

「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品
生産技術の開発」

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	2-8
2.4. 中間評価結果への対応	2-8
2.5. 評価に関する事項	2-8
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	3-1
3.2. 研究開発項目毎の成果、実用化・事業化に向けた取組及び見通しについて	
3.2.1 研究開発項目①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」および研究開発項目②「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」	
3.2.1.1 データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム(Data-driven iBMS)の研究開発	3.2.1.1.1-1
3.2.1.1.1 新規ターゲット探索基盤	3.2.1.1.1-1
3.2.1.1.1.1 スクリーニング技術構築とバイオリソース整備	3.2.1.1.1.1-1
3.2.1.1.1.2 ミリオンスクリーニング技術の開発	3.2.1.1.1.2-1
3.2.1.1.2 培養データ駆動型産業用スマートセル構築技術の開発	3.2.1.1.2.1-1
3.2.1.1.2.1 培養データからの産業用スマートセル創出技術の開発	3.2.1.1.2.1-1
3.2.1.1.2.1.1 培養データ駆動型細胞内ダイナミクス解析技術開発	3.2.1.1.2.1.1-1
3.2.1.1.2.1.2 発酵槽培養における生産性低下因子探索技術開発	3.2.1.1.2.1.2-1
3.2.1.1.2.1.3 新規可溶性蛋白質高発現化手法の開発	3.2.1.1.2.1.3-1

3.2.1.1.2.2	産業用スマートセルの構築	3.2.1.1.2.2.1-1
3.2.1.1.2.2.1	脂溶性化合物生産のための油脂酵母産業用スマートセルの構築	3.2.1.1.2.2.1-1
3.2.1.1.2.2.2	ポリマー原料生産のための大腸菌等産業用スマートセル構築	3.2.1.1.2.2.2-1
3.2.1.1.2.2.3	芳香族化合物生産のためのコリネ菌産業用スマートセル構築	3.2.1.1.2.2.3-1
3.2.1.1.2.2.4	産業用糸状菌改良技術の開発	3.2.1.1.2.2.4-1
3.2.1.1.2.2.5	産業用タンパク質生産性極大化技術開発	3.2.1.1.2.2.5-1
3.2.1.1.3	バイオ生産プロセス基盤の確立	3.2.1.1.3-1
3.2.1.1.3.1	マルチスケラブルな培養技術の開発と培養のビッグデータ化	3.2.1.1.3.1-1
3.2.1.1.3.2	マルチオミクス解析による培養状態の定量的記述	3.2.1.1.3.2-1
3.2.1.1.3.3	AI（人工知能）を活用した実用培地・培養戦略迅速決定システムの開発	3.2.1.1.3.3-1
3.2.1.1.3.4	バイオ生産プロセスにおけるLCA、TEAシミュレーターの開発と有効性の実証	3.2.1.1.3.4-1
3.2.1.1.4	次世代バイオプロセス技術の開発	3.2.1.1.4.1-1
3.2.1.1.4.1	並列型のバイオ生産 AI 制御システムの開発	3.2.1.1.4.1-1
3.2.1.1.4.2	攪拌羽根レス・微生物用シングルユース培養槽の開発	3.2.1.1.4.2-1
3.2.1.1.5	持続可能なバイオプロダクション産業の創出と発展に資する人材育成拠点の形成	3.2.1.1.5-1
3.2.1.1.6	研究戦略等検討	3.2.1.1.6-1
3.2.1.2	データベース空間からの新規酵素リソースの創出	3.2.1.2-1
3.2.1.3	スマートセル時代のバイオ生産プロセス実用化を促進させるためのバイオファウンドリ拠点の確立	3.2.1.3-1
3.2.1.4	遺伝子組換え植物を利用した大規模有用物質生産システムの実証開発	3.2.1.4-1
3.2.1.4.1	抵抗性メカニズム打破による導入遺伝子高発現宿主植物の研究開発	3.2.1.4-20
3.2.1.4.2	オートファジー系抑制植物でのウイルスベクターによる有用物質大量生産技術の研究開発	3.2.1.4-26
3.2.1.4.3	1株あたり有用タンパク質生産量の高い植物栽培環境の制御技術の研究開発	3.2.1.4-31
3.2.1.4.4	組換え植物体からの大規模有用物質抽出・精製システムの開発	3.2.1.4.40
3.2.1.4.5	精製における有害因子を低減する技術開発	3.2.1.4-46

3.2.2 研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」

3.2.2.1.1	大腸菌発酵による酸化型グルタチオン高生産技術の開発	3.2.2.1.1-1
3.2.2.1.2	ポリアミド原料の発酵生産技術開発	3.2.2.1.2-1
3.2.2.1.3	天然ヒト型長鎖セラミド高効率生産システムの開発と実証	3.2.2.1.3-1
3.2.2.1.4	微生物によるグリチルレチン酸および類縁体の生産システム実証	3.2.2.1.4-1
3.2.2.1.5	次世代グリーンバイオ素材「HYA50」のインライン自動化生産システム開発	3.2.2.1.5-1
3.2.2.1.6	製紙工場における第二世代糖生産システム実証	3.2.2.1.6-1
3.2.2.1.7	超耐熱性プロテアーゼを活用した感染制御技術の社会実装実証	3.2.2.1.7-1
3.2.2.1.8	糸状菌が生産する農薬活性天然物の生産性向上システムの構築、実証	3.2.2.1.8-1
3.2.2.1.9	Bacillus 属細菌による抗菌環状リポペプチド生産システム実証	3.2.2.1.9-1
3.2.2.1.10	バイオプロセスによるイミダゾールジペプチドの効率的生産方法の開発	3.2.2.1.10-1
3.2.2.1.11	コリネ菌によるバイオイソプロパノール生産システム実証	3.2.2.1.11-1
3.2.2.2.1	ジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質（PCN-HF）大量生産システムの構築	3.2.2.2.1-1
3.2.2.2.2	エピジェネティクス代謝変換技術を用いた高集積糖生産システムの実証	3.2.2.2.2-1
3.2.2.3.1	生物メタネーションとバイオ燃料製造を可能とする新排水処理プロセスの開発	3.2.2.3.1-1

(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	2022年8月30日
プロジェクト名	カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品 生産技術の開発	プロジェクト番号	P20011
担当推進部/ PMまたは担当者	材料・ナノテクノロジー部 PM 林 智佳子 (2020年2月～8月、2021年4月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 PM 坂井 至 (2020年9月～2021年3月) 材料・ナノテクノロジー部 永井 良憲 (2020年4月～2022年3月) 材料・ナノテクノロジー部 伊藤 雅人 (2020年6月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 土谷 浩史 (2020年11月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 金田 晃一 (2021年3月～2021年9月) 材料・ナノテクノロジー部 薩摩 和正 (2021年5月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 小笠原 真人 (2021年5月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 田村 昂一 (2021年10月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 澤田 和敏 (2021年10月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 長谷川 義基 (2022年2月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 秋葉 幸範 (2022年3月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 峯岸 芙有子 (2022年7月～現在)		
0. 事業の概要	<p>バイオによるものづくりは、化学プロセスと比較して省エネルギーでの物質生産が可能であるとともに、原料を化石資源に依存しないバイオマスからの物質生産も可能であり、炭素循環型社会実現と持続的経済成長に資するものづくりへの変革が期待できる。バイオによるものづくりを加速させるためには、原料から最終製品に至るボトルネックの解消が求められている。本事業では、新たなバイオ資源の拡充や分離・精製、回収等を含むバイオ生産プロセスを開発する。また、生産プロセス条件と育種の関連付けが可能となる統合解析システム等の開発を行う。さらに実生産への橋渡しを効果的に行うバイオファウンドリ基盤を整備し、バイオ由来製品の社会実装の加速とバイオエコノミーの活性化に貢献する。</p> <p>研究開発項目①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」(委託) 研究開発項目②「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」(委託) 研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」(委託、助成)</p>		
1. 事業の位置 付け・必要性 について	<p>パリ協定、SDGs 等において産業界には CO₂ 削減、炭素循環型社会の実現等社会課題の解決と持続的経済成長の両方が求められてきているが、近年の合成生物学等の発展に伴い、世界では様々な産業がバイオ化していく情勢となっている。欧米、中国等では、バイオエコノミー（バイオテクノロジーが経済生産に大きく貢献できる市場（産業群））の拡大に向け、国家戦略を策定し加速度的に投資を拡大している。特にものづくり分野での成長が見込まれている中、循環型社会形成に向けた課題解決にバイオが担える役割は大きいと考えられる。</p> <p>日本では2019年6月に10年ぶりに新たなバイオ戦略が策定され、2030年に世界最先端のバイオエコノミー社会を実現することが目標として掲げられた。高機能バイオ素材、バイオプラスチック、生物機能を利用した生産システム等の9つの市場領域について重点的な取組強化が打ち出され、バイオものづくりを加速させる技術・環境・人材育成の必要性が示された。</p> <p>現状技術ではコスト的に見合わないため民間企業の市場原理に基づく研究開発のインセンティブが期待できない領域であり、生物工学・化学工学・情報科学など複数分野の融合が必要であり産学官の英知の結集する NEDO 事業として実施する意義がある。</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「バイオ資源活用促進基盤技術開発」</p> <p>【中間目標（2022年度）】 バイオものづくりの社会実装促進に要する酵素、微生物、植物等の新規バイオ資源候補を20件以上提案する。</p> <p>【中間目標（2024年度）】 バイオものづくりの社会実装促進に要する酵素、微生物、植物等の新規バイオ資源候補を40件以上提案し、その中から20個以上有用なものを選抜し評価する。</p> <p>【最終目標（2026年度）】 バイオものづくりの社会実装促進に要する酵素、微生物、植物等の新規バイオ資源候補を100件以上提案し、その中から20個以上有用なものを選抜・評価し、ユーザーとなる企業に提供可能な状態とする。</p>		

	<p>研究開発項目②「生産プロセスのバイオフィアウンドリ基盤技術開発」</p> <p>【中間目標（2022年度）】 次世代のバイオ生産システム基盤の基本設計に目途が立ち、評価サンプルとなる生産物が得られる環境であることを1例以上のモデル生産物で確認する。また、生産プロセス情報等に基づく産業用スマートセル開発に向けて、生産と育種を関連づけさせることができる統合解析システムのプロトタイプを開発する。 発酵槽から生産ターゲット物質の分離・精製処理を含む、微生物を用いた物質生産の実用化検証が可能なバイオフィアウンドリ拠点を形成し、モデル生産物で検証を開始する。</p> <p>【中間目標（2024年度）】 生産パラメーター情報等をフィードバックして開発する産業用スマートセルを用いて、具体的な生産物事例を設定し、次世代のバイオ生産システム基盤の基本設計が実生産への橋渡しをする上で有効であることを最低1つのターゲットで検証する。生産プロセス情報に基づく産業用スマートセル開発に向けて、生産と育種を関連づけさせることができる統合解析システムの有効性を検証する。 バイオフィアウンドリ拠点を活用して企業・アカデミア等が実用化を進める生産ターゲット物質について複数例検証を行いながらバイオフィアウンドリ機能の改善点を明確にするとともに、ものづくり人材の育成プログラムを作成する。</p> <p>【最終目標（2026年度）】 産業用スマートセルの開発やサンプル評価をするための生産物を得るまでのプロセスについて、開発期間の短縮化、プロセスの省力化等が可能であることを実証する。また、次世代生産技術への育種モデルの変換を目指した拡張性のある統合解析システムを確立する。 企業・アカデミア等が実用化を進めるターゲット物質についての検証事例を増やしてバイオフィアウンドリ拠点の実効性を示すとともに、ものづくり人材の育成プログラムの運用を開始する。</p> <p>研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」</p> <p>以下の内容を基本としつつ、用いる生物種やターゲット物質等によって目標が大きく異なることから、具体的な定量目標は研究開発テーマ毎に別途実施計画書において定める。</p> <p>【委託フェーズ】 研究開発期間終了時点で、産業用物質生産システム検証を開始できる基本的な株やデータの取得が完了している。 【助成フェーズ】 研究開発期間終了時点で、評価サンプルによる生産物評価により、性能、環境合理性、経済性等の面で総合的に競争力があることを示す。</p> <p>なお、研究開発段階に応じて委託又は助成で実施することとし、各フェーズで設定している事業期間以内で研究開発を終了する又はステージゲートによるフェーズ移行を求める。</p>								
事業の計画内容	主な実施事項	2020fy	2021fy	2022fy	2023fy	2024fy	2025fy	2026fy	
	研究開発項目① 「バイオ資源活用促進基盤技術開発」								
	研究開発項目② 「生産プロセスのバイオフィアウンドリ基盤技術開発」								
	研究開発項目③ 「産業用物質生産システム実証」								

	会計・勘定	2020fy	2021fy	2022fy	2023fy	2024fy	2025fy	2026fy	総額
事業費推移 (会計・勘定別に NEDO が負担した実績額 (評価実施年度については予算額) を記載) (単位:百万円)	一般会計	—	—	—	—	—	—	—	—
	特別会計 (電源・需給)	1,773	2,872	3,871	—	—	—	—	8,516
	開発成果促進財源	—	—	—	—	—	—	—	—
	総 NEDO 負担額	1,773	2,872	3,871	—	—	—	—	8,516
	(委託)	1,773	2,757	3,655	—	—	—	—	8,185
	(助成) : 助成率 2/3, 1/2	0	115	216	—	—	—	—	331
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 : 国立大学法人千葉大学 教授 関 実 SPL : 一般財団法人バイオインダストリー協会 事業連携推進部長 中川 智 SPL : 元 国立研究開発法人産業技術総合研究所 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 バイオエコノミー推進室 室長 林 智佳子							
	実施先	<p>研究開発項目①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」 研究開発項目②「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」</p> <p>(1) データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム (Data-driven iBMS) の研究開発 【委託先】 京都大学、九州大学、(株)ニコンソリューションズ、(独)製品評価技術基盤機構、長岡技術科学大学、早稲田大学、広島大学、(株)オンチップ・バイオテクノロジーズ、(国研)産業技術総合研究所、東京大学、花王(株)、UBE(株)、不二製油グループ本社(株)、新潟薬科大学、(公財)地球環境産業技術研究機構、東北大学、佐竹マルチミクス(株)、合同酒精(株)、大阪工業大学、大阪大学、(株)ちとせ研究所、(一財)バイオインダストリー協会 【再委託】 (国研) 医薬基盤・健康・栄養研究所、函館工業高等専門学校、鶴岡工業高等専門学校、長岡工業高等専門学校、都城工業高等専門学校、鹿児島大学、信州大学、岡山大学、九州大学、東京大学、徳島大学、北見工業大学、ナノミストテクノロジーズ(株)、サラヤ(株)、大阪工業大学 【共同実施】 龍谷大学、徳島大学、(株)396 バイオ、三菱ケミカル(株)、ヤスハラケミカル(株)、天野エンザイム(株)、(株)カネカ、Noster(株)、(株)ダイセル、NRI システムテクノ(株)、三井化学(株)、AGC(株)、北海道糖業(株)、協和発酵バイオ(株)、神戸天然物化学(株)、(株)カネカ、(株)ミツワフロンテック、三菱商事ライフサイエンス(株)、(株)日立プラントサービス、ビジネスエンジニアリング(株)、(株)丸菱バイオエンジ、(株)エイブル、味の素(株)、天野エンザイム(株)、東レ(株)</p> <p>(2) データベース空間からの新規酵素リソースの創出 【委託先】 神戸大学、東京大学、九州大学、(国研)理化学研究所、出光興産(株)、小川香料(株)、花王(株)、高砂香料工業(株)、長瀬産業(株)、不二製油グループ本社(株) 【再委託先】 千葉大学</p> <p>(3) スマートセル時代のバイオ生産プロセス実用化を促進させるためのバイオファウンドリ拠点の確立 【委託先】 Green Earth Institute(株)、協和発酵バイオ(株) 【再委託先】 (株)小榎屋、マイクロ波化学(株)、北海道大学</p>							

		<p>(4) 遺伝子組換え植物を利用した大規模有用物質生産システムの実証開発 【委託先】 (国研)産業技術総合研究所、北海道大学、東京大学、鹿島建設(株)、デンカ(株)</p> <p>研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」</p> <p>(1) 大腸菌発酵による酸化型グルタチオン高生産技術の開発 【助成先】 (株)カネカ 【共同研究先】 神戸大学、大阪大学</p> <p>(2) ポリアミド原料の発酵生産技術開発 【助成先】 東レ(株) 【共同研究先】 (国研)産業技術総合研究所</p> <p>(3) 天然ヒト型長鎖セラミド高効率生産システムの開発と実証 【助成先】 福岡醤油醸造協同組合 【共同研究先】 九州大学、(国研)産業技術総合研究所、(国研)理化学研究所</p> <p>(4) 微生物によるグリチルレチン酸および類縁体の生産システム実証 【助成先】 住友化学(株) 【共同研究先】 大阪大学</p> <p>(5) 次世代グリーンバイオ素材「HYA50」のインライン自動化生産システム開発 【助成先】 Noster(株) 【共同研究先】 京都大学、(株)ダイキンアプライドシステムズ</p> <p>(6) 製紙工場における第二世代糖生産システム実証 【委託先】 三菱製紙(株) 【再委託先】 (株)Biomaterial in Tokyo</p> <p>(7) 超耐熱性プロテアーゼを活用した感染制御技術の社会実装実証 【委託先】 サラヤ(株)、岡山理科大学</p> <p>(8) 糸状菌が生産する農薬活性天然物の生産性向上システムの構築、実証 【委託先】 (株)MMAG 【共同実施先】 (国研)産業技術総合研究所</p> <p>(9) <i>Bacillus</i> 属細菌による抗菌環状リポペプチド生産システム実証 【委託先】 (株)カネカ 【共同実施先】 神戸大学、群馬大学</p> <p>(10) バイオプロセスによるイミダゾールジペプチドの効率的生産法の開発 【委託先】 東海物産(株)、早稲田大学</p> <p>(11) コリネ菌によるバイオソプロパノール生産システム実証 【委託先】 Green Earth Institute(株)</p> <p>(12) ジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質 (PCN-HF) 大量生産システムの構築 【助成先】 ホクサン(株) 【共同研究先】 (国研)産業技術総合研究所</p> <p>(13) エピジェネティクス代謝変換技術を用いた高集積糖生産システムの実証 【委託先】 アクプランタ(株)、東京工業大学、高崎健康福祉大学</p>
--	--	---

		(14) 生物メタネーションとバイオ燃料製造を可能とする新排水処理プロセスの開発 【委託先】 大成建設(株)、埼玉大学、中部大学、(公財)かずさ DNA 研究所		
情勢変化への対応	<p>【2021 年度追加公募の実施】</p> <p>バイオ戦略 2020 等の政策的位置づけを踏まえ、令和 2 年度補正予算により研究開発項目②「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」の一環として関東圏バイオファウンドリ拠点形成を実行するため、公募により体制を決定し着手した。</p> <p>【国内外の動向把握】</p> <p>NEDO 技術戦略研究センター(バイオエコノミーユニット)と連携し、政策動向・技術動向などを調査。また、研究開発推進のための特許・先行技術調査などを実施計画の一部に盛り込み動向を把握しながら研究開発を推進。</p> <p>【コロナ禍の状況下での対応】</p> <p>プロジェクト開始当初より、緊急事態宣言等により出社制限があったことで研究計画の一部遅延や半導体不足による研究機器の導入遅れが発生したケースがあった。やむを得ない事情を勘案し契約変更により研究計画及び予算の後倒しを行って研究継続をはかったことで、その後に遅れを挽回し中間目標の達成に大きな影響はでなかった。</p>			
中間評価結果への対応	—			
評価に関する事項	事前評価	2019 年度実施 担当部 材料・ナノテクノロジー部		
	中間評価	2022 年度実施、2024 年度実施 (予定)		
	事後評価	2027 年度実施 (予定)		
3. 研究開発成果について	研究開発項目	目標	成果	達成度 (2022 年度末)
	研究開発項目 ①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」	バイオものづくりの社会実装促進に要する酵素、微生物、植物等の新規バイオ資源候補を 20 件以上提案する。	<p>酵素、微生物、植物等の新規バイオ資源候補を 50 件獲得済み。今年度末までの取組によってさらに成果蓄積が期待できる。</p> <p>具体的には、</p> <ul style="list-style-type: none"> ・有用遺伝子資源 28 件 (Acyl-CoA synthetase 遺伝子、糖変換酵素遺伝子、脂質変換酵素遺伝子、オキシダーゼ、オキシゲナーゼなど) ・各種炭素源を使用可能な油脂酵母 6 株 ・有用化合物生産につながる酸化還元反応や脱炭酸反応などのテンプレート酵素 10 件、人工酵素プロトタイプ 5 件を獲得 ・新規宿主植物の開発において、モデル遺伝子の発現レベルを 3 倍以上に増加可能な植物体候補を予備的実験で獲得。さらに発現増加可能な組換え植物体・ゲノム編集植物体を選抜中など 	◎ (設定目標を上回った件数が得られた)
	研究開発項目 ②「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」	次世代のバイオ生産システム基盤の基本設計に目途が立ち、評価サンプルとなる生産物が得られる環境であることを 1 例以上のモデル生産物で確認する。ま	【植物】 ・宿主改変から大規模抽出精製まで一貫した大規模植物生産の開発を実施。up-stream から、down-stream に至るまで新規の技術開発の一例として、有用物質抽出・精製システム開発では	◎ (人材育成取組は前倒し成果)

	<p>た、生産プロセス情報等に基づく産業用スマートセル開発に向けて、生産と育種を関連づけさせることができる統合解析システムのプロトタイプを開発する。</p> <p>発酵槽から生産ターゲット物質の分離・精製処理を含む、微生物を用いた物質生産の実用化検証が可能なバイオファウンドリ拠点を形成し、モデル生産物で検証を開始する。</p>	<p>パイロットプラントスケールの試作機的设计・製作・改造等を進め、基本設計に目途が立ちつつある。また、破碎処理システムでは目的タンパク質の抽出効率が中間目標値を大幅に上回る結果を得る等、生産物が得られるシステムであることを確認した。</p> <p>【微生物】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・「培養データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム」開発を実施。その構成要素となる主要な技術群は2022年度末時点での技術目標を達成する見込み。油脂酵母を事例として生産物が得られる方法論であることを確認する結果が得られた。さらに、異なる宿主・ターゲット物質での応用を進める計画がある。 ・また、生産プロセス情報等に基づく産業用スマートセル開発のための統合解析システムのプロトタイプが2022年度末にできる見込み。例えば、測定培養データを元に、宿主細胞の「収率」「生育速度」「生産フェーズ」の最適化のための細胞内代謝のダイナミクス解析技術を開発し、大腸菌および油脂酵母モデルを適用し新たな改変箇所を提案可能である結果が得られている。 ・さらに、生産と育種を関連付けさせて開発期間を短縮するため、必要とされるデータを集積し、統合的に活用できる環境の整備ができつつある。 ・LCA・TEA 検証のため、油糧酵母、SL 生産株の培養における炭素収支や卓上培養槽運転に伴う電力消費のデータを取得。シミュレーターver.1を2022年9月開発完了見込み。 <p>【バイオファウンドリ拠点】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・関東圏に発酵槽から生産ターゲット物質の分離・精製処理を含む実証拠点の構築を整備中。新設建屋の施工事業者を選定し、設計についてのデザインレビュー（開発、設計の審査）を実施。運営委員会を設置し、各種法規制の順守のため運営マニュアルを策定するなど、バイオファウンドリ拠点の運用方針を策定2022年度中に最大3,000L規模の発酵槽を備える実証設備 	
--	--	--	--

			<p>を完成させ、1種のターゲットを用いたスケールアップ検証予定。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・最大1,500L規模の既存の発酵槽設備で1種のターゲットを用いたスケールアップ検証に着手済み。 ・さらに、高性能CFDソフトウェア・スケールダウンモデルを利用したバイオ生産プロセスの最適化手法とスケールアップ実証手法の開発、マイクロ波技術を使ったバイオ生産プロセスの低コスト化・省エネ化・低炭素化等の周辺技術開発を進めている。 ・2020年度実施者の取組の中から神戸大・阪大・大工大・京大・ちとせ研究所が整備・開発を進めている設備をもとに、関西圏バイオファウンドリ拠点化を検討し着手。本格稼働またはPJ内研究の支援を行い、PJ外からの受入れ仕組みを構築中。 <p>【人材育成】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・バイオ生産プロセスにおける最適化及びスケールアップ手法、CFD解析手法の研修、バイオファウンドリ設備を使ったバイオ生産プロセスの運転の実習等の研修資料の完成。予定を前倒しして、2022年の秋から研修を開始。 ・大阪工大に教育施設として設置完了。人材育成プログラム（基礎・応用セミナー）基礎編受講実績61名。NEDO特別講座として一般公開を開始。 	
	<p>研究開発項目 ③「産業用物質生産システム実証」</p>	<p>以下の内容を基本としつつ、用いる生物種やターゲット物質等によって目標が大きく異なることから、具体的な定量目標は研究開発テーマ毎に別途実施計画書において定める。</p> <p>【委託フェーズ】 研究開発期間終了時点で、産業用物質生産システム検証を開始できる基本的な株やデータの取得が完了している。</p> <p>【助成フェーズ】 研究開発期間終了時点で、評価サンプルによる生産物評価により、性能、環境合理性、経済</p>	<p>※詳細は各テーマの事業原簿を参照。全ての実施テーマは、事業化に向けて解決すべき各種課題について毎年度の目標を定めて研究開発を実施。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・助成フェーズの実施テーマは、スケールアップ検討を進めることにより各テーマにおける毎年度目標を達成している（または達成見込み）。一部ターゲット物質の生産性向上に関して期待通りの成果が出なかったテーマがあるが、今後培養条件の再検討を行う等課題解決を進めている。 ・委託フェーズの実施テーマは、産業用物質生産システム検証を開始できる基本的な株や 	○

	<p>性等の面で総合的に競争力があることを示す。</p>	<p>データの取得が進展している。ステージゲート段階での目標クリアに向けて研究を推進。助成フェーズでのスケールアップ検証準備を実施計画に含んでいるテーマでは、培養条件の確認など着実に研究を進めている。</p>	
<p>投稿論文</p>	<p>2020年度：査読付き1件、その他1件 2021年度：査読付き22件、その他3件 2022年度：査読付き25件、その他0件（見込み含む）</p>		
<p>特許</p>	<p>2020年度：国内出願2件、外国出願0件、PCT出願2件 2021年度：国内出願2件、外国出願1件、PCT出願3件 2022年度：国内出願23件、外国出願7件、PCT出願6件（見込み含む）</p>		
<p>その他の外部発表 (プレス発表等)</p>	<p>2020年度：プレス発表2件、学会発表・講演28件、新聞等掲載2件 2021年度：プレス発表8件、学会発表・講演67件、新聞等掲載12件 2022年度：プレス発表9件、学会発表・講演64件、新聞等掲載15件 (2022年8月時点)</p>		
<p>4. 成果の実用化・事業化に向けた取組及び見通しについて</p>	<p>研究開発項目①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」 研究開発項目②「生産プロセスのバイオフィアウンドリ基盤技術開発」</p> <p>【共通基盤（微生物）】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・個々の成果の実用化に向けた取組を進めるとともに、関東圏バイオフィアウンドリ拠点の形成着手を契機に、実施者の取組をベースに関西圏バイオフィアウンドリ拠点化検討を進めた。プロジェクト全体でバイオプロセス開発プラットフォームとして主要な成果をまとめた拠点化を進め、各拠点が有機的な連携関係のもと機能できる形を協議し取組を強化している。 ・特に人材育成に関しては、プロジェクト参画機関を対象に試行を進めて公開準備をしてきた講座を含め全体カリキュラムを整理し、NEDO 特別講座の枠組みを活用して一般に向けてバイオものづくり人材育成講座を開講した。 <div style="text-align: center;"> <p>研究開発ステージ</p> </div> <p>・その他、開発された各種の成果の実用化を促すため、ワークフローの作成を進めている。将来的には外部機関のボトルネック課題に対してどの技術を活用すべきか可視化可能なワークフロー図を作成する予定。</p> <p>・実用可能な要素技術として、1. 機械学習等の情報解析システムによるテンプレート酵素選定技術、2. 計算科学的手法に基づく人工酵素構築技術、3. 高機能性テンプレート酵素/人工酵素の提供、4. ハイスループット活性評価システム（全自動ハイスループット活性評価システム、微小ゲルビーズを用いたハイスループット酵素アッセイシステム）、5. ハイスループット可溶性評価技術、6. 基質特異性の高速多様化技術基質結合イベントを指標とした新規スクリーニング法を想定している。単体もしくは組み合わせを活用したビジネスモデルの検討している。</p>		

	<p>【共通基盤（微生物・バイオファウンドリ）】 ・バイオファウンドリ拠点の核となる建屋を新設し、同建屋にバイオ生産プロセスを開発するために必要な設備をできる限り備え、様々な生産実証案件に対応できるようにする。さらに、生産実証を実施可能な適切な情報管理体制を整える。また、短期間に最適な条件を確立し、スケールアップできる拠点となるために、高度な CFD やスケールダウンモデルを開発する。低コスト、省エネのバイオ生産プロセスを提示できる拠点となるために、マイクロ波技術や原料の新しい前処理技術等を開発、導入する。バイオ生産プロセスの商用化に必要と考えられる製造コスト試算や LCA による CO2 排出量算出等のサービスを提供できるようにする。この拠点において、日本のバイオものづくりの基盤となる人材を育成する。</p> <p>【共通基盤（植物）】 ・植物による物質生産に関しては、本プロジェクトで開発した技術の社会実装のために、知財調査を行い、特許出願やノウハウ化に努め、学会発表はもとより、バイオビジネスにおけるパートナーリングイベントを活用することで、積極的に対外的発信や情報交換を行い、国内外の企業にライセンス契約による実用化を働きかけている。産業技術総合研究所・北海道大学で取り組んでいる、新規に開発された宿主植物の種子においては、種子そのものがライセンス契約等により提供可能なため、それを踏まえたマテリアルの管理を行うと共に、特許出願に向けた準備を進めている。また、鹿島建設株式会社においては、国内外の遺伝子組換え植物工場での有用物質生産を計画する事業者に対して施設受注につなげていけるよう、ホームページ、各種関連イベントやセミナーなどを通じて PR を進め、成果を知財化し、施設受注における競争優位性を高めるほか、ライセンス販売が可能な体制を整えている。</p> <p>研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」 ・本プロジェクトにおいて事業化に向けた課題解決を図り、助成フェーズ終了時点で評価サンプルによる生産物評価により、性能、環境合理性、経済性等の面で総合的に競争力があることを示す。並行して、プロジェクト終了後の企業化計画に基づき、NEDO 事業終了後の取組として、試作品、試験的サービス等の社会的利用（顧客への提供等）が開始される、2030 年までに製品・サービス等として社会実装されることを目指す。</p>	
5. 基本計画に関する事項	作成時期	2020 年 2 月 作成
	変更履歴	2020 年 9 月 改訂 プロジェクトマネージャー交代に伴う改訂 2021 年 2 月 改訂 別紙 1 研究開発項目②の記載内容変更 2021 年 3 月 改訂 別紙 1 研究開発項目②の記載追記 2021 年 4 月 改訂 プロジェクトマネージャー交代に伴う改訂 2022 年 4 月 改訂 人材育成の運用等記載追記

カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発

用語集

研究開発項目①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」および

研究開発項目②「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」

(微生物)

用語	説明
AG Δ -GAG Δ	細胞壁の多糖成分ある α -1,3-グルカン (AG) とガラクトサミノガラクタン (GAG) の合成機能が欠損した麹菌。菌糸分散性を示す。
CFD	Computational Fluid Dynamics (数値流体力学) の略。偏微分方程式の数値解法等を駆使して、流体に関する運動方程式をコンピュータで解く数値流体力学により、空気の流れや温度の分布状況の可視化を行う数値解析、シミュレーション手法。
<i>CutL1</i>	麹菌におけるクチナーゼ遺伝子。クチナーゼはワックスエステルであるクチンを加水分解する酵素であり、麹菌 <i>CutL1</i> は生分解性プラスチック PBSA を分解することでも知られている。
DO (Dissolved Oxygen)	溶存酸素量。液中に溶解している酸素の量を指す。
DoE (Design of Experiments)	実験計画法。効率のよい実験方法を設計し、結果を適切に解析することを目的とする統計学である。実験結果に影響すると想定される、多数の要因の効率的な組合せを導き出す。
DR (Design Review)	製品企画、製品設計、生産準備等の各設計の最終段階で、設計に問題がないかを担当者以外の第三者を交えて評価、検討すること。
FNAP-sort	Fluorescent nucleic acid probe in droplets for bacterial sorting の略。ドロップレット内で増殖した微生物の RNase を指標にして、微生物の増殖を蛍光で検出する技術。
GMD	Gel Microdroplet の略称。WODL とは水相にゲル化剤を添加して固体化している点が異なる。固体であるため、外液を水溶液に置換可能である。

GMD 凝集培養法	微生物を封入した GMD を、油相中で緩く凝集させた状態で培養する技術。GMD 内の微生物細胞は GMD 間を移動しないが、水溶性物質の移動は起こるため、微生物間相互作用による微生物の増殖促進が期待される。
k_{La}	総括酸素移動容量係数。水中への酸素の溶解速度を示す指標
LCA (Life Cycle Assessment)	製品やサービスのライフサイクル全体（資源採取、原料生産、製品生産、流通、廃棄又はリサイクル）又はその特定段階における環境負荷を定量的に評価する手法。
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。
pH (Potential Hydrogen)	水素イオン濃度指数。溶液の酸性・アルカリ性の程度を表す物理量を指す。
RNAseq 解析	次世代シーケンサーを利用して細胞内の全転写物の配列を解読することで、転写物の発現量の定量、新規転写配列の発見を行う解析手法。
ScreenHit	本プロジェクトで開発したウェブインターフェイス。本プロジェクトで収集した探索情報、微生物情報及びゲノム情報が保存されているクラウドサービスから、これらの情報を検索・閲覧可能。
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。
WODL	water-in-oil w/o droplet の略称。WODL とは、油中にドロップレットが分散した状態やドロップレット自体の事を指す。外液が油、内液が水溶液になっている。
<i>XynF1</i>	麴菌におけるキシラナーゼ遺伝子。キシランを加水分解する酵素。
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。
アルスロファクチン	<i>Pseudomonas</i> 属細菌 MIS38 が生産するリポペプチド型バイオサーファクタント (表面活性物質)。界面活性、保湿、抗菌活性等の効果を持つ。

イソブタノール	炭素数 4 の分岐鎖アルコール。エステル原料になることから化成品の中間体原料、また燃料として使用される。
遺伝子アノテーション	遺伝子配列にどのような機能なのかを割り当てること、遺伝子同定。
遺伝子発現プラットフォーム	遺伝子組換え技術を利用して遺伝子を発現させる基盤菌株や菌株での発現システム。
イメージングソータ	画像情報等に基づきドロップレット等を選別可能な装置。蛍光・比色、微生物の増殖、形態等に基づくスクリーニングを実現する。
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。
オミクス解析	生物内のゲノム、転写物、タンパク質、代謝物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が挙げられる。
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。
カタボライト抑制転写因子	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であるカタボライト抑制に関与する遺伝子の転写を制御するタンパク質。
菌糸分散株	東北大学が開発した菌糸が絡みつかない麹菌。麹菌は一般的に培養中に菌糸伸長によってペレット状に絡みつくが、細胞壁の多糖成分を合成できない麹菌は培養中でも絡みつかずパルプ状に生育する。
高効率タービン翼	佐竹マルチミクス株式会社が開発したタービン翼。極めて低い動力数、高いガス吸収能、高い剪断力を生み出すことが特徴。
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。
細胞壁ストレス関連遺伝子	細胞と外界の境界である細胞壁が晒されるストレスに応答して発現する遺伝子。細胞壁ストレスの例としては、浸透圧、温度、pH などが挙げられる。

酸化・浸透圧関連転写因子	酸化ストレスや浸透圧ストレス応答に関与する遺伝子の転写を制御するタンパク質。
酸素移動速度 (OTR)	Oxygen Transfer Rate の略で、培養槽内の気泡中（気相）の酸素が培養液（液相）へ移動して溶存酸素となる速度を示す。単位は $\text{mmol O}_2 / (\text{m}^3 \cdot \text{hr})$ 。
酸素移動容量係数 ($k_L a$)	気液界面に境膜を仮定し、境膜内での酸素分子の移動速度を評価したパラメータ。一般的に、気相中の酸素が液相に溶け込む速度を表し、培養槽内の酸素供給能力を示す。単位は hr^{-1} 。
ジャーファーメンター	微生物の大量培養に用いる装置。温度、通気量、攪拌速度、pH 等の微生物の培養に必要な条件を一定に保つことができる。
主成分分析	数万次元におよぶ遺伝子発現空間内のサンプルの分布を可視化する 1 つの方法。二次元平面で可視化を行う場合、サンプルの分散が最大となる方向を第一主成分、それに直交する二番目に分散が大きい方向を第二主成分として決定し、サンプル点をプロットする。
樹木チップ	街路樹や公園などの木を剪定したときに出る剪定枝を細かくチップ状にした物。埋め立てなどで処理されることが多い。
人工酵素プロトタイプ候補	人工的な改変により人工酵素プロトタイプとなり得ることが期待される酵素
スクリーニング	ある指標にしたがって標的物を選別すること。研究項目 1 では、目的の活性・機能等の表現型にしたがって、環境微生物や育種微生物を選別・獲得することを意味する。
スケールアップファクター	培養スケールを上げる際に指標とする物理因子
スマートセル	生物細胞が持つ物質生産能力を人工的に最大に最大限引き出し、最適化された細胞。
剪断応力	物体内部のある面と平行方向に、その面にすべらせるように作用する際に生じる物理量。
単位体積当たりの通気攪拌所要動力 (P_{gv})	単位体積当たりに使用した通気攪拌時の消費動力。スケールアップの指標として用いられることがある。単位は kw/m^3 。

テンプレート酵素	基質特異性が広く、触媒効率が高い酵素であり、新規反応の創出が期待できる酵素。
テンプレート酵素候補	テンプレート酵素の性能が期待できる酵素。
ドロップレット	水溶液や油中に分散した微小水滴の事。water-in-oil w/o droplet (WODL) と Gel Microdroplet (GMD) を含む。本事業では直径 30 から 120 μm 程度のドロップレットを微生物の微小培養器として利用する。
ドロップレット混合培養系	WODL か GMD に微生物を封入し、ドロップレット内もしくはドロップレット間での微生物間相互作用を引き起こしながら培養する技術。未培養・難培養微生物の可培養化や、ヘルパー微生物のスクリーニングへの応用が期待される。
ドロップレット培養スクリーニング技術	WODL や GMD のドロップレットを培養器として微生物を培養し、セルソーター等の選別技術により微生物をスクリーニングする技術のこと。なお、通常のセルソーターではドロップレットが崩壊してしまうため、専用の装置が必要となる。
バイオ生産プロセス	バイオリファイナリー技術により目的物を生産するまでの工程及び当該工程を指す。
バイオフィアウンドリ	合成生物学や未利用微生物の実用化も含めた微生物等の育種から生産に必要な大量培養に至るまでのバイオ生産システム。
バイオマス	生物資源 (bio) の量 (mass) を表す概念であり、再生可能な、生物由来の有機性資源で化石資源を除いたもの。
バイオリファイナリー	バイオマスより様々な燃料や化学製品を製造すること。
培養パラメータ	培養状態の評価に使用する変動値
発現変動遺伝子 (DEGs)	Differential Expressed Genes の略。RNAseq 解析において条件の異なる 2 条件間で発現量が上昇 (あるいは減少) している遺伝子。
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。

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。
ヘルパー微生物	スマートセルなどの特定の物質生産株の生育・生産能力を向上させる微生物のこと。
マイクロ波	空間に生じた電場と磁場の変化によって生まれる波で電磁波の一種。周波数としては 300MHz から 300GHz（波長にすると 1m から 1mm）程度であり、電子レンジの加熱や携帯電話、GPS の通信等に使用される。加熱においては誘電体に直接的、選択的に作用して発熱させることができる。
未培養・難培養微生物	人類が単離培養してきた微生物は、地球上の 0.02%程度に過ぎず、残りの約 99%の微生物は単離できていない。この 99%の微生物が未培養・難培養微生物である。従来の技術で培養できない微生物が難培養微生物であり、技術的には培養可能であるが何らかの理由で単離培養できていない微生物が未培養微生物である。
ミリオンスクリーニング技術	本事業で開発を行う改良型のドロップレット培養スクリーニング技術のこと。100 万検体以上のスクリーニングを基本単位としているため“ミリオン”と名付けた。
ムサシメソッド	テンプレート酵素候補を提示する新規情報解析技術
溶存酸素濃度 (DO)	Dissolved Oxygen の略であり、水に対してどれだけの濃度で酸素が溶存しているかを示すもの。単位は mg/L。
連続培養	培地成分を連続的に加え、生産物を含む培養液も同じ流量で連続的に引き抜く培養方法。
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。
人工テンプレート酵素	テンプレート酵素としての性能を高めた改変酵素

人工酵素	人工的な改変により目的の基質に対して産業レベルの高活性を付与した酵素
人工酵素プロトタイプ	人工的な改変により目的の基質に対して特異性を持たせた酵素

(植物)

用語	説明
BLAST 解析	DNA やアミノ酸配列のアライメント比較を行うアルゴリズム。
LCA 評価	Life Cycle Assessment (LCA) とは、本プロジェクトにおけるライフサイクル全体（遺伝子組換え、組換え植物の栽培、収穫、破碎、清澄化、精密濾過、精整）でそれら CO ₂ 排出量等の環境負荷を定量的に評価するための方法。
magnICON®	デンカ株式会社の保有する植物一過性発現によるタンパク質生産系。トバモウイルス由来のウイルス複製因子を利用する第二世代ウイルスベクター。目的遺伝子とともにバイナリープラスミドベクターの T-DNA 領域に組み込まれ、アグロバクテリウムによって植物細胞内に導入される。
<i>Nicotiana benthamiana</i>	オーストラリア固有のタバコ属の野生種。植物ウイルスに対する感受性が高く、植物ウイルス学などでモデル植物として利用されてきた。一過性遺伝子発現法の事実上のモデル植物の一種である。
RNAi	二本鎖 RNA により誘導され、二本鎖 RNA に相同な配列を持つ mRNA やウイルス RNA が分解される。植物を含む広範囲の真核生物が共通に持つシステム。
RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRP)	ウイルスに由来し RNA を鋳型として RNA を増幅する作用を有する酵素。
アグロバクテリウム	植物に対して病原性をもつグラム陰性菌の一群の総称。T-DNA と呼ばれるプラスミドの一部の領域を植物ゲノム中に組み込むことで、形質転換を生じさせる性質がある。外来遺伝子を組み込むトランスジェニック植物の作出に利用される。
アポプラスト	植物体内において、細胞膜より外側の水溶液で満たされた空間で、細胞壁および細胞間隙の総体をさす。また、アポプラストを満たす水溶液をアポプラス液とよぶ。

ウイルスベクター	有用タンパク質をコードする遺伝子など外来遺伝子を感染宿主細胞内で発現するための遺伝子ツール。植物ウイルスベクターは、感染植物体内で自立的に全身移行して増殖する能力を持つために、植物体全体で外来遺伝子を高発現することが出来る。
ゲノム編集 (CRISPR)	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats の略で細菌 DNA の繰り返し配列であるが、最近、侵入ウイルスを切断する免疫システムであることが見出された。システムが単純で Cas と呼ばれる DNA 切断酵素と Cas をターゲット DNA 配列に導くガイド RNA を発現するだけで働き、植物を含む多様な生物のゲノム編集（変異導入）に応用されている。
精密濾過	約 0.05～10 μm の粒子を分離するろ過処理。
セルトレイ	数 cm 程度の大きさの四角錐台状のポットが連結したトレイ状の育苗用資材。内部に培地等を充填して使用する。
総可溶性タンパク質	Total soluble protein (TSP) は、水溶性の総タンパク質を示す。
フィルタープレス	濾過・洗浄・脱水機能を持つ固液分離装置であり、ろ布で圧搾して脱水する方式。
ヘマグルチニン (HA)	インフルエンザウイルスの表面に存在する糖タンパク質。インフルエンザワクチンの主成分として利用される。
ロックウール	原料である玄武岩等を高温で溶解・成形して製造する繊維状資材。養液栽培用の固形培地として利用される。
減圧浸潤	植物体を上下反転し、地上部を遺伝子組換えアグロバクテリウム懸濁液に浸漬し、減圧・復圧を行うことでアグロバクテリウムを植物葉の細胞間隙に浸潤させる方法。本操作により組換えアグロバクテリウムが葉肉細胞に感染し、目的遺伝子が細胞内に挿入される。
光合成有効光量子束密度 (PPFD)	光合成に有効な波長 400～700 nm の範囲の光量子のフラックス密度。
有害因子	研究開発項目②-3 で定義した造語で、植物からのタンパク質精製の過程でコスト負荷の要因となる植物由来不純物を指す。
緑色蛍光タンパク質	オワンクラゲ由来の蛍光タンパク質。紫外放射・青色光で励起し、緑色光の蛍光を射出する。

研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」

(微生物)

用語	説明
BGL	β -グルコシダーゼの略称。セロビオース等の β -1,4-グルコシド結合を分解し、グルコースを生成させる酵素。
CFD (Computational Fluid Dynamics)	偏微分方程式の数値解法等を駆使して、流体に関する運動方程式をコンピュータで解く数値流体力学により、空気の流れや温度の分布状況の可視化を行う数値解析、シミュレーション手法。
CLP	環状リポペプチド cyclic lipopeptide
CSyGT	トリテルペン骨格へのグルクロン酸転移酵素（セルロース合成酵素由来グルコシルトランスフェラーゼ）。グリチルレチン酸へグルクロン酸を転移することによるグリチルレチン酸モノグルクロニドの形成に関わる。
CYP72A63、CYP72A154	β -アミリンおよびその誘導体の30位酸化酵素（シトクロム P450 モノオキシダーゼ 72）。11-オキソ- β -アミリンからのグリチルレチン酸の形成等に関わる。
CYP88D6	β -アミリンおよびその誘導体の11位酸化酵素（シトクロム P450 モノオキシダーゼ 88）。 β -アミリンからの11-オキソ- β -アミリンの形成等に関わる。
GSH	還元型グルタチオン
GSSG	酸化型グルタチオン
HYA [®]	NOSTER が、世界で初めて食品向けとして製造に成功した、腸内細菌による脂質代謝物。10-hydroxy- <i>cis</i> -12-octadecenoic acid。
KP	クラフトパルプの略称。苛性ソーダや硫化ソーダ等から成る蒸解液を用いて木材等を高温高圧で蒸解することによって得られる。
L-アミノ酸 α -リガーゼ	遊離のL-アミノ酸同士を結合させることが出来る酵素。ATPの加水分解反応と共役することで反応をすすめる。
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	分裂酵母の一種。本事業では新規 BGL 遺伝子を導入する宿主として用いられる。略称：「 <i>S. pombe</i> 」。
SDS-PAGE	SDS は Sodium Dodecyl Sulfate の略称、PAGE は PolyAcrylamide Gel Electrophoresis の略称。タンパク質に SDS を付加して負に帯電させることによってポリアクリルアミドゲル中を電気泳動させ、分子量の違いで分離するタンパク質の分析方法。

UGT73P	第2糖のグルクロン酸転移酵素（UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ）。グリチルレチン酸モノグルクロニドへさらにグルクロン酸を転移することによるグリチルリチンの形成に関わる。
β -アミリン	多くの植物種に共通して含まれる、トリテルペンの一種。2,3-オキシドスクアレンが β -アミリン合成酵素により閉環されて形成される。
アルテミシニン	3分子のイソプレンユニットをもつセスキテルペノイドのひとつで、抗マラリア活性を有する。前駆体（アルテミシニン酸）を酵母で生合成させ化学合成法と組み合わせることにより、工業スケールでの合成が可能となっている。
アンセリン	β -アラニンとN-メチルヒスチジンから成るジペプチド
イソプロパノール	イソプロピルアルコールの別名であり、2-プロパノールともいう第2級アルコールのひとつである。
医療器具洗浄	侵襲的治療に用いられた医療器具は、洗浄、消毒・滅菌工程を経て、再生される。医療器具の洗浄には、タンパク質、脂質を主成分とする体液汚れ、また感染性タンパク質などを効果的に除去することが求められる。
エチレン	二重結合で結ばれた炭素2個の有機物プロピレンと同様に合成樹脂や石油化学製品の原料として主に使用されている。
回収ボイラー	クラフトパルプ製造工程で発生する黒液を燃焼してエネルギーを得るためのボイラー。
カルノシン	β -アラニンとヒスチジンから成るジペプチド
グリチルリチン	甘草の根に含まれる有効成分。スクロース（砂糖）の150倍の甘みを持つといわれる。多数の薬効があり、特に消化性潰瘍や去痰薬としての効果がある。
グリチルレチン酸	甘草の根に含まれるグリチルリチンの加水分解によって得られる。グリチルリチンはスクロース（砂糖）の150倍の甘みを持つといわれる。多数の薬効があり、特に消化性潰瘍や去痰薬としての効果がある。
グリチルレチン酸モノグルクロニド	グリチルレチン酸からのグリチルリチン合成における中間体。スクロース（砂糖）の900倍の甘味を持つといわれる。グリチルレチン酸の3位の水酸基にグルクロン酸が転移して形成される。

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。
サポニン	ステロイド骨格またはトリテルペン骨格を含むサポゲニンと糖から構成される配糖体の総称。グリチルリチンを含む。
酸素移動容量係数	気相中の酸素が培養液に溶け込む速度を表す。エアレーションの良し悪しを示す指標。略称: k_{La} 。
ジャーファーマンター	微生物の大量培養に用いる装置。温度、通気量、攪拌速度、pH等の微生物の培養に必要な条件を一定に保つことができる。
セルラーゼ	セルロースを分解する酵素の総称。分解機構によりセロビオヒドロラーゼやエンドグルカナーゼ等に分類される。
第二世代糖	可食由来の糖 (第一世代糖) ではなく、非可食物 (草本類、木質系) を由来とする糖。
テルペノイド	イソプレヌ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等の官能基を持つ誘導体の総称。構成単位毎にトリ(6)、セスキ(3)等がある。
バイオスティミュラント	植物に対する非生物的ストレスを制御することにより気候や土壌のコンディションに起因する植物のダメージを軽減し、健全な植物を提供する新しい技術
バイオ農薬	バイオ農薬は、植物、動物、バクテリア、鉱物などの天然資源から作られた農薬。害虫を駆除する天然物質 (生物化学農薬)、害虫を駆除する微生物 (微生物農薬)、植物の成長を調節する生化学物質など。
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。
プラスミド	微生物の核外に存在しており、染色上の DNA とは独立しているが、増殖時の分裂では引き継がれる。一般的には環状の 2 本鎖構造を取っている。
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。

プロテアーゼ	タンパク質のペプチド結合の加水分解を触媒する酵素。タンパク質分解酵素。医薬品製造、食品加工、皮革・繊維加工、洗浄剤有効成分などとして産業利用されている。主に常温性の枯草菌由来酵素が利用されている。
プロピレン	炭素数が3つであり、二重結合を1つもつ有機物。合成樹脂や石油化学製品の原料として主に使用されている。
ポリプロピレン	プロピレンが結合して大きな分子になったものを言う。
メチル化酵素 YNL092W	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 由来のカルノシン N-メチルトランスフェラーゼ。S-アデノシル-L-メチオニンとカルノシンを基質として、S-アデノシル-L-ホモシステインとアンセリンを生成する。
流加培養	菌体と培養液を培養終了まで抜き取らずに、培地を連続的又は間欠的に培養槽に供給する培養法。
理論対糖収率	グルコースから生産可能な最大量を示す値。イソプロパノールの場合、理論対糖収率が33%であるため、100gのグルコースから最大で33gのイソプロパノールが生産可能。
菌体反応	菌体内に酵素を発現させ、菌体を触媒代わりに酵素反応を行う。酵素の発現だけでなく、酵素反応においてATPなど菌体内の代謝物を利用することが可能である。
超好熱菌由来のプロテアーゼ	好熱菌から単離されたタンパク質分解酵素で、高温環境などに対して顕著な安定性を示すことから特殊な用途に用いることができる。しかし、自己分解の可能性があるため、大量生産や取り扱いが難しい。

(植物・藻類)

用語	説明
CRISPR-Cas9	細菌の獲得免疫システムを利用したゲノム編集システムである。化膿性レンサ球菌由来のクラス2 type II CRISPR-Casに属するCas9と呼ばれるDNA切断酵素を用いる。短いRNA分子であるgRNA(ガイドRNA)とCas9が複合体を作り標的DNAを切断することで変異が導入される。2012年に初めて報告されて以来、簡便さから現在広く利用されている。

TiD	光合成細菌由来のクラス 1 type I-D に属する CRISPR-Cas を用いたゲノム編集技術であり、刑部 G が開発した新規の国産ゲノム編集ツールである。ヒト細胞および植物において変異導入が可能であることが示されている。
エピジェネティクス	遺伝子の DNA 配列に依存せず、遺伝子の転写活性や染色体構造の制御に関する研究分野。ヒストンタンパク質の化学修飾および DNA メチル化などが主な制御因子として働き、全ての真核生物に共通して保存されるメカニズム。
ゲノム編集	標的とする遺伝子を特異的に切断することによって、遺伝子の破壊や外来 DNA の挿入を行う技術。様々な生物種に利用可能であり、微生物から植物や動物での遺伝子改変に適用することができる。
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。
バイオスティミュラント	生物が生来的にもつ生体内機能および反応を刺激し、励起することができる物質。各種の有機酸、アミノ酸およびミネラルなどの植物への投与により、環境ストレス耐性や成長などにポジティブに働くことが知られている。
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

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。パリ協定、SDGs等において産業界にはCO2削減、炭素循環型社会の実現等社会課題の解決と持続的経済成長の両方が求められてきているが、近年の合成生物学等の発展に伴い、世界では様々な産業がバイオ化していく情勢となっている。欧米、中国等では、バイオエコノミーの拡大に向け、国家戦略を策定し加速度的に投資を拡大している。2030年、世界のバイオ市場は約200兆円規模に拡大すると予測(OECD)され、特にものづくり分野での成長が見込まれている中、循環型社会形成に向けた課題解決にバイオが担える役割は大きいと考えられる。バイオによるものづくりは、従来の化学プロセスに比べ、省エネルギー・低コストに物質生産が可能であるとともに、原料を化石資源に依存しないバイオマスからの物質生産が可能であり、炭素循環型社会実現に資するものづくりへの変革が期待できる。バイオマス等を原料としたものづくりへの転換、炭素循環型社会の実現を目指す上で強化すべき取組として、バイオ資源活用促進のための各種技術や従来法にとらわれない次世代生産技術開発等について情報解析技術を活用して確立することが急務と考えられる。

国内外の状況

① 我が国の状況

2000年代にバイオテクノロジーを活用する戦略で策定されたバイオテクノロジー戦略大綱における取組を踏まえ、持続可能な新たな社会経済システムの要素として欠かすことができない「バイオエコノミーの実現」に向けた戦略へと転換し、2019年6月に新たなバイオ戦略が策定された。当該戦略では、2030年に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標に、目指すべき社会像や狙うべき市場領域の中で取組を進めるものである。規制・公共調達等に関しては、バイオ生産品の表示を通じた「見える化」や公共調達制度のバイオ製品への対応などの検討や取組を進める方針が打ち出されている。高機能バイオ素材、バイオプラスチック、生物機能を利用した生産システム等の市場領域についても取組強化が打ち出され、バイオとデジタルの融合を基盤とする環境・技術・人材の整備が求められている。特に、原料から最終製品に至る過程に存在するボトルネック(原料供給やスケールアップのむずかしさ)を技術的に解消する上で、我が国の強みである微生物育種や発酵技術等を活かし、生産プロセスを高度化した次世代生産技術開発を図る必要性が言及されている。

② 世界の取組状況

米国をはじめとした諸外国ではバイオ分野への投資が加速しており、IT系企業がバイオとデジタルの融合領域に対する投資を活発化させている。欧州では原料処理から製品(化合物)生産までを一貫生産できる設備を持つ微生物発酵生産用パイロットス

ケールプラント（例：Bioprocess Pilot Facility）、米国でもローレンス・バークレー国立研究所に同様の設備（Agile Bio Foundry）が整備される等、バイオフィアウンドリ拠点の構築が進んでいるほか、世界的なアライアンス立ち上げの動きも活発化している（Global Biofoundry Alliance）。

事業の位置づけ

2019年6月に統合イノベーション戦略推進会議決定された「バイオ戦略」（2019）において、「2030年に世界最先端のバイオエコノミー社会を実現」が全体目標に掲げられている。「世界最先端のバイオエコノミー社会」とは①バイオフィースト構想②バイオコミュニティ形成③バイオデータ駆動の実現とされている。基本方針として、①市場領域設定・バックキャスト・継続的なコミット②バイオとデジタルの融合③国際拠点化・地域ネットワーク化・投資促進④国際戦略の強化⑤倫理的・法的・社会的問題への対応が明記されている。さらに、我が国の特徴（強み）と世界の潮流を踏まえつつ、市場の成長性を十分に考慮して、内外から大きな投資を呼び込むことが見込まれる以下9つの市場領域が設定された。①高機能バイオ素材（軽量性、耐久性、安全性）②バイオプラスチック（汎用プラスチック代替）③持続的・一次生産システム④有機廃棄物・有機排水処理⑤生活習慣改善ヘルスケア、機能性食品、デジタルヘルス⑥バイオ医薬・再生医療・細胞治療・遺伝子治療関連産業⑦バイオ生産システム（バイオフィアウンドリ）⑧バイオ関連分析・測定・実験システム⑨木材活用型建築・スマート林業。

2020年6月に統合イノベーション戦略推進会議決定された「バイオ戦略」（2020）においても、②市場獲得を実現するデータ連携③グローバルバイオコミュニティ・地域バイオコミュニティの形成④バイオ戦略2019に沿って遅滞なく取り組むべき市場領域に係る基盤的施策の推進⑤バイオ戦略を推進する司令塔機能の強化が示されている。

さらに、2021年6月に統合イノベーション戦略推進会議決定された「バイオ戦略フォローアップ」において、直ちに取り組むべき感染症収束後の迅速な経済回復を見据え、バイオ戦略2019に沿って遅滞なく取り組むべき基盤的施策（データ基盤整備関連、バイオコミュニティ形成関連、制度整備関連等）が決定された。さらに「バイオ戦略」（2019）で策定された9つの市場領域について、2030年の市場規模目標の達成に向けて取り組む施策が決定、市場領域及び市場領域ロードマップの検討に当たっては、それぞれの領域のみに留まることなく、領域横断的な発想やロードマップ間の連携等も念頭に置いて、バイオコミュニティにおける具体的な取組の状況を踏まえることが明記されている。

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カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発は、環境負荷低減と炭素循環型社会の構築等地球規模の課題解決に貢献することから社会的必要性は大きい。また、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、多様な技術が求められる領域を対象としているが効率的な開発を進めるためには産学官の英知の結集を要するため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。

現状技術ではコスト的に見合わないため民間企業には市場原理に基づく研究開発実施のインセンティブが期待できないことから国主導で実施する必要性が高い。そして、バイオプロセスのLCAは標準的な評価手法が確立されておらず、プロジェクトを通じてコンセンサスを得ながら開発を進める必要がある。

最後に、本事業は工業（ものづくり）産業の競争力強化に貢献するアウトプットが期待できるが、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、農畜水産分野への展開が可能であり、波及効果が大きいプロジェクトと考えられる。

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7年間、総事業規模約150億円（NEDO負担額138億円）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367万t-CO₂/年相当のCO₂削減に貢献することをアウトカム目標としている。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標としている。

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、生物機能を活用したものづくりにおいて実生産との橋渡しをより効率的に行うバイオファウンドリ基盤を構築し、バイオ由来製品の創出に向けた産業用物質生産システムを確立する。また、新たなバイオ資源の拡充、産業用スマートセル創出に資する統合解析技術、物質生産工程での高精度な制御を可能とする情報解析技術等を確立する。産業用物質生産システムによるバイオ由来製品創出に向けた検証や本プロジェクトで開発した技術の利用により、社会実装に向けた橋渡し検証事例を 10 件以上創出する。

C02 削減や炭素循環型社会の実現等社会課題の解決と持続的経済成長の両方が求められてきている状況において、現状技術ではコスト的に見合わないため民間企業には市場原理に基づく研究開発実施のインセンティブが期待できない領域である。また、バイオプロセスの LCA は標準的な評価手法が確立されていないことから、国が主導して実施する必要がある。これらは、複数の専門分野にまたがる機関の連携が必要であり、企業、アカデミア、研究機関等の産学官が一体となって基盤構築をする必要がある。

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「バイオ資源活用促進基盤技術開発」

【中間目標（2022 年度）】

バイオものづくりの社会実装促進に要する酵素、微生物、植物等の新規バイオ資源候補を 20 件以上提案する。

【中間目標（2024 年度）】

バイオものづくりの社会実装促進に要する酵素、微生物、植物等の新規バイオ資源候補を 40 件以上提案し、その中から 20 個以上有用なものを選抜し評価する。

【最終目標（2026 年度）】

バイオものづくりの社会実装促進に要する酵素、微生物、植物等の新規バイオ資源候補を 100 件以上提案し、その中から 20 個以上有用なものを選抜・評価し、ユーザーとなる企業に提供可能な状態とする。

研究開発項目②「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」

【中間目標（2022 年度）】

次世代のバイオ生産システム基盤の基本設計に目途が立ち、評価サンプルとなる

生産物が得られる環境であることを1例以上のモデル生産物で確認する。また、生産プロセス情報等に基づく産業用スマートセル開発に向けて、生産と育種を関連づけさせることができる統合解析システムのプロトタイプを開発する。

発酵槽から生産ターゲット物質の分離・精製処理を含む、微生物を用いた物質生産の実用化検証が可能なバイオファウンドリ拠点を形成し、モデル生産物で検証を開始する。

【中間目標（2024年度）】

生産パラメーター情報等をフィードバックして開発する産業用スマートセルを用いて、具体的な生産物事例を設定し、次世代のバイオ生産システム基盤の基本設計が実生産への橋渡しをする上で有効であることを最低1つのターゲットで検証する。生産プロセス情報に基づく産業用スマートセル開発に向けて、生産と育種を関連づけさせることができる統合解析システムの有効性を検証する。

バイオファウンドリ拠点を活用して企業・アカデミア等が実用化を進める生産ターゲット物質について複数例検証を行いながらバイオファウンドリ機能の改善点を明確にするとともに、ものづくり人材の育成プログラムを作成する。

【最終目標（2026年度）】

産業用スマートセルの開発やサンプル評価をするための生産物を得るまでのプロセスについて、開発期間の短縮化、プロセスの省力化等が可能であることを実証する。また、次世代生産技術への育種モデルの変換を目指した拡張性のある統合解析システムを確立する。

企業・アカデミア等が実用化を進めるターゲット物質についての検証事例を増やしてバイオファウンドリ拠点の実効性を示すとともに、ものづくり人材の育成プログラムの運用を開始する。

研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」

以下の内容を基本としつつ、用いる生物種やターゲット物質等によって目標が大きく異なることから、具体的な定量目標は研究開発テーマ毎に別途実施計画書において定める。

【委託フェーズ】研究開発期間終了時点で、産業用物質生産システム検証を開始できる基本的な株やデータの取得が完了している。

【助成フェーズ】研究開発期間終了時点で、評価サンプルによる生産物評価により、性能、環境合理性、経済性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3つの研究開発項目を実施する。

研究開発項目①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」

環境中からのメタゲノムや二次代謝関連遺伝子群をデジタル技術との融合による解析を活用しつつ、新たな酵素群・微生物資源・植物等の取得を進め、あわせて関連する技術の開発を行う。例えば、高活性・高安定性・新規活性等の酵素群の拡充、有機溶媒耐性・特殊代謝経路等を持つ宿主候補の拡充、カーボンリサイクルに資する原料を安定的に活用可能とするなど、バイオ資源活用促進のための各種技術等を開発する。

なお、環境性評価や経済性評価についての検証結果を研究開発にフィードバックさせる仕組みをとることとする。

研究開発項目②「生産プロセスのバイオフィアウンドリ基盤技術開発」

我が国のこれまで培った発酵生産技術や培養／栽培技術に立脚もしくは従来法にとらわれない次世代の物質生産技術の開発及び検証を行う。既存の生産プロセス環境や設備等を有効活用しつつ、実生産への橋渡しを可能とするスケールを有し、一気通貫で生産プロセスを検証し評価サンプルを創出できるバイオ生産システム基盤の構築とその周辺技術開発を行う。例えば、情報科学を活用することにより、高精度な制御を可能とするような技術や回収、破碎、分離、精製等を含む生産プロセスに関わる基盤技術を開発する。

生産プロセスから得られる情報等に基づく産業用スマートセル開発の実現を目指し、生産パラメーター情報等をフィードバック可能とする情報解析技術を開発する。バイオフィアウンドリ基盤では産業用スマートセルを用いたバイオものづくりの検証を行い、LCA 評価等も取り入れて技術課題の解決と新たな技術を理解する人材の育成も図る。

微生物機能を活用した物質生産の実用化を促進させるため、発酵槽での培養条件の検討や生産ターゲット物質の試作等に利用可能なバイオフィアウンドリ拠点を形成し、運用するとともに、バイオフィアウンドリ拠点を活用したものづくり人材の育成プログラムを整備する。バイオフィアウンドリ機能の改善は開発技術の適用だけでなくユーザーからのフィードバックを活かすこととし、必要に応じて試行ユーザーの一部利用を含む運用を可能とする。

研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」

炭素循環型社会実現に向けて特定の生産ターゲットを設定した上で、目的物質の生産性向上を狙うとともに、量産化を見据えて生産プロセスの最適化を図り、産業用スマートセル等の生物機能を活用した物質生産による生産物のサンプル評価を行う。

なお、研究開発段階に応じて委託又は助成で実施することとし、各フェーズで設

定している事業期間以内で研究開発を終了する又はステージゲートによるフェーズ移行を求める。

【委託フェーズ】産業用物質生産システム検証を本格的に行うための事前研究を行う。例えば、高生産性生物開発が未着手の場合でラボ実験による基本株を取得する等の研究開発を想定。研究開発期間は、原則1～2年以内。

【助成フェーズ】将来の事業化に向けて必要となる実用化開発を行う。本開発終了後、3年以内に製品化を目指す事業が対象。研究開発期間は、原則1～3年以内。

事業の計画

全体の研究スケジュールは以下のとおり。

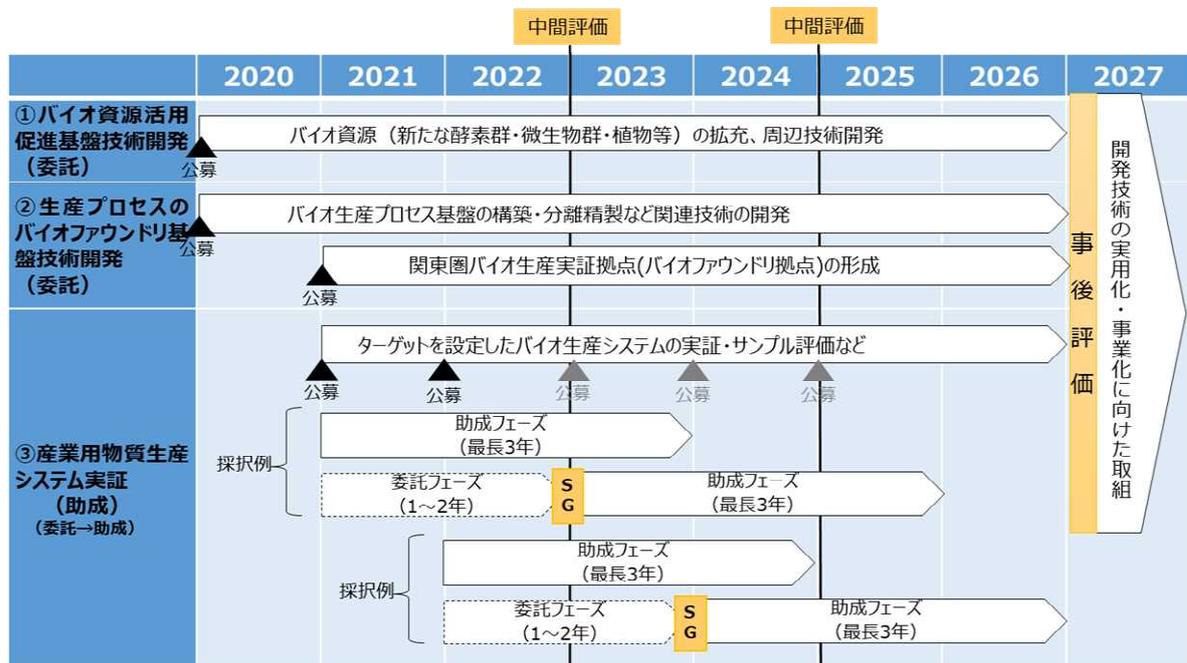


図 2-1 プロジェクト全体スケジュール

表 2-1 研究開発予算

	(百万円)							
	2020年	2021年	2022年	2023年	2024年	2025年	2026年	総額
①バイオ資源活用促進基盤技術開発								
②生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発	1,773	2,572	3,495	—	—	—	—	7,840
③産業用物質生産システム実証		300	376	—	—	—	—	676
合計	1,773	2,872	3,871	—	—	—	—	8,516

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。

千葉大学 教授 関 実氏をプロジェクトリーダー（PL）、バイオインダストリー協会 事業連携推進部長 中川 智氏及び元 産業技術総合研究所 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。

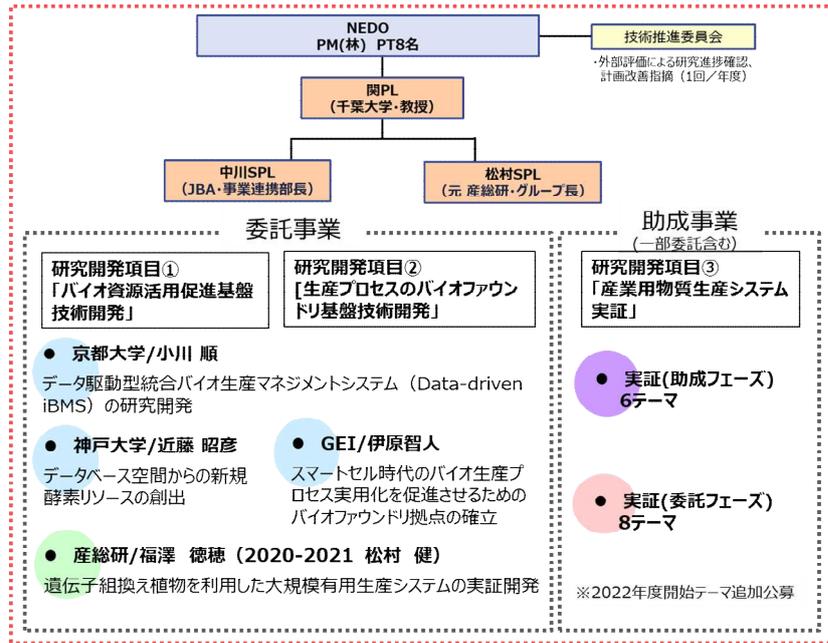


図 2-2 プロジェクト体制図（概要）

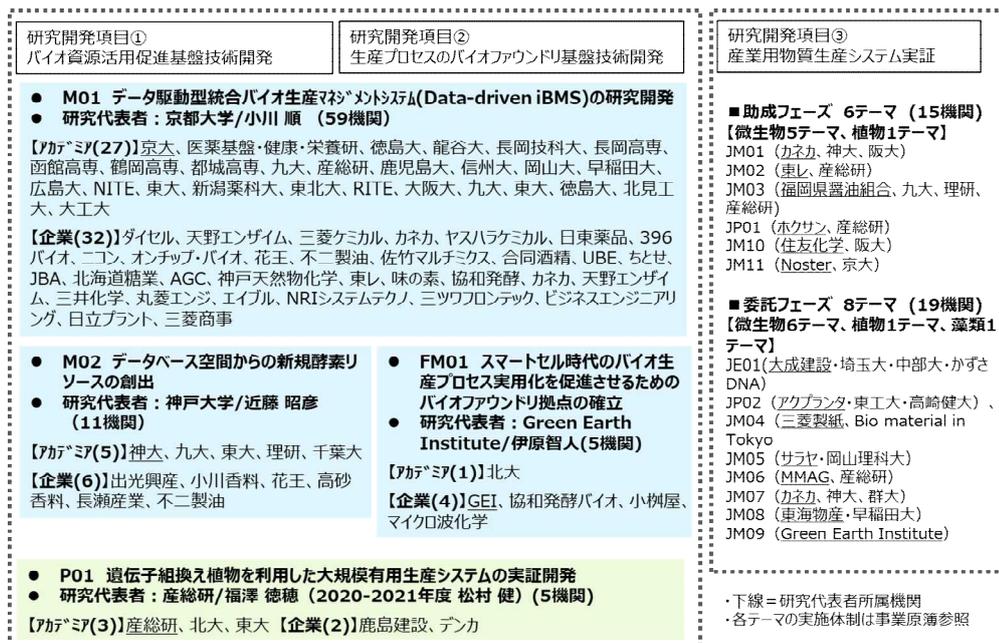


図 2-3 プロジェクト体制図（詳細）2022年6月時点

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し外部有識者による各研究開発項目の目標達成の見通し確認を行うことで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（1回）、テーマ代表者会議（3回）実施した。（表2-2参照）

表 2-2 研究開発の進捗管理

区分	概要	頻度	備考
ステアリング会議	PL/SPL/NEDOでマネジメント上の各種検討を実施。 ・中間目標、最終目標に関して各研究開発テーマの具体的な達成指標を確認 ・研究開発項目・分野を超えた連携・技術利用を推進 ・テーマ再編、予算配分見直し等を検討 ・対外的な成果の開発PR、技術利用促進策の検討・実施	随時	対面/オンライン/メール
進捗確認	・テーマ単位の研究進捗、計画の軌道修正指示等 ・個別の検討課題に応じて、現場確認・打合せ・指導等 ・月報・日誌、予算執行調査による確認	2回程度/年 都度 1回/月	対面/オンライン/メール
テーマ連携/テーマ代表者会議	年度の主要イベント・スケジュール、成果の発信など留意すべきことの共有や議論。 実施概要をnon confidentialベースで情報交換。2022年度は10月に対面でポスターセッションを予定。	1-2回/年度	対面/オンライン
技術推進委員会	採択審査にも関与した有識者を含む外部有識者による進捗確認・改善コメント。実施者にフィードバック。	1回/年度	対面/オンライン

② 技術分野における動向の把握・分析

NEDO 技術戦略研究センター(バイオエコノミーユニット)と連携し、国外政策動向・技術動向などを調査。

研究開発推進のための特許・先行技術調査などを実施計画の一部に盛り込み動向を把握しながら研究開発を推進。

政策動向や他部署の研究開発プロジェクト情報を保有するNEDOと産業界やアカデミアの動向を多く保有するPL/SPLが、随時情報を交換しプロジェクトへの影響を確認しつつマネジメントを実施。

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③委託事業を対象として、ステージゲート方式を適用した。

④ 研究開発成果の普及

生物工学会と NEDO 共催でキックオフシンポジウムを実施(2021年5月)した。また、マッチングイベントに NEDO が出展ブースを構え、プロジェクト成果の広報機会を提供 (BioJapan2020, 2021, 2022(予定)、Nanotech2021, 2022, 2023(予定))するとともに、PL/SPL/PM が外部講演や新聞・雑誌等の取材対応と記事寄稿 (日本化学学会、化学装置系雑誌) を積極的に行った。さらに、技術情報集約ホームページを作成中。イベントで技術集を配布予定。

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

各研究開発項目について、以下の実用化・事業化を目指している。

「実用化・事業化」の考え方

【研究開発項目①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」

研究開発項目②「生産プロセスのバイオフアウンドリ基盤技術開発」】

本事業における実用化とは、開発する共通基盤 (バイオ資源、産業用スマートセル開発技術、生産プロセス技術、バイオフアウンドリ拠点等) が、共同研究等により利用が開始されること。

【研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」】

本事業における実用化とは、試作品、試験的サービス等の社会的利用 (顧客への提供等) が開始されること。

本事業における事業化とは、2030年までに製品・サービス等として社会実装されること。

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「バイオ資源活用促進基盤技術開発」(委託)

研究開発項目②「生産プロセスのバイオフアウンドリ基盤技術開発」(委託)

- ・「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、知財運営委員会や知財の帰属、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実施者間で合意形成を形成。
- ・研究開発実施者は、他の研究開発テーマに裨益する共通基盤技術について、研究開発テーマの垣根を越えてプロジェクト全体として研究成果の最大化を図るよう努めるものとする。
- ・本プロジェクトは NEDO 特別講座 (NEDO プロジェクトを核とした人材育成、産学連携等の総合的展開) の一環で人材育成や必要に応じて周辺研究等を行うこととした。
- ・開発した技術の競争的価値が守られる場合には国内外への特許出願等により権利化を推奨 (出願後の維持管理方策も考慮)、守られないことが想定される場合はノウハウ化を推奨。論文等での成果の公表は知財化状況に応じて適切なタイミングで行うこととしている。
- ・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、成果発信を積極的に行う。

研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」（委託／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。

2.3. 情勢変化への対応

【2021年度追加公募の実施】

バイオ戦略2020等の政策的位置づけを踏まえ、令和2年度補正予算により研究開発項目②「生産プロセスのバイオフィアウンドリ基盤技術開発」の一環として関東圏バイオフィアウンドリ拠点形成を実行するため、公募により体制を決定し着手した。

【国内外の動向把握】

NEDO技術戦略研究センター(バイオエコノミーユニット)と連携し、政策動向・技術動向などを調査。また、研究開発推進のための特許・先行技術調査などを実施計画の一部に盛り込み動向を把握しながら研究開発を推進。

【コロナ禍の状況下での対応】

プロジェクト開始当初より、緊急事態宣言等により出社制限があったことで研究計画の一部遅延や半導体不足による研究機器の導入遅れが発生したケースがあった。やむを得ない事情を勘案し契約変更により研究計画及び予算の後倒しを行って研究継続をはかったことで、その後に遅れを挽回し中間目標の達成に大きな影響はでなかった。

2.4. 中間評価結果への対応

本プロジェクトは、2022年度に中間評価を実施。

2.5. 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2022年度と2024年度に行い、事後評価を2027年度とする。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、前倒しするなど、適宜見直すものとする。

3. 研究開発成果及び実用化・事業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

主要な成果を下表にまとめる。詳細は各テーマの事業原簿を参照。

研究開発項目	目標	成果	達成度 (2022年度末)
研究開発項目 ①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」	バイオものづくりの社会実装促進に要する酵素、微生物、植物等の新規バイオ資源候補を20件以上提案する。	<p>酵素、微生物、植物等の新規バイオ資源候補を50件獲得済み。今年度末までの取組によってさらに成果蓄積が期待できる。</p> <p>具体的には、</p> <ul style="list-style-type: none"> ・有用遺伝子資源28件（Acyl-CoA synthetase 遺伝子、糖変換酵素遺伝子、脂質変換酵素遺伝子、オキシダーゼ、オキシゲナーゼなど） ・各種炭素源を使用可能な油脂酵母6株 ・有用化合物生産につながる酸化還元反応や脱炭酸反応などのテンプレート酵素10件、人工酵素プロトタイプ5件を獲得 ・新規宿主植物の開発において、モデル遺伝子の発現レベルを3倍以上に増加可能な植物体候補を予備的実験で獲得。さらに発現増加可能な組換え植物体・ゲノム編集植物体を選抜中 など 	◎ (設定目標を上回った件数が得られた)
研究開発項目 ②「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」	次世代のバイオ生産システム基盤の基本設計に目途が立ち、評価サンプルとなる生産物が得られる環境であることを1例以上のモデル生産物で確認する。また、生産プロセス情報等に基づく産業用スマートセル開発に向けて、生産と育種を関連づけさせることができる統合解析システムのプロトタイプを開発する。発酵槽から生産ターゲット物質の分離・精製処理を含む、微生物を用いた物質生産の実用化検証が可能なバイオファウンドリ拠点を形成し、モデル生産物で検証を開始する。	<p>【植物】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・宿主改変から大規模抽出精製まで一貫した大規模植物生産の開発を実施。up-stream から、down-streamに至るまで新規の技術開発の一例として、有用物質抽出・精製システム開発ではパイロットプラントスケールの試作機的设计・製作・改造等を進め、基本設計に目途が立ちつつある。また、破碎処理システムでは目的タンパク質の抽出効率が中間目標値を大幅に上回る結果を得る等、生産物が得られるシステムであることを確認した。 <p>【微生物】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・「培養データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム」開発を実施。その構成要素となる主要な技術群は2022年度末時点での技術目標を達成する見込み。油脂酵母を事例として生産物が得られる方法論であることを確認する結果が得られた。さらに、異なる宿主・ターゲット物質での応用を進める計画がある。 ・また、生産プロセス情報等に基づく産業用スマートセル開発のための統合解析システムのプロトタイプが2022年度末にできる見込み。例えば、測定培養データを元に、宿主細胞の「収率」「生育速度」「生産フェーズ」の最適化のための細胞内代謝のダイナミクス解析技術を開発し、大腸菌および油脂酵母モデルを適用し新たな改変箇所を提案可能である結果が得られている。 ・さらに、生産と育種を関連付けさせて開発期間を短縮するため、必要とされるデータを集積し、統合的に活用できる環境の整備ができつつある。 ・LCA・TEA 検証のため、油糧酵母、SL 生産株の培養における炭素収支や卓上培養槽運転に伴う電力消費のデータを取得。シミュレーターver.1を2022年9月開発完了見込み。 	◎ (人材育成取組は前倒し成果)

		<p>【バイオフィアウンドリ拠点】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・関東圏に発酵槽から生産ターゲット物質の分離・精製処理を含む実証拠点の構築を整備中。新設建屋の施工事業者を選定し、設計についてのデザインレビュー（開発、設計の審査）を実施。運営委員会を設置し、各種法規制の順守のため運営マニュアルを策定するなど、バイオフィアウンドリ拠点の運用方針を策定 2022 年度中に最大 3,000L 規模の発酵槽を備える実証設備を完成させ、1 種のターゲットを用いたスケールアップ検証予定。 ・最大 1,500L 規模の既存の発酵槽設備で 1 種のターゲットを用いたスケールアップ検証に着手済み。 ・さらに、高性能 CFD ソフトウェア・スケールダウンモデルを利用したバイオ生産プロセスの最適化手法とスケールアップ実証手法の開発、マイクロ波技術を使ったバイオ生産プロセスの低コスト化・省エネ化・低炭素化等の周辺技術開発を進めている。 <p>・2020 年度実施者の取組の中から神戸大・阪大・大工大・京大・ちとせ研究所が整備・開発を進めている設備をもとに、関西圏バイオフィアウンドリ拠点化を検討し着手。本格稼働または PJ 内研究の支援を行い、PJ 外からの受入れ仕組みを構築中。</p> <p>【人材育成】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・バイオ生産プロセスにおける最適化及びスケールアップ手法、CFD 解析手法の研修、バイオフィアウンドリ設備を使ったバイオ生産プロセスの運転の実習等の研修資料の完成。予定を前倒しして、2022 年の秋から研修を開始。 ・大阪工大に教育施設として設置完了。人材育成プログラム（基礎・応用セミナー）基礎編受講実績 61 名。NEDO 特別講座として一般公開を開始。 	
<p>研究開発項目 ③「産業用物質生産システム実証」</p>	<p>以下の内容を基本としつつ、用いる生物種やターゲット物質等によって目標が大きく異なることから、具体的な定量目標は研究開発テーマ毎に別途実施計画書において定める。</p> <p>【委託フェーズ】 研究開発期間終了時点で、産業用物質生産システム検証を開始できる基本的な株やデータの取得が完了している。</p> <p>【助成フェーズ】 研究開発期間終了時点で、評価サンプルによる生産物評価により、性能、環境合理性、経済性等の面で総合的に競争力があることを示す。</p>	<p>※詳細は各テーマの事業原簿を参照。全ての実施テーマは、事業化に向けて解決すべき各種課題について毎年度の目標を定めて研究開発を実施。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・助成フェーズの実施テーマは、スケールアップ検討を進めることにより各テーマにおける毎年度目標を達成している（または達成見込み）。一部ターゲット物質の生産性向上に関して期待通りの成果が出なかったテーマがあるが、今後培養条件の再検討を行う等課題解決を進めている。 ・委託フェーズの実施テーマは、産業用物質生産システム検証を開始できる基本的な株やデータの取得が進展している。ステージゲート段階での目標クリアに向けて研究を推進。助成フェーズでのスケールアップ検証準備を実施計画に含んでいるテーマでは、培養条件の確認など着実に研究を進めている。 	<p>○</p>

成果の普及（プロジェクト全体）

年度	特許			論文		その他外部発表				受賞実績
	国内	外国	PCT	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	
2020	2	0	1	1	1	28	2	1	1	2
2021	2	1	3	22	3	67	12	15	7	5
2022～（見込含む）	23	7	6	25	0	64	15	10	9	0
PJ期間合計	27	8	10	48	4	159	29	26	17	7

プレスリリース

[リリース日・リリース主体]

2020年度 2件[2020.8.25 NEDO、2020.9.11 宇部興産]

2021年度 8件[2021.7.7 NEDO、2021.7.7 アクプランタ、2021.7.7 東海物産、2021.7.9 Noster、
2021.8.23 NEDO、2021.8.27 GEI、2021.9.6 マイクロ波化学、2022.2.7 GEI]

2022年度 9件[2022.5.24 NEDO、2022.5.24 GEI、2022.7.1 NEDO、2022.7.1 大阪工業大学、
2022.7.1 GEI、2022.7.4 大阪大学、2022.7.31 NEDO、2022.8.24 NEDO、
2022.8.24 東レ]

<主なNEDOプレスリリース事例>

- ・ バイオ由来製品の实用化に向け、産業用物質生産システムの実証14件に着手
— バイオ産業の裾野拡大や炭素循環型社会の実現を目指す—
- ・ 関東圏に微生物機能を活用したバイオ生産の実証拠点を形成
— 实用化に向けたスケールアップ検証と人材育成の場を提供—
- ・ 千葉県で微生物発酵生産用の実証拠点を稼働開始
— バイオ由来製品の商用生産を想定したスケールアップ検証などを実施—
- ・ バイオものづくり分野の人材育成プログラムを順次開講
— 理論から実践までを学び、バイオものづくり人材の育成を目指す—
- ・ 100%バイオ由来アジピン酸の合成方法を開発
— 環境配慮型ポリアミド66の实用化に向けたスケールアップ検討を開始—

3.2. 実用化・事業化に向けた取組及び見通しについて

研究開発項目①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」

研究開発項目②「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」

【共通基盤（微生物）】

- 個々の成果の実用化に向けた取組を進めるとともに、関東圏バイオファウンドリ拠点の形成着手を契機に、実施者の取組をベースに関西圏バイオファウンドリ拠点化検討を進めた。プロジェクト全体でバイオプロセス開発プラットフォームとして主要な成果をまとめた拠点化を進め、各拠点が有機的な連携関係のもと機能できる形を協議し取組を強化している。
- 特に人材育成に関しては、プロジェクト参画機関を対象に試行を進めて公開準備をしてきた講座を含め全体カリキュラムを整理し、NEDO 特別講座の枠組みを活用して一般に向けてバイオものづくり人材育成講座を開講した。



- その他、開発された各種の成果の実用化を促すため、ワークフローの作成を進めている。将来的には外部機関のボトルネック課題に対してどの技術を活用すべきか可視化可能なワークフロー図を作成する予定。
- 実用可能な要素技術として、1. 機械学習等の情報解析システムによるテンプレート酵素選定技術、2. 計算科学的手法に基づく人工酵素構築技術、3. 高機能性テンプレート酵素/人工酵素の提供、4. ハイスループット活性評価システム（全自動ハイスループット活性評価システム、微小ゲルビーズを用いたハイスループット酵素アッセイシステム）、5. ハイスループット可溶性評価技術、6. 基質特異性の高速多様化技術基質結合イベントを指標とした新規スクリーニング法を想定している。単体もしくは組み合わせを活用したビジネスモデルの検討している。

【共通基盤（微生物・バイオファウンドリ）】

- バイオファウンドリ拠点の核となる建屋を新設し、同建屋にバイオ生産プロセスを開発するために必要な設備をできる限り備え、様々な生産実証案件に対応できるようにする。さらに、生産実証を実施可能な適切な情報管理体制を整える。また、短期間に最適な条件を確立し、スケールアップできる拠点となるために、高度な CFD やスケールダウンモデルを開発する。低コスト、省エネのバイオ生産プロセスを提示できる拠点となるために、マイクロ波技術や原料の新しい前処理技術等を開発、導入する。バイオ生産プロセスの商用化に必要と考えられる製造コスト試算や LCA による CO2 排出量算出等のサービスを提供できるようにする。この拠点において、日本のバイオものづくりの基盤となる人材を育成する。

【共通基盤（植物）】

- ・植物による物質生産に関しては、本プロジェクトで開発した技術の社会実装のために、知財調査を行い、特許出願やノウハウ化に努め、学会発表はもとより、バイオビジネスにおけるパートナーリングイベントを活用することで、積極的に対外的発信や情報交換を行い、国内外の企業にライセンス契約による実用化を働きかけている。産業技術総合研究所・北海道大学で取り組んでいる、新規に開発された宿主植物の種子においては、種子そのものがライセンス契約等により提供可能なため、それを踏まえたマテリアルの管理を行うと共に、特許出願に向けた準備を進めている。また、鹿島建設株式会社においては、国内外の遺伝子組換え植物工場での有用物質生産を計画する事業者に対して施設受注につなげていけるよう、ホームページ、各種関連イベントやセミナーなどを通じて PR を進め、成果を知財化し、施設受注における競争優位性を高めるほか、ライセンス販売が可能な体制を整えている。

研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」

- ・本プロジェクトにおいて事業化に向けた課題解決を図り、助成フェーズ終了時点で評価サンプルによる生産物評価により、性能、環境合理性、経済性等の面で総合的に競争力があることを示す。並行して、プロジェクト終了後の企業化計画に基づき、NEDO 事業終了後の取組として、試作品、試験的サービス等の社会的利用(顧客への提供等)が開始される、2030年までに製品・サービス等として社会実装されることを目指す。

3.2 研究開発項目毎の成果及び実用化・事業化に向けた取組及び見通し

3.2.1 研究開発項目①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」および研究開発項目②「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」

3.2.1.1 M01「データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム(Data-driven iBMS)の研究開発」(代表機関；京都大学)

(1)背景と目的

炭素循環型社会の創出などの社会課題解決と持続的な経済成長を実現すべく、バイオ産業への期待が上昇し、関連する市場ニーズが多様化してきている。本研究開発テーマ(M01)では、スマートセルプロジェクトで開発された各種技術を基盤に、バイオ生産の社会実装確率を高めるべく、バイオ生産に求められる探索、菌株構築、培養等に関わる新規技術を開発し、カーボンリサイクル実現の加速に貢献することを目指す。

スマートセルプロジェクトでは、デジタル技術等の活用により生物機能が最適化された細胞“スマートセル”の構築・基盤技術開発が行われた。しかし、本技術を実生産規模へ適用するには、「遺伝子リソース不足」、「スケールアップ対応育種」、「培養要素技術開発と統合化」、「匠」に頼らない培養制御」といった様々なボトルネックが存在する。

M01では、これらの障壁を克服すべく、下記の1～5の研究項目が一体となり開発を推進する。さらに得られるデータを集積、解析、発信する「培養データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム」を構築し、それを核とした循環型バイオ事業開発により、バイオ産業の活性化を介したカーボンリサイクルを実現する。各研究項目は以下の通り(図3.2.1.1-1)。

研究項目1.「新規ターゲット探索基盤」

研究項目2.「培養データ駆動型産業用スマートセル構築技術の開発」

研究項目3.「バイオ生産プロセス基盤の確立～持続可能なバイオプロダクション産業の創出と発展に資する実用化検証・人材育成拠点の形成～」

研究項目4.「次世代バイオプロセス技術の開発」

研究項目5.「培養データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム(Data-driven integrated Bioproduction Management System(iBMS))の開発」



図 3.2.1.1-1 本研究開発テーマ(M01)における各研究項目と克服課題

(2)位置づけ、目標値

米国をはじめとした諸外国ではバイオ分野への投資が加速しており、IT系企業がバイオとデジタルの融合領域に対する投資を活発化させている。欧州では原料処理から製品生産までを一貫生産できる設備「バイオフィャンドリ」の構築が進んでいる。我が国でも、2019年以降策定が積み重ねられているバイオ戦略において、2030年に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標に、高機能バイオ素材、バイオプラスチック、生物機能を利用した生産システム等の市場領域について取組強化が打ち出された。

M01では、バイオとデジタルが融合した取り組みにより、適正な生産規模での培養再現性が確保された培養装置を並列化するバイオフィャンドリの構築を目指す。並列化により生産規模を自由に変わることができるため、中量中品種から、少量多品種までさまざまな市場サイズに応えるバイオ生産が期待される。すなわち、バイオ生産のマスカスタマイゼーションが実現できる（プロセス技術の革新）。一方、新規ニーズを創出する探索基盤と産業用スマートセル育種技術により、多様な市場のニーズをとらえた多数の新規アイテムの投入が容易となることが期待される（育種技術の革新）（図3.2.1.1-2）。

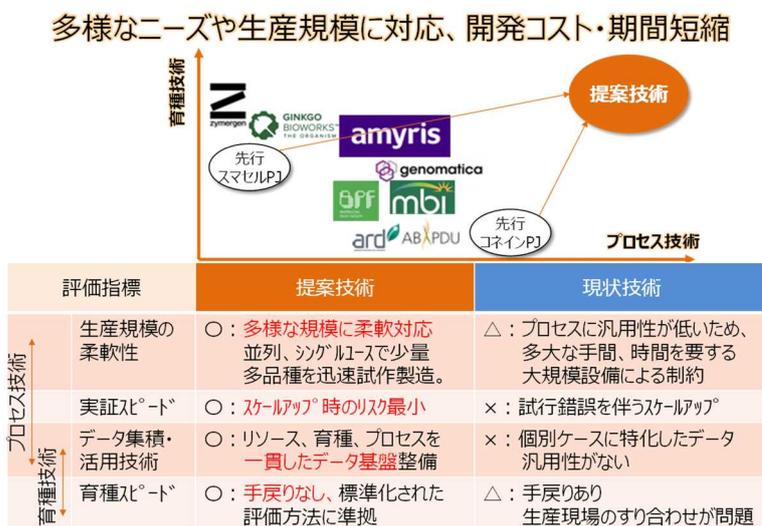


図 3.2.1.1-2 M01 提案技術の位置づけと目標

結果として、多様な市場ニーズに柔軟に対応したバイオ生産開発を、短い期間、少ない投資額で実現できる技術基盤の構築を目指す。このような、市場のニーズをとらえた多数のアイテムの新規参入、早期マーケットインにより、開発期間の短縮、開発コストの削減、多様なニーズへの対応を実現することで、バイオ生産の実用化障壁を下げ、バイオ産業を大いに活性化し、ひいては、カーボンリサイクルを実現する持続可能な社会の創出に貢献する。

(3)全体計画

M01の全体目標をバイオものづくりの「開発期間の短縮」と設定し、各研究項目の目標（「」内に記載）、取り組み（箇条書きで記載）を下記に設定した。

研究項目 1. 「新規ターゲット探索基盤」

「培養ならびに生産における問題を解決する有用遺伝子・宿主をラインナップすることで開発期間を短縮する」

- 機能ならびに表現型レベルでの探索により、機能と関連付けられたゲノム情報を拡張し、有用遺伝子・宿主の選抜を効率化する。（パウダースクリーニング）
- ミリオンレベルでの機能評価により有用遺伝子・宿主の拡張・選抜を容易にし、さらに有用微生物の育種期間を短縮する。（ミリオンスクリーニング）

研究項目 2. 「培養データ駆動型産業用スマートセル構築技術の開発」

「開発期間短縮のために、培養条件に適合した育種技術を開発し産業用スマートセルを構築する」

- ジャー培養での生産性を確保する産業用スマートセル構築技術の開発
- 産業用スマートセルの構築と検証（原核宿主微生物および真核宿主微生物）

研究項目 3. 「バイオ生産プロセス基盤の確立～持続可能なバイオプロダクション産業の創出と発展に資する実用化検証・人材育成拠点の形成～」

「生産プロセスを育種と並行開発して開発期間を短縮する」

- 培地最適化とプロセス最適化により、生産プロセスを並行開発して開発期間短縮
- LCA/TEA 手法を構築し、生産プロセスと育種の並行開発に貢献
- バイオプロセス人材育成を通して、プロセス開発にかかるリーダー人材・技術人材を輩出

研究項目 4. 「次世代バイオプロセス技術の開発」

「培養の自動化・シングルユース化で開発・実証期間を短縮する」

- AI 技術を活用した自動培養とその並列運転で、素早く試作・実証でき、開発期間を短縮できる。
- 攪拌レスのシングルユースバック培養システムにより、あらゆる品目を素早く試作・実証することで、開発期間を短縮できる。

これらの取り組みの全体計画を図 3. 2. 1. 1-3 にまとめた。

なお、研究項目 5 の詳細については、(5) 運営管理、(10) 成果の普及、(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略、(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組、に記載。

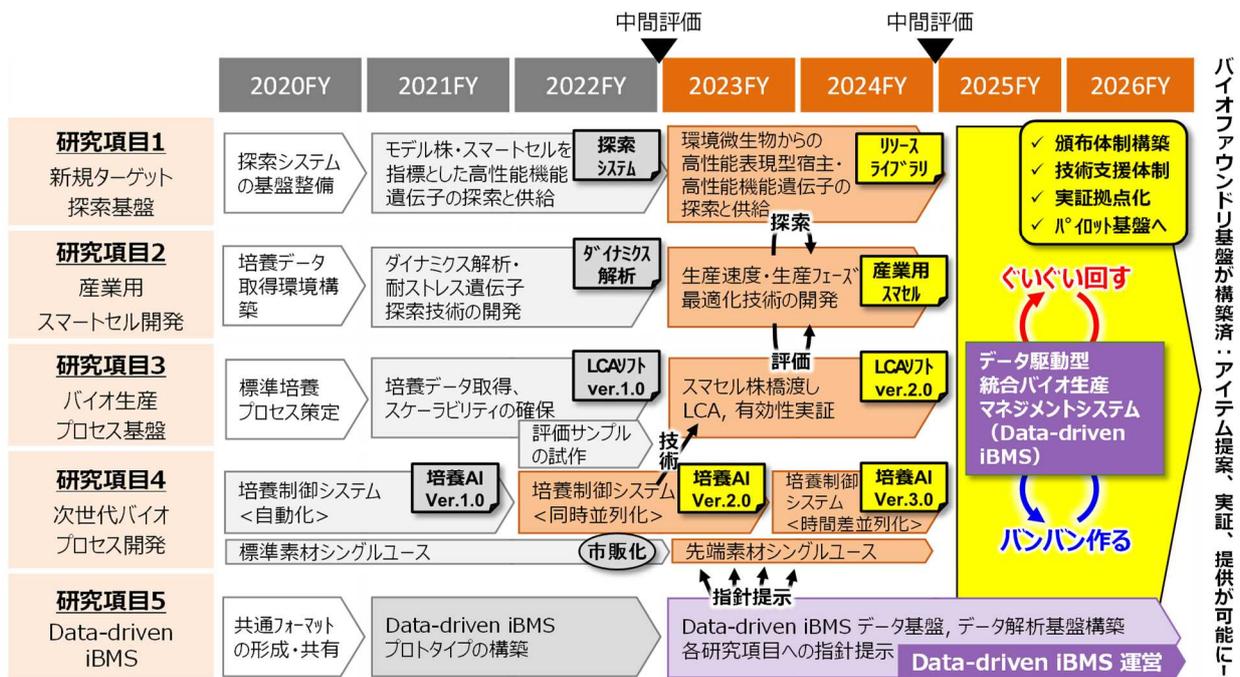


図 3. 2. 1. 1-3 M01 の全体計画とスケジュール

(4) 実施体制

実施体制は図 3.2.1.1-4 の通り。



図 3.2.1.1-4 M01 の実施体制

(5) 運営管理

ボトムアップ型の取り組みとして、各研究項目（研究項目 1～4）における基盤技術の高度化を目指した分科会（実務関係者限定の少人数会議も含め基本的に月 1 回）を開催するとともに、各研究項目間の連携をデザインするコーディネーターを中心に研究項目間の連携、統合化を進めている。

一方、トップダウン型の取り組みとして、M01 全体のマネジメントをとり行う iBMS 委員会を設置した。iBMS 委員会にて、各研究項目にて得られるデータ・成果を統合する培養データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム（Data-driven iBMS）の研究開発方針を策定し、データ基盤・解析基盤の技術的整備、データ連携を容易にするための標準培養装置、モデル株の設定を進めた（これらは研究項目 5 としての取り組みである）。また、これらの業務を円滑に行う事務局として、バイオインダストリー協会（JBA）の支援（項目 6）が効率的に機能している。

図 3.2.1.1-5 にこれらの取り組みの実施例を示す。

研究進捗の共有強化と年間スケジュール例

		2021年						2022年					
大項目	小項目	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
モデル株	酵母データ取得	データ連携テーマ検討			連携会議			連携のためのデータ取得					
	コリネ菌選定	選定方針の検討			培地の選定								
データ基盤	ID統一	分析法IDの検討、組織IDを随時更新											
	共通フォーマット	培養情報シート確定・運用開始 その他の共有フォーマット整備、運用開始および適宜更新											
データ解析基盤	データ解析基盤の提供準備	AWSマニュアル配布・ハンズオン開催											
	AWS運用	AWSアカウント発行、順次データ格納開始											
知財/データ	知財合意書	最終合意											
	成果マネジメントプラン	第1回調査票をJBAに移管						フォーマットの更新、全体共有					
委員会運営	iBMS委員会	→ 第4回				→ 第5回		→ 第6回				→ 第7回	
	分科会	→ 課題ごとに開催						→ 課題ごとに開催					
	iBMS全体会議	→ 第3回						→ 第4回					
	技術推進委員会							→ 第2回					
	ピッチ会開催	→ 第1回											
	実務者会議	→ 適宜開催											

図 3. 2. 1. 1-5 M01 の運営管理状況とスケジュール例

(6) 実施の効果

成果として期待されるバイオものづくりにおける原料・生産物多様化の効果を図 3. 2. 1. 1-6 に、費用対効果、費用・売上目標の概略を図 3. 2. 1. 1-7 に示す。

バイオものづくりの原料・生産物の多様化、石化代替をねらう

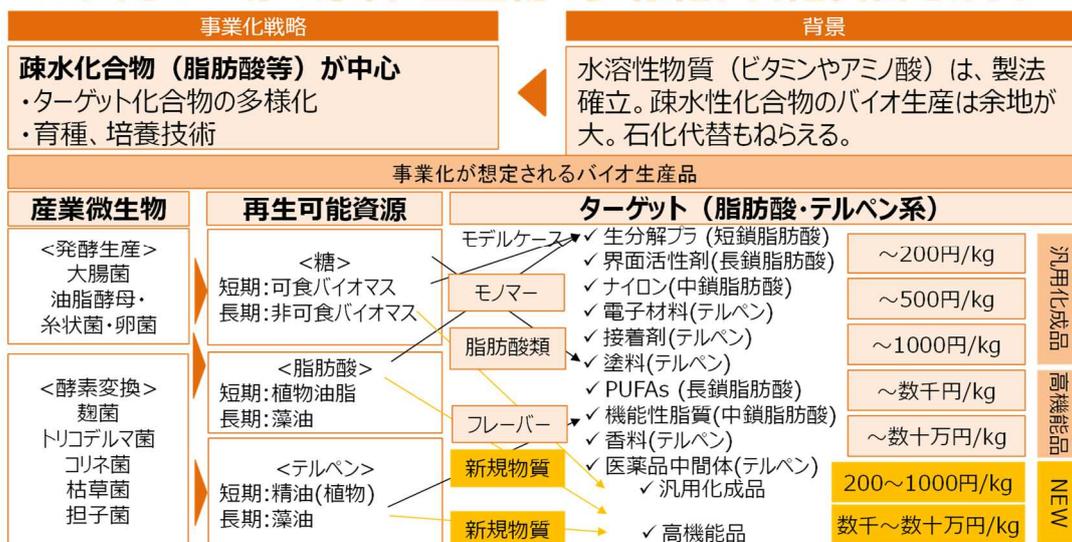


図 3. 2. 1. 1-6 M01 のバイオものづくりにおける原料・生産物多様化の効果

我が国のバイオエコノミーへの貢献13兆円を目指す

想定されるバイオ生産支援サービス

- バイオ生産品を生み出すための支援サービスとして、1300億円規模の事業創成を目指します。
- 支援サービス対価が、原料メーカー利益の10%とし、末端メーカーは、利益率10%で商品販売すると仮定して、1300億円規模の支援サービスは、バイオエコノミーに年13兆円の経済効果をもたらすことを目指すことになります。

サービス概要	収入名目	売り上げ計画(百万円)			想定 利益率 (2030)
		2023	2025	2030	
D-iBMSの改良	開発受託費	53	210	12,000	30%
D-iBMSの基盤利用	利用料,保守費	44	175	16,000	60%
バイオ生産AI制御システムの改良	開発受託費	53	210	12,000	30%
バイオ生産AI制御システムの利用	利用料,保守費	44	175	16,000	60%
設備設計	設計,コンサル費	80	310	20,000	35%
設備施工	業務委託費	175	630	30,000	12%
プロセス開発	業務委託費	30	120	4,000	20%
バイオ生産受託	業務委託費		50	20,000	30%
合計		478	1,880	130,000	

新たに形成されるバイオ生産品の市場規模

- 原料市場ベースで、2.3兆円の市場規模を創出し、原料の実体経済への経済効果が、5-10倍あると想定する
- 2030年までに年13兆円規模のバイオエコノミーへの貢献を目指す

年間生産量	種類	単価	原料市場規模	経済全体への貢献
1万トン	10	1万円/kg	1兆円	5倍→ 5兆円
5万トン	8	2500円/kg	1兆円	5倍→ 5兆円
20万トン	3	500円/kg	3000億円	10倍→ 3兆円

図 3. 2. 1. 1-7 M01 の費用対効果、費用・売上目標の概略

CO₂削減・省エネルギー目標の概略を図 3. 2. 1. 1-8 に示す。

- 我々は、年間1万トン規模で、早期にバイオ生産品をマーケットインするとともに、2030年までにそのうち8アイテムは5万トン規模に、3アイテムは20万トン規模にまで拡大し、2030年までに390万トンのCO₂削減を目指します。

390万t-CO₂/年の削減を目指す



図 3. 2. 1. 1-8 M01 の CO₂削減・省エネルギー目標の概略

(7) 中間目標の達成度

表 3.2.1.1-1 に中間時点での達成度をまとめた。

表 3.2.1.1-1 M01 の中間目標の達成度

研究項目	目標 (2022年度)	成果	達成度 (2022年度末)	今後の課題と解決方針
研究項目 1 : 新規ターゲット探索 基盤	培養ならびに生産における問題を解決する有用遺伝子・宿主をラインナップするための基盤ライブラリ、コア技術構築	<ul style="list-style-type: none"> ● パウダー化微生物ライブラリ ● ミリオンスクリーニング技術 ● 環境微生物対応技術 	○	<ul style="list-style-type: none"> ● 機能ならびに表現型レベルでの探索により、機能と関連付けられたゲノム情報を拡張し、有用遺伝子・宿主の選抜を効率化する。(パウダースクリーニング) ● ミリオンレベルでの機能評価により有用遺伝子・宿主の拡張・選抜を容易にし、さらに有用微生物の育種期間を短縮する。(ミリオンスクリーニング)
研究項目 2 : 産業用スマートセル 開発	培養条件に適した育種技術を開発し産業用スマートセルを構築するための予測技術、解析技術構築	<ul style="list-style-type: none"> ● 培養ダイナミクスの予測技術 ● 脂溶性化合物生産のための産業用スマートセル ● 麹菌生産技術開発 	○	<ul style="list-style-type: none"> ● ジャー培養での生産性を確保する産業用スマートセル構築技術の開発 ● 産業用スマートセルの構築と検証(原核宿主微生物および真核宿主微生物)
研究項目 3 : バイオ生産プロセス 基盤	生産プロセスを育種と並行開発するための培養技術、培地設計技術、解析技術開発	<ul style="list-style-type: none"> ● マルチスケラブルな培養技術 ● AI(人工知能)活用実用培地設計 ● マルチオミックス解析 	○	<ul style="list-style-type: none"> ● 培地最適化とプロセス最適化により、生産プロセスを並行開発して開発期間短縮 ● LCA/TEA手法を構築し、生産プロセスと育種の並行開発に貢献 ● バイオプロセス人材育成を通して、プロセス開発にかかるリーダー人材・技術人材を輩出
研究項目 4 : 次世代バイオプロセス 開発	培養の自動化・シングルユース化を支援するAI技術開発、培養装置開発	<ul style="list-style-type: none"> ● AI技術を活用した自動培養 ● 攪拌レス・微生物用シングルユース培養槽 	○	<ul style="list-style-type: none"> ● AI技術を活用した自動培養とその並列運転で、素早く試作・実証でき、開発期間を短縮できる。 ● 攪拌レスのシングルユースバック培養システムにより、あらゆる品目を素早く試作・実証することで、開発期間を短縮できる。

上表の内容に加え、バイオ生産における統合マネジメントの確立と今後の成果の普及に向けて、生産と育種を関連付け、必要とされるデータを集積し、統合的に活用できる環境整備を進めた。詳細は、(10)成果の普及、を参照。

また、関西圏バイオファウンドリ拠点化に向けた検討を進め、NEDO 特別講座(人材育成)を開講した。加えて、~30L 規模の実証拠点として各種整備を推進。関東圏バイオファウンドリ拠点との連携協議を開始した。詳細は、(12.5)波及効果、を参照。

研究と並行して先行技術調査等を順次進めている。また、アウトリーチ活動の一環として本研究開発テーマを含むプロジェクト全体の技術を集約するホームページを構築中。

(8) 研究開発の成果と意義

スマートセルの基盤技術を実生産規模へ適用するには、「遺伝子リソース不足」、「スケールアップ対応育種」、「培養に関する要素技術不足」、「匠」に頼らない培養制御」などのボトルネックが存在する。各研究項目では、これらの課題に答えるべく、図 3.2.1.1-9 の四隅に示す要素技術が開発されている。



図 3.2.1.1-9 バイオ生産における課題に答える M01 の開発要素技術

表 3.2.1.1-2 は、現時点での成果事例を抽出したものである。各事例の詳細については、各研究項目 1~4 の対応箇所を参照されたい。

表 3.2.1.1-2 M01 研究項目 1~4 の成果事例

研究項目	成果事例
研究項目1：新規ターゲット探索基盤	① 機能スクリーニングシステム(パウダー化微生物ライブラリーなど)の構築と油脂酵母開発などへの応用 ② ミリオンスクリーニング技術(表現型スクリーニング技術構築、複合型スマートセル技術、環境微生物対応技術)
研究項目2：培養データ駆動型産業用スマートセル構築技術の開発	③ フラックスバランス解析(FBA)を用いた培養ダイナミクスの予測技術の開発 ④ 脂溶性化合物生産のための産業用油脂酵母産業用スマートセル構築 ⑤ 麹菌生産技術開発データの提供を通じた基盤構築への貢献とその有効性検証
研究項目3：バイオ生産プロセス基盤の確立~持続可能なバイオプロダクション産業の創出と発展に資する実用化検証・人材育成拠点の形成~	⑥ マルチスケラブルな培養技術の開発と培養のビッグデータ化 ⑦ AI(人工知能)を活用した実用培地・培養戦略迅速決定システムの開発 ⑧ マルチオミックス解析による培養状態の定量的記述
研究項目4：次世代バイオプロセス技術の開発	⑨ 並列型のバイオ生産制御システムの開発 ⑩ 攪拌レス・微生物用シングルユース培養槽の開発

加えて、研究開項目5では、これまでのバイオ生産開発の大きな問題点であった、育種と培養生産との技術的断絶を解消すべく、各研究成果がシームレスに繋がるように、各研究項目間のデータ連携のためのオープンなデータを取得可能な株（モデル株）ならびに社会実装のための運用を想定し限定的な情報開示にて運用される株（リファレンス株）を選定した。また、培養データを共有し培養駆動型の育種が実施できるよう標準培養装置（条件）の設定を行った（図3.2.1.1-10）。これらにより、スムーズなスケールアップ対応育種と統合的プロセス開発の実現が期待される。その実施例については、（12.2）実用化・事業化に向けた具体的取り組みにおいて、油脂酵母ならびにコリネ型細菌（カテコール生産）に関する研究項目横断型の開発事例を紹介する。

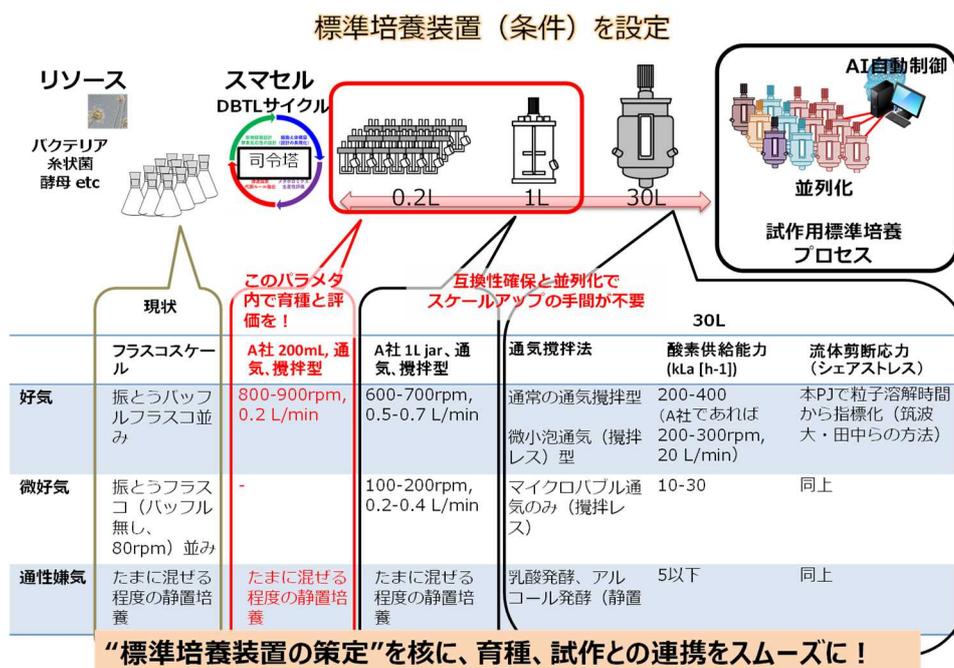


図 3.2.1.1-10 標準培養装置・条件の設定

(9) 成果の最終目標の達成可能性

各研究項目内の開発を示す水平方向の動き、および研究項目間の連携を示す垂直方向の両軸での7年間の研究開発を実施する（図3.2.1.1-11）。この際、要素技術の開発は概ね3-5年間で進め、最後の2年間は実証研究を中心とし、研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」に活用できるものは随時展開する。

水平方向の取り組み

研究項目	最終目標	解決策
1. 新規ターゲット探索基盤	培養ならびに生産における問題を解決する有用遺伝子・宿主をラインナップすることで開発期間を短縮する	1. 機能ならびに表現型レベルでの探索により、機能と関連付けられたゲノム情報を拡張し、有用遺伝子・宿主の選抜を効率化する。(パウダースクリーニング) 2. ミリオンレベルでの機能評価により有用遺伝子・宿主の拡張・選抜を容易にし、さらに有用微生物の育種期間を短縮する。(ミリオンスクリーニング)
2. 培養データ駆動型産業用スマートセル構築技術の開発	開発期間短縮のために、培養条件に適合した育種技術を開発し産業用スマートセルを構築する	1. ジャー培養での生産性を確保する産業用スマートセル構築技術の開発 2. 産業用スマートセルの構築と検証(原核宿主微生物および真核宿主微生物)
3. バイオ生産プロセス基盤の確立	生産プロセスを育種と並行開発して開発期間を短縮する	1. 培地最適化とプロセス最適化により、生産プロセスを並行開発して開発期間短縮 2. LCA/TEA手法を構築し、生産プロセスと育種の並行開発に貢献 3. バイオプロセス人材育成を通して、プロセス開発にかかるリーダー人材・技術人材を輩出
4. 次世代バイオプロセス技術の開発	培養の自動化・シングルユース化で開発・実証期間を短縮する	1. AI技術を活用した自動培養とその並列運転で、素早く試作・実証でき、開発期間を短縮できる。 2. 攪拌レスのシングルユースバック培養システムにより、あらゆる品目を素早く試作・実証することで、開発期間を短縮できる。

垂直方向の取り組み

図 3.2.1.1-11 最終目標達成に向けた取り組み

最終目標はバイオエコノミー拡大を実現するために、バイオ生産に関わる様々なニーズに答える技術を提供することである(図 3.2.1.1-12)。現状課題とされている件に関して、ピックアップテーマを代表する技術開発が順調に進んでいるため、目標達成の可能性は高いと考えている。



図 3.2.1.1-12 バイオエコノミー拡大を実現するための多様なニーズへの対応技術

(10) 成果の普及

成果普及活動の一環として、M01 の成果の事業化を目指し、開発された技術の特徴と技術適用領域等を広く周知するサイト（ホームページ）と技術紹介集を作成する。また、バイオものづくりプロジェクトの趣旨を表現したロゴマーク（イラストなど）を作成し、理解浸透を図る。

また、本研究開発テーマが成熟した際に創設を想定しているコンソーシアの活動を介して、ユーザーとなるバイオ企業が M01 の成果を活用しやすくすべく、生産と育種を関連付け開発期間を短縮するために必要とされるデータを集積し統合的に活用できる環境を、研究項目 5 の取り組み（5.1 ならびに 5.2）の中で図 3.2.1.1-13 のように整備している

5.1データ基盤	5.2解析基盤
<ul style="list-style-type: none"> ● データ連携のためのIDの提案、共通フォーマットへの反映 <ul style="list-style-type: none"> ➢ 機関ID、BatchID、菌株ID、サブ菌株ID、サンプルID、分析法ID、代謝物ID、iBMS代謝物ID、ランID ● 各研究項目からのデータをiBMS格納するための共通フォーマットの構築 <ul style="list-style-type: none"> ➢ 培養情報シート、菌株情報シート、メタボローム分析情報シートを提案・作成し、運用開始 ➢ 培養結果シート、サンプル分析条件シート、育種情報シート、探索情報シート、解析情報シート、ゲノム分析情報シートを提案し、作成中 	<ul style="list-style-type: none"> ● 解析環境の整備 <ul style="list-style-type: none"> ➢ 知財のオープンクローズ戦略に合わせ、成果マネジメントプランを整備し、運用開始 ➢ 公開・制限公開が選択可能なデータ格納フローチャートを作成し、AWSの利用ルールを整備した ➢ 各参画機関へアカウントを発行し、運用マニュアルを配布、データ解析基盤共用のための格納が開始 ● 項目間連携の実施 <ul style="list-style-type: none"> ➢ 研究項目間の連携促進のため設定したモデル株・油脂酵母を用いた連携が開始

図 3.2.1.1-13 データ集積・統合化のためのデータ基盤・解析基盤の整備

研究成果の発表状況は以下の通り。

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	
2020	1	1	22	1	0	0	2
2021	9	0	27	1	7	0	4
2022	1	0	2	1	0	0	0
PJ 期間合計	11	1	51	3	7	0	6

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

知財やデータ・成果の取扱いにおける基本的な考え方として、下記のグランドルールを策定し、本方針に基づいて研究開発、知財戦略等を進めている。

【グランドルール】

1. iBMS の社会実装に向けた基盤技術開発を参画機関全員で実施する。
開発された iBMS は、コンソーシアを通じて社会実装されることを想定する
2. iBMS 基盤技術に関わる知財/データは共有・公開を前提とする。
知財・データマネジメントプランを活用し、本研究開発テーマを通じて得られるデータ等を把握する。
3. 知財/データの利用条件を明確化する。
全て無条件とせず、データ提供機関・利用者がともにメリットを享受できる形とする。

運営にあたっては知財運営委員会を設置し、知財管理を行うとともに、本研究開発テーマの成果の適切な共有に向けた情報の公開・非公開の調整を行っている。

調整にあたっては、独自の知財/データマネジメントプラン様式（本事業で取得されるデータ等を列挙し、その公開レベルや公開条件などを整理）を策定し、JBA のサポートのもと進めている。知財・データマネジメントプランについては、成果のオープン・クローズを適時・適者に行えるよう定期的に見直しを行う。その際、上記グランドルールに沿うよう、知財運営委員会による検証を行う。

年度	特許出願		
	国内	外国	P C T
2020	0	0	0
2021	1	0	0
2022	0	0	0
PJ 期間 合計	1	0	0

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

各研究項目の個々の先端技術の実用化・事業化の考え方については、以降の事業原簿の記述を参照されたい。ここでは、M01 全体として成果をどのように連携し、バイオ生産の社会実装確率向上に貢献するかを述べる。

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

M01 内で開発された各種の成果は、研究開発テーマ成熟時の創設を目指すコンソーシアを通じて、既存のバイオ産業やベンチャー企業の抱えるボトルネック解決の手段としてマッチングされ、各開発アイテムの上市速度を加速することに貢献する（図 3.2.1.1-14）。

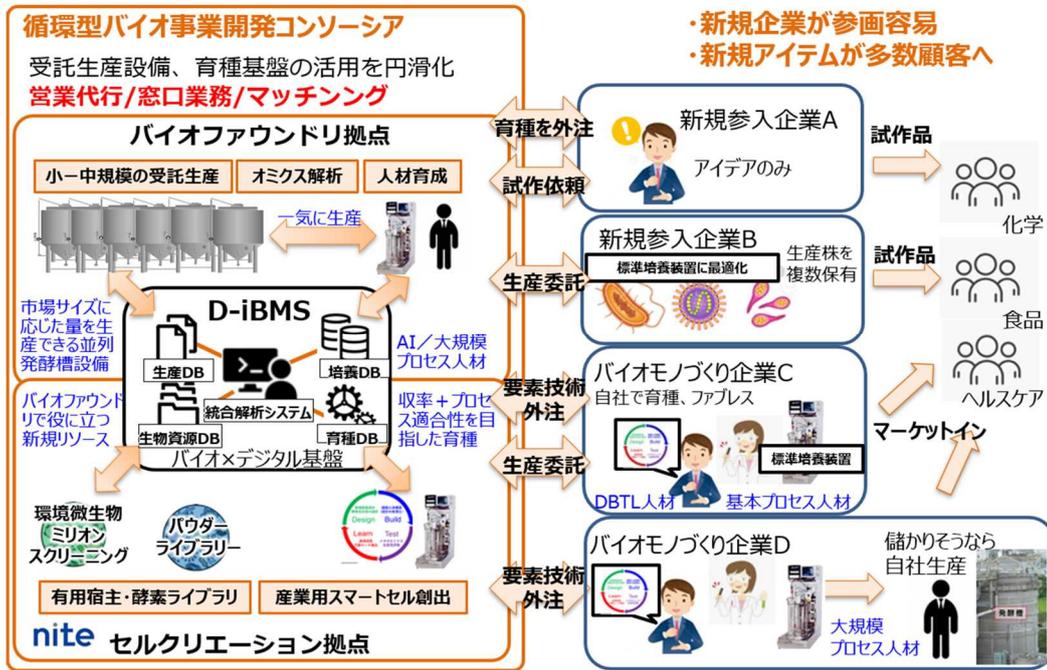


図 3.2.1.1-14 バイオ事業開発コンソーシアの概要

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

M01 で開発された各種の成果の実用化を促すため、ワークフローの作成を進めている（研究項目 5）。現在は、本研究開発テーマ内の各研究小項目の位置づけが可視化される活動をしており（図 3.2.1.1-15 の赤枠）、将来的には外部機関のボトルネック課題に対してどの技術を活用すべきか可視化可能なワークフロー図を作成する予定である（図 3.2.1.1-16）。

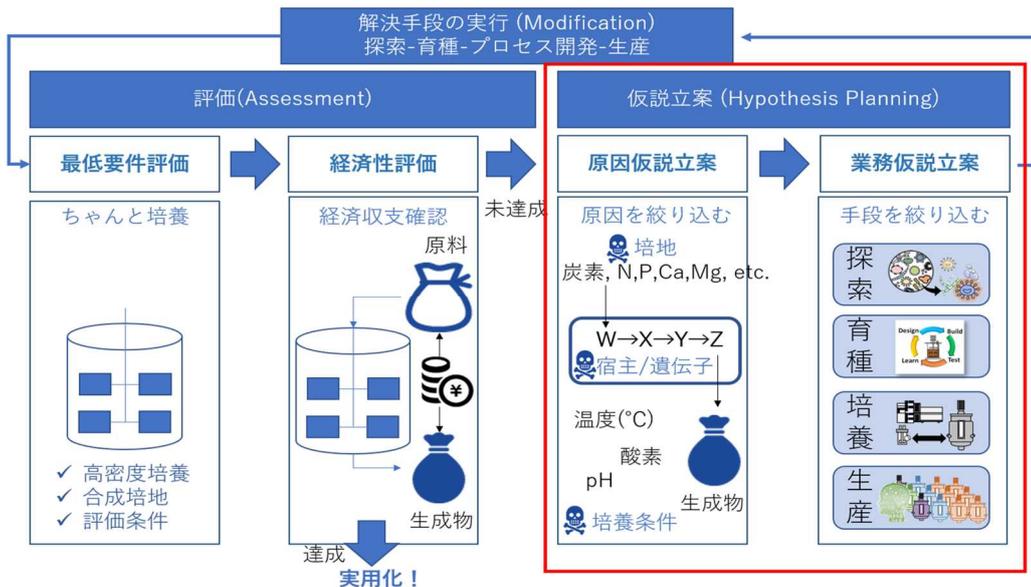


図 3.2.1.1-15 バイオ生産における課題解決の方法論と各研究項目の位置づけ（赤枠）

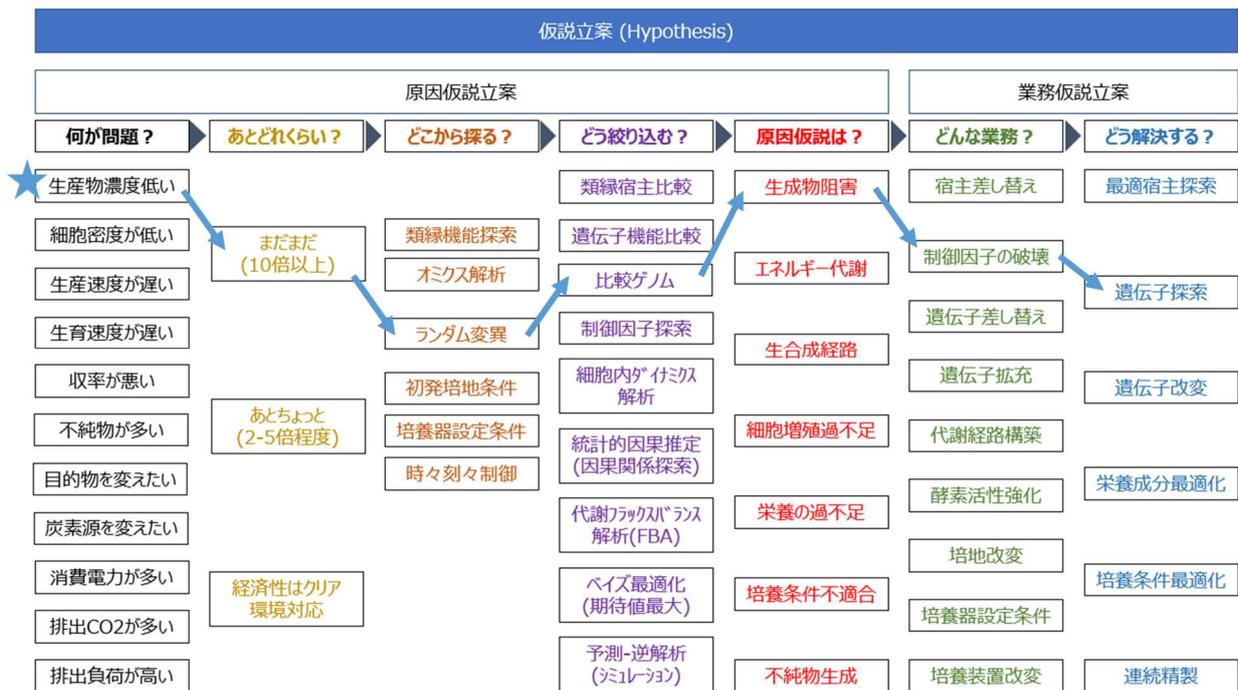


図 3.2.1.1-16 バイオ生産における課題ワークフロー

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

バイオ生産の社会実装確率向上に向けた取り組み例として、本研究開発テーマにおける各要素技術を上述のワークフローを活用して具体的開発課題のボトルネック解決に落とし込み、M01型の統合バイオ生産マネジメントの有効性を可視化している（研究項目5が取りまとめ）。

次の図（図 3.2.1.1-17、図 3.2.1.1-18）はそれぞれ油脂酵母、コリネ型細菌をモデル株として取り上げた研究項目横断型の開発事例と成果の現状である。

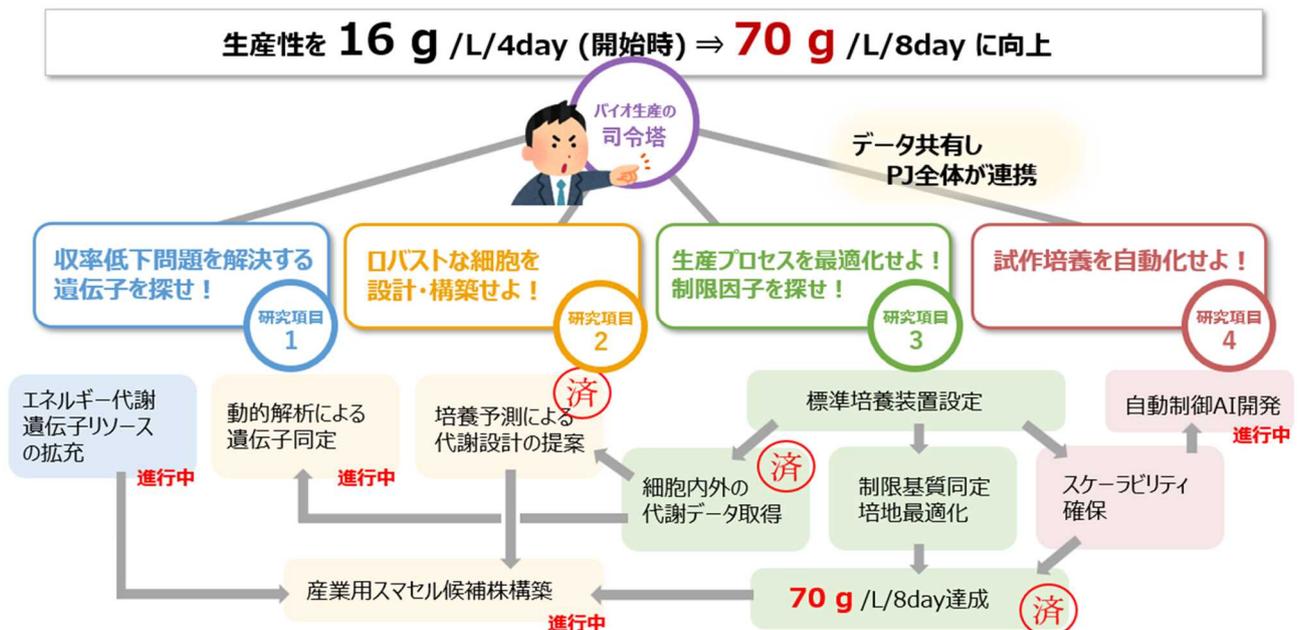


図 3.2.1.1-17 油脂酵母における研究項目横断型の開発成果

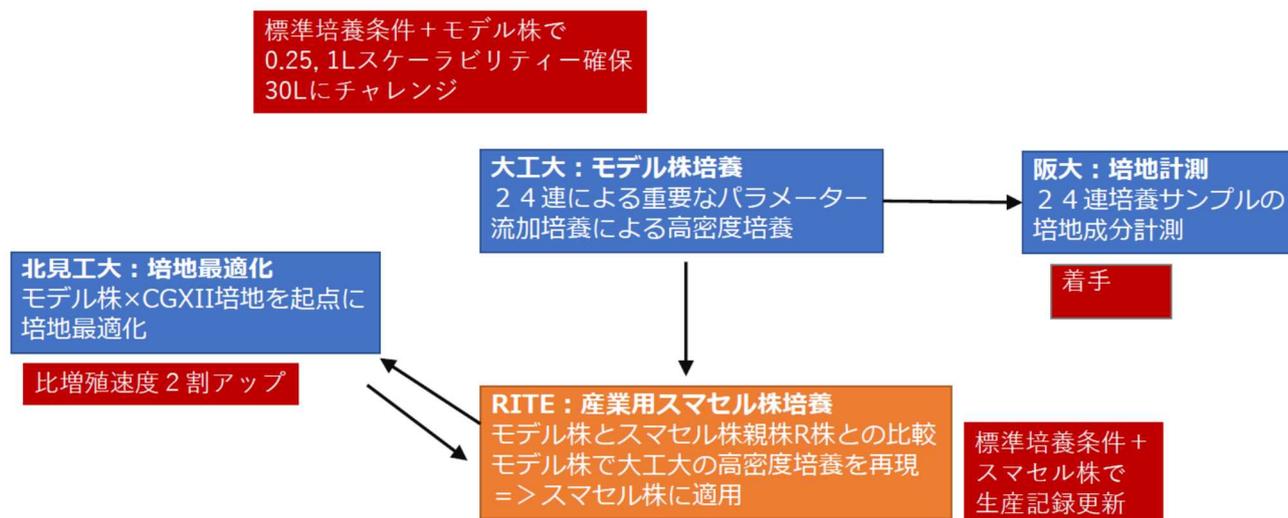


図 3.2.1.1-18 コリネ型細菌における研究項目横断型の開発成果

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

本研究開発テーマにおける各開発技術の先進性、それらを統合したバイオ生産マネジメントの独自性を第三者的に分析し、アウトリーチ活動に活用すべく、AI自動培養制御などの各開発技術ならびにデータレポジトリに関する調査を実施した（項目6）。現在のところ、データレポジトリの調査で菌株、オミクス情報に加え、培養条件とその結果まで取り込んだ統合型バイオ生産マネジメントの前例は世界的にもなく、高い独自性が担保されており、将来のニーズの呼び込みが期待される。

また、企業等の統合型バイオ生産マネジメントのユーザーの要望を吸い上げるべく、ユースケース調査をM01参画企業に対して行った。現時点で表3.2.1.1-3のような回答等を得ており、これらの要望をもとに、スムーズな実用化・事業化に向けたテーマの設定、データ連携等の取り組みを進めている。

表 3.2.1.1-3 実用化・事業化に向けたニーズ把握としてのユースケース調査

課題	ユースケース回答
探索	<ul style="list-style-type: none"> ● 新規酵素の探索。特定の組み換え蛋白の生産に適したホストの探索 ● 企業が要望している非天然化合物をバイオ生産可能かどうか早期に見極めたい ● 社内ニーズに応じて、特定酵素、トランスポーター、特定化合物を生産する微生物の候補を絞り込む
育種	<ul style="list-style-type: none"> ● 育種の際に目的物質生産の律速段階が推定できるような分析が可能であること ● 生産性が向上した菌株の生理的、形態的变化(親株比)に関する情報の探索 ● ある宿主で発酵生産できた化合物を、別の宿主でも発酵生産可能かどうかを早期に見極めたい
培養	<ul style="list-style-type: none"> ● コンタミなどのトラブルに繋がる要因について培養設計の段階から示唆が得られること ● 培養スケールアップ時に起こる課題の原因を掴み、生産力価を向上させたい ● 培養条件を早期に最適化したい
その他	<ul style="list-style-type: none"> ● iBMSを用いることで、企業内での人材育成・教育(技術・技能伝承)を加速する ● 自社でのデータサイエンティスト育成の際の教材。目的物生産量からの製造コスト試算

(12.5) 波及効果

M01の一部は、関西圏のバイオファウンドリ拠点を形成するものとして整備が進められている。阪大、大工大、京大・ちとせの3拠点を中心に、技術活用および人材教育を展開している(図3.2.1.1-19)。

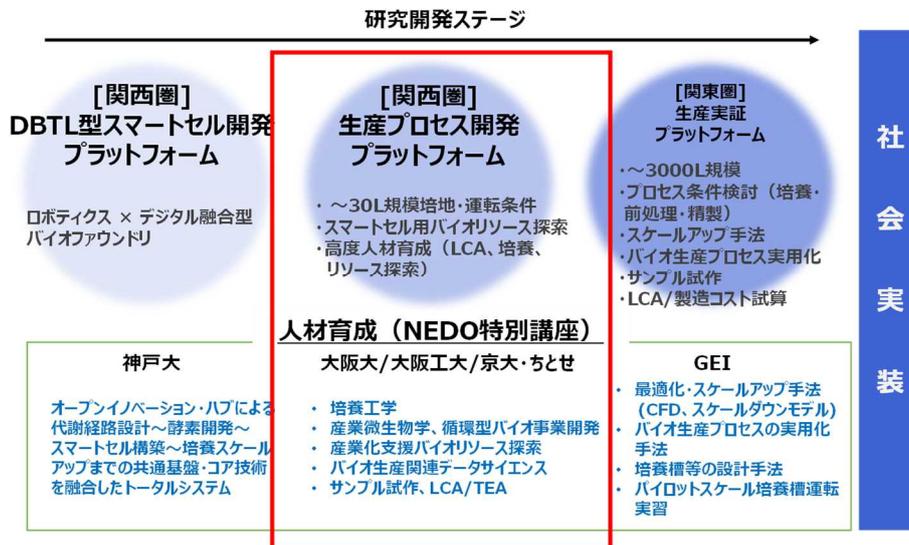


図 3.2.1.1-19 NEDO バイオファウンドリ技術活用・人材育成構想

例として、大工大拠点ではプラットフォーム機能として小規模多連培養設備を活かした基本条件探索や、人材教育として培養技術に関して実技を踏まえた教育を提供している(図3.2.1.1-20)。

プラットフォーム
最適化・試作支援機能
小規模多連バッチ培養 (培地、基本条件探索) ~ 実証規模流加培養 (プロセス最適化)

人材育成
実技教育機能
培養装置の正しい使い方 (操作設計) を教える実技・座学セミナー (基礎&応用) を定期開催

全ての培養槽に自動サンプラーを整備

- 30L蒸発滅菌型培養槽
- 30Lシングルユースマイクロバブル気泡型培養槽
- 20Lシングルユース培養槽
- スクリーニング・条件出し用 0.25L x 24連培養槽
- 教育・小規模流加用 1Lx12連培養槽
- 流加培養用 5Lx4連培養槽
- 自動カウンター (酵母、微生物)
- 酵素式センサー
- HPLC・UPLC (糖・有機酸・アミノ酸)
- 無菌培養&分析に関わる基本設備 (P2対応)

図 3.2.1.1-20 大阪工業大学拠点のプラットフォーム機能

また、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、農畜水産分野へも展開可能である（図 3.2.1.1-21）。ものづくりバイオ（ホワイトバイオ）に加えアグリ・環境（グリーン・ブルーバイオ）、健康・医療（レッドバイオ）など、多様なバイオ技術の社会実装確率を高めることで、バイオフィースト社会の構築を支援し、カーボンリサイクルを実現する。

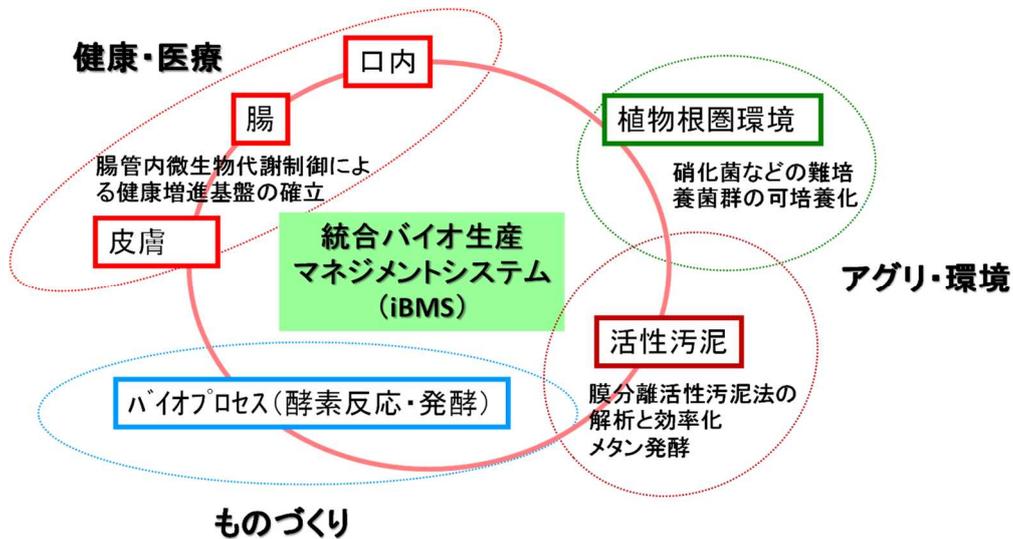


図 3.2.1.1-21 多様な産業への波及効果

3.2.1.1.1 新規ターゲット探索基盤 研究項目 1

3.2.1.1.1.1 表現型スクリーニング基盤構築と高性能表現型宿主・高性能機能遺伝子群の取得
(担当機関;京都大学、徳島大学、龍谷大学、396 バイオ)

研究項目 1.1.1.1, 1.1.1.3.1, 1.1.2.1, 1.2.2.1, 1.2.2.2

(1) 背景と目的

スマートセル技術社会の実装確率を向上すべく、バイオものづくりプロセスの開発期間短縮を実現する技術を構築する。これに資する生物資源をさらに充実させる観点から、「培養ならびに生産における問題を解決する有用遺伝子・宿主をラインナップすることで開発期間を短縮する」ことを目標とする。すなわち、「機能ならびに表現型レベルでの探索により、機能と関連付けられたゲノム情報を拡張し、有用遺伝子・宿主の選抜を効率化する」。具体的技術としては、「生産性向上のための代謝関連遺伝子活用技術」、「複合酵素系の新しい設計技術」、「複合微生物系を用いたプロセス開発のための基盤技術」、の構築を目指す。また、これらの技術基盤構築を効率化する探索ツールとしてパウダー化微生物を活用した「パウダー化微生物を用いた機能スクリーニングシステム」を整備する。パウダー化微生物の優位性と探索における特徴を図 3.2.1.1.1.1-1 に示した。

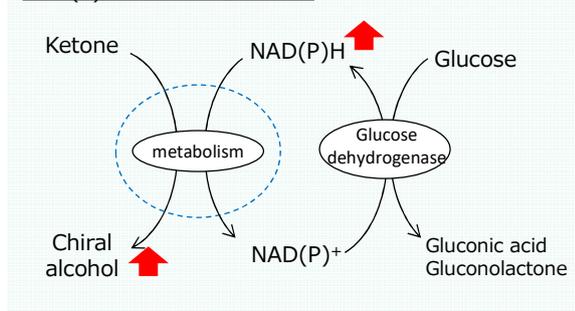
【メリット】

- あらかじめ培養した菌体をパウダー化して保管しているため、スクリーニング時に**菌体を培養する期間が不要**であり、効率的に探索できる。
- パウダー化により膜透過性が向上し、**細胞内の機能を、制限要素を排除して顕在化**させ評価することができる。

制限要素
 ・エネルギー (ATP量)
 ・還元力 (NAD(P)H量)
 ・補酵素量
 ・電子伝達メディエーター量 など

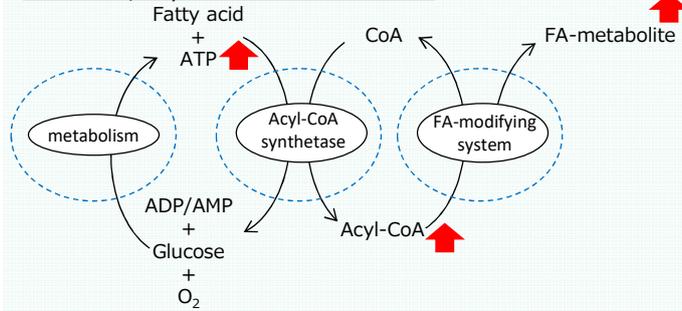
例 1

NAD(P)H再生系との組み合わせ



例 2

ATP再生系, Acyl-CoA供給系との組み合わせ



- 膜が処理されているとは言え、酵素や代謝系は菌体内に保持されており、**外環境に対し安定化されている**。
- ある程度の負荷の存在下で菌体処理を施すため、あらかじめノイズレベルの弱い活性はキャンセルされ、**ロバストな活性が顕在化している**。そのため、産業応用に資するものが選抜されやすい。
- ある程度、水を排除する処理が施されているため、疎水性化合物や溶媒に対する親和性が高く、**脂溶性化合物への変換活性を評価しやすい**。

【デメリット】

- 膜タンパク質群が関与する複雑な酵素系の場合、パウダー化過程で弱化する可能性がある。
- パウダー化した菌体は、誘導基質を含まない条件で培養しているため、誘導酵素の場合は適応できない。

図 3.2.1.1.1.1-1 パウダー化微生物の優位性と探索における特徴

(2) 位置づけ、目標値

以下に各開発技術の目標を示す。

1. パウダー化微生物を用いた機能スクリーニングシステム

適度な膜透過性（細胞間物質供給）を有し疎水性化合物に適した反応系に適用できる安定性の高い宿主・酵素探索リソースとしてのパウダー化微生物の提供

2. 生産性向上のための代謝関連遺伝子活用技術

多様な基質からエネルギー（ATP）・補酵素（NADH等）を供給する代謝系遺伝子の提供による活性向上・反応持続性向上、ならびに原料の多様化

3. 複合酵素系の新しい設計技術

CoA・補基質・電子伝達分子等が関与する複合酵素系、阻害物質（活性酸素等）除去を配慮した複合酵素系、生産物を多様化するカスケード反応のための複合酵素系の新規設計技術開発

4. 複合微生物系を用いたプロセス開発のための基盤技術

還元力（水素、NAD(P)Hなど）がコミュニケーション分子となる複合微生物系プロセスの開発
なお、上記2.～4.に関して、1.で構築するNITE株の微生物パウダーライブラリを活用し、特異機能に着目した高性能表現型宿主・高性能機能遺伝子を探索する。

具体的産業応用例としては、2.に関して、高度な油脂生産性を有する可能性のある子のう菌酵母及び担子菌酵母について、各種糖質を含む培地における油脂生産性を評価し、油脂関連化合物生産の宿主としての利用可能性を調査する。未利用バイオマスを生産原料として利用することにより、安価な油脂生産が可能になるとともに、CO₂排出削減効果が期待される。また、新規生産対象化合物を創出し、幅広いニーズに応える体制を構築する。2.の企業参画機関である396bioの対象市場・製品は、細胞が生合成する際にエネルギー化合物であるATPを多く必要とする代謝産物である。競合技術は、米国ベンチャーアミリス社などの細胞の節エネ技術であるが、基礎代謝エネルギーを犠牲にし生産性向上に限界があるのに対し、本技術は細胞の創エネ技術であり、基礎代謝エネルギーを維持し生産性向上が可能である。また、競合技術が生産物に応じてゼロから再構築しなければならないのに対し、本技術は生産物共通に適用ができ、スマートセル向きである。

表 3.2.1.1.1.1-1 最終目標値

位置づけ	根拠	中間目標値	最終目標値
NITE株からのモデル株・スマートセル類縁株微生物パウダーライブラリ構築（京都大） 研究項目 1.1.1.1.	ターゲット株の類縁株をNITE株から抽出するに十分な数	微生物パウダー累計 400 株	微生物パウダー 累計 1000 株
モデル株・スマートセルの類縁微生物、モデル株変異株を対象としたスクリーニング（京都大・徳島大・龍	基盤技術ならびに共同実施企業による基盤技術検証に対応するターゲット数	高性能表現型を有する高生産株 累計 6 株 高性能機能遺伝子 累計 6 遺伝子	高性能表現型を有する高生産株 累計 12 株 高性能機能遺伝子 累計 30 遺伝子

谷大) 研究項目 1.1.1.3.1.			
特異機能に着目した高性能表現型宿主・高性能機能遺伝子の探索 (京大・徳島大・龍谷大) 研究項目 1.1.2.1.a	基盤技術ならびに共同実施企業による基盤技術検証に対応するターゲット数	代謝系機能遺伝子 累計 4 遺伝子 酸化還元系機能遺伝子累計 4 遺伝子 エネルギー産生系機能遺伝子 累計 4 遺伝子 抗酸化系機能遺伝子 累計 2 遺伝子 オルガネラ機能遺伝子 累計 2 遺伝子 複合微生物系機能 累計 6 組	代謝系機能遺伝子 累計 12 遺伝子 酸化還元系機能遺伝子 累計 12 遺伝子 エネルギー産生系機能遺伝子 累計 12 遺伝子 抗酸化系機能遺伝子 累計 6 遺伝子 オルガネラ機能遺伝子 累計 6 遺伝子 複合微生物系機能 累計 22 組
特異機能に着目した高性能表現型宿主・高性能機能遺伝子の探索 (エネルギー産生系) (396bio) 研究項目 1.1.2.1.b	DB・ライブラリ利用技術における従来のヒット率	DB・微生物ライブラリから高機能ロドプシンを 4 遺伝子以上獲得する	DB・微生物ライブラリから高機能ロドプシンを 4 遺伝子以上獲得する
	分子育種技術における従来のヒット率	DB・微生物ライブラリから得られた高機能ロドプシンを遺伝子改変し、より高機能のロドプシンを 4 遺伝子以上獲得する。	天然資源からあるいは分子育種により高機能ロドプシンを 4 遺伝子以上獲得する
	光培養系開発においてスケールアップした時の光培養機能実証が必要	該当なし	スケールアップ光培養系での機能実証
新規生産対象化合物の創出 (京大・徳島大・龍谷大) 研究項目 1.2.2.1.	基盤技術ならびに共同実施企業による基盤技術検証に対応するターゲット数	新規ターゲット化合物 2 化合物	新規ターゲット化合物 累計 12 化合物
新規開発ターゲットの生産に向けた	基盤技術ならびに共同	上記の全てに分散して内包	上記の全てに分散して内包

<p>オンデマンド高性能微生物供給（京都大・三菱ケミカル・ヤスハラケミカル・天野エンザイム・カネカ・ダイセル・Noster）</p> <p>研究項目</p> <p>1. 2. 2. 2.</p>	<p>実施企業による基盤技術検証に対応するターゲット数</p>		
---	---------------------------------	--	--

(3) 全体計画

表 3.2.1.1.1.1-2 全体計画表

項目\年度	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027~
NITE株からのモデル株・スマートセル類縁株微生物パウダーライブラリー構築 (京都大)					累計1000株			
モデル株・スマートセルの類縁微生物、モデル株変異株を対象としたスクリーニング (京都大・徳島大・龍谷大)		探索・選抜				選抜・格納		
特異機能に着目した高性能表現型宿主・高性能機能遺伝子の探索 (京都大・徳島大・龍谷大)		探索・選抜				選抜・格納		
エネルギー産生系遺伝子の探索技術の開発 (396bio)								
エネルギー産生系遺伝子の微生物ライブラリー・データベースからの選抜 (396bio)								
エネルギー産生系遺伝子の天然資源からの選抜や分子育種 (396bio)								
高性能エネルギー産生系の開発 (光培養系の開発など) (396bio)								
様々な産業用スマートセル・企業開発株への適用による高性能エネルギー産生宿主の開発 (396bio)								

4) 実施体制

(体制図)

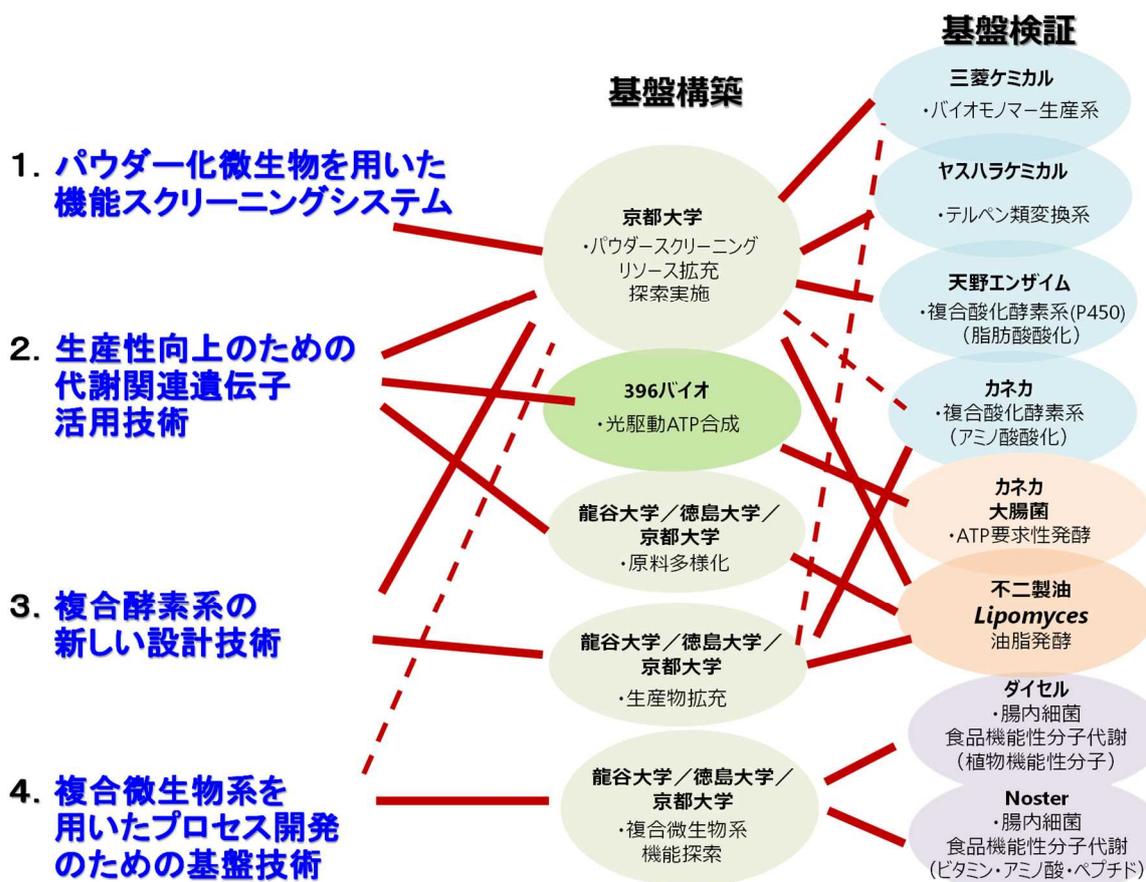


図 3.2.1.1.1.1-2 実施体制

(5) 運営管理

定例会議等

京大 G・NITE 打合せ:	5/6, 7/2
京大 G・ダイセル・NITE 打合せ:	7/26, 9/1
項目 1 分科会:	5/27, 6/29, 7/27, 8/31
長岡技科大 G との打合せ (@長岡) :	7/16-17
京大 G 小分科会:	8/30, 9/28, 10/26, 11/30, 1/25, 3/29
研究項目 1.2.2.2 企業テーマ成果、目標、進捗確認会議:	9/14, 10/4 (Noster, 396 バイオ, カネカ)
JBA 事務局との打合せ:	10/11
研究項目 1&研究項目 2 会議:	10/15
NEDO 施設見学:	10/27
ワークフロー検討会:	11/4
NEDO 打合せ:	11/10, 11/11, 11/25
JBA 打合せ・iBMS 委員会:	11/17
JBA 打合せ・NEDO 中間検査 :	11/18
西ファウンドリ打合せ:	12/3
iBMS 全体会議:	12/24
ヒアリング (項目 1 : 進捗会議) :	1/7, 1/18
技術推進委員会:	2/21-22
テーマ代表者会議:	3/23
ワークフロー会議:	3/17
NEDO 中間評価キックオフ会議:	3/23

再委託先/共同実施先

三菱ケミカル打合せ:	4/8, 5/14, 6/24, 8/6, 8/19, 10/1, 10/26, 12/2, 1/24, 2/1, 2/28
ちとせ研究所:	4/16
Noster:	4/21, 6/2, 8/4, 8/23, 8/24, 9/3, 10/1, 10/4, 10/21, 1/6, 2/17, 3/1, 3/2
ヤスハラケミカル:	5/12, 7/27, 9/30, 11/15, 3/4
カネカ:	6/8, 9/14, 12/7, 3/8
天野エンザイム:	6/23, 11/5, 11/26, 12/6-10(パウダースクリーニング検討), 3/23
ダイセル:	6/29, 9/1 (NITE との連携) , 9/28, 12/6(NITE 打合せ), 12/15, 3/7
JBA:	1/19
SPL・NEDO:	1/28, 2/4

他機関 (Gr) との連携/依頼

NITE 菌株利用打合せ:	5/6
モデル株に関する議論 (RITE 等) :	4/28, 5/19
RITE 打合せ:	6/18 (テーマ関連) , 6/25 (モデル株関連) ,

	11/16, 12/20
NEDO/PL/sPL/METI (ファウンドリ関連) :	7/6
NEDO/PL/sPL (京大 G 視察) :	7/6
項目 1, 2, 3, 4 油脂酵母研究連携打合せ:	10/5, 10/8, 10/15, 10/29, 11/8
近畿バイオインダストリー振興会議・西ファウンドリ打合せ:	11/8, 1/13, 3/16
NEDO プロジェクト情報交換会:	11/9
近畿経済産業局・西ファウンドリ打合せ:	11/15
Green Earth Institute 東西ファウンドリ打合せ:	12/8
ちとせ研究所打合せ:	12/27, 2/7
研究開発項目③Noster ステージゲート:	1/24
METI 調査インタビュー:	1/26

(6) 実施の効果

原料の多様化緩急により、草本系や廃棄物系等の未利用バイオマスを利用した油脂関連化合物生産を実現でき、大幅な CO₂ 削減が可能である。生産する物質にもよるが、ファインケミカルの場合、2033 年度に従来よりも 2~3 倍の生産性が得られれば、製造設備を 1/2~1/3 にでき、CO₂ や消費エネルギーを 1/2~1/3 にできる。

(7) 中間目標の達成度

表 3.2.1.1.1.1-3 中間目標の達成度

研究項目	活動内容	中間目標	達成度
1.1.1.1. パウダー化微生物を用いた機能スクリーニングシステム	NITE 株からのモデル株・スマートセル類縁株微生物パウダーライブラリ構築 (京都大)	微生物パウダー累計 400 株	累計 400 株をパウダーとした。 ○
1.1.1.3.1. 生産性向上のための代謝関連遺伝子活用技術	モデル株・スマートセルの類縁微生物、モデル株変異株を対象としたスクリーニング (京都大・徳島大・龍谷大)	高性能表現型を有する高生産株 累計 6 株 高性能機能遺伝子 累計 6 遺伝子	・各種炭素源を使用可能な油脂酵母 6 株を同定した。○ Acyl-CoA synthetase 遺伝子を 6 つ取得した。○

<p>1.1.2.1. 複合酵素系の新しい設計技術</p> <p>複合微生物系を用いたプロセス開発のための基盤技術</p>	<p>特異機能に着目した高性能表現型宿主・高性能機能遺伝子の探索（京都大・徳島大・龍谷大）</p>	<p>代謝系機能遺伝子 累計 4 遺伝子 酸化還元系機能遺伝子累計 4 遺伝子 エネルギー産生系機能遺伝子 累計 4 遺伝子 抗酸化系機能遺伝子 累計 2 遺伝子 オルガネラ機能遺伝子 累計 2 遺伝子 複合微生物系機能 累計 6 組</p>	<p>糖変換酵素遺伝子、脂質変換講師遺伝子、オキシダーゼ、オキシゲナーゼなど、目標数の遺伝子を取得した。○</p>
<p>1.1.2.1.b エネルギー産生系</p>	<p>ゲノム DB/微生物ライブラリ利用技術 6 遺伝子獲得 (396 バイオ)</p>	<p>ゲノムデータベース・微生物ライブラリから高機能ロドプシンを 4 遺伝子以上獲得する</p>	<p>2022 年度の目標を 2021 年度ですでに 1.5 倍達成；○</p>
	<p>分子育種技術 2022 年度より実施予定 (396 バイオ)</p>	<p>天然資源あるいは分子育種により高機能ロドプシンを 4 遺伝子以上獲得する</p>	<p>-</p>
	<p>光培養系開発 2023 年度より実施予定 (396 バイオ)</p>	<p>スケールアップ光培養系での機能実証</p>	<p>-</p>
<p>1.2.2.1. 新規生産対象化合物の創出</p>	<p>新規生産対象化合物の創出（京都大・徳島大・龍谷大）</p>	<p>新規ターゲット化合物 2 化合物</p>	<p>水酸化脂肪酸、ω3 脂肪酸を創出した。○</p>
<p>1.2.2.2. 新規開発ターゲットの生産に向けたオンデマンド高機能微生物供給</p>	<p>新規開発ターゲットの生産に向けた高機能遺伝子の供給（京都大・三菱ケミカル・ヤスハラケミカル・天野エンザイム・カネカ・ダイセル・Noster）</p>	<p>上記の全てに分散して内包</p>	<p>上記の全てに分散して内包 ○</p>

(8) 研究開発の成果と意義

「パウダー化微生物を用いた機能スクリーニングシステム」ならびに「生産性向上のための代謝関連遺伝子活用技術」に関連するすような成果は以下の通り。

Lipomyces 属等の油脂酵母について、油脂生産性の向上に有用な遺伝子を取得するべく、近縁種の酵母について、パウダーライブラリーを構築した。構築したパウダーライブラリーを用いて、ATP 再生能やアシル CoA シンターゼ活性が高い菌株を選抜し、有用な候補遺伝子を取得した。具体的成果は以下の通り。ATP 再生能と Acyl-CoA synthetase (ACS) 活性の評価系を構築し、本パウダーライブラリーを用いて、ATP 再生能と ACS 活性を評価した。その結果、ATP 再生能が高い株として、*Candida castelli*、*C. dajiaensis*、*C. diversa* を見いだした (図 3.2.1.1.1.1-3)。また、ACS 活性が高い株として、*C. freyschussii*、*C. methanosorbosa* を見いだした (図 3.2.1.1.1.1-4)。選抜された株については、九州大学・田代グループとの共同による RNA-seq により、機能遺伝子の特定を進めている。また、これらの菌株をジャー培養したときの生育基礎データならびに油脂生産データの取得、共有データとしての提供を進めている。また、生産原料の多様化を目的とし、工業生産の副産物であるグリセロール、植物バイオマスに由来するキシロースあるいは廃棄物に含まれるデンプン等の利用可能性について検討を行った。生産原料の多様化は、製造コストの削減に繋がるとともに、未利用バイオマスの活用により CO₂ 削減に貢献可能である。具体的には、*Lipomyces* 属や *Saitozyma* 属に属する酵母約 100 株を NITE より分譲を受け解析対象とした。グルコース、グリセロール及びキシロースを炭素源とする培地で培養し、油脂生産に関するデータを取得した。その結果、*Lipomyces* 属酵母ではグルコース以外の炭素源を用いた場合にも、高効率で油脂を生産する株が存在することが示唆された (図 3.2.1.1.1.1-5、図 3.2.1.1.1.1-6、図 3.2.1.1.1.1-7)。ATP 再生産能や脂質合成酵素等を解析しているグループと連携し、選択した酵母株の利用性に関する検討を深めていく

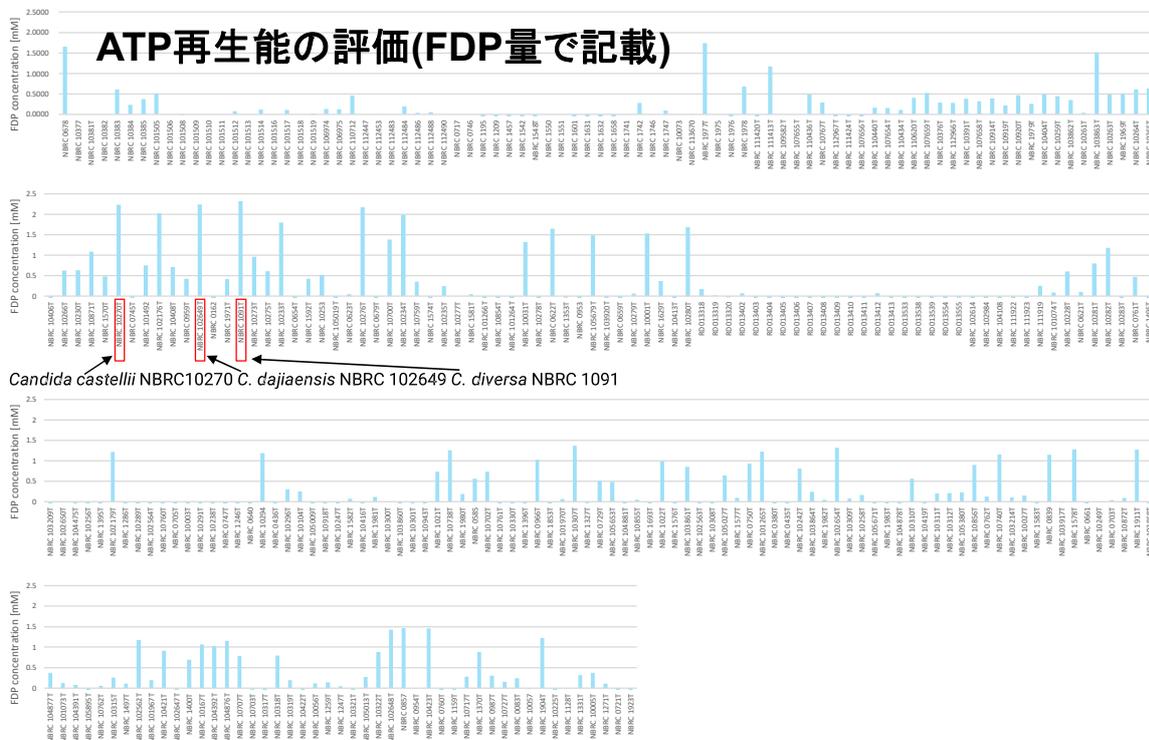


図 3.2.1.1.1.1-3 パウダーライブラリーの ATP 再生能評価結果

A₅₅₀が高いほどAcyl-CoA量が多い

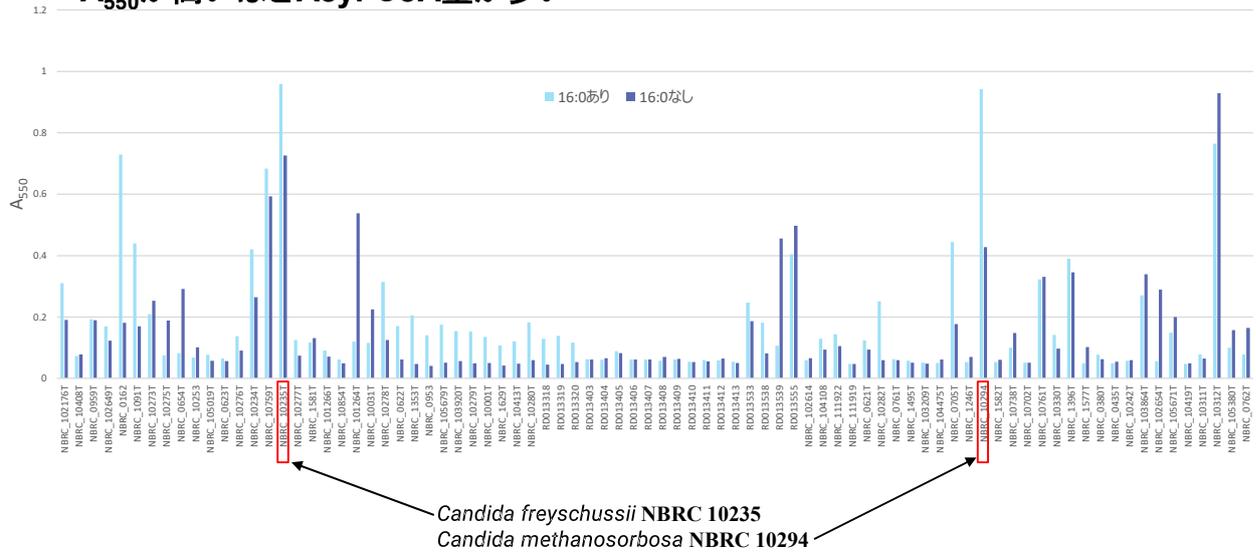


図 3. 2. 1. 1. 1-4 パウダーライブラリの AGS 活性評価結果

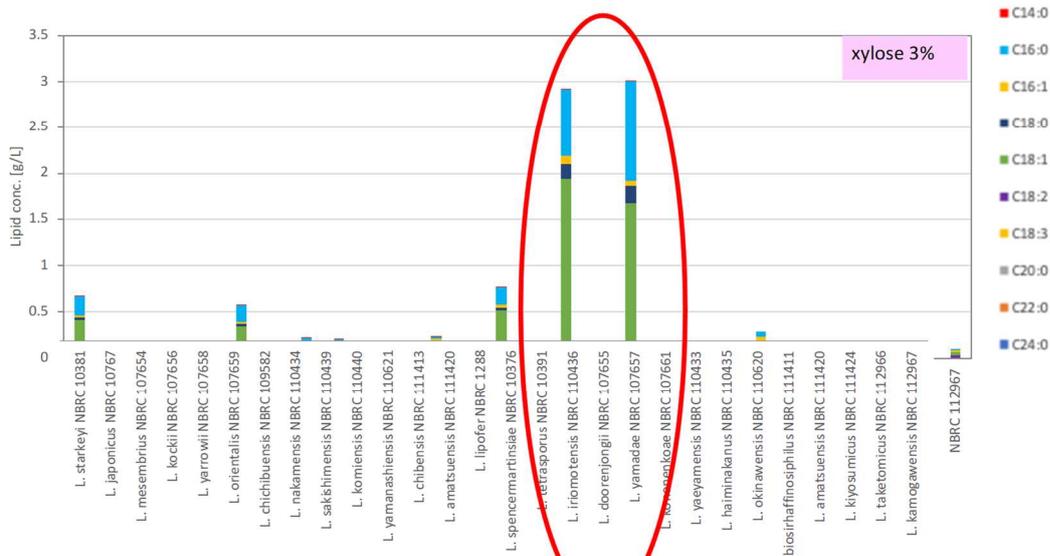
グルコースを炭素源として効率よく油脂生産可能な *Lipomyces* 属酵母の探索 (コントロール条件)



Lipomyces doorenjongii 南アフリカで分離 1999年に新種として報告

図 3. 2. 1. 1. 1-5 グルコースを炭素源として効率よく油脂生産可能な *Lipomyces* 属酵母の探索 (コントロール条件)

キシロースを炭素源として油脂生産 可能な*Lipomyces*属酵母(宿主)の探索



Lipomyces yamadae 南アフリカで分離 1999年に新種として報告
Lipomyces iriomotensis 西表島で分離、私どものグループで新種報告

図 3. 2. 1. 1. 1-6 キシロースを炭素源として油脂生産可能な *Lipomyces* 属酵母 (宿主) の探索

デンプンを炭素源として油脂生産 可能な*Lipomyces*属酵母(宿主)の探索



Lipomyces tetrasporus フランスで分離
Lipomyces doorenjongii 南アフリカで分離、1999年に新種として報告

図 3. 2. 1. 1. 1-7 デンプンを炭素源として油脂生産可能な *Lipomyces* 属酵母 (宿主) の探索

また、研究項目 1.2.2.1 ならびに 1.2.2.2 をサポートするプロダクトの多様化に関し、*Lipomyces* 属等の油脂酵母では生産が困難と予想されるポリマー原料となる水酸化脂肪酸の生産に最適な宿主の取得や、真核生物での水酸化脂肪酸生産に有用な酵素遺伝子を取得した。具体的には、再委託先・徳島大において、表現型・機能評価探索系の構築目標に向けて以下の研究成果を達成した。自然界より単離したフザリウム属糸状菌が菌体内に水酸化脂肪酸を蓄積することを明らかにした。それら脂肪酸群を同定したところ、10-hydroxystearic acid (HYB)、10-hydroxy-12-octadecenoic acid (HYA)、10-oxostearic acid (KetoB)であることがわかった(図 3.2.1.1.1.1-8)。いくつかの脂質を培地に添加して脂肪酸の定量的な解析を行ったところ、オレイン酸メチルエステルや遊離型のオレイン酸を効率よく HYB へ変換し、菌体内に蓄積することも明らかにした(図 3.2.1.1.1.1-9)。このフザリウム属糸状菌から公開されているゲノム情報を参考に脂肪酸水和酵素遺伝子と推定された遺伝子をクローニングし、機能解析を試みた。大腸菌発現系を利用した遺伝子機能解析の結果、オレイン酸を HYB へ、パルミトオレイン酸を 10-hydroxypalmitic acid へ、リノール酸を HYA へ変換することが明らかになった。このフザリウム属糸状菌の脂肪酸水和酵素を油糧微生物モルティエセラ・アルピナで発現させることを試みた。油糧微生物モルティエセラ・アルピナはアラキドン酸などの高度不飽和脂肪酸を著量蓄積する糸状菌であり、京都大学がその宿主ベクター系を開発した。京都大学が保持するこの宿主ベクター系を利用して、遺伝子発現体の脂肪酸生産性を評価したところ、野生株では生産しない HYB の生産が確認された。油糧糸状菌における新たな機能性脂質生産の可能性が示唆された。

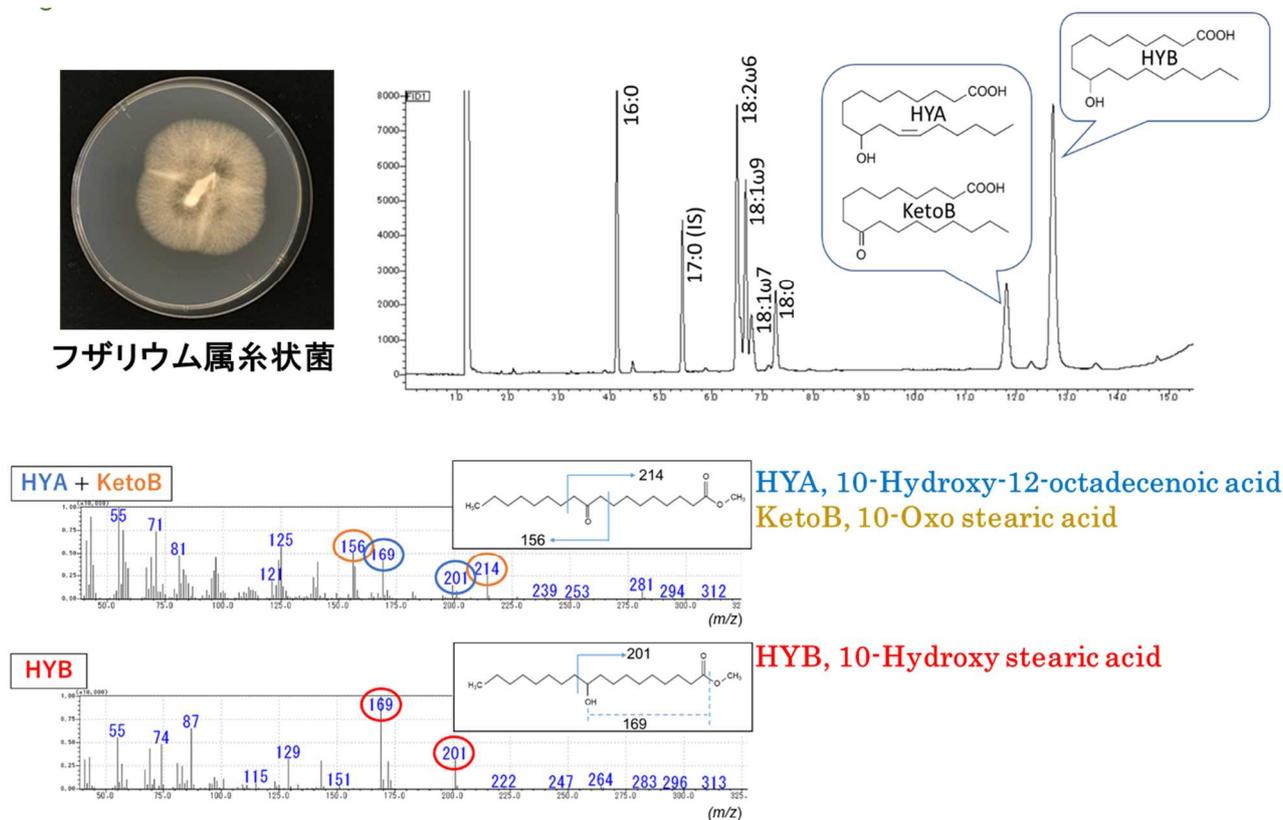


図 3.2.1.1.1.1-8 *Fusarium* sp. による水酸化脂肪酸とオキソ脂肪酸生産

Effects of lipids on HYB production

Lipid	Fatty acid production (mg/ml)		DCW (mg/ml)*
	KetoB+HYA	HYB	
Methyl oleate	0.03 (±0.01)**	<u>0.14 (±0.01)</u>	6.33 (±1.21)
<i>Mortierella</i> oil	0.01 (±0.01)	0.01 (±0.00)	6.13 (±3.81)
Oleic acid	0.04 (±0.01)	<u>0.18 (±0.06)</u>	5.82 (±1.24)
Soy lecithin	0.11 (±0.01)	0.03 (±0.00)	7.40 (±1.12)

* Abbreviation: DCW, Dry cell weight.

** The values in parentheses indicate the standard deviation.

トリアシルグリセロールを多く含むモルティエラ属糸状菌由来油脂やリン脂質を多く含む大豆レシチンを炭素源としたときHYBをあまり作らないものの、オレイン酸メチルや遊離オレイン酸を炭素源としたときHYBを多く蓄積した。

図 3.2.1.1.1.1-9 *Fusarium* sp. による水酸化脂肪酸生産における脂質の影響

産業用スマートセルへの新規なエネルギー獲得系の導入に関して、エネルギー産生機能であるロドプシン様遺伝子を探索・改良した。各ロドプシントイプの相間配列を抽出し、それぞれのライブラリを作製した。次に系統樹を作製し、高機能ロドプシンを推定後、実際にプロトンポンプ活性を測定した。その結果、既存最大活性を超える高機能ロドプシンを3遺伝子取得した。

また、NITEの保有株から高機能ロドプシンを探索するため、NITE保有の高度好塩菌10株を対象に活性スクリーニングを実施した。具体的には、10株の高度好塩菌を培養したところ、うち4株の菌体が赤色に呈色した。また、これらのロドプシンをクローニングし、すべてのロドプシンを大腸菌で発現させることができた。さらに、これらの4種類のNITE株由来ロドプシンを発現させた大腸菌4種類について、プロトン輸送活性を評価したところ、うち1種類のロドプシンが高機能ロドプシンであることがわかった。

さらに、データベースに対してデルタロドプシンの相同配列によりスクリーニングを行い、選抜した10種類のロドプシンを大腸菌で発現させたところ、うち7種類のロドプシンが大腸菌での発現に成功した。しかし、この中に高機能ロドプシンは含まれていなかった。また、それぞれのロドプシンの光に対する特性を解析したところ、NITE株由来ロドプシン2種類を含む4種類が高機能ロドプシンであることがわかった。

以上の結果から、6種類の高機能ロドプシンを獲得しており、2022年度の間目標である「ゲノムデータベース・微生物ライブラリから高機能ロドプシンを4遺伝子以上獲得する」を超える成果を2021年度時点で達成することに成功した。

なお、テーマ間連携への取り組みについては、ロドプシンへの光エネルギーの供給の仕方について、大阪工業大学の長森先生を中心に本プロジェクトにて開発中のシングルユース培養は、透明なシングルユースバッグを用いるため、光照射培養に向いていると考えられ、研究項目1.1.4.2とのテーマ間連携研究についても検討を開始している。

共同実施企業（三菱ケミカル、ヤスハラケミカル、天野エンザイム、カネカ、ダイセル、Noster）と実施している、4つの基盤技術「パウダー化微生物を用いた機能スクリーニングシステム」、「生産性向上のための代謝関連遺伝子活用技術」、「複合酵素系の新しい設計技術」、「複合微生物系を用いたプロセス開発のための基盤技術」の実効性検証に関する成果は、以下の通り。

三菱ケミカル株式会社は、持続可能な社会を創出すべく、プラスチック原料をバイオマス等のサステナブルリソースから製造するプロセスの確立を目的としている。プラスチック原料となる目的モノマー化合物の効率的な新規生合成経路を見定め、当該生合成経路上に存在する反応を触媒する酵素を京都大学保有の微生物パウダーライブラリを用いてスクリーニングした。その結果、生産ルート上の反応を触媒する活性を有する微生物の選抜に至った。

ヤスハラケミカル株式会社では、各テルペンを基質として、パウダーライブラリならびに酵素を用いたスクリーニングを行い、電子溶剤用テルペン類への変換反応に適用できる酵素を選抜した。同様に香料ターゲット化合物へのスクリーニングを実施し、標的酵素を見いだした。また、見いだした酵素を用いた反応条件を検討し、スケールアップ時の課題について洗い出しを行った。結果、過剰基質と酵素の接触によって、酵素の失活が起こるなどの問題点を明確にするとともに、現時点での最適反応系の設計を行った。

天野エンザイム株式会社は、機能性油脂生産酵素剤の実用開発の為、ホスト菌株の開発とパウダー化微生物のスクリーニングを進めた。前年度に開発した遺伝子発現系において、内在酵素による目的生成物の分解が生じていた。各種検討の上で、目的生成物の分解を引き起こす内在酵素を推定して、当該遺伝子を破壊した菌株を作製した。その結果、目的生成物の分解が抑制されて、実用的なホスト菌体の開発に成功した。また、酵素剤の実用化においては、酵素の安定化という課題があり、酵素が失活して反応が進まなくなるという問題が古くから知られている。酵素失活の原因となる要素を除去する酵素のスクリーニングを進めており、候補となる株を9株選定した。

株式会社カネカは、肥料、飼料、機能性食品、化粧品、医薬品等の原料など高付加価値の有用化合物の酵素・微生物を用いたクリーンで効率的な生産法確立を目的とする中で、近年研究の進むアミノ酸水酸化酵素を主軸に置いた検討を開始した。微生物の当該活性を検出する評価系を確立し、菌体パウダーライブラリや自然界からの分離株の評価、また、既存の遺伝子配列から酵素遺伝子を取得して大腸菌等で当該遺伝子を高発現する系について検討を開始した。

株式会社ダイセルではユニークな腸内代謝物をターゲットとして、生産に関わる2種類の腸内細菌を共培養で利用することで、ターゲット化合物の1ポット発酵生産に成功し（世界初）た。また、生産株のプロテオーム解析とゲノム配列を基に、ターゲット化合物の中間体生成に関与する酵素遺伝子群を特定するとともに酵素の諸性質を明らかにし、異種発現に成功した。更に、他のターゲット化合物類縁体の生産に繋げることを狙いとして、京都大学、NITEと連携し、様々な微生物資源（ゲノムDNA情報）から、上記以外の関連酵素の探索及び解明を進めている。

Noster株式会社では、混合培養生産系の鍵化合物生産（相互作用因子）における基本培地を設定するとともに、培養に伴うターゲット化合物ならびに代謝中間体の分析系を確立した。その結果、代謝経路に存在する中間体の増減を同時に評価できる分析系を確立し、ターゲット化合物を産生する腸内細菌の存在を確認した。定量性のある網羅的なスクリーニング系を構築できたことにより、当初の予定通り、2022年度からのスクリーニングの実施が可能となった。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

本研究項目では、有用物質の工業生産への貢献に向けて高性能宿主ならびに高機能性遺伝子を探索することが目標である。探索を続行するとともに、工業生産に活用可能な宿主株の機能遺伝子の特性解明を進める。特に、油脂関連化合物生産において有用性の高い宿主酵母、生産性向上のための代謝関連遺伝子の特定を介して、関連企業との連携を深めていく。以上の研究を効率的に実施することにより、最終目標の達成可能性は高い。

「エネルギー産生機能であるロドプシン様遺伝子をラインナップし、産業用スマートセルへの適用により開発期間を短縮する」という最終目標に対し、現状は光照射のコストが課題である。ファインケミカルをターゲット化合物とした場合、従来よりも2~3倍の生産性が得られれば、製造設備を1/2~1/3にできる。高機能ロドプシンの獲得と光培養系の開発により、光照射システムをその差分内でのコスト・労力で導入できれば、この最終目標を達成可能である。

(10) 成果の普及

表 3.2.1.1.1.1-4 成果リスト

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	
2020	0	0	0	0	0	0	1
2021	3	0	6	0	0	0	2
2022	4	0	6	0	0	0	0
PJ 期間 合計	7	0	12	0	0	0	0

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

化成品などを生産する企業に製造技術開発のプラットフォームを提供し、企業と共同技術開発の加速をはかることにより、知的財産権の確保に取り組む。

表 3.2.1.1.1.1-5 特許出願数

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2020	1	0	0
2021	0	0	1
2022	0	0	0
PJ 期間 合計	1	0	1

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

本研究項目では、油脂関連化合物、化成品、機能性食品、プロバイオティクスなどを生産する企業に対して、物質生産の基盤となる生物資源プラットフォームを提供し、製本開発期間の短縮をはかる。これらの取り組みを強化し実用化可能な製造技術を構築する。さらに、製品原料として未利用バイオマス等を活用することにより、国際的な重要な課題である CO₂ 削減に貢献することが可能になる。

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

「パウダー化微生物を用いた機能スクリーニングシステム」、「生産性向上のための代謝関連遺伝子活用技術」、「複合酵素系の新しい設計技術」、「複合微生物系を用いたプロセス開発のための基盤技術」については、プロジェクト内の共同実施企業にパウダー化微生物ライブラリならびに各技術の実効性を検証していただく過程を通して、それぞれのターゲット生産物の社会実装をサポートする形で、事業化に機能する。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

「パウダー化微生物を用いた機能スクリーニングシステム」に関しては、NITE との共同により、NITE 保有株につき、パウダー化微生物をオープンに提供できるかどうかを協議中である。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

共同実施企業との意見交換をメールレベルでは頻繁に実施、また、対面もしくはオンラインでの会合を概ね 1~3 か月の間隔で実施している。これらの意見交換により、実用化・事業化に向けた探索ターゲットの選定、探索技術の改良の方向性、具体的ターゲット生産物の実用化・事業化戦略等の議論を進めている。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

開発基盤技術を活用して共同実施企業の具体的なニーズに立脚したスクリーニング事例を複数実施しており、各共同実施企業においてそれらの成果の事業化が検討されている。

三菱ケミカル：三菱ケミカルでは植物由来原料からプラスチック原料のモノマー化合物を発酵法により製造する方法を開発中である。この製法置換えにより、製造時のエネルギー消費や排出物の削減が期待され、環境負荷の低減した方法で製造が可能となる。当モノマー化合物は世界的需要が非常に大きいため、発酵法による製法置換えを進めることでサーキュラーエコノミー実現への大きな寄与が期待できる。

ヤスハラケミカル：プロジェクト終了後 1 年後までに、プロジェクトで得られた成果物を用いての生産プロセス／顧客先との品質確定を行い、2 年次に生産設備改良・投資を行う。各スクリーニングを通じ、ライブラリや iBMS 構築による標的／原料／条件相関データ蓄積への貢献のほか、パウダーを利用することでの「疎水性化合物反応への適合／コスト優位」「巨大培養設備投資の省略」が期待できる。

天野エンザイム：プロジェクトを通して、酵素製剤化（複合酸化酵素製剤）、生産プロセスの開発、微生物触媒の開発を進めていく。これまでの取り組み（NEDO・スマセル事業）成果をアピール

して、興味を持っていただいた会社との情報交換を進める。実際に、ターゲット生産物メーカーとの勉強会の開催と事業の可能性を検討している。複合酸化酵素製剤を構成する酵素の特許を取得することで権利を保護できるよう準備を進めている。終了後1年目（令和9年度）からテストマーケティングを開始、終了後2年目（令和10年度）からの上市を目指す。

カネカ：ターゲット化合物生産株は育種できれば現在社内で進行中の育種株と入れ替える。医薬中間体用酵素はライブラリとして使用。

ダイセル：一つ目のターゲットであるウロリチンA含有素材は実機製造設備での製造を実現した。今後、事業化を進められる見通しである。化合物Xは2027年度以降に事業化を進められる見通しである。

Noster：すでにB to Bでの食品向けプロバイオティクス原料供給を行っているが、今回の研究開発にて提案する新規プロバイオティクス菌についても国内及び海外での食品向け原料供給を事業化の中心と考えている。2022年度に新規プロバイオティクス菌株の提案を行い、2023年度以降、選抜株の生産に向けた検討を行い、2026年度までに原料発売の準備を完了する予定である。

396 バイオ：ATP 高要求性生産ターゲットの製造が本テーマのゴールである。共同実施企業と共同で、ATP 高要求性生産ターゲットの受託製造により本技術を実用化する。また、本事業で得られた「情報」を可能な範囲でiBMSに提供し、広く社会に還元する。

(12.5) 波及効果

本探索基盤技術の構築により、バイオ生産における有用遺伝子資源の効率的提供が期待される。加えて、その遺伝子資源を活用し、様々なバイオ技術を活用した有用生産物、例えば、今回各共同実施企業と事業化を目指している、ポリマー原料、疎水性機能性化合物、機能性油脂、機能性アミノ酸、酵素剤、腸内細菌代謝物、プロバイオティクス、などの社会への提供を通して、バイオエコノミーの活性化、バイオファーストの実現に貢献する。

3.2.1.1.1.2 ミリオンスクリーニング技術の開発（長岡技術科学大学、産業技術総合研究所、製品評価技術基盤機構（NITE）、広島大学、早稲田大学、九州大学、オンチップ・バイオテクノロジー、ニコソリユーションズ、長岡工業高等専門学校、函館工業高等専門学校、鶴岡工業高等専門学校、都城工業高等専門学校） 研究項目 1.1.1.2、1.1.1.3.2、1.1.1.3.3、1.1.2.2、1.2.1

(1)背景と目的

バイオ製品の市場での流通と消費を加速するための課題を解決可能なバイオものづくりに必要不可欠な基盤として、開発期間を短縮すると共に、バイオ資源の活用を促進するための生物情報・資源の拡充、バイオプロセスに適した原料活用として安定的供給に資する将来的な要素技術、生産プロセスパラメーターと育種を関連づけさせることができる統合解析システム等の開発があげられる。特に、バイオ資源(新たな酵素群・微生物資源・植物等)の拡充は産業用スマートセルの構築の可能性を大きく広げるポテンシャルを持つ。

項目1がバイオものづくりに貢献すべき要素は、項目2に寄与する宿主微生物の選定、遺伝子資源の探索・拡充およびターゲット物質を高生産する菌株の構築技術ならびに項目3、4に寄与する商業生産プロセスの構築技術である。本項目ではこれらの技術を開発することで、従来生産が不可能だった物質を生産可能にし、新たな価値を創造するための表現系に基づく探索・育種プロセスを飛躍的に効率化することにより、バイオものづくりの開発期間短縮を始めとする課題の解決と循環型バイオエコノミー社会の実現への貢献を目指す。

本開発では、直径 100 μ m 程度のサイズのドロップレット（液中液滴 water-in-oil w/o droplet、WODL と Gel Microdroplet、GMD）を中核とする、表現型・タンパク質レベルの評価に基づき 1000 倍以上の処理能力を有する探索システムの開発を目指している。本技術は、100 万検体やそれ以上の探索能力を目指して、“ミリオンスクリーニング技術”と称している。従来の類似技術では、未培養/難培養微生物への対応、検出技術が不足しており汎用性が低い、ボトルネックの解消が必要、実施例が少なく運用実績や課題抽出が不足しているという課題があった。本技術開発ではこれら課題の解決を目的としている（下表）。

表 3.2.1.1.1.2-1. 研究項目の目的ならびに目的達成のために設定した詳細な研究開発項目

研究項目	目的
1.1.1.2 目標解決のための技術開発：表現型スクリーニング技術構築	<ul style="list-style-type: none"> ・目的表現型に基づいて対応した培養・検出を可能にする ・表現型に付いて検出されたシングルドロップレットを分取・分注可能にする ・イメージング技術等により細胞数や色情報に基づき微生物分離可能にする
1.1.1.3.2 スマートセル変異株ライブラリー対象のスクリーニング	<ul style="list-style-type: none"> ・参画企業と協議・連携し、企業ターゲット物質に適応した育種を、ミリオンスクリーニング技術により実施し、項目 1.1.1.2 で開発された技術を実証する
1.1.1.3.3 環境微生物を対象としたスクリーニング	<ul style="list-style-type: none"> ・参画企業と協議・連携し、企業ターゲット物質に適応した環境微生物の探索を、ミリオンスクリーニング技術により実施し、項目 1.1.1.2 で開発された技術を実証する
1.1.2.2 微生物複合型スマートセルを可能にするスクリーニング技術開発	<ul style="list-style-type: none"> ・微生物間相互作用を再現したドロップレット混合培養技術を開発することで、他の微生物を生育に必要とする難培養微生物の可培養化や、特定の物質生産株とその生育・生産能力を向上させるヘルパー微生物の獲得に資する基盤技術の開発を目指す
1.2.1 データ駆動型探索システム構築のための生物資源・ゲノム情報の格納	微生物探索で得られた「もの（微生物）」と「情報」を利用しやすい形で管理・整理し、「新規ターゲット探索基盤」として提供することで、新規シーズの効率的創出に貢献する。

(2)位置づけ、目標値

【位置づけ】

本事業技術であるミリオンスクリーニング技術は、スクリーニングの方の分類的にはドロップレット培養スクリーニング法に分類される(図 3.2.1.1.1.2-1)。従来のドロップレット培養スクリーニング法(従来技術 2)は、シャーレ等を用いた寒天培養やフラスコや多穴 well プレートを用いた液体培養を古典的なスクリーニング法(従来技術 1)と比較して、100 万検体に対する所要時間が短い・培養空間が小さく低コストである・条件検討が容易であるという利点がある一方で、比色検出や生育検出ができない・デリケートな作業が多く作業者に技術が必要であるという欠点もあった。本事業のみミリオンスクリーニング技術(改良されたドロップレットスクリーニング法)では、これらの欠点を克服することで、取得可能な資源を増加し 1000 倍以上の効率化を実現する。具体的には、比色検出や画像の検出に対応し、微生物の増殖・形態に基づくスクリーニングに対応する。さらに、所要時間をさらに短縮し、作業者の負担を軽減される。

スクリーニング法		従来技術 1 ・寒天培養・液体培養 ・スクリーニング法	従来技術 2 ・ドロップレット培養 スクリーニング法	本事業技術 ・改良ドロップレット培養 スクリーニング法
100万 検体に 要する	所要 時間	×数ヶ月～年単位 △ロボットを使った作業 ×再培養と多段階スクリーニ ング必須	△数日～数ヶ月 ○ドロップレット技術で高速化 ×再培養と多段階スクリーニ ング必須	○数日～数週間 ○ドロップレット技術で高速化 ○再培養不要で完結
	培養 空間	×96ウェルマイクロプレート 1万枚	○1.5 mLマイクロチューブ 1本	
条件検討の 容易さ		×マイクロウェルプレートの 培養スペースに依存	○チューブ1本ごとに条件検討可能	
検出系 手法 対象	○蛍光、比色 ○活性、増殖	△蛍光 △活性	◎蛍光、比色、画像 ◎活性、増殖、形態	
	作業者の扱い やすさ	○容易 ・一般的な技術で扱える	×困難 ・デリケートな作業が多く、作業 者に技術が必要	△容易 ・デリケートな手作業を減少
		可培養化率・検出系限界 数ヶ月～年単位、労力・工数 大	可培養化率・検出系向上 数日～数週間、労力・工数 小	

取得可能な資源増加・1000倍以上の効率化

図 3.2.1.1.1.2-1. 従来技術との比較

【目標値】

表 3.2.1.1.1.2-2. 研究項目 1 ミリオンスクリーニング 研究項目の目標

研究項目	研究項目の最終目標	研究項目の中間目標
1.1.1.2 目標解決のための技術開発：表現型スクリーニング技術構築	<ul style="list-style-type: none"> ・培養パラメーターに対応する表現型スクリーニングシステム（表現型に基づくハイスループットスクリーニング・シングルドロップレット分取分注トータルシステムなどを統合したシステム）を完成 	<ul style="list-style-type: none"> ・pH や温度などの想定されるストレスへの耐ストレス微生物スクリーニング基盤技術を開発、標的微生物へ適応 ・シングルドロップレット分取・分注トータルシステムのシングルドロップレットの分取と分注技術に関する要素技術の実用化を見据えた改良 (加速計画) ・イメージングソーター検証機を完成（流速1~100ドロップレット/secで画像取得可能・画像処理法の検討が可能） ・イメージングソーター検証機を用いて1種類以上のモデル微生物でドロップレット内の細胞数の定量が可能であることを確認し実用性を判断
1.1.1.3.2 スマートセル変異株ライブラリー対象のスクリーニング	<ul style="list-style-type: none"> ・研究項目 1.1.1.2 で開発された技術を実証するためにスマートセル育種に適応 ・高性能表現型宿主の取得 24 株、高性能機能遺伝子の提案 6 遺伝子を取得（累計） 	<ul style="list-style-type: none"> ・研究項目 1.1.1.2 で開発された技術を実証するためにスマートセル育種に適応させ完成（実用化） ・モデル微生物の高性能表現型宿主を取得（累計 12 株）
1.1.1.3.3 環境微生物を対象としたスクリーニング	<ul style="list-style-type: none"> ・研究項目 1.1.1.3.2 で構築する培養パラメーターや企業が求める機能に対応する表現型スクリーニングシステムを環境微生物のスクリーニングに応用 ・環境微生物のスクリーニングを実施。得られた微生物のゲノム解析を研究項目 1.2.1.2 と連携して実施 	<ul style="list-style-type: none"> ・培養パラメーターに対応する表現型スクリーニングシステムを環境微生物のスクリーニングに応用 ・難培養・未培養微生物からのターゲット活性・機能保持微生物の取得 12 種（累計 18 種）
1.1.2.2 微生物複合型スマートセルを可能にするスクリーニング技術開発	<ul style="list-style-type: none"> ・複合型スマートセルのハイスループットスクリーニング系の確立し、スマートセルの物質生産を向上させるヘルパー微生物との組み合わせを1つ以上見出す。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ドロップレット混合培養系を活用して、新規未培養微生物を1株以上獲得する
1.2.1 データ駆動型探索システム構築のための生物資源・ゲノム情報の格納	<ul style="list-style-type: none"> ・微生物探索で得られた「もの（微生物）」と「情報」を利用しやすい形で管理・整理し、「新規ターゲット探索基盤」として提供することで、新規シーズの効率的創出に貢献する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・微生物培養、提供の継続。 ・単離された微生物の培養条件の確認、提供標品の作成 10 件 ・単離された微生物のゲノム解析およびデータ格納 継続 ・微生物データベースからの情報提供開始

(3) 全体計画

ミリオンスクリーニング技術の課題である、選抜技術の不足、ボトルネックの解消、実証例・課題抽出の不足を解決して課題を解決するために、段階的に技術開発を行いながら企業課題の解決への取組を通じた PoC を通じた実証を行う（表 3.2.1.1.1.2-3）。

表 3.2.1.1.1.2-3. 研究計画線表

事業項目	2020年度	2021年度	2022年度	2023年度	2024年度	2025年度	2026年度
1.1.1.2. 目標解決のための技術開発: 表現型スクリーニング技術構築				→	→	→	→
	シングルドロップレット分取・スクリーニング効率化開発			→	→	→	→
	浸透圧、pH 耐性、酸素量等スクリーニング技術開発			→	→	→	→
				→	→	→	→
1.1.1.3.2. スマートセル変異株ライブラリーを対象としたスクリーニング				→	→	→	→
				→	→	→	→
1.1.1.3.3. 環境微生物を対象としたスクリーニング				→	→	→	→
				→	→	→	→
1.1.2.2. 微生物複合培養型スクリーニング技術開発				→	→	→	→
				→	→	→	→
1.2.1.1. 機能データを付与した生物資源の管理提供				→	→	→	→
				→	→	→	→
1.2.1.2. 機能データやゲノム情報等の情報資源の管理提供				→	→	→	→
				→	→	→	→

(4) 実施体制



図 3.2.1.1.1.2-2. 研究項目 1 ミリオンスクリーニンググループ体制図

(5) 運営管理

グループ全体や各研究快活課題内外の連携のために研究項目 1 の分科会やミリオンスクリーニンググループの実務者会議などを定期的で開催すると共に、必要に応じて機関間で会議を開催。

(6) 実施の効果

ミリオンスクリーニング技術は、従来技術では数ヶ月から年単位かかっていた作業を、1000倍効率化することで数日から数週間に短縮可能である。さらに未培養/難培養微生物への対応と検出系の拡充等を通じた汎用性の拡張により、従来はアクセス不能であった生物資源も獲得可能とする。

CO₂削減とコストの観点から評価すると、例えば従来技術では100万検体のスクリーニングに少なくとも500kgのプラスチック製品(96wellプレートのみ計算)が必要とされていたが、本技術では100g以下であり、5000倍のプラスチック削減効果がある。培養スペースや必要な試薬等も数千倍節約できるため、機器、消耗品、消費電力等の点で大幅なコスト削減が可能となる。以上の空間的・時間的・物質的な効率化は、様々な観点からCO₂・コストや石化資源の使用大幅に削減したスクリーニング技術を実現する。

(7) 中間目標の達成度

表 3.2.1.1.1.2-4. 中間目標に向けた活動内容と達成度

研究項目	研究項目の中間目標	活動内容	達成度
1.1.1.2 目標解決のための技術開発：表現型スクリーニング技術構築（産業技術総合研究所、長岡技術科学大学、早稲田大学、オンチップ・バイオテクノロジーズ、ニコソリューションズ、早稲田大学、函館高専、鶴岡高専、長岡高専、都城高専）	<ul style="list-style-type: none"> ・pH や温度などの想定されるストレスへの耐ストレス微生物スクリーニング基盤技術を開発、標的微生物へ適応 ・シングルドロップレット分取・分注トータルシステムのシングルドロップレットの分取と分注技術に関する要素技術の実用化を見据えた改良 (加速計画) ・イメージングソーター検証機を完成（流速1~100ドロップレット/secで画像取得可能・画像処理法の検討が可能） ・イメージングソーター検証機を用いて1種類以上のモデル微生物でドロップレット内の細胞数の定量が可能であることを確認し実用性を判断 	<ul style="list-style-type: none"> ・低 pH、高浸透圧ストレス微生物スクリーニング基盤技術をモデル微生物で確立。油脂生産性や2種類の酵素活性を用いたスクリーニング系を開発し、モデル生物で確立。物質生産に影響を及ぼす亜集団の動態を可視化 ・シングルドロップレット分取・分注トータルシステムを完成し、94%の分注精度を達成。モデル生物の細胞を100%回収可能。散乱光検出系の改良により、平均封入細胞数0と10のWODLの識別に成功 ・イメージングソーター検証機を完成し、6.6ドロップレット/secで画像取得が可能な条件をみいだした。更なる高速化のために光学系を再検討する予定 ・イメージングソーター検証機を用いて<i>L. starkeyi</i>の画像解析技術検討用の画像を取得し、細胞数に基づく認識に成功。実現可能かつ実用的なイメージングソーターの開発計画を定めた 	<p>○；低 pH、耐浸透圧や3種類の表現型をはじめとした基盤技術の開発に成功した</p> <p>◎；シングルドロップレット分取・分注トータルシステムを完成。検出系の要素技術も改良</p> <p>△；6.6ドロップレット/secで画像取得に成功。光学系を再検討が必要</p> <p>○；モデル微生物の解析を通じ、細胞数定量の実現可能性・実用性を示した。</p>
1.1.1.3.2 スマートセル変異株ライブラリー	<ul style="list-style-type: none"> ・研究項目1.1.1.2で開発された技術を実証するためにスマートセル育種に適応させ完 	<ul style="list-style-type: none"> ・油脂生産性に基づく表現型スクリーニング系を<i>L. starkeyi</i>へ適応 	<p>○；油脂生産性に基づく表現型スクリーニング</p>

対象のスクリーニング (長岡技術科学大学、 産業技術総合研究所)	成 (実用化) ・モデル微生物の高性能表現型宿主を取得 (累計 12 株)	・油脂高生産や生育能に基づくスクリーニングにより、高性能表現型株を計 18 株獲得。ゲノム解析の結果油脂生産性や生育に関する遺伝子資源が獲得できた	計をスマートセルに適応できた ◎; 18 株の候補株を取得。ゲノム解析の結果、遺伝子資源も獲得できた
1.1.1.3.3 環境微生物を対象としたスクリーニング (長岡技術科学大学、産業技術総合研究所、函館高専、鶴岡高専、長岡高専、都城高専)	・培養パラメーターに対応する表現型スクリーニングシステムを環境微生物のスクリーニングに応用 ・難培養・未培養微生物からのターゲット活性・機能保持微生物の取得 12 種 (累計 18 種)	・ペプチダーゼ活性、油脂生産性に基づくスクリーニング基盤を環境微生物スクリーニングに応用 ・17 株のペプチダーゼ生産株を獲得。新規性の高い油脂生産株候補株を 17 株獲得	○; 2 種類の表現型スクリーニング系を応用した ○; 計 34 株の候補株を獲得
1.1.2.2 微生物複合型スマートセルを可能にするスクリーニング技術開発 (産業技術総合研究所、広島大学)	・ドロップレット混合培養系を活用して、新規未培養微生物を 1 株以上獲得する	・WODL および GMD を用いたドロップレット混合培養系の開発に成功し、新奇未培養微生物の候補株を取得。10 種類の未培養種を獲得に成功し、これには既存種との相同性が 90% 以下の新規微生物候補株も含まれる	○; 混合培養系の開発に成功し、新規未培養微生物候補株を 10 株取得
1.2.1 データ駆動型探索システム構築のための生物資源・ゲノム情報の格納 (九州大学、NITE)	・微生物培養、提供の継続。 ・単離された微生物の培養条件の確認、提供標品の作成 10 件 ・単離された微生物のゲノム解析およびデータ格納 継続 ・微生物データベースからの情報提供開始	・微生物培養、提供体制を整備 ・単離された微生物の受け入れ保管体制を整備 ・単離された微生物のゲノム解析し、順次データ格納している ・微生物データベースからの情報提供を中間評価までに開始	○; 2 年間で 646 株実施 ○; 10 件 37 株実施 ○; 31 株実施 ○; ウェブアプリケーションを開発

(8) 研究開発の成果と意義

研究項目 1.1.1.2 目標解決のための技術開発：表現型スクリーニング技術構築

バイオ資源活用促進を志向した目標解決のためのスクリーニング技術の構築を目指す。特に、water-in-oil ドロップレット (WODL) と呼ばれる微小水滴を用いたハイスループットなスクリーニング技術や顕微鏡技術を基盤としたシングルセルレベルでの細胞表現型評価技術の構築を目指す。WODL を用いた技術においては 100 万個単位のドロップレットを扱える強みを生かしたスループット性の高い技術開発を目指す。顕微鏡技術を基盤とした表現型評価技術においてはイメージングソーターのような汎用的な技術としては世界で未だ開発が実現していないような次世代型スクリーニングシステムを見据えた技術開発を推進する。そのために本項目では 1. WODL を用いた目的表現型スクリーニング技術開発、2. 目的表現型スクリーニング実現のためのシングルドロップレット分取・分注トータルシステムの開発、3. 目的表現型スクリーニングのため

のシングルセルレベルでの細胞機能評価技術、4. イメージングソーター検証機の開発 を実施する。

1. WODL を用いた目的表現型スクリーニング技術開発

(A) 高浸透圧耐性を持つ微生物をスクリーニングする技術開発

WODL を用いた高浸透圧耐性を持つ微生物をスクリーニングする技術開発を行なった。スクロース濃度を 1.0M まで高めた培地を水相として用いて WODL を作製し、その安定性を評価した。その結果、1 週間程度以上は安定的にドロップレットの形状が保持されることがわかった。次に、スクロース濃度を 0.5M とした M9 培地を用いて、土壌微生物から高浸透圧耐性を持つ微生物のスクリーニングを WODL を用いて行った。微生物が増殖したドロップレットの識別には FNAP-sort (Fluorescent nucleic acid probe in droplets for bacterial sorting) 法を用いた。本手法ではドロップレット内で増殖した細菌の菌体内から放出される RNase を指標にして微生物の増殖を蛍光で検出している。具体的には、ドロップレット内に RNase の活性によって切断されると蛍光を発する核酸プローブをあらかじめ封入しておき、非破壊的にドロップレット内の細菌の増殖を判別するという手法である。1 週間の培養の後に顕微鏡で観察したところ、いくつかのドロップレットで細菌の増殖が確認され、また増殖の見られたドロップレットは蛍光を発していた (図 3.2.1.1.1.2-3)。

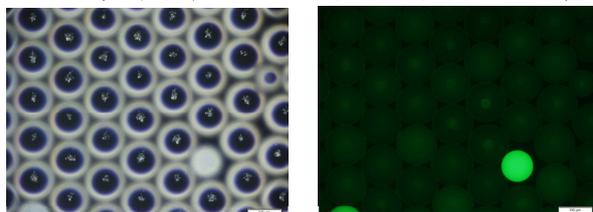


図 3.2.1.1.1.2-3. 0.5M スクロース M9 培地を用いたドロップレット培養 (1 週間後)

そこで、蛍光値の高いドロップレット上位 1%程度を回収し、LB プレート培地に塗抹したところ、複数のコロニーが得られた。このコロニーについて 16S rRNA 遺伝子配列を解析したところ、既知の放線菌と 100%マッチした。データベース上でマッチした放線菌のうち一つの株はその 16S rRNA 遺伝子配列が *Streptomyces griseochromogenes*, *Streptomyces adustus*, *Streptomyces cellostaticus* と 100%マッチしていた。得られたコロニーをスクロース 0.5M, 1.0M を含む培地で再培養したところ、増殖が確認された。以上より WODL を用いて高浸透圧体制の細菌を獲得することが可能なことが示された。同様に低 pH 耐性 (pH4.5) の細菌を対象に、WODL を用いてスクリーニングする系の構築も行った。

(B) ペプチダーゼに基づくスクリーニング系の構築

WODL は界面活性剤によって安定化された微小な液滴を油 (主にフッ素系オイル) が取り囲むという特殊な環境から、ドロップレット間の物質移動が制限される。傾向として、疎水性物質は界面活性剤および油相を介してドロップレット間で拡散し、親水性物質はドロップレット内部に保持される (図 3.2.1.1.1.2-4)。疎水性物質がドロップレットから漏洩することは、培養した微生物の代謝物が拡散し、ドロップレット間 (異なる微生物種間) でシグナル分子等の受け渡しが可能になるなど利点になり得る。一方で、この特徴はドロップレット内の微生物活性を検出する際には欠点になる。ドロップレット内部で酵素活性を検出する際に用いられる蛍光基質 (蛍光プローブ) の多くは疎水性物質であり、ドロップレット全体に拡散し活性の評価が困難であった。中でもペプチダーゼ蛍光基質のプロー

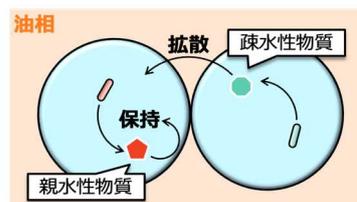


図 3.2.1.1.1.2-4. ドロップレット間の物質移動

ブに広く用いられる 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)は、疎水性物質であり、加水分解によってペプチドやアミノ酸から遊離したあと、直ちにドロップレットから漏洩してしまうため、Water-in-oil エマルジョンでは利用不可であった。本研究開発では、親水性蛍光プローブを用いた新規ペプチダーゼ基質を開発し、FNAP-sort と組み合わせることでWODLを使用した微生物の生育とペプチダーゼ活性を同時に検出する系を構築した。本成果に関して、現在特許出願準備中である。

(C) 油脂生産微生物スクリーニング系の構築

脂溶性化合物生産微生物の検出系構築のために、最も基本となる GMD 方による油脂生産微生物の培養・検出系の構築を行った。従来のセルソーターや密度勾配遠心法を用いたスクリーニング法では、油脂量を評価できる一方、増殖能や細胞数の評価ができない上に、変異後に培養を経由することで同一株が複数スクリーニングされてしまいインディペンデントクローン数が少ないという課題があった。しかし、GMD 法はこれらの課題を克服し、油脂量の他に増殖能や細胞数の評価が可能な上に、GMD に隔離後に培養することでインディペンデントクローン数が確保できる。

油脂生産性微生物スクリーニング系は、油脂以外の脂溶性化合物生産微生物のスクリーニング系にも応用可能であるため、波及効果が高い。しかし、本技術には以 GMD をソーティングする際の陽性検体の濃縮効率が悪い、油脂量に基づくスクリーニング法が構築されていないという課題がある。そのため、本項目ではこれらの課題を克服するために、GMD ソーティングパラメータの改善と油脂量に基づくスクリーニング法の構築を行った。

●GMD ソーティングパラメータの改善

脂溶性物質生産菌のスクリーニングにおける中核技術である GMD のソーティングパラメータの条件検討を実施した。従来より、セルソーターを用いた GMD 選別の段階の陽性検体の濃縮率が 10%台と非常に悪く、課題になっていた。そこで、セルソーターの設定変更と結果の評価の繰り返しを通じたチューニングにより、濃縮効率が 80~90%に改善できた。

●油脂量に基づくスクリーニング法の構築：GMD 培養を行った油脂生産性によるモデル微生物の単離

油脂生産量を検出するのに適した色素を検討した結果、BODIPY により細胞中の油脂を染色できた。BODIPY は、水よりも油脂に多く溶解し、細胞膜も透過するため、細胞内の脂肪滴を定量的に染めることができる。油脂非蓄積モデル微生物として *S. cerevisiae*、油脂蓄積モデル微生物として *L. starkeyi* を染色した結果、*L. starkeyi* の脂肪滴が特異的に染色されおり、シグナルも強かったことから、BODIPY による染色で脂肪量を評価できると示唆された。

実際に BODIPY によりソーティングできるか検証した。培養 5 日目の *S. cerevisiae* と *L. starkeyi* のドロップレットを 1:1 で混合しソーティングした結果、分離することに成功した(図 3.2.1.1.1.2-5A)。この際、両モデル生物のシグナル強度の差が小さかったことから、染色条件やフローサイトメトリーの解析条件を改善した結果、分

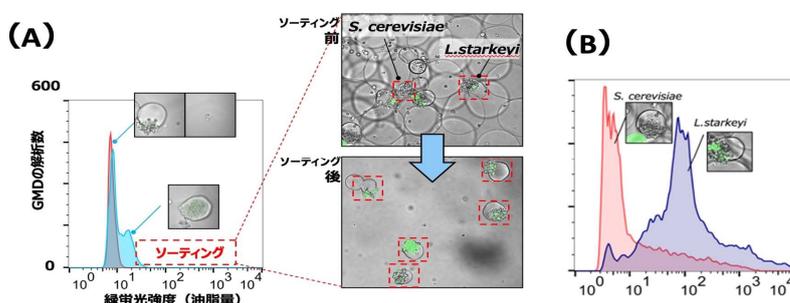


図 3.2.1.1.1.2-5. 油脂生産/非生産モデル生物の選別
(A) 油脂非生産生物と油脂生産生物が別々に含まれるドロップレットを混合したものから、油脂生産生物が含まれるドロップレットのみを選別 (B) 分離条件の改善により、SB 比が向上。

離精度の向上にも成功した（図 3.2.1.1.1.2-5B）。以上により、油脂量に基づくスクリーニング技術を構築できた。

以上により GMD を用いた油脂生産性スクリーニング系の基盤を構築できたことから、次のステップではストレス耐性株のスクリーニングに向けた酸性条件下でのスクリーニング技術を構築を行った。

(D) セルラーゼ活性に基づくスクリーニング系の構築

本項目では、菌体外活性検出技術のモデルとして、企業の要望のあったセルラーゼ活性に基づくスクリーニング系の構築を行った。スクリーニング技術として、蛍光基質を用いた検出法と、不溶性基質を持ちいた検出系の構築を試みた。

蛍光基質を用いた探索法では、まず本技術に適した基質を調査して、Fluoresein di-bata-D-celllobioside を選定した。この酵素は、Cellobiohydrolase (CBH) や Endoglucanase (EG) の標的になるため、幅広い種類のセルラーゼ生産菌の探索に適すると考えられる。

FCB は初め親水性のグルコース残基が 4 つ結合しているため水溶性の物質である一方で、分解が進行すると最終的に脂溶性の蛍光物質 Fluresein が生じる。Fluresein は疎水性が強いいため、油相に拡散してしまう。そのため、反応液組成や培養・反応条件を適切に設定する必要があった。そこで、反応液組成や培養・反応条件の条件検討を行った。その結果、培養開始後 22 時間で微生物が含まれるドロップレットに強い蛍光が観察された（図 3.2.1.1.1.2-6）。モデル生物のセルラーゼ活性を検出することができたため、今後は環境微生物のスクリーニングに応用していく。

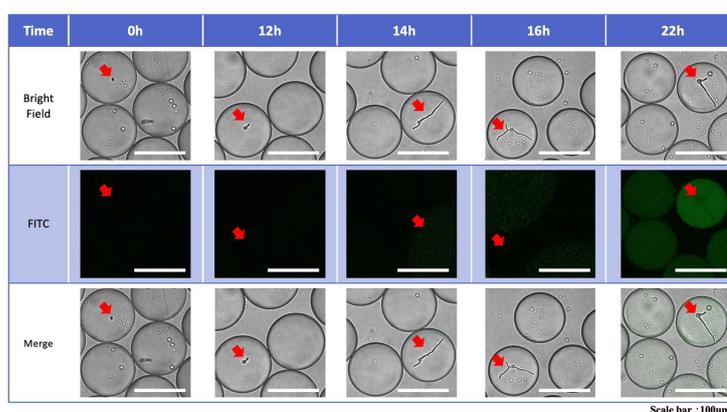


図 3.2.1.1.1.2-6. セルラーゼ生産菌のセルラーゼ活性検出 *Trichoderma reesei* のセルラーゼ高生産株の胞子をドロップレットに封入して、FCB により活性を検出。

不溶性基質を用いた検出系では、ミリオンスクリーニングにおける不溶性物質でのスクリーニング法の構築を目的とし、セルロースナノファイバーを用いてのセルラーゼ生産微生物のスクリーニング方の構築を試みた。WODL へのセルロースナノファイバーの封入を観察し、長期間安定的に構造を保持できることを確認した。さらに、WODL におけるセルラーゼ用蛍光基質(フルオレシン系)の使用を検討し、3 日間程度は蛍光を示し、その後は周囲の WODL に拡散していくことが観察された。また、セルロースナノファイバーを封入した WODL においてポジティブコントロールとしてスマートセル・セルラーゼ高生産糸状菌 *T. reesei* を培養し、セルラーゼ用蛍光基質によって蛍光を検出することに成功した。

2. 目的表現型スクリーニング実現のためのシングルドロップレット分取・分注トータルシステムの開発

●改良型散乱光検出機：側方散乱光の検出感度向上により、ドロップレット内の菌数を識別可能な技術を開発

フッ素オイルを利用した WODL 内で細菌の増殖を検出するために、菌体数と側方散乱光強度の関係を評価するために Negative control (空ドロプレット) から平均 1000 個の大腸菌を封入したドロプレットを用意して計測した結果を下記図に示した。

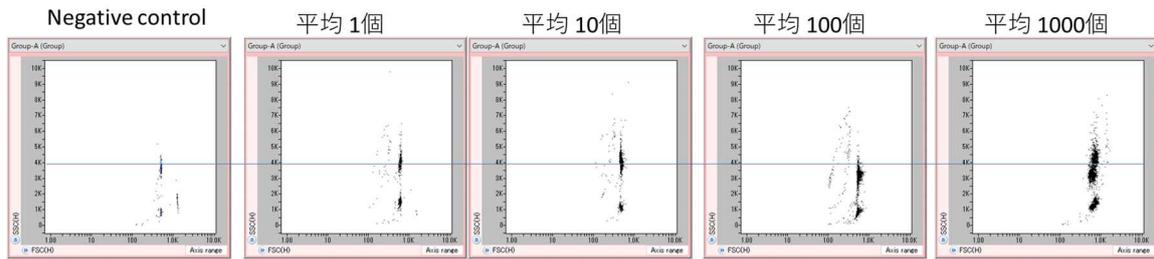


図 3.2.1.1.1.2-7. 各菌体数における側方散乱光強度

図が示す通り、現行の光学系では平均 10 個と 1000 個封入したもので散乱光強度に差が無かった。ドロプレット内の微生物個数の測定感度向上させる為に①ノイズ低減エマルジョン端から発する散乱光ノイズを低減させるために照射光学系の最適化を実施した。②検出方法の最適化エマルジョン内部の散乱光を正確に読み取るため信号処理方法の最適化を実施した。①と②の対策を実施した結果を右記図に示す。

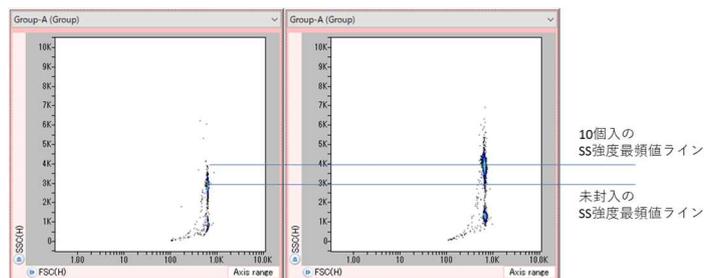


図 3.2.1.1.1.2-8. 大腸菌封入 0 個 (左) と平均 10 個で封入したドロプレット側方散乱光測定結果

未封入エマルジョンに対して平均 10 個封入したエマルジョンは側方散乱光強度において優位な差を確認することができた。この①と②の対策結果により、大腸菌 10 個を封入したドロプレットを空のドロプレットを側方散乱光で識別すること示した。

●ドロプレット回収技術と選別技術との一体化：ソーティングしたドロプレットを直接 1 つずつ取得可能なシングルドロプレット分取・分注トータルシステムを完成 (オンチップ社)

ドロプレット 1 個を分取分注するために図 3.2.1.1.1.2-9 で示したマイクロ流路チップと分注システムを開発し原理検証機を試作した。レーザーで検出したターゲットドロプレット 1 個をソーティングパルスで回収ポートへ分離する。その後、分離したドロプレット 1 個を自動化した分注ピペットで回収ポートからドロプレットを回収プレートへ分注した。

分取分注システムの原理検証を使用し、96 ウェルプレートにドロップレット 1 個ずつ分注を行った。分注後の精度は下記図に示すように蛍光顕微鏡で 1 ウェルずつ観察し評価を行った。5 回の分注試験を実施したところ平均分注精度は 94%と目標 90%以上を達成した。この試作チップ、分注システムを用いた実験結果により、ドロップレットを 1 個ずつプレートへ分取できることを示し、分取・分注トータルシステムを完成した。

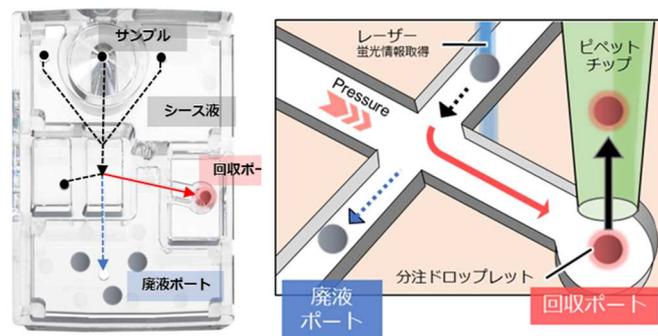


図 3.2.1.1.1.2-9. ドロップレット分離回収チップ (左) とピペットチップによる回収システム (右)

●回収された陽性ドロップレットから効率的に微生物を回収し、次のゲノム解析などに提供可能な技術を開発

プレートへ回収した陽性ドロップレットから効率的に微生物を回収する技術を構築した。回収したドロップレットから微生物を取り出すためにはドロップレットを水層（培養液）と融合させる必要がある。再現良くドロップレットを融合させる方法が必要である。検討の結果、交流高電圧高周波による印加を用いた方法で効率よく融合ができることが分かった。本実験では試作原理検証機を制作し、この方法で大腸菌にダメージ無く融合できるか確認するための検討を行った。LB 培地で一晚培養した大腸菌をエマルジョン 1 個辺り平均 7 個入るように封入し、限界希釈法でエマルジョンが 1 個になるように分注を行った。その後、ドロップレット融合を促し、培養して 3 日後に大腸菌の増殖を確認した。交流高電圧高周波による印加を用いた方法ではコロニーを形成する条件ではサンプルの希釈率にかかわらず 100%コロニーが形成された。この結果により、開発したドロップレット融合技術が有効であることを示した。

3. 目的表現型スクリーニングのためのシングルセルレベルでの細胞機能評価技術

クローナルな微生物集団中に存在する増殖速度の異なる細胞の評価技術を構築した。増殖速度を 1 細胞レベルで解析するために、細胞を培養しながら顕微鏡下で動態を可視化できるマイクロ流体デバイスを構築した。本装置は、マイクロ流体チップ、半透膜、マイクロチャンバー付きカバーガラスから構成されている。カバーガラスの片面には、細胞を捕捉するための円形マイクロチャンバーをフォトリソグラフィ技術により配置した。本研究では直径 65 μm の円形培養チャンバーを数千個超並列に配置した。円形チャンバーの形状は観察対象に合わせて自在に変更可能である。マイクロ流体チップに形成された蛇行した流路には培地が連続的に流れ、円形チャンバー内で成長する細胞に培地が半透膜を介して供給される。ストレスなどを与えて細胞の反応をリアルタイムに分析することも可能である。顕微鏡観察には、ニコンソリューションズ製 Ti2E 倒立顕微鏡を用い、パーフェクトフォーカスシステムによって自動で高効率なデータ取得を実施した。

本装置を用いて、*Corynebacterium glutamicum*、*Lipomyces starkeyi* のタイムラプスシングルセル観察を実施し、1 回の観察により 20 細胞以上の増殖速度データを取得し、4-5 回のタイムラプス観察データを統合して *C. glutamicum* 244 細胞、*L. starkeyi* 100 細胞の増殖速度のばらつきを示すヒストグラムを取得した。特に *L. starkeyi* では、世代時間が 8 時間以上である増殖速度

の遅い亜集団の存在がヒストグラムより明らかになった。さらに 11% (100 細胞中 11 細胞) もの非増殖細胞が存在することもタイムラプスシングルセル観察により明らかになった。本技術により、物質生産に影響を及ぼす亜集団の動態を可視化することが可能であることを示した。

ミリオンスクリーニングを実施するにあたり、目的達成のために利用可能な評価系が圧倒的に不足しており、その拡大が急務である。本研究では、大腸菌や、油脂酵母 (*L. starkeyi*) を題材に、蛍光イメージング技術を駆使すること微生物培養時の表現系をシングルセルレベルで評価する基盤技術の構築を行なった。

4. イメージングソーター検証機の開発

ミリオンスクリーニング技術の開発を進めながら関連企業にヒアリングを進めて得られた情報・ニーズは、環境微生物を生育に基づいてスクリーニングしたい、微生物が何の物質を生産したか知りたい、微生物の形態情報や色情報・物質生産量を知りたい、多検体をハイスループット、自動で解析したい、の 4 点にまとめられる。特に生育能に基づくスクリーニングは、微生物のスクリーニングの根幹を成すものである。

本事業における研究開発を通じて、ドロップレット内で増殖した微生物の生化学的な解析が画像イメージングによって実現可能で、上述のニーズが満たさせる可能性が示唆されてきた。増殖能については、FNAP-sort や本事業で開発中の改良型の散乱光検出機によって大まかに検出出来ると期待されるが、定量性に限界がある。

これまでにドロップレット内で増殖した微生物を、生育量や形態情報を反映する画像イメージング情報に基づいてハイスループットにスクリーニングすることが可能な装置 (=イメージングソーター) は開発されていない。イメージングソーター技術が実現することにより本テーマの中核技術であるスクリーニングプラットフォームの汎用性・応用性がさらに拡張され、より実用的な実証データの取得が可能となり、社会実装時の波及効果の拡大が期待される。本技術は酵素反応や蛍光物質も不要なため、汎用性も広い。そこで、本研究開発では示すイメージングソーターの開発を企画した。世界で初めてのイメージングソーターを実現するために、基盤技術を有する企業とアカデミアが連携して研究開発を実施する。

ドロップレットイメージングソーターの開発には流路内を流れるドロップレットの鮮明な画像を顕微鏡下で取得することが必要不可欠である。本研究開発では、まず比較的フレームレートの高い CMOS カメラを用いて、顕微鏡下で流路を流れるドロップレットの鮮明な画像の取得が可能か検証した。その結果、9.2 ドロップレット/秒の速度で流路を流れるドロップレットを撮影するには、従来のカメラ性能では不十分であった (図 3.2.1.1.1.2-10)。1 ドロップレット/秒までドロップレット移動速度を低下させた場合、ドロップレットの像を捉えることはできたが、輪郭の残像が写り、鮮明な画像の取得は困難であった。そこで、フレームレートが高いハイスピードカメラを搭載したイメージングソーターの検証機を構築することで、流路を流れるドロップレットの鮮明な画像の取得を試みた。

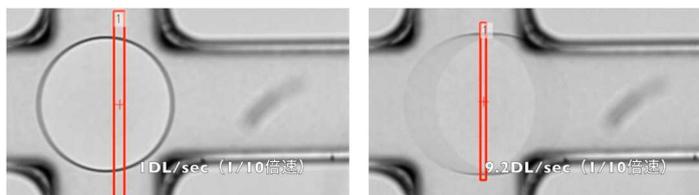


図 3.2.1.1.1.2-10 流動するドロップレットの動画

本検証機を用いて微生物を封入したドロップレットを導入し、高速でドロップレットを流し撮影した結果、流動するドロップレット内の微生物細胞を鮮明に撮影することに成功した。以上の検証結果からプロトタイプ機器の目標性能を定めた。

研究項目 1.1.1.3.2. スマートセル変異株ライブラリー対象のスクリーニング

研究項目 1.1.1.2. で開発された油脂生産微生物スクリーニング系の PoC のために、油脂生産性に基づく突然変異育種スクリーニングを行った。このスクリーニングでは GMD 中で育成したい生物の油脂生産性を評価するため、培養時の生産性が良い株を選別可能であり、実生産に寄与する遺伝子資源の獲得が期待される。

フラスコにて前培養した *L. starkeyi* CBS1807 株（野生株で本事業標準株）紫外線を照射した後、 $\lambda=0.1$ になるように GY 培地を含む GMD に封入し、5 日間培養した。その後、On-Chip Sort で約 9 万個の GMD を対象に油脂生産性（緑色蛍光強度）に基づくソーティングを実施し、上位 2% を回収した後、特に緑蛍光強度の高い 6 個の GMD をマニピュレータにて分離して 6 つの変異株を単離した。単離後、フラスコ培養を実施し油脂生産性を評価した結果、最も良い株は親株よりも培地あたりの油脂生産性が 127%、菌体あたりの油脂生産量が 128% 向上

していた（図 3.2.1.1.1.2-11）。

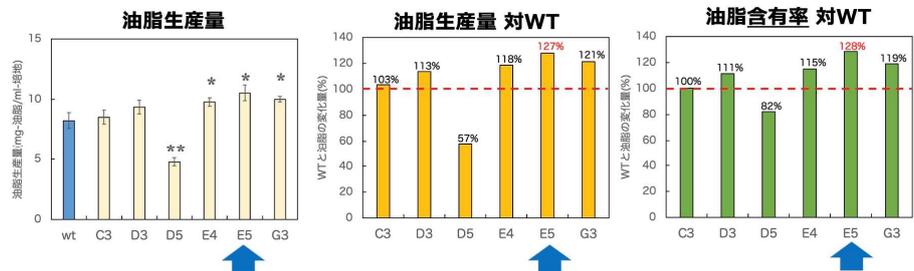
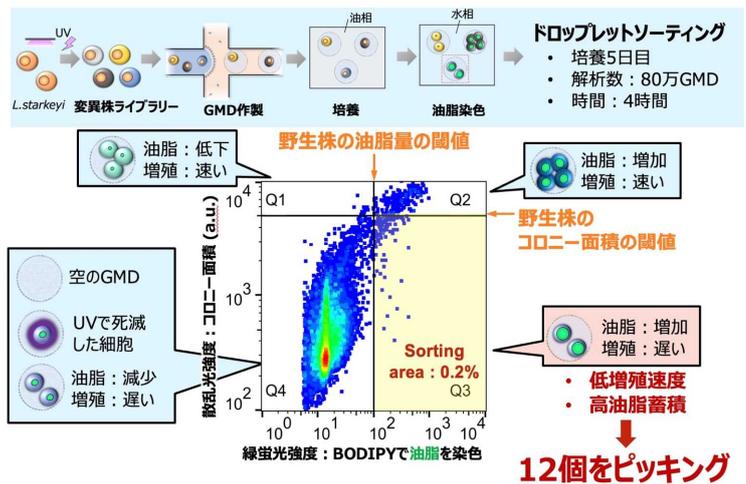


図 3.2.1.1.1.2-11. 油脂高生産変異株の評価

油脂生産性が増加しつつ、増殖が遅くなった株（生育遅延株）の育種を試みた。この株からは生育に寄与する遺伝子資源の取得が期待される。前項と同様の方法で *L. starkeyi* CBS1807 株に変異を導入した後、油脂生産性と生育能に基づくスクリーニングを行った。油脂生産性はこれまで同様 BODIPY の緑色蛍光で評価し、生育は側方散乱光の強度で検出した。側方散乱光は、WODL では油相と水相の境界面でレーザーが拡散されるために精度が悪いが、GMD では外液と内液が水相であるため、精度良くソーティングすることが可能である。これまでに GMD で側方散乱光を用いた生育能スクリーニングが実施されたこと

が無い場合、初めての試みである。今回のスクリーニングでは、野生株の油脂生産量と生育を基準として、約 80 万の GMD から上位 0.2 をソーティングして、そのうち 12 個を顕微鏡観察下でピックアップした（図 3.2.1.1.1.2-12）。12 株をフラスコ培養で評価した結果、その結果、目的に反し 1 菌体あたりの油脂生産性が向上した株は得られず、親株とほとんど同じか、生産性の最大値が悪い株、生産速度は遅いが最終的には親株と同じ程度油脂を生産する株などが得られた。



が無い場合、初めての試みである。今回のスクリーニングでは、野生株の油脂生産量と生育を基準として、約 80 万の GMD から上位 0.2 をソーティングして、そのうち 12 個を顕微鏡観察下でピックアップした（図 3.2.1.1.1.2-12）。12 株をフラスコ培養で評価した結果、その結果、目的に反し 1 菌体あたりの油脂生産性が向上した株は得られず、親株とほとんど同じか、生産性の最大値が悪い株、生産速度は遅いが最終的には親株と同じ程度油脂を生産する株などが得られた。

WT よりも生育が 10 倍遅延しながらも、最終的に WT 以上に油脂を蓄積するなどの株も得られている。

以上の油脂生産性に基づく育種で得られた 6 株と生育遅延株の育種で得られた株 12 株の整理し、表現型の変化が大きかった 10 株のゲノム解析を研究項目 1.2.1 に依頼した。解析結果、同じ株や同系統関係にある株は一つも無く、全てがインディペンデントクローンであった。従来のスクリーニング技術では一部の系統株に偏ることが快々としてあることから、本技術は独立した変異株が効率的に単離できる、遺伝子資源探索に適した手法であると評価できる。生産性が向上した 4 株は、アミノ酸変異を伴う変異が一株当たり 1~3 遺伝子しか無かった。この中で油脂生産性に寄与する遺伝子として、脂肪酸合成関連遺伝子 1 つと糖質代謝関連遺伝子 1 つが見いだされた。これら遺伝子は、油脂生産性への寄与に関する既往報告がない、新規な遺伝子である。生産性が低下した株 6 株については、アミノ酸変異を伴う変異が一株当たり 8~22 遺伝子であり、変異点が多かった。株間で共通する変異は無かったが、複数の成長関連遺伝子の関与が示唆された。

以上のように、GMD を使用したスクリーニング法では、生育と物質生産性による 2 軸のスクリーニング、インディペンデントクローンの取得、目的表現型に関与する遺伝子資源の観点から有用であると示唆された。

研究項目 1.1.1.3.3 環境微生物を対象としたスクリーニング

2-b. ドロップレット評価技術で開発されたペプチダーゼ活性スクリーニング技術および油脂生産微生物スクリーニング技術を初めとするミリオンスクリーニング技術全体の PoC のために、

(A) ペプチダーゼ活性と (B) 油脂生産性に基づく環境微生物のスクリーニングを実施した。

(A) ペプチダーゼ活性に基づくスクリーニング

研究項目 1.1.1.2 で開発したペプチダーゼ基質と FNAP-sort による Water-in-oil エマルジョンを使用した微生物の生育とペプチダーゼ活性の同時検出系を用いて、環境微生物のスクリーニングを実施した。本研究開発ではジペプチド部分が疎水性と酸性の 2 種類の基質を用意し、ペプチドリッチな豆腐屋の廃液からジペプチジルペプチダーゼ活性にもとづき、環境微生物をスクリーニングした。各スクリーニング段階のサンプルは 16S rDNA (V3-V4 領域) のアンプリコンシーケンスを実施し、細菌叢の推移を評価した。またスクリーニング後の単離株に関しては 16S rDNA 全長のシーケンスを実施し、菌株を同定した。

豆腐屋廃液サンプルに対して、ミリオンスクリーニングを実施した結果、各基質活性に基づいてスクリーニングした合計 44 コロニーを無作為に分離した。16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスにより、合計 30 種の微生物が同定された。特に疎水性と酸性の両方の加水分解活性を持つ微生物群が単離された。各微生物種が DPP 遺伝子を保持しているかどうかを BLAST による同源性検索で解析した。ここでは脂溶性基質と酸性基質を加水分解できる酵素のアミノ酸配列をクエリ配列とした。その結果、30 株中 17 株が当該遺伝子を有していた。本スクリーニングにより標的酵素を有する微生物の単離に成功した。

(B) 油脂生産性に基づく環境微生物のスクリーニング

研究項目 1.1.1.2 で油脂生産微生物スクリーニング技術等の PoC として、環境中からの油脂生産微生物のスクリーニングを試みた。この際のモデル環境サンプルとして、ミミズ飼育難資化性樹

木チップ土壌（以降、ミミズ堆肥）を用いた。この環境サンプルは、窒素源が少なく炭素源を利用する微生物の多様性が期待され、これまでのスクリーニングの対象になった成果が公開されておらず、新規な微生物の獲得も期待される。

ミミズ堆肥に前処理を行った後、S培地を含むGMDに環境微生物を封入した後、30°Cで4日間培養を行った。GMDの外液置換、BODIPIによる染色の後、6万株を対象にして上位0.149%をソーティングし94GMDを得た（図3.2.1.1.1.2-13）。これを寒天培地にプレーティングして、酵母用のコロニーを12株得た。油脂と細胞壁を染色した状態で顕微鏡観察を行ったところ、全ての株で油脂生産が確認された。今後は油脂の生産性を評価していく

培養10日目のGMD培養サンプルに関しても同様に油脂生産性にもとづいたドロップレットスクリーニングを実施した。合計で17,215ドロップレットを解析し、そのうちBODIPIの緑蛍光の値が上位0.052%に当たる9GMDをドロップレットソーティングにより分離した。分離したGMDをYPDプレートに塗布し、酵母様コロニー5株を単離できた。

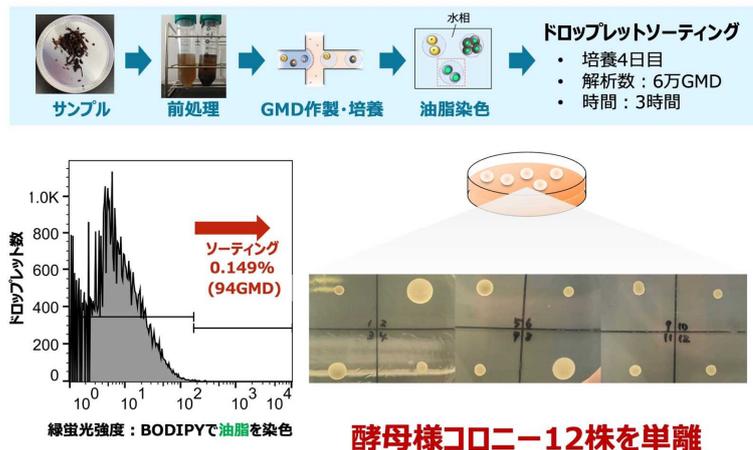


図3.2.1.1.1.2-13. ミミズ堆肥由来環境微生物の油脂生産性に基づくスクリーニング

研究項目 1.1.2.2 微生物複合型スマートセルを可能にするスクリーニング技術開発

本研究項目では、単ドロップレットに複数種類の微生物が封入されるようにドロップレットを生成する技術、もしくは単ドロップレットに1種の微生物を封入して多数のドロップレットを共存して培養する技術を開発する。以下の仕様を満たすドロップレット混合培養系を実現することで、他の微生物を生育に必要とする難培養微生物の可培養化や、特定の物質生産株とその生育・生産能力を向上させるヘルパー微生物の獲得に資する基盤技術の開発を目指す。

- (1) 培養にはWODL培養系、またはGMD培養系を用いる。
- (2) ドロップレット内もしくはドロップレット間で微生物間相互作用を再現する。
- (3) 微生物間相互作用を増殖に要するような未培養・難培養微生物の可培養化が可能。従来法の10倍以上の環境微生物を生育させることが可能。
- (4) ドロップレット混合培養系を活用して特定の物質生産株とその生育・生産能力を向上させるヘルパー微生物の組合せを効率的に獲得することが可能。

2022年度中間目標は、「微生物間相互作用を再現するDL混合培養系の開発」と、「それを活用した新規未培養微生物の獲得（1株以上）」である。

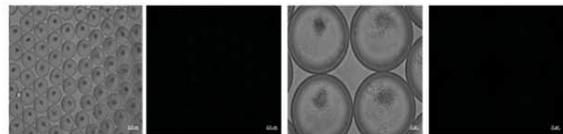
●WODL培養における微生物間相互作用検証実験

WODL培養系におけるAHL生産菌とセンサー菌を用いた微生物間相互作用の再現の検証試験を行った。具体的には、炭素数6のアシル鎖を持つN-ヘキサノイル-L-ホモセリンラクトン（AHL-C6）を生産する *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 株とAHL-C6により緑色蛍光タンパクGFPを発現誘導する大腸菌株を用いて、1)センサーセルのみの単一培養系、2)AHL生産

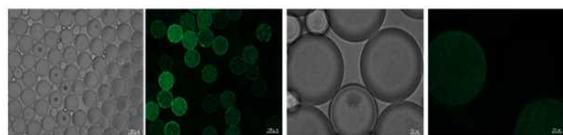
菌とセンサー菌をそれぞれ別々にドロップレットに封入した後に 1:1 の割合で混合した培養系、3) 単一ドロップレットに AHL 生産菌とセンサー菌の両方が封入された混合培養系、の各条件を比較した。その結果、2) と 3) の混合培養系でセンサー菌の GFP 蛍光が観察され、生産菌とセンサー菌の間の AHL のやりとりが確認された (図 3.2.1.1.1.2-14)。3) の蛍光値は 2) よりも高いことから、ドロップレット内に生産菌が混在するほうがセンサーセルに供給される AHL 分子の量は多いと示唆される。一方で、2) の混合培養系におけるセンサーセルの封入ドロップレットの広範な蛍光は、AHL-C6 がドロップレット間を移動可能であることを示している。次に、炭素数 14 のアシル鎖を持つ N-テトラデカノイル-L-ホモセリンラクトン (AHL-C14) を用いた同様の解析により、疎水性の高い長鎖のアシル基化合物もドロップレット間を行き来することを確認した。さらに、単一ドロップレットに 2 色の蛍光菌が封入されるようにドロップレットを生成したところ、増殖ドロップレットのうちの一部ではあるものの、2 種の菌を単一ドロップレット内で共培養することが可能であることを確認した。以上より、WODL 混合培養系の手法開発し、ドロップレット内外を介した微生物間相互作用の再現を実証した。



1. センサー菌のみ



2. AHL生産菌とセンサー菌を異なるDLに封入し1:1の割合で混合



3. AHL生産菌とセンサー菌を同一DL内で共培養

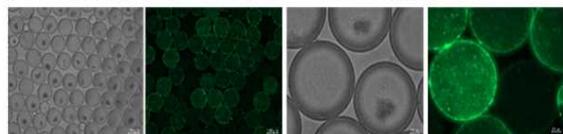


図 3.2.1.1.1.2-14. WODL 培養系におけるドロップレット内外を介した微生物間相互作用の再現の検証

●GMD 凝集培養法による可培養化率向上と混合培養系の開発

微小ゲル粒子 (GMD : Gel Micro-Droplet) 凝集培養法という、超高密度 (10^7 cells/ml 以上) の植菌数でありながら各菌体の純粋培養の維持ができ、かつ微生物間相互作用を保てる培養系を用いて (図 3.2.1.1.1.2-15)、未培養・難培養微生物の可培養化と、新規な混合培養生産系の獲得を目指している。作成する GMD の直径は $10\sim 30\ \mu\text{m}$ で、1 粒子の GMD に対して 1 細胞の微生物が含まれるように調製し、ゆるく凝集させた状態で培養する。GMD 内の微生物細胞は GMD 間を移動しないが、水溶性物質の移動は起こるため、微生物間相互作用による微生物の増殖促進が期待される。

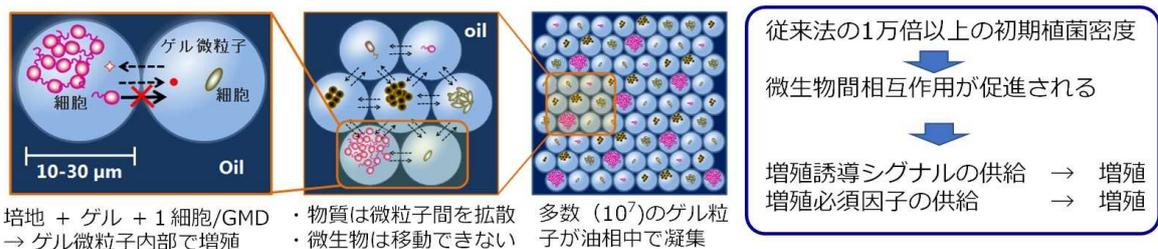


図 3.2.1.1.1.2-15 GMD 凝集培養法の原理

GMDの培養法として、オイル中でGMDを分散させた状態で培養する分散培養系と、GMDをゆるく凝集させた状態で培養する凝集培養系という2つの培養方法を構築した。広島大学内の土壌より抽出した微生物細胞を用いてGMDを作成し、一定期間、GMDをオイル中でスターラーによる攪拌を行いながら、分散もしくは凝集培養を行った。

凝集培養と分散培養におけるGMD内での細菌のコロニー形成率と菌叢を比較した。分散培養では全培養期間を通じて常に10%以下と低かったが、凝集培養でのコロニー形成率は最大で70%に達した(図3.2.1.1.1.2-16)。GMD内で形成された菌叢については、培養株が得られていないCandidate Phyla Radiation (CPR)の1つであるSR1や、難培養性細菌であるVerrucomicrobia、Bdellovibrionota、Planctomycetesに属する細菌群の増殖が凝集培養で見られるのに対し、分散培養ではそれらの群が見られず、さらに培養日数が経つにつれて多様性の低下が見られた(図3.2.1.1.1.2-17)。これらの結果から、分散培養ではGMDのオイル内での散在によって物質移動に制限があるために細菌の増殖が抑制されるのに対し、凝集培養では水溶性物質を介した微生物間相互作用が維持されるため、未培養・難培養性細菌を含む細菌が増殖する可能性が示唆された。

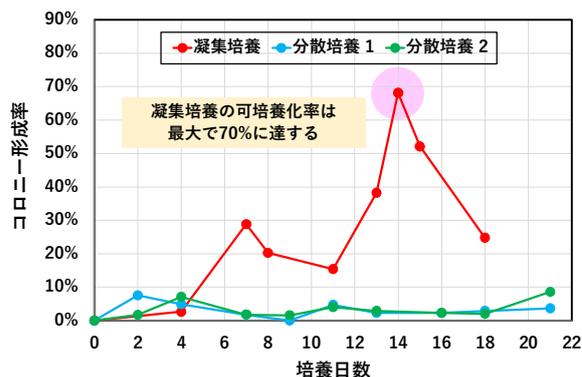


図 3.2.1.1.1.2-16. GMD 凝集培養と分散培養のコロニー形成率

凝集培養では未培養・難培養性細菌(★印)の増殖が見られる。分散培養では未培養・難培養性細菌を含む細菌が増殖する可能性が示唆された。

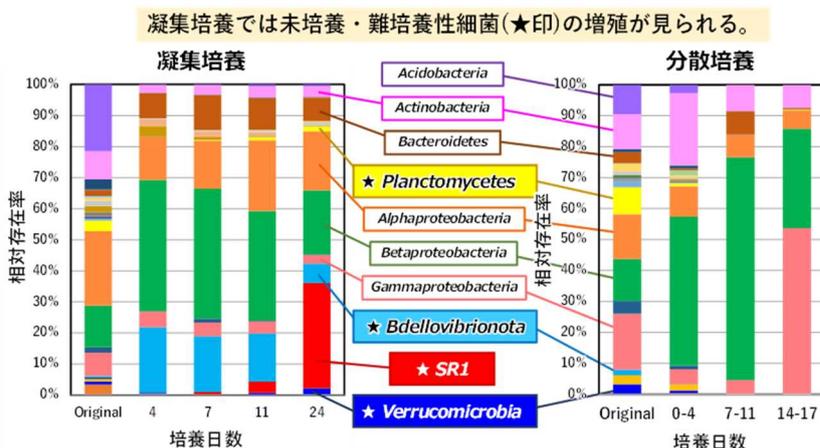


図 3.2.1.1.1.2-17. GMD 凝集培養と分散培養における経時的な菌叢

従来法では培養困難な未培養・難培養性細菌や寄生・捕食性細菌の増殖が見られたことから、GMD凝集培養法は微生物間相互作用を保持した培養系と言える。

広島大学構内の松林土壌より微生物細胞を抽出し、GMDを作成して3連で凝集培養を行った。図3の研究の流れに沿って菌叢の経時変化とセルソーター分取後の分離株取得を試みた。また、対照試験として標準寒天培養法(SDP)を行った。GMD凝集培養と標準寒天培養法で得られた分離株と、その近縁種の系統樹を図3.2.1.1.1.2-18に示す。GMD凝集培養は標準寒天培地法で得られた分離

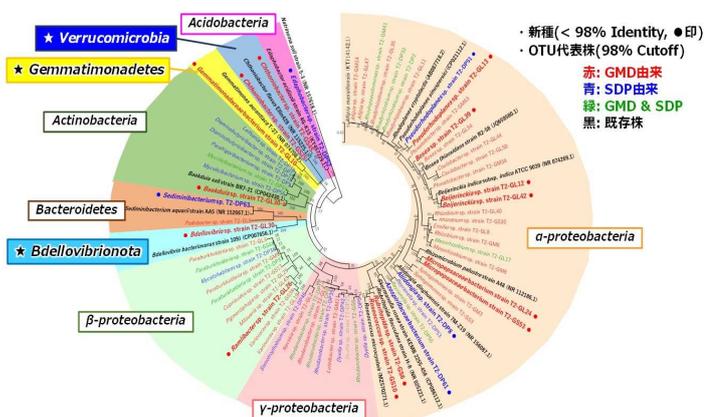


図 3.2.1.1.1.2-18. 分離株と近縁の既存株の系統樹

株の系統を大部分カバーしており、さらに難培養性細菌群である *Bdellovibrionota*、*Verrucomicrobia*、そして既存分離株が世界で数株しか存在しない *Gemmatimonadetes* に属する細菌の分離株を取得した。取得した新種については、今後ゲノム買い配列を取得して新規遺伝子の探索を行う。

研究項目 1.2.1 データ駆動型探索システム構築のための生物資源・ゲノム情報の格納

本プロジェクトにおいて開発されたスクリーニング技術とそれにより得られた有用微生物を物質生産に活用するためには、得られた微生物を保管し提供できる体制の整備と、ゲノム解析による遺伝資源の整備、さらに得られた微生物の情報を検索できるシステムの整備が必要である。本研究項目では研究項目 1.2.1.1 で「もの(微生物)」の整備としてスクリーニング用微生物の提供とスクリーニングによって選抜された微生物の保管と提供を行う。研究項目 1.2.1.2 では「情報」の整備としてゲノム情報の整備と微生物の情報データベースの構築を行う。

研究項目 1.2.1.1 機能データを付与した生物資源の管理提供

本研究項目ではプロジェクト開始期に「微生物の提供に関する同意書」を定め、参画機関に提出いただくことで NITE が保有する微生物の提供スキームを確立した(図 3.2.1.1.1.2-19)。参画機関は同意書を提出することで NITE から無償で微生物の提供を受けることができ、

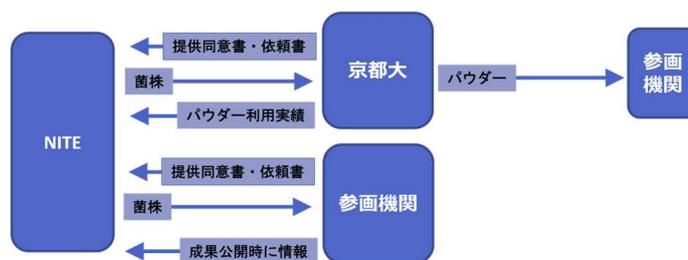


図 3.2.1.1.1.2-19. NITE 保有微生物の提供スキーム

希望する場合はプロジェクト終了後も継続利用や商用利用を可能とする予定である。このスキームにより、2020 年度に 3 機関に 263 株、2021 年度に 12 機関に 383 株の微生物を提供した。提供した微生物はパウダースクリーニングや活性スクリーニングの材料として使われたほか、モデル株として各機関で同一ロットの株を用いた実験に用いられた。

プロジェクト期間中において得られる微生物をプロジェクト期間後も利活用されるようにするためには、スクリーニングによって選抜された微生物を適切に保管し活用できる体制を整備することも重要である。このため、プロジェクトで選抜された微生物について「微生物の保管に関する依頼書」、「保管完了通知書」等の文書を作成し、NITE に条件を明示した上で保管し、プロジェクト内の希望者に提供できるスキームを整備した(図 3.2.1.1.1.2-20)。参画機関は NITE に保管された有用微生物を

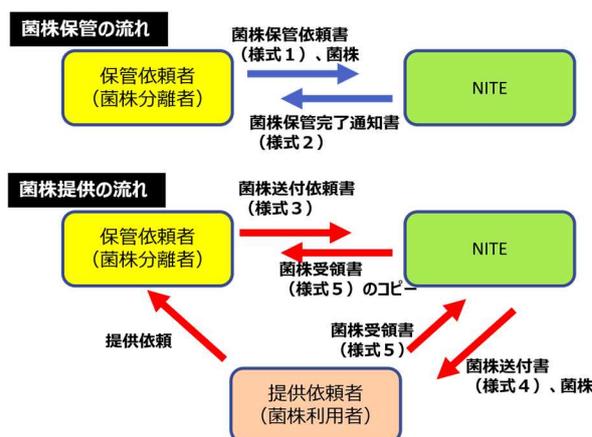


図 3.2.1.1.1.2-20. スクリーニングにより選抜された微生物の保管・提供スキーム

利用することができ、またスクリーニング実施者も利用状況を把握することが可能となっている。このスキームにより 2021 年度に 5 機関より 10 件 37 株の微生物を受け入れた。

微生物は今後プロジェクト内で希望者に提供される。プロジェクト終了後の微生物の保管・提供の在り方については、今後検討する予定である。

研究項目 1.2.1.2 機能データやゲノム情報等の情報資源の管理提供

スクリーニングにより選抜された微生物はさらにゲノム解析を行うことで活性に関与する遺伝子の探索や有用酵素遺伝子の発見など、遺伝資源として活用することができるようになる本研究項目では研究項目 1 において得られた有用微生物のゲノムを決定した。まず、研究項目

1.1.1.3.2 「スマートセル変異株ライブラリーを対象としたスクリーニング」から得られた油脂生産性が変化した油脂酵母育種株 10 株のゲノム解析を実施し

た。変異遺伝子を同定した結果、それぞれの株が独立した変異を保持することが判明し、油脂生産性に影響する新たな遺伝子が同定された。また、研究項目

1.1.1.3.3 「環境微生物を対象としたスクリーニング」において単離された環境微生物のゲノム解析を実施し、既知の微生物との相同解析によって、全て新種の微生物であることが判明した。

表 3.2.1.1.1.2-5. 油脂酵母育種株ゲノム解析結果

	oil production	mutaion in CDS	mutation in intergenic region	in-del
1	high	3	20	
2	high	3	13	1
3	high	6	25	
4	low	34	86	3
5	low	32	111	
6	low	9	26	1
7	low	35	114	2
8	low	19	66	3
9	low growth	29	97	
10	low	4	18	

表 3.2.1.1.1.2-6. 環境微生物を対象として得られたスクリーニング結果概要

	scaffolds	estimated genome length	protein estimation	identity%with RecA		estimation with genome annotation			
				identity%	estimation	ANI%	Organism name	size(Mb)	protein
1-1	7	3,401,624	3,253	99.718	[Curtobacterium sp. ME26]	87.787	Curtobacterium albidum	3.67499	3,276
1-2	3	4,582,159	4,419	99.714	[Nocardiooides sp. zg-1228]	86.3914	Nocardiooides exalbidus	4.59985	4,338
2	3	3,687,345	3,425	88.402	[Herbiconiux flava]	90.2496	Herbiconiux flava	3.84915	3,479
3	7	4,038,664	3,756	100	[Sphingomonas taxi]	97.4144	Sphingomonas taxi	3.86	3,508
4	1	3,576,627	3,338	100	[Herbiconiux flava]	86.7526	Herbiconiux flava	3.84915	3,479
5	7	5,385,130	4,495	98.857	[Hymenobacter sp. BT635]	91.9077	Hymenobacter aquaticus	5.51175	4,493
6	1	3,385,633	3,213	92.683	[Cryobacterium sp. MLB-32]	80.5418	Protaetiibacter intestinalis	3.09711	2,873

同様に、研究項目 1.1.1.3 「高性能表現型宿主・高性能機能遺伝子の探索」において同定された株に関して、ゲノム解析および RNA 解析による遺伝子同定の準備を整えた。

さらに、ゲノム解析手法の検討およびデータベースへの登録情報の検討素材として、研究項目 1.1.1.3.3 「環境微生物を対象としたスクリーニング」で単離された油脂生産微生物や PHA 生産微生物のゲノム解析を実施し、今後のデータベース登録形式の検討を開始した。

さらに、プロジェクト内で実施されたスクリーニングに関する情報と活性の有無を含めた結果を登録・整備し、さらにゲノム情報を登録してデータベース化することで微生物と遺伝子の利活用が促進されると考えられる。本プロジェクトでは研究項目間でデータを連携しやすくするため、データの種類毎に共通のデータシート及びデータ項目が定められている。本研究項目では探索情報、微生物情報、及びゲノム情報の各シートを設定し、各シートに記載されたデータを共通のクラウド（AWS（アマゾンウェブサービス））に保管することで、データベースから関連データを参照できる仕組みを構築した。これにより実施者が情報シートにデータを記載し、指定されたフォルダにアップロードすることで、簡便にデータベースにデータを登録することができるようになった。さらに、

ウェブインターフェースとして「ScreenHit」を開発し、ログイン認証を経た上で、登録されたスクリーニング系の概要、ヒット株数、活性データの概要、ヒット菌株の概要等が検索・閲覧できる環境を構築した（図 3.2.1.1.1.2-21）。



図 3.2.1.1.1.2-21. スクリーニングと微生物情報を検索・閲覧できる ScreenHit

(9) 成果の最終目標の達成可能性

研究項目	研究項目の最終目標	最終目標の達成可能性
1.1.2.2 微生物複合型スマートセルを可能にするスクリーニング技術開発	複合型スマートセルのハイスループットスクリーニング系の確立し、スマートセルの物質生産を向上させるヘルパー微生物との組み合わせを1つ以上見出す。	これまでにドロップレット混合培養技術の構築に成功し、科学的な裏付けや可培養化率の向上に成功している。今後は未培養微生物の純粋分離手法を確立するとともに、実際に未知・未培養微生物を純粋分離することで本技術の有効性を実証する。また特定の物質生産株とその生育・生産能力を向上させるヘルパー微生物の組合せを効率的に獲得するための基盤技術構築も実施する。さらにターゲット物質生産株の生育や生産能力を向上する候補微生物の単離・獲得を試みて有用性を実証する。これらの研究開発に必要な混合培養技術の構築に予定通り成功しているため、最終目的も達成可能であると期待される。
1.1.1.2 目標解決のための技術開発：表現型スクリーニング技術構築	培養パラメーターに対応する表現型スクリーニングシステム（表現型に基づくハイスループットスクリーニング・シングルドロップレット分取分注トータルシステムなどを統合したシステム）を完成	企業が必要とする表現型である2種類のストレス耐性や3種類の表現型に対するスクリーニング技術を確立しつつ、培養物質生産に影響を及ぼす亜集団の動態の可視化に成功している。さらに、表現型に基づくハイスループットスクリーニング・シングルドロップレット分取分注トータルシステムの中核となる、シングルドロップレット分取・分注トータルシステムの開発・実用化に前倒しで成功している。加えて本事業中

		に得られた情報・企業ニーズに基づき、ミリオンスクリーニング技術の汎用性を向上させるイメージングソーターを企画し、検証機を完成して実現可能性・実用性も示した。以上により、当初目標を達成しつつ、当初計画以上に実用的なスクリーニング技術の開発も進めており、当初よりもより良い形で最終目的を達成可能であると期待される。
1.1.1.3.2 スマートセル変異株ライブラリー対象のスクリーニング	<p>高性能表現型宿主株と高性能機能遺伝子群の探索方法の確立ならびにバイオプロセスに資する宿主株や遺伝子株の探索を通じた実証のために、以下を達成する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・研究項目 1.1.1.2 で開発された技術を実証するためにスマートセル育種に適応 ・高性能表現型宿主の取得 24 株、高性能機能遺伝子の提案 6 遺伝子を取得（累計） 	<p>研究項目 1.1.1.2 で開発された表現型スクリーニング技術の概念実証とフィードバック、ミリオンスクリーニング技術の有効性検証および高機能宿主表現型宿主・高性能機能遺伝子群の取得による本事業全体全体への貢献を目的としている。2022 年度中頃までに、スマートセル株に対する油脂生産性や生育に関するスクリーニング技術検証、油脂生産性や生育に関する高機能表現型宿主 10 株、高機能機能遺伝子の候補遺伝子が 3 遺伝子得られている。そのため最終目標の数値目標も達成しながら、目的も達成できると期待される。</p>
1.1.1.3.3 環境微生物を対象としたスクリーニング	<p>高性能表現型宿主株と高性能機能遺伝子群の探索方法の確立ならびにバイオプロセスに資する宿主株や遺伝子株の探索を通じた実証のために、以下を達成する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・研究項目 1.1.1.3.2 で構築する培養パラメーターや企業が求める機能に対応する表現型スクリーニングシステムを、環境微生物のスクリーニングに応用 ・環境微生物のスクリーニングを実施。得られた微生物のゲノム解析を研究項目 1.2.1.2 と連携して実施 	<p>研究項目 1.1.1.2 と 1.1.2.2 で開発された表現型スクリーニング技術・混合培養技術の概念実証とフィードバック、ミリオンスクリーニング技術の有効性検証および高機能宿主表現型宿主・高性能機能遺伝子群の取得による本事業全体全体への貢献を目的としている。2022 年度中頃までに、環境微生物に対する油脂生産性に基づくスクリーニング技術検証、現状新規性が高いと期待される 油脂生産株 20 株微生物株が獲得できており、ゲノム解析を実施中である</p> <p>さらに、新規性の高い遺伝子資源の取得を目指したスクリーニングを実施中であり最終目標を実施可能であると期待される。</p>
研究項目 1.2.1 データ駆動型探索システム構築のための生物資源・ゲノム情報の格納	<p>微生物探索で得られた「もの（微生物）」と「情報」を利用しやすい形で管理・整理し、「新規ターゲット探索基盤」として提供することで、新規シーズの効率的創出に貢献する。</p>	<p>これまで「もの（微生物）」と「情報」の両面から管理・整備するための枠組を構築し、実際に微生物と情報の集積を開始している。</p> <p>引き続き集積を継続し、さらに利用しやすい形でウェブインターフェースやデータ等を整備していくことで最終目標を実現可能であると期待される。</p>

(10) 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	
2020	0	0	0	0	0	0	0
2021	1	0	3	0	0	0	0
2022	0	0	0	1	0	0	0
PJ 期間 合計	1	0	3	1	0	0	0

(2022年5月現在)

(11) 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
2020	0	0	0
2021	0	0	0
2022	3(出願準備中)	0	0
PJ 期間 合計	3(出願準備中含む)	0	0

(2022年5月現在)

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

本開発では有用微生物の探索・育種プロセスを従来よりも1000倍以上効率化可能なミリオンスクリーニング技術を開発、実用化を目指している。この実用化には、(1)背景と目的に記載したミリオンスクリーニング技術の課題の解決が必要である。本技術開発では、1)スクリーニング技術開発、2)スクリーニング装置、3)スクリーニング・アプリケーション(事例)を一体として開発を進めており、実用化の実現性は高いと考えている。

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

前記の「ミリオンスクリーニング全自動装置」に搭載される各技術(ドロップレット生成技術、ドロップレットを使った培養技術、ドロップレット選別技術、ドロップレット回収技術、ミリオンスクリーニング装置、ドロップレットからの細胞回収技術)は一体化されることを待たず、個別に事業化可能なものは、順次、事業化する。装置の販売による事業化だけでなく、ミリオンスクリーニングの受託を株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズが事業化する計画である。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

前述の通り、1)スクリーニング技術、2)スクリーニング装置、3)スクリーニング・アプリケーション(事例)を一体として開発を進め、実用化可能なものを順次事業化する戦略である。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

前述の通り、3)スクリーニング・アプリケーション(事例)を企業からの具体的なニーズを収集し行うことで、事業化の蓋然性を高めている。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

企業の具体的なニーズに立脚しスクリーニング事例を複数構築することで、速やかな事業化が可能と考えている。

(12.5) 波及効果

表現系に基づく探索・育種プロセスを飛躍的に効率化して探索範囲の拡大を実現することにより、効率的に多様な遺伝子資源と宿主を拡充可能になる。これによりバイオによるものづくりにおいて、開発期間の短縮し、少量多品目の大量生産を実現できることとなり、循環型バイオエコノミーの社会の実現に貢献できる。

3.2.1.1.2 培養データ駆動型産業用スマートセル構築技術の開発 研究項目 2

3.2.1.1.2.1 培養データからの産業用スマートセル創出技術の開発 研究項目 2.1

3.2.1.1.2.1.1 培養データ駆動型細胞内ダイナミクス解析技術開発 (産総研、京大、医薬基盤研、新潟薬科大、RITE) 研究項目 2.1.1

(1)背景と目的

スマートセル設計技術の一つに、ゲノムスケールレベルの代謝モデルをもとに、理想的な代謝経路を設計し、その設計図にもとづいて目的の細胞を構築する技術がある。この技術を用いて設計した宿主微生物は、ジャーファーメンターなどを用いてスケールアップ培養した際に、試験管やフラスコなどでは考えられてこなかった因子により代謝が変動し、生産性が低下するという問題がある。そこで、本研究項目では、ジャー培養等で測定される溶存酸素、pH、培地成分濃度の経時的な変化などから、培養プロファイルの予測モデルの構築を行い、その結果をもとに宿主改変に必要な提案を行う。

(2)位置づけ、目標値

測定培養データを元に、宿主細胞の「収率」「生育速度」「生産フェーズ」の最適化のための細胞内代謝のダイナミクス解析技術を開発する。ジャー培養の各種パラメータから細胞内代謝の変動を予測し、目的生産物の生産性向上に必要な培養条件や遺伝子改変等の情報を提案する。この技術をもって微生物を用いた有用化学品生産の市場に有効な知見を提供する。中間目標値として、代謝ダイナミクスモデルのプロトタイプを3種類以上の産業株に適用し、モデルの検証を行う。最終目標値として、標準化された生産プロセスおよび発酵槽培養における宿主微生物の代謝ダイナミクスモデル技術と多品種化合物の実用生産に資する代謝設計バリエーション技術を確立し、産業用スマートセル構築を実現する。

(3) 全体計画

	2020 年 度	2021 年 度	2022 年 度	2023 年 度	2024 年 度	2025 年 度	2026 年度
i 代謝ダイナミクス予測	1 つ以上の培養パラメータを導入	実データのモデルへの採用・導入	3 種類以上の産業株に適用	モデルの	高精度化	次世代スマートセル株を用いた有効性検証	
ii 代謝設計バリエーション技術	新規アノテーション技術	モデルバリエーション生成技術	複数宿主・化合物に関する代謝モデル生成	標準生産プロセスに適	合した代謝設計	多品種化合物の実用生産と事業化に向けた代謝設計	

(2020 年度の目標)

- ・ 1 つ以上の培養パラメータによる細胞内代謝のダイナミクス予測技術を開発する。
- ・ 新規アノテーション技術を開発する。

(2020 年度実施内容)

- ・ 培養条件などの外的環境パラメータの代謝予測計算への反映方法を検討し、溶存酸素濃度変化など 1 つ以上の培養パラメータの経時変化データによる細胞内代謝のダイナミクスを予測する技術を開発する。
- ・ モデル宿主ゲノムを利用した代謝パスウェイ中遺伝子に関する新規アノテーション技術を開発する。

(2021 年度末目標)

- ・ 様々な培養パラメータ変化に対応する代謝ダイナミクスプロトタイプを開発する。
- ・ 代謝モデルバリエーション生成技術の開発とダイナミクス計算への提供を行う。

(2021 年度実施内容)

- ・ 前年度構築した代謝ダイナミクスモデルについて、様々な培養パラメータに対しそれぞれ適用し、培養の経時変化に対応した代謝ダイナミクスのプロトタイプを構築する。なお、培養パラメータについては、研究項目 2.2.1~4 のうち一項目以上におけるデータを採用し、モデルの開発を行う。
- ・ 酵素反応・遺伝子のアノテーション技術をもとに、代謝モデルバリエーションを生成する技術を開発する。

(2022 年度末目標)

- ・代謝ダイナミクスモデルのプロトタイプを 3 種類以上の産業株に適用し、モデルの検証を行う。
- ・複数宿主 (5 種) ・多品種化合物 (5 種) に関する代謝モデル・設計バリエーション生成技術の開発とダイナミクス計算への提供を行う

(2022 年度実施内容)

- ・前年度で構築した代謝ダイナミクスモデルのプロトタイプを研究項目 2.2.1~4 のうち 3 種類以上の産業株に適用する。その結果をもとにモデルの高精度化に必要な培養制御パラメータまたは表現型データを 1 つ以上抽出し、代謝ダイナミクスモデルによる予測値と実際の実験データとのギャップから、各産業株に対し、改良すべき 1 つ以上の培養制御パラメータ、または 1 つ以上の遺伝子可変個所の情報を提案する。
- ・複数宿主 (5 種) ・多品種化合物 (5 種) の代謝モデル・設計バリエーションの生成技術を開発する。

(2024 年度末目標)

- ・高精度化した代謝ダイナミクスモデルを 5 種類以上の宿主に適用
- ・複数宿主・多品種化合物への適用を前提とした標準生産プロセス (5 種) に適合した代謝設計バリエーション生成技術の開発

(2023-2024 年度実施内容) (予定)

- ・代謝ダイナミクスモデル高精度化を行いながら、それを累計 5 種類以上の産業株に適用することにより、産業用スマートセルとしての代謝設計を提案し、培養環境変化にロバストな産業宿主株のための情報を提供する。
- ・代謝設計と標準生産プロセス (5 種) の比較検討により、各種プロセスに適合した代謝バリエーション生成技術を開発する。

(2026 年度末目標)

- ・3 種類以上の代謝ダイナミクスモデルを汎用的に利用することにより、構築された次世代スマートセル株の有効性を実証する。
- ・多品種化合物 (3 種) の実用生産と事業化に向けた代謝設計バリエーション生成技術の開発

(2025-2026 年度実施内容) (予定)

- ・目的化合物を細胞内に蓄積する株、排出する株、非水溶性の目的化合物を生産するなど、培養特性に対応した 3 種類以上の代謝ダイナミクスモデルを汎用的に利用することにより、構築された次世代スマートセル株の有効性を実証する。
- ・標準生産プロセスを利用した多品種化合物 (3 種) の実用生産と事業化に向けた代謝設計バリエーション生成と選択の技術を開発する。

(4) 実施体制

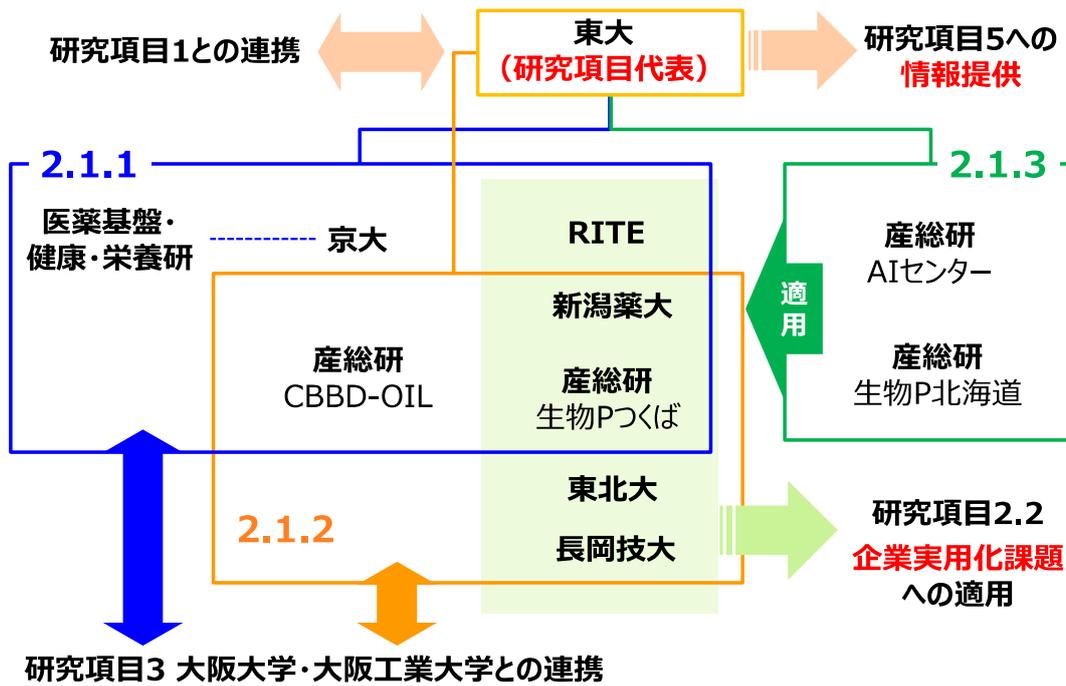


図 3.2.1.1.2.1.1-1 実施体制図

(5) 運営管理

半年に一度以上の頻度で研究項目2に参加している実施者と進捗の確認を行い、また、1または2ヶ月に一度以上の頻度で、各実用化の課題の実施者と進捗の確認、情報を共有し常にアップデートを試みている。また、研究項目2.1および研究項目2.2の課題実施者とは、情報技術開発のシナジー効果が得られる可能性が高いため、1ヶ月に一度以上の頻度で情報共有を行い、課題解決に向けた議論を進めている。

(6) 実施の効果

宿主微生物代謝ダイナミクスモデル技術を活用することで、各企業の微生物生産による事業化の支援、技術コンサルを実施することにより、100万/件を想定する。また、ツール化したソフトウェアパッケージもしくは設計支援サービスを提供することにより、1000万/件を想定する。CO₂削減・省エネルギー等については、本課題実施による直接的な影響はないが、上記サービスを提供することにより、産業界が微生物を用いたモノづくり技術を高め、化石原料一辺倒からの脱却をサポートすることにより、間接的にCO₂削減・省エネルギーに貢献する。

(7) 中間目標の達成度

活動項目 (担当)	活動内容	中間目標	達成度

<p>培養プロファイル予測モデルの構築 (産総研)</p>	<p>測定培養データを元に、宿主細胞の「収率」「生育速度」「生産フェーズ」の最適化のための細胞内代謝のダイナミクス解析技術を開発する。 目的生産物の生産性向上に必要な培養条件や遺伝子改変等の情報を提案する。</p>	<p>・代謝ダイナミクスモデルのプロトタイプを3種類以上の産業株に適用し、モデルを検証する。</p>	<p>・大腸菌および油脂酵母に関し、開発したモデルを適用し、新たな改変箇所を提案できた。さらにコリネ型細菌および糸状菌に対し、本モデルを適用した。;○</p>
<p>代謝モデルバリエーション生成技術の開発 (京大)</p>	<p>複数宿主・多品種化合物および標準プロセスに対応・適合した最適・準最適な解を含む代謝モデル・設計バリエーションの生成・探索とそのダイナミクス計算のベースとしての提供を行う。</p>	<p>・複数宿主(5種)、多品種化合物(5種)に関する代謝モデル・設計バリエーション生成技術の開発</p>	<p>・大腸菌、コリネ型細菌、酵母、糸状菌など複数宿主について開発したアノテーション技術を適用済で、代謝モデルの拡張を実施した また、大腸菌で酵素候補を複数提案し、その結果を検証した。代謝バリエーション生成技術を大腸菌のモデルを例に開発し、上記の他宿主および多品種化合物に適用拡大し、検証した。; ○</p>

(8) 研究開発の成果と意義

本課題では、代謝のダイナミクスを取り入れた表現型の予測モデルを開発し実用展開する。発酵槽培養の溶存酸素、pH、培地成分濃度などの環境状態を取り入れたゲノムスケールレベルの代謝フラックス予測をもとにして、表現型ダイナミクスを予測する。実際の培養試験結果とギャップが生じた場合に解析するポイントを提示し、その時点での培養データおよびオミクス等の解析データを用いて、培養環境変化に対応できるロバスタな細胞設計の提案を行う。また、酵素反応・遺伝子アノテーション技術や代謝バリエーション生成技術を用いた代謝モデル・設計バリエーションの生成とそのダイナミクス計算へ提供する。これまでの成果として、代謝フラックスバランス解析(FBA)を連続的に用いることにより、培養プロファイルを予測する技術を構築した。大腸菌のゲノムスケールモデル

(iJ01366) を用いて培養ダイナミクスを予測するプログラムを構築し、酸素や窒素など様々な培養パラメータを反映できるモデルを構築した。

培養プロファイル予測モデルの構築

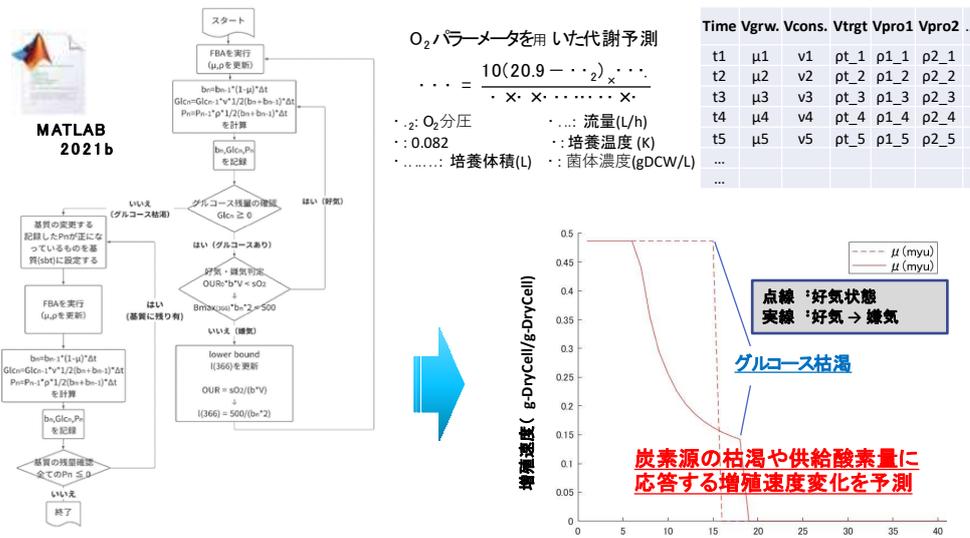


図 3.2.1.1.2.1.1-2 酸素変化パラメータを取り入れた代謝ダイナミクスの予測

構築したモデルを油脂酵母に適用し、測定された培養データをもとにして、宿主細胞の培養プロファイルの予測を行なった。また、予測と実際のギャップを表現する因子を同定し、目的生産物の生産性向上に必要な培養条件や遺伝子改変等の情報の提案を行なった。

さらに、代謝モデル・設計バリエーション生成技術の開発において、酵素反応・遺伝子アノテーション技術の開発・改良を行い、代謝モデルを用いたバリエーション生成技術の開発を行なった。具体的には、酵素配列からの酵素のアノテーション技術による大腸菌での有用物質生産に関する外来の酵素配列候補の予測・提案を行った。また、アノテーション技術を複数宿主に適用し、それらの代謝モデルの拡張を実施している。代謝バリエーション生成については、大腸菌のモデルを例にその技術を開発し、ダイナミクス計算のベースとして供するためのバリエーションを生成した。

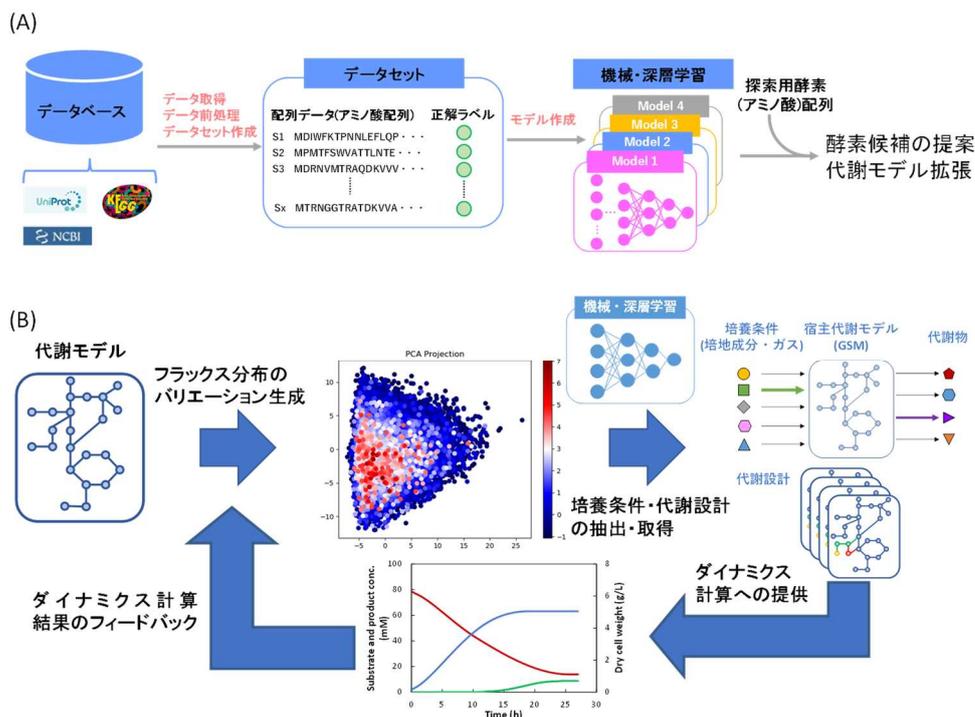


図 3.2.1.1.2.1.1-3 酵素アノテーションによる酵素候補の提案・代謝モデルの拡張(A)およびダイナミクス計算に供する代謝モデル・設計バリエーションの生成(B)。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

最終目標は、目的化合物を細胞内に蓄積する株、排出する株、非水溶性の目的化合物を生産するなど、培養特性に対応した3種類以上の代謝ダイナミクスモデルを汎用的に利用することにより、構築された次世代スマートセル株の有効性を実証する。2022年度までに、培養特性が異なる3種類の産業微生物を設定済みであり、それぞれに対応するモデルの開発および高精度化を目指しており、最終目標の達成は十分に可能であると考えられる。

また、もう一つの目標として、標準生産プロセスを利用した多品種化合物(3種)の実用生産と事業化に向けた代謝設計バリエーション生成と選択の技術を開発する。そのために、2022年度末までに複数宿主・多品種化合物に関するバリエーション生成技術を適用拡大し、その後の代謝設計と標準生産プロセスの比較検討を進める。そして、各種プロセスに適合した代謝バリエーション生成技術へと展開することで、最終目標の達成は十分に可能であると考えられる。

以上を達成することにより、標準化された生産プロセスおよび発酵槽培養における宿主微生物の代謝ダイナミクスモデル技術と多品種化合物の実用生産に資する代謝設計バリエーション技術を確立し、産業用スマートセル構築を実現することを2026年度末(プロジェクト完了時)のゴールイメージに設定できている。

(10) 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	
2020	2	3	0	0	0	0	0
2021	2	0	1	0	1	0	0
2022	0	0	4	0	1	0	0
PJ 期間 合計	4	3	5	0	2	0	0

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

論文等による公開を含めた酵素反応予測・代謝バリエーション生成技術の優位性を周知する。

実際に改変提案した遺伝子や培養条件に関しては、課題を行った参画企業と共に特許申請などを実施する。

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2020	0	0	0
2021	0	0	0
2022	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	0

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

ツール化したソフトウェアパッケージもしくは設計支援サービスを提供する。宿主微生物代謝ダイナミクスモデル技術を活用することで、各企業の微生物生産による事業化の支援、技術コンサルを実施する。また、酵素反応予測・代謝バリエーション生成技術については、オープン化による実用化を目指す。

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

各参画機関が開発した情報解析ツールや技術についてはノウハウとして保有し、各企業の微生物生産による事業化の支援、技術コンサルという形を取る。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

各企業の微生物生産による事業化の支援、技術コンサルを実施すべく、代謝ダイナミクス予測技術を開発する。そのために、多岐にわたる生産プロセスをグループ化し、それらの培

養特性に対応したモデル開発を行うことで汎用化を進める。酵素反応予測・代謝バリエーション生成技術については、オープン化による実用化を目指す。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

具体的な産業宿主を用いた実生産課題と連携し、各課題を解決することで、微生物代謝ダイナミクスモデル技術の汎用化を進めている。酵素反応予測・代謝バリエーション生成技術のオープン化については、どのような種類、質のデータがモデル化に必要なかを明確化し、事業化支援や設計支援サービス提供の際に情報を共有することで、適切なモデル化・代謝設計の提案を目指す。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

開発した代謝ダイナミクス予測技術を用いて、各企業や研究機関が保有する独自の微生物細胞の開発に個別に対応する予定である。そのために、有用宿主の代謝モデルのフォーマットを用意し、各個別対応に要する時間を削減する。各課題に対し事業形態の検討および経済性評価に必要な情報を共有し、事業化への道筋を明確化するためのサービスを提供する。

(12.5) 波及効果

ツール化したソフトウェアパッケージもしくは設計支援サービスを提供することにより、具体的な産業宿主を用いた実用化を加速することができる。また、本サービス事例を積み重ねることで新しいニーズに対しても迅速な対応を可能にし、バイオ産業の構築をさらに加速することに繋がる。

3.2.1.1.2.1.2 発酵槽培養における生産性低下因子探索技術開発（東京大学、産業技術総合研究所、東北大学、新潟薬科大学、長岡技術科学大学） 研究項目 2.1.2

(1)背景と目的

ラボスケールのフラスコ培養時に物質生産能を最適化された微生物では、ジャーフェンター等の発酵槽培養で培養した場合、物質生産性の低下が知られている。スマートセルの産業展開を実現するためには、実際の産業現場で使用されている培養槽を用いた培養時の物質生産性の最大化という課題を解決する必要がある。そこで、本研究項目では、第一にジャーフェンター等の培養槽で測定された培養時系列データから、生産性や生育不全の要因の発生時期を推定し、生産性低下を改善した宿主微生物構築に向けた改変候補遺伝子の推定技術を開発する。第二に生産能と生育能の両方を最適化するための情報技術の開発を行う。スマートセル構築のための情報基盤技術の一つであるネットワークモデル構築技術に加え、時系列データからの要因解析技術を開発することで、生産能と生育能を中心としたパレート最適解を求めるための情報解析技術を開発し、収量最大化モデルとして構築する。

(2)位置づけ、目標値

本研究項目では、発酵槽培養を用いた培養での生産性最大化に向け、発酵槽培養時における生産性低下因子の探索と細胞群に生じる生産能と生育能というトレードオフの関係にある2つのパラメータの最適化に向けた情報解析技術をそれぞれ開発する。中間目標として、発酵槽培養データからの生産性低下因子探索技術を開発し、2種以上の産業用宿主において発酵槽培養でのスマートセル宿主構築のための遺伝子改変候補を提案する。また、生育能と生産能を考慮した収率最適化モデルを開発する。最終目標値として、一般的な発酵槽培養時に宿主細胞に生じている生産性低下因子を遺伝子レベルで明確化することで、物質生産に影響を及ぼしている要因を解明し、発酵槽培養時にも生産性が低下しない宿主微生物構築基盤としての産業用スマートセル宿主構築技術として確立する。

(3) 全体計画

研究項目	2020年度	2021年度				2022年度				2023年度	2024年度	2025年度	2026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				
2.1.2. 発酵槽培養における生産性低下因子探索技術開発	ストレス関連遺伝子抽出 →												
・生産性低下因子探索技術開発		発見データから	の生産性低下			生産性低下遺伝子	推定技術			生産性低下遺伝子	推定技術		
・収量最大化モデル構築						推定された生産性	低下因子の検証						
		項目 2.2.3, 2.2.4 で測定	された遺伝子発見データの	変動パターン解析									
			収量最大化モデルのための	最適化技術開発						収量最大化モデル高精度化			
							収量最大化モデルプロトタイプ構築						

本研究項目では、発酵槽培養における生産性低下因子探索技術の開発に向け、大きく次の1) 生産性低下因子探索技術開発、2) 収量最大化モデル構築、を実施する。以下に年度ごとの各項目の目標ならびに実施内容等について記載する。

(2020年度の目標)

2020年度研究項目タイトル

「標準化された培養条件における耐酸化/浸透圧ストレス遺伝子探索技術開発」

- ・2種以上の産業用宿主について、ストレス関連遺伝子を選定する。
- ・2種以上の産業用宿主について、培養条件等を検討する。

(2020 年度実施内容)

生育能データと生産能データの時系列データを集積し、取得されたデータからストレスが発生する培養条件を選定の上、遺伝子発現データ取得のための条件検討を実施した。また、生育パラメータと生産量の逐次時系列データから、ストレスが発生している時点を推定する技術を開発した。さらに、各条件で生じると予想されるストレス関連遺伝子について、既知の遺伝子機能情報を元にデータ整理を実施した。

(研究項目タイトルの変更)

2020 年度のデータ解析結果、および企業ニーズの精査により、ジャー培養でボトルネックとなっている遺伝子はストレス関連に限らないことが示唆された。そこで、産業用スマートセルを実現するためにはストレスに限定しない生産性低下因子探索が必要と考え、2021 年度以降の研究項目タイトルを次に変更した。修正研究項目タイトル「発酵槽培養における生産性低下因子探索技術開発」

(2021 年度末目標)

- ・発酵槽培養データからの生産性低下因子探索技術を開発する。
- ・発酵槽培養でのスマートセル宿主構築のための遺伝子改変候補を提案する

(2021 年度実施内容)

初年度で検討した培養条件で測定された各宿主の遺伝子発現情報を元に、各宿主の遺伝子発現変動パターンを解析した。また、研究項目 2.2.3 および研究項目 2.2.4 で取得された発酵槽培養における遺伝子発現データ解析を実施し、物質生産時にボトルネックとなっている遺伝子の同定を行った。

(2022 年度末目標)

- ・2 種以上の産業用宿主において、発酵槽培養でのスマートセル宿主構築のための遺伝子改変候補を提案する。
- ・生育能と生産能を考慮した収率最適化モデルを開発する。

(2022 年度実施内容)

研究項目 2.2.3 および研究項目 2.2.4 で測定された発酵槽培養時の生育パラメータと生産量の逐次時系列データから、生産性低下・ボトルネックが発生している時点 Phase Transition Point (PTP) を定義し、その周辺で宿主細胞に生じている現象遷移状態を実験データから同定する。また、研究項目 2.2.3 および研究項目 2.2.4 で測定されたオミクスデータの時系列情報から PTP 周辺で生じている各種オミクスデータの変動パターンを解析し、遺伝子改変候補を提案する。

(2024 年度末目標)

- ・産業用宿主について 5 個以上の生産性低下因子候補遺伝子を推定し、実際の培養によって検証する。

- ・ 2 種以上の産業用宿主について収率最適化モデルを開発対象宿主に適用し、標準化された条件にて収率が最大化するための遺伝子改変候補を 3 つ以上提案する。

(2023-2024 年度実施内容) (予定)

- ・ 2022 年度までに実施した PTP 周辺のアミクスデータ変動パターン解析から、発酵槽培養特異的に影響を受けている遺伝子群を特定する。
- ・ 発酵槽培養にて生産性低下因子となっている遺伝子群と、変動していた細胞内因子群（遺伝子、タンパク質、メタボローム）、および培養データの関連構造をアミクスデータから構築する。
- ・ 研究項目 2.2 の各課題および助成事業課題等で発酵増培養におけるスマートセル宿主構築に必要な遺伝子改変候補を推定し、産業用スマートセルとして発酵槽培養にて生産性向上の確認・検証を実施する。

(2026 年度末目標)

- ・ 発酵槽培養における生産性低下因子と、生育能×生産能が最適化された収率最大化モデルを統合する情報解析手法を確立する。
- ・ 開発してきた手法を iBMS システムへ統合することを検討する。

(2025-2026 年度実施内容) (予定)

発酵槽で逐次的に測定された生育能データと生産能データの時系列データから生育能×生産能が最大化する予測モデルを構築する。具体的には、スマートセルプロジェクトで開発したネットワークモデル構築技術に、時系列データ解析技術を組み合わせた改良を行い、2 変数で定義される収量を表現するモデルを開発する。開発したモデルを元に、生育能および生産能のバランスが最適化され、結果として収量が最大化するポイントを推定する。また、推定されたポイントを実現するため、研究項目 2.1 で開発された培養プロファイル予測モデルや研究項目 2.1.2 で開発した改変遺伝子候補探索技術を適用し、産業用スマートセル構築に必要な改変指針を提案・検証する。

(4) 実施体制

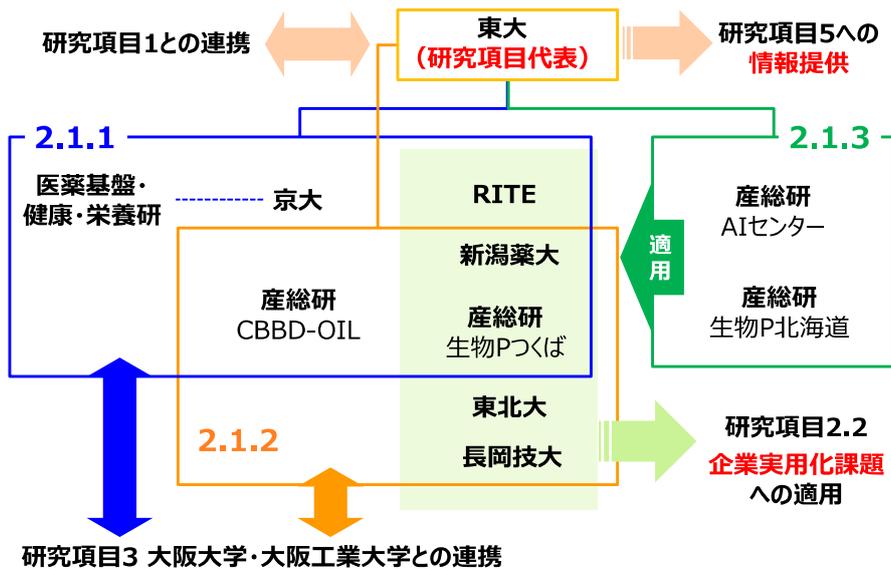


図 3.2.1.1.2.1.2-1 実施体制図

(5) 運営管理

研究項目 2 に参加している実施者と半年に一度以上の頻度で進捗の確認を行っている。また、各実用化課題の実施者とは、1~2 ヶ月に一度以上の頻度で進捗の確認並びに互いの情報共有を行うことで、進捗状況のアップデートを常に試みている。また、情報技術開発課題のシナジー効果を期待し、研究項目 2.1 および研究項目 2.2 の課題実施者とは、1 ヶ月に一度以上の頻度で情報交換を行い、互いの課題解決並びに他項目との連携に向けた議論を実施している。

(6) 実施の効果

開発した生産性低下因子探索技術や収量最大化モデルを iBMS システムへ統合することを検討し、国内の産業界が広く利活用可能な形で技術を提供する。産業用スマートセル構築を支援するため、各企業におけるターゲット物質の生産効率を高めるための技術コンサル事業展開等を想定している。

(7) 中間目標の達成度

活動項目 (担当)	活動内容	中間目標	達成度
i. 生産性低下因子探索技術の開発（産総研）	各宿主の遺伝子発現データから発酵培養槽での生産性低下因子の探索技術を開発し、候補遺伝子を探索する。	発酵槽培養データからの生産性低下因子探索技術を開発する。2種以上の産業用宿主において、発酵槽培養でのスマートセル宿主構築のための遺伝子改変候補を提案する。	発酵槽培養における生産性低下に関与する遺伝子の探索技術を開発した。この技術を発酵培養槽時の麹菌、油脂酵母、糸状菌に適用した。；○
ii. 収量最大化モデルの構築（産総研）	生育能と生産能に関連する遺伝子群を同定し、収量最大化モデルを開発する。	生育能と生産能を考慮した収量最適化モデルを開発する。	生産能と生育能を最大化した収率最適化の理論モデルを構築した。このモデルを油脂酵母などから得られた実データへの適用を検討中である。；○

(8) 研究開発の成果と意義

本課題では、発酵培養槽における生産性低下因子の探索技術を開発し実用展開する。これまでの成果として、公知データベースを含む遺伝子発現データから宿主微生物が受けるストレス関連遺伝子群の選定、発酵槽培養のボトルネックに関連する培養条件の探索、発酵槽培養時の培養パラメータならびに遺伝子発現データからの宿主微生物の状態変化点の検出技術をそれぞれ開発した。今後開発予定の技術を含め、一連の開発技術を実用課題における発酵槽培養データに適用することで、物質生産性のボトルネックとなる因子を遺伝子発現データ、培養条件、培養パラメータ等から同定し、産業用宿主のスマートセル技術構築に向けた新たな宿主改変候補因子を提案可能とする。

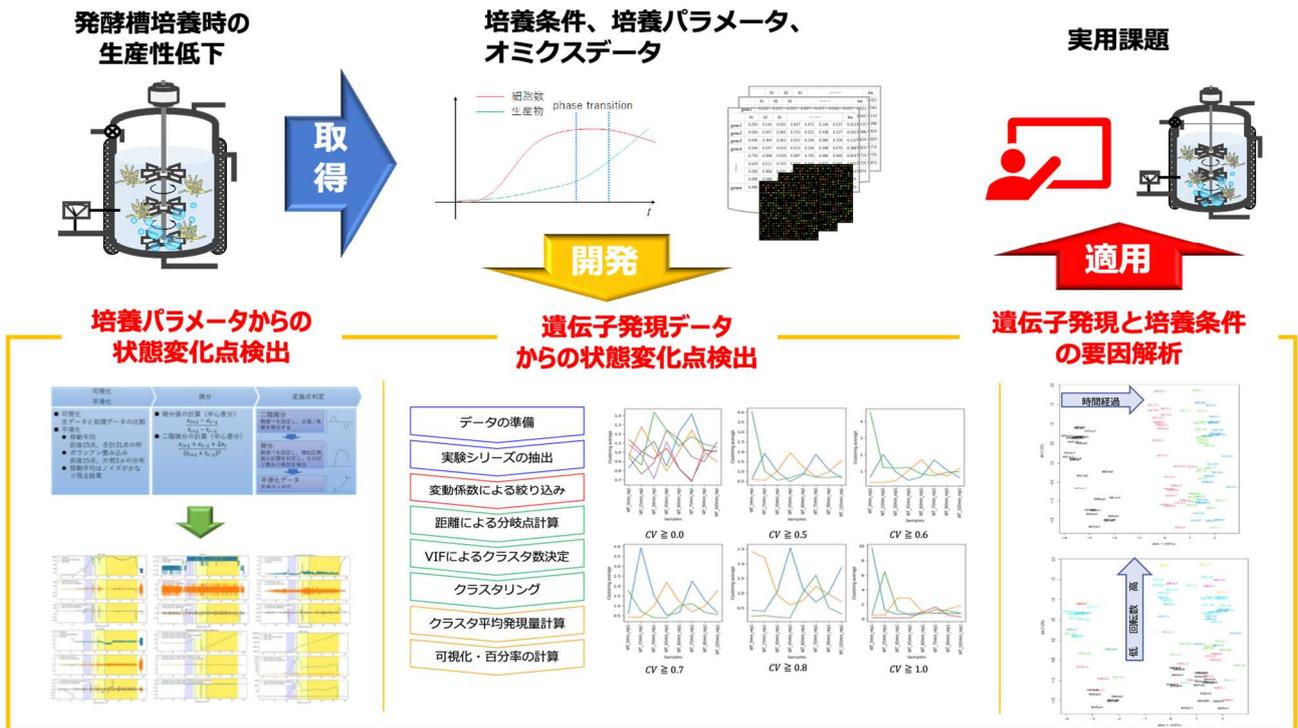


図 3.2.1.1.2.1.2-2 発酵培養槽における生産性低下因子探索に向けた開発技術

(9) 成果の最終目標の達成可能性

最終目標として、発酵槽培養における生産性低下因子と、生育能×生産能が最適化された収率最大化モデルを統合した情報解析手法を確立する。また、これら手法の iBMS システムへの統合を含めて検討している。2022 年度末までに 2 種以上の産業用宿主において、発酵槽培養でのスマートセル宿主構築のための遺伝子改変候補を提案し、それぞれに対応する生育能と生産能を考慮した収率最適化モデルを開発済みであり、最終目標の達成は十分に可能である。以上を達成することにより、発酵槽培養時に宿主細胞に生じている生産性低下因子を遺伝子レベルで明らかにし、発酵槽培養時にも生産性が低下しない産業用スマートセル宿主構築を 2026 年度末（プロジェクト完了時）のゴールイメージとして設定している。

(10) 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	
2020	1	0	2	0	0	0	0
2021	3	1	4	0	1	0	0
2022～ (見込、件/年)	3	0	4	0	1	0	0
PJ 期間 合計	7	1	10	0	2	0	0

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

論文等による公開を含めた開発技術の優位性を周知する。実際に改変提案した遺伝子や培養条件に関しては、課題を行った参画企業と共に特許申請などを実施する。

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2020	0	0	0
2021	0	0	0
2022～(見込、件/年)	1	0	0
PJ 期間 合計	1	0	0

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

開発した発酵槽培養時の生産性低下因子探索技術や収量最大化モデルを iBMS システムへ統合することを検討し、国内の産業界が広く利活用可能とする。各企業におけるターゲット物質の生産効率を高め産業用スマートセル構築を支援するため、技術コンサル等の事業展開を考えている。

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

開発した情報解析技術についてはノウハウとして保有し、各企業の微生物生産による事業化の支援ならびに技術コンサルへと展開する。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

各企業の微生物生産による事業化の支援、技術コンサルを実施すべく、産業スケールで想定される発酵槽培養時の生産性低下因子探索技術を開発する。そのために、生産プロセスにおける遺伝子発現データ、培養条件、培養パラメータの多岐にわたる数値データを取得し、

様々な培養特性に応じた状態変化点の検出や収量最適化モデルを開発することで汎用化を促進し、幅広い産業宿主に適用可能な技術へと展開させる。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

複数種の産業宿主を用いた実生産課題と連携し、各課題を解決することで、発酵槽培養時の生産性低下因子の探索技術の汎用化を進めている。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

産業スケールで想定される発酵槽培養時の生産性低下因子の探索技術を用いて、各企業や研究機関が保有する独自の微生物細胞の開発に個別に対応する予定である。そのために、最適な培養パラメータや時系列時点を検討することで、計測データの取得等に要する時間を削減する。各課題に対し事業形態の検討および経済性評価に必要な情報を共有し、事業化への道筋を明確化するためのサービスを提供する。

(12.5) 波及効果

微生物生産の事業化支援ならびに技術コンサルを介して、各企業や研究機関が保有する独自の宿主微生物に適用することで、各企業の産業スケールでのスマートセル設計技術の普及に繋がると考えている。

3.2.1.1.2.1.3 新規可溶化蛋白質高発現化手法の開発（東京大学、産業技術総合研究所、RITE、東北大、長岡技科大）（再委託：鹿児島大、信州大、岡山大） 研究項目 2.1.3

(1)背景と目的

酵素や機能性蛋白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、物質生産に向けた人工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。さらに、それらの蛋白質の発現量を調節できれば、代謝経路の流量（化学反応量）を考慮した物質高生産株の構築が可能となる。そのため、配列改変による蛋白質発現・機能制御法の開発が行われてきた。これまで、コドンの使用頻度に基づいて改変を行うコドン最適化法が良く用いられており、蛋白質高発現化に効果があることが知られている。例えば、本項目担当の亀田（産総研）らは、開始コドン付近の遺伝子配列を再設計することにより、蛋白質の生産量を75%の確率で増大させることに成功している（Saito Y et al., 2019, Sci. Rep.）。しかし、発現した蛋白質が不溶化・失活してしまうために、人工代謝経路が機能せず生産株の取得に失敗してしまう例が多く発生した（図 3.2.1.1.2.1.3-1）。また、ジャーファーマンターなど、大量培養時には、pH が下がるなどの最適条件とは異なる溶液条件になるため、そもそも酵素が失活しやすいという問題点が指摘されていた。そこで、2つのアプローチで対策法を開発する。

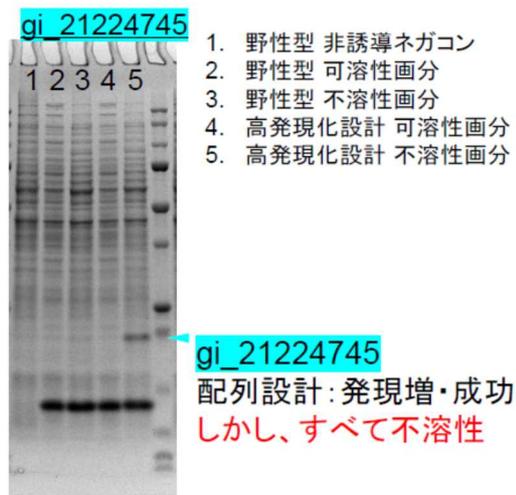


図 3.2.1.1.2.1.3-1
蛋白質高発現化設計の例

野生型では、蛋白質がほとんど発現していない
（レーン 2, 3）高発現化設計により、明確なバンド
が確認できるレベルで発現量が向上したが、ほぼ不
溶化してしまう（レーン 4, 5）

①最新の翻訳制御研究に基づいた、遺伝子改変による新規可溶化蛋白質高発現化手法の開発

例えば、これまで行われてきた蛋白質高発現化法は、使用頻度が低いコドンを頻度が高いコドンに変換する手法が用いられてきたが、最近、わざと使用頻度が低いコドン（レアコドン）を少数導入することで、蛋白質の可溶化度を高めることができ、特に蛋白質の C 末端側に導入すると効果が大きいとの報告があった（Konczal J et al., 2019, PLOS One）。また、独自データにより、可溶化蛋白質の C 末端には正電荷荷電アミノ酸が多く出現することを見出している。そこで本研究では、我々がこれまでに開発してきた遺伝子配列設計手法とレアコドン・正電荷アミノ酸導入を組み合わせることで、可溶化かつ高発現化両方を満たす配列設計法を開発を行う（図 3.2.1.1.2.1.3-2）。

特に、我々がこれまでに開発してきた高発現化手法は、遺伝子配列上流側（5'側）のみを再設計する手法であり、今回開発する可溶化手法は下流側（3'側）を設計する手法であるため、互いに組み合わせることで相乗効果が期待できる。

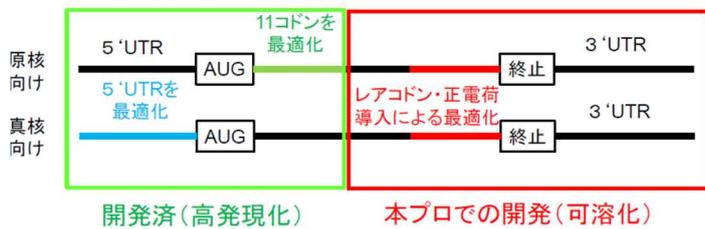


図 3.2.1.1.2.1.3-2
蛋白質高発現化手法と可溶化手法

②分子動力学シミュレーションを援用したジャー環境下での安定蛋白質変異体の開発

フラスコでの培養とは異なり、ジャーフェンターなど大規模設備での培養は、長時間行うため、対数増殖期を超え安定期に入る。すると、微生物はフラスコ培養時とは異なった状態に入る。例えば、大腸菌は安定期で有機酸を分泌するようになり、培養液が酸性になる。そのため、硫酸アンモニウムなどで液性を中性に保ちながら培養を続ける必要があるが、菌体内での pH は低いままである。そのため、フラスコ培養時には機能した人工代謝経路が、低 pH による酵素の不安定化・失活により機能しなくなるケースが良く見られる。また、微生物培養を促すための、培養槽への空気のエアリングのために、酵素が酸化され（例：メチオニン→スルホン酸化）失活してしまう事例もよく発生する。この問題は重要であり、本プロジェクトの他課題でも扱われる。具体的には、京大・荒木、理研・白井、産総研・油谷らにより、特殊な環境下でも失活しない酵素を探索し、ジャー培養時でも機能する代謝経路の構築が試みられる。また、失活するような酵素を回避した人工代謝経路の構築も試みられる。しかし、そのような酵素・代謝経路が発見できないケースも考えられる。

そこで、本課題では、これまでの手法で提案されてきた酵素を、特殊な環境下でも機能するように安定化する手法を開発する。これまで亀田らは、分子動力学（MD）シミュレーションを用いて、様々な変異体の熱安定性を調査し、耐熱性が高いと思われる変異体を予測してきた。それらを実験による合成・測定を行い、実際に熱安定性があること、活性が保たれることを確認してきた。本課題では、ジャー培養時に起こる特殊な溶媒環境（低 pH、酸化条件など）を計算機上に再現し、その環境下で多数変異体のシミュレーションを行い、ジャー環境下でも安定・失活しない変異体の探索を行う（図 3.2.1.1.2.1.3-3）。

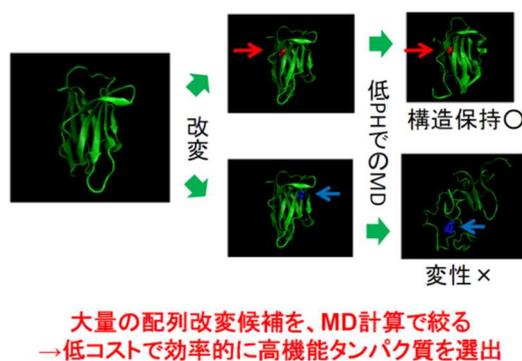


図 3.2.1.1.2.1.3-3 MD シミュレーションを援用したジャー環境下での安定蛋白質変異体探索(2) 位置づけ、目標値

(2)位置づけ、目標値

本課題で開発する可溶化法は、アミノ酸タグを付加するなど蛋白質改変を伴う設計法が主であるが、本課題では、蛋白質アミノ酸配列に変化を加えずに設計する方法を開発する。また、様々な環境下での蛋白質安定化についてはこれまで様々な研究例があるが、本課題のように、分子動力学シミュレーションに基づいて安定化配列を設計する例は数少ない。

最終年度に、産業での生産株（3種）での、蛋白質可溶化かつ高発現化を同時に満たす配列設計法を確立すること、pH変化、酸化条件など複数の条件が共存した状態で、安定に活性を持つように改変する配列設計法を確立することを目標とする。

(3)全体計画

事業項目	2020年度	2021年度				2022年度				2023年度	2024年度	2025年度	2026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					
2.1.3 「細胞内因子量制御技術開発」	→	原核生物を宿主とした難溶蛋白質発現系構築								→	ジャーでの難溶蛋白質発現可溶化			
2.1.3.1 ・新規可溶化蛋白質高発現化手法の開発		原核生物向け蛋白質可溶化配列設計法開発										→		産業株を用いた難溶蛋白質可溶化
		真核生物を宿主とした難溶蛋白質発現系構築										→		
		真核生物向け蛋白質可溶化配列設計法開発										→		
2.1.3.2 ジャー環境下での安定蛋白質変異体設計法開発	→	ジャー培養時蛋白質安定性アッセイ系構築								→	→			様々な溶媒条件下での蛋白質安定化配列設計法開発
		蛋白質安定化配列設計法開発										→		大容量ジャー培養時蛋白質安定化技術開発

本研究項目 2.1.3 では、2つの細目、2.1.3.1 新規可溶化蛋白質高発現化手法の開発、2.1.3.2 ジャー環境下での安定蛋白質変異体設計法開発、を実施する。以下に年度ごとの各項目の目標ならびに実施内容等について記載する。

研究項目 2.1.3.1 新規可溶化蛋白質高発現化手法の開発

(2020年度の目標)

- 既報の難溶蛋白質生産を再現する、原核生物宿主利用蛋白質発現系を構築する。

■ 上記システムを用い、遺伝子配列設計を行い、少なくとも1蛋白質に対する可溶化発現を検証する。

(2020年度実施内容)

■ コドン最適化を行うことで、不溶化することが知られている蛋白質について、同等の現象が生じることを再現できる蛋白質発現系を構築する。

■ 原核生物宿主に対する蛋白質可溶化遺伝子配列設計法を構築し、上記で開発した発現システムを用いた発現実験を実施する。

(2020年度成果)

■ 既報の難溶蛋白質生産を再現する、原核生物宿主利用蛋白質発現系を、大腸菌、放線菌上に構築した。

■ 原核生物宿主に対する蛋白質可溶化遺伝子配列設計法を構築し、上記発現システム（大腸菌、放線菌）を用いて、10蛋白質の発現実験を実施した。いくつかの蛋白質について、可溶化度が増大した。

(2021年度の目標)

■ 既報の難溶蛋白質生産を再現する、真核生物宿主利用蛋白質発現系を構築する。

■ 遺伝子配列設計を行い、原核生物・真核生物各宿主について少なくとも1蛋白質に対する可溶化発現を検証する。また、活性の残存も検証する。

(2021年度実施内容)

■ コドン最適化を行うことで、不溶化することが知られている蛋白質について、同等の現象が生じることを再現できる蛋白質発現系を真核生物宿主（酵母・麴菌）について、構築する。

■ 原核生物・真核生物宿主に対する蛋白質可溶化遺伝子配列設計法を構築し、上記で開発した発現システムを用いた発現実験を実施する。また、invitro系でのアッセイを行い、活性の調査を行う。

(2022年度末目標)

■ 原核生物宿主（2種）での、蛋白質可溶化かつ高発現化を同時に満たす配列設計法の確立

(2022年度実施内容)

■ 2021年に構築したシステムを用いて、複数宿主、複数蛋白質について配列設計・検証実験（可溶性・活性）を行う。

(2024年度末目標)

■ 真核生物宿主（2種）での、蛋白質可溶化かつ高発現化を同時に満たす配列設計法の確立

(2023-2024 年度実施内容) (予定)

■ 2022 年度末に確立する、蛋白質を可溶化発現できる遺伝子配列設計法を、ジャー培養での蛋白質発現系に適用し、その効果を確認する。一般に、フラスコ培養とジャー培養とで培養条件が異なることから、2022 年度時点で開発された設計法はそのままでは機能しないことが想定される。そこで、ジャー培養時でも可溶化発現できるように改良を行う。

(2026 年度末目標)

■ 産業での生産株 (3 種) での、蛋白質可溶化かつ高発現化を同時に満たす配列設計法の確立

(2025-2026 年度実施内容) (予定)

■ 2024 年度末に確立する蛋白質を可溶化発現できる遺伝子配列設計法を、大容量ジャー (>5 リットル) 培養に適用し、その効果を確認する。一般に、ジャー培養での最適条件はその容量に応じて異なることから、2024 年度時点で開発された設計法はそのままでは機能しないことが想定される。そこで、大規模ジャー培養時でも可溶化発現できるように改良を行う。

研究項目 2.1.3.2 ジャー環境下での安定蛋白質変異体設計法開発

(2020 年度の目標)

- pH など溶媒環境を一定に保った条件下で菌体を育成し、蛋白質の安定性を測定できる実験系 (ジャー培養) を構築する。
- 分子動力学シミュレーションを用いた遺伝子配列設計を行い、少なくとも 1 蛋白質に対する耐酸性変異体開発を実施する。

(2020 年度実施内容)

- 小容量ジャー (<2 リットル) を用いた蛋白質発現系を構築し、pH など溶媒条件を一定に保った条件下での蛋白質発現を行えるようにする。
- 分子動力学シミュレーションを用いた、酵素高耐酸化設計を行う。少なくとも 1 蛋白質に対して実施し、実験でその効果を検証する。

(2020 年度成果)

- 蛋白質・変性剤・水を含めた系の分子動力学シミュレーションを用いて、変性剤水溶液中での蛋白質の安定性を見積もる手法を開発し、実験値とよく相関することを確認した。
- 小容量ジャー (<2 リットル) を購入し、微生物を用いた蛋白質発現系を構築した。

(2021 年度の目標)

- 過酷な溶媒環境 (変性剤溶液など 1 条件) 中で、少なくとも 1 蛋白質に対して安定な蛋白質変異体を設計し、実験でその効果を検証する。

(2021 年度実施内容)

■ 2020 年度に開発した手法を用いて、分子動力学シミュレーションを用いた、蛋白質安定化設計を行う。少なくとも 1 蛋白質に対して実施し、実験でその効果を検証する。

(2022 年度の目標)

■ 過酷な溶媒環境（変性剤溶液など 1 条件）中で、少なくとも機能が異なる 2 蛋白質に対して安定な蛋白質変異体を設計し、実験でその効果を検証する。

(2022 年度実施内容)

■ 2020 年度に開発した手法を用いて、分子動力学シミュレーションを用いた、蛋白質安定化設計を行う。少なくとも機能が異なる 2 蛋白質に対して実施し、実験でその効果を検証する。

(2024 年度末目標)

■ 複数蛋白質（異なる性質を持つ 2 種）を、2022 年度で達成した溶媒環境以外の過酷な条件下（酸化条件、有機溶媒中など）でも、安定に活性を持つように改変する

(2023-2024 年度実施内容)（予定）

■ 分子動力学シミュレーションを用いた蛋白質安定化を行う。2022 年度に実施した条件と異なる溶媒条件下（酸化条件、有機溶媒中など）でのシミュレーションを行うことで、安定に存在できる変異体設計を行い、実験でその効果を検証する。

■ 項目 2, 3, 4 からの依頼に対応する

(2026 年度末目標)

■ 複数蛋白質（異なる性質を持つ 2 種）を、pH 変化、酸化条件など複数の条件が共存した状態で、安定に活性を持つように改変する

(2025-2026 年度実施内容)（予定）

■ 大容量ジャー (>10 リットル) では、局所的に温度、pH、溶存酸素濃度が異なり、フラスコ培養、低容量ジャー培養と比べ、さらに過酷な溶液条件になることが知られている。そこで、過酷な溶媒状況が複数組み合わせさせた条件（低 pH かつ有機溶媒存在下）に対して安定な変異体を設計する方法の構築を行い、様々な宿主を用いてその効果を検証する。

(4) 実施体制

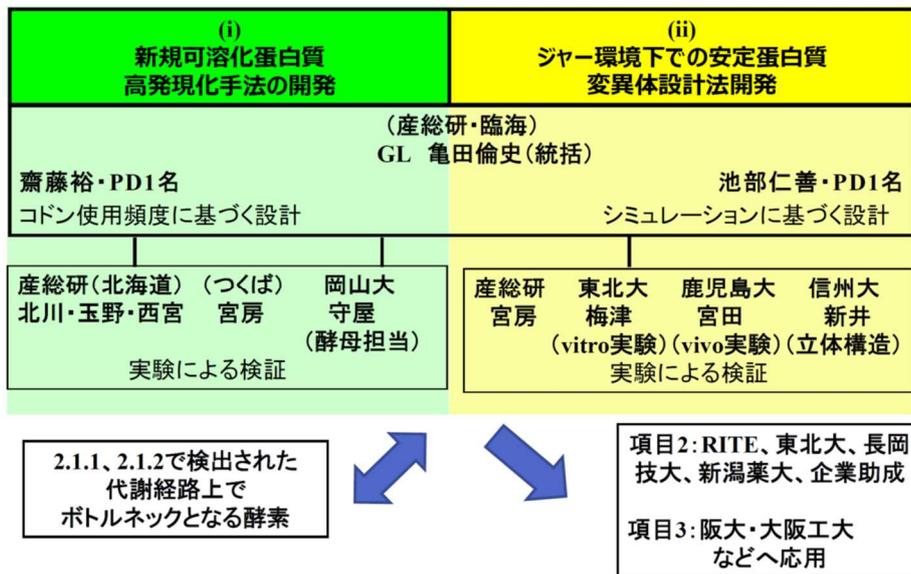


図 3.2.1.1.2.1.3-4
研究項目 3.1.3 実施体制図

(5) 運営管理

研究項目 2.1.3 に参加している実施者と、1~2 ヶ月に一度以上の頻度で会議を行い、進捗の確認並びに互いの情報共有を行っている。

(6) 実施の効果

開発した可溶化・安定化設計技術を iBMS システムへ統合し、国内の産業界が広く利活用可能な形で技術を提供する。また、産業用スマートセル構築を支援するため、各企業におけるターゲット物質の生産効率を高めるための技術コンサル事業展開等を想定している。

(7) 中間目標の達成度

活動項目 (担当)	活動内容	中間目標	達成度
i. 新規可溶化蛋白質高発現化手法の開発 (産総研)	凝集・不要化する蛋白質の DNA 配列を改変し、可溶化を試みる。	宿主 (2 種) での、蛋白質可溶化かつ高発現化を同時に満たす配列設計法の確立	設計法を様々な宿主由来の蛋白質に適用し可溶化効果を試している。現在、大腸菌・酵母での蛋白質可溶化に成功。○
ii. ジャー環	不安定化さ	ある不安定	不安定化させる環境下での安定性を推定す

<p>境下での安定蛋白質変異体設計法開発 (産総研)</p>	<p>せる環境下での安定性を推定する手法を構築し、その手法をもとに安定変異体を創出する。</p>	<p>条件下で蛋白質安定変異体を創出する。</p>	<p>る手法を構築し、実験値とよく相関することを示した。本手法を複数蛋白質に適用し、実験でその効果を確認中である。○</p>
--------------------------------	--	---------------------------	--

(8) 研究開発の成果と意義

(i) 可溶化高発現化手法の開発 (産総研) について、立体構造予測法を用いて予測された立体構造情報をもとにした、可溶化手法を構築した。図 3.2.1.1.2.1.3-5 に可溶化度が向上した例を示す。

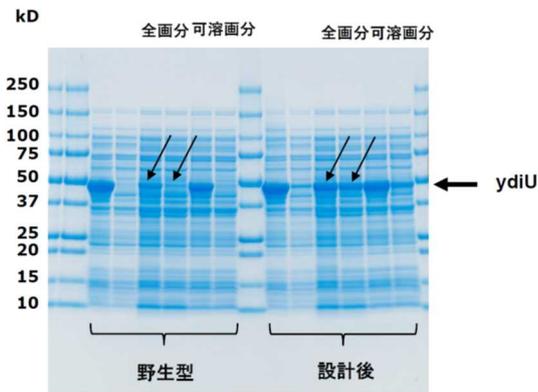


図 3.2.1.1.2.1.3-5

開発した設計法を用いて、難溶性蛋白質を可溶化した例

可溶画分増大

(ii) ジャー環境下での安定蛋白質変異体設計法開発について、変性剤変性及び参加変性環境下での蛋白質安定性を MD シミュレーションで評価する手法を開発し、実験による安定性 (自由エネルギー ΔG) とよく相関することを明らかにした。本手法を用いて、複数蛋白質の安定化設計を実施・実験で検証中である。

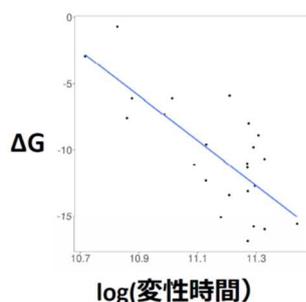


図 3.2.1.1.2.1.3-6

開発した安定性評価法。計算値 (x 軸) 実験値 (y 軸)

様々な変異体の変性剤中での安定性 (ΔG) をシミュレーションで算出する方法を開発がよく相関している。

↓
よく相関 ($r = -0.75$) 2 蛋白質で実証

(9) 成果の最終目標の達成可能性

最終目標として、現在開発中の可溶化法及び安定化法を確立する。また、これら手法の iBMS システムへの統合を行う。すでに中間評価目標値は達成するなど研究は順調に推移しており、最終目標達成は可能であると考えている。

(10) 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	
2020	0	0	0	0	0	0	0
2021	0	0	0	0	0	0	0
2022~ (見込、件/年)	2	0	2	0	0	0	0
PJ 期間 合計	2	0	2	0	0	0	0

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

開発した手法について、論文・学会展示会での講演で開発技術の優位性を周知する。可溶化・安定化に成功した蛋白質については、課題を行った参画企業と共に特許申請などを実施する。

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2020	0	0	0
2021	0	0	0
2022~(見込、件/年)	4	4	4
PJ 期間 合計	4	4	4

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

開発した可溶化法・安定化法を iBMS システムへ統合し、国内の産業界が広く利活用可能とする。また、各企業におけるターゲット物質の生産効率を高め産業用スマートセル構築を支援するため、技術コンサル等の事業展開を考えている。

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

開発した設計手法を用いて、各企業の微生物生産による事業化の支援ならびに技術コンサルへと展開する。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

各企業の微生物生産による事業化の支援、技術コンサルを実施すべく、産業スケールで想定される発酵槽培養時の可溶化法・安定化法を開発する。具体的には、ジャー環境などの大規模生産時には pH、酸化など、複数の不安定性要素が同時に存在すると考えられる。そのような状態でも可溶化・安定化する手法の開発を実施し、企業での生産時にも適用できるように改良を行う。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

複数種の産業宿主を用いた実生産課題と連携し、各課題を解決することで、設計法の有効性検証を行っている。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

現在、様々な宿主・蛋白質・培養環境で本手法が機能するか検証しているところである。中間目標値を達成するなど研究は順調に推移しており、最終年度には企業課題でも利用できる程度に改良され、実用化・事業化が可能になっているものとする。

(12.5) 波及効果

不溶化・不安定化によって、ターゲット物質としての蛋白質が利用できない事例は数多く存在する。また、物質生産のための人工代謝経路を構築した際に、不溶化・不安定化のために経路が機能しない事例も多い。そのため、本項目によりこれらが改善されればその波及効果は大変大きなものとなる。

3.2.1.1.2.2 産業用スマートセルの構築

3.2.1.1.2.2.1 脂溶性化合物生産のための油脂酵母産業用スマートセルの構築（担当機関：不二製油グループ本社株式会社 新潟薬科大学） 研究項目 2.2.3

(1) 背景と目的

現状、パーム油、大豆油が世界の植物油の7割を占めているが、プランテーション化により熱帯地域のジャングルの環境破壊につながるため、特にパーム椰子栽培が世界的に問題視されている。その一方で、2050年には100億人になると予想される人口を養うには、植物油の中で最も生産効率が高く、食品用途だけでなく、オレオケミカル用途や化石燃料に代わるBDF用途など、様々に加工され用いられているパーム油の増産が今後も求められている。このような背景の中で地球環境破壊による温暖化問題は深刻さを増しており、従来のパーム椰子プランテーションに代わる油脂生産技術が必要である。油脂酵母が生産する油脂はパーム油代替油脂としての価値があり、油脂生産性もパーム油の100倍以上高い。安価な原料に効率良く生産することができれば、熱帯地域で広大な面積を必要とするパーム椰子栽培に代わる高密度な発酵生産方法が、国内で産業化でき、海外産の植物油に頼らずに、安定的な油脂供給につながる。また、安価な原料の1つとして、非可食糖類はセルロースの糖化や生産性の高い畜糖作物の耕作放棄地の活用による栽培で供給できる。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* で、スマートセルとして遺伝子改変された油脂生産性の高い親株に、更なる改変を加え、産業用株として開発し事業化を目指す。実用化、事業化へ向けての課題として、①油脂品質の向上、②油脂生産性の向上（油脂生産速度、対糖油脂収率）、③細胞増殖性の向上（比増殖速度、細胞密度）④培養から菌体回収、油脂精製プロセスの実用的な製造工程が挙げられる。油脂生産性向上においては、オーミクス解析を行うことで得られるデータを活用した3.2.1.1.2.1培養データ駆動型細胞内ダイナミクス解析技術開発を活用し、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、脂質合成関連遺伝子発現をコントロールすることにより、パーム油に近い脂肪酸組成の改変に取り組む。実用的な製造プロセスにおいては、培養工学的アプローチを加え、培養条件の最適化、下流プロセスの最適化を目指す。

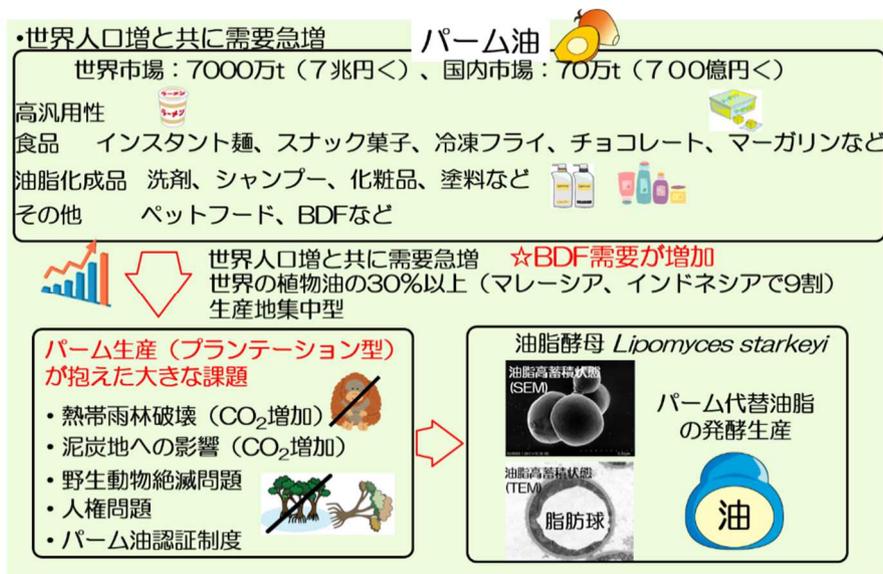


図 3.2.1.1.2.2.1-1 パーム油の現状と油脂酵母でのパーム油代替油脂の生産

- (2) 位置づけ、目標値
位置づけ

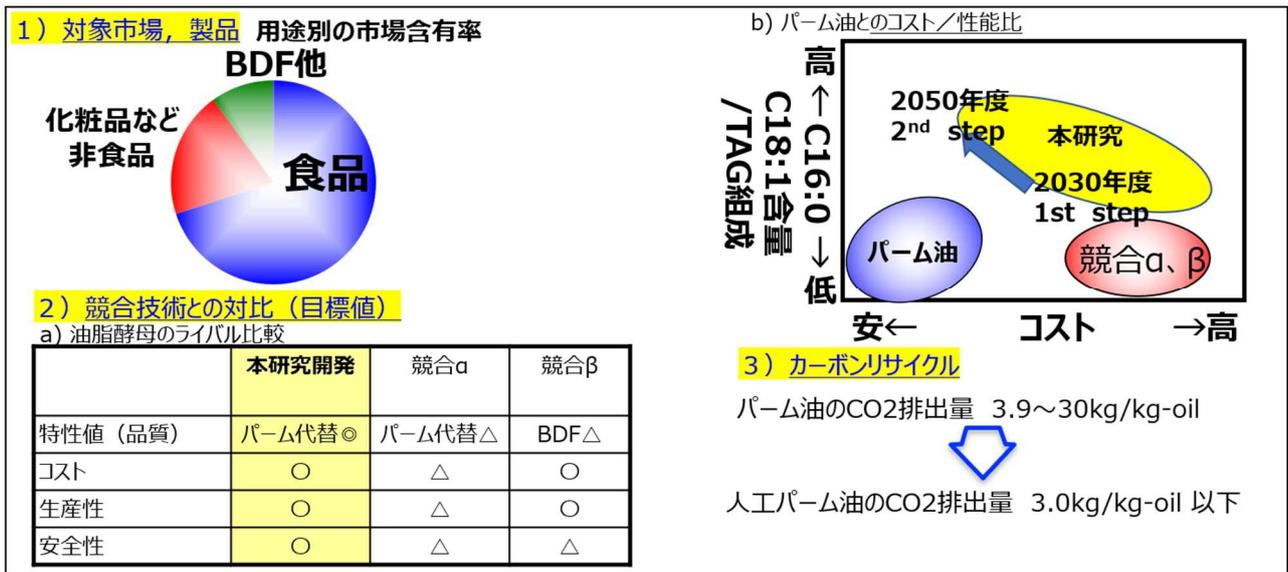


図 3.2.1.1.2.2.1-2 対象市場や競合技術との対比

対象市場、製品：パーム油代替として、今後大きな市場の伸びが期待される油脂酵母による人工パーム油生産を対象とする。当初は、高付加価値油の代替(1st Step)を目指す。次にパーム油代替となる食品用途、非食品用途(2nd Step)を目指す。環境に優しい油脂としてのブランド製品化を目指す。

競合技術との対比(目標値)：競合であるα、βの技術よりも安価で油脂特性に優れた人工パーム油を開発する。

カーボンリサイクル (環境負荷低減への貢献)：油脂酵母による人工パーム油製造は、従属栄養 (安価なC源利用) による培養生産であり、地球環境に悪影響を与えるパーム栽培よりも、トータル環境負荷が最大で90%以上削減できる。

表 3.2.1.1.2.2.1-1 中間目標値(2022)と最終目標値(2026)

項目		中間目標値(2022)	最終目標値(2026)
<p>【課題 ①】培養槽における油脂酵母の油脂生産能の向上</p>	<p>油脂蓄積変異株及び脂肪酸組成変異株の取得及びその表現型、油脂特性解析 油脂生産性向上及び脂肪酸組成改変に関与する遺伝子の同定 油脂生産性、対糖油脂収率の向上</p>	Jar 培養で油脂の生産性低下を引き起こす原因特定と改善を1つ	Jar 培養で油脂の生産性低下を引き起こす原因特定と改善を1つ
		油脂生産性（油脂生産速度、対糖油脂収率）を向上させる因子1つ	油脂生産性（油脂生産速度、対糖油脂収率）を向上させる因子1つ
		油脂生産性 70g/ℓ/6日	油脂生産性 100g/ℓ/4日
		対糖油脂数率：20% (油脂変換率)	対糖油脂収率：25% (油脂変換率)
		油脂中のオレイン酸組成 50%以上の油脂生産（達成済み）	—
<p>【課題 ②】産業培養条件下におけるパーム代替油脂の高生産</p>	<p>実用的な Jar 培養にて細胞密度、油脂生産性の向上 菌体回収、油脂抽出、油脂精製の改善(下流プロセス)</p>	Jar 培養で上記の油脂生産性、対糖油脂収率達成	実用的な Jar 培養で上記の油脂生産性、対糖油脂収率達成
		<ul style="list-style-type: none"> ・課題①改変株での細胞増殖を向上させる培地組成の特定と改良、増殖期の短縮に向けて、前培養での細胞密度向上、流加培養条件の最適化 ・油脂回収・精製条件の簡略化 	<ul style="list-style-type: none"> ・課題①改変株での流加培養にて、実用時の想定される生育低下や生産性の課題をクリアし実用的な製造工程を確立させる。C源の効率的利用、5ℓJar⇒30ℓJarのスケールアップによる培養データ収集により、バイオファウンドリでの実証試験につなげる ・下流プロセス（菌体回収、油脂精製など）条件の最適化、油脂の各産業用途での評価による製造工程評価

(3) 全体計画

表 3.2.1.1.2.2.1-2 全体計画表

研究項目	2020年度	2021年度				2022年度				2023年度	2024年度	2025年度	2026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				
2.2.3 脂溶性化合物生産のための産業用油脂酵母産業用スマートセル構築 ・培養槽における油脂酵母の油脂生産能の向上													
		スマセル株を親株とした油脂生産高油脂生産性向上因子のスマセル株蓄積株の取得と原因遺伝子の同定への活用と機能解析				様々な油脂生産発酵槽培養条件時の表現型、オミクスデータ取得・解析							
・産業培養条件下におけるパーム代替油脂の高生産													
		回分発酵槽培養における油脂生産条件検討				様々な油脂生産発酵槽培養条件時の表現型、オミクスデータ取得・解析							

(4) 実施体制

【課題①】培養槽における油脂酵母の油脂生産能の向上

- i. 油脂生産性を低下させる因子の特定と改善
- ii. 油脂生産性向上、脂肪酸組成改変の育種

【課題②】産業培養条件下におけるパーム代替油脂の高生産

- i. 回分→流加培養スケールアップ工程の確立
- ii. 菌体の回収、油脂抽出、油脂精製の改善

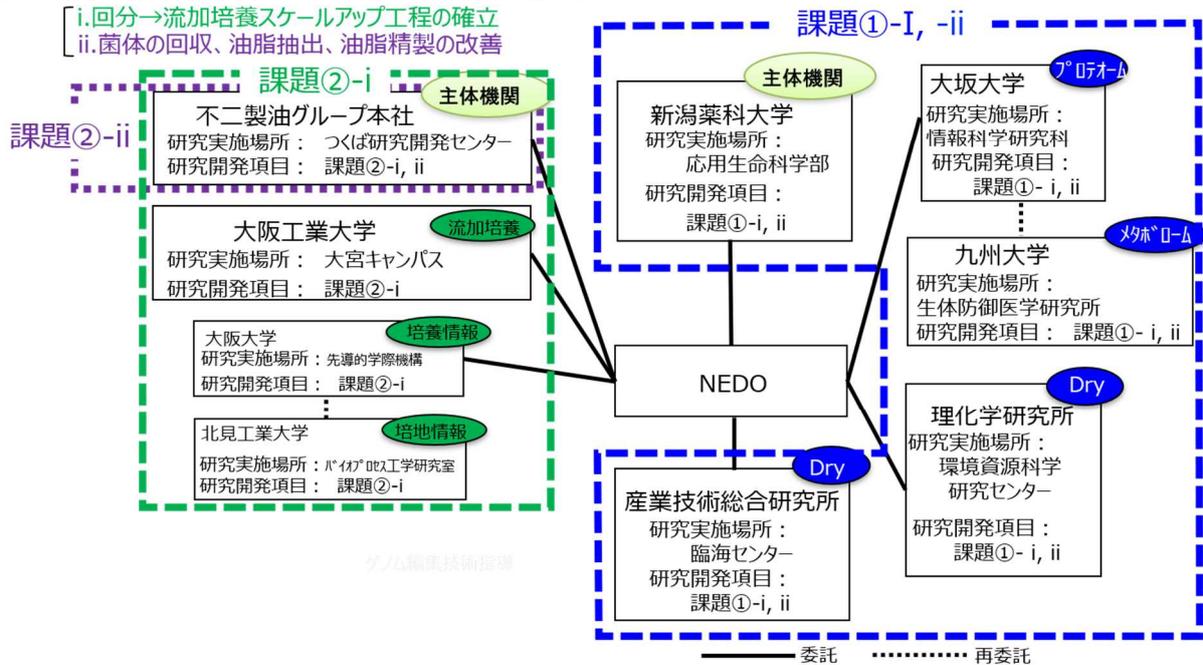


図 3.2.1.1.2.2.1-3 実施体制

(5) 運営管理

(5).1 全体会議・・・本テーマ全参画機関が参加し、半年に1回開催

20.9.11 (Web)、20.12.18 (Web)、21.6.1 (Web)、21.12.24 (ハイブリッド)、22.5.20 (ハイブリッド)

成果マネジメントプラン説明会 21.8.30 (Web)、バイオものづくりPJ テーマ代表者会議

21.11.9 (Web)、その他 バイオものづくり事業研究開発内容の確認 20.10.9 (NEDO, PL, SPL、霞が関分室)、iBMS ユースケース調査説明会 21.2.10 (Web)、研究項目 2.2.3 ご相談 21.7.26 (福岡)

(5).2 分科会・・・研究項目 2,2,3 の連携機関との会議、NEDO, PL, SPL 参加、半年に1回開催

21.4.22 (Web)、21.9.6 (Web) FBA、21.11.22 (Web)、21.12.25 培養 (大阪、ハイブリッド)、22.5.10 FBA (福岡、ハイブリッド)

(5).3 連携会議・・・他の研究項目との連携を強化するための会議

研究項目 3 との連携会議 20.11.25 (大阪)、21.1.19 (Web)、21.2.19 (Web)、21.2.26 (Web)、21.4.13 (Web)、21.12.10 (大阪)、研究項目 1 との連携会議 (リコG) 21.2.12 (Web)、

21.3.23 (Web)、21.4.5 (Web)、22.3.7 (Web)、研究項目 1 との連携会議 (京大) 21.10.15 (Web)、研究項目 2 (dryG), 3 連携会議 21.8.2 (Web)、21.8.6 (新潟)、21.12.9 (Web)、研究項目 3 連

携メタボローム、プロテオーム会議 21. 7. 27 (福岡)、21. 10. 11 (新潟)、研究項目 2 の dry 関係者会議 21. 7. 12 (札幌)、21. 7. 16 (札幌)、22. 2. 25(Web)、22. 4. 18(Web)、22. 4. 19(Web)、研究項目 4 連携会議 21. 4. 19(Web)、21. 10. 20(Web)、研究項目 3, 4, 5 連携会議 21. 10. 5(Web)、21. 10. 8(Web)、21. 10. 29(Web)、22. 3. 17(Web)、ゲノム編集技術導入会議 21. 12. 27 (Web)、バイオファウンドリ情報共有会議 (Web) 22. 1. 26 (Web)

以上のようにテーマ関連の会議を 40 回以上開催し、綿密に情報共有を行っている。

(6) 実施の効果

2030 年度以降、パーム油を含む植物油の食品用途だけでなく非食品用途の急速な需要拡大による供給不足が懸念され、植物油に代わる安定的な油脂の供給源が求められている。その油脂源として油脂酵母が生産する油脂による供給を目指す。

(7) 中間目標の達成度

表 3.2.1.1.2.2.1-3 中間目標の達成度

研究項目 2.2.3	中間目標	活動内容	達成度
培養槽における油脂酵母の油脂生産能の向上	油脂生産速度：70g/L/6日、対糖油脂収率 20% を達成に貢献する菌株の作製	<ul style="list-style-type: none"> ・油脂高蓄積変異株の取得及原因遺伝子を同定による新規油脂生産制御因子の発見と特許化、油脂生産性の向上 ・実用株として高品質オレイン酸高含有油脂生産株の作製 ・油脂発酵生産のメタボロームデータ取得と FBA 解析による油脂生産性向上のための代謝デザイン提案 ・2 種類の酵母のトランスクリプトームデータ比較による <i>L. starkeyi</i> の比増殖速度の上昇に関連する可能性の高い遺伝子群を抽出 	<p>◎；</p> <ul style="list-style-type: none"> ・油脂生産性に関与する新規遺伝子の発見並びに特許出願 ・オレイン酸含有率 50% 以油脂組成改変を達成 ・FBA による提案代謝改変により油脂生産性を向上 ・変異株解析より見出した新規油脂生産制御因子活用により油脂生産性向上
産業培養条件下におけるパーム代替油脂の高生産	上記の改変菌株を用い Jar 培養にて油脂生産速度：70g/L/6日、対糖油脂収率 20%	<ul style="list-style-type: none"> ・上記の改変株の流加培養においてモデル油脂酵母培養データ活用 (研究項目 3 連携) により、中間目標の油脂生産性を達成 ・上記の油脂生産性を、より実用的な流加培養条件 (オンライ 	<p>◎；</p> <ul style="list-style-type: none"> ・50Jar の流加培養にて 98 g/l/6 日、対糖油脂収率 20% を達成 ・目標油脂量蓄積達成へ向けた前培養での細胞の高密度化達成 (10

	を達成	<p>ングルコースセンサーによる自動流加システム、培養途中での培地抜き取りのないプロセス、)にて実施し目標の油脂生産性を確認</p> <ul style="list-style-type: none"> ・目標の油脂量蓄積達成へ向けた細胞の高密度化を前培養条件 (Jar 回分培養) の検討により達成 ・使用培地を天然培地から合成培地への変更による細胞増殖向上 ・下流プロセス (菌体回収、油脂精製) にて細胞壁破碎方法の検討による簡略化を実施 	<p>倍向上)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・使用培地の合成培地への変更による比増殖速度 3 割向上 ・下流プロセスの簡略化となる工程改善を実施し、有機溶剤不使用の回収方法 (ラボスケール) を見出した。
--	-----	---	---

(8) 研究開発の成果と意義

(8).1 油脂酵母の油脂生産能の向上

(8).1.1 油脂生産性並びに油脂品質の向上

油脂 (TAG: トリアシルグリセロール) 合成系の 10 以上の遺伝子の転写は、転写制御因子 LsSpt23p により制御されている。これまでに野生株に変異型 LsSpt23p を高発現させた株 (スマセル株) を構築し、その油脂生産性を野生株よりも約 4 倍向上させることに成功している。そこでさらに図 3.2.1.1.2.2.1-4 のように、①脂肪酸伸長反応では補酵素 NADPH が必須であることから、*L. starkeyi* の内在性 NAD 依存型 Malic enzyme (MAE1) と微生物 A 由来の NADP 依存型 Malic enzyme (MaMCE2) の置換による NADPH 供給強化を施したスマセル M 株、②TAG の脂肪酸組成においてオレイン酸含有率を高め、発酵生産油脂の高付加価値化を行ったスマセル M0 株を構築した。スマセル株に対し、スマセル M 株及びスマセル M0 株の生育速度及び最終細胞到達濃度は低下したが、細胞あたりの TAG 量は約 2 倍と大きく向上し、それに伴い培地あたりの TAG 量も約 1.5 倍向上した。また、スマセル M 株及びスマセル M0 株の対糖油脂収率は、スマセル株が 14% であったのに対し、20%まで向上した (図 3.2.1.1.2.2.1-4, 図 3.2.1.1.2.2.1-5 スマセル株、スマセル M 株、スマセル M0 株の生育及び油脂生産性)。さらに脂肪酸合成経路のパルミチン酸からステアリン酸の変換に関与する LsELO2 遺伝子を高発現させ、オレイン酸からリノール酸の変換に関与する LsFAD2 遺伝子を破壊したスマセル M0 株の脂肪酸組成のオレイン酸含有率はスマセル株の 45.6% から 58.6% まで上昇し、現行のパーム油よりも高品質の油脂生産に成功した。

スマセル株：変異型LsSpt23pを高発現
 スマセルM株：L.starkey Malic enzyme (MAE1) 破壊、
 微生物A由来Malic enzyme(MaMCE2)高発現導入
 スマセルMO株：LsELO2高発現、LsFAD2破壊

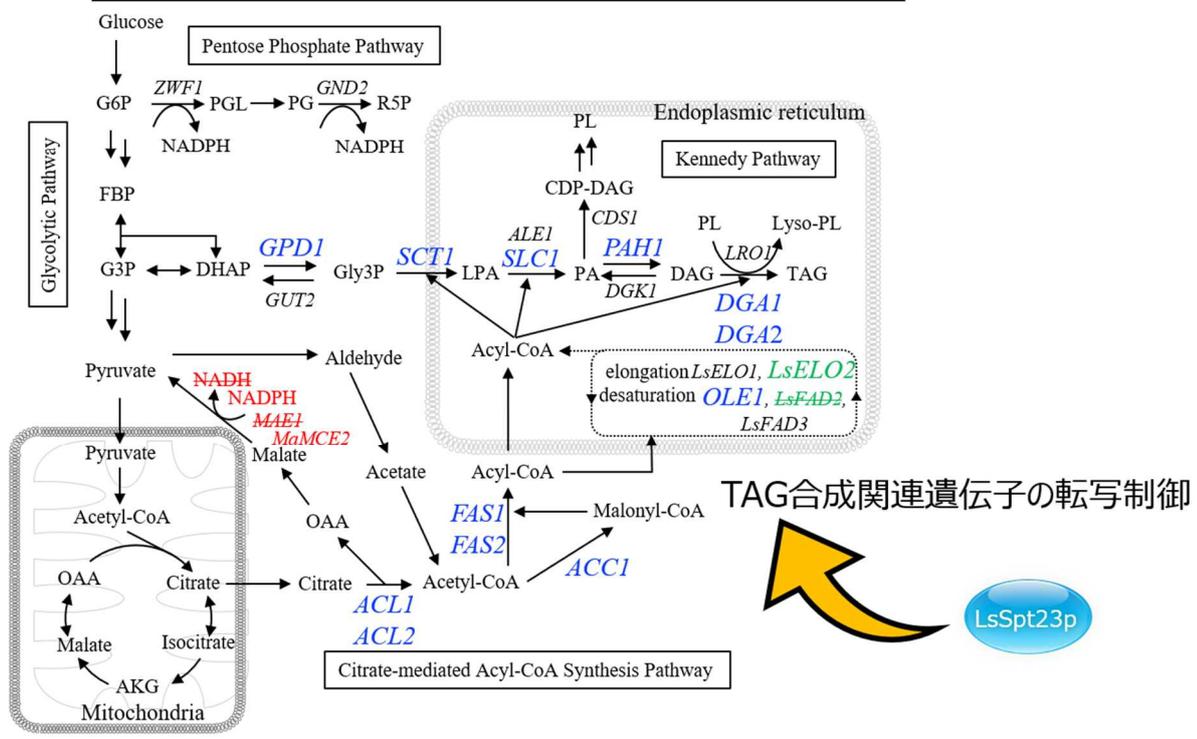


図 3. 2. 1. 1. 2. 2. 1-4 スマセル株、スマセル M 株、スマセル MO 株の代謝改変

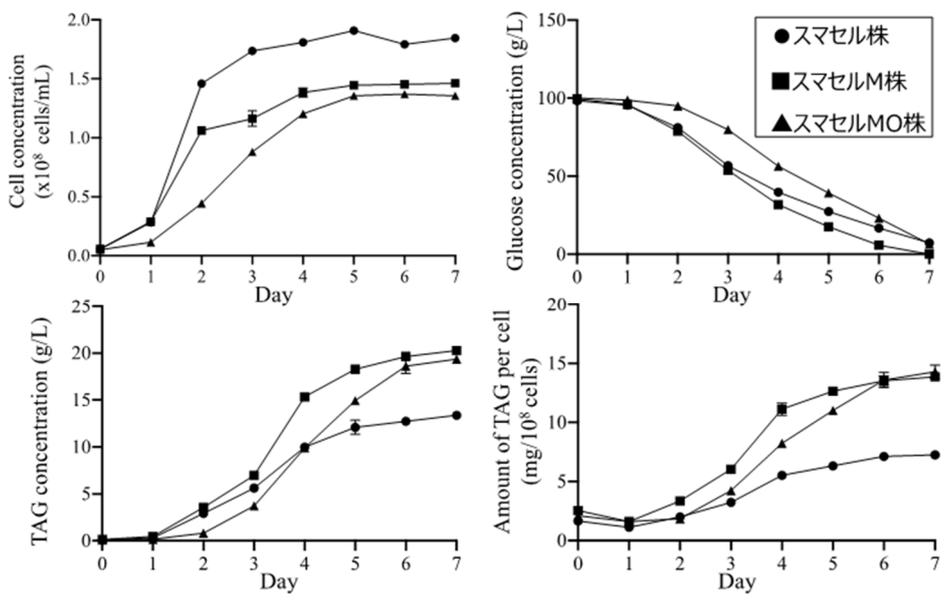


図 3. 2. 1. 1. 2. 2. 1-5 スマセル株、スマセル M 株、スマセル MO 株の生育及び油脂生産性

(8). 1. 2 油脂生産性低下に繋がる領域特定 (研究項目 2. 1. 1 の産総研/理研、研究項目 3. 1. 2 の九州大、大阪大と連携研究)

スマセル MO 株の油脂生産において、フラスコ培養から jar 培養の容量変更時に油脂生産性 (対糖油脂収率) の低下が見られた。そこで Jar によるスマセル MO 株の油脂の発酵生産を行

い、メタボロームデータを取得し、フラックスバランス解析(FBA)による代謝経路デザインを介した、油脂生産性の向上を目指した。合成培地における Jar 培養の結果、36 時間目までが生育期、36 時間以降が油脂蓄積期の 2 つの時期が見出された。経時的な変化を把握するため、12 時間ごとにサンプリングし、細胞濃度、グルコース資化量、油脂 (TAG) 量、対糖油脂収率、アンモニア態窒素 (NH₄-N) 濃度、排出二酸化炭素濃度 (図 3.2.1.1.2.2.1-6 スマセル M0 株の Jar 培養による油脂発酵生産) 及び培地中の代謝産物 (糖類、有機酸、アミノ酸、無機塩類) (図 3.2.1.1.2.2.1-7 培養液中の代謝物質解析: 研究項目 3.1.2 の九州大提供データ) を測定した。そのメタボロームデータを利用して、*L. starkeyi* のゲノムスケールを用いた代謝シミュレーション (FBA) を実施した。グルコースの取り込み速度、油脂生産速度をインプットデータとして、増殖 (バイオマス) を最大化させるように FBA 計算を行った結果、48 時間までは菌体あたりの TAG 生産は理想化されていたため、60 時間以降のギャップ解析から TAG 生産を向上させる反応を抽出し、代謝デザイン提案を行った (表 3.2.1.1.2.2.1-6 *L. starkeyi* のゲノムスケールを用いた FBA による改変提案反応: 研究項目 2.1.1 の産総研/理研提供データ)。その提案の検証の中で、提案経路の「⑤代謝経路 E」におけるイオン B の供給強化 (図 3.2.1.1.2.2.1-8 酵素 B の高発現によるイオン B 供給強化) でスマセル M 株の油脂生産性の向上が見出された。これまでに油脂生産性が最も高かったスマセル M 株に、*L. starkeyi* ゲノム上で見出された酵素 B をコードすると予想させる ID:XXX、ID:YYY 及び微生物 B 由来酵素 B をコードする遺伝子を導入し、高発現させた。その結果、スマセル M 株/ ID:XXX 及びスマセル M 株/微生物 B 由来酵素 B において、生育速度及び細胞到達濃度がスマセル M 株と比較して低下したが、細胞あたりの TAG の量は、スマセル株の約 1.8 倍向上し、それに伴い培地あたりの TAG 量は、約 1.2 倍向上し、対糖油脂収率も 1%向上した (図 3.2.1.1.2.2.1-9 スマセル M 株における酵素 B 高発現による油脂生産性への影響)。この TAG の比生産速度と対糖油脂収率を向上させる成果は、油脂の発酵生産時間の短縮化に大きく貢献すると考えられ、Jar 培養への適用を試みる。

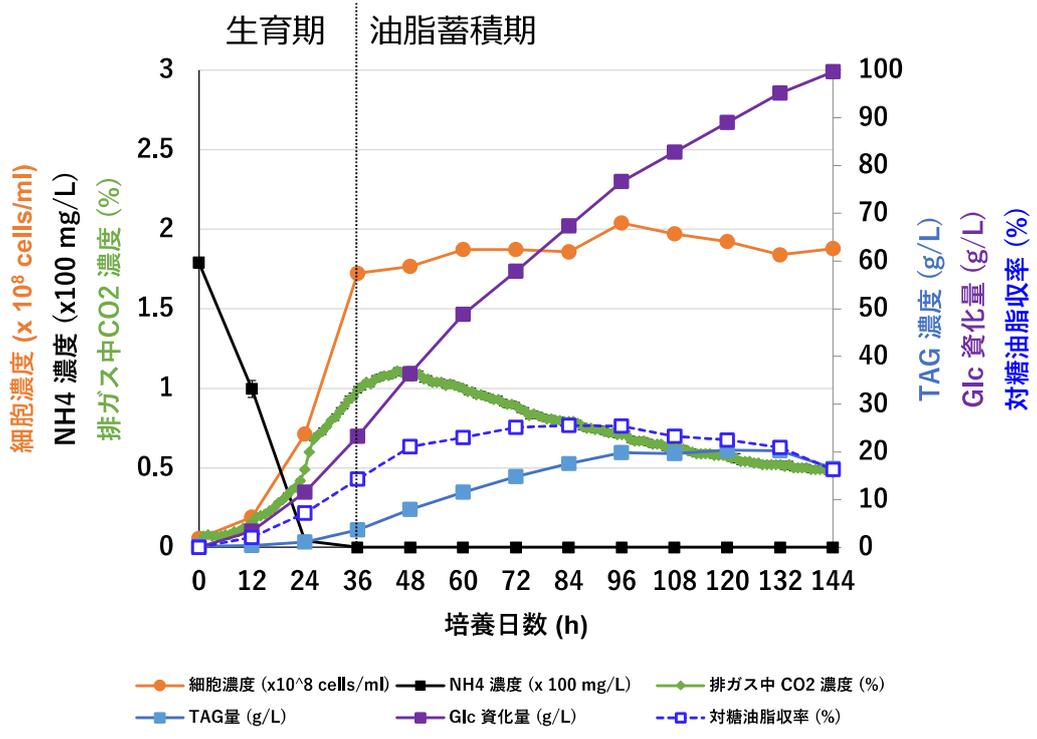


図 3. 2. 1. 1. 2. 2. 1-6 スマセル M0 株の Jar 培養による油脂発酵生産

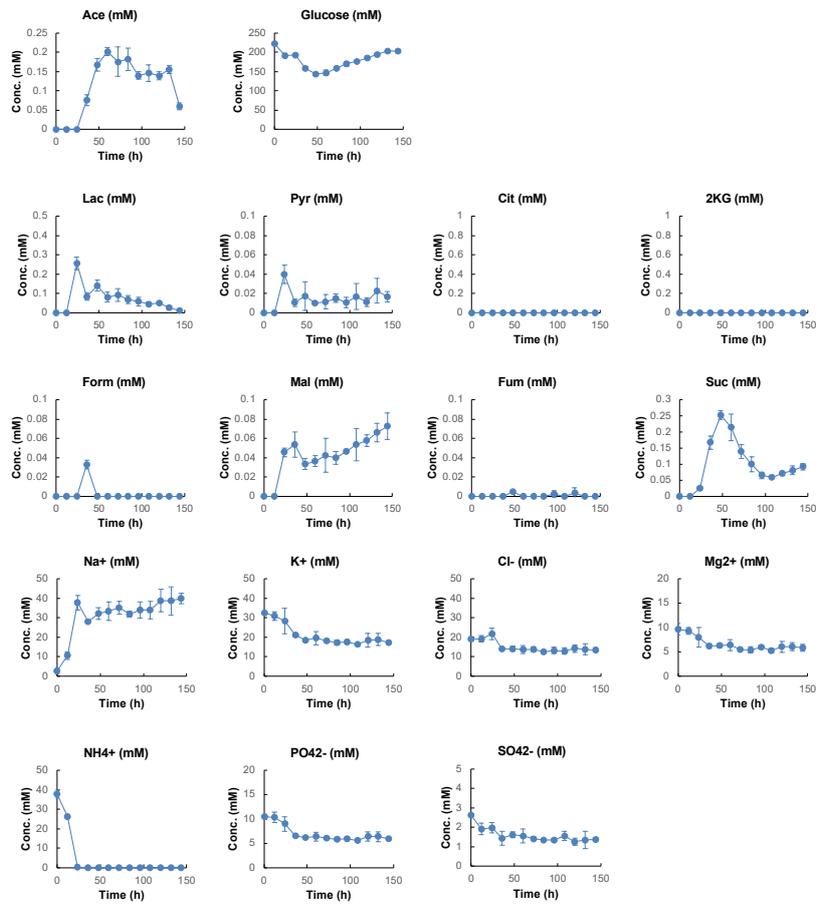


図 3. 2. 1. 1. 2. 2. 1-7 培養液中の代謝物質解析

表 3.2.1.1.2.2.1-4 *L. starkeyi* のゲノムスケールを用いた FBA による改変提案反応

代謝改変デザイン案	
反応の弱化	
1.	代謝経路A
2.	代謝経路B
3.	代謝経路C

反応の強化	
4.	代謝経路D
5.	代謝経路E
6.	代謝経路F

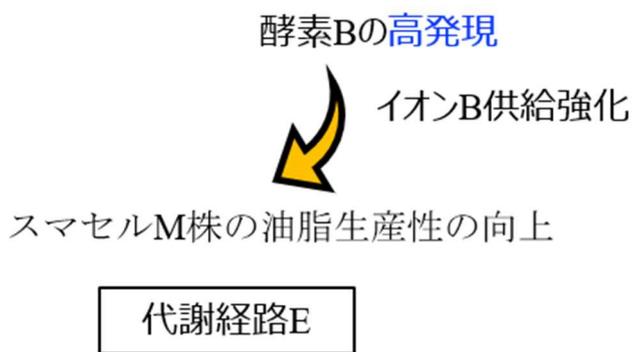


図 3.2.1.1.2.2.1-8 酵素 B の高発現によるイオン B 供給強化

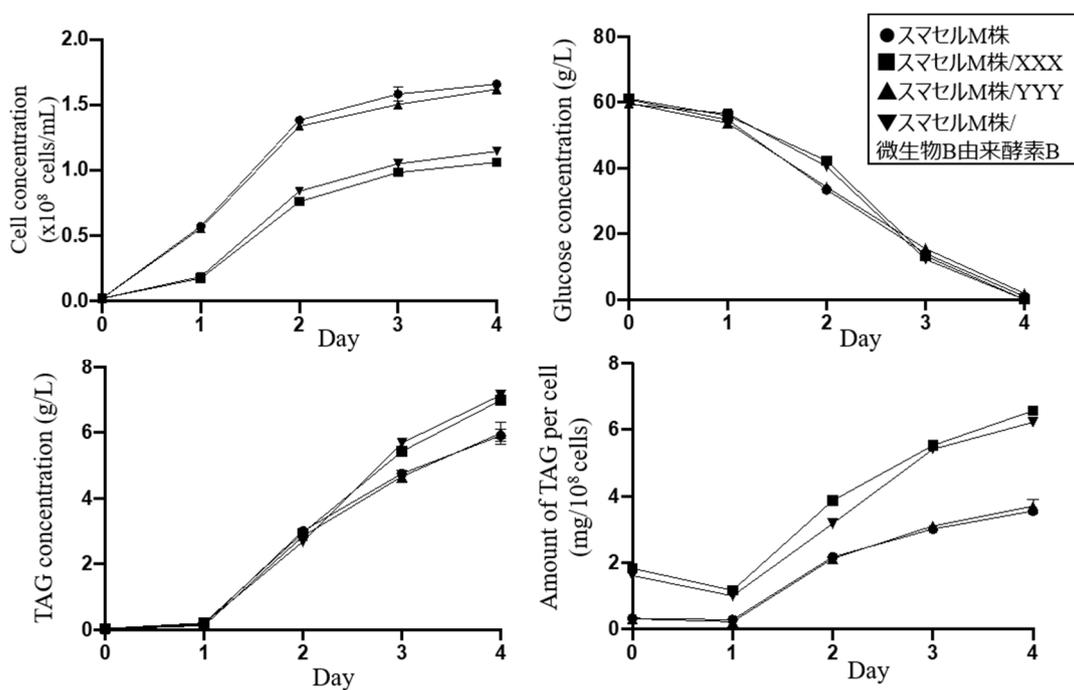


図 3.2.1.1.2.2.1-9 スマセル M 株における酵素 B 高発現による油脂生産性への影響

(8). 1.3 油脂生産性が向上した新規油脂高蓄積変異株取得

油脂合成系の転写制御因子 LsSpt23p の変異型 zzz 遺伝子置換株 (Mzzz) を親株として、突然変異導入を試み、新たに油脂生産性が向上した新規油脂高蓄積変異株取得 (Mzzz-a) を取得した (図 3.2.1.1.2.2.1-10 新規油脂高蓄積変異株の油脂生産性向上)。親株と変異株のゲノム比較解析により抽出された遺伝子を調査し、Mzzz-a の油脂生産性を向上させた原因遺伝子 ZZZ を同定した。また、ZZZ 遺伝子へのナンセンス変異の導入が油脂生産性向上の原因であることを明らかにした (図 3.2.1.1.2.2.1-11 油脂生産性を向上させる遺伝子 ZZZ の同定)。本成果は、油脂生産性を向上させる重要な因子であることから知財化 (特願 2022- 24585 「油脂酵母の油脂生産制御因子」 令和 4 年 2 月 21 日) に繋げた。遺伝子 ZZZ と油脂生産性の関連性を明らかにすると共に、スマセル M0 株に変異型 ZZZ 遺伝子を活用した新たなスマセル M0 株を構築し、Jar 培養による油脂生産性を検証する。

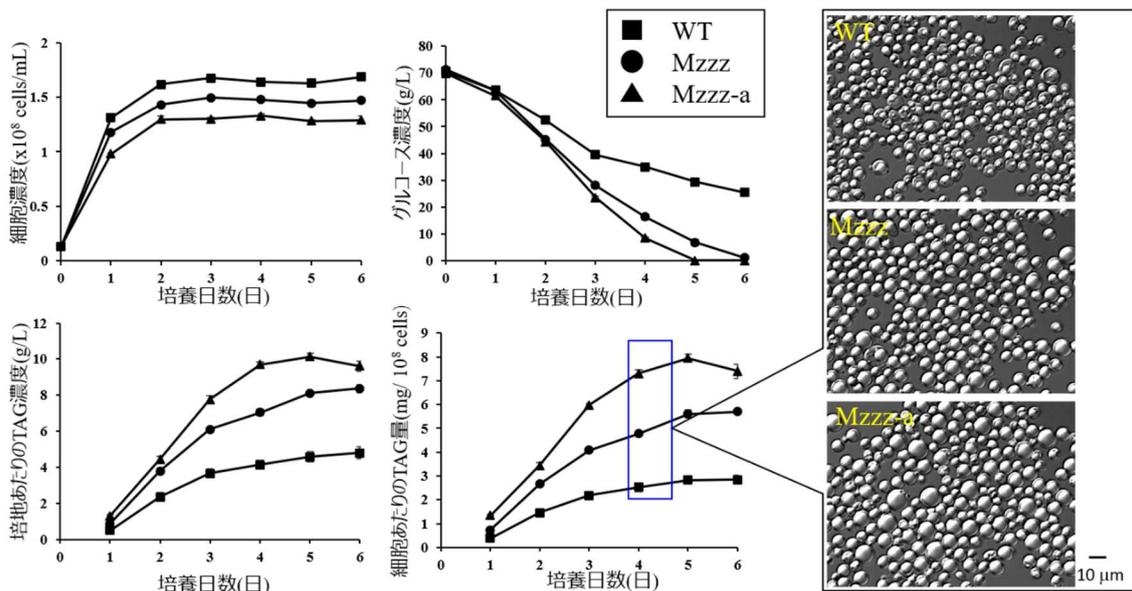


図 3.2.1.1.2.2.1-10 新規油脂高蓄積変異株の油脂生産性向上

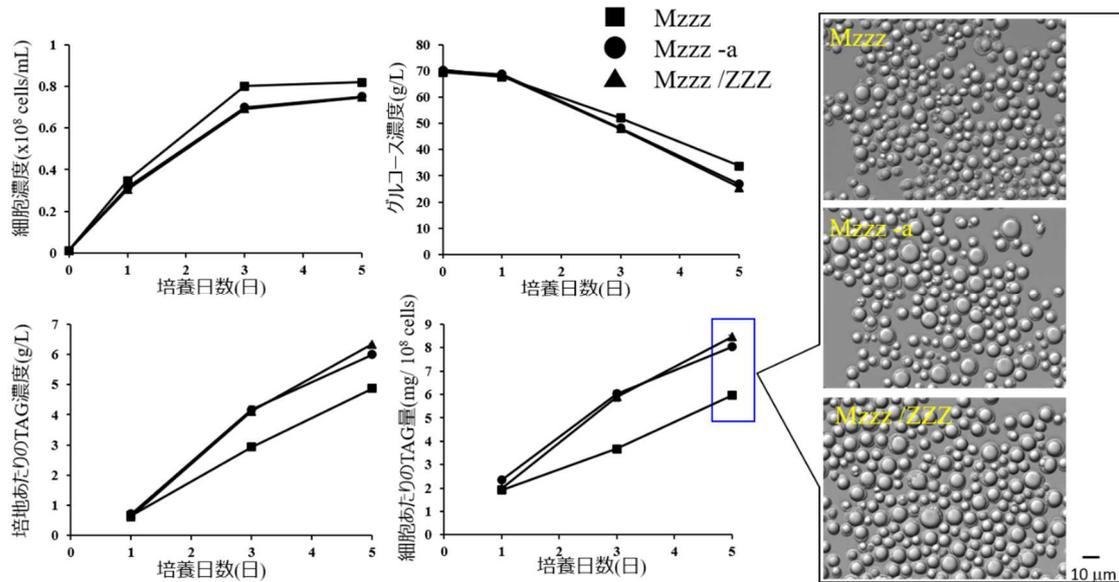


図 3.2.1.1.2.2.1-11 油脂生産性を向上させる遺伝子 110315 の同定

(8).1.4 油脂酵母の比増殖速度の向上 (研究項目 2.1.1 の産総研と連携研究)

スマセル M0 株の油脂生産において、目標値である 70g/l/6 日の油脂を生産させるためには、ある一定以上の細胞濃度が必要になる。その細胞濃度に到達するまでの時間は、決められた期間における目標値までの油脂生産に大きな影響を与える。すなわち、細胞の増殖速度の向上は、この生育時間の短縮、油脂の発酵生産時間の短縮に繋がる。油脂酵母 *L. starkeyi* は、産業用として活用実績のある *Saccharomyces cerevisiae* と比較しても、その増殖速度は非常に遅い (図 3.2.1.1.2.2.1-12 酵母 *S. cerevisiae* と油脂酵母 *L. starkeyi* の比増殖速度の比較)。そこで *L. starkeyi* の増殖速度向上のため、比増殖速度の大きい酵母 *S. cerevisiae* と油脂酵母 *L. starkeyi* の Jar 培養における増殖時におけるトランスクリプトームデータを取得した。*L. starkeyi* の比増殖速度の上昇に関連する可能性の高い遺伝子群として、2 種のオーソログ遺伝子を対象に、*S. cerevisiae* での時系列上での遺伝子発現パターンと比較して発現レベルの上昇が遅れているものを抽出した。抽出遺伝子改変を *L. starkeyi* に施し、比増殖速度の向上を検証する。

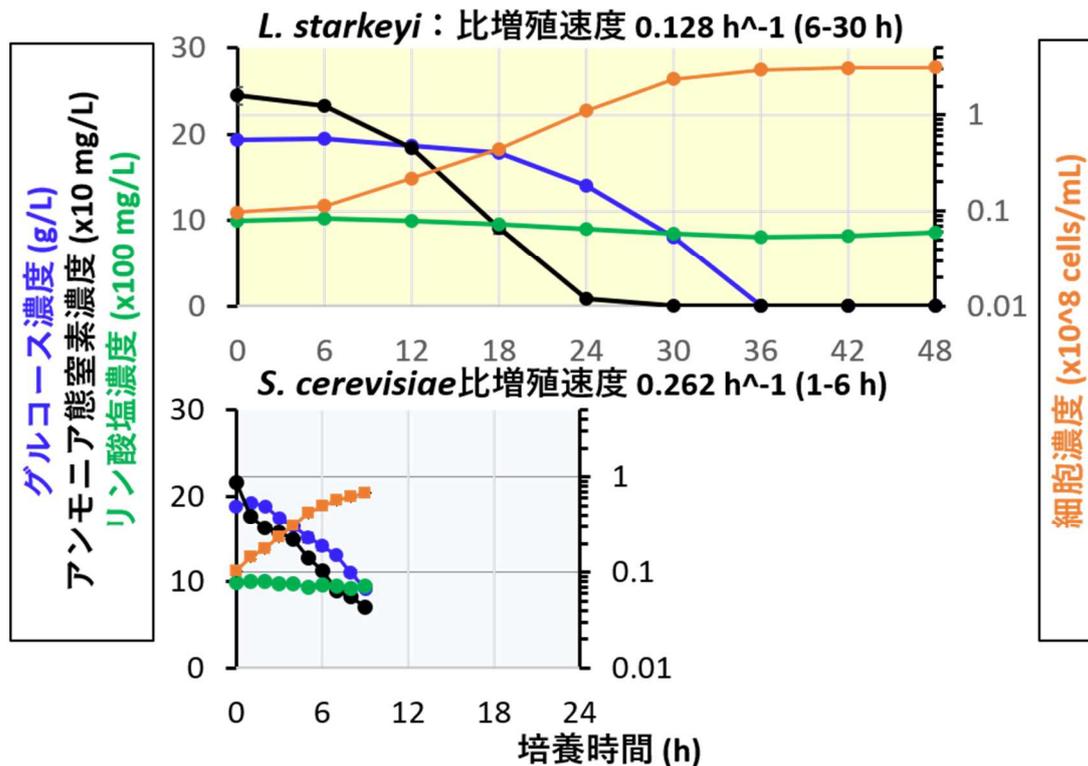


図 3.2.1.1.2.2.1-12 酵母 *S. cerevisiae* と 油脂酵母 *L. starkeyi* の比増殖速度の比較

(8).2 パーム代替油脂の高生産 (培養)

(8).2.1 培地の検討 (研究項目 3.1.3 の北見工大と連携研究)

合成培地は、増殖も Glc (グルコース) + CSL (コーンステープリカー) 培地よりも良好 (表 3.2.1.1.2.2.1-5 合成培地と他の培地での比増殖速度の比較)。合成培地と他の培地での比増殖速度の比較で、増殖に必要な培地成分の特定も容易になるメリットがある。合成培地において、スマセル株の細胞増殖に必要な成分、油脂蓄積に必要な成分の特定を進めており、Jar 培養における油脂の発酵生産の状況に合わせた培地組成を構築する。

表 3.2.1.1.2.2.1-5 合成培地と他の培地での比増殖速度の比較

	10 % Glc+yeast extract	15 % Glc+CSL*	合成培地
菌株	スマセル株	スマセルM株	スマセルMO株
比増殖速度	0.075 h ⁻¹	0.066 h ⁻¹	0.104 h ⁻¹

* CSL = コーンステープリカー

(8).2.2 流加培養条件の検討 (研究項目 3.1.1 の大阪大、大阪工大と連携研究)

昨年度実施した回分培養 (フラスコ) から流加培養 (50-Jar) に変更し、油脂生産能の向上を目指した。Jar 流加培養を行うにあたって、Jar の取り扱いを含めた流加培養法の習得を行うために研究項目 3 の連携先である大阪工大での技術研修を受けた。また、スマセル MO 株の Jar 流加培養を行うにあたって、大阪大が実施した野生株の Jar 高密度培養条件 (油脂生産量 63 g/l/8 日、対糖油脂収率 12%) を適用して油脂生産性の評価を試みた。その結果、昨年

末には 75 g/l/6 日、対糖油脂収率 21% 到達 (2021 年度目標 40 g/l/6 日、対糖油脂収率 15%) を達成し、2022 年度の目標値である 70 g/l/6 日、対糖油脂収率 20% も達成することに成功した。一方、実施した培養条件では Jar の容量を上回る基質の流加を行っているが、設定した培養時間で培地を抜き取る半連続培養系の形をとっているため、培地コストが高くなるといったデメリットが予想された。そこで、全体の培養ボリュームを見直し、培養中の培地抜き取りの必要が生じない培養プロセスを設定し油脂生産性の評価を試みた。また、培養中の糖濃度制御方法をオンライングルコースセンサーによる自動流加システムに切り替えることにより、流加制御の簡略化を図った。その結果、98 g/l/6 日、対糖油脂収率 20% の達成に成功した (図 3.2.1.1.2.2.1-13 50-Jar を用いた流加培養による油脂生産)。今後は、さらに最終目標値 (100 g/l/4 日、対糖油脂収率 25%) の達成に向け、流加条件の最適化、前培養の高密度化による初発細胞濃度の向上、(8).1 の新たなスマセル株の活用などの検討を行い生産油脂量の向上と培養期間の短縮を達成していく予定である。

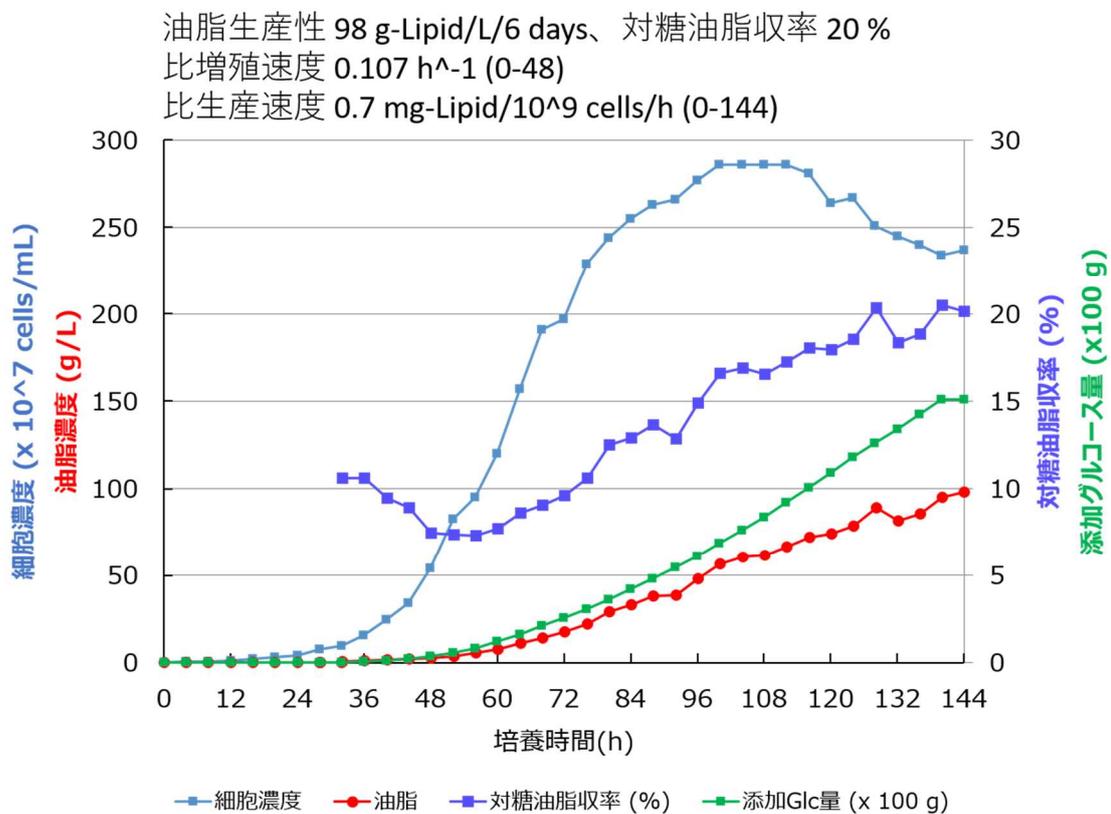


図 3.2.1.1.2.2.1-13 50-Jar を用いた流加培養による油脂生産

(8).2.3 前培養の細胞密度の検討

油脂の発酵生産において油脂生産量を向上させるためには培養期間全体に占める細胞増殖期間を短縮し、油脂生産期間を最大化させるのが理想である。そこで、初発細胞濃度の向上を目的とした前培養の細胞濃度向上を試みた。フラスコ培養では通気が制限律速となるため、培地成分濃度を検討しても最終到達細胞濃度の向上は見られなかった。そこで Jar 回分培養による検討を実施した結果、流加培養期間の短縮に必要な目標である 1.2 x 10⁹ cells/ml まで細胞

濃度を向上させることに成功した（表 3.2.1.1.2.2.1-6 前培養の高密度化検討）。今後は、培地成分の最適化による細胞密度向上のための検討を進めつつ、Jar 回分培養により調整した前培養液を用いて流加培養を実施し油脂生産性と培養時間の評価を行い、培養期間短縮の達成を目指す。

表 3.2.1.1.2.2.1-6 前培養の高密度化検討

培養容器	培地	細胞濃度
フラスコ	合成培地 2 % Glc	1 x 10 ⁸ cells/mL
フラスコ	合成培地 2 % Glc + 成分A 10 倍	3 x 10 ⁸ cells/mL
フラスコ	合成培地 10 % Glc + 成分A 10 倍	5 x 10 ⁸ cells/mL
JAR 回分	合成培地 10 % Glc + 成分A 10 倍	1.2x 10 ⁹ cells/mL

(9) 成果の最終目標の達成可能性

表 3.2.1.1.2.2.1-7 成果の最終目標達成の可能性

研究開発項目	現状	最終目標 (2026 年度末)	達成見通し
培養槽における油脂酵母の油脂生産能の向上	<ul style="list-style-type: none"> ・オレイン酸含有率 50% 以上の高品質油脂組成改変を達成 ・FBA による提案代謝改変により油脂生産性を向上 ・変異株解析より見出した新規油脂生産制御因子活用により油脂生産性向上 	<ul style="list-style-type: none"> ・Jar 培養で油脂の生産性低下を引き起こす原因特定と改善を 1 つ以上 ・油脂生産性（油脂生産速度、対糖油脂収率）、比増殖速度を向上させる因子 1 つ以上 ・原料糖の生育と油脂生産への最適なフラックスバランスの提案情報技術の開発とその実証及び活用 	<p>達成可能</p> <p>細胞増殖の比増殖速度、油脂生産の油対糖油脂収率、油脂生産速度の課題について 1 つずつ解決する。原料糖の生育と油脂生産への最適なフラックスバランス改変提案と改変技術を確立する。以上の成果を融合することにより目標は達成可能である。</p>
産業培養条件下（流加培養）における脂溶性化合物の高生産	<ul style="list-style-type: none"> ・50Jar の流加培養にて油脂生産速度：98 g/l/6 日、対糖油脂収率 20% を達成 ・目標油脂量蓄積達成へ向けた前培養で 	<ul style="list-style-type: none"> ・実用的な流加培養、スケールアップ検討にて上記の改変株で油脂生産速度：100g/l/4 日対糖油脂収率 25% の達成 	<p>達成可能</p> <p>流加培養にて 50 → 300Jar への移行、効率的な C 源利用や、細胞密度向上による油脂生産に適した実用</p>

	<p>の細胞の高密度化達成(10倍向上)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・使用培地の合成培地への変更による細胞増殖向上 ・下流プロセスの簡略化となる工程改善を実施 	<ul style="list-style-type: none"> ・想定される産業培養条件下(pH、糖化C源、流加プロセス簡略化など)にて、細胞増殖期の短縮化へ向け細胞密度の向上、増殖に必要な培地成分の特定を加え、油脂生産性を向上させる培養条件の実証及び活用 ・スケールアップ培養条件下で得られた菌体を用いた下流プロセスの工程の確立 	<p>的な培養系を確立する。</p> <p>実用的な菌体回収及び油脂精製の下流プロセスを確立する。</p> <p>以上により目標は達成可能である。</p> <p>目標達成後は、バイオファウンドリでの実証へ移行し、安全性試験、顧客評価を経て事業化を目指す。</p>
--	---	--	---

(10) 成果の普及

表 3.2.1.1.2.2.1-8 成果リスト

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	
2020	0	0	0	0	0	0	0
2021	1	0	2	0	0	0	0
2022 *1	0 (1)	0 (0)	0 (4)	0 (1)	0 (1)	0 (0)	0 (0)
2026 *2	8	1	15	3	3	2	0

*1：2022年3月末時点での実施済み件数、()内は2022年度末の予定件数

*2：2026年度末までに予定している累積件数

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

表 3.2.1.1.2.2.1-9 特許出願数

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2020	0	0	0
2021	1	0	0
2022 *1	0 (1)	0 (0)	0 (0)
2026 *2	3	1	0

*1：2022年3月末時点での出願済み件数、()内は2022年度末の予定件数

*2：2026年度末までに予定している累積件数

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

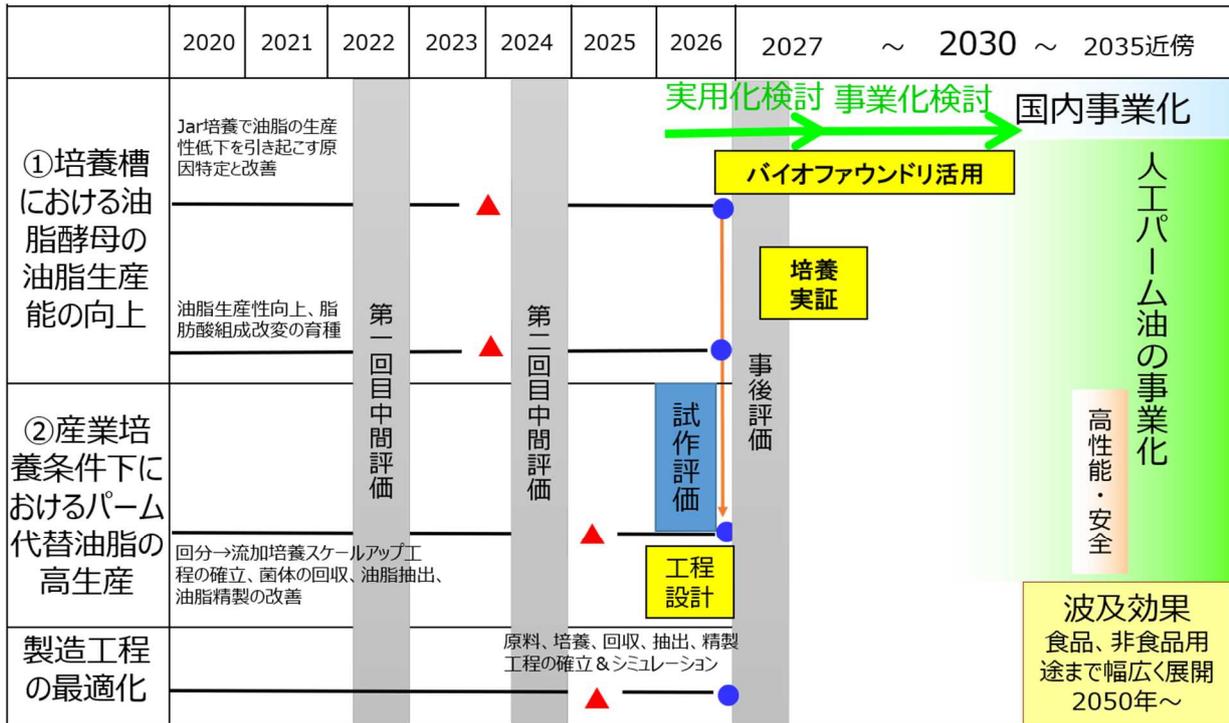
EUを中心に森林破壊につながるパーム油使用への制限・規制が年々厳しくなっており、地球環境に負荷をかけない代替の油脂源が求められている。また、他の油糧作物栽培も過剰施肥や水資源の枯渇で収量や耕作地を増やすことが困難になっており、世界的に食品用途だけでなく、化石原料代替資源として非食品用途でも急増する需要に対応することができない。一方、酵母のライバルとなる微細藻類での油脂生産では広大な面積と大量の水を必要とし、薄い濃度の菌体の回収などの費用が嵩み、なかなかコストダウンが進まず、国内生産は現実的ではない。本テーマで確立される酵母による油脂生産技術は国内生産が可能であり、工場での高密度培養により油脂が量産化できる。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

事業化当初は、持続可能な高付加価値用途での利用を推進する。また、食品用途から非食品用途まで幅広く使用できるので、用途により価格を最適化し、2050年には、微細藻類、油脂酵母などの他のライバルよりも低価格での国内供給を目指す。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

表 3.2.1.1.2.2.1-10 実用化・事業化に向けた計画表



▲：基本原理確認 ●：基本技術確立

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

実用株とスケールアップ条件が本テーマで確立できれば、次ステップとしてバイオファウンドリでの実証試験につなげる。この試験で一連の生産工程（培養、回収、精製）の各工程の製造条件を確認し、各工程を最終調整し、生産プロセスを決定する。また、生産物の安全性評価、市場での評価&顧客評価などを経て、2030年までに事業化判断を行う。

(12.5) 波及効果

本テーマで開発される技術を元にした油脂酵母による国内油脂生産システムが完成すると、カーボンニュートラルな社会が実現し、海外原料のみに頼らず国内自給率向上につながる油脂産業が構築できる。また、国内のバイオ人材の育成や雇用確保、周辺産業であるバイオ産業向け農業、工業の発展にも大きく貢献できる。

3.2.1.1.2.2.2 ポリマー原料生産のための大腸菌等産業用スマートセル構築 (UBE 株式会社、国立研究開発法人産業技術総合研究所) 研究項目 2.2.1

(1)背景と目的

ポリマー原料は主に石油から化学法で製造されているが、カーボンリサイクルの観点から、バイオマスなどの非化石資源を原料にバイオプロセスを経由するバイオベースの製法開発が近年注目され、その研究開発が活発となっている。しかしながら、同製法におけるポリマー原料の生産性は一般的に低く、また製造コストが高いなどの課題もあり、実用化レベルには至っていない技術開発事例が多い。

本技術開発では、バイオマスを起源とする化合物を原料に、ポリマー原料を生産可能とする大腸菌等のスマートセル（以下、スマセルと略す）及び培養技術を構築すると共に、分離精製も含め構築した技術について実証試験及び生産物の品質評価を行い、石油化学法の代替として同技術の実用化可能性を検証する。また、iBMS 基盤技術テーマへの情報やデータの提供、基盤技術の有効性検証を通じて、同技術の確立やその社会普及に貢献することを目的とする。

(2)位置づけ、目標値

将来的に市場拡大が期待される石油由来品と同等の特性を有するポリマー原料を対象に、そのバイオベース製造技術について調査した結果、低生産性の問題を克服する事が最優先課題であると考えられた。そこで本技術開発では、先行技術を凌駕し、更に実用化において想定する設備コストを満足する為に必要となるポリマー原料生産性を主な指標として各目標を設定した。

(中間目標 2022 年度末)

- ・先行技術より 20 倍のポリマー原料生産性を達成する
- ・有望な産業用スマセルを 1 株以上提案する
- ・培養から分離精製に至る独自の基本プロセスを 1 件以上提示する

(最終目標 2024 年度末)

- ・先行技術より 30 倍のポリマー原料生産性を示す産業用スマセルを創出する
- ・開発したポリマー原料生産スマセルを用いた生産性試験データをもとに FS を行い、LCA と基本プロセス設計を完了する

(3)全体計画

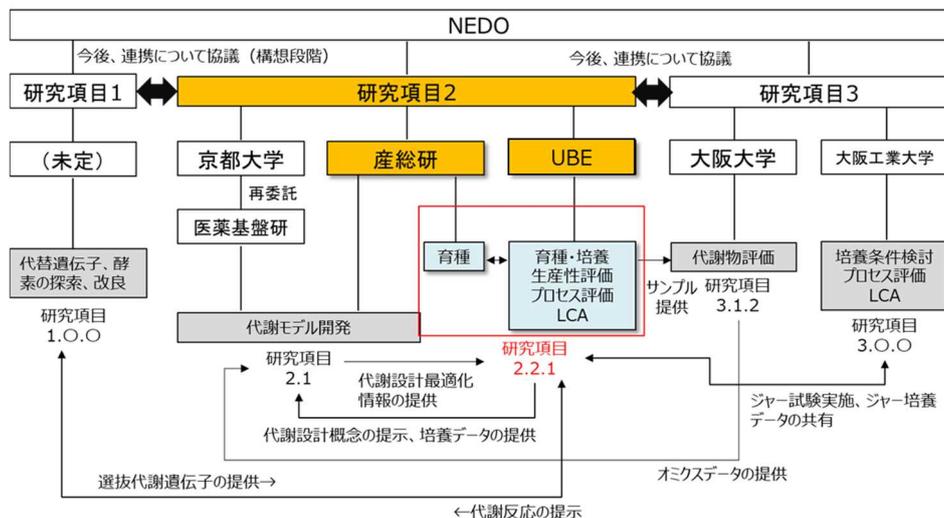
他研究項目において開発する iBMS 基盤技術の有効性検証を行うと共に、以下の手段により目標達成に向けて技術開発を行う。*2025 年度以降については、委託事業から自社開発に移行予定

- ①培養データ及びオミクスデータに基づく生産ボトルネック探索
- ②スマセル代謝設計技術及び培養データ駆動型スマセル構築技術に基づく代謝経路設計
- ③ジャースケールでの培養条件最適化、ポリマー原料生産性試験並びに分離プロセス設計

研究項目 2.2.1 ポリマー原料生産のための大腸菌等産業用スマートセル構築 (UBE、産総研)	2020年度	2021年度	2022年度	2023年度	2024年度	2025年度	2026年度
1) 主要代謝経路・輸送体等遺伝子の探索・改良 (項目 1、2 と連携)		探索・改良方法の検討		候補の探索・改良			
2) 代謝モデル開発 (項目 2.1 と連携)		スマセル代謝設計	培養データ駆動型産業用スマセル構築技術等に基づく設計				
3) ポリマー原料生産株の育種、宿主の調査		R株の作成、改良	産業用スマセル株の作成				
4) オミクス解析 (項目 3.1.2 と連携)		候補宿主・遺伝子組換え技術の調査					
5) 生産性評価、培養データ取得、ベンチ実証	R株の評価	R株などの培養データ取得	産業用スマセル株の評価、培養データ取得			ベンチ実証試験	
6) 分離精製法、品質評価、プロセス評価、LCA (一部について、項目 3 と連携)		分離精製法の検討	品質評価	分離精製法・品質評価 (継続、1次FS)	2次FS、LCA		

(4) 実施体制

2020～2021年度は、研究項目2内の連携を軸に技術開発を実施した。2022年度以降は、研究項目1や3との連携も視野に入れた技術開発を計画している。



(5) 運営管理

実務者会議を年数回開催し、技術開発の方向性確認、研究進捗の共有化、課題に対する解決策などについて議論を行った。また、PLやSPLも交えた会議の実施、全体会議への参加を通じて、プロジェクト全体方針に沿う技術開発を推進できるよう運営管理した。更にメール等によりタイムリーな実験結果の情報共有を図る事で、速やかに次のアクションを取れるよう努めた。

(6) 実施の効果

他研究項目との連携の中で、iBMS 基盤技術の一部（研究項目 2.1.1: 新規酵素探索技術）について有効性を検証するとともに、リファレンス酵素の活性を上回る新規代謝酵素の取得やポリマー原料の生産能が向上したスマセル株の開発に成功したことから、本技術の実用化に向けて更なる進展が期待できる。

(7) 中間目標の達成度

活動項目 (担当)	活動内容	中間目標 (2022 年度末)	達成度
1) ポリマー原料生産スマセル構築 (産総研、UBE)	新規酵素探索技術（研究項目 2.1.1）を利用した新規代謝遺伝子の探索	有望な産業用スマセルを 1 株以上提案する	新規代謝酵素遺伝子の導入により、先行技術のポリマー原料生産性を超えるスマセルを構築した； ○
	遺伝子発現制御技術の開発		
	大腸菌最適株の探索 (他項目と連携)		
2) 培養プロセス、代謝モデル開発 (産総研、UBE)	膜タンパク質の機能的発現を可能とする培養条件探索 (項目 2.1, 3 と連携)	先行技術より 20 倍のポリマー原料生産性を達成する	21 年度末時点で先行技術と比較して 2.4 倍のポリマー原料生産性に到達しており、更なる育種や培養及び反応プロセス改良により達成の見込み；△
	ジャー培養及びオミクスデータの取得 (項目 3 と連携)		
3) 反応プロセス、分離精製法の開発 (産総研、UBE)	菌体や基質濃度、温度の最適化、反応液組成の検討	培養から分離精製に至る独自の基本プロセスを 1 件以上提示する	反応液からポリマー原料を溶媒抽出できる事を確認済。スケールアップなど更に開発を進める事で、より詳細な検討が実施でき、基本プロセスも提示できる見込み；△
	ポリマー原料の分離法検討（溶媒の種類や処理条件など）		

(8) 研究開発の成果と意義

A) ポリマー原料生産模倣株の構築と評価手法の検討

〔背景、目的〕

他研究項目で開発する産業用スマセル構築基盤技術を用い、本研究項目で開発するポリマー原料を生産する産業用スマセルの性能を評価するためには、まず、ポリマー原料生産性に関する先行技術の検証と性能把握、および生産株の開発や生産プロセスにおける課題を抽出する必要がある。そこで、まず先行技術を模倣した株（模倣株）を構築し、目的生産物の性能評価を先行技術に準じる方法で行った。

〔方法〕

先行技術情報をもとに、一連の遺伝子について人工遺伝子を合成し、先行技術を再現する最大 8 種類の遺伝子が導入されたプラスミドベクターを構築した。プラスミドベクターは pACYC Duet-1 (Novagen、p15A ori、Cm 耐性)の抗生物質耐性を Km 耐性に変更したものおよび pUfd2 (P_{T7} を使用しない場合、pUC19 由来 colE1 ori、Amp 耐性、Cre recombinase の標的配列 loxP を付加したもの) あるいは pUFI (PT7 を使用する場合、pUfd2 に *lacI* を付加) を主に使用した。先行技術と同様、主要代謝遺伝子については、コドン利用を変更せずにそのままの塩基配列を使用した。なお、一部の主要代謝遺伝子については、先行技術と同じ塩基配列での人工遺伝子合成が困難であったため、アミノ酸を変更せずに大腸菌のコドン利用に合わせて塩基配列の改変を行ったが、それ以外の遺伝子については、すべて核酸供与体種におけるコドン利用のままとし、大腸菌での発現のために最適化を行わなかった。これらの遺伝子を最終的に pUC19 系と pACYC 系の 2 つのプラスミドベクターに集約した。これらのプラスミドを用いて大腸菌 BL21(DE3) 又は JM101 株を二重形質転換し、抗生物質による選別により模倣株のクローンを得た。

抗生物質及び 1%グルコースを添加した 15 mL LB 培地（容器は 125 mL バッフルフラスコを使用）に、模倣株の前培養液を 1/50 容量加え、30℃、180 rpm で本培養を行った。本培養開始 2 時間後、発現誘導剤の添加により各遺伝子発現の誘導を開始し、培養を 4 時間継続した。培養後に得られた培養液から遠心分離により菌体を回収し、基質を含む反応液に分散させて菌体反応を行った（全反応液容量は 0.5 mL）。得られた反応液について溶媒抽出を行い、基質から誘導される生成物を含む有機相を GC-FID で分析した。

〔結果と考察〕

先行技術によると、生産株でリコンビナントタンパク質の発現が確認されているのは 2 種の遺伝子のみであり、他の遺伝子産物がどの程度発現し、各々どのような活性を持つかというエビデンスは示されていない。実際に今回作成した模倣株のタンパク質発現を SDS-PAGE で評価した結果、バンドとして確認できたのは 1 種の遺伝子のみであった。つまり、ポリマー原料生産に必要なこれらの遺伝子は大腸菌では同時発現困難であり、これらの酵素発現量と目的生産物量の相関については不明な点が多い。したがって、本事業においてより高い生産性を持つ産業用スマセルを構築するためには、導入した外来遺伝子産物（酵素等）の発現、局在及び酵素活性を評価しつつ、生産性についても併せて評価する方法を確立する必要があると考えられる。

模倣株では中間産物を検出することはできたが、最終目的産物は検出できなかった。また、P_{T7lac} により発現誘導する代わりに、より弱いプロモーター P_{lacUV5} により発現誘導するプラスミド

を使用した株や宿主を BL21(DE3) から JM101 に変更した株でも最終目的産物は未検出であり、中間産物の量も顕著に少ない事がわかった。先行技術を模倣した結果、彼らと同等の結果は得られなかったがその理由は不明であった。目的とする産業用スマセルの開発のためには、生産性の正確な評価系確立が必要不可欠であり、その評価系確立のためには、最終目的産物の生産を確認できる株が必要であるため、次項において、株の改良を行った。

B) ポリマー原料生産株の改良（研究項目 2.1.3 と連携）

〔背景、目的〕

前項 A) の通り、先行技術の模倣株では、反応中間産物の生産は確認できたが、他のポリマー原料への変換は確認できなかった。その原因として、主要代謝遺伝子に由来するリコンビナントタンパク質の発現量に問題があるのではないかと考えた。

研究項目 2.1.3 では、mRNA 上の翻訳開始メチオニン残基に対応する塩基配列の前後に存在する二次構造を最適化することにより、翻訳効率を最適化する技術（以下、N 末端最適化技術）の開発を行っている。本技術をポリマー原料生産株における律速酵素の発現に適用することで、目的化合物の生産性向上が期待される。そこで、転写制御や翻訳制御（プロモーターの選択や遺伝子発現のための発現ユニットの構成の仕方）および遺伝子塩基配列のコドン利用の変更に加え、新たに N 末端最適化技術も適用する事で、先行技術と同じアミノ酸配列を有するリコンビナントタンパク質の発現量増加と最終目的産物の生産性向上を試みた。

〔方法〕

①強力なプロモーターの利用、②代謝遺伝子の追加導入、③発現構成の変更、④各遺伝子の ORF 全体のコドン最適化、さらに⑤N 末端最適化技術（研究項目 2.1.3）という 5 つの視点でプラスミドベクターの改良を行った。④については、最適化の目安となる Codon Adaptation Index (CAI) は、0.95 以上となるように設計した。N-end ルール（2 番目のアミノ酸が特定のものである場合、アミノペプチダーゼの標的となるためタンパク質の寿命が短くなる）に該当する遺伝子については、2 番目のアミノ酸を別のアミノ酸に置換した配列も検討した。さらに、P_{T71ac} に対する各遺伝子の最初の 33 塩基（11 アミノ酸）について、N 末端最適化技術を適用した。以上、全 46 種の配列を人工遺伝子あるいは Primer Extension 法により変異導入したものを P_{T71ac} のもとの発現するプラスミドに導入し、BL21(DE3) を形質転換後、単独遺伝子発現株を樹立した。これらの株についてタンパク質発現量を比較後、発現が良好な配列を選抜し、改良株に導入した。培養及び反応評価方法は前項 A) に記載した方法と同じであるため省略。

〔結果と考察〕

模倣株において最終産物は未検出であったが、代謝遺伝子を追加した株では最終産物が少ないながら初めて検出された（図 3.2.1.1.2.2.2-1）。しかし、模倣株で採用している転写制御では、遺伝子発現を誘導する為に 2 つの誘導剤を必要とするが、一方の誘導が強すぎると、もう一方の発現が抑制される現象が認められた。そこで、システマティックな改良を加えることで、改良株を複数作成した。評価が完了した改良株のうち、最も性能が高かったものは、プロモーターを P_{T71ac} に統一し、遺伝子構成はオペロンを利用、コドン最適化を採用した株であった。以上のよ

うに、システマティックな改良により最終目的産物を十分発現する株が得られたことで、ポリマー原料生産株の性能評価系を確立することができた。

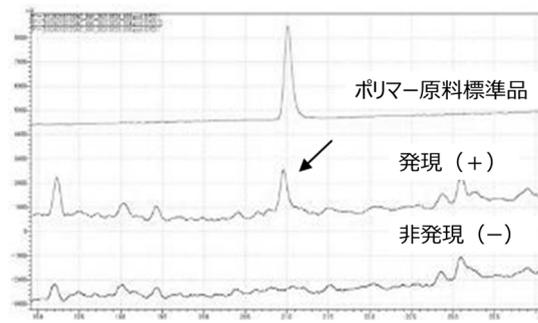


図 3.2.1.1.2.2.2-1 最終目的産物の検出 (GC-FID 分析)

C) 新規酵素探索手法の開発及び酵素スクリーニングの実施 (研究項目 2.1.1 と連携)

〔背景、目的〕

ポリマー原料の生産性を向上した産業用スマセル開発においては、先行技術で使用されている遺伝子と機能的に同等以上の新規酵素を探索し、それを利用することが必要である。ある酵素と同じ機能を持つ別の酵素遺伝子を探索する場合、一般的には BLAST 検索等の塩基あるいはアミノ酸一次配列の相同性や類似性をもとに検索を行う。しかし、同手法で探索した酵素遺伝子を利用した場合、他社の持つ権利に抵触し、事業化検討の障害となる可能性がある。根本的な解決法は、出発物質と目的生産物が同一でありながら、先行技術とは異なる代謝経路を用いて生産する方法を新たに開発することだが、本ケースでは適用困難と研究項目 2.1 により判断された。そこで、本項では、先行技術と同じ反応を触媒するが、権利範囲から外れている、同等以上の性能を有する新規酵素の探索と取得を目的とする。

研究項目 2.1.1 で開発する機械学習に基づく新規酵素探索技術は、BLAST 検索のように単なるアミノ酸配列や塩基配列の同一性や相同性に基づいてホモログ遺伝子を探索するのではなく、酵素活性のエビデンスに基づく遺伝子産物のアミノ酸配列の構造的特徴を抽出することで、配列類似性という観点では見つけることができない、同一酵素反応を触媒する未知酵素をデータベースから探索する手法を提供するものである。そこで、本項では、同技術の適用により、先行技術で用いられている酵素よりも大腸菌で発現しやすく、比活性が高い新規酵素の探索を試みた。

〔方法〕

ポリマー原料等の微生物生産において必要となる最大 9 遺伝子産物のうち、主要な代謝酵素 2 種 (代謝酵素 A 及び C) を標的とした。先行文献に基づき、これらと同じ機能を有すると考えられるリファレンス遺伝子を複数選抜後、その情報を研究項目 2.1.1 に提供し、機械学習を用いて新規酵素の検索を行った。候補遺伝子として各 10 種が提案された

得られた候補遺伝子のアミノ配列を元に、前項 B) と同様にコドン最適化後、人工遺伝子を合成した。合成 DNA を鋳型として増幅した PCR 産物を pET ベクター (代謝酵素 A 用) および pACYC ベクター (代謝酵素 C 用) に挿入し、当該候補遺伝子およびリファレンス遺伝子をそれぞれ単独で発現するためのプラスミド (代謝酵素 A 代替候補 : 9 種、代謝酵素 C 代替候補 : 13 種、コント

ロール含む、重複するものを除く)を構築した。得られたプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)に導入後、各遺伝子の単独発現株を樹立し、SDS-PAGE で酵素発現を確認した。

前項 A) 及び B) と同様に前培養・誘導・本培養を行い、菌体反応後、生成物を分析した。

[結果と考察]

最初に、代謝酵素 C 候補遺伝子の大腸菌における発現のしやすさを調べた結果、851 を除き、明瞭な酵素発現を確認できた (図 3.2.1.1.2.2.2-2)。854 および 860 は中程度の発現が認められ、その他の株では、発現そのものは十分高いものの、いずれも不溶性画分に存在した。可溶性画分にバンドが認められたのは、854, 855, 858, 861, 862, 863 であった。

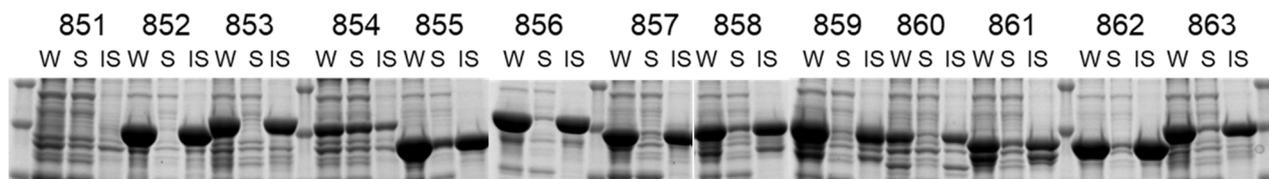


図 3.2.1.1.2.2.2-2 代謝酵素 C 代替遺伝子候補リコンビナントタンパク質の発現

次に、代謝酵素 C 候補遺伝子導入株のうち 6 種について、モデル基質に対する酵素活性を菌体反応で評価し、リファレンス酵素のものと比較した (図 3.2.1.1.2.2.2-3)。その結果、5 種について活性が認められ、そのうち 2 種 (854 及び 855) については、リファレンス酵素を発現する株 (815) と同等以上の活性を示すことが分かった。また、851 についてはバンドが確認できないほど発現量が低いにもかかわらず、活性が認められるという興味深い結果も得られた。このことは、大腸菌で発現しにくい遺伝子であっても、発現状態を改善することで菌体あたりの酵素活性を飛躍的に向上できる可能性を示唆している。

以上の通り、研究項目 2.1.1 で開発した新規酵素探索技術を利用する事で、ターゲットとする酵素反応を触媒しうる未知酵素の探索に成功した (同技術の有効性を検証)。更に、リファレンス酵素より活性の高い新規代謝酵素 C の取得に成功した。今後、活性評価を終えていない代謝酵素 C 候補遺伝子および代謝酵素 A 候補遺伝子の発現株についても評価を進め、上記探索技術の更なる検証と新規酵素の探索を継続して実施する予定である。

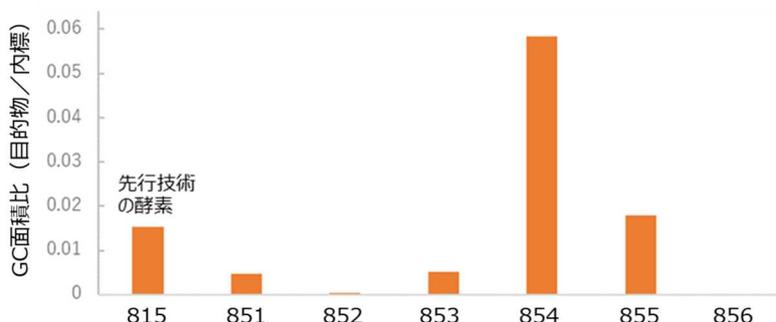


図 3.2.1.1.2.2.2-3 代謝酵素 C 代替遺伝子候補の活性評価 (菌体反応) と発現確認

D) 新規酵素を適用したポリマー原料生産株（産業用スマセル株）の構築と評価

〔背景、目的〕

前項 C) で探索した新規代謝酵素 C は、酵素単独でのモデル反応系では先行技術を凌駕すると期待されるものであった。同酵素のポリマー原料生産株への適用によるポリマー原料生産性の向上有無を検証するために、既存の代謝酵素 C を前項 C) で選抜された新規代謝酵素 C により置換したポリマー原料生産株を作成し、その評価を行った。

〔方法〕

ポリマー原料生産株の基準株に導入されている代謝酵素 C 遺伝子を、前項 C) で選抜した新規代謝酵素 C 遺伝子に置換えたポリマー原料生産株を複数作成し、その一部（3 株）について、検討 A で記載した培養条件で培養し、得られた菌体のポリマー原料生産性を前項 A) で記載した方法により評価した。

〔結果と考察〕

前項 C) に記載のモデル反応において、最も高い活性を示した新規酵素を適用した株は、先行技術のポリマー原料生産性より 1.2 倍高い値を示し、今回評価した株の中で最も生産能が高い結果となった。また、前項 C) のモデル反応における活性序列と、今回作成したポリマー原料生産株のポリマー原料生産性の序列に相関がある事も明らかとなった。以上より、今回作成した一連のポリマー原料生産株のポリマー原料生産においては、代謝酵素 C の反応が反応律速になっている可能性が示唆された。

中間産物も含めたポリマー原料生産性は先行技術より 2.4 倍高い値であり、そのうち約半数は中間産物が占めている。今後、代謝酵素 C の発現量調節、比活性の高い新規酵素又は変異体の適用などにより、最終産物の生産性が更に向上するものと考えられる。

今回の検討において、前項 A)～C) で構築した一連の宿主ベクター系、新規酵素探索手法及びポリマー原料生産性の評価手法について有効性を検証することができ、更に、基準株よりポリマー原料生産性の高いスマセル株の構築に成功した。今後、代謝酵素 C 以外の酵素についても前項 C) に記載した新規酵素探索を行い、そこで選抜した新規酵素をポリマー原料生産株に適用することで、ポリマー原料生産性の更なる向上が期待できる。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

活動項目 (担当)	活動内容	最終目標 (2024 年度末)	達成可能性
1) ポリマー原料生産スマセル構築 (産総研、UBE)	新規代謝遺伝子（電子伝達タンパク質や膜輸送体など）の探索	先行技術より 30 倍のポリマー原料生産性を示す産業用スマセルを創出する	新規代謝酵素 C の探索において有効性が確認できた新規酵素探索技術（研究項目 2.1.1）を他の新規代謝遺伝子（特に膜タンパク質）の探索に適用し、取得遺伝子を生産株に実装・発現最適化する事で、生産ポテンシャルの
	複数遺伝子の同時発現最適化、膜タ		

	ンパク質の機能的 発現と安定化		高い株の創出が期待できる。
	大腸菌最適株の探 索 (項目3と連携)		
2)培養プロセス、代謝モデル開発 (産総研、UBE)	培養スケールアップと生産性低下因子の把握 (項目2.1及び3と連携)	開発したポリマー原料生産スマセルを用いた生産性試験データをもとにFSを行い、LCAと基本プロセス設計を完了する	研究項目2.1や3と連携してポリマー原料生産株の培養スケールアップ及び培養/オミクスデータを取得/解析する事で、生産性低下因子を同定し、それに基づく生産株の合理的設計が期待できる。
	高密度培養方法の検討		
	ベンチ試験の実施 (項目3と連携)		
3)反応プロセス、分離精製法の開発 (産総研、UBE)	反応条件の最適化	開発したポリマー原料生産スマセルを用いた生産性試験データをもとにFSを行い、LCAと基本プロセス設計を完了する	最適化条件で各単位工程の物質収支データを取得する事により、精度の高いプロセス設計、FS及びLCA実施が期待できる。
	物質収支データの取得		
	ポリマー原料の分離方法(晶析、溶媒回収など)の検討、ポリマー原料の単離とその評価(純度、重合性など)		

(10) 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	
2020	0	0	0	0	0	0	0
2021	0	0	0	0	0	0	0
2022	1 (見込み)	0	1 (見込み)	0	0	0	0
PJ 期間 合計	1 (見込み)	0	1 (見込み)	0	0	0	0

(11) 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
2020	0	0	0
2021	0	0	0
2022	2 (見込み)	0	0
PJ 期間 合計	2 (見込み)	0	0

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

本委託事業で開発した技術では、ポリマー原料をバイオマスから製造する事が可能である為、同技術を自社事業に展開する事ができれば、同社で初となるバイオマスプラスチック製品の事業創出が期待できる。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

化石資源に由来するポリマー原料を本委託事業で開発した技術に由来するバイオ製品に置換えるケースを想定し、自社製造を可能とする為の特許網の構築や商業プラント設計を目指したプロセス開発を進める。製品については、自社の既存サプライチェーン活用により流通及び販売を行う。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

2024年度末の委託事業終了後、パイロット実証試験（発酵槽として数百～数千L規模）を計画しており、仮に技術開発が遅滞なく進捗した場合は、ポリマー原料を kg オーダーで販売先に対してサンプルワーク可能である。また、自社内で同サンプルから樹脂を合成し、同樹脂をサンプルワークすることも可能である。これらのサンプルワークを通して得られたユーザー評価結果を基に、特に懸念される製品中のバイオマス由来不純物の影響調査（重合性や着色、物理的特性、機械的特性、熱的特性、電気的特性）を関連する部署と連携して行う。これらの調査結果を分離精製技術開発にフィードバックし、品質を担保できるプロセス改良を追加で実施する。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

本委託事業においてターゲットとするポリマー原料の生産性に関する最終目標値を基準に、バイオ由来ポリマー原料の製造原価を概算した結果、化石資源由来品と同等の製造原価（目標製造原価）になる可能性が示唆された。iBMS 基盤技術を活用し、ポリマー原料生産に関する最終目

標を達成することで、化石資源由来と同等の製造原価でバイオ由来ポリマー原料を製造できる可能性があり、実用化・事業化の確度が高まるものと期待される。

(12.5) 波及効果

対象市場の樹脂製品のうち、約 10%を本委託事業において開発した技術で製造するポリマー原料由来品に置換えた場合、経済効果として売上約 100 億円が期待できる。

3.2.1.1.2.2.3 芳香族化合物生産のためのコリネ菌産業用スマートセル構築 (公益財団法人地球環境産業技術研究機構) 研究項目 2.2.2

(1)背景と目的

[背景]

カテコールは農薬原料、香料原料として需要の高い芳香族化合物である。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。我々は NEDO プロジェクトの成果である「スマートセル設計システム」を活用することでカテコール生産可能なコリネ菌生産株を育種した。しかし培養液中に生産したカテコールが蓄積すると生産が停止するという問題が発生した。様々な解析から、カテコールによる生産物毒性が生産停止の原因であることがわかった。実用化にあたってはこの生産物毒性を克服する技術の確立が必須である。

また、育種の手戻りを防ぎ開発期間を短縮するため標準培養条件を想定した代謝設計が必要である。つまり、既存の培養設備の仕様に対応した条件で生産可能となる生産株の育種が重要である。

[目的]

上述の背景を受け、本研究項目では標準培養条件下での発酵槽培養において、生産能・収率・生育速度等で定義される生産性の最適化および開発期間短縮を可能とする産業用スマートセル構築技術の開発と、開発した技術の適用による実用化レベルの芳香族化合物生産株構築を目指す。毒性のため生産困難な物質のバイオ生産を可能とする基盤技術の開発、データ提供と有効性検証、及び基盤技術を活用したカテコール生産実用化技術開発を行う。

(2)位置づけ、目標値

[位置づけ]

カテコールの世界市場は毎年の成長が見込まれているがこれまでバイオ生産の例はない。そのため化学合成による製造が競合技術となる。再生可能資源由来の製品としてシェア獲得を目指す。

[目標値]

工業生産に展開可能なスケールの発酵槽を用いた条件にて、実用化可能なレベルまで生産濃度を高めた産業用スマートセルを構築する。この目標値を達成するための手段は以下の通りである。

- ・プロジェクト内機関と連携し、培養時・生産時のオミクスデータを収集・提供することで各機関が開発する基盤技術の高精度化に貢献し有効性検証を実施する。
- ・基盤技術を活用してカテコールの毒性機序解明と克服技術を確立する。
- ・基盤技術を活用して最適培地選択、最適代謝設計を実施し、工学的手法と組み合わせて標準培養条件下でのカテコール生産性を最大化する。

中間目標	<ul style="list-style-type: none">・標準培養条件下でのカテコールの基盤生産条件を決定し、工業生産に展開可能なスケールの発酵槽でのカテコールの高濃度生産達成(最終目標値の 6 割)。・工業生産に展開可能なスケールの発酵槽を用いて、培養液中のカテコール
------	--

	濃度を毒性回避の基準値以下に抑える工学的培養技術を開発する。
最終目標	工業生産に展開可能なスケールの発酵槽での、実用化可能なレベルのカテコール生産濃度達成。

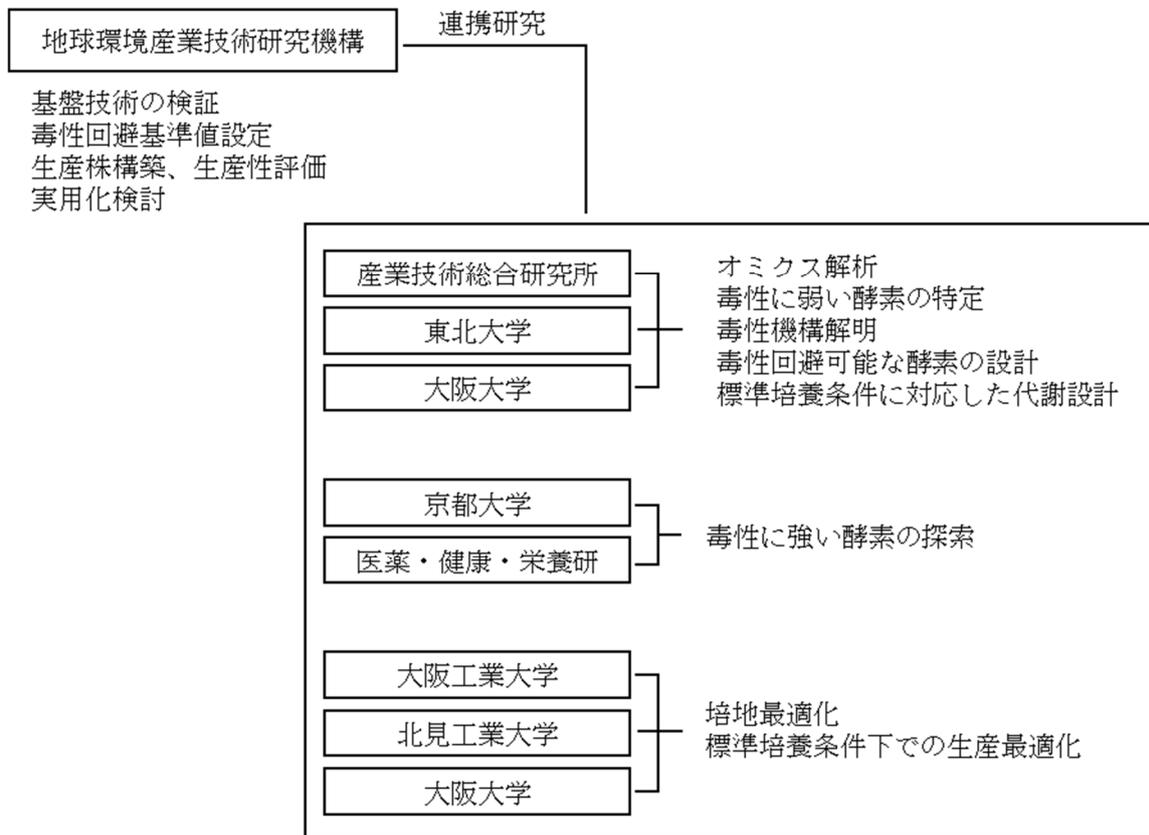
(3) 全体計画

事業項目	2020 年度	2021 年度				2022 年度				2023 年度	2024 年度	2025 年度	2026 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代謝設計と生産株構築技術の開発		テルペン系化合物生産のための コリネ菌産業用スマートセル構築 (2020 年度で終了)											
①-1 前駆体高生産株の代謝設計と実証株構築		代謝設計、生産性評価											
芳香族化合物生産のためのコリネ菌産業用スマートセル構築													
① 毒性の影響を受けない酵素、プロモータの探索、改変		野生株、生産株での培養プロファイルデータ、オミクスデータの取得・解析											
		毒性回避基準値設定											
		毒性回避可能な酵素の探索				毒性回避可能なプロモータ、配列設計の探索							
						毒性回避可能な生産株構築、生産性評価							
② 標準培養条件下で高生産可能な株構築技術開発		代謝設計を反映した生産株構築、生産性評価、1 L スケールでの生産条件設定				生産株構築、生産性評価、スケールアップ条件での生産条件設定							
						副生物等抑制、生産物劣化抑制のための代謝設計を反映した生産株構築、生産性評価							
③ 毒性回避可能な工学的培養法の確立		1 L スケールでの工学的培養技術を利用した生産性評価、条件最適化				スケールアップ条件での工学的培養技術を利用した生産性評価、条件最適化							
						標準培養条件下での最適生産条件設定							

本技術の実用化確度と産業用スマートセル創出技術開発の完成確度を上げるため、研究開発のターゲット化合物を 2021 年度からカテコールに変更した。これに伴い開発名称を「研究項目 2.2.2 テルペン系化合物生産のためのコリネ菌産業用スマートセル構築」から「研究項目 2.2.2 芳香族化合物生産のためのコリネ菌産業用スマートセル構築」に変更した。カテコールは NEDO スマートセルプロジェクトでのターゲット化合物であり生産株開発を実施してきた経緯があった。さらに同プロジェクト最終年度にカテコール生産濃度が飛躍的に向上した結果を得た。本プロ

プロジェクトでのターゲットをカテコールに変更することで毒性克服技術の確立などが可能となり、実用化確度を上げることができる。

(4) 実施体制



(5) 運営管理

- ・連携研究機関と月 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 2 回程度、プロジェクトリーダー、サブプロジェクトリーダー、NEDO および課題関係者全員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。
- ・年に 1 度、外部有識者で構成される技術推進委員会に参加し、進捗状況と研究開発成果を発表するとともに研究テーマの推進に有益な助言等を受けた。

(6) 実施の効果

生産物毒性は発酵生産分野において普遍的な課題である。本研究開発により、毒性のため生産困難な物質のバイオ生産を可能とする基盤技術が開発される。また、技術開発過程のデータを蓄積することで今後の日本のバイオ産業の強化につながる。

現在、多く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。本研究開発成果によって複数の生産困難化合物の原料を再生可能な非可食バイオマスに転換できれば環境負荷の低減、CO₂ 排出量の削減が期待できる。

(7) 中間目標の達成度

活動項目 (担当)	活動内容	中間目標	達成度
芳香族化合物 生産のための コリネ菌産業 用スマートセル 構築 (地球環境産 業技術研究機 構)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 毒性に弱い酵素の 特定 ・ 毒性機構解明検討 ・ 毒性耐性酵素探索 ・ 毒性基準値設定 ・ 培地最適化 ・ 生産条件最適化 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 標準培養条件下でのカテ コールの基盤生産条件を決 定し、工業生産に展開可能 なスケールの発酵槽でのカ テコールの高濃度生産達成 (最終目標の6割)。 ・ 工業生産に展開可能なス ケールの発酵槽を用いて、 培養液中のカテコール濃度 を毒性回避の基準値以下に 抑える工学的培養技術を開 発する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ○：既に XX g/L の生 産濃度を達成した。 本年度内に中間目標達 成可能である。 ・ ○：毒性回避基準値 を設定し、その濃度以 下に抑える技術を開発 した。

(8) 研究開発の成果と意義

本研究開発では実用化における解決すべき課題として生産物毒性を挙げ、これを解決する技術開発のために実データの取得、共有、有効性検証を行う。また、標準培養条件の下、育種とプロセス開発を並行して実施することで、実用化レベルの生産性を示す生産システムを短時間で開発できることを示す。本研究開発目標が達成されることによって生産困難物質の生産をバイオ化する技術を確認することができ、日本のバイオものづくり基盤の強化と拡大につながる。

① 毒性の影響を受けない酵素、プロモータの探索、改変（連携機関：産総研、東北大学、大阪大学、京都大学、医薬・健康・栄養研）

[生産物毒性の影響評価]

本研究開発で扱うコリネ菌 (*Corynebacterium glutamicum*) は増殖が速い、高密度培養が可能、遺伝子組換え技術が確立されているなど、物質生産の宿主菌として有利な特徴を備えている。また、我が国で発酵産業に使われてきた歴史が長い安全な菌として認知されている。本研究開発ではこれらの特徴を活かして有用化合物のバイオ生産技術開発を行う。今回の生産ターゲットはカテコールとした。しかしコリネ菌の野生株はカテコールの生産経路を有しておらず、育種が必要である。過去の NEDO プロジェクトにおいて我々はカテコール生産株の育種を実施した。その際プロジェクトの成果である「スマートセル設計システム」を活用することでカテコールを全く生産しない状態から最大約 10 g/L を生産する株の育種に成功した。この生産菌開発の過程で、さらなる生産性向上と実用化のために克服すべき課題が顕在化した。図 3.2.1.1.2.2.3-1 に示したように、培養液中のカテコール濃度が 10 g/L 程度まで高まると生産が停止することが確認された。この時グルコース消費も完全に止まっていたため、カテコールによる代謝経路への阻害効

果が表れていると考えられた。これらの結果から、カテコールのバイオ生産実用化において生産物毒性が重要な課題であることが判明した。

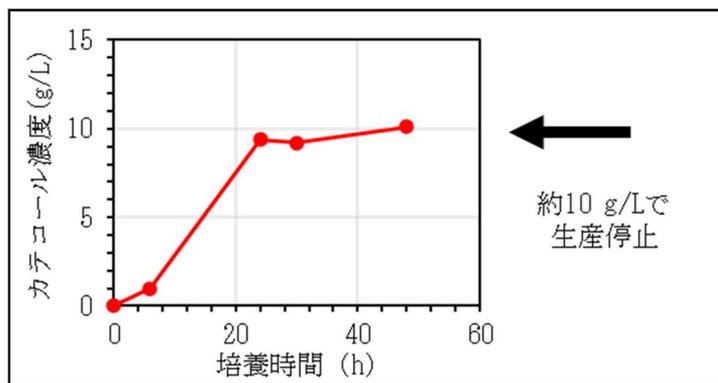


図 3.2.1.1.2.2.3-1 生産物毒性による生産停止

カテコールによる生産物毒性をさらに詳細に調べた。カテコール前駆体の生産株を育種し、生産検討時にカテコールを外添することで前駆体生産速度に差が現れるかを調べた。その結果、カテコール非添加状態に対し、カテコールを培養液に添加した条件では生産速度が明らかに低下することがわかった。この速度低下はカテコール添加濃度に依存したため、カテコールの毒性の影響であることが強く示唆された。

[毒性の作用機序解明]

カテコールによる生細胞への毒性についての知見は乏しく、まずはどのような現象が起きているかの把握が必要である。グルコース消費の停止など代謝活動の停滞が予想されるため、カテコールが酵素活性を低下させている可能性が考えられた。そのため、細胞の状態を把握するためにマルチオミクス解析を実施した。具体的にはカテコールの存在下、非存在下でコリネ菌を培養しトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム解析を行った。先行して得られたプロテオーム解析結果からは比較的低濃度のカテコールの存在によって一部の酵素の存在量が低下する結果を得た。これらの酵素を毒性克服に必要な酵素候補とした。続けて実施しているトランスクリプトーム、メタボロームの結果と合わせて候補を抽出し、より耐性の高い酵素のスクリーニングまたは改変を今後実施する。

[カテコール存在下での酵素活性測定]

オミクス解析によるカテコールに弱い酵素の絞り込みと並行して、生産代謝経路上の特に重要な酵素についてカテコール毒性の影響を受けるかどうか先行的に検討した。具体的には、カテコール生産においてキーとなる酵素 A を対象に直接活性測定を行い確認した。酵素 A を発現した検討株を準備し細胞破砕液を調製、反応基質を含んだ反応液に細胞破砕液を加え、基質の濃度変化から酵素 A の活性を測定した。反応前に細胞破砕液を様々な濃度のカテコールと共にインキュベートすることで濃度依存的なカテコールの影響を調べた。その結果、ある濃度 (B mM) のカテコールに暴露させることで酵素の失活が確認された。さらに、精製した酵素 A を用いて同様の検討を行った。こちらの結果でも同程度の濃度のカテコール暴露によって酵素は完全に失活した。

これらの結果から、酵素 A は一定濃度のカテコールの存在下で活性が顕著に低下することがわかり、カテコールが酵素に悪影響を与えることを強く示唆する結果を得た。

[カテコール毒性の作用機序予測]

カテコールが酵素 A へどのように作用するのかを理解するため詳細な検討を進めた。酵素活性検討と同様に酵素 A を精製し、失活する条件でカテコールと共にインキュベートした。このサンプルを連携機関に送付し酵素の安定性などの面からカテコールの影響を調査している。また、酵素失活の原因の 1 つは、カテコールが酵素と結合し変性を引き起こしたためであるという仮説を立てた。1 分子のカテコールが複数の部分(タンパク質内、タンパク質間)と結合した場合は架橋構造となり、1 か所のみ結合よりも酵素活性に影響を及ぼすと予想できる。今後この仮説を確認するためカテコール暴露前後のタンパク質の質量変化を分析する。仮説の通り、カテコールが酵素に結合することで活性低下を引き起こしている場合はその対策手法の開発などを行う。

[カテコールに強い酵素の探索]

カテコールに弱い酵素に対し、連携機関と協力してカテコールに強い酵素の探索を実施する。情報解析技術を利用した探索と、カテコールに強い菌のスクリーニングの両面から進める。

② 標準培養条件下で高生産可能な株構築技術開発 (連携機関：大阪工業大学、北見工業大学、大阪大学)

[モデル株]

本プロジェクトで研究項目を横断して共通で扱う生産宿主の、原核生物の候補としてコリネ菌を提案した。前述のようにコリネ菌は我が国で発酵産業に使われてきた歴史が長い。遺伝子組換えに必要なツールも揃っているためスマートセル設計システム、産業用スマートセル設計技術によりデザインされた代謝系を再現することが可能である。コリネ菌を用いた発酵生産に関わる知見を蓄積することで、バイオものづくりに新たに参入する企業に対して生産宿主としてのコリネ菌を提案可能になる。

[培地最適化・生産条件最適化]

増殖速度、到達菌体密度を指標に培地最適化および培養条件最適化検討を実施した。連携の役割分担は以下の通りである。基本となる合成培地組成を設定し、北見工業大学が AI を活用して最適な培地組成を提案する。提案をもとに大阪工業大学がコリネ菌野生株を用いてジャーファーメンターでの効果を確認する。地球環境産業技術研究機構は得られた知見をカテコール生産株に応用し、生産性向上につながるか検証する。現在、連携によって改善した培地組成と培養条件を用いることで生産株でも増殖速度が向上することを確認した。また、合成培地でも天然培地と同等の生産性を示すことを確認した。今後は最適化された培地、培養条件を用い、標準培養条件に合致した代謝設計を実施する。

③ 毒性回避可能な工学的培養法の確立

[毒性基準値設定]

カテコール毒性を克服した生産株の育種と、吸着樹脂などの工学的手法の組み合わせにより最終目標濃度のカテコール生産を達成する想定である。前述の酵素活性測定結果では、B mMのカテコールによって細胞破碎液に含まれる酵素の活性が低下した。カテコール生産株では細胞外よりも細胞内に高い濃度のカテコールが存在していることを実験的に確認している。そのため少なくとも細胞外カテコール濃度が B mM 程度でも活性を維持する酵素が必要である。また、生産速度を比較した結果では、細胞外に高濃度のカテコールが存在すると生産速度は低下したが、B mM 程度ではほとんど変わらなかった。そのため培養液中のカテコール濃度を B mM 以下に抑えることができる除去技術を開発する。このように酵素活性と工学的手法の視点から考察し、毒性基準値を両者とも B mM と設定した。つまり、培養液にカテコールが B mM 含まれる状態でも活性の低下しない酵素を選抜し、さらに培養液中のカテコール濃度を B mM 以下に抑えることができる除去技術を開発することで毒性を克服することを目指す。

[工学的手法を用いたカテコールの高濃度生産]

(本項目は非公開)

④ 追加の成果

[バイオカテコールサンプル準備]

発酵生産した培養液からカテコールを精製する技術の開発に取り組んだ。スモールスケールで精製品を得ることに成功しており、さらに大きいスケールへの適用を進めている。

[カテコール発酵生産の LCA]

2050 年カーボンニュートラルに向けた CO₂ 排出量削減効果を明確に示すため、石油原料からの生産に対して再生可能資源を原料とした場合の排出量計算を進めている。LCA 活用推進コンソーシアムが提供するインベントリデータベース IDEA を使用する。

[生産困難物質を生産可能な宿主としてのコリネ菌]

事前検討から、コリネ菌は複数の芳香族化合物に対して他の複数の微生物よりも耐性を示すことがわかっている。化合物耐性を指標とし、コリネ菌を宿主とした場合に優位性を示す化合物の網羅的調査を進める。また、オミクス解析等からなぜ強いのかの解明を目指す。

(9)成果の最終目標の達成可能性

連携機関と協力し、研究開発は順調に進んでいる。カテコールの生産性も向上しているため最終目標達成可能性は極めて高い。

(10)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	
2020	0	0	2	0	0	0	0

2021	1	1	6	0	2	1	0
2022	0	0	0	0	0	0	0
PJ 期間 合計	1	1	8	0	2	1	0

(11) 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
2020	0	0	0
2021	0	0	0
2022	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	0

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

本プロジェクトで開発した生産株、生産方法を応用して生産したバイオカテコールが化学品として上市、または既に流通している香料や農薬の原料として使用されることをいう。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

カテコールを実際に扱っている国内メーカーを協力企業とする。ターゲットとしたカテコールは毒性が極めて強いため他者はバイオでの高濃度生産不可能である。先行して生産困難物質の生産技術を確立することでバイオ市場の開拓を狙う。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

国内外企業とバイオカテコール実用化協議中である。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

最終目標に向けて着実に生産性が向上している。生産物毒性の問題を本 PJ の技術で解決することで目標達成が早まる、もしくは目標値を超える成果を達成でき、実用化が可能となる。

(12.5) 波及効果

生産困難物質を新たにバイオ化する際、RITE の開発事例を参考にすることができる。これにより開発期間の短縮ができるため新規にバイオものづくりに参入する企業が増え、バイオエコノミー社会の実現を強く推進することが可能となる。

3.2.1.1.2.2.4 M01「産業用糸状菌改良技術の開発」 研究項目 2.2.4.1

(担当機関；国立大学法人東北大学、佐竹マルチミクス株式会社、合同酒精株式会社)

(1)背景と目的

産業用糸状菌の麹菌は蛋白質を大量生産することが可能であり、世界的にも多くの酵素生産に用いられている。しかし、液体培養においては菌体密度の上昇に伴い培養粘度の上昇や菌糸の接着による凝集塊形成により、酵素生産が困難となることが大きな課題となっている。

東北大学が開発した菌糸接着因子を欠損した菌糸分散株 (AG Δ -GAG Δ ；特許第 6647653 号・USPT11021725 B2) は、野生型 (非分散株) と比較して高い酵素生産能を示した。本研究開発では、この菌糸分散株を用いて従来困難であった連続培養を可能とし、酵素生産を最大化させる産業用スマート麹菌の構築を目指す。

産業用スマート麹菌の構築については、国立研究開発法人産業技術総合研究所 (産総研) の情報解析技術を連携活用し、発酵槽培養における細胞応答 (オミクス解析) から酵素生産の障害となる生産性低下因子を探索 (研究項目 2.1.2) し、遺伝子配列設計技術による細胞内因子量の発現制御 (研究項目 2.1.3) を実施する等、培養データからの産業用スマートセル創出技術の開発に協調する。酵素生産の最大化については、物理的作用の視点から発酵槽内の培養液の流動性およびガス分散性ならびに剪断応力、これらの槽内均一性等の物理的要因を CFD 解析によって可視化し、把握することでスケールアップファクターを推定し、発酵槽培養の最適化を図る。

そして、産業利用の観点から精製面における菌糸分散性能の優位性について評価し、産業用スマート麹菌における基盤技術の確立および実用面での有効性を検証し、新規事業参入への開発技術支援など新たな産業展開を推進する。

(2)位置づけ、目標値

産業用酵素の現状と展望

産業用酵素の世界市場は、約 7,000 億円と推定され、CAGR 6.5%前後で推移し、2030 年頃には 1 兆円ビジネスになると予測される (Industrial Enzymes Market by Type (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases, Other Types), Source, Application, Form, and Region - Global Forecast to 2026 (by MarketsandMarkets, 2020.4))。産業用酵素の生産は、低コストな遺伝子組換え製造が世界的に主流となりつつあり、特に *Aspergillus* 糸状菌は汎用性の高いことが知られており、異種酵素遺伝子の適用例が多い。しかしながら、遺伝子組換え申請製品の開発者は海外メーカーが大半となっており、産業用スマート麹菌の開発によって国内生産の回復に繋がりたいと考えている。

2022 年度中間目標

- ①オミクス解析から生産性低下因子となる遺伝子を 2 種以上特定し、細胞内因子量の発現抑制を含む育種改良株を 1 株以上取得する。
- ②5 L スケールの発酵槽培養において菌糸分散株の酵素生産性を非分散株に対して 150%以上を達成する。
- ③スケールアップ実証に向け、30 L および 200 L スケールの発酵槽培養において CFD 解析を実施し、これに基づくフィードバック検証からスケールアップファクターを確立する。

④糸状菌培養に特化した高ガス分散性・省エネルギーを可能とする高効率タービン翼を搭載した 200 L スケールの新型リアクターを設計・製作し、スケールアップ実証試験を実施する。

2026 年最終目標

- ① 東北大学が開発した培養解析からのアプローチによる遺伝子組換え育種技術により、合同酒精は実産業株を産業用スマート麹菌へ造成し、本菌を宿主とした遺伝子発現プラットフォームによる異種酵素遺伝子の発現も含め酵素生産性を親株比 200%以上の達成を目指す。
- ② 産業用スマート麹菌による酵素生産において精製面は、簡素化・短縮化される。また、高生産によって製造回数または製造スケールが低減される。これらの結果によって、エネルギーコストは 20%以上削減され、CO₂ 排出量も約 50%削減し、環境負荷軽減へ大きく貢献する。
- ③ 産業用スマート麹菌を用いた培養から精製まで簡便且つ容易な酵素生産方法を確立し、旧態依然を一新する汎用性の高い酵素生産システムをパッケージ化し、社会実装を目指して提供体制を整える。

(3) 全体計画

2020 年度から開始された本研究開発は、実施項目を 7 点に設定し、項目毎に進捗管理しながら最終目標を目指している。

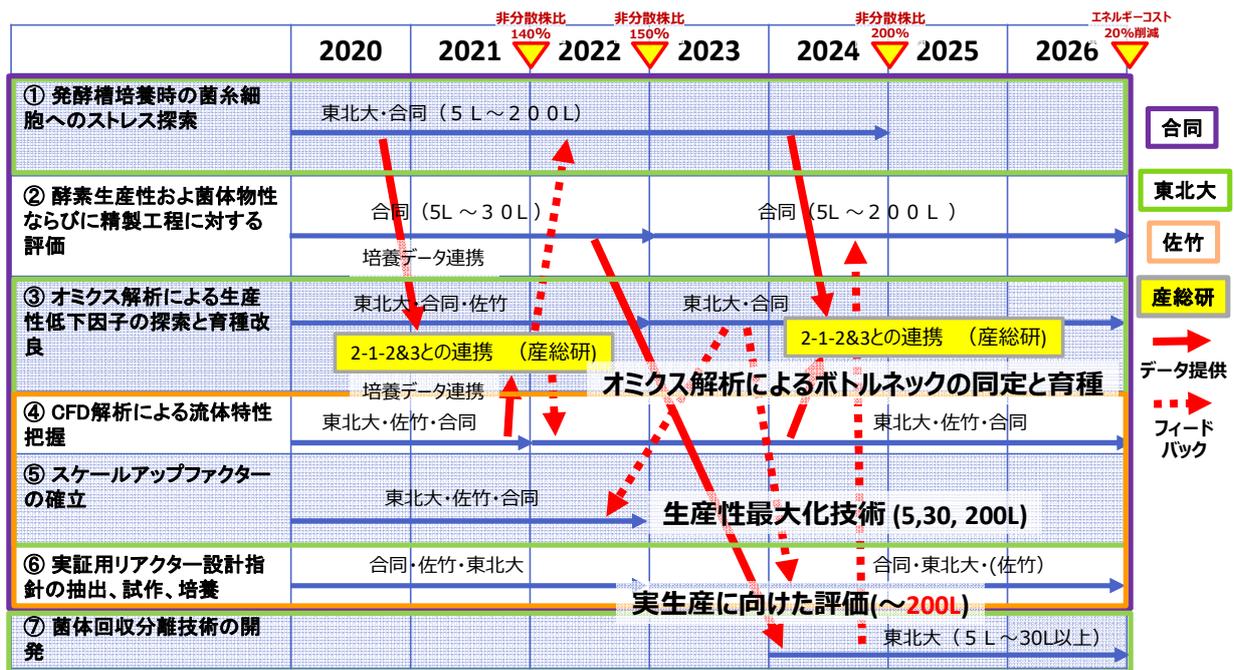


図 3.2.1.1.2.2.4-1 研究項目 2.2.1.4 の全体計画

(4) 実施体制

東北大学の培養解析技術・遺伝子組換えおよび育種改良技術、佐竹マルチミクスの発酵槽内における数値流体解析技術、合同酒精の酵素生産技術、さらに産総研の情報解析・蛋白質改変技術、これら技術を連携・包括し、産業用スマート麹菌の構築からスケールアップまで研究開発を実施する。

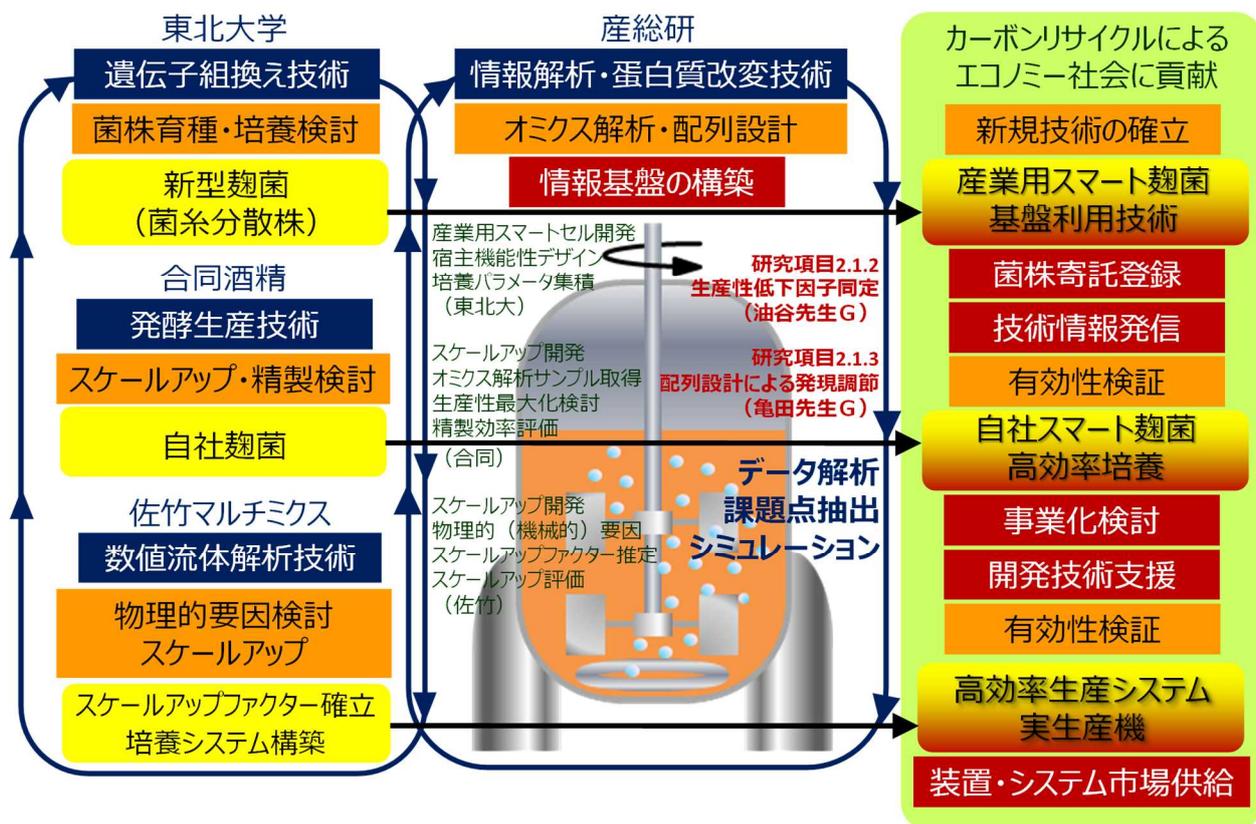


図 3.2.1.1.2.2.4-2 研究項目 2.2.1.4 の実施体制

(5) 運営管理

定期進捗確認会議および非定期的な個別会議（Web ミーティング）等を実施しながら情報の交換および共有を図っている。また、東北大学の研究室、佐竹マルチミクスの攪拌技術研究所、合同酒精のパイロット施設を訪問し、現地確認および共同実験ならびに技術習得等、若手人材育成を含め取り組んでいる。

(6) 実施の効果

従来の遺伝子組換え手法による目的酵素遺伝子の宿主への導入から培養および精製ならびに工業化検討等を経て製品化まで開発期間は約 3～10 年を要した。本プロジェクトにおいて開発した産業用スマート麹菌または産業用スマート麹菌を造成する基盤利用技術を用いることにより、開発期間は約 1～2 年と大幅に短縮される。また、糸状菌用高効率リアクターを導入することによって、高密度・高生産を実現し、小規模生産が可能となる。さらに精製工程がスリム化し、大規模プラントを不要とした省エネルギー生産が主流となる。

(7) 中間目標の達成度

実施項目 (担当)	実施内容	中間目標	達成度
① 発酵槽培養時の菌糸細胞へのストレス探索 (東北大・合同)	DO制御培養、ストレス因子の培養検証	ストレス種2種以上の特定	ストレス種2種以上を特定、5 L発酵槽培養にて検証中；○
② 酵素生産性および菌体物性ならびに精製工程に対する評価 (合同)	5 L、30 L、200 L発酵槽による標準培養法の確立、生産性および菌体物性評価、サンプル取得、実産業株の菌糸分散化および生産性向上株の取得	酵素生産性は非分散株比150%以上の達成	5 L、30 L発酵槽の標準培養法を確立、5 Lの酵素生産性は非分散株比150%以上を達成、精製面における菌糸分散株の優位性確認、実産業株の菌糸分散化；○
③ オミクス解析による生産性低下因子の探索と育種改良 (東北大・合同・佐竹)	①、③、④実施時のRNAseq解析 (研究項目2.1.3&3連携)	生産性低下因子遺伝子2種以上の特定、育種改良株1株以上の取得	生産性低下因子遺伝子2種以上を特定、第一段階の育種改良中 (2022年度完了見込み)；○
④ CFD解析による流体特性把握 (東北大・佐竹・合同)	CFD解析に基づくフィードバック検証	②と連動 (同目標)	5 L、30 L、200 L発酵槽の全スケールについてCFD解析を実施中 (2022年度完了見込み)；○
⑤ スケールアップファクターの確立 (東北大・佐竹・合同)	④の検証結果から培養条件の精査	④と連動 (同目標)	④の結果を踏まえ培養条件を体系的に精査する (2022年度完了見込み)；○
⑥ 実証用リアクター設計指針の抽出、試作、培養実証 (合同・佐竹・東北大)	実証用リアクターの設計・製作、合同パイロット施設への設置、稼働	実証用リアクターのパイロット施設への供給	実証用リアクター製作中 (11月頃パイロット施設へ設置見込み)；○

(8) 研究開発の成果と意義

① 発酵槽培養時の菌糸細胞へのストレス探索

発酵槽培養時の菌糸細胞へのストレス探索を目的として、菌糸分散株および非分散株のモデル酵素 A 発現株について 5 L 発酵槽 (HSF リアクター；佐竹マルチミクス社製) を用いて攪拌数を 400-1200 rpm の条件にて培養した。その結果、酵素生産は攪拌数に対して依存傾向を示した。また、次頁の図、攪拌 800 rpm 条件における培養パラメータ比較に示す通り、菌糸分散株と非分散株は菌体密度が同等であっても酵素生産は異なり、菌糸分散株の酵素生産性は非分散株に比べ高生産を示した。また、両株の溶存酸素濃度 (DO) 挙動も異なり、培養期間における菌糸分散株の動的な酸素移動容量係数 (k_La) は非分散株に比べ高値を推移した。これは、菌糸分散株の培養特性からガス分散性能が改善されたと共に菌糸表面 (固相) と培地 (液相) の界面積が拡大し、菌糸細胞の物質透過性が増大することによって酸素および栄養素の吸収が改善され、酵素生産が増大したと推察している。一方、菌糸分散株は菌体密度を非分散株に比べ高密度とすることが可能であることから、連続流加による高密度培養を行ったところ、菌体密度の上昇に伴い培養液は低酸素 (DO 枯渇) 状態となった。そのため、本来であれば菌体増加に伴い酵素量の大幅な増大が期待されたが、酵素量/菌体量 (菌体比活性) に顕著な増大は認められなかった。これらのことから、発酵槽培養時の低酸素状態は生産性低下となるストレス因子の一つではないかと推察された。

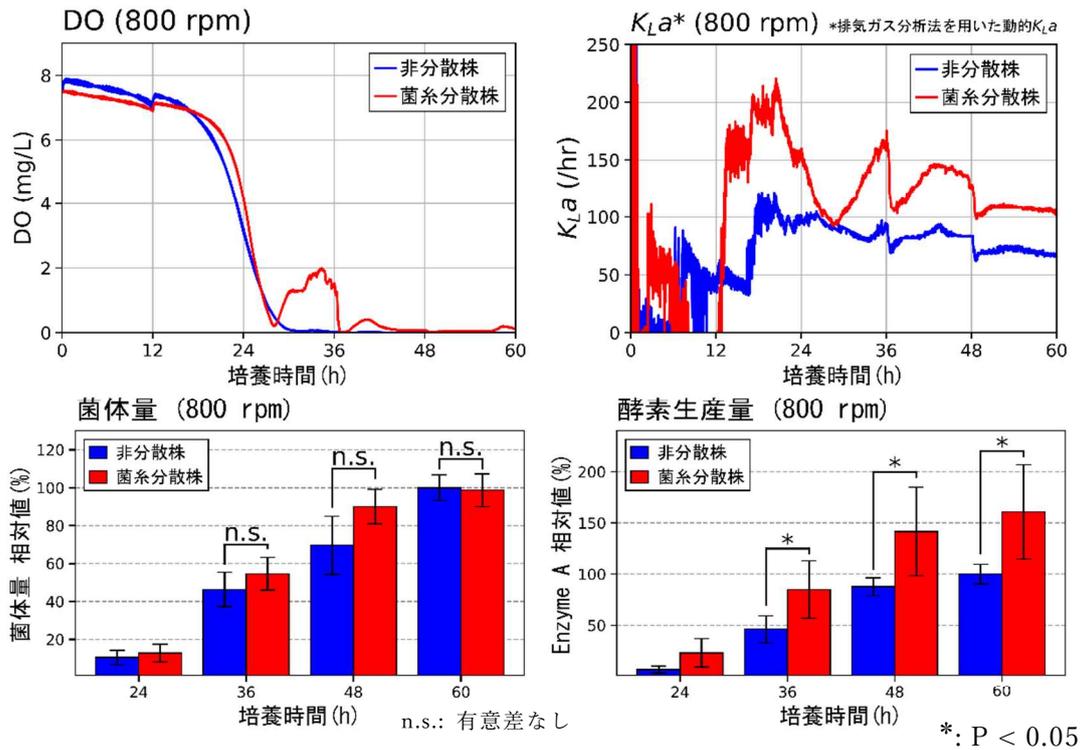
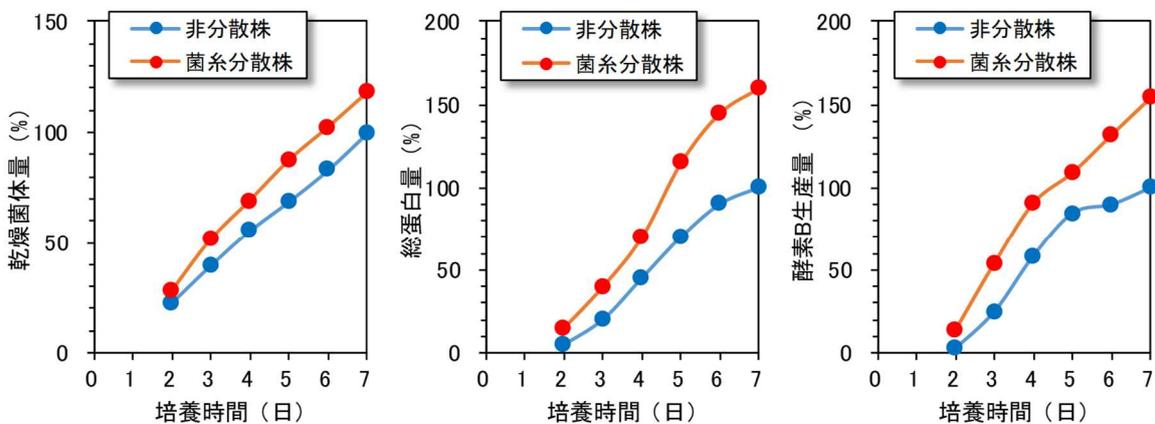


図 3.2.1.1.2.2.4-3 攪拌 800 rpm 条件における培養パラメータ比較

② 酵素生産性および菌体物性ならびに精製工程に対する評価

菌糸分散株の産業利用への適性について評価するため、5 L 発酵槽 (BMS-5L; エイブル社製) を用いて菌糸分散株のモデル酵素 B 発現株を培養した。その結果、菌体量は 7 日間の培養中は直線的に増大した。生産性は、非分散株比 150% 以上の高生産を示した。また、遠心分離による回収試験を行ったところ、菌糸分散株は非分散株に比べ遠心分離による脱水性が高く、総蛋白質回収率が非分散株比 10% 向上した。これらのことから、菌糸分散株は工業生産利用に優位であることが明らかとなった。



*菌体量、蛋白量、酵素量は非分散株を100%とした換算値

図 3.2.1.1.2.2.4-4 組換え麹菌 菌糸分散株による酵素生産

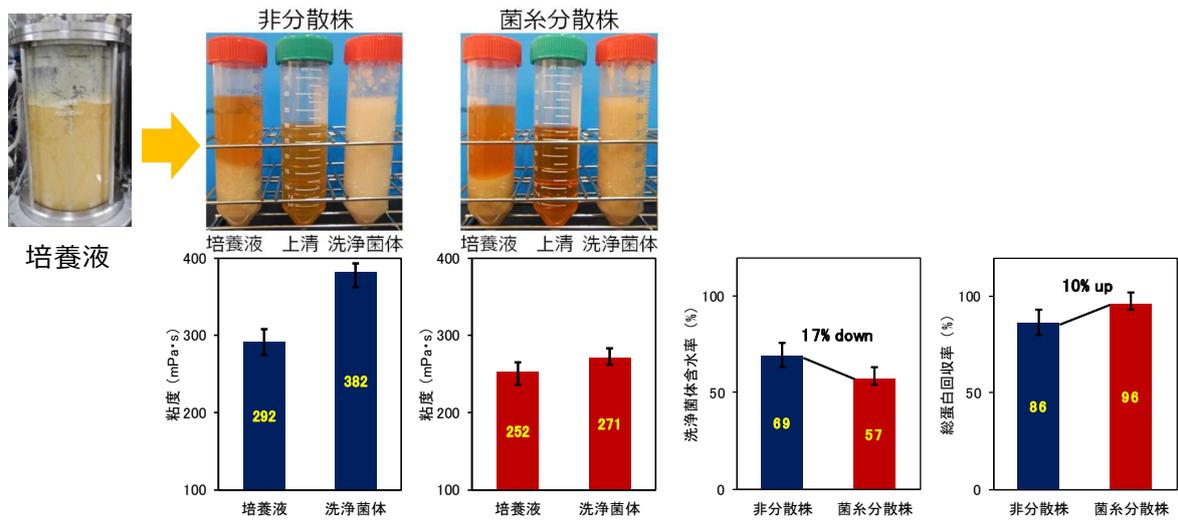


図 3.2.1.1.2.2.4-5 遠心分離による回収試験

③オミクス解析による生産性低下因子の探索と育種改良

生産性低下因子の探索を目的として、培養菌体を用いて RNAseq 解析を行った。前述①の検討において培養時間 (24、36、48、60 hr) と攪拌数 (400-1200rpm) の条件を組合せて菌糸分散株の培養菌体から mRNA を抽出し、RNAseq 解析に供した。得られた麹菌遺伝子発現プロファイルから各培養時間に対する各攪拌数の発現変動解析を行ったが発現変動遺伝子 (DEGs) が非常に多かったため、培養時間に依存せず攪拌速度変化に依存して発現変動する遺伝子を抽出し、遺伝子アノテーションを確認しながら細胞応答の仮説を立てた。また、培養時の遺伝子発現プロファイルを用いて k_{La} の変動と相関する遺伝子を主成分分析で抽出したところ、主成分で寄与の大きい遺伝子の中に、カタボライト抑制転写因子、細胞壁ストレス関連遺伝子および酸化・浸透圧関連転写因子が生産性低下因子として見出された。また、本結果に基づき 5L および 30L 発酵槽を用いて合成培地による DO 制御下の培養を行い、対数増殖期の末期における溶存酸素の枯渇から定常期 (酵素生産誘導期) へ移行する短時間スパンにおいても前述と同様の遺伝子発現変動が認められるのかフィードバック検証を開始した。

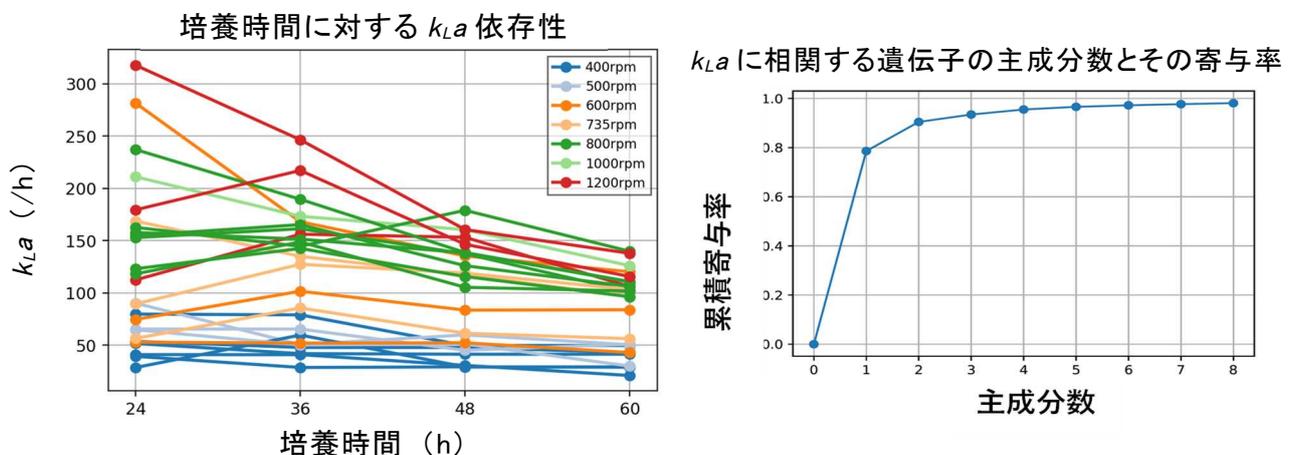


図 3.2.1.1.2.2.4-6 k_{La} に相関する遺伝子による主成分分析

④CFD 解析による流体特性把握

菌糸分散株の流体特性を把握するため、前述①の検討において 5 L 発酵槽培養の CFD 解析を網羅的に行った。なお、物理的指標を CFD 計算にて求めた際、計算結果は実現象との整合性が不明なため、培養時に正確な軸トルクを計測し、その際の実測消費動力と計算結果がほぼ同等となるように高精度メッシュ条件・計算モデル・独自の微係数を確定するための数値実験を繰り返し、精度の高い結果のみにて解析した。菌糸分散株の酵素生産は、攪拌数に対して強い依存傾向を示したが、攪拌数は物理的な意味を持たないことから、CFD 計算で得られた剪断応力、 k_{La} および単位体積当たりの通気攪拌動力 (P_{gv}) を指標とした。その結果、菌糸分散株は非分散株に比べ見掛け上粘度が低く、槽内のガス分散は良好な状態となっていた。さらに高効率リアクター (HSF リアクター) においては槽内全体に流動状態が形成され、適性の高いことが明らかとなった。下段および次頁の図、物理的指標に対する酵素生産性に示す通り、生産性は P_{gv} に対して強い依存性を示し、剪断応力および k_{La} に対しては 3 乗に比例して増大していることが判明した。また、さらに k_{La} に対しては k_{La} 値 80/h 付近を境に生産性が大きく増大する特異的な傾向を示した。

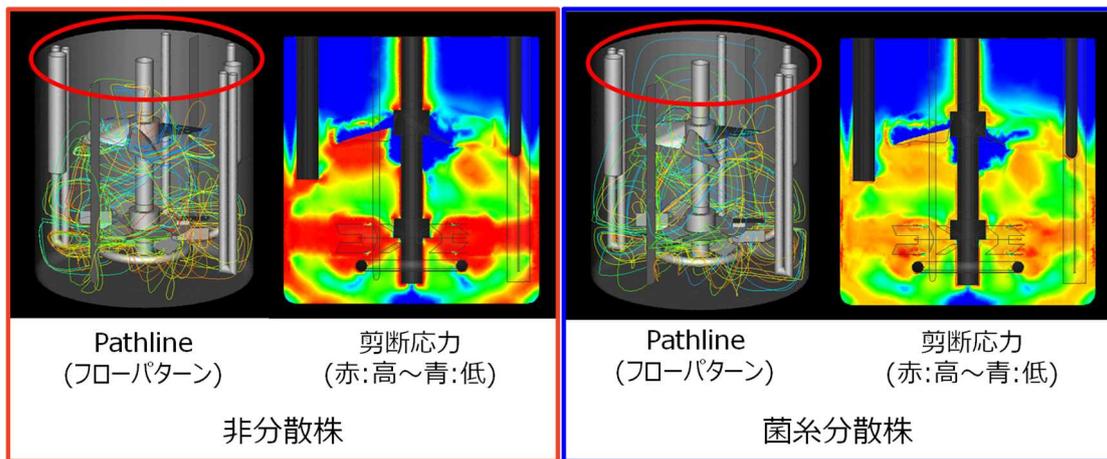


図 3.2.1.1.2.2.4-7 同一培養条件による CFD 解析結果 (菌糸分散株の流動特性)

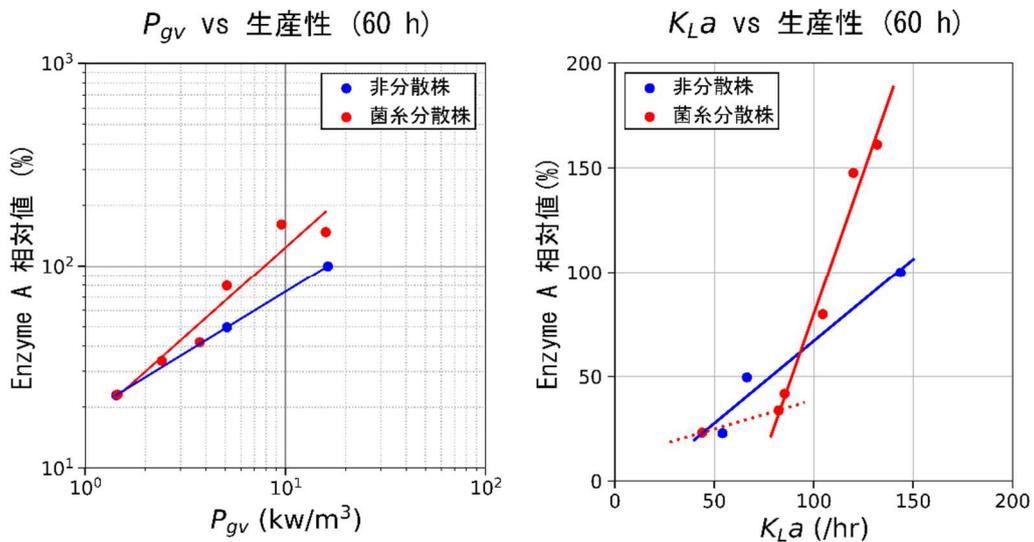


図 3.2.1.1.2.2.4-8 物理的指標に対する酵素生産性 I

⑤スケールアップファクターの確立

前述①および④の検討において、菌糸分散株は非分散株に比べ剪断耐性が極めて高いことも判明した。糸状菌は、一般的に物理的剪断耐性が弱いとされており、剪断応力（シェアストレス）をスケールアップファクター（指標）とすることを想定したが、5 L 発酵槽培養における一連の結果ではシェアストレスの閾値に至らなかった。予想に反して生産性は剪断応力の3乗に比例して増加し、エネルギーをかけるほどに生産性が増大する結果となった。

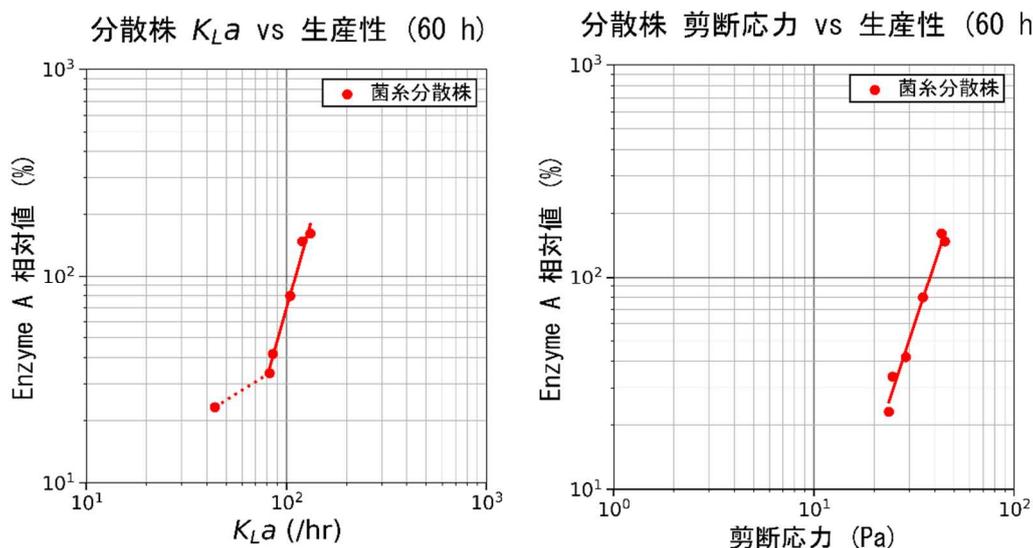


図 3.2.1.1.2.2.4-9 物理的指標に対する酵素生産性 II

また、基本的な検討として、低酸素状態時の生産性との関連も探るため、5 L スケールでの酸素富化による DO 制御も実施することから酸素移動速度 (OTR) との相関性についても精査し、最終的には 30 L および 200 L 発酵槽培養へのスケールアップにおける CFD 解析結果（シェアストレス、 OTR 、 P_{gv} ）と生産性の関係を明らかにし、総合的な判断から実生産に向けたスケールアップファクターを確立し、体系的にスケールアップを行う。

⑥実証用リアクター設計指針の抽出、試作、培養検証

2021 年 11 月に実証用 200L リアクターの設計を完了し、試作機において基本的な滅菌バリデーションを実施した。そこで得られた知見を基に、低コストで本検討を進めるべくシングルユースとリユースを組み合わせたハイブリッド型のバイオリアクターを製作し、高効率タービン／高効率軸流翼の組み合わせによる 200L スケールアップ検証を行い、本技術の社会実装に向けた基盤を確立する。2022 年 11 月頃を目処に本 200L バイオリアクターを完成させ、パイロット施設への設置を予定している。

なお、培養装置面からのスケールアップ取り組みは、2022 年度をもって完了させる。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

成果の最終目標としては、産業用スマート麹菌を宿主とし、さらにスケールアップ技術を導入することにより、培養液当たりの酵素生産性を非分散株比 200%以上、エネルギー効率を 20%以上改善する。産業用スマート麹菌および構築した発現情報基盤を利用することで、産業的なタンパク質生産の新規参入事業者の開発を効率化・短期化が可能なプラットフォームの構築が可能となる。また、新規技術を実産業麹菌の開発および実生産に適用し、現状生産量を 20%以上向上させ、発酵製品（酵素製剤）の社会への安定的かつ安価な提供を可能とし、基盤技術の実証例として社会実装を目指す。

■ 目標に向けて、2023 年度以降の課題および計画

- 引き続き研究項目 2.1.2&3 と連携し、生産性低下因子およびその改善付与遺伝子を強化した産業用スマート麹菌の構築を進める。
- 生産性最大化プラットフォームを構築し、実生産培養・精製プロセスにおいて産業用スマート麹菌の省エネ効果について評価する。
- 基盤情報・新規技術を利用した発酵製品（酵素製剤）の社会実装例として本事業成果の製品化を実現する。

項目\年度	2023	2024	2025	2026	2027~
①発酵槽培養時の菌糸細胞へのストレス探索	パイロット試験、オミクス解析用サンプル取得 (項目③④⑥と連動、2.1.2&3 との連携)				2.1.2&3 情報蓄積・公開
②酵素生産性および菌体物性ならびに精製工程に対する評価	モデル評価菌株、自社産業株育種株の育種およびスケールアップ評価 (生産性 200%以上、⑥⑦と連動)				事業化 実用化で活用
③オミクス解析による生産性低下因子の探索と育種改良	RNAseq データの取得 & オミクス情報解析 (項目①と連動; 2.1.2&3 との連携) 産業用スマート麹菌の構築				産業用スマート麹菌強化 活用 2.1.2&3 情報蓄積・公開
④CFD 解析による流体特性把握	CFD シミュレーションのスケールアップ評価 (項目①②③と連動)				実用化で活用
⑤スケールアップファクターの確立	スケールアップ試験で活用(項目①②と連動)				実用化で活用
⑥実証用リアクター設計指針の抽出、試作、培養実証	実生産に向けた評価 (⑦と連動、エネルギー効率 20%以上改善)				実用化で活用
⑦菌体回収分離技術の開発	スケールアップ菌体試験 (②⑥と連動)				実用化で活用

(10) 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	
2020	0	0	0	0	0	0	0
2021	4	0	2	0	0	1	1
2022	掲載 1+ 予定 1	0	3 (予定)	1	1	1	0
PJ 期間 合計	6	0	5	1	1	2	1

(11) 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
2020	0	0	0
2021	0	0	0
2022	1 (予定)	0	1 (予定)
PJ 期間 合計	1	0	1

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

スマートセル技術に立脚したバイオプロセス開発の社会実装を実現する新規技術の開発を通して、多様なバイオ生産品の市場投入におけるバイオエコノミー社会の実現のために、実産業生産レベルへ向けた新規参入事業者を含めたスケールアップの開発期間の短縮する技術を実証する。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

- ・東北大学が開発した新型麹菌をベースとして構築した産業用スマート麹菌を宿主とする。
- ・研究項目 2.1.2 & 3 と共同で構築した情報基盤を活用し、システムのバージョンアップを図る。
- ・最適化された培養システム（スケールアップ技術）により宿主の性能を最大限引き出す。
- ・情報基盤・新規技術を利用し、発酵製品（酵素製剤）の社会実装を目指す。
- ・新規参入へのコンサルティングを含む開発技術支援（生産菌育種、情報基盤利活用、試験培養、最適な培養槽の提案、生産プロセス設計、コストシミュレーション等）によりバイオものづくりを拡大する。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

- ・事業化に向けた課題および優位性

1. 対象市場、製品

産業用酵素全般（現在推定約 7000 億円）。CAGR6.5%前後で推移している（2030 年には 1 兆円ビジネス）。環境負荷低減を目的とした有用酵素探索研究も活発に行われている。

2. 従来技術との対比

生産宿主は *Aspergillus* 属糸状菌及び *Bacillus* 属細菌が多用されるが、*Aspergillus* 属糸状菌は異種酵素遺伝子適用例が多く、より汎用性が高い。現状では申請製品および流通製品の開発者は国外メーカーが主流であり、国産有用酵素製剤を拡大させる。

3. カーボンリサイクル（環境負荷低減への貢献）

改良型産業用スマート麹菌を利用することで生産性が増大（目標 200%）し、小規模生産の実現、さらに製造バッチ数が減少し、排出 CO₂ 量が 50%削減可能。また、成果物である環境負荷低減用途の酵素・素材の利用が促進される。

- ・課題解決の方針

本事業で構築した麹菌酵素生産プラットフォームを用い、有用酵素遺伝子を有する新規参入事業者への技術支援を行い、国産産業用酵素の開発を効率化し、国内発酵工業の回復を目指す。また、プロジェクトで蓄積した情報基盤・知識からのフィードバックも活用し継続的な技術的刷新を図る。

【技術支援体制】

- ・生産菌株構築（有用酵素遺伝子導入）：東北大学
- ・培養槽フィッティング・シミュレーション・最適化：佐竹マルチミクス株式会社
- ・生産プロセス設計・製造コストシミュレーション：合同酒精株式会社

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

- ・新型麹菌のオミクス解析を実施し、生産性低下因子を抽出しており、改善育種を開始。
- ・数値流体解析によりスケールアップファクターを確立し、スケールアップ実証用リアクターを整備。
- ・実産業株への基盤情報・新規技術を導入するため、実産業株の菌糸分散化を実施中。
- ・東北大、佐竹マルチミクス、合同酒精で連携を強化し、技術支援体制を構築。

(12.5) 波及効果

- ・これまで蓄積していなかった麹菌スケールアップ時のオミクスデータへのアクセスが可能となる。
- ・環境負荷低減用途の新規有用酵素や素材生産の実用化に要する期間・コストが大きく短縮・低下しバイオものづくりが拡大することで、脱炭素循環型、省エネルギー社会へと進む。
- ・麹菌生産技術をプラットフォーム化することにより、情報系や石油化学系、農業系からの人材流入・交流も進み、バイオものづくりがさらに活性化する。

3.2.1.1.2.2.5 産業用タンパク質生産性極大化技術開発 (花王株式会社、長岡技術科学大学)
研究項目 2.2.4.2

(1)背景と目的

伝統的な醸造産業において古来より利用されてきた糸状菌は、産業上有用な有機酸、酵素、抗生物質を含む幅広い高付加価値品の大規模生産にとって最も重要な微生物である。本課題でモデル糸状菌として用いる *Trichoderma reesei* は、微生物の中でも類稀なるタンパク質生産性を示し、産業利用を目的とした数十年の研究の歴史のなかで液体大量培養に適した菌株が開発されてきた。また、大量培養系が確立されスケールアップも容易であるという利点がある。さらに、未利用非可食植物バイオマスであるセルロースを炭素源として生育することができるため、非可食バイオマスから有用タンパク質を生産できるという観点でカーボンリサイクルに貢献できる。また、産業上有用なタンパク質を生産する宿主としての潜在能力を有する。*T. reesei* のタンパク質発現宿主としての利点は、大量のタンパク質を菌体外に分泌生産できること、タンパク質の糖鎖修飾が高等生物に類似していること、誘導的で強力なプロモーターを有していることが挙げられる。本課題では、産業用異種タンパク質の生産宿主としての *T. reesei* スマートセル開発を目的としている。これまでの大量培養系においては用いる炭素源あたりのタンパク質生産性が現状 20%程度であり、実用化のためには本課題でタンパク質の理論収率を決定し、それに近づける必要がある。本課題は、大量培養における *T. reesei* の各種オーミクスデータを活用し、情報基盤技術開発課題と連携して代謝フラックスの把握および培養ストレスの顕在化技術を開発し、タンパク質生産性を向上させる技術開発を目的とする。また、*T. reesei* においては異種タンパク質の発現成功例が少ないという課題があるため、異種遺伝子の発現を妨げているファクターを特定するとともに、情報基盤技術開発課題と連携して異種遺伝子の配列設計、最適な発現法の検討など異種タンパク質発現技術の開発を目的とする (図 3.2.1.1.2.2.5-1)。

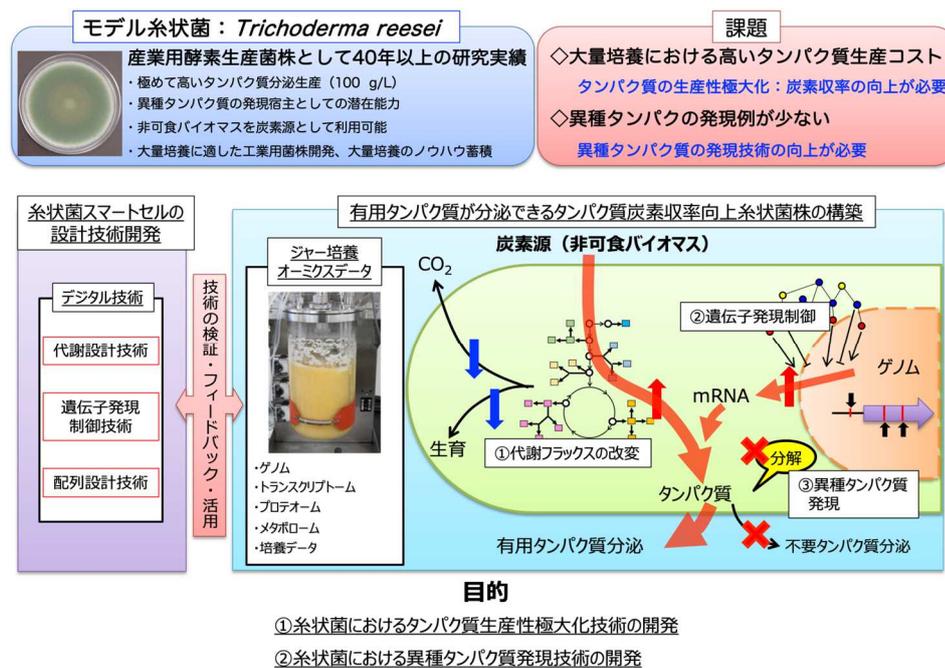


図 3.2.1.1.2.2.5-1 本課題の背景および研究目的

3.2.1.1.2.2.5-1

(2)位置づけ、目標値

SDGs 加速に伴い、2030 年に向けた第 2 世代エタノールの生産量増加や植物バイオマスからのバイオリファイナリによるバイオプロダクト生産の需要急増が予測される植物バイオマス糖化酵素を本課題のモデルとしている。特に、産業用酵素分野においてバイオ燃料分野は今後も成長が予測される。そのため企業にとって、競合他社よりも低コストで酵素生産が可能な宿主を開発することが 1 つの目標となる。本研究課題の具体的な目標値は以下の通りである。これを達成することにより、タンパク質生産極大化技術の確立によって、分泌タンパク質の炭素収率を向上させた菌株の育種が可能になる。また、*T. reesei* の持つ高生産宿主の特徴を生かした異種タンパク質の製造手法が確立される。これにより、新しい宿主での異種有用タンパク質の大量発現が達成される（表 3.2.1.1.2.2.5-1）。

表 3.2.1.1.2.2.5-1 本課題の目標値とその根拠

中間目標値	根拠
分泌タンパク質量を基準として、本プロジェクト開始時の菌株と比較して、炭素収率を 30~40%向上させたプロトタイプの産業用スマートセルの構築	現状の排気ガス (CO ₂) を減少させることで、その分タンパク質を増加させる事ができると仮定し、目標値を設定した。
本プロジェクト開始時の菌株が分泌する分泌タンパク質の 50~70%以上を欠損させた菌株の構築	異種タンパク質の精製負荷を低減するため内在性の不要な分泌タンパク質を削除する必要があるため。
<i>T. reesei</i> にて発現困難な異種タンパク質 2 種について、活性型タンパク質としての発現	本テーマで発現技術を確立するためのモデルとして 2 種設定した。
ゲノム上の異種遺伝子導入スポットを 3 か所以上決定	異種タンパク質を複数種同時に発現させる可能性があるため。 宿主の機能を強化する場合に複数遺伝子を導入するため。
最終目標値	
タンパク質の炭素収率向上株をベースとした異種タンパク質 5 種以上の発現	複数の異種タンパク質発現が可能であることを検証するため。

(3) 全体計画

事業項目	2020 年度	2021 年度				2022 年度				2023 年度	2024 年度	2025 年度	2026 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糸状菌におけるタンパク質生産性極大化技術の開発													
①-1. 発酵槽培養	→	ジャー培養系の確立											
データのダイナミクス解析				予測されたタンパク質生産性改善因子の評価									
				オミクスデータ取得、2.1.1 へのフィードバック									
①-2. タンパク質分泌の制御因子探索	→	オミクスデータの取得											
				予測されたタンパク質生産制御因子の評価									
				オミクスデータ取得、2.1.2 へのフィードバック									
①-3. 炭素収率向上菌株の造成					プロトタイプ株の構築								
										炭素収率向上株の構築			
② 糸状菌における異種タンパク質発現技術の開発													
②-1. 配列設計に基づく異種タンパク質発現系の構築	→	ターゲットタンパク質決定											
		2.1.3 への情報提供											
				設計配列の評価				異種糖化酵素の発現評価					
				2.1.3 へのフィードバック									
②-2. 発現用プロ					プロモーターの選定								
								プロモーターの評価					

(5) 運営管理

月に1回以上の実務者会議を開催している。また、半年に一度 PL、SPL との会議を開催し、研究開発方針について議論している。

(6) 実施の効果

カーボンリサイクル（環境負荷低減への貢献）として、炭素収率向上技術を適用した酵素生産法により、2030 年度以降、開発宿主を使用することによって、発酵生産時の CO₂ 排出量 20-40%程度削減が見込める。

(7) 中間目標の達成度

活動項目 (担当)	活動内容	中間目標	達成度
①糸状菌におけるタンパク質生産性極大化技術の開発			
①-1 発酵槽培養データのダイナミクス解析（花王・長岡技科大）	ジャー培養におけるオーミクスデータを拡充し、情報基盤技術グループ（研究項目 2.1.1 および研究項目 2.1.2）と共有し、タンパク質の炭素収率について理論値を推定する。	・分泌タンパク質量を基準とし、炭素収率を 20～30% 向上させた菌株の構築	・ジャー培養で取得したデータ群（菌体量、DO、排気 CO ₂ 、添加窒素量のトレンド、培地中のアミノ酸量およびトランスクリプトームデータ）をもとに理論収率を推定した。 オーミクスデータより炭素収率改善因子抽出を行った。取得したデータセットでは、有効な因子抽出が難しいことが判明した。そこで、炭素収率改善因子抽出の向上のための情報解析用培養条件の設定を検討した。；しかしながら、ターゲット遺伝子の発現改変株によるタンパク質生産性が確認できなかった。
①-2 タンパク質分泌の制御因子探索（花王・長岡技科大）	ここで推定されたタンパク質の炭素収率改善因子をコードする遺伝子の高発現もしくはノックアウト株を構築する。構築した株の解析結果を情報基盤技術グループにフィードバックする。		
①-3 炭素収率向上菌株の造成（花王・長岡技科大）			
②糸状菌における異種タンパク質発現技術の開発			
②-1 タンパク質をコードする遺伝子の配	情報基盤技術グループ（研究項目 2.1.3）の塩基配	<i>T. reesei</i> にて発現困難な異種タンパク質 2 種	・異種タンパク質 2 種について、発現用コンストラクトを構築し、評価した。ま

列設計（花王・長岡技科大）	列の設計に基づいて異種糖化酵素の発現コンストラクトを複数構築し <i>T. reesei</i> における発現評価を行う。その結果を情報基盤技術グループへとフィードバックする。	について、複数の発現用コンストラクトの構築および評価	た、トランスクリプトーム並びにプロテオームデータより、候補プロモーターを抽出した。
②-2 タンパク質発現用プロモーターの選定と改変・評価（花王・長岡技科大）	ジャー培養におけるトランスクリプトームデータから、タンパク質生産時に高発現する遺伝子を同定し、その遺伝子プロモーターを異種タンパク質発現用のプロモーター候補とする。		
②-3 タンパク質発現コンストラクトの導入に最適なゲノム位置(ホットスポット)の探索と評価	レポーター発現コンストラクトをゲノム上に導入し、高発現かつ生育が親株と同等の菌株を取得する。	ゲノム上の異種遺伝子導入スポットを3か所以上決定	・レポーター発現株を複数取得し、遺伝子導入しても異常が起きないスポットをゲノム上に3か所決定した。
②-4 異種タンパク質の分泌に不要な分泌タンパク質の欠損	発現させた異種タンパク質の精製障害となる分泌タンパク質を除去するため、不要な分泌タンパク質を欠損させた菌株を構築する。	本プロジェクト開始時の菌株が分泌するタンパク質の40~50%を欠損させた菌株の構築	・モデル株(PC-3-7株)にてセルラーゼ多重欠損時の生産量について評価し、欠損順序を検討した。合わせて、工業生産株のマーカ付与株を作成し、欠損を開始した。

(8) 研究開発の成果と意義

①糸状菌におけるタンパク質生産性極大化技術の開発

①-1 分泌タンパク質の炭素収率向上のための発酵槽培養データのダイナミクス解析

T. reesei の植物バイオマス糖化酵素の生産条件における代謝フラックスを把握するために、工業用酵素生産培地を模したセルロースを炭素源としたジャーファーメンター培養の条件を確立した。その条件下において、*T. reesei* を培養して pH、溶存酸素 (DO)、排気 CO₂、使用アンモニア量のトレンドデータを取得した。

あわせて、培地中の残存セルロース量、菌体量、総アミノ酸を定量することによって分泌タンパク質量の経時的データを取得した。その結果、菌体生育が旺盛でタンパク質を活発に生産している時間をターゲットとして各培養パラメータを情報基盤技術グループ（研究項目 2.1.1）と共有し、*T. reesei* のゲノムスケールモデルを用いてフラックスバランス解析 (FBA) を行った。その結果、FBA によって予測された炭素回収率によるタンパク質生産性に対して、実際の培養では半分以下のタンパク質生産性であり、向上の余地があるということが明らかとなった。現時点では分泌タンパク質の炭素収率向上株の作出に至っていないが、代謝経路上の遺伝子のノックアウトもしくは発現量の調節によって炭素の流れが制御でき、結果として分泌タンパク質生合成が向上する可能性が示された。これら遺伝子をターゲットとして今後の菌株開発を進める。

①-2 タンパク質分泌の制御因子探索

①-1 にて取得したジャーファーメンター培養における各種培養パラメータを用いて、トランスクリプトームデータからタンパク質生産に関与している遺伝子の抽出を情報基盤技術グループ（研究項目 2.1.2）とともに試みた。その結果、タンパク質生産量が一次的に増加している条件においては、各時間におけるタンパク質生産性の差が無いとみなされ、有効な因子抽出が困難であることが判明した。そこで、培地中の窒素源を制限することにより、タンパク質の生産性に差がある培養条件を検討し、各種培養パラメータおよびトランスクリプトームデータを取得した。これらのデータを用いて、タンパク質生産に関与する遺伝子の抽出を進める。

①-3 炭素収率向上菌株の造成

①-2 にて明らかとなったターゲット遺伝子をターゲットとして遺伝子破壊株の構築し、遺伝子破壊の効果の評価を開始した。

以上から、菌株開発に向けてジャー培養における炭素収率の向上の余地があるということが具体的に示され、改変のためのターゲットが示されたという点で大きな意義がある。現時点ではターゲット遺伝子の発現改変株の構築中であり、その効果の確認、中間目標の達成には至っていないため、急ぎ研究開発を進める

②糸状菌における異種タンパク質発現技術の開発

②-1 タンパク質をコードする遺伝子の配列設計

これまでに *T. reesei* にて発現に成功していなかった異種タンパク質 2 種をコードする遺伝子の塩基配列、分泌発現させるための 3 種の糖質加水分解酵素遺伝子のプロモーター、および分泌シグナル配列をコードする塩基配列を情報基盤技術グループ（研究項目 2.1.3）と共有し、塩基配列の設計を行った。塩基配列の設計は、1）構造遺伝子のコドン使用頻度最適化、2）RNA 2 次構造を形成しないような分泌シグナルをコードする塩基配列の設計、3）発現量を向上させるために、ヌクレオソーム構造をとらないようなプロモーターの塩基配列設計の 3 つを行った（図 3.2.1.1.2.2.5-3）。

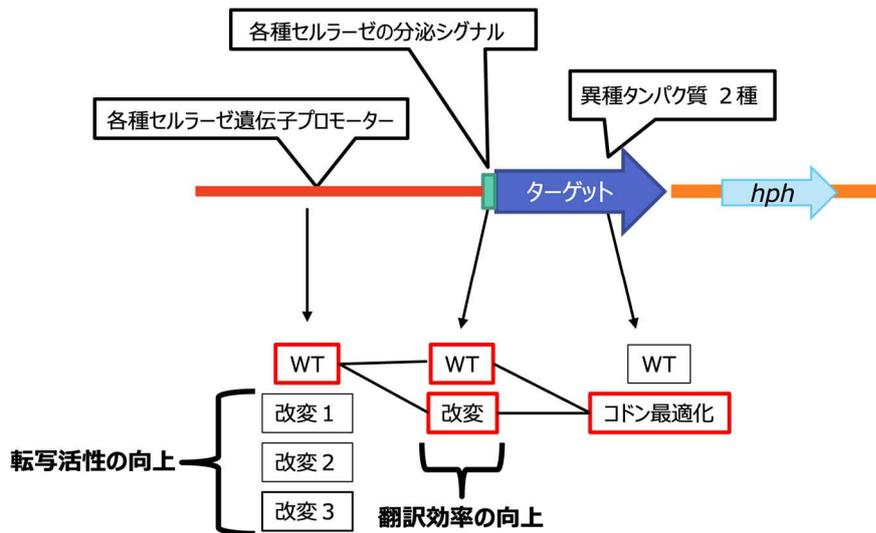


図 3.2.1.1.2.2.5-3 異種タンパク発現のための塩基配列設計

まずはターゲットタンパク質が発現するかどうかを確認するために、native のプロモーターの支配下に改変シグナル配列およびコドン使用頻度を最適化したターゲット酵素遺伝子を組み込んだ発現コンストラクトを構築した（図 3.2.1.1.2.2.5-3 赤枠）。その結果、2 種のターゲット酵素の発現に成功した。しかしながら、用いたプロモーターの転写能力を鑑みると目的遺伝子の転写量は極めて少ないという課題が生じたため、さらなる検討を行う必要がある。

②-2 タンパク質発現用プロモーターの選定と改変・評価

T. reesei の各種バイオマス糖化酵素遺伝子は同調して発現するため、*T. reesei* を植物バイオマス糖化酵素の生産菌株として利用する場合、効果的な異種糖化酵素を *T. reesei* のバイオマス糖化酵素とともに発現させるためには *T. reesei* 内在性のバイオマス糖化酵素の遺伝子プロモーターが用いられてきた。しかしながら、*T. reesei* の遺伝子組換えによる異種タンパク質発現は、プラスミドではなくゲノム組込型でおこなわれるため、内在性のバイオマス糖化酵素の遺伝子プロモーターを用いた異種タンパク質発現用コンストラクトが内在性の酵素遺伝子の位置に導入され、結果的に内在性の酵素の発現が失われる危険性がある。そこで、ジャーファーメンターによるバイオマス糖化酵素の生産条件下におけるトランスクリプトームデータから、バイオマス糖化酵素とともに高発現している遺伝子のプロモーターを探索した。その結果、最も高い発現量を示す *cbh1* 遺伝子を 100 と

したときに、比較的高発現している遺伝子を10個選抜した。これらの遺伝子プロモーターについて、異種タンパク質発現用のプロモーターとして検討する。

②-3 タンパク質発現コンストラクトの導入に最適なゲノム位置(ホットスポット)の探索と評価

T. reesei の遺伝子組換による異種タンパク質発現は、プラスミドではなくゲノム組込型でおこなわれるため、発現コンストラクトのゲノム組込み位置によってその発現量が大きく異なることが経験的に明らかとなっている。そこで、他のバイオマス糖化酵素の生産および菌体の生育に影響を与えず、なおかつ組み込んだ遺伝子が正常に発現するゲノム上の位置(ホットスポット)を明らかにできれば、異種タンパク質を発現させる手段の新たな選択肢となる。*T. reesei* 内在性であり、セルラーゼ生産条件下では極めて発現量の低いアミラーゼ遺伝子をレポーターとして、バイオマス糖化酵素遺伝子のプロモーターを用いた発現コンストラクトを構築し、ゲノム中に無作為に組み込んだ形質転換体を作出した。得られた形質転換体をバイオマス糖化酵素生産条件下で培養し、アミラーゼ活性を評価した。その結果、各種形質転換体はバラエティに富むアミラーゼ生産性を示した。そのうち3株の形質転換体(図3.2.1.1.2.5-4、赤丸)について発現コンストラクト組込み位置のシーケンス解析を行い、組込み位置の特定に成功した。これらの株は、ジャーファーメンター培養において生育、酵素生産性に大きな影響を与えなかったため、明らかになったゲノム位置は異種タンパク質発現コンストラクトの導入位置として活用することができる。

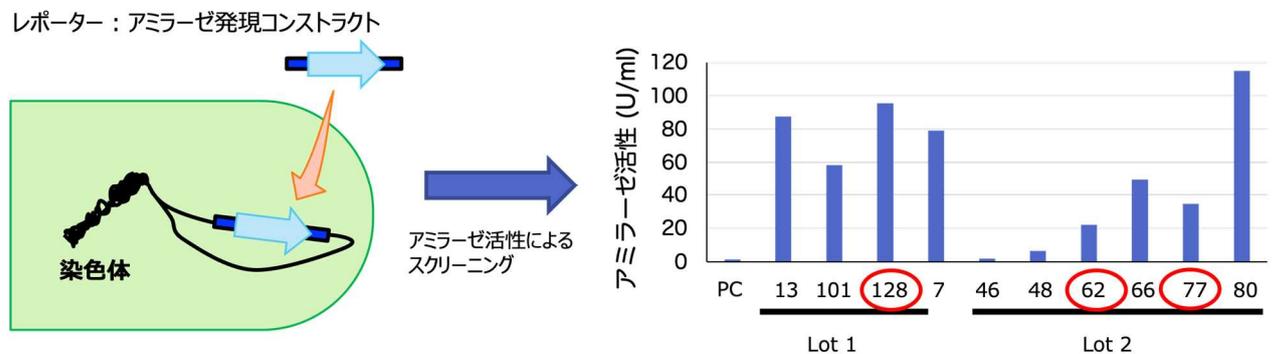


図 3.2.1.1.2.2.5-4 ホットスポット探索用のレポーター発現株のスクリーニング

②-4 異種タンパク質の分泌に不要な分泌タンパク質の欠損

T. reesei の分泌するタンパク質の95%はバイオマス糖化酵素であるため、バイオマス糖化酵素以外の産業上有用なタンパク質の生産宿主として *T. reesei* を用いる場合、バイオマス糖化酵素はターゲットタンパク質精製のための障害となる。そこで、*T. reesei* の各種バイオマス糖化酵素のノックアウト株の酵素生産性を評価した。その結果、発現量の多いバイオマス糖化酵素であるCBHI、CBHIIをそれぞれ破壊するとタンパク質の分泌量が大きく低下することが明らかとなった(図3.2.1.1.2.2.5-5 A)。そこで、CBHIとCBHIIの2重ノックアウト株を構築し、タンパク質生産性を解析した。CBHIおよびCBHIIはセルロースの加水分解に重要な酵素であるため、セルロースを炭素源とした場合に2重ノック

アウト株の生育は極めて悪く、タンパク質の生産性を評価できなかつた。そこで、バイオマス糖化酵素の誘導基質であるセロビオースを炭素源とした場合、2重破壊株は親株のPC-3-7株に比べて約50%までタンパク質の分泌量を低下させることが明らかとなった(図3.2.1.1.2.2.5-5 B)。

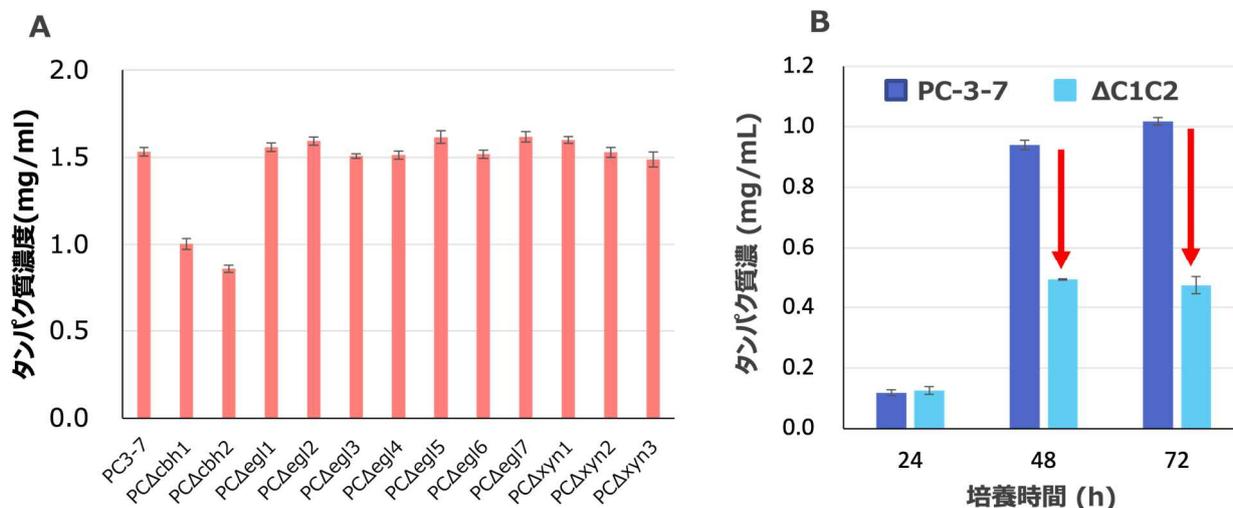


図 3.2.1.1.2.2.5-5 A: 各種バイオマス糖化酵素ノックアウト株のタンパク質生産性(炭素源:セルロース)、B: CBHI/CBHII 二重ノックアウト株(ΔC1C2)のタンパク質生産性(炭素源:セロビオース)

以上から、異種タンパク質の発現に成功した点は、将来的に種々のタンパク質を発現させるためのルールの解明につながるという点で大きな意義がある。今後は発現量が少ないという点を改善していく必要がある。また、*T. reesei* のセルラーゼ群とともに異種タンパク質を発現させる場合、セルラーゼ遺伝子とは別の遺伝子プロモーターの選定や発現コンストラクトのゲノム上への組込み位置の特定は他のセルラーゼ遺伝子の生産を妨げないという点で大きな意義がある。それとは別に、内在性の分泌酵素の削減に成功したことは、ターゲットタンパク質のみを発現させるために大きな意義がある。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

①糸状菌におけるタンパク質生産性極大化技術の開発

プロジェクト開始時に把握できていなかったタンパク質の理論的な炭素収率を求めることができ、現状の炭素収率を向上できる可能性が示された。菌体内アミノ酸バランスが偏っていることも判明したため、このバランスの調整によって分泌タンパク質の炭素収率向上に寄与する可能性がある。また、タンパク質生産性の異なる培養条件を設定し、オミクスデータを取得しており、遺伝子発現解析からも改変ターゲットが抽出できる可能性がある。これらを組み合わせることで、炭素源あたりのタンパク質生産性を向上できる可能性がある。

②糸状菌における異種タンパク質発現技術の開発

現時点でこれまで困難であった異種タンパク質の発現に成功している。また、異種タンパク質の発現コンストラクトを導入するゲノム位置も決定できている。今後の課題は異種タンパク質の発現量の向上および、特定したゲノム位置における異種タンパク質発現の有用性を検証していく。

(10) 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	
2020	-	-	1	-	1	-	-
2021	-	-	-	-	1	-	-
2022	-	-	1	-	-	-	-
PJ 期間 合計	-	-	2	-	2	-	-

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

特許出願は、実施企業にて取りまとめ PCT 出願を予定している。開発技術の多くは遺伝子改変等の技術として、特許出願を予定。また、培養方法に紐づけされる技術はノウハウとして扱う。出願後、事業化に必要な特許は実施企業にて知財買取を希望している。

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

産業用酵素分野において、SDGs 加速に伴う 2030 年以降の第 2 世代バイオ燃料生産量増加やバイオ由来原料生産増加により、バイオマス糖化酵素を中心とした酵素産業は今後も成長が予測される。特に、急増することが予想されるバイオマス糖化酵素を中心に酵素産業の事業化に取り組む。

3.2.1.1.3.1 マルチスケラブルな培養技術の開発と培養のビッグデータ化（大阪大学・大阪工業大学） 研究項目 3.1.1

(1) 背景と目的

バイオプロダクション産業の創出と発展に向けて、生物が持つ物質生産能力を人工的に引き出した細胞（スマートセル株等）の構築基盤技術が開発されてきた。しかし、これらの細胞が、工業用培地での培養や大規模生産、環境や技術経済性への影響を想定して開発されることは稀であった。このため研究開発ステージに進んだ段階で、根本的な技術変更が求められる「手戻り」が生じ、バイオ生産プロセスの開発の妨げとなってきた。そこで本実施項目では産業化に必要な要件を満たす培養槽や培養条件を標準培養装置（培養条件）として予め策定し、当該培養装置内において満足いく機能発現が可能な微生物を探索・育種するというバックキャストिंग的手法を採用することで、「手戻り」の抑止をはかる。研究実施項目間の密な連携により、標準培養条件での検証結果を細胞株の探索・育種グループと共有、両者を並行開発することでバイオ生産プロセスの開発短縮に貢献する。

(2) 位置づけ、目標値

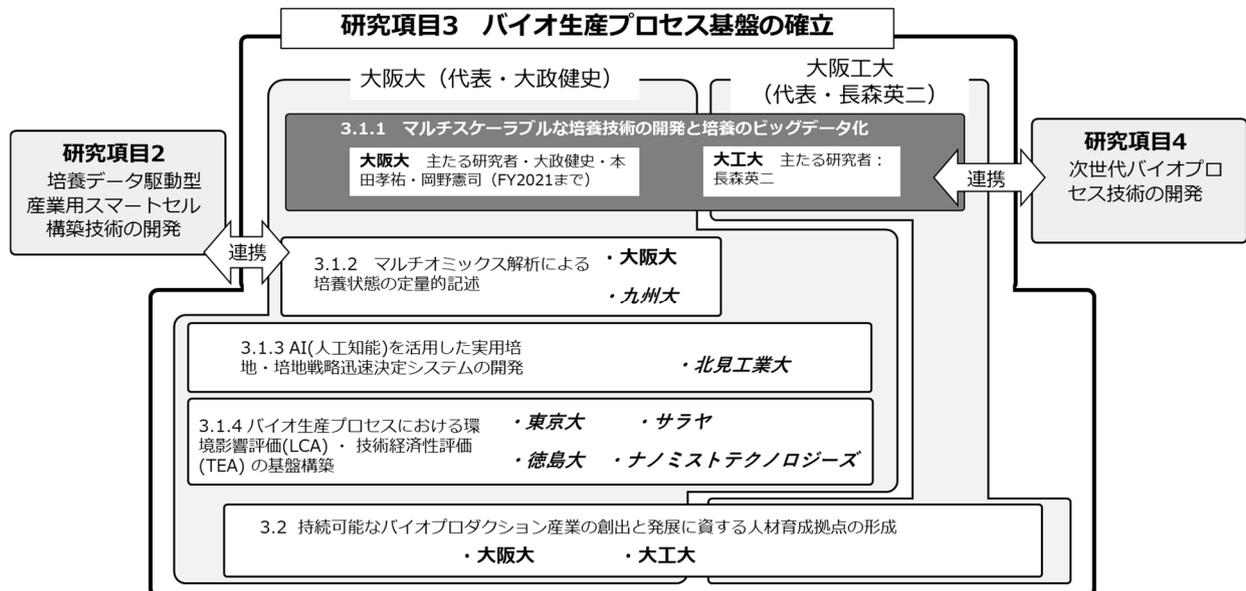
持続可能なものづくり産業の形態のひとつとしてバイオ生産プロセスへの注目が高まるにつれ、欧米では細胞株の育種から中～大規模培養によるそれらの性能試験までを請け負うバイオファウンドリ拠点が整備されつつある。本プロジェクトでは、これらと同等以上の機能を有したバイオファウンドリ拠点をわが国にも整備し、新規バイオ生産事業者の参入拡大をはかることを目的とするが、このうち本実施項目ではラボスケール（0.2～30 Lスケール）での培養装置を用いたバイオ製品の試作と実用性検証までを担当する。標準株（モデル株）を用いた試験データの取得・公開を通じて試作施設としての実施能力を示し、他機関からの評価対象株（他の実施項目から提供されるスマートセル株等）の受け入れを促進する。受け入れた株の実用性検証を行い、実用化に向けて改良すべき探索・育種指針を菌株提供機関にフィードバックする（2022年度末までに5件、2024年度末までに30件程度）。プロジェクト終了時までには少なくとも1株において低コスト・低環境負荷が実現可能な生産条件を策定、プロセスの省力化等を達成する。

(3) 全体計画

	FY2020	FY2021	FY2022	FY2023	FY2024	FY2025	FY2026
マルチスケラブルな培養技術の開発と培養のビッグデータ化	培養装置の導入・動作確認	培養装置の拡充	モデル株培養1 (油糧酵母)	モデル株培養3 (大腸菌)	スマートセル株培養2		
産業用スマートセルの大量培養への適合性と LCA・TEA 検証	モデル株策定・スケラビリティ検	モデル株による LCA・TEA 検証 (油糧酵母・SL 生産酵母)	モデル株培養2 (コリネ型細菌)	スマートセル株培養1	スマートセル株培養3		
		培養パラメーター測定法の標準化					
				スマートセル株による LCA・TEA 検証			

(4) 実施体制

研究項目3全体の組織図を示す。斜体の実施機関は大阪大学の再委託先を表す。



(5) 運営管理

プロジェクト (M01) 全体会議とは別に、研究項目3 (大阪大学とその再委託先、ならびに大阪工業大学) 内の情報共有のための定例会議 (オンライン) を開催している。本定例会議には4半期ごとに NEDO、PL、SPL、M01 代表にも参加いただき、定期的な情報交換が行える体制を整えている。他研究項目との連携促進のため、大工大・長森が研究項目4「次世

代バイオプロセス技術の開発」、大阪大学・松田（研究項目 3.2 担当）が研究項目 2「培養データ駆動型産業用スマートセル構築技術の開発」との窓口を務め、情報の集約・整理を行っている。

(6) 実施の効果

「(1)背景と目的」にも記載のとおり、本実施項目は、プロジェクト全体で整備を目指すバイオファウンドリ拠点のひとつと位置付けられる。そのため個々の製品の費用対効果等については言及しないが、他の研究開発グループから寄託されたスマートセル株等の培養条件最適化と実用化性能の評価を通じて、研究開発期間を短縮化し、プロジェクト（特に M01）全体が掲げる目標である 390 万トン/年削減の達成に貢献する。実証施設ならびに研究項目 3.2 で取り組む人材育成プログラムを活用して、プロジェクト終了後の拠点の自走化・新規産業化を目指す。

(7) 中間目標の達成度

活動項目 (担当)	活動内容	中間目標	達成度
設備導入・整備（阪大・大工大）	培養設備の導入と整備	・ 検証試験の受託に必要な培養設備を完備する。	・ ○ 阪大：1L 卓上培養槽 6 機， 5L 卓上培養槽 6 機 大工大：0.2L 卓上培養槽 24 機， 1L 卓上培養槽 12 機， 5L 卓上培養槽 4 機，30L 蒸 煮式培養槽 1 機導入
培養パラメータ測定法の標準化（大工大）	各種培養パラメータ（ k_{La} 、シェアストレスなど）の測定法の比較検討と標準化	・ 各種培養パラメータの測定法の標準化を完了する。	・ ○ 異なる方法で測定された k_{La} 値の相関を明示。 K 値を用いたシェアストレスの測定を実施。
モデル株（油糧酵母・コリネ型細菌）の培養（阪大・大工大）	公開可能な培養データ取得のためモデル株を策定し、培養条件の最適化を実施する。	・ モデル株の選定 ・ 培養条件最適化 ・ 探索・育種指針のフィードバック（5 件程度）	・ ○ 油糧酵母モデル株の培養において合成培地で世界最高水準の油脂生産を達成。培養に関する技術移転を含め受託元機関に成果をフィードバック。
LCA・TEA 検証（阪大・大	油糧酵母モデル株、SL 生産株の培	・ LCA・TEA に必要なインベン	・ ○ 油糧酵母、SL 生産株の培養

工大)	養を対象に LCA・TEA に必要なイベントトリデータを取得する。	トリデータの取得	における炭素収支や卓上培養槽運転に伴う電力消費のデータを取得。
-----	-----------------------------------	----------	---------------------------------

(8) 研究開発の成果と意義

(8)-1 設備導入（大阪大学・大阪工業大学）

2020～2021年度の両年度にまたがって実証機関として必要な培養装置群を大阪大学、大阪工業大学のそれぞれに導入した（図 3.2.1.1.3.1-1）。大阪大学には、1 L、5 L 卓上培養槽を各 6 機導入し、培養制御のほか、LCA に必要となる排気ガスセンサーや消費電力計を合わせて導入した。大阪工大には 1 L 卓上培養槽 12 機、5 L 卓上培養槽 4 機のほか、培養条件の初期スクリーニングのための 0.25 L 卓上培養槽 24 機、スケールアップ性能評価のための 30 L 蒸煮式培養槽 1 機も導入した。

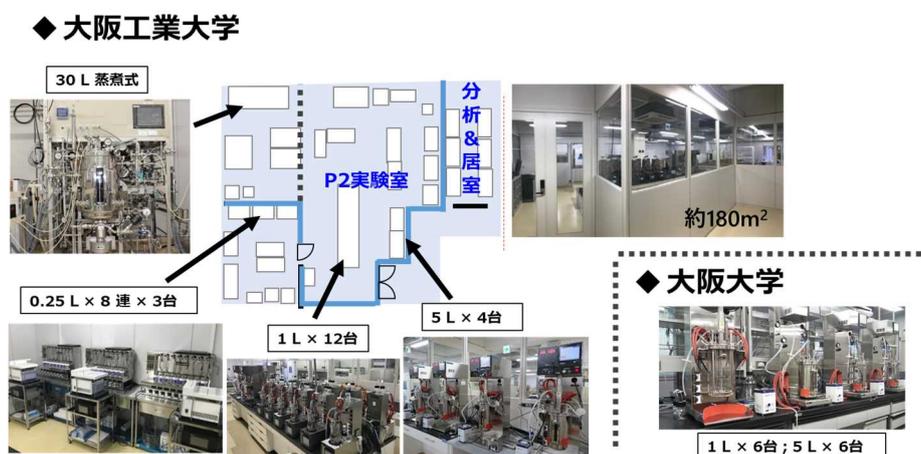


図 3.2.1.1.3.1-1 導入した培養装置と設備類

(8)-2 培養パラメーター測定法の標準化（大阪工業大学）

(8)-1 に記載の培養槽には一般的な培養装置に備えられる温度、pH センサーのほか、溶存酸素 (DO) センサー、濁度 (OD) センサー、生細胞数センサー、排ガスモニターなどのオンラインセンサー類が装備されている。また自動サンプルコレクターも同時に導入されており、高スループットに培養パラメーターの取得が可能となっている。これらの計測機器類により定量可能なパラメーターに加え、ここでは特にスケールアップ指標として汎用されるパラメーターである酸素移動容量係数 (k_{La}) ならびに攪拌に伴うシェアストレスの測定方法の標準化を行った（図 3.2.1.1.3.1-2）。 k_{La} の測定には、培養槽中の DO の変化を DO センサーにて測定するダイナミック法、亜硫酸ソーダの酸化量にて酸素吸収速度を測定する亜硫酸ソーダ法、培養排ガス中の O_2 、 CO_2 分圧から酸素吸収速度を算出する排ガス法などが挙げられる。このうちダイナミック法で用いられる DO センサーはその測定原理によりガルバニ式（隔膜式）、燐光消失式などに大別され、センサー応答速度の違いから測定される k_{La} の値に少なくない違いが生じる。こうした差異の補正を可能とすべく、

異なる測定法・センサーによる k_{La} 測定を行った。温度 30°C、培地張込み量 0.5 L、通気速度 0.7 L/min の条件下で攪拌速度を変化させて測定を行ったところ、攪拌速度 300 rpm、 $k_{La}=50 \text{ h}^{-1}$ 程度までの範囲では用いるセンサー間で顕著な違いは見られなかったものの、これを超える条件下では、隔膜式の場合、センサー応答速度の遅れに起因すると考えられる打ちが見られた。一方の燐光消失式では攪拌速度 600 rpm、 $k_{La}=250 \text{ h}^{-1}$ 程度の範囲まで、攪拌速度に対して指数関数的に k_{La} が上昇する様子が観察された。以上の結果に基づき、以降、本項目にてダイナミック法での k_{La} 測定を実施する場合は、燐光消失式センサーを使用することとした。また同センサーによる各種培養槽の k_{La} を測定し、スケールアップ試験のための基本データとした。

シェアストレスの指標としては、筑波大・田中ら（生物工学会誌 84 巻 1 号，2006 年）の報告に基づき、 β -ナフトールの溶解速度からシェアストレスを定量する K 値を用いた。 k_{La} と同様、異なるスケールの培養槽にて測定を行ったところ、スケールの違いには大きく影響されず、攪拌速度に応じてシェアストレスが上昇していく様子が確認された（図 3.2.1.1.3.1-3）。

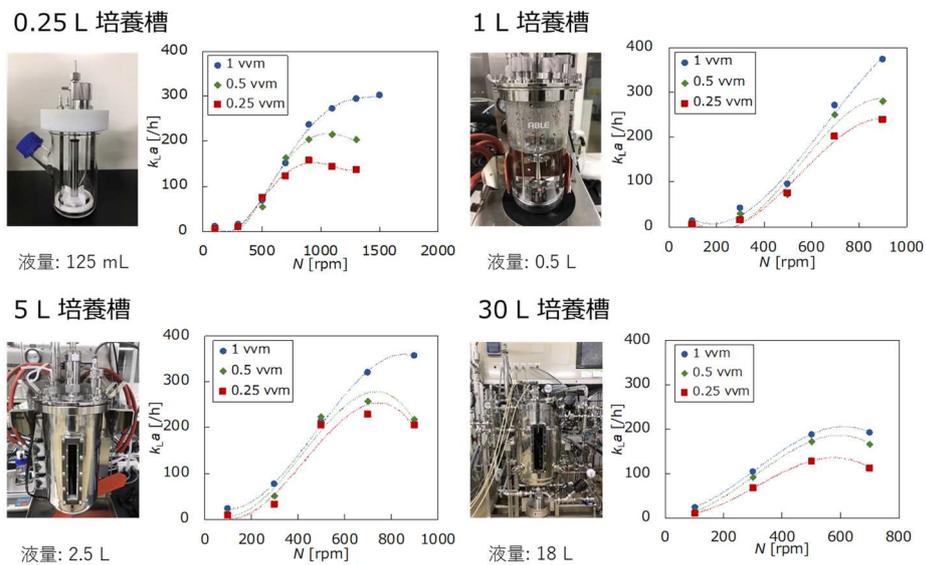


図 3.2.1.1.3.1-2 各培養槽における攪拌速度と k_{La} の相関

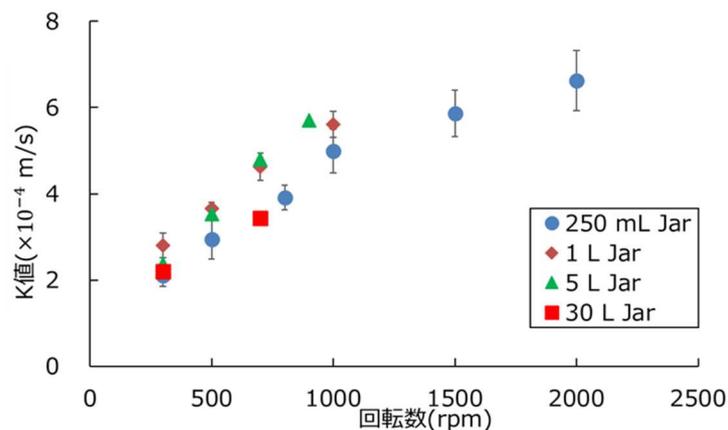


図 3.2.1.1.3.1-3 各培養槽における攪拌速度とシェアストレス (K 値) の相関

(8)-3 モデル株の培養（阪大・大工大）

上記の取り組みにより一連の設備導入と培養パラメーター測定法の標準化がなされたことから実際の培養試験に取り組んだ。培養条件の最適化とそれによる実用化検証試験の成果を公開し、バイオ生産プロセス開発支援機関としてのパフォーマンスをプロジェクト参加機関等に周知することを目的に、ここでは研究成果の開示が可能なモデル株を用いた試験を実施した。M01 プロジェクト全体で取り扱うモデル株として、先行プロジェクトからの取扱い実績が豊富な油糧生産酵母 *Lipomyces starkey* を取り上げた。研究の遂行に当たっては、同株の育種・評価で先行する研究項目 2.2.1 のグループ（不二製油・新潟薬大）、次世代バイオプロセス技術の開発に取り組む研究項目 4.1 のグループ（ちとせ研究所）、ならびにプロジェクトリーダー、サブプロジェクトリーダーなどと都度の協議・連携をとり、研究の方向性を決定した。

L. starkey は必要な栄養素が十分に存在する環境下では細胞増殖を行う一方で、炭素源は存在するものの窒素やリンなど増殖に必要なほかの栄養素が不足する環境においては、培地中の炭素源を細胞内に取り込み油脂として蓄積する。すなわち目的物質の生産と細胞増殖が別々のフェーズで生じる増殖非連動型の生産プロファイルを示す微生物と分類できる。一般に増殖非連動型の微生物の培養では、目的とする物質の生産に先立ち、十分な細胞数

（細胞密度）を達成したうえで、培養のフェーズを細胞増殖から物質生産へと切り替えることが定石とされる。本項目でもこの定石に従い、(i) 必要な栄養素が含まれた培地を用いた指数流加培養による細胞密度の最大化と、これに続く(ii) 窒素源を含まない培地の定速流加による油脂蓄積からなる培養戦略を採ることとした。培地成分のモニターと制御が簡便な完全合成培地を用いることとし、Pomraning らの報文 (Biotechnol. Biofuel., 12, 162 (2019)) に記された培地組成を採用、以降、必要に応じてこれを改変・最適化していった。なお本培地では、炭素源、窒素源としてそれぞれグルコース、塩化アンモニウム (NH_4Cl) を用いている。初期グルコース濃度を 20 g/L に固定し、C/N 比を変化 (= NH_4Cl 濃度を変化) させた回分培養を行い、グルコース枯渇前に窒素源が枯渇することなく、かつ過度の窒素源が残存し

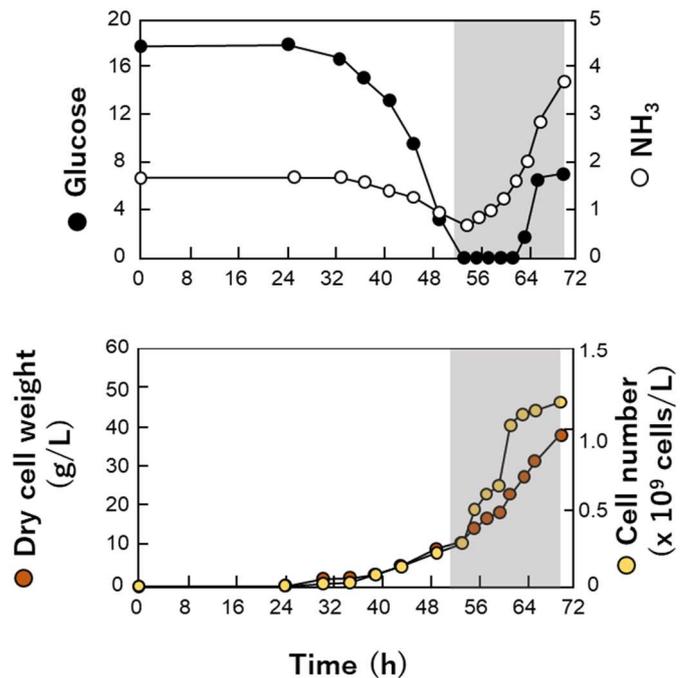


図 3.2.1.1.3.1-4 細胞密度の最大化を目的とした流加培養試験。培養開始から 52 時間までは回分培養。灰色で示す期間（培養開始から 52~68 時間）、グルコース 500 g/L、 NH_4Cl 102.5 g/L (C/N 比 = 8.7) を含む新鮮培地を指数流加。流加速度は $\mu = 0.125 \text{ h}^{-1}$, $Y_{X/S} = 0.45$ として、本文中に示した数式により算出したものを用いた。

ない初期 NH_4Cl 濃度を決定した。回分培養終了後、細胞密度最大化のための指数流加を開始した。培地流入速度は下式によって求め、算出に必要な比増殖速度 (μ) と増殖収率 ($Y_{X/S}$) の値は回分培養実験の結果から求めたものを利用した。

$$F(t) = \frac{\mu V_0 X_0}{Y_{X/S} S_F} \exp(\mu t)$$

なお $F(t)$ は時間 t における流加培地の流入速度、 V_0 は流加培養開始時点の培養液体積、 X_0 は同培養液内の細胞濃度、 S_F は流加培地中のグルコース濃度である。回分培養と同様にグルコース濃度を固定 (500 g/L) し、C/N 比 (NH_4Cl 濃度) を変化させた流加培地を用い、 NH_4Cl 濃度の最適化をはかった。しかし図 3.2.1.1.3.1-4 に示すように培地中には一定量の窒素源が残存しているにもかかわらず、細胞密度は培養開始 62 時間後 (流加開始 10 時間後) ごろから、 $1.1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 程度で頭打ちが起こっている様子が観察された。このとき細胞密度が頭打ちとなっているにもかかわらず、培養液中の乾燥菌体濃度が上昇していることから、増殖は停止している一方で、細胞内で油脂蓄積が生じ細胞体積が向上していることが推察された。すなわち指数流加の過程で窒素源以外の栄養素が枯渇し、意図しないタイミングでの脂質生産フェーズへの切り替えが生じたものと考えられる。そこで研究項目

3.1.2 (マルチオミクス解析グループ; 大阪大学・九州大学) に無機成分も含めた培養液成分の分析を依頼した。分析結果より培養の進行に伴い、特にリン酸イオン濃度の低下が顕著にみられることが確認された。この結果に基づき、回分培養に用いる本培地ならびに流加培地中のリン酸イオン濃度を初期設定値の 4 倍にあたる 1.5 g/L に設定し、再度試験を行った。結果として、培養開始から 103 時間

(流加開始から 51 時間) まで細胞密度の上昇が続き、その値はおよそ $4.8 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ にまで達した (図 3.2.1.1.3.1-5)。この培養液に NH_4Cl をほとんど含まない流加培地を流加し、窒素源の枯渇による油脂生産の誘導を行った。培地流入速度の最適化を行った結果、現在までに細胞内油脂含有率 48% (w/w) で 63.4 g L^{-1} にの油脂生産濃度 (トリアシルグリセロール) を達成している。この値は、既報において栄養培地上で *L. starkey* を用いて得られている最大の油脂生産濃度に比肩するものである。合成培地に限定すれば他の油糧酵母を用いた場合と比較しても世界最高水準に位置づ

き、その値はおよそ $4.8 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ にまで達した (図 3.2.1.1.3.1-5)。この培養液に NH_4Cl をほとんど含まない流加培地を流加し、窒素源の枯渇による油脂生産の誘導を行った。培地流入速度の最適化を行った結果、現在までに細胞内油脂含有率 48% (w/w) で 63.4 g L^{-1} にの油脂生産濃度 (トリアシルグリセロール) を達成している。この値は、既報において栄養培地上で *L. starkey* を用いて得られている最大の油脂生産濃度に比肩するものである。合成培地に限定すれば他の油糧酵母を用いた場合と比較しても世界最高水準に位置づ

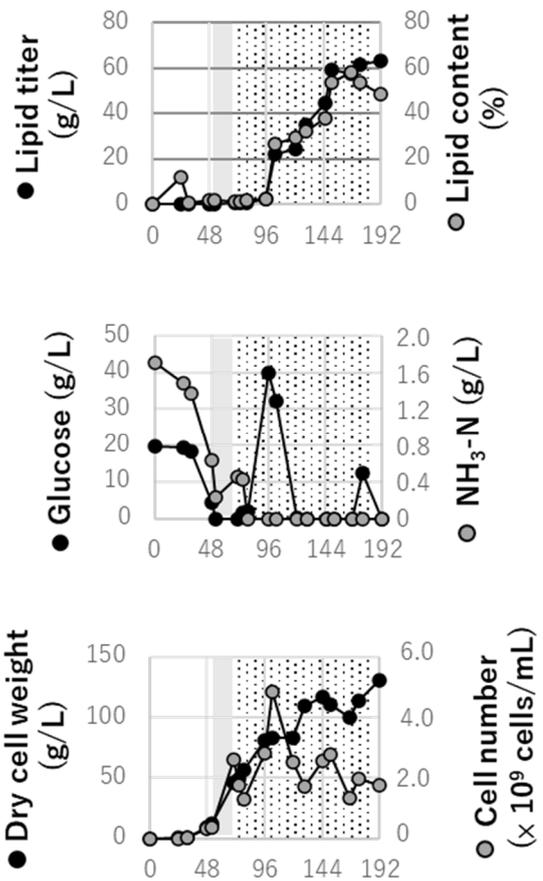


図 3.2.1.1.3.1-5 *L. starkey* を用いた二段階流加培養による油脂生産。回分培養に引き続き、灰色で示す培養開始から 52~76 時間までの期間は NH_4Cl を含む培地を指数流加。網掛けで示す残りの期間は、窒素源をほとんど含まない培地を定速流加し、油脂生産を誘導。

けられ、本グループのバイオ生産プロセス支援機関としてのパフォーマンスを十分に示すものであると評価できる（表 3.2.1.1.3.1-1）。また不二製油グループから研究者を受け入れ、油脂蓄積能を向上させた *L. starkey* スマートセル株の育種に向けた指針として、培養技術の移転と本項目でデータのフィードバックを行った。

表 3.2.1.1.3.1-1 種々の油脂酵母による油脂生産試験の成果の比

Yeasts	Carbon and nitrogen sources	Cultivation method	Cultivation time	Biomass	Lipid titers	Lipid content	Y _{X/S}	References
			h	g/L	g/L	% (wt)	g/g	
<i>C. curvatus</i>	Glucose, peptone, yeast extract, ammonium chloride	Fed-batch	183	104	86	83	nd	Zhang et al. (2011)
<i>C. curvatus</i>	Hydrogen production effluent containing volatile fatty acid, acetic acid	Fed-batch	192	168	126	75	nd	Chi et al. (2011)
<i>L. starkeyi</i>	Glucose, yeast extract, peptone	Two-stage fermentation	43*	105	68	65	nd	Lin et al. (2011)
<i>L. starkeyi</i>	Glucose, ammonium chloride	Fed-batch	192	131	63	48	0.12	This study
<i>R. glutinis</i>	Glucose, yeast extract, ammonium sulfate	Fed-batch	nd	185	74	40	nd	Pan et al. (1986)
<i>R. glutinis</i>	Sucrose, ammonium sulfate	Fed-batch	84	106	67	63	0.18	Lorenz et al. (2017)
<i>R. torulooides</i>	Glucose, yeast extract, ammonium sulfate	Fed-batch	135	107	73	68	0.26	Li et al. (2007)
<i>Y. lipolytica</i> (engineered)	Glucose, yeast extract, ammonium sulfate	Fed-batch	83	148	99	67	0.27	Qiao et al. (2017)
<i>Y. lipolytica</i> (engineered)	Glucose, yeast extract, ammonium sulfate	Fed-batch	144	194	115	59.3	0.16	Xu et al. (2017)

nd: no data

*: the cultivation time does not include all fermentation process

(8)-4 LCA・TEA 検証（阪大・大工大）

(8)-3 記載の *L. starkey* の培養結果に培養槽排ガス中の CO₂ 測定結果を加味し、同培養における炭素収支を求めた。炭素源として供給されたグルコースのうち 12% が油脂に変換され、38% が CO₂ として排出される結果となった。この値を LCA のためのインベントリデータとして研究項目 3.1.4（LCA シミュレーターグループ）の東京大学と共有するとともに、不二製油グループに対しても *L. starkey* の育種指針のひとつとして提供を行った。同様の培養試験を 3.1.4 にてサラヤが取り扱うソホロリピッド生産株についても実施した。これとは別に、卓上培養槽の運転に伴う消費電力を駆動部分ごとに測定し、加熱・冷却や攪拌、通気等のそれぞれの操作に伴うエネルギー消費量を推算した。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

これまでの取り組みにより、モデル株（野生株）を用いた最適化試験にて高い油脂生産量を達成するなどバイオ生産プロセス開発支援機関としての優れたパフォーマンスが示されている。培養に必要な技術移転や、得られた培養液や生産物を研究項目 3.1.2（マルチオミクス解析グループ）提供しここで得られた代謝物データも含めて育種グループに対して有益なフィードバックを行うことができている。今後、機械学習を用いた培地・培養戦略迅速決定システム（北見工大）や LCA・TEA シミュレーター（東大）が開発・導入されていくことにより、より迅速で高精度な最適化と実用性評価が可能と予想され、最終目標の達成見込みは高い。

(10) 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	
2020	0	0	0	0	0	0	0
2021	0	0	0	0	0	0	0
2022	0	0	0	1	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	0	1	0	0	0

(11) 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
2020	0	0	0
2021	0	0	0
2022	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	0

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

本項目で開発に取り組むバイオ生産プロセス開発支援機関としての機能、ならびに研究項目 3.2 で取り組む人材育成拠点としての機能を統合した有償のバイオファウンドリ施設として、プロジェクト終了後の自走化をはかることを実用化・事業化のゴールに据える。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」プロジェクト全体として整備に取り組む複数のバイオファウンドリ施設との間で、連携を密に保ち、地理的・機能的な役割分担を明確化させる。本項目で整備される設備については、小～中規模での培養条件の最適化と試作支援、ならびに LCA・TEA を活用した実用化検証機関としての機能を強化、他との差別化をはかる。これとは別に研究項目 3.2 での取り組みにより人材育成拠点としての機能を付与し、受託研究費のほか受講料収入の獲得を見込む。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

プロジェクト実施期間中は、引き続き参画機関からのスマートセル株等の受託と評価を行い、試作支援施設としてのパフォーマンスを示していく。この際、研究項目3に属する他機関（九州大学、北見工業大学、東京大学）等で開発される要素技術も取り込み、機能強化をはかる。また受託元の期間や人材育成活動への参加者らからのフィードバックを収集し、採算性を持った受託研究費、受講料の設定をはかる。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

バイオフィアウンドリは近年、欧米などでも複数の事例が見られるが、本取り組みにて事業化を目指す施設のように人材育成機能を備えたものはほとんどない。少子高齢化に伴う人材不足とノウハウの損失はわが国のバイオ生産分野が抱える大きな問題のひとつである。この問題の解決に目的を据えたことにより、バイオフィアウンドリ機関としての独自性を備えるとともに、受託研究のみに頼らない運用形態が可能となる。

(12.5) 波及効果

バイオ生産分野への新規参入への障壁は、製造設備を持たない企業が巨額な初期投資を行わねばスタートラインに付けないことにある。本取り組みにより整備されるバイオフィアウンドリ機関は、この障壁を取り払うための有力な戦略となる。新規参入企業の増加は、既存のバイオ生産企業への刺激となり分野全体の活性化に資する大きな波及効果を有する。

3.2.1.1.3.2 「マルチオミックス解析による培養状態の定量的記述」 研究項目 3.1.2

(1) 背景と目的

培養中の細胞内外の代謝物濃度の計測は、本テーマにおいて重要な役割を果たす。本テーマでは、バイオモノづくりにおいて、培養のスケールアップを迅速化し、試作に至るまでの期間を短縮するための方法論の開発を目指している。大規模培養条件内で十分なパフォーマンスを発揮する微生物、即ち「大量培養への適合性」を有する微生物を探索・育種するためには、何らかの探索・育種指針が必要である。そこで、研究項目 3.1.1 では、 k_{La} やシエアストレスといったインプットの変化に対する培養挙動の変化を調査するが、微生物の遺伝子群やタンパク質（酵素）群、代謝物群にどのような状態変化が起きた結果、比増殖速度や比生産速度、生産物濃度、菌体収率といったアウトプット値の変化がもたらされるかという細胞内プロセスを明らかとする必要がある。この「培養の良し悪し」を判断するには、まず、細胞外の培地成分含量の測定が必要となる。将来的に「培養の良し悪し」をリアルタイムで判断・制御できる指標を見出すことができれば、研究項目 4 が開発する培養の高度制御に寄与するため、発酵のモニタリング技術が必要となる。

また、細胞内の代謝中間体含量（メタボローム）、酵素発現プロファイル（プロテオーム）データを組み合わせることで、研究項目 2 で育種した大量培養への適合性を有する微生物（産業用スマートセル）の代謝状態の計測にも重要となろう。さらに、研究項目 1 のバイオリソースの探索段階では、リソース中の菌が産生するユニークな代謝産物を探索するため、代謝表現型の多様性の解析技術が必要とされる。

そこで、本研究項目では、「培養計測基盤技術の開発」および、「培養状態の定量的記述」を目的とする。

1) 培養計測基盤技術の開発

- ① 高精度培養計測技術：培養ビッグデータを統合解析システム（iBMS）に提供した後に実施される再解析等に適合したデータ取得法を構築する。菌体外代謝物と菌体内代謝物の濃度を高精度に測定するターゲットメタボローム解析法を開発する（九州大学・馬場 G、大阪大学・松田 G）。また、菌体内酵素タンパク質のプロテオーム解析および菌体内代謝流束の解析（大阪大学・松田 G）をモデル株や産業用スマートセルへと適用する（研究項目 2, 3.1.1 との連携）。
- ② 発酵モニタリング技術の開発：細胞内の代謝状態の変化を表す成分の網羅的計測法を開発を行う（大阪大学・福崎 G）（研究項目 3.1.1 との連携）。
- ③ 多様性計測技術の開発（令和 5 年度から実施）：バイオリソース中の菌が産生する代謝表現型の多様性をとらえるための計測技術を開発する。そのために必要なメタボローム解析法を開発する（九州大学・馬場 G、大阪大学・松田 G）（研究項目 1 との連携）。

2) 培養状態の定量的記述

ベンチスケール培養槽を用いて様々な培養条件、タイムスケールで培養を行った培養サンプル（研究項目 3.1.1 の研究者より提供）について、高精度培養計測技術の成果を活用してデータを取得し、培養状態の定量的記述を行う。また、研究項目 2 等が実施する産業用スマートセル開発に資する細胞内、細胞外の代謝物・酵素発現プロファイルデータを取得する。データの取得は

九州大学・馬場 G・大阪大学・松田 G が連携して実施し、iBMS へのデータ提供が可能な形を整える。

(2)位置づけ、目標値

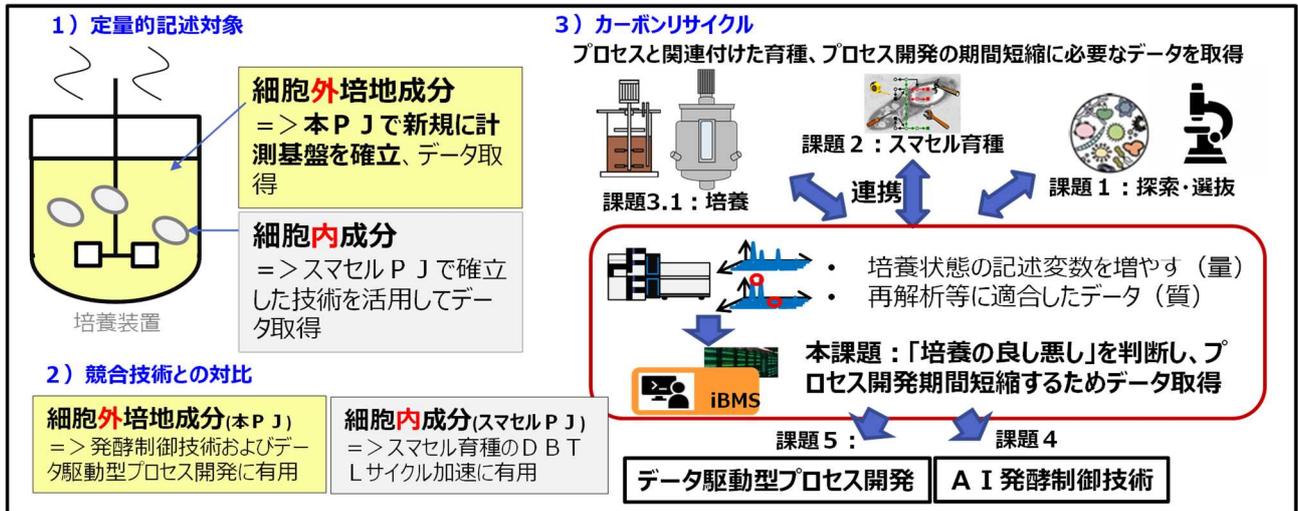


図 3.2.1.1.3.2-1 本課題の位置づけ プロセスと関連付けた育種、プロセス開発に必要な「培養の良し悪し」を判断するためデータを、細胞外成分および細胞内成分の計測を行うことで取得する。

1. 定量的記述対象
 - プロセスと関連付けた育種、プロセス開発に必要な「培養の良し悪し」を判断するためのデータを細胞外成分および細胞内成分の計測を行うことで取得する (図 3.2.1.1.3.2-1)。
2. 競合技術との対比 (目標値)
 - 既存技術である細胞内成分の計測技術に加えて、細胞外培地成分の記述を行うことで、標準培養装置から取得できる「培養の良し悪し」の判断を可能とする。
 - スマートセル開発、プロセス開発の期間短縮目標に適合したデータを年 50 件以上取得する。
3. カーボンリサイクル (環境負荷低減への貢献)
 - スマートセル開発、プロセス開発の期間短縮に寄与する。
4. 中間目標
 - 1) 培養計測基盤技術の開発：複数の研究機関から取得したデータの互換性を検証し、菌体外成分の高精度培養計測技術を確立する。
 - 2) 培養状態の定量的記述：培養状態の定量的記述 (年 50 件以上)
5. 最終目標
 - 1) 培養計測基盤技術の開発：高精度培養計測技術の確立と標準化
 - 2) 培養状態の定量的記述：培養状態の定量的記述 (年 50 件以上を継続)

(3) 全体計画

	FY2020				FY 2021	FY 2022	FY 2023	FY 2024	FY 2025	FY 2026
	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期						
3.1.2										
1. 培養計測基盤技術の開発			計測基盤の整備		高精度培養計測技術の確立				標準化・ノウハウ化	
①高精度培養計測技術										
②発酵モニタリング技術の開発			計測基盤の整備		発酵モニタリング技術の開発		自動培養制御のための指標抽出		標準化・ノウハウ化	
③多様性計測技術の開発							多様性計測技術の確立		標準化・ノウハウ化	
2. 培養状態の定量的記述			計測基盤の整備		モデル株培養状態の定量的記述		スマセル株培養状態の定量的記述		培養状態の定量的記述	

図 3.2.1.1.3.2-2 全体計画

1年目（FY2020）に研究開発基盤を整備後、2年ごとに3つのフェーズに区切って研究開発を実施している（図 3.2.1.1.3.2-2）。第1フェーズ（FY2021 - 2022）は高精度培養計測技術の確立、発酵モニタリング技術の開発を行い、さらに、モデル株培養状態の定量的記述を行う。第2フェーズ（FY2023 - 2024）において、発酵モニタリング技術では、自動培養のための指標抽出を試みる。また、多様性計測技術の開発に着手し、スマセル株培養状態の定量的記述を行う。第3フェーズ（FY2025 - 2026）では、開発した技術の標準化、ノウハウ化を行う計画である。

(4) 実施体制

本項目は、大阪大学・福崎英一郎、九州大学・馬場健史、大阪大学・松田史生が分担して実施する（図 3.2.1.1.3.2-3）。この3名は、我が国における質量分析装置を用いたオミクス（メタボロミクス）技術開発をけん引してきたグループであり、これまで培った技術の本テーマに展開して、プロセスと関連付けた育種、プロセス開発の期間短縮に必要なデータ取得可能な体制を構築した。

1) 培養計測基盤技術の開発のうち、① 高精度培養計測技術は、九大・馬場 G、阪大・松田 G が共同して実施する。これまで両チームは、並行開発による計測精度の相互検証によって計測技術の高精度化研究を実施してきた実績があり（Izumi et al Metabolites 9 (11), 257）、これを本PJにて発展させる。② 発酵モニタリング技術の開発は、阪大・福崎 G が担当する。阪大・福崎は GC-MS のメタボロミクス技術の我が国における第一人者であり、装置開発まで視野に入れた新規性の高い技術開発を行う。

2) 培養状態の定量的記述のうち、細胞外培地成分の計測は、九大・馬場 G、阪大・松田 G が「高精度培養計測技術」を用いて共同で実施する。また、細胞内代謝物：メタボロームの測定は、九大・馬場 G が実施する。九大・馬場 G は、内因性代謝物を測定する新たな計測技術を開発する世界的なトップラボであり、これまで培ってきた技術を用いて産業用スマートセル開発に必要なデータを取得する。また、細胞内酵素量：プロテオームは、阪大・松田 G が実施する。阪大・松田 G はスマートセルPJにおいて、細胞内酵素タンパク発現量を一斉測定する、定量プロテオミクス技術を開発しており、これを本PJに展開する。産業用スマートセル開発に必要なデータを取得する。

3.2.1.1.3.2-3

本項目で取得したデータの利活用は、他課題との連携を通じて行う。図 3.2.1.1.3.2-3 に示したように、産業用スマートセル育種を行う研究項目群と、プロセス開発を担う研究項目 4.1「並列型のバイオ生産 AI 制御システムの開発」、研究項目 3.1.1「マルチスケラブルな培養技術の開発」と密接な連携を行っている。特に細胞外培地成分の計測は、スループットの向上が可能なため、今後必要とされる助成事業への対応が可能な体制を整える計画である。

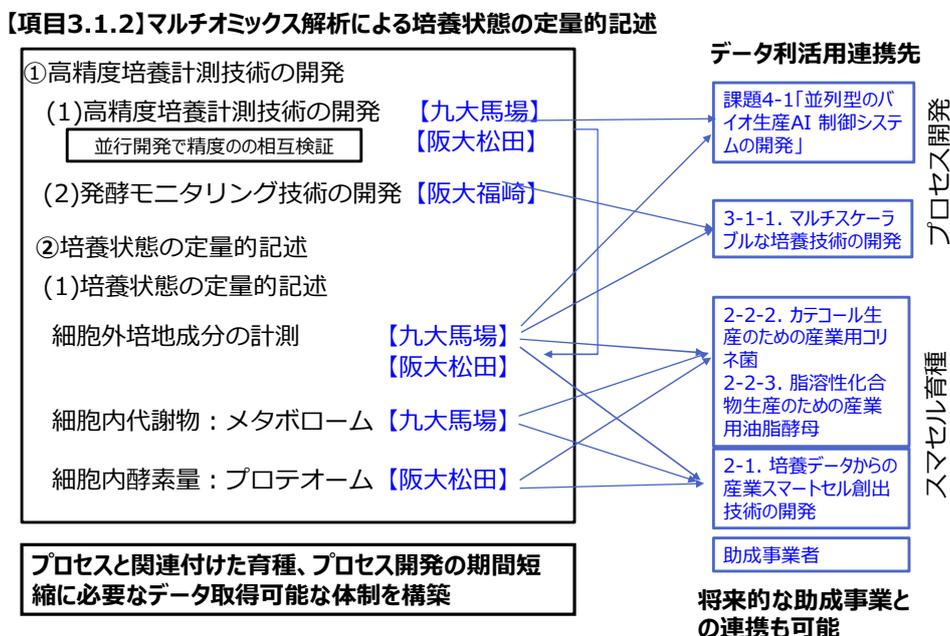


図 3.2.1.1.3.2-3 実施体制

(5) 運営管理

本項目内の運営管理は、研究項目 3. 「バイオ生産プロセス基盤の確立～持続可能なバイオプロダクション産業の創出と発展に資する実用化検証・人材育成拠点の形成～」の単位で、毎月 1 回第最終金曜日に実施している iBMS 分科会 3 定例会議に参加して実施している。2022.4 月までに本項目より計 20 回の進捗報告が行われた。また、本項目は、他課題との連携が必須となる課題であり、本 PJ 全体の方針を決定する iBMS 委員会の指導の下、さまざまなレベルで連携の企画、調整、実施が行われている点に特徴がある。これまで大小合わせて 20 回以上の現地打ち合わせ、オンライン打ち合わせ、メール打ち合わせが実施された。

(6) 実施の効果

本課題は、図 3.2.1.1.3.2-1 に示したように、産業用スマートセル開発やプロセス開発を行う他課題と連携し、プロセスと関連付けた育種、プロセス開発に必要な「培養の良し悪し」を判断するためデータを取得する。培養状態の定量的記述で用いる高精度なメタボローム分析手法、定量プロテオミクス法は外注が困難であり、本 PJ 内で実施することで、研究開発の期間短縮に寄与する。また、図 3.2.1.1.3.2-3 に示したように、すでに他課題と密接に連携する実施体制を構築しており、本課題で開発した技術、データは産業用スマートセル開発やプロセス開発の期間短縮に大きく寄与している。例えば、研究項目 3.1.1 (大阪大学・本田 G) 野生株流加培養培地サ

ンプルの分析からは、油脂蓄積期に欠乏する制限基質成分を見出すことに成功し、油脂生産性向上に貢献した（後述）。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	達成度	理由
1) 培養計測基盤技術の開発 ① 高精度培養計測技術の開発	複数の研究機関から取得したデータの互換性を検証し、菌体外成分の高精度培養計測技術を改良する。	○	アミノ酸、有機酸、無機イオンの高精度培養計測技術の開発に成功。
② 発酵モニタリング技術の開発	知財化のため記述なし	○	知財化のため記述なし
2) 培養状態の定量的記述	課題 3.1.1 等が実施する培養試験件数のうち年間 50 件を目標としてデータ取得を行う。	○	2021 年度に 50 件/年の代謝成分計測体制を整備。

(8) 研究開発の成果と意義

1) 培養計測基盤技術の開発

本課題では、① 高精度培養計測技術で、培養中の細胞内、細胞外の代謝物、無機物、② 発酵モニタリング技術の開発で、培地成分を定量的に記述するための基盤技術の開発を行った。開発にあたって、モデル株である油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の培養から得た培地サンプルを利用した。

① 高精度培養計測技術（九大・馬場 G、阪大・松田 G）

中間目標：複数の研究機関から取得したデータの互換性を検証し、菌体外成分の高精度培養計測技術を改良する。

達成度：○（アミノ酸、有機酸、無機イオンの高精度培養計測技術の開発に成功。）

Lipomyces starkeyi の合成培地の情報および油糧酵母の文献情報をもとに、「培養の良し悪し」を判断するために必要となることが予想される菌体外成分の選定を行った。その結果、培地中の炭素源である糖（グルコースなど 15 種）、発酵副産物である有機酸（20 種）やアミノ酸（20 種＋関連物質）に加えて、従来ではあまり観測してこなかった無機イオン（陽イオン Na^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} および陰イオン PO_4^{3-} , Cl^- , SO_4^{2-} ）を観測対象として液体クロマトグラフィー（HPLC）を基盤とした高精度計測技術の開発に着手した。HPLC を用いて菌体外成分の網羅的定量分析を行うためには、測定対象化合物の物理化学的性質をよく理解した上で、適切な分離条件と検出法を組み合わせる必要があった。また、データの互換性を検証するため、九大・馬場 G および阪大・松田 G にて別個に分析条件の開発を行った。

九大・馬場 G では、各種カラムや移動相、グラジエント条件などを最適化することで、4 種の定量分析法の開発に成功した（図 3.2.1.1.3.2-4）。当該分析法を用いることで *L. starkeyi* の培地上清から 40 種の成分の検出・定量に成功した。

阪大・松田 G では、有機酸・糖を対象として Bio-Rad 社製 Aminex HPX-87H カラムを使用し、示差屈折率検出により島津 HPLC Prominence にて 9 種類を定量する手法を用いた。また Agilent 社製 Phenomenex Luna C18 カラムを使用し、AccQ・Tag 法で誘導体化した後、UV 吸収検出により島津 HPLC Nexera にてアミノ酸 18 種類を定量する方法を用いた。また、無機イオンは、Agilent 社製 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムを使用し、蒸発光散乱検出により島津 HPLC Nexera にて 8 種類を定量する系を確立した。

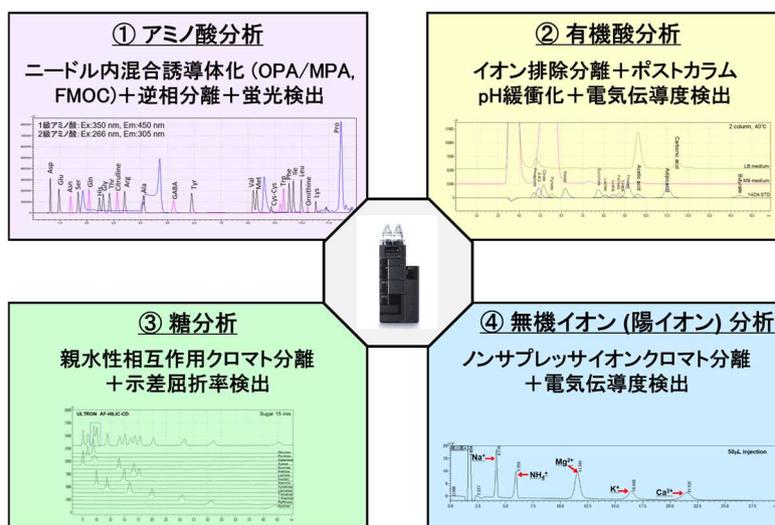


図 3.2.1.1.3.2-4 菌体外成分の高精度培養計測技術の開発

② 発酵モニタリング技術の開発【阪大・福崎 G】

知財化のため記述なし

2) 培養状態の定量的記述 (九大・馬場 G、阪大・松田 G)

中間目標：研究項目 3.1.1 等が実施する培養試験件数のうち年間 50 件を目標としてデータ取得を行う。

達成度：○ (2021 年度に 50 件/年の代謝成分計測体制を整備。)

本課題では、他課題と連携して、培養中の細胞内、細胞外の代謝物、無機物、酵素タンパク質濃度を測定し、培養状態の定量的記述を行う。得られたデータはデータ共有基盤を通じて、要素技術開発、産業用スマートセル開発、培養 AI 開発に活用する。

細胞外培地成分濃度の記述：上記の 1) 培養計測基盤技術の開発 ① 高精度培養計測技術にて開発した培地成分定量技術を用い、実施計画に従い、油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の野生株、産業用スマートセル株培養の培地成分の分析を行った。研究項目 3.1.1 と連携して大阪大学・本田 G の野生株流加培養でのサンプル 4 件、大阪工業大学・長森 G の 24 連ジャーでの野生株サンプル約 250 検体、および研究項目 2.2.3 「脂溶性化合物生産のための油脂酵母産業用スマートセル構築」の産業用スマートセル株の培養サンプル分析などの解析を実施した。

研究項目 3.1.1 (大阪大学・本田 G) 野生株流加培養培地サンプルの分析からは、油脂蓄積期に欠乏する制限基質成分を見出すことに成功し、研究項目 3.1.1 において、該当成分を培地に追加することで油脂生産性を向上することに成功した。

研究項目 2.2.3 (新潟薬大・高久 G) の産業用スマートセル株培養培地サンプルの分析を実施した。得られたデータは、研究項目 2.1.1 「培養データ駆動型細胞内ダイナミクス解析技術開発」と共有し、基盤技術開発に用いられている。

研究項目 3.1.1 (大阪工業大学・長森 G) 24 連ジャー野生株培養培地サンプルの一部について、九大・馬場 G および阪大・松田 G でそれぞれ分析を行った。九大・馬場 G では、有機酸・糖を 9 種類、アミノ酸 23 種類、無機イオン 7 種類の合計 39 の代謝成分を計測した。阪大・松田 G では、合計代謝成分 35 種類を計測した。データの互換性を検証するため、阪大と九大の両方で測定できた 28 の代謝物について、長森 G の 50 検体における代謝物濃度の比較を行った。図 3.2.1.1.3.2-5 に示したように、ほぼ全ての代謝物の濃度が 2 つの研究機関でよく一致した。唯一、無機イオンの Na^+ は概ね常に阪大の濃度が九大のものより 2 倍低くなる傾向にあるが、標品の濃度や検量線の改善で対応できると考えられる。複数の研究機関から取得データの互換性は高く、中間目標である菌体外成分の高精度培養計測技術の確立に成功したと言える。

取得したデータは AWS を通じて、iBMS へ格納した。データ格納については、まずちとせ研究所の担当者の方に AWS アカウントの発行していただき、ユーザー ID と PW で AWS にログインした。AWS サービスの S3 から、自分のグループの「osu-ba-s3」パッケージに、指定のフォーマットでデータをアップロードした。分析台帳には、研究項目 3.1.1 で作成された培養 ID の他、バッチ毎のラン ID、分析法 ID、代謝物名、代謝物 ID、濃度を記し、iBMS 基盤を通じて、プロセス開発を行う他項目の研究者が利活用できる体制を整えた。

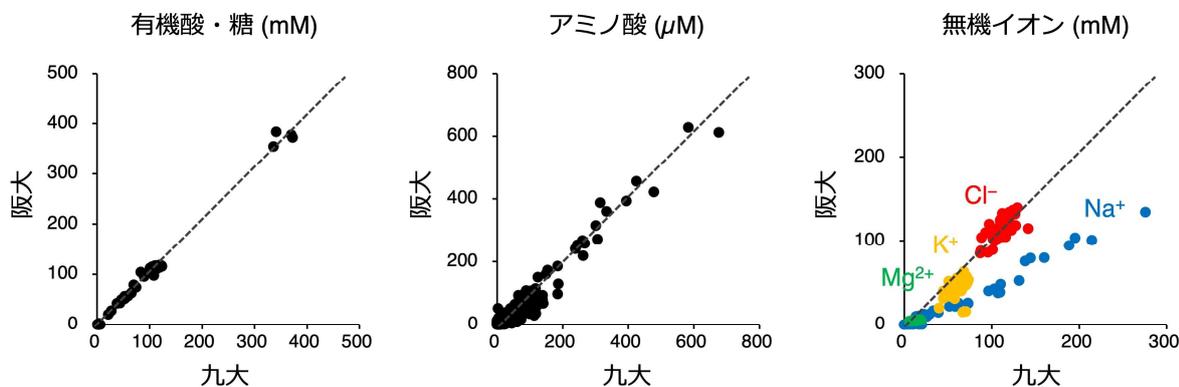


図 3.2.1.1.3.2-5 複数の研究機関から取得したデータの互換性検証

細胞内代謝物、酵素タンパク質発現量の記述：九大・馬場 G では、これまで開発を進めてきた細胞内のメタボローム情報を包括的かつ定量的に取得するための各種分析法の高度化を行った。具体的には、細胞内の親水性代謝物（水に溶解しやすい物理化学的性質を有する低分子化合物）の包括的分析を行うために、親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析 (unified-HILIC/AEX/MS/MS) と命名した新規の分析法を開発し、500 種の親水性代謝物が測定可能な分析系へと発展させた。一方、細胞内の疎水性代謝物（脂質）の網羅的測定は、超臨界流体クロマトグラフィータンデム質量分析 (SFC/MS/MS) による独自の分析プラットフォームを既に構築しており、約 2500 種の脂質分子を測定対象としたワイドターゲットリピドーム分析が実

施可能である。さらに、本研究課題では、研究項目 2.2.3 の新潟薬大・高久 T および不二製油・荒木 T と連携し、*L. starkeyi* のメタボローム解析法を検討した。以下知財化のため記述無し。

また、阪大・松田 G では、定量プロテオミクス技術を産業用スマートセル開発に適用した。研究項目 2.2.3 の新潟薬大・高久 T と連携し、油脂酵母 *L. starkeyi* の中心代謝酵素タンパク質約 100 種の発現プロファイルの経時変化を測定した。また、研究項目 2.2.2 の RITE T と連携し、コリネ菌の中心代謝酵素タンパク質約 100 種の発現プロファイルの経時変化を測定した。

得られた細胞内代謝物、酵素タンパク質発現量データは研究項目 2.1 「培養データからの産業用スマートセル創出技術の開発」および、研究項目 2.2 「生産困難化合物の発酵槽生産に適した産業用スマートセル構築」において利活用される。

(9)成果の最終目標の達成可能性

これまで、「培養計測基盤技術の開発」で技術開発を進め、中間目標である「複数の研究機関から取得したデータの互換性を検証し、菌体外成分の高精度培養計測技術を確立する。また、他研究項目との密接な連携を進め、培養状態の定量的記述も年 50 件以上行うことができた。現在、本項目が取得したデータを、iBMS 基盤を通じて、プロセス開発を行う項目 3, 4 の課題のみならず、産業用スマセル開発を担う項目 2 の多数のテーマが利活用する体制を構築しつつある。本項目の最終目標の達成はこれらの連携をさらに発展させることで、可能である。

(10)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	
2020	0	0	0	0	0	0	0
2021	1	0	9	0	0	0	0
2022	0	0	5	0	0	0	0
PJ 期間 合計	1	0	14	0	0	0	0

(11)知的財産権などの確保に向けた取り組み

本項目の成果を、実用化・事業化するカギとなるのは、1) 培地計測基盤技術（培養状態の定量的記述技術）である。まず本技術のうち、新規性があるものについては、知財化を検討する。さらに、培地計測基盤技術を本テーマ内でのルーチン分析に投入し、データを高精度に取得するための改良、およびノウハウの蓄積を行う。蓄積したノウハウのうち、新規性があり、分析法、分析装置のパッケージ化に必要と思われるものについては、知財化を行う計画である。

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2020	0	0	0
2021	0	0	0
2022	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	0

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

本研究項目（3.1.2「マルチオミックス解析による培養状態の定量的記述」）が実用化・事業化する成果とは、1）開発した培地計測基盤技術（培養状態の定量的記述技術）および、2）本技術を用いて取得した、iBMS に格納した測定データの活用である。以下、その戦略、取り組み、見通し、波及効果について述べる。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

培地計測基盤技術を実用化・事業化する戦略として、開発後、本テーマ内において、改良、実証を行い、必要に応じて標準化を検討する。本テーマ終了後、計測機器メーカーと連携して、分析法、分析装置のパッケージとして市販化することを検討する。本課題を実施している福崎（大阪大）、馬場（九州大）、松田（大阪大）は、我が国における計測機器のトップメーカーである、島津製作所と産学協同を進めており、これまでも、分析法、分析装置のパッケージとして島津製作所から市販化した実績がある（図 3.2.1.1.3.2-6）。

また、iBMS に格納したデータの活用として、本テーマの社会実装の主体である循環型バイオ事業開発コンソーシアにおいて、新規シーズ創出、並列型の AI 制御システムの確立のための標準化された情報として利用することが想定されている。



図 3.2.1.1.3.2-6：本課題の担当者が過去に島津製作所から市販化した分析法、分析装置のパッケージ（本テーマ外）

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

培地計測基盤技術を実用化・事業化するには、戦略として、開発後、本テーマ内において、改良、実証を行い、ノウハウ化、必要に応じて標準化を検討する。本テーマ終了後、計測機器メーカーと連携して、分析法、分析装置のパッケージとして市販化することを検討する。本課題を実施している福崎（大阪大）、馬場（九州大）、松田（大阪大）は、我が国における計測機器のトップメーカーである、島津製作所と産学協同を進めており、これまでも、分析法、分析装置のパッケージとして島津製作所から市販化した実績がある（図 3.2.1.1.3.2-6）

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

上述のように、培地計測基盤技術は、本テーマ終了後は、計測機器メーカーと連携して、分析法、分析装置のパッケージとして市販化することを検討する。また、主に研究項目3で連携して実施する細胞外成分の定量的記述データ、および細胞内成分の定量的記述データは、iBMSへ格納し、本テーマ終了後は、循環型バイオ事業開発コンソーシアにおいて活用開始する見通しである（図 3.2.1.1.3.2-7）。

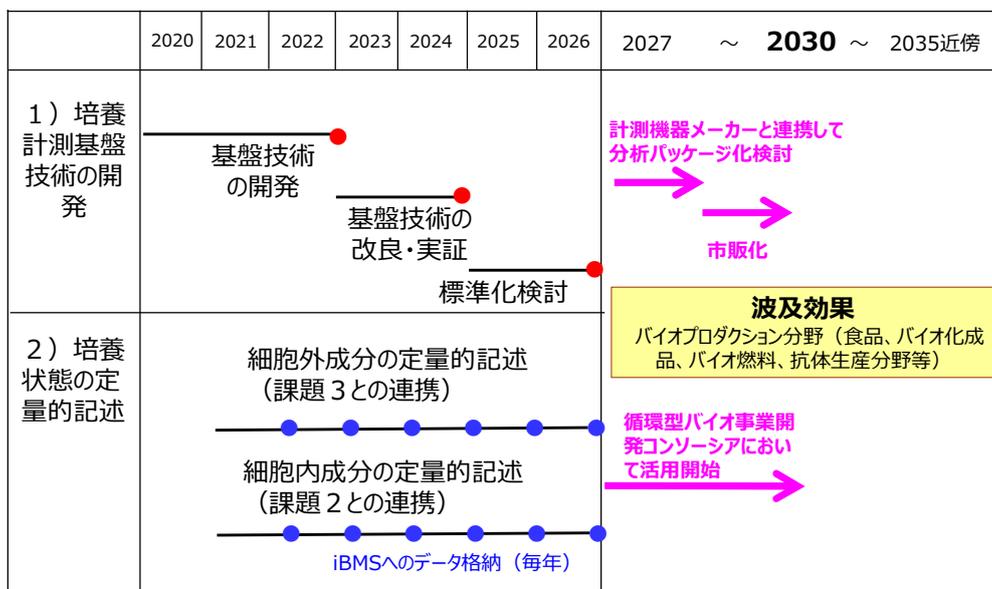


図 3.2.1.1.3.2-7 : 成果の実用化・事業化の見通し

(12.5) 波及効果

本テーマで開発する培地計測基盤技術が対象とする成分（糖、アミノ酸、無機塩など）はさまざまな用途の培地に共通して含まれる。このため、培地計測基盤技術は、微生物細胞、植物培養細胞、動物培養細胞を用いた、食品、バイオ化学品、バイオ燃料、抗体生産分野などに適用可能であり、汎用性が高い。培地計測基盤技術のノウハウ化、標準化を行い、分析法パッケージの開発につながると、高精度な計測データを幅広いユーザーが取得できるようになる。次世代産業用スマートセルを開発したバイオ関連企業が独自にデータを取得し、統合解析システム（iBMS）を活用し、短期間で目標を達成できるようになり、開発期間およびコストの削減に繋がると期待される。

3.2.1.1.3.3 「AI（人工知能）を活用した実用培地・培養戦略迅速決定システムの開発」（大阪大学、再委託先：北見工業大学） 研究項目 3.1.3

(1)背景と目的

研究項目3では、プロジェクト内で探索・育種された有用生産菌に対し、スケールアップ性能が担保された標準培養装置(条件)を用いて、それらの機能を実証するとともに一連の作業の円滑化に資する手法論を開発することを目的としている。しかしながら、探索・育種された有用生産株の培地組成や培地成分に対する応答は十分にわかっていないことが多く、標準装置での培養方法検討における基礎培地の設計や流加培地の設計のための情報が不足している場合が多い。また、生産物の用途や栄養要求性が不明な場合には、酵母エキスなどの天然原料を含む半合成培地を利用する場合、天然原料の組成の影響や含有成分の影響を十分に理解できていない場合も考えられる。円滑に有用微生物の機能を実証し、バイオプロセスの最適化を円滑に進めるためには、プロセス開発の初期段階で培地の最適化や培地成分の機能を理解することが重要である。

培地の最適化や成分の影響を推定する場合、1成分の影響を1回の実験で評価する“one-factor-at-time”法が最もよく用いられるが、最適培地の探索に時間がかかり、成分同士の相互作用を評価に組み込めないなどの課題がある。近年では、これらの欠点を回避するため実験計画法が採用され、回帰分析によるモデル化、応答曲面法による最適化が多く報告されているが、最適化できる因子数が7因子程度まででの実施例が多く、複雑で多成分を含む培地の最適化には十分適用できていない。

半合成培地の最適化においては、実施者らが開発したメタボローム解析技術を応用した培地オミクス解析により、酵母エキス中の成分が大腸菌に与える影響や農産廃棄物由来糖化液中の揮発性生成成分がバイオエタノール生産に与える影響を解析できることを報告しているが、ノンターゲット分析データを利用しているため、不明なピークや汎定量的データにより、多くのエラーが含まれる解析結果となっている。

そこで、迅速に多数の因子を同時に最適化できるAI培地最適化システム(培地AI)を提案し、概念実証を進めるとともに、プロジェクトで創出されるスマートセル株の最適培地を提案し、培養最適化のための適正培地や流加培養における流加培地組成・流加制御の戦略策定に資するデータを提供することを目的とした(図3.2.1.1.3.3-1)。

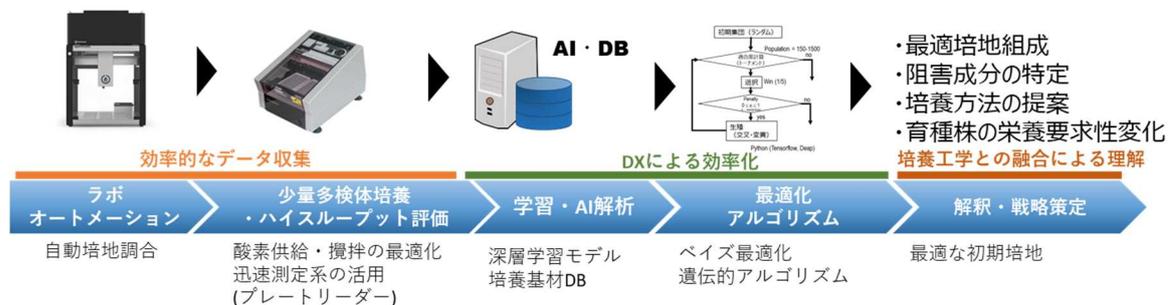


図 3.2.1.1.3.3-1 AI（人工知能）を活用した実用培地・培養戦略迅速決定システムの開発

(2)位置づけ、目標値

(2020 年度末目標)

- 糖蜜・酵母エキス・ペプトンについて、10 種類以上の成分プロファイルを測定し、3~4 種のモデルを選定する。

(2021 年度末目標)

- GC-MS、LC-MS、イオンクロマトグラフにより、30種類の天然成分の組成プロファイルの収集を完了する。
- 油脂酵母*Lipomyces starkeyi*をモデル株として、菌体の増殖性や油脂生産性に影響を及ぼす天然成分中の成分または、無機成分を特定する。
- 実験計画法で実施するより、少ない培養実験数から得られる最少データセットで解析できるAIモデルの作成方法を提案し、従来の方法よりも網羅性を高めかつ迅速に、増殖性や生産性に重要と考えられる成分（重要成分）を見出す（培地AI）。
- 既存の産業用微生物によるターゲット化合物生産にも、培地AIを適用できることを示すため、プロジェクト参画企業との連携先を決定する。

(2022 年度末目標)

- 培地 AI で見出された重要成分を培地へ添加することで、天然成分使用量を削減した培地を提案し、油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* を用い、研究開始時の生産用培地と比較し、培養液当たりの油脂生産性が低下しないこと、もしくは向上することを確認する。
- 学習済み機械学習モデルを用いて、網羅的な成分分析もしくは重要成分の分析値からロット間差に生産性の変動に起因する成分を特定する。
- 一連の検討プロセスを再評価して、最短の検討時間(2 か月程度)で天然成分使用量を低減した改良培地を提案するため検討スキームを提案する(網羅性・検討スループット向上)。
- 2021 年度に連携を開始した実施機関との協働により、既存の産業用微生物(育種後 *Lipomyces starkeyi*、乳酸菌等)についても、モデル株で作成した培地戦略迅速決定システムの検討スキームが有効であることを示す。

(2024 年度末目標)

- 2022 年度までに検討した培地戦略迅速決定システムの検討スキームを活用して、産業用スマートセル株プロトタイプの培養戦略の策定に取り組み、モデル株との栄養要求性の違いを見出し、スマートセル株(プロトタイプ)に適した培地組成を提案する。育種に関連する情報が得られた場合、項目 2 にフィードバックする。

(2026 年度末目標)

- 次世代産業用スマートセル株の培養戦略の策定を数か月で完了できる技術を構築する。

(3) 全体計画

	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027~
研究項目 3.1.3 「AI（人工知能）を活用した実用培地・培養戦略迅速決定システムの開発」（北見工業大学）								
1) 培地基材の組成 DB 構築	アミノ酸，有機酸，ビタミン・無機イオン網羅的分析		重金属等網羅分析					
2) 培地 AI の改良	HS 培養-DNN-最適化分析							
3) モデル株による POC		油脂酵母(不二製油・新潟薬科大)		コリネ型細菌(RITE)				
4) スマートセルプロトタイプへの適用			油脂酵母(不二製油・新潟薬科大)		コリネ型細菌(RITE)			
5) スマートセル(実用株への適用)				スマートセル実用株での検証				社会実装(民間企業が利用)

1) 培地基材組成 DB 構築

半合成培地の天然基材組成の課題にも対応するため、各社の酵母エキスやペプトン類の網羅的定量分析（ガスクロマトグラフィー質量分析計、液体クロマトグラフィー質量分析計、ポストカラム染色法によるアミノ酸分析、イオンクロマトグラフィー）を実施し、データベースを構築する（2020-2021）。ニーズ調査から重金属類の影響も考慮する必要性がわかったため、誘導結合プラズマ発光分光分析法による重金属成分の網羅分析も実施することとした。

2) 培地 AI の改良

分注ロボットによる網羅的な培地調製システム - 小スケールによる網羅培養 - 深層学習(DNN)による予測モデル構築 - 情報工学的手法による最適化を組み合わせることで、1度の実験で30成分の相互作用を考慮した最適化を達成できる培地 AI システムの構築と検証を実施する。

3) モデル株による POC

プロジェクト内で開発中のスマートセル株の基準株を用いて培地 AI システムによる解析を実施し、最適化された培地の情報や培養方法開発に重要な培地成分(阻害成分や促進成分)に関する情報を特定し、下流の培養技術開発(阪大・大工大)、LCA シミュレーター開発(東大)への情報共有を図り、研究項目全体の研究スループットを向上させるとともに、基準株の培地特性を上流のスマートセル開発へフィードバックする。関係者との協議により FS2021 年度に油脂酵母ならびにコリネ型細菌での POC を進めることになった。

4) スマートセルプロトタイプへの適用

モデル株同様にスマートセルプロトタイプでも解析を進め、培地成分に対する応答特性がプロトタイプ株と基準株で違いを検証する。得られた情報をモデル株同様に共有する。

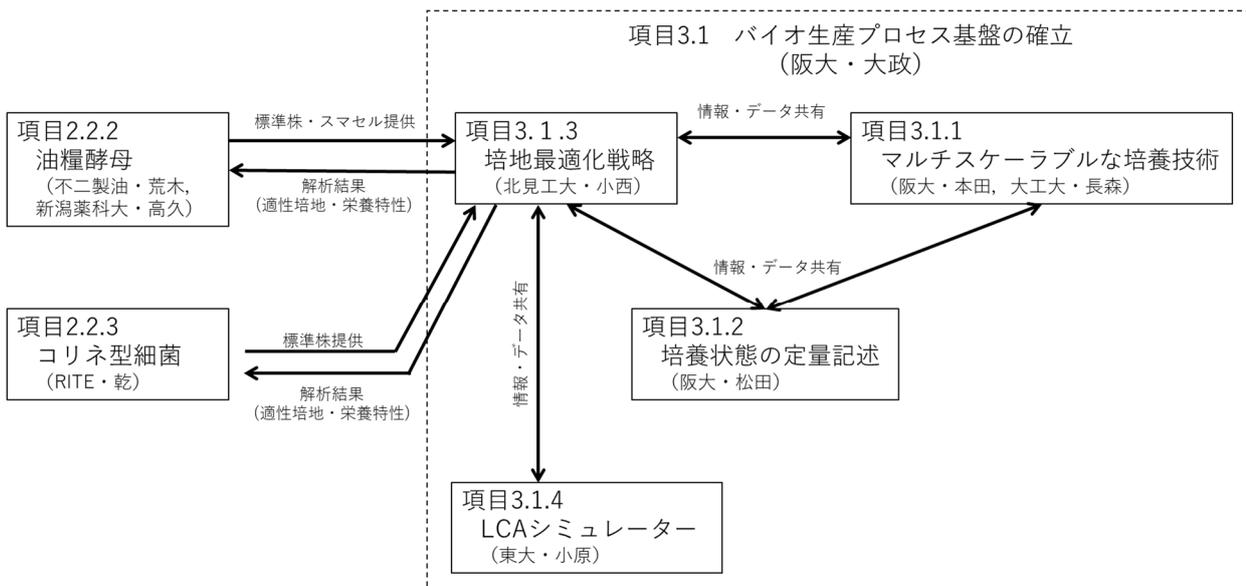
5) スマートセル実用株への適用

基準株・プロトタイプと同様の検討を実施し、情報共有する。

(4) 実施体制

研究項目 3.1 内で情報共有・データ共有を進めるとともに、上流の研究項目 2 との連携を強化した。培地 AI の POC のため、2021 年度から油脂酵母の野生株および変異育種株の解析を進めるため、不二製油・新潟薬科大学のグループ「脂溶性化合物生産のための油脂酵母産業用スマートセル構築」と連携を開始し、年に 2 回程度の情報交換を実施している。2021 年度末から RITE グループ「芳香族化合物生産のためのコリネ菌産業用スマートセル構築」とも連携を開始し、コリネ型細菌の培地最適化に関する培地 AI 解析に着手している。

(体制図)



(5) 運営管理

テーマの運営としてグループ内で月 2 回程度打合せをしており、月に 1 度の頻度で研究項目 3 全体会議により進捗状況の報告や情報共有を実施した。研究項目 2.2.3「脂溶性化合物生産のための油脂酵母産業用スマートセル構築」(不二製油・新潟薬科大学)、研究項目 2.2.2「芳香族化合物生産のためのコリネ菌産業用スマートセル構築」(RITE)と連携した。基準株やスマートセル株を譲渡していただき、プロジェクトで開発中の細胞用の適正培地の探索を実施した。北見工業大学 PL, SPL, NEDO 関係者および関連研究者による情報共有会を 2 回開催し、情報共有するとともに、課題抽出、実施内容の検討をした(2021 年 4 月(北見・ハイブリッド), 2022 年 3 月(北見・対面))。油脂酵母産業用スマートセル構築の課題について、関係者による対面での情報共有を実施した(2021 年 7 月(新潟))。

(6) 実施の効果

本研究項目 3.1.3 のみの成果で費用対効果や費用・売上・CO₂削減、省エネルギー効果を算出することは困難であるが、培地コストは培養コストの～50%を占めるとされており、培地が最適化されることで、培地コストを削減することができる。研究項目 3 で達成される生産効率の向上や LCA を用いた開発が可能になれば相応の費用の削減・CO₂削減効果が見込まれる。培地コスト 8%, 通気コスト 40%, 攪拌コスト 2%, 運転管理 50%(トータル 100%)の好気培養を 2 倍程度まで生産性を改善する場合、45%のコスト削減効果が見込まれる。

培地コストの上昇を 20%、培地以外のコストは半減するものとした。合成培地化による環境負荷の削減も見込まれる。2020 年のアミノ酸生産量は 980 万 t、2021 年グルタミン酸市場規模は 104 億米ドル(約 12 兆円)とされており、2030 年まで年平均成長率は 5.5%程度と推定されている。アミノ酸市場規模の 1%程度の市場規模(120 億円)に相当する新規バイオプロセスの生産コストが売り上げの 20%程度(24 億円)と仮定した場合、1%生産コストを改善することができれば 0.24 億円のコスト削減効果が見込まれる。生産性を改善できた場合は相応する省エネルギー効果が得られる。

培地を最適化することで培養後の残留成分の量を削減できれば、廃水処理の際排出される CO₂ 量の削減効果が期待できる。また廃水処理に必要なエネルギーの大半を曝気用のコンプレッサーの動力が占めており、上記の生産性の改善がない場合でも、同等の生産効率を達成できる培地を設計できれば、省エネルギー効果、CO₂削減効果が期待できる。

(7) 中間目標の達成度

中間目標(2022 年度目標)	達成度(2022 年末の達成見込み)
<p>培地 AI で見出された重要成分を培地へ添加することで、天然成分使用量を削減した培地を提案し、油脂酵母 <i>Lipomyces starkeyi</i> を用い、研究開始時の生産用培地と比較し、培養液当たりの油脂生産性が低下しないこと、もしくは向上することを確認する。</p>	<p>○ 培地AIにより、増殖に適した培地組成ならびに油脂生産に適した培地組成を見出している。基礎培地および流加培地を設計し、ミニジャーでの生産性評価が完了する予定である。</p>
<p>学習済み機械学習モデルを用いて、網羅的な成分分析もしくは重要成分の分析値からロット間差に生産性の変動に起因する成分を特定する。</p>	<p>○ 網羅的な定量分析により、複数の天然基材(酵母エキス・ペプトン)のプロファイルを完了しており、ロット差を検出できている。培地AIを適用することでロット差に起因する要因を特定できる。</p>
<p>一連の検討プロセスを再評価して、最短の検討時間(2 か月程度)で天然成分使用量を低減した改良培地を提案するため検討スキームを提案する(網羅性・検討スループット向上)。</p>	<p>○ 最も手間がかかる網羅的な培地調製に分注ロボットによるオートメーション化を導入することにより検討スキームを改善している。さらに、網羅性の改善について検討を進めている。</p>
<p>2021 年度に連携を開始した実施機関との協働により、既存の産業用微生物(育種後 <i>Lipomyces starkeyi</i>、乳酸菌等)についても、モデル株で作成した培地戦略迅速決定システムの検討スキームが有効であることを示す。</p>	<p>○ 本年度、不二製油グループから育種後の <i>Lipomyces starkeyi</i>(油脂酵母)を手に入れている。RITE グループとも連携を進めており、達成が見込まれる。</p>

(8) 研究開発の成果と意義

スマートセル開発により大規模に代謝経路を変更した場合、最適な培地が変わる可能性がある。基準となる株で最適化した培養方法との特性の違いを把握することは重要である。そこで、2020-2021年度の取り組みの中で図 3.2.1.1.3.3-2 に示す自動化、多検体培養、迅速測定系、培養基材 DB、機械学習、ベイズ最適化を組み合わせた迅速な培地解析および最適化システムを構築した。

分注ロボットを用いた培地調製のオートメーション化、ディープウェルによる多検体培養、マイクロプレートリーダーの活用により、培地 AI に入力する学習データを効率的に収集するシステムを導入した。同時に培地 AI に利用するデータ処理、機械学習、最適化について、Python 言語による専用プログラムを用意することで一連の検討を一貫して実施する体制を構築した。

緑色蛍光タンパク質(GFP)を生産する大腸菌をモデルとして、システムの検証を実施した。最小培地を基盤として、アミノ酸やビタミンを加えた 31 成分で構成される合成培地を用いた。実験計画に利用されるラテン方格を用いて、81 条件($n = 3$)の培養を行い、蛍光検出により GFP 生産量を測定した。実験データを学習データとする深層学習(DNN)モデルを構築し、培地組成から GFP 生産量を予測するモデルを構築した。GFP 生産量を最大化する培地組成をベイズ最適化アルゴリズムにより探索したところ、予測された培地組成は高い GFP 生産を達成できたものの実測値と予測値の間に差がみられた。詳細な培地組成の探索には学習データが不足していると考えられたため、予測値を検証した際のデータを学習データに加えたモデルを再度構築し適正培地を探索したところ、GFP 生産量を当初の学習データの 1.4 倍まで高めることができた。フラスコスケールおよび卓上ジャーファーメンタースケールにスケールアップして最適培地を評価したところ、ディープウェルと同様の傾向が得られたため、本システムでの培地最適化の結果がスケールアップ後の培養に利用できることが示された。以上により、培地 AI システムの基本システムの構築および検証が完了した。

油脂酵母を用いた検討では、蛍光色素を用いた迅速測定系を導入し、油脂蓄積ならびに比増殖速度について、培地 AI 解析を実施し、合成培地ならびに半合成培地それぞれの最適培地組成を予測することができている。合成培地(19 成分)、半合成培地(6 成分)を一度の解析で最適培地を提案できている。合成培地による生産の場合、窒素源のみならずリン酸、カリウム、マグネシウム、亜鉛の添加量を抑制することで細胞あたりの油脂蓄積量を増加させる傾向が見出された。窒素源以外の成分についても流加方法や流加制御を検討することで、さらなる生産性の向上につながる可能性がある。2022 年度からはプロジェクトで開発されたスマートセル株での検討を実施し、基準株とスマートセル株での適正培地を見出すとともに、培地成分に対する挙動の違いを定量的に評価する。得られた情報を不二製油・新潟薬科大学のスマートセル開発チームにフィー

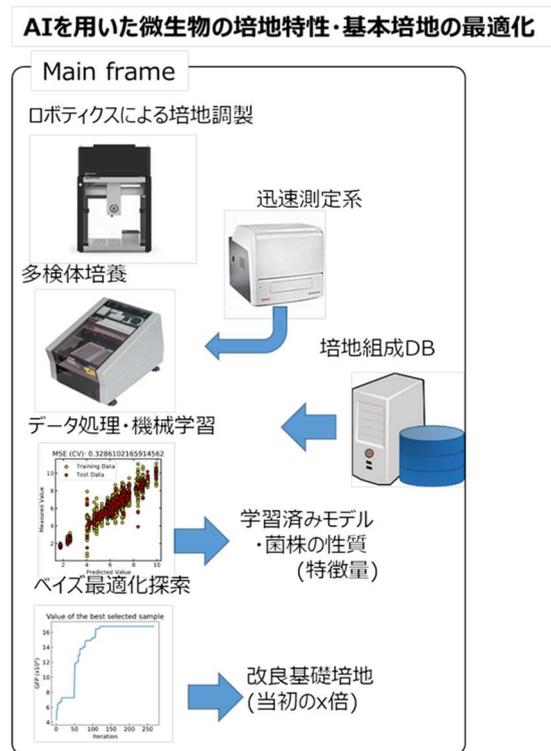


図 3.2.1.1.3.3-2 培地 AI による培地最適化

ドバックし、スマートセル株の培養特性の変動の問題の有無について、情報共有を進める。また、課題内で阪大・大工大のマルチスケラブル培養技術開発チームと情報共有することにより、培養方法の検討、スケールアップ検討をサポートする。

コリネ菌の検討では、RITE グループとの情報交換によりワンポット休止菌体反応による物質生産を想定しているため、菌体生産プロセスの効率化のニーズがあることがわかったため、基準株による培地 AI 解析を実施した。1 か月足らずの検討により、培地中の窒素源およびリン酸が高濃度になると比増殖速度が極端に低下することを見出し、比増殖速度を最大化する初期培地組成の候補を得ることができた。これらの成分は初期培地では低濃度で添加しておいて、適正な濃度および速度で流加することで槽内濃度を低く抑える培養戦略をとることが望ましいことがわかった。2L 通気攪拌槽にて、最適化培地を検証したところ、窒素源であるアンモニアを pH 調整剤として利用し

て、pH を維持するように流加することで、初期増殖速度を維持したまま($\mu = 0.344 \text{ h}^{-1}$ [0-17 h])、高密度($\text{OD}_{600} = 120$)まで培養できることが確認できた(図 3.2.1.1.3.3-3)。得られた情報を RITE のスマートセル開発チームにフィードバックし、スマートセル株の培養特性の変動の問題の有無について、情報共有を進める。また、課題内で阪大・大工大のマルチスケラブル培養技術開発チームと情報共有することにより、培養方法の検討、スケールアップ検討をサポートする。

半合成培地の天然基材のロット差による生産性変動の課題を解決するため、培養基材を複数の機器で分析し、糖・アミノ酸・ビタミン・無機塩・金属の定量プロファイルを進めている。2021 年度までの分析データにより、酵母エキスのロット差を検出できることがわかっている。培地 AI システムに天然基材の成分プロファイルを反映できるようにすることで、ロット差に起因する培地の課題を迅速に解決できるシステムの構築が見込まれる。

(9)成果の最終目標の達成可能性

従来の培養戦略の策定プロセスを整理すると、フラスコスケールの回分培養で、一成分の影響を一回の実験で評価する“one-factor-at-time”法による培地組成の最適化、阻害成分等の影響や成分が生産性に与える影響を評価し、初期培地組成の決定、流加成分の決定などの基本戦略を策定する。培地 AI システムを採用することで、短い期間で初期培地を提案できるほか、特徴量を解析することで、阻害成分を見出すことも可能である。複数の成分間の相互作用も考慮できること

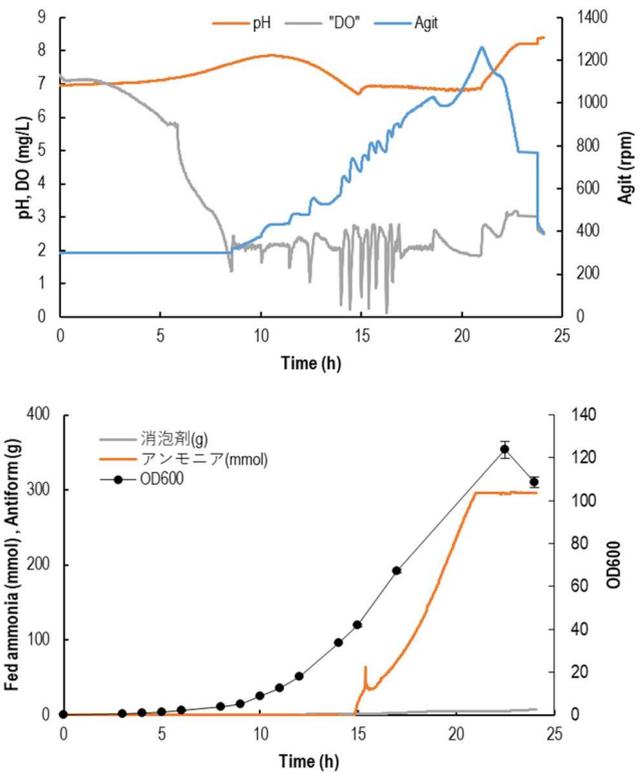


図 3.2.1.1.3.3-3 AI によって導き出したコリネ菌最適培地による高密度培養(1L スケール, 回分培養)

が明らかになっており、培養技術開発の初期段階での適用により、複数の流加成分を提案するなど、従来の方法では、容易に見出されない初期段階の培養戦略を提供することができる。

実際のスマートセル開発での適用について、検証を進めるとともに、詳細な方法の改良を進めることで最終目標の達成が見込まれる。具体的な検証例として、油脂酵母やコリネ菌の検証を進めており、プロジェクト全体の進捗に合わせて、数例の検証を実施し、バイオファウンドリの機能として実装を目指す。

(10) 成果の普及

成果の一部が日本生物工学会で認められ、2021年度に研究奨励賞(照井賞)を受賞した。培地 AI 技術について、複数の依頼公演を受け、成果の普及に努めた。

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	
2020	1	1	8	0	0	0	1
2021	1	1	15	0	0	1	2
2022	0	0	0	0	0	0	0
PJ 期間 合計	2	2	23	0	0	1	3

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

知的財産については、個別の方法については取得予定はない。論文などに記載しないノウハウについては秘匿する。培地 AI システムとして装置特許としての取得を検討する。

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2020	0	0	0
2021	0	0	0
2022	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	0

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

民間企業での活用を実用化・事業化と考える。バイオフィアウンドリ機能の一部としての活用を進める。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

バイオフィアウンドリ事業を手掛ける企業へのノウハウの移転による実用化・事業化を目指す。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

2022年3月および4月にG社との秘密保持契約を締結した上で情報交換を実施した。培地最適化サービスとして実用化に向けて、議論を進めている。将来の事業主体になりえる企業との関係性を構築する。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

プロジェクト期間中に具体的な研究例を示すことで、成果の実用化や事業家が現実的になる。GEI社への技術移転を含めバイオフィアウンドリ事業を進める企業での実用化が見込まれる。

(12.5) 波及効果

培地の最適化や天然基材に由来する課題解決を望んでいる関連企業は多く、培地AIがさらに洗練され迅速に課題解決可能な技術になった場合、多くの企業で利用される。バイオフィアウンドリを事業化する企業への技術移転により、バイオ生産プロセス開発が効率化され、競争力強化につながる。

3.2.1.1.3.4 バイオ生産プロセスにおけるLCA、TEAシミュレーターの開発と有効性の実証
(東京大学、サラヤ(株)、ナノミストテクノロジーズ(株):NMT、徳島大学) 研究項目 3.1.4

(1)背景と目的

①LCA/TEAシミュレーターの開発 【東京大学】 研究項目 3.1.4.1

植物由来原料や微生物を扱うバイオ生産プロセスは、生産効率に影響を与える変動要因の組合せパターンが多いため、化学工業プロセスとは異なり、開発初期段階で商業化規模での最終的な設備投資額、製造量、GHG排出原単位、製造コスト等を一定以上の精度でシミュレーションすることが困難である。そのため、バイオ生産プロセスのLCA/TEAは大規模実証段階で実施されることが多く、環境性や経済性の面での将来的な課題からバックキャストして研究初期段階で課題を解決するような未来志向型の先制的なLCA/TEAは実施されてこなかった。そこで本研究では、バイオ研究者自身が小スケールの実験結果に基づいて事業化段階の環境影響性や経済性を予見し、定量的根拠に基づいて環境性や経済性に影響を与える優先的課題の抽出を可能にするLCA/TEAシミュレーターを開発することを目的とする。初期の対象プロセスとしてソホロリピッド生産(液体培養)とセルラーゼ生産(固体培養)を選定し、その有効性を検証した後、将来的にその他のバイオ生産プロセスへ展開する。

②ソホロリピッド生産でのシミュレーターの有効性実証 【サラヤ(株)】 研究項目 3.1.4.2

ソホロリピッド(SL)はバイオマスから酵母が生み出す界面活性剤であるバイオサーファクタントの1種である。日本では100万トン/年以上の界面活性剤が生産され、一般家庭や外食・中食産業、医療施設、各種工場から排出された界面活性剤は最終的に海洋へと流出する。プラスチックとは異なり、界面活性剤は回収が不可能であるため、生分解性が良いことが求められる。SLは良好な生分解性を示すことが知られているが、発酵生産に使用する原料や製造工程における環境影響について焦点を当てた報告数は少なく、実機での環境影響の定量化はもちろん、ラボスケールの実験結果から実機での環境影響を予測することも難しい。そこで本研究では、SL発酵製造のLCAを行うことおよび東京大学が開発したシミュレーターの機能検証を実施することを目的として、100L発酵槽での培養試験を行いインベントリデータの取得を目指す。また廃棄物を活用することにより、さらに環境配慮型のSL発酵製造方法の確立に取り組む。

③セルラーゼ生産でのシミュレーターの有効性実証 【徳島大学・NMT】 研究項目 3.1.4.3

セルラーゼは、セルロース系原料からのバイオエタノール(いわゆる第2世代バイオエタノール)の生産に欠かせない酵素であり、セルラーゼによる糖化コストがその経済性に大きく影響を与える。糖化コストの高さは、高コストの高力価セルラーゼが大量に必要であることに起因する。高力価セルラーゼの大量生産には、酸素供給に動力が不要な固体培養法が採用される例が多く、その最適化の多くは試行錯誤で行われている。そこで本研究では、簡単な操作・設定で酵素生産における自動連続運転(培養)を可能とする固体培養装置とキーワードを入力するだけで瞬時に最適条件を抽出し、環境影響や経済性の予測まで可能な固体培養用シミュレーター開発し、効率的な酵素生産に寄与することを目的とする。

(2)位置づけ、目標値

①LCA/TEA シミュレーター開発 (東京大学) 研究項目 3.1.4.1

【対象市場・製品】 バイオプロセス用 LCA/TEA シミュレーター

【競合技術との対比】 従来ソフトウェアでは、バイオプロセス関連のプロセスモデルやインベントリデータが不足しており、更に新規技術での検討や感度解析が困難である。

【目標値】

■中間目標：(i)インベントリデータベース構築(原料：20件以上、プロセス：20件以上)
(ii)評価対象のプロセスモデル作成(2件：ソホロリピッド・セルラーゼ生産)
(iii)簡易版シミュレーター(ver.1)の開発・検証(機能：3件以上)

■最終目標：社会実装段階での環境影響性(GHG排出量)や経済性、各パラメータの感度(重要度)を可視化できるようなバイオプロセス用LCA/TEAシミュレーターの完成(機能：5件以上)

②ソホロリピッド(SL)生産(サラヤ) 研究項目 3.1.4.2

【対象市場・製品】 世界のバイオサーファクタント市場規模：134.7億ドル(2017)。市場予測では172.7億ドル(2022)→203.1億ドル(2026年：プロジェクト終了時)→241.1億ドル(2031年：プロジェクト終了から5年後)まで成長すると想定される。

【競合技術との対比】 石油系・天然系の合成界面活性剤より環境への影響面で優れる

【目標値】

■中間目標：SL発酵製造における発酵工程のインベントリデータの取得

■最終目標：(i)100L発酵槽取得データを用いたSL発酵製造のLCA
(ii)環境性を向上させたSL発酵製造プロセスの確立

③固体培養によるセルラーゼ生産(徳島大学・NMT) 研究項目 3.1.4.3

【対象市場・製品】 開発された固体培養装置および固体培養シミュレーターは、酵素製造分野での利用が期待され、またセルラーゼそのものは、セルロース系廃棄物の有価物化(例：飲料工場副産物やフードロスからのバイオエタノール生産、畜産廃棄物のバイオガス生産における発酵補助剤等)での利用が期待できる。

【競合技術との対比】 先行する液体培養技術(文献値)と比較して高セルラーゼ活性で、酵素活性あたりの培養コスト及びGHG排出量を削減することを目指す。

【目標値】

■中間目標：(i)固体培養装置(数kg/batch規模)及び制御ソフトウェアの開発

(ii)ラボ培養試験データを用いた固体培養シミュレーター(試作版)の開発

■最終目標：固体培養装置(数t/batch規模)及び固体培養シミュレーター実機の開発

(3)全体計画

2021年度末までに、サラヤ、徳島大学・NMTがそれぞれソホロリピッド生産、固体培養によるセルラーゼ生産に関するプロセス情報を東京大学に提供し、3者が協力してプロセスモデルを作成する。東京大学は原料やプロセスに関するインベントリデータを収集し、2022年度中にLCA/TEAシミュレーターのプロトタイプ(ver.1)を作成する。その後、3者

でシミュレーターの検証や改良、データの拡充を行い、併行して他のバイオ企業へのデモ等を行いながら、2026年度にLCA/TEAシミュレーターを完成させる。

①LCA/TEAシミュレーター開発 【東京大学】

	2020年度	2021年度				2022年度				2023年度	2024年度	2025年度	2026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]LCA 基盤整備	→												
[2]シミュレーター設計	全体設計 ver.1設計									ver.2設計		ver.3設計	
[3]シミュレーター開発		(シミュレーターver.1開発)								ver.2開発		ver.3開発	
[4]プロセスの情報収集	プロセスデータ	(ソホロリビッド生産) (セルラーゼ生産)								データ拡張		検証 インターフェース改良	
[5] 原料データベースの構築	準備	単位操作データ (発酵・分離・精製等の効率・エネルギー・ユーティリティ) GHG排出原単位データ				現地調査・原料サンプル入手・分析 GHG排出原単位データ コストデータ							

②ソホロリピッド (SL) 生産の LCA/TEA シミュレーターの有効性実証 【サラヤ】

	2020 年度	2021 年度				2022 年度				2023 年度	2024 年度	2025 年度	2026 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] 100 L 発酵槽・ データ測定設備	→												
[2] SL 発酵製造の LCA 評価													
[3] バリデーション													
[4] 低環境負荷型 SL 生産の確立													
[5] 発酵残渣等の 活用によるゼロ エミ化													

③固体培養によるセルラーゼ生産の LCA/TEA シミュレーターの有効性実証【徳島大学・NMT】

	2020年度	2021年度				2022年度				2023年度	2024年度	2025年度	2026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] フラスコスケールでのセルラーゼ生産	PPS培地でのセルラーゼ生産の確認												
[2] 固体培養装置の開発	小スケール装置作成と設置					ソフトウェア強化				演算・推論機能の搭載			
[3] インベントリデータ収集						パラメータ推論機能							
[4] スケールアップ・実用化機の開発										固体培養装置のスケールアップ			実用化機開発
[5] データ収集・シミュレーターへの反映						データ収集とシミュレーターへの反映 (フラスコスケール→小型固体培養装置→スケールアップ培養装置)							

(4) 実施体制

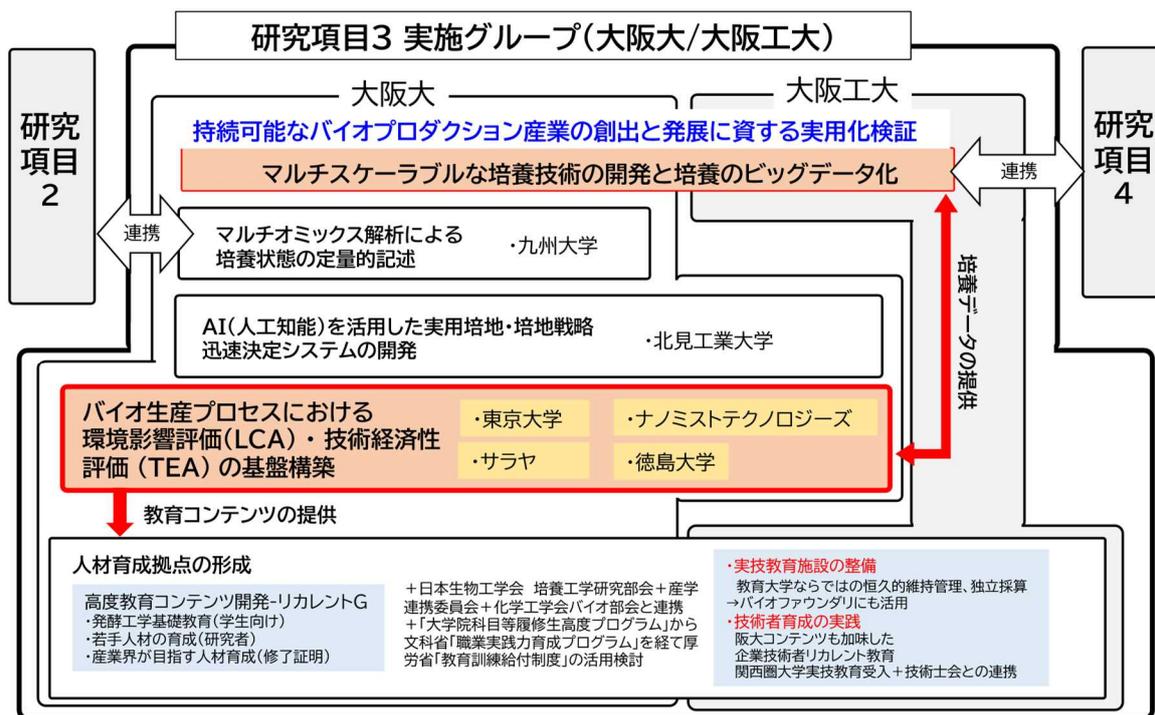


図 3.2.1.1.3.4-1 実施体制図

(5) 運営管理

大阪大学が定例会議を毎月開催し、各課題の進捗の共有や関係機関との連携・協力の依頼等の情報交換を実施している。情報共有に関しては、定例会議以外に、大阪大学・大阪工業大学と東京大学の研究者間でジャーファーマンターでのインベントリデータ取得に関するミーティングをほぼ毎月開催している。LCA/TEA は企業の内部情報を利用することがあるため、大阪大学のマネジメントのもとで企業に公開/非公開を確認するなど情報管理を徹底し、更に LCA/TEA 結果を公開することを念頭において、既に公開されているデータへの置換やブラックボックス化を行う等の工夫を行っている。その上で、東京大学とサラヤとのミーティング、東京大学による徳島大学・NMTの現地訪問など、積極的な情報交換を実施している。

(6) 実施の効果

バイオプロセス用 LCA/TEA シミュレーターが開発され、バイオ産業で実装されることで環境面・コスト面での改良ポイントの明確化や優先順位付けが行われ、その対策として原料やプロセスの見直し、改善効果の高いプロセスでの省エネ化、GHG 排出削減が促進されることで、大幅な GHG 排出量削減や製造コスト低減が期待できる。また脱炭素化や国境間炭素税の導入等の流れの中で、国内のバイオ産業も今後は製品や事業活動における GHG 排出量の開示が求められる可能性があり、その際には本シミュレーターの導入効果が更に大きくなる。SL やセルラーゼに関しても、LCA/TEA シミュレーターを活用し

て、低環境負荷・低コストの製造方法が開発された場合の売上や企業価値の向上効果は大きいと予想される。

(7) 中間目標の達成度

①LCA/TEA シミュレーター開発 【東京大学】 研究項目 3.1.4.1

活動項目	活動内容	中間目標	達成度
LCA基盤整備	(1)研究基盤の整備 (2)従来ソフトウェアに不足するデータ/機能の明確化	(1)整備完了 (2)情報明確化 (20件以上)	(1)整備完了； ○ (2)情報明確化 25件； ○
シミュレーターの設計	・シミュレーターver.1の グランドデザイン	・設計完了	・設計完了； ◎
シミュレーターの開発	・シミュレーターver.1の 開発(2021年度から着手)	・開発完了	・計画通り。2022年9 月開発完了見込； △(○：2022年9月)
プロセス情報収集	・評価対象プロセスの簡易 プロセスモデルを作成	・2件	・2件作成(ソホロリ ピッド，セルラーゼ生 産プロセス)； ○
データベースの構築	インベントリデータの収集 (1)原料生産・収量・組成 (2)原料のGHG排出原単位 (3)培地・ユーティリティ	(1)20件以上 (2)10件以上 (3)20件以上	(1)459件(153原料×3 年分)のデータ収集； ◎ (2)10件(計画前倒し)； ○ (3)23件； ○

②ソホロリピッド (SL) 生産 【サラヤ】 研究項目 3.1.4.2

活動項目	活動内容	中間目標	達成度
SL発酵製造のLCA(100L発酵槽)	(1)消費電力測定装置の設備導入 (2)100L発酵槽の試運転及びメンテナンス (3)SL発酵工程におけるインベントリデータ取得	(1)導入完了 (2)試運転及びメンテナンス完了 (3)インベントリデータ収集完了	(1)設備導入完了； ○ (2)試運転メンテナンス完了； ○ (3)インベントリデータの収集完了； ○

③固体培養によるセルラーゼ生産 【徳島大学・NMT】 研究項目 3.1.4.3

活動項目 (担当)	活動内容	中間目標	達成度
フラスコスケールでのインベントリデータの取得 (徳島大学)	バイオマス固体培地(麦藁、稲藁等)で様々な培養条件でのセルラーゼ活性値のデータを取得する	(1)セルラーゼ生産の確認 (2)データ収集(20件以上)	(1)フラスコスケールでセルラーゼ生産確認；○ (2)麦藁培地データ収集(20件)；○
固体培養装置開発 (NMT)	培養条件(温度、湿度、酸素濃度、通気速度、外気取込量)を変更可能な小型の固体培養装置を開発する	(1)徳島大学に設置完了 (2)制御機能の追加(3件以上)	(1)2020年設置完了；○ (2)熱量・水分量・酸素消費速度の各演算機能を追加中(計画通り。2022年7月完了予定)；△(○：2022年7月)
固体培養装置でのセルラーゼ生産 (徳島大学)	固体培養装置でセルラーゼ生産が可能であることを確認する	・フラスコスケールと同等の生産性	・麦藁培地でフラスコスケールと同等のセルラーゼ活性を達成；○
LCA/TEAシミュレーター用のプロセスモデルの作成 (NMT)	固体培養での培養条件(温度/湿度/培地成分;Input)とセルラーゼの生産量及び力価(Output)の関係を基にプロセスモデルを作成する	・プロセスモデル作成：1件以上	数値モデル1件作成；○ ※各培養条件との因果関係は2022年度に継続実施(計画通り)
改良型固体培養装置でのセルラーゼ生産(徳島大学)	改良型培養装置を用いて、セルラーゼ生産データを取得する。	・インベントリデータ：10件以上	・装置改良中(計画通り)麦藁培地でデータを取得予定； △(○：2022年度末)
生産物量の推論エンジンの開発 (NMT)	・一次情報から菌体量やセルラーゼ力価を推論するエンジンを構築する ・実データと比較検証し、推論精度を向上する	・推論エンジンの構築 ・実データとの比較検証。	・固体培養装置の改良が遅延。必要なデータを取得できず未構築； ×(○：今後装置改良を完了し、データ取得を進められる見通しがあるため2022年度末達成見込み)

(8) 研究開発の成果と意義

①LCA/TEA シミュレーター開発【東京大学】 研究項目 3.1.4.1

バイオプロセス原料となる国内の糖質・セルロース系バイオマス作物（サトウキビ、エリアンサス、ススキ、ネピアグラス）について、国際農林水産業研究センターから153品種（系統）×3年分の栽培試験データ（単位収量、組成）を取得しデータベース化した（様々なバイオマス作物の品種レベルのデータベースとしては世界初）。更に計画を前倒しで、各原料別のGHG排出原単位（原料生産までのGHG排出量）を算出した（図3.2.1.1.3.4-2）。従来のLCAデータベースでは、原料重量あたりのGHG排出量のみが格納されているが、今回の原料データベースでは、組成データと紐づけて、原料、糖分、セルロースの各単位重量ベースでの各GHG排出量を算出しているため、糖分を利用する液体培養、セルロース分を利用する固体培養の両方に対応可能なデータを格納している。

プロセス情報については、サラヤ、徳島大学・NMTより液体培養によるソホロリピッド生産、固体培養によるセルラーゼ生産の技術情報を提供してもらい、物質収支を取り、簡易的なプロセスモデルを作成した（図3.2.1.1.3.4-3）。また、バイオプロセスで一般的に使用される培地原料（糖、酵母エキス、栄養塩類）や化成品（酸・アルカリ）、ユーティリティのインベントリデータを既存データベース（IDEA、ecoinvent、味の素DB等）から抽出した。バイオプロセスに特化したプロセスインベントリデータベースは従来無く、今後も様々なバイオプロセスに適用できるようにデータベースの拡充を継続していく予定。

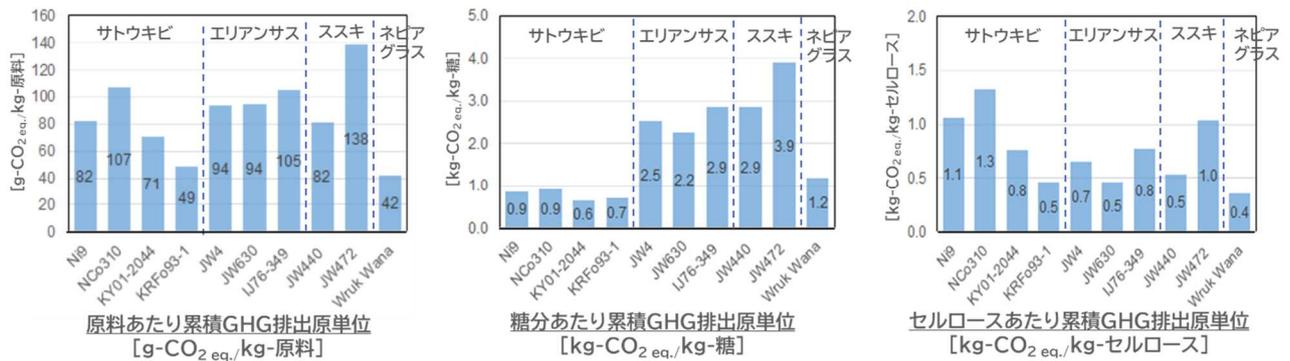


図 3.2.1.1.3.4-2 バイオプロセス原料別の GHG 排出原単位

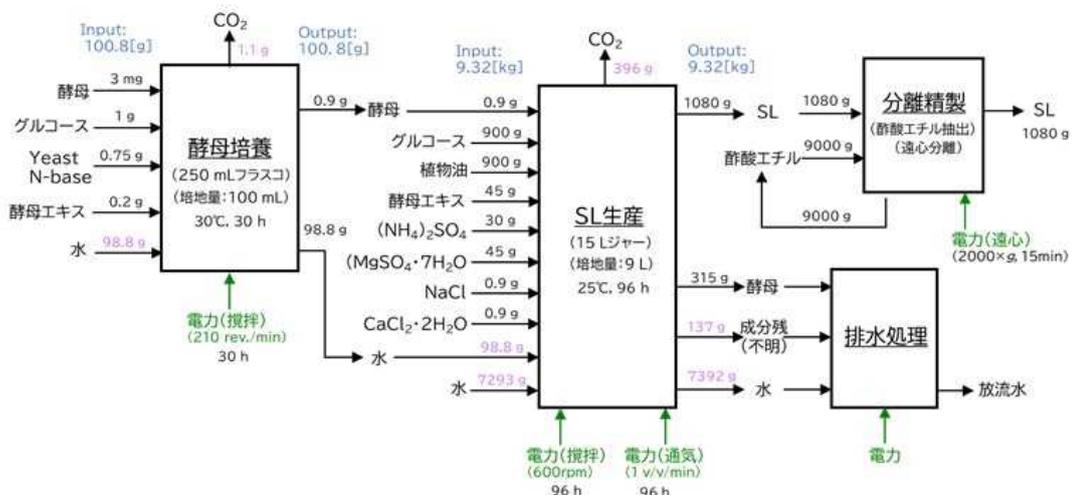


図 3.2.1.1.3.4-3 プロセスモデルの例（ソホロリピッドの物質収支モデル）

②ソホロリッド (SL) 生産【サラヤ】 研究項目 3.1.4.2

初年度に 100 L 発酵槽の消費電力測定装置を導入し、2 年度目に発酵工程におけるインベントリデータを取得し、中間目標を達成した。インベントリデータはLCA評価を行うにあたり必須のデータであるため、このデータを収集できる設備を導入しデータを収集できたことは、今後の SL 発酵製造の環境影響評価を可能にする。

③固体培養によるセルラーゼ生産 【徳島大学・NMT】 研究項目 3.1.4.3

■フラスコスケールでのセルラーゼ生産 (ペーパースラッジ、麦藁、稲藁、バガス、竹)

[成果] 各サンプルのセルロース含有率は 30~50%程度であり、セルラーゼ生産のための固体培養培地として利用可能であることが分かった。次に、*Trichoderma reesei* ATCC 56765 を用いてセルラーゼ生産試験を行ったところ、麦藁が他の基質よりも安定的に高いセルラーゼ活性値を示した (培養 9 日目で最大活性 4.8 FPU/g-麦藁)。

■フラスコスケールでのセルラーゼ生産におけるインベントリデータの取得 (20 件)

[成果] 麦藁を固体培養培地として、培養パラメータを変化させた時のセルラーゼ活性値の経時変化データを全 22 件取得した (図 3.2.1.1.3.4-4)。なお、基本培養条件 (図中では■) として、セルラーゼ生産菌は *Trichoderma reesei* ATCC 56765 を使い、培養温度は 30°C、麦藁 (水洗浄無し) の粒径=100 μm~4 mm、初期含水率=60%、C/N 比=59.0 とし、通常培地成分の添加 (微量金属類など) を行った。

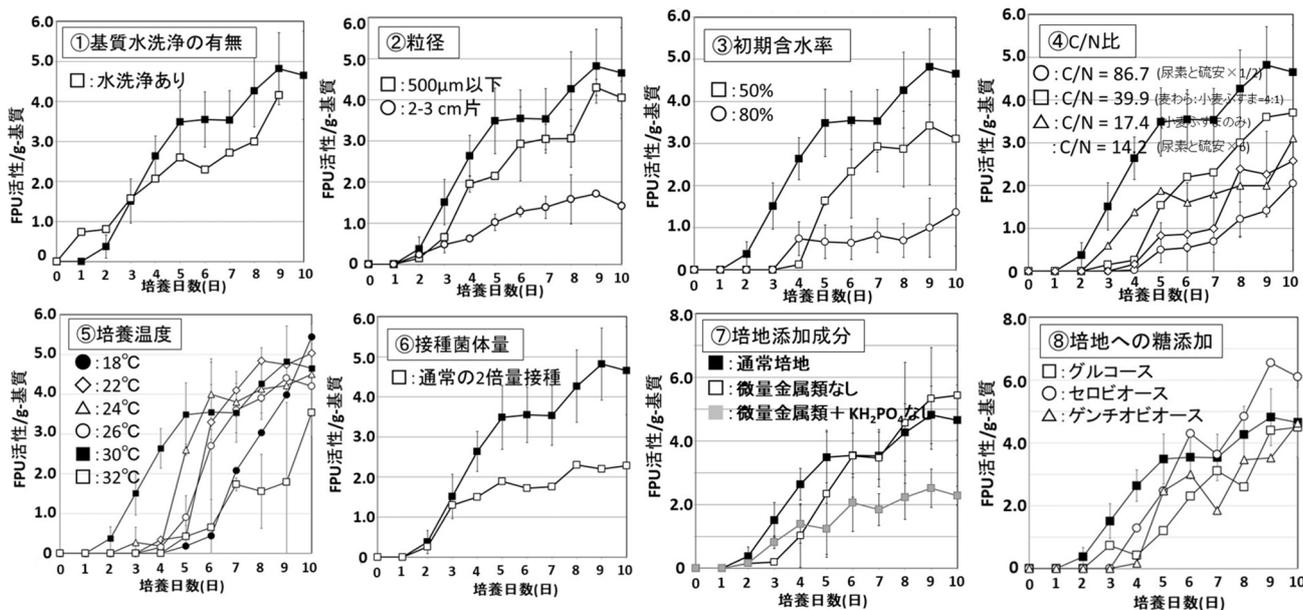


図 3.2.1.1.3.4-4 フラスコスケールでの各種条件でのセルラーゼ生産

■固体培養装置の開発

[成果] 実験用の固体培養装置を開発した。操作因子として①温度、②湿度、③酸素濃度、

④ 通気速度および外気取込量を変更できる機能を有している。温度は、温水タンク内の温水温度と、温水タンク内部を通気した湿潤空気の培養容器への導入量で制御する。湿度は上記同様湿潤空気の通気量によって制御し、培養容器内部湿度を計測する。酸素濃度と二酸化炭素濃度を監視しながら装置全体の空気をブロウで循環させ、培養容器内部の二酸化炭素が一定濃度まで増加したとき外部空気を取り入れることで酸素濃度を大気濃度まで増加させる。マスフローコントローラによって取り込んだガス量とバルブの開閉回数を計

測する。以下の培養時のデータが示すとおり、温度・湿度・ガス濃度等の計測が可能である。



図 3.2.1.1.3.4-5
実験用固体培養装置

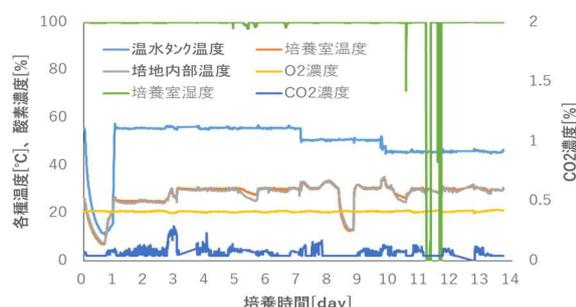


図 3.2.1.1.3.4-6
培養試験中の温度・湿度等の計測データ

■固体培養装置によるセルラーゼ生産

[成果] NMT 製の固体培養装置を用いて、麦藁を培地としたセルラーゼ生産試験を行った。培養試験 1 回目の最大セルラーゼ活性 3.8 FPU/g-麦藁、2 回目の培養試験では 4.8 FPU/g-麦藁という結果となり、安定的なセルラーゼ生産が可能であることを確認した。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

①LCA/TEA シミュレーター開発【東京大学】 研究項目 3.1.4.1

計画通り、着実に進捗しており、最終目標は達成可能である。

②ソホロリピッド (SL) 生産【サラヤ】 研究項目 3.1.4.2

中間目標を予定通り達成できたことから、最終目標である SL の環境影響の定量化および今後のシミュレーターの実証についても予定通り達成できると考える。

③固体培養によるセルラーゼ生産【徳島大学・NMT】 研究項目 3.1.4.3

順調にインベントリデータ収集が進んでおり、最終目標である LCA/TEA シミュレーターの開発及び様々な培養条件に対応可能な実生産用の固体培養装置の完成も達成可能である。

(10) 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	
①LCA/TEA シミュレーター (東京大学)	2020	0	0	0	0	0	0	0
	2021	0	0	0	0	0	0	0
	2022	0(1)	0	0	0	0	0	0
	PJ 期間合計	0(1)	0	0(1)	0	0	0	0
②ソホロリピッド 生産 (サラヤ)	2020	0	0	0	0	0	0	0
	2021	0	0	0	0	0	0	0
	2022	0	0	0	0	0	0	0
	PJ 期間合計	0	0	0	0	0	0	0
③固体培養 セルラーゼ生産 (徳島大学・ NMT)	2020	0	0	0	0	0	0	0
	2021	0	0	0	0	0	0	0
	2022	0(1)	0	0(1)	0	0	0	0
	PJ 期間合計	0(1)	0	0(1)	0	0	0	0

()内は、2022 年度末の予定件数

(11) 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
①LCA/TEA シミュレーター (東京大学)	2020	0	0	0
	2021	0	0	0
	2022	0	0	0
	PJ 期間 合計	0	0	0
②ソホロリピッド 生産 (サラヤ)	2020	0	0	0
	2021	0	0	0
	2022	0	0	0
	PJ 期間 合計	0	0	0
③固体培養による セルラーゼ生産 (徳島大学・NMT)	2020	1	0	0
	2021	0	0	0
	2022	0	0	0
	PJ 期間 合計	1	0	0

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

①LCA/TEA シミュレーター開発【東京大学】 研究項目 3.1.4.1

データベースやシミュレーターについてはBlack box 化して知財・ノウハウを保護した上で、LCA/TEA の経験が無いバイオ研究者や製造事業者にも活用してもらうことで実用化する。

②ソホロリピッド (SL) 生産【サラヤ】 研究項目 3.1.4.2

本プロジェクトでの SL 発酵製造の LCA の結果を活用し、現行の SL 製造方法よりもさらに環境面での品質が向上した SL 発酵製造方法を確立することを実用化・事業化と考える。

③固体培養によるセルラーゼ生産【徳島大学・NMT】 研究項目 3.1.4.3

本プロジェクトにおける安価なセルラーゼを提供することによって、糖化工程のコストダウンを図り、未利用のバイオマス（農林水産系の廃棄物、副産物、加工残渣）の有価物転換の事業を普及させる。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

①LCA/TEA シミュレーター開発【東京大学】 研究項目 3.1.4.1

バイオ産業のニーズ（GHG 排出量削減・コスト低減）に応えるシミュレーターを開発し、ソフトウェア企業との提携による市販化やコンサルタント事業（顧客からプロセスデータを提供してもらい、シミュレーターを使用した予測結果を提供）等を検討する。インベントリデータは企業からの Confidential な技術情報はマスクした上で、NDA を締結し無償提供する。

②ソホロリピッド (SL) 生産【サラヤ】 研究項目 3.1.4.2

SL 発酵製造の LCA 結果をもとに GHG 排出量が大きい項目の改良を検討し、安定製造できるように管理工程の検討も含めて製造手順書等を作成する。

③固体培養によるセルラーゼ生産【徳島大学・NMT】 研究項目 3.1.4.3

食品加工工場から中間流通業者、小売業者、外食などに至るサプライチェーン上で排出されるフードロスを対象として、固体培養で生産したセルラーゼを活用して、小規模かつ各事業単位でエタノール転換できる装置を開発し、各事業所単位で消毒用エタノールを生産・利用できる事業を目指す。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

①LCA/TEA シミュレーター開発【東京大学】 研究項目 3.1.4.1

成果の普及を目指して、他の研究課題に参画しているバイオ企業に LCA/TEA による評価手法や効率的なバイオプロセス設計への展開例を紹介し、協和発酵バイオ（株）と天野エンザイム（株）と共同で LCA を実施中である。

②ソホロリピッド (SL) 生産【サラヤ】 研究項目 3.1.4.2

現時点では特に無し。

③固体培養によるセルラーゼ生産【徳島大学・NMT】 研究項目 3.1.4.3

セルラーゼを活用するエタノール転換装置（小型高濃度エタノール製造装置）の設計まで実施済みであり、試作段階にある（1号機の開発予算：1,000万円）。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

①LCA/TEA シミュレーター開発【東京大学】 研究項目 3.1.4.1

適用可能なバイオプロセスや機能の拡張、普及に向けた専門的人材（LCA/TEA を実行できるバイオエンジニア）が不足しており、他の研究課題と連携して人材育成にも取り組むことで実用化に繋げる。

②ソホロリピッド (SL) 生産【サラヤ】 研究項目 3.1.4.2

2027～2028 年度に本プロジェクトでの SL 発酵製造の LCA 結果をもとに GHG 排出量が削減できる培養手法をラボスケールにて検討する。2029～2030 年度にラボスケールで検討した培養方法をもとに、実製造での管理項目や製造手順書を作成する。また安定製造できるかを確認するために、試作製造を実施し、2031 年度から実製造を開始する (40 t/y 規模)。

③固体培養によるセルラーゼ生産【徳島大学・NMT】 研究項目 3.1.4.3

2023～2024 年度に固体培養セルラーゼ生産装置のスケールアップを行い、フードロスからのエタノール製造装置の 1 号機を完成させる。

(12.5) 波及効果

①LCA/TEA シミュレーター開発【東京大学】 研究項目 3.1.4.1

顧客の GHG 排出量削減や製造コスト低減、マーケティング戦略による売上増加・市場規模拡大に貢献する。シミュレーターの感度解析により、GHG 排出量や製造コストへの影響度の高い因子を抽出し、経験と勘による技術開発から脱却した効率的な改善に貢献する。また、LCA/TEA からのバックキャスト型のバイオプロセス設計という新しい学理の創出が期待できる。

②ソホロリピッド (SL) 生産【サラヤ】 研究項目 3.1.4.2

本プロジェクト終了後には培養条件や原料の見直し、廃棄物を活用した SL 発酵製造法の LCA 評価を実施できているため、SL 発酵製造の環境影響について定量化できている。また SL は生分解性が良く、環境負荷が小さい界面活性剤であることが知られているため、成果物だけでなく、その製造方法に至るまで環境影響が小さいことを示すことができると期待される。これにより、化成品である一般的な界面活性剤からバイオサーファクタントへの代替の機運を高めることが期待されるため、カーボンリサイクル促進の一助となり、バイオ産業の発展に貢献できる

③固体培養によるセルラーゼ生産【徳島大学・NMT】 研究項目 3.1.4.3

安価なセルラーゼの生産体制が整い、バイオマス食品系廃棄物 (2000 万 t/y)、ペーパースラッジ (500 万 t/y)、農林水産系廃棄物 (バイオマス, 8000 万 t/y) 等からエタノールや生分解性プラスチックを量産できれば、食品廃棄物処理のための現行の輸送コストや、焼却に伴う CO₂ 排出量の削減に貢献でき、我が国の食品廃棄物の有効利用が可能となる。

3.2.1.1.4 次世代バイオプロセス技術の開発 研究項目 4

3.2.1.1.4.1 並列型のバイオ生産 AI 制御システムの開発 (ちとせ研究所) 研究項目 4.1

(1) 背景と目的

発酵分野で工業的に利用されているバイオリアクターの原型は1940年頃に作られており、攪拌法や通気法等の改良や栄養源等を連続的に添加する流加培養法などが開発されることで培養手法が発達してきた。培養技術は経験豊富な技術者によって制御される匠の技であり、そのため現場担当者に知見が蓄積している。その技術力によって発達した発酵産業は日本の大きな強みとなっていた。90年代には現在の手法は完成されたが、その後の技術的革新は見られていない(図3.2.1.1.4.1-1)。さらに、経済状況の変化に伴い生産現場が海外に移行し、匠に蓄積する発酵生産のノウハウが海外に流出していることが社会課題となっている。



図 3.2.1.1.4.1-1 培養技術の発展とその課題

また、従来の発酵生産では、単一品目を大規模生産することでスケールによるコストメリットが得られていた。しかし、スケールアップの手間が掛かり技術的なハードルが高いこと、設備の汎用性が低く様々な用途には使用できないこと、大規模設備の初期投資が高いことなどが新規参入の障壁となっている。産業のバイオ化を加速しバイオエコノミーを拡大するためには、従来型の生産に加えて多品種少量生産にも対応しうる柔軟な生産設備とそれに対応する技術が求められている。

そこで本研究項目では、これまで匠依存であった発酵生産を AI 技術等の情報科学を活用によって高精度な制御を実現し、多様なニーズや市場規模に対応可能なバイオとデジタル技術が融合した自動制御並列培養システム基盤を開発する(図3.2.1.1.4.1-2)。

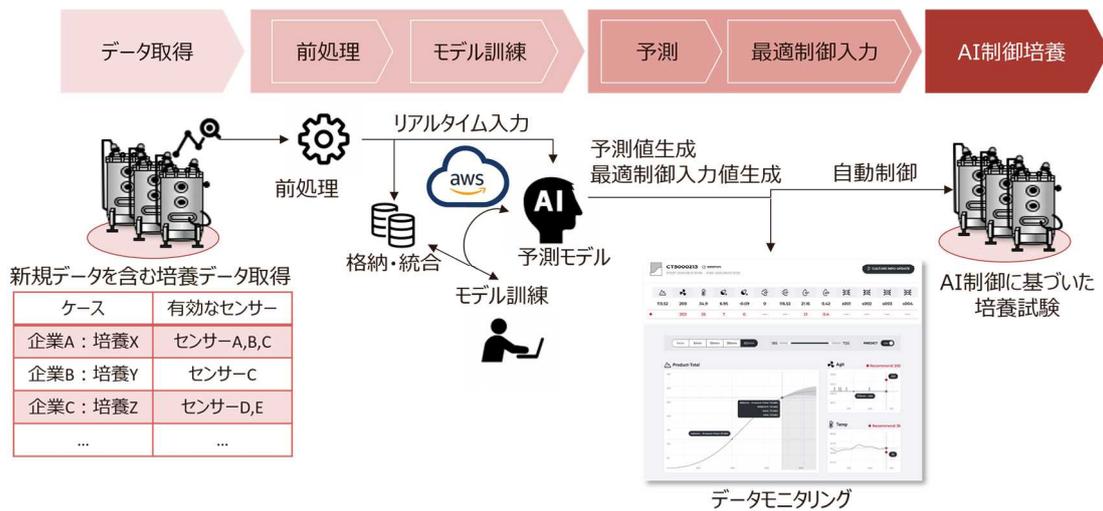


図 3. 2. 1. 1. 4. 1-2 AI 技術を活用した自動制御システムのイメージ図

発酵生産の制御には、pH、温度、溶存酸素濃度などのセンサーからオンラインデータとして取得可能なデータが用いられる。しかし、定量化され、リアルタイムに取得可能なデータは限られており、これだけでは高精度な培養制御は不可能である。前述のように、従来の発酵生産では匠の技が重要となるが、経験豊富な技術者はセンサー情報に加えて色や匂いなどの五感も含めた情報に基づいて制御がなされてきた。そのため AI 学習にはこのような非定量化データの活用も不可欠であると考えられる。AI を活用する際には取得データと目的（生産性の改善など）との因果関係が事前に分かる必要はない。培養の情報が経時的・連続的に取得できることが重要であり、このような AI 学習に特化したデータセットをちとせ研究所ではコンボリューショナルデータ^{*}と命名し、これまで定量化されていない情報をセンシング可能な新規デバイスを開発し、高精度な制御の実現を目指す（図 3. 2. 1. 1. 4. 1-3）。

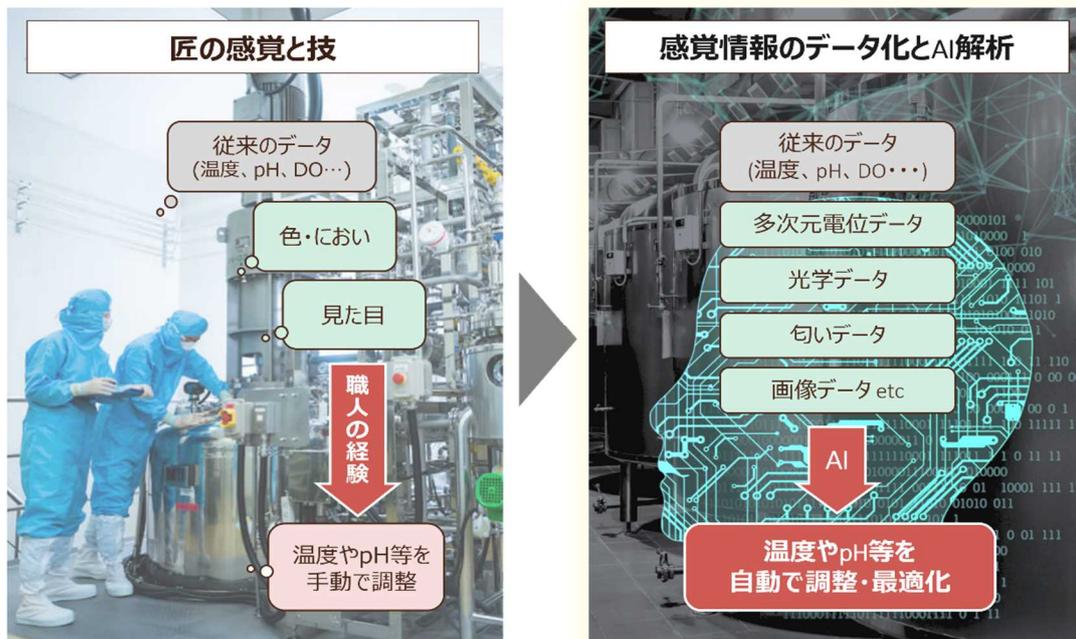


図 3. 2. 1. 1. 4. 1-3 匠の技術のデータ化

柔軟かつ迅速にバイオ生産品を供給するためには、スケールアップの手間を省いた汎用性の高い生産システムが必要となる。そこで、複数の培養装置を並列運用可能なシステムを構築し、同時に稼働させる培養槽数によってスケールを柔軟にコントロールすることで従来技術の課題に対応することを目指す。しかし、制御対象の増加に伴う労務費コストの増大が新たな問題が発生する。人による管理を最小化するために、培養を適切な状態に自律的に制御可能な自動制御システムが必須となる。そこで、コンボリューショナルデータを活用したAI技術によって培養制御を自動化すると共に、それを並列で運用できる技術基盤を開発する。

(2)位置づけ、目標値

本研究成果は発酵生産を実施する企業に導入することを想定している。現時点でAI技術を発酵生産に応用し、独自のセンサー技術を活用して培養制御の最適化まで提供するサービスは世界的にも存在しない。

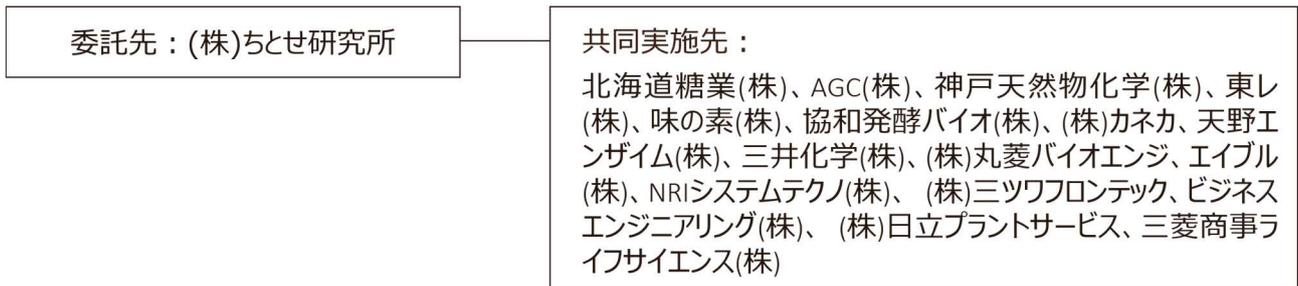
目標値は、自動制御の高精度化に資する自動化用センサーを開発するため、2022年度末までに3件、2024年度末までにさらに3件のセンサーを開発する。システム化については、AIが生成する最適制御入力値が適切に培養装置に入力され、誤動作等の問題点なく実行可能な状態を構築するため、2022年度末までに同時並列自動培養制御モデルのシステムエラー率1%以内、2024年度末までに時間差並列自動培養制御モデルのシステムエラー率1%以内、2026年度末までに0.1%以内を達成する。また、上記の開発成果をユーザー企業に実装評価いただき、抽出された課題をフィードバックとして得ることで、開発成果を改善するために、2022年度末までに実装評価のための条件抽出を6件以上、実装評価を1件以上、2024年度末までに条件抽出を3件以上、実装評価を5件以上、2026年度末までにアップグレードを5件以上実施する。開発成果を実際の試作生産に活用するため、2026年度末までに時間差並列制御によって開発期間を10%以上短縮化1件以上で実証する。

(3) 全体計画

研究項目	FY2020	FY2021	FY2022	FY2023	FY2024	FY2025	FY2026
4.1.1 AIによる自動培養制御技術の確立	30L培養槽の設置 5000L培養槽の設計	自動化用センサー開発					
4.1.2 AIによる自動培養制御技術のシステム化	5L培養槽での自動培養プロトタイプング	同時並列自動培養制御モデルのプロトタイプング		時間差並列自動培養制御モデルのプロトタイプング		モデルのアップデート	
4.1.3 AIによる自動培養制御システムの実装評価				ユーザー企業での実装評価			
4.1.4 AIによる自動培養制御システムによる試作品製造および受託						試作品製造および受託	

(4) 実施体制

ちとせ研究所が代表委託先となり、共同実施先として16企業が参画する。このうち、成果を商品化する事業者候補と開発を進め、開発成果はユーザー候補企業に実装評価いただき、そのフィードバックを得ることで開発の方向性を検討し、成果の社会実装を目指す。



(5) 運営管理

本テーマ全体で実施される全体会議とは別に、本研究項目に参加する全機関との分科会での情報交換および共同実施先との個別の会合を適時実施している。

(6) 実施の効果

本研究項目により、社会課題となっていた匠の不在、技術継承問題の解決に繋がり、停滞していた培養技術の発展により発酵生産におけるボトルネックの解消に繋がる。また、柔軟かつ迅速にバイオ生産品を供給する体制を構築することで、実生産への橋渡し機能を強化し、迅速な開発を実現することで、バイオエコノミー拡大およびプロジェクトの全体目標である 390 万トン-CO₂/年の削減に貢献する。

(7) 中間目標の達成度

研究項目	活動内容	中間目標	達成度
4.1.1 AIによる自動培養制御技術の確立	モデル酵母の培養データを取得し、本データを元に自動化モデルを構築し、本モデルの予測精度が改善するセンサーを提示する。	自動化モデルの予測精度 (RMSE) を 10% 以上改善するセンサーの追加 3 件	○：油脂酵母向け自動化モデルの構築に必要な培養データ取得を進めており、特にリアルタイムなセンサー情報取得に必要なデータ処理技術の開発を進めており、本年度中に 3 件の評価は完了する予定である。
4.1.2 AIによる自動培養制御技術のシステム化	培養装置の制御システムに対して、機械学習で提案された制御値を書き込むためのシステムを開発する。	同時並列自動培養制御モデルのシステムエラー率 1% 以内	○：クラウド上に構築したデータベースに培養データを蓄積し、本データを基にモデル構築およびリアルタイムな情報の入出力が可能となる制御システムの導入を進めている。並行して培養槽を複数同時に扱うことで制御を最適化する仕組みについても検討を進めている。これらのシステム構築および評価は本年度中に完了する予定である。
4.1.3 AIによる自動培養制御システムの実装評価	ユーザー企業に開発段階の製品を実装評価いただき、そのフィードバック	実装評価のための条件抽出を 6 件以上、実装評価を 1 件以上	○：22 年度は 7 社との実装評価を進める準備を進めており、今年度中に条件抽出および評価が完了する予定

	クを得て、アップグレードに繋げる。		である。
--	-------------------	--	------

(8) 研究開発の成果と意義

(8)-1 AI による自動培養制御技術の確立

予測モデルの精度を改善するセンサー開発のため、モデル株として利用している油脂酵母の菌体量予測モデルを構築した。5L ジャーで油脂酵母を培養し、得られた培養データのうち従来データ（pH、温度等）のみで作成した予測モデルと、コンボリユーショナルデータを活用した予測モデルを作成し、その予測精度を one-leave-out 法によって比較した。予測精度を示す RMSE（Root Mean Squared Error）は値が低いほど精度が高いことを意味する。コンボリユーショナルデータを活用したモデルの RMSE 値は従来データより低下し（図 3.2.1.1.4.1-4）、データ全体の平均値としては予測精度（RMSE）が 24%改善した。

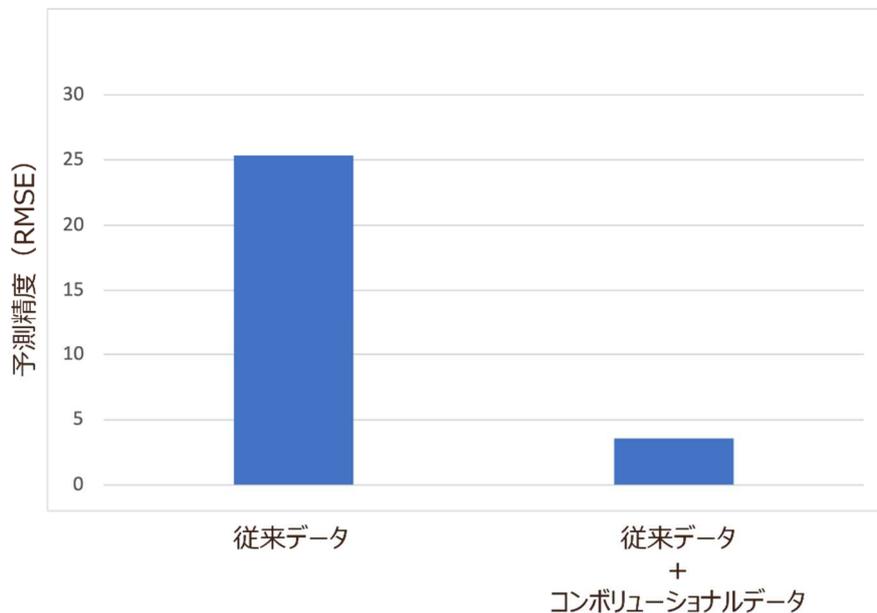


図 3.2.1.1.4.1-4 菌体量予測モデルの精度比較

予測モデルに使用したデータの重要度を SHAP 値にて比較した。SHAP 値では重要度が高いほどグラフ上部にデータが表示される。比較の結果、コンボリユーショナルデータが最も重要度が高いことが示された（図 3.2.1.1.4.1-5）。

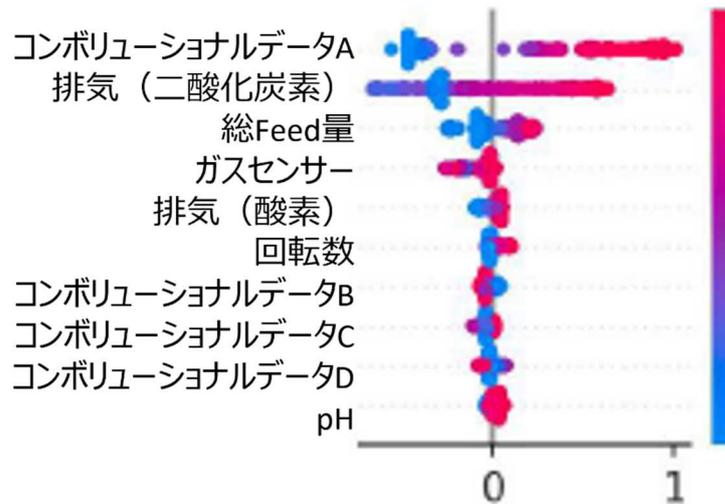


図 3.2.1.1.4.1-5 学習データの重要度比較

(8)-2 AI による自動培養制御技術のシステム化

30L 容培養槽（丸菱バイオエンジニアリング社製 5 台、三ツワフロンテック社製 5 台）および 800mL 容培養槽（エイブル社製 6 台）のデータを、データ集約・制御管理 PC に一元的に集めるインフラを整備した。培養装置は、各社ごとの OPC サーバ機能を持つ制御 PC に繋がっており、対応した PC 経由で培養装置の情報を取得している。取得した計測情報を、構築したイントラネットを通じて、データ集約・制御管理 PC に一元的にミラーリングし、集約するシステムを構築した（図 3.2.1.1.4.1-6）。集約した 16 台の培養情報は、データ集約・制御管理 PC からユーザーインターフェースを通して、データ閲覧するための可視化が可能である。

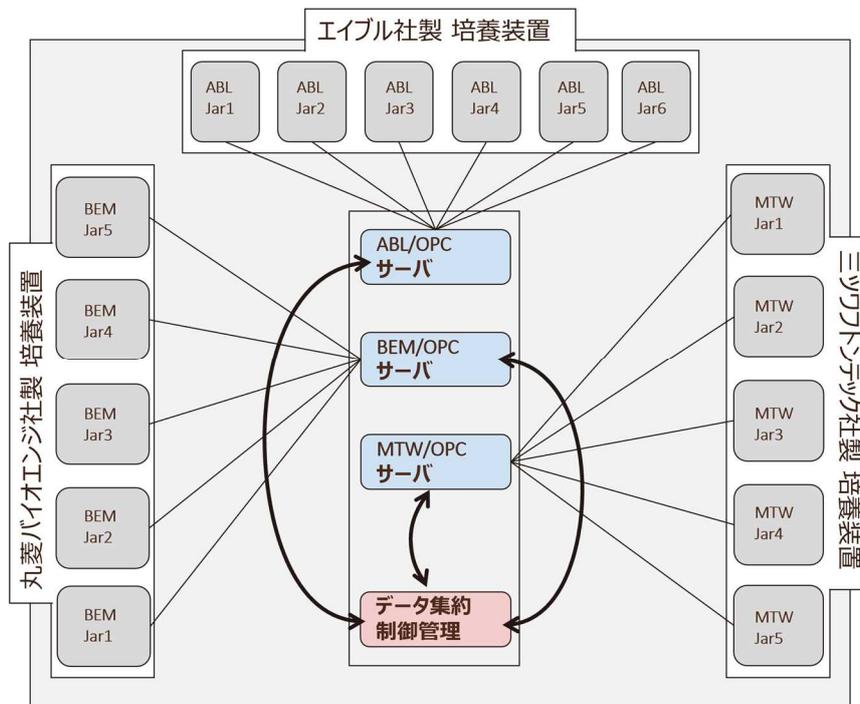


図 3.2.1.1.4.1-6 一元管理 PC による各社の培養槽との連携模式図

ABL : エイブル社、MTW : 三ツワフロンテック社、BEM : 丸菱バイオエンジニアリング社

30L 容培養槽の 5 台同時稼働を実施するため、管理 PC から培養槽へ設定値の書き込みが実施できるかを検証した。管理 PC のウェブアプリケーションから培養装置へ制御命令を書き込み、5 台の培養槽の設定値と実測値が同一となることを確認した（図 3.2.1.1.4.1-7）。

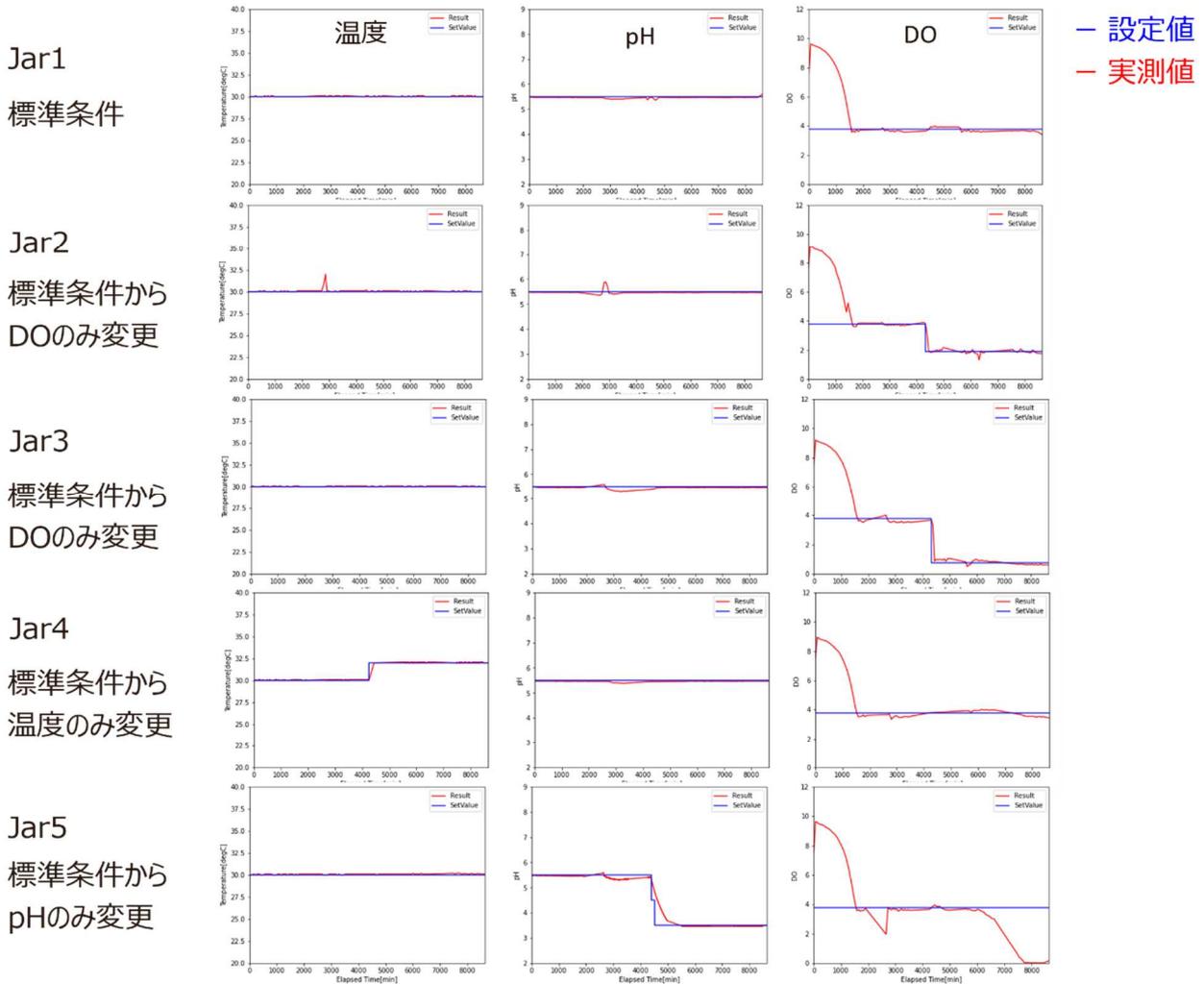


図 3.2.1.1.4.1-7 5 台同時稼働した際の設定値および実測値データ

(9) 成果の最終目標の達成可能性

自動制御システムを活用した試作品の受託のためには、センサー開発などの要素技術およびシステム基盤の構築が不可欠となる。現状では、予定していたセンサーおよびシステム開発は順調に進んでいるため、計画に沿って最終目標が達成される見込みは高いと考えられる。

(10) 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	
2020	-	-	-	-	-	-	-
2021	-	-	-	1	-	-	-
2022	-	-	-	-	2 (予定)	1 (予定)	-
PJ 期間 合計	-	-	-	1	2 (予定)	1 (予定)	-

(11) 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	P C T
2020	-	-	-
2021	-	-	-
2022	-	-	-
PJ 期間 合計	-	-	-

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

本研究項目では発酵生産を実施する企業に新規センシングデバイス、AI 技術に基づく自動制御システムおよびその関連成果のサービス提供を事業化する。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

本研究項目にはユーザー候補となる企業が参画している。ユーザー候補企業からプロジェクト中に開発成果を実装評価いただき、その結果を研究開発にフィードバックすることで、ユーザー企業が求める機能/スペックを備えたサービスの構築を目指す。また、30L 培養槽を中心とした試作機能評価を本研究項目中に試作受託を実施することで評価および改善し、実際に必要となる試作サービスの提供を目指す。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

本研究項目が開発する成果をユーザー候補となる共同実施先が実装評価するための準備を進めている。また、NEDO 参画企業以外への成果の共有を強化するため、学会誌や Japan times 等の一般情報誌、バイオジャパン等の展示会、セミナー・講演等を通じて情報発信を進めている。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

研究開発の成果に記載した通り、新規センシングデバイスや自動システム開発は予定通り進んでおり、実用化・事業化に問題はないと考えている。

(12.5) 波及効果

本研究項目では、これまで限られたデータしか得られなかった系に対して、センシング技術によって新規データを取得し、ヒトが処理出来ない情報量を最新の解析技術を用いることで、経験豊富な技術者でなくとも最適な制御に繋げるための技術を開発する。この技術は、本プロジェクトが主に対象とする発酵産業だけでなく、生き物を使った同様の課題が発生する生産系に対して応用可能なものであり、動物細胞や藻類も含めたバイオ生産全体に対して応用可能な技術である。

3.2.1.1.4.2 「攪拌羽根レス・微生物用シングルユース培養槽の開発」（大阪工業大学） 研究項目 4.2

バイオプロダクション産業の創出と発展に向けて、スマートセル設計技術等により生み出される有用微生物候補株を、速やかに実生産プロセスへと導くために求められる技術体系が求められている。本研究項目では、生産プロセス開発の短期間化やスムーズな試作品製造・実証（POC）を進めるために有用と期待される“微生物用シングルユース（SU）培養システム”を開発する。多様な品目を多様な量・品質で次々に試作・生産する技術としてSUシステムに期待が集まる。大工大に設置した培養施設を試作支援事業に活用する際にも、このSUシステムはフレキシビリティを発揮するものと期待される。

(1)背景と目的

バイオプロダクション産業の創出と発展に向けて、スマートセル設計技術等により生み出される有用微生物候補株を、速やかに実生産プロセスへと導くために求められる技術体系が求められている。本項目では、生産プロセス開発の短期間化やスムーズな試作品製造・実証（POC）を進めるために有用と期待される“微生物用シングルユース（SU）培養システム”を開発する。細胞設計・改変技術の近年の飛躍的な進歩により、多様なバイオ品目が速やかに社会実装されることが期待される一方、多様な品目を多様な量・品質で次々に試作・生産する技術としてSU培養システムに期待が集まる。

従来の蒸煮滅菌タイプ（数十リットル以上）のスチールタンク培養槽（マルチユース、MU）は、定置滅菌や定置洗浄が必要で、これを実現するためのボイラーや配管、自動バルブの点数などが非常に多く、設備導入費と維持費が高額である。加えて洗浄は簡単とはいえず、そのバリデーションを取ることに手間と労力（人件費）を要する。MUシステムを使って、多様な品目を試作・製造する場合、チェンジオーバー（ラインの切り換え）に長い時間と労力を

		シングルユース (SU)	マルチユース (MU, steel tank)
設備導入コスト（減価償却）		low	high
維持コスト（人件費）		no	high
洗浄コスト（人件費）		no	CIP
チェンジオーバー		short	long
滅菌		γ線, 膜ろ過 low	SIP, high
基本構造		simple	complex
バリデーション（人件費）		simple	very complex
実現可能な容量		< 2 kL	> 400 kL
消耗品		バッグ, 継手, 使い捨て	少ない
CO2排出	化石燃料 ¹ 使用国	中程度	高い
	再生可能 ¹ 使用国	中程度	低い
適用		mammalian	all

図 3.2.1.1.4.2-1 SU と MU のベンチマーク

要することとなり、非常に非効率となる。一方でSUシステムは基本構造が非常に単純であり、上述の固定費（設備減価償却、人件費、保守費等）を削減できると期待される。バック本体はγ線滅菌で、培地はフィルター滅菌を用いるため、大掛かりな滅菌設備を持たず、また配管もほぼ使い捨てとなる。洗浄の手間やチェンジオーバーの時間が省けるため、多様な品目を代わるがわる作る際には、好適であると想定される（図 3.2.1.1.4.2-1）。

SUシステムは初期導入費が低く抑えられることから、新規参入を目指す企業にとっては参入障壁を下げることに繋がると期待できる。試作品生産を終え稼働率が低くなる培養設備を維持管理するにも、SUでは無駄な固定費を削減できる。SUシステムではセンサー類の使い捨てにも対応できる可能性があり、維持管理費の低減に一層寄与する可能性がある。

少し特異なケースではあるが、胞子を作ったり、菌自体が高い熱耐性や薬剤耐性を有するなど、定置洗浄、定置滅菌では除去できなくなる可能性のある菌種はMUシステムでは扱い難く、このような菌種を用いる場合には培養槽だけでなく、以降の分離精製や乾燥の工程までSU化することが求められている場合もある。

もちろん全ての生産にSU培養システムが適する訳ではなく、適材適所を意識せねば議論が混乱するので留意が必要である。生産実証を終え、単一の品目を大量に作る事で利益を得たい段階では、これまで通り巨大なMUの設備を繰り返し使うことが合目的である。固形物を含んだり粘性を生じる培地は膜滅菌を用いる事が出来ないためSUでは扱い難く、合成培地等には相性が良い。

SUシステムはこれまで、動物細胞による抗体医薬生産など非常に付加価値が高い製品を対象に開発・上市されてきたため、使い捨てとなるバックのコストが数十万円以上と非常に高額である。微生物用途に改良された既製品もあるが、通気・攪拌性能を高めるために羽根はグレードアップされ、むしろバックコストは高額化する方向となっている。そこで本研究(図3.2.1.1.4.2-2)では、攪拌羽根を持たず、微細泡発生器を用いた気泡塔型のSUバックを試作する。達成可能な性能(k_La)の把握や、無菌操作の可否、微生物用途に適した操作手順の確定を進めることで、市販システムとして成立するか判断することを目標とする。攪拌羽根の泡を細かくせん断する作用が失われることから、SU化が可能な素材を用いた微細泡(マイクロバブル)発生器を活用する。加えて、ガス透過性を有するバック素材を本体胴体部に用いる事も検討する。羽根が無いことで混合能力や物質移動係数は限られるため、カビなど粘性を有する培養系への適用は恐らく困難であると考えられるが、適した用途は割り切る必要がある。

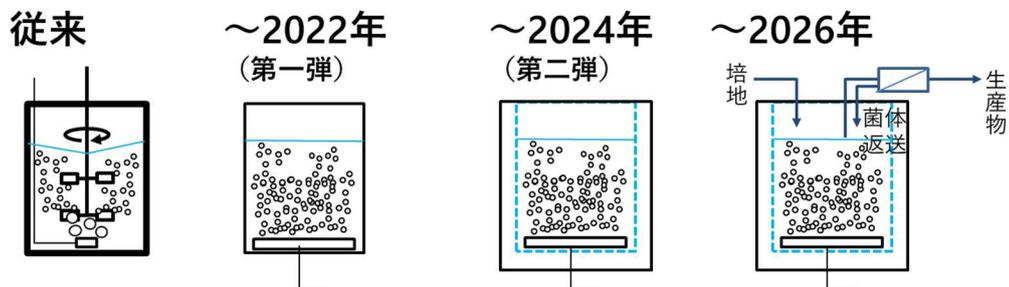


図 3.2.1.1.4.2-2 本項目で開発するSUシステムの概要

現状ではSUシステムに使用するセンサー類は、繰り返し利用が可能な旧来のプローブタイプが使用されており、センサーの別滅菌と無菌接続が可能な治具(アタッチメント)が使用されている。このアタッチメントが非常に高額(万円/箇所)であるため、センサー素子のSU化(数千円/箇所)はバックの低コスト化に寄与する。本項目ではSUバックが透明であることを活かして、光学式のセンサー類を採用することを計画している。また無菌接手のアタッチメントも非常にバックを高額化させる要因となっているため、微生物培養の運用に相応しい継手の在り方についても産業界と議論をしつつ必要最低限の仕様と運用を固める。

以上のような低コストな微生物用SUバックが開発できた場合、多様な品目を素早く、少ない固定費コストで試作できることになる。次に予想されるのは量の可変性に対するニー

ズである。バイオ生産では、大量に作らねば利益の出ないようなバルク品だけでなく、非常に付加価値が高く量は求められないため、一度作ったらしばらく作らなくて良い（年に数回の運転で済む）ようなものもある。仮に同じ生産物であっても、例えば用途が食用と医療用と異なるだけでも、前述のようなケースが生じる可能性がある。SU

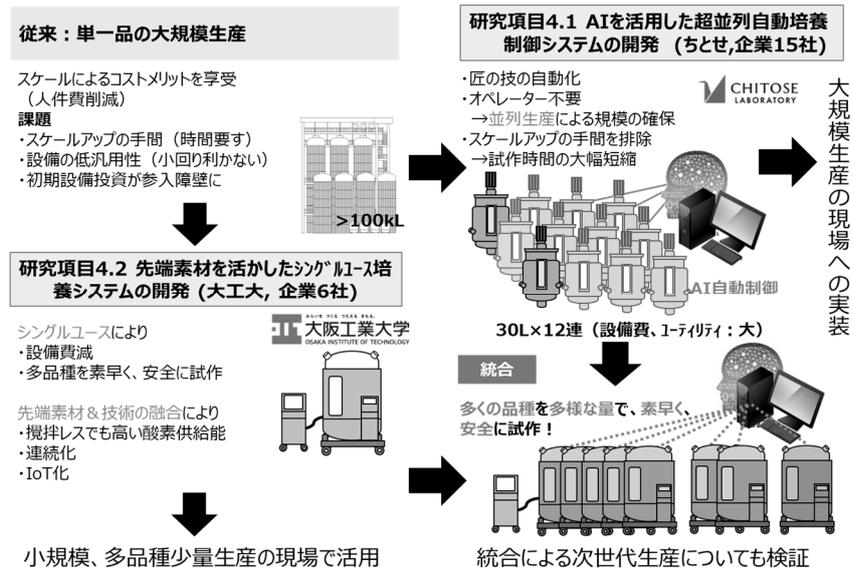


図 3.2.1.1.4.2-3 多様な量への対応を可能とする SU 並列化

システムでは、制御側をそのままに胴体側を変更するだけで、数十リットルから数百リットル、最大で数トンレベルの生産規模が可能（加温や冷却能、通気動力は変更が必要）な製品が存在していることから、既にある程度のフレキシビリティを有している。それ以上に大きなサイズが求められる場合には、研究項目 4.1 で開発される AI 自動制御を活用した並列生産技術と組み合わせることで、SU システムでもある程度の規模（量）への対応が可能となると期待される（図 3.2.1.1.4.2-3）。数トン以上の大型培養槽には、容器内不均一性の問題が伴ってくる。スケールアップの手間と労力を排して量を稼ぐためには、中規模発酵槽の並列生産システムは、試作品製造段階では有望と考えられる。一方で、プロセスの連続化により小さな容量でも生産性を高め、量に対応する方向性も期待される。本項目では SU 化が可能な菌体分離モジュールを備えた灌流培養システムについても検討を行う（図 3.2.1.1.4.2-2）。

他にも、SU システムを使用することによる環境負荷について、定量的に評価しておく必要がある。研究項目 3 との連携により、SU と MU を LCA 手法で比較評価する計画である。以上を通じて、ユーザーが必要とする情報を備えた微生物用 SU システムを開発し、M01 テーマの共通課題である“開発期間の短縮”に貢献し、バイオプロダクション産業の創出と発展に貢献する。

(2) 位置づけ、目標値

前述の目的と実施内容のとおり、本研究項目では攪拌羽根レスの SU バック培養システムを開発する（図 3.2.1.1.4.2-2）。まず目的の構造を培養可能な SU 培養システムを大工大培養施設内に試作・設置し、第一弾として大面積の微細泡発生装置を底部に配置した気泡塔型バックを試作する。達成可能な性能 (k_{La}) の把握や、無菌操作の可否、微生物用途に適した操作手順の確定を進める。2022 年度末までに、研究項目 4 で設定した標準培養条件の下限を満たす $k_{La} = 200 \text{ h}^{-1}$ を達成し、無菌操作の運用面も検討することで、第一弾の市販化に必要な目途付けを完了する。第二弾として、ガス透過性素材を活用した新規な SU バックの開発や、光学式センサー類 (pH, DO, 溶存 CO_2 , 菌体濁度) を活用したセンサー素子 SU

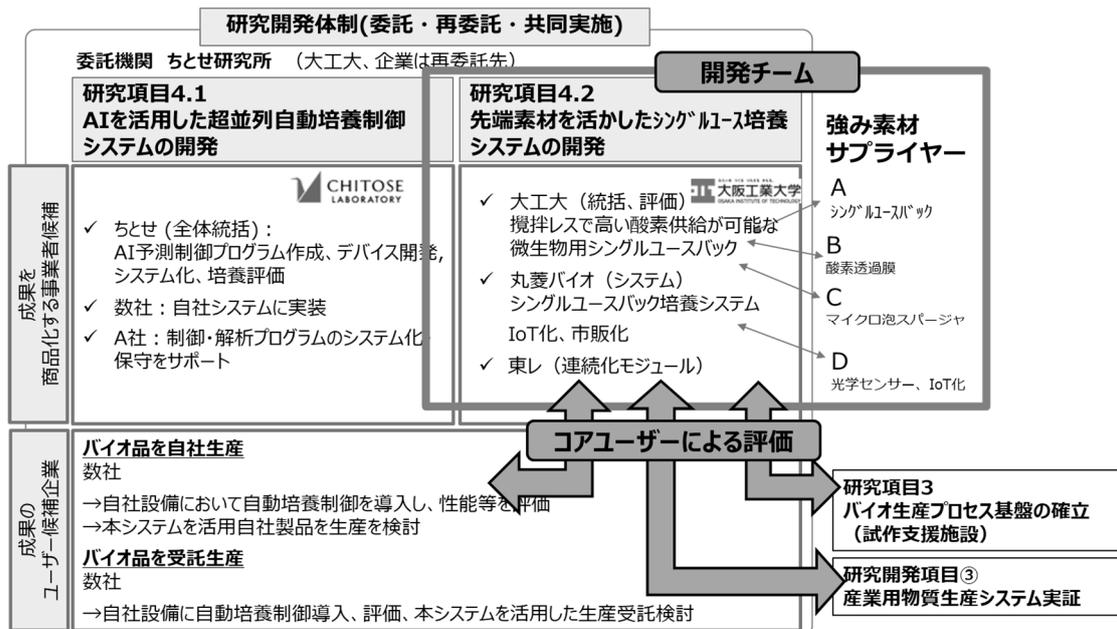
化を検討する。2022年度末までに要素技術の試作を経た評価を行い実装の目途付けを行う。2024年度末までに、 $k_{La} = 300 \text{ h}^{-1}$ を達成し、可能なセンサー類についてはSU化を完了する。引き続き連続化（灌流培養）モジュールやAI自動制御と連携した統合型SUシステムへのアップグレードを2026年度までに完了し、生産効率化（10%以上）を達成する。

(3) 全体計画

研究項目	FY2020	FY2021	FY2022	FY2023	FY2024	FY2025	FY2026
4.2.1 微生物用シングルユースバックと培養制御システムの開発	装置の試作・バックの基本設計	検取、設計 第一弾 SU バックの試作・評価・改良		市販化への目途付け完了 (3.2における試作支援等に活用)			
4.2.2 先端要素技術を盛り込んだ高機能シングルユースバックと並列・連続培養制御システムの開発	試作装置への必要な仕様の反映	第二弾 SU バックに搭載を計画する要素技術の試作・評価・目途付け		第二弾 SU バックの試作・評価・改良人材輩出		連続化、AI 制御等との統合・高機能化	

(4) 実施体制

研究項目4の実施体制図と、研究項目4.2の位置づけ、外部連携を示す。プロジェクトの内外と連携を取り、多様な試作品をフレキシブルに評価可能な体制を取っている。開発品はユーザー候補企業で評価やフィードバックを受けることも想定している



(5) 運営管理

プロジェクト (M01) 全体会議とは別に、研究項目 4 (ちとせ研究所とその再委託先、ならびに大阪工業大学) の報告会を年 2 回程度開催すると共に、研究項目 4.2 については、不定期かつ個別に進めていた会合を 2022 年度から定例化 (年 4 回、オンライン) し、情報共有する。本定例会議には別に、半年ごとに NEDO、PL、SPL、M01 代表にも参加いただき、定期的な情報交換が行える体制を 2022 年度から整えた。他研究項目との連携促進のため、大工大・長森が研究項目 3「バイオ生産基盤の確立」、大阪大学・松田が研究項目 2「培養データ駆動型産業用スマートセル構築技術の開発」との窓口を務め、情報の集約・整理を行っている。

(6) 実施の効果

「(1)背景と目的」にも記載のとおり、本実施項目は、プロジェクト全体で整備を目指すバイオフィュードリー拠点の中で用いられる技術のひとつと位置付けられ、試作支援機能を担う。また SU システム自体も助成事業を中心に展開され活用されることを見込んでいる。そのため個々の製品・開発技術の費用対効果等については言及しないが、他の研究開発グループから寄託されたスマセル株等の培養条件最適化と実用化性能の評価を通じて、研究開発期間を短縮化し、プロジェクト (特に M01) 全体が掲げる目標である 390 万トン/年削減の達成に貢献する。

(7) 中間目標の達成度

研究項目 (担当)	活動内容	中間目標	達成度
4.2.1 微生物用 SU バックと培養制御システムの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・第一弾 SU システムの設計・試作・設置 ・第一弾 SU バックの設計・試作・評価・改良 	<ul style="list-style-type: none"> ・設備導入の完了 ・$k_La = 200 \text{ h}^{-1}$ を達成 ・無菌操作等の運用面も検討完了 	<ul style="list-style-type: none"> ・○ 設備試作・設置を完了 ・○ 吐出速度増大による達成に目途 ・○ γ 線滅菌済みバックの試作を完了し、評価に着手済み
4.2.2 先端要素技術を盛り込んだ高機能 SU バックと並列・連続培養制御システムの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・第二弾 SU バックに実装が期待される要素技術の試作・評価・見極め ・SU 対応の連続化モジュールの試作・設置・評価 ・AI 制御との連携等による生産効率向上の実証 	<ul style="list-style-type: none"> ・各要素 1 回以上の試作と評価による搭載可否判断の完了 ・1 回以上の試作と評価による課題抽出の完了 ・中間評価時点の目標は無し 	<ul style="list-style-type: none"> ・○ 既に各要素について試作・改良を実施し、機能が向上した部材もあるため、順調に推移している。 ・○ 既に試作機を大工大に設置完了、試作評価が可能な体制を整えた ・○ 2022 年度に SU 制御装置側の機能追加を行い、AI 制御への対応準備を完了

(8) 研究開発の成果と意義

(8)-1 第一弾微生物用 SU バックと培養制御システムの開発

研究項目 3 および研究項目 4 の参画企業と連携・策定した“標準培養条件”を満たす培養装置群（30L、5L4 連、1L12 連、0.2L24 連）が設置された大工大の培養実証施設内に、微生物用 SU バック用培養制御システム（30L）の試作機を併設し、横並びでの検証を開始できる体制を整えた。微細泡発生器を底部に搭載した SU バックを試作し、酸素共有性能を評価した。評価には研究項目 3 において標準的な k_La 評価法として選定された、光学式溶存酸素センサー（応答速度が極めて速い）を用いた Gassing Out 法で行った。現状では、吐出ノズルを 3 か所、通気速度を 2 VVM の条件において、到達 k_La は約 140 h^{-1} である。大型の気泡塔培養槽や通気攪拌槽を数十リットルスケールで再現するには 5VVM 程度まで通気を上げることが許容できることから、機能改良（本体制御側の吐出速度増大）に取り組んでいる。標準培養条件に近い酸素供給能が実現されそうな目途が立ったため、無菌培養試験用の γ 線滅菌済 US バックを試作し、評価を開始した。M01 テーマの中でモデル株として選定されたコリネ型細菌を用いた評価を進めている。

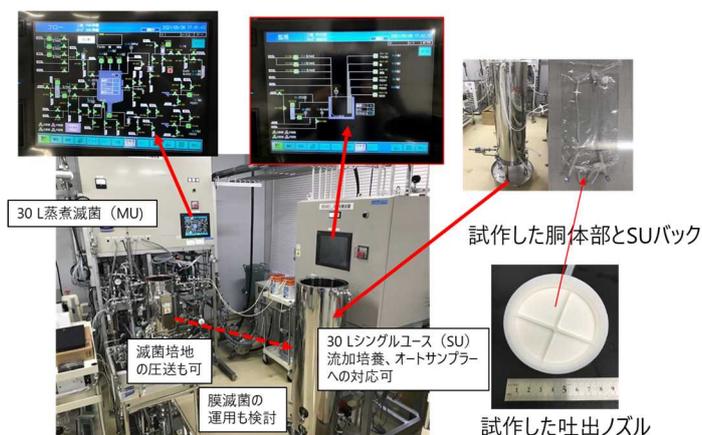


図 3.2.1.1.4.2-4 試作した微生物用 SU 培養システム

(8)-2 先端要素技術を盛り込んだ高機能 SU バックと並列・連続培養制御システムの開発（大阪工業大学）

研究項目 4.2.1 で開発する SU バックよりも、更に高い酸素供給能を有するシステムを実現するために、新規な素材をバック胴体部に用いることを検討した。酸素移動速度係数の測定により、気液界面並みのガス交換が可能な素材である事が判

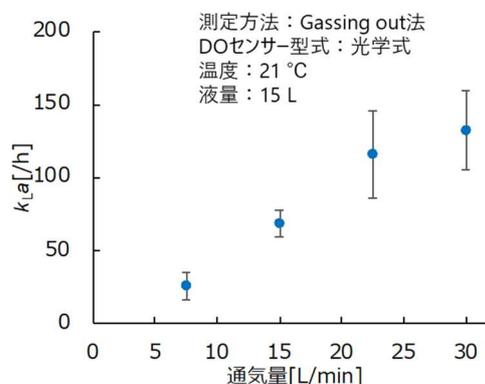


図 3.2.1.1.4.2-5 第一弾 SU バック試作器における通気量と k_La の関係 (n=3)

明したが、3L 容試作バックでの培養試験では、ガス交換が優れるが故の問題点も顕在化した。これを解消する新規な構造を検討し、改良には目途が立った。今後はさらに 30L 規模に大型化されたバックとそれを温調するシステムの設計を進め、2022 年度以降の試作評価へと進めていく。より低コストかつ扱いやすい構造とするため、溶存酸素や pH、菌体濃度を透明胴体部から非侵襲的に計測する（高額なセンサー挿入用アタッチメントの使用点数を削減する）技術や、グルコース濃度をオンラインで計測し制御に活用するためのセンシング技術について、試作および評価に着手した。生産性を長く維持しプロセス効率化を実

現するための菌体返送式連続培養（灌流培養）システムについては、試作機を培養施設に設置完了し、評価を開始した。研究項目 4.1 で開発される AI 自動制御との速やかな連携を可能とするため、試作 SU 培養システム制御器側への機能追加を完了した。

(9)成果の最終目標の達成可能性

微生物用 SU バック培養システムについて試作・設置を完了し、第一弾 SU バックについては微細泡発生器の試作や、これを搭載した試作バックの酸素供給速度の評価、これを無菌培養操作で評価するためのγ線滅菌済みバックの試作を順調に終えており、制御装置側の吐出速度の改良を経て、2022 年度終了時に目的とする培養評価を完了する目途が立っている。第二弾バックに搭載することが期待される先進的な要素技術についても、ガス透過性バックや非侵襲型センサーについて、試作や評価に着手出来ており、2023 年度以降の試作に向けて順調に進捗している。SU 化に対応した連続化（灌流培養）モジュールの試作機を大工大に設置完了し、AI 制御に対応するための制御装置側への機能追加を完了し、将来の高度化による実証に備えられている。以上のことから、計画に沿って最終目標が達成される見込みは高い。

(10)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	
2020	0	0	0	0	0	0	0
2021	0	0	0	0	0	1	0
2022	0	0	0	0	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	0	0	0	1	0

(11)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
2020	0	0	0
2021	0	0	0
2022	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	0

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

標準培養プロセスを反映した微生物用 SU バック培養システムは、実用面やコスト面の問題が無いことを確認の上で、市販化を目指している。まずは本プロジェクトの助成事業を中心に提供し、適用例を順調に増やせるか注視して見極めつつ、事業性について判断する。

開発する SU 培養システムは、研究項目 3.1 ならびに研究項目 3.2 の出口として想定する有償の人材育成および試作支援施設（バイオフィアウンドリ）において、多様な品目を素早く試作する機能の一部を担い、プロジェクト終了後の自走化をはかることにも寄与するものと考ええる。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

標準培養プロセスを反映し、使い捨てバックコストを大幅に低減した微生物用 SU バック培養システムとして、まず本プロジェクトの助成事業を中心に提供を開始し、使用感をヒヤリングするなどして実用性・事業性について判断する。まずコアなユーザーに使ってもらい、寄せられる意見に基づいて必要な改良は行い、使用感を向上させ、広く普及させられる製品に近づけていく。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

これまでプラント規模から卓上サイズまで数多くの微生物用培養装置を製品ラインナップし、幅広いユーザーに納入実績の有る培養装置メーカーを通じ、生物工学会や農芸化学会など関連学会大会などでのブース展示なども含め、知名度を獲得し販売促進を図る。また大工大の試作支援施設等のバイオフィアウンドリ拠点で活用されることで、新しいユーザーとの出会いも想定している。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

微生物用シングルユース培養システムは近年、主に医療や製薬の分野で活用が始まっているが、コストの問題があり裾野は限られている状況にあると推測される。今回、食品分野や化学分野など幅広いユーザーの声を反映し、使い捨てバックの低コスト化を強く意識している本開発品は、既存の海外製品と比較しても特徴があり、微生物用途に特化した製品として広く普及（スタンダード化）する可能性があるかと期待される。助成事業を中心とした活用例が増え、2026 年度末には認知度が高まり販売数が増えていると予想する。

(12.5) 波及効果

バイオ生産分野への新規参入への障壁は、製造設備を持たない企業が巨額な初期投資を行わねばスタートラインに付けないことにある。本取り組みにより開発される SU 培養システムは初期投資や固定費を低減することで参入障壁を下げると期待される。本プロジェクトで整備されるバイオフィアウンドリ拠点でも SU 培養システムは活用され、多様な品種を素早く試作することに貢献する。新規参入企業の増加は、既存のバイオ生産企業への刺激となり分野全体の活性化に資する大きな波及効果を有する。

3.2.1.1.5 持続可能なバイオプロダクション産業の創出と発展に資する人材育成拠点の形成 (大阪大学・大阪工業大学) 研究項目 3.2

バイオプロダクション産業の創出と発展に向けて、本研究項目では、スマートセル設計技術等により生み出される有用微生物候補株を、速やかに実生産プロセスへと導くために欠かせない“産業バイオ人材（生物化学工学の理論体系を理解し、高度な培養操作を実践できる人材）を育成”する。細胞設計・改変技術の近年の飛躍的な進歩により、多様なバイオ品目が速やかに社会実装されることが期待される一方、新規参入を志す企業にとっては、実プロセス開発を担う人材を見つけることが難しく、参入障壁のひとつとなっている。本項目では、大阪工業大学と大阪大学に整備された培養施設や、本研究課題で対象とされる開発期間を短縮する技術群を活かし、理論（座学）と実践（実技）を習得し、トレーニングされた産業バイオ人材の育成を目指す。

(1)背景と目的

バイオプロダクションで必要とされる反応工学・培養工学的知見は、1964年出版の「Biochemical Engineering（生物化学工学）」により体系化され、それ以降、さまざまなバイオ由来製品の生産に活用されてきた。一方、遺伝子組換え技術の発展などを背景にアカデミアにおけるバイオプロダクション研究の中心は、反応工学・培養工学から、より早く成果が得られる育種研究などへのシフトしてきた（1990年代以降）。特に若い世代において生物化学工学の基礎を身に着けた人材の育成不足は長く指摘されてきた。時は流れて現在、細胞設計・改変技術の飛躍的な進歩により、多様なバイオ品目が速やかに社会実装されることが期待される一方、近年発酵産業を支える現場では深刻な担い手不足に見舞われている。わが国の発酵産業を支えてきた団塊世代の大量退職と少子化の影響、学においても実践的な培養工学を指導できるアカデミア人材が不足したことで、産業バイオ人材の輩出が困難になっている。特にスマートセル技術を活かした新規参入を志す企業にとっては、実プロセス開発を担う人材を見つけることが難しい。既に多様な生産プロセス開発実績を有し、育成に十分な時間と資金を投入することが可能な大手メーカーを除き、バイオプロダクション分野への参入障壁は高まっている。

本研究項目では、スマートセル設計技術等により生み出される有用微生物候補株を、速やかに実生産プロセスへと導くために欠かせない産業バイオ人材（生物化学工学の理論体系を理解し、高度な培養生産技術を実践できる人材）を育成する。研究項目3や研究項目4で整備された培養施設（多連小型培養槽から蒸煮滅菌型30L培養槽を設置する。M01テーマ全体の協働で開発されるプロセス開発期間短縮技術群を含む）を活用し、理論（座学）と実践（実技）をトレーニングされた産業バイオ人材の育成を目指す。また育成コンテンツ（培養実技セミナー基礎編・応用編）や運用面の開発・その評価を行う。

(2)位置づけ、目標値

バイオ生産技術は、経験と勘に頼った「匠の技」による生産制御に頼りがちである。これは生物反応という非常に複雑な事象を扱う（多様な現象に目を向け、時々刻々取るべき制御を多面的・総合的に判断する必要がある）が故に、その操作を単純化・マニュアル化することが著しく困難であることに起因すると考える。実際の生産現場でもその操作は

属人化された部分が多いとされる。これら経験知に基づく操作を身に着けるためには、座学による理論体系の理解だけでなく、実務を伴ったトレーニング（OJT）が重要となる。このような場を設けることは、新規参入を目指す企業からはニーズが非常に多く、また、実生産現場の海外流出により OJT の機会が減り、技術継承が難しくなっている既存発酵メーカーにとっても有益であると推測される。

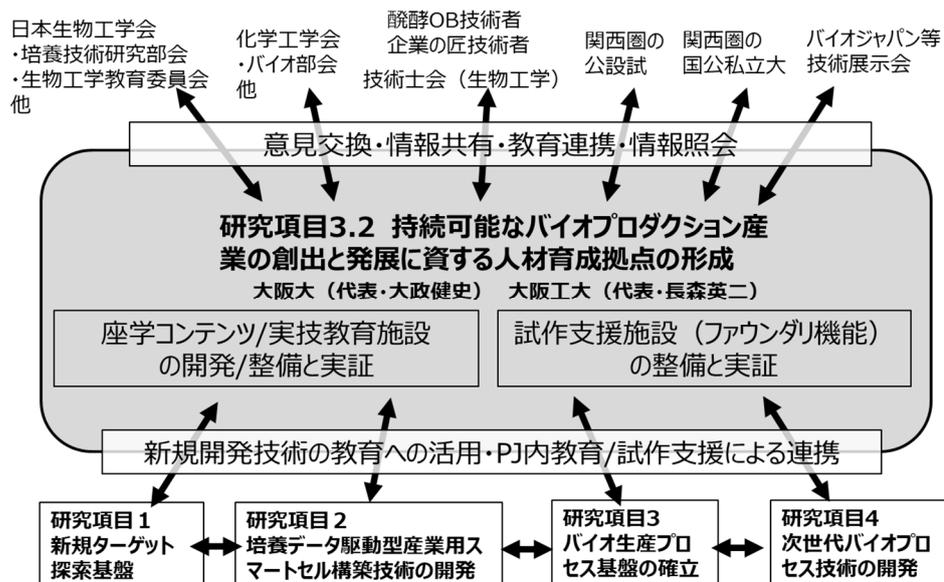
本項目では、大阪工業大学と大阪大学に整備された培養施設を活かし、理論（座学）と実践（実技）をトレーニングするためのセミナーコンテンツ（基礎編・応用編）を整備し、実践を理解した産業バイオ人材の育成・輩出を目指す。2022年度末までに基本人材育成実績 30 名以上を育成する。2024年度末までに基本人材育成実績 50 名以上、応用人材育成コンテンツの実装を目標とする。最終目標として、2026年度末までに基本人材育成実績 70 名以上、高度人材育成実績 20 名以上を達成する。全期間を通し、教育拠点として当該施設を恒久的・発展的に維持する運営体制を構築することを目指し、実現性を判断するための評価を行う。加えて、産業界側からの培養最適化支援や試作支援の要請に対して開発支援の実務実績を積み、将来バイオファウンドリ機能の発揮による持続的運営収入の確保が可能か、判断材料を得る。

(3) 全体計画

	FY2020	FY2021	FY2022	FY2023	FY2024	FY2025	FY2026
基盤整備	装置の導入 コンテンツリストアップ						
基礎セミナー		コンテンツ準備・ プレセミナー	本格運用・コンテンツ見直し	セミナー継続・人材輩出			
高度セミナー	OB人材からの ヒヤリング、経験知の収集	コンテンツ準備・ プレセミナー	本格運用・コンテンツ見直し	セミナー継続・人材輩出			
持続的運用	設置体制の検討	持続的運用の可否に関する情報の収集（適宜）				持続的運用に向けた体制確立	

(4) 実施体制

研究項目 3.2 の実施体制図を示す。外部との多様な連携・協調により、効果的な人材育成を実現すべく活動を行っている。



(5) 運営管理

プロジェクト（M01）全体会議とは別に、研究項目3（大阪大学とその再委託先、ならびに大阪工業大学）と共に、定期的な情報共有のための定例会議（オンライン）を開催している。本定例会議には4半期ごとにNEDO、PL、SPL、M01代表にも参加いただき、定期的な情報交換が行える体制を整えている。他研究項目との連携促進のため、大工大・長森が研究項目4「次世代バイオプロセス技術の開発」、大阪大学・松田（研究項目3.1.2担当）が研究項目2「培養データ駆動型産業用スマートセル構築技術の開発」との窓口を務め、情報の集約・整理を行っている。

(6) 実施の効果

「(1)背景と目的」にも記載のとおり、本実施項目は、プロジェクト全体で整備を目指すバイオファウンドリ拠点のひとつと位置付けられ、バイオ産業人材育成と将来の試作支援機能を担う。そのため個々の製品・開発技術の費用対効果等については言及しないが、他のプロジェクト内の研究開発グループから寄託されたスマートセル株等の培養条件最適化と実用化性能の評価を通じて、研究開発期間を短縮化し、プロジェクト（特にM01）全体が掲げる目標である390万トン/年削減の達成に貢献する。

(7) 中間目標の達成度

活動項目 (担当)	活動内容	中間目標	達成度
基盤整備（阪大・大工大）	目的を達成するための設備の仕様に関するヒヤリング、設備導入	・設備導入の完了 ・基礎教育セミナーのコンテンツ	・○ 設備導入、培養施設整備を完了 ・○ 基礎教育セミナーの構築を完了

		<p>ツ策定完了。運営開始。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 経験知の収集、高度版セミナーコンテンツ整備。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ○ 応用編セミナーの構築に着手し、2022年度末のコンテンツ完成に目途
基礎・応用セミナー（大工大）	基礎教育セミナーの運営 応用編セミナーの運営準備	<ul style="list-style-type: none"> ・ 基本人材育成実績 30 名以上。 ・ 応用編の運営準備の完了 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ◎ 基礎編受講実績 61 名（2022 年度申込分含む） ・ ○ 2022 年度内に応用編プレセミナー実施に目途
持続的運用（阪大・大工大）	設置・運営形態の策定。	<ul style="list-style-type: none"> ・ 持続的教育が可能な設置・運営形態を検討・判断 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ○ 大阪工大に教育施設として設置完了。持続的運営に向けた情報収集に着手。 ・ NEDO 特別講座として一般公開を開始。

(8) 研究開発の成果と意義

(8)-1 基盤整備（大阪大学・大阪工業大学）

教育・実証機関として必要な培養装置群（培養施設）を大阪大学、大阪工業大学のそれぞれに導入した（図 3.2.1.1.5-1）。大阪大学には、1 L、5 L 卓上培養槽を各 6 機導入し、培養制御のほか、LCA に必要となる排気ガスセンサーや消費電力計を合わせて導入した。大阪工大には「NEDO バイオものづくりラボ」と称した 180 m² の占有スペースを（学園の手厚い理解の元に）設置した。1 L 卓上培養槽 12 機（内部の観察性の良いガラスベッセルで教育用途に優れ、基礎的な流加培養検討にも対応）、5 L 卓上培養槽 4 機（加圧による本格的な流加培養検討が可能で、各種センサーや流加制御システムを実装）、0.25 L 卓上培養槽 24 機（回分培養による菌体スクリーニング、培養条件や培地最適化に適する）、

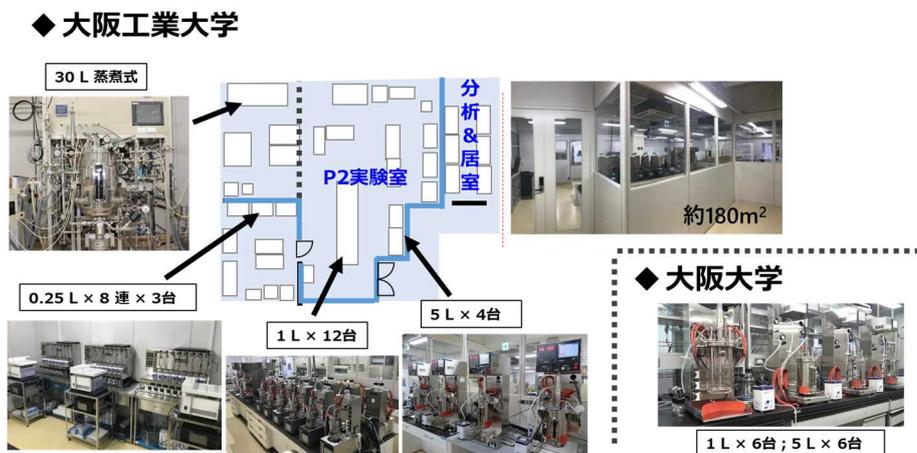


図 3.2.1.1.5-1 導入した培養装置と設備類

30 L 蒸煮式培養槽 1 機（実生産規模を見据えたスケールアップ検討・評価用）に加え、全ての培養槽にオートサンプラー、培地分析に必要な分析機器（HPLC、UPLC 等）、無菌操作設備（P2 対応）を備えた。以上の培養設備を整備するにあたっては、教育及び試作支援施設として満たすべき仕様について産業界（施設活用希望者、あとを引き継ぐ受託生産企業）や関西圏公設試等へのヒヤリングをおこない、十分に機能的・特徴的であることを確認している。

基礎教育セミナーのコンテンツの整備については、まずは必要な教育コンテンツの目次（基本的には生物化学工学の成書に準じたもの）を作成し、有識者や日本生物工学会培養技術研究部会など内外のオーソライズを得た。これを受講者が短時間で理解するための新たなコンテンツとして、培養工学のエッセンスを講義するダイジェスト版の座学講習（所要時間 4-5 h、テキストに対応したオンデマンド方式の動画視聴）と、バイオリクターの基本操作や k_La 測定の実務を体験する実技講習（1 日、操作マニュアルに従いオンサイトで実施）を新たに制作した（図 3.2.1.1.5-2）。その具体的な運営や結果については次項に述べる。

応用編のコンテンツについては、醗酵 OB 技術者からの聞き取りや、日本生物工学会本部や培養技術研究部会が開催する培養技術教育セミナーを通して匠の知を収集し、流加培養操作や蒸煮滅菌型培養槽の実務、更には LCA 実施の基本、を教育対象と定め、座学（テキストと動画）、実技（操作マニュアルや運営面の手順）についてコンテンツ構築に着手した（2022 年度中に整備完了の見込み）。

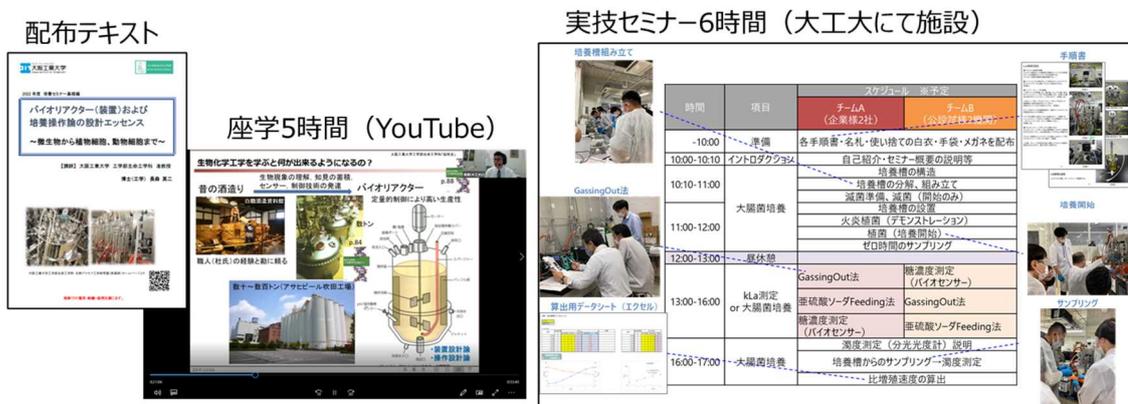


図 3.2.1.1.5-2 バイオリクターの基礎セミナー（座学&実技）

(8)-2 基礎・応用セミナーの運営（大阪工業大学）

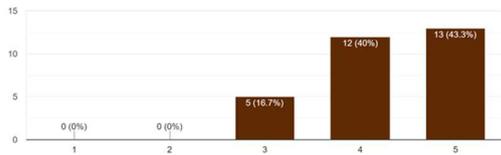
構築した基礎セミナー（座学、実技）の運営に際し、プレセミナーの実施結果・経験も踏まえ、実施手順を構築した。座学については、受講者が事前に理論を十分に理解できるよう、座学コンテンツは web 視聴する形式とし、事前にテキストを郵送することとした。実技については、これまでバイオ実験やジャー培養を経験したことがある受講者から、全く経験のない受講者まで、多様なレベルの受講者にきめ細かな対応が可能となるよう、申込者に対する事前アンケート（無菌培養操作経験の有無、用いたことがある菌株、バイオリクター使用経験の有無、使ったことがある培養槽メーカー、容積）を行い、班分けと対応者の配置を都度工夫することとした。実施当日は軽装を推奨し、白衣や手袋、安全メ

ガネなどは施設側で準備・着用とすることで、安全面でも十分に配慮している。バイオリアクターの成り立ちに関する解説を踏まえながら、培養槽の組み立て・センサー校正・滅菌・植菌・サンプリングを体験した後、DOセンサーを使った Gassing Out 法や亜硫酸ソーダ Feeding 法を用いた k_{La} 測定の実務や、菌体濃度や糖の経時変化測定から比速度算出等を、班ごとに進める内容となっている。終了後には受講者アンケートを行い、教育内容の効果の評価し、フィードバックを伴った改良を可能とする体制を整えている。

2020 年度から構築を進め、プレセミナーを経て完成版としたコンテンツを、2021 年度から年 3 回開催として運用開始した。2021 年度の受講者は、M01 テーマ内で生産プロセス検討や培養装置開発を実施中の参画企業・機関に加えて、バイオジャパンやナノテック等の技術展示会を通じて個別にアクセスのあった企業、関西圏の公設試・大学など、16 社、2 研究機関、3 大学から計 23 名であった。2022 年度については、計 3 回の実施日（5 月、8 月、11 月）を定め、2021 年度中に M01 テーマ内に申込みを募ったところ、12 社、1 研究機関、2 大学から 38 名（うち 10 名は動画視聴のみ）の応募があり、順次実施している。

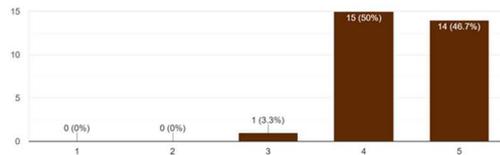
座学の理解度

1 座学 (YouTubeによる動画) について：内容の理解度を、1～5 から選択してください。
30 件の回答



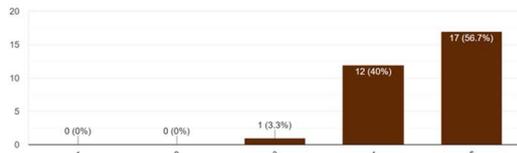
座学の満足度

3 座学の満足度を、1～5 から選択してください。
30 件の回答



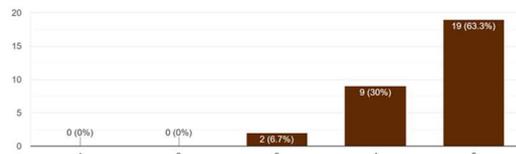
実技の理解度

4 実技について：内容の理解度を 1～5 から選択してください。
30 件の回答



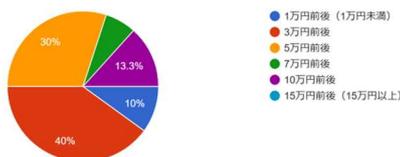
実技の満足度

6 実技の満足度を、1～5 から選択してください。
30 件の回答



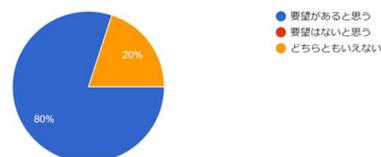
有料とする場合の料金

9 本セミナーを「座学 (対面) & 実技で2日間開...のくらいなら支払う価値があると思えますか。
30 件の回答



培養施設の利用可能性の有無

11 本学の培養施設を使用した開発検討 (条件や...いて、今後要望があると思えますでしょうか。
30 件の回答



2022年度1回目 (5月) 終了時点 回答数 : 30

図 3.2.1.1.5-3 基礎セミナー (座学&実技) 受講後のアンケート回答のまとめ

本報告書作成 (2022 年 5 月) 時点の参加者アンケートの結果まとめを、図 3.2.1.1.5-3 に示す。回答数は 30 件であった。まず理解度と満足度について情報収集した。座学、実技の共に、十分な理解度と満足度を得られているものと判断された。座学に関しては web 受講の方が良いという意見が大半で合った。このコンテンツを有料化した際に支払える額 (セミナーの価格価値) についても情報収集した。半数以上は 5 万円以上、ほとんどの受講者が 3 万円以上との回答を得た。具体的に企業内研修 (新人教育やベテラン技術者のリカレント教育) で活用したいといった相談案件が複数、届いている。本培養施設を利用した

開発検討（培養最適化、スケールアップ検討など）に関する要望があるか、情報収集した。結果、8割（24名）が要望有りとして回答した。今後も継続的にデータを取得しつつ内容を更新し、持続可能な教育・試作支援拠点とする際の収支計算の判断材料として活用する予定である。試作支援事業の利用価格見込みについては、各所にヒヤリングを進めつつ状況把握に努めている。

応用編セミナー（流加培養操作や蒸着滅菌型培養槽の実務教育、LCA実施の基本的知識）については上記の準備が完了した段階で、開催へ移行する計画である。具体的には2022年度中に一回のプレ実施を行い、その結果を踏まえた改訂を経て、2023年度に本格実施に移行したい。

(8)-3 持続的設置・運営に向けた検討（阪大・大工大）

設置した教育/実践（実技）のための培養施設と教育コンテンツを、持続可能な形で将来のバイオフィンドリの拠点として運用し続けることが可能か検討するには、前項で述べた教育支援の有料化に関わるアンケートデータのように、検討素材となる情報を収集することが必要である。ここでは試作支援機能を期待する企業関係者に、「企業がバイオフィンドリに期待する点」「バイオフィンドリの利用にあたり欲しい情報」についてアンケートを行った結果を示す（図3.2.1.1.5-4、令和3年度近畿経産局調査事業「バイオものづくり技術の社会実装に向けた関西におけるバイオフィンドリ活用可能性調査実施報告書」令和4年2月より一部改訂して転載）。アンケート送付先はバイオものづくりに携わる企業30機関である。まず、回収率は57%であり、本件に対する関心の高さ（ニーズ

近畿経済産業局・バイオものづくりの産業化促進にむけたアンケート

- ・アンケート送付先属性：バイオものづくりに携わる企業
- ・アンケート送付数：30機関
- ・アンケート票回収数：17件（回収率56.7%）
- ・実施時期：2022年1月～2月（2022/2/10（木）締切）

・実施方法：オンラインアンケート

・調査主体：近畿経済産業局地域経済部バイオ・医療機器技術振興課

・調査協力：大阪工業大学 工学部 生命工学科 准教授 博士(工学) 長森 英二

・事務局：株式会社ダン計画研究所

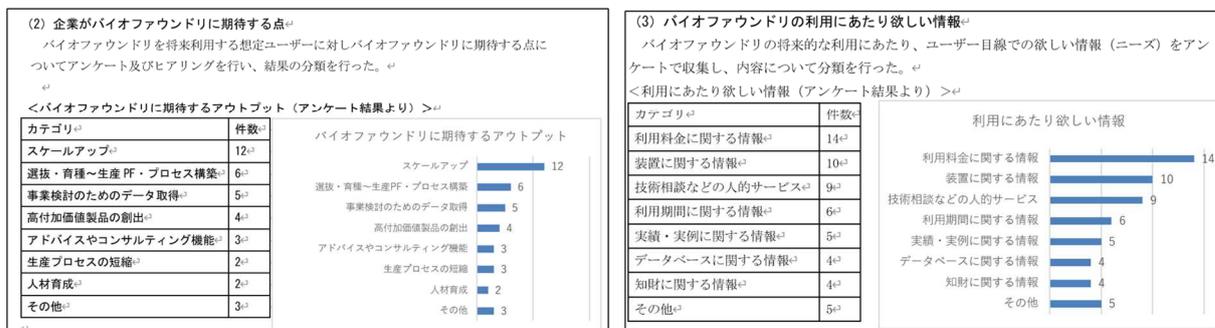


図 3.2.1.1.5-4 バイオものづくり産業がバイオフィンドリに期待すること

の顕在化) が伺われた。

「バイオフィンドリに期待する点」としては、スケールアップやバイオ生産プロセスの最適化に関わる機能に関する回答が多かった。「利用検討するにあたって欲しい情報」は、利用料金や期間、設置されている機器、人的サービスに関わる情報に回答が集まった。当該培養施設のコンセプトは、既存受託メーカーが受け難いような培養条件や培地の最適化に関わる基礎検討と、ラボレベルから大規模生産への足掛かりとなる30Lサイズまでのスケールアップデータを取得することで、受託メーカーとスマートセル開発企業の谷間を埋めることであり（30L程度まで出来ていないと、受託納期が読めないため見積書す

ら出せない)、このコンセプトと前述のニーズには、大きな齟齬が無いことが確認できた。バイオ生産開発の最適化検討期間を短縮し、速やかに試作品生産ステージやPOCに進められる事に、どれ程の価格価値が認められ得るか、実績を積みながら引き続き検証を進めていく。研究項目3で報告した油脂酵母に加え、今後も小型～30L培養槽を用いた生産プロセス検討について複数機関の題材を受入れ、実績と経験を積みつつ持続的運営に関わる情報収集を進め、最終的には教育と試作支援を両輪とした持続可能な運営体制の確立へと進めていく。

(9)成果の最終目標の達成可能性

人材育成に関わる施設と設備、教育コンテンツ基礎編、その運用面を計画に沿って遅れなく整備することが出来ており、また、開発したコンテンツの理解度・満足度ともにアンケートで高いスコアが得られていることから、引き続き応用編の開発を計画通り進めることで人材育成数の最終目標を、質を兼ね揃えた状態で達成できるものと期待される。試作支援機能に関する実績も積みつつ、教育事業と試作支援事業で提供できる価格価値を、ニーズと共に地道に定量化していくことで、持続可能な運営の判断に必要な基礎データが整い、結論できると考えられる。以上のことから、最終目標は達成見込みである。

(10)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	
2020	0	0	0	0	0	0	0
2021	0	0	0	0	2	0	0
2022	0	0	0	0	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	0	0	0	0-	0

(11)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
2020	0	0	0
2021	0	0	0
2022	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	0

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

研究項目3で開発に取り組むバイオ生産プロセス開発支援機関としての機能、ならびに本項目で取り組む人材育成拠点としての機能を統合した有償のバイオフィアウンドリ施設として、プロジェクト終了後の自走化をはかることを実用化・事業化のゴールに据える。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

「生産プロセスのバイオフィアウンドリ基盤技術開発」プロジェクト全体として整備に取り組む複数のバイオフィアウンドリ施設（西のバイオフィアウンドリ、東のバイオフィアウンドリなど）との間で、連携を密に保ち、地理的・機能的な役割分担を明確化させる。本項目で整備される設備については、小～中規模での培養条件の最適化と試作支援、ならびにLCA・TEAを活用した実用化検証機関としての機能を強化し、他の拠点との差別化をはかる。受託研究費と受講料収入の獲得を見込んでおり、これまでのヒヤリングやアンケート結果から想定する収入は、開始当初時に試算した収入から大きく逸脱したものとなっていないため、収支のバランスが取れることを見込んでいる。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

プロジェクト実施期間中は、引き続き参画機関からのスマセル株等の受託と評価を行い、試作支援施設としてのパフォーマンスを示していく。この際、研究項目3に属する他機関（九州大学、北見工業大学、東京大学）等で開発される要素技術も取り込み、機能強化をはかる。また受託元の期間や人材育成活動への参加者らからのフィードバックを引き続き収集し、採算性を持った受託研究費、受講料の設定をはかる。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

バイオフィアウンドリは近年、欧米などでも複数の事例が見られるが、本取り組みにて事業化を目指す施設のように人材育成機能を備えたものはほとんどない。少子高齢化に伴う人材不足とノウハウの損失はわが国のバイオ生産分野が抱える大きな問題のひとつである。この問題の解決に目的を据えたことにより、バイオフィアウンドリ機関としての独自性を備えるとともに、受託研究のみに頼らない運用形態が可能となる。

(12.5) 波及効果

バイオ生産分野への新規参入への障壁は、製造設備を持たない企業が巨額な初期投資を行わねばスタートラインに付けないことにある。本取り組みにより整備されるバイオフィアウンドリ機関は、この障壁を取り払うための有力な戦略となる。新規参入企業の増加は、既存のバイオ生産企業への刺激となり分野全体の活性化に資する大きな波及効果を有する。

(1)背景と目的

M01 テーマ各研究項目の研究開発推進と成果の社会実装に向けて、以下の研究・知財・実用化に係る全体戦略の検討を支援している。

項目 6.1. 研究戦略 (iBMS 委員会で戦略策定)

- ・ iBMS 委員会の運営支援および参加
- ・ プロジェクトの目的達成に本テーマの成果を反映させるために必要に応じ運営側 (NEDO/プロジェクトリーダー (PL) /サブ PL (SPL) との会議を設定する
- ・ Data-driven iBMS 全体会議の運営 (2 回程度/年)
- ・ 研究方針策定、推進のための先行技術調査・先行知財調査 (2、3 件程度/年)
- ・ 研究進捗状況の全体把握と iBMS テーマ内の情報発信 (月例レポート等)

項目 6.2. 知財戦略 (iBMS 委員会と知財運営委員会で分担して戦略策定)

- ・ 知財運営委員会および iBMS 委員会の運営支援
- ・ 知財合意書、データ合意書、および知財運営委員会規則等の策定支援と運用支援
- ・ バックグラウンド-IP/フォアグラウンド-IP の権利関係整理 (iBMS 委員会、知財運営委員会の支援)

項目 6.3. 実用化戦略

- ・ 成果の利用・普及方策、実用化・事業化を促進するための組織の設立と運営
- ・ 本プロジェクトの成果の利用促進・普及活動
- ・ 成果利用のための窓口機能

(2)位置づけ、目標値

多くの企業やアカデミアが参加する本テーマ内で中立な立場にある一般財団法人バイオインダストリー協会が事務局となって、本テーマの研究戦略、知財戦略、および本テーマを含む本プロジェクト全体の実用化戦略の支援活動を以下の中間目標、最終目標を設定して進めている。

項目 6.1. 研究戦略支援

(中間目標)

- ・ 研究方針徹底のための全体会議の開催
- ・ iBMS 委員会 (研究戦略作成) における協議に応じた研究方針の策定・修正の支援
- ・ テーマの方向性が本プロジェクトの目的に一致するように iBMS 委員と運営側 (NEDO/PL/SPL) との打合せの場の設定
- ・ 本テーマ全体で必要となる先行技術調査・知財調査に基づく研究方針の策定・修正支援

(最終目標)

- ・ iBMS 委員会における協議に応じた研究方針の策定・修正の支援
- ・ テーマの方向性が本プロジェクトの目的に最後まで一致するように iBMS 委員と運営側との打合せの場の設定
- ・ プロジェクト終了後も本テーマの成果を活用できる体制案の提案

項目 6.2. 知財戦略支援

(中間目標)

- ・知財運営委員会の設立
- ・知財合意書案の策定とテーマ内の同意に向けた協議推進
- ・知財合意書、および運営委員会規則に基づく知財戦略策定支援および知財運営委員会の運営支援
- ・本テーマ基幹技術のバックグラウンド-IP の整理およびフォアグラウンド - IP の管理と知財戦略、研究戦略への反映

(最終目標)

- ・知財・データ合意書、および委員会規則に基づく知財戦略策定支援および知財運営委員会の運営支援
- ・バックグラウンド-IP、フォアグラウンド-IP の整理とプロジェクト終了後の知財維持方針案や社会実装を見据えた知財戦略策定の支援

項目 6.3. 実用化戦略支援

(中間目標)

- ・本テーマ内での成果の相互活用推進
- ・適時、プレス発表や展示会での研究成果の積極的な発信活動の実施

(最終目標)

- ・継続的な本テーマの成果が活用されると推定される市場領域の調査の実施と効果的な実用化戦略の提案
- ・Data-driven iBMS を含め他テーマを含む本プロジェクトの成果の社会実装に向けた支援例が1例以上

(3) 全体計画

図 3.2.1.1.6-1 に示す計画で各戦略の支援活動を推進している。

(4) 実施体制

図 3.2.1.1.6-2 に示す体制で各戦略の支援活動を推進している。

(5) 運営管理

本テーマの研究戦略等の策定を行う iBMS 委員会の年 3 回の開催を支援すると共に、研究開発実施機関が参加する全体会議の年 2 回主催するほか、毎月の事務局月例レポートの発信やグループウェアの導入・活用、さらには毎月、NEDO との定期連絡会を行い、テーマ全体の情報共有を推進している。また知財に関する外部有識者が参加する知財運営委員会を適宜開催すると共に、公表・発明届の委員会意見の取り纏め、および本テーマ参画機関の成果マネジメントプラン調査と管理など知財戦略の支援のための運営を進めている。

(6) 実施の効果

各戦略の検討、支援活動により全 65 機関が参画する本テーマ内の情報共有と連携が推進され、バイオ生産技術の統合・社会実装支援システムである Data-driven iBMS の基盤技術や知財管理体制の早期の構築と運用開始が期待される。

事業項目	2020	2021 年度				2022 年度				2023	2024	2025	2026	
	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	年度	年度	年度	年度	
研究戦略														
・研究方針の策定・共有化・修正		★延長契約対応				★延長契約対応								
・全体会議・iBMS委員会の開催	●	●	●	●	●	●	●	●	●	(●: iBMS 委員会、▲; 全体会議)				
・先行技術調査項目の策定 (◆)		◆				(◆)				(◆)				
・研究方針策定の為の技術調査		→				→								
・分科会等での戦略支援		→				→								
知財戦略														
・合意書・規則等の策定と順守		策定				順守								
・知財関連委員会の運営支援		→												
BP-IP の整理		→												
FP-IP の整理		→												
・知財専門家の意見反映		→												
実用化戦略														
・研究成果の把握・共有		→												
・研究全体の広報(展示会等)			■BioJapan				■BioJapan							
・各種媒体による広報活動検討			→											
・成果発表会・技術説明会など			→											

図 3.2.1.1.6-1 研究戦略等検討全体計画

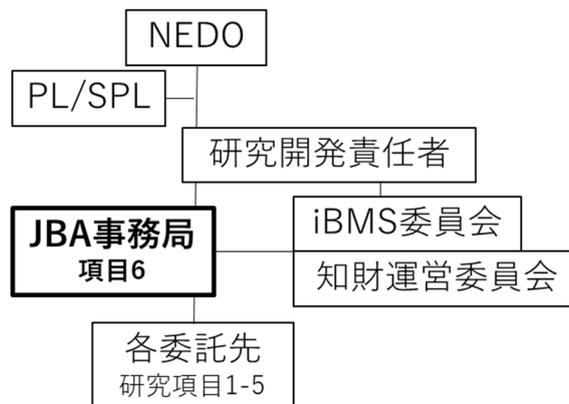


図 3.2.1.1.6-2 研究戦略等検討体制図

(7) 中間目標の達成度

項目 (担当)	活動内容	中間目標	達成度 () は 2022 年度見通し
6.1 研究戦略の 支援	各種会議等による 本テーマ研究方針 等の情報共有、お よび先行技術調査 等による本テーマ 研究戦略策定／推 進の支援	<ul style="list-style-type: none"> ・本テーマ研究方針徹底のための全体会議の開催等 ・iBMS 委員会の研究方針策定・修正支援 ・iBMS 委員会と運営側の打合せ設定 ・先行技術調査等による研究方針策定・修正支援 	<ul style="list-style-type: none"> ・テーマ全体会議年 2 回の開催による研究方針のテーマ内共有；○ ・テーマ内情報共有のための月例レポートの発信、および情報共有システム（サイボウズ）の導入と活用；◎ ・iBMS 委員会年 3 回の開催支援と同委員として研究方針・全体目標の策定支援、およびテーマ内共有；○ ・NEDO、PL/SPL の iBMS 委員会・全体会議への参加調整と会議内容の共有；○ ・先行技術調査 5 件の実施、本テーマ周辺技術トレンド把握と本テーマ基盤技術の特徴の理解推進；○
6.2 知財戦略の 支援	知財運営／iBMS 委員会の運営支援と 知財／データ合意書、委員会規則等の策定・運用支援、および知財権利関係の整理等	<ul style="list-style-type: none"> ・知財運営委員会の設立 ・知財合意書案の策定とテーマ内合意推進 ・知財合意書、運営委員会規則に基づく知財戦略策定支援と知財運営委員会の運営支援 ・本テーマ基幹技術のバックグラウンド-IP の整理および 	<ul style="list-style-type: none"> ・知財運営委員会の設立、有識者選任；○ ・知財・データに関する合意書作成支援と全参画機関の締結；○ ・合意書、委員会規則に基づく研究成果の公表・発明届の提出・審議運用の実施、および成果マネジメントプラン調査実施と回答取り纏め、知財運営／iBMS 委員会の意見聴取と各機関へのフィードバック、修正依頼；○ ・知財マネジメントプラン調査および発明届によるフォアグラウンド-IP 取り扱い方針・

		びフォアグラウンド - IP の管理と知財戦略、研究戦略への反映	出願予定を確認。バックグラウンド-IP 回答確認、今後整理検討予定；△
6.3 実用化戦略の支援	成果の利用／普及の方策、実用化／事業化促進の組織運営など、成果の利用促進・普及活動や窓口機能等	<ul style="list-style-type: none"> ・本テーマ内での成果の相互活用推進 ・適時、プレス発表や展示会での研究成果の積極的な発信活動の実施 	<ul style="list-style-type: none"> ・基盤技術リスト作成とテーマ内共有；○ ・BioJapan2021・2022 主催者セミナーにおける本プロジェクトおよび本テーマ紹介講演の設定；○ ・全プロジェクト紹介ホームページ（一部は 2022 年度末完成予定）、技術集、およびロゴマークの作成；△

(8) 研究開発の成果と意義

項目 6.1. 研究戦略の支援

1) 全体会議の開催

本テーマ研究方針や目標の徹底、各研究項目の進捗、連携状況などのテーマ内情報共有の推進等を目的として、本テーマ参加者全員を対象とする全体会議を、以下のように年2回のペースで開催した。また、各回において JBA 事務局で担当する各種情報共有（月例レポート、情報共有システム導入）戦略策定のための先行技術調査、知財関連（合意書、委員会規則、公表・発明届、成果マネジメントプラン等）、および成果普及（本テーマ基盤技術リスト、プロジェクトホームページ等）の活動について報告した。

なお、本プロジェクト運営側との意見交換、情報共有を推進するため、本委員会には毎回、NEDO、PL/SPL にも参加いただき、ご意見、ご助言などを頂いている。

<Data-driven iBMS 全体会議開催状況>

第1回 2020年9月1日、第2回 2020年12月18日、第3回 2021年6月1日、
第4回 2021年12月24日、第5回 2022年5月20日

※コロナ禍で第1-3回はオンライン、第4-5回は京都大学／オンラインハイブリッド

2) iBMS 委員会の開催支援と戦略策定への取り組み

本テーマ研究戦略、方針等の策定等を行う iBMS 委員会の年3回の開催（以下記載）を支援すると共に、研究戦略策定のための必要情報として関連する先行技術調査の実施計画、結果の報告、ほか各種情報共有、先行技術調査、知財関連、成果普及の活動状況を報告した。また本テーマの研究戦略などの各種支援活動をより有効に進めるため、各研究項目の方針、進捗や連携状況の確認、把握を進めた。

なお、本プロジェクト運営側との意見交換、情報共有を推進するため、本委員会には毎回、NEDO、PL/SPLにも参加いただき、ご意見、ご助言などを頂いている。

<iBMS 委員会開催状況>

第1回 2020年8月3日、第2回 2020年10月21日、第3回 2020年12月15日、
第4回 2021年4月16日、第5回 2021年8月18日、第6回 2021年11月17日、
第7回 2022年4月12日

※コロナ禍で第1-6回はオンライン、第7回は京都大学／オンラインハイブリッド

3) 先行技術調査・先行知財調査

本テーマの研究戦略、方針等の策定、推進のために必要な先行技術や知財等について、iBMS 委員会での検討と NEDO、PL/SPL のご助言を踏まえ、以下の外部調査を実施し、調査報告書を iBMS 委員会、および全機関と共有し、本テーマに関する国内外の知財、および研究動向を明確にした。また特に②、③、④の調査では本テーマに類似する技術開発動向やデータデポジトリの状況を確認し、本テーマ基盤技術の特徴を明らかにすると共に今後の開発方針策定のための重要な情報が得られた。また現在、②の調査結果を踏まえ、更に国内および海外の関連技術トレンドに関する詳細調査⑤を検討中であり、2022年秋までに実施完了予定である。

①宿主技術の特許情報トレンド調査、(株)IBLC、2021年2月2日～3月18日

②バイオプロセスによるものづくりに関する重要な技術に関するトレンド調査(国内)、(株)三菱ケミカルリサーチ、2021年1月6日～2022年3月18日

③データ駆動型バイオ生産マネジメントシステム(Data driven iBMS)の開発テーマで運用するデータレポジトリに関する調査、三菱 UFJ リサーチ&コンサルティング(株)、2022年1月12日～3月18日

④データ駆動型バイオ生産マネジメントシステム(Data driven iBMS)の開発テーマに関連する技術分野の海外技術動向を調査、三菱 UFJ リサーチ&コンサルティング(株)、2022年3月28日～2022年6月20日

⑤国内外技術トレンド詳細調査(ヒアリング含)、検討中(2022年秋までに実施予定)
更に今後、本テーマ開発技術および成果の実用化、事業化への支援活動ための参考情報として以下の書籍を購入し情報収集した。また⑥については出版元と交渉の結果、特約条項覚書を締結のうえ、本テーマ全機関への CD-ROM 版の貸出閲覧が可能となり、これまで9機関で活用頂き、本テーマ技術の展開に関する情報を提供している。

⑥2020年グリーンケミカル・脱石油化学市場の現状と将来展望 (株)富士キメラ総研

⑦バイオスタートアップ総覧 2021-2022 (株)日経 BP マーケティング

⑧2022年版 微生物による物質生産技術の最新動向と注目事例研究 (株)シード・プランニング

⑨微生物を用いた発電および水素生産 (株)シーエムシー出版

4) テーマ内情報発信・共有

本テーマの研究方針や目標、進捗状況、および各種会議予定や知財関連の取り組み状況、および NEDO からの連絡事項などの全実施機関（委託先、再委託先、共同実施先、65 機関）での共有を進めるため、研究開発責任者、iBMS 委員会および NEDO とも連絡を取りながら、上記状況を簡単に纏めた月例レポートを作成し、毎月末に全機関へメール配信している（2021 年 1 月～）。また会議資料や各種規程、マニュアル、共通書式やスケジュール等の共有などが可能となるグループウェアシステムとしてサイボウズ Office（サイボウズ（株））の導入を提案し、NEDO 等とも協議のうえ、全機関のアカウントを設定して、2022 年 2 月より運用を開始した。

5) その他会議（分科会等）への参加

2022 年度から分科会等に延べ 8 回参加して研究進捗を把握するとともに研究開発方針について助言を行った。また会議で得た知見は先行技術調査に反映し、より効果的な調査を行った

項目 6.2. 知財戦略の支援（iBMS 委員会と知財運営委員会で分担して戦略策定）

1) 運営体制の整備（合意書、知財運営委員会など）

本テーマの成果や知財の取り扱い等に関する合意書案、委員会規則案、および届出マニュアル案（いずれも代表機関京都大学知財部門作成）について、JBA 事務局で本テーマ参画機関への共有と意見取り纏め及び修正提案も行い、調整して全 65 機関間での合意書締結を完了した（2021 年 10 月 11 日付け）。

また、研究開発責任者と協力して知財専門家 2 名と本テーマ産学官代表 3 名から成り、成果、知財等の公表、出願、活用等の諸事項の審議、助言を行う知財運営委員会を設立し、第 1 回知財運営委員会（2021 年 8 月 4 日）を開催して、iBMS 委員会とも連携する以下の知財運営活動を開始した。

2) 知財運営

本テーマ成果の公表届や知財出願届の受理、iBMS 委員会／知財運営委員会への確認依頼と委員会意見の取り纏め、および公表・出願了承通知等を JBA 事務局が担当しており、2022 年 5 月末までに公表届 33 件、発明届 3 件を管理している。

また、データおよび知財の本テーマ内外での活用連携の推進のため、各実施機関の方針案を記載する成果マネジメントプランの様式を修正整備し、全 65 機関への調査を行って 2022 年 5 月末までに 61 機関から回答があった。更に各プランに対する iBMS 委員会、知財運営委員会の意見を聴取し、各機関にフィードバックしてより活用連携が推進できるプランへの修正依頼を進めている。

3) バックグラウンド-IP/フォアグラウンド-IP の権利関係整理

フォアグラウンド-IP の取り扱いについては成果マネジメントプランの知財マネジメントプランとして 38 機関からの回答で方針を確認し、知財運営委員会、および iBMS 委員会からの意見で見直し修正を進めている。また 3 件の発明届で内容等を確認している。

一方、バックグラウンド-IPについては16機関から回答があり、マネジメントプランを確認した。今後、本テーマにおけるバックグラウンド-IPの権利関係について整理検討を進める予定である。

項目 6.3. 実用化戦略の支援

1) 成果の利用促進・普及活動

本テーマで開発される基盤技術のテーマ内での利用促進のため、また今後のテーマ外への普及活動の際のベース情報となる基盤技術リストの作成を提案し、各技術開発機関に協力いただき、技術の特徴と開発機関、連絡窓口などを記載した基盤技術リスト第1版を作成し、本テーマ全参加機関で共有した。今後も定期的にアップデートおよび情報追加を進める予定である。

2) 研究成果の積極的な発信活動の実施

BioJapan2021 主催者セミナー「バイオフィーストで産業を切り拓く～バイオエコノミー実現に向けた産学官の取り組み～」において、本プロジェクトリーダーの千葉大学関教授より本プロジェクト全体を紹介する講演を企画した（2021年10月13日（水）パシフィコ横浜）。また BioJapan2022 でも本テーマ研究開発責任者の京都大学小川教授より本テーマ紹介の講演企画を進めている（2022年10月14日（金）パシフィコ横浜開催予定）。

また NEDO と相談のうえ、2021 年度より本プロジェクトを紹介するホームページの構築、および技術集と本プロジェクトロゴマークの作成を進めており、2022 年 8 月には基盤技術紹介のホームページ第 1 弾と技術集を公開する予定である。最終的に 2022 年度末までに技術活用事例や技術利用等の相談ページも開設する計画である。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

研究開発責任者、iBMS 委員会、知財運営員会、および NEDO/PL/SPL との密に情報・意見交換を行い、項目 6.1.および 6.2.については当初の計画通りである。また項目 6.3.では本テーマを含む本プロジェクト全体の実用化戦略の支援活動を進めており、今後も同様に取り組みを進め、最終目標であるプロジェクト終了後も本テーマの成果を活用できる体制案の提案、知財維持方針案や社会実装を見据えた知財戦略策定の支援、および効果的な実用化戦略の提案や本プロジェクト成果の社会実装に向けた支援を達成できる見込みである。

(10) 成果の普及

JBA は研究開発の担当ではないため論文、発表はないが、JBA が主催する BioJapan2021 において本プロジェクトリーダーの千葉大学関教授による主催者セミナー講演を企画、実施した。また BioJapan2022 でも本テーマ研究開発責任者の京都大学小川教授による主催者セミナー講演を企画し、予定している。

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

JBA は研究開発の担当ではないため特許出願はないが、本テーマ内の発明届の受理、管理、および知財運営委員会・iBMS 委員会での確認と出願了承通知を担当し、本テーマ成果の知的財産権確保への取り組みを行った。

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

本テーマを含む本プロジェクト全般の成果の実用化・事業化推進のため、本プロジェクトを紹介するホームページ、技術集、およびロゴマーク作成を実施しており、ホームページを通じて外部からの問い合わせ窓口として支援を継続する予定である。

3.2.1.2 M02「データベース空間からの新規酵素リソースの創出」（神戸大学、東京大学、九州大学、理化学研究所、出光興産(株)、小川香料(株)、花王(株)、高砂香料工業(株)、長瀬産業(株)、不二製油グループ本社(株)）

(1)背景と目的

微生物を利用したものづくりは従来の化学プロセスに比べ、省エネルギーかつ低コストな物質生産を実現するポテンシャルを有しており、計算科学的手法により設計した代謝経路を細胞内に実装することで、生産量や収率の向上が図られてきた。その際、生産ターゲットの生合成経路を構成する酵素の選択は極めて重要であり、酵素に求める性能としては、触媒効率 (k_{cat}/K_m) と基質特異性の高さ、酵素の細胞内安定性の向上等が挙げられる。酵素そのものが商材になる場合は、使用および保管環境での安定性や、基質特異性の観点で、より高性能な酵素の開発が求められている。

従来、酵素の選択は既知の情報から、人間の頭脳で行われてきた。一方で、酵素には非常に多くの種類がある。反応形式に従った分類だけでも、EC番号として7,500種以上あり、それぞれの反応について、各生物種が特徴の異なる多種の酵素を有しているため、その数は膨大となり、酵素の選定は容易ではない。したがって、進展著しい AI 技術で最適な酵素を選定する必要がある。

一方で、既知情報に依存することは、利用する酵素変換と酵素活性を限定していたことに他ならない。そこで、将来に向けたバイオ生産のポテンシャルを拡大し、産業競争力を得る上では、バイオ生産に資する新規活性を発揮する酵素や極めて高い活性を示す酵素を獲得していくことが重要である。

神戸大学および理化学研究所では、これまでの研究を通して、触媒効率 (k_{cat}/K_m) が高く、基質特異性が広い酵素を『テンプレート酵素』として用意し、酵素工学的手法を用いて特定の基質に対する認識能を高めた人工酵素を開発することが、様々な生産ターゲットを迅速に高生産する上で有効な手法であることを見出してきた。

有用な化合物（汎用化合物、高機能化合物、二次代謝物、非天然化合物）の生産には共通の反応特異性を有する酵素がよく使われている。そこで、反応特異性に基づいて酵素を分類し直し、各カテゴリーの中で優れた特性（触媒効率が高く、基質特異性が広い特徴）を有する酵素群を『テンプレート酵素』として体系化しておけば、新規の人工酵素の開発により、あらゆる生産ニーズに迅速に対応することが可能になる（図 3.2.1.2-1）。

本研究開発では、バイオインフォマティクスによりデータベース空間を最大限活用し、バイオものづくりに資する新規酵素を体系的に獲得する。具体的には、バイオインフォマティクスとデータ集積によりデータベース上の酵素関連情報をバイオものづくりの観点から再整理し、さらに改変の方向性を与える情報解析システムを構築して、高活性あるいは新規活性を有する人工酵素の獲得を目指す。情報解析とハイスループット技術を活用した独自のアプローチにより「基質特異性の広いテンプレート酵素」と「産業レベルの高活性を有する人工酵素」を開発することで、新規反応の創出、非天然化合物の生産等の人工系を含め、様々な酵素創出ニーズに迅速に対応できることを概念実証として示していく。

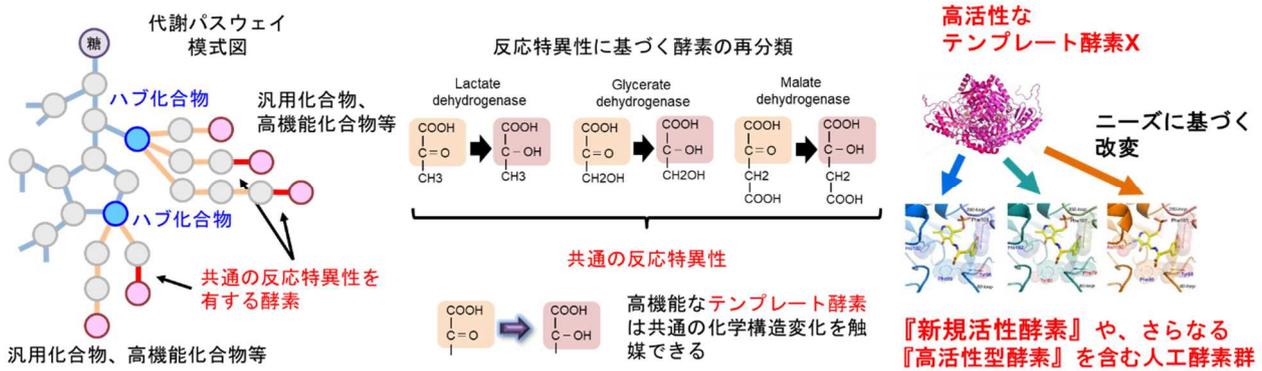


図 3.2.1.2-1 テンプレート酵素の概念図

(2)位置づけ、目標値

従来、バイオ変換に最適な酵素の選定は産業競争力の源泉となっていたが、多くの酵素の中から有用な酵素を選定することは容易ではなかった。また、酵素データの不足は酵素選定や酵素設計の障害であり、無作為的なランダムアプローチに依存せざるを得なかった。その結果、研究開発のスピードが遅く、競争力が上がらなかった。ハイスループット技術を利用して集積した酵素データは、今後新たなテンプレート酵素の選定や、新たな人工酵素の設計に取り組む際、学習用データ（教師データ）として活用することができることから、従来の問題を打破し、合理的な酵素選定や酵素設計を実現し、将来の AI 開発につながっていく。本研究を行うことにより、バイオ由来製品創出につながる成果を見出せるターゲットを選定する。

(3)全体計画

本研究では、産業ニーズのある化合物の高生産に資する『テンプレート酵素ライブラリー』を構築し、各種のテンプレート酵素を起点にした『新規有用人工酵素群』を獲得する。

具体的には以下のアプローチで取り組む。

STEP1 情報解析技術システムによるテンプレート酵素候補の絞り込み； 目的生産化合物の合成経路において、反応を触媒しうる酵素の中からテンプレート酵素として有望な酵素を絞り込む。酵素の絞り込みには、酵素配列と反応特異性に基づく機械学習や、データからのベイズ最適化等を用いる。

STEP2 ハイスループット技術によるテンプレート酵素の獲得；大量の酵素データを集積し、各反応に適したテンプレート酵素を体系的に取得する。ハイスループット技術としては、自動 DNA 合成・自動プラスミド構築・半自動形質転換等を用いるとともに、独自のスクリーニング系を開発してデータを集積する。活性や基質特異性を評価し、クラスタリング解析や自己組織化マッピング等の統計解析を行う。

STEP3 計算科学的酵素設計とハイスループット評価による人工酵素の獲得； 情報解析が導出する酵素改変戦略に則って多様な酵素配列を設計し、活性を評価して人工酵素を選定する。酵素改変戦略の導出には、SVM モデルを利用した機械学習や、ドッキングシミュレーション等を用いる。

本研究開発では、データベース空間に対するベイズ最適化や機械学習等の計算科学的手法による有用酵素候補の絞り込み、ハイスループットな多検体・並列実験系による体系的な酵素データの集積、自己組織化マップなどの統計解析を用いた新規有用酵素の体系化を行い、ニューラルネットワークやベイズ最適化などの機械学習により合理的な新規活性酵素や高活性酵素の開発を行う。また、民間企業のターゲット酵素に関する実証試験を通して得られたデータを大量に集積することにより、これを学習用データ（教師データ）とした酵素選定・酵素開発のAI化を進める。最終的には、産業ニーズに対する適応力の高い酵素データベースを構築し、汎用性の高い酵素群を多数獲得できる基盤を確立する。

以下、本プロジェクトの実用化・事業化に向けた全体計画を示す（図 3.2.1.2-2）。

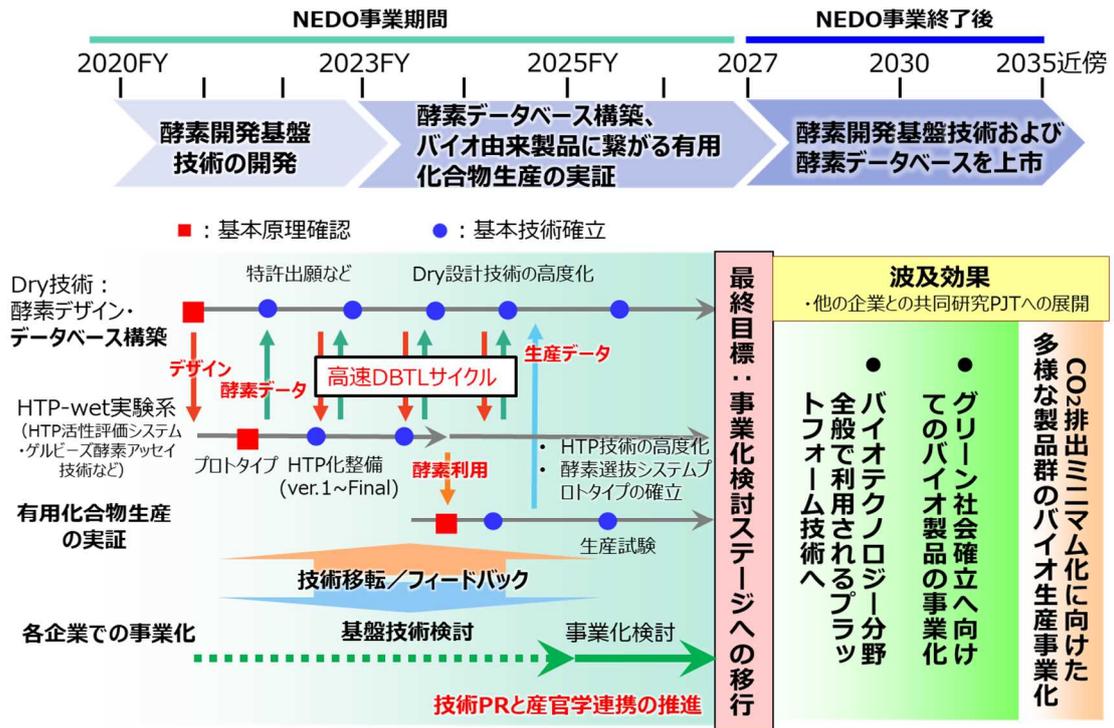


図 3.2.1.2-2 実用化・事業化に向けた全体計画

2023FYまでは、酵素開発基盤技術の開発を行う。また2023FYから2026FYまでは酵素データベース構築、バイオ由来生産に繋がる有用化合物生産の実証に取り組み、得られた酵素データや方法を酵素開発基盤技術の高度化に活用する。PJ終了後は、酵素開発基盤技術および酵素データベースについて事業化検討ステージへ移行する。

(4) 実施体制

本研究開発はアカデミアと産業界が密接な連携体制を構築し、以下の役割分担で進めている（図 3.2.1.2-3）。



図 3.2.1.2-3 研究開発における役割分担

(5) 運営管理

半年に一度、全参画機関と関プロジェクトリーダー、中川サブプロジェクトリーダー、林プロジェクトマネージャーらが集う全体会議（実務者会議）を開催した。また一年に一度、外部有識者による技術推進委員会を実施した。また、1~2ヶ月に一度、神戸大学をハブとして、アカデミア+各参画企業ごとに進捗確認打合せを実施した。必要に応じて神戸大学をハブとしてメールによる情報共有を適宜行っている。関PL、中川SPL、林PMの指導や助言を受けながら、プロジェクトの推進を図っている。

(6) 実施の効果

バイオ・モノづくりでは、天然の反応経路と酵素の選定がキモである。バイオ生産ターゲットに対する『共通前駆体（ハブ化合物）』と『共通の反応特異性を有する酵素（テンプレート酵素）』を掌握することで、人工系を含むあらゆる化合物の高生産が短期間で可能になると予想される。酵素開発期間の短縮・性能の向上は、バイオ産業の活性化のみならず、化学産業への技術波及および化学産業のバイオ技術移行につながる。テンプレート酵素・人工酵素開発基盤技術および酵素データベースを上市することで、当該技術を基盤とした酵素開発技術革新・普及によってバイオ合成の需要拡大と社会構築が促進する。これにより、トータル排出CO₂量削減が期待できる。

(7) 中間目標の達成度

①情報解析とハイスループット実験系を利用したテンプレート酵素の選定と体系化

(担当：九州大学、神戸大学、千葉大学、東京大学、理化学研究所)

2022 年度目標	目標に対する達成度の自己評価 (○)は 2022 年度末見通し	見通しの根拠
2022 年末までに新たに 20 件以上のテンプレート酵素を提案する。(神戸大学、理化学研究所、東京大学、九州大学)	△(○)	テンプレート酵素提案のために、酵素データを大量に取得する必要ある。酵素の新規クラスタリング手法「ムサシメソッド」や「ハイスループット酵素活性評価システム」によって、テンプレート酵素候補のデータを大規模取得する体制は整っている。
テンプレート酵素を利用し、バイオ由来製品につながる有用化合物生産(長炭素鎖アルコールなど)の実証試験を行い、目的の化合物生成の有無を確認する。(神戸大学、理化学研究所、東京大学、九州大学)	△(○)	酸化還元反応や脱炭酸反応などのテンプレート酵素は見出している。宿主微生物に発現させることで、目的化合物生成を確認する準備は整っている。
立体構造を基盤とした変異導入により、ジオキシゲナーゼを人工テンプレート酵素化の作製や基質特異性や反応性を改変した人工酵素を作製し、2 件以上提案する。(東京大学)	△(○)	2021 年度に 6 種類の酵素の立体構造を取得済である。立体構造に基づいて、改変酵素の設計は完了しており、目的の活性を有する人工酵素を提案する見通しは立っている。
微小ゲルビーズを用いたハイスループット酵素機能評価系を、酸化還元反応、脱炭酸反応、加水分解反応等のテンプレート酵素のスクリーニングへ拡張する。(九州大学)	△(○)	2021 年度に、モデル酵素高活性変異体選抜系を確立した。スクリーニング系構築に必要な基本原理は検証済で、酵素の拡張を実施している。

②安定化効果を指標としたテンプレート酵素の特異性拡張技術（人工テンプレート酵素作製技術）（担当：神戸大学、千葉大学）

2022 年度目標	目標に対する達成度の自己評価 ()は 2022 年度末見通し	見通しの根拠
細胞蛍光シグナルの基質応答性変化を指標とした、基質結合や選択性の変更に重要な残基を特定する技術を確立する。	○	蛍光出力による「特異性部位」の検出のための基本原理は検証済みであり、酵素のアミノ酸配列のランダム化とシグナル変化についてデータを取得している。
細胞蛍光変化を指標にしたハイスループットスクリーニングによって、基質として認識しない化合物にも結合できる変異体を取得することで、テンプレート酵素の機能拡張を実現する。	△(○)	原理実証までは完了している。酵素のアミノ酸配列のランダム化によるライブラリーも作製済み。新規基質への結合性を持つ変異体のスクリーニング探索を実施中。
人工テンプレート酵素を3つ以上創出する。	△(○)	テンプレート酵素の反応ポケットにあるアミノ酸配列のランダム化を実施している。

③ハイスループット実験系を利用した人工酵素ライブラリーの構築技術の開発
 (担当：神戸大学、理化学研究所)

2022 年度目標	目標に対する達成度の自己評価 (○)は 2022 年度末見通し	見通しの根拠
事業内容①で選定したテンプレート酵素（酸化還元反応、脱炭酸反応、加水分解反応等）に対し、50 件以上の人工酵素候補を設計する。（神戸大学、理化学研究所）	△(○)	タンパク質の高次構造の高精度予測が可能なシステム（alphafold2）や分子ドッキングシミュレーションツールを導入し、設計のための準備は完了している。
テンプレート酵素の人工酵素化による生成物新規創出系構築技術や新規特異性創出技術の開発を行う。（神戸大学）	△(○)	高次構造に基づく分子設計と酵素改変を行い、新規活性や特異性拡張のための酵素活性データを取得している。
アルデヒドデホルミル化オキシゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、脱炭酸酵素などを対象に検討し、8 件以上の人工酵素候補を作出する。（神戸大学）	△(○)	設計に基づく改変で既に 4 件以上の人工酵素候補の取得に成功している。2022 年度末には、8 件以上の人工酵素候補の作出を達成できる見込みである。
バイオ由来製品につながる有用化合物（長炭素鎖アルコールなど）1 件以上を対象に、テンプレート酵素の人工酵素化によるバイオ合成反応の検証を行う。	△(○)	アルコールデヒドロゲナーゼなど人工酵素は見出している。宿主微生物に発現させることで、目的化合物生成を確認する。

④データベース空間からの事業化用新規酵素の獲得と酵素データの集積

(担当：出光興産株式会社、小川香料株式会社、花王株式会社、高砂香料工業株式会社、長瀬産業株式会社、不二製油グループ本社株式会社、神戸大学)

1) 樹脂原料モノマーおよび農薬合成のための人工酵素の開発

(出光興産株式会社、神戸大学)

2022 年度目標	目標に対する達成度の自己評価 ()は 2022 年度末見通し	見通しの根拠
化合物 X の特定の位置二か所を両方水酸化可能な高活性人工酵素の取得 (1 件)	△(○)	化合物 X の特定の位置二か所を両方水酸化可能な人工酵素を取得済み。高活性化のための改変を実施中。
化合物 X (樹脂用モノマー) を高効率に変換可能なスマートセルを構築する (1 件)	△(○)	化合物 X の水酸化活性を高めた人工酵素の開発を進めており、当該酵素を組み込んだスマートセルを作製予定。
培養方法の最適化により、ラボスケールで 90%以上の化合物 X の変換効率を達成する。	△(○)	現状の変換効率は 10%程度。上記の高活性酵素を組み込んだスマートセルの培養方法を最適化し、2022 年度末には変換効率 90%の達成を目指す。
化合物 Y (農薬) 合成のための人工酵素 (2 個) を開発する。	△(○)	「ムサシメソッド」により、化合物 Y 合成のためのテンプレート酵素を選定・評価し、天然経路中の酵素よりも高活性であることを確認済み。今後、ドッキングシミュレーション等により高活性な人工酵素 (2 個) を取得見込み。

2) 有用香料化合物を生合成する酵素開発

(小川香料株式会社、神戸大学)

2022 年度目標	目標に対する達成度の自己評価 ()は 2022 年度末見通し	見通しの根拠
<p><新規酵素 A の開発> 人工酵素プロトタイプの改良を行い、高活性酵素 A を取得する。(1g/L/3day の酵素活性)</p>	<p>△(○)</p>	<p>今期前半にテンプレート酵素選抜のための活性評価がずれ込んだため進捗は遅れているが、<i>in silico</i> による効率的な活性部位の絞り込みと改良はスムーズに実施できると想定しており、酵素 A の活性幅も高いため、高活性型も取得できると見込みがあるため。</p>
<p><新規酵素 A の開発> テンプレート酵素候補を起点とした酵素評価を行ったあと、基質特異性が高く、触媒効率の高い人工酵素を 1 種取得する。</p>	<p>×(×)</p>	<p>反応機構および基質特性を評価した結果、ターゲット酵素は特異性が高いことが示唆され、テンプレート酵素には適さないと判断したため。</p>
<p><化合物 C 生合成系新規酵素の開発> 化合物 C 高生産菌の配列を読解し、生合成系遺伝子群を特定する。</p>	<p>×(×)</p>	<p>昨年度実施した化合物 C 高生産菌のスクリーニングにおいて、化合物 C の生産性は低く、配列解析および生合成系遺伝子群の特定を取り止めたため。</p>
<p><化合物 C 生合成系新規酵素の開発> 化合物 C 高生産株由来の化合物 C 生合成系遺伝子を自社生産菌に導入し、化合物 C 生産性を向上させる。(10 mg/L/3day)</p>	<p>×(○)</p>	<p>化合物 C 高生産菌由来の遺伝子導入の代替として、メタボローム解析によってボトルネックは推定できており、フィードバック制御の解除などによって生産性の向上(10 mg/L/3day)は達成見込みであるため。来年度以降、同定した酵素のテンプレート酵素を取得予定。</p>

3) ピリジンジカルボン酸、及び誘導体生産用新規酵素群の開発と生産菌構築
(花王株式会社、神戸大学)

2022 年度目標	目標に対する達成度の自己評価 ()は 2022 年度末見通し	見通しの根拠
PDCA の生産性 10g/L 以上の達成	○	21 年時点からさらに生産性向上する改良点を見出しており、22 年目標は問題なく達成できる見込み。
PDCA 誘導体化人工酵素プロトタイプ 1 件以上の発見	△(○)	検討している経路の中で、初発の反応を行う誘導体化酵素 1 件を発見した。22 年中に残り反応の酵素の探索を進める。

4) 有用香料素材の生産に向けた新規酵素の開発
(高砂香料工業株式会社、神戸大学)

2022 年度目標	目標に対する達成度の自己評価 ()は 2022 年度末見通し	見通しの根拠
人工酵素プロトタイプ 2 件 (酵素 A の目的化合物生成量 1g/L、酵素 B の目的化合物生成量 5g/L) を取得する。	△(○)	酵素 B はハイスループットアッセイ系を構築し、人工酵素プロトタイプの作出中。生成量は 57 g/L を達成している。酵素 A はプレート酵素の取得中であり、人工酵素プロトタイプの作出を行っていく。

5) 有用な産業酵素の高機能化
(長瀬産業株式会社、神戸大学)

○酵素 A

2022 年度目標	目標に対する達成度の自己評価 ()は 2022 年度末見通し	見通しの根拠
人工酵素プロトタイプを取得する。1～数個の人工酵素プロトタイプを取得する。	△ (○) テンプレート構造探索を実施し、候補構造をリストアップした。候補構造の酵素活性を確認した。	設計に基づき、1 個の変異体候補を設計した。この手法を基に、候補数を増やす。
構築したハイスループット実験系で酵素 A の酵素活性の測定を行う。	△ (○) 神戸大学ではハイスループット活性評価系の構築が完了した	ハイスループット系に提供可能な活性測定法の検討を進めており、プロトコルが固まり次第、ハイスループット系に適用する。

○酵素 B

2022 年度目標	目標に対する達成度の自己評価 ()は 2022 年度末見通し	見通しの根拠
人工酵素プロトタイプ設計の中間結果が完成している。1 個以上の人工酵素プロトタイプが設計されている。	△ (○) テンプレート構造探索を実施し、候補構造をリストアップした。候補構造の酵素活性を確認した。	酵素-基質の親和性計算から高速に変異体を設計する体制が完了している。テンプレート構造が決定できれば、すぐに設計段階に移行可能。
酵素 B の酵素活性を測定可能なハイスループット実験系の構築を開始する。活性測定方法が確立している。	△ (○) ハイスループット活性評価系の構築が完了した	ハイスループット系に提供可能な活性測定法の検討を進めており、プロトコルが固まり次第、ハイスループット系に適用する。

○酵素 C

2022 年度目標	目標に対する達成度の自己評価 ()は 2022 年度末見通し	見通しの根拠
テンプレート酵素候補の酵素活性試験を完了し、テンプレート酵素を決定する。目標は、1～数個の遺伝子が、テンプレート酵素候補となること。	△ (○) データベース上からテンプレート酵素候補の探索、および選択を行った。	酵素 A, B と同様の手法で、発現試行実験および活性測定を行う。
人工酵素プロトタイプ的设计を開始する。	× (○) 酵素-基質の親和性計算から高速に変異体を設計する体制が完了した	テンプレート構造が決定できれば、すぐに設計段階に移行可能。

6) リパーゼ人工酵素の開発

(不二製油グループ本社株式会社)

2022 年度目標	目標に対する達成度の自己評価 ()は 2022 年度末見通し	見通しの根拠
スクリーニング系を確立しテンプレート酵素候補の改変を開始して高活性リパーゼの獲得に向け、ハイスループット実験系により、リパーゼの k_{cat} で 5 倍以上、耐熱性 65℃以上の人工酵素を取得するための設計を完了し、獲得する人工酵素の特許出願を行う。	○	ベンチマークとしている酵素より活性の高い mutation 酵素がいくつか作出することが出来た。
新しいバイオ技術の実用化検討に向け、高活性リパーゼを利用したバイオ技術に関する調査とターゲットを設定し、新規用途に関する評価を完了する。	△(○)	使用用途事例から環境負荷低減などを Keyword に想定される用途分野 5 つを抽出することが出来た。

(8) 研究開発の成果と意義

①情報解析とハイスループット実験系を利用したテンプレート酵素の選定と体系化（神戸大学、九州大学、東京大学、理化学研究所）

神戸大学と理化学研究所では、産業ニーズの高い有用物質の生産に幅広く関与する反応（酸化還元反応など）について、データベース空間の酵素配列に対して機械学習手法を用いて分類する手法「ムサシメソッド」を開発した。「ムサシメソッド」が提示する酵素をテンプレート酵素候補として多様な基質に対する活性を解析し、酵素データを集積した（図 3.2.1.2-4）。このうち、幅広い基質特異性と高い活性を示した酵素群をテンプレート酵素群として同定し、合計 4 件以上のテンプレート酵素の獲得に成功した。また、神戸大学では、ラボオートメーションを活用して、リコンビナント酵素を高速に取得するセミオートメーションシステムとハイスループット活性評価システムを開発した（図 3.2.1.2-5）。開発した評価系を酸化還元酵素の選抜に適用した。ムサシメソッドについては全ての参画企業に「テンプレート酵素を選定する手法」として展開し、これに基づき選定したテンプレート酵素候補の酵素機能評価を行い、テンプレート酵素を見出している。またハイスループット活性評価システムについては、すべての参画企業及びアカデミア機関のターゲット酵素に適用可能である。全ての参画機関の個別のターゲット酵素で、活性測定方法プロトコルを検討している。

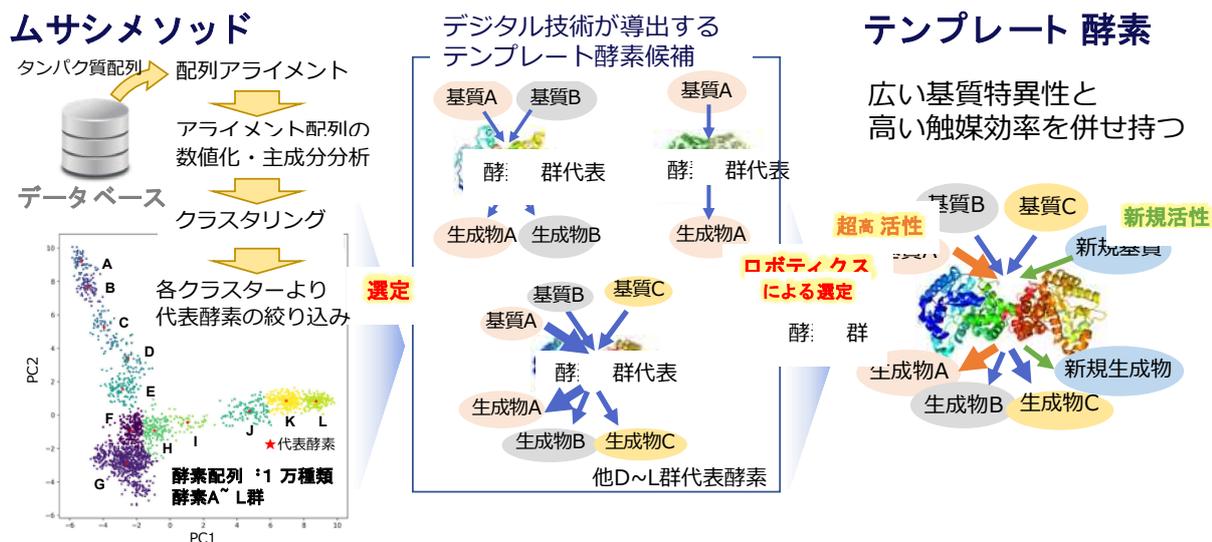


図 3.2.1.2-4 テンプレート酵素選定の流れ

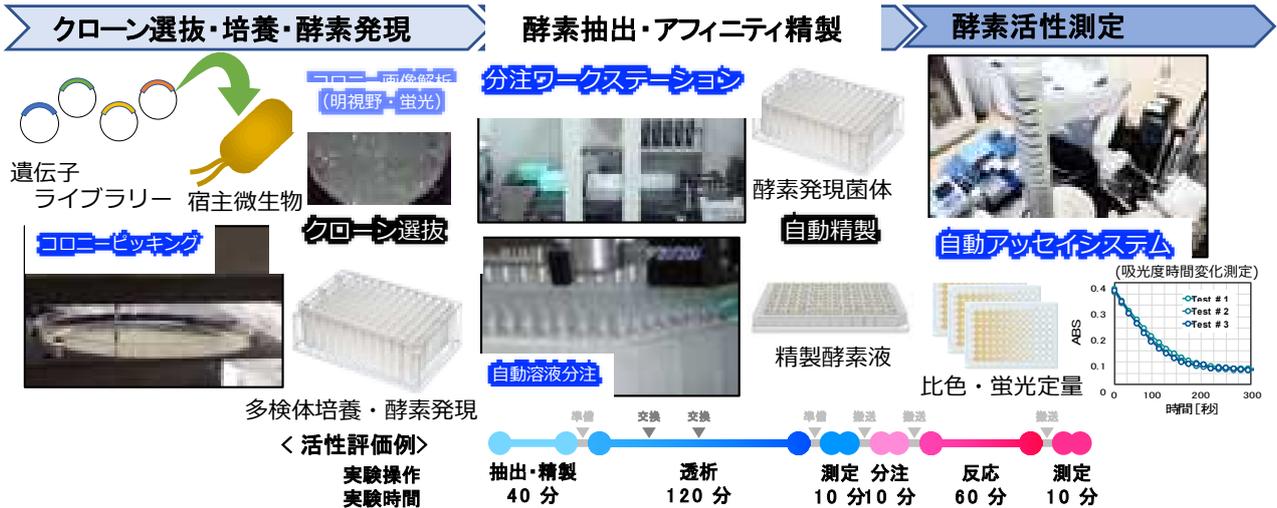


図 3.2.1.2-5 「ハイスループット酵素活性評価システム」の概要

東京大学（阿部 G）では、糸状菌、放線菌のゲノム配列から新規 2-オキソグルタル酸（2-OG）依存性ジオキシゲナーゼ含む遺伝子群の探索と機能解析を行い、14 種類の 2-OG 依存性ジオキシゲナーゼについて同定、精密機能解析を行なった。そのうち 6 種の酵素については立体構造を取得した（図 3.2.1.2-6）。東京大学（大西 G）では、データベース空間のリシン水酸化酵素ホモログ（2-OG 依存性ジオキシゲナーゼ）について前年度までの結果を合わせて、16 種のホモログ酵素の機能解析を完了した。2-OG 依存性ジオキシゲナーゼについては、データベース空間に酵素配列データが充実していない。機能未知の遺伝子リソースが糸状菌や放線菌に数多く存在する。阿部 G と大西 G は糸状菌、放線菌などのゲノム情報に基づき、基質特異性や活性といった酵素データの拡充を行い、神戸大学は得られたデータに基づいてデータベース構築を進める。

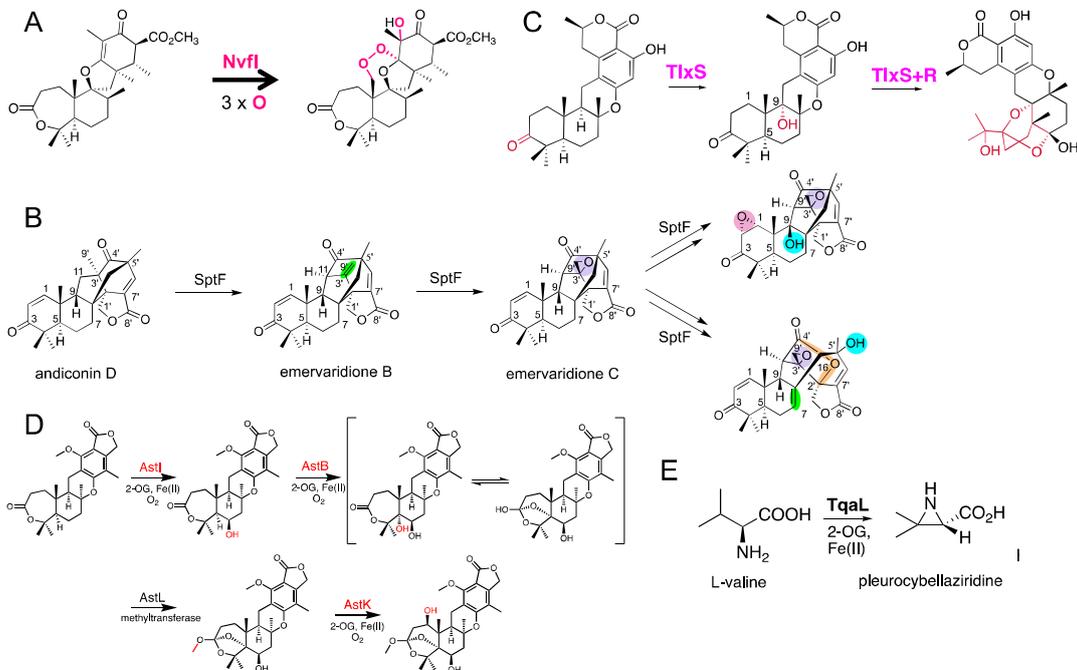


図 3.2.1.2-6 2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼテンプレートの選定と開発

九州大学では、微小ゲルビーズ内での無細胞タンパク質合成反応場を構築し、ゲルビーズ中に機能を持った酵素の固定化に成功した。酵素活性を反映したゲルビーズアッセイ系を構築し、

モデル酵素の高活性変異体選抜系を確立した（図 3.2.1.2-7）。本アッセイ系を用いた酵素評価の適用可能性について、神戸大学のターゲット酵素である酸化酵素について検討し、適用できる酵素種の拡張を行う。

①対象遺伝子ライブラリーからの無細胞タンパク質合成(CFPS)と微小ゲルビーズへの固定化

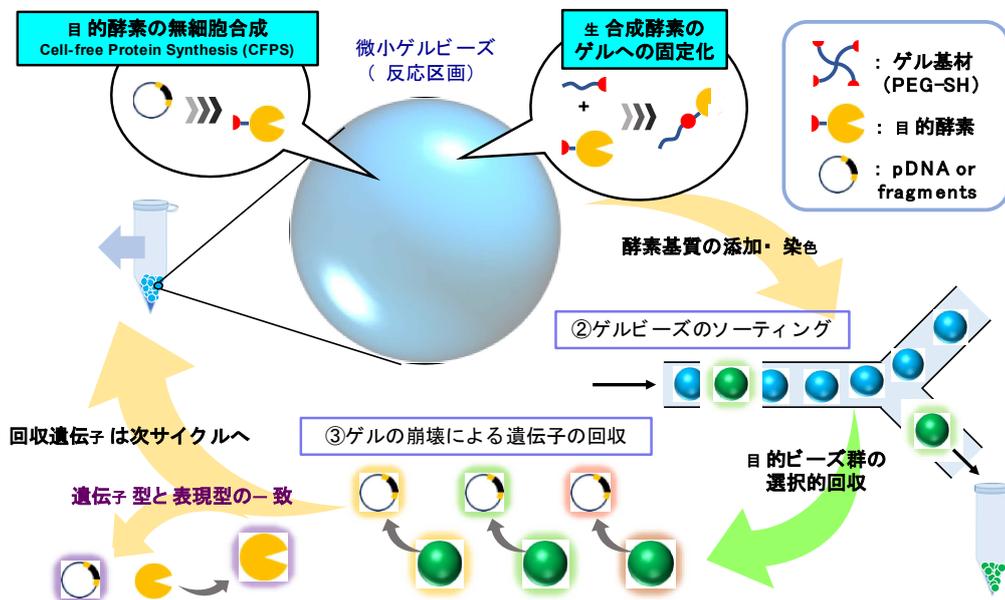


図 3.2.1.2-7 微小ゲルビーズを活用した迅速酵素機能評価系の構築

②安定化効果を指標としたテンプレート酵素の特異性拡張技術（神戸大学、千葉大学）

千葉大学では、融合したレポーターが基質依存的に実際に充進することを、様々な酵素に対して確認し、数十を超えるモチーフで原理検証を完了した。また、テンプレート酵素を N/C 末端のどちらにもレポーター融合できるシステムを確立した（図 3.2.1.2-8）。変異の効果の特定（安定化・親和性変化の区別）についてはノウハウを蓄積した。モデル酵素を用いて、蛍光出力によって5箇所「特異性部位」の特定に成功した。本技術を使って東京大学（阿部 G）の 2-OG ジオキシゲナーゼの特異性拡張を行っており、本技術の適用性について評価を行う。また、適用できる酵素種の拡張を行う。

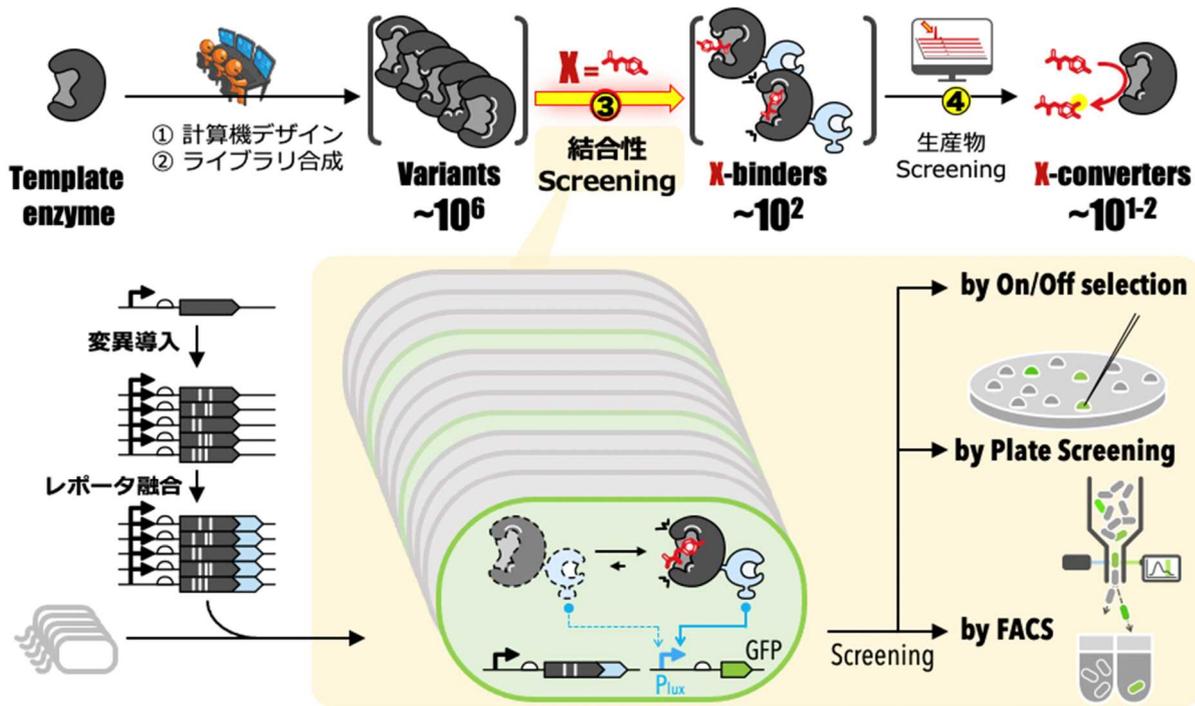


図 3.2.1.2-8 基質結合に伴う安定性を指標としたスクリーニングの概要

③ハイスループット実験系を利用した人工酵素ライブラリーの構築技術の開発（神戸大学、理化学研究所）

神戸大学と理化学研究所では、特定の基質に対する触媒効率を向上させるため、高次構造予測およびドッキングシミュレーション等の計算科学的手法を組み込んだ人工酵素開発ワークフローを構築した。事業内容①で選定したテンプレート酵素（酸化還元反応、脱炭酸反応、加水分解反応等）に対し、計算科学的手法によって人工酵素を設計し、アルコールデヒドロゲナーゼなどについてハイスループット活性評価システムで酵素活性を測定した。高活性型アルコールデヒドロゲナーゼなど計2件以上の人工酵素を獲得に成功した。人工酵素開発ワークフローについては全ての参画企業に方法論を展開し、これに基づき人工酵素プロトタイプ的设计を行っている。出光興産のターゲット酵素について、目的基質に対する活性が見出されるなど成果が得られている。設計から得られる酵素機能化の確度を高めるために、引き続き学習データを収集する。

④ハイスループット実験系を利用した人工酵素ライブラリーの構築技術の開発（出光興産株式会社、小川香料株式会社、花王株式会社、高砂香料工業株式会社、長瀬産業株式会社、不二製油グループ本社株式会社、神戸大学）

出光興産株式会社では、「樹脂原料モノマーおよび農薬合成のための人工酵素の開発」テーマに対し、化学合成では合成が難しい新規樹脂用モノマー生産を目指し、目的化合物を位置特異的に修飾可能な人工酵素2個を取得した。また、農薬用の目的化合物生産性向上を目指し、酵素アッセイ系を構築し、天然酵素よりも高活性なテンプレート酵素1個を取得した。

小川香料株式会社では、「有用香料化合物を生合成する酵素開発」テーマに対し、効率的に目的物質へ変換する新規人工酵素の開発を目標とし、前年度に選抜した既存酵素の活性評価を行い、活性の高い2種を取得した。また、データベース上の酵素群を分類し、上記で活性評価した酵素をマッピングすることにより、テンプレート酵素候補の絞り込みをした。

花王株式会社では、「ピリジンジカルボン酸、及び誘導体生産用新規酵素群の開発と生産菌構築」テーマに対し、ピリジンジカルボン酸の生産性向上に関しては、21年度目標を達成した。また、ピリジンジカルボン酸の誘導体生産用酵素探索に関しては、類縁体に反応し、基質特異性が広く目的微生物で発現性が高い酵素5種をテンプレート酵素として選抜した。

高砂香料工業株式会社では、「有用香料素材の生産に向けた新規酵素の開発」テーマに対し、酵素Aのテンプレート酵素候補5件の発現系を構築し、ターゲット基質との反応性評価を行った。酵素Bのテンプレート酵素候補のターゲット基質およびその他の基質との反応性評価を行い、テンプレート酵素を3件取得した。そのうち1件で酵素Bの目的化合物生成量57g/Lを達成し、さらに、立体構造解析のための結晶化用精製酵素を調製した。

長瀬産業株式会社では、「有用な産業酵素の高機能化」テーマに対し、産業上有用な3種類の酵素に対して神戸大が開発した手法を適用することにより、データベース空間から網羅的な配列探索を実施した。うち2種の酵素について、得られた配列の発現試行、および酵素活性評価の結果からテンプレート構造候補を選定した。

不二製油グループ本社株式会社では、「リパーゼ人工酵素の開発」テーマに対し、遺伝子組み換え酵素の宿主としては遺伝学的知見がまだ少ない放線菌をもちい、データベース空間上の情報からデザインした組み換えリパーゼを発現させることに成功した。今後は、実際改変したリパーゼの特性を酵素デザインに反映させていくことで目標とする機能に到達するよう酵素の改良を進めていく。

以上の研究開発によって得られた酵素機能データは、神戸大学に学習データとして集約して、今後の酵素選定と設計の確度向上を図る。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

研究項目はいずれも計画通りに達成できていることから、最終目標についても計画通り達成できると見込んでいる。

(10) 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	
2020	0	0	6	0	1	1	0
2021	12	0	18	0	1	4	0
2022	19	0	32	4	1	4	0
PJ 期間 合計	31	0	56	4	3	9	0

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

知財戦略：

- ・ DB 空間からのテンプレート酵素の選定、人工酵素設計及び創製技術に関する基本特許の取得を本 PJ の基盤とする。
- ・ HTP の wet 実験系を支える詳細な蓄積技術・ノウハウは非公開とする。
- ・ 知財権取得を最優先するため、知財権を含む研究成果の公表は、特許出願後とする。

情報管理：

- ・ 各企業での生産目的化合物名や製法については事業者間で秘密保持契約をし、秘密を担保する。

年度	特許出願		
	国内	外国	P C T
2020	0	0	0
2021	1	1	1
2022	9	2	1
PJ 期間 合計	10	3	2

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

実用可能な要素技術として、1. 機械学習等の情報解析システムによるテンプレート酵素選定技術、2. 計算科学的手法に基づく人工酵素構築技術、3. 高機能性テンプレート酵素/人工酵素の提供、4. ハイスループット活性評価システム（全自動ハイスループット活性評価システム、微小ゲルビーズを用いたハイスループット酵素アッセイシステム）、5. ハイスループット可溶性評価技術、6. 基質特異性の高速多様化技術基質結合イベントを指標とした新規スクリーニング法を想定している。民間企業のターゲット酵素については、各社の実用化・事業化の方針に沿う。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

本 PJ の実用化技術（単体もしくは組み合わせ）を活用したビジネスモデルの検討している。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

要素技術とビジネスモデルの紐付けとしては、酵素配列情報を提供など技術コンサルティングやテンプレート酵素選定技術をライセンスする技術ライセンスを想定している。また、プロジェクト外で製造プロセス開発を行うために、自社で最終製品までの開発・製造・販売を行う企業（バックス・バイオイノベーション社など）への事業展開を想定している。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

多様なケーススタディに取り組むことで要素技術を高度化し、社会実装の確度を上げる。

(12.5) 波及効果

本プロジェクトは、以下の事項に対して波及効果を有する。

- 個別企業との連携促進
- 新規ナショナルプロジェクトへの展開
- Global BioFoundry Alliance の設立（第一回会議を神戸で開催）による国際的バイオ拠点の形成と研究開発のすそ野拡大
- 産学コンソーシアムの形成；先端バイオ工学推進機構（OEB、38社参画）の振興
- 汎用化学品（合成樹脂原料）、高機能物質（医薬品素材など）生産のバイオ化による脱炭素社会への移行
- バイオ生産産業化の加速だけでなく、バイオ操作自動化等の新産業分野の創出
- 関連バイオ産業の市場拡大に伴う民間投資誘発および雇用創出、人材育成

3.2.1.3 FM01「スマートセル時代のバイオ生産プロセス実用化を促進させるためのバイオフィアウンドリ拠点の確立」(Green Earth Institute 株式会社、協和発酵バイオ株式会社)

(1)背景と目的

微生物によるバイオ生産は、原料を化石資源に依存せず、有機物残渣を含むバイオマスからの物質生産が可能であり、カーボンリサイクルやサーキュラーエコノミー（循環型経済）の実現に資するものづくりといえる。

バイオ生産では、微生物育種や遺伝子組換え等の菌体改良の部分に注目が集まりがちであるが、事業化のためには、原料調達から製品生産まで一貫して低コストで生産できるプロセスが必須である。

しかし、日本においては、原料やユーティリティ、人件費等のコスト高、バイオ生産拠点の国内から海外への移転、バイオ生産に関する技術やデータの蓄積の不足、バイオ生産の経験者やバイオ生産プロセスの教育機会の減少といった要因から、バイオ生産産業が減退してきている。

一方、これらの課題を克服すれば、かつては実用化実績が多かった日本のバイオ生産産業が再び世界で勝てる可能性が見えてくる。

本事業においては、以下の機能を提供するバイオフィアウンドリ拠点を関東圏に整備し、必要な周辺技術開発を行い、それらを拠点設備に実装し、有用性を実証していく。そして、世界との競争が激化している中で、このバイオフィアウンドリ拠点の機能を活用して確立したバイオ生産プロセスが、短期間に商用化できるようになることを目指す。

- バイオ生産プロセスの確立を効率的（短期間、低コスト、高い精度）に実現する機能
- スケールアップとあわせて商用生産時に最も低コスト、省エネな生産条件を提示する機能
- バイオ生産プロセスの省エネを実現する技術を提供する機能
- LCAによるCO₂の排出量の算出、製造コストの算出等のサービスを提供する機能
- 国内で安価な糖を確保する技術を提供する機能
- パイロットテストの実施及び一定規模以上の発酵槽で商用サンプルを生産する機能
- バイオ生産の知識及び経験を有する人材を育成する機能 等

(2)位置づけ、目標値

本事業は、バイオ生産を巡る世界との競争において、バイオ生産プロセスの最適条件の確立、スケールアップという商用化にとって重要な部分を、我が国において強化していくためのものである。かかる観点から、本事業においては、バイオ生産プロセスの最適条件が確立でき、スケールアップを行い、当該バイオ生産プロセスを商用化まで持っていける拠点が整備され、運用されることを目標とする。

具体的には、最低限、世界の同様の機能を有する拠点と比較し、同等あるいは同等以上の機能を有することが求められる。特に進んでいる欧米の類似施設との比較は以下のとおりである。

表 3.2.1.3-1 欧米のバイオファウンドリ拠点との比較

施設・組織	場所	機能・特徴
Bioprocess Pilot Facility	欧州（オランダ）	農業残渣などの原料処理から製品（化合物）生産までを一貫生産できるパイロットスケールプラント、スケールダウンアプローチも導入。
Agile Bio Foundry	米国	菌体開発（*）からスケールアップまでを実施する国立の研究施設。最大容量9000L。コスト試算・LCAも実施。 （*）①統合分析を通じた微生物及び生物科学経路の選出と、コンピュータ支援設計を利用した製品アウトプット増加手段の計画による設計 ②性能改善を目的とした試験を行う微生物菌株生成のために、分子生物学ツールと実験室自動化を活用した製造 ③マルチオミクスアプローチとプロセスの統合により、生成された菌株を評価する試験 ④先進統計アルゴリズムと機械学習を活用し、今後実施される実験に向けた情報として結果をまとめる学習を含む設計・製造・試験・学習プロセスを反復するシステムの開発
本バイオファウンドリ拠点	日本	有機残渣等の原料処理から製品生産までを一貫生産できるパイロットスケールプラント。最大容量3,000L。 高精度CFD及びスケールダウンモデルを使った、商用生産時の最適条件を提示する機能、マイクロ波技術を使った省エネバイオ生産プロセス、新加水分解技術を使った有機残渣の有効利用方法、コスト試算、LCA、技術移転支援、マッチング、人材育成も実施。共通インフラとしてスケールアップ等のデータの提供。

(3) 全体計画

2021 年度から 2022 年度にかけて、三井化学株式会社（以下「三井化学」という。）が保有している茂原分工場内既設のバイオエンジベンチを拠点の当初のベースとして、茂原分工場内の敷地にバイオファウンドリ拠点の中核となる建物を建設し、本事業で提案する内容の遂行に必要な培養等設備を新規に購入し、新設建物に設置する計画である。また、併せて、千葉県木更津市に所在する Green Earth 研究所と同じくかずさアカデミアパークに在する、かずさいンキュベーションセンターを同研究所のサテライト拠点として設ける。

バイオエンジベンチ及びかずさいンキュベーションセンターの活用により、2022 年度より研究開発及び生産実証の一部の早期開始を企図している。また、建設と並行して、新設建物の稼働時における各種法令等の遵守やセキュリティの確保のための運営マニュアルの策定を行う。

2023 年度中においては、精製設備等の新規購入も進め、生産実証の範囲に精製工程も含めるものとする。

2024 年度以降は、2022 年度及び 2023 年度の研究開発及び生産実証で得られた成果を基に、多様な製品を対象として生産実証を行い、商用化を目的としたノウハウや実証実績を蓄積し、効率的な生産実証のためのバイオ生産プロセスへの反映を行っていく。

また、バイオファウンドリ拠点の機能の 1 つとして、日本のバイオものづくりを推進するための人材育成プログラム（研修及び実習）を、2021 年度及び 2022 年度において企画立案し、2022 年度後半からの開始、2023 年度からの本格実施を見込んでいる。



図 3.2.1.3-1



図 3.2.1.3-2



図 3.2.1.3-3



図 3.2.1.3-4

(4) 実施体制

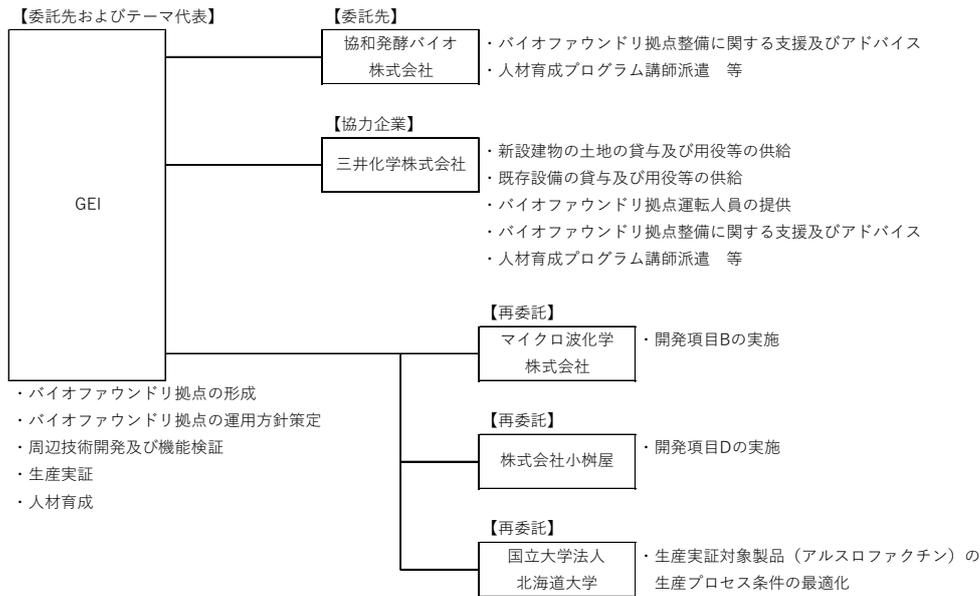


図 3.2.1.3-5

(5) 運営管理

GEI の社内においては、基本毎週開催の定例会議にて日々の進捗確認を行うとともに、2021 年末において各研究開発及び生産実証案件の有機的な連携を図り、再委託先等も含めた開発報告会議を開催した。

2022 年度以降は定例会議及び開発報告会議を継続するとともに、さらに研究開発のうち特に開発項目 A の高性能 CFD ソフトウェア・スケールダウンモデルを利用したバイオ生産プロセスの最適化等を各生産実証案件において検証を進めるため、各担当者による個別開発会議を開催していく計画である。

また、バイオファウンドリ拠点において生産実証を行う第三者（以下「利用者」という。）の秘密情報やバイオリソースを含めた秘密が守られる環境、体制、運用ルールを整備し、各種法令や規制に準拠のうえ、利用者の利便性に配慮した運営をするため、運営委員会を設置する。同委員会においては、運営マニュアルの策定や生産実証スケジュール及び生産実証案件の選定等の検討、決定する。

(6) 実施の効果

本事業の実施によって、直接的に以下の成果が上がり、結果として日本におけるバイオものづくりが拡大する。

- ① バイオ生産プロセスの最適化、スケールアップにより商用化が実現する。
- ② バイオマス残渣の利用が可能となる。
- ③ 低コスト、省エネ、低炭素のバイオ生産装置及びプロセスが実用化される。
- ④ バイオ生産プロセスに関する知識を有する人材が増える。
- ⑤ バイオ生産プロセスの商用化を進めるサービスが始まる。

上記のうち、①について、例えば、イソプロパノールが見込みどおり上市されれば、2030年には180億円の市場（想定市場規模10万トン・想定市場価格180円/kg）となる。

また、⑤について、バイオ生産プロセスの開発支援サービスやサンプル生産、有機廃棄物評価サービス等で、2030年には毎年4億円近くの市場となることを見込んでいる。

この他、②の残渣関連産業や、③の装置及びプロセス関連の市場も加わることから、本事業に投資予定の54億円は十分の費用対効果が得られるものと推計している。

CO₂削減効果についても、①のイソプロパノールだけで2030年までに42万トンのCO₂が削減されることになる（下記参照、10万トンのバイオポリプロピレンの生産を前提）。

【バイオイソプロパノールのCO₂削減効果】

イソプロパノールはポリプロピレンの原料であることからバイオ化されることで以下のとおりポリプロピレン1トンあたり4.2トン（(A)－(B)＋(C)）のCO₂排出量が削減されることになる。

(A) 石油化学品プロピレン1トン製造時のCO₂排出量＝1.5トン

(B) バイオプロピレン1トン製造時のCO₂排出量＝0.4トン

(C) ポリプロピレン燃焼時のCO₂排出量＝3.1トン

(7) 中間目標の達成度

表 3.2.1.3-2

研究開発項目	中間目標 (2022年度末)	成果	達成度 (2022年度末 見込)	今後の課題と 解決方針
① バイオフィアウンドリ拠点の形成	<ul style="list-style-type: none">・ 新設建屋の基本設計、実施設計、建設を完了する。・ 目的の機能を有した、サンプル生産設備、スケールダ	<ul style="list-style-type: none">・ 新設建屋の施工事業者を選定し、設計についてのデザインレビュー（開発、設計の審査）を実施した。ま	○	<ul style="list-style-type: none">・ 新設建屋の設計についてデザインレビューを継続し、施工事業者とともに仕様の細部を順次決

研究開発項目	中間目標 (2022 年度末)	成果	達成度 (2022 年度末 見込)	今後の課題と 解決方針
	<p>ウンモデルを用いたスケールアップ検討設備、CFD の高度化開発設備を設置する。</p> <ul style="list-style-type: none"> 三井化学の規定に則った、茂原分工場内における実験（生産実証）の技術評価を行う。 	<p>た、建築確認の準備申請を行った。</p> <ul style="list-style-type: none"> 新設建屋に導入する各種設備を選定し、設計についてのデザインレビューを実施、長納期の設備より発注し、製作を開始した。 製品 A について、技術評価につき、評価資料の作成を開始し、三井化学の担当部門への事前相談手続きを行った。 		<p>定、施工する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ユーティリティや通信設備等については、建屋とは別途施工事業者を選定し、設計段階より同事業者の支援を受けて効率的なデザインレビューを行い、仕様を決定、施工する。 製品 A に続き、製品 A の評価に関して得られた知見を活用し、その他のバイオ生産実証案件についても技術評価を実施する。
<p>② バイオフィアウンドリ拠点の運用方針策定</p>	<ul style="list-style-type: none"> 運営委員会を原則年 3 回開催する。（必要に応じて回数は検討。） 各種法規制の順守を確認可能な体制とする。 	<ul style="list-style-type: none"> 運営委員会を設置し、第 1 回目を 2022 年 4 月に開催した。 運営マニュアルの目次案を第 1 回運営委員会にて決定された。 	<p>○</p>	<ul style="list-style-type: none"> 生産実証案件の選定検討等のため、2022 年度第 2 四半期において第 2 回、2022 年度報告及び 2023 年度の計画検討等のため、第 4 四半期において第 3 回を開催する。 目次案に則り、三井化学との協議のうえ、各種

研究開発項目	中間目標 (2022 年度末)	成果	達成度 (2022 年度末 見込)	今後の課題と 解決方針
				運営マニュアル を順次策定す る。
③周辺技術開発・バイオフィアウンドリ機能検証				
開発項目A：高 性能 CFD ソフ トウェア・ス ケールダウン モデルを利用 したバイオ生 産プロセスの 最適化手法と スケールアップ実証手法の 開発	<ul style="list-style-type: none"> ・製品 A を対象として、小スケール ジャーでのテスト、スケールダウン モデルでのテストを実施する。 ・3,000L 槽を用いてスケールダウン 手法を利用した最適条件決定、ス ケールアップシステムの妥当性を検 証する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・CFD ソフトウェア の高度化に必要な 設備及び装置等 について、仕様、機 種を決定した。 ・CFD ソフトウェア につき、製品 A の 実生産で使用する 想定規模の発酵槽 モデルを使用して 試解析を行った。 	○	<ul style="list-style-type: none"> ・CFD での解析と同 一条件での模擬 培養槽又は実発 酵槽での実培養 条件下における 重要パラメータ の実測を行い、 CFD 解析結果と実 測値の誤差を縮 小させる。 ・模擬培養槽や中 規模、大規模発 酵槽の CFD モデ ルを作成、利用 し、大規模発酵 槽の設備のス ケールダウンモ デルを作製す る。
開発項目B：マ イクロ波技術 を使ったバイ オ生産プロセスの低コスト 化・省エネ 化・低炭素化	<ul style="list-style-type: none"> ・マイクロ波化学株 式会社の実証サイ ト設備において、 培地滅菌設備への マイクロ波技術の 適用試験を実施す る。 	<ul style="list-style-type: none"> ・蒸気製造、蒸留、 糖化前処理、培地 滅菌の4つのバイ オ生産工程につ き、マイクロ波技 術の適用可能性に ついて机上検討を 行った結果、蒸気 製造を除き、マイ クロ波の適合性を 確認した。 ・そのうえで、バイ 	○	<ul style="list-style-type: none"> ・培地滅菌設備へ のマイクロ波技 術の適用に関 し、当該設備の 設計の基本構 想、仕様検討を 行う。

研究開発項目	中間目標 (2022 年度末)	成果	達成度 (2022 年度末 見込)	今後の課題と 解決方針
		<p>オフアウンドリ事業における汎用性等の事業面も判断要素とし、培地滅菌を開発テーマに決定した。</p>		
<p>開発項目C：バイオ生産プロセスに適合した LCA による CO2 排出量の算出モデルの構築</p>	<ul style="list-style-type: none"> 3 件のバイオ生産プロセスにおける CO2 排出量の算出を実施する。 	<ul style="list-style-type: none"> 開発を行いながら（生産条件が完全に確定していない時点においても）、個別のバイオ生産プロセスの CO2 排出量の算出が実施可能な計算モデルのひな型案を作成した。 	○	<ul style="list-style-type: none"> LCA を実施し、CO2 排出量を計算するモデルに必要なバイオ生産プロセスの要素を的確に抽出する。 新しい計算モデルで 3 件のバイオ生産プロセスの CO2 排出量の計算を実施し、必要に応じてモデルの改良を行う。
<p>開発項目D：バイオマス残渣の前処理技術としての新加水分解技術の適用</p>	<ul style="list-style-type: none"> 新規の前処理技術である二軸同方向押出加熱器等を中心とした前処理設備一式を設置する。 バイオリファイナリー原料としての適性を判断するため、新たに複数のバイオマス資源の成分分析を実施する。 	<ul style="list-style-type: none"> バイオ生産における原料候補となるバイオマス資源リストを作成した。 原料として適切と考えられる 3 種類のバイオマス資源（コーヒーかす、茶かす、食パンくず）を調達し、成分分析を実施した。 	○	<ul style="list-style-type: none"> 機器メーカーと連携し、前処理設備の仕様及び製造状況、新設建屋への搬入据付等の確認を行う。 バイオマス資源の調査を継続し、リストの充実を図る。 バイオリファイナリー原料として適切と推定さ

研究開発項目	中間目標 (2022 年度末)	成果	達成度 (2022 年度末 見込)	今後の課題と 解決方針
				れるバイオマス資源を調達し、発酵試験を実施する。
④ バイオ生産実証				
製品 A	<ul style="list-style-type: none"> 製品 A 生産プロセスの 3,000L 発酵槽へのスケールアップ実証の際の重要パラメータを決定する。 スケールダウンモデルを用いた、大規模発酵槽の性能の把握を行う。 3,000L 発酵槽の機能を確認する。 スケールアップについて、CFD ソフトウェアを用いた技術の妥当性の実証を行う。 	<ul style="list-style-type: none"> 協和発酵バイオ株式会社（以下「KHB」という。）の製品 A 実験の再現性を確認できた。 製品 A 生産時の呼吸速度を実験で求め、CFD での解析を行った。 DO 制御の培養を行い、DO が重要パラメータになることが分かった。 	○	<ul style="list-style-type: none"> 製品 A の生産性に影響を与える重要パラメータを決定する。 スケールダウンモデルによるスケールアップ実験を行い、商業生産規模における培養条件や発酵槽の設定条件を解析、検証する。
アルスロファクチン	<ul style="list-style-type: none"> フラスコ培養及びジャーファーメンター培養で、従来比 10 倍 (1g/L) の生産収率を達成する。 	<ul style="list-style-type: none"> フラスコ培養において、培地、温度、振とう速度を最適化し、目標値を達成した。さらに、廃グリセリンが培地成分に代用できることを実証し、廃棄物活用技術に活路を見出した。 	○	<ul style="list-style-type: none"> ジャーファーメンター培養において、発泡を抑制しながら必要な溶存酸素濃度を維持する方法の策定が課題である。そのため、多孔質フッ化エチレンチューブの利用を検討する。

研究開発項目	中間目標 (2022 年度末)	成果	達成度 (2022 年度末 見込)	今後の課題と 解決方針
⑤ バイオファウン ドリ拠点を活 用したものづく り人材の育成	・ バイオ生産プロセ スにおける最適化 及びスケールアップ 手法、CFD 解析手 法の研修、バイオ ファウンドリ設備を 使ったバイオ生産プ ロセスの運転の実習 等の研修資料の完 成	・ 研修内容の大枠は 決定済。 ・ 各研修資料につい ても作成に着手済 である。	◎	・ 予定を前倒しし て、2022 年の秋 から研修を開始 する。

(8) 研究開発の成果と意義

① バイオファウンドリ拠点の形成

本事業では、(3)全体計画に記述のとおり、茂原分工場内既設のバイオエンジベンチを拠点のベースとして、茂原分工場内の敷地に新たに建物を建設する計画であり、当該新設建屋並びに本事業における研究開発に必要な設備につき、三井化学や KHB 等の技術部門も加わったデザインレビュー（開発、設計の審査）を行い、仕様決定、購入手続きを進めている。

この計画により、バイオエンジベンチで実施可能な研究開発内容を、早期に開始することが可能であるとともに、拠点整備に要するコストを抑えることを可能とする。また、更なる早期化及び早期からの使用可能な設置の選択肢を増やすため、既設設備として、バイオエンジベンチと併せて、かずさインキュベーションセンターを設けたところである。

バイオエンジベンチに設置されている発酵槽及び周辺機器は、いずれも標準的な仕様（L/D、攪拌羽根等）の機器であるが、新規導入予定の設備は、③周辺技術開発・バイオファウンドリ機能検証の一つであるスケールダウンモデルにも対応可能な仕様の機器である。ターゲットの製品や開発の目的に応じて、既存設備、新設設備を使い分けて、効率的な研究開発及び本拠点の運用を進める予定である。

新設設備としては、大きくは培養関連設備、前処理・糖化設備、精製設備、ユーティリティ設備、建屋に分けられる。

これらの設備及びバイオエンジベンチの既存設備について実施内容と目標は以下のとおりである。

- フラスコレベルで得られたターゲットとする製品（化合物）の生産検討結果を、商用化を想定した大型発酵槽で再現させるための効率的なスケールアップ、最適化検討用試験設備とする。
- 工業化実績のある主要な微生物発酵生産プロセスに適用出来る仕様とする。

- 300kL 程度までの広範な規模の既設、新設発酵槽のいずれのスケールアップ検討にも対応可能で、効率的で、高い精度のスケールアップを短時間で行うことが出来るシステムを備える。
- ターゲット製品のサンプル生産を可能とする設備を導入する。

培養設備

培養設備のうち、最も重要な設備の一つである発酵槽については以下の規模（容量）とし、いずれもスキッド（本体設備に附属機器を含む設備一式がセットで組み立てられたもの）で作成し、建屋完成時にそれぞれ設置することとした。

3,000L：通気攪拌槽としては国内最大スケールと思われる 300kL 発酵槽の 1/100 規模で、スケールアップの最終確認ができる仕様とした。

300L：3,000L の 1/10 規模とし、スケールアップの検証及び精製工程でのサンプル製造のための培養を行う仕様とした。

生産実証においては、好気性微生物の培養を主に行うことを想定しているが、嫌気性微生物（運転エネルギーの低減が可能）の利用も可能な仕様とする。好気性微生物では、高密度培養を想定して、要求される最大酸素供給速度を検討し、付替え可能な攪拌機を発酵槽内に設置する設計とした。また、CFD ソフトウェアの開発が可能となるよう、発酵槽内の温度、pH、DO 等の計測を可能とする複数のセンサーを装着可能な仕様とした。

また、回分培養のほか、フィード培養、さらには開発テーマとして連続培養も可能とすることも考慮した設備とするため、各発酵槽にそれぞれ、120L 及び 1,200L のフィードタンクを設置することとした。

前処理・糖化設備

食品残渣、農産残渣等の有機廃棄物をバイオリファイナリーの糖源として利用するために、これまでの前処理方法の課題を解決し得る前処理装置として二軸同方向押出加熱器を利用した加圧混練システムを導入する。

前処理の既存技術としては、爆砕法、加圧熱水法がある。これらの方法では、多くの場合、水を加える必要があるため、得られる糖液が希薄になり、糖液の濃縮工程が必要となる。また高温高压で処理するため、反応器にハステロイ（高耐食性・耐熱性の合金）等の高価な材料や高压に耐える構造にする必要がある等の課題があった。

そこでこれらの課題をクリアできる技術として、二軸同方向押出加熱器を利用した、加圧混練システムによる新しい前処理技術を開発し、国内の非可食バイオマスのバイオリファイナリー利用を促進することを企図している。

二軸同方向押出加熱器は、400℃までの高温処理が可能であり、原料を同機器内で移動させることで短時間の処理が可能である。また加熱部分が減容化されるため、従来法に比べて大幅に設備コスト及び所要エネルギーの削減が可能になると予想している。

二軸同方向押出加熱によって処理したバイオマスは、次いで糖化槽（300L 発酵槽の使用を想定している。）に投入し、原料に応じた酵素を投入して糖化を行った後、希薄な場合は濃縮、セラミックフィルタやUF膜を通して糖液を得られるよう計画した。

精製設備

2021 年度～2022 年度にかけては、設備関連は新設建屋及び培養関係の設備導入に予算を配分し、2022 年度中に応募された生産実証の内容を踏まえ、2023 年度以降に精製設備を購入する計画としている。なお、精製設備の導入前の期間に実施する生産実証において必要な精製については外注で対応する。

また、精製設備の規模は、300L 発酵槽の培養液からのサンプル生産が可能なものとする方針である。

ユーティリティ設備

ユーティリティとして、上水、イオン交換水、蒸気、圧縮空気、冷却水、電気、及び排水について、検討した。

例えば、上水、イオン交換水、蒸気は三井化学の工場から供給を受けることができるため、その供給方法について、三井化学と相談し、決定した。またこれらについて供給能力（上水、純水を一度に多量に使用する可能性があるため貯留槽を設ける。）、要求仕様（イオン交換水の純度を高める。）に合わせた追加設備、工事決定した。

排水

排水については、遺伝子組換え体を含む可能性のある廃液、工場活性汚泥処理を行う排水、工場の排水処理に送れない高濃度 BOD 排水について、処理経路を検討した。

遺伝子組換え体を含む可能性のある、各培養槽、遠心分離からの上清槽、菌体受け槽等のタンクから発生する排水や、流し台や床にこぼれた排水等は床に設置した排水溝で受けてピットに集め、ピットから不活化槽にポンプで送って滅菌する計画とした。不活化槽は 3,000L 発酵槽の廃液及びその洗浄液を受け入れられる容積として 5kL とした。不活化した排水は、高濃度の BOD を含む場合は高 BOD 排水として産業廃棄物処理業者に処理を依頼し、焼却処分する計画である。

また、ユーティリティ関係の設備一式は新設建屋の外で、大量の供給が必要な試製室に近い位置に基礎及び小屋を設けて設置する計画とした。

建物

新規に建設する建屋は、一般的な鉄骨構造のほか、建築コスト削減のためシステム建築等の比較を行った結果、将来の拡張工事が可能な一般的な鉄骨造りで価格競争力がある業者を選定した。

三井化学とは土地の賃貸借契約を交渉、締結して、茂原分工場内に 40m×60m の敷地及び 17m×6m の取付道路用地を借用し、18m×42m（床面積 798m²）の一部 2 階建て、高さ 11.3m の鉄骨造準耐火建築物の建屋を設計、2022 年度中の竣工を目指して建築を開始した。

また、屋外にユーティリティ関係のコンプレッサー、チラー、クーリングタワー等の設備を配置した。

バイオフィアウンドリ拠点として重要な点として、培養設備の設置スペースは、カルタヘナ法第2種利用のカテゴリー1に対応する部屋（室）として、不透水性仕上げの床とし、建屋内の空気は同室に向けて流れ、同室からの排気はすべて除菌フィルタを通して行う設計とした。これにより、万一遺伝子組換え菌が漏洩しても、建屋外には漏出しない構造とした。

建屋内には前述の培養設備のほか、各種分析装置（HPLC、振盪培養器、恒温培養器、クリーンベンチ、オートクレーブ、遠心分離機、分光光度計、顕微鏡、超純水製造装置、ドラフトチャンバー、糖類定量装置等、微生物の培養、生産物、副生物の分析装置等のバイオフィアウンドリ拠点の機能を発揮するのに必要な設備を、2023年1月の建屋竣工に合わせて使用可能になるように、順次発注している。特に製品Aの実験に必要な設備を整えている。

②バイオフィアウンドリ拠点の運用方針策定

バイオフィアウンドリ拠点の適切な運用及び幅広い利用者において円滑な生産実証の検証が可能となるよう、新設建物が本格稼働するまでに、バイオフィアウンドリ拠点の運営に関するルールや体制を整備することを目的としている。

上記の体制等にかかる重要事項の検討及び決定にあたって、エンジニアリング技術やバイオプロセスにかかる生産実績、また、「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（カルタヘナ法）」等の法令に関する知見等を有する有識者により構成される運営委員会を設置する。

運営委員会においては、具体的にはバイオフィアウンドリ拠点の運営マニュアルの構成、新設建物や新規に導入する設備に関する法規制対応や安全管理体制、生産実証スケジュール及び生産実証案件の選定の基本方針、並びに利用者から提供された貸与菌体を含むバイオリソースのセキュリティ確保の方法等の審議を行う。

運営委員会は2021年度中の設置を計画していたが、委員やオブザーバーの人選及び交渉に時間を要した結果、2022年4月に第1回の開催、本委員会の決議によって、運営委員会の運営要綱の制定及び委員長の選任となった。

バイオフィアウンドリ拠点の実質的な運用については、運営委員会にて決定された運営マニュアルの構成に基づき、運営全般、安全衛生、保安防災、環境保全、セキュリティ及び設備管理等のマニュアルを策定し、これらのマニュアルに則った施設運営を行っていく。なお、バイオリソースのセキュリティ確保については、セキュリティのマニュアルにその方法を定めて運用するものとしている。

運営マニュアルの策定については、2021年度より、三井化学の茂原分工場における主として安全衛生及びリスク管理にかかる規定も踏まえ、目次構成の検討及び目次案の作成を行っており、第1回運営委員会において目次案の決定がなされたところである。

③周辺技術開発・バイオフィアウンドリ機能検証

開発項目A：高性能CFDソフトウェア・スケールダウンモデルを利用したバイオ生産プロセスの最適化手法とスケールアップ実証手法の開発

微生物によるバイオ生産プロセスの実用化検討を行う際、効率化、省力化、省エネルギー等が改良された商業生産システムを、従来と比較して、短期間にかつ、低コストで構築できるサービスの提供を可能とする手法の開発を行う。

これにより、従来、規模を100倍程度ずつ複数の段階を踏んで拡大しながら検討を繰り返し、実用化されているプロセス開発について、理想的には1000倍以上のスケールアップを、小規模での実験、検討のみで従来と比較して短時間に達成できるようにする。

具体的には、生産時において想定される発酵槽を選定し、当該発酵槽のCFDモデルを作成した後に、高性能なCFDソフトウェアを利用して、発酵生産を行っている際の発酵槽内部の状態の解析を行い、スケールアップ因子となる可能性のあるパラメータ（D0、温度、pH、グルコース濃度等）の槽内分布等を算出する。

次に、小スケールジャーを用い、上述のパラメータについてDoEを用いて計画した設定条件で生産実験を行い、重要パラメータの抽出と定量化を行う。

そのうえで、予めCFDソフトウェアで商用生産時の発酵槽と同等の混合性能を示すことを確認できた、バイオファウンドリ拠点の発酵槽を用いて、商用生産規模での生産性を把握するためのスケールダウンモデルテストを行うことができることを目標としている。

CFDソフトウェア自体も、バイオ生産プロセスは、広範な通気攪拌条件、広範な発酵槽の規模及び仕様、多様な微生物種等が課題となり、実際の生産発酵槽とkLa、ガスホールドアップ窓について差異の少ない予測結果を得ることが現状難しいことから、この精度を高めるための開発を、模擬培養槽（透明で精度の高い実測を可能とした実験用通気攪拌槽）あるいは実発酵槽を用いて行う。CFDソフトウェアの解析結果と、模擬培養槽でのあるいは実培養条件下での気泡径、kLa、ガスホールドアップ、D0、pH、糖濃度等の実測値の誤差を検証、CFDソフトウェアを改良することで、CFD解析精度を高めていく。

また、商用化を目指すにあたっては、バイオ生産プロセスの実用化検討の様々な過程で、運転に要するコストを、外部に依頼することなくプロセス開発者が自身で試算し、プロセス開発に反映させることが望ましい。そのため、バイオ生産プロセスの生産性と併せてバイオ生産プロセスの設定条件による消費エネルギーや必要とする培地や消耗品等の単位費用、使用する設備の取得価額等を入力することで、簡易的に製造コストを試算可能なツール（運転コスト簡易計算表）を作成する。

これらの各手法は、様々なバイオ生産プロセスに適用可能であり、商用生産に向けたプロセス最適化、スケールアップ実証の標準的なプラットフォームとなり得るものである。これらの手法により、技術的な面のみならず、コストの観点からも、適切な事業計画の立案を可能とし、商用化の成功確率が上がることになる。

上述の開発については、複数のスケールアップ案件、その評価及び検証、その結果の開発計画への反映の積み重ねが必要であることから、本事業においては、④バイオ生産実証における案件をスケールアップ実験の事例として、各生産実証案件と連携して進めるものとする。

これまでに、CFDソフトウェアや模擬培養槽や新設建屋に導入する30L、300L、3,000L発酵槽等の培養設備並びに培養時の重要パラメータのデータ採取用の運転制御ソフトウェア

ア・装置等について、製品設計のための DR を三井化学や KHB の技術部門を交えて実施した。模擬培養槽については、撮影デモテストも実施し、CFD 解析の重要影響因子の一つである気泡径を測定できることを確認のうえ、これらの設備の仕様を決定した。

また、バイオ生産実証のための机上での生産設備へのスケールアップ検討のために、生産菌体の生産性の把握を行い、その生産性データを用いて、想定年産量のために必要な生産設備の規模を算出した。そして、そのスケールの槽について、CFD シミュレーションモデルを作成し、試解析を開始した。

開発項目 B：マイクロ波技術を使ったバイオ生産プロセスの低コスト化・省エネ化・低炭素化

本研究開発の意義は、ものづくりの高度なグリーン化に貢献することである。微生物によるバイオ生産は、原料の観点では化石資源に依存しないグリーンなものづくり手法である一方、バイオ生産といえども、各工程の運転では化石燃料を使用する工程も含まれ、CO₂ 排出の点で改善を要さないわけではない。このような背景のもと、本事業では電化技術であるマイクロ波の利用により製造プロセスにおける CO₂ 排出量を大幅に低減できることに着目し (https://mwcc.jp/carbon_neutral/)、バイオ生産プロセスにマイクロ波を適用して、より高度にグリーンなものづくり技術を研究開発することとした。なお、マイクロ波は直接的、選択的に対象物へエネルギーを伝達させることが可能であり、この特徴を活かすことにより、CO₂ 排出量低減のみならず、プロセス時間短縮、温度低減等のメリットが得られる。したがって、プロセスコスト低減を実現しながら、ものづくりのグリーン化を達成できる点で、本研究開発の意義は大きいと考える。

2021 年度においては、バイオ生産プロセスにおいて化石燃料を使用する工程として、蒸気製造、蒸留、糖化前処理、培地滅菌を検討項目として設定し、マイクロ波適用の可能性を検証した。蒸気製造については、既存の電気ボイラー設備を調査した結果、既に高度にエネルギー的に最適化されていたことから、その他 3 項目についてラボレベルにて実験的に検証した。

上述のとおり、マイクロ波の特長は従来の伝熱とは異なり、物質を選択的に直接加熱できる点にあり、それゆえ特異的な効果が見られることがある。その効果はターゲットのプロセスに対して必ずしもメリットとして働くわけではなく、物質の分解等好まれざる影響をもたらす場合も見られる。そこで今回のラボ検討ではマイクロ波で各プロセスが問題なく実現できるかを確認した。実現可能か否かの判断は対応する伝熱加熱プロセスと同等の結果が出ることを指標とした。

その結果、3 項目いずれにおいてもマイクロ波での実現可能性を確認できた。

また、例えば特に蒸留においては、オレイルアルコール/イソブタノールの重量比が 99/1 の試料を用いた場合、伝熱加熱では蒸留できなかった低い温度にて、マイクロ波を用いることでイソブタノールが蒸留可能であることが確認される等、マイクロ波の特長が活かされる知見を得ることができた。実験を通して、夾雑物を含む溶液を蒸留する場合やバイオマス等の固形物を加熱する場合にはマイクロ波では伝熱面を必要としないため、伝熱面の焦付きやスケーリング等の抑制が期待できそうという議論もあり、マイクロ波利用技術への期待が高まった。

実験のほかに、マイクロ波技術の適用による各工程のCO₂排出量低減の効果を試算した。その結果、どの工程においても同程度で、従来の化石燃料を用いるプロセスに比べて80%以上のCO₂排出量削減効果が期待できることが確認された。

これら技術面の検討を踏まえて、今後生産実証に向けて検討を行う技術について上述の3項目からの絞込みを行った。絞込みにあたっては、バイオフィアウンドリ拠点での検証で得られる知見や、バイオフィアウンドリ事業における汎用性といった事業面も考慮に加え判断した。マイクロ波化学株式会社と協議を重ねた結果、培地滅菌プロセスの開発を継続していくことに決定した。

開発項目C：バイオ生産プロセスに適合したLCAによるCO₂排出量の算出モデルの構築

バイオ生産プロセスは、石油化学生産プロセスと異なり、原材料として化石資源を使用せず、大気中のCO₂が農産物等へ吸着したバイオ由来の炭素原子を製品の分子の骨格に含むことから、ライフサイクルで見た場合にCO₂の排出の抑制が期待されているが、正確な数値を把握することは困難である。

より詳細に見ると、原料の元となる農産物が、同じ農産物でも生産地や生産方法が異なる場合、サーキュラーエコノミー下における原料としてのバイオ廃棄物の性状に幅がある場合、様々な精製プロセスを経る場合、バイオ生産プロセス特有の特徴を持つ製品を生産する場合等幅広い条件が考えられるなかで、実態に即したLCAを実施したうえで検討することが求められる。

現在バイオ由来製品の生産は、その原料の性状（廃棄物や農業プロセスの副産物等を原料とする場合は特に）により収率や設定する生産条件が異なる。また、同じ農産物や副産物を用いた原料であっても、農地の場所や調達量が異なるとその環境負荷が大きく異なることがあり、厳密なLCAを実施することは難しい。本バイオフィアウンドリ拠点でバイオ生産実証される案件については、様々な原料を用いた発酵条件で得たデータ等をもとに、発酵生産プロセスにおけるLCAを実施する。

従来、バイオ生産プロセスについてのCO₂排出量を算出する場合は、プロセスが固まった後にLCAを実施し、当該バイオ生産プロセスにおけるCO₂排出量を算出していた。

一方、脱炭素の流れが強まるなかで、バイオ生産プロセスにおいてもCO₂排出量を低く抑えることが求められ、開発の過程においてCO₂排出量を意識することが必要とされ、発酵条件等を決める要素となっている。

そのため、プロセス開発をしながら、CO₂排出量を算出できるLCAの計算モデルを作成することとし、本事業では、このモデルの開発をバイオフィアウンドリ拠点で実施する生産実証案件に当てはめつつ実施する。

2021年度は、コーヒー粕を原料とした場合及び製品Aをバイオ生産プロセスで作った場合のCO₂排出量を主要な要素に限定したLCAにて試行的に算出した。

2022年度においては、バイオ生産プロセスの要素を詳しく分解したうえで、それらの要素の一部については、予め想定される数字や比率を入れておくことで、すべてのバイオ生産プロセスの条件が確定せずとも、実験で得られるデータのみを使用してCO₂排出量が算出可能な計算モデルのひな型の作成を開始した。

開発項目 D：バイオマス残渣の前処理技術としての新加水分解技術の適用

食品残渣、農業残渣等のバイオマス由来の廃棄物は、微生物の餌となり得ることから、様々な有用化合物を発酵生産するための原料としてのポテンシャルがあり、国内で発生する有望な再生可能資源と考えられる。特に廃棄され未利用であるこれらの資源を有効に利用するサーキュラーエコノミー技術の確立は資源の乏しい我が国にとって重要である。

しかし、発酵生産するための原料としては、これらのバイオマス残渣の発生は各地で偏在化しており、さらに高水分等の特徴があり課題も多い。

本事業では、バイオ生産の原料となり得るバイオマス残渣を対象にリストを作成し、バイオマス残渣の発生場所、発生量、成分を見える化することで、バイオ生産するための原料の安定的な調達を可能とし、事業性を高めるものとする。

2021 年度の成果として、原料リストの作成と原料として有望な 3 種類のバイオマス残渣の成分分析を実施した。

原料リストは統計的なデータではなく現実的に活用できるものとするため、愛知県にて環境に配慮した廃棄物処理及び資源再生事業を営む株式会社小榎屋（以下「小榎屋」という。）のネットワークを活用してバイオマス残渣のデータを収集し、発生場所、発生量、成分に加え、バイオマス残渣の現物価値として炭素現物比率や炭素絶対量及び単価等を評価項目として追加した。なお、項目やその内容についてはバイオマスリサイクルや環境工学分野の有識者へのヒアリングを行い、そのアドバイスを反映した。

表 3.2.1.3-3 バイオマス原料リストの評価項目

評価項目		内 容
発生量		バイオマス残渣の排出企業の数と各地域でどの程度発生するの かを示した。（例えば飲料企業等は全国に工場を有するが、企 業全体ではなく地域に絞った発生量を示した。）
処理単価		排出事業者が処理費として支払う経費には、処分費の他、収 集・運搬費も含まれる。（管理費も含まれる場合もある。） 本リストでは処分費のみを示した。なお、収集・運搬費は運搬 先によって異なるため、今回は示していない。
成分	含水率	文献による分析データ及び小榎屋での分析結果を活用し、成分 を表示した。
	炭素	文献による分析データ及び小榎屋での分析結果を活用し、成分 を表示した。
	炭素現物比 率	本事業におけるバイオマス残渣の「現物価値」（バイオ生産プ ロセスにおいて利用可能な成分量）を示す項目である廃棄物現 物（水分のある状態）における炭素量を示した。 一般的な炭素量に関する文献等のデータは、乾物重量当りの ものとなっており、現物の価値が明確にならないため水分含量 を考慮した評価項目とした。含水率に範囲にあるものは平均値 を用いて算出した。

評価項目		内容
	炭素絶対量	発生量や排出企業（場所）等を考慮した「活用できる原料規模」を示す項目である。 炭素現物比率×発生量で算出する。排出企業や排出地域等を限定することで、収集効率等も踏まえ、活用可能な原料の絶対量を評価する。本事業で生産実証を行う案件の最終製品の製造規模の目安になる。
現在の主なリサイクル方法及びその販売単価		競争力確認のため、バイオマス残渣の現在の利用方法及び販売単価をまとめた。

また、有望バイオマス残渣の成分分析については、原料リストより、1ヶ所で単一の原料が大量に発生するという特徴を備えているものを選定、実施した。選定基準は原料利用が商用化された際の最終製品の付加価値（低コスト化、安定供給等）を高めることが期待されるものとした。

表 3.2.1.3-4 回収したバイオマス残渣の特徴

種類	排出元	特長
コーヒーかす (産業廃棄物)	飲料メーカー	単一で大量に発生している。 コーヒーかすは、コーヒー関連商品が製造されると必ず発生し、また減量が困難である。一方、乾物重量当たりの油分が比較的多く、約 15%程度含んでいる。
茶かす (産業廃棄物)	飲料メーカー	単一で大量に発生している。 茶かすもコーヒーかすと同様の特徴があり、減量が困難。タンパク質（窒素分）も多く含んでいる。
パンくず (有価物)	製パン企業	2021 年度においてはパン耳を調達、評価した。 愛知県内でも 1 つの企業で 30t/月程排出しており、当初の想定排出量より大量に発生している印象。現在は、飼料として利用されていることが多い。

④ バイオ生産実証

製品 A

製品 A は植物の中でも一部のものにはしか見つかっていない特有なアミノ酸である。日本では食品添加物として指定され、その機能としてリラックス効果、睡眠改善効果、脳神経細胞の保護作用、集中力効果が報告されており、こうした効果を期待した製品 A 含有の食品の需要が世界的に拡大している。しかしながら、一部の植物に含まれる製品 A は微量であり、継続的かつ効率よく摂取するため、製品 A 含有量の高い食品素材及び健康食品素材が求められているところである。現在市場に流通している製品 A の大半は工程中に危険な薬物の使用を含む化学合成法により製造されており、主たる生産国は中国であることから、昨今の中

国環境規制の強化を背景に将来の供給不安と製造コストの上昇、更には環境汚染のリスクが懸念されている。

本事業においては、KHB が確立した、グルコース等の安価な糖類を主原料とする大腸菌を用いた発酵生産法を、製品 A の基本プロセスとしている。具体的には CFD ソフトウェアや DoE を活用して、製品 A 生産プロセスの重要パラメータを特定及び定量化し、スケールダウンモデルを用いて商用生産用発酵槽の性能を把握する。これらの結果を踏まえた効率的なスケールアップ実証並びに運転コスト簡易計算表による商用化シミュレーションを行うものである。さらに、CFD ソフトウェアを用いた技術の妥当性を実証する。

2021 年度においては、3,000L 発酵槽（大規模パイロット設備）へのスケールアップ実証の際の重要パラメータを決定する前段階として、KHB と同様な実験を GEI で実施し、再現性を確認した。続いて製品 A 生産時の呼吸速度を測定し、CFD 解析を行った。さらに、溶存酸素濃度（DO）を制御した培養実験を行い、DO が製品 A 生産性に影響を与える重要パラメータの一つであることが分かった。今後は CFD ソフトウェアや DoE を活用して小規模での製品 A 生産実験を行い、製品 A 生産性に影響を与える重要パラメータを特定する。

アルスロファクチン

アルスロファクチンとは、微生物が生産する中分子の高活性界面活性剤であり、バイオサーファクタント（表面活性物質）といわれるものの一つである。現在、実用化されているバイオサーファクタントであるサーファクチンよりも低い濃度で優れた界面活性効果を示す。

これまでに、国立大学法人北海道大学における開発において、フラスコスケールで 0.1g/L 程度の生産性を確認しているが、商用化のためには、培地の最適化、培地の追加添加等の発酵生産の基本プロセスの情報とともに、商業化に向けたスケールアップ検討が必要である。

2021 年度は、フラスコ回分培養法により、培地組成、温度、通気条件（振とう速度）等を最適化することで、1g/L（ODA（oil displacement activity…油膜排除活性）10,000mm²/10μL）（従来比 10 倍）を達成することを目標とした。

各条件について、条件を振って実験をした結果、1g/L の目標を達成した。

また、低コスト化のため、原料として廃棄物を使うことを検討した。アルスロファクチンを生産できることは確認できたが、生産性は 10 分の 1 に留まった。

2022 年度では、フラスコからジャーファーメンターにスケールアップしつつ、さらに培養方法の最適化を図ることとしている。また、実生産時に起泡が課題となることがわかってきたため、その対処法の検討を始めている。

⑤ バイオフィラウンドリ拠点を活用したものづくり人材の育成

現在、日本の産業界においては、バイオ生産プロセスを含むバイオものづくりを担い、牽引する人材が不足している実態がある。本事業においては、バイオものづくりの土台の一つとなり得る人材育成のためのプロジェクトを積極的に進めていく。

そのため、NEDO 事業として 1 年早く始まっている関西圏におけるバイオフィアウンドリ拠点での人材育成プログラムを補完する形で、本バイオフィアウンドリ拠点では実生産を意識した内容の研修と本拠点にある設備を使った実習を組み合わせる内容にすることとし、2021 年度及び 2022 年度においては、人材育成プログラムの企画立案を進め、2023 年度からの本格実施を計画していた。

2021 年度においては、関西圏の人材育成プログラムの講師との情報交換を行いながら、本拠点で実施すべき研修内容を整理し、以下のとおり、カリキュラムの案を作成したところである。

表 3.2.1.3-5 人材育成プログラム カリキュラム案

講座内容		時間
講義 (座学)	バイオプロセス実用化① ー洗浄、滅菌技術	3 時間/日×2 日
	バイオプロセス実用化② ーアップストリーム（細胞分離まで）の最適化・スケールアップ	3 時間/日×1 日
	バイオプロセス実用化③ ー技術移転、構想設計、基本設計解説	3 時間/日×1 日
	バイオプロセス実用化④ ーダウンストリームの最適化・スケールアップ	3 時間/日×1 日
	バイオプロセス実用化⑤ ー糖化プロセスの最適化・スケールアップ	3 時間/日×1 日
実習	バイオプロセス実用化⑥ ーバイオプロセスへの DoE、多変量解析、流動解析（CFD）利用の実習	6 時間/日×1or2 日
	バイオプロセス実用化⑦ ーアップストリーム工程のスケールアップデータ収集法の実習	6 時間/日×1 or2 日
	バイオプロセス実用化⑧ ー洗浄、滅菌操作、検証に関する実習	6 時間/日×1 or2 日

(9) 成果の最終目標の達成可能性

①バイオフィアウンドリ拠点の形成

新型コロナウイルスの世界的な蔓延により、機械、設備の製造につき、部品の供給量の不足や製造期間の長期化等様々な影響を受けており、通常より納期が大幅に遅れている状況であるが、計画どおり 2022 年度末までに新設建屋の竣工、必要なユーティリティ、設備、機器類の据付、試運転を終え、製品 A の 3,000L 発酵槽による培養試験を行える体制が整う予定で進んでいる。

② バイオフィアウンドリ拠点の運用方針策定

運営マニュアルについては、関連の法規制の新規制定や改正、新設建物への更なる設備の導入等、実態に則した整備が必要となるものであることから、本事業期間において完了するものではないが、まず、新設建物の本格稼働前の 2022 年度中に第 1 段階の策定を終え、2023 年度より運用を開始し、以降随時制改定を行っていく。

2022 年 4 月時点において、(8) 研究開発の成果と意義の項目に記載のとおり、目次案は決定されており、当該案に基づく各マニュアルの作成を進めているところである。新建物の稼働においてはルールブックにあたる運営マニュアルの整備が必要不可欠であり、計画どおり 2022 年度中に策定を終え、2023 年度以降適時適切な制改定及びこれに準拠した運用を継続する見込みである。

③ 周辺技術開発・バイオフィアウンドリ機能検証

開発項目 A：高性能 CFD ソフトウェア・スケールダウンモデルを利用したバイオ生産プロセスの最適化手法とスケールアップ実証手法の開発

2022 年度より、製品 A 生産菌を使った小スケールジャーでのテストを実施し、重要パラメータの抽出と定量化を行う。また、CFD ソフトウェアで確認しておいた商業生産規模と同等の混合性能となる 5L、30L 又は 300L のいずれかの発酵槽（スケールダウンモデル）を用いて、商業生産規模での生産性を把握する培養テストを行う。このテスト結果を踏まえつつ、3000L でのパイロット試験を行い、高性能 CFD ソフトウェア及びスケールダウンモデルの検証、高性能 CFD ソフトウェア・スケールダウンモデルを利用したバイオ生産プロセスの最適化手法とスケールアップ実証手法の検証を実施する。

CFD ソフトウェアの高度化については、気泡の形状、気泡径分布、表面張力、粘度等の把握のための計測・分析機器を設置し、製品 A 生産菌を使って、CFD での解析と同一条件での模擬培養槽あるいは実発酵槽での実培養条件下で気泡径、 kLa 、ガスホールドアップ、 $D0$ 、 pH 、糖濃度等の実測を行い、その実測結果をもとに、CFD ソフトウェアの改良を進める。

また、製品 A 生産菌によるバイオ生産プロセスの想定生産条件を用いて運転コスト簡易計算表により製造コストを試算し、試算結果による想定販売価格と想定市場価格の比較を行う。想定販売価格が想定市場価格を上回る場合には、計算表のうちコストの比重の高い要素を抽出し、上述のスケールダウンモデルにおけるバイオ生産の設定条件へ反映し、営利活動として商用化可能なプロセス開発を行う。

なお、計算表自体についても、バイオ生産プロセスの実用化の経験を有する事業者等の有識者の意見聴取を行い、改良を検討する方針である。

2023 年度以降は、2022 年度の開発結果を踏まえ、④ バイオ生産実証の生産実証案件を活用して、同様の開発内容にて検証データを蓄積し、スケールダウン手法を利用したバイオ生産プロセスの最適条件決定・スケールアップシステムの完成度を向上させていく。

開発項目 B：マイクロ波技術を使ったバイオ生産プロセスの低コスト化・省エネ化・低炭素化

本研究開発の最終目標は、バイオフィアウンドリ拠点に実装したマイクロ波設備で生産実証を運用し、その低コスト化、省エネ化、低炭素化を評価することである。2021 年度は、

3つの工程について、ラボレベルでマイクロ波の適用可能性について検証し、それを確認することができた。そのほか、例えばオレイルアルコール/イソブタノールの重量比99:1の系の蒸留検証においてはマイクロ波優位性が見られる等、マイクロ波利用により期待される効果も実験的に確認できた。

今後生産実証に向けて検討を行う技術について、技術面に加えてバイオフィアウンドリ事業における汎用性の観点から期待される効率が同じでもCO2排出量の低減効果がより高く、また、バイオフィアウンドリ拠点での検証でより多くの知見が得られることを鑑みた結果、培地滅菌プロセスの開発を継続していくことに決定した。本選考過程においては、バイオフィアウンドリ拠点に設置する装置の概要を含めて協議し、マイクロ波設備の実装並びにバイオ生産実証における運転・評価という最終目標の達成可能性がより高い培地滅菌を選択している。

開発項目C：バイオ生産プロセスに適合したLCAによるCO2排出量の算出モデルの構築

最終的な目標とするバイオ生産プロセスに関するCO2排出量の計算モデルは、本事業の生産実証で適用しながら改良を続けていく方針である。

2022年度においては、既に作成を開始している計算モデルのひな型（計算モデルの第一案）を基に、そのプロトタイプ版を策定し、3件のバイオ生産プロセスにて試行することでLCAの主要な要素選択等の課題を抽出する。

生産実証案件については④バイオ生産実証の案件のほか、2022年3月より公募を開始しており、必要な試行件数を確保できるものと考えている。なお、2023年度以降は当該課題を基に改良を行っていく予定である。

開発項目D：バイオマス残渣の前処理技術としての新加水分解技術の適用

全国に偏在するバイオマス残渣の賦存量について、本事業で活用できるレベルの統計やデータがないため、公的機関等とも協力し、さらに詳しく調査を進め、原料リストの充実を図る。前処理設備（新加水分解技術）の導入により、省エネルギー、低コストでのバイオマス残渣の前処理が可能となることが期待できるため、そのままでは利用が難しいものも有望なバイオリファイナリー原料としてリスト化が期待できる。

2023年度以降は、原料リストの充実に加えて、原料リストより商用化につき有望なバイオマス残渣について、前処理設備での加熱温度、処理時間等の処理条件を検討する。原料の調達是小桝屋と連携して行い、これらの資源を単独で、又は混合して利用することで、より事業性の高い前処理、糖化プロセスの検討を行う。

また、バイオ生産プロセスを得た後の発酵残渣を含む、飼料及び肥料としてバイオマス残渣の有用性評価も行っていく。

④バイオ生産実証

製品A

④バイオ生産実証の中で始めに取り組む製品Aは、③周辺技術開発・バイオフィアウンドリ機能検証で実施するバイオ生産プロセススケールアップのための各種開発のモデルケースとなる重要な案件である。2022年度は新設建屋の竣工前であるため、既設施設のバイオエ

ンジベンチ及びびかずきインキュベーションセンターの設備を利用して開発を進めるものとし、KHB や三井化学と議論を重ねたうえで実験計画を立て、適切なスケジュールを組む。

製品 A 生産性に影響を与える重要パラメータの特定には、CFD ソフトウェア及び DoE を活用することで実験数の削減、時間短縮を図る。概ね6ヶ月を予定しており、重要パラメータの種類によっては、さらに短期間で特定できる可能性もある。

商用生産用発酵槽の性能把握にはCFD解析及びスケールダウン実験が必要である。スケールダウン実験は概ね3ヶ月を予定しており、CFDでスケールダウンモデルを検討することで、タイムリーにスケールダウン実験を開始できるようにする。これらの成果を基に商用生産用発酵槽の性能を解析する。

また、新設建屋及び新設設備が完成し、3,000L 発酵槽（新設建屋に設置を予定する設備のうち、最大規模の発酵槽である。）を用いて製品 A のサンプル生産を開始する予定であり、新設建屋が予定とおり完成すれば、すべての最終目標達成が可能と考えている。

アルスロファクチン

2021 年度にフラスコで達成した生産性を維持したままジャーファーメンターへのスケールアップを実現することを目指しつつ、実生産時の課題となりうる起泡の問題の解決を図る。

スケールアップについては、フラスコで得られたデータを基に各条件を段階的なスケールに合わせて調整していくことで達成可能であると考えている。また、起泡の課題については、既に2つの対応策を考案し、実験にも着手しており、2022 年度中に解決できると見込んでいる。

⑤ バイオフィアウンドリ拠点を活用したものづくり人材の育成

2021 年度に、バイオフィアウンドリ拠点における人材育成のためのカリキュラムは概ね固まり、カリキュラムごとの講師に研修資料の作成を依頼している。

当初の計画では、2022 年度いっぱいかけて、研修資料の作成を完了する予定であったものの、資料作成作業の前倒しにより、2022 年秋に、最初の研修を実施できる見通しであり、人材育成プログラムの公募要領の作成を開始している。

(10) 成果の普及

バイオフィアウンドリ拠点が日本のバイオものづくりのプラットフォームとなるため、その活動と実績を広く知ってもらう必要があることから、適切な機会を活用して普及活動を実施する。特に2023年に入り新設建屋での活動が開始した後は、普及活動にも注力していく。

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	
2021	—	—	1	2	—	1	—
2022	—	—	—	2	—	6	—
PJ 期間 合計	—	—	1	2	—	7	—

注 2022年8月に講演1件（上表には含まれない。）を予定している。

(11) 知的財産権等の確保に向けた取り組み

本事業の開発により発生する知的財産としては、③周辺技術開発・バイオフィアウンドリ機能検証の各開発項目に関する発明、④バイオ生産実証で得られる実験データ、⑤バイオフィアウンドリ拠点を活用したものづくり人材の育成で作成予定の研修教材等を想定している。

これらの知的財産のうち、③の開発のなかで得られる発明については、新規性及び進歩性が認められる可能性が高いと判断されるものの特許出願を予定しており、既に1件について出願の準備を進めている。④の生産実証で得られる実験データの取扱いの方針は、運営委員会決定する予定である。また、⑤にて作成する人材育成のための教材については、NEDOと相談のうえ、著作権を含めた取扱いを決定する想定である。

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2021	—	—	—
2022	—	—	—
PJ 期間 合計	—	—	—

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

本事業では、2つの種類の実用化及び商用化を目指す。一つは、本事業で実施する生産実証案件の商用化であり、もう一つは、本バイオフィアウンドリ拠点で実施されるバイオ生産プロセスに関する各種機能及びサービスの実用化である。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

本事業で、バイオフィアウンドリ拠点においてスケールアップ開発に必要な各種設備を導入、法規制に則りこれらを運転可能な体制を整備のうえ、バイオ生産プロセスに関する各種機能及びサービスを開発、高度化、充実させることにより、本拠点で生産実証を行う案件が競争力のあるバイオ製品として商用化されるのと同時に、バイオ生産プロセスの開発の支援拠点としての魅力

が高まり、本拠点が、国内外のバイオ生産の商用化を目指す企業等が案件を持ち込む、バイオものづくりのプラットフォームとしての立場を確立することを目指す。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

- バイオフィアウンドリ拠点の核となる建屋を新設し、同建屋にバイオ生産プロセスを開発するために必要な設備をできる限り備え、様々な生産実証案件に対応できるようにする。
- 生産実証を実施可能な適切な情報管理体制を整える。
- 短期間に最適な条件を確立し、スケールアップできる拠点となるために、高度な CFD やスケールダウンモデルを開発する。
- 低コスト、省エネのバイオ生産プロセスを提示できる拠点となるために、マイクロ波技術や原料の新しい前処理技術等を開発、導入する。
- バイオ生産プロセスの商用化に必要と考えられる製造コスト試算や LCA による CO2 排出量算出等のサービスを提供できるようにする。
- 日本のバイオものづくりの基盤となる人材を育成する。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

本事業終了後、バイオフィアウンドリ拠点で生産実証を行った案件が年間 2 件以上、実用化及び商用化されることを見込む。同時にバイオフィアウンドリ拠点において、バイオ生産プロセスの開発支援サービスが年間 4 件以上、サンプル生産が年間 5 件以上、有機廃棄物評価サービスが年間 10 件以上提供されること並びに、年間 20 名以上のバイオ生産プロセスに関する知見を有する人材が輩出されることを見込む。

(12.5) 波及効果

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の内容に加えて、バイオフィアウンドリ拠点で生産実証を行い、商用レベルでの生産の最適条件が決まった案件について、自社で生産設備を有しない企業については、国内の発酵受託会社に委託をすることが想定される。また、国内において、様々な企業にバイオ生産プロセスに関する知見を有する人材が入ることで、日本全体のバイオ生産産業の底力が向上することが期待される。

3.2.1.4 P01「遺伝子組換え植物を利用した大規模有用物質生産システムの実証開発」
 (産業技術総合研究所、北海道大学、東京大学、鹿島建設株式会社、デンカ株式会社)

(1) 背景と目的

本研究開発は、基本計画：研究開発項目①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」に対して、
 研究項目①-1：新規宿主植物の研究開発（担当：国立研究開発法人 産業技術総合研究所）
 研究項目①-2：有用物質大量生産技術の研究開発（担当：国立大学法人 北海道大学）
 この二つの研究項目を設け、高効率に物質生産を可能とする新規宿主植物の研究開発を実施する。
 また、研究開発項目②：「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」に対して、
 研究項目②-1：植物栽培環境の制御技術の研究開発（担当：国立大学法人 東京大学）
 研究項目②-2：組換え植物体からの大規模有用物質抽出・精製システムの開発（担当：鹿島建設
 株式会社、国立研究開発法人 産業技術総合研究所）
 研究項目②-3：精製における有害因子を低減する技術開発（担当：デンカ株式会社）
 この三つの研究項目を設け、高効率・大規模生産プロセスを構築するための一貫通貫型、すなわ
 ち up-stream から、down-stream に至るまで新規の技術開発をシームレスに行うものである。



図 3.2.1.4-1 本研究開発テーマ全体の概要

以下に、各課題の背景と目的について記載する。

3.2.1.4-1. 新規宿主植物の研究開発（担当機関：国立研究開発法人 産業技術総合研究所）

遺伝子の一過性発現系において世界的に共通利用されている *N. benthamiana* を遺伝子操作により改変し、物質生産目的の新規植物を開発する。一過性発現時の目的遺伝子の発現に影響すると考えられる植物の機能に着目し、その機能にかかわる遺伝子について、RNAi による発現抑制、ゲノム編集によるロックアウト、あるいは過剰に発現する植物体を作成し、目的遺伝子が高発現する新規改変植物を開発する。

3.2.1.4-2. 有用物質大量生産技術の研究開発（担当：国立大学法人 北海道大学）

宿主植物のタンパク質 X を抑制することで、ウイルスベクターから発現する外来タンパク質を大量・安定生産する実証試験を行う。タンパク質 X を抑制することができれば、標的となっているウイルスベクターやそこから発現する有用タンパク質の蓄積量を増大させることが可能であると考えたからである。タンパク質 X および関連遺伝子をノックダウンまたはノックアウトすることでタンパク質 X 抑制プラットフォーム植物を作出する。ノックダウンは RNAi によって誘導する。さらには、CRISPR 系のゲノム編集技術によりタンパク質 X および関連遺伝子のノックアウト形質転換植物の作出を試み、シーケンスによって遺伝子が壊れていることを確認した後にこれを固定する。その後、ウイルスベクターに蛍光マーカータンパク質（GFP など）遺伝子を挿入し、上記で説明した形質転換植物に接種して、ターゲットタンパク質の発現量の評価を行う。

3.2.1.4-3. 植物栽培環境の制御技術の研究開発（担当機関：国立大学法人 東京大学）

本研究項目では、一過性遺伝子発現法の上流工程のうち、遺伝子導入前および導入後栽培の 2 つの工程を対象として、新たな環境制御により、上流工程全体でのエネルギー投入量あたり目的タンパク質生産量を従来法と比較して向上させる技術を開発する。一過性遺伝子発現法の中でも、外来遺伝子の導入にアグロバクテリウムを単独で用いるアグロインフィルトレーション法と、アグロバクテリウムと植物ウイルスの機能と組み合わせて用いるアグロインフェクション法（magnICON®ベクター）の 2 つの方法に特化した技術開発を行う。宿主植物には、上記の両法において共通基盤的に使用されている野生タバコ (*Nicotiana benthamiana*) を用いる。発現目的タンパク質には、緑色蛍光タンパク質（GFP）などのモデルタンパク質、サブユニットワクチンタンパク質、および抗体の、計 3 種類を用いる。

3.2.1.4-3. -(1) 短期間・大量バイオマス生産技術開発

植物工場における有用タンパク質生産のための植物生産では、移植作業を省略し、遺伝子導入のための減圧浸潤処理を自動化・ハイスループット化するために、上流工程から収穫まで一貫して高密度の栽培トレイを用いることが望ましく、そのような高密度での栽培系において短期間・大量バイオマス生産技術を確立する必要がある。

しかし、高密度栽培には、i) 高密度で栽培しても、一定の密度以上では栽培面積あたりのバイオマスが頭打ちとなる、ii) 高密度にすると、必要とする葉身のバイオマスだけでなく、茎や葉柄のバイオマスも増えてしまう、iii) 個体群内部の葉では、受光量の減少により、葉の有用タンパク質蓄積能力が低下する、という 3 つの解決すべき課題がある。

そこで、これらの問題点を解決するための方法として、光照射方法の改良および他の環境要素の制御と組み合わせた栽培技術を開発する。これにより、照射した光エネルギーあたりのバイオマス生産量が高まり、結果としてバイオマス生産に要する消費電力量削減効果も大きくなると考えられる。最終的に、遺伝子導入前栽培における総合的な環境制御のプロトコルを策定する。

3.2.1.4-3. -(2) 省エネルギー栽培技術開発

遺伝子導入後栽培において重要なことは、葉バイオマス中の有用タンパク質を、いかに省エネルギーで、大量に蓄積させるかにある。植物体内でのミクロな現象に着目すると、遺伝子導入後栽培の期間中に、植物細胞内では、遺伝子転移、遺伝子増幅、転写、生合成・分解などの生物学

的プロセスが（一部重複しながら）順次進行していると考えられる。これらのプロセスは、それぞれ環境に対して異なる応答性を有することが知られている。

これらのようなプロセス特異的な環境応答性をふまえると、遺伝子導入後栽培では、上述の各生物学的プロセスの環境応答性を考慮しながら、現在進行中の生物学的プロセスを好適に制御するよう、期間ごとに環境要素を異なる値に制御することが有効であるといえる。

そこで、本研究開発では、遺伝子導入後栽培において、環境条件を時間（hour）・日（day）の時間スケールで精緻に制御することで、一定水準の有用タンパク質生産量を担保しつつ、消費電力量を可能な限り削減することを目的とする。併せて、遺伝子転移と遺伝子増幅以降のそれぞれの期間ごとに、さまざまな環境制御を組み合わせることで、有用タンパク質生産効率の最大化を図る。

3.2.1.4-4. 組換え植物体からの大規模有用物質抽出・精製システムの開発（担当機関：鹿島建設株式会社、国立研究開発法人 産業技術総合研究所）

本研究項目では、(1)植物の高バイオマス化と遺伝子導入後の枯死率を低減させる新規水耕栽培技術の開発、(2)遺伝子導入後の植物バイオマスからの大規模抽出・精製の基盤システムの開発、および、(3)商業生産のための施設設計指針への統合、の3課題より構成される。

3.2.1.4-4. -(1) 植物の高バイオマス化と遺伝子導入後の枯死率を低減させる新規水耕栽培技術の開発（国立研究開発法人産業技術総合研究所）

現在、*N. benthamiana* の一過性発現系事業規模での栽培・生産は、土、もしくはロックウールを用いているが、これらは遺伝子組換え微生物に汚染されるため、再利用ができず、滅菌処理に必要な大量の土壌・産業廃棄物を生じさせている。これらのコスト、処理エネルギーを大幅に低減させるために、本研究では支持体を使用しない *N. benthamiana* の効率的な水耕栽培技術を開発する。すなわち、支持体を使用しない水耕栽培で *N. benthamiana* を栽培することで廃棄物量を削減し、かつ生育促進処理によって栽培期間を短縮して単位面積あたりの年間収穫量を向上させる。また、アグロバクテリウム浸漬処理後の *N. benthamiana* の葉では、アグロバクテリウム感染に伴う細胞死等によって目的タンパク質の生産量が抑えられていることが推測されるため、本研究項目ではバイオマス増産効果が期待される薬剤と枯死低減が期待される薬剤について検討する。

3.2.1.4-4. -(2) 組換え植物体の高効率大規模破碎・抽出システムの開発（鹿島建設株式会社）

本研究項目では、遺伝子導入植物体内にて発現させた目的タンパク質をパイロットプラントスケール（100 kg・植物体生重量/日以上と想定）の植物材料から短時間で高効率に回収するための抽出システムの開発として、破碎工程、清澄化・精密ろ過工程を研究開発対象としている。

破碎工程は植物組織内の目的タンパク質を効果的に抽出するために植物組織を破碎する工程である。これまでの一過性発現技術を利用した植物利用物質生産プロセスの実用化に向けた取り組みにおいて、実験室等の小規模なラボスケールでの精緻な人作業による破碎・抽出工程に対して大量破碎装置による処理は目的タンパク質の収率を低下させることが示唆された。そこで、抽出性能に直結する植物破碎パーツの開発を行い、運転条件の組み合わせにより、目的タンパク質を高効率に抽出できる破碎処理装置を開発する。

清澄化・精密濾過工程は、破碎処理によって得られた遺伝子組換え微生物を含む植物粗汁液を、後工程のカラム精製工程で要求される清澄度（細孔径 0.22 μm のフィルターを透過）となるように処理する工程である。実験室規模では高速遠心機や超高速遠心機を用いた遠心分離処理によって目標とする清澄度を容易に確保している。しかし、事業化を目的とした場合、これらの装置での大量処理は、装置の処理能力、コストの観点から事実上困難である。このため海外機関においては、フィルタープレスなどの方法で試行錯誤している状況であり、未だ世界的にもこの工程における効率的な手法は開発されていない。そこで、清澄化・精密濾過処理工程において、開発者らは植物の粗汁液からの清澄化・精密濾過における膜閉塞を軽減し、効率的な濾過処理を可能とするシステムを考案・構築する。まず、既存の種々のパラメーターを細かく設定可能な機器により、実際の植物材料を用いて清澄度レベルの検討を行い、関連データを蓄積する。次いで、得られたデータを基に仕様を決定し、これにより試作機を設計・製作し、実証することで大量清澄化・精密濾過装置の開発を行う。

3.2.1.4-4.-(3) 商業生産のための施設設計指針への統合

各研究項目の成果を統合し、パイロット生産スケールから大規模商業生産スケールに適應する施設エンジニアリングの事業化に向け、以下を行う。

- a) 作業工程及び物流工程の分析、ならびに各工程における原料・資材・成果物の物量等、運用システムの構築と施設の空間構成に必要な基礎データの取得、整理
- b) GMPやカルタヘナ法等、適合すべき関連規制・規格への対応方法、施設を構成する要素（室・設備・部材等）の抽出と、それらの関連性や各要素が満たすべき機能・性能・構造等、必要条件のリスト化
- c) 仮定生産量に基づき想定される施設規模によるモデル施設の試設計及びコストスタディ等による「組換え植物による有用物質一貫生産システムの施設設計指針」の策定と、具体的な適用例としての試作モデルシステムの構築

また、本研究項目において、各研究項目における消費エネルギーの低減に関する成果を統合し、LCA評価を行う。

なお、本実施項目は2020年度～2021年度の研究成果をもとに、2022年度より実施している。

3.2.1.4-5. 精製における有害因子を低減する技術開発（担当機関：デンカ株式会社）

本研究開発では、植物体 (*Nicotiana benthamiana*) からの目的タンパク質を精製する工程で問題となる有害因子を低減するための技術を開発する。

弊社では、植物一過性発現系の magnICON®システムを利用したタンパク質生産について研究開発を行っているが、精製工程で植物由来不純物に起因した問題に直面している。この問題は精製の様々な工程で見られ、最終的には精製コストの増加の要因となっている。原因となる物質は様々なものが想定されるため、以降は、これらを便宜上「有害因子」とする。

本研究項目では、3.2.1.4-5.-(1) 有害因子除去効果を付与した濾過技術と、3.2.1.4-5.-(2) 有害因子混入を低減するアポプラスト抽出技術の、2つのアプローチを実施する。3.2.1.4-5.-(1)では、有害因子を吸着除去するための素材を探索し精製プロセスに適應する。3.2.1.4-5.-(2)では、植物を破壊することなくタンパク質を抽出する手法を開発する。従来の破碎・固液分離によるタンパク質の抽出では、植物を破壊するため、有害因子の混入を避けることができな

い。有害因子は主に細胞内に局在しているため、従来の破碎・固液分離によりタンパク質を抽出する手法では、有害因子の混入を避けることができない。そこで、細胞膜の外側に位置するアポプラストに目的タンパク質を局在させ、さらに、細胞を破壊することなくアポプラスト液を回収することができれば、有害因子の混入を抑えて目的タンパク質を抽出することができると考えられる。

(2)位置づけ、目標値

研究項目 (担当機関)	位置づけ	中間目標値 (2022年度)	最終目標
新規宿主植物の研究開発 (産総研)	一過性発現系による物質生産のために関与する特定の遺伝子を操作する宿主植物の改変は実施報告がほとんど無い。	遺伝子操作した植物体の作出を終了、特定物質の蓄積量などを指標に評価選抜した個体において、導入遺伝子の発現量が3倍以上に発現増加する個体を見出す。	2種類の機構を標的として作成した作成した遺伝子操作植物体をベースに両方の形質を持つ植物体を作成する。これらの系統を用いて、目的物質の発現量が5倍以上に上昇する新規宿主植物を見出す。
有用物質大量生産技術の研究開発 (北大)	物質生産のために細胞内タンパク質 X 遺伝子を操作する宿主植物の改変は実施報告が無い。	タンパク質 X-KD 及びタンパク質 X-KO 植物において、CMV ベクターから発現するタンパク質の蓄積レベルを2倍以上にする。	作出したタンパク質 X 抑制さらにはタンパク質 X 活性化遺伝子も抑制した植物に、CMV ベクターを接種した時、発現するターゲットタンパク質の蓄積レベルが、非形質転換体に比較して4倍以上である。
植物栽培環境の制御技術の研究開発 (東大)	一過性発現系による物質生産量の向上を狙った栽培技術開発において、省エネに着眼した技術は確立されていない。	遺伝子導入前栽培における単位時間・単位栽培面積あたりのバイオマス生産量を、従来法と比較して向上させる。同量の目的タンパク質を生産するのに必要な、遺伝子導入後栽培での消費電力量を、従来法と比較して削減する。	上流工程全体でのエネルギー投入量あたり目的タンパク質生産量を、従来法と比較して向上させる。

<p>組換え植物体からの大規模有用物質抽出・精製システムの開発（鹿島建設、産総研）</p> <p>(1) 植物の高バイオマス化と遺伝子導入後の枯死率を低減させる新規水耕栽培技術の開発（産総研）</p> <p>(2) 組換え植物体の高効率大規模破碎・抽出システムの開発（鹿島建設）</p> <p>(3) 商業生産のための施設設計指針への統合（鹿島建設）</p>	<p>(1) 世界の大規模生産施設における単位面積あたり年間収穫量の最大値の30%増しを中間目標、更に30%増しを最終目標とした。</p> <p>(2)および(3)パイロットスケールで植物体から目的タンパク質を短時間で高効率に回収するための一貫システムが確立されていない。</p>	<p>(1) 世界の大規模生産施設における単位面積あたり年間収穫量の最大値の30%増しを目指す。アグロインフィルトレーション処理1週間後の枯死した面積を100%とし、2.5%分枯死を抑制する。</p> <p>(2) 初年度実績よりも目的タンパク収率3割向上及び処理速度30 kg・植物FW/h以上の一貫システムの開発を行う。</p> <p>(3) 施設設計指針に必要な諸条件、LCA対象項目をリスト化する。</p>	<p>(1) 世界の大規模生産施設における単位面積あたり年間収穫量の最大値の30%増しを中間目標、更に30%増しを最終目標。アグロインフィルトレーション処理1週間後の枯死した面積を100%とし、5%分枯死を抑制する。</p> <p>(2) 初年度実績よりも目的タンパク収率3割向上及び処理速度30 kg・植物FW/h以上の一貫システムの開発を行う。</p> <p>(3) 施設設計指針に必要な諸条件、LCA対象項目をリスト化する。</p>
<p>精製における有害因子を低減する技術開発（デンカ）</p> <p>(1) 有害因子除去効果を付与した濾過技術 (2) 有害因子混入を低減するアポプラスト抽出技術</p>	<p>パイロットスケールで植物体から目的タンパク質を精製する工程での有害因子を低減するための技術は確立されていない。</p>	<p>(1) 有害因子を吸着除去する素材を使った濾過処理により、従来の清澄化技術と同等の有害因子除去効果を達成する。</p> <p>(2) 試作した小型機を使って目的タンパク質を抽出し、従来の清澄化技術と同等の有害因子低減効果を達成する。</p>	<p>(1) 数十キログラムバイオマスを処理する条件で、有害因子を吸着除去する素材を使った濾過処理により、従来の清澄化技術の5倍の有害因子除去効果を達成する。</p> <p>(2) 試作したパイロット機を使い、数十キログラムバイオマスを処理する条件で、目的タンパク質を抽出し、従来の清澄化技術の5倍の有害因子低減効果を達成する。</p>

(3) 全体計画

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

事業項目	2020	2021				2022				2023	2024
	年度	年度				年度				年度	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		
研究項目①-1:新 規宿主植物の研究 開発											
① -1-(1):新規抑制 植物の開発	VIGS法により候補遺伝子を1つ以上選抜 *1	→	→	→	→	→	→	→	→		
① -1-(2):新規阻害 植物の開発	*2	*3	*3	*4	*5	*5	*6	*7	*8	*8	*9
	VIGS法により候補遺伝子を1つ以上選抜							目的タンパク質の一過性発現量を3倍以上増加			

- *1 抑制用ベクターを1つ以上，ゲノム編集用ベクターを1つ以上構築
- *2 抑制用ベクターおよび高発現ベクターを1つ以上，ゲノム編集用ベクターを1つ以上構築
- *3 再分化を開始
- *4 抑制または高発現組換え体においては、最低10系統以上得る。ゲノム編集個体においては、再分化当代個体（30個体以上）からゲノム編集個体の選抜を開始
- *5 有望系統の選抜
- *6 有望系統の選抜終了
- *7 目的タンパク質の一過性発現量を3倍以上増加
- *8 抑制系等を融合させた遺伝子組換え系統を作出
- *9 2種類の機構を標的として作成した遺伝子操作植物体をベースに、両者を融合した植物体を作出

事業項目	2020 年度				2021 年度				2022 年度				2023 年度	2024 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		
研究項目①-2:有用物質大量生産技術の研究開発（北大）	タンパク質 X 抑制でウイルスベクター蓄積が上昇することを確認する				ノックダウン及びノックアウトタンパク質 X 遺伝子を有する植物を作出す				CMV ベクターから発現するタンパク質の発現量を非形質転換体に比べて2倍以上にする					
	→				→				→					
				*1	*2	*3	*4	*5	*6	*7	*8			

*各四半期の目標:

- *1: タンパク質 X-KD およびタンパク質 X-KO 用のベクター構築完了
- *2: タンパク質 X-KD ベクターによる *N. benthamiana* の形質転換
- *3: タンパク質 X-KO ベクターによる *N. benthamiana* の形質転換
- *4: 作成中のタンパク質 X-KD 及びタンパク質 X-KO 形質転換体について、前者では、タンパク質 X 遺伝子の発現抑制、及び後者では、ゲノム編集による変異を確認
- *5: タンパク質 X-KD 形質転換体を 3 ライン以上選抜
- *6: タンパク質 X-KO 形質転換体を 3 ライン以上選抜
- *7: タンパク質 X-KD 及びタンパク質 X-KO 形質転換体の性状解析及び CMV ベクターから発現するタンパク質の発現解析と条件検討
- *8: CMV ベクターから発現するタンパク質の発現量を非形質転換体に比べて 2 倍以上にする

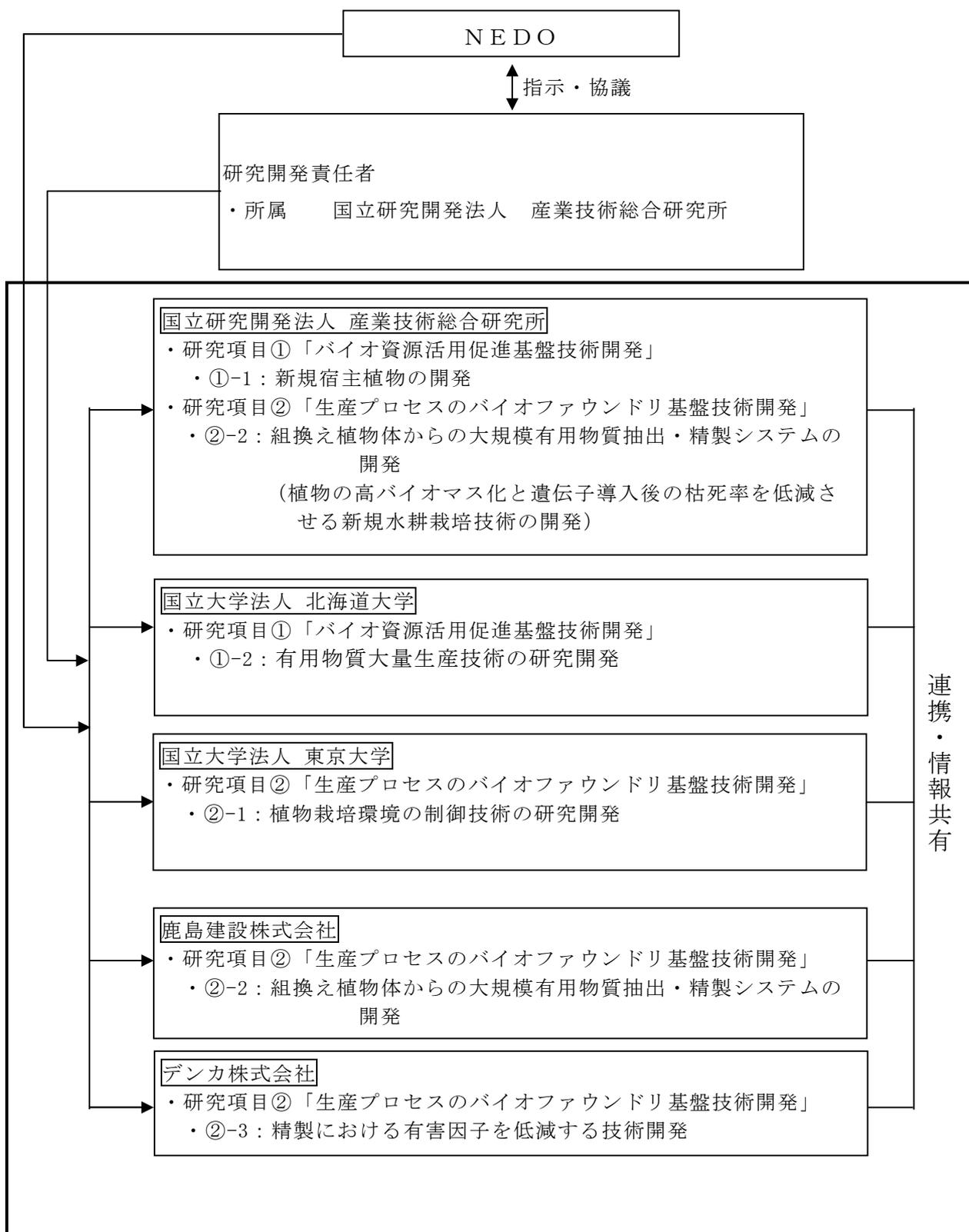
事業項目	2020	2021				2022				2023	2024
	年度	年度				年度				年度	年度
		第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期		
研究項目②-1:植物栽培 環境の制御技術の研究 開発 ②-1-(1): 短期間・大量バイオマス 生産技術開発	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content;"> 単位時間・単位栽培 面積あたりのバイオマ ス生産量を、従来法と 比較して向上できる光 照射処理を1つ以上 提示 </div>			<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content;"> 光照射処理2つ 以上の、従来法 との比較を完了 </div>							
②-1-(2): 省エネルギー栽培技術開 発	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content;"> 従来法と同量の目的 タンパク質を、消費電 力量を削減して生産し うる新たな環境制御法 候補を2つ以上考案 </div>			<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content;"> 環境制御法2つ 以上の、従来法 との比較を完了 </div>				<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content;"> 目的タンパク質量あた り消費電力量削減（従 来法比） </div>			
		*1	*2	*3	*4	*9	*10	*11	*12		
		*5	*6	*7	*8	*13	*14	*15	*16		

- *1, *2, *3 : 光照射処理の改良・効果検証、閉鎖型植物生産システム整備
- *4 : 光照射処理2つ以上の、従来法との比較を完了
- *5, *6 : 光照射処理の改良
- *7 : 1種めのタンパク質で、光照射処理2つ以上の、従来法との比較を完了
- *8 : 他の目的タンパク質の発現・定量法確立
- *9, *10, *11 : 光照射処理最適化検討、閉鎖型植物生産システム整備・検証
- *12 : バイオマス生産量15%以上向上（従来法比）
- *13, *14, *15 : 2, 3種めのタンパク質を対象として環境制御法改良
- *16 : 目的タンパク質量あたり消費電力量15%以上削減（従来法比）

事業項目	2020	2021				2022				2023	2024
	年度	年度				年度				年度	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		
研究項目②-3:精製 における有害因子を低減する技術開発											
②-3-(1):有害因子除去効果を付与した濾過技術											
②-3-(2):有害因子混入を低減するアポプラスト抽出技術											

- *1, *2 : 素材3種類を対象に有害因子の吸着・除去による濾過性への影響を確認する
- *3, *4 : 有望な素材または素材3種を対象に、有害因子の吸着・除去条件を検討し、有望な素材を選択する。
- *5, *6, *7, *8 : アポプラスト抽出法のバッファー成分の条件等を検討して最適条件を設定する。本結果を踏まえ小型抽出機を試作する。
- *9, *10, *11, *12 : 候補素材の形状・官能基の種類や反応条件を検討して最適条件を設定する。
- *13, *14, *15, *16 : 小型抽出機で抽出条件を検討して最適条件を設定する。本結果を踏まえ問題点を解決した、又は、スケールアップした抽出機を試作する。

(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。

令和2年10月 8日	個別会議	(デンカ株式会社主催、産総研)
令和3年10月14-16日	個別会議	(北海道大学、産総研) バイオジャパン会場
令和2年11月20日	全体会議	(産総研主催 5機関)
令和3年 3月30日	個別会議	(東京大学主催、産総研)
令和3年 4月 6日	個別会議	(デンカ株式会社主催、産総研)
令和3年 4月14日	個別会議	(鹿島建設株式会社主催 産総研)
令和3年 6月 4日	全体会議	(デンカ株式会社主催 5機関)
令和3年 9月21日	全体会議	(産総研主催) Web 会議
令和3年10月13-15日	個別会議	(東京大学、鹿島建設株式会社、産総研) バイオジャパン会場
令和3年12月 2日	全体会議	(東京大学主催 5機関)
令和4年 4月12日	全体会議	(産総研主催 Web 会議 5機関)
令和4年 5月30-31日	全体会議	(北海道大学主催 5機関)

<産総研-鹿島建設株式会社 Web 会議>

令和2年 8月18日	個別会議	(産総研、鹿島建設株式会社) Web 会議
令和2年 8月31日	個別会議	(産総研、鹿島建設株式会社) Web 会議
令和3年 4月20日	個別会議	(産総研、鹿島建設株式会社) Web 会議
令和3年 4月26日	個別会議	(産総研、鹿島建設株式会社) Web 会議
令和3年 5月20日	個別会議	(産総研、鹿島建設株式会社) Web 会議
令和3年 6月 1日	個別会議	(産総研、鹿島建設株式会社) Web 会議
令和3年 6月17日	個別会議	(産総研、鹿島建設株式会社) Web 会議
令和3年 9月 1日	個別会議	(産総研、鹿島建設株式会社) Web 会議
令和3年10月11日	個別会議	(産総研、鹿島建設株式会社) Web 会議
令和4年 3月 1日	個別会議	(産総研、鹿島建設株式会社) Web 会議

<デンカ株式会社-鹿島建設株式会社 teams 会議>

令和4年 2月 1日	個別会議	(鹿島建設株式会社主催、デンカ株式会社) Web 会議
------------	------	-----------------------------

(6) 実施の効果

タンパク質 1kg を哺乳類細胞培養生産系で生産した場合の CO₂ 排出量は、21,333 トン、植物生産系で生産した場合は、9.797 トンと試算される。従って、本研究開発の目標達成により、国内の哺乳類培養系で生産されるタンパク質販売重量の3%を植物系で代替生産した場合、CO₂ 排出量を年間 116.2 万トン削減可能と推算する。

2030 年度におけるバイオ医薬品等関連の国内市場規模は、3.3 兆円※と推定される。診断薬市場において、例えば本課題で開発予定の CRP 検査試薬 (抗体) の市場の場合 36 億円、ワクチン市場においては、インフルエンザワクチン (抗原) 市場の場合 400 億円と予測される。

遺伝子組換え技術を利用した植物体を原料とした目的タンパク質生産に関する市場規模は、2030 年度におけるバイオ医薬品等関連の市場の3% が遺伝子組換え植物工場での生産に置き換え

られると想定した場合の製品の売上高が、約 990 億円/年に達すると推測される。目的タンパク質を生産するための「遺伝子組換え植物工場」の市場規模については、事業者の利益見込み及び投資回収期間から推測すると、2030 年までの設備投資規模は 1,980 億円程度と推定される。

※) 「バイオ戦略ロードマップ市場領域⑥ バイオ医薬・再生医療・細胞治療・遺伝子治療関連産業について」(2021 年 4 月 内閣府)

(7) 中間目標の達成度

研究項目 (担当機関)	中間目標の達成度
新規宿主植物の研究開発 (産総研)	△ (○ 2022 年度達成見込み) モデル遺伝子の発現レベルを 3 倍以上に増加可能な植物体候補を予備的実験で得たが、さらに発現増加可能な組換え植物体・ゲノム編集植物体を選抜中。
有用物質大量生産技術の研究開発 (北大)	○ モデル遺伝子の発現レベルを 2 倍以上にできた。
植物栽培環境の制御技術の研究開発 (東大)	◎ 「遺伝子導入前栽培におけるバイオマス生産量を向上」に対して、目標を達成した。 「目的タンパク質生産量あたり遺伝子導入後栽培での消費電力量を削減」に対して、目標を達成した。
組換え植物体からの大規模有用物質抽出・精製システムの開発 (鹿島建設、産総研)	△ (○ 2022 年度達成見込み) (産総研) バイオマスについては目標値を大きく超えて達成した。枯死抑制については現状では目標値未達だが、予備的データに目標値を超えるものがあり現在確認を進めており今年度達成見込みである。 △ (○ 2022 年度達成見込み) (鹿島建設) 破碎処理システムでは、目的タンパク質の抽出効率が初年度条件より 2.4 倍まで高くなり、中間目標値の 1.3 倍を大幅に上回った。 清澄化・精密濾過システムでは、パイロットプラントスケール (30 kg FW/h 以上の処理速度) の精密濾過システム試作機の設計・製作・改造を行った。 商業生産のための施設設計指針では、各成果を統合するために、工程フロー案ならびに動線、エリア区分等を考慮したブロックプラン作成に着手した。
精製における有害因子を低減する技術開発 (デンカ株式会社)	○ 有害因子除去効果を付与した濾過技術に対して、目標とする有害因子除去効果を確認した。有害因子混入を低減するアポプラスト抽出技術に対して、目標とする有害因子混入抑制効果を確認した。

(8) 研究開発の成果と意義

3.2.1.4.1 新規宿主植物の研究開発（担当機関：国立研究開発法人 産業技術総合研究所）

一過性発現系における目的タンパク質の生産量を増加させるために、A 遺伝子に着目し、この遺伝子に対し、RNAi による発現抑制、およびゲノム編集によるノックアウトを試みることにした。A 遺伝子の発現抑制組換え植物体の作出を行うために、RNAi 誘導配列（400bp）を導入した植物発現用ベクターを構築した。このベクターを用いてアグロバクテリウムを形質転換し、*N. benthamiana* のリーフディスクに感染後、再分化を行って組換え体を作成した。Genomic PCR 解析を行ったところ、127 系統で遺伝子導入が確認された。次に、これらの植物体に対し A 遺伝子の mRNA レベルを定量的 RT-PCR を用いて解析した結果、野生型植物体(WT)に比較して、A 遺伝子の発現が 10%以下に抑制した組換え植物体を 18 系統得た。

A 遺伝子のノックアウト組換え植物体（ゲノム編集個体）の作出を行うために、ゲノム編集のターゲット領域として、ガイド RNA を設計し、3 種類のゲノム編集用ベクターを作製した。これらを用いて、組換え植物体の作出を行ったところ、ベクターが導入された組換え植物体を 123 系統得た。これらのゲノム編集候補植物体（T0 個体）に対し、次世代シーケンス (NGS) 解析によるターゲット領域の変異解析を実施したところ、変異（フレームシフトを伴う挿入、欠失変異等）が確認された系統を 35 系統得た。現在は、次世代種子の採取、変異がホモで導入された個体の作出を進めている。

N. benthamiana ゲノム上には、B 遺伝子の相同遺伝子が複数存在することが BLAST 解析により明らかになった。そこで、複数の B 遺伝子の mRNA を同時にターゲット可能な RNAi 誘導配列（157bp）を導入した植物発現用ベクターを構築した。これをアグロバクテリウムに形質転換し、*N. benthamiana* のリーフディスクに感染させて再分化を誘導して組換え体を作成した。Genomic PCR 解析を行ったところ、42 系統で遺伝子導入が確認された。次に、B 遺伝子の mRNA レベルを定量的 RT-PCR で解析した結果、野生型植物体(WT)に比較して、B 遺伝子の発現が 10%以下に抑制した組換え植物体を 24 系統得た。

N. benthamiana ゲノム上には、C 遺伝子が 2 種類存在することが BLAST 解析により明らかになった。そこで、C 遺伝子のノックアウト組換え植物体（ゲノム編集個体）の作出のために、ゲノム編集のターゲット領域として、ガイド RNA を設計し、3 種類のゲノム編集用ベクターを作製した。これらを用いて、組換え植物体の作出を行ったところ、ベクターが導入された組換え植物体を 78 系統得た。これらのゲノム編集候補植物体（T0 個体）に対し、NGS 解析によるターゲット領域の変異解析を実施したところ、変異（フレームシフトを伴う挿入、欠失変異等）が確認された系統を 38 系統得た。現在は、次世代種子の採取、変異がホモで導入された個体の作出を進めている。

D 遺伝子（約 1400bp）を恒常的に発現できる植物発現用ベクターを構築し、アグロバクテリウムを用いたリーフディスク法で組換え体の作出を行った。作出した組換え体の Genomic PCR 解析を行ったところ、39 系統で遺伝子導入が確認された。次に、D 遺伝子のタンパク発現量を検討するため、特異的抗体を用いてウエスタンブロット解析を行い、D 遺伝子のタンパク発現が認められる組換え個体を 22 系統得た。

これらの組換え植物体・ゲノム編集植物体の詳細については(表 3.2.1.4.1-1)に示した。

表 3.2.1.4.1-1 組換え植物体・ゲノム編集植物体（候補）の作出系統数と genomic PCR 解析結果

標的遺伝子	作出方法	組織培養数	genomic PCR解析
		発根系統数	遺伝子導入系統数/解析系統数
A	ノックダウン (RNAi)	136	127/136
	ノックアウト (ゲノム編集)	219	123/219
B	ノックダウン (RNAi)	46	42/46
C	ノックアウト (ゲノム編集)	127	78/127
D	過剰発現	46	39/46

本課題において作出された組換え植物体・ゲノム編集植物体は、現在主流となっている一過性発現系を使用するうえで、従来の野生型植物体による発現と比較して高効率な物質生産が期待される。

3.2.1.4.2 有用物質大量生産技術の研究開発（担当機関：国立大学法人 北海道大学）

本研究項目の目標は、宿主植物のタンパク質 X を抑制することで、感染させたウイルスベクターの増殖量および生産される外来有用タンパク質の蓄積量を増大させることである。これまでに作出したタンパク質 X 抑制植物にウイルスベクターを感染させ、発現する有用タンパク質の蓄積量を 2 倍以上に上げることができた。本研究項目で標的としている 4 つのタンパク質 X および関連遺伝子は、タンパク質 X の実行に必須であり、これらのタンパク質 X および関連遺伝子をノックダウン (KD) もしくはノックアウト (KO) することでタンパク質 X が抑制され、タンパク質 X の標的となっていたウイルスベクターや有用タンパク質の蓄積量を増大させることが出来たと考えられる。これにより本研究戦略が正しいことを例証することができた。タンパク質 X 抑制植物を用いることで有用タンパク質の生産コスト、エネルギー、CO₂ 排出量の抑制への貢献が期待できる。

2020 年度は、想定通りタンパク質 X 抑制によりウイルスベクターの蓄積量が向上することを 4 つのタンパク質 X および関連遺伝子をウイルス誘導型 RNA サイレンシングによりそれぞれノックダウン (KD) することで証明した。4 つ全てのタンパク質 X 及び関連遺伝子の KD でウイルスベクターの蓄積量が向上したことから、2021 年度からこれら 4 遺伝子の KD 及び 2 つのタンパク質 X 及び関連遺伝子のノックアウト (KO) 植物の作出に着手した。KD と KO には、RNAi と CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用いた。タンパク質 X 抑制により生育や稔性に著しい影響がある場合に備えて、一過的に RNAi を誘導するために誘導プロモーターも用いた。これまでに標的とした 4 つ全てのタンパク質 X および関連遺伝子に対する KD および KO 植物を作出することが出来、最終的にそれぞれ 3 系統以上のタンパク質 X-KD およびタンパク質 X-KO 植物を得られる見込みである。

テーマ間連携については、産総研で作出した改変植物と我々のタンパク質 X-KD/KO 植物と交配することで多重抑制植物を作製する。この植物に、ウイルスベクターを接種することで、ウイルスから発現する有用タンパク質の蓄積レベルが、最終目標である非形質転換体に比較して 4 倍以上に出来るものと期待している。

3.2.1.4.3 植物栽培環境の制御技術の研究開発（担当機関：国立大学法人 東京大学）

本研究項目では、一過性遺伝子発現法の上流工程のうち、遺伝子導入前および導入後栽培の 2 つの工程を対象として、新たな環境制御により、上流工程全体でのエネルギー投入量あたり目的タンパク質生産量を向上させる技術を開発する。宿主植物には、上記の両法において共通基盤的に使用されている野生タバコ (*Nicotiana benthamiana*) を用いる。「(1) 短期間・大量バイオマス生産技術開発」では、遺伝子導入前の工程を対象として、新規の環境制御法を開発する。「(2) 省エネルギー栽培技術開発」では、遺伝子導入後の工程を対象として、環境条件を時間 (hour) ・日 (day) の時間スケールで精緻に制御することで、一定水準の有用タンパク質生産量を担保しつつ、消費電力量を可能な限り削減することを目的とする。

3.2.1.4-3-(1) 短期間・大量バイオマス生産技術開発

光照射処理の光強度および照射期間の影響

まず、自作の小型白色 LED パネルを用いて、光照射処理の光強度および照射期間の影響を検討した。対象植物には *N. benthamiana* を用いた。培地にはロックウールを用い、培養液を用いて養液栽培した。播種後 35 日目の生育調査の結果から、有効な光照射処理の強度および照射期間を判断した。

種々の光源を用いた光照射処理の効果の検証

自作の小型白色 LED パネルに加えて、種々の光源を用いて、光照射処理の効果を検証した。播種後 35 日目の生育調査の結果に基づき、対照区に対する、処理区的全葉の乾物重増加率、および消費電力量あたり乾物生産量の増加率を算出した。これらの結果から、いずれの光源を用いた場合でも、光照射処理により、対照区と比較して、乾物重、消費電力量あたり乾物生産量をともに増加できることが明らかとなった。

種々の条件における光照射処理の効果の検証

種々の条件における光照射処理の効果を検証した。光照射処理の期間は播種後 28~35 日目とした。播種後 35 日目の生育調査の結果に基づき、対照区に対する、全葉の乾物重増加率、および消費電力量あたり乾物生産量の増加率を算出した。光照射処理を行なった一部の区では、対照区と比較して、乾物重、消費電力量あたり乾物生産量がともに増加した。他方、別の光照射処理を行なった場合には、対照区と比較して、乾物重は増加したが、消費電力量あたり乾物生産量には顕著な効果は認められなかった。今後は、光源について再検討し、あらためて検証を行う。

光照射処理と他の環境制御の組み合わせの検証

光照射処理に加えて、他の環境制御を組み合わせることで行うことの効果を検証した。栽植密度の異なる複数の区を用意した。播種後 35 日目の生育調査の結果に基づき、対照区に対する、全葉の乾物重増加率、および消費電力量あたり乾物生産量の増加率を算出した。特に栽植密度の高い条件において、光照射処理と他の環境制御の組み合わせにより、乾物重増加率および消費電力量あたり乾物生産量の増加率が高くなる傾向にあった。

減圧浸潤前後の光照射処理が生育および有用タンパク質生産量に及ぼす影響

遺伝子導入のための減圧浸潤処理の前および後の光照射処理し、収穫時の生育および有用タンパク質生産量に及ぼす影響を調査した。播種後 35 日目に、magnICON ベクターを用いたアグロインフュクション法により、インフルエンザワクチンタンパク質であるヘマグルチニン (HA) の遺伝子を導入し、42 日目に収穫した。減圧浸潤前および後の光照射処理は、それぞれ播種後 28～35 日目および 35～42 日目に行なった。収穫時の栽培面積あたり葉乾物重は、減圧浸潤前後に光照射処理した処理区で最も高く、次いで減圧浸潤前にのみ光照射処理した処理区で高かった。他方、収穫時の栽培面積あたり HA 収量は、減圧浸潤前後もしくは減圧浸潤後にのみ光照射処理した処理区で高い傾向にあった。この結果から、減圧浸潤前のみならず、減圧浸潤後にも光照射処理を行うことが有効である可能性が示唆された。

高密度の個体群を対象とした、遺伝子導入前の光照射処理の効果を検証した。光照射処理により、従来法よりも、乾物重、消費電力量あたり乾物生産量ともに増加させることができた。今後より詳細な検討を進める。

3.2.1.4-3.-(2) 省エネルギー栽培技術開発

減圧浸潤後前期の環境の影響

播種後 35 日目まで *N. benthamiana* を栽培した。播種後 35 日目に、magnICON ベクターを用いたアグロインフュクション法により HA 遺伝子を導入した。減圧浸潤後の環境を変えた 4 処理区を設けた。減圧浸潤後 3 日目に qPCR 法により HA 遺伝子および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (*RdRP*) 遺伝子の mRNA 量を、減圧浸潤後 6 日目に葉生体重あたり HA 含量を測定した。減圧浸潤後 6 日目の葉 HA 含量は、ある処理区においてその他の処理区より高かった。他方、減圧浸潤後 3 日目の *RdRP* 遺伝子の mRNA 量は、同じある処理区で高い傾向にあったものの、HA 遺伝子の mRNA 量には処理区間に明確な差は認められなかった。減圧浸潤後 6 日目の葉 HA 含量の処理区間の差は、翻訳、翻訳語修飾、またはタンパク質分解等の過程に関わるものと推察される。

減圧浸潤後後期の環境の影響

播種後 35 日目に HA 遺伝子を導入した。減圧浸潤後後期の環境をさまざまなパターンに設定した。減圧浸潤後 7 日目に、生育および葉 HA 含量を調査した。葉 HA 含量、葉生体重、および株あたり HA 生産量には、処理区間に有意な差は認められなかった。減圧浸潤後の消費電力量を用いて計算した HA 生産量あたり消費電力量は、ある処理区で、対照区より低かった。このことから、減圧浸潤後後期の環境制御は、HA 生産に要する減圧浸潤後の消費電力量削減に効果的であることがわかった。

減圧浸潤後の特定タイミングでの環境条件の影響

減圧浸潤後の特定タイミングでの環境条件が目的タンパク質含量に及ぼす影響を調査した。播種後 35 日目に HA 遺伝子を導入した。減圧浸潤後 7 日目に、生育および葉 HA 含量を調査した。その結果から、減圧浸潤後の特定タイミングでの環境条件が、葉 HA 含量を低下させないために特に重要であることがわかった。

緑色蛍光タンパク質（GFP）を用いた、減圧浸潤後後期の環境の影響の検証

上記の HA を用いた実験で得られた結果が、HA 以外の目的タンパク質にも適用しうるものであるかどうかを検証するため、GFP を用いた実験を行なった。減圧浸潤後後期の環境制御は、減圧浸潤後 7 日目の葉 GFP 含量および株あたりの GFP 生産量には顕著な低下をもたらさず、GFP 生産量あたり消費電力量は対照区より低かった。このことから、減圧浸潤後後期の環境制御による消費電力量削減の効果は、HA のみならず GFP でも認められることが確認された。

遺伝子導入後の環境制御の影響を検証した。サブユニットワクチンタンパク質（インフルエンザ HA）および緑色蛍光タンパク質（GFP）について、減圧浸潤後後期（収穫前数日）の環境制御が、目的タンパク質の生産量を顕著に減少させることなく、消費電力量削減の可能性を示し、減圧浸潤後における目的タンパク質生産量あたり消費電力量を低減させることができた。このような結果は、世界的にも実証例がないレベルのものである。抗体、およびアグロインフィルトレーション法における効果について、今後検証を進める。

3.2.1.4.4 組換え植物体からの大規模有用物質抽出・精製システムの開発（担当機関：鹿島建設株式会社、国立研究開発法人 産業技術総合研究所）

3.2.1.4-4-(1) 植物の高バイオマス化と遺伝子導入後の枯死率を低減させる新規水耕栽培技術の開発（産総研）

本研究項目では水耕養液に薬剤を添加して感染用植物を効率よく栽培する高バイオマス水耕栽培技術と感染後植物の葉の枯死を抑制する方法を開発する。一過性発現を利用する海外の植物工場では培養土や人工支持体を使用するケースが多いが、本研究開発では支持体を使用せず *N. benthamiana* を水耕栽培することで廃棄物量を削減する。さらに水耕養液に薬剤を添加する生育促進処理により単位面積あたりの年間収穫量（バイオマス）向上を目指している。これまでに 12 種類の薬剤を水耕養液に個別添加する方法を検討し、薬剤無添加と比較してバイオマスが 23%増加する方法を見出した。アグロインフィルトレーション処理後の葉では感染に伴う細胞死等によって目的タンパク質の生産量が抑えられていることが推測される。薬剤処理により感染後の葉の枯死率低減技術の開発を目指しており、これまでに 5 種類の薬剤について検討して枯死率を 1.1%抑制（中間目標は 2.5%抑制）する方法を見出した。

高バイオマス水耕栽培

最初に完全人工環境の栽培室において *N. benthamiana* を水耕栽培する基本的栽培方法を検討した。実用化を想定して大量のアグロインフィルトレーション処理が容易、かつ廃棄物削減のためにセルトレイを用いて支持体を使用しない方法で栽培することとし、栽植密度と播種方法、養液濃度を同時に比較した。その結果セルトレイあたり地上部新鮮重量が約 2 倍に増加し、本条件が基本的水耕栽培方法として適当であると判断した。続いて水耕養液への薬剤添加によりバイオマスを増加する方法を検討した。薬剤濃度は 4 段階あるいは 5 段階設定し、水耕養液にもともと含まれている成分の場合は、添加量と合算した濃度を表示した。これまでに 12 種類の薬剤を水耕養液に個別添加する方法が地上部新鮮重量に及ぼす影響を検討した。その結果薬剤 A 添加で 23%増加、薬剤 B 添加で 18%増加、薬剤 C 添加で 15%増加、薬剤 D および E 添加で 12%増加したこ

とが示された。今後はバイオマス増加効果が期待される別の薬剤について検討するほか、複数薬剤の組合せ効果について検討し、より効果的な栽培方法を開発予定である。

枯死抑制

上記薬剤添加栽培に準じた方法で *N. benthamiana* を栽培し、セルトレイごとアグロインフィルトレーションに供した。アグロバクテリウムは GFP または抗体を発現するベクターを保持した株を使用し、薬剤処理は水耕栽培液への添加あるいはアグロバクテリウム懸濁液へ添加する方法で実施した。薬剤濃度は3段階あるいは4段階設定し、基本的栽培方法に準じて栽培し、インフィルトレーション1週間後あるいは10日後の葉の枯死割合を比較した。感染葉の枯死割合は葉身の写真から汎用ソフトウェアを用いて算出した。薬剤 F を添加したところ、インフィルトレーション1週間後に葉の枯死率が 1.1 %減少したことが確認された。また予備的データではあるが 5.6%の枯死抑制効果がある別の薬剤を見出しており現在確認を進めている。今後は更に高い枯死抑制効果を目指し新たな薬剤について検討するほか、複数薬剤の組合せ効果についても検討する。

3.2.1.4-4.-(2) 組換え植物体の高効率大規模破碎・抽出システムの開発（鹿島建設）

遺伝子導入植物体内にて発現させた目的タンパク質をパイロットプラントスケールの植物材料から短時間で高効率に回収するための抽出システムの開発を目的として以下を実施した。

本工程は、（i）植物材料の破碎処理→（ii）破碎液の固液分離/清澄化処理→（iii）精密濾過処理の3種類の処理システムで構成した（図3.2.1.4.4-1）。



図3.2.1.4.4-1：本項目における開発対象工程

破碎処理システムの検討

パイロットプラントスケールの破碎処理が可能な破碎処理方法として、事前調査・予備実験を通じて、2種を候補装置として選定した。

N. benthamiana を供試材料とし、サンプルに加えるバッファー条件、両装置の回転数や処理時間を検討し、破碎条件がタンパク質抽出効率に及ぼす影響について調査した。破碎液中の総可溶性タンパク質濃度が最大になる条件を解明した（図3.2.1.4.4-2）。

これらの知見をもとに現在、目的タンパク質として抗体を候補として、最適破碎条件を検証中である。

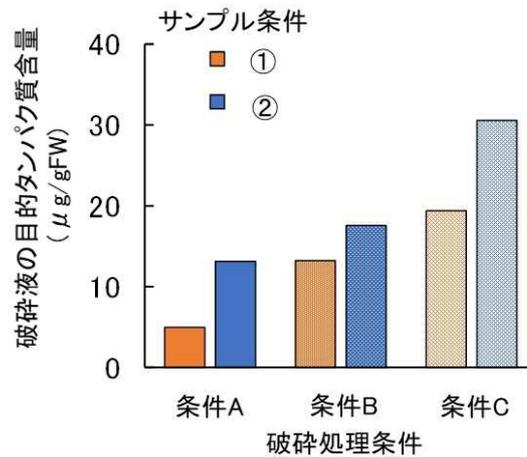


図 3.2.1.4.4-2 : 破砕処理条件が破砕液中の目的タンパク質含量に及ぼす影響

清澄化処理システムの検討

前工程で得られる破砕液は、植物組織等の固形分粒子を大量に含有しており、精密濾過処理工程で持続的な濾過運転ができなくなる。このため、精密濾過運転の処理効率向上及びフィルターの長寿命化のためには、清澄化処理によって固形分粒子をできる限り除去した事前濾過液を精密濾過処理に供試する必要がある。

そこで、清澄化のためのシステムとして 4 種類の処理方法を選定し、事前実験を通じて固形分粒子除去性能、ろ過液回収率、連続処理の観点から、連続バッチ処理が可能な方式を採用した。その清澄化処理では、破砕時の処理条件と事前濾過液の清澄度の相関を明らかにした。さらに、植物粗破砕液の圧送を可能とする供給ポンプの変更、ならびに、遺伝子組換え体に対する不活化を目的とした装置内部の殺菌剤充填可能な装置改造を行った。

精密濾過処理システムの検討

パイロットプラントスケールでの清澄化・精密濾過処理の能力を有する試作機を設計するために、既存の卓上精密濾過実験装置を用いて、ラボスケールのデータを収集した。得られたデータを基に、パイロットプラントスケールの処理目標である植物 30 kg (+バッファー 30 L) を 1 時間で処理するために必要な仕様を決定し、大型試作機のベース装置を設計、製作した。さらに、処理効率の向上および高価な精密濾過フィルターの寿命を延ばすことを目的とした装置の改造を行った。

3.2.1.4-4.-(3) 商業生産のための施設設計指針への統合 (鹿島建設株式会社)

- ・ 工程フロー案ならびに動線、エリア区分などを考慮したブロックプラン作成に着手した。

3.2.1.4.5 精製における有害因子を低減する技術開発 (担当機関: デンカ株式会社)

3.2.1.4.5.-(1) 有害因子除去効果を付与した濾過技術

有害因子を吸着する素材を探索するため、50 種類の素材を対象に、葉の抽出液を素材で処理し、処理液の澄明性向上、色味低減、濾過効率向上を指標に、有害因子除去効果を評価した。その結果、4 種の素材で有効性が認められた。これら 4 種の素材による有害因子除去の最大効果の

見込みを確認するため、4種の素材を組み合わせた処理について、これまでの検討結果をもとに暫定的に条件を設定し、素材処理の効果を評価した。ターゲットタンパク質を発現させた葉を破碎・固液分離して調製した抽出液を、素材処理した結果、処理後の液は濾過性及び澄清性が向上し、色味はほぼ無色となった（図 3.2.1.4.5-1）。さらに、本処理液を Ni カラムに供し、精製への影響を評価した結果、カラムレジンの吸着効率と再使用性が向上し、精製コスト削減の効果を確認した。今後、本処理をスケールアップ精製工程へ適応しながら有害因子除去効果を最適化していく。

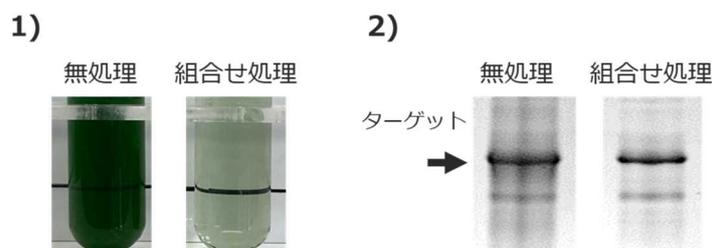


図 3.2.1.4.5-1 4種の素材の組合せ処理の評価結果
 1) 素材処理および無処理の抽出液の写真撮影画像
 2) 素材処理および無処理の抽出液の SDS-PAGE の画像。

3.2.1.4.5.-(2) 有害因子混入を低減するアポプラスト抽出技術

ラボスケールにおいて、様々な条件でタンパク質の抽出を試みた結果、植物を破壊することとなるターゲットタンパク質を優先的に抽出する手法を見いだした（図 3.2.1.4.5-2）。従来の破碎を伴う方法（①）に対し、本方法（②）では、物由来のタンパク質の混入は極めて少なく、色味も大幅に低減できることを確認した。

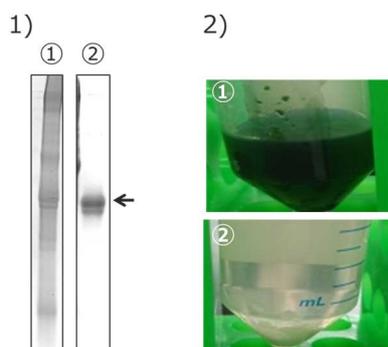


図 3.2.1.4.5-2 タンパク質抽出の評価結果
 1) 抽出液の SDS-PAGE の画像 2) 抽出液の写真撮影画像
 ①：破碎抽出法により調製した抽出液
 ②：開発中の手法により調製した抽出液
 * 矢印 (←) はターゲットタンパク質のバンド

本方法を実用化するための装置開発初期検討として、0.1 kg バイオマスを処理可能な専用装置を試作し、様々なタンパク質の抽出を検討した。各種条件の最適化により、ラボスケールと同等の抽出を達成した。本検討結果を踏まえ、さらにスケールアップした装置を試作した。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

最終目標の達成に向けて、これまでに開発した研究項目①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」、研究項目②「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」を融合し、宿主植物の作出・生産の up-stream から down-stream に至るまで、これまでの未開発の一貫した工程を実現できる基盤技術を開発を進める。以下に、各課題の詳細について記載する。

研究項目（担当機関）	現状	最終目標	達成見通し
新規宿主植物の研究開発（産総研）	過年度作出に着手した遺伝子組換え体の有望系統の選抜中	2種類の機構を標的として作製した遺伝子操作植物体をベースに、両方の形質を持つ植物体を作成する。これらの系統を用いて、目的物質の発現量が5倍以上に上昇する新規宿主植物を見出す。	○
有用物質大量生産技術の研究開発（北大）	過年度作出に着手したタンパク質 X および関連遺伝子のノックダウン (KD)・ノックアウト (KO) 遺伝子組換え体の有望系統の選抜中	作出したタンパク質 X 抑制さらにはタンパク質 X 活性化遺伝子も抑制した植物に、CMV ベクターを接種した時、発現するターゲットタンパク質の蓄積レベルが、非形質転換体に比較して4倍以上である。	○
植物栽培環境の制御技術の研究開発（東大）	遺伝子導入前の消費電力量あたりバイオマス生産量、および遺伝子導入後の消費電力量あたり有用タンパク質生産量の、さらなる増加に取り組んでいる。	上流工程全体でのエネルギー投入量あたり目的タンパク質生産量を、従来法と比較して向上させる。	○
組換え植物体からの大規模有用物質抽出・精製システムの開発（鹿島建設、産総研）	(1) 薬剤添加による高バイオマス栽培および感染後植物の枯死抑制方法の開発に取り組んでいる。 (2) タンパク質抽出効率の高い条件を決定した。また、パイロットプラントスケールの精密濾過システム試作機を製作した。 (3) 工程フロー案ならびに動線、エリア区分などを	(1) 世界の大規模生産施設における単位面積あたり年間収穫量の最大値の30%増しを中間目標、最終目標は更に30%増しを目指す。アグロインフィルトレーション処理1週間後の枯死した面積を100%とし、5%分枯死を抑制する。 (2) 初年度実績よりも目的タンパク収率3割向上及び処理速度30kg・植物FW/h以上の一貫システムの開発を行う。	○

	考慮したブロックプラン作成に着手した。	(3) 施設設計指針に必要な諸条件、LCA 対象項目をリスト化する。	
精製における有害因子を低減する技術開発（デンカ）	(1) 有害因子の除去に有望な 4 種の素材を用いた処理技術のスケールアップを検討中。 (2) アポプラスト抽出のための装置開発及び処理条件を検討中。	(1) 数十キログラムバイオマスを処理する条件で、有害因子を吸着除去する素材を使った濾過処理により、従来の清澄化技術の 5 倍の有害因子除去効果を達成する。 (2) 試作したパイロット機を使い、数十キログラムバイオマスを処理する条件で、目的タンパク質を抽出し、従来の清澄化技術の 5 倍の有害因子低減効果を達成する。	○

(10) 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	
2020	0	0	0	1	0	0	0
2021	0	0	2	0	2	0	0
2022	1+ (2)	0	(3)	0	(3)	0	0
PJ 期間 合計	1+ (2)	0	2+ (3)	1	2+ (3)	0	0

(見込値)

(11) 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
2020	1	0	1
2021	0	0	0
2022	(4)	5	(1)
PJ 期間 合計	1+ (4)	5	1+ (1)

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

本プロジェクトでは、所属機関の知財ポリシーに従い、開発技術要素毎に特許取得を行った後、実用化に供することを想定している。一方で、事業規模レベルの有用物質生産システムの開発を行うために、各過程における研究項目の成果を統合し、最も生産効率の良いシステムを構築することを想定している。従って、事業化のためには、これらの各技術をシステム実証拠点で集約し、最終的に得られた原材料をデンカ株式会社で製品化し販売する。加えて、この一貫工程過程で得られた実証データを基に、当該システムを核とした生産施設・システムのエンジニアリング事業を鹿島建設株式会社が展開していく。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

研究項目 3.2.1.4.1（産業技術総合研究所）および 3.2.1.4.2（北海道大学）においては、物質生産効率を強化した宿主植物の開発を実施しており、当該技術の知財化を期間内に進め、ライセンスによる技術供与を実施していく。具体的には、開発された宿主植物の種子によるライセンスないしは有償提供による実用化、もしくは事業化を目指す企業との共同研究から事業化への展開を行う。

研究項目 3.2.1.4.3（東京大学）および 3.2.1.4.4-1（産業技術総合研究所）で開発される栽培方法及び栽培環境制御技術については、特許出願またはノウハウ化を行い、速やかに知財化する。その後、本提案の共同研究体制内での活用を含めて、企業との共同研究により事業化・実用化を目指す。また、学術論文や学会で成果を公表し、広く社会に周知することで、ライセンスを通じた社会実装を行う。

研究項目 3.2.1.4.4-2（鹿島建設株式会社）においては、「遺伝子組換え植物工場」のトータルエンジニアリング（建屋と内部の生産システムの一括受注）を提供することで、成果の社会実装を推進する。プロジェクト期間内もしくは終了直後には、上記成果の国内外における知的財産を確保することを想定しており、海外企業等へは当該設計・構造等々のライセンスも事業化の対象としている。

研究項目 3.2.1.4.5（デンカ株式会社）においては、成果を速やかに知財するとともに、本委託事業で建設したパイロット検証施設を活用し、実証実験を経て、デンカ株式会社の製品である体外診断用医薬品の原料タンパク質として実製造へ適用することを目指す。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

本プロジェクトで開発した技術の社会実装のために、知財調査を行い、特許出願やノウハウ化に努め、学会発表はもとより、バイオビジネスにおけるパートナーリングイベントを活用することで、積極的に対外的発信や情報交換を行い、国内外の企業にライセンス契約による実用化を働きかけている。

産業技術総合研究所・北海道大学で取り組んでいる、新規に開発された宿主植物の種子においては、種子そのものがライセンス契約等により提供可能なため、それを踏まえたマテリアルの管理を行うと共に、特許出願に向けた準備を進めている。また、鹿島建設株式会社においては、国内外の遺伝子組換え植物工場での有用物質生産を計画する事業者に対して施設受注につなげてい

けるよう、ホームページ、各種関連イベントやセミナーなどを通じて PR を進め、成果を知財化し、施設受注における競争優位性を高めるほか、ライセンス販売が可能な体制を整えている。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

本プロジェクトでは、現在、研究成果の知財化を最優先として取り組んでいる。特許出願前の案件は、十分な PR 活動に至っていないが、今後のプロジェクトの進捗に伴い、積極的に学会およびマッチングイベントに参加し、新規開発技術を社会へ浸透できるように取り組んでいく。産総研においては、開発した技術成果を基に遺伝子組換え植物による医薬品製造において共同研究先企業と実用化に成功した実績を有しており、これらの経験も生かして実用化へ結び付けていくことが期待できる。鹿島建設株式会社においては、遺伝子組換え植物工場に関するトータルエンジニアリングについて多数の実績も有しており、その建設に必要なソリューションを保有する唯一のプロバイダーとしての企業である。今後、拡大が予想される該当市場において大きなシェアを確保することが可能である。デンカ株式会社においては、世界トップクラスの植物一過性発現によるタンパク質生産用ベクターを有しており、本委託事業にて開発した技術との組み合わせによるコスト削減効果が実製造へつながることが期待できる。

(12.5) 波及効果

植物を用いた一過性発現系による有用タンパク質生産において、日本国内では、宿主改変から大規模抽出精製まで一貫した大規模植物生産の開発は、本研究以外は、世界的にもこれまで皆無であり、これまでに開発された世界的な技術と比較して、日本独自のより高効率・高精度な技術レベルに達することが期待される。一気通貫で生産プロセスを検証し評価サンプルを創出できるバイオ生産システム基盤の構築とその周辺技術の社会実装により、医薬品原材料等の生産のみならず、食品関連施設や化粧品関連施設等への適用が可能となる。植物によるワクチン抗原・治療用抗体等の生産システムは、国内におけるパンデミックなど世界的な緊急課題解決のためにも貢献が期待される。カーボンニュートラル実現に向けた国内企業における脱炭素への取組みが注目される中、これまでの哺乳動物細胞培養によるタンパク質生産を植物系で代替生産した場合のCO₂排出削減率は大きく、新規産業創出が期待される。

3.2.2.1.1 JM01「大腸菌発酵による酸化型グルタチオン高生産技術の開発」(株式会社カネカ)

(1)背景と目的

世界の人口は、2000年の61億人から、2020年には77億人と増加し、2050年には98億人まで増加することが予想されている。これに比例して、穀物需要も増加していくことが予測されている。一方で世界の耕作面積は1960年から15%弱しか増加していないのが実情である。従って、単位面積当たりの食糧生産性の向上が重要な社会課題となっている。

1960年代には、緑の革命によって大幅な食糧増産を達成した。しかしながら、この増産は化学肥料や化学農薬に大きく依存したものであった。その結果、土壌、水、大気が過剰な養分や農薬によって汚染され、生物多様性と気候に悪影響をもたらすことが明らかになってきた。これを受け、持続可能な食糧生産の実現に向けて、近年、各国で化学肥料や化学農薬の低減に向けた指針が定められつつある。我が国においても2021年に「みどりの食料システム戦略」が策定され、2030年までに化学肥料使用量の30%削減が目標となっている。このような背景を受け、環境にやさしい農業が求められる中、バイオスティミュラントが注目を集めている。バイオスティミュラントとは、植物に刺激を与え、高温、低温、強光、低日照、乾燥、湿害といった非生物的ストレスに対する抵抗性を誘導することで、非生物的ストレスに起因する収量減少を軽減する新しいタイプの農業資材である。一般に、非生物的ストレスは収量を最大30%減少させると言われている。昨今、食糧生産に対する気候変動の影響が世界的な問題となる中、バイオスティミュラントへの期待は今後ますます大きくなることが予想される。

このような社会課題に対するソリューションとして、株式会社カネカは、バイオスティミュラントの一種である酸化型グルタチオン(GSSG)に着目し、研究開発を行ってきた。現在、GSSGを含む肥料製剤を、カネカペプチド®、カネカファーティライザー™として上市している。実圃場での安定した増収効果が高く評価され、てんさい、馬鈴薯、玉ねぎなどを対象に市場拡大を進めている。一方で、グルタチオンは医薬品として利用されてきた経緯もあって価格が高く、今後の利用拡大に向けては、コストダウンが強く求められる。そこで、本事業ではスマートセルテクノロジーを活用することで、圧倒的に安価なGSSG革新製法を構築することを目的とする。

(2)位置づけ、目標値

本研究開発では、既存の酵母発酵法に対して、圧倒的な価格競争力を持ち得る大腸菌発酵技術の確立を目指している。開発目標を達成した場合に基づく、GSSGの想定価格を算出し、本研究開発におけるGSSG培養生産性の最終目標値を設定した。生産性を向上するため、GSSG高生産菌株の育種、およびGSSG高生産培養技術の構築を技術目標とした。

(3)全体計画

スマートセルテクノロジーを活用することにより、菌株育種期間、および培養技術構築期間を短縮し、以下の①～⑤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 GSSG生産性向上因子の探索
- ② GSSG高生産培養技術の構築
- ③ 代謝最適化育種
- ④ 培養スケールアップ検討
- ⑤ GSSG原末試作品取得

表 3.2.2.1.1-1 全体計画

事業項目	2021 年度				2022 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
①GSSG 生産性向上因子の探索		GSSG 生産性向上因子候補の探索				育種～培養評価		
②GSSG 高生産培養技術の構築		高生産培養技術構築のためのデータ取得				有効性評価		
③代謝最適化育種			代謝律速の特定			育種～培養評価		
④培養スケールアップ検討			スケールアップ試験 1 回目			スケールアップ試験 2 回目		
⑤GSSG 原末試作品取得						試作品取得		

(4) 実施体制

GSSG 高生産株の育種、および GSSG 高生産培養技術の開発にあたり、目標値の達成に必要な技術を選出した。株式会社カネカが主体となり、神戸大学と大阪大学との共同研究体制を構築し、スマートセルテクノロジーを活用しながら研究開発を実施した。



図 3.2.2.1.1-1 実施体制図

(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。必要に応じて、プロジェクトリーダー、サブプロジェクトリーダー、プロジェクトマネージャーから、株式会社カネカ・神戸大・大阪大への指導・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、各共同研究先と株式会社カネカとの研究成果から相乗効果を得るために、株式会社カネカ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、スマートセルテクノロジー活用による菌株育種の効率化、培養技術の高度化により、株式会社カネカがこれまで開発してきた技術と相乗効果を発揮し、革新的な GSSG 発酵生産技術を確立する。本研究開発で得られた成果をベースとした製造技術の社会実装を目指し、GSSG コストダウンを通じて、世界中に GSSG の利用を拡大することで、持続可能な食糧生産の実現、およびバイオエコノミー原料となるバイオマスの供給強化を通じて、持続可能社会の実現に貢献する

(7) 中間目標の達成度

表 3.2.2.1.1-2 中間目標の達成度

研究項目	目標	成果	達成度
① GSSG 生産性向上因子の探索	GSSG 生産性向上因子を特定する	スマートセルテクノロジーを活用して GSSG 生産性向上因子を探索するための技術基盤準備が完了した。	○
② GSSG 高生産培養技術の構築	流加制御処方を最適化することにより GSSG 培養生産性を最大化できる培養技術を構築する。	GSSG 培養生産における流加成分 X の細胞内での動態を明らかにすることができた	○
③ 代謝最適化育種	GSSG 発酵生産における代謝律速を特定し、高生産菌株育種を加速する。	メタボローム解析やトランスクリプトーム解析、及びそれらデータを元にした代謝シミュレーションによって、成分 Y が細胞内外に著量蓄積することを明らかにした。この結果から、代謝律速を特定し、その解消に向けた育種開発に着手した。	○
④ 培養スケールアップ検討	GSSG 発酵技術の工業化を見据え、培養スケールアップでの問題有無を検証する。	菌株 Z を用いて培養スケールアップ検討を行い、所定量の培養槽において問題なく培養が実施できることを確認した。	○
⑤ GSSG 原末試作品取得	既存の酵母発酵法の既存原末と同等品質であること。	GSSG 培養液から GSSG 原末試作品を生産し、てんさい、馬鈴薯、玉ねぎなどで増収効果などの品質を確認する予定。	(○)

達成度 ◎：大きく上回って達成、○：達成、△：概ね達成、×：未達、（）：見込み

(8) 研究開発の成果と意義

研究項目①： GSSG 生産性向上因子の探索

- ・ スマートセルテクノロジーを活用して、生産性向上に寄与する遺伝子改変をハイスループットに検証することで、GSSG 生産性向上因子を特定する。
- ・ 2021 年度成果として、GSSG 生産性向上因子を探索するための技術基盤整備が完了した。

研究項目②： GSSG 高生産培養技術の構築

- ・ GSSG 培養生産における流加基質成分 X について、流加制御処方を最適化することにより、GSSG 培養生産性を最大化できる培養技術を構築する。
- ・ 2021 年度成果として、流加成分 X の細胞内での動態を明らかにすることができた。

研究項目③： 代謝最適化育種

- ・ メタボローム解析やトランスクリプトーム解析、及びそれらデータを元にした代謝シミュレーションによって、GSSG 発酵生産における代謝律速を特定し、高生産株育種を加速する。
- ・ 2021 年度成果として、成分 Y が細胞内外に著量蓄積することを明らかにした。この結果から、代謝律速を特定し、その解消に向けた育種開発に着手した。

研究項目④： 培養スケールアップ検討

- ・ GSSG 発酵技術の工業化を見据え、培養スケールアップ検討を行う。
- ・ 2021 年度、菌株 Z を用いて培養スケールアップ検討を行い、所定量の培養槽において問題なく培養が実施できることを確認した。

研究項目⑤： GSSG 原末試作品取得

- ・ GSSG 培養液から、GSSG 原末試作品を生産し、既存原末と同等品質であることを確認する。
- ・ 2021 年度は実施なし。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

研究項目①～④はいずれも計画通りに達成できていることから、研究項目⑤を含めて、最終目標についても計画通り達成できると見込んでいる。

(10) 成果の普及

表 3.2.2.1.1-3 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	
2021	0	0	1	0	0	0	0
2022	0	0	0 (1)	0	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	2	0	0	0	0

(1) は 2022 年度見込み

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

表 3.2.2.1.1-4 特許出願実績

年度	特許出願		
	国内	外国	P C T
2021	0	0	2
2022	0 (2)	0	0
PJ 期間 合計	2	0	2

(1) は 2022 年度見込み

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

本プロジェクトで構築した GSSG 高生産菌株、及び GSSG 高生産培養技術について、早期に生産プロセスに実装する。生産した GSSG 原末を肥料製剤に加工して販売する。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

株式会社カネカは、カネカペプチド®、カネカファーティライザー™等の肥料製剤を既に上市しており、実圃場での有効性評価、及び市場開発を進めている。本プロジェクトで開発した GSSG 革新製法は、早期に生産プロセスに実装し、事業に貢献する。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

事業性については、既にカネカペプチド®、カネカファーティライザー™等の肥料製剤の販売数量を元に判断することを想定している。開発した GSSG 革新製法の実用化については、プロジェクト終了後に実装に向けた諸検討を継続しつつ、市場ニーズに応じて適切なタイミングで実装できるよう進めていく予定である。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

既にカネカペプチド®、カネカファーティライザー™等の肥料製剤について、国内外で販売を開始しており、使用頂いた生産者からも圃場での安定した効能を高く評価頂いている。今後引き続き市場開発を進める予定である。

(12.5) 波及効果

本プロジェクトにて開発した大腸菌での基盤技術は、他の発酵生産ターゲットにも適用できる可能性があることから、バイオものづくり全般への波及効果が期待できる。

3.2.2.1.2 JM02「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固定を利用した重要なカーボンリサイクルプロセスである。

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。

バイオポリマーの原料である「バイオモノマー」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きたが、これらは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、また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。

(3)全体計画

微生物発酵生産技術の開発と並行してスケールアップ検討を進める。単離精製についても技術構築およびスケールアップ検討を進める。

(4) 実施体制

東レ株式会社が主体となり、産業総合技術研究所と共同研究体制を構築し、研究開発を実施した。

(5) 運営管理

共同研究先と進捗報告会議を定期的に行き、テーマ推進や課題へのアプローチについて議論をした。

(6) 実施の効果

本研究開発では、東レがこれまで培ってきた技術をさらに高め、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) 中間目標の達成度

実用化に適した微生物の開発およびプロセス改良に取り組んだ。それらの成果としてポリアミド原料の生産性を2倍以上に向上させ、世界最高の生産性を実現すると共に単離精製技術の構築およびスケールアップ検討を進め、中間目標を達成した。

(8) 研究開発の成果と意義

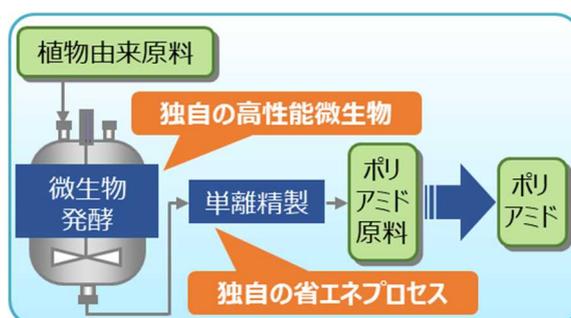


図 3.2.2.1.2-1 ポリアミド原料製造プロセス

① 高生産微生物株を用いた発酵生産技術の開発

実用化に適した微生物の開発および発酵生産プロセスの改良に産総研と共同で行った。それらの成果としてポリアミド原料の生産性を2倍以上に向上させ、世界最高の生産性を実現した。

② 省エネ型単離精製プロセスの構築

東レの強みである膜分離技術を活用した省エネ型単離精製プロセスを構築し、目的物を高収率で取り出すことに成功した。

③ 微生物発酵・単離精製プロセスのスケールアップ

東レ保有設備を用いた微生物発酵および単離精製プロセスのスケールアップ検討を進めた。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

東レが保有する独自の高生能微生物を用いた微生物発酵生産プロセスにおいて、これまでの自社開発成果やスマートセル PJ 成果を活用することで短期間の生産性向上が期待でき、単離精製プロセスと共に今後さらなる改良を進めることで目標の達成が見込める。スケールアップについても計画通り検討が進んでおり、全ての成果を統合することで最終目標を達成可能であると見込んでいる。

(10) 成果の普及

BioJapan2021 での NEDO ブース出展にあたっての刊行物作成に参加した。

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

特許は権利範囲の広さや他社牽制力を総合的に勘案して出願の是非を決定し、ノウハウに関わる情報は秘匿し、実用化に向けた競争力の強化を図る。

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

本プロジェクトにおける実用化とは、従来化石資源より製造されていたポリマーを植物由来原料から製造するための技術を構築し、バイオポリマー製品を市場に投入することである。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

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。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組み

本事業の終了後も事業化に向けた検討を進め、基本生産技術を確立する。並行して事業化フィージビリティスタディを高い精度で実施し、量産化判断が可能な状態を目指す。

(12.4) 成果の実用化・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、事業化フェーズ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。

(12.5) 波及効果

本事業で開発するバイオ由来ポリアミド原料の製造技術が実用化できれば、日本経済への貢献として、工場建設に伴う設備投資および雇用創出、販売および技術ライセンスによる利益創出、バイオエコノミー関連の技術波及などが見込める。

3.2.2.1.3 JM03 「天然ヒト型長鎖セラミド高効率生産システムの開発と実証」
 (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、バリアの機能を有する成分はセラミドだけであり化粧品素材として注目を集めている。「ヒト型セラミド」は化粧品素材として使用されているが、現状は化学合成で生産されたヒト型セラミドである。また、「天然セラミド」として用いられるセラミドは、植物由来のグルコシルセラミドが主であり本申請で対象とする天然ヒト型セラミドとは異なる構造をしている。本開発のセラミドは、醤油麹菌を用いた発酵法により生産されるものであって「天然」で且つ「ヒト型」のセラミドであり、しかも、保湿効果の高い長鎖の脂肪酸を有するセラミド AP とセラミド NP より成る希少な「天然ヒト型長鎖セラミド」である (図 3.2.2.1.3-1)。本開発の目的は、天然ヒト型長鎖セラミドをマーケットニーズに対応し十分な供給能力を確保することにある。

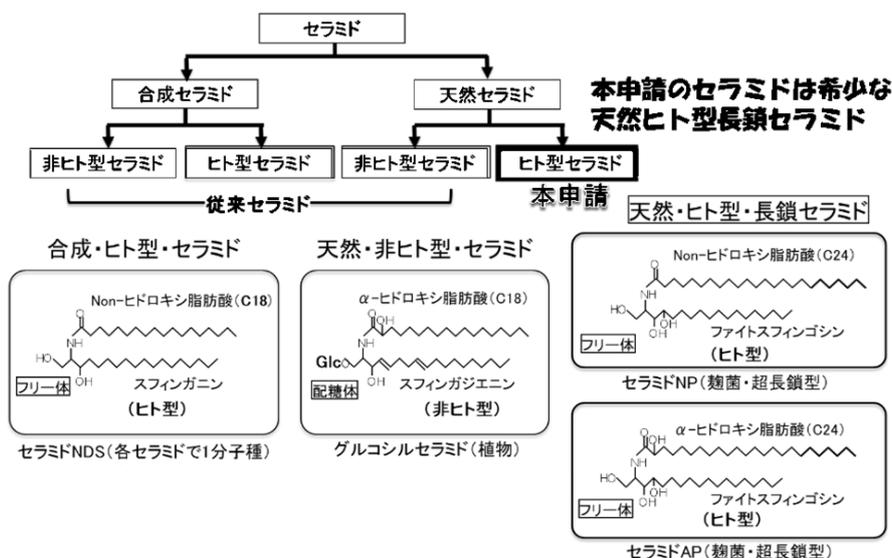


図 3.2.2.1.3-1 本開発の天然ヒト型長鎖セラミドと市販のセラミドの関係

(2)位置づけ、目標値

天然ヒト型長鎖セラミドの対象マーケットとする化粧品の国内市場は、新型コロナウイルスの感染拡大の影響を受け、インバウンド需要の急激な消失や外出自粛によるメイクアップ機会の低下などにより 2020 年の市場規模は 2 兆 5,948 億円と前年比で 7.8%の落ち込みが見込まれる (富士経済)。しかし、その原因は人流の停滞に有り、新型コロナ感染症が収束し経済活動が活発化すると共に需要が喚起されるものと考えている。スキンケア市場は化粧品市場の約半分(1 兆 1,802 億円)を占める。セラミドは保湿成分として注目の素材であるが、本研究の天然ヒト型長鎖セラミドと競合するセラミドとの比較を表 3.2.2.1.3-1 にまとめた。天然ヒト型長鎖セラミドは、分子種がヒト角質層のセラミドと同じであること、保湿機能において競合品に比べ同等以上であり、コスト面において、同じ天然物由来のグルコシルセラミドに勝る。

表 3.2.2.1.3-1 ヒト型長鎖セラミドの競合品との比較

	【本研究】 天然ヒト型 長鎖セラミド	【競合品 A】 合成 ヒト型セラミド	【競合品 B】 天然 非ヒト型セラミド (グルコシルセラミド)
分子種 (ヒト型)	◎	○	×
機能(保湿)	◎	○	○
純度	◎	◎	×
コスト	○	◎	×

最終目標値：

天然ヒト型長鎖セラミド生産性を向上させた実用株を育種するとともに、菌糸の伸長に伴いバルブ状となる培地に対応し、諸条件を最適化することで生産に掛かる時間を短縮する。麹菌発酵法では高額な培養設備が設備投資の多くを占めるが、本開発の高効率生産システムによりこれを最小化し従来の醤油粕抽出法に比べも製造コストを削減する。

中間目標値：

・2021 年度 天然ヒト型長鎖セラミド発酵前期工程において、生産時間を短縮するため、フラックスバランス解析 (FBA) や遺伝子発現ネットワーク解析などにより標的遺伝子を同定する。麹菌の発酵前期条件を最適化するため、5L 培養装置を用いて諸条件が天然ヒト型長鎖セラミド生産に与える影響についてデータ収集する。また、抽出条件を麹菌体に対して最適化するため、諸条件が天然ヒト型長鎖セラミド抽出率に与える影響についてデータ収集する。

・2022 年度 前年度に同定した遺伝子の組合せ遺伝子改変麹菌 (実用株) を作成し目標としている生産性を達成する。実用株の 5L 培養装置を用いて菌糸の伸長に伴いバルブ状となった培地の最適な発酵前期条件を設定する。天然ヒト型長鎖セラミドの抽出工程では引き続き抽出条件が抽出率に与える影響についてデータを収集し、その他諸条件を設定する。

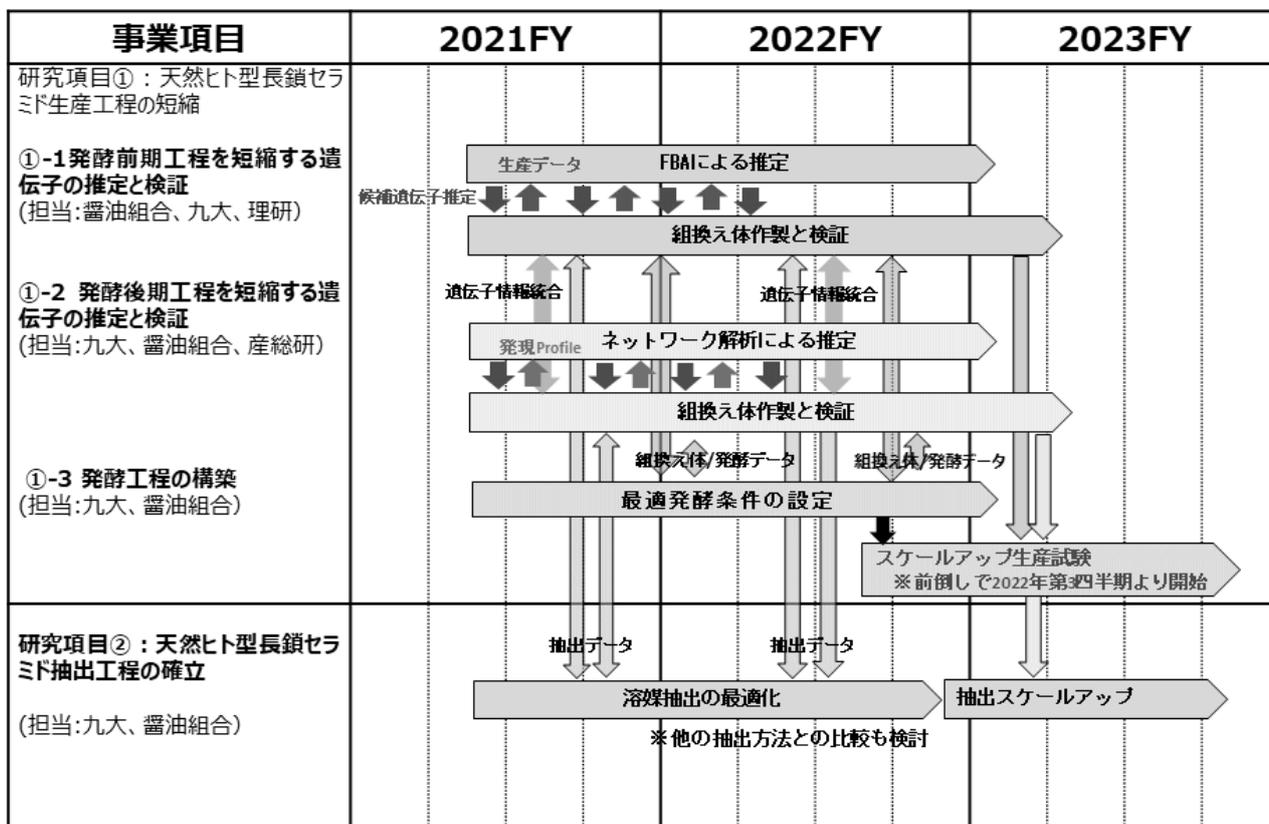
・2023 年度 遺伝子改変組合せ株を作製する。本株を用いて前年度 5L 培養装置で最適化した条件をもとに、50L および 500L 培養装置にスケールアップする。さらに、2021 年度、2022 年度に設定した天然ヒト型長鎖セラミド抽出工程をスケールアップし抽出率を確認する。

(3) 全体計画

本研究の目的は天然ヒト型長鎖セラミド高効率生産システムの開発である。そのための戦略として、スマートセル設計システムのフラックスバランス解析 (FBA) と遺伝子発現制御ネットワーク解析を活用し、発酵前期工程に関与する標的的遺伝子推定を行う。また、総合的な天然ヒト型長鎖セラミド生産性向上の観点から、発酵後期工程に関わる標的遺伝子の推定も行い、実用株の

培養条件の最適化と麹菌体からの天然ヒト型長鎖セラミド抽出プロセスの最適化を行う（表 3.2.2.1.3-2）。

表 3.2.2.1.3-2 全体計画



(4) 実施体制

天然ヒト型セラミドの生産性向上のための標的遺伝子の推定手法として、フラックスバランス解析（FBA）と遺伝子発現制御ネットワーク解析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成においては九州大学にて行い、麹菌の培養とヒト型長鎖セラミド抽出プロセスの構築は福岡県醤油醸造協同組合にて行う体制となっている。

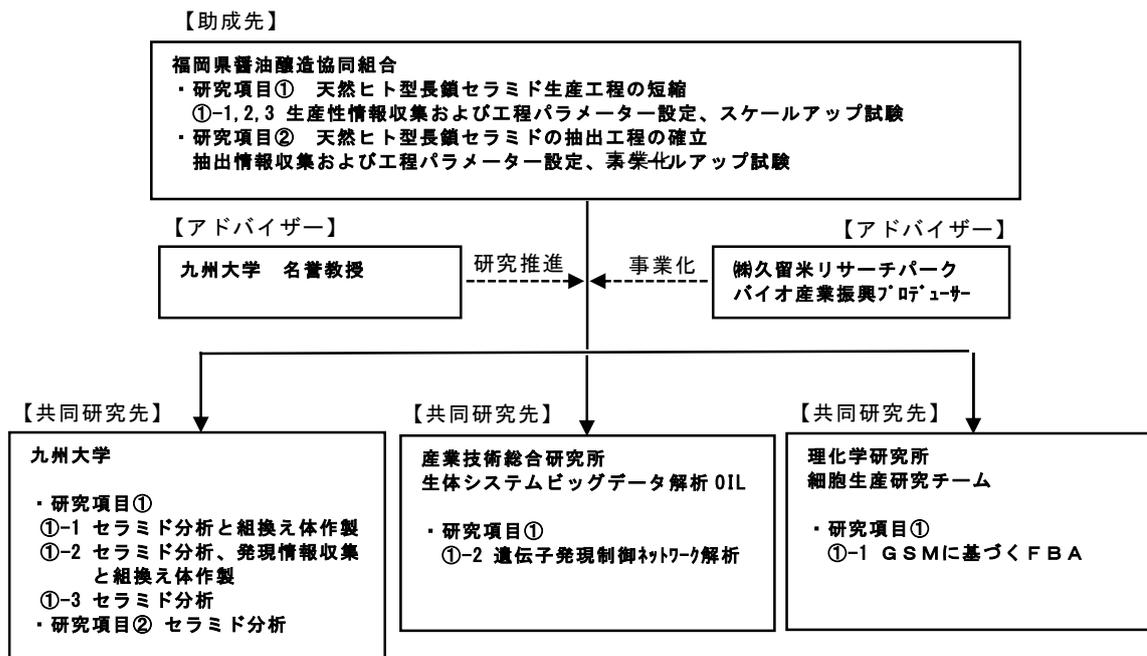


図 3.2.2.1.3-2 実施体制

(5) 運営管理

開発プロジェクトの運営は、アドバイザーと組換え体作製を担う九州大学との2回/月のWeb会議を基本とし、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会議を行うことで開発の推進を図った。さらに、培養装置の酸素供給系などの外部有識者との意見交換を適宜行った。

(6) 実施の効果

化粧品素材としてのセラミドは、化学構成合成で製造されたセラミドが広く用いられている。本研究では、植物を起源原料とする培地に麹菌を増殖させ天然のヒト型長鎖セラミドを高効率に生産する。天然ヒト型セラミドは、脂肪酸部分の炭素数が24である希少なフィトセラミド（セラミドAP、セラミドNP）であり、主に炭素数18の合成セラミドに比べ皮膚のバリア機能改善が期待され（Kyung-Mi Joo Journal of Dermatological Science 60(2010)）、バイオマス等を原料としたものづくり（バイオ合成）への転換、炭素循環型社会の実現に貢献する。

本開発の麹菌発酵法（高効率生産システム）は、設備や抽出溶剤の量を最小化でき、生産に係る工場消費エネルギーと炭酸ガス排出量とともに従来法の醤油粕抽出法に比べ74%削減することができる。さらに、排出される廃棄物の量も97%削減することが可能である。

(7) 中間目標の達成度

表 3.2.2.1.3-3 目標達成度

実施項目	中間目標	成果	達成度
研究項目① 天然ヒト型長鎖セラミド生産促進株の育種と生産工程の短縮	研究項目①-1 2021年度 発酵前期に係る標的候補遺伝子の同定 2022年度 発酵前期に係る標的候補遺伝子の同定と同定遺伝子組み合わせ株の作製と評価	2021年度 ①文献情報より得られた遺伝子候補 18 遺伝子に関して過剰発現株を作製したが、目的の効果は認められなかった。 ②発酵前期条件の変更により目的物量が増加した(①-3 参照)。同条件の遺伝子発現情報収集中であり、今後ネットワーク解析を行う。 ③前項までの発酵前期に加え、ヒト型長鎖セラミド生産性向上のため、発酵後期に関する遺伝子の FBA を実施し 29 遺伝子を推定した。 2022年度 ⑤FBA によって推定したヒト型長鎖セラミド生産性向上のための発酵後期に関する遺伝子の組換え体を作製した。 ⑥ネットワーク解析のための発酵前期条件の変更により目的物量が変化した遺伝子発現プロファイルデータを取得した。 今後、ネットワーク解析と FBA で得られた遺伝子の組み合わせ株の評価することで、中間目標を達成する見込みである。	2021年度 ○ 2022年度 △ (○)
	研究項目①-2 2021年度 発酵後期に係る標的遺伝子の同定 2022年度 発酵後期に係る標的候補遺伝子の同定と同定遺伝子組み合わせ株の作製と評価	2021年度 ①発酵後期に関わる遺伝子の過剰発現株を 7 株作製し、生産性向上に資する遺伝子 2 個同定した。これにより発酵後期を短縮することが可能となった。 ②ネットワーク解析により発酵後期に関わる遺伝子 29 遺伝子を推定した 2022年度 ③ネットワーク解析により推定した発酵後期に関わる遺伝子の組換え体を作製し評価した結果、発酵後期を短縮することに関与する遺伝子を 5 遺伝子同定した。 今後、同定した遺伝子の組み合わせ株を作製・評価することで中間目標を達成する見込みである	2021年度 ○ 2022年度 △ (○)
	研究項目①-3 2021年度 5L Jar にてパルプ状培地における天然ヒト型長鎖セラミド生産に与える影響についてデータ収集 2022年度 5L Jar にてパルプ状培地における天然ヒト型長鎖セラミド生産に与える影響についてデータ収集と条件設定、設定生産性目標達成	2021年度 ①発酵前期条件 1~3 を比較し、既存条件に比べ、発酵前期条件 1 を使用することで目的物量が増大した ②発酵前期条件 4~8 の目的物量への影響を検討した。既存条件に比べ発酵前期条件 5 で最大の目的物量が得られた。 ③各条件にて、セラミド生産量、D0、排出炭酸ガス、培地成分などのデータを収集した。 2022年度 ④発酵前期条件において目的物量への影響を検討するために発酵装置の機械的改造を行った。 今後、発酵装置の最適化を行うことで、中間目標を達成する見込みである。	2021年度 ○ 2022年度 △ (○)
研究項目② 天然ヒト型長鎖セラミド抽出工程の確立	2021年度 天然ヒト型長鎖セラミド回収量に与える影響についてデータ収集 2022年度 天然ヒト型長鎖セラミド回収量に与える影響についてデータ収集と設定抽出率の達成	2021年度 ①抽出条件 1~4 の抽出率※への影響を検討した。試験の範囲では抽出条件 2 で高い抽出率を示した。 ②抽出条件 4~11 の抽出率※への影響を検討した。試験の範囲では抽出条件 5 で高い抽出率を示した。 2022年度 ③前処理条件の抽出率への影響を検討した。 今後、前処理条件を検討し、前処理からの抽出条件までのトータルプロセスを最適化することで、中間目標を達成する見込みである。	2021年度 ○ 2022年度 △ (○)

※：クロロホルム・メタノール抽出した天然ヒト型長鎖セラミド量に対するエタノール抽出した天然ヒト型長鎖セラミド量の割合

◎：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）

（）は 2022 年度未達成度

(8) 研究開発の成果と意義

研究項目①天然ヒト型長鎖セラミド生産促進株の育種と生産工程の短縮

研究項目①-1 麹菌の発酵前期に関する遺伝子の推定と検証

（福岡県醤油醸造協同組合、九州大学、理化学研究所）

本研究開発項目では、ヒト型長鎖セラミド生産時間を短縮するために、発酵前期に関連する遺伝子を FBA にて推定し、発酵前期工程を短縮可能な組換え体の取得をめざす。

2021 年度は、発酵前期に係る標的候補遺伝子を 3 遺伝子同定することを目標として研究開発を行った。実験に使用する麹菌は産生するヒト型セラミドの分子種の多い麹菌株を用いた。調査した文献情報をもとに、18 遺伝子に関して組換え体を作製して、その評価を行った。それら組換え体の発現プロモーターには、発現プロファイルから得られたトップ 5 % の発現プロモーターを使用した。しかし、発酵前期に関する遺伝子は同定できなかったものの、研究開発項目①-3 で後述する発酵工程の条件変更にて目的物の増量が見込めた。

麹菌の天然ヒト型長鎖セラミドは、発酵前期に物質 A として蓄積し、発酵後期に天然ヒト型セラミドとして生産されることが、前回のスマートセルプロジェクトで判明している。

そこで、麹菌を 5L ジャーファメンターにて 26 条件で培養したプロファイルデータを使用して、FBA 解析を行い、物質 A の高生産に関与する遺伝子の推定を行った。その結果、候補遺伝子は合計で 29 個推定した。

2022 年度は、2021 年度 FBA 解析によって推定された物質 A の高生産に関する遺伝子の推定を行う。現在、推定した 29 遺伝子中の 15 遺伝子の高発現株を作製し、評価を行っている。また、研究項目①-3 で後述する発酵工程の条件変更にて目的物の増量が認められた遺伝子プロファイルデータをすでに取得している。これらのデータを遺伝子発現ネットワーク解析に供し、遺伝子を同定する。それらの方法にて、発酵前期の目的物量を、同定遺伝子を組み合わせた多重変異株を作製する。それらの株 3 株作製し、評価することで 2022 年度の目標達成する見込みである。

研究項目①-2 麹菌の発酵後期に関する遺伝子の推定と検証

（福岡県醤油醸造協同組合、九州大学、産業総合研究所）

本研究項目①-2 では、発酵後期に天然ヒト型長鎖セラミドを生産する遺伝子を遺伝子発現ネットワーク解析にて推定し発酵後期を短縮する株を作製する。

前回のスマートセルプロジェクトにより、物質 A から発酵後期に天然ヒト型長鎖セラミド生産されることが明らかになっている。これらのセラミド生産に関わる遺伝子を高発現させることで発酵後期が短縮できることが予想される。そこで、セラミド生産に関わる遺伝子を過剰発現した株の作製と遺伝子発現ネットワーク解析を行った。

2021年度は、発酵後期の天然ヒト型長鎖セラミド生産に係標的遺伝子の同定を2遺伝子同定することを目標として研究開発を行った。麹菌株のゲノム情報をもとに、報告されている遺伝子の相同性検索を行い、7遺伝子推定した。それらの遺伝子の過剰発現株を研究開発項目①-1の方法にて作製して、評価を行った。その結果、7遺伝子の過剰発現株のうち、2遺伝子において、従来のWT（野生株）よりもセラミド生産速度が早まることが分かった。

次にセラミド生産遺伝子の高発現に関与する遺伝子を推定するために5Lジャーファメンターで取得した遺伝子発現プロファイルデータを使用して、遺伝子発現ネットワーク解析を行った。その結果、29遺伝子が推定され、その中でも特に効果があると推定された13株に関して、遺伝子組み換え体を作製し、評価を行っている。

2022年度は、2021年度作製した13株の遺伝子発現ネットワーク解析によって推定した発酵後期にセラミド生産にかかる遺伝子組み換え体の評価を行った。その結果、WTよりもセラミド生産速度が向上した遺伝子組み換え株を確認した。さらに確認したうち、5遺伝子がWTよりも大幅に生産速度が向上することが分かった。2022年度はさらに過剰発現および遺伝子発現ネットワーク解析で効果のあった遺伝子の組み合わせ株を作製し、評価をすることで、2022年度の中間目標を達成する見込みである。

研究項目①-3 天然ヒト型長鎖セラミド発酵工程の構築

（福岡県醤油醸造協同組合、九州大学）

研究項目①-3は、研究開発項目①-1と①-2項で取得した天然ヒト型長鎖セラミド生産株を用い発酵前期条件を設定する。醤油麹菌は通気攪拌培養では菌糸の伸長に伴い培地がパルプ状になり生産性にばらつきが出ることが知られている。スケールアップ培養に対応し、それらの問題の解決と麹菌による天然ヒト型長鎖セラミド生産の最適条件の設定をする。

2021年度は、5L Jarにてパルプ状培地における天然ヒト型長鎖セラミド生産に与える影響についてデータ収集した。その結果、発酵前期条件1を使用した場合、既存条件に比べ目的物量が増大し、セラミド量が増大した。

2022年度は、発酵装置の機械的改造を行い、目的生産物の対する影響を検討する。2021年度と2022年度の検討の結果をもとに発酵条件の最適化を行い、2022年度の中間目標を達成する見込みである。

研究項目②：天然ヒト型長鎖セラミド抽出工程の確立

〔醤油組合（抽出情報収集と評価）、九大（セラミド分析）〕

本研究項目では、菌体からの天然ヒト型長鎖セラミド精製コストの低減のために、抽出条件の最適化を行い、麹菌体に好適な抽出方法を確立する。本研究開発の目標値は、実験等で使用される汎用の全脂質抽出溶媒のクロロホルム：メタノール混液で抽出した場合の抽出量を目安とした量で設定した。

2021年度は、麹菌体より天然ヒト型長鎖セラミドをエタノール抽出する際の抽出条件1~4と抽出条件5~11が抽出性に及ぼす影響のデータを収集した。抽出条件1~4の検討の結果、抽出条件2で抽出を行うことにより、抽出条件3や4と同等のセラミドを抽出することが可能であったが、クロロホルム：メタノール抽出量を目安とした抽出量目標には達しなかった。

次に、アルコール抽出性における抽出条件 5～11 の影響を検討した結果、抽出条件 5 が最も高い抽出率を示したが、クロロホルム：メタノール抽出量を目安とした抽出量目標には達しなかった。2022 年度は、抽出性を向上させるため抽出前処理などの検討を行う予定である。検討後、前処理条件の最適化を行うことで、2022 年度中間目標を達成する見込みである。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

研究項目①の生産性目標達成のため生産時間を短縮する。このうち、発酵前期の短縮においては、それに関わる遺伝子は探索中であるものの発酵前期条件の最適化により、目的物量は従来より増加させ、次いで、発酵後期についてそれに関わる遺伝子を過剰発現させることで短縮できた。現在実施中の発酵前期や発酵後期に関わる遺伝子の遺伝子発現制御ネットワーク解析と FBA により、天然ヒト型長セラミド生産性向上に資する遺伝子を同定し前出の成果と組み合わせることで目標を達成できると考えている。

研究項目②の抽出プロセスの確立は、菌体から工業的に広く利用されているエタノール抽出法により天然ヒト型セラミドを抽出することを前提に進めている。天然ヒト型セラミドの抽出率（クロロホルム・メタノールで抽出した天然ヒト型セラミド量に対する百分率）は現在目標に達していないが、抽出前処理など行うことにより、目標が達成できると考えている。

(10) 成果の普及

知財化に注力しているため、現在論文、社外発表などは控えている。今後、事業化の見通した時点時点で、積極的に成果をアピールしていく。

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

表 3.2.2.1.3-4 特許出願実績

年度	特許出願		
	国内	外国	P C T
2021	0	0	0
2022	0 (1)	0	0
PJ 期間 合計	0 (1)	0	0

() 内の数字は予定している件数

本研究では 3 件の特許出願を予定している。このうち 1 件は 2022 年に、2 件は 2023 年の出願を目指す。

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

天然ヒト型長鎖セラミドの対象マーケットとする化粧品の国内市場は、新型コロナウイルスの感染拡大の影響を受け、インバウンド需要の急激な消失や外出自粛によるメイクアップ機会の低下などにより 2020 年度の国内市場は前年比 85.5%の 2 兆 7,502 億円となっている（富士経済調

べ)。しかし、その原因は人流の停滞に有り、新型コロナ感染症が収束し経済活動が活発化すると共に需要が喚起され、2021年度は2兆8,415億円（前年比103.3%）の見通しである。また、対面販売が困難となっている状況や在宅勤務と言う勤務形態が増加したことを背景に販売チャンネルとしてECが注目され販売形態の多元化が進んだ。なお、本研究の製品は皮膚の保湿成分であるが、スキンケア市場は化粧品市場の約半分の1兆1,802億円を占め潜在的な需要は大きい。本研究を推進し天然ヒト型長鎖セラミドの従来よりも安価に潤沢にマーケットに供給し市場を広げる。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

事業化に必要な設備投資削減を目指し、細胞当たりの生産性を向上させ、培養期間等を短縮し年間生産能力を向上させる。これにより製造コストを低減する麹菌発酵・セラミド抽出法を開発する。これを達成するため、スマートセル設計システムを駆使し麹菌の天然ヒト型長鎖セラミド生産性を向上させた株を育種するとともに、バイオファンドリ施設を活用し培養条件を整え工程の短縮に取り組む。また、生産した天然ヒト型長鎖セラミド高含有麹菌体から効率的に天然ヒト型長鎖セラミドを抽出するプロセスの確立を行う。これらの研究を推進すること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。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

本開発を推進するとともに事業計画のブラッシュアップやセールスツール(原料規格書、原料説明書(パンフレット)など資料)を整備を進める。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するとともに、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。

(12.4) 成果の実用化・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。また、化粧品業界に豊富な知識を有する専門家のヒアリングを通じて事業計画をブラッシュアップすることで事業化を着実に進める。

(12.5) 波及効果

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。本開発が達成されると、世界初の麹菌発酵法による天然ヒト型長鎖セラミドの工業生産が可能になる。また、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、日本の醸造産業の機能性材料生産産業への構造転換を図ることが可能となる。

3.2.2.1.4 JM10「微生物によるグリチルレチン酸および類縁体の生産システム実証」（住友化学株式会社）

(1) 背景と目的

グリチルリチンは、和漢薬として利用される植物である甘草（カンゾウ；*Glycyrrhiza uralensis* または *Glycyrrhiza glabra*）の根に蓄積される特化代謝産物（二次代謝産物）であり、医薬品、化粧品、ヘルスケア製品等の有効成分として広く利用されている。グリチルリチンのアグリコン（糖鎖を取り除いた成分）であるグリチルレチン酸（GA）も、グリチルリチンと同様に様々な用途で利用されている。しかしながら、GA は根から抽出したグリチルリチンを化学的に処理して糖鎖を除去する方法で生産されており、工程が複数であるためグリチルリチンよりも製造コストが高い化合物である。日本は甘草ならびに甘草抽出物の全てを輸入に依存しており、その8割以上が中国産である。近年、乱獲による砂漠化の影響により甘草の輸入量は減少傾向にあり、原料の安定供給が課題となっており、野生植物に依存しない持続可能な、新しい GA および類縁体の生産方法が求められている。

植物トリテルペノイドは炭素数5のイソプレヌユニット6個から構成され、共通前駆体である炭素数30の直鎖の化合物であるオキシドスクアレンを出発物質として、環化酵素、酸化酵素、糖転移酵素などの酵素反応によって生合成される。グリチルリチンの場合、まず、オキシドスクアレンからβアミリンを経て、11位ならびに30位の部位特異的酸化によりGAが生合成され、さらに、GAの3位の水酸基に、グルクロン酸が転移したGAモノグルクロニド（GA-GlcA）が、続いてさらに第2糖のグルクロン酸が転移し、グリチルリチンが生合成される。

共同研究者の大阪大学の村中、關らの研究グループは、これまでに、グリチルリチンの生合成経路の解明に向け精力的に研究を行い、11位ならびに30位の部位特異的酸化酵素（CYP88D6, CYP72A154/CYP72A63）、第2糖のグルクロン酸転移酵素（UGT73P）の遺伝子を同定した（図3.2.2.1.4-1）。さらに、GAにグルクロン酸を転移する新規酵素CSyGTを発見し論文発表している。このCSyGTが単離されたことにより、グリチルリチン生合成に関わるすべての酵素が揃った。そこで、本事業では、酵母等微生物を用いたGAおよび（GA-GlcAを含む）類縁体の生合成について、包括的な生産システム実証（生合成酵素の最適化ならびにプロセス最適化検討、ならびに、酵素タンパク質安定化と成生物の菌体外排出促進）を行うことを目的とする。

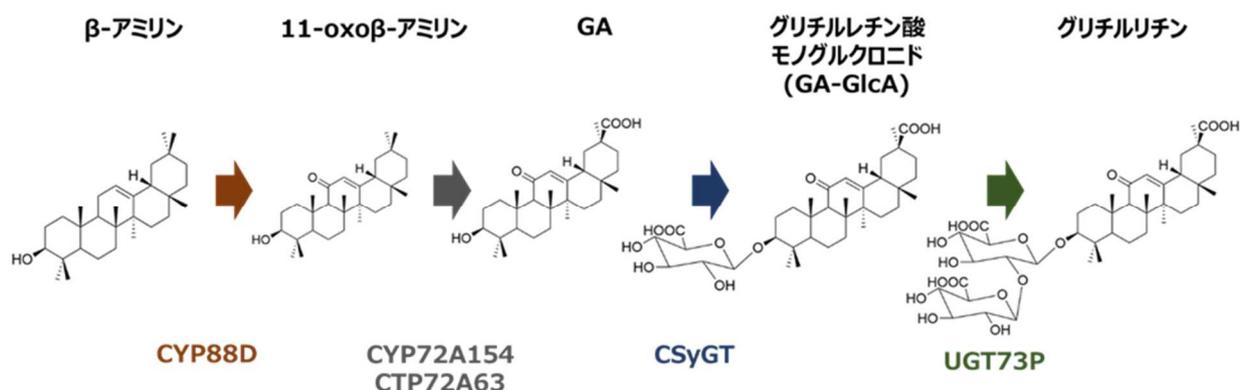


図 3.2.2.1.4-1. GA および類縁体の生合成（生合成酵素遺伝子）

(2)位置づけ、目標値

位置づけ

GAについては、抗炎症、抗酸化、抗老化作用によるアンチエイジングケアなどを目的とした化粧品原料として化粧品メーカー等への販売を想定する。高額なGAが安価に製造できれば市場も大きくなると予想される。事業化を想定する領域での市場性、規制動向を見極めながら、製造コストも考慮して判断していく。

目標

GAあるいは類縁体の生産については、合成経路の複雑性も考慮に含めながら、最終目標として2024年度までに産業化の目途をつける。

(3)全体計画

酵母宿主による高生産性を実現するスマートセルを開発するため、住友化学株式会社が研究項目(1)を担当し、国立大学法人大阪大学が研究項目(2)を担当する。

研究項目(1) 生合成酵素の最適化ならびにプロセス最適化検討(担当:住友化学株式会社)

研究項目(2) 酵素タンパク質安定化と生成物の菌体外排出促進(担当:国立大学法人大阪大学)

表 3.2.2.1.4-1 全体計画

項目	2021年度				2022年度				2023年度				2024年度			
	1 Q	2 Q	3 Q	4 Q												
(1)生合成酵素の最適化ならびにプロセス最適化(住友化学)																
(1)-1.生合成酵素の最適化	→															
(1)-2.生産プロセスの最適化	→															
(2)酵素タンパク質安定化と生成物の菌体外排出促進(大阪大学)																
(2)-1.酵素タンパク質の安定化	→															
(2)-2.生成物の菌体外排出促進	→															

(4)実施体制

事業実施にあたり、以下の体制で行った(図 3.2.2.1.4-2)。研究分担は以下の通り。

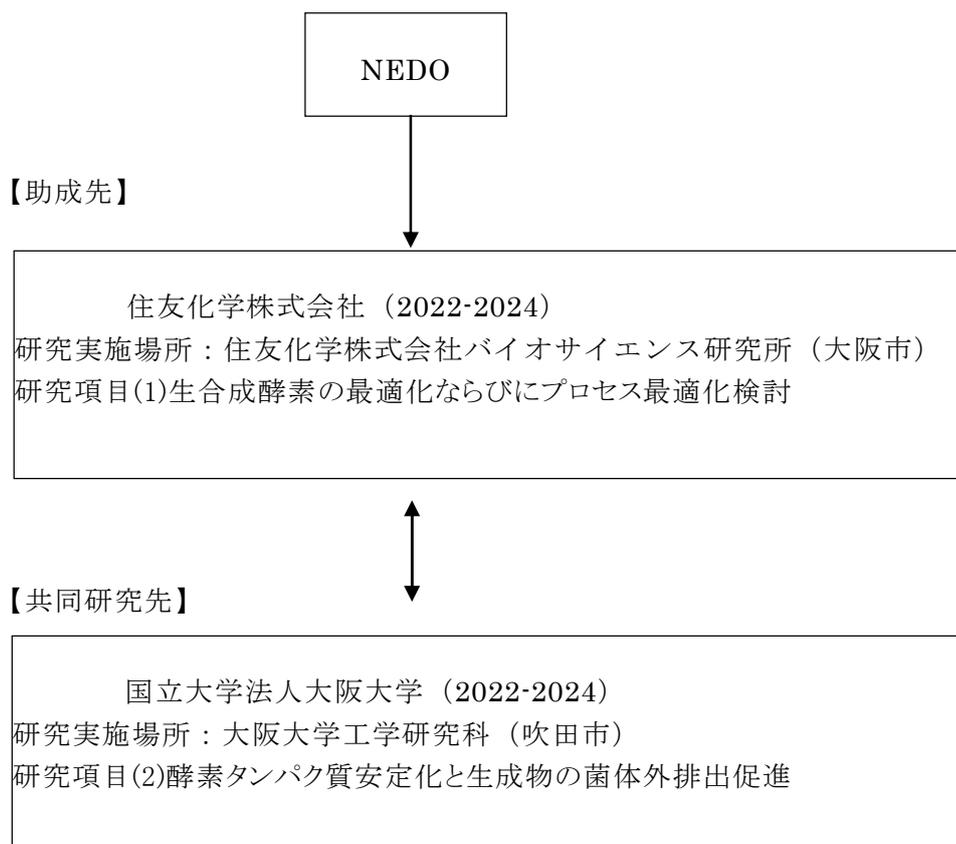


図 3.2.2.1.4-2 実施体制図

(5)運営管理

四半期に一度以上の頻度で、テーマ間での進捗会議を実施している。また資料・サンプルの提供等を含めた情報交換は電子メール等で遅滞なく行った。NEDO への進捗報告ならびにステージゲート審査を実施した。

(6)実施の効果

GA の世界市場は増加傾向にあり、微生物による生産システムにより安価に製造できれば市場はさらに大きくなると予想される。

(7)中間目標の達成度

項目	目標	成果	達成度
研究項目(1)-1 生合成酵素の最適化	GA 或いは類縁体生合成各種遺伝子について、酵母等の宿主 1 種類以上に導入する。	GA 生合成各種遺伝子を組込んで最適化し、発現条件の最適化検討を行ったところ、中間目標まで到達した。	○
研究項目(2)-1 酵素タンパク質安定化	生合成酵素の細胞内安定性を高めるタンパク質の遺伝子の単離と組換え酵母の作出を行い、GA 関連物質の生成量に及ぼす効果を解析する。並行して、生成物を菌体外に排出させる候補遺伝子の探索を行い菌体外への排出促進効果を評価する。	生合成酵素の細胞内安定性を高める遺伝子の単離と GA 等生産基本株への導入を行ない生成量に及ぼす効果の解析に着手した。成生物の細胞外排出候補遺伝子の探索と単離を計画前倒しで行い候補について形質転換酵母を作出した。	○

達成度 ◎:大きく上回って達成、○:達成、△:概ね達成、×:未達

(8)研究開発の成果と意義

本プロジェクトは、GA および類縁体の生合成について、包括的な生産システム実証を行うことを目的としており、さらに構築した生産システムをトリテルペノイド類に発展させること視野に入れている。

研究項目をそれぞれ、研究項目(1) 生合成酵素の最適化ならびにプロセス最適化検討(担当:住友化学株式会社)および、研究項目(2) 酵素タンパク質安定化と生成物の菌体外排出促進(担当:国立大学法人大阪大学)とした。

研究項目(1)については、グリチルレチン酸およびその類縁体を微生物によって生合成するために必要な全遺伝子を酵母へ導入した。さらに、生合成酵素の由来種の検討および変異導入を実施した。試験用酵母株を用いた検討でグリチルレチン酸およびその類縁体の生産を確認でき、最も生産量の高い株(最新株)を選択した(図 3.2.2.1.4-3)。また今後使用する酵母株を 3 系統選択した。今後、研究項目(2)の成果と統合することによりさらなる生産量を向上させる。

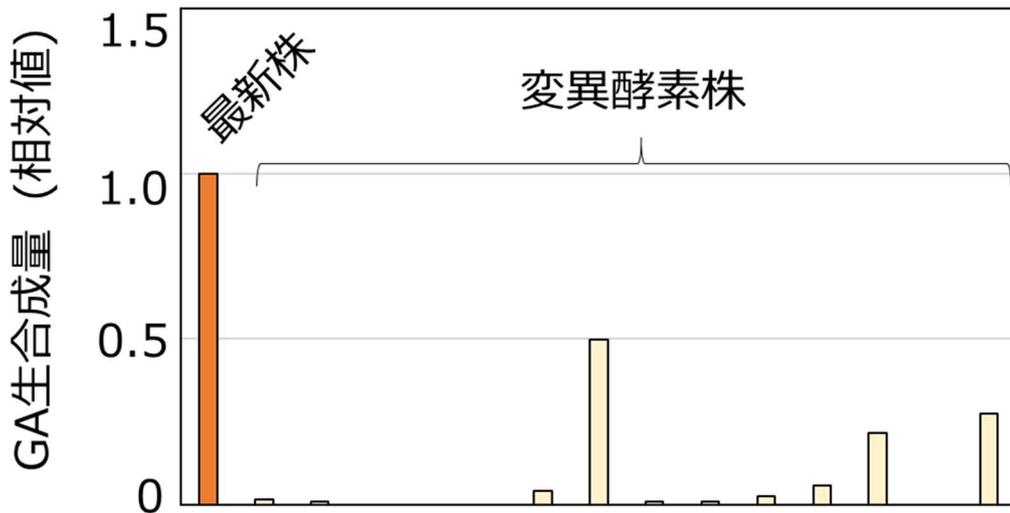


図 3.2.2.1.4-3 必要な生合成遺伝子（酵素）に各種変異を加えた検討結果

研究項目(2)については、生合成酵素の細胞内安定化および生成物を菌体外に排出させる候補遺伝子を探索し、生合成酵素の細胞内安定化および生成物を菌体外に排出させる候補遺伝子を複数見出した。今後、これらが成生物量の向上に資する否かを解析するとともに、他の候補遺伝子の単離と機能解析を継続する予定である。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

グリチルレチン酸および類縁体を生産できる菌株を取得済である。今後、生合成酵素の安定化および菌体外への排出機能を付与し、各種遺伝子発現を制御することで、さらなる大量生産の目途がたっている。

(10) 成果の普及

公知としてよい成果、プロジェクト概要の紹介など、プロジェクト基本計画に基づき研究成果を広範に普及するため、セミナーや各種媒体を通じて積極的に取組を発信する。

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

事業化につながる成果は知財化を積極的に進める。

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

今後の研究開発の進行を鑑みて、研究開発継続および事業化への可能性の判断を行う予定である。事業化決心がなされた後は、事業化に向けた具体的体制を整える。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

現状品は甘草からの抽出物を加水分解して生産しており、生産国は中国および中央アジア圏である。現状価格に対して競争力のある販売価格を設定し、また安定供給の利点を活用して、市場拡大を図る予定である。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

本事業終了後、工業製造の為のエンジニアリングデータ取得、および精製回収条件の検討を実施する。確立した条件で安全性試験・効能試験(サンプルワーク)のためのサンプル製造を行い、顧客(企業)へ効能試験(サンプルワーク)を実施する。グリチルレチン酸の市場規模については、適宜ヒヤリング等を通じて市場規模とシェア予測を見直しながら、売上見通しの精度を上げていく。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

先行事例(アミレス社のアルテミシニン酸発酵生産)を鑑み、本技術開発での目標値を到達することができれば、価格競争力のある工業スケール生産化が実現できる見込みである。

(12.5) 波及効果

微生物によるトリテルペノイド類の商用生産技術が確立できれば、これらの知見を他のトリテルペノイド類への応用展開す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、我が国のバイオモノづくり推進に寄与することを目指す。

3.2.2.1.5 JM11「次世代グリーンバイオ素材「HYA50」のインライン自動化生産システム開発」
(Noster 株式会社)

(1)背景と目的

HYA[®]は京都大学小川順教授らのグループが世界に先駆けて発見した腸内細菌が産生する有用物質（ポストバイオティクス[®]）であり、腸管バリア保護、代謝改善、インスリン抵抗性の改善、食後血糖の上昇抑制など様々な生理活性が認められている。我々は、京都大学とHYA[®]の実用化開発を開始し、NEDOの支援（25イノベ）を得て、純度50%のHYA[®]（HYA[®]50）を製造するシステムをパイロットスケールで構築した。更に、NEDOの支援（27橋渡し、28橋渡し）を得てHYA[®]50の機能性食品開発を行い、食品向け臨床試験により食後血糖の上昇を有意に抑制する効果を確認し、2021年1月より、サプリメントとして「HYA[®]-50」の販売を開始した。HYA[®]50は有機溶媒や金属触媒を使用せず、植物オイルに乳酸菌を加えて微生物変換で合成できることから、地球にやさしい次世代グリーンバイオ素材である。今後の事業計画として、サプリメント販売のみならず、原料として供給して様々な製品に広く汎用させ、海外への進出を視野に入れており、全世界の健康と生命を守ることへの貢献を目指す。

(2)位置づけ、目標値

本研究開発では、既に参画している「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発／①バイオ資源活用促進基盤技術開発／②生産プロセスのバイオフアウンドリ基盤技術開発」で水平展開する微生物合成技術を活用し、生産性の更なる向上と大量生産を見据え、高収率・低エネルギーを可能とする新たなHYA[®]50の生産システムの構築を実現する。各研究開発項目の目標値は以下の通りである。

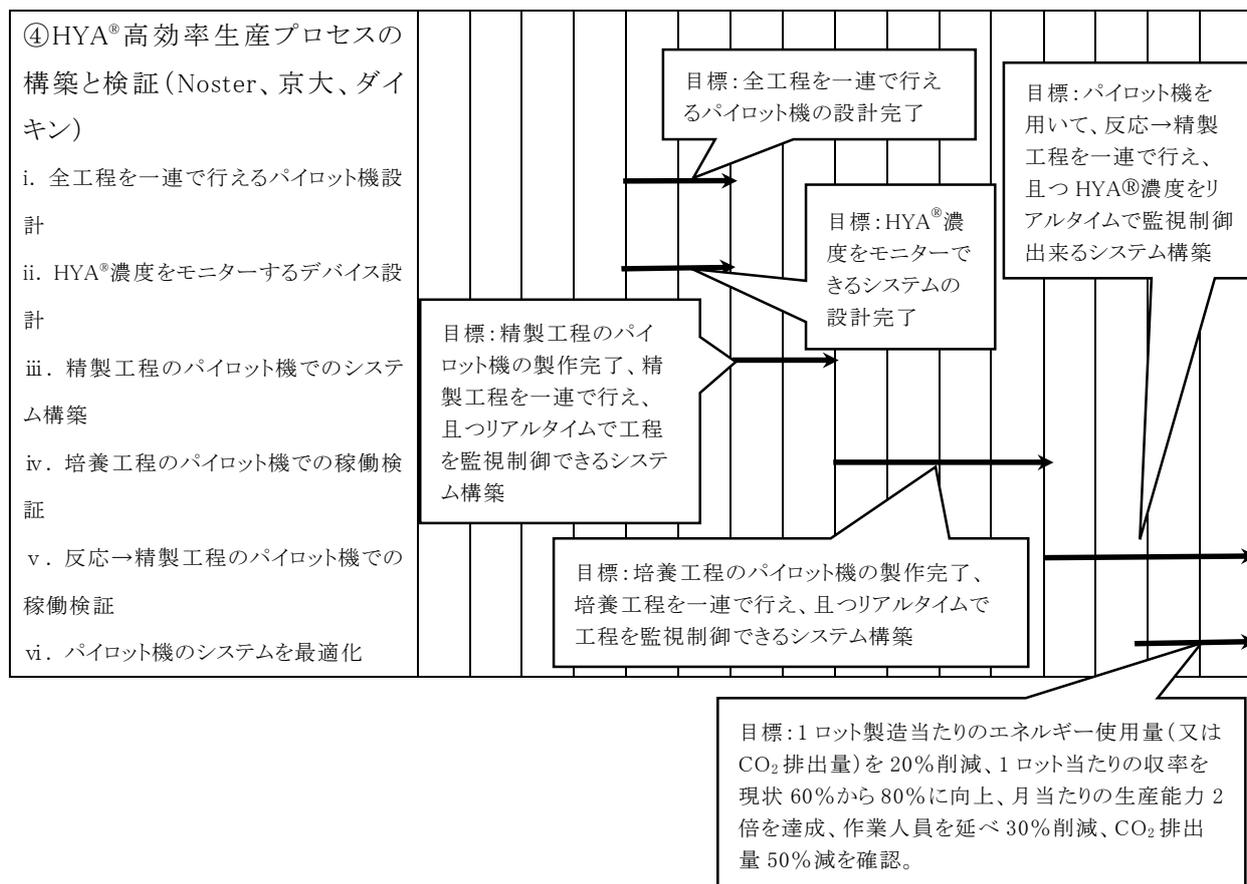
研究開発項目	位置づけ	目標値
HYA [®] 産生株の開発とHYA [®] 高変換条件の検討		
HYA [®] 産生株の培養時の収量向上	乳酸菌の培養1バッチ収量の向上と菌体g当たりの活性を高める。	HYA [®] 高生産株の菌体回収量（又は活性）を20%向上させる。
反応時のHYA [®] 産生株の使用量の削減	反応1バッチに使用する乳酸菌の使用量を抑える。	HYA [®] 高生産株である乳酸菌の反応時の使用量を50%削減する
反応工程の回収率向上と培養工程、反応工程の自動化に向けたシステム構築		
培養液から菌体を自動回収する分離技術の開発	自動化	乳酸菌の培養液から菌体を自動回収するための分離機の仕様を決定する
反応液から油分を高回収する分離技術の開発	物理的回収量の向上	HYA [®] 反応液から油分の回収率を60%から80%に向上させる
HYA [®] 濃度測定技術の検討	自動化	HYA [®] 濃度（又は変換率）をモニターできる原理を確立する
製造原価の低減	原価低減	培養工程、反応工程の効率化によ

		り、原材料費を50%削減する
菌体を自動搬送するシステムの開発	自動化	乳酸菌の培養液から自動回収した菌をインラインで自動搬送が可能なラインの仕様を決定する。その結果、パイロット機の製作に必要な情報（装置選定、配管の接続方法等）が整う。
油分を自動搬送するシステムの開発	自動化	反応液から油分のみを高回収し、インラインで自動搬送が可能な分離機とラインの仕様を決定する。その結果、パイロット機の製作に必要な情報（装置選定、配管の接続方法等）が整う。
HYA®濃度分析用酵素の開発	自動化	HYA®濃度モニターに必要な分析用酵素の開発
精製工程の自動化に向けたシステム構築		
精製工程を自動化できるシステムの開発	自動化	精製工程全工程を自動化できる機器とラインの仕様を決定する。
HYA®高効率生産プロセスの構築と検証		
全工程を一連で行えるパイロット機的设计	自動化	培養→反応→精製の工程を一連で行えるパイロット機的设计が完了する
HYA®濃度をモニターするデバイス设计	自動化	パイロット機において、HYA®濃度（又は変換率）をモニターできるシステムの設計が完了する。
精製工程のパイロット機でのシステム構築	自動化	精製工程のパイロット機の製作が完了し、本工程を一連で行え、且つリアルタイムで工程を監視制御出来るシステムを構築する
培養工程のパイロット機での稼働検証	自動化	培養工程のパイロット機の製作が完了し、培養の工程を一連で行え、且つリアルタイムで工程を監視制御出来るシステムを構築する
反応→精製工程のパイロット機での稼働検証	自動化	パイロット機を用いて、反応→精製の工程を一連で行え、且つHYA®の濃度（又は変換率）をリアルタイムで監視制御出来るシステムを構築する
パイロット機のシステムを最適化	カーボンリサイクル	パイロット機を用いて、システムの最適化を行い、1ロット製造当たりのエネルギー使用量（又はCO ₂ 排出量）

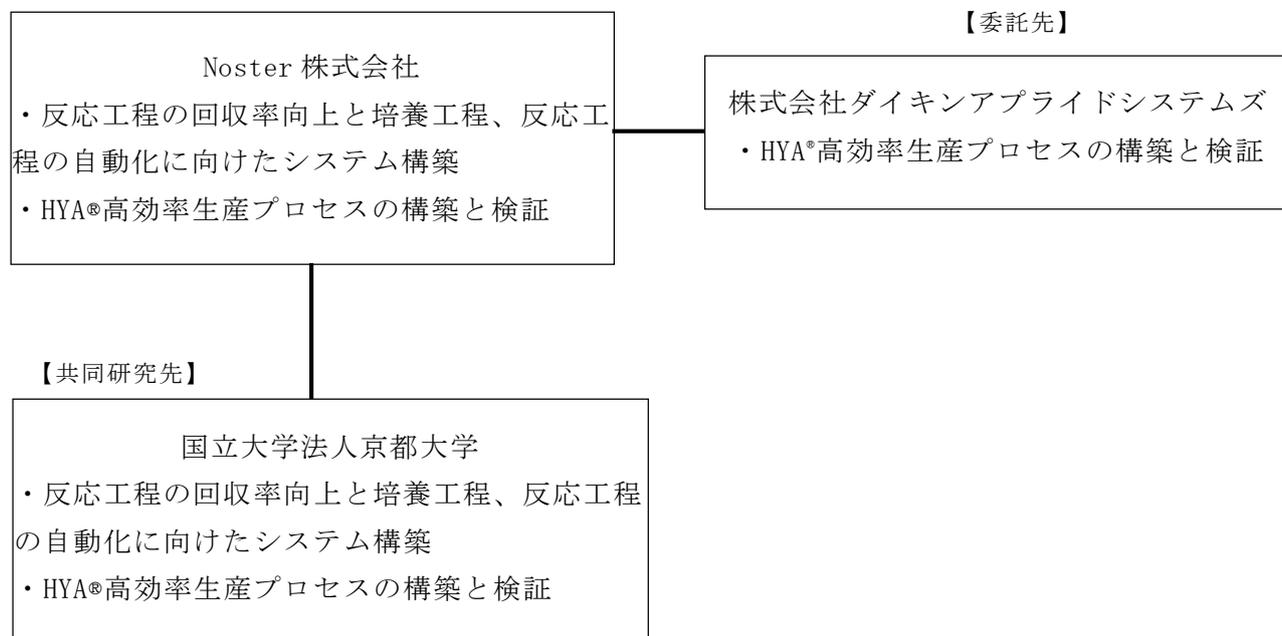
		を20%削減し、1ロット当たりの収率を現状60%から80%に向上、月当たりの生産能力2倍を達成する。また、自動化、連続ライン化により、作業人員を延べ30%削減する。更にCO ₂ 排出量50%減を確認する。
--	--	---

(3) 全体計画

	2021年度				2022年度				2023年度				2024年度			
	第1 四 半 期	第2 四 半 期	第3 四 半 期	第4 四 半 期												
<p>①HYA[®]産生株の開発とHYA[®]高変換条件の検討(Noster、京大)</p> <p>i. HYA[®]産生株の培養時の収量向上</p> <p>ii. 反応時のHYA[®]産生株の使用量の削減</p>																
<p>②反応工程の回収率向上と培養工程、反応工程の自動化に向けたシステム構築(Noster、京大)</p> <p>i. 菌体を自動回収する分離技術の開発</p> <p>ii. 油分を高回収する分離技術の開発</p> <p>iii. HYA[®]濃度測定技術の検討</p> <p>iv. 製造原価の低減</p> <p>v. 菌体を自動搬送するシステムの開発</p> <p>vi. 油分を自動搬送するシステムの開発</p> <p>vii. HYA[®]濃度分析用酵素の開発</p>																
<p>③精製工程の自動化に向けたシステム構築(Noster)</p> <p>精製工程を自動化できるシステム開発</p>																



(4) 実施体制



(5) 運営管理

3ヶ月に1回、連携グループ内での会議を開催。毎月1回NEDOに研究開発の進捗状況を報告。

(6) 実施の効果

本事業にて最適化した条件を具現化できる自動化されたシステムを設計し、パイロットプラントを構築、スケールアップ条件下でエネルギー使用量を20%削減、月当たりの生産能力2倍を実現し、化学合成法と比較して、LCAで現行プロセスのCO₂排出原単位の半減以下を実現して、2030年に367万t-CO₂/年のCO₂削減効果に貢献する。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	目標値	成果	達成度
HYA [®] 産生株の開発とHYA [®] 高変換条件の検討			
HYA [®] 産生株の培養時の収量向上	HYA [®] 高生産株の菌体回収量（又は活性）を20%向上させる。（2021年度）	菌体回収量20%増以上を確認した。	◎
反応時のHYA [®] 産生株の使用量の削減	HYA [®] 高生産株である乳酸菌の反応時の使用量を50%削減する。（2021年度）	乳酸菌の使用量を50%以上削減した。	◎
反応工程の回収率向上と培養工程、反応工程の自動化に向けたシステム構築			
培養液からの菌体を自動回収する分離技術の開発	乳酸菌の培養液から菌体を自動回収するための分離機の仕様を決定する。（2021年度）	分離機の仕様を決定した。	○
反応液から油分を高回収する分離技術の開発	HYA [®] 反応液から油分の回収率を60%から80%に向上させる。（2021年度）	回収率80%以上を確認した。	◎
HYA [®] 濃度測定技術の検討	HYA [®] 濃度（又は変換率）をモニターできる原理を確立する。（2021年度）	酵素を用いた測定系をデザインした。	○
製造原価の低減	培養工程、反応工程の効率化により、原材料費を50%削減する。（2021年度）	原材料費50%以上の削減を確認した。	◎
菌体を自動搬送するシステムの開発	乳酸菌の培養液から自動回収した菌をインラインで自動搬送が可能なラインの仕様を決定する。その結果、パイロット機の製作に必要な情報（装置選定、配管の接続方法等）が整う。（2022年度）	2022年4月よりラインの仕様を検討中。	実施中
油分を自動搬送するシステムの開発	反応液から油分のみを高回収し、インラインで自動搬送が可能な分離機とラインの仕様を決定する。その結果、パイロット機の製作に必要な情報（装置選定、配管の接続方法等）	2022年4月より分離機とラインの仕様を検討中。	実施中

	が整う。(2022年度)		
HYA [®] 濃度分析用酵素の開発	HYA [®] 濃度モニターに必要な分析用酵素の開発。(2022年度)	2022年4月より分析用酵素を検討中。	実施中
精製工程の自動化に向けたシステム構築			
精製工程の全工程を自動化できるシステムの開発	精製工程全工程を自動化できる機器とラインの仕様を決定する。(2021年度)	自動化を可能とする機器の仕様と条件を設定した。	○
HYA [®] 高効率生産プロセスの構築と検証			
全工程を一連で行えるパイロット機の設計	培養→反応→精製の工程を一連で行えるパイロット機の設計が完了する。(2022年度)	2022年4月より設計に必要な情報収集を実施中。	実施中
HYA [®] 濃度をモニターするデバイス設計	パイロット機において、HYA [®] 濃度(又は変換率)をモニターできるシステムの設計が完了する。(2022年度)	2022年4月よりHYA [®] 濃度モニターの設計に必要な情報収集を実施中。	実施中
精製工程のパイロット機でのシステム構築	精製工程のパイロット機の製作が完了し、本工程を一連で行え、且つリアルタイムで工程を監視制御出来るシステムを構築する。(2022年度)	システムの設計検討中。	実施中
培養工程のパイロット機での稼働検証	培養工程のパイロット機の製作が完了し、培養の工程を一連で行え、且つリアルタイムで工程を監視制御出来るシステムを構築する。(2023年度)	2023年度実施予定。	実施予定
反応→精製工程のパイロット機での稼働検証	パイロット機を用いて、反応→精製の工程を一連で行え、且つHYA [®] の濃度(又は変換率)をリアルタイムで監視制御出来るシステムを構築する。(2024年度)	2024年度実施予定。	実施予定
パイロット機のシステムを最適化	パイロット機を用いて、システムの最適化を行い、1ロット製造当たりのエネルギー使用量(又はCO ₂ 排出量)を20%削減し、1ロット当たりの収率を現状60%から80%に向上、月当たりの生産能力2倍を達成する。また、自動化、連続ライン化により、作業人員を延べ30%削減する。更にCO ₂ 排出量50%減を確認する。(2024年度)	2024年度実施予定	実施予定

(8) 研究開発の成果と意義

助成フェーズに関する検討は 2022 年度からの開始となるため、本項では 2021 年度の委託フェーズの成果を記載する。

基盤技術開発として、以下の①～③について研究開発を行い、生産性の向上、原価削減、自動化システムの構築を検討した。

- ①HYA[®]産生株の開発と HYA[®]高変換条件の検討
- ②反応工程の回収率向上と培養工程、反応工程の自動化に向けたシステム構築
- ③精製工程の自動化に向けたシステム構築

研究開発項目①の成果及び達成度

HYA[®]産生株は Noster 株式会社保有する乳酸菌ライブラリーより、増殖性に優れ、HYA[®]変換活性の高い株として選抜された。選抜された株を用いて、培養条件の更なる最適化を行い、目標「菌体回収量（又は活性）の 20%増」に対して、菌体回収量 35%増を確認し、目標を達成した。また、反応条件の更なる最適化を行い、目標「反応時の菌体使用量 50%削減」に対して、50%以上の削減を確認し、目標を達成した。

研究開発項目②の成果及び達成度

リノール酸から HYA[®]への変換反応は、植物油に HYA[®]変換菌を加えて乳化させて行うが、生成物の回収において、水、固形物を除き、油分のみを物理的に高回収する為には、適切な条件と技術を必要とする。また、自動化に向けて、培養工程、反応工程、精製工程を連動させるには、各工程品を配管輸送できる機構、装置、システムの構築が不可欠となる。

培養工程と反応工程を連動させる為に、目標「菌体を自動回収できる分離機の仕様を決定する」を設定し、分離板型遠心分離機（テスト機）を用いて、菌体の配管内の流動性を確保した条件で 99.9%の菌体回収を確認し、目標を達成した。

反応工程の回収率向上について、目標「油分の回収率を 80%に向上させる」に対して、分離条件を最適化して、回収率 80%以上を確認し、目標を達成した。

自動化に向けたシステム構築について、目標「HYA[®]をモニターできる原理を確立する」に対して、酵素を用いた測定系のデザインを完了し、目標を達成した。

研究開発項目③の成果及び達成度

分離板型遠心分離機（テスト機）を用いて、反応液から菌体、水相を除去し、油相のみを連続自動回収出来ること、粗精製液から固形不純物、水相を除去し、油相のみ連続自動回収出来ることを確認した。また、精製工程の自動化を可能とする装置としてインラインミキサーを導入し、現状と同等以上の精製度が得られることを確認した。以上の結果より、目標「精製工程を自動化できる機器とラインの仕様を決定する」に対して、自動化を可能とする機器（遠心分離機、インラインミキサー）の仕様と条件を設定できたことから、目標を達成した。

研究開発項目①～③の効果を合算して、目標「原材料費 50%削減」に対して、50%以上の削減を確認し、目標を達成した。

上記委託フェーズにて構築した基盤技術を実用化に結びつけるべく、助成フェーズでの検討を行う。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

2021年度の委託フェーズの目標は全て達成したことから、助成フェーズにおいても計画通り進捗させ、最終目標を達成することは十分可能であると考えます。

(10) 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	
2021	0	1	5	3	4	0	0
2022	0	0	0 (4)	0 (5)	0 (5)	0	0
PJ 期間 合計	0	1	9	8	9	0	0

※カッコ内は見込み件数

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

今回の事業は、HYA®の自動化生産システムの開発であり、工程の連結や生産スケールアップのためのノウハウといった部分の研究開発になることから、これらを特許出願して開示することは知財対応としては適さないため、基本的に本事業において特許出願はしない戦略をとる。

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

京都大学とHYA®の実用化開発を開始し、NEDOの支援（25 イノベ）を得て、純度50%のHYA®（HYA®50）を製造するシステムをパイロットスケールで構築した。更に、NEDOの支援（27 橋渡し、28 橋渡し）を得てHYA®50の機能性食品開発を行い、食品向け臨床試験により食後血糖の上昇を有意に抑制する効果を確認し、2021年1月より、サプリメントとして「HYA®-50」の販売を開始した。生産性の更なる向上と、大量生産を見据えた持続可能な生産システムの構築のため、微生物合成技術を活用し、高収率・低エネルギーを可能とする新たなHYA®50の生産システムの構築を実現する。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

本事業の目標は、次世代グリーンバイオ素材「HYA®50」によって腸内細菌の代謝物“ポストバイオティクス”というヘルスケア領域を確立し、世界中の人々の健康と生命を守ることにある。

今後の事業計画として、サプリメント販売のみならず、原料として供給して様々な製品に広く汎用させ、海外への進出を視野に入れた事業拡大を実施する。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

HYA[®]にはインスリン抵抗性改善及び肥満抑制をはじめとして、腸管バリア保護、歯肉バリア保護、ピロリ菌抑制など多岐にわたる機能性が見出されており、Nature Communicationsをはじめとした世界的な科学誌でその研究成果を発表している。また、日本国内における機能性表示食品の届出・受理を行うとともに、海外展開を見据え、日本発の次世代グリーンバイオ素材であるHYA[®]50を新たな機能性素材原料として世界市場の開拓を行う。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

HYA[®]50はすでに自社ECサイトでサプリメントとして販売を行っており、ポストバイオティクス及びHYAについての啓蒙、認知向上活動を自ら行う予定である。

また、事業終了後には、自ら及び原料卸会社と連携し、国内におけるHYA[®]50の原料販売を開始するとともに、大量生産プラントの設計、建設を開始する。海外に向けた原料供給体制が整い次第、新プラントを稼働させ、海外に向けた原料販売を海外営業部門を有する企業との提携により開始する。

(12.5) 波及効果

HYA[®]の純品については、神戸大学医学部附属病院で2型糖尿病患者を対象に特定臨床研究を進めており、本事業で構築する生産技術は医薬中間体の製造にも応用可能であり、医薬品分野での波及効果も期待できる。本事業で構築する生産技術は、腸内細菌による水酸化脂肪酸の製造に応用可能であり、一般食品分野への波及効果も期待できる。また、海外を含めた機能性素材原料の供給を行うために、大量プラントの新設も計画していることから雇用の創出を含めた経済的効果が期待できる。事業により得られた収益は、米国科学振興協会と設立したNoster & Science Microbiome Prizeを通じて若手研究者の研究へ還元し、バイオ研究の更なる発展に貢献することにより、バイオテクノロジーと経済活動が一体化するバイオエコノミー社会の実現を目指すとともに、日本のバイオ産業の競争力向上に貢献する。

3.2.2.1.6 JM04「製紙工場における第二世代糖生産システム実証」

(三菱製紙株式会社)

(1)背景と目的

我が国では、2030年に2013年度比で46%もの温室効果ガス排出削減を実施することを国際公約として掲げている。この数字を達成するためには、国内のバイオリソースの有効活用が必須であり、特に化成品やバイオ燃料の生産に欠かせない「糖質（グルコース、キシロース）」の確保が重要となる。現状、我が国では、化成品、医薬品用途のグルコースの輸入量が10,000トン/年を超えており、その90%以上を中国・韓国からの輸入に頼っている。昨今の国際情勢を勘案すると、今後輸入が困難になった時に備え、第二世代糖として非可食原料からグルコース、キシロースを生産する技術開発は重要である。

また、国内紙パルプ産業においては、板紙等の一部品種の需給は堅調に推移しているものの、デジタル技術の発展による電子媒体の利便性等からペーパーレス化が進み、構造的な需要減退が続いている状況にある。今後は、これまで培ってきたバイオマス技術、既存設備を活用し、新規事業への転換を図る必要がある。

三菱製紙株式会社八戸工場では、年産約55万トンのクラフトパルプ（以下、「KP」）の生産システムを有しており、現状の生産状況では余力がある。この余力分のKPを第二世代糖の原料として利用することで、国産の第二世代糖の供給源としてビジネスを開始する計画である。今回、化成品やバイオ燃料の生産に欠かせない「糖質（グルコース、キシロース）」を低コストで、安定供給することで、炭素循環型社会の実現に貢献することを目的とする。

(2)位置づけ、目標値

本事業の対象市場は化成品やバイオ燃料の生産に使用されるグルコース・キシロースとする。国内で非可食原料から糖質（グルコース、キシロース）を生産するにあたり、重要な課題となるのは安定生産と低価格化である。

今回、KPの糖化には酵素糖化法を採用する。KPの糖化後に、糖液を膜分離してベース酵素（セルラーゼやヘミセルラーゼ等から成る酵素カクテル）を回収することで酵素コストの低減を図る予定である。酵素（セルラーゼ）は、市販酵素Aをベース酵素として利用することを予定している。KPの糖化後に、糖液を膜分離してベース酵素を回収することで酵素コストの低減を図る予定である。しかし、ベース酵素は50℃でのパルプ糖化時に、 β -Glucosidase（以下、「BGL」）を含む酵素構成成分の活性が低下することが分かっている。この欠点を克服するために、回収ベース酵素にBGLを外添（補充）することで酵素活性を維持することを目指す。また、将来の酵素の安定的な供給元確保を考慮し、委託フェーズの段階では、市販酵素A以外の酵素の利用の可能性も調査する。

本研究で使用するBGLは、株式会社Biomaterial in Tokyoが異種発現技術を有する分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*（以下、「*S. pombe*」））に2重変異導入BGL遺伝子を導入し培養することで生産することを予定している。2重変異導入BGL遺伝子は*S. pombe*に今回初めて導入される。

2重変異導入BGL（以下、「新規BGL」）は遺伝子組み換え技術により構成アミノ酸に変異導入を行っており、「耐熱性の向上」、「生成物（糖）阻害回避」の2つの特徴を有しているため、

添加する BGL の性質としても非常に優秀である。本研究の中で、他の BGL との比較も含め、新規 BGL の有効性を確認する。

新規 BGL は、既往の研究成果「NEDO 成果報告書（平成 25 年度～28 年度）バイオマスエネルギー技術研究開発 バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業 可溶性糖質源培養による木質系バイオマス由来パルプ分解用酵素生産の研究開発」として信州大学、株式会社 Biomaterial in Tokyo によって作出されたものであるが、その際の宿主は *S. pombe* ではなく *E. coli* Origami B (DE3) pLysS であり、酵素の生産性は低かった (PLoS ONE 11(1): e0147301.)。

コスト面・性能面で実用レベルの見通しを得るためには、新規 BGL の生産性を向上する必要がある。

以上から、本事業では以下 2 つの研究項目に取り組む。

研究項目① : *Schizosaccharomyces pombe* を使った新規 β -Glucosidase の生産法の確立
(担当：株式会社 Biomaterial in Tokyo)

新規 BGL の課題は生産性が低いことであり、本事業で生産性を向上することで、コスト面・性能面で実用レベルを目指す。

中間目標値について、2021 年度は、「5L 培養槽にて生産性向上の達成」、2022 年度は「30L 培養槽にて生産性向上の達成」とした。生産性を向上させる戦略としては、培養条件の最適化、宿主への導入コピー数を 2～3 コピーとすることなどを計画しており、発現タンパク質量を増加させる。宿主には、形質転換系を確立している *S. pombe* を使用する。

事業開始時は新規 BGL の生産培地中の糖質に購入グルコースを用いるが、その後はコスト削減のために糖質をベース酵素を使用してパルプから自製した糖液（グルコース、キシロース含有）に変更し、最終的には工場での生産を模した培養法の確立を目指す。また、助成フェーズで設置を計画している大型発酵槽の設計情報を得るために、委託フェーズでは発酵槽をスケールアップして評価を行う。酸素移動容量係数 (KLA) を測定し、大型発酵槽での空気供給量の目途をつけることで、コンプレッサーの大きさに反映させる。

研究項目② : 新規 β -Glucosidase の糖化における外添効果評価
(担当：三菱製紙株式会社)

八戸工場ではユーカリチップ、アカシアチップ、国産チップ等を用い KP の製造を行っており、使用するチップの配合比率は状況により変更している。これまで八戸工場の KP の糖化性評価を継続してきた中で、チップ配合以外の要因で糖化性に差が生じることが確認できている。樹種や薬品使用量以外に、季節要因の影響も考えられることから、工場由来原料の糖化性及び酵素の再利用性の周年確認を行うことで、事業化を見据えた基礎データの蓄積を行う。具体的には、再委託先より供与された新規 BGL とベース酵素として市販酵素 A を使用し、5L 発酵槽を利用した糖化試験を実施する。

中間目標値について、2021 年度は回収したベース酵素の活性再生に必要な新規 BGL とベース酵素の添加量、及び回収したベース酵素の再利用可能回数の確認を行う。2022 年度は工場由来原料の糖化性の周年確認を行っていく。本事業の最終目標値は、競合品となる海外の第二世代糖よりも低コストとなる技術を開発することである。酵素の回収・再利用と外添（補充）によって酵素コストを低減し、目標値の達成を目指す。

(3) 全体計画

2021～2022年度の委託フェーズにおいて、新規BGLの生産法の確立、新規BGLの外添効果評価を実施する。ステージゲート審査を経て、2023～2025年度の助成フェーズでは、オンサイトBGLの生産プロセス構築、並行して第二世代糖の生産実証を実施する。

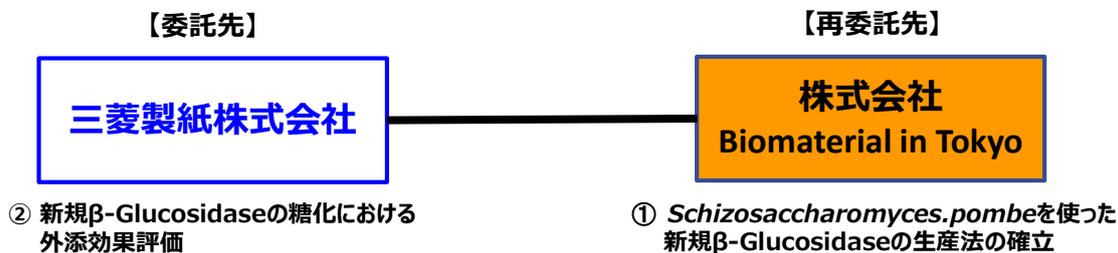
ステージゲート審査

新規BGL 研究開発項目	担当	委託フェーズ		助成フェーズ			2026～
		2021	2022	2023	2024	2025	
①生産法の確立	bits	→		生産法確立			
②外添効果評価	MPM	→					
③大型発酵槽を用いたオンサイト生産 第二世代糖の生産	MPM & bits			大型発酵槽設置	新規BGLの実証事業		
				試験生産			
					第二世代糖の事業化検討		

図 3.2.2.1.6-1 全体計画

(4) 実施体制

<委託フェーズ>



<助成フェーズ>

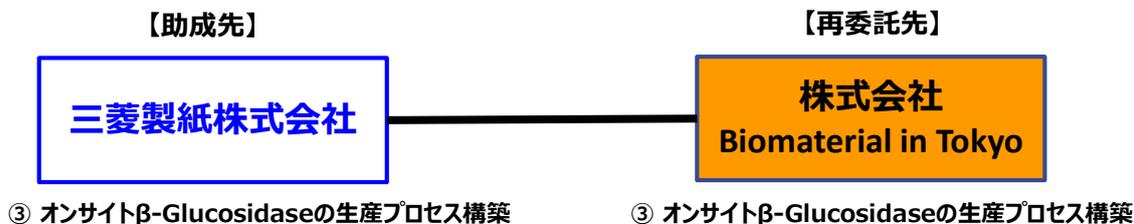


図 3.2.2.1.6-2 実施体制

(5) 運営管理

テーマの進捗について1回/月程度のペースで再委託先と会議を開催している。

(6) 実施の効果

2030年の第二世代糖の国内市場規模見通し50万トン/年(600億円/年)

(7) 中間目標の達成度

7-1) 研究項目① *S. pombe* を使った新規 BGL の生産法の確立

目標：30L 発酵槽にて生産性向上を達成する。

検討項目	達成度・成果 () は 2022 年度末	今後の予定
新規 BGL 遺伝子による <i>S. pombe</i> の形質転換	達成度：○ <i>S. pombe</i> に、二重変異導入 BGL の遺伝子を導入した。	完了。
5L 発酵槽にて生産性向上を達成する	達成度：✕ → (○) 現在、5L 発酵槽では、新規 BGL の生産性を向上できていない	2022 年度第二四半期までに、生産性に影響する推定される培養条件の調査を行い、5L 発酵槽での培養条件を確立する。 その後、30L スケールでの培養条件を確立する。
新規 BGL の特性評価	達成度：△ → (○) フラスコスケールで生成した新規 BGL の特性を評価し、耐熱性は、中程度レベルであり、耐糖性に優れていた。	2022 年度第二四半期までに、5L の発酵槽で生産した新規 BGL に関して、特性評価を行っていく。また、パルプを使った糖化実験を行い、新規 BGL の有用性を確認していく。

7-2) 研究項目② 新規 BGL の糖化における外添効果評価

目標：回収したベース酵素に新規 BGL を添加した系での糖化実験を行い、周年確認を行う。

検討項目	達成度・成果 () は 2022 年度末	今後の予定
ベース酵素と新規 BGL を使った糖化条件の検討	達成度：△ → (○) 新規 BGL の生産性が、当初の目標値よりも低いため、ベース酵素とモデルとなる既存 BGL を組み合わせて、高い糖化率を維持する条件を見出した。	ベース酵素と BGL の添加量の削減の可能性を調査する。 また、新規 BGL とベース酵素を組み合わせた糖化テストを行い、新規 BGL の有用性を確認する。さらに新規 BGL の生産方法を確立し、有用性を確認後、周年確認を行う
ベース酵素の調査	達成度：○ 本検討の当初に利用を考えていたベース酵素「市販酵素 A」以外にも、将来の安定供給を考慮して、代替になりうる酵素（仮称「酵素 B」※）を見出した。	今後の評価においては、「酵素 B」を使った糖化系についても評価・検討を行っていく。

※ 将来、継続的な供給の可能性のある国産酵素である。

◎：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) 研究開発の成果と意義

8-1) 研究項目① *S. pombe* を使った新規 BGL の生産法の確立（担当：株式会社 Biomaterial in Tokyo）

8-1-1) 新規 BGL 遺伝子による *S. pombe* の形質転換

構成アミノ酸に変異導入を行うことで「耐熱性の向上」、「生成物（糖）阻害回避」の 2 つの特徴を付与した二重変異導入 BGL（新規 BGL）の遺伝子を *S. pombe* に導入することを試みた。手法としては、*S. pombe* に最適化されたベクターに新規 BGL 遺伝子をライゲーションし、線状化処理を行った後、相同組換えによって *S. pombe* に導入した。上記の手段により形質転換された *S. pombe* の中から BGL 活性を有する株をスクリーニングした後、この株のフラスコ培養（100m L スケール）を行った。初期評価用の新規 BGL について、SDS-PAGE によって分析した結果、設計された分子量範囲内にあることを確認できた（図 3.2.2.1.6-3）。

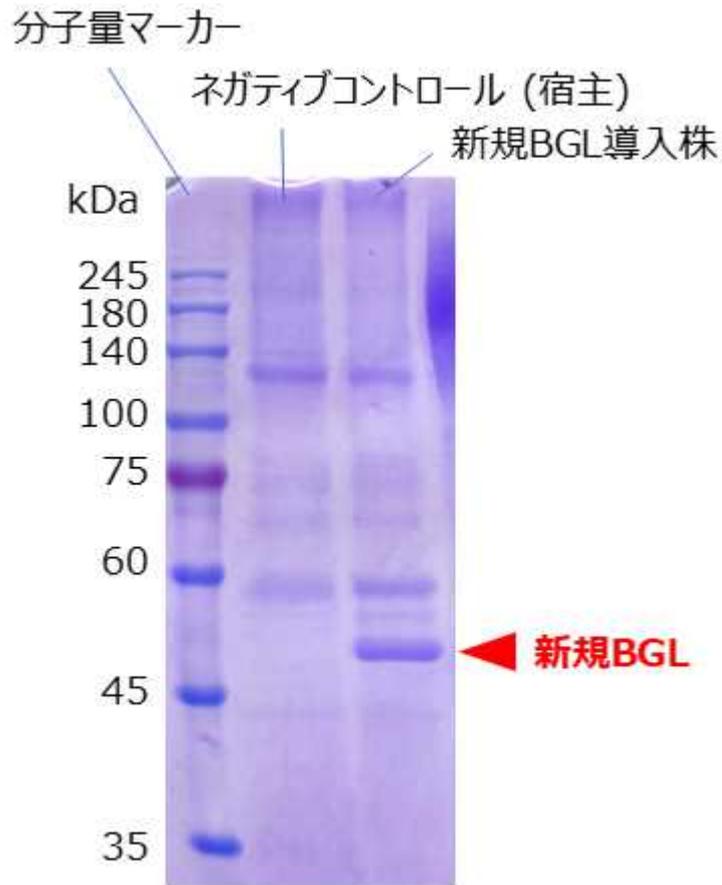


図 3.2.2.1.6-3 新規 BGL の SDS-PAGE 分析結果

8-1-2) 新規 BGL の耐熱性・耐糖性（生成物阻害回避）評価

次に、上記 8-1-1) の工程で得られた新規 BGL の耐熱性と耐糖性（生成物阻害耐性）の評価を行った。耐熱性に関しては、新規 BGL を 30℃、40℃、50℃、60℃ で各 30 分間加熱処理後の BGL 活性を測定した。耐糖性に関しては、種々のグルコース濃度下において BGL 活性を測定した。以下に評価結果を示す（図 3.2.2.1.6-4）。

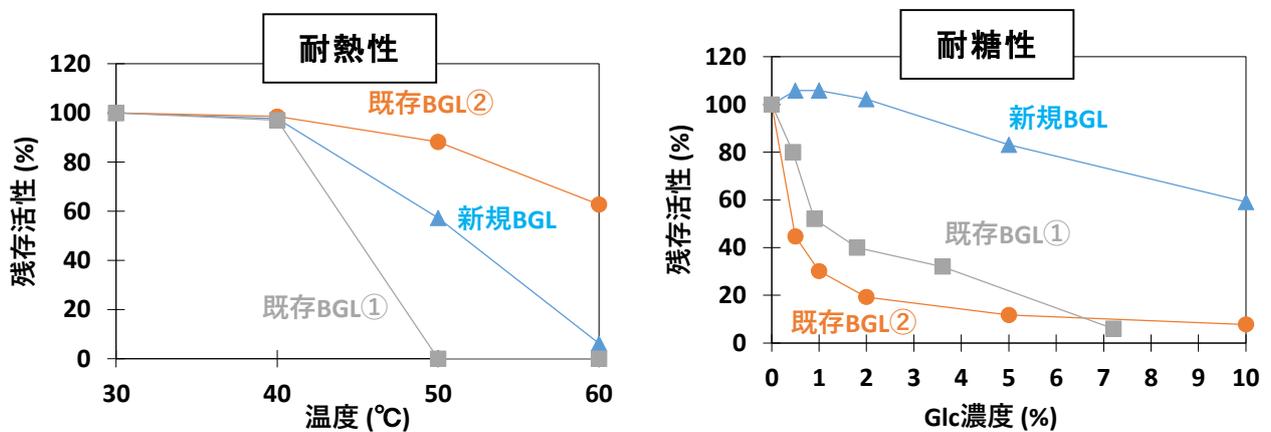


図 3.2.2.1.6-4 新規 BGL の耐熱性と耐糖性 評価結果

耐熱性に関して、新規 BGL の活性は 30℃ 処理に対して、40℃ 処理までほとんど低下しないが、50℃ 処理では 60% 程度まで低下し、60℃ 処理ではほぼ失活した。既存 BGL との比較では中程度のレベルの耐熱性であった。

耐糖性に関して、既存 BGL はグルコース濃度 1% で活性がブランク（0% 濃度）の 50% 以下に低下したのに対して、新規 BGL の活性はほぼ 100% 維持されており、既存 BGL が 10% 以下に失活するグルコース濃度 10% においてもブランクの 60% 程度の活性を維持していた。以上より、新規 BGL の耐糖性は既存 BGL よりも明確に優れることが分かった。

今回、フラスコスケールで培養された活性が低い新規 BGL のサンプルを用いた評価であったことから、今後は、培養条件の最適化された本培養で得られる、より高活性の新規 BGL について評価していく。

8-1-3) 新規 BGL 導入 *S. pombe* の 5L ジャーによる流加培養

新規 BGL の生産性を確認するため、新規 BGL 遺伝子導入 *S. pombe* の流加培養を、5L ジャーを用いて行った。しかし、タンパク質濃度、BGL 活性は想定より著しく低い結果であった。今後、培養条件を見直し、適切な培養条件によって目標とする生産性を目指す。具体的には、培養時における温度、pH、培地組成を見直し、最適化することで、生産性の改善を目指す。

8-1-4) 新規 BGL 導入 *S. pombe* の 30L ジャーによる流加培養

上記 5L ジャーでの培養条件をベースに、30L ジャーでの流加培養を検討する。また、新規 BGL の生産培地中の糖質を自製パルプ糖化液に変更し、工場での生産を模した培養法を確立することで、30L 発酵槽にて新規 BGL の生産性向上を達成する。

8-2) 研究項目②新規 BGL の糖化における外添効果評価（担当：三菱製紙株式会社）

本検討の段階では、新規 BGL を糖化実験に必要な量を得られていないため、既存 BGL②を新規 BGL のモデル酵素として検討を行い、高い糖化率を維持する条件を見出した。なお本検討は、新規 BGL を用いた場合の結果を予測可能なシミュレーションとなる。さらに、将来の酵素の安定供給を考慮し、本プロジェクト開始時に利用を計画していた、市販酵素 A 以外にも、代替可能な酵素として、酵素 B も利用が可能であることを見出した。酵素 B と既存 BGL②（新規 BGL のモデルとして使用）を混合し酵素カクテルとすることによって、酵素 B と既存 BGL②の酵素カクテルの FPU 活性は、相乗効果で、酵素 B 単独時に比較して、約 1.7 倍に向上した。この酵素カクテルを糖化に用いた後に膜回収して再び糖化に用いる（フレッシュ酵素カクテルも外添する）実験を繰り返したところ、再利用されたベース酵素を利用しても、高い糖化率を維持できることを確認できた（表 3.2.2.1.6-1）。

表 3.2.2.1.6-1 酵素Bと既存 BGL②の酵素カクテルに関する再利用性 評価結果

	糖化率 (%)
1サイクル目	83
2サイクル目	86
3サイクル目	83
4サイクル目	84
5サイクル目	85

(9) 成果の最終目標の達成可能性

現状において、研究項目①では新規 BGL 遺伝子によって形質転換された *S. pombe* は得られており、この形質転換体が新規 BGL を産生することは確認できた。しかし、現段階では、新規 BGL の生産性が低い。2022 年度の第二四半期までに、5L レベルの培養槽において、新規 BGL の生産性向上の技術を確立する。

生産性が向上しない原因として、「培養条件が最適でない」、「新規 BGL のフォールディングに問題がある」等の可能性が考えられるが、現在、原因調査しながら、過去に実績のある培養条件をベースに、2021 年度の条件から改善の余地のある部分を最適化することで新規 BGL の生産性を向上できる見込みである。

研究項目②では、2022 年度においては、5L レベル培養槽で得られた新規 BGL を使って、実際に、酵素Bと新規 BGL の酵素カクテルを使って、パルプの糖化テストを行う計画である。2021 年度の検討の結果から、新規 BGL は、耐糖性に優れており、パルプ糖化時における、糖化速度が向上する効果が期待される。

(10) 成果の普及

現段階では実用化に必要な技術開発に注力しているため、論文、社外発表などは控えている。今後、事業化の見通しがたった時点で、積極的に成果をアピールしていく。

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

本事業で新たに作出された「二重変異 BGL 遺伝子導入菌株」について、2022 年度に出願する予定である。

年度	特許出願		
	国内	外国	P C T
2021	0	0	0
2022	(1)	0	0
PJ 期間 合計	(1)	0	0

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

GHG 削減で有利なプロセスを用いてコスト競争力のある国産第二世代糖を工業的に大量生産する技術開発によって、従来にない付加価値が創出され、化成品やバイオ燃料に使用されるグルコース・キシロースなど糖質を国内で非可食原料から安定生産と低価格化を実現、提供することである。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略実用化・事業化に向けた戦略としては以下である。

- ① ベース酵素の回収再利用及び新規 BGL の活用によって第二世代糖のコストを低減する。
 - ② 原料として、製紙工場の直送クラフトパルプを利用する。
 - ③ クラフトパルプ工程の回収ボイラーを活用することで GHG 削減の付加価値を付ける。
 - ④ 製造→販売→活用のノウハウを持つ各社と協業することで事業化を加速する。
- これら手段を組みあわせて事業化を推進し、ビジネスを拡大していく。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

実用化、事業化に向けて、下記取り組みを行い、2030 年までには第二世代糖の製造・販売を事業化させる。

項目	目的	取組み
新規 BGL の開発	糖化コスト削減	新規 BGL の効率生産法の開発 (2021. 09～2022. 09)
メイン酵素の調査	酵素の安定供給	メイン酵素の調査 (2021. 09～2022. 09)
糖化効率の変動調査	通年での糖化効率の調査	直送パルプを使っての一定条件での糖化効率の変動調査 (2021. 09～2023. 03)
第二世代糖の利用	利用先を開拓	活用先の調査 (2021. 09～2025. 03)
新規 BGL の試験生産	新規 BGL の量産技術の実証	大規模設備での新規 BGL の生産条件の確立 第二世代糖試作品のワーク (2023. 03～2025. 03)
新規 BGL の本生産	新規 BGL の安定生産	第二世代糖を原料とした新規 BGL の商業生産 第二世代糖製品の販売 (2025. 04～)

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

本プロジェクトにおいて、助成フェーズに進んだ場合、以下の想定が考えられる。

- ・新規 BGL の実機培養 → 2023～2025 年度に助成フェーズで達成する見通し
- ・第二世代糖の生産実証 → 2025 年度に実機設備による生産実証の見通し

しかしながら、上記の第二世代糖の実用化・事業化を進めるためには、本プロジェクトで検討している新規酵素の開発以外に、「原料となるパルプ原料の選定、処理方法」、「エネルギーコストの削減」、「糖化プラントの生産性改善」等の課題を総合的に検討し、取り組む必要がある。

(12.5) 波及効果

本研究開発によりアウトプットされる製品は主に「第二世代糖」である。「第二世代糖」においては、原料を食品と競合しない木材資源を原料とするパルプを使用しており、バイオものづくり産業の基盤技術として貢献する。国連食糧農業機関（FAO）においても食糧不足問題が起きる可能性が危惧されており、当研究における第二世代糖の作出には重要な意義がある。

また、パルプを生産する際にパルプ化工程から生成されるリグニンは、回収ボイラーを介して、熱エネルギーと熱エネルギーを使った自家発電の電気に変換される。これらバイオマス由来のエネルギーを利用して「第二世代糖」を製造することができ、GHG 削減に貢献できる。

3.2.2.1.7 JM05「超耐熱性プロテアーゼを活用した感染制御技術の社会実装実証」

(サラヤ株式会社、岡山理科大学)

(1)背景と目的

食品加工現場、医療施設から家庭にいたるまで高度な衛生管理、感染制御が求められている。衛生管理の基本は洗浄にあり、アルカリ性薬剤や酵素洗浄剤が用いられている。既存の洗浄剤には、①高 pH 廃液など環境とユーザーに負荷がかかる、②酵素洗浄剤の使用条件（温度、pH）に制限がある、③除去、不活化が困難な難分解性タンパク質があり、新興感染病原体に対抗しうる新技術の確立が求められている、という課題がある。超好熱菌由来の耐熱性プロテアーゼを薬剤に組み合わせることでこれらの課題を克服できる。本事業では高い洗浄力と分子レベルの感染因子不活化効果を発揮できる“超洗浄”技術を実用化することを目的とする。

(2)位置づけ、目標値

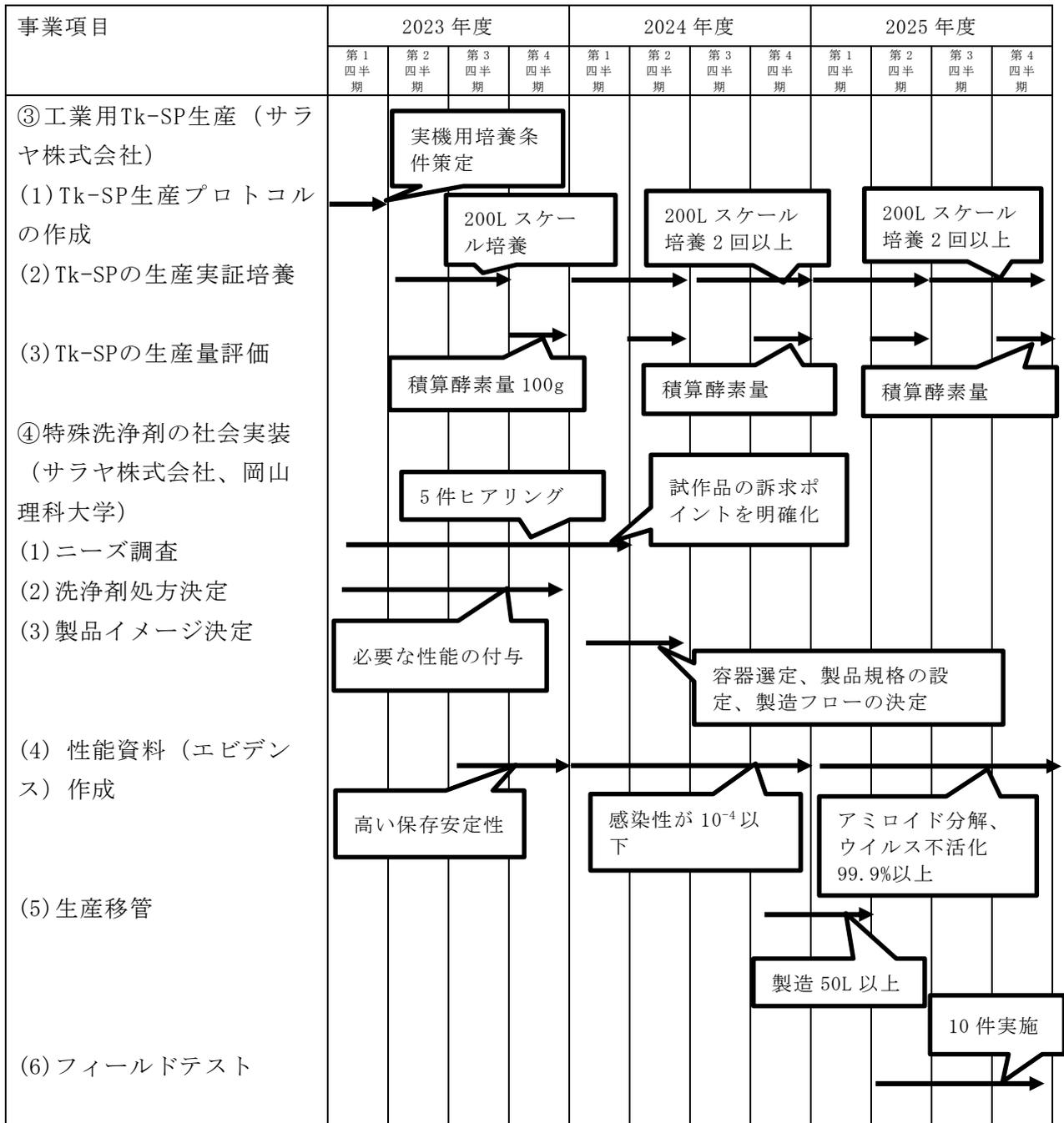
医療、食品製造での汚れの確実な除去が、医療器具の消毒・滅菌の質を大きく左右し、また食中毒発生の防止、アレルゲンの混入防止に必須である。業務用洗浄剤の高機能化は、高度な衛生管理実現のための主要な技術である。また、家庭においても接触感染防除のため、家庭用衛生商品の需要が増加している。現在、業務用界面活性剤市場は 2580 億円、医療衛生用品（30 品目）市場は 4,997 億円に上る。医療器具や製造機械など、洗浄対象の複雑化、多様化、小型化により、それらの洗浄技術もさらなる高度化が求められている。これまでに洗浄温度を高温（80℃以上）にすることで、洗浄効果が高まることが知られている。一方で、複雑な構造物の洗浄や、感染因子を分子レベルで不活化できる技術として、酵素洗浄剤が利用されている。しかし、洗浄用酵素の耐熱性が不十分なことから高温（80℃以上）で使用できる酵素洗浄剤はまだない。

本研究開発では、超好熱菌由来のプロテアーゼ（Tk-SP）が、洗浄用酵素として活用できる生産性を持った生産技術を確立し、洗浄成分中での高い安定性と 80℃以上の高温で高い活性を有することを示して、産業用酵素としての実用性を実証する。最終的には洗浄と感染因子の不活化を同時に行える技術として、80℃で既存酵素洗浄剤と同等以上の酵素の効果を発揮できる洗浄剤を実用化することを目的とする。

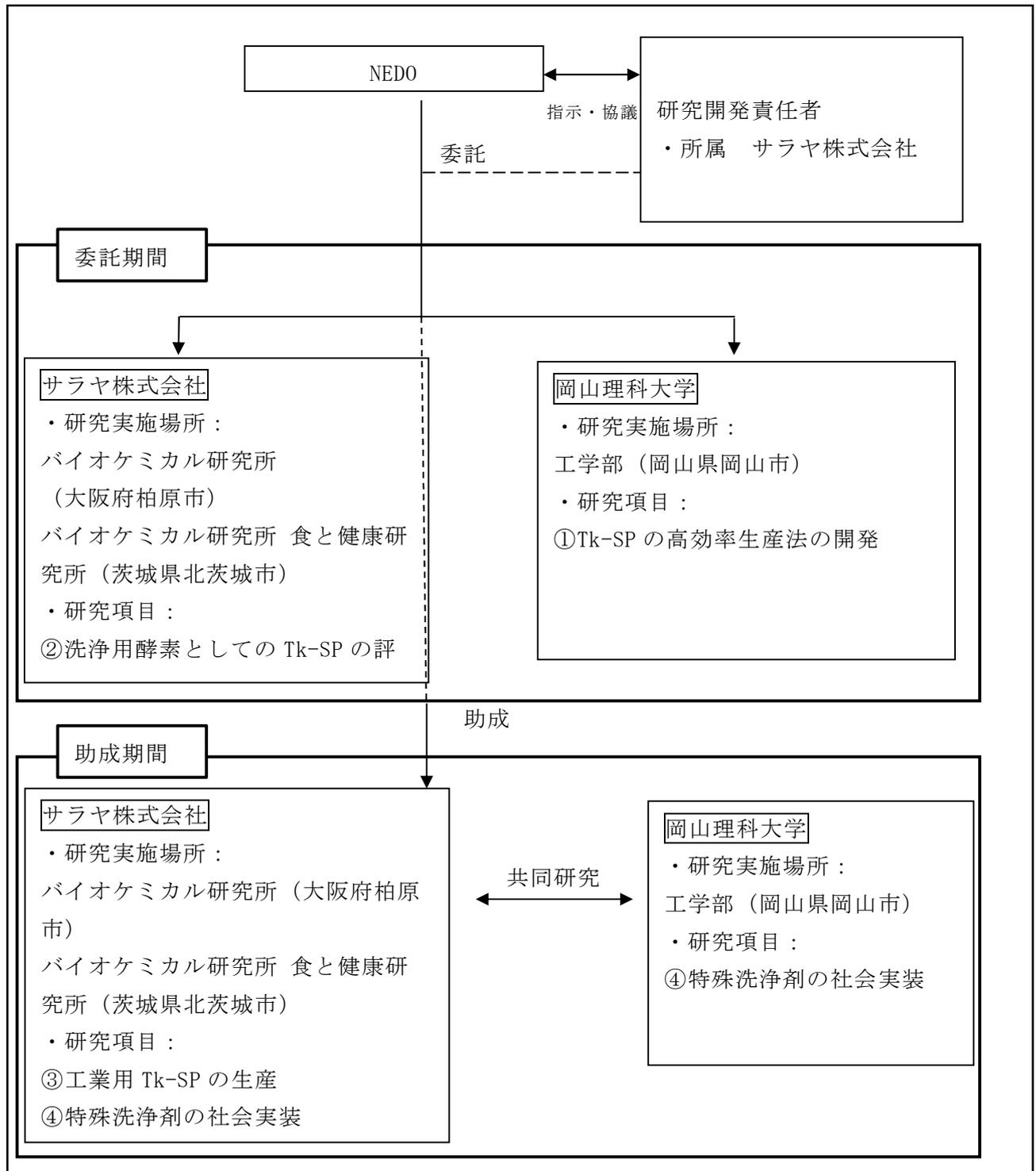
(3) 全体計画

事業項目	2021年度				2022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	
①Tk-SP の高効率生産法の開発（担当：岡山理科大学） (1) Tk-SP 発現菌株の構築 (2) Tk-SP 発現菌株の生産性測定 (3) 基本株培養スケールアップ (4) 酵素調製法の確立		*1	*2	*3	*4	*5	*6	*7	
				大腸菌、酵母宿主で Tk-SP 発現系を構築					
				高発現菌株を選抜		スケールアップ培養プロトコル作成			
							成熟化効率向上		
②洗浄用酵素としての Tk-SP の評価（担当：サラヤ株式会社） (1) 洗浄剤成分中での酵素活性評価 (2) 洗浄剤組成中での酵素安定性評価 (3) ラボスケールでの洗浄評価 (4) 実機での洗浄評価		*8	*9	*10	*11	*12	*13	*14	
		高温で高い活性		高い保存安定性					
						市販洗浄用酵素と同等以上の洗浄			
						市販洗浄用酵素と同等以上の洗浄力			

*1～*2: Tk-SP 発現菌株の構築、*2～*3: 発現菌株の生産性評価、*4～*5: 培養スケールアップと培養プロトコル作成、*5～*7: 酵素調製法の確立、*8～*9: 洗浄剤組成中での酵素評価、*9～*10: 酵素安定性評価、*11～*12: ラボスケール洗浄評価、*12～*14: ウォッシャーディスインフェクター実機での洗浄評価。



(4) 実施体制



(5) 運営管理

本研究課題の遂行にあたり、サラヤの実施者、岡山理科大学の実施者で構成された進捗報告会を1か月に1度開催し、プロジェクトの進捗報告、酵素や洗浄剤に関する情報交換を行うほか、相互の研究実施場所を訪問し情報共有をはかっている。

(6) 実施の効果

市場調査法人 Markets and Markets が 2017 年に発行した「医療機器洗浄・消毒の世界市場：プロセス別、用途別 2022 年予測」では、医療機器洗浄・消毒の世界市場規模は 2017 年段階で 13 億 1,000 万ドル（1,400 億円）と推計され、2022 年には 17 億 1,000 万ドル（1,800 億円）市場に拡大すると予測されている。酵素による分子レベルでの不活化技術は、アルコール、次亜塩素酸、界面活性剤に代わる新しい不活化法として、将来的な新興感染源によるパンデミック対策になりうる。その場合の市場規模は上記よりも大きくなると予想される。Tk-SP を有効成分とし、高温、弱アルカリ領域で酵素洗浄が可能な感染防除技術は、今までに無い特徴ある技術であるため、これらの市場で、一定のシェアを取ることが期待できる。産業用途の洗浄剤でのビジネスモデルが達成された場合、家庭用衛生商品への Tk-SP の配合も視野に入れている。この場合、市場規模は国内だけで 2,000 億円規模になると見込まれる。また、酪農では乳牛の乳房炎による損失が 1 戸あたり年間 100 万円、ホクレンの 5 農協で 1 年間 10 億円にのぼると試算されている。そのため、搾乳に使用される搾乳機はアルカリ性の強い薬剤での効果的な洗浄と滅菌が必要である。しかし、アルカリによるゴム部品の劣化や、排水中和の負担がかかることから、簡便で安全性の高い洗浄方法の普及が求められている。食品加工現場においても、製造ラインの洗浄は、接合部分を分解して行う手間のかかる作業になる。医療現場でも、凝固した体液や、器具の微細構造の汚れを効果的に除去する方法が常に望まれている。さらに、 β アミロイドや異常プリンタンパク質のような難分解性タンパク質の不活化除去も問題となっている。公共の場や一般家庭においても、感染症予防や衛生管理意識が高まっている。ノロウイルスのような病原体は吐瀉物などに含まれた形で、繊維などに付着するため、洗浄と殺菌を同時に行うことができる製品が不可欠である。Tk-SP を有効成分とする洗浄剤では、固着した体液や食物などを、水溶化させながら Tk-SP を繊維内部や器具の微細構造の奥に到達させることができる。高温の水溶液中で洗浄剤と同時に作用させることができるため、負担の軽い安全性の高い衛生管理を実現できる。高安定性酵素を用いることで、洗浄剤中の安定化剤が必要なくなるため、製品の省容量化、省重量化（既存製品の 30%以上減）を達成できる。予想洗浄剤出荷量（年間 1,000 t）の輸送に伴う CO₂ 排出量の削減は、年間 26.5t（「物流分野の CO₂ 排出量に関するガイドライン Ver3.1」記載の改良トンキロ法で計算）以上削減できることになる。これに加え冷蔵保存時の CO₂ 排出量も削減できると見積もられる。また、弱アルカリ性洗浄剤の場合、廃液の中和が容易になり環境負荷、作業時の安全性の向上が達成できる。

(7) 中間目標の達成度

研究項目①：Tk-SP の高効率生産法の開発（岡山理科大学）

	研究開発項目	研究内容	中間目標	達成度
2021 年度	(1)Tk-SP 発現 菌株の構築	大腸菌、酵母宿主 で Tk-SP 発現系を 構築	Pro-Tk-SP もしくは Tk-SP を安定に発現す る菌株を取得する。	○ 酵母宿主と大腸菌宿主での Tk- SP 発現菌株を培養し、種菌ス トックを作製した。
	(2)Tk-SP 発現 菌株の生産性 測定	大量培養し Tk-SP の生産量を評価す る。	高発現菌株を選抜す る。	○ フラスコ培養（1L）、ジャー ファーメンターでの回分培養 （2～5L）を行い、生産性を確 認できた。
2022 年度	(3) 基本株 培養スケール アップ	200L スケールへの スケールアップに 向けたデータを取 り、生産培養の標 準プロトコルを作 成する。	ラージスケールでの 培養。	△（○） 30L スケールの培養に向け、8L スケールでの再現性の確認試 験を実施した。グルコースを 炭素源とした培養条件の検討 を行った。200L スケールでの 培養に向けた検討項目の洗い 出し。30L スケールでの培養を 可能とする事業者との連携中 である。
	(4) 酵素調 製法の確立	Tk-SP の成熟化プ ロセスにおける酵 素濃度、酵素成熟 化（活性化）条件 （温度、時間、加 熱方法）を最適化 する。保存加速試 験を行い、酵素調 製の標準プロトコ ルを策定する。	成熟化効率の向上。 50℃での使用時に活 性を示し、加速試験 で高い残存活性を示 す保存安定性。	△（○） 成熟化 Tk-SP のロット差を解析 し、酵素活性低減に、成熟化 進行度の違いが影響している ことを確認した。さらに、そ の差が成熟化のみならず自己 分解の影響を受けることも確 認した。標準プロトコルの策 定には至っていないが、自己 分解を抑制しつつ、高効率で 成熟化を達成する条件の決定 し、達成可能と見込まれる。

研究項目②：洗浄用酵素としての Tk-SP の評価（サラヤ株式会社）

	研究開発項目	研究内容	中間目標	達成度
2021 年度	(1) 洗浄剤成分中の酵素活性評価	洗浄剤成分中での Tk-SP の酵素活性を定量的に評価し、基礎データとする。	高温で高い活性を示す。洗浄剤成分は 20 種類以上評価する。	○ 32 成分（濃度違い含めて）のうち 25 成分で高い活性を示した。コントロール（市販洗浄用酵素）は全て満たさなかった。
	(2) 洗浄剤成分中の酵素安定性評価	洗浄剤成分中での Tk-SP の酵素安定性を定量的に評価し、基礎データとする。	加速試験において洗浄剤成分中で高い残存活性を有することを示す。洗浄剤成分は 20 種類以上評価する。	○ 32 成分（濃度違い含めて）のうち 24 成分で高い残存活性を示した。コントロール（市販洗浄用酵素）では 2 成分のみであった。
2022 年度	(3) 洗浄性評価	高温、中性～弱アルカリ性で洗浄評価を実施する。	高温、中性～弱アルカリ性で市販洗浄用酵素と比べて同等以上の洗浄力を有することを示す。	△ (○) ラボスケールでの洗浄試験条件（洗浄時間、モデル汚れ量、浴比など）を概ね決定した。今後実機での条件も決定し、それら条件で試験を実施予定。2021 年度の取組みにおいて、Tk-SP の高温における酵素活性は市販酵素よりも優れていることが明らかになったことから、洗浄性においても同等以上を示すものと考えられる。

◎：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）

() は 2022 年度末見通し

(8) 研究開発の成果と意義

研究項目①：Tk-SP の高効率生産法の開発

(1) Tk-SP 発現菌株の構築

[研究内容]

大腸菌、酵母宿主で Tk-SP 発現系を構築

Tk-SP を大量発現させると宿主に生育阻害を引き起こすため、一般的な発現系では高発現系を作ることが困難である。そこで分泌発現と、Tk-SP 活性阻害条件下での発現を行った。

[2021 度末目標値]

Pro-Tk-SP もしくは Tk-SP を安定に発現する菌株を取得する。

[2021 年度成果（達成度（%））]

分泌発現宿主においても生育阻害が原因で発現宿主の取得が困難であったが、分泌発現宿主と共同研究先保有のプラスミドを使用したところ 100mg/-L 前後の発現量が確認できた。一方、菌体内発現において、Tk-SP の特阻害条件下で発現させることで約 170mg/L-culture の発現宿主を構築することができた。分泌発現宿主と菌体内発現宿主それぞれの Tk-SP 発現菌株を培養し、種菌ストックを作製した。いずれの種菌においても Tk-SP が安定発現できることを確認した。（達成度：100%）

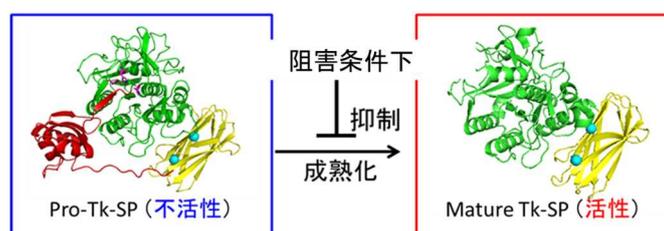


図 3.2.2.1.7-1 Tk-SP の活性化抑制イメージ
Pro-Tk-SP の成熟化を阻害することにより、菌体内での活性化を阻止する。

表 3.2.2.1.7-1 Tk-SP 発現量の比較

※比活性で換算

	Total activity	Estimated Protein
	(U)	(mg)
WT	88	8.4
共発現	1.8×10^3	171.4

発現量20倍

Pro-Tk-SP と阻害ペプチド (Tk-Pro) の共発現により発現量が 20 倍になる。

(2) Tk-SP 発現菌株の生産性測定

[研究内容]

8L スケールのジャーファーメンターを使用して、種菌としてストックした発現宿主を大量培養し Tk-SP の生産量を評価した。

[2021 度末目標値]

高発現菌株を選抜する。

[2021 年度成果 (達成度 (%))]

フラスコ培養 (1L)、ジャーファーメンターでの回分培養 (2~5L) を行った。分泌発現系を使うことで 100mg/L 前後の Tk-SP の分泌発現が確認された。一方、大腸菌発現系においては、NZCYM 培地を使用した基本条件下での培養を行ったところ約 500mg/L-culture に達した。さらに培地を高密度培養可能なものに変えて培養したところ、10 倍の菌体量を得ることに成功し、Tk-SP の十分量の生産性を確認できた。Tk-SP の生産性の高い菌体内発現宿主を使用することとした。(達成度: 100%)

(3) 基本株培養スケールアップ

[研究内容]

発現再現性の高い菌株を用いて、30L 発酵槽での Tk-SP 生産実証培養を行い、200L スケールへのスケールアップに向けたデータを取り、生産培養 (バッチ培養) の標準プロトコルを作成した。

[2022 度末目標値]

ラージスケールでの培養。

[2022 年度成果 (達成度 (%))]

30L スケールの培養に向け、8L スケールでの再現性の確認試験を実施した。また 30L スケールでの培養試験実施に向けて、連携を進めている。(達成度: 50%)

(4) 酵素調製法の確立

[研究内容]

発現誘導方法を策定し、標準的な菌体増殖データ、酵素生産性データの測定を行い、Tk-SP の成熟化プロセスにおける酵素濃度、酵素成熟化 (活性化) 条件 (温度、時間、加熱方法) の最適化を試みた。培養サンプルを菌体破碎後、熱成熟化プロセスを経て凍結乾燥し酵素剤とし、酵素活性測定、SDS-PAGE による成熟化進行度の確認を行った。

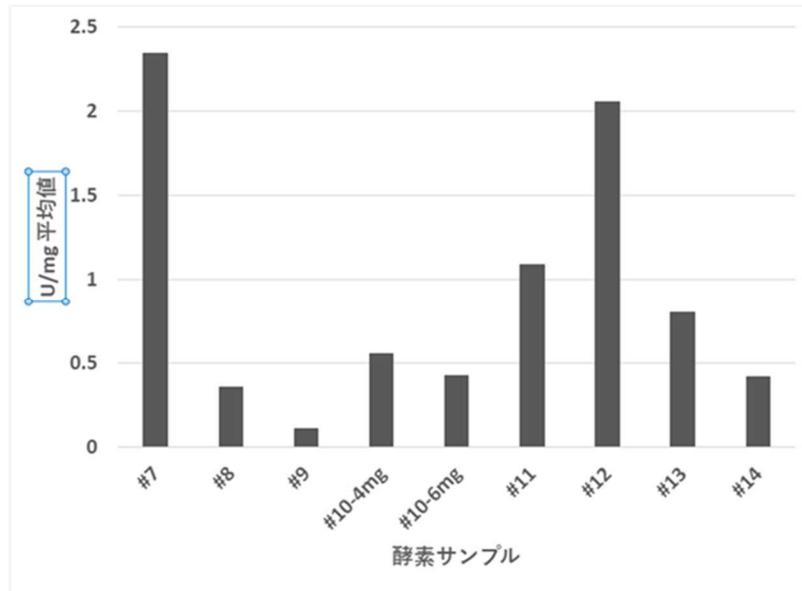


図 3.2.2.1.7-2 成熟化 Tk-SP (lot #7~#14) の比活性の比較

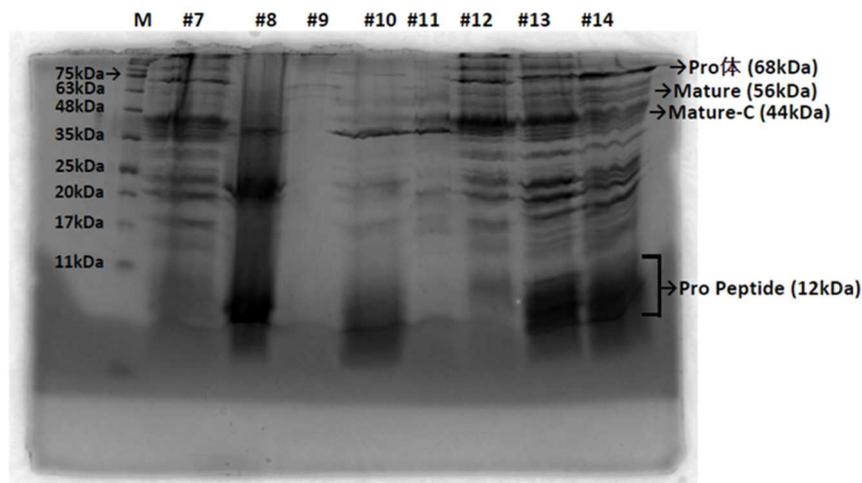


図 3.2.2.1.7-3 成熟化 Tk-SP の SDS-PAGE

この結果、#7、#12 のように、比活性の高いサンプルでは、成熟体 (mature-c) が十分存在し、且つ Pro peptide (Tk-pro) の分解が進行していることが確認できた。一方、#13 のように成熟体は十分存在しているものの Pro peptide の分解が進んでいない (成熟化が十分進行していない) 場合と、#9、10、11 のように成熟体事態が自己分解している (成熟化が進みすぎている) 場合が確認できた。現状の成熟化プロセスは、80℃、1 時間の熱処理であるが、酵素濃度や加熱方法などを検討し再現性のあるプロセスを作ることが課題として明確になった。

[2022 度末目標値]

発現酵素の 70% 以上を活性化できる条件の検討。加速試験で常温保存安定性が確認できる酵素剤調製法を標準化し酵素調製プロトコルを作成。

[2022 年度成果（達成度（%））]

成熟化 Tk-SP のロット差を解析し、酵素活性低減に、成熟化進行度の違いが影響していることを確認した。さらに、その差が成熟化のみならず自己分解の影響を受けることも確認した。標準プロトコルの策定には至っていないが、自己分解を抑制しつつ、高効率で成熟化を達成する条件の決定し、達成可能と見込まれる。（達成度：50%）

研究開発項目②：洗浄用酵素としての Tk-SP の評価

（1）洗浄剤成分中での酵素活性評価

[研究内容]

洗浄剤成分（界面活性剤、pH 緩衝液、除菌剤、キレート剤）中での Tk-SP の酵素活性を定量的に評価し、基礎データとした。

[2021 度末目標値]

高温の洗浄剤成分中で高い酵素活性を有することを示す。洗浄剤成分は 20 種類以上評価する。

[2021 年度実績（達成度（%））]

結果を表 3.2.2.1.7-2 に示す。32 成分中 27 成分で高い活性を示し目標を達成した。市販洗浄用酵素は全ての成分において酵素活性は検出限界以下となった。（達成度：100%）

（2）洗浄剤成分中での酵素安定性評価

[研究内容]

洗浄剤成分（界面活性剤、pH 緩衝液、除菌剤、キレート剤）中での Tk-SP の酵素安定性を定量的に評価し、基礎データとした。

[2021 度末目標値]

加速試験において、洗浄剤成分中で高い残存活性を有することを示す。洗浄剤成分は 20 種類以上評価する。

[2021 年度実績（達成度（%））]

「（1）洗浄剤成分中での酵素活性評価」で目標を達成した 27 成分について安定性を評価した。その結果を表 3.2.2.1.7-2 に示す。27 成分中 20 成分で高い残存活性を示し目標を達成した。市販洗浄用酵素で高い残存活性を示したのは 3 成分のみであった。（達成度：100%）

表 3.2.2.1.7-2 洗浄用酵素としての Tk-SP の評価結果

	酵素活性評価*1		酵素安定性評価*2	
	Tk-SP	市販洗浄用酵	Tk-SP	市販洗浄用酵
洗浄成分なし（コントロール）	○	×	○	×
アニオン界面活性剤 A（1%）	○	×	○	×
アニオン界面活性剤 A（10%）	○	×	×	×
アニオン界面活性剤 B（1%）	○	×	○	×
アニオン界面活性剤 B（10%）	○	×	×	×
アニオン界面活性剤 C（1%）	○	×	○	×
アニオン界面活性剤 C（10%）	○	×	×	×
カチオン界面活性剤 A（1%）	×	×	n. d.	n. d.

カチオン界面活性剤 A (10%)	×	×	n. d.	n. d.
両性界面活性剤 A (1%)	○	×	○	×
両性界面活性剤 A (10%)	○	×	○	×
非イオン界面活性剤 A (1%)	○	×	○	×
非イオン界面活性剤 A (10%)	○	×	○	×
非イオン界面活性剤 B (1%)	○	×	○	×
非イオン界面活性剤 B (10%)	○	×	○	×
溶剤 A (10%)	○	×	○	×
溶剤 A (20%)	○	×	○	○
溶剤 B (10%)	○	×	×	×
溶剤 B (20%)	○	×	○	×
安定化剤 A (1%)	○	×	○	○
安定化剤 A (5%)	○	×	○	○
安定化剤 B (1%)	○	×	○	×
安定化剤 B (5%)	○	×	○	×
キレート剤 A (1%)	○	×	○	×
キレート剤 A (5%)	×	×	n. d.	n. d.
キレート剤 B (1%)	×	×	n. d.	n. d.
キレート剤 B (5%)	×	×	n. d.	n. d.
キレート剤 C (1%)	○	×	×	×
キレート剤 C (5%)	○	×	○	×
Tris-HCl 緩衝液 pH7	○	×	○	×
Tris-HCl 緩衝液 pH8	○	×	○	×
炭酸 K-炭酸水素 K 緩衝液 pH9	○	×	×	×
炭酸 K-炭酸水素 K 緩衝液 pH10	○	×	×	×

* 1 ○：高温の洗浄剤成分中で酵素活性が基準値以上、

×：高温の洗浄剤成分中で酵素活性が基準値未満

* 2 ○：加速試験において残存活性が基準値以上

×：加速試験において残存活性が基準値未満

n. d. : no data

(3) 洗浄性評価

[研究内容]

高温、中性～弱アルカリ性で洗浄評価を実施する。

[2022 年度末目標値]

高温、中性～弱アルカリ性で市販洗浄用酵素と比べて同等以上の洗浄力を有することを示す。

[2022 年度実績（達成度（％））]

ラボスケールでの洗浄試験条件を概ね決定した。今後実機での条件も決定し、それら条件で試験を実施予定。2021 年度 of 取組みにおいて、Tk-SP の高温における酵素活性は市販酵素よりも優れていることが明らかになったことから、洗浄性においても同等以上を示すものと考えられ、2022 年度末には目標を達成できる見通し。（達成度：50%）

高い洗浄力と分子レベルの感染因子不活化効果を発揮できる酵素洗浄剤の実用化を本テーマの全体目標とし、それを実現するために、酵素の生産系の確立と高温洗浄剤成分中での酵素性能評価、および洗浄剤成分中の保存安定性評価の実施を中間目標とした。2021年度末までにこれらの中間目標値を達成した。これにより、Tk-SPの高効率生産法を確立し、工業用Tk-SP生産を行い、高い洗浄力と分子レベルの感染因子不活化効果を発揮できる酵素洗浄剤の社会実装に大きく近づいた。

2022年度は構築されたTk-SP生産菌株を用いて、安定的に酵素生産できる基本培養条件の策定を進め、培養の基本プロトコルを作成することを目的としている。すでに5Lスケールの培養条件下で安定的に高密度培養できる条件を見出しており、来年度の大規模培養に向けた条件の見直しを進めている。また、Tk-SPは成熟化プロセスを経て活性化するが、現在、試作したTk-SPにおいては、成熟化プロセスが安定していなかったが、その原因が成熟化条件の違いによって、酵素の自己分解や成熟化不十分になるためであることが分かった。熱成熟化、凍結乾燥プロセスが酵素生産性に大きく影響していることが見出され、今後生産効率を上げるために検討する項目が明確になった。今後、Tk-SPの培養の標準プロトコルの作成、温度、酵素濃度、加熱方法、凍結乾燥法を検討し、成熟化効率の良いTk-SP成熟化方法を決定できる見込みである。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

高い洗浄力と分子レベルの感染因子不活化効果を発揮できる酵素洗浄剤の実用化を最終目標とする。既存の酵素洗浄剤と同等以上の洗浄力を80℃以上の高温で達成することにより、洗浄と感染因子の不活化を同時に行うことができ、かつ、多様な洗浄対象に対しても対応できる高度な洗浄法を確立できる。酵素の洗浄剤成分中での性能が既存酵素に比べて高いことは明らかになったため、酵素の大量生産系を確立しスケールアップの課題をクリアすれば最終目標の達成は可能であると考えられる。

酵素(Tk-SP)の大量生産系の確立に向けて、下記の段階を経て、産業スケールの酵素生産体制を準備する。

研究項目①「Tk-SPの高効率生産法の開発」(大阪大学(2021年度)、岡山理科大学(2022年度))では、Tk-SP発現菌株の構築:大腸菌、メタノール資化酵母を宿主とするTk-SPの発現系をそれぞれ複数株構築し発現効率の良い菌株の選抜を行うことを計画し、2021年度達成した。また、それぞれの大腸菌発現系、酵母発現系それぞれについて種菌ストックを作製し、ジャーファーマンターを用いて、各種菌を3Lスケールで培養し、Tk-SPの生産性を評価したところ、大腸菌宿主において十分量の生産効率のTk-SP生産基本株を構築できた。

2022年度は構築されたTk-SP生産菌株を用いて、安定的に酵素生産できる基本培養条件の策定を進め培養の基本プロトコルを作成する。すでに5Lスケールの培養条件下で安定的に高密度培養できる条件を見出しており、さらに効率的な条件を検討している。これらの培養条件で生産性の再現性の確認を行う見込みである。

また、Tk-SPは成熟化プロセスを経て活性化するが、現在、試作したTk-SPにおいては、成熟化プロセスが安定していなかったが、その原因が成熟化条件の違いによって、酵素の自己分解や成熟化不十分になるためであることが分かった。酵素の品質を安定させるために、成熟化条件の

標準化を進めており、2022 年度中に酵素の成熟化プロセスについても標準化させることが可能である。

(10) 成果の普及

2022 年に学会発表を 1 件予定している。

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	
2021	0	0	0	0	0	0	0
2022	0	0	(1)	0	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	(1)	0	0	0	0

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

従来の医療器具用洗浄剤との差別化ポイントを明確にして、知財化を目指す。

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

プロジェクトの最終年度（2025 年度）にサラヤ株式会社においてフィールドテストを実施した後、その結果も踏まえて医療器具用洗浄剤ラインナップとして製品化を行う。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

産業用器具の洗浄剤は、洗浄対象の材質、形状、機能の違いによって洗浄方法や洗浄剤組成、洗浄方法を個別に調整する必要があり、用途によって細分化している。現在、広く普及しているアルカリ高温洗浄ではカバーしきれない、洗浄対象の多様化や新たな感染症等に対する高度な洗浄需要の高まりを考慮すると、弱アルカリ、高温領域での洗浄が可能な酵素洗浄剤をラインナップに加えることにより、新たな洗浄剤市場を獲得することができる。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

プロジェクトの最終年度に実施したフィールドテストの結果をもとに、サラヤ株式会社で販売部門も含めて当該製品の妥当性を検証する。洗浄性などの性能はもちろんのこと、使い勝手やラベルデザイン、さらには経済合理性など製品仕様全体について検証し、必要に応じて設計を調整・変更する（1～2 年）。その後、製品化のための社内ルートに乗せて、全社で製品化の妥当性を見極めていく。特に、品質の妥当性については入念な検証を行う。並行して、プロモーショ

ン戦略を決定し、それに従ったカタログなどの販促物作成、および Key Opinion Leader (KOL) との連携も行う (1~2 年)。その後、製造・製品化するが、製造における設備投資は不要で現有設備で可能と判断している。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

サラヤ株式会社は、環境負担低減を意識した独自性の高い技術を有する感染制御関連技術メーカーとして、アルコール手指消毒剤、医療器具洗浄剤、内視鏡洗浄システム、消費者向け洗剤、スキンケア製品等を手がけている。約 20 年前から医療機関向けの、専用洗浄剤を製品化し、多様な洗浄対象に対応できるよう製品展開している。また、協業先との共同開発による内視鏡洗浄システムは、国内トップシェアを持っており、機器洗浄剤の開発・販売の実績があり、事業化へのノウハウを有している。さらに、上記製品を実施するのに必要な材料の調達先や製造工場、在庫管理システム、および販売経路を有しており、サプライチェーンマネジメント体制が整っている。販売部門とは定期的な情報交換の機会を設けており、その中で本技術の実用化研究を実施中であることを共有している。

(12.5) 波及効果

現在、医療器具の洗浄や食品生産ラインの洗浄においては、アルカリ性の洗浄剤や塩素系漂白剤のような強力な酸化剤が用いられている。一方、強力な薬剤による器具の腐食や作業者の安全性の問題から医療、食品生産現場で普及しにくいという課題がある。酵素洗浄剤は分子レベルでの汚染除去が可能であるものの、酵素安定性の問題で高度な洗浄が可能な高温 (80℃以上) 洗浄ができない。本研究開発では上記の課題解決に取組み、この課題を解決できれば、強力な薬剤を使うことなく、高度な洗浄 (80℃以上、弱アルカリ、酵素利用) が可能となる。これは世界的にも優れた技術であり、高度な安全性の実現と作業安定性、洗浄対象と環境への低負荷を実現できる。

3.2.2.1.8 JM06「糸状菌が生産する農薬活性天然物の生産性向上システムの構築、実証」 (株式会社 MMAG)

(1) 背景と目的

人口増加に伴い農作物の生産性向上が求められ、生産性向上には薬剤による病虫害の防除は必須である。特に、地球環境に配慮した持続可能な食糧生産の実現に向けて、微生物や有用昆虫等の天然資源、およびそれら由来の天然物質等を利用した環境調和型の病虫害・雑草防除ニーズが高まっている。しかしながら、これらの技術は商業生産の点で課題が多く、使用される資源の種類や使用場面は限定的なものにとどまっている。

特に、微生物二次代謝産物を利用する際には、複雑な化学構造を持つ有効成分が多く、有機化学合成では多工程の化学反応や、特殊な原料を必要とする。また、多くのエネルギー、有機溶媒、高価な原料が必要となり、製造コストの高止まり、環境への影響が懸念される。一方、微生物の培養により有効成分を取得しようとする場合、省資源、少廃棄物、低コストでの生産となり環境負荷低減が期待される。しかし、目的の有効成分の生産性向上が課題となっている。

本テーマにおいては、高い害虫防除効果と人畜、有用生物への基礎的安全性が見出され、持続可能な食糧生産に貢献できる農薬候補化合物（以下、「本化合物」と記す）を、適切な経済性を有する製品として提供するために、微生物培養によって生産するシステムを構築することを目的としている。

本化合物を生産する糸状菌は、発酵培養での生産性が低いことから、生産コストと防除に必要な薬量から算出される製品価格が市場価格に見合わず、これまで開発が断念されてきた。

しかしながら、本化合物の対象市場は世界で1000億円を超える大きさであり、環境影響が強い既存の薬剤の代替が求められている市場状況にある。そのため、新規農薬の開発候補としての検討を開始した。近年、飛躍的に進歩する遺伝子発現、メタボローム、そして遺伝子発現ネットワーク等の解析技術を用いることで、生合成遺伝子クラスターの恒常的な高い発現を可能とし、更にコンベンショナルな育種、培養条件検討等を組み合わせることにより商業的な生産に適合する高い生産を達成し、社会ニーズに応えていく。

(2) 位置づけ、目標値

本化合物の投入を予定している対象市場において、現在多用されている薬剤は使用者や環境への安全性が十分でないものが多く、今後使用が制限される可能性がある。本化合物は高い有効性および安全性を示すことから、代替剤としての市場優位性が高いと考えられる。

2021年度目標として、培養生産性 500mg/L を達成できる菌株の取得を掲げる。また、2022年度目標は培養生産性 10,000mg/L 以上の菌株を取得することとする。

10,000mg/L 以上の培養生産性を達成できた場合、対象市場の競合剤の価格と同等以下で提供できるため、価格競争性を保持できると考えられ、目標として掲げた。

(3) 全体計画

年度	枠組み	担当	2021	2022	2023	2024	2025
達成目標	本プロジェクト		・液体培養可能な菌株の取得 ・培養生産性500～5000mg/Lの菌株の取得	・培養生産性10000mg/L以上の菌株の取得	・100L培養槽での生産、精製 ・大量培養・精製方法の条件確立 ・大量培養に適した菌株への改変	・10kL培養槽での生産生産性15000mg/L達成	・165kL培養槽での培養、精製の実施 ・培養生産性15000mg/Lの達成
	農業開発			本化合物による国内外開発判断		GLP試験開始	
研究項目〔1〕	活性化化合物合成遺伝子制御フローの探索	MMAG 産総研	→				
研究項目〔2〕	活性化化合物高生産菌株の開発	産総研	→				
研究項目〔3〕	活性化化合物高生産菌株候補の生産性評価	MMAG	→				
研究項目〔4〕	活性化化合物高生産菌株の生産プロセスの検討・改良	MMAG 産総研			→		

図 3.2.2.1.8-1 全体スケジュール

2021、2022 年度の委託フェーズにて培養生産性が向上した菌株の取得を研究項目〔1〕～〔3〕を通して達成する。2023～2025 年度の助成フェーズにて商業生産に向けて大量培養手法の確立を進める。

(4) 実施体制

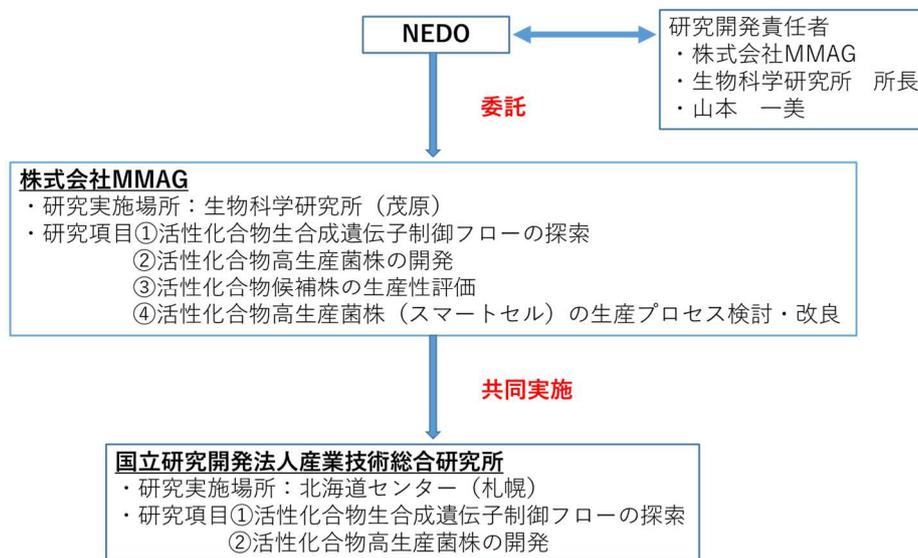


図 3.2.2.1.8-2 体制図

(5) 運営管理

1～3 ヶ月に一度の頻度で全体会議を開催し、研究の進捗共有と課題点の共有、解決方法の協議を実施。また、共同研究先へ訪問し、糸状菌からの RNA 抽出手法を習得した。

(6) 実施の効果

本化合物を商業化することは、環境負荷に配慮しながら作物収穫量を向上させることができるため、環境負荷低と農作物生産者の収益改善につながり、持続的で安定した食料生産に貢献できる。また、国外でのニーズも高いことから海外への展開を通じた世界的な農業への貢献、さらには外貨の獲得による日本の経済再生にも寄与できると考えている。

本化合物の投入を予定している対象市場において、農作物への被害は、甚大な場合には収穫量が70～80%にまで落ち込むことが報告されている。そのため、世界中の国・地域で重要病害に位置付けられており、本化合物を開発することにより日本発の技術が世界の食料生産向上に大きく貢献できると考える。

また、糸状菌での本化合物の生産技術確立は、医薬品、農薬など、他の微生物由来の天然物質の生産基盤としての活用も期待できると考えている。

さらに、地球環境課題の点からも、本化合物が微生物の培養による生産が可能になると、その生産において、高温または低温等の化学反応、環境への排気、排水系からの有機溶媒、有害物質の回収等のエネルギーを要するプロセスが不必要になり、脱炭素へ貢献する。

(7) 中間目標の達成度

中間目標	達成度・成果	今後の予定
液体培養可能な株取得	△ (○) 恒常的な発現を目指し、生合成遺伝子上流因子と推定した転写因子の強制発現株を構築した	転写解析を実行し、遺伝子ネットワーク解析により上流因子候補を選抜、選抜した因子に係る変異株を作成し、目標とする培養生産性を達成する株を見出す。
培養生産性 10000mg/L以上の株の取得	× (○) 遺伝子ネットワーク解析を用いて上流因子を推定するため、解析に相応しい転写解析サンプル作成を行い、解析準備を完了。異種糸状菌での発現による生産性向上のため、高頻度相同組み換え株の構築を完了し、生合成遺伝子の導入を開始した。	並行して、必須の生合成遺伝子の特定を進め異種糸状菌への導入および目的物質の培養生産性を調査する。

◎：大きく上回って達成、○：達成、△：概ね達成、×：未達

()は2022年度末見通し

(8) 研究開発の成果と意義

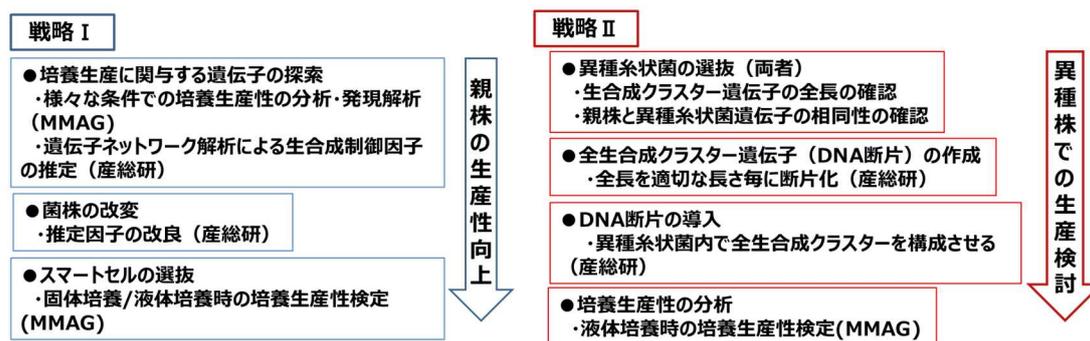


図 3.2.2.1.8-3 研究の全体像

現時点、中間目標は未達であるが、既知情報等から本化合物の生合成遺伝子の制御因子の推定・選抜、推定因子の変異株作製、異種糸状菌での高頻度組換え株の構築を完了した。取得した変異株の培養生産性向上への関与については試験、分析を進めている段階である。

具体的には、以下のとおり。

- ・ 遺伝子ネットワーク解析に供試するサンプルの培養条件の検討培養、条件決定 (戦略 I)
- ・ 遺伝子ネットワーク解析に必要な RNA サンプルを多数の培養条件にて準備、調整を実施 (戦略 I)
- ・ 生合成に関与する重要遺伝子のノックアウト株の作成、培養生産性の調査による生合成遺伝子クラスター領域の特定 (戦略 I)
- ・ 本化合物の生合成の鍵と推定される遺伝子の過剰発現株の作製完了 (戦略 I)
- ・ 異種糸状菌での生合成遺伝子発現を目指し、多数の生合成遺伝子導入に必要な高頻度相同組換えシステム、マーカーリサイクリングシステムの導入完了 (戦略 II)

上記内容を進めることで、生合成遺伝子の機能の解明、最短での異種糸状菌での生合成遺伝子群の発現に繋がり、今後の研究を進める知見集積と手法構築ができた。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

現時点で有望な変異株が見いだされておらず、難易度は高いと認識しているが、菌株の培養生産性の特性、生合成遺伝子に関わる知見が蓄積されており、発現解析および遺伝子ネットワーク解析を通して生産性に強く関与する因子の特定、改変を円滑に進めることで中間目標の培養生産性 10,000 mg/L の達成は可能と考えている。更に、最終目標である商業用の大容量培養槽での培養生産性 15,000 mg/L に向けて、糸状菌特有の菌体が凝集する性質の改変を進め、小容量の培養装置での培養条件検討、100 L 以上の大容量培養槽を用いた培養、および精製工程の構築を行っていく。

本化合物の生産菌株の遺伝子改変に加えて、異種糸状菌への生合成遺伝子の導入、発現の 2 通りの方策で進めることで、目標達成確度を上げる。

(10) 成果の普及現

段階では実用化に必要な技術開発に注力しているため、論文、社外発表などは控えている。今後、事業化の見通しがたった時点で、積極的に成果をアピールしていく。

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

本化合物の製造に関する特許を出願予定している。

年度	特許出願		
	国内	外国	P C T
2021	0	0	0
2022	1	0	0
PJ 期間 合計	1	0	0

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

本プロジェクトで商業的な培養生産を達成し、農薬登録取得を進め、製品化を予定する。国内だけでなく国外展開も視野に置いて、登録、上市、販売により実用化・事業化を行う。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

本プロジェクトおよびテーマ間連携も視野に、高い培養生産性を商業生産規模の大きさと達成するという課題解決を図ることと並行し、本化合物の有効性評価や詳細な作用機構解明等、生物学的な特徴付け評価および農薬登録に必要な毒性試験等を進め、最短での農薬登録申請を計画している。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

有効性評価を進めており、実用的な効果を示す薬剤の投下薬量を見出している。

さらに、簡易的な毒性試験も実施しており、これまでに対象とした標的外生物に明確な影響はみられていない。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

本プロジェクトでの商業的な生産手法の確立と登録要件試験の実施を並行して進め 2026 年の国内および国外での農薬登録申請を目指す。

(12.5) 波及効果

本プロジェクトで実施している異種糸状菌での発現の技術は、本化合物に限らず応用可能であり、これまでに生産性の観点から断念されてきた二次代謝産物の生産性向上さらにはその商業化に貢献できるものである。さらに、グローバルに商業化された微生物二次代謝産物由来の農薬の多くは日本がオリジンであるが、本プロジェクトにより構築された技術は、国内外で応用でき、世界の持続可能な食糧生産に貢献できる。

3.2.2.1.9 JM07「Bacillus 属細菌による抗菌環状リポペプチド生産システム実証」（株式会社カネカ）

(1)背景と目的

安全、安心かつ、持続可能な食糧生産に向けた取り組みとして、各国で化学農薬に対する規制が始まっている。2020年5月にEUが発表した「Farm to Fork 戦略」では、2030年までに化学農薬の使用を50%低減し、有機農業を25%拡大する、という目標が掲げられている。我が国においても、農林水産省より2021年3月に発表された「みどりの食糧システム戦略」において、同じく化学農薬の使用量半減や有機農業の面積拡大（17年度比40倍以上）が目標となっている。このように、化学農薬からの脱却は、持続可能な食糧生産の実現に向けて、世界が取り組むべき主要課題の一つと位置付けられている。

しかしながら、単純に化学農薬の使用を止めてしまうと、さまざまな外的環境に起因する植物病害を抑制することは難しい。そこで、化学農薬に代わって、植物病害を抑止する安全、安心な手法・素材が強く求められている。

化学農薬を用いずに植物病害を抑止する方法として、バイオ農薬が注目を集めている。バイオ農薬とは、有害生物の天敵となる昆虫や微生物、ウイルスをそのまま活用するものや、フェロモン剤、有用成分を含む植物抽出物や発酵生産物を指す。いずれも天然由来で生分解性が高く、安全・安心な素材をベースにしているため、耐性菌発生リスクや農薬残留リスクが極めて低いと言われている。現在、農薬業界の市場規模約6兆円に対し、バイオ農薬が占める市場は約3,000億円程度と極めて小さいが、年率約10%の成長市場であり、2025年の市場規模は約6,500億円程度に達するとの予測もある。また、アメリカの調査会社Lux Research社は50年以内にバイオ農薬市場規模と化学農薬市場規模が逆転するという予測を発表しており、これからの成長著しい市場である。

株式会社カネカでは、植物病原菌への殺菌活性や植物自体の抵抗性誘導効果を有する環状リポペプチド（cyclic lipopeptides：cLP）に着目し、その発酵生産から機能解析、製品化に及ぶ各種研究開発を進めてきた。既存バイオ殺菌剤の1例としては、cLPを生産するBacillus属細菌自体を登録活性成分とした芽胞剤や、その培養液を製剤化したものがあり、主流となっている。しかしながら、これら製剤散布後、植物上での微生物定着性や残効性が十分でなく、化学農薬と比べると期待効果が劣ると言われている。そこで、微生物定着性や残効性の低さを解決し、且つ、既存の化学農薬と効果が同等以上のバイオ農薬製品創製を目標とした。そのためには、cLPの安価生産法だけでなく製剤化、施用法検討を含むトータルの視点での技術開発が必須となるが、本委託事業内では、Bacillus属細菌のcLPにフォーカスし各種開発を進めている。

(2)位置づけ、目標値

本研究開発では、独自のCLP生産技術の開発を目指している。開発目標を達成した場合に基づく、CLPの想定価格を算出し、本研究開発におけるCLP培養生産性の最終目標値を設定した。

(3) 全体計画

特許出願戦略により詳細な研究内容の公開を控える。

スマートセルテクノロジーを活用することにより、菌株育種期間、および培養技術構築期間を短縮し、以下の①～⑥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 CLP 技術開発(1)
- ② CLP 技術開発(2)
- ③ CLP 技術開発(3)
- ④ 代謝最適化による生産性向上
- ⑤ 酵素改変による生産性向上
- ⑥ 培養処方最適化と評価用サンプル取得

表 3.2.2.1.9-1 全体計画

事業項目	2021 年度				2022 年度				2023 年度	2024 年度	2025 年度
	1Q	2Q	3Q	4Q	1Q	2Q	3Q	4Q			
①CLP 技術開発(1)				菌株育種、培養評価							
②CLP 技術開発(2)				菌株育種、培養評価							
③CLP 技術開発(3)				菌株育種、培養評価							
④培養処方最適化									培養技術開発		
⑤代謝最適化による生産性向上									代謝解析、菌株育種、培養評価		
⑥酵素改変による生産性向上									酵素開発、菌株育種、培養評価		

(4) 実施体制

CLP 技術開発にあたり、目標値の達成に必要となる技術を選出した。株式会社カネカが主体となり、神戸大学と群馬大学との共同研究体制を構築し、スマートセルテクノロジーを活用しながら研究開発を実施した。

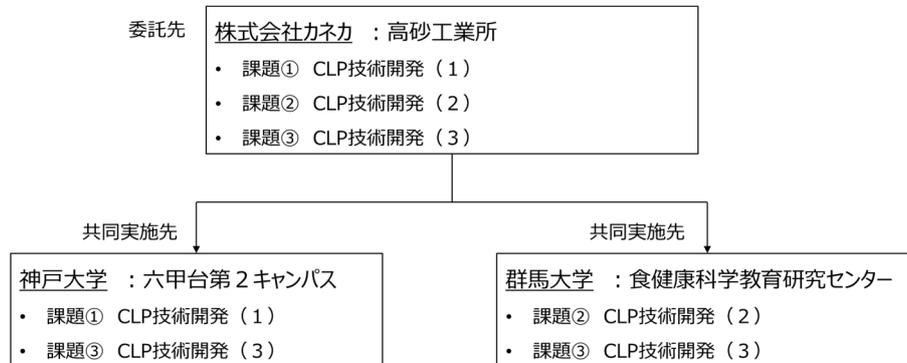


図 3.2.2.1.9-1 実施体制図（委託フェーズ）

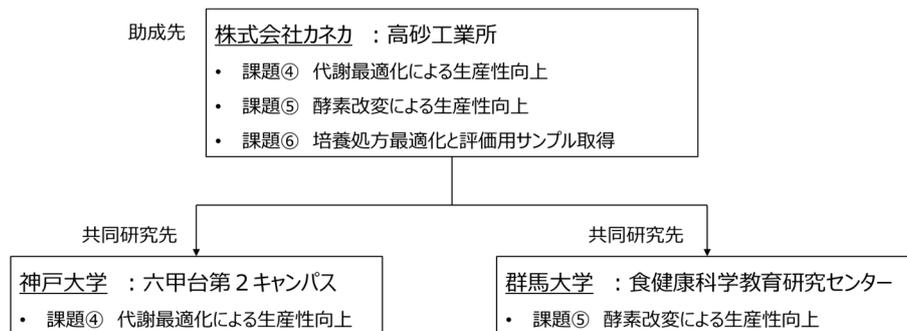


図 3.2.2.1.9-2 実施体制図（助成フェーズ）

(5) 運営管理

共同実施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。定期的な進捗確認会に加えて、プロジェクトリーダー、サブプロジェクトリーダー、プロジェクトマネージャーから、株式会社カネカ・神戸大・群馬大への指導・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、各共同実施先と株式会社カネカとの研究成果から相乗効果を得るために、株式会社カネカをハブとして各共同実施先へ随時展開した。

(6) 実施の効果

本研究開発では、スマートセルテクノロジー活用による菌株育種の効率化、培養技術の高度化により、株式会社カネカがこれまで開発してきた技術と相乗効果を発揮し、革新的なCLP生産技術を確立する。本研究開発で得られた成果をベースとした製造技術の社会実装を目指し、CLP生産技術開発を通じて、世界中にCLPの利用を拡大することで、持続可能な食糧生産の実現、およびバイオエコノミー原料となるバイオマスの供給強化を通じて、持続可能社会の実現に貢献する。

(7) 中間目標の達成度

表 3.2.2.1.9-2 中間目標の達成度

研究項目	達成度*	理由
① CLP 技術開発 (1)	△	一部遅延が生じたものの、概ね計画通り達成することができた。
② CLP 技術開発 (2)	○	計画通り達成することができた。
③ CLP 技術開発 (3)	○	計画通り達成することができた。

*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

研究項目①： CLP 技術開発 (1)

研究項目②： CLP 技術開発 (2)

研究項目③： CLP 技術開発 (3)

いずれの研究項目においても菌株育種～培養評価を適切に実施し、研究開発を進め一定の成果を得た。取得した成果の一部については、特許出願を予定している。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

研究項目①が少し遅延しているものの、研究項目②、③がいずれも計画通りに達成できていることから、助成フェーズで実施予定の研究項目④～⑥を含めて、最終目標についても計画通り達成できると見込んでいる。

(10) 成果の普及

表 3.2.2.1.9-3 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	
2021	0	0	0	0	0	0	0
2022	0	0	0	0	0	0	0
PJ 期間合計	0	0	0	0	0	0	0

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

表 3.2.2.1.9-4 特許出願実績

年度	特許出願		
	国内	外国	P C T
2021	0	0	0
2022	0 (2)	0	0
PJ 期間 合計	0 (2)	0	0

() は 2022 年度見込み

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

委託事業で構築した CLP 生産菌株をベースとし、助成事業にて菌株育種による高生産株獲得、及び CLP 高生産培養技術の構築を達成し、実用化を加速する。助成事業の後、開発した技術を早期に生産プロセスに実装する。製剤化や施用法検討を含むトータルの視点での技術開発を経てバイオ農薬として上市する。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

製剤化や施用法検討を含むトータルの視点での技術開発を通じて、既存化学農薬、及び既存生物農薬に対する優位性を確認し実用化を目指す。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

バイオ農薬市場への参入に向けて、市場調査を進めている。また現場ニーズの高い植物病害への防除効果評価系整備を進めている。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

化学農薬に対する規制を背景に、バイオ農薬への注目はどんどん高まっている。そのため、例えば枯草菌を用いた既存生物農薬に比べて、圧倒的な実効性のある製剤を開発することが出来れば、実用化は十分に見通せる状況である。

(12.5) 波及効果

本プロジェクトにて開発した枯草菌の基盤技術は、他の発酵生産ターゲットにも適用できる可能性があることから、バイオものづくり全般への波及効果が期待できる。

3.2.2.1.10 JM08「バイオプロセスによるイミダゾールジペプチドの効率的生産法の開発」

(東海物産株式会社、早稲田大学)

(1)背景と目的

開発ターゲットとしているアンセリンは、鶏や高速大型回遊魚と呼ばれる鮪、鰹、鮭などに含まれている天然の抗酸化化合物である。アンセリンはカルノシンと合わせてイミダゾールジペプチドと呼ばれ、鶏肉にはアンセリンとカルノシンが約3：1で含まれ、機能性表示食品の素材として近年注目されている健康機能性成分でもある。イミダゾールジペプチドは古くから研究されており、主に生体 pH 緩衝能、金属キレート作用、抗疲労作用、運動能力向上、記憶力改善などが報告されている。

現在、市場に流通しているアンセリンは高速大型回遊魚からの抽出に依存している。最近は、CO₂の影響による地球温暖化によりエルニーニョ現象やラニーニャ現象の発生頻度が高まっており、漁獲量は極めて不安定で近年においては急激に減少している。一方、地中海食や日本食のブームにより、世界の水産物に対する需要は増加しているため、魚価は上昇している(図 3.2.2.1.10-1)。大型回遊魚の多くは食材として活用されており、その供給量が減少するとアンセリン生産の原料としての利用は出来なくなる可能性が高い。拡大が見込まれるアンセリン需要を補うためには、アンセリンとカルノシンを含む鶏肉からの供給にシフトしていくことが考えられるが、ここでも食との競合がある。また、養鶏ではその排泄物の処理において、温室効果ガスである一酸化二窒素の放出が問題となっている。すなわち、Our World in Data (OWID)の2020年1月の記事「Environmental impacts of food production」によれば、家禽肉タンパク質100グラムあたり温暖化ガス 5.7 キログラム (CO₂換算)が排出されているため、簡単に増産はできない。

これらの問題点を解決していくためには、天然資源に依存しているアンセリンを別の方法で生産していくしかない。カルノシンは b-アラニンと L-ヒスチジンが比較的安価に入手できるため、既に化学合成品が市場に流通しているが、アンセリンではアミノ酸基質であるヒスチジンのメチル化体(3-メチルヒスチジン)が非常に高価なため生産コストも高く、アンセリンの化学合成法による工業的生産技術があるにも関わらず、市場には流通していない。

早稲田大学の木野教授らは、b-アラニンおよびL-ヒスチジンをアミノ酸基質とする菌体反応系を利用したカルノシンの酵素合成法を開発(特許第 6934774 号、特開 2020-023453)している。更に木野教授らは菌体反応系を利用したカルノシンからのアンセリンへの変換技術を確立している。しかし、この酵素合成法の変換率(現在、対基質変換率 20%程度)は工業化を達成する上ではまだ低い。また、メチル化反応に必要な S-アデノシルメチオニン (SAM) は非常に高価であるため、SAM を外部添加する方法では低コスト型アンセリン生産技術の開発は難しく、その工業化には課題が多い。

天然資源に依存しているアンセリンを酵素生産に代替することで、食との競合を回避できるほか、温室効果ガスの排出抑制による CO₂削減効果が期待される。一方、我が国では組換え DNA 技術を応用した食品及び添加物の社会的受容性が問題となるが、内閣府食品安全委員会により高度精製品に該当すると判断されたものは、厚生労働省によって組換え DNA 技術を応用した食品及び添加物に該当しないとみなされ(組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の(平成 12 年厚生省告示第 233 号)第 3 条第 5 項)、これまでに多くの食品が製品として上市され

ている。また、アンセリンは同じイミダゾールジペプチドであるカルノシンよりも抗酸化活性など生理活性が高い可能性も示されており、機能性表示食品では尿酸値低減を謳った商品が数多く販売されている。昨今の新しい臨床研究においては、カルノシンとアンセリンのイミダゾールジペプチドミックスの約半分量のアンセリン投与で軽度認知障害の認知機能が改善するという報告もある。超高齢社会を迎えている我が国において、フレイル対策としても期待されている。アンセリンはヒトの血中において分解されにくいなど、カルノシンよりも効果的で機能性の面でも期待されており、間違いなく市場は拡大するものと予想されている。安価に安定供給が可能な高質アンセリンを社会実装することは、世界の健康寿命延伸に大きく貢献するものと考えている。

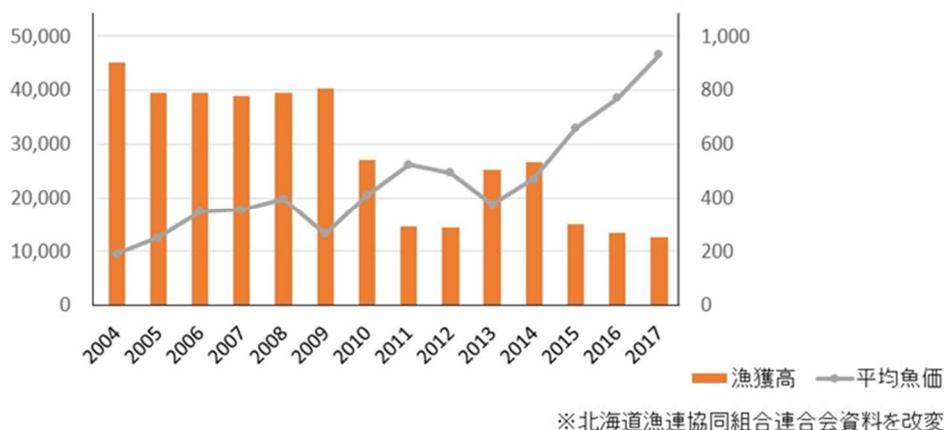


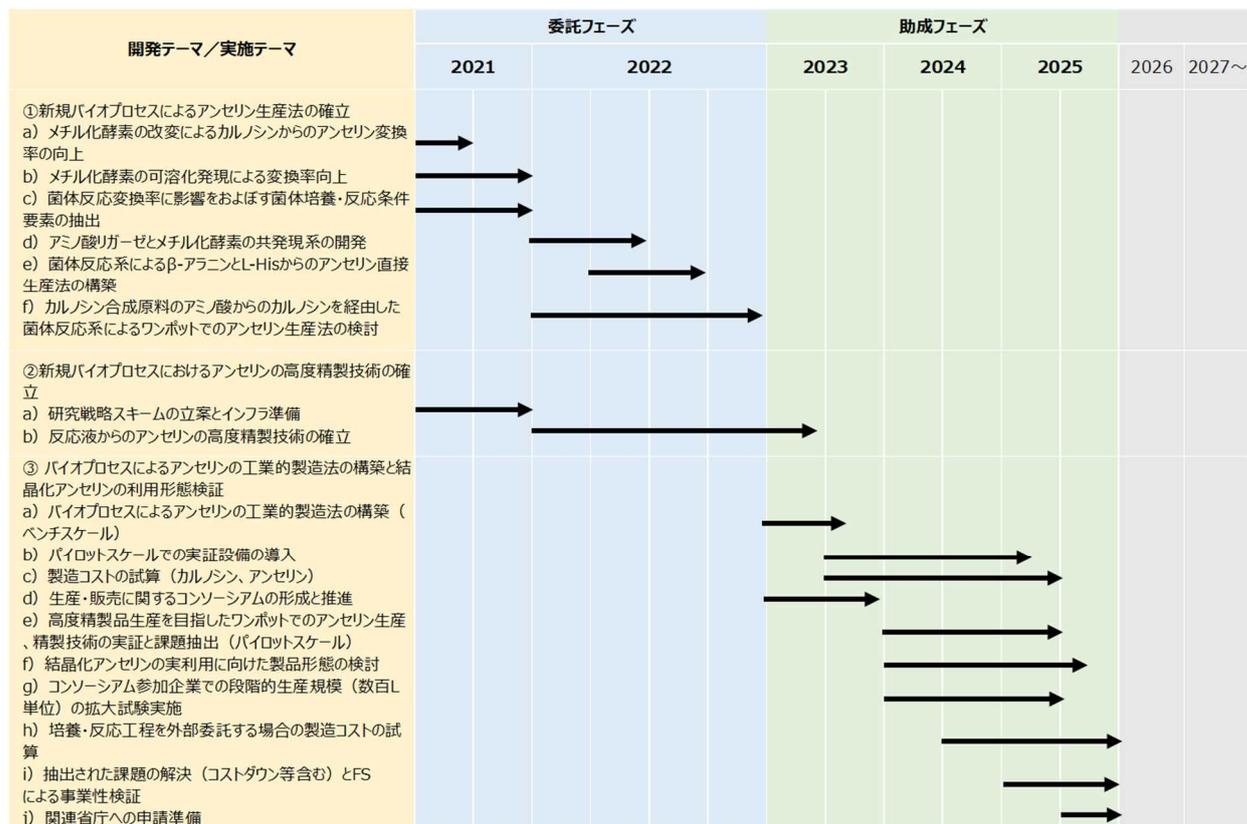
図 3.2.2.1.10-1 秋鮭漁獲高（日本）の推移

(2)位置づけ、目標値

現在の市場におけるアンセリンの販売価格は鮭を原料とした天然物で約 30 万円/kg、化学合成品で 400 万円/kg である。これに対して本プロジェクトでは菌体反応を用いることで 15~20 万円/kg の市場販売価格を目指す。また GHG 排出量 (CO₂ 換算) は鶏肉を原料とした場合アンセリン 1kg あたり 1,520kg となるが、菌体反応では原料の C 源はカーボンニュートラルと考えられるため GHG 排出量はわずかとなる。

上記を達成するため、ベンチスケールにて基質アミノ酸に対するアンセリンへの変換率 70%以上を達成して工業的生産の基本プロセスを構築するとともに、アンセリンと同様の物性を示すイミダゾールジペプチドであるカルノシンを用いて結晶化精製方法を検討し、カルノシン合成菌体反応液から、純度 95%以上のカルノシンを得ることを中間目標とする。最終目標としては、アミノ酸を原料とした菌体反応によるアンセリン生産技術 (純度 95%以上) をパイロットスケールで確立し、販売単価 15 万円/kg 未満を可能にする技術確立を目指す。

(3) 全体計画



(4) 実施体制

1. 研究開発責任者

研究開発責任者： 所属 東海物産株式会社 食品研究所 所長 岡田 行夫

2. 管理者

東海物産株式会社

業務管理者： 所属 食品研究所 氏名 佐藤 謙一郎

経理責任者： 所属 営業部 氏名 小坂 康士

事務担当窓口： 所属 営業部 氏名 小坂 康士

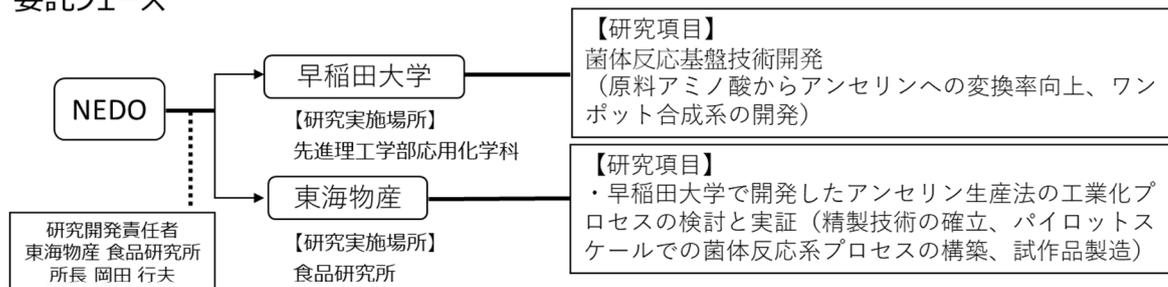
早稲田大学

業務管理者： 所属 理工学術院先進理工学部応用化学科 氏名 木野 邦器

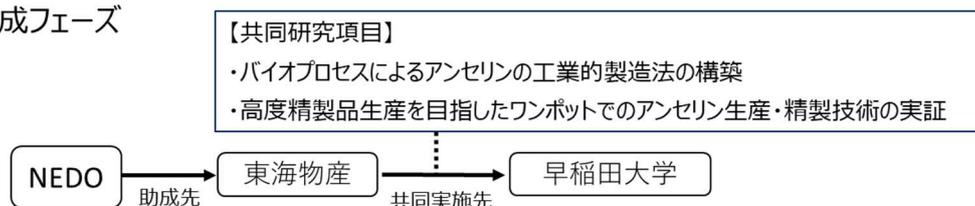
経理責任者： 所属 理工学術院統合事務・技術センター事務部 研究総合支援課
氏名 大西 正泰

事務担当窓口： 所属 理工学術院統合事務・技術センター事務部 研究総合支援課
氏名 北野 達也、小林 亮介

委託フェーズ



助成フェーズ



(5) 運営管理

早稲田大学と東海物産で研究進捗打合せを月に1回以上の頻度で実施し、進捗の確認と研究開発の進め方に関する討議を実施している。

(6) 実施の効果

アンセリンを含むイミダゾールジペプチド市場は、現在でも50億円を超える市場を形成している。ただ、高額な素材となるため、潜在的な需要は大きいものの、他の健康機能性成分のような急拡大は果たしていないのが現状である。現状であれば2025年には60億円程度であるが、仮に天然由来の半額に近い15万円/kg程度でバイオ手法によるアンセリンの供給が可能となれば、イミダゾールジペプチドの抗酸化効果を基盤として、高齢化社会に応える様々な機能を有するアンセリンを中心にその市場は潜在的な需要を反映して2~3倍に急拡大していくと予想している。本事業による酵素合成アンセリン生産技術が確立されれば、大きな化学プラントを持たずとも酵素合成アンセリンの生産が可能となる。

イミダゾールジペプチドのうち、化学合成カルノシンは米国を中心とした海外でも安価なサプリメントとして販売されている。酵素合成による安価なアンセリンが実用化出来れば、日本発の健康機能性素材として海外の市場へ新規参入も期待できる。我が国は2007年に高齢化率が21%を超え、超高齢社会へ突入した。今後もハイスピードで高齢化率は高くなると予測されている。高齢者数は3,600万人にまで上昇しており、アンセリンにより高齢者の健康寿命が延伸していけば、高齢者の雇用促進にも繋がるはずであり、日本が抱える人材不足を中心とした様々な問題を解決できると考えている。また、今回我々が申請する技術開発は、国連が2030年を目標として設定したSDGsのNo.3（健康と福祉）とNo.9（産業と技術の基盤を作る）ならびにSociety 5.0の推進方策とも合致する。

環境視点では、アンセリンの抽出源になっている鮭などの海洋資源の保護に加え、イミダゾールジペプチドの抽出源のひとつである鶏肉も不要となることで、その生産における温室効果ガスの排出削減にも貢献できる。2020年1月に公表されたOur World in Data (OWID)の記事

「Environmental impacts of food production」によれば家禽肉タンパク 100 グラムあたりの温室効果ガス排出量 (CO₂ 換算) は 5.7 キログラムとなる。2025 年の国内イミダゾールジペプチド市場を 250 トンと推定すれば、それに相当する鶏肉は 25,000 トンとなり、その生産に伴う温室効果ガスの排出は CO₂ 換算で 285,000 トンとなる。さらに菌体反応による合成法は化学合成法と比べてもマイルドな条件での反応が可能であり、本研究開発成果はカーボンリサイクルの実現ならびに地球環境課題の解決にも貢献できるものである。

(7) 中間目標の達成度

実施項目	中間目標	実施内容	達成度
①-a) メチル化酵素の改変によるカルノシンからのアンセリン変換率の向上	試験管スケールの菌体反応系でのカルノシンからアンセリンへの変換率 10%以上	酵母由来カルノシンメチル化酵素 YNL092W のレアコドン置換により発現量が向上。活性向上変異との組み合わせにより、カルノシンからのアンセリンへの変換率 19%を達成した。 (早稲田大学)	○
①-b) メチル化酵素の可溶化発現による変換率向上	菌体反応系(ラボスケール)でカルノシンからアンセリンへの変換率 15%以上	GFP 蛍光を指標としたスクリーニングにより可溶性が向上した YNL092W 変異体を取得した。取得した変異体を pET ベクターにて発現させたところ、可溶化発現量、アンセリン合成活性ともに大きな改善は見られなかった。発現方法の検討が必要と考えられる。(早稲田大学) ①-a)での検討により本項目の目標も達成済み	○
①-c) 菌体反応変換率に影響をおよぼす菌体培養・反応条件要素の抽出	Lal 発現大腸菌(カルノシン生産用)を用いて培養条件や菌体反応条件が変換率に影響を与える要素をラボスケールで把握し、その対策の検討を開始する	薬剤添加なしの菌体培養や、培養液への基質直接添加による菌体反応は、アミノ酸からカルノシンへの変換率を低下させる可能性があり、対策検討中である。	○
①-d) アミノ酸リガーゼとメチル化酵素の共発現系の開発	共発現系の確立により、試験管スケール(3mL)にて、基質アミノ酸に対するアンセリンへの変換率 30%以上を達成する。	2022 年度実施項目(2022 年 4 月より開始) 発現させるメチル化酵素(異なる起源の酵素や導入変異など)、発現宿主(欠損遺伝子や導入遺伝子)、共発現方法(プラスミド発現、染色体への遺伝子組み込みなど)などを検討中 (早稲田大学)	- 計画通り 着手
①-e) 菌体反応系による β-アラニンと L-His からの	共発現系による反応系を最適化させ、ラボスケールにおいて、基質ア	2022 年度実施項目(2022 年 7 月より開始予定) ①-d)での検討結果を踏まえて共発現方法を確定	- 計画通り

アンセリン直接生産法の構築	ミノ酸に対するアンセリンへの変換率 70%以上を達成する。	原料アミノ酸および補酵素となる ATP、SAM の供給方法など反応条件を検討予定 (早稲田大学)	着手予定
①-f) 菌体反応系によるワンポットでのアンセリン生産法の検討	ベンチスケール (5L ジャーファーマンター) において、基質アミノ酸に対するアンセリンへの変換率 70%以上を達成し、工業的生産の基本プロセスを構築する。	2022 年度実施項目 (2022 年 4 月より開始) カルノシン合成反応において培地成分、少なくとも酵母エキスとペプトンは変換効率を低下させる原因となっていることが判明、より変換効率に影響を及ぼさない培地条件を検討中である。(東海物産)	- 計画通り 着手
②-a) 研究戦略スキームの立案とインフラ準備	基本プロセスを立案し、ラボスケールでのアンセリン精製に向けたインフラを整える	カルノシン合成菌体反応液よりラボスケールで 98.3%純度のカルノシンの精製に成功した。(東海物産)	○
②-b) 反応液からのアンセリンの高精度精製技術の確立	菌体反応液からアンセリンを高純度に精製するための技術の確立を目的とし、アンセリンと同様の物性を示すイミダゾールジペプチドであるカルノシンを用いて結晶化精製方法を検討し、ベンチスケールで生産された菌体反応液から、純度 95%以上のカルノシンを得る。	2022 年度実施項目 (2022 年 4 月より開始) 精製純度に影響を及ぼす成分の同定と対策を検討中である (東海物産)	- 計画通り 着手

◎ : 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) 研究開発の成果と意義

研究開発項目① : 新規バイオプロセスによるアンセリン生産法の確立

実施項目①-a : メチル化酵素の改変によるカルノシンからのアンセリン変換率の向上 (早稲田大学)

最終目標であるアンセリンのワンポット合成技術の開発に向けて、2021 年度は後半のカルノシンからアンセリンへのメチル化反応の強化に重点を置いた。これまでにメチル化反応を担う酵素として YNL092W を用いることでアンセリン合成に成功しているが、大腸菌での可溶化発現量が少ないことが課題であった。本実施項目では発現量向上に向けてレアコドン置換を検討した。

メチル化酵素 YNL092W は真核生物である酵母由来の酵素である。酵母と発現宿主である大腸菌とではコドンの使用頻度に差があり、レアコドンと呼ばれる使用頻度の低いコドンが多数存在すると翻訳速度の低下や翻訳の停止など、翻訳過程に問題が生じる。実際に YNL092W のコドンを確認すると、400 アミノ酸中 30 アミノ酸のコドンが大腸菌にとってのレアコドンであり、複数のレアコドンが局所的に集中している箇所も存在した。そこで、これらを翻訳後のアミノ酸が変化しないように大腸菌にとって標準的な使用頻度のコドンへ置換した YNL092W_{dRare} の遺伝子を人工合成した。

レアコドン置換の効果を評価するため、カルノシン分解酵素遺伝子 *pepD* を欠損させたアンセリン生産用の宿主大腸菌に YNL092W (置換前) または YNL092W_{dRare} (置換後) の遺伝子を導入し、それぞれを発現させた。SDS-PAGE により発現量を評価した結果、可溶性画分での発現量に変化は認められなかったが、不溶性画分での発現量は増加しており、レアコドン置換により完全長 YNL092W の発現量を向上させることができた。また、10mM のカルノシンを原料としてアンセリン生産活性の評価を行ったところ、レアコドン置換によりアンセリン合成量が増加した。さらに、これまでに見出していた活性向上にかかわる 2 か所の変異を導入した変異型についても評価したところ、同様にアンセリン合成量が増加し、最大で 1.9 mM、対カルノシン変換率 19% でのアンセリン生産を達成した。レアコドン置換により発現量が増加したことで、アンセリン生産活性にも好影響が出たものと考えられる。

本項目で目標とした「カルノシンからのアンセリン変換率 10%」は十分に達成することができた。レアコドン置換による発現量増加および活性向上は 2022 年度実施予定のアミノ酸リガーゼとメチル化酵素の共発現系の開発 (実施項目①-d) においても有効と考えており、共発現させるメチル化酵素の第一候補として YNL092W_{dRare} の活性向上変異体を準備することができた。

実施項目①-b: メチル化酵素の可溶化発現による変換率向上 (早稲田大学)

実施項目①-a の検討により発現量および活性が向上したが、可溶化は促進されなかったため、進化工学的な手法を用いて可溶性の向上した変異体の取得を目指した。YNL092W_{dRare} に蛍光タンパク質である GFP を融合することでその蛍光により可視化・定量化し、これを指標とした。YNL092W 部分へ変異を導入したライブラリを作製し、大腸菌に導入、発現させる。目的変異体は親よりも GFP 由来の蛍光強度が強くなっていると考えられるため、プレート上で蛍光強度を指標としたスクリーニングを行い、有望な株について可溶性の確認を行う。これを繰り返すことで可溶性が向上した変異体を創製・取得することを試みた (図 3.2.2.1.10-2)。

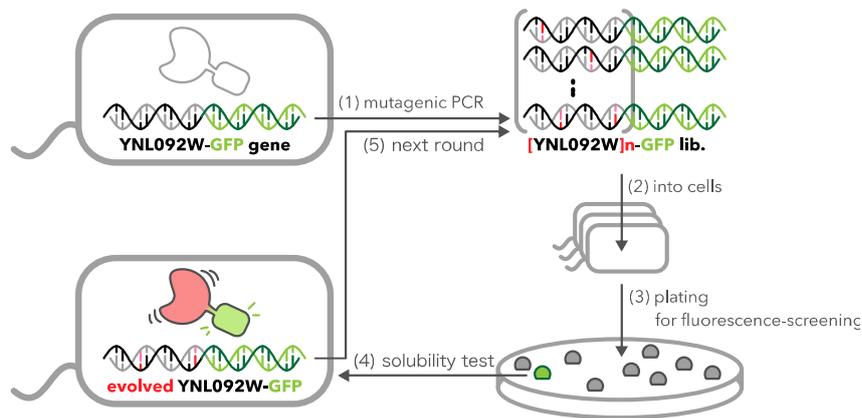


図 3.2.2.1.10-2 進化工学的手法による YNL092W 可溶化変異体のスクリーニング

変異導入にあたり、変異箇所を絞り込むためコンピューター上で予測を行った。可溶性は溶液中での安定性であると考え、YNL092W の結晶構造をもとに、アラニンスキャン（各残基をアラニンに置換）およびポジションスキャン（特定の残基を全アミノ酸に置換）による安定性変化計算を行った。その結果、11 か所において置換先のアミノ酸の種類により安定性が向上することが予測された。そこで、これら 11 か所について実際にランダム化したライブラリを作製し、GFP 蛍光を指標としたスクリーニングを実施した。まず、プレート上で親よりも蛍光強度が高い株をライブラリから選抜すると、12,960 株から 16 株が得られた。シーケンス解析により変異を特定したところ 7 種類のユニークな変異体であった。これらを液体培養し、細胞破碎後の可溶性画分の蛍光強度を測定すると、5 種類で親よりも蛍光強度が高くなり、可溶性が向上していることが示唆された。

蛍光スクリーニングにて取得した 5 つの変異体について、YNL092W 部分のみを pET ベクターに導入し、アンセリン生産用の大腸菌にて評価した。SDS-PAGE により発現量を確認したところ、pET 発現系では可溶化発現量の大幅な向上は認められなかった。また、アンセリン生産活性の評価においては、レアコドン置換を施した野生型酵素と比較して、2 種類の変異体は活性を維持し、1 種類の変異体は約 75%の活性であった。一方で残る 2 種類の変異体は約半分以下にまで活性が低下した。以上の結果から 1 か所の変異のみではアンセリン合成活性の向上はみられなかったが、さらに変異を重ねることで効果があらわれると考え、変異による活性低下が少なかった 3 か所に着目し、2 世代目の進化工学を実施した。

3 か所に対して同時にランダム化した変異体ライブラリを作製し、1 世代目と同様にプレート上での選抜、シーケンス解析による変異の特定、可溶性画分の蛍光強度測定により可溶化変異体の評価を行った。その結果、可溶性画分の蛍光強度が 1 世代目の 2~3 倍となる 11 種類の変異体を取得することができた。これらについても 1 世代目と同様にアンセリン生産大腸菌にて変異の効果の評価した。SDS-PAGE での発現量確認では pET 発現系での可溶化発現量の向上はみられず、アンセリン生産活性についても野生型と比較して活性が向上した変異体は得られなかった。発現させた変異酵素を精製し、精製酵素反応にてアンセリン合成活性を野生型酵素と比較したところ、いずれの変異体も変異により比活性が低下しており、これが可溶性向上の効果よりも大きく影響しているものと考えられた。

本項目では実施項目①-aにて検討したレアコドン置換では改善できなかった可溶性の向上を目的として、進化工学的手法による可溶化変異体の取得を試みた。蛍光スクリーニングの結果か

らは変異導入により確かに物性が改善され、可溶性画分の蛍光強度が上昇していたが、アンセリン生産宿主での pET 発現系では可溶化発現量の増加は見られなかった。したがって、酵素の物性のみならず発現方法に検討の余地があると考えられるため、実施項目①-d にてアミノ酸リガーゼとの共発現方法の開発や発現バランスの調節とともに取り組む予定である。なお、本項目で目標とした「カルノシンからのアンセリン変換率 15%」については実施項目①-a での検討にて達成済みである。

実施項目①-c: 菌体反応変換率に影響をおよぼす菌体培養・反応条件要素の抽出（東海物産）

菌体反応によるアンセリン生産の実用化にあたり、まずは導入プラスミドの脱落を防ぐためにラボスケール試験で実施している菌体培養時の培地へのアンピシリン添加、および菌体培養から菌体反応への移行時に行う菌体洗浄の 2 工程を省略できないかを検討している。アンピシリン添加については、最終的に除去されるとはいえ食品素材の視点からは抗生物質を生産工程において添加することは好ましくはなく、また原料のコストアップも懸念される。菌体洗浄についても菌体の集菌・洗浄工程の追加により生産工程が複雑となり、製造原価の上昇が懸念される。

アンセリン合成系がまだ確立されていないことから、試験は L-アミノ酸 a-リガーゼ遺伝子を有するプラスミドを形質転換した大腸菌によるカルノシン合成の系を用いて行なった。アンピシリン添加／無添加の LB 培地で培養した菌体をそれぞれ集菌、洗浄し、菌体反応によるカルノシン合成を行なったところ、アンピシリンを使用して調製した菌体を使用した場合には 91.5%、アンピシリンを使用しなかった場合には 69.8%の変換率でカルノシンが合成され、薬剤無添加により変換率が低下する可能性が示された（表 3.2.2.1.10-1）。アンピシリンの添加の有無がカルノシン合成活性に与える影響については、今後さらに知見を深めていく必要がある。

表 3.2.2.1.10-1 培養時アンピシリン添加の有無におけるカルノシン合成量の比較
(1 回目：反応時間 23hr)

	Car (mM)	His (mM)	変換率 (%)	反応後pH
アンピシリン添加区	1.2	11.4	91.5	7.28
アンピシリン無添加区	3.1	8.7	69.8	7.28

菌体洗浄を省略して培養液に直接基質を添加する菌体反応によるカルノシン合成試験では、LB 培地を用いた培養液に基質と L-アミノ酸 a-リガーゼ反応に必要な硫酸マグネシウム、および反応に要求される ATP を大腸菌に生産させるためのグルコースを添加して反応を行なった。この結果、菌体調製時のアンピシリン添加の有無に関わらずカルノシンへの変換率は 12%程度と低かった（表 3.2.2.1.10-2）。今後、基質添加系での変換率の向上のための条件を検討していく。

表 3.2.2.1.10-2 基質添加系でのカルノシン合成試験

	Amp	Car (mM)	His (mM)	変換率 (%)	反応後pH
基質添加系	+	1.5	9.9	11.8	6.43
	-	1.5	10	11.7	5.19

実施項目①-d：アミノ酸リガーゼとメチル化酵素の共発現系の開発（早稲田大学）

2022 年度実施項目。現時点で特記事項なし。

実施項目①-e：菌体反応系による b-アラニンと L-His からのアンセリン直接生産法の構築（早稲田大学）

2022 年度実施項目。現時点で特記事項なし。

実施項目①-f：菌体反応系によるワンポットでのアンセリン生産法の検討（東海物産）

実施項目①-c の結果を受けて、2022 年度は培養液への基質添加系における変換率向上に向けた施策を検討し、ワンポットでの菌体反応につなげていく。

研究開発項目②：新規バイオプロセスにおけるアンセリンの高度精製技術の確立

実施項目②-a：研究戦略スキームの立案とインフラ準備（東海物産）

菌体反応によるアンセリン合成技術はまだ技術確立中であることから、アンセリンの菌体反応液を用いた精製技術の確立検討はアンセリン合成技術の確立を待ってからの実施となる。一方で菌体反応によるカルノシン合成技術は既に確立できており、カルノシンはアンセリンと類似の性質を持つことから、まずはカルノシンの菌体反応液を用いて実製造を想定した高度精製技術の確立を目指す方向で進めることとした。

カルノシン純度 1.6%の菌体反応液を陽イオン交換クロマトグラフィーで処理をすることで、カルノシン純度は 74.1%に向上した。さらにこれをエタノール沈殿して減圧乾燥することで純度 98.3%のカルノシン粉末を得ることが出来た。

実施項目②-b：反応液からのアンセリンの高度精製技術の確立（東海物産）

2022 年度からの実施であり、実施項目①-f で検討していくワンポットでの菌体反応条件のための各要素が精製工程にどのような影響を及ぼすかを確認し、その課題解決を検討していく。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

2021 年度はアンセリンのワンポット合成技術における後半の反応であるカルノシンからアンセリンへのメチル化反応に関する検討を行い、酵母由来メチル化酵素の YNL092W のレアコドン置換と活性向上変異の組み合わせにより、目標とした変換率 15%を超える変換率 19%を達成している。2022 年度は本酵素を用いたメチル化反応を、前半の反応であるアミノ酸リガーゼを用いた b-Ala と L-His からのカルノシン合成反応と組み合わせ、基質アミノ酸からのワンポット合成法を検討する。カルノシン合成反応に関しては既に 100%近い収率を達成しており、メチル化酵素の発現方法やアミノ酸リガーゼとの発現バランスを適切に設定することでアンセリン生産への展開も可能であると考えている。また、酵母以外の生物を起源とするメチル化酵素やその変異体など種々検討することで、メチル化反応単独の変換率向上も見込まれる。これらは実施項目①-d にて検討予定であり、目標とする「基質アミノ酸に対するアンセリンへの変換率 30%」は達成可能であると考えている。さらに、実施項目①-e においては、開発した共発現系でのアンセリン生産条件を最適化することで、さらに変換率を高める。特に本反応システムには ATP や SAM といった補酵素が必要である点が重要である。これらはいずれも宿主大腸菌のもつ代謝機能により

供給しており、培養・生産条件の検討（培養系での生産、通気攪拌条件等）により代謝回転を改善することで、各反応ステップの効率化および全体としてアンセリンへの変換率の向上につながり、目標とする変換率 70%を達成可能と考えられる。

一方でラボスケールレベルで確立したアンセリン合成技術をスケールアップして実製造を目指すには、ラボスケールでの反応・精製条件を実製造でも適用可能な条件にカスタマイズする必要がある。プラスミドの脱落を防ぐための薬剤添加は食品製造の視点からは出来れば避けたいところであるが、薬剤不使用時に変換率が低下する可能性が示された。これは導入遺伝子を含むプラスミド脱落が原因と考えられるが、この課題は導入遺伝子を染色体 DNA に組み込むことや、薬剤耐性マーカーのかわりに栄養要求性マーカー等を利用することで回避できると考えている。基質の培養液の直接添加による菌体反応においても、変換率を低下させる要因がわかりつつあり、これらの発見を足掛かりに、実製造に適用できる方法でより高い変換率や精製純度を目指していく。

(10) 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	
2021	0	1	1	2	0	0	0
2022	0 (1)	0	0 (2)	0 (1)	0	0	0
PJ 期間 合計	1	1	3	3	0	0	0

() は 2022 年末の見込み

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

学校法人早稲田大学と東海物産株式会社の間で締結された「知財及びデータの取り扱いについての合意書」に基づき、早稲田大学と東海物産の関係メンバーで構成された知財運営委員会による検討により知財化もしくは秘匿化を決定する。本テーマ参加者は、自己に属する研究開発従事者が、本テーマの実施により発明等をなした場合には、直ちに知財運営委員会に対し、発明者等及び発明等の成果の内容を届け出る。学校法人早稲田大学と東海物産株式会社の間で締結された「知財及びデータの取り扱いについての合意書」に基づき、早稲田大学と東海物産の関係メンバーで構成された知財運営委員会による検討により知財化もしくは秘匿化を決定する。本テーマ参加者は、自己に属する研究開発従事者が、本テーマの実施により発明等をなした場合には、直ちに知財運営委員会に対し、発明者等及び発明等の成果の内容を届け出る。

年度	特許出願		
	国内	外国	P C T
2021	0	0	0
2022	0 (2)	0	0
PJ 期間 合計	2	0	0

() は 2022 年度末の見込み

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

FS で構築したコンソーシアム参加企業による大規模生産を行い、東海物産で高度精製作業を実施することにより、大幅なコスト削減を予定。コストを下げることにより、天然品や化学合成品の 1/2~1/10 の市場価格を目指す。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

アンセリンを含むイミダゾールジペプチドの市場は天然素材だけでも 2020 年で約 43 億円であるが、2025 年には 60 億円と 1.4 倍規模に拡大する見込み。この天然市場へ安価な酵素合成品を投入することにより、更なる市場拡大を促す。2030 年には市場規模 100 億円に到達すると予想される。海外においては、化学合成カルノシンが一定の市場を確保しているが、アンセリンの市場は無い。安価な酵素合成アンセリンを新規で海外市場に供給することが出来れば、同市場は急拡大することが可能である。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

販売単価 15~20 万円/kg を目指し、酵素合成によるアンセリン生産法および生産したアンセリンの高度精製法をラボスケールで確立する。これを商用規模まで順次スケールアップする。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

酵素合成アンセリンを食品素材として市場に流通させるうえで、組換え DNA 技術を応用した食品添加物及び添加物に対する社会的受容性の問題が課題となる。これを回避するために、内閣府食品安全委員会により高度精製品と判断されるレベルまで製品の精製度を高め、厚生労働省から組換え DNA 技術を応用した食品及び添加物に該当しないとの判断を得る必要がある。同判断を得るに、コンソーシアム参加企業と共に例えば協和発酵バイオの組換え微生物食品・転換物の申請支援事業を利用する等を実施していく予定。また、米国等の海外展開をしていく場合についても、各国の食品医薬局 (FDA) への申請・認可が必要になる。

天然物から精製しているアンセリンは食経験が豊富であるが、必要最低限と判断される安全性試験 (急性毒性試験、反復投与試験、Ames 試験) を実施し、食品市場へ流通させている。よって、酵素合成アンセリンにも必要な安全性試験を追加し、これら申請作業に対する準備作業を助成フェーズ終了後、実施する予定。

(12.5) 波及効果

天然物由来や試薬グレードしかないアンセリンを食品素材として活用できる酵素合成法による素材を世界の市場に供給することにより、以下の波及効果が見込まれる。

- SDGs 目標 2

アンセリンを酵素合成法で生産することにより、食との競合を避け、食料確保に貢献、水産資源の保護

- SDGs 目標 3

アンセリンを安価に市場へ供給することにより、用途開発研究（機能性表示食品への用途拡大、ヒト臨床試験）が推進され、高齢者の健康維持に貢献

- SDGs 目標 13

アンセリン酵素合成法を活用することにより、養鶏による GHG 排出量を抑制

3.2.2.1.11 JM09「コリネ菌によるバイオイソプロパノール生産システム実証」 (Green Earth Institute 株式会社)

(1)背景と目的

ポリプロピレンは世界で2番目に生産量が多いプラスチックであり、日本で生産されるプラスチックの2割強を占めており、年間250万トンが生産されている。自動車部材をはじめ、医療、家電、住宅、食品分野まで、幅広い用途に使用されており、人々の生活に欠かせない素材の1つである。しかし、ポリプロピレンの原料となるプロピレンはバイオ化の難易度が高く、今のところ、商用化レベルの技術確立には至っておらず、引き続き石油を原料とした石油化学法(石化法)で生産されている。

プロピレンをバイオ法で生産する場合は、発酵法でバイオエタノールを生産し、化学合成によってバイオエチレン→バイオプロピレンとする方法が考えられてきたが、高コストであり、実用化には至っていない。そこで、共同研究先の三井化学の独自技術である一段階でイソプロパノール(IPA)⇒プロピレンを生産する世界初の製法を用いて、バイオポリプロピレンの実用化を実現する。

そのためには、原料となるバイオ IPA を生産する必要があることから、本事業において、IPAを生産する菌体とプロセスの開発を行う。

(2)位置づけ、目標値

現在、全ての化学品について、石油由来をバイオ由来に変えていこうという流れの中で、IPA価格についても、石油由来のIPA価格の概ね1.5倍以下で生産できれば、ポリプロピレン原料のみならず、IPA単独での需要も期待でき、両者を合わせて、100億円超の市場創出効果が期待できる。

生産したIPAが高濃度になると大腸菌が死滅し生産量に上限があるという課題のため、宿主をGEIのコリネ菌としたアミノ酸生産菌育種で培った遺伝子改変技術や増殖非依存型バイオプロセスの商用化技術と、三井化学の大腸菌を用いたバイオIPA生産技術とを組み合わせることで、短期間に基本的なバイオIPAの生産システムを構築する。より安価な生産システムの構築を目指し、CO₂を固定化する代謝系をさらに導入することで、大腸菌を宿主とした場合の理論上の対糖収率と同等ないし上回る生産システムを構築し、従来の石化法によるCO₂排出を大幅に削減したバイオIPAの生産システムの実現することを本事業の目標とする。

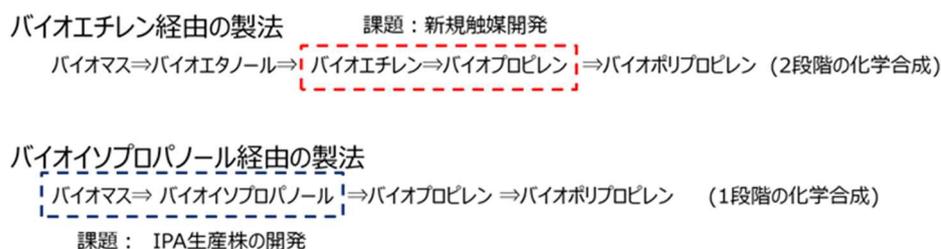


図 3.2.2.1.11-1 各技術の課題

(3) 全体計画

委託フェーズである 2021 年度から 2022 年度は IPA を生産するコリネ菌の開発を行う。開発初年度である 2021 年度は三井化学(株)が大腸菌で作製した IPA 生産株を基にした経路をコリネ菌に導入する。2022 年度は理論対糖収率の向上を目的として、二酸化炭素固定経路をコリネ菌に導入し、理論対糖収率以上で IPA を生産するコリネ菌を作製する。

助成フェーズに移行した 2023 年度以降は生産プロセスの構築も並行して実施していく予定である。生産プロセスに『水よりも沸点が低い特性を利用したプロセス』と『CO₂ を原料として利用するプロセス』を組み込むことによって、IPA 生産コリネ株が有する生産能を最大限に引き出す生産プロセスを開発する。助成フェーズの 1 年目の 2023 年度は 1 L ジャーファーメンターで生産プロセスの確立を目指す。2024 年度は構築したプロセスを 10L-ジャーファーメンターを用いて生産試験を行い、生産条件の最適化を行い、数 kL 発酵槽のパイロット試験 1 回目を行う。2025 年度は 1 回目のパイロット試験で得られたデータからスケールダウンモデルで培養条件を再度最適化し、2 回目のパイロット試験を実施する予定である。

	2021年	2022年	2023年	2024年	2025年
イソプロパノール 生産株の開発 (担当：Green Earth Insutitute(株))	IPA生産コリネ菌の作製 ・既存の生産経路をコリネ菌に導入		プロセスに応じて生産株を改良 ・副生成物の削減 ・増殖に悪影響を与えない		
イソプロパノールの 生産プロセス検討・改良 (担当：Green Earth Institute (株) 共同実施先：三井化学(株))		・CO2固定回路を導入し、理論 対糖収率を超える株の作製	生産プロセスの検討及び最適化 ・1L-JarでのIPA貯留プロセス とCO2再利用プロセスの開発		1.5KL or 3kL発酵槽で 実証試験
生産拠点と使用する発酵槽の選定					

図 3.2.2.1.11-2 研究の全体スケジュール

(4) 実施体制

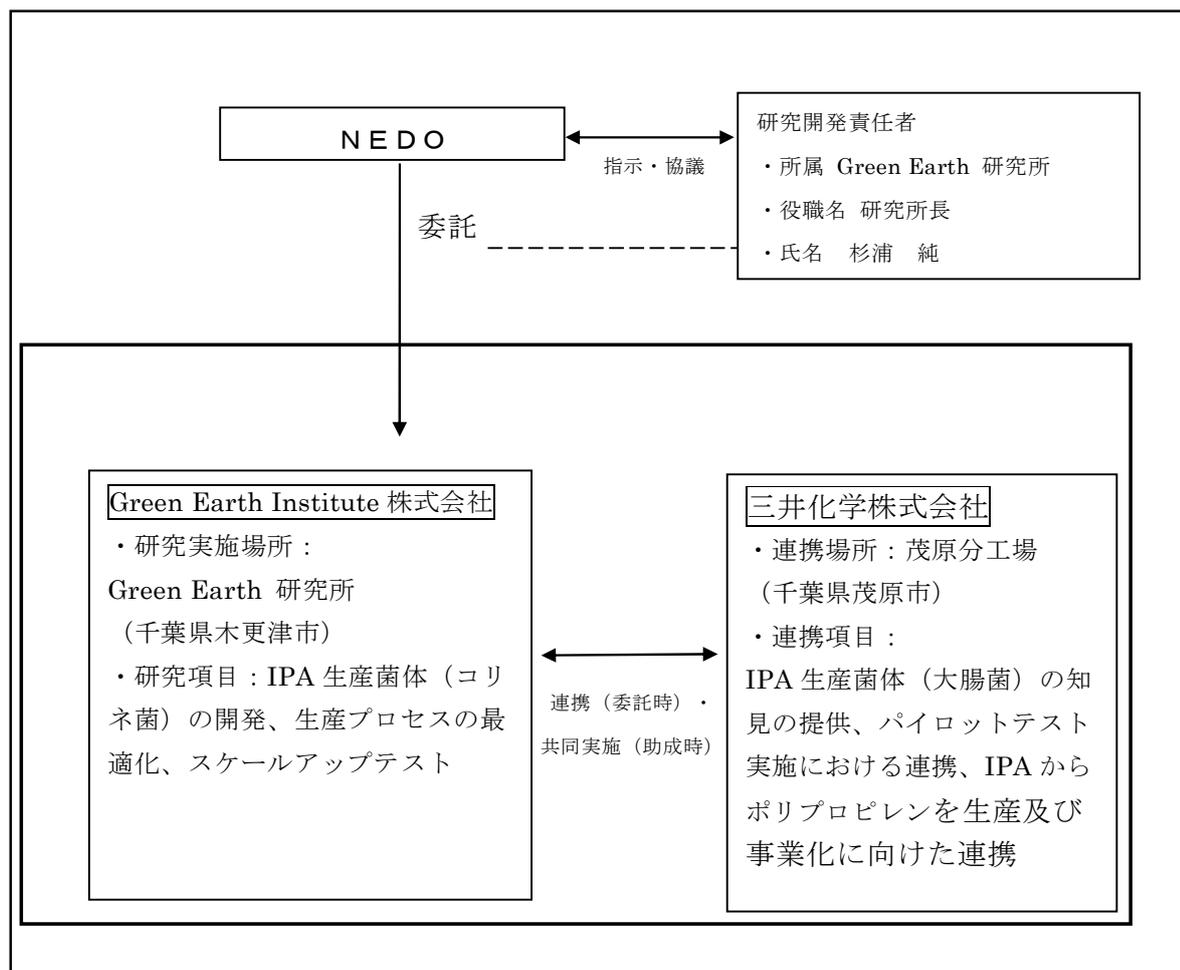


図 3.2.2.1.11-3 実施体制

(5) 運営管理

GEI の社内においては基本毎週開催の研究開発会議で月一回本プロジェクトについての進捗報告を行うとともに、研究開発方針の妥当性について議論を行っている。

また、三井化学(株)の研究者と定期的に情報交換を実施しており、連携を図れる体制が構築されている。

(6) 実施の効果

バイオイソプロパノールが見込み通り上市されれば、2030 年には年間 10 万トン生産を目指しており、180 億円の市場になると見込んでいる。

C02 排出削減という観点では以下のとおり、計算される。

- ① 石油化学品プロピレン 1 t 製造時の C02 排出量=1.5 t
- ② バイオプロピレン 1 t 製造時の C02 排出量=0.4 t
- ③ ポリプロピレン燃焼時の C02 排出量=3.1t

従って、バイオマス由来原料でプロピレンを製造した場合、プロピレン 1 トンあたり 4.2 トンの C02 が削減されることになる。

(7) 中間目標の達成度

表 3.2.2.1.11-1 中間目標の達成度合い

研究開発項目	目標	成果	達成度	今後の課題と解決方針
① イソプロパノール生産 コリネ菌の 作製	理論対糖収率を超える株の作製	・コリネ菌での イソプロパノールの生産を確認 ・二酸化炭素固定をコリネ菌に 導入	△ (○) 2022 年度末 見通し	・二酸化炭素固定回路が円滑に循環するために各酵素の発現量の調整 ・二酸化炭素固定回路から得られた代謝物から効率よくイソプロパノールを生産するために、各酵素の発現量の調整

◎：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) 研究開発の成果と意義

① 「イソプロパノール生産株の開発」

①-a イソプロパノール生産酵素の発現系確立

イソプロパノールの生産に関与する酵素をコリネ菌内で発現させるために、イソプロパノールの発現用プラスミドを構築した。プラスミドの構築は制限酵素で線状化し、発現用ベクターの末端配列を付加したプライマーで増幅したイソプロパノール生産酵素の DNA を In-fusion 酵素で DNA 断片を融合した。作製した発現用プラスミドは複製起点が 2 種類、プロモーターが 3 種類、抗生物質が 2 種類、発現ベクターに導入するイソプロパノール生産酵素の組み合わせを変えることで、24 種類を作製した。

①-b イソプロパノール生産能を向上させる酵素の欠損と導入

先行研究でイソプロパノール生産能に関与すると言われていた酵素の欠損と導入を行った。次に作製した菌体の増殖を確認するために、1L-Jar を用いて培養試験を行った。その結果、改変株①の倍加時間は野生型の 1.04 倍増加し、改変株②では 1.2 倍に増加していることが分かった。野生型と比較すると、倍加時間は増加傾向であったが、これまでに実用化されている株と比較すると、問題になるほど増加していない。そのため、イソプロパノール生産酵素を導入することにした。

①-c イソプロパノール生産酵素を導入したコリネ菌でのイソプロパノール生産試験

野生株と改変株にイソプロパノール生産酵素発現用プラスミドを導入し、発現確認及び活性測定を行った。さらに、試験管スケールと1L-ジャーファーメンターでのイソプロパノール生産試験を行った結果、イソプロパノールの生産を確認することが出来た。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

イソプロパノール生産コリネ菌の開発は 2022 年度中に一定の目途が立つ見込みであり、2023 年度から菌体性能を最大限に引き出す生産プロセスの開発を推進させる。スケールアップ時にイソプロパノール生産能に影響を与える可能性がある要因の特定は CFD ソフトウェア及び DoE を活用することで実験数の削減、時間短縮を図る。要因を特定するために行った実験結果から、発酵槽内の状態の CFD 解析を行なうことにより、パイロットスケールでの最適培養条件を検討し、パイロット試験を実施する。

パイロット試験から得られたデータと CFD 解析による生産シミュレーション結果を検証して、シミュレーションモデルの妥当性を確認する。妥当性が確認できなかった場合にはラボスケールの 5L もしくは 10L でのジャーファーメンターで実験を再度実施する。得られたデータからシミュレーションモデルの確度を向上させる。向上させたモデルから最適培養条件を決定し、パイロット試験を実施する。実験データと CFD 解析によるシミュレーションを並行して行うことで、商用までにかかる時間を大幅に短縮できると考えている。

イソプロパノール生産コリネ菌の開発に目途が立つ見込みであり、前述の施策を講じることにより商用に向けて研究開発の効率化が図られ、本事業の最終目標を達成できる見込みである。

(10) 成果の普及

本プロジェクトで新規性・進歩性がある発明については特許出願後に、論文や学会等の広報活動で成果普及に努める。また、論文を投稿する際にはオープンアクセスとして、だれでも読めるようにする。

表 3.2.2.1.11-2 プロジェクト期間中の成果報告件数

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	
2021	0	0	0	0	0	1	0
2022	0	0	0	0	0	0	0
PJ 期間合計	0	0	0	0	0	1	0

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

本プロジェクトにより発生する知的財産権はバイオイソプロパノール生産コリネ菌と生産プロセスに関する発明が想定される。バイオマス由来原料としたイソプロパノールの生産菌に関する研究はこれまで多くの機関等で行われているため、先行研究調査と侵害予防調査を徹底し、新規性または進歩性が認められる可能性が高い発明については特許出願を予定している。

表 3.2.2.1.11-3 プロジェクト期間中の特許出願件数

年度	特許出願		
	国内	外国	P C T
2021	0	0	0
2022	(1)	0	0
PJ 期間 合計	1	0	0

() は見込み

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

本プロジェクトでは、バイオマス由来原料から製造したイソプロパノールの製造と販売を目指している。製造したイソプロパノールは主にポリプロピレンの原料として、三井化学に販売する。工業原料・有機溶剤、消毒・清掃用品、燃料用水抜き剤などの用途向けも販売する。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

バイオマス由来を原料としたイソプロパノールの大量生産のためには安価かつ大量なグルコース(糖)と大規模な発酵設備が必要である。上記の条件を満たす発酵メーカーを本プロジェクトに選定する。自社技術を他社が保有している発酵設備において、製造物質の量産化に成功しており、これまでの経験やノウハウを活かし、速やかな量産化を目指す。

日本国内での製造も安価なグルコース(糖)を入手できれば製造の見込みがあるため、本プロジェクト中に入手方法等を検討する。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

本研究開発終了後1年間(2026年度)で既存の発酵設備(または今後形成されるバイオファウンドリ拠点)を活用した量産化準備を実施。2027年4月からの成果であるバイオIPAの発酵法による量産を開始。並行して、2年をかけて、三井化学と連携して、バイオマス由来原料から生産したイソプロパノールを使ったバイオポリプロピレンの量産化準備を実施し、三井化学において2028年4月からバイオポリプロピレンの量産開始を目指す。

- ・事業化に必要な各種規制等への対応

本研究開発の実用化にあたって対応が必要な規制は以下の通りである。

- ・カルタヘナ法第13条1項に基づく経済産業大臣の確認
- ・消防法上、イソプロパノールは第4類アルコール類に該当することから、扱う数量にあわせて、必要な措置を講ずる。

- ・有機溶剤中毒予防規則では、イソプロパノールは第2種有機溶剤に該当することから、作業主任者の選任などの各種措置を講じる。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

本プロジェクト終了後、2026年4月から発酵メーカーに技術開示を行い、2027年中に発酵メーカーでのパイロット試験を終了し、2028年1月から商用生産を開始する予定。2028年には年間2万トンを目標生産量とし、2029年には5万トン、2030年には10万トンの生産を目標としている。

(12.5) 波及効果

イソプロパノールはポリプロピレンの原料以外にも自動車部材をはじめ、医療・家電・住宅・食品分野まで幅広い分野で使用されている汎用化成品である。生産量を順次拡大することによって幅広い分野で使用されているイソプロパノールをバイオマス由来原料から生産したイソプロパノールへの転換が考えられる。

3.2.2.2 植物

助成フェーズ

3.2.2.2.1 JP01「ジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質（PCN-HF）大量生産システムの構築」（ホクサン株式会社）

(1)背景と目的

本開発の目的は、新規のジャガイモシストセンチュウ（Potato Cyst Nematode;以下、PCNと記載）防除剤の原材料となるPCN孵化促進物質（Hatching Factor;以下、HFと記載）のバイオ生産プロセスを実用・事業規模にまで向上させる、全く新しい生産・精製システムの開発である。

ジャガイモは、世界で3.6億トン以上の生産量があり（引用文献1）、主要な食用作物の一つである。PCNは、ジャガイモに寄生する病害虫の一つで、世界中のジャガイモ生産現場において、甚大な被害をもたらしているが、未だ効果的な防除剤は開発されていない。PCNが難防除である原因として、その生活環（図3.2.2.2.1-1）と、その中の一形態である“シスト”の環境耐性・薬剤耐性・長期間（数年～十数年）の生存性にある。シスト内の卵は、宿主植物（この場合ジャガイモ）が栽培されて初めてその根から分泌されるPCN-HFに感応して、孵化を開始する。それまでは環境耐性の強いシスト内で十年以上も休眠・生存している。従って、一旦PCNが発生した圃場では、数年間ジャガイモ栽培を休止しても、再開すると再び同様の被害がもたらされる。

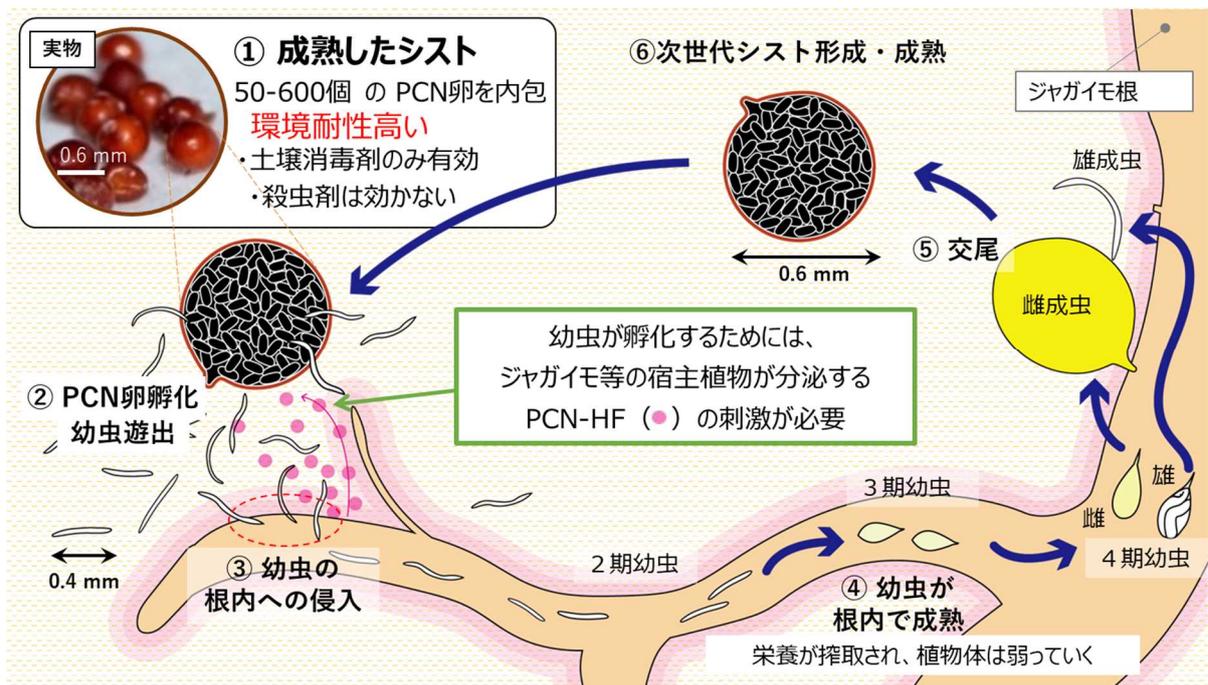


図 3.2.2.2.1-1 PCN の生活環

現在、販売されているPCN防除農薬でシストに効果があるのは、緊急的な防除対策として用いられる、非選択的な殺虫効果を有する土壌消毒剤（D-D剤）である。しかし、有効成分が劇物指定されており、使用時には作業者の安全対策に加え、河川への漏出による漁場の汚染が想定されるなど、周辺環境への配慮・使用制限が必須となる。

本研究開発で構築した生産システムで生産される最終製品、PCN-HF による防除剤は、餌となる宿主植物が存在しない状態の圃場に処理しても、シスト内の卵を孵化・遊出を促す効果がある。孵化した幼虫は餌となる宿主植物が存在しないため餓死する。その結果、PCN 汚染圃場の PCN 密度の低減が期待できる（図 3.2.2.2.1-2）。これに加え、主成分がジャガイモ由来であり安全性が高く、農作業開始前の圃場に施用可能と考えられるため、作業性も格段に優れた製品と期待できる。

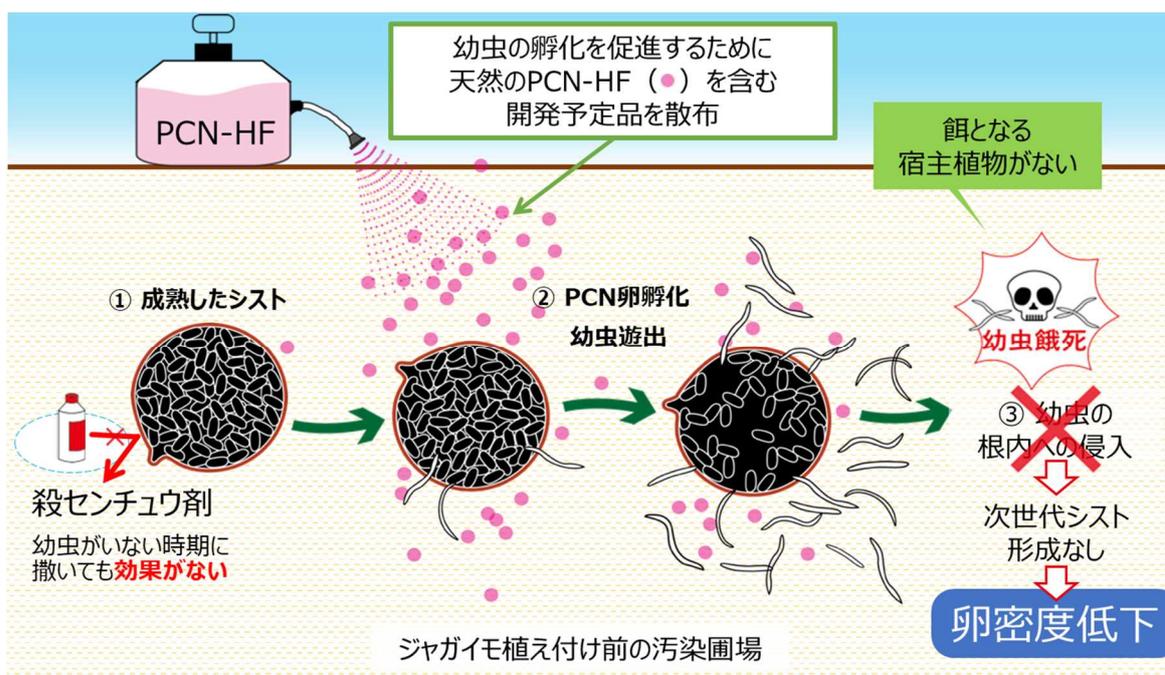


図 3.2.2.2.1-2 PCN-HF による防除剤を用いた PCN 防除戦略

引用文献 1 FAOSTAT 2019

(2)位置づけ、目標値

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。植物体から分泌される PCN-HF 量は微量で、量的・コスト的に産業上利用可能なまでに生産することが困難であり、実現していない。また、PCN-HF の化学合成による大量生産の試みは、技術的・コスト的に破綻することが他機関の研究開発にて既に実証されている。一方、既存の PCN 防除剤は孵化後の幼虫に効果を有するので、競合品ではない。何故なら、開発予定品によりシスト内の PCN 卵の孵化を促進し、シストから遊出した幼虫を既存の防除剤で殺虫する併用での使用法が想定されるため、既存の PCN 防除剤は開発予定品と競合しない。

本開発の目的は、新規の PCN 防除剤の有効成分である PCN-HF 原料の大量生産・回収・精製を可能にする新規のバイオ生産プロセスを開発することにより、ラボスケールから実用・事業規模にスケールアップすることにある。表 3.2.2.2-1 に、本研究開発の達成目標を記載する。

表 3.2.2.2.1-1 現状値と達成目標

項目	現状値 (ラボスケール方法)	達成目標
PCN-HF 含有培養液生産	12.6 リットル/人/日	1260 リットル/人/日 (100 倍)

3.2.2.2.1-2

PCN-HF 成分回収・精製	16.2 リットル*/人/日	4,000 リットル/日
----------------	----------------	--------------

*：カラム分画、減圧乾固等の工程含む

【目標値】

中間目標

研究項目	研究開発目標	根拠
研究項目 (1) PCN-HF 含有培養液生産規模のスケールアップ法の開発	半自動化生産システムに適したプロトタイプ培養容器を試作する。	従来容器と同等の孵化活性を維持し、スケールアップに柔軟に対応可能かつ半自動化に対応した容器を開発することで、実用・事業スケールに対応可能と判断。
研究項目 (2) PCN-HF 原料の大量・高効率回収・精製方法の開発	濃縮・精製・糖除去の最適な装置・条件を検討・シミュレーションを行う。	孵化活性を損なわない濃縮・糖除去の方法、条件を確定し、パイロットシステムに応用することにより、4,000 リットル/日相当の規模の処理が可能と判断。
研究項目 (3) PCN-HF 原料の品質管理に向けた分析方法の検討	孵化活性と相関のある候補ピークより活性成分のピーク又は、指標を選定する。	活性成分のピーク又は指標を選定することで、これを指標とした品質管理方法を検討し、方法の確立が可能と判断。

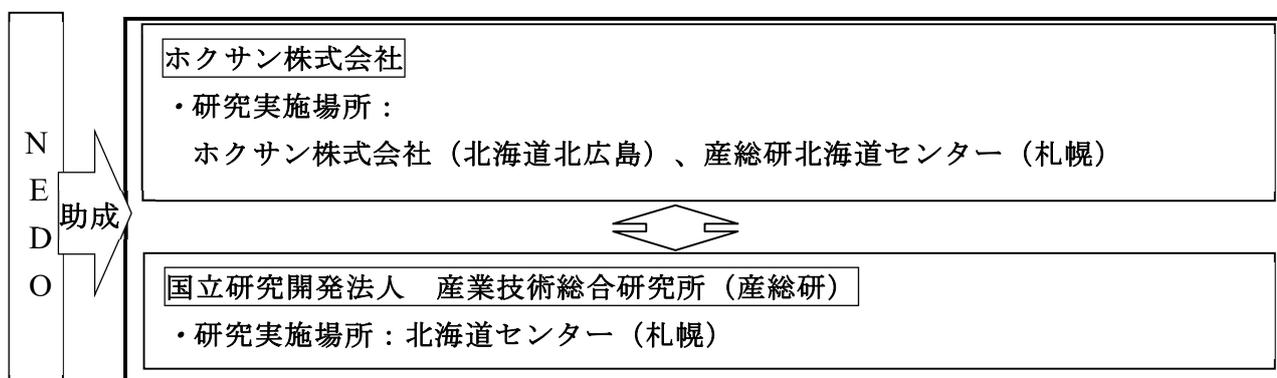
最終目標

研究項目	研究開発目標	根拠
研究項目 (1) PCN-HF 含有培養液生産規模のスケールアップ法の開発	構築した培養液生産/回収システムでの1,260リットル/人/日（100倍）規模の実証	一連の工程を可能な限り単純化・自動化するシステムを構築することで短縮可能。
研究項目 (2) PCN-HF 原料の大量・高効率回収・精製方法の開発	4,000 リットル/日相当の培養液処理可能なパイロットシステム実証	PCN-HF の活性を損なわない処理条件での検討が必要だが、各濃縮法の処理量は機器カタログ調査によると最大規模で1,200kg/時間の能力を有しており、処理可能と判断。
研究項目 (3) PCN-HF 原料の品質管理に向けた分析方法の検討	品質評価手法の確立	これまでに LC-MS による分画と孵化活性の相関性のある程度解析済みであるため、詳細に分画・解析することで達成可能と判断。

(3) 全体計画

研究項目	2021 年度	2022 年度	2023 年度
ジャガイモシストセンチュウ 孵化促進物質（PCN-HF） 大量生産システムの構築	PCN-HF 含有培養液	生産規模のスケールアップ法の開発	→
	PCN-HF 原料の大量	・高効率回収・精製方法の開発	→
	PCN-HF 原料の品質	管理に向けた分析方法の検討	→

(4) 実施体制



(5) 運営管理

内容	回数	開催日
PL, sPL, NEDO への進捗状況報告	2	2021/12/13, 2022/5/31
進捗共有・試験検討	10	2021/11/12, 2021/12/1, 2022/1/7, 2022/3/4, 2022/3/16, 2022/3/25, 2022/3/30, 2022/4/13, 2022/4/22, 2022/5/18

(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に対し、年間売上の試算より、販売開始 5 年目以降に、開発経費の回収が可能と予測される。

【費用・売上】

コスト試算に基づく原価率、並びに販売開始 5 年後の年間売上額の予測から、販売 3 年後には黒字化を予定。

【省エネルギー】

本技術開発により製造される PCN 防除剤は、同等品が存在しないため、現在 PCN 防除に用いられている化学合成品、D-D 剤の合成工程との CO₂ 排出削減効果を試算した。

D-D 剤の合成に比して、本提案の植物を用いたバイオ生産プロセスでは、一製品あたり、98.7%、CO₂ 排出を削減すると試算された。

現在の D-D 剤シェアの 20%代替で年間 2.452 万トンの CO₂ 削減となる。

(7) 中間目標の達成度

研究項目	中間評価目標	成果	達成度
研究項目 (1) PCN-HF 含有培養液生産規模のスケールアップ法の開発	最適な素材の容器にて生産システム構築を開始する。	素材の異なる 3 種類の容器を試作し、栽培試験を実施。一部で良好な生育を確認。(生育が良好な容器で生産システムを構築予定)	△ (○)
研究項目 (2) PCN-HF 原料の大量・高効率回収・精製方法の開発	濃縮・精製・糖除去の最適な装置・条件を検討・シミュレーションを行う。	2 種類の濃縮方法での検討を行い、ラボ機での条件検討結果を基に、事業化規模の機種でのシミュレーションを行い、それぞれ 1 台で実施可能であることを確認した。	○
研究項目 (3) PCN-HF 原料の品質管理に向けた分析方法の検討	孵化活性と相関のある候補ピークより活性成分のピークまたは、指標を選定する。	PCN-HF 粗精製物を分画し、孵化活性と相関のある分画を特定した。更に、この分画での LC-MS 解析を行い、孵化活性と相関のある候補ピークを確認した。(活性成分の指標分画または、ピークを選定予定)	△ (○)

◎：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)

() は 2022 年度末見通し

(8) 研究開発の成果と意義

《研究項目 (1) PCN-HF 含有培養液生産規模のスケールアップ法の開発》

(1)-1 培養液の効率的な回収システムの構築

本項目は、従来容器 (ガラス容器) と同等の孵化活性を持つ培養液が回収可能な素材を探索し、ジャガイモの良好な生育、無菌環境の維持、及びガス交換性に優れ、培養液 1,260 リットル/人/日規模の回収を想定した培養容器を検討し、決定することを目的とする。素材・形状などが異なる培養容器を 2 種類以上試作することを目標とし、2021 年度は通気性素材として入手可能であった素材 A と素材 B にて検討を行った。素材 A は光透過度が低いことを受け、透明度の高い別

素材（素材 C）と組合せ、通気面を担保するために素材 A 面、若しくは底面に配置した 2 タイプの容器を作製した。素材 B は光透過度が高いため、本素材のみで全面に通気性を担保した容器を試作し、それぞれで栽培試験を行った。その結果、素材 A を使用した容器では、通気面の配置に関わらず、ジャガイモの生育が停滞し、培養 20 日後には枯死した。一方で、素材 B では、培養苗の良好な生育成育がみられた。素材 B 容器にて 4 週間培養した培養液を回収し、in vitro 孵化試験にて評価したところ、対照とした従来容器の培養液と同等の活性を有していた。

2022 年度は引き続き、素材 B にて容器形状の最適化検討を行う。また、2022 年度新規検討の素材を用いた容器の試作と培養試験、および得られた培養液の孵化活性について in vitro 孵化試験による評価を進める。

選抜した容器を用いて、培養液の供給・回収半自動化システムの構築を開始する。

(1)-2 ジャガイモの品種検討

ジャガイモの品種によって PCN-HF の生産量が異なることが示唆されている。そこで、ラージスケール化によるジャガイモ培養液中の PCN-HF 含有量の低下リスクの回避、もしくは更なる PCN-HF 分泌量の増加を狙い、使用するジャガイモ品種検討を行なった。具体的には、品種 A を含む 13 品種の無菌培養株を作製し、ラボスケール（ガラス培養ビン）にて培養、in vitro 孵化試験にて孵化活性を確認し、現在使用している品種 A より生産性（孵化活性、採取養液量）の高い品種の選抜を目標として検討を行った。その結果、「品種 A」と比較して、「品種 B」および、「品種 C」で高い孵化活性が認められた。なお、各品種における回収養液量には大きな差は認められなかった。これらの品種を用いて、大容量容器にて培養をおこない、再現性を確認する予定である。

《研究項目（2）PCN-HF 原料の大量・高効率回収・精製方法の開発》

(2)-1 濃縮・精製検討

本研究項目では、1 日 4,000 リットルの培養液が濃縮可能なパイロットシステムを開発するため、大量濃縮技術として、濃縮方法 A、濃縮方法 B、濃縮方法 C、粉末化方法 D、粉末化方法 E の 5 種類の方法に関して、PCN-HF の活性を損なわない処理条件について検討することとした。濃縮率は 10 倍以上、且つ、濃縮還元時の孵化活性が濃縮処理前の 50% 以上を維持すること指標に、2021 年度は濃縮方法 A と粉末化方法 D の 2 種の方法について検討を行った。

(2)-1-1 粉末化方法 D

本法にて、自社保有のラボ機を用い、スモールスケールでジャガイモ培養液を処理したところ、検討したいずれの条件でも粉末として回収することができなかった。培養液に含まれるショ糖が原因と考えられたため、果汁等の糖含有液のような粉末化が難しい液体で使用される賦形剤を用いた添加検討を行った。検討に先立ち、供試候補の賦形剤 9 種類について孵化活性への影響（孵化阻害）を確認し、この内の一種を選抜した。

糖含有液の当該処理に関する既報論文を参考に、賦形剤添加量をジャガイモ培養液中のショ糖含有量と同等量とし、温度・送液量等を条件パラメータとして粉末を試製した。その結果、粉質が良好な粉末を得ることができた。粉末の孵化活性を確認するため、粉末を濃縮還元した懸濁液にて in vitro 孵化試験を行ったところ、いずれも処理前の培養液の孵化活性をほぼ維持していることが確認できた。

(2)-1-2 濃縮方法 A

本法について、温度および、供試液量を条件パラメータとして濃縮検討を行った。濃縮液の濃縮還元液にて *in vitro* 孵化試験を行ったところ、処理前原液の孵化活性を維持していることが確認できた。処理速度が最速となる加熱温度および、処理液量での検討結果を用いて、培養液 4,000L 処理に必要な時間および機器台数のシミュレーションを行った結果、事業化規模の機種 1 台で処理可能であることを確認した。

以上より、2021 年度検討した粉末化方法 D、濃縮方法 A は、いずれも選抜指標（濃縮率 10 倍以上、且つ濃縮還元時の孵化活性が 50%以上）を達成し、ジャガイモ培養液の濃縮・精製法への有効な方法として選抜することができた。今後は、剤化検討における、保存安定性や取扱い易さを考慮し、上記 2 種類の方法の組合せによる剤化検討を行う。また、今年度新規に検討予定の 3 種類の方法について検討も行う。

(2)-2 糖除去検討

ジャガイモ植物体培養液には、ショ糖に代表される多数の培地成分も含まれているため、粘性増加などによる製剤化障害の可能性や、品質管理上における問題等のリスクが想定される。そこで、本研究項目では、これら不要物の除去方法を検討する。2021 年度は、不溶物除去後の培養液の孵化活性を評価し、糖濃度が原液の 1/10 以下となることを指標として、「糖除去方法 A」と「糖除去方法 B」の 2 種類について検討を行った。それぞれの方法において大量処理を想定していたが、コロナ禍による需要ひっ迫の影響から、当初予定していた資材が生産中止、大幅な納期遅延が発生したため、まずは入手可能なスモールスケールにて処理条件の確認を行うこととした。

方法 A において、ポアサイズが異なる 3 種の膜にて処理したところ、原液の糖度が低下し、糖濃度 1/10 に除去可能であった。除去培養液にて *in vitro* 孵化試験をしたところ、最小ポアサイズにて原液とほぼ同程度の活性を保持していた。

方法 B では、ポアサイズが異なる 4 種の膜にて濃縮前のジャガイモ培養液を処理したところ、原液の糖度が低下し、糖濃度 1/10 以下に除去可能であった。上記処理を行った培養液にて *in vitro* 孵化試験を行ったところ、原液との活性比で 8-9 割の活性を維持していた。また、項目 (2)-1 の濃縮法にて調整した 25 倍濃縮液で処理したところ、短時間で糖度が低下し、糖濃度を概ね 1/10 以下に除去可能であった。上記処理を行った濃縮液を濃縮還元して *in vitro* 孵化試験を行い、原液との対比で約 80%の活性を維持していることを確認した。

以上より、今後は、両方法とも大容量可能なシステムでの検証を検討・実施中である。

(2)-3 効果実証（圃場試験）

PCN 防除剤の実用化にあたり PCN 発生圃場での効果確認が必須である。過年度までの圃場試験で、従来のカラム法で粗精製した試料（PCN-HF 粗精製物）を処理することで、PCN 卵密度が低減することを確認している。本プロジェクト初年度の 2021 年度は、項目 (2)-1 にて作製した濃縮試料は時期的に準備できないため、PCN-HF 粗精製物を用いて、有効最小処理量を検討した。具体的には PCN 発生圃場に PCN-HF 粗精製物を散布し、卵密度を指標として効果を評価した。過年度までに効果の見られた処理量に加え、更に処理量を減らした試験区を含めた 4 処理区を設定し、1 処理区 1m²、3 反復での散布を行った。その結果、PCN 卵密度の増減に統計的な有意差は認めら

れなかったが、処理後 30 日以降の粗精製物処理区では、0g/m²処理区と比較すると卵密度減少の傾向が認められた。

2021 年度に処理した圃場は、PCN 卵密度が低く、卵密度の差の判別が困難な条件であった。そこで、2022 年度には、PCN 卵密度の高い一般圃場を探索し、中密度以上の卵密度を示す圃場を選定した。濃縮方法 A による濃縮液を試料として、上記圃場にて、6 月から散布試験を開始している。

《研究項目(3) PCN-HF 原料の品質管理に向けた分析方法の検討》

各項目で実施している *in vitro* 孵化試験は無菌 PCN 卵を活用した再現性の高いバイオアッセイ系であるが、実用化後の製品評価においては、他に異なる評価方法も備えておく必要がある。そこで、バイオアッセイ系以外の方法として機器分析による評価法を本項目にて検討する。より具体的には、PCN-HF 粗精製物を LC-MS に供試し、検出されたピーク群から孵化活性と相関するピークを探索し、機器分析の指標とする。2021 年度は、孵化活性と相関する PCN-HF 粗精製物由来分画成分の 50 ピーク以上から、候補ピークを選定することを目標として検討を行った。

これまでの研究開発（スマートセル PJ）で、培養液からカラム精製にて採取した PCN-HF 粗精製物について、分子量と極性で分画し、孵化活性を有する画分を抽出している。2021 年度からは、この分画について、さらに HPLC で分離・分取を行い、59 分画を得た。全 59 分画を *in vitro* 孵化試験に供し、孵化活性が高い 8 分画を得ることができた。これら 8 分画を LC-MS に供し、検出された合計 89 ピークより孵化活性と相関する候補ピークを選出し、活性成分のピークの特定を継続している。

また、項目（1）-2 で確認した孵化活性の高い品種と低い品種の培養液から PCN-HF 粗精製物を調製し、分子量と極性で分離精製した分画成分の比較分析を実施中である。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

研究項目	現状	研究開発目標	達成見通し、根拠
研究項目 (1) PCN-HF 含有培養液生産規模のスケールアップ法の開発	素材の異なる 3 種類の容器を試作し、栽培試験を実施。一部で良好な生育を確認。(生育が良好な容器で生産システムを構築予定)	構築した培養液生産/回収システムでの 1,260 リットル/人/日 (100 倍) 規模の実証	一連の工程を可能な限り単純化・自動化するシステム構築することで短縮可能。
研究項目 (2) PCN-HF 原料の大量・高効率回収・精製方法の開発	2 種類の濃縮方法での検討を行い、ラボ機での条件検討結果を基に、事業化規模の機種でのシミュレーションを行い、それぞれ 1 台で実施可能であることを確認した。	4,000 リットル/日規模の実証	PCN-HF の活性を損なわない処理条件での検討が必要だが、各濃縮法の処理量は機器カタログ調査によると最大規模で 1,200kg/時間の能力を有しており、処理可能と判断。
研究項目 (3) PCN-HF 原料の品質管理に向けた分析方法の検討	PCN-HF 粗精製物を分画し、孵化活性と相関のある分画を特定した。更に、この分画での LC-MS 解析を行い、孵化活性と相関のある候補ピークを確認した。(活性成分の指標分画または、ピークを選定予定)	品質評価手法の確立	これまでに LC-MS による分画と孵化活性の相関性がある程度解析済みであるため、詳細に分画・解析することで達成可能と判断。

(10) 成果の普及

本事業の実用化に向け、人的資源（人材）を集中させているため、論文・外部発表などは当面行わない。今後、実用化の目処がついたところで、論文・外部発表、新聞発表などを積極に行っていく。

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

植物培養・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し、特許化は行わない。

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

天然の PCN-HF を利用した PCN 防除方法は、構想としては以前から農薬の代替技術として提唱されていたが、植物からの PCN-HF の分泌量は極めて微量で、しかも土中から回収することは、非常に困難で未だ実現はしていない。また、化学合成の場合は 52 工程を経る必要があり（引用文献 3）、時間もコストも膨大にかかることなども確認されており、実際に PCN-HF の化学合成もしくは、その構造類縁体を用いた防除方法の大型国プロジェクトも成功には至っていない（引用文献 4）。本提案は、提案者らのチームが世界的にも唯一成功しているジャガイモ水耕栽培技術を基に、ジャガイモ植物体の液体培養によりこれまでに無い飛躍的な生産量向上と PCN-HF を溶液中に分泌させることによる回収の効率性を兼ね備えた新規の PCN-HF 高生産基盤技術を基に大量生産システムを構築しようとするものである。

引用文献 3 Nature Chemistry, 3, 484 (2011)

引用文献 4 農水省レギュラトリーサイエンス新技術開発事業 研究実績報告書 2407

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

本開発予定品は、農薬あるいは土壌改良資材（農業資材の一種）として開発・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と考えられる。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。ただし、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、農水省担当部署へのヒアリング継続し、適切な手続きが進められるよう情報収集を行っている。

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へのヒアリングを既に開始し、適切な手続きが進められるよう情報収集を行っており、農薬資材での事業化見通しとしては、2025 年に製造・販売を開始する予定である。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

本開発事業期間内で得られた PCN-HF を原材料とした製剤化検討を、事業終了後 1 年目には終了、2 年目までに PCN 類の被害が特に深刻な地域を対象として、サンプル配布・試験販売を行う。国内の主な販売先は、提案者が主事業（農薬等の製造販売）で用いている販売ルートを使用する。国外においては、欧州・米国・中国・インド及びロシア等をターゲットとし、提案者の主要株主の一つである外資系農薬メーカーや自社製品にて取引のある商社、農薬の原体メーカーを活用して、試験販売を経て当該開発技術（生産システム）のライセンス契約を行い、本技術の海外展開を図る。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

PCN-HF を有効成分とする 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。

開発予定品は植物由来成分で毒性は低いと考えられるため、回数制限なく使用可能と見込まれる。加えて、薬剤耐性の高いシスト内の卵に作用することから防除効果は高いことが示唆されている。よって、開発予定品は安全性と防除効果の高い新規センチュウ防除剤として農業生産者に受容され易いと期待される。

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。

(12.5) 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。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。令和 4 年 3 月時点での発生状況は、ジャガイモシロシストセンチュウ確認圃場は 330ha となっている（農林水産省対策検討会議：令和 4 年 3 月報告）。このような状況において、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。開発予定品は、既存の農薬に対して、安全性と防除効果に高い優位性がある。その普及は、国内のみならず国外の農作物に対しても安定供給に寄与し、世界的な食糧問題にも貢献することになる。

3.2.2.2.2 JP02「エピジェネティクス代謝変換技術を用いた高集積糖生産システムの実証」 (アクプランタ株式会社、東京工業大学、高崎健康福祉大学)

(1)背景と目的

SDGs の提言を受け、産業界は CO₂ 削減、炭素循環型社会の実現等社会課題の解決と持続的経済成長の両方が求められている。我が国においても、バイオエコノミー社会の実現のため、バイオ生産プロセスの高度化と社会実装の加速化により、国際競争力の向上や炭素循環型社会の確立が急務となっている。

本事業では、「エピジェネティクス代謝変換技術を用いた高集積糖生産システムの実証」のため、研究項目[1]:「エピジェネティクス技術を用いた環境ストレス逆利用型育成法の開発」、研究項目[2]:「ゲノム編集による高効率糖合成植物の分子デザイン基盤技術開発」、研究項目[3]:「ゲノム編集作物に最適化した糖高集積生産システムの開発」の3つの研究項目で構成し、バイオものづくり産業の基盤として、バイオ資源活用促進のための各種技術や従来法にとられない次世代グルコース生産技術等の開発を行う。

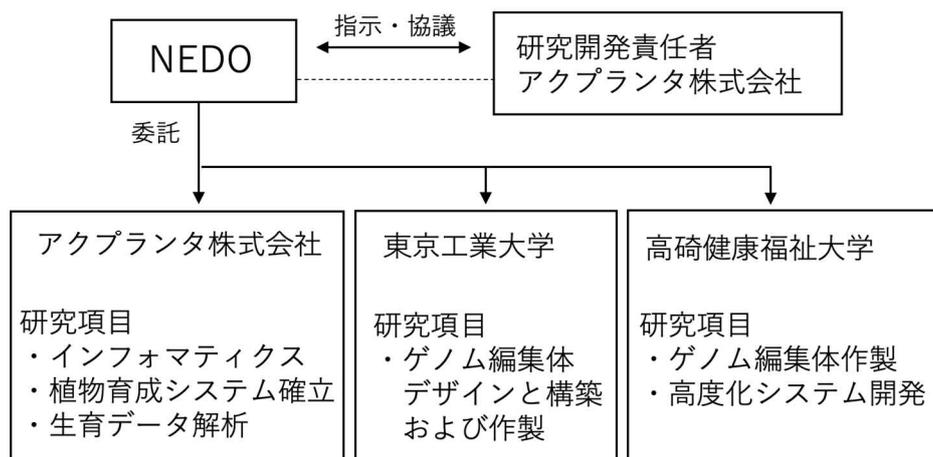
(2)位置づけ、目標値

現在我が国のグルコース生産は、海外からのトウモロコシを主とする原料に大きく依存しており、その価格と量は国際競争にさらされている。地球温暖化による異常気象の影響と、世界的なバイオ資源およびバイオエネルギー需要の増大により、トウモロコシを主とするグルコース原料の供給不安定化が既に生じている。本事業の推進により国内のグルコース原料の自給率拡大を目指した植物生産法の確立を行う。トウモロコシ等の栽培高密度化などにより、単位面積あたりの植物生産量を 2.5 倍するためのプロトタイプシステムを構築する。また、ゲノム編集による生体内の生産能力改変により、植物体内のグルコース生産量を 2 倍以上にできる変異体の確立を行う。トマト等での試験系等を早期に構築し、これら生産スキームの概念実証として利用する。これらを統合して最終的（助成フェーズ終了時）に、単位面積あたりの生産量を現行の 2~10 倍にすることで、低価格で安定したグルコース供給のプロセス構築を目指す。

(3) 全体計画

開発テーマ/実施テーマ	2021	2022	2023	2024	2025
[1]-1：高密度高生産栽培システム構築の基盤構築 [1]-2：植物工場を利用した環境ストレス逆利用型育成法のシステム構築（アクプランタ）	ホモログ解析	バイオステミュラント（BS）効果の確認 BSを用いた栽培条件の最適化	トウモロコシおよびゲノム編集トマトなどでの生育条件同定	ゲノム編集トマトでの高密度栽培最適化	ゲノム編集トウモロコシ生育条件検索試験導入
[2]-1：糖生産ゲノムデザインに利用する高効率ゲノム編集遺伝子改変技術基盤の構築 [2]-2：糖生産プロセスの高効率化のための植物デザイン技術（ゲノム編集技術）基盤の構築（東工大）	ゲノム編集基盤構築 トマトでのベクター導入	変異効率評価 生産効率化遺伝子用ベクター作成	トマトでの変異系統単位 生産効率化遺伝子用ベクター構築	TiDベクター作成実装用トマト編集株作成 TiD実装用トマト編集システム作成	高効率糖合成バイオファウンドリ変異純粋システム確立
[3]-1：糖高生産遺伝子「X」編集トウモロコシ・レタスの作製の開発 [3]-2：糖高生産遺伝子「X」編集個体に適した栽培・環境制御技術の開発（高崎健大）	レタスでのTO個体確立	ゲノム編集レタスの確立 トウモロコシでのベクター導入	追加ゲノム編集レタス作成	追加ゲノム編集トウモロコシ作成	実装用TiDゲノム編集トウモロコシ作成

(4) 実施体制



(5) 運営管理

分担研究チーム間での進捗報告会、および相互の研究機関における学術講演等を行い、各技術の理解と事業進捗についてすり合わせながら、事業全体の推進状況について把握管理をすすめる。また、NEDO、プロジェクトリーダーおよび技術推進委員との情報共有を適宜行い、進捗管理に反映させる。

(6) 実施の効果

バイオ資材などの基質や様々なものづくりの主原料の一つであるグルコースは、今後一段と供給量が減少すると見込まれる。現状、グルコースの価格は今後の更に価格上昇すると見込まれる。本計画では、遺伝子 X 変異を持つ新品種を創生、かつ栽培法の確立を目指す。本技術により、

グルコース生産の過程で生じる CO₂ 排出量は現状の 10% 近く抑えられる。また、このプロセス構築に伴うグルコース精製技術とこれをバイオ素材として利用した新産業の創出が見込まれる。

(7) 中間目標の達成度

研究項目 (担当機関)	中間目標値 (2022 年度)	中間目標の達成度 (2022 年度末達成度)
[1] エピジェネティクス技術を用いた環境ストレス逆利用型育成法の開発 (アクプランタ社)	[1]-1 高密度高集積栽培法確立に向けたゲノム編集体コンストラクト作製のための X 遺伝子ホモログの抽出と情報解析	◎ レタス、トマトおよびトウモロコシでの X 遺伝子ホモログに成功
	[1]-2 トマトおよびトウモロコシでの環境ストレス逆利用型育成法のシステム構築	◎ トマトに対する酢酸 BS 処理で成長量増大に成功
[2] ゲノム編集による高効率糖合成植物の分子デザイン基盤技術開発 (東工大)	[2]-1 糖生産ゲノムデザインに利用する高効率ゲノム編集遺伝子改変技術基盤の構築	◎ トウモロコシでの形質転換および CRISPR-Cas9 の発現を最適化しベクターを構築
	[2]-2 糖生産プロセス効率化のための植物デザイン技術	○ 標的遺伝子のゲノム編集ベクターを導入した複数のトマト系統に対して変異解析を実施するとともに、TiD 発現ベクターを構築
[3] ゲノム編集作物に最適化した糖高集積生産システムの開発 (高崎健大)	[3]-1 糖高生産 X 遺伝子編集トウモロコシ・レタスの作製	◎ ゲノム編集コンストラクトを導入したレタス T1 種子を収穫 (達成率 100%)。トウモロコシは遺伝子組換えの母体となる植物を獲得
	[3]-2 糖高生産 X 遺伝子編集個体に適した栽培・環境制御技術の開発	△ (○) 各種ゲノム編集体の栽培に資する制御系の検討を継続

(8) 研究開発の成果と意義

研究項目 [1] : エピジェネティクス技術を用いた環境ストレス逆利用型育成法の開発 (アクプランタ社)

[1]-1 高密度高集積栽培法確立に向けたゲノム編集体コンストラクト作成のための X 遺伝子ホモログの抽出情報解析

トマト、レタス、トウモロコシにおける下記遺伝子を同定した。また、東工大グループのゲノム編集ベクターに資する情報を提供した。高糖度産生および劣悪環境条件下での生育を助長する遺伝子の検索を行い、シロイヌナズナの酢酸-乾燥応答に関するデータから、トウモロコシでの関連遺伝子の抽出を実施中である (図 3.2.2.2-1)。

[1]-2 トマトおよびトウモロコシでの環境ストレス逆利用型育成法のシステム構築

節水型栽培システムにおけるバイオスティミュラントを用いたトマトでの生育および環境データ等の収集を開始した。極節水条件下でのトマトでの生育（成長）に対する酢酸バイオスティミュラント剤の一回使用効果を確認。本圃に定植後の湿重量比で生育スピードが3倍以上になることを確認した（図 3.2.2.2.2-1）。



水処理区

酢酸 BS 処理区

図 3.2.2.2.2-1 節水環境施設内でのトマト生産

地上部の生育量比較 左：水処理区、右：酢酸 BS 処理区

酢酸バイオスティミュラントを用いた時のトウモロコシ（スイートコーン）に対する乾燥効果の付与実験を実施した。トウモロコシでは、500 倍希釈した酢酸バイオスティミュラントの効果が付与できることが明らかとなった（図 3.2.2.2.2-2）。また、トウモロコシ（デントコーン）への適用では発達ステージに対する酢酸バイオスティミュラントを用いた時の、成長促進および阻害効果について検証した。その結果、阻害は見られないため、発芽初期からの投与が可能であることが明らかとなった。



図 3.2.2.2.2-2 トウモロコシに対する酢酸 BS の耐性付与効果検証

（左：水のみ、中：500 倍希釈、右：250 倍希釈）

発芽およそ3週間のトウモロコシ苗を用いて酢酸 BS を段階的に投与した後、無給水で3週間放置した時の変化を観察した。酢酸 BS 500 倍希釈で株元に投与した場合に特に強い乾燥耐性が付与できることが明らかとなった。

研究項目[2]：ゲノム編集による高効率糖合成植物の分子デザイン基盤技術開発（東工大）

[2]-1 糖生産ゲノムデザインに利用する高効率ゲノム編集遺伝子改変技術基盤の構築

トマト、レタス、トウモロコシにおける糖超高生産および高蓄積植物の作製のために、遺伝子 X を標的とした高効率ゲノム編集ツール構築およびトマト変異系統の作製を行った。

アクプランタ株式会社より研究項目[1]において示されたトマト、レタス、トウモロコシ糖超高生産に関わる遺伝子（トマト2種、レタス1種、トウモロコシ1種）において、CRISPR-Cas9ベクターに挿入する gRNA を設計し、トマト、レタスについては既に構築済みの双子葉植物用の高効率 CRISPR-Cas9 ベクター、トウモロコシについては新たにトウモロコシでの形質転換および CRISPR-Cas9 の発現を最適化して構築したトウモロコシ用の CRISPR-Cas9 ベクターに導入し、それぞれの遺伝子に対して4種ずつのベクターを構築した。トマト用 CRISPR-Cas9 はアグロバクテリウムを用いた形質転換法によりトマト細胞へ導入した。レタスおよびトウモロコシについては構築したベクターを高崎健大に提供した（図 3.2.2.2.2-3）。

トマト糖超高生産に関わる遺伝子を標的としたゲノム編集ベクターを導入したトマト系統；カルス 13~20 系統ずつおよびシュート 10 系統ずつを作製し、それぞれについて変異解析を実施した。その結果複数の CRISPR-Cas9 導入細胞系統において変異が検出され、それぞれ変異系統（ベクター導入世代(T0)）とし、次世代系統（T1）単離のため育成を継続した。

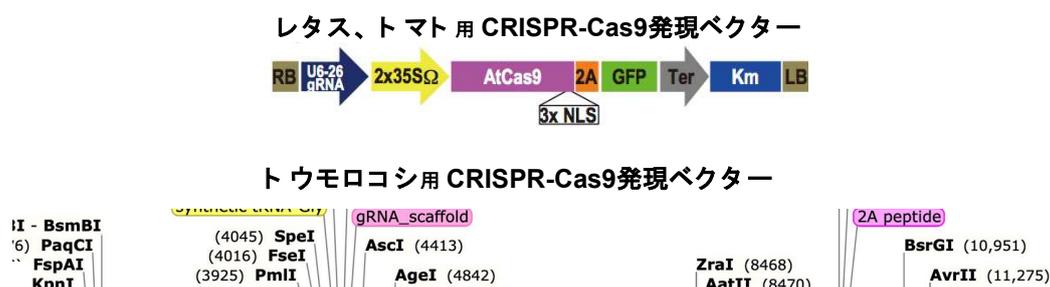


図 3.2.2.2.2-3. 本研究項目で用いる CRISPR-Cas9 ベクター

レタス、トマト用ベクター(Ueta et al. 2017 Sci. Rep. 7, 507)は植物に組み込まれる T-DNA 領域、トウモロコシ用ベクターは、組込み型ベクターではないが線上

[2]-2 糖生産プロセスの高効率化のための植物デザイン技術（ゲノム編集技術）基盤の構築

TiD 発現ベクターに導入する gRNA をそれぞれの植物において選抜・設計し gRNA 選抜用ベクターを構築した（トウモロコシ用 10 種、トマト計 22 種）。LUC SSA assay を用いた gRNA 活性評価法(Osakabe et al. 2020 Comm. Biol., 2021 Nuc. Acid Res.)を用いて、活性の高い gRNA の絞り込みを行い、植物用の TiD 発現ベクターを構築した。

以上から、トマト、レタス、トウモロコシの3種の植物において糖超高生産に関わる遺伝子への変異導入のためのベクター作製、およびトマト変異個体作製について計画通り達成した（達成度 100%）。

研究項目[3]：ゲノム編集作物に最適化した糖高集積糖生産システムの開発（高崎健大 G）

2021 年度の本研究項目では、ゲノム編集装置遺伝子を対象とするレタスに導入し、糖高生産遺伝子「X」が編集された T1 個体を作製すること、アクプランタ社製バイオスティミュラント剤によるレタス生育環境の最適化、に向けて研究開発を進めた。

[3]-1 糖高生産遺伝子「X」編集トウモロコシ・レタスの作製

この研究課題では、ゲノム編集装置遺伝子を対象とするレタスに導入し、糖高生産遺伝子「X」が編集された T1 個体を作製することを目標として研究開発を行った。試験に用いるレタスの品種はチマサンチとなる。いわゆる実用品種であり、実験系統ではないことから形質転換法が確立されていない。そのため、形質転換過程において、再分化条件を決定する特に重要な因子であるサイトカイニン類濃度の検討を行った。これにより再分化条件が最適化され、チマサンチの形質転換が可能となった。この方法を用いて東工大 G の作製したゲノム編集装置遺伝子が格納されたコンストラクト(ゲノム編集ベクター)の導入を行った。ゲノム編集ベクターは独立に 4 種類あり、導入したすべてのベクターについて T0 個体が再生した（表 3.2.2.2-1）。これら T0 個体を鉢上げし、T1 種子を得ている（図 3.2.2.2-4）。鉢上げした個体における導入遺伝子は、PCR により確認した（図 3.2.2.2-5）。

当初の計画では 2022 年度 Q3 より開始予定であったトウモロコシのゲノム編集個体作出に着手した。まず、ゲノム編集の対象となるトウモロコシ品種の選定を行った。選定する基準は、短稈、早生、自殖、育成者権失効の 4 点となり、実験系統である 2 品種を用いることに決定した。加えて、トウモロコシ形質転換体作出に必要なインキュベーターを作製し、生育条件の調整を行った。この課題の目標は「最低 1 系統のゲノム編集コンストラクトが導入された T0 レタスを作製する。」となるため、本年度の達成度は 100%となる。

表 3.2.2.2-1 ゲノム編集コンストラクトを導入したレタス T0 個体

コンストラクト	遺伝子導入外値片数	シュート再生数	鉢上げ個体
6-1	16 x 8	5	1
6-2	16 x 9	7	3
6-3	16 x 9	7	3
6-4	16 x 8	8	1



図 3.2.2.2.2-4 ゲノム編集コンストラクトを導入したレタス
左：とう立ち前のレタス T0 レタス、右：とう立ちした T0 レタス

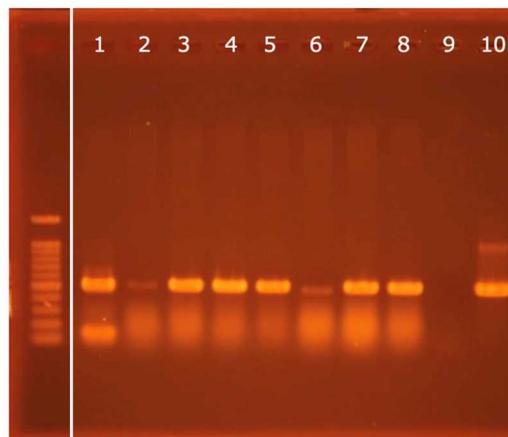


図 3.2.2.2.2-5 レタス T0 植物におけるゲノム編集コンストラクトの確認
1: 6-1-1、2-4: 6-2-1~3、5-7: 6-3-1~3、8: 6-4-1、
9: WT (negative control)、10: plasmid (negative control)

[3]-2 糖高生産遺伝子「X」編集個体に適した栽培・環境制御技術の開発

今年度は非組換えレタスを対象に、バイオスティミュラント剤を付加した条件下における水ストレスに対する応答を調査した。太陽光型植物工場において、水耕栽培ベンチをベースに異なる水位条件で栽培し、レタスに水ストレスを付加できる実験系を構築した。播種後、育苗した小植物体の根をバイオスティミュラント剤に 24 時間浸漬した後に、水耕ベンチに定植し試験を行っ

3.2.2.2.2-7

た。定期的に収穫し、成長量を解析することにより水ストレスの影響、バイオスティミュラント剤付加の影響に関する解析を継続実施中である。

(9) 成果の最終目標の達成可能性

生産環境の最適化と生産回数の増加、およびゲノム編集体の確立進捗状況から、これらの組み合わせにより最終目的の達成は可能と考える。

(10) 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	
2021	1	0	8	2	1	0	1
2022	0	0	0	0	0	0	0
PJ 期間 合計	1	0	8	2	1	0	1

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

本事業に関する知財出願に向けて弁理士事務所と準備を進めている。

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

育種、生産、精製および販売にかかる一連の流れをアクプランタ社が統括して実施するスキームを提案し、これを確立するための取り組みを鋭意進めている。各工程に係る施設および事業会社等との連携を開始しているため、助成フェーズ移行後に速やかにこれらステップ確立、改良の加速化が可能であり、本事業計画立案時と比較して、その実用化・事業化に向けた取組及び見通しは大きく前進している。

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

育種、生産、精製および販売にかかる一連の流れをアクプランタ社が統括して実施するスキームを提案し、これを確立するための取り組みを鋭意進めている。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

実用化に必要な、生産、精製方法と事業化に必須の販売に関するビジネススキームを立案し、最短および効率的な確立が可能な関係企業およびパートナーを開拓していく。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

現在パートナー企業等と連携した事業化の取り組みを進めている。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

本計画に基づく事業化に参加する各パートナー企業等において、それぞれの関与ステップについて技術開発を開始しているため、実用化、事業化への見通しは大きく前進していると考えられる。

(12.5) 波及効果

本事業から創造可能な糖生産技術は、実際に問題となっていたバイオ資源生産の律速解消に大きく期待されている。今後の日本国内を中心としたグルコース生産自給化に向けた大きな成果が期待できることから、その波及効果は非常に大きい。本事業は、植物環境応答に関わる分子生物学、ゲノム編集技術、合成生物学、環境制御学の世界最先端の研究チームの集結により、「純国産技術の向上と、育種から精製まで一貫した糖生産技術の確立が可能であり、糖生産の分野における革新的技術として評価されることが期待できる。

3.2.2.3.1 JE01「生物メタネーションとバイオ燃料製造を可能とする新排水処理プロセスの開発」（大成建設株式会社、埼玉大学、中部大学、かずさDNA研究所）

(1)背景と目的

我々が経済活動を行う上で必ず発生する下水・産業排水は、これまで「水環境を汚染する廃棄物」として、活性汚泥法等の好気処理が行われてきた。これらの既往処理は、排水に含まれる有機物を微生物の反応により分解・除去できるが、曝気等、処理に係る投入エネルギー量が高いだけでなく、処理に伴って発生する大量の余剰汚泥を焼却等により処理する必要がある。これらの課題に対して地方自治体が運営している下水処理事業では、高効率機器への更新や余剰汚泥のエネルギー利用を進めている。しかしながら、余剰汚泥からのエネルギー利用率は、2019年度時点で24%に留まっており（国土交通省）、余剰汚泥を資源とした利活用が進んでいない状況である。また、国内の約2,200か所の下水処理場の多くは標準耐用年数を超過しており、そのうち約2,000か所（91%）が、更新・改築並びに定期的な設備の修繕が必要と報告されている（国土交通省）。一方で今後、国内の人口減少に伴い収入源である下水道使用料が減少する可能性がある。このような潜在的なリスクを回避するためには、下水に含まれる有機物を「資源」と捉え、市場価値の高い製品を生産・供給することで、下水処理分野における脱炭素化と事業継続を図る必要がある。さらに近年では、民間企業に対してESG（Environment（環境）、Social（社会）及びGovernance（ガバナンス））の社会的課題に取り組む姿勢が求められている。そのため、下水処理事業と同様に民間の製造業においても、産業排水を「資源」と捉えた循環経済を創出する取り組みは、重要な経営戦略の一つとなりえる。

当研究グループでは、地方自治体及び企業が抱える下水・産業排水処理に係る課題を解決でき、かつ市場価値の高い物質材料を生産できる技術「生物メタネーションとバイオ燃料製造を可能とする新排水処理プロセス」の確立を目指している。本プロセスは、（a）下水・産業排水に含まれる有機物からメタンを生成し発電するシステムと（排水からのメタン製造システム）、（b）発電により生成したCO₂を原料に藻類バイオ燃料を生産するシステム（藻類バイオ燃料製造システム）で構成されている（図3.2.2.3.1-1）。そこで、本研究事業では、各システムの確立に必要な要素技術を開発するとともに、実験的なシステムの性能評価や実規模を想定したFSより開発プロセスにおける経済性、生産性及び環境適合性について明らかにし、最終的には一連のプロセス（メタン製造と藻類バイオ燃料製造）の有効性を実証することを目的としている。本事業後では、権利化や協業企業の選定など事業化の推進を図るとともに、比較的処理規模が小さい産業排水に対して実機導入を進める。このような実プロジェクトの案件により段階的にスケールアップしていくことで大規模処理である下水処理事業への適用を目指す。

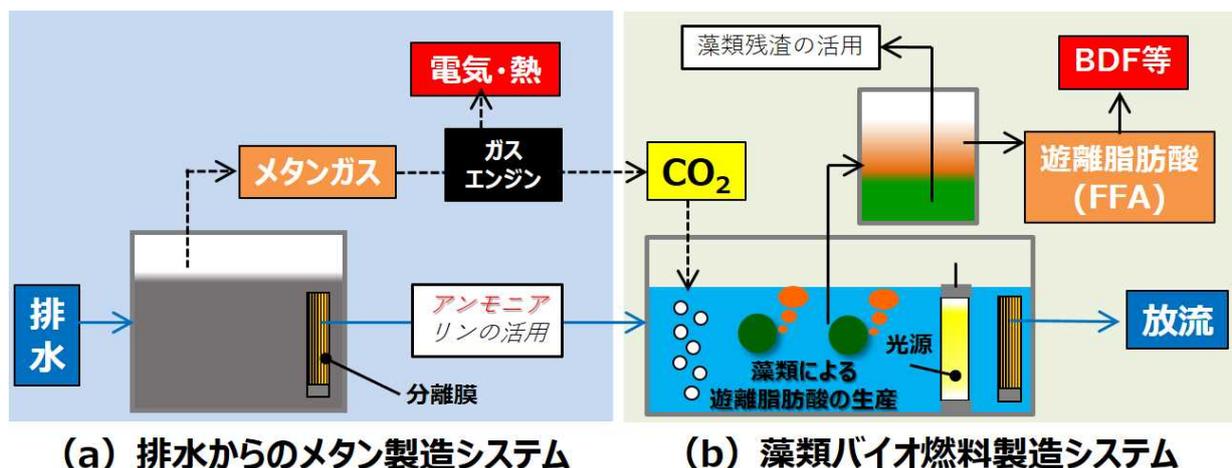


図 3.2.2.3.1-1 メタン及び藻類バイオ燃料製造を可能とする新排水処理プロセス

(2)位置づけ、目標値

本研究事業では、3つの研究項目に基づいて研究開発を実施する。以下、研究項目の位置づけ及び目標（表 3.2.2.3.1-1）について記載する。

研究項目【1】排水からのメタン製造システム

メタン発酵はこれまで家畜糞尿や生ごみ等、高濃度の有機系廃棄物を対象に実用されている。一方、本事業で対象の一つである下水の有機物濃度はこれらの廃棄物よりも極めて低いことから、メタン発酵の適用が困難であった。適用不適と考えられる理由としては、(a)下水には溶存酸素が含まれているためメタン生成菌が増殖し優占化し難いこと、(b)メタン生成菌の極めて遅い増殖速度から施設が大規模となり実用性に乏しいこと、(c)増殖速度の遅さからメタン発酵の立ち上げが困難であることの3点が挙げられる。これらの課題を解決するべく、当研究グループでは、メタン発酵と膜分離を組み合わせたメタン製造システムを提案している（図 3.2.2.3.1-2）。これにより、反応槽内にメタン発酵に寄与する嫌気性微生物を長期間保持できるだけでなく、バイオガスの一部を循環することにより汚泥と排水の接触効率を改善できるため、メタン生成に関与する微生物の迅速な馴養が期待できる。他方、本システムは分離膜を用いているため、膜のろ過性能を長期間、安定的に維持する必要がある。この対策としてメタン発酵槽の後段に分離膜槽を設けることで、分離膜槽における嫌気性汚泥濃度を低く維持することができ、結果として分離膜の目詰まりの抑制が期待される。以上のことから本研究項目では、これまでメタン発酵の対象として不適とされてきた低濃度の排水に対して、本システムの成立性と実用性を示すことを目的とし、①メタン生成反応の促進手法の検討、②実排水への適用性評価と運転条件の最適化及び③ベンチスケールでのメタン製造システムの実証を行う。

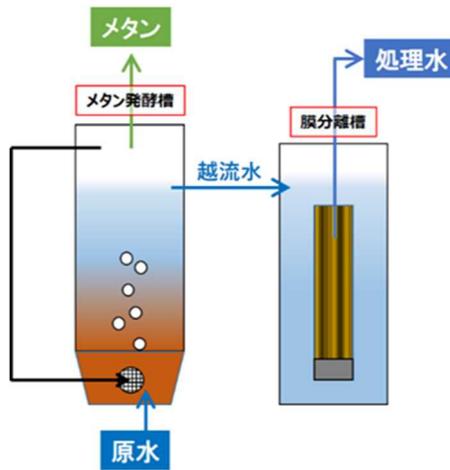


図 3.2.2.3.1-2 当研究グループが提案するメタン製造システム

研究項目【2】藻類バイオ燃料製造システム

自然界に生息する一部の微細藻類は、細胞内にトリアシルグリセロール (TAG) 等の脂質を蓄積することが明らかとなっている。細胞内に蓄積した脂質は、ジェット燃料やバイオディーゼル燃料 (BDF) の原料に用いることができるため、微細藻類を用いたバイオ燃料生産に関する研究が行われている。しかしながら、これらの藻類が生産する燃料物質は細胞内に蓄積されるため、培養後に藻類菌体を回収・乾燥し有機溶媒等で抽出する必要がある (細胞内生産法)。特に、藻類菌体の回収・乾燥及び有機溶媒による抽出工程では、燃料物質の生産に係る投与エネルギーの50%以上を占めているため、実用化の弊害となっている。これに対し、当研究グループが提案する細胞外生産法は、遺伝子改変を施した藻類 (ラン藻) により BDF 等の原料となる遊離脂肪酸 (FFA) を細胞外に生産することができるため (図 3.2.2.3.1-3)、細胞内生産法よりも効率的なバイオ燃料製造が期待できる。しかしながら、実用化を見据えた場合、遺伝子組換え微生物の工業利用は、自然環境への漏洩等の対策やその管理など運用面での課題がある。以上のことから本研究項目では、効率的なバイオ燃料の製造システムの構築を目的として、内在性遺伝子を活用した非組換え型の FFA 生産株を作製し、メタン製造システムと藻類バイオ燃料製造システムの一貫プロセスにおける性能検証 (燃料生産性・水処理性能) を行う。

組換え型FFA生産株 (従来)

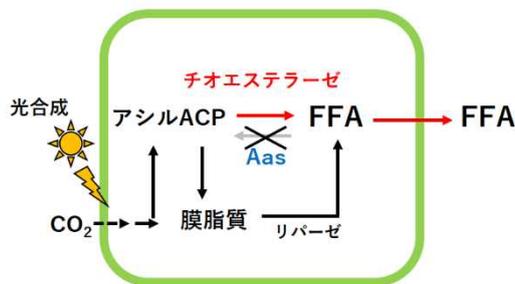


図 3.2.2.3.1-3 遺伝子組換え型 FFA 生産株の FFA 生産機構

研究項目【3】実規模を想定した FS

本事業で開発するプロセスを下水及び食品工場等の産業排水処理に適用した場合の FS を行う。比較対象としては排水処理分野で広く実用されている活性汚泥法である。評価項目は、今後の社会ニーズへの適用性、事業性を判断するために、消費エネルギー、温室効果ガス（GHG）排出量、ランニングコストの3項目とし、メタン製造コスト及び GHG 排出量の試算を行う。

表 3.2.2.3.1-1 各研究項目の目標

研究項目	目標値	
	中間 (2022 年度終了時点)	最終 (2025 年度終了時点)
研究項目【1】 排水からのメタン製造システムの開発	メタン生成量の向上	メタン生成量の向上
研究項目【2】 藻類バイオ燃料の製造システムの開発	内在性遺伝子を活用した非組換え型の FFA 生産株の作製と FFA 生産性の向上	リアクターを用いた非組換え型 FFA 生産株による FFA の連続生産
研究項目【3】 実規模を想定した FS	活性汚泥法と比較して GHG 排出量を大幅に削減できる対策を立案	活性汚泥法と比較して GHG 排出量を大幅に削減
	メタン製造コストの低減	メタン製造コストの低減

(3) 全体計画

事業項目	2021 年度				2022 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
研究項目【1】(大成) 排水からのメタン製造システムの開発 ①メタン生成反応の促進手法の検討 ②実排水への適用性評価と運転条件の最適化		→						
研究項目【2】 (大成・埼玉大・中部大・かずさ D) 細胞外生産法による藻類バイオ燃料の製造システムの開発 ①新規 FFA 生産株の開発 (セルフクローニングによる FFA 生産株の作製) ②藻類培養システムの開発		→						
研究項目【3】(大成) 実規模を想定した FS		→						

(4) 実施体制

図 3.2.2.3.1-4 に本研究項目の実施体制を示す。メタン製造システムの開発は大成建設株式会社が担当し、藻類バイオ燃料の製造システムの開発は、大成建設株式会社に加え埼玉大学、中部大学、かずさ DNA 研究所が担当する。

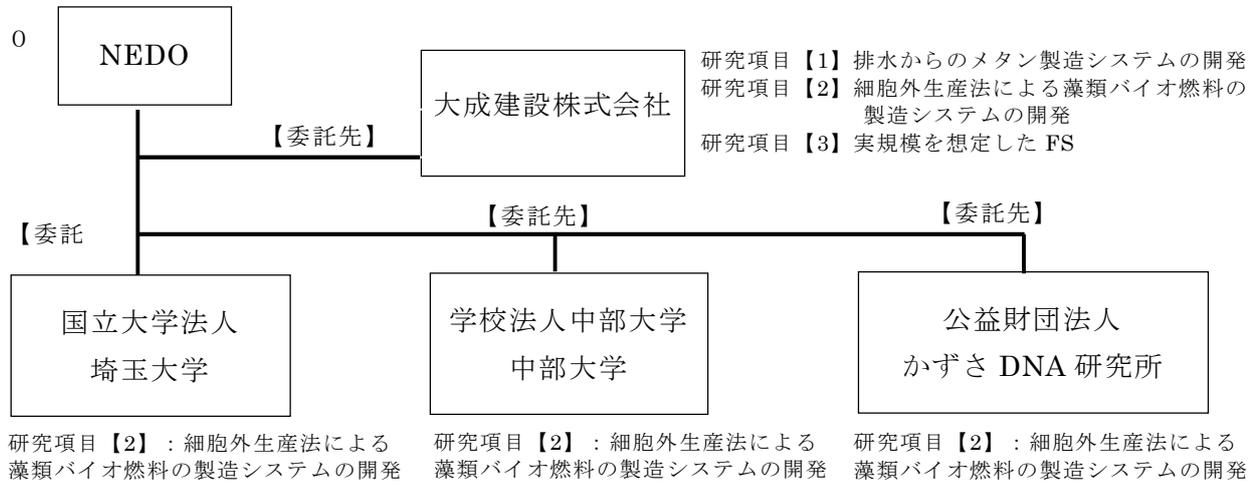


図 3.2.2.3.1-4 研究実施体制

(5) 運営管理

研究進捗会議（オンライン形式の定例会）を毎月実施し、進捗報告と研究方針に関する打合せを行っている。定例会議とは別に特定の課題でのディスカッションが必要な場合は、オンライン会議だけでなく、対面での会議体を実施している。

(6) 実施の効果

従来技術の活性汚泥法に対するメタン製造システムの実施効果を評価するために、10,000 m³/日の下水（人口規模：およそ4万人）に対して①消費エネルギー、②廃棄汚泥量、③創エネルギー量及び④GHG 排出量に関する FS を実施した。その結果、メタン製造システムの①消費エネルギー及び②廃棄汚泥量は、活性汚泥処理と比較して、それぞれ 31%、53%削減可能であることが示された。また、エネルギー収支から GHG 排出量についても試算したところ、メタン製造システムの GHG 排出量は、活性汚泥処理の 50%削減できる可能性が示唆された。以上の結果から、メタン製造システムは従来の活性汚泥処理よりも投与エネルギー量、廃棄物量及び GHG 排出量を抑制できる効果が期待される。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	現状	達成度
①メタン製造システムの開発	メタン生成量の向上	立ち上げ運転完了。運転条件ごとの性能を評価するとともに、メタン生成量の向上を図る。	△ (○) 今年度中達成予定
②藻類バイオ燃料の製造システムの開発	内在性遺伝子を活用した非組換え型の FFA 生産株の作製と FFA 生産性の向上	非組換え型 FFA 生産株の作製を実施中。FFA 増産に寄与する各種機能の強化を図る。	△ (○) 今年度中達成予定
	効率的に FFA を生産できる藻類の培養方式の選定	藻類の培養方式の選定中。	○
③実規模を想定した FS 検討	メタン製造コストの低減	国内の下水及び産業排水の水質調査を完了。下水及び産業排水のそれぞれに対して FS を実施中。	△ (○) 今年度中達成予定
	活性汚泥法と比較して GHG 排出量を大幅に削減できる対策を立案		

◎：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) 研究開発の成果と意義

研究項目【1】排水からのメタン製造システムの開発（担当：大成建設）

① メタン生成反応の促進手法の検討

既往研究における下水からのメタン収率は、化学的酸素要求量（COD）に対するメタンの理論生成量（0.35 L/g-COD）の 50～60%であり、依然としてメタン収率が低いといった課題が挙げられる。メタン収率の低い原因は、嫌気性微生物による有機物分解にて生成する電子が系内に蓄積することにより発酵阻害を生じるためであると考えられる。そこで、本項では、系内の電子の授受を促進させるための導電性物質を添加し、メタン生成反応の促進効果を評価した。その結果、鉍物 A を添加することにより、無添加系のコントロールと比較してメタン生成速度が 15%向上することが確認された（図 3.2.2.3.1-5）。また、鉍物 A の添加量がメタン生成量に及ぼす影響に関する試験も完了した。

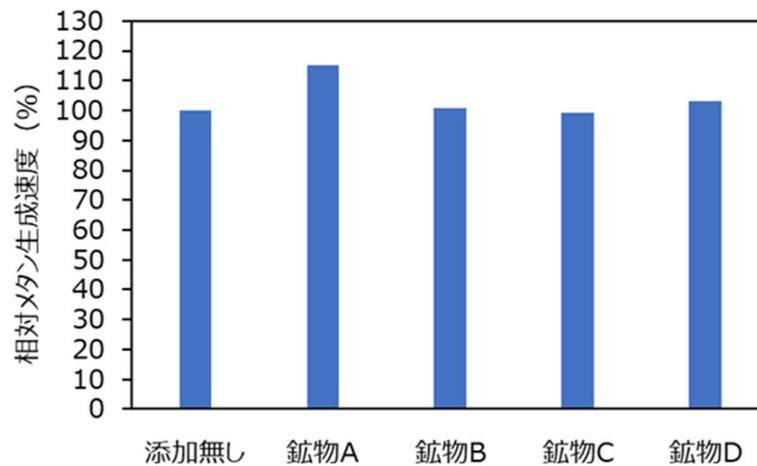


図 3. 2. 2. 3. 1-5 各種導電性物質を添加した試験でのメタン生成速度

②実排水への適用性評価と運転条件の最適化

開発するシステムの実排水への適用性評価と運転条件を最適化することを目的として、三浦市の東部浄化センターに実証装置を設置した（図 3. 2. 2. 3. 1-6）。試験では、活性汚泥処理の余剰汚泥を種菌としてメタン発酵の立ち上げ運転を実施した。その結果、時間の経過とともにメタンの生成量が増加することが確認され、処理水の BOD（生物学的酸素要求量）及び COD も低減する傾向が示された。今後は、水理的滞留時間（HRT）などの運転条件を変化させることによりメタンの生成量や処理水の水質変化を評価することとしている。

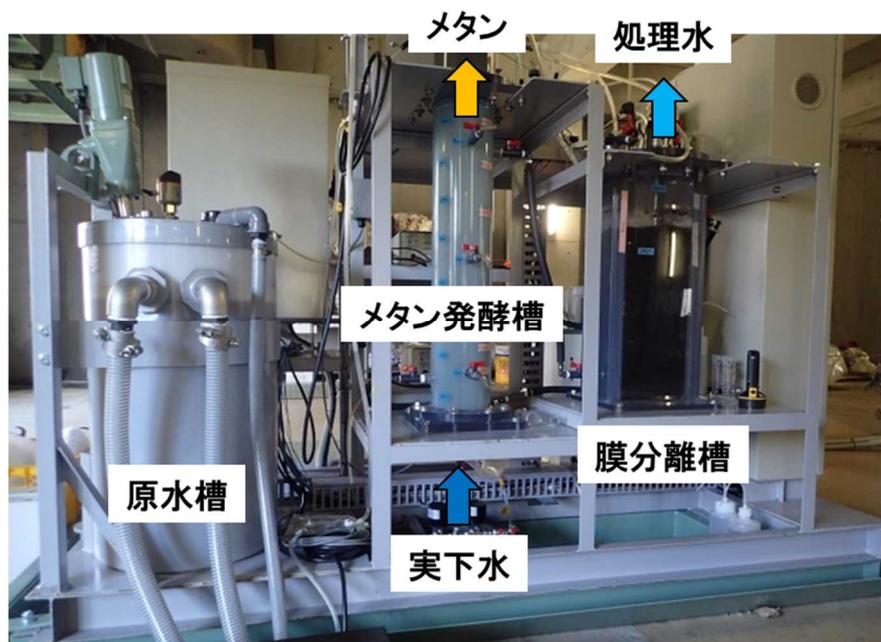


図 3. 2. 2. 3. 1-6 実証試験装置

研究項目【2】細胞外生産法による藻類バイオ燃料の製造システムの開発（担当：大成建設、埼玉大学、中部大学、かずさDNA研究所）

①新規 FFA 生産株の開発（セルフクローニングによる FFA 生産株の作製）

本項では、メタン製造システムの処理水に含まれるアンモニアやリンを利用してバイオ燃料となる遊離脂肪酸（FFA）を生産する藻類（ラン藻）を開発することを目的としている。これまでに、FFA を細胞外で高生産するラン藻が作製されてきたが、外来遺伝子である大腸菌チオエステラーゼ遺伝子が導入された遺伝子組換え型ラン藻であった。しかしながら、実機での遺伝子組換え生物の取り扱いについては課題があることから、本項では、ラン藻の内在性遺伝子を操作によって、外来遺伝子フリーの非組換え型 FFA 生産株の開発を進めている。これまでにセルフクローニングによる FFA 生産株の親株を選定し、その株を用いた FFA 生産株の作製を試みた。

②藻類培養システムの開発

これまでの研究から、細胞外に生産された FFA 濃度が高濃度になると FFA の毒性により藻類が死滅することが明らかとなっている（図 3.2.2.3.1-7）。そのため、安定的に FFA を生産するためには、培養液中の FFA 濃度を低減する必要がある。そこで、本項では、培養液中の FFA の低濃度化手法を検討し複数の低濃度化手法を見出した。さらにこの手法を用いて既開発の遺伝子組換え型 FFA 生産株を培養した結果、FFA による毒性を回避しながら効率的に培養できることが明らかとなった。

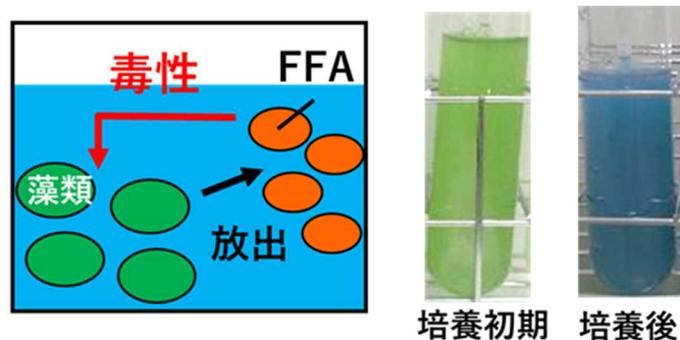


図 3.2.2.3.1-7 FFA の毒性による藻類の死滅

研究項目【3】実規模を想定したFS検討（担当：大成建設）

下水・産業排水の水質調査

本項では、開発プロセスの導入効果を評価することを目的として、従来技術と開発技術における経済性、生産性及び環境適合性についてFSを行う。これまでにFSを行う上で必要となる下水及び産業排水の水質調査を実施した。その結果、下水のBOD、全窒素及び全リンの濃度は、排水基準値前後の数値であることが明らかとなった。一方で産業排水については、下水と比べて全ての水質項目において高い値を示し、特にメタンの原料となるBODについては、およそ9倍高い値であった。以上の結果から下水と産業排水では、水質が異なるため、下水と産業排水それぞれに対してFSを実施中である。

表 3.2.2.3.1-2 下水及び産業排水の水質調査の結果（単位：mg/L）

	BOD	SS (懸濁物質)	全窒素	全リン
下水	194	170	37	5
産業排水	1,701	804	80	14

(9)成果の最終目標の達成可能性

研究開発項目	最終目標	目標に対する課題と対策
①メタン製造システムの開発	ベンチスケールの実証装置にて安定的なメタン生成能及び水処理性能の実証	長期的な処理性能の維持： システムの安定的稼働を可能とする運転条件決定とトラブル時のマニュアル化
②藻類バイオ燃料の製造システムの開発	ラボスケールでの一貫プロセスにおいて、効率的なFFA生産の実証 藻類残渣を用いた複数のバイオ由来製品の作製と評価	FFA生産能を低下させる因子の特定
③実規模を想定したFS検討	メタン製造コストの低減	ランニングコストの抑制とGHG排出量の低減： コスト・GHG排出量において寄与度が高い項目の抽出とそれらを低減できる対策の提案
	GHG排出量を大幅に削減	

(10) 成果の普及

これまで得た知見を踏まえ、査読論文や学会発表を積極的に実施していく。

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	
2021	0	0	0	2	0	0	0
2022	0	0	4	2	0	0	0
PJ 期間 合計	0	0	4	4	0	0	0

※確定している案件の数値

(11) 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
2021	1	0	0
2022	1	0	0
PJ 期間 合計	2	0	0

※確定している案件の数値

(12) 実用化・事業化に向けた取組及び見通し

(12.1) 本プロジェクトにおける実用化・事業化の考え方

本事業では、メタンやバイオ燃料などのバイオ由来製品を製造できる排水処理システムの販売・施工を行う。

(12.2) 実用化・事業化に向けた戦略

展開先としては、下水処理事業を運営する地方公共団体や合弁会社（下水道コンセッション事業の場合）、製造業の民間企業を想定している。

(12.3) 実用化・事業化に向けた具体的取組

開発技術の導入先としては、民間企業の産業排水処理事業と地方自治体が運営する下水処理事業が挙げられる。これらのうち、処理規模が比較的小さい産業排水処理事業に対して、メタン製造システムの導入を進める。

(12.4) 成果の実用化・事業化の見通し

事業化までのスケジュールを以下に示す。

年度	2026	2027	2028	2029	2030
1.事業化推進		実施体制の整備／権利化等			
2.メタン製造システムの実用化		スケールアップ／初号機導入			
3.藻類バイオ燃料システムの実用化		スケールアップ／製品化検討			

(12.5) 波及効果

本事業で提案するシステムは、これまで静脈インフラとして産業活動を支えてきた排水処理の機能を維持しつつ、メタン、バイオ燃料、建設材料などの市場価値の高い物質材料を動脈産業へ供給できる。そのため、本システムの普及により、膨大なコスト・エネルギーを投入する消費型の事業経営から、新たな収入源を見込める生産型の事業経営に転換できるとともに、定期的な雇用や積極的な施設の更新・改築など、長期的な事業継続を目指した戦略的な経営を実行することが可能である。この抜本的な事業運営の改革は、人口減少に伴う下水道使用料の縮小、施設の老朽化、施設管理を担う技術者の減少など下水処理事業が将来直面するリスク（国土交通省）を回避できるものと考えられる。そのため、これまで産業活動を支えてきた排水処理の方式やその経営／事業を見直すことは、我が国の経済を牽引する動脈産業の活性化につながるものと考えられる。他方、国内の下水処理施設（下水道・農業集落排水等・浄化槽）の普及状況は、汚水処理人口普及率として91.7%（2020年3月末の時点）まで進み、水環境の保全のためのインフラ整備が整いつつある。しかしながら、実際に下水処理場で処理される下水量は、当初、計画された下水処理量に達していない施設が多く存在し、また、設備の増設のための敷地を確保していたものの活用されないまま保有している自治体も存在している（本研究グループによる調査）。一方で、既存の下水処理場の多くは、標準耐用年数を超えており、戦略的な施設の更新・改築が必要な状況であることから、将来的な下水処理場の再編成において本プロセスの導入は受け入れやすいものと考えられる。以上のことから、本事業で提案するプロセスは、下水処理の既存施設・敷地を十分に活用した提案が可能であり、脱炭素化及び経済成長の両立した事業運営を実行することで、国内の経済再生に貢献できるものと考えられる。一方で、海外においては、依然として下水道の整備が遅れている地域がある。具体的には、東南アジアやアフリカ諸国が挙げられるが、これらの地域では日本よりも気温が高いことから微生物の反応を利用した本システムの展開先として適しているものと考えている。このような地域に日本発のエネルギー生産型の新排水処理を導入していくことで、その地域の経済活動の活性化だけでなく、脱炭素化への貢献が期待できるものと考えている。

「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」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

パリ協定、SDGs 等において産業界には CO₂ 削減、炭素循環型社会の実現等社会課題の解決と持続的経済成長の両方が求められてきているが、近年の合成生物学等の発展に伴い、世界では様々な産業がバイオ化していく情勢となっている。欧米、中国等では、バイオエコノミーの拡大に向け、国家戦略を策定し加速度的に投資を拡大している。2030年、世界のバイオ市場は約 200 兆円規模に拡大すると予測 (OECD) され、特にものづくり分野での成長が見込まれている中、循環型社会形成に向けた課題解決にバイオが担える役割は大きいと考えられる。バイオによるものづくりは、従来の化学プロセスに比べ、省エネルギー・低コストに物質生産が可能であるとともに、原料を化石資源に依存しないバイオマスからの物質生産が可能であり、炭素循環型社会実現に資するものづくりへの変革が期待できる。バイオマス等を原料としたものづくりへの転換、炭素循環型社会の実現を目指す上で強化すべき取組として、バイオ資源活用促進のための各種技術や従来法にとらわれない次世代生産技術開発等について情報解析技術を活用して確立することが急務と考えられる。

②世界の取り組み状況

米国をはじめとした諸外国ではバイオ分野への投資が加速しており、IT 系企業がバイオとデジタルの融合領域に対する投資を活発化させている。欧州では原料処理から製品 (化合物) 生産までを一貫生産できる設備を持つ微生物発酵生産用パイロットスケールプラント (例: Bioprocess Pilot Facility)、米国でもローレンス・バークレー国立研究所に同様の設備 (Agile Bio Foundry) が整備される等、バイオファウンドリ拠点の構築が進んでいるほか、世界的なアライアンス立ち上げの動きも活発化している (Global Biofoundry Alliance)。

③我が国の状況

2000年代にバイオテクノロジーを活用する戦略で策定されたバイオ戦略における取組を踏まえ、持続可能な新たな社会経済システムの要素として欠かすことができない「バイオエコノミーの実現」に向けた戦略へと転換し、2019年6月に新たなバイオ戦略が策定されている。当該戦略では、2030年に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標に、目指すべき社会像や狙うべき市場領域の中で取組を進めるものである。規制・公共調達等に関しては、バイオ生産品の表示を通じた「見える化」や公共調達制度のバイオ製品への対応などの検討や取組を進める方針が打ち出されている。高機能バイオ素材、バイオプラスチック、生物機能を利用した生産システム等の市場領域についても取組強化が打ち出され、バイオとデジタルの融合を基盤とする環境・技術・人材の整備が求められている。特に、原料から最終製品に至る過程に存在するボトルネック（原料供給やスケールアップのむずかしさ）を技術的に解消する上で、我が国の強みである微生物育種や発酵技術等を活かし、生産プロセスを高度化した次世代生産技術開発を図る必要性が言及されている。

④本事業の狙い

本プロジェクトでは、バイオものづくり産業の基盤として、バイオ資源活用促進のための各種技術や従来法にとらわれない次世代生産技術開発等を実施する。次世代生産技術としてはスケールアップや回収、破碎、分離、精製等まで含め、工業化に向けた生産プロセスに関わる技術の開発と検証を目指す。実生産との橋渡しをより効率的に行うために必要となる規模のバイオ生産プロセス基盤を開発し、実用課題での検証を実施する。さらに、バイオものづくりに必要不可欠な基盤として、バイオ資源の活用を促進するため生物情報・資源の拡充、プロセスに適した原料活用として安定的供給に資する将来的な要素技術、生産プロセスパラメーターと育種を関連づけさせることができる統合解析システム等の開発を行う。

これまで NEDO「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（スマートセルプロジェクト）において、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”を構築するための基盤技術を開発してきた。スマートセルプロジェクトで開発してきた各種技術（情報解析技術を核とした微生物育種技術、新規ゲノム編集技術、代謝系発現制御・環境制御技術等）や他省庁事業での取組を必要に応じて活用／連携することにより、生物機能を活用した産業用物質生産システムの一貫的な検証を実現できるバイオファウンドリ基盤を開発し、バイオ由来製品の社会実装の加速化を目指す。これらの取組の中で、バイオとデジタルの融合を基盤とする検証環境を整

え、バイオものづくりの基盤技術を開発するとともに本分野で先端研究と産業界の橋渡しをできる人材の育成を図っていく。これらの取り組みにより、CO₂削減や炭素循環型社会の実現等社会課題の解決と持続的な経済成長のバランスをとりながら、我が国のバイオエコノミー活性化に向けて貢献をする。

(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、生物機能を活用したものづくりにおいて実生産との橋渡しをより効率的に行うバイオフィアウンドリ基盤を構築し、バイオ由来製品の創出に向けた産業用物質生産システムを確立する。また、新たなバイオ資源の拡充、産業用スマートセル創出に資する統合解析技術、物質生産工程での高精度な制御を可能とする情報解析技術等を確立する。産業用物質生産システムによるバイオ由来製品創出に向けた検証や本プロジェクトで開発した技術の利用により、社会実装に向けた橋渡し検証事例を10件以上創出する。

研究開発項目ごとの目標については、別紙にて定める。

②アウトカム目標

本プロジェクトの成果により、バイオ由来製品の社会実装を加速し、新たな製品・サービスを創出し、7兆円規模のバイオエコノミー市場形成に貢献する。また、バイオによるものづくりを通じて2030年に367万t・CO₂/年のCO₂削減効果に貢献する。

③アウトカム目標達成に向けての取組

バイオ由来製品の社会実装をスムーズに行うため、原料から生産プロセスまでの一貫したライフサイクルアセスメント(LCA)の要素を取り入れて技術的な課題抽出と将来技術の開発を行う。また、スタートアップ時のコスト面の競争力強化のための公共調達の利用など、制度や規制も大きな役割を持つため、研究開発と並行して公共調達制度の見直し等の政策サイドへの働きかけを行う。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、成果発信を積極的に行う。

(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1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や調査研究等を行う。

研究開発項目①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」

研究開発項目②「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」

研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」

研究開発項目①及び②については、CO₂削減や炭素循環型社会の実現等社会課題の解決と持続的経済成長の両方が求められてきている状況において、現状技術ではコスト的に見合わないため民間企業には市場原理に基づく研究開発実施のインセンティブが期待できない領域である。また、バイオプロセスのLCAは標準的な評価手法が確立されていないことから、国が主導して実施する必要がある。これらは、複数の専門分野にまたがる機関の連携が必要であり、企業、アカデミア、研究機関等の産学官が一体となって基盤構築をする必要があるため、委託事業として実施する。

また、環境性評価や経済性評価については、LCA評価手法等を通じて検証を行い、その検証結果を研究開発にフィードバックさせる。プロジェクト参画機関は検証に必要な情報を共有することとする。

なお、研究開発項目③は開発ステージに応じて委託事業と助成事業のフェーズを設ける。フェーズ移行はステージゲート等により行い、将来的な事業化に向けた課題は、企業の積極的な関与により推進されるべき研究開発として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バイオエコノミー推進室の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。

NEDO は、公募により研究開発実施者を選定する。研究開発実施者は、企業や大学等の研究機関等（以下、「団体」という。）のうち、原則として日本国内に研究開発拠点を有するものを対象とし、単独又は複数で研究開発に参加するものとする。ただし、国外の団体の特別の研究開発能力や研究施設等の活用又は国際標準獲得の観点から必要な場合は、当該の研究開発等に限り国外の団体と連携して実施することができるものとする。

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（以下、「PL」という。))を選定し、各実施者はPL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、PL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推進委員会等を組織し、定期的に技術的評価を行い、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。早期実用化が可能と認められた研究開発については、開発フェーズの進展に応じて委託事業から助成事業へのスキーム変更や期間内であっても研究を完了させる等、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。

② 技術分野における動向の把握・分析

プロジェクトで取り組む技術分野について、必要に応じて国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

NEDOが設置する外部有識者で構成する技術推進委員会等で定期的にテーマ評価を行う。研究開発項目③を対象としてステージゲート方式を適用し、研究開発を効率的に推進させる。

3. 研究開発の実施期間

2020年度～2026年度までの7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2022年度と2024年度に行い、事後評価を2027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、前倒しするなど、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研究開発の加

速・縮小・中止等の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。必要に応じて、ユーザーとの連携を促す等、成果の利用・普及に努める。

②研究開発項目間の連携

研究開発実施者は、他の研究開発テーマに裨益する共通基盤技術について、研究開発テーマの垣根を越えてプロジェクト全体として研究成果の最大化を図るよう努めるものとする。特に、研究開発項目①、②は、研究開発段階において連携することが不可欠であることから、必要に応じて秘密保持契約や共同研究契約等の締結や実施計画及び実施体制の見直しを柔軟に行い、密接な連携関係をとること。

③標準化等の取組

得られた研究開発成果は、社会実装の推進を図るため標準化等の取組を必要に応じて実施する。

④知的財産権の帰属、管理等取扱いについての方針

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実用化／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

「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発における知財マネジメント基本方針」を適用する。

⑥データマネジメントに係る運用

「NEDO プロジェクトにおけるデータマネジメント基本方針」を適用する。

(2) 人材育成にかかる運用

本プロジェクトは NEDO 特別講座 (NEDO プロジェクトを核とした人材育成、産学連携等の総合的展開) の一環で人材育成や必要に応じて周辺研究等を行う。

(3) 基本計画の変更

PM は、当該研究開発の進捗状況及びその評価結果、社会・経済的状況、国内外の研究開発動向、政策動向、研究開発費の確保状況等、プロジェクト内外の情勢変化を総合的に勘案し、必要に応じて目標達成に向けた改善策を検討し、達成目標、実施期間、実施体制等、プロジェクト基本計画を見直すなどの対応を行う。

(4) 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) 2020 年 2 月、制定
- (2) 2020 年 9 月、プロジェクトマネージャー交代に伴う改訂
- (3) 2021 年 2 月、別紙 1 研究開発項目②の記載内容変更に伴う改訂
- (4) 2021 年 3 月、別紙 1 研究開発項目②の記載追記に伴う改訂
- (5) 2021 年 4 月、プロジェクトマネージャー交代に伴う改訂
- (6) 2022 年 4 月、その他重要事項への人材育成の運用等記載追記に伴う改訂

(別紙1) 研究開発計画

研究開発項目①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」

1. 研究開発の必要性

バイオものづくりにおいて、近年代謝工学、ゲノム編集等で目的生成物を作るための代謝経路の自在なデザインが可能になりつつあるが、デザインを具現化して産業用スマートセルを構築するには既知の酵素変換・活性、生物宿主では非常に限定されるのが現状である。したがって、バイオ資源（例えば、新たな酵素群・微生物資源・植物等）の拡充は産業用スマートセルの構築の可能性を大きく広げるポテンシャルを持つ。例えば、現在培養可能な微生物は全体の1%以下と言われており、これまで培養困難であった未利用の微生物群はバイオ資源のフロンティアといえる。原料から生産プロセスまでの一貫したライフサイクル思考を取り入れて技術的な課題抽出と将来技術の開発を進めることにより、炭素循環型社会実現に向けたバイオ由来製品の社会実装が加速されると期待できる。

2. 研究開発の具体的な内容

環境中からのメタゲノムや二次代謝関連遺伝子群をデジタル技術との融合による解析を活用しつつ、新たな酵素群・微生物資源・植物等の取得を進め、あわせて関連する技術の開発を行う。例えば、高活性・高安定性・新規活性等の酵素群の拡充、有機溶媒耐性・特殊代謝経路等を持つ宿主候補の拡充、カーボンリサイクルに資する原料を安定的に活用可能とするなど、バイオ資源活用促進のための各種技術等を開発する。

なお、環境性評価や経済性評価についての検証結果を研究開発にフィードバックさせる仕組みをとることとする。

3. 達成目標

【中間目標（2022年度）】

バイオものづくりの社会実装促進に要する酵素、微生物、植物等の新規バイオ資源候補を20件以上提案する。

【中間目標（2024年度）】

バイオものづくりの社会実装促進に要する酵素、微生物、植物等の新規バイオ資源候補を40件以上提案し、その中から20個以上有用なものを選抜し評価する。

【最終目標（2026年度）】

バイオものづくりの社会実装促進に要する酵素、微生物、植物等の新規バイオ資源候補を100件以上提案し、その中から20個以上有用なものを選抜・評価し、ユーザーとなる企業に提供可能な状態とする。

研究開発項目②「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」

1. 研究開発の必要性

バイオ戦略（2019年6月11日策定）において、高機能バイオ素材、バイオプラスチック、生物機能を利用した生産システム等の市場領域についても取組強化が打ち出された。我が国の強みである微生物育種や発酵技術、組換え植物による物質生産の実績等の活用が期待される一方、これらの技術は現場担当者の経験に基づいた匠の技とも言われ、発酵法による製造拠点の海外進出や熟練担当者の高年齢化に伴い、技術の継承自体が製造業では課題として揚げられるようになり、バイオとデジタルの融合を基盤とする環境・技術・人材の整備が求められている。

我が国の強みである微生物育種や発酵技術等に加え、NEDO等のプロジェクトにおいて開発が進められてきた植物／微生物機能を活用した物質生産関連技術、他省庁事業の様々な研究進展を踏まえ、社会実装を進めるためのさらなる取組が重要となる。

特に、原料から最終製品に至る過程に存在するボトルネック（原料供給やスケールアップのむずかしさ）を技術的に解消し、生物機能を活用した生産プロセスの高度化を図り、生物機能を活用した産業用物質生産システムの一貫的な検証を実現できるバイオファウンドリ基盤を構築してバイオ由来製品の社会実装を加速することが必要である。

2. 研究開発の具体的な内容

我が国のこれまで培った発酵生産技術や培養／栽培技術に立脚もしくは従来法にとられない次世代の物質生産技術の開発及び検証を行う。既存の生産プロセス環境や設備等を有効活用しつつ、実生産への橋渡しを可能とするスケールを有し、一気通貫で生産プロセスを検証し評価サンプルを創出できるバイオ生産システム基盤の構築とその周辺技術開発を行う。例えば、情報科学を活用することにより、高精度な制御を可能とするような技術や回収、破碎、分離、精製等を含む生産プロセスに関わる基盤技術を開発する。

生産プロセスから得られる情報等に基づく産業用スマートセル開発の実現を目指し、生産パラメーター情報等をフィードバック可能とする情報解析技術を開発する。バイオファウンドリ基盤では産業用スマートセルを用いたバイオものづくりの検証を行い、LCA評価等も取り入れて技術課題の解決と新たな技術を理解する人材の育成も図る。

微生物機能を活用した物質生産の実用化を促進させるため、発酵槽での培養条件の検討や生産ターゲット物質の試作等に利用可能なバイオファウンドリ拠点を形成し、運用するとともに、バイオファウンドリ拠点を活用したものづくり人材の育成プログラムを整備する。バイオファウンドリ機能の改善は開発技術の適用だけでなくユーザーからのフィードバックを活かすこととし、必要に応じて試行ユーザーの一部利用を含む運用を可能とする。

3. 達成目標

【中間目標（2022年度）】

次世代のバイオ生産システム基盤の基本設計に目途が立ち、評価サンプルとなる生産物が得られる環境であることを1例以上のモデル生産物で確認する。また、生産プロセス情報等に基づく産業用スマートセル開発に向けて、生産と育種を関連づけさせることができる統合解析システムのプロトタイプを開発する。

発酵槽から生産ターゲット物質の分離・精製処理を含む、微生物を用いた物質生産の実用化検証が可能なバイオファウンドリ拠点を形成し、モデル生産物で検証を開始する。

【中間目標（2024年度）】

生産パラメーター情報等をフィードバックして開発する産業用スマートセルを用いて、具体的な生産物事例を設定し、次世代のバイオ生産システム基盤の基本設計が実生産への橋渡しをする上で有効であることを最低1つのターゲットで検証する。生産プロセス情報に基づく産業用スマートセル開発に向けて、生産と育種を関連づけさせることができる統合解析システムの有効性を検証する。

バイオファウンドリ拠点を活用して企業・アカデミア等が実用化を進める生産ターゲット物質について複数例検証を行いながらバイオファウンドリ機能の改善点を明確にするとともに、ものづくり人材の育成プログラムを作成する。

【最終目標（2026年度）】

産業用スマートセルの開発やサンプル評価をするための生産物を得るまでのプロセスについて、開発期間の短縮化、プロセスの省力化等が可能であることを実証する。また、次世代生産技術への育種モデルの変換を目指した拡張性のある統合解析システムを確立する。

企業・アカデミア等が実用化を進めるターゲット物質についての検証事例を増やしてバイオファウンドリ拠点の実効性を示すとともに、ものづくり人材の育成プログラムの運用を開始する。

(※) 産業用スマートセルと表記しているが物質生産システムとして用いるものをセル（細胞）に限定するものではない。

研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」

1. 研究開発の必要性

産業界では地球環境問題への対応を意識した取組を各種実施している中で、炭素循環型社会実現に向けたさらなる解決手段としてバイオへの強い期待がある。しかし、現状技術ではコスト的に見合わないため、民間企業においては市場原理に基づく研究開発や投資が促進されにくい。バイオ由来製品の社会実装をスムーズに行うためには、生産ターゲットのサンプル評価を進めることで開発スピードの高速化・効率化・確実性を向上させ、生物機能活用による物質生産における課題を解決する必要がある。

2. 研究開発の具体的な内容

炭素循環型社会実現に向けて特定の生産ターゲットを設定した上で、目的物質の生産性向上を狙うとともに、量産化を見据えて生産プロセスの最適化を図り、産業用スマートセル等の生物機能を活用した物質生産による生産物のサンプル評価を行う。

なお、研究開発段階に応じて委託又は助成で実施することとし、各フェーズで設定している事業期間以内で研究開発を終了する又はステージゲートによるフェーズ移行を求める。

【委託フェーズ】産業用物質生産システム検証を本格的に行うための事前研究を行う。例えば、高生産性生物開発が未着手の場合でラボ実験による基本株を取得する等の研究開発を想定。研究開発期間は、原則 1～2 年以内。

【助成フェーズ】将来の事業化に向けて必要となる実用化開発を行う。本開発終了後、3 年以内に製品化を目指す事業が対象。研究開発期間は、原則 1～3 年以内。

3. 達成目標

以下の内容を基本としつつ、用いる生物種やターゲット物質等によって目標が大きく異なることから、具体的な定量目標は研究開発テーマ毎に別途実施計画書において定める。

【委託フェーズ】研究開発期間終了時点で、産業用物質生産システム検証を開始できる基本的な株やデータの取得が完了している。

【助成フェーズ】研究開発期間終了時点で、評価サンプルによる生産物評価により、性能、環境合理性、経済性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

	2020		2021		2022		2023		2024		2025		2026		2027	
	中間評価															
①バイオ資源活用促進基盤技術開発 (委託)	新規酵素群・新規微生物資源・新規植物細胞 安価炭素源・窒素源の拡充															
	産業用スマートセル創出技術 生産プロセス・要素技術															
②生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発 (委託)	産業用物質生産システム実証															
	一例	委託フェーズ (最長2年)		S G		助成フェーズ (最長3年)		公募								
③産業用物質生産システム実証 (委託・助成)	事後評価															
	<ul style="list-style-type: none"> ・事業化に向けた取組 ・開発技術の美用化に向けた取組 															

※LCA 評価手法を取り入れた技術課題の解決や新たな技術を理解する人材育成も行う。本事業で形成するバイオファウンドリ拠点では、必要に応じて試行ユーザーの一部利用を含む運用を可能とする

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	カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発事業	
担当課室	商務・サービスグループ 生物化学産業課	
事業期間	令和2年度～令和8年度（7年間）	
概算要求額	令和2年度 2,000（百万円）	
会計区分	エネルギー対策特別会計	
実施形態	国（委託・補助）→ NEDO → 事業者	
PJ / 制度	研究開発課題（プロジェクト）	
事業目的	本事業では、協調領域として活用可能なスケールアップ技術の確立などを通じてバイオファウンドリ技術基盤整備、新規バイオ資源（高機能酵素群、新規微生物資源等）の拡充を行い、バイオによる炭素循環型生産プロセスを構築、カーボンリサイクル社会をバイオエコノミーの観点から実現していく。	
事業概要 (7ヶパティ)	生物機能を利用してバイオマス等から化学品やバイオ燃料等を生産するにあたって、実験室規模から商用規模へのスケールアップの課題解決やバイオ資源の拡充など、カーボンリサイクルを加速するためのバイオ生産技術開発を行う。 ①バイオ資源活用促進基盤技術開発 ②生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発	
	アウトプット指標 研究開発に係る活動の成果物。目的達成に向けた活動の水準。	アウトプット目標
(指標1) パイロットスケールでの生産検討件数		(令和4年度(中間評価時)) 1件
(アウトプットの受け手) 研究実施者、ベンチャー企業、発酵メーカー等		(令和8年度(終了時評価時)) 3件(累計)
(指標2) 新規バイオ資源候補の取得数		(令和4年度(中間評価時)) 1件
(アウトプットの受け手) 研究実施者、ベンチャー企業、発酵メーカー等		(令和8年度(終了時評価時)) 5件(累計)
	アウトカム指標 研究開発に係る活動自体やそのアウトプットによって、その受け手に、研究開発を実施または推進する主体が意図する範囲でもたらされる効果・効用。	アウトカム目標
(指標1) CO ₂ 削減効果		(令和12年度) 367万 t-CO ₂ /年
(指標2) バイオ由来製品の社会実装数		(令和12年度) 3件以上
外部有識者（産構審評価WG又はNEDO研究評価委員会）の所見【技術評価】		
<ul style="list-style-type: none"> バイオ資源を活用したものづくり産業の育成は、我が国において必要な課題であり、産業基盤となるバイオファウンドリを構築することは、国際競争力向上の面からも重要であるため、本プロジェクト推進の意義は大きい。ただし、バイオファウンドリを活用した産業創出のためには、具体的な出口戦略を描き、プロジェクト当初から想定ユーザーを巻き込んだ体制作りを行うことが必要である。また、アウトカム目標についてはCO₂排出削減だけでなく、雇用などの産業創出に係る指標設定の検討も期待したい。さらに、バイオ×デジタルを実現する上で、データベースの構築及び活用が非常に重要であるため、それらを本プロジェクトのアウトプット目標の一つとして取り組み、構築したデータベースが大きな財産となることを期待する。〔第59回NEDO研究評価委員会〕 		
上記所見を踏まえた対処方針		

- 本事業の実施にあたっては、バイオ戦略に加え、公募プロセスや有識者のヒアリング等を通じて、事業の位置付け、出口戦略を更に明確化していく。
- 技術革新に資するため想定ユーザーのニーズについて情報を充分得た上での確な基本計画を策定し、具体的なアウトプット、アウトカムの創出を目指す。カーボンリサイクル実現のためには、バイオエコノミーの観点からのアウトカムも重要な指標である。実際の実施体制を鑑みつつ、波及効果を出したい市場規模など産業創出の指標になりうる目標を検討する。
- データベースの取り扱いに関しては、研究開発の実施体制が公募により確定した段階で適切に設定していく。どのようなデータベースを作り・どう活用するような仕組みとするのか、ユーザー・実施者等の意見も考慮しつつ検討する。

プロジェクト名：カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発

研究開発の目的

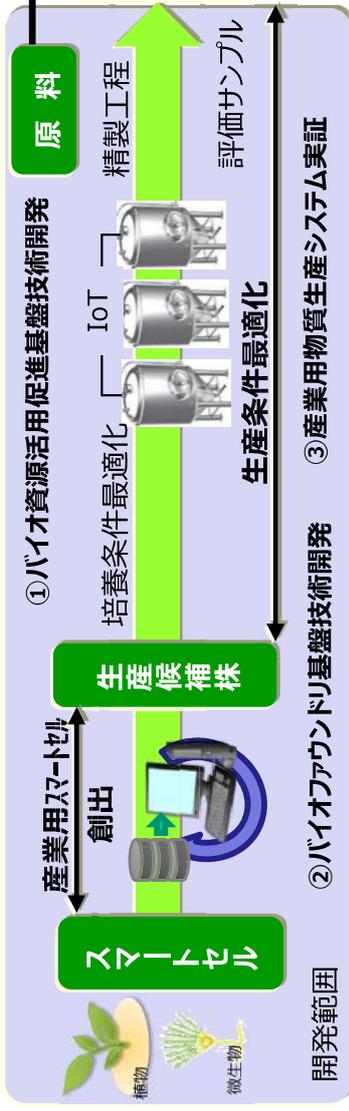
バイオによるものづくりは、従来の化学プロセスに比べ、省エネルギー・低コストに物質生産が可能であるとともに、原料を化石資源に依存しないバイオマスからの物質生産が可能であり、炭素循環型社会実現に資するものづくりへの変革が期待できる。バイオマス等を原料としたものづくりへの転換、炭素循環型社会の実現を目指す上で強化すべき取組として、バイオ資源活用促進のための各種技術や従来法にとらわれない次世代生産技術の開発等について情報解析技術を活用して確立することが急務と考えられる。

本プロジェクトでは、バイオものづくり産業の基盤として、バイオ資源活用促進のための各種技術や従来法にとらわれない次世代生産技術の開発を実施する。次世代生産技術としてはスケールアップや後工程の回収・破碎、分離、精製等まで含め、工業化に向けた生産プロセスに関わる技術の開発と検証を目指す。

プロジェクトの規模

- ・事業費総額 150億円（予定）
- ・NEDO予算総額 138億円（予定）
- ・実施期間 2020～2026年度（7年間）

成果適用のイメージ



研究開発の内容

研究開発項目①「バイオ資源活用促進基盤技術開発」

環境中からのメタゲノムや二次代謝関連遺伝子群をデジタル技術との融合による解析を活用しつつ、新たな酵素群・微生物資源・植物等の取得を進め、あわせて関連する技術の開発を行う。例えば、高活性・高安定性・新規活性等の酵素群の拡充、有機溶媒耐性・特殊代謝経路等を持つ宿主候補の拡充、カーボンリサイクルに資する原料を安定的に活用可能とするなど、バイオ資源活用促進のための各種技術等を開発する。なお、環境性評価や経済性評価について検証結果を研究開発にフィードバックさせる仕組みをとる。

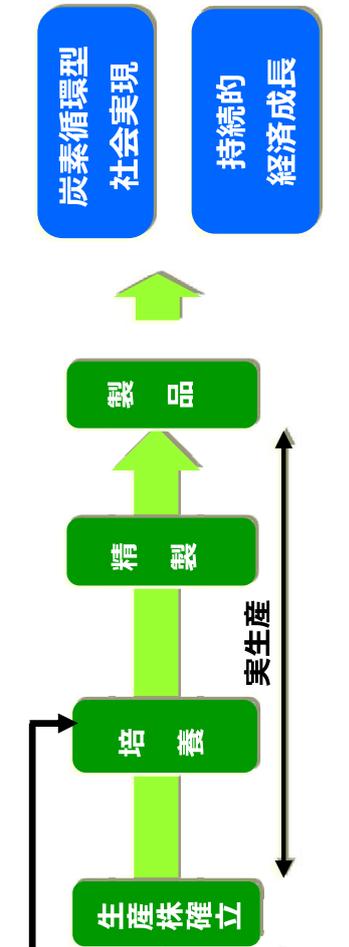
研究開発項目②「生産プロセスのバイオファウンドリ基盤技術開発」

我が国のこれまで培った発酵生産技術や培養／栽培技術に立脚もしくは従来法にとらわれない次世代の物質生産技術の開発及び検証を行う。既存の設備等も活用しつつ、実生産への橋渡しを可能とするスケールを有し、一気通貫で生産プロセスを検証し評価サンプルを創出できるバイオ生産システム基盤の構築とその周辺技術開発を行う。さらに、生産プロセスから得られる情報等に基づく産業用スマートセル開発の実現を目指し、生産パラメータ情報等をフィードバック可能とする情報解析技術を開発する。LCA評価手法も取り入れて技術課題の解決と新たな技術を理解する人材の育成も図る。

研究開発項目③「産業用物質生産システム実証」

炭素循環型社会の実現に向けて特定の実用ターゲットを設定した上で、目的物質の生産性向上を狙うとともに、量産化を見据えて生産プロセスの最適化を図り、産業用スマートセル等の生物機能を活用した物質生産による生産物のサンプル評価を行う。なお、研究開発段階に応じて委託又は助成で実施することとし、各フェーズで設定した事業期間内で研究開発を終了する、又はステージゲートによるフェーズ移行を行う。

◆バイオ資源の拡充



「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発基本計画（案）」に対する
パブリックコメント募集の結果について

2020年2月27日
NEDO
材料・ナノテクノロジー部

NEDO POSTI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。
貴重なご意見をいただき、ありがとうございます。

1. パブリックコメント募集期間
2020年1月15日～2020年1月29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
<p>[意見 1] ・高濃度のグルコースを生成する海藻：ジユズモ (Chaetomorpha) が発見されており、欧米では海藻がバイオマス原料として注目されている。海の中で海藻などの生物が吸収する二酸化炭素を「ブルーカーボン」と呼び、ブルーカーボンを増やしていくことが温暖化対策の有効な選択肢になると考えられる。ジユズモ等は高価なセルラーゼを多用すればグルコースまで糖化できるが、多糖類組成が不明でその糖化方法は未開発である。グルコースまで糖化できればエタノールも生分解性プラスチックも製造できると思われ、これらも経済性などさらに高める必要があるか。海藻を原料としたエタノール・生分解性プラスチックの製造システムの開発は重要ではないか。</p>	<p>[考え方と対応 1] ・ブルーカーボンという観点で、海藻を活用することによる炭素循環及び有用物質生産について、今後実現が期待される選択肢の一つであると考えます。ご意見を参考に研究開発動向をみながら、NEDO 全体での取り組みを検討して参ります。</p>	<p>[反映の有無と反映内容1] 特になし。</p>
<p>[意見 2] ・カーボンリサイクルは単なる再利用可能な製品の再利用にとどまらず、生活・産業の下流に位置する廃棄物から無限の持続可能な太陽光エネルギーを用いて産業の最上流である燃料・原材料として再生する新規システムの構築を行うことで、化石燃料社会から再生エネルギー利用社会の構築を目指さなければならぬのではないか。</p>	<p>[考え方と対応 2] ・再生エネルギー利用を含めた持続可能な社会システムに向けてNEDO 全体での取り組みを進めて参ります。</p>	<p>[反映の有無と反映内容2] 特になし。</p>

<p>[意見 3]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・バイオによるものづくりは、これまでも実施例に事欠かないが、大学等アカデミアでの研究数に比べ産業利用が少ない例が少なくないことは認めざるを得ない。アカデミアに実用化のための製造コスト計算の知識と概念が弱いことが考えられるが、早期の実用化を目指したものは、早い段階から企業との連携が必要。プロジェクト成果が確実に社会実装されるためには、論文執筆を主眼とする大学研究者ではなく、実際の現場での利用を目指して取り組んでいる実学に取り組んでいる研究者、企業等でプロジェクトが実施されるべき。 	<p>[考え方と対応 3]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・産学官が一体となって取り組む必要があるとの認識のもと、特に成果の社会実装に向けて企業との連携を重視して研究開発を推進できる体制構築を進めて参ります。 	<p>[反映の有無と反映内容3]</p> <p>特になし。</p>
<p>[意見 4] (3件)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・炭素循環型社会実現・持続的経済成長の為であり、当分野における我が国の技術力革新の意味でも本プロジェクトは非常に重要な取り組み。 ・スマートセル等の細胞株構築に多くの予算が投じられている状況であるが、それらの株を最適な条件で培養し効率的に生産する培養工学に関する研究投資が限られており、大学での基礎研究もままならない状況にある。いまだプラットフォームホックスも多量に生物物を制御し、最大物質生産を目指す生産技術開発やスケールアップ検討などのスマート化などバイオ産業化に必要な生産技術に関する要素技術の研究開発にももっと目を向けるべき。 ・抗体医薬、遺伝子治療、再生医療、などが普及していく中、「細胞を育てる技術」は数十年も大きな変化がなく、現状のニーズと合致していない。また、細胞を扱える作業者は、引く手数多の状態にあるが、作業の効率化が進まない一方で、作業者の人数やレベルは低下傾向にある。さらに、作業の効率化や作業教育は、統一化されておらず、個々の企業内で独自に行われているのが現状である。この様な一見地味な活動は、先端的な研究ではないが、日本が力を入れるべき「細胞ビジネス」の根拠を支えるものであり、一朝一夕に構築できるものではないため、今から取り組みなくてはならないプロジェクトと考える。「箱モノ」に終わらない様、永続的な運営を目指している点も評価できる。 	<p>[考え方と対応 4]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・重要なプロジェクトであるとのご期待に応えられるよう、プロジェクトを積極的に進めて参ります。 	<p>[反映の有無と反映内容4]</p> <p>特になし。</p>
<p>[意見 5] (2件)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・日本は伝統的に優れた発酵技術に定評があり、さらに創意工夫を凝らすのは日本人の得意とするところ。持続的な社会の実現のために「何を作るのか」はもちろん重要な検討項目であるが、「いかに作るか」も必要不可欠であり、製造技術を習得した人材の育成や知識の伝承は、将来の国内産業を支えるうえで大変重要である。今一度、培養工学の教育を強化し、培養・精製の装置を見たことのない若手研究者のために、実際の装置を見る、触れる機会を与え、且つ培養工学に関する知識を学べる環境は必要。 ・バイオものづくり産業において重要な要素の一つが人材であり、次世代の生産技術を進めるためには、バックグラウンドを持った技術者育成や教育も重要。若手の培養技術者、アカデミア（教育者側）が数多く育つ体制で取り組んでほしい。基盤となる技術者育成は学会等の組織を巻き込んだ活動の展開を期待する。プロジェクト終了後、永続的に維持・管理・活用される体制がとれる機関で実施してほしい。 	<p>[考え方と対応 5]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・技術・ノウハウの伝承と人材育成について重要な課題であるとの認識のもと、プロジェクトを積極的に進めて参ります。 	<p>[反映の有無と反映内容5]</p> <p>特になし。</p>
<p>[意見 6]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・学会は産学官が共存する場であり、交流を通して立場の異なる意見・情報の交換が可能である。中核となる企業や周辺分野の企業が多く参加しており、産業界からの意見収集が可能であることから、学会と連携しながら教育活動の基盤づくりを行うてはどうか。一大学や一団体のためではなく、学会などとも連携するなどして成果を広く共有できる公益的な体制でプロジェクトを推進していただきたい。 	<p>[考え方と対応 6]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・産業界ニーズの把握、人材育成、成果の共有等について、関連学会との連携による活性化が図られるよう検討を進めて参ります。 	<p>[反映の有無と反映内容6]</p> <p>特になし。</p>

以上