBR) の 3 種類のルシフェラーゼに対する特異的発光活性阻害剤の探索を実施し、優れた阻害活性を有する化合物を複数同定することが出来た。特に、比較的安価な既存の薬物を用いて、図 3.2.1.3-4-2 に示すような新規レポーターアッセイ系の開発に成功した。本研究で見いだされた特異的発光活性阻害剤は、発光レポーターアッセイの超高感度化にも応用可能であると考えられる。

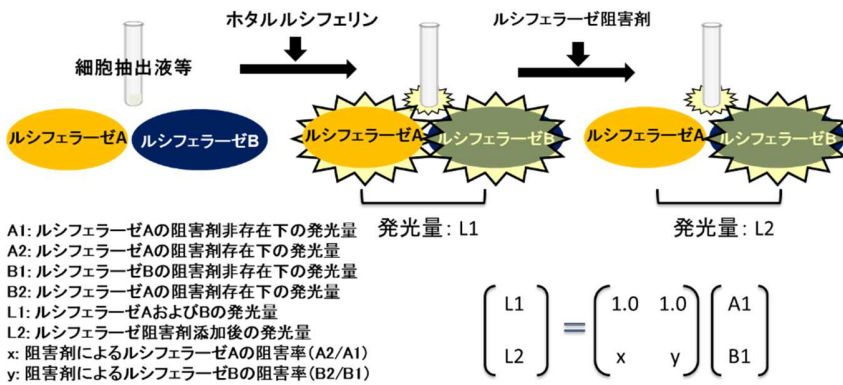


図 3.2.1.3-4-2. 特異的阻害剤を用いたホタルルシフェリンを共通基質として用いた新規なデュアルアッセイ法

2. 導入遺伝子発現制御、目的物質の高発現に有効な生理活性物質・因子等の探索と利用

生理活性物質等の添加や栽培環境により、二次代謝物質の蓄積量を人為的に制御することが可能であり、病虫害防御応答誘導性ジャスモン酸メチル (MeJA) 処理でタキソール合成が増強される例などが知られている。本研究では、特に二次代謝物質合成と関連する防御応答系の新規生理活性物質・制御因子等を見出すことを目的とした研究開発を実施した。特に、MeJA のアゴニストなどの探索を中心に、サリチル酸 (SA) 系防御応答遺伝子発現制御物質のスクリーニング系も用いて複数の生理活性物質を見出した。これらのうち、YNU-001 と仮称する化合物については、極めて強力な二次代謝物質生産活性化能を有することが供与先の研究により実証された (本研究プロジェクト内外の共同研究)。さらに、化合物ライブラリースクリーニングを進めたところ、低濃度で MeJA 誘導性遺伝子発現を誘導する新規化合物を新たに複数見出したが、それらのうちのひとつ (YNU-NE と仮称) は、SA 系遺伝子発現にも誘導的に働くという、合成低分子化合物としては新規な活性を有する可能性が示唆された (図 3.2.1.3-4-3)。

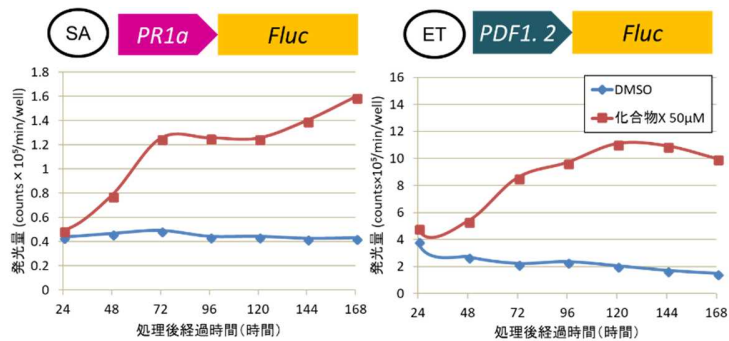


図 3.2.1.3-4-3. 新規化合物 X のサリチル酸誘導性 (SA) およびエチレン・ジャスモン酸誘導性 (ET) 系の各遺伝子発現誘導の経時観察結果

YNU-NE については網羅的な遺伝子発現解析により、処理後に変動する遺伝子群について調べた結果、有意に誘導される遺伝子が多く見いだされ、複数の二次代謝関連遺伝子の発現誘導も顕著に観察された（図 3.2.1.3-4-4）。

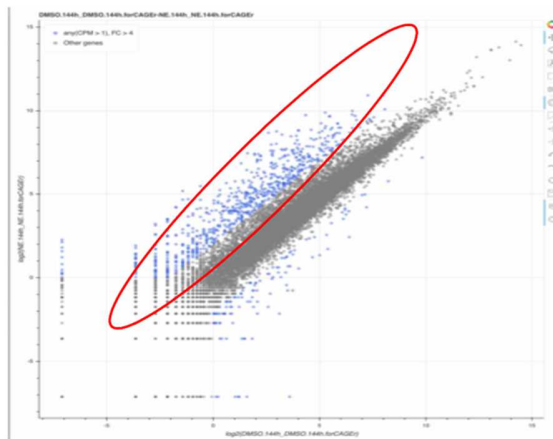


図 3.2.1.3-4-4. YNU-NE によって特異的に誘導される遺伝子群の解析
化合物処理 144 時間後に対照区と比較して 4 倍以上変動する遺伝子を青点で示している。赤線で囲われた範囲の点が特異的に誘導された遺伝子群である。

一方、新規な高性能探索系の開発を確率する目的で、ジャスモン酸系の生理活性物質の探索・特徴付けに有効な JAZ タンパク質の融合タンパク質を用いたシステムを構築し、複数の JAZ タンパク質を用いることにより特異的応答性のモニタリングが可能であることを示した。また、新たにアブシシン酸応答性または解毒系の各種遺伝子プロモーターにルシフェラーゼを連結した発光レポーターを用い、ストレス応答性遺伝子発現を指標とした、生理活性物質の評価・探索系の構築も行った。

3. 人工転写因子等を用いた植物遺伝子転写制御の検討

遺伝子編集に用いられる CAS9 タンパク質の DNA 切断能を欠失させた dCAS9 系を用いた新規な転写制御因子評価方法を検討し、GAL4 系のシス制御配列である UAS をターゲットとする dCAS9 融合タンパク質の転写制御能の一過性遺伝子発現による評価系を構築した。それを用いた転写活性化ドメインの探索・評価を試みた結果、テッポウユリから単離された植物固有の転写因子である GRAS タンパク質の一種である、L1SCL (*Lilium longiflorum* SCARECROW-LIKE) が有する N 末端側の酸性アミノ酸に富む領域が、dCAS9 系において VP16 等の既存の転写活性化因子を上回る強力な転写活性化能を示すことが明らかとなった（図 3.2.1.3-4-5）。さらに、L1SCL 相同遺伝子の cDNA を、イネとタバコから単離し、それらの N 末端側の酸性アミノ酸に富む領域について転写活性化能を比較検討した結果、それらが L1SCL と同等以上の転写活性化ドメインとして機能することを明らかにした。これらの転写活性化ドメインは、dCAS9 融合タンパク質系を用いた内在遺伝子の選択的活性化に有効利用可能であると考えられる。

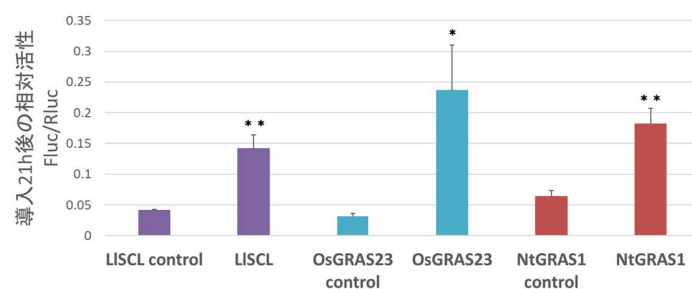


図 3.2.1.3-4-5. LISCL とイネおよびタバコ由来相同遺伝子の N 末端領域の転写活性化能の比較

さらに、384 穴プレートを用いたアグロインフィルトレーション法の効率を向上させる低分子化合物等の新規探索系の開発に取り組み、ハイスループット系として十分に運用可能であることを確認することが出来た (図 3.2.1.3-4-6)。さらに、本系をもちいて合成化合物ライブラリーから、アグロインフィルトレーション法における外来遺伝子発現を 5 倍程度向上させる活性を有する新規化合物を見出すことが出来た。

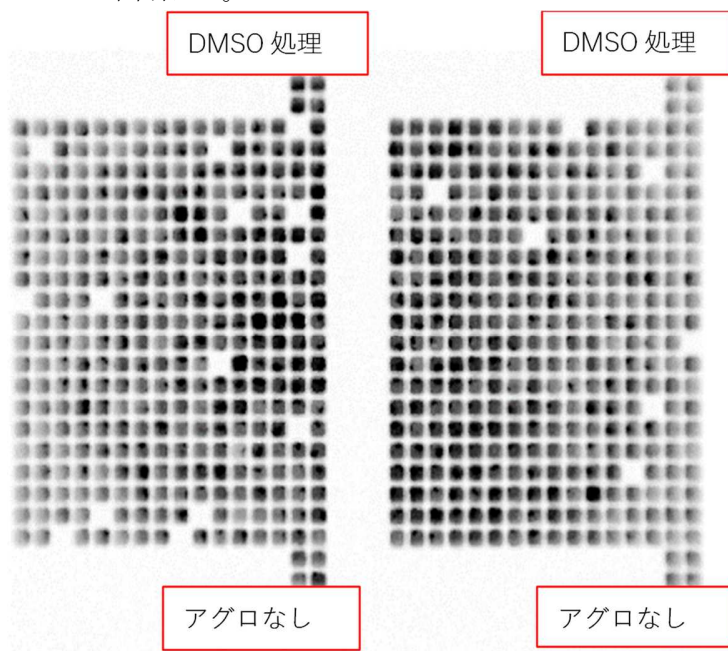


図 3.2.1.3-4-6. 多穴プレートを用いた多色発光レポーターによるスクリーニング系
化合物処理した 35S-CBR(赤色発光)を有する形質転換シロイヌナズナに対してアグロインフィルトレーション法により、35S-iCBG(緑色発光)を導入し、緑色発光と赤色発光の比率を計算して評価する。

4. 転写制御に有効な標的配列探索方法の開発

内在プロモーターの標的配列を探索するのに先立ち、標的配列候補の要件について dCAS9 融合タンパク質の GAL4-UAS 系による一過的発現系をもちいて検討した結果、PAM 配列 (CRISPR/Cas9 システムにおいて DNA 二本鎖切断に必要な NGG 3 塩基の配列) 付加が切断効率のみでなく、転写活性化効率にも大きく影響することが判明した。従って、内在プロモーターをターゲットとする場合においても、当該プ

ロモーターの Pam 配列を有する領域を優先すべきである可能性が示唆された。実証例として、二次代謝系遺伝子発現を司る主要因子のひとつであるシロイヌナズナ NPR1 遺伝子プロモーターをターゲットとして dCAS9 系の標的配列について詳細な検討を行い、CRISPR/Cas9 システムにおいて PAM 配列が当該プロモーターにおいても転写活性化に強く影響することなどを明らかにし、sgRNA の設計に有用な知見が得られた (図 3.2.1.3-4-7)。

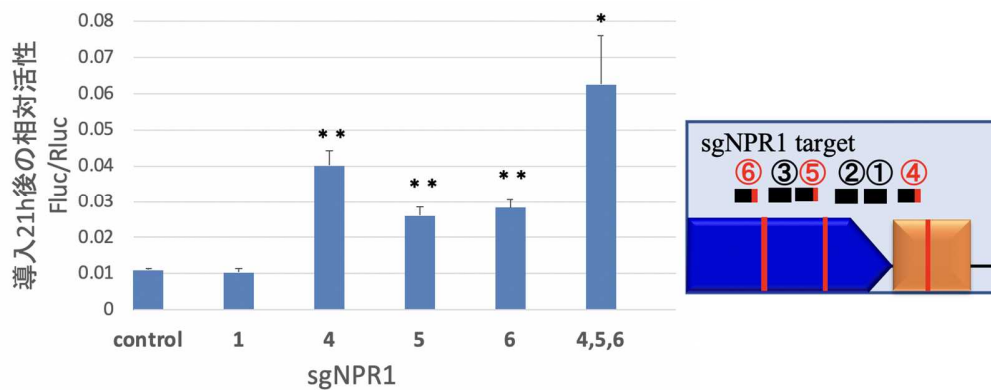


図 3.2.1.3-4-7. 多穴プレートを用いた多色発光レポーターによるスクリーニング系

3.2.1.3-5. 環境ストレスを活用した植物の二次代謝系制御による高効率物質生産 (担当機関：国立大学法人千葉大学)

1. 試験の概要

本研究では環境ストレス因子に光（紫外線と光質）、オゾンガス、低温、水分を選び、単独または複合的なストレス環境を、生育ステージごとに、短期・長期の処理を付与する。対象植物にはトランスクリプトーム解析のできる実用的なモデル植物としてタバコ (*Nicotiana benthamiana*) とセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) を用いる (図 3.2.1.3-5-1)。また成果の応用を実用するための実用植物として薬用植物であるスイカズラ (*Lonicera japonica* Thunb.) を用いる。

実験は植物工場実験棟内の栽培室・人工気象室で実施する。複数のストレス要因を付加・除去しながら株全体または器官局所的に与えて、生合成が変化する状態を人為的に作り、転写および生合成を解析する。トランスクリプトーム解析により環境ストレス付与の影響を受けやすい遺伝子群を選び、定量解析を行う。平行して、二次代謝系の主要な二次代謝成分の分析を行う。つぎに高発現を示すストレス条件を探索してストレス付与条件の最適化を図る。以上により目的とする有用成分の高発現を器官特異的に誘導する手法を確立する。

セイヨウアブラナとベンサミアーナタバを用いて、環境ストレスとして紫外線 (UV) 照射、オゾンガス曝露および低培養液温を単独または複合的に与えて (表 3.2.1.3-5-1)、葉の網羅的な遺伝子発現解析 (DNA マイクロアレイ解析)、定量的な遺伝子発現解析、および主要な代謝物測定を行った。定量的な遺伝子発現解析で対象とした二次代謝系の生合成経路は、フェニルプロパノイド生合成経路、フラボノイド生合成経路 (アントシアニン生合成経路を含む)、テルペノイド生合成経路 (カロテノイド生合成経路を含む) である。この解析により、紫外線特異的な遺伝子発現、オゾンガス特異的な遺伝子発現、低培養液温特異的な遺伝子発現を明らかにした。また、複合処理により、単独処理よりも遺伝子発現が活性化して主要代謝物が増加する条件を明らかにした。スイカズラについては、オゾンガス曝露および低培養液温を単独または複合的に与えて、薬用効果を持つ主要な生理活性物質に及ぼす影響を明らかにし、これらの物質濃度が高まる条件を見出した。実験は、環境ストレス処理としてオゾン (O_3) 濃度制御装置、UV-B (UV) 蛍光灯、低培養液温 (LT) 制御装置を組み込んだ人工気象室および植物工場栽培室内で行った (図 3.2.1.3-5-2)。



ベンサミアーナ



セイヨウアブラナ



スイカズラ

図 3.2.1.3-5-1. 研究対象の 3 植物

紫外線 (UV) 照射

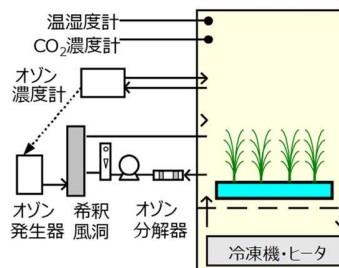


要素：UV種類 (AとB)、UV強度、照射期間

オゾンガス (O₃) 曝露

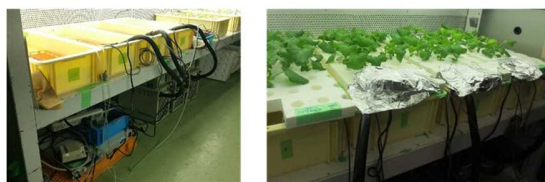


LEDランプ



要素：O₃濃度、曝露期間

培養液の低温 (LT)



要素：水温、処理期間

図 3.2.1.3-5-2. ストレス付与試験の概要

表 3.2.1.3-5-1. マイクロアレイ解析・PCR 解析に用いたストレス条件 (ベンサミアーナ)

処理	葉位	処理期間 (日, 時)	低温、オゾンガス、UV-B
LT	3	1 d, 2d, 3d	15 °C
O ₃	3	1 d	200 ppb
O ₃	3	1 d, 2d	400 ppb
UV	3	1d, 2d, 3d	0.3 W/m ²
LT+UV	3	1d, 2d, 3d	15 °C, 0.3 W/m ²
LT+O ₃	3	1 d, 2d, 3d	15 °C, 200 ppb
UV+O ₃	3	1 d, 2d, 3d	0.3 W/m ² , 200 ppb
LT+UV+O ₃	3	1 d, 2d, 3d	15 °C, 0.3 W/m ² , 200 ppb

LT: 低培養液温 (low solution temp.)
 UV: 紫外線B照射 (UV irradiation)
 O₃: オゾンガス曝露 (Ozone exposure)

それぞれ、ストレス処理しない株を対照区に設定

2. ベンサミアーナタバコ (*Nicotiana benthamiana*)

播種 25 日目の第 6 葉出葉時にストレス処理を 3 日間または 5 日間行った。主な解析対象葉は子葉から数えて第 3 葉とした。DNA マイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。解析においては、処理区の蛍光強度を対照区の蛍光強度で除し、Log₂ 変換することで、発現比率 (Log₂ Ratio) を用いた。その後、複合処理で発現変動が特に大きかったフラボノイド生合成経路に関わる酵素遺伝子を対象としてリアルタイム RT-PCR 法による定量解析を行った (省略)。

2.1 発現変動遺伝子数

環境ストレスごとに対照区と比較して2倍以上もしくは1/2倍以下発現した遺伝子数を特定した。本試験の中では、LTUVの2DOT (Day of Treatment: 処理日数) で発現変動した遺伝子数が最も多かった。1DOTにおいてLTUVの発現変動遺伝子数はLTより大、UVより小だった。LTUVの2DOT, 3DOTはLTやUVより発現変動が大だった。LTUVは単独処理より大きな影響を与えた可能性がある。

LTUVはLT₀₃と比較して3日間を通じて発現変動が大きく、特に2DOTで発現が増加した遺伝子数が多かった。紫外線は表皮組織に酸化ストレスを与えて活性酸素種 (ROS) を生成させる。オゾン は組織液を酸化してROSを生成させる。低培養液温下において、植物体内で生産されたROSは紫外線照射でオゾン曝露よりも多かった可能性がある。

LTUV₀₃は1DOTと3DOTにおいてLTUVやLT₀₃より発現変動遺伝子数が多かった。ROSはアポプラストで生産されるものと葉緑体で生産されるものがある。紫外線照射とオゾン曝露の複合処理で、1DOTからアポプラストと葉緑体の両方の器官で多量のROSが発生したことが起因し、LTUV₀₃での発現変動がLTUVやLT₀₃より大となった可能性がある。また、LTUV₀₃はUV₀₃よりも発現変動遺伝子数が大だった。低培養液温は吸水ストレスを引き起こし、二次的にROSを生成させる。UV₀₃に低培養液温を複合したことで植物葉に対してより大きな影響を与えた可能性がある。以上より、遺伝子発現に影響を与えやすい環境ストレスが明らかとなった。そこで次に、各環境ストレスに応答する遺伝子発現を詳しく調べるために、KEGG Orthology (KO) を用いた機能分類およびパスウェイ解析を行った。

2.2 KOを用いた機能分類

マイクロアレイにマウントされていた全プローブのうち、KOを特定できた2,255個の遺伝子をKEGG mapperを用いてベンサミアーナが持つ120の機能に分類した。UV、LTUV、LTUV₀₃、UV₀₃では植物免疫、スチルベノイド生合成、フェニルプロパノイド生合成などに関わる遺伝子群の発現が増加し、スベリン生合成、スフィンゴ糖脂質、光合成などに関わる遺伝子群の発現が減少した。ここでは生理活性に着目し、増減の大きかったフラボノイドとテルペノイド生合成に関わる遺伝子を調査した。

フラボノイド生合成経路に関わる多くの酵素遺伝子の発現はUV、LTUV、LTUV₀₃、UV₀₃で増加した。遺伝子発現量を示すLog₂ Ratioは、UVよりLTUV₀₃やUV₀₃の方が大だった。フラボノイドは物理的には紫外線を吸収し、化学的にはROSの除去を行う。紫外線とオゾンの複合処理で、フラボノイド生合成が単独処理より促進された可能性がある。

テルペノイド生合成経路に関わる一部の酵素遺伝子発現はLTUVにおいてLTやUVより増加した。テルペノイドは細胞防御機構や細胞膜の構成成分としての機能を持つ。紫外線照射と低培養液温の複合処理で、細胞膜に大きな障害が及びテルペノイド生合成が単独処理より促進された可能性がある。

2.3 パスウェイ解析

フラボノイド生合成経路に関わる酵素遺伝子の発現は、UV、LTUV、LTUV₀₃、UV₀₃において増加した。本経路の代謝産物のフラボノールやアントシアニンが増加した可能性がある。テルペノイド生合成経路に関わる酵素遺伝子の発現は、UV、LTUV、LTUV₀₃、UV₀₃において非メバロン酸（MEP）経路に関わる遺伝子発現は減少したが、メバロン酸（MVA）経路に関わる遺伝子発現は増加した。色素体では、MEP経路を通じてカロテノイドやクロロフィル側鎖が生合成される。紫外線照射を含む処理区では、これらの生合成が抑制された可能性がある。細胞質基質では、MVA経路を通じてステロールやブラシノステロイドが生合成される。紫外線照射を含む処理区では、これらの生合成が促進した可能性がある。

2.4 まとめ

低培養液温、紫外線照射、オゾン曝露の複合環境ストレスがベンサミアーナの遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにした（表 3.2.1.3-5-2）。本研究の結果より、フラボノイド生合成の促進には、紫外線照射とオゾン曝露の複合処理、もしくは、低培養液温と紫外線照射とオゾン曝露の複合処理が有用であると考えられる。テルペノイド生合成の促進には、低培養液温と紫外線照射の複合処理が有用であると考えられた。

表 3.2.1.3-5-2. ストレス処理中における各機能に関わる遺伝子発現の増減（ベンサミアーナ）

機能および生合成経路	LT	UV	LTUV	LTO ₃	LTUVO ₃	UVO ₃
フラボノイド		↑	↑		↑	↑
テルペノイド			↑			
フェニルプロパノイド		↑	↑		↑	↑
スチルペノイド					↑	↑
α-リノレン酸					↑	↑
カロテノイド			↓			
光合成					↓	↓

2倍以上発現した機能 : 上矢印
 1/2倍以下変動した機能 : 下矢印

3. セイヨウアブラナ (*Brassica napus* L.)

播種 18 日目の第 4 葉出葉時に各種のストレス処理（表 3.2.1.3-5-3）を 3 日間または 5 日間行った。解析対象葉は子葉から数えて第 3 葉とした。DNA マイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。解析においては、処理区の蛍光強度を対照区の蛍光強度で除し、Log₂ 変換することで、発現比率（Log₂ Ratio）を用いた。また、発現変動が大きいと予想したフェニルプロパノイド経路、フラボノイド生合成経路、カロテノイド経路に関わる酵素遺伝子を対象としてリアルタイム RT-PCR 法による定量解析を行った。加えて主要代謝物の定量解析を行った。本稿では紫外線照射、オゾン曝露について報告する。

表 3.2.1.3-5-3. マイクロアレイ解析・PCR 解析に用いたストレス条件
(セイヨウアブラナ)

処理	葉位	処理期間 (日, 時)	強度
LT	3	1 d, 2d, 3d, 4d, 5d	10 °C
O ₃	3	1 d, 2d, 3d	200 ppb
	3	4 d, 5d	400 ppb
UV	3	1 d, 2d, 3d, 4d, 5d	0.6 W/m ²
	2	1 d, 3d, 5d	0.6 W/m ²
LT+UV	3	3d, 5d	10 °C + 0.6 W
UV	3	0.5 h, 1h, 2h, 5h, 8h, 12h, 16h, 24h, 72h	3, 5, 7 W/m ²
UV	3	1 d, 2d, 3d	UV-B(>300 nm) UV-B(<300 nm)

LT: 低培養液温 (low solution temp.)
UV: 紫外線B照射 (UV irradiation)
O₃: オゾンガス曝露 (Ozone exposure)

それぞれ、ストレス処理しない株を対照区に設定

3.1 遺伝子発現解析

第3葉において、DNA マイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、フェニルプロパノイド、フラボノイドおよびカロテノイド生合成経路のパスウェイ解析を行った。加えて、これらの生合成経路に関連する計9つの遺伝子の発現を RT-RT-PCR で定量解析した。

3.2 遺伝子発現/網羅的解析

発現の変動した遺伝子数は UV 照射では処理期間中に増減せず、オゾン曝露では処理期間が長いほど多くなった。UV 照射後数時間で、発現の変動する遺伝子数が増加するという報告がある。本研究でも UV 照射開始から 24 時間以内に植物の防御応答が誘導され、発現変動する遺伝子数の増加があった可能性がある。自然環境下で、植物は高濃度のオゾンに曝露されることがない。そのため本試験では植物がオゾンに対して十分に適応できず、オゾン曝露を継続的に行うことでオゾンの強い酸化力で細胞内の物質が酸化され、経日的に発現の変動する遺伝子数が増加したと考えられた。

パスウェイ解析より、フェニルプロパノイド生合成経路で、UV 照射によってフラボノイド生合成に重要な前駆物質である p-クマル酸を生成する C4H の発現が増加した。また、オゾン曝露により発現の増加した酵素遺伝子が多くみられた。オゾンは活性酸素の一種であり、かつ細胞内で二次的に種々の活性酸素種を発生させる。そのため、オゾン曝露により活性酸素種が生じ、抗酸化能を有する成分を多く代謝するフェニルプロパノイド生合成が活性化したと考えられた。

フラボノイド生合成経路において、UV 照射では発現の増加した酵素遺伝子が多く、オゾン曝露では発現の減少した酵素遺伝子が多かつ。葉の表皮細胞に蓄積するフラボノイドは物理的に有害な UV を吸収し、化学的に活性酸素の除去を行っている。UV 照射によりフラボノイド生合成経路において酵素遺伝子の発現が増加したことは、UV への防御応答としてフラボノイド生合成が促進したことを示唆した。

カロテノイド生合成では，処理によらず酵素遺伝子の発現が減少した。カロテノイド生合成における酵素遺伝子の多くは光を受けて発現が増加する。しかしながら，光強度がある程度に達すると，光酸化による活性酸素が過剰となり一部のカロテノイドは分解される。本試験ではUV照射とオゾン曝露により活性酸素が生じ，葉緑体へダメージを与えることでカロテノイドは分解され，かつ生合成も抑制された可能性が考えられた。

3.3 遺伝子発現/定量解析

9つの酵素遺伝子のうち，各経路の律速酵素の結果に着目する。PAL発現量はUV照射により処理1, 2日目に対照区より大となり，オゾン曝露では2日目以降に大となった。CHS発現量はUV照射で1, 2日目に大きく変動する傾向がみられ，オゾン曝露では対照区より小となった。PSY発現量は両処理に共通して処理期間中，対照区より小となった。また，いずれの酵素遺伝子においても，その発現変動の傾向は下位葉ほど顕著に表れた。

RT-RT-PCRの結果から，ストレス処理によって影響を受ける生合成経路や処理期間が異なると考えられる（表 3.2.1.3-5-4）。

表 3.2.1.3-5-4. ストレス処理中における各機能に関わる遺伝子発現の増減（セイヨウアブラナ）

	UV	O3
フェニルプロパノイド系	1,2日目に増加	経日的に増加
フラボノイド系	処理期間中増加	処理期間中減少
カロテノイド系	一部減少	処理期間中減少

3.4 二次代謝成分

第2, 3葉において，生育に関連するクロロフィル濃度および遺伝子発現を調査した二次代謝経路に由来する総ポリフェノール、総フラボノイド、アントシアニン、β-カロテン、ルテイン濃度を測定した。

総ポリフェノール濃度は，UV照射により処理5日目に，オゾン曝露により3日目以降に対照区より有意に大となった。総フラボノイド濃度は，UV照射およびオゾン曝露共に処理3日目以降に対照区より有意に大となった。β-カロテン濃度は，UV照射により処理1日目から，オゾン曝露により5日目に対照区より有意に小となった。総ポリフェノールおよびβ-カロテン濃度は，それぞれの生合成経路の酵素遺伝子発現に近い傾向となった。またUV照射においてフラボノイド生合成関連遺伝子の発現と同様に総フラボノイド濃度は増加傾向であったが，オゾン曝露において発現は減少し濃度は増加した。以上より，両処理は二次代謝成分濃度に影響を与えることが明らかになった。

3.5 まとめ

UV 照射とオゾン曝露がセイヨウアブラナの生育，二次代謝酵素遺伝子発現および二次代謝物の蓄積に及ぼす影響の共通点と相違点を明らかにした。本研究の結果からフェニルプロパノイド生合成の促進にはオゾン曝露，フラボノイド生合成の促進には UV 照射が有効であると考えられる。

4. スイカズラ

ベンサミアーナとセイヨウアブラナの結果から UV、オゾン、低培養液温が効果を示したフェニルプロパノイド、フラボノイド、テルペノイドに焦点をあてて、実用植物であるスイカズラで基礎的知見を応用する実証を行った。

4.1 スイカズラの特徴

スイカズラ (*Lonicera japonica* Thunb.) はスイカズラ科スイカズラ属の多年生半常緑蔓性低木で、葉、花蕾に多様な生理活性物質を持つ伝統的な薬用植物である。スイカズラ葉の主要な生理活性物質は、フェニルプロパノイド生合成経路のクロロゲン酸 (CGA)、テルペノイド生合成経路のロガニン (L0)、フラボノイド生合成経路のルテオリン (LU) とルテオリン 7-O-β-D-グルコシド (LU7) である (図 3.2.1.3-5-3)。試験開始時に基部から数えて第 1 節から第 5 節の葉 (葉長 1 cm 以上) を付けた株を各種のストレス処理下で 3 日間または 5 日間栽培した。

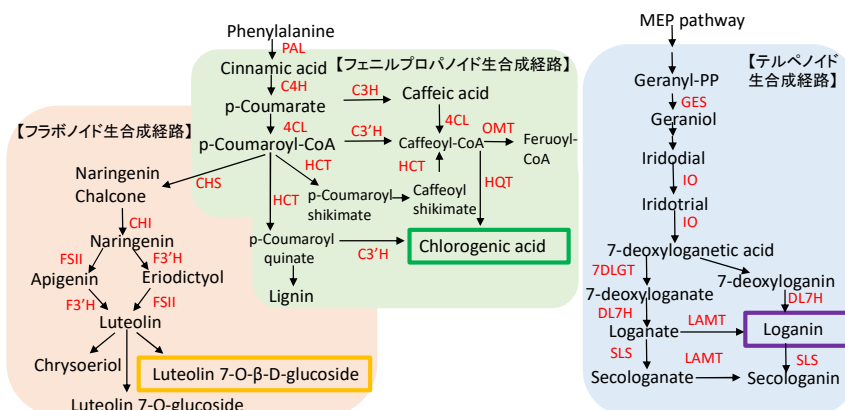


図 3.2.1.3-5-3. スイカズラ葉の主要な生理活性物質の生合成経路

本研究で調査した生理活性物質として、クロロゲン酸 (CGA) はフェニルプロパノイド、ルテオリン (LU)、ルテオリン 7-O-β-D-グルコシド (LU7) はフラボノイド、ロガニン (L0) はテルペノイド生合成経路に属する。

4.2 UV 照射

生育に試験区間で差はみられなかった。20 W・m⁻² で 3 日間処理では、CGA および LU7 が UV 処理で有意に増加した。ただし、生理活性物質濃度を高める UV 照射条件は生理活性物質ごとに異なり、CGA は 20、25 W・m⁻² で 3 日間、LU7 は 20、25 W・m⁻² で 3 日間および 15、20 W m⁻² で 5 日間だった。増加率が最大となったの

は、LU7 の 20 W・m⁻² の 5 日間処理で、3.4 倍だった。また、L0 ではいずれの照射条件でも減少または変化しなかったことから、UV 処理ではフラボノイド生合成を高めるが、テルペノイド生合成経路の促進には適さないと考えられた。

4.3 O₃ 曝露

O₃ 濃度が 400 ppb では葉に障害がみられ、生理活性物質濃度の増加はみられなかった。200 ppb では障害はみられず、第 3 葉では無処理より処理区で LU が増加する傾向がみられた。LU では、O₃ 200ppb 処理の 1 日処理が無処理の 2.7 倍で最大値を示し、以降は低下した。よって、LU では 200ppb 処理で 1 日以内の処理が適当である可能性が考えられた。他の成分については、無処理と同程度か無処理より減少した。

4.4 低培養液温

葉に障害はみられなかった。第 3 葉では 5℃ 区の LU7 が無処理の 1.8 倍に増加した。この時、同じフラボノイドの LU は無処理より減少したことから、LT 処理が LU の生合成を抑制したか、LU から LU7 への代謝が促進された可能性が考えられた。他の成分について、CGA には差がなく、L0 は 5℃ および 10℃ 処理のいずれも無処理より減少した。

4.5 複合処理【UV+LT】

UV および LT 処理は単独処理でそれぞれ LU7 濃度を高めたが、これらを複合した結果では、5 日間処理の LU7 濃度で無処理の 1.7 倍に増加したのが最大で、それ以外は無処理と同程度または減少する傾向を示した。UV 単独処理では無処理の最大 3.4 倍、LT 単独処理では最大 1.8 倍だったことから、UV と LT の複合処理による生理活性物質の相乗的な高濃度化はないと考えられた。他の成分について、LU は無処理と同程度、CGA と L0 は無処理より減少した。よって、いずれの生理活性物質においても単独処理と UV と LT の複合処理は同程度の影響であることが示された。

4.6 複合処理【O₃+LT】

O₃ と LT の複合処理では、LU 濃度が無処理の 2.5 倍となり、最大値を示した。LT の単独処理では、LU 濃度は無処理より減少したことから、複合処理による LU 濃度の増加は O₃ 処理の影響と考えられた。ただし、単独処理以上の LU 濃度増加はみられなかったことから、O₃ と LT の複合処理による生理活性物質の相乗的な高濃度化はないと考えられた。

他の成分については、単独処理と複合処理で同程度の結果となり、複合処理が有効な成分はみられなかった。

4.7 複合処理【UV+O₃】

UV と O₃ の複合処理では、UV や O₃ の単独処理の CGA、LU、LU7 濃度の増加率より低い増加率を示した。特に、UV 単独で増加したフラボノイド (LU と LU7) が無処

理と同程度となり、CGAは無処理より減少した。LO濃度は単独、複合処理ともに無処理より減少したが、減少の程度は同程度だった。よって、UVとO₃の複合処理においても、単独処理を上回る高濃度化はみられず、複合処理による相乗効果は得られないことが示された。

4.8 まとめ

3～5日間のUV照射により、フラボノイドであるLUおよびLU7濃度が増加することが明らかになり、UV処理を含んだ複合処理でも同様の傾向を示した（表3.2.1.3-5-5）。これらの結果は、セイヨウアブラナやベンサミアーナと同様であり、スイカズラにおいてもUVによるフラボノイド生合成経路の活性化が示唆された。UVやLT処理により、テルペノイドであるLO濃度は無処理より顕著に低下することが明らかになり、LOを高める明確な処理は見いだせなかった。しかし、O₃処理ではLO濃度の低下はみられず、無処理と同程度だった。このようにO₃処理ではUV処理やLT処理とは異なる植物応答を誘導することが明らかになり、影響する生合成経路も異なることが示唆された。

表 3.2.1.3-5-5. 単独および複合処理がスイカズラの第3葉（中位葉）の主要な生理活性物質濃度の無処理（Cont.）に対する増加率一覧。

Middle	Days	O ₃				LT		UV						
		200 ppb				400 ppb	5°C	10°C	15		20		25	
		1	2	3	5	3	5	5	3	5	3	5	3	5
Phenylpropanoid	CGA	1.2	1.4	1.1	0.9	1.1	1.1	1.0	1.2	1	1.4	1.1	1.5	0.6
	LU	2.7	2.2	2.2	0.8	0.3	0.2	0.7	2.7	1	1.3	2.6	1.4	0.4
Flavonoid	LU7	1.3	0.9	1.0	0.6	1.3	1.8	1.5	1.9	2.8	2.4	3.4	2.4	4.1
Terpenoid	LO	0.8	0.6	1.1	0.9	0.8	0.4	0.8	0.2	0.5	0.4	0.3	0.2	0.8

Middle	UV +LT		O ₃ +LT	UV+O ₃
	20 W m ⁻² +5°C		200 ppb + 5°C	20W m ⁻² +200 ppb
	3	5	3	3
Phenylpropanoid	0.8	0.7	0.8	0.6
Flavonoid	1.0	1.2	2.5	0.7
	1.1	1.7	1.0	1.2
Terpenoid	0.7	0.4	1.1	0.5

注) 有意に増加した場合は赤字、有意に減少した場合は青字で示した

3.2.1.3-6. 人工環境・栽培技術における代謝系遺伝子変動解析を利用した化合物高効率生産技術開発（担当機関：公益財団法人北海道科学技術総合振興センター）

本研究の目的は、人工的に栽培環境ストレスを付与した場合における植物二次代謝系の変動を解析し、その情報を利用することによって、多くの植物種において目的代謝産物生合成の増強を可能とすることである。そこで、栽培環境や栽培方法を変更したときに、主要代謝経路の中でも律速段階・代謝反応分岐点を司るキーエンザイム遺伝子の発現がどのように変動するか解析し、インデックスを作成することとした（図3.2.1.3-6-1）。対象植物種としては、ゲノム情報が公開されており、他機関での共同研究課題において共通に取り扱われている *Nicotiana benthamiana* を用いた。*N. benthamiana* は気温・相対湿度、光強度等を一定に制御可能な人工環境下において水耕栽培した。成長程度を揃えた植物体に対して栽培環境変動・ストレス付与処理を行い、葉や根から抽出した total RNA を材料とした real-time PCR による発現解析や代表的な産物の解析を行った。さらに、*N. benthamiana* で得られたインデックスの実効性を検討するため、薬用植物ジオウにおける実証試験を行った。

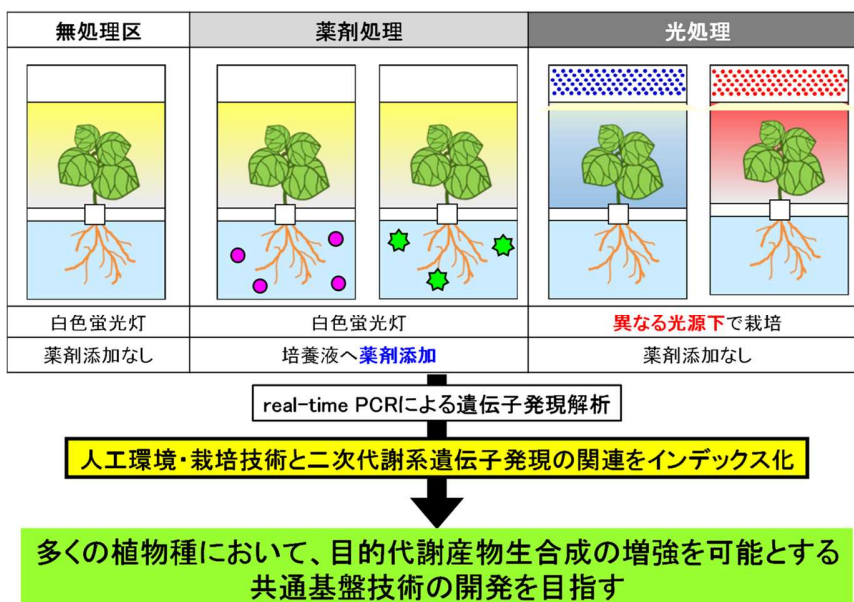


図 3.2.1.3-6 -1 本研究開発テーマの目的

研究開発項目 1. 各種解析系の確立

1-1. 二次代謝経路主要遺伝子の real-time PCR 解析系の確立

・ *N. benthamiana* における二次代謝経路主要遺伝子発現変動解析方法

本課題では、二次代謝経路の中でも律速段階・代謝反応分岐点を司るキーエンザイム遺伝子について real-time PCR 系を確立した。発現解析対象遺伝子は、テルペノ

イド系 16 遺伝子、アルカロイド系 7 遺伝子、フェニルプロパノイド系 6 遺伝子、フラボノイド系 2 遺伝子、アントシアニン系 4 遺伝子の計 35 遺伝子である。

1-2. 代謝産物分析系の確立

本研究では、得られた遺伝子の発現変動結果を基に、目的代謝産物量の増加を誘導するために導き出した処理栽培方法が効果的であることを検証するため、代謝産物の蓄積量が遺伝子発現の結果から期待通りに変動するか確認している。すなわち、real-time PCR で得られた結果をもとに、キーエンザイム遺伝子の mRNA 量の増加に伴って、代謝経路の下流に位置する産物が期待通りに増加するか定量した。定量は LC-MS/MS またはメタボローム解析により行った。

LC-MS/MS の対象とする代謝産物としては、テルペノイド系 7 物質、アルカロイド系 2 物質、フラボノイド系 1 物質について抽出および定量法を確立した。

メタボローム解析では、主要遺伝子の変動が代謝経路の下流に位置するものも含めた二次代謝産物にどのように影響するか調べた。本研究開発で委託した *N. benthamiana* のサンプルにおいては、テルペノイド系 22 物質、アルカロイド系 1 物質、フェニルプロパノイド系 3 物質、フラボノイド系 4 物質の合計 30 種類の代謝産物が検出された。

研究開発項目 2. 薬剤処理栽培方法の開発

・ *N. benthamiana* の栽培方法（遺伝子発現解析用）

遺伝子発現解析の対象とする薬剤処理栽培、光処理栽培ならびに複合処理栽培に共通する処理栽培方法を確立した。

・ 薬剤処理栽培方法の開発

薬剤の処理方法としては、水耕養液に各種の薬剤を添加する処理栽培を行うこととした。薬剤処理栽培で投与する薬剤の候補として、これまでに何らかの二次代謝経路主要遺伝子の mRNA 発現量や二次代謝産物の蓄積量を増加、または減少させることが報告されている薬剤や、二次代謝経路上にある酵素の活性を阻害、または促進するとされる薬剤、全体的な遺伝子発現の活性化や抑制に作用すると考えられる薬剤などを検討した。これらの薬剤の中から、5 ヶ年で計 64 種の薬剤処理栽培を実施した。薬剤処理栽培を行う期間中に、処理した植物体が枯死したり重度の奇形が生じたりするなど致命的な影響が生じない濃度を選定して実施することとした。二次代謝経路主要遺伝子の発現解析の際は、薬剤処理後 1 日目、3 日目のタイミングでサンプリングして real-time PCR を実施した。なお、各タイミングで水耕養液に薬剤を添加しない無処理区からもサンプリングして対照とした。real-time PCR により得られた発現解析結果は、処理後 1 日目、3 日目でサンプリングした無処理区における発現量を 1 とした相対値で評価し、インデックスを作成した。また、二次代謝分析用のサンプルを用いて、これらの遺伝子発現の結果から代謝産物の蓄積量が期待通りに変動するかも確認した。

研究開発項目 3. 光環境調節栽培法の開発

・光処理栽培法の開発

異なる光波長下栽培における代謝系変動解析として、複数の光強度の赤色光、青色光、遠赤色光の LED および暗黒下における *N. benthamiana* 水耕栽培の処理栽培を実施した。

研究開発項目 4. 複合的処理による栽培方法の開発

・複合処理栽培法の開発

複合処理栽培法としては、薬剤処理栽培方法と光環境調節栽培方法を組み合わせたもの、2 種類の薬剤を同時に処理したものを実施した。複合したそれぞれの処理は、これまでに単独で処理し、発現変動データが得られている処理から選定して行った。最終的に 19 種類の複合処理栽培を実施し、二次代謝経路主要遺伝子の発現変動を解析した。

・*N. benthamiana* における二次代謝経路主要遺伝子の発現解析

薬剤処理栽培法と光環境調節栽培法ならびに複合的処理による発現変動データについて、発現解析対象とした 35 遺伝子の発現変動をまとめた。

本研究開発では、64 種類の薬剤処理栽培と 4 種類の光処理栽培、並びに 19 種類の複合処理栽培を実施し、上記の real-time PCR 系によって二次代謝経路主要遺伝子の発現がどのように変動するか解析を行った。

葉で発現している 28 遺伝子と根で発現している 34 遺伝子のそれぞれに分けて、調べた。すなわち、葉で発現している 28 遺伝子に対しては、6 倍から 8091 倍まで発現を促進することができる処理栽培が存在し、0.6 倍から 0.1 倍まで発現を抑制できる処理栽培が存在することが明らかとなった。また、根で発現している 34 遺伝子に対しては、2 倍から 173 倍まで発現を促進することができる処理栽培が存在し、0.5 倍から 0.1 倍まで発現を抑制できる処理栽培が存在することが明らかとなった。

葉で発現している 28 遺伝子について mRNA 発現量を 5 倍以上に増加させる処理栽培方法が 1 つ以上あることが明らかとなった。また、これらの遺伝子において、14 遺伝子については mRNA 発現量を 1/10 以下に減少させる処理栽培法が明らかとなった。さらに残り 14 遺伝子のうち 12 遺伝子については、少なくとも mRNA 発現量を 1/2 ~ 1/10 まで減少させる処理栽培方法が見つかった。

根で発現している 30 遺伝子については mRNA 発現量を 5 倍以上に増加させる処理栽培方法が 1 つ以上あることが明らかとなり、残り 4 遺伝子のうち 2 遺伝子については少なくとも mRNA 発現量を 2~4.9 倍まで増加させる処理栽培が存在したが、2 遺伝子に対しては 2 倍以上に増加させることもできなかった。また、25 遺伝子については mRNA 発現量を 1/10 以下に減少させる処理栽培法が明らかとなった。残り 9 遺伝子については、少なくとも mRNA 発現量を 1/2~1/10 まで減少させる処理栽培法が 2 つ以上存在することが明らかとなった。

・*N. benthamiana* における代謝産物分析

ニコチンは、アスパラギン酸からニコチン酸に至る経路とオルニチンから N-メチルピロリニウムカチオンに至る経路を経て生合成される。本研究開発では、アスパラギン酸からニコチン酸に至る代謝経路を司る酵素 AO、QS、QPT、およびオルニチンからニコチンに至る代謝経路を司る ODC、PMT、MPO、A622 の発現量を real-time PCR で解析した。

薬剤 G で処理すると、根ではこれら全てのアルカロイド系遺伝子の発現量が 4.6～27.3 倍と著しく上昇した。一方葉では、AO、QS、QPT、ODC が 2 倍以上に上昇することはなかった。なお薬剤 G 処理はテルペノイド系、フェニルプロパノイド系、フラボノイド系、アントシアニン系の遺伝子を総じて著しく上昇させることはなかった。

これらの結果と、ニコチンが根で生成されて葉に転流する特徴をもつことから、薬剤 G 処理によってニコチンの生合成量が増加する事が期待された。そこで本試験では、発現解析結果から予測されるようにニコチン含量の増加または減少がみられるか二次代謝産物を LC-MS/MS により定量分析した。薬剤 C 処理では、葉と根でニコチンはむしろ減少していた。一方薬剤 G 処理では、発現解析結果から期待されたように葉でも根でも明らかにニコチン含量が増加していた。これらの結果は、ニコチン生合成に関与するキーエンザイム遺伝子の real-time PCR による mRNA の増減分析結果を反映して、ニコチン量が増減していることを示している。

プトレシンは、ニコチン生合成の中間代謝産物で、ornithine decarboxylase (ODC) によってオルニチンから生成される。ニコチンの他にもスペルミンなどの前駆物質であり、二次代謝経路の上流に位置する植物において重要な中間代謝産物である。

薬剤 G で処理すると、根では ODC の発現量が 14 倍と著しく上昇したが、葉では ODC が 2 倍以上に上昇することはなかった。また、薬剤 C で処理すると、葉では ODC が 14 倍と著しく上昇し、根では数倍程度の発現上昇が見られた。以上の発現解析結果から、根では両薬剤処理によりプトレシンが増加し、葉では薬剤 C 処理のみで増加することが期待された。薬剤 C または薬剤 G 処理とそれぞれの対照の LC-MS/MS による定量した。薬剤 C 処理では、期待通り葉でも根でもプトレシンが増加した。一方薬剤 G 処理では、根では期待通り増加したが、葉ではむしろ減少傾向にあった。

またいくつかのテルペノイド系とフラボノイド系の代謝産物について、メタボローム解析と LC-MSMS 解析で遺伝子の増加に伴って下流の代謝産物の増加が確認できた。

研究開発項目 5. インデックスのデータベース化検討

研究開発項目 2 ならびに 3 の結果は、少なくとも 2 回以上繰り返して実施した処理栽培から得られたサンプルを用いて、二次代謝経路主要遺伝子の発現がどのように変動するか解析したものである。これらのうち、2019 年度までに得られた解析結果について精査したところ、32 種類の薬剤処理栽培法と 4 種類の光処理栽培法においては十分な精度が得られていることを確認できた。十分な精度が得られていることを確認できたデータを選定してクラスター解析を行ったところ、引き起こされる発現変動から各処理をグループ分けすることができた。さらに、2 種類の化合物をベースとしてそれぞれの構造類似体を処理した場合、複数の構造類似体が元の化合物

と同様の発現変動を引き起こすことが明らかとなった。このことから、構造の類似性を基に、その化合物が引き起こす発現変動を推定できる可能性が示された。

研究開発項目 6. 薬用植物を用いたインデックスの実効性検討

本課題では、薬剤処理・光処理した *N. benthamiana* の遺伝子発現変動インデックスを用いた実効性検討を行う。実証モデル植物には薬用植物ジオウを用い、目的の二次代謝産物であるカタルポールが増加すると期待される処理栽培を選定する。選定した処理条件でジオウの水耕栽培を行い、カタルポール含量が最終目標である対照区の 5 倍以上になるかを検証した。

カタルポールは、凍結乾燥葉からメタノールで抽出し、LC-MS/MS により定量分析した。その結果、カタルポール含量は、5 種の処理区で無処理区 (Cont.) との有意な差があり、最も高かった薬剤 A 処理ではおよそ 3 倍だった。さらに、処理日数を 3 日から 10 日に延ばし、白色蛍光灯の光強度を 80 から 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に強くした (強光) 条件下で、薬剤 A 処理を行ったところ、カタルポール含量は Cont. に対しておよそ 10 倍まで増加した。以上より、*N. benthamiana* で解析したインデックスから選定した処理によって、薬用植物のジオウにおけるカタルポール含量を 10 倍程度まで増加させることが可能であり、インデックスの有効性を示すことが出来た。今後、本研究開発の成果であるインデックスを用い、異なる植物種や目的成分の増加例を増やしていくことが求められる。

【テーマ間連携に向けた取り組み】

●本テーマで開発された技術の融合（遺伝子制御と環境制御の融合）

本研究は、代謝系遺伝子発現制御技術（研究開発項目①-（2）：以下、遺伝子制御）および栽培・生育環境による発現制御技術（研究開発項目①-（3）：以下、環境制御）を併用することにより、目的代謝産物量を大幅に増加可能か検討するため実施した。

これまでの研究により、*N. benthamiana* のテルペノイド生合成系に関連する多くの遺伝子が、特定の薬剤処理によりその発現が変動することが明らかとなった。そこで、テルペノイド生合成系に含まれる 2,3-オキシドスクアレンをモデル物質として、その葉中の蓄積量を増加させることが可能か、以下の手法を併用することで検討した。

- ・【遺伝子制御】環境制御と同時に 2,3-オキシドスクアレンをシクロアルテノールに代謝する *CAS1* 遺伝子の発現を、*CAS1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化誘導により抑制し、2,3-オキシドスクアレンの代謝を抑制することで、その蓄積量増加を試みる。
- ・【環境制御】薬剤添加により 2,3-オキシドスクアレン合成ステップより上流のテルペノイド生合成系遺伝子の発現量を増加させることで、2,3-オキシドスクアレン合成量増加を試みる。

まず、2,3-オキシドスクアレン生合成経路を活性化させる薬剤処理を、これまでに作成したインデックスより選定した複数の薬剤を用いて *N. benthamiana* の薬剤処理試験を実施し、テルペノイド生合成系遺伝子の発現変動を qRT-PCR により解析した。その結果、アブシジン酸 (ABA)、プロヘキサジオン Ca、サーチノールで処理した *N. benthamiana* において、2,3-オキシドスクアレン合成ステップより上流のテルペノイド合成系遺伝子の発現が増加する傾向が認められた。一方、*CAS1* 遺伝子の遺伝子制御を実施するため、*CAS1* 遺伝子のプロモーター領域に対する DNA メチル化 inducer を導入した CMV ベクターを作製し、*CAS1b* 遺伝子の DNA メチル化誘導による遺伝子発現抑制 (TGS の誘導) を試みた。加えて、*N. benthamiana* では *CAS1a* 遺伝子も存在することから、TRV ベクターを用いた転写後遺伝子サイレンシング (PTGS の誘導) により *CAS1a* 遺伝子の発現抑制も同時に行うこととした。

試験においてはまず環境制御のためアブシジン酸 (ABA)、プロヘキサジオン Ca、サーチノールの 3 薬剤をそれぞれ *N. benthamiana* 水耕栽培溶液に添加した後、ウイルスベクター接種により *CAS1* 遺伝子の発現抑制を試みた。ウイルス接種 14 日後の植物体における標的 DNA 配列に対する DNA メチル化状況をバイサルファイトシーケンス法により解析した結果、すべてのウイルスベクター接種個体において標的 DNA 配列における DNA メチル化率の増加が認められた (図 1)。また、いずれの薬剤処理区においても 2,3-オキシドスクアレン合成ステップ上流の遺伝子の発現増加と、TGS 誘導を行った *CAS1* 遺伝子の発現の顕著な減少が認められた。

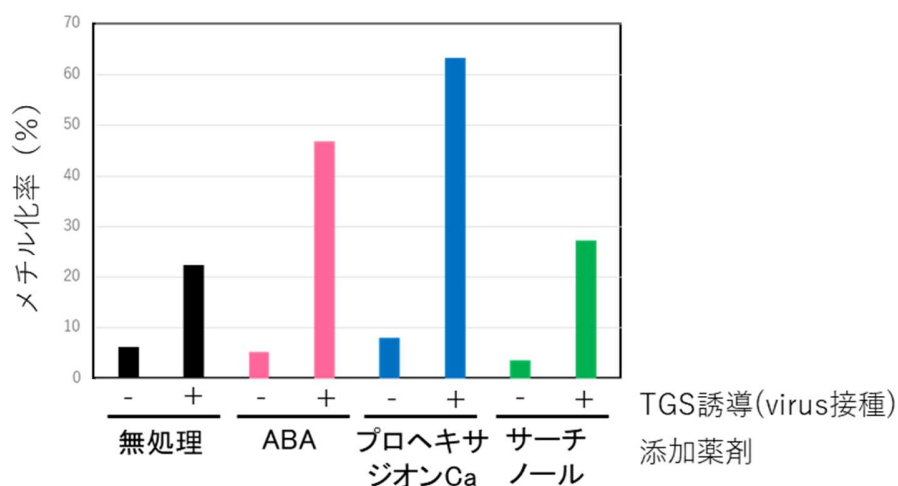


図 1. ウイルスベクター接種後 14 日目における *CAS1b* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化解析結果

3 種類の薬剤を *N. benthamiana* に添加した後、CMV ベクターから *CAS1b* 遺伝子の TGS inducer を発現させ、TRV ベクターから *CAS1a* 発現抑制 inducer (PTGS 誘導) を同時に供給した。接種 14 日後の *CAS1b* 遺伝子プロモーター領域 (Transcription start site 近傍) をバイサルファイトシーケンス解析した。

これらの植物体葉中の 2,3-オキシドスクワレンの蓄積量を、GC/MS により解析した。その結果、薬剤処理単独では、2,3-オキシドスクワレンは検出限界以下の蓄積量であったのに対し、遺伝子制御と薬剤処理を併用した植物体では、2,3-オキシドスクワレンの蓄積量の顕著な増加が認められた (表 1)。特に、ウイルスベクター接種による遺伝子制御を行った ABA 処理区では、薬剤無処理区と比較して約 4 倍の 2,3-オキシドスクワレンが検出された (表 1)。薬剤処理単独では 2,3-オキシドスクワレン合成ステップより上流の遺伝子発現が上昇しているにも関わらず、2,3-オキシドスクワレンの蓄積増加が認められなかった。これは 2,3-オキシドスクワレンが速やかに代謝されたためだと推測される。しかし、遺伝子操作で、2,3-オキシドスクワレンを代謝する遺伝子を抑制することで、2,3-オキシドスクワレンの代謝が抑制され、薬剤処理による相乗効果が確認出来た。すなわち、遺伝子制御と環境制御の融合により、各単独の技術よりも相乗効果が期待できることが示された。

表 1. 遺伝子制御と環境制御の融合による 2,3-オキシドスクアレン含量の変動

試験区		2,3-オキシド スクワレン ピーク面積	相対値 (/遺伝子制御)
遺伝子制御	環境制御		
未接種葉 (Healthy)	無処理	0	-
	ABA	0	-
	プロヘキサジオンCa	0	-
	サーチノール	0	-
TGS+PTGS	無処理	163,636	1.0
	ABA	652,057	4.0
	プロヘキサジオンCa	198,320	1.2
	サーチノール	220,371	1.3

(9) 成果の普及

研究項目	年度	論文		その他外部発表			
		査読付き	その他	国内学会発表/ 講演	国際学会発表/ 講演	プレス発表	その他
(2) 代謝系遺伝子 発現制御技術の研究 開発	2016-2020	8	2	60	15	0	15
	2021	2	0	2	0	0	0
(3) 栽培・生育環 境による発現制御技 術の研究開発	2016-2020	4	0	6	7	1	12

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

実施機関名	年度	特許出願			ノウハウ化
		国内	外国	PCT出願	
(2) 代謝系遺伝子 発現制御技術の研究 開発	2016-2020	6 (共同出願含む)	1	3 (共同出願含む)	1 (共同)
(3) 栽培・生育環 境による発現制御技 術の研究開発	2016-2020	0 ※	0 ※	0 ※	5 (共同含む)

()内は予定

※知的財産等に関する戦略

本研究開発により得られる成果は、人工環境・栽培技術によって発現変動する遺伝子リスト、ならびに増加する二次代謝産物の候補である。これらの情報は特許で公開されると容易に乱用されやすいため、詳細情報を秘匿してノウハウ化する。

(1 1) 成果の実用化に向けた戦略

本技術開発の実用化への取り組みについては、所属機関の知財ポリシーに従い、取得した特許をもとに技術のライセンス契約を主眼に実施される。従って、基本的には本研究で開発した技術について世界スタンダードとなる特許の取得を目指すとともに、技術およびノウハウを代謝関連遺伝子に限らず、遺伝子組換え技術を活用した植物バイオテクノロジーの実用化を目指す企業等に広く提供する。

また、横浜国立大学で取り組んでいる、新規にスクリーニングされた化合物等においては、特許取得後に大学または大学発ベンチャー企業等（横浜バイオテクノロジー株式会社または新規設立会社）を通じて、有体物供与、ライセンス契約、受託生産、ノウハウ提供、受託研究等により提供し、当該企業等の生産性効率化に貢献しており、今後も継続していく。

栽培環境関係課題については、環境変動による遺伝子変動情報自体を特許等で公開した場合、容易にその情報だけを利用され、特許侵害を証明することも困難と予想されるため、特許取得の戦略は執らず、ノウハウ化を行った。基本戦略として、インデックスの有用性を示す実験的な成果のみを公表し、本成果情報に興味を有する企業との秘密保持もしくは共同研究契約後に、情報もしくは実施に必要な技術を供与することで実用化を図る。成果概略情報の対外的発信や利用先企業の探索には、北海道科学技術総合振興センターのネットワーク活動や学会、シンポジウム、講演会なども活用していく。各企業への技術供与の結果、ある特定目的化合物の増産や事業化の目処が成立した段階で、個別に特許出願していく。

(1 2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

本技術を積極的に使用してもらえるように、特許・ノウハウ技術のフォロー・強化に努め、学会発表はもとより、企業への技術紹介に関わるチャンスやルートも活用して、特許等の宣伝を積極的に行い、国内外の企業にライセンス契約による実用化を引き続き働きかけていく。場合によっては、企業との個別共同研究等を立ち上げることによって、事業化への取り組みを開始する。また、大学発ベンチャー企業として活動を始めている横浜バイオテクノロジー株式会社を通じた技術提供・受託研究等についても有効に活用する（横浜国立大学）。また、北海道科学技術総合振興センターにおいては、様々な企業の事業支援や研究開発支援を実施するクラスター事業部・研究開発支援部・産学連携支援部がある。これらの部署と連携して、成果概略情報の対外的発信や企業との情報交換等を行う、もしくは、北海道科学技術総合振興センターが有する事業化の支援体制などを活用していく。

(1 3) 成果の実用化の見通し

本実施課題は、既に本プロジェクト成果の進捗において、プロジェクト内外の企業において、コンタクトが執られつつある。

今後、プロジェクトの進行に伴い成熟化していく技術・情報においても積極的に学会等およびマッチングイベントへ参加し、当該開発技術を広く周知する。

例えば、奈良先端科学技術大学院大学においては、すでに複数の学会等に参加し情報発信を行うことで、これまでに試料移転契約を4件、共同研究契約を17件（年度契約のべ数）締結している。また、横浜国立大学においては、発光レポーターを用いた技術サービスに関しては既に一部は提供開始しており、共同研究・受託研究は7件が進行中である（横浜バイオテクノロジー株式会社を通じた案件2件を含む）。

上記のような、特許化、ライセンスによる実用化戦略において、産総研、奈良先端科学技術大学院大学、横浜国大等においては、過去の研究成果において実際に実用化へ向けた取り組みを実施してきた経緯も有する。

また、産総研においては、開発した技術成果を基に、世界初となる遺伝子組換え植物を利用した医薬品製造に関して、共同研究先企業において事業化に成功した実績も有し、これらの経験も生かせることから、開発技術の実用化は期待できる。

一方、ノウハウ化による実用化を目指す課題においては、個々の詳細情報は秘匿するものの、何が、どういうことが当該インデックスで実現できるかの実証例を学会、一般公開シンポジウム等で広く周知することに加え、実用化するのに特段の施設設備や技術等が不要なことから、普及化のハードルは高くないと想定している。

3.2.2 研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」【助成】

3.2.2.1 高機能組換え植物組織培養によるビタミン D3 高効率生産技術の開発

(株式会社竹中工務店、キリンホールディングス株式会社、神戸天然物化学株式会社)

(1)背景と目的

ビタミン D₃ (以後、VD₃ と表記) は脂溶性ビタミンの一種であり、食物からの摂取または体内で合成された後、肝臓および腎臓で代謝され、活性型ビタミン VD₃ (以後、活性型 VD₃ と表記) へ変換される。活性型 VD₃ は動物体内において主にカルシウムやリン等の吸収調節に関わっており、不足することにより骨軟化症や骨粗鬆症の原因の一つになる。近年高齢化社会へと進むにしたがい、健康寿命の観点から骨粗鬆症等が特に問題視されている。活性型 VD₃ はこれら骨粗鬆症の治療薬として有効である。

現在、これらの活性型 VD₃ は化学合成によって市場に供給されている。それと並行して、植物の研究により活性型 VD₃ および VD₃ が植物にも存在することが報告されている。しかしながら、植物体中の VD₃ 関連化合物の含有量は数～数十 ng/gFW レベルと極めて低く、その利用は困難であった。しかし近年、植物分野における遺伝子組換え技術、ゲノム編集技術および培養技術等が著しく発展し、植物細胞が持つ物質生産能力を最大限に引き出したスマートセルの構築が可能になりつつある。

そこで本開発では、次の二点を目的とした。

- 1)ゲノム編集、外来遺伝子等の導入を行った形質転換植物の作製、ならびに生育環境制御を行うことによる VD₃ および活性型 VD₃ 含有量向上技術の確立
- 2)植物の袋培養等をもちいた大量栽培技術の開発と抽出・精製技術の構築による、VD₃ 関連化合物の事業化に向けた基盤技術の確立

(2)位置づけ、目標値

市場調査資料によると、2020年度のVD₃関連製品(医薬品、食品添加物および飼料添加物)市場は3000億円に達するものと推定されている。そのうち活性型VD₃市場規模は、2009年の420億円に対して2014年には600億円へ拡大しており、年率7%の成長を示している。VD₃は世界人口の大半が摂取不足とされており、VD₃関連商品の今後の需要拡大が期待できる。現在、VD₃関連商品は主として化学合成によって供給されており、需要拡大に対応する代替供給源として、形質転換植物の利用が期待されている。

そこで、VD₃関連化合物の事業化に向けた基盤技術を確立することにより、形質転換植物を供給源とした活性型VD₃販売価格が、既製品である化学合成品と同等価格帯を達成する見込みをたてることを目標とした。

(3)全体計画

基礎的な形質転換植物の作製および培養・抽出の研究開発を本事業期間に行ったのち、順次作製した形質転換植物のさらなる改良、大量培養や工業スケールでの抽出・精製プロセスの検討および形質転換植物の導入遺伝子の発現安定性などを検討していく事業化準備期間へ移行する計画とした。

2018 年度の中間評価では、植物体作出に関する研究開発推進、および最新薬価を参照した事業性評価の随時実施について指摘を受けた。これを受けて植物体作出フローの作成と担当する機関の役割分担調整を行い研究開発のスピードアップを図った。また、年度ごとに最新の薬価を参照し、事業性評価を行うことで、事業化に向けた取組みを推進した。

(4) 実施体制

スマートセル作出から生産プロセス構築までに開発が必要な技術を抽出した。民間企業 3 社と大学機関 4 者の計 7 機関で共同開発体制を構築し、各要素技術ごとに専門とする機関が主担当として研究開発を進めた。研究開発成果は最終的に一つの生産プロセスに集約することが重要である。そこで民間企業 3 社で事業化検討グループを構成し、事業化の観点から定期的な研究開発成果の評価を行うとともに、成果統合に向けたスケジュール調整などを実施して事業を推進した。

(5) 運営管理

プロジェクト全体は、大きく 4 つの方針で運営を行った。

1. 研究開発重点討議のための全体会議開催 (年 2 回)
2. 研究開発に関係する外部有識者を招いた勉強会実施 (年 1~2 回)
3. 関係者メーリングリストによる日常的な情報共有 (適宜)
4. 開発技術知財化に向けた大学-企業間の知財取得体制構築 (研究進捗に応じて適宜)

以上の取り組みに加え、民間企業 3 社間での事業化に向けた打合せの実施や、NEDO 事務局の PL 巡回による研究開発指導を受審することで、研究開発推進を図った。

(6) 実施の効果

本研究開発は、1) 数多くの研究プロジェクトの中で培われたゲノム編集・遺伝子組換え技術を軸とした高機能植物組織開発、2) 生産効率を高めて事業展開を行った実績を持つ袋型培養槽を用いた大量組織培養法の適用、3) 省エネルギー施設環境制御実績を応用した代謝促進環境制御法の導入、以上 3 つの独自技術を組み合わせることで、植物組織の有用物質生産機能を最大限に引き出そうとするものである。これまで異なる分野で発展してきた各技術を、本プロジェクトを契機に統合し、培われてきた技術の相乗効果により、産業としての展開、成果・知的財産の創出を実現させる。

(7) 最終目標の達成度

最終目標として以下の 2 つを設定した。

- 1) 競合となる化学合成による活性型 VD3 中間体販売価格と同程度の販売価格見込みの獲得
- 2) 植物由来活性型 VD3 中間体販売事業の将来事業性向上を可能にする植物資源探査

1) の販売価格見込みについては、ゲノム編集により VD3 前駆体増産形質転換植物体の作製に成功し、また生産プロセスコストに関わる植物培養コストなどの大幅なコスト低減にも成功して、植物由来活性型 VD3 中間体販売事業の基盤づくりができた。一方で、ゲノム編集を適用した植物体生長速度に課題が残り、今後さらなる植物体改良の検討が必要であることが明らかになった。この課題を解決できれば、目標とする販売価格達成見込みがあることを、想定事業規模から計画

した事業施設計画などにに基づき確認した。植物生長速度に関する課題は、今後の研究開発で解決する予定としている。

2) 将来事業性向上に向けた植物探査では、植物由来 VD3 生産事業に資すると考えられる植物種や遺伝資源について探査を進めることができた。当初目標を達成し、事業性向上に向け得られた知見を活用する予定である。

以上のように、ゲノム編集による植物作出で、目標通り VD3 前駆体が高含有される植物体が作出できた。また生産プロセス改良や将来の事業性向上に資する知見蓄積を進めることができた。その一方で、作出された植物生長速度において想定外の課題が見つかった。植物生長速度の課題が解決できれば、プロジェクト申請時に設定した最終目標である植物由来活性型 VD3 中間体販売事業成立の見通しを得られると考えた。事業実現に向けた作出植物体の課題解決に今後取り組む予定である。

(8) 研究開発成果の意義

VD3 関連化合物の蓄積報告があり、かつ遺伝子等の配列情報の整備がされている植物を供試植物に選定し、①形質転換植物の作製、②環境制御の検討、③開発対象植物の袋培養法の検討、④VD3 関連成分の抽出・精製法の検討、の4課題について研究開発を行った。

①形質転換植物の作製

VD3 前駆体までの上流代謝フラックス増強、不要代謝経路の遮断、VD3 高蓄積のための植物体の脂質蓄積能増強および活性型 VD3 生合成関連遺伝子の導入した各形質転換植物組織を作製した。

上流代謝フラックス増強に関する研究開発では、イソプレノイド代謝上流の調節および植物ステロール分岐に関わる各酵素をターゲットとして外来酵素遺伝子を導入した形質転換植物を得た。なかでも内在遺伝子の過剰発現による転写後抑制のリスク低減のため、供試植物とは系統分類上遠縁な植物から当該酵素と同様の機能を持つ遺伝子を発見することができた。これは学術的なインパクトのある発見にとどまらず、今後の酵素活性増強につながる有益な情報になりえる。

また、ゲノム編集技術を利用し、不要代謝経路の遮断を行った形質転換植物組織では、野生種に比べて VD3 前駆体の含有量が飛躍的に向上したことが確認できた。さらに同様の技術を利用して、脂質蓄積能増強を確認した。これに加えて、化学処理による脂質蓄積能増強についても知見が得られた。活性型 VD3 生合成に関する形質転換植物の作製では、微生物由来の活性型 VD3 生合成関連酵素遺伝子を導入し植物体内での機能発現を確認することに成功した。

以上により、植物由来活性型 VD3 生産植物作出にむけた技術基盤を構築することができた。

②環境制御の検討

モンテカルロ法レイトレーシングに基づき光環境制御時の袋内植物組織密度や照明照射方向など最適な袋型培養槽光照射条件を検証するシミュレーションプログラムを開発した。並行して、実際の植物への照射条件の予備検討を進めた。VD3 前駆体高蓄積形質転換植物組織に光環境制御を適用したところ、植物体内における VD3 への変換が確認できた。今後、詳細な光環境条件を検討していく。

③開発対象植物の袋培養法の検討

独自の植物組織高密度生産技術である袋培養法を改良することによって供試植物の培養を実証できた。これは従来の植物工場における土耕・水耕生産手法とは異なる手法で、ロット単位で無菌の植物体を生産・管理できる新たな植物生産手法の一形態として発展が期待できる。さらに、低コストの増殖に向け、より安価な資材/設備を用い、スペースを有効活用した増殖システムの検討も開始し、大幅な設備簡素化および培養コスト低減の見込みを得た。

④VD3 関連成分の抽出・精製法の検討

野生種の植物体には VD3 関連化合物が微量にしか存在しないため、最初に ng オーダーの微量定量分析法の開発を行った。次に VD3 関連化合物の標準品を用いた植物試料への添加回収試験を行い、抽出精製の基礎的知見を得た。得られた知見をもとに植物体からの VD3 関連化合物の抽出精製に成功し、事業化に向けた基本的な抽出精製プロトコルを作成することができた。

以上、植物体作出から生産プロセスに至るまでの 4 課題、それぞれの分野で成果が得られた。本成果は VD3 スマートセルインダストリー事業実施に向けた基盤技術となる。

(9) 成果の普及

これまでに行った成果普及活動の集計を表 3.2.2.1-1 に示す。また、2021 年度に 3 件の論文投稿を予定している。

表 3.2.2.1-1 成果普及活動集計

年度	論文		その他外部発表				受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他(プレスリリース他)	
2016～2018	0	0	3	3	1	1	0
2019	0	0	1	0	0	0	0
2020	0	0	1	0	1	0	0
準備中	3	0	0	0	0	0	0
PJ 期間合計	0	0	5	3	2	1	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

開発で得られた成果については、開発技術の内容にしたがい知財化またはノウハウ化を検討し、知財化できるものについては担当の大学および企業で権利化を順次行っている。これにより事業の基盤となる植物体作出に関わる技術および生産プロセスに関わる技術の特許を出願し、事業実施に向けた基盤を構築することができた。

表 3.2.2.1-2 特許出願実績（出願準備中含む）

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2016～2018	2	0	1
2019	2	0	0
2020	0	0	1
出願準備中	2	0	0
PJ 期間 合計	6	0	2

(11) 成果の事業化に向けた戦略

【市場動向】

VD3 関連の世界市場規模は約 3000 億円と推定されている（株式会社グローバルインフォメーションプレスリリース “ビタミン D の世界市場動向・予測 2020 年：機能性飲食品・医薬品・飼料&ペットフード・パーソナルケア調査レポートの販売開始”）。なかでも活性型 VD3 は、生体カルシウム・リン代謝を調節する成分として骨粗鬆症、運動機能低下の予防・治療、慢性腎不全、副甲状腺機能低下症などへの原薬として市場がある。活性型 VD3 関連製剤の 2021 年の世界市場は約 600 億円（QYR Pharma & Health Research Center “Global Calcitriol Market Research Report 2016”）と予想され、高齢化社会へ向けた市場の拡大が期待される。

【研究成果概略及びそれを活用した事業体制例】

今後の研究開発成果及び製品群等を踏まえた事業形態の具体化過程において、個々の製品における投資・収益からみた費用対効果、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）やクライアントとなる企業との協議やニーズの中で事業体制や事業化の可能性を評価していく。

(12) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

【事業化ステップ】

今後の研究開発の進行を鑑みて、成果に基づく研究開発の継続・事業化への可能性の判断を行う予定である。本研究開発に参加している民間企業による事業化の推進決定がなされた後は、事業化に向けた各社の役割と具体的な対応に関する体制を整える。

(13) 成果の事業化の見通し

【競合製品との比較・競争力の確保】

製品候補の一例として現在市販されている活性型 VD3 製剤の薬価（2020 年度薬価 6.7 円/0.25 μ g、約 2,680 万円/g）を参考として開発製品の目標販売価格を設定し、価格競争力が確保できるように研究開発および事業体制構築を推進する。

【波及効果】

本事業は、ゲノム編集などによる“多段の代謝改変を行ったスマートセル開発”と、高密度植物組織培養や高効率抽出精製を中心とした“生産プロセス構築”という、今後の植物スマートセルを活用した高機能物質生産事業の二本柱とし研究開発を並行して進めている。

これらの研究開発で得られた知見は、本事業の目標物質である活性型 VD3 の生産事業だけでなく、ほかの植物スマートセル高機能物質生産事業にも展開できる基礎技術となることが期待できる。目標達成に向けた研究開発を進めると同時に、基盤技術関係の知財化やノウハウ集積を図ることで、スマートセルインダストリー構想の推進に寄与することを目指す。

3.2.2.2 医薬品中間体原料植物の代謝変換によるアルカロイド製造技術の開発（味の素株式会社）

(1) 背景と目的

本研究開発においては、多くの生理活性物質を含むモノテルペンインドールアルカロイド（MIA）の生産プラットフォームとして、キョウチクトウ科に分類されるニチニチソウを定め、MIA 原体製造のための高品質な植物原料を安定的、かつ持続的に製造するための技術開発を目指す。ニチニチソウには、およそ 60 年前に見いだされ、現在もホジキン病などの悪性リンパ腫の治療に使用されるビンカアルカロイドが含まれる。ビンカアルカロイドは、化学構造的には MIA に分類され、その生合成経路については、多くの知見が集積している（図 3.2.2.2-1）。本プロジェクトにおいては、このような基礎知見を活用し、ビンカアルカロイドの生合成にかかる代謝経路を改変する技術開発を行い、ビンカアルカロイドそのもの、および、その生合成中間体に由来する特定の MIA をニチニチソウに蓄積させることを目指す。さらに、比較的小型の植物であるニチニチソウを人工光型植物工場で有効に栽培生産することも可能とし、これらを組み合わせることで、目的 MIA の安定的で持続的な原料供給のため技術パッケージの開発を目的とする。

【ニチニチソウのビンカアルカロイド生合成経路】

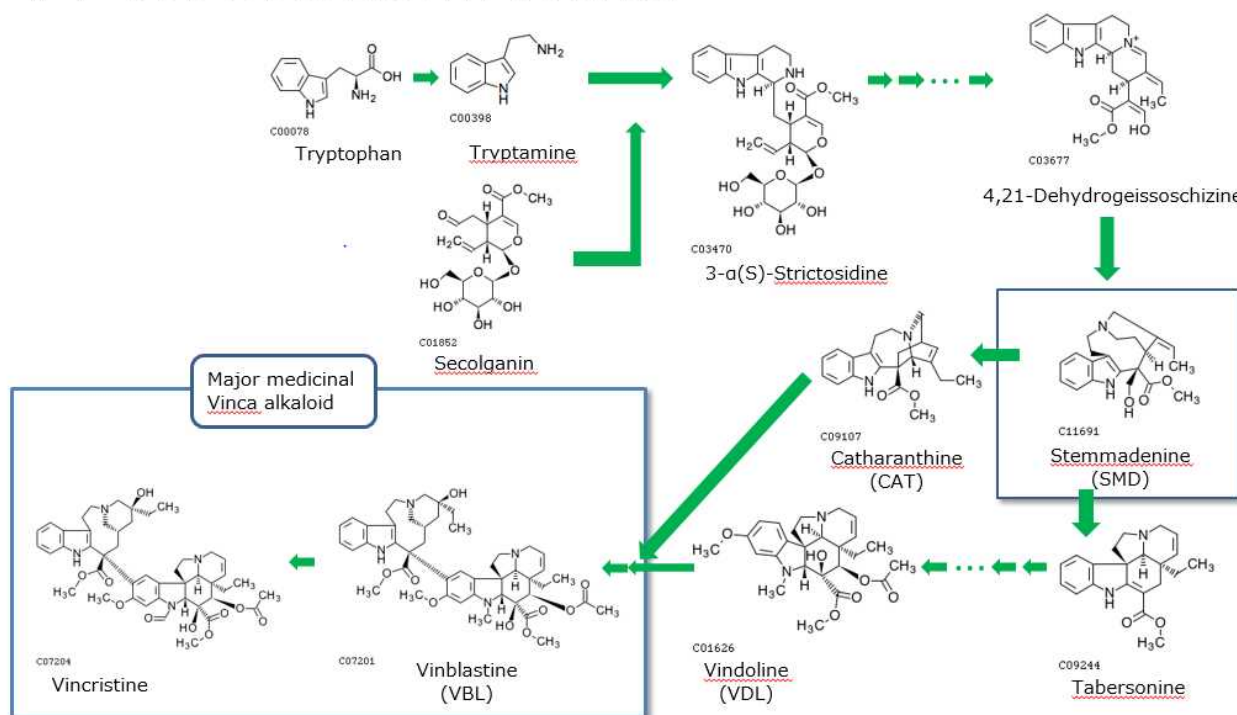


図 3.2.2.2-1 ニチニチソウのビンカアルカロイド生合成経路の概略

(2) 位置づけ、目標値

上記を実現するための技術戦略は、ニチニチソウのビンカアルカロイド合成の代謝フラックスを増大させ、合成量のキャパシティを増加させることを、プロジェクトの前半（2016 年度～

2018 年度) に実現し、さらに、プロジェクトの後半 (2019 年度～2020 年度) に、そのようなバックグラウンドを有するニチニチソウにゲノム編集技術を応用し、特定の代謝中間体化合物の蓄積が可能であることを示す。また、合わせて、当該ニチニチソウの人工光型植物工場での栽培技術を確立し、安定的持続的な植物生産技術の開発も行う。

(3) 全体計画

上述のとおり、中間目標においては、ビンカアルカロイド生合成系への代謝フラックスを増大させる遺伝子を特定し、それらの遺伝子が導入されたニチニチソウの形質転換体を作成することが目標である。特に、ニチニチソウの形質転換系は、再現性のある系の報告もなく、中間目標までに、最も困難なチャレンジとなる。さらに、当該形質転換体を人工光型植物工場で、栽培評価を行い、制御された環境でのアルカロイド蓄積量の評価、及び、そのパフォーマンスの安定性の評価を行う。

最終目標においては、代謝フラックスが増加したニチニチソウの作出を目指しつつ、当該植物にゲノム編集を行い、特定の代謝中間体化合物を高蓄積化するための技術開発を目指す。また、中間評価の結果を受け、ニチニチソウの一過性発現系を利用することによるスピーディー化及び、研究開発の精度やコスト試算の精度をより高めることに留意し、事業化を念頭に置きながら研究開発を推進する。

(4) 実施体制

事業実施にあたっては、以下の体制を構築した (図 3.2.2.2-2 括弧内は実施年度)。共同研究先の京大生存圏研究所とは、遺伝子発現分析、および、輸送体遺伝子の単離、千葉大学環境健康フィールド科学センターとは、ニチニチソウの形質転換系の開発、玉川大学とは、ニチニチソウの人工光型植物工場での栽培技術の開発、徳島大学とは、植物ゲノム編集技術を用いたニチニチソウのアルカロイド代謝改変、北海道科学技術総合振興センターとは、人工光型植物工場を利用したニチニチソウのスケールアップ栽培、の各テーマを分担し実施した。

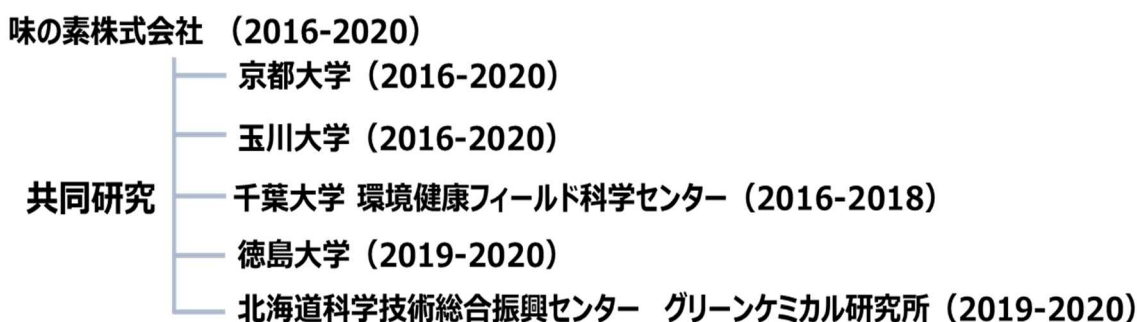


図 3.2.2.2-2 実施体制図.

(5) 運営管理

テーマ運営については、年に一度、主に上半期において、サブプロジェクトリーダーが研究現場に出向き、ヒアリングという形式で、テーマ進捗を報告し、技術的な課題について議論助言をいただく場を設けた。また、年に一度、主に下半期において、外部有識者による技術推進委員会

が開催され、テーマの進捗、及び、課題へのアプローチ法、さらに、実用化の見通しとその課題等への議論と助言をいただく場が設けられた。

研究グループ間の連携は、上述のヒアリング、あるいは技術推進委員会の内容をレビューする目的でのミーティングを開催した。また、テーマ代表者は、半期に一度の頻度（必要があれば、さらに多くの頻度で）で、共同研究先を訪問し、又はオンラインミーティングを開催し、個別に研究進捗、結果、方針などについて議論を行った。また、大きな進捗、あるいは、外部からの情報が得られた際は、電子メール等での情報共有を遅滞なく行った。

(6) 実施の効果

本プロジェクトの経費は、5年間の助成金を含めて3.7億円となる。一方、例えば、先述の悪性白血病等の治療に用いられるビンカアルカロイドであるビンブラスチン、ビンクリスチン等の世界市場は、年間200-300億円となる。

(7) 最終目標の達成度

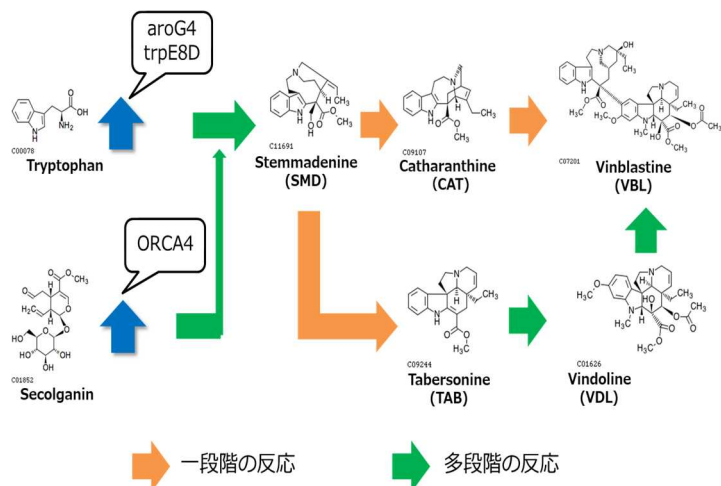
ビンカアルカロイド生合成を強化する遺伝子の特定、ニチニチソウの形質転換系の確立、及び、ニチニチソウの人工光型植物工場栽培条件の改良による目標バイオマス量の達成、ゲノム編集個体の作製等、概ね目標は達成された。

(8) 研究開発成果の意義

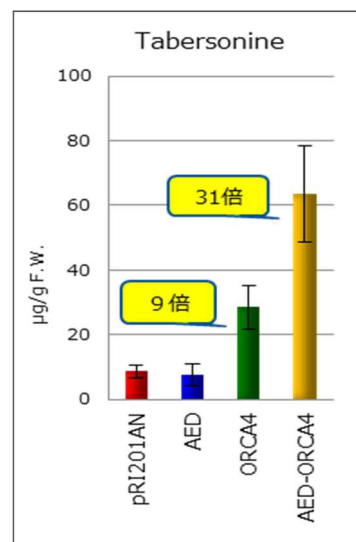
本プロジェクトでは、医薬原料となるアルカロイドの安定・安全（高品質）、及び、持続的な製造を実現するための手段として、ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) のビンカアルカロイド生合成経路のゲノム編集を含む遺伝的な改変を加え、さらに改変したニチニチソウを人工光型植物工場で栽培する技術パッケージの開発を目指すことである。

1) 代謝フラックス増大遺伝子の探索・特定（味の素株式会社、京都大学、徳島大学）

ビンカアルカロイド生合成の前駆体の1つであるトリプトファンへのフラックスを増大させることを目的に、トリプトファンへのフィードバック阻害が解除された 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase (aroG4)、anthranilate synthase (trpE8D)、イソプレノイド代謝系増大を目的にアルカロイドの転写制御因子である ORCA ファミリー遺伝子、geraniol-10-hydroxylase (G10H)、secologanin synthase (SLS) さらに、ビンカアルカロイド代謝系強化のために、strictosidine synthase (STR)、strictosidine β -D-glucosidase (SDG) 等を候補遺伝子として選定した。これらの遺伝子を短期間で評価するために、独自にニチニチソウの一過性発現方法を確立し、上記遺伝子を単独または組合せにて一過性発現させた場合の Catharanthine、Tabersonine、Vindoline、Ajmalicine、Secologanin 及び Tryptophan 含量に対する影響について分析を行った。その結果、トリプトファン代謝系強化遺伝子 (aroG4, trpE8D を連結した AED 遺伝子群) とアルカロイドの転写制御因子 ORCA4 遺伝子を、一過性発現技術を用いてニチニチソウに共発現させた場合 (図 3.2.2.2-3A)、Tabersonine 含量が顕著 (31 倍) に増加することが分かった (図 3.2.2.2-3B)。植物個体中のビンカアルカロイド含量を顕著に増加させることができた例はこれまでになく、世界初の成果である。



(A)



(B)

図 3.2.2-3 ニチニチソウの一過性発現系を用いた、AED-ORCA4 遺伝子の機能評価

(A) ニチニチソウのビンカアルカロイド代謝系（簡略化）。aroG4、trpE8D 及び ORCA4 遺伝子の発現を強化

(B) 一過性発現による Tabersonine 含量の変動。AED: aroG4, trpE8D 遺伝子の連結体。AED-ORCA4: AED 遺伝子群と ORCA4 遺伝子の連結体

2) ニチニチソウ組織培養による個体再生系と形質転換系の確立（味の素株式会社、千葉大学）

ニチニチソウの形質転換に関する報告は、これまでに数件存在する。初めに、6 種類（園芸種）のニチニチソウを用いて、論文と同様な培地組成や手順に従い、形質転換ニチニチソウの作出を試みた。再生植物は全く得られず、再現できなかった。そこで、独自に 6 種類（園芸種）のニチニチソウの種子を用いて、播種後 10 日目の実生の子葉からの再分化条件の検討を行った。植物ホルモンの種類や濃度の検討を行った結果、最終的には、ガンボーク培地を半分に薄めた 1/2 B5 培地に植物ホルモンを添加しない培地において、パシフィカ XP 及びタイタンの子葉からの shoot の再分化が確認できるようになった。タイタンは F1 種子を使用していることから、固定種であるパシフィカ XP に絞って、アグロバクテリウムの感染及び選抜方法の検討を行った。タバコの形質転換体作出等で用いられている 300mg/l カルベニシリンを用いてアグロバクテリウムの除菌を行うと、ニチニチソウの子葉が直ぐに褐変し、アグロバクテリウムの増殖を抑えることができなかった。このため、アグロバクテリウムの種類や除菌のための抗生物質の種類、濃度等の検討を行った結果、*Agrobacterium rhizogenes* A13 系統を用い、また、20 mg/l メロペネムを用いて除菌を行った場合に、アグロバクテリウムの増殖や組織の褐変が抑制され、長期培養が可能であることが分かった。そこで、カナマイシン耐性を有する pRI201-AN ベクターに GFP 遺伝子を挿入し、これを *Agrobacterium rhizogenes* A13 に形質転換を行い、パシフィカ XP の子葉に感染させた。感染後、50 mg/l カナマイシン及び 20 mg/l メロペネムを含む培地で選抜と除菌を繰り返して長期間の培養を行った。その結果、初めに、子葉の切り口部分にカルスが形成され、その後、そのカルス付近から根の再生が認められた。さらに、選抜と培養を繰り返すことで、カルス部分から shoot が再生してくることが確認できた。また、培養条件の最適化を行うことで、より高効率なニチニチソウの形質転換系を確立することができた（図 3.2.2.2-4）。

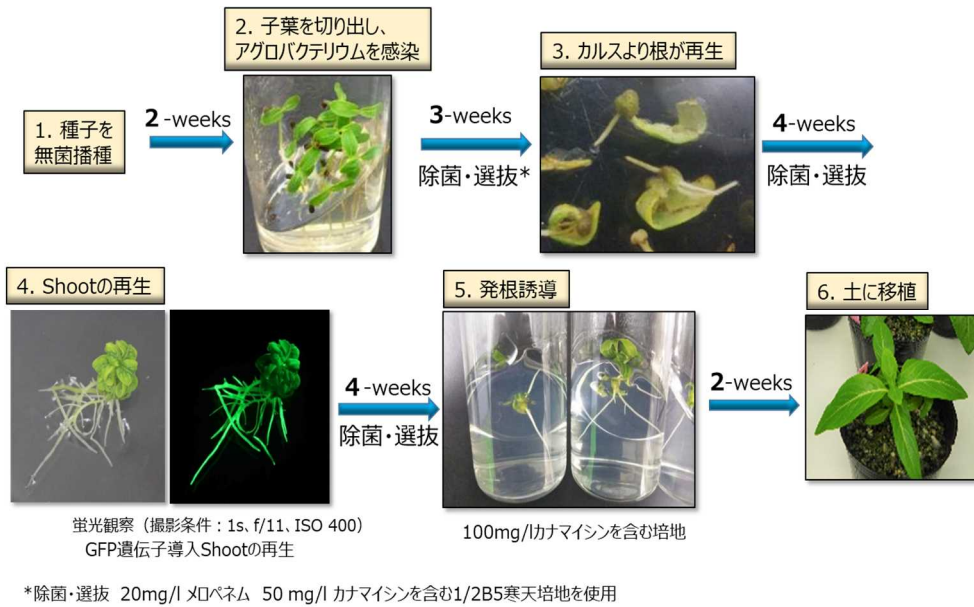


図 3. 2. 2. 2-4 本助成事業で独自に確立したニチニチソウの形質転換方法

さらに、前述のトリプトファン代謝を強化する遺伝子（AED 遺伝子群）を用いて、*Agrobacterium rhizogenes* A13 に形質転換し、パシフィカ XP の子葉に感染させ、50 mg/l カナマイシン及び 20 mg/l メロペネムを含む培地で選抜と除菌を繰り返すことで、独立した 4 株の再生個体を得ることができた（図 3. 2. 2. 2-5A）。これらのトリプトファン代謝系が強化された形質転換体では、Catharanthine 含量が増加することが分かった。特に TG25 系統では、GFP 遺伝子を導入した形質転換体（Cont）に対し 1.8 倍の Catharanthine を蓄積していることが確認できた（図 3. 2. 2. 2-5B）。汎用性が高く、高効率なニチニチソウの形質転換系が確立され、さらに、実際に遺伝子導入により顕著にアルカロイド含量が増加した形質転換ニチニチソウが得られたことは、有用成分を含む植物の代謝研究のモデル植物としてニチニチソウの有用性が示されたことになり、新たな技術領域の開拓につながるものと期待される。

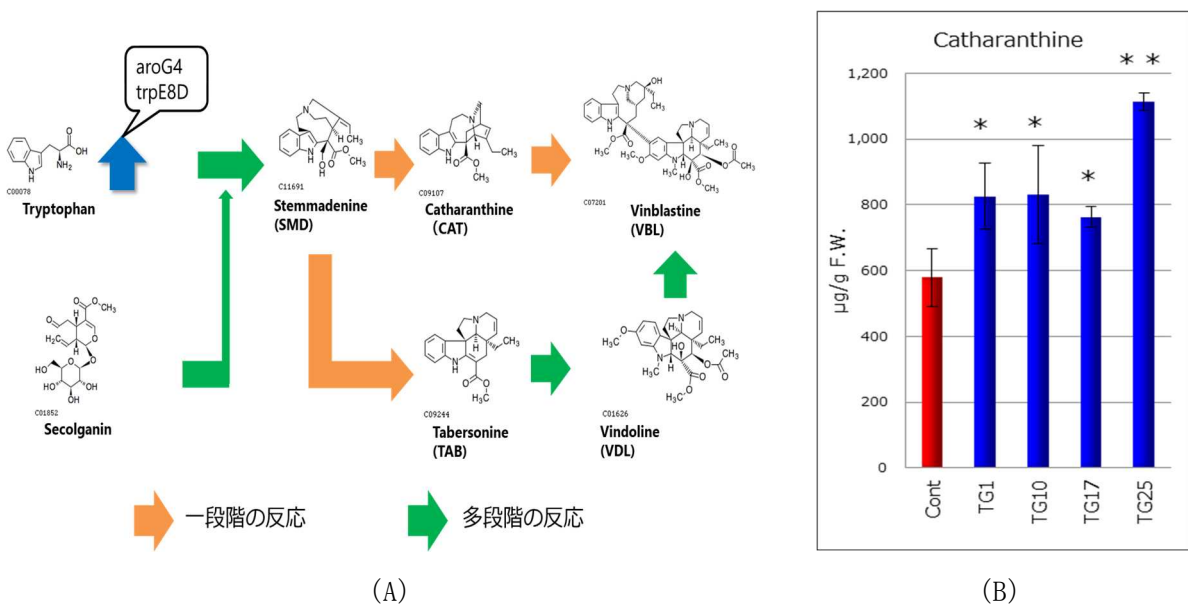


図 3. 2. 2. 2-5 組換えニチニチソウの作出と解析

(A) ニチニチソウのピンカアルカロイド代謝系（簡略化）。トリプトファン代謝系を強化する AED 遺伝子群（aroG4, trpE8D 遺伝子を連結）を導入した組換えニチニチソウの作出

(B) AED 遺伝子群を導入した組換えニチニチソウの Catharanthine 含量。Cont は GFP 遺伝子を導入した形質転換体。TG1、TG10、TG17 及び TG25 は、それぞれ独立して得られた組換え体

3) 人工光型植物工場でのニチニチソウ栽培技術の高度化・安定化（味の素株式会社、玉川大学、北海道科学技術総合振興センター）

グロースチャンバーを用いて、気温 23°C、湿度 50%、光源は白色蛍光灯を使用し、光合成光子束密度 (PPFD) は 150-200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、16 時間日長にて、栽植密度の検討を行った。播種後 2 か月目の苗を用いて、1 コンテナ当たり 4 株 (24 株/ m^2)、8 株 (48 株/ m^2) 及び 16 株 (96 株/ m^2) になるように定植し、1 が月間栽培を行った。その結果、16 株 (96 株/ m^2) 区が最も収量が高く、定植後 28 日以降は収量が鈍化する傾向が示された (図 3.2.2.2-6A)。以上の結果より、育苗 2 か月、本栽培 1 か月のサイクルを、1 ha 規模で年間 6 回栽培することを想定し、試算すると 16 株 (96 株/ m^2) 区では、地上部重量で 100 トン/ha/年の収量が見込まれることが分かった (図 3.2.2.2-6B)。これまで、ニチニチソウを用いた人工光型植物工場での栽培報告はなく、人工光型植物工場を用いた医薬用原料植物の安定生産に大きく寄与する結果であった。

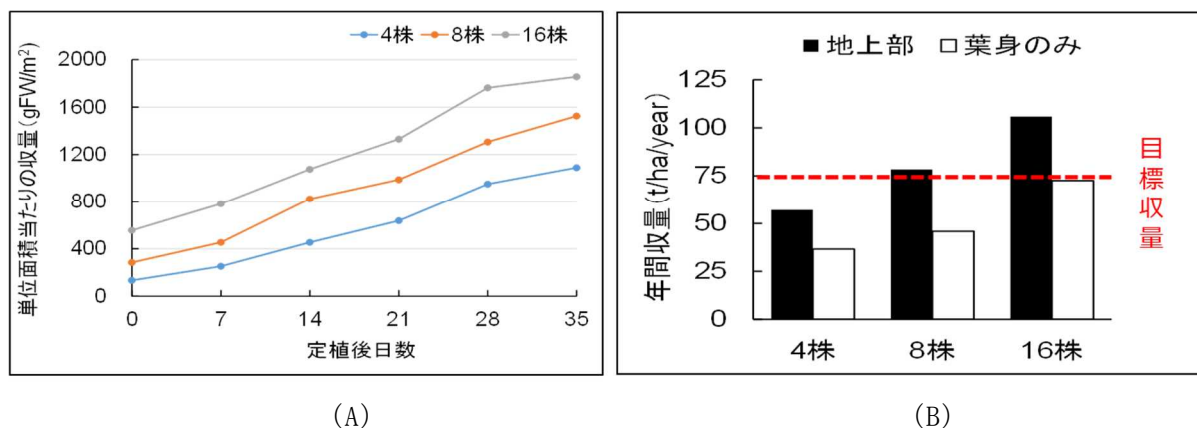


図 3.2.2.2-6 ニチニチソウを用いた人工光型環境での栽培条件検討

(A) コンテナ栽培で 4 株 (24 株/ m^2)、8 株 (48 株/ m^2) 及び 16 株 (96 株/ m^2) 栽培した際の収量

(B) 年間 6 回、1 ha 規模で栽培した場合の地上部及び葉身の生重量

(9) 成果の普及

当社としては、積極的に社外に向けて発表するスタンスをとるものではない。ただし、特許出願し、公開された成果に関しては、論文化、あるいは、学会発表を行う方針である。

表 3.2.2.2-1 成果普及活動実績

年度	論文		その他外部発表				受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016～2018	0	0	0	0	0	0	0
2019	0	0	0	0	1	0	0
2020	0	0	0	0	1	0	0
PJ 期間 合計	0	0	0	0	2	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

特許出願において、当社知的財産部と適宜打合せを実施し、特許出願や審査請求を実施し、さらには、海外出願など、事業計画に沿って戦略的に権利化に取り組んだ。

本プロジェクトの成果に関し、以下の表 3.2.2.2-2 に示す特許出願を行った。

表 3.2.2.2-2 特許出願実績

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2016～2018	2	0	0
2019	0	0	1
2020	0	1	0
PJ 期間 合計	2	1	1

(11) 成果の事業化に向けた戦略

本プロジェクトで開発された医薬品中間体原料植物は、当社グループの医薬品中間体事業での活用を意図する。

植物系の医薬品中間体は、原料植物、品質の安定性（広義の Safety）、供給の安定性（Stability）、及び、供給の持続性（Sustainability）の課題のあることが多い。すなわち、野外での採集はもちろん、栽培される場合でも、天候の影響等を受け、成分の含量、あるいは、不純物の含量、さらに、収量の変動もおこる。また、中間体化合物の需要が増加した場合、その需要に見合う原料植物を調達すると、野外採集であれば、当該植物種が絶滅する恐れがある。ま

た、栽培の場合でも、農地の開拓による環境負荷が増大し、供給の持続性を担保することの大きな障害となる。

このような原料植物の課題を一挙に解決する手段が人工光型植物工場での栽培である。ニチニチソウは、比較的小型の植物であり、人工光型植物工場での栽培は可能である。ビンカアルカロイド、及び、その生合成中間体の原料植物にニチニチソウをエンジニアできれば、高品質・安定的・持続的な原料調達手段として、当社グループのポートフォリオの範囲で十分に活用されることを期待している。さらに、生態系の保全につながる技術でもあり、SDGs 達成の観点からもアピールしうる技術となる。

(12) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

成果の事業化に向けた取組みは、本プロジェクトで得られる基本技術を活用し、比較的小規模の植物工場モジュールで最適化を達成し、そのモジュールを増設することで、スケールアップを実現することを意図している。抽出・取上げは、基本的には既存・現行技術でカバーできる。

(13) 成果の事業化の見通し

上述のとおり、本技術開発は、すでに存在する事業スキームへの取込みであるため、基本的に事業化が前提となっている。技術開発が順調に進めば、2022 年から、サンプル提供が可能となる見込みである。

また、本技術開発は、市場・ユーザーのニーズである高品質中間体原料の安定的・持続的供給の実現を目指している。

3.2.2.3 組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産 (ホクサン株式会社)

(1)背景と目的

本事業は、ジャガイモシストセンチュウ（以下、PCN と記載）防除剤の主成分となる PCN 孵化促進物質（Hatching factor：HF、以後、PCN-HF）の大量生産系の開発を目指すものである。

PCN は、ジャガイモの根に寄生する農作物害虫のひとつで、発生圃場から根絶させることが困難とされている。現状、北海道のジャガイモ圃場の少なくとも約 20%（11,000 ha）において PCN の発生が確認されている¹⁾。また、海外のほとんどのジャガイモ栽培地域においても、すでに甚大な被害がもたらされているため、100 か国以上で植物検疫上の法規制（汚染土の移動制限等）が執られている。欧州に限った PCN 被害額は、年間€300M（約 406 億円）と試算される²⁾。このように、世界的に PCN の被害は、農業上甚大な問題であるにも関わらず、現在、PCN 防除に効果的な薬剤の開発は成功していない。

PCN は、図 3.2.2.3-1 に示す生活環を有し、薬剤耐性の高いシストを形成する。卵はジャガイモの根から分泌される PCN-HF に反応して孵化する特性を持つ。幼虫に効果のある農薬は開発されているが、処理時期がジャガイモ作付け前の 1 回に制限されているため、ジャガイモ作付け後に孵化する幼虫に対して有効な防除はできていない。

一方、ジャガイモ作付け前の土壤に PCN-HF を施用することにより、シスト中の PCN 卵を強制的に孵化

させ、シストから遊出した幼虫を餓死させる PCN 防除法が考えられるが、元々、植物体から分泌される PCN-HF 量は少ない。また、化学合成品も PCN-HF を量的、コスト的に産業上利用可能なまでには生産することができていないため、未だ実現はしていない。本事業では、この PCN-HF の大量生産系の構築を目標とする。

参考文献

- 1) 農畜産業振興機構ホームページ、「北海道におけるジャガイモシストセンチュウの発生状況と対応（2016年3月）」、https://www.alic.go.jp/joho-d/joho08_000587.html
- 2) J.F. Moxnes and K. Hausken, Ecol. Model., 207, 339 (2007)

(2)位置づけ、目標値

【対象市場・製品や競合技術との対比】

PCN 防除に適用登録のある農薬は、先述の通り使用回数がジャガイモ作付け前の 1 回に制限されており、防除効果が不十分である。また、開発予定品は既存の防除剤との併用で殺虫効果を高めることも可能であることから、既存剤と共存し得る。一方、PCN-HF を有効成分とする PCN 防除剤は、世界的にも同等品は存在しない。開発品予定品の想定単価と既知の PCN-HF の価格（10a あたりの必要量より算出）を比較すると、試薬 A の市販価格は開発予定品の 830 倍、物質 B（市販品なし）は桁違いに高価と試算される。

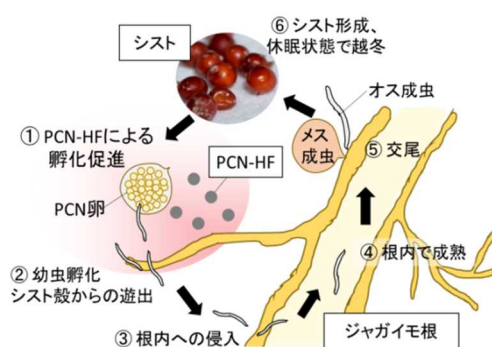


図 3.2.2.3-1 PCN 生活環

【目標値】

中間目標

研究開発項目	研究開発目標	根拠
組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	遺伝子導入による二次代謝経路の制御と栽培環境の最適化により、最終的に、現状の45倍量のPCN-HFの生産を目標とする。	最終開発目標である現状の100倍量のPCN-HF生産の達成にあたり、中間目標では遺伝子導入による二次代謝変化の誘導により現状の15倍量、栽培環境最適化により現状の3倍量のPCN-HFの生産を目標とする。

最終目標

研究開発項目	研究開発目標	根拠
組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	最終的に現状の100倍量のPCN-HFの生産を目標とする。	事業化に必要とされる年間PCN-HF生産量から、最終開発目標を設定した。

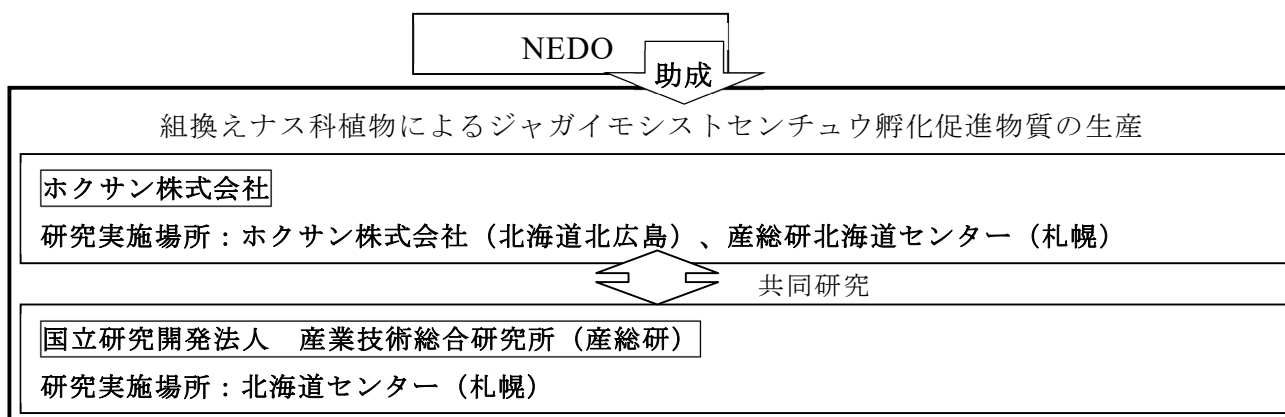
(3) 全体計画

年度	2016年度	2017年度	2018年度	2019年度	2020年度
研究開発項目					
組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	遺伝子導入による二次代謝変化の誘導				
	栽培環境の最適化				
	PCN 孵化試験の精度向上				

【中間評価結果への対応】

中間評価コメント「孵化促進物質の代謝経路が明確でない中、孵化活性のみを指標に開発を進めていることに問題はないか。」への対応として、孵化活性以外の指標を探索するため、PCN-HF含有液を粗精製した粗精製物の成分分析を行い、孵化活性と相関のあるフラクションを絞り込んだ。

(4) 実施体制



(5) 運営管理

表 3.2.2.3-1 打合せ実績一覧

内容	回数	開催日
PL, sPL, NEDO への進捗状況報告	9	2016/12/2、2017/4/26、2017/11/29、 2018/7/4、2018/11/1、2019/7/3、 2019/12/4、 2020/5/28、2020/12/16
テーマ間連携に向けた打ち合わせ	3	2017/12/18、2018/1/31、2018/3/20
進捗共有・試験検討	33	2016/8/22～2020/11/27（1回/月程度）

主要研究員による進捗状況確認、試験検討をほぼ毎月実施し、情報共有に努めている。

(6) 実施の効果

【費用対効果】

研究開発全期間における助成事業の総費用 2.5 億円（うち助成額 1.9 億円）

【予測市場】

販売開始 5 年後に国内の殺センチュウ防除剤の市場の 4%シェアを見込む。海外市場への展開も想定し、年間 10.3 億円の売上を想定。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目	最終目標	成果	達成度	今後の課題と解決方針
組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	遺伝子導入による二次代謝経路の制御により、現状の20倍量のPCN-HFの生産を目標とする。 栽培環境の最適化により、最終的に現状の100倍量のPCN-HFの生産を目標とする。	<ul style="list-style-type: none"> ・ PCN シスト無菌化技術の特許出願。 ・ 標的代謝酵素遺伝子4種類について発現抑制および下流の目的外代謝物量の減少を確認、孵化活性に関わる候補遺伝子を1種類見出した。 ・ ジャガイモの組換え体における孵化活性の増加を確認。 ・ 栽培方法の最適化および栽培容器の検討により、従来法と比較して1株あたりから得られるPCN-HF量が飛躍的に増加。 ・ 上記結果より現状の126倍のPCN-HFの生産を達成した。 	◎ PCN-HF生産量は従来法の126倍となり、目標を達成した。	事業化に向けたスケールアップ検討

達成度 ◎：大きく上回って達成、○：達成、△：概ね達成、×：未達

(8) 研究開発成果の意義

1) 代謝系遺伝子発現制御検討

本研究では、PCN-HF 高生産植物の開発を最終目的として、PCN-HF 代謝関連遺伝子の発現量を操作し、代謝系の改変を行った。代謝操作戦略の有効性を迅速に評価するために、水耕栽培タバコと植物ウイルスベクターを用いた一過的発現調節による評価系の構築を進めた。これまでに同定した標的代謝酵素遺伝子 *a-d* それぞれについて virus induced gene silencing (VIGS) 法による一過的な発現抑制を試み、real-time PCR により各遺伝子の mRNA 量を評価した。

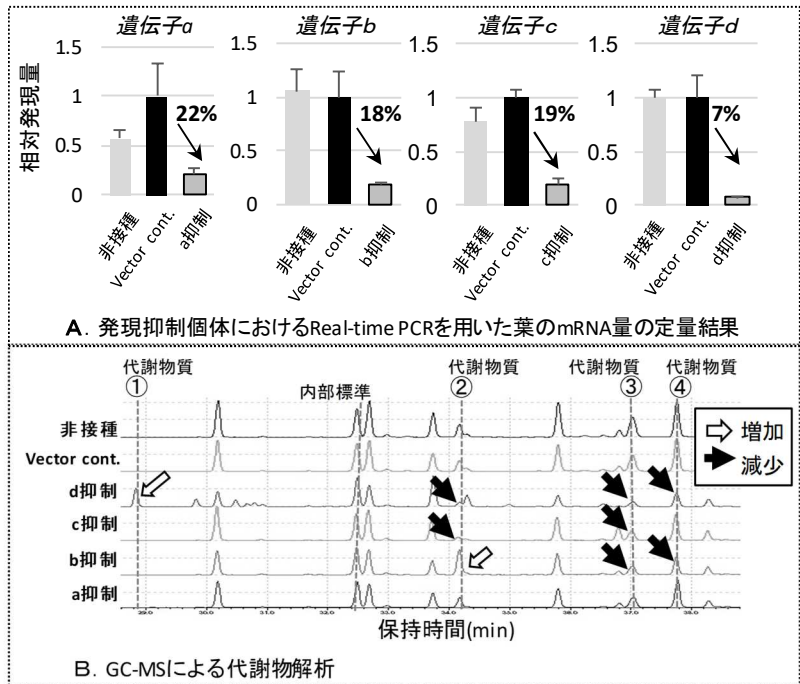


図 3.2.2.3-2 VIGS 法による標的代謝系遺伝子の一過的発現抑

その結果ウイルスベクター接種

15 日後の葉組織において、遺伝子 *a-d* の発現量を減少させることに成功 (図 3.2.2.3-2A)、また、茎・根組織においても発現量を抑制することに成功した。さらに、代謝物量に変動しているかを確認するため、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いて代謝物量を解析した結果、各標的酵素遺伝子の下流代謝物量の減少と上流代謝物量の増加が認められた (図 3.2.2.3-2B)。

上記遺伝子の発現を抑制した各個体由来の根浸出液の孵化活性を PCN 孵化試験により評価したところ、*b* 遺伝子の発現抑制により孵化活性の上昇が認められた。

2) PCN 孵化試験の精度向上

PCN 孵化試験による評価には、安定的に同程度の孵化率を示す PCN 卵の準備が必須である。現状の温室土壌等を用いた PCN 増殖方法では、寄生菌による PCN 卵の汚染率が高く、孵化率の変動要因のひとつとなっている。この要因を排除するため、PCN 孵化幼虫の無菌化を検討した。まず、PCN 幼虫表面に付着するカビを単離し、顕微鏡観察および ITS (internal transcribed spacer) 領域配列解析を行ない、菌を同定した。当該真菌に対する抗菌性試験及び PCN 幼虫の生存率より、表面殺菌に最適な薬剤とその処理濃度を確定した (図 3.2.2.3-3)。

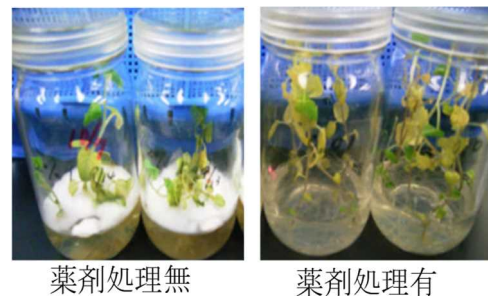


図 3.2.2.3-3 薬剤検討試験の様子

当該薬剤を用いた無菌化処理にて得られたシストから抽出した PCN 卵は、無処理シストより抽出した PCN 卵と比較して汚染卵率が減少し、孵化率が上昇する傾向となった。これらの PCN 幼虫の無菌化技術の特許出願した。

3) 目的物質高生産のための組換え体の作出

1) の結果を踏まえて、PCN-HF 代謝関連遺伝子を導入した組換え体を得た。得られたジャガイモ系統を用いて孵化試験を実施した結果、非組換え体と比較して 1.5 倍の孵化率をもつ系統が確認された。

しかし、PCN-HF 代謝関連遺伝子である *a* 遺伝子を過剰発現させた組換え体で、内在性の *a* 遺伝子が顕著に発現抑制される結果となった。そこで、組換え戦略を変更し、PCN-HF 代謝遺伝子の過剰発現を辞め、新たに発現抑制のみの戦略で組換え体を作製し、評価を行った。評価方法は、作製した組換え体について 4) 栽培条件の検討で最適化した栽培方法で栽培し、得られた栽培液での孵化活性を確認した。その結果、非組換え体と比較して、顕著に孵化活性が向上した系統は得られなかった。

4) 栽培条件の検討

PCN-HF を効率的に生産するための栽培方法として、複数の養液栽培法を比較検討し、選抜した栽培方法について改良検討を行った。更に改良した栽培方法で、容器検討も実施した。

それぞれの回収した栽培液中に含まれる PCN-HF 量をスコア化し (PCN-HF 回収量スコア = 回収養液量相当* × 年間栽培回数 × 相対孵化率**)、1 株当たりからの PCN-HF 生産量を評価した結果、最も良い栽培方法では従来法と比較して PCN-HF 回収量が 126 倍以上となった (図 3.2.2.3-4)。

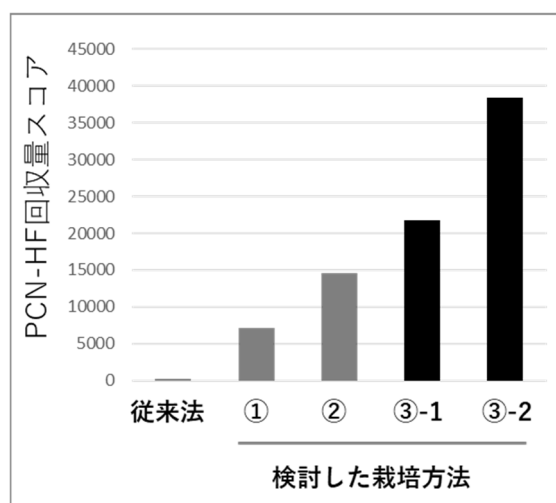


図 3.2.2.3-4 PCN-HF 回収量スコアの比

**回収養液量相当：回収液量 × 孵化試験の際の希釈倍率

*相対孵化率：1mM メタバナジン酸ナトリウム (標準試料) の孵化率を 1 とした場合の孵化率

5) 回収方法の検討

PCN-HF を効率的に精製・回収する方法を構築するため、PCN-HF 粗精製の吸着担体、処理条件等の検討を行い、PCN-HF の粗精製方法を確立した。本検討により得られた粗精製物について、PCN 孵化活性を確認し、PCN 汚染土壌への処理を行った。その結果、対照区と比べ、有意に孵化幼虫数の増加が認められ、土壌中の卵密度が低下する傾向を示した。この結果より、回収した粗精製物の土壌における有効性が確認された。

テーマ間連携への取り組み

- ① 遺伝子発現抑制制御検討では、(国研) 産業技術総合研究所とテーマ連携し、生合成遺伝子の発現抑制による目的物質生産性向上の検討を行った。
- ② 環境制御検討では、(公財) 北海道科学技術総合振興センターとテーマ連携し、薬剤による発現制御の方向性を確認した。
- ③ 遺伝子探索について、国立大学法人京都大学大学院とテーマ連携し、未知の生合成遺伝子探索の方向性を確認した。

(9) 成果の普及

表 3.2.2.3-2 成果普及活動実績

年度	論文		その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌の掲載	その他	
2016～2018	1	0	2	0	2	0
2019	0	0	0	0	1	0
2020	0	0	0	1	1	0
PJ期間 合計	1	0	3	1	4	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

実施者らはすでに植物工場での遺伝子組換え植物栽培・生産技術の基本となるノウハウを所持しており、遺伝子組換え植物の栽培・生産技術の新規の技術については、容易に模倣化されやすく技術流出のリスクがあるためノウハウ化とする。一方、PCN卵の孵化活性測定試験の精度向上に係る技術は、知財化を進める。加えて、本研究開発により「PCN孵化促進物質を有効成分とするPCN防除剤」の製法等の知財化を進めていく。

表 3.2.2.3-3 特許出願実績

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2016～2018	1	0	0
2019	0	0	1
2020	0	0	0
PJ期間 合計	1	0	1

(11) 成果の事業化に向けた戦略

本開発予定品は、新規農業資材として販売を行う予定である。開発予定品は、殺菌・殺虫効果等を持たないため現行の農薬の定義から外れているが、土壌改良資材の定義には合致する。ただし、土壌改良資材は、省令に登録されている物質のみが対象となるため、未登録物質に関しては、まずは法令変更による物質登録作業が必須となる。

一般的に農業資材の開発には、農薬開発と比較して開発期間の短期化やコスト低減が可能であるが、本開発予定品は過去に前例のないPCN防除剤であるため、許認可の対象の選定や審査自体に時間を要する可能性がある。そこで、実際の審査に先駆け、農業資材登録認可に係る農水省担当部署とのヒアリングにて、適切な手続きが進められるよう情報収集を行っている。

【市場動向】

本開発予定品は、PCN-HF を有効成分とするPCN防除剤であり、世界的にも同等品は存在しない。さらに、国内未発生であったジャガイモシロシストセンチュウが2015年（平成27年）に確

認められ、大きな問題となっていることから、PCN 防除剤の需要は更に拡大すると見込まれる。また、ジャガイモは 159 ヶ国で栽培される世界的にも主要な作物であり、そのほとんどの地域で PCN が蔓延している。世界のジャガイモ圃場面積は日本の 238 倍（約 1,734 万 ha）であること³⁾から、PCN 防除剤市場は格段に開けている。現状、PCN 防除に効果的な薬剤が存在しないことから、海外における PCN 防除剤の需要は今後さらに拡大すると見込まれる。

【売上損益見通し】

事業期間内に、非組換え植物を使用した栽培環境の最適化により目標値に到達することができた。事業化に向けたスケールアップ検討が必要であり、この追加検討を進めることで、2024 年から販売を開始できる見込みである。販売初年度は PCN 被害が深刻な生産地に向けて販売を開始し、次年度以降は、実施者が通常利用する販売ネットワークを最大限活用し、販売地域・販売数の拡大を見込む。さらに、販売開始 3 年目から海外展開を実施し、販売数を増加させる見込みである。

(12) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

表 3.2.2.3-4 農業資材として事業化する場合の具体的取り組み

年度	2021 年度	2022 年度	2023 年度	2024 年度	2025 年度
段階	製品開発段階			市場段階	
大規模化の検討			→		
製剤化検討			→		
圃場での評価試験			→		
登録申請・審査関係			→	→	
製造・販売				→	→

【事業化に向けた課題と解決方針】

PCN-HF 回収工程について、ラボレベルから実用レベルへとスケールアップ検討を行う。また、普及促進に向け、生産現場で受け入れやすい処理方法に適合した製剤化を検討し、圃場試験にて効果を実証する。なお、非組換え植物にて PCN-HF 生産を行うため、当初に計画していた遺伝子組換え植物の第 2 種使用の申請や対応については不要とした。

本成果をもとに開発される PCN 防除剤は、孵化促進効果を効能としており、これを利用した防除システムの確立は世界初の技術となる。本開発予定品は過去に前例のない PCN 防除剤であるため、許認可規制の対象確認の選定や、該当した場合の申請・審査自体に時間を要する可能性がある。そこで、実際の審査に先駆け、開発段階毎に関係省庁への相談等を随時行っていく予定である。

(13) 成果の事業化の見通し

【市場ニーズ・ユーザーニーズに合致しているか、競合する技術・事業との比較】

PCN-HF を有効成分とする化学合成した PCN 防除剤は、原料コストが高額となることから、世界的に同等品は存在しない。また、既存の防除剤は開発予定品との併用、つまり、シスト内の卵を

開発予定品により孵化促進し、シストから遊出した幼虫を既存の PCN 防除剤で殺虫する使用方法が考えられるため、競合品とは言えない。さらに、開発予定品は既存の PCN 防除剤と比較して安全性と防除効果に高い優位性を持つ。

【量産技術への見通しの観点】

実施者の主たる事業は農薬の製造販売であり、以下の経験・知識を持つことから、確度高く、量産化・製品化が可能となる見込みである。

- ① 農薬等の登録審査に関する豊富な実績。
- ② 独自の処方技術により製剤設計・検討を行い、製品化開発を実施。
- ③ 農薬及び農業資材等の開発特許、剤化特許及びノウハウと経験を持つ。
- ④ 農薬事業の基礎研究から事業化までの一貫したノウハウの蓄積。
- ⑤ 殺センチュウ剤の開発および評価系を有する（土壤中のシストの検出手法と PCN 殺虫評価系及び、PCN 卵の孵化活性測定試験系など）。
- ⑥ 遺伝子組換え植物体を用いた医薬品の生産・事業化に成功し、事業を継続。

【技術確立、事業化による波及効果】

本開発予定品は PCN のみならず、ジャガイモシロシストセンチュウの防除への応用も期待される。現在、国内未発生であったジャガイモシロシストセンチュウが 2015 年（平成 27 年）8 月に確認され、大きな問題となっている。汚染調査の結果、ジャガイモシロシストセンチュウ確認圃場は 682ha に広がっていた（農林水産省対策検討会議：平成 29 年報告）。急ぎ、まん延防止対策を執る必要があり、緊急防除に関する省令（平成 28 年 9 月 23 日農林水産省令第六十一号）が発令され、防除指定区域ではジャガイモの植え付けが禁止された。しかし、これ以降もシロシストセンチュウの発生地域の拡大が続いている。2021 年 2 月現在、北海道内の 3 市町 468ha にて発生が確認されており、緊急防除対策は継続中である⁴⁾。このような状況であるため開発予定品は、ジャガイモシロシストセンチュウ防除および他圃場への拡散防止の有効な手段として期待される。開発予定品の普及は、国内および国外の農作物の安定供給に貢献することが可能となる。

参考文献

3) FAOSTAT（2019 年）、

4) 第 11 回ジャガイモシロシストセンチュウ対策検討会議（議事概要）

3.2.2.4 イチイ細胞培養技術を用いたタキサン系医薬中間体 10-DAB の効率生産法開発 (北海道三井化学株式会社)

(1)背景と目的

タキサン系抗がん剤である paclitaxel は微小管の脱重合阻害作用を有し、1990 年代ではイチイの樹皮より採取されていたが、含量が極めて低く、また樹皮を剥ぐことで樹木が枯死することから代替供給法の確立が必要とされていた。2000 年代に入るとイチイ細胞培養法での paclitaxel 生産法が確立され、BMS 社は本法での生産供給を可能とした。しかしながら paclitaxel (Taxol™) 特許は 2003 年に、抗腫瘍効果や溶解性が改良された docetaxel (Taxotere™) 特許は 2010 年に特許切れとなった。このため現在では、これらの後発品に加えて、ヒト血清アルブミンに結合させ水溶性を改善した abraxane が市場に投入されている。これらのほとんどはプランテーション或いは天然のイチイ樹木由来のタキサン化合物より供給されている。イチイは樹木の中でも生長が非常に遅く、1 年で枝が 10cm 程度伸長するのみであり、また paclitaxel 等タキサン類の含有量を高めるためには 10 年以上の生育期間が必要となる（10 年生のイチイ中 paclitaxel 含量:数 ppm~400ppm、総タキサン含量:最大 1,000ppm）。国内で使用されているタキサン系抗がん剤の原料は全てが海外からの輸入であり、この現状は重要な天然物医薬品の安定確保の観点から問題である。タキサン系抗がん剤製造において、イチイ茎葉原料中には paclitaxel 以外に多種タキサン化合物が含まれ、これらは医薬中間体 10-deacetylbaaccatin III (10-DAB) に一度戻してから paclitaxel などのタキサン系医薬原体へと再度合成されている。そこで、イチイ培養細胞の paclitaxel 生合成酵素の遺伝子をノックダウン (KD) またはノックアウト (KO) し、生産される多様なタキサン類を paclitaxel、docetaxel、cabazitaxel いずれもの合成中間体である 10-DAB に集約させ、またタキサン輸送に関わるトランスポーターを特定、制御することで、輸送・蓄積の最適化を行い 10-DAB の生産性を飛躍的に高めることを目的とした。

(2)位置づけ、目標値

タキサン系抗がん剤は卵巣ガン、乳ガン、子宮頸ガン等に用いられ、Paclitaxel、docetaxel については後発品も数多く出ており、タキサン系抗がん剤の市場規模は拡大を続けている。現在、タキサン系抗がん剤は、①イチイ植物体からの抽出、精製、②10-DAB からの半合成、③イチイ細胞培養法により生産されているが、供給の約 80%はイチイ植物体を用いており、細胞培養法は 20%程度に過ぎず、イチイ細胞の増殖速度が遅いことから培養設備拡大に対する投資が容易ではないことがその要因として考えられる。

2018 年度の間目標は、イチイ細胞への遺伝子組換え技術開発における導入法の確立、タキサン系化合物生産性向上に資するアルカロイド輸送体の解明に向けた情報獲得、小試験用バイオリクターの開発、イチイ培養細胞の増殖試験の実施しスケールアップ試験用データの獲得である。また、2020 年のプロジェクト最終目標は、10-DAB 生産性：1g/L/28d の達成、2m³レベルの袋培養技術確立である。

(3)全体計画

1) イチイ細胞への遺伝子組換え技術開発 (担当：北海道三井化学)

当社の過去の検討より、アグロバクテリウム法を用いた結果、ストレスによりイチイ細胞が生育阻害を起こすという結果を得ており、また一般的にアルカロイド生産性の培養細胞は安定した形質転換が困難で且つイチイ培養細胞の増殖は極めて遅い。そのため形質転換について難航が予想されることから、2018年度末にイチイ細胞の形質転換法を確立する。

2) 10-DAB 高生産イチイ培養細胞株の作出 (担当：北海道三井化学)

タキサン高生産イチイ培養細胞株を作出、合わせて標的となる遺伝子のノックダウン、ノックアウト用コンストラクトを作製し、1) で確立された形質転換法を用いて遺伝子を導入し、得られた株にて 10-DAB 生産性評価を実施する。

3) タキサン系化合物生産性向上に資する新規な膜輸送体の開拓 (担当：京都大学)

アルカロイド輸送に関する遺伝子、高発現プロモータ取得のための高発現遺伝子特定のため、cDNA 配列解析を行い、得られた情報を基に cDNA クローン化及びコンストラクトを作出、イチイ培養細胞へ導入し評価する。輸送体遺伝子の評価結果を基に、輸送体の導入、或いはノックアウト・ノックダウンを行いイチイ細胞の生育、タキサン系化合物の生産性に対して与える影響を評価する。

4) バイオリアクター培養法開発 (担当：北海道三井化学)

小試、中試用バイオリアクターの設計、試作検討を行う。バイオリアクターはカルチャーバッグ部と外側支持部を当社で設計し作成を外注することで、安価に培養が可能な系の作成を目指し、最終的に 1m³ 又は 2m³ のバイオリアクターを試作する。

5) タキサン系化合物に関与するアセチル基転移酵素の開拓 (担当：京都大学)

10-DAB 高生産に資する有効なアセチル基転移酵素を特定するため、基質となるイチイ代謝物を網羅的に解析する手法としてメタボローム解析法を確立する。解析結果を基に酵素基質の特定、及び酵素遺伝子の単離を行い、活性特性を評価する。評価結果からターゲット遺伝子の導入、或いはノックアウト・ノックダウンをイチイに導入し、生産されるタキサン系化合物の種類、生産性を評価する。

中間評価結果では、輸送系遺伝子の導入や paclitaxel 生合成酵素の遺伝子ノックダウンは時間がかかる作業で、組み合わせにより予期しない現象が起こることも危惧され、培養系での遺伝子の集積の計画をたてるとともにスピード感を持って研究を進めるよう指摘があった。2019 年度より、輸送系遺伝子の細胞内局在性や機能を明らかにすると共に、paclitaxel 生合成遺伝子、輸送系遺伝子のノックダウン、ノックアウトによる 10-DAB 生産性の評価を実施した。

(4) 実施体制



図 3.2.2.4-1 助成事業の実施体制図

(5) 運営管理

研究進捗については、月に一度の進捗ミーティングを開催して結果を共有した。共同研究先との連携については、共同研究者間での相互訪問や、学会等の機会を利用した研究打合せ、情報交換を実施した。その他、メールや月報でデータの共有やディスカッションをタイムリーに実施した。

(6) 実施の効果

本テーマ開発により、現在は 100%海外に依存しているタキサン系抗がん剤原料を国内で生産し、安定的に原料を確保することが可能となる。加えて、広大な土地での栽培が現実的ではない日本において、小さな土地面積で管理された培養技術を用い、高効率に有用成分を生産できれば、イチ樹木が生産するタキサン系抗がん剤原料のみにとどまらず、他の植物細胞での有用物質生産にも応用可能である。更に、細胞培養により 10-DAB を直接高生産することが可能となれば、溶剤の使用量を劇的に減らすことが可能となる。Green Chemistry in the Pharmaceutical Industry において半合成法と細胞培養法の使用溶剤の比較がなされており、細胞培養法にすることで 10 種類の溶剤 (toluene, isobutyl acetate, heptanes, acetone, methanol, tetrahydrofuran, methyl t-butyl ether, ethanol, ethyl acetate, glacial acetic acid)、5年間で溶剤合計約 6,00kL の削減が可能であることが示されている。

(7)最終目標の達成度

本助成事業の目標に対する成果、達成度について表 3.2.2.4-1 に示す。

表 3.2.2.4-1 最終目標に対する成果、及び達成度

研究開発項目	最終目標	成果	達成度	達成度の根拠
1) イチイ細胞への遺伝子組換え技術開発	形質転換法の確立、ノックダウンイチイ培養細胞の作成を開始	ウィスカー法、パーティクルボンバードメント法などによるイチイ培養細胞への遺伝子導入を GFP 蛍光により確認した。また、アグロバクテリウム リゾゲネスを用いた遺伝子導入に成功し、本法にて得られた根が形質転換体の毛状根であることを確認した。	○	形質転換効率が極めて高い遺伝子導入法を確立した。
2) 10-DAB 高生産イチイ培養細胞株の作出	ノックアウト・ノックダウンが導入されたイチイ培養株の獲得、10-DAB 生産性が 1g/L/28d である培養株の獲得	アグロバクテリウム リゾゲネスを用いた遺伝子導入法にて CRISPR/Cas9 でのノックアウトを試みた。ノックアウトを導入した根、及び遺伝子発現向上に寄与するエンハンサーを導入発生した根を解析したが遺伝子の変異は未検出であった。またノックダウンを導入した根からカルス誘導を行い 11 本からカルスを取得、液体培養株化を行った。この培養細胞からノックダウンのマーカ―検出を試みたが、導入された細胞は得られなかった。また前述以外の遺伝子導入法にてイチイ培養細胞に対してノックダウンを試みたところ 10-DAB の生産が確認された。	△	最終目標であるノックダウンイチイ培養株は得られなかったものの、培養細胞へのノックダウンでは 10-DAB 生産性向上効果が得られており、且つ 10-DAB 生産向上に効果が高いと考える次の標的が定まっている。
3) タキサン系化合物生産性向上に資する新規な膜輸送体の開拓	アルカロイド輸送体遺伝子のイチイへの導入、又は内在性輸送体遺伝子のノックアウト、ノックダウンによるタキサン系化合物の生産性の評価	RNA-seq 解析より、MeJA 処理区で高い発現を示す輸送体遺伝子ファミリーを見出した。PTX 結合性チューブリン遺伝子、また輸送体遺伝子を導入した酵母による輸送体評価系を構築し、該輸送体遺伝子を導入した酵母において PTX 輸送による増殖阻害が認められ、且つ 10-DAB 輸送活性が認められ、タキサン系化合物の輸送機能を有する輸送体の遺伝子であることが明らかとなった。	△	細胞生育における輸送体遺伝子の重要性についての知見が得られ、また複数のタキサン化合物の輸送活性を示す遺伝子情報を有している。
4) バイオリアクター培養法開発	2m ³ レベルのシングルユース袋型バイオリアクター (SUB) の培養技術獲得	小試験用 SUB の設計、試作行いイチイ細胞の培養を試みた。種々 SUB の改良、検討により 100L 及び 250L、800L 容量の SUB にてフラスコと同等の増殖率であることを確認した。またイチイ細胞以外の植物細胞でもフラスコと同レベルの良好な細胞増殖性を確認でき、攪拌翼なしに細胞が沈殿することなく培養できる点を特徴とする汎用性の高い SUB を開発できた。最終目標である 2m ³ (2,000 L) サイズ SUB 及び支持体については、設計試作を完了した。	△	2m ³ SUB の納期遅れにより最終目標は未達であるが、培養におけるノウハウを蓄積し、これを基にイチイ属以外の植物細胞の培養が可能であることも確認、汎用性の高い SUB を設計した。
5) タキサン系化合物に関与するアセチル基転移酵素の開拓	イチイ 10-DAB 高生産に資するアセチル基転移酵素の特定、遺伝子の導入、或いはノックアウト・ノックダ	タキサン系化合物に関与するアセチル基転移酵素特定のためメタボローム解析法を開発、タキサン系化合物の生合成に関与する新規アセチル基転移酵素を取得した。酵母発現系等による 10-DAB への反応性を解析し、既知を含む 3 遺伝子について 10-DAB を反応基質とすることが示唆された。	△	ノックダウンの検討により検出限界以下であった 10-DAB の生産性が 131.8mg/L に向上、また他の遺伝子発現抑制で更なる生産性向上が期待される。

ウンによるタキサン系化合物の生産性を評価	イチイ培養細胞に対してアセチル基転移酵素遺伝子のノックダウンを試みたところ、これまで検出限界以下のレベルであった 10-DAB の生産向上が認められ、10-DAB 生産量は 131.8mg/L であった。これは総タキサン化合物の 57%に相当し、Baccatin III、 PTX を加えると総タキサン化合物の 92%を占め、他の遺伝子の阻害により 10-DAB 生産の更なる向上が期待された。		
----------------------	---	--	--

*達成度 ◎：大きく上回って達成、○：達成、△：概ね達成、×：未達

(8) 研究開発成果の意義

- ・目標に対する達成状況

1) イチイ細胞への遺伝子組換え技術開発

- ・パーティクルボンバードメント法

取得したイチイ培養細胞 5 株についてウィスカー法、パーティクルボンバードメント法及びアグロバクテリウム法を用いて GFP 遺伝子を導入し、GFP の発現を確認した（図 3.2.2.4-2）。

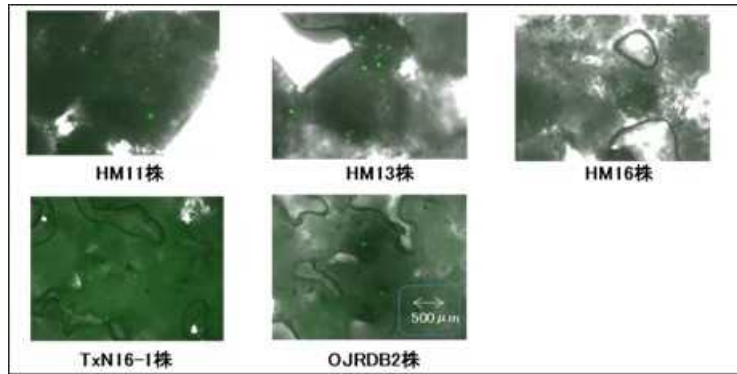


図 3.2.2.4-2 パーティクルボンバードメント法での形質転換

- ・アグロバクテリウム リゾゲネスを介した形質転換法

イチイ新枝の切り口をアグロバクテリウム リゾゲネス ATCC15834、LBA1334、A13 株懸濁液に浸漬し、真空条件下で菌体を接種した後、挿し木した。接種約 40 日後、新枝より毛状根の誘導を確認した。接種後 60 日間育成した不定根（図 3.2.2.4-3）から DNA を抽出し、アグロバクテリウム リゾゲネスよりイチイへ導入される rolB 遺伝子、及び接種菌内在性の virD2 遺伝子を接種菌残存の判別基準として用い PCR (Polymerase Chain Reaction) 法により解析した。発生した毛状根 49 本を解析したところ、11 本から rolB 遺伝子が検出され、7 本からは virD2 遺伝子が検出されず形質転換された毛状根が得られたことが明らかとなった（図 3.2.2.4-4）。



図 3. 2. 2. 4-3 発生した毛状根

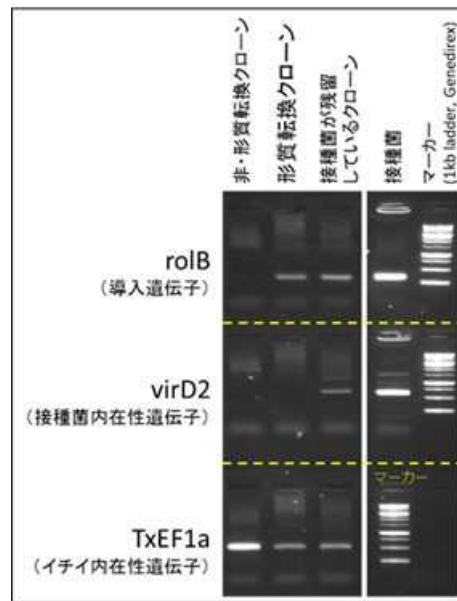


図 3. 2. 2. 4-4 PCR による導入遺伝子の確認

2) 10-DAB 高生産イチイ培養細胞株の作出

・タキサン高生産培養株の取得

タキサン高生産に資する培養株の取得を目指し、北海道三井化学構内の日本イチイ (*T. cuspidata*) 21 個体より needle 部を採取し、N5MWP 寒天培地を用いて 15 個体から誘導したカルスを取得した。得られたカルスより液体培養での安定継代増殖可能な株 (OJRD A6, B2, B7 および HM13) を確立した (図 3. 2. 2. 4-5)。

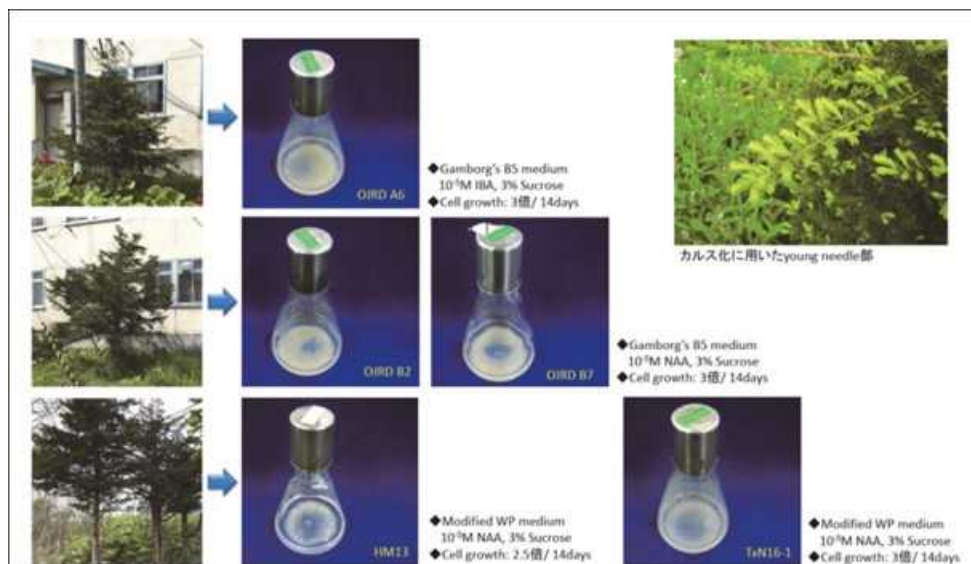


図 3. 2. 2. 4-5 イチイ細胞の株化

得られたイチイ細胞株をジャスモン酸メチルで処理し、最もタキサン系化合物生産性の高かった OJRD B7 株では 478.6mg/L の総タキサン生産性であった (表 3. 2. 2. 4-2)。

表 3.2.2.4-2 タキサン系化合物生産性評価

	Taxane yield (mg/L)					Total taxanes (%)
	1, baccatin III	2, 10-deacetyl-PTX	3, cephalomannine	4, paclitaxel (PTX)	5, baccatin VI	
Cells	20.5	36	70.4	135.4	187.5	449.7 (94)
Medium	10.6	2.6	3.7	1.8	10.2	28.9 (6)
Cells + Medium	31.1	38.6	74.1	137.2	197.7	478.6 (100)

また、本助成事業で開発したアグロバクテリウム法による毛状根取得のため、B7 株の親イチイ個体の枝に対し、タキサン生合成遺伝子及び輸送体遺伝子を標的として CRISPR/Cas9 でのゲノム編集法によるノックアウト及び RNAi によるノックダウンの導入を試みた。タキサン生合成遺伝子のノックダウンコンストラクトを構築しイチイ枝への導入し 528 本の不定根を獲得、CAPS 法により標的遺伝子の変異を解析したがゲノム編集された根は検出されなかった。更に、イチイ細胞中で遺伝子発現に寄与することが判明したエンハンサーを Cas9 上流に導入、gRNA をタンデムに配置したコンストラクトを構築し同アグロバクテリウム法を用いイチイ枝に導入、発生したノックアウト導入根 670 本について標的配列のシーケンス解析を実施したがゲノム編集された根は未検出であった。一方、ノックダウン用コンストラクトを構築し、同アグロバクテリウム法でイチイ枝に導入し発生した根（131 本）を順次カルス化し、この内 11 本からカルスを取得、液体培養株化を行った。この培養細胞 11 株から検出を試みたが、ノックダウンマーカー遺伝子は未検出であった。

3) タキサン系化合物生産性向上に資する新規な膜輸送体の開拓

・10-DAB 生産

アルカロイド輸送に関する遺伝子、高発現プロモータ取得を目指し、ジャスモン酸メチルでタキサン系化合物誘導、未誘導のイチイ培養細胞より RNA を抽出し cDNA 配列解析 (de novo RNA-seq) を試みた。解析結果より遺伝子の発現変動比較を行い、ジャスモン酸メチル誘導区で高い発現を示す Transporter 遺伝子ファミリーのリストを作成した (図 3.2.2.4-6、表 3.2.2.4-3)。

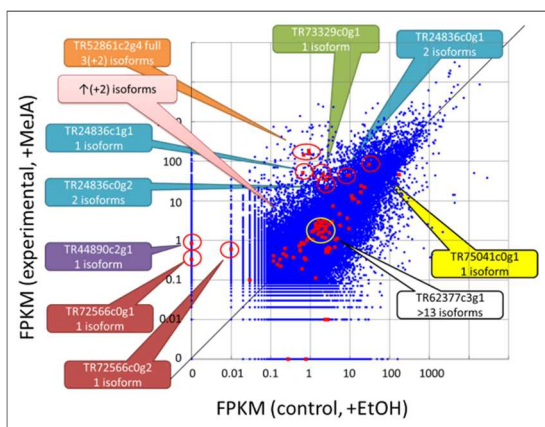


図 3.2.2.4-6 ジャスモン酸メチル誘導区での発現変動比較

表 3.2.2.4-3 輸送体遺伝子リスト

ID	hit contig数	総contig数	最長contig	最大変動値
TR76497	7	21	5477	34倍
TR55858	2	12	4345	7.5倍
TR80578	3	6	2149	7.1倍
TR65646	2	4	2545	3.6倍
TR78121	3	15	865	15倍
TR66244	2	17	685	25倍
TR14801	1	1	2234	3.8倍
TR81163	4	8	3591	2.2倍
TR82259	5	26	2996	13倍
TR73017	5	17	5854	11倍
TR74400	6	9	5361	8.9倍
TR32743	2	2	1629	3.1倍
TR43878	2	2	601	26倍
TR36024	2	3	3331	10倍
TR52861	10	13	2545	360倍
TR72566	2	2	2086	60倍
TR24836	5	5	2303	76倍
TR73329	1	1	2341	22倍
TR87901	2	4	1191	3.3倍
TR44958	1	12	1051	3.7倍

また RNAseq 発現解析で強発現を示した遺伝子のプロモータ領域を TAIL-PCR で伸長し、開始コドンより上流領域を単離し配列を決定し、本プロモータ配列について特許出願を行った（特願 2019-53639）。

・輸送体評価

細胞内局在性確認及び paclitaxel、10-DAB の輸送評価を行うため、2 種のプロモータ、C 末端 GFP タグ、及びタグ無しの 2 種と組み合わせた 4 種類の構成を JAT1、JAT2 及び DTX1 遺伝子について構築し計 12 種、加え N 末端に GFP タグを付加した JAT1、DTX1 遺伝子の計 4 種、合わせて 16 種のコンストラクトを構築した。

PTX に感受性となるチューブリン遺伝子の変異 tub2-25 を持つ酵母に各輸送体遺伝子を導入し、PTX を含む寒天培地上で生育を観察した結果、生育阻害が見られ PTX の輸送活性が認められた。

4) バイオリアクター培養法開発

・袋型バイオリアクター設計、細胞の袋培養最適化

シングルユース小試験用バイオリアクターの基本設計を北海道三井化学で行い、袋型バイオリアクター試作品を作製した。イチイ細胞培養において、当初培養条件の不適合によるストレスでの細胞の赤褐色化が起こったが、バイオリアクターの改良、通気量の最適化、細胞移植密度の検討により改善され、既存ジャーフェメンターと同等の細胞増殖倍率となる条件を確立した。またイチイ以外の植物培養細胞（L 細胞、H 細胞）株を用いて細胞増殖性を比較し、いずれの細胞株においても既存ジャーフェメンターと同等の細胞増殖倍率を示し、イチイ細胞のみならず多種植物細胞株の培養に広く適用できることを確認した。小試験用 SUB を基に中試験用として設計した 100L 及び 250L 容量の SUB にてイチイ培養細胞株の培養試験を実施し、小試験用 SUB での細胞増殖倍率と同等レベルで培養可能であることを確認した。更に、800L 容量の SUB を設計、製作し、リアクター底部の細胞滞留に対し通気方法を改良し細胞沈降を解消させ、細胞増殖試験により細胞増殖性、バッグ内の細胞流動性共に良好であることを確認した。また、800L サイズ SUB においてもイチイ培養細胞がジャーフェメンターと同等の増殖率であることを確認した。最終目標である 2m³ (2,000L) サイズ SUB 及び支持体については、設計試作を完了した。培養試験を実施したものの、SUB の製造不良による漏れの発生、及び SUB 製造元での部品不足による大きな遅延により、2,000L での培養検討は助成事業期間内で完了できなかった。

5) タキサン系化合物に関与するアセチル基転移酵素の開拓

タキサン系化合物に関与するアセチル基転移酵素を特定するため、LC-MS によるメタボローム解析法を開発した。イチイ培養細胞抽出物から分子量 200-1,000 の範囲に約 300 のピークが観察され、一部については 10-DAB や PTX 等の既知化合物と同定または推定された（図 3.2.2.4-7）。更に、高精度 LC-Orbitrap-MS を用いたメタボローム解析を行い、67 のタキサン系化合物の候補ピークが示唆され、この内 41 について構造予測を行い 29 成分（異性体を含む）の存在が示唆された。タキサン系化合物の生合成に関与する新規アセチル基転移酵素の候補として、遺伝子進化や発現パターンを元に 8 個の候補遺伝子を取得した。酵母発現系等を利用した酵素反応実験で候補遺伝子産物の 10-DAB への反応性を解析したところ、既知のもの 1 個を含む 3 個について 10-DAB を反応基質とすることが示唆された。

イチイ培養細胞に対しアセチル基転移酵素遺伝子のノックダウンを試みたところ、これまで検出限界以下のレベルであった 10-DAB の生産向上が認められた (図 3.2.2.4-8)。また培養期間を調整することでタキサン化合物の生産性が向上すると共に 10-DAB 生産性も向上した。培養 1L 当たりの 10-DAB 生産量は 131.8mg であり (図 3.2.2.4-9)、これは総タキサン化合物の 57%に相当し Baccatin III, PTX を加えると総タキサン化合物の 92%を占めた。

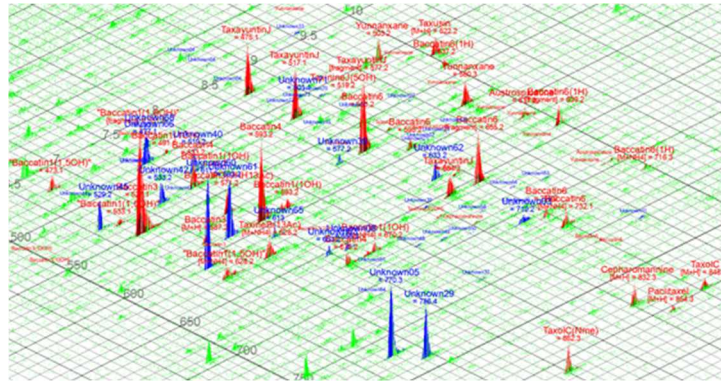


図 3.2.2.4-7 タキサン系化合物のメタローム解析例 LC 溶出時間と MS 検出質量を両軸にとる平面上に解析結果を描画した。赤と青は化合物の観察を示す。赤は既知、青は未同定。

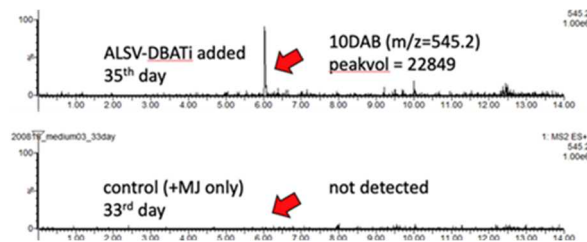


図 3.2.2.4-8 ALSV-DBAT-KD による 10-DAB 生産

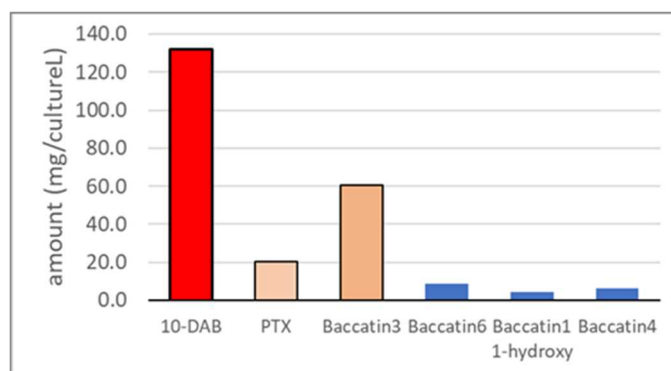


図 3.2.2.4-9 ALSV-DBAT-KD によるタキサン化合物の生産量

(9) 成果の普及

成果普及活動実績について、表 3.2.2.4-4 に示す通り論文、及びその他外部発表を行った。詳細は特許・論文等リストに示す。

表 3.2.2.4-4 成果普及活動実績

年度	論文		その他外部発表				受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016～2018	0	0	7	2	0	0	0
2019	1	0	6	2	1	0	1
2020	0	0	2	4	1	1	0
PJ 期間合計	0	0	15	8	2	1	1

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

本助成事業において、イチイ由来の新規プロモータの発見、及び効果的な遺伝子導入方法の知見が得られ、これらについて特許出願を行った。特許出願実績について表 3.2.2.4-10 に示す。詳細は特許・論文等リストに示す。

表 3.2.2.4-10 特許出願実績

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2016～2018	1	0	0
2019	0	0	0
2020	(1)	(3)	1
PJ 期間 合計	1 (1)	(3)	1

※カッコ内は PCT の各国移行予定の件数

(11) 成果の事業化に向けた戦略

Paclitaxel の市場規模は 2016 の市場調査レポートより、直近 5 年間で生産能力が年率 10%程度の割合で拡大し、それに伴って生産量も年率 13～16%の伸びを示している。生産能力に対して 85%程度の実生産量が示されていることに加え、cabazitaxel 等の新規タキサン系抗がん剤が市場拡大を更に押し広げていることから、10-DAB の安定需要はさらに高まると推測される。paclitaxel の単価に対し 10-DAB の単価は約 1/2 であることからタキサン系抗がん剤世界市場 4,600 億円の 1/2、2,300 億円を 10-DAB の市場として年率 5%の成長率として市場規模を算出した(図 3.2.2.4-10)。プランテーションについては栽培面積の拡大による供給量増が主たる製品

確保の方法であるが、長期栽培のリスク改善にはつながらないため価格の低下は少ないものと予想される。その一方で収穫に影響が出た場合にはおそらく単価の急激な高騰につながるものと考えられる。また、イチイの茎葉に含まれるタキサン化合物含有量が低いため、溶剤を用いて大量の茎葉から抽出を行う必要がある。10-DAB の含量が高まれば再結晶等で容易に高純度の 10-DAB を生産できる可能性がある。

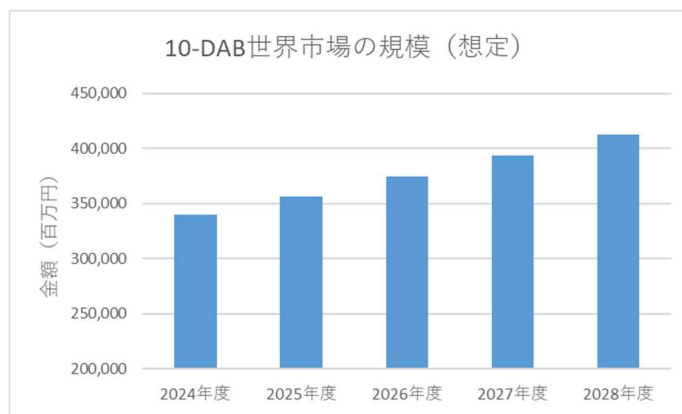


図 3. 2. 2. 4-10 10-DAB 世界市場の規模

(12) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

事業化に向けたマイルストーンを図 3. 2. 2. 4-11 に示す。

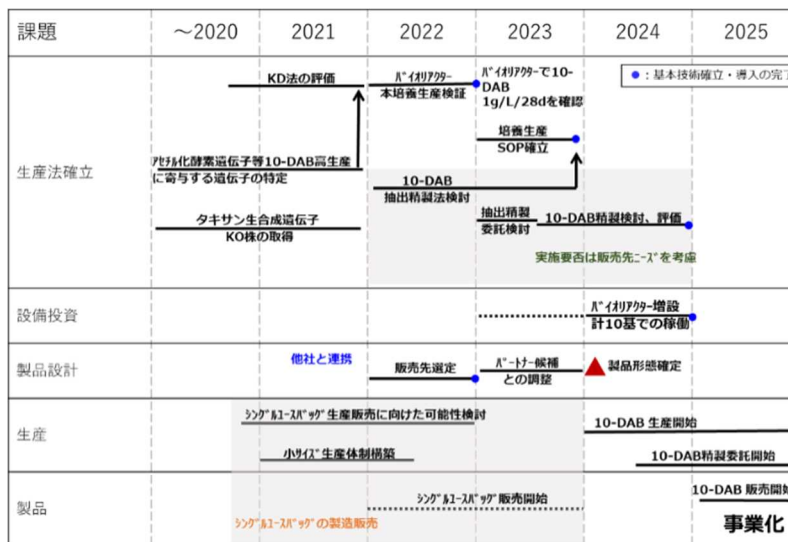


図 3. 2. 2. 4-11 10-DAB 事業化に向けたマイルストーン

・ 事業化に向けた課題、及び解決方針

想定している事業は、医薬中間体である 10-DAB を高効率で安定的に取得するための原料を供給するものであり、プランテーションにより収穫されたイチイ植物と同等の位置づけにあたる。従って、販売先は 10-DAB を原料として PTX などのタキサン化合物を生産する企業になるが、原料レベルでの求められる純度が現時点では不明である。本品は Paclitaxel 生合成遺伝子を不活

化することで多種タキサン化合物を 10-DAB に留めることが可能と考えており、イチイ植物抽出物に含まれるタキサン化合物の多様性に比べ、培養生産の場合は 10-DAB の純度が遥かに高いものになることが期待される。事業化に向け、他社との連携した製造、販売体制を構築する方針で、10-DAB 精製委託・生産、原薬製造の機能を有し且つタキサン系抗癌剤の販売を行っている企業へのアプローチを計画している。

(13) 成果の事業化の見通し

現在の流通単価と比べて製造コストが流通価格の 1/2 以下となる試算結果であり、最終目標が達成できれば、現行と同等あるいはそれ以下の価格で安定した原料供給が可能になるものと考えられる。また、10-DAB の純度が高いことで、以降の抽出精製工程での収率向上の観点でも細胞培養生産品が有利になるとも考えられる。

3.2.2.5 シソ代謝系制御技術による健康機能性成分の高効率増産技術開発（株式会社アミノアップ）

(1)背景と目的

本事業は、健康成分として利用されるシソ葉に含まれる機能性成分 A 及び機能性成分 B 群を飛躍的に高生産する技術開発を目的とする。

弊社の輸出用機能性素材（製品名：Benegut）は、機能性成分である機能性成分 A や機能性成分 B 群含有量を規格化しており、2012 年に上市して以来、好評を博し、主にドイツの代理店 VITAL SOLUTION 社を通し、ヨーロッパ、アジア、オセアニア地域への販売を拡大している。

原料の乾燥シソ葉は、露地栽培及び天日干しにより生産されている。乾燥シソ葉中の機能性成分含有量は、天候等の自然環境や年次間差や地域間差に影響されやすい。そのため、規格を下回り、原料として不適なシソが多い。よって、現状の露地栽培及び栽培品種を用いた不安定な原料生産では原料需要の伸びに対して、原料供給不足が予想され、販路・市場拡大の妨げの主要因となる。これらを解決するために機能性成分を高効率かつ安定的に生産できる技術開発が不可欠である。そこで、本研究開発では、遺伝子組換え技術により代謝系を制御し、さらに人工環境下における栽培技術を用いてシソの機能性成分 A 及び機能性成分 B 群を飛躍的に高生産する技術開発を行う。

(2)位置づけ、目標値

本事業の中間目標、最終目標を表 3.2.2.5-1 に記載する。

表 3.2.2.5-1 中間目標と最終目標

	目標値	根拠
中間 (2018年度)	乾燥シソ葉1g当たり機能性成分A含量を5倍に、機能性成分B群含量を2倍へ増加させる。	遺伝子組換え技術:シソ科植物丹参において、機能性成分A合成の上流遺伝子を過剰発現し、毛状根培養により最大600 mg/L(培養液)に成功している。 栽培技術:セージやムラサキの培養細胞において、フェニルアラニン処理やUV-B照射により機能性成分B群が4~5倍に増加することが報告されている。 上記報告から、各技術で中間目標値を達成可能と判断している。
最終 (2020年度)	乾燥シソ葉1g当たり機能性成分A含量を10倍に、機能性成分B群含量を5倍へ増加させる。	遺伝子操作技術(遺伝子組換えまたはゲノム編集)とストレス栽培いずれかもしくは両技術の併用効果により、機能性成分の高含有化により目標値を達成するものと考えられる。

(3) 全体計画

本事業の全体計画を表 3.2.2.5-2 に記載する。

表 3.2.2.5-2 事業全体計画

事業年度	2016年度	2017年度	2018年度	2019年度	2020年度
研究開発項目					
1. シン機能性成分代謝系遺伝子の操作 1) 関連代謝系遺伝子の単離 2) 遺伝子組換えシンの作出と解析	候補遺伝子の単離 候補遺伝子の選抜	遺伝子組換え条件の検討	遺伝子組換えの実施		
2. ストレス栽培技術によるシン機能性成分の製造基盤技術 1) 人工環境下におけるシン高収量条件の検討 2) 機能性成分の高生産を目的としたストレス栽培技術の確立	高収量条件の検討 阻害剤添加栽培、遠赤色光処理の実施		遺伝子組換えシン等を用いた阻害剤添加栽培の実施		
3. シン含有機能性成分のハイスループット解析技術の確立 1) 機能性成分の標準品を用いた定性、定量分析条件の検討 2) シンからの機能性成分一斉分析法の最適化 3) 工場での遺伝子組換えシンの機能性成分一斉分析	機能性成分10成分等の分析条件確立	実試料を用いた一斉分析法の確立	遺伝子組換えシン等を用いた促進剤添加栽培の実施		
4. 遺伝子組換え作物を用いた機能性素材の海外販売に係る調査研究 1) 各国の法規制などの調査 2) 遺伝子組換えの受容度の高い国の現地調査	各国の法規制調査及び販売候補国の選定	現地調査			
5. シン代謝系遺伝子のゲノム編集による制御 1) ゲノム編集ベクターを用いた形質転換				*ゲノム編集	
6. シン代謝系遺伝子の脱メチル化による制御 1) モデル植物等を用いた代謝系遺伝子のメチル化状態の解析				*脱メチル化	(中止)

中間評価において「市場・技術動向等の把握をすべきである」とのコメント及び「ゲノム編集個体」を使用する旨の提案を受けた。当初計画では遺伝子組換え技術及びストレス栽培技術を主として使用する予定であったが、遺伝子組換えに相当しないと見なされる可能性が高い技術を使用することで事業化へのハードルを下げる可以考虑と考へ、表中(*)のゲノム編集および脱メチル化技術の検討を2019年度より実施した。

(4) 実施体制

本事業の実施体制を図3.2.2.5-1～3に記載する。

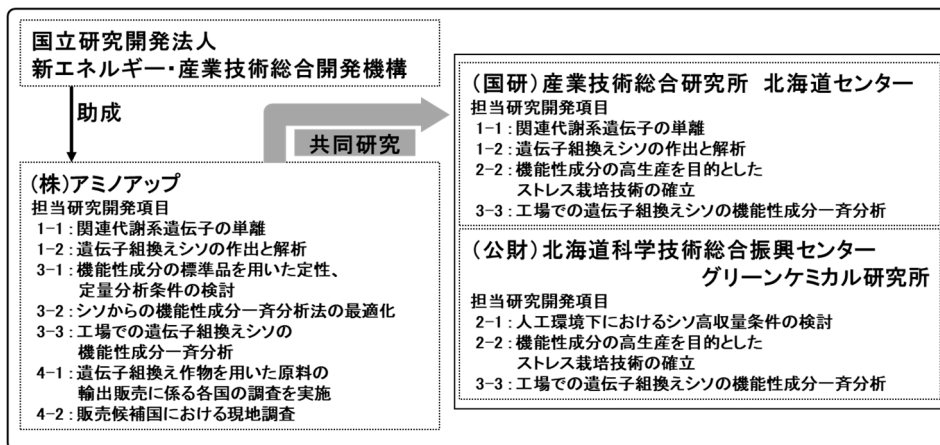


図 3.2.2.5-1 2016-2018 年度の実施体制図

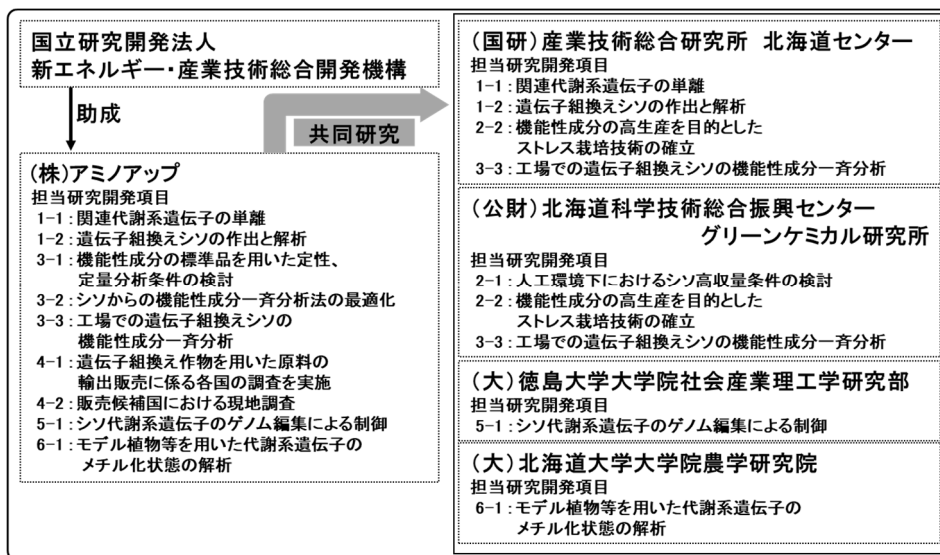


図 3.2.2.5-2 2019 年度の実施体制図

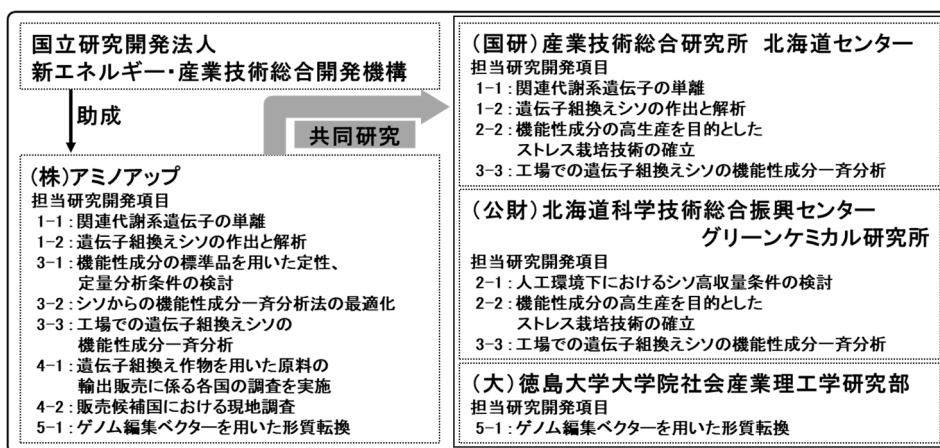


図 3.2.2.5-3 2020 年度の実施体制図

(5) 運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有する NEDO、プロジェクトリーダー及びサブプロジェクトリーダーと密接な連絡を維持しつつ、本事業の目的及び進捗について運営管理を実施した（プロジェクト会議）。また弊グループ内において、研究進捗の打合せをその都度実施した（グループ内会議）。開催実績は表 3.2.2.5-3 の通りである。

表 3.2.2.5-3 打合せ実施一覧

年度	2016年度	2017年度	2018年度	2019年度	2020年度	合計
プロジェクト会議	3	5	5	4	4	21
グループ内会議	10	24	16	11	11	72

(6) 実施の効果

① 本事業の技術開発による費用について

本事業は総事業費 131,400 千円（助成金 96,300 千円、2016 年度～2018 年度）となっている。中間評価後、2019、2020 年度と継続が決定し、総事業費は 205,500 千円（助成金 148,000 千円）となった。事業計画では技術開発成果を基に植物工場の建設、製造原料の安全性試験などを実施する。プロジェクト終了 6 年後（2026 年度）から製品を上市し、事業終了後に掛かる設備投資を 5 年で回収する計画である。

② 本事業の技術開発による温室効果ガスの削減見込み（機能性成分 A 換算）

本事業で計画中の植物工場で 1 年間生産可能と推定した機能性成分 A 量 74 kg を基準に、化学合成による生産と、人工環境下で生産した場合の CO₂ 排出量を求めた。

表 3.2.2.5-4 化学合成と人工栽培の CO₂ ガス排出量比較

方法	CO ₂ 排出量	算出根拠
化学合成	2,698トン	攪拌動力50 kW/m ³ × 5 m ³ × 16,000h → 原油1,030 kL × 2.619 ^{※1}
	17,508トン	原油6,685 kL × 2.619 ^{※1}
人工栽培	112トン	灯油45kL × 2.489 ^{※2}
削減量	20,094トン	(2,698トン+17,508トン) - 112トン

※1 原油の CO₂ 排出係数 (tCO₂/kL) ※2 灯油の CO₂ 排出係数 (tCO₂/kL)

(7) 最終目標の達成度

最終目標に対する成果、達成度を表 3.2.2.5-5 に記載する。

表 3.2.2.5-5 最終目標の達成度

研究開発項目	最終目標	成果	達成度
シソ代謝系制御技術による健康機能性成分の高効率増産技術開発	乾燥シソ葉1g当たり機能性成分A含量を10倍に、機能性成分B群含量を5倍へと増加させる。	ストレス栽培により機能性成分A含量を約21倍、ゲノム編集とストレス栽培の併用により機能性成分B群を約2.9倍に高含有化した。	◎：機能性成分Aの達成度は100%。 △：機能性成分B群の達成度は57.4%。

達成度 ◎：大きく上回って達成、○：達成、△：概ね達成、×：未達

(8) 研究開発成果と意義

本事業ではシソの遺伝子組換え技術及び栽培環境を制御したストレス栽培技術を併用し、機能性成分 A 及び B 群の高生産方法を開発した。シソ遺伝子組換え技術による機能性成分の高含有化においては、機能性成分 A や機能性成分 B 群の合成、代謝に関わる酵素遺伝子を過剰発現もしくは発現抑制した。また、人工環境下において、栽培環境を制御するとともに各種薬剤処理や光波長処理により、機能性成分 A や B 群を高含有化させるストレス栽培技術も開発した。同時に遺伝子組換えやストレス栽培技術による機能性成分の変動を捉えるため、機能性成分及びその前駆体物質、周辺物質の一斉分析法も開発した。遺伝子組換え技術及び栽培環境を制御したストレス栽培技術を併用することで、従来の栽培法では不可能な機能性成分の高含有化を実現させ、最終的に機能性成分 A 及び B 群の含有量をそれぞれ 10 倍、5 倍に増加させることを目標とした。

さらに本事業で作出された遺伝子組換えシソを原料とした機能性素材を開発し、海外において原料及び最終製品の販売を計画している。そのため、遺伝子組換えシソを利用した製品の海外販売に係る調査研究を実施し、販売に向けた情報収集を行った。

中間評価において、機能性成分 B 群の高生産化に向け、委託事業で研究開発が進められている新規ゲノム編集ツール TiD システムによる機能性成分 B 群の代謝に係る酵素遺伝子の機能欠損個体の作出を提案された。この提案を受け、2019 年度より徳島大学との共同研究を開始した。

研究開発項目 1：シソ機能性成分代謝系遺伝子の操作（担当 主：アミノアップ、副：産業技術総合研究所）

本研究開発では、機能性成分 A 及び B 群の高含有化を目的として機能性成分代謝系遺伝子を組換えしたシソを作出した。そのため、シソ代謝系遺伝子を単離し、その遺伝子が機能性成分の高含有化にどの程度寄与しているのかを評価した。また同時にシソの形質転換法を確立し、得られた成果を合わせて代謝系遺伝子組換えシソを作出した。

まず機能性成分 A 生合成系及び B 群の代謝に関与する遺伝子の単離を行った。両代謝系遺伝子の内、既に単離済みであった 3 遺伝子（機能性成分 A 生合成系遺伝子、機能性成分 B 群生合成系遺伝子 2 種）に加え、機能性成分 A 生合成系の 1 遺伝子、機能性成分 B 群代謝系の 1 遺伝子の単離を実施した。次に単離したシソ代謝系遺伝子をアグロインフィルトレーション法によりタバコ葉 (*Nicotiana benthamiana*) において一過性発現もしくは発現抑制を行い、機能性成分含有量の変化量から高含有化に対して効果の高い遺伝子を評価した。5 つの代謝系遺伝子について解析した結果、機能性成分 B 群の合成に関わる 2 遺伝子がそれぞれ過剰発現したタバコ葉において、

B 群と推定される HPLC クロマト上のピーク面積が増大していることから、両遺伝子の過剰発現は機能性成分 B 群合成に効果があると考えられた。

シソの遺伝子組換え実施例は世界的にも数例しかなく、モデル植物のような遺伝子組換え方法は確立していない。そのため、シソの使用部位、カルス培養、遺伝子導入後の薬剤耐性等の条件

検討から始めた。その結果、カルス誘導率・不定芽誘導率を基準に最適な使用部位と植物ホルモンの条件が明らかとなった。最適な条件を用いてマーカー遺伝子を用いた組換え試験を実施した。マーカータンパク質が触媒作用する酵素-基質反応を利用した染色法により、マーカー遺伝子がシソ植物体に組み込ま

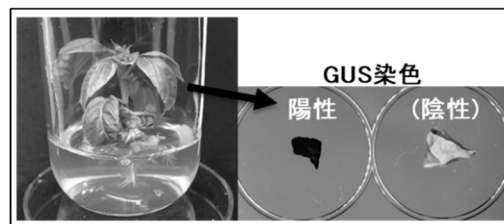


図 3.2.2.5-4 GUS 遺伝子組換えシソの GUS 染色

れていることが確認でき、シソの形質転換法が確立された（図 3.2.2.5-4）。

目的とする代謝系 5 遺伝子について、シソへの遺伝子組換えを実施し、抗生物質耐性を有する植物体を作成した。作成した 5 つの遺伝子組換え体のうち、機能性成分 A の高生産化を目的とした 2 つの遺伝子過剰発現体については、研究開発項目 2 におけるストレス栽培条件の検討により機能性成分 A 高含有化の最終目標値を達成したため、解析は実施していない。また、機能性成分 B 群の高生産化を目的とした 1 つの遺伝子発現抑制体については、2019 年度から開始した研究開発項目 5 におけるゲノム編集技術により効率的な機能欠損個体の作出が可能となった。よって、機能性成分 B 群の高生産化を目的とした 2 つの生合成系遺伝子の過剰発現体を優先して遺伝子発現量および機能性成分 B 群量を解析した。それぞれの組換え体の導入遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR (Taqman® probe 法) により分析した結果、一方の生合成系遺伝子過剰発現体では解析した全ての系統で非遺伝子組換え体と比較し有意に目的遺伝子の発現量が増加した（約 1.9 倍から 21.9 倍）。もう一方の生合成系遺伝子過剰発現体では 21 系統中 18 系統で有意に目的遺伝子の発現量が増加した（約 3.1 倍から 8.6 倍）。このことより、遺伝子導入によって目的通りの遺伝子発現制御が実現できていることが明らかとなった。一方、機能性成分 B 群の含量を分析したところ、両遺伝子組換え体共に目標値を達成するような含量の増加は認められなかった。両遺伝子の組換え体共に、遺伝子発現量が高い系統または機能性成分 B 群量が比較的高いそれぞれ 2 系統を研究開発項目 2 でのストレス栽培との併用に供する系統として選抜し、ストレス栽培を実施するとともに後代 (T1 世代) について採種した。

研究開発項目 2：ストレス栽培技術によるシソ機能性成分の製造基盤技術（担当 主：産業技術総合研究所、副：北海道科学技術総合振興センター）

本研究開発では人工環境下でシソの高収量化技術及び機能性成分 A や B 群の高蓄積化技術を開発した。

高収量化については、シソの乾燥葉を高効率に生産することを目的とした人工環境下における水耕栽培技術を開発するために、栽培環境では光強度や光質、栽培方法では栽植密度や養液組成をそれぞれ検討した。その結果、光強度は強光条件で収量が高く、光質の違いでは収量の差は見られず、栽植密度は密植条件で、養液処方の濃度は高濃度でそれぞれ収量が増加した。各環境および栽培条件を最適化した中規模栽培の実証試験では、既存法と改良法で 4 週間栽培した。その結果、改良法では、既存の水耕栽培より 2 倍以上の収量が得られ、高収量栽培法が確立された。

機能性成分 A 及び B 群を高生産するストレス栽培技術の開発においては、代謝系酵素の阻害剤や促進剤の薬剤処理あるいは特定光波長照射や純水置換などの環境ストレスにおいて、効果的な条件を検討した。機能性成分 B 群関連化合物の生合成遺伝子の組換えシソや代謝系遺伝子のゲノム編集体を用い、合計 35 種のストレス栽培を実施した。機能性成分 A の濃度は、シソ通常品種におけるストレス単独処理で原料規格値の約 21 倍（最終目標値の 2.1 倍）に達した。機能性成分 B 群はストレス処理と機能性成分 B 群代謝関連酵素遺伝子のゲノム編集個体との併用により原料規格値の約 2.9 倍に達したが、最終目標値には及ばなかった。

機能性成分 A は、実験スケールでは最終目標を達成したため、スケールアップした規模かつ本研究開発で確立した高収量な栽培条件を併用した試験を実施した。その結果、機能性成分 A 濃度は最終目標値の 95%であった。よって、事業化する規模での本技術の実効性の検証や、効率的な栽培方法の検討の必要性が認められた。

研究開発項目 3：シソ含有機能性成分のハイスループット解析技術の確立（担当 アミノアップ）

栽培条件の最適化や生合成遺伝子の導入検討の効果を評価するためには、機能性成分のみではなく、その生合成に関わる前駆物質や周辺物質の含量を測定することが必須である。この課題を解決するためにトリプル四重極型液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS/MS）を導入し、生合成経路における各成分を一度の分析で一斉解析する技術を開発し、効果を検証した。

機能性成分 A 合成経路及び機能性成分 B 群合成経路上の 38 化合物を対象として、まず標準品を用いて分析条件を検討した。その結果、標準品を用いた場合、38 化合物中 34 化合物について一斉分析が可能となった。次に凍結乾燥処理を行ったシソ葉をサンプルとして、抽出溶媒、液体クロマトグラフィー分離条件、トリプル四重極 MS の検出条件等を検討した。その結果、実試料においては 23 化合物について定量可能となった。

確立した一斉分析法を用いて研究開発項目 1 に由来する遺伝子組換え体、研究開発項目 2 に由来するストレス処理に供した植物体、研究開発項目 5 に由来するゲノム編集体の機能性および周辺成分を解析することで、個々の技術開発による効果を検証し、その結果を更なる検討へとフィードバックした。例として研究開発項目 5 における解析について記述する。研究開発項目 5 では機能性成分 B 群に係る代謝系遺伝子の機能欠損個体を作成することで、機能性成分 B 群を高含有化することを目的とした。標的遺伝子は機能性成分 B 群とその他の下流代謝物の分岐点に位置しかつその他の下流代謝物の合成に関与する遺伝子である。そのため、標的遺伝子にゲノム編集が生じた個体ではその他の下流代謝物量が減少することが見込まれた。ゲノム編集システムに対する一斉分析において、バイアレリックな系統において機能性成分 B 群が増加するとともに標的遺伝子直下の代謝物が検出感度以下に低下していることが確認された。よってバイアレリックな系統においてはゲノム編集により標的遺伝子の機能欠損が生じた可能性が示唆された。この結果は研究開発項目 5 における遺伝学的解析とともにゲノム編集個体の系統選抜へとフィードバックされた。

研究開発項目 4：遺伝子組換え作物を用いた機能性素材の海外販売に係る調査研究（担当 アミノアップ）

本事業で作出される遺伝子組換え植物由来の機能性素材の海外展開を計る場合、各国の当該法規制に関して調査する必要がある。また販売候補国の担当機関等の現地調査が必要である。

2016 年度は遺伝子組換え作物に関わる法規制の概要、遺伝子組換え食品を流通させるのに必要な試験データや担当機関等について、6 カ国及び 2 地域を対象として、以下 5 項目について、調査を実施した。調査内容：①遺伝子組換え作物を原料とした機能性素材の規制状況、②遺伝子組換え作物を原料とした機能性素材販売に必要な手続き、製品情報、データ、③担当規制当局、④関連法規、⑤規制状況。

2017 年度は 2016 年度に調査した 6 カ国、2 地域から販売候補国 1 国を選定し、当該国の遺伝子組換えを管轄する機関、機能性素材を管轄する機関、食品全般を管轄する機関及び現地 3 企業と面談した。

研究開発項目 5：シソ代謝系遺伝子のゲノム編集による制御（担当 主：徳島大学、副：アミノアップ）

本事業では、遺伝子組換え技術の開発によりシソの代謝系を制御し、機能性成分を高含有化することを目的としている。機能性成分 B 群の高生産化には標的遺伝子の RNA interference による発現抑制体を用いる計画であったが、中間評価においてゲノム編集による遺伝子機能欠損個体の使用の提案を受けた。本スマートセルプロジェクトでは、ゲノム編集技術の開発が進められており、その開発された技術と本事業で確立したシソ実用品種に対する遺伝子組換え系との連携が可能であると考えられた。そこで植物のゲノム編集に向けた新規ツール開発を実施している徳島大学（「ゲノム編集技術」テーマ）と共同研究を開始し、シソの代謝系遺伝子のノックアウト組換え体の作出を実施した。

徳島大学で開発された TiD を用いるにあたり、まずは既存のゲノム編集法を用いて標的遺伝子のゲノム編集が機能性成分 B 群の高含有化に寄与するかどうかを検討した。徳島大学が運営する gRNA 設計支援 Web アプリケーション Focas を用いて、標的遺伝子のコード領域上の 3 箇所の標的配列をゲノム編集に利用する gRNA として設計した。ゲノム編集ベクターの構築では、まず設計した gRNA 配列に対応するセンス鎖およびアンチセンス鎖のオリゴ DNA を合成し、2 本のオリゴ DNA をアニールして二本鎖 DNA を得た。次に、gRNA に対応する二本鎖 DNA を従来のゲノム編集ベクターの gRNA 発現カセット部位に連結し、3 種の発現ベクターを構築した。研究開発項目 1 で確立したシソ実用品種に対する遺伝子組換え系を用いてシソ胚軸切片への形質転換を実施した。3 種のベクターのうち 1 種のベクターでのみゲノム編集が認められた。再分化した植物体について PCR-RFLP 法によりゲノム編集の有無を確認した結果、9 系統でゲノム編集が確認され、うち 5 系統はバイアレリックなゲノム編集体であり、前述の通り研究開発項目 3 での一斉分析による解析において標的遺伝子の下流代謝物が大きく減少した系統が認められた。次世代シーケンス (NGS) 解析を実施したところ、ゲノム編集陽性個体と認められた個体においてはストップコドンを生じさせる機能欠損変異が生じていた。以上の結果を考慮して次世代において詳細な解析を行う 2 系統を選抜した。

T0 世代のゲノム編集個体は個体中の細胞レベルでは様々なゲノム編集パターンが混在する可能性があるため、編集パターンが個体中の細胞レベルで同一となる T1 世代を採種した。T1 世代のバイアレリック個体において一斉分析を実施したところ、T0 世代同様に標的遺伝子の下流代謝物は検出されなかった。また NGS 解析においても T1 世代個体には T0 世代個体でみられたストップコドンを生じさせるフレームシフト変異が遺伝していることが確認された。T1 世代のバイアレリック個体において機能性成分 B 群濃度が原料規格値の約 2 倍に達し、また研究開発項目

2 ストレス栽培技術を併用することで前述の通り機能性成分 B 群は原料規格値の約 2.9 倍に達した。加えて、シソを対象としたゲノム編集個体の作出報告はこれまでになく、世界初の技術成果である。

従来のゲノム編集技術を用いて機能性成分 B 群に関わる代謝系遺伝子の機能欠損による機能性成分 B 群含量の高蓄化の効果が検証できたため、新規ゲノム編集ベクターである TiD を用いた当該遺伝子のゲノム編集個体の作出を実施した。まず、TiD で利用する gRNA 配列を徳島大学で作成した検索プログラムを用いて標的遺伝子上に設計した。TiD の標的化に重要なプロトSpacer隣接モチーフ (PAM) は 35 塩基の標的配列の 5' 側上流に位置する 5'-GTH-3' (H は A, C, or G) であるが、TiD による変異導入で実績がある PAM 配列 5'-GTT-3' および 5'-GTC-3' について検索を行い、46 種の gRNA 候補を見出した。

TiD によるゲノム編集では、従来のゲノム編集法とは異なり、内在性のゲノム遺伝子の変異導入実験に先立ちモデルシステム:ルシフェラーゼ組換えレポーターシステム (LUC 組換えアッセイ) を用いた予備スクリーニングの実施が効果的であることがわかっている。そこで、上記で設計した TiD が利用する gRNA 候補のうち、標的遺伝子の第一エクソン上に設計した 16 種の gRNA 候補について、LUC 組換えアッセイに必要なコンストラクト作製を行い、モデルコンストラクトによる評価を行った。本実験の結果から、6 種の配列を gRNA 候補として絞り込んだ。上記 6 種の gRNA 候補は、徳島大学が構築した植物用 TiD 発現ベクター pMGTiD20 へ連結し、シソ胚軸切片へと形質転換を行った。胚軸切片からのカルス、不定芽、植物体の形成を誘導した。

研究開発項目 6: シソ代謝系遺伝子の脱メチル化による制御 (担当 主: 北海道大学、副: アミノアップ)

遺伝子発現は DNA 上のメチル化、脱メチル化により制御されていることが近年明らかとなっている。サブプロジェクトマネージャーのコメントを受け、本事業においてもこれらの制御がシソ代謝系遺伝子にも関与しているかどうかを検討した。代謝系遺伝子のメチル化が明らかになった場合、機能性成分 B 群の高生産化を目的とした当該関連遺伝子の脱メチル化による高発現化を試みる。従来の遺伝子の高発現方法は外来性遺伝子を導入する遺伝子組換えに依存するところであるが、北海道大学で研究開発されているウイルスベクターによる脱メチル化技術は外来性遺伝子を導入することなく内在性遺伝子の高発現が実現可能である。そのため、この技術により作出される植物体は非遺伝子組換えと分類されると考えられる。

北海道大学で研究している脱メチル化技術用いた遺伝子の高発現化技術には、ウイルスベクターの構築が必要である。そこで本研究開発項目では、まずはウイルスベクターとして使用可能なシソに効率よく感染するウイルス種の検討を 2019 年度に実施した。その結果、シソにおいては散発的にのみ感染するウイルスの一般系統と比較し、全身感染が長期的に維持される系統を見出した。この系統の感染当代において機能性成分 B 群の合成に関わる遺伝子の発現が増加する現象を確認した。さらにウイルスフリーであることを確認した後代個体においても同様の結果が得られたことから、この遺伝子発現の増加は遺伝的変異を伴わないメチル化状態の変化による発現変動 (エピジェネティックな現象) である可能性が示唆された。しかし、当該遺伝子の発現が上昇したいずれの世代においても目的とする機能性成分 B 群の増加は認められなかった。そこで脱メチル化による発現制御では機能性成分 B 群の高蓄化の可能性は低いと判断し、2020 年度に予定していた北海道大学との共同研究を中止とした。

(9) 成果の普及

成果普及活動実績について、表 3.2.2.5-6 に示す通りである。

表 3.2.2.5-6 成果普及活動実績

年度	論文		その他外部発表				受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016～2018	0	0	4	0	1	1	0
2019	0	0	2	0	0	0	0
2020	0	0	1	2	1	0	0
PJ 期間合計	0	0	7	2	2	1	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

本プロジェクトで見出した機能性成分の高生産化に係る成果の一部について 2017 年度に国内特許出願（特願 2018-2334）、2020 年度に審査請求（特開 2019-118331）を実施した。

表 3.2.2.5-7 特許出願一覧

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2016～2018	1	0	0
2019	0	0	0
2020	0	0	0
PJ 期間 合計	1	0	0

(11) 成果の事業化に向けた戦略

事業化を目指す製品のターゲットとしては「整腸作用」と「アレルギー症状緩和」が中心となるが、機能性成分 A や B 群の機能性から「抗酸化」「メタボ対策」「ダイエット」「脳機能改善」といった分野も対象となる。2015 年の健康・機能性食品素材市場規模は 1,009 億円となっている（株式会社 矢野経済研究所）。「整腸作用」「アレルギー症状緩和」に加え、「抗酸化」「メタボ対策」「ダイエット」「脳機能改善」の市場も加えると、全体の 7 割程度の大きさと考えられ、当社としても非常に魅力的な市場であり是が非でも上市・販売したいと考えている。

国内同様に海外の機能性食品市場においてもプロバイオティクスが脚光を浴びはじめている。世界規模でのプロバイオティクス市場は、2016 年には市場規模 426 億ドル（約 4.3 兆円）に達するとされている（リサーチステーション合同会社）。また、「アレルギー性鼻炎治療」の世界市場は、2014 年に 113 億ドル（約 1.2 兆円）に達し、2024 年にかけてさらに拡大すると予想されている（リサーチステーション合同会社）。国内・海外あわせて 5 兆円以上の市場規模があり、

大きなビジネスチャンスと考えている。弊社の経営計画上、海外売上を全体の 50%まで伸ばすことを掲げているため、既存ルートを含めて海外市場へも販売を拡大する予定である。

「遺伝子組換え技術の国民的理解に関する調査研究」¹⁾によるとオーストラリアのように遺伝子組換えを国として積極的に取り入れ、国民理解の高い国もある。そこで本事業では、遺伝子組換えに対して比較的受容度がありかつ遺伝子組換え製品の輸出販売に係る法規制が整備された国において、開発した遺伝子組換えシソを原料とした機能性素材の販売を計画している。本事業では、研究開発項目 4「遺伝子組換え作物を用いた機能性素材の海外販売に係る調査研究」を設定し、調査を実施した。2016 年は 6 カ国 2 地域について、遺伝子組換え製品に関する輸出、販売に係る窓口機関や手続き方法などの調査を行った。さらに 2017 年度は前年度の調査結果より、販売候補国を選定し、現地調査を実施した（Ⅲ. 2.2 研究開発項目毎の成果を参照）。

引用文献

- 1) 平成 20 年度・平成 21 年度科学技術振興調整費「重要政策課題への機動的対応の推進」プログラム

(12) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

事業化スケジュールは 2019 年度に製品設計を行い、2022 年度までに各種安全性試験、遺伝子組換え作物等の産業利用第 2 種申請を実施する。さらに 2025 年度の上市に向けて、生産量の検討や生産設備を用いた試験製造検討、製品の安定性試験を実施する予定である。

実用化・事業化の中断や延期など、実用化・事業化全体の計画変更を考慮する必要がある重大なポイントは、遺伝子組換えの安全申請（厚生労働省）の承認の可否によるが、まずは現在使用している完全密閉型植物工場において「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成 15 年法律第 97 号）」に基づき第 2 種使用に係る申請として、独立行政法人製品評価技術基盤機構への事前審査、経済産業省へ本申請を行う。

ただし、中間評価以降に機能性成分 B 群の高生産化を目的としゲノム編集技術を用いることとなり、当該技術の使用であれば上記申請は不要となる。一方、厚生労働省へのゲノム編集技術応用食品等の事前相談及び届出が必要となる。

(13) 成果の事業化の見通し

本事業における技術開発は、露地栽培による原料生産の問題点を克服し、また弊社製品の販売拡大に対して十分なシソ乾燥葉の生産を達成するものである。提案時には、建設予定の栽培面積 1,500 m² の植物工場を用いた場合、3.2 トンのシソ乾燥葉を生産できると試算した。中間評価までの本事業の成果において、人工環境下の高収量栽培条件及びストレス栽培技術のそれぞれに最適条件が明らかになりつつある。最適条件が併用可能な場合、必要なシソ乾燥葉量を確保するための栽培面積は 1,500 m² から半分程度まで減らせる試算である。そのため、量産化に向けた事業化のハードルが下がると考えられる。

本事業の最終的な成果として、植物工場におけるシソの水耕栽培の単位面積当たりの年間収量が既存の栽培方法と比較して約 2.8 倍となる高収量の栽培条件を見出した。さらに機能性成分 A の濃度はストレス栽培技術により最終目標値の 2.1 倍（現規格値の 21 倍）の高含有化を達成できた。そこで栽培面積を実験スケールから約 11 倍のスケールへと拡大し、かつ、機能性成分 A

の高含有化条件と高収量栽培条件を併用した予備的な検討を実施した。その結果、機能性成分 A 濃度は目標値に近似した値ではあったが、実験スケール時の約半分程度であり、また、収量も高収量栽培条件の半分程度であった。この結果は高含有化条件と高収量条件の併用に起因するのか、または栽培スケールの違いに起因するのかは現段階では不明であるため、今後詳細な検討の必要がある。一方、機能性成分 B 群の濃度は水耕養液に薬剤を添加するストレス栽培技術とゲノム編集技術の併用により弊社の現在の規格値の約 2.9 倍となった。しかし、最終目標を現在の規格値の 5 倍と設定しているため、達成度は 6 割程度である。よって事業化に向けては機能性成分 B 群が目標値に達する技術開発を継続する必要がある。さらに機能性成分 B 群の高含有化に着目した栽培技術のスケールアップにおいても、機能性成分 A と同様に実験スケールから想定される収量や機能性成分量に達しないことが予測されるため、今後、実生産に向けたスケールアップ条件の詳細検討が必要である。

3.2.3 研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」【委託】

(1) 背景と目的

新規情報解析技術を開発することにより、微生物が持つ物質生産能力を人工的に最大限引き出した細胞を短時間で構築し、従来法の生産性の凌駕、または生産が難しい有用物質の創製を目指す。そのために必要となる基盤技術を開発するとともに、特定の生産物質における実用化技術を開発する。

具体的には、わが国の独自技術である長鎖 DNA 合成技術を超高速化することで、高度の多様性を有する微生物を短時間で構築する技術を開発するとともに、情報解析に必要な生産性データおよびオミクスデータを高精度かつ高スループットで取得する分析・評価技術、すなわち「ハイスループット合成・分析・評価技術」を開発する。

次に、取得したデータを基に、有用物質の生産性を画期的に高め、従来と比較して圧倒的に現実性を高めた代謝モデル、遺伝子発現制御モデル、統合モデル（これらをスマートセルモデルと称する）を構築し、スマートセルモデルを具現化する遺伝子配列を設計するシステム、「高生産性微生物設計システム」を開発する。

本システムは、出芽酵母や大腸菌等の汎用宿主だけでなく、産業用微生物にも適用性を広げ、民間企業が標的とする特定の生産物質で有効性を検証するとともに実用化技術を開発する。さらには、上記の基盤技術を集約した「スマートセル創出プラットフォーム」を構築し、微生物物質生産における新規産業形態の創出を目指す。

(2) 位置づけ、目標値

生体細胞を産業利用するためには、細胞の高次生命システムを理解し、細胞プロセスを制御することが求められる。そのためには細胞構成物質群全体の挙動の観測が必要であり、次世代シーケンサー（NGS）や質量分析器（LC-MS）などの科学技術が進展してきた。さらに最近では、NGS や LC-MS 等による DNA、mRNA、タンパク質、代謝物というそれぞれの階層の物質の細胞内全量測定が積極的に実施され、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームという各種オミクス研究が盛んに行われている。今後は、これらオミクス情報を高精度かつ網羅的・体系的に取得し、機械学習等の情報科学的な手法によって階層縦断的なオミクスデータ解析を実施する統合オミクス解析技術の確立が期待されている。これにより、例えば主要代謝経路上にない転写因子間の相互作用、代謝物と転写因子との関係性など、従来の実験的知見では得られなかった重要因子が特定され、革新的な生産性の向上、全く新規の物質創製に貢献すると考えられる。

近年進展著しい情報解析技術が微生物の物質生産能を向上させることが期待されている。バイオ生産に有用な情報を抽出することにより、特定の微生物で特定の物質を効率的に生産させるための代謝経路の設計、酵素および遺伝子の選択が可能になる。その結果、これまでの代謝改変戦略の限界を超え、戦略の選択肢が拡大すると期待される。また、代謝改変戦略の立案に要していた膨大な時間を短縮し、研究開発効率を向上させることができる。

【中間目標（2018年度）】

(1) ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

- ・ 30kb 超の DNA 合成時間を従来の 1/2 に短縮する技術を確立する。
- ・ LC-MS のハイスループット化により、現状と比較して 10 倍の分析速度を実現する。
- ・ その他、高生産性微生物設計システムを効率的に運用するために必要となるハイスループット評価技術を確立する。

(2) 高生産性微生物設計システムの開発

- ・ 階層内、階層間の制御ネットワークを推定する階層縦断的な情報解析手法を開発する。
- ・ 上記解析手法や代謝流束推定、人工酵素設計技術等を統合し、特定物質の生産性向上に資する重要因子、改変すべき遺伝子配列を提示する汎用的な設計システムを構築する。

(3) 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

- ・ (1)、(2)で開発したシステム（スマートセル創出プラットフォーム）を用いて、生産性の大幅な向上に資することを最低 1 つのターゲットで実証する。
- ・ 各国の類似事業・研究開発動向を調査し、我が国の優位性を生かした独自の知財戦略及び事業化モデル（案）を策定する。

【最終目標（2019 年度）】

- ・ スマートセル創出プラットフォームを用いることにより、従来育種と比較し、物質生産株の開発期間を 1/10 に短縮することを実証する。
- ・ 開発した要素技術、システムを維持・運営するための事業化モデルを策定する。

(3) 全体計画

(1) ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

(2)の情報解析技術を用いて構築するシステムで提示される遺伝子配列の効率的な導入のために、DNA 断片の合成からプラスミドの構築、精製、長鎖 DNA 合成までをハイスループットで行う長鎖 DNA 合成技術を開発する。また、メタボロームを高速に取得するために、前処理や解析の自動化、分析装置の改良等を行い、ハイスループット化した LC-MS を開発する。その他、高生産性微生物設計システムを効率的に運用するために必要となるハイスループット評価技術を開発する。

(2) 高生産性微生物設計システムの開発

同一サンプル、同一条件での各オミクス情報を体系的に取得・蓄積し、そのビックデータから機械学習等の情報解析技術を用いて DNA、mRNA、タンパク質、代謝物の階層内、階層間の制御ネットワークを推定する手法（方法論、アルゴリズム）を開発する。併せて、酸化還元バランス等も考慮した代謝流束推定手法や人工酵素設計手法を開発する。これらの解析手法を統合し、特定物質の飛躍的な生産性向上に資する重要因子、改変すべき遺伝子配列を提示する汎用的な設計システムを構築する。

また、上記システム構築のために、測定データの規格化、体系化されたデータベースの構築、公開データからの知識整理等も併せて実施する。

(3) 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

(1)(2)で開発したシステムを用いて、将来事業化を想定する対象物質を設定の上、その大幅な生産性向上及び従来育種（例：5年）と比較して開発期間の短縮化に資することを実証する。また、プロジェクト終了後も維持・運営するために必要となる知財戦略及び事業化モデルを検討する。

(4) 実施体制

運営組織として、事業化検討委員会、知財運営委員会、データベース委員会、事務局を設けた。（運営組織：事業化検討委員会、知財運営委員会、データベース委員会の役割については、(5)運営管理にて述べる）

(5) 運営管理

①テーマ独自に運営管理している会議体等を以下に示した。

- ・拠点会議、全体会議
研究進捗管理、技術共有、研究者育成のため定期開催（約半年に1度）
- ・研究管理委員会
プロジェクト運営検討（拠点会議、全体会議時に開催を基本とする）
- ・事業化検討委員会
事業環境分析、ベンチマーク企業分析を基にしたビジネスモデルの検討（随時開催）
- ・知財運営委員会
成果公開時の審議承認、知財合意書周知の為の会合、他（随時開催）
- ・データベース委員会
実験データの集積、管理ルール・方法の策定（随時開催）
- ・その他
イベント企画（展示、公開セミナーへの参加・開催、出版）
ワークショップ（技術共有ミーティング）など

また、各課題検討の際には、例えば「有効性検証課題に Dry 担当者が参画した会合」など、課題ごとに定期的な会合（約1か月ごと）を開催し、課題抽出、進捗管理の打合せを行っている。

②会議体以外に、進捗管理や情報共有のための取組みとして、有効性検証における基盤技術の活用促進、課題研究の進捗加速を目的として、基盤技術の開発状況、有効性検証の進捗状況をプロジェクト全体で共有していく仕組み（基盤技術目録、DBTL サイクル図・ワークフロー）を策定し、定期的に更新している。

- ・基盤技術目録
開発している基盤技術ごと、技術水準、強み（弱み）、実用性、知財観点から一覧表とし、全機関が共有する仕組みを運用している。
- ・DBTL サイクル図・ワークフロー
有効性検証課題ごとの進捗を「DBTL サイクル図」で表現し、サイクルがどのように回転しているか、定期的に更新している。また、対象の微生物、生産物ごと課題解決に向けて活用した技術を組みこんだワークフローを策定している。

基盤技術目録、ワークフローはプロジェクトの大きな成果物であり、将来的な実用化、事業化検討の礎にする。

これらの実施に際しては課題(1)～(3)の領域代表者（進捗、課題抽出など情報のとりまとめ役）、およびそれぞれの要素技術（基盤技術）を開発する技術開発責任者を定め、取り組んでいる。

課題(1) ハイスルーブット合成・分析・評価手法の開発：Build、Test 領域

課題(2) 高生産性微生物設計システムの開発：Design、Learn 領域

課題(3) 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証：有効性検証課題

その他に、実験データの格納、会議資料の共有のため、グループウェアを立ち上げて運用している。また、研究者目線での情報共有の為、事務局が情報収集し、月例レポートを発行している。

③実用化・事業化に向けた取り組み

(I)実用化に向けた戦略（目的と達成手段）

(i)目的

プロジェクトで開発した基盤技術を、企業等を含む産業微生物に適用して有効性（超高速育種の実現、従来育種を超える生産性向上、新規の物質生産株の創出）を実証し、実用化技術とする。

(ii)最終目標と達成手段

（最終目標）

本プロジェクトで得られた基盤技術を「有効性を実証した実用化技術」として確立し、事業化に向け蓄積する。

（達成手段）

開発している基盤技術を企業等の産業微生物に適用し、実証データをフィードバックすることによって、基盤技術を実用化技術として確立する。

(II)実用化に向けた具体的取組み

開発している基盤技術を複数の有効性検証課題に適用し、得られた実証データは基盤技術開発にフィードバックされ、さらなる改良を進めている。

戦略に沿った具体的取り組みの例として、「パイロットラボの構築」と「自家蛍光顕微鏡の開発」を示す。両者とも参画している企業とアカデミアが共同で開発をしており、当初の実実施計画を前倒しして、事業化に進める予定である。

「パイロットラボの構築」

本事業で開発した DBTL サイクルを形成する基盤技術を集約したパイロットラボを神戸大学内に設置した。このパイロットラボでは、スマートセルを従来の 1/5 以下の機関で開発が可能であり、企業などがパイロットラボを「スマートセル開発プラットフォーム」のプロトタイプとして広く活用できる体制を整えた。

当初計画を超え、内閣府 PRISM を活用の枠組みを活用して、各機器をロボットで連携させる工程の自動化を進めた。

「自家蛍光顕微鏡の開発」

(課題名(1)-9「自家蛍光顕微鏡開発」)

(株) ニコンソリューションズと筑波大学は、共焦点レーザー顕微鏡システムを用いて微生物の自家蛍光シグネチャーから細胞を傷つけることなく生きたままの生理的状态を高速で定量的に評価し、識別する細胞評価技術および自動解析ソフトウェアを開発した。

本技術を活用することで、従来数日かかっていた微生物の生理状態の評価が10分～60分程度に短縮され、微生物をはじめ植物や動物の細胞育種などの研究を効率化できる。本システムは2021年度中の販売開始を見込んでいる。

(III) 事業化に向けた戦略 (目的と達成手段)

(i) 目的

本プロジェクトの研究開発成果を、生物による物質生産「スマートセルインダストリー」の領域で国際的な競争力を持つバイオフィュードリーの構築に繋げる。

(ii) 最終目標と達成手段

(最終目標)

本プロジェクト開始後の3年間で、研究開発成果を維持・運営するための基本戦略とビジネスモデルの検討を行い、プロジェクト終了後には事業化に向けた準備を完了する。

(達成手段)

研究管理委員会の統括のもと、神戸拠点、産総研拠点、知財運営委員会、事務局と連携をとりながら、事業化検討委員会を中心にした検討を行う。

(IV) 事業化に向けた具体的取り組み

(i) 事業化に向けた具体的検討取り組み (アプローチ)

事業化検討委員会を立ち上げて以降、事業環境分析、ベンチマーク企業分析、ビジネスモデルの検討等を進めてきた。

(ii) ベンチマーク企業の選定及び絞り込み

公開情報や入手可能な調査報告書等を幅広く分析することを通じて、「スマートセルインダストリー」の領域に関する、事業環境分析を行った。さらに、同領域に関係する既存企業の洗い出し(予備調査)を行った。事業環境を理解した上で、洗い出した企業群から、ベンチマーク対象候補企業として約40の企業を選定し、更に詳しい分析を行い、事業内容、企業規模等を考慮し、17社に調査対象を絞り込んだ。その後、外部有識者や日本を訪問してきた欧米のバイオベンチャー関係者等との意見交換等も行い、特に参考にするべき米国企業5社を選定し、現地調査を行った。

(iii) ビジネスモデルの検討

ベンチマーク企業分析の結果から、本プロジェクトの研究開発成果を、生物による物質生産「スマートセルインダストリー」の領域で国際的な競争力のある事業化につなげるための、ビジネスモデルを検討し、「スマートセルインダストリー」のバリューチェーンの中における当該企業のポジショニング及び提供する機能（事業内容）、収益モデル等の複合的な観点に基づいて、ビジネスモデルのパターン化を行った。

(iv) 事業化の見通し

随時更新される基盤技術目録、DBTL サイクル図・ワークフローと、上述の取り組みから導かれた複数のビジネスモデルとの関係性等を分析し、具体的な事業化モデルの検討を開始している。

例えば、基盤技術を集約した「スマートセル創出プラットフォーム」を活用する、バイオワークス型企业立ち上げの具体的な検討に入り、神戸大学発ベンチャーとして社会実装が始まるなど、事業化モデルの実現に向けた取り組みが進んでいる。

また、開発した基盤技術を活用したいというプロジェクト外部の企業から 185 件の問い合わせがあり、そのうち 102 件が共同研究など具体的な取り組みに進んでおり、技術の社会実装が進んでいる。

(v) 知的財産管理

先行技術調査を行った結果を基に知的財産化方針を定め、また知的財産合意書、知財運営委員会運営規則を全参画機関と策定し、運用している。また、成果の公表の事前承認を中心に知財運営委員会を定常的に運営している。円滑な知財管理、運営により、43 件の特許出願を行った。

【基盤技術開発結果の知的財産化方針】

外部調査機関（（独）工業所有権情報・研修館）を用い、先行技術調査（特許文献、非特許文献）を行った結果を基に、領域ごと以下の方針で取り組む。

- ・Design、Learn 領域は先行する企業の例と同じく、開発した技術の多くはノウハウとして保全し、実用化レベルとする。
- ・Build、Test 領域は出願、公開化を積極的に推し進める。

【知的財産合意書、知財運営委員会運営規則の策定】

知的財産合意書、知財運営委員会運営規則を策定し（2016 年 12 月 14 日）、運用している。

【知財運営委員会の運用】

メンバーは、全委託先、再委託先代表者で構成し、知財合意書の改廃、構成機関の追加、成果公表時の事前承認について審議、決議を行っている。

(6) 実施の効果

高速化・低コスト化・高精度化などの目標に向かって開発を進めた技術の中には、成果を搭載して装置化し事業化（販売）したものやベンチャー企業への技術移転により事業化に進んでいるものが出ており、市場の拡大と産業競争力強化が見込まれる。また、技術を開発するだけでなく共通基盤技術を広く活用できる仕組みを作ることで、様々な有用物質を生み出せる微生物をいち早く獲得することで競争力を持ち、企業が実用化したいバイオ由来製品の社会実装を加速する波及効果が期待できる。実際に、ワークフローを活用した企業テーマでは、食品・化粧品・医薬品等の産業で市場を獲得が期待される機能性物質（エルゴチオネイン）や産業用酵素（コレステロールエステラーゼ）の生産性を高めることに成功した事例がでてきたことで、今後の市場創出効果が見込まれる。

本プロジェクトの後継プロジェクトが 2020 年度からすでに立ち上がっており、本プロジェクトで開発した技術等を活用する企業テーマの生産実証開発を支援する。特に微生物によるものづくりでは、実生産段階での匠の技とも言える発酵生産プロセスが新規参入企業のハードルとなっていることから、後継プロジェクトでは本プロジェクトの一部成果を引き継ぎブラッシュアップしつつ、次世代のバイオ生産プロセス技術開発を行っている。微生物によるものづくりが普及することで、世界的な競争力をもった画期的な新製品（バイオ医薬品や機能性食品、機能性化粧品、バイオ素材、バイオ燃料等々）の開発と新規事業の創造を通じた雇用の創出、輸出やライセンス収入の拡大等が期待でき、国内のバイオ産業が 2015 年の約 3.1 兆円から、2030 年に 20 兆円へと約 7 倍拡大し、そのうちで工業分野の市場規模が 2015 年の約 0.3 兆円から、2030 年には約 8 兆円へと約 26 倍まで大きく拡大すると予想される。

(7) 研究開発成果

生物資源の活用とバイオテクノロジーにより経済成長と地球環境対策の両立を図る「バイオエコノミー」形成は世界的な動きとなり様々な研究開発や産業政策、経済活動等が包括的に推進されている。本プロジェクトでは、Dry と Wet の技術を有機的に連結し、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た「スマートセル」を創出する技術の開発に取り組んできた。課題(2)では微生物物質生産における課題解決のための情報解析技術（代謝設計技術、代謝最適化技術、タンパク質・酵素開発技術、ネットワークモデル構築技術、知識ベース開発、データベース開発）に取り組んできた。課題(1)では情報解析に供するデータを収集する目的で、超高速な大規模微生物株構築技術（シャーシ株高速育種技術、長鎖 DNA 合成・解析技術、ハイスループット形質転換技術、輸送体探索技術）や高速高精度な微生物株性能評価技術（メタボライトセンサ構築技術、ハイスループットトランスクリプトーム解析技術、高精度メタボローム解析技術、定量ターゲットプロテオーム解析技術、サンプル非破壊型細胞評価技術）の開発を実施した。課題(3)では開発した要素技術の有効性を検証し、本プロジェクトで開発した高度な情報技術とバイオ技術の融合・システム化により構築した、我が国独自の産業微生物「スマートセル」による高機能品生産技術を確立した。以下にその概要を記す。

課題(1): ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

- 従来法で合成困難な DNA を含んでいようとも低コストかつ短時間で長鎖 DNA を合成できる手法を構築し、ライブラリー化技術へ展開して事業化に成功した。正確にアッセ

ンプルした DNA を簡易的に単離する技術の構築にも成功した。長鎖 DNA ライブラリーを利用することで香料やワクチン抗原等、有用物質の飛躍的な生産量向上に貢献した。

- 一日あたり 5000 株以上の組換え体を作成可能な半自動形質転換システムの構築に成功した。従来困難であった、生産標的物質の排出輸送体を探索する技術を構築した。
- 細胞内代謝産物をインジケート可能なセンサーを 20 件以上作出することに成功し、育種に適切に応用するためのノウハウを集積した。また、正確な遺伝子発現解析を可能にするスパイクインミックスの開発に成功した。メタボローム解析技術として、データの再現性を極限まで高めた自動前処理ロボットの開発、約 200 成分の代謝物質を高感度に定量できる分析技術、超臨界流体抽出を駆使した高速評価系の開発に成功した。また、スマートセル用の定量ターゲットプロテオーム解析技術を開発した。さらに、細胞の物質生産性を評価軸としてハイスループットに評価・選抜する新規イメージング技術を開発した。
- スマートセル設計に必要な多様なデータセットを、メタデータも含めて適切に紐づけ、一元的に管理できる統合データ管理システムを構築し、データ取得者とデータ解析者が容易に共有できることを確認した。
- 開発した要素技術は、課題（3）に適用し、各種産業用スマートセルの構築に極めて有効であることを確認した。
- 開発した成果は事業化（技術コンサルティング、装置受注、販売開始）段階に進めることができた他、バイオフィアウンドリー型ベンチャーに技術導出段階とすることができた。

課題(2):高生産性微生物設計システムの開発

- 新奇代謝経路設計では酵素反応データを利用した学習方法を開発した。また、反応を網羅的に学習し特徴量を抽出し、特徴量空間内で酵素遺伝子を探索するプロトツールを開発した。
- 開発した各種情報解析ツールを相互に連結し、汎用性の広い代謝設計ツールに機能化を実現した。ネットワーク解析と FBA 解析の連結に成功した。また、実証結果を入れたネットワークモデル高精度化手法の開発を行った。
- 遺伝子配列設計では発現量向上タグを用いることで 100%の確率で発現量向上に成功した。膜タンパク質（難ターゲット）の高発現化に成功した。ネットワークモデルでは各検証課題において生産制御モデル構築に必要な技術開発と適用を行った。
- MD シミュレーションでは、従来モデルと比較し、約 100 倍の速度向上を達成した。また、企業所有サーバーでの計算可能な技術を開発した。
- 知識ベース開発では文献知識と FBA 解析を統合する代謝系設計提案モデルを構築した。また、品質評価指標の策定と理論的評価を完了した。また、標準化データベース第 2 版のリリースを行った。
- プロジェクトで開発してきた情報解析技術をツール化、マニュアル化して「スマートセル設計プロトコル」として整備、標準化した。プロジェクト終了後、早い時期に「スマートセル設計」を実施する事業体を設立することとした。

課題(3):高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

- 「スマートセル創出プラットフォーム」が、プロジェクトの目標である「育種開発期間の短縮」、「目的物質（化合物／タンパク質）の生産性向上」、「新規生合性経路の実現」に対して有効であることを実証した。
- 検証においては、事業化を目指す様々なターゲット物質に対して、モデル微生物だけでなく産業用宿主を用いてDBTLサイクルを回し、Wet領域、Dry領域の相互連携に成功し、スマートセル創出プラットフォームの有用性を示すことに成功した。また、スマートセル創出プラットフォームの高度化に貢献した。
- 微生物株の高速育種に成功するのみならず、微生物生産が実現していないターゲット物質の生産の実現、従来育種では限界と考えられた生産量の飛躍的向上に成功した。インパクトのある成果で成功事例を示すことにより、世界の競合技術に対して優位性を示すことができた。

3.2.3.1 ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

課題名：C(1)-1 シャーシ株高速育種法の開発と実証

担当機関：神戸大学、京都大学、理化学研究所、東京大学

(1) 背景と目的

バイオ生産において、目的の有用化合物を高生産できる微生物株の育種には5~10年以上の年月がかかると言われてきた。その理由として、従来の微生物育種では、ターゲットとなる化合物毎に、研究者の知識と経験を頼りに代謝改変戦略を構築し、遺伝子合成、プラスミド構築、遺伝子組換え、培養、評価を何度となく繰り返してきたからである。また、必要に応じて、育種の方針を変更し、代謝バランスを整えることも往々にしてある。このように、作業工程毎に試行錯誤を繰り返すために膨大な作業量と時間が必要であった。こうしたことから、目的とする化合物の種類によらずに高生産株を短期間で開発するための汎用的な育種法の開発が強く望まれてきた。

本研究開発項目では、バイオ産業で求められる有用化合物の多くが共通のハブ化合物から生合成されることに着目した(図3.2.3.1-1-1)。ハブ化合物の生産性が高い株(シャーシ株)が開発できていると、これを宿主として目的の有用化合物を高生産できる菌株の育種期間を大幅に短縮することが可能になると考えられる。

そこで、2019年度までに開発してきた、M-pathやFBA等を用いた代謝経路設計技術、OGAB法(特許取得済)による長鎖DNA合成技術、ハイスループット形質転換技術、ハイスループット微生物評価技術などの独自の要素技術を高度化・統合化することで汎用的なシャーシ株高速育種ワークフローの開発を行う。続いて、有用化合物生産経路の設計技術や長鎖DNAによるワンステップでの代謝経路導入技術などの要素技術を確立し、シャーシ株を宿主に要素技術を適用することで有用化合物高生産株を短期間で育種できることを実証する。

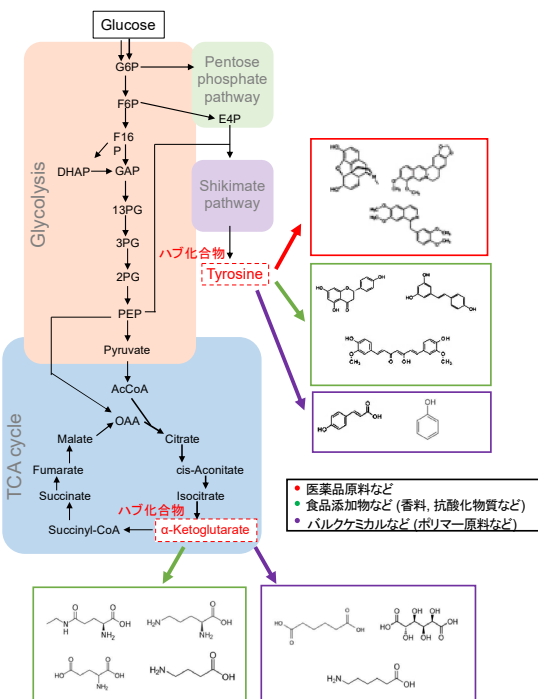


図 3.2.3.1-1-1 本研究開発項目ターゲットにしたハブ化合物

(2) 位置づけ、目標値

バイオ産業で求められる有用物質は共通のハブ化合物から生合成されているため、ハブ化合物の生産性が高い株（シャーシ株）が開発できていると、これを宿主として目的物質高生産株の育種期間を短縮することが可能となる。従来型の育種ではターゲット化合物毎に、既知の代謝情報を基にした遺伝子組換えと培養を繰り返し、結果に応じて育種の方針を変え、代謝のバランスを整えたりしながら、高生産株の開発に数年を要してきた。本研究開発項目では、情報解析技術と合成生物学技術を組み合わせることでこの課題を解決する。すなわち、FBAによる代謝経路設計技術、コンビナトリアルな長鎖 DNA ライブラリによる網羅的遺伝子発現調節技術、ハイスループット株評価技術、情報解析による生産向上因子特定技術などを組み合わせることで、シャーシ株高速育種のための汎用的なワークフローを構築する。

注．2019年度に行った課題改変まで、下記の旧課題名として研究開発に取り組んだ。そのため、各課題の2016～2018年度の「(2)位置づけ、目標値」～「(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み」については、現課題名の中で記述した。尚、「旧 C(2)-1-2 代謝モデル構築・解析技術開発と実用微生物への技術展開」については、知財化の計画があるため非公開とした。

旧 C(2)-2-3 Combi-OGAB 法と機械学習による迅速な DNA 配列因子組み合わせの探索技術の開発

→現 C(1)-2-3 Combi-OGAB 法と機械学習による迅速な DNA 配列因子組み合わせの探索技術の開発

旧 (1)-5 ハイスループット微生物構築・評価技術の開発

→現 C(1)-8 ハイスループット微生物構築・評価技術の開発 / 評価系のネットワーク化

旧 (2)-1-3 反応機構推定に基づく酵素選択・機能改変

→現 C(2)-2 タンパク質・酵素開発

旧 C(2)-1-2 代謝モデル構築・解析技術開発と実用微生物への技術展開

→ (知財化の計画があるため非公開)

(2019～2020 年度)

研究開発項目	2019 年度末目標値	2020 年度末目標値	最終目標値
①ハブ化合物高生産株の開発	<ul style="list-style-type: none"> ハブ化合物としてチロシン、α-ケトグルタル酸 (AKG) を高生産できるシャーシ株を開発する。 6 遺伝子以上の高効率同時破壊が可能な多遺伝子破壊手法を開発する。 	<ul style="list-style-type: none"> ハブ化合物高生産株のさらなる改良と株構築手法のプロトコル化。 高効率多遺伝子ランダム破壊技術の実証。 	<ul style="list-style-type: none"> シャーシ株構築に必要なデータセットの選定が完了し、汎用的な株構築ワークフローを確立する。 大腸菌を中心に主要なハブ化合物高生産株群のラインナップを揃える。

<p>②ハブ化合物高生産株を基にした、キラーマテリアル高生産株の高速育種法の開発と実証</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・キラーマテリアル生合成経路の探索を完了する。 ・シャーシ株を宿主に標的化合物生産経路遺伝子を長鎖DNAで導入して、キラーマテリアル高生産株を開発する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・キラーマテリアル生産経路最適化株の開発。 ・キラーマテリアル高生産株構築手法のプロトコル化。 	<ul style="list-style-type: none"> ・キラーマテリアル生産株構築に必要なデータセットの選定が完了し、汎用的な株構築ワークフローを確立する。 ・ハブ化合物高生産株を用いることで、標的物質（キラーマテリアル）の高生産株を短時間で育種できることを実証する。
---	---	--	--

(3) 全体計画

(2016～2018年度) 旧課題(2)-2-2 代謝モデル構築・解析技術の開発と実用微生物への技術展開

事業項目	2016年度				2017年度				2018年度			
	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期
代謝モデル構築・解析技術開発と実用微生物への技術展開												
代謝モデル構築												
シャーシ株構築												

Genome-scale standard metabolic model construction (2016 Q2 - 2017 Q4)

Expansion of individual metabolic model construction (2016 Q3 - 2018 Q1)

Genome-scale standard metabolic model construction (2016 Q3 - 2018 Q1)

Large intestine yeast chassis construction (2016 Q3 - 2018 Q1)

Industrial microorganism verification (2018 Q1 - 2018 Q2)

(2019～2020 年度)

事業項目	2019年度				2020年度			
	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期
①ハブ化合物高生産株の開発	経路設計▶	解析・学習▶	解析・学習▶	学習▶	改良デザイン▶	解析・学習▶	解析・学習▶	
	菌株作成・評価	菌株作成・評価	菌株作成・評価		改良	改良	実証	
②ハブ化合物高生産株を基にした、キラーマテリアル高生産株の高速育種法の開発と実証	経路設計▶		解析・学習▶	解析・学習▶	解析・学習▶	解析・学習▶	解析・学習▶	解析・学習▶
	生産株構築・評価		生産株構築・評価		生産株構築・評価	改良		実証

(4) 実施体制

神戸大学が菌株作成など WET の研究を担当すると共に全体の調整を図りながら、理化学研究所、京都大学、東京大学、産業技術総合と協力して代謝経路設計、データ解析による生産向上因子の探索などの DRY の研究を行った（図 3.2.3.1-1-2）。開発した菌株の評価は有効性検証課題の各機関と協力して行った。

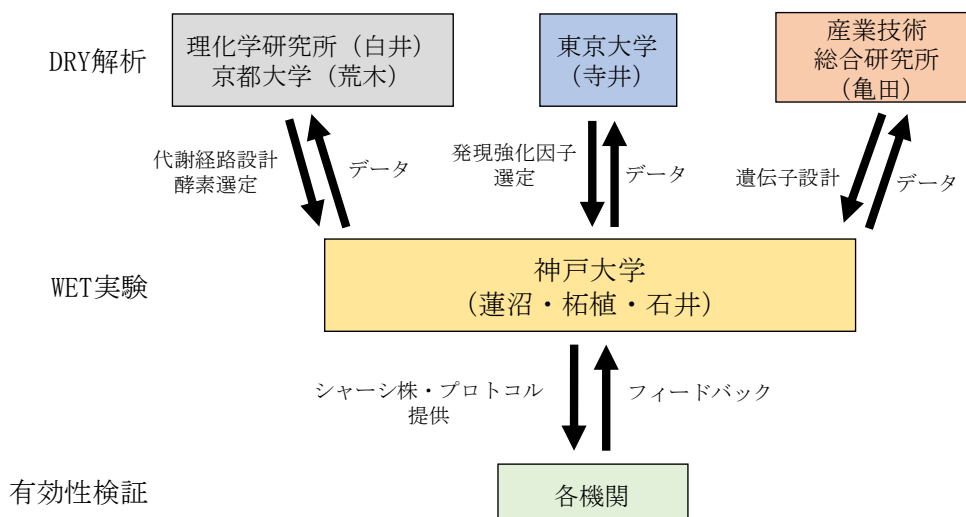


図 3.2.3.1-1-2 課題(1)-1 の実施体制

(5) 運営管理

3 週間に一度の頻度で報告会を実施しており、研究開発の進捗や方針等について情報共有を図った。また、Web ミーティング等を活用しながら進捗共有および情報交換を行った。

(6) 実施の効果

従来の株構築手法では、シャーシ株と同等の株を開発するのに約 2 年半の期間が必要であった。本 PJ で開発した DBTL ワークフローを用いることで、最短約 4 ヶ月でシャーシ株が育種可能になり、株開発に必要な人件費や研究費用等の大幅なコスト削減につながる。また費用面以外にも、シャーシ株を親株に用いることで有用化合物高生産株の開発も容易になり、例えば、現在石

油化学により生産されている燃料やポリマー原料等の生産を発酵生産に置き換えることが可能になれば、CO₂削減などの環境負荷削減効果も期待できる。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目 (担当)	現状	最終目標	達成度
①ハブ化合物高生産株の開発 (神戸大、京大、理研、東京大)	シャーシ株の高速育種に必要な DBTL ワークフローを構築すると共に、シャーシ株構築に必要なデータセットを決定した。大腸菌を宿主に、チロシンおよびα-ケトグルタル酸を例に、シャーシ株を短期間(従来の1/7程度)で開発できることを実証した。	本研究を行うことで、シャーシ株構築に必要なデータセットの選定が完了し、汎用的な株構築ワークフローを確立する。 大腸菌を中心に主要なハブ化合物高生産株群のラインナップを揃える。	○ (2020年度に達成)
②ハブ化合物高生産株を基にした、キラーマテリアル高生産株の高速育種法の開発と実証 (神戸大、京大、理研)	目的高生産株の短期間育種に必要なデータセットの選定、ワークフローのプロトコル化を行った。 ハブ化合物高生産株を宿主に、キラーマテリアル生産経路の最適化、酵素の改変、長鎖DNAの導入、培養条件の検討、オミクス解析を通して、従来株以上にキラーマテリアルを高生産する株の短期育種に成功した。	本研究を行うことで、キラーマテリアル生産株構築に必要なデータセットの選定が完了し、汎用的な株構築ワークフローを確立する。 ハブ化合物高生産株を用いることで、標的物質(キラーマテリアル)の高生産株を短期間で育種できることを実証する。	○ (2020年度に達成)

(8) 研究開発の成果と意義

バイオ生産において、目的の有用化合物を高生産できる微生物株の育種には一般的に5~10年以上の長い開発期間を要してきた。本研究開発項目では、バイオ産業で求められる有用化合物の多くは共通のハブ化合物から生合成されることに着目し、ハブ化合物の生産性が高い株(シャーシ株)が開発できていると、これを宿主として目的の有用化合物を高生産できる菌株の育種期間を大幅に短縮することが可能になると考えた。

①ハブ化合物高生産株の開発では、シャーシ株を短期間かつ少ない工数で構築できる汎用的なDBTLワークフローを考案し、必要な要素技術を開発した(図3.2.3.1-1-3)。チロシンとAKGをターゲットにシャーシ株の開発を行い、DBTLワークフローを回すのに必要なデータセットの量と質を決定した。つまり、シャーシ株を短期間で構築できるワークフローの構築に成功した(特願2020-203335)。また、シャーシ株開発を加速する技術として、切らないゲノム編集技術

である Target-AID と長鎖 DNA 合成技術の組み合わせにより、多遺伝子の同時破壊技術とランダム破壊技術の開発に成功した（図 3.2.3.1-1-3）。

②ハブ化合物高生産株を基にした、キラーマテリアル高生産株の高速育種法の開発と実証では、M-path によるキラーマテリアルを高生産できる見込みのある代謝設計技術と、設計した代謝経路を長鎖 DNA により微生物へ簡便に導入する手法を開発した。シャーシ株を宿主に開発した要素技術を適用することで、有用化合物高生産株を短期間で開発できることを実証した（図 3.2.3.1-1-3）。

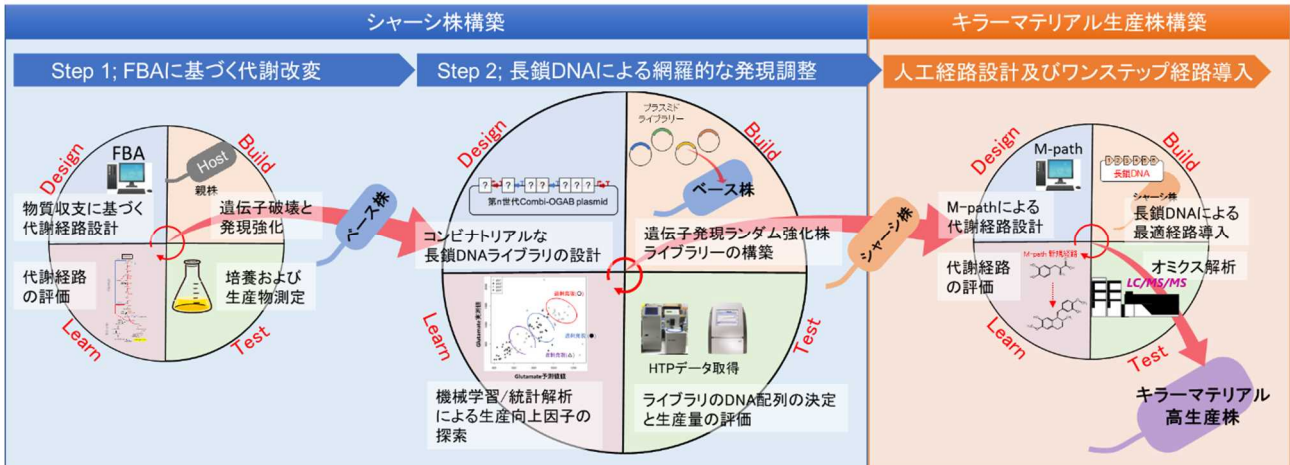


図 3.2.3.1-1-3 本研究課題の全体像

① ハブ化合物高生産株の開発(神戸大、京都大、理研、東京大)

・シャーシ株構築のためのアプローチ

本研究では、2つの DBTL サイクルからなるシャーシ株構築ワークフローを考案した（図 3.2.3.1-1-4）。ステップ1のDBTLサイクルでは、従来、微生物の代謝予測に用いられていたフラックスバランス解析（FBA）を利用して、ハブ化合物高生産のための代謝経路設計を行い（Design）、改変案に従い株を作成して（Build）、培養を行い細胞内外の代謝物を調べ（Test）、設計した代謝設計の評価（Learn）を行なうことで、ハブ化合物生産能力が向上したベース株を開発した。

FBA では、代謝経路中の遺伝子発現等による代謝の制御を予測することはできないため、予測された最適なフラックスを実現するためには、実験により遺伝子発現を最適化して代謝フラックスを調整する必要がある。しかしながら、既存の技術では10以上の代謝遺伝子の発現を網羅的に制御して、最適な代謝状態を作り出す事は非常に困難であった。

そこで、ステップ2が必要になる。ステップ1で開発したベース株において最適な代謝状態を作り出すために、ハブ化合物生産量向上の見込みのある長鎖DNAの設計を行ない（Design）、長鎖DNAにより代謝経路がランダムに強化された株ライブラリを作成して（Build）、独自に開発したハイスループット評価系によりハブ化合物生産量や遺伝子配列データを取得して（Test）、統計解析と機械学習を組み合わせた情報解析技術により生産向上因子の特定を行なった（Learn）。

本研究開発項目では、考案した、DBTL サイクルを回すのに必要なデータセットを決定するために、チロシンと α -ケトグルタル酸（AKG）をターゲットにシャーシ株の開発を行った。

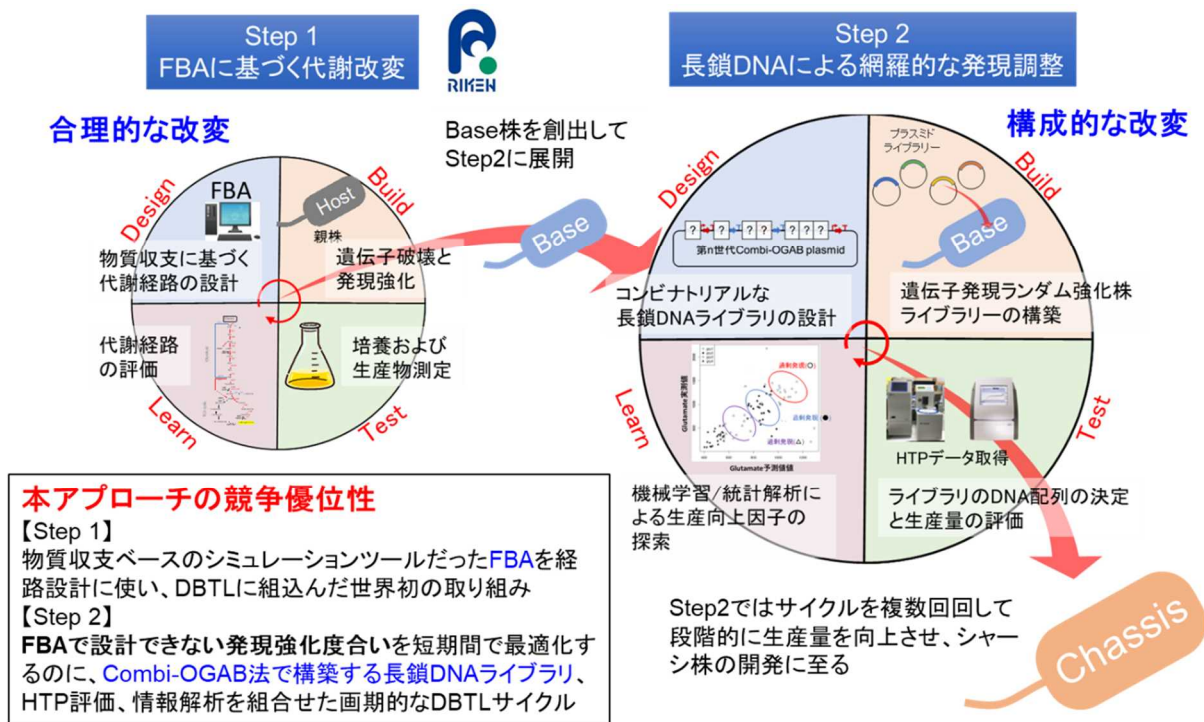


図 3. 2. 3. 1-1-4 FBA および長鎖 DNA を用いたシャーシ株構築のためのアプローチ

【Step 1 FBA に基づく代謝経路設計】

先行研究において、チロシンなど一部のハブ化合物については高生産に寄与する遺伝子の報告はあるが、候補遺伝子の網羅的な特定や、効果的な遺伝子組換えの組合せはこれまで不明であった。そこで、理化学研究所・白井グループと協力して FBA を用いた、ハブ化合物高生産のための新規代謝設計手法を開発した。また、実際に候補に上がった改変を施した株を試作して目的化合物の生産量や代謝フラックスを評価して、ハブ化合物の生産量向上に寄与する最適な代謝改変の組み合わせを決定する手法を開発した。

開発した手法を用いて、チロシンおよび AKG 高生産のための代謝設計を行ない、高生産に寄与する代謝改変を評価して、チロシンおよび AKG の生産量が向上した株の開発に成功した。FBA により設計された代謝経路を導入した株をベース株と称して、Step2 で長鎖 DNA を用いて発現量を調整するための実験に用いた。

【Step 2 長鎖 DNA を用いた網羅的発現調整】

ここでは、代謝遺伝子の発現を最適化する必要があるが、従来の手法では 10 以上の遺伝子の発現を調節するためには膨大な実験量が必要で時間がかかることが課題であった。

本研究では、長鎖 DNA 合成技術を応用することで、目的化合物までの代謝経路遺伝子の発現を網羅的に調節するためのプラスミドライブラリを作成する Combi-OGAB 法を開発して、最適な過剰発現の組み合わせを探索することによりフラックスの最適化を行った。Combi-OGAB 法では、配列相同性の低い人工パーツを用い DNA 断片の脱落を回避し、効率よく集積する技術を確立し、多様なプラスミドライブラリを簡便に開発できる技術を確立した (図 3. 2. 3. 1-1-5)。続いて、Combi-OGAB プラスミドライブラリを大腸菌に効率よく導入するための形質転換方法を検討して、高効率に Combi-OGAB プラスミドライブラリを大腸菌に導入することに成功した。チロシ

ンでは 16 遺伝子、AKG では 17 遺伝子の最適な過剰発現の組み合わせを調べるための Combi-OGAB プラスミドライブラリを作成して、チロシンベース株および AKG ベース株それぞれにプラスミドライブラリを導入した。

Design&Build

Combi-OGAB法による遺伝子発現ランダム強化株ライブラリ作成

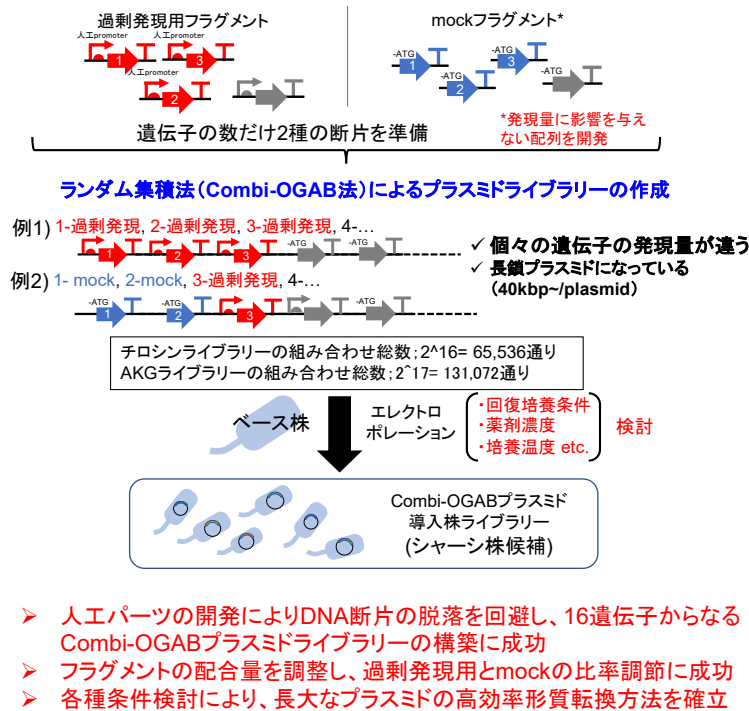
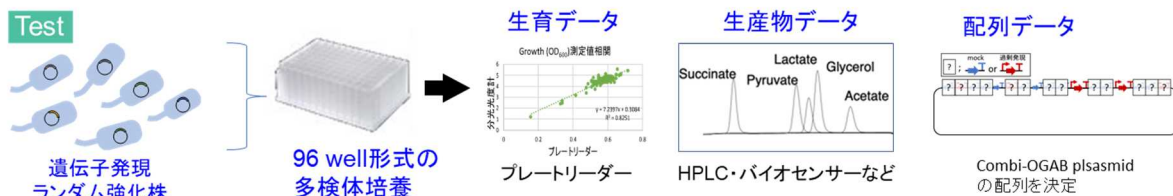


図 3. 2. 3. 1-1-5 Combi-OGAB によるプラスミドライブラリの作成

プラスミドライブラリ導入株のハブ化合物生産能力を高速かつ簡便に評価するために、96well プレートを用いたハイスループット培養系および、バイオセンサーや HPLC を用いた生産物のハイスループット分析系を確立した (図 3. 2. 3. 1-1-6)。また、導入された Combi-OGAB プラスミドの配列を高速に評価するために新規配列決定方法を確立した。プラスミドライブラリを導入したチロシン生産株を用いて、96well プレートでの培養を行い、ハイスループット分析系を用いてチロシン生産量および導入されたプラスミドの配列解析を行なった。培養の結果、世界最高の対糖収率を示すチロシン生産量を示す株の獲得に成功した。プラスミドライブラリを導入した AKG 生産株でも同様に、96well プレートでの培養を行ない、ハイスループット分析系を用いてグルタミン酸生産量および配列解析を行なった。培養の結果、遺伝子の発現調節をしていないコントロール株に比べて 20 倍以上グルタミン酸の生産量が向上した株の獲得に成功した。続いてグルタミン酸の生産量向上に寄与した因子を特定するために、グルタミン酸生産量と配列データを情報解析に供した。統計解析による生産強化因子の探索と機械学習による高生産に寄与する組合せ探索を行ない、AKG 生産量向上に寄与するいくつかの因子の決定に成功した。



> 96 well形式での培養法と超高速評価法の連結、ハイスループットDNA配列決定法の構築に成功
 > シャーシ株構築に必要なデータセットの選定を完了

図 3.2.3.1-1-6 微生物ライブラリのハイスループット評価系

続いて DBTL サイクルを回すことでハブ化合物の生産量が向上することを検証するために、1 周目の Learn の結果を基に、第 2 世代の AKG Combi-OGAB プラスミドライブラリを開発した。1 周目と同様に、作成したプラスミドライブラリを AKG ベース株に導入して、ハイスループット評価系を用いて、グルタミン酸の生産量評価と導入されたプラスミドの配列解析を行なった。第 2 世代の株ライブラリでは、第 1 世代の株ライブラリに比べてグルタミン酸生産量が高い傾向にあり、第一世代での最高値を超えるグルタミン酸高生産株の獲得に成功した。1 周目と同様に情報解析技術を用いて得られたグルタミン酸生産量と配列データの解析を行なったところ、グルタミン酸の生産量向上に有意に寄与する新たな因子の同定に成功し DBTL サイクルを回すことでハブ化合物生産量が向上し、生産に寄与する因子を特定できることを実証できた。

【多遺伝子同時破壊技術の開発】

シャーシ株開発を加速するためには多遺伝子の同時発現調節以外にも、多数の遺伝子を同時に破壊したり変異を導入したりする技術も必須である。近年、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術の登場により破壊を含む遺伝子改変が比較的容易に行えるようになってきた。しかしながら、従来技術では多遺伝子を同時に編集可能な gRNA 発現プラスミドの構築に非常に時間がかかることや、多遺伝子の同時切断が多くの生物にとって致死性が高いことが、多遺伝子を同時に編集する上での大きな課題であった。

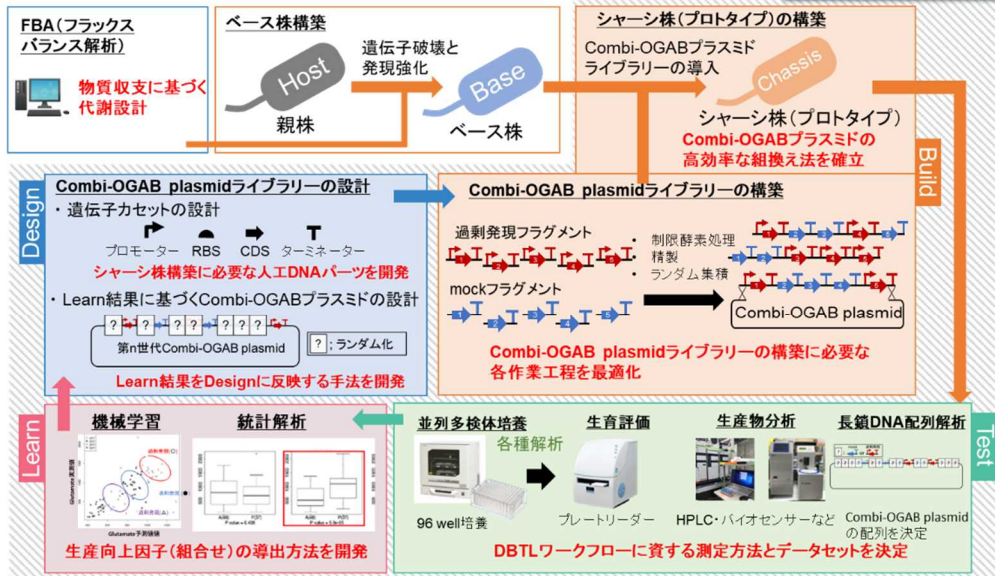
本研究では、長鎖 DNA 合成技術とゲノム編集技術を組み合わせることで多遺伝子を同時に破壊する技術と、複数のターゲット遺伝子の中からランダムに破壊する技術の開発に成功した。

研究開発項目①ハブ化合物高生産株の開発では、シャーシ株を短期間かつ少ない工数で構築できる汎用的な DBTL ワークフローの構築に成功した（特願 2020-203335）（図 3.2.3.1-1-7）。また、シャーシ株開発を加速する技術として、ゲノム編集技術を応用した多遺伝子の同時破壊技術とランダム破壊技術の開発に成功した。続く研究開発項目②では、①で開発したシャーシ株を宿主にすることでキラーマテリアル高生産株を高速で育種できることを実証する。

シャーシ株育種ワークフローの全体像

赤字: 研究成果

特願2020-203335



- シャーシ株開発に必要な作業工程を決定しプロトコル化した
- ハブ化合物高生産株の開発期間を大幅に短縮した(約4ヶ月)

図 3.2.3.1-1-7 シャーシ株育種ワークフローの全体像

② ハブ化合物高生産株を基にした、キラーマテリアル高生産株の高速育種法の開発と実証（神戸大、京都大、理研）

本開発項目では、有用化合物高生産株を短期間で育種するために必要な要素技術を高度化すると共に、生産の宿主としてハブ化合物高生産株（シャーシ株）を利用することで育種期間の短期化や目的有用化合物の生産量が向上することを実証する。

バイオ生産のターゲットとなる化合物の中には、天然の微生物が生産しない化合物や通常の代謝経路では生産性の低い化合物が多数存在する。本研究ではまず、ターゲット化合物毎に M-path により酵素反応情報に基づく新規の生産経路の設計を行なった。続いて、長鎖 DNA 合成技術により生産経路の構築に必要な遺伝子を 1 つのプラスミドに集積してワンステップで宿主に導入する手法を開発し、設計した新規生産経路の有効性や経路構築に必要な遺伝子の検討をハイスループットに行えるワークフローを構築した（図 3.2.3.1-1-8）。

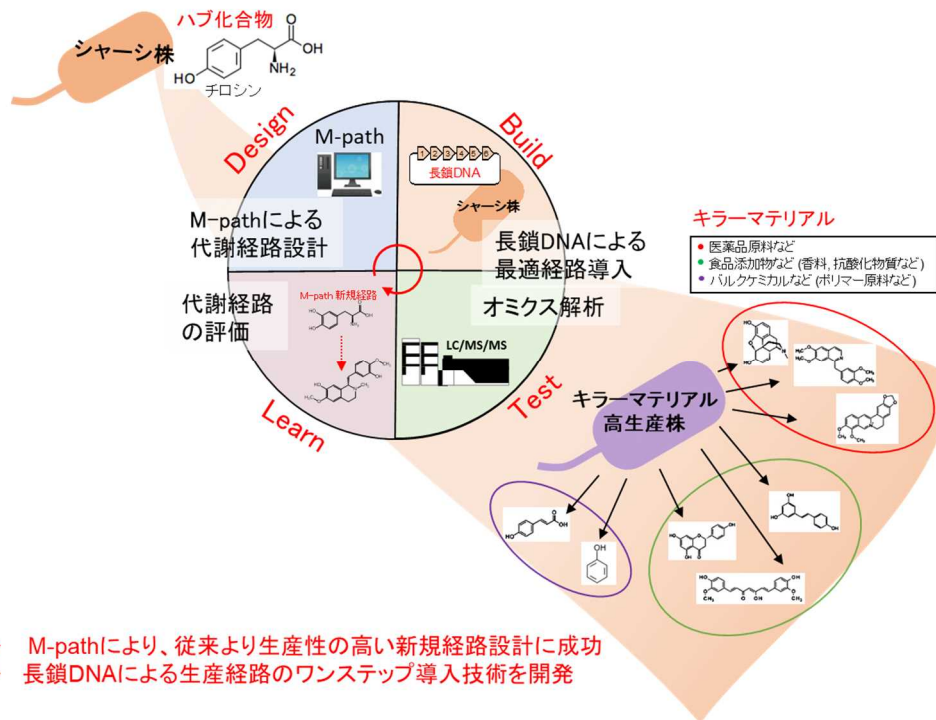


図 3.2.3.1-1-8 キラーマテリアル高生産株育種ワークフロー

チロシンシャーシ株では、解熱・鎮痛作用など様々な薬理効果があるオピオイド類をターゲットに選定し、キラーマテリアル高生産株開発に必要な要素技術の検討をおこなった。本研究ではまず、M-path を用いて生産経路の探索を行ったところ、従来ボトルネックとなっていた酵素反応を介さずにターゲット化合物を生産できる新規経路を見出した。続いて、長鎖 DNA 合成技術によるワンステップでの経路導入により、新規生産経路の構築に必要な遺伝子を検討した結果、従来型の経路導入株に比べて生産量が 2 倍以上向上した新規経路導入株の獲得に成功した。またオピオイド類の生産では、大腸菌内生の酵素の働きにより副生成物の生成が収率を改善する上で大きな課題であった。そこで、千葉大学と協力して本プロジェクトで新規開発したメタボライトセンサを用いて副生成物の生産に寄与する酵素の探索を行ない、副生成物の生産に関与している可能性が高い遺伝子の同定に成功した。

AKG シャーシ株では、AKG から生産できるポリマー原料やアミノ酸などの 3 つの化合物をターゲットに、高生産株の開発を行った。チロシンの時と同様に、各ターゲット化合物に対してまずは M-path を用いた経路設計を行った。続いて設計した経路を構築するのに必要な遺伝子を長鎖 DNA により合成して、大腸菌野生株 (WT 株) と AKG シャーシ株に導入して培養試験を行った。WT 株を宿主に用いた時より AKG シャーシ株を宿主に用いたときの方が、ターゲットに選定した化合物やその前駆体において約 2 倍の生産量の向上が見られ、シャーシ株を用いることで生産量に優れた株を簡便に構築することに成功した。

(9) 成果の普及

年度	論文	その他外部発表	受賞

	査読付 き	その他	学会発 表・講演	新聞・雑 誌等へ の掲載	展示会 への出 展	その他	実績
2019	3	0	13	2	0	2	0
2020	1	0	3	0	0	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2019	0	0	0
2020	3	0	0

課題名：C(1)-2-1 ハイスループット長鎖 DNA 合成技術の開発

担当機関：神戸大学

(1) 背景と目的

近年の合成生物学の進展に伴い、長鎖 DNA に対する需要が高まっている。例えば、新規の代謝経路を構築するためには多数の遺伝子を導入する必要があるが、これらの遺伝子を一括して導入可能な長鎖 DNA は、生産株の開発期間短縮のために必須である。また、「スマートセル設計システム」の出力として、超高速に実物の長鎖 DNA に変換する技術を開発することは、目的の微生物を短時間に構築することを実現するのに重要である。しかしながら、世界的にみても、10kb を超える長鎖 DNA の合成を引き受ける受託合成会社は多くなく、しかも合成に 1~2 か月かかる場合もあり、さらに価格も 1 塩基当たり 20 円という高価格がネックとなりなかなか長鎖 DNA を気軽に試せる状況ではなかった。

神戸大学の有する、第二世代 OGAB 法と呼ぶ枯草菌のプラスミド形質転換系を利用した高効率な長鎖 DNA 合成技術は、世界最多となる 50 個以上の DNA 断片を一度に連結可能で、これにより長鎖 DNA を構築することが可能となった。しかしながら 50 個以上の長鎖 DNA の材料を準備することは、一部の合成困難な DNA の合成を受託会社が引き受けてくれなかったり、あるいは、人手で大量のサンプルを短期間に取り扱うことは困難であり、30kb 超の長鎖 DNA の合成に 2 か月以上の時間を要して、より短期間に、低コストで、ハイスループットに長鎖 DNA を合成する方法が望まれていた。

(2) 位置づけ、目標値

「スマートセルモデル」を具現化する「スマートセル設計システム」によりデザインされる配列を、超高速に実物の長鎖 DNA に変換する技術を開発することにより、目的の微生物を短時間に構築することを実現する。

最終目標値

新規 DNA 化学合成機の開発と遺伝子集積のハイスループット化により、OGAB 法による 30 kb 超の長鎖 DNA 合成時間を従来の 2 ヶ月から 10 日程度に短縮し、1 塩基当たり 5 円程度のコストで合成する技術を確立する。

(3) 全体計画

2016 年度より開始した本研究開発項目は当初 4 研究機関が参画していたが、中間審査時点で見直しを行い、以降は、神戸大学のみが継続して研究開発を行うことになった。そのため、見直し以前の 2016 年度—2018 年度と、以後の 2019 年度—2020 年度の 2 つに分けて計画を記載する。



(4) 実施体制
体制図

【2016 年度-2018 年度】

神戸大学が全体の調整を図りながら、長鎖 DNA 合成の上流から、日本テクノサービス、神戸大学、プレジジョン・システム・サイエンス、慶應義塾大学の順で連携して行った（図 3.2.3.1-2-1-1）。

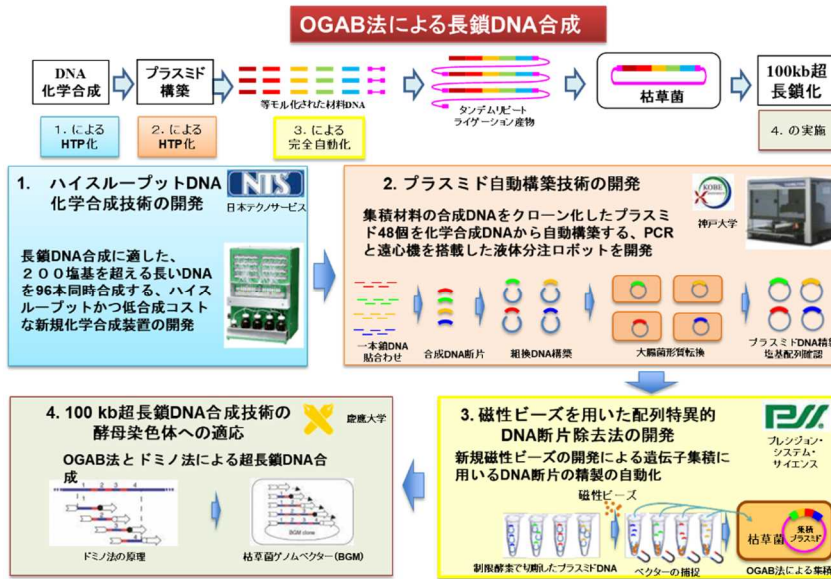


図 3.2.3.1-2-1-1 2016 年度-2018 年度実施体制

【2019 年度-2020 年度】

(1)-2 長鎖DNA合成・解析技術の開発

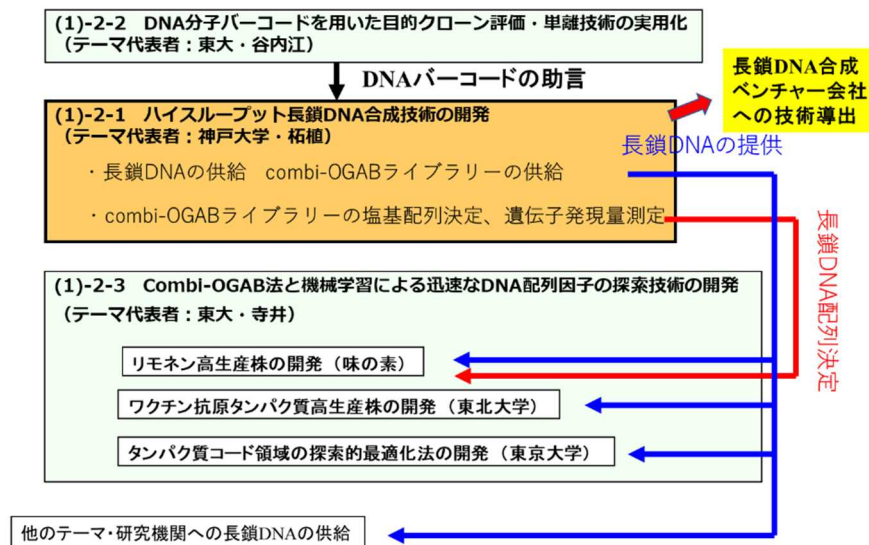


図 3.2.3.1-2-1-2 2019 年度-2020 年度実施体制

中間評価による見直しにより、2019年度からは、新しく(1)-2長鎖DNA合成・解析技術の開発の中に再編成された。

(5) 運営管理

【2016年度-2018年度】

神戸大学を拠点として、3か月に1回程度の会議を開催した。また、半年に一度全体会議開催などの際にも会議を行い、月に1回程度の高い頻度で連絡を取り合った。

【2019年度-2020年度】

新(1)-2グループ内で、半年に1回程度の頻度でwebを用いた会議を行い、進捗を確認した。

(6) 実施の効果

2018年度の世界の5 kb以上のDNA合成の市場規模は、28億円であり、この5年間に約1.7倍の勢いで成長している。仮に2030年の世界市場の長鎖DNA合成市場の規模が今までと同じ成長率で進んだ場合、100億円程度になる予想である。このうちの20%の市場を確保できるとすれば20億円となり、本研究開発の対費用効果は大きい。さらに、合成された長鎖DNAを用いたスマートセルインダストリーによる、CO2削減、省エネルギー化を含めた波及効果は計り知れない。

(7) 最終目標の達成度

【2016年度-2018年度】

研究開発項目	最終目標	成果	達成度
ハイスループットDNA化学合成技術の開発 (日本テクノサービス)	20時間以内に200塩基までの化学合成DNAを、材料コスト約3円/塩基で96種類同時合成可能な試作3号機を製作する。	20時間以内に200塩基までの化学合成DNAを、材料コスト約3円/塩基で96種類同時合成可能な試作3号機を製作した。2018年度中に最終目標を達成。同年中にその成果を製品化、市販を開始した。	◎
プラスミド自動構築技術の開発 (神戸大学)	36 kbの長鎖DNAの合成に必要な48個のプラスミドDNAの構築し、高純度にプラスミドを精製する工程を、4日程度で行う、統合プラスミド自動構築システムを構築する。	液体分注ロボットのプログラム策背により16サンプル×3回の分割により48個のプラスミド構築を達成した。	◎
磁性ビーズを用いた配列特異的DNA断片除去法の	ベクターDNAとレセプター固定化磁性粒子が特異的に結合する反応	複数種のターゲット(オリゴDNA、PCR産物、pUC19ベクター)を用いて、磁性粒子による配列特異的回収試験を実施	△

開発 (プレシジョン・システム・サイエンス)	条件を見出し最適化する。	し、長いターゲットに対しての条件検討がまだ必要であることを見出した。2018年度、代替法採用により開発終了した。	
100 kb 超長鎖DNA合成技術の酵母染色体への適応 (慶應義塾大学)	100kbp 以上の酵母染色体を枯草菌ゲノムから切り出し、酵母に導入することにより目的とする野生型の酵母III番染色体との間でスワッピングが可能であることを実証する。	酵母III番染色体を完全にカバーするドミノを設計し完全にカバーするドミノセットを得た。これらをドミノ法で枯草菌に組み込み、ドミノクラスターを得た。100 kbの領域を大腸菌から酵母へ接合伝達法で導入した。酵母染色体を枯草菌で合成し、接合伝達法により酵母細胞へ再導入するスワッピングの要素技術が示された	○

【2019年度-2020年度】

研究開発項目	最終目標	成果	達成度
ハイスループット二本鎖DNA合成技術の開発 (神戸大学)	<ul style="list-style-type: none"> 長鎖DNA合成及びcombi-OGABライブラリの合成スループットを4個/月の長期実証を行う。 	<ul style="list-style-type: none"> 各研究参画機関からの長鎖DNA合成およびライブラリ構築を引き受け、4個/月のスループットを長期的に維持することで、ハイスループット長鎖DNA合成のノウハウを蓄積した。 	○
	<ul style="list-style-type: none"> combi-OGABライブラリからの1,000細胞のRNA-seq解析とDNA配列の対応付けを2例以上行う。 	<ul style="list-style-type: none"> 1,000個程度のクローンに対する、塩基配列と発現量の情報に対応付けた情報セットを得る実験を2例行い、本手法のDBTLサイクルの時間短縮に対する有効性を実証した。 	○

(8) 研究開発の成果と意義

【2016年度-2018年度】

1. ハイスループットDNA化学合成技術の開発(日本テクノサービス)

長鎖DNA合成の自動化における初期材料となる200塩基を超えるDNA断片を低コスト、高効率、短時間での合成が可能な多本数(24~96本)同時合成装置の開発を行うべく、2016年度より、試作1号機の開発を開始し、合成効率を測るトリチルモニター機構の改良および24本同時合成タイミングを最適化した送液プログラムの開発を行い、200塩基を20時間以内に24本同時合成を可能とした。また、既存機が8本合成時で合成時間約42時間、コスト42円に対し、試作1号機で3倍の24本を20時間以内に合成コスト約17円を達成した。

2017年度は、試作2号機にて、24本同時合成機構を4つ並列させ、200塩基を20時間以内に96本同時合成を可能とした。さらに、これまで構築した送液方法の活用、改良にて、試薬の微量制御、送液試薬同士の高速混和を可能とする高速スイッチングバルブを搭載した多チャンネル型送液機構を開発し、微量送液によるコストダウンを実現。同じ20時間以内にて試作1号機の4倍の96本合成を可能にし、コストも8.2円に減少した。

2018年度は、開発した多チャンネル型送液機構を搭載することで、少ない送液量で高反応効率を保つことを可能にし、目標の20時間で200塩基の合成DNAを材料コスト3円/塩基で96種類同時合成可能な試作3号機を完成させ、目標を達成した。96wellフォーマット対応へは、切り出し中でも連続合成が行えるよう装置を独立させ、合成後の合成カラムユニットから96WellフォーマットへDNAを切り出せるDNA溶出機を試作し、対応した。

最終成果として、20時間以内に200塩基までの化学合成DNAを、材料コスト約3円/塩基で96種類同時合成可能な試作3号機を試作完了し、2018年10月より、試作3号機を基

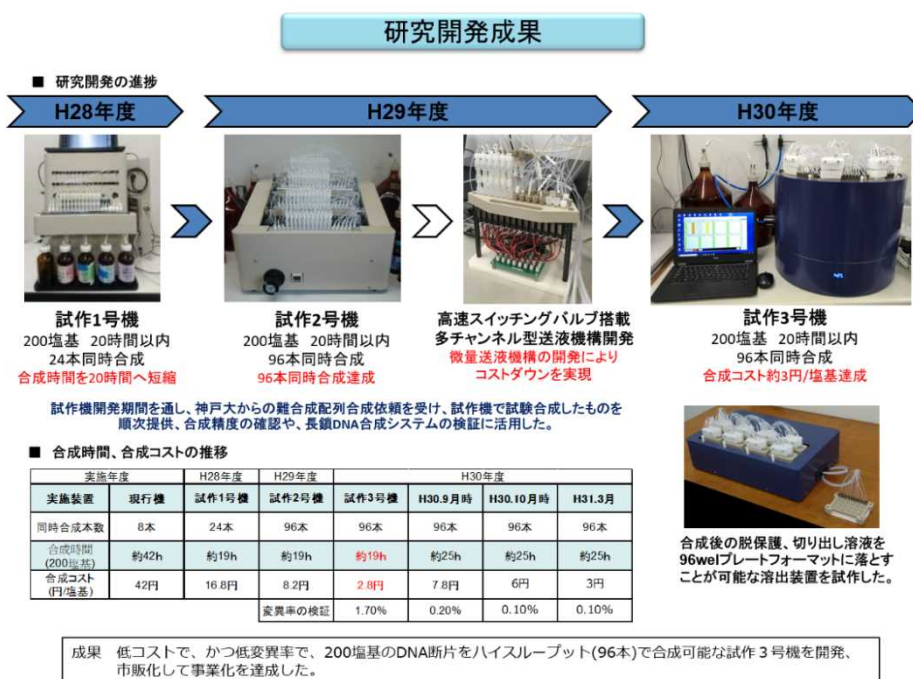


図 3.2.3.1-2-1-3 DNA 化学合成装置試作機開発の進捗

とした核酸合成「M-96-LD 長鎖 DNA 合成用核酸合成機」を製品化、市販を開始し、事業化を達成した。

2. プラスミド自動構築装置の開発 (神戸大学)

液体分注ロボットを用いて化学合成 DNA を自動的にアセンブルするシステムを開発した。本システムでは、まず、1つの OGAB ブロック (750~1,000 bp) を構築する 6 本の DNA を図 3.2.3.1-2-1-4 のように隣り合う 2 本の DNA を 3 個に分けて、それぞれを PCR により伸

多段階PCRを用いた新規二本鎖DNA合成法の開発

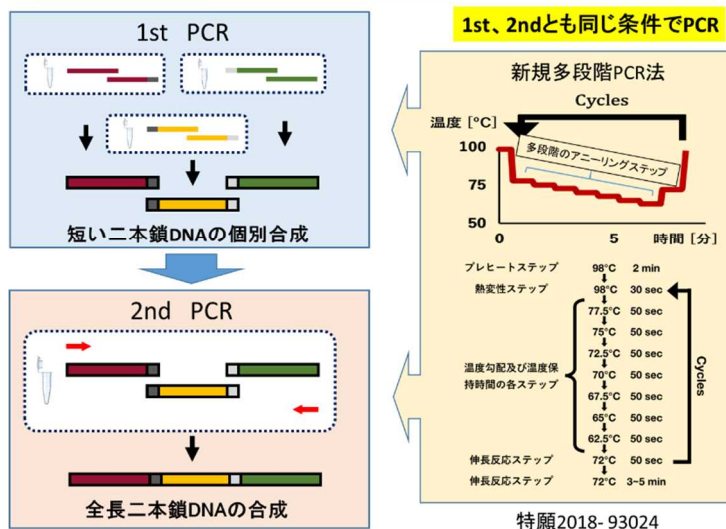


図 3.2.3.1-2-1-4 新規二本鎖 DNA 合成法 (MAP 法)

長し (第一段階)、その後、その 3 つの溶液と両末端に設計したプライマーの 1 つの容器に統合後、オーバーラップエクステンション PCR を行う (第二段階) ことで目的とする DNA 断片を調達する 2 段階 PCR 法である。どちらの PCR の反応条件も同じであるが、特に、PCR のアニーリングのステップが多段化になっていることを大きな特徴としている。本法を MAP 法と命名した。

本システムにより図 3.2.3.1-2-1-5 に示すように DNA 受託合成会社から合成を拒否された難易度の高い DNA61 個を同時合成したところ、全ての DNA が問題なく合成することに成功した。ここで得られた二本鎖 DNA を大腸菌のプラスミドベクターに連結し、形質転換するプロセス、及び、得られた形質転換体からハイスループットに高純度のプラスミド DNA を

ロボットを用いたハイスループット二本鎖DNA合成

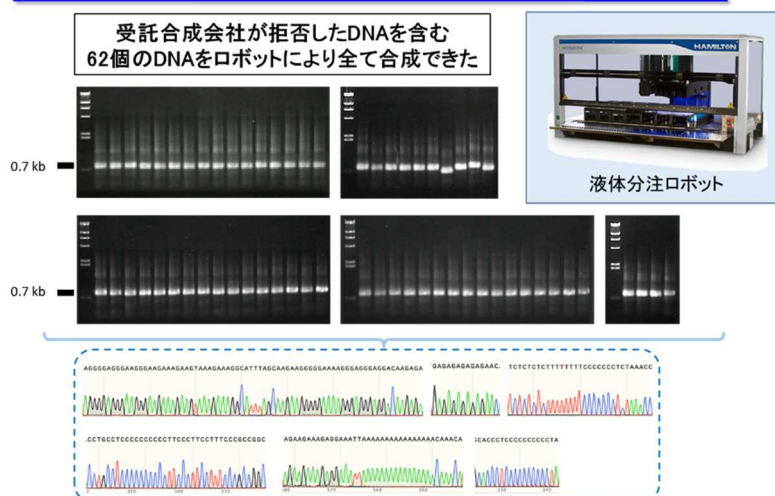


図 3.2.3.1-2-1-5 ロボットによる二本鎖 DNA 合成

精製するプロセスも同じ液体分注ロボットにより構築した。これにより 48 個のプラスミドを同時構築し、96 個のプラスミドを同時精製するハイスループットシステムを完成した。また、化学合成 DNA に由来する変異導入率を 1/10 程度に減少する変異 DNA 校正方法を確立した。参画研究機関からの要請のあった多数の長鎖 DNA を構築した。

3. 磁性ビーズを用いた配列特異的 DNA 断片除去法の開発 (プレジジョン・システム・サイエンス)

レセプター分子を磁性粒子に固定化する方法として SA 磁性粒子を使用した方法を検討し、ベクター DNA とレセプター固定化磁性粒子が配列特異的に結合する反応条件を検討した。プラスミド DNA のベクター配列を配列特異的にキャプチャーして除去する方法として、光クロスリンク能を有する光応答性人工ヌクレオチドを利用した。光応答性人工ヌクレオチドは、CNVK をオリゴヌクレオチドに組み込んだ場合、366nm の光照射により、相補鎖のチミン塩基、シトシン塩基と共有結合での架橋が誘導され、強固な結合となる。この光応答性人工ヌクレオチドをベクター配列キャプチャー用 Probe として利用し、キャプチャー用 Probe に付加したラベルを介して磁性ビーズによるベクターの回収を試みた。オリゴヌクレオチドに組み込んだ場合、366nm の光照射により、相補鎖のチミン塩基、シトシン塩基と共有結合での架橋が誘導され、強固な結合となる。この光応答性人工ヌクレオチドをベクター配列キャプチャー用 Probe として利用し、キャプチャー用 Probe に付加したラベルを介して磁性ビーズによるベクターの回収を試みた。

Probe 1 と完全相補な配列である合成オリゴヌクレオチド (Probe-1 comp) に対し、CNVK 組み込み Biotin ラベル各 Probe を反応させ回収試験を実施した (図 3.2.3.1-2-1-7 A)。結果、磁性ビーズ分離後の上清に合成オリゴヌクレオチドが含まれていなかったのは、完全相補な配列である Probe 1 のみであった。また、Biotin ラベルされていない Probe-1 comp は、磁性ビーズ分離後の上清に Probe-1 comp が存在し、磁性ビーズによる配列特異的な回収が示された。

OGAB ブロックの回収評価として、制限酵素で処理した pUC19 ベクターおよび Insert に対し、CNVK 組み込み Biotin ラベル各 Probe を反応させ回収試験を実施した (図 3.2.3.1-2-1-7 B)。結果、Biotin 化ラベルしていない Insert も回収されている様子があり、Beads が非特異的に Insert に吸着していることが示された。

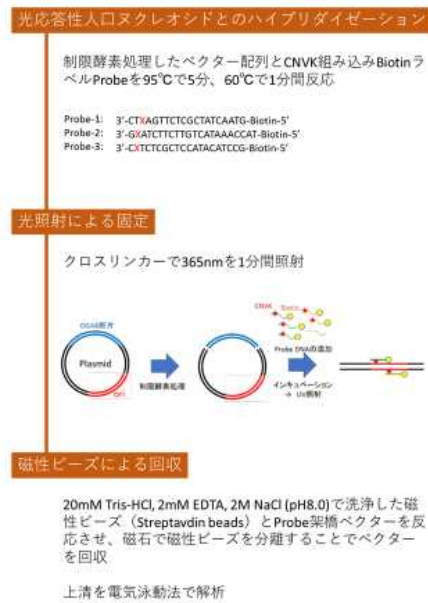


図 3.2.3.1-2-1-6 配列特異的 DNA 断片回収法の概要

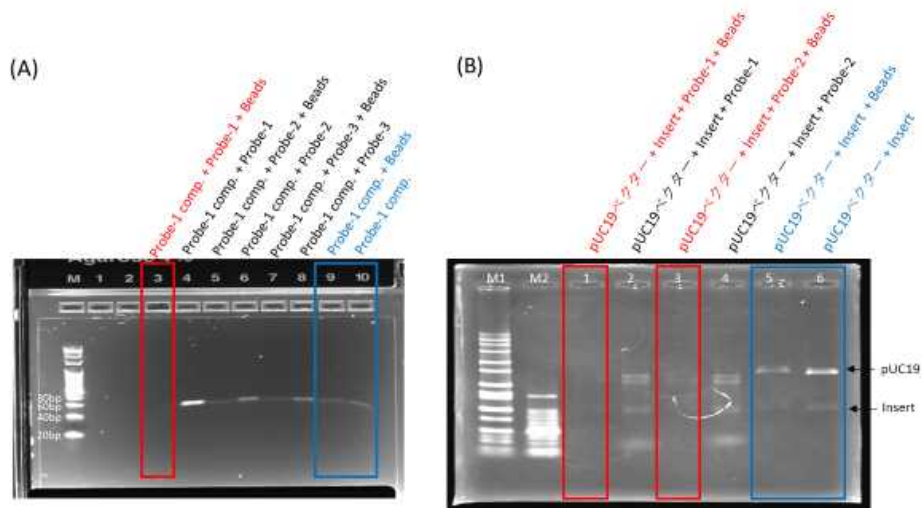


図 3.2.3.1-2-1-7 配列特異的 DNA 回収の結果

4. 100 kb 超長鎖 DNA 合成技術の酵母染色体への適応

酵母第 III 染色体全長 (315 kb) をカバーするドミノが必要である (図 3.2.3.1-2-1-8)。必要なドミノを再設計し、Long PCR 法により全ての染色体領域をカバーする 22 個のドミノクローンの構築に成功した (図 3.2.3.1-2-1-9)。枯草菌へのドミノ法による組み込みにより、最大で 124 kb の連続した領域の構築に成功した。隣り合う領域同士を連結して一気にサイズを増大する課題は今後に残された。一方、cenIII 配列を含む 50 kb のクローンを大腸菌の接合伝達プラスミドに連結し、サッカロ酵母に接合伝達法で導入することに

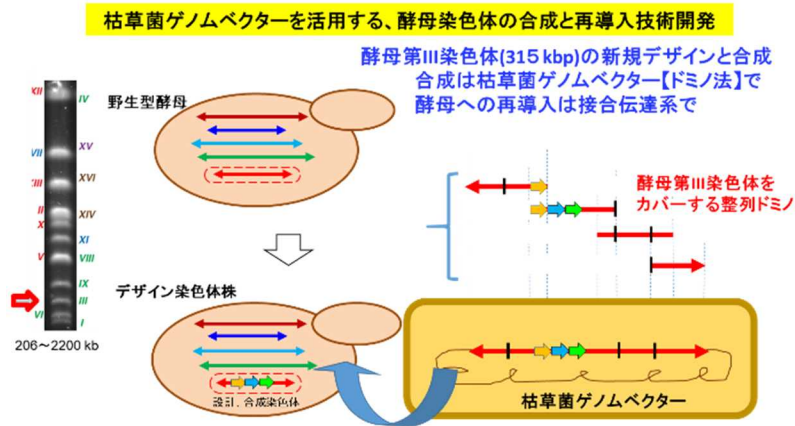
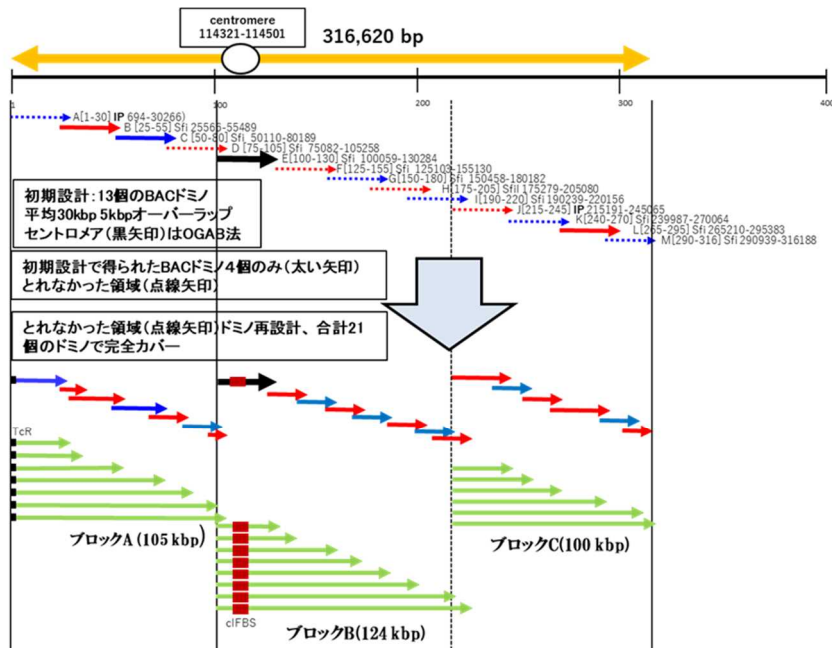


図 3.2.3.1-2-1-8 枯草菌による酵母染色体の合成と導入

成功した。



最上段 酵母III番染色体316,620 bp セントロメアは白楕円で表示、BACドミノは横矢印で表示。ブロックAの左端の黒四角は枯草菌でのテトラサイクリン耐性マーカー(TcR)。ブロックBの赤色四角は枯草菌でのプラストサイディンS耐性マーカー(BSR)。下段の緑線はドミノ法で枯草菌ゲノムベクター中で延長された酵母DNA。

図 3.2.3.1-2-1-9 酵母 III 番染色体のドミノクローンの準備状況

【2019 年度-2020 年度】

ハイスループット長鎖 DNA 合成技術の開発（神戸大学）

配列の如何を問わず、どのような長鎖 DNA についても、合成とその配列確認が迅速で低コストに行えるようにするために、GC 含量が極端な難合成 DNA に対する二本鎖 DNA 合成法を検討した。化学合成した一本鎖 DNA を二本鎖化する際の MAP 条件について、使用する酵素、反応バッファー、サイクル数、温度のパラメーターを組合せて変化させることで、GC 含量 85%の超高 GC 含量 DNA、逆に 5%の超低 GC 含量 DNA といった難易度の高い DNA に対する二本鎖合成方法を開発した（図 3.2.3.1-2-1-10）。合成に時間を要する DNA を減少させることで、従来の 2 倍程度のハイスループット化を実現した。実際に、参画研究機関から依頼を受けた長鎖 DNA 及び Combi-OGAB ライブラリの合成において、2019 年 11 月において 4 個/1 カ月のスループットを実証した（図 3.2.3.1-2-1-11）。

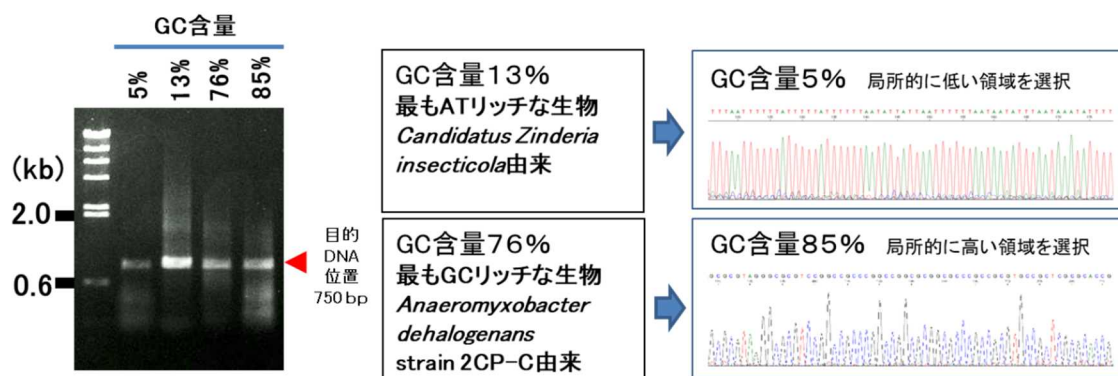


図 3.2.3.1-2-1-10 超高 GC 含量と超低 GC 含量 DNA の合成の実例

重鎖長鎖DNA種類	遺伝子 数	長さ (kb)	ライ ブラ リ 規 模	完成時期	重鎖長鎖DNA種類	遺伝子 数	長さ (kb)	ライ ブラ リ 規 模	完成時期
代謝経路遺伝子クラスター	17	27.8	—	2019年8月	代謝経路遺伝子クラスター	5	6.3	—	2020年1月
代謝経路遺伝子クラスター	17	25.8	—	2019年8月	代謝経路遺伝子クラスター Combi-OGABライブラリ	5	6.3	1,500	2020年2月
代謝経路遺伝子クラスター Combi-OGABライブラリ	17	28.8	1,000	2019年8月	代謝経路遺伝子クラスター	17	25.8	—	2020年5月
代謝経路遺伝子クラスター	16	20.8	—	2019年9月	代謝経路遺伝子クラスター Combi-OGABライブラリ	17	28.8	1,000	2020年5月
代謝経路遺伝子クラスター	16	19.2	—	2019年9月	代謝経路遺伝子クラスター	16	20.8	—	2020年5月
代謝経路遺伝子クラスター Combi-OGABライブラリ	16	20.0	2,500	2019年9月	代謝経路遺伝子クラスター	16	19.2	—	2020年5月
代謝経路遺伝子クラスター	12	2.4	—	2019年10月	代謝経路遺伝子クラスター Combi-OGABライブラリ	16	20.0	3,000	2020年5月
代謝経路遺伝子クラスター	12	27.8	—	2019年11月	代謝経路遺伝子クラスター	12	2.4	—	2020年6月
代謝経路遺伝子クラスター	12	27.1	—	2019年11月	酵素遺伝子	1	1.5	8	2020年10月
代謝経路遺伝子クラスター Combi-OGABライブラリ	12	27.5	15,000	2019年11月	代謝経路遺伝子クラスター	5	5.1	5	2020年10月
代謝経路遺伝子クラスター	5	5.0	—	2019年11月	代謝経路遺伝子クラスター Combi-OGABライブラリ	5	5.1	1500	2020年11月
タンパク質遺伝子 Combi-OGABライブラリ	1	0.8	8,000	2019年11月	代謝経路遺伝子クラスター	12	27.1	16	2020年11月
代謝経路遺伝子クラスター	5	5.1	—	2019年12月	代謝経路遺伝子クラスター	17	25.8	—	2020年12月
代謝経路遺伝子クラスター	5	6.3	—	2020年1月	代謝経路遺伝子クラスター	5	5.0	2	2020年12月
代謝経路遺伝子クラスター	5	6.3	—	2020年1月	代謝経路遺伝子クラスター	17	28.8	—	2020年2月
代謝経路遺伝子クラスター	5	6.3	—	2020年1月	代謝経路遺伝子クラスター	16	20.8	—	2020年2月
代謝経路遺伝子クラスター	5	6.3	—	2020年1月					

図 3.2.3.1-2-1-11 2019 年度-2020 年度 DNA 合成実績

また、DBTL サイクル高速化において問題となる Combi-OGAB 法により構築された DNA ライブラリの塩基配列の構造決定と転写量測定が 1,000 クローンレベルでハイスループットに行える技術の開発を行った。カロテノイド合成遺伝子クラスターの 5 つの遺伝子についてそれぞれ活性強度の

異なる 5 つのプロモーターを準備した Combi-OGAB ライブラリ（可能なライブラリ規模 $5^5 = 3,125$ 通り）を設計した（図 3.2.3.1-2-1-12）。この際、各遺伝子には、真核生物の mRNA を模して mRNA に poly-A テールが付くように poly-A の DNA 配列を終止コドンの下流に配置した。プラスミドの薬剤耐選択マーカーとなるクロラムフェニコール耐性遺伝子には、終止コドンの直後に分子固有のランダム配列を DNA バーコードとなるように、さらにその下流に poly-A の DNA 配列を配置した。このライブラリを構築後、大腸菌に導入した。各形質転換体を 96 穴プレートに個別に植菌し、培養ののち、それらを統合して 10XGenomics 社の Chromium に導入し、エマルジョン中の水滴内に、上記とは異なる液滴の同一性を担保する DNA バーコードを有するビーズ 1 個と大腸菌 1 細胞を封入した状況を実現し、液滴内で DNA バーコーディングと客転写を行った。得られた産物を次世代シーケンサーで解析することにより、同一液滴内の転写産物の種類とカウント数、そして、プラスミド分子固有のバーコード情報を得た。これを別途磁性第シーケンサーで解読したプロモーター情報とプラスミド分子固有のバーコードと結びつけることにより、各プラスミドの配列情報と転写量を 1,000 クローンレベルで結びつける技術を確認した。

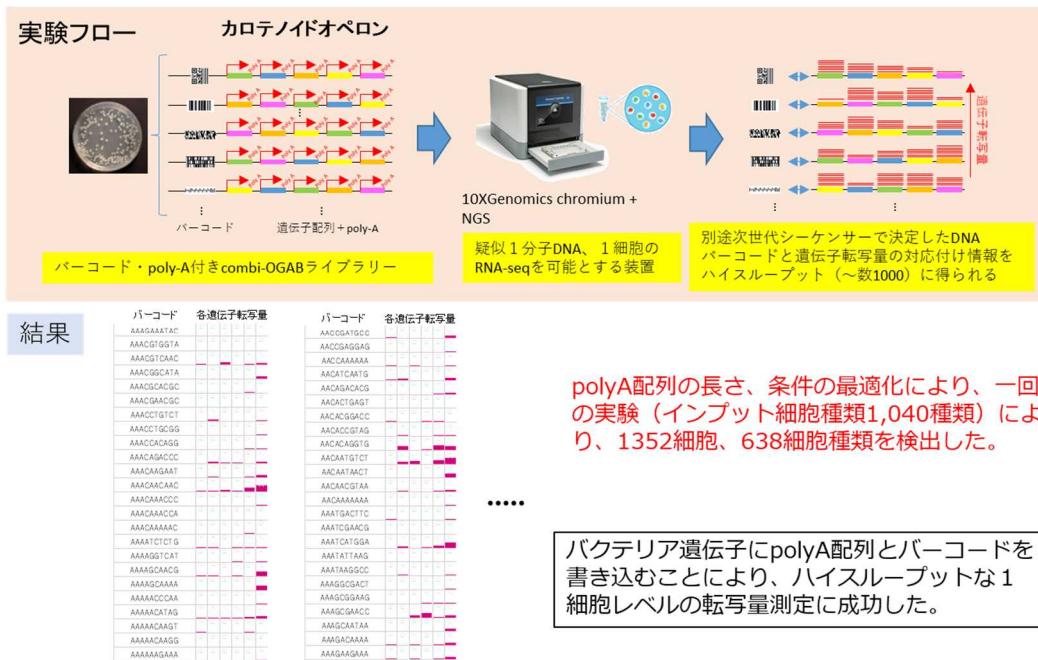


図 3.2.3.1-2-1-12 カロテノイド合成遺伝子クラスターの Combi-OGAB ライブラリーの DNA バーコードを用いた転写量の対応付け例

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	1	1	0	1	0
2017	0	0	0	0	1	0	0
2018	4	3	11	0	1	2	1
2019	0	1	4	0	1	0	0
2020	0	1	0	0	1	1	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	1	1	0
2019	0	0	0
2020	0	0	0

課題名：C(1)-2-2 高生産性微生物創生に資する情報解析システムの開発—目的クローン単離技術の開発

担当機関：東京大学

(1) 背景と目的

本研究開発課題では微生物による有用物質生産のために、高リピート配列を含む DNA を高効率かつ安価にアセンブリ・選抜する技術を開発し「高速にデザインされた全ゲノムや遺伝子群を全自動で合成する」システムを開発する。

現在、長鎖 DNA 合成とクローニングは、いずれも短鎖 DNA のアセンブリ反応からはじまる。一方で、アセンブリ反応効率自体が必ずしも高くないために、反応産物から目的産物をクローン化する必要がある。通常はアセンブリ反応産物によって微生物細胞の形質転換を行い、細胞クローンを無作為かつ大量に単離、正しいアセンブリ産物を持つ細胞クローンを同定し、そこから目的の DNA を回収する。しかしながら、長鎖 DNA やリピート配列を含む DNA のアセンブリ効率は必ずしも高くなく、大量の細胞クローンの単離とそれらがもつ DNA の同定を必要とすることが長鎖 DNA 合成におけるボトルネックである。自動化技術においても同様の課題がその拡張性のハードルとなる。本事業では Spiber 株式会社が無細胞系によって高効率に DNA をアセンブリする技術および高リピート配列を高精度でアセンブリする技術を開発し、東京大学が DNA 分子バーコード技術と長鎖 DNA シークエンシング技術によって、大量かつ無作為な細胞クローンの単離と同定を必要とせずに、高効率に目的のアセンブリ反応産物のみをクローニングする技術を開発する。これらの技術群を組み合わせることによって長鎖 DNA 合成技術の底上げを図る。

(2) 位置づけ、目標値

有用微生物ゲノムや人工遺伝子のデザイン、合成とそれらの機能の試験サイクルを素早く繰り返すことで高機能物質生産を行う際、DNA 合成がそのプロセスのボトルネックであってはならない。現時点では特に、全ゲノムレベルの DNA 断片の全自動合成とその並列化技術の開発が喫緊の課題である。人工的に設計された長鎖 DNA を合成するためには、化学合成された DNA 断片のアセンブリとその評価が不可欠である。長鎖 DNA アセンブリ法として有効なものには出芽酵母細胞を用いた Gap Repair Cloning 法や枯草菌を用いた OGAB 法が知られているが、長鎖 DNA アセンブリ及びその自動化をさらに効率化するためには、これらの技術に利用する DNA 断片をある程度の長さにより安価かつより単純な手法でアセンブルでき、従来技術では困難である高リピート配列を含む DNA 断片も合成可能な技術が必要である。

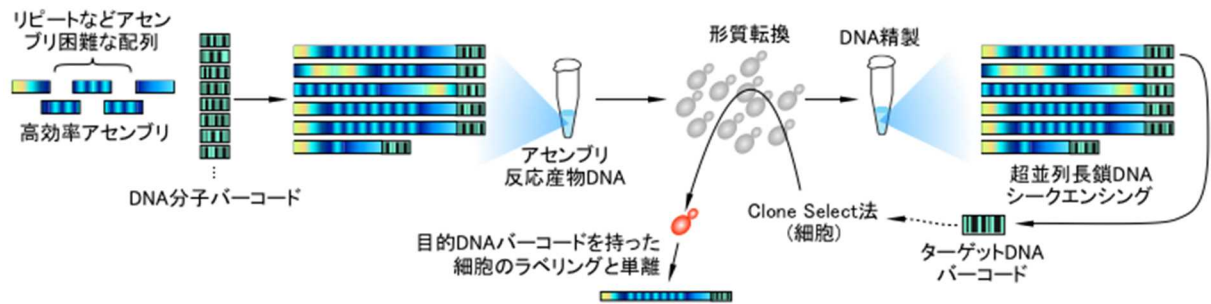


図 3.2.3.1-2-2-1 本研究開発の概要。高効率・低コストの DNA アセンブリ技術によって DNA アセンブリ反応産物中に目的産物が含まれる割合を向上させる。さらにアセンブリ反応においてすべてのアセンブリ反応産物分子が DNA バーコードによって特異的に標識される。アセンブリ反応産物を用いて一斉に細胞を形質転換後（あるいは細胞内における DNA アセンブリ反応後）、細胞から DNA を回収し、超並列シーケンシングによって DNA バーコードとアセンブリ反応産物を一斉に同定する。目的のアセンブリ反応産物を保持する細胞はその DNA バーコードに応じて蛍光ラベル化され、これがフローサイトメトリーセルソーターあるいは蛍光を呈示するコロニーの同定によって単離されることで、目的のアセンブリ反応産物が回収される。あるいは DNA バーコード依存的に細胞に薬剤耐性を付与することができ、これを薬剤選択によって得ることができる。

本研究開発課題では、Spiber 社がさらに高効率・低コストの DNA アセンブリ技術を樹立させる。特に細胞を用いずに酵素反応のみによって 100 程度の化学合成された DNA 断片をアセンブルする技術、高リピート配列を高効率でアセンブルする技術を確立する。また現在の DNA クローニング技術では、アセンブリ反応産物から正しくアセンブルされた DNA 分子を単離するために、これらを細胞クローンの形で複数（場合によっては大量に）分取、それぞれを DNA シーケンシングによって評価し、正しくアセンブルされた DNA 分子を含む細胞クローンを同定する必要がある。東京大学は DNA アセンブリをこのようなプロセスから解放するために、DNA アセンブリ反応産物の全ての分子を DNA バーコードで標識し、DNA シーケンシング技術を利用して夾雑物の含まれるアセンブリ反応産物を DNA バーコードとともに高速に評価することで、目的の DNA バーコード（と目的のアセンブリ反応産物）を保持する細胞クローンを蛍光ラベル化あるいは薬剤耐性を付与して単離できる Clone Select 法を開発する（図 3.2.3.1-2-2-1）。これによって、クローンを一気に評価・単離する系を確立し、様々な DNA アセンブリにおいて、その効率を 1,000 倍程度に拡張する基盤技術を実現する。

最終目標

①無細胞系で高効率且つ安定的に数十断片以上を連結する技術の開発（Spiber 株式会社）

試験管内で高効率且つ安定的に数十断片以上を連結する技術の汎用性実証試験、改良研究開発を進める。2,000 塩基程度 50 種類以上の DNA について、化学合成された短鎖 DNA オリゴマー（50～100 塩基程度）から無細胞系酵素反応によって高効率な DNA アセンブリが可能であることを実証する。

②リピート配列を持つ長鎖 DNA の安定的な DNA アセンブリ技術の開発（Spiber 株式会社）

高リピート配列を含む 10,000 塩基程度の遺伝子について、5 つの DNA 断片の高効率アセンブリ反応を 3 段階的に繰り返し、計 125 断片のアセンブリによって技術実証を行う。また、プロセス全自動化のために DNA サイズセレクションを必要としない階層的 DNA アセンブリ技術を達成する。

③出芽酵母における Clone Select 法の開発と実用化（東京大学）

DNA バーコード化されたアセンブリ反応産物 1,000 クローン混合した試料から Clone Select 法 1 回によって任意の DNA バーコードを持つクローンを感度 50%以上、特異度 80%以上で単離する出芽酵母細胞を用いた反応系を確立する。これによって、DNA アセンブリ反応後、個別のアセンブリ反応産物クローンの単離とシーケンシングによる評価プロセスを排除し、これを長鎖 DNA シーケンシング法によるアセンブリ反応産物の一斉評価と目的のアセンブリ反応産物に紐付いた DNA バーコードを持つ細胞クローンを単離するというプロセスに切り替えるための基礎技術とする。

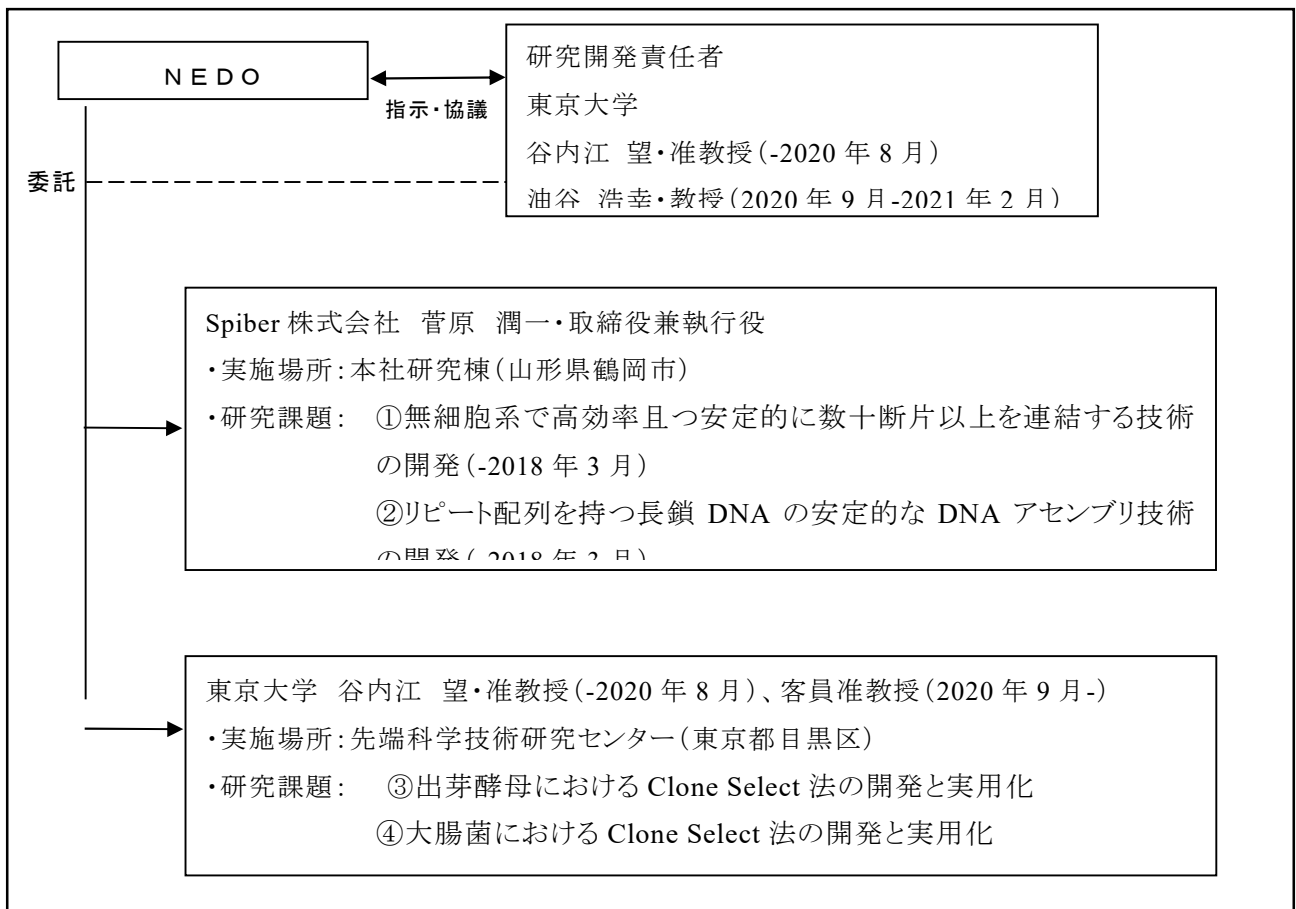
④大腸菌における Clone Select 法の開発と実用化（東京大学）

DNA バーコード化されたアセンブリ反応産物 1,000 クローン混合した試料から Clone Select 法 1 回によって任意の DNA バーコードを持つクローンを感度 50%以上、特異度 80%以上で単離する大腸菌細胞を用いた反応系を確立する。既に実現している出芽酵母細胞に加えて原核生物細胞においても Clone Select 法が利用可能になり、枯草菌を用いた OGAB 法など様々な長鎖 DNA 合成プラットフォームにおいてこれが利用可能になる。これらを長鎖 DNA 合成における基幹技術として国内に確立させる。

(3) 全体計画

研究開発項目		第 1 年度 (2017 年度)		第 2 年度 (2018 年度)		第 3 年度 (2019 年度)		第 4 年度 (2020 年度)	
		前	後	前	後	前	後	前	後
①	無細胞系で高効率且つ安定的に数十断片以上を連結する技術の開発 (Spiber 株式会社)				→				
②	リピート配列を持つ長鎖 DNA の安定的な DNA アセンブリ技術の開発 (Spiber 株式会社)				→				
③	出芽酵母における Clone Select 法の開発と実用化（東京大学）				→				
④	大腸菌における Clone Select 法の開発と実用化（東京大学）								→

(4) 実施体制



(5) 運営管理

各実施機関内において毎週運営会議および研究進捗会議をそれぞれ開催した。運営会議では知財戦略を、研究進捗会議ではデータおよび進捗状況の共有を行った。また Spiber 株式会社に参加していた 2018 年度までは年 4 回の運営会議を開催した。

(6) 実施の効果

1 遺伝子アセンブリの現状コストを合成コスト+評価コスト (500 円/クローン×平均 100 クローン) とした場合、月産 1,000 遺伝子を前提とするパイプラインにおいて、EFA-PCR や nSTART 法によるアセンブリの効率化による必要なクローン評価数の低減と Clone Select 法による超並列クローン評価パイプラインの樹立によって (評価コストの 1/1,000 までの削減) 月 5,000 万円のコスト削減が見積もれる基礎技術を全て確立した。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目	達成状況	達成度

①	無細胞で高効率且つ安定的に数十断片以上を連結する技術の開発 (Spiber 株式会社)	10 種類の DNA アセンブリについて汎用的にアセンブリ可能な反応条件の最適化が完了した。	○
②	リピート配列を持つ長鎖 DNA の安定的な DNA アセンブリ技術の開発 (Spiber 株式会社)	nSTAR Assembly 法による 5×5 断片の階層的アセンブリが汎用的に行えることを示した。	○
③	出芽酵母における Clone Select 法の開発と実用化 (東京大学)	1,000 クローン混合試料から Clone Select 法によって任意の DNA バーコードを持つクローンを感度 20%以上、特異度 100%で単離することができることを示した。	○
④	大腸菌における Clone Select 法の開発と実用化 (東京大学)	1,000 クローン混合試料から Clone Select 法によって任意の DNA バーコードを持つクローンを感度 90%以上、特異度 90%以上で単離することができることを示した。	◎

(8) 研究開発の成果と意義

①無細胞で高効率且つ安定的に数十断片以上を連結する技術の開発 (Spiber 株式会社)

EFA-PCR 法によって 80 断片程度の短鎖 DNA をアセンブリすることによって 3,000 塩基程度の大腸菌プラスミド DNA を試験管内で構築できることを示した。本技術を用いて、2,000 塩基程度の DNA アセンブリを 10 例程度実施し、本技術に汎用性があることを示した。

②リピート配列を持つ長鎖 DNA の安定的な DNA アセンブリ技術の開発 (Spiber 株式会社)

nSTAR 法によって、計画通り順調に 5 断片のアセンブリ計 25 種類を達成した。さらに 5 断片アセンブリ産物の 2 階層目のアセンブリを実施した。また Golden Gate 法と並列に同アセンブリを実施した結果、Golden Gate 法よりも高効率のリピート配列アセンブリが観察され、リピート配列を持つ長鎖 DNA のアセンブリ技術として優れていることを示した。

③出芽酵母における Clone Select 法の開発と実用化 (東京大学)

出芽酵母における Clone Select 法の開発を進めた。本手法では DNA アセンブリ反応時の反応産物分子それぞれに特異的な DNA バーコードが付与されるように設計した。反応産物プールを用いて、出芽酵母細胞を形質転換後、細胞を 2 群に分け、片方から DNA アセンブリ産物と DNA バーコードの組み合わせを超並列 DNA シークエンシングで解析し、もう片方から目的の DNA アセンブリ産物をもつ細胞クローンをその DNA バーコード特異的に蛍光ラベル化する手法を開発した。はじめに、3 種類のバーコードを保持する出芽酵母細胞を準備し、特定の DNA バーコードがラベル化される条件化で 3 種類全ての細胞のラベル化を試みた場合、目的の DNA バーコードのみが特異

的にラベル化されることを示した。また、このラベル化が青色光照射時に細胞スポットにおいても目視で確認できた。次に、DNA バーコードを約 100 種類 (Pool 100) および 1,580 種類 (Pool 1580) 持つ出芽酵母細胞プールをそれぞれ準備し、それぞれから特異的な DNA バーコードをラベル化し、細胞を寒天培地に塗布後蛍光を示すコロニーを単離することで目的の DNA バーコードを持つクローンを単離する実験を行った。その結果、Pool 100 を用いた実験では、26 DNA バーコード中、61.5%について蛍光を呈するコロニーを単離することができ、それらのすべてが正しい DNA バーコードを保持することを確認した。また Pool 1580 を用いた実験においても、試験した 29 DNA バーコード中、20.6%について蛍光を呈するコロニーを単離することができ、それらのすべてが正しい DNA バーコードを保持することを確認した。

③大腸菌における Clone Select 法の開発と実用化 (東京大学)

大腸菌における Clone Select 法の開発を進めた。本手法でも DNA アセンブリ反応時の反応産物分子それぞれに特異的な DNA バーコードが付与されるように設計した。反応産物プールを用いて、大腸菌細胞を形質転換後、細胞を 2 群に分け、片方から DNA アセンブリ産物と DNA バーコードの組み合わせを超並列 DNA シークエンシングで解析し、もう片方から目的の DNA アセンブリ産物をもつ細胞クローンをその DNA バーコード特異的に薬剤耐性を付与する手法を開発した。この結果、酵母細胞の時と同様に、ゲノム編集によって標的とする DNA バーコード依存的に薬剤耐性を持つ細胞が薬剤選択環境下において得られることを確認した。また薬剤耐性の獲得系を実現することによって、蛍光を呈する細胞を探索して単離するという手間が省けることを示した。次に、DNA バーコードを約 100 種類 (Pool 100) および 1,550 種類 (Pool 1550) 持つ大腸菌細胞プールをそれぞれ準備し、それぞれから特異的な DNA バーコードをもつ細胞を薬剤選択によって単離する実験を行った。その結果、Pool 100 を用いた実験では、10 DNA バーコード中、全てについて薬剤耐性をもつ細胞を得ることができ、それらのすべてが正しい DNA バーコードを保持することを確認した。また Pool 1550 を用いた実験においても、試験した DNA バーコード 8 種において、薬剤耐性を持つ細胞を単離できることを確認した。Clone Select 法は様々な DNA アセンブリに対して汎用的に用いることができる技術であり、様々な DNA アセンブリ技術が実現している出芽酵母細胞および大腸菌細胞を用いてこれを実現することにより、当初掲げた様々な DNA アセンブリにおいてその DNA 合成効率を 1,000 倍にする基幹技術を実現するという最終目標を達成した。

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2018	0	1	0	0	0	0	0

2019	0	0	1	0	0	0	0
2020	0	0	0	0	0	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2018	0	0	0
2019	1	0	0
2020	0	0	0

課題名：C(1)-2-3 Combi-OGAB 法と機械学習による迅速なDNA配列因子組み合わせの探索技術の開発

担当機関：東京大学、神戸大学、東北大学、味の素、鹿児島大学、大阪大学

(1) 背景と目的

本研究項目では、Combi-OGAB 法を用いた微生物ライブラリの構築と機械学習を繰り返すことにより、微生物による物質生産量を上げていくためのプラットフォームを開発する。Combi-OGAB 法では、いくつかの DNA をバラバラにして再構成することにより、多様なバリエーションを持つ DNA を一度に生成することができる（図 3.2.3.1-2-3-1 左）。作成された多様な DNA はプラスミドにクローン化された状態で得られるため、容易に微生物に導入することが可能である（以下、Combi-OGAB 法により作成したプラスミドを導入することで得られる微生物群を“微生物ライブラリ”と記述する）。得られた微生物ライブラリに含まれる細胞の物質生産量とプラスミド DNA 配列のデータを多数取得し、機械学習により分析する（図 3.2.3.1-2-3-1 右）。機械学習により物質生産を向上させる DNA 配列因子を予測し、この予測に基づき次に探索すべき DNA 配列を設計する。このサイクルを繰り返すことにより、微生物による物質生産量を上げていく。

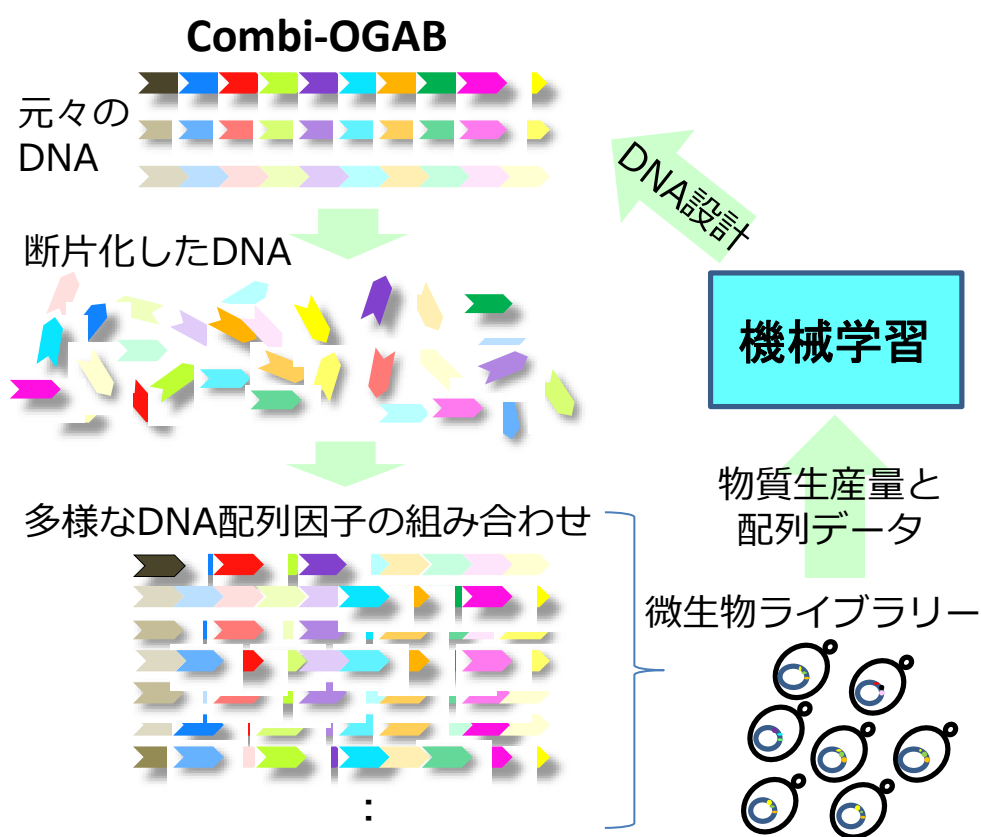


図 3.2.3.1-2-3-1 本項目の研究開発の流れ

プロジェクト期間中に、3 つの具体的な個別課題に対してこのサイクルを回すことにより、このサイクルを効率よく回すために必要な要素技術を開発する。個別課題①「タンパク質コード領域の探索的最適化法の開発（遺伝子配列設計方の開発）」では、目的タンパク質の発現量を最適

化するために必要なタンパク質コード領域断片の組み合わせを探索する技術を開発する。この技術を使って得られたデータから、遺伝子配列設計を行う技術を開発する。個別課題②「タンパク質高生産菌の開発」においては、目的タンパク質の発現量を最大化することを目的として、必要な遺伝子情報の組み合わせを探索する技術を開発する。個別課題③「化合物高生産菌の開発」では、目的物質の生産量を最大化することを目的として生合成酵素の組み合わせを探索する。個別課題①を東京大学、②を東北大学と鹿児島大学、③を味の素株式会社を中心となり実施する。

(2) 位置づけ、目標値

ライブラリ作成と機械学習の組み合わせという観点では、競合研究として Sympromics 社（英国）の事業があげられる。同社は、遺伝子治療用の組織特異的プロモーター配列を創出し、100億円もの資金を獲得している。転写因子結合部位を含む DNA 断片を組み合わせることで多様なプロモーター配列を作成し、これを細胞に導入する。それら細胞から得られる配列と発現量のデータを人工知能により分析するとされているが、その詳細は非公開である。図 3.2.3.1-2-3-2 に Sympromics 社によるプロモーター開発法のイメージを記す。本研究項目で用いる Combi-OGAB 法は、既存技術よりも多数の DNA 断片を組み合わせることが可能である。具体的には、既存手法では困難な 15 以上の DNA 断片を組み合わせることも可能である。断片数に制約の少ない Combi-OGAB 法は、得られるデータの自由度が高いという点で機械学習との相性が良いと言える。

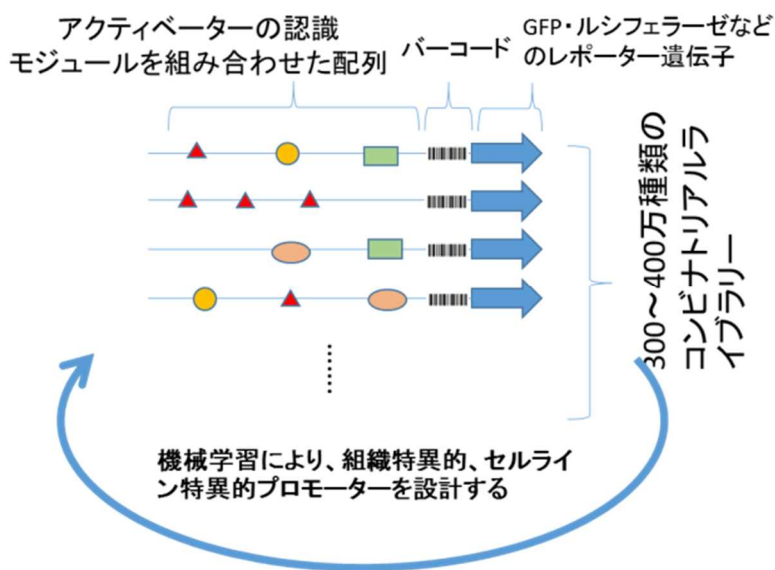


図 3.2.3.1-2-3-2 Sympromics 社のプロモーター開発

(3) 全体計画

図 3.2.3.1-2-3-3 に全体計画を示す。2018 年度までは本プラットフォームを実施するための要素技術の開発、および Combi-OGAB と機械学習のサイクルの試験的な実行に注力する。2018 年度以降は、本プラットフォームを利用した目的物質の高生産化、および取得するデータの大規模化を行う。

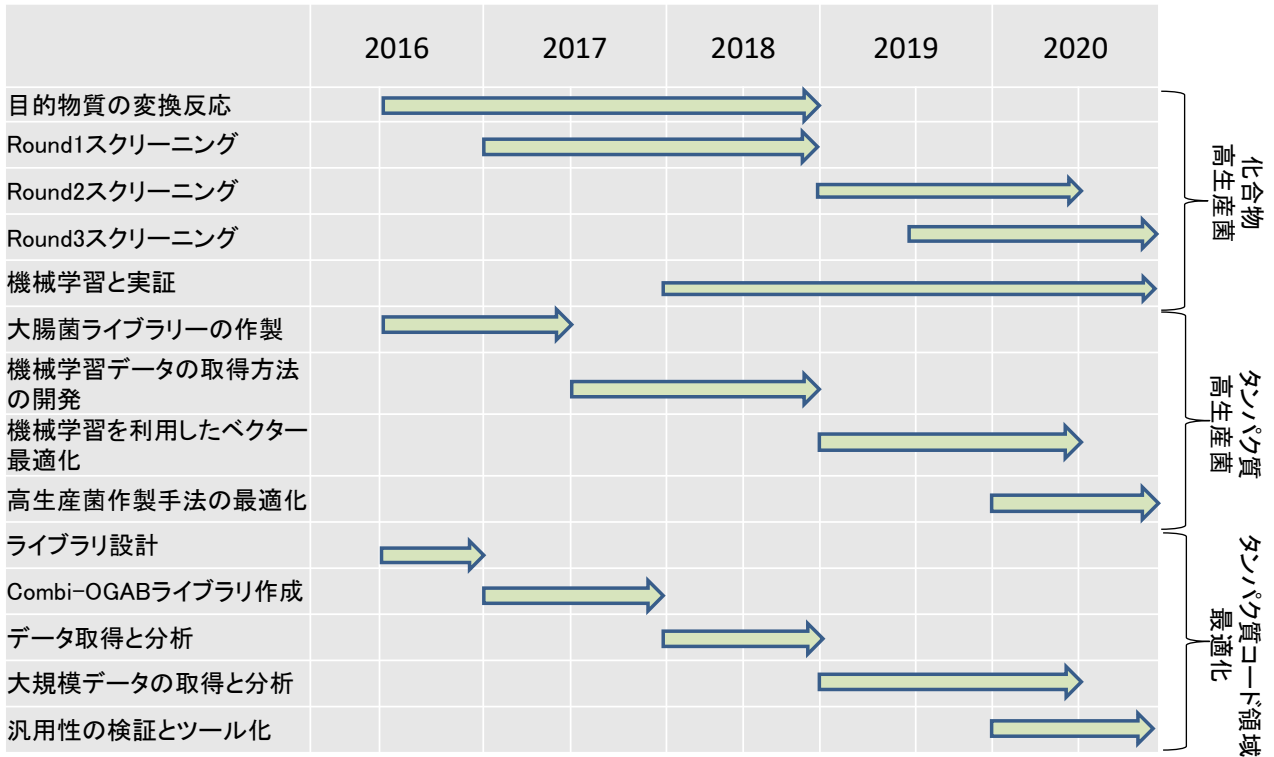


図 3.2.3.1-2-3-3 全体計画

(4) 実施体制

図 3.2.3.1-2-3-4 に本研究項目の実施体制を示す。機械学習を中心とした情報解析を東京大学で担当し、Combi-OGAB 法を用いた微生物ライブラリーの作成を神戸大学が担当する。この体制の元で、3つの個別課題を実施する。本研究項目で作成された要素技術は、研究項目 C(1)-1 に提供する。

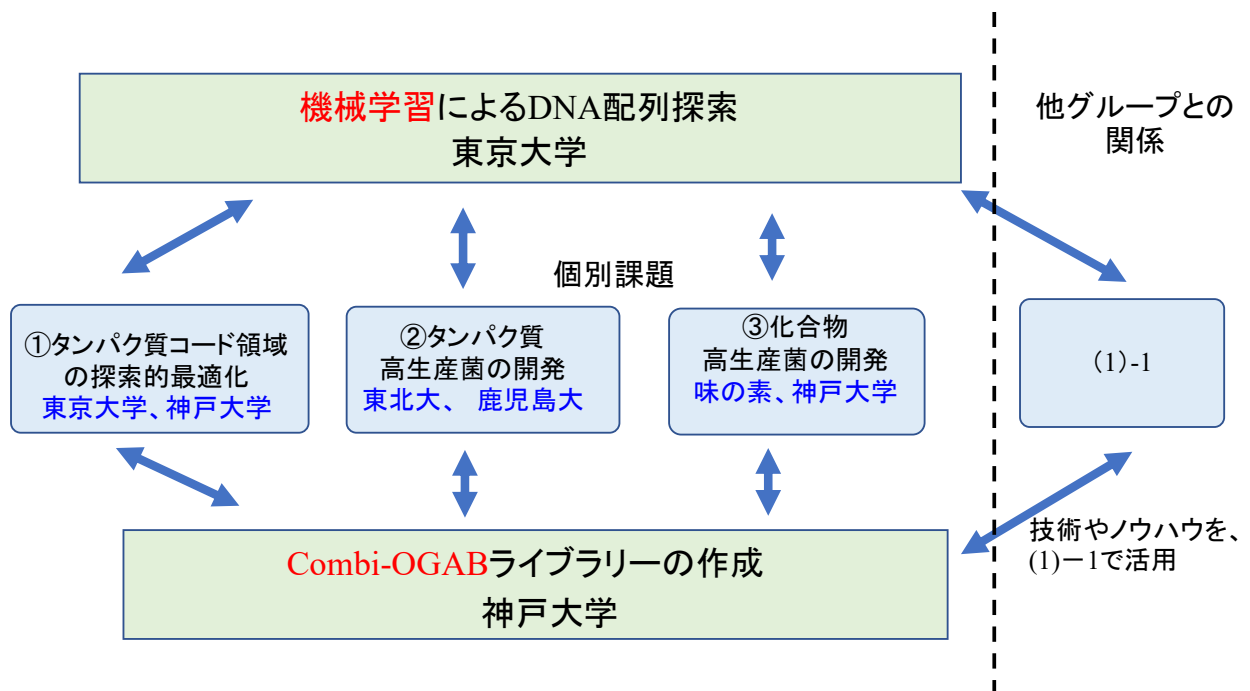


図 3.2.3.1-2-3-4 研究実施体制

(5) 運営管理

本研究項目の参加者による全体会議を年に 1~2 回の頻度で実施し、進捗報告と研究方針に関する打ち合わせを行っている。個別の研究に関する日常的な打ち合わせは、担当者間による電子メールあるいは電話にて実施している。より密な議論が必要な場合には、Polycom や Skype などによるテレビ会議を活用している。直接顔を合わせる機会よりも、頻繁に連絡を取り合うことを重視して研究を進めている。

(6) 実施の効果

本研究項目を実施することにより作成されるプラットフォームは、生合成遺伝子の調整による目的化合物の高生産や、タンパク質コード領域などの遺伝子情報の最適化による目的タンパク質の高生産を効率よく実現させるものである。具体的な費用対効果の見積もりは、目的物質の価格にも依存するため計算が難しいが、高生産株の作成コストを大きく削減するものを考えられる。また個別課題②を実施することにより創出される目的タンパク質高生産株は、タンパク質の大量生産に直接利用できる可能性がある。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目	成果	達成度 (2020 年度末)	残課題
① タンパク質コード領域の探索的最適化法の開発 (遺伝子配列設計法の開発)	開発した遺伝子設計法の有効性を検証したところ、予測発現量と実測発現量の相関係数 0.8 以上を達成した。	○	検証実験のデータ数がまだ少ない。現在、追加実験中である。
②タンパク質高生産菌の開発	目的タンパク質の発現量を親株と比較して 26 倍以上向上させ、52 mg/培地 L を達成した。	○	
③ 化合物の高生産菌の開発	目的化合物の生産量はプロジェクト開始当初より 55 倍向上した。	△	培養条件を含む有効因子の組み合わせによる高生産化

(8) 研究開発の成果と意義

本項目では、プロジェクト期間中に 3 つの研究テーマ（個別課題）を設定し、それぞれに対して Combi-OGAB 法による微生物ライブラリ作成と有用な DNA 因子の組み合わせ抽出を行う。これにより、幅広い対象に対するプラットフォームを構築するとともに、その有効性を実証する。本プラットフォームの完成により、目的の性質を持つスマートセルを短期間に作成できるように

なることが期待される。また、本研究項目を実施する過程で得られた高生産株は、有用物質の工業生産に直接利用できる可能性がある。以下では、個別課題ごとに研究成果を報告する。

① タンパク質コード領域の探索的最適化法の開発

タンパクコード領域の塩基配列、つまりはコドンの最適化は異種タンパク質発現における重要な要素の一つである。しかしながらコドンが発現量に影響を与える分子メカニズムは完全には解明されておらず、また既存のコドン最適化法がうまくいくとは限らない。特に、組換え体の作成に手間のかかる真核生物においては、コドンと発現量の関係を調べるのが難しく、両者の関係にはいまだに不明な点が存在する。

本個別課題では、Combi-OGAB 法による微生物ライブラリの作成と機械学習を利用して、タンパク質コード領域の塩基配列の関係に関するデータを効率よく取得する手法を開発する。そして、このデータを用いて真核生物における遺伝子配列の設計方法を開発する。真核生物のモデル生物であり産業利用も進んでいる出芽酵母を対象とする。本個別課題で実施する研究の流れを図 3.2.3.1-2-3-5 に記載する。以下、この図に従ってこれまでの研究成果を記述する。まず、同じ GFP をコードするが異なるコドンを持つ ORF を 5 種類設計し (図 3.2.3.1-2-3-5①)、これを断片化したものを Combi-OGAB 法で再構成することによりキメラ GFP (②) を作成した。これを出芽酵母に導入した後、蛍光センサーを使って蛍光強度に従い weak、medium1、medium2、strong の 4 つのグループに分類した (③)。各グループから 24 株ずつをランダムに選択した全 96 株を別々に培養した後、それぞれのクローンのキメラ GFP の配列決定と、蛍光強度の再測定を実施した (④)。その結果、キメラ GFP では様々な ORF 断片がまじりあっていることを確認した。また、キメラ GFP の配列により発現量が大きく異なることが確認できた。ここまでの研究により、Combi-OGAB 法を利用してタンパクコード領域の塩基配列とタンパク質発現量の両方に多様性を生み出すことに成功した。また、タンパクコード領域の塩基配列と、これに対応する発現量のデータを多数収集できることを示した。

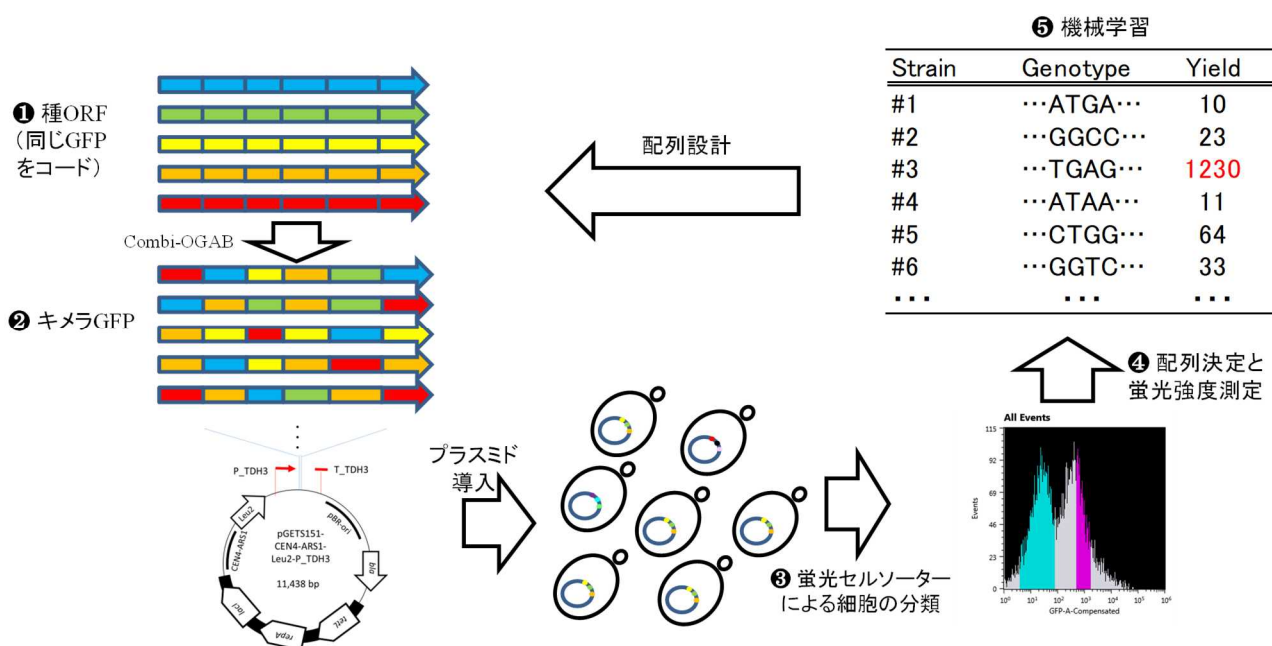


図 3.2.3.1-2-3-5 GFP に対するタンパク質コード領域の探索的最適化法の実施手順

・大量データの取得と遺伝子配列設計法の開発

上記の実験系を利用し、タンパク質コード領域の塩基配列と発現量に関する大量のデータを取得した。そして、このデータから抽出した特徴に基づき、遺伝子配列の設計手法を開発した。この遺伝子配列設計法を用いて、GFP とはアミノ酸配列も立体構造も異なるタンパク質の配列設計を行なった。そのタンパク質量を実験的に測定したところ、遺伝子配列設計で想定した発現量と実際の発現量がよく一致することが確認された。

② タンパク質高生産菌の開発

本個別課題では、タンパク質を高生産させる微生物を開発する。そのためのアプローチとして、タンパク質発現に関与する遺伝子配列を微生物へ複数導入する。複数の遺伝子配列を導入した場合、それら遺伝子配列がどのように影響し合ってタンパク質の生産量がどのように変化するかはわからない。そこで、導入する複数の遺伝子配列の組み合わせを変えたベクターライブラリを combi-OGAB で作製し、微生物を形質転換させた。そして、1,000 株以上をクローン化し、それら微生物ライブラリから得られるタンパク質生産量を迅速に測定するため、ELISA を用いて 96 株のタンパク質生産量を並列に測定する実験系を構築した。この系を用いれば、1 か月に 1,000 株程度のタンパク質生産量を測定することが可能になった。そこで、この系を用いて目的の組換えタンパク質について利用したところ、そのタンパク質の生産量を 5~10 倍程度向上させることができ、遺伝子解析の結果、組換えタンパク質によって導入すべき遺伝子配列は異なることが分かった。

また、上記技術において、遺伝子配列解析に多くの時間とコストがかかることが分かったため、遺伝子配列解析を行わなくても微生物中で有効に作用し遺伝子配列を同定できる技術を開発した。その結果、データ取得期間を 4 分の 1、配列同定に掛かるコストを 10 分の 1 に削減することができ、機械学習に必要な学習データ量を短期間で取得できるようになった。そこで、100 クローン程度の学習データを取得し、機械学習を行い、目的組換えタンパク質の生産性を向上させる遺伝子配列の組み合わせを予測した。そして、予測された上位の組み合わせを導入した微生物を作製したところ、目的組換えタンパク質の生産量を 10 倍以上向上させることができた。

③ 化合物高生産菌の開発

本個別課題では、化合物を高生産させる微生物を開発する。目的とする化合物はテルペン系のフレーバーである化合物 A およびその前駆体である化合物 B とした。化合物 B から化合物 A への変換反応において、ターゲットプロテオーム解析の知見をもとに 3 種類の酵素発現量の最適化により、1 菌体で目標量の化合物 A を生産し、且つ副生物を低減させた (C(1)-7、C(3)-2 共同)。

化合物 B 生産菌構築では生合成経路遺伝子を様々な強度で発現させる Combi-OGAB プラスミドライブラリを作成し、高生産に寄与するルール抽出を試みた。プロジェクト期間中に合計 4 回の DBTL サイクルを実施し、各ラウンドにおいて化合物 B 高生産ルールの抽出と検証を行った。抽出した高生産ルールをもとに構築した生産菌は、プロジェクト開始当初の菌株と比較して化合物 B 生産量が 55 倍に向上した。また、DBTL サイクルに必要な時間を 17 カ月 (Round1) から 9 カ月 (Round3) に短縮した。Round1 では 196 株、Round2 では 100 株、Round3 では 316 株、Round4 では

11株のプロモーター配列の組み合わせおよび培養データをもとに高生産ルールの抽出を行った。

各種オミクス解析として、RNA-seq解析(C(1)-5 スパイクイン標準物質を活用)、プロテオーム解析(C(1)-7 共同)、メタボローム解析(C(1)-6 共同)を行い、化合物B生産菌におけるボトルネックの特定や力価低下の原因究明に役立てた。特にプロテオーム解析ではQconCAT法により生合成経路酵素の量比を比較できる手法を開発し、育種に役立てた。また、C(1)-6と連携し、化合物B生産菌を効率的にスクリーニングする方法を開発し、共同で特許出願を行った。迅速にデータを取得するため、スループット性が高い一次評価系の開発(ヘッドスペースバイアル培養の高速化)、高生産性を評価するための二次培養評価系の開発、次世代シーケンサー活用によるCombi-OGABライブラリ1344株のプロモーター配列一括決定法の開発を実施した。また、一部ラウンドではシャーシ株(C(1)-1)を活用し、データの取得を行った。また、FBAシミュレーション結果(C(2)-1)をもとに、炭素源を変更することによる化合物Bの生産量向上効果を確認した。

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表		
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他
2016	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	0	0	0	0
2018	0	0	2	0	0	1
2019	0	0	0	1	0	0
2020	1*	0	0	0	0	0
合計	1*	0	2	1	0	0

*他の課題との共著を含む

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

本研究項目を実施する過程で作成された高生産株を順次、特許化する。情報解析部分については特許出願せずにノウハウとして保有する。

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0

2018	0	0	0
2019	0	0	0
2020	2*	0	1*

*他の課題との共同出願を含む

課題名：C(1)-3 メタボライトセンサの開発

担当機関：千葉大学、石川県立大学、神戸大学、三菱ケミカル

(1) 背景と目的

激化する微生物での有用物質生産における世界との競争に打ち勝っていくためには、微生物の育種開発期間を短縮することが一つの重要な課題となっており、Design-Build-Test-Learn (DBTL) サイクルを高速にまわし、有用微生物を高速に構築する技術が必須となりつつある。Learn/Design/Buildにおける技術革新はめざましい。その最大の理由は、この3者には、開発項目がプロジェクトの内容に関わらず、DNAのデザインと編集技術に集約されるからである。対してTest(T)はテーマ毎に標的分子が異なるため、ハイスループット化や普遍化が非常に困難であり、海外のベンチャー企業や巨大プロジェクトでも二の足を踏む状態が続いている。

本研究開発項目では、無数の形質転換体やゲノム編集株の生産性評価、およびハイスループットな微生物評価技術の開発の最重要項目のひとつとして、任意の標的代謝物に対して、オンデマンドに希望のスペックのセンサを提供する普遍的ワークフローを確立するという大きな目標を設定した(図3.2.3.1-3-1)。そのような基盤技術ができれば、つまり、代謝マップに載るあらゆる代謝物に対するバイオセンサの開発が実現するならば、想定されるあらゆるバイオものづくり構想において、その「経路の開通と改良」「宿主株の育種」などに不可欠であるハイスループットスクリーニングが可能となるのみならず、DBTLサイクルによってセミラショナルに作出された様々な株の代謝状態を並列解析できるため、DBTLの律速段階の解消による飛躍的な高生産株開発が可能となる。

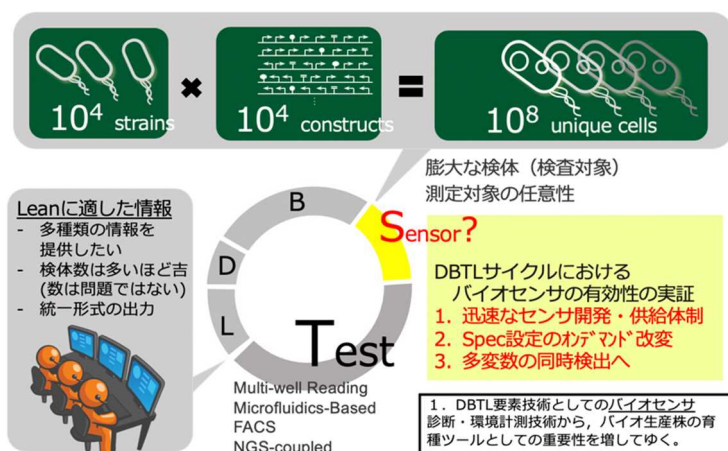


図 3.2.3.1-3-1 本プロジェクトにおけるバイオセンサ開発の重要性

(2) 位置づけ、目標値

Amyris や Ginkgo Bioworks などの微生物の菌株開発に特化したベンチャーのように自社で利用できるオートメーションシステムをインハウスで構築している企業も複数存在しているが、そのブラックボックスの内容は、実は大きな違いはない。DNA 合成/DNA 編集の超並列化と低コスト化、形質転換の高効率化と多検体ハンドリング・管理技術、そして得られる膨大な情報のハンドリングと有用情報抽出である。これらにおける優劣は、要素技術の違いよりも、その共役のさせかたによって勝敗が決まると言っても良い。対してハイスループット解析技術は、どのプロジェクトでも、(1) すでに知られる比色アッセイを利用できる系を応用した DBTL か、あるいは、(2) ひ

とつふたつの重要な化合物に対するアッセイ系確立（その過程は低スループットである）を開発項目に含めるもの、となっている。

本研究開発項目で開発するのは、持ち込まれる複数の技術課題に対し、必要な化合物の検出や定量に資するバイオセンサの開発そのものをハイスループット化することにある。通常、バイオセンサの開発は、FRET/BRET型、転写因子型、スタンドアローン型などがあるが、いずれも、標的化合物の結合に伴うアロステリック変化を読み出す形式であるため、タンパク質工学としての難度が高い。そのスペック改良まで含めると、一つに対して何ヶ月も何年もかかる、負荷の高い作業であった。そこで本研究では、「安定化の見える化」という新たな、そして普遍性の高い機構を採用することによって、さらには、センサそのものにも DBTL サイクルの高速化を目指して、その試作期間を最短 1~2 週間程度にまで圧縮することを目標とした（図 3.2.3.1-3-2）。さらに、バイオセンサ開発の全工程を液体ハンドリングのみで行えるようにすることによって、複数のバイオセンサの並列開発を可能とすることを目標とした。そして最後に、これらのセンサを実際の生合成 DBTL サイクルに援用し、高生産株に資するさまざまな変異体取得につなげ得ることを実証することを最終目標とした。

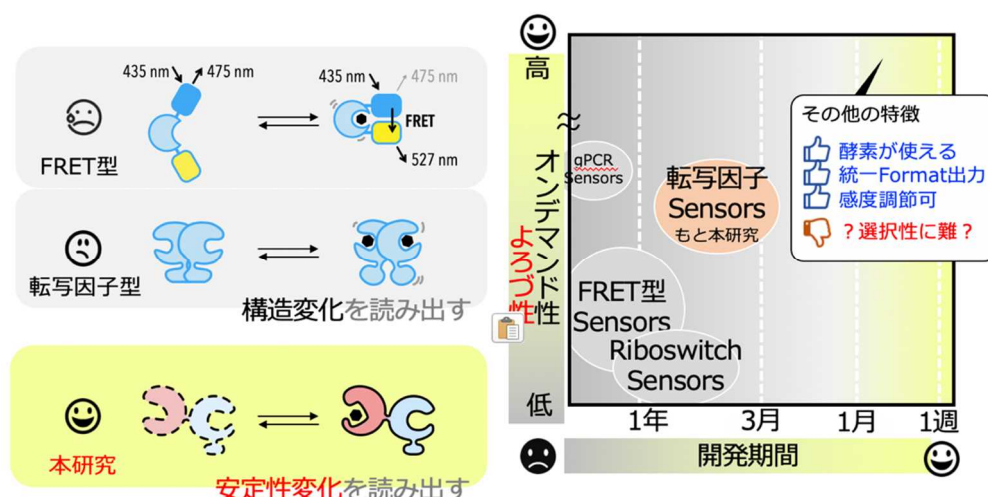


図 3.2.3.1-3-2 : バイオセンサ開発における本研究の位置づけ

具体的な目標として

- ・ リガンド（受容体）や基質（酵素）の結合に伴う安定性変化を拾い出すことによって、さまざまな物質を検出できるバイオセンサを多数（>10 種類）制作する。
- ・ 物性や性質の異なるさまざまな受容体・酵素タンパク質を迅速にセンサ化するために、そのワークフローの改良を重ね、~2 週間で試作品が作れる技術基盤を確立する。
- ・ 有価イソプレノイド類の効率的な生産株の創出のため、その前駆体の細胞内レベルをハイスループットに蛍光出力するバイオセンサーを開発し、それを用いた高生産株のスクリーニングを実施する。
- ・ 有価アルカロイド類の高効率生産株の樹立・育種のため、各種前駆体のセンサ開発を行う。それを用いて実際に、生合成の一部の経路最適化を実現する。

(3) 全体計画

プロジェクト発足当初は、TRAHED 事業で開発された転写因子の高速進化系の適用によって、自然界に存在する代謝物応答型の転写因子のリガンド特異性の改変を行うことによって、新規代謝物センサの高速開発を目指していた。また、これらのセンサの被検物質に他の化合物を転化する生合成経路の附設による「見える化」可能な代謝物センサのラインナップ拡充を目指していた。

この当初の計画は概ね期待通りに進んだが、いくら全てが液体操作のみで並列実施可能だとはいえ、そのプロトタイプシステムにおけるワークフローの改良やデザインにおいて、多大な研究者時間を要すること、そして何よりも、メタボライトによっては、天然モチーフの選択性改変という方法ではアクセスできないものも多いことから、2019年より、全く新しい手法を導入することとした。この2年限定の加速プログラム「メタボライトセンサの開発」によって、センサの開発時間と歩留まりを飛躍的に向上させること（上記目標参照）を実現し、2桁のセンサを「労力すくなく」製作してみせること、それらのセンサが育種に応用可能であることを実証するとともに、その応用における方法論・ノウハウを蓄積することを最終目標とした。

全体計画

事業項目	2016年度	2017年度	2018年度	2019年度	2020年度
ハイスループット微生物構築・評価技術の開発	代謝物センサの試作と機能評価 →	代謝物センサの進化工学的改良技術の開発 →	改良型の代謝物センサの開発 →		
メタボライトセンサの開発				新原理にもとづく代謝物センサと開 →	作出したセンサの育種応用 →

(4) 実施体制

神戸大学の再委託先として、千葉大学がメタボライトセンサの製作手法の開発、その改良やセンサ利用技術の開発を行う。製作されたセンサは、神戸大学のシャーシ株開発、石川県立大学のオピオイド経路の開発、三菱ケミカル社のイソプレレン生合成経路の開発などに応用される。その応用に際して、細かなユーザー要望を拾い、センサのスペック改良を行う。この「センサのDBTLサイクル」を通じて、センサ開発と利用ノウハウを蓄積する。

(5) 運営管理

研究テーマ内部では随時、進捗確認とミーティングを実施している。連携研究機関とも、必要に応じてメールやTV会議も活用しながら、1回/2ヶ月程度の頻度で情報交換や進捗確認を行っている。

(6) 実施の効果

本研究開発項目で開発する代謝物センサおよびその作製技術、利用技術は、標的の種類やスケールを問わず、さまざまなバイオものづくりシステム（酵素、生合成経路、そして宿主開発）

プロジェクトにフレキシブルに対応し、その開発を飛躍的に加速させる重要な国産技術となる。本技術はオートメーションシステムとしているため、コストパフォーマンスが高く、様々な標的化合物に対してフレキシブルな対応が可能な技術となっている。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
アルカロイドとその前駆体センサの開発と応用	1) 酵素 COR を分子認識素子とするレクチリンセンサを開発し、育種応用する。 2) 3) 酵素 CODM を分子認識素子とするテバインセンサを開発し、生合成工学に応用する。 3) 1	1) 世界初のレクチリンセンサの開発に成功、神戸大学に提供した(◎)。 2) 神戸大学は、バイオセンサを用いたスクリーニングによって、レクチリン高生産株の取得に成功した(○)。 3) 世界初のテバインセンサ開発に成功し、神戸大学と石川県立大に提供した。テバイン生合成の最後の3ステップの酵素の人工オペロンライブラリの中から、効率のよい経路のスクリーニング取得に成功した(○)。
イソプレノイド前駆体センサの開発と応用	4) 酵素 idi を分子認識素子とする IPP+DMAPP センサを開発し、育種応用する。 5) 酵素 dxr を分子認識素子とするテ DOXP センサを開発し、酵素工学に応用する。	4) イソプレノイド化合物の建材である DMAPP+IPP と律速酵素 dxs のプロダクトである DOXP のバイオセンサを開発し、神戸大学と三菱ケミカルに提供した。神戸大学チームによって、従来のリコペン色素蓄積を代替できることが示された(◎)。 5) これを利用した進化分子工学によって MEP 経路の Dxs、IspH の高活性変異体を取得した。さらにイソプレノ合成酵素 IspS の活性スクリーニングにも使えることを実証した(○)。
メタボライトセンサのオンデマンド開発・利用技術の確立	6) センサ制作ワークフローの DBTL による超高速化と普遍化	6) 融合する転写因子の種類や物性のラインナップ化による酵素ワークフローの短縮に成功した。試した計 19 の酵素・レセプタタンパク

	7) センサの育種応用のノウハウの集積	<p>質のうち、14までをセンサ素子化できた。各種糖分子、アミノ酸誘導体、CoA 化合物、有機酸、リン酸化合物などの重要代謝物に対するセンサを得た(そのいくつかは世界初：◎)。</p> <p>7) 実際に PJ 内の育種応用に上記センサを試用することによって、その有用性を実証した。また、これらを通して、バイオセンサの応用レシピを開発するとともに、センサ感度改良の新規手法を3つ開発した(○)。</p>
--	---------------------	---

(8) 研究開発の成果と意義

多くの代謝物は、それを直接のリガンドとする転写因子を持たないが、代謝物である以上、それに特異的に結合して下流の代謝物に転化する酵素は知られていることが殆どである。もしこれらをセンサの「素子」として流用する普遍的技術が確立できれば、もはや「天然のセンサの不在問題」は解消し、殆ど任意の代謝物を「見える化」（蛍光出力などでハイスループット検出/定量）できるに違いない。再委託先の千葉大学がごく最近開発した技術では、レセプタタンパク質と標的分子との結合を、ほかのタンパク質の機能の有無として読み出すことができる（図 3.2.3.1-3-3）。

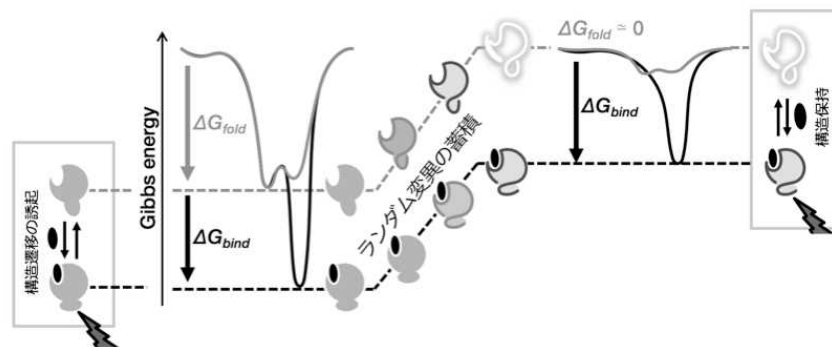


図 3.2.3.1-3-3：リガンド・基質結合によるタンパク質安定化を「見える化」する原理

この検出原理は、結合による安定化効果の可視化に基づくものであり、酵素と基質の「結合イベント」も読み出せることが期待される。つまり、他の方法では標的化が困難であった代謝物でも、それを基質とする酵素さえあれば、それを素子とした迅速なセンサの設計・試作が可能となる。

そこで、本プロジェクトで事業化を目指す化合物群に対するセンサの加速的供出のため、2018年7月から、本技術を転用したメタボライトセンサの開発研究を実施することにした。実際、加速期間をまたずして、幾つかの酵素を素子としたセンサが完成しており、本技術は酵素をもセンサ素子として用いることが可能であることが明らかとなっている。これから、芳香族アミノ酸、そしてイソプレノイド前駆体を直接標的とするセンサの開発を実施した。

[1] メタボライトセンサの制作技術

知られる様々な代謝物の殆どに対して、そのバイオセンサーは入手不可能である。代謝マップに出てくる代謝物であれば、それを基質として認識する酵素は存在するはずである。つまり酵素をセンサの分子認識素子に変換する技術さえあれば、代謝マップ上のあらゆる代謝物に対するセンサ開発が可能となる。図 3.2.3.1-3-3 に示すように、適度な不安定化を施せば、どの酵素も「基質結合による安定化があるときにのみ細胞内で安定に機能を発揮する」ように作り替えることができる。

本研究では、この酵素に in-frame でレポータとなるタンパク質を融合した。得られた融合タンパク質の適切な安定性調節をすることによって、そのレポータタンパク質の細胞内機能が、酵素基質の濃度を反映するように「進化」させる技術（図 3.2.3.1-3-4）を完成させた。

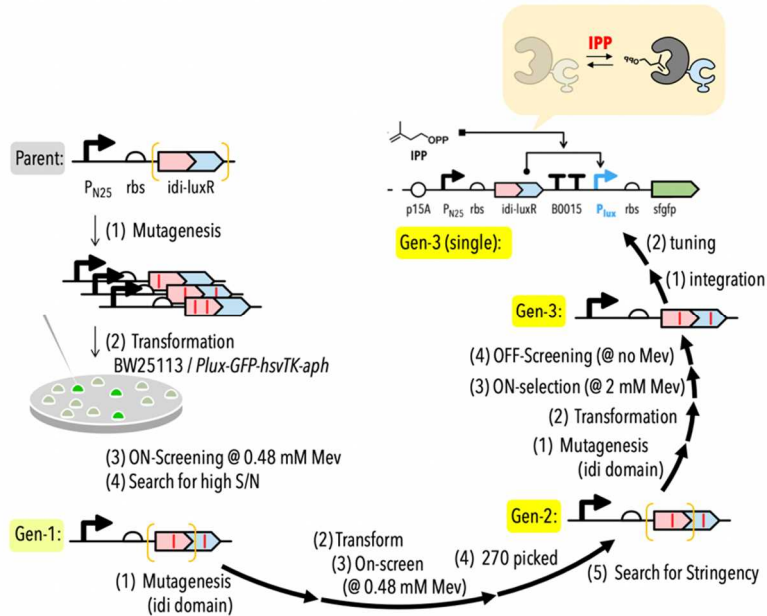


図 3.2.3.1-3-4：酵素を一部とするバイオセンサの開発ワークフロー

この方法では、(1) まず標的代謝物を基質とする酵素の遺伝子を転写因子の遺伝子（主に LuxR という亢進型転写因子を用いた）と in-frame で融合し、(2) その遺伝子全体にランダム変異を導入する。こうして得られた融合タンパク質のライブラリの中から、(3) 酵素基質濃度に応じて転写因子の機能の ON/OFF が大きな変異体を選抜する。

この方式で、多くの酵素が簡単にセンサ素子として使えることがわかった。プロジェクト期間内に試した 19 モチーフのうち 14 モチーフまでが、0~1 ラウンドの進化工学サイクルのうちに代謝物センサとしての機能を示した。生合成経路を追加することによって、わずかなエフォートで多くの代謝物のセンシングが可能となった（図 3.2.3.1-3-5）。

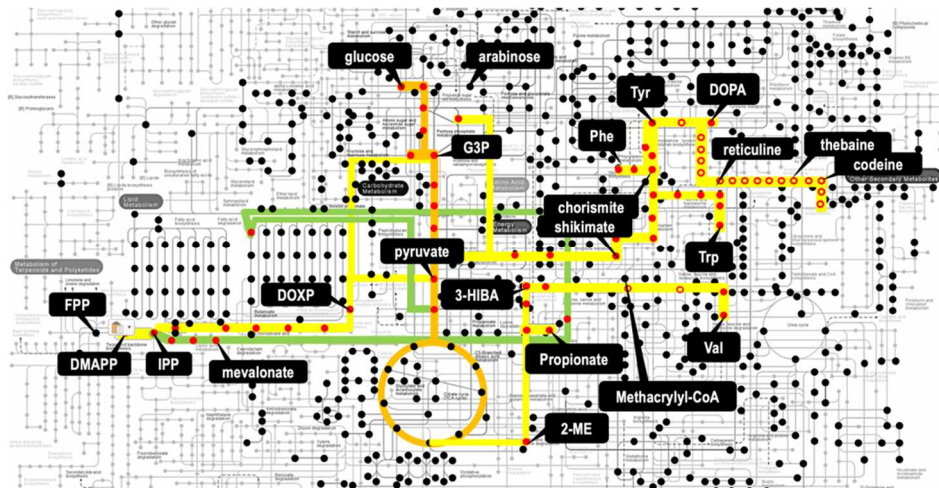


図 3.2.3.1-3-5 : 本PJでバイオセンサ検出が可能となった代謝物

[2] イソプレノイド前駆体センサとその生合成工学への応用

イソプレノイド化合物はカロテノイド色素やテルペン香料、天然ゴムやそして抗がん剤や抗HIV、抗マラリア薬などを含む一大化合物群であり、これらの高効率生産を目指して多くの代謝工学研究がなされてきた。アルテミシニンなど医薬品の一部に関しては、実用生産が可能になりつつあるが、さらにグラム単価の安いさまざまな有価テルペン類の実用生産のためには、さらに高生産な株を作る必要がある。すでに既存の知識をもとにした合理的デザインは限界とされており、スループットの高い進化デザイン・育種が必要である。

我々は、イソプレノイドの建材であるイソペンテニルニリン酸（IPP）を基質とする酵素、IPPイソメラーゼ（EC 5.3.3.2）を転写因子LuxRと融合し、2ラウンドの進化工学を行った（図3.2.3.1-3-3）。得られた変異体は、IPPのバイオセンサとして機能した（図3.2.3.1-3-6）。

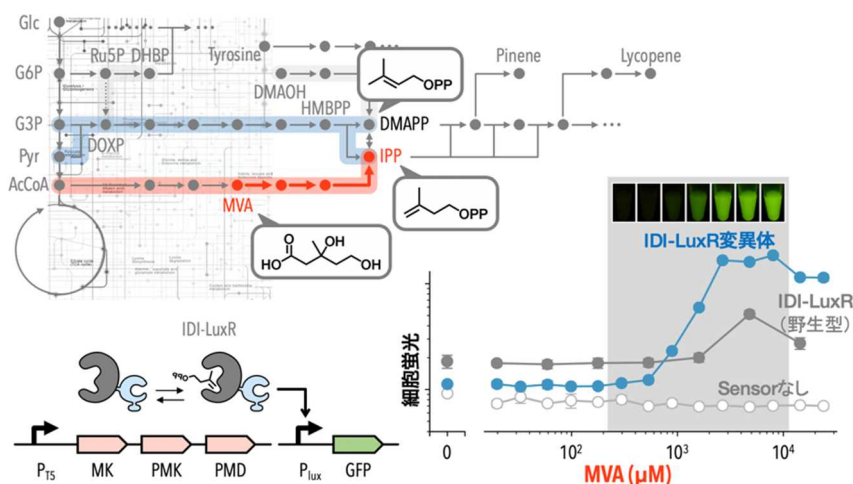


図 3.2.3.1-3-6 : イソプレノイド前駆体 IPP のバイオセンサとその挙動

このセンサは優れた性能を示した。長年、イソプレノイド上流経路の良否は、リコペンなどのカロテノイド色素の蓄積量を指標としてスクリーニングされてきたが、この方法は呈色に～3日ほど待つ必要があるのみならず、カロテノイド色素の膜蓄積量の限界があるため、ダイナミック

レンジに難点があった。対して、ここでつくられたバイオセンサは、一晩でスクリーニングが完了する（図 3.2.3.1-3-7）。

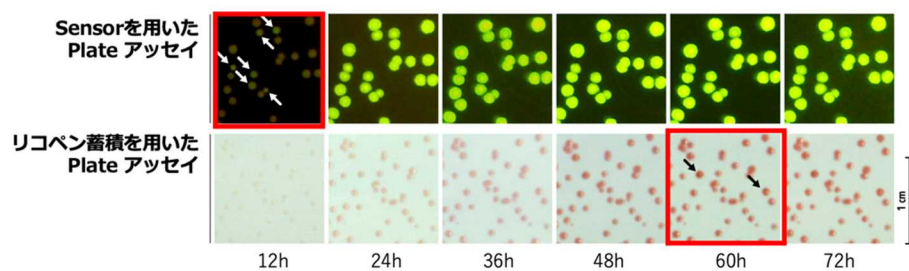


図 3.2.3.1-3-7 : スクリーニングのタイムライン

以上、本研究で作出されイソプレノイド前駆体酵素は、イソプレノイド・イソプレレン生合成に関わる様々な酵素ステップの改良に利用可能であることが実証された。

[3] アルカロイドセンサの開発と生合成酵素への応用

本PJでは、石川県立大学を中心としたテバイン生合成に挑んでいる。我々は本研究で開発した技術を用いて、同経路のキー中間体であるチロシン、シキミ酸、レチクリン、テバインのバイオセンサを開発した。

テバインセンサの場合、テバインをコデインデメチラーゼ（CODM、EC 1.14.11.32）とLuxRの融合とランダム変異による安定性調節によって、取得することができた。このセンサはCODMの基質であるテバインとコデインには応答するが、最終産物であるモルヒネや上流のレチクリンなどには応答しない選択的な中間体センサである。

我々は、このCODM-LuxRのテバイン選択性を利用して、テバイン生合成経路の最終3ステップの構築と改良を試みた。具体的には、サリタルジンからテバインまでの3ステップを担当するSalR、SalAT、THSの3酵素の発現強度をふった「オペロンライブラリ」を作出し、サリタルジンを添加した培地中で蛍光強度高い変異体を選抜した。この生合成経路と協同させることによって、テバインセンサ（CODM-LuxR）は、実質的にサリタルジンセンサとして機能させることができる。

こうして、アルカロイド経路の主要な生合成中間体の経路が揃った。これらを使ったハイスクリーンングを繰り返すことによって、テバインを始めとする有価アルカロイドの高生産株の樹立が可能になるものと期待される。

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	1	9	0	0	0	0
2018	1	4	5	1	0	0	0
2019	1	2	7	1	0	0	0
2020	0 (1)	1	4 (1)	0	1	0	0

*1：2020年度末までに予定している累積件数

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	0	0	0
2019	1	0	0
2020 *2	(1)	(1)	(1)

*2 : 2020 年度末までに予定している累積件数

課題名：C(1)-4 排出ボトルネック解消に向けた化合物排出輸送体探索プラットフォームの構築
 担当機関：東北大学、産業技術総合研究所

(1) 背景と目的

微生物を利用した物質生産において、細胞内の代謝系の改変が広く行われている。しかしながら、膜透過性の低い化合物や新規の化合物の生産においては、細胞内代謝の強化により生産物が細胞内に蓄積し、負のフィードバックにより生産反応を阻害する。そこで、本研究では生産物を細胞外に排出する輸送体の機能を強化することにより細胞内の生産反応の効率化をめざす。膜輸送体は通常の可溶性酵素と比較して研究の推進が困難であるため、現在までのところ膜輸送体の機能について、信頼できるデータベースは存在していない。そこで、本研究では、目的化合物の生産を効率化するための排出輸送体の探索技術の開発を実施する。2019年度以降、これまでに開発した技術を有効性検証課題に積極的に応用していくと同時に、情報技術、実験技術共に、輸送体導入による効率化に向けて見いだされた新たな課題に対する新規技術開発を実施する。

(2) 位置づけ、目標値

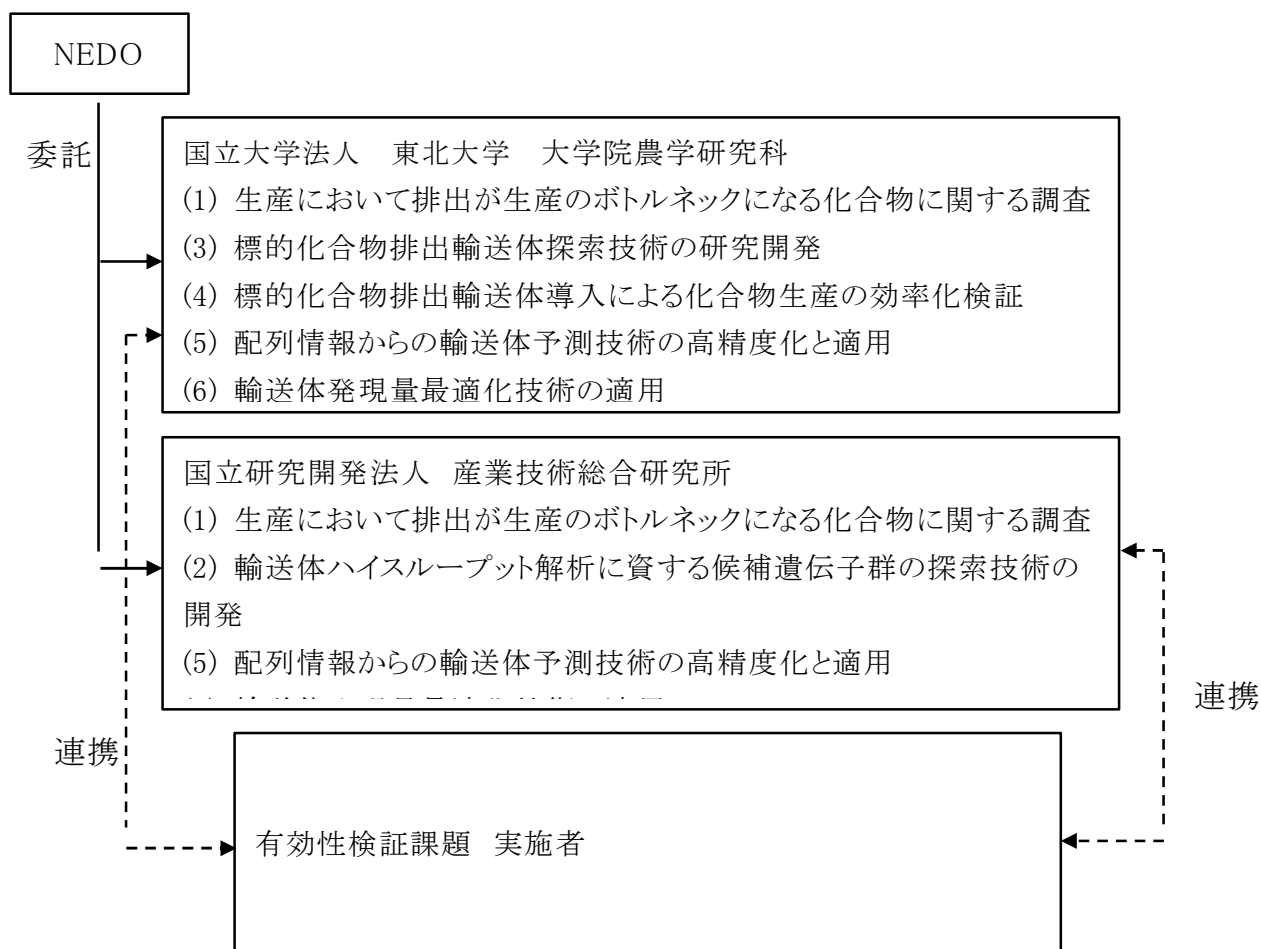
研究開発項目	位置づけ	目標値（2018年度末）
①生産において排出が生産のボトルネックになる化合物に関する調査（東北大・産総研）		
	化合物の生産において、排出がボトルネックとなっている化合物の調査を実施する。	排出がボトルネックとなっている化合物（3化合物以上）を選定する。
②輸送体ハイスループット解析に資する候補遺伝子群の探索技術の開発（産総研）		
輸送体ハイスループット解析に資する候補遺伝子群の探索技術の開発	目的化合物産生微生物群のゲノム情報からの化合物輸送体候補遺伝子群リストの作成	<ul style="list-style-type: none"> 公開されている微生物ゲノム情報からの網羅的輸送体候補遺伝子群リストの作成 輸送体候補遺伝子群探索技術のツール化
オミクスデータからの輸送体候補遺伝子のスコアリング技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> 遺伝子発現データを用いた有用化合物排出輸送体候補遺伝子群のスコアリング技術の開発 	<ul style="list-style-type: none"> 質量分析データからの化合物特性と輸送体遺伝子の配列特徴量の検出技術の開発
③標的化合物排出輸送体探索技術の研究開発（東北大）		
標的化合物排出輸送体候補遺伝子発現微生物ライブラリの構築	標的化合物（3化合物）の排出に関与すると推定される輸送体遺伝子のライブラリを構築する。	各標的化合物につき10遺伝子以上
輸送体発現ライブラリへの標的化合物代謝系の導入	標的化合物生産遺伝子（群）をPCRにより増幅し、輸送体探索に使用する宿主で発現が	各標的化合物につき1遺伝子以上

	可能なプラスミドベクター等にクローニングし、生合成系遺伝子の導入を実施する。	
標的化合物排出輸送体の同定	質量分析装置等を用いて標的化合物排出輸送体候補から有効な標的化合物排出輸送体を選抜する。	各標的化合物につき 1 遺伝子以上
④ 標的化合物排出輸送体導入による化合物生産の効率化検証 (東北大)		
	③において、同定した標的化合物排出輸送体を用いて、生産実証試験を実施する。	各標的化合物につき 1 遺伝子以上、輸送体非導入株に対して、1.3-3 倍の増産
⑤ 配列情報からの輸送体予測技術の高精度化と適用		
アミノ酸輸送体予測器を拡張し芳香族や脂肪族アミノ酸輸送体の予測器を構築する	膜貫通領域予測結果や各種 PSSM スコアを統合し、特徴ベクトル構築法を改善し、輸送基質クラス毎に予測モデルの最適化を行う。	各実証課題で要求される芳香族化合物輸送体候補 (80 個以上) を予測
	対象とする基質クラスを拡張し、各実証課題で必要とされる基質輸送体の予測器の構築と検証。	2019 年度に構築した予測器を拡張し、芳香族化合物輸送体の候補を予測する
	情報技術に絞り込まれた標的化合物の輸送体候補について、クローニングを実施する。	情報技術により選抜した各種基質輸送体遺伝子 (80 個) のクローニング
	情報技術により絞り込まれた輸送体について、化合物生産試験を実施する。	情報技術から提案された各種基質の排出輸送体の検証 (探索実施 40 個)
⑥ 輸送体発現量最適化にむけた技術の開発		
プロジェクト内で同定した輸送体を対象に、輸送体量発現制御技術の有効性検証	輸送体毒性を考慮した最適発現量を実現する技術の開発と適用	発現最適化技術を輸送体に適用する。
	輸送体の発現量を制御し、その中から最適な発現量を示す。	輸送体の発現量を制御し、標的化合物生産効率化実証試験を実施する。

(3) 全体計画

事業項目		2017年度	2018年度	2019年度	2020年度
① 生産において排出が生産のボトルネックになる化合物に関する調査		←→			
② 輸送体ハイストリート解析に資する候補遺伝子群の探索技術の開発	(2)-1. ゲノム情報からの輸送体候補遺伝子群リストの作成と既知情報の整理	←→			
	(2)-2. オミクスデータからの輸送体候補遺伝子のスコアリング技術の開発	←→	←→		
③ 標的化合物排出輸送体探索技術の研究開発	(3)-1. 標的化合物排出輸送体候補遺伝子発現微生物ライブラリの構築	←→			
	(3)-2. 輸送体発現ライブラリへの標的化合物代謝系の導入	←→			
	(3)-3. 培養液分析による標的化合物排出輸送体の同定	←→			
④ 標的化合物排出輸送体導入による化合物生産の効率化検証			←→		
⑤ 配列情報からの輸送体予測技術の高精度化と適用	芳香族や脂肪族アミノ酸輸送体の予測器を構築			←→	
	予測器を拡張し、芳香族化合物輸送体の候補を予測 サイクル①			←→	
	芳香族化合物輸送体の候補を予測 サイクル②				←→
	芳香族輸送体のクローニングサイクル①			←→	
	芳香族輸送体の探索サイクル①			←→	
	芳香族輸送体のクローニングサイクル②				←→
	芳香族輸送体の探索サイクル②				←→
⑥ 輸送体発現量最適化にむけた技術の開発	モデル輸送体の設計			←→	
	モデル輸送体の改変			←→	
	最適なモデル輸送体の選抜			←→	
	輸送体の設計				←→
	輸送体の改変				←→
	最適な輸送体の選抜				←→

(4) 実施体制
体制図



(5) 運営管理

参画グループ（東北大学、産業技術総合研究所）、連携研究グループ（神戸大学、地球環境産業技術研究機構）が参加するオンライン研究進捗会議を毎月実施し、連携を図った。3か月に一度、PLに参加して頂いた形でオンライン会議を実施し、進捗及び方向性について重点的に議論した。

(6) 実施の効果

本プロジェクトにより、将来的に有用輸送体の効率的探索と輸送体の実用株への適用に必要な技術を整備することができた。輸送体の効率的探索の実現と、輸送体利用技術の確立により、輸送体の利用による効率的化合物生産の普及に貢献する。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目	現状	最終目標	達成度、達成見通し
① 生産において排出が生産のボトルネックになる化合物に関する調査（東北大・産総研）			
	東北大独自化合物として3件、連携しているプロジェクト参加者との連携化合物として2件、計5件の化合物を選定した。	3件程度の候補を選定	◎
② 輸送体ハイスループット解析に資する候補遺伝子群の探索技術の開発（産総研）			
輸送体ハイスループット解析に資する候補遺伝子群の探索技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ <i>A. oryzae</i> および <i>E. coli</i> ゲノム情報および遺伝子発現情報から輸送体候補遺伝子群リストを作成した ・ 公開されている微生物ゲノム情報からの網羅的輸送体候補遺伝子群を抽出する手法を開発。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 目的化合物産生微生物群のゲノム情報からの化合物輸送体候補遺伝子群リストの作成 ・ 公開されている微生物ゲノム情報からの網羅的輸送体候補遺伝子群リストの作成 ・ 輸送体候補遺伝子群探索技術のツール化 	○
オミクスデータからの輸送体候補遺伝子のスコアリング技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子発現データから有用化合物排出輸送体候補遺伝子群のスコアリングを実施した。 ・ 質量分析データからの化合物特性と輸送体遺伝子の配列特徴量の検出技術を開発中 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子発現データを用いた有用化合物排出輸送体候補遺伝子群のスコアリング技術の開発 ・ 質量分析データからの化合物特性と輸送体遺伝子の配列特徴量の検出技術の開発 	○
③ 標的化合物排出輸送体探索技術の研究開発（東北大）			
標的化合物排出輸送体候補遺伝子発現微生物ライブラリの構築	5つの標的化合物の内、3化合物についてはライブラリの構築を終了した。	標的化合物（3化合物）の排出に関与すると推定される輸送体遺伝子のライブラリを構築する。	◎
輸送体発現ライブラリへの標的化合物代謝系の導入	5つの標的化合物の内、1化合物については生合成系遺伝子の導入を終了した。	標的化合物生産遺伝子（群）をPCRにより増幅し、輸送体探索に使用する宿主で発現が可能なプラスミドベクター等にクローニ	○

		ングし、生合成系遺伝子の導入を実施する。	
標的化合物排出輸送体の同定	3 化合物について、輸送体の探索を実施し、新規排出輸送体の同定に成功した。	質量分析装置等を用いて標的化合物排出輸送体候補から有効な標的化合物排出輸送体を選抜する。	◎
④標的化合物排出輸送体導入による化合物生産の効率化検証（東北大）			
	1 化合物について、生産性実証試験を実施し、有効性を検証した。	③において、同定した標的化合物排出輸送体を用いて、生産実証試験を実施する。	○
⑤配列情報からの輸送体予測技術の高精度化と適用			
アミノ酸輸送体予測器を拡張し芳香族や脂肪族アミノ酸輸送体の予測器を構築する	プロトカテク酸生産時、非生産時の発現解析データを用いて、候補輸送体の絞り込みを実施した。	各実証課題で要求される芳香族化合物輸送体候補（80個以上）を予測	◎
	MS データに加えて RNA-Seq によるカテコール生産株と野生株との間の時系列発現解析結果を用い、カテコール高生産時における輸送体遺伝子全体の発現動態の解析を行った。	2019 年度に構築した予測器を拡張し、芳香族化合物輸送体の候補を予測する	◎
	コリネ型細菌の有する輸送体遺伝子 205 遺伝子のクローニングを実施した。	情報技術により選抜した各種基質輸送体遺伝子（100個）のクローニング	◎
	205 輸送体について、生産培養試験を実施した。	情報技術から提案された各種基質の排出輸送体の検証（探索実施 50 個）	◎
⑥輸送体発現量最適化技術の開発			
輸送体毒性を考慮した最適発現量を実現する技術の開発と適用	15 種の輸送体について設計を行い、情報提供を行った。	輸送体毒性を考慮した最適発現量を実現する技術の開発と適用	◎
	5 種の輸送体について、発現制御実証試験を実施した。	最適化した輸送体を用いて、標的化合物生産効率化実証試験を実施する。	◎

(8) 研究開発の成果と意義

(8).1 生産において排出が生産のボトルネックになる化合物に関する調査

微生物を用いた化合物生産において、細胞内代謝系の強化や改変を施しても生産を効率化できない化合物がある。そのような化合物は、生産菌の菌体内からの生産化合物の排出が律速となっている可能性があり、本研究の標的化合物となりえる。本研究開発では、プロジェクト参画者を含め、企業が生産技術の開発を進めている化合物の中から、化合物の排出がボトルネックとなり生産の効率化が達成されていない化合物を探索し、本技術開発でモデルとして輸送体の探索と有効性の検証を行うための標的化合物の調査を実施した。

(8).1-1 アラニン

化合物生産における排出輸送体の有効性検証を目的として、これまでに細胞内代謝に関する研究がある程度進んでおり、排出輸送体に関する知見もある L-アラニンを標的化合物とした。L-アラニンは、タンパク質を構成するアミノ酸（20 種）の一つで、甘味を有するアミノ酸である。L-アラニンは、生体内で糖新生や脂肪酸合成などに利用される重要なアミノ酸である。飼料用添加物、食品添加物、低栄養状態などにおけるアミノ酸補給等を目的として、ヒト用医薬品として用いられている。本研究開発においては、コリネ菌輸送体ライブラリ発現大腸菌に対して L-Ala-L-Ala ジペプチドをもちいたペプチドフィーディング法による新規の排出輸送体の探索を実施することとした。

(8).1-2 コウジ酸

コウジ酸は、チロシナーゼの活性化に必要な銅イオンをキレートすることでその活性を阻害し、メラニンの生成を抑制することから、化粧品の成分などに利用されている麹菌が生産する有用二次代謝化合物である。コウジ酸生合成に関しては、すでにコウジ酸の生合成に関わる酸化還元酵素 KojA、生産されたコウジ酸の細胞外排出に関わると予想される輸送体 KojT とそれらの遺伝子の発現制御を司る転写因子 KojR の 3 遺伝子がクラスターを構成していることが明らかとなっている。KojA 高発現に加えて輸送体 KojT を高発現した株を作製したところ、KojA 単独高発現株に比べてコウジ酸生産量の顕著な増加を認めた一方で、KojT 破壊株でも量は少ないもののコウジ酸は細胞外に生産されており、他にもコウジ酸を排出できる輸送体の存在が示唆されている (Zhang et al. 2017 JBB)。そこで、麹菌ゲノム情報等からコウジ酸の排出能を有する新規輸送体を探索し、コウジ酸排出をし得る新規輸送体の探索を実施することとした。

(8).2 輸送体ハイスループット解析に資する候補遺伝子群の探索技術の開発

(8).2.1 目的化合物産生微生物群のゲノム情報からの化合物輸送体候補遺伝子群リストの作成

目的化合物産生微生物のゲノム情報から膜輸送体に関連する遺伝子群の抽出をおこなった。麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム情報から GO による機能アノテーションを実施し、目的化合物であるコウジ酸の輸送に関わる可能性がある輸送体関連遺伝子群の抽出を行った。さらに、推定された遺伝子群のそれぞれについて、KEGG、ChEBI、TransportDB および TCDB などの文献情報やデータベース情報を用いて化合物に関連する情報を収集し、推定した輸送体候補遺伝子群の付加情報として蓄積、整備をおこない、候補遺伝子群のリストを作成した。また、大腸菌 *Escherichia coli* のゲノム情報に対しても同様の処理を行い、化合物 A 生合成経路の各遺伝子の発現プロファイルと同期する膜タンパク質を探索し、文献情報も併せて化合物 A の菌体外排出に関係すると考えられる遺伝子群の抽出を行った。

(8).2.2 オミクスデータからの輸送体候補遺伝子のスコアリング技術の開発

産生微生物の遺伝子発現データをもとに、ターゲット化合物生合成関連遺伝子群の発現プロファイルや、関連すると考えられる各種細胞内応答と相関が高い遺伝子発現プロファイルを有する輸送体候補遺伝子群の同定を行った。具体的には、麹菌 *A. oryzae* で測定された 150 条件以上の遺伝子発現データを利用し、遺伝子配列情報から輸送体候補と推定された候補遺伝子群と、ターゲット化合物であるコウジ酸生合成遺伝子群の多対多の全組み合わせにて相関解析を実施した。ここで、コウジ酸生合成遺伝子群と有意に相関が高いと判断された遺伝子群について、上記で付加された文献情報棟を元に、輸送体候補遺伝子群のリストにつちえ、順位付けを実施した。また、大腸菌 *Escherichia coli* の公開されている 59 条件の RNA-Seq 情報を用い、化合物 A 生合成経路の発現プロファイルと相関を持つ膜タンパク質のリストを作成し、輸送体候補遺伝子の抽出も行った。

(8).3 標的化合物排出輸送体探索技術の研究開発

(8).3.1 標的化合物排出輸送体候補遺伝子発現微生物ライブラリの構築

(8).3.1-1 アラニン

アラニン排出輸送体の探索には、東北大学が保有する新規排出輸送体ライブラリに、さらに新規排出輸送体を追加した排出輸送体ライブラリを構築し探索に用いた。新規の排出輸送体候補遺伝子を大腸菌発現用ベクターにクローニングし、L-Ala-L-Ala 感受性大腸菌を形質転換し、排出輸送体候補遺伝子発現微生物ライブラリを構築した。

(8).3.1-2 コウジ酸

産総研・油谷グループにおいて、コウジ酸排出輸送体候補として抽出された 10 遺伝子を麹菌ゲノムをテンプレートとした PCR により増幅した。増幅断片を麹菌用高発現プロモーター (*amyB* プロモーター) 下流にクローニングした。探索で用いる麹菌株 (*kojA* を過剰発現する *kojT* 遺伝子破壊株) の形質転換を実施している。

(8).3.2 輸送体発現ライブラリへの標的化合物代謝系の導入

(8).3.2-1 アラニン

Ala 発酵試験では、大腸菌野生株から Ala 排出輸送体を欠損させた *E. coli* MG1655 $\Delta ygaW$ 株に、ピルビン酸の還元的アミノ化反応を行う *Bacillus sphaericus* の Ala 脱水素酵素遺伝子 (*alaD*) を発現する pSTV29 プラスミドを導入した株を宿主として用いた。

(8).3.2-2 コウジ酸

麹菌におけるコウジ酸の生成には、少なくともコウジ酸の生合成に関わる酸化還元酵素 *KojA*、生産されたコウジ酸の細胞外排出に関わると予想される輸送体 *KojT* とそれらの遺伝子の発現制御を司る転写因子 *KojR* をコードする 3 遺伝子が必要であることが明らかとなっている (Terabayashi, 2010)。Zhang らの研究により、コウジ酸の排出には *KojT* 以外の輸送体の関与が示唆されており (Zhang, 2017)、酵母発現系を利用したコウジ酸排出輸送体の迅速な探索系の構築を試みた。*kojA-3HA* および *kojT-GFP* をコードする遺伝子を酵母高発現プロモーターであるグリセルアルデヒド-3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) プロモーター下流に連結したプラスミドを構築した。これらプラスミドを導入した酵母において、ウェスタンブロット法にて、*KojA-3HA* タンパク質および *KojT-GFP* タンパク質の発現を確認した。さらに、蛍光顕微鏡観察により、*KojT-*

GFP タンパク質は原形質膜上に局在することを明らかにした。この株を培養した後、10%グルコース溶液に懸濁し、コウジ酸の生成を試みた。しかし、コウジ酸による鉄イオンのキレートで生じる暗赤色の呈色は見られなかった。従って、グルコースからのコウジ酸生成に必要な KojA 以外の酵素が存在する可能性が考えられた。そこで、現時点では異種宿主を用いたコウジ酸排出輸送体の探索は困難であると考えられたため、コウジ酸生産能が確実に発現する麹菌を宿主としてコウジ酸排出輸送体の探索を行うこととした。酵母宿主系に比較して探索速度は落ちるという欠点はあるが、コウジ酸高生産株の構築にスムーズに移行できる利点がある。

(8).3.3 培養液分析による標的化合物排出輸送体の同定

(8).3.3-1 アラニン

本研究開発において、L-アラニンの排出輸送体の探索には、L-アラニンの細胞内代謝系をすべて欠損し、同定されている排出輸送体を欠損した大腸菌を宿主として、L-Ala-L-Ala ジペプチドを用いたペプチドフィーディング法による新規の排出輸送体の探索を実施した。探索には *Echerichia coli* MLA301 Δ ygaW株を用いた。本株はL-アラニン要求株(MLA301)のAla 排出輸送体(YgaW)を欠損させた株)である。MLA301 Δ ygaW株はジペプチドAla-Ala存在下で生育が阻害される。これは、取込んだAla-Ala由来のL-アラニンを菌体外に排出できず、細胞内で過剰蓄積するためである。この株を用いて、排出輸送体ライブラリからAla排出能を有する輸送体候補遺伝子を探索した。探索を行った結果、複数の候補遺伝子が同定された。これらの候補遺伝子をL-アラニン生合成系導入株に形質導入して、HPLCを用いてL-アラニン排出評価を行った。その結果、新規輸送体SMA-Z01が、有意なL-アラニンの輸送を示した。

(8).4 配列情報からの輸送体予測技術の高精度化と適用

2018年までにアミノ酸などのモデル化合物の排出輸送体探索を実施した。そこで、2019年度以降は、実際に有効性検証課題で、化合物の排出が課題となっている化合物に焦点を絞り排出輸送体の探索を実施することとした。有効性検証課題において、公益財団法人地球環境産業技術研究機構が実施している「コリネ型細菌を用いた芳香性化合物の生産」において、中間体化合物であるプロトカテク酸の細胞外への漏出と最終産物であるカテコールの細胞外への排出が課題となっていた。そこで本課題では、遺伝子破壊によるプロトカテク酸の漏出抑制を目的としてプロトカテク酸排出輸送体の探索と最終産物であるカテコールの排出強化によるカテコール生産の効率化を目的として、カテコール排出輸送体の探索を実施した。

(8).4.1 プロトカテク酸排出輸送体の探索

はじめに、産総研・油谷グループにおいて、公益財団法人地球環境産業技術研究機構の取得したプロトカテク酸生産時、非生産時の発現解析データを用いて、候補輸送体の絞り込みを実施した。発現解析は、プロトカテク酸を細胞内に蓄積させるよう代謝改変を行った株では、プロトカテク酸を細胞外に積極的に排出輸送を行う輸送体の発現が誘導させる可能性があるという仮説に基づいて実施された。産総研では発現解析データを用いて、プロトカテク酸が細胞内にもっとも高い濃度で蓄積させるタイミングで強く輸送されている膜タンパク質の一覧を作成し、配列解析によって輸送体関連遺伝子とみられる候補遺伝子を抽出し、ウェットアッセイ候補遺伝子として東北大グループにその一覧を提示した。

次に東北大において、産総研・油谷グループより提示された輸送体リストに挙げられたコリネ型細菌由来の輸送体（80種）を、膜輸送体の安定的な発現を可能にするフュージョンパートナー遺伝子の下流にクローニングした。次に、これらの遺伝子を大腸菌プロトカテク酸生合成株に形質転換した。各株を最小培地で培養し、培養上清をLC/MS/MSを用いて解析しプロトカテク酸生産量を定量した。その結果、コントロール株と比較して培養上清中のプロトカテク酸量が4倍以上、上昇した株が6株あり、これらの遺伝子をプロトカテク酸排出輸送体候補遺伝子とし、公益財団法人 地球環境産業技術研究機構に情報の提供を行った。しかしながら、本試験の結果より、プロトカテク酸が多く輸送体によって細胞外に排出されていることが明らかとなり、遺伝子破壊によるプロトカテク酸の漏出を止めることは難しい可能性が示唆された。

(8).4.2 カテコール排出輸送体の探索

続いて最終産物であるカテコールの排出輸送体の探索を実施した。はじめに、コリネ型細菌のもつ輸送体の既にクローニング済みである80以外の輸送体についてクローニングを実施し、計205遺伝子からなるライブラリを構築した。神戸大・石井Gの自動形質転換装置を用いて、同ライブラリを大腸菌カテコール生産株に形質転換した。各株について、最小培地を用いて培養を行い、培養上清を質量分析等によりカテコールの生産量を定量した。絞り込んだ10種について、再現性試験を実施し、カテコール生産を効率化する遺伝子上位3位を絞り込んだ。結果について公益財団法人 地球環境産業技術研究機構に情報を提供した。

(8).4.3 MSデータの解析

東北大のプロトカテク酸、カテコール生産試験データを使用して、産総研・油谷Gでは高生産時において誘導される輸送体遺伝子の分析を行った。東北大によるMSデータに加えて公益財団法人 地球環境産業技術研究機構にて実施されたRNA-Seqによるカテコール生産株と野生株との間の時系列発現解析結果を用い、カテコール高生産時における輸送体遺伝子全体の発現動態の解析を行った。その結果、プロトカテク酸やカテコールが細胞内に高濃度で存在するタイミングでMFS (Major Facilitator Superfamily) Transporter およびABC Transport に分類されるものを中心に複数の輸送体が強く発現していることが判明した。しかしながらこれらの遺伝子のカテコール輸送能は特段高くないことが明らかになった。これらの解析により、今回の発現系において宿主生物であるコリネ菌はプロトカテク酸およびカテコールの細胞内蓄積ストレスを受け、これらの物質を効率的に輸送する排出輸送体を選択的に誘導するのではなく、複数の排出系を同時に用いて異物排出を行っていることを示唆する結果が得られた。

(8).5 輸送体発現量最適化技術の適用

微生物を用いた有用化合物の生産において、特に膜不透過性の化合物を生産する際には、生産物を細胞外に排出する排出輸送体が必要となる。しかしながら、膜タンパク質である輸送体の細胞膜上での発現は容易ではない。これまでに、東北大ではパートナーフュージョン遺伝子を用いた膜タンパク質の安定発現方法を開発し、輸送体の探索に応用してきた。一方で、これまでの研究から輸送体の高発現は細胞に毒性を与えることが分かっており、膜輸送体を用いた物質生産の効率化には適切な発現量に最適化をする必要がある。そこで、本研究では産総研・亀田Gと共同で、輸送体の発現を最適化する技術の開発を実施した。

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2017	0	0	0	0	0	0	0
2018	0	1	3	0	0	0	0
2019	0	0	0	0	0	0	0
2020*1	(1)	1	(1)	0	0	0	0

*1：2021年2月時点での実施済み件数、()内は2020年度末の予定件数

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2017	0	0	0
2018	1	0	0
2019	0	0	0
2020 *1	1 (1)	0 (0)	0 (0)

*1：2021年2月時点での出願済み件数、()内は2020年度末の予定件数

課題名：C(1)-5 トランスクリプトーム解析技術開発

担当機関：産業技術総合研究所

(1) 背景と目的

微生物を利用した物質生産においては、その生産性と遺伝子発現の関連性が考えられており、例えば、生産対象物質の直接の代謝関連遺伝子の変動は、とりわけ、より下流側のものの発現変動と生産性の関連性が高いと考えられる。実際、これまでに多くの生産系において、代謝経路の遺伝子をプラスミド等で導入し過剰発現させることで、目的産物の生産性を高めることに成功している例が認められる。他方、こうしたやり方には限界があることも確かであり、より詳細かつ直接は関係していない代謝経路との関連性も踏まえた、大規模な遺伝子発現変動解析からのアプローチが求められていた。こうした中、最近では、いわゆる次世代シーケンサにより大量の配列情報がより短時間で取得可能な状況となっており、より大規模かつ包括的な遺伝子発現変動解析が比較的小規模な研究室でも実施可能となってきている。さらに情報工学の発展により、大規模データを機械学習等の手法により、より高速かつ高精度に各種シミュレーションが可能になりつつある。しかしながら、こうした手法を、いわゆる産業微生物に取り入れ、物質生産性の向上に利用しようとする動きは世界的に見てもまだ始まったばかりであり、RNA 抽出手法の最適化、取得された RNA の品質と RNA-Seq データの相関、データ量と発現変動解析結果の相関性などトランスクリプトームデータの質及び量をきちんと管理する方法論が整っていないのが現状である。そこで、本研究開発項目においては、信頼性の高い RNA-Seq 解析のためのスパイクインを含むプロトコルの策定を行い、特に、スパイクイン物質に関しては、より高度化させつつ PJ 内での頒布体制を確立する。そのために、まずはモデル微生物を対象にハイスループット化を考慮しつつ RNA 抽出条件の検討を進め、順次産業微生物への適用を実施する。さらに、当初着手した、より完全長に近い cDNA を解析するための技術開発を発展させて、未分解 RNA の選択的調製技術の適用検討を進める。これらの開発技術に関しては、PJ 内での共同研究体制の中で、産業微生物に適用を進める。

(2) 位置づけ、目標値

本項目で開発する情報解析に適したトランスクリプトーム解析技術が産業微生物に適用可能であることを実証する。また、スパイクインとして利用する核酸標準物質の開発・高度化・評価技術の整備、および PJ 内における 24 種類の二次標準物質の頒布体制を確立するなど、信頼性の高い RNA-Seq 解析のためのスパイクインを含むプロトコルの策および産業微生物への適用を行う。さらに、未分解 RNA の選択的調製技術を開発し、モデル微生物および産業微生物への適用可能性を実証する。

(3) 全体計画

事業項目	2016年度	2017年度	2018年度	2019年度	2020年度
トランスクリプトーム解析技術開発	大腸菌や放線菌を含む3種類のモデル微生物でのRNA抽出条件の検討		PJ参画企業等との連携による産業微生物へのRNA抽出条件の適用、解析		
RNA抽出条件の検討	→				
スパイクイン用核酸標準物質の開発と検討	10種類のスパイクイン用核酸標準物質の開発・PJ内での頒布開始		18種類へ拡張		GC含量、鎖長にバリエーションを持たせた24種の開発
未分解RNAの選択的調製技術の適用検討	長鎖・完全長 cDNA 解析技術の開発		未分解RNAの選択的調製技術の開発とモデル微生物および産業微生物への適用		

(4) 実施体制

三谷恭雄（産総研）：課題統括、RNA抽出条件の検討など

野田尚宏、佐々木章、松倉智子（産総研）：スパイクイン用核酸標準物質の開発と検討など

菅野学（産総研）：未分解RNAの選択的調製技術の適用検討など

(5) 運営管理

技術推進委員会等の公式会議のほか、半年に一回程度の全体会議においてPJ全体の動向を把握するとともに、必要に応じて個別に議論し、情報共有を行なった。また、個別課題の担当者は札幌とつくばに在籍することから、常時メールにて情報共有や進捗管理を行うとともに、2ヶ月に一回程度はセミナー形式での進捗報告と研究推進に関する議論並びに関連情報共有を行なった。なお、最終年度は主にネット経由のリモート会議により実施した。

(6) 実施の効果

スパイクイン物質のPJ内での頒布体制が整い、頒布を開始した。また、未分解RNAの選択的調製技術についてはPJ内でプロトコルの共有を行った。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目	現状	最終目標	達成度 (2020 年度末)
RNA 抽出条件の検討	大腸菌や放線菌などに対し市販キット等の組み合わせによる RNA 抽出を行い、最適条件を見出すとともに、産業微生物への適用も行った。	産業微生物からの効率的な高品質 RNA の抽出法を確立し、情報解析に適したトランスクリプトーム解析技術が産業微生物に適用可能であることを実証する。	○
スパイクイン用核酸標準物質の開発と検討	GC 含量、鎖長にバリエーションを持たせたスパイクイン用核酸標準物質 24 種類について PJ 内頒布体制を確立し、一部は実サンプル解析に供した。	スパイクインとして利用する核酸標準物質の開発・高度化・評価技術の整備、および PJ 内における 24 種類の二次標準物質の頒布体制を確立する。	○
未分解 RNA の選択的調製技術の適用検討	未分解 RNA の選択的調製技術を開発し、モデル微生物および産業微生物への適用可能性を実証し、培養後期の試料からの遺伝子発現解析を実施した。	培養後期で物質生産性が上がることが確認されている産業微生物での未分解 RNA の選択的調製を行い、遺伝子発現変動の解析を可能にする。	○

(8) 研究開発の成果と意義

■ RNA 抽出条件の検討

遺伝子発現情報を網羅的に取得する手法として RNA-Seq の普及が著しいが、その際の RNA の取得方法やその品質評価、得られたデータにおける発現頻度差の解釈などは経験的な感覚で行われているケースが多いと考えられる。プロジェクト参画者は多様な業態からなり、原核生物から真核生物まで、また、一般的な菌株から産業利用に特化した菌株まで幅広い種を利用して物質生産を目指している。それぞれのケースにおいて、特に企業等で育種歴が長く利用実績が豊富にあるケースでは菌体破碎法や RNA 抽出に関して独自のノウハウを築いていることもあるが、そうでない場合には多様なラインナップの揃う現在の RNA 抽出法などからいずれの手法を選択すべきかの指針を見出すことは意外と難しいと考えられる。しかしながら、これら市販キット類を一律に特定の菌株に適用し、その際の得られる RNA の品質や得られる RNA-Seq データの再現性などを確

認することは困難である。また、そうしたデータの取得には多大な労力を要するため、実際にはいずれかのキットによる抽出を行い、十分な RNA が得られればそのまま実験を進めるケースが多いと考えられる。実際、よほど特殊な菌株でない限りは通常必要とされる RNA を取得することは、いずれのキットでも可能であり、通常はキット間での差異はあまり意識されていないものと考えられる。こうした状況下において、「スマートセル」創出に求められる大規模データセットに基づく機械学習等に提供するトランスクリプトームデータには、何らかの品質管理の目安を設け、再現性を担保できる実験系の構築が求められる。そのため本課題では、まずはモデル微生物に関して、各種細胞固定法や細胞破砕法と市販各種キット類の組合せによる RNA 抽出を行い、それぞれの場合に得られる収率やその品質についての評価を実施した。その際の大まかなスキームを図に示す（図 3.2.3.1-5-1）。



図 3.2.3.1-5-1 RNA 抽出のスキーム

スマートセル PJ 内での使用菌株を想定して、モデル微生物として、大腸菌（1種）、放線菌（計4種）を対象として、一連の評価を行った。得られた RNA については、まずは一般的に品質管理指標として用いられている OD260/280、OD260/230 や濃度を基本データとして取得した。さらに、分解の程度の指標として用いられているバイオアナライザーによる RIN 値を取得した。RNA-Seq 受託解析では一般的に、OD260/280、OD260/230 のいずれもが 1.8 以上、16S/23S の値が 1.4 以上、かつ、RIN 値が 8.0 以上程度のものを基準として、これらを上回る試料に関して一定の結果を担保しているケースが多い。

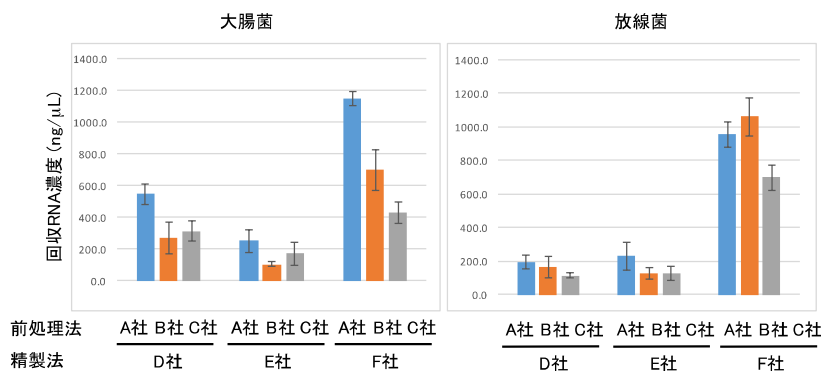


図 3.2.3.1-5-2 各手法による回収 RNA

今回の一連の実験結果から、いずれの方法においても概ねこれらの数値は確保されることがわかった。しかしながら、一部の産業微生物として用いられている放線菌においては、いずれの方法であっても 4 程度の低い RIN 値しか得られないケースがあり、こうした試料についていかにして品質管理をするかが重要な課題として生じている。また、今回実施した解析においては、いずれも RNA-Seq 解析のためのライブラリ構築に十分な量の RNA が回収できているが、収量は各群で大きな開きがあり、その傾向は大腸菌、放線菌とも類似したものであった（図 3.2.3.1-5-2）。ま

た、ここでは示していないが、放線菌に関しては2属4種について検討を行ったが、いずれも図と同様の結果が得られている。特に産業微生物では、長時間培養を経て、少なくなった菌体からRNAを抽出する必要があるケースもあることから、より収率の高い手法を提案するための基本データが得られたものと考えられる。

■ スパイクイン用核酸標準物質の開発と検討

トランスクリプトーム解析データの品質向上を目的に、信頼性の高いRNA-Seq解析プロトコルの策定を行うための一環として、RNA試料へのスパイクイン標準RNAとして利用可能な核酸標準物質の開発・高度化・評価技術の整備を行った。具体的には200ntから7,000nt程度の人工的なRNA配列を設計・準備した。特にGC%が50%程度のものを中心に開発・作製したが、プロジェクト遂行中の要望等に応じるために、あえてGC%が高いスパイクイン用RNAと、同様にGC%の低いものも作製した。さらに長鎖RNAの解析ニーズも高まってきたことから7,000ntのスパイクイン用RNAも作製した。作製方法としては、設計された配列情報に基づき、RNA発現用プラスミドを作製し、in vitro転写システムによりスパイクイン標準RNAを大量に合成するという一連のプロトコルを構築した。in vitro合成したスパイクイン標準RNAを所定の純度になるまで精製を繰り返して行った。得られたスパイクイン標準RNAの候補品を核酸低吸着チューブに分注して、プロジェクト内での頒布や利用を行った。最終的に作製したスパイクイン標準RNAは全部で24種類となった。

作製したスパイクイン標準RNAの候補品のうち5種類の配列を選択して、スパイクイン用RNA標準物質のRNA-Seqにおける利用方策の検討を行った。すなわち、RNA試料へスパイクイン標準RNAを添加した際に5種類の配列の最終濃度が10倍ずつ異なるように濃度調整した混合溶液を作製した。この調整済みスパイクイン用RNA標準物質混合溶液の作成標準プロトコルとRNA試料への添加方法を示した標準プロトコルを同時に整備した(図3.2.3.1-5-3)。

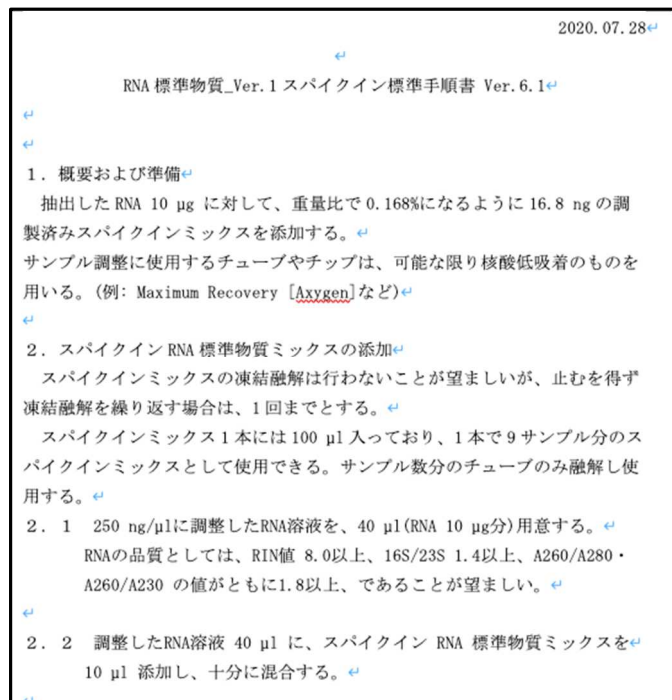


図 3.2.3.1-5-3 RNA試料への添加方法を示した標準プロトコルの

RNA 試料へのスパイクイン用 RNA 標準物質の添加における課題は最適な添加量を見いだすことと、Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria)等の rRNA 除去プロセスにおいて特定の配列の RNA 標準物質が除去されてしまうなどのバイアスの有無を評価することの二つである。実際に大腸菌等の微生物から抽出した RNA 試料に対してスパイクイン用 RNA 標準物質混合溶液の量を変えつつ添加することで、これらの課題を解決するための検討を行った。添加量は抽出した total RNA に対して 0.001%、0.01%、0.1%、1%とした。スパイクイン用 RNA 標準物質を添加し、rRNA 除去プロセスなどを行った後に、次世代シーケンサーで RNA-Seq を行った。得られた結果について、添加したスパイクイン用 RNA 標準物質の量と RPKM の関係を解析した (図 3.2.3.1-5-4)。

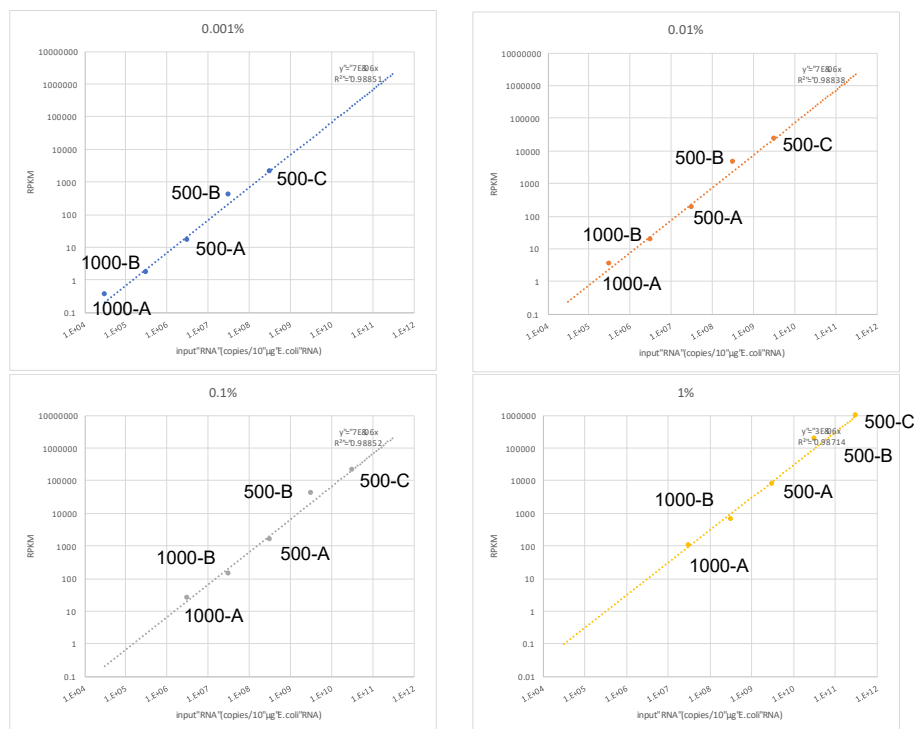


図 3.2.3.1-5-4 添加したスパイクイン用 RNA 標準物質の量と RPKM の関係

いずれの添加量においても 5 種類の RNA 標準物質の RPKM と初期添加量の間には直線性が認められた。この結果から、RNA-Seq の前処理プロセスの一つである rRNA 除去工程において、特定の配列の RNA 標準物質だけが除去されるなどのバイアスが起らないことがわかった。また、これらの検討結果から RNA 試料に対して添加する RNA スパイクインの最適な量を算出し、スパイクイン RNA 利用のためのプロトコルに反映した。

さらに、これらのスパイクイン用 RNA を利用して異なる配列の 10 種類を様々な濃度で混合したスパイクイン mix ver1 と同様に異なる 8 種類の配列を混合したスパイクイン mix ver2 を作製した。RNA 抽出前の細胞に mix ver2 を加え、抽出した RNA に mix ver1 を加えるなど利用することで、細胞数のデータと合わせて解析すれば、細胞あたりの RNA 発現量をサンプル間で正規化したり、また抽出 RNA の意図しない分解などもチェックしたりすることができるようになった (図 3.2.3.1-5-5)。このようなスパイクイン用 RNA mix はプロジェクトに参画していた機関に頒布してプロジェクト内で積極的に利用した。

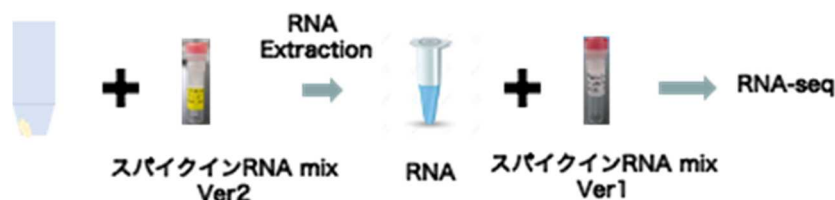


図 3.2.3.1-5-5 スパイクイン用 RNA mix の利用方法

作製したスパイクイン用 RNA の濃度を計測する技術として蛍光相関分光法（FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy）を用いた。本手法では蛍光染色した RNA について、一分子レベルでの分子数の測定から RNA の配列によらず溶液中の RNA 濃度を算出することができる。質量分析法などの他の手法で値付けされた RNA を標品として用い、さらに SI トレーサブルな標準蛍光色素も利用することで FCS による正確かつ簡便な RNA の濃度測定手法の原理実証に成功した（図 3.2.3.1-5-6）。

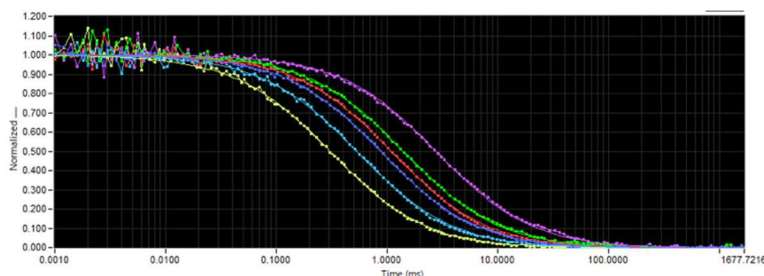


図 3.2.3.1-5-6 蛍光相関分光装置と SI トレーサブルな標準試料で校正した装置による RNA 数の測定

■ 長鎖・完全長 cDNA 合成技術の開発

高付加価値な化合物の微生物生産を効率化するうえで、その生合成遺伝子群の発現実態を把握することは極めて重要である。バクテリアの RNA の大半は複数の遺伝子からなるポリシストロン転写単位（オペロン）として存在し、二次代謝産物生合成遺伝子群は一般に数 kb から数十 kb の複数のオペロンから構成されることが知られる。しかし、既存の RNA-Seq 解析で汎用されるイルミナ社の次世代シーケンサー（NGS）では、1 リード長が数百 bp と短いために、シーケンスデータの機能推定にはゲノム配列へのマッピングや de novo アセンブルが必要となり、数 kb を超える転写産物の全長をありのままに解析することが出来ない。すなわち、二次代謝産物生合成遺伝子群における各ポリシストロニック mRNA の発現単位のばらつき（転写開始位置や転写終結位置の不均一性）を、1 分子レベルで捉えることは不可能であった。複雑な代謝経路の組立て等により有用物質の高効率なバイオものづくりが実現可能な合成生物学の時代にあって、バクテリア宿主に導入されたポリシストロニックな代謝遺伝子群がデザイン通りに発現しているかを迅速に評価するためには、新たなトランスクリプトーム解析技術の開発が望まれる。

本研究は、既存の RNA-Seq と比較して、長鎖トランスクリプト情報の取得に優れた解析手法の開発を目指す。開発技術の検証には、全ゲノムおよび転写開始位置の網羅的解析結果から各オペロンの領域と長さが既に分かっており、数十の二次代謝産物合成遺伝子群を持つことが知られる、モデル放線菌の *Streptomyces coelicolor* A3(2) 株の菌体を用いた。この株は、二次代謝化合物の遺伝子が発現しているかどうかを培地の色によって推測することができ、多様な化合物の

生産誘導培地および抑制培地にて定常期初期まで培養した菌体を実験に使用した（図 3.2.3.1-5-7）。



図 3.2.3.1-5-7 抗生物質生産のモデル放線菌株 *S. coelicolor* A3(2) の菌体培養の様子

まず、なるべく RNA を壊さずに細胞から抽出する必要があるため、酵素溶菌（リゾチーム法）、ケミカル、（Isogen によるフェノール・クロロホルム抽出）、物理破碎（ガラスビーズ破碎法）といった異なる原理の RNA 抽出工程を検討した。それぞれ調製した RNA の品質を評価したところ、ガラスビーズ破碎法で唯一 rRNA の顕著な分解が見られず収率にも優れていたため、こちらを採用することとした（図 3.2.3.1-5-8）。

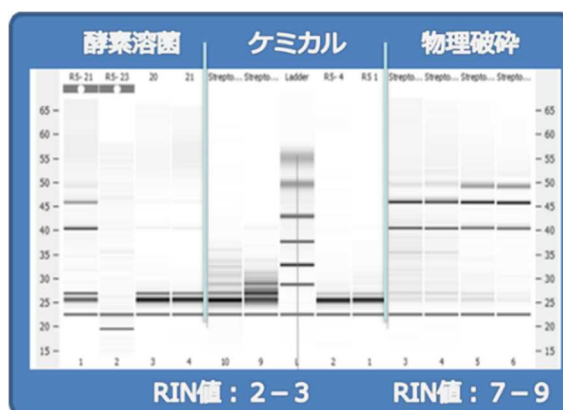


図 3.2.3.1-5-8 異なる手法で抽出した total RNA の Bioanalyzer（アジレント社）を用いた品質評価

次に、真核生物 Iso-seq の cDNA 調製法をバクテリアに発展的に応用することで、通常手法と比較して長鎖 cDNA 調製に優れる逆転写メソッドを開発した。具体的には、3' 末端に polyA を人工的に付与した mRNA を total RNA から調製し、オリゴ dT プライマーと SMARTScribe 逆転写酵素の組み合わせによって、ターミナルトランスフェラーゼ活性を利用した完全長逆転写産物の選択的調製を検討した（図 3.2.3.1-5-9）。試験菌株の 9 つの二次代謝産物生合成遺伝子群内の 15 オペロンを対象に、調製 cDNA の長さを PCR 増幅により検証した結果、通常手法と比較して約 2kb 程度長い cDNA を調製することに成功した。さらに、RNA の高次構造の形成解除や逆転写酵素の安定性向上に資する化合物を逆転写反応時に添加することで、取得 cDNA 長をさらに伸長させることを確認しており、本開発技術へ発展的に応用する。

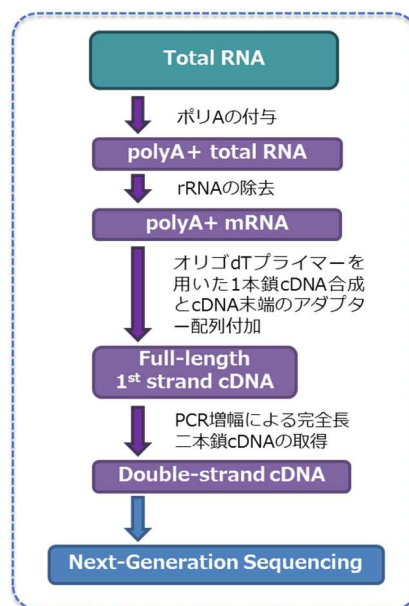


図 3. 2. 3. 1-5-9 長鎖・完全長 cDNA の調製方法のワークフロー

続けて、上記手法にて調製した cDNA をシーケンス原理の異なる NGS 機種で解析し、取得情報の違いを比較することで、本研究の目的に合致する NGS 機種の選定を試みた（表 3. 2. 3. 1-5-1）。その結果、ナノポア社 MinION や PacBio を用いた解析によって 10kb を超えるトランスクリプトを 1 リードとして検出することに成功した。一方で、イルミナ社の HiSeq や MiSeq はデータ量に優れるため遺伝子発現の定量的な評価には適するものの、1 リード長が短いために発現単位をデータから推測することは出来ないことが明らかとなった。MinION の解析結果より、興味深いことに、転写開始/終結位置は厳密に制御されておらず、試験菌株の二次代謝産物生合成遺伝子群は多様なオペロンバリエントで構成されている可能性が示唆された。本解析技術の広範な適用によって、真核生物 mRNA のスプライシングバリエントを想起させるこの不均一なバクテリアオペロンの発現実態が今後明らかになる可能性が期待される。また、スマートセル開発における長鎖 DNA の設計配列の転写開始位置や転写終結位置のデータ蓄積とノウハウ化が期待される。

表 3. 2. 3. 1-5-1 次世代シーケンサの各機種の解析原理と解析長の違い

解析原理	Sequencing by Synthesis	
機種名	HiSeq (Illumina)	MiSeq (Illumina)
1リード長 *	100 bp	300 bp
リード数 *	2000万リードペア	5000万リードペア

解析原理	Single Molecule Real-Time	
機種名	PacBio Sequel (PacBio)	MinION (Nanopore)
1リード長 *	平均10kb, 最大60kb	平均2-4kb, 最大100kb
リード数 *	36.5万リード	6-10万リード

* メーカーウェブサイト情報を参考

■ 未分解 RNA の選択的調製技術の適用検討

培養後期の微生物細胞を対象とした RNA-Seq 解析では、増殖期の転写産物の分解物が total RNA の大半を占めて rRNA の占有率が低いために、バイオアナライザの測定において RIN (RNA integrity number) が低く算出される。シーケンス出力データの大半は分解 RNA 由来と考えられ、信頼度の低い発現情報しか得られないことが懸念される。微生物の目的物質の生産は増殖停滞～非増殖時に活発化することが多いため、従来法では不可能なこれら低品質 RNA のトランスクリプトーム解析技術の開発が望まれる。

本研究は、原核微生物 (バクテリア) の RNA 末端構造の違いに着目した RNA 調製法によって、RNA プロセッシングや分解の進んでいない”生まれたて”の mRNA を選別する技術開発に取り組んだ。まず、培養 72 時間後に色素生産が活発化するモデル放線菌の *Streptomyces coelicolor* A3(2)株の抽出 RNA を対象に、以下の 3 種類の手法をそれぞれ適用してシーケンス解析を行い、未分解 RNA の選択的調製に優れた手法の選別を行った。

- (1) Terminator-5' -phosphate dependent exonuclease (TEX)による 5' 末端に 3 リン酸基を持たない分解 RNA を除去
- (2) デスチオビオチン標識キャップ化とアジビンビーズ精製による 5' 末端に 3 リン酸基を持つ未分解 RNA の回収
- (3) ピューロマイシンアナログ付きビオチンビーズによる菌体回収時の翻訳に関わるリボソーム結合 mRNA の回収

その結果、(1)の TEX を用いた RNA 調製法が、解析に要する RNA 量、試薬コスト、労力の点から実用性に比較的優れると判断されたため、これを採用してプロトコルを作製した (図 3.2.3.1-5-10)。

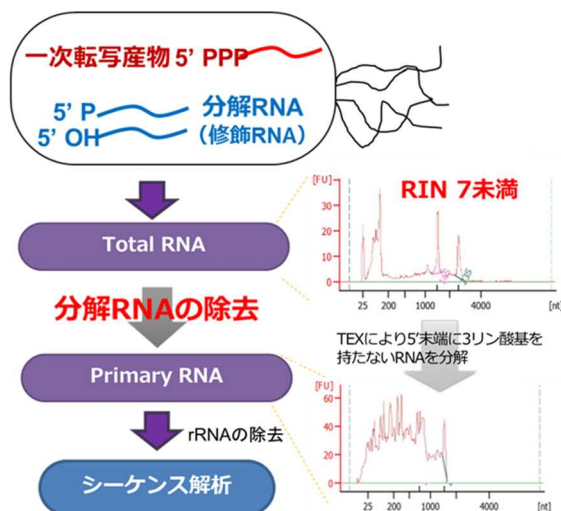


図 3.2.3.1-5-10 未分解 RNA の調製方法の概念図

次に、非増殖期に物質生産を誘導する産業微生物として、誘導処理 48 時間後 (培養 55 時間後) のアルカロイド生産大腸菌株に本技術を適用して効果を検証した。誘導処理後の細胞で本来発現しているはずの物質生産関連遺伝子群の一部が従来法では検出されない一方で、TEX を用いて RNA 調製した試料では全遺伝子で高発現を捉えることに成功した。本技術の適用によって、分解 RNA のノイズを除去して物質生産期の遺伝子発現状態を反映したスナップショット情報を信頼

度高く取得することが可能になったと推察される。残念ながら、バクテリアと RNA 構造が異なる真核微生物の解析には本技術をそのまま適用することはできない。低品質 RNA からの発現情報取得のために” 一手間” をかける有効性がまずバクテリアで今後明らかとなっていくことで、本技術が将来に真核微生物でも同様の技術開発を行ううえでの先駆けになることを期待したい。

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	0	0	0	0	0
2018	1	1	5	0	0	0	0
2019	0	0	0	0	1	0	0
2020	0	1	0	0	1	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	0	0	0
2019	0	0	0
2020	0	0	0

課題名：C(1)-6 メタボローム解析技術開発

担当機関：神戸大学、島津製作所

(1) 背景と目的

細胞に含まれる低分子化合物（代謝物質）の蓄積量を網羅的に定量するメタボローム解析は、ゲノム情報である遺伝子の発現、翻訳産物であるタンパク質の生化学反応を経て形成される細胞の表現型を特徴づけることができる。数十種類の代謝物質の蓄積量の増減を計測することにより、細胞の代謝状態を俯瞰することが可能であり、微生物が生産する高機能性化合物の生産性に寄与するバイオマーカーの特定、バイオマーカーに基づく優良変異株の選抜と培養条件の最適化が可能になる。神戸大学では、これまでに、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計（CE-TOFMS）や液体クロマトグラフ-タンデム四重極型質量分析計（LC/MS/MS）を用いた微生物メタボローム解析技術のプラットフォームを構築し、メタボローム解析結果に基づく微生物育種により、ストレス耐性能の向上、細胞内酸化還元バランスの改良、細胞内代謝フラックスの改良に成功してきた。また、メタボローム解析結果に基づく優良変異株の選抜や培養条件の改良にも成功し、有用物質生産におけるメタボローム解析の有効性を示してきた実績がある（Hasunuma *et al.*, (2011) *Microb. Cell Fact.*, 10: 2、Morita *et al.*, (2011) *Anal. Chem.*, 83: 4023-4029、Hasunuma *et al.*, (2013) *J. Exp. Bot.*, 64: 2943-2954、Ho *et al.*, (2014) *Biotechnol. Biofuels*, 7: 97、Hasunuma *et al.*, (2014) *Biotechnol. Biofuels*, 7: 493、Wan *et al.*, (2015) *Metallomics*, 7: 322-332、Ho *et al.*, (2015) *Biotechnol. Biofuels*, 8: 48、Hasunuma *et al.*, (2016) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1027-1038)。

しかしながら、多くの場合、バイオマーカーは実験研究者の深い知識や経験に基づいて同定され、それらなしには物質生産に有用な情報を抽出することが困難であった。そもそも、広範な代謝経路の制御メカニズムの全貌を把握している研究者は稀有であり、実際には、生産性に寄与する代謝物質を見落とすことの方が多く、メタボローム解析で得られる多様で大規模なデータを十分に活用できていたとは言えないのが現状である。加えて、人の目を介する有用情報の抽出には、文献検索等からはじまる情報の収集や整理、思考に膨大な時間を必要とする。つまり、従来の研究手法では、育種戦略の導出に時間が必要となり、高速性が求められる世界的な微生物育種競争に勝ち抜くことが困難になってきた。

本プロジェクトでは、機械学習等の情報解析技術を用いて「高度な生産細胞モデル（スマートセルモデル）」を構築し、育種戦略の導出と、戦略を具現化する遺伝子配列の設計の短期間での実現を目指すわけであるが、スマートセルモデルを構築するためには、“再現性とスループットの高い”メタボローム解析データが必須である。しかし、従来の技術には多くの課題があり、情報解析で求められる精度とスループットを得ることが困難であった。

メタボローム解析のワークフローにおいて、培養から前処理にかけての工程(図 3.2.3.1-6-1)は、操作が煩雑でスループットが低く、手作業のため再現性が低い問題があった。この課題に対し、開発項目①「自動前処理システムの開発」で、培養から代謝物抽出までを自動化したメタボローム解析用自動前処理システムを開発する。

分離・検出の工程(図 3.2.3.1-6-1)は、高極性代謝物の分離のために使用するイオンペア剤が感度、精度、網羅性を低下させる問題があった。また、測定可能な代謝物の網羅性が不足してい

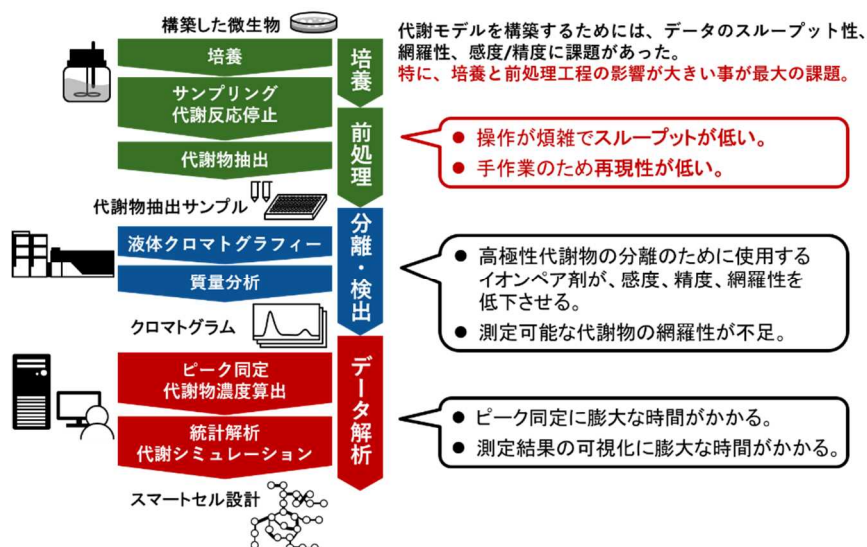


図 3.2.3.1-6-1 PJ 開始時点での、高精度メタボローム解析の課題(1)

た。この課題に対し、開発項目②「高精度メタボローム解析技術のワイドターゲット化」では、イオンペア剤を用いない LC/MS/MS 分離・検出条件の検討と、クロマトグラムから代謝物濃度を自動的に定量するシステムの構築を行い、分析精度とスループットの向上を目指す。それとともに、一次代謝経路を中心とした水溶性代謝物約 150 成分に加え、産業界から解析ニーズのある低極性代謝物の測定も可能なメタボローム解析手法を構築する。

DBTL サイクルの Build で構築される膨大な微生物ライブラリを、上記①、②で網羅することは困難であり、高精度メタボローム解析の前に、微生物ライブラリから高生産株をスクリーニングする段階が必要である(図 3.2.3.1-6-2)。しかし、液体培養と前処理が必要な従来の方法では、数日から数週間を要する。この課題に対し、開発項目③「ターゲット高速評価系の開発」では、CO₂超臨界流体抽出技術(SFE)を活用し、細胞コロニーから煩雑な前処理操作なしに代謝物を抽出し、代謝物高生産株を高速にスクリーニングが可能な、新規評価システムを開発する。

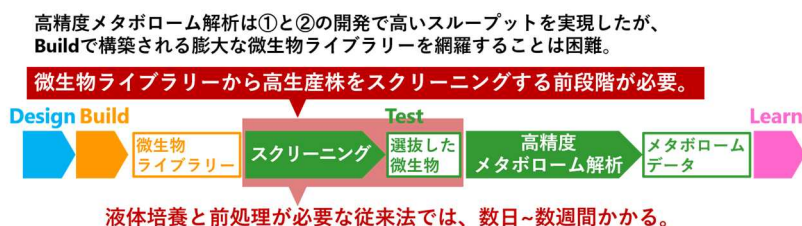


図 3.2.3.1-6-2 PJ 開始時点での、高精度メタボローム解析の課題(2)

(2) 位置づけ、目標値

バイオテクノロジーを駆使し、CO₂排出や化石燃料枯渇といった問題に対処しつつ高効率に物質生産を行う新たな産業構造の構築を目指す潮流を「バイオエコノミー」と呼ぶ。この分野において、低分子化合物である細胞内外の代謝物を網羅的に測定する事の重要性が急激に増してい

る。この領域は LC/MS/MS の有力な用途の 1 つであり、今後の市場拡大が期待される(図 3.2.3.1-6-3)。

本プロジェクトの中で、参画企業との共同研究を通して顧客・研究ニーズを把握し、ニーズにフィットした製品をいち早く開発・商品化し、顧客の現場へ提供できる。

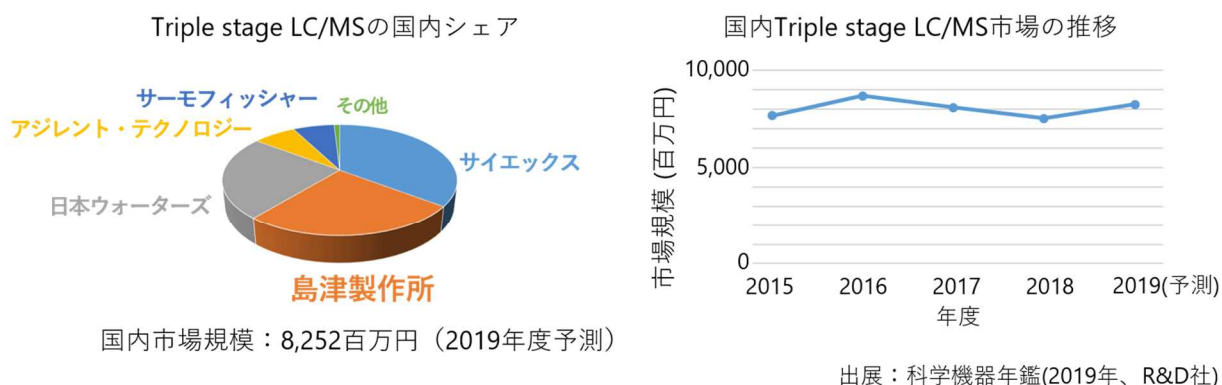


図 3.2.3.1-6-3 LC/MS/MS の市場動向

(2020 年度末 (プロジェクト完了時) のゴールイメージ)

情報技術に資するメタボロームデータとして要求されるスループットと再現性を実現するには、前処理の自動化が必須であるが、世界的にもメタボローム解析に特化した自動前処理装置は未開発である。本プロジェクトでは、要素技術の新規開発と統合により、培養から代謝物抽出までを自動化したメタボローム解析用自動前処理システムの開発を完了する。産業微生物による実証を通じ、DBTL サイクルにおける有効性を示す。

一次代謝経路を中心とした水溶性代謝物約 150 成分に加え、脂溶性の高い二次代謝物の測定も可能なメタボローム解析手法を構築する。CE-MS 等の従来技術と比して定量的データに関する網羅性が高く、スループット性が高いことは確認済みであり、産業微生物による実証を通じて DBTL サイクルにおける有効性を示す。

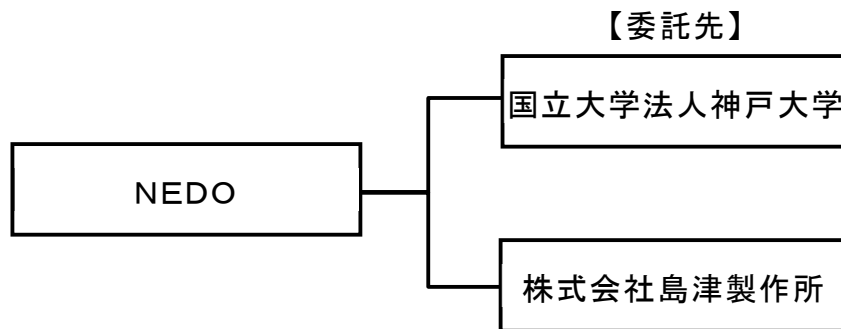
SFE は細胞凝集塊からの脂溶性二次代謝化合物の抽出効率が極めて高い。この特徴を最大限活用し、有用二次代謝物を高生産する菌体コロニーを簡便に選抜する高速スクリーニング技術を構築する。

(3) 全体計画

	2016年度 (H28年度)	2017年度 (H29年度)	2018年度 (H30年度)	2019年度 (H31年度)	2020年度 (H32年度)
① 自動前処理システムの開発	前処理条件の検討	自動前処理のプロセス検討	自動前処理システムの開発	菌体重量測定/培養上清分析用サンプル処理工程の検証	菌体重量測定/培養上清分析用サンプル処理工程の検証 スループットの更なる検討(60分/サイクル)288サンプル/日以上 産業微生物での実証、フィードバック
② 高精度メタボローム解析技術のワイドターゲット化		標的代謝物の分離・検出の検証		高極性代謝物のLC条件の確立	高極性代謝物のLC条件を最適化 低極性代謝物のLC及びSFC条件を最適化 産業微生物での実証、フィードバック
		超臨界流体抽出物の分離・検出の評価		低極性代謝物のLC及びSFC条件の確立 特徴量を抽出するデータ解析システムの構築	
③ ターゲット高速評価系の開発	代謝物連続抽出プロセスの開発		代謝物連続抽出システムの開発	ターゲット代謝物のSFE/SFC条件の確立 菌体コロニーを抽出ベッセルへ移送するシステムの開発	産業微生物での実証、フィードバック
		オンライン導入システムの検討			

(4) 実施体制

神戸大学が自動前処理システム、およびLC/MS/MS測定条件検討を中心に取り組む。
島津製作所がSFE-SFC/MS/MSオンラインシステムを中心に取り組む。



(5) 運営管理

月に2回以上の頻度で島津製作所と打ち合わせを行い、進捗状況の確認と研究開発方針の検討を行っている。

(6) 実施の効果

バイオエコノミー分野は分析装置の有力な用途の1つであり、今後の市場拡大が期待される。本プロジェクトの中で、参画企業との共同研究を通してバイオエコノミー分野における顧客・研究ニーズを収集・分析し、ニーズにフィットした製品をいち早く開発・商品化し市場へ投

入できる。現在、LC/MS/MS の国内市場規模は約 9,000 百万円で島津製作所のシェアは 30.7%であり、プロジェクト終了時にはシェア 40%を目指す。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目	現状 (2020 年度末)	最終目標 (2020 年度末)	達成見通し
① 自動前処理システムの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ トータルシステム化の実証を通して明らかになった課題（送液プロトコルや試料処理・搬送手法等）の解決に取り組み、再現性とスループット性の両立を検証した。 ・ 自動サンプリングユニットと自動抽出ユニットを統合した統合自動前処理システムでプロセスの最適化を検討した。 ・ 実験結果に基づいてトータルシステムの最適化へ向けたフィードバックを行った。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 288 サンプル/日以上のスループットを実現する。 ・ 自動前処理システムを用いた高精度・ハイスループットメタボローム解析技術の、産業微生物での実証を行う。 	○ 残課題なし
② 高精度メタボローム解析技術のワイドターゲット化	<ul style="list-style-type: none"> ・ 産業微生物に対し、低極性代謝物（標的生産物の前駆体）を含んだ高精度メタボローム測定技術の検証を行った。 ・ 汎用性を高めるための測定可能代謝物の追加を行った。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 産業微生物を用いてワイドターゲット一斉分析系の検証を行う。実験結果を基にシステムの最適化を施す。 	○ 残課題なし
③ ターゲット高速評価系の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ コロニー1 個の細胞を寒天培地ごと装置に導入し、5分/検体で測定可能なシステムを構築した。 ・ 産業微生物に対し、ハイスループットスクリーニング評価 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 産業微生物を用いてハイスループットスクリーニング評価系の検証を行う。実験結果を基にシステムの最適化を施す。 	◎ 残課題なし

	系の実証を行った。		
--	-----------	--	--

(8) 研究開発の成果と意義

最終的なシステム構成は図 3. 2. 3. 1-6-4 の通りである。以下、研究開発項目に沿って詳細を

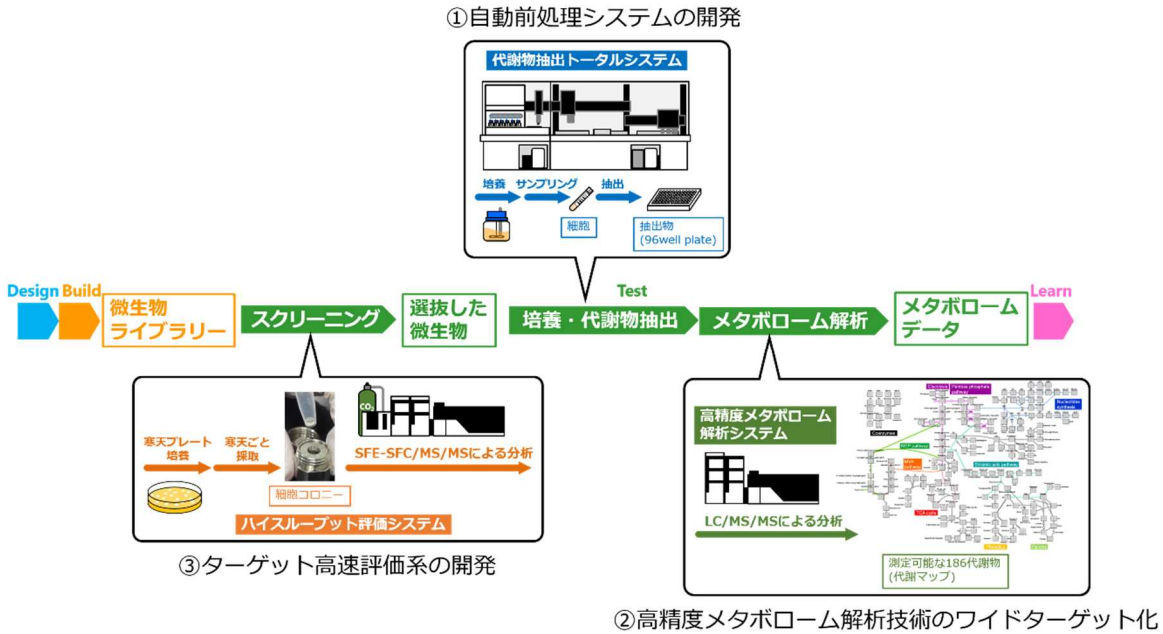


図 3. 2. 3. 1-6-4 システムの全体の構成

述べる。

① 自動前処理システムの開発

細胞の培養から LC/MS/MS 測定へ供するための代謝物を抽出するまでを「前処理」と称する。従来、手技で行われる前処理は煩雑で実験操作には熟練を要し、操作の精度は熟練度に大きく依存した。また、処理できるサンプル数は一人当たり 1 日二十数本が限界であり、本プロジェクトで必要となる多様性に富んだデータセットの取得には全く不十分であった。前処理工程では多くの段階を要するにも関わらず、サンプルとサンプル ID の紐づけは人間頼りであり、信頼性、トレーサビリティに問題があった。

これらの課題を解決するためには、ロボティクスを駆使した自動前処理システムの開発が必須であった。本システムは以下の 3 つのユニットから構成される(図 3. 2. 3. 1-6-5)。

1. 細胞培養から代謝反応停止までを行う「自動サンプリングユニット」
2. 培養液から細胞を回収し、細胞から代謝物の抽出液を作製する「自動抽出ユニット」
3. 抽出液を減圧乾固する「乾固ユニット」

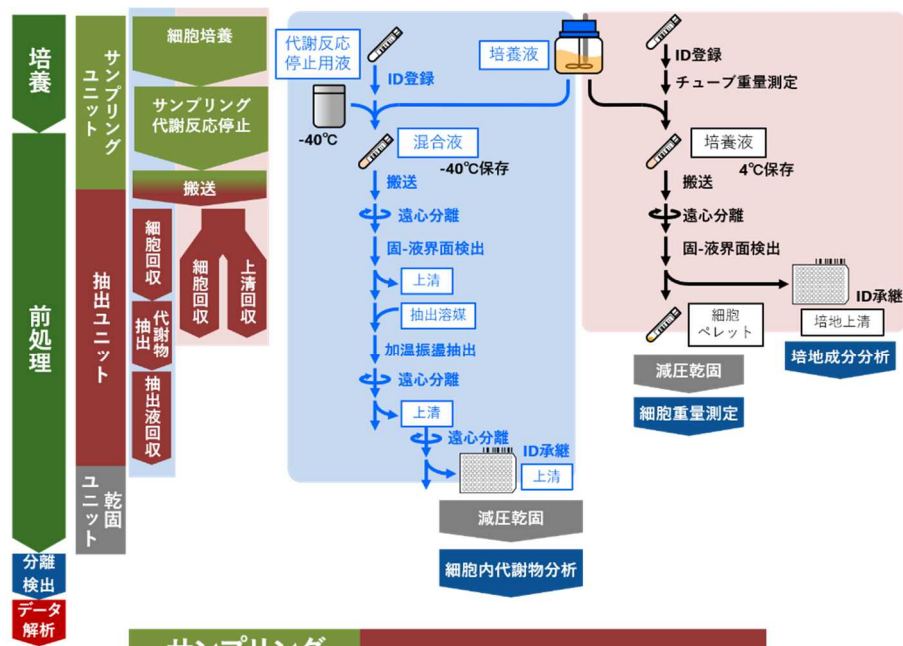


図 3. 2. 3. 1-6-5 自動前処理システムの構成とワー

ここでは、多くの要素技術開発を要した 1 と 2 について述べる。

①-1 サンプリングユニット

ジャーファーメンターを用いた細胞培養は、培養条件を自動制御できるため高い再現性が期待できるが、煩雑な操作に加え高額の初期投資と運用コストが必要で、多検体の解析には不向きであった。

フラスコ振盪による細胞培養は、簡便である事と引き換えに再現性が低く、サンプリング作業を手技に頼るためスループットの向上も困難であった。フラスコ振盪培養の再現性が低い原因の一つは溶存酸素濃度の制御が困難な点である。振盪速度、気相体積、容器形状、培地組成等々、多くの要因が複雑に絡み、溶存酸素濃度の制御を困難にした。中でも、溶存酸素濃度を確保するためには十分な気相体積が必要であり、これは容器、ひいては装置の大型化を招き、多検体解析の妨げとなった。

本プロジェクトでは、溶存酸素濃度と温度の制御が可能で、手技による煩雑なサンプリング操作を必要としない、多検体に対応した省スペースの自動培養装置の開発を行った(図 3. 2. 3. 1-6-6)。

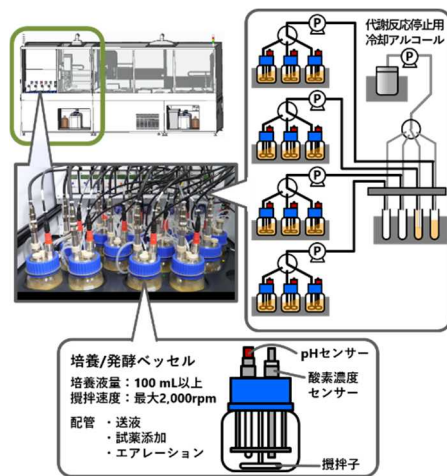


図 3.2.3.1-6-6 サンプルユニット

本機は繰り返し使用できる培養ベッセル 12 本の同時運転を行い、溶存酸素濃度と温度、pH を自動制御する。サンプリングはロボットアームではなく、ポンプと電磁バルブによって制御された配管によって行う。培養液採取と同時に冷却アルコールを加え、代謝反応を停止させる。

①-2 抽出ユニット

従来手技によって行ってきた培養細胞からの代謝物抽出過程には、図 3.2.3.1-6-7 に示す通り、精度、スループット共に多くの課題があった。

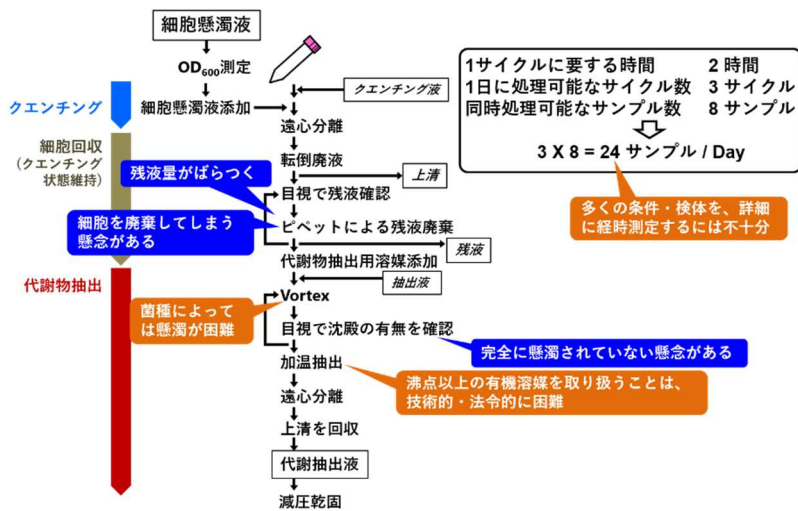


図 3.2.3.1-6-7 手技による前処理スキームと技術的な課題

遠心後の上清をピペットで除去する際、どこまで吸い取るかは作業者の判断であり、残液量のバラつきを招く。その際、細胞ペレットを吸ってしまう事は定量精度の低下に直結する。目視による沈殿懸濁の確認が不十分な場合も、同様に定量精度の低下が懸念される。

手技による前処理は一人当たり 1 日二十数本が限界であるため、多くの検体・条件を網羅的に解析する必要がある本プロジェクトには対応できない。また、菌種によっては懸濁が非常に困難な場合が存在する、有機溶媒を高温で扱う処理が含まれているなどの要素は、ハイスループット化を困難にする。

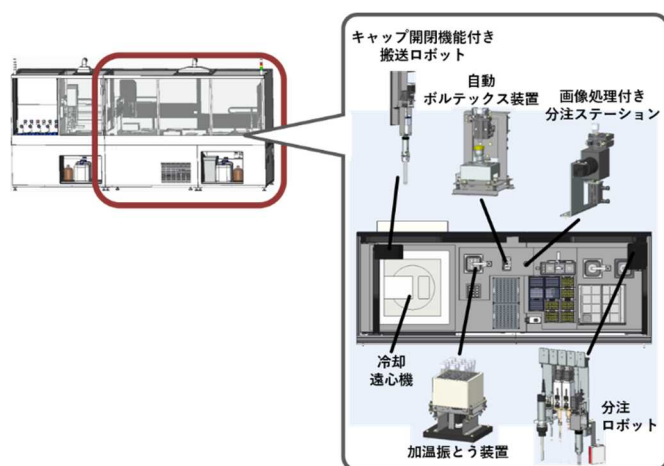
本プロジェクトでは、ロボティクスによる自動化と、手技では困難な処理を組み込むことにより、相対標準偏差 5%以内、かつ手技の 10 倍以上のスループットを実現する自動抽出装置の開発を目指した。

汎用の液体ハンドリングロボットは数多く実用化されているが、専用の要素技術開発と複雑な工程が必要なメタローム解析試料作製専用機はこれまでに例が無い。本プロジェクトでは、汎用機では実現不可能な精度、スループットを目指したシステム開発を行った。島津製作所には尿・血液検体からの薬毒物サンプル調製を自動化する装置(ATLAS)の開発実績があり、メタローム解析試料作製専用機開発に十分な素地を有する。

これまでの研究で、手技で行っていた抽出過程は自動化に不向きな工程を含んでいることが明らかとなったので、代表的なモデル生物ごとに、自動化に向けた抽出プロトコルの最適化を行った。

各工程の装置を運搬ロボット・分注ロボットで連結し、完全自動化されたユニットを構成した(図 3.2.3.1-6-8)。さらに、高温加熱したまま振とう攪拌を行うといった、人手では困難な処理を組み込むこと

を超えた効率と精度のサンプルと
するために、バー
システムを実装し



で、人の動きのトレース度を実現した。また、多データを誤りなく紐づけコードによる ID 管理した。

図 3.2.3.1-6-8 抽出ユニットの要素装置

サンプリングユニットと抽出ユニットの統合を完了し、世界初の、培養から抽出までを一貫して自動化したメタローム解析サンプル調製用ロボットが完成した。このシステムにより、スループットに関して、20 人分に匹敵する処理速度を実現した(図 3.2.3.1-6-9)。

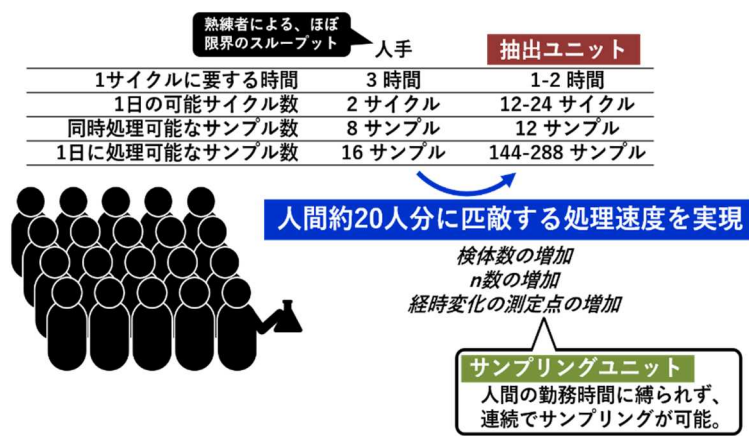


図 3. 2. 3. 1-6-9 スループットの向上

② 高精度メタボローム解析技術のワイドターゲット化

イオンペア剤を排除した LC/MS/MS 測定条件を確立し、186 代謝物の分離・検出を可能とした。またデータ解析において、LC/MS/MS クロマトグラムからのピーク同定と可視化を高速に行うデータ解析プラットフォームの構築を行った(図 3. 2. 3. 1-6-10)。

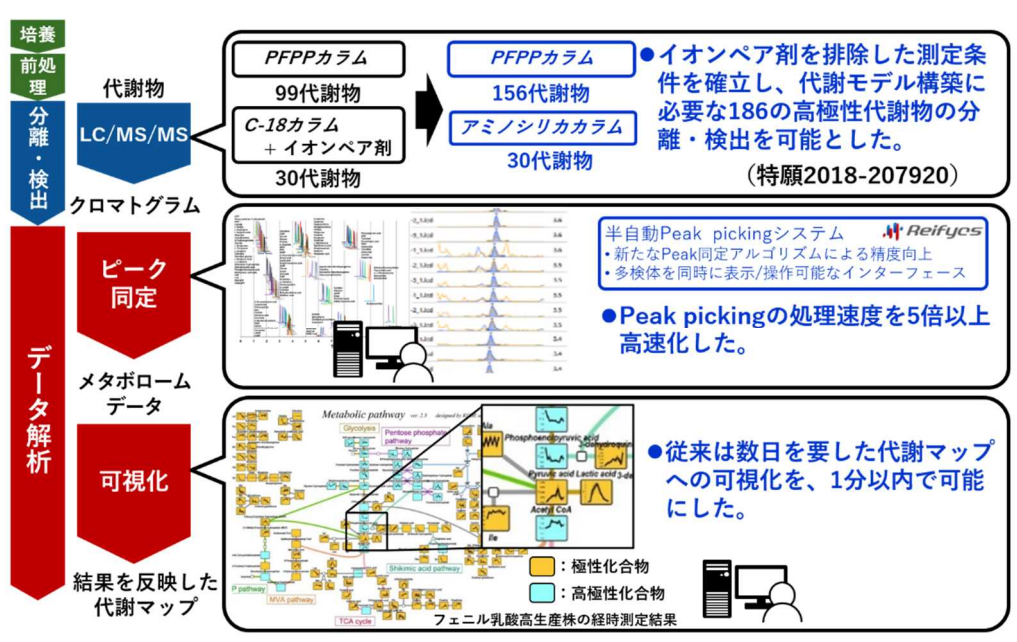


図 3. 2. 3. 1-6-10 ②成果

②-1 イオンペア剤を排除した LC/MS/MS 測定条件

従来、LC/MS を用いて親水性の高い代謝物を分離・検出する場合、逆相分配クロマトグラフィーにおいて、移動相にイオンペア剤を添加することで固定相への保持を強める方法が行われてきた(図 3. 2. 3. 1-6-11)。

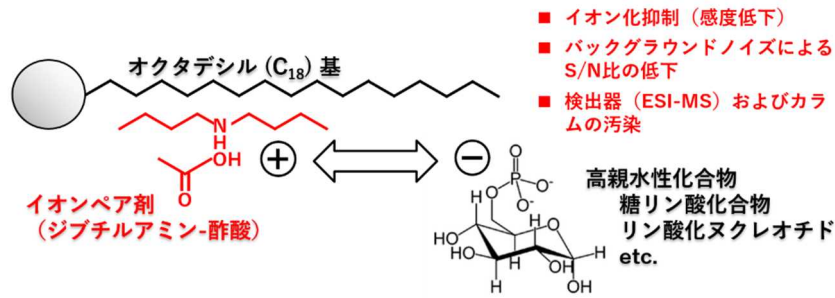


図 3.2.3.1-6-11 従来の、イオンペア剤を用いた逆相クロマトグラ

しかし、イオンペア剤の添加は、イオン化抑制による感度低下、およびバックグラウンドノイズによる S/N 比の低下を招き、精度の観点から深刻な課題を含んでいる。また、イオンペア剤の使用はイオン源や検出器の汚染を招く事から、多検体の測定が必須である本プロジェクトの運用形態には不適と言わざるを得ない。

本プロジェクトではイオンペア剤を用いない分離・検出技術の開発を行った。その結果、PFPP カラム、アミノシリカカラムを用いた手法が極めて有効である事を確認した。現在、標的とする 186 代謝物の測定条件を確立した(図 3.2.3.1-6-12)。測定可能範囲、ばらつき、添加回収率までも検証している事例はなく、本研究開発の強みとなっている(表 3.2.3.1-6-

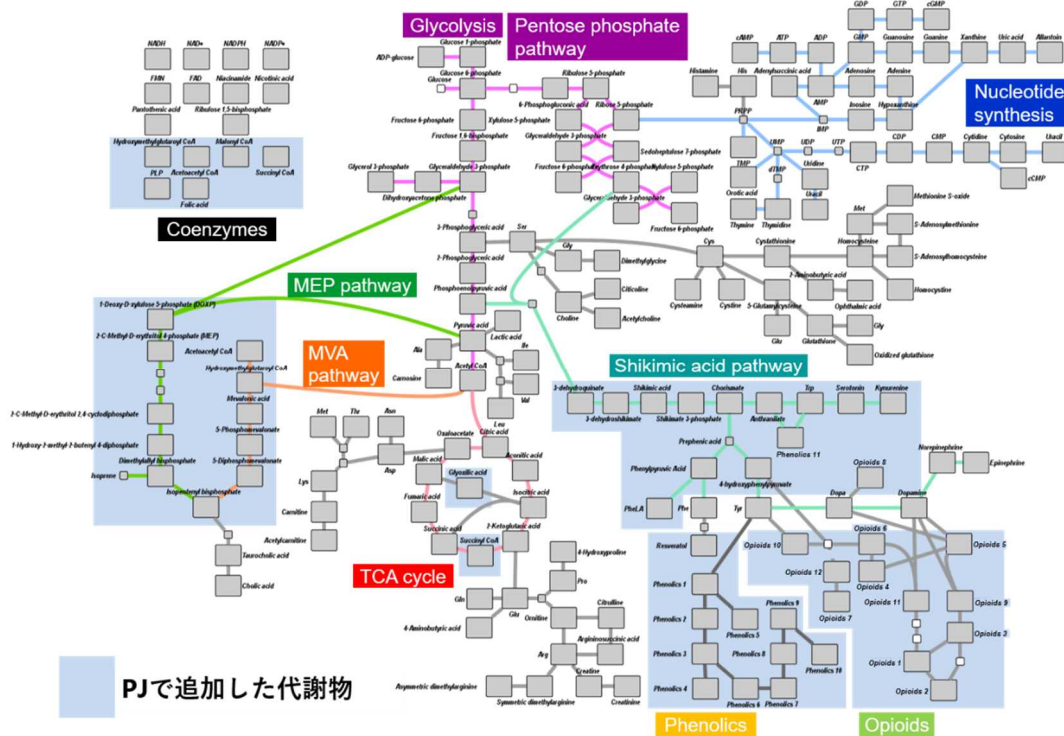


図 3.2.3.1-6-12 半定量可能な代謝物(代謝マップへ反

表 3.2.3.1-6-1 半定量可能な代謝物

代謝物名	測定可能 濃度範囲(μM)	ばらつき (CV, %)	添加回収率 (%)	代謝物名	測定可能 濃度範囲(μM)	ばらつき (CV, %)	添加回収率 (%)	代謝物名	測定可能 濃度範囲(μM)	ばらつき (CV, %)	添加回収率 (%)
Glycolysis				Amino acids				Others			
Lactic acid	ND	ND	46.3	4-Hydroxyproline	0.001-10	6.9	88.3	2-Aminobutyric acid	0.001-10	5.8	82.5
Pyruvic acid	0.5-10	71.4	72	Ala	0.01-10	7.7	90.8	Acetylcholine	0.0001-10	3	90.2
DHAP	0.5-10	In progress	In progress	Arg	0.005-10	1.9	103.3	Acetylcholine	0.005-10	ND	12.7
FBP	0.05-10	In progress	In progress	Asn	0.005-10	9.1	98.3	Allantoin	0.01-10	ND	43.3
FFP	0.1-10	In progress	In progress	Asp	0.01-10	7.9	93.2	Carnitine	0.005-10	17.3	92.4
GI-P	0.005-10	In progress	In progress	Asymmetric dimethylarginine	0.001-10	1.8	96	Carnosine	0.001-10	20.6	93.5
G6P	0.5-10	In progress	In progress	Citrulline	0.001-10	15	90.8	Choline	0.005-5	14.4	83.2
G3P	0.1-10	In progress	In progress	Cystine	0.0001-10	ND	17	Citicoline	0.005-10	4.8	90.7
PEP	0.05-10	In progress	In progress	Dimethylglycine	0.005-10	23.4	91.5	Creatinine	0.005-10	18	74.4
6PG	0.1-10	In progress	In progress	Glu	0.01-10	1	79.2	Cysteamine	0.05-10	ND	2.6
E4P	0.5-10	In progress	In progress	Gln	0.01-10	6.7	95.6	Dopa	0.005-10	ND	127.4
R5P	0.1-10	In progress	In progress	Gly	0.01-10	4.5	116.1	Dopamine	0.0001-10	ND	43.3
Ru5P	0.1-10	In progress	In progress	His	0.01-10	8.6	92.9	Epinephrine	0.001-10	141.4	82.1
S7P	0.05-10	In progress	In progress	Homocystine	0.001-10	ND	90.4	Histamine	0.001-10	19.8	84.2
Xu5P	0.05-10	In progress	In progress	Ile	0.005-10	1.5	91.7	Hypoxanthine	0.005-10	17.8	93.3
Acetyl CoA	0.05-10	In progress	In progress	Leu	0.01-10	1.0	95.7	Kynurenine	0.001-10	12.7	86.4
TCA cycle pathway				Nucleosides/nucleotides				Others			
2-Ketoglutaric acid	0.1-10	33.3	180.2	Adenine	0.005-5	15.9	101.9	Opioids 1	0.0001-0.5	0.7	92.1
Acetic acid	0.005-10	ND	135.5	Cytosine	0.001-10	4.5	85.1	Opioids 2	0.001-10	3.1	102.2
Citric acid	0.005-10	11.7	86.3	Guanine	0.01-10	21	103.3	Opioids 3	0.0001-10	2.7	80
Fumaric acid	0.001-10	23.8	108	Thymine	0.005-10	23.2	123.4	Opioids 4	0.005-10	ND	ND
Isocitric acid	0.005-10	85.4	277.7	Uracil	0.01-10	10	84.3	Opioids 5	0.1-10	1.8	45.5
Malic acid	0.01-10	36.9	89.8	Xanthine	0.005-10	23.3	94.8	Opioids 6	0.0001-0.5	4.6	70.5
Succinic acid	0.005-10	26.1	116.9	Adenosine	0.005-0.5	10.8	92.7	Opioids 7	0.5-10	5.8	51.6
Shikimate pathway				Methylated and demethylated cycle				MES			
3-dehydroquinate	0.01-10	ND	567.3	Adenosine	0.005-10	10.8	92.7	D-Camphor sulfonic acid	0.001-10	ND	50.9
3-dehydroshikimate	0.05-10	ND	73.4	Cytidine	0.005-1	5	101.5	Methionine sulfone	0.01-10	ND	114.2
Chorismate	0.05-10	ND	10.2	Guanosine	0.001-10	5.9	99.2	PFPPカラム			
Phenylpyruvic acid	0.005-10	29.1	96.5	Inosine	0.0001-10	21.5	96.8	アミノシリカカラム			
Shikimic acid	0.005-10	ND	99.6	Thymidine	0.001-10	18.4	53.6	ばらつき 0 15 50 %			
Shikimate 3-phosphate	0.1-10	31.5	96.5	Uridine	0.01-10	18.8	94.2	添加回収率 50 80 100 120 150 %			
MVA pathway				CAMP							
Malonyl CoA	0.5-10	ND	ND	cAMP	0.005-5	10.4	95.6				
Acetoacetyl CoA	0.5-10	ND	ND	AMP	0.005-10	4.1	104.2				
HMG-CoA	0.5-10	ND	ND	CMPP	0.005-10	ND	157.7				
Mevallonic acid	0.01-10	18.2	101.2	CMP	0.005-10	3.1	95.7				
5-Phosphomevalonate	0.005-10	35.4	118.6	CGMP	0.005-10	ND	95.3				
5-Diphosphomevalonate	0.5-10	ND	ND	GMP	0.001-10	13.7	87.9				
MEP pathway				ATP							
DOPP	0.005-10	28.4	97.9	ADP	0.05-10	In progress	In progress				
IDMAPP	0.1-10	ND	ND	ATP	0.5-5	In progress	In progress				
MEP	0.01-10	29.1	80.4	GDP	0.05-10	In progress	In progress				
CMPP	0.01-10	In progress	In progress	ADP-glucose	0.05-5	In progress	In progress				
Coenzymes				Methylated and demethylated cycle							
FAD	0.0001-10	14.5	120.2	Cystathionine	0.005-10	5.3	91.7				
FMN	0.005-10	9.1	85.3	Cys	0.005-10	6.4	104.1				
NAD ⁺	0.005-10	39.4	113.3	Homocysteine	0.005-10	22	91.7				
NADH	0.1-10	In progress	In progress	S-Glutamylcysteine	0.005-10	6.6	85.2				
NADPH	0.5-10	In progress	In progress	Glutathione	0.001-10	ND	ND				
NADP ⁺	0.05-5	In progress	In progress	Oxidized glutathione	0.001-10	14.7	103.7				
Organic acids				S-Adenosylmethionine							
4-Aminobutyric acid	0.001-10	13.8	109.3	S-Adenosylmethionine	0.0001-10	11	100.5				
Adenylsuccinic acid	0.005-10	27.1	80.5								
Argininosuccinic acid	0.005-10	16.7	96.3								
Cholic acid	0.1-10	ND	1156.6								
Creatine	0.005-10	16.9	82								
Nicotinic acid	0.005-10	16.9	81.2								
Ophthalmic acid	0.001-10	15.3	100.1								
Orotic acid	0.01-10	22.7	228.8								
Pantothenic acid	0.0001-5	5.1	100.6								
Taurolic acid	0.01-10	10.3	134								
Uric acid	0.005-10	94.2	78.3								

1) (Takenaka *et al.*, *Talanta*, 222 (2021) 121625)。これらは島津製作所からメソッドパッケージとして製品展開の予定である。

②-2 データ解析システムの高速度化

LC/MS/MS 測定によって得られるデータは各代謝物のクロマトグラムである。各代謝物の存在量(メタボロームデータ)を得るためには、この波形データから目的代謝物のピークを同定し、その面積を求める Peak picking という作業を行う。従来、LC/MS/MS 装置付属の解析ソフトウェアを用いて Peak picking を行った場合、測定可能な 186 代謝物に対し、20 検体/Day の作業時間を要していた。これは代謝物抽出と LC/MS/MS 測定を合わせた作業時間に匹敵する長さであり、スループットの大きな律速であった。

本研究開発では、あらたなアルゴリズムを実装したクロマトグラム解析ソフトウェア

「Traverse MS(Reifycs 社)」をベースに、高速 Peak picking システムを構築した(図 3.2.3.1-6-13)。このソフトウェアは優れたピーク同定機能と結果の視認性を有しており、Peak picking 作業が半自動化された。その結果、従来 20 検体/Day を要した作業が 100 検体/Day で処理可能となり、大幅な省力化に成功した。

本プロジェクトにおけるメタボローム解析の意義の第一は、スマートセルモデルの高精度化に資する事にある。メタボロームデータを人間が理解できる形に加工し(可視化)、代謝の変化を目視で検討することは十分に意味がある。従来、汎用的な表計算・作図ソフトウェア(Excel、PowerPoint 等)を用いた手作業での可視化が行われてきたが、多くの手間と時間がかかり、測定可能代謝物全てを可視化する事は現実的ではなかった。本プロジェクトでは、オミクスデータ解析のためのオープンプラットフォームである「GARUDA」と、GARUDA 上で島津製作所製 LC/MS/MS からのデータを解析するためのツール「Shimadzu Multi-omics Analysis Gadget Pack(島津製作

所)」を用い、メタボロームデータを簡便に代謝マップ上へ反映させる方法を確認した。これにより、多検体の全代謝物のメタボロームデータを、1時間以内で可視化できるようになった。また、この方法をあらかじめ共有する事で、連携先(味の素、長瀬産業、三菱ケミカル、RITE、新潟薬科大学、AIST)とのデータ共有の簡便化を実現した。さらに、統計解析から得られた特徴量を代謝マップ上へ可視化することで、代謝変化の指標を明確に示すツールを開発するための基礎的研究を終えた。

③ ターゲット高速評価系の開発

高精度メタボローム解析は前述の自動前処理システムとワイドターゲット化技術の開発により高いスループットを実現したが、Buildの段階で構築される膨大な微生物ライブラリライブラリを網羅することは困難であるため、微生物ライブラリライブラリから高生産株を高速にスクリーニングする必要がある。本プロジェクトでは、SFC/MS/MSによる低極性代謝物の分析系とSFEによる細胞からの代謝物抽出技術を集約し、産業微生物が代謝する低極性代謝物の生産能を1検体あたり約5分で判別する生産能高速評価系を構築した。これまでの評価系であるヘッドスペース(HS)-GCMS法では分析前に培養後のコロニーを掻き取り液体培養が必要であり、判定までには数日間を要する。今回、開発した評価系における培養後の分析前作業は細胞コロニー1個を寒天培地ごと打ち抜き、抽出ベッセルに充填した後、装置に導入するだけで完了する。分析開始後、構築した1検体5分の分析系により低極性代謝物を検出し、生産能の違いを判別することが出来る。前述のHS-GCMS法の結果の相関性から、本評価系の妥当性も確認されている。

[まとめ(図 3.2.3.1-6-13)]

①自動前処理システム

- ・ 培養～抽出を完全自動化した。
- ・ 手技と比較し、約 20 人分に匹敵するスループットを実現した。
- ・ 熟練者を凌駕する再現性を実現した。
- ・ サンプル ID 管理システムにより、データの信頼性と可用性を大幅に向上した。

②高精度メタボローム解析技術のワイドターゲット化

- ・ イオンペア剤フリーの高感度システムを構築した。
- ・ スマートセル設計に必要な 186 成分を一斉分離・検出できるシステムを構築した。
- ・ Peak picking の処理速度を 5 倍以上に高速化した。
- ・ 数日を要した代謝マップへの可視化を、1 分以内を実現した。

③ターゲット高速評価系の開発

- ・ 超臨界流体抽出技術により以下を実現し、数日～数週間を要したスクリーニングを 1 日に短縮した。
 - － コロニー 1 個からの分析
 - － 寒天培地ごと採取したコロニーからの分析
 - － 1 検体 5 分で測定可能

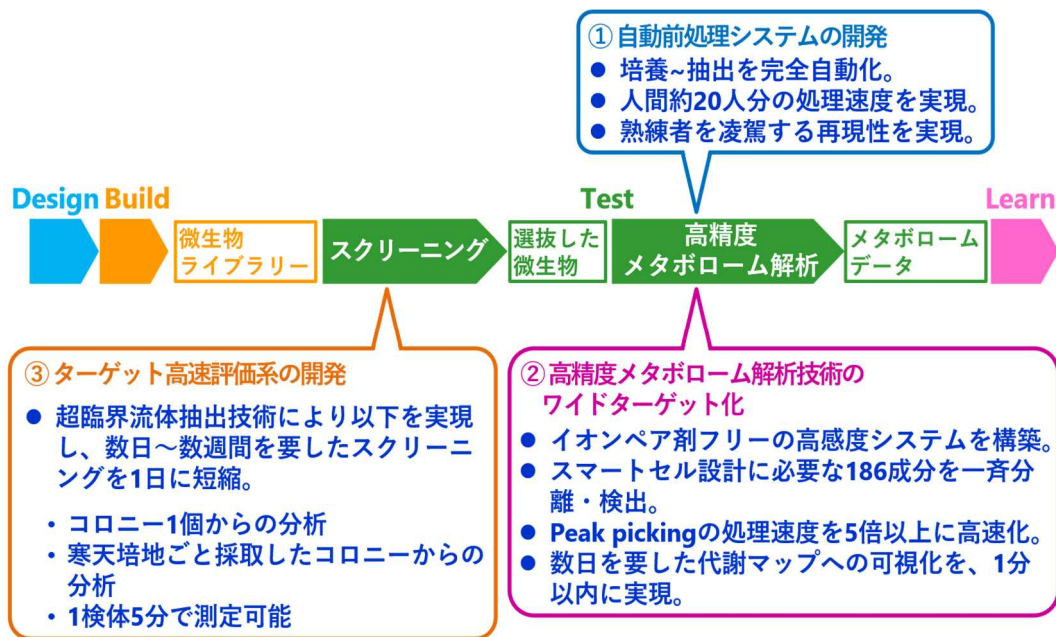


図 3.2.3.1-6-13 (1)-6 メタボローム解析技術開発の成

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	3	0	0	0	0
2017	0	1	12	0	1	0	1
2018	2	2	16	8	1	4	1
2019	3	2	6	2	2	5	1
2020	2	1	10	5	1	3	1

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	6	0	0
2019	1	0	5
2020	1	0	0

課題名：C(1)-7 高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術の開発

担当機関：大阪大学

(1) 背景と目的

有用物質生産微生物の分子育種では代謝経路の合理的な改変が求められる。代謝経路の改変とは、宿主微生物のゲノムを人為的に書き換え、(1)新規酵素タンパク質を発現させて、細胞内に新たな代謝経路を構築する。(2)遺伝子破壊で不要な経路を除く。(3)酵素タンパク質量を増減させて、各反応の触媒活性を調節する。作業であるといえる。

近年の代謝設計技術の進展により、目的物生産に最適な代謝経路の設計が可能となり、それを実現するためのゲノム編集技術や長鎖 DNA 合成技術が実用化されつつある。また、設計通りにスマートセルを構築できたのか評価する手法として、発酵試験による目的物生産収率、比速度の測定に加えて、メタボローム解析による細胞内代謝中間体含量の一斉定量などが広く用いられてきた。このように、酵素タンパク質の細胞内存在量の測定は、スマートセルの評価に重要な役割を果たすと期待される。

そこで本研究では、スマートセルの評価に最適なタンパク質量定量法である定量プロテオミクス法に注目し、定量プロテオミクス法の高感度、確実性を生かしつつ、技術的な課題となっている網羅性、スループットを向上する技術開発を行うことで、多数の酵素発現量を高精度に一斉定量可能な測定技術を開発することを目標とする(図 3.2.3.1-7-1)。これにより、高生産微生物のタンパク質発現量が設計図通りに調節できたのか確認することを可能とする。さらに、新規代謝経路の設計、代謝モデル構築に資するデータを取得することを可能とする。そのために必要な項目を4つ挙げ、研究開発項目として設定した。

1. 高速 MRM アッセイメソッド構築法の開発

課題：MRM アッセイメソッド構築に時間がかかる。

定量プロテオミクス法では、測定タンパク質毎に質量分析装置の設定を最適化した MRM アッセイメソッドを構築する必要がある。5 タンパク/日程度のスループットしかなく、100 種以上の酵素を測定するメソッドの作成には不十分だった。そこで、20 タンパク/日までスループットを向上することを目指した技術開発を行う。

2. MRM アッセイメソッド構築

課題：宿主微生物毎に MRM アッセイメソッドの構築が必要

定量プロテオミクス法で用いる、MRM アッセイメソッドは測定タンパク質の配列に依存する。このため、同じ反応を触媒する酵素であっても、生物種ごとに MRM アッセイメソッドを作成しなおす必要がある。開始時は、酵母、シアノバクテリアの中心炭素代謝経路にかかわる酵素について MRM アッセイメソッドの構築が完了していた。そこで、本プロジェクトで取り扱う大腸菌、酵母、糸状菌などの宿主微生物について、ターゲット代謝経路の関わる酵素 200 種の MRM アッセイ法を構築することを目指す。

3. 定量の高精度化

課題；定量精度が低い

プロジェクト開始時の定量プロテオミクス法では、異なるスマートセル株間でのタンパク質発現量の相対比較が可能である。しかしながら、同じスマートセル内で2種類のタンパク質を発現した時、この2種の発現量を比較することができず、代謝モデル構築には精度が不足していた。

そこで、人工内部標準タンパク質を用いた高精度な定量法を確立し、代謝設計へと活用する技術を開発する。

4. 試料調整法の効率化

課題：サンプル調製のスループットが低い

定量プロテオミクス法では、スマートセルからの粗酵素液の抽出、タンパク質定量、還元アルキル化、トリプシン消化、脱塩にいたるサンプル調整作業を手作業で行っているため、大量サンプルの取り扱いに必要なスループットが欠けていた。そこで、作業の効率化により 1.5 倍のハイスループット化を目指す。

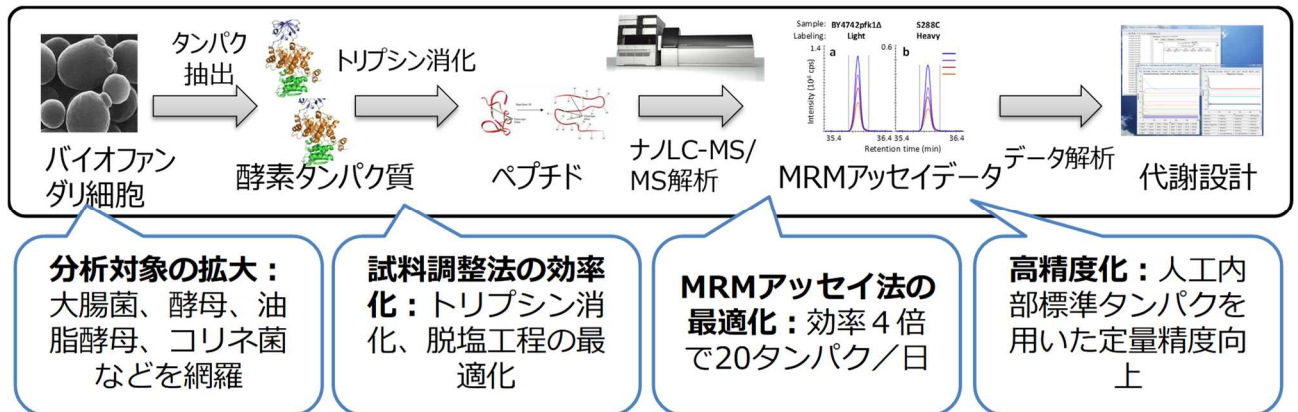


図 3. 2. 3. 1-7-1 本研究で開発する高精度定量プロテオーム解析技術

(2) 位置づけ、目標値

これまで様々なタンパク質定量法が開発されてきたが、スマートセルの評価には、定量プロテオミクス法が最適である。ウェスタンブロッティングは古典的なタンパク質存在量の測定法として、現在でも広く用いられている。目的タンパク存在量を高感度に評価できるが、抗体作成の必要性、網羅性、スループットなどの課題も多い。また、プロテオミクス分野では 2 次元電気泳動法の感度、網羅性、再現性などの課題を解決すべく、発見型プロテオミクス法が開発された。粗タンパク質抽出物から調製したトリプシン消化ペプチド混合物を、液体クロマトグラフータンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) に供し、自動取得したプロダクトイオンスペクトルデータをもとにペプチド同定を行い、サンプル中に含まれるタンパク質の網羅的なカタログ化を目指している。一方、スマートセルの評価では、あらかじめ決定した測定対象タンパク質の存在量を定量したい。そこで、LC-MS/MS の検出器を、より定量性に優れたトリプル四重極型質量分析装置に変更すれば、選択反応モニタリングモード (MRM) を用いることで、数十種のタンパク質をより確実に高感度で一斉定量することが可能となる。このターゲット (定量) プロテオミクス法が、スマートセルの評価に最適であることに注目し、筆者らは島津製作所と共同で純国産ターゲットプロテオミクス分析システムの開発を進めてきた。

表 3. 2. 3. 1-7-1 他技術との比較

	感度	網羅性	スループット	確実性
ウェスタンブロッティング	◎	×	×	◎

二次元電気泳動	△	△	×	△
発見型プロテオミクス	○	◎	○	△
定量プロテオミクス	◎	△	○	◎

最終目標値（2020）

研究開発項目		開始時（2016）	最終目標値（2020）
①DBTL サイクルを回すための高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術の開発	1) 高速MRMアッセイメソッド構築法の開発(2016-18)	5 タンパク/日	20 タンパク/日
	2)MRM アッセイメソッド構築(2016-18)	酵母、光合成微生物の酵素 200 種の MRM アッセイ法	物質生産ターゲット代謝経路の100種以上の酵素発現量を高精度に一斉定量可能
	3) 実用化検証 G との連携によるデータ取得および試料調整法の効率化(2017-20)	5-10 検体/週	サンプル前処理効率を 32 サンプル/週に向上させる。 実用化検証 G と 5 件以上の連携を進め、高生産性微生物の実用化および代謝設計システム開発に資するデータを取得する。
②高精度タンパク測定技術の開発	1) 定量の高精度化(2016-20)	タンパク/タンパク間の相対定量不可	人工内部標準タンパク質の利用で同時定量可能な酵素タンパク数を 10 個以上に増加させる。

(3) 全体計画

本研究では、まず、①-1 高速 MRM アッセイメソッド構築法の開発に着手し、これをもとに①-2MRM アッセイメソッド構築を進め、技術的な課題となっている網羅性、スループットを向上する技術開発を行う。さらに 2017 年度からは、①-3 実用化検証 G との連携によるデータ取得を開始し、さらに、②高精度タンパク測定技術の開発に着手して、2018 年度までに基礎的な技術開発にめどをつける。2019 年度以降は、①-3 実用化検証 G との連携によるデータ取得および試料調整法の効率化、②-1 定量の高精度化へと展開する。本プロジェクト内で作成されるスマートセルについて実用化に向けた条件最適化、高性能代謝設計のためのデータ取得を行う。さらに、

構築した要素技術をもとに超高精度なターゲットプロテオーム測定技術へと発展させ、人工内部標準タンパク質の利用で同時定量可能な酵素タンパク数を10個以上に増加させる。

事業項目	28年度				29年度				30年度			
	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期
① DBTL サイクルを回すための高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術の開発	高速MRMアッセイ構築法の開発				MRMアッセイ構築法のさらなる高速化				サンプル調整法最適化			
		大腸菌酵母のMRMアッセイ法構築			油脂酵母等のMRMアッセイ法構築				汎用宿主微生物のMRMアッセイ法構築			
					他機関と連携データ取得開始				他機関との連携データ取得			
② 高精度タンパク測定技術の開発									定量の高精度化			

事業項目	2019年度				2020年度			
	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期
①DBTL サイクルを回すための高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術の開発	分析メソッドの開発、データ取得				実用化に向けた条件最適化・高生産代謝設計のためのデータ取得			
	脱塩法の効率化			トリプシン消化法の効率化				
②高精度タンパク測定技術の開発化	酵素タンパクコピー数を測定可能な技術開発							
	同時定量可能数を10個以上に増加させる（長岡技大Gと連携）							

(4) 実施体制

プロジェクトリーダー、神戸大拠点長、産総研拠点長のリーダーシップの元、スマートセル開発チームのDBTLサイクルと密接に連携し、必要に応じて協力してサンプル調製、データ取得を行うことで、DBTLサイクル加速に貢献する体制を構築した。また、阪大内では定量プロテオーム解析のための分析メソッドの開発、データ取得のためのサンプル前処理、LC-MS分析、データ処理を実施し、作成したMRMアッセイ法のDB化や、サンプル調製法のノウハウ化を行うための体制を整えた（図3.2.3.1-7-2は非公開）。

(5) 運営管理

小規模なグループであるが、内部では 2 回／週のグループ内進捗確認ミーティングを実施した。連携研究期間とは、1-2 回／週程度の頻度で情報交換を行い、研究開発の進捗管理と情報共有を行っている。

(6) 実施の効果

受託分析の競合はいまのところ存在しない。また、微生物をターゲットに定量プロテオーム解析の技術開発を行っている機関は国内に存在しない。きわめて独自性の高いデータをプロジェクトに提供し、研究開発を加速する横串技術として実施の効果がある。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目		最終目標値 (2020)	達成度 (2020)
①DBTL サイクルを回すための高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術の開発	1) 高速 MRM アッセイメソッド構築法の開発 (2016-18)	20 タンパク／日	○
	2) MRM アッセイメソッド構築 (2016-18)	物質生産ターゲット代謝経路の 100 種以上の酵素発現量を高精度に一斉定量可能	○
	3) 実用化検証 G との連携によるデータ取得および試料調整法の効率化 (2017-20)	サンプル前処理効率を 32 サンプル／週に向上させる。 実用化検証 G と 5 件以上の連携を進め、高生産性微生物の実用化および代謝設計システム開発に資するデータを取得する。	○
② 高精度タンパク測定技術の開発	1) 定量の高精度化 (2016-20)	人工内部標準タンパク質の利用で同時定量可能な酵素タンパク数を 10 個以上に増加させる。	○

(8) 研究開発の成果と意義

① DBTL サイクルを回すための高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術の開発

1. 高速 MRM アッセイメソッド構築法の開発

1-1. 目的

定量プロテオーム解析では、定量対象タンパク質をトリプシン消化し、得られたペプチドから LC-MS で最も効率よくイオン化し、高感度に検出可能な定量ペプチドを事前に選抜する必要がある（図 3.2.3.1-7-3）。また、定量ペプチドを他のペプチドと区別して選択的に検出するために、トリプル四重極質量分析装置の多重反応モニタリング（MRM）法で検出を行うが、これも事前に最適な定量断片（フラグメント）を選抜する必要がある。事前の検討で設定した、定量ペプチドと定量断片の組み合わせを MRM アッセイメソッドと呼ぶ。1つの対象タンパクについて MRM アッセイメソッドを作成するには、すべての定量ペプチドと定量断片の組み合わせで実測したデータから、最適なものを選抜する必要がある。これには総計 500-1,000 程度の組み合わせを網羅する必要がある、トリプル四重極質量分析装置を 6 時間程度使用してデータを取得する必要がある。そこで、本研究課題では、作業時間を 1.5-3h に減らすことを目標として 1. 定量ペプチドの候補を減らす技術の開発、2. 定量断片候補を事前に減らす技術の開発、の 2 つの項目について検討を行った。

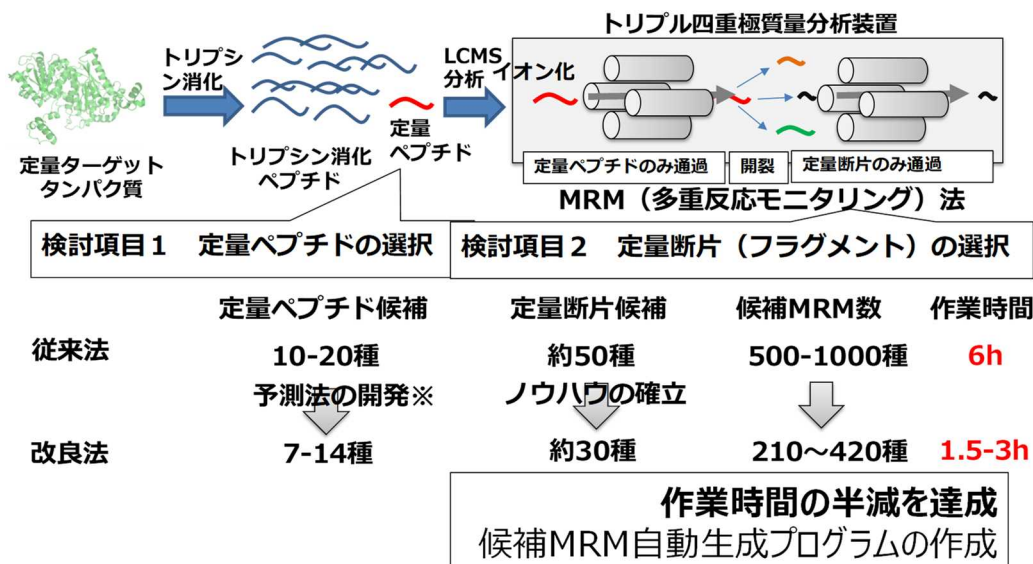


図 3.2.3.1-7-3 高速 MRM アッセイメソッド構築法の開発の概要

1-2. 定量ペプチド候補を減らす技術の開発

CONSeQuence や PeptideRank などの既存の技術はペプチドのアミノ酸配列から、有望な定量ペプチドの予測が試みられてきた（Methods 61: 287-298, 2013）。しかしながら、本来定量ペプチドとすべきものを、誤って有望ではないと判定する偽陰性が多いという課題があった。そこで、本研究では発想を逆転し、測定対象になりそうにない有望ではない（Hopeless）ペプチドを予測し、定量ペプチド候補を減らすことを目指した。

そこで、ペプチド配列からシグナル強度を予測する回帰式の作成を試みた。研究開発項目 2. MRM アッセイメソッド構築では、大腸菌の中心代謝酵素 203 種からトリプシン消化ペプチドの LC-MS 分析でのシグナル強度を測定していた。機械学習技術を用いて、10 万件超のデータを用いて、二種類のペプチド A、B の配列から、シグナル強度比を予測する式を作成した。本式では、比較的高精度に相対強度値を予測することが可能となった。

そこで本式を用いて、大腸菌中心代謝酵素 203 種のトリプシン消化ペプチド全 3,856 ペプチドの予測を行ったところ、1,275 個 (33%) が期待できないペプチドと判定された。このうち、本来定量ペプチドとするべきペプチドを誤って、期待できないとした誤りは 3% と許容できるレベルだった。以上の検討から定量ペプチド候補を事前に 3 割削減可能な技術を開発できた。

1-3. 定量断片候補を減らず技術の開発

ついで、定量断片候補を減らず技術の開発を試みた。トリプル四重極質量分析装置の多重反応モニタリング (MRM) 法は、途中でペプチドイオンの断片化を行う。生成しやすい定量断片 (フラグメント) の予測モデルの作成が試みられているが、有効なモデルの作成は困難なことが知られている。本研究においても、研究開発項目 2. MRM アッセイメソッド構築で取得した定量断片の定量データを用いた予測モデルの開発を試みているが、有用な結果は得られていない。

そこで、これまでの経験から、定量断片候補を減らずノウハウの確立を試みた。トリプシン消化ペプチドは、LC-MS 分析のイオン化時に、プロトンが 2 つ付加した 2 価イオンと、プロトンが 3 つ付加した 3 価イオンが生成することが知られている。前述の「1-2 定量ペプチド候補を減らず技術の開発」で作成した予測モデルとその検証結果から、主に 2 価イオンが生成し、側鎖にポジティブチャージがあるアミノ酸を持つペプチドで、3 価イオンが主に生成する傾向があることが明らかとなった。そこで、これまでは全ペプチドで 2 価イオンと 3 価イオンを候補に加えていたが、このノウハウをもとに、特定の条件でのみ 3 価イオンを候補とするルールを作成した。さらに、定量断片についても、b シリーズと呼ばれるタイプの定量断片がある特定の条件で高頻度に生成することに注目し、特定の条件でのみ b シリーズの断片を候補とするルールを作成した。これらのノウハウを組み合わせると、定量断片候補を 40% 程度削減できた。

1-4. 支援プログラムの作成

「1-2 定量ペプチド候補を減らず技術の開発」と「1-3 定量断片候補を減らず技術の開発」を組み合わせると 1 定量対象タンパク質の MRM アッセイメソッドを作成するために必要な時間を 1.5h 以下にすることが可能になった。さらに、作成した技術・ノウハウを集約した支援プログラムを作成して作業効率を向上させ、目標値である 20 タンパク質/日の作成効率を可能とした。

2. MRM アッセイメソッド構築

2-1. MRM アッセイメソッド構築

これまでに大腸菌中心代謝、アミノ酸、核酸代謝に関わる酵素タンパク質 203 種の MRM アッセイメソッドを構築した。さらに糸状菌が生産する有用タンパク質、油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の中心代謝酵素、コリネ型細菌中心代謝酵素、外来代謝経路構築用タンパク質などのターゲットタンパクの MRM アッセイメソッド構築を完了させた。

2-2. MRM アッセイメソッドデータベースの構築

いったん作成した MRM アッセイメソッドは、トリプル四重極質量分析装置のメーカー、機種に依存せず利用可能なことが知られている。また、非常に多数の MRM アッセイメソッドを作成して

いるため、データの管理、閲覧、改訂履歴の確認、活用の手間が煩瑣となった。そこで、サーバクライアント形式の MRM アッセイメソッドデータベースを構築し、ウェブブラウザを用いて MRM アッセイメソッドデータベースの閲覧、データ改訂を可能とした。これまで本研究及び、他プロジェクトで作成した、大腸菌、枯草菌、シアノバクテリア等の MRM アッセイメソッドを収集したデータベースを構築した（図 3.2.3.1-7-4）。

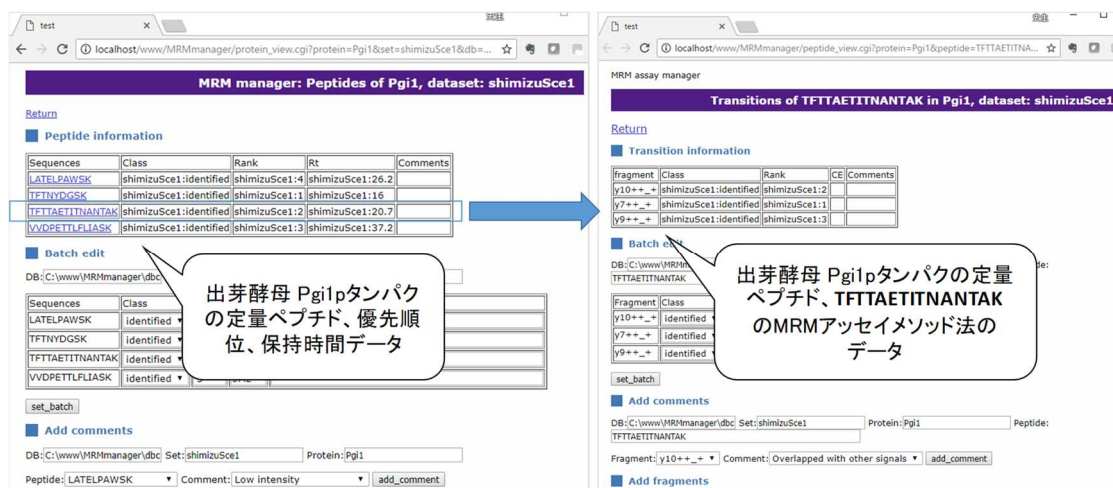


図 3.2.3.1-7-4 MRM アッセイメソッドデータベース

3. 実用化検証 G との連携によるデータ取得および試料調整法の効率化

3-1. 実用化検証 G との連携によるデータ取得

実用化検証 G と様々な連携を行い DBTL サイクルの加速に貢献した。本項目で開発し高精度定量プロテオーム解析技術が、スマートセル開発の加速に有用であることを実証した。

3-2. 試料調整法の効率化

ターゲットプロテオミクス法で用いる前処理法（タンパク質抽出、定量、還元アルキル化、トリプシン消化、脱塩）について効率化を進め、32 サンプル/週のサンプル調製を可能とした。また、本課題の実施を通じて得た知見をノウハウ化し文書化しを連携研究機関と共有開始した。

②高精度タンパク測定技術の開発

1) 定量の高精度化

ターゲットプロテオーム解析では、タンパク質 A、B、C それぞれの発現量をサンプル間で比較することが可能であったが、タンパク質 A、B、C 間で発現量を比較することができなかった。そこで、定量に用いる内部標準ペプチドが合成可能であるという、ターゲットプロテオーム解析の利点を生かし、DNA 合成技術を活用して作成した人工タンパク質を内部標準物質に用いる QconCAT 法の適用を試みた。人工代謝経路を構築するためにタンパク質 A、B、C を発現させた微生物株を構築したとする。この 2 タンパク質の存在量比を評価するには、タンパク質 A、B、C の定量ペプチドをつないだ人工タンパク質（QconCAT タンパク質）を設計して大腸菌内で発現させることで、安定同位体標識 QconCAT タンパク質を調整できる。QconCAT タンパク質由来の安定同

位体標識定量ペプチドの存在量は同じなのデータタンパク質 A、B、C 由来の定量ペプチドとの比率から、タンパク質 A、B、C の存在量比を測定できる。

そのアイデアをスマートセル開発に活用し、外来代謝経路を構築するタンパク質の発現量を比較可能な人工内部標準タンパク質、さらにはスマートセルが分泌する有用タンパク質 24 種の濃度を一斉定量可能な人工内部標準タンパク質の開発に成功した。これにより、高精度タンパク測定技術がスマートセル開発の加速に有用であることを実証した。

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	1	1	0	0	0	0	0
2018	0	0	2	0	0	0	1
2019	0	0	1	0	0	0	0
2020	0	1	0	0	0	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	0	0	0
2019	0	0	0
2020	0	0	0

(1) 背景と目的

従来の物質生産微生物開発では、①論文等の生物学的知見に基づく改変ターゲット（酵素、タンパク質、代謝経路）の設定、②ターゲット遺伝子の構築、③形質転換による菌株の作出、④生産性の評価、というスキームをトライ&エラーで行い、このスキームを何十回と繰り返すことにより、～数十年という長い開発期間を要してきた。しかしながら、激化する微生物での物質生産における世界との競争に勝つためには、微生物を高速に開発する技術の開発が必須である。

本プロジェクトでは、情報解析技術を利用して高機能物質の高生産微生物を短期間で作出するための技術を開発することを目的としており、公開データや取得済みのデータを反映させることで代謝モデルや遺伝子発現モデルの構築を行う。さらに、これらの既知情報に加えて、①多様な菌株（変異株や DNA 形質転換株）を構築し、②高精度オミクスや生産性評価により必要なデータを取得し、③取得したデータと情報解析を用いて代謝モデル・遺伝子発現モデルを高精度化する（図 3.2.3.1-8-1）。本研究では、公開情報では得られないデータをインハウスで独自に取得し、導出されるデザインの精度や正答率を向上させることにより、世界的に見ても優位な生産細胞モデルを構築する点で、世界的に優位なモデル構築が可能になる。その結果、高精度化したモデル（生産細胞モデル）に基づく遺伝子配列設計が可能となり、設計した遺伝子配列を搭載した微生物を高速に構築することで、微生物の育種開発期間を大幅に短縮することができる。

優位性の高い生産細胞モデルを構築するためには、生産性が異なる多様な細胞を解析することが重要である。一方で、生産細胞モデルの構築に必要な細胞の情報や実験データの種類、数、精度などは、未だかつて精査されることがないため、開発の初期段階では重要と想定されるデータを相当数取得することが必要である。また、得られる膨大なデータを効率的に管理して情報解析チームと共有できるデータ管理システムも必要となる。

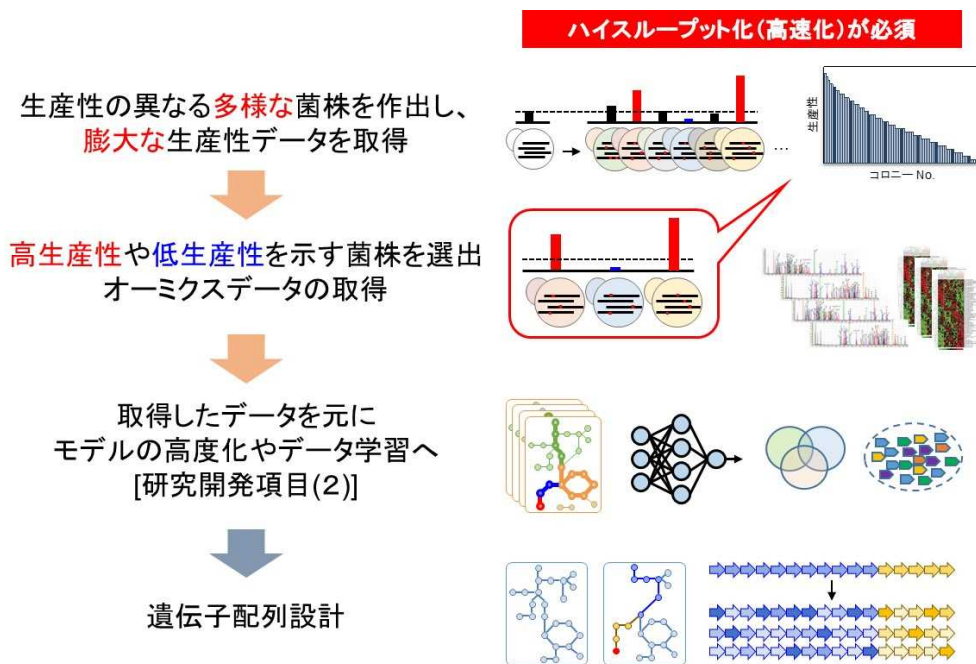


図 3.2.3.1-8-1 遺伝子配列設計に資するハイスループット微生物育種・評価

(2) 位置づけ、目標値

ハイスループット微生物構築・評価技術の開発においては、微生物の物質生産能力を向上させる遺伝子を網羅的な解析から探索するとともに膨大な評価データを情報解析に提供するために、数千以上の多様な菌株を短期間で構築するとともに、構築した微生物を高速に評価して有用株を選定するための技術を開発する（2016-2018 年度）。また、得られる膨大なデータを効率的に管理してデータを情報解析チームと共有するために、wet の観点からも使いやすいデータ管理システムを構築する（2019-2020 年度）。

(3) 全体計画

事業項目	2016 年度				2017 年度				2018 年度				2019 年度				2020 年度			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
旧(1)-5. ハイスループット微生物構築・評価技術の開発（2016-2018 年度）																				
■ 自動形質転換システムの構築																				
■ ハイスループット評価システムの構築																				
(1)-8. 評価系のネットワーク化（2019-2020 年度）																				
■ 統合データ管理システムの構築																				

(4) 実施体制

神戸大学において実施

(5) 運営管理

年に一度の全体会議と外部有識者による技術推進委員会を開催した。また、毎月～2 ヶ月に 1 回程度、神戸大学内での拠点会議を開催して、進捗状況・開発項目を確認した。データ管理システムの開発に関しては、仕様策定のために、2019 年度・2020 年度それぞれ約半年に渡って、実務者レベルで毎週の打ち合わせを行うとともに、2 週間に一度の定例会を開催した。また、必要

に応じて、PL との個別打ち合わせも行うことで課題の抽出とプロジェクト全体における役割を調整し、開発を加速した。

(6) 実施の効果

膨大な形質転換体を簡便に評価してデータを取得できるようになり、神戸大学だけでなく、企業を含む他機関との連携による物質生産微生物の育種スピードを加速することが可能となった。例えば、後述する味の素とのリモネン高生産大腸菌の開発や、助成事業の長瀬産業・東北大学との共同で大腸菌遺伝子破壊株からのトランスポーター探索にも活用した。本技術は、様々な物質生産微生物の高速育種開発に利用できるため、2030 年までに微生物物質生産プロセスの実用化が多数生まれると期待される。

(7) 最終目標の達成度

	達成度
ハイスループット微生物構築・評価技術の開発（2016-2018 年度） ■ 自動形質転換システムの構築 ■ ハイスループット評価システムの構築	◎大きく上回って達成 ◎大きく上回って達成
評価系のネットワーク化（2019-2020 年度） ■ 統合データ管理システムの構築	◎大きく上回って達成

(8) 研究開発の成果と意義

ハイスループット微生物構築・評価技術の開発（2016-2018 年度）

微生物での物質生産において遺伝子組換えにより様々な酵素を発現させることはもはや必須であるが、例えば、組換え微生物で酵素を発現させる場合、由来となる生物種、アイソザイムによって基質特異性や活性は異なり、発現量も予測困難である。したがって、2、3 種類以上の異なる生物種由来の酵素の性能を評価するとして、10 個の遺伝子を導入する場合でも $2^{10}=1,024$ または $3^{10}=59,049$ 通りの組み合わせが存在することになる。さらに、発現量を最適化するには、タンパク質をコードする遺伝子（ORF）とプロモーターとの組み合わせも考える必要があり、すでに配置された 10 個のプロモーターに決められた 10 個の ORF の順列組み合わせを考えただけでも、 $10P^{10}=3,628,800$ 通り存在することになり、機械学習を援用することを考慮しても～数千程度の菌株を一度に構築して、なおかつ評価できる技術が必須である。また、大腸菌や酵母など遺伝子破壊株ライブラリや遺伝子過剰発現ライブラリが提供されているものの、全ての遺伝子の中から物質生産に寄与する因子を探索するにはそれぞれ約 4,000~6,000 株もの形質転換体を作成して評価しなければならない。しかし、人の手作業で作出できる遺伝子の数は限られており、100 種類のデザインを試すだけでも悠に数ヶ月～一年以上の期間を要する。

本研究では、最低でも数百以上の菌株を一度に自動で構築できるハイスループット微生物構築技術を開発した。まず、微生物を自動で形質転換するための自動分注機のプログラムは一般に存在しないため、遺伝子組換え操作が比較的容易な大腸菌と出芽酵母を宿主として、96 穴プレートに対応可能で一度に数千株の形質転換体を取得できるセミオートメーションの自動形質転換システムを確立した（図 3.2.3.1-8-2）。具体的には、自動化に適した簡便かつ遺伝子導入効率の高い形質転換プロトコル、自動分注装置の制限された動作では困難を伴う操作を再現良く実行できる分注プログラム、観点プレート上の 96 個の形質転換体からコロニーの単離なしに培養する手法、を開発し、大腸菌および酵母のハイスループット微生物構築方法を確立した。

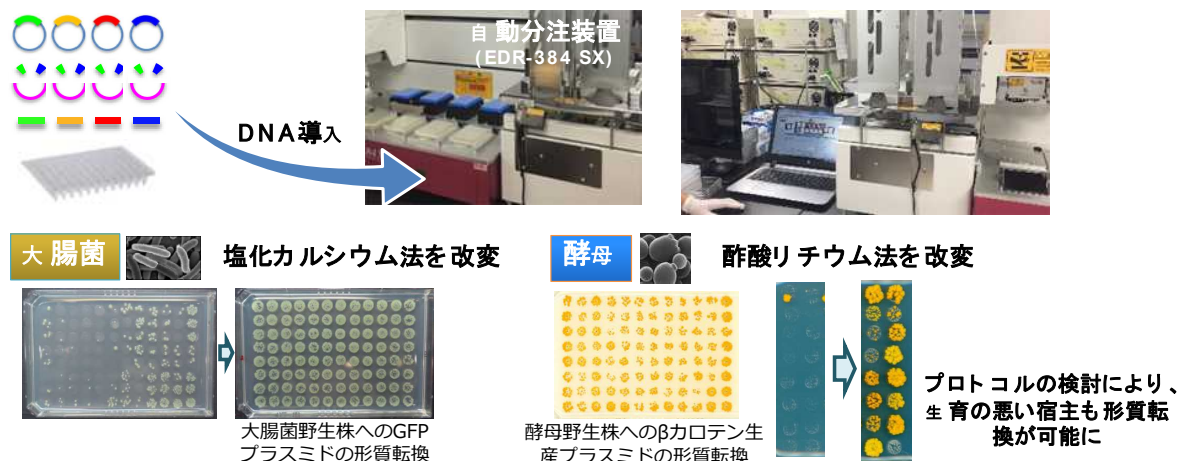


図 3.2.3.1-8-2 自動分注装置を用いた自動形質転換システム

カロテノイド色素（リコペンまたは β -カロテン）の生産量をハイスループットに簡易定量できる手法をスキャナと画像解析ソフトを用いて構築し、さらに開発した自動形質転換システムを用いて、大腸菌および酵母の遺伝子破壊株（約 4,000 株および 5,000 株）にカロテノイド色素（リコペンまたは β -カロテン）生合成経路プラスミドを網羅的に導入した形質転換体を作出することに実証した（図 3.2.3.1-8-3）。また、菌体呈色の画像解析によりカロテノイド色素の生産量を一度に数千株（96 細胞/プレートずつ）評価できる技術を開発し、自動形質転換システムにより作出したリコペン生合成経路プラスミドを導入した大腸菌遺伝子破壊株と β カロテン生合成プラスミドを導入した酵母遺伝子破壊株の生産性を網羅的に評価しデータを取得した。



図 3.2.3.1-8-3 大腸菌遺伝子破壊株ライブラリへのプラスミド自動形質転換

さらに、揮発性イソプレノイド（リモネン）を標的として、200 サンプル/日で分析が可能なターゲット限定超高速定量分析メソッドを開発し、味の素（吉田）、神戸大（柘植）東大（寺井）と共同でリモネン生産大腸菌の非メバロン酸経路（MEP 経路）遺伝子群のプロモータの組み合わせ

せを Combi-OGAB によりランダム化したライブラリを高速評価し、得られたデータを機械学習することで最適な発現バランスを示す候補を推定することにも成功した（図 3.2.3.1-8-4）。

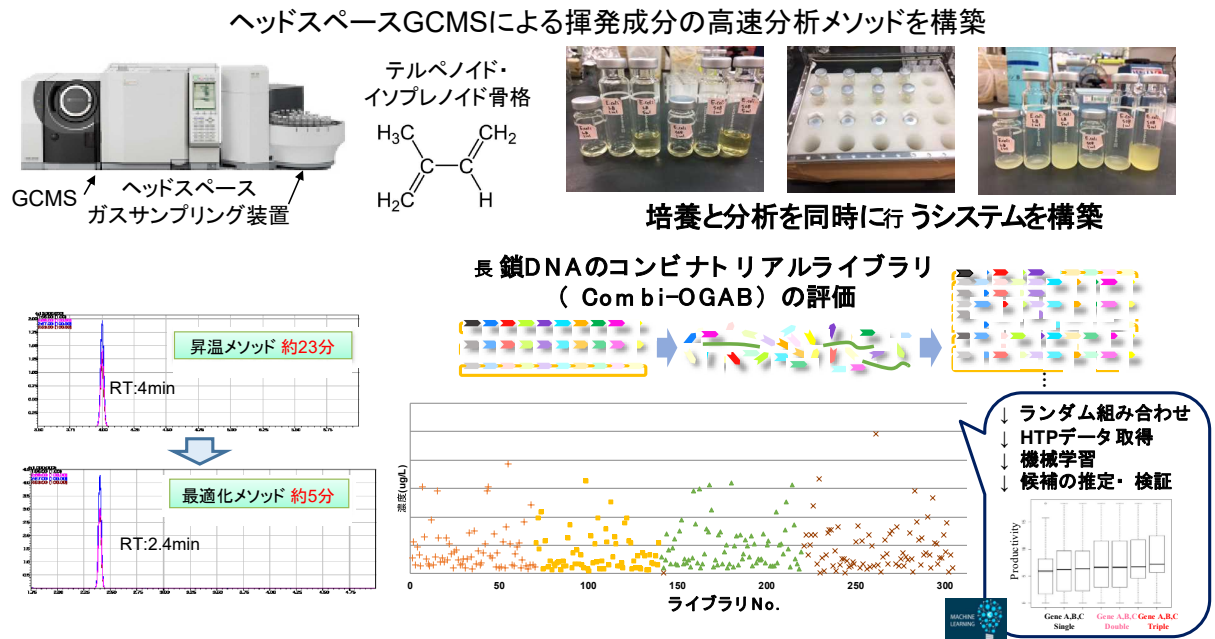


図 3.2.3.1-8-4 Combi-OGAB によるリモネン生産大腸菌の MEP 経路発現量のライブラリ化・高速分析と得られたデータの機械学習による候補推定

評価系のネットワーク化 (2019-2020 年度)

ハイスループット技術により導出される生産性・メタボローム等の膨大な分析データの管理と菌株情報の紐付けには多大な時間と労力を要する。そこで、菌株情報と各種分析データを自動で取得・紐付けして、研究開発課題ごとに管理・集約し、共通のインターフェイスでアクセス・共有が可能な統合データ管理システムを構築した。特に、本 NEDO スマートセルプロジェクトの研究に即して DBTL (Design-Build-Test-Learn) の流れに沿ってデータを登録できる独自のシステム (神戸大学統合データ管理システム: KIDS と命名) を開発した (図 3.2.3.1-8-5)。

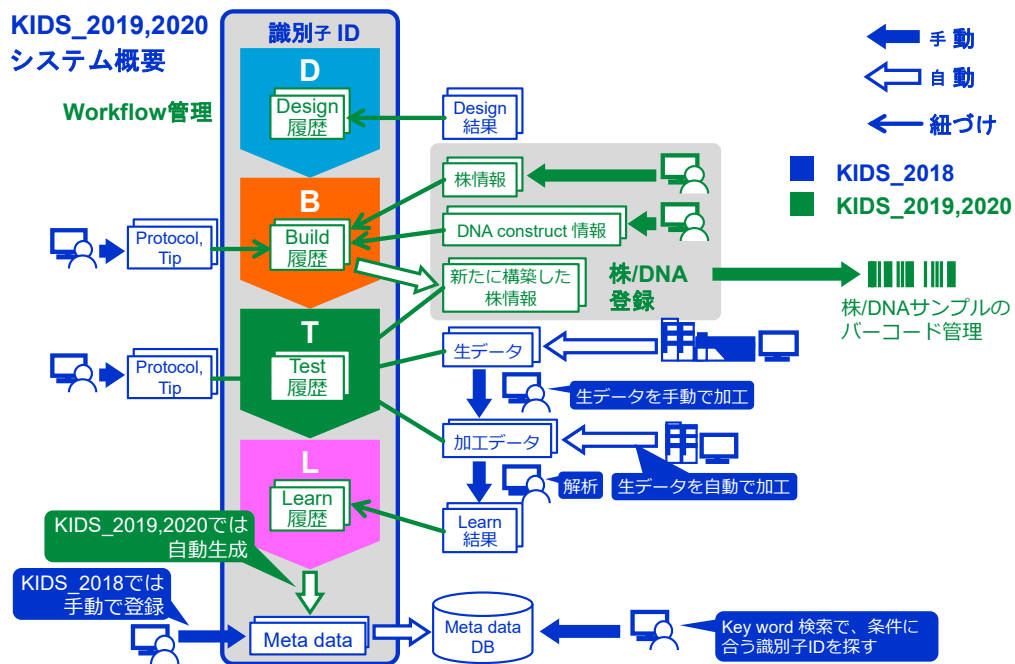


図 3.2.3.1-8-5 神戸大学統合データ管理システム (KIDS) 2019 年度版、2020 年度版の概要

本データ管理システムでは、まず実験を区別するための ID (識別子 ID) として、プロジェクトの課題番号 (e.g., (1)-5 ハイスループット微生物構築・評価技術の開発) や、実験カテゴリ (e.g., カロテノイド_大腸菌破壊株)、実験テーマ (e.g., Keio ライブラリ網羅的評価_Lycopene) などの情報を登録する。また、同様の画面から DNA や株についても、詳細な情報を登録することができ、検索も可能である。また、DBTL の実験の流れに沿ってデータや情報を登録でき、wet の研究者が入力したい情報も細かく設定できるなど、ユーザー視点で使いやすい仕様やインターフェイスを多数組み込む努力をしている。さらに、どのような DBTL ワークフローを組んだかひと目で分かる overall 確認画面も実装した。

2019 年度に作成したプロトタイプ of KIDS をベースに、2020 年度は各種の改良を行った (図 3.2.3.1-8-6)。具体的には、「ユーザーインターフェイス (UI) の刷新」や、「株・DNA の編集機能の実装」、株の構築履歴を追跡できる「Tree 表示機能の実装」、関連情報にワンクリックで移動できる「参照機能の強化」、外部機関との連携で必須となる「アクセス制限機能の実装」、面倒なマスタ管理を簡単に実行できる「マスタメンテナンス機能の実装」、登録済みの株・生成した TF 株から、新たな Plate・Tube を作成することができる「ピックアップ登録機能の実装」、登録時の入力を自動でアシストする「登録アシスト補助機能の実装」、検索画面に戻らなくてもデータ登録画面で検索が可能な「独立検索機能の実装」、外国人ユーザーも利用できるようにした「英語版 UI の実装」、などの改良・新たな機能の追加を実施した。これらの改良により、ユーザービリティが格段に向上した。

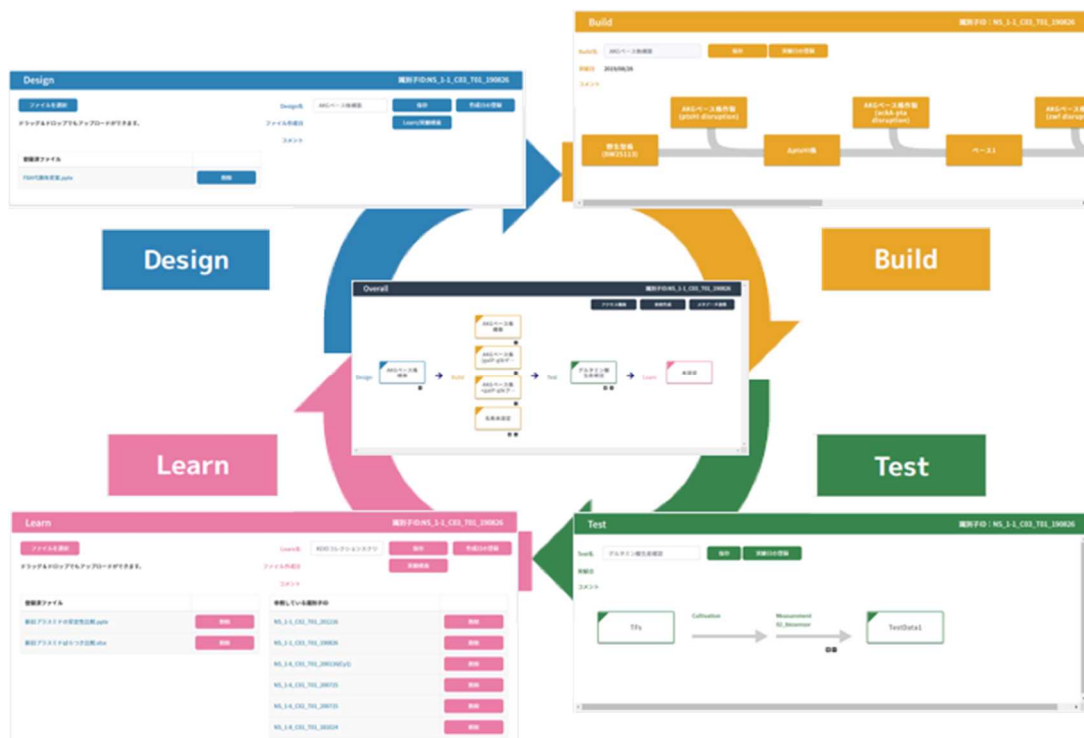


図 3. 2. 3. 1-8-6 新しい KIDS のユーザーインターフェイス (2020 年度版)

KIDS は 2019 年度より開発を開始したため、本格的に使用できるようになったのはつい最近であるが、現在、(1)-1 シャーシ株高速育種法の開発と実証や、旧(1)-5 ハイスループット微生物構築・評価技術の開発、で得られたデータを実際に登録しており、wet のチーム内でもデータや構築した菌株情報の共有に極めて役に立っている。また、京都大学（荒木）と日立製作所（伊藤）らの (2)-4 文献・公開・測定データを利用した知識ベースと連携して、KIDS に格納されている (1)-1 の α -ケトグルタル酸 (α -KG) やチロシンを高生産するシャーシ株開発のデータを(2)-4 と共有し、そのデータを元に新たな設計改変提案を受けており、現在検証を進めている。このように、本データ管理システムは、データ管理にかかる労力の大幅削減と wet-dry 研究者間の情報共有のスムーズ化に貢献し、スマートセル開発のための重要なコアとして機能する。

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	1	3	0	1	0	0
2018	0	1	3	0	2	0	0
2019	1	0	10	1	1	0	1
2020	2	2	5	1	1	0	2

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	0	0	0
2019	1	0	0
2020	1(見込)	0	1

課題名：C(1)-9 植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発/高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発

担当機関：筑波大学、ニコンソリューションズ、製品評価技術基盤機構

(1) 背景と目的

物質生産性などの代謝変化を一細胞レベルで分析・評価出来る技術を開発することで、革新的なハイスループット細胞分析・評価システムの基盤構築を行う。これまで、目的物質高生産菌の取得には、育種（形質転換等）を施した形質転換体を単離し96穴プレートなどで培養し、代謝産物を定量分析するため、煩雑な機器（操作）と多くの時間がかかっている。そのためにハイスループットスクリーニング（HTS）が米国を中心に発展してきた。現在、ロボット工学を取り入れたHTS自動化システムが主流になっている。しかし、それらは培養・代謝物解析などの一連の流れを小型化・自動化したにすぎない。つまり、HTSの中からヒットする細胞（およびその細胞が産生する代謝物）を選択するには培養を介さざるをえないのが現状である。

本課題では、目的物質高生産による細胞内の代謝の変化を非破壊で一細胞を評価することを目指す。よって、培養を介さずあるいは細胞が混合のまま高生産菌を確認することが出来、飛躍的時間短縮のみならず、一細胞で評価が可能となることから、これまでのHTSから次元の異なる革新的次世代ハイスループット評価技術の基盤となることが期待される。

さらに、本事業の成果は、得られた細胞ごとの自家蛍光プロファイルのデータベース化（リファレンスとして利用）につながる。つまり、微生物自家蛍光データのデータベース構築のための国際規格策定に資することが期待される。

以上、本課題のゴールイメージは、培養を介さず一細胞レベルで有用株を見出す非破壊評価系を構築することで、革新的次世代ハイスループット細胞評価技術の基盤創製を行うことである。

(2) 位置づけ、目標値

自家蛍光パターンを目印として異なる代謝などの性質をもった細胞を見分ける新しい手法「Meta-Spectral Imaging法」（特願2016-249896）を利用して、物質生産性などの代謝変化を一細胞レベルで分析・評価出来る技術を開発することで、革新的なハイスループット細胞分析・評価システムの基盤構築を行う。細胞内のタンパクや代謝産物は様々な種類・強弱の自家蛍光を発しており、それらを総合した各細胞の自家蛍光パターン（面）が細胞の代謝を表現する“指紋”として機能することを見いだしており、よって、一細胞ごとの非破壊評価が可能となる。通常の蛍光イメージングでは、細胞内の様々な物質から発せられる蛍光を分離することができず、これらが混合した光の強弱だけを測定しており、結果として、細胞内の特徴となる蛍光波長のパターンを捉えることが出来なかった。

これに対して、本技術では蛍光を色（波長）ごとに分離することで、個々の物質に由来する蛍光を検出し、さらにその励起波長を少しずつ変えながら行うことで、一細胞から発せられる様々な種類の蛍光を網羅的にスキャンできるのが特色である。その結果、細胞内のタンパクや代謝産物を総合した自家蛍光パターンを面として捉えることが出来、細胞の物質生産の強弱の判定が細胞を殺さずに培養を介さず行う事が可能となった。本研究では、この手法を有用微生物のハイスループットスクリーニングに応用するための基盤を創製する。具体的には、微生物変異株を用いたシステム評価系の構築、3次元画像処理評価系の構築、多点選択的スキャン制御の開発を行う

ことで、「Meta-Spectral Imaging 法」の高速化と高感度化を図り、ハイスループット細胞分析・評価システムの基盤構築を行う。

①微生物変異株を用いたシステム評価系構築のための情報収集とマーカー開発（担当：筑波大学）

システムの有効性を検証するために、すでに本「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」（以下、「スマートセルPJ」と略す）で使用されている微生物を使用し研究を進める。具体的には、酵母において脂質生産性が変化した変異株と、大腸菌においてアミノ酸生産性が変化した変異株を用いる。1年目には、生産性が大幅に異なるもの、すなわち非生産株と過剰生産株を用いる。生産性が大幅に異なるものを用いて、自家蛍光パターンに現れる有用物質生産性の特徴を把握する。

3次元空間中に分布する細胞一つ一つの自家蛍光パターンを観測して記録する。これは共焦点顕微鏡を用いて特殊なスキャン（断層撮影）をして得る。具体的には自家蛍光パターンを観測するために、複数の励起波長で順番に細胞を照明し、それぞれの励起波長について戻ってきた蛍光の強さと波長つまりスペクトルを記録する。特別に作成した顕微鏡制御アルゴリズムを用いて、この際に同時に共焦点反射顕微鏡法を用いて細胞の位置情報も記録する。

2年目には、各種有用物質の生産能が段階的に異なる変異株群について進める。具体的には、非生産株と過剰生産株の中間的な生産量の株や、あるいは中間代謝産物を蓄積する株などを用いて、生産性のより微妙な違いが自家蛍光パターンに与える影響を検証する。また、各種培養（培地）条件を変えた場合や、増殖時期が異なる場合の自家蛍光パターン取得を行い、全てのデータベース化に取り組む。

その他、本事業はスマートセルPJの既存の各開発テーマにおける発現制御技術開発などの細胞育種に柔軟に対応したい。

（2017年度目標）

- 各種有用物質の生産能が段階的に異なる変異株群を用いて、生産性のより微妙な違いが自家蛍光パターンに与える影響を検証し、現状のシステムで達成可能な判別解像度を明らかにする。

②3次元画像処理評価系の構築（担当：筑波大学）

顕微鏡制御ソフトウェアの評価のために、3次元共焦点画像データから自家蛍光を一細胞レベルで取得して機械学習で解析する画像処理評価系を構築する。具体的にはまず共焦点反射顕微鏡法を用いて得られた細胞の位置情報を利用して、個々の細胞の内部から発せられた蛍光のスペクトルを抽出し、細胞ごとに発している蛍光を網羅的にカタログ化する。このプロセスは顕微鏡撮影の後に画像解析として行う。識別を行うためには、機械学習モデルを訓練するフェイズ（学習フェイズ）では、予めカテゴリ分けされた自家蛍光パターン（教師データ）を与えて訓練する。判別フェイズでは、与えられた未知の一細胞自家蛍光パターンがどのカテゴリに属するかを識別させる。また上記①で有用物質生産性の変異株群を用いて、顕微鏡制御ソフトウェアの実用性を検証し、チューニングを進め完成させる。

（2018年度目標）

- 3次元空間中に分布する細胞一つ一つの自家蛍光パターンを再構築する。

③多点選択的スキャン制御の開発（担当：株式会社ニコンソリューションズ）

選択的範囲に特化した励起を可能にする制御系の開発と、微生物の形態・スペクトラム・微生物間のデータベース構築の関連ソフトウェア開発を行う。具体的には、選択的範囲に特化した励起による画像取得の高速化のために、一度共焦点顕微鏡でスキャンしたあとに、特定領域のみをプロジェクター技術を用いて証明する制御系を開発する。これにより2次元の取得時間分解能を向上させる。さらに、2年目には液体レンズを用い制御系も含めた開発を実施し、3次元の取得時間分解能を上げることがめざす。微生物の形態・スペクトラム・微生物間のデータベース構築のために、細胞領域、形態認識システムを構築する。具体的にはNikonでiPSCにおいて実績のある早期識別ソフトウェアCLQをベースに対象微生物向けに機械学習を実施することにより、視野内の細胞の90%から自家蛍光と形態の情報を抽出することを目指す。現状ではこの網羅率は30%であり、これを向上させること時間あたり、スキャンあたりのスループットを向上させることも見込む。これに加え、製品化を意識し、特別な訓練なく使えるユーザーインターフェースを整備し、汎用化を目指す。

2017～2018年度の成果概要

2017-2018年度において、微生物細胞自家蛍光プロファイル解析基盤の構築を進めた。まず、本プロジェクトにおいて対象微生物である油脂高生産酵母について進めたところ、細胞ごとに自家蛍光プロファイルの取得することが出来、さらにAI技術等を導入することで、高生産分泌型細胞、蓄積型細胞などの評価に成功した。

実施項目④自家蛍光プロファイル解析の高度化および汎用化の基盤構築開発

（2019年度の目標）

- 微生物の形質に関与する自家蛍光プロファイルを収集するための技術基盤開発

（2019年度実施内容）

- 各種微生物細胞自家蛍光プロファイルデータの取得（微生物細胞5種以上）
- データ解析等を行うAIプログラム等の精度向上

（2020年度目標）

- 生理機能を自家蛍光プロファイルから予測するためのソフト・ハードの開発

（2020年度実施内容）

- 有用物質を生産する菌と、その類似菌での自家蛍光プロファイルデータ取得（1モデルケース）
- 自家蛍光プロファイルから類似菌の有用物質産生の有無を予測するモデルの構築

実施項目⑤ハイスループット化に向けたシステム改良

（2019年度の目標）

- ハイスループットに向けたシステム改良

(2019 年度実施内容)

- S/N 比向上のための光学系の改良 (2018 年度末と比較して S/N 比 1.5 倍以上向上)
- ノイズの低減等を実現するソフト改良

(2020 年度目標)

- ハイスループットに向けたソフト改良

(2020 年度実施内容)

- ユーザーインターフェイスの改良
- 細胞解析精度向上のための対象観察領域拡大

実施項目⑥自家蛍光プロファイルによる生理機能予測のための基盤構築

(2019 年度の目標)

- 各系統のプロファイルの解析と生理学的知識の比較

(2019 年度実施内容)

- 各種系統群の代表的細胞の自家蛍光プロファイルデータ取得法の構築
- 自家蛍光プロファイルと生理学的知見の比較 (5 サンプル以上)

(2020 年度目標)

- 自家蛍光プロファイルによる生理機能の回帰分析モデルの基盤構築

(2020 年度実施内容)

- 有用物質を生産する場合としない場合との比較検証 (1 モデルケース) と回帰分析モデルの作製

(3) 全体計画

事業項目	2017年度				2018年度			
	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期
①微生物変異株を用いたシステム評価系の構築		→						
				①-1 ①-2				
					→			
②3次元画像処理評価系の構築		→						
				②-1				
③多点選択的スキャン制御の開発		→						
				③-1 ③-2				
					→			

①の実施内容

システムの有効性を検証するために、すでに本 NEDO プロジェクトで使用されている油脂酵母あるいは大腸菌などを使用し、各種自家蛍光パターンを共焦点顕微鏡を用いた特殊なスキャン(断層撮影)をして得る。2年目は、さらに生産性のより微妙な違いが自家蛍光パターンに与える影響を検証する。

2017年度目標

①-1 酵母において脂質生産性が変化した変異株を用いて、自家蛍光パターンに現れる有用物質生産性のマーカーを把握する。

①-2 大腸菌においてアミノ酸生産性が変化した変異株を用いて、自家蛍光パターンに現れる有用物質生産性のマーカーを把握する。

2018年度目標

①-3 各種有用物質の生産能が段階的に異なる変異株群を用いて、生産性のより微妙な違いが自家蛍光パターンに与える影響を検証する。

② の実施内容

顕微鏡制御ソフトウェアの評価のために、3次元共焦点画像データから自家蛍光を一細胞レベルで取得して機械学習で解析する画像処理評価系を構築する。

2017年度目標

②-1 3次元空間中に分布する細胞一つ一つの蛍光スペクトルを取得する。

2018年度目標

②-2 3次元空間中に分布する細胞一つ一つの自家蛍光パターンを再構築する。

③ の実施内容（担当：株式会社ニコンソリューションズ）

選択的範囲に特化した励起を可能にする制御系の開発と、微生物の形態・スペクトラム・微生物間のデータベース構築の関連ソフトウェア開発を行う。

2018年度目標

③ -1 機械学習のソフトウェアを用いることにより、視野内網羅率99%（現状30%）を目指す。

③ -2 プロジェクター技術を用いて時間分解能の向上を目指す。

2018年度目標

③ -3 液体レンズを用いて高速3次元制御系を実現し時間分解能を更に向上させる。

2017～2018年度の成果概要

2017-2018年度において、微生物細胞自家蛍光プロファイル解析基盤の構築を進めた。まず、本プロジェクトにおいて対象微生物である油脂高生産酵母について進めたところ、細胞ごとに自家蛍光プロファイルの取得することが出来、さらにAI技術等を導入することで、高生産分泌型細胞、蓄積型細胞などの評価に成功した。

事業項目	2019 年度				2020 年度			
	第 1 四半 期	第 2 四半 期	第 3 四半 期	第 4 四半 期	第 1 四半 期	第 2 四半 期	第 3 四半 期	第 4 四半 期
④自家蛍光プロファイル解析の高度化および汎用化の基盤構築開発	→							④-i ④-ii ④-iii
⑤ハイスループット化に向けたシステム改良	→							⑤-i ⑤-ii
⑥自家蛍光プロファイルによる生理機能予測のための基盤構築	→							⑥-i ⑥-ii ⑥-iii

実施項目④自家蛍光プロファイル解析の高度化および汎用化の基盤構築開発

(2019 年度の目標)

- 微生物の形質に関する自家蛍光プロファイルを収集するための技術基盤開発

(2019 年度実施内容)

- 各種微生物細胞自家蛍光プロファイルデータの取得 (微生物細胞 5 種以上)
- データ解析等を行う AI プログラム等の精度向上

(2020 年度実施内容)

- 有用物質を生産する菌と、その類似菌での自家蛍光プロファイルデータ取得 (1 モデルケース)
- 自家蛍光プロファイルから類似菌の有用物質産生の有無を予測するモデルの構築

実施項目⑤ハイスループット化に向けたシステム改良

(2019 年度の目標)

- ハイスループットに向けたシステム改良

(2019 年度実施内容)

- S/N 比向上のための光学系の改良 (2018 年度末と比較して S/N 比 1.5 倍以上向上)
- ノイズの低減等を実現するソフト改良

(2020 年度目標)

- ハイスループットに向けたソフト改良

(2020 年度実施内容)

- ユーザーインターフェースの改良
- 細胞解析精度向上のための対象観察領域拡大

実施項目⑥自家蛍光プロファイルによる生理機能予測のための基盤構築

(2019 年度の目標)

- 各系統のプロファイルの解析と生理学的知識の比較

(2019 年度実施内容)

- 各種系統群の代表的細胞の自家蛍光プロファイルデータ取得法の構築
- 自家蛍光プロファイルと生理学的知見の比較 (5 サンプル以上)

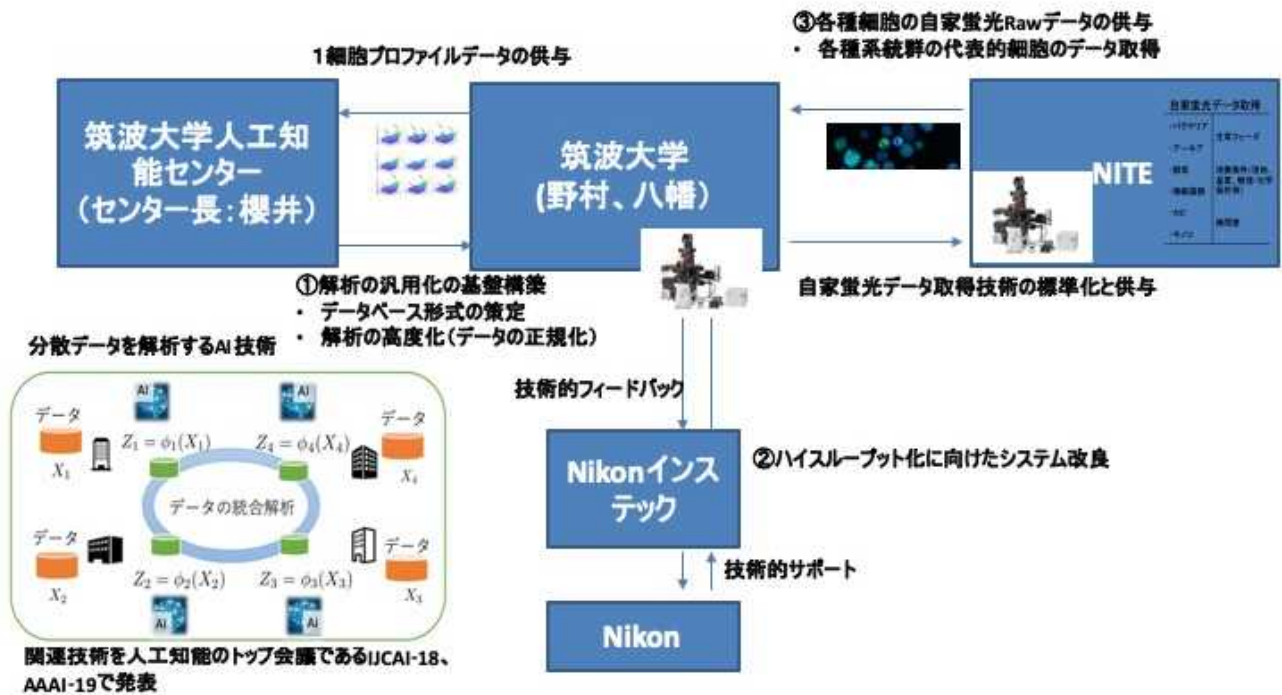
(2020 年度目標)

- 自家蛍光プロファイルによる生理機能の回帰分析モデルの基盤構築

(2020 年度実施内容)

- 有用物質を生産する場合としない場合との比較検証 (1 モデルケース) と回帰分析モデルの作製

(4) 実施体制



(5) 運営管理

半年に一度程度の頻度で全体会議および拠点会議（神戸拠点）をそれぞれ実施しており、各研究テーマとの連携や互いの要望について議論を行なっている。また、筑波大学 - ニコンソリューションズ-NITE では1ヶ月に1回程度の頻度で報告会(オンライン含む)を実施しており、進捗を共有している。

(6) 実施の効果

微生物は、健康・食・油脂酵母・環境などさまざまシーンで活躍できる潜在力を秘めており、科学的に Biomicro を人類が活用して得られる対価は計り知れない。それら全ての分野において、生の(微生物)サンプルをマーカーレスで非破壊・非侵襲でそのまま、同定・機能の差別化出来ることが強く望まれている。しかし、現状ではそれは不可能と考えられている。よって、現時点では市場が形成されておらず本製品により市場が新規に創造される。

7) 最終目標の達成度

研究開発項目 (担当)	研究内容	目標値	実績/進捗度 (%) (3月末見込み)	達成度
i. 各種微生物細胞自家蛍光プロファイルデータの取得 (筑波大学)	<i>L. starkeyi</i> 細胞油脂生産培養系の確立および、自家蛍光プロファイルデータの撮影を行う。併せて <i>L. starkeyi</i> 基準株細胞自家蛍光プロファイルデータの抽出を行う。	各種微生物細胞自家蛍光プロファイルデータを取得する (5 カテゴリー)。 <i>L. starkeyi</i> 細胞の油脂生産培養系を確立し、経時的な自家蛍光プロファイルデータを撮影する。撮影したデータから、経時的な自家蛍光プロファイルの再構築を行う。	<i>Lipomces</i> 属、 <i>Lipomyces</i> 属以外の油脂酵母、色素生産菌、不飽和脂肪酸蓄積ラビリンチュラ及び PHB 蓄積細菌の自家蛍光プロファイル取得を検討し、課題抽出を行った。 <i>L. starkeyi</i> 細胞の油脂生産培養系が確立したことを同時染色技術で確認した。また経時的な自家蛍光プロファイルデータの撮影に成功し、油脂生産時期と油脂分解時期それぞれの特徴を反映する自家蛍光プロファイルの経時データを再構築した。(100%)	◎
ii. データ解析等を行う AI プログラム等の精度向上 (筑波大学)	<i>L. starkeyi</i> 細胞自家蛍光プロファイルデータの非線形モデルによるクラスタリングを行う。	経時的な自家蛍光プロファイルから、油脂生産時期と油脂分解時期を推定する基盤となる非線形モデルを構築する。	経時的な自家蛍光プロファイルから、油脂生産時期と油脂分解時期だけではなく、培養開始後の経過時間 (日) までも高精度に推定できる非線形モデルの構築に成功した。(100%)	◎
iii. 自家蛍光プロファイル解析の高度化および汎用化の基盤構築開発 (筑波大学)	有用物質を生産する菌と、その類似菌での自家蛍光プロファイルデータ取得 (1モデルケース) 自家蛍光プロファイルから類似菌の有用物質産生の有無を予測するモデルの構築	生理機能を自家蛍光プロファイルから予測するためのソフト・ハードの開発 (1モデルケース)	有用物質を生産する菌と、その類似菌での自家蛍光プロファイルデータを取得した (1モデルケース) 自家蛍光プロファイルから類似菌の有用物質産生の有無を予測するモデルの構築した (100%)	◎

研究開発項目 (担当)	研究内容	目標値	実績/進捗度 (%) (3月末見込み)	達成度
i. S/N比向上のための光学系の改良 (ニコソリューションズ)	S/N比向上のための光学系の改良	2018年度末と比較してS/N比1.5倍以上向上	ノイズ主要因の部位(反射防止コーティング剤)の特定し、改良に向けた検討完了、2020年1月に対策を実施予定(100%)	◎
ii. ノイズの低減等を実現するソフト改良 (ニコソリューションズ)	画像処理によるバックグラウンドノイズの低減を図る	ノイズの従来比0.8倍以下に低減等を実現する	ノイズ低減処理をソフトウェアに追加、及び細胞領域を抽出するセグメンテーションソフトを改良し、従来に比べ約2倍の検出精度を確保(100%完了)	◎
iii. ハイスループット化に向けたシステム改良	<ul style="list-style-type: none"> ・ユーザーインターフェイスの改良 ・細胞解析精度向上のための対象観察領域拡大 	<ul style="list-style-type: none"> ・ハイスループットに向けた操作性、解析精度改良 ・操作回数を1回以上減らすことが可能とするユーザーインターフェイスの改良 	<ul style="list-style-type: none"> ・ソフトウェアの新規開発により、従来2つのソフトを組み合わせて実施していた作業を1つのソフトに統合、操作回数を減らし、従来数日かかっていた評価・識別を10分から60分で実現した。 	◎
i. 各種微生物細胞自家蛍光プロファイルデータの取得(NITE)	筑波大学にのみセットアップされている自家蛍光プロファイル取得装置をNITEに導入し、 <i>L. starkeyi</i> 細胞の撮影を行う。併せて、油脂酵母における機能性データ取得のために脂肪酸成分分析環境を整える。	NITEにおいて自家蛍光プロファイル取得環境及び油脂成分分析環境を構築し、両データを取得して比較する(5サンプル以上)。	2019年9月末までに自家蛍光プロファイル取得装置を導入し、ガスクロマトグラフィーによる油性成分分析環境を構築した。 <i>L. starkeyi</i> の野生株2株と変異株2株について両分析を行い、培養条件変更を含め5サンプル以上の解析を行った。(100%)	◎

研究開発項目 (担当)	研究内容	目標値	実績/進捗度 (%) (3月末見込み)	達成度
ii. データ解析等を行う AI プログラム等の精度向上 (NITE)	筑波大学と NITE で取得する自家蛍光プロファイルデータを比較し、データ解析の精度を上げる。	筑波大学と NITE で取得した自家蛍光プロファイルデータを比較して、取得データの差異について検証する。	<i>L. starkeyi</i> の野生株 1 株と変異株 2 株の自家蛍光プロファイルデータを比較し、問題点を抽出し、データの差異を解決した。(100%)	◎
iii. 自家蛍光プロファイルによる生理機能予測のための基盤構築 (NITE)	有用物質を生産する場合としない場合との比較検証(1モデルケース)と回帰分析モデルの作製	自家蛍光プロファイルによる生理機能の回帰分析モデルの基盤構築	油脂生産酵母野生株として <i>Lipomyces starkeyi</i> 9 株、 <i>Lipomyces</i> 属別種 8 株、別属 3 株の自家蛍光プロファイルと油脂生産量のデータを取得した(1モデルケース)。油脂酵母の自家蛍光プロファイルから油脂産生を予測するモデルを構築した。(100%)	◎

(8) 研究開発の成果と意義

①微生物変異株を用いたシステム評価系構築のための情報収集とマーカー開発 (担当: 筑波大学)

酵母において脂質生産性が変化した変異株を用いて、自家蛍光パターンに現れる有用物質生産性の自家蛍光シグネチャー (マーカー) を把握した。微生物変異株を用いたシステム評価系構築のための主要ステップの一つをクリアした。

②3次元画像処理評価系の構築 (担当: 筑波大学)

ニコン製共焦点顕微鏡システムを用いて3次元空間中に分布する細胞一つ一つの蛍光スペクトルを取得する事に成功した。3次元画像処理評価系の入口部分のコンポーネントが作成された。

③多点選択的スキャン制御の開発 (担当: 株式会社ニコンソリューションズ)

細胞領域の認識精度向上の概念実証が成功した。多点選択的スキャン制御の基盤の一つが構築された。

④-i 各種微生物細胞自家蛍光プロファイルデータの取得

Lipomces 属、*Lipomyces* 属以外の油脂酵母、色素生産菌、不飽和脂肪酸蓄積ラビリンチュラ及び PHB 蓄積細菌の自家蛍光プロファイル取得を検討し、課題抽出を行った。

L. starkeyi 細胞の油脂生産培養系が確立したことを同時染色技術で確認した。また経時的な自家蛍光プロファイルデータの撮影に成功し、油脂生産時期と油脂分解時期それぞれの特徴を反映する自家蛍光プロファイルの経時データを再構築した。

④-ii データ解析等を行う AI プログラム等の精度向上

経時的な自家蛍光プロファイルから、油脂生産時期と油脂分解時期だけではなく、培養開始後の経過時間（日）までも高精度に推定できる非線形モデルの構築に成功した。

④-iii 自家蛍光プロファイル解析の高度化および汎用化の基盤構築開発

有用物質を生産する菌と、その類似菌での自家蛍光プロファイルデータを取得した。自家蛍光プロファイルから類似菌の有用物質産生の有無を予測するモデルを構築した。

⑤-i S/N 比向上のための光学系の改良

ノイズ主要因の部位（反射防止コーティング剤）の特定し、改良に向けた検討完了、2020年1月に対策を実施した。

⑤-ii ノイズの低減等を実現するソフト改良

ノイズ低減処理をソフトウェアに追加、及び細胞領域を抽出するセグメンテーションソフトを改良し、従来に比べ約2倍の検出精度を確保した。

⑤-iii ハイスループット化に向けたシステム改良

ソフトウェアの新規開発により、従来2つのソフトを組み合わせて実施していた作業を1つのソフトに統合、操作回数を減らし、従来数日かかっていた評価・識別を10分から60分で実現した。

⑥-i 各種微生物細胞自家蛍光プロファイルデータの取得

2019年9月末までに自家蛍光プロファイル取得装置を導入し、ガスクロマトグラフィーによる油性成分分析環境を構築した。*L. starkeyi* の野生株2株と変異株2株について両分析を行い、培養条件変更を含め5サンプル以上の解析を行った。

⑥-ii データ解析等を行う AI プログラム等の精度向上

L. starkeyi の野生株1株と変異株2株の自家蛍光プロファイルデータを比較し、問題点を抽出し、データの差異を解決した。

⑥-iii 自家蛍光プロファイルによる生理機能予測のための基盤構築

1モデルケースとして、油脂生産酵母野生株として *Lipomyces starkeyi* 9株、*Lipomyces* 属別種8株、別属3株の自家蛍光プロファイルと油脂生産量のデータを取得した。取得した油脂酵母の自家蛍光プロファイルから油脂産生を予測するモデルを構築した。

以上の④から⑥の成果をとりまとめたものを図3.2.3.1-9-1に示す。

**油脂産生において、青色と赤色蛍光に強い相関がある
(相関解析: 油脂生産量と相関のある蛍光波長を分析により)**

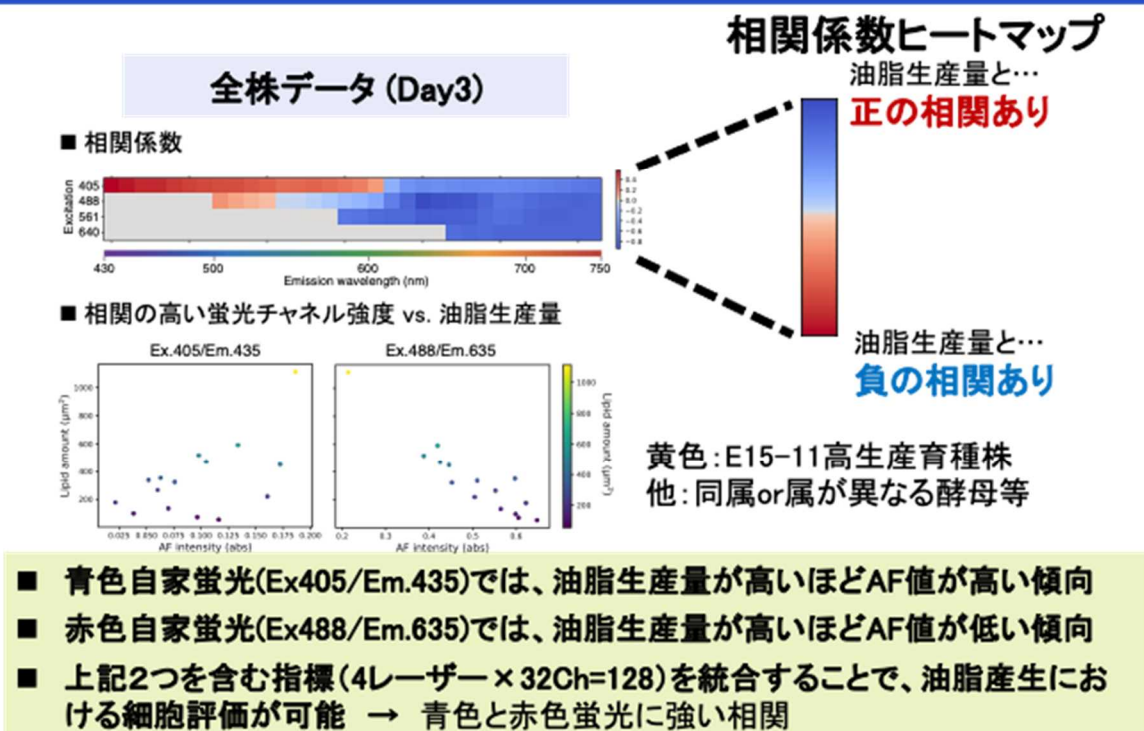


図 3. 2. 3. 1-9-1 油脂生産と相関のある自家蛍光の波長

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	-	-	-	-	-	-	-
2017	0	0	3	0	0	0	0
2018	0	0	0	0	0	0	0
2019	1	0	3	0	0	0	0
2020	1	0	5	1	0	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	-	-	-
2017	0	0	0
2018	0	0	0
2019	0	0	0
2020	1	0	0

3.2.3.2 高生産性微生物設計システムの開発

課題名：C(2)-1 代謝設計・最適化技術の開発

担当機関：理化学研究所、京都大学、産業技術総合研究所、神戸大学

(1) 背景と目的

代謝モデルを用いた物質生産改善のためのシミュレーション・解析の有用性はこれまで多く示されてきた。モデル微生物(大腸菌・酵母)など一部微生物については代謝モデルとしてゲノムスケールモデル(GSM)が提供されているが、これらのモデルも物質生産への応用面からは不完全である。実際に世界では6,000以上のGSMが開発されており、様々な生物種でデータベースが構築されつつある。しかしながら、実験データと整合性を取りながら構築したモデルの検証までを進め、一定の環境下における細胞内代謝の表現型を再現できているGSMは200弱に止まる。また、GSMが提供されていない非モデル微生物や産業宿主(放線菌、コリネ菌など)については、新たに公開データや配列・測定データから得られる情報により代謝モデルを構築する必要がある。そのため、公開データおよび配列・測定データなどから汎用的かつ高速に代謝モデルを構築する技術開発が必要である。さらに、物質生産のための代謝経路の設計にはM-pathおよびHyMepなどが開発されているが、これらの利用についてはこれまでは個々に用いられてきた。したがって、個々に開発されてきた代謝設計ツールを統合的に運用し、目的の化合物を高生産するための代謝設計をツールとしてシステム化することは必要な課題である。

一方で、より効率的な物質生産株の開発・構築には遺伝子改変候補・収率などを高い予測精度で提案するための代謝設計手法の開発が必要である。現在、GSMを用いた細胞内代謝フラックスの予測計算手法はCOBRA Tool (<https://opencobra.github.io/cobratoolbox/stable/>)において利用可能であり、30ほどの計算手法が開発・公開されている。しかしながら、これらの計算手法は、培養条件や遺伝子改変などの環境パラメーターを入力した際に、細胞内の代謝フラックスがどのようになり得るのか、または変化するののかということを予測するものであり、目的の化合物を高生産するための遺伝子改変の箇所を提案する技術になり得ていないのが現状である。既に開発されているOptKnockと呼ばれる計算手法を用いると、目的の化合物を高生産するための遺伝子改変の箇所を提案することはできるが、事前に欠損する反応箇所の候補を100程度に絞り込んでおく必要があること、専用の計算ソルバーが必要なこと、計算時間が長い実質的には5反応以上の欠損の計算はできないことなどから、あまり実用的な運用には至っていない。したがって、公開データや測定データなどから汎用的かつ高速に、目的化合物を高生産するための予測精度の高い計算手法を開発する。さらに、トランスクリプトームやプロテオームなどのオミクスデータをもとにして、次の代謝設計提案に反映する技術を開発する。これら開発した技術は、大腸菌や油脂酵母、コリネ型細菌など、各実証課題((1)-1、(3)-3~8)に適用し、その有効性を検証することで精度の評価を行う。

(2) 位置づけ、目標値

本研究項目が対象とする代謝モデル構築・解析技術の開発と実用微生物への技術展開は、研究項目としては、①代謝設計システムの高機能化および②オミクスデータを導入したFBA結果の高精度化の二つに大別される。代謝設計の位置づけは、DBTLサイクルの設計(Design)部分における目的化合物を効率良く生産する宿主及びその生産改変方策の迅速な提案である。これまでに

も、代謝モデルを用いた目的化合物の生産改善の有用性は多く示されており、代謝モデルの構築ツール、代謝シミュレーションツール、オミクスデータ反映ツールなど様々なツール・手法が現在も提案され続けている。2020年において、6,000以上の生物種のゲノムスケールの代謝モデル(GSM)が開発され、様々なデータベースで公開されているが、実験データとの整合性が取られ、細胞の表現型を比較的良好に再現できているのは200弱に止まっている。さらに、代謝設計計算手法としては30弱が開発、公開されているが、いずれもユーザーが入力する環境パラメータ、つまり、培養条件や細胞の遺伝子型によって細胞内代謝がどのような状態を取っているのか、ということの予測するツールでしかない。つまり、現状では目的の化合物の高生産化を目指した場合の代謝設計手法は完全には開発されていない、というのが現実的な問題になっている。そこで、我々は、この問題をクリアすべく、最適な代謝設計を提案する技術を開発する。そして、机上の空論ではなく実現性の高い代謝設計を提案し、個別の課題に対してハイスループットな成果創出に貢献することを目標とする。また、オミクスデータの反映ツールについては、各実証課題(1)-1、(3)-4および(3)-7と連携し、各生産宿主のプロテオームデータおよびメタボロームデータを用い、代謝フラックスの予測計算を行うことで、目的化合物のさらなる高生産化に向けた遺伝子・代謝反応の改変箇所を提案することを目標とする。

(3) 全体計画

2016年度に、代謝モデル構築については、モデル微生物に関する代謝モデルの構築として、大腸菌を対象に既知の公開データをもとに代謝ゲノムスケールモデル(GSM)の再構築を行った。代謝GSMの提供されていない産業宿主については、モデル微生物の代謝モデルをベースとして、新たに公開・測定ゲノムデータから得られる情報によりモデルを更新することで、代謝GSMの構築を行った。得られる代謝モデルをもとに、代謝流束バランス解析による収率予測の基盤構築を行った。シャーシ株構築については、グルコースからイソペンテニルニリン酸(IPP)までの連続した50を超える一次代謝遺伝子を欠損した、イソプレノイド高生産に向けた大腸菌シャーシ株に、グルコース~IPP~イソプレレン、あるいは、グルコース~IPP~セスキテルペンの代謝経路をスワッピングし、目的物質の生産性を検証することで、シャーシ株と人工ゲノムスワッピング技術の有用性を示した。また、出芽酵母のシャーシ株については、シキミ酸経路と、IPP経路についてのシャーシ株を構築するための第一段階として、共通する代謝経路である解糖系のシャーシ株構築に取り掛かった。

2017年度に、モデル微生物および産業宿主の拡張代謝モデルの構築においては、標準代謝モデルをもとに目的化合物に応じて、新規代謝経路設計・HyMepによる代謝経路拡張を行った。また、測定データ(ゲノム・トランスクリプトームなど)を拡張代謝モデルに反映させていくことで、目的化合物・宿主毎の個別代謝モデルを構築し、データベース化してきた。得られる代謝モデルをもとに、代謝流束バランス解析による収率予測と改変すべき遺伝子の提示を行うシステムを構築した。また、大腸菌のシキミ酸経路のシャーシ株を構築した。酵母シャーシ株構築について、解糖系~ペントースリン酸経路シャーシ株を構築した。

2018年度は、個別代謝モデルをもとに、代謝流束バランス解析・代謝感度解析・収率予測等を行うことで、目的化合物・宿主毎に最適な代謝経路を見出し、目的化合物・宿主毎の最適代謝モデルを構築した。

2019 年度は、様々な目的化合物・宿主に対応できる最適代謝モデルを迅速に構築するためのワークフロー及びシステムを開発した。(1)-1 課題において、大腸菌シャーシ株構築のための目的化合物を高生産するための代謝改変箇所を提案し、その有効性を確認することができた。さらに、産業利用されるコリネ細菌や油脂酵母の GSM を作成し、表現型データなどから代謝モデルを改良することで、目的産物を高生産するための代謝設計を行った。また、(2)-3 と連携し、開発されたネットワークモデルから得られた反応ボトルネックの情報をもとにして、同時に強化・または欠損すべき代謝反応箇所を提案する技術を開発した。さらに、(1)-7 と連携することによりコリネ型細菌や油脂酵母で得られた定量プロテオームデータを使って、各代謝フラックスの解空間を限定することにより、目的化合物を高生産するための次の代謝設計提案を行う技術を開発した。この技術は、(3)-4 および(3)-7 のコリネ型細菌および油脂酵母でその有効性が実証された。

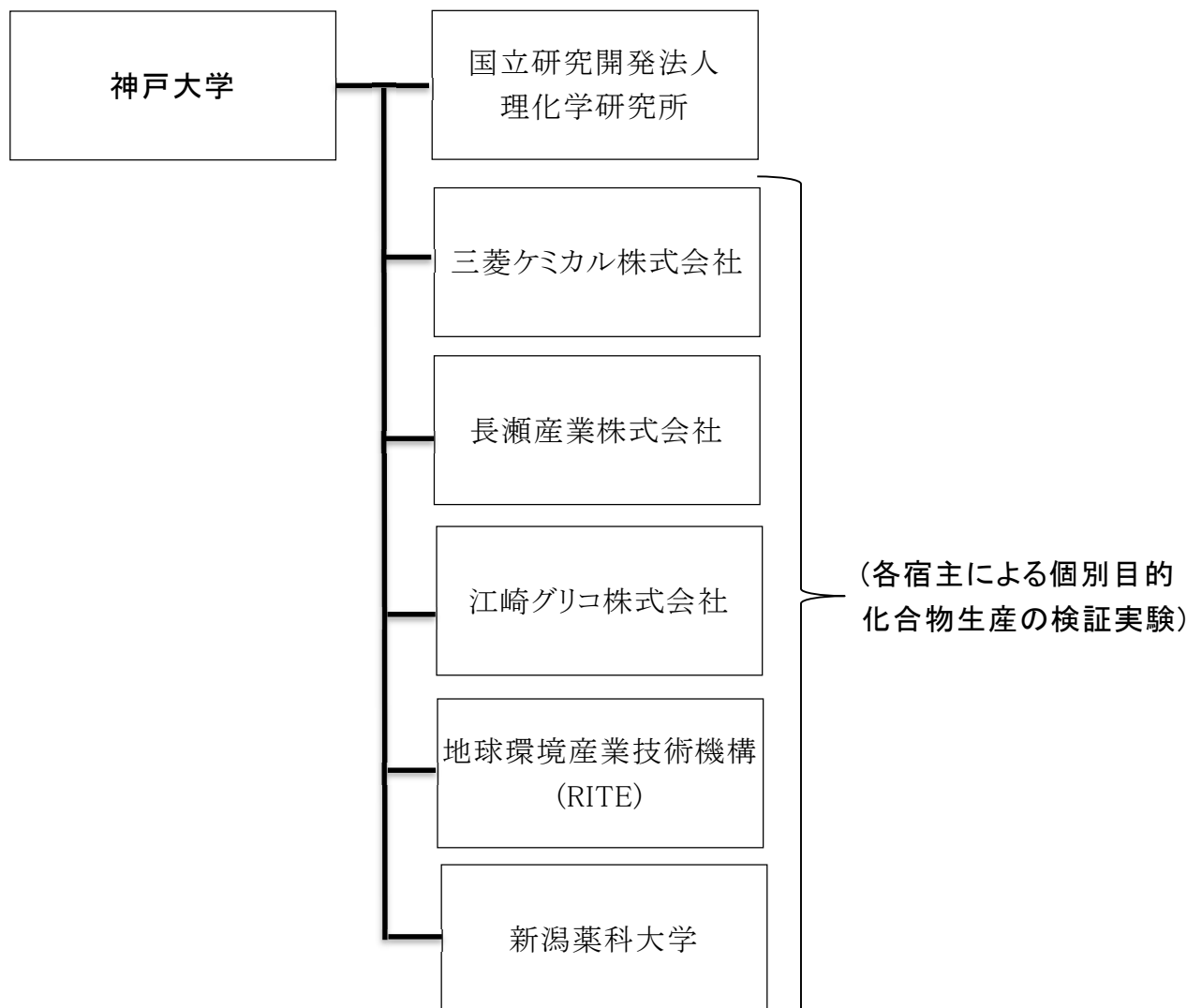
2020 年度は、代謝設計における計算ツールを高速化し、また専用のソルバーを必要としないアルゴリズムを開発した。この開発したツールを大腸菌シャーシ株や、コリネ型細菌や油脂酵母にも実用展開し設計精度の検証を行った。

(4) 実施体制

研究の実施体制としては、公開データベースなどを利用した代謝モデルの構築およびそのアルゴリズムの開発、目的化合物の生産改善のための代謝デザインなどの提案については、京都大学および理化学研究所が中心となり行った。また、代謝モデルの測定データ反映による高精度化・個別最適化については理化学研究所が中心となり、三菱ケミカル(株)、長瀬産業(株)、江崎グリコ(株)、地球環境産業技術機構(RITE)、新潟薬科大学の個別の目的化合物について情報を共有し研究を進めた。

(代謝モデル構築・高精度化)

(代謝モデル構築・高精度化)



(5) 運営管理

テーマの運営に関しては、神戸大学および理研と有効性検証担当機関(三菱ケミカル、長瀬産業、江崎グリコ、RITE、新潟薬科大学)との間で、1 カ月に一度を目安に連絡会議を実施し、開発進捗を共有した。また、更に、四半期に一度全体の情報を共有化し、各課題の進捗を共有した。これまでに代謝モデルによるシミュレーションから得られた予測を各機関で検証し、得られた知見をフィードバックすることで代謝モデルの高精度化が図られた。

(6) 実施の効果

本研究項目における代謝モデルを用いた高生産性微生物の構築は、本プロジェクトにおいて、目的化合物生産のための菌株開発を効率化するための技術である。これらの技術の適用により、開発期間が短縮されれば、従来の開発期間に生じていた開発コスト(費用、CO₂の排出量やエ

エネルギー消費量など)の削減にも大いに寄与すると考えられる。また、これらの技術は汎用性が高いため、本プロジェクト以外でもその適用が期待できる。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目	現状 (2021年2月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
①代謝設計システムの高機能化を実現	代謝設計システムとして、ゲノムスケールの代謝モデルをベースに反応の追加・削除などエクセルフォーマットを通して、他のツールとの連携を可能している。 特殊なソルバーや有償のソフトウェアの必要のない、多重変異を高速に提案できる新たな代謝設計手法の開発が完了している。	個々の代謝設計ツールを連携させ、目的化合物の合成経路の探索から細胞内代謝の最適化までを、ニーズに合わせて利用できるツールを実用化する。 5重変異以上の代謝設計を実現する技術を開発する。	◎大きく上回って達成
②オミクスデータを導入したFBA結果の高精度化を実現	オミクスデータのうち最も表現型に近いプロテオームデータを代謝設計計算にフィードバックすることにより、目的化合物の高生産に向けた新たな設計提案ができています。	有効性検証課題テーマ2件以上に対し、プロテオームデータをフィードバックした代謝設計提案を行う。	◎大きく上回って達成

(8) 研究開発の成果と意義

■ 代謝モデル構築

2016年度にモデル微生物である大腸菌の代謝モデルを公開データなどを利用し再構築した。代謝モデルの再構築には開発中のツールである GSM generator を使用した(図 3.2.3.2-1-1)。このツールは公開データ(KEGG などのデータベースを含む)を用い指定した菌株について代謝フラックスバランス解析によるシミュレーションが可能な代謝モデルを出力することを目指している。しかしながら、シミュレーションに供するには、反応の追加・削除、修正などが必要であった。そこで大腸菌の代謝モデルをシミュレーションに供するために施した修正方策から得られたノウハウを用い、産業宿主(放線菌、コリネ菌)についての代謝モデルを構築した。2017年度に

は本プロジェクト構築した代謝モデルの妥当性検証を実施した(図 3.2.3.2-1-2)。また、代謝モデルを目的化合物の生合成経路を追加したモデルへと拡張し、目的化合物生産改善のために改変すべき遺伝子の提案や収率予測を実施した。具体的には、カロテノイド(神戸大)、イソプレノイド(三菱ケミカル)、機能性アミノ酸(長瀬産業)、芳香族化合物(RITE)などである。2018年度はこれまでに構築した代謝モデルとそれらに基づく予測の検証実験の結果(オミクスデータを含む)などからモデルの高精度化を図り、目的化合物・宿主毎の最適代謝モデルを構築した。

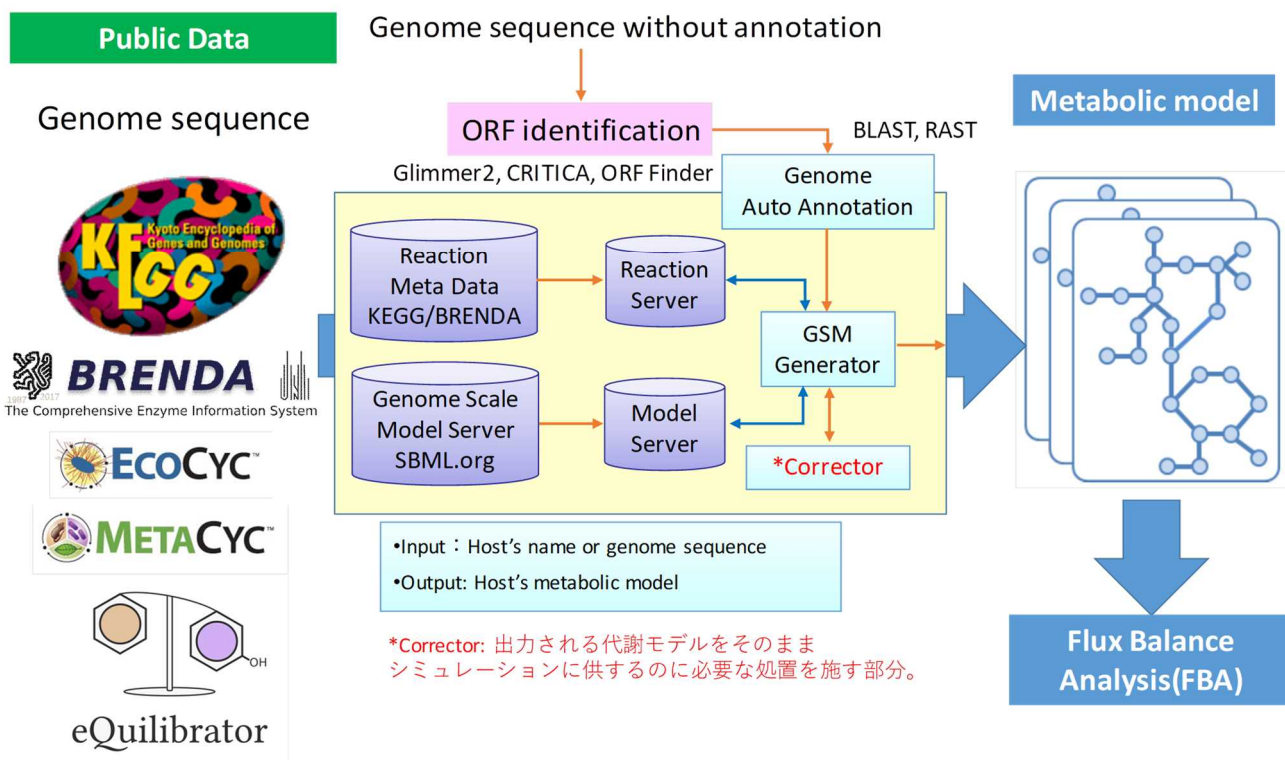


図 3.2.3.2-1-1 代謝モデル構築ツール GSM generator によるモデル構築フロー

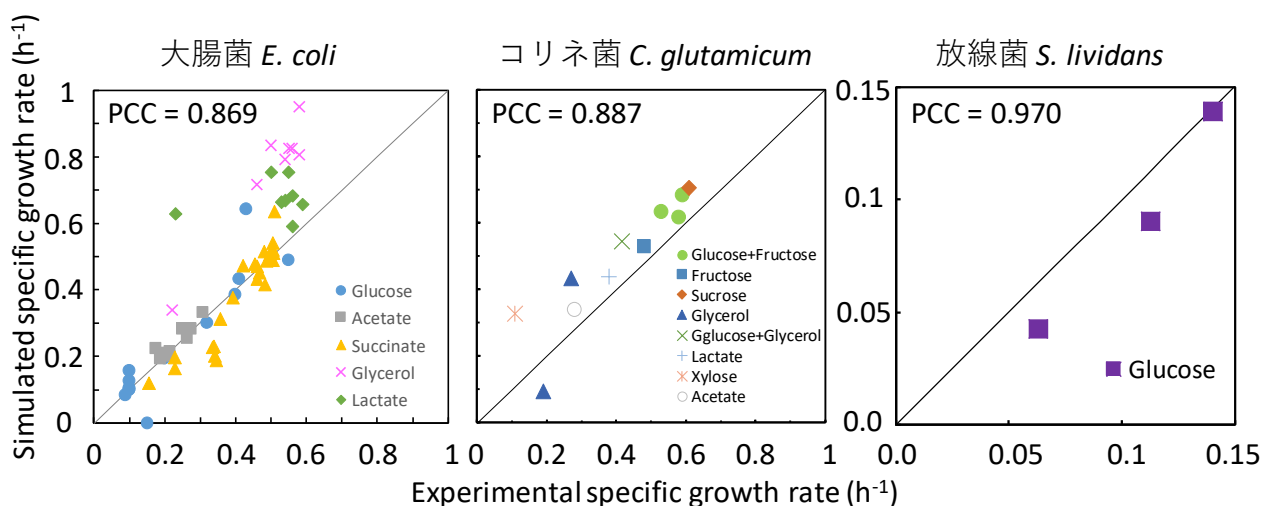


図 3.2.3.2-1-2 構築した代謝モデルの妥当性検証例。横軸が実験値、縦軸がシミュレーション値を示しており、対角線に近いほど予測精度が高いことを示している。PCC はピアソン積率相関係数を示している。

2019年度は、様々な目的化合物・宿主に対応できる最適代謝モデルを迅速に構築するためのワークフロー及びシステムを開発した。

FBAによる代謝設計のための相互機能化

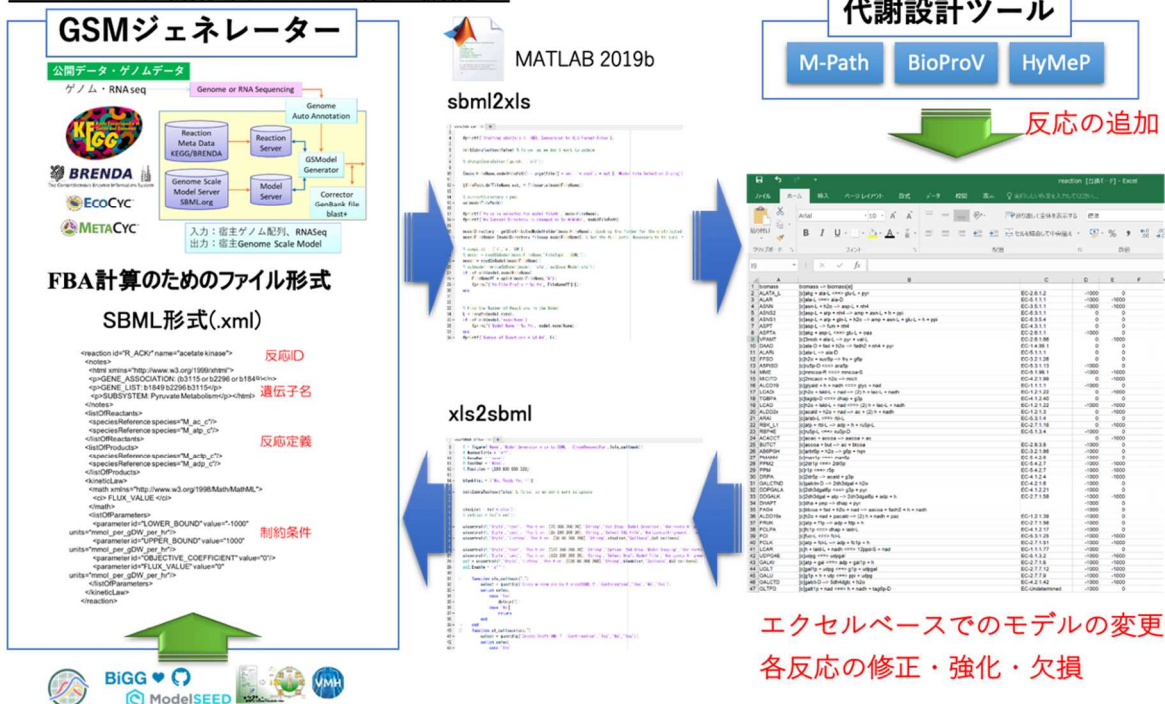


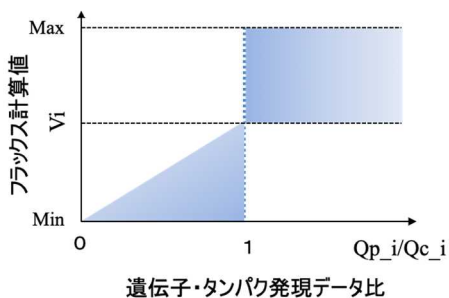
図 3. 2. 3. 2-1-3 代謝設計計算のためのワークフロー。GSMをベースに反応の追加・削除などエクセルフォーマットを通して、他のツールとの連携を可能にしている。

これらのワークフローにもとづいて、プロジェクト内の目的化合物を生産する大腸菌シャーシ株を構築し代謝設計技術の精度の検証を行った。さらに、産業利用されるコリネ細菌や油脂酵母のGSMを作成し、表現型データなどから代謝モデルを改良することで、目的産物を高生産するための代謝設計を行った。さらに、オミクスデータを代謝設計計算に反映する手法の開発を行った (図 3. 2. 3. 2-1-4)。

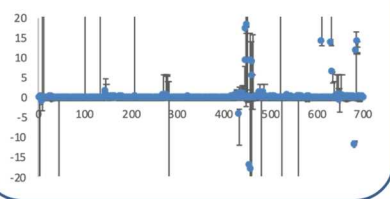
オミクスデータのFBA解析への導入

Control vs. 目的の生産株
遺伝子・タンパク発現オミクスデータ値：
(Q_{c_i}) vs. (Q_{p_i})

FBA解空間の限定



各フラックス値の取り得る範囲 (解空間)



発現量が低下: 該当フラックス上限を限定

$$Vi_Upperbound = Vi \times \left(\frac{Q_{p_i} + Q_{p_i} \times Error_p_i}{Q_{c_i} - Q_{c_i} \times Error_c_i} \right) \text{ if } < 1$$

発現量が上昇: 該当フラックス下限を限定

$$Vi_Lowerbound = Vi \text{ if } \left(\frac{Q_{p_i} - Q_{p_i} \times Error_p_i}{Q_{c_i} + Q_{c_i} \times Error_c_i} \right) > 1$$

$$Error = \text{STD}/\text{Val}_i$$

FBA計算による代謝設計の再提案へ

図 3.2.3.2-1-4 オミクスデータの代謝設計計算への反映方法。トランスクリプトームおよびプロテオーム解析による各フラックスが取りうる値の範囲（解空間）を限定することにより、代謝の再設計が可能になる。

また、他の情報解析ツールであるネットワーク解析技術（(2)-3）と連携し、ネットワーク解析により抽出されたボトルネックのフラックスに対する他の残りのフラックスの感度解析を行い、同時に強化すべき、または減衰・欠損すべき反応の抽出、再設計のための提案を行った。

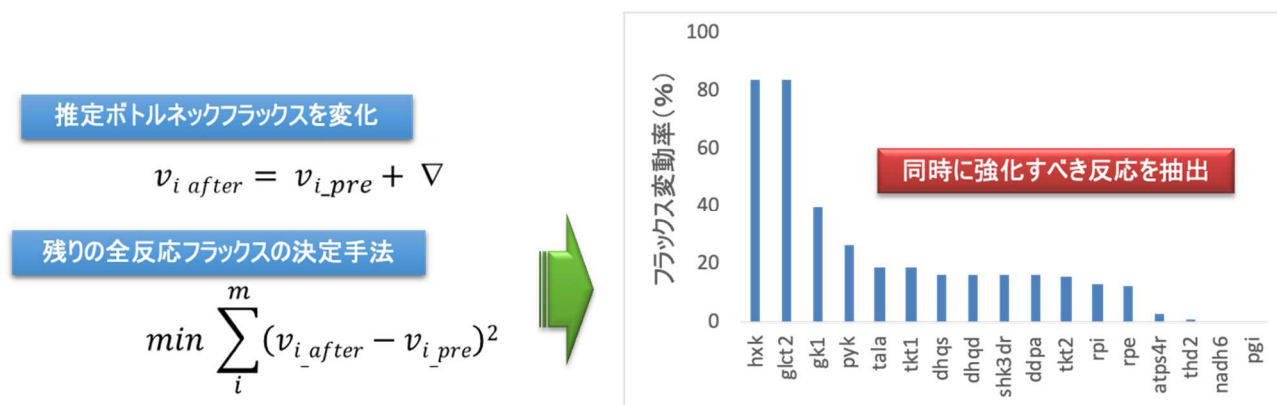


図 3.2.3.2-1-5 ネットワーク解析結果のFBAへの反映方法。ネットワークモデル（(2)-3）によるボトルネック反応抽出により、その反応がおよぼす他のフラックスへの影響を計算し、同時に強化、または欠損すべき反応を抽出して提案する。

2020年度は、代謝設計における計算ツールを高速化し、また専用のソルバーを必要としないアルゴリズムを開発した。この開発したツールを大腸菌シャーシ株や、コリネ型細菌や油脂酵母にも実用展開し設計精度の検証を行うことができた。

(9) 成果の普及

表 3.2.3.2-1-1. 論文、外部発表等の件数 (2020年2月現在)

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	1	0	0	0	0
2017	1	0	2	0	1	0	0
2018	1	0	4	0	1	0	0
2019	1	0	3	1	1	0	0
2020	1*	0	1	0	1	0	0

*: 2020年度末までに予定している累積件数

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

情報解析技術・ツールなどの基盤的技術は特許化しにくいという背景のもと、各種技術・ツール・データベースに関しては論文投稿による技術優位性のアピールを行うとともに、ユーザーへのインターフェイスとしてはノウハウ蓄積(秘匿化)、オープンクローズ戦略を使い分けることで競争的優位性を維持していく。

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	0	0	0
2019	1	0	0
2020	1*	0	0

*: 2020年度末までに予定している累積件数

課題名：C(2)-2 タンパク質・酵素開発

担当機関：産業技術総合研究所、神戸大学、岡山大学、東北大学、信州大学、鹿児島大学、地球環境産業技術研究機構、神戸天然物化学

(1) 背景と目的

酵素や機能性タンパク質を産業利用するには、生産量増大のための高発現化や、高機能化が重要となる。また、代謝経路を作成するためには、その経路内にある、生合成酵素、転写制御因子等に対応する遺伝子を導入する必要があるが、そのタンパク質の発現量を調節することによって、代謝経路の流量（化学反応量）を考慮した改変が可能になる。本項目では、配列改変によるタンパク質発現・機能制御法の開発を行う。

(2) 位置づけ、目標値

課題①:対象市場,製品

蛋白質発現量向上のため
コドン頻度を用いた最適化が
一般的に行われている
(例:GenScript社)



一方、蛋白質発現量を向上させる要因は
はっきりしておらず、この分野の研究は
しばしばトップジャーナルに掲載される

ARTICLE

Codon influence on protein expression in *E. coli* correlates with mRNA levels

Gregory BalF¹, Hiko Lata^{2*}, Jihan Nooly^{3*}, W. Nicholas Price^{1*}, Kam Ho Wong⁴, Min Shu⁵, Jun D. Laff⁶, Myoung Yehosh⁷, John K. Swartz⁸, Thomas B. Acton⁹, Bing Xiao³, Guozhong T. Mao^{10,11}, Daniel F. Anderson¹², John F. Hunt¹

課題②:対象市場,製品

機能性蛋白質が耐熱性の問題などから
利用できない事態がしばしば発生する
(例:ワクチン蛋白質)



ワクチンの市場規模:280億ドル(2010)
コールドチェーン(冷蔵流通)が整っていない
発展途上国を市場として拡大するためには
耐熱性向上が重要

課題①:様々な特徴量を用いた配列改変による
蛋白質発現量調節法の確立

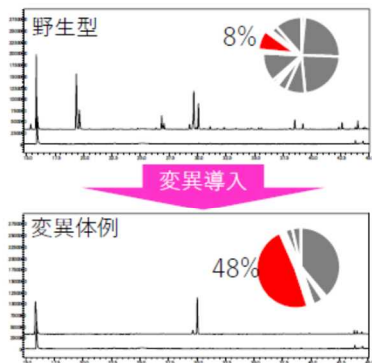
目標値(中間)高発現化時、発現量3倍、低発
現時1/3程度(最終)学術研究で用いられない、
企業所有宿主でも中間目標値を達成

課題②:分子動力学(MD)シミュレーションを
用いた機能性蛋白質高機能化法の確立

目標値(中間)変性温度10度以上向上(最
終)学術研究で用いられない、企業所有蛋白
質でも中間目標値を達成

課題③:対象市場,製品

微生物に導入する代謝経路を効率的に働かせるために、酵素の高活性化が必要となる



課題③:分子動力学(MD)シミュレーションを用いた機能性蛋白質高機能化法の確立
目標値:MDによる高活性変異体推定システムの構築

(3) 全体計画

		2016	2017	2018	2019	2020
課題①	配列設計法の構築	→				
	企業所有宿主での実証				→	
	手法の高速化				→	
課題②	高機能化法の構築	→				
	企業所有酵素での実証				→	
	手法の高速化				→	
課題③	高機能化法の構築	→				
	企業所有酵素での実証				→	
	手法の高速化				→	

(2016 年度実施内容)

課題①：翻訳に関する最新研究の妥当性・他宿主への適用性を、産総研独自データに基づいて検証し、得られた結果に基づき新規遺伝子改変法を開発する。これまで、遺伝子改変手法では特徴量としてコドン頻度を用いてきたが、最新の研究で翻訳に関与すると示唆されている、遺伝子の mRNA 量、mRNA の二次構造形成度、翻訳に使われる tRNA の種類、SD 配列が ORF 内に出現する頻度、ヒストンとの結合安定性、人工イントロン導入なども考慮した遺伝子改変による発現量制御法の開発を行う。その際、産総研・田村らが独自に行ってきた蛋白質生産実験に関するデータも用いて、手法を開発する。遺伝子改変法が出来次第、原核生物、真核生物を用いた、蛋白質発現による検証実験を開始し効果を検証する。

課題②：MD シミュレーションを用いた機能性蛋白質高機能化法の開発を行い変異体の予測を行う。具体的には、機能性蛋白質の熱安定性を予測するための MD シミュレーションを用いた手法を開発する。高温での MD による熱安定性の測定だけでなく、蛋白質に外力を加えることで変性しやすくする計算系の開発など、多角的な検討を加える。機能性蛋白質としては、家畜用ワクチンなどを用い、X 線結晶解析やホモロジーモデリングにより MD 計算の初期構造を作成する。計算系構築後、変異体の熱安定性予測を行う。耐熱性向上のための配列改変としては、(a) 蛋白質内部の疎水性向上、(b) SS 結合、塩橋、水素結合の導入、(c) 変性構造の不安定化、などが考えられるが、まずはいずれか一つを導入した改変を行う。また、高機能化の検証実験を開始する。具体的には、アミノ酸改変体の発現・熱安定性測定を行う。

課題③：酸化反応等をモデルとして、酵素機能評価系及び分析系などの実験系の構築を行い MD シミュレーションに供する P450 等の選定を行う。選定酵素を題材として、X 線結晶解析やホモロジーモデリングにより酵素の初期構造を作成し、MD シミュレーションを行うことで、酵素の活性部位近傍のアミノ酸側鎖配置の動き・構造揺らぎなど動的な性質も含めた立体構造を詳細に調査する。調査結果を踏まえた上で、選定した P450 の改変に向けて活性部位近傍のアミノ酸改変提案を行う。

(2017 年度実施内容)

課題①：前年度行った蛋白質生産実験データを元に、遺伝子改変による蛋白質発現量調節法をさらに改良する。データ数が増えた時点で、機械学習などの人工知能に関する手法を導入した、新規遺伝子改変法の開発も検討する。また、本年度に開発した手法の検証も継続して行う。さらに、蛋白質の発現量が増加するにつれて、アミノ酸の枯渇による他蛋白質の発現量低下、凝集体形成などにより、酵母が死滅するなどの悪影響を生じることが予想される。そこで、蛋白質の発現量に応じて、酵母内にどのような現象・影響が及ぼされるのか簡便に調査する手法を開発する。

課題②：前年度の結果を元に、機能性蛋白質の熱安定性予測法の改良を行う。それに基づいたアミノ酸改変体の設計を行い、熱安定性予測を行う（産総研）。また、アミノ酸変異体の検証実験（発現・安定性測定）を継続する。

課題③：触媒活性及び、生成物選択性の向上のために、MD シミュレーションにより提案された活性部位周辺にあるアミノ酸の改変を行う。アミノ酸改変酵素の設計・MD シミュレーションを行い、実験での実証を繰り返すことで、選択性・反応性の高い酵素を創出する。

(2018 年度実施内容)

課題①：これまでに開発した新規遺伝子改変法を用いた蛋白質生産実験データを元に、遺伝子改変法をさらに改良・検証実験を継続して行い、原核生物、真核生物を宿主とした生産に対して手法を確立する。本年度終了までに、高発現化に関しては改変前の発現量比 3 倍以上、低発現時は 1/3 倍の達成を目標とする。また、蛋白質の発現量に応じて、酵母内にどのような現象・影響が及ぼされるのか簡便に調査する手法を確立し、少なくとも 5 遺伝子以上について調査を行うことを目標とする。

課題②：これまでの結果を元に、機能性蛋白質の熱安定性を予測する手法の改良・アミノ酸改変体の設計・検証実験を継続して行い、高機能化法を確立させる。本年度終了までに耐熱性向上に関しては改変前の変性温度を 10 度以上向上することを目標とする。

課題③：触媒活性・生成物選択性向上だけでなく、様々な基質に対しても位置特異的に修飾出来るように酵素改変手法を改良する。以上の手法に基づき、基質・位置特異的修飾酵素を 3 個以上創出する

(2019 年度実施内容)

課題①：これまでスパコンを用いて計算してきた遺伝子配列設計を web サーバーなどで行えるようにするために、高速化を行う。具体的には、考える配列数を絞り込む手法の開発、高発現化アミノ酸タグをあらかじめ複数用意し、遺伝子配列によって適切なタグを選出する方法の開発を行う。また、膜蛋白質などの発現量の調節が困難と考えられるターゲットへの計算システムの開発を行う。

課題②：これまで、1 変異体当り半日～1 日要していた MD 計算を高速化し、スパコンではなく、企業所有サーバーでも動作するようにする。具体的には、MD 計算用プログラムそのものの高速化、物理化学的な近似（水和効果の近似など）を計算システムに導入することによる高速化を行う。

課題③：これまで、1 変異体当り数日要していた MD 計算を高速化し、スパコンではなく、企業所有サーバーでも動作するようにする。具体的には、MD 計算用プログラムそのものの高速化、物理化学的な近似（水和効果の近似など）を計算システムに導入することによって、高活性変異体取得の高速化を行う。

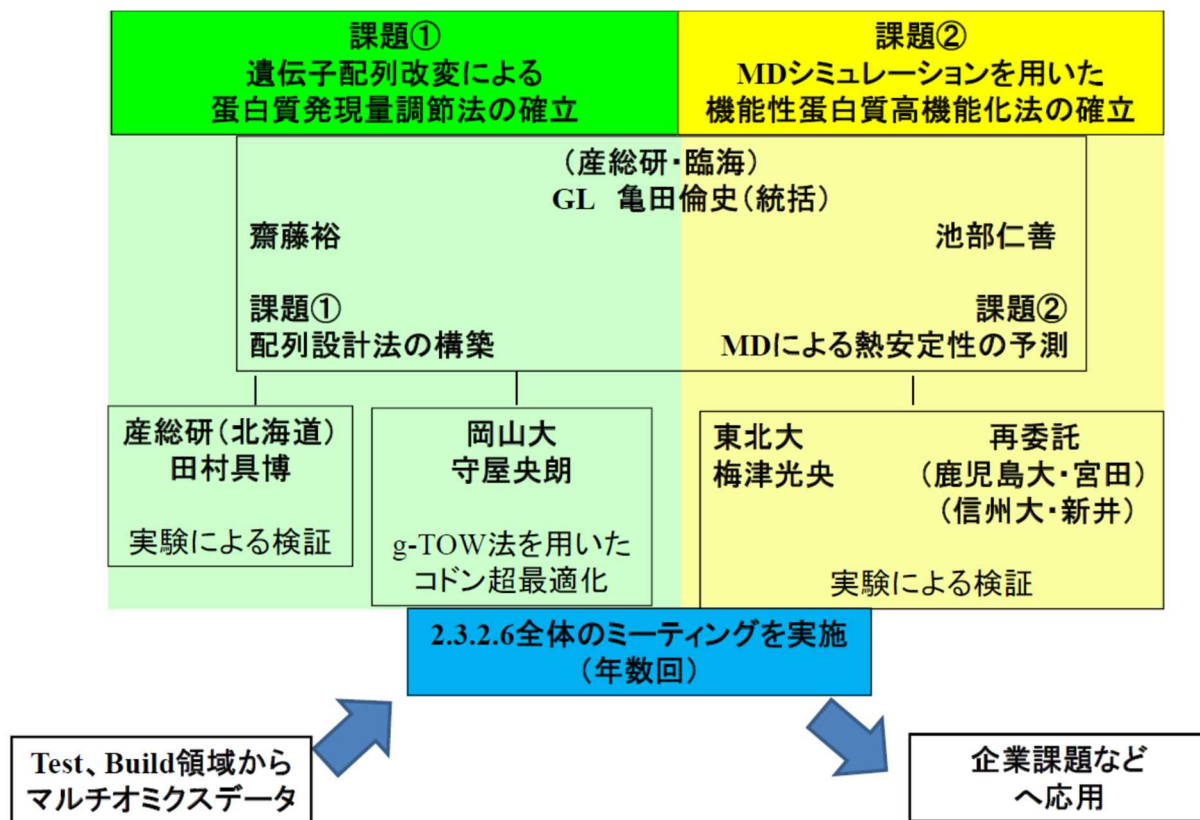
(2020 年度実施内容)

課題①：昨年度に作成した計算システムを用いて、様々なターゲット（実証課題から提案された配列、課題ごと 3 種以上）に対して予測を行い、実証する。また、開発した計算システムの web サーバー・ソフトウェア化を試みる。

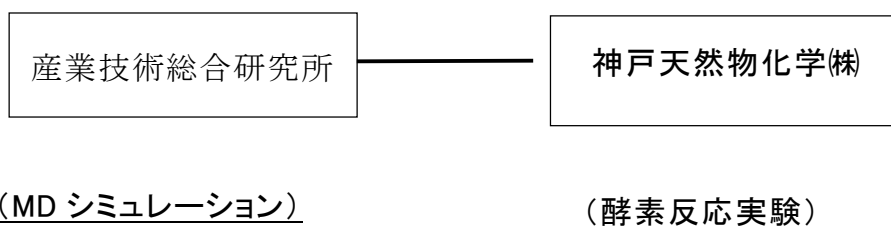
課題②：昨年度作成した計算システムを用いて、実際に予測を行い、実験でその効果を確認する。また、高速化計算システムとスパコンを用いた、大量データの予測も試みる。

課題③：昨年度作成した計算システムを用いて、実際に予測を行い、実験でその効果を確認する。

(4) 実施体制



課題③：



(5) 運営管理

各課題とも、概ね月に1度報告会を行い、研究進捗に関して確認を行っている。また、年に1度程度、全体でのミーティングを開催している。

(6) 実施の効果

実験による 100~1,000 のオーダーでの変異体作成による検証をすることなく、計算・シミュレーションによる予測に基づき、100 以下の変異体作成による実験で高発現・高機能化などの成果を得ることができる。それにより、消耗品・設備に関する費用、人件費などを大きく削減することができる。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
① 原核生物に対する配列設計法の開発	大腸菌、放線菌（ロドコックス）、ストレプトマイセス）、コリネバクテリウムにおいて、目標値（3倍）を達成。また、用いた設計法を誰でも実施できるwebサーバーを構築した。さらに、すでに設計した発現量向上タグを作成し、タグをつけるだけで、発現量向上できることを示した。	高発現化に関して、改変前の発現量比3倍以上を目標とする。また、科学研究ではあまり用いられない企業所有の宿主・蛋白質に対しても、本方法が有効であることを確認し、実際の生産に生かす。	◎
① 真核生物に対する配列設計法の開発	酵母については目標値（～6倍）を達成、麹菌についても達成（～8倍）。また、本手法を助成事業に適用した。	高発現化に関して、改変前の発現量比3倍以上を目標とする。また、科学研究ではあまり用いられない企業所有の宿主・蛋白質に対しても、本方法が有効であることを確認し、実際の生産に生かす。	◎
② MDシミュレーションを用いた機能性蛋白質高機能化法の確立（耐熱化）	ワクチンの一部となる蛋白質の変性温度を10.2℃向上させることに成功した。また、本計算法を開発当初と比べ30倍以上高速化した。本手法を、助成事業で、企業課題に適用した。	確立された蛋白質高機能化法を、企業所有蛋白質の高機能化に適用し実証を続ける。	◎
③ MDシミュレーションを用いた機能性蛋白質高	酵素・基質複合体のMDシミュレーションに基づき、効果的と考えられる変異体を提案する手法を開発し、	高機能酵素変異体設計システム構築	◎

機能化法の確立 (高活性化)	活性・収量を最大8倍まで 向上させることに成功し た。		
-------------------	-----------------------------------	--	--

(9) 研究開発の成果と意義

課題①・原核生物向けの手法として、最新の翻訳制御研究に基づいた、遺伝子改変による新規高発現化手法の開発を行った。近年、良く用いられるコドン利用頻度に加え、遺伝子の mRNA 量、mRNA の二次構造形成度、翻訳に使われる tRNA の種類、SD 配列が ORF 内に出現する頻度、ヒストンとの結合安定性なども翻訳量に寄与することが分かってきた (Boel G et al.; 2016 Nature, 529, 358-363)。本研究では、これらの最新研究の妥当性・他宿主への適用性を、独自データに基づいて検証した。具体的には、産総研・田村らが所有している放線菌などを宿主とするタンパク質生産を数多く行った際の、遺伝子配列、タンパク質生産量情報に関するデータに基づき最新の翻訳研究の検証を行った。すると、mRNA の二次構造形成傾向が蛋白質発現量と最もよく相関し、コドン使用頻度も比較的相関することが分かった。そこで、まず、mRNA 二次構造形成を減らすよう、遺伝子配列を設計し、10 以上の遺伝子に対して蛋白質発現を試みたところ、平均で 50% の確率で発現量を向上させることに成功した。さらに、コドン使用頻度も取り込んだ設計法を開発し、実証したところ、平均で 75% の確率で発現量が向上した。特に、ほとんど発現しなかった遺伝子に対しては、100% の確率で発現量が向上した。また、その際には発現量が大幅に向上しており、目標値の 3 倍を大きく超えている。本手法を、大腸菌、放線菌 (ロドコッカス、ストレプトマイセス)、コリネバクテリウムにも適用し、同様に発現量が 3 倍以上向上させることに成功した。

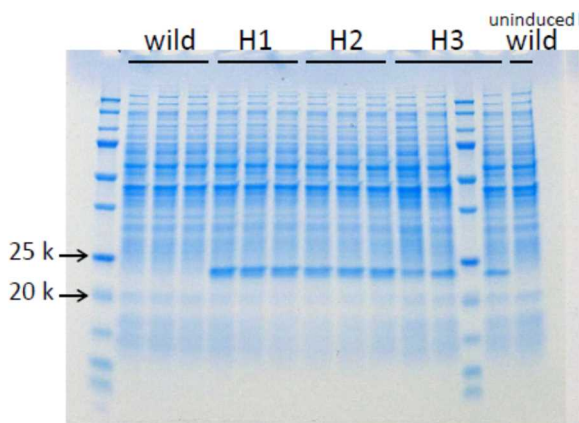


図 3.2.3.2-2-1 課題①原核生物向け配列設計法：発現量がほとんどない遺伝子 (WT)、本手法で設計 (H1-3)。H1-3 は明確なバンドが確認でき、発現量が大幅に向上したことが分かる。

また、用いた設計法を誰でも実施できる web サーバーを構築した。本サーバーは、科学研究でよく用いられる大腸菌・酵母以外の産業用宿主にも適用できるようになっており、特に本事業に参画した機関が用いている宿主はすべて網羅していることに特徴がある (ヒト細胞、CHO 細胞、昆虫細胞、トリコデルマ、油脂酵母、麴菌、酵母、コリネバクテリウム、放線菌、大腸菌)。来年度に本格運用を開始する予定である。

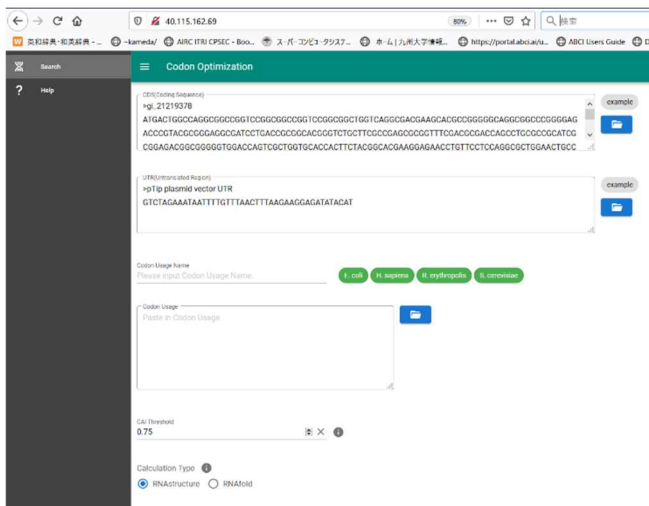


図 3. 2. 3. 2-2 : 配列設計用 web サーバー

さらに、すでに設計した発現量向上タグを作成し、タグをつけるだけで、発現量向上できることを示した。特にニッケルカラムでの分離ができるようにヒスチジン配列、プロテアーゼで切断できるようにプロテアーゼ認識配列も本タグに含めており、3つの効果が同時に期待できる。

FXタグ：MHHHHHIEGRM
 EKタグ：MHHHHHDDDDK

さらに、HISタグ + プロテアーゼ認識配列も埋め込み多機能性を持たせる

FX3,EK3:二次構造重視設計 FX4,EK4:CAI重視設計

	W-	W+	FX3	FX4	EK3	EK4	これまでの設計法
gi_21220656	—	1	25.54	19.74	16.87	17.73	2.68
gi_21222584	—	1	2.64	1.95	2.71	3.66	2.04
gi_21224627	—	1	2.92	3.22	2.85	2.83	1.05
gi_21224745	—	ND	1.93	1.27	2.25	2.7	—
gi_21226036	—	1	18.13	11.55	14.04	17.8	1.59

図 3. 2. 3. 2-2-3 : 発現量向上タグ (FX、EK タグ)

最後に、難しいターゲット蛋白質の一例として、東北大 (阿部 G) が取り組んでいる、アミノ酸排出体の高発現化を共同で行い、高発現化することに成功した (詳細は阿部 G 記述を参照)

課題②・真核生物向けの手法として、ヒストンとの結合安定性を考慮した配列設計法を開発した。これは、遺伝子中のプロモータ配列とヒストンとの結合能を下げることで、mRNA 転写量を増やし、結果蛋白質発現量を増やすことを狙ったものである。この設計法を酵母 (3 遺伝子)・麹菌 (2 遺伝子) で、実証したところ、酵母 (発現量~6 倍)、麹菌 (発現量~8 倍) ともに目標値を達成した。

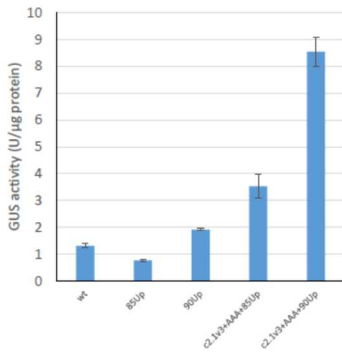


図 3.2.3.2-2-4：麴菌での成果。蛋白質発現量が最大で 8.5 倍向上している。

また、課題①・真核生物向けの手法として、出芽酵母での細胞内タンパク質発現について、従来知られている限界を超えた機能発現を可能にする配列設計技術の構築を行った。これまでに岡山大・守屋らは、g-TOW 法により、出芽酵母の 6,000 種類すべてのタンパク質の発現限界を調査して酵母細胞における一般的なタンパク質の発現限界（タンパク質発現キャパシティ）を評価することに成功した。一方、キャパシティの限界まで発現できるタンパク質はもともと高発現の解糖系の酵素に限られること、発現できない理由は、コドンの使用頻度・細胞内局在・酵素活性などに起因していることを見出している。特に解糖系の酵素のコドンは、他の大半のタンパク質に比べて高度に最適化（超最適化）されており、それがタンパク質発現の障害となっていた。そこで、まず、酵母解糖系以外の酵素を標的としたコドンの超最適化を行い、タンパク質発現を評価した。具体的には、発現が困難とされる膜蛋白質や酵素約 10 種について超最適化を行った。次に、タンパク質発現量が酵母の代謝に与える影響や細胞内局在の異常、凝集体を形成する事を簡便に評価する系を構築し、評価したところ、最大に全蛋白質の 2%程度まで発現させることに成功した。現在、発現が困難である企業所有酵素についての超発現化・毒性評価による発現限界量の測定にも取り組んでいる。

簡便な毒性評価系

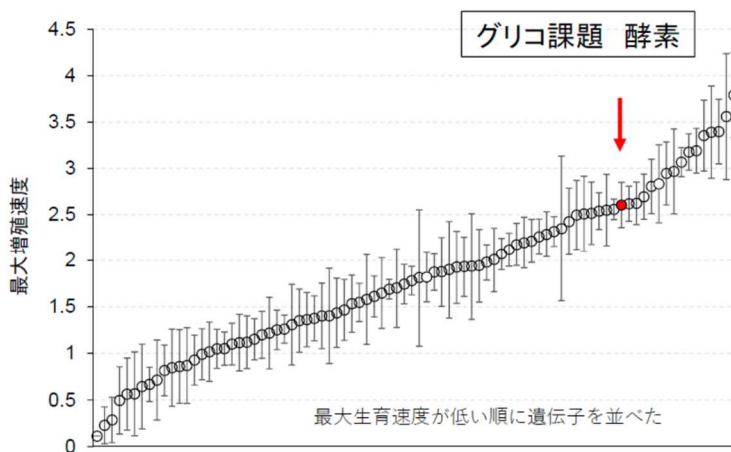


図 3.2.3.2-2-5

課題①真核生物向け配列設計法：

g-TOW 法超最適化及び簡便な毒性評価による蛋白質発現：限界量の測定

最強の発現誘導系構築→大半は、増殖阻害を起こす
 →増殖阻害を起こす発現量を簡便に評価する系も構築
 →NEDO課題蛋白質など評価中

課題②として、MDシミュレーションを援用した配列設計による、タンパク質高機能化法の開発を行う。様々な高機能化のうち、本研究では耐熱性向上を取り上げた。というのは、機能性タンパク質をワクチンなどとして利用する際に、そのタンパク質の熱安定性が低いために実用化が妨げられることがあるためである。これまでデータタンパク質を高機能化するための手法として、ファージディスプレイ法などの人工進化系を用いたタンパク質改変や、X線結晶解析・NMR解析によって得られた立体構造に基づくアミノ酸置換を行う試みがなされてきた。しかし、人工進化系による高機能化には、時間を要するために、結果として、人手・コストがかかってしまうという問題がある。また、立体構造に基づく高機能化では、酵素反応に伴う立体構造の動きを考慮できないために、高温下データタンパク質が変性する過程を考慮した高機能化ができない、などの問題がある。そこでデータタンパク質構造の動きに関する情報を短時間で得られる手法として知られている、MDシミュレーションを利用した、タンパク質高機能化に期待が集まっていたが、計算機性能の面からその利用は阻まれてきた。しかし、最近になって、MDシミュレーションを用いたタンパク質の高機能化に成功したという報告例が出始めている (Domani SC et al., 2016, Nature Chemistry; Wijma HJ et al., Angew. Chem., 2015)。

そこで、MDシミュレーションを援用した配列設計によるタンパク質機能制御法の開発に取り組んだ。課題②で実施する耐熱性向上のための配列改変としては、(a) タンパク質内部の疎水性向上、(b) SS結合、塩橋、水素結合の導入、(c) 変性構造の不安定化、などが考えられるが、実験に基づく手法ではそのような設計に基づいたタンパク質を実際に生産し・熱安定性測定を行い、効果を確認する必要があるが、時間・コスト・人手の問題から、試すことができるタンパク質の数は限られてしまう。そこで、様々なアミノ酸配列改変を行ったタンパク質を計算機上に大量に作成し、高温条件下でそれらのMDシミュレーションを行う。MD計算後、立体構造が崩れなかったタンパク質を、耐熱性が向上した改変候補として絞り込み、実験での確認を行う。これにより、大量の配列改変候補を安価に高速に絞り込むことが可能となる。以上の手順で、MDを用いた配列設計法を確立させる。

これまでに、7つの蛋白質（内、ワクチン蛋白質3つ）に対して、高温での網羅的なMDシミュレーションを行い、変性するまでにかかった時間（計算値）と、変性温度（実験値）との間に強い相関がみられることを確認した。耐熱性が向上すると思われる変異体について、その変性温度、ワクチン蛋白質・ターゲット物質間の結合能を測定しているが、変性温度が最大10.2℃向上、98℃での熱処理後の活性の残存率が100%近い変異体の取得に成功している。

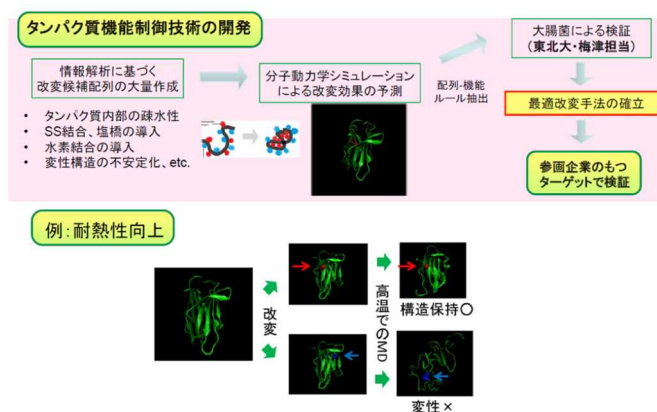


図 3.2.3.2-2-6
課題②MDシミュレーションを用いた
蛋白質高機能化法の開発：
研究 protocol

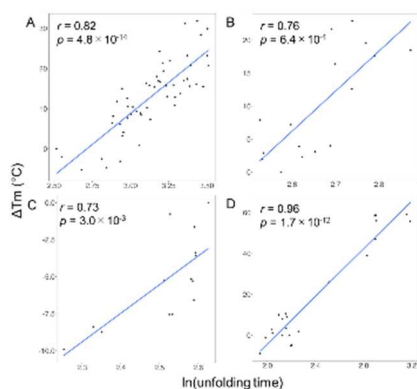


図 3.2.3.2-2-7 変性時間（計算値）と変性温度（実験値との比較）4 蛋白質について、相関係数 0.73~0.96

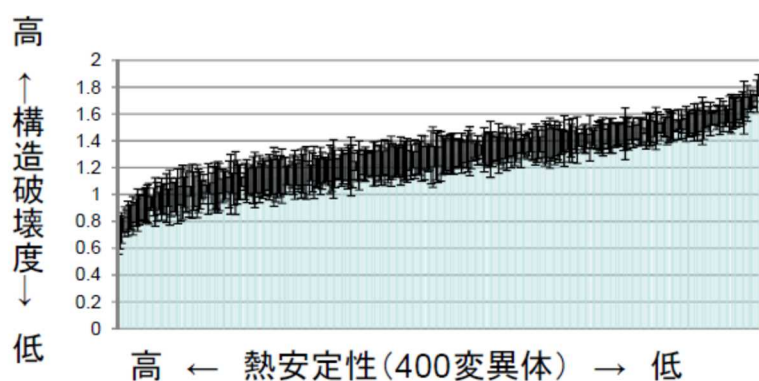


図 3.2.3.2-2-8 課題②MD シミュレーションを用いた蛋白質高機能化法の開発：ワクチン 400 変異体を高温で MD シミュレーションした際の構造破壊度の分布。このうち、熱安定と予想された変異体を実験で検証したところ、実際に熱耐性が向上した 2 変異体の取得に成功した。

また、本手法をスパコンではなく、企業が所有している計算機でも実施できるように、高速化を行った。具体的には、水和効果を表現するために、水分子を含めるのではなく、水和エネルギーで近似することで、計算速度を 30 倍高速にした。また、すでに相関することがわかっている 4 蛋白質に本手法を適用したところ、3 蛋白質については同様に相関がみられた。

課題③：

2016 年度に、酸化反応等をモデルとして、酵素機能評価系及び分析系などの実験系の構築を行い MD シミュレーションに供する P450 等の選定を行った。当初は、基質選択性の高い真核生物由来の P450 を用いる予定であったが、立体構造が分かっているものが少なく、ホモロジーモデリングでの作成も困難であった。そこで、立体構造が分かっている微生物由来の P450 を用いることにした。微生物由来の P450 は活性が高いものの、副産物を多く生成してしまうという欠点があったため、活性を保ちつつ、副産物生成を減らす変異体作成を試みることにした。

選定酵素を題材として、MD シミュレーションを行うことで、酵素の活性部位近傍のアミノ酸側鎖配置の動き・構造揺らぎなど動的な性質も含めた立体構造を詳細に調査したところ、P450 の活性部位であるヘム周辺の側鎖の配置は多様であり、非常に長時間のシミュレーションを行わ

なければ調査が難しいことが分かった。そこで、構造サンプリングを高速に行うことができる ALSD 法を用いることで、ヘム周辺および基質の構造配置を詳細に調べることが可能とした。2017 年度に、昨年度までに作成した計算プロトコルに基づき、P450 活性部位周辺に基質を配置した系に対して、シミュレーションを行い、基質の特定箇所を酸化するために重要と思われるアミノ酸を特定した。その結果を元に、1 アミノ酸変異体を複数選出し、神戸天然物化学が微生物での酵素生産及び活性を調べたところ、反応量、及びターゲットとなる生成物の比率が向上する変異体を発見した。反応量は最大 3.5 倍、生成物比率は最大 2 倍向上させることに成功した。本手法について、特許取得及び論文発表に向けて準備を進めている。

2018 年度は、これまで得られた結果に加え、さらに変異箇所を増やした変異体に対するシミュレーションを行い、位置選択性は最大 6 倍、収量は最大 1.5 倍向上した。

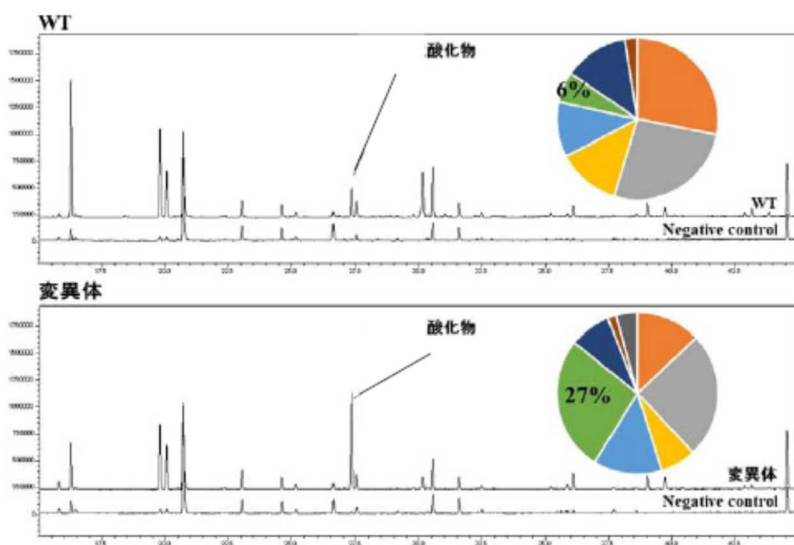


図 3.2.3.2-2-9 P450 の反応生成物 WT と変異体の比較

2019 年度以降は、これまで基質として用いていたリモネン以外の基質でも、適用できるのか調べるため、p-シメンを用いた計算及び物質生産を行ったところ、目的化合物生産比率が 13→70%に向上するなど、これまでと同様の結果を得ることができた。また、本手法をスパコンではなく、企業所有の計算機でも実行できるようにするため、計算の高速化を行った。具体的には、シミュレーション手法として用いていた ALSD 法をレプリカ交換 MD 法に置き換えることで計算速度を約 23 倍高速にすることに成功した。

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	2	0	0	0	0
2018	0	1	8	0	0	0	0
2019	1	1	12	3	0	0	0
2020	4	0	3	1	0	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	0	0	0
2019	0	0	0
2020	0	0	0

課題名：C(2)-3 ネットワークモデル構築技術開発

担当機関：産業技術総合研究所、理化学研究所、京都大学

(1) 背景と目的

微生物を利用した物質生産の効率化は、古くは「醗酵」に始まり、最近では「合成生物学」を利用した効率化が求められている。その中で、欧米ではいち早く「情報解析技術」を微生物生産技術向上に組み込んだ取り組みが行われており、バイオエタノール等でいくつかの成功を収めている。欧米型の取り組みにおいて一番の特徴は機械学習を基盤とした大量データからの特徴量抽出である。この技術の長所として、大量データ（数万～数十万サンプル）がある場合は高精度のルール抽出が可能になることが挙げられる。時間経過とともにデータ数が増えれば増えるほどその精度はより高くなり、質生産の指針となる育種方針の提案精度は向上する。その一方データゲット物質毎に偏向していないデータを大量に取得する必要がある、一定の精度を出すためには宿主細胞および生産物質毎に数万サンプル程度の大量データを必要とする必要がある、高精度な結果を得るためには、コスト的な面で負荷がかかる点が懸念される。現時点において、本分野で後塵を拝している我が国がこれらの先行国との国際競争を対等に行うためには、機械学習のみを利用した時の短所である「大量データ」と「宿主依存型」の2点を解消することが必須である。そこで本課題では、「スマートセル＝高度に合理化され人為的に設計された高機能な物質生産能力を有する生体細胞」を構築するために、①現実的なデータ数（最小100サンプル程度）で、②より正確で、③汎用的に利用可能なスマートセル設計を実現するための情報解析技術の開発を実施した。

微生物による効率的物質生産を実現するためには、物質生産時に微生物細胞内で起こっている現象をメカニズムとして理解し、それを一つの稼働システムとして制御することが求められる。この複雑な「システム」を理解し活用する上で遺伝子の発現制御ネットワークモデルが有用である。遺伝子間の発現制御ネットワークモデルは、生体細胞内で起こっているプロセスを因果グラフとして表現するため、そのプロセス工程におけるボトルネック探索や効率化に必要な改変操作ポイント探索が可能になる。ターゲットとする生産物質がタンパク質の場合も化合物等の代謝産物である場合も、細胞を制御するために実際に行われる人為的操作は、遺伝子導入や破壊等の遺伝子改変が中心であることから、「どの遺伝子」を「どのように改変するか」の指針を提示することが可能になれば、微生物による物質生産をより効率化することが可能になる。そこデータゲット物質の生産性に寄与するために必要な改変候補遺伝子を提示するためには、細胞内で行われている制御システムを遺伝子間のネットワークグラフとしてモデル化する事が有効であると考えられる。

本研究開発項目の目的は、遺伝子の操作による収量向上を行うため、遺伝子発現データから遺伝子相互間の制御関係を明らかにし最適な操作を提示する数理科学的手法を開発・適用し、微生物の有する物質生産能を向上させるための基盤となるネットワークモデル構築技術を開発することである。

(2) 位置づけ、目標値

本課題では、先行している欧米の微生物物質生産分野に対抗するため、欧米型の短所である「ターゲット物質毎に大量データを必要とする」部分を最小限にするための情報解析技術として

システム生物学的アプローチを基盤とした技術開発を行っている。本手法により、①より少量のデータで（低コスト）、②より正確に（細胞内メカニズムがベース）、③汎用的に（数理モデル構築）の3つが可能になると考えている。

	最終目標値（2020）	根拠
課題 2.3.2.5「遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子の探索」 課題 2.3.2.9「統合オミクス解析技術の開発」 ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓	【2018 年度・中間】 <ul style="list-style-type: none"> ・ システマティックな実験デザイン技術の開発 ・ 物質生産関連遺伝子群の同定技術の開発 ・ 各株にて物質生産に寄与する遺伝子を選択する手法の確立 ・ 物質生産に寄与すると考えられた遺伝子群において、少数のデータから制御構造を推定する技術の開発と適用 ・ 遺伝子ネットワークモデル構築と高精度化 ・ 産業微生物で改変ターゲット遺伝子選定技術の有効性を実証する ・ 改変ターゲット遺伝子選択技術の確立 【2020 年度・最終】 <ul style="list-style-type: none"> ・ 生産性をネットワークモデルに組み込んだ最大収量実現にむけた有効性の実証 ・ モデル re-fitting アルゴリズムによるネットワーク構造推定手法への改良と一般化 ・ ネットワーク構造上のすべての遺伝子について、ターゲット因子への影響力を数値化する技術の開発 	微生物による効率的物質生産を実現するためには、物質生産時に微生物細胞内で起こっている現象をメカニズムとして理解し、それを一つの稼働システムとして制御することが求められる。ターゲットとする生産物質がタンパク質の場合も化合物等の代謝産物である場合も、細胞を制御するために実際に行われる人為的操作は、遺伝子導入や破壊等の遺伝子改変が中心となる。そこターゲット物質の生産性に寄与するために必要な改変候補遺伝子を提示するためには、遺伝子レベルで細胞内で行われている制御システムをネットワークグラフとしてモデル化する事が有効であると考えられる。
(2)-3. ネットワークモデル構築技術開発	(同上)	(同上)

<p>1) 生産制御ネットワークモデルの構築と検証</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・生産性等の表現型データを結果変数として導入したネットワークモデルを構築する ・生合成経路全体を1つの潜在変数としてネットワークモデルに組み込む技術を開発・適用する 	<ul style="list-style-type: none"> ・生産量の最大化のためには、生産能のみならず生育速度等も考慮する必要があるため、表現型データを結果変数としたモデル構築技術が必要である。 ・化合物生産性を向上に目的とし、生合成経路外にある制御因子を探索するため、生合成経路全体を一つの潜在変数としたモデル構築を検討する必要がある。
<p>2) 制御実現のためのネットワークモデル高精度化</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ネットワークモデルの re-fitting 技術を開発し、ネットワークモデルと実証結果の差分を最小化する。 ・少数の培養データから高精度なネットワークモデルを構築する技術を開発・適用する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・実証実験によって得られた正例・不例両方の情報を組み込んだモデル構築でより高精度化が実現できると考えられる。 ・実際の現場で測定されている少数のデータからもできるだけ高精度なネットワークモデル構築を実現する必要がある。
<p>3) 開発済ネットワークモデルの適用と実用性検証</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・トランスクリプトームデータから経路上ボトルネックとなっている酵素と相関が高い遺伝子群を抽出し、改変候補として提案する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・技術開発の段階では、データ数や改変株構築技術が優れている特定の課題についてネットワークモデル構築および実証を行ってきた。開発した手法の汎用性を高めるため、実際に企業が扱っている課題である助成課題や、その他の課題について開発してきた技術を適用することが必要である。

(3) 全体計画

2016年度～2018年度

課題 2.3.2.5 「遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子の探索」

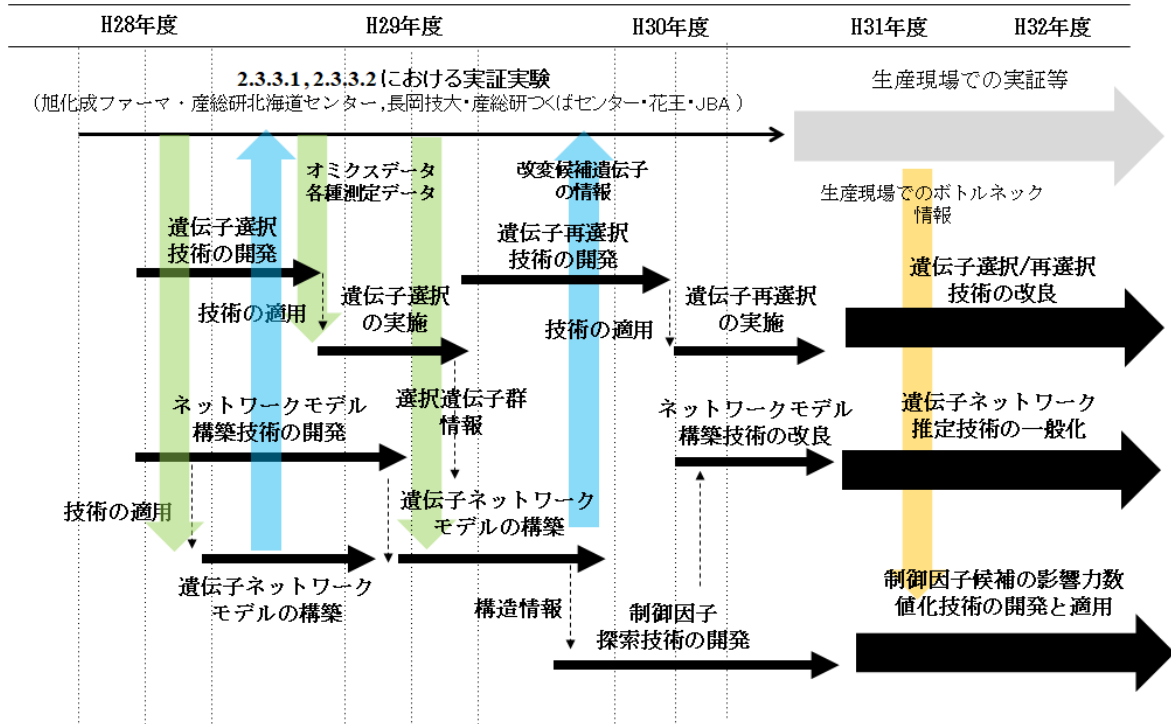


図 3.2.3.2-3-1

課題 2.3.2.9 「統合オミクス解析技術の開発」

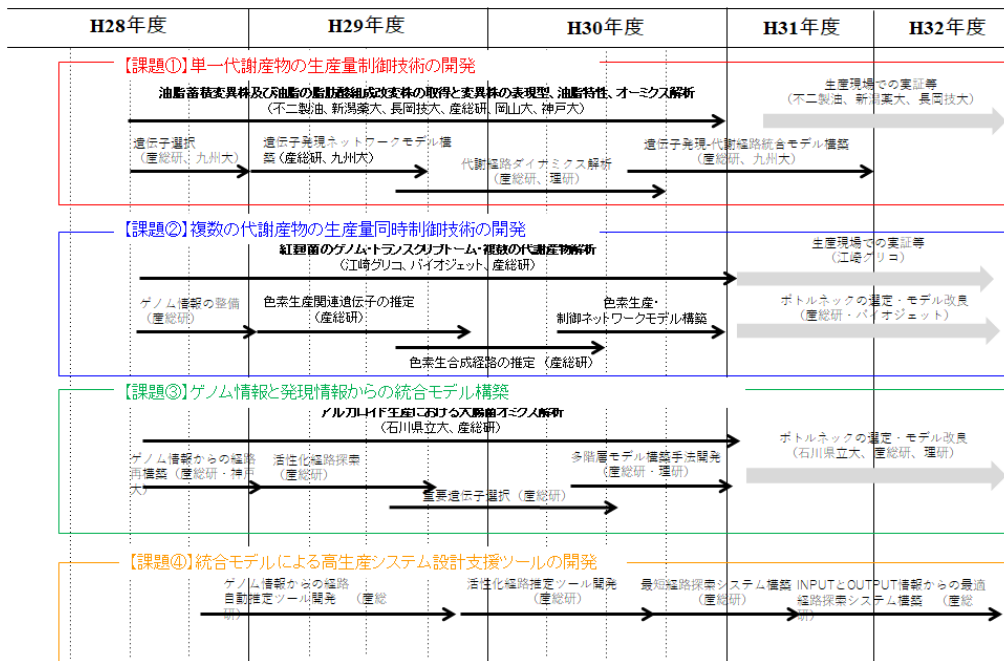


図 3.2.3.2-3-2 課題 2.3.2.9 で設定した計画

2018 年度までの成果を受けた 2020 年度までの計画

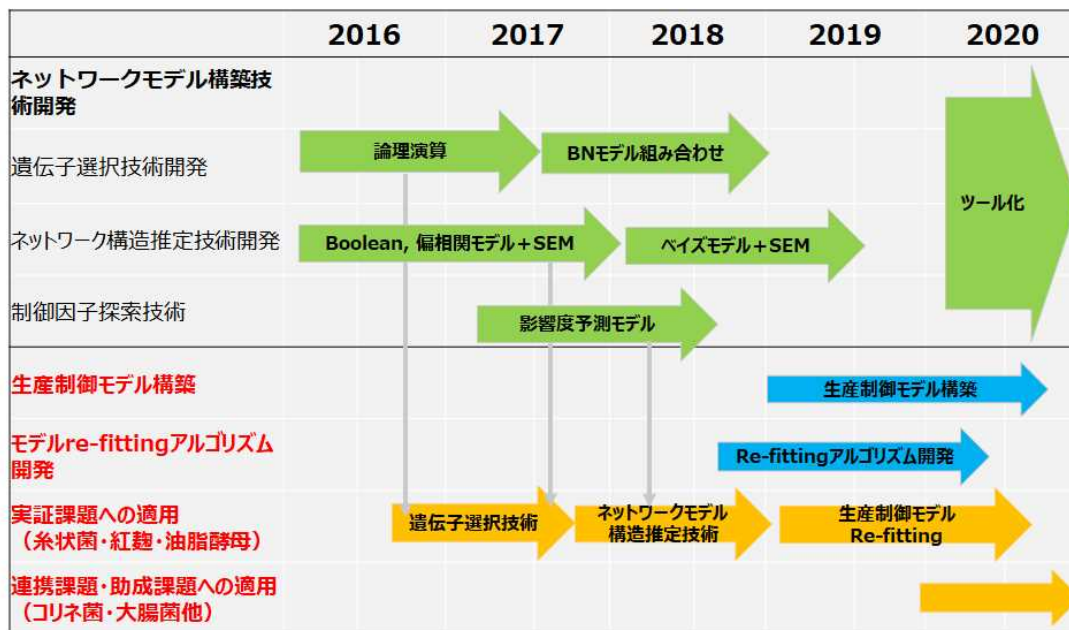


図 3.2.3.2-3-3 課題(2)-3 として設定した全体計画

2016 年度～2018 年度

2018 年度までは、課題 2.3.2.5 「遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子の探索」および課題 2.3.2.9 「統合オミクス解析技術の開発」の 2 課題を実施した。実証課題 2.3.3.1、2.3.3.2、2.3.3.7、2.3.3.9、2.3.3.10 と連携し、実課題を設定したうえでアルゴリズム開発と実データへの適用を行った。先行データが多数取得されている課題を元に遺伝子選択の技術開発を行い、ある程度技術が開発できたところで、ネットワークモデル構築技術開発を実施した。構築されたネットワークモデルを元に、制御因子探索のための技術を開発した。各課題について複

数回の改変候補遺伝子の提案と検証を実現するとともに各技術のブラッシュアップを行った。また、開発した技術を最終的にツール化することを念頭に、プロトタイプのツール構築を行った。

2019年度～2020年度

2018年度に実施された中間評価を受け、課題2.3.2.5「遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子の探索」および課題2.3.2.9「統合オミクス解析技術の開発」の2課題を(2)-3「ネットワークモデル構築技術開発」としてまとめ、これまでに開発して技術の高精度化・汎用化を目的として以下3点の研究開発を実施した。1)生産制御モデル構築技術の開発、2)モデルre-fittingアルゴリズムの開発と適用、3)他課題への適用と検証。1)はこれまでに開発してきた中で、生産能を上げた場合には宿主細胞の生育能が低下する現象が多数見られたことから、生産能と生育能を掛け合わせた生産性を制御するための表現型データを組み込んだモデル構築技術の開発と実証課題への適用を実施した。2)は、これまでに実証実験によって得られた正解・不正解の情報を組み込むことでデータを新規に取得しなくても、より確度の高いモデルを構築するためのアルゴリズムを開発し、実証課題へ適用した。3)は、2018年度までに開発した技術および2019年度以降に開発・改良した技術の汎用性を高めるため、他課題にもネットワークモデル構築を実施し、検証を行った。

(4) 実施体制

体制図 (2016年度～2018年度)

課題2.3.2.5「遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子の探索」

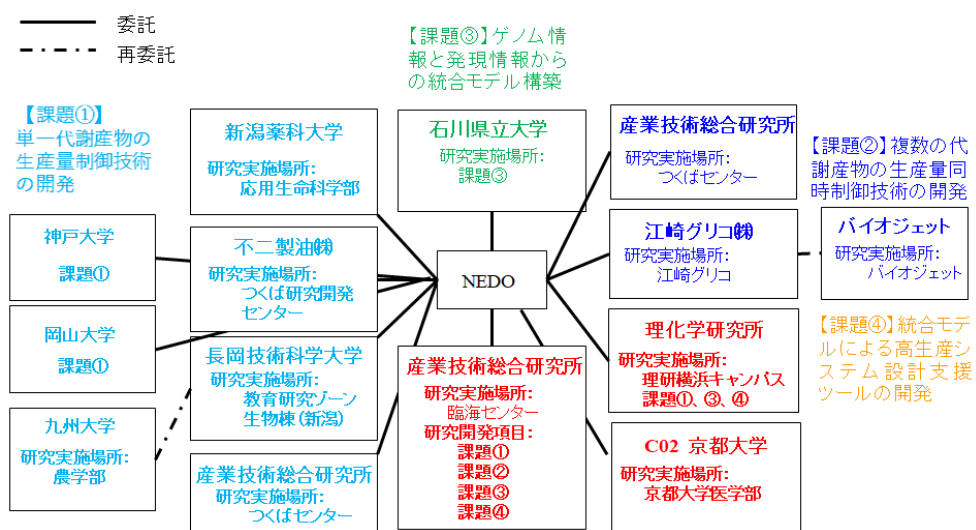


図 3.2.3.2-3-4 課題2.3.2.5の実施体制

課題 2.3.2.9 「統合オミクス解析技術の開発」

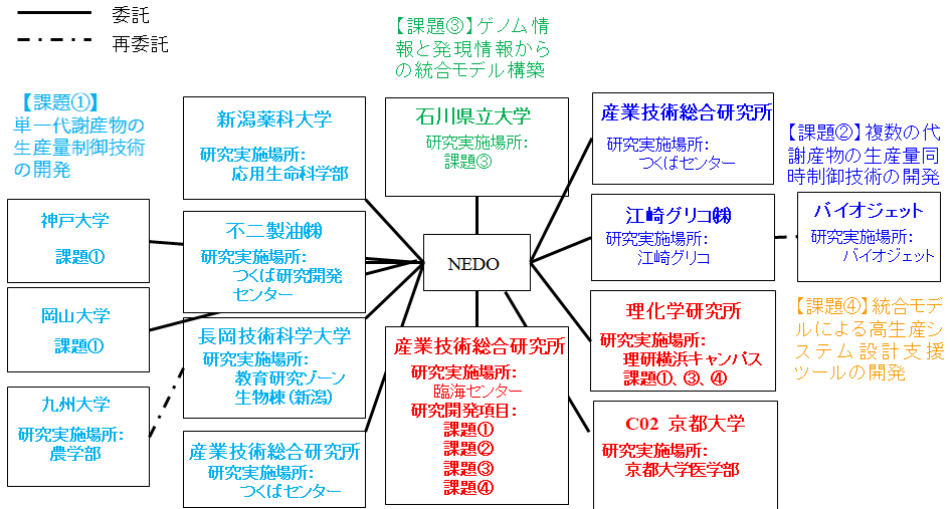


図 3.2.3.2-3-5 課題 2.3.2.9 の実施体制

体制図 (2019 年度～2020 年度)

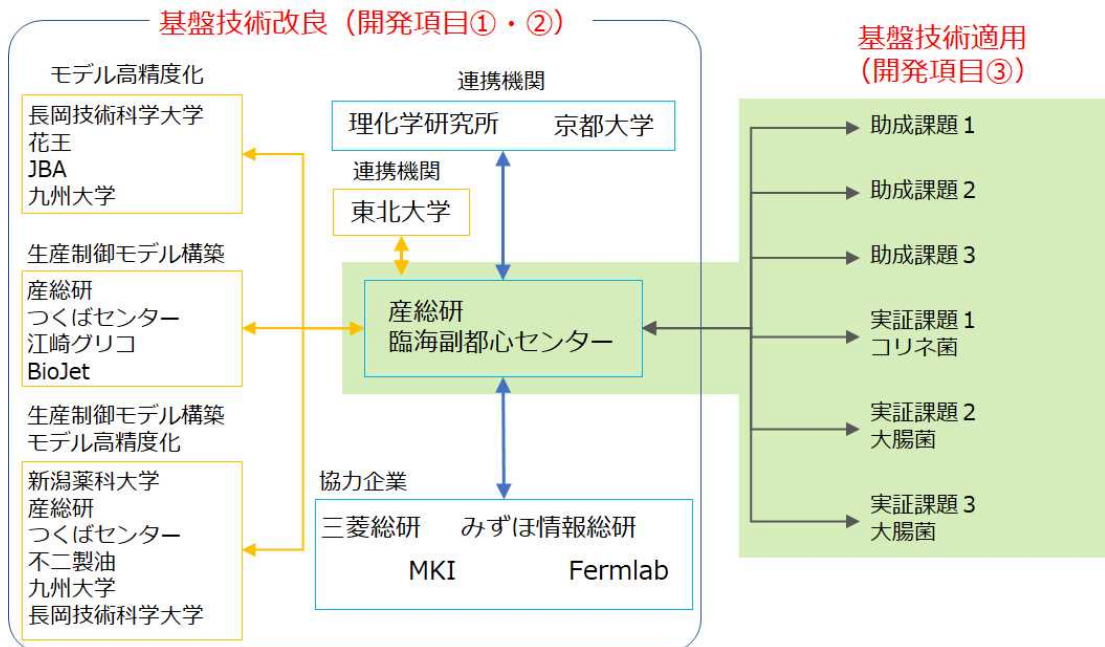


図 3.2.3.2-3-6 課題(2)-3 の実施体制図 (公開版)

本研究開発項目は、実証課題と連携しながら技術開発を実施している。情報解析技術は産総研臨海センターが中心となり、理化学研究所、京都大学と連携して実施した。本情報解析技術を開発する上で必要なゲノム、トランスクリプトーム等の各種オミクスデータ、およびターゲット物質の生産量データ、また遺伝子発現ネットワークモデルで推定された制御因子の正誤判定等の検証実験等については、各実証課題と連携して実施した。

開発項目 1)2)については(3)-1 糸状菌を用いた有用タンパク質同時生産制御による有効性検証、(3)-5 紅麴菌を用いた色素生産制御による有効性検証、(3)-7 ω-3 系多価不飽和脂肪酸含有油脂の生産性向上による有効性検証と連携した。開発項目 3)については(3)-3 有用イソプレノイドの生産性向上による代謝解析技術の有効性検証、(3)-4 コリネ菌を用いた有用芳香族化合物の生産性向上による代謝解析技術の有効性検証、(3)-8 微生物を用いたアルカロイド等の新規生産法の有効性検証と連携するとともに、助成課題 3 件についても開発した技術を適用した。

(5) 運営管理

- ・情報解析技術の開発と適用については、中心機関である産総研臨海センターにおける対面、もしくは Web 会議を活用した月 2 度以上の研究進捗報告、および研究内容についての打ち合わせを行い、研究の方向性を確認しながら本課題を実施した。
- ・実証課題関係者とは、研究実施者レベルでは適宜月 1 度～複数回の研究打ち合わせを行った。
- ・2～3 カ月に 1 度程度、課題関係者全員が集まり、NEDO、PL を含めた進捗報告会と研究方針についての会議を実施した。

(6) 実施の効果

本研究開発項目の実施により、従来法では発見が難しい改変候補遺伝子を探索することが可能になる。具体的な成果は後述するが、事実、従来育種では発見することが困難と予想される複数の制御因子の同定を実現してきた。従来法によって、これらの制御因子を同定するためには、長期間におよぶ育種および大量の変異株作成が必要と予想されることから、少なくとも育種期間の短縮(1/2～1/3)、さらに変異株作成コスト削減(1/2程度)の効果が期待される。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目	現状	最終目標	達成見通し (2020年2月)
1. 生産制御ネットワークモデルの構築と検証	<ul style="list-style-type: none">・物質生産量をターゲットとしたモデル構築技術を開発。実証課題(油脂課題、糸状菌課題、紅麹課題)に適用し、制御因子を推定済。・至適化生合成経路の制御モデル構築技術の開発し、油脂課題および助成課題3件に対し適用済(2-1と連携)	<ul style="list-style-type: none">・物質生産量を増加させるための制御因子推定と検証(3件以上)・至適化生合成経路制御モデル構築と適用(2件以上)	<ul style="list-style-type: none">○(3課題に適用し、制御遺伝子を10件以上提案)○(3課題に適用し、制御遺伝子10件以上提案)
2. 制御実現のためのネットワークモデル高精度化	<ul style="list-style-type: none">・最適化アルゴリズムの改良を実施。改良最適化アルゴリズムによるネットワーク構築を行い、実証課題(油脂課題、糸状菌課題、紅麹課題、コリネ菌課題、大腸菌課題)および助成課題3件へ改	<ul style="list-style-type: none">・制御ネットワークモデルの構築と実証(3件以上)	<ul style="list-style-type: none">○(7課題に適用し、15件以上のネットワークモデル構築と制御因子提案を実施)

	<p>変候補遺伝子提案</p> <ul style="list-style-type: none"> ・少数のデータにおけるリサンプリングによるネットワークモデル構築とロバストな構造抽出アルゴリズムを開発し、特定培養データからネットワークモデル構築した。(油脂酵母課題、糸状菌課題、紅麹課題) 	<ul style="list-style-type: none"> ・特定培養データから推定した制御因子の検証と構築したネットワークモデルの検証(2件以上) 	<p>○</p> <p>(3課題に適用、モデル構築が可能であった1課題について3件の制御遺伝子を提案・検証済)</p>
<p>3. 開発済ネットワークモデルの適用と実用性検証</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・2019年度から新規に助成課題3件、実証課題2件(コリネ菌課題、大腸菌課題2件)を対象としたネットワークモデル構築を実施し、実用性を検証した。 	<ul style="list-style-type: none"> ・構築したネットワークモデルの検証 ・推定した制御因子の検証(3件以上) 	<p>○</p> <p>(6課題でネットワークモデルを構築し、制御因子10件以上を提案した。それぞれについて検証を実施した。)</p>

(8) 研究開発の成果と意義

本研究項目では、2018年度までに実験観測データを解析し、収量向上のために改変すべき遺伝子を提示するシステムティックな手法を開発してきた。遺伝子相互間の発現制御関係のネットワーク構造をデータから同定または推定する(ネットワーク推定)手法を核として、その前段階となるネットワークに組み入れるべき遺伝子のリストアップを行う(遺伝子選択)手法、その後段階となるネットワーク構造からの制御因子探索手法の3点を重点的に開発した。本研究項目は、2.3.3.1(コレステロールエステラーゼの生産性向上による有効性検証)、2.3.3.2(糸状菌を用いた有用タンパク質同時生産制御による有効性検証)、2.3.3.9(ω -3系多価不飽和脂肪酸含有油脂の生産性向上による有効性検証)、2.3.3.7(紅麹菌を用いた色素生産制御による有効性検証)、2.3.3.10(微生物を用いたアルカロイド等の新規生産法の有効性検証)と連携し、実課題を設定したうえでアルゴリズム開発と実データへの適用を行った。

2018年度までは課題(2)-2-1「遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子の探索」および課題(2)-3「統合オミクス解析技術の開発」において下記5つの技術を技術開発項目として設定した。

- 1-1) ターゲット物質生産性に寄与する可能性のある遺伝子群の推定技術(遺伝子選択技術)
- 1-2) 推定した遺伝子間の制御構造をネットワークグラフとしてモデル化する技術(ネットワーク構造推定技術)

- 1-3) 推定したネットワーク構造からターゲット遺伝子発現量の最適制御因子を探索する技術（制御因子探索技術）
- 1-4) 代謝モデルと遺伝子発現制御ネットワークの連結技術の開発
- 1-5) 統合モデルによる高生産システム設計支援ツールの開発

それぞれ、2018年度までに開発してきた技術について詳細を下記に記載する。

1-1) 物質生産性に寄与する可能性のある遺伝子群の推定技術

生体細胞において、物質生産等の細胞内現象に必要な遺伝子は約 10% ~20%と推定されている。しかしながら、現在、物質生産時に実際に貢献している遺伝子の多くは未同定である。そこで、本研究課題では、遺伝子発現データや変異株ゲノムデータ等のオミクスデータから、効率よくかつ高精度に物質生産に寄与している遺伝子群を同定するため、多群検定と BN モデルを組み合わせた遺伝子選択手法を開発した。

による遺伝子選択手法

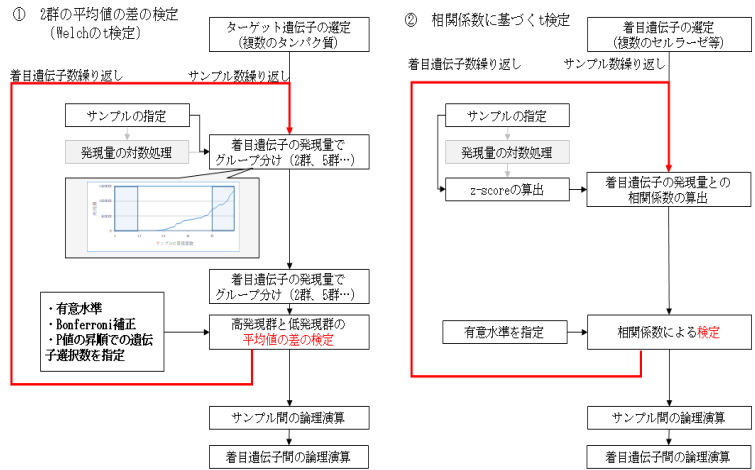


図 3. 2. 3. 2-3-7 論理演算

1-2) 遺伝子間の制御構造をネットワークグラフとしてモデル化する技術

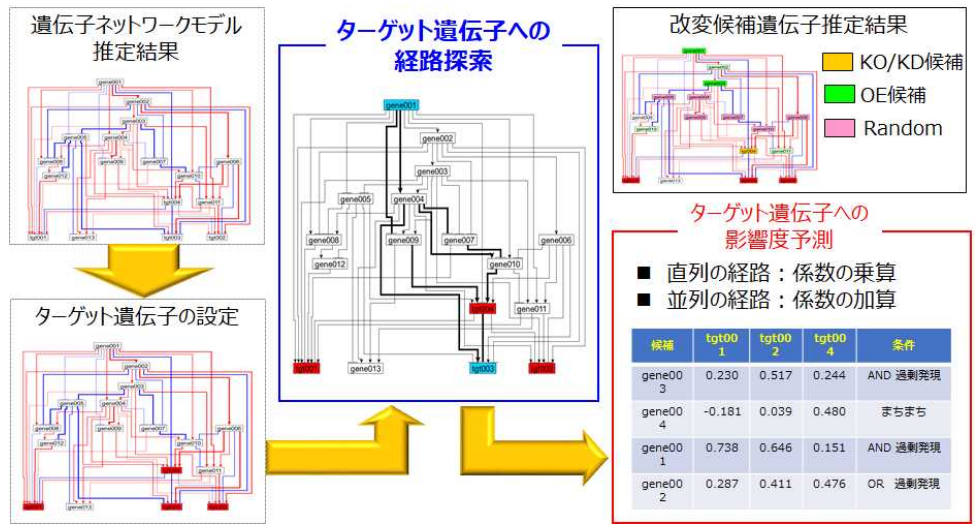
ターゲット物質生産性が、細胞内における多数の因子の影響に起因すると仮定すると、ターゲット物質生産量を結果変数とし、細胞内因子を説明変数とした確率モデルとして表現可能になる。これらの説明変数群と目的変数間の関係性を明らかにするために、多変量解析を基盤とした統計モデルによるネットワーク構造推定手法を開発した。具体的には、ブーリアンモデル、ベイジアンネットワークモデル、構造方程式モデリングによるネットワークモデル構築手法を本プロジェクトの測定データに適用するための改良・改変を行った。



図 3. 2. 3. 2-3-8 ネットワークモデル構築手法

1-3) ネットワーク構造からターゲット遺伝子発現量の最適制御因子を探索する技術

1-1. 1-2. の技術によって、ターゲット物質の生産量に直結するターゲット因子をノードとして包含した遺伝子間の制御構造がネットワークグラフとして推定される。ここで推定されたネットワークグラフの構造は往々にて単純な階層構造にとどまらず、場合によっては再帰的構造を包含した複雑な構造を有する。そのため、ネットワークグラフに存在するどのノード（遺伝子）がターゲット因子の量を調節する上で効率的な制御因子となりうるかについて推定・検証する技術を開発した。



(2)-3-9 制御因子探索技術

1-4) 代謝モデルと遺伝子発現制御ネットワークの連結技術の開発

最適化された代謝モデルを遺伝子発現制御ネットワークモデルと連結する数的手法を開発し、複数のタンパク質生産の制御を可能にするアルゴリズムとして整備した。最終目的はターゲット化合物の収量の最大化、つまり代謝モデル上の特定のノードの数値を最大化することであることから、始点としては代謝モデルを設定し、第一に代謝モデル上で必要な酵素バランスを算出し、そのエッジバランスを実現するために必要な人為操作をシミュレーションによって探索する技術を開発した。

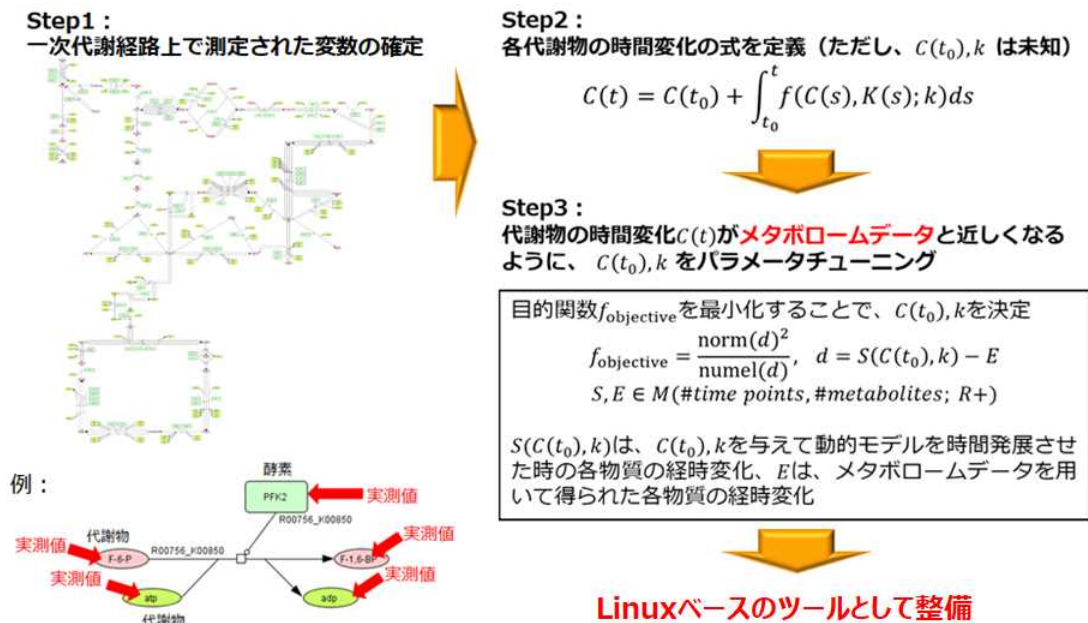


図 3. 2. 3. 2-3-10 ダイナミクス解析による代謝経路上の制御因子探索手法

1-5) 統合モデルによる高生産システム設計支援ツールの開発

ユーザーが標的株の発現データ、ゲノムデータ、メタボロームデータを入力とし、標的となる高生産物質を指定することで、推定されたネットワーク構造と、制御候補遺伝子を出力するシステムを開発した（2018年度プロトタイプ版、2020年度改良版）。

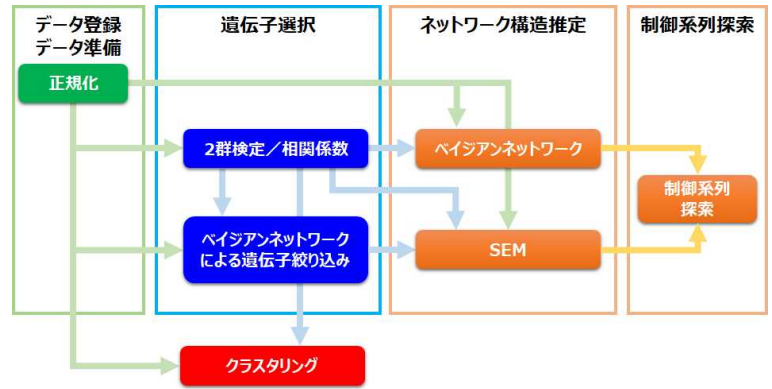


図 3. 2. 3. 2-3-11 設計支援ツールでの解析フロー

2019年度からは、これまでに開発してきたネットワークモデル構築技術の高精度化および汎用性を高めることを目的とし、2課題を1つの「ネットワークモデル構築技術開発」としてまとめ下記3点を研究開発項目として設定した。

- 2-1) 生産制御ネットワークモデルの構築と検証
- 2-2) 制御実現のためのネットワークモデル高精度化
- 2-3) 開発済ネットワークモデルの適用と実用性検証

それぞれの詳細については下記に記載する。

2-1) 生産制御ネットワークモデルの構築と検証

2018年度までは、宿主細胞の物質生産能向上を目的とした遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築技術開発・改良を行ってきた。ここで、微生物宿主の物質生産能を向上させると生育速度が著しく低下する等の問題点が明らかになった。物質生産性を最大化させるためには、単なる遺伝子発現制御ネットワークモデルではなく、生産量総数を結果変数として組み込んだネットワークモデル構築の必要性が明らかになった。そこで、本課題では生産量総数（生産性）を制御するため、遺伝子発現データ以外の表現型データを入れた「拡張ネットワークモデル」構築技術を開発し、各実証課題へ適用した。

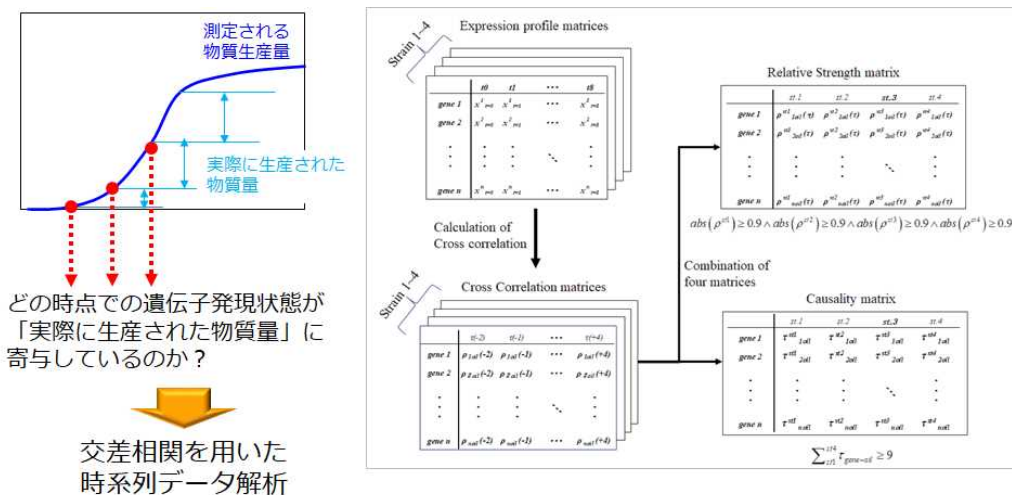


図 3. 2. 3. 2-3-12 拡張モデル構築フロー

2-2) 制御実現のためのネットワークモデル高精度化

ネットワークモデルでは、選択された遺伝子群間の制御関係を因果グラフで表現する。しかしながら、細胞内では選択された遺伝子群間以外にも多種多様な制御関係が働いていることが想定される。そこで、ネットワークモデルを構築する上で、これらの「見えない」遺伝子間の制御関係を考慮したモデル最適化アルゴリズムを開発した。さらに、構築したネットワークモデルで推定された改変候補遺伝子について、実証実験を通じて実際に物質の生産量（生産能）が向上するかを確認を行ったところ、正解と不正解の両方の情報が得られた。これは、最初の遺伝子選択の段階で結果変数に設定した遺伝子や生産量等との関連性が高い遺伝子群を選択したことに起因する「不適切な構成因子の選択」と、ネットワークモデル構築における「数理モデルの限界」の2つの理由が考えられる。そこで、精度向上を目的とし、実験的に検証された正解・不正解情報をモデル最適化の段階に導入したモデル re-fitting アルゴリズムを開発し、より高精度なネットワークモデル構築技術に改良した。

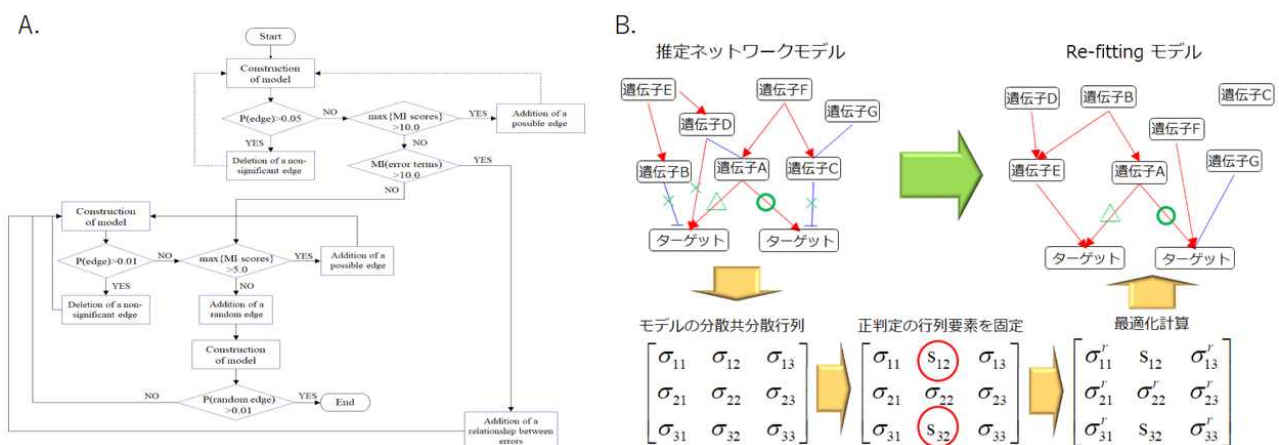


図 3.2.3.2-3-13 A. 高精度化モデル最適化アルゴリズム、B. モデル re-fitting アルゴリズム



図 3.2.3.2-3-14 少数データからのネットワーク構造推定手法

さらに、少数データからのネットワークモデル構築を実現することを目的とし、リサンプリング手法を組み合わせることで、少数データでも確度の高いネットワークモデルを構築するための手法を開発した。

2-3) 開発済ネットワークモデルの適用と実用性検証

これまで開発してネットワークモデル構築技術は、特定の実証課題と連携することで基盤技術として確立してきた。開発した技術の汎用性を高めるため、他の宿主微生物をターゲットとする実証課題や助成課題に適用し、実用性の検証を行った。

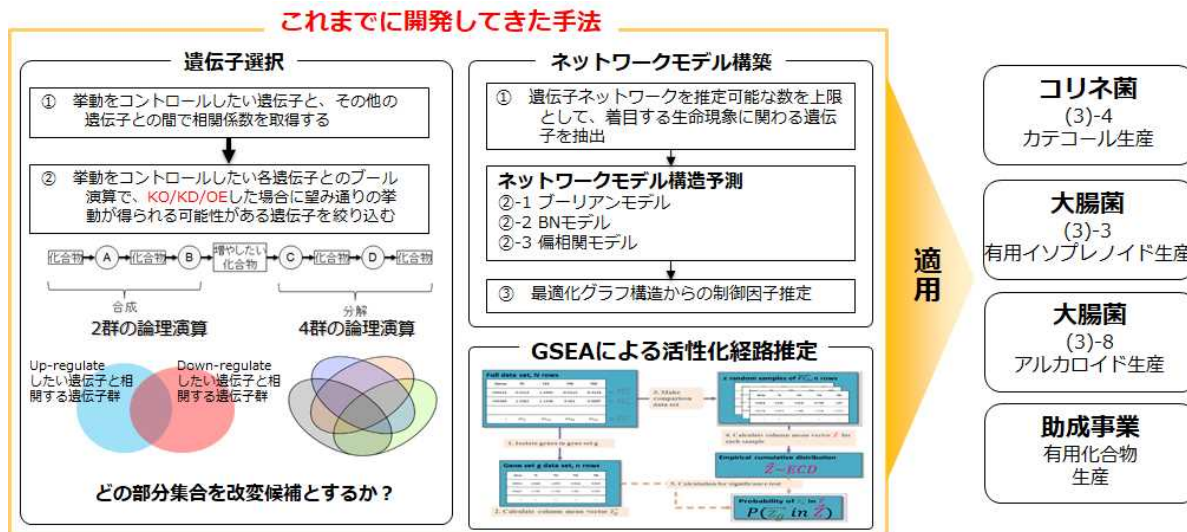


図 3. 2. 3. 2-3-15 開発した手法の適用例

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	1	0	3	0	0	0	0
2017	1	0	14	0	1	0	0
2018	1	6	11	0	1	0	0
2019	8	1	19	0	1	0	0
2020	4	2	2(3)	0	1	0	0

*1：2020年2月時点での出願済み件数、()内は2020年度末の予定件数

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	1	0	0
2018	2	0	0
2019	2	0	1
2020 *1	0 (1)	0 (0)	0 (0)

*1：2020年2月時点での出願済み件数、()内は2020年度末の予定件数

課題名：C(2)-4 文献・公開・測定データを利用した知識ベース開発

担当機関：京都大学、日立製作所、九州大学、神戸大学、理化学研究所、大阪大学、医薬基盤・健康・栄養研究所

(1) 背景と目的

スマートセル開発の DBTL サイクル (Design-Build-Test-Learn) おける学習 (Learn) プロセス、すなわち各種測地データや代謝モデルの解釈と、それをもとにした次の設計仮説の創出プロセスの多くは、開発者個人の知識背景や、手作業による文献調査・データベース検索に依存している。こうした属人的な知識獲得プロセスは、スマートセル開発における律速であるとともに、体系的な知識の蓄積・発見・再利用が困難であるなど、技術的に解決すべき大きな課題となっていた。加えて、近年の機械学習・人工知能 (AI) 技術の進展に伴い、既存データからの新たな知識・パターン抽出も可能となってきたことから、こうした技術の応用も期待されている。

こうした背景のもと、本研究項目の目的は、スマートセル開発に特化した文献・公開・測定データ等からの情報抽出および知識ベースの構築である。文献・公開・測定データなどから、データ処理・AI 技術により知識を収集・整理し、既存の Design/Build/Test に不足した知識を補完する。これにより、オミクス測定データや代謝モデルの解釈の迅速化、代謝経路設計・酵素反応選択の意思決定支援、更には遺伝子・代謝物に関する新たな知識発見と獲得をめざす。更には、有効性検証と連動した知識ベース拡充と AI 基盤技術高度化を進め、本プロジェクトが対象とする宿主・生産物への適用拡大を狙う。

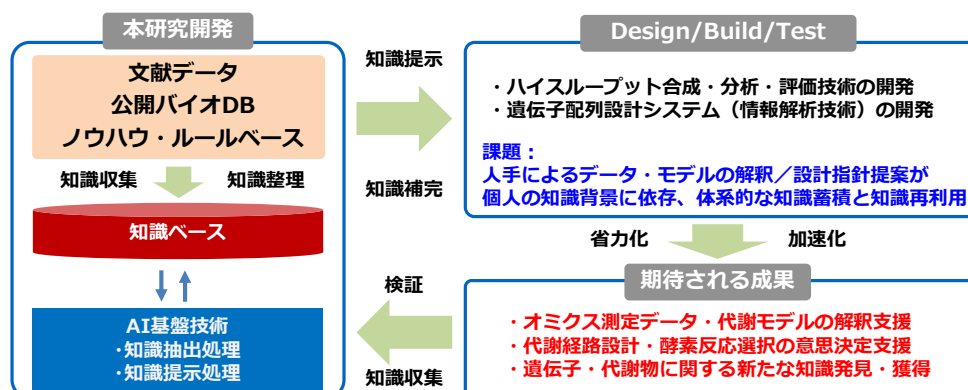


図 3.2.3.2-4-1 本研究開発項目の目的

(2) 位置づけ、目標値

本研究項目が対象とする知識ベースおよびデータ処理・AI 基盤技術の位置づけは、DBTL サイクルの学習 (Learn) 部分におけるデータ解釈・意思決定の迅速化である。これまで、文献等からの情報抽出により、酵素反応・代謝パスウェイ・遺伝子制御ネットワーク等に関するデータベース・知識ベースが数多く構築されてきているが、その多くは生物機能の解明といった、人間のバイオ研究者向けに情報を整理する目的で構築されてきた。そのため、スマートセル開発に資する知識の抽出には、依然として人手による検索・整理に依存している状況である。これに対し、本研究項目では、知識ベース化の対象をスマートセル開発に特化し、知識の抽出と整理に AI 技術を活用することで差別化を狙う。

本研究開発の最終目標として、知識ベース有効利用によるスマートセル設計工数短縮化の実証と、各課題における知識抽出・整理技術の実用化検証を想定する。そのために、中間目標では、スマートセル開発の各課題に応じた知識ベース構築ワークフロー策定と、それを構成する AI 技術基盤の開発を目標とした。

【中間目標（2018 年度）】

研究開発項目を、①文献データ・公開データ等からの知識ベース構築と②知識ベースの有効性検証と AI 基盤構築に大別する。①では文献・公開データベース等からのデータ抽出・処理技術から汎用的な知識ベース構築技術の開発を主として設定し、②では各機関と共同で各種スマートセル開発課題（サブテーマ）を実施することで、データ解釈・学習システムの開発とそれに伴う①の知識ベース拡充を行う仕組みとした。各研究開発項目の目標については、D/B/T 技術開発を行う機関・企業が将来要望する工数レベルから算出した。

表 3.2.3.2-4-1 研究開発項目と中間目標

研究開発項目	中間目標（2018 年度末）
①-1. 知識ベース構築ワークフロー開発	1) 知識ベース基盤プロトタイプ構築とサブテーマ展開 2) 各サブテーマ展開に基づいた知識ベース構築ワークフロー策定 3) 知識収集（キュレーション・アノテーション）の枠組み構築
①-2. 知識ベース構築のための AI 技術基盤開発	①-2-a: 文献・公開データからのオミクス数理特徴量抽出技術の開発 1) オミクス情報数理特徴量抽出方法論の確立 2) 知識ベース基盤プロトタイプへの統合
	①-2-b: 文献横断オミクスデータ解読支援技術の開発 1) オミクス情報の共起関係・関係性抽出手法開発 2) 関係性データベース構築と知識ベース基盤プロトタイプへの統合
②-1. 代謝設計提案技術の開発	②-1-a. 知識ベースを利用した最適な代謝設計の提案技術の開発 1) 遺伝子改変情報推定モデルの設計 2) 知識ベース概念設計およびワークフロー構築
	②-1-b. 菌株設計に資する遺伝子-表現型関係情報取得技術の開発 ・現行プロジェクトのターゲット化合物を対象とした共起・関係性知識ベースの構築と知識ベース基盤組み込み
	②-1-c. シアノバクテリアによる物質生産に関する代謝および生産条件に関する知識ベースの構築 ・シアノバクテリアによる物質生産に関する文献データベースおよび実験データベースの構築
②-2. アミノ酸配列情報から酵素活性を推定する知識ベースの有効性検証	1) 文献からのデータを格納するデータベース構築 2) 一次配列から酵素活性を予測するモデル構築

	3) 予測モデルによる一次配列の推定と実験による確認
②-3. 長鎖 DNA のデザインを対象とした論文データの知識ベース化有効性検証	1) 長鎖 DNA にかかる知識抽出手法の開発 2) 長鎖 DNA デザイン設計支援知識提示手法および知識ベース概念設計
②-4. 知識ベースを利用した化合物産生可能性判定の検証	1) 化合物産生可能性判定ワークフローの構築 2) 知識ベース基盤プロトタイプへの組み込み

【最終目標（2020 年度）】

2018 年度までに開発した技術の統合を進め、モデルカスタマイズ、精度向上を含めた検討を行う。また、有効性検証テーマと連携し実開発課題への適用例を増やし、内部処理を拡充することを目標とした。これらにより、スマートセル開発における工数削減効果を検証し、実用化の見通しを立てることとした。

研究開発項目としては、2018 年度までの②知識ベースの有効性検証における各開発項目を、①代謝系設計提案技術と②長鎖 DNA 配列設計の 2 つに集約し、実用化にむけた課題での有効性検証を目標とした。また、2018 年度までの知識ベース基盤プロトタイプと、AI 基盤技術を③スマートセル設計支援知識ベースに集約し、実課題を通じたスマートセル設計工数短縮化の検証を目標とした。具体的な目標は以下の通り。

表 3.2.3.2-4-2 研究開発項目と中間目標

研究開発項目	最終目標（2020 年度末）
①知識抽出・整理技術を活用した代謝系設計提案技術の研究開発 i) 代謝設計提案モデル ii) 酵素反応データ学習 iii) 酵素データ学習	実用化合物生産での代謝系設計提案有効性検証（適用件数 3 件以上）
②知識抽出・整理技術を活用した長鎖 DNA 配列設計の研究開発	実課題への適用による長鎖 DNA 配列有効性検証（適用件数 3 件以上）
③スマートセル設計支援知識ベースの研究開発	実課題への適用を通じた知識ベースによるスマートセル設計工数短縮化検証（設計総工数 1/2）

(3) 全体計画

中間目標(2018 年度)までに、各サブテーマと連携して知識ベース構築のためのワークフロー開発を進めるとともに、それらの知見を集約した知識ベース基盤のプロトタイプの構築と、AI 基盤技術の方法論を確立した(表 3.2.3.2-4-3)。2019 年度から 2020 年度にかけては、研究開発項目を①代謝設計提案、②長鎖 DNA 配列設計、③知識ベース構築に集約し、プロジェクト内有効性検証テーマと連携して、開発技術の有効性検証を行った(表 3.2.3.2-4-4)。

表 3. 2. 3. 2-4-3. 全体計画 (2017～2018 年度)

事業項目	2017年度		2018年度			
	第3 四半期	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期
①- 1. 知識ベース構築 ワークフロー開発		知識ベース基盤 プロトタイプ構築		サブテーマ展開・高度化 知識収集枠組み構築		
①-2-a. 文献・公開デー タからのオミクス数理特徴 量抽出技術の開発		低分子加工物 数理特徴量抽出法確立	対象オミクス 拡充		知識ベース基盤 統合	
①-2-b. 文献横断オミク スデータ解読支援技術の 開発		オミクス情報共起関係・ 関係性抽出手法開発	手法拡張 データベース構築		知識ベース基盤 統合	
②-1-a. 知識ベースを利用 した最適な代謝設計の提 案技術の開発		遺伝子改変情報と 表現型の相関データ 様式設計	相関データ様式妥当性検証 遺伝子改変情報集指定モデルの設計			
		遺伝子改変情報推定 インタフェースの設計	ワークフロー設計		知識ベース概念設計	
②-1-b. 菌株設計に資す る遺伝子-表現型関係情 報取得技術の開発		対象文献・データベース 調査およびデータ収集	共起・関係性データベース構築、 知識ベース基盤組み込み			
		知識ベース インタフェース設計				
②-1-c. シアノバクテリアに よる物質生産に関する代 謝および生産条件に関す る知識ベースの構築		文献からの情報収集、 データベース設計	データベース構築・ 改良		インタフェース構築	
		シアノバクテリアの 物質生産実験	シアノバクテリアの 物質生産実験データ収集			
②-2. アミノ酸配列情報か ら酵素活性を推定する知 識ベースの有効性検証		文献からの情報収集、 データベース設計、 予測モデル設計	データベース構築、 予測モデル開発		予測モデル改良	
		酵素変異体作成と 酵素活性測定法確立	酵素活性測定、 測定HTP化		予測結果の 実験による確認	
②-3. 長鎖DNAのデザイン を対象とした論文データの 知識ベース化有効性検証		長鎖DNAに関する 論文収集・ ワークフロー設計	長鎖DNA単純記述 データ設計		長鎖DNA構築可能性 判定インタフェース設計	
			長鎖DNA単純記述データ抽出方法設計			
②-4. 知識ベースを利用し た化合物産生可能性判 定の検証		ワークフロー構築、 インタフェース設計	知識ベース基盤 組み込み		アルゴリズム高度化	

表 3. 2. 3. 2-4-4. 全体計画 (2019~2020 年度)

事業項目	2019年度				2020年度			
	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期
①知識抽出・整理技術を活用した代謝系設計提案の研究開発	代謝系設計提案 モデル開発							
		酵素反応データ学習・ 活性推定モデル開発	有効性検証			有効性検証(実用化合物)・ モデルカスタマイズ		
②知識抽出・整理技術を活用した長鎖DNA配列設計の研究開発	配列パターン 最適化モデル開発			長鎖DNA 合成		実課題適用・ モデルカスタマイズ		
③スマートセル設計支援 知識ベースの研究開発		知識ベース構築			カスタマイズ		工数短縮化検証	

(4) 実施体制

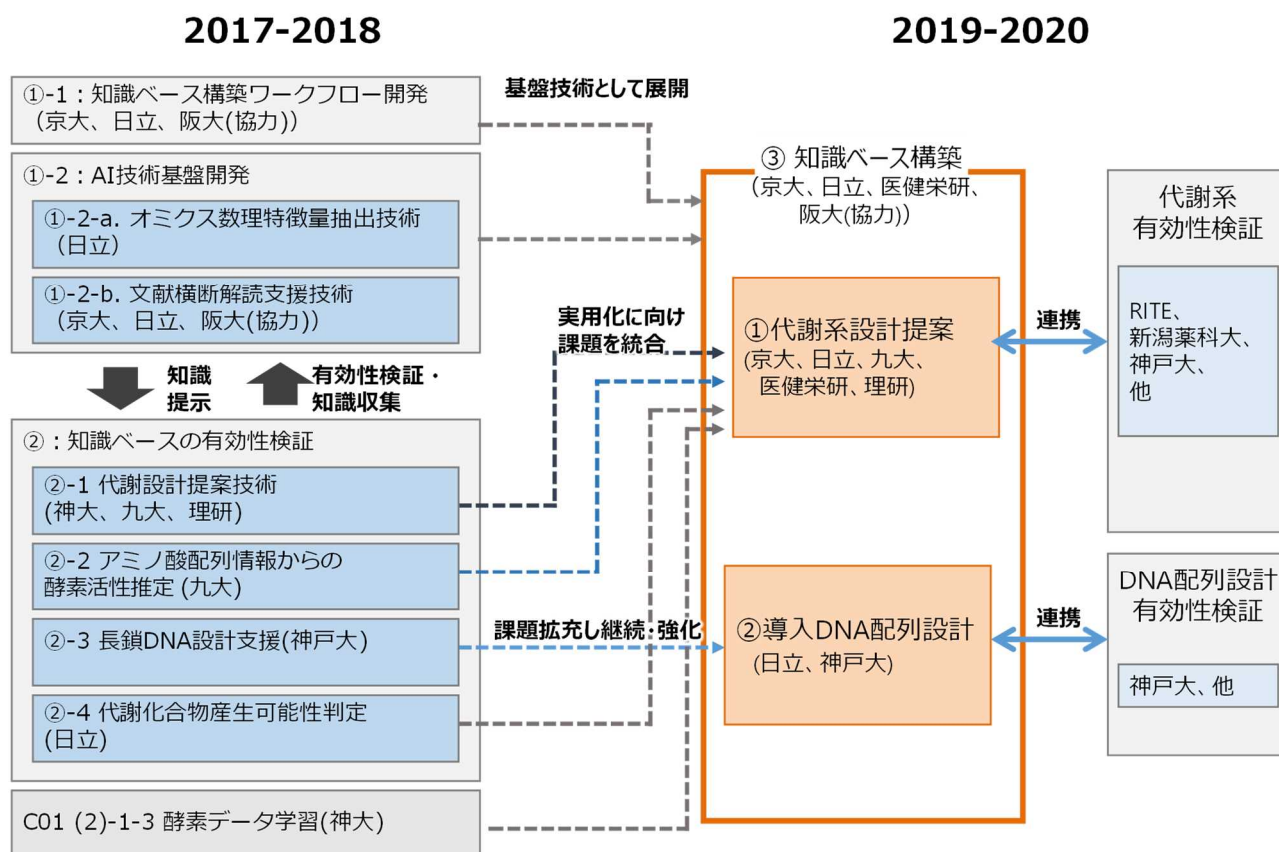


図 3. 2. 3. 2-4-2. 実施体制図

(5) 運営管理

テーマの運営に関しては、主として知識ベース開発を担当する機関（京都大学・日立製作所）と、検証課題を担当する各機関（神戸大学、九州大学、理化学研究所）との間で、1 カ月に一度を目安に連絡会議を実施し、開発進捗を共有している。また、更に、半年に一度全体会議を開催

し、サブテーマを含めた研究開発項目全体の進捗を共有している。有効性検証で得られた知見を随時フィードバックすることで、データ処理・AI 技術基盤の開発および知識ベース基盤の概念設計を促進できた。

(6) 実施の効果

本研究項目が対象とする知識ベースおよびデータ処理・AI 技術は、特定の宿主・生産物に依らず、スマートセルが対象とする事業全般において開発の効率化する技術であり、多分野での適用が期待される。また、本技術成果の活用により、スマートセル開発工数が圧縮されることで人的・時間的コストの削減、及びそれに伴う省エネルギー化を期待できる。

(7) 目標の達成度

表 3.2.3.2-4-5. 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018 年度末)
①-1 知識ベース構築ワーク フロー開発	1) 知識ベース基盤プロ トタイプ構築とサブ テーマ展開 2) 各サブテーマ展開 に基づいた知識ベース 構築ワークフロー策定 3) 知識収集（キュー レーション・アノテー ション）の枠組み構築	1) 知識抽出部、知識提示部を基 本処理構造とした知識ベース 基盤プロトタイプ構築完了。項目 ②-1-b へ展開。 2) 各サブテーマにおけるワー クフロー策定完了。 3) 知識収集の枠組みの概念設 計を完了。	○
①-2-a 文献・公開データベー スからのオミクス数理 特徴量抽出技術の開発	1) オミクス情報数理 特徴量抽出方法論の確 立 2) 知識ベース基盤プロ トタイプへの統合	1) 低分子化合物および酵素反 応予測を対象に数理特徴量抽出 方法論を確立。特徴量の妥当性 を②-4 をユースケースに確認。 2) 知識ベース基盤プロトタイ プへ統合に向けた入出力設計完 了。	○
①-2-b 文献横断オミクスデー タ解読支援技術の開発	1) オミクス情報の共 起関係・関係性抽出手 法開発 2) 関係性データベー ス構築と知識ベース基 盤プロトタイプへの統 合	1) 公開文献から、物質生産関連 のオミクス情報の共起関係を抽 出し可視化するワークフローを 構築完了。共起関係の抽出精度 向上を実施。word2vec を用いた 関係性抽出手法を開発。 2) 知識ベース基盤プロトタイ プに統合し、Saccharomyces Genome Database に公開される 情報を起点に文献情報を収集 し、フローの検証を完了	○
②-1-a 知識ベースを利用した 最適な代謝設計の提案 技術の開発	1) 遺伝子改変情報推 定モデル設計 2) 知識ベース概念設 計および ワークフロー構築	1) スマートセル特有の文献情報 を用いた 遺伝子改変情報推定モデルの 設計と妥当性の確認を完了。 2) 設計代謝経路を入力として 遺伝子改変候補を提案する、 知識ベースの概念設計および ワークフローの構築を完了。 3) 知識ベース統合作業を先行 着手、プロジェクト内展開	○
②-1-b 菌株設計に資する遺伝	1) 現行プロジェクト のターゲット化合物を	1) 微生物によるカロテノイ ド・アルカロイド生産に関する	○

子-表現型関係情報取得技術の開発	対象に共起・関係性知識ベース構築と知識ベース基盤組み込み	文献収集を対象に共起・関係性知識ベース構築、オミクスデータの共起関係性を可視化。知識ベース基盤プロトタイプに組み込みを完了。	
②-1-c シアノバクテリアによる物質生産に関する代謝および生産条件に関する知識ベースの構築	1) シアノバクテリアによる物質生産に関する文献データベースおよび実験データベースの構築	1) 遺伝子組換えシアノバクテリアによる物質生産に関する論文 100 報を選別、遺伝子改変など重要項目の抽出を完了した。抽出項目を格納するデータベースの構築を完了。 2) 文献情報に基づいて、物質生産シアノバクテリアを 1 件構築、生産実験を完了。	○
②-2 アミノ酸配列情報から酵素活性を推定する知識ベースの有効性検証	1) 文献データの格納データベース構築 2) 一次配列から酵素活性を予測するモデル構築 3) 予測モデルによる一次配列の推定と実験による確認	1) 文献情報を整理するデータベースを設計。 2) 深層学習を用いた塩基配列情報を解析する基本モデルを設計。一つの酵素を対象として、ランダム変位導入ライブラリを作製。 3) 酵素活性の測定を非破壊で、より容易に行うために、蛍光強度で評価できるシステムを構築。	○
②-3 長鎖 DNA のデザインを対象とした論文データの知識ベース化有効性検証	1) 長鎖 DNA にかかる知識抽出手法の開発 2) 長鎖 DNA デザイン設計支援知識提示手法および知識ベース概念設計	1) 長鎖 DNA にかかる知識抽出ワークフロー設計を完了。フローを自動化したプロトタイプの開発を完了。同プロトタイプを神戸大に設置完。実合成による検証着手。 2) 自動抽出した知識を基にした長鎖 DNA デザイン設計支援知識提示手法および知識ベース概念設計を完了。	○
②-4 知識ベースを利用した化合物産生可能性判定の検証	1) 化合物産生可能性判定ワークフローの構築 2) 知識ベース基盤プロトタイプへの組み込み	1) オミクス数理特徴量 (①-2-a) を利用した化合物産生可能性判定ワークフロー構築を完了。プロトタイプを作成し妥当性を確認。 2) 知識ベース基盤プロトタイプ組込みに向けたインターフェイスを設計完了。	○

表 3.2.3.2-4-6. 最終目標の達成度

研究開発項目	最終目標	成果	達成度 (2020 年度)
①知識抽出・整理技術を活用した代謝系設計提案技術の研究開発	実用化合物生産での代謝系設計提案有効性検証 (適用件数 3 件以上)	<ul style="list-style-type: none"> 文献からの知識抽出により、改変遺伝子提案を行う代謝設計提案モデルを開発、有効性検証テーマ 3 件で実用性を検証 酵素反応データを利用した学習方法を開発、有効性検証テーマ 3 件で実用性を検証 非破壊酵素活性測定 HTP 法の 	○

		改良をさらに行い、10,000 以上の変異体酵素の配列データを取得、それを用いた酵素活性推定 AI モデルの作成・改良完了。	
②知識抽出・整理技術を活用した長鎖 DNA 配列設計の研究開発	実課題への適用による長鎖 DNA 配列有効性検証（適用件数 3 件以上）	<ul style="list-style-type: none"> 設計代謝系を入力として、合成実現性の高い長鎖 DNA 配列を出力する最適化モデルを開発。 最適化モデルを、代謝経路 3 件へ適用 (MEP 経路、α ケトグルタル酸、チロシン)。得られた出力結果によりモデルをカスタマイズ、配列判定精度が最大 3 倍向上 提案された 3 件の長鎖 DNA を実構築し、物質生産への有効性を検証 	○
③スマートセル設計支援知識ベースの研究開発	実課題への適用を通じた知識ベースによるスマートセル設計工数短縮化検証（設計総工数 1/2）	<ul style="list-style-type: none"> 実課題 3 件 (カテコール生産コリネ菌、不飽和脂肪酸油脂酵母、シャーシ株 & キラーマテリアル生産株) に知識ベースによる設計改良ワークフローを適用、生産性向上を実証。 通常の文献検索を用いた知識抽出と比較し、設計工数短縮効果 50% 以下を見通して確認 	○

(8) 研究開発の成果と意義

【2017 年度～2018 年度】

①-1. 知識ベース構築ワークフロー開発（担当機関：京都大学、日立製作所、大阪大学）

2017 年度から 2018 年度にかけて、スマートセル開発ワークフローに沿って知識を蓄積するために、知識抽出部、知識提示部、および制約条件設定部からなる知識ベース基盤の基本処理構造を設計した。設計した基本処理構造に基づき、知識ベース基盤プロトタイプを、項目②-1-b をテストケースとして、計算サーバー上に構築した。また、②-1～②-4 における各サブテーマにおいて、知識抽出部、知識提示部を活用するワークフローの策定を行い、知識収集の枠組みの概念設計を完了した。

本項目で開発した知識ベース基盤プロトタイプは、2019 年度以降の研究開発項目③「スマートセル設計支援知識ベース」のプラットフォームとして、サブテーマにおいて策定した知識ベース構築ワークフローの統合基盤として活用している。

①-2-a. 文献・公開データからのオミクス数理特徴量抽出技術の開発（担当機関：日立製作所）

人の知見によらない新規代謝・合成経路設計の実現を目指し、低分子化合物および酵素反応予測を対象に数理特徴量抽出技術の方法論を確立した。具体的には、公開されている低分子化合物データベース (ChEMBL) から、低分子代謝化合物の構造記述データ (SMILES) を大量に取得し、機械学習により構造特徴を 292 次元の数値ベクトル (特徴量ベクトル) に変換する構造特徴量符号化器を構築した。この構造特徴量符号化器を用いて、KEGG・PubChem から取得した代謝パス

ウェイ上の反応物、生成物およびその酵素反応を特徴量ベクトルに変換し、これをデータベース化（オミクス特徴量 DB 化）を完了した。開発した特徴量について、②-4 をユースケースにワークフローを構築し妥当性の確認を行った。

本項目で開発した数理特徴量抽出技術およびオミクス特徴量 DB をベースに、2019 年度以降の研究開発項目①代謝設計提案技術において酵素反応データ学習技術を開発した。

①-2-b. 文献横断オミクスデータ解読支援技術の開発（担当機関：京都大学、日立製作所、大阪大学）

文献・DB に散在した物質生産に資するオミクスデータ因果関係の解読と整理を目的に、公開文献を収集し、物質生産関連のオミクス情報の共起関係を抽出し可視化するワークフローを構築した。また、Saccharomyces Genome Database (SGD) に公開される情報を起点に文献情報を収集し、フローの検証を行った。構築したワークフローでは、共通となる自然言語処理をモジュール化し、それらを柔軟に組み合わせることで所望の共起・関係性を解析できる構成とした。文献情報が充実している出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を例題として、SGD に公開される情報を起点に文献情報を収集、遺伝子・酵素・化合物と関連用語の共起を解析し、ネットワーク情報（グラフデータ）として蓄積する一連のワークフローを構築し、知識ベース基盤への組込みを行った。更に、アルゴリズムの見直しを行い、共起関係の抽出精度を向上させるとともに、word2vec による関係性抽出手法を開発した。

本項目で開発した文献横断オミクスデータ解読支援技術をベースに、2019 年度以降の研究開発項目①代謝設計提案技術において代謝設計提案モデルを開発した。

②-1-a. 知識ベースを利用した最適な代謝設計の提案技術の開発（担当機関：理化学研究所、神戸大学、日立製作所、京都大学）

目的化合物と遺伝子改変候補の相関を推定する遺伝子改変情報推定モデルを設計し、妥当性の検証を完了した。また、設計代謝経路を入力として、推定モデルを用いて遺伝子改変候補を提案する知識ベースの概念設計、およびワークフローの構築を完了した。

また、本推定モデルを用いて遺伝子改変候補を提案する知識ベースの概念設計を行い、インターフェイスを設計した。本インターフェイスは、導入・削除といった遺伝子改変候補の提案と共に、その提案の根拠となった文献を提示する。同時に、実験結果等の開発者のフィードバックを入力できるようにしたことで、遺伝子改変に関する知見の収集を行い、知識としての蓄積と、推定モデルの改良に活用するものとした。連携する神戸大に展開し、知識ベース統合作業を先行着手、ワークフローの検証を行った。

本項目で開発した代謝設計の提案ワークフローに、上述の文献横断オミクスデータ解読支援技術を統合し、2019 年度以降の研究開発項目①代謝設計提案技術において代謝設計提案モデルを開発した。

②-1-b. 菌株設計に資する遺伝子-表現型関係情報取得技術の開発（担当機関：神戸大学、日立製作所、京都大学）

2017 年度から 2018 年度にかけて、微生物によるカロテノイド、アルカロイド生産に関する文献の調査・収集を完了した。収集した論文をもとに、オミクスデータの共起関係を抽出し、ネッ

トワーク情報として可視化するインターフェイスを設計した。本項目は、基盤技術として開発する項目①-2-bの直接的な実用展開例として、プロジェクトのニーズに応じた、表現型などスマートセル開発に特化した共起・関係性の解析インターフェイスの拡張に取り組んだ。

本項目で開発した技術は、2019年度以降の研究開発項目③「スマートセル設計支援知識ベース」のプラットフォームに統合し、サブテーマにおいて策定した知識ベース構築ワークフローの統合基盤として活用している。

②-1-c. シアノバクテリアによる物質生産に関する代謝および生産条件に関する知識ベースの構築（担当機関：九州大学、日立製作所、京都大学）

2017年度は、PubMed centralを中心とした文献データベースから、遺伝子組換えシアノバクテリアを用いた物質生産に関する論文100報弱を選別し、導入した遺伝子、培養条件などを含む、物質生産に重要な項目のデータを抽出した。抽出した重要項目に基づいて、データを格納、整理する物質生産情報データベースを設計した。また、選別した文献情報から一つの文献を選び、その文献情報に基づいて、物質生産するシアノバクテリアを1件構築し、生産実験を行った。

本項目で開発した技術は、2019年度以降の研究開発項目③「スマートセル設計支援知識ベース」のプラットフォームに統合し、微生物開発の設計知識を蓄積・整理する統合基盤として活用している。

②-2. アミノ酸配列情報から酵素活性を推定する知識ベースの有効性検証（担当機関：九州大学、日立製作所、京都大学）

2017年度から2018年度にかけては、文献データを整理するデータベースの設計と、塩基配列情報を解析する深層学習モデルを用いた基本的な予測モデル設計の検討を行った。また、一つの酵素を対象として、ランダム変位導入をError-prone PCR法を用いて行い、ランダム変位導入ライブラリを作成した。さらに、モデルの学習に必要な導入変位に対応した酵素活性の測定を、非破壊で容易に行うために、蛍光強度で評価できるシステムの構築を行った。

本項目で開発した予測モデルおよび評価システムをもとに、2019年度以降の研究開発項目①代謝設計提案技術において酵素活性推定技術を開発した。

②-3. 長鎖DNAのデザインを対象とした論文データの知識ベース化有効性検証（担当機関：神戸大学、日立製作所、京都大学）

2017年度から2018年度にかけては、長鎖DNAの設計を自動化する目的で、文献・公開データベースからDNA配列情報を収集し、支援情報として提示するワークフローを設計した。設計したワークフローの一部を自動化したプロトタイプシステムを開発し、神戸大においてフローの妥当性を検証した。また、自動抽出した知識を基とした長鎖DNAデザイン設計支援知識提示手法および知識ベース概念設計を完了した。

本項目で開発したワークフローは、2019年度以降の研究開発項目②長鎖DNA設計の研究開発として継続し、フローの高度化を行った。

②-4. 知識ベースを利用した化合物産生可能性判定の検証（担当機関：日立製作所）

2017年度から2018年度にかけては、オミクス数理特徴量（項目①-2-a）を利用した化合物賛成可能性判定のワークフロー構築を完了した。具体的には、①-2-aで確立したオミクス数理特徴量抽出技術を用いて、公開データベースから既知の酵素反応の反応物・生成物ペアを取得し、各化学構造特徴ベクトルの差分ベクトルを酵素反応特徴ベクトルと定義してデータベース化した。この酵素反応特徴ベクトルのデータベースを酵素番号と紐づけて学習させ、反応物・生成物ペアから酵素番号を推定するプロトタイプシステムを開発した。また、知識ベース基盤プロトタイプ組み込みに向けたインターフェイスの設計を完了した。

本項目で開発した数理特徴量抽出技術およびオミクス特徴量DBをベースに、2019年度以降の研究開発項目①代謝設計提案技術における酵素反応データ学習技術を開発した。

【2019年度～2020年度】

① 知識抽出・整理技術を活用した代謝系設計提案技術の研究開発（担当機関：京都大学、日立製作所、九州大学、医薬基盤・健康・栄養研究所、理化学研究所）

i. 代謝系設計提案モデル

2019年度から2020年度にかけては、文献の設計有用度を判定するスマートセル文献検出技術を開発し、ゲノムスケールモデル（GSM）を起点とした文献知識とFlux Balance Analysis（FBA）の結果を統合・補完して改変遺伝子提案を行う代謝設計提案モデルを開発した（図3.2.3.2-4-3）。スマートセル文献検出技術は、代謝工学論文誌などスマートセル設計に関連する文献に出現する特徴語を予め学習しておくことで（スマートセル文献モデル）、任意の検索クエリに対して設計課題解決に有用な文献を提示する技術である。この技術へ、FBAからの提案内容を入力することで、スマートセル設計に有用な文献を検出し、その文献内で言及された遺伝子を提示することで、FBAなど設計ツールの補完を行うものである。開発した技術を、大腸菌による化合物22種（シキミ酸、コリスミ酸、アミノ酸20種）の生産課題に対して適用し、FBAとの結果比較において、FBA単独では抽出できない改変遺伝子候補（生産経路補強因子や転写制御因子）の提案が可能であることを確認した。

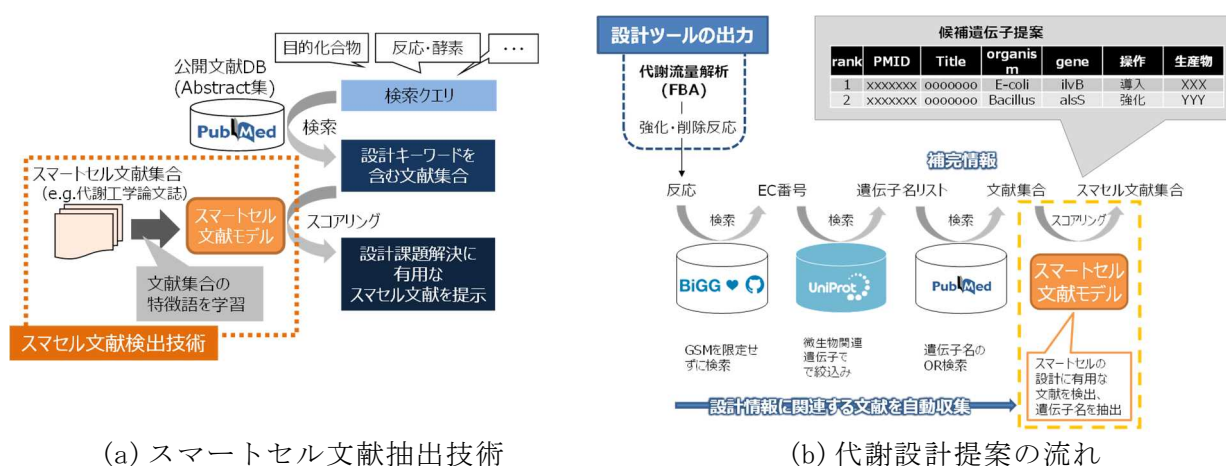


図 3.2.3.2-4-3. 代謝設計提案モデル

ii. 酵素反応データ学習

2019年度から2020年度にかけては、機械学習の一つであるサポートベクターマシン（SVM）やニューラルネットワーク技術を用いた酵素反応データの学習ならびに探索手法を開発した（図

3.2.3.2-4-4)。KEGG、BRENDA、NCBI、UniProt、PubChem、ChEMBL等のデータベースをもとに、既知酵素の配列・反応およびタンパク質としての特性・特徴データ(E)と基質(S)・生成物(P)の化学構造・物理化学的特性データを利用し、酵素(タンパク質)についてはPROFEAT、化合物についてはDragonと言った数値化手法を利用した。データベースまたは測定データをもとに、正例(正解ラベルの付く)、負例(不正解ラベルの付く)の学習データセットを作成し、機械学習を行うことにより、任意の反応を触媒するかあるいは任意のEC番号に該当するか否かの判別モデルを生成し、候補配列を判別スコアをもとに提示することとし、有効性検証課題(江崎グリコ社、新潟薬科大学、地球環境産業技術機構(RITE))への適用と、検証結果の再学習プロセスの開発により、有用な酵素配列を見出すことに成功した。

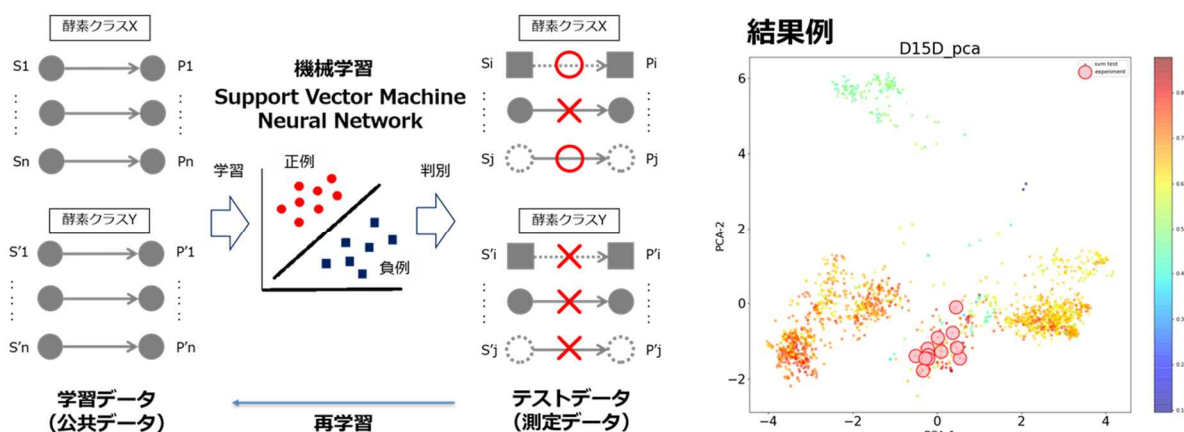


図 3.2.3.2-4-4. 酵素反応データ学習技術

また、2018年度までに開発したオミクス数理特徴量抽出技術をもとに、既知・未知の酵素反応後によって起こり得る化合物構造を予想し、新規代謝経路を探索する技術を開発した(図 3.2.3.2-4-5)。具体的には、(1)代謝物の数理特徴量抽出技術を用いた代謝反応ベクトル抽出(図 3.2.3.2-4-5(a))、(2)組合せ最適化技術を用いた代謝系設計(候補経路生成)(図 3.2.3.2-4-5(b))、および(3)公開代謝経路DB(KEGG)上の代謝反応ベクトルを学習させたアンサンブル型ニューラルネットワークによる反応可能性予測技術の3点を特徴とする代謝経路提案技術を開発した。本提案技術を、公開論文にて報告されている、公開代謝経路DB(KEGG)上に収載されていない酵素反応を含む代謝経路探索例題に適用したところ、論文で報告されていた経路の探索に成功した。このようにして、EC番号が規定されていない酵素反応を含む新規代謝系提案への有効性を確認した(図 3.2.3.2-4-5(c))。

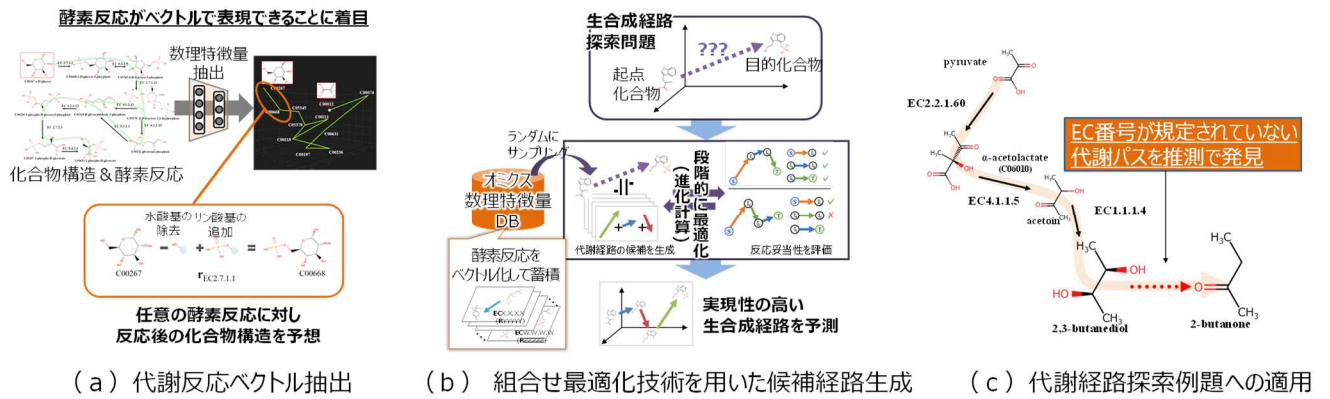


図 3.2.3.2-4-5. 酵素反応データ学習による新規代謝経路探索

iii. 酵素活性推定

2019 年度から 2020 年度にかけては、細胞を非破壊で酵素活性を蛍光強度として測定することができるタンパク質ベースのバイオセンサーを合成生物学的手法により構築した。次に、このバイオセンサーを酵素の変異体ライブラリとともに、セルソーターで分析・分離することで、酵素活性をハイスループット (HTP) で解析する法を開発した。また、この HTP 方法で分離した高い酵素活性を有する株と低い活性を有する株を、次世代シーケンサーで配列解析し、大量の活性別遺伝子配列情報を得ることができた。さらに、これらのデータを AI 技術の一つであるディープニューラルネットワークで学習することで、配列情報から酵素活性を予測するモデルの構築に成功した。

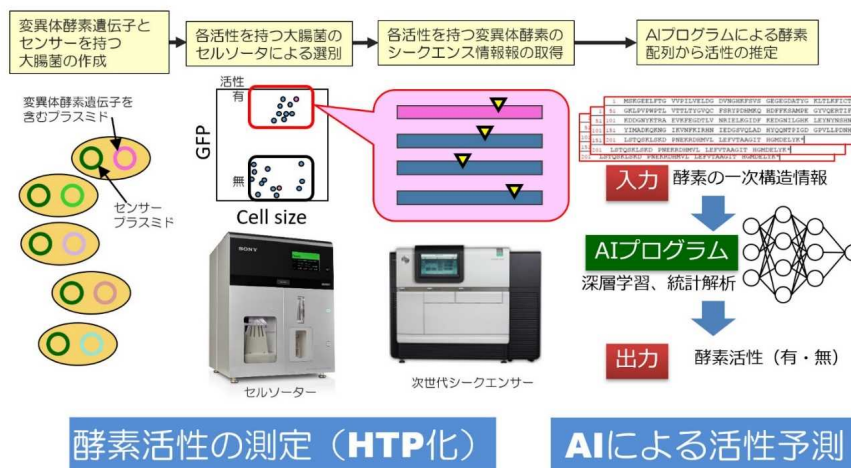


図 3.2.3.2-4-6. 酵素活性推定

② 知識抽出・整理技術を活用した長鎖 DNA 配列設計の研究開発 (担当機関：日立製作所、神戸大学)

2019 年度から 2020 年度にかけては、長鎖 DNA 配列の出力配列パターンを最適化し、且つ同配列の機能性配列としての予測精度を向上するモデルを設計した。

図 3.2.3.2-4-7 に本ワークフローの簡略図と最適化・予測モデルの説明を示す。2018 年度までに開発したワークフローに、下記 3 つの機能を追加して、適切な長鎖 DNA 配列を提示する最適化

モデルを構築した。詳細を以下に記載する。まず、どのようなクエリに対しても出力配列が提示されるように、実績のある機能性配列リストを準備し、ユーザーが配列の機能（発現強度等）より機能性配列を選択できるモデルを構築した。更に、目的とする生物種の配列を限定して提示するために、天然及び人工配列候補リストに収納された配列をクエリとして blastn 解析を実施する工程を追加し、得られた結果よりユーザーが求める生物種由来の配列のみを抽出し出力できるモデルを構築した。更に出力配列中に存在する機能性配列領域を特定するために、同配列に対して blastx 解析を実施する工程を追加し、相同性領域外の領域を機能性配列領域と特定するモデルを構築した。以上の最適化モデルを反映したフローにより得られた出力結果において、機能性配列の予測精度を向上するために、各配列における GeneBank のアノテーション情報より、プロモータ、ターミネータ配列を評価する予測モデルも構築した。本予測モデルの適用により、機能性配列の判定精度が最大で 3 倍向上できることを示した。最適化及び予測モデルを 2016 年度までに設計したワークフローへ反映し、全工程を自動化することで、クエリに対し予測精度の高い長鎖 DNA 配列を自動で出力できるツールを開発した。

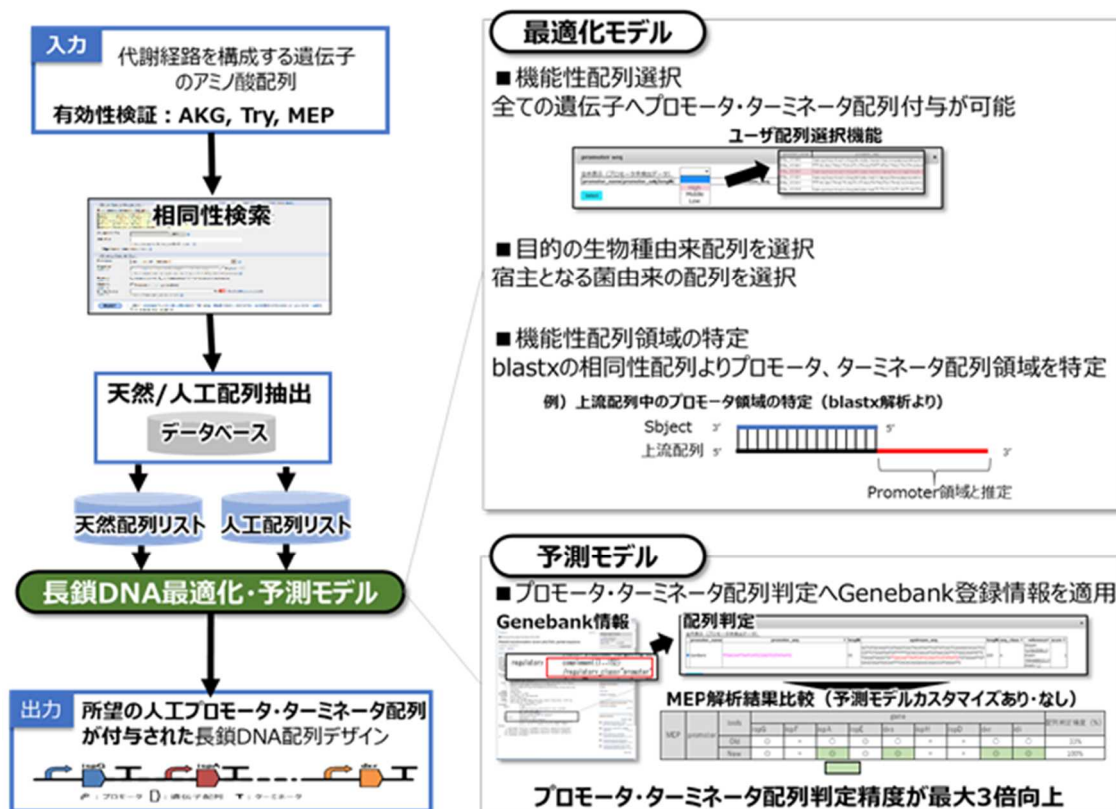


図 3.2.3.2-4-7 長鎖 DNA デザイン最適化・予測モデル

更に α ケトグルタル酸、チロシン、非メバロン酸経路に係る遺伝子をクエリとして、同ツールを用いて解析し、得られた出力配列を実際に合成・検証することで、本ワークフローの有効性検証を実施した。特に大腸菌の非メバロン酸経路遺伝子群に対して行った同ツールの検証においては顕著な結果が得られた (図 3.2.3.2-4-8)。非メバロン酸経路人工オペロンプラスミドは、一年間の試行錯誤により得られたプラスミドであるが、ゼアキサンチンの生産量の向上は困難で

あった。同ツールにより得られプラスミドを利用することで、一回の試行で大幅に生産量を向上されることに成功し、有用性が実証された。

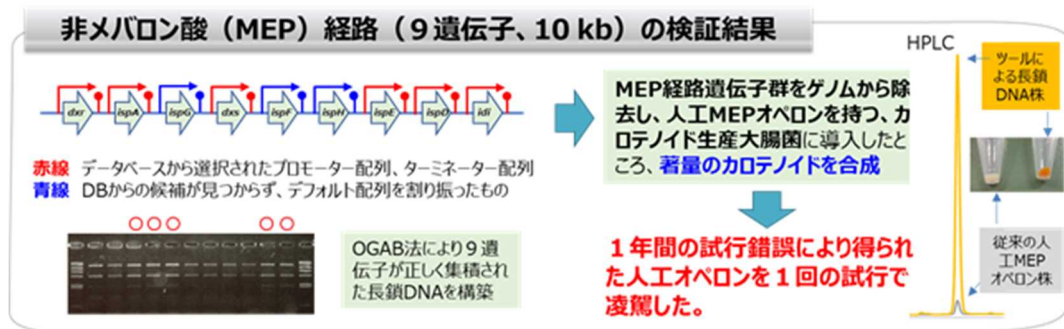
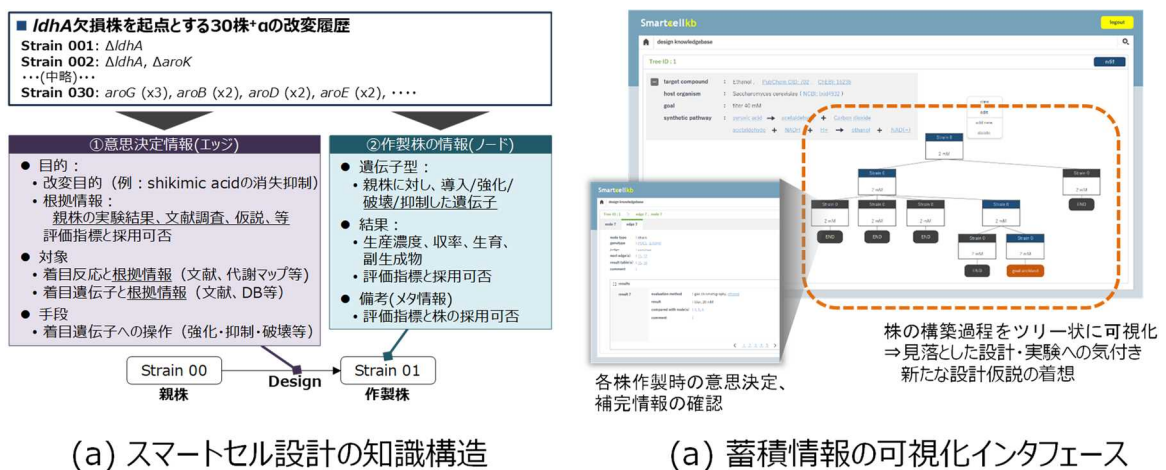


図 3.2.3.2-4-8 大腸菌の非メバロン酸経路にツールを適用した際の有効性の検証結果

③ スマートセル設計支援知識ベースの研究開発（担当機関：京都大学、日立製作所、医薬基盤・健康・栄養研究所）

2019～2020 年度は、スマートセル設計支援知識ベースとして、各課題における遺伝子変更の設計・根拠情報・設計に基づく実験結果の知見を登録・蓄積する情報システムを構築した(図 3.2.3.2-4-9)。具体的には、課題(3)-4において、RITE 保有のシキミ酸高効率生産株の設計履歴を基に設計の試行錯誤過程を「①意思決定情報」「②各株の情報」から成るツリー構造で整理する知識構造を策定した(図 3.2.3.2-4-9(a))。更に、蓄積された情報を可視化するインターフェイスを組み込んだ情報システムを構築し、クラウド基盤に搭載した(図 3.2.3.2-4-9(b))。



(a) スマートセル設計の知識構造

(a) 蓄積情報の可視化インターフェイス

図 3.2.3.2-4-9. スマートセル設計支援知識ベース

次に、各物質生産課題に対し、本システムに蓄積された遺伝子変更の設計及び変更意図の情報を入力として、研究開発項目①で開発した代謝系設計提案モデルを用いて、追加変更の候補となる遺伝子を提案する追加変更提案ワークフローを設計・構築した(図 3.2.3.2-4-10)。具体的には、知識ベースに蓄積された情報のうち、設計履歴（親株に対して施した遺伝子変更）を入力として、スマートセルに関連する文献の集積を行い、更に、関連する文献で設計履歴中の遺伝子と

同時に考慮されていた遺伝子名を抽出することで、現在の設計に追加すべき有望な遺伝子改変を提示するワークフローである(図 3. 2. 3. 2-4-10(a))。このワークフローを情報システムに組み込み、蓄積された設計履歴から、遺伝子改変候補リストを出力するインターフェイスを開発した(図 3. 2. 3. 2-4-10(b))

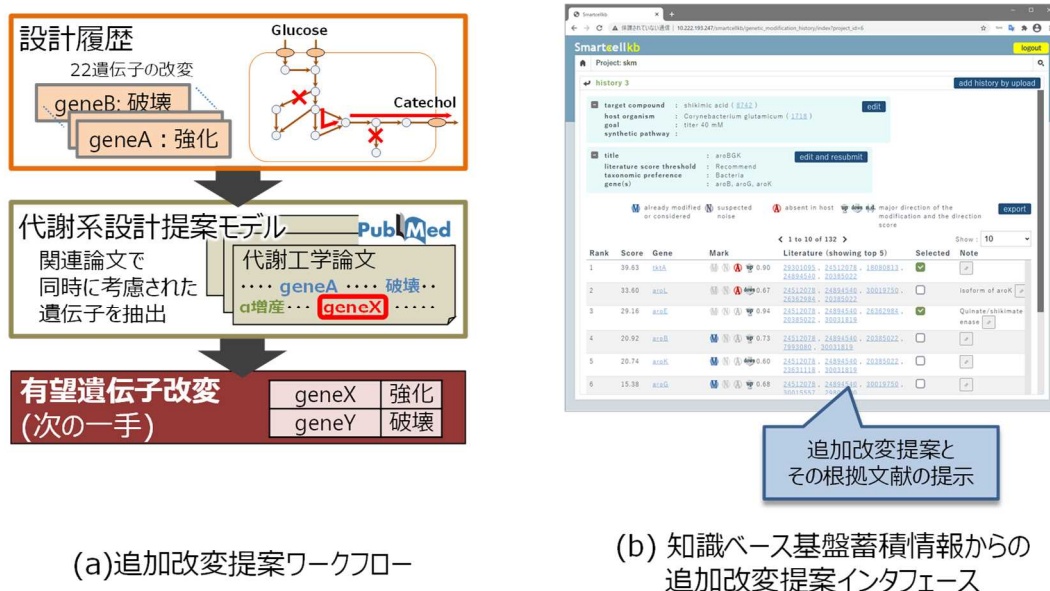


図 3. 2. 3. 2-4-10. 知識ベースを活用した遺伝子の追加改変提案

有効性検証テーマ・助成テーマと連携し、物質生産の実課題に本ワークフローを適用し、以下の通り本技術の有効性を確認した。

(1)-1 課題におけるハブ化合物生産株及びキラーマテリアル生産株に関し、神戸大と連携し、(1)-8 評価系課題における統合データ管理システムにて蓄積された知見を本知識ベースと接続した。同知見を入力に追加改変提案を導出することで、DBT と L を接続し DBTL サイクルを構成した。

(3)-4 課題において RITE と連携し、有用芳香族化合物カテコールを生産するコリネ菌株の設計情報に対して、知識ベース活用による追加改変候補遺伝子の提案の有効性検証を行った。具体的には、改変済み 22 遺伝子の設計履歴から追加改変候補遺伝子を抽出、9 件に対して検証株を構築した。

(3)-7 課題における TAG 高生産油脂酵母の設計情報(改変済み 15 遺伝子)に対し、知識ベース活用による追加改変候補遺伝子の提案と、制御ネットワーク提案技術との提案傾向比較を行った。制御ネットワーク提案技術では未知の有望遺伝子が提案される傾向があるのに対し、本知識ベースでは TAG 合成の主経路に直結する遺伝子が提案される傾向があり、本知識ベースによる提案には常套手段的な遺伝子の見落としを防ぐ、補完的な効果があることを確認した。

スマートセル設計工数短縮効果の検証として、(3)-4 課題におけるカテコール生産コリネ菌について、通常の文献検索を用いたケースとの比較を行った(図 3. 2. 3. 2-4-11)。本技術において、提案の上位 30 遺伝子中、専門家が有望と判断した提案は 8 遺伝子であった。一方、通常の文献検索(“catechol” AND “production”での検索)で得られた出現頻度上位 30 遺伝子中、専

門家に有望と判断された提案数は4遺伝子であった。すなわち、有望遺伝子探索効率は本技術により倍増しており、設計工数短縮効果50%以下を見通しで確認した。

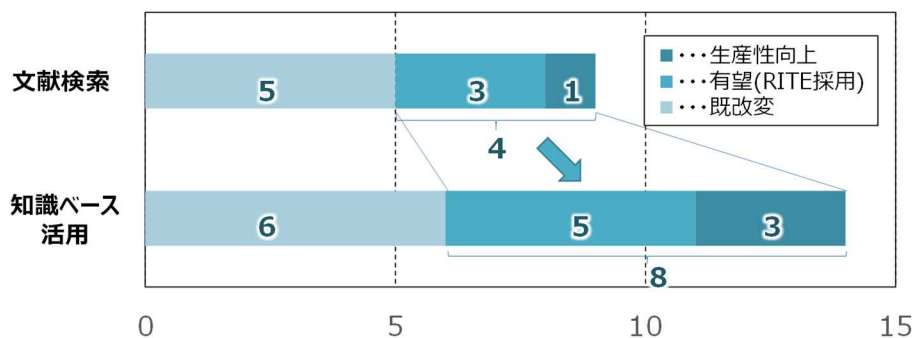


図 3.2.3.2-4-11 知識ベース活用による有望遺伝子探索効率向上

(8) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2017	0	0	3	2	0	0	0
2018	0	0	6	0	2	0	0
2019	1	0	3	0	1	0	0
2020	2	0	2	0	1	1	0
累計	3	0	14	2	4	4	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2017	0	0	0
2018	2	0	0
2019	2	2	0
2020	1	2	0

累計	5	4	0
----	---	---	---

課題名：C(2)-5 データベース開発

担当機関：産業技術総合研究所、製品評価技術基盤機構

(1) 背景と目的

高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発には、高生産性微生物設計システムが重要な基盤技術となる。設計のためには既知の知識や、本プロジェクトの標的生物に特化した新規の知識が必要である。新規の知識については、本プロジェクト内で測定された実験結果を活用するが、高品質の実験結果であるほど、設計システムに用いられる予測計算の精度が向上すると期待できるため、測定データの品質管理を行いつつ、一定の品質基準を満たす測定データによって標準化されたデータベースを構築し、本プロジェクトの測定データを収集し再利用できるよう情報基盤を整備することを目的としている。

(2) 位置づけ、目標値

・位置づけ

一定の品質基準に基づき、基準を満たした測定データのみでデータベース化するという理想的なデータベースは、公共データベースでは実現困難である。本プロジェクトの実証課題で用いられる標的生物は、それぞれ独自の研究によって得た測定データが不可欠であるが、これらの独自データを集積することによって、データベースとして世界的にみても独自性の高い位置を占めることになる。実証課題で用いられる標的生物の有用性が高ければ高いほど、本データベースの価値も高くなる。

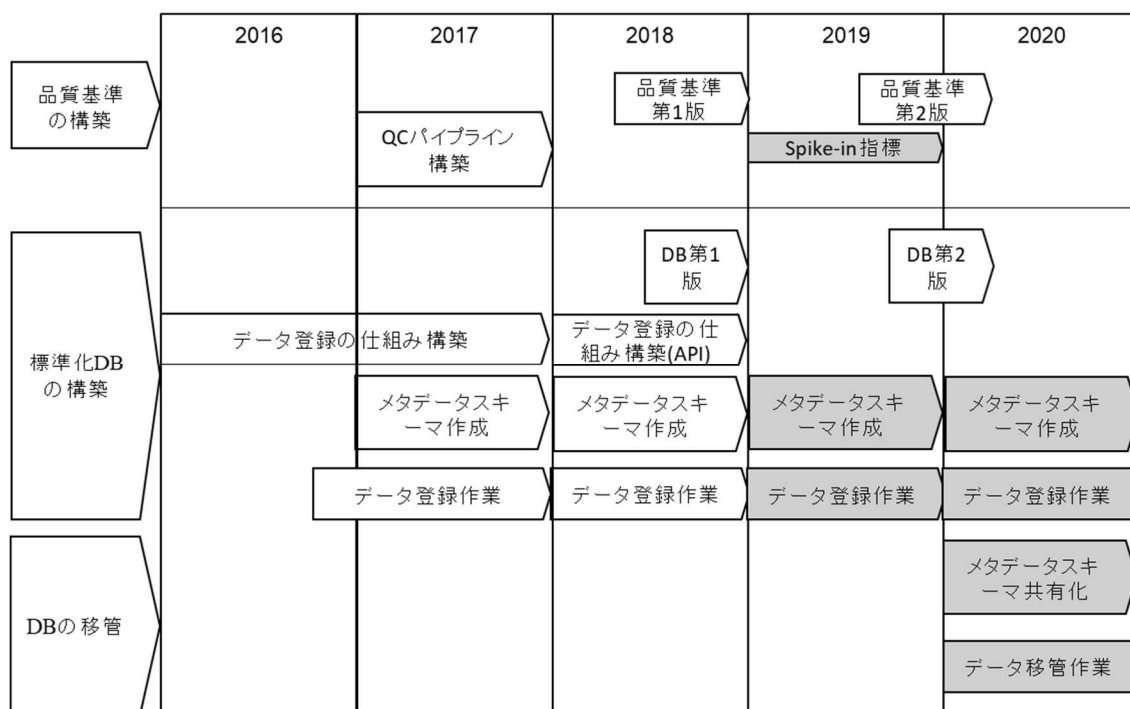
・中間目標値(2018)

情報システムとしてのデータベースは、データベースとしての基本機能の実装を 2018 年度までに完了する。基本機能は大別して次の 2 つの機能である：測定データの登録機能、品質検査機能。測定データの登録機能とは、ファイルのアップロード機能、ファイルの検疫機能（ウイルス検査）、基本的なメタデータ（実験付随情報）の構造、データ閲覧機能、データ検索機能、情報ツール連携インターフェイスである。連携インターフェイスとは、高生産性微生物設計システムと本データベースが人間を介さず、両者のプログラムが連携して動作できるように設ける通信手段である。品質検査機能とは、RNA-Seq データの品質検査機能である。

・最終目標値(2020)

本プロジェクト内で測定されたデータの収容および登録を 2020 年度までに完了する。本プロジェクト内の測定データは、次世代シーケンサーによるものや質量分析装置によるもの、マイクロアレイによるものなど、多岐にわたるが、これらの多様な測定データを単一のデータベース内で収容できるようメタデータスキーマを作成する。また、プロジェクト終了後もデータベースを継続して維持運用できるようにする。

(3) 全体計画



補足：

- QCパイプライン構築～RNA-seqデータに関する品質検査パイプラインを構築した。
- Spike-in指標～RNA-seq解析において用いられるSpike-inを添加した品質評価指標について文献調査を行った。
- メタデータスキーマ作成～生データに付随する実験情報をデータベースに登録するためのデータ構造を作成した。
- メタデータスキーマ共有化～移管元と移管先との間でメタデータのデータ構造を共通化することで移管をスムーズにするための作業。

(4) 実施体制

課題	主担当	副担当
品質評価基準の構築	産業技術総合研究所（光山）	
標準化DBの構築	産業技術総合研究所（光山）	
データの移管	製品評価技術基盤機構（市川）	産業技術総合研究所（光山）

(5) 運営管理

月に1回、テーマ進捗会議を開催し、データ登録状況、移管状況、メタデータ整備状況、データベース運用状況について情報共有しメンバー間で同意のもと意思決定を行った。

(6) 実施の効果

データ登録申請のあった課題のデータはすべて期間内にデータベースに登録することができた。データの移管についても大きな問題なく進めることができた。

(7) 最終目標の達成度

○達成見込み（2020 年度末）

(8) 研究開発の成果と意義

成果：

① 品質基準の構築

本課題では、RNA-seq に関する品質評価基準作りに取り組み QC パイプラインの構築を行った。これはシーケンス後の配列データについて、既存の品質検査ソフトウェアを組み合わせで検査するものである。パイプラインは、FastQC プログラム、csDAI プログラムによって構成されている。前者は FASTQ 形式の配列データに関する品質指標について検査する。後者はイリミナ社製シーケンサー特有の品質指標と、ゲノムマッピング後の品質指標について検査する。また RNA-seq に関連して、Spike-in による RNA 発現量の補正方法についても既存研究を調査しまとめた。図 3.2.3.2-5-1 に、Spike-in による RNA 発現量の補正方法をまとめた。

RNAの推定量(z)は、リード数(y)と Spike-in由来の定数項(v)から求める。

$$z = \frac{y}{v}$$
$$v = \frac{f_1 \mathcal{L}^{SI}}{n_1}$$

全部Spike-in由来の定数

この論文はERCC(96配列)を想定しているが、補正項で用いる配列は1つのみ。式は数理的に導出されたもの。

f_1 はSpike-in配列(1)のSpike-inライブラリ全体における割合
 n_1 はSpike-in配列(1)の分子数
 \mathcal{L}^{SI} はSpike-inライブラリ全体のリード数

図 3.2.3.2-5-1 Spike-in による RNA 発現量の補正方法

② データベース

本データベースには、14 課題 82 実験の計 7,770 個の結果ファイルが登録され、対象となった生物種は 185、株は 2,585 におよぶ。また、様々な解析方法が用いられており、各手法とファイル数の内訳を表 3.2.3.2-5-1 に示す。データベース開発の概要を図 3.2.3.2-5-2 に示す。

実験データにはデータの共有範囲を定める開示レベル（表 3.2.3.2-5-2）が登録者によって指定されている。開示レベルとファイル数の関係を表 3.2.3.2-5-3 に示す。

表 3.2.3.2-5-1 解析方法とファイル数

解析方法	ファイル数
情報解析	2408
DNA-seq	446
GC-MS	1747
ゲノムアッセムブリ	91
メタボローム解析	194
マイクロアレイ解析	641
プロテオーム解析	471
RNA-seq	1772
合計	7770

表 3.2.3.2-5-2 開示レベル

レベル 1：範囲＝プロジェクト参画全機関 期間＝プロジェクト期間中及び終了後
レベル 2：範囲＝プロジェクト参画全機関 期間＝プロジェクト期間中のみ
レベル 3：範囲＝プロジェクト参画機関のうち、データ提供者、大学及び産総研に限定 期間＝プロジェクト期間中及び終了後
レベル 4：範囲＝プロジェクト参画機関のうち、データ提供者、大学及び産総研に限定 期間＝プロジェクト期間中

表 3.2.3.2-5-3 開示レベルとファイル数

開示レベル	ファイル数
1	1127
2	846
3	542
4	2841
合計	7770

スマートセルプロジェクトでの実験データを整理してデータベースに登録！

プロジェクトで生み出された実験結果を再利用可能な情報資源として整備する

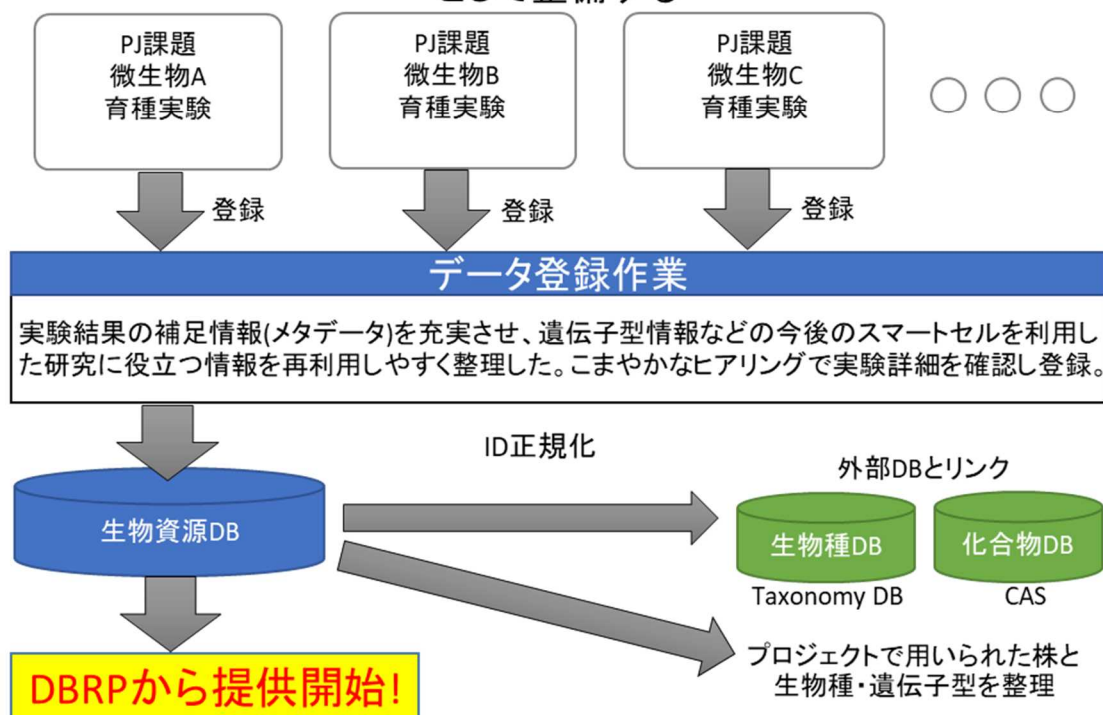


図 3.2.3.2-5-2 データベース開発の概要

意義：

これほどの規模のプロジェクトで、なおかつ様々な生物種、様々な手法が用いられる実験結果を、プロジェクト独自のデータベースとしてとりまとめた事例は他に例をみない。一方、実験結果を再利用する上では、実験品質をどのように標準化するかという大きな課題がある。我々はRNA-seqについては、既存の知見に基づいて品質基準を議論することができたが、それ以外の実験手法については、研究現場でも十分な研究がなされていない現状である。一方でどのように実験が行われたかというメタデータについては、既存の知見はほとんどないといっても過言ではない。我々はメタデータの充実に着目し、これの充実をはかる手段について追及した。この問題は、現実世界の情報をいかに効率よく情報空間に写し取るか、という現代人工知能技術の課題のひとつでもある。プロジェクト由来の実験データは、プロジェクトの進捗に応じて登録申請がなされるため、事前にどのようなデータが登録対象となるかについて具体的に知ることは難しい。その点に着目して、我々はなるべく柔軟な情報表現が可能な方法を用いてメタデータの表現方法を開発した。幸いにしてこの表現方法は、データ移管先の製品評価技術基盤機構においても採用されており、その結果として極めてスムーズなデータ移管を実現することができた。

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	0	0	0	0	0
2018	0	1	0	0	0	0	0
2019	0	0	0	0	0	0	0
2020	0	0	1	0	0	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み
なし

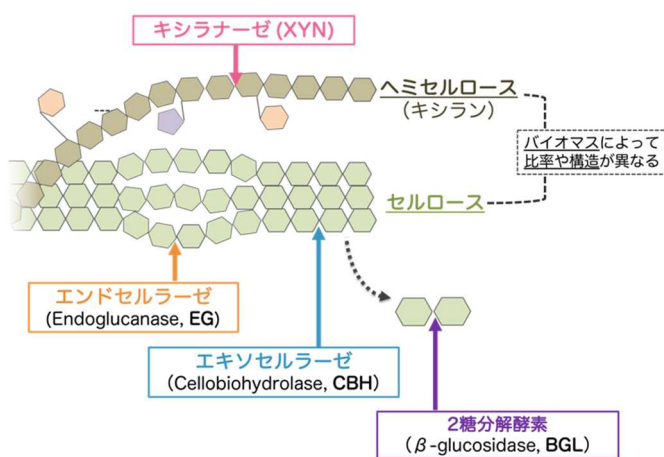
3.2.3.3 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

課題名：C(3)-1 糸状菌を用いた有用タンパク質同時生産制御による有効性検証

担当機関：長岡技術科学大学、花王、バイオインダストリー協会、九州大学、産業技術総合研究所、大阪大学

(1) 背景と目的

現在、化石資源に代わる新たなエネルギー源・原料源として食糧と競合しないセルロース系バイオマスが注目されている。セルロース系バイオマスは、植物細胞の主要な構成成分として地球上に最も多く存在するバイオマスであり、その分解によって生じた二酸化炭素は、植物生育時に光合成により大気中から固定された二酸化炭素であるため、大気中の二酸化炭素量の増加を引き起こすことがなく、再生可能でカーボンニュートラルな資源である。また、セルロース系バイオマスの分解により生じるグルコースなどの糖は食品産業で広く利用できるほか、化成品やファインケミカルの原料、エタノールなど様々なものに変換することができる。そのためセルロース系バイオマスからのバイオリファイナリーは化石燃料からのオイルリファイナリーに替わる新たな物質生産技術として非常に期待されている。セルロース系バイオマスは、セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンから構成されている。主成分であるセルロースはグルコースが直鎖状に β -1,4結合した高分子ホモ多糖である。セルロースはそれぞれのセルロース鎖間で水素結合を形成することで強固な結晶構造をとるため、化学処理によってグルコースまで分解することは極めて困難である。細胞壁成分の中でセルロースに次ぐ含有量であるヘミセルロースはヘテロ多糖であり、その構成成分によりキシラン、グルコマンナン、キシログルカンおよびアラビノガラクトサンなどに分けられる。セルロースおよびヘミセルロースは、それぞれグルコースおよびキシロースなどの単糖へと分解することが可能である。しかし、セルロースはその強固な結晶構造から容易に糖化できず、かつては硫酸を用いた化学的な分解処理による糖化が行われてきた。しかし、化学的処理は環境負荷が大きいため、微生物が産生する糖質加水分解酵素であるセルラーゼおよびヘミセルラーゼを用いた環境低負荷な酵素処理による糖化技術が研究されている。セルラーゼはセルロースの β -1,4結合を加水分解する酵素の総称であり、Endoglucanase (EG)、Cellobiohydrolase (CBH)、 β -glucosidase (BGL)の3種類に分類される。EGはセルロース鎖内部の β -1,4結合を無作為に加水分解するエンド酵素であり、CBHはセルロース鎖末端からセロビオース単位に加水分解するエキソ酵素である。また、Xylanase (XYN)はヘミセルロースの主要成分であるキシランを加水分解する酵素である。BGLはセロビオースまたはセロオリゴ糖を非還元末端からグルコース単位に加水分解する酵素である。セルロースには結晶領域と非結晶領域が存在し、分解過程ではまずEGがセルロースの非結晶領域を分解することで多数の末端を作り、この末端をCBHが順にセロビオース単位に分解する。そして最後にBGLが遊離されたセロビオースをグルコースに分解する。この



ように 3 種類のセルラーゼの相乗作用によりセルロースは効率よく分解される (図 3.2.3.3-1-1)。そのため、セルロースの分解効率を高めるには、3 種のセルラーゼが適切な割合で存在することが重要である。糖質加水分解酵素群を生産する生物は、原生生物、細菌、真菌、植物、動物と多岐にわたる。その中でも糸状菌 *Trichoderma reesei* は、セルロース系バイオマスの分解に必要とされている全ての糖質加水分解酵素を大量に分泌生産することから、産業的な糖質加水分解酵素源として広く研究が進められてきた。これまでに、*T. reesei* の野生株である QM6a 株を唯一の起源とするセルラーゼ生産性向上株群が世界中で開発されてきた。

我が国においては、「新燃料油開発技術研究組合 (RAPAD)」が第二次オイルショック後の昭和 55 年に設立され、石油 9 社、発酵 4 社、プラント 7 社、化学 2 社の計 22 社が 7 カ年計画のバイオマス利活用研究を目的とした大型国家プロジェクトを推進した。この中で *T. reesei* の世界的標準株 QM9414 株を起源とした菌株改良が行われ、工業酵素開発ベース株である高生産変異株 PC-3-7 株が獲得されてきた。*T. reesei* PC-3-7 株の酵素生産性、酵素遺伝子発現制御メカニズムに関して長岡技術科学大学において 30 年にわたり研究が進められ、2008 年～2017 年に実施された NEDO プロジェクトにおいて、世界最高レベルのバイオマス糖化能を示すセルラーゼ生産菌株の造成に成功している (図 3.2.3.3-1-2)。バイオマス酵素糖化において、セルロース・ヘミセルロースを被覆しているリグニンが反応を阻害する。そのため、酸・アルカリ・機械的処理を用いた前処理によってリグニンを除いた前処理済みバイオマスを使用することで、効率的な酵素糖化が可能となる。しかしながら、前処理済みバイオマスの多糖成分の組成は用いる

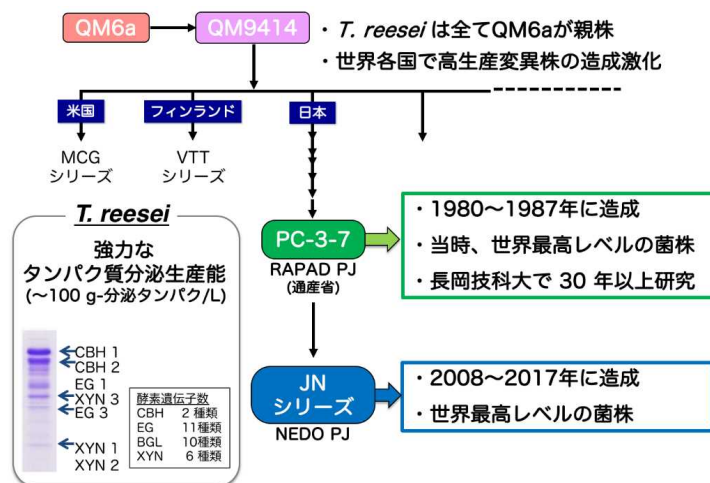


図 3.2.3.3-1-2 日本で開発されている *T. reesei* セルラーゼ生産菌株の系統

バイオマスの由来や前処理の手法によって異なる。そのため、より効率的なバイオマス糖化には各バイオマスに応じた酵素成分で構成される糖化酵素が必要である。これまでの *T. reesei* 菌株開発方針は、特定のバイオマスを糖化ターゲットに定め、これまでの *T. reesei* 研究で得られた知見を活かして進めてきた。例として、セルラーゼ遺伝子群全体をコントロールする既知転写抑制因子の破壊、*T. reesei* の各種セルラーゼ遺伝子のプロモーター解析の結果から、遺伝子発現に最適なプロモーターを選択して目的の酵素を発現させる、といったことが挙げられる (図

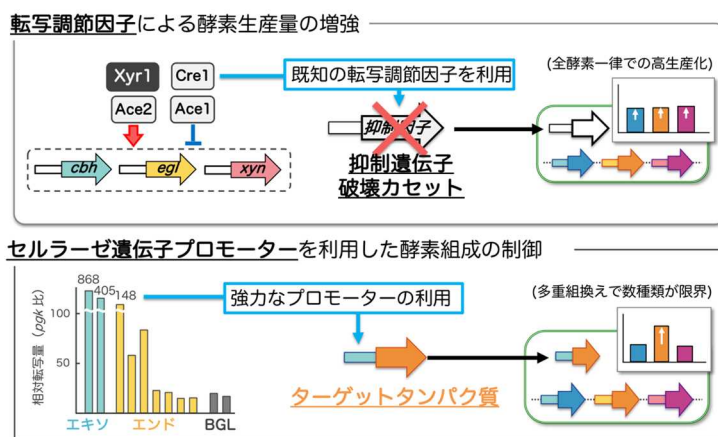


図 3.2.3.3-1-3 機能・形態に基づいた酵素の遺伝子

3.2.3.3-1-2) 機能・形態に基づいた酵素の遺伝子

3.2.3.3-1-3)。しかしながら、菌株の開発に長時間を必要とし、ある特定のバイオマスにしか効力を最大限に発揮できないという問題を抱えていた。また、これまでに特定のセルラーゼやヘミセルラーゼのみを制御する調節因子は見いだされていないため、糖質加水分解酵素群の生産比率制御は、比率を変更したい酵素遺伝子を多コピーで導入する必要があり、ゲノム上の組込み位置をコントロールすることが困難であること、多コピーで導入されても想定した発現量を発揮しないなど、安定した菌株を得ることが困難であった。そのため、数種類の酵素を個別に制御する因子「複数遺伝子制御因子」の発現量操作を介して簡便に酵素の生産比率を操作する手法の確立が必要である。しかし、複数遺伝子制御因子の同定は研究者の経験や直感に頼ったこれまでの研究手法では新規制御因子を見出すことは困難である。そこで、本研究開発では大量のオミクスデータを活用しバイオインフォマ

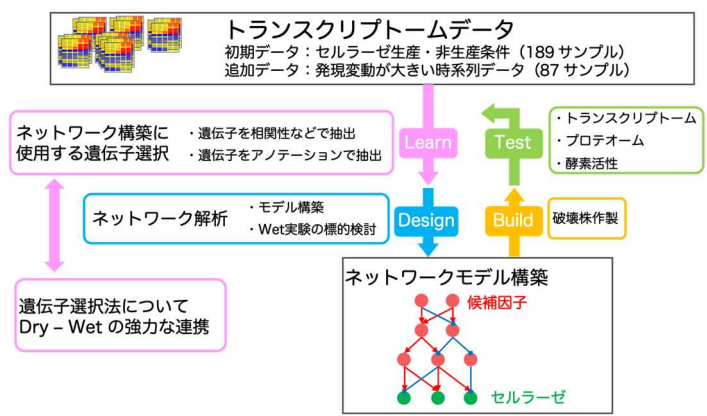


図 3.2.3.3-1-4 本 DT で行うデータ駆動型菌株開発

ティクス手法によりセルラーゼ遺伝子群とそれらの発現を制御する因子のネットワークモデルを推定し、実際の菌株を用いてそのネットワークモデルの検証、高精度化を行うことによって複数の特定セルラーゼ遺伝子を同時に制御することができる新規因子の同定およびその活用を目的とする（図 3.2.3.3-1-4）。最終的には、複数の酵素遺伝子を制御するネットワークならびにターゲット遺伝子の発現量制御のモデル構築し、日本で開発された *T. reesei* の工業用酵素生産菌株のベース株（PC-3-7 株）およびその派生株を用いて、任意の酵素の発現量を同時制御できる技術の開発を行う。

(2) 位置づけ、目標値

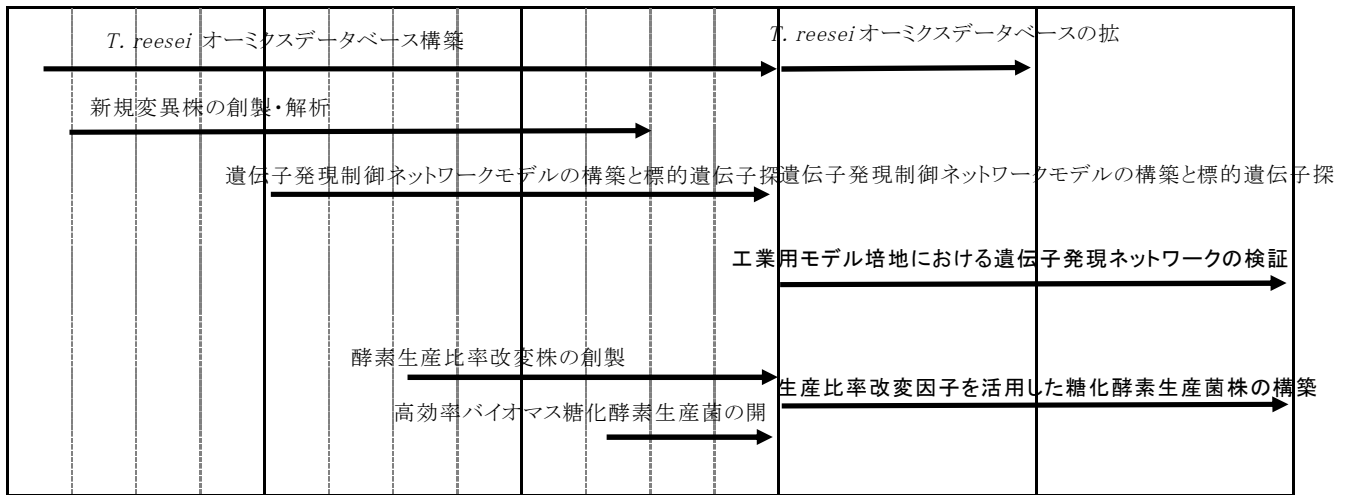
位置づけ：世界有数の酵素メーカーが提供しているバイオマス糖化酵素は依然として製造コストが高く、糖化性能が不十分と思われる。本研究開発を実施し、酵素組成を自由に制御できる技術が確立できれば、バイオマスリファイナリーを目指した企業へコストパフォーマンスの高い酵素を提供できる。本研究開発の成果を活用することで、広くユーザーのニーズを取り入れ、そのプロセスに適した酵素（テーラーメイド酵素）を開発可能となり、優位に展開可能と思われる。

最終目標値：バイオインフォマティクス手法と実際の菌株を用いた解析の連携より得られた酵素遺伝子群の発現コントロール因子についての知見を活用することで、高効率糖化酵素生産菌株の構築を行った。開発株において、糖化性能については特定のバイオマスの 80%糖化に必要な酵素量を 10-30%低減、酵素比率については全分泌酵素の 20%以上の範囲にて組成改変されていることを目標とした。

(3) 全体計画

2016 年	2017 年	2018 年	2019 年	2020 年
--------	--------	--------	--------	--------

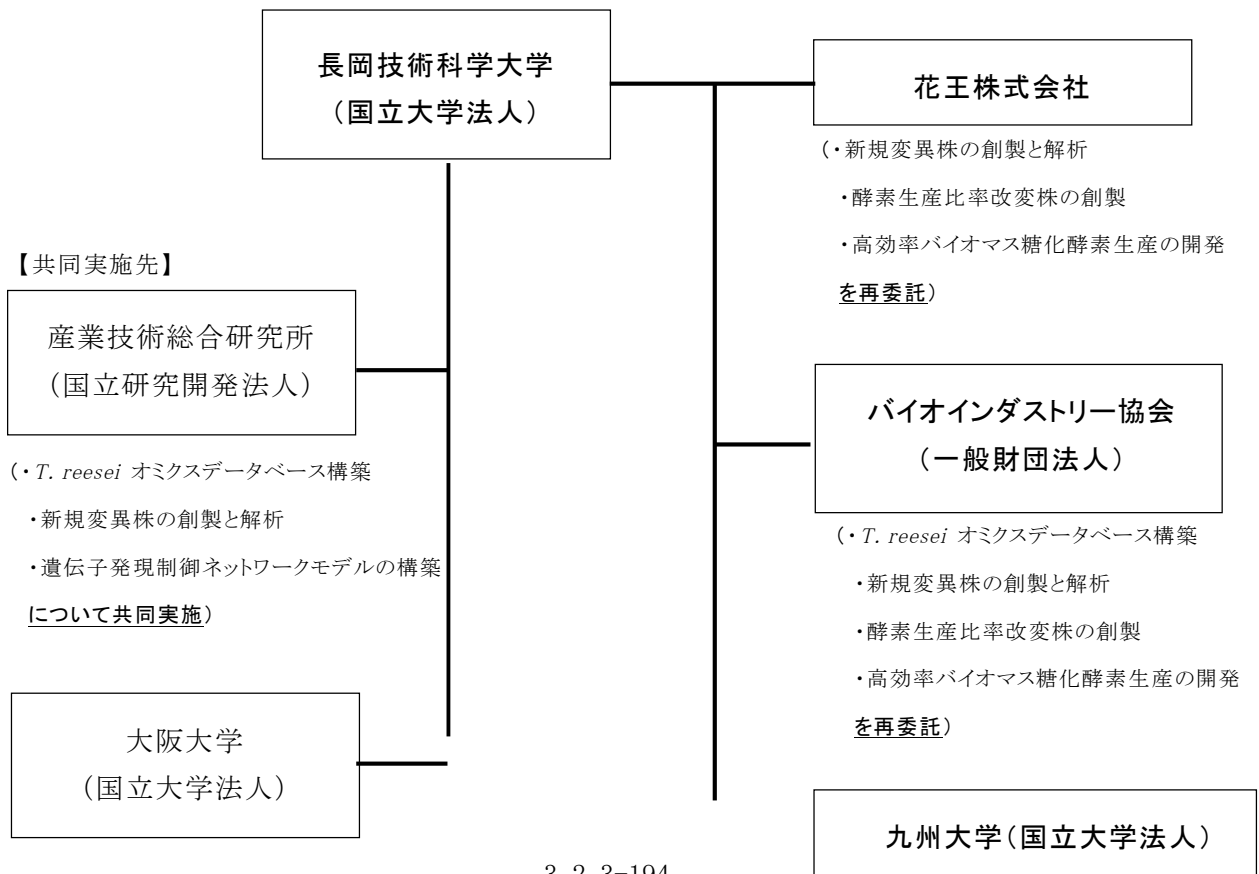




工業用酵素生産ベース株であるPC-3-7株を中心としてその派生株や *T. reesei* 日本型系統樹変異株のオミクスデータ（トランスクリプトーム、ゲノム、プロテオーム）を整備した。また、研究開発を進める際に分泌タンパク質が酵素生産比率に影響を与えることが示唆されたので、主要な分泌酵素のノックアウト株についてもオミクスデータを整備した。

得られたトランスクリプトームデータを基にバイオインフォマティクス手法により酵素遺伝子発現制御ネットワークモデルを構築した。ネットワークモデルから予測された発現制御因子についてPC-3-7株をベースとして検証し、その結果をフィードバックすることによってネットワークモデルの高精度化を行った。その効果が明らかとなった酵素遺伝子発現制御因子を活用し、工業用酵素の生産菌株において酵素発現比率の改変および高効率バイオマス糖化酵素生産菌の開発を行い、評価した。

(4) 実施体制



(・*T. reesei* オミクスデータベース構築

について共同実施)

(・新規変異株の創製と解析

・遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築

を再委託)

(5) 運営管理

半年に一度、本テーマに関与する機関が一同に介して進捗報告会を行い、それぞれの期間における研究開発の進捗を報告するとともに今後の研究開発は方針についての会議を開催した。また、2ヶ月に1~2回のペースで実務者レベルでのミーティングを開催した。

(6) 実施の効果

競合他社のバイオマス糖化酵素は依然として、コストおよび糖化性能が不十分。本PJにて、酵素組成を自由に制御できる技術が確立することで、バイオマスリファイナリーを目指した企業へコストパフォーマンスの高い酵素を提供できる。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目	目標	成果	達成度 (2021年2月)	今後の課題と解決方針
<i>T. reesei</i> オミクスデータベースの構築 (2018年度まで)	表現型データ基盤の整備 (21株)	高生産系統樹株8株、単一酵素欠損株13株の表現型データを整備した。また、新規変異株3株の表現型データを整備した。	○	
<i>T. reesei</i> オミクスデータベースの拡張 (2019~2020年度)	各種単独酵素破壊株および主要転写因子破壊株について経時的に60検体のオミクスデータ取得	16株の単独酵素破壊株について49検体、5株の転写因子について16検体のオミクスデータを取得した。	○	
遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築 (2018年度まで)	ターゲット遺伝子の発現コントロール因子を5因子以上予測	ターゲット遺伝子の発現コントロール因子を14因子以上予測し、その効果を検証した	◎	効果のあったネットワーク因子の機能解析

遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築 (2019~2020年度)	ネットワーク因子8個以上検証	ネットワーク因子14個以上検証した	◎	効果のあったネットワーク因子の機能解析
新規変異株の創製 (2018年度まで)	変異株の創製15株、解析15株、オミクス解析15株、比較ゲノム解析15株	41株の変異株を創製し、解析した。そのうち3株のオミクス解析を行った。	○	ネットワーク因子の解析に注力するため規模縮小した。
工業用モデル培地における遺伝子発現ネットワークの検証 (2019~2020年度)	工業用の酵素生産モデル培地でのネットワークモデル構築	13株のネットワーク因子破壊株について、工業用モデル培地でのオミクス解析を行った。	○	実生産培地でのさらなる検証、培養スケールアップ対応が必要
酵素生産比率改変株の創製 (2018年度まで)	酵素比率を10%以上改変	PC-3-7株にて達成	◎	
高効率バイオマス糖化酵素生産株の開発 (2018年度まで)	バイオマスの80%糖化に使用する酵素量を親株に対して5~10%低減	特定のバイオマスの80%糖化に使用する酵素量の12%低減に成功	○	
生産比率改変因子を活用した糖化酵素生産菌株の構築 (2019~2020年度)	酵素比率を20%以上改変 特定のバイオマスの80%糖化に使用する酵素量を親株の15~20%低減	酵素生産比率を20%以上改変した。また、特定のバイオマスの80%糖化に使用する酵素量を30%以上低減させた。	◎	幅広い有用バイオマスへの適応と実用に耐えうる株の創成

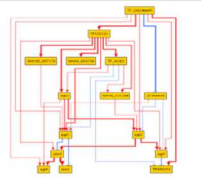
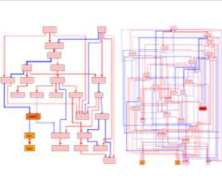
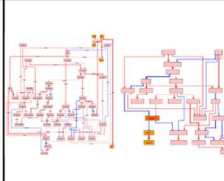
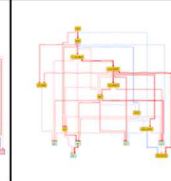
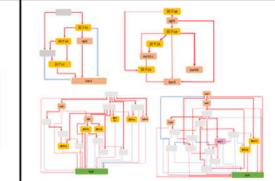
(8) 研究開発の成果と意義

- ・ 遺伝子発現ネットワークモデルの構築
- ・ 酵素生産性改変株の創製
- ・ 高効率バイオマス糖化酵素生産菌株の開発

T. reesei において、遺伝子発現制御ネットワークを構築する上で全遺伝子の発現量データ (トランスクリプトームデータ) を取得する必要があるがあった。プロジェクト開始時点までに、*T.*

reesei 日本型変異系統樹株のうち世界的標準株である QM9414 株およびセルラーゼ高生産変異株である PC-3-7 株についてセルラーゼ生産条件下および非生産条件下でのトランスクリプトームデータ (QM9414 株 : 117 条件、PC-3-7 株 : 72 条件) を活用してネットワークモデルの構築を課題 (2)-2-1 「遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子の探索」と連携して行った。*T. reesei* のすべての遺伝子 (約 9,174 遺伝子) を用いたネットワークモデル構築には計算機の能力の観点から困難であり、実際には取得不可能な極めて膨大な量のトランスクリプトームデータが必要である。そこで、計算機の負荷を軽減し、取得済みのトランスクリプトームデータを最大限に活用するためには、ネットワークモデルの構築に用いる遺伝子を抽出する必要がある (図 3.2.3.3-1-4)。

表 3.2.3.3-1-1 構築したネットワークモデルおよび予測されたネットワーク因子

遺伝子抽出 コンセプト	セルラーゼ遺伝子との緩やかな 相関関係	エンド/エキソ 同時制御	エンド/エキソ 独立制御	探索空間の 限定	個別遺伝子の 独立制御
ネットワー クモデル					
予測した ネットワー ク因子No.	1~3	4~7	8, 9	10~14	15~28

そこで、あるコンセプトに基づいて遺伝子を抽出し、それらを用いてネットワークモデルの構築を行ってセルラーゼ遺伝子を制御する因子 (ネットワーク因子) を推定した。(表 3.2.3.3-1-1 : 因子 1~9)。*T. reesei* の因子 1~9 の破壊株の表現型を解析し、セルラーゼ遺伝子発現挙動に影響を与えなかった因子と隣接する遺伝子を除くことで探索空間を限定した。その結果得られたネットワークモデルから予測されたネットワーク因子について破壊株を構築することでその効果を検証した (表 3.2.3.3-1-1 : 因子 10~14)。合わせて、バイオマス糖化に効果がある糖化酵素遺伝子を独立して制御するネットワークモデルを構築し、推定されたネットワーク因子の破壊株を解析した (表 3.2.3.3-1-1 : 因子 15~28)。検証したすべてのネットワーク因子破壊株におけるセルラーゼ遺伝子の発現挙動 (図 3.2.3.3-1-5) から、特定のセルラーゼ遺伝子の発現に影響を与えていた因子を用いて高精度化ネットワークモデルを構築した (図 3.2.3.3-1-6)。

個別の遺伝子に影響

因子No.	cbh1	cbh2	egl1	egl2	egl3	egl4	egl5	egl6	egl7	xyn1	xyn2	xyn3	bgl1	bxl1
1		↓					↓	↓	↓					
3								↓						
8	↓	↓				↓								
10						↑		↓						
11				↑		↑				↑	↑			
20	↓									↑	↑	↑		
22	↑													
23								↓		↑				
24	↓			↓								↑	↑	

全体に影響を与え、なおかつ特定の遺伝子に影響

因子No.	cbh1	cbh2	egl1	egl2	egl3	egl4	egl5	egl6	egl7	xyn1	xyn2	xyn3	bgl1	bxl1
全体を活性化	2							↓			↓			
全体を抑制	6					↓			↓					
全体を活性化	7					↓								
全体を抑制	14		↓		↓									
全体を抑制	21													↑

全体に影響を与える

12, 13, 15, 17, 18, 19, 26, 27

影響なし

4, 5, 16

図 3.2.3.3-1-5 ネットワーク因子がセルラーゼ遺伝子発現↑に与える影響 ↓ : 転写活性化 : 転写抑制

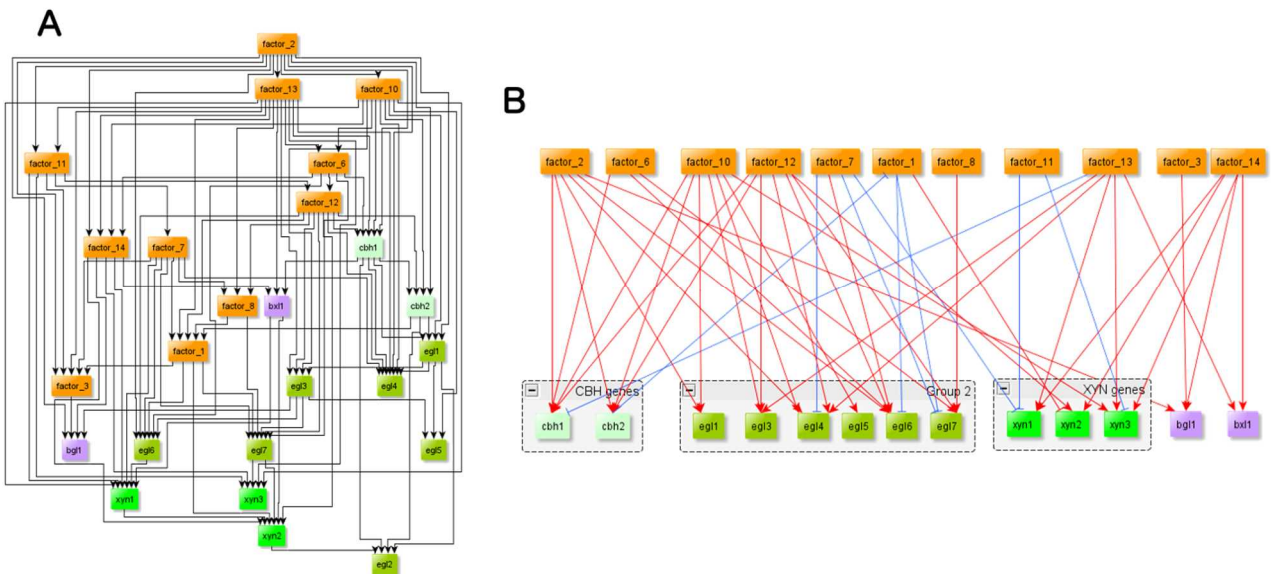


図 3.2.3.3-1-6 高精度化ネットワークモデル A: ネットワークモデル全体像 B: セルラーゼ遺伝子をターゲットに A を再構築したもの

構築したすべてのネットワーク因子破壊株について、分泌されたセルラーゼ・ヘミセルラーゼのプロテオーム解析から、分泌酵素の成分組成を分析した。その結果、ほぼすべてのネットワーク因子破壊株において酵素組成に変動があることが明らかとなった(図 3.2.3.3-1-7)。各破壊株の酵素組成比は、各酵素遺伝子の発現量比率を完全に反映していなかった。これは、分泌タンパク質によって翻訳、分泌の過程にストレスがある、タンパク質そのものの安定性の違いによるものであると推測される。

各ネットワーク因子破壊株の酵素標品を用いてバイオマスの糖化試験を行ったところ、因子 2、3 および 19 破壊株はアルカリ処理、水熱処理エリアンサス両方に対して PC-3-7 株より糖化率が高く、因子 18 および 14 は水熱処理エリアンサスに対して高い糖化効果を示した。

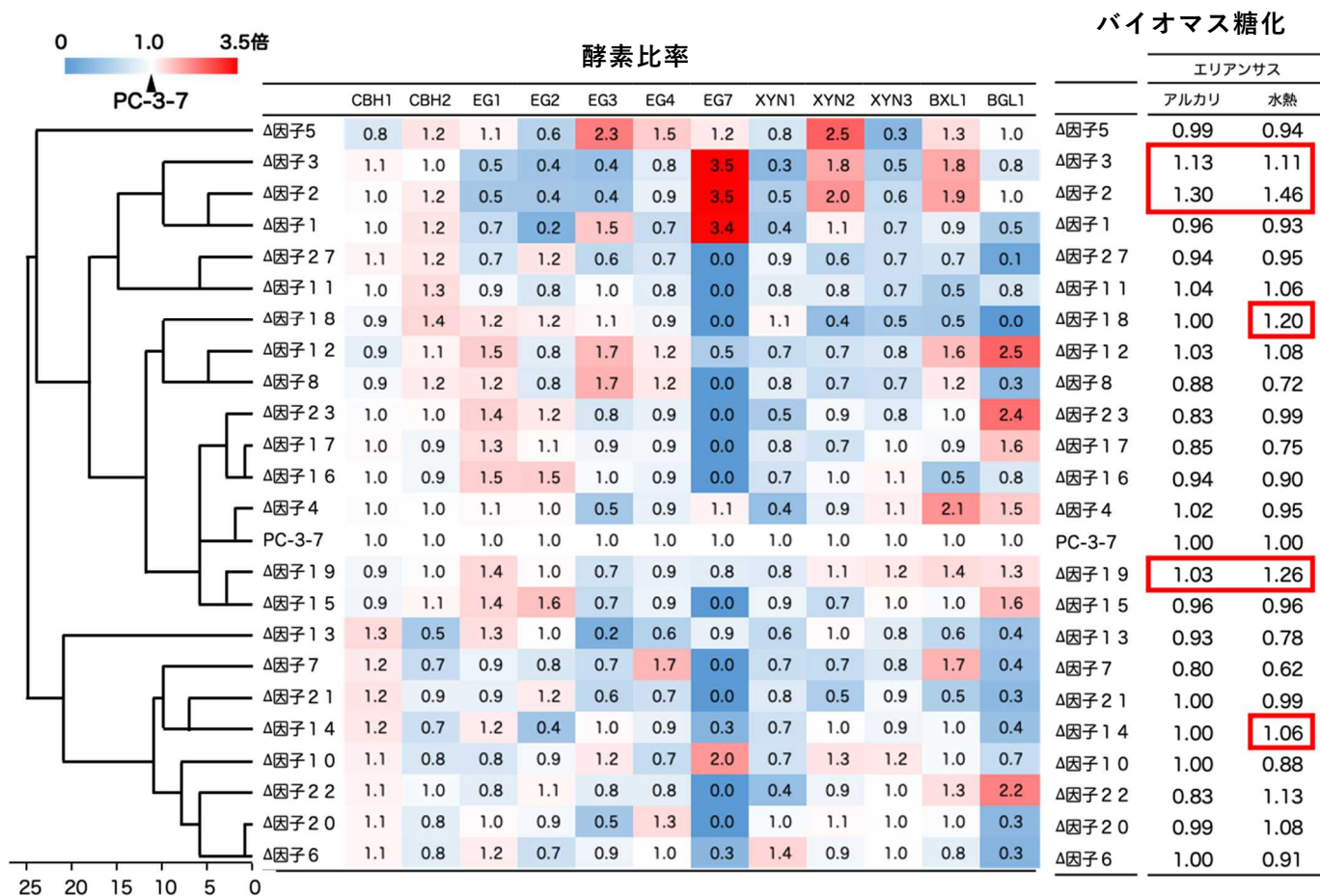


図 3.2.3.3-1-7 ネットワーク因子の酵素生産比率によるクラスタリングおよびバイオマス糖化結果
 酵素比率：PC-3-7 株における各酵素の比率を 1 としたときの値で示した。
 バイオマス糖化率：PC-3-7 株の糖化率を 1 としたときの値で示した。

バイオマスの糖化力が親株よりも高かったものおよびそれらとは異なるクラスターに分類された破壊株から一株ずつ（因子 5、10 および 14 破壊株）選択し、β-グルコシダーゼが強化された工業用ベース株における破壊株を構築した。得られた破壊株の生産する酵素標品を用いて各種バイオマスの糖化試験を行った（表 3.2.3.3-1-2）。その結果、因子 2 破壊株はアルカリ処理および水熱処理エリアンサスに、因子 14 破壊株はアルカリ処理エリアンサスを除く全てのバイオマスに対して工業用ベース株よりも高い糖化効果を示した。PC-3-7 において効果のあった因子 18、19 の破壊が工業用ベース株において効果がなかったのは、工業用ベース株における強化されたβ-グルコシダーゼの効果にマスクされてしまった可能性がある。それに対して、因子 2 および因子 14 破壊はβ-グルコシダーゼ以外の酵素活性が強化されたことを示唆している。

表 3.2.3.3-1-2 工業用ベース株におけるネットワーク因子破壊株のバイオマス糖化率

	エリアンサス			ユーカリ		バガス (ベトナム)		バガス (日本)	
	アルカリ	水熱	希硫酸	アルカリ	水熱	アルカリ	水熱	アルカリ	水熱
Δ因子5	0.96	0.99	1.02	0.99	1.03	0.98	0.98	0.99	1.01
Δ因子2	1.05	1.05	0.98	0.87	0.89	0.93	0.86	0.88	0.90
Δ因子18	0.92	0.94	1.00	0.85	0.85	0.96	0.92	0.98	0.92
Δ因子19	0.95	0.89	0.97	0.82	0.86	0.93	0.84	0.93	0.87
Δ因子14	0.98	1.08	1.08	1.15	1.15	1.08	1.14	0.99	1.06
Δ因子10	0.95	0.87	0.97	0.81	0.88	0.93	0.90	0.87	0.92

工業用ベース株の糖化率を1としたときの値で示した。

PC-3-7の因子2、18および19破壊株について、バイオマスの80%糖化に必要な酵素量を解析したところ、PC-3-7の酵素使用量に対して因子2破壊株は11.9%、因子18破壊株は31.7%、因子19破壊株は34.8%低減させることが明らかとなった(図3.2.3.3-1-8)

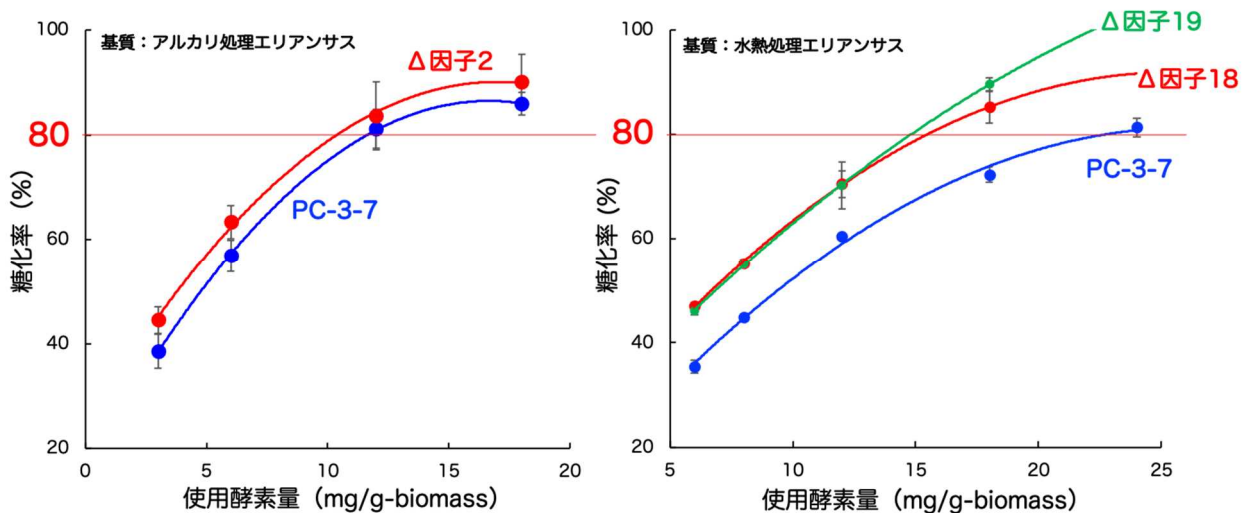


図3.2.3.3-1-8 因子2、18、19破壊株のバイオマスの80%糖化に必要な酵素量

また、工業用ベース株の因子14破壊株についてもバイオマス糖化に必要な酵素量を解析したところ、工業用ベース株の酵素使用量よりも16.8%低減させることが明らかとなった(図3.2.3.3-1-9)。

以上の研究結果は、遺伝子発現制御ネットワークモデル構築技術をもちいて産業用微生物の改変を効果的に行うことができるということを示すという意味で大きな意義がある。また、*T. reesei*の分泌する糖化酵素の成分組成を改変できたことから、本技術は様々な種類のバイオマスにたいして効

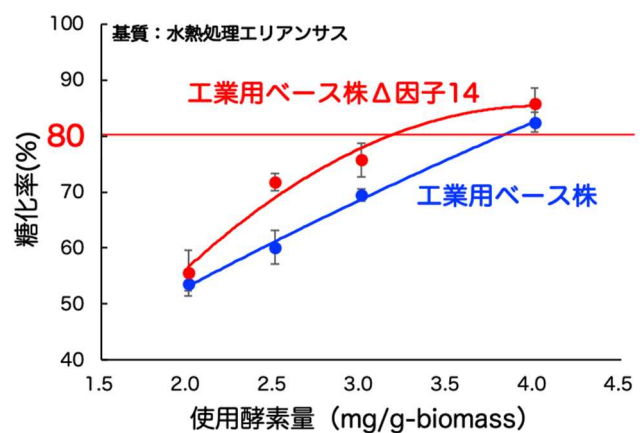


図3.2.3.3-1-9 工業用ベース株の因子14破壊株のバイオマス80%糖化に必要な酵素量

果的な糖化酵素を提供できる基盤を構築できたという点で大きな意義がある。

- ・新規変異株の創製

酵素タンパク質生産性が変化している株のオミクス解析（トランスクリプトーム、ゲノム、プロテオーム）を行うことによって複数の酵素タンパク質の発現を制御している因子の情報が得られると考えられる。そこで、ネットワーク解析に投入するデータとして、炭素源異化抑制解除株、タンパク質非生産株、タンパク質生産性強化株を突然変異によって作出し、そのオミクス解析を行うこととした。セルラーゼ遺伝子のプロモーター支配下にレポーター酵素である β -グルクロニダーゼ（GUS）の遺伝子を連結した株に紫外線照射によって変異導入を行った。その後、レポーターアッセイによって酵素低生産株を 29 株、高活性株を 4 株、生産パターン変化株を 8 株得た。これら変異株のうち、特徴的な表現系を示した 3 株についてオミクスデータを取得し、ネットワーク解析のためのデータセットとした。

- ・工業用モデル培地における遺伝子発現ネットワークの検証

通常研究室で用いられる培地とは異なり、工業用生産培地はタンパク質の生産性が増大する。そこで、工業用培地を模したモデル培地にてネットワーク因子破壊株を培養し、セルラーゼ遺伝子群の発現挙動を解析した。その結果、研究用培地と工業用モデル培地でネットワーク因子の破壊効果が異なることが明らかとなった。これは、工業用モデル培地における遺伝子発現ネットワークモデルが研究用培地のそれとは異なることを示している。そのため、産業応用を目指した *T. reesei* スマートセルの開発には、実際の生産条件におけるオミクスデータを活用したバイオインフォマティクスの応用が必要である。

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	1	0	8	0	0	0	0
2017	0	0	16	1	0	0	1
2018	1	0	2	0	0	0	0
2019	2	0	5	0	1	0	0
2020	1	0	1	0	0	1	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	1	0	0
2019	0	0	0
2020	0	0	0

課題名：C(3)-2 リモネンをはじめとするモノテルペノイド酸化酵素を用いた酵素設計技術の有効性検証

担当機関：神戸天然物化学、産業技術総合研究所、神戸大学

(1) 背景と目的

近年、微生物を用いた物質生産においてアミノ酸、糖類、脂肪酸等の一次代謝産物だけでなく、二次代謝産物の重要性が増している。特にテルペノイド（イソプレノイド）化合物は、医薬品原料やフレーバー・フレグランスに加えて、米国を中心にバイオ燃料としても注目を集めており微生物による物質生産が検討されている。その中でも食品用香料（フレーバー）としては、天然香料が望まれているおり、原料は植物由来原料を用いて生産される。しかしながら、植物を原料とするため製造コストが比較的高価であり、天候不順による供給不安定が危惧されるほか、耕地拡大による生産量増加は困難である。

テルペノイドで例を挙げれば、カルボンはスペアミントに含まれる香料原料であり、リモネンからカルベオールを経て植物体内で生産される。リモネンからカルベオールの反応はシトクロム P450（以下 P450 と略す）に触媒される酸化反応である。しかしながら、P450 のなかには、位置選択性並びに活性も低いものがあり、実用化が困難なものも多い。これらの問題が解決できれば物質生産でネックになっている酵素反応の改善が期待される。

本研究の目的は、モノテルペノイドをモデル化合物として、分子動力学（MD）シミュレーションを用いて原子レベルの酵素基質のドッキング構造情報から目的の反応生成物を得るのに重要な変異導入箇所を理論的に予測し、作製する変異体導入箇所を大幅に削減しスマートセルの開発を促進することである。さらに培った酵素改変技術を他の化合物に展開し、市場ニーズを探るマーケティングに係る技術開発期間を短縮する事と、P450 に触媒される酸化反応を使いこなすことにより、より付加価値の高いターゲット化合物の開発を狙うことである。

(2) 位置づけ、目標値

(R)-カルボンはスペアミントに主として含まれる光学活性体であり、スペアミント様のフレーバーとしてチューインガム、歯磨き粉や医薬原料としての用途があり、世界市場規模は 2,400 トン/年で、売り上げは 120 億円以上と推定される。その生産はスペアミントからの抽出あるいは、比較的安価に入手可能なリモネンからの化学合成が主な方法となっている。一般的に植物原料から抽出されるフレーバーは、その供給の不安定性から高価となる傾向にあり、そのために安価な合成品が使用されることが多い。近年の消費者のナチュラル志向の高まりにより、フレーバーにも糖原料からの微生物による直接発酵や天然原料からの微生物変換といったナチュラルな製法が求められているが、未だ直接発酵による製法は開発されていない。我々は MD シミュレーション等を利用した酵素設計により従来よりも効率的に、且つ早期にカルボン等のテルペン系フレーバー等を高品質で安価なナチュラル製品として供給することにより、需要の伸びにも対応可能な安定供給を実現することを目標とする。

(2020 年度最終目標)

新規基質による反応の位置選択性等の向上（2 倍）

P450 触媒反応の位置選択性等 ほぼ 100%

(3) 全体計画

本研究は2018年度まで味の素（株）及び神戸大学と連携して「(3)-3. カルボンの生産性向上による代謝解析・酵素設計技術の有効性検証」として実施された。2019年度から神戸天然物化学（株）及び産総研が担当した「シトクロム P450 の選択」が課題独立し「(3)-2 リモネンをはじめとするモノテルペノイド酸化酵素を用いた酵素設計技術の有効性検証」として開発を行った。

開発のスケジュールは、1年目に実験系の構築や分析系の立ち上げを行った。2年目からMDシミュレーションを用いた酵素改変方法の開発及び改変体の作製機能評価を行い、酸化反応の位置選択性の向上等の検討をおこなった。

4年目から酸化反応の位置選択性の変更を検討しMDシミュレーションを利用した酵素改変の汎用性を検証する為、新規基質を用いて位置選択性の向上及び変更を実施した。新規ターゲットの選定及び変異体作製・評価及び新規反応物の構造解析を主に神戸天然物化学が担当し、MDシミュレーション及び解析とアミノ酸残基改変個所の提案を主に産総研が担当した（図 3.2.3.3-2-1）。

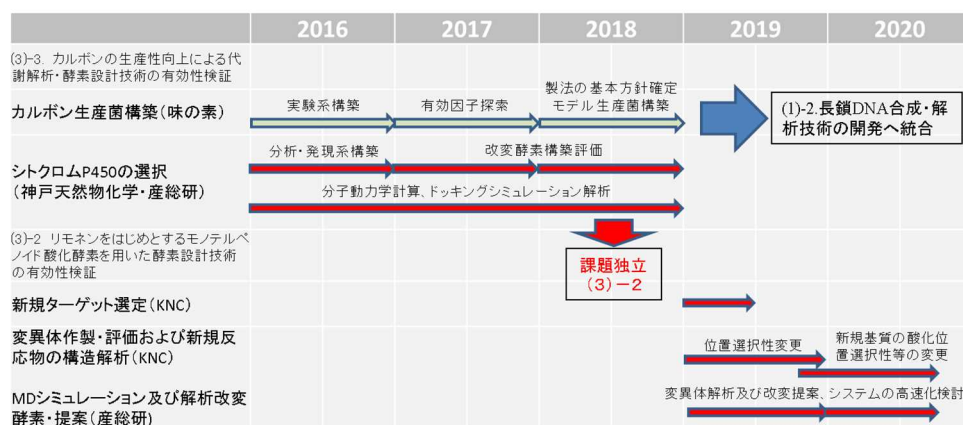


図 3.2.3.3-2-1 酸化酵素（シトクロム P450）を用いた酵素設計技術の全体計画

(4) 実施体制

研究の実施体制としては、P450のMDシミュレーションを用いたドッキング構造の解析法の開発と各構造群間のコンタクト情報による改変部位の提案法の開発を産業技術総合研究所が担当し、改変酵素の構築及び機能評価を神戸天然物化学（株）が担当した。

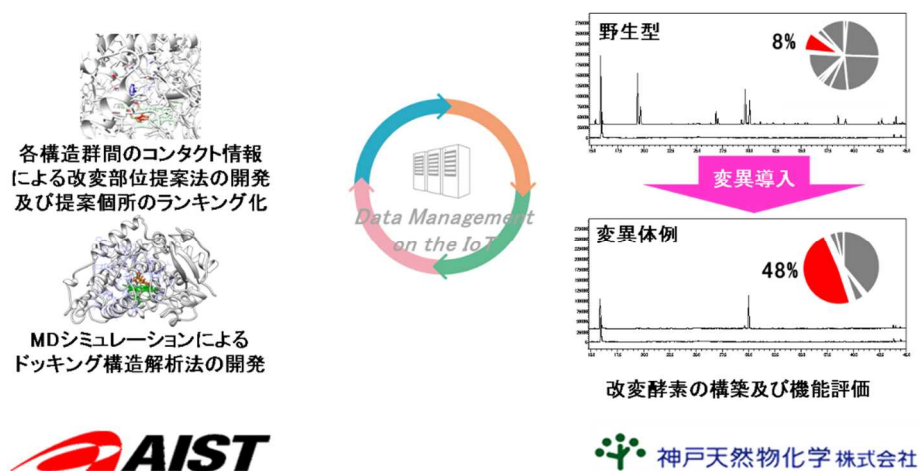


図 3.2.3.3-2-2 酵素設計技術の実施体制

(5) 運営管理

テーマの運営に関しては、P450 の MD シミュレーション解析及び改変部位の提案方法は、産業技術総合研究所が中心に技術開発を行い、改変酵素の構築及び機能評価は神戸天然物化学㈱が行った。1 か月半に一度の研究進捗を共有する為会合を定期的を開いた。2020 年 2 月以降のコロナ禍で面談が困難になった時期は、Web 会議システムを用いて研究進捗の共有を行ったことで影響を最小限に抑えることができた。

(6) 実施の効果

MD シミュレーション解析を用いた実用的な酵素機能の高度化の方法は世界初である（実施者調べ）。改変酵素の設計機能評価に要する期間は、開発初期の 1 年半から 2 か月半ほどに短縮できた。

改変酵素を無作為に作製する従来法では 10 万程度の変異体を作製する必要があるが、本法を用いると 57～95 株の変異体を作製すれば、その内半数から 6 割程度の株において位置選択性が向上することが確認できた。従来法と比較すると変異体作製数が約 1/1,000～170 に省力化できることが予測される。

また、野生型では 8%であったカルベオール生成率が本法を用いることにより、改変酵素で 48%まで向上した。野生型と比較して精製工程に用いる原料は 1/6 に縮小したため、より小規模な設備で簡便に精製できることから工程の削減が大いに期待できる。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目 (担当)	研究内容	2020年度末 目標値	2020年度実績/進捗度 (100%)(2月末見込み)	残課題
MDを利用した酵素 改変設計(産総研 /KNC)	MDシミュレーションに よるドッキング構造解析 及び改変個所の提案と 酵素機能の評価	新規基質による 反応の位置選択性 等の向上(2倍) (最終目標) ・P450触媒反応の 位置選択性等 ほぼ100%	酵素改変設計技術を用いて、 変異を入れることにより、 <i>p</i> -シメンの2位及び3位酸化物の選択 性がともに約3倍、変換量も約3 倍以上向上した株を複数得る ことができた。 ○基質の変更にも応用できる ことが示された ○変換量は野生株の2%程度 にとどまったが、目的化合物の 位置選択性が>99%の株を得 ることができた。	-

(8) 研究開発の成果と意義

(8) -1 分子動力学計算(MD)による P450 の改変

P450 を利用するにあたって酸化反応の位置選択性と低い反応性が問題になることがある。モデル化合物の香料原料の(*R*)-カルボン生産を念頭に置くと、低い位置選択性による不純物の増加は最終製品の香調変化の原因となり、低い反応性は生産コストの増大原因となる。反応の位置選択性が変更できれば新たな化合物の開発につながる。本有効性検証では特に位置選択性の向上を目指し、MD シミュレーションによる位置選択性の制御、すなわち選択性向上及び変更を目指した酵素改変を産業技術総合技術研究所とともに実施することとした。

従来、酵素改変手法としては PCR 法を利用して無作為に変異を導入する方法が広く用いられている。しかし、この手法は数千以上の変異体の作製・評価を行う必要があるため、目的の改変酵素を得るのに多大な時間と労力が必要となる。ハイスループットな酵素改変の手法を確立させるためには、変異を導入すべき残基を絞り込み、実際に作製・評価する改変酵素数を低減させる必要がある。本課題では酵素-基質の立体構造情報を用いて、ドッキングに關与するアミノ酸残基を予測し、変異を導入すべき残基の絞り込みを行った(図 3.2.3.3-2-3)。

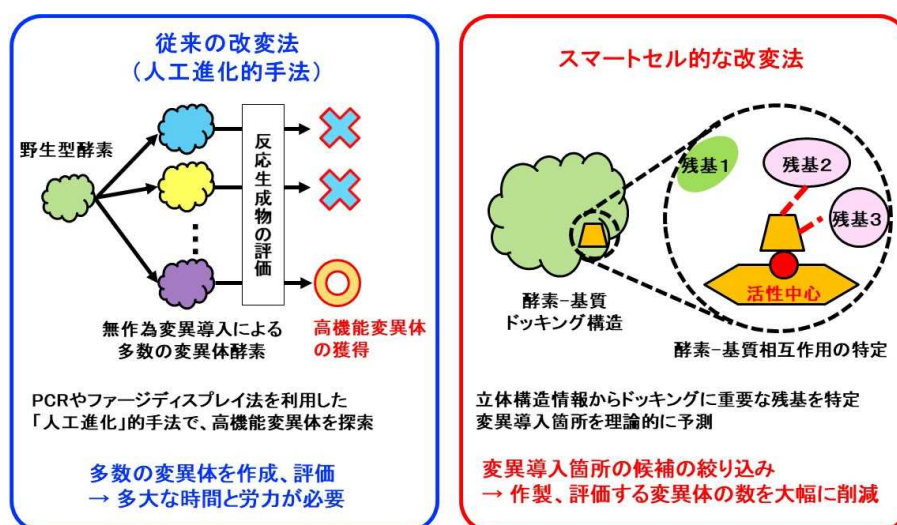


図 3.2.3.3-2-3 従来の改変酵素作製法との比較

P450 とリモネンの酵素反応は、酸化反応位置の異なる複数の生成物を生じることから、複数のドッキング構造が存在すると考えられる。最も一般的なドッキング構造予測法であるドッキングシミュレーションは、高速な構造探索を可能とする反面、酵素を剛体として扱うため、酵素ポケット内部の構造変化を考慮することができない。モデル P450 (アポ体) の結晶構造のポケット内部には、リモネンが活性部位に接触するのを妨げるように残基側鎖が突出しているため、ドッキング構造を網羅的に探索するためには、P450 ポケット内部の構造変化を考慮できる手法が必須である。そこで、酵素、基質、またそれらを取り囲む水分子などの溶媒を構成する各原子が相互作用しながら運動を行う MD シミュレーションによる構造探索を行うこととした。

最初に、文献情報及び KNC P450 ライブラリからリモネンを基質として、カルボン前駆体のカルベオールへ酸化する植物由来の P450 及び微生物由来の P450 の 2 つの P450 を改変候補とした。植物由来の P450 のホモロジーモデルを用いて一定温度における MD シミュレーションをおこなった。その結果、結晶構造が決定されている微生物由来の P450 と比較して植物由来の P450 のホモロジーモデルは主鎖構造が大きく構造変化してしまうことが観測された。よって、ホモロジーモデルの立体構造は不安定でありリモネンとヘムの安定したドッキング構造を推定することが困難であることから、微生物由来の P450 をもとに実験を進めることにした。次に、MD シミュレーションが実験結果を正しく再現できるのかを確認するため、モデル P450 のポケットにリモネンの光学異性体である S 体と R 体を配置した 2 つの MD シミュレーションをそれぞれ実行し、計算結果と実験の比較を行った。リモネンの S 体と R 体の両光学異性体それぞれをモデル P450 導入大腸菌にて微生物変換を行い、生成物を GC-MS を用いて分析すると、リモネンの 2、3、6、9 位が単独または複数個所が酸化された化合物が検出される。これらの酸化化合物群で最も特徴的なのは 3 位酸化物で、S 体では 6% なのに対して R 体では 37% 検出される (図 3.2.3.3-2-4B)。MD シミュレーションで R 体と S 体のリモネンの酸化部位と P450 の活性部位であるヘム酵素のコンタクト率について解析を行うと、実験と同様に R 体の 3 位コンタクト率が S 体に比べ有意に高い値をとることが示される (図 3.2.3.3-2-4C)。以上の結果により、MD シミュレーションがリモネンの光学異性体の違いによる反応性の違いを正しく判別できる精度を持つことが確認された。

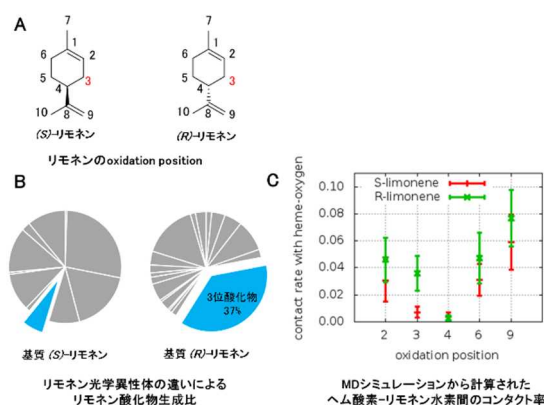


図 3.2.3.3-2-4 微生物由来 P450 によるリモネン酸化物生成比と
ヘム酸素-リモネン間のコンタクト率の比較

次に、P450 酸化反応の位置選択性を向上させるため、野生型 P450 の MD シミュレーション結果を用いて以下のような解析をおこなった。まず、MD シミュレーションから得られた全立体構造集団から、目的反応物（カルベオール）の酸化位置に相当するリモネン 6 位水素とヘム酸素がコンタクトしているドッキング構造集団（6 位構造群）を抽出し、各反応副生成物についても同様に構造群の抽出をおこなった。目的反応物のドッキング構造を維持しつつ、反応副生成物のドッキング構造を不安定化させるため、6 位構造群中ではリモネンとコンタクトせず、その他の構造群中ではコンタクトする P450 のアミノ酸残基を、それぞれの構造群におけるコンタクト率の差分から推定した。置換候補として推定したアミノ酸残基はコンタクト率より算出したスコアに基づきランキングし、ランキング上位 4 残基について変異を導入した。作製した変異酵素 76 種を評価した結果、野生型ではカルベオールの生成比率がおよそ 9% だったのに対し、ランキング上位 4 残基に対応する変異酵素ではそれぞれ 15%、12%、23% および 24% に向上した（図 3.2.3.3-2-5）。また、ランキング上位 4 残基の置換変異体では、変異体 76 種のうち 42 種においてカルベオール生成比率が向上していたのに対し、ランキング下位 3 残基では、変異体 57 種のうち 55 種においてカルベオール生成比率が低下していた。これらの結果から、基質-P450 のコンタクト率に基づく提案法により、位置選択性を向上させるアミノ酸残基を適切に提案できることが示された。

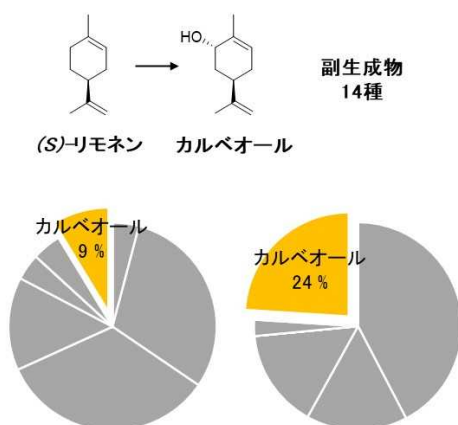


図 3.2.3.3-2-5 野生型ならびに変異酵素における (S)-リモネン酸化物生成比

さらにリモネン 6 位酸化物ではなく 3 位酸化物（イソピペリテノール）を目的反応物とした場合も同様に置換候補残基が提案できるか検証した。イソピペリテノールを目的反応物として作成したランキングリスト上位 2 残基について置換変異酵素 38 種を作製・機能評価した。その結果、野生型では生成比率がおよそ 5% なのに対し、ランキング上位 2 残基に対応する変異酵素でそれぞれ 8%、30% に向上した。このことから、この手法は 6 位以外の酸化位置選択性を向上させる際にも有効であることが示された。

次にリモネン以外の化合物を基質とした場合も位置選択性を向上させることができるか、平面構造を持つ *p*-シメンを用いて検証した。野生型 P450 では、*p*-シメンは主に 8 位酸化物へ変換され、香料原料として利用される 2 位酸化物（カルバクロール）ならびに 3 位酸化物（チモール）にはそれぞれおよそ 13% ならびに 5% 程度しか変換されない。そこで、カルバクロールならびにチモールを目的反応物とし、ランキングリストに基づく変異酵素の作製ならびに評価を行った。その結果、それぞれのランキングリスト上位 3 残基の変異酵素を作製・評価することで、目的反

応物の位置選択性が向上した変異酵素が取得できた。取得した変異酵素のうち、菌体当たりの生成量が野生型を上回った変異酵素では、カルバクロールはおよそ 21%に、チモールはおよそ 18%まで生成比率が向上した。また、野生型より生成量は下回ったものの、カルバクロールはおよそ>99%に、チモールはおよそ 30%まで生成比率が向上した変異酵素も取得できた。以上の結果より、この手法はリモネン以外の化合物を基質とした場合も有効であることが示された。

一アミノ酸置換変異酵素の予測について有効性を述べてきたが、変異酵素の MD シミュレーションを行うことでさらに変異を追加することも可能である。また、現在開発中の基質ポケットの空間サイズに基づく新たな置換候補残基の提案法と組み合わせることで、さらに変異酵素の位置選択性を向上させることもできた。例えばカルベオールでは、二つの手法から提案された置換候補残基を組合せた三アミノ酸残基置換変異体において、生成比率がおよそ 8%から 48%に向上した変異酵素が取得できた (図 3.2.3.3-2-6A)。得られた変異酵素による目的反応物の生成比率は 48%に向上し、およそ 14 種類確認された副生成物がほとんど 1 種類まで減少したことで、大きく精製工程の省力化が期待できる。また、カルバクロールでも、提案された部位を組合せた二アミノ酸置換変異体において、生成比率がおよそ 11%から 74%に向上した変異酵素が取得でき、精製工程の大幅な省力化が期待できる (図 3.2.3.3-2-6B)。

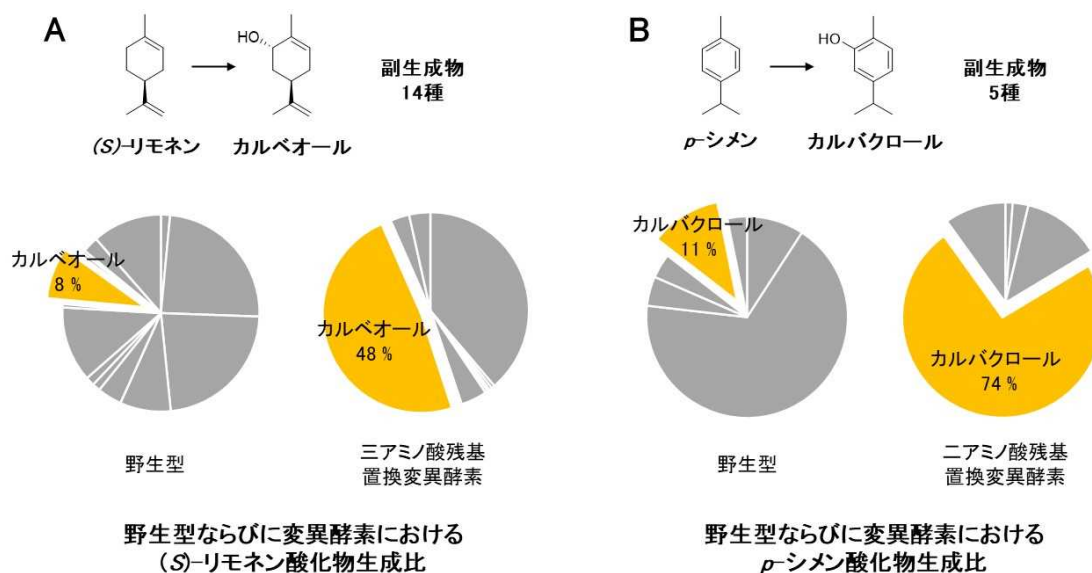


図 3.2.3.3-2-6 野生型ならび変異酵素における目的反応物の生成比

(8)-2 P450 発現大腸菌の宿主改良

カルボンを生産する過程で律速と想定されるのは、リモネンからカルベオールを生産する P450 を利用した酸化反応である。P450 は一般的に活性が非常に低いことが知られている。原因として、P450 は、活性部位に結合するヘムや P450 レダクターゼからの電子供給、空気中からの酸素分子の供給など複雑なメカニズムにより反応が進行するため、宿主細胞内環境からの影響を非常に受けやすいことが報告されている。そこで、本課題では、P450 反応メカニズムに基づき、カルベオール生産性向上に寄与する有効因子の探索及び改良を検討した。

まず、リモネンは揮発性物質のため、揮発性物質に適した微生物変換系の構築を行った。反応条件の最適化により、カルベオール生産量を初期条件と比較して約 60 倍向上させた。さらに、反応向上に有効な因子の探索を行うこととし、メカニズムに基づき 30 因子について検討を行った結果(図 3.2.3.3-2-7)、カルベオール生産性向上に寄与する 6 種の因子を見出した。特に、細胞内ヘム濃度向上による P450 活性強化を目的としてヘム生合成経路における律速酵素を新たに見出し、発現量を向上させることにより、P450 活性を従来に比べて約 1.6 倍に向上させた。

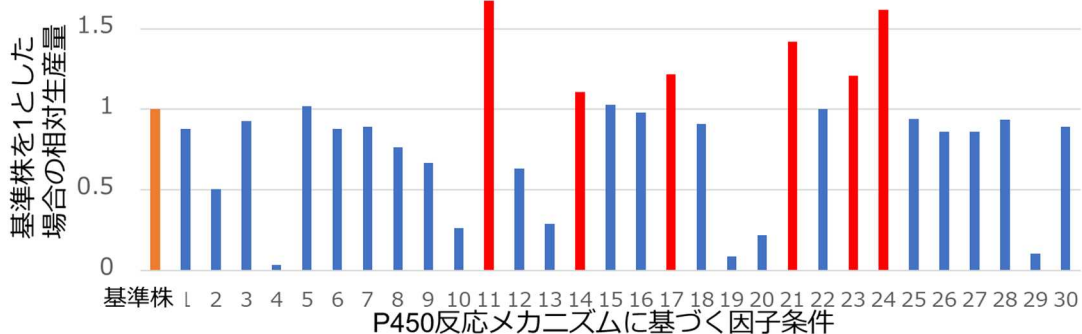


図 3.2.3.3-2-7 P450 反応メカニズムに基づいた P450 活性を向上させる有効因子の探索

有効因子を探索する中で、P450 活性向上に対して重大な影響を及ぼす因子として、ヘムの細胞内蓄積とリモネンの細胞内外輸送の 2 つを見出した。ヘムは細胞内にて生合成された後、そのほとんどが細胞外へ排出されるため、細胞質内で発現した P450 との結合率が低く、活性の低下を引き起こす。一方で、リモネンは水溶性が極めて低く、細胞内への取り込みが制限されることに加え、細胞外へ排出されやすいため P450 との反応性は非常に低い。そのため、ヘム及びリモネンの排出に関与する輸送体を欠損させることで、細胞質内高蓄積が可能となり、P450 の反応性が飛躍的に向上することが期待された。

そこで、東北大学と連携して、ヘム及びリモネンの大腸菌内膜輸送体の探索及び欠損株を用いた評価を行った。大腸菌内膜輸送体として、複数の候補について欠損株を作製し、リモネンを基質としたカルベオール生産について検討を行ったところ、欠損株において、大腸菌野生株と比較してリモネン消費量が約 2.5 倍、カルベオール生産量が約 12 倍と飛躍的に向上した。さらに、欠損株についてヘム及びリモネンについて細胞内局在性を解析したところ、細胞内にリモネンが著しく蓄積していた。これらの結果から、リモネンの排出を抑制することで P450 を用いたカルベオール生産を劇的に促進することが明らかとなった。低活性な酵素の反応性向上において内膜輸送体発現制御が非常に重要なファクターであることを実証した。

これまでの有効因子の探索と改良を経て、最終的に基質として 1 g/L のリモネンから 0.47 g/L(変換率 47%)のカルベオールの生産を可能とした。

(8)-3 まとめ

今回用いた微生物由来 P450 には変異を導入することで位置選択性に影響を与えると推定された基質ポケット内のアミノ酸残基が 75 ヶ所あった。その全てを野生型と異なるアミノ酸残基に置換した場合一アミノ酸置換変異酵素は 1425 種になるが、今回開発した手法ではランキング上位に提案される数残基に変異を入れることで、有用な変異酵素を取得することが可能である。酸化位置のみ異なる化合物は吸光度や蛍光検出を用いたハイスループットなスクリーニング法では化合物の構造情報を得ることが難しく、GC-MS や LC-MS などによる詳細な化学構造情報が必要になる。したがって MD シミュレーションを用いた理論的予測を用いることで実際に作製・評価する変異酵素数の低減が期待される。本法を用いることで時間と労力の削減につながり、スマートセル作製促進に大きく貢献できるだろう。

(9) 成果の普及

年度	論文		その他外部発表		
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌への掲載	その他
2016	0	0	1	0	0
2017	0	0	0	0	0
2018	0	0	4	0	1 (書籍)
2019	0	0	5	0	0
2020	1(投稿中)	0	3	0	0
計	1(投稿中)	0	13	0	1 (書籍)

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT 出願
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	0	0	0
2019	0	0	0
2020	0	0	0

MD シミュレーションなどスーパーコンピュータ等を利用し計算するソフトウェアが必須であり、ソフトウェアコードなどに高い秘匿性があるため、特許の出願を見送った。

課題名：C(3)-3 有用イソプレノイドの生産性向上による代謝解析技術の有効性検証

担当機関：三菱ケミカル、J S R、産業技術総合研究所、神戸大学、京都大学

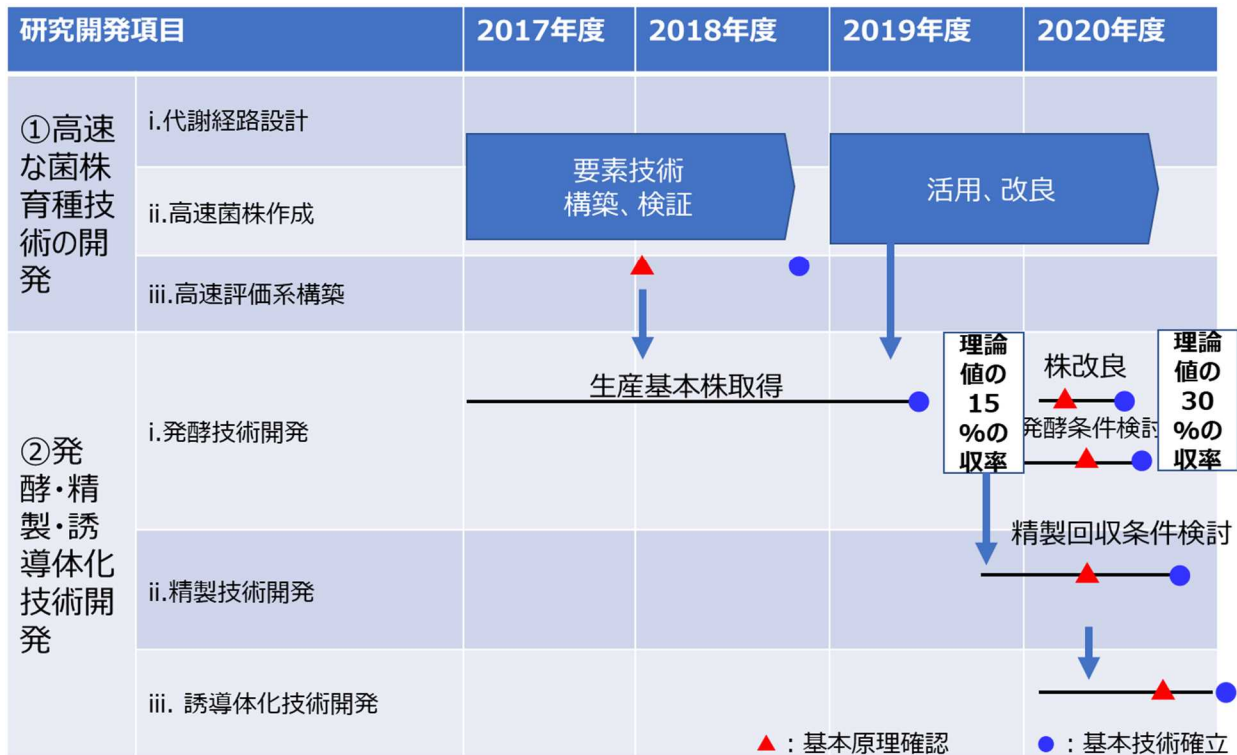
(1) 背景と目的

イソプレノイドとは 2-メチル-1, 3-ブタジエン骨格を基本構造単位として生合成される天然物の総称であり、これらには生体内において代謝、構造形成、及び、情報伝達などの重要な機能を有する分子が少なくなく、医薬品、化粧品、または、栄養補助食品としての実用化が期待されている。また、現状の産業において高分子化合物の原料となっている天然資源の枯渇やそれらの使用による環境悪化といったリスクを回避するため、高分子化合物の原料や燃料としての活用が期待されるイソプレノイドも存在する。しかしながら、こうした化合物は少なからず複雑な構造をとるがゆえに天然資源からの抽出や化学合成は容易ではない、または、天然資源を用いる既存の物質や技術を代替できるほどの性能や生産レベルに達していない、という理由から実用化される例は限られている。我々は産業上有用な各種イソプレノイドの高効率かつロバストな生産に利用可能な共通プラットフォームとなる微生物菌株の構築を目指しており、本経路の重要中間体であるイソペンテニルピロリン酸（IPP）及びジメチルアリルピロリン酸（DMAPP）を効率よく生産しうる代謝経路を合成生物学的手法により構築することを目的として研究に取り組んだ。しかしながら、これらの中間体の蓄積は細胞内で厳密に制御されていることから、IPP 及び DMAPP を生産する代謝経路の構築とそのポテンシャル評価は容易ではないと考えられる。このため、本研究を進めるにあたり、標的とするイソプレノイドとして、産業上の有用性があり、IPP または DMAPP の蓄積を回避するためのカーボンシンクになりえる化合物を検討して、標的イソプレノイドを決定し、その対原料重量収率をもって生産能力の指標とすることとした。

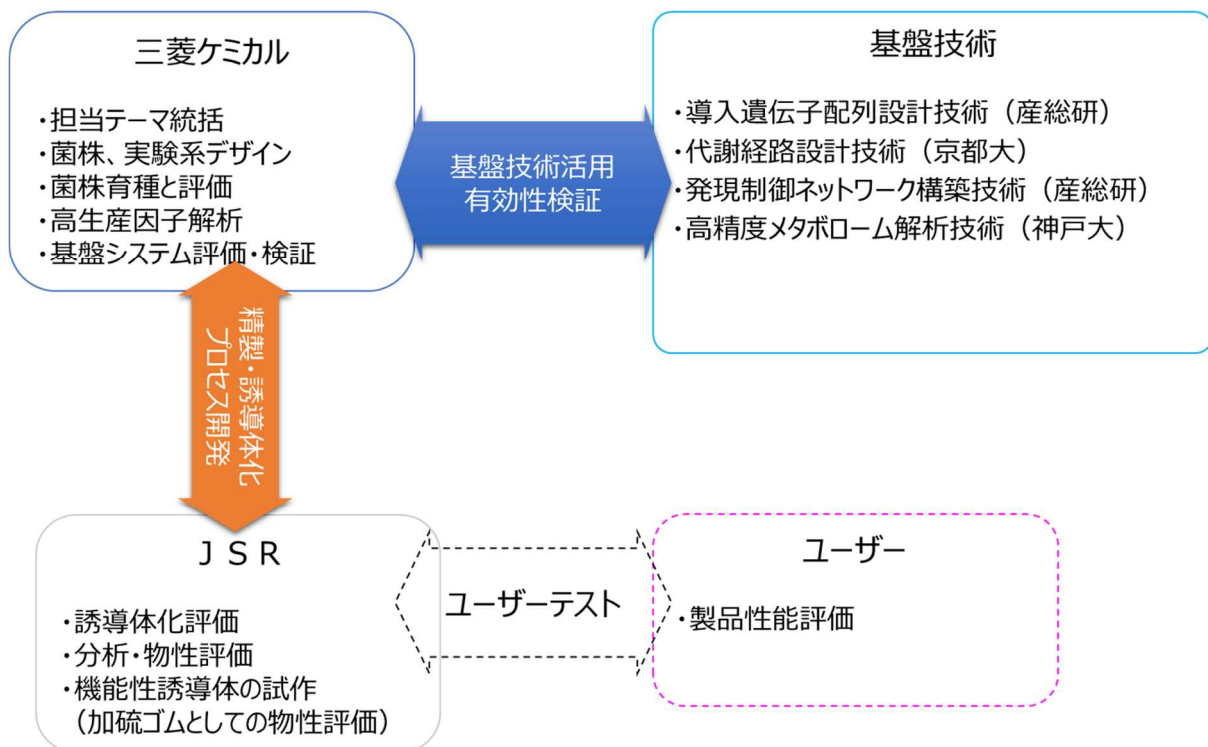
(2) 位置づけ、目標値

	目標	根拠
中間目標	原料から標的イソプレノイドへの変換収率が理論値の 10%以上となる微生物菌株を構築する。	代表的なイソプレノイドの製造コストに関する文献に記載の発酵成績の 1/3 以上の性能を有する菌株
最終目標	原料から標的イソプレノイドへの変換収率が理論値の 30%以上となる微生物菌株を開発する。発酵・精製の各プロセス、及び、その後の誘導体化プロセスへの適用について、実験室レベルでその実施が可能であることを示す	標的イソプレノイドの製造コストに関する文献に記載の発酵成績を上回る性能を有する菌株

(3) 全体計画



(4) 実施体制



(5) 運営管理

- ・全体会議開催（1回／年）：テーマについて、進捗、課題、及び、今後の予定を共有し、基盤技術の開発状況やその有用性、及び、有効性検証テーマにおける基盤技術の活用効果や課題について共有・意見交換する。
- ・テーマ進捗会議（3回／年）：本テーマの進捗及び課題をテーマ関係者で共有し、技術課題に対する各種基盤技術の活用可能性などを踏まえ、その後の計画を議論する。これ以外に、個別の技術課題について基盤技術開発テーマと主にWEBベースで打ち合わせを実施。

(6) 実施の効果

循環型原料由来発酵イソプレノイドを原料とする誘導体製品が実用化された場合、2030年ごろにはテーマ実施者は当該製品の主要供給者としてサステナブルな社会構築に貢献していることが期待される。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目	現状 (2021年2月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し（残課題）
有用イソプレノイドの生産性向上による代謝解析技術の有効性検証	原料からの変換収率が理論値の33%となる生産基本株を取得した。	原料からの変換収率が理論値の30%以上となる精算基本株を開発する。	○
有用イソプレノイドの生産性向上による代謝解析技術の有効性検証	ラボ発酵槽を用いた培養にて発酵イソプレノイドを生産し回収した。イソプレノイドの不純物を調節したモデル発酵バイオイソプレノイドを用いて誘導体化反応及び誘導体の物性に影響が少ないことを確認した。	発酵・精製の各プロセス、及び、誘導体化プロセスへの適用について、実験室レベルでその実施が可能であることを示す。	△（発酵イソプレノイドに含まれる不純物を低減した上で、発酵イソプレノイドを誘導体化すること）

(8) 研究開発の成果と意義

①高速な菌株育種技術の開発

i) 代謝経路設計（産業技術総合研究所、神戸大学、京都大学、三菱ケミカル株式会社）

標的イソプレノイド発酵生産の代謝経路をデザインするため、既報の反応を組み合わせた代謝経路で収率を最大化する代謝流束バランスのデザインを行い、次いで、新規反応を盛り込むことでより高効率な代謝経路のデザインに取り組んでいる。

i)-1. 既存反応の組み合わせによる代謝経路の設計

代謝経路をデザインするため、公開されている代謝モデルを用いて Flux Balance Analysis (FBA) を行い、標的イソプレノイドを最大収率で生産する代謝流束分布、及び、そのときの収率を予測した。このとき、代謝モデルにおけるイソプレノイド経路を構成する各反応について、反応式の妥当性を論文情報に照らして確認したところ、3 つの反応について反応式を修正またはモデルから削除を行うことが必要であった。なお、イソプレノイド合成経路として、メバロン酸経路 (MVA 経路)、または、非メバロン酸経路 (MEP 経路)、あるいは、その両方を活用するケースに分け、それぞれについて制約条件を詳細に変化させることによる代謝流束バランスの変化を解析した。また、代謝改良ポイントを絞り込むため、イソプレノイド収率最大化条件と生育最大化条件における各反応流束の差異を求めた。その中で、大きく流束の差異があった反応 (遺伝子) の中から遺伝子発現を抑制する候補として 4 つの遺伝子が選ばれた。他方、遺伝子発現を促進する候補としてはイソプレノイド合成経路に関連する遺伝子が選ばれた。

i)-2. 新規反応を取り込んだ代謝経路の設計検討

嫌気条件におけるイソプレノイド合成の効率よい代謝経路をデザインするため、主要代謝経路中間体のうち新規反応も含めた数段の反応経路にて標的イソプレノイドへの高い収率及び高いエネルギー収支のバランスが期待できる化合物とその経路を M-Path にて予測し、その反応経路を成立させるための酵素候補を探索しているが、現時点では見出せていない。

i)-3. イソプレノイド合成経路鍵酵素の遺伝子配列設計

イソプレノイド合成経路における鍵酵素として宿主内在の酵素よりも高い酵素学的性質が報告されている微生物 X 由来の配列について発現を検討した。しかしながら、当該配列を発現する菌株のイソプレノイド収率は低下した。本菌体の無細胞抽出液から可溶性画分を抽出したところ、その SDS-PAGE は同酵素蛋白質の発現量が低いことを示したが、遺伝子の転写量に問題はなかったことから翻訳効率が低いことと推察された。このため、当該遺伝子の翻訳効率向上を目的として産業技術総合研究所に遺伝子配列の設計 (Sci Rep. 2019; 9: 8338.) を依頼した。本手法によって設計された微生物 X 由来鍵酵素遺伝子を発現させ、細胞破碎後の可溶性画分と不溶性画分を SDS-PAGE 及び CBB 染色により検出した結果を示した。配列設計を行うことによって鍵酵素蛋白質の発現量は 4.2 倍増加させることに成功した。しかし、そのほとんどが不溶性画分に検出され、全体の発現量に対して可溶性の発現量はわずか 4.5%であった。そこで、遺伝子発現誘導における培養条件をさらに検討したところ、低温で培養することにより可溶化が大きく改善、全体の発現量に対する可溶性の発現量が 36%と、可溶性発現の比を 8 倍高めることに成功した。

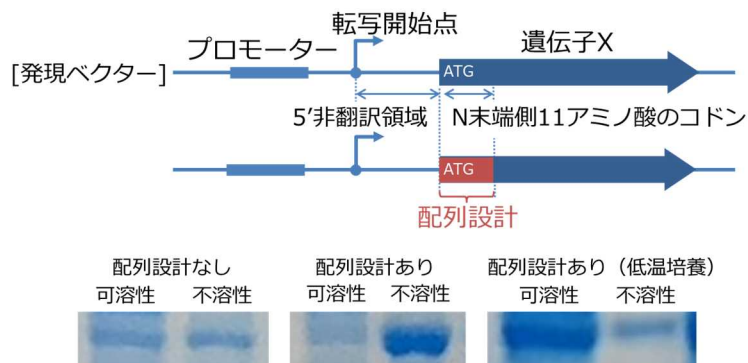


図 3. 2. 3. 3-3-1 配列設計の対象領域及び配列設計による蛋白質発現 (SDS-PAGE)

ii) 高速菌株作製（産業技術総合研究所、神戸大学、三菱ケミカル株式会社）

ii)-1. 遺伝子のサイレンシングライブラリ

微生物の代謝改良検討において、網羅的な遺伝子過剰発現ライブラリ構築はプラスミドベクターの活用により比較的効率よく実施可能であるが、網羅的に遺伝子発現を抑制した菌株のライブラリ構築については Keio コレクションなど遺伝子破壊株ライブラリに目的代謝経路構築に必要な遺伝子を過剰発現する核酸を導入する手法に限られている。このため、菌株育種の途中段階で網羅的な遺伝子発現抑制のライブラリを構築するのは容易なことではない。そこで、産業技術総合研究所にて開発したアンチセンス RNA を用いた遺伝子サイレンシング手法の有効性を検証した。本法ではアンチセンス RNA 発現ベクターで宿主菌株を形質転換することで各種遺伝子のサイレンシングライブラリを構築可能であり、解糖系、TCA 回路、及び、ペントースリン酸回路を構成する遺伝子を中心とした約 70 種類のアンチセンス RNA 発現ベクターをそれぞれ形質転換で導入し、効率よく遺伝子サイレンシングライブラリを構築の上、それらの反応試験により各遺伝子のサイレンシング効果を比較することに成功したことから、本方法は有用であると判断している。

ii)-2. ゲノム編集による遺伝子破壊ライブラリ

各種の代謝改良株の作製において、一部の代謝改良についてはゲノム組込みを活用する。このため、効率よいゲノム上の遺伝子加工方法としてゲノム編集方法を試験している。具体的にはゲノム編集方法を活用して 2 種類の遺伝子を一度に破壊できることを確認した。

iii) 高速評価系の構築（神戸大学、産業技術総合研究所、三菱ケミカル株式会社）

iii)-1. イソプレノイド定量技術及びメタボローム測定

標的イソプレノイド高蓄積菌株を効率よく構築するため、各種遺伝子の発現量や代謝産物の蓄積量などのマルチモーダルなデータを効率よく取得し菌株の性能を高速に評価・解析する手法の構築に取り組んだ。まず、実験室における標的イソプレノイドの測定にはガスクロマトグラフィー及び質量分析 (GC-MS) を利用することとして分析条件を構築した。しかしながら、当初、イソプレノイド定量のスループットは高くなかったため、分析条件を抜本的に見直したところ、分析時間を約 1/6 に短縮することが可能になり大幅にスループットが改善した。また、標的イソプレノイド以外の代謝産物の蓄積を把握するため、神戸大で開発した LC-MS 及び CE-MS を用いたメタボローム解析を用いた。この方法では解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸回路、及び、イソプレノイド合成経路上の代謝産物、並びに、補酵素を加えて代謝物について菌体内外の蓄積量を一斉に測定することが可能である。サンプル調製からデータ取得まで効率よく実施可能であり、DBTL を効率よく回転させるうえで有用な技術であると考えられる。

iii)-2. イソプレノイド生産菌株の高速スクリーニング系

GC-MS を用いたイソプレノイド測定は短時間で実施可能であるが、ランダム変異体のスクリーニングに使用できるほどのスループットではない。そこで、より簡便にイソプレノイド生産能力を検出できるスクリーニング系が必要である。このため、呈色するイソプレノイド化合物を用いた比色法及びメタボライトセンサについて実用性を検討した。結果、両者とも適切な条件設定の上で、スクリーニングスループット向上に有用と考えられる。

iii)-3. トランスクリプトームのネットワーク解析によるボトルネック改良ポイントの抽出検討
 イソプレノイド生産菌株を複数の条件で培養し、培養液当たりのイソプレノイド蓄積量を測定し、トランスクリプトームを取得した、これらの結果の解析によりイソプレノイド蓄積に関する2種類のローカルな因果関係モデルが構築され、合計6種類の遺伝子改変が提案された。しかしながら、これらの改変を実施したところ、イソプレノイド蓄積を大幅に改善する結果は得られなかった。この原因としては目的変数として用いたイソプレノイド蓄積量が極めて低いレベルでありS/Nが十分に高くなかったことが原因であろうと考えている。この結果を踏まえ、現在、イソプレノイド収率に明確な差異がある40種類の菌株について、イソプレノイド収率を測定し、その反応に供した菌体のトランスクリプトームを取得した。現在、ネットワーク解析中であり、事業期間中に代謝改良候補が示され、その有効性を検証する予定である。

②イソプレノイド発酵・精製・誘導体化技術開発

i) 発酵技術開発（三菱ケミカル株式会社、産業技術総合研究所、神戸大学）

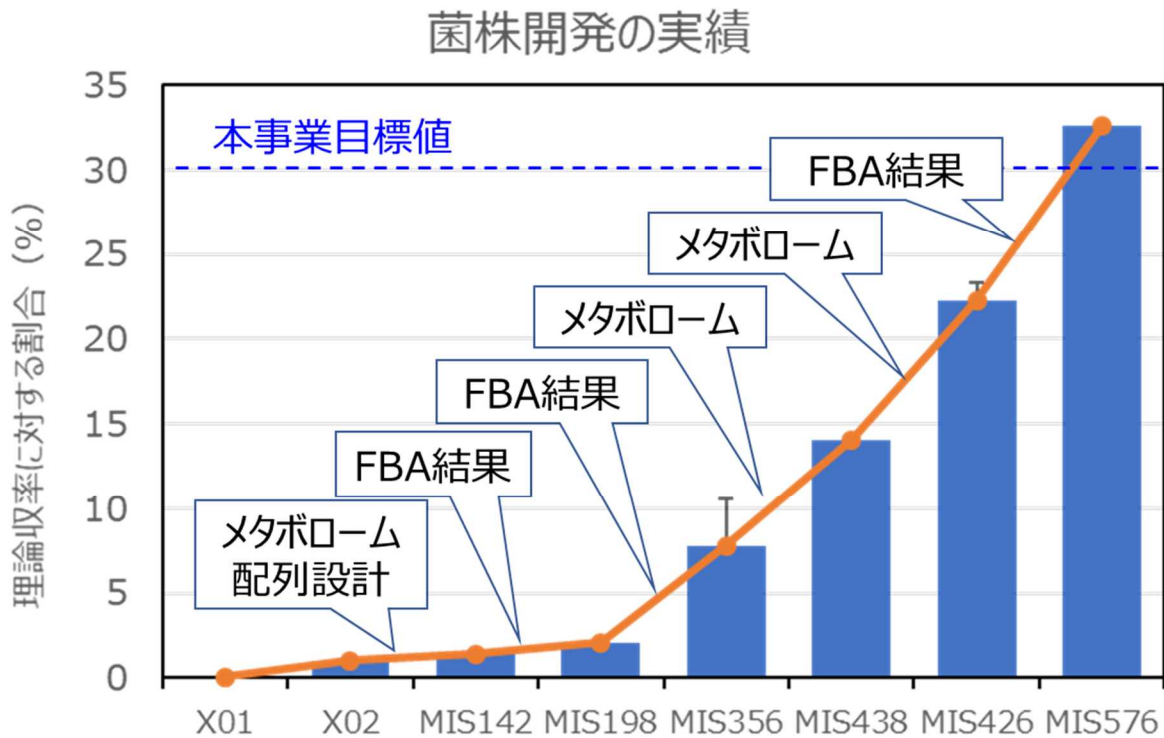


図 3.2.3.3-3-2 本事業における菌株開発の推移

本テーマで構築した菌株の理論収率に対する割合の推移を図 3.2.3.3-3-2 に示す。まず、本テーマで用いる微生物菌株に異種由来の酵素遺伝子を導入した菌株（X01 株）を作製し、目的とするイソプレノイドの蓄積を確認した。X01 株からイソプレノイド合成経路の遺伝子を過剰発現する菌株（X02 株）を構築した。次に、メタボロームの結果を踏まえ、代謝経路の鍵となる酵素反応の流束を高めるべく配列設計した異種生物由来酵素遺伝子を導入して MIS142 株を構築し、当該菌部で FBA を用いて予測した反応抑制候補の有効性を検証した。4 種類の遺伝子について発現抑制を行ったところ、うち 3 つの遺伝子について発現を抑制することがイソプレノイド収率向

上に有効であることが分かった。そのうち遺伝子 X を破壊した MIS198 株に異種生物由来遺伝子を過剰発現する MIS356 株を構築したところ、収率は MIS198 株の約 4 倍に向上した。さらに、メタボロームで顕著な蓄積が見られた代謝中間体の直後の反応を過剰発現し、MIS426 株及び MIS438 株を構築した。そして、再度 FBA で予測された発現を抑制する遺伝子候補のうち、遺伝子 Y の発現を抑制する菌株 (MIS576) を作製した。この菌株は MIS426 に比べ、収率が約 1.5 倍高く、本事業の目標値を超える収率を示した。

以上、開発初期の X01 株から収率が約 600 倍向上した MIS576 株を構築できたが、その過程における、各種スマートセル要素技術の有用性について以下まとめる。

- ✓ FBA による経路設計：今回使用した代謝モデルではイソプレノイド合成経路関連の反応データについてクレンジングを実施した。宿主生物の代謝モデルとして許容される完成度は明らかになっていないが、代謝経路構築の方針を定める上で、有用な情報がもたらされたと考える。
- ✓ FBA による代謝改良ポイント絞り込み：本テーマではイソプレノイド生産において抑制すべき反応候補として予測された 4 種の反応について、遺伝子破壊またはノックダウンによる有効性を検証したところ、うち 3 種類で効果があった。よって、FBA による代謝改良ポイントの絞り込みは有用な方法と考える。また、本テーマではこうした予測を効率よく検証するためにアンチセンス RNA や CRISPRi による遺伝子サイレンシングを活用したが、これらは開発途上の菌株で遺伝子発現抑制ライブラリを構築する上でも有用と考える。
- ✓ 蛋白質発現の配列設計：本テーマでは、蛋白質のアミノ酸配列を維持したまま蛋白質発現量を改善することが可能であり有用であった。他方、同種蛋白質の発現量が高まると不溶化する場合が少なくなく、本事業の範疇ではないが、可溶性を維持したまま高い発現量を実現する技術の開発が望まれる。
- ✓ 高速メタボローム：本テーマでは、サンプル調製も特段煩雑ではなく、既存のメタボローム解析サービスに比べ、比較的短時間で分析結果が得られ、菌株構築方針の策定に有用な情報が得られた。
- ✓ ネットワーク解析：現時点では検討を進めているところであるが、FBA やメタボロームでは予測できない代謝改良ポイントを検出する期待は高い。
- ✓ 高速スクリーニング系：本テーマで検討したスクリーニング手法は両者とも適切な条件設定の上で、スクリーニングスループット向上に有用と考えられる。

こうして開発したイソプレノイド高収率生産菌株の有用性を検証するため、有用イソプレノイドの一つとして J S R 株式会社におけるゴム用途を想定し、イソプレンを発酵生産するための菌株を作製した。当該菌株をラボレベルの発酵槽で培養したところ、発酵排ガス中にイソプレンを検出し、その以外の物質として物質 A 及び物質 B を検出した。

ii) 精製技術開発 (三菱ケミカル株式会社、産業技術総合研究所、神戸大学)

ラボ発酵槽でのイソプレレン生産において、発酵槽排ガスに含まれるイソプレレンのうち、約 90% のイソプレレンを回収できたと考えられる。今後さらに回収歩留まりを向上する必要がある。

iii) 誘導体化技術開発 (J S R 株式会社)

発酵生産で得られるイソプレン中には、従来のナフサ由来のイソプレンとは異なる副生物（不純物）が含まれている。そこで、これらの不純物が誘導体化（ポリイソプレンゴム（IR）を合成する重合反応）に及ぼす影響を検証した。最初に発酵イソプレンに関する特許情報記載の不純物、3-メチル-2-ブテン-1-オール、2-メチルフランおよび酢酸メチルがイソプレン中に含まれる場合に IR のラボ重合反応へ及ぼす影響を検討した。2-メチルフランは重合反応に対する影響は見られなかったが、3-メチル-2-ブテン-1-オールと酢酸メチルは、イソプレン中に数百 ppm 含まれると重合活性が低下し、重合阻害物質として働くことが分かった。次に三菱ケミカル株式会社が実施した発酵試験時の分析結果から、主成分として含まれていたのは物質Aおよび物質Bであった。これらの物質についてもラボ重合実験にて IR 重合反応への影響を検討した。その結果、物質Aはイソプレン中に 363 ppm 含まれると、また物質Bは 129 ppm 含まれると重合活性が低下することがわかった。これらの結果から、発酵イソプレンの実用化に向けては、発酵工程および回収・精製工程において、これらの不純物を IR の重合反応に影響しない濃度まで低減することが課題となることがわかった。

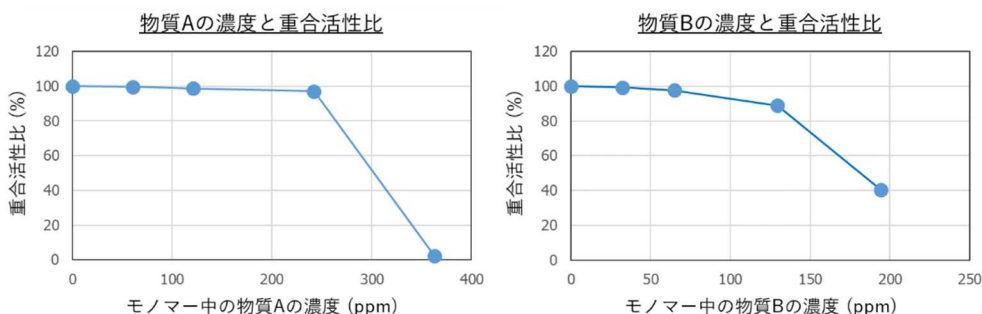


図 3. 2. 3. 3-3-3 モノマー中の不純物濃度が重合活性比に及ぼす影響

次に発酵イソプレン中の不純物が、合成した IR の品質に及ぼす影響を検証した。三菱ケミカル株式会社からの不純物分析結果から物質Aが 75 wt%、物質Bが 25 wt%の割合、および前記ラボ重合検討結果より不純物の IR 重合反応への阻害影響が小さいと推定される量（二種類合計で 100ppm）を選定し、試薬イソプレンに混合したものをモデル発酵イソプレンとした。このモデル発酵イソプレンと不純物を含まない試薬イソプレンを使用した IR の合成を行った。この二種類の IR サンプルは、ともに無色透明で不純物が原因の着色はなく、IR の分子量やマイクロ構造（cis 含量）も同等であった。IR の品質確認は、手袋用途等を想定した硫黄系配合（配合処方-1）と自動車タイヤ、工業用部品用途等を想定したカーボンブラック/硫黄系配合（配合処方-2）の二種類の基礎的な配合にて実施した。

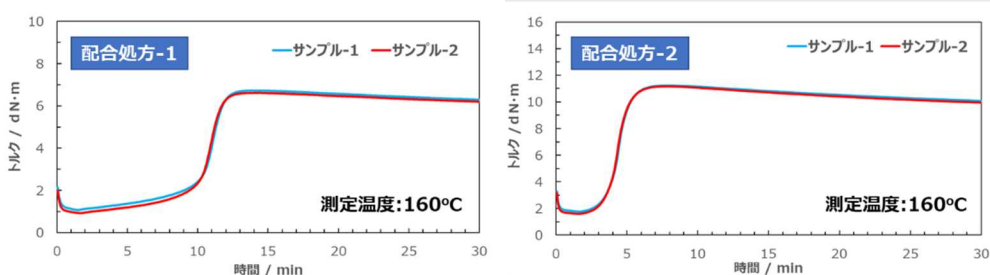


図 3. 2. 3. 3-3-4 IR ゴム配合未加硫物の加硫特性

モデル発酵イソプレンおよび試薬イソプレンから合成したそれぞれの IR サンプルは、二種類の配合処方で測定した加硫挙動、引張試験はともに同等であり、配合処方-2 における耐摩耗試験、

粘弾性試験でも同等の結果を示した。これらの結果より、今回検討したモノマー中の不純物濃度であれば、IR の品質に影響を及ぼさないことがわかった。今後、発酵イソプレンの実用化に向けては、発酵イソプレンそのものを使用した IR サンプルにて品質確認していく必要がある。

表 3.2.3.3-3-1 IR ゴム配合加硫物の引張試験結果

	配合処方-1		配合処方-2	
	サンプル-1	サンプル-2	サンプル-1	サンプル-2
破断強度 (MPa)	2.6	2.7	14.5	14.9
破断伸び (%)	510	510	590	590

(9) 成果の普及 (2021年2月15日現在)

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	0	0	0	0	0
2018	0	0	0	0	0	0	0
2019	0	0	0	0	0	0	0
2020	0	0	1	0	0	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み (2021年2月15日現在)

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	0	0	0
2019	0	0	0
2020*1	0 (2)	0	0

*1 : 2020年2月時点での累積出願済み件

課題名：C(3)-4 コリネ菌を用いた有用芳香族化合物の生産性向上による代謝解析技術の有効性
検証

担当機関：地球環境産業技術研究機構、理化学研究所、京都大学、大阪大学、神戸大学、産業技術総合研究所、東北大学

(1) 背景と目的

現在ほとんどの芳香族化合物は原油等の化石資源を原料とした化学法によって生産されているが、再生可能な非可食バイオマスを原料としたバイオ法による生産に転換することで環境負荷の低減、CO₂ 排出量の削減が可能になる。しかし芳香族化合物は高い細胞毒性を示すことや、生合成経路の反応ステップ数が多いことから、菌体増殖を伴う通常の発酵法では芳香族化合物の生産性は極めて低かった。地球環境産業技術研究機構(RITE)は独自の検討により、大腸菌や溶媒耐性菌として知られる *Pseudomonas putida* S12 株などと比較してコリネ菌は様々な芳香族化合物に対して耐性が強いことを見出した。このため、コリネ菌を宿主として用いることは芳香族化合物類を高生産する際の大きなメリットになる。本研究開発では需要が高いにもかかわらずバイオ化が進んでいないカテコールを生産ターゲットと定めた。土壌性細菌であるコリネ菌はカテコール分解能を持つがカテコール生産代謝経路は持たない。そのため最適と思われる代謝経路を設計し、必要な遺伝子の追加に加えて適切な遺伝子の高発現、破壊を行う必要がある。従来、この生産株育種戦略の立案は熟練者の能力に頼っていたが、知識や調査範囲、実験試行回数には限界がある。そのため新たな生産株開発には膨大な時間と労力が必要であった。育種戦略の一部を、情報解析技術を用いて立てることができれば、改変すべき遺伝子候補をシミュレーションや大規模データベースを利用して挙げるができる。これにより人の頭では思いつかない最適な改変が提案されるだけでなく、最小限の試行で短期間での生産株開発が期待できる。

本研究開発では、複数のスマートセル基盤技術開発チームと連携し、必要な実験データの提供と、データにもとづいた技術の更新を繰り返すことで基盤技術を高精度化することを目的とする。さらに基盤技術開発チームから改変提案を受けることでカテコールの高生産株育種を行い、基盤技術の有効性を検証する。具体的には、「高精度メタボローム解析技術」、「HTP トランスクリプトーム解析技術」、「定量ターゲットプロテオーム解析技術」を活用してデータを取得する。これらを生産検討データと併せて「代謝経路設計技術」、「酵素改変設計技術」、「導入遺伝子配列設計技術」、「発現制御ネットワーク構築技術」、「輸送体探索技術」、「文献等からの知識抽出・学習技術」と共有することで各基盤技術の高精度化を図る。さらに各基盤技術から生産性向上のための改変提案を受け、1 つの生産株系列に重ねることで、最小限の試行かつ短期間でのカテコール高生産株の構築、生産性向上を示す。

(2) 位置づけ、目標値

本研究開発では香料原料、農薬原料をはじめとして様々な用途での需要が高い芳香族化合物カテコールをターゲットとした。カテコールは市場規模が大きく、今後の成長も予測されているにもかかわらずバイオ化は進んでいない。現在は石油からフェノールを経て酸化反応により製造されている。しかし前述の環境負荷低減のため、再生可能資源からのバイオ製造が望まれている。本研究開発により、通常の発酵法では生産が困難なカテコールの製造技術を開発することで社会

実装を目指す。カテコールの生産困難性と市場価格、国内・世界生産量を考慮し、プロジェクトでの最終生産目標値を 10 g/L と設定した。

(3) 全体計画

研究開発項目		2016 年度	2017 年度	2018 年度	2019 年度	2020 年度
実施項目① コリネ菌を用いたカテ コールの生産性向上に よる代謝解析技術の高 度化と有効性検証	①-1 代謝設計技術の高度化と有効性検証					
	①-2 発現制御ネットワーク解析 技術の高度化と有効性検証	→				→
	①-3 酵素選択・設計技術の高度 化と有効性検証	→				→
	①-4 タンパク質配列設計、MDシ ミュレーション技術の高度化と有効 性検証	→	→			→
	①-5 芳香族化合物輸送体の探索	→	→	→		→
実施項目② シキミ酸高生産株開発 プロセスの知識ベース 化	シキミ酸生産株構築トレース 知識ベースの有効性検証	→	→	→	→	→
実施項目③ 工学的手法を用いた生 産性向上技術の開発	③-1 目的化合物の分離回収技術 開発	→	→	→	→	→
	③-2 生産物の分離回収を伴う生 産システム開発	→	→	→	→	→

プロジェクト開始時に設定した実施項目に、2018年度から項目①-4と①-5を追加した。2019年度から実施項目②を追加した。さらに2020年度から実施項目③を追加した。

(4) 実施体制

体制図

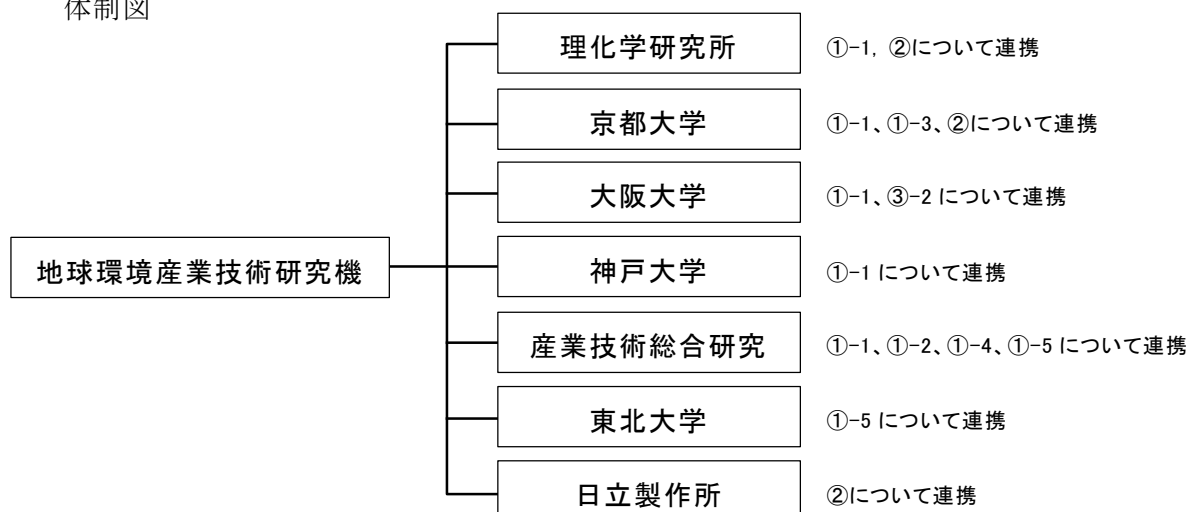


図 3.2.3.3-4-1 体制図

(5) 運営管理

- ・連携研究機関と適宜月 1-複数回程度の研究打合せを行った。
- ・データの速報値を適宜メールベースで共有した。
- ・年 3 回程度、PL、NEDO および課題関係者が参加する進捗報告会を開き、研究方針についての議論を行った。

(6) 実施の効果

本プロジェクトで開発された基盤技術を活用することで理想的な代謝経路を設計でき、ターゲット化合物を高収率で高濃度生産可能となる。その結果、エネルギーコスト、濃縮・精製等のダウンストリームコスト、生産時間等が低減され、安価な製品を提供可能となる。また、化石資源を原料として用いたエネルギー消費型の化学的製造法とは異なり、バイオ法は常温常圧条件下で環境負荷を低く抑えた生産が可能となる。さらに再生可能な非可食バイオマスを原料として用いることを目指すため、生産規模が拡大すれば CO₂ 排出量の大幅な削減を可能とする。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目	現状	最終目標	達成見通し
実施項目① コリネ菌を用いたカタコールの生産性向上による代謝解析技術の高度化と有効性検証	基盤技術開発チームと連携し、生産検討データの提供、フィードバック繰り返すことで基盤技術の高精度化に貢献した。基盤技術開発チームからの改変提案をもとにカタ	理論収率の 60%以上かつ生産濃度 10 g/L 達成	◎大きく上回って達成

	コール生産株を構築し、理論収率の XX%かつ生産濃度 XX g/L を達成した。		
実施項目② シキミ酸高生産株開発プロセスの知識ベース化	各組換え段階のシキミ酸生産株データと生産株構築理論を提供した。知識ベースから改変候補遺伝子の提案を受け生産株を構築したところシキミ酸生産株だけでなくカテコール生産株でも生産性が顕著に向上した。	高生産株構築システムの知識ベースの有効性検証	◎大きく上回って達成
実施項目③ 工学的手法を用いた生産性向上技術の開発	カテコールを反応液中から分離回収可能な素材の選抜と手法を開発した。分離回収を伴う条件下で生産濃度が大幅に向上し、XX g/L を達成した。	生産濃度 XX g/L	◎大きく上回って達成

(8) 研究開発の成果と意義

カテコールの生産性向上を通してスマートセル基盤技術の高度化と有効性検証を行った。実施項目①において各基盤技術開発チームからの改変提案を1つの生産株系列に重ねることで、収率と生産濃度が順次向上した株を育種した。さらに実施項目②からの改変提案を重ね、生産条件を詳細に検討することで高い収率と高い生産濃度の両立を達成した。さらに実施項目③で開発した工学的手法を併用することで、XX g/L という極めて高濃度の生産結果を得た(図 3.2.3.3-4-2)。これは過去の文献報告濃度を大幅に上回る値で世界最高の発酵生産濃度である。

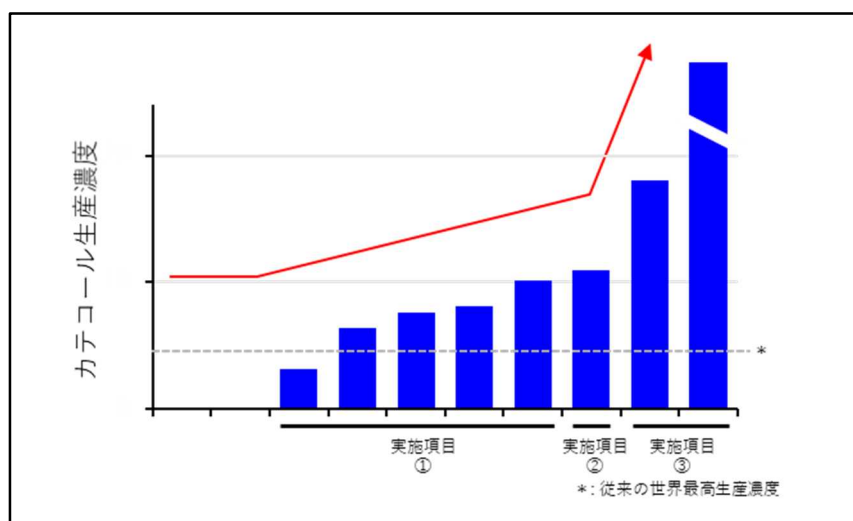


図 3.2.3.3-4-2 全実施項目を組み合わせた生産濃度の推移

実施項目① コリネ菌を用いたカテコールの生産性向上による代謝解析技術の高度化と有効性検証

(最終目標：理論収率の60%以上かつ生産濃度10 g/L達成)

コリネ菌はカテコール生産代謝経路を持たない。生産に必要な遺伝子 *ubiDX* を導入し、さらに前駆体のプロトカテク酸分解酵素遺伝子とカテコール分解酵素遺伝子の破壊を重ねることで初期生産株を育種した。この株はわずかなカテコールを生産能しか示さなかった。この生産株をベースとして、下記に示した実施項目①-1から5にて各基盤技術開発チームと連携することで順次生産性が向上する結果を得た。最終的に収率XX%かつ生産濃度XX g/Lの生産性を示したことで、実施項目①のプロジェクト最終目標を達成した。

実施項目①-1 代謝設計技術の高度化と有効性検証

(連携機関：理研、京都大学、大阪大学、神戸大学、産総研)

グルコースからカテコールに至る生産経路は複数組み立てることができる。基盤技術を利用したカテコール生産シミュレーションから最適な生産経路と、発現強化すべき遺伝子群、破壊すべき遺伝子群の提案を受けた。さらに生産性向上のための以下の改変提案を受けた。i. 2経路利用。デヒドロシキミ酸からプロトカテク酸を合成する経路に加えて、コリスミ酸から4-ヒドロキシ安息香酸を経てプロトカテク酸を合成する経路を追加する。これは、コリネ菌の生産株に新たにコリスミ酸リアーゼ (UbiC) を追加することで検討株を育種した。ii. *PobA* の補酵素要求性変換。4-ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素 *PobA* の補酵素要求性を NADPH 型から NADH 型に変換することを目指す。これにより、解糖系で生じた NADH を効率よく酸化することが可能となる。NADH 活性を有する他種由来 *PobA* を調査、スクリーニングしコリネ菌生産株に導入することで検討株を育種した。iii. グルコース取り込み系の変更。コリネ菌は通常ホスホトランスフェラーゼシステム (PTS) を利用してグルコースをリン酸化しつつ細胞内に取り込む。その際ホスホエノールピルビン酸 (PEP) をリン酸供与体として利用するためグルコースと等モル消費する。一方で PEP はシキミ酸経路初発酵素の基質であるため消費を抑える必要があった。この問題を解決するため、グルコーストランスポーター遺伝子とヘキソキナーゼ遺伝子を導入した検討株と、さらに PTS を構成する遺伝子を破壊した検討株を育種した (図 3.2.3.3-4-3)。

以上の検討株の生産性を確認したところ、改変が進むに従って順次生産性が向上していく結果を得た。

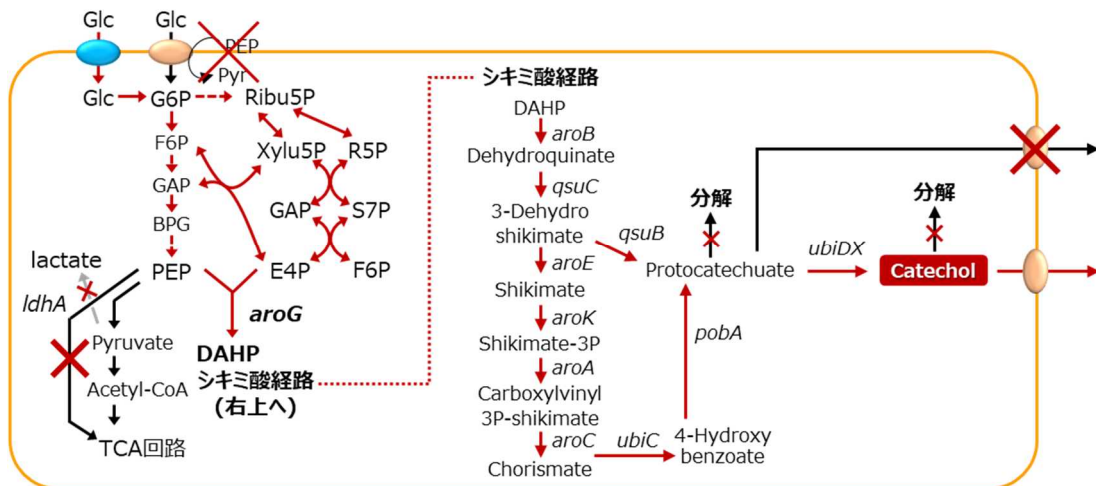


図 3.2.3.3-4-3 カテコールの生産代謝経路図

基盤技術の高精度化のため、複数のカテコール生産検討株、RITE が保有していたシキミ酸生産株の生産時のトランスクリプトームデータ、プロテオームデータ、メタボロームデータを取得し開発チームと共有した。これらはプロジェクトで整備されたデータベースにも登録した。

これらの検討の過程で、カテコール生産濃度が高まるに伴い生産に重要な特定の酵素の発現量が顕著に減少することが判明した。カテコールの毒性による酵素発現量低下として明確に捉えることができたため、対策としてプロモーターの変更、同機能酵素との入替えなどによる毒性回避技術の検討を進めた。また、実施項目③でも毒性回避手段の開発を行った。

実施項目①-2 発現制御ネットワーク解析技術の高度化と有効性検証

(連携機関：産総研)

細胞内で発現している mRNA 量を網羅的に測定し、特定条件下での遺伝子間の発現量変化の相関を解析する。これにより物質生産に有利になる転写制御因子等を抽出できる。RITE がこれまでに開発してきた複数のシキミ酸生産株での発現挙動を利用して芳香族化合物の代謝経路に働きかける転写制御因子の同定を目指した。基盤技術開発チームと協議し、組換え段階の異なるシキミ酸生産株を用い、求められた生産条件下でのサンプルから total RNA を抽出した(図 3.2.3.3-4-4)。これらをトランスクリプトーム解析に供し、得られたデータからネットワーク解析技術を用いて芳香族化合物の生成向上につながる改変遺伝子候補の提案を受けた。検討株を構築し検討した結果カテコール生産性に大きな影響はなかった。カテコールは毒性を示すため効果が判断しにくいことが考えられる。提案の根拠となったシキミ酸や、他の芳香族化合物での生産において効果を示す可能性がある。

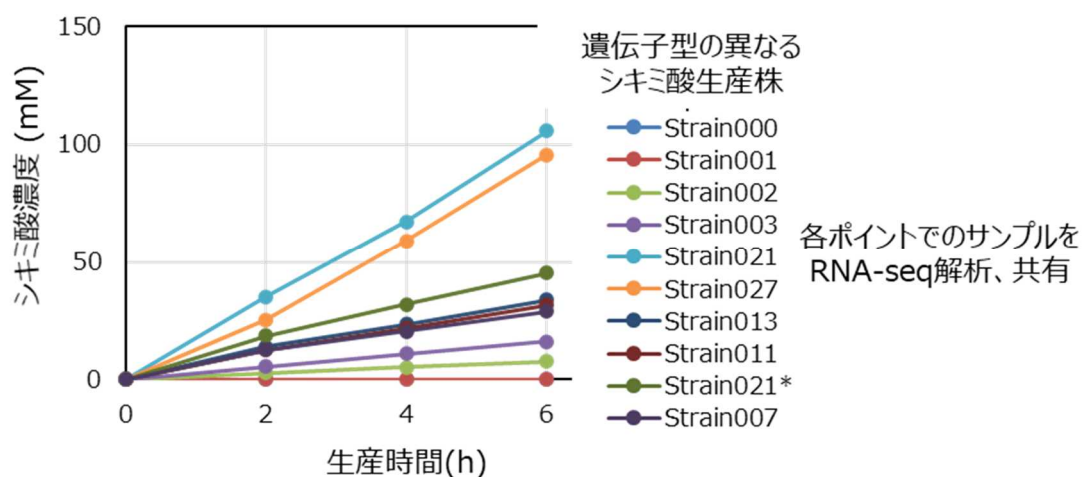


図 3.2.3.3-4-4 トランスクリプトーム解析に供したシキミ生産株生産データ

実施項目①-3 酵素選択・設計技術の高度化と有効性検証

(連携機関：京都大学)

コリネ菌が有する PobA は補酵素として NADPH を要求し NADH では活性を示さない。しかし前述のように基盤技術開発チームからの提案では NADH の利用が推奨された(図 3.2.3.3-4-5)。そこで酵素選択技術を用いた計算から、NADH 利用型であると期待できる酵素の提案を受けた。検討株

を育種し、細胞破碎液での活性測定を行ったところ候補の内、4つの酵素がNADHを利用可能であることがわかった。これら他種由来 *pobA* 遺伝子をカテコール生産株に導入した検討株を育種し、生産検討を実施したところ収率が大幅に向上した。

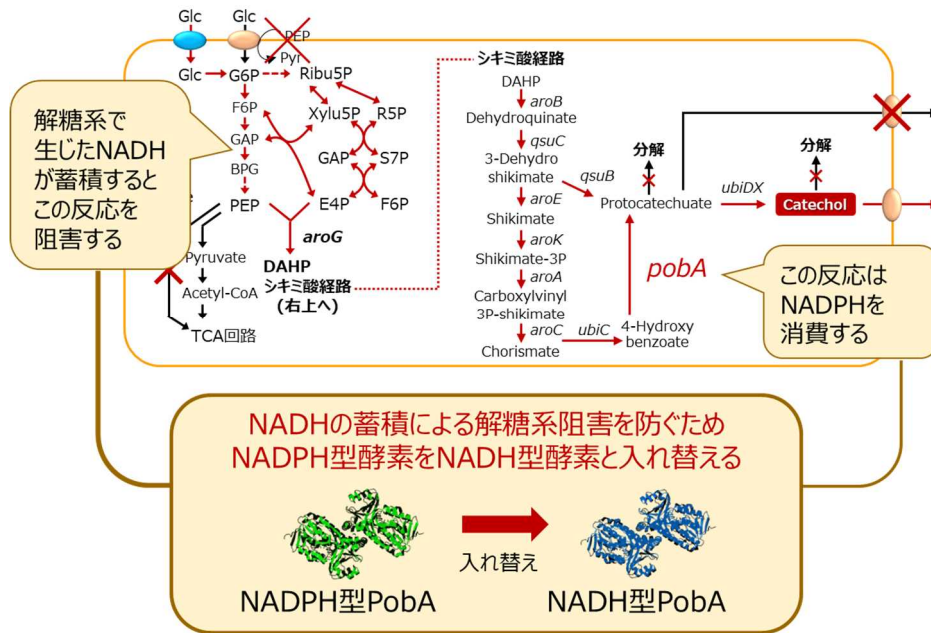


図 3. 2. 3. 3-4-5 *PobA* の補酵素要求性変換

実施項目①-4 タンパク質配列設計、MD シミュレーション技術の高度化と有効性検証
(連携機関：産総研)

基盤技術開発チームにおいて、コリネ菌ゲノム上にコードされる全遺伝子について N 末数残基分の塩基配列の特徴量を抽出し、タンパク質発現量予測計算を実施した。発現量が全遺伝子の予測順位下位 20%に含まれる遺伝子のうち、カテコール生合成経路上に位置する遺伝子 *aroC* と *aroK* に着目した。これらの発現量向上が期待される配列改変を計算により算出、提案を受けた。検討株を育種し、まず SDS-PAGE によりタンパク質発現量への影響を調べたところ明らかな発現量増加を確認した(図 3. 2. 3. 3-4-6)。この改変配列をカテコール生産株に導入したところ、生産性向上を確認した。

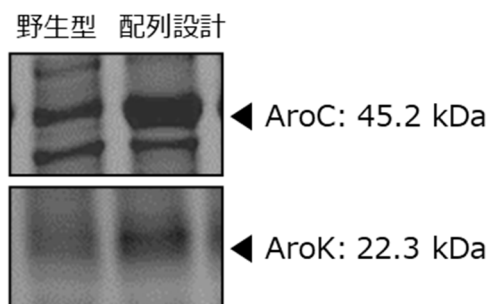


図 3. 2. 3. 3-4-6 SDS-PAGE 解析による発現量比較

PobA の補酵素要求性変換について、MD シミュレーションを利用したアプローチからアミノ酸変異点の候補 2 点の提案を受けた。それぞれ飽和変異検討株(計 40 株)を育種し、細胞破碎液を用いて補酵素要求性を評価した。結果、NADH を優先的に利用する変異型 PobA を複数得ることができた。この変異の 1 つを生産株に組み込み生産検討を行ったところ収率を維持したまま生産濃度向上結果を得た。

実施項目①-5 芳香族化合物輸送体の探索

(連携機関：東北大学、産総研)

カテコールの前駆体であるプロトカテク酸の細胞外流出を防ぐことでカテコール生産速度が向上することを期待し、プロトカテク酸輸送体の探索を行った(図 3.2.3.3-4-7)。基盤技術開発チームから提案を受けた候補遺伝子についてそれぞれ破壊株を育種し検討したところ、親株と同様に細胞外にプロトカテク酸が蓄積することを確認した。この結果から、プロトカテク酸は複数の輸送体を經由して排出されていることが予想でき、特定は困難であるとの結論に至った。続けてカテコール輸送体の探索を進めた。配列をもとにした情報解析、輸送体ライブラリを用いた毒性試験、生産試験を基盤技術開発チームが実施し、複数の輸送体候補提案を受けた。それぞれを発現させた検討株を構築し生産試験を実施したが顕著なカテコール生産性向上は確認できなかった。生産検討の際、輸送体の過剰発現が原因と考えられる生育の阻害が観察された。配列設計等の技術による候補輸送体の発現制御が必要と考えられる。

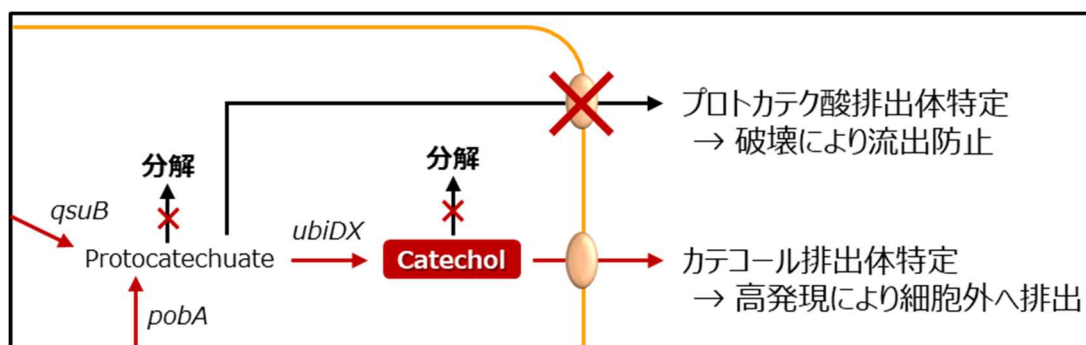


図 3.2.3.3-4-7 輸送体探索による改変の狙い

実施項目② シキミ酸高生産株開発プロセスの知識ベース化

(最終目標：高生産株構築システムの知識ベースの有効性検証)

(連携機関：京都大学、理化学研究所、日立製作所)

物質生産株を構築した履歴を整理し、開発フロー等の情報を蓄積した知識ベースの開発を目指す。過去に RITE が開発したシキミ酸高生産株に至る各組換えとその意図や根拠情報をまとめ、知識ベース開発チームに提供した。これによりシキミ酸高生産株構築過程のトレースに成功した。

さらに、シキミ酸生産性向上に寄与すると期待できる候補の提案を受けた。これは RITE のシキミ酸生産株組換え履歴をもとに知識ベース技術を用いて文献データベースから抽出された遺伝子である。この提案にもとづき組換えを行ったところ複数の候補でシキミ酸生産性が顕著に向上した。これにより本年度目標である、知識ベースの有効性検証を達成した。さらに、この技術を

カテコール生産株に応用し複数の候補を検討した結果、生産性が向上した結果を得た(図 3.2.3.3-4-8)。

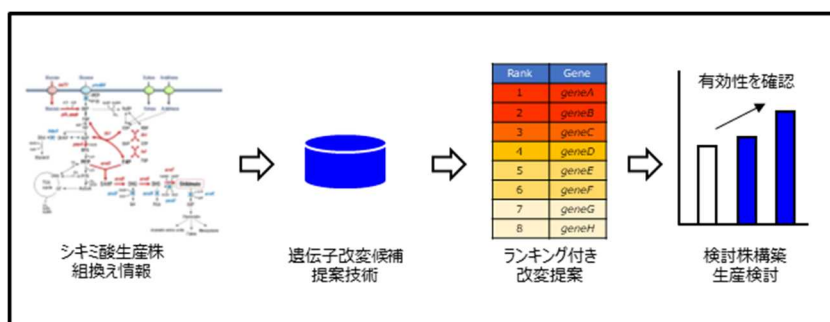


図 3.2.3.3-4-8 知識ベース技術の有効性検証

実施項目③ 工学的手法を用いた生産性向上技術の開発

(最終目標: 生産濃度 XX g/L)

生産ターゲットとしているカテコールは細胞毒性が強く、反応液中の濃度が高まると生産が停止してしまう恐れがあった。そこで、生産されたカテコールを反応液から分離することができれば継続した生産により濃度が向上することが期待できる(図 3.2.3.3-4-9)。2019 年度技術推進委員会にて工学的手法によりカテコール生産時の反応方法を改良する旨の示唆があった。そのため新たな開発項目を立て、生産濃度目標を XX g/L と設定して検討を実施した。反応液中からカテコールを除去する素材と実験系を検討した結果、XX g/L の生産濃度を達成したため、プロジェクトの最終目標を達成した。

実施項目③-1 目的化合物の分離回収技術開発

反応液に含まれる前駆体を残してカテコールを選択的に取り除く分離素材の検討が必要である。吸収溶媒素材 9 種、吸着樹脂素材 10 種、カテコールとプロトカテク酸の両者を含んだ溶液を準備し、溶液からのカテコール抽出率とプロトカテク酸残存率を指標に最も有望な素材の探索を実施した。その結果、吸収溶媒として XX、吸着樹脂として XX がそれぞれ適切な素材であると判断した。

実施項目③-2 生産物の分離回収を伴う生産システム開発

吸収溶媒として XX を使い、使用量と反応条件を検討することにより最高 XX g/L のカテコール生産を達成した。

吸着樹脂として XX を使い、さらに菌体分離膜を利用して樹脂と生産株が接触しない反応系を組み立てることで反応液中のカテコール濃度を常に低く維持することができ、菌の生産活性を落とさずに長時間の継続生産が可能となった。生産濃度は当初の想定をはるかに上回り、XX g/L を超えた。これにより本年度の目標値を達成した。

さらに、反応液中のカテコール濃度を低く抑えた状態でのサンプルをプロテオーム解析に供したところ、期待通り酵素発現量が十分に維持されていた。カテコール毒性を回避することで高濃度生産が可能であることを実証できた(図 3.2.3.3-4-10)。

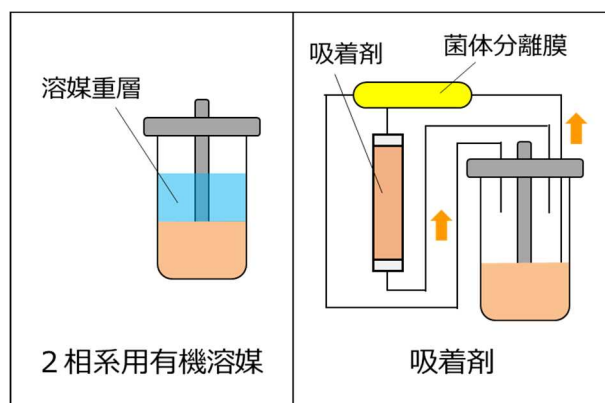


図 3.2.3.3-4-9 検討した 2 種の工学的カテコール分離手段

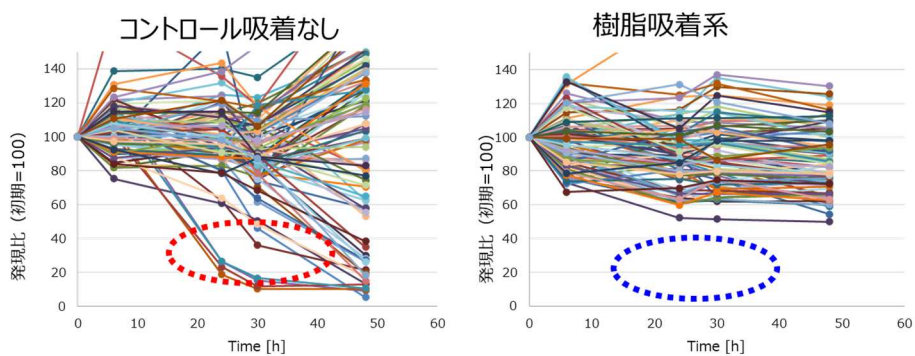


図 3.2.3.3-4-10 樹脂吸着の使用、不使用でのターゲットプロテオーム解析結果
樹脂吸着を行うことで生産関連タンパク質の発現量が維持されていることがわかった。

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	2	0	1	0	0
2017	0	0	10	0	2	1	0
2018	0	3	13	0	3	3	0
2019	0	5	23	2	4	4	0
2020	0	6	27	4	6	7	0

累積件数

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	1	0	1
2019	1	0	1
2020	1	3	1

累積件数

課題名：C(3)-5 紅麴菌を用いた色素生産制御による有効性検証

担当機関：江崎グリコ、バイオジェット、産業技術総合研究所

(1) 背景と目的

紅麴菌 *Monascus purpureus* の生産する紅麴色素は、日本国内の食用色素の年間需要の約 1/6 を占める代表的な天然色素である。本色素は、様々な色の調合に必要な基本色の一つであること、中性域で自然な赤色を呈することなどから、恒常的な需要がある。近年、グローバル食品企業が、合成色素を天然系色素に切り替える方針転換を示しており、世界的に天然系色素へのニーズが高まっている。また、紅麴色素は食品色素以外の用途として、医薬品・化粧品・健康食品・サプリメント・工業用化学品などへの用途拡大も期待されるが、それには生産性の飛躍的拡大をもたらす新規技術の開発が必要である。

紅麴色素生産菌は、共通の azaphilone 骨格を持つ赤色色素、橙色色素、黄色色素を同時に生産する。これらは紅麴菌の二次代謝物であり Acetyl-CoA 及び Malonyl-CoA 代謝経路を利用して作られる。代謝経路の途中までは共通であることは分かっているが、個々の成分色素合成経路や関連する酵素の一部は明らかにされておらず、商業上利用価値の高い橙色・赤色色素の成分比率を高めることも実用上の課題の一つである。また、紅麴色素生産菌は色素生産と同時に、少量のシトリニン(カビ毒の一種)を生産する。紅麴色素中のシトリニン含量は 0.2 ppm 以下と定められており(第 9 版食品添加物工程書)、精製等によるシトリニン除去を必要としないシトリニン含量の少ない紅麴菌・色素生産プロセス技術の開発は、色素生産性向上とともに重要かつ必要不可欠な課題の一つとなっている。

このように、紅麴菌は、食経験もある微生物の一種ですでに商業利用されてもいるが、紅麴色素生産技術は四半世紀以上も前に確立されたものである。従来技術では目標を達成することそのものが困難であり、時間・労力もかかる。一方で、これまで紅麴色素の生産性向上に関する研究は少なく、紅麴色素の生産性は大幅な改良の余地があると考えられる。そこで、本研究開発課題では、紅麴色素の実生産菌株を用いて、「紅麴色素の生産性向上」と「シトリニンの生産性低下」という 2 つの指標を同時に達成しうる、「生合成モデルと遺伝子発現制御ネットワークモデルの連結技術により構築する統合数理モデル」の有効性の検証を行う。また、従来とは異なる紅麴色素成分比に変えるための代謝経路予測技術の有効性検証を行う。

(2) 位置づけ、目標値

中間目標	紅麴色素生産性を対基準株比で 2 倍以上、シトリニン含量を対基準株比で 1/2 以下を達成する。
最終目標	① 紅麴色素生産性を対基準株比で 3 倍以上、シトリニン含量を対基準株比で 1/3 以下を達成する。 ② 従来とは異なる紅麴色素成分比に変えた遺伝子組換え紅麴菌株を 1 株以上作成する

(3) 全体計画

2016年度～2018年度（2019～2020年分は別表参照）

研究開発項目	小項目（実施内容）	16年	17年	18年	19年	20年
①紅麴色素生産性向上基盤技術開発	i. 基準株の選定：グリコ社が保有する紅麴生産菌株の中から、安定して高い生産を示す基準株を選定する。	→				
	ii. 基準株ゲノム・遺伝子情報の取得：紅麴色素生産基準株の高精度ゲノム・遺伝子情報を整備する。	→	→			
	iii. 生産性バリエーション株の取得：ネットワークモデル構築に適したデータを提供するために、生産性バリエーションを示す菌株を6株以上取得する。	→	→	→		
	iv. 生産性が異なる培養条件の取得：ネットワークモデル構築に適したデータを提供するために、生産性バリエーションを示す培養条件等を3以上取得する。		→	→		
②統合オミクスモデルの有効性検証	i. 紅麴色素生合成モデルの構築：取得した紅麴菌ゲノム情報より、Acetyl-CoAから紅麴色素・シトリニ生合成に関連する遺伝子検索を行い、ターゲット遺伝子候補の抽出及び生合成モデルを構築する。	→	→	→		
	ii. 有用遺伝子情報取得：選別したバリエーション株・培養条件において、RNA-seq法によりトランスクリプトームデータをそれぞれ9件以上取得し、数理モデル構築に提供する。	→	→	→		
	iii. 紅麴菌遺伝子組換え技術の開発：紅麴菌の形質転換技術を確立する。		→	→		
	iv. 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築：取得したトランスクリプトームデータから紅麴色素生合成に関する遺伝子発現制御ネットワークモデルを構築する。	→	→	→		
	v. 統合オミクスモデルの構築と遺伝子改変方法の提案：②-i、②-ivを統合した新しい統合数理モデルを構築し、紅麴色素生産性向上に資する転写因子、酵素遺伝子等の導入・破壊方法を提案する。			→		
	vi. 数理モデル予測に基づく遺伝子組換え紅麴菌の作成：ii.を用いて統合オミクスモデルの結果に基づいて遺伝子組換え菌を作成する。			→		
	vii. 統合オミクスモデル予測精度の検証：iii.で開発した菌株のラボレベル、実製造スケールにおける生			→		

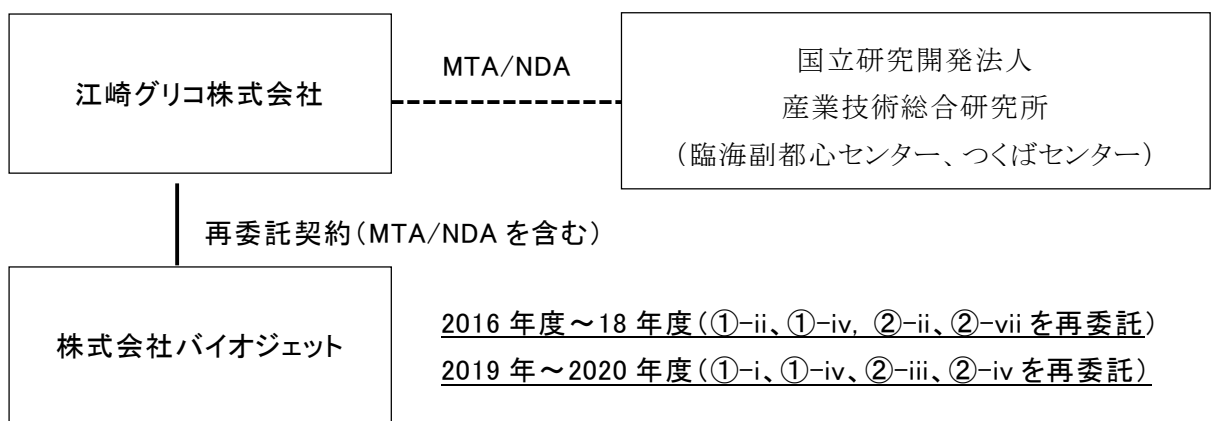
	産性を検証し、情報解析チームへフィードバックする。					
	viii. パイロット試験装置を用いた実用化検討：開発した新規紅麴生産菌の性能評価を行い、色素生産性3倍、シトリニン1/3を達成できるかどうか3tパイロット試験装置を用いて実用化の検証を行う（2019年度以後実施予定）。					

2019年～2020年

研究開発項目	研究開発小項目		16年	17年	18年	19年	20年
① 拡張ネットワークモデルによる紅麴色素生産性向上・カビ毒低減株作製技術の検証	i. 網羅的遺伝子発現データの取得	組換え体の RNA-seq データ及び代謝産物データを数理モデルチームへ提供				→	
	ii. 拡張ネットワークモデルの構築（(2)-3再掲）	拡張ネットワークモデルを構築し、候補遺伝子を選択、改変指針を提案				→	
	iii. 検証用遺伝子組換え紅麴菌の作成	候補遺伝子を実装した遺伝子組換え紅麴菌を作成				→	
	iv. 数理モデルの有効性検証	ラボスケール・ベンチスケールにおいて色素・シトリニン生産性評価し、数理モデルチームへ提供				→	
② 代謝モデルによる紅麴色素変換技術の検証	i. 代謝モデルによる色素変換遺伝子の予測（(2)-1、(2)-3再掲）	BioProVを用いた代謝予測技術により、現在生産している紅麴色素分子を1反応および複数経路で修飾し、異なる色味の色素分子へ変換する酵素遺伝子を選択、提案				→	
	ii. 検証用遺伝子組換え紅麴菌の作成	当該遺伝子を発現・欠損する遺伝子組換え紅麴菌を作成				→	

iii. 網羅的遺伝子発現データの取得	組換え体の RNA-seq データ及び代謝産物データを数理モデルチームへ提供					→
iv. 数理モデルの有効性検証	ラボスケールにおいて紅麴色素成分比・色価を検証し、その結果を数理モデルチームへ提供					→

(4) 実施体制



(5) 運営管理

半年に一度の全体会議、一年に一度の外部有識者による技術推進委員会に参加し、進捗状況を発表するとともに、テーマの推進に有益な助言等を他の参画メンバー及び推進委員より受けた。チームの運営に関しては、江崎グリコ社が主体となって、約 3 か月に 1 度 (年 4 回程度)、各参画機関の当該期間における実施サブテーマについて、進捗状況の報告・情報共有を行うため、数理モデルチームメンバーとともにチームミーティングを開催した。本研究テーマでは、江崎グリコ社の保有する実用生産菌株の一つである GB-01 株を用いて複数機関で一体として実施するため、基準株、変異体、遺伝子組換え体等の研究成果物を参画機関内で迅速に共有し、相互に利用できるようにするために、MTA/NDA 契約を締結した。また、江崎グリコ社の研究所 (実験場所) 及び実際に実験を行う手順等を実地体験する機会を設ける等、本プロジェクトで得られた成果や技術 (ノウハウを含む) を、本テーマに参画する各機関が共有できるような運営を行った。知財戦略については、本研究開発プロジェクトで使用する菌株は江崎グリコ社の GB-01 (基準株) であるため、その派生物についても江崎グリコ社が権利を保有する。江崎グリコ社の実用生産菌派生物をベースに研究開発を行っている観点から、基本的にノウハウとして秘匿するが、変異体に関する情報及び新規情報解析技術によってもたらされる色素生産性向上やカビ毒低減に資する遺伝子改変方法等については、産総研・江崎グリコ社・バイオジェット社と協議の上、しかるべき知的財産権の確保に努める。2020 年度は、各参画機関ともに新型コロナウイルス感染症拡大防止の取り組みのため、従来のように参画機関が参集して会議を行うことが困難であったため、メール・Web 会

議などのオンラインツールを利用して進捗状況、課題等について参画機関間のコミュニケーションを図った。

(6) 実施の効果

本項目は非公開。

(7) 最終目標の達成度

2016年度～2018年度（2019年～2020年分は別表参照）

研究開発項目		達成度	成果
①紅麹色素生産性向上基盤技術開発	i. 基準株の選定(2016)	○	目標とする安定した生産を示し、かつ高い生産性を示す株を基準株として選定。さらに、基準株を用いることで、評価のための標準培養法・標準測定法を整備した。
	ii. 基準株ゲノム・遺伝子情報の取得(2016-17)	○	以後の研究開発に必要な紅麹色素生産基準株ドラフトゲノムを構築した。現在、ver. 3.0。
	iii. 生産性バリエーション株の取得(2016-18)	○	異なる色素/カビ毒生産を示す菌株を up3 株、down3 株取得済み。
	iv. 生産性が異なる培養条件の取得(2016-18)	○	色素生産性が大きく異なる培養条件 3 条件について再現性と 5L ミニジャーにおけるスケールアップ時の安定性を確認済み。
②統合オミクスモデルの有効性検証	i. 紅麹色素生合成モデルの構築(2016-18)	○	類縁種との比較解析により、紅麹菌における色素合成遺伝子クラスターを同定した。また、同定した遺伝子クラスターから、生合成経路モデルを推定した。
	ii. 有用遺伝子情報取得(2016-18)	◎	基準株・変異株と培養条件を組み合わせることで、異なる色素生産条件において予定を大幅に上回る 84 件の RNA-seq. データを取得した。
	iii. 紅麹菌遺伝子組換え技術の開発(2016-18)	△	紅麹菌の遺伝子組換えプロトコル、外来遺伝子発現ベクターを確立した。遺伝子破壊は現時点では未達成のため、ドミナントネガティブ法によりノックダウン法を確立する予定。
	iv. 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築(2016-18)	◎	②-ii でこれまで取得した RNA-seq データを元に、色素生産、カビ毒生産を制御する pigR1/2、cit1 を制御するネットワーク構造の推定を行い、4 候補遺伝子を見出した。
	中間目標：色素生産性 2 倍、カビ毒 1/2	△	本プロジェクトで得られている株の細胞あたりの色素生産性は 1.6 倍。(8)に記載の通り、現在、②-vii において数理モデルの予測精度検証を行っているところ。

研究開発項目	達成度	成果
③ 拡張ネットワークモデルによる紅麴色素生産性向上・カビ毒低減株作製技術の検証	i. 網羅的遺伝子発現データの取得 (2019-20)	○ RNA-seq36 データを数理モデルチームへ、AIST-SpikeIn 検証のための RNA-seq16 データを SPIKE-in チームへ提供。本プロジェクトで取得したゲノム及び RNA-seq. 198 データを DB チームへ提供。
	ii. 拡張ネットワークモデルの構築 ((2)-3 再掲) (2019-20)	○ 発現データと色素生産性の変化率等を結合した新たな数理モデルを作成し、色素生産性向上のための遺伝子改変法を複数提案した。
	iii. 検証用遺伝子組換え紅麴菌の作成 (②-iii 継続) (2019-20)	○ 色素生産性向上が見込まれる候補遺伝子を発現する、あるいはドミナントネガティブ法により候補遺伝子発現を抑制する組換え紅麴菌を作成した (35 系統、対照株を含む)。
	iv. 数理モデルの有効性検証 (2019-20)	○ 色素生産性試験 (500mL フラスコ: 249、5L ジャー: 40 ラン/799 データ) により検証を行った。また、検証株の中で、有望な 2 株を選択し、ベンチスケール (90L) での実証試験 (3 ラン) を行い、色素約 1.7 倍・カビ毒 1/5。カビ毒・シトリニンの高精度検出法を開発。
	最終目標: 紅麴色素生産性を対基準株比で 3 倍以上、シトリニン含量を対基準株比で 1/3 以下を達成する。	○ ラボスケール (5L ジャー) における色素生産性について、約 3 倍の生産性向上 (A411)、カビ毒については、約 1/6 まで低減 (A427 株) を確認し、発現制御ネットワークモデルの有効性を確認した。
④代謝モデルによる紅麴色素変換技術の検証	i. 代謝モデルによる色素変換遺伝子の予測 ((2)-1、(2)-3 再掲) (2019-20)	○ BioProV により、新規代謝経路 (単一) を構成する反応 2 種を提案、候補遺伝子として 3 種が見出された。新規の複数遺伝子による代謝経路は見出せなかったが、1 段目: 新規反応と 2 段目: 非酵素反応という新規経路が 2 種を提案、候補遺伝子としては 5 種が見出された。
	ii. 検証用遺伝子組換え紅麴菌の作成 (2019-20)	○ 上記の提案に基づき、11 種の遺伝子組換え紅麴菌を作成。

	iii. 網羅的遺伝子 発現データの取得 (2019-20)	○	候補遺伝子を導入した2株について、RNA-seq. データを取得。
	iv. 数理モデルの有 効性検証 (2019- 20)	○	作成した遺伝子組換え紅麹菌 11 種について、ラ ボスケール (5 L ジャー) 色素生産性試験を 行った。
	従来とは異なる色味 の紅麹色素を生産す る遺伝子組換え紅麹 菌株を 1 株以上作成 する	○	作成した遺伝子組換え紅麹菌 (生育阻害 3 株を 除く) は、標準培養条件において、いずれも基 準株とは異なる成分比率を示した。目的とする 赤色色素成分は最大 9% 程度向上した。

(8) 研究開発の成果と意義

2016 年度～18 年度

① 紅麹色素生産性向上基盤技術開発

i. 基準株の選定 (2016、江崎グリコ)

グリコ社内育種で分離された紅麹色素実生産兄弟株の中から、図 3.2.3.3-5-1 に示す菌株のうち、最も色素生産性の高いグリコ B 株を選定した。本菌株を N=5 にて同条件で培養し、図 3.2.3.3-5-2 に示す通り培養後期で色素生産性にばらつきのない安定した菌株であることを確認し、これを基準株として選定した。

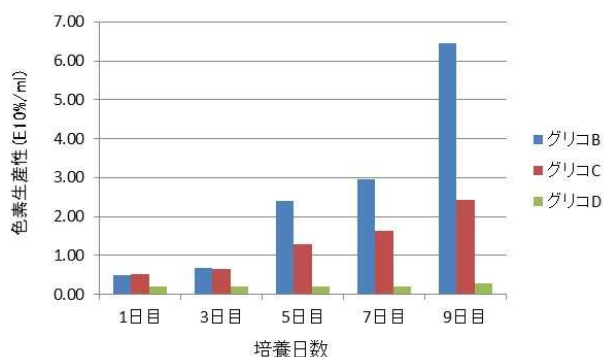


図 3.2.3.3-5-1 実生産兄弟株の色素生産性

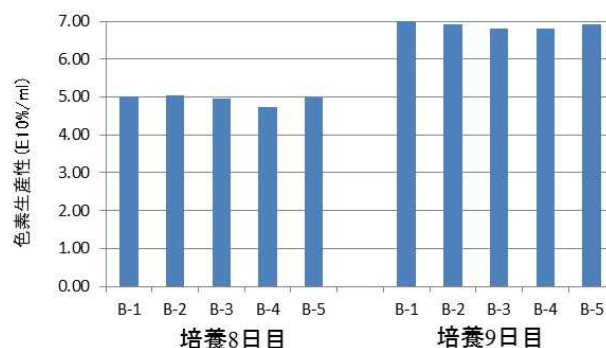


図 3.2.3.3-5-2 グリコ B 株の色素生産安定性

ii. 基準株ゲノム・遺伝子情報の取得 (2016-17、産総研、バイオジェット)

本プロジェクトで使用する基準株 GB-01 よりゲノム DNA を抽出し、複数の次世代シーケンスプラットフォーム及び RNA-seq の結果を用いて、図 3.2.3.3-5-3 紅麹菌ゲノムアセンブリフロー (省略) に従ってドラフトゲノムを構築し、*ab initio* 遺伝子予測ソフトウェアの予測結果と併せて 8, 402 個の遺伝子 (コーディングシーケンス) を取得した。得られた遺伝子・アミノ酸配列の機能解析を行い、麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 ゲノムと比較したところ、多くの遺伝子は共通するが糖代謝関係、細胞壁、二次代謝関係の遺伝子が少ないことが判明した。

iii. 生産性バリエーション株の取得 (2016-18、江崎グリコ)

i で選定した基準菌株 GB-01 に対し、UV 照射により自然変異を生じさせ、さまざまな色素生産性を示すバリエーション株の取得を試みた。得られた自然変異菌株を、100 mL フラスコスケールにて液体培養し、色素の生産性を調べた。その結果、基準菌株と比較して、最大で色素生産性が 1.6 倍に上昇した菌株 (Up 株)、1/8 倍に色素生産性が低下した菌株 (Down 株)、それらの間に位置するさまざまなバリエーション株が得られた (図 3.2.3.3-5-4、結果の一部を掲載)。これらバリエーション株の中から、500 mL フラスコ培養、あるいは 5L ミニジャーで安定して Up あるいは Down の形質を維持するものを探索することで、Up 株 3 株、Down 株 3 株、計 6 菌株のバリエーション株を得たことを確認した (図 3.2.3.3-5-5)。

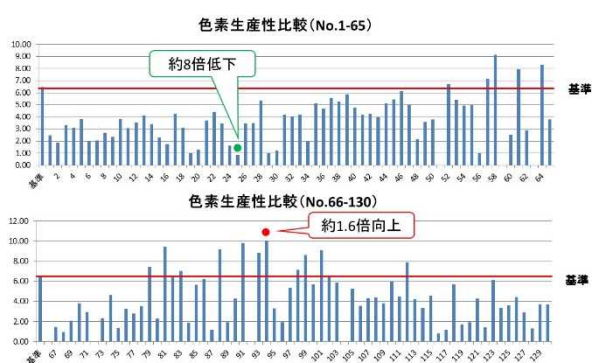


図 3.2.3.3-5-4 色素生産性バリエーション株の取得

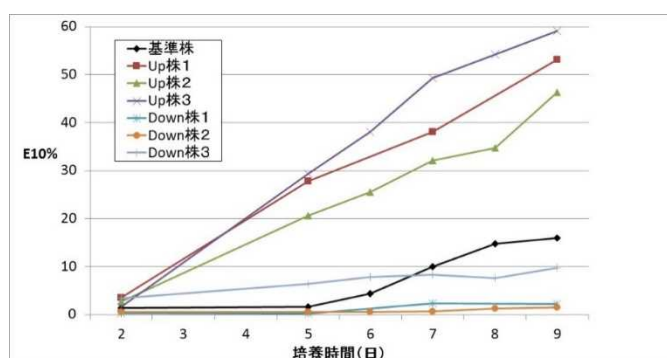


図 3.2.3.3-5-5 ミニジャーによる Up 株、Down 株の色素生産性

iv. 生産性が異なる培養条件の取得 (2017-18 江崎グリコ、バイオジェット、産総研)

紅麴色素生産性に寄与する遺伝子群を推定するために、同一株でも色素生産性が大きく異なる培養条件を見出し、それぞれの条件下での RNA-Seq データを取得する必要がある。そのため、まずは基準株について、培地成分、通気、攪拌、温度、添加剤などさまざまな培養条件を変化させて色素生産性を比較した。その結果、色素生産性の大きく異なる条件として、

- (1) 培地の種類
- (2) 培地中の炭素源/窒素源の比率 (C/N 比) 図 3.2.3.3-5-6
- (3) 炭素源の添加タイミング 図 3.2.3.3-5-7
- (4) 菌糸分散剤の種類 図 3.2.3.3-5-8

を変化させることで、大きく色素生産性あるいはシトリン生産性が異なることを見出した。

②統合オミクスモデルの有効性検証

i. 紅麴色素合成モデルの構築 (2017-20、産総研)

①-ii で予測された全遺伝子から、色素合成に関与する二次代謝クラスターの予測を行った。既知の遺伝子クラスターとの相同性検索を実施し、20 遺伝子からなる色素合成遺伝子クラスターおよび、13 遺伝子からなるシトリン合成遺伝子クラスターを同定した。同定したクラ

スターを構成する遺伝子群の機能アノテーションを実施し、色素生合成モデルを構築した。予測された色素生合成遺伝子クラスターと、近縁種である *Monascus pilosus* の公開されているゲノム情報との比較を行った結果、クラスター内の遺伝子の多くに高い相同性がみられた（図 3.2.3.3-5-9、一部のみ抜粋）。

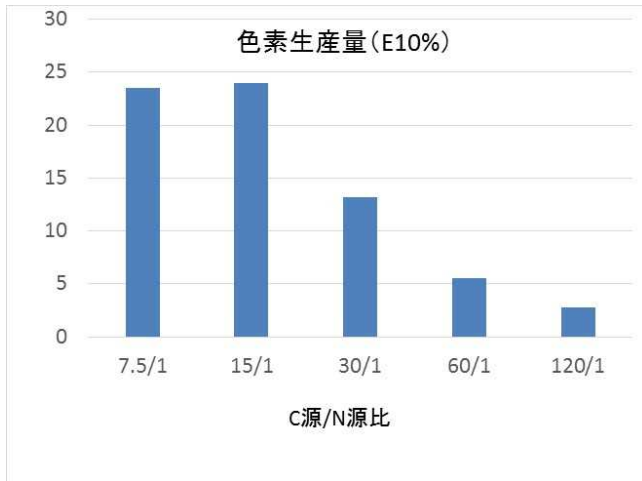


図 3.2.3.3-5-6 培地中の C 源/N 源比率変化時の色素生産性の比較

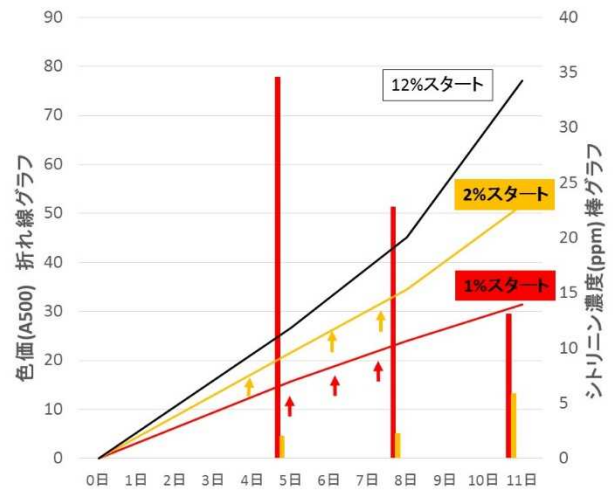


図 3.2.3.3-5-7 C 源添加タイミングとシトリニン生産量の比較。↑はグルコースが枯渇したためスタート時と同じ濃度のグルコースを添加したことを示す。



図 3.2.3.3-5-8 分散剤の種類による色素生産性の比較。

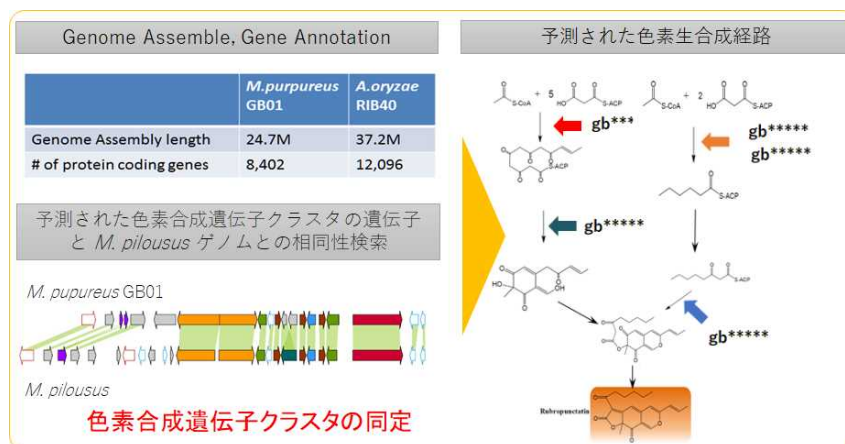


図 3.2.3.3-5-9 紅麴菌ゲノム情報からの色素合成経路

ii. 有用遺伝子情報 産総研、バイオ

の同定

報取得(2017-20、
ジェット)

各種培養条件下で培養を行い、培養日数ごとにサンプリングを行い total RNA を抽出した。紅麴菌菌体から RNA-seq. グレードの高品質の total RNA 調製は、他のモデル微生物等に比べると著しく困難であると予想されたため、(1)-1 チームと連携しつつ、紅麴菌に特化したプロトコルの開発を行ったところ、通常の培養法であれば RIN 値=6 程度の品質の total RNA を安定して取得することが可能になった。当初の目標では、採取する RNA-seq. データポイント数を 9/年としていたが、中間評価時点で目標を大幅に超える 84 点の RNA-seq. データを取得した (表 3.2.3.3-5-(1)省略)。また、異なる次世代シーケンスプラットフォーム (HiSeq、MiSeq、IonProton) を駆使して RNA-seq. データを取得したが、プラットフォーム間でのバイアスは認められなかった。

iii. 紅麴菌遺伝子組換え技術の開発 (2018-19、産総研、江崎グリコ)

紅麴菌の遺伝子組換え技術は文献上で数例あるのみで、これまでほとんど検討されてこなかった。また、今回使用する菌株は江崎グリコ社の実用生産菌株であり、実績のある株とは性状が大きく異なることも分かっていた (データ非掲載)。統合数理モデルによって提案される遺伝子改変法は、大きく分けて 2 つに分類できる。一つは、遺伝子過剰発現であり、もう一つは遺伝子破壊である。シトリニンの低減には、②-i で明らかになった、GB-01 株のシトリニクラスター遺伝子のうち、重要な役割を果たす遺伝子を破壊することによってシトリニン非生産株を作ることには容易に想像できる。しかし、少なくとも一部の生合成経路を色素合成とシトリニン合成で共有することから、シトリニン合成遺伝子を破壊することによって色素生産性が影響を受ける可能性も考えられる。したがって、シトリニン合成遺伝子の破壊の場合には、色素生産性を低減させない遺伝子を統合数理モデルによって導き出すことが重要になる。

遺伝子組換え紅麴菌の作成に必要な要素技術として、紅麴菌内で任意の外来遺伝子 (遺伝子破壊のための抗生物質耐性遺伝子も含む) を必要なタイミングで必要な量を発現させるためのプロモーターが必要である。そこで、紅麴菌で遺伝子発現が可能な強力なプロモーター及び安定して培養後期でも発現可能な 2 種類のプロモーターの同定を試みた。約 8400 の Gene model 情報と紅麴菌全遺伝子と標準状態における RNA-seq. による遺伝子発現データから、強い遺伝子発現が可能なものとして 13 種 (表 3.2.3.3-5-2 省略) を、また、培養日数に応じて変化の少ない安定した発現が期待でき、かつ様々な強さのプロモーターとして 9 種を選抜した (表 3.2.3.3-5-3 省略)。

iv. 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築 (2017-20、産総研)

これまでに測定された異なる色素生産量を示す Up/Down 株・条件におけるトランスクリプトームデータから、紅麴色素生合成に重要な役割を果たすと予測される転写因子及び酵素遺伝子の絞り込みを行い、(2)-3 で開発した技術を適用し、遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築を行った。

対象とする生合成クラスターを制御するために必要な転写因子をターゲット遺伝子とし、遺伝子制御ネットワークモデル構築するための遺伝子選択を実施した。具体的には、糸状菌の転写因子に共通する PFam ID、 Superfamily ID を調査し、紅麴ゲノム中の全転写因子候補 423 個のセットを作成した。次に、72 条件の RNA-Seq による発現解析結果を元に、色素生合成クラスター内転写制御因子および、シトリン合成クラスター内転写制御因子との発現相関関係を計算した。そのうえで、両クラスター内転写制御因子のいずれかと高い相関を持つ遺伝子を幾つかの条件で、ネットワークを構成する転写制御因子からのサブセットおよび、全遺伝子からのサブセットを合計 9 セット作成した (図 3.2.3.3-5-(10))

紅麴菌色素合成量に関係する遺伝子選択フロー。省略)。作成したセットの中から特に Criterial を用いて、第一弾のネットワークモデルを構築し、色素生産性を向上させる 2 つの過剰発現候補遺伝子、2 つの破壊候補遺伝子を提案した (図 3.2.3.3-5-11)。

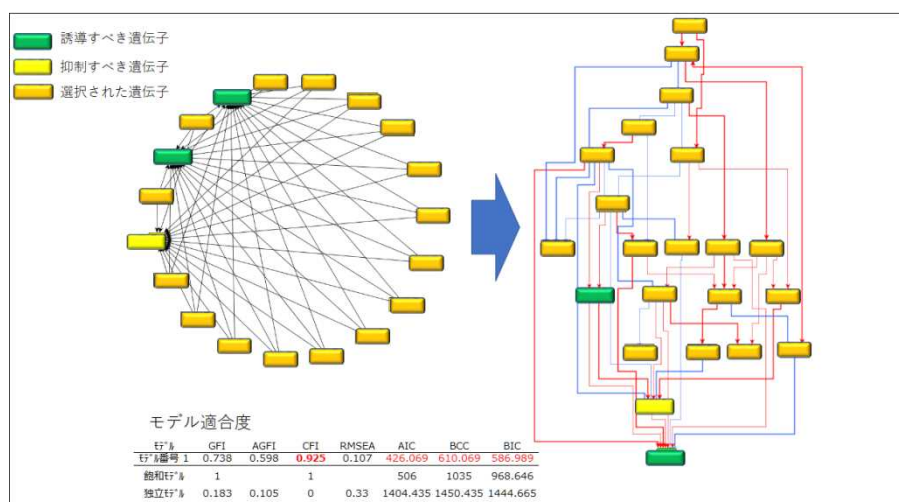


図 3.2.3.3-5-11 紅麴菌色素合成量調節のための遺伝子ネットワーク

v. 統合オミクスモデルの構築と遺伝子改変方法の提案 (2018-20、産総研)

色素生合成経路モデル、遺伝子発現制御ネットワークモデルを統合し、生合成経路遺伝子を原因変数、各種色素を結果変数とする統合数理モデルの構築を行った。具体的には、先に推定した色素生合成クラスターを構成する遺伝子群の発現量制御を実現するため、クラスター内に存在する転写因子を誘導ターゲット遺伝子と設定するとともに、抑制すべきシトリン合成クラスター内の転写因子を抑制ターゲット遺伝子と設定した。第一段階で推定した遺伝子ネットワークモデルを高精度化するため、先に選択した 9 セットについて遺伝子ネットワークを構築した結果、特に Criteria7 と Criteria8 のセットにおいてネットワーク精度が高いことが予測された。そこで、新たに構築した 2 つの遺伝子ネットワークモデルについて、構築したネットワークモデル構造から、特に係数が高いエッジ (制御関係) のみで構築したサブグラフを抽出し、サブグラフ上でそ

それぞれのターゲット遺伝子の上流にある遺伝子を、改変候補遺伝子として提案した（図 3.2.3.3-5-12）。

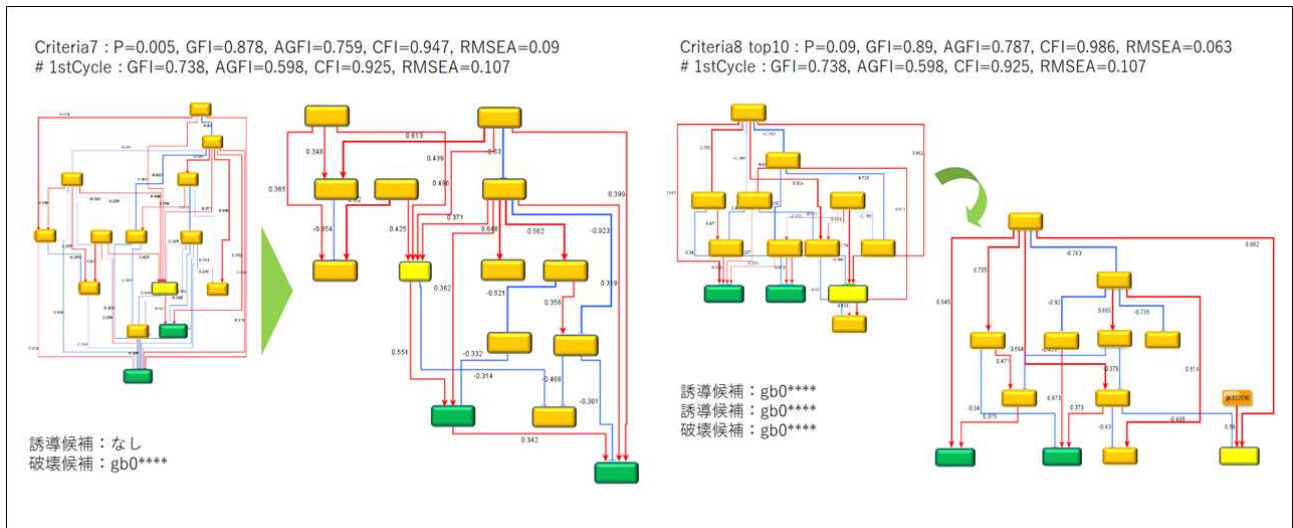


図 3.2.3.3-5-12 複数のターゲット遺伝子調節のための改良型遺伝子ネットワーク

vi. 数理モデル予測に基づく遺伝子組換え紅麹菌の作成 (2018-20、産総研)

遺伝子組換え紅麹菌の作成のためにプロトプラスト形質転換法の検討から行った。長岡技大の協力を得て、*Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*)の手法を参考に紅麹菌形質転換のためのプロトプラスト調製法を確立した。GB-01 株は相同組換え効率が低く、相同組換えによるノックアウト法の確立は困難であることが判明した。そこで、数理モデルにより導き出された破壊候補の検証には、ドミナントネガティブ型遺伝子過剰発現によるノックダウン法を適用した。作成した遺伝子組換え紅麹菌については③-iiiに記載。

vii. 統合オミクスモデル予測精度の検証 (2018-20、産総研、江崎グリコ、バイオジェット)

本項目及び①-vi は、2020 年度に行う予定の項目であったため、③-ivに記載。

2019 年～2020 年

(註) ステージゲート後に、終了した項目及び小項目について実施計画を整理した関係で、ステージゲート前後において実施計画書上の研究開発項目番号と小項目番号に重複が生じている。本成果報告書では、混乱を避けるため、ステージゲート後の研究開発項目を①②→③④とすることでステージゲート前と区別する。継続する小項目については連続性がわかるように明記した。

③ 拡張ネットワークモデルによる紅麹色素生産性向上・カビ毒低減株作製技術の検証 (江崎グリコ、バイオジェット、産総研) (2019～2020 年度)

i. 網羅的遺伝子発現データの取得 (※②-ii の継続)

過年度までの発現制御ネットワークモデルを改良し、さらに紅麹色素生産試験における各種代謝産物データを結合した拡張ネットワークモデル構築のために、作成した遺伝子組換え紅麹菌の 5L ジャー培養において色素生産性評価を行ったサンプルより網羅的遺伝子発現データの取得を行った。紅麹菌培養サンプルからの高品質な RNA の調製が課題であったが、調製プロトコルの改

良を行い、培養後半（day 7 以後）においても RIN 値=7 以上かつライブラリ作成に必要な十分量（濃度）の RNA 調製が可能になった。取得した 95 データの RNA-seq. は、すべて③-iv 有効性検証のために各色素生産性試験における day 3 及び day 7 のサンプルを用いて行い、色素データとともに RNA-seq の結果を数理モデルチームへ提供した。この中には、(1)-1 で開発した AIST-SpikeIn の検証のために、AIST-SpikeIn を添加した 9 データ及び④-iii の検証のために取得した 6 データが含まれる。また、本テーマで取得した合計 198 点のゲノム及び網羅的遺伝子発現情報は、データベースチーム（テーマ番号？）へ提供した（本テーマで取得したデータリストは省略）。

ii. 拡張ネットワークモデルの構築（※②-iv、v の継続、(2)-3 再掲）

上記③-i で取得した網羅的遺伝子発現情報及び③-iv 数理モデルの有効性検証で取得した色素生産性・カビ毒生産性情報を結合した新規の数理モデル（拡張ネットワークモデル）を開発した。紅麹菌の生産する紅麹色素は、培養前半の増殖期を経て、後半に加速的に色素生産を行うことが知られている。そのため、3 回目の DBTL サイクルでは、この培養ステージに着目し、培養 3 日目から培養 7 日目の 1 細胞あたりの色素生産量の変化率と遺伝子発現に着目し、RNA-seq. と紅麹色素生産性情報がセットになっている独立した 32 実験データを用いて、培養 3 日目から 7 日目にかけて紅麹色素量を最大化する影響予測モデルを構築した（図 3.2.3.3-5-13）。その結果、第 1、第 2 サイクルとは異なる 3 遺伝子が提案されたがいずれも遺伝子破壊を示唆するものであった。

さらに、サイクル 3 のモデルでは、菌体増殖は考慮されておらず、1 細胞あたりの色素生産性が向上しても、菌体増殖に負の影響があるとバッチあたりの色素生産性は低下することになる。そこで、DBTL サイクル 4 では、菌体増殖を考慮し、本テーマでこれまでに取得した RNA-seq. データ、乾燥菌体質量及び紅麹色素生産性情報がセットになっている独立した 82 実験データから培養容器 1 mL あたりの色素生産量を最大化する拡張モデルを構築した（図 3.2.3.3-5-14）。

iii. 検証用遺伝子組換え紅麹菌の作成（※②-vi の継続）

研究開発項目②-iv、v 及び上記③-ii で提案された遺伝子改変法に基づいて、遺伝子組換え紅麹菌株を作成した。候補遺伝子を過剰発現する場合、色素生産性が低い原因が、内在性の候補遺伝子のプロモーター強度が弱い可能性があるため、①-iii で見出した紅麹菌ゲノム中に存在する強力な内在性プロモーターを用いて過剰発現させ、統一的に評価することとした。遺伝子破壊候補については、

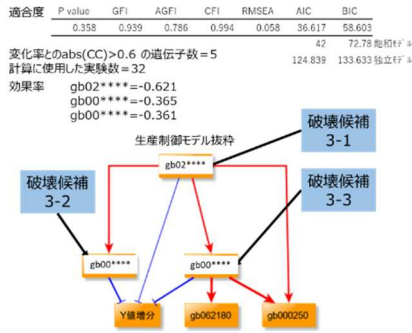


図 3.2.3.3-5-13 紅麴色素生産量(day 3→day 7)の変化率への影響予測モデル (サイクル 3)

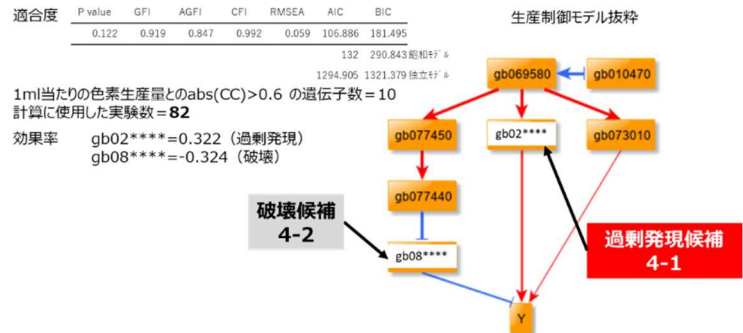


図 3.2.3.3-5-14 紅麴色素生産量への影響予測モデル (サイクル 4)

相同組換えによるノックアウト法が適用できなかったため、独自に開発したドミナントネガティブノックダウン法を適用した。過年度までに確立したプロトプラスト形質転換を用いて pAUR316 (Takara バイオ) をベースに構築したプラスミドベクター (図 3.2.3.3-5-15、省略) を江崎グリコ社の保有する GB-01 株に導入し、抗生物質 Aureobasidin A による選択を行い遺伝子組換え紅麴菌クローンを取得した。作成した 35 系統の遺伝子組換え紅麴菌は以下の表 3.2.3.3-5-4 の通り。

表 3.2.3.3-5-4 作成した遺伝子組換え紅麴菌

DBTL Cycle	SN	株番号	遺伝子の機能と改変方法
Cycle 1	1	A409	NA
	2	A411	NA
	3	A413	Knock-down TF
	4	A415	Knock-down TF
Cycle 2	5	A405	TF (strong promoter)
	6	A406	TF (moderate promoter)
	7	A474	TF (weak promoter)
	8	A475	TF (weak promoter)
	9	A407	TF
	10	A417	Knock-down TF
	11	A419	Knock-down TF
	12	A421	Knock-down TF
	13	A423	Knock-down TF
	14	A425	Knock-down TF
	15	A427	Knock-down TF
Cycle 4	16	A477	Oxydase
	17	A478	Oxydase

色素変換（単一経路）	18	A463	Transaminase 1 (genomic)
	19	A465	Transaminase 2 (genomic)
	20	A467	Transaminase 3 (genomic)※生育不良
	21	A469	Transaminase 1 (codon optimized cDNA)
	22	A471	Transaminase 2 (cDNA)
	23	A473	Transaminase 3 (codon optimized cDNA)
色素変換（複数経路）	24	A481	Oxydoreductase
	25	A483	Transaminase 4
	26	A485	Transaminase 5
	27	A487	Transaminase 6※生育不良
	28	A489	Transaminase 7
Citrinin Gene Cluster	29	A435	ctnR
	30	A437	knock-down ctnR
	31	A439	knock-down ctnR
	32	A441	knock-down ctnR
Pigment Gene Cluster	33	A429	pigR1
	34	A431	pigR2
	35	A433	pigE (※すべてのクローンで生育不良)

iv. 数理モデルの有効性検証

(1) 5 L ジャーを用いたラボスケール色素及びカビ毒生産性試験

作成した遺伝子組換え紅麹菌を用いて、5L ジャーによる色素生産性及びカビ毒シトリニンの生産試験を行った。色素生産性試験で使用する培地および培養方法は、江崎グリコ社の標準プロトコルによる。提案された遺伝子改変法に基づき作成した 17 系統 (SN1~SN17) のうち、色素生産性向上が期待される提案のうち、効果が認められるものとしては、A411 (過剰発現)、A405 (過剰発現)、A427 (ノックダウン) が見出された。また、シトリニン低減期待される効果が期待される提案のうち、効果が認められるものとしては、A423 と A427 (同一遺伝子の異なるドミナントネガティブ型) が見出された。特に、A411 は約 3 倍、A409 は約 2.7 倍という結果が得られた (図 3.2.3.3-5-16 上段)。また、色素あたりのシトリニン量を測定したところ、A411 では減少、A409 ではほぼ変化なしという結果から、色素あたりの相対的なカビ毒量は増加していなかった (図 3.2.3.3-5-16 下段)。以上のことは、発現制御ネットワークモデルにより、従来、生合成モデルから色素合成に直接関与する遺伝子の改変を中心とした従来の育種技術とは全くことなる情報科学をベースにした、通常予測しえない代謝改善、目的代謝物の生産性向上をもたらすことができるという点で、数理モデルの有効性が優れていることを示している。

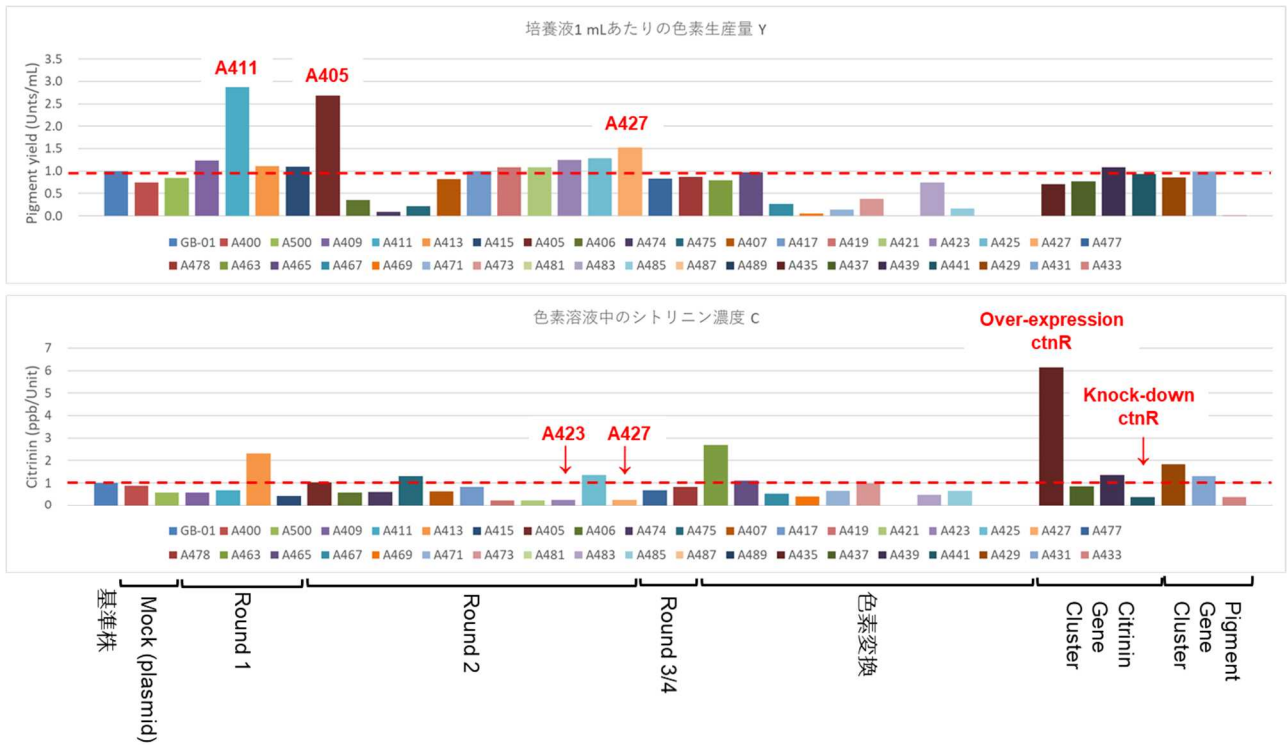


図 3.2.3.3-5-16 数理モデルの有効性検証（まとめ）。上段：培養液 1mL あたりの色素生産性 (Yield, Unit pigment per mL) と色素溶液中の色素あたりのシトリン濃度 (Concentration of Citrinin per pigment, ppb/Unit pigment)

(2) 紅麴色素の定量法の開発

数理モデルにより作成した遺伝子組換え紅麴菌体の中でおきる代謝反応であるため、期待される効果は「1 細胞あたりの色素生産性」で評価する必要があった。そのため、従来の公定書法では定量できない本課題を解決するために、独自の色素定量標準プロトコルを作成した（詳細は省略）。

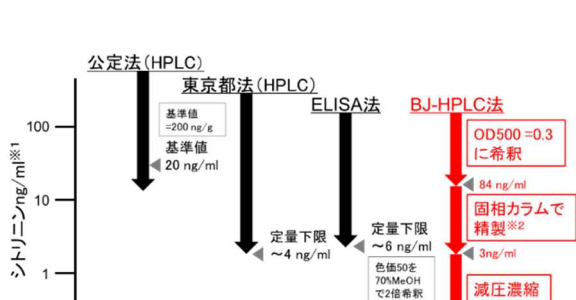


図 3.2.3.3-5-(17) シトリン定量法の比較 (公定書法、東京都法、ELISA 法、BJ-HPLC 法)

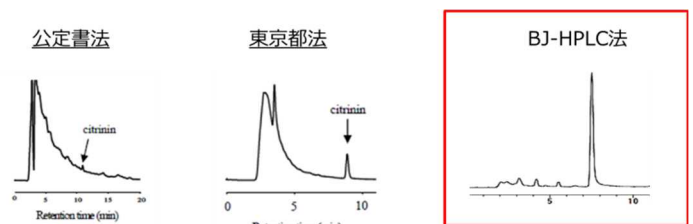


図 3.2.3.3-5-(18) 各シトリン定量法におけるシトリンピークの比較 (公定書法、東京都法、BJ-HPLC 法)

(3)カビ毒シトリニンの定量

数理モデルに基づいて作成した遺伝子組換え紅麹菌 1 細胞あたりのカビ毒生産量を、色素抽出液をサンプルから ppb レベルで測定し、数理モデルの有効性を検証する必要がある。そのため、カビ毒シトリニンの定量は ELISA 法 (RAID スクリーン FAST シトリニンキット / r-Biopham 社) を採用した。

(4)紅麹色素に含まれる微量のカビ毒を高感度に測定する方法の開発

より低濃度のカビ毒シトリニンの定量のために、固相カラム抽出の条件を改良と濃縮工程を追加することにより、定量限界として約 0.3 ng/mL、検出限界を約 0.08 ng/mL と大幅に向上させることに成功した (BJ-HPLC 法、図 3.2.3.3-5-17)。この新手法によって、江崎グリコ社が保有する GB-01 が生産するカビ毒シトリニン量は、そもそも少ないものであったが、従来考えられたよりもさらに 1 桁以上低い安全な株であることも明らかになった。

(5)90 L ジャーを用いたベンチスケールによる色素生産性試験

上記②-vii 及び③-iv-(1)において行った 5 L ジャーを用いた色素・カビ毒生産性試験の結果を受けて、選抜された A411 及び A409 の 2 株について、90 L ジャーフェルメンターを用いたベンチスケール試

験を行った。A411 はベンチスケールにおいて、色素生産性約 1.7 倍、カビ毒シトリニンは色素当たりの量は約 1/5 (対基準株比) であった。ベンチスケールでも色素生産性の向上は認められたもののラボスケールで見られた効果よりは小さく、大規模な培養系では、ラボスケールに比べ生育がやや遅いという課題も見えてきた。今後、ベンチスケールでのデータ蓄積やスケールアップを通じて、これらの課題を解決していく必要がある。

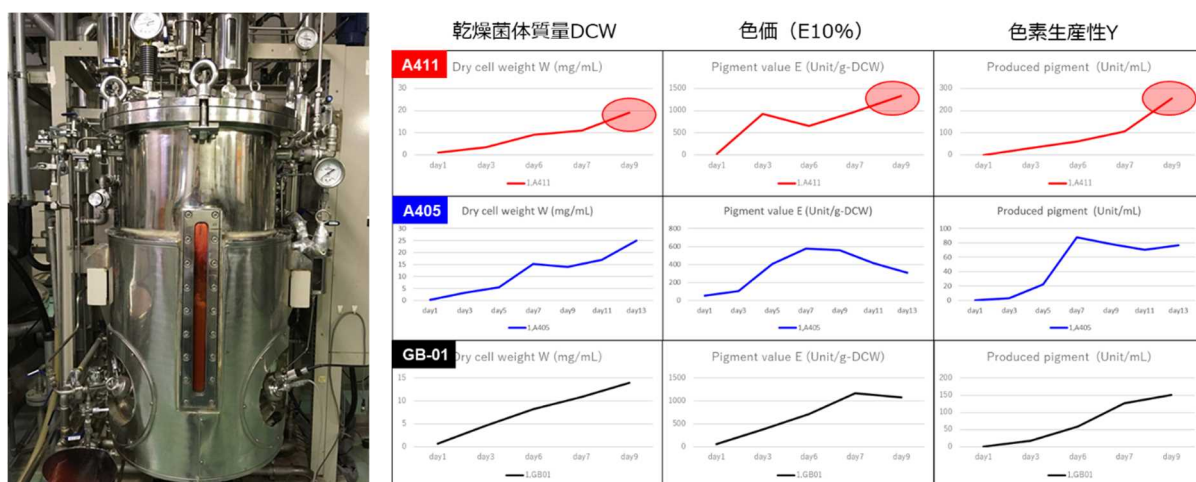


図 3.2.3.3-5-19 90 L ジャーフェルメンターを用いたベンチスケールによる紅麹色素・カビ毒生産性試験。左 (写真) : 遺伝子組換え (P1) 対応ジャーフェルメンター、右図 : ベンチスケール試験における色素生産性 3 指標 (乾燥菌体質量 DCW、色価 E10%、色素生産性 Y) の結果

(6) RT-PCR による遺伝子組換え紅麹菌における導入遺伝子の発現確認

数理モデルの有効性検証のために作成した遺伝子組換え紅麹菌における候補遺伝子発現を定量的に確認するために、定量 PCR (RT-PCR) による候補遺伝子、内在性遺伝子の発現定量を行った。各遺伝子組換え紅麹菌における、導入遺伝子の発現については、A463 を除くすべてにおいて培養 3 日目、7 日目において確認できたが、発現量にはばらつきがあった (図 3.2.3.3-5-20)。特に、発現量の多いものとしては、A409、A405、A431 が挙げられるが、A407 を除いて、培養 3 日目に比べて培養 7 日目の発現量が低下するという傾向が認められた。本テーマでは、他の糸状菌に比

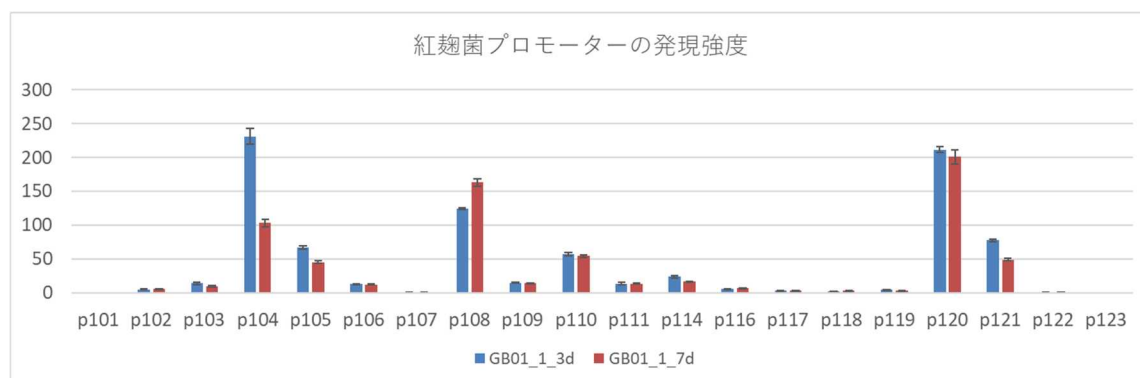


図 3.2.3.3-5-20 培養 3 日目、7 日目の基準株 GB-01 における p101 遺伝子発現量に対する各プロモーターの相対発現量 (各 n=3)

べ遅れていた各種実験系の構築を平行して行ってきたが、数理モデル紅麹色素の生産性増加には、プラスミドベクターの安定性、培養後期における安定した遺伝子発現するための技術が今後の課題であると考えられる (表 3.2.3.3-5-5 RT-PCR に用いた遺伝子組換え紅麹菌と RNA サンプル、合成した 1st strand cDNA の量、省略)。

① 代謝モデルによる紅麹色素変換技術の検証 (江崎グリコ、バイオジェット、理化学研究所、産業技術総合研究所) (2019 年~20 年度)

i. 代謝モデルによる色素変換遺伝子の予測 ((2)-1 再掲)

紅麹色素の代謝経路は完全には解明されておらず、特に、赤色色素はオレンジ色色素から生産されていると考えられているが、この変換に関わる代謝経路及び代謝遺伝子は未知のままである (図 3.2.3.3-5-21)。そこで、研究開発項目① (紅麹色素生産性向上とカビ毒低減) に加えて、2019 年度から、紅麹菌の生産する色素成分比率を大きく変更することを目指し、特により赤みの強い色素を生産するために、情報科学に基づく新奇代謝経路予測技術の有効性検証を行った。

具体的には、(2)-1 で開発された BioProV を用いて、オレンジ色色素から目的とする赤色色素分子へ 1 反応 (2019 年度) 及び複数経路で (2020 年度) 変換可能な新規代謝経路予測を行い、これに基づいて当該反応を触媒しうる酵素遺伝子の探索を行った。その結果、単一経路での反応としては、EC2.6.1.19 と EC2.6.1.11 の 2 種の反応が提案された (図 3.2.3.3-5-22)。この反応を触媒すると考えられる遺伝子は Transaminase type III に属するが、紅麹菌ゲノム中から探索したと

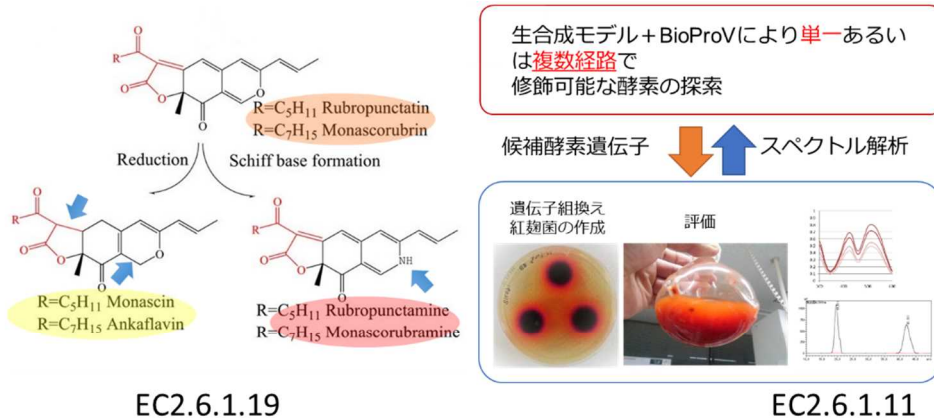


図 3.2.3.3-5-21 6種の紅麹色素分子の違いと研究開発スキームの概要

図 3.2.3.3-5-22 鋳型となる反応 (単一経路)

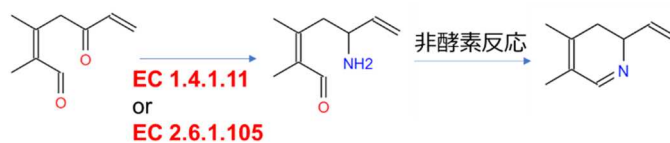


図 3.2.3.3-5-23 BioProVにより推定された新規代謝経路 (複数経路)

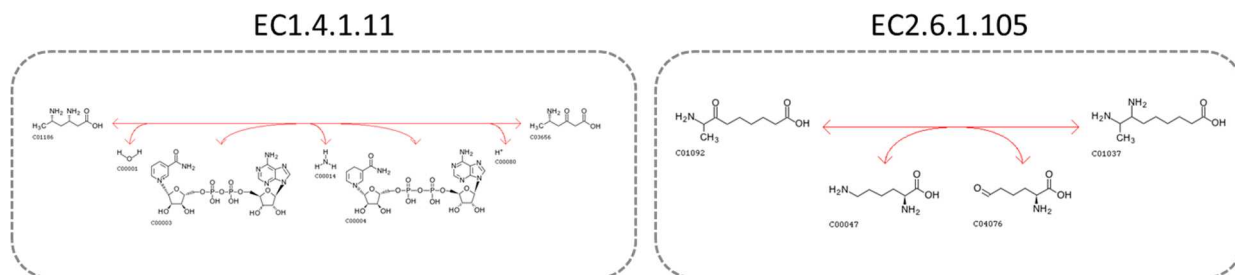


図 3.2.3.3-5-24 鋳型となる反応 (複数経路)

ころ、EC2.6.1.19の候補として2遺伝子、EC2.5.1.11の候補として1遺伝子計3遺伝子が見出された。さらに、複数経路(複数酵素)により、目的生産物である赤色色素分子へ変換可能な新規代謝経路探索を行った。しかし、残念ながらこのような代謝経路は見つからなかった。その代わりに、一段目は酵素反応、二段目は自律閉環反応で進むと予測される代謝経路が提案された(図3.2.3.3-5-23)。鋳型となる反応を図3.2.3.3-5-24に示す。EC1.4.1.11はOxydoreductaseであり、EC2.6.1.105は単一経路と同じくTransaminaseである。この反応を触媒しうる候補酵素遺伝子として、これまでに見出されたものとは異なる遺伝子として、EC1.4.1.11の反応を触媒しう

る候補酵素遺伝子として 1 遺伝子、EC2.6.1.105 を触媒しうる候補遺伝子として 4 遺伝子が見出された。

ii. 検証用遺伝子組換え紅麴菌の作成

上記④-i で予測された単一経路 3 遺伝子について、イントロンを含むゲノム塩基配列として強力なプロモーターの下流に導入・発現させた A463、A465、A467 及びイントロンを除く cDNA として導入・発現させた A469、A471、A473 株を構築した。また、予測された複数経路の前半を担う 5 遺伝子について、イントロンを含むゲノム塩基配列として導入した A481、A483、A485、A487、A489 の合計 11 種の遺伝子組換え紅麴菌の作成を行った。このうち、A467 と A487 (いずれも Transaminase 遺伝子) を発現する遺伝子組換え紅麴株は、いずれのクローンも著しい生育不良のため、色素生産試験に供することができなかった (③-iii、表 3.2.3.3-5-4 参照)。

iii. 網羅的遺伝子発現データの取得

③-iv 参照 (省略)。

iv. 数理モデルの有効性検証

上記④-iii で作成した遺伝子組換え紅麴菌が赤色色素をより多く生産するかどうかを確認するために、③-iv-(1)と同様に、5L ジャーにより色素生産性・カビ毒生産性試験を行った。色素生産・カビ毒シトリニンの測定を行うと同時に、抽出した色素溶液を用いて色素スペクトル解析を行った。作成した遺伝子組換え紅麴菌は、オレンジ色が減少し、赤色が増加すると予想されるため、425 nm のピークを 1 として normalize し、510 nm のピークを比較したところ、いずれもコントロール (基準株 GB-01) に対していずれも増加するという結果が得られた (図 3.2.3.3-5-21)。しかし、その増加率は期待したより小さく、最大 109% (A465m Transaminase 2) であっ

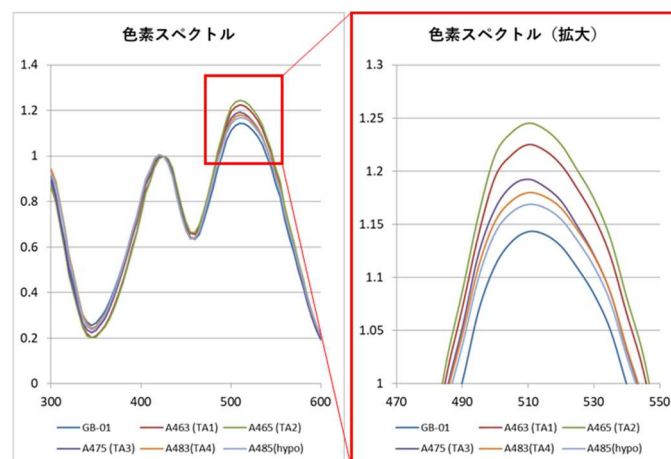


図 3.2.3.3-5-21 BioProV により提案された新規代謝経路遺伝子導入紅麴菌の色素スペクトル (表 3.2.3.3-5-6) 新規代謝経路遺伝子導入紅麴菌の 510 nm/425 nm ピーク比率、省略)。

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	0	0	0	0	0
2018	1	1	0	0	0	0	0
2019	0	0	0	0	1	1	0
2020	0	0	0	0	1	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

江崎グリコ社は、本技術に関しては特許ではなくノウハウとして知的財産を保護する方針。

課題名：C(3)-6 微生物を用いたパプリカ由来カロテノイドの新規生産法の有効性検証

担当機関：江崎グリコ、石川県立大学、京都大学、産業技術総合研究所

(1) 背景と目的

食品用色素には天然色素と合成色素が存在するが、近年、天然色素のニーズが急激に上昇している。現在、天然色素の原料となる植物の調達に関しては、その大半を中国に依存しているのが現状である。原料を植物に頼らず微生物において色素生産が実現できれば、原料調達の問題が回避でき、日本企業が世界をリードできると考えられる。一方、カロテノイド色素は、可視光、紫外線の吸収機能、活性酸素の消去機能、完全な共役電子系、などの特徴を有する機能材料であり、色素としての利用以外に、生理機能素材としての健康食品、化粧品への利用が世界的に進むと考えられている。これまでの研究で、パプリカ中には、アスタキサンチンを上回る非常に高い抗酸化活性を有するカロテノイドが多く存在することが確認されており、パプリカ由来カロテノイドは生理機能素材として食品、化粧品、医薬部外品で事業化が期待できる。しかし、パプリカ植物中のカロテノイド含有量は非常に低く、パプリカ植物からの抽出によってカロテノイドを大量生産するには実用化に問題がある。

本研究では、パプリカ由来カロテノイドの微生物生産実現のため、カロテノイド代謝工学技術、酵母による物質生産技術、及び代謝を設計するための情報解析技術、など、ドライ技術とウェット技術を組み合わせ、実用的な生産系を構築することで、世界に先駆けて国際競争力のあるカロテノイド生産系を構築し、事業活用する。

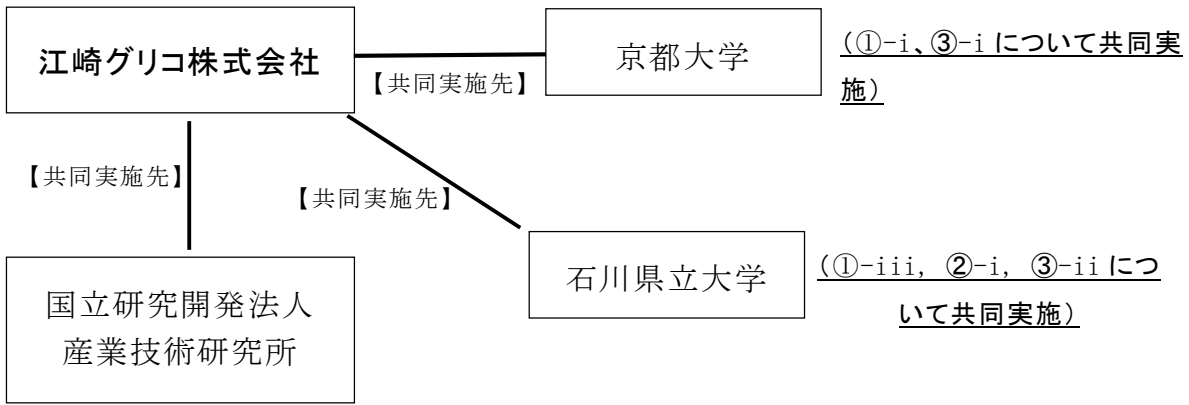
(2) 位置づけ、目標値

中間目標	<ul style="list-style-type: none">・代謝酵素候補遺伝子導入株の改良（目標値：改良株の構築2株以上）・大型発酵装置等での生産性の検証（目標値：パプリカ由来希少カロテノイドの生産性0.3 g/L以上）・構築微生物等におけるトランスクリプトーム解析（目標値：2株以上）
最終目標	<p>カロテノイドDに関して、酵素選択ドライ技術の精度向上への貢献（40種類以上の菌株評価結果をドライチームへ提供）、大腸菌あるいは実験室または実用酵母におけるカロテノイドD生産：20 mg/L以上</p> <ul style="list-style-type: none">・カロテノイドEに関して、大腸菌あるいは酵母におけるカロテノイドE生産性改良株の創出し、大腸菌又は酵母におけるカロテノイドE生産：10 mg/L以上

(3) 全体計画

開発項目	開発内容	28年	29年	30年	31年	32年
①カロテノイド A 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証	i. 未同定酵素の予測：ドライ技術で候補遺伝子を予測する。	→				
	ii. 検証用微生物の構築：大腸菌、酵母を宿主微生物として生産菌株を構築する。	→				
	iii. 候補遺伝子の導入・評価：大腸菌、酵母、植物に導入して生産性の評価を行う。	→				
	iv. 微生物の構築、解析、改良：構築した組換え大腸菌、酵母での生産条件検討、トランスクリプトーム解析を実施する。	→				
	v. 生産性検証（ラボ機、実機）：構築、改良された組換え大腸菌、酵母のカロテノイド生産性をミニジャーあるいは大型発酵槽を用いて検証する。			→		
②カロテノイド B 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証	i. 微生物の構築、解析、改良：構築した組換え大腸菌、酵母での生産条件検討、トランスクリプトーム解析を実施する。	→				
	ii. 生産性検証（ラボ機、実機）：構築、改良された組換え大腸菌、酵母のカロテノイド生産性をミニジャーあるいは大型発酵槽を用いて検証する。		→			
③カロテノイド D ならびにカロテノイド E 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証	i. 機械学習情報解析技術による候補遺伝子の選抜		→			
	ii. 微生物の構築、解析、改良：i. で提案された候補遺伝子に系統樹解析を加えて候補を絞り込み、宿主に実装し、構築した組換え大腸菌、酵母での生産条件をラボスケールにて検討、生産性を解析し、ドライチームへフィードバックを行う。			→		
	iii. ラボ機での生産性検証：ii. で得られた有望菌株に関して、カロテノイド生産性をミニジャーを用いて検証する。			→		

(4) 実施体制



(①-i, ii, iii, ②-i, ②-ii, ③-ii, ③-iii について共同実施)

(5) 運営管理

半年に一度の全体会議、一年に一度の外部有識者による技術推進委員会に参加し、進捗状況を発表するとともに、テーマの推進に有益な助言等を他の参画メンバー及び推進委員より受けた。チームの運営に関しては、江崎グリコ株式会社が主体となって、約3か月に1度（年4回程度）、各参画機関の当該期間における実施サブテーマについて、進捗状況の報告・情報共有を行うため、ドライチームメンバーとともにチームミーティングを開催した。本研究テーマでは、石川県立大学で開発されたカロテノイド合成遺伝子/プラスミドベクター系を基本に、そのパブリカ由来各種カロテノイド合成遺伝子を付加したデリバティブを複数機関で活用する。そのため、遺伝子情報、遺伝子組換え体等の研究成果物を参画機関内で迅速に共有し、相互に利用できるようMTA/NDA 契約を締結した。

(6) 実施の効果

商業用カロテノイド生産菌改良株が完成後、2024年までに組換え対応生産設備に1.5億円を投資予定である。また、販売（カロテノイド製剤売上）は2025年度9億円を見込んでいる。植物抽出に頼るアジアを中心とした新興国企業に対し、微生物生産を実現することで圧倒的なコスト競争力を生み出すことができ、2030年度の国内外合わせたシェアは25%を見込んでいる。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目		目標	成果 (2021年2月)	達成度	今後の課題
①カロテノイドA生産微生物の構築と実生産スケールでの検証	i. 未同定酵素の予測を行う	パブリカ由来カロテノイドのより高効率な生産が可能な微生物を構築する	ドライ技術で候補遺伝子を26種類予測し、ウェットチームに提供した。	○	(プロジェクト期間終了後に生産株を取得した)
	ii. 検証用微生物の構築を行う		iの候補遺伝子を合成し、大腸菌、酵母を宿主微生物として		

			生産菌株を構築できた。		
	iii. 候補遺伝子の導入・評価を行う		大腸菌、酵母、植物に導入して生産性の評価を行った。		
	iv. 微生物の構築、解析、改良を行う		構築完了は確認できた。		
	v. 生産性検証（ラボ機、実機）を行う		2018年度末に計画変更により中止。研究開発項目③に注力することとした。		
②カロテノイド B 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証	i. 微生物の構築、解析、改良を行う	パプリカ由来カロテノイドのより高効率な生産が可能な微生物を構築する。	上流プロモーター強度を改良することによりカロテノイド B 駆体（カロテノイド C）合成用微生物（大腸菌）を構築できた。	○	（プロジェクト期間終了後にカロテノイド B 生産株を取得した）
	ii. 生産性検証（ラボ機、実機）を行う		2018年度末に計画変更により中止。研究開発項目③に注力することとした。		
③カロテノイド D、E 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証	i. 機械学習情報解析技術によって、候補遺伝子を選抜する。	<カロテノイド D> 酵素選択ドライ技術の精度向上への貢献	DBTL6 サイクルにわたり、数百種類の候補遺伝子を予測、提供した。	○	
	ii. 微生物の構築、解析、改良：i. で提案された候補遺伝子に系統樹解析を加えて候補を絞り込み、宿主に実装し、構築した組換え大腸菌、酵母での生産条件をラボス	（40 種類以上の菌株評価結果をドライチームへ提供）、大腸菌あるいは実験室または実用酵母におけるカロテノイド D 生産：20 mg/L 以上	204 種の候補遺伝子を微生物に実装、生産性を評価し、2 種類の宿主微生物（大腸菌、ならびに酵母）におけるカロテノイド D 生産菌株を構築できた。上流代謝経路の改善、新規代謝経路の導入とゲノムへの組み込み、		

	ケールにて検討、生産性を解析し、ドライチームヘフィードバックを行う。	<カロテノイドE> 大腸菌あるいは酵母におけるカロテノイドE生産性改良株の創出し、カロテノイドE生産：10 mg/L以上	関連代謝遺伝子のバランス調整によりカロテノイドE生産菌株を構築できた。		
	iii. ラボ機での生産性検証： ii. で得られた有望菌株に関して、カロテノイド生産性をミニジャー等を用いて検証する。		ii. で得られた菌株に関して高密度培養の諸条件を検討することで、カロテノイドD 20.1mg/L、カロテノイドE 生産性 11.0mg/Lの生産性を確認できた。		

(8) 研究開発の成果と意義

① カロテノイドA生産微生物の構築と実生産スケールでの検証

i. 未同定酵素の予測：ドライ技術で候補遺伝子を予測する。（2016-18、神戸大、江崎グリコ、産総研）

課題(2)代謝系を設計する情報解析技術の開発のうち、課題(2)-1 新規代謝経路の設計・最適化手法の開発において、機械学習による新規酵素反応予測手法の開発に資する適用例として、カロテノイドAの生合成遺伝子配列の予測を実施した。具体的には、1) 機械学習による酵素遺伝子の判別器を利用した予測、2) マルチプルアラインメントをもとにした配列解析との比較検証、を実施した。研究開発の成果は以下の通り。

1) 機械学習による酵素反応判別

機械学習による新規酵素反応予測手法は、酵素配列のみならず、基質・生成物といった化学構造を考慮して、学習データをもとに酵素反応の判別を行う。この際、酵素配列・化学構造を特徴ベクトル化し、学習データ（正例・負例）データをもとに、サポートベクターマシン（SVM）によって判別器を作成する。正例としては、予測する酵素反応に関して既知のEC番号に分類される酵素反応情報（配列・化学構造）を利用し、負例はそれ以外のEC番号に分類される酵素反応情報、または酵素配列と化学構造情報を任意に組み合わせた情報を利用する。学習データとしては、与えられた課題を考慮して、正例・負例の組合せを数種準備し、複数の学習判別器を生成し、各結果を平準化することで、学習そのものの偏りを軽減することとした。カロテノイドAの生合成遺伝子（酵素反応）の予測においては、化学反応そのものが未知の酵素反応予測であるため、正例としては当該代謝パスウェイ上にある類似の遺伝子を参照した。テストデータとしては、トウガラシの成熟フェーズにおいて、顕著に発現のみられる遺伝子発現データを利用して、遺伝子配列候補を抽出し、これらを判別器で予測した。得られた酵素候補遺伝子を判別器によるスコア順に表に示す（図3.2.3.3-6-1）。

Enzyme name	SEP score	SE score	RE score
ORF8_CL20133Contig1	0.8635	0.957	0
ORF5_G60Dcomp55190_c0_seq1	0.7291	0.951	0.0047
ORF1_CL693Contig2	0.7522	0.9497	0.0264
ORF1_CL693Contig3	0.7522	0.9497	0.0264
ORF4_G10Dcomp10906_c0_seq2	0.9055	0.9403	0
ORF3_CL15829Contig1	0.9333	0.9392	0.0034
ORF1_G40Dcomp14568_c0_seq1	0.9887	0.9338	0
ORF3_CL1Contig210	0.7401	0.9312	0.0065
ORF2_G60Dcomp11523_c0_seq1	0.8651	0.924	0
ORF9_CL540Contig3	0.8651	0.924	0
ORF1_G40Dcomp3477_c0_seq2	0.7222	0.9193	0.2677
ORF9_CL196Contig6	0.8237	0.9184	0.3473
ORF1_CL1277Contig6	0.7807	0.9178	0.0157
ORF27_CL425Contig1	0.7963	0.9173	0
ORF1_CL1646Contig1	0.8976	0.9144	0
ORF2_CL7921Contig1	0.8223	0.9133	0.2576
ORF1_G40Dcomp3880_c0_seq2	0.9772	0.9092	0
ORF28_CL1238Contig1	0.9047	0.9086	0
ORF6_CL1402Contig2	0.9094	0.9031	0
ORF1_CL5968Contig1	0.9621	0.9021	0
ORF8_CL1642Contig2	0.8847	0.8996	0.3229
ORF5_G40Dcomp9776_c0_seq1	0.6633	0.8994	0.5195
ORF1_G60Dcomp8333_c0_seq2	0.9158	0.8993	0.8951
ORF1_CL2123Contig2	0.9158	0.8993	0.8951

青: 公開データベースより収集された *C. annuum* 由来キサントフィル合成関連酵素 (データベースにより品種が異なるため、末尾に品種名を記載)

黒: *C. annuum* の発熟果実のトランスクリプトームデータから予測された候補遺伝子

候補遺伝子の絞り込み条件

■ 下記の名反応から予想された候補のスコア順位を系統樹に加筆した。

- EnzX
Antheraxanthin → Cucurbitaxanthin A
- CCS
Antheraxanthin → Capsanthin
Violaxanthin → Capsorubin

■ キサントフィル合成関連酵素群からの距離によるグループ分け
近 ← A, B, C, その他 → 遠

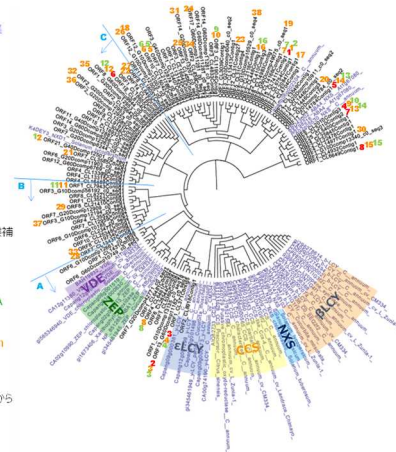


図 3.2.3.3-6-1 予測された酵素候補遺伝子

2) 配列解析との比較検証

配列解析では、当該代謝パスウェイ上の酵素遺伝子と予測に利用した遺伝子発現データ由来の酵素遺伝子の各配列情報を利用し、クラスタリングを実施した。これに、機械学習にて高いスコアを示した遺伝子配列をマッピングした結果を図 (青色の遺伝子) に示す。これにより、配列解析のみでは類似と判定されない酵素遺伝子配列であっても、機械学習においてスコアが高いケースもあることが示され、酵素遺伝子候補の提示という観点から、多様性を有する配列を提示することができた。

ii. 検証用微生物の構築: 大腸菌、酵母を宿主微生物として生産菌株を構築する。(2016-18、江崎グリコ、産総研)

1) 検証用大腸菌の構築

カロテノイド産生細菌 *Pantoea ananatis* は、大腸菌 (*Escherichia coli*) と同じクラス (綱) である γ -Proteobacteria に属することもあり、*P. ananatis* 由来のカロテノイド生合成遺伝子群は大腸菌で容易に機能発現し、大腸菌に、リコペン (リコピン)、 β -カロテン、ゼアキサントチン生産能を与える (図 3.2.3.3-6-2)。

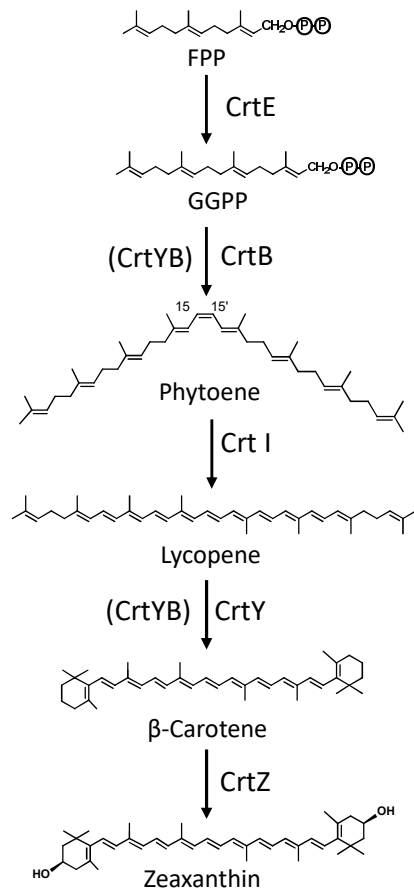


図 3. 2. 3. 3-6-2 微生物のゼアキサンチン生合成系

大腸菌を用いてカロテノイド A 生産微生物を構築するため、ゼアキサンチン合成に必要な *P. ananatis* の *crt* 遺伝子群を含むプラスミド pAHP-Zea を導入したゼアキサンチン合成大腸菌株に *Zeaxanthin epoxidase* (*ZEP*) 遺伝子を導入し、カロテノイド A 合成の中間産物であるアンテラキサンチンの合成を試みた。過去に、藻類由来の *ZEP* 遺伝子が大腸菌では機能しないことが分かっていたため、様々な植物由来の *ZEP* 遺伝子の_{大腸菌での機能評価を試みた。}*Capsicum annuum*、*Arabidopsis thaliana*、*Zea mays*、*Ipomoea nil*、*Prunus armeniaca* 各由来の *ZEP* 遺伝子を導入した結果、*C. annuum* 由来 *ZEP* 遺伝子が_{大腸菌で良く機能することが分かり、アンテラキサンチンおよびビオラキサンチン合成株を作出することができた。}

大腸菌には様々な株が存在するため、*P. ananatis* 由来のリコペン生合成遺伝子群などを利用して、カロテノイド生産能、生産の安定性、できるだけ変異の数が少ないこと等を指標に、種々の大腸菌株の評価を行った。その結果、最適なカロテノイド生産用宿主株として、JM101 (DE3)、BL21 (DE3) の 2 株を選出した。さらに、これら 2 株について全ゲノム配列を解読した。

これまでに構築したカロテノイド生産大腸菌は、プラスミド導入により獲得しており、今後の安定的かつ経済的な生産のためには、プラスミドではなく大腸菌ゲノムに直接カロテノイド生合成遺伝子を挿入することが望ましい。そこで、相同組換えにより大腸菌ゲノムにカロテノイド生合成遺伝子を挿入する試みを行った。その結果、すでに相同組換えが報告されている大腸菌株での予備実験を経て、実際に生産に使用する予定の BL21 (DE3)、JM101 (DE3) で IPP isomerase をコードする *idi* 遺伝子 (イソプレノイド合成の鍵遺伝子) をゲノムに挿入した相同組換え株を獲

得することができた。相同組換えを繰り返すことにより、*idi* 遺伝子以降の遺伝子をゲノムに挿入し、カロテノイド安定生産株を構築した。

2) 検証用酵母株の構築

酵母におけるカロテノイド生産に関わる研究は、これまで様々な研究結果が報告されているが、その多くが本来カロテノイドの生産能を有する酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* などにおける生産性の改善や、また、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* などのカロテノイド非生産酵母でのリコペン、 β -カロテン、アスタキサンチンなどの生産に関わるものである。本課題のターゲットであるカロテノイド A やカロテノイド B・カロテノイド C は、前駆体としてアンテラキサンチンからの生合成が示唆されており、そのため、ドライ技術によって予測される候補遺伝子の検証のためには、アンテラキサンチン生合成酵母株が必須である。しかしながら、酵母におけるこれらカロテノイドの生産の報告は、これまでほとんどなされていない。

そこで本課題における検証用酵母株の構築に適した酵母株を選抜するため、カロテノイド生産性が比較的高く、複数種類の遺伝子の同時保持のため、多数の選択マーカー遺伝子が使用可能な酵母株の選抜を行った。用いた酵母株は、これまでの研究において出芽酵母におけるタンパク質生産において比較的高い生産性を有する株として、INVSc1 株 (Thermo Fisher Scientific 社)、内在性プロテアーゼを欠損させた BY4743 株、および YPH500 株を用いた。

酵母でのカロテノイド生産において主に利用されているカロテノイド生合成遺伝子群としては、*Pantoea ananatis* 由来 *crtE* (以後 *PaCrtE* と記載)、*crtI* (以後 *PaCrtI* と記載)、*crtB* (以後 *PaCrtB* と記載)、*crtY* (以後 *PaCrtY* と記載)、または、カロテノイド生産酵母である *Xanthophyllomyces dendrorhous* 由来 *CrtE* (以後 *XdCrtE* と記載)、*CrtI* (以後 *XdCrtI* と記載)、*CrtYB* (以後 *XdCrtYB* と記載) が利用されており、これらの遺伝子セット (*PaCrtE/PaCrtI/PaCrtB/PaCrtY*、または *XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB*) を導入することで、出芽酵母においても β -カロテンの生産が報告されている。そのため、これらの遺伝子セットを用いた発現プラスミドを構築し、それぞれ 3 種類の宿主酵母株へ導入した。その結果、いずれの宿主酵母株においても、*P. ananatis* 由来遺伝子セット (*PaCrtE/PaCrtI/PaCrtB/PaCrtY*) を導入した株よりも、*X. dendrorhous* 由来遺伝子セット (*XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB*) を導入した株において、主に β -カロテンの蓄積による比較的強い酵母細胞の着色 (橙色) が観察され、酵母細胞におけるカロテノイド生産において *X. dendrorhous* 由来遺伝子セットが適していることが示唆され、以後の実験では主に本遺伝子セット (*XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB*) を用いて行なった。また、宿主酵母株として用いた 3 株において、INVSc1 株は酵母細胞の着色が弱く、カロテノイド生産には適していないことが明らかとなった。一方、BY4743 株および YPH500 株は、いずれも酵母細胞の強い着色が観察され、特に YPH500 株は高いカロテノイド生産性が示唆されたことから、以後の実験では、本酵母株を用いて行なった。

次に、アンテラキサンチンの前駆体であるゼアキサンチンの生合成のため、*XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB* 遺伝子セットに加え、*P. ananatis* 由来 *crtZ* (以後 *PaCrtZ* と記載) を用いた発現プラスミドを作製した。本プラスミドを YPH500 株に導入した結果、 β -カロテンは中間代謝産物として残存してはいるが、ゼアキサンチンの生産が確認でき、アンテラキサンチンの前駆体であるゼアキサンチンの生産株を構築することができた。

ゼアキサンチンからアンテラキサンチンを生合成するためには、ゼアキサンチンエポキシダーゼ (*ZEP*) がその反応を触媒することが知られており、また、*ZEP* 遺伝子は主に植物が有している

ことが報告されている。しかしながら、酵母におけるアンテラキサンチン（もしくはビオラキサンチン）の生合成についての報告例はない。そのため、パプリカが有する *ZEP* 遺伝子 (*CaZEP*) を用いた発現プラスミドを構築し、ゼアキサンチン生合成遺伝子セット (*XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB/PaCrtZ*) を用いた発現プラスミドと合わせて YPH500 株に導入した株を作製した。これらの酵母株におけるアンテラキサンチン・ビオラキサンチンの生産について、HPLC によるカロテノイド組成分析を行なった結果、少量ではあったがその生産に成功した。また、アンテラキサンチン・ビオラキサンチンの生産性の改善のため、*ZEP* を宿主酵母株の小胞体への発現を試みた結果、その生産性がある程度改善されることも明らかにした。以上の実験結果から、カロテノイド A の前駆体と考えられるアンテラキサンチン（ビオラキサンチン）生合成株の構築に成功し、検証用微生物の構築を完了した。

iii. 候補遺伝子の導入・評価：大腸菌、酵母、植物に導入して生産性の評価を行う。（2016-18、江崎グリコ、石川県立大、産総研）

1) 大腸菌における候補遺伝子の評価

i の項で予測された *EnzX* 候補遺伝子が大腸菌アンテラキサンチン/ビオラキサンチン合成株に導入し、カロテノイド A の蓄積の有無で *EnzX* の *in vivo* 活性を評価した。まず、タンパク質構造予測のスコアの高い 7 候補遺伝子について検証を行ったが、カロテノイド A の蓄積は見られなかった。そこで、新たに異なる観点（登熟期の遺伝子発現パターン、局所予測、既知のカロテノイド酵素群とのアミノ酸配列の相同性）から絞り込まれた 19 遺伝子について検証を行ったが、カロテノイド A の蓄積は見られなかった。

2) 酵母における候補遺伝子の評価

カロテノイド A の生合成に関わる未知遺伝子について、ドライ解析によって予測された候補遺伝子の評価のため、各候補遺伝子と改変型候補遺伝子を用いた各種発現プラスミドを構築し、検証用酵母株への導入と発現による検証を行ったが（図 3.2.3.3-6-3）、着色の変化が観察された構築株は得られなかった。

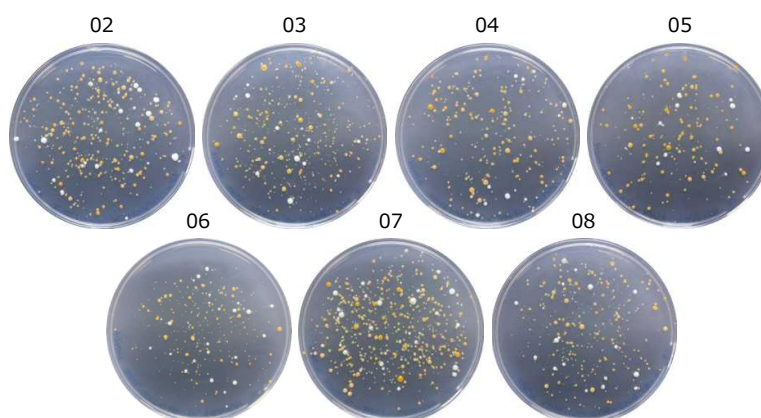


図 3.2.3.3-6-3 予測された候補遺伝子導入株の検証（一部）

② カロテノイド B 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証

i. 微生物の構築、解析、改良：構築した組換え大腸菌、酵母での生産条件検討、トランスクリプトーム解析を実施する。（2016-18、江崎グリコ、石川県立大、産総研）

1) 大腸菌におけるカロテノイド B の生産株の構築

①-ii で作成されたビオラキサンチン合成大腸菌株に対し、カロテノイド C/カロテノイド B 合成酵素 (CCS) 遺伝子を導入し、カロテノイド C 合成を試みた。カロテノイド C およびカロテノイド B を蓄積することが分かっている *Capsicum annuum* および *Lilium lancifolium* 由来の CCS 遺伝子と、これら CCS 遺伝子と相同性が高い *Citrus sinensis* 由来遺伝子を導入したが、カロテノイド C およびカロテノイド B の蓄積は認められなかった。しかし、リコペン合成株にこれら CCS 遺伝子を導入すると、副活性である lycopene β -cyclase 活性が認められ、*in vivo* で CCS は活性型で存在することが分かった。CCS 及びその他のカロテノイド合成関連酵素の局在性予測結果から、CCS と疎水性の高いカロテノイド基質との局在性の不一致が原因の一つと予想し、膜輸送シグナル構造が知られている *crtZ* 遺伝子のシグナル領域を CCS 遺伝子に結合することを試みたが、CCS は機能しなかった。また、CrtZ や ZEP などの局在性が既知で CCS より代謝の上流で機能しているタンパク質と CCS の融合タンパク質化を試みたが、*in vivo* での CCS 活性は確認できなかった。アンテラキサンチンを合成する組換え大腸菌に、*CaCCS* 遺伝子、及び子葉での葉緑体生合成に必要なタンパク質で、シャペロンとして働くと考えられている *AtCYO1* 遺伝子を導入すると、赤ピーマン (パプリカ) に含まれるカロテノイド C、カロテノイド A、Nigroxanthin と類似の反応機構で、新規カロテノイド (NewCarotenoid-1) が主要産物として生成することを確認した (図 3.2.3.3-6-4、特許出願)。

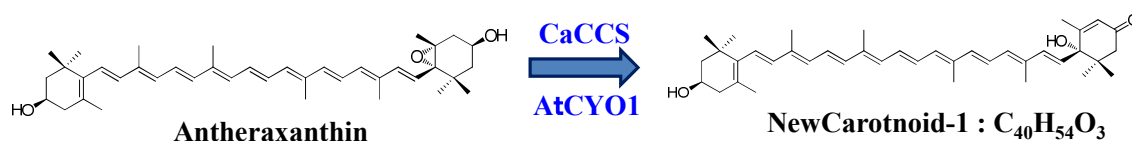


図 3.2.3.3-6-4 新規カロテノイド (NewCarotenoid-1) の構造とアンテラキサンチンからの生成

2) 酵母におけるカロテノイド B 生産株の構築

カロテノイド C およびカロテノイド B の前駆体は、それぞれ、アンテラキサンチンおよびビオラキサンチンであり、また、カロテノイド C・カロテノイド B のアンテラキサンチン・ビオラキサンチンからの変換は、カロテノイド B・カロテノイド C シンターゼ (CCS) が触媒することが報告されている。そのため、前述の検証用酵母株に用いたビオラキサンチン生合成遺伝子セット (XdcrtE/XdcrtI/XdcrtYB/PacrtZ/CaZEP) に加えて、CCS 遺伝子を有する植物であるパプリカおよびオニユリ由来の CCS 遺伝子を用いて、酵母におけるカロテノイド C・カロテノイド B 生産株の構築を試みた。

パプリカ由来 CCS (以後、CaCCS と記載) 遺伝子の発現プラスミドを構築し、ビオラキサンチン生合成遺伝子セットを含む発現プラスミドを用いて形質転換株を作製した。また、CCS は、植物体内では色素体に局在していることが知られており、その N-末端には葉緑体 (色素体) への移行シグナルが含まれている。そのため、本移行シグナルが出芽酵母細胞内において、その触媒活性等に影響を及ぼすことも考慮し、全長型 CaCCS、および葉緑体移行シグナルを除いた成熟型 CaCCS を導入した酵母株をそれぞれ作製した。これらの酵母株において、カロテノイド C・カロテノイド B の生産について検証を試みたがそれらの生合成は確認できなかった。

これらの構築株においてカロテノイド C・カロテノイド B の生合成が確認できなかったことから、宿主酵母細胞内における CaCCS 発現が困難であることが示唆された。そのため、宿主酵母細胞内において CaCCS タンパク質の発現を確認するため、CaCCS タンパク質の過剰発現を試みた。本実験では、低温条件下において目的タンパク質を高度に発現・蓄積させることが可能である出芽酵母低温誘導発現系を用いて行なった。本発現実験の結果、CaCCS タンパク質は可溶性画分にはその発現が確認できなかったが、全細胞タンパク質サンプルにおいて CaCCS の発現・蓄積を確認できた (図 3.2.3.3-6-5)。さらに、構築株における導入カロテノイド生合成遺伝子についてのターゲットプロテオーム解析 ((1)-3.高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術の開発との連携による依頼分析) を試みた結果、1 遺伝子産物 (PaCrtZ タンパク質) 以外の遺伝子産物 (XdCrtE、XdCrtI、XdCrtYB、CaZEP、および CaCCS 遺伝子産物) の発現を可溶性画分に確認することができた。以上の結果から、これらの遺伝子産物が出芽酵母細胞内においてタンパク質として発現に成功していることが示唆された。

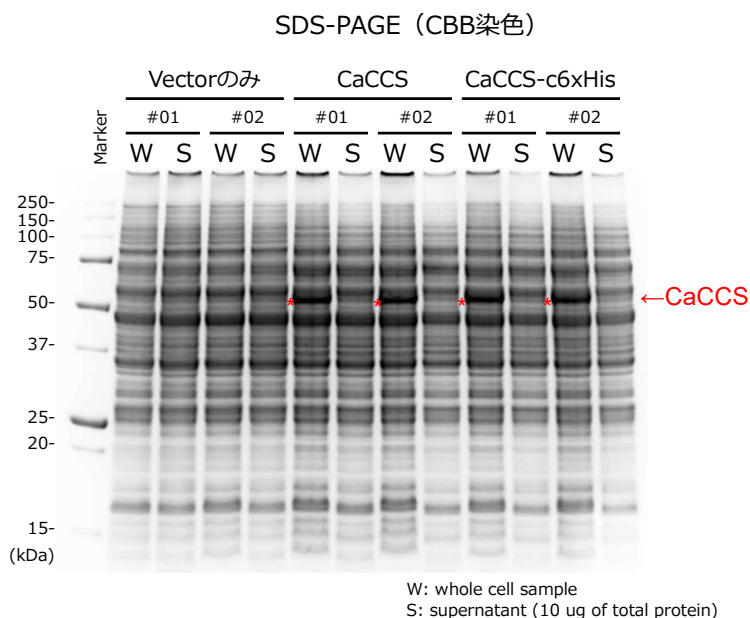


図 3.2.3.3-6-5 出芽酵母における CaCCS タンパク質の過剰発現

CCS は、アンテラキササンチン・ビオラキササンチンからカロテノイド C・カロテノイド B への変換だけでなく、副反応として、リコペンから β -カロテンへの反応を触媒することが知られている。そのため、リコペン生合成遺伝子セット (PaCrtE/PaCrtI/PaCrtB) を導入した発現プラスミドを構築し、CaCCS 発現プラスミドと合わせて、YPH500 株に導入した形質転換株を構築した。本形質転換株のカロテノイド組成分析の結果、僅かではあるが β -カロテンの生合成を確認できた。このことから、出芽酵母細胞内において CaCCS タンパク質は少なくとも副反応を触媒できる形で発現できていることが示唆された。

また、オニユリが有する CCS (以後、L1CCS と記載) 遺伝子の発現も試みた。CaCCS 遺伝子の発現同様、完全長 L1CCS および葉緑体移行シグナルを除いた成熟型 L1CCS 遺伝子を用いて発現プラスミドを構築し、ビオラキササンチン生合成遺伝子セット (XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB/PaCrtZ/CaZEP) を含む発現プラスミドと共に用いて、形質転換株を作製した。本構築株の HPLC によるカロテノ

イド組成分析の結果、カロテノイド C・カロテノイド B の生産は、確認できなかった。以上の結果から、CCS タンパク質の発現によるカロテノイド C・カロテノイド B 生産酵母株の構築は、CCS タンパク質の酵母細胞内での発現はできているものの、主反応であるアンテラキサンチン・ビオラキサンチンからカロテノイド C・カロテノイド B への触媒反応が困難であることが示唆された。

CCS 酵素がリコペン β -シクラーゼおよびカロテノイド C/カロテノイド B シンターゼとしての二重の活性を持つことが、現象を複雑にしていると考えられた。そこで、各遺伝子発現量の組み合わせの実験を行い、特に高い発現レベルの CCS 遺伝子と、7 つの上流のカロテノイド生成遺伝子を調節することによって副産物を最小化することが大腸菌でのカロテノイド C 形成に重要であることを見出した。その結果、大腸菌でカロテノイド C を検出・同定することに世界で初めて成功した。特許出願済み（特願 2020-188462）。カロテノイド C はカロテノイド B の前駆体であり、さらなる発展が期待される。

ii. 生産性検証(ラボ機、実機)：構築、改良された組換え大腸菌、酵母のカロテノイド生産性をミニジャーあるいは大型発酵槽を用いて検証する。(2016-20、江崎グリコ、産総研)

中間産物であるビオラキサンチンの大腸菌での生産について、ミニジャー(3L)を用いて培養条件を検討した。大腸菌 JM109 株に pAHP-Zea および pUC18-CaZEP を導入した組換え大腸菌ビオラキサンチン合成株を用いた。2xYT 培地 2.0L を調製し、培地の pH および溶存酸素濃度を経時的に測定しながら条件①200rpm・通気無し、条件②200rpm・通気あり、条件③400rpm・通気あり、の3条件で25℃で培養した。その結果、①と②は大腸菌の対数増殖期以降に溶存酸素が枯渇した環境となり、③では一定の溶存酸素濃度を維持した環境となった。pH に大きな違いは見られなかった。培養開始後40時間後および63時間後にサンプリングを行い、大腸菌からカロテノイドを抽出し、HPLC を用いてカロテノイド組成を調べた結果、溶存酸素濃度の高い③の条件でビオラキサンチンが多く合成されることが確認された(図 3.2.3.3-6-6)。この結果は、アンテラキサンチンおよびビオラキサンチン合成反応において、エポキシド形成のために酸素が必要であることが関連していると思われる。

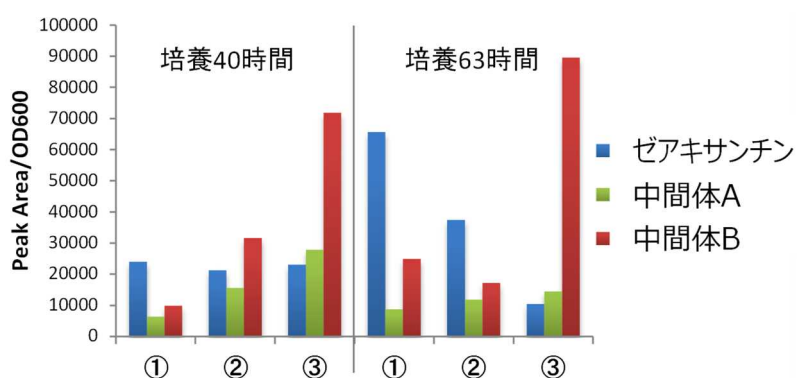


図 3.2.3.3-6-6 培養条件によるカロテノイド組成の変化

③ カロテノイド D、カロテノイド E 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証

i. 機械学習情報解析技術、系統樹解析による候補遺伝子の選抜 (2019-21、京都大学、江崎グリコ、産総研)

β -carotene hydroxylase (bCH) および CrtR を NCBI blast+ に供し、得られた酵素群を学習・テストデータとして、深層学習により LSTM および CNN オートエンコーダ (AE) モデルを作成した。目的物質の高産生な酵素の特徴を有しつつ、より広範な候補を探索・選抜するために、作成したモデルの中間層に注目した。モデルの中間層には学習により得られた酵素配列の重要な特徴が抽出・圧縮されていると考えられるためである。中間層のスコアを参照し、実験的に目的物質が高産生であった酵素配列や Citrus 属酵素の配列のスコア分布と合致する特徴を持つテスト酵素配列を生物種やアミノ酸配列相同性を加味して選別し、実験によりその一部の活性を検証した。実験により得られた結果は、学習データに反映し、モデル作成、解析・候補予測、検証実験、再学習と DBTL サイクルを繰り返した。なお、これまでに計 6 回の提案・検証実験を実施した。主な学習・解析条件を下表に示した (表 3.2.3.3-6-1)。

1 回目から 3 回目までは学習方法に LSTM を用い、前の回までの検証実験結果を学習データに追加しつつ、候補を探索・選抜した。4 回目は CNN と LSTM と異なる 2 つの学習方法でそれぞれモデルを作成し、より広範な範囲での候補酵素探索のためにアノテーションが不明な uncharacterized protein より候補配列を選抜した。5 回目、6 回目は学習方法に CNN を用い、前の回までの検証実験結果を学習データに追加しつつ、候補を探索した。

表 3.2.3.3-6-1 酵素予測のための学習・解析条件

周回数	query	blast data	学習、テスト酵素数	最大 AA 配列長	AE モデル	中間層数	参照配列
1	bCH	refseq	4718	330	LSTM	100	Citrus 属
2	bCH	refseq	2647	400	LSTM	200	実験高産生
3	bCH	refseq	2647	400	LSTM	200	実験高産生
4	bCH	uncharacterized	4761	400	CNN、 LSTM	200	実験高産生
5	CrtR	refseq	2647	720	CNN	240	実験高産生
6	bCH	refseq	2647	400	CNN	140	実験高産生

ii. 微生物の構築、解析、改良 (2019-21、江崎グリコ、産総研、石川県立大)

1) カロテノイド D 生産大腸菌株の構築

カロテノイド D は分子の両端の β 環の一方に水酸基が付加された構造をもち、両端の β 環の両方に水酸基が付加されるとゼアキササンチンとなる。この反応を触媒する酵素は CrtZ (微生物) もしくは β -carotene hydroxylase (β CH、植物) と呼ばれ、両端の β 環に作用する。そのため、中間産物であるカロテノイド D までで反応を止めるのは難しいと考えられてきた。カロテノイド D 合成株を構築するため、リコペン合成株 (石川県立大学にて構築) に *lycopene β -cyclase* 遺伝子および β CH 遺伝子を導入した。温州ミカン (*Citrus unshiu*) で多くのカロテノイド D を蓄積することが分かっていることから、*C. unshiu* 由来 β CH 遺伝子を用いた。 β CH と同じ反応を触媒する細菌由来の CrtZ をコードする遺伝子を導入した場合と比較して、ゼアキササンチンの生成量が抑えられることが分かったが、ゼアキササンチンの蓄積を完全に抑えることはできていない。

そのため、カロテノイド D の合成に最適な遺伝子の予測をドライチームに依頼し (③-i)、候補遺伝子の検証を行った。

候補遺伝子を人工遺伝子合成し、大腸菌に実装してカロテノイド蓄積量と組成を調べ、その結果をもとに、ドライチームに再解析していただいた。DBTL6 サイクルで、合成 204 遺伝子について in vivo で評価した。その結果、コントロールとして用いた *C. unshiu* 由来 β CH 遺伝子よりもカロテノイド D 量が多く、カロテノイド全体に占める比率も高い遺伝子が複数見つかった。特に *Bixa orellana*、*Tareraya hassleriana* 由来遺伝子の評価が高かった (図 3.2.3.3-6-7)。植物由来のこれら遺伝子には通常 N 末端に色素体移行シグナルが付与されている。大腸菌での遺伝子発現には不要と考え、N 末端のシグナル配列を ChloroP を用いて予測・除去した結果、カロテノイド D 合成量はさらに増加した (4.84 mg/L)。また、並行して、石川県大で取り組んできたエチルアセト酢酸 (EAA) を基質とするメバロン酸 (Mev) 経路酵素群、アセト酢酸 CoA リガーゼ、およびパラニトロベンジルエステラーゼ等をコードする一連の遺伝子を実験室に導入し、EAA からテルペンの構成単位となるイソペンテニルニリン酸 (IPP) を合成する経路を新たに付与することによっても、総カロテノイド合成量の増加を確認している。

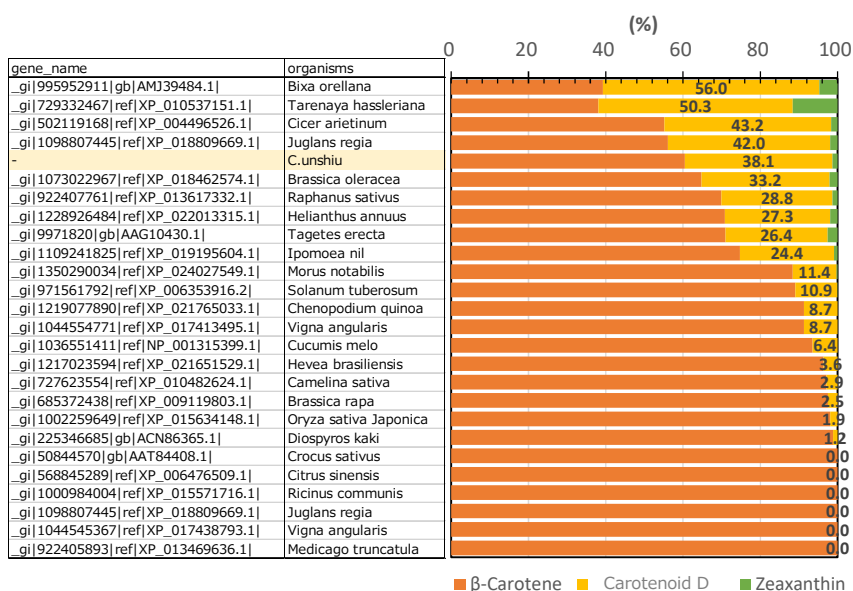


図 3.2.3.3-6-7 培養条件によるカロテノイド組成の変化

2) カロテノイド D 生産酵母株の構築

前述の出芽酵母における研究結果において、カロテノイド D は、ゼアキササンチン生合成遺伝子セット (XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB/PaCrtZ) を用いることで、中間代謝産物 (ゼアキササンチンの前駆体) として生産が可能であることがわかった。しかしながら、PaCrtZ 遺伝子を用いた場合、ゼアキササンチン含量が比較的高く、その前駆体であるカロテノイド D の含量が低いことも明らかになった。そのため、PaCrtZ に代わる酵素として、温州ミカン由来 β -カロテン水酸化酵素 (以後、CuCHX2 と記載) を利用することで、カロテノイド D の含量の改善を試みた。

CuCHX2 遺伝子、および改変型 CuCHX2 遺伝子を用いた発現プラスミドを構築し、 β -カロテン生合成遺伝子セット (XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB) を含む発現プラスミドを合わせて YPH500 株に導入した株を構築した。これらの構築株の HPLC によるカロテノイド組成分析の結果、PaCrtZ 遺伝子を用いた場合と比較して、CuCHX2 遺伝子を用いることで、ゼアキササンチン含量を低下させること

ができ、また、改変型 CuCHX2 遺伝子を用いることで、ゼアキサンチン含量の増加は伴うが、カロテノイド D の含量をある程度増加させることにも成功した (図 3.2.3.3-6-8)。また、これらの遺伝子セットを、メバロン酸経路を強化した宿主酵母株のゲノムに導入したカロテノイド D 生産酵母株を構築した (図 3.2.3.3-6-8)。

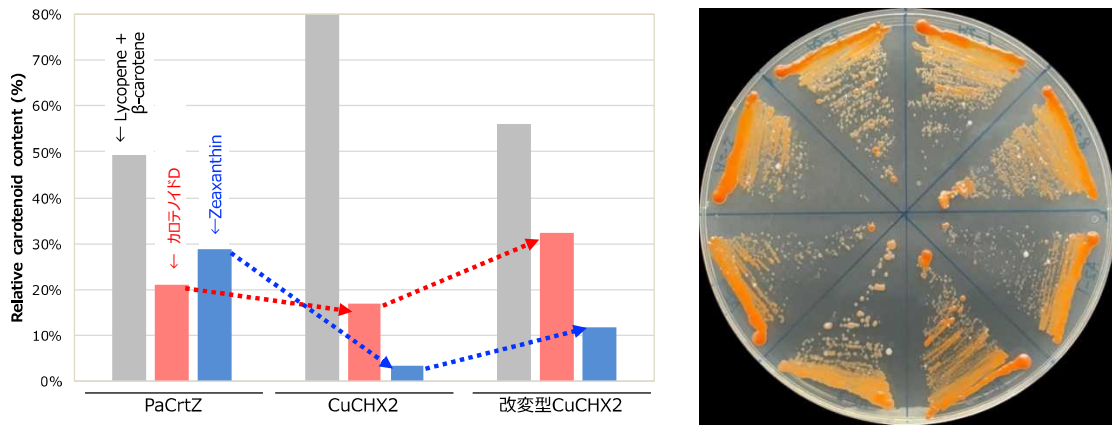


図 3.2.3.3-6-8. カロテノイド D 生産酵母株の改良 (左図) および構築したカロテノイド D 生産酵母株 (ゲノム導入株、右図)

次に、ドライ解析技術によって選抜された各種 β -CH 遺伝子について、酵母における検証を行った。 β -カロテン生合成遺伝子 (*XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB*) を導入した β -カロテン生産実験室酵母株を宿主として用いて、選抜された 113 種類の β -CH 遺伝子について、出芽酵母にコドン使用頻度等で最適化した人工遺伝子を合成し、それらを導入した各種カロテノイド D 生産酵母株を作製した。各酵母株の培養 (SC 培地、26°C) を行い、カロテノイド D の生産性の評価を行った。本スクリーニングの結果、温州ミカン由来 β -CH 遺伝子 (*CuBCH*) を用いた株と比較して、カロテノイド D の生産性が改善された多数の遺伝子を同定することができた。特に、トウモロコシ由来 β -CH 遺伝子 (222_*ZemaBCH* および 224r_*ZemaBCH*) および *Panicum hallii* (イネ科植物) 由来 β -CH 遺伝子 (223_*PahaBCH*) を導入した株において、温州ミカン由来遺伝子を導入した株よりも、カロテノイド D の生産性で約 4 倍、含有率では約 2 倍に改善されることが示された (図 3.2.3.3-6-9)。

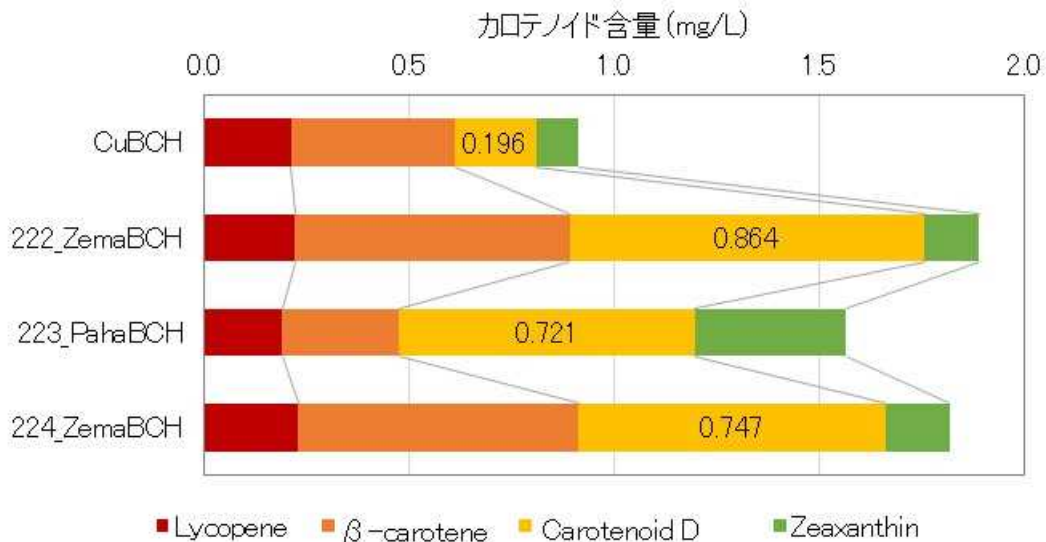


図 3.2.3.3-6-9 ドライ解析によって選抜された各種遺伝子の検証結果（一部）

3) カロテノイド E 生産大腸菌株の構築

本研究開発の実施までに我々は、リコペン生産大腸菌にゼニゴケ由来の *LCYb*、*LCYe* 遺伝子、ならびにゼニゴケ由来の *BHY*、*CYP97C* 遺伝子を導入し、微量のカロテノイド E を生産する大腸菌を構築していた（石川県立大学はカロテノイド E 合成のための本製法を特許化済み；特許第 5965932 号）。また、大腸菌にパスウェイエンジニアリングを施すことで、3 円/g と安価なアセト酢酸エチルエステル（EAA）を基質としてテルペン類を合成する取り組みを行ってきた。すなわち、メバロン酸（Mev）経路酵素群、アセト酢酸 CoA リガーゼ（*Aac1*）、およびパラニトロベンジルエステラーゼ（*PnbA*）等をコードする一連の遺伝子は大腸菌に導入し、EAA からテルペンの構成単位となるイソペンテニルニリン酸（IPP）を合成する経路を新たに付与することに成功していた（特許第 6399315 号）。

本研究開発では、上記の先行技術をもとに、①カロテノイド E 生産プラスミドの再構築と②上流経路の強化、の二つをメインに行った。ファルネシルニリン酸（FPP）までの上流経路を図 3.2.3.3-6-10 に、FPP からカロテノイド E までの生合成経路を図 3.2.3.3-6-11 に示した。まず初めに用いたプラスミドは以下の 4 種、すなわち 1) pAC-Mev/*Aac1*/*pnbA*、2) pRK-HIEBI、3) pET-Mp*LCYb*/Mp*LCYe*、4) pRSF-Mp*CYP97C*/Mp*BHY* である。1) は EAA から Mev 経路経由で IPP を合成、2) は IPP からジメチルアリルニリン酸（DMAPP）の合成と、FPP からリコペンを合成、3) はリコペンから α -カロテン、4) は α -カロテンからカロテノイド E を合成するそれぞれの酵素遺伝子を有する。これらのプラスミドを導入した大腸菌 JM101 (DE3) および BL21 (DE3) を用いて培養条件の検討を行った結果、JM101 (DE3) 株をフルクトース入り培地で培養した時、カロテノイド生産性が高く、大腸菌生重量に対する全カロテノイド生産量は 13.2 $\mu\text{g/g}$ FW、培地 1 L 当たりでは 3.2 mg/L、カロテノイド E の生産量は 0.74 $\mu\text{g/g}$ FW、0.18 mg/L となった。

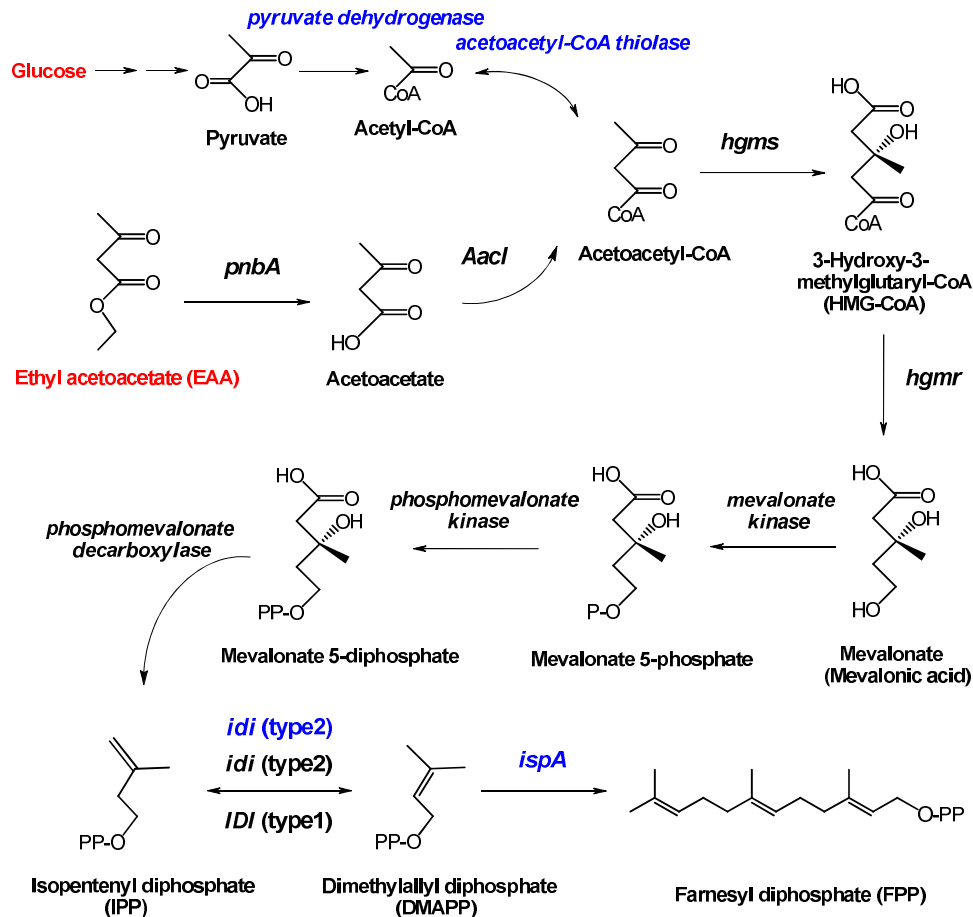


図 3.2.3.3-6-10 上流の生合成経路（黒字は導入した遺伝子、青字は大腸菌が元々持っている遺伝子である。なお、*ispA* 遺伝子は大腸菌で恒常的に発現している。）

飛躍的なカロテノイド E の生産性向上を達成するため、さらに、①カロテノイド E 生産プラスミドの再構築を行うこととした（図 3.2.3.3-6-11）。まず、リコペンからカロテノイド E を合成する際に働く 4 つの酵素のバランスが重要であることが予想されたため、上記 2) 3) 4) のプラスミドを 2) pRK-HIEBI-MpLCYb-MpLCYe-Z、3) CDF-MpCYP97C-MpLCYe に変更した。次に、それぞれの遺伝子の評価を行うために、ゼニゴケ以外の生物由来の遺伝子の使用やコドン最適化などを行った。その結果、LCYb には葉緑体移行シグナルを除いたゼニゴケ由来の MpLCYb Δ TP が、LCYe には大腸菌のコドン使用頻度に最適化したゼニゴケ由来の MpLCYe が、CYP97C には大腸菌のコドン使用頻度に最適化したゼニゴケ由来の MpCYP97C が、カロテノイド E 生産に適していることが明らかとなった。また、MpLCYe は MpLCYb と比較して活性が低いため、重複してプラスミドに入れることで、MpLCYb との活性バランスをとることに成功した（図 3.2.3.3-6-12）。

次に、②上流経路の強化を行うために、これまで用いてきたメバロン酸経路含有プラスミドに含まれる初発の *AacI*、*pnbA* 遺伝子、及び上流経路の鍵遺伝子である IPP イソメラーゼ (*IDI*) 遺伝子 (*Haematococcus* 由来、type 1) を大腸菌ゲノムに挿入し、安定的にメバロン酸経路を機能させることを試みた。これにより、カロテノイド増産に適した大腸菌基本宿主株 JM101 (DE3) Δ (*manXYZ*) [*IDI*] Δ (*yjFP*) [*AacI-pnbA*] を構築した。

最後に、①カロテノイド E 生産プラスミドの再構築と②上流経路の強化を組み合わせて、カロテノイド E 実用生産用大腸菌系統株 JM101 (DE3) Δ (*manXYZ*) [*IDI*] Δ (*yjfP*) [*AacI-pnbA*] (pRK-HIEBI-MpLCYb Δ TP-MpLCYe-Z-E_{Pg} + pAC-Mev/Scidi/AacI/pnbA + CDF-MpCYP97C-MpLCYe) 等を構築した。これら大腸菌系統株を用いた場合、三角フラスコレベルでの最も高いカロテノイド E 生産性は 3.5 mg/L であり、当初の 10 倍以上に生産性を向上させることができた (図 3.2.3.3-6-13)。

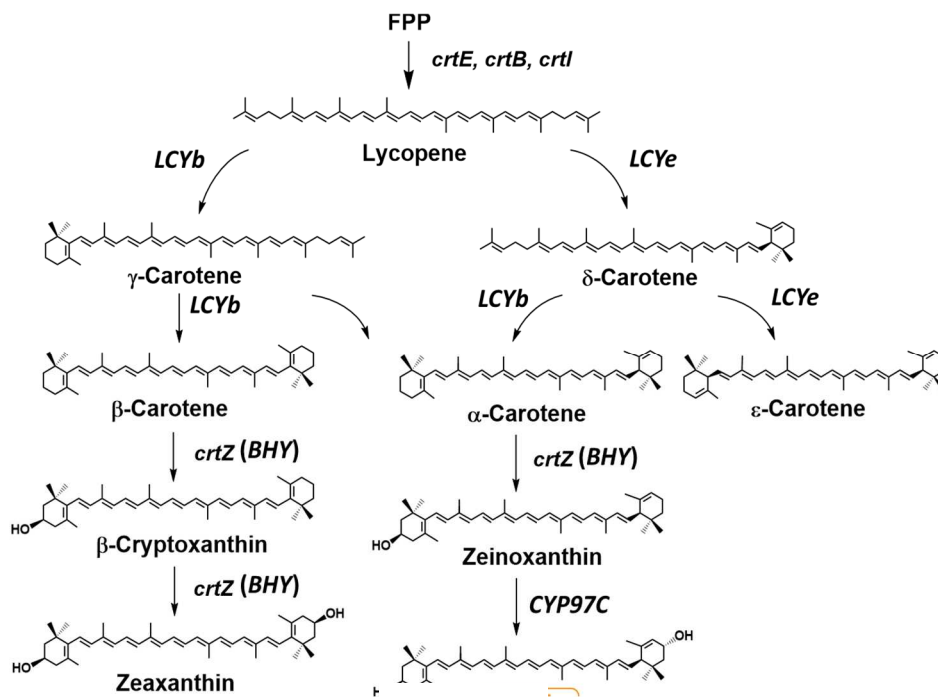


図 3.2.3.3-6-11 カロテノイド合成経路と導入した遺伝子

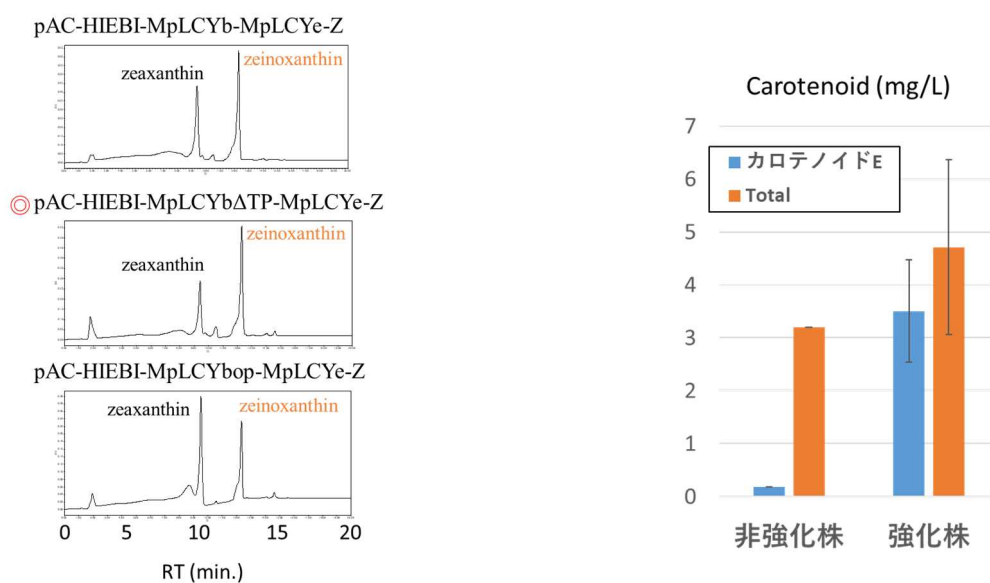


図 3.2.3.3-6-12 カロテノイド E 生合成に適した LCYb の選定 強化の効果

図 3.2.3.3-6-13 上流経路

4) カロテノイド E 生産酵母株の構築

カロテノイド E の酵母での生産は報告がほとんどなく、未だ実現されていない。本実験におけるカロテノイド E 生産酵母株の構築は、リコペン生合成遺伝子セット (XdCrtE/XdCrtI/PaCrtB)、およびリコペンからカロテノイド E に至る生合成経路は、ゼニゴケ由来の遺伝子群を用いることで、カロテノイド E 生産酵母株の構築を進め、幾つかの構築株についてその生産について評価を行った。本酵母株のカロテノイド E の生産について HPLC による分析を行った結果、極微量ではあるがカロテノイド E と思われるピークが検出され、カロテノイド E の生合成に関わるゼニゴケ由来酵素が、大腸菌同様、酵母細胞においても機能する可能性が示唆された。

iii. ラボ機での生産性検証：構築、改良された組換え大腸菌、酵母のカロテノイド生産性をミニジャー等を用いて検証する。(2019-21、江崎グリコ、産総研、石川県立大)

1) 大腸菌における生産性検証

3L容のジャーフェンターを用いて ii. で構築された大腸菌株のカロテノイド D およびカロテノイド E の生産性を確認した。

カロテノイド D 合成のための検討株として、これまでの検討で最も生産性の高かった株 pUC-BoBCH + pAC-Mev-Scidi-Aacl-pnbA + pRK-HIEBIY /BL21(DE3)を用いた (BoBCH 遺伝子はドライ解析の結果が最も良かった遺伝子)。各抗生物質及び EAA を含む TB 培地にグルコースを経時的に添加 (0.4 mg/L/hr) する流加培養で条件検討を行った。25°C、pH 7.0 で培養を行い、0.1 mM IPTG で誘導を行った。12 時間ごとにサンプリングし、カロテノイド組成および含量を UPLC を用いて行い、最大で 20.1 mg/L のカロテノイド D 生産性を示した (図 3.2.3.3-6-15)。

カロテノイド E 株については、JM101 (DE3) Δ (*manXYZ*) [*IDI*] Δ (*yjfP*) [*Aacl-pnbA*] (pRK-HIEBI-MpLCYb Δ TP-MpLCYe-Z-E_{Pg} + pAC-Mev/Scidi/Aacl/pnbA + CDF-MpCYP97C-MpLCYe) を用いた。各抗生物質及び EAA を含む TB 培地にグルコースを経時的に添加 (0.4 mg/L/hr) する流加培養で条件検討を行った。25°C、pH 7.0 で培養を行い、0.1 mM IPTG で誘導を行った。カロテノイド E 合成のキー酵素である CYP97C の活性を促進するため 0.5 mM FeCl₃ を培地に添加した。最大で 11.0 mg/L の生産性を示した (図 3.2.3.3-6-14)。

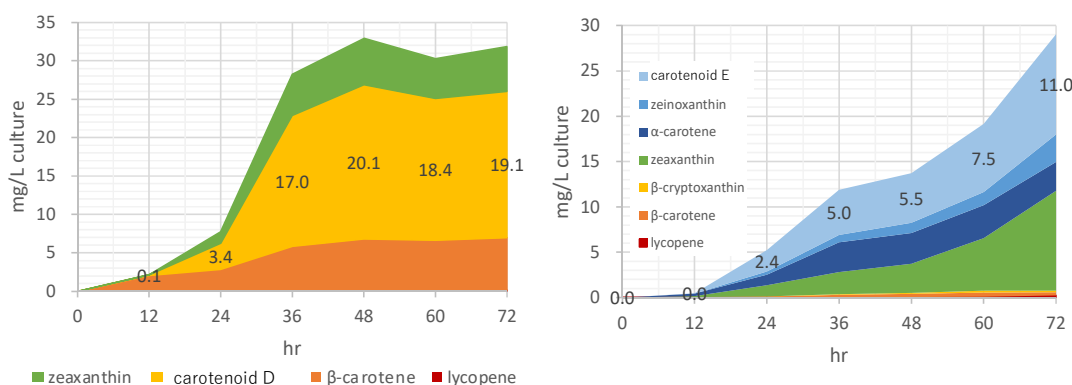


図 3.2.3.3-6-14 ジャーフェンターにおける生産条件の最適化

2) 酵母における生産性検証

酵母におけるカロテノイド D の生産性検証のため、実験室酵母を用いた検証実験等から得られた各種有用遺伝子情報に基づき、細胞増殖能等に優れた実用酵母株を宿主として用いてカロテノイド D 生産実用酵母株の構築を行った。実用酵母株に、 β -カロテン生合成遺伝子 (*XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB*)、メバロン酸経路の強化に関わる遺伝子 (*tHMG1*)、酢酸の細胞外排出抑制に関わる遺伝子欠損 (Δ YPL062*W*)、およびドライ解析技術によって選抜されたカロテノイド D 生合成遺伝子の検証実験によって同定された遺伝子 (222_ZemaBCH、223_PahaBCH、または 224r_ZemaBCH) を実装した株を構築した (図 3.2.3.3-6-15 左図)。これらの株を用いて、高密度培養条件 (YPD 培地、26°C) における培養を行い、各株におけるカロテノイド D の生産性の評価を行った。評価の結果、構築した実用酵母株は、高密度培養により総カロテノイド量 (リコペン、 β -カロテン、カロテノイド D およびゼアキサンチン) は最大 73.3 mg/L まで増加し、そのうちカロテノイド D の生産性は最大で 14.7 mg/L を示した (図 3.2.3.3-6-15 右図)。

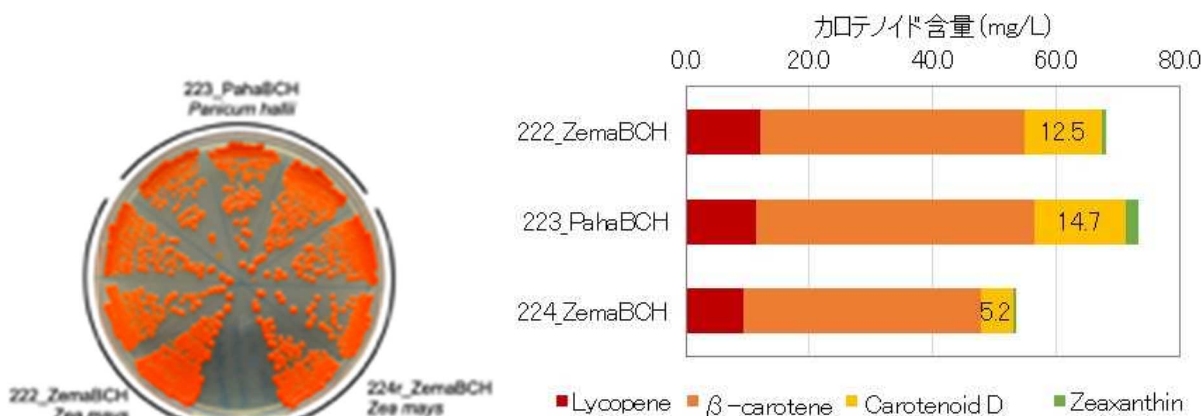


図 3.2.3.3-6-15 カロテノイド D 生産実用酵母株 (左図) および構築した各種カロテノイド D 生産実用酵母株におけるカロテノイド生産性 (右図)

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	0	0	0	0	0
2018	0	1	2	0	0	0	0
2019	1	0	1	0	0	0	0
2020	1	0	0	0	0	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	0	0	0
2019	1	0	0
2020	1	0	1

課題名：C(3)-7 ω -3 系多価不飽和脂肪酸含有油脂の生産性向上による有効性検証

担当機関：新潟薬科大学、不二製油グループ本社、長岡技術科学大学、産業技術総合研究所、大阪大学、理化学研究所、京都大学、九州大学

(1) 背景と目的

多価不飽和脂肪酸の ω -3系及び ω -6系脂肪酸は、人間の生体内では合成できないため、必須脂肪酸として知られている。 ω -6系脂肪酸は成長、生殖生理を保つのに必須であり、 ω -3系脂肪酸は、脳・網膜の働きを保つのに必須である。 ω -6系脂肪酸は様々な食材に多く含まれているが、 ω -3系脂肪酸を多く含む食材は一部の植物油や魚油に限られるため、意識して摂取しなければ、 ω -6/ ω -3が上昇して生体内の必須脂肪酸バランスが崩れる。また、 ω -3系脂肪酸の α -リノレン酸は、人体内で動脈硬化予防効果を有するエイコサペンタエン酸(EPA)や認知症予防効果を有するドコサヘキサエン酸(DHA)へ変換されることもあり、世界各国で摂取目安量が決められ、積極的に摂取することが求められている(図 3.2.3.3-7-1)。 ω -3系脂肪酸の世界市場としては189億ドル/年、毎年14%で市場が伸長しており、新興国を中心に更なる需要が期待できる。その一方で ω -3系脂肪酸の原料である魚油は、乱獲により供給量が減少続けており、需要を賄うだけの供給量を将来確保できない可能性がある。海外では、微細藻類(従属栄養)による商業生産が行われ始めているが、生産効率が悪く、価格が魚油由来に比べ数倍と割高であり、市場に十分供給できるものではない。このような状況を考慮して、本研究では、油脂酵母による ω -3系脂肪酸含有油脂の高生産技術開発を行う。油脂酵母は、細胞内に脂肪球という形で油脂を高蓄積できる酵母で、その中には乾燥菌体重量の60%以上も細胞内に油脂を蓄積する酵母も存在し、他の油糧微生物と比較してもその油脂蓄積能は高い。本研究では、乾燥菌体重量の70%以上の油脂蓄積能をもつ*Lipomyces starkeyi*を中心に開発を進める。実用化、事業化へ向けての課題として、①油脂生産性の向上(油質量、対糖収率)、②脂肪酸組成の改変(ω -3系脂肪酸含有率)があげられる。油脂生産性向上においては、油脂蓄積変異株を取得し、オミクス解析を行うことで得られるデータを活用した「発現制御ネットワーク技術」の有効性を検証しながら、油脂生産性向上に寄与する遺伝子の同定及び活用を目指す。脂肪酸組成の改変においては、「文献等からの知識抽出・学習技術」の有効性を検証しながら、 ω -3系脂肪酸の α -リノレン酸からEPAへの合成経路を構築し、EPA等の ω -3系脂肪酸の含有率を向上させる酵素選択、改変を行う。

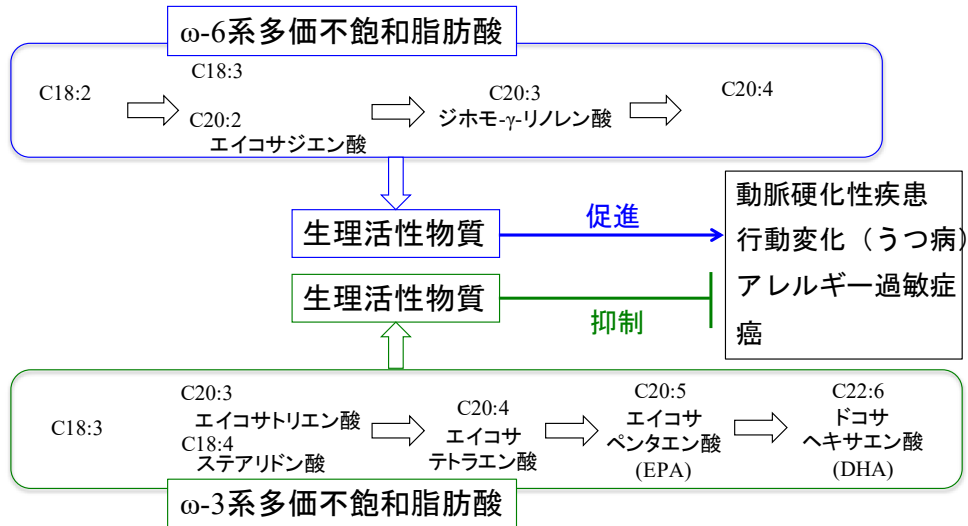


図 3.2.3.3-7-1 ω-3 系及びω-6 系多価不飽和脂肪酸の種類とその機能

(2) 位置づけ、目標値

対象市場・製品

対象市場の ω-3 油脂市場において、酵母由来の ω-3 油脂は、魚油の代わりに伸長していく微細藻類油の代替(1st Step)を目指す。次に魚油代替(2nd Step)を目指す。さらに生臭さのないイースト ω-3 油脂としてのブランド製品を目指す。

競合技術との対比

現在の ω-3 油脂市場を形成している魚油と同等以上の ω-3 油含有率が目標となる。微細藻類油は、生産効率が悪く、コスト高である。現状、魚油の 3 倍以上の価格であり、対糖油脂収率向上、生育効率向上、培地コスト削減等で優位性を確立する。

最終目標値 (2020 年度)

研究開発項目		最終目標値 (2020 年度末)
油脂生産性の向上	油脂生産性	75g/L/5days
	対糖油脂収率	20%
油脂の脂肪酸組成改変	ω-3 系多価不飽和脂肪酸生産性	22.5g/L/5 days (油脂生産性 75g/L/5days の場合、ω-3 系多価不飽和脂肪酸含有率 30%)

(3) 全体計画

H28年度	H29年度	H30年度	H31年度	H32年度
			【課題①】油脂酵母における ω -3系多価不飽和脂肪酸高含有油脂の蓄積性の向上	
			i 油脂酵母におけるEPA合成に関与する最適な伸長酵素、不飽和化酵素の選択とEPA生産性の検証 (不二製油、新潟薬大、長岡技大、産総研、京大)	
			ii ω -3系多価不飽和脂肪酸高含有油脂の蓄積性の改善 (不二製油、新潟薬大、長岡技大、産総研、九大)	
			【課題②】油脂生産性の向上	
			i 遺伝子発現データからの増殖因子および油脂生産制御因子の推定と活用 (新潟薬大、産総研、九大)	
			ii フラックスバランス解析による油脂合成経路の強化 (新潟薬大、産総研、理研、阪大)	
			【課題③】遺伝子発現-代謝経路統合ネットワークモデルの構築	
			発現制御ネットワークの構築とその有効性検証 (新潟薬大、産総研)	

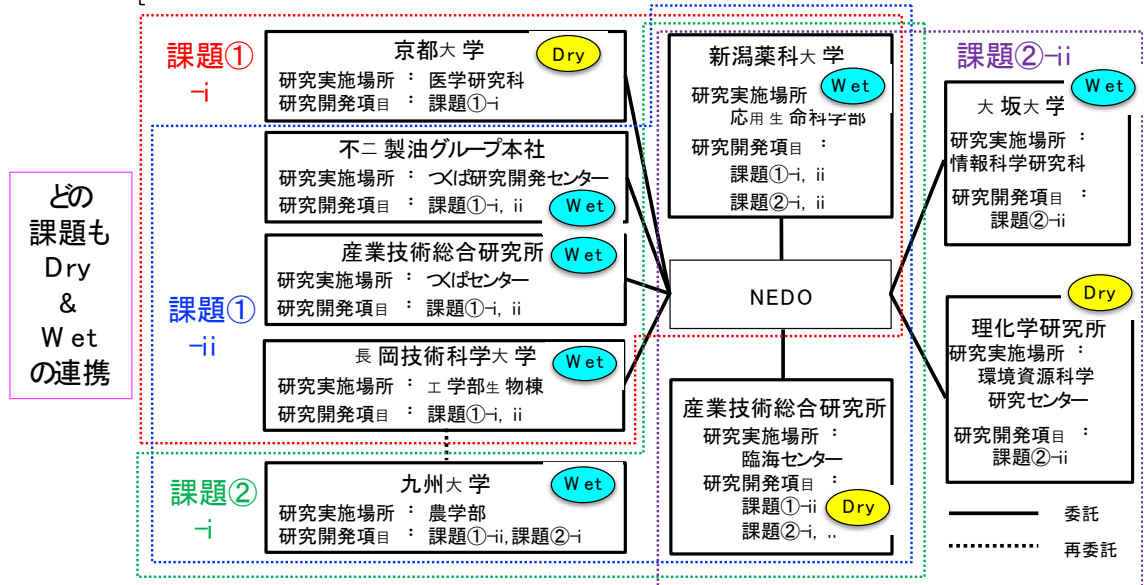
(4) 実施体制

【課題①】 油脂酵母における ω -3系多価不飽和脂肪酸高含有油脂の蓄積性の向上

- i. ω -3系多価不飽和脂肪酸高生産に向けた最適な伸長、不飽和化酵素の選択
- ii. ω -3系多価不飽和脂肪酸高含有油脂の蓄積性の改善

【課題②】 油脂酵母の油脂生産性の向上

- i. 遺伝子発現データからの増殖因子および油脂生産制御因子の推定
- ii. フラックスバランス解析による油脂合成経路の強化



(5) 運営管理

- (5).1 テーマ全体会議・・・本テーマ全参画機関（新潟薬大、不二製油、長岡技大、産総研、神戸大、九大、みずほ総研、三菱総研、大阪大、京都大、理研）、NEDO、PL が参加し、2016-20 年度まで半年に 1 回以上の開催。
- (5).2 Wet 会議・・・本テーマの油脂蓄積変異株取得と解析、オミクス解析、油脂生産性向上、脂肪酸改変等に関する Wet 研究者の会議。2016-20 年度まで年間 6 回以上開催。
- (5).3 Dry 会議・・・産総研、神戸大、京都大、みずほ、三菱総研の Dry 研究者と新潟薬大、産総研、長岡技科大の Wet 研究者の Dry 解析技術の油脂酵母を利用した有効性検証に関する会議。2016-20 年度まで年間 6 回以上開催。

以上のようにテーマ関連の会議を毎月実施し、綿密に情報共有を行った。また、Wet 実験で得られたオミクスデータは情報共有システムにアップロードし、データベース構築への寄与も行った。

(6) 実施の効果

2030 年度には ω -3 系多価不飽和脂肪酸市場は現状の 2~3 倍に拡大していることが予測され、事業化目標品質である ω -3 系多価不飽和脂肪酸含有率を達成し、 ω -3 系多価不飽和脂肪酸含有油脂を生産する。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目		最終目標値 (2020 年度末)	達成度
油脂生産性の向上	油脂生産性	75g/L/5days	「発現制御ネットワーク構築技術」等の情報科学技術を活用し、3 種類の油脂生産制御因子を獲得し、情報科学技術の有効性が示された。そのうち 1 つの変異型油脂生産制御因子をコードする遺伝子高発現株で油脂生産性は目標値を達成。 ○
	対糖油脂収率	20%	「代謝経路設計技術」を活用して、提案された経路の改変と変異型油脂生産制御因子をコードする遺伝子高発現株を組み合わせることにより、目標値を達成した。また、情報科学技術の有効性が示された。 ◎
油脂の脂	ω -3 系多価	22.5g/L/5 days	「文献等からの知識抽出・学習技術」を活用

脂肪酸組成 改変	不飽和脂肪酸 生産性	(油脂生産性 75g/L/5days の 場合、 ω -3系多 価不飽和脂肪酸 含有率 30%)	し、 ω -3系脂肪酸の α -リノレン(ALA)酸以外 ω -3系脂肪酸の合成に成功した。EPAを 17.9%含有する油脂を生産できる菌株を開発し た。さらに ω -3系多価不飽和脂肪酸含有率 31.1%の油脂の発酵生産に成功し、その ω -3系 多価不飽和脂肪酸量は目標値を達成し、情報科 学技術の有効性が示された。 ○
-------------	---------------	---	--

(8) 研究開発の成果と意義

(8).1 油脂生産性の向上

(8).1.1 油脂蓄積変異株の取得

効率的な油脂蓄積変異株取得法 (Percoll 密度勾配遠心分離法) を利用して、油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 油脂超高蓄積変異株 96 株、油脂高蓄積変異株 27 株、油脂低蓄積変異株 46 株を取得、さらに油脂酵母 *Rhodospiridium toruloides* 油脂高蓄積変異株 8 株、油脂低蓄積変異株 3 株を取得し、合計 180 株の油脂蓄積変異株を取得した。

(8).1.2 油脂蓄積変異株の解析

上記獲得油脂蓄積変異株 180 株のうち、*L. starkeyi* 野生株、油脂超高蓄積変異株 E15-11、E15-15、E15-25、*L. starkeyi* 油脂高蓄積変異株 E15、E47、A42、K13、K14、*L. starkeyi* 油脂低蓄積変異株 m45、m47、sr5、sr17、sr22 の合計 14 株においては、経時的 (day0-7) に細胞数、濁度、平均粒子径、乾燥菌体重量、油脂(TAG)量、糖消費量を測定後、細胞あたりの油脂量、培地あたりの油脂量、対糖油脂収率、油脂含有率を算出し、それぞれの油脂蓄積変異株の油脂生産性を詳細に評価した (表 3.2.3.3-7-1)。このように油脂生産性がそれぞれ大きく異なる油脂蓄積変異株 14 株の詳細な表現型データを取得し、情報解析システムの有効性を検証するためのオミクス解析を実施した。

表 3.2.3.3-7-1 野生株と油脂蓄積変異株の油脂生産性

株の種類	株名	細胞あたりの油脂量 (野生株比)
野生株	CBS1807	1.0 倍
超高蓄積変異株	E15-11、 E15-15、 E15-25	4.6、 5.0、 7.1 倍
高蓄積変異株	E15、 E47、 A42、 K13、 K14	2.0、 1.4、 1.5、 1.9、 2.3 倍
低蓄積変異株	m45、 m47、 sr5、 sr17、 sr22	0.5、 0.6、 0.4、 0.4、 0.2 倍

(8).1.3 油脂蓄積変異株のメタボローム解析 ((1)-6 高精度メタボローム解析技術と連携)

L. starkeyi CBS1807 株 (WT)、高蓄積変異株 E15、K14 の経時的な培養を実施し、図 3.2.3.3-7-2 に示す解糖系、ペントースリン酸系、TCA 回路、アシル CoA 合成系の代謝産物 (赤字) のメ

タボローム解析を行った。TCA サイクルで生じたクエン酸はミトコンドリアから細胞質に放出され、一般的な微生物には存在せず、油脂酵母や哺乳類特有の酵素である ATP クエン酸シンターゼ (ACL1、 2) によりオキサロ酢酸とアセチル CoA に変換される。アシル CoA 合成系では、主にクエン酸から生じたアセチル CoA がアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC1) によりマロニル CoA に変換される。その後、脂肪酸合成酵素複合体により炭素数が 16 又は 18 の飽和脂肪酸が合成され、アシル CoA が生じる。野生株と油脂高蓄積変異株の代謝産物比較の結果、野生株と比較して油脂高蓄積変異株のアシル CoA 合成経路における細胞あたりのクエン酸量は低下し、アセチル CoA、マロニル CoA 量は増加していた。また、リアルタイム PCR による発現解析の結果も油脂高蓄積変異株において、アシル CoA 合成経路に関与する遺伝子が野生株と比較して高発現していたことから油脂生産性の向上とアシル CoA 合成経路の活性化の関係が明らかとなった。さらに、油脂高蓄積変異株のペントースリン酸経路は野生株と比較して活性化されており、脂肪酸の合成に必要な NADPH の供給は、ペントースリン酸経路が主要となっていることが示唆された。そこで油脂酵母野生株に上記遺伝子 *ACL1*、 *ACL2*、 *ACC1* を導入し、高発現させたところ、それぞれの遺伝子の高発現株において油脂生産性が向上し、特に 3 遺伝子同時高発現株は、野生株の約 1.9 倍の油脂生産性を示した。すなわち、油脂生産性向上に関与する 3 種類の遺伝子の同定に至った。

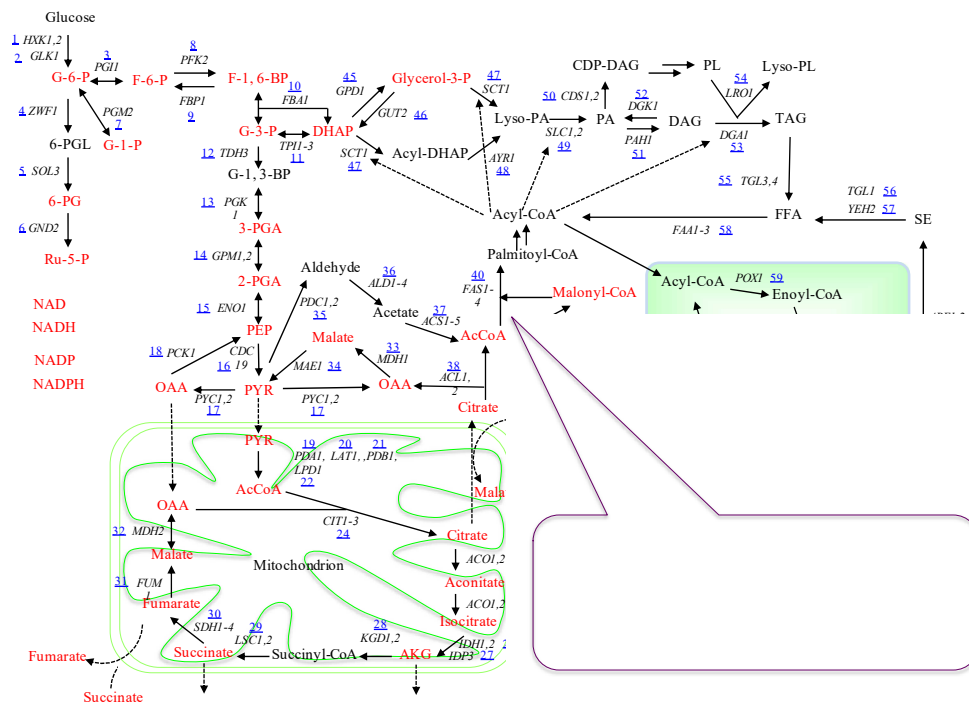


図 3.2.3.3-7-2 油脂酵母の油脂合成・分解経路の代謝マップ

(8). 1. 4 油脂生産制御因子の取得 ((2)-3 発現制御ネットワーク構築技術と連携)

油脂生産制御ネットワークは、本研究室で取得した油脂高蓄積変異株、油脂超高蓄積変異株、油脂低蓄積変異株のトランスクリプトームデータ (発現データ) を利用して構築された。各株経時的な発現データの合計 152 points のデータを基に油脂量の増減と遺伝子発現量の相関性が高い遺伝子を選択した。Bayesian Network を活用してネットワークの初期モデル化後、さらに構造方程式モデルによるモデルの最適化し、最適化モデルから制御因子の推定を行った。9 種類の推定油脂生産制御因子の油脂生産性への関与を明らかにするために、ネットワークの情報から遺伝子の高発現又は欠失株を作製した。その結果、2 種類の遺伝子改変株の油脂生産性は野生株の 2.0 及び 1.5 倍に向上した。また、その高発現で油脂生産性が向上した遺伝子の欠失株で

は、油脂生産性は 0.7 倍に減少した。油脂合成に関与する重要な経路としてアシル CoA 合成経路とケネディ経路がある。油脂生産性が野生株より向上した上記 2 株のそれぞれの経路に関与する遺伝子発現を調査したところ、野生株と比較してアシル CoA 合成経路に関与する遺伝子の発現が上昇していた。また、油脂生産性が野生株よりも減少していた株では、野生株と比較してアシル CoA 合成経路に関与する遺伝子の発現が減少していた。すなわち、標的遺伝子の高発現及び欠失が、アシル CoA 合成経路関連遺伝子発現の上昇と減少と相関がある遺伝子の蛋白質はアシル CoA 合成の制御因子であることが示唆された。以上の結果は、発現制御ネットワーク構築技術が代謝物の生産性向上（代謝経路の活性化）に繋がる遺伝子の同定へ導いたものであり、その情報科学技術の有効性が示された。

続いて、*L. starkeyi* CBS1807 基準株 (WT)、油脂低蓄積変異株 m45、m47、sr5、sr17、sr22、高蓄積変異株 A42、K13、K14、E15、E47、および超高蓄積変異株 E15-11、E15-15、E15-25 のゲノムを読み、公開されている基準株ドラフトゲノム配列をリファレンスとして各株に生じた変異を比較することによって原因遺伝子を探索した。その結果、油脂超高蓄積株と油脂高蓄積変異株において変異が導入されている遺伝子が見出された。上記遺伝子の油脂蓄積変異株における遺伝子相補実験、また遺伝子破壊株及び遺伝子過剰発現株を作製し、それらの油脂生産性の比較検討を行い、油脂生産性の向上に関与する遺伝子として同定した。特に同定した遺伝子の変異型を高発現させた組換え株は野生株の 4 倍の油脂生産性を示した。また、この遺伝子をコードする機能解析により、TAG 合成を担う制御因子であることが明らかになった。

(8).1.5 対糖油脂収率

(2)-1 代謝経路設計技術、(1)-7 定量ターゲットプロテオーム解析技術と連携)

原料糖から油脂の変換効率（対糖油脂収率）は、コストに大きく反映する。*L. starkeyi* のゲノムスケール代謝モデル構築から NADPH 供給が油脂合成の効率の 1 つの鍵になっていることが示された。そこで、3 経路の NADPH 供給の強化を考案した。野生株への 3 種類の NADPH 強化は、2 種類において効果があり、それぞれ対糖油脂収率は変わらないが、油脂生産量が 1.45 倍、1.25 倍に向上した。

次に (8).1.4 で記載した TAG 合成を担う制御因子をコードする遺伝子の変異型を高発現株への 3 種類の NADPH 強化は、1 種類においてのみ効果があり、もともと高かった油脂の生産量を 1.1 倍向上させ、さらに対糖油脂収率を目標値の 20% 以上に向上させた。以上の代謝経路設計技術の油脂の効率的な生産への寄与からその有効性が実証された。さらに上記変異型遺伝子の高発現株へ NADPH 供給強化を行った株は、高密度培養を行った結果、その油脂生産性は目標値の 75 g/L/5 days 以上を達成した。

(8).2 油脂の脂肪酸組成改変 ((2)-4 文献等からの知識抽出・学習技術と連携)

(8).2.1 リノール酸高含有油脂生産 *L. starkeyi* の創製

油脂酵母 *L. starkeyi* はモデル酵母である *Saccharomyces cerevisiae* とは異なり、リノール酸 (C18:2) や α -リノレン酸 (C18:3) などの多価不飽和脂肪酸を僅かながら蓄積する。培養条件と脂肪酸組成の解析から、*L. starkeyi* は低温 (20°C) においてより多価不飽和脂肪酸を蓄積することが明らかになった。*L. starkeyi* がリノール酸や α -リノレン酸などの多価不飽和脂肪酸を蓄積することは、本油脂酵母が脂質中のオレイン酸 (C18:1) をリノール酸に変換する $\Delta 12$ 脂肪

酸不飽和化酵素及びリノール酸を α -リノレン酸に変換する $\Delta 15$ 脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子を有することを示唆している。この *L. starkeyi* が有する $\Delta 12$ 及び $\Delta 15$ 脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子の同定と発現強化は *L. starkeyi* において ω -3 多価不飽和脂肪酸を生産するための根幹となる。

既知の $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素との相同性検索の結果、*L. starkeyi* において $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素をコードしている可能性のある2つの遺伝子 (D12d-1 及び D12d-2) が見出された。次に、これらの遺伝子が $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素をコードしているかを明らかにするために、モデル酵母 *S. cerevisiae* 及び油脂酵母 *L. starkeyi* において両遺伝子の過剰発現を試みた。*L. starkeyi* 由来 D12d-1 を過剰発現した *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* + D12d-1) ではオレイン酸がリノール酸に変換されていたのに対し、D12d-2 を過剰発現した株 (*S. cerevisiae* + D12d-2) ではリノール酸だけでなく α -リノレン酸の蓄積も観察された。また同様に、D12d-1 及び D12d-2 を過剰発現した *L. starkeyi* (*L. starkeyi* + D12d-1 及び *L. starkeyi* + D12d-2) ではそれぞれリノール酸と α -リノレン酸の蓄積が観察された。

次に、D12d-1 及び D12d-2 をコードする遺伝子の破壊と、その破壊株の脂肪酸組成の解析を行った。低温培養条件において蓄積していたリノール酸及び α -リノレン酸は D12d-1 破壊株において劇的に低下した。また、D12d-2 破壊株ではリノール酸の含量は低下しなかったが、 α -リノレン酸の蓄積が全く見られなくなった (表 3.2.3.3-7-2)。

表 3.2.3.3-7-2 低温培養時における D12d-1 破壊株及び D12d-2 破壊株の脂肪酸組成

	脂肪酸組成		
	オレイン酸	リノール酸	α -リノレン酸
<i>L. starkeyi</i> 親株	33%	23%	13%
D12d-1 破壊株	64%	0.5%	1.5%
D12d-2 破壊株	28%	44%	0%

以上の結果から、*L. starkeyi* 由来 D12d-1 は $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素であること、また、D12d-2 は $\Delta 12/\Delta 15$ 不飽和化酵素であることが明らかになった。*L. starkeyi* の多価不飽和脂肪酸生産に重要な脂肪酸不飽和酵素を発見とその発現強化によって ω -3 多価不飽和脂肪酸合成の上流物質であるリノール酸及び α -リノレン酸を高生産する *L. starkeyi* の作製に成功した。

L. starkeyi における多価不飽和脂肪酸生産に資する脂肪酸不飽和化酵素の同定と過剰発現によってリノール酸の生産量を劇的に向上させることができたが、*L. starkeyi* が生産する油脂にはまだ20~30%以上のパルミチン酸 (C16:0) がふくまれている。パルミチン酸の炭素鎖を伸ばすことができれば、よりリノール酸などの ω -3 多価不飽和脂肪酸合成の上流物質が蓄積することが期待される。そこで次に炭素数16 (C16) 脂肪酸を炭素数18 (C18) 脂肪酸に伸長する脂肪酸伸長酵素の同定を試みた。相同性検索などを駆使することにより、2つの推定脂肪酸伸長酵素 (Elo1 及び Elo2) が C16 脂肪酸の伸長に関与していることが予想された。そこで、この2つの推定脂肪酸伸長酵素のモデル酵母 *S. cerevisiae* における異種宿主発現を行った。その結果、*L. starkeyi* 由来 Elo1 は C24 脂肪酸までの脂肪酸の伸長に関与していること、また、Elo2 は C16 脂肪酸を C18 脂肪酸に伸長する活性を有していることが明らかになった。この知見から、Elo2 の

発現強化は *L. starkeyi* においてリノール酸や α -リノレン酸の高生産に資することが示唆された。

L. starkeyi における D12d-1 の発現強化によってリノール酸の生産性が大きく向上したが、まだ一部のオレイン酸が残存していた。*L. starkeyi* においてより効率的にオレイン酸をリノール酸に変換できる $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素を発見することができれば、より ω -3 多価不飽和脂肪酸の生産に適した *L. starkeyi* 菌株を構築することができると期待される。そこで、リノール酸含有率の高い微生物を探索することにより、高機能 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素の探索を行った。産業技術総合研究所の敷地内において単離した主に酵母によって構成されている微生物ライブラリを GY 培地 (5% glucose、0.5% yeast extract) において培養し、微生物 46 クローンの脂肪酸組成の解析を行った。その中で、オレイン酸をほとんど含んでおらず、リノール酸を高蓄積している酵母を発見した。その酵母のゲノム DNA を抽出し、部分シーケンス解析を行うことにより酵母菌種の同定を行った。その結果、本酵母は *Pseudozyma antarctica* (別名 *Moesziomyces antarcticus*) であることが明らかになった。Saika らによって解析された当該酵母のゲノム情報をもとに、我々が同定した *L. starkeyi* 由来 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素 (D12d-1) とアミノ酸配列が類似したタンパク質を BLAST 解析した結果、GenDB accession No. XP_014658794 がヒットした。当該タンパク質 (Pa $\Delta 12d$) をコードする遺伝子を *L. starkeyi* *lslig4* 破壊株において過剰発現プロモーターを利用して 18S rDNA 上において過剰発現させ、GY 培地で培養した結果、リノール酸の含量が劇的に向上した (表 3.2.3.3-7-3)。

表 3.2.3.3-7-3 Pa $\Delta 12d$ 過剰発現株の脂肪酸組成解析

	脂肪酸組成 (%)	
	オレイン酸	リノール酸
<i>L. starkeyi</i> 親株	46.0 %	7.7 %
<i>L. starkeyi</i> Pa $\Delta 12d$ 過剰発現株	6.9 %	52.3 %

上記の結果から、Pa $\Delta 12d$ を過剰発現した *L. starkeyi* は ω -3 多価不飽和脂肪酸の上流物質であるリノール酸を極めて高効率に生産することができ、 ω -3 多価不飽和脂肪酸生産菌として高いポテンシャルを有することが明らかになった。

(8).2.2 ω -3 系多価不飽和脂肪酸含有油脂高生産 *L. starkeyi* の創製

L. starkeyi の内在性遺伝子の強化や Pa $\Delta 12d$ の利用により、*L. starkeyi* においてリノール酸などの効率的な生産が可能になった。しかし、より高付加価値な ω -3 多価不飽和脂肪酸を合成するためには $\Delta 15$ 脂肪酸不飽和化酵素や $\Delta 9$ 脂肪酸伸長酵素、 $\Delta 8$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 17$ 脂肪酸不飽和化酵素などが必要である。

そこで、次に情報解析による ω -3 系脂肪酸生産に必要な脂肪酸伸長酵素・不飽和化酵素の選択を進めた。文献等からの知識抽出・学習技術によって、公開されている膨大なゲノム情報から ω -3 系脂肪酸生産に必要な脂肪酸伸長酵素・不飽和化酵素をコードしている遺伝子を予測し、当該遺伝子を *L. starkeyi* において発現し、その機能を評価した。その結果、 α -リノレン酸やその他の ω -3 系脂肪酸の生産に有効な複数の遺伝子の同定に成功し、これまでに見出した酵素

と Pa Δ 12d や公知の酵素とを組み合わせることによって、構成脂肪酸の 30%以上を ω -3 系脂肪酸が占める複数の *L. starkeyi* 株の構築に成功した (表 3.2.3.3-7-4)。また、文献等からの知識抽出・学習技術により選抜された酵素の ω -3 系脂肪酸生産への寄与は、その情報科学技術の有用性を実証した。

表 3.2.3.3-7-4 ω -3 系脂肪酸生産 *L. starkeyi* の脂肪酸組成解析

形質転換株	脂肪酸組成 (%)			
	リノール酸 (ω -6)	α -リノレン酸 (ω -3)	α -リノレン酸以外 の ω -3 脂肪酸	ω -3 系合計
P	52 %	9 %	0 %	9 %
PS	9 %	53 %	0 %	53 %
FPL Δ	0.4 %	11 %	20 %	31 %

形質転換株 P (Pa Δ 12d 高発現株)、形質転換株 PS (Pa Δ 12d、文献等からの知識抽出・学習技術により選抜された酵素の高発現株)、形質転換株 FPL Δ (公知の酵素遺伝子、文献等からの知識抽出・学習技術により選抜された酵素遺伝子、内在性遺伝子高発現、内在性遺伝子欠失)

さらに形質転換株 FPL Δ で高密度培養を行った結果、 ω -3 系多価不飽和脂肪酸量は 23.42g/L であり、目標値を達成した。

また、欠損させることによって ω -3 系脂肪酸の生産性が向上する 2 種類の遺伝子を見出し、これらをコードする遺伝子の欠損が外来遺伝子を導入した *L. starkeyi* における ω -3 系脂肪酸の生産に有効であることを明らかにした (表 3.2.3.3-7-5)。特に、MonoDE3/P Δ ps 株は、動脈硬化予防効果を有する付加価値の高い EPA を約 18%まで蓄積できるようになった。

表 3.2.3.3-7-5

外来脂肪酸不飽和化・伸長酵素発現株とその内在性遺伝子欠損株の ω -3 系脂肪酸の生産能力

形質転換株	ω -3 系脂肪酸 (%)
MonoDE3/P	4 % (EPA : 3.9%)
MonoDE3/P Δ p	10 % (EPA : 8.4%)
MonoDE3/P Δ ps	20 % (EPA : 17.9%)

MonoDE3 (外来脂肪酸不飽和化・伸長酵素高発現)

形質転換株 MonoDE3/P (MonoDE3、Pa Δ 12d 高発現)、形質転換株 MonoDE3/P Δ p (MonoDE3、Pa Δ 12d 高発現、内在性遺伝子欠失)、形質転換株 MonoDE3/P Δ ps (MonoDE3、Pa Δ 12d 高発現、2 種類の内在性遺伝子欠失)

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	1	1	12	0	0	0	0
2017	0	0	9	0	0	0	0
2018	1	1	9	0	1	1	0
2019	4	1	7	0	2	1	0
2020	4	1	2	2	1	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	1	0	0
2018	1	0	0
2019	1	0	0
2020	1	0	1

課題名：C(3)-8 微生物を用いたアルカロイド等の新規生産法の有効性検証

担当機関：石川県立大学、産業後術総合研究所、理化学研究所、京都大学、千葉大学

(1) 背景と目的

背景

植物アルカロイドは様々な生理活性を有しており、新規高機能品のシーズとして有効だが、植物における含有量は低く、製品化されていない。そのほとんどが、生薬、漢方として利用されている。

生合成工学の進展により、植物アルカロイドの生合成経路を微生物内に構築し、生産することが可能となっている。しかしながら、そのほとんどが植物の生合成経路の再構成であり、微生物内において効率的な経路となっていない。必要となる生合成経路の反応は10~20段階におよぶため、最適な経路の構築は行われておらず、実用レベルの生産には成功していない。そのため、実用生産には、微生物宿主に適応した新規生合成経路を構築する必要がある。

目的

情報解析技術開発により、新規代謝経路の設計・最適化手法の共同開発ならびに有効性の検証を行う。これにより、植物アルカロイド等の二次代謝産物の新規生合成経路を実現させ、微生物による実用生産を目的とする。

(2) 位置づけ、目標値

1) 対象市場, 製品

- i) テバイン
(Nakagawa et al., 2016 *Nat. Commun.*)
 - ・オピオイド系鎮痛剤原料 (市場規模2兆円)
- ii) マグノフロリン (Minami et al., 2008 *PNAS*)
 - ・漢方薬の有効成分
 - ・抗HIV作用、抗ガン活性がある
- iii) ベルベリン
 - ・漢方薬の一種、糖尿病、止瀉等に効果がある
 - ・痩身効果からサプリメントとしても利用される
- iv) テトラヒドロパパペリン
 - ・鎮痙剤アトラクリウム原料
 - ・WHOの必須医薬品リストの1つ

2) 競合技術との対比 (目標値)

- ・植物からの抽出により生産
- ・希少アルカロイドに関しては、生産されていない

競合技術 (酵母) との対比

- ・テバイン
- 酵母による生産効率 (6 μ g/L) より、我々 (105mg/L) の方が優位



酵母で3g/Lのレチクリン (アルカロイド中間体) 生産に成功したという論文発表があり、緊急に実用化に向けた対策の必要性

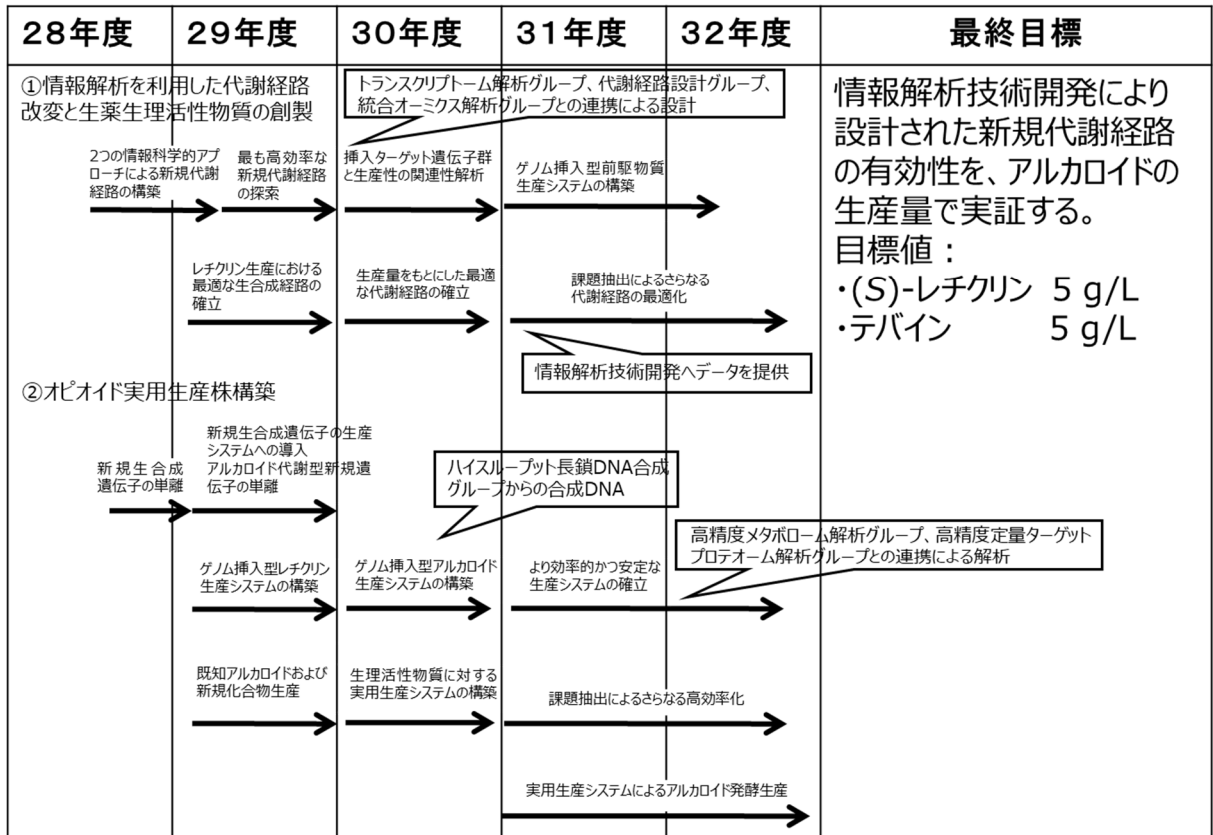
1. 対象市場, 製品

医薬品原料であるケシアルカロイド (テバイン)、製品化されていない希少アルカロイド、植物の産生しない新規アルカロイドを対象とする。

2. 競合技術との対比 (目標値)

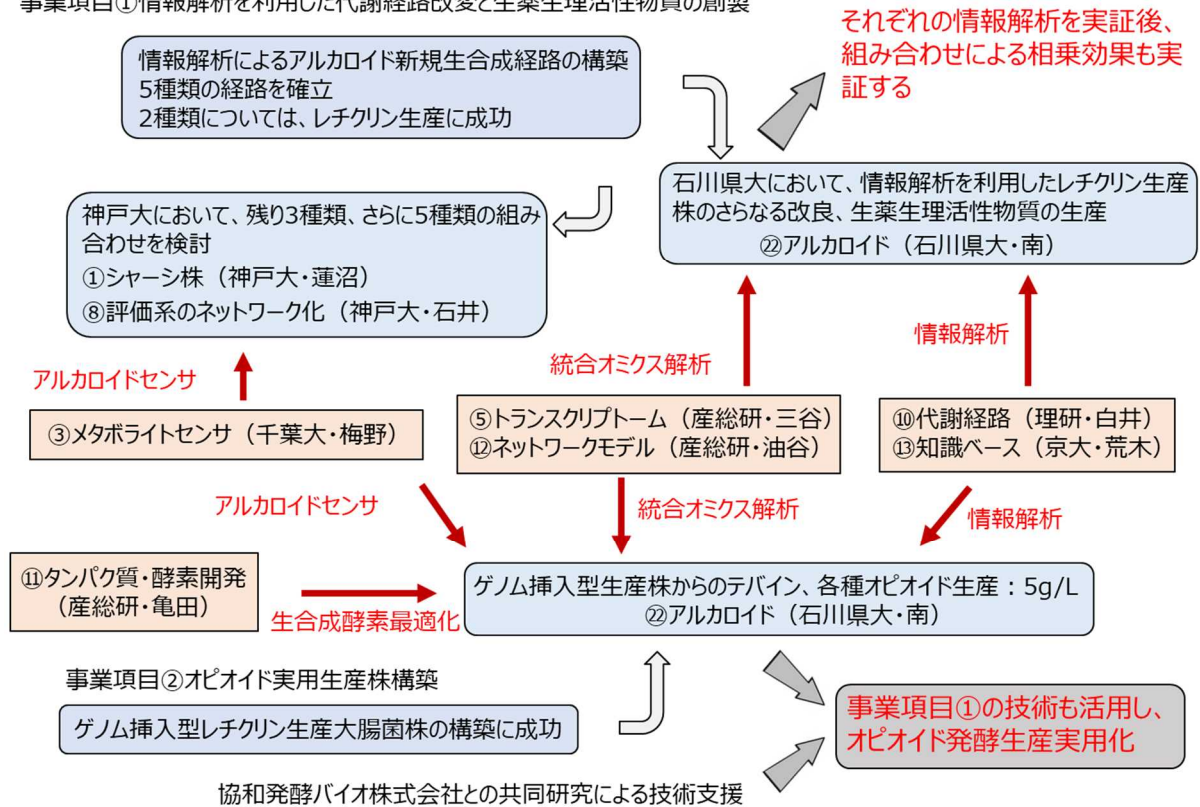
植物抽出法および酵母による生産よりも、低コストで高効率な生産プラットフォームを開発する。
(最終目標値：テバイン 5g/L)

(3) 全体計画



(4) 実施体制

事業項目①情報解析を利用した代謝経路改変と生薬生理活性物質の創製



(5) 運営管理

3ヶ月を目安に、連携グループでの進捗および情報共有のための会議を開催。

(6) 実施の効果

テバインはオピオイド系鎮痛剤の原料として、生産量がここ10年でおおよそ3倍に増えている。しかし、植物体からの抽出によって得られており、コストが高いという問題がある。米国の疼痛向け医薬品市場は約1兆円（1米ドル105円による換算）であり、このうち強い痛み向け薬剤群オピオイドが約半分の5,000億円程度を占めている。そのオピオイドの中で、テバインを原料とする医薬品オキシコンチン（OxyContin®）が1品目だけで約5割の約2,400億円を占めており、その市場規模はかなり大きく、実施の効果は非常に高い。

また、漢方薬、生薬の市場規模は年々増加しており、2015年度は1,460億円である。微生物発酵法によるアルカロイドの安価な生産により、漢方薬やそれらを利用した健康食品関連の市場規模の拡大が期待できる。生活習慣病等の予防・健康サービスの市場規模は年間4兆円と試算されており、本研究成果を生産現場へ導入することによる経済効果は非常に高いものと考えられる。

(7) 最終目標の達成度

研究開発項目①：情報解析を利用した代謝経路改変と生薬生理活性物質の創製

研究開発項目 (担当)	研究内容	現状	最終目標	達成見通し
i.情報解析による中心代謝経路の最適化 (京都大学、理研、石川県立大学)	情報解析によるレチクリンに対する複数候補の新規生合成経路の確立、および各生合成遺伝子の大腸菌発現株構築と生産システムへの導入	レチクリン生産株に対する中心代謝経路の代謝シミュレーションの結果から、メチル基供与体であるSAMの再生系に用いる生合成遺伝子の違い（大腸菌型とコリネバクテリウム型）による影響が示唆された。しかし、SAM再生系をコリネバクテリウム型に変更することで生育が悪くなり、レチクリン生産効率が下がる結果となった。 協和発酵バイオ株式会社が作製したプラスミド型レチクリン高生産株（非公開）の代謝改変情報をもとに、ゲノム挿入型レチクリン高生産株の構築を行った。現在、ジャーファーマンターでの培養条件を検討中である。	新規代謝経路によるレチクリン生産：5g/L	○ SAM再生系に関しては、結果をフィードバックするとともに、生産効率を高めた株で再検討を行う。 ゲノム挿入型レチクリン高生産株に対するジャーファーマンターでの最適条件を決定することで、5g/Lのレチクリン生産を達成する。
ii.統合オミクス解析による代謝経路改変 (神戸大学、産総研、石川県立大学)	情報解析グループと連携し、ゲノム挿入型レチクリン生産株に対して統合オミクス解析による代謝経路改変を行い、アルカロイド生産プラットフォームを確立する。	野生型大腸菌株、ゲノム挿入型ドーバミン生産株、ゲノム挿入型レチクリン生産株に対してメタボローム解析およびトランスクリプトーム解析を完了した。	代謝改変による大腸菌プラットフォームの改良 (レチクリン生産量で評価)	○ 解析結果をもとに中心代謝経路を改変し、生産効率の変動を検証する。
iii.アポルフィンアルカロイド生産 (石川県立大学)	生産プラットフォームを利用したアポルフィンおよびプロトベルベリンアルカロイド生産	ゲノム挿入型レチクリン生産株を利用し、マグノロリン生合成遺伝子を導入することで、グルコースからのマグノロリン発酵生産に成功した。	マグノロリン発酵生産：0.1g/L	○ 生産効率改善のために、情報解析による代謝改変、および培養条件の最適化を行う。

研究開発項目②：オピオイド実用生産株構築

研究開発項目 (担当)	研究内容	現状	最終目標	達成見通し
i.ゲノム挿入型テバイン生産株の構築 (石川県立大学)	生合成酵素を大腸菌ゲノムに挿入し、より安定な生産システムを構築することで、テバイン発酵生産を行う。	昨年度までに構築したゲノム挿入型テバイン生産株に対して、生合成遺伝子の組み合わせを最適化することで、テバインが9mg/L生産された。さらに、(S)-レチクリン以降の生合成遺伝子をプラスミドにより高発現させることで、生産効率を改善（105.2mg/L）することに成功した。	安定的なテバイン生産大腸菌株の作製 テバイン発酵生産：5g/L	○ 代謝改変の検証結果を導入し、さらなる生産効率の改善を行う。
ii.テバイン生合成経路の最適化 (産総研、千葉大学、石川県立大学)	生合成遺伝子に対して最適な配列設計を行うことで、代謝経路を最適化する。 アルカロイドに特異的な微生物センサを開発し、生合成酵素および代謝経路を改変する。	律速段階の生合成遺伝子であるMAO、CYP80Y2、ATR2、DRRのタンパク質発現量を最適化した結果CYP80Y2において(R)-レチクリンへの反応を約10倍効率化することに成功した。 テバインに対するセンサ感度を検討し、生合成遺伝子のスクリーニングシステムを確立した。	配列設計技術を利用したテバイン生合成経路の構築 スクリーニングに適したテバインセンサの作製	○ 最適化したCYP80Y2をテバイン生産システムに導入し、生産効率の改善を行う。
iii.実用化に向けたテバイン生産方法の確立 (石川県立大学)	構築した種々のアルカロイド生産株を用いて、より安価かつ迅速な生産方法を確立する。	代謝改変の情報から生合成遺伝子の並び順を検討し、(S)-レチクリンからテバインを約90%変換できる生産株の構築に成功した。	テバイン発酵生産：5g/L	○ ゲノム挿入型レチクリン高生産株を組み合わせた2菌体での段階培養による生産をジャーファーマンターを用いて検討し、5g/Lのテバイン生産を達成する。

(8) 研究開発の成果と意義

研究開発項目①：情報解析を利用した代謝経路改変と生薬生理活性物質の創製

京都大学荒木グループおよび理研白井グループとの連携（代謝経路設計技術、文献等からの知識抽出・学習技術）による情報解析（M-Path および BioProV）により、チロシンから 3、4-DHPAA までの 5 種類の新規代謝経路の設計を行った。さらに、NITE の MiFup を用いて、それらの生合成遺伝子群を選定した。実際に選定された *Kulyveromyces marxianus* 由来フェニルピルビン酸デカルボキシラーゼを用いた生産システムでは、従来の経路よりも 2 倍のレチクリン生産量を示した。さらに、レチクリン生産において律速反応であったチロシンからドーパへの変換反応を触媒する酵素、tyrosinase に対して、MiFup を用いて代替酵素を予測した結果、4 種類の生物種、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、うずら (*Phasianidae sp.*)、うなぎ (*Anguilla anguilla*)、ラット (*Rattus norvegicus*) 由来のチロシン水酸化酵素が選抜された。チロシン水酸化酵素は、その反応にテトラヒドロビオプテリン (BH₄) を補酵素として必要とする。そこで、BH₄ 生産に必要な 3 種類の生合成酵素、guanosine triphosphate cyclohydrolase I (MtrA)、6-pyruvoyltetrahydropterin synthase (PTPS)、sepiapterin reductase (SPR) とともに、4 種類のチロシン水酸化酵素をそれぞれ生合成経路に導入し比較した結果、ショウジョウバエ由来のチロシン水酸化酵素が生産効率の改善に有効であることが明らかとなった。

これらの情報解析により選出した生合成遺伝子を用いて、実用化に向けた生産プラットフォームであるゲノム挿入型レチクリン生産株 (103.5mg/L) の構築に成功した。

産総研油谷、矢追グループおよび三谷グループとの連携（発現制御ネットワーク構築技術、HTP トランスクリプトーム解析技術）により、トランスクリプトーム解析と大腸菌ゲノム情報からの代謝経路の再構築および遺伝子発現データからアルカロイド生産時に活性化している経路を推定した結果、KEGG 上に登録されている 436 の代謝経路のうち、16 の代謝経路が活性化していた。アルカロイド生産時にピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合遺伝子 (*aceEF*) の発現量低下によるアセチル CoA の枯渇、7-carboxy-7-deazaguanine synthase (*queE*) による BH₄ 生成阻害の可能性が示唆された。*aceEF* のリプレッサーである *pdhR* の破壊による生産能向上、および *queE* 破壊による生産能向上を検討したが、レチクリン増産は達成できなかった。しかし、ゲノム情報からの経路推定の有効性は実証できたため、安定的なゲノム挿入型レチクリン生産株において同様の解析を行った。その結果、レチクリンが最も生産される定常期後期のサンプルでも解析に成功し、RNA の分解が問題となる生産株に対して解析が可能であることを実証することができた。活性化経路の探索を行い、代謝改変による大腸菌プラットフォームの改良を検討中である。

神戸大学蓮沼グループとの連携（高精度メタボローム解析技術）により、ゲノム挿入型ドーパミン、レチクリン生産株に対するメタボローム解析を行った。その結果、アルカロイド生合成経路上からは分からない律速段階を情報解析技術により検出することに成功した (図 3.2.3.3-8-1)。

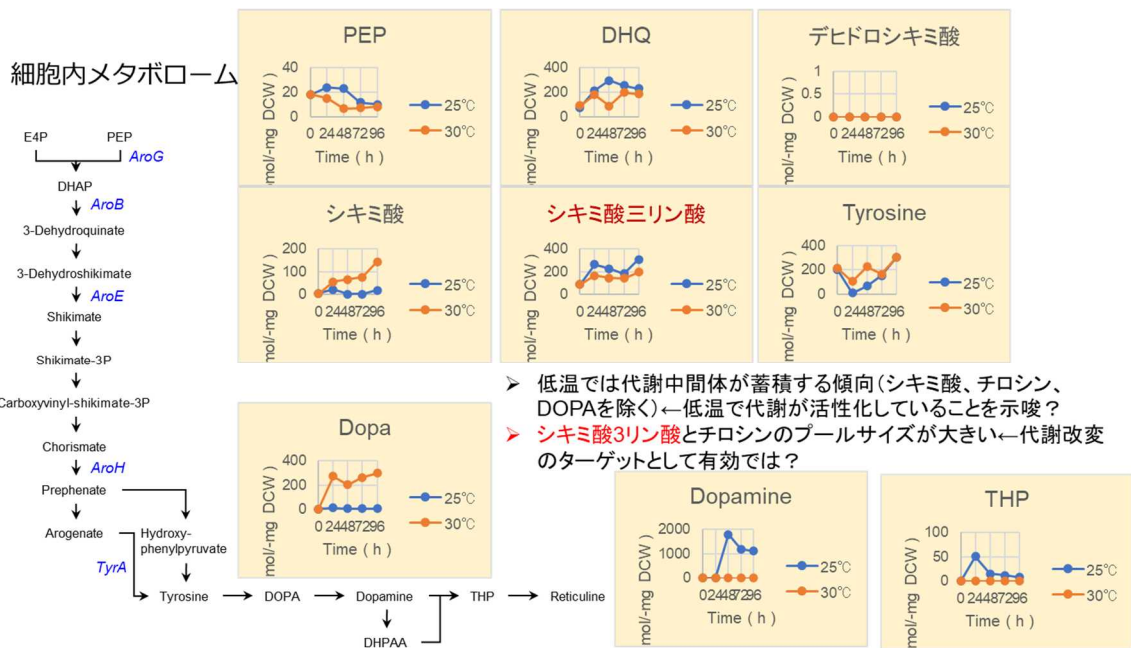


図 3. 2. 3. 3-8-1 ゲノム挿入型ドーパミン、レチクリン生産株に対するメタボローム

メチオニン¹⁾はレチクリン生産においてメチル基の供給源として重要であり、安価なため培地に添加することが可能である。そこで、培地へのメチオニン添加の影響を検討した結果、すでに確立済みのプラスミド型レチクリン高生産株 (Jar を用いた Batch 培養で 165.9 mg/L の生産量) において、三角フラスコを用いた培養条件において 213 mg/L の生産に成功した。レチクリン高生産株ではメチル基の供給が律速であり、培地へのメチオニン添加によって律速が改善されることが明らかとなった。

アルカロイド²⁾生合成経路には P450 酵素が関与していることが多く、大腸菌における効率的な発現システムの構築が不可欠となっている。P450 酵素の機能的な発現には補酵素としてヘムが必要であり、通常はヘム前駆体である 5-アミノレブリン酸 (5ALA) を培地に添加している。しかしながら、5ALA は非常に高価なため、実用生産での使用には不向きである。そこで、ヘム過剰生産系 (ヘムの共発現系) の導入により、大腸菌における効率的な真核生物由来 P450 酵素の発現システムを確立した。その結果、5ALA 添加依存的な CYP719A1 において、2 倍以上の効果があった。さらにこの技術を利用し、ゲノム挿入型レチクリン生産株に 4 酵素をプラスミドで導入することで、世界で初めて 1 菌体でグルコースからマグノフロリンを生産する菌株を作製した (図 3. 2. 3. 3-8-2)。ヘム共発現系導入により、P450 の機能的な発現を必要とする物質生産を安価に行うことが可能となった。

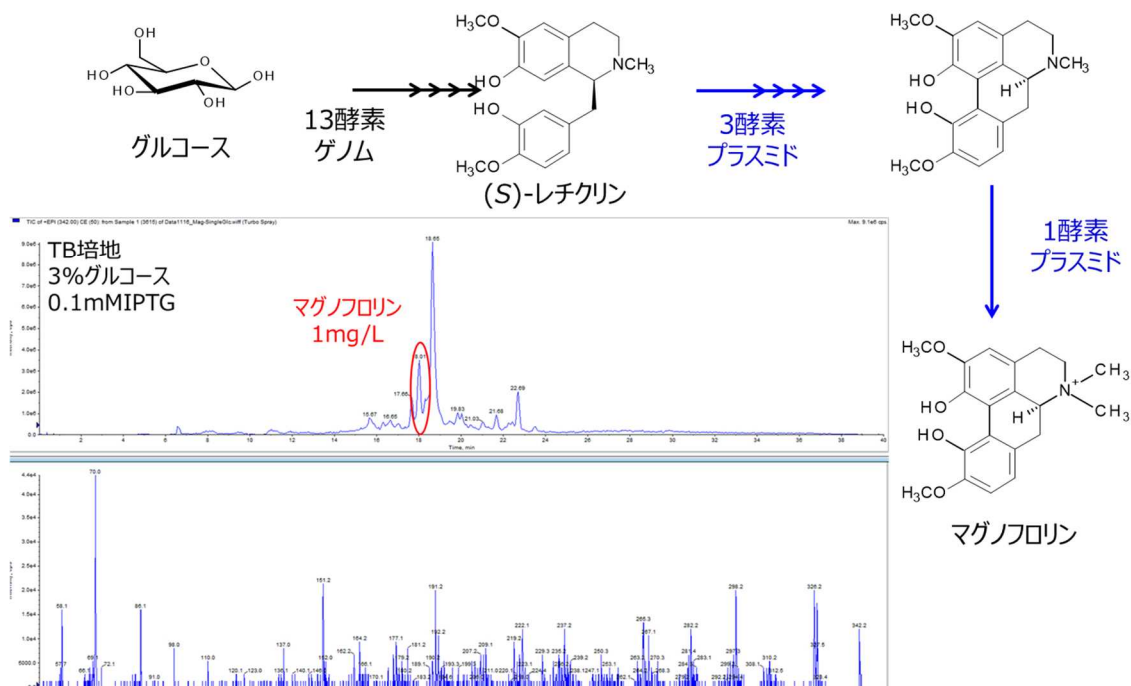
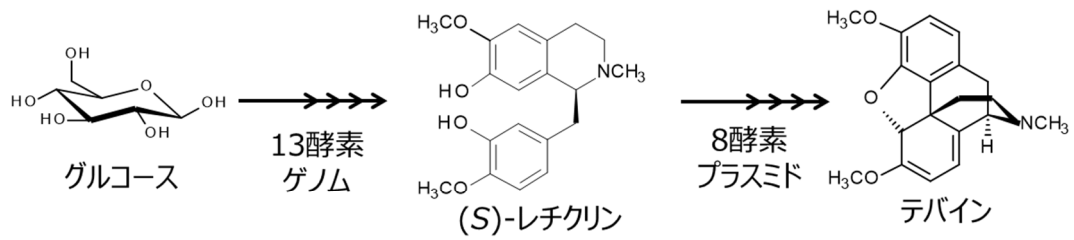


図 3.2.3.3-8-2 ゲノム挿入-プラスミド併用型マグノフロリン生産株の構築

研究開発項目②：オピオイド実用生産株構築

千葉大学梅野グループとの連携（メタボライトセンサ構築技術）により、特異的な検出方法のないアルカロイドに対して、センサタンパク質（LuxR）を用いたレチクリンおよびテバインセンサの構築に成功した。さらに、テバイン生産量を指標としたスクリーニングが可能であることを実証した。

ゲノム挿入型レチクリン生産株に対して、レチクリン以降のテバイン生合成遺伝子8種類をゲノムに挿入しゲノム挿入型テバイン生産株を構築した。しかしながら、生産効率が低かったため、レチクリン以降の生合成遺伝子をプラスミドにより発現させることで、さらなる生合成酵素発現量の改善を行った。その結果、プラスミド発現系を併用することで、テバイン生産効率を改善（105.2 mg/L）することに成功した（図 3.2.3.3-8-3）。さらに、産総研亀田グループと連携（導入遺伝子配列設計技術）し、律速段階の生合成遺伝子である MAO、CYP80Y2、ATR2、DRR のタンパク質発現量を最適化した結果、プラスミドを用いた CYP80Y2 の発現において、(R)-レチクリンへの反応を約 10 倍効率化することに成功した（図 3.2.3.3-8-4）。導入遺伝子配列設計技術により、生合成遺伝子を最適化することが可能であることが実証された。現在、最適化した CYP80Y2 をテバイン生産システムに導入し、生産効率の改善を検討しているところである。



ゲノム挿入型レチクリン生産菌（5ヶ所、13酵素） テバイン生産用プラスミド(3種、8酵素)

図 3. 2. 3. 3-8-3 ゲノム挿入-プラスミド併用型テバイン生産株の構築

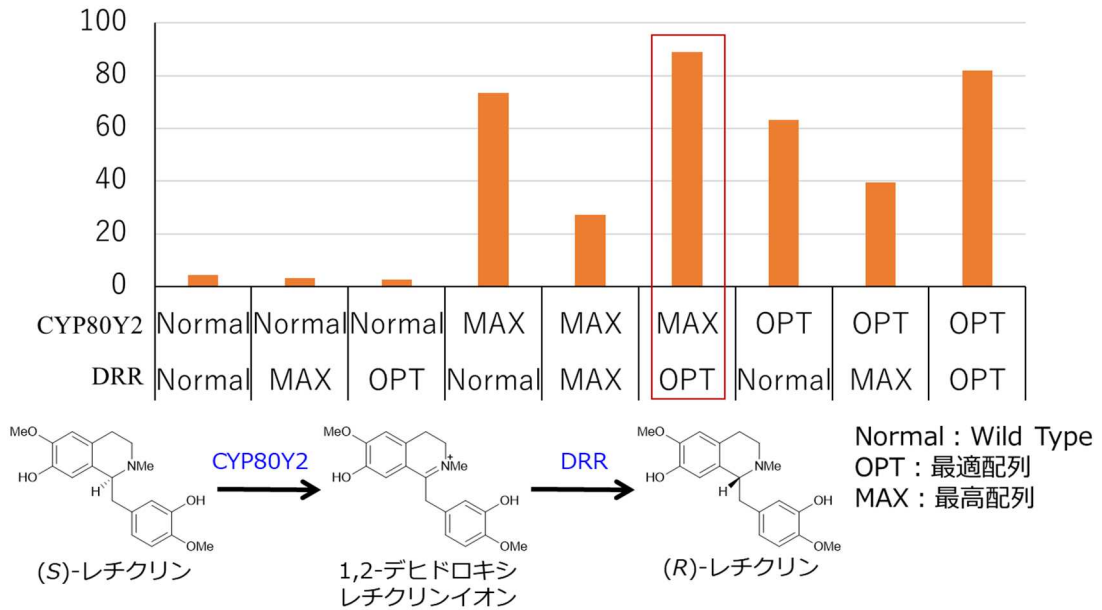


図 3. 2. 3. 3-8-4 CYP80Y2 および DRR による (R)-Reticuline の生産

最終目標であるテバイン 5g/L を達成するために、1 菌体での生産だけでなく、グルコースから (S)-レチクリンをゲノム挿入型の高生産株、(S)-レチクリンからテバインをプラスミド型の生産株を用いて、2 菌体での段階培養による生産を行った。これまでの代謝改変の情報から、(S)-レチクリンからテバインまでの生合成遺伝子の発現ベクターごとの並び順を検討し、(S)-レチクリンからテバインを 90%程度変換できる生産株の構築に成功しており、2 菌体での段階培養によるテバイン生産を検討中である。

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	2	0	0	0	0
2017	0	0	3	0	1	0	0
2018	1	1	3	1	1	0	0
2019	1	1	1	1	1	0	0
2020	1	0	1	1	0	0	0

*1：見込み含む

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	1	0	0
2019	1	0	0
2020	0	0	0

課題名：研究成果の積極的な発信等（アウトリーチ）

担当機関：一般財団法人バイオインダストリー協会

(1) 背景と目的

本テーマで開発された各種基盤技術の実用化、事業化の推進を目指して、研究開発成果の積極的な発信等を行う。

(2) 目標（2020年度末）

1. 本テーマ担当者との情報共有により、開発された技術の特徴とビジネスモデル案の確認、課題の抽出、技術適用領域の検討等を行う。
2. バイオインダストリー協会の機関誌や電子媒体等を利用した上記技術情報の広報動に加え、成果利用の促進を図るため技術利用イメージをわかりやすく紹介する映像を制作する。また開発された技術を海外にもアピールする宣伝記事を国際的知名度が高い科学雑誌に掲載する。宣伝記事の別刷を上記説明会や勉強会、展示会などで活用する。
3. プロジェクトと開発技術の概要を紹介する説明会、開発された技術の詳細をプロジェクト外の企業等に説明する勉強会などを企画、開催する（関東、関西で各 2019年度 1～2回、2020年度各 2回以上）。また、上記の活動を通じてプロジェクトで開発された技術の利用に興味を持つ企業を募り、技術の利用に関する個別相談会等のマッチングの機会を設定する。

(3) 全体計画

実施項目	2019年度	2020年度
1. 開発技術の理解と適用領域の検討	<p>● 全体会議</p> <p>課題別会議 →</p>	<p>助成ヒアリング →</p> <p>→</p> <p>→</p>
2. 開発技術の広報	<p>HP 作成・改良 →</p> <p>紹介映像作成・改良 →</p> <p>特集記事 →</p>	<p>Nature →</p>
3. 開発技術の利用に関する機会の提供	<p>技術セミナー ● ●</p> <p>●</p> <p>問い合わせ対応 →</p>	<p>BioJapan プレゼン ●</p> <p>企業ヒアリング →</p>

(4) 実施体制

バイオインダストリー協会（JBA）が中心となって、NEDO・PL との相談・協議のうえ、以下の活動をすすめた。

活動項目	概要、目標	担当
1. 開発技術の理解と適用領域の検討	プロジェクト担当者との情報共有により、開発された技術の特徴とビジネスモデル案の確認、課題の抽出、技術適用領域の検討等を行う	JBA
2. 開発技術の広報	機関誌や電子媒体等を利用した上記技術情報の広報動に加え、成果利用の促進を図るため技術利用イメージをわかりやすく紹介する映像を制作する。	JBA
3. 開発技術の利用に関する機会の提供	開発技術を紹介する説明会、勉強会、および技術の利用に関するマッチングの機会を企画、開催する	JBA

(5) 運営管理

各活動の計画立案および推進時には、適宜、NEDO および PL との協議を行い、目標および方針の統一を図った。

(6) 実施の効果

開催した3回の技術セミナーでは、毎回約80～110名の参加があり、活発な議論が行われた。またセミナー終了後に、セミナー参加企業9社からスマートセルの技術活用やプロジェクトに関する問い合わせがあり、利用希望技術の開発機関やNEDOとの相談機会の設定など対応を行った。さらに、技術セミナー参加企業のうち、特に化学系企業14社がヒアリングに応じ、技術利用への興味と課題など貴重な情報が得られた。作成したスマートセル紹介動画（NEDDチャンネル）にはこれまで1,400回以上の閲覧があった。

(7) 最終目標の達成度

活動項目 (担当)	活動内容	最終目標 2020 度末	達成見通し 2020 年度末
1. 開発技術の理解と適用領域の検討 (JBA)	開発技術の特徴・課題や適用領域の確認・検討	<ul style="list-style-type: none"> 全体会議、各課題会議への参加・議論 課題別ヒアリングの開催、進捗確認 	<ul style="list-style-type: none"> 全体会議への参加（2020年度はコロナで開催なし）；○ 課題別会議への参加；○ 助成課題ヒアリング実施（5社）；○

2. 開発技術の 広報 (JBA)	冊子や電子媒体 による広報活動	<ul style="list-style-type: none"> • 機関誌 B&I 特集記事掲載 (16 報) • ホームページ (HP)/紹介動画の作成改良 • Nature 特集記事作成 	<ul style="list-style-type: none"> • 特集記事掲載 (全 20 報) 植物テーマ (4 報) へ拡大; ○ • B&I 微生物テーマ特集記事の冊子作成・配布; ○ • HP/紹介動画の作成・公開、改良、英語版の追加; ○ • Nature 特集記事の掲載 (8 報)、冊子作成・配布; ◎
3. 開発技術の 利用に関する 機会提供 (JBA)	説明会・勉強 会・相談会など の開催	<ul style="list-style-type: none"> • 説明会・勉強会年 4 回以上開催 • アウトリーチ活動の紹介 • 企業の個別相談の実施 	<ul style="list-style-type: none"> • 技術セミナー3 回開催・学会シンポ企画 (コロナで 2020 年度は開催なし); △ • BioJapan2020 でのアウトリーチ活動プレゼン; ○ • 技術セミナー参加企業問い合わせ対応; ○ • スマセルに興味ある企業の個別面談実施 (14 社); ◎

(8) 研究開発の成果と意義

基盤技術の実用化・事業化を目指し、本プロジェクト外の企業等を対象としたアウトリーチ活動として、プロジェクトの各課題担当者や関係者との情報交換、議論のうえ、プロジェクトの概要、基盤技術の詳細と有効性を広く紹介する以下の活動を行った。

1. 開発技術の理解と適用領域の検討

2019 年度

- ①全体会議、技術推進委員会への参加
- ②課題別ミーティング・ヒアリングへの参加 (基盤技術課題; 6 回以上、実証課題; 7 回以上、助成事業: 2 回)

2020 年度

- ①技術推進委員会への参加 (COVID-19 のため全体会議は開催されず)
- ②課題別 Web ミーティング・ヒアリングへの参加 (実証課題; 3 回)
- ③助成事業実施者への自主ヒアリング実施 (全 5 機関; 5 回)

2. 開発技術の広報

2019 年度

- ①JBA 機関誌「バイオサイエンスとインダストリー」へのスマートセル基盤技術の特集記事の掲載 (微生物テーマ 10 報)

②ホームページの作成（スマートセル基盤技術の内容、利用事例の紹介）

③スマートセル紹介映像の作成

2020 年度

①JBA 機関誌「バイオサイエンスとインダストリー」への基盤技術の特集記事の掲載（微生物テーマ 6 報、植物テーマ 4 報）、および微生物テーマ 16 報の別刷りの作成、配布

②ホームページ英語版・予告編(基盤技術の内容、利用事例の紹介)の作成と日本語版の改修・アップデート

③スマートセル紹介映像英語版の作成

④Nature Focal Point スマートセル特集記事の掲載（8 報）および別刷り（日本語・英語）の作成と配布

3. 開発技術の利用に関する機会の提供

2019 年度

①技術セミナー4回の開催(第1回(東京)9月 参加109名、第2回(東京)11月 参加83名、第3回(大阪)12月 参加85名、農芸化学会大会シンポジウム(福岡)3月 (COVID-19のため要旨集掲載のみ))

②基盤技術利用等に関する企業問い合わせ(9件)対応(ヒアリング、研究実施者紹介等)

2020 年度

①BioJapan2020 NEDO 展示ブースでのアウトリーチ活動のショートプレゼンテーション

②化学系企業へのスマートセル技術の活用等に関する面談(14社)

(9) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2019	0	0	0	0	0	0	0
2020	0	0	0	0	1	0	

BioJapan 2020 展示会 NEDO 出展ブースにおいて、アウトリーチ活動に関するショートプレゼンテーションを行った。「アウトリーチ活動 ～研究開発成果の紹介と社会実装の促進～ スマートセルプロジェクトの内容をもっと知りたい人のために」 2020年10月15日、パシフィコ横浜

また、プロジェクト全体の成果普及のため、以下の技術セミナーの開催、および特集記事の掲載を行った。

1. セミナーの開催

2019 年度

- ① 第1回スマートセル技術セミナー「スマートセル創出プラットフォームの構築と実証 ―微生物利用による物質生産（技術総論、芳香族化合物・油脂事例）―」
2019年9月24日、御茶ノ水ソラシティ・カンファレンスセンター（東京）
- ② 第2回スマートセル技術セミナー「スマートセル創出プラットフォームの構築と実証 ―微生物利用による物質生産（技術紹介、有用酵素・色素事例）―」 2019年11月21日、
TKP ガーデンシティ PREMIUM 京橋（東京）
- ③ 第3回スマートセル技術セミナー「スマートセル創出プラットフォームの構築と実証 ―微生物利用による物質生産（技術総論、芳香族化合物・油脂事例）―」 2019年12月18日
グランフロント大阪北館・ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター（大阪）
- ④ 2020年度日本農芸化学会大会シンポジウム「微生物による有用物質生産「スマートセルインダストリー」の実現を目指す」2020年3月28日、九州大学（COVID19感染拡大のため、講演中止・要旨集公開）

2. バイオサイエンスとインダストリー誌 スマートセル特集記事 の掲載

2019年度

- ① 金田 晃一：生物で工業材料を生産するスマートセルインダストリー、バイオサイエンスとインダストリー, 77 (4), 332 (2019)
- ② 柘植 謙爾、寺井 悟朗、谷内江 望：DBTL サイクルに即した長鎖 DNA 構築技術の開発、バイオサイエンスとインダストリー, 77 (5), 408 (2019)
- ③ 蓮沼 誠久：スマートセル開発に資するメタボロミクス技術、バイオサイエンスとインダストリー, 77 (5), 410 (2019)
- ④ 八幡 志央美、野村 暢彦、八幡 穰：非破壊イメージングによるハイスループット細胞評価技術、バイオサイエンスとインダストリー, 77 (6), 512 (2019)
- ⑤ 松田 史生；複数酵素タンパク質発現量の一斉定量技術の開発、バイオサイエンスとインダストリー, 77 (6), 514 (2019)
- ⑥ 関 貴洋、小林 一幾、梅野 太輔：スマートセル開発のためのメタボライトセンサ製作技術、バイオサイエンスとインダストリー, 77 (6), 516 (2019)
- ⑦ 白井 智量：高生産性微生物設計システムにおける代謝設計・最適化技術の開発、バイオサイエンスとインダストリー, 78 (1), 62 (2020)
- ⑧ 油谷 幸代：細胞内制御因子探索のためのネットワークモデル構築、バイオサイエンスとインダストリー, 78 (1), 64 (2020)
- ⑨ 亀田 倫史：情報解析に基づく遺伝子配列改変によるタンパク質発現量調節・高機能化、バイオサイエンスとインダストリー, 78 (2), 166 (2020)
- ⑩ 荒木 通啓、花井 泰三、伊藤 潔人：代謝・酵素設計提案に向けた知識ベース・学習技術開発、バイオサイエンスとインダストリー, 78 (2), 168 (2020)

2020年度

- ① 亀田 倫史：分子動力学シミュレーションによるタンパク質高機能化、バイオサイエンスとインダストリー, 78 (3), 262 (2020)
- ② 七谷 圭、中山 真由美、熊谷 俊高、阿部 敬悦：物質生産の効率化に向けた輸送体探索技術の開発、バイオサイエンスとインダストリー, 78 (4), 358 (2020)
- ③ 三谷 恭雄、野田 尚宏、菅野 学：HTP トランスクリプトーム解析技術、バイオサイエンスとインダストリー, 78 (4), 360 (2020)
- ④ 乾 将行：コリネ菌を用いた有用芳香族化合物生産菌の開発、バイオサイエンスとインダストリー, 78 (5), 450 (2020)
- ⑤ 小笠原 渉、志田 洋介、油谷 幸代：糸状菌を用いた有用タンパク質同時生産制御技術の開発、バイオサイエンスとインダストリー, 78 (5), 448 (2020)
- ⑥ 高久 洋暁、荒木 通啓、油谷 幸代：油脂酵母を用いた機能性油脂生産菌の開発、バイオサイエンスとインダストリー, 78 (5), 452 (2020)
- ⑦ 松村 健：スマートセルインダストリー創出に向けた植物バイオの新たな一歩、バイオサイエンスとインダストリー, 78 (6), 531 (2020)
- ⑧ 中村 崇裕、刑部 敬史、加藤 義雄：国産ゲノム編集技術プラットフォームの確立、バイオサイエンスとインダストリー, 79 (1), 61 (2021)
- ⑨ 高橋 麻起子：シソ健康機能性成分の高効率生産技術開発、バイオサイエンスとインダストリー, 79 (2), 61 (2021)
- ⑩ 一町田 紀子ら：ジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の大量生産系の確立に向けて、バイオサイエンスとインダストリー, 79 (2), 158 (2021)

3. Nature 特集記事の掲載

2020 年度

Focal Point on Synthetic Biology in Japan, Nature, 584 (7819), 05 August (2020)

- ① A foundation of fermentation、
- ② Improved gene-editing precision to boost Japan's bioeconomy *
- ③ The productive plant switch *
- ④ Giving the green light to useful plant genes *
- ⑤ Designer metabolic pathway for sustainable aromatics
- ⑥ Yeast rises to the omega-3 challenge
- ⑦ A systematic approach to scaling up synthetic biology
- ⑧ Breakthrough in bio-based production of longevity vitamin, ergothioneine

* 植物テーマは産総研・徳島大から発注

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	国外	PCT
2019	0	0	0
2020	0	0	0

<成果の実用化>

課題名：C(1)-1 シャーシ株高速育種法の開発と実証

担当機関：神戸大学、京都大学、理化学研究所、東京大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

Wet 技術と Dry 技術を組合せた技術プラットフォームである「シャーシ株構築技術」を確立して従来にない短期間で有用化合物生産株を提供すること、および構築技術そのものを提供することを目指す。具体的には、ハブ化合物高生産株の開発、キラーマテリアル高生産株の開発を通して、要素技術の統合および実用化に向けた検証に取り組み、シャーシ株育種ワークフローを最適化して、開発期間を大幅に短縮した実用技術とする。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

【課題統合による加速】

2018 年度末までにプロジェクトで開発してきた要素技術「ハイスループット微生物構築・評価技術（課題(1)-5)」、「代謝モデル構築・解析技術（課題(2)-1-2)」、「Combi-OGAB 法と機械学習による迅速な DNA 配列因子組み合わせの探索技術（課題(2)-2-3)」、「反応機構推定に基づく酵素選択・機能改変技術（課題(2)-1-3)」を統合することによって、シャーシ株育種ワークフローを最適化し、さらに有効性検証課題と連携して標的物質（キラーマテリアル）の高生産株を短期間で育種できることを実証した。

【知的財産網の確立】

知的財産網の確立のために特許出願を積極的に推進するとともに、論文公開、学会発表を通して、成果の公開を進めた。

特許（出願済 3 件（特願 2020-010032、特願 2020-052453、特願 2020-203335）、出願準備中 1 件）については、ベンチャー事業会社に移管する。

(3) 成果の実用化の見通し

2020 年 3 月に設立したベンチャー事業会社（株式会社バッカス・バイオイノベーション）に知的財産を含む技術移転を計画し、既存の Synplogen 社（長鎖 DNA 合成技術）、BioPalette 社（ゲノム編集）と合わせ、生産ニーズに基づいて開発を受託する「総合受託型ビジネス」への展開を志向して準備を開始した。



課題名：C(1)-2-1 ハイスループット長鎖 DNA 合成技術の開発

担当機関：神戸大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本プロジェクトなどで得られた技術の実用化する目的で、2017 年に長鎖 DNA の受託合成事業を行う、神戸大学発ベンチャー会社のシンプロジェンを立ち上げた。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

本プロジェクトにより取得した特許は、神戸大学が出願人となるが、これらの知財を神戸大学発の長鎖 DNA 受託合成会社のシンプロジェン社に技術移転することにより事業を行うスキームを構築した。

(3) 成果の実用化の見通し

シンプロジェン社は、新規二本鎖合成法（MAP 法）に関する知財の実施権を神戸大学から得て、実際の長鎖 DNA 受託合成事業に用いている。また、液体分注ロボットを用いたプラスミドの自動構築技術、Combi-OGAB ライブラリーの DNA バーコード技術と次世代シーケンサーを用いたハイスループット塩基配列決定技術、および転写量測定技術については、同社に技術移転する予定である。総じて、本プロジェクトで開発された技術は、実用化されると言える。

課題名：C(1)-2-2 高生産性微生物創生に資する情報解析システムの開発—目的クローン単離技術の開発

担当機関：東京大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

長鎖 DNA 合成を事業化しているシンプロジェン社を通じた技術の事業利用について検討を進める。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

長鎖 DNA 合成を事業化しているシンプロジェン社を通じた技術の事業利用について検討を進めている。

(3) 成果の実用化の見通し

基盤技術について本事業期間中に完成し、実用化開発に向けた目処がついている。

課題名：C(1)-2-3 Combi-OGAB 法と機械学習による迅速な DNA 配列因子組み合わせの探索技術の開発

担当機関：東京大学、東北大学、味の素、鹿児島大学、神戸大学

実用化・事業化に向けた取組及び見通しについては非公開とする。

課題名：C(1)-3 メタボライトセンサの開発

担当機関：千葉大学、石川県立大学、神戸大学、三菱ケミカル

(1) 成果の実用化に向けた戦略

- 今後も役に立ちそうなメタボライトセンサは作り足し続け、測定できる重要代謝物の数を増やしてゆく。これらは、様々な生合成経路の改良や育種技術を加速するキラーツールになってゆくと期待される。
- センサの応答時間や感度などの改良研究を継続し、栄養学や環境分析などにも応用幅を広げてゆきたい。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

- 特に本PJで関わったオピオイド生合成経路の構築研究に関しては、今後も継続して石川県立大学にセンサを提供し、その効率改良に貢献する。
- テルペノイド・イソプレノイド化合物の微生物生産の研究は、共同研究としては続かないが、本PJで作出提供した各種センサは、イソプレノイド生合成株製作に非常に有利なキラーパーツである；後継NEDOプロジェクトの助成研究などに応募したいと考えている。

(3) 成果の実用化の見通し

- センサの受託開発事業は、すぐにでも開始できる状況にある。
- 理想的には、あらゆる代謝物のセンサをあらかじめ取り揃えておきたいのであるが、そのためにはさらに多くの人員と研究資金がかかる。
- 細胞透過性の低いものは本技術の対象にならない。GPCRなど膜タンパク質に対して同技術を適用できれば、もはやあらゆる化合物を測定できるようになると期待している。

課題名：C(1)-4 排出ボトルネック解消に向けた化合物排出輸送体探索プラットフォームの構築

担当機関：東北大学、産業技術総合研究所

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本プロジェクトにおいて、東北大・産総研で開発した基盤技術については可能な限り知財化し、ライセンス化できる体制を整える。参画企業と連携して実施した研究の成果は、知財化後、知財合意に基づいた知財権の移転または実施移譲手続きを取った上で、連携先企業に技術移譲し、連携先企業等における標的化合物の生産に貢献する。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

本プロジェクト内で新たに開発した技術については、標的化合物の生産を効率化する技術と

してすみやかに知財化できる体制を整えている。また、連携先企業とは権利化知財の移譲に関する相談を進め、すみやかに知財の移転あるいは実施移譲ができる体制を整えている。

(3) 成果の実用化の見通し

本プロジェクトでは、連携先企業において実用化を目指す化合物を主軸に輸送体の探索を進めており、研究開発の成果が実用化につながる見通しは高いと考えている。

課題名：C(1)-5 トランスクリプトーム解析技術開発

担当機関：産業技術総合研究所

(1) 成果の実用化に向けた戦略

スパイクイン用核酸標準物質に関しては、本 PJ 内で開発した 24 種類について、二次標準物質として頒布可能とするために、簡便で確実な定量手法を確立し安定性を確保する。さらには安定的に量産できる手法を確立し、広く頒布可能な体制を整える。また、未分解 RNA の選択的調製技術に関しては、これまで PJ 内で連携してきた参画企業を中心に個別の共同研究を進めることを想定して、それぞれの産業微生物での本技術の評価を行い、各連携企業等において本手法の成果を反映させた菌株を用いた企業内での物質生産を目指す。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

スパイクイン用核酸標準物質に関しては、質量分析法などの他の手法で値付けされた RNA を標品として用い、さらに SI トレーサブルな標準蛍光色素も利用することで蛍光相関分光法による正確かつ簡便な RNA の濃度想定手法の原理実証を終えている。こうした手法を本格的に導入することで二次標準物質の安定的な供給体制の構築が可能となる。また、未分解 RNA の選択的調製技術に関しては、スパイクインの活用も含めてこれまでに連携してきた参画企業とデータ解析について協議を継続しており、具体的な共同研究へ向けて準備を進めている。

(3) 成果の実用化の見通し

スパイクイン標準物質に関しては、今回の成果として作製されたスパイクイン用 RNA の頒布体制・利活用方策について、今後検討を進める。未分解 RNA の選択的調製技術に関しては、まずは連携先企業内での実用化に向けて技術協力を進めていく。

課題名：C(1)-6 メタボローム解析技術開発

担当機関：神戸大学、島津製作所

(1) 成果の実用化に向けた戦略

開発したシステムの受注開始を神戸大学統合研究拠点に設置されたパイロットラボのプレスリリースを同時に実施し、単なる開発完了ではなく具体的な使用事例を添えることで実用化をアピール。パイロットラボのシステムも含め成果の活用を促進する。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

上記のプレスリリースを 2021 年 2 月 17 日に実施。

(3) 成果の実用化の見通し

自動前処理システムはプレスリリースを実施する 2021 年 2 月 17 日以降、自動前処理装置以外は当初より市販品の応用開発で進めたため、既に実用化されている。

課題名：C(1)-7 高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術の開発

担当機関：大阪大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本課題はスマートセル開発加速に必要な高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術の開発を行った。このため成果の実用化に向けた戦略には大きく分けて 3 つある。

- 1) 本 P J 内において行ったスマートセルの解析結果から得られた知見によりスマートセルの開発が加速され、それにより結果有用物質生産技術が実用化する
- 2) 開発した高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術のノウハウ文書化、さらには、MRM アッセイ法 D B は分析パッケージ化を行うことで商業化する。
- 3) 開発した高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術を他の P J 等に展開し、技術の高度化、スマートセル開発の加速を行うことで、開発した技術の波及効果を広げる。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

上記に掲げた成果の実用化に向けた 3 つの戦略について下記のような具体的な取り組みを進めている。

- 1) 本 P J 内で実施した、スマートセルの開発成果は各実施グループが実用化に向けた取り組みを行っている。それらの取り組みに協力する。
- 2) 定量ターゲットプロテオーム解析技術のノウハウの文書化はすでに実施している。さらに、MRM アッセイ法 D B はインターフェイス等の構築を行い、利用可能な状態となっている。
- 3) 開発した高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術は、他研究プロジェクトにおいて行われる研究、実証レベルのスマートセル開発への貢献を開始している。

(3) 成果の実用化の見通し

成果の実用化に向けた 3 つの戦略にもとづく取り組みによる成果の実用化の見通しは次のとおりである。

- 1) 本 P J 内で実施したスマートセルの開発はカーボンリサイクルプロジェクトにおいて、培養生産技術を含めた実用化に向けた段階に進んでいる。高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術はその加速に協力していく計画である。
- 2) MRM アッセイ法 D B については、協力関係にある企業等と市場調査を行い、市販化に向けた検討を行う。
- 3) カーボンリサイクルプロジェクトにおいて行われる実用化を目指したスマートセル開発

に、高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術を活用する。

課題名：C(1)-8 ハイスループット微生物構築・評価技術の開発 / 評価系のネットワーク化
担当機関：神戸大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

自動形質転換システムは、神戸大学が進めている様々な菌株育種のコア技術として利用するだけでなく、企業が実用化を目指す菌株開発に今後も活用していく。また、神戸大学発バイオベンチャーへのライセンスも検討している。

統合データ管理システム（KIDS）は、神戸大学内での運用に加えて、外部機関への利用拡大や、販売・ライセンスの可能性を模索していく。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

自動形質転換システムは、実際に長瀬産業（助成事業）の実用株開発にも利用してきており、ニーズが高いことを確認している。今後、NEDO 官民による若手研究者発掘支援事業などの公募に申請しながら、個別に共同研究を実施する企業も探していく予定である。

統合データ管理システムは、神戸大学においてインハウスの運用を進めながら、テスト・バグ出しを行っていく。必要に応じて、システムの改修・改良を行い、外注先の富士通九州システムズ（ライフサイエンスグループは現在 富士通に移管）と協議しながら、パッケージ化や販売・普及の形の模索を続けていく。なお、富士通九州システムズとのソフトウェア著作権の持分譲渡契約は無事に完了している。

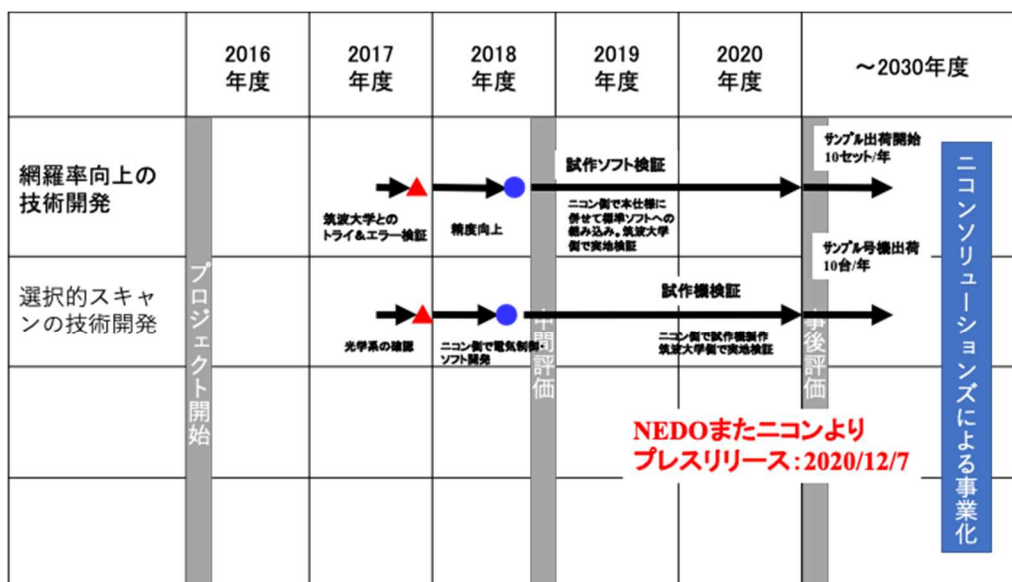
(3) 成果の実用化の見通し

自動形質転換システムは、神戸大学発ベンチャーへのライセンスを検討しており、本システムを活用した実用株の開発に利用される予定である。ただし、独占使用権を認めるか否かについては、よく協議した上で決定する。

統合管理システムも同様に神戸大学発ベンチャーへのライセンスを視野に入れているが、こちらについては富士通九州システムズとのパッケージ化などより広い範囲で活用される形を併せて模索していく予定である。

課題名：C(1)-9 植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発 / 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発
担当機関：筑波大学、ニコンソリューションズ、製品評価技術基盤機構

(1) 成果の実用化に向けた戦略



▲: 基本原理確認 ●: 基本技術確立

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

- ・ 本技術の汎用化に向け、開発されたソフトウェアのリリースを前提とした評価試験を行っている。
- ・ 本成果の一部である、油脂生産性の予測については、知財化を進めている。

(3) 成果の実用化の見通し

- ・ 本プロジェクトで開発された要素技術が搭載された顕微鏡システムがニコンより販売される予定である。

課題名：C(2)-1 代謝設計・最適化技術の開発

担当機関：理化学研究所、京都大学、産業技術総合研究所、神戸大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本プロジェクトで開発した各種代謝設計に関するツールについては、各ニーズにもとづいて独自に利用できるようにする。学会や論文などで各種ツールに関する有効性をアピールし、ニーズを引き出す戦略を取る。特に、新奇な代謝設計および未知代謝経路の可能性探索や人工代謝経路の設計に関しては、M-PathおよびBioProVツールをそれぞれ用途に合わせて使用し、産業界やアカデミアからのニーズに対応する。また、ゲノムスケール代謝モデルを用いて目的化合物の高生産を目指した代謝設計については、必要な遺伝子および反応改変箇所を提案し、相手にその有効性を検証してもらう。また実際の実験データをフィードバックし、更なる改変箇所を提案する。これらの実用化に向けては、各クライアントの研究フェーズに合わせて共同研究やコンサルティングの形態を取り柔軟に対応する。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

本プロジェクトで開発した各種代謝設計に関するツールについて、これまで学会やシンポジ

ウムなどの場や、論文発表などにおいて世間に広く告知してきた。以降も、各クライアントが抱える課題に対してこれら開発したツールを適用し、有効性を認めてもらうことで産業界やアカデミアに普及していく。本プロジェクト終了後には、産業界の企業やアカデミアの研究者らと共同研究を行い、代謝設計ツールの有効性を確認してもらうと体制を整えている。また彼らの課題に対応できるツールにブラッシュアップしていく予定である。またコンサルティングの体制も整える予定である。

(3) 成果の実用化の見通し

(1)および(2)でも述べたように、本プロジェクトで開発した各種ツールは、プロジェクト内で既に実用されその有効性を検証してきた。また、同時に他のアカデミアや産業界と別途共同研究を行う形で各種ツールが利用されており、既に実用化されているものもある。今後は、各種ツールのブラッシュアップを図るとともに、微生物を用いたモノづくり研究課題に対し貢献することを柱として、できるだけ多くの他の分野に展開し実用化を図っていく予定である。

課題名：C(2)-2 タンパク質・酵素開発

担当機関：産業技術総合研究所、神戸大学、岡山大学、東北大学、信州大学、鹿児島大学、地球環境産業技術研究機構、神戸天然物化学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本項目で開発した遺伝子配列設計法を用いれば、蛋白質高機能化・高発現化を実現できることは確定した。ただし本手法の実行にはスパコンが必要など計算機資源を多く必要とする。企業が自社で所有している計算機資源で実行できるようにするには、計算手法の高速化が必要となる。そこで、本事業後半2年間では、計算手法の高速化を行った。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

課題①：まず、蛋白質高発現化に関して、コドン頻度が高い配列のみを用いて、取り扱う配列数の削減を試み、削減しても高発現化可能なことを確認した。言い換えると、計算時間を大幅に削減できることが分かった。その結果をもとに、遺伝子配列設計 web サーバーを構築した。改変したい遺伝子配列を入力すると、設計された遺伝子配列が数分～数十分以内に回答される。また、すでに遺伝子配列設計を行ったタグを DNA 5'末端（蛋白質での N 末端）側につけて発現させることで、改めて配列設計を行わなくても蛋白質を高発現化できるタグの開発も行った。

課題②：MD シミュレーションによる、蛋白質耐熱化については、水和効果を、エネルギーで近似表現することで、30倍高速化した。本計算法でも、多くの蛋白質ではこれまで同様、耐熱性を予測することが可能である。

課題③：MD シミュレーションによる、蛋白質高活性化については、利用するシミュレーション技法を ALSD 法からレプリカ交換 MD 法に変更することで、計算速度が約 23 倍向上した。これまで、企業所有サーバーでは、計算が 2~3 か月かかると見込まれていたが、数日で実行できることになる。

(3) 成果の実用化の見通し

すでに、高発現タグ、配列設計 web サーバー、高速化 MD 計算法は構築済みである。

課題名：C(2)-3 ネットワークモデル構築技術開発

担当機関：産業技術総合研究所、理化学研究所、京都大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

- ・ 実証課題と連携することで、各実証課題にて推定したターゲット物質の生産制御因子に対する知財化に貢献する。
- ・ 本研究項目にて開発してきた「データ正規化」「遺伝子選択」「ネットワークモデル構築」「制御因子推定」の各技術を統合したシステムを構築し、Ver. 1.0 を Web 上でリリース。最終的にはシステムとして公開するとともに立ち上げ予定の情報解析の受注を実施する事業者へ提供する。
- ・ 開発してきた技術を生かした技術コンサルを実施する。（契約済 2 件、検討中 1 件、問い合わせ 2 件）

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

- ・ 開発してきた手法をローカルで稼働する試作品ソフトの開発し、実際のユーザーとなる研究者等の PC に導入済。
- ・ 本研究項目で開発した技術を含めた一連の情報解析手法を特許出願し、微生物による物質生産向上のための情報解析技術フローとして知財化を目指す。

(3) 成果の実用化の見通し

- ・ 本研究項目で開発した技術をツール化したものを含め、統合解析システムを構築し、新規ユーザーへの技術提案およびネットワークモデルによる改変候補遺伝子等の提案を実施する事業者の立ち上げを準備している。（2021 年度 ba 立ち上げ予定）

課題名：C(2)-4 文献・公開・測定データを利用した知識ベース開発

担当機関：京都大学、日立製作所、九州大学、神戸大学、理化学研究所、大阪大学、医薬基盤・健康・栄養研究所

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本研究開発項目の成果の実用化形態としては、知識ベースや、データ処理・学習技術単独をツール化し、パッケージもしくは設計支援サービスとして提供する他、設計・合成、計測技術と統合した、スマートセル開発のための DBTL 総合ソリューションとしての提供も念頭に入れる。特に、本研究開発成果は、本プロジェクトで開発した代謝設計技術や、遺伝子配列設計システムなどの他技術や、およびハイスループット合成・分析・評価手法を補完するものとして位置づけられ、これらと統合したプラットフォームとして構成することで、ソリューションとしての差別化が期待できる。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

本事業において、知識ベースおよびデータ処理・学習技術について、有効性検証テーマとの連携において一定の実用性を示すことは出来た。今後ユーザ企業との個別共同研究等を進めることで、更に適用課題を拡張することや、技術改良による知識抽出・提示精度の向上を狙う。これにより、有効性検証事例を蓄積するとともに、事業形態の具体化および経済性評価の検討を進める。

(3) 成果の実用化の見通し

文献・実験データの解釈から設計指針の導出までの期間短縮は、スマートセル開発における主要課題の一つであり、本研究開発成果実用化へのニーズは非常に大きい。今後は、一般公開できる部分は公開するなどの方法にて実用化を実現するとともに、事業化可能な部分について、上述の設計支援サービスや DBTL 総合ソリューションなどのビジネスモデルの検討を進める。

課題名：C(2)-5 データベース開発

担当機関：産業技術総合研究所、製品評価技術基盤機構

(1) 成果の実用化に向けた戦略

データはプロジェクト終了後も製品評価技術基盤機構に移管され継続して運用される。メタデータのスキーマを両者間で共有化することで、データの移管がスムーズに行われるようにした。

データベースに登録されている実験データが、プロジェクト終了後、製品評価技術基盤機構に移管されることについて、実験実施者と製品評価技術基盤機構との間で別途契約手続き中である。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

製品評価技術基盤機構ではすでに「生物資源データプラットフォーム」(DBRP)を運用しており、プロジェクトデータベースは DBRP に取り込まれるかたちで、移管後すぐに利用可能になる。

(3) 成果の実用化の見通し

移管作業は予定通りに進捗している。

課題名：C(3)-1 糸状菌を用いた有用タンパク質同時生産制御による有効性検証

担当機関：長岡技術科学大学、花王、産業技術総合研究所、バイオインダストリー協会、九州大学、大阪大学

実用化・事業化に向けた取組及び見通しについては非公開

課題名：C(3)-2 リモネンをはじめとするモノテルペノイド酸化酵素を用いた酵素設計技術の有効性検証

担当機関：神戸天然物化学、産業技術総合研究所、神戸大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本課題では実用的な方法としては世界初(実施者調べ)と考えられる「MD シミュレーションを利用した酵素の改変導入個所の予測法」をシトクロム P450 (以下 P450 と略す) を用いて開発するとともに、多数の改変酵素の作製・機能評価を行った。改変酵素を無作為に作製する従来法では 10 万程度の変異酵素を作製・評価する必要があるが、本法では 57~95 種の変異酵素を作製すれば、その内半数から 6 割程度において位置選択性が向上することが確認できている。特に酵素の位置選択性の向上等、機能評価に反応生成物の構造情報が必要な場合は、GC-MS などを用いた質量分析などが必要となり、多数の変異酵素の評価は困難である。したがって、本法を利用することで効率的に酵素機能改良に取り組めるため、酵素を取り扱う化学、製薬関連企業から注目が高いと考えられる。

さらに、神戸天然物化学では P450 関連事業ですでに多くの顧客から評価を受けている。本課題において作成した変異 P450 を弊社所有の P450 ライブラリーへ追加拡充し、引き続き事業の拡大につなげていく。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

酵素改変事業の検討

	2021年度	2022年度	2023年度	2024年度	2025年度
開発成果の発表及び論文化					
開発技術の社内評価及び有効性検証					
酵素関連事業の市場評価 (顧客ヒアリング)					
実用化・事業化					
実用化・事業性判断	社内評価段階	社内・顧客評価段階	社内・顧客評価段階	実用化	実用化

共通する予想される重大な障害：

- 社内評価段階：技術指標の洗い出しと指標未達成による開発遅延、或いは中断
競合技術との比較による優位性不十分による中断
- 顧客評価段階：顧客の酵素改変に対する技術目標等と合致せず中断
- 実用化段階：生産コストが折り合わない、品質問題に起因する生産中止

P450 関連事業への展開

	2021年度	2022年度	2023年度	2024年度	2025年度
社内設備による再現性等の基礎的な確認					
新規P450ライブラリーの紹介					
新規ライブラリーのバイオコンバージョン事業の開始					
実用化・事業性判断	社内評価段階	顧客紹介段階	顧客紹介段階	生産段階	生産段階

共通する予想される重大な障害

- 社内評価段階：技術指標の未達成による開発遅延、或いは中断
- 顧客紹介段階：顧客要望の酸化反応と合致せず生産検討移行中止。

受託生産段階 : 生産コストが折り合わない、品質問題に起因する生産中止

(3) 成果の実用化の見通し

「MD シミュレーションを利用した酵素の改変導入個所の予測法」について本課題で得られた P450 成果の一部を論文にまとめて公開、NITE のデータベースにて公開するとともに、酵素反応に関心を持つ製薬、化学関連企業を中心に技術紹介・マーケット調査を行っていく。またあわせて、技術指標の洗い出しと追加開発を行うことで実用・事業化の見通しを随時検討する。

さらに、開発した変異 P450 を神戸天然物化学のバイオコンバージョン事業に利用するために、変異 P450 をライブラリーへ追加ならびに整備を行った後、顧客に新規 P450 ライブラリーの紹介を通じて実用化の見通しを検討する。

課題名 : C(3)-3 有用イソプレノイドの生産性向上による代謝解析技術の有効性検証

担当機関 : 三菱ケミカル、J S R、産業技術総合研究所、神戸大学、京都大学

実用化・事業化に向けた取り組み及び見通しについては非公開

課題名 : C(3)-4 コリネ菌を用いた有用芳香族化合物の生産性向上による代謝解析技術の有効性検証

担当機関 : 地球環境産業技術研究機構、理化学研究所、京都大学、大阪大学、神戸大学、産業技術総合研究所、東北大学

実用化・事業化に向けた取り組み及び見通しについては非公開

課題名 : C(3)-5 紅麹菌を用いた色素生産制御による有効性検証

担当機関 : 江崎グリコ、バイオジェット、産業技術総合研究所

実用化・事業化に向けた取り組み及び見通しについては非公開

課題名 : C(3)-6 微生物を用いたパプリカ由来カロテノイドの新規生産法の有効性検証

担当機関 : 江崎グリコ、石川県立大学、京都大学、産業技術総合研究所

実用化・事業化に向けた取り組み及び見通しについては非公開

課題名 : C(3)-7 ω -3 系多価不飽和脂肪酸含有油脂の生産性向上による有効性検証

担当機関：新潟薬科大学、長岡技術科学大学、京都大学、大阪大学、九州大学、不二製油グループ本社、理化学研究所、産業技術総合研究所

(1) 成果の実用化に向けた戦略

対象市場： ω -3系多価不飽和脂肪酸市場

本研究で開発された ω -3系多価不飽和脂肪酸を30%以上含有する油脂を生産する油脂酵母の目指す市場は、毎年数十%以上の成長を見せている ω -3系多価不飽和脂肪酸市場となる。

対象市場：パーム油脂市場

本研究で開発された75g/L/5daysの油脂生産性を達成した油脂酵母の目指す市場は、その油脂の脂肪酸組成がパーム油と非常に類似しているため、世界の植物油の4割を占めているパーム油脂市場となる。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

ω -3系多価不飽和脂肪酸を高含有する油脂を生産する油脂酵母

- ・ ω -3系多価不飽和脂肪酸生産性の向上
- ・ 油脂生産性
- ・ 実用培地における培養法の確立
- ・ 菌体回収と油脂精製のプロセス工程の確立
- ・ 安全性確認

パーム代替油脂を高生産する油脂酵母

- ・ 油脂生産性の向上
- ・ 対糖油脂収率の向上
- ・ 実用培地における培養法の確立
- ・ 菌体回収と油脂精製のプロセス工程の確立
- ・ 安全性確認

(3) 成果の実用化の見通し

ω -3系多価不飽和脂肪酸を高含有する油脂、パーム代替油脂共に、バイオフィアウンドリーによる生産を実現し、高付加価値な用途へ向けに2030年の上市を目指す。

課題名：C(3)-8 微生物を用いたアルカロイド等の新規生産法の有効性検証

担当機関：石川県立大学、産業技術総合研究所、理化学研究所、京都大学、千葉大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

最適化の難しい多段階のアルカロイドの代謝経路に対して、情報解析システムによる複数の新規経路構築を行い、実効性の高い代謝経路を効率的に設計する計画である。さらに、新規代謝経路の構築と同時に、実用生産に適したゲノム挿入型アルカロイド生産株の構築にも成功しており、それをプラットフォームとすることで、安定的なアルカロイド高生産システムを確立する。

また、アルカロイドは植物における含有量の低さから生理活性の不明なものが多く、ほとんどが製品化されていない。そのため、ゼブラフィッシュやマウスを用いた生理活性評価についても検討しており、実用生産システム確立とともにアルカロイドの具体的な利用方法の提案が可能である。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

アルカロイドの中でも最も医薬品原料として需要のあるオピオイド（テバイン）に対して実用生産システムを確立する。現在、105mg/L のテバイン生産に成功しており、情報解析技術により代謝経路を最適化することで、引き続き生産効率の改善を行っている。最終的には、合成生物学研究が進展しているアメリカにおいて、オピオイドの販路を有する製薬メーカーに対して技術供与を行うことで、微生物発酵法によるテバイン生産を実用化する予定である。

（具体的な実用化・事業化に向けた取組および見通しについては非公開）

(3) 成果の実用化の見通し

アルカロイド中間体であるレチクリンのゲノム挿入型高生産システムは確立済みであり、それをプラットフォームとしてテバイン実用生産株を構築予定である。さらに、レチクリンをハブ化合物とすることで、アポルフィンアルカロイドであるマグノフロリンの生産にも成功していることから、様々なアルカロイドの実用生産が可能であると考えている。

また、ゼブラフィッシュ等を用いた生理活性評価系によって、実際にレチクリンに対する新たな生理活性も解明済みである。そのため、オピオイド以外の生理活性が不明な希少アルカロイドに対しても製品化が期待できる。

課題名：研究成果の積極的な発信等（アウトリーチ）

担当機関：一般財団法人バイオインダストリー協会

(1) 成果の実用化に向けた戦略と取り組み

本事業の終了後も個別相談の対応体制を維持し、開発技術の利用や後継事業への参画などについて関係者との相談機会の設定など、実用化への支援を継続する予定である。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

構築したホームページや紹介動画は継続して管理・公開する。また、ホームページなどを通じて、スマートセル技術に関する問い合わせを受け付け、内容に応じて利用希望技術の開発機関やNEDO関係者への相談機会設定などの支援を行う予定である。

3.2.4 研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」【助成】

3.2.4.1 ポリアミド原料の発酵生産技術開発（東レ株式会社）

(1)背景と目的

国連が2015年に掲げたSDGsにも示されているように、地球温暖化の抑制および持続可能な消費と生産の実現は世界共通の課題である。これらの社会的課題に対し、全産業の基幹を成す化学品製造産業においても、従来の化石資源に依存した廃棄型プロセスから脱却して循環型プロセスを構築することが急務となっている。中でも、植物由来原料（バイオマス）を原料とする化学品製造は、光合成によるCO₂固定を利用した究極の炭素循環型プロセスであると言える。また、バイオマス原料からの化学品製造は、従来プロセスと比較し温室効果ガスの排出量の低減に繋がると考えられる。

このような社会的背景から、バイオマスを原料とするポリマー（バイオ由来ポリマー）製造は成長産業として位置づけられている。市場調査レポート（2018年、Global Bio Based Polymers Market）によるとバイオマス由来ポリマーの世界生産能力は2018年の年間183万tから年平均成長率（CAGR）約11%で伸び、2023年には年間約300万tに達すると予想されている。したがってバイオ由来ポリマー市場に進出することは、持続可能社会の実現だけでなく日本の産業力強化にもつながる。

バイオ由来ポリマーの原料である「バイオ由来モノマー」の研究開発に関しては、古くから乳酸など生物が元来生産する化合物を対象とした開発が行われているが、一般に従来の石化由来モノマーと比べて製造コストが高く、さらに物性が劣る場合が多いため用途は限定的である。一方、石化由来モノマーそのものをバイオマス原料から製造する「ドロップイン型バイオ由来モノマー」は、ポリマー物性が石化由来品と同一である上、石化由来モノマーと混合することでバイオ由来モノマーの製造コストを吸収可能である。すなわち、ドロップイン型バイオ由来モノマーの最大のメリットである既存石化由来モノマーと置き換え可能である点は、化学品製造企業にとって導入障壁が低く、新規のバイオ由来モノマーに比べ普及が容易であるという利点をもたらす。本研究開発では、ポリアミド原料をバイオマス原料から製造する技術開発を目的とする。

(2)位置づけ、目標値

本研究開発では、石化由来ポリアミド原料に対して価格競争力を持ち得る世界初の製造技術の構築を目指している。開発目標を達成した場合に基づく、バイオ由来ポリアミド原料の想定価格を算出し、本プロジェクトにおける生産性の中間目標値と最終目標値を設定した。また、ポリアミド原料の生合成におけるキー反応を触媒する酵素の活性を向上させることを目標とした。

(3)全体計画

基盤技術を応用することにより、株開発期間を短縮し、以下の①～④について研究開発を行い、目標とする生産性を達成する。

- ① 生産性を最大化する生合成経路の設計
- ② オミクスデータに基づく潜在的な生産性向上遺伝子の探索
- ③ RNA二次構造予測による遺伝子発現の最適化という技術を組み合わせ、高性能な株の構築

- ④ 立体構造シミュレーションを用いた生合成酵素の高機能化により、ポリアミド原料の生産性を向上させ、本プロジェクトでの成果をベースとし、競争力のあるバイオ由来ポリアミド原料の製造技術の確立

(4) 実施体制

ポリアミド原料高生産株の開発にあたり、目標値の到達に必要な技術を選出した。東レ株式会社が主体となり、産業総合技術研究所と理化学研究所との共同研究体制を構築し、基盤技術を取り入れた生産株と酵素の開発を実施した。

(5) 運営管理

共同研究先と進捗報告会議を月に1回程度の頻度で開催し、テーマ推進や課題へのアプローチについて議論をした。1年に1度京都大学から理研・東レへ指導・助言の場を設けた。その他にも、メールによる情報共有を適宜行い、滞りないプロジェクトの推進を図った。また、各共同研究先と東レとの研究成果から相乗効果を得るために、東レをハブとして各共同研究先へ随時展開した。

(6) 実施の効果

本研究開発では、計算手法を取り入れた生産株と酵素の改良により、東レがこれまで培ってきた技術との相乗効果による、競争力のある世界初のバイオ由来ポリアミド原料の製造技術を構築する。本プロジェクトで得られた成果をベースとした製造技術の事業化を目指し、バイオ由来ポリマー市場に進出することで、持続可能社会の実現に貢献する。

(7) 最終目標の達成度

基盤技術を取り入れた生産株開発に取り組み、生産性が最大化する生合成経路の設計、生産性が向上する遺伝子の取得、そして生合成の律速反応を触媒する酵素の発現量の向上といった成果を得た。これらの成果を生産株に統合することで、生産性を3.2倍に向上させ、世界最高の生産性を実現し、将来の実用化が見通せるレベルとして設定した最終目標を概ね達成した。

キー酵素の高機能化においては、目的とするポリアミド原料の生産活性が向上した酵素の取得を最終目標とした。酵素構造をベースとしたMD計算手法を用いることで、活性が14倍向上した酵素を取得し、生産技術コンセプトの実証に最低限必要なレベルとして設定した目標を大きく上回った。

(8) 研究開発成果の意義

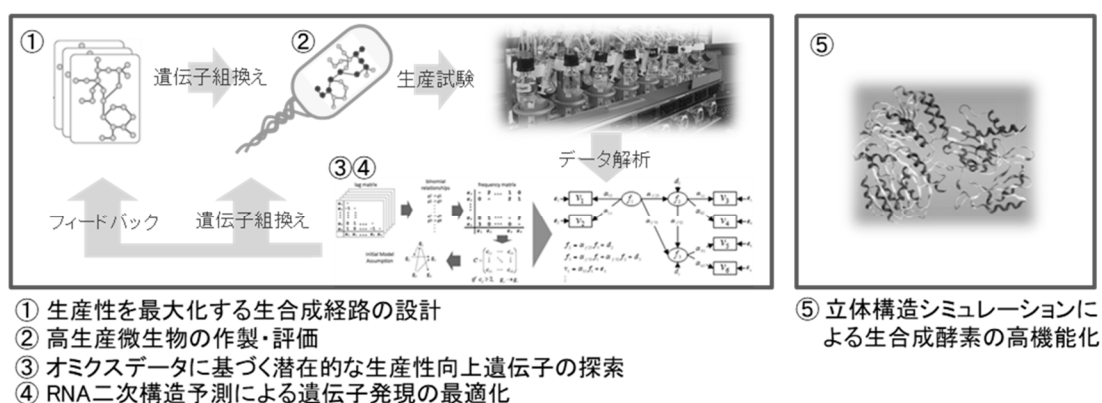


図 3.2.4.1-1 生産株とキー酵素の開発スキーム

①生産性を最大化する生合成経路の設計

②高生産微生物の作製・評価

ポリアミド原料の生合成経路の最適化を目的として、代謝予測（基盤技術）と実験検証に基づく株の遺伝子改変に取り組み、生産性を 3.2 倍に向上させ、世界最高の生産性を実現した。

③オミクスデータに基づく潜在的な生産性向上遺伝子の探索

種々の生産株および培養条件下での培養試験で取得したトータル RNA を RNA-seq に供し、得られた遺伝子発現データを元に発現制御ネットワーク推定（基盤技術）を実施した。そこで見出された、ポリアミド原料の生産性向上に寄与すると推定される 5 遺伝子の評価を行った結果、生産性が向上した 3 遺伝子を取得した（最大 1.3 倍向上）。

④RNA 二次構造予測による遺伝子発現の最適化

ポリアミド原料の生合成において律速となっている酵素の発現量向上を目的として、mRNA の二次構造予測に基づく塩基配列設計（基盤技術）を実施した。目的酵素遺伝子の ORF（Open Reading Frame）上流に翻訳を促進するタグ配列を付加することで、発現量および生産性を向上させた。

⑤立体構造シミュレーションによる生合成酵素の高機能化

生合成酵素の活性向上を目的として、酵素の立体構造に基づく改変に取り組んだ。改良された MD 計算方法である ALSD 法（基盤技術）を用いて目的活性の向上に寄与するアミノ酸残基を推定した。最も評価スコアが高かったアミノ酸残基を他の 19 種類のアミノ酸残基に置換した変異体を作製・評価した結果、MD 計算 1 回の試行で活性が 14 倍に向上した変異体を取得した。

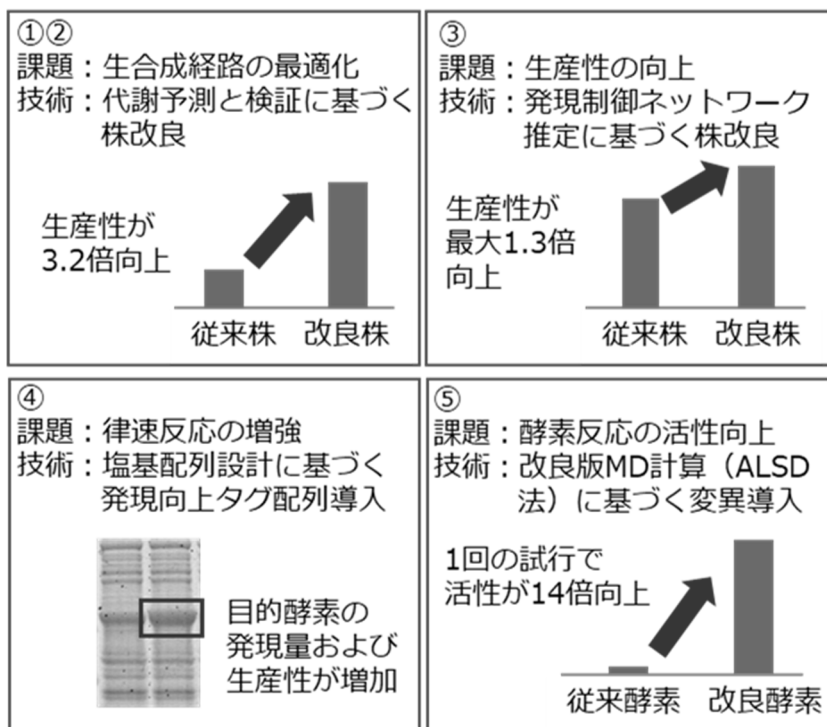


図 3.2.4.1-2 生産株とキー酵素の開発の成果

(9) 成果の普及

BioJapan2019 および BioJapan2020 での NEDO ブース出展にあたっての刊行物作成に参加した(表 3.2.4.1-1)。

表 3.2.4.1-1 成果普及活動実績

年度	論文		その他外部発表				受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2019	0	0	0	0	1	0	0
2020	0	0	0	0	1	0	0
PJ 期間 合計	0	0	0	0	2	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

2020 年度に 1 件の特許出願を行った(表 3.2.4.1-2)。

表 3.2.4.1-2 特許出願実績

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2019	0	0	0
2020	1	0	0
PJ 期間 合計	1	0	0

(11) 成果の事業化に向けた戦略

本技術開発の実用化への取り組みについては、自社での実施、または取得した特許をもとにした技術ライセンスの可能性が考えられる。実用化は社会情勢、市場動向などを考慮し戦略的に進める。

【市場動向】

バイオマスを原料とするポリマー製造は、成長産業として位置づけられている。市場調査レポート（2018 年、Global Bio Based Polymers Market）によると、バイオマス由来ポリマーの世界生産能力は 2018 年の年間 183 万 t から年平均成長率（CAGR）約 10%で伸び、2030 年には年間約 575 万 t に達すると予想されている。

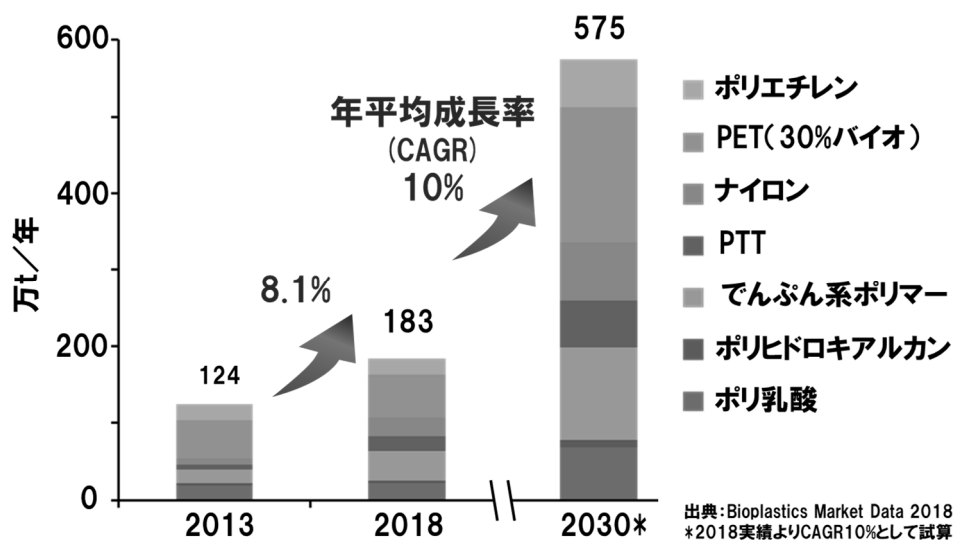


図 3.2.4.1-3 バイオマス由来ポリマーの世界市場予測

(12) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

バイオ由来ポリアミド原料の製造について、今後の研究開発の進捗状況から、成果に基づく研究開発の継続・現状の事業化への可能性の判断を行う予定である。事業性については、製造技術レベル、市場ニーズ、原料価格、社会動向などから判断することを想定している。また、スケー

ルアップ検討により得られたサンプル品を社内外へ提供し、評価結果を製造技術にフィードバックする予定である。

(13) 成果の事業化の見通し

【用途（販売予定先）】

本事業で開発したポリアミドは、従来の石化由来品と同様の用途に展開可能であると見込んでいる。東レは、素材メーカーとして各種ポリマーの製造、加工、販売までのインフラとノウハウを保有しており、繊維や樹脂製品として展開してきた実績があることから、従来と同様の用途、販売ルートを活かすことができる。

【事業化のスケジュール】

本プロジェクトの成果を基盤として継続的に事業化に向けた検討を進め、事業化フィージビリティスタディを高い精度で実施することを想定している。

【競合に対する優位性の根拠】

本事業の開発対象であるポリアミドは、従来の石化由来品と同様の物性であるため、既存石化由来品と置き換えることによる市場投入が可能と考えられる。

【価格競争力】

開発目標を達成した場合に基づくバイオ由来ポリアミド原料の想定価格を算出し、石化由来品と同等の価格で販売しても収益が見込めるバイオ由来ポリアミド原料の技術水準および生産規模を求めた。社会情勢、市場環境にもよるが、技術向上および生産規模が拡大すれば、石化由来品と同等あるいはそれ以下の価格で販売できる可能性がある。

(3) 全体計画

計画は以下の表 3.2.4.2-1 の通り。研究開発項目①～⑤で得られた成果を用いて菌株を最適化し、研究開発項目⑥でスケールアップを実施した。

表 3.2.4.2-1 全体計画

研究開発項目	2019 年度				2020 年度			
	第 1 四半期	第 2 四半期	第 3 四半期	第 4 四半期	第 1 四半期	第 2 四半期	第 3 四半期	第 4 四半期
①RNAseq 解析								
②培養方法検討								
③コレステロールエステラーゼと foldase の発現量最適化								
④分泌機構最適化								
⑤結晶構造解析を基盤とした機能解析								
⑥スケールアップ検討								

(4) 実施体制

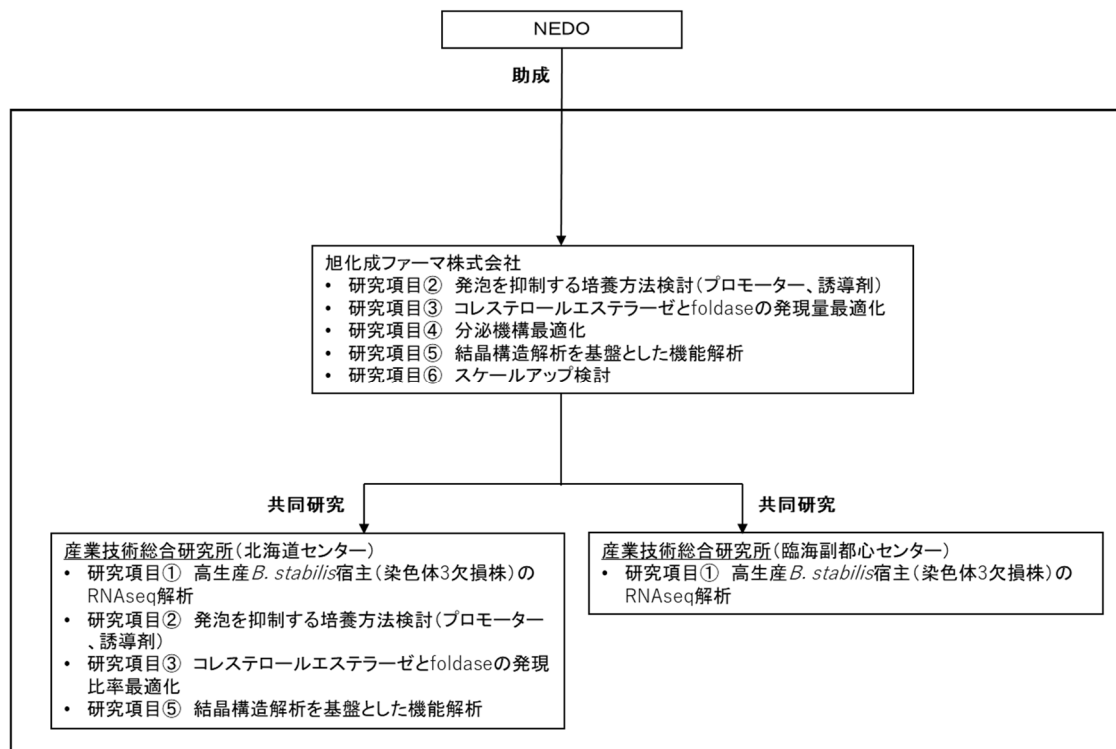


図 3. 2. 4. 2-2 実施体制図

(5) 運営管理

共同研究先と定期的な打ち合わせを実施した。

(6) 実施の効果

従来の微生物（野生株）と比べ 30 倍以上の生産能力を持つスマートセルを開発することができた。この結果、生産工程における電力消費量も低減でき、CO2 排出量を年間約 23 トン削減（従来比約 96%削減）する効果が期待できる。

(7) 最終目標の達成度

表 3. 2. 4. 2-2 最終目標の達成度

研究開発項目	達成度*	理由
①RNAseq 解析	○	計画通り達成することができた
②培養方法検討	○	計画通り達成することができた
③コレステロールエステラーゼと foldase の発現量最適化	○	計画通り達成することができた
④分泌機構最適化	○	計画通り達成することができた
⑤結晶構造解析を基盤とした機能解析	○	計画通り達成することができた
⑥スケールアップ検討	◎	計画以上の結果を得ることができた

*達成度 ◎：大きく上回って達成、○：達成、△：概ね達成、×：未達

(8) 研究開発の成果と意義

コレステロールエステラーゼ高生産化のために、スマートセル技術を用いた宿主の改良に取り組んだ。無作為に染色体上の遺伝子を破壊する実験や、遺伝子に変異を導入する実験によって得られた変異株のコレステロールエステラーゼ生産量と遺伝子配列解析との相関を検討した結果、コレステロールエステラーゼの生産能力向上に寄与する、従来は機能が不明であった特異的な遺伝子を発見することに成功した。

委託事業で構築した新規プロモーターを利用した発現技術と助成事業で構築した改変型宿主を組み合わせることにより、コレステロールエステラーゼの分泌生産量が野生株の 30 倍以上に向上することを発見し、従来の育種法では解決できなかった高生産型スマートセルの構築に初めて成功した。これにより年間に使用する培養量と製造回数を削減しても従来と同量のコレステロールエステラーゼ生産が可能となり、結果として生産工程における電力消費量を CO2 排出量で換算すると年間約 23 トンの削減効果（従来比約 96%削減）が期待できる（図 3.2.4.2-3）。

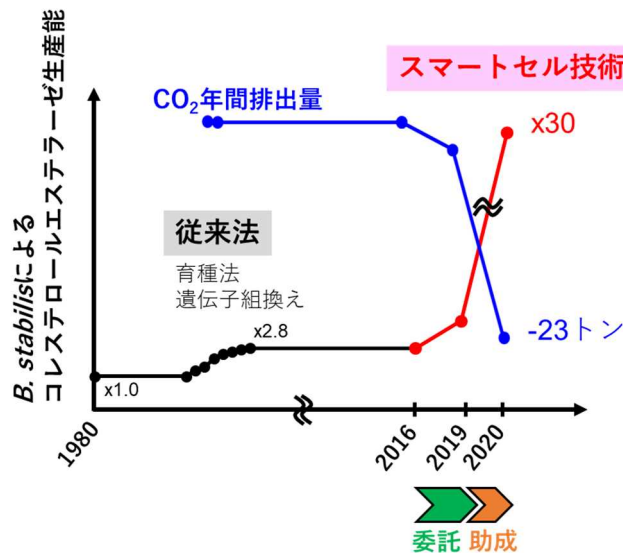


図3.2.4.2-3 研究の成果

(9) 成果の普及

表 3.2.4.2-3 成果普及活動実績

年度	論文		その他外部発表				受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2019	1	0	4	0	1	0	0
2020	1	0	2	3	1	0	0
PJ 期間合計	2	0	6	3	2	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

表 3.2.4.2-4 特許出願実績

年度	特許出願		
	国内	外国	P C T
2019	1	0	1
2020	1	0	1
PJ 期間 合計	2	0	2

(11) 成果の事業化に向けた戦略

本研究で構築したスマートセルを用いて早期の事業化を進め、スマートセルインダストリーの実現に貢献します。これにより野生株を用いた生産工程に対し、年間 CO2 排出量を約 23 トン削減した低環境負荷生産の実現に取り組んでいきます。

(12) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

構築したスマートセルによって生産されたコレステロールエステルゼの事業化および製造に必要な準備を進め、早期の販売開始を目標として進める。

(13) 成果の事業化の見通し

開発したスマートセルを用いることで、性能面だけでなく価格面での優位性を獲得することができ、ユーザーニーズに合致したコレステロールエステルゼを提供することが可能である。

3.2.4.3 希少アミノ酸エルゴチオネイン高生産スマートセルの開発（長瀬産業株式会社）

(1)背景と目的

本事業で高生産菌の開発を目指すエルゴチオネイン（以下、EGT）は、強力な抗酸化活性をもち、ヒト体内で生合成できないことからビタミン様物質として近年注目されている希少アミノ酸である。その機能性の高さから、特に食品・化粧品市場での需要が大きく、国内だけでも既に100種近い配合製品（多くがキノコ抽出物）が存在する。今後の市場規模の拡大が予測されており、関連する抗酸化剤であるグルタチオン、アスタキサンチン、コエンザイム Q10 との比較より、潜在的に同等以上の市場規模が見込まれている。しかし、現行の製造方法である化学合成法、キノコ類からの抽出法には、製造コスト、安全性、安定供給に大きな課題が存在する。このため、既存の EGT は非常に高価であり、既存製品に含まれる EGT の含量は非常に少なく、最も需要がある機能性食品等の製品に使用できない実情がある。そのため、本事業では本プロジェクトの研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」の基盤技術を活用することで、EGT の高生産スマートセルを開発し、EGT を安価・安全・安定的に供給可能なバイオプロセスの実現を目指す。

(2)位置づけ、目標値

現行の主要な製法である化学合成法では、高純度な EGT を製造可能であるが、製造コストが高く十分な有効濃度の EGT を含むサプリメントや化粧品等の製品を開発することが困難であった。当社では、EGT の使用を希望する複数のメーカーと用途開発を進めることで、発酵由来高純度 EGT のポテンシャル、及び需要を確認している。本事業では「発酵＋高度精製」を組み合わせ、発酵由来高純度 EGT の安価生産法の開発を目的に、EGT 高生産スマートセルの育種を目指す。市場での希望価格、当社グループの過去の発酵生産物の培養・精製を含む製造実績から、事業化に必要な生産菌の最終目標生産量を設定した。また、EGT の発酵法開発を目指す複数の競合グループが国内外に存在するが、公知で最も高い EGT 生産量（Tanaka et.al., Sci Rep., 2019, 13;9(1):1895）と比較し、チャレンジングな目標値を設定した。

また、当社では放線菌を用いた EGT 生産菌の開発を進めているが、本事業では高機能な合成酵素、排出輸送体を 2 年弱という短期間で開発するために、扱いが容易且つ、微生物ライブラリー等のツールが充実している大腸菌を宿主として利用し、研究開発を行う。

【事業終了時点の目標】

- ・ エルゴチオネインを培養液中に、目標生産量（非公開）以上生産させる。

上記を達成するために、以下の課題に関する研究開発を行う。

- ・ 課題①：高機能型 EGT 合成酵素を取得し、生産性を向上させる。
- ・ 課題②：大腸菌における EGT の排出輸送体（エクスポーター）を探索・同定する。
- ・ 課題③：EGT エクスポーターの発現を最適化する。

(3) 全体計画

課題①、②、③について実施体制記載（図 3.2.4.3-1）の通り、各課題について平行して技術開発を進める。各課題で得られた知見については、随時共同研究先と共有を行い、長瀬産業において生産菌株への集約を実施し高生産菌での有用性を評価する。評価後、各共同研究先へフィードバックを行い、開発した技術の有意性を迅速に評価し、効率的な開発を進める。

(4) 実施体制

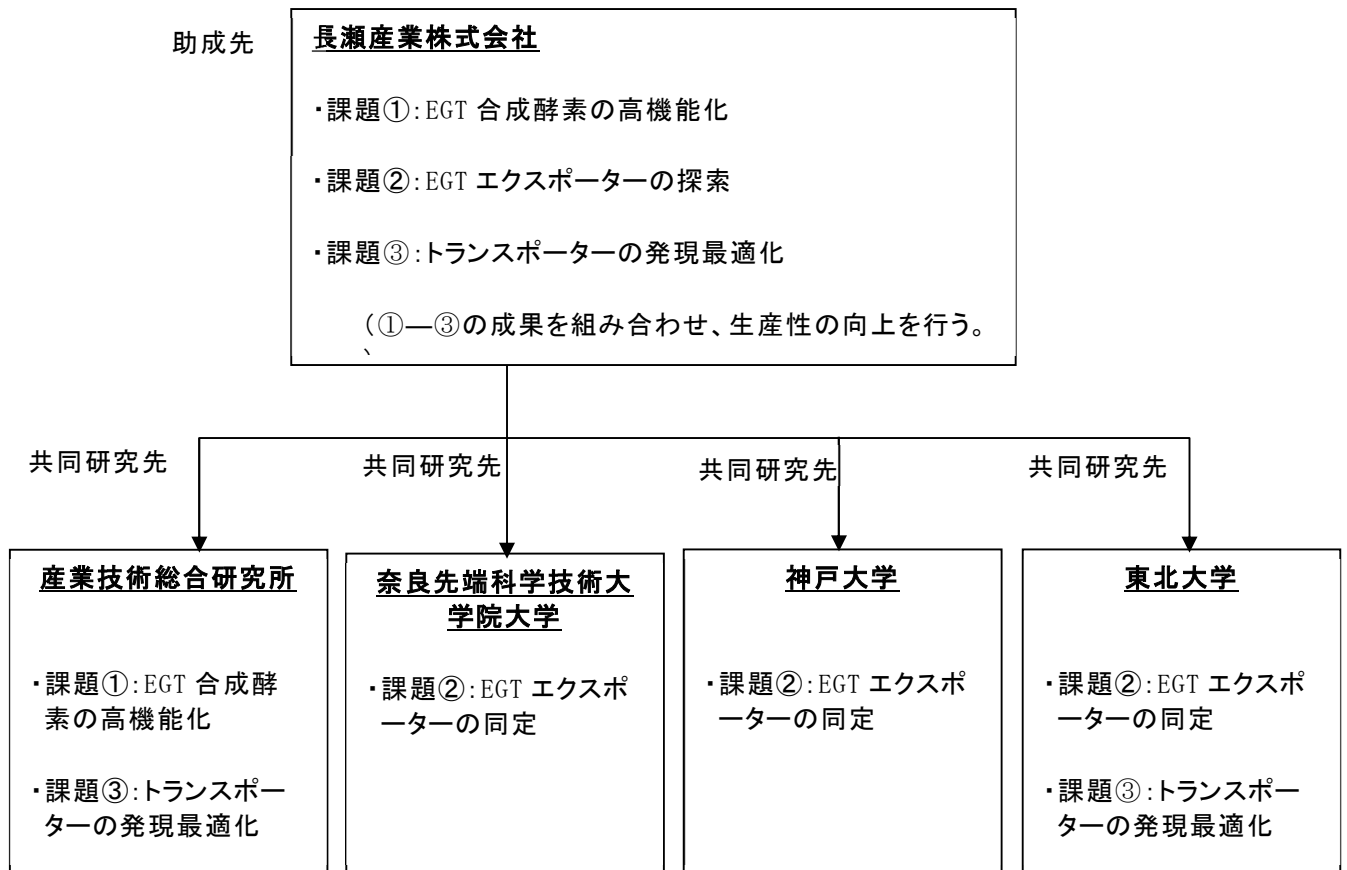


図 3.2.4.3-1 実施体制図

(5) 運営管理

下記の会議体により、助成先及び各共同研究先で円滑な進捗共有を行った。

- 全体会議：助成先及び全共同研究先が参加・実施。半年に一度。
- 進捗会議：助成先及び各共同研究先と実施。3 か月に一度、随時。
- PL ヒアリング：助成先及び全共同研究先が参加・実施。半年に一度。
(東北大学とは進捗会議を2週間に一度、オンラインで実施)

課題②など連携機関が多いテーマに関しては、PJ の遅延等が起きないように、上記会議体に加え助成先研究員がメールによる密な連絡を実施。

(6) 実施の効果

EGT については、今後の市場規模の拡大が予測されており、類似する抗酸化剤であるグルタチオン、アスタキサンチン、コエンザイム Q10 の市場を考慮すると、潜在的な世界市場は数十億円規模を超えると予測されている。現状、サプリメント等の安価な製品市場で使用可能な高純度 EGT は市場に存在しないため、本技術開発により上記市場の開拓が可能となる。

(7) 最終目標の達成度

最終目標に対する成果と達成度を表 3.2.4.3-1 に記載する。

表 3.2.4.3-1 最終目標に対する成果と達成度

課題	開発項目	成果	達成度
課題①	EGT 合成酵素の高機能化	約 4200 種類の EGT 合成酵素を評価し、従来酵素より生産性が高い 39 種の酵素を同定した。さらに生産性が向上する 18 種の酵素を同定した。	◎
課題②	EGT エクスポートの探索	EGT の排出に関わるエクスポーター遺伝子を複数同定し、さらに生産性向上に関わる輸送体遺伝子についても複数同定した。	◎
課題③	トランスポーターの発現最適化	課題②にて、同定した輸送体遺伝子の発現をコントロールし、生産性を向上させた。	○
課題①～③ 集約	1-3 知見の生産菌への集約	各課題において、要素技術を開発し、それらを組み合わせることで、最終目標生産量を達成した。（世界最高レベル達成）	○

◎：大きく上回って達成（特筆した成果を記載）

○：達成（成果を記載）

△：概ね達成（成果と未達ともに記載）

×：未達（未達理由について記載）

(8) 研究開発成果の意義

本助成事業では、スマートセル基盤技術である、「酵素改変設計技術」、「導入遺伝子配列設計技術」、「ハイスループット（HTP）微生物構築・評価技術」、「輸送体探索技術」を活用し、安価かつ高純度な EGT を提供可能なバイオプロセスを確立し、早期の事業化を目指す。目標を達成する為に、①EGT 合成酵素の高機能化、②EGT エクスポートの探索、及び③トランスポーターの発現最適化、以上 3 つの課題の解決を目指した。

【課題①：EGT 合成酵素の高機能化】

産総研グループと共同で、酵素改変設計技術を活用することで、生産性が向上する可能性がある約 4200 種の合成酵素を候補に選定した。実際にこれらの酵素を「HTP 微生物構築・評価技術」を活用し評価した結果、生産性が向上する 39 種の合成酵素、うち顕著に生産性が向上する 10 種の酵素を同定した。

【課題②：EGT エクスポートの探索】

神戸大学グループ、奈良先端大学グループとの協業により、長瀬産業において「EGT 生産株 HTP 評価システム」を構築した。同システムに、奈良先端大学グループの Keio collection 及び、神戸大学の自動形質転換技術を組み合わせることで、EGT 生産ベクターを導入した大腸菌全輸送体欠損株（581 株）の培養評価を行った。得られた各破壊株の生産性データを解析し、欠損により EGT 生産性が有意に低下する輸送体候補遺伝子を特定し、東北大学グループの輸送体探索プラットフォームを活用することで、EGT 生産性向上に関与する輸送体遺伝子を同定した。

また、このスクリーニングの結果、破壊により EGT 生産性が向上する輸送体遺伝子についても複数同定した。

【課題③：トランスポーターの発現最適化】

東北大学グループ、産総研グループとの協業により、生産菌での輸送体タンパク質の発現毒性を抑える技術開発を行った。検討の結果、上記毒性を緩和することに成功した。

【課題①、③：技術の生産菌への集約】

上記の通り、生産性向上に寄与する改変を複数同定した。それら有効改変を組み合わせることで相乗的な効果が確認され、EGT 生産性が顕著に向上することを見出した。

【年度総括】

最終的に事業目標を超える生産量を達成し、事業開始時の元株と比較し 5.4 倍の生産性を達成する生産菌の開発に成功した（世界最高レベル）。現在、EGT の健康食品、化粧品市場での利用の期待から、EGT 発酵生産菌の開発競争は激化している状況にある。本助成事業により、ニーズが高まっている EGT の事業化目標値を達成した社会的意義は大きい。来年度以降、得られた知見を活用し EGT 生産性をさらに高めたスマートセルの開発を進める。また、同菌株を活用し、既に開発を行っている培養プロセス、高度精製プロセスを用いることで、EGT 発酵生産の事業化を進める予定である。

(9) 成果の普及

表 3.2.4.3-2 成果普及活動実績

年度	論文		その他外部発表				受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他プレスリリース	
2019	0	0	1	0	0	0	0
2020	0	0	1	5	1	1	0
PJ 期間 合計	0	0	2	5	1	1	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

酵素、及び輸送体については生産菌株で評価を行い、知財化の際に、既存技術と比較し有効な権利範囲を確保できるか、新規性、進歩性を担保できるかなど随時判断し、競争力のある知的財産の確保を目指している。

(11) 成果の事業化に向けた戦略

エルゴチオネイン（EGT）に関する論文や特許は年々増加しており、これまでに認知機能が低下する軽度認知障害の患者、フレイル患者、さらに高齢者で血中 EGT 濃度が低いことが報告されている。また、ヒト試験においても EGT の経口摂取が認知・学習機能を改善することが示されたことで、2021 年 1 月に国が定める機能性表示食品制度の機能性関与成分として登録され、注目度が上がっている。EGT に関しては、サプリメント、化粧品、医薬品など多様な分野での利用が想定されるが、世界的に認知症患者が増加傾向にあることや、上記の機能性を考慮すると、健康食品やサプリメント市場での利用が強く期待される。また、化粧品用途においても、既に高価な合成品由来の EGT が配合されていることから、安価・高純度な発酵 EGT の提供を実現することで、既存製品より高濃度に EGT を配合した製品など、新たな市場の開拓も期待できる。

これまで、世界的に安価かつ高純度な EGT の安定供給が課題とされており、本事業の成果を活用し、発酵法＋高度精製法を組み合わせたバイオプロセスを完成させることで、上記課題の解決を目指す。

(12) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

本事業の成果を活用し、当社でこれまで進めてきた放線菌に適応、また開発した大腸菌の利用により EGT 高生産発酵プロセスの開発を進める。さらに、当社で独自に開発した発酵液からの高度精製プロセスと組み合わせることで、事業化を目指す。

(13) 成果の事業化の見通し

当社の事業化コンセプトは、発酵法を用いることで製造コストの課題を解決し、安価かつ高純度な EGT をサステナブルなプロセスで安定供給することにある。これにより、高純度であるが環

境および製造コストに課題がある化学合成法、食品としての安全性は高いが純度、製造コスト及び安定供給に課題がある抽出法との差別化が可能となる。現在、事業化を目指し、既に EGT の利用に興味をもつ複数のポテンシャルユーザー企業と協業を進めている。これまでに、有効性の検証、製品に求められる規格・価格等を調査してきており、安価・高純度な EGT への市場ニーズがあることを確認している。

当社グループ会社には、食品用酵素や機能性食品素材について、発酵技術を用いて製造・販売を行うナガセケムテックス株式会社がある。既に、同社と開発中の発酵及び高度精製プロセスのスケールアップ検討について協業を開始している。今後、事業化を見据えたマーケティング活動にも注力し、製造及び販売に関する体制を整え早期の事業化を目指す。

3.2.4.4 スマートセル技術を応用した天然ヒト型長鎖セラミド高含有醤油麹菌の開発 (福岡県醤油醸造協同組合)

(1)背景と目的

肌の保湿成分にはコラーゲンやヒアルロン酸、エラスチン、セラミドなどがある。コラーゲンやヒアルロン酸、エラスチンは皮膚の真皮に存在し皮膚のハリや弾力を担っている。一方、セラミドは表皮の最外層である角質層に存在し、外界からの異物の侵入や内部からの水分の蒸散を防ぐバリアの機能を有している。コラーゲン、ヒアルロン酸、エラスチン、セラミドは何れも皮膚の保湿成分であるが、バリア機能を有する成分はセラミドだけであり、化粧品の素材として注目を集めている。本研究ではヒトの角質層に存在するセラミドであって、その化学構造はスフィンゴ塩基が 4-ヒドロキシスフィンガニン（フィトスフィンゴシン）、脂肪酸部分がノンヒドロキシ脂肪酸のセラミド NP と脂肪酸部分が α -ヒドロキシ脂肪酸のセラミド AP、さらに脂肪酸の炭素数が 24 のものをヒト型長鎖セラミドと称している。このセラミドと同じ化学構造のセラミドが醤油粕など醸造粕中に発見され、現在、化粧品素材として使用されている。醤油粕中のヒト型長鎖セラミドは麹菌の作用により産生されているため、麹菌を用いた培養法でヒト型長鎖セラミドを造ることを試みたが、その生産性に課題があった。そこで、本研究ではスマートセルプロジェクトで開発されたゲノムスケールモデル（GSM）に基づくフラックスバランス解析（FBA）からヒト型長鎖セラミド生産性向上に寄与する標的遺伝子の推定、遺伝子発現制御ネットワークからの同標的遺伝子の推定を行い、推定された標的遺伝子を統合しヒト型長鎖セラミドを高含有する麹菌を作出することで、その事業化に目途を付けることを目的とした。

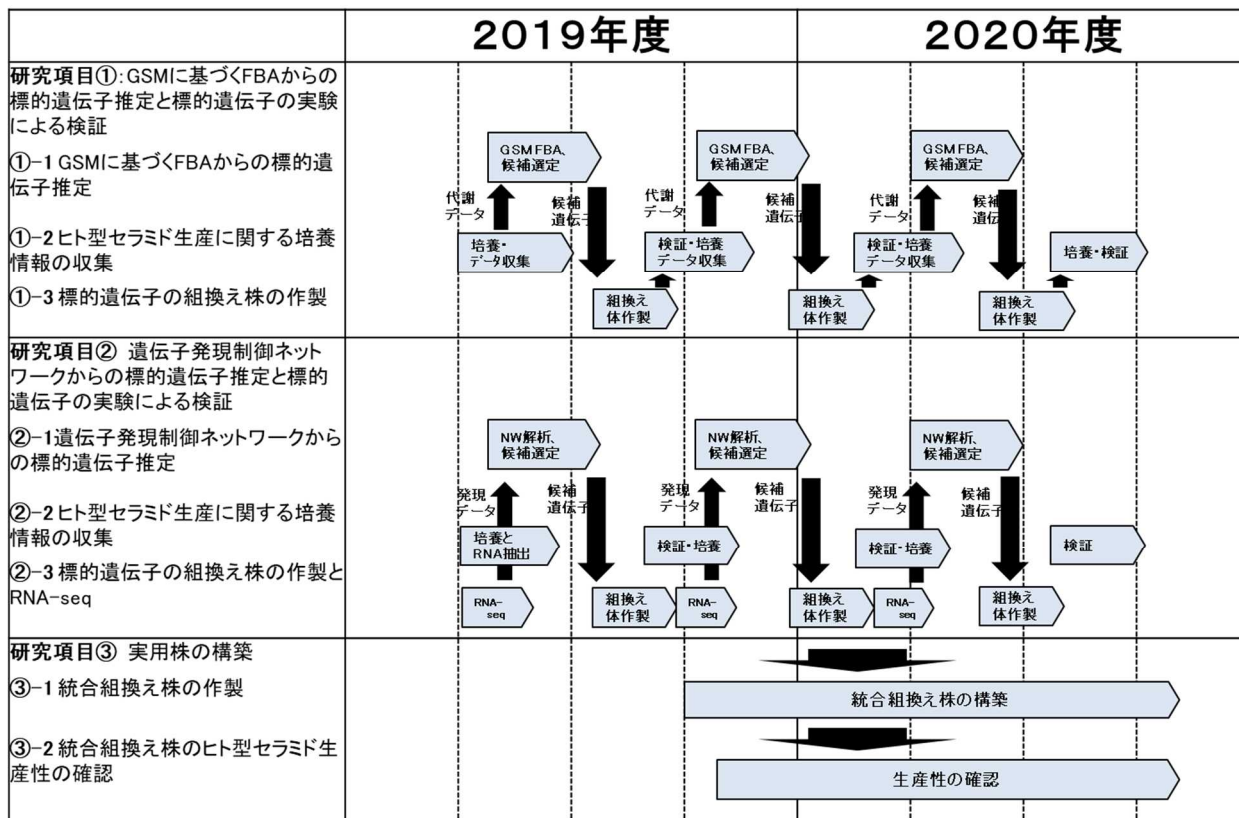
(2)位置づけ、目標値

ヒト型長鎖セラミドは主にスキンケアの素材として用いられている。2020 年の国内化粧品市場は、コロナ感染症による渡航制限でインバウンド需要が激減すると共に外出自粛などに伴うメイクアップ機械減少により、前年比 7.8%減の約 2 兆 6000 億円と見込まれる。この中で約 48%を占めるスキンケア分野の市場希望は 1 兆 1800 億円と予想されている。化粧品素材としてのセラミドが主に化学合成品であるのに対して、本研究のセラミドは前述の天然のヒト型セラミドであり、新しいコンセプトの商品開発が期待される。天然ヒト型セラミドを高含有する麹菌を作出することにより、従来の製造方法に比べ製造コストを大幅に下げることが目標とした。

(3)全体計画

本目的は、現状のセラミド産生醤油麹菌を改変して、セラミド高含有醤油麹菌を作出することである。そのための戦略として最も重要な項目は高精度な改変遺伝子の推定である。この推定手法として、スマートセルプロジェクトにおいて開発された 2 つの手法、研究項目①ゲノムスケールモデル（GMS）に基づくフラックスバランス解析（FBA）からの標的遺伝子推定、及び研究項目②遺伝子発現制御ネットワークからの標的遺伝子推定、を用いる。開発全体としては、「改変候補遺伝子推定と遺伝子改変株の作出と実証、及び実験データ収集」を繰り返すことによって、最終的に研究項目③で天然ヒト型セラミド高含有麹菌株の作出を目指した（表 3.2.4.4-1）。

表 3.2.4.4-1 全体計画



(4) 実施体制

標的遺伝子を推定手法として、ゲノムスケールモデル（GSM）に基づくフラックスバランス解析（FBA）からの標的遺伝子推定、と遺伝子発現制御ネットワークからの標的遺伝子推定、を活用できる研究体制を確立した。また、麹菌の組換え体の作製において専門の研究者の加入により体制強化を図った（図 3.2.4.4-1）。

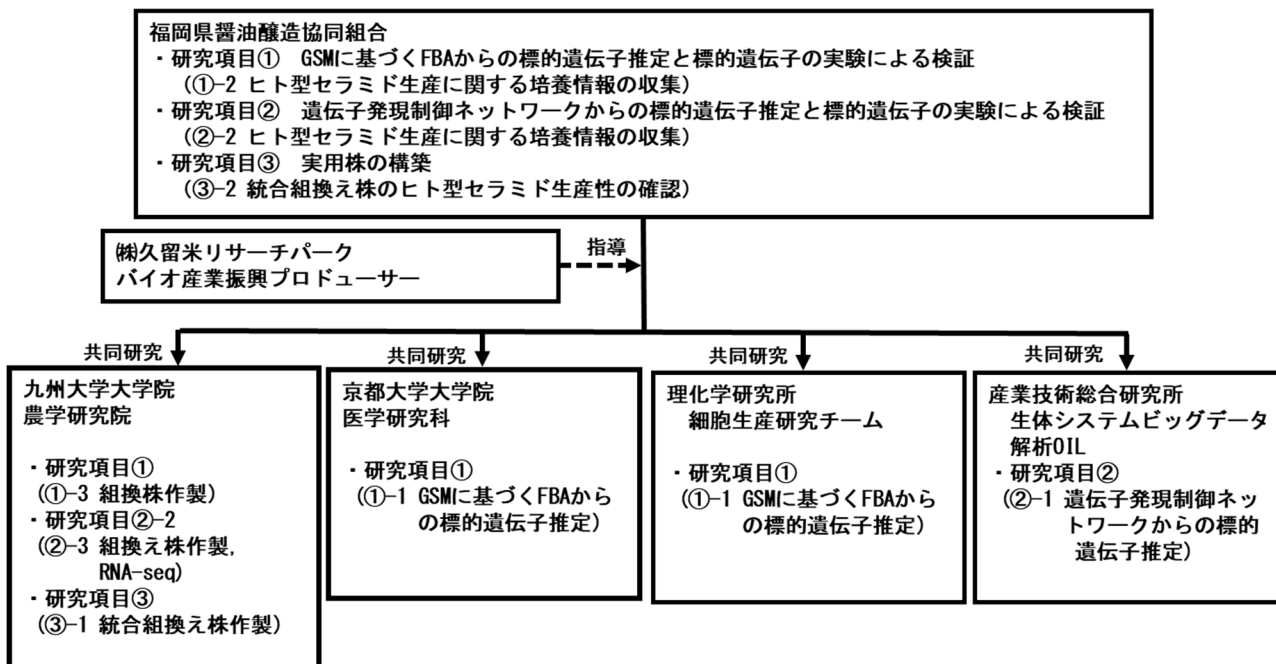


図 3.2.4.4-1 実施体制

(5) 運営管理

研究の運営は、標的遺伝子推定を担うグループとの意見交換・討議は年数回適時 Web 会議にて行った。また、組換え体の作製とその評価を行うグループについては、月に複数回面談し研究の推進を図った。さらに、ヒト型長鎖セラミドに関連するスフィンゴ脂質類の代謝や分析の専門家、事業化の推進について自治体アドバイザーとの意見交換を適宜行った。

(6) 実施の効果

2020 年の国内の化粧品市場は約 2 兆 6,000 億円と見込まれているが、世界全体では 34 兆円を超える市場との見積りもある。その中でセラミドは大変注目を集めている保湿成分である。本開発を達成することで、ヒト型長鎖セラミドを抽出する際に使用される溶媒の量を大きく減少させる。さらに発酵過程を加えても従来の製造方法に比べ工場稼働日数を 4 割程度減少させ環境負荷を低減することができる。

(7) 最終目標の達成度

表 3.2.4.4-2 目標達成度

実施項目	目標	成果	達成度
①GSMに基づくFBAからの標的遺伝子推定と標的遺伝子の実験による検証	・ 生産性向上の代謝経路制御を行う遺伝子を推定する。	・ GSMに基づくFBAの結果から標的遺伝子破壊株を作製し、ヒト型長鎖セラミド量が増加した組換え体が確認され生産性向上の代謝経路制御を行う遺伝子が確認された。 ・ セラミド代謝経路の関連遺伝子の破壊株を作製し、ヒト型長鎖セラミド量が増加した組換え体が確認した。	○
②遺伝子発現制御ネットワークからの標的遺伝子推定と標的遺伝子の実験による検証	・ 生産性向上の発現制御を行う遺伝子を推定する。	・ 「ヒト型セラミド生産改善」と「ヒト型セラミド関連酵素強化」の観点で解析した。 ・ 「ヒト型セラミド生産改善」の標的遺伝子破壊株を作製し、ヒト型長鎖セラミド量が増加した組換え体が確認され生産性向上の発現制御を行う遺伝子が確認された。	○
③実用株の構築	・ 実用候補株の取得	・ 培養条件の検討を行い従来の培養条件に比べヒト型セラミド量が増加する条件を見出した。 ・ この結果と実施項目①②の結果を組合せ、ヒト型長鎖セラミド発酵生産の目的が立った。	○

* 達成度 ○：大きく上回って達成、○：達成、△：概ね達成、×：未達

(8) 研究開発成果の意義

研究項目①：GSMに基づくFBAからの標的遺伝子推定と標的遺伝子の実験による検証

(2019～2020 年度、理化学研究所、京都大学)

本研究開発では、麴菌のヒト型セラミド合成系に最適化した GSM を作製し、これに基づく FBA 解析により生産性向上の代謝経路制御を行う遺伝子を決定した。決定した遺伝子の遺伝子組換え麴菌を作製し、ヒト型セラミド生産性の評価を行った。

使用する麴菌は産生するヒト型セラミドの分子種の多い M61 株を用いた。従来の麴菌 M61 株の培養条件を基準に様々な培養パラメーターを変化させた培養条件を設定し、麴菌 M61 株のヒト型セラミド生産性等の培養プロファイルを取得した。それらの培養プロファイルデータを使用して、公開されている麴菌のゲノム情報および試験に用いた麴菌 M61 株のゲノム情報を基に京都大学と理化学研究所にて構築した GSM に基づく FBA を行った。その結果、解糖系に関与する遺伝子や多糖の生合成に関与する遺伝子などがヒト型セラミド生産性改善のための標的遺伝子として推定された。それらの遺

伝子破壊株を、麴菌 M61 株を使用して作製し、ヒト型セラミド生産性を評価した。その結果、親株よりヒト型セラミド生産量が増大された遺伝子組換え麴菌を複数株確認した。

研究項目②：遺伝子発現制御ネットワークからの標的遺伝子推定と標的遺伝子の実験による検証
(2019～2020 年度、九州大学、産業技術総合研究所)

ヒト型セラミド合成量データと遺伝子発現プロファイルデータを基に遺伝子発現ネットワークを解析し生産性向上の発現制御を行う遺伝子決定した。前項の麴菌の培養データ収集時麴菌体を 48 検体採取し RNA を抽出し遺伝子発現情報を収集用サンプルとした。

先に決定した醤油麴菌 M61 株のゲノム配列情報を用いて DNA マイクロアレイを設計し、この DNA マイクロアレイで遺伝子発現情報収集を行った。得られた遺伝子発現情報を使用して、産業技術総合研究所においてネットワーク解析を実施し、複数のヒト型セラミド生産性に関与する遺伝子の候補を得た。それらの遺伝子破壊株を作製し、その生産性の評価を行った。その結果、セラミド蓄積量に関する遺伝子は、膜タンパク質やトランスポーター等で親株よりセラミド生産性の増大を確認した。

研究項目③：実用株の構築 (2019～2020 年度、九州大学)

2019 年度は麴菌の遺伝子組換え方法の構築を行った。麴菌の組換え体作製は、マーカーに *pyrG* 遺伝子を使用し、5-F0A 耐性により *pyrG* 遺伝子の欠損をスクリーニングする方法にて検討した。その結果、上記方法により単独破壊株および二重破壊株が作製できることを確認した。構築した遺伝子組換え法によって得られたヒト型セラミド高生産用遺伝子組換え麴菌の培養条件を検討した。その結果得られた最適培養条件の適用で、従来の方よりも高いセラミド生産が可能になった。

本研究は、麴菌による天然ヒト型長鎖セラミド (N- α -tetracosanylphytosphingosine) の実用規模生産に向けた世界初の試みであり、本事業の成果はその実現に寄与するものである。

(9) 成果の普及

表 3.2.4.4-3 成果普及活動実績

年度	論文		その他外部発表				受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2019	0	0	0	0	0	0	0
2020	0	0	0	0	1	0	0
PJ 期間合計	0	0	0	0	1	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

特許出願については 2021 年度出願予定である。

表 3.2.4.4-4 特許出願実績

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2019	0	0	0
2020	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	0

(11) 成果の事業化に向けた戦略

2020 年の化粧品市場のスキンケア分野は約 46%程度を占め 1 兆 1800 億円と見込まれている。2020 年はコロナ感染症の影響で市場規模は減少したものの、敏感肌のカテゴリーでは消毒やマスク接触部位の肌荒れ対応などウィズコロナの新たなニーズも生まれている。

天然ヒト型長鎖セラミドに関するこれまでの研究開発で化粧品素材としての安全性および機能性を明らかにした。また、その生産方法として醤油粕抽出法と醤油麹菌による発酵手法を開発してきた。その過程で、前者は大量の抽出溶剤と抽出設備の防爆化、後者は醤油麹菌の天然ヒト型長鎖セラミド蓄積量の向上が課題となっている。本開発の遂行により、醤油麹菌のヒト型長鎖セラミド蓄積量を著しく向上させることで、抽出溶剤の削減や生産設備の最小化により、低コストで天然ヒト型長鎖セラミドの生産が可能となり事業化に目途を付けることができる。

(12) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

表 3.2.4.4-5 事業化に向けた具体的な取組み

課題	2021年	2022年	2023年	2024年	2025年
実用株が生産するヒト型長鎖セラミドの品質確認	● →				
菌体生産設備の検討と設置	● →				
製品設計・生産			● →		
生産テスト・品質確認					● →

本開発の終了後はヒト型長鎖セラミド高生産麹菌の生産設備の検討を進めると共に、実用株が生産するヒト型長鎖セラミドの品質確認や品質規格の設定などの製品設計を行う。さらに生産テストと品質確認を行い本格生産に繋げる（表 3.2.4.4-5）。

(13) 成果の事業化の見通し

醤油粕由来の天然ヒト型セラミドについては化粧品素材として展示会等で営業活動がなされており、スキンケア分野の中の自然派や天然派と言ったカテゴリーで浸透しつつある。従来、化粧品の素材としては主に合成セラミドが用いられてきた。麹菌由来である本研究のヒト型長鎖セラミドも消費者へ醤油粕セラミドと同様のアプローチを行う。

ヒト型長鎖セラミドの量産化に向けて麹菌体の効率的な生産システムを開発する。従来の通気攪拌培養での生産パラメーターの最適化を先行させつつ、新方式の菌体製造装置の検討を行うことで既存設備での生産と新規高効率設備の設置を並行して進める。これにより、ヒト型長鎖セラミドを市場に投入しつつ量産化に目途を付ける。

本開発ではスマートセル設計システムを活用したゲノム編集による産業用麹菌スマートセルの取得と目的物質生産のための生産プロセス開発をヒト型長鎖セラミド（セラミド AP、セラミド NP）生産に適用した試みである。セラミドには多くの分子種があり、本開発の知見は他のセラミド生産にも適用できる。また、麹菌を物質生産の場とする他の物質の生産技術にも展開できる。

3.2.4.5 生体触媒の反応機構推定に基づく高付加価値化成品の製造法開発 (天野エンザイム株式会社)

(1)背景と目的

化学物質の製造において、環境に対する負荷が小さくなるように設計、製造することはグリーンケミストリーと呼ばれており注目を集めている。近年、環境意識の高まり、SDGs への関心、また各国政府の規制強化により、化成品製造への酵素利用が急速に進んでいる。酵素は金属触媒などと比べて環境負荷が少ない触媒であり、バイオプロセスによる物質生産への転換には必須な技術要素である。しかし、必ずしも工業プロセスに最適ではなく、反応プロセスによっては目的物質が十分に得られない場合がある。そのため、酵素改良によりプロセス改善、効率化、省エネルギー化を達成することは、グリーンケミストリーの実現に向けた重要な技術課題である。近年、理論的な酵素設計技術が発展しており、特に分子動力学 (MD) 計算により酵素-基質反応のシミュレーションと、それを利用した酵素設計技術は大きな注目を集めている。

本助成事業では、スマートセルプロジェクトで開発された基盤技術である「MD 計算とドッキングシミュレーションによる酵素設計技術」を活用して、2 種類の微生物由来酵素を対象として研究開発を行った。

(2)位置づけ、目標値

研究項目① メントールの製造酵素開発

位置づけ：

メントールは3つの不斉炭素を有し、合計8種類の構造異性体が存在する。この中で強い清涼感・香気成分を有する異性体はL-メントールのみである。そのため、高品質で安価にL-メントールを生産することが求められている。現状、酵素触媒で製造されるメントールのL-メントール含有率(鏡像体過剰率)は97.0%ee程度のため、医薬品グレードに必要な高純度L-メントール(99%ee以上)に使用されていない(図3.2.4.5-1)。高純度L-メントールを製造する競合技術としては、植物由来の天然メントールの抽出と一部の化学メーカーにより実用化された化学法があげられる。しかし、それらの課題として、植物由来ミント作物に関しては、作付面積・収量が頭打ちとなっていて、需要の増加にこれ以上の対応が難しいことがあげられる。化学法の場合は、高純度L-メントールの製造を可能にするためには、高度な化学合成プロセスの設計運用が必須であり、現在のところ製造可能な企業は世界で3社のみである。

そのため、本事業で開発する酵素が上市されて酵素法による高純度L-メントールの製造が可能になれば、高度な化学合成プロセスを持たない企業でも高純度L-メントールの製造が可能になり、大きな価値があると考えている。

以上より、研究項目①の目標をL-メントールへの光学選択性の向上によりメントールのL-メントール含有率を99%ee以上で合成できる世界初の酵素を開発するとした。

	L-メントールの 光学異性純度
植物由来	99.5%ee
化学法	99.0%ee
酵素法	97.0%ee

⇒ 酵素設計で99%ee以上の選択性を目指す

図 3.2.4.5-1 鏡像体過剰率の比較

研究項目② ω 3系高度不飽和脂肪酸の高付加価値化

位置づけ：

ω 3系高度不飽和脂肪酸（ ω 3系脂肪酸）は魚油に多く含まれる機能性脂肪酸であり、抗炎症作用、動脈硬化の予防改善、認知症予防など様々な健康増進作用があることが知られている。米国では、サプリメントの原料として人気があり、年率25%近い市場の成長が続いている。また、日本においても病気を未然に防ぐという観点から、日常生活での積極的な摂取が推奨されている。近年、 ω 3系脂肪酸の生体内における代謝メカニズムの研究が進み、例えば、エイコサペンタエン酸（EPA）は17,18-エポキシエイコサテトラエン酸（17,18-EpETE）に代謝されることで、食物アレルギー症状を予防あるいは治療する効果があることが見出されている（図3.2.4.5-2）。価格的には、EPAに対して、17,18-EpETEは1000倍程度高価になっている。そのため、酵素法による ω 3系脂肪酸代謝物の大量生産に成功すれば大きなインパクトがあると思われる。

以上より、研究項目②の目標を、 ω 3系脂肪酸の酸化位置特異性の向上により ω 3位エポキシ化率が95%以上の選択性を持つ世界初の酵素を開発するとした。

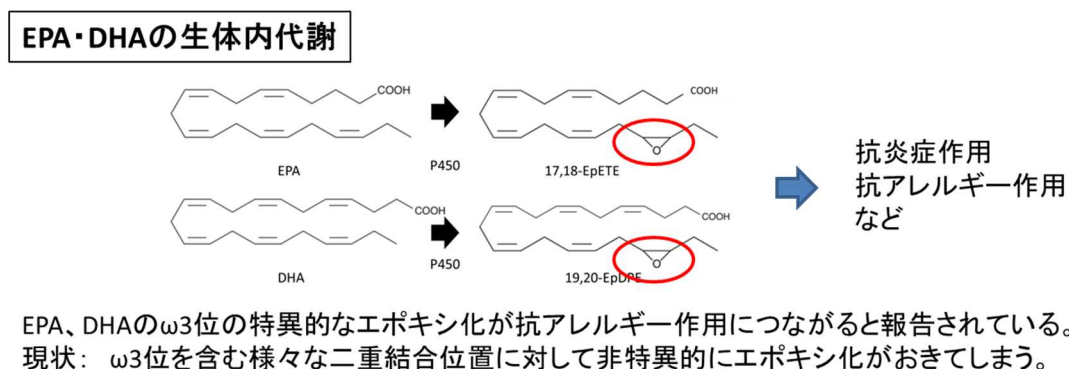


図 3.2.4.5-2 EPA、DHA の生体内代謝の模式図

(3) 全体計画

全体計画を表3.2.4.5-1に示す。

(4) 実施体制

本助成事業の実施にあたり、共同研究を産業技術総合研究所ならびに京都大学と実施した。分担としては、天野エンザイムは、研究項目①のラボ評価（変異型酵素の作製、培養、酵素基質反応、分析）、研究項目②のラボ評価（変異型酵素の作製、培養）を分担した。産業技術総合研究所は、研究項目①、研究項目②のMDシミュレーション計算と酵素-基質反応に関わる重要アミノ酸の同定を分担した。京都大学は、研究項目②のラボ評価（酵素基質反応、生成物の解析）を担当した（図3.2.4.5-3）。

表 3.2.4.5-1 全体計画（助成期間 2 年）

事業項目	2019 年度				2020 年度			
	第 1 四半期	第 2 四半期	第 3 四半期	第 4 四半期	第 1 四半期	第 2 四半期	第 3 四半期	第 4 四半期
① メントールの製造酵素開発 ①-1: MD シミュレーション・変異点設計 ①-2: リパーゼのラボ評価		スクリーニング系の開発	ラボ評価①	MD 計算① ↑	MD 計算② ↓	ラボ評価 (組み合わせ)	スケールアップ評	スケールアップ準備
② ω3 系高度不飽和脂肪酸の高付加価値化 ②-1: MD シミュレーション・変異点設計 ②-2: P450 のラボ評価		スクリーニング系の開発	MD 計算① ↓	ラボ評価①	MD 計算② ↑	ラボ評価②	ラボ評価	スケールアップ評

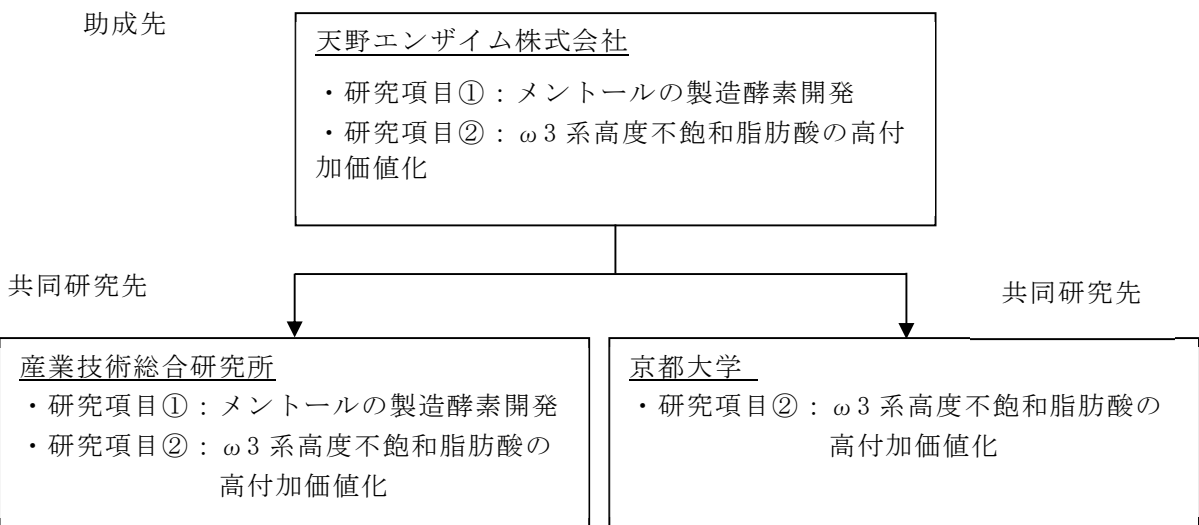


図 3.2.4.5-3 実施体制図

(5) 運営管理

NEDO（PL、PM を含む）関係者同席の全体会議を行い、事業の全体的な進捗や情報の共有を行った。また、研究の進捗に応じて共同研究先とのグループ会議を行い、情報共有、研究方針の議論、次回までの作業分担などの打ち合わせを行った。また、会議とは別に研究の進捗やサンプル提供などの機会に応じて、メール連絡を適宜行った（表 3.2.4.5-2）。

表 3.2.4.5-2 助成期間における会議の件数

	全体会議	グループ会議
2019 年度	2 回（5 月，11 月）	6 回（7 月，8 月，10 月，11 月，12 月，1 月）
2020 年度	2 回（5 月，11 月）	9 回（4 月（2 回），5 月，7 月，9 月，10 月，11 月，12 月，2 月）

(6) 実施の効果

研究項目①：L-メントールの製造酵素開発

- ・ 従来の酵素法を改良して、高品質 L-メントールの製造を実現する。化学合成プロセスを利用せずに、高純度 L-メントールを製造可能な酵素を提供する。
- ・ 本事業により、メントール中の L-メントール鏡像体過剰率が 99%ee 以上を実現できる世界初の酵素を開発した。酵素法で植物由来または化学法で製造する純度と同等の高品質 L-メントールを製造できるようになった。

研究項目②： ω 3 系高度不飽和脂肪酸の高付加価値化

- ・ 本事業により、 ω 3 位に対する位置特性性が 95%以上で特異的にエポキシ化できる世界初の酵素を開発した。さらに、酸化型 ω 3 脂肪酸製造を、バッチ処理で製造できる可能性が示唆された。
- ・ 化学プロセスでは不可能な特異的な酸化反応を実現して、高機能脂肪酸の新たな市場を開拓することを目標に事業化を進める予定。

(7) 最終目標の達成度

表 3.2.4.5-3 最終目標に対する達成度と成果

研究項目	事業項目	最終目標	達成度*	成果
メントールの製造酵素開発	MD シミュレーション・変異点設計	MD シミュレーション計算・酵素反応に関わる重要アミノ酸の同定	○	2 回の MD 計算を実施して、重要アミノ酸を選定してラボ評価を行った。
	リパーゼのラボ評価	L-メントールへの光学選択性の向上、およびメントールの L-メントール含有率（鏡像体過剰率）を 99%ee 以上	○	評価の結果、目標とした鏡像体過剰率 99%ee 以上を達成した。

ω3系高度不飽和脂肪酸の高付加価値化	MD シミュレーション・変異点設計	MD シミュレーション計算・酵素反応に関わる重要アミノ酸の同定	○	3回のMD計算を実施して、重要アミノ酸を選定してラボ評価を行った。
	P450のラボ評価	ω3系脂肪酸の酸化位置特異性の向上、およびω3位エポキシ化率が95%以上	○	評価の結果、目標とした位置選択性95%以上を達成した。

*達成度 ○：大きく上回って達成、○：達成、△：概ね達成、×：未達

(8) 研究開発成果の意義

研究項目①：メントールの製造酵素開発

1. MD計算によるドッキング構造探索と酵素-基質反応に関わる重要アミノ酸残基の同定

最初にMDシミュレーションで再現する反応系を検討した。本来の酵素使用条件はエステル合成反応と呼ばれる反応系となる。これは工場のメントール製造過程と同じ反応であるが、現実的にはメントール製造工場で起きているような酵素反応の再現が難しく、高濃度の基質、有機溶媒等を条件に組み込む必要がある。さらに、2種類の基質（メントール、ビニルアセテート）の構造探索が必要となり、計算に非常に時間がかかると予想された。一方、加水分解反応を再現する場合は、スクリーニングと同じ反応系のシミュレーションとなる。こちらは、酵素周辺環境を再現しやすく、水溶媒であることから一般的な環境に近い条件となる。また、基質は実質的にメンチルアセテート1種だけとなる。そのため、計算量が少ない加水分解反応のMDシミュレーションを行うこととした。

対象とする *B. cepacia* 由来リパーゼの立体構造と基質を含めて、産総研が独自に開発した ALSD シミュレーションを実行した（図 3.2.4.5-4）。これは、基質ならびに酵素活性部位周辺の残基側鎖あるいは主鎖も含めた構造変化を促進させることで、酵素と基質の安定構造を探索する MD 計算技術である。その結果、基質の構造変化を促進してもポケット内の活性部位に正しく基質が結合したポーズは観測されずエネルギー的に安定な大部分の構造では基質は活性部位から外れた位置に配置されることがわかった。また、安定的に収束する構造を確認したところ、一般的に酵素の Closed 構造と呼ばれる、酵素の全体構造が変化して酵素-基質の複合体で酵素のポケット構造が閉じたようになっている構造を取ることが分かった。

MD計算の結果得られた構造がClosed構造と推定できるために、2回目のMD計算をこの構造を基にして行った。酵素-基質のドッキング構造探索を行い、2回の独立した計算を行った。その結果、L-メンチルアセテートとは安定して結合できるが、D-メンチルアセテートとの結合は不安定化を促すような改変部位候補スコアを算出した。共通して高スコアとなった8アミノ酸残基を選定した。

2. L-メンチルアセテートに対する加水分解活性のラボ評価

上記1. で選定した変異点（8アミノ酸残基）について、実際に変異酵素を作製してラボ評価を行った。タンパク質を構成する特定のアミノ酸残基に変異を導入する実験手法を部位特異的変異導入と呼んでいる。MD計算から高スコアとなった8アミノ酸残基について、それぞれの残基に部位特異的変異導入を行った。タンパク質を構成するアミノ酸は20種類あることが知られているため、それぞれのアミノ酸残基について本来のアミノ酸残基（野生型）をそれ以外のアミノ酸残基（19種類）に置換したア

ミノ酸置換変異酵素（以下、変異酵素）を作製した。変異酵素の発現は大腸菌発現系を利用した。変異酵素は合計152種類を作製して、すべての変異酵素を大腸菌で培養して、酵素抽出液を作製して、基質となるL-メンチルアセテートとD-メンチルアセテートの加水分解を評価した。L-メントールの生成率と変換率を野生型と比較してスクリーニングしたところ、2つの変異点でL-メントールに対する鏡像体過剰率が向上して、特に4種類の変異酵素で鏡像体過剰率が99%ee以上となった（図3.2.4.5-5）。

3. 変異酵素のL-メントール合成活性評価の実施（スケールアップ評価）

スケールアップの条件検討後に培養を行い、エステル合成評価用の固定化酵素を作製した。ガスクロマトグラフ分析後は、得られたチャートを定量して、鏡像体過剰率を計算した。初期のサンプリングデータでは、変異酵素の鏡像体過剰率は、変換率と野生型よりも高い数値を示した。さらに、反応後期においても野生型の鏡像体過剰率97%eeよりも高いことを確認した。

以上の結果から、目標の「L-メントールの鏡像体過剰率が99%ee以上」を実現できる世界初の変異酵素を開発した。

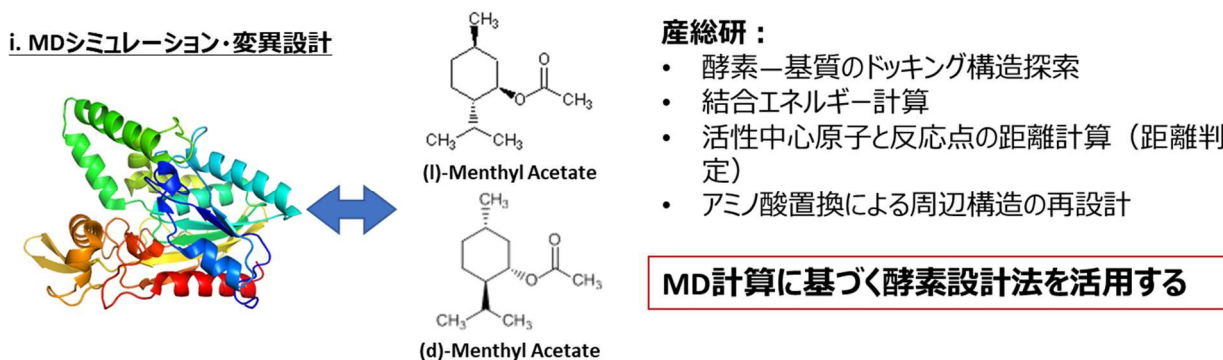


図 3. 2. 4. 5-4 MD シミュレーション（酵素-基質の安定構造の探索）

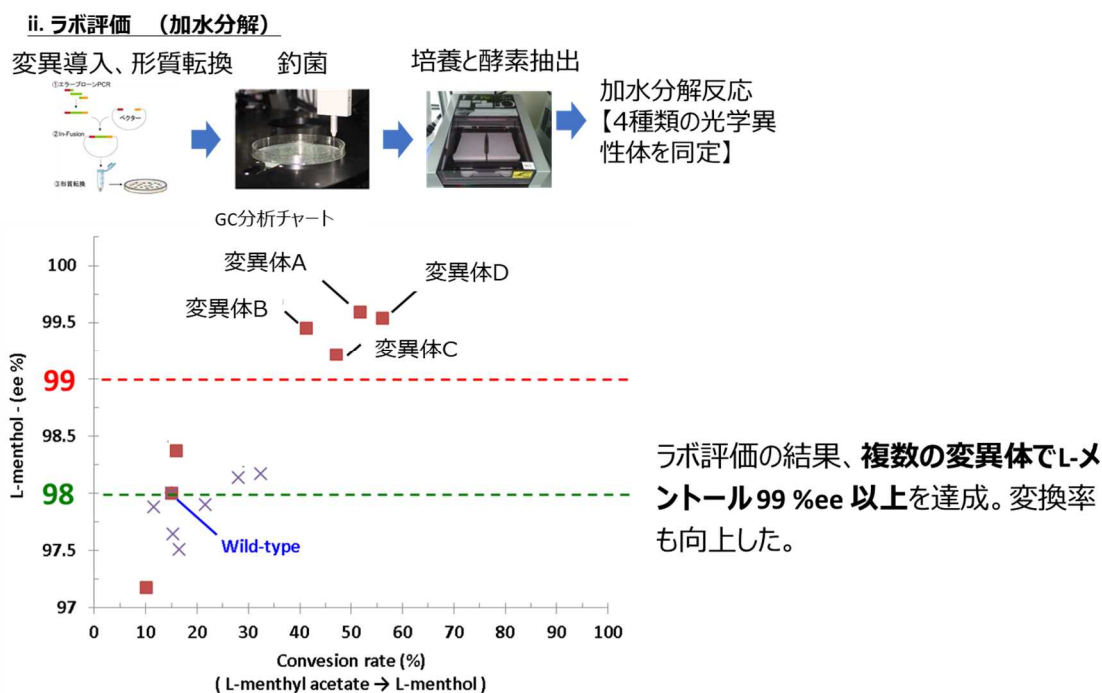


図 3. 2. 4. 5-5 変異型リパーゼのラボ評価①（L-またはD-メンチルアセテートに対する活性評価）

研究項目② ω 3系高度不飽和脂肪酸の高付加価値化

1. MDシミュレーション計算プログラムの実施

基質EPAに対する酸化位置特異性を向上する目的で、酵素—基質の複合構造のドッキングモデル構築とMDシミュレーションを実行して、基質の ω 3位の反応に関わる重要なアミノ酸残基を予測した。酸化還元型酵素P450の立体構造と基質EPAを用いて、基質ならびに酵素活性部位周辺の残基側鎖あるいは主鎖も含めた構造変化を促進させるため、ALSDシミュレーションを複数パターン実行した。基質が酵素の活性部位に結合し、エネルギー的に安定なドッキングポーズをとることができる構造変化促進領域の設定について様々な条件を検討した。その結果、EPAがポケット内で動きやすくなる条件を見出した。計算の収束性を確認するため、初期条件を変えた計算を2回実行した。

その結果、2回の独立した結果が同じアミノ酸残基に収束した。EPAの17,18位がヘムとコンタクトする構造と、14,15位がヘムとコンタクトする構造を比較して、基質の ω 3位の反応に関わる重要アミノ酸残基を予測した。候補点を選定して変異酵素を設計した。2回の計算で共通してスコアの高い7アミノ酸残基について、それぞれの残基に部位特異的変異導入を行った。

2. 変異酵素のラボ評価（一重変異）

上記のMD計算から高スコアとなった7アミノ酸残基について、それぞれの残基に部位特異的変異導入を行った。それぞれのアミノ酸残基について、本来のアミノ酸残基（野生型）をそれ以外のアミノ酸残基（19種類）に置換した変異酵素を作製した。変異酵素を作製して、酵素と基質（EPA）の反応を行った。反応後の生成物を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により解析した結果、その中の1つである変異体Eは、副生成物の減少、目的生成物である17,18-EpETEの蓄積が見出された。さらに、酵素—基質反応をタイムコースで解析して、変異体Eは目的生成物である17,18-EpETEの蓄積が起きると分かった（図3.2.4.5-6）。

また、新しい課題も見出された。変異体Eでは基質EPAが十分に消費されず、反応率は40-50%となった。この理由としては、17,18-EpETEによる生成物阻害の可能性が考えられた。そこで、EPAと17,18-EpETEが共存した条件で反応を行い野生型と変異体Eを比較した。その結果、変異体Eは17,18-EpETEがある条件では、EPAに対する酸化反応が大きく低下すると分かり、生成物阻害が示唆された。

以上の結果から、変異体Eは、17,18-EpETEに対する酸化位置特異性が向上して、目的生成物の17,18-EpETE蓄積が起こる。しかし、新たな課題として、同時に17,18-EpETEによる生成物阻害が起こり、EPAが十分に消費されないと分かった。

3. MD計算によるドッキング構造探索と酵素—基質反応に関わる重要アミノ酸残基の設計（二重変異）

上記の実験の結果を受けて、変異体Eで起こる生成物阻害の解消を目的に2回目のMD計算を行った。変異体Eを酵素として、生成物の17,18-EpETEが離れやすくなる変異点を設計した。具体的には、基質EPAには影響を与えないが、生成物17,18-EpETEがポケット内にいることを不安定化させるアミノ酸残基の選定を行った。2回の独立した計算の結果、3種類のアミノ酸残基を選定した。

4. 変異酵素のラボ評価（二重変異）

PCRにより部位特異的変異導入を行い、変異体Eとの二重変異酵素を作製した。変異体Eと比較して、複数の二重変異酵素で17,18-EpETEの生成量が向上した。特に、そのなかの二重変異体Fは最も17,18-EpETEの生成量が多くなった。

さらに詳細な解析を行い、野生型、変異体 E、二重変異体 F について、酵素-基質反応を比較した。17, 18-EpETE の位置特異性を計算したところ、野生型では最大値が 44%であるのに対して、変異体 E は 89%、二重変異体 F は 92%となった (図 3. 2. 4. 5-6)。また、二重変異体 F は 17, 18-EpETE の蓄積が起こると分かった。反応後 24 時間の時点でも、変換率 60%で 17, 18-EpETE が蓄積していた。この結果は、バッチ処理による製造可能性が示され、野生型では不可能であった工業的なバッチ製造の可能性が示唆された。

5. MD 計算によるドッキング構造探索と酵素-基質反応に関わる重要アミノ酸残基の設計 (三重変異)

二重変異体 F のさらなる位置特異性の向上、生成物阻害の解消を目的に 3 回目の MD 計算を行った。P450 をモデリングして、生成物 17, 18-EpETE の生成を維持しながら生成物阻害をする構造を不安定化する変異体を設計した。MD 計算で、生成物 (酸化した基質) が安定的に結合しない設計を行った。その結果、3 か所のアミノ酸残基が選定された。

6. 変異酵素のラボ評価 (三重変異)

PCR により部位特異的変異導入を行い、三重変異酵素を作製した。三重変異酵素と基質 EPA と反応を行い、生成物を HPLC で分析した。その結果、複数の三重変異酵素では、二重変異体 F よりも 17, 18-EpETE の生成量増加が見られた。その中でも、三重変異体 G は酸化位置特異性が向上して 17, 18-EpETE の生成率が 95%となった (図 3. 2. 4. 5-6)。

以上の結果から、3 回の MD 計算と評価を繰り返して BILD サイクルを回すことで、野生型 P450 の酸化位置特異性が大きく向上して、世界初の特異性 95%となる変異型 P450 を開発した。

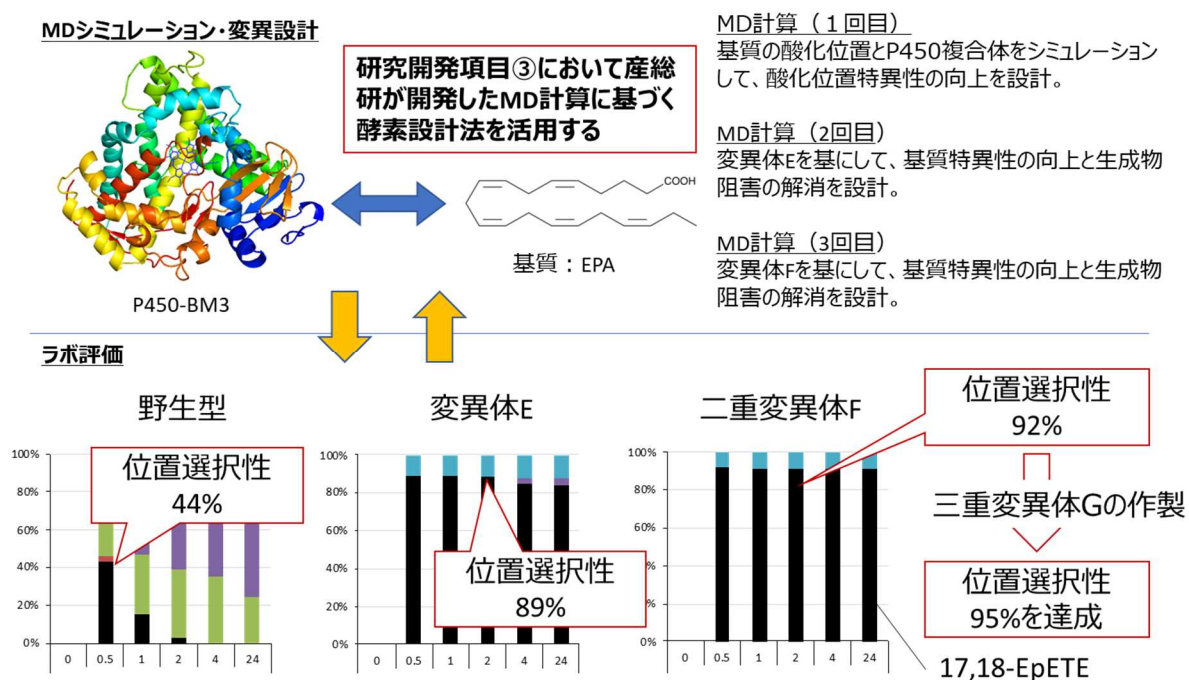


図 3. 2. 4. 5-6 P450 の MD シミュレーションとラボ評価

(9) 成果の普及

表 3.2.4.5-4 助成期間における成果普及活動実績

年度	論文		その他外部発表				受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2019	0	0	0	0	0	0	0
2020	0	0	1	0	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	1	0	0	0	0

(10) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

特許に関しては、本プロジェクトで開発した酵素について知財化する方針で進めている。現在、L-メントールを高純度で製造するための酵素については特許申請の準備を進めている。ω3系脂肪酸のω3位を特異的に酸化する酵素については、必要な追加データの取得を進めており、特許出願の準備を進めている。

(11) 成果の事業化に向けた戦略

研究項目①：L-メントールの製造酵素開発

【マーケットの現状及び将来の規模】

L-メントールはペパーミント油の主成分で、ミントのような冷涼な香味と冷感効果を持っており、フレーバーやフレグランスなどの香料原料として最も需要の多い素材のひとつである。その用途は幅広く、オーラルケア製品（歯磨き粉・マウスウォッシュ）、ガム・タブレット、シャンプー、制汗剤、湿布剤などに使用されている。そのため、大きな波及効果を持つ製品素材である。また、シンプルな構造から医薬品などの化合物を合成する際の基本骨格としても利用されており、医薬品原体としては高純度品が必要とされている。

L-メントールの需要は年率 10%程度の増加が続いており、天然 L-メントールの相場価格は上昇している。化学合成品の L-メントールも相場が上昇しており、メントール市場全体では、2018 年の 7 億 9000 万米ドルから、2025 年末には 11 億 5900 万米ドルの規模に成長すると予測されている。その理由としては、中国、インド、東南アジアなどで需要が高まっていることが挙げられる。清涼剤、メントールタバコなどの嗜好性の高い商品が広がることにより、マーケット拡大が続くと予想されている（図 3.2.4.5-7）。

・ L - Menthol 市場 ...



- ・ 10 % / 年で需要量拡大
(新興国市場の成長)
- ・ 需要量 > 供給量
- ・ BASF が2013年より参入

・ 製造方法 ...

- 抽出法** : 植物 (Peppermint) から抽出
- 化学法** : 野依触媒を用いた化学合成
- 酵素法** : 酵素を用いた DL- Menthol の光学分割

4

図 3. 2. 4. 5-7 メントール市場概観図

【競争環境】

メントールは3つの不斉炭素を有し、合計8種類の構造異性体が存在する。この中で強い清涼感・香気成分を有する異性体はL-メントールのみとなる。そのため、品質良く安価にL-メントールを生産することが求められている。天然由来L-メントールはインドが現在大きな生産地となっており、ペパーミント油の80%を生産している。一方、L-メントールの化学合成品は、高砂香料社、Symrise社、BASF社の3社が大きなシェアを持っている。

研究項目②： ω 3系高度不飽和脂肪酸の高付加価値化

【マーケットの現状及び将来の規模】

ω 3系高度不飽和脂肪酸(ω 3系脂肪酸)は魚油に多く含まれる機能性脂肪酸であり、抗炎症作用、動脈硬化の予防改善、認知症予防などの様々な健康増進作用があることが知られている。市場規模は世界全体で約4200億円であり、そのうち北米が最大マーケットである(図3.2.4.5-8)。米国ではサプリメントの原料として人気があり、年率25%近い成長が続いている。また、日本においても病気を予防するという観点から、日常生活での積極的な摂取が推奨されている。近年、 ω 3系脂肪酸の生体内での代謝メカニズムの研究が進み、例えば、エイコサペンタエン酸(EPA)は17,18-エポキシエイコサテトラエン酸(17,18-EpETE)に代謝されることで、食物アレルギー症状を予防あるいは治療する効果があることが見出されている。また、ドコサヘキサエン酸(DHA)は19,20-エポキシドコサペンタエン酸(19,20-EpDPE)に代謝されることで、やはりアレルギー症状を予防あるいは治療する効果があることが見出されている。

現状、17,18-EpETEや19,20-EpDPEの価格は、EPAやDHAと比較して約1000倍の差がある。そのため、酵素法による ω 3系脂肪酸代謝物の大量生産に成功すれば大きなインパクトがあると思われる。

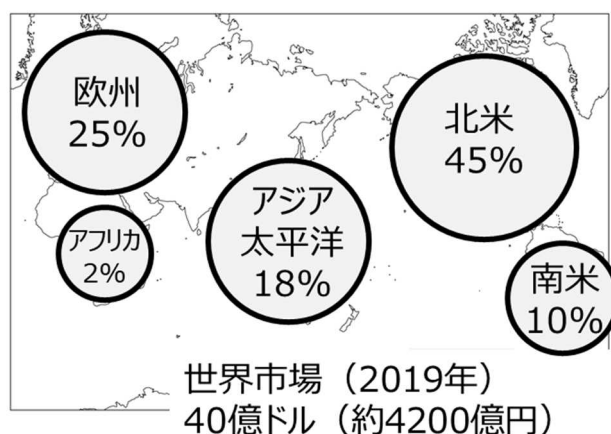


図 3. 2. 4. 5-8 ω3 系脂肪酸マーケット概略図

【競争環境】

従来は魚類から抽出した魚油をそのまま濃縮した製品が多く見られたが、近年はより機能的に優れた製品の開発が期待されている。ω3 系脂肪酸をそのまま添加するのではなく、機能性の高い 17, 18-EpETE のような ω3 系脂肪酸代謝物を添加することで、付加価値の高い商品を開発することが可能となる。そのため、本事業で開発する酵素が市場に出ると、ω3 油脂メーカーによる医薬品やサプリメント向け高付加価値、高価格帯製品の製造、販売が可能となる。現在、17, 18-EpETE のような ω3 系脂肪酸代謝物を大量生産しているメーカーはないことから、新しい市場を開拓できる。

(12) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

研究項目①：L-メントールの製造酵素開発

- 従来の酵素法を改良して、高品質 L-メントールの製造を実現する。化学合成プロセスを利用せずに、高純度 L-メントールを製造可能な酵素を提供する。
- 高純度 L-メントールを合成できる世界初の酵素の開発を達成した。特許取得などの権利化を行い、事業化を進めていく。

研究項目②：ω3 系高度不飽和脂肪酸の高付加価値化

- 化学合成プロセスでは不可能な特異的な酸化反応を実現して、高機能脂肪酸の新市場を開拓することを目標に事業化を進める予定。
- 今後は、酵素を利用した世界初の酸化 ω3 脂肪酸製造法の検討を進める予定。顧客には酵素とセットでの紹介を計画している。

(13) 成果の事業化の見通し

研究項目①：L-メントールの製造酵素開発

- 本事業により、L-メントールの鏡像体過剰率が 99%ee 以上を実現できる世界初の酵素を開発した。酵素法で植物由来または化学法で製造する純度と同等の高品質 L-メントールを製造できるようになった。
- 今後は販促用の資料作成、製造工程の確立を行う。

- 2022 年上市を目標に計画を進行中。まずは、主要顧客に紹介していく。

研究項目②： ω 3 系高度不飽和脂肪酸の高付加価値化

- 本事業により、 ω 3 位に対する位置特性性が 95%以上で特異的にエポキシ化できる酵素を開発した。さらに、酸化型 ω 3 脂肪酸製造をバッチ処理で製造できる可能性が示唆された。新たな技術領域を開拓した。
- 今後は、酸化 ω 3 脂肪酸製造法の検討と補酵素リサイクルを可能にする酵素製剤の開発を行い、世界初の産業実用化を目指す。
- 2024 年上市を目標に計画を進めていく。

【波及効果】

本事業では、スマートセルプロジェクトで開発された基盤技術である「MD 計算とドッキングシミュレーションによる酵素設計技術」を活用して、2 種類の微生物由来酵素を改良し、新規酵素を開発した。その結果、どちらも目標として設定した基質特異性を達成できた。このことから、MD 計算による論理的な酵素設計は、産業用酵素の最適化に有用な技術であると実証できた。

さらに、リパーゼの MD シミュレーションでは、Closed 構造と呼ばれる、酵素の全体構造が変化して、酵素-基質の複合体で酵素のポケット構造が閉じた構造の推定が可能と分かった。リパーゼと総称される酵素のほとんどは、酵素-基質反応が起こるときは Closed 構造を取ると推定されている。すなわち、MD シミュレーションによる Closed 構造の予測と、それに基づく酵素-基質のドッキング構造探索は、ほとんどのリパーゼの構造探索に応用することが可能と思われる。

以上の成果から、MD 計算による酵素-基質反応のシミュレーションと、それを利用した酵素設計技術の有用性を示すことができた。本研究の成果は、今回の酵素以外にも波及効果がある重要な技術になると考えている。

「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」基本計画

材料・ナノテクノロジー部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

①政策的な重要性

バイオテクノロジーは、経済活動の様々な分野で利用される技術体系となっており、近年欧米や米国を中心に、バイオテクノロジーを用いた経済活動を“Bioeconomy”と称して政策提言に取り上げられている。OECD では 2009 年に「The Bioeconomy to 2030: Designing a policy Agenda」というレポートを取りまとめ、2030 年にはこの“Bioeconomy”が OECD 諸国の GDP の 2.7% (約 192 兆円) に成長すると予想し、中でもこれまで中心であった健康・医療分野での利用から、物質生産などの工業利用の市場が拡大していくと見込んでいる。

このような“Bioeconomy”の成長見込みの背景には、次世代シーケンサーをはじめとした各種解析装置が急速に進化し、遺伝子情報や生産物情報を正確かつ高速に入手できるようになったこと、及び2000年代前半からゲノム上の遺伝子を能動的に組み替える、いわゆるゲノム編集技術が開発されたことが挙げられる。これらの技術により、例えば特定の物質の生産量が最大になる条件など、目的に適した遺伝子配列をコンピュータ上で設計し、更にその設計に基づき、様々な生物の遺伝子を能動的に操作することが可能になってきたことで、様々な物質生産への適用拡大に期待が高まっている。

しかしながら、このような取り組みは欧米が先行しており、我が国としても同分野での競争力強化が急務である。また、現状は基礎学理が構築され、コンセプトが上がってきた段階であることから、国として生物を利用した高機能品生産に寄与することを実証していくことも重要である。

②世界の取り組み状況

米国では、遺伝子配列の設計、構築、評価、学習に係るサイクルを圧縮するツール開発と、そのツールを用いて全く新しい物質の創製、既知物質の高効率生産を狙った **Living Foundries program** を立ち上げ、160 億円もの研究投資を行っている。

また、EU においても、**Horizon2020** の枠組み等を活用し、生物資源の持続可能な活用による材料、化学薬品等の加工・生産に関する研究開発を産官学連携で推進しているところである。加えて、英国では、生物学的デザインに係る研究推進の場として 30 もの機関・企業が集まるセンターを設立し、最重要政策課題として本分野を推進している。

③我が国の状況

2010年度まで経済産業省で実施した「植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発」の成果により、ホクサン株式会社が世界で初めて遺伝子組換え植物による医薬品原料生産の事業化に成功するなど、組換え植物の栽培に必要な密閉型植物工場における生産技術を大きく進展させてきた。また、2012年度から開始した経済産業省の「革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発」において、目的に応じた最適な遺伝子配列デザインに資する解析、合成手法等を開発し、要素技術を構築してきたところである。

しかし、前述のとおり、特定遺伝子の編集が容易なゲノム編集技術は米国に後れを取っている状況であり、また、遺伝子情報やその発現情報、生産物情報を統合的に解析する技術も未確立であることなど、実用化に向けた課題は多い。

④本事業の狙い

本プロジェクトでは、植物等の生物が持つ物質生産能力を人工的に最大限引き出した細胞“スマートセル”を構築し、化学合成では生産が難しい有用物質の創製、又は従来法の生産性を凌駕することを目的に、必要となる基盤技術を開発するとともに、特定の生産物質における実用化技術を確立する。なお、物質生産に係るコストや安全性の面から、本プロジェクトでは植物と微生物による生産技術を対象とし、それぞれの特性を踏まえて以下の技術開発を実施する。

植物については、植物自身が有する豊富な代謝系を最大限活用することを前提に、生産性向上に資するゲノム編集技術等の基盤技術の開発、代謝系遺伝子発現制御の基盤技術、及び人工栽培環境による代謝系の効率化技術開発を行うとともに、実用植物における高機能品生産の実用化技術を開発する。

微生物については、動物や植物に比べてゲノムサイズが小さく、実験的に全細胞レベルの観察が可能である。これらの特徴を活かして特定物質を生産する細胞プロセスをコンピュータ上で解析し、最適なプロセス設計を可能とする統合オミクス解析等の情報解析技術を開発する。また、細胞における物質生産プロセス解明のために必要なオミクス情報の取得に資する分析・評価手法や、解析結果に基づく遺伝子改変を効率的に行う長鎖DNA合成関連技術も並行して開発する。これら技術を複合的に活用する仕組みを構築し、具体的な高機能品生産の実用化技術を開発する。

以上の研究開発により、持続可能な社会の構築に資するスマートセルによるものづくり“スマートセルインダストリー”の実現を狙う。

(2) 研究開発の目標

①アウトプット目標

本プロジェクトを通じて、化学合成では生産が難しい有用物質の創製、又は従来法を凌駕する生産性の実現に資する基盤技術及び実用化技術の確立を目指す。

研究開発項目ごとの目標については、別紙1にて定める。

②アウトカム目標

本プロジェクトの成果により、化学プロセスから植物等による生産に代替されることで、2030年時に85.8万kl相当の原油削減に資する。また、OECDにおいて、2030年にバイオテクノロジーを用いたものづくり等の工業関連市場は世界で70兆円に拡大すると予想されており、その内1割となる7兆円市場の獲得に資する。

③アウトカム目標達成に向けての取組

研究開発と並行して、海外の知財動向やビジネス動向を調査し、開発成果の円滑な実用化・事業化に資する知財戦略及び事業化モデルを検討する。加えて、本プロジェクトで開発した成果を広く社会に普及させるために、ワークショップ等を通じた成果発信も積極的に行う。

(3) 研究開発の内容

上記目標を達成するために、以下の項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施するとともに、国内外の関連情報の収集及び調査等を行う。研究開発事項は以下の通り設定する。

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」

研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」

研究開発項目①、③については、実用化まで長時間を要するハイリスクな基盤的技術に対して、産学官の複数事業者が互いのノウハウ等を持ちより協調して実施する事業であるため、委託事業として実施する。

研究開発項目②、④については、実用化に向けて企業の積極的な関与により推進されるべき研究開発であり、助成事業として実施する（NEDO負担率：大企業1／2助成、中堅・中小・ベンチャー企業2／3助成）。

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

プロジェクトマネージャー（PM）にNEDO 材料・ナノテクノロジー部 林 智佳子を任命して、プロジェクトの進行全体を企画・管理や、そのプロジェクトに求められる技術的成果及び政策的効果を最大化させる。

本プロジェクトは、NEDOが単独ないし複数の企業、大学等の研究機関（原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別の研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点から国外企業との連携が必要な部分はこの限りではない。）から、原則公募によって実施者を選定し実施する。

なお、各実施者の研究開発能力を最大限に活用し、効率的かつ効果的に研究開発を推進する観点から、NEDOは研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を選定し、各実施者はプロジェクトリーダーの下で研究開発を実施する。

(2) 研究開発の運営管理

NEDOは、研究開発全体の管理及び執行に責任を負い、研究開発の進捗のほか、外部環境の変化等を適切に把握し、必要な措置を講じるものとする。運営管理は、効率的かつ効果的な方法を取り入れることとし、次に掲げる事項を実施する。

①研究開発の進捗把握・管理

PMは、プロジェクトリーダーや研究開発実施者と緊密に連携し、研究開発の進捗状況を把握する。また、外部有識者で構成する技術検討委員会を組織し、定期的に海外の技術動向も踏まえた評価を受け、目標達成の見通しを常に把握するとともに、必要に応じて研究開発の加速、中止を検討する。

②技術分野における動向の把握・分析

PMは、プロジェクトで取り組む技術分野について、内外の技術開発動向、政策動向、市場動向等について調査し、技術の普及方策を分析、検討する。なお、調査の効率化の観点から、本プロジェクトにおいて委託事業として実施する。

③研究開発テーマの評価

研究開発を効率的に推進するため、研究開発項目①及び②を対象として、ステージゲート方式を適用する。PMは、外部有識者による審査を活用し、2019年度以降の研究開発テーマの継続是非を2018年12月に決定する。

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDOは、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な関係を維持しつつ、事業の目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目

標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて、技術検討委員会等における外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、適宜プロジェクトリーダーとともに事業の進捗について報告を受けること等により進捗の確認及び管理をものとする。

また、必要に応じて、ユーザーとの連携を促す等、成果の早期達成が可能になるよう努める。早期実用化が可能と認められた研究開発については、期間内であっても研究を完了させ、実用化へ向けた実質的な研究成果の確保と普及に努める。

3. 研究開発の実施期間

研究開発項目①及び②については、2016年度から2020年度までの最長5年間、研究開発項目③については、2016年度から2021年度までの最長6年間とする。

研究開発項目④については、2019年度から2020年度までの最長2年間とする。

4. 評価に関する事項

NEDOは技術評価実施規程に基づき、技術的及び政策的観点から研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、プロジェクト評価を実施する。

評価の時期は中間評価を2018年度、事後評価を2021年度とし、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

また、中間評価結果を踏まえ、必要に応じて事業の加速・縮小・中止等、見直しを迅速に行う。

5. その他の重要事項

(1) 研究開発成果の取扱い

①成果の普及

研究開発実施者は、研究成果を広範に普及するよう努めるものとする。NEDOは、研究開発実施者による研究成果の広範な普及を促進する。

②研究開発項目間の連携

研究開発成果のうち研究開発項目①及び③の共通基盤技術に係るものについては、研究開発項目を超えてプロジェクト内で共有し、継続的に相互利用の可能性を検討すること。また、研究開発項目①と②並びに③と④については、①及び③で開発する共通基盤技術の有効性検証のために、必要に応じて秘密保持契約や共同研究契約を締結し、密接に産学官で連携すること。連携の枠組みはPMとPLが主導して構築する。

③標準化等との連携

得られた研究開発成果は、標準化等との連携を図るため、標準化に向けた評価手法の提案、データの提供等を必要に応じて実施する。

④知的財産権の帰属

研究開発成果に関わる知的財産権については、「国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、全て委託先に帰属させることとする。なお、プロジェクトの初期段階から、事業化を見据えた知財戦略を構築し、適切な知財管理を実施する。

⑤知財マネジメントに係る運用

「NEDOプロジェクトにおける知財マネジメント基本方針」を適用する。

(2) 基本計画の変更

NEDOは、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済的状況、国内外の研究開発動向、政策動向、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) 根拠法

本事業は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第十五条第一号ニ及び第三号、第九号に基づき実施する。

6. 基本計画の改訂履歴

- (1) 2016年3月、制定。
- (2) 2016年8月、プロジェクトマネージャー交代に伴う改訂
- (3) 2018年3月、研究開発項目③の細目順序入替え及び記載表現の見直し等
- (4) 2020年10月、PRISM 予算執行に伴う期間延長

(別紙1) 研究開発計画

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」

1. 研究開発の必要性

これまで医薬品原料や機能性食品、各種化学品などの有用物質が植物を利用して生産され、品種改良等により生産性向上が図られてきた。しかし、大きな機能改変は難しく、かつ、開発に相当の時間がかかることから、その効果は限定的であった。また、従来の遺伝子組換え技術も同様の課題を克服できているとは言えない。

このような状況下、特定の遺伝子を認識し、その遺伝子を能動的に操作可能なゲノム編集と呼ばれる技術が 2000 年代前半の ZFN 登場以降、TALEN、そして CRISPR と次々と開発されてきた。中でも 2013 年に開発された CRISPR は、扱いの簡便さや効率の良さなどから様々な分野の研究者がゲノム編集技術を活用するきっかけともなり、例えば 2013 年以降のゲノム編集関連論文数の伸びは目覚ましい。

これらゲノム編集技術は米国が主導権を握っており、我が国の技術開発は後塵を拝している状況である。しかし、CRISPR は、狙った遺伝子以外を編集してしまう Off-target の問題や分子の大きさから導入細胞がある程度限定されることなど、技術的な課題が残っている段階であることから、我が国技術が追い上げる余地も十分あるものと考えられる。

また、植物による生産性を高める上では、遺伝子ノックアウトを誘導するゲノム編集だけではなく、遺伝子ノックダウンを目的としたゲノムへの化学修飾を制御するエピゲノム編集技術や転写された RNA の機能を制御する技術、逆に代謝系遺伝子の発現を向上させる技術等も組み合わせて遺伝子発現を制御していくことが重要となる。加えて、これまで栽培環境、特にストレス付与が植物の二次代謝系を大きく変動させることが一部のストレス源と植物種では知られている。近年の人工環境栽培技術の進歩に伴い、遺伝子制御だけではなく、環境制御による生産効率向上技術の開発も期待される場所である。

そこで、これらの遺伝子制御技術及び環境制御による変動誘因技術を融合させた新たな有用化合物の効率的生産技術確立が求められているところである。

2. 研究開発の具体的な内容

(1) ゲノム編集技術

植物等による物質生産機能の制御・改変及びその産業化に向けて、既存のゲノム編集では対応できない新規の国産のゲノム編集関連技術を開発し、生物を利用した物質生産における我が国の産業競争力を向上させるための新たな技術基盤の形成を目指す。また、研究開発項目②と連携し、開発した技術の有効性を検証する。

研究開発と並行して、他国の特許動向等を調査し、開発した成果の実用化を睨んだ知財戦略を策定する。

(2) 代謝系遺伝子発現制御技術

生産効率の向上、コスト低減に向けて、目的遺伝子メチル化誘導技術や遺伝子発現の抑制を効率的に複数の遺伝子で制御する技術、目的代謝産物の蓄積機構を制御する技術等を開発する。また、研究開発項目②と連携し、開発した技術の有効性を検証する。

(3) 栽培・生育環境による発現制御技術

複数の栽培環境要因が代謝主要経路群に与える影響を各代謝系の主要遺伝子の発現レベルで解析し、目的代謝産物の効率的生産に効果的な栽培環境条件を利用可能にする技術を開発する。また、研究開発項目②と連携し、開発した技術の有効性を検証する。

3. 達成目標

【最終目標（2020年度）】

(1) ゲノム編集技術

- ・ 植物等による物質生産機能の制御・改変において、既存のゲノム編集では対応できない新しい機能を有する国産のゲノム編集関連技術（対象領域、精密性、ゲノム設計、細胞毒性、導入効率等）を確立する。
- ・ 研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した新規の国産ゲノム編集技術の有効性を示す。
- ・ ゲノム編集を産業利用するために必要な要素技術を戦略的に集約し、国産ゲノム編集技術基盤を確立する。

(2) 代謝系遺伝子発現制御技術

- ・ 目的代謝系遺伝子の発現を5倍程度増強又は1/10以下に抑制する技術を確立する。
- ・ 研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した遺伝子発現制御技術の有効性を示す。

(3) 栽培・生育環境による発現制御技術

- ・ 目的代謝系における主要遺伝子/産物の発現を5倍程度増強させる技術を確立する。
- ・ 研究開発項目②で対象とする実用植物において、栽培・生育環境による発現制御技術の有効性を示す。

【中間目標（2018年度）】

(1) ゲノム編集技術

- ・ 既存のゲノム編集技術では対応できない独自の新しい機能を有するゲノム編集関連技術（対象領域、精密性、ゲノム設計、細胞毒性、導入効率等）の基本技術を確立し、

その新規性、有用性を検証する。

- ・ 開発した成果の産業利用に向けて、他国の動向も踏まえた知財戦略を策定する。

(2) 代謝系遺伝子発現制御技術

- ・ メチル化誘導、遺伝子発現制御因子解析等の基本技術を確立する。
- ・ 目的代謝系遺伝子の発現を2倍以上増強又は1/5以下に抑制する。

(3) 栽培・生育環境による発現制御技術

- ・ 栽培環境因子と代謝系主要遺伝子の半数の解析を終了させる。

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」

1. 研究開発の必要性

これまで次世代シーケンサーや質量分析器を用いて、生物個々の遺伝子配列や代謝経路が解読され、特にモデル植物におけるトランスクリプトームやメタボローム解析の進捗に伴い、近年それら情報を基にした遺伝子発現制御により、代謝産物の生産制御が植物で可能となってきた。また、植物の栽培環境が代謝系に影響を与えることを利用し、栽培環境を自在に制御可能な密閉型植物工場を活用して、生産効率を向上させるノウハウも蓄積してきている。

しかし、実際には、植物内の代謝経路は複雑に絡み合っており、標的遺伝子を改変し、特定の代謝経路の促進・抑制を誘起したとしても、様々な因子が関連した副反応により、予想通りの結果が得られるとは限らない。また、植物によっては栽培方法が異なり、さらには現状ではモデル植物以外に遺伝子組換え手法が確立されていないものが多いといった課題があり、実用植物において遺伝子組換え技術を適用し、生産性を向上させるためには、植物に応じた栽培及び遺伝子組換え技術を開発する必要があるなど、実用化に向けては技術的なハードルが高い。

従って、本分野の産業応用を促進するためには、個々の実用植物種における特定物質の生産実用化技術を個別に開発・実証する必要がある。

2. 研究開発の具体的な内容

特定の生産ターゲットを設定した上で、生産させる実用植物の栽培、培養系の確立及び遺伝子組換え技術を開発するとともに、生産性向上に寄与する遺伝子の特定・改変、環境条件の最適化を行い、実用に資する生産性を実現する。

3. 達成目標

【最終目標（2020年度）】

- ・化学合成等による競合品と比較して、コスト、性能等の面で総合的に競争力があることを示す。

【中間目標（2018年度）】

- ・対象とする実用植物の栽培、培養系の確立及び遺伝子組換え技術を確立する。
- ・生産性向上に寄与する遺伝子を明らかにし、コスト、性能等の面で総合的に競争力があるとの見通しを得る。

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」

1. 研究開発の必要性

細胞は DNA、RNA、タンパク質、代謝物など多様な化学物質で構成されている。これまでの研究では、この細胞構成物質を明らかにすることを主目的にしており、過去にはゲノムプロジェクトやターゲットタンパクプログラムなどによって、多くの生体化学物質の存在やその構造を明らかにしてきた。しかし、これは生体細胞内におけるプレーヤーを明らかにしたに過ぎない。生体細胞を産業的に利用するためには、細胞の高次生命システムを理解し、細胞プロセスを制御することが求められる。高次生命システムの理解とは、細胞内で起こる現象のメカニズム解明に他ならず、同一階層又は異なった階層の細胞構成物質間の相互作用ネットワークを明らかにすることである。そのためには先の様々なプロジェクトによって明らかになった細胞構成物質群全体の挙動の観測が必要であり、事実これらの要望に呼応する形で、次世代シーケンサー（NGS）や質量分析器（LC-MS）などの科学技術が急激に進展してきた。最近では、NGS や LC-MS 等による DNA、mRNA、タンパク質、代謝物というそれぞれの階層の物質の細胞内全量測定が積極的に実施され、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームという各種オミクス研究が盛んに行われている。

今後は、これらオミクス情報を高精度かつ網羅的・体系的に取得し、機械学習等の情報科学的な手法によって階層縦断的なオミクスデータ解析を実施する統合オミクス解析技術の確立が期待されている。これにより、例えば主要代謝経路上にない転写因子間の相互作用、代謝物と転写因子との関係性など、従来の実験的知見では得られなかった重要因子が特定され、革新的な生産性の向上、全く新規の物質創製に貢献すると考えられる。

本研究開発項目では、これら統合オミクス解析を基盤とする情報解析技術を開発するとともに、オミクス情報の網羅的に取得に資する分析・評価手法の開発、解析結果に基づく遺伝子改変を効率的に行う長鎖 DNA 合成関連技術の開発を行い、高生産性微生物創出のためのプラットフォームを構築する。並行して、開発した各要素技術及びシステムを維持・運営するための知財戦略及び事業化モデルの検討を行う。

2. 研究開発の具体的な内容

(1) ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

(2) において情報解析技術を用いて構築するシステムで提示される遺伝子配列の効率的な導入のために、DNA 断片の合成からプラスミドの構築、精製、長鎖 DNA 合成までをハイスループットで行う長鎖 DNA 合成技術を開発する。

また、メタボロームを高速に取得するために、前処理や解析の自動化、分析装置の改良等を行い、ハイスループット化した LC-MS を開発する。

その他、高生産性微生物設計システムを効率的に運用するために必要となるハイスループット評価技術を開発する。

膨大なサイズの微生物ライブラリーの構築・評価工程の一部自動化/遠隔化を行い、

遠隔操作による動作最適化のためのデータ統合を進める。

(2) 高生産性微生物設計システムの開発

同一サンプル、同一条件での各オミクス情報を体系的に取得・蓄積し、そのビックデータから機械学習等の情報解析技術を用いて DNA、mRNA、タンパク質、代謝物の階層内、階層間の制御ネットワークを推定する手法(方法論、アルゴリズム)を開発する。併せて、酸化還元バランス等も考慮した代謝流束推定手法や人工酵素設計手法を開発する。これらの解析手法を統合し、特定物質の飛躍的な生産性向上に資する重要因子、改変すべき遺伝子配列を提示する汎用的な設計システムを構築する。

また、上記システム構築のために、測定データの規格化、体系化されたデータベースの構築、公開データからの知識整理等も併せて実施する。

(3) 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

(1)(2) で開発したシステムを用いて、将来事業化を想定する対象物質を設定の上、その大幅な生産性向上及び従来育種(例: 5年)と比較して開発期間の短縮化に資することを実証する。また、プロジェクト終了後も維持・運営するために必要となる知財戦略及び事業化モデルを検討する。

3. 達成目標

【最終目標(2021年度)】

- ・(1)(2) で開発したシステムを用いることにより、従来育種と比較し、物質生産株の開発期間を1/10に短縮することを実証する。また、微生物ライブラリーの構築プロセスの自動化により、さらなる開発期間の短縮化を図る。
- ・(1)(2) で開発した要素技術、システムを維持・運営するための事業化モデルを策定する。
- ・

【中間目標(2018年度)】

(1) ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

- ・30kb 超の DNA 合成時間を従来の 1/2 に短縮する技術を確立する。
- ・LC-MS のハイスループット化により、現状と比較して 10 倍の分析速度を実現する。
- ・その他、高生産性微生物設計システムを効率的に運用するために必要となるハイスループット評価技術を確立する。

(2) 高生産性微生物設計システムの開発

- ・階層内、階層間の制御ネットワークを推定する階層縦断的な情報解析手法を開発する。

- ・上記解析手法や代謝流束推定、人工酵素設計技術等を統合し、特定物質の生産性向上に資する重要因子、改変すべき遺伝子配列を提示する汎用的な設計システムを構築する。

(3) 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

- ・(1)(2)で開発したシステムを用いて、生産性の大幅な向上に資することを最低1つのターゲットで実証する。
- ・各国の類似事業・研究開発動向を調査し、我が国の優位性を生かした独自の知財戦略及び事業化モデル(案)を策定する。

研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」

1. 研究開発の必要性

微生物は、植物に比べて産出する代謝物は多くないものの、その単純さゆえに、大幅なゲノム改変を行い、目的とする遺伝子配列を人工的に設計することが容易である。また、一般的に培養時間も短く、コスト的に優位である。そのため、研究開発項目③で開発したシステムを用い、最適な遺伝子配列を設計し、微生物の細胞に導入することで、従来法と比べて圧倒的な生産性の実現、又は全く新しい機能を有する物質創製の実現に寄与する可能性があり、ものづくりの核となる技術として期待される。

2. 研究開発の具体的な内容

特定の生産ターゲットを設定したうえで、研究開発項目③で開発した高生産性微生物設計システム等を用い、目的物質の生産性向上を狙うとともに、量産化を見据え、宿主となる微生物の培養条件等を最適化する。

3. 達成目標

【最終目標（2020年度）】

- ・化学合成等による競合品と比較して、コスト、性能等の面で総合的に競争力があることを示す。

(別紙2) 研究開発スケジュール

	2016年度	2017年度	2018年度	2019年度	2020年度	2021年度
研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」(委託)	国産ゲノム編集技術の開発		ステージゲート	実用植物への適合性の検証及び技術改良		
	代謝系遺伝子発現制御技術の開発					
	栽培・生育環境による発現制御技術の開発					
研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」(助成)	代謝経路、鍵遺伝子の特定 形質転換技術の開発			栽培環境条件の最適化 生産性の実証		
研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」(委託)	高生産性微生物設計システムの開発		有効性 検証	開発システムの改良及びパッケージ化		微生物ライブラリ 構築・評価工程 の自動化・遠隔化
	ハイスループット合成・分析・評価手法の開発					
研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」(助成)				システム活用による実用ターゲット開発		

研究開発事業に係る技術評価書(事前評価) (経済産業省)

事業名	遺伝子組み換え植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発			推進課室名	生物化学産業課		
事業開始年度	平成28年度	事業終了(予定)年度	平成32年度	主管課室名	生物化学産業課		
事業の目的	本事業は、大規模な遺伝子組換え技術と情報技術を利用した合理的な遺伝子設計技術とを融合させることで、植物、微生物等による物質生産機能を制御・改変し、省エネルギー・低コストな高機能品(試薬・香料・化粧品など)の生産技術を開発する。						
事業概要	別紙記載のとおり。						
平成28年度概算要求額	2150 (百万円)						
成果目標(アウトカム)	成果指標			単位	目標最終年度42年度		
	原油使用の削減量		目標値	万kl	85.8万kl		
活動指標(アウトプット)	活動指標			単位	28年度活動見込		
	高機能品生産細胞の開発数		当初見込み	件	1		
事業所管部局(推進課、主管課)による自己点検・改善状況							
	項目			評価	評価に関する説明		
国費投入の必要性	事業の目的は国民や社会のニーズを的確に反映しているか。			○	省エネ型の次世代ものづくり産業基盤の構築に資する技術開発であり社会のニーズを反映している。		
	地方自治体、民間等に委ねることができない事業なのか。			○	本事業の遂行には遺伝子工学、化学、薬学等の各種分野融合が必要不可欠であり、企業や地方自治体で実現することは難しい。		
	政策目的の達成手段として必要かつ適切な事業か。政策体系の中で優先度の高い事業か。			○	省エネルギーな高機能品の生産技術を実現する上でも、経済産業省が積極的に進めるべき事業である。		
事業の効率性	競争性が確保されているなど支出先の選定は妥当か。			-	平成28年度新規実施事業のため、実績なし		
	受益者との負担関係は妥当であるか。						
	単位当たりコスト等の水準は妥当か。						
	資金の流れの中間段階での支出は合理的なものとなっているか。						
	費目・用途が事業目的に即し真に必要なものに限定されているか。						
	不用率が大きい場合、その理由は妥当か。(理由を右に記載)						
事業の有効性	成果実績は成果目標に見合ったものとなっているか				平成28年度新規実施事業のため、実績なし		
	事業実施に当たって他の手段・方法等が考えられる場合、それと比較してより効果的あるいは低コストで実施できているか。						
	活動実績は見込みに見合ったものであるか。						
	整備された施設や成果物は十分に活用されているか。						
関連事業	関連する事業がある場合、他部局・他府省等と適切な役割分担を行っているか。(役割分担の具体的な内容を各事業の右に記載)						
	所管府省・部局名		事業番号	事業名			
点検・改善結果	点検結果	契約時や確定検査時に点検を行うとともに、事業者へのヒアリングや研究開発に係る有識者委員会、研究開発進捗報告会(年2回開催予定)での議論を聴取することにより、出先、用途の把握・状況確認を行い、また、適性かつ効率的な予算使用がなされていることを確認する。また、中間目標に対して実績がどうであったかを中間年度に評価し、事業の見直し等も実施することで、より効率的な事業の推進に努める。					
	改善の方向性						

外部有識者(産業構造審議会評価WG)の所見【技術評価】

- ・この事業はベンチャーへの転換がロードマップ上に示されており、ゴールがはっきりしているが、戦略的に技術組合でやっていることを全部引き継いでビジネスになるかどうかを精査しつつ、それをブラッシュアップする仕組みづくりに取り組むこと。(微生物等)
- ・本事業の狙いが、植物工場でしかできない新しいことをやるのか、省エネなのか、又、植物を作るプロセスなのか、バイオメカニズムなのか等について、実施体制を含めて整理し、明確化すること。(植物)
- ・全体のプロジェクトの構成、整合性及び個々のテーマと企業との関係等を十分詰めて進めること。そのことを中間評価で確認することとする。(植物)

外部有識者(産業構造審議会評価WG)の所見を踏まえた改善点等

- ・事業成果のうち産業技術基盤に関するテーマについてはベンチャー企業として事業化することを前提にしつつも、知財戦略やマーケティング等に関して十分に精査して進める。また、個別要素技術の開発成果については、参画企業が責任を持って事業化を進める。(微生物等)
- ・本事業の狙いは、ゲノム編集などの新育種技術を利用して植物の物質生産機能を制御・改変することにより、高機能品の生産技術を開発・実証することである。(植物)
- ・本事業により、高機能品の生産方法を「化学合成」から「遺伝子組換え植物を利用した生物合成」に転換することで、生産工程の省エネルギー・低コスト化が見込まれる。そのためには、組換え植物の物質生産技術の実証、及び生産量を増加させるための栽培環境の制御を行う密閉型植物工場が必要不可欠となる。(植物)
- ・また、幅広い高機能品の生産に適用するためにはこれまで利用されてきたモデル植物(シロイヌナズナ、トマトなど)以外の植物を対象とした遺伝子組換え技術の確立とゲノム編集技術が必須となることから、これらの開発も併せて進める。プロジェクト管理は(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構が行い、事業者を公募して進める予定である。(植物)
- ・全体のプロジェクトの構成としては、企業を中心とした実証開発のグループと、実証開発へ適用することを前提とした基盤研究を行う研究グループとで進める予定である。プロジェクトの構成、整合性及び個々のテーマと企業との連携等に関しては中間評価で確認する。(植物)

「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基本計画（案）」に対するパブリックコメント募集の結果について

平成28年3月24日

NEDO

電子・材料・ナノテクノロジー部

NEDO POSTにおいて標記基本計画（案）に対するパブリックコメントの募集を行いました結果をご報告いたします。
お寄せいただきましたご意見を検討し、別添の基本計画に反映させていただきました。
貴重なご意見を頂き、ありがとうございました。

1. パブリックコメント募集期間
平成28年2月25日～平成28年3月9日
2. パブリックコメント投稿数<有効のもの>
計9件
3. パブリックコメントの内容とそれに対する考え方

ご意見の概要	ご意見に対する考え方	基本計画・技術開発課題への反映
全体について		
<p>[意見1]（6件）</p> <p>植物に関する本プロジェクトは、日本における植物バイオテクノロジーと植物工場研究の実績を事業化へ繋げるために必要な施策であると考えられる。</p> <p>国内における植物組織培養技術、遺伝子組換え技術、植物工場等での栽培技術等、物質生産における個々の要素技術には特筆すべき研究成果も認められる。それらをパッケージ化できれば、海外にキャッチアップすることも十分に可能と思われ、本プロジェクトがそのようなハブ機能を発揮することを期待する。</p> <p>化学合成では合成できない機能性成分を植物で効率的に生産できる技術が開発されると、省エネルギー社会へ向けたブレークスルーになると思われる。本プロジェクトの産学官連携研究で新しいゲノム編集技術や形質転換技術等の学術基盤が形成されるとともに、植物や微生物を用いた機能性成分の効率的生産が実用化されることを期待する。</p>	<p>[考え方と対応]</p> <p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。</p> <p>本プロジェクトを通じて、当該分野における我が国の産業競争力強化に努めて参ります。</p>	<p>[反映の有無と反映内容]</p> <p>特になし。</p>

<p>[意見2] (1件)</p> <p>植物と微生物を活用した物質生産であるが、微生物を「等」に含めることに違和感を覚える。植物、微生物以外も含めるのであれば、植物・微生物等とするのが自然ではないか。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。</p> <p>ご指摘の通りプロジェクト名では「植物等」と記載しておりますが、基本計画中には植物及び微生物を宿主の対象とすることを明記しております。</p>	<p>特になし。</p>
<p>[意見3] (1件)</p> <p>バイオテクノロジーを塗り替えようとするゲノム編集やシステム生物学に基づく物質生産（合成生物学）の関連技術に遅れをとる中、追従型のプロジェクトで一発逆転が狙えるものか。既に技術的に先行する欧米が予算規模も桁の違う中でさらに加速し、多くのバイオベンチャーも発足する中、今から国産技術を育てましようというシナリオで勝ち目はあるか。現状認識や論文・知財調査などは適切に行われているか。</p> <p>研究者のアイデアで逆転を狙うのであれば、提案公募型も含めたプロジェクト体制がふさわしいと思われるが如何か。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。</p> <p>本プロジェクトにて扱う技術分野について、現状認識を含む技術戦略を別途策定しており、当該戦略に基づいてプロジェクトを推進して参ります。</p> <p>また、継続的に海外における技術動向等を調査し、その分析結果に応じて柔軟に運営管理して参ります。</p> <p>公募にあたっては、基本計画に記載の課題に沿った提案を広く受け付けます。</p>	<p>特になし。</p>
<p>[意見4] (1件)</p> <p>本プロジェクトが目指す生産技術の基盤として、「植物などの生物が持つ物質生産能力を人工的に最大限引き出した細胞（スマートセル）」を挙げているが、植物などの遺伝子を発現させるのに適したモデル細胞の開発は、今後当該研究を推進するにあたり非常に有用なツールになると予想され、このような独創的な構想はもっとアピールすべきと考える。例えば、1 (1) ④「本事業の狙い」でこの構想の意義を強調する、「研究開発計画」項目①②にスマートセルに関する記述を盛り込むことを提案する。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。</p> <p>スマートセルの意義は「本事業の狙い」としてしっかりと記載しておりますので、現状案の通りとさせていただきます。</p>	<p>特になし。</p>
<p>1. 研究開発の目的</p> <p>(1) 研究開発の目標</p>		

<p>[意見1] (1件)</p> <p>目標設定においては、既存生産系に対する品質面やコスト面での優位性を想定した設定とすることが求められる。一方で、生産物質は既存生産系で確立された物質よりも、植物や微生物による生産系ならではの独自の機能性や品質、製品などをターゲットとしたほうが、より競争力の高い技術や製品が成果として期待できるものと考えられる。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。 頂いた視点を踏まえ、本プロジェクトにおける生産対象物質を検討して参ります。</p>	<p>特になし。</p>
<p>[意見2] (3件)</p> <p>研究開発項目①(2)及び(3)について、発現濃度のみの目標値を設定している点に疑問を感じる。 植物においてはリニアな代謝制御だけではなく、生合成経路への原料物質の供給、あるいは、生成物の貯蔵部位への輸送など、3次元的な広義の代謝制御を念頭に置く必要があり、発現濃度のみでは最終的な物質生産性が明確とならない場面も想定される。 従って、発現量変化の目標値は、想定した作用メカニズムで異なると思われ、目標物質やテーマ設定などに応じて柔軟に目標設定やプロジェクトの運営管理を行っていくことも検討すべき。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。 最終的な目的物質の生産性は、研究開発項目②にて実用植物を用いて個別に検証いたします。 研究開発項目①では基盤技術として遺伝子発現制御技術を確立することを目的としており、当該項目では発現変化を目標として設定しております。</p>	<p>特になし。</p>
<p>(2) 研究開発の内容</p>		
<p>[意見1] (1件)</p> <p>研究開発項目①(3)では環境ストレスの付与が前提となっているようだが、一般的には環境ストレスによって植物の生育量自体は低下する傾向にあり、最終的な物質生産にも影響を及ぼす場合がある。従って、ストレス処理に限らず、発現制御に有効な環境調節や環境制御技術を探してもよいのではないかと考える。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。 本プロジェクトではストレス処理に限らず、環境制御技術全般を対象として考慮しております。</p>	<p>研究開発項目①2. 研究開発の具体的な内容における文章において、「ストレス」の文言を、「栽培環境」に置き換えました。</p>
<p>[意見2] (1件)</p> <p>研究開発項目②2. 研究開発の具体的な内容の中で「生産させる実用植物の栽培及び遺伝子組換え技術を開発するとともに」とあるが、植物を用いたターゲット物質生産は、栽培のみならず培養によるアプローチも生産性向上に効果的である。従って、「生産させる実用植物の栽培、培養系の確立及び遺伝子組み換え技術を開発するとともに」のように培養生産アプローチも含まれる形で記載すると栽培に限定されないことが明確に解ると思う。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。 ご指摘の通り、「生産させる実用植物の栽培、培養系の確立及び遺伝子組換え技術を開発するとともに」とすることで検討いたします。</p>	<p>研究開発項目②2. 研究開発の具体的な内容及び中間目標において、「培養系の確立」を追記しました。</p>

<p>[意見3] (1件)</p> <p>植物など生物は生合成した物質を、生合成の場であるオルガネラや細胞から別の場所へ輸送したり蓄積したりするための輸送体をもっているが、有用物質生産遺伝子(代謝酵素)と一緒に、輸送体遺伝子をモデル細胞に導入・発現できれば、抽出・精製工程を簡略化でき、実用化に近づくと考える。</p> <p>この実現のためには輸送・蓄積機構を理解する必要があり、代謝系遺伝子にとどまらず、輸送遺伝子や蓄積機構の解明まで網羅することを提案する。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。</p> <p>研究開発項目①(2)の研究開発内容に記載の通り、本プロジェクトでは輸送・蓄積機構を制御する技術の開発も考慮しております。</p>	<p>特になし。</p>
<p>2. 研究開発の実施方式 (1) 研究開発の運営管理</p>		
<p>[意見1] (1件)</p> <p>研究開発項目①と②だけがステージゲート方式の対象になっているのは何故か。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。</p> <p>研究開発項目①②については、委託・助成先事業者が個別の研究開発を進める中で、中間時点で有望案件を精査し、4年目以降は集中的投資の下に実用化に向けた研究開発を進めることがマネジメント上重要と判断し、ステージゲートを設定しております。</p> <p>一方、研究開発項目③は、委託先事業者が一体的に一つの統合システムを開発するものであり、途中で一つでも要素技術が欠けることは不適切として、ステージゲートは設定しておりません。また、④は平成31年度から開始することを予定しておりますので、ステージゲートの予定はありません。</p>	<p>特になし。</p>
<p>その他</p>		

<p>[意見1] (1件)</p> <p>研究開発項目①(2)の説明文に「蓄積機構を制御する技術等」とあり、研究開発項目①の目指す具体的な方向性が示されていると思うが、「1. 研究開発の必要性」にも同様の文言を加えては如何か。例えば「代謝・輸送系遺伝子」もしくは「有用物質の高蓄積をデザインする」という文言を入れるとさらに具体性と統合感が加えられ、実用化に資する基盤技術開発にふさわしいと感じる。</p> <p>同様に、達成目標の項目(2)にも補足して「目的代謝・輸送系遺伝子の発現を」とするのは如何か。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。</p> <p>本項目では輸送・蓄積に関与する遺伝子も考慮しており、代謝系遺伝子に包含しております。</p>	<p>特になし。</p>
--	--	--------------

以上

(添付資料-3)

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
特許論文等リスト

3.2.1 研究開発項目① 植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発【委託】

3.2.1.1 ゲノム編集技術

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内/ 外国 /PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	九州大学、エディットフォース	特願2021-13091	国内	2021年1月 29日	出願	RNAスプライシングを制御するための分子	八木祐介、佐々木忠将、中村崇裕、田村泰造
2	高崎健康福祉大学、産業技術総合研究所	特願 2021-13616	国内	2021年1月 29日	出願	核酸を植物細胞のゲノムへ導入する方法	木村光宏、吉積毅、中村史
3	筑波大学 産業技術総合研究所	PCT/JP2021/3260	PCT	2021年1月 29日	出願	A METHOD FOR INCREASING METHYLATION OF GENOMIC DNA	
4	筑波大学 産業技術総合研究所	特願 2021-012831	国内	2021年1月 29日	出願	光合成真核生物におけるゲノム編集方法	
5	理化学研究所	2021-012474	国内	2021年1月 28日	出願	ゲノム編集ツールの評価方法	
6	産業技術総合研究所	特願2021-005696	国内	2021年1月 18日	出願	タンパク質を動物細胞に導入する方法	加藤義雄、古旗祐一
7	広島大学	特願2020-539416	国内	2020年12 月1日	国内移行済	新規ヌクレアーゼドメインおよびその利用	山本卓、佐久間哲史、齋藤勝和
8	徳島大学	2020-170714	国内	2020年10 月8日	出願	CRISPRタイプI-Dを利用した標的ヌクレオチド配列改変技術	
9	神戸大学	特願2020-054225	国内	2020年3月	出願	オルガネラ形質転換体の選別方法	<u>西田 敬二</u>
10	産業技術総合研究所	特願2020-53154	国内	2020年3月	出願	マイクロニードルアレイ及びそれを用いた植物細胞への物質導入方法	<u>中村 史</u>
11	東京大学	特願2020-053077	国内	2020年3月	出願	連結DNAの製造方法及びそれに用いるためのベクターの組	<u>谷内江 望</u>

						み合わせ	
12	産業技術総合研究所	特願2020-049242	国内	2020年3月	出願	DNA酵素及びRNA切断方法	加藤義雄
13	徳島大学	WO/2020/184723	PCT	2020年3月13日	公開	CRISPRタイプI-Dシステムを利用した標的配列改変技術	
14	東京医科歯科大学、広島大学	PCT/JP2019/036372	PCT	2019.9.17	出願	C a s タンパク質の活性調節法	野村 渉
15	広島大学	PCT/JP2019/033045	PCT	2019年8月23日	出願	新規ヌクレアーゼドメインおよびその利用	山本卓、佐久間哲史、齋藤勝和
16	徳島大学	US 62/818450	米国	2019年3月14日	公開	Method of editing a targeted sequence of genomic DNA in a cell	
17	産業技術総合研究所	特願2018-193751	国内	2018年10月12日	出願	植物細胞の核内へのタンパク質導入法	加藤義雄、古旗祐一
18	東京医科歯科大学	62/732054	外国	2018年9月17日	出願	DEVELOPMENT OF CELL CYCLE DEPENDENT ACTIVATION SYSTEM OF CRISPR/CAS9	野村渉、松本大亮、玉村啓和
19	広島大学	特願2018-158710	国内	2018年8月27日	出願	新規ヌクレアーゼドメインおよびその利用	山本卓、佐久間哲史、齋藤勝和
20	徳島大学	PCT/JP2018/030607	PCT	2018年8月20日	公開	ヌクレオチド標的認識を利用した標的配列特異的改変技術	
21	徳島大学	2017-158876	国内	2017年8月21日	公開	ヌクレオチド標的認識を利用した標的配列特異的改変技術	

【論文】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名	ページ番号	発表年月
1	田村泰造、中村崇裕	九州大学	植物由来の核酸結合モジュール、PPRタンパク質を利用したDNA/RNA編集技術の開発	化学と生物	59, 113-121	2021年3月
2	中村崇裕、刑部敬史、加藤義雄	九州大学、徳島大学、産業技術総合研究所	国産ゲノム編集技術プラットフォームの確立	バイオインダストリー協会、B&I	79	2021年3月
3	太田 賢、中村崇裕	九州大学、エディットフォース	ゲノム編集関連技術の開発動向とその産業利用	最新のゲノム編集技術と用途応用	P30-42	2021年2月
4	中村崇裕	九州大学	DNA切断酵素	ゲノム編集	P21-26	2021年

				食品		2月
5	中村崇裕	九州大学	RNA操作技術	ゲノム編集 食品	P33-38	2021年 2月
6	Yuan S, Kawasaki S, Abdellatif IMY, Nishida K, Kondo A, Ariizumi T, Ezura H, Miura K.	神戸大学	Efficient base editing in tomato using a highly expressed transient system.	Plant Cell Rep.	In print	2021年 2月
7	古旗祐一、加藤義雄	産業技術総合 研究所	Asymmetric roles of two histidine residues in Cas9 catalytic domains upon chemical rescue	Biochemist ry	60, 194- 200	2021年 1月
8	Nishida K, Kondo A.	神戸大学	CRISPR-derived genome editing technologies for metabolic engineering.	Metabolic Engineerin g	63:141-147	2020年 12月
9	Hunziker J, Nishida K, Kondo A, Kishimoto S, Ariizumi T, Ezura H.	神戸大学	Multiple gene substitution by Target-AID base-editing technology in tomato.	Scientific Reports	10(1):2047 1.	2020年 11月
10	Osakabe K, Wada N, Miyaji T, Murakami E, Marui K, Ueta R, Hashimoto R, Abe-Hara C, Kong B, Yano K, Osakabe Y	徳島大学、明 治大学	Genome editing in plants using CRISPR type I-D nuclease.	Communicat ions Biology	3: 648	2020年 11月
11	Daisuke Matsumoto, Hirokazu Tamamura, <u>Wataru Nomura</u>	広島大学学	A Cell Cycle-dependent CRISPR-Cas9 Activation System Based on an Anti- CRISPR Protein Shows Improved Genome Editing Accuracy.	Communicat ions Biology	3, 601	2020年 10月
12	Shinozaki Y, Beauvoit BP, Takahara M, Hao S, Ezura K, Andrieu MH, Nishida K, Mori K, Suzuki Y, Kuhara S, Enomoto H, Kusano M, Fukushima A, Mori T, Kojima M, Kobayashi M, Sakakibara H, Saito K, Ohtani Y, Bénard C,	神戸大学	Fruit setting rewires central metabolism via gibberellin cascades.	Proc Natl Acad Sci U S A.	22;117(38) :23970- 23981.	2020年 9月

	Prodhomme D, Gibon Y, Ezura H, Ariizumi T.					
13	間世田 英明	産業技術総合研究所	細菌の抗生物質耐性獲得システムの応用技術	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	Vol. 51 9号 P432-437	2020年
14	Komatsu A, Ohtake M, Shimatani Z, Nishida K.	神戸大学	Production of Herbicide-Sensitive Strain to Prevent Volunteer Rice Infestation Using a CRISPR-Cas9 Cytidine Deaminase Fusion	Frontiers in Plant Science	11:925	2020年 8月
15	Sakata RC, Ishiguro S, Mori H, Tanaka M, Tatsuno K, Ueda H, Yamamoto S, Seki M, Masuyama N, Nishida K, Nishimasu H, Arakawa K, Kondo A, Nureki O, Tomita M, Aburatani H, Yachie N.	東京大学・神戸大学	Base editors for simultaneous introduction of C-to-T and A-to-G mutations.	Nature Biotechnology	38(7):865-869	2020年 6月
16	Jing Zhao、猪股梨華、加藤義雄、宮岸真	産業技術総合研究所	Development of aptamer-based inhibitors for CRISPR/Cas system	Nucleic Acids Research	e0227477	2020年 3月
17	<u>西田敬二</u>	神戸大学	ゲノム編集による次世代育種	機能性食品と薬理栄養	Vol. 13 No. 4 204-209	2020年 2月
18	Yuichi Furuhata, Ayako Sakai, Tomi Murakami, Akira Nagasaki, <u>Yoshio Kato</u>	産業技術総合研究所	Bioluminescent imaging of Arabidopsis thaliana using an enhanced Nano-lantern luminescence reporter system	PLOS ONE	15(1):e0227477	2020年 1月
19	中井明日也, Ang Li, <u>西田敬二</u>	神戸大学	Target-AIDの設計と作製	実験医学別冊 完全版 ゲノム編集 実験スタンダード	112-118	2019年 12月
20	寺本 潤, <u>西田敬二</u>	神戸大学	ゲノム編集技術を用いた次世代微生物育種	実験医学別冊 完全版 ゲノム編集 実験スタンダード	317-324	2019年 12月

21	Daisuke Matsumoto, Hirokazu Tamamura, <u>Wataru Nomura</u>	東京医科歯科 大学	TALEN-Based Chemically Inducible, Dimerization- Dependent, Sequence- Specific Nucleases	Biochemist ry	59, 197-204	2019年 10月
22	Katayama K, Mitsunobu H, <u>Nishida K.</u>	神戸大学	Mammalian synthetic biology by CRISPRs engineering and applications.	Curr Opin Chem Biol.	52, 79-84	2019年 10月
23	<u>西田敬二</u>	神戸大学	DNA塩基書き換えによる切らな いゲノム編集 Target-AID	J A T A F F ジャーナ ル	7巻5号 17-21	2019年 5月
24	Furuhata Y, Sakai A, <u>Kato Y</u>	産業技術総合 研究所	Protein electroporation of Cre recombinase into cultured Arabidopsis cells with an intact cell wall	Protocol Exchange	27	2019年 3月
25	森秀人 & <u>谷内江 望</u>	東京大学	新規ゲノム編集ツールを探索 する	細胞	51, 3, 8- 12	2019年 3月
26	中村崇裕	エディットフ ォース	日本発の新規DNA/RNA操作技術 の開発	産学連携ジ ャーナ ル	15, P10-12	2019年 2月
27	佐々木忠将、 <u>八木祐介</u> 、 <u>中村崇裕</u>	九州大学、エ ディットフ ォース	PPR蛋白質を用いた新規なRNA 操作技術	細胞	51, 133- 135	2019年 2月
28	Furuhata Y, Sakai A, Murakami T, Morikawa M, Nakamura C, <u>Yoshizumi T</u> , Fujikura U, <u>Nishida K</u> , <u>Kato Y</u>	産業技術総合 研究所、神戸 大学、理研（ 高崎健康福祉 大学）	A method using electroporation for the protein delivery of Cre recombinase into cultured Arabidopsis cells with an intact cell wall	Scientific reports,	9, 2163	2019年 2月
29	Shimatani Z, Ariizumi T, Fujikura U, Kondo A, Ezura H, <u>Nishida K.</u>	神戸大学	Targeted Base Editing with CRISPR-Deaminase in Tomato.	Biotechnol Journal	13(9):e170 0596	2019年 1月
30	Mori H, Evans-Yamamoto D, Ishiguro S, Tomita M & <u>Yachie N</u>	東京大学	Fast and global detection of periodic sequence repeats in large genomic resources	Nucleic Acids Research	gky890	2019年 1月
31	Kimura M, <u>Yoshizumi T</u> , Numata K	理研（高崎健 康福祉大学）	A centrifugation-assisted peptide-mediated gene transfer method for high- throughput analyses.	Plant Biotechnol ogy	36, 49-52	2018年 11月
32	<u>Wataru Nomura</u> , Daisuke Matsumoto, Taisuke Sugii, Takuya	東京医科歯科 大学	Efficient and Orthogonal Transcription Regulation by Chemically Inducible	Biochemist ry,	57, 6452- 6459	2018年 11月

	Kobayakawa, Hirokazu Tamamura		Artificial Transcription Factors.			
33	Despres PC, Dube AK, Nielly-Thibault L, <u>Yachie N</u> & Landry CR	東京大学	Double Selection Enhances the Efficiency of Target-AID and Cas9-Based Genome Editing in Yeast	G3: Genes, Genomes, Genetics	8, 3163-3171	2018年 10月
34	野村 渉	東京医科歯科大学	ゲノム編集がもたらす蛍光バイオイメージングの革新	Precision Medicine,	1, 80-85.	2018年 10月
35	谷内江 望	東京大学	ブレークスルーを狙うバイオテクノロジー 編/東京大学谷内江研究室 第1回: ゲノム編集ー美しきテクノロジーウェブの新たな中心	実験医学	Vol. 36, No. 18, 3134-3140	2018年 10月
36	Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, Gao L, Hirano S, Okazaki S, Noda T, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Mori H, Oura S, Holmes B, Tanaka M, Seki M, Hirano H, Aburatani H, Ishitani R, Ikawa M, <u>Yachie N</u> , Zhang F & Nureki O	東京大学	Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space	Science	361, 1259-1262	2018年 9月
37	Nagasaki A, <u>Kato Y</u> , Meguro K, Yamagishi A, Nakamura C, Uyeda TQP	産業技術総合研究所	A genome editing vector that enables easy selection and identification of knockout cells	Plasmid	98, 37-44	2018年 9月
38	<u>Wataru Nomura</u>	東京医科歯科大学	Development of Toolboxes for Precision Genome/Epigenome Editing and Imaging of Epigenetics.	The Chemical Record	18, 1717-1726	2018年 8月
39	Shimatani Z, <u>Fujikura U</u> , Ishii H, Terada R, <u>Nishida K</u> , Kondo A.	神戸大学	Herbicide tolerance-assisted multiplex targeted nucleotide substitution in rice.	Data in Brief	1325-1331	2018年 8月
40	Hiroto Endo, Yutaka Hanawa, Hiroya Araie, Iwane Suzuki and Yoshihiro	筑波大学	Overexpression of <i>Tisochrysis lutea</i> Akl1 identifies a key cold-induced alkenone	Scientific Report	8, 11230	2018年 7月25日

	Shiraiwa		desaturase enzyme.			
41	石黒 宗 & 谷内江 望	東京大学	全ゲノム合成時代における長鎖DNA合成の考え方	スマートセルインダストリー-微生物細胞を用いた物質生産の展望-	32-38	2018年6月
42	Yoshizumi T, Oikawa K, Chuah JA, Kodama Y, Numata K.	理研	Selective Gene Delivery for Integrating Exogenous DNA into Plastid and Mitochondrial Genomes Using Peptide-DNA Complexes.	Biomacromolecule	19, 1582-1591	2018年5月
43	T. Imai., Y. Yagi, T. Nakamura	エディットフォース	Recent Progress Toward RNA Manipulation with Engineered Pentatricopeptide Repeat Proteins	Applied RNA Bioscience	151-160	2018年4月
44	Banno S, Nishida K, Arazoe T, Mitsunobu H, Kondo A.	神戸大学	Deaminase-mediated multiplex genome editing in Escherichia coli.	Nature Microbiology	3, 423-429	2018年2月
45	谷内江 望	東京大学	長鎖DNA合成のオートメーション化による生命科学の未来	実験医学別冊 あなたのラボにAI×ロボットがやってくる	80-91	2017年12月
46	山本-エヴァンス 楠, 谷内江 望	東京大学	AI・LabDroidと交わす言葉をつくりだす	実験医学別冊 あなたのラボにAI×ロボットがやってくる	124-129	2017年12月
47	Anne-Ruxandra Carvunis & Trey Ideker 翻訳: 森秀人 & 谷内江 望	東京大学	Siri of the Cell-生物学はiPhoneから何を学べるだろうか	実験医学別冊 あなたのラボにAI×ロボットがやってくる	116-123	2017年12月
48	野村 涉	東京医科歯科大学	DNAメチル化制御から精密エピゲノム編集へ	MEDCHEM NEWS	200-207	2017年11月
49	野村 涉	東京医科歯科大学	生体分子間相互作用を基盤とする機能分子の創製とケミカ	Yakugaku Zasshi	1223-1231	2017年10月

			ルバイオロジーへの展開			
50	石黒 宗, 増山 七海 & 谷内江 望	東京大学	オミクス科学における実験数の組合せ爆発に挑むDNAバーコード技術	生化学	89, No 4, 538-545	2017年 8月
51	Mitsunobu H, Teramoto J, Nishida K, Kondo A.	神戸大学	Beyond Native Cas9: Manipulating Genomic Information and Function.	Trends in Biotechnology.	35, 983-996	2017年 7月
52	田村泰造、中村崇裕	九州大学	新規ゲノム編集ツール	医療応用をめざすゲノム編集、化学同人	203-214	2017年 7月
53	Jo M (共同筆頭著者), Chung AY (共同筆頭著者), <u>Yachie N</u> (共同筆頭著者), Seo M, Jeon H, Nam Y, Seo Y, Kim E, Zhong Q, Vidal M, Park HC, Roth FP & Suk K	東京大学	Yeast genetic interaction screen of human genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: identification of MAP2K5 kinase as a potential drug target	Genome Research	27, 1487-1500	2017年 6月
54	Ghanegolmohammadia F, Yoshida M, Ohnuki S, Sukegawa Y, Okada H, Obara K, Kihara A, Suzuki K, Kojima T, <u>Yachie N</u> , Hirata D & Ohya Y	東京大学	Systematic analysis of Ca ²⁺ homeostasis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> based on chemical-genetic interaction profiles	Molecular Biology of the Cell	28, 3415-3427	2017年 5月
55	<u>Yachie N</u> , Robotic Biology Consortium & Natsume T	東京大学	Robotic crowd biology with Maholo LabDroids	Nature Biotechnology	35, 310-312	2017年 4月
56	Zenpei Shimatanil, Sachiko Kashojiya, Mariko Takayama, Rie Terada, Takayuki Arazoe, Hisaki Ishii, Hiroshi Teramura, Tsuyoshi Yamamoto, Hiroki Komatsu, Kenji Miura, Hiroshi Ezura, <u>Keiji Nishida</u> , Tohru Ariizumi and Akihiko Kondo.	神戸大学、筑波大学	Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion	Nature Biotechnology	35, 441-443	2017年 3月
57	石黒 宗, 森 秀人 & 谷	東京大学	DNAバーコードによる生命科学	実験医学増	35, No. 5	2017年

	内江 望		実験の限界突破	刊		3月
58	八木祐介	エディット フォース(株)	PPR技術を利用した新しい DNA/RNA操作ツールの開発	実験医学、 All about ゲノム編集	180-184	2016年 12月
59	山本-エヴァンス 楠、増 山 七海 & 谷内江 望	東京大学	バーコードフュージョン遺伝学	医学のあゆ み	259, No. 8, 832-838	2016年 11月
60	Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z & Kondo A	神戸大学、筑 波大学	Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems.	Science 353	aaf8729	2016年 9月

【外部発表】

(a) 学会発表・講演

番号	発表者	所属	タイトル	学会名・イベント名等	発表 年月
	2020年度				
1	星 柁 充、宮澤幸乃、 田中知子、山岸彩奈 、古旗祐一、加藤義 雄、牧本なつみ、竹 下俊弘、小林健、岩 田太、木村光宏、吉 積毅、中村史	産業技術総合 研究所、静岡 大学、高崎健 康福祉大学	マイクロニードルアレイを 用いたCas9輸送による植物 のゲノム編集	日本化学会 第101春季 年会 (2021)	2021 年3月
2	西田敬二 *招待講演	神戸大学	生化学若い研究者の会	塩基編集による切らないゲ ノム編集の開発と応用	2021年 1月
3	西田敬二 *招待講演	神戸大学	千里ライフサイエンスセミナ ー	一塩基編集技術の開発と応 用展開	2020年 11月
4	中村崇裕	九州大学	大学発ゲノム編集技術の産業 化 における諸課題	JBAシンポジウム「ゲノム編 集技術の社会実装に伴う諸 問題にどう対処すべきか? 」	2020年 10月
5	野村涉 *招待講演	広島大学	ノーベル賞解説講演・”ゲノム 編集” その概念と技術革命	第10回CSJフェスタ	2020年 10月
6	刑部敬史	徳島大学	植物スマートセルインダスト リーを実現する新規ゲノム編 集ツールの開発	(一財)バイオインダストリ ー協会 植物バイオ研究会 第一回勉強会	2020年 10月
7	間世田 英明	産業技術総合 研究所	国産ゲノム編集技術PODIRシス テムの開発について	Bio Japan 2020	2020年 10月
8	野村涉	広島大学	テイラーメイドタンパク質に	第93回日本生化学会大会	2020年

	*招待講演		よる精密、安全なゲノム編集・機能制御技術		9月
9	星 柁充、宮澤幸乃、山岸彩奈、古旗祐一、加藤義雄、牧本なつみ、竹下俊弘、小林健、岩田太、中村史	産業技術総合研究所、静岡大学	マイクロニードルアレイを用いた植物組織へのCas9タンパク質の直接導入によるゲノム編集	第14回バイオ関連化学シンポジウム	2020年9月
10	Nozomu Yachie *招待講演	東京大学	DNA event recording biology	CRISPR and Beyond: Perturbations at Scale to Understand Genomes	2020年9月
11	刑部敬史	徳島大学	植物スマートセルインダストリーを実現するゲノム編集技術	日本生物工学会 生物工学Webシンポジウム	2020年9月
	2019年度				
12	星 柁充、宮澤幸乃、山岸彩奈、古旗祐一、 <u>加藤義雄</u> 、牧本なつみ、竹下俊弘、小林 健、 <u>中村 史</u>	産業技術総合研究所	ナノニードルアレイを用いた植物組織に対するゲノム編集タンパク質直接導入法の開発	日本化学会	2020年3月
13	<u>Wataru Nomura</u> *招待講演	広島大学	Development of CRISPR-Cas/TALEN-based tools for precision genome editing and gene regulation.	iPOPS 2020	2020年2月
14	<u>中村崇裕</u> *招待講演	九州大学	PPR蛋白質を利用したDNA/RNA編集技術の開発	プロジェクト横断型公開シンポジウム 「植物のゲノム編集基盤技術開発の現状と展望」	2020年2月
15	刑部敬史	徳島大学	新しいゲノム編集酵素を用いた植物のゲノム編集技術	プロジェクト横断型公開シンポジウム「植物のゲノム編集基盤技術開発の現状と展望」	2020年2月
16	間世田 英明	産業技術総合研究所	転写のゆらぎと自己ゲノム編集による抗生物質耐性遺伝子の発現	第93回日本細菌学会	2020年2月
17	<u>西田敬二</u>	神戸大学	塩基編集技術の開発と育種応用	農芸化学関西支部セミナー	2019年12月
18	<u>西田敬二</u>	神戸大学	塩基編集技術の植物科学および育種への波及	植物科学シンポジウム	2019年12月
19	<u>加藤 義雄</u>	産業技術総合研究所	Protein delivery into cells: from animal to plant	CEBST2019	2019年12月

20	<u>西田敬二</u>	神戸大学	Base editing, gene conversion and local diversification without DNA double strand break	Frontiers in Genome Engineering	2019年 11月
21	<u>中村崇裕</u> *招待講演	九州大学	PPR蛋白質を利用したDNA/RNA編集技術の開発	「九州大学学術研究都市」セミナー	2019年 11月
22	<u>Nozomu Yachie</u> *招待講演	東京大学	Recording cellular events in DNA	Frontiers in Genome Engineering 2019	2019年 11月
23	Miyashita N, Yamaguchi T, Matsukura L, Furue M	近畿大	Molecular Dynamics Simulations of CRISPR Type I-E System and the DNA binding Mechanisms	The 5th International Conference on Molecular Simulation	2019年 11月
24	Osakabe K, Wada N, Marui K, Murakami E, Ueta R, Hashimoto R, Abe C, Miyaji T, Osakabe Y	徳島大学	Genome editing in plants by using a novel genome editing tool, TiD	Frontiers in Genome Engineering 2019	2019年 11月
25	間世田 英明	産業技術総合研究所	核酸医薬の可能性を広げる新規ゲノム編集技術	”日経バイオテク プロフェッショナルセミナー 多様化する核酸医薬のモダリティ”	2019年 11月
26	<u>Nozomu Yachie</u> *招待講演	東京大学	Recording cellular events in DNA	Asian Synthetic Biology Association 2019	2019年 10月
27	<u>西田敬二</u>	神戸大学	塩基編集技術Base editingの開発と展望	BioJapan	2019年 10月
28	<u>西田敬二</u>	神戸大学	Genome engineering by base editing in various organisms	Asian Synthetic Biology Association	2019年 10月
29	<u>加藤 義雄</u> 、古旗 祐一	産業技術総合研究所	Restoration of Cas9 catalytic activity for DNA cleavage by small molecules	International Symposium on Nucleic Acids Chemistry	2019年 10月
30	<u>加藤 義雄</u>	産業技術総合研究所	植物へのゲノム編集モジュールの導入方法	BioJapan	2019年 10月
31	佐久間哲史	広島大学	新規ヌクレアーゼドメイン“FirmCutヌクレアーゼ”による高効率ゲノム編集	BioJapan 2019	2019年 10月
32	<u>T Nakamura</u> , <u>Y Yagi</u>	九州大学 エディットフォース	Designer RNA binding protein based on PPR protein, as a new modality for targeted therapy	ESGCT2019	2019年 10月
33	刑部敬史	徳島大学	高等植物のゲノム改変に利用	BioJapan2019 NEDOセミナー	2019年

			可能な新規ゲノム編集ツールの開	ー	10月
34	間世田 英明	産業技術総合研究所	細菌の抗生物質耐性獲得機能を応用したゲノム編集	Bio Japan 2019	2019年 10月
35	木村 光宏、 <u>吉積 毅</u>	高崎健康福祉大学	ペプチド法による植物ミトコンドリアへの遺伝子導入効率を向上させる技術開発	第37回日本植物細胞分子生物学学会 京都大会	2019年 9月
36	<u>中村崇裕</u> *招待講演	九州大学	PPR蛋白質を利用したDNA/RNA編集技術の開発	第31回日本比較免疫学会学術集会ー第30回日本生体防御学会学術総会 合同集会	2019年 9月
37	<u>中村崇裕</u> *招待講演	九州大学	PPR蛋白質の配列特異的なRNAとの結合の理解と利用	日本育種学会・シンポジウム	2019年 9月
38	<u>野村 涉</u> *招待講演	広島大学	CRISPR-Cas based methods toward precision and secure genome editing/regulation.	第13回バイオ関連化学シンポジウム	2019年 9月
39	<u>西田敬二</u>	神戸大学	塩基編集技術Target-AIDの開発と応用	日本遺伝学会	2019年 9月
40	星 柁充、宮澤幸乃、山岸彩奈、古旗祐一、加藤義雄、牧本なつみ、竹下俊弘、小林 健、 <u>中村 史</u>	産業技術総合研究所	ナノニードルを用いた植物組織へのゲノム編集タンパク質の導入	日本化学会バイオ関連化学シンポジウム	2019年 9月
41	刑部敬史	徳島大学	高等植物におけるゲノム編集技術の活用と展望	日本遺伝学会第91回大会ワークショップ	2019年 9月
42	<u>西田敬二</u>	神戸大学	Potential of base editing technology for gene therapy	細胞遺伝子治療学会	2019年 7月
43	<u>八木祐介</u>	エディットフォース	ゲノム編集関連技術の開発動向とその産業利用	日本ゲノム編集学会 第4回大会	2019年 6月
44	<u>Nozomu Yachie</u> *招待講演	東京大学	DNA barcode technologies to dissect heterogeneous biological systems	The 13th Intn'l Workshop on Advanced Genomics	2019年 6月
45	古旗 祐一、坂井 綾子、村上 登美、 <u>吉積 毅</u> 、藤倉 潮、 <u>西田 敬二</u> 、 <u>加藤 義雄</u>	産業技術総合研究所 神戸大学	細胞壁を有する植物培養細胞へのタンパク質のエレクトロポレーション導入:安全性を高めたゲノム改変を目指して	日本ゲノム編集学会第4回大会	2019年 6月
46	星 柁充、宮澤幸乃、森川萌音、山岸彩奈、 <u>加藤義雄</u> 、 <u>中村 史</u>	産業技術総合研究所	ナノニードルアレイを用いた植物組織へのCreタンパク質導入	日本ゲノム編集学会	2019年 6月
47	齋藤勝和、武永充正、	広島大学	新規ヌクレアーゼドメイン	日本ゲノム編集学会第4回	2019年

	持田圭次、佐久間哲史、 <u>山本卓</u>		“FirmCut Nuclease”を用いた高効率・高利便性ゲノム編集	大会	6月
48	刑部敬史	徳島大学	高等動植物に利用可能な新規ゲノム編集ツールの開発	第4回日本ゲノム編集学会大会「植物セッション」	2019年6月
49	<u>西田敬二</u>	神戸大学	塩基編集技術Target-AIDの開発と応用	東京大学 佐藤守俊研究室 セミナー	2019年5月
50	<u>西田敬二</u>	神戸大学	DNA二重鎖を切らない塩基編集技術	協和発酵バイオ セミナー	2019年5月
51	<u>西田敬二</u>	神戸大学	塩基編集、Base editing の開発と応用	東京大学医科学研究所 セミナー	2019年5月
	2018年度				
52	木村光宏、 <u>吉積毅</u> 、沼田圭司	理研（高崎健康福祉大学）	ペプチド-DNA複合体を用いた葉緑体ゲノム組換えタバコの作出	園芸学会平成31年度春季大会	2019年3月
53	中村崇裕	エディットフォース	PPR技術で創るDNA/RNA編集技術	国際医薬品開発展	2019年3月
54	間世田 英明	産業技術総合研究所	緑膿菌の多剤耐性獲得機構をゲノム編集技術に応用する	第53回緑膿菌感染症研究会	2019年3月
55	中村崇裕	九州大学	New DNA/RNA editing techniques based on PPR protein	事業者間連携公開セミナー「ゲノム編集技術を活用した農作物・バイオの新たな展開」	2019年2月
56	中村崇裕	エディットフォース	独自のDNA、RNA編集技術を用いたバイオ産業への展開	RINK FESTIVAL	2019年2月
57	加藤義雄 *招待講演	産業技術総合研究所	Protein delivery into cells for altering the genomic DNA sequence	DAILAB-CAFE	2019年2月
58	八木祐介 *招待講演	エディットフォース	PPRタンパク質を利用した細胞内核酸操作技術	関西スマートセルフフォーラム2018	2019年1月
59	間世田 英明	産業技術総合研究所	生物の適応・進化の力をゲノムデザイン技術へ	新化学技術推進協会（JACI）ライフサイエンス技術部会反応分科会 講演会	2019年1月
60	<u>Wataru Nomura</u> , Takumi Kamimura, Daisuke Matsumoto, Hirokazu Tamamura	東京医科歯科大学	Fluorogenic and genetically encodable tag-probe system for in-cell imaging of protein synthesis.	10th International Peptide Symposium	2018年12月
61	中村崇裕	九州大学	PPR蛋白質を利用したDNA/RNA編集技術の開発	産学官連携秋季シンポジウム	2018年12月
62	谷内江望	東京大学	We do not have a time	Asian Synthetic Biology	2018年

	*招待講演		machine, but can install a recording system to a cell	Association 2018	11月
63	谷内江望 *招待講演	東京大学	Developing new genome editing technologies	第41回日本分子生物学会年会	2018年 11月
64	古旗祐一、坂井綾子、村上登美、森川萌音、中村史、 <u>吉積毅</u> 、藤倉潮、 <u>西田敬二</u> 、 <u>加藤義雄</u>	産業技術総合研究所、神戸大学、理研（高崎健康福祉大学）	細胞壁を有する植物細胞における遺伝子改変：エレクトロポレーションによるCreタンパク質の直接導入	第41回日本分子生物学会年会	2018年 11月
65	齋藤勝和、武永充正、持田圭次、佐久間哲史、 <u>山本卓</u>	広島大学	新規高活性ヌクレアーゼ“FirmCut Nuclease”を用いたゲノム編集技術の開発	第41回日本分子生物学会年会	2018年 11月
66	谷内江望 *招待講演	東京大学	Synthetic DNA memory devices to measure molecular and cellular dynamics	生命科学系フロンティアミーティング 2018	2018年 10月
67	谷内江望 *招待講演	東京大学	Chasing molecular and cellular dynamics using DNA barcodes	Cell Mapping Symposium	2018年 10月
68	間世田 英明	産業技術総合研究所	日本発新規ゲノム編集技術の研究開発	Bio Japan 2018	2018年 10月
69	間世田 英明	産業技術総合研究所	ゲノム編集を産業技術に！	テクノブリッジフェア2018 in つくば	2018年 10月
70	<u>野村涉</u> 、松本大亮、杉井太亮、小早川拓也、玉村啓和	東京医科歯科大学	化合物を用いた直交的な内因性遺伝子制御系の構築	第12回バイオ関連化学シンポジウム	2018年 9月
71	谷内江望 *招待講演	東京大学	Bringing the sense of amazing yeast genetics to mammalian biology	第22回酵母合同シンポジウム	2018年 9月
72	加藤義雄 *招待講演	産業技術総合研究所	タンパク質の直接導入法を利用した効率的なゲノム改変	化学工学会	2018年 9月
73	谷内江望 *招待講演	東京大学	A new genetic marker to analyze molecular dynamics of a same clone in complex cell populations	The 91st Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society	2018年 9月
74	谷内江望 *招待講演	東京大学	Scaling up massively parallel experiments using DNA barcodes	JST ImPACT Artificial Cell Program	2018年 9月
75	<u>Yoshizumi T</u> , Numata K.	理研	Development of transplastomic spectinomycin-sensitive Arabidopsis using a fusion	International Association for Plant Biotechnology Congress	2018年 8月

			peptide.		
76	Kimura M, <u>Yoshizumi Y</u> , Numata K	理研	A Centrifugation-Assisted Peptide-mediated plant Transformation (CAPT) method for various high-throughput analyses: its protocol and efficiency.	International Association for Plant Biotechnology Congress	2018年 8月
77	吉積毅、無津呂（青木）裕美、沼田圭司	理研	ミトコンドリアゲノムへの遺伝子挿入に必要な相同配列の長さ	第36回日本植物細胞分子生物学学会大会	2018年 8月
78	木村光宏、 <u>吉積毅</u> 、沼田圭司	理研	遠心による植物細胞へのペプチド-DNA複合体導入	第36回日本植物細胞分子生物学学会大会	2018年 8月
79	刑部祐里子	徳島大学	植物の生産性を制御する新規ゲノム編集システムの創生	第36回日本植物細胞分子生物学学会大会シンポジウム	2018年 8月
80	間世田 英明	産業技術総合研究所	バクテリアの耐性獲得機構に見られる自己ゲノム編集機構の解析と育種NEDOへの応用	第36回日本植物細胞分子生物学学会（金沢）大会	2018年 8月
81	長崎晃、 <u>加藤義雄</u> 、目黒慶一、山岸彩奈、中村史、上田太郎	産業技術総合研究所	高効率で簡便なゲノム編集のための新規ベクターの開発	日本ゲノム編集学会	2018年 6月
	2017年度				
82	木村光宏・ <u>吉積毅</u> ・沼田圭司	理研	ハイスループット解析を可能にするペプチド-DNA複合体による遺伝子導入法の開発：Centrifugation-Assisted Peptide mediated plant Transformation (CAPT) 法の簡便性と遺伝子導入効率の評価	園芸学会 平成30年度春季大会	2018年 3月
83	吉積 毅・沼田 圭司	理研	融合ペプチドを用いたシロイヌナズナ葉緑体形質転換体作出の試み	第59回日本植物生理学会年会	2018年 3月
84	中村崇裕	九州大学	国産ゲノム・RNA編集技術の医療での展開	シンポジウム「革新的医薬・核酸医薬の開発」	2018年 1月
85	八木祐介	エディットフォース	日本発のゲノム・トランスクリプトーム編集技術～エディットフォースの挑戦～	第17回IPSN講演会	2018年 1月
86	西田敬二 *招待講演	神戸大学	Genome Editing with Non-Nuclease Editors from Bacteria to Plants	Keystone Symposia	2018年 1月
87	八木祐介、中村崇裕	エディットフォース	PPR蛋白質を応用したRNA操作	分子生物学会	2017年

		オース	技術の開発		12月
88	猪股梨華、Jing Zhao、 加藤義雄、宮岸真	産業技術総合 研究所	三重鎖人工核酸(TFO)による二 本鎖DNAの認識とゲノム編集応 用への試み	第40回日本分子生物学会年 会	2017年 12月
89	Wataru Nomura, Daisuke Matsumoto, Taisuke Sugii, Takuya Kobayakawa, Hirokazu Tamamura	東京医科歯科 大学	Differential regulation of endogenous genes in an orthogonal manner by distinct chemically inducible systems	International Conference on Epigenetics and Bioengineering	2017年 12月
90	中村崇裕	九州大学	PPR motif as a New DNA/RNA Binding Module for Genome/Transcriptome Editing	AFELiSA	2017年 11月
91	八木祐介	エディットフ ォース	PPRタンパク質を用いた新しい 核酸編集技術について(ゲノム からトランスクリプトームま で)	Bio Japan	2017年 10月
92	中村崇裕	九州大学	Genome/Transcriptome Editing technologies, based on PPR protein engineering	BioJapan主催者セミナー	2017年 10月
93	西田敬二 *招待講演	神戸大学	生命プログラムの書き換え、ゲ ノム編集技術とその応用	CSJ化学フェスタ	2017年 10月
94	西田敬二 *招待講演	神戸大学	点変異導入型のゲノム編集技 術Target-AIDの開発	第83回酵母研究会講演会	2017年 9月
95	野村 渉 *招待講演	東京医科歯科 大学	生体分子間相互作用を制御す る機能性ペプチド/タンパク 質の設計と応用	熊本大学先端科学研究部セ ミナー	2017年 9月
96	Wataru Nomura *招待講演	東京医科歯科 大学	Development of genome editing and gene regulation systems utilizing specific DNA binding domains	熊本大学 HIGO program seminar	2017年 9月
97	八木祐介、中村崇裕	エディットフ ォース	PPRタンパク質の核酸認識機構 を利用した新規DNA/RNA操作技 術の開発	生物工学会	2017年 9月
98	西田敬二 *招待講演	神戸大学	Targeted nucleotide substitution by genome editing artificial enzyme	IBS-Nature Conference on Frontiers in Genome Engineering	2017年 9月
99	西田敬二 *招待講演	神戸大学	DNAを直接書き換えるゲノム編 集技術「Target-AID」	第46回植物バイオテクシンポ ジウム	2017年 8月
100	Wataru Nomura,	東京医科歯科	Development of chemical-	the 254th ACS National	2017年

	Daisuke Matsumoto, Tsukasa Hashimoto, Taisuke Sugii, Hirokazu Tamamura	大学	inducible artificial transcription factors based on sequence-specific DNA binders	Meeting and Exposition	8月
101	中村崇裕	九州大学	DNA、RNAの両方を操作する第四 世代ゲノム編集技術	Innovation Japan	2017年 8月
102	青木裕美・吉積毅・沼 田圭司	理研	DNA-ペプチド複合体を用いた ミトコンドリアゲノムへの遺 伝子導入	第35回日本植物細胞分子生 物学会	2017年 8月
103	吉積毅・沼田圭司	理研	ペプチド法を用いて組換えた シロイヌナズナ葉緑体の <i>in planta</i> 選抜	第35回日本植物細胞分子生 物学会	2017年 8月
104	青木裕美・吉積毅・沼 田圭司	理研	植物オルガネラゲノム編集を 可能にするDNA-ペプチド複合 体の創製	第27回バイオ・高分子シン ポジウム	2017年 7月
105	吉積毅・沼圭司	理研	植物への導入を目的とした巨 大DNAとカチオン性ペプチドか ら成る複合体の機能解析	第27回バイオ・高分子シン ポジウム	2017年 7月
106	谷内江望 *招待講演	東京大学	生物学者の現実世界プログラ ミング	ロボット・シェアリング共 同研究開発キックオフシン ポジウム「AI×ロボットが 切り拓くライフサイエンス の未来」	2017年 7月
107	西田敬二 *招待講演	神戸大学	DNA塩基変換反応を利用した点 変異導入型ゲノム編集技術	日経バイオテク プロフェ ッショナルセミナー「ゲノ ム編集が生み出す新ビジネ ス」	2017年 7月
108	中村崇裕	九州大学	PPR技術による物質生産から創 薬応用まで	日経バイオテク プロフェ ッショナルセミナー「ゲノ ム編集が生み出す新ビジネ ス」	2017年 7月
109	八木祐介、中村崇裕	エディットフ ォース	PPR蛋白質を利用したRNA操作 技術の開発	RNA学会	2017年 7月
110	西田敬二 *招待講演	神戸大学	Targeted base editing in plants by Target-AID, the CRISPR/Cas9 deaminase fusion.	XIX international Botanical Congress	2017年 7月
111	谷内江 望 *招待講演	東京大学	DNA バーコードによる分子・細 胞動態計測の加速	日本プロテオーム学会2017 年大会JHUP0第15回大会	2017年 7月
112	西田敬二 *招待講演	神戸大学	Development of a Targeted Nucleotide Editing Tool	第17回日本蛋白質科学会年 会	2017年 6月

			Target-AID and its Applications		
113	谷内江 望 *招待講演	東京大学	細胞プログラミングと現実世界プログラミング	研究産業・産業技術振興協会	2017年 6月
114	今井崇喜、八木祐介、 中村崇裕	エディットフォース	PPRタンパク質の基質認識機構の解明とそれを用いた新規DNA/RNA操作技術への応用	日本ゲノム編集学会第2回大会	2017年 6月
115	森川萌音、高野勇太、 山岸彩奈、加藤義雄、 中村史	産業技術総合研究所	ナノニードルアレイを用いたCas9蛋白質の直接物理的輸送	日本ゲノム編集学会第2回大会	2017年 6月
116	Yachie N *Invited Talk	東京大学	DNA barcode technologies for high-throughput measurements of molecular and cellular dynamics	50th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Tokyo	2017年 5月
117	谷内江 望 *招待講演	東京大学	生物学における様々な計測限界の突破ー分子バーコード、ロボティクス、AIー	バイオインダストリー協会 "未来へのバイオ技術"勉強会「生物学実験における限界の破壊と新素材革命の加速」	2017年 5月
118	西田敬二 *招待講演	神戸大学	DNA、RNAの両方を操作する次世代型ゲノム編集技術の開発	第58回ヒューマンサイエンス・バイオインターフェースーバイオ技術移転のための交流の場ー	2017年 5月
119	中村崇裕	九州大学	DNA、RNAの両方を操作する次世代型ゲノム編集技術の開発	第58回ヒューマンサイエンス・バイオインターフェースーバイオ技術移転のための交流の場ー	2017年 5月
120	Yachie N *Invited Talk	東京大学	Dissecting dynamic progression of heterogeneous cell populations using DNA barcode and genome editing technologies	Canada, CIFAR Genetic Networks Workshop, Tokyo	2017年 4月
	2016年度				
121	西田敬二 *招待講演	神戸大学	切らないゲノム塩基編集の多様な生物への応用	第60回日本放線菌学会学術講演会	2017年 3月
122	西田敬二、荒添貴之、 坂野聡美、近藤昭彦*	神戸大学	塩基変換による切らないゲノム編集	日本農芸化学2017年度大会 シンポジウム 3SY05 ゲノ	2017年 3月

	招待講演			ム編集技術の実用化への期待と課題	
123	西田敬二 *招待講演	神戸大学	より精密なゲノムデザイン改変を可能とする点変異ゲノム編集	第2回デザイン生命工学研究会	2017年 3月
124	吉積毅	理研	ペプチドを用いたゲノム編集周辺技術の開発	第58回植物生理学会年会シンポジウム「植物機能の解明を目指すゲノム編集技術」	2017年 3月
125	Yachie N *招待講演	東京大学	Development of synthetic cell systems to understand molecular and cellular dynamics	Annual Meeting in Awaji for Systems and Synthetic E. coli Biology, Hyogo	2017年 3月
126	野村渉	東京医科歯科大学	分割型部位特異的ヌクレアーゼを利用した化合物誘導型ゲノム編集技術の開発	日本化学会 第97春季年会	2017年 3月
127	Yachie N *招待講演	東京大学	DNA barcode technologies for high-throughput measurements of molecular and cellular dynamics	Physical Approaches for Growing and Evolving Populations, Tokyo	2017年 2月
128	谷内江 望 *招待講演	東京大学	DNAバーコードによる分子・細胞動態計測の拡張	定量生物学の会 第八回年会	2017年 1月
129	野村渉	東京医科歯科大学	Improved split DNA methylase activity by optimization of assembly on target sites	2017 Keystone Symposia Conference A2: Precision Genome Engineering	2017年 1月
130	野村渉	東京医科歯科大学	Chemical-inducible artificial transcription factors based on sequence-specificity of TALE and dCas9	2017 Keystone Symposia Conference A2: Precision Genome Engineering	2017年 1月
131	西田敬二 *招待講演	神戸大学神戸大学	Genome editing by targeted deaminase	PAG XXV- Plant & Animal Genome Conference. Plant Genome Engineering workshop	2017年 01月
132	野村渉	東京医科歯科大学	化合物による誘導が可能な分割型人工ヌクレアーゼの構築とその評価	第39回日本分子生物学会年会	2016年 12月
133	野村渉	東京医科歯科大学	分割型メチル化酵素の会合様式が与えるメチル化効率への	第39回日本分子生物学会年会	2016年 12月

			影響		
134	中村崇裕 *招待講演	九州大学	PPRモチーフを利用したDNA/RNA操作技術の開発	植物科学シンポジウム2016 植物科学とイノベーション	2016年 12月
135	中村崇裕 *招待講演	九州大学	PPRモチーフを利用したDNA/RNA操作技術の開発	第9回DNA鑑定学会	2016年 11月
136	野村渉	東京医科歯科大学	化学誘導二量体形成法を応用したゲノム編集ツールの開発	「細胞を創る」研究会9.0	2016年 11月
137	Yachie N *招待講演	東京大学	BARCODE FUSION GENETICS FACILITATES MEASURING THE DYNAMICS OF MOLECULAR NETWORKS	International Conference on Single Cell Research 2016, Tokyo	2016年 11月
138	八木祐介 *招待講演	エディットフォース(株)	Beyond the genome editing	BioJapan2016	2016年 10月
139	谷内江 望 *招待講演	東京大学	オミクス計測限界の破壊ー超マルチプレクス化、AI、ロボティクス	第5回生命医薬情報学連合大会, お台場	2016年 9月
140	中村崇裕 *招待講演	九州大学	PPRモチーフを利用したDNA/RNA操作技術の開発	日本植物学会 第80階大会 理事会主催シンポジウム: ゲノム編集～現状と未来	2016年 9月
141	野村渉	東京医科歯科大学	TALEおよびdCas9を利用した化合物による標的遺伝子特異的な転写活性制御技術	第10回バイオ関連化学シンポジウム	2016年 9月
142	野村渉	東京医科歯科大学	生体分子間相互作用を基盤とする機能分子の創製とケミカルバイオロジーへの展開	第60回日本薬学会関東支部大会	2016年 9月
143	西田敬二、荒添貴之、島谷善平、坂野聡美	神戸大学	切らないゲノム編集技術	日本植物学会 第80回大会 P-1515	2016年 9月
144	西田敬二 *招待講演	神戸大学	DNA塩基変換反応を利用した点変異導入型ゲノム編集技術	新化学技術推進協会 ライフサイエンス技術部会・材料分科会 講演会	2016年 8月

(b)新聞・雑誌等への掲載

番号	発表者	所属	タイトル	雑誌名・学会名・イベント名等	発表年月
1	刑部敬史、刑部祐里子	徳島大学	徳島大、ゲノム編集ミス少なく	日経産業新聞	2020年12月
2	刑部敬史、刑部祐里子	徳島大学	ゲノム編集より正確に	読売新聞(大阪本社版)	2020年12月
3	刑部敬史、刑部祐里子	徳島大学	世界初、新規ゲノム編集技術「TiD」で植物の遺伝子改変の有効性を実証 - 日本のバイオインダストリー推進の原	NEDOニュースリリース	2020年11月

			動力として期待 -		
4	刑部敬史、刑部祐里子	徳島大学	CRISPR-Casサブタイプ Type I-Dを活用した新しいゲノム編集“TiD”システムの開発に成功 -植物ゲノム編集技術への活用-	徳島大学プレスリリース	2020年11月
5	中村崇裕	九州大学	国産化ゲノム編集技術、注目のPPRたんぱく質	化学工業日報	2020年10月
6	Keishi Osakabe	徳島大学	Nature Focal Point “Improved gene-editing precision to boost Japan’s bioeconomy”	Nature, 584, No. 7819	2020年8月
7	八木祐介	エディットフォース	Webページリニューアル		2019年11月
8	西田敬二	神戸大学	フジテレビ ワイドナショー 出演		2019年10月
9	西田敬二	神戸大学	日テレBS 深層NEWS		2019年 8月
10	中村史	産業技術総合研究所	植物ゲノム編集細菌使わず	日経産業新聞	2019年 7月
11	西田敬二	神戸大学	NHK Eテレ 出演		2019年 5月
12	八木祐介	エディットフォース	日本発の新規DNA/RNA操作技術の開発	産学連携ジャーナル	2019年2月
13	八木祐介	エディットフォース	ゲノム上書き、病をデリート	日経産業新聞	2018年10月
14	谷内江 望	東京大学	東京大学、周期的配列の高速検出ソフト ゲノム編集向けDNA・アミノ酸	日刊工業新聞	2018年10月
15	谷内江 望	東京大学	ゲノム編集遺伝子の発見に役立つソフトウェアSPADEを東京大学が開発	日経バイオテクノロジー	2018年10月
16	刑部敬史、刑部祐里子	徳島大学	徳島大と産総研、日本独自のゲノム編集技術2つ	日経バイオテクONLINE	2018年8月
17	刑部敬史、刑部祐里子	徳島大学	特集；農水分野のゲノム編集2018	日経バイオテク2018/08/27号	2018年8月
18	西田敬二	神戸大学	安全性高いゲノム編集技術	日経産業新聞	2018年2月
19	八木祐介	エディットフォース	ゲノム編集関連技術の近年の動向	日本ゲノム編集学会メルマガ第5号	2018年2月
20	西田敬二	神戸大学	ゲノム編集に新たに基礎技術 ミチをひらく	朝日新聞	2017年12月
21	野村 渉	東京医科歯科大	ゲノム編集技術に関する紹介記事	日経産業新聞	2017年12月
22	八木祐介	エディットフォース	日本の未来企業	日刊工業新聞	2017年11月

23	八木祐介	エディット フォース	新バイオ技術始動	読売新聞	2017年8月
24	西田敬二	神戸大学	ゲノム編集 海外開拓	日本経済新聞	2017年7月
25	八木祐介	エディット フォース	九州大学における産学官の取り組み	飛翔	2017年7月
26	中村崇裕	九州大学	ゲノム編集 日本出遅れ	日本経済新聞	2017年4月
27	八木祐介	エディット フォース	九州大学発VB3億円調達	日本経済新聞	2017年4月
28	中村崇裕	九州大学	第4世代ゲノム編集技術	福岡県主催の次世代 バイオ産業創出研究 会	2017年2 月
29	中村崇裕	九州大学	PPRタンパク質を利用したゲノム編 集技術の開発	九州大学主催、第4 回TR推進合同フォー ラム・ライフサイエ ンス技術交流会	2016年10 月

(c) その他

・受賞実績

番号	発表者	所属	タイトル	雑誌名・学会名 ・イベント名等	発表年月
1	中村崇裕	九州大学	科学技術振興機構理事長賞	大学発ベンチャー表彰2019	2019年7月
2	西田 敬二	神戸大学	科学技術への顕著な貢献 2017 (ナイスステップな研 究者)	科学技術・学術政策研究所	2017年11月
3	野村 渉	東京医科歯科大学	奨励賞	日本薬学会関東支部会	2016年09月

・その他

ゲノム編集産業化ネットワークの構築

(<https://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/smg/GEIN/index.html>)

3.2.1.2、3.2.1.3 代謝系遺伝子発現制御技術／栽培・生育環境による発現制御技術

3.2.1.2.1 「ゲノム編集技術および代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発」

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	舛本寛、柴田大輔、大関淳一郎、岡崎孝映、久郷和人、大竹興一郎	特願2018-152008 PCT出願番号 :PCT/JP2019/030783 特願2020-535772 US 17266378	国内・PCT PCT出願移行国 日本 米国	2018年8月10日 2019年8月5日 2021年2月8日 2021年2月8日	出願	「植物組換え遺伝子発現プラットフォームの構築」	舛本寛、柴田大輔、大関淳一郎、岡崎孝映、久郷和人、大竹興一郎

【論文】

(準備中 4 報)

【外部発表】

(a) 学会発表・講演

番号	発表者	所属	タイトル	学会名・イベント名等	発表年月
1	高橋征司、大関淳一郎、久郷和人、岡崎孝映、大竹興一郎、山田和子、Jekson Robertlee、山家史大、花野滋、柴田大輔、舛本寛	東北大学大学院工学研究科・かずさDNA研究所	遺伝子発現ON/OFFスイッチングプラットフォームの開発とイソプレノイド合成経路遺伝子群の発現制御	BioJapan 2020	2020年10月14-16日
2	舛本寛、高橋征司、柴田大輔	かずさDNA研究所・東北大学大学院工学研究科	遺伝子発現ON/OFFスイッチングプラットフォームの開発とイソプレノイド合成経路遺伝子群の発現制御	BioJapan 2020	2020年10月16日
3	舛本寛、高橋征司、大関淳一郎、久郷和人、岡崎孝映	かずさDNA研究所・東北大学大学院工学研究科	染色体工学による植物遺伝子の発現スイッチングとイソプレノイド合成制御	BioJapan 2019	2019年10月9日-11日
4	栗栖尚嗣、角掛陽、茂木大介、菊池洋平、廣森美樹、古谷昌弘、和氣駿之、中山亨、○高橋征司	東北大学大学院工学研究科	セイヨウトウキ由来酵素ファミリーをモデルとしたテルペン合成酵素の多様性と機能進化に関する研究	第29回イソプレノイド研究会例会	2019年10月26日
5	○栗栖尚嗣、角掛陽、茂	東北大学大学院工学研究科	セイヨウトウキ由来テルペン合成	第37回日本植	2019年9

	木大介, 菊池洋平, 廣森美樹, 古谷昌弘, 和氣駿之, 中山亨, 高橋征司	院工学研究科	酵素ファミリーの構造機能に関する研究	物細胞分子生物学会	月8日
6	○角掛陽, 茂木大介, 菊池洋平, 栗栖尚嗣, 廣森美樹, 古谷昌弘, 和氣駿之, 中山亨, 高橋征司	東北大学大学院工学研究科	セイヨウトウキ由来新規モノテルペノイド合成酵素AaTPS2の機能解析	第37回日本植物細胞分子生物学会	2019年9月8日
7	○舛本寛, 高橋征司, 大関淳一郎, 久郷和人, 岡崎孝映, 大竹興一郎, 山田和子, Jekson Robertlee, 山家史大, 花野滋, 柴田大輔	かずさDNA研究所・東北大学大学院工学研究科	クロマチン操作による遺伝子発現ON/OFFスイッチングプラットフォームの開発	第37回日本植物細胞分子生物学会大会・産学連携シンポジウム	2019年9月7日
8	茂木大介, 末永美樹, 菊池洋平, 角掛陽, 童佳麗, 栗栖尚嗣, 青木裕一, 新藤一敏, 古谷昌弘, 下山武文, 和氣駿之, 中山亨, ○高橋征司	東北大学大学院工学研究科	セイヨウトウキ由来テルペン合成酵素ファミリーの網羅的探索と機能解析	第28回イソプレノイド研究会例会	2018年8月29日
9	○山家史大, 大竹興一郎, 田部井仁美, 和氣駿之, 舛本寛, 柴田大輔, 中山亨, 高橋征司	東北大学大学院工学研究科・かずさDNA研究所	イソプレノイド高生産植物の創出にむけた異種生物由来イソペンテニルニリン酸合成経路の移植	第28回イソプレノイド研究会例会	2018年8月29日
10	○角掛陽, 茂木大介, 菊池洋平, 末永美樹, 和氣駿之, 中山亨, 高橋征司	東北大学大学院工学研究科	セイヨウトウキ由来新奇非環式モノテルペノイド合成酵素AaTPS12の機能解析	第36回日本植物細胞分子生物学会年会	2018年8月28日
11	田部井仁美, 山家史大, 大竹興一郎, 和氣駿之, 舛本寛, 柴田大輔, 中山亨, 高橋征司	東北大学大学院工学研究科・かずさDNA研究所	植物におけるイソプレノイド代謝工学系構築に向けた放線菌由来メバロン酸経路酵素群の機能解析	第36回日本植物細胞分子生物学会年会	2018年8月28日
12	大竹興一郎, 山家史大, 田部井仁美, 和氣駿之, 舛本寛, 柴田大輔, 中山亨, ○高橋征司	東北大学大学院工学研究科・かずさDNA研究所	異種生物由来メバロン酸経路の移植による高等植物におけるイソプレノイド高生産プラットフォームの構築	第59回日本植物生理学会年会	2018年3月30日
13	○田部井仁美, 山家史大, 大竹興一郎, 和氣駿之, 舛本寛, 柴田大輔, 中山亨, 高橋征司	東北大学大学院工学研究科・かずさDNA研究所	真核生物で異種発現させた放線菌由来メバロン酸経路の機能解析	日本生物学会 2017年度北日本支部シンポジウム	2017年12月25日

(b) 新聞・雑誌等への掲載

番	発表者	所属	タイトル	雑誌名・学会名・	発表年月
---	-----	----	------	----------	------

号				イベント名等	
1	舩本寛, 柴田 大輔高橋征司	かずさDNA研究所・東北大 学大学院工学研究科	The productive plant switch	Nature focal point	2020年8月5日

(c)その他

・受賞実績

番号	受賞者	所属	受賞名	授与団体	受賞年月
1	高橋征司	東北大学大学院工 学研究科	第1回バイオインダスト リー奨励賞	一般財団法人バイオイン ダストリー協会	2017年10月

3.2.1.2.2 「ゲノム編集技術および代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発」

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内 外 国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	京都大学	特願2018-121203	国内	2018年6月26日	出願	「植物体を用いてハイスループット試験を行うための容器」	藤原崇志、青山卓史、矢崎一史

【論文】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名	ページ番号	発表年月
1	Takanashi K, Nakagawa Y, Aburaya S, Kaminade K, Aoki W, Saida-Munakata Y, Sugiayama A, Ueda M, Yazaki K.	京都大学	Comparative proteomic analysis of <i>Lithospermum erythrorhizon</i> reveals regulation of a variety of metabolic enzymes leading to comprehensive understanding of the shikonin biosynthetic pathway	Plant Cell Physiol	60 (1), 19-28	2019年
2	Saeki, H., Hara, R., Takahashi, H., Iijima, M., Munakata, R., Kenmoku, H., Fuku, K., Sekihara, A., Yasuno, Y., Shinada, T., Ueda, D., Nishi, T., Sato, T., Asakawa, Y., Kurosaki, F., Yazaki, K., Taura F.	京都大学	A novel aromatic farnesyltransferase functions in the biosynthetic pathway of daurichromenic acid	Plant Physiol.	178, 535-551	2018年
3	Kitajima, S., Aoki, W., Shibata, D., Nakajima, D., Sakurai, N., Yazaki, K., Munakata R., Taira, T., Kobayashi, M., Aburaya, S., Hibino S., Yano, H.	京都大学	Comparative multi-omics analysis reveals diverse latex-based defense strategies against pests among latex-producing organs of the fig tree (<i>Ficus carica</i>)	Planta	247 (6): 1423-1438	2018年
4	Ueoka H, Sasaki K, Miyawaki T, Ichino T, Tatsumi K, Suzuki S, Yamamoto H, Sakurai N, Suzuki H, Shibata D, Yazaki K	京都大学	A cytosol-localized GPP synthase from <i>Lithospermum erythrorhizon</i> and its molecular evolution	Plant Physiology	182 (4): 1933-1945	2020年

5	Tatsumi K, Ichino T, Onishi N, Shimomura K, Yazaki K.	京都大学	Highly efficient method of <i>Lithospermum erythrorhizon</i> transformation using domestic <i>Rhizobium rhizogenes</i> strain A13	Plant Biotechnology (Tokyo), Vol. 37 (1): 39-46	Plant Biotechnology (Tokyo), Vol. 37 (1): 39-46	2020年
6	: Munakata R, Takemura T, Tatsumi K, Moriyoshi E, Yanagihara K, Sugiyama A, Suzuki H, Seki H, Muranaka T, Kawano N, Yoshimatsu K, Kawahara N, Yamaura T, Grosjean J, Bourgaud F, Hehn A, Yazaki K.	京都大学	Isolation of <i>Artemisia capillaris</i> membrane-bound di-prenyltransferase for phenylpropanoids and redesign of artemipillin C in yeast	Communications in Biology, Article no. 384	Article no. 384	2019年
7	Munakata R, Kitajima S, Nuttens A, Tatsumi K, Takemura T, Ichino T, Galati G, Vautrin S, Bergès H, Grosjean J, Bourgaud F, Sugiyama A, Hehn A, Yazaki K.	京都大学	Convergent evolution of the UbiA prenyltransferase family underlies the independent acquisition of furanocoumarins in plants	New Phytologist	225 (5): 2166-2182	2020年
8	Kusano H, Li H, Minami H, Kato Y, Tabata H, Yazaki K	京都大学	Evolutionary Developments in Plant Specialized Metabolism, Exemplified by Two Transferase Families	Front. Plant Sci.,	10: 794	2019年 6月
9	Izuishi Y, Isaka N, Li H, Nakanishi K, Kageyama J, Ishikawa K, Shimada T, Masuta C, Yoshikawa N, Kusano H, Yazaki K.	京都大学	Apple latent spherical virus (ALSIV)-induced gene silencing in a medicinal plant, <i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Scientific Reports	10 (1): Article no. 13555	2020年
10	Munakata R, Olry A, Takemura T, Tatsumi K, Ichino T, Villard C, Kageyama J, Kurata T, Nakayasu M, Jacob F, Koeduka T, Yamamoto H, Moriyoshi E, Matsukawa T, Grosjean J, Krieger C, Sugiyama A, Mizutani M, Bourgaud F, Hehn A,	京都大学	Parallel evolution of UbiA superfamily proteins into aromatic O-prenyltransferases in plants	Proceedings of the National Academy of Sciences, USA	118 (17): e2022294118	2020年

Yazaki K					
----------	--	--	--	--	--

【外部発表】

(a) 学会発表・講演

番号	発表者	所属	タイトル	学会名・イベント名等	発表年月
1	矢崎一史	京都大学	ムラサキのシコニン生産誘導系を用いたオミックス解析	日本農芸化学会2017年度大会（シンポジウム講演）	2017年3月19日
2	Ueoka, H., Miyawaki, T., Sasaki, K., Ichino, T., Yamamoto, K., Ohara, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Yazaki, K.	京都大学	Functional analysis of geranyl diphosphate synthase localized in cytosol in <i>Lithospermum erythrorhizon</i>	The 2 nd Asia Research Node Symposium on Humanosphere Science (京都)	2017年7月19日～20日
3	市野琢爾、藤原 崇志、棟方有桂、矢崎一史、青山卓史	京都大学	植物における代謝産物の蓄積機構の制御技術の開発	BioJapan2017 (横浜)	2017年10月11日～13日
4	Ueoka, H., Miyawaki, T., Sasaki, K., Ichino, T., Yamamoto, K., Ohara, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Yazaki, K.	京都大学	Characterization of geranyl diphosphate Synthase (GPPS) in <i>Lithospermum erythrorhizon</i>	JSBBA KANSAI 4 th Student Forum	2017年11月4日
5	巽 奏、岡咲洋三、梶川昌孝、市育代、市野琢爾、斉藤和季、福澤秀哉、矢崎一史	京都大学	ムラサキ培養細胞における脂質の細胞外分泌とシコニンとの関わり	第59回日本植物生理学会 (札幌)	2018年3月28日～30日
6	Ichino, T., Fujiwara, T., Saida-Munakata, Y., Tatsumi, K., Aoyama, T., Yazaki, K.	京都大学	Regulation of metabolite accumulation system in plant cells toward high production of valuable compounds	The 5th AGORA BASF at Kyoto University (京都)	2018年4月4日
7	Yazaki, K., Tatsumi, K., Ichino, T., Matsuoka, H., Sato, F., Sato, M., Tsuyama, T., Toyooka, K.	京都大学	Shikonin production of <i>Lithospermum erythrorhizon</i> , a model system of secondary metabolic lipids in plants	The 23 rd International Symposium on Plant Lipids (Yokohama)	2018年7月8日～13日
8	Ichino, T., Saida-Munakata, Y., Tatsumi, K., Yazaki, K.	京都大学	Molecular basis for secretory trafficking of lipophilic metabolites shikonin derivatives in a medicinal plant <i>Lithospermum erythrorhizon</i>	The 23 rd International Symposium on Plant Lipids (Yokohama)	2018年7月8日～13日
9	Ueoka, H., Sasaki, K.,	京都大	Characterization of cytosol-	The 23 rd	2018年7

	Miyawaki, T., Ichino, T., Yamamoto, K., Ohara, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Yazaki, K.	学	localized geranyl diphosphate synthase in <i>Lithospermum erythrorhizon</i>	International Symposium on Plant Lipids (Yokohama)	月8日～13日
10	Tatsumi, K., Okazaki, Y., Kajikawa, M., Ichino, T., Sato, M., Toyooka, K., Saito, K., Fukuzawa, H., Yazaki, K.	京都大学	Lipid molecules concomitantly secreted with shikonin, a lipophilic secondary metabolite, produced in <i>Lithospermum erythrorhizon</i>	The 23 rd International Symposium on Plant Lipids (Yokohama)	2018年7月8日～13日
11	巽 奏、岡咲洋三、佐藤繭子、豊岡公德、市野琢爾、梶川昌孝、福澤秀哉、斉藤和季、矢崎一史	京都大学	脂溶性二次代謝産物シコニンの分泌系におけるトリアシルグリセロールの役割	第36回日本植物細胞分子生物学会(金沢)	2018年8月26日～28日
12	市野琢爾、棟方(齊田)有桂、巽 奏、矢崎一史	京都大学	ムラサキにおける脂溶性二次代謝産物シコニンの分泌機構の解明に向けて	第36回日本植物細胞分子生物学会(金沢)	2018年8月26日～28日
13	矢崎一史	京都大学	脂溶性物質のアポプラスト集積に関わる生物学的イベント	第36回日本植物細胞分子生物学会(金沢)	2018年8月26日～28日
14	上岡颯人、佐々木佳菜子、宮脇達也、市野琢爾、櫻井望、鈴木秀幸、柴田大輔、矢崎一史	京都大学	薬用植物ムラサキにおける細胞質局在型ゲラニルニリン酸合成酵素の解析	第36回日本植物細胞分子生物学会(金沢)	2018年8月26日～28日
15	矢崎一史	京都大学	植物の特異的スマートセルとその制御戦略	第2回セミナー「関西スマートセルフォーラム2018」(大阪)	2018年11月14日
16	巽 奏、市野琢爾、岡咲洋三、東泰弘、梶川昌孝、佐藤繭子、豊岡公德、福澤秀哉、斉藤和季、矢崎一史	京都大学	シコニン分泌細胞からのTAG分泌とその脂肪酸組成	第31回日本植物脂質シンポジウム(高知)	2018年11月30日～12月1日
17	市野琢爾、巽 奏、津山濯、矢崎一史	京都大学	ムラサキにおいてシコニン生産特異的に発現するLeDI-2の機能解析	第60回日本植物生理学会年会(名古屋)	2019年3月13～15日
18	巽 奏、市野琢爾、棟方有桂、矢崎一史	京都大学	脂溶性二次代謝産物シコニンの細胞外分泌に関する輸送体の探索	第60回日本植物生理学会年会(名古屋)	2019年3月13～15日
19	矢崎一史	京都大学	生合成工学と輸送工学を統合したプレニル化ポリフェノールの生合成リデザイン	科研費新学術領域「生合成リデザイン」第6回公開シンポジウム	2019年7月5日
20	矢崎一史	京都大	植物の脂溶性テルペン化合物の細	理研シンポジウム「天	2019年7

		学	胞外分泌	然ゴムから考えるバイオマテリアルエンジニアリングのこれから」(鶴見)	月19日
21	<u>上岡颯人</u>	京都大学	薬用植物ムラサキ由来ゲラニルニリン酸合成酵素の分子進化	新学術領域研究「生合成リデザイン」第3回若手シンポジウム(千葉県長柄町)	2019年8月31日～9月1日
22	<u>上岡颯人</u> , 佐々木佳菜子, 宮脇達也, 市野琢爾, 巽奏, 鈴木史朗, 山本浩文, 櫻井望, 鈴木秀幸, 柴田大輔, 矢崎一史	京都大学	細胞質局在型の新奇ゲラニルニリン酸合成酵素の分子進化	第37回日本植物細胞分子生物学会(京都)	2019年9月7日～8日
23	<u>Hao Li</u> , 巽奏, 市野琢爾, 中安大, 草野博彰, 下村講一郎, 矢崎一史	京都大学	ムラサキ科植物の <i>in silico</i> 解析によるシコニン関連遺伝子の絞り込みとゲノム編集	第37回日本植物細胞分子生物学会(京都)	2019年9月7日～8日
24	<u>出石佑樹</u> , 草野博彰, 井坂夏海, 増田税 海道真典, 石川一也, 矢崎一史	京都大学	Virus-induced gene silencing of phytoene desaturase in <i>Lithospermum erythrorhizon</i> plant	第37回日本植物細胞分子生物学会(京都)	2019年9月7日～8日
25	<u>矢崎一史</u>	京都大学	物質集積メカニズムの制御による高次物質生産技術ー植物における代謝産物の蓄積機構の制御技術の開発ー	BioJapan 2019 NEDOセミナー(横浜)	2019年10月11日
26	<u>上岡颯人</u> , 佐々木佳菜子, 宮脇達也, 市野琢爾, 巽奏, 鈴木史朗, 山本浩文, 櫻井望, 鈴木秀幸, 柴田大輔, 矢崎一史	京都大学	メロテルペノイド生合成に寄与する細胞質型ゲラニルニリン酸合成酵素の解析	第29回イソプレノイド研究会(那覇)	2019年10月26日
27	<u>中西浩平</u> , 李 豪, 刑部敬史, 矢崎一史	京都大学	シコニン生合成を調節するHMGRとプレニルアクセプタを供給する4CLの解明	第29回イソプレノイド研究会(那覇)	2019年10月26日
28	<u>巽奏</u> , 市野琢爾, 岡咲洋三, 東泰弘, 梶川昌孝, 佐藤繭子, 豊岡公徳, 福澤秀哉, 斉藤和季, 矢崎一史	京都大学	植物の脂溶性二次代謝産物シコニンはトリアシルグリセロールにより区画化され細胞外に分泌する	第42回日本分子生物学会年会(福岡)	2019年12月3日～6日
29	<u>巽奏</u> , 市野琢爾, 東泰弘, 井坂夏海, 上撫健太, 梶川昌孝, 福澤秀哉, 豊岡公徳, 佐藤繭子, 市育代, 斉藤和季, 矢崎一史	京都大学	脂溶性二次代謝産物シコニンの細胞外蓄積に關与する分泌脂質分子の解析	第61回日本植物生理学会年会(吹田)	2020年3月19日～21日

30	中西浩平、李 豪、刑部敬史、渡辺文太、矢崎一史	京都大学	ムラサキのシコニン生合成に関わる4CLの機能解明	第61回日本植物生理学会年会（吹田）	2020年3月19日～21日
31	藤原崇志、矢崎一史、青山卓史	京都大学	トマト (<i>Solanum lycopersicum</i>) の TRYPTICHON ホモログの機能解析	第61回日本植物生理学会年会（吹田）	2020年3月19～21日
32	市野琢爾、藤原 崇志、棟方有桂、矢崎一史、青山卓史	京都大学	植物における代謝産物の蓄積機構の制御技術の開発	BioJapan2020（横浜）	2020年10月15日～10月16日

(b)新聞・雑誌等への掲載

番号	発表者	所属	タイトル	雑誌名・学会名・イベント名等	発表年月
1			「スマートセルインダストリー」 特集 1 植物の潜在能力を引き出す（代謝系遺伝子の発現制御技術）	focusNEDO No. 70	2018年

番号	発表機関	タイトル	発表年月日
1	NEDO	「スマートセルインダストリー」 特集 1 植物の潜在能力を引き出す（代謝系遺伝子の発現制御技術）	2018年10月
2	京都大学	アルテピリンC合成酵素の発見とその生産ー雑草の遺伝子から生理活性物質の生産へー	2019年10月25日
3	財経新聞	京大ら、雑草からアルテピリンC活性酵素を発見 高品質プロボリスの国産化に期待	2019年10月27日

(c)その他

・受賞実績

番号	受賞者	所属	受賞名	授与団体	受賞年月
1	矢崎一史	京都大学	日本植物細胞分子生物学会学術賞	第34回日本植物細胞分子生物学会	2016年9月2日
2	巽 奏、市野琢爾、岡咲洋三、東泰弘、梶川昌孝、佐藤繭子、豊岡公德、福澤秀哉、斉藤和季、矢崎一史	京都大学	最優秀ポスター賞	第31回日本植物脂質シンポジウム	2018年11月30日

3.2.1.2.2 「ゲノム編集技術および代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発」

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	産業技術総合研究所、北海道大学	特願 2018-139316	国内	2018/07/25	国内優先権みなし取り下げ	植物における標的DNAのメチル化を抑制する方法	増田税、犬飼剛、松永航、磯田玲華、松村健、厚見剛
2	産業技術総合研究所、北海道大学	特願 2019-237374	国内	2019/12/26	出願	植物における標的DNAのメチル化を抑制する方法	松村健、厚見剛、増田税、犬飼剛、松永航、磯田玲華
3	産業技術総合研究所、北海道大学	特許出願 2020-532485 PCT/JP2019/029318	国内 外国PCT	2019/07/25	国内：特許 6915820 (2021/07/19) 外国PCT：公開	植物における標的DNAのメチル化を抑制する方法	増田税、犬飼剛、松永航、磯田玲華、松村健、厚見剛
4	産業技術総合研究所、北海道大学	PCT/JP2020/048997	外国PCT	2020/12/25	公開	植物における標的DNAのメチル化を抑制する方法	厚見剛、松村健、増田税、犬飼剛、松永航、磯田玲華
5	奈良先端科学技術大学院大学	特願2018-077249	国内	2018年4月13日	審査中	単子葉植物において組み換えタンパク質の高発現を可能にする5' UTRをコードするDNA分子	加藤晃
6	奈良先端科学技術大学院大学	PCT/JP2019/015506	PCT、外国（米国、カナダ、欧州）	2018年4月13日	審査中	単子葉植物において組み換えタンパク質の高発現を可能にする5' UTRをコードするDNA分子	加藤晃
7	奈良先端科学技術大学院大学	特願2021-058895	国内	2021年3月30日	審査中	植物へ導入する遺伝子の人工配列の設計システム	加藤晃, 山崎将太郎
8	横浜国立大学	特願2017-39903 特許第 6823787号	国内	2017年3月2日	令和3年1月14日登録	阻害剤、阻害方法、光識別方法、物質の検出方法、レポーターアッセイ方法及びキット	平塚和之、小倉里江子、伊藤早紀

9	横浜国立大学	特許第 6579539号	国内		令和1年 9月6日登 録	光識別方法、物質の検 出方法、レポーターア ッセイ方法、キット、 ルシフェリン-ルシフ ェラーゼ反応阻害剤、 その他別紙記載	平塚和之、小 倉里江子、大 澤友紀子、伊 藤早紀
10	横浜国立大学	特許第 6652763号	国内		令和2年 1月28 日登録	害虫防除剤、害虫の防 除方法、形質転換効率 促進剤、及び形質転換 効率促進方法	平塚和之、小 倉里江子、石 川晴登
11	横浜国立大学	特許第 6670499号	国内		令和2年 3月4日 登録	植物抵抗性誘導制御 剤、植物抵抗性誘導制 御方法、及び植物病害 の防除方法	平塚和之、小 倉里江子、柴 田詩織
12	横浜国立大学	特願2021- 046236	国内	2021年3月 19日	審査中	植物抵抗性の誘導方 法、植物抵抗性誘導剤 及びバイオスティミュ ラント	平塚和之、小 倉里江子

【論文】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名	ページ番号	発表年月
1	厚見剛、松尾幸 毅、福澤徳穂、 松村健	産業技術総合研 究所	Virus-Mediated Targeted DNA Methylation Illuminates the Dynamics of Methylation in an Endogenous Plant Gene	<i>Int. J. Mol. Sci.</i>	22, 4125	2021年4月
2	Wataru Matsunaga ¹ , Hanako Shimura ¹ , Senri Shirakawa ¹ , Reika Isoda ¹ , Tsuyoshi Inukai ¹ , Takeshi Matsumura ² , Chikara Masuta ¹	北海道大学、産 業技術総合研究 所	Transcriptional silencing of 35S driven-transgene is differentially determined depending on promoter methylation heterogeneity at specific cytosines in both plus- and minus-sense strands	<i>BMC Plant Biol.</i>	19: 24	2019年1月
3	山崎将太郎, 真田 裕司, 今瀬諒司, 松浦秀幸, 上野大 心, 出村拓, 加藤	奈良先端大	<i>Arabidopsis thaliana</i> cold- regulated 47 gene 5- untranslated region enables stable high-level expression of	<i>J. Biosci. Bioeng.</i>	125 (1), 124-130	2018年1月

	晃		transgenes			
4	加藤晃, 山崎将太郎	奈良先端大	植物でのタンパク質の高効率翻訳を可能にする数理モデル	バイオサイエンスとインダストリー	75 (3), 240-241	2018年5月
5	上野大心, 山崎将太郎, 出村拓, 加藤晃	奈良先端大	Comprehensive analysis of mRNA internal cleavage sites in <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>J. Biosci. Bioeng.</i>	125 (6), 723-728	2018年6月
6	山崎将太郎, 鈴木淳展, 山野泰彰, 川邊陽文, 上野大心, 出村拓, 加藤晃	奈良先端大	Identification of 5' - untranslated regions that function as effective translational enhancers in monocotyledonous plant cells using a novel method of genome-wide analysis	<i>Plant Biotechnol.</i>	35 (4), 365-373	2018年12月
7	上野大心, 向田堯史, 山崎将太郎, 三上真希, 出村拓, 松井健史, 澤田和敏, 勝元幸久, 興津奈央子, 加藤晃	奈良先端大	Different plant species have common sequence features related to mRNA degradation intermediates	<i>Plant Cell Physiol.</i>	61 (1), 53-63	2020年1月
8	山崎将太郎, 加藤晃	奈良先端大	網羅的翻訳状態解析に基づく外来遺伝子高発現システム	生物工学会誌	98 (11), 611-613	2020年11月
9	上野大心, 三上真希, 山崎将太郎, 金子美穂, 向田堯史, 出村拓, 加藤晃	奈良先端大	Changes in mRNA degradation efficiencies under varying conditions are regulated by multiple determinants in <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Plant Cell Physiol.</i>	62 (1), 143-155	2021年1月
10	上野大心, 川邊陽文, 山崎将太郎, 出村拓, 加藤晃	奈良先端大	Feature selection for RNA cleavage efficiency at specific sites using the LASSO regression model in <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>BMC Bioinformatics</i>	印刷中	2021年7月
11	Hagiwara H, Ogura R, Fukumoto T, Ohara T, Tsuda M, Hiratsuka K	三井化学アグロ、横浜国立大学	Novel bacterial control agent t olprocarb enhancing systemic acquired resistance in Arabidopsis and rice as a second mode of action.	<i>J. Gen. Plant Pathol.</i>	86, 39-47	2020年1月
12	Hiratsuka K	横浜国立大学	Studies on regulated expression of plant defense genes.	<i>J. Gen. Plant</i>	86, 531-533	2020年10月

				<i>Pathol.</i>		
13	Ki-Ho Son	千葉大学	Growth characteristics and phytochemicals of canola (<i>Brassica napus</i>) grown under UV radiation and low root zone temperature in a controlled environment	Horticulture, Environment, and Biotechnology (HEAB), Springer	61, 267-277. https://doi.org/10.1007/s13580-019-00219-4	2020年3月
14	Saito, Kota	千葉大学	Evaluation of the Light Environment of a Plant Factory with Artificial Light by Using an Optical Simulation.	Agronomy10, 1663. https://doi.org/10.3390/agronomy10111663	10, 1663. https://doi.org/10.3390/agronomy10111663	2020年9月
15	Eiji Goto	千葉大学	Enhancement of gene expression related to phytochemical accumulation in plant leaves via exposure to environmental stresses in a plant factory.	Acta Horticulturae	1296, 265-272 DOI: 10.17660/ActaHortic.2020.1296.34	2020年10月
16	Eiji Goto	千葉大学	Transcriptome analysis of secondary metabolite pathways of <i>Brassica napus</i> L. on exposure to ultraviolet light and ozone in a plant factory with artificial light.	Acta Horticulturae	Accepted	2021年6月

【外部発表】

(a) 学会発表・講演

(b) 新聞・雑誌等への掲載

(c) その他

3.2.2 研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」【助成】

3.2.2.1 高機能組換え植物組織培養によるビタミンD3 高効率生産技術の開発

【特許】

番号	出願人	出願番号	国内外国PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	神戸天然物化学(株) 神戸大学	特願 2018- 32173	PCT/JP201 9/005088	2018年 2月26 日	国内移 行	形質転換植 物、およびそ の利用	水谷正治(神戸大学) 鈴木宗典(神戸天然物化学 (株))
2	大阪府立大学 キリンホールデ ィングス(株) (株)竹中工務店	特願 2019- 066955	PCT/JP202 0/014455	2019年 3月29 日	出願	油脂を蓄積す る植物体及び 植物体に油脂 を蓄積させる 方法	太田大策、岡澤敦司(大 阪府立大学) 大西昇(キリンホールディ ングス(株))
3	(株)竹中工務店 キリンホールデ ィングス(株)	特願 2019- 192292		2019年 10月 21日	出願	植物培養装置	川島哲文、水谷敦司、小 島倫直((株)竹中工務店) 大川博志、大西昇、間宮 幹士(キリンホールディン グス(株))
4	(株)竹中工務店	特願 2020- 157481		2020年 9月18 日	出願	光照射装置	小島倫直、川島哲文、水 谷敦司((株)竹中工務店)
5	学校法人東日本 学園北海道医療 大学他				出願準 備中	ルリヤナギ形 質転換植物体 作成方法	高上馬希重(学校法人東 日本学園北海道医療大学) 他
6	学校法人東日本 学園北海道医療 大学 大阪大学他				出願準 備中	ルリヤナギ属 植物によるビ タミンD3製 造方法	高上馬希重(学校法人東 日本学園北海道医療大学、 關光、村中俊哉(大阪大 学)他

【論文】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番 号	発表 年月日
1	高上馬希重 他	北海道医 療大学 他	Transgenic plant regeneration through Agrobacterium-mediated transformation of Solanum glaucophyllum	Plant Biotechnology(予 定)	投稿準備中
2	太田大策他	大阪府立 大学他	Flux control in starch synthesis by CRISPR-Cas9 genome editing induced lipid droplet formation	Frontiers plant science	投稿準備中

			in tomato		
3	澤井学他	大阪大学 他	Characterization of sterol side chain reductase 2 in <i>Asparagus officinalis</i>	Frontiers plant science	投稿準備中

【外部発表】＜学会発表・講演＞

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	柳橋邦生	竹中工務店	バイオ分野における建設業のチャレンジー骨粗鬆症予防薬の原料を植物で作るー	NEDO スマートセルインダストリープロジェクトキックオフシンポジウム	2016年11月14日
2	川島哲文	竹中工務店	高機能品生産植物の開発をはじめとしたバイオ医薬品への取り組み	バイオインダストリー協会研究会“スマートセルインダストリーとバイオエンジニアリング”	2018年1月19日
3	水谷敦司	竹中工務店	スマートセル技術の応用事例 ～植物組織培養による活性型ビタミンD3高効率生産の研究～	関西スマートセルフオーラム2018	2018年11月9日
4	中川真太郎 ¹ 、秋山遼太 ¹ 、刑部敬史 ² 、刑部由里子 ² 、鈴木宗典 ³ 、杉本幸裕 ¹ 、水谷正治 ¹	¹ 神戸大院農、 ² 徳島大・生物資源産業学 部、 ³ 神戸天然物化学	ステロール7位還元酵素の遺伝子破壊によるビタミンD3高生産トマト毛状根の作出	第37回日本植物細胞分子生物学会（京都）大会、日本植物細胞分子生物学会	2019年9月8日
5	小島倫直	竹中工務店、キリンホールディングス、神戸天然物化学	植物の代謝多段改変と高効率培養によるビタミンD3生産システムの開発	BioJapan2020	2020年10月16日

【外部発表】＜新聞・雑誌、プレスリリース＞

番号	タイトル	媒体名	発表年月日
1	骨粗しょう症等に効果的な活性型ビタミン	日刊工業新聞	2016年9月

2	D3 の効率的な生産技術の開発に着手	建設産業新聞	30 日
3		建設工業新聞	

【外部発表】 <展示会出展>

番号	所属	タイトル	展示会	発表年月日
1	(株)竹中工務店、キリンホールディングス(株)、神戸天然物化学(株)	植物の代謝多段改変と高効率培養による活性型ビタミン D3 生産システムの開発 (パネル展示)	BioJapan2017	2017 年 10 月
2	(株)竹中工務店、キリンホールディングス(株)、神戸天然物化学(株)	袋型培養槽による植物生産システム (模型展示)	BioJapan2020	2020 年 10 月

【外部発表】 <プレスリリース>

番号	発表機関	タイトル	発表年月日
1	(株)竹中工務店、キリンホールディングス(株)、神戸天然物化学(株)、大阪大学、大阪府立大学、神戸大学、北海道医療大学	骨粗しょう症等に効果的な活性型ビタミン D3 の効率的な生産技術の開発に着手	2016 年 9 月 29 日

3.2.2.2 医薬品中間体原料植物の代謝変換によるアルカロイド製造技術の開発

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内外 国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	味の素 (株)	特願 2018- 73800	国内	2018 年 4 月 6 日	優先擬制 取下げ	アルカロイドの 製造方法	木坂広明/三輪哲 也/ 平野博人
2	味の素 (株)	特願 2018- 168132 (特開 2020- 039277)	国内	2018 年 9 月 7 日	審査請求 中	キョウチクトウ 科ニチニチソウ 属の形質転換植 物体	木坂広明/三輪哲 也
3	味の素 (株)	PCT/JP2019- 015184 (W02019/19430 9A)	PCT	2019 年 5 月 4 日	指定国移 行済	アルカロイドの 製造方法	Hiroaki Kisaka/ Tetuya Miwa/ Hiroto Hirano
4	味の素 (株)	US 17/062, 155 (US 2021- 0024944 A)	外国	2020 年 10 月 2 日	公開・審 査中	METHOD OF PRODUCING ALKALOID	Hiroaki Kisaka/ Tetuya Miwa/ Hiroto Hirano

【外部発表】 <展示会への出展>

番号	発表者	タイトル	展示会名	発表年月日
1	味の素 (株)	医薬品中間体原料植物の代謝変換によるアルカ ロイド製造技術の開発	BioJapan2019	2019 年 10 月
2	味の素 (株)	医薬品中間体原料植物の代謝変換によるアルカ ロイド製造技術の開発	BioJapan2020	2020 年 10 月

3.2.2.3 組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内外 国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	ホクサン (株)	特願 2020-500576 (PCT/JP2019/00512 の再公表)	国内	平成 31 年 2 月 15 日 (国 際出願日)	審査 中	無菌化シス トセンチュ ウを得る方 法	林琴美、 宮代裕子、鰐淵恭 子、小野貞子、田林 紀子

【論文】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ペ ージ番号	発表年月日
1	厚見 剛 1 加賀谷 羽衣子 2 田林 紀子 2 松村 健 1	1) 産業技術総 合研究所 生物 プロセス研究部 門 2) ホクサン (株)	Analysis of the mechanisms regulating the expression of isoprenoid biosynthetic genes in hydroponically-grown <i>Nicotiana benthamiana</i> plants using virus-induced gene silencing	Scientific Reports (Springer Nature)	オンライン掲 載日：2018 年 10 月 4 日

【外部発表】 <学会発表・講演>

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	林 琴美 宮代 裕子 鰐淵 恭子 小野 貞子 田林 紀子	ホクサン(株)	ジャガイモシストセンチュウの in vitro 増殖系の確立	平成 30 年度日 本植物病理学会 大会	2018 年 3 月 25 日-27 日
2	厚見 剛 1 一町田 紀子 2 加賀谷羽衣子 2 長谷田 茜 2 林 琴美 2 古田 和義 2 田林 紀子 2 松村 健 1	1)産業技術総合研 究所 生物プロセ ス研究部門 2)ホクサン(株)	Development of the VIGS system towards enhancing the production level of hatching factors for potato cyst nematode using <i>Nicotiana</i> <i>benthamiana</i>	11th International Congress of Plant Pathology	2018 年 7 月 29 日-8 月 3 日

【外部発表】＜新聞・雑誌など＞

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	一町田紀子、古田和義、田林紀子	ホクサン(株)	ジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の大量生産系の確立に向けて	バイオサイエンスとインダストリー(B&I)	2021年3月号

【外部発表】＜その他＞

番号	発表者・所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	ホクサン(株)	組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	BioJapan2017	2017年10月
2	ホクサン(株)	組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	BioJapan2018	2018年10月
3	ホクサン(株)	組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	BioJapan2019	2019年10月
4	ホクサン(株)	組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	BioJapan2020	2020年10月

3.2.2.4 イチイ細胞培養技術を用いたタキサン系医薬中間体 10-DAB の効率生産法開発

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内外 国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	北海道三井 化学	特願 2019- 53639	国内	2019 年 3 月 20 日	-	イチイ由来のプロ モータ及びその用 途	矢崎一史、草野博 彰、南洋、 多葉田誉
2	北海道三井 化学、京都 大学	2020P00428W0	PCT	2020 年 8 月 24 日	-	イチイ属の毛状根 の製造方法	矢崎一史、草野博 彰、南洋、 多葉田誉

【論文】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	発表年月日
1	Hiroaki Kusano	京都大学生存圏研究所 (Laboratory of Plant Gene Expression, Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University,)	Evolutionary developments in plant specialized metabolism, exemplified by two transferase families	Frontiers in Plant Science doi: 10.3389/fpls.2021.62 0245	2019 年 6 月 25 日

【外部発表】 <学会発表・講演>

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	多葉田誉	北海道三井化学	形質転換利用に向けたイ チイ培養細胞株の評価	日本薬学会第 138 年 会	2018 年 3 月 27 日
2	草野博彰	京都大学生存圏研究 所	イチイ培養細胞における タキサン化合物生合成の 解析	第 59 回日本植物生 理学会年会	2018 年 3 月 28- 30 日
3	南洋	北海道三井化学	Evaluation for transformation of yew- cultured cell line	The 23rd International Symposium on Plant Lipids ISPL2018	2018 年 7 月 8- 13 日
4	草野博彰	京都大学生存圏研究 所	A Study for Taxoid Biosynthesis in Yew Suspension Cultured Cells	The 23rd International Symposium on Plant Lipids ISPL2018	2018 年 7 月 8- 13 日
5	加藤嘉博	北海道三井化学	シングルユース袋型バイ オリアクターによる植物	第 36 回日本植物細 胞分子生物学会大会	2018 年 8 月 27 日

			細胞培養		
6	草野博彰	京都大学生存圏研究所	イチイのタキサン化合物輸送体の解析	第60回日本植物生理学会年会	2019年3月13-15日
7	多葉田誉	北海道三井化学	イチイ培養細胞由来高発現プロモータ	日本薬学会大139年会	2019年3月20-23日
8	多葉田誉	北海道三井化学	植物細胞培養技術を応用した機能性原料開発	日本食品科学工学会第66回大会	2019年8月29日
9	南洋	北海道三井化学	アグロバクテリウムリゾゲネスを用いたイチイの効率的な形質転換法の開発	第37回日本植物細胞分子生物学会(京都)大会	2019年9月7-8日
10	草野博彰	京都大学生存圏研究所	メタボローム解析によるタキサン化合物輸送体の解析	第37回日本植物細胞分子生物学会(京都)大会	2019年9月7-8日
11	草野博彰	京都大学生存圏研究所	イチイ培養細胞が産生するタキサン化合物の網羅的解析と膜輸送体の機能解析	第29回イソプレノイド研究会例会	2019年10月26日
12	多葉田誉	北海道三井化学	イチイ細胞培養により生産されるタキサン化合物の時空間的解析	日本薬学会第140年会	2020年3月25-28日
13	草野博彰	京都大学生存圏研究所	メタボローム解析を利用したタキサン化合物トランスポーターの機能解析	第61回日本植物生理学会大阪年会	2020年3月19-21日
14	多葉田誉	北海道三井化学	産業応用から見た植物細胞培養技術によるファイトケミカル生産	生物工学 web シンポジウム 2020 シンポジウム WS3 植物によるバイオ生産フロンティア	2020年9月2日
15	草野博彰	京都大学生存圏研究所	メタボローム解析を利用したタキサン化合物トランスポーターの機能解析	第62回日本植物生理学会年会(オンライン開催)	2021年3月14-16日

【外部発表】<新聞・雑誌などへの掲載>

番号	所属・発表者	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	北海道三井化学	植物培養で抗がん剤原料	化学工業日報	2017年10月13日
2	北海道三井化学 多葉田誉	イチイ”スマートセル”細胞培養によるタキサン化合物生産	アグリバイオ	2018年9月22日
3	北海道三井化学 多葉田誉	イチイ”スマートセル”細胞培養によるタキサン化合物生産	アグリバイオ	2019年4月20日

4	北海道三井化学	抗がん剤中間体に進出 10-DAB 効率生産	石油化学新聞	2019年11月4日
5	北海道三井化学	抗がん剤中間体 植物細胞培養で生産 効率化技術確立急ぐ	石油化学新聞	2020年10月26日
6	北海道三井化学	安価に植物細胞培養 使い捨てバッグ開発	化学工業日報	2021年2月19日
7	北海道三井化学	北海道三井化学、植物細胞培養用の使い切りバッグを開発	石油化学新聞	2021年2月19日
8	北海道三井化学	植物細胞、低コスト培養 北海道三井化学が新技術	日刊工業新聞	2021年2月24日

【外部発表】 <展示会への出展>

番号	所属・発表者	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	北海道三井化学 多葉田 誉	スマートセルを用いた医薬中間体 10-DAB の効率生産法開発	BioJapan2019	2019年10月
2	北海道三井化学 多葉田 誉	スマートセルを用いた医薬中間体 10-DAB の効率生産法開発	BioJapan2020	2020年10月

【外部発表】 <ニュースリリース>

番号	所属・発表者	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	北海道三井化学 新エネルギー・産業技術総合開発機構	植物細胞の低コスト培養を可能にするシングルユースバッグを開発 —多様な植物由来機能性物質の高効率生産を実現へ—	https://www.nedo.go.jp/news/press/AA5_101407.html https://jp.mitsuichemicals.com/jp/release/2021/2021_0218_02.htm	2021年2月18日

【受賞実績】

番号	受賞者・所属	タイトル	名称	発表年月日
1	草野博彰・京都大学生存圏研究所	イチイ培養細胞が産生するタキサン化合物の網羅的解析と膜輸送体の機能解析	第29回イソプレノイド研究会 発表奨励賞	2019年10月26日

3.2.2.5 シン代謝系制御技術による健康機能性成分の高効率増産技術開発

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内外 国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	(株)アミノ アップ、 産業技術総 合研究所	特願 2018- 002334 (特開 2019- 118331)	国内	平成 30 年 1 月 11 日	審査請求済 (2021/1/8)	植物の栽培方法 及び植物におけ るロスマリン酸 含有量を増加さ せる方法	田坂恭 嗣、松村 健、阿部 圭馬、後 藤一法

【外部発表】 <学会発表・講演>

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、 媒体 名	発表 年月 日
1	田坂恭嗣 ¹ 、阿 部圭馬 ² 、後藤 一法 ² 、松村健 一 ¹	¹ 産業技術総合研究 所、 ² (株)アミノアッ プ化学	薬剤添加によりシンのロス マリン酸を増加させる水耕 栽培方法の開発	園芸学会平成 30 年度春季大会	2018 年 3 月 25 日
2	南谷健司 ¹ 、阿 部圭馬 ² 、後藤 一法 ² 、田坂恭 嗣 ³ 、松村健 ³	¹ (公財)北海道科学 技術総合振興センタ ー、 ² (株)アミノアッ プ化学、 ³ 産業技術総 合研究所	密植条件下における光環境 がエゴマの生育および機能 性成分に及ぼす影響	園芸学会平成 30 年度春季大会	2018 年 3 月 25 日
3	南谷健司 ¹ 、小 川瑛利子 ² 、阿 部圭馬 ² 、後藤 一法 ² 、田坂恭 嗣 ³ 、松村健 ³	¹ (公財)北海道科学 技術総合振興センタ ー、 ² (株)アミノアッ プ、 ³ 産業技術総合研 究所	水耕栽培における純水置換 がエゴマの生育および機能 性成分に及ぼす影響	園芸学会平成 31 年度春季大会	2019 年 3 月 24 日
4	小川瑛利子 ¹ 、 高橋麻起子 ¹ 、 阿部圭馬 ¹ 、後 藤一法 ¹ 、南谷 健司 ²	¹ (株)アミノアップ、 ² (公財)北海道科学技 術総合振興センター	エゴマにおける機能性成分 の高効率生産技術およびそ れら関連代謝物の一斉分析 法の開発	園芸学会平成 31 年度春季大会	2019 年 3 月 24 日
5	小川瑛利子	(株)アミノアップ	シン機能性成分の高含有化 を目指した技術開発につい て	令和元年グリー ンテクノバンク 北方系機能性植 物研究会 北の機 能性作物活用シ	2019 年 10 月 29 日

				ンポジウム	
6	南谷健司 ¹ 、小川瑛利子 ² 、阿部圭馬 ² 、後藤一法 ² 、田坂恭嗣 ³	¹ (公財)北海道科学技術総合振興センター、 ² (株)アミノアップ、 ³ 国立研究開発法人産業技術	水耕栽培における純水置換がエゴマおよびアカジソの二次代謝産物に及ぼす影響	園芸学会令和2年度春季大会	2020年3月21日
7	後藤一法	¹ (株)アミノアップ	シソ機能性成分の高生産化技術開発 ～遺伝子操作技術とストレス栽培技術～	BioJapan 2020	2020年10月16日

【外部発表】＜新聞・雑誌等＞

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	(株)アミノアップ	(株)アミノアップ	世界に挑むバイオ企業	Biz com 北海道 SP (北海道テレビテレビ放送)	2020年11月22日
2	高橋麻起子	(株)アミノアップ	シソ健康機能性成分の高効率生産技術開発	バイオサイエンスとインダストリー Vol. 79 No. 2, 156～157	2021年3月10日

【外部発表】＜展示会＞

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	後藤一法 ¹ 、高野翔 ¹ (説明員)	¹ (株)アミノアップ、産業技術総合研究所、(公財)北海道科学技術総合振興センター	NEDO ブース パネル出展 遺伝子操作とストレス栽培技術の融合によるシソ健康機能性成分の高効率生産	BioJapan 2018	2018年10月13～15日
2	後藤一法 ¹ (説明員)	¹ (株)アミノアップ、産業技術総合研究所、(公財)北海道科学技術総合振興センター、徳島大学、北海道大学	NEDO ブース パネル出展 シソの健康機能性成分を高含有化する技術開発 ～古来より利用されてきたシソを用いて～	BioJapan 2020	2020年10月14～16日

【外部発表】＜その他＞

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	高野翔 ¹ 、後藤	¹ (株)アミノアップ	シソ CYP98A6 遺伝子 mRNA 配列	DDBJ	2017年11月

	一法 ¹ 、田坂恭嗣 ²	化学、 ² 産業技術総合研究所	のデータベースへの登録 http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/getentry/na/LC333457?filetype=html		7日
--	------------------------------------	----------------------------	--	--	----

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」【委託】

【特許】

<2017 年度>

1. 出願番号：特願 2018-025394、名称：組換え宿主細胞及びD-ブタントリオールの新規製造方法、出願人：神戸大学
2. 出願番号：特願 2018-034748、名称：油脂高蓄積株、油脂高蓄積株を製造する方法、油脂高蓄積株を用いて油脂を製造する方法、及び、油脂高蓄積株の抽出物、出願人：新潟薬科大学、不二製油グループ本社(株)

<2018 年度>

3. 出願番号：特願 2018-88424、名称：コリネ型細菌の形質転換体およびそれを用いる有用化合物の製造方法、出願人：地球環境産業技術研究機構
 4. 出願番号：特願 2018-93024、名称：二本鎖 DNA 合成方法、出願人：神戸大学
 5. 出願番号：特願 2018-103382、名称：新規プロモーター、および同プロモーターを用いたタンパク質の製造方法、出願人：旭化成ファーマ(株)、産業技術総合研究所
 6. 出願番号：特願 2018-134169、名称：サンプリング装置、出願人：神戸大学、島津製作所
 7. 出願番号：特願 2018-134171、名称：キャップ着脱装置、並びに、これを備えたサンプリング装置及び前処理装置、出願人：神戸大学、島津製作所
 8. 出願番号：特願 2018-134174、名称：攪拌装置及び前処理装置、出願人：神戸大学、島津製作所
 9. 出願番号：特願 2018-134177、名称：攪拌装置及び前処理装置、出願人：神戸大学、島津製作所
 10. 出願番号：特願 2018-134179、名称：固液界面検出装置及びこれを備えた前処理装置、出願人：神戸大学、島津製作所
 11. 出願番号：特願 2018-156232、発明の名称：・12 脂肪酸デサチュラーゼ、出願人：産業技術総合研究所、不二製油グループ本社(株)
 12. 出願番号：特願 2018-203904、名称：ベンジルイソキノリンアルカロイド (BIA) 産生用の組換え宿主細胞及びベンジルイソキノリンアルカロイド (BIA) の新規製造方法、出願人：神戸大学
 13. 出願日：平成 30 年 11 月 2 日、出願番号：特願 2018-207620、名称：分析方法、吸着防止剤および分析用キット、出願人：神戸大学、島津製作所
 14. Application Number: US16/185106, Title: Method for synthesizing double-stranded DNA, Applicant: Kobe university.
 15. 国際出願番号：PCT/JP2019/005902、コリネ型細菌の形質転換体およびそれを用いる有用化合物の製造方法、出願人：地球環境産業技術研究機構
 16. 出願番号：特願 2019-023520、名称：ドーパミン産生大腸菌及びドーパミンの製造方法、出願人：産業技術総合研究所
 17. 出願番号：特願 2019- 38244、名称：新規カロテノイド及び該カロテノイドの製造方法、出願人：石川県立大学
- #### <2019 年度>
18. 出願番号：特願 2019-012268、名称：細胞を単離又は同定する方法及び細胞集団、出願人：東京大学、Spiber
 19. 出願番号：特願 2019-069798、名称：キメラプラスミドライブラリーの構築方法、出願人：神戸大学
 20. PCT/JP2019/027323、名称：サンプリング装置、出願人：神戸大学、島津製作所
 21. PCT/JP2019/027324、名称：キャップ着脱装置、並びに、これを備えたサンプリング装置及び前処理装置、出願人：神戸大学、島津製作所

22. PCT/JP2019/027325、名称：攪拌装置及び前処理装置、出願人：神戸大学、島津製作所
23. PCT/JP2019/027326、名称：攪拌装置及び前処理装置、出願人：神戸大学、島津製作所
24. PCT/JP2019/027327、名称：固液界面検出装置及びこれを備えた前処理装置、出願人：神戸大学、島津製作所
25. 出願番号：特願 2019-132559、名称：情報解析システム、方法、およびプログラム、出願人：産業技術総合研究所、理化学研究所、京都大学
26. 出願番号：特願 2019-210138、名称：情報処理システムおよび検索方法、出願人：日立製作所
27. 出願番号：特願 2020-10032、名称：組換え宿主細胞及びそれを用いた有用物質の製造方法、出願人：神戸大学
28. 出願番号：特願 2020-032655、名称：油脂酵母の油脂生産制御因子、出願人：新潟薬科大学、不二製油グループ本社(株)、産業技術総合研究所
29. 出願番号：特願 2020-034548、名称：代謝物センサおよび酵素活性のスクリーニング方法、出願人：千葉大学
30. 出願番号：特願 2020-45980、名称：文献検索システム及び方法、出願人：日立製作所

<2020 年度>

31. 出願番号：特願 2020-153681、名称： $\Delta 15$ 脂肪酸デサチュラーゼ発現カセットを含む酵母、出願人：不二製油グループ本社(株)、産業技術総合研究所
32. 出願番号：特願 2020-188462、名称：形質転換体並びにそれを用いるカプサンチン及びカプソルピンを含むカロテノイド組成物の製造方法、出願人：江崎グリコ
33. 出願番号：特願 2020-218498、名称：計算機システム、及び、その方法、出願人：日立製作所、京都大学
34. 出願番号：特願 2021- 4392、名称：核酸塩基、有機酸及び／又はポリアミンの生産方法、出願人：東北大学
35. 出願番号：特願 2021-010181、名称：微生物の代謝物の分析方法、出願人：神戸大学、島津製作所、味の素
36. 出願番号：特願 2021-029169、発明の名称：細胞の表現型と自家蛍光の対応データ作成方法及びデータ使用方法、出願人：筑波大学、製品評価技術基盤機構
37. 出願番号：特願 2021-046678、発明の名称：大腸菌及び当該大腸菌を用いた目的のタンパク質を製造するための方法、出願人：東北大学、神戸大学、東京大学
38. 出願番号：特願 2021-52892、名称：イソプレレン産生能を有する遺伝子改変微生物およびこれを用いたイソプレレン製造方法、出願人：三菱ケミカル(株)、産業技術総合研
39. 出願番号：特願 2021-52847、名称：イソプレノイド類産生能を有する遺伝子改変微生物およびこれを用いたイソプレノイド類製造方法、出願人：産業技術総合研究所、三菱ケミカル(株)

【論文】

(1)-1 原著論文

<2016 年度>

1. Oguro Yoshifumi, Harutake Yamazaki, Satoshi Ara, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara, Masamichi Takagi, Hiroaki Takaku: Efficient gene targeting in non-homologous end-joining-deficient *Lipomyces starkeyi* strains; Curr. Genet. Published online (2017)
2. Yoshifumi Oguro, Harutake Yamazaki, Satoshi Ara, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara, Masamichi Takagi and Hiroaki Takaku: Efficient gene targeting in non-homologous end-joining-deficient *Lipomyces starkeyi* strains; Curr. Genet. (2017) First Online 20 February

<2017 年度>

3. Daisuke Tominaga, Hideo Kawaguchi, Yoshimi Hori, Tomohisa Hasunuma, Chiaki Ogino, Sachiyo Aburatani, "Analyses of metabolic system dynamics for time series data of small samples", Bioinformatics and Biology Insights.

4. Vavricka, C.J., Muto, C., Hasunuma, T., Kimura, Y., Araki, M., Wu, Y., Gao, G.F., Ohrui, H., Izumi, M., Kiyota, H. (2017) Synthesis of sulfo-sialic acid analogues: potent neuraminidase inhibitors in regards to anomeric functionality, *Scientific Reports* 7 (1): 8239
5. Fumio Matsuda, Atsumi Tomita, Hiroshi Shimizu. (2017) Prediction of hopeless peptides unlikely to be selected for targeted proteome analysis. *Mass Spectrometry (Tokyo)* 2017; 6(1): A0056
6. Konishi Kenji, Kumagai Toshitaka, Shin-ich Sakasegawa, Tomohiro Tamura. (2017) Complete Genome Sequence of *Burkholderia stabilis* FERM P-21014. *Genome announcements* Jul 20;5(29). pii: e00636-17.
<2018 年度>
7. Sasaki A, Yamamoto J, Kinjo M, Noda N. (2018) Absolute quantification of RNA molecules using fluorescence correlation spectroscopy with certified reference materials. *Anal Chem.* 90(18):10865-10871.
8. Mori, K. Shida, Y. Shioya K. Tashiro K. Aburatani, S. Kuhara, S. Hirasawa H. Ogasawara W. (2019) Cellulase productivity of *Trichoderma reesei* mutants developed in Japan varies with varying pH conditions, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.128, 264-273.
9. Tominaga, D., Kawaguchi, H., Hori, Y., Hasunuma, T., Ogino, C., Aburatani, S. (2018) Mathematical model for small size time series data of bacterial secondary metabolic pathways, *Bioinformatics and Biology Insights*, 12: 1-7
10. Kawaguchi, H., Yoshihara, K., Hara, K. Y., Hasunuma, T., Ogino, C., Kondo, A. (2018) Metabolome analysis-based design and engineering of a metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum* to match rates of simultaneous utilization of D-glucose and L-arabinose, *Microbial Cell Factories*, 17: 76
11. Eguchi, Y., Makanae, K., Hasunuma, T., Ishibashi, Y., Kito, K., Moriya, H. (2018) Estimating the protein burden limit of yeast cells by measuring expression limits of glycolytic proteins, *eLife*, 7: e34595
12. Hasunuma, T., Matsuda, M., Kato, Y., Vavricka, C.J., Kondo, A. (2018) Temperature enhanced succinate production concurrent with increased central metabolism turnover in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Metabolic Engineering*, 48, 109-120
13. Nayani Dhanushka Daranagama, Koki Shioya, Masahiro Yuki, Haruna Sato, Yuki Ohtaki, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara, Proteolytic analysis of *Trichoderma reesei* in cellulase inducing condition reveals a role for trichodermapepsin (TrAsP) in cellulase production, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* Vol.46, 831-842(2019)
14. Tomohiko Matsuzawa, Tomoko Maehara, Yasushi Kamisaka, Satoshi Ara, Hiroaki Takaku, Katsuro Yaoi (2018) Identification and characterization of $\Delta 12$ and $\Delta 12/\Delta 15$ bifunctional fatty acid desaturases in the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (20): 8817-8826
15. Eitaro Matsumura, Akira Nakagawa, Yusuke Tomabechei, Shinichi Ikushiro, Toshiyuki Sakaki, Takane Katayama, Kenji Yamamoto, Hidehiko Kumagai, Fumihiko Sato, Hiromichi Minami. (2018) Microbial production of novel sulphated alkaloids for drug discovery. *Scientific Reports* 8: 7980
<2019 年度>
16. Vavricka, C.J., Hasunuma, T., Kondo, A. (2020) Dynamic metabolomics for engineering biology: Accelerating learning cycles for bioproduction, *Trends in Biotechnology*, 38(1), 68-82
17. Bamba, T., Yukawa, T., Guirimand, G., Inokuma, K., Sasaki, K., Hasunuma, T., Kondo, A. (2019)

Production of 1,2,4-butanetriol from xylose by *Saccharomyces cerevisiae* through Fe metabolic engineering, *Metabolic Engineering*, 56: 17–27

18. Vavricka, C.J., Yoshida, T., Kuriya, Y., Takahashi, S., Ogawa, T., Ono, F., Agari, K., Kiyota, H., Li, J., Ishii, J., Tsuge, K., Minami, H., Araki, M., Hasunuma, T., Kondo, A. (2019) Mechanism-based tuning of insect 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde synthase for synthetic bioproduction of benzylisoquinoline alkaloids, *Nature Communications*, 10, 2015
19. Sakata RC, Ishiguro S, Mori H, Tanaka M, Tastuno K, Ueda H, Yamamoto S, Seki M, Masuyama N, Nishida K, Nishimasu H, Arakawa A, Kondo A, Nureki O, Tomita M, Aburatani H & Yachie N. Single CRISPR base editors to induce simultaneous C-to-T and A-to-G mutations. *Nature Biotechnology* (accepted)
20. Watanabe, N., Murata, M., Ogawa, T., Vavricka, C.J., Kondo, A., Ogino, C., Araki, M. “Exploration and Evaluation of Machine Learning-Based Models for Predicting Enzymatic Reactions”, *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol.60(3), 1833–1843 (2020).
21. Yamazaki, H., Kobayashi, S., Ebina, S., Abe, S., Ara, S., Shida, Y., Ogasawara, W., Yaoi, K., Araki, H., Takaku, H. (2019). Highly selective isolation and characterization of *Lipomyces starkeyi* mutants with increased production of triacylglycerol. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(15), 6297–6308.
22. Takaku, H., Miyajima, A., Kazama, H., Sato, R., Ara, S., Matsuzawa, T., Yaoi, K., Araki, H., Shida, Y., Ogasawara, W., Yamazaki, H. (2020). A novel electroporation procedure for highly efficient transformation of *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Microbiological Methods*, 169, 105816
23. Matsuzawa, T., Kamisaka, Y., Maehara, T., Takaku, H., Yaoi, K. (2020). Identification and characterization of two fatty acid elongases in *Lipomyces starkeyi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(6), 2537–2544.
24. Khanh Dung Pham, Shida, Y., Miyata, A., Takamizawa, T., Suzuki, Y., Ara, S., Yamazaki, H., Masaki, K., Mori, K., Aburatani, S., Hirakawa, H., Tashiro, K., Kuhara, S., Takaku H., Ogasawara, W. (2020). Effect of light on lipid and carotenoid production in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol.84(7), 1501–1512
25. Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Kazuki Mori, Kosuke Tashiro, Sachiyo Aburatani, Yosuke Shida, Satoru Kuhara, Wataru Ogasawara: “Cellulase productivity of *Trichoderma reesei* mutants developed in Japan varies with varying pH conditions”, *Journal of bioscience and bioengineering*, 128(3), 264–273, 2019
26. T. Kumagai, M. Tsukahara, N. Katayama, K. Yaoi, S. Aburatani, K. Ohdan, K.E. Fujimori: Whole-Genome Sequence of *Monascus purpureus* GB-01, an industrial strain for food colorant production. *Microbiol Resource Announcements* 8:e00196–19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00196-19>
27. K. Yoshida, K. Konishi, A. Magana-Mora, A. Rougny, Y. Yasutake, S. Muramatsu, S. Murata, T. Kumagai, S. Aburatani, S. Sakasegawa, T. Tamura: Production of recombinant extracellular cholesterol esterase using consistently active promoters in *Burkholderia stabilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(10), 1974–1984, (2019)
28. Y. Saito, W. Kitagawa, T. Kumagai, N. Tajima, Y. Nishimiya, K. Tamano, Y. Yasutake, T. Tamura & T. Kameda : Developing a codon optimization method for improved expression of recombinant proteins in actinobacteria. *Scientific Reports* 9: 8338 (2019)

<2020 年度>

29. Yukawa, T., Bamba, T., Guirimand, G., Matsuda, M., Hasunuma, T., Kondo, A. (2021/01) Optimization of 1,2,4-butanetriol production from xylose in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of NADH/NADPH balance, *Biotechnology and Bioengineering*, 118(1), 175-185
30. Takenaka et al., An ion-pair free LC-MS/MS method for quantitative metabolite profiling of microbial bioproduction systems, *Talanta*, 222 (2021) 121625
31. Tominaga M, Nozaki K, Umeno D, Ishii J*, Kondo A. Robust and flexible platform for directed evolution of yeast genetic switches. *Nat Commun* in press
32. Ito Y, Terai G, Ishigami M, Hashiba N, Nakamura Y, Bamba T, Kumokita R, Hasunuma T, Asai K, Ishii J*, Kondo A*. (2020) Exchange of endogenous and heterogeneous yeast terminators in *Pichia pastoris* to tune mRNA stability and gene expression. *Nucleic Acids Res.* Dec 16; 48(22): 13000-13012
33. 柘植謙爾, 石井純, 近藤昭彦, ゲノム編集技術を応用した製品開発とその実用化 ～研究開発動向・課題解決策・技術予測と市場展望～, 第4章 ゲノム編集によるスマートセルインダストリーの技術開発とその課題解決, 第7節 「長鎖DNA合成技術による有用物質生産微生物の構築とその課題解決」技術情報協会
34. T. Fuji, S. Nakazawa, and K. Ito. "Feasible-metabolic-pathway-exploration technique using chemical latent space." *Bioinformatics* 36. Supplement 2 (2020): i770-i778.
35. Y. Kuriya and M. Araki. "Dynamic Flux Balance Analysis to Evaluate the Strain Production Performance on Shikimic Acid Production in *Escherichia coli*." *Metabolites* 10.5 (2020): 198
36. Daranagama ND, Suzuki Y, Shida Y, Ogasawara W, Involvement of Xyr1 and Are1 for Trichodermapepsin gene expression in response to cellulose and garactose in *Trichoderma reesei*., *Curr. Microbiol.*, 77(8), 2020, p1506-p1517
37. Takemura, M., Pathway engineering for efficient biosynthesis of violaxanthin in *Escherichia coli*., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103: 9393-9399.
38. Shimode, S., A new carotenoid, 6'-hydroxy-3'-didehydro-lutein, produced by recombinant *Escherichia coli* that expresses the violaxanthin biosynthesis and chaperone AtCY01 genes — its structure and antioxidant activities., *Phytochem. Lett.* 35: 113-118.
39. Takaku, H., Ebina, S., Kasuga, K., Sato, R., Ara, S., Kazama, H., Matsuzawa, T., Yaoi, K., Araki, H., Shida, Y., Ogasawara, W., Ishiya, K., Aburatani, S., Yamazaki, H. (2021). Isolation and characterization of *Lipomyces starkeyi* mutants with greatly increased lipid productivity following UV irradiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Published online 2021 Feb 10.
40. Aburatani, S., Ishiya, K., Itoh, T., Hayashi, T., Taniguchi, T., Takaku, H. (2020). Inference of Regulatory System for TAG Biosynthesis in *Lipomyces starkeyi*. *Bioengineering*, 7(4), 148.
41. Matsuzawa, T., Maehara, T., Kamisaka, Y., Ayabe-Chujo, Y., Takaku, H., Yaoi, K. (2020). Identification and characterization of *Pseudozyma antarctica* Δ12 fatty acid desaturase and its utilization for the production of polyunsaturated fatty acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 130(6), 604-609.
42. Hiroaki Takaku, Sayaka Ebina, Kotoha Kasuga, Rikako Sato, Satoshi Ara, Haruka Kazama, Tomohiko Matsuzawa, Katsuro Yaoi, Hideo Araki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara, Koji Ishiya, Sachiyo Aburatani, Harutake Yamazaki, Isolation and characterization of *Lipomyces starkeyi* mutants with greatly increased lipid productivity following UV irradiation, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Published online, 2021.Feb
43. Yoshiaki Yasutake, Kenji Konishi, Shuji Muramatsu, Keitaro Yoshida, Sachiyo Aburatani, Shin-ichi

Sakasegawa, Tomohiro Tamura, Bacterial triacylglycerol lipase is a potential cholesterol esterase: Identification of a key determinant for sterol-binding specificity, International Journal of Biological Macromolecules, 167, 578-556

44. Sachiyo Aburatani, Koji Ishiya, Toshikazu Itoh, Toshihiro Hayashi, Takeaki Taniguchi, Hiroaki Takaku, Inference of Regulatory System for TAG Biosynthesis in *Lipomyces starkeyi*, Bioengineering, 7(4), 148.
45. Khanh Dung Pham, Yosuke Shida, Atsushi Miyata, Takeru Takamizawa, Yoshiyuki Suzuki, Satoshi Ara, Harutake Yamazaki, Kazuo Masaki, Kazuki Mori, Sachiyo Aburatani, Hideki Hirakawa, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara, Hiroaki Takaku, Wataru Ogasawara, Effect of light on carotenoid and lipid production in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*, Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 84(7), 1501-1512
46. Rational Thermostabilisation of Four-Helix Bundle Dimeric De Novo Protein, Shin Irumagawa et al. (submitted to Sci. Rep.)
47. Enzyme modification by using mutation site prediction for enhancing the regioselectivity of substrate reaction sites, Jinzen Ikebe et al. (submitted to Nature Comm.)
48. Evaluation of protein thermal stability by molecular dynamics simulation, Kaito Kobayashi et al. (in preparation)
49. Designing system of a N-terminal sequence tag for improved protein expression, Naoyuki Tajima et al. (in preparation)

(1)-2 総説

<2016 年度>

1. Yosuke Shida, Takanori Furukawa, Wataru Ogasawara: Deciphering the molecular mechanisms behind cellulase production in *Trichoderma reesei*, the hyper-cellulolytic filamentous fungus; Biosci. Biotechnol. Biochem., 80(9), 1712-1729 (2016)
2. 高久 洋暁, 山崎 晴丈: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における遺伝子組換えシステムの構築とその応用; オレオサイエンス, 17(3), 107-116 (2017)
3. 小林直也, 木村尚弥, 新井亮一: バイナリーパターン配列デザインによるデノボ蛋白質の創出と蛋白質ナノブロックによる超分子複合体の創生; 生物工学会誌, 94(8), 485-488 (2016).
4. Naoya Kobayashi, Ryoichi Arai: Design and construction of self-assembling supramolecular protein complexes using artificial and fusion proteins as nanoscale building blocks; Curr. Opin. Biotech. 46, 57-65 (2017).

<2017 年度>

5. 蓮沼誠久, バイオリファイナリー実現を加速する先端バイオ技術と情報技術の融合, アグリバイオ, 11月号, vol.1(12), 24-29 (2017)
6. Fumio Matsuda, Yoshihiro Toya and Hiroshi Shimizu. (2018) Learning from quantitative data to understand central carbon metabolism. Biotechnology Advances 35(8):971-980
7. 柘植謙爾・石井純・荒木通啓・近藤昭彦, ゲノム合成の潮流のインパクト 微生物による物質生産, 現代化学, 562, 36-41 (2018)
8. 梅野太輔, 「生物をつくる 新薬を生み出すスーパー酵母を創る」, バイオベンチャーの冒険者たち 世界をアップデートする6人のバイオ研究者, 千葉大学ベンチャービジネスラボラトリー編, 幻冬舎 (2018年3月20

<2018 年度>

9. 蓮沼誠久、田村具博、近藤昭彦「総論」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、1-9(2018)
10. 森良仁「ハイスループット DNA 化学合成技術の開発」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、13-18 (2018)
11. 柘植謙爾、高橋俊介、近藤昭彦「OGAB 法による長鎖 DNA 合成技術」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、19-25 (2018)
12. 板谷光泰「枯草菌ゲノムベクターと利用する長鎖 DNA の(超)長鎖化技術」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、26-31(2018)
13. 石黒 宗、谷内江 望「全ゲノム合成時代における長鎖 DNA 合成の考え方」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、32-38 (2018)
14. 石井純、西晶子、北野美保、中村朋美、庄司信一郎、秀瀬涼太、蓮沼誠久、近藤昭彦「微生物を用いた物質生産とハイスループット微生物構築技術」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、39-43 (2018)
15. 木村友紀、関貴洋、大谷悠介、栗原健人、梅野太輔「バイオセンサーを利用したハイスループット評価技術」、スマートセルインダストリー、44-50 (2018)
16. 三谷恭雄、野田尚宏、菅野学「トランスクリプトーム解析技術」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、56-61(2018)
17. 蓮沼誠久「スマートセル設計に資するメタボローム解析」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、62-68(2018)
18. 松田史生「高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、69-74(2018)
19. 光山統泰「測定データのクオリティコントロール、標準化データベースの構築」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、75-82(2018)
20. 荒木啓通、白井智量「新規代謝経路の設計」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、83-87(2018)
21. 厨祐喜、白井智量、荒木啓通「代謝モデル構築と代謝経路設計」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、88-91(2018)
22. 川崎浩子、細山哲、寺尾拓馬、白井智量「微生物資源の有効活用」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、92-98(2018)
23. 荒木啓通「代謝設計に向けた酵素選択」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、99-103(2018)
24. 亀田倫史、池部仁善「酵素の機能改変」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、104-107(2018)
25. 亀田倫史、齋藤裕、田島直幸、西宮佳志、玉野孝一、北川航、安武義晃、田村具博「情報解析に基づく遺伝子配列改変による発現量調節」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、112-116(2018)
26. 守屋央朗「コドン(超)最適化という設計戦略」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、117-122(2018)
27. 寺井悟朗「大量データに基づく遺伝子配列設計」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、123-129(2018)
28. 油谷幸代「統合オミクス解析技術」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、130-134(2018)
29. 酒瀬川信一、小西健司、村田里美、古田圭太郎、安武義晃、油谷幸代、田村具博「診断薬用酵素コレステロールエステラーゼ (CEN) 生産への応用」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、151-155(2018)
30. 小笠原渉、志田洋介、鈴木義之、掛下大視、五十嵐一暁、小林良則、田代康介、油谷幸代、矢追克郎「セルラールーゼ生産系状菌の複数酵素同時生産制御に向けた技術開発」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)

版)、156-161 (2018)

31. 吉田エリカ、大貫朗子、臼田佳弘、小森彩、小島基、鈴木宗典、池部仁善、亀田倫史「カルボンの生産性向上による代謝解析・酵素設計技術の有効性検証」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、166-170(2018)
32. 仲谷豪、山本省吾、石井伸佳、曾田匡洋「Streptomyces 属放線菌を用いた物質生産技術：N-StePP®」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、171-176(2018)
33. 阪本剛、山田明生「スマートセルシステムによる有用イソプレノイド生産微生物の構築の取組み」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、177-182(2018)
34. 豊田晃一、久保田健、小暮高久、乾将行「網羅的解析を利用した高生産コリネ型細菌の育種戦略」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、183-188(2018)
35. 片山直也、大段光司、塚原正俊、熊谷俊高、油谷幸代、藤森一浩「紅麴色素生産の新展開」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、189-194(2018)
36. 久保亜希子、佐原建彦、竹村美保、三沢典彦「植物由来カロテノイドの微生物生産」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、195-204(2018)
37. 高久洋暁、荒木秀雄、小笠原渉、田代康介、蓮沼誠久、油谷幸代、矢追克郎「油脂酵母による油脂発酵生産性改善へ向けた技術開発」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、206-214 (2018)
38. 中川明、南博道「情報解析技術を活用したアルカロイド発酵生産プラットフォームの最適化」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、215-219(2018)
39. 宮田健、新川武、玉城志博、梅津光央、新井亮一、亀田倫史「計算化学によるコンポーネントワクチン開発のための分子デザイン」、スマートセルインダストリー (シーエムシー出版)、220-225(2018)
40. 梅野太輔：「進化」が可能にした新しい酵素や抗体の超高速開発：実験医学, 36 (19), 3265-3267 (2018)
41. 梅野太輔：ノーベル化学賞；進化のプロセスを模したタンパク質機能のデザイン手法：パリティ, 33 (12), 44-48 (2018)
42. 梅野太輔：実験室内[定向進化]による酵素の改良・創出技術：化学, 73(12), 12-16 (2018)
43. 板谷光泰、金子真也「ゲノム合成の潮流」実験医学, vol. 37, (No. 3) 452-457 (2019)
44. 乾将行, 低炭素社会の実現を目指したグリーン化学品生産技術の開発, バイオプラジャーナル, 17, 15-19, (2018)
45. 乾将行, 低炭素社会の実現を目指したバイオ燃料・グリーン化学品生産技術の開発, バイオマス利用研究, 19, 25-34, (2018)

<2019 年度>

46. 金田晃一, 生物で工業材料を生産するスマートセルインダストリー, バイオサイエンスとインダストリー (B&I), Vol. 77(4), 332-225 (2019)
47. 柘植謙爾, 寺井悟朗, 谷内江望, DBTL サイクルに即した長鎖 DNA 構築技術の開発, バイオサイエンスとインダストリー (B&I), vol. 77(5), 408-409 (2019)
48. 蓮沼誠久, スマートセル開発に資するメタボロミクス技術, バイオサイエンスとインダストリー (B&I), vol. 77(5), 410-411 (2019)
49. 八幡志央美, 野村暢彦, 八幡 穰, 非破壊イメージングによるハイスループット細胞評価技術, バイオサイエンスとインダストリー (B&I), Vol. 77(6), 512-513 (2019)
50. 松田史生, 複数酵素タンパク質発現量の一斉定量技術の開発, バイオサイエンスとインダストリー (B&I), Vol. 77(6), 514-515 (2019)
51. 関貴洋, 小林一幾, 梅野太輔, スマートセル開発のためのメタボライトセンサ開発技術, バイオサイエンス

とインダストリー(B&I), Vol.77(6), 516-517 (2019).

52. 白井智量, 高生産性微生物設計システムにおける代謝設計・最適化技術の開発, バイオサイエンスとインダストリー(B&I), Vol.78(1), 62-63 (2020)
53. 油谷幸代, 細胞内制御因子探索のためのネットワークモデル構築, バイオサイエンスとインダストリー(B&I), Vol.78(1), 65-65 (2020)
54. 亀田倫史, 情報解析に基づく遺伝子配列改変によるタンパク質発現量調節・高機能化, バイオサイエンスとインダストリー(B&I), Vol.78(2), 166-167 (2020)
55. 荒木通啓, 伊藤潔人, 花井泰三, 代謝・酵素設計提案に向けた知識ベース・学習技術開発, バイオサイエンスとインダストリー(B&I), Vol.78(2), 168-169 (2020)
56. 蓮沼誠久, スマートセルインダストリーの形成に向けたバイオ×デジタルの技術開発, 化学工学, Vol. 84(2), 51 (2020)
57. 蓮沼誠久, Christopher J. Vavricka, 荒木通啓, 新たに設計した代謝経路を用いた大腸菌によるアルカロイド高生産, バイオサイエンスとインダストリー(B&I), Vol. 78(1), 32-33 (2020)
58. Masuyama M, Mori H & Yachie N. DNA barcodes evolve for high-resolution cell lineage tracing. (2019) *Current Opinion in Chemical Biology* 52, 63-71
59. Ishiguro S, Mori H & Yachie N. DNA event recorders send past information of cells to the time of observation. (2019) *Current Opinion in Chemical Biology* 52, 54-62
60. 大谷悠介, 関貴洋, 梅野太輔, 二次代謝経路の一次代謝化技術, ファルマシア, 55(7), 658-661 (2019).
61. 北出幸広, 乾 将行, バイオプロセスによる芳香族化合物生産技術の開発, プラスチックス, 107, 20-23, (2019)
62. 豊田晃一, 乾 将行, 炭素循環社会の実現を目指したバイオリファイナリー技術の開発, 環境技術, 48, 141-145, (2019)
63. 高久洋暁, 「日本の油脂自給率改善へ向けた油脂酵母の解析とその応用」, 化学と生物, vol.57, (No.10) 609-615 (2019)
64. Nakagawa A. (石川県大) and Minami H (石川県大) . Morphine and new directions. *Comprehensive Natural Products III: Chemistry and Biology*. (Hung-Wen Liu and Tadhg P. Begley Eds.) Elsevier: Oxford p. 686-699 (2020).

<2020 年度>

65. 柘植謙爾 (神戸大)、石井純 (神戸大)、近藤昭彦 (神戸大)、第7 節 長鎖 DNA 合成技術による有用物質生産微生物の構築とその課題解決、No.2088 ゲノム編集、技術情報協会 (2021)
66. Transcription factors as evolvable biosensors.: D. Umeno, Y. Kimura, S. Kawai-Noma; *Anal Sci.*, in press <https://doi.org/10.2116/analsci.20SCR12>
67. Directed evolution of biosensors.: Yuki Kimura and Daisuke Umeno, *Enzyme Engineering and Evolution: Specific Enzyme Applications/ Methods Enzymol.*, Vol. 644, p.191-208 2020.9.16 Academic Press (ISBN978-0-12-824431-9)
68. 七谷 圭、中山真由美、熊谷俊高、阿部 敬悦、『物質生産の効率化に向けた輸送体探索技術の開発』、バイオインダストリー (2020) VOL.78 NO.4
69. 三谷恭雄、野田尚宏、菅野学: HTP トランスクリプトーム解析技術; バイオサイエンスとバイオインダストリー、78(4)、2020年7月
70. 松田 史生 タンパク質発現プロファイリングのための定量プロテオミクス 医薬品開発におけるオミクス解析技術、情報機構 2020

71. 石井純, 新型コロナで変わる時代の実験自動化・遠隔化 「微生物での発酵生産と実験の自動化」 羊土社, 2020年12月 (2021年1月号, 第39巻, 第1号, 8-12)
72. 厨 祐喜, 荒木 通啓. 代謝パスウェイ・酵素反応改変における情報解析技術の活用, ファルマシア, Vol. 56(10), 930-934 (2020)
73. 乾 将行(地球環境産業技術研究機構), コリネ菌を用いた有用芳香族化合物生産菌の開発, バイオサイエンスとインダストリー, 78, 450-451, (2020)
74. 高久洋暁(新潟薬大)、荒木通啓、油谷幸代「 ω -3系多価不飽和脂肪酸含有油脂の生産性向上油脂酵母を用いた機能性油脂生産菌の開発」、バイオサイエンスとインダストリー、vol.78, (No.5) 452-453 (2020)
75. Takaku, H. (新潟薬大), Matsuzawa, T., Yaoi, K., Yamazaki, H. (2020). Lipid metabolism of the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 104(14), 6141-6148
76. 小笠原渉(長岡技大)、志田洋介、油谷幸代「糸状菌における有用タンパク質同時生産制御技術の開発」、バイオサイエンスとインダストリー、vol.78, (No.5) 448-449 (2020)

【外部発表】

(a) 学会発表・講演

<2016年度>

1. 石井純「酵母でのモノづくり細胞のエンジニアリング」第11回日本ゲノム微生物学会(慶應義塾大学 湘南藤沢キャンパス), 平成29年3月
2. 荒木通啓「代謝経路デザインの限界」第11回日本ゲノム微生物学会(慶應義塾大学 湘南藤沢キャンパス), 平成29年3月
3. 蓮沼誠久「日本独自の超高速微生物育種プラットフォーム“スマートセルフアウンドリ”の開発」NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」キックオフシンポジウム(東京), 平成28年11月
4. 蓮沼誠久「バイオリファインリーの構築に資する微生物細胞工場の創製」第21回 関西大学 先端科学技術シンポジウム「地域資源の高度利用を図るバイオリファインリーの基盤形成とその実用化(関西大学), 平成29年1月
5. 富永大介, 川口秀夫, 堀良美, 蓮沼誠久, 油谷幸代, “時系列データと代謝マップからの実反応経路の推定”, 化学工学会第82年会, 東京, 2017年3月(口頭)
6. 臼田佳弘:「生物機能を活用したものづくりにおける味の素(株)の取組とプロジェクトへの期待」;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 キックオフシンポジウム, 平成28年11月
7. Takeshi Kubota: Challenges to the production of high value-added chemicals: aromatic compounds; BioJapan 2016(パシフィコ横浜), 平成28年10月
8. 乾 将行: バイオリファインリー社会の実現を目指したバイオ燃料・グリーン化学品生産; RITE 革新的環境技術シンポジウム2016~エネルギー・環境技術のイノベーションによるゼロエミッション社会の構築~(東京大学伊藤謝恩ホール), 平成28年12月
9. 南博道: 微生物発酵法による植物アルカロイド生産と生薬生理活性物質の創製; 日本農芸化学会2017年度大会(京都女子大学), 平成29年3月
10. 中川明, 佐藤文彦, 南博道: 創薬研究を目指した大腸菌を用いたベンジルイソキノリンアルカロイド生産系の構築; 日本薬学会第137年会(東北大学), 平成29年3月
11. 小笠原 渉: 微生物がかかわる生活(環境・食料・健康など); 第6回緑水工業水環境フォーラム「水に映す未来。」(ホテルニューオータニ長岡 NCホール), 2016年10月
12. Nguyen Le Quynh Anh, 藤原 南帆, 南郷 修司, 大隅 正子, 志田 洋介, 小笠原 渉: 糸状菌 *Trichoderma reesei* の形態学的解析; 第1回高専生サミット on Bioinspired Chemistry (鶴岡工業高等

専門学校) 2016年9月

13. 平沢 大樹, 志田 洋介, 田代 康介, 久原 哲, 小笠原 渉: 有用糸状菌 *Trichoderma reesei* 日本型変異株の網羅的表現型解析; 第68回日本生物工学会大会(富山国際会議場) 2016年9月
14. Dung Pham Khanh, Atsushi Miyata, Yosuke Shida, Harutake Yamazaki, Kazuo Masaki, Kazuki Mori, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara, Hiroaki Takaku, Wataru Ogasawara: Analysis of light response mechanisms in carotenoid synthesis of the yeast *Rhodospiridium toruloides*; 第68回日本生物工学会大会(富山国際会議場), 2016年9月
15. Hiroki Hirasawa, Yosuke Shida, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara, Wataru Ogasawara: Identification of the novel pH-responsive cellulase regulating factor in filamentous fungus *Trichoderma reesei*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2016年10月
16. Ayana Nakamura, Machiko Takahashi, Tomohiko Matsuzawa, Yosuke Shida, Katsuro Yaoi, Wataru Ogasawara: The physiological role of BGLII in *Trichoderma reesei*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2016年10月
17. Atsushi Miyata, Pham Khanh Dung, Yosuke Shida, Harutake Yamazaki, Kazuo Masaki, Kazuki Mori, Satoru Kuhara, Hiroaki Takaku, Wataru Ogasawara: ANALYSIS OF RELATIONSHIP BETWEEN LIGHT RESPONSE AND LIPID PRODUCTION IN THE OLEAGINOUS YEAST *Rhodospiridium toruloides*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2016年10月
18. Nayani D. Daranagama, Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Haruna Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Transcriptional regulation mechanism of proteases in *Trichoderma reesei*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2016年10月
19. Kazumasa Yoshizawa, Hiroki Taniguchi, Takanori Furukawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Functional analysis of C terminal-tail of putative transceptor CRT1 involved in lignocellulase production in *Trichoderma reesei*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2016年10月
20. Minaho Fujiwara, Shingo Tahara, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: FUNCTIONAL ANALYSIS of CHITIN SYNTHASES in *Trichoderma reesei*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2016年10月
21. Dung Pham Khanh, Atsushi Miyata, Yosuke Shida, Harutake Yamazaki, Kazuo Masaki, Kazuki Mori, Satoru Kuhara, Hiroaki Takaku, Wataru Ogasawara: ANALYSIS OF LIPID PRODUCTION IN THE OLEAGINOUS YEAST *Rhodospiridium toruloides*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2016年10月
22. Nguyen Le Quynh Anh, Minaho Fujiwara, Nobuhito Nango, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Visualization of nuclei in *Trichoderma reesei*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2016年10月
23. Keitaro Takahashi, Hiroki Aita, Hiroki Hirasawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Elucidation of cellobiose-responsive cellulase production mechanism in *Trichoderma reesei*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2016年10月
24. 平沢 大樹, 志田 洋介, 小笠原 渉: 糸状菌 *Trichoderma reesei* における新規 pH 依存的セルラーゼ生産制御因子の解析; 第16回糸状菌分子生物学コンファレンス(京都大学), 2016年11月
25. 吉澤 和将, 谷口 大樹, 古川 隆紀, 志田 洋介, 小笠原 渉: *Trichoderma reesei* における推定トランセプター CRT1 の C 末端テール領域の解析; 第16回糸状菌分子生物学コンファレンス(京都大学), 2016

年 11 月

26. 藤原 南帆, 志田 洋介, 小笠原 渉: ガラクトース異性化酵素遺伝子 gal10 の機能から見る *Trichoderma reesei* が生産する繊維状物質の特性解明; 第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜), 2016 年 11 月
27. 宮田 淳史, 志田 洋介, 山崎 晴丈, 正木 和夫, 森 一樹, 田代 康介, 久原 哲, 高久 洋暁, 小笠原 渉: 油脂生産酵母 *Rhodospirium torulooides* の突然変異導入による油脂生産向上因子の同定; 第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜), 2016 年 11 月
28. 北原 雪菜, 吉澤 和将, 谷口 大樹, 古川 隆紀, 志田 洋介, 小笠原 渉: *Trichoderma reesei* における推定トランセプター CRT1 のシグナル伝達機構; 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会 (慶応大学・藤沢), 2017 年 3 月
29. 岩本 孝信, 宮田 淳史, Pham Khanh Dung, 志田 洋介, 山崎 晴丈, 正木 和雄, 森 一樹, 久原 哲, 高久 洋暁, 小笠原 渉: 油脂生産酵母 *Rhodospiridium torulooides* の油脂およびカロテノイド生産の相関解析; 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会 (慶応大学・藤沢), 2017 年 3 月
30. Pham Khanh Dung, Atsushi Miyata, Yosuke Shida, Harutake Yamazaki, Kazuo Masaki, Hiroaki Takaku, Wataru Ogasawara: Lipid production in the oleaginous yeast *Rhodospiridium torulooides*; 地域活性に関する国際会議 (ISLife2017) (鹿児島県出水郡長島町), 2017 年 3 月
31. Ebina, S., Abe, S., Yamazaki H. and Takaku H.: Isolation of Industrial Oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* Mutants Accumulating a High Level of Lipid; International Conference on Food for Health in Niigata 2016 (日本・新潟) 平成 28 年 11 月
32. Kobayashi S., Yamazaki H. and Takaku H.: Expression profile of genes responsible for lipid production in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* mutant K13 exhibiting high lipid accumulation; International Conference on Food for Health in Niigata 2016 (日本・新潟) 平成 28 年 11 月
33. Sano M., Yamazaki H. and Takaku H.: Metabolic engineering of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* for over production and secretion of fatty acids from glucose; International Conference on Food for Health in Niigata 2016 (日本・新潟) 平成 28 年 11 月
34. 小林 鈴花, 海老名 沙也佳, 阿部 史歩, 山崎 晴丈, 志田 洋介, 小笠原 渉, 高久 洋暁: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂高蓄積変異株の取得と油脂合成・分解関連重要遺伝子の同定; 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都女子大学) 平成 29 年 3 月
35. 海老名 沙也佳, 春日 琴葉, 志田 洋介, 小笠原 渉, 山崎 晴丈, 高久 洋暁: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における油脂高蓄積変異株の育種; 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都女子大学) 平成 29 年 3 月
36. 佐野 真那理, 志田 洋介, 小笠原 渉, 山崎 晴丈, 高久 洋暁: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における脂肪酸の分泌発酵生産; 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都女子大学) 平成 29 年 3 月
37. 木村尚弥, 小林直也, 新井亮一: 超安定化二量体新規人工蛋白質 Super WA20 (SUWA) の創出と自己組織化蛋白質ナノブロック複合体構築; 日本生物工学会 2016 年度大会 (富山国際会議場), 2016 年 9 月
38. Naoya Kobayashi, Naoya Kimura, Ryoichi Arai: Self-assembling supramolecular nano-architectures created from de novo protein nano-building blocks; 日本生物工学会 2016 年度大会 (富山国際会議場), 2016 年 9 月
39. Ryoichi Arai, Naoya Kobayashi, Naoya Kimura, Michael H. Hecht: De Novo Protein Nano-Building Block Approach for "Synthetic Structural Biology" to Create Artificial Supramolecular Protein Complexes; The 42nd Naito Conference (シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ), 2016 年 10 月
40. Naoya Kobayashi, Naoya Kimura, Ryoichi Arai: Design and construction of supramolecular nanostructures by using de novo protein nanobuilding blocks; 第 54 回日本生物物理学会大会 (つくば

国際会議場), 2016年11月

41. 木村尚弥, 小林直也, 新井亮一: 蛋白質ナノブロック用超安定化人工蛋白質 SUWA (Super WA20) の特性解析及び構造解析; 第39回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜), 2016年12月
42. 小林直也, 木村尚弥, 新井亮一: 人工蛋白質ナノブロックによる多様な自己組織化超分子ナノ構造複合体: ネオバイオ超分子の創生を目指して; 第39回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜), 2016年12月
43. 新井亮一: 信州発! 微生物によるナノバイオものづくりイノベーションに向けて: 人工タンパク質ナノブロック開発による自己組織化超分子複合体の創出; 菌類・微生物ダイナミズム創発研究センター キックオフシンポジウム (信州大学), 2016年12月
44. Naoya Kimura, Naoya Kobayashi, Ryoichi Arai: Dynamical Ordering Nanostructures Constructed from Protein Nanobuilding Blocks; The 5th International Symposium of Dynamical Ordering of Biomolecular Symstems for Creation of Integrated Functions (東京大学), 2017年1月
45. Ryoichi Arai: Self-assembling supramolecular nanostructures created from de novo protein nanobuilding blocks; The 11th Annual Symposium on Nanobiotechnology (川崎市産業振興会館), 2017年2月
46. 木村尚弥, 小林直也, 新井亮一: タンパク質ナノブロックによる動的秩序構造形成, 日本化学会第97春季年会 (慶応大学), 2017年3月
47. Naoya Kimura, Naoya Kobayashi, Ryoichi Arai: Self-assembling supramolecular nanostructures created from de novo protein nanobuilding blocks; Okazaki Conference 2017 on Grand Challenges in Small-angle Scattering (岡崎コンファレンスセンター), 2017年3月

<2017年度>

48. 菅野学, 三谷恭雄, 野田尚宏, 木村信忠, 田村具博: バクテリアのポリシストロニックオペロンの発現実態の解明を目指した長鎖 cDNA 調整手法の開発; 第17回 LS-BT 合同発表会 (つくば), 2018年2月
49. 菅野学, 三谷恭雄, 野田尚宏, 木村信忠, 田村具博: 放線菌の長鎖 mRNA の発現情報取得の新規アプローチ ~二次代謝産物生合成遺伝子群の発現をありのまま捉える~; 日本農芸化学会 2018年大会 (名古屋), 2018年3月
50. 齋藤裕, 北川航, 田村具博, 亀田倫史: コドン最適化による放線菌蛋白質発現量の調節; 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017); 神戸ポートアイランド, 2017年12月
51. 亀田倫史: MD シミュレーションを用いた機能性タンパク質の高機能化法の開発; 日本農芸化学会 2018年大会 (名古屋), 2018年3月
52. Sachiyo Aburatani, "Network Inference by Structural Equation Modeling for systems biology", *Escherichia coli* biology workshop, Awaji Yumebutai, Hyogo, Japan, Mar. 2018
53. Sachiyo Aburatani, Tomohiro Tamura, "Statistical Inference of Gene Regulatory Network from Gene Expression Profiles", ISPROF2017, Lisbon, Portugal, Sep. 2017
54. 富永大介, 川口秀夫, 堀良美, 蓮沼誠久, 荻野千秋, 油谷幸代, "酵素反応の速度モデリングにおける補酵素やエネルギー分子の影響", LS-BT 合同発表会, つくば市 (2018).
55. Wong Pui Shan, Sachiyo Aburatani, "Elucidation of the sequential transcriptional activity in *Escherichia coli* using time-series RNA-seq data", Metabolomics & Systems Biology, Prague, Czech Republic, Aug. 2018
56. Wong Pui Shan, Sachiyo Aburatani, "Elucidation of the sequential transcriptional activity in *Escherichia coli* using time-series RNA-seq data", 第17回 LS-BT 合同発表会 (つくば), 2018年2月
57. 松沢智彦, 前原智子, 神坂泰, 荒学志, 高久洋暁, 矢追克郎: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の delta 12-

fatty acid desaturase の機能解析；日本農芸化学会 2018 年大会（名古屋），2018 年 3 月

58. 蓮沼誠久，スマートセルインダストリーの創出に資する微生物育種プラットフォームの開発，新化学技術推進協会（JACI）ライフサイエンス技術部会・反応分科会講演会講演会「スマートセルインダストリーに関する研究開発動向」，東京，2018.2.26
59. 蓮沼誠久，藻類オイル生産の実用化に向けた代謝メカニズム解析の重要性，微細藻燃料開発推進協議会（JMAF）開催 シンポジウム，東京，2018.1.29
60. Tomohisa Hasunuma, Production of highly functional biomaterials using “Smart Cells”, iBioS-2017, Singapore, 2017.12.20
61. Tomohisa Hasunuma, Development of dynamic metabolomics and its application to metabolic engineering in the “Smart Cell” project, The 8th Kobe University Brussels European Centre Symposium, Brussels, 2017.11.21
62. 蓮沼誠久，動的メタボロミクスの開発とスマートセル・インダストリーへの展開，第 11 回メタボロームシンポジウム，大阪，2017.11.14
63. 蓮沼誠久，Engineering Biology によるバイオリファインリーの構築とスマートセルインダストリーへの展開，静岡大学グリーン科学研究所 第 4 回シンポジウム，浜松，2017.11.9
64. 蓮沼誠久，スマートセルを創出する合成バイオプラットフォームの開発，BioJapan，横浜，2017.10.12
65. 蓮沼誠久，代謝工学的手法による海洋性ラン藻でのアスタキサンチン生産，第 31 回カロテノイド研究談話会，京都，2017.9.16
66. 蓮沼誠久，スマートセルを創出する合成バイオプラットフォームの開発と応用への挑戦，iBioK 第 7 回 合成生物学シンポジウム，神戸，2017.8.3
67. Tomohisa Hasunuma, Cell surface engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for biomass breakdown, SB7.0 (The seventh international meeting on synthetic biology), Singapore, 2017.6.13-16
68. 蓮沼誠久，進化した細胞表層工学によるバイオマス変換プロセスの開発と機能性物質生産への新展開，新化学技術推進協会（JACI）エネルギー・資源技術部会 バイオマス分科会 講演会「バイオマス資源変換触媒の研究動向」，東京，2017.4.2
69. 高橋俊介，柘植謙爾，近藤昭彦，第二世代 OGAB 法に適した，新規二本鎖 DNA 調達方法の開発，2017 年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017），神戸，2017 年 12 月 7 日
70. 志田洋介，小笠原渉：糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるセルロース認識メカニズム；セルラーゼ研究会第 31 回大会（佐久平プラザ 21），2017 年 7 月
71. Nayani D. Daranagama, Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Haruna Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: The proposed mechanism of Trichodermapepsin induction in *Trichoderma reesei*; セルラーゼ研究会第 31 回大会（佐久平プラザ 21），2017 年 7 月
72. 平沢大樹，高橋圭太郎，会田広樹，志田洋介，小笠原渉：糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるセロビオース応答性セルラーゼ生産制御；セルラーゼ研究会第 31 回大会（佐久平プラザ 21），2017 年 7 月
73. 大川欣英，平沢大樹，志田洋介，小笠原渉：*Trichoderma reesei* におけるキシラナーゼ生産に関わるプロテインキナーゼの同定；セルラーゼ研究会第 31 回大会（佐久平プラザ 21），2017 年 7 月
74. 北原雪菜，吉澤和将，谷口大樹，古川隆紀，志田洋介，小笠原渉：糸状菌 *Trichoderma reesei* における膜タンパク質 Crt1 によるセルラーゼ誘導機構；第 12 回トランスポーター研究会年会（東北大学片平キャンパスさくらホール），2017 年 7 月
75. 北原雪菜，吉澤和将，谷口大樹，藤原南帆，田原伸悟，古川隆紀，志田洋介，小笠原渉：糸状菌 *Trichoderma reesei* の生き様への理解；第 2 回高専サミット（沖縄高専），2017 年 9 月

76. Hiroki Hirasawa, Keitaro Takahashi, Hiroki Aita, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Cellobiose-dependent Cellulase Production Mechanism in Filamentous Fungi *Trichoderma reesei*; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2017年10月
77. Nayani D. Daranagama, Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Haruna Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Contribution of Transcription Factors to Protease Regulation in *Trichoderma reesei*; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2017年10月
78. Yoshihide Ohkawa, Hiroki Hirasawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Identification of the Protein Kinase Contributes to Xylanase Production in *Trichoderma reesei*; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2017年10月
79. Daichi Okayama, Hiroki Hirasawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Analysis of the nitrogen-responsive transcription factor in filamentous fungus *Trichoderma reesei*; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2017年10月
80. Nguyen Le Quynh Anh, Minaho Fujiwara, Nobuhito Nango, Yosuke Shida, Masako Osumi, Wataru Ogasawara: The nuclear dynamics in cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2017年10月
81. Kazuya Otani, Yukina Kitahara, Yosuke Shida, and Wataru Ogasawara: Analysis of Putative Sugar Transporter Tr67752 by Global Analysis of Transporter in *Trichoderma reesei*; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2017年10月
82. Nguyen Le Quynh Anh, Minaho Fujiwara, Nobuhito Nango, Yosuke Shida, Masako Osumi, Wataru Ogasawara: Education of the relationship between nuclear dynamics and cellulose productivity in filamentous fungus *Trichoderma reesei*; 2017 2nd STI-Gigaku (長岡技術科学大学), 2017年10月
83. Nayani D. Daranagama, Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Haruna Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: The involvement of transcription factors for protease induction in *Trichoderma reesei*; 2017 2nd STI-Gigaku (長岡技術科学大学), 2017年10月
84. Yukina Kitahara, Kazumasa Yoshizawa, Hiroki Taniguchi, Takanori Furukawa, Yoshuke Shida, Wataru Ogasawara: Functional analysis of C-terminal tail of putative transceptor Crt1 involved in lignocellulase production in *Trichoderma reesei*; 2017 2nd STI-Gigaku (長岡技術科学大学), 2017年10月
85. 大谷和也: *Trichoderma reesei*におけるによる二糖トランスポーターの網羅的解析; 第10回北陸合同バイオシンポジウム (富山県立大学), 2017年11月
86. 鈴木義之, Nayani Daranagama, 志田洋介, 森一樹, 油谷幸代, 小笠原渉: 糸状菌 *Trichoderma reesei* における分泌プロテアーゼの生産応答機構の解析; 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス (佐賀市立東与賀文化ホール), 2017年11月
87. 佐藤直美, 鈴木義之, 志田洋介, 小笠原渉: 比較ゲノム解析のための *Trichoderma reesei* のセルラーゼ生産性変異株の取得と解析; 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス (佐賀市立東与賀文化ホール), 2017年11月
88. NGUYEN LE QUYNH ANH, 藤原南帆, 志田洋介, 小笠原渉: *Trichoderma reesei* における核挙動とセルラーゼ生産性との相関の解明; 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス (佐賀市立東与賀文化ホール), 2017年11月
89. 志田洋介, 北原雪菜, 森一樹, 油谷幸代, 小笠原渉: 糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるトランセプター CRT1 の機能解析; 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス (佐賀市立東与賀文化ホール), 2017年11月

90. 乾将行：未利用バイオマスから 100%グリーンジェット燃料の生産；第 4 回 GOJO 大学（五條市中央公民館），2017 年 6 月
91. 乾将行：低炭素社会の実現を目指したバイオ燃料・グリーン化学品生産技術の開発；第 93 回バイオマス利用研究会（京都高度技術研究所），2017 年 7 月
92. 乾将行：グリーン化学品・バイオ燃料の生産技術開発と実用化；第 5 回奈良まほろば産学官連携懇話会（奈良先端科学技術大学院大学），2017 年 9 月
93. 乾将行：低炭素社会の実現を目指したバイオリファイナリー生産技術の開発；高分子学会 17-2 エコマテリアル研究会（京都工芸繊維大学），2017 年 10 月
94. 乾将行，平賀和三，須田雅子，豊田晃一，久保田健：コリネ菌を用いた有用芳香族化合物の生産性向上による代謝解析技術の有効性検証；BioJapan 2017（パシフィコ横浜），2017 年 10 月
95. 乾将行：低炭素社会の実現を目指したバイオリファイナリー生産技術の開発；RITE 革新的環境技術シンポジウム 2017（東京大学），2017 年 12 月
96. 中川明，佐藤文彦，片山高嶺，南博道 「創薬研究を目指したベンジルイソキノリンアルカロイドの大腸菌を用いた生産系の構築」日本生物工学会 2017 年度大会（早稲田大学、東京）、2017 年 9 月
97. Akira Nakagawa. Alkaloid production using an engineered *Escherichia coli*. 19th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology, (Rostock, Germany) 2017 年 9 月
98. 南博道 「微生物発酵法による生薬生理活性物質生産」BioJapan2017（パシフィコ横浜、横浜）、2017 年 10 月
99. 中川明，松村栄太郎，小柳喬，片山高嶺，山本憲二，佐藤文彦，南博道 「大腸菌を用いた単純な炭素源からのモルヒネ発酵生産系の構築」日本分子生物学会 2017 年度大会（神戸ポートアイランド、神戸）2017 年 12 月
100. 石井純，森田啓介，伊田賢吾，加藤寛子，木下翔平，旗谷章子，清水浩，近藤昭彦，松田史生「出芽酵母における代謝経路デザインと高級アルコール生産」第 3 回デザイン生命工学研究会，2018 年 3 月 9-10 日，今帰仁村コミュニティセンター
101. Daisuke Umeno, Directed evolution of carotenoid and terpenoid biosynthetic pathways., The 9th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products, 2017 年 5 月 30 日～6 月 4 日，Lake Arrowhead, CA
102. 梅野太輔「カロテノイド生合成経路の進化能の探索」，第 81 回植物学会シンポジウム，2017 年 9 月 8 日，東京理科大学
103. 梅野太輔「テルペノイド生合成経路の兵站体系を再検討する」，第 69 回生物工学会シンポジウム，2017 年 9 月 13 日
104. 李伶，古林真衣子，河合繁子，眞岡孝至，斎藤恭一，梅野太輔「カロテノイド生合成におけるリコペルセン経路の構築」，カロテノイド研究談話会，2017 年 9 月 17 日，京都薬科大
105. Daisuke Umeno, Directed evolution of carotenoid and terpenoid biosynthetic pathways., The 1st Chiba-Japan Symposium on Natural Product Biosynthesis, 2017 年 10 月 2 日～3 日，上海日航ホテル
106. 佐伯和哉，湯本達也，小林一幾，木村友紀，梅野太輔，「遺伝子制御ネットワークのコンパクト化技術」，細菌の構造と代謝の根幹解析研究会，2017 年 10 月 20 日，三島遺伝学研究所
107. Shigeko Kawai-Noma, Kazuya Saeki, Tatsuya Umoto, Kyoichi Saito, and Daisuke Umeno, “Identification and assembly of genes that boost the genomic incorporation of mutagenic nucleoside for the development of highly-efficient negative selection platform”, 2nd Symposium of Chiral Molecular Science and Technology, 2018 年 1 月 11-12 日，千葉大学

108. 梅野太輔, センサーと制御ネットワークの進化デザイン, 第3回産学連携・分子組織シンポジウム, 2018年1月20日, 九州大学医学系キャンパス
109. 木村友紀, 湯本達也, 栗原健人, 渡邊荘爾, 小林一幾, 佐伯和哉, 梅野太輔, 「情報処理機能の実験室内「創発」, 生命の起源および進化学会第43回学術講演会, 2018年3月15~17日, 埼玉大学
110. 梅野太輔, 非天然トリテルペノイド生合成の進化成成生物学, 日本農芸化学会2018年大会シンポジウム, 名城大学
111. 寺井悟朗, 高橋俊介, 中村朋美, 柘植謙爾, 石井純, 浅井潔; Combi-OGAB法を利用した最適コドンの探索; 日本農芸化学会2018年度大会; 名城大学 天白キャンパス, 2018年3月
112. 風間春香, 岡由佳, 小林鈴花, 荒学志, 山崎晴丈, 志田洋介, 小笠原涉, 矢追克郎, 森一樹, 油谷幸代, 荒木秀雄, 高久洋暁: 赤色油脂酵母 *Rhodospiridium toruloides* の油脂高蓄積変異株の取得及びその油脂蓄積性の解析; 日本農芸化学会2018年度大会(名城大学)平成30年3月
113. 春日琴葉, 海老名紗也佳, 荒学志, 山崎晴丈, 志田洋介, 小笠原涉, 矢追克郎, 森一樹, 油谷幸代, 荒木秀雄, 高久洋暁: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂超高蓄積変異株の取得及び油脂蓄積重要遺伝子の同定; 日本農芸化学会2018年度大会(名城大学)平成30年3月
114. Khanh Pham Dung, Atsushi Miyata, Yosuke Shida, Harutake Yamazaki, Kazuo Masaki, Kazuki Mori, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara, Wataru Ogasawara: Analysis of carotenoid production in the yeast *Rhodospiridium toruloides* by light response; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学)平成29年10月
115. Kota Oshiro, Takanobu Iwamoto, Takeru Takamizawa, Yoshiyuki Suzuki, Harutake Yamazaki Hiroaki Takaku, Yosuke Shida, and Wataru Ogasawara: Comparison of Transformation Method in *Rhodospiridium toruloides*; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学)平成29年10月
116. KhanhPham Dung, Atsushi Miyata, Yosuke Shida, Harutake Yamazaki, Kazuo Masaki, Kazuki Mori, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara, Wataru Ogasawara: Analysis of light response mechanisms in carotenoid synthesis of the yeast *Rhodospiridium toruloides*; 第69回日本生物工学会大会(早稲田大学)平成29年9月
117. Khanh Dung Pham, Yosuke Shida, Harutake Yamazaki, Kazuki Mori, Sachiyo Aburatani, Kasuke Tashiro, Satoru Kuhara, Hiroaki Takaku, Wataru Ogasawara: Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild type and hyper carotenoid strains of the yeast *Rhodospiridium toruloides*; 第12回日本ゲノム微生物学会年会(京都大学)平成30年3月
118. 酒井里佳子, 荒学志, 山崎晴丈, 志田洋介, 小笠原涉, 矢追克郎, 荒木秀雄, 高久洋暁: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂低蓄積変異株の取得及びその油脂蓄積性の解析; 日本農芸化学会2018年度大会(名城大学)平成30年3月
119. 宮島温美, 荒学志, 山崎晴丈, 志田洋介, 小笠原涉, 矢追克郎, 荒木秀雄, 高久洋暁: 脂質工学への展開を視野に入れた油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の簡易的形質転換系の開発; 日本農芸化学会2018年度大会(名城大学)平成30年3月
120. 厨祐喜, 大山彰, 荒木通啓: 大腸菌による有用物質生産の改善のためのコアモデル; 第69回日本生物工学会大会(早稲田大学西早稲田キャンパス), 2017年9月(ポスター)
121. Yuki Kuriya, Akira Ohyama, Michihiro Araki.: Construction of metabolic model using genomic sequence and reaction database for improving valuable chemical productions by microorganisms; IIBMP2017(北海道大学札幌キャンパス), 2017年9月(ポスター)
122. 村田昌浩, 藤花佐依子, 小川哲平, 荒木通啓: 新規代謝経路の設計・最適化手法の開発 / 反応機構推定に

- 基づく酵素選択 ; BioJapen2017 (パシフィコ横浜) , 2017 年 10 月 (展示 : ポスター)
123. 厨祐喜, 大山彰, 荒木通啓 : 代謝モデル構築・解析技術の開発と実用微生物への技術展開 ; BioJapen2017 (パシフィコ横浜) , 2017 年 10 月 (展示 : ポスター)
 124. 厨祐喜, 大山彰, 荒木通啓 : ゲノム配列および反応データベースを用いた有用物質生産の主要バクテリア宿主の代謝モデル構築 ; 第 12 回日本ゲノム微生物学会年会 (京都大学桂キャンパス) , 2018 年 3 月 (口頭)
 125. 厨祐喜, 大山彰, 荒木通啓 : 微生物による有用物質生産の改善に資する代謝モデルの反応データベースおよび配列データからの自動構築 ; 日本農芸化学会 2018 年度大会 (名城大学天白キャンパス) , 2018 年 3 月 (口頭)
- <2018 年度>
126. 三谷恭雄, 野田尚宏, 菅野学, 情報解析に適したゲノム・トランスクリプトーム解析技術開発、第 20 回新産業技術促進検討会、2018 年 7 月
 127. 菅野学, 三谷恭雄, 野田尚宏, 木村信忠, 田村具博、ロングリード RNA-seq が明らかとするバクテリアオペロンの発現実態～二次代謝産物合成遺伝子群のオペロンバリエーションを捉える～、第 70 回日本生物工学会大会 (関西大学千里山キャンパス)、2018 年 9 月
 128. 寺井悟朗, 高橋俊介, 中村朋美, 柘植謙爾, 石井純, 浅井潔, DNA シャッフリングを利用した出芽酵母におけるコドン最適化ルールの抽出、第 41 回日本分子生物学会年会 ; パシフィコ横浜、2018 年 11 月
 129. 富永大介, 川口秀夫, 堀良美, 蓮沼誠久, 荻野千秋, 油谷幸代, 二次代謝系の動的特性解析における大過剰化合物測定の有無の影響の数理解析、第 70 回日本生物工学会大会, 吹田市, (2018).
 130. 富永大介, 川口秀夫, 堀良美, 蓮沼誠久, 荻野千秋, 細菌の二次代謝系の動的特性解析における大過剰分子測定の影響、第 62 回日本薬学会関東支部大会, 中野区, (2018)
 131. 富永大介, 代謝系の動的特性解析のための速度モデルにおける大過剰化合物の有無の影響、生命医薬情報学連合大会 IIBMP2018, 鶴岡, (2018)
 132. Tominaga, D. Kawaguchi H. Hori Y. Hasunuma T. Ogino C. Consideration of excessive metabolites on dynamical analysis of bacterial secondary metabolic pathways, CBI 学会 2018 年大会, 江戸川区, (2018)
 133. 富永大介, 川口秀夫, 堀良美, 蓮沼誠久, 荻野千秋, 代謝系の動的挙動のモデリングにおける大過剰化合物測定の有無の影響の数理解析、第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜市, (2018)
 134. 田島直幸, 北川航, 齋藤裕, 西宮佳志, 玉野孝一, 安武義晃, 田村具博, 亀田倫史。放線菌ロドコッカス属における遺伝子配列改変による発現調節手法の開発、第 41 回日本分子生物学会年会、018 年 11 月
 135. 田島直幸, 北川航, 齋藤裕, 西宮佳志, 玉野孝一, 安武義晃, 田村具博, 亀田倫史, *Rhodococcus erythropolis* を用いた遺伝子配列変換によるタンパク質発現調節法の開発、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019 年 3 月
 136. 池部仁善, 小森彩, 鈴木宗典, 亀田倫史, REDUCTION OF ENZYME-LIGAND DOCKING STRUCTURES WITH MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION USING ADAPTIVE LAMBDA SQUARE DYNAMICS METHOD, 63rd annual meeting of the biophysical society 2019 年 3 月
 137. 佐藤里佳子, 阿部紗也, 荒学志, 山崎晴丈, 志田洋介, 小笠原涉, 矢追克郎, 森一樹, 油谷幸代, 荒木秀雄, 田代康介, 高久洋暁, 「油脂酵母 *Lipomyce starkeyi* 油脂低蓄積変異株の原因遺伝子の同定と解析」2019 年 3 月、日本農芸化学会
 138. 鈴木義之, Nayani Daranagama, 志田洋介, 森一樹, 油谷幸代, 小笠原涉, 「糸状菌 *Trichoderma reesei* における分泌プロテアーゼの発現制御機構の解析」2019 年 3 月、日本農芸化学会
 139. 蓮沼誠久, 動的メタボロミクスの開発とスマートセルインダストリーへの展開, 第 13 回アジレントメタボロミクスセミナー2018, 東京, 2018. 7. 25

140. 蓮沼誠久, 酵母の代謝解析の最新知見と化粧品原料への応用, 第 70 回日本生物工学会 SK-II ランチョンセミナー, 大阪, 2018.9.7
141. 蓮沼誠久, スマートセル創出プラットフォームに資するメタボローム解析技術の開発第 70 回日本生物工学会大会シンポジウム「スマートセル開発のためのバイオ技術とデジタル技術の革新と融合」, 大阪, 2018.9.7
142. 蓮沼誠久, 先端バイオ工学研究センターについて, iBioK 第 8 回合成生物学シンポジウム, 神戸, 2018.9.26
143. 蓮沼誠久, 次世代型微生物育種に資するスマートセル創出プラットフォームの開発, BioJapan2018「バイオ×デジタルで加速するスマートセルインダストリー/我が国の新しいバイオ政策とスマートセルインダストリーの実現に向けて」, 横浜, 2018.10.10
144. Hasunuma, T. Development of "smart cell" construction platform for next-generation microbial breeding, Kyoto Univ. Clock Tower Centennial Hall, Kyoto, 2018.11.19
145. Hasunuma, T. Platform technologies for development of smart cell, 1st Asia Synthetic Biology Association, Korea, 2018.11.23
146. 蓮沼誠久, スマートセル創出プラットフォームの構築と実証に向けて, 関西スマートセルフォーラム 2018「スマートセルを巡る最新技術動向」, 大阪, 2019.1.30
147. Fujito, Y., Hori, Y., Mochizuki, M., Yoshida, T., Hasunuma, T., Hayakawa, Y., Development of online SFE-LC/MS system for analysis of metabolites in microbial cells, 66th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, USA, 2018.6.3-7
148. 高橋俊介、柘植謙爾、近藤昭彦、第二世代 OGAB 法に適した、新規二本鎖 DNA 合成法の開発、2018 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議（熱海）、2018 年 8 月 31 日（ポスター発表）
149. 崎濱由梨、柘植謙爾、近藤昭彦、大腸菌シキミ酸シャーシ株の構築、第二世代 OGAB 法に適した、新規二本鎖 DNA 合成法の開発、2018 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議（熱海）、2018 年 8 月 31 日
150. 高橋俊介、柘植謙爾、近藤昭彦、第二世代 OGAB 法に適した、新規二本鎖 DNA 合成法の開発、2018 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議（熱海）、2018 年 9 月 1 日（口頭発表）
151. 柘植謙爾、大規模な代謝経路をデザインすることへの挑戦、第 70 回日本生物工学会大会（吹田）、2018 年 9 月 7 日
152. 柘植謙爾、長鎖 DNA 合成自動化に向けたトータルシステムの構築、第 8 回合成生物学シンポジウム（神戸）、2018 年 9 月 26 日
153. Kenji TSUGE, Synthesis of Long DNA up to 100 kb by 2nd Generation OGAB Method, The 1st Asia Synthetic Biology Association 2018 (Jeju), 2018. 11. 23
154. Kenji Tsuge, Long DNA Foundry at Kobe University. The 10th International Symposium of Innovative BioProduction Kobe (Kobe), 2019. 1. 25
155. Shunsuke TAKAHASHI, Kenji TSUGE, Akihiko KONDO, A new method for procuring synthetic DNA fragments, suitable for constructing long DNA sequences, The 10th International Symposium of Innovative BioProduction Kobe (Kobe), 2019. 1. 25
156. 柘植謙爾、高橋俊介、近藤昭彦、長鎖 DNA 合成ファウンドリー、第 4 回デザイン生命工学研究会（東京）、2019 年 3 月 8 日
157. 高橋俊介、柘植謙爾、近藤昭彦、長鎖 DNA の構築に適した、新規人工 DNA 合成法の開発、第 4 回デザイン生命工学研究会（東京）、2019 年 3 月 8 日
158. 柘植謙爾、正確で迅速な長鎖 DNA 合成、日本農芸化学会 2019 年度大会（東京）、2019 年 3 月 26 日
159. 石井純「物質生産宿主としての酵母の代謝経路改変とゲノム改変に向けた合成生物工学的手法開発」第 70 回日本生物工学会大会シンポジウム（関西大学 千里山キャンパス）平成 30 年 9 月

160. Ishii J, Tabata T, Nakamura Y, Kondo A. Yeast-based in vivo metabolite sensor using signal transduction machinery. The 1st International Symposium of the Asian Synthetic Biology Association (ASBA 2018). 2018, Nov, Hyatt Regency Jeju, Jeju Island, Republic of Korea
161. 情報処理機能の「創発」と生合成工学への応用. 梅野太輔:細胞を創る研究会 (10/17-18/2018, 東北大)
162. タンパク質「センサ機能」の創発と集積化原理. 梅野太輔:学術振興会 151 委員会 (9/28/2018, 和光理研)
163. 二次代謝経路の一次代謝化のための代謝物応答センサの製作技術:梅野太輔:新学術領域研究「生合成リデザイン」第4回公開シンポジウム (5/26/2017 北海道大学)
164. センサと制御回路の「生まれ方」:梅野太輔:理化学研究所物質改階層原理研究&ヘテロ界面研究合同春合宿 (05/12/2018、熱海)
165. 厨祐喜, 大山彰, 荒木通啓: 微生物による有用物質生産に資する代謝モデルの実験データを用いた妥当性検証と予測精度の改善. 第70回日本生物工学会大会, (関西大学千里山キャンパス), 2018年9月(口頭発表)
166. Yuki Kuriya, Akira Ohyama, Tomokazu Shirai, Michihiro Araki: Validation and prediction accuracy improvement with experimental data on reconstructed metabolic model for bioproductions. ECCB2018, Athens, September 2018 (Poster presentation).
167. Yuki Kuriya, Akira Ohyama, Tomokazu Shirai, Michihiro Araki: Improvement of prediction accuracy by metabolic model using experimental data to improve microbial production of valuable chemicals. IIBMP2018, Tsuruoka, September 2018 (Poster presentation: Japanese).
168. 厨祐喜, 大山彰, 荒木通啓: 配列データおよび反応データベースを用いた微生物代謝モデルの自動構築・ツールについて. トーゴーの日シンポジウム 2018, (日本科学未来館), 2018年10月(ポスター発表)
169. 村田昌浩, 藤花佐依子, 荒木通啓: 新規代謝経路の設計・最適化手法の開発 / 反応機構推定に基づく酵素選択; BioJapen2018 (パシフィコ横浜), 2018年10月(展示:ポスター)
170. 厨祐喜, 大山彰, 白井智量, 荒木通啓: 代謝モデル構築・解析技術の開発と実用微生物への技術展開; BioJapen2018 (パシフィコ横浜), 2018年10月(展示:ポスター)
171. 厨祐喜, 大山彰, 白井智量, 荒木通啓. 代謝モデルの構築における補酵素および反応熱力学に関する修正・制約の妥当性および汎用性. 第41回日本分子生物学会年会, (パシフィコ横浜), 2018年11月(ポスター発表)
172. 厨祐喜, 大山彰, 白井智量, 荒木通啓: 疑似的な dFBA を用いた微生物による有用物質生産の改善方策とその有効性の検証. 日本農芸化学会 2019 年度大会 (東京農業大学世田谷キャンパス), 2019 年 3 月 (口頭)
173. 小笠原渉: 糸状菌を用いた有用タンパク質同時生産制御; モノづくり日本会議 第20回新産業技術促進技術検討会「バイオで切り拓くモノづくりの新潮流～スマートセル創出プラットフォームの構築と実証～」(東京), 2018年7月
174. 志田洋介: 糸状菌のスマートセル化に向けた研究開発; 新科学技術推進協会 ライフサイエンス技術部会 反応分科会 講演会「スマートセルインダストリー創出に向けた技術開発」(東京) 2019年1月
175. 鈴木義之, 佐藤直美, 内山拓, 尾崎克也, 小林良則, 掛下大視, 五十嵐一暁, 田代康介, 森一樹, 油谷幸代, 志田洋介, 小笠原渉: *Trichoderma reesei* の新規糖質加水分解酵素発現制御因子の同定; 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス(長岡) 2018年11月15日
176. 鈴木義之, 佐藤直美, 志田洋介, 小笠原渉, 内山拓, 小林良則, 掛下大視, 五十嵐一暁, 森和樹, 油谷幸代: 工業用酵素生産 *Trichoderma reesei* の開発; 第32回セルラーゼ研究会(長野), 2018年7月
177. 小島基, 小森彩, 鈴木宗典, 中村克哉: 植物 P450 発現大腸菌を用いたモノテルペノイド変換の条件最適化; 第70回日本生物工学会大会(大阪), 2018年9月

178. 仲谷豪、嘉悦佳子、仲島菜々実、山田佑樹、野口祐司、曾田匡洋、劉曉麗. 糖からの直接発酵を目指したエルゴチオネイン高生産放線菌の開発、第70回日本生物工学会大会、2018年9月5日-7日.
179. 仲谷豪、嘉悦佳子、仲島菜々実、野口祐司、石井伸佳、厨祐喜、白井智量、荒木通啓、曾田匡洋. エルゴチオネイン発酵法開発におけるヒスチジン合成制御系の解除と代謝モデルの活用、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019年3月24日-27日
180. 野口祐司、嘉悦佳子、仲島菜々実、仲谷豪、菅野学、三谷恭雄、木村信忠、曾田匡洋. 放線菌物質生産条件における RNA-Seq 解析とエルゴチオネイン生産株をモデルとした有効性の検証、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019年3月24日-27日.
181. 乾将行, 炭素循環社会の実現を目指したバイオ燃料・グリーン化学品生産, 先端シーズフォーラム [バイオマス利用研究の大海を未来に向けて進む舟], 大阪科学技術センター, 2018年2月
182. 乾将行, 高機能化コリネ型細菌によるバイオリファイナリー技術の創製, 日本農芸化学会 2018 年度大会シンポジウム [Super cell-factory, *Corynebacterium glutamicum* の最新基盤研究と新たな物質生産システムへの展望], 名城大学, 2018年3月
183. 乾将行, 炭素循環社会の実現を目指したバイオリファイナリー生産技術の開発, 長瀬産業(株) ナガセ R&D センター, 2018年7月
184. 乾将行, 炭素循環社会の実現を目指したバイオリファイナリー生産技術の開発, 未来社会を支える温暖化対策技術シンポジウム in 関西, 大阪科学技術センター, 2018年9月
185. 乾将行, 持続可能な社会の実現を目指したグリーンバイオプロセスの開発, 革新的環境技術シンポジウム 2018, 東京大学 伊藤謝恩ホール, 2018年12月
186. 久保亜希子, 大段光司, 眞岡孝至, 佐原健彦, 矢追克郎, 竹村美保, 三沢典彦, 栗木隆: 大腸菌における Antheraxanthin および Violaxanthin 合成に関する検討; 第36回植物細胞分子生物学会大会(金沢), 2018年8月
187. 竹村美保, 久保亜希子, 大段光司, 眞岡孝至, 佐原健彦, 矢追克郎, 三沢典彦: 大腸菌による violaxanthin の生産; 日本農芸化学会 2019 年度大会(東京), 2019年3月(口頭)
188. 下出早貴, 宮田佳奈, 島田裕士, 竹村美保, 三沢典彦, 新藤一敏: 組換え大腸菌によるゼアキササンチン代謝物としての新規カロテノイド生産; 日本農芸化学会 2019 年度大会(東京), 2019年3月(口頭)
189. 高久洋暁: 機能的油脂生産へ向けた油脂酵母の改良; モノづくり日本会議 第20回新産業技術促進技術検討会「バイオで切り拓くモノづくりの新潮流～スマートセル創出プラットフォームの構築と実証～」(東京), 2018年7月
190. 高久洋暁: 油脂酵母を肥満へと導くスマートな戦略とは? ; 第22回 酵母合同シンポジウム(福岡), 2018年9月
191. 風間春香, 小林鈴花, 荒学志, 山崎晴丈, 志田洋介, 小笠原涉, 矢追 郎, 森一樹, 油谷幸代, 荒木秀雄, 高久洋暁: 遺伝子発現解析による油脂酵母の油脂高蓄積重要遺伝子の同定; 日本農芸化学会 2019 年大会(東京), 2019年3月
192. 小林鈴花, 荒学志, 山崎晴丈, 吉田崇伸, 志田洋介, 小笠原涉, 矢追克郎, 荒木秀雄, 蓮沼 誠久, 高久洋暁: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* のアシル CoA 合成酵素の高発現による油脂生産性の向上; 日本農芸化学会 2019 年大会(東京), 2019年3月
193. 小林彩子, 小林鈴花, 荒学志, 山崎晴丈, 吉田崇伸, 志田洋介, 小笠原涉, 矢追克郎, 荒木秀雄, 蓮沼誠久, 高久洋暁: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の中性脂質合成酵素の高発現による油脂生産性の向上; 日本農芸化学会 2019 年大会(東京), 2019年3月
194. 酒井里佳子, 阿部紗也, 荒学志, 山崎晴丈, 志田洋介, 小笠原涉, 矢追克郎, 森一樹, 油谷幸代, 荒木秀雄,

- 田代康介、高久洋暁：油脂低蓄積変異株の原因遺伝子の同定と解析；日本農芸化学会 2019 年大会（東京），2019 年 3 月
195. 高久洋暁、小笠原渉、矢追克郎、油谷幸代、荒木秀雄、田代康介、蓮沼誠久、山崎晴丈：油脂生産性の飛躍的向上を目指した油脂酵母の改良；日本農芸化学会 2019 年大会（東京），2019 年 3 月
196. 岩本孝信、高見沢健留、Pham Khanh Dung、志田洋介、荒学志、山崎晴丈、高久洋暁、小笠原渉：油脂生産酵母 *Rhodospiridium toruloides* の炭素源応答解析；第 70 回日本生物工学会大会（大阪），2018 年 9 月
197. 高見沢健留、Pham Khanh Dung、志田洋介、山崎晴丈、森和樹、田代康介、久原哲、高久洋暁、小笠原渉：*Rhodospiridium toruloides* のカロテノイド生産制御機構の解析；第 11 回北陸合同バイオシンポジウム（石川），2018 年 10 月中川明、南博道「生合成工学によるオピオイド発酵生産」細胞を創る研究会 11.0（東北大学サイエンスキャンパスホール、仙台）、2018 年 10 月
198. 中川明、南博道「生合成工学によるオピオイド発酵生産」細胞を創る研究会 11.0（東北大学サイエンスキャンパスホール、仙台）、2018 年 10 月
199. 中川明、南博道「生合成工学による植物アルカロイド発酵生産」第 7 回植物二次代謝フロンティア研究会（アヤハレークサイドホテル、滋賀県）、2018 年 12 月
200. 金達英、土金恵子、宮澤せいは、細山哲、中川明、南博道、白井智量、川崎浩子「大腸菌による植物アルカロイド生産を題材とした人工代謝経路の実証」日本農芸化学会 2019 年度大会（東京農業大学、東京）、2019 年 3 月
- <2019 年度>
201. Hasunuma, T. Metabolomics-based engineering for bio-production, Asian Synthetic Biology Association (ASBA) 2019, Chengdu, China, 2019.10.27
202. Hasunuma, T. Metabolomics-based engineering for smart cell development, Metabolic Engineering Summit 2019, Tianjin, China, 2019.10.22
203. 蓮沼誠久, バイオ×デジタルによるスマートセル開発への挑戦, BioJapan 2019 JST ALCA シンポジウム, 2019.10.10
204. Hasunuma, T. Smart cell development based on high throughput technology, advanced analysis and computational science for bio-production in microorganisms, The 14th Asian Congress on Biotechnology (ACB), Tamsui Fisherman's Warf, Taiwan, 2019.7.3
205. 蓮沼誠久, スマートセル創出プラットフォーム構築へ向けた挑戦, 日本生物工学会 第 6 回 SBJ シンポジウム「超スマート社会 (Society 5.0) の実現に向けた『生物工学』の挑戦!!」, 大阪, 2019.5.24
206. 蓮沼誠久, スマートセルインダストリーに資するハイスループット微生物構築・評価技術の開発, 日本農芸化学会 2020 年度大会シンポジウム, 九州大学, 2020 年 3 月
207. 柘植謙爾, Development of total system for long-chain DNA synthesis by OGAB method. ASBA2019, 成都(2019)
208. 柘植謙爾, Long chain DNA foundry at Kobe University. 2019 GENOME PROJECT WRITE AND 8TH ANNUAL SC2.0 MEETING、ニューヨーク大、(2019)
209. 高橋俊介, 柘植謙爾, 近藤昭彦, 新規人工 DNA 断片合成法の開発, 第 42 回分生物学会年会, 博多, (2019)
210. 柘植謙爾, Long chain DNA biofoundry at Kobe University, 第 5 回デザイン生命工学研究会, OIST, (2020)
211. 梅野太輔, 進化学による未踏カロテノイド空間の探索, IFIA Japan (2019 年 5 月 23 日, 東京ビックサイト)
212. 梅野太輔, 二次代謝経路の一次代謝化による稀少機能分子の高効率生産系, 新学術公開シンポジウム (2019 年 5 月 27 日, 北里大学)

213. 梅野太輔, タンパク質センサ機能の創発と集積化原理, 日本分析化学会シンポジウム (2019年9月13日, 千葉大学)
214. Mei Nonoshita, Yuki Kimura, Yusuke Otani, Shigeko Kawai-Noma, Daisuke Umeno, Evolutionary Engineering of Opioid Biosynthetic Pathways., The 3rd Molecular Chirality Research Center Symposium (2020年3月4日, 千葉大学)
215. 野々下芽以, 木村友紀, 大谷悠介, 小林一幾, 中川明, 南博道, 河合繁子, 梅野太輔, 合成酵素を分子認識素子とするアルカロイドセンサの開発, 日本化学会 (2019年9月13日, 千葉大学)
216. Ishii J, Tabata T, Nakamura T, Kato H, Asama R, Nakamura Y, Kondo A. Construction of metabolite sensor using yeast signal transduction machinery for monitoring melatonin production. The 10th Symposium on Innovative BioProduction Taichung (iBioT2019). 2019, Nov 7-9, Tunghai University, Taichung, Taiwan (招待講演)
217. Ishii J, Tabata T, Nakamura T, Kato H, Asama R, Nakamura Y, Kondo A. Construction of melatonin metabolite sensor using yeast signal transduction machinery. Asian Synthetic Biology Association 2019 (ASBA 2019). 2019, Oct 26-30, JW Marriott Hotel Chengdu, Chengdu, China (招待講演)
218. 石井 純「合成生物学とバイオエコノミー -神戸大学における研究紹介-」第5回 Laboratory Automation 勉強会, 2019年10月19日, 神戸大学百年記念館 六甲ホール (招待講演)
219. 石井 純「大腸菌・酵母の半自動形質転換システムとハイスループット生産性評価」第92回日本生化学会大会 (シンポジウム「実験自動化の今」), 2019年9月18-20日, パシフィコ横浜 (招待講演)
220. 富永将大, 小川ひろ, 能崎健太, 近藤昭彦, 石井 純「新規な3機能性融合マーカーを用いた酵母遺伝子スイッチの組織的開発」日本農芸化学会関西支部 支部例会 (第511回講演会), 2019年12月7日, 神戸大学 六甲台キャンパス
221. 能崎健太, 富永将大, 梅野太輔, 近藤昭彦, 石井 純「進化デザインによる新規テルペノイドセンサの開発」日本農芸化学会関西支部 支部例会 (第511回講演会), 2019年12月7日, 神戸大学 六甲台キャンパス (優秀発表賞)
222. 浅間梨々花, 田畑琢也, 中村泰之, 中村朋美, 加藤寛子, 近藤昭彦, 石井 純「メラトニン生産性を簡便かつハイスループットに評価するメタボライトセンサの開発」日本農芸化学会関西支部 支部例会 (第511回講演会), 2019年12月7日, 神戸大学 六甲台キャンパス
223. 能崎健太, 富永将大, 梅野太輔, 近藤昭彦, 石井 純「陽性/陰性選択マーカーと蛍光タンパク質から成る3機能性新規融合タンパク質を用いた酵母遺伝子スイッチの開発」第71回日本生物工学会大会, 2019年9月16-18日, 岡山大学 津島キャンパス
224. 堀川拓真, 伊藤洋一郎, 石井 純, 近藤昭彦 「分泌タンパク質精製のハイスループット自動化」生物学若手研究者の集い 夏のセミナー2019, 2019年7月20-21日, 琵琶湖国定公園 近江白浜 政府登録旅館 白浜荘
225. 浅間梨々花, 田畑琢也, 中村泰之, 加藤寛子, 近藤昭彦, 石井 純「メラトニン発酵生産性を簡便に評価する酵母メタボライトセンサの開発」生物学若手研究者の集い 夏のセミナー2019, 2019年7月20-21日, 琵琶湖国定公園 近江白浜 政府登録旅館 白浜荘
226. 白井智量, 代謝経路設計技術の開発と実用微生物への技術展開, スマートセルプロジェクト 第二回セミナー, 2019年11月21日@東京
227. 荒木通啓 「代謝デザインのデジタル化」第6回 SBJ シンポジウム (2019.5 千里ライフサイエンスセンター, 大阪)
228. 伊藤潔人, 高生産性微生物創製に向けた AI 基盤技術, 日本生物工学会東日本支部生物学フォーラム, 2019.8

229. 梅津昂明, 濱田浩幸, 花井泰三, NADPH 利用酵素の非破壊活性測定のためのハイスループットシステムの構築, 第 26 回日本生物工学会 九州支部長崎大会, 2019. 12.
230. 渡邊直暉, 村田昌浩, 荻野千秋, 近藤昭彦, 荒木通啓 「基質酵素反応予測のための機械学習に基づく予測モデルの構築方法の探索と評価」第 71 回日本生物工学会大会 (2019. 9 岡山大学, 岡山)
231. 佐藤直美, 志田洋介, 小笠原渉, 内山 拓, 尾崎克也, 小林良則, 掛下大視, 五十嵐一暁, 田代康介, 矢追克郎, 油谷幸代, *Trichoderma reesei* における酵素生産制御因子の探索と検証; 第 33 回セルラーゼ研究会, 2019 年 8 月
232. 筥崎 悠貴, 高見沢 健留, 森 一樹, 田代康介, 油谷幸代, 山崎晴丈, 高久洋暁, 志田洋介, 小笠原 渉 マーカーサイクル法を用いた *Rhodospiridium toruloides* 二倍体株における KU70 破壊株の作出; 日本農芸化学会 2020 年大会, 2020 年 3 月
233. 乾 将行, 炭素循環社会の実現を目指したグリーンバイオプロセスの開発, 日本生物工学会 [第 6 回 SBJ シンポジウム], 千里ライフサイエンスセンター, 2019 年 5 月
234. 乾 将行, バイオエコノミーの実現を目指したグリーンバイオプロセスの開発, 高分子学会 19-2 ポリマーフロンティア 21, 東京工業大学 デジタル多目的ホール, 2019 年 6 月
235. 乾 将行, 持続可能な社会の実現を目指したバイオリファイナリー生産技術の開発, 未来社会を支える温暖化対策技術シンポジウム in 関西, 大阪科学技術センター, 2019 年 9 月
236. Masayuki Inui, The emerging green bioprocess technology to attain a carbon-free society, Innovation for Cool Earth Forum (ICEF) 6th Annual Meeting, ホテル椿山荘東京, 2019 年 10 月
237. 久保田 健, 持続可能な社会の実現を目指したバイオリファイナリー生産技術の開発, BioJapan 2019 出展者プレゼン, パシフィコ横浜, 2019 年 10 月
238. 乾 将行, バイオ化学品製造の技術開発状況と今後の展望, 蔵前工業会 [バイオマスセミナー], 東京工業大学 蔵前会館, 2019 年 10 月
239. 乾 将行, 脱炭素社会の実現を目指したバイオリファイナリー生産技術の開発, 石油学会 [新エネルギー部会 次世代バイオ燃料分科会] 勉強会, 石油学会 会議室, 2019 年 11 月
240. 乾 将行, 脱炭素社会の実現を目指したグリーンバイオプロセスの開発, 革新的環境技術シンポジウム 2019, 東京大学 伊藤謝恩ホール, 2019 年 12 月
241. 乾 将行, 脱炭素社会の実現を目指したグリーンバイオプロセスの開発, JBA“未来へのバイオ技術”勉強会 バイオの匠~未来へつなぐ技術伝承, 一般財団法人バイオインダストリー協会, 2020 年 2 月
242. 乾 将行, スマートセル創製技術を活用した芳香族化合物生産コリネ型細菌の開発, 日本農芸化学会 2020 年度大会シンポジウム, 九州大学, 2020 年 3 月
243. Akiko Kubo, Kouji Odan, Takashi Maoka, Takehiko Sahara, Katsuro Yaoi, Miho Takemura, Norihiko Misawa, Takashi Kuriki: Production of antheraxanthin and violaxanthin in *E. coli* transformed with zeaxanthin epoxidase from plants. GIM2019, Pisa, September 2018 (Poster presentation).
244. 寺澤大輝, 白井智量, 松田史夫, 油谷幸代, 荒 学志, 山崎晴丈, 志田洋介, 小笠原 渉, 矢追克郎, 荒木秀雄, 高久洋暁: フラックスバランス解析を活用した油脂酵母の油脂生産性の改良; 日本農芸化学会 2020 年大会, 2020 年 3 月
245. 風間春香, 森 一樹, 油谷幸代, 荒 学志, 山崎晴丈, 志田洋介, 小笠原 渉, 矢追克郎, 荒木秀雄, 田代康介, 高久洋暁: 比較ゲノム解析による油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の新規油脂蓄積制御因子の同定とその機能解析; 日本農芸化学会 2020 年大会, 2020 年 3 月
246. 庭山ひかる, 油谷幸代, 荒 学志, 山崎晴丈, 志田洋介, 小笠原 渉, 矢追克郎, 荒木秀雄, 高久洋暁: 情報科学を活用した油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の新規油脂生産制御因子の獲得; 日本農芸化学会 2020 年大

会, 2020年3月

247. 佐藤里佳子, 山田日向子, 森 一樹, 油谷幸代, 荒 学志, 山崎晴丈, 志田洋介, 小笠原 涉, 矢追克郎, 荒木秀雄, 田代康介, 高久洋暁: 比較ゲノム解析による油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂低蓄積原因遺伝子の同定; 日本農芸化学会 2020 年大会, 2020 年 3 月
248. 山本大雅, 荒 学志, 山崎晴丈, 志田洋介, 小笠原 涉, 矢追 克郎, 荒木秀雄, 高久洋暁: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* のトリアシルグリセロール分解酵素の機能解析; 日本農芸化学会 2020 年大会, 2020 年 3 月
249. 高久洋暁, 山崎晴丈, 小笠原 涉, 矢追克郎, 荒木秀雄, 荒木通啓, 油谷幸代: 機能性油脂生産へ向けた情報科学を利用した油脂酵母の改良; 日本農芸化学会 2020 年大会, 2020 年 3 月
250. 宮崎悠貴, 高見沢健留, 森 一樹, 田代康介, 油谷幸代, 山崎晴丈, 高久洋暁, 志田洋介, 小笠原 涉: マーカーリサイクル法を用いた *Rhodospiridium toruloides* 二倍体株における KU70 破壊株の作出; 日本農芸化学会 2020 年大会, 2020 年 3 月
251. Nakagawa A., Minami H. Morphine production using engineered *Escherichia coli*. OIST Workshop “A World of Microbiota” 2019. 7. 4
252. 三谷恭雄, 菅野 学, 野田尚宏: 情報解析に適したトランスクリプトーム解析技術開発; BioJapan 2019 (横浜), 2019 年 10 月
253. 油谷幸代, 白井智量, 荒木通啓, 亀田倫史, “スマートセル設計システムの概要”, 日本農芸化学会 2020 年大会, 2020 年 3 月
254. 亀田倫史ら, Evaluation of the protein thermal stability by molecular dynamics simulation. BPS2020 (アメリカ・サンディエゴ)
255. 亀田倫史ら, Enhancing Enzyme Function with Molecular Dynamics Simulation. BPS2020 (アメリカ・サンディエゴ)
256. 亀田倫史ら, 人工知能・分子シミュレーションを用いた蛋白質高機能化法, sbj 講演会 (大阪)
257. 亀田倫史ら, 人工知能と分子シミュレーションを用いた蛋白質高機能化法, CBI 学会 (東京)
258. 亀田倫史ら, 遺伝子配列設計による蛋白質高発現化・高機能化, NEDO 関西フェスタ (大阪)
259. 亀田倫史ら, Developing a sequence design method for increasing the expression of recombinant proteins in actinobacteria, 19th Annual PepTalk (サンディエゴ)
260. 亀田 倫史ら, Optimizing Gene Sequences for Improved Protein Expression in Industrial Microorganisms, 19th Annual PepTalk (サンディエゴ)
261. 亀田倫史ら, Evaluation of the protein thermal stability by molecular dynamics simulation. , 19th Annual PepTalk (サンディエゴ)
262. 矢追克郎, 微生物スマートセル創出プラットフォームの実用化検証, 日本農芸化学会 2020 年度大会シンポジウム, 九州大学, 2020 年 3 月
263. 谷内江 望目的遺伝子クローン単離技術の開発. NEDO フェスタ 2019 (2019/12/18), 大阪
<2020 年度>
264. 蓮沼誠久, バイオ×デジタルの技術融合による有用微生物「スマートセル」開発への挑戦, 質量分析インフォマティクス研究会・第 5 回ワークショップ, 2020.08.07
265. 蓮沼誠久, 代謝設計に資するハイスループットプラットフォームの開発による微生物スマートセルの構築, CBI 学会 2020 年大会, 2020.10.27
266. 蓮沼誠久, 微生物を利用した有用物質生産に資するスマートセル創出プラットフォームの開発, JASIS2020 ライフサイエンスイノベーションゾーン, 2020.11.11

267. 酵素とセンサの進化分子工学：梅野太輔，（2020年9月29日，千葉工大）
268. メタボライトセンサ：梅野太輔，BioJAPAN（2020年10月14日，東京ビックサイト）
269. A simple and versatile strategy to engrave information processing function on proteins.：Daisuke Umeno（2020年11月4日，大阪大学）
270. 二次代謝経路の一次代謝化技術：梅野太輔，新学術領域生合成リデザインシンポジウム（2020年11月15日）
271. センサと制御機能の「創発モード」：梅野太輔，東京大学駒場（2021年1月15日）
272. 酵素というナノ界面をつかったセンサ構築技術：梅野太輔，日本化学会シンポジウム（2021年3月21日予定）
273. 七谷 圭、増田 歩、石井 智子、伊藤 隼哉、勝部 哲、米山 裕、仲川 清隆、阿部 敬悦、効率的物質生産を実現する新規トランスポーター探索技術の開発、日本農芸化学会 2021 年度大会、2021 年 3 月 20 日、仙台（オンライン）
274. 三谷恭雄、菅野学、野田尚宏：情報解析に適したトランスクリプトーム解析技術開発；BioJapan 2020（横浜）、2020年10月
275. 蓮沼誠久，バイオプロセスにおける膜利用の現状と将来展望，第一回先端膜工学研究推進機構特定テーマフォーラム～医薬・バイオプロセスにおける膜利用の現状と将来展望～，2020.12.22
276. Hasunuma, T. Metabolomics-based engineering biology for microbial bio-production with sustainability, 2nd ASBA Webinar, 2020.12.11
277. 蓮沼誠久，ハイスループットプラットフォームの開発による微生物スマートセルの構築，CBI 学会 2020 年大会，2020.10.27
278. 蓮沼誠久，高精度メタボローム解析技術の開発，Bio Japan 2020，2020.10.15
279. 蓮沼誠久，加藤悠一，微細藻類を利用した物質生産プロセスへの LED の応用，JPC 関西特別報告会，2020.10.1
280. 蓮沼誠久，メタボローム解析の自動化に向けた挑戦，Laboratory Automation 勉強会，2020.8.29
281. 蓮沼誠久，バイオ×デジタルの技術融合による有用微生物「スマートセル」開発への挑戦，2020.8.7
282. 石井純「酵母を用いたセルフファクトリーとスマートセル創出に向けた基盤技術開発」日本化学会第 101 年會春季年會 イノベーション共創プログラム (CIP) (スマートセルインダストリーという未来)，2021 年 3 月 19-22 日，オンライン開催【招待講演】
283. 宮崎敬太，三井靖雅，旗谷章子，富永将大，近藤昭彦，石井純「酵母におけるスクアレン生合成経路の改変および下流モノオキシゲナーゼの発現調節」日本農芸化学会関西支部第 513 回講演会，2020 年 11 月 28 日，オンライン開催【優秀発表賞】
284. 浅間梨々花，中村泰之，中村朋美，近藤昭彦，石井純「ドーパミン発酵生産性を簡易的に評価する GPCR メタボライトセンサの開発」日本農芸化学会関西支部第 513 回講演会，2020 年 11 月 28 日，オンライン開催【優秀発表賞】
285. 石井純，舘野雄紀「自動分注装置を用いた微生物形質転換システムの構築」Laboratory Automation Developers Conference 2020 (LADEC2020)，2020 年 10 月 2-3 日，オンライン開催【招待講演】
286. 浅間梨々花，中村泰之，中村朋美，近藤昭彦，石井純「ドーパミン受容体を用いた酵母メタボライトセンサの開発と微生物生産評価への応用」化学工学会第 51 回秋季大会，2020 年 9 月 24-26 日，オンライン開催
287. 白井智量、日本化学会 第 101 春季年會 シンポジウム講演：人工代謝経路設計による有用化合物のバイオ生産に関する研究
288. Fuji, T., Nakazawa, S., Ito, K., “Feasible-metabolic-pathway-exploration technique using chemical latent space,” the 19th European Conference on Computational Biology (ECCB20), 2020/09

289. 伊藤潔人（日立製作所），バイオとデジタル：高生産性微生物創製に向けた AI 活用、先端バイオ工学推進機構「化学・素材・燃料分科会」第6回会合 講演会
290. 外内 尚人¹、北橋 優子¹、木村 明音¹、光山 統泰²、市川 夏子¹（¹製品評価技術基盤機構、²産業技術総合研究所）バイオ x デジタル：スマートセルプロジェクトで得られた生産性データ・オーミクスデータの DB 化 日本農芸化学会 2021 年度大会 3B04-04
291. 掛下大視、*Trichoderma* を用いたバイオマス糖化酵素開発、2021 年度日本農芸化学会大会シンポジウム、2021 年 3 月
292. 亀田倫史、人工知能・MD を用いた蛋白質高機能化、新化学技術推進協会(web)2020、12 月
293. 亀田倫史、遺伝子配列設計による蛋白質高発現化・高機能化、BioJapan2020（横浜）2020、10 月
294. 乾 将行（地球環境産業技術研究機構），バイオエコノミー社会の実現を目指したグリーンバイオプロセスの開発，未来社会を支える温暖化対策技術シンポジウム in 関西，大阪科学技術センター，2020 年 9 月
295. 久保田 健，乾 将行（地球環境産業技術研究機構），スマートセル設計システムを駆使した有用芳香族化合物生産菌の開発，BioJapan 2020 NEDO スマセルショートプレゼン，パシフィコ横浜，2020 年 10 月
296. 乾 将行（地球環境産業技術研究機構），サーキュラー・バイオエコノミーの実現を目指したグリーンバイオプロセスの開発，革新的環境技術シンポジウム 2020，イイノホール，2020 年 12 月
297. 乾 将行（地球環境産業技術研究機構），バイオエコノミーの実現を目指したグリーンバイオプロセスの開発，第 94 回日本細菌学会総会シンポジウム，オンライン開催，2021 年 3 月
298. Kubo et al., Production of antheraxanthin and violaxanthin in *E. coli* transformed with zeaxanthin epoxydase from plants. International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (GIM 2019), 2019/9/8.
299. 高久洋暁（新潟薬大）、油谷幸代、荒木秀雄、正木和夫、家藤治幸、長沼孝文、山崎晴丈、高木正道：産業利用を目指した油脂酵母の油脂生産機構の解明とその応用；日本農芸化学会 2021 年大会，2021 年 3 月
300. 平山智弘（筑波大）、八幡志央美、風間春香、高久洋暁、野村暢彦、八幡穰：一細胞自家蛍光シグネチャーに基づく非破壊的な油脂生産性の予測；日本農芸化学会 2021 年大会，2021 年 3 月
301. 油谷幸代（産総研）、石谷孔司、Wong Pui Shan、Adrien Rougny：スマートセル構築のためのネットワークモデル構築技術と適用；日本化学会春季年会，2021 年 3 月
302. 安武義晃（産総研）、小西健司、村松周治、吉田圭太郎、油谷幸代、酒瀬川信一、田村具博：Crystal structure analysis of *Burkholderia stabilis* cholesterol esterase；量子ビームサイエンスフェスタ，2021 年 3 月
303. 油谷幸代（産総研）：Systems Biology for newly Bioproduction technology；BIOTECHBIOCHEM 2020，2020 年 12 月
304. 油谷幸代（産総研）：再構成システムの質的・量的最適化にむけた数理モデル構築；日本生物工学会，2020 年 9 月
305. 分子シミュレーションと人工知能を活用した蛋白質高機能化、日本化学会 第 101 春季年会（2021）（3 月講演予定）
306. タンパク質生産性を向上させる遺伝子配列設計技術、日本農芸化学会（2021）（3 月講演予定）

(b)新聞・雑誌等への掲載

<2016 年度>

1. プレスリリース プレシジョン・システム・サイエンス(株)；2016.9.15「NEDO 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)の参画について」

<2017 年度>

- 石井純 「長鎖 DNA 合成技術による高機能遺伝子デザインの可能性」第 69 回日本生物工学会大会（ランチョンセミナー），2017 年 9 月 11-14 日，早稲田大学 西早稲田キャンパス

<2018 年度>

- 神戸大・島津製作所：「高精度メタボローム解析システム」について（2018.5.25）紙面掲載；日本経済新聞、産経新聞、京都新聞、日刊工業新聞、化学工業日報、日経バイオテク（オンライン版）、TV 放映；KBS 京都
- 長瀬産業：本事業に関するエルゴチオネイン発酵生産法の開発に関して（2018.8.20.）長瀬産業ホームページにてプレスリリース
- 神戸大・日本テクノサービス：「M-96-LD 長鎖 DNA 合成用核酸合成機製品化」（2018.10.9）日本経済新聞、他
- 産総研：核酸分子の“絶対濃度”を正確に定量する方法の開発（2018.11.15）産総研ホームページ「主な研究成果」に掲載
- モノづくり日本会議「第 20 回新産業技術促進検討会」（テーマ「バイオで切り拓くモノづくりの新潮流 ～スマートセル創出プラットフォームの構築と実証～」での講演概要が日刊工業新聞に掲載された。（2018.8.29）
- 記事「センサー、一週間で作成」（千葉大）が日本経済新聞に掲載された。（2019.3.14）
- NEDO 広報紙「Focus NEDO」に特集「バイオ×デジタルで切り拓く未来 スマートセルインダストリー」として掲載された。（第 70 号、2018.10）

<2019 年度>

- 酵母の鉄代謝機構の改変により医薬・化成品原料であるブタントリオールの発酵生産性の向上に成功、2019/08/28 Research at Kobe
- “スマートセル”開発で医薬品原料の生産性向上に成功、2019/05/07 Research at Kobe
- スマートセル技術セミナー開催/NEDO，化学工業日報，2019 年 9 月 26 日
- 微生物のタンパク質生産量を向上させる遺伝子配列設計技術（産総研）、化学工業日報 2019 年 06 月 14 日 朝刊 3 面、科学新聞 2019 年 06 月 28 日 1 面
- 第 6 回 SBJ シンポジウム報告，生物工学会誌 2019，Vol.97 第 8 号（地球環境産業技術研究機構）
- RITE Today Annual Report 2019 Vol.14（地球環境産業技術研究機構）
- 人工知能でタンパク質を自動設計—様々な機能性タンパク質開発の加速に期待—、JPubb（WEB）、亀田倫史（産総研）

<2020 年度>

- プレスリリース 「高速・高精度で細胞代謝物を解析する技術を開発—より効率的に高機能な物質を大量生産する細胞構築を実現—」2021 年 2 月 17 日：NEDO・神戸大学・島津製作所 三者合同
- プレスリリース 「スマートセル開発に寄与する要素技術を集積したパイロットラボを整備—スマートセルを短期間で構築、「スマートセルインダストリー」の創出を目指す—」2021 年 2 月 17 日：NEDO・神戸大学 二者合同
- 番場崇弘，湯川貴弘，蓮沼誠久，鉄代謝改変酵母による 1,2,4-ブタントリオール生産，バイオサイエンスとインダストリー(B&I)，vol.78(2)，114-115（2020/03）
- 蓮沼誠久，<巻頭言>スマートセルインダストリーの形成に向けたバイオ×デジタルの技術開発，化学工学，Vol.84(2)，51（2020/02）
- 蓮沼誠久，Christopher J. Vavricka，荒木通啓，新たに設計した代謝経路を用いた大腸菌によるアルカロイド高生産，バイオサイエンスとインダストリー，Vol.78(1)，32-33（2020/01）
- プレスリリース 「ピキア酵母においてターミネーター配列が RNA 安定性と遺伝子発現量を制御していることを発見 -タンパク質の発現を最適化する技術として期待-」2020 年 12 月 1 日（掲載雑誌：Nucleic Acids Research “Exchange of endogenous and heterogeneous yeast terminators in *Pichia pastoris* to tune

mRNA stability and gene expression”)

23. プレスリリース 「微生物の生理的状态を最短 10 分で定量的に評価し、識別する技術を開発 ―物質生産や水質汚染の低減などへ応用でき、持続可能な社会の実現へ貢献―」 2020 年 12 月 7 日、筑波大学、NEDO、ニコソソリューションズ
24. プレスリリース 「カテコールを発酵生産/RITE 持続可能な香料原料」 化学工業日報, 2020 年 12 月 3 日
25. Nature, Volume 584 Issue 7819, 6 August 2020, “Focal Point on Synthetic Biology in Japan”, 2020 年
26. RITE Today Annual Report 2020 Vol.15 (地球環境産業技術研究機構)
27. 30 年のあゆみ 1990-2020 (地球環境産業技術研究機構)
28. 持続可能なプラスチックの資源循環に向けて, 東京工业大学同窓会誌, Kuramae Journal, No.1077, 2020 年

(c)その他

・受賞実績

<2016 年度>

1. 長岡技術科学大学研究・産学官連携活動表彰 (2016)
2. 第 39 回日本分子生物学会年会優秀ポスター賞, 木村尚弥: 蛋白質ナノブロック用超安定化人工蛋白質 SUWA (Super WA20) の特性解析及び構造解析 (パシフィコ横浜), 2016 年 12 月

<2017 年度>

3. 蓮沼誠久, 神戸大学第 9 回学長表彰
4. 長岡技術科学大学研究・産学官連携活動表彰 (2017)
5. セルラーゼ研究会第 31 回大会 ポスター賞 3 等, Nayani D. Daranagama, Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Haruna Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara : The proposed mechanism of Trichodermapepsin induction in *Trichoderma reesei*; (佐久平プラザ 21), 2017 年 7 月

<2018 年度>

6. 蓮沼誠久、神戸大学第 10 回学長表彰
7. 板谷光泰、2018 年度慶應大学慶應義塾賞受賞
8. 仲谷豪、他、第 70 回日本生物工学会大会トピックス選出、2018 年 9 月 5 日-7 日

<2019 年度>

9. 蓮沼誠久、2019/10 第 11 回学長表彰
10. 日本農芸化学会関西支部 支部例会 (第 511 回講演会) 優秀発表賞
11. 能崎健太, 富永将大, 梅野太輔, 近藤昭彦, 石井純「進化デザインによる新規テルペノイドセンサの開発」 日本農芸化学会関西支部 支部例会 (第 511 回講演会), 2019 年 12 月 7 日, 神戸大学 六甲台キャンパス

<2020 年度>

12. 蓮沼誠久, 第 12 回神戸大学学長表彰, 2020.10
13. 日本農芸化学会関西支部 支部例会 (第 513 回講演会) 優秀発表賞 (支部長推薦) 宮崎敬太, 三井靖雅, 旗谷章子, 富永将大, 近藤昭彦, 石井純「酵母におけるスクアレン生合成経路の改変および下流モノオキシゲナーゼの発現調節」日本農芸化学会関西支部第 513 回講演会, 2020 年 11 月 28 日, オンライン開催
14. 日本農芸化学会関西支部 支部例会 (第 513 回講演会) 優秀発表賞 (賛助企業推薦) 浅間梨々花, 中村泰之, 中村朋美, 近藤昭彦, 石井純「ドーパミン発酵生産性を簡易的に評価する GPCR メタボライトセンサの開発」日本農芸化学会関西支部第 513 回講演会, 2020 年 11 月 28 日, オンライン開催

・その他

<2016 年度>

1. 蓮沼誠久「研究者が語る 今、バイオテクノロジーの現場で起こっていること」METI Journal 経済産業ジャーナル; 平成 28 年 12・1 月号
2. HP トピックスに NEDO 事業参画のお知らせを掲載 (神戸天然物化学(株); URL; <http://www.kncweb.co.jp/>)

<2017 年度>

3. 日経バイオテク 2017 年 8 月 28 日号「合成生物学の最前線 ゲノムの合成技術を武器に、日本から国際プロに参加へ」(神戸大学)
4. 日経バイオテク 2017 年 12 月 4 日号「微生物を利用した物質生産 合成生物学で米国はビジネス活況、AI で微生物株の開発期間 10 分の 1 へ」(神戸大学、味の素)
5. RITE Today Annual Report 2017 Vol.12 (地球環境産業技術研究機構)
6. BioJapan2017 にて、ハイスループット DNA 合成機試作 1 号機実機を展示した。(日本テクノサービス)

<2018 年度>

7. 展示会「BioJapan2018」(2018.10.10-12) にて、長鎖 DNA 合成機試作 3 号機を NEDO ブースにて展示した。(日本テクノサービス、神戸大)
8. 展示会「BioJapan2018」に向けて「自動前処理装置システム」、「自動形質転換装置」、「長鎖 DNA 合成トータルシステム」の動画を作製し、展示会場にて投影した。(神戸大)
9. 開発した成果を基に、長鎖 DNA 合成用核酸合成機 M-96-LD として市販開始した。(日本テクノサービス、2018.10)
10. けいはんな View (2017.12)、「TOPICS 6 RITE のバイオマス有効利用に関する最新の研究開発状況/低炭素社会の実現を目指したスマートセルによるバイオ燃料・グリーン化学品生産」、(地球環境産業技術研究機構)
11. RITE Today Annual Report 2019 Vol.14、「持続可能な社会の実現を目指したグリーンバイオプロセスの開発」(地球環境産業技術研究機構)
12. ADEME-NEDO 合同ワークショップ (2019.3.12)「Development of online SFE-LC/MS system for analysis of metabolites in microbial cells」として SFE-LC/MS システムによる細胞内代謝物の分析を紹介した。(島津製作所、神戸大)

<2019 年度>

13. 第 1 回 NEDO スマートセルプロジェクト技術セミナー, 御茶ノ水ソラシティ・カンファレンスセンター (東京), 2019 年 9 月 24 日
 1. 矢追克郎、微生物スマートセル創出プラットフォームの実用化検証
 2. 乾 将行、スマートセル創製技術を駆使した有用芳香族化合物生産菌の開発
 3. 高久洋暁、情報科学を活用した油脂酵母の油脂生産性及び脂肪酸組成の改変
 4. 油谷幸代、スマートセル設計システムの概要
 5. 蓮沼誠久、スマートセル開発に資するハイスループット微生物構築・評価技術の概要
14. 第 2 回 NEDO スマートセルプロジェクト技術セミナー, TKP ガーデンシティ PREMIUM 京橋 (東京), 2019 年 11 月 21 日
 1. 田村具博、体外診断用医薬品酵素コレステロールエステラーゼの大量生産を目指して
 2. 藤森一浩、発現制御ネットワーク構築技術を活用した紅麴色素生産性向上の取り組み
 3. 柘植謙爾、長鎖 DNA 合成
 4. 白井智量、代謝経路設計技術の開発と実用微生物への技術展開
 5. 齋藤 裕、配列設計によるタンパク質発現制御

6. 池部仁善、分子動力学シミュレーションによる酵素高機能化
15. 第3回 NEDO スマートセルプロジェクト技術セミナー, グランフロント大阪北館 ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター (大阪), 2019年12月18日
1. 矢追克郎、微生物スマートセル創出プラットフォームの実用化検証
 2. 乾 将行、スマートセル創製技術を駆使した有用芳香族化合物生産菌の開発
 3. 志田洋介、糸状菌を用いた有用タンパク質同時生産制御
 4. 油谷幸代、スマートセル設計システムの概要
 5. 亀田倫史、遺伝子配列設計によるタンパク質高発現化・高機能化
 6. 蓮沼誠久、スマートセル開発に資するハイスループット微生物構築・評価技術の概要
 7. 阿部敬悦、輸送体探索技術の開発
 8. 谷内江望、目的遺伝子クローン単離技術の開発
16. 展示会「BioJapan2019」(2019.10.9-11) 長鎖 DNA 合成機 (M-96-LD) を NEDO ブースにて展示した。(日本テクノサービス、神戸大)
17. 展示会「BioJapan2019」(2019.10.9-11) 糸状菌由来の糖化酵素を NEDO ブースにて展示した。(長岡技科大、花王、産総研、JBA、九州大)
18. 展示会「BioJapan2019」(2019.10.9-11) 油脂酵母由来のエイコサペンタエン酸含有油脂を NEDO ブースにて展示した。(新潟薬科大、不二製油グループ本社、長岡技術科学大、産総研、理研、京都大、九州大)
19. 展示会「nano tech 2020」(2020.1.29-31) 油脂酵母由来のエイコサペンタエン酸含有油脂を NEDO ブースにて展示した。(新潟薬科大、不二製油グループ本社、長岡技術科学大、産総研、理研、京都大、九州大)
- <2020年度>
20. 展示会「BioJapan2020」にて、DNA 合成機を NEDO ブースにて展示した。(日本テクノサービス、神戸大)
21. 展示会「BioJapan2020」にて、「デザインした長鎖 DNA を正確・短期間・低コストに合成する技術の開発」のショートプレゼンテーション (神戸大学、日本テクノサービス)
22. 研究トピックス「生物進化の仕組みを AI に取り込むことで、細胞内の代謝経路を新たに創り出す技術を開発」日立製作所、<https://www.hitachi.co.jp/rd/news/topics/2020/1008.html>
23. 掛下大視、*Trichoderma* を用いたバイオマス糖化酵素開発、2021年度日本農芸化学会大会シンポジウム、2021年3月
24. BioJapan2020 NEDO 展示ブース、RITE 展示ブースにて成果紹介、2020年10月(地球環境産業技術研究機構)
25. nano tech 2021 NEDO 展示ブースにて成果紹介、2020年12月(地球環境産業技術研究機構)
26. 展示会「BioJapan2020」(2020.10.14-16)にて、油脂酵母由来のエイコサペンタエン酸含有油脂を NEDO ブースにて展示した。(新潟薬科大、不二製油グループ本社、長岡技術科学大、産総研、理研、京都大、大阪大、九州大)
27. 2020年度日本農芸化学会大会シンポジウム「微生物による有用物質生産「スマートセルインダストリー」の実現を目指す」2020年3月28日、九州大学(COVID19感染拡大のため、講演中止・要旨集公開)(JBA)
28. 展示会「BioJapan2020」にて、「アウトリーチ活動 ～研究開発成果の紹介と社会実装の促進～ スマートセルプロジェクトの内容をもっと知りたい人のために」のショートプレゼンテーション (JBA)
29. 展示会「BioJapan2020」にて、「遺伝子配列設計技術による蛋白質高機能化高発現化」のショートプレゼンテーション (産総研)
30. バイオサイエンスとインダストリー誌 スマートセル特集企画 (JBA)
- ① 亀田 倫史: 分子動力学シミュレーションによるタンパク質高機能化, バイオサイエンスとインダストリー, 78 (3), 262 (2020)

- ② 七谷 圭ら：物質生産の効率化に向けた輸送体探索技術の開発，バイオサイエンスとインダストリー，78 (4)，358 (2020)
 - ③ 三谷 恭雄ら：HTP トランスクリプトーム解析技術，バイオサイエンスとインダストリー，78 (4)，360 (2020)
 - ④ 乾 将行：コリネ菌を用いた有用芳香族化合物生産菌の開発，バイオサイエンスとインダストリー，78 (5)，450 (2020)
 - ⑤ 小笠原 渉ら：糸状菌を用いた有用タンパク質同時生産制御技術の開発，バイオサイエンスとインダストリー，78 (5)，448 (2020)
 - ⑥ 高久 洋暁ら：油脂酵母を用いた機能性油脂生産菌の開発，バイオサイエンスとインダストリー，78 (5)，452 (2020)
 - ⑦ 松村 健：スマートセルインダストリー創出に向けた植物バイオの新たな一歩，バイオサイエンスとインダストリー，78 (6)，531 (2020)
 - ⑧ 中村 崇裕ら：国産ゲノム編集技術プラットフォームの確立，バイオサイエンスとインダストリー，79 (1)，61 (2021)
 - ⑨ 高橋 麻起子：シソ健康機能性成分の高効率生産技術開発，バイオサイエンスとインダストリー，79 (2)，xx (2021)
 - ⑩ 一町田 紀子ら：ジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の大量生産系の確立に向けて，バイオサイエンスとインダストリー，79 (2)，xx (2021)
31. Focal Point on Synthetic Biology in Japan, Nature, 584 (7819), 05 August (2020)の企画 (JBA)
- ① A foundation of fermentation,
 - ② Improved gene-editing precision to boost Japan's bioeconomy *
 - ③ The productive plant switch *
 - ④ Giving the green light to useful plant genes *
 - ⑤ Designer metabolic pathway for sustainable aromatics
 - ⑥ Yeast rises to the omega-3 challenge
 - ⑦ A systematic approach to scaling up synthetic biology
 - ⑧ Breakthrough in bio-based production of longevity vitamin, ergothioneine

3.2.4 研究開発項目③「微生物による高機能品生産技術開発」【助成】

3.2.4.1 ポリアミド原料の発酵生産技術開発

【特許】

非公開情報のため、未記載

3.2.4.2 組換え *Burkholderia stabilis* 由来コレステロールエステラーゼ開発

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内外国PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	産業技術総合研究所、旭化成フ ァーマ(株)	2020- 027721	国内	2020年 2月21 日	出願	コレステロールエス テラーゼ活性が向上 したポリペプチド	吉田圭太郎, 安武義晃, 田村具博, 村松周治, 小西健司, 酒瀬川信一
2	産業技術総合研 究所、旭化成フ ァーマ(株)	2021- 25664	国内、 PCT(予 定)	2021年 2月19 日	出願	標的タンパク質の生 産方法	吉田圭太郎, 安武義晃, 田村具博, 小西健司, 酒瀬川信一, 村松周治

【論文】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ペー ジ番号	発表年 月日
1	Keitaro Yoshida ^a , Kenji Konishi ^b , Arturo Magana-Mora ^{c,d} , Adrien Rougny ^{c,d} , Yoshiaki Yasutake ^{a,d} , Shuji Muramatsu ^b , Satomi Murata ^b , Toshitaka Kumagai ^e , Sachiyo Aburatani ^{c,d} , Shin-ichi Sakasegawa ^b , Tomohiro Tamura ^{a,d,f}	^a Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Sapporo, Japan ^b Asahi Kasei Pharma Corporation, Shizuoka, Japan ^c Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, AIST, Tokyo, Japan ^d Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory (CBBD-OIL), AIST, Tokyo, Japan ^e Fermlab Inc., Tokyo, Japan; ^f Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan ^f Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan	Production of recombinant extracellular r cholesterol esterase using consistently active promoters in <i>Burkholderia stabilis</i>	BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY, 1974-1984	2019/10

2	Yoshiaki Yasutake ^{a,b} , Kenji Konishi ^{c,d} , Shuji Muramatsu ^c , Keitaro Yoshida ^a , Sachiyo Aburatani ^{a,b,e} , Shin-ichi Sakasegawa ^c , Tomohiro Tamura ^{a,bd}	^a Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Sapporo 062-8517, Japan ^b Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory (CBBD-OIL), AIST, Tokyo 169-8555, Japan ^c Asahi Kasei Pharma Corporation, Shizuoka 410-2321, Japan ^d Laboratory of Molecular Environmental Microbiology, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060- 8589, Japan ^e Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, AIST, Tokyo 135-0064, Japan	Bacterial triacylglyce rol lipase is a potential cholesterol esterase: Identificati on of a key determinant for sterol- binding specificity	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES、 578-586	2021/1
---	---	---	---	---	--------

【外部発表】①学会発表・講演

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	Kenji Konishi ^a , Keitaro Yoshida ^b , Yoshiyuki Ota ^a , Yoshiaki Yasutake ^b , Shuji Muramatsu ^a , Satomi Murata ^a , Sachiyo Aburatani ^b , Shin-ichi Sakasegawa ^a and Tomohiro Tamura ^b	^a Asahi Kasei Pharma Corporation, ^b National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)	Characterization of cholesterol esterase from Burkholderia stabilis and its application as a diagnostic enzyme	International Conference on Biotechnology and Bioengineering	2019/09/26
2	Keitaro Yoshida ^b , Kenji Konishi ^a , Yoshiyuki Ota ^a , Yoshiaki Yasutake ^b , Shuji Muramatsu ^a , Satomi Murata ^a , Sachiyo Aburatani ^b , Shin-ichi Sakasegawa ^a and Tomohiro Tamura ^b	^a Asahi Kasei Pharma Corporation, ^b National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)	Recombinant production of extracellular cholesterol esterase using consistently active promoters in Burkholderia stabilis	International Conference on Biotechnology and Bioengineering	2019/09/26
3	小西健司 ¹ , 吉田圭太郎	1 旭化成ファーマ株式会	Burkholderia	日本農芸化学会	2019/11/09

	² , 太田喜之 ¹ , 安武義晃 ² , 村松周治 ¹ , 村田里美 ¹ , 油谷幸代 ² , 酒瀬川信一 ¹ , 田村具博 ²	社, 2 産業技術総合研究所	stabilis 由来コレステロールエステラーゼの機能と臨床検査薬への適用	西日本・中四国支部合同大会	
4	吉田圭太郎 ¹ , 小西健司 ² , 村松周治 ² , 酒瀬川信一 ² , 安武義晃 ¹ , 油谷幸代 ¹	1 産業技術総合研究所 2 旭化成ファーマ株式会社	Burkholderia stabilis のコレステロールエステラーゼは T2SS 機構の内膜タンパク質 GspF を介して分泌される	日本農芸化学会 西日本・中四国支部合同大会	2019/11/09
5	吉田圭太郎 ¹ , 小西健司 ² , Arturo Magana Mora ¹ , Rougny Adrien ¹ , 安武義晃 ¹ , 村松周治 ² , 村田里美 ² , 熊谷俊高 ³ , 油谷幸代 ¹ , 酒瀬川信一 ² , 田村具博 ¹	1 産業技術総合研究所 2 旭化成ファーマ株式会社 3 株式会社ファームラボ	Burkholderia stabilis を宿主とした細胞外コレステロールエステラーゼの組換え生産	日本農芸化学会	2020/03/27
6	小西健司 ¹ , 吉田圭太郎 ² , 安武義晃 ² , 村松周治 ¹ , 酒瀬川信一 ¹ , 田村具博 ²	1 旭化成ファーマ株式会社, 2 産業技術総合研究所	Burkholderia stabilis 由来コレステロールエステラーゼの診断薬への応用	日本農芸化学会	2020/03/27

【外部発表】②新聞・雑誌等への掲載

番号	発表機関	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	旭化成ファーマ株式会社	スマートセル技術により、野生株に対し約 30 倍高い原料酵素の生産性を実現	Web	2021 年 2 月 25 日
2	産業技術総合研究所	スマートセル技術により、野生株に対し約 30 倍高い原料酵素の生産性を実現	Web	2021 年 2 月 25 日
3	NEDO	スマートセル技術により、野生株に対し約 30 倍高い原料酵素の生産性を実現	Web	2021 年 2 月 25 日

【外部発表】③展示会への出展

番号	発表機関	タイトル	展示会名	発表年月日
1	旭化成ファーマ株式会社	体外診断用医薬品酵素コレステロールエステラーゼの大量生産を目的とする Burkholderia stabilis スマートセルの開発	BioJapan2019	2019 年 10 月
2	旭化成ファーマ株式会社	体外診断医薬品酵素生産 コレステロールエステラーゼ生産スマートセルの開発	BioJapan2020	2020 年 10 月

3.2.4.3 希少アミノ酸エルゴチオネイン高生産スマートセルの開発

【外部発表】＜学会発表・講演＞

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	仲谷 豪	長瀬産業株式会社	バイオケミカル生産プラットフォームの開発	微生物ウィーク（東京大学）	2019年7月24日
2	仲谷 豪	長瀬産業株式会社	放線菌セルファクトリー「N-STePP [®] 」の開発	日本化学会第101春季年会	2021年3月22日

【外部発表】＜新聞・雑誌等への掲載＞

番号	所属	タイトル	媒体名	発表年月日
1	長瀬産業株式会社	Breakthrough in bio-based production of longevity vitamin, ergothioneine	Nature	2020年8月6日
2	長瀬産業株式会社	希少アミノ酸生産性約1000倍に ナガセ R&D センター・スマートセル活用	化学工業日報	2020年10月1日
3	長瀬産業株式会社	長瀬産業「エルゴチオネイン」の生産性向上実現	健康産業新聞	2020年9月30日
4	長瀬産業株式会社	長瀬産業、研究開発施設「ナガセ R&D センター」の希少アミノ酸「エルゴチオネイン」の生産性向上	日本経済新聞 電子版	2020年9月30日
5	長瀬産業株式会社	エルゴチオネイン	生物由来の機能成分 富士経済社	2020年12月

【外部発表】＜展示会へ出展＞

番号	発表者	タイトル	展示会名	発表年月日
1	長瀬産業株式会社	希少アミノ酸「エルゴチオネイン」高純度精製サンプル展示	BioJapan2020	2020年10月

【外部発表】＜ニュースリリース＞

番号	発表者	タイトル	発表年月日
1	長瀬産業株式会社 (NEDO)	希少アミノ酸「エルゴチオネイン」の生産性を約1000倍に向上	2020年9月30日

3.2.4.4 スマートセル技術を応用した天然ヒト型長鎖セラミド高含有醤油麹菌の開発

【外部発表】 展示会への出展

番号	発表者・所属	タイトル	展示会名	発表年月日
1	植木達朗 福岡県醤油醸造協同組合	スマートセル技術を応用した天然ヒト型長鎖セラミド高含有醤油麹菌の開発	BioJapan2020	2020年10月16日

3.2.4.5 生体触媒の反応機構推定に基づく高付加価値化成品の製造法開発

【外部発表】

番号	発表者	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	石原聡 天野エンザイム(株)	MDシミュレーションに基づく酵素設計－酵素設計技術を活用した化成品製造法の開発－	BioJapan2020	2020年10月16日