

3.1 研究開発成果について

<ものづくりバイオ(バイオプロセス)の課題>

- ・(微生物の)反応速度が遅く、化学プロセスに対抗できない
- ・コモディティケミカル(汎用化学品)領域への拡張

<欧米技術レベル・開発動向>

- ・最小遺伝子細胞合成の発想が出現
- ・酵素反応過程のコンピュータシミュレーションは我が国と同レベル
- ・DOE(米):バイオファイナリー技術開発を推進中だが、化学品開発はエタノール、1,3-プロパンジオール、L-乳酸止まり
- ・セルラーゼ組合せ効果の発見(活性4倍にUP)
- ・欧州バイオ産業協会を中心としたwhite Biotechnology構想が展開中

高性能宿主細胞創製技術の開発

(精密発現制御技術の確立)

- ・ゲノムのデファイン化・リファイン化・インテリジェント化
- ・遺伝子発現制御、細胞ユーティリティ機能増強

遺伝子多重削除によるゲノムのシンプル化及び負の制御ネットワーク削除という発想は本プロジェクトのみ

基礎技術開発

微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

(反応場制御技術の確立)

- ・非水系反応場/複合酵素系機能発現制御
- ・酵素反応シミュレーション
- ・非天然物質合成遺伝子クラスター改変

これまで困難であった非水系酸化反応の主体であるP450複合酵素系の改良にコンピュータシミュレーションを導入するのは本プロジェクトのみのchallengingな試み

バイオリファイナリー技術の開発

(環境調和型バイオマス糖化技術、高速物質生産技術の確立)

- ・超高速物質生産技術—増殖非依存型反応—の開発
- ・超高機能酵素触媒—セルロソーム—による糖化技術開発

増殖非依存型反応の反応速度は従来法の10倍超。セルロソームによる糖化技術開発は世界初(個別セルラーゼ混合物の数十倍の活性あり)
化学プロセスを凌駕する世界最高の高生産性を2種化合物で既実証済み

化学反応を凌駕する物質生産バイオプロセスの実現

=ものづくりバイオのパラダイムシフト=

出口・波及効果等

有用化学物質生産

古紙処理への応用

新規雇用促進

地球環境保全・循環型社会の構築に貢献

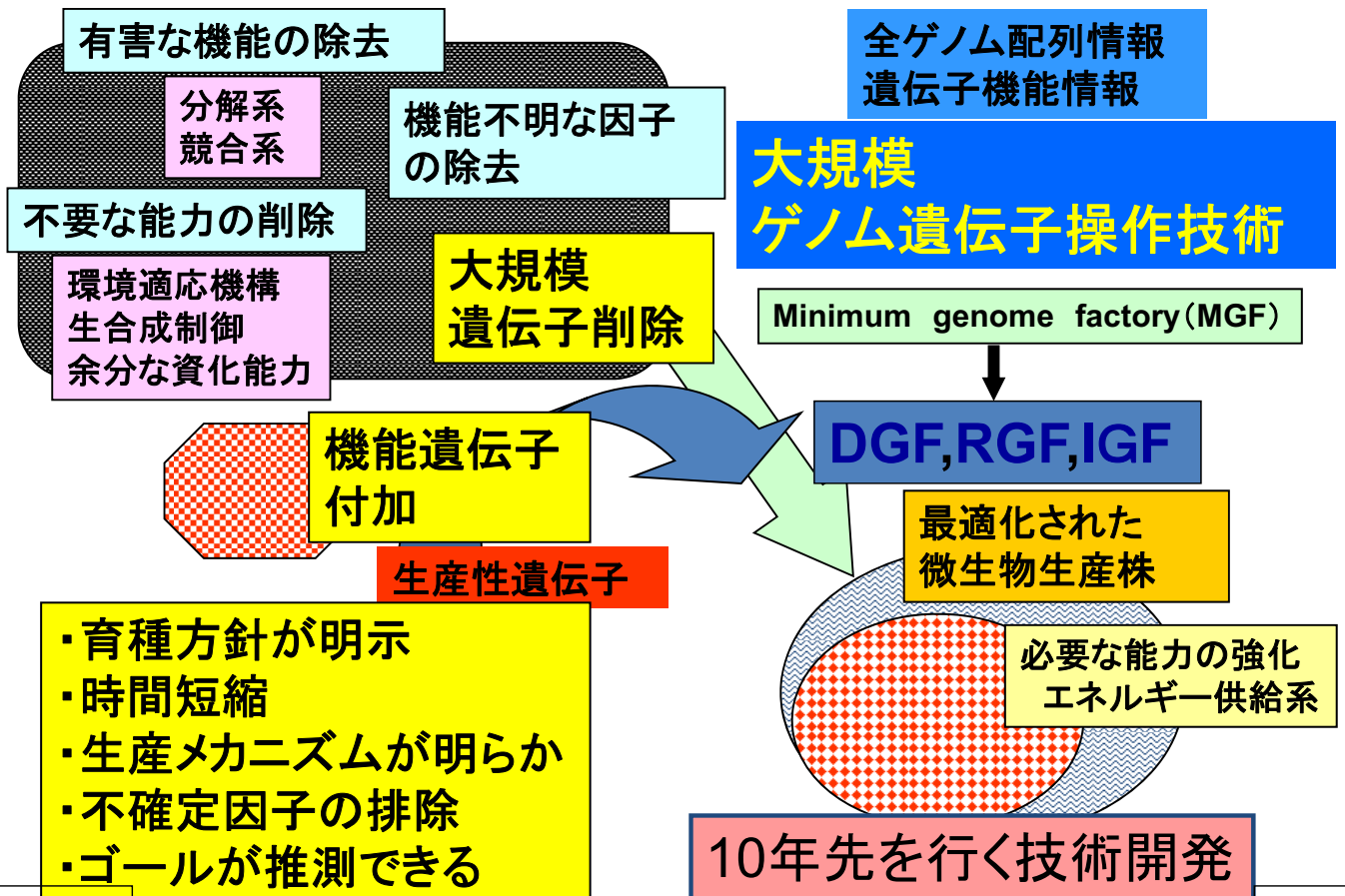
3.2 研究開発項目の目標と達成状況

研究開発項目	目標	成果	達成度
高性能宿主細胞創製技術	微生物細胞への特異的遺伝子発現制御機能付与及び補酵素供給等のユーティリティ機能増強によって、プロジェクト開始時における 世界最高値の2倍以上 の生産性を達成する。	世界最高値の2倍以上 の生産性を達成 アルギニン生産3.9倍 セルラーゼ生産2.5倍 ヒト成長ホルモン(hGH) 2.6倍	達成
微生物反応の多様化・高機能化技術	バイオプロセス生産 既知物質についてはSTY1g/L/h以上、 未知物質についてはSTY0.1g/L/h以上、 医薬品等の高付加価値品については (実用化に十分なSTYの数倍以上)生産を行うことにより、 バイオプロセスの実用化適用範囲を拡大 する。	以下の物質に関して 目標を達成 (R)-マンデル酸(RMA) 8.8g/L/h (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸 2.1g/L/h ビタミンD 従来STYの3倍 非天然L体アミノ酸類 100g/L/h 非天然抗生物質 7.3mg/L/h	達成
バイオリファイナリー技術	草本系ソフトバイオマスについて、 原料・濃度10%にて1日で90%の糖化 を行える技術を開発する。 糖から6種の 基幹物質をSTY 10 g/L/h以上で継続的に生産 することのできる技術を開発する。 実用的に利用可能なバイオマスを原料として高効率で糖化し、各種化成品等生産のための基幹物質を、生成した糖から高効率で生産するバイオプロセス体系を開発・構築する。	酵素再利用法により、リグニン含有古紙を 糖化率80%で400時間超の連続糖化を達成 。 STY10g/L/hを以下の物質で達成 D-乳酸 10g/L/h以上 L-アラニン 10.3g/L/h キシリトール 10g/L/h以上 パリン 10g/L/h以上	達成

3.3プロジェクト開発技術の海外優位性

研究開発項目	世界の技術レベル・開発動向	本プロジェクトの優位性
高性能宿主細胞創製技術	①合成ゲノムによる宿主細胞創製の研究が行われている。 ②欧州において枯草菌のシステムバイオロジープロジェクト「BaSysBio」の研究が動いている。 ③プロジェクト開始時は、ヒト成長ホルモン、ヒト血清トランスフェリンの生産性は同レベル	①遺伝子の多重削除によるゲノムシンプル化と特異的遺伝子発現制御機能付与やユーティリティ機能向上で菌株全体の能力を高めることを目指した取り組みは 本プロジェクト独自 である。 ②彼らは本プロジェクトの成果を見て軌道修正など行っている。 我々がトップランナー ③現在では、分裂酵母による 独自の生産システム で優位な生産性を保ち、 世界最高値に匹敵
微生物反応の多様化・高機能化技術	①有機溶媒耐性微生物を用いた バイオ変換プロセス の基礎的研究が欧米、インド、中国などで行われている。 ②酸素添加酵素を機能改変するアプローチはあるが、本プロジェクトのように電子伝達系を含めた マルチコンポーネント系の反応場 を定義し、最適化を実施する研究はない。 ③酵素反応過程の コンピュータシミュレーション は我が国と同レベル ④ 非天然型抗生物質の化学プロセス による生産は、多工程で収率が低く、製造コストが高い。	①非水系反応場で機能が発現する生体触媒を構築しバイオプロセスを開発するという 概念は新しく 、様々な難水溶性化合物の物質変換に応用可能となる有機溶媒耐性菌を見出している。 ②微生物変換法によるビタミンD水酸化体製造は 専有技術 であり、本酵素遺伝子ライブラリーや迅速スクリーニング系で 独自の技術 を有している。 ③これまで困難であった非水系での酸化反応の主体であるP450複合酵素系の改良にコンピュータシミュレーションを導入するのは 本プロジェクト独自 ④放線菌による非天然型二次代謝産物の 発酵生産に成功 し、律速となっている生合成酵素の基質特異性改良技術開発では 世界をリード
バイオリファイナリー技術	①米国DOEがバイオリファイナリー技術開発を推進中、開発化学品はエタノール、1,3-プロパンジオール、乳酸など DOE資金で、セルロース系バイオ燃料製造のためのスーパーセルラーゼを開発 ② 膜利用発酵リアクター によるD-乳酸発酵での好成績は報告されていない。	①超高機能酵素触媒「人工セルロソーム」による糖化技術の開発は 世界初で、我が国独自技術 増殖非依存型バイオプロセスは、我が国の至宝コリネ細菌の特有の代謝制御技術を利用した 独自技術 ②膜利用発酵リアクターによるD-乳酸発酵で、発酵継続時間、生産速度、光学純度の全ての面で 世界最高レベル の成績を達成

1. 高性能宿主細胞創製技術の開発



微生物を活用した高度製造基盤技術開発プロジェクト

1. 高性能宿主細胞創製技術の開発

協和発酵：大腸菌 Designed Genome Factory

花王：枯草菌 Refined Genome Factory

旭硝子：分裂酵母 Intelligent Genome Factory

製品評価技術基盤機構(NITE)：
発現タンパク質解析(網羅的プロテオーム解析)

1. 高性能宿主細胞創製技術の開発

共同実施先と研究課題

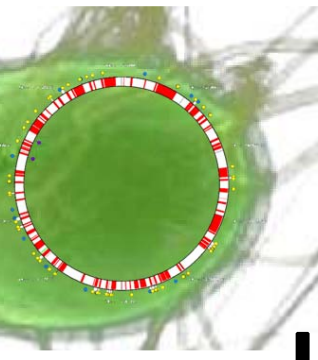
- ・国立遺伝学研究所 仁木 宏典 教授 「大腸菌機能未知遺伝子の機能解析」
- ・奈良先端科学技術大学院大学 小笠原 直毅 教授
「大腸菌染色体加工株のトランスクリプトーム解析」
「大腸菌発現制御系コレクション」
- ・奈良先端科学技術大学院大学 小笠原 直毅 教授
「枯草菌における特異的遺伝子発現制御技術」
- ・筑波大学大学院 中村 幸治 教授 「枯草菌細胞の異種タンパク質生産機能」
- ・信州大学 関口 順一 教授 「枯草菌細胞ユーティリティ機能増強技術」
- ・九州大学(前 香川大学) 竹川 薫 教授
「分裂酵母の細胞ユーティリティ機能増強技術」

高性能宿主細胞創製 大腸菌 Designed Genome Factory

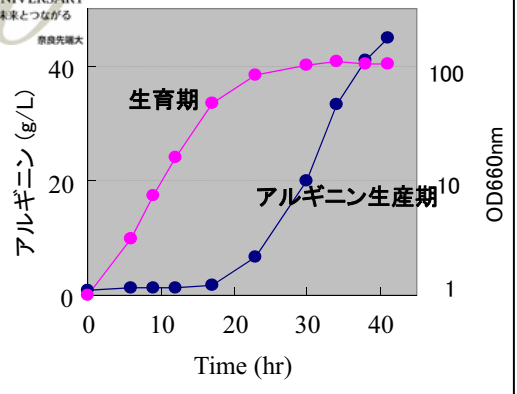
KYOWA KIRIN

染色体縮小化株作製

- 野生株染色体を35%削除
- 機能未知遺伝子の3.1%は削除不能 ⇒ 機能解明へ
- ATP供給能力が大幅に向上

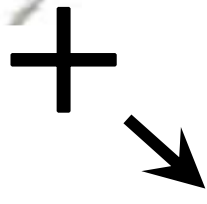
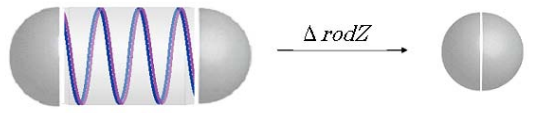


生育連動型プロモーター
アルギニン 3.29 g/L/hを達成!



機能未知遺伝子機能解析

- yfgA=rodZ* 桿菌構造の形成に関与
- yhhK=panZ* パントテン酸合成系活性化因子

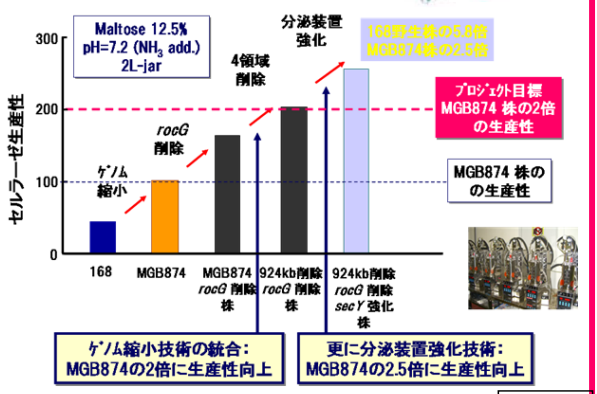
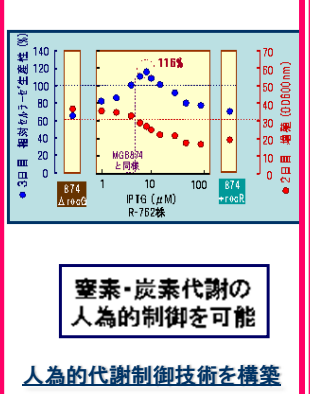
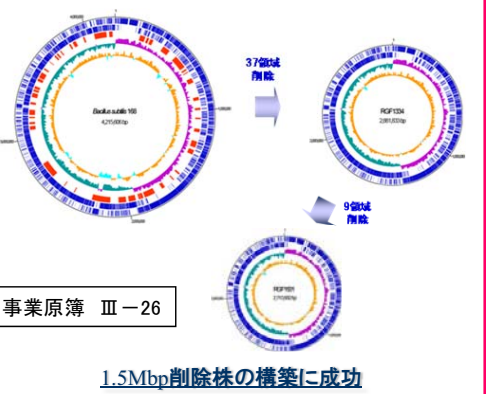
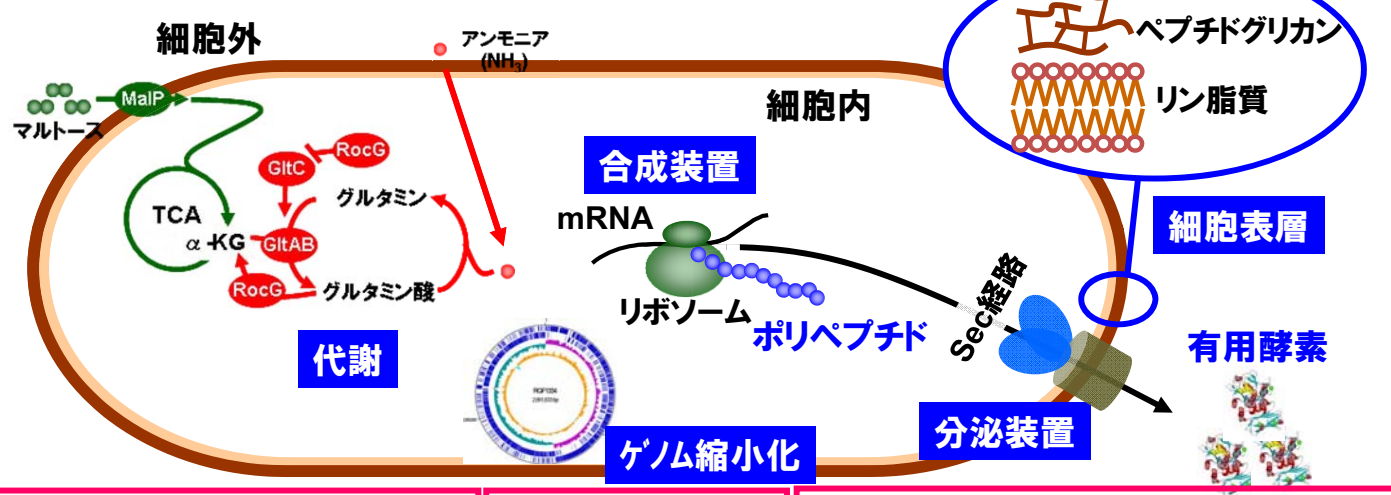


- 染色体縮小化株で生産系遺伝子を発現させ、目的化合物に応じてチューニングすることで、効率的な物質生産系を構築。
- 実用化・事業化に向け子会社で検討継続。積極的なライセンスアウトや共同研究により更なるブラッシュアップを予定。

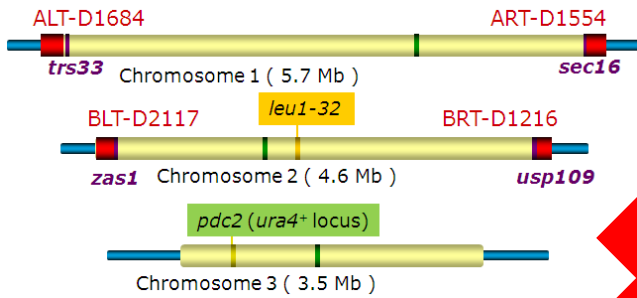


高機能性枯草菌宿主の開発

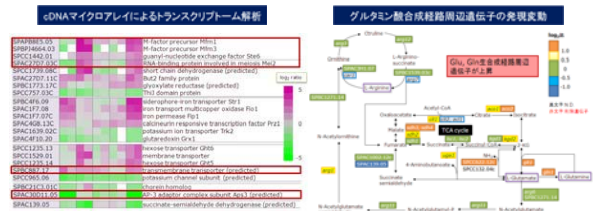
(Refined Genome Factory)



染色体大規模削除株△657.3kbpを完成



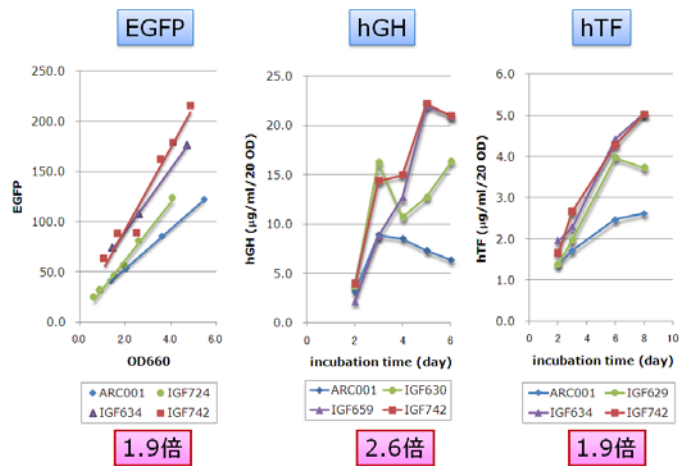
窒素飢餓検知・代謝変動解析



異種タンパク質生産効率が2倍に向上

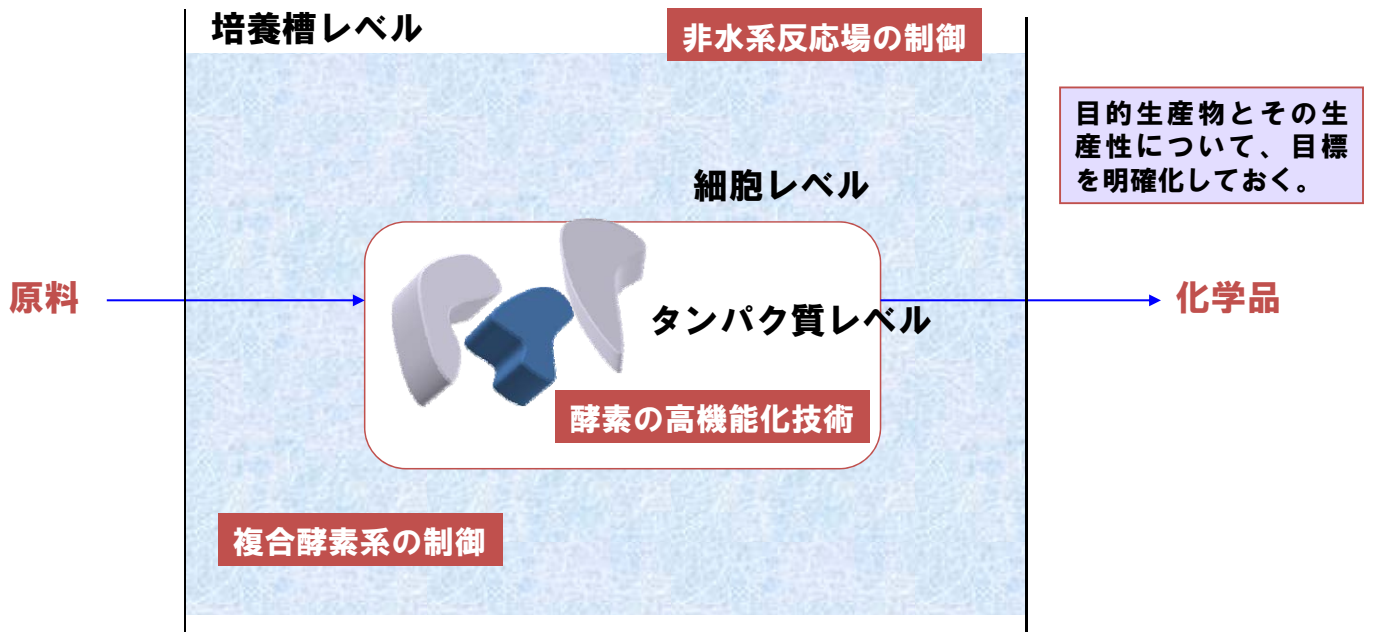
関連技術の進展

1. 多座組込型発現システム (5ユニット同時Tf2座分散組込可能)
2. 外部制御型誘導発現システム (増殖依存後期プロモーターihc取得)
3. 分泌生産性向上技術開発 (外来因子利用分泌量増大)
4. 糖鎖構造最小化技術開発 (ヒト型糖鎖基本構造構築終了)



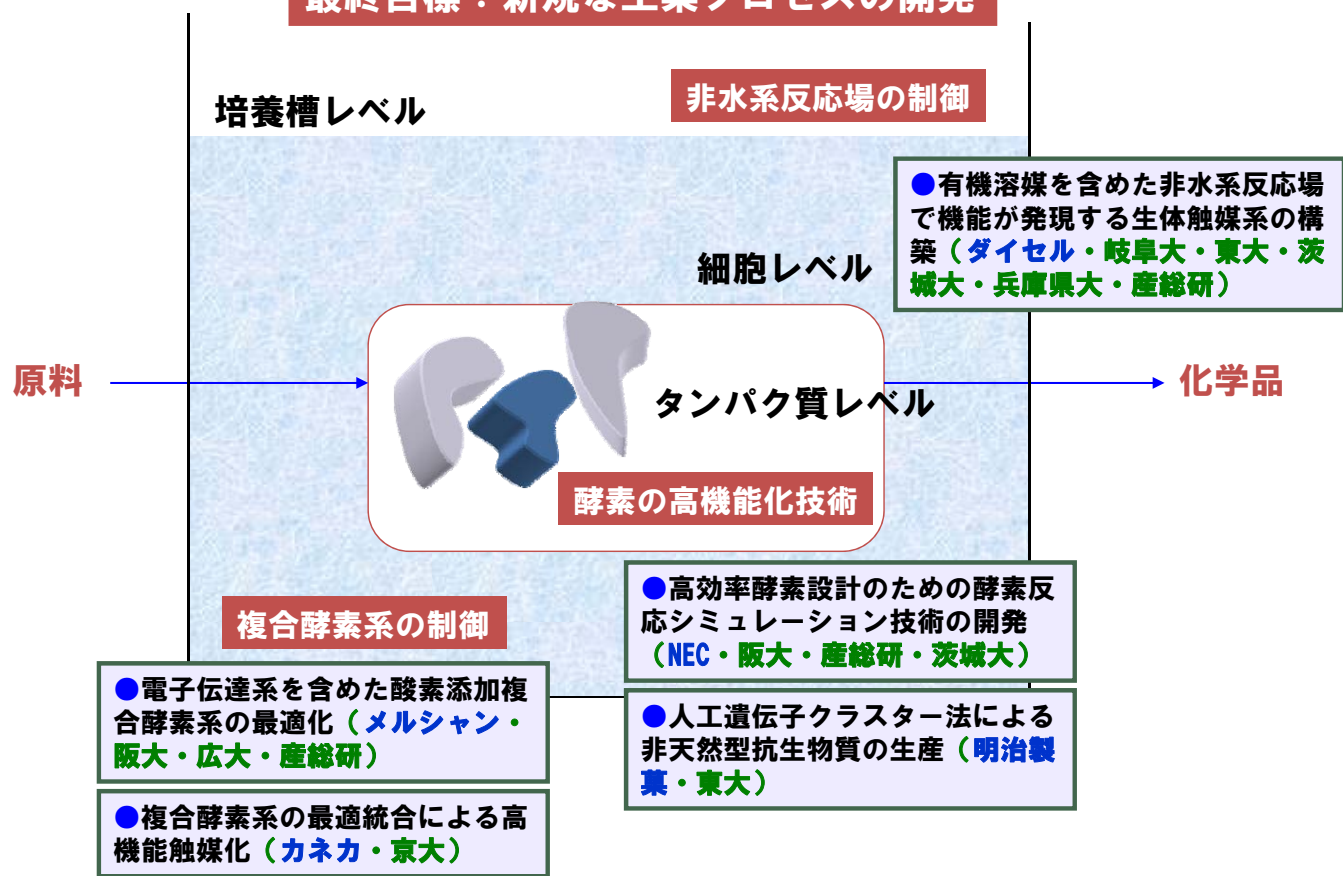
2. 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

公開



複合酵素系や非水系などにおける反応場制御技術の開発と、遺伝子改変等による酵素の高機能化技術の開発を行い、既にバイオプロセスにより生産できることが知られている物質についてはSTY (Space/Time/Yield: 反応容器の時間あたりの生産量) 数g/L/h以上、バイオプロセスによって生産できることが知られていない物質についてはその10分の1以上(医薬品等の高付加価値品については実用化に十分なSTYの数倍以上)の生産を行うことにより、バイオプロセスの実用化適用範囲を拡大する。

最終目標：新規な工業プロセスの開発



2. 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

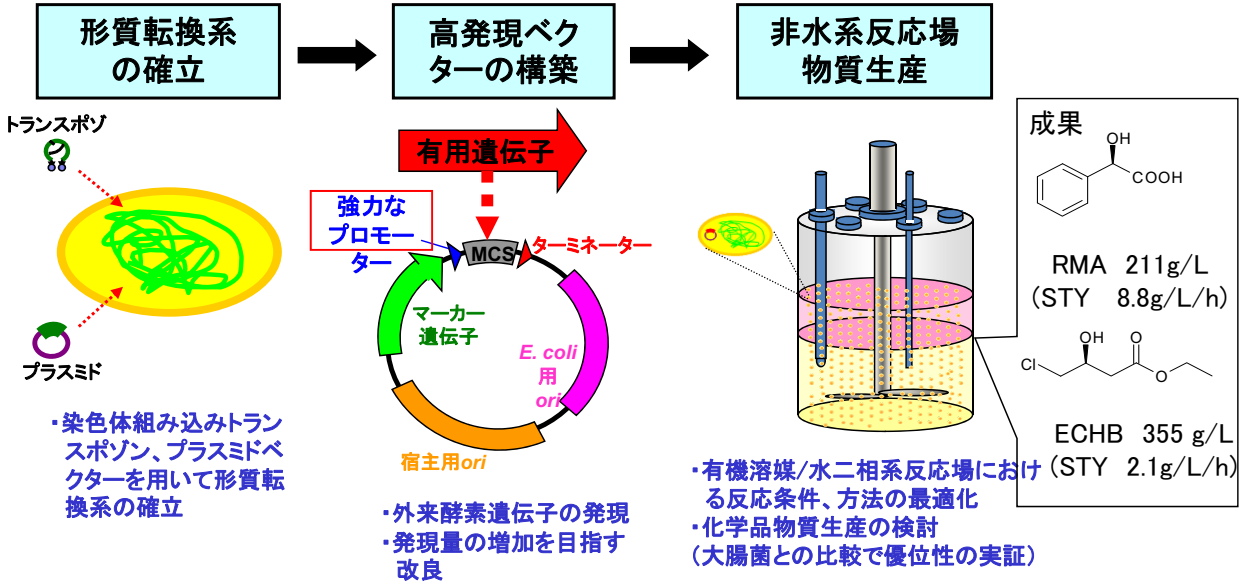
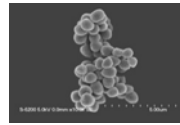
共同実施先と研究課題

- ・**東京大学大学院** 石井 正治 准教授 「非水系生体触媒への水素酸化能付与」
- ・**茨城大学** 西原 宏史 准教授 「水素利用微生物触媒の開発と反応」
- ・**岐阜大学** 長澤 透 教授 「酵素タンパク質の有機溶媒耐性機構と疎水性化合物変換酵素」
- ・**産業技術総合研究所** 宮崎 健太郎 グループ長 「メタゲノム手法による複合反応システムデザイン技術」
- ・**兵庫県立大学大学院** 樋口 芳樹 教授 「有機溶媒耐性酵素等有用酵素の精製・結晶化・構造化学的研究」
- ・**産業技術総合研究所** 田村 具博 グループリーダー 「酸素添加酵素の結晶構造解析技術」
- ・**大阪大学大学院** 大竹 久夫 教授 「Whole cell catalyst における酵素反応場の解析・制御技術」
- ・**広島大学大学院** 加藤 純一 教授 「マルチコンポーネント酸化酵素系の反応場制御基盤技術」
- ・**大阪大学** 奥村 光隆 教授 「密度汎関数法(CAS-DFT法)による酵素反応シミュレーション高信頼化技術」
- ・**産業技術総合研究所** 福西 快文 主任研究員 「酵素反応シミュレーションのための自由エネルギー計算手法」
- ・**茨城大学大学院** 高妻 孝光 教授 「ラマン分光法による酵素反応シミュレーション評価技術」
- ・**京都大学大学院** 小川 順 教授 「複合酵素系微生物触媒の基盤技術」
- ・**東京大学大学院** 大西 康夫 教授 「放線菌による非天然型二次代謝産物生合成の制御」

目標：現在のバイオプロセスは、水反応場で用いられるものがほとんどであり、化学工業において利用される疎水性化合物を原料とする生産への応用は困難である。そこで、各種有機溶媒中で細胞構造を維持することのできる微生物を宿主とするベクター系を開発し、非水系反応場で利用可能なバイオプロセスを確立することを目標とする。

成果：

有機溶媒耐性菌
***Kocuria rhizophila* DC2201**



実用化の見通し：有機溶媒耐性*K. rhizophila* DC2201に各種の反応を触媒する酵素遺伝子を導入することによって有機溶媒反応場で難水溶性化合物を原料にした医薬品中間体等の化学品生産を3~5年後の実用化を目指して、検討して行く。

酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の開発

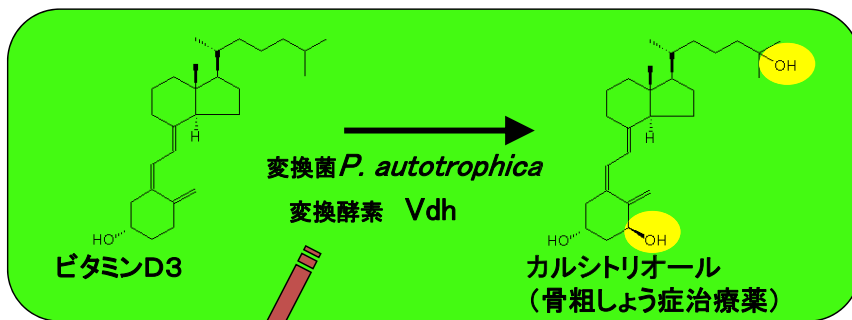
公開



メルシヤン株式会社

共同実施機関
産業技術総合研究所、大阪大学、広島大学

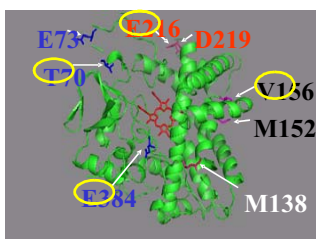
目的：高度水酸化バイオプロセスの開発



他の有用P450酵素変換系にも応用展開

有用水酸化化合物 (医薬・化学品)の開発
受託製造

酵素機能改変および構造解析



酵素機能改変で活性20倍
副反応1/6に

ゲノムデータを利用した
反応場促進因子の探索

マルチコンポーネント最適化
その他の宿主改良

遺伝子ライブラリー

従来の3倍以上の
生産性向上を達成!



ビタミンD水酸化体製造

酵素機能・反応機構の理解

① P450水酸化酵素の一連の反応プロセスをシミュレーション

ビタミンD3の取込 → 水素引抜 → 水酸化ビタミンD3の放出

量子化学の高度な計算手法の開発に基づく

反応場の詳細を説明

② 改変ホットスポットの予測に応用

予測法1: 活性向上 (角度変化) vs 予測法2: 副反応抑制 (相互作用エネルギー)

RC

188, L171

接触アミノ酸番号

③ 新変異体設計に成功
メルジャン社の新規基質
副反応を1/3に抑制に成功
ランダム変異に比べて遥かに高い成功率

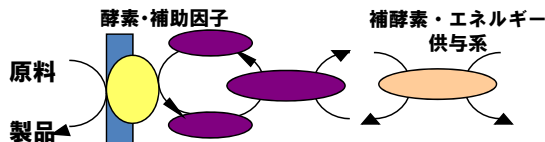
④ 実用化見通し
抗体や酵素を利用した分子センサの高度化

事業原簿 III-124

大阪大学 OSAKA UNIVERSITY | BIRC | 京大 51

微生物複合酵素系の産業用触媒

(カネカ、京都大学)



Integrated-Bio-Factory (IBF)
複数の機能素子(酵素など)を統合した(Integrated)生物工場 (Bio-Factory)

代謝利用生産系には本質的限界 → 構成酵素系の最適統合化による高機能触媒化 → バイオプロセスの幅広い実用化

実用化レベルの生産プロセス開発

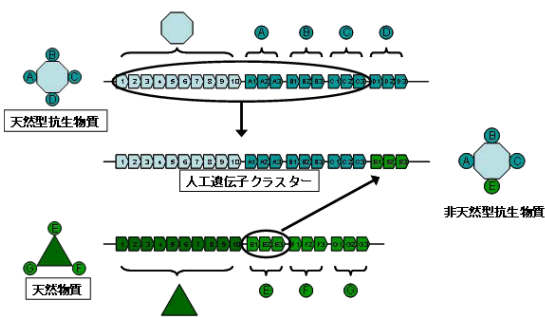
- 4酵素酸化還元複合酵素系によるL体非天然アミノ酸の安価生産プロセスを開発した。(100 g/L、高収率、高純度)
- 4酵素酸化還元複合酵素系によるキラルジオール類の安価生産プロセスを開発した。(100 g/L、高収率、高純度)
- 4酵素酸化還元複合酵素系による複不斉キラルアルコールの生産プロセスを開発した。(50 g/L、高収率、高純度)
- アミノ基転移・酸化還元複合酵素系によるキラルアミン類の生産プロセスを開発した。(50 g/L、高収率、高純度)
- ATP産生・炭素-炭素結合複合酵素系によるリン酸化糖類の生産プロセスを構築した。(50 g/L、高収率、高純度)
- 炭素-炭素結合・アミノ基転移複合酵素系によるヒドロキシアミノ酸類の生産プロセスを開発した。(30 mM、高純度)
- ジオキシゲナーゼ複合酵素系を用いるヒドロキシアミノ酸類の生産プロセスを開発した。(70 g/L、高収率、高純度)
- 異性化複合酵素系を用いる共役脂肪酸類の生産プロセスを開発した。(50 mg/mL、高収率、高純度)
- 水和複合酵素系を用いるキラル水酸化脂肪酸類の生産プロセスを開発した。(25 g/L、高収率、高純度)

複合酵素系活用のための基盤技術開発

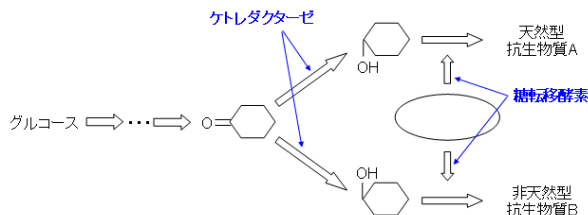
- スーパーオキシドディスムターゼがシクロクロムP450水酸化酵素の安定化及び活性化に寄与することを示した。
- 各種の微生物二次代謝産物や合成化合物に、ラッカーゼメディエーター活性を発見した。
- アルコール脱水素酵素の補酵素依存性を改変する手法を開発した。
- カルボニル還元酵素、オレフィン還元酵素、アミノ基転移酵素、炭素-炭素結合形成酵素、ラッカーゼ、P450モノオキシゲナーゼ、脂肪酸共役化酵素系(飽和化、不飽和化、異性化)などの新たな機能をもつ酵素を発見し、これらを用いる酵素的生産プロセスの基盤を築いた。

放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発 (明治製菓株式会社・東京大学)

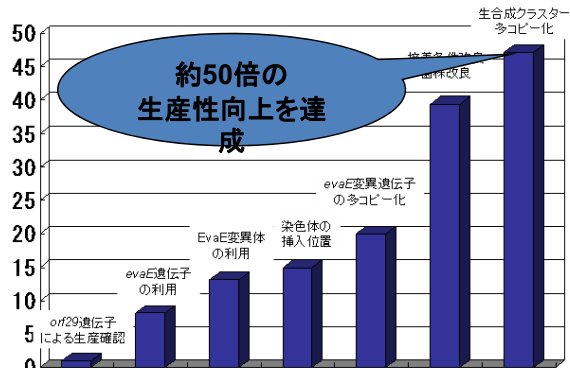
研究開発の概要



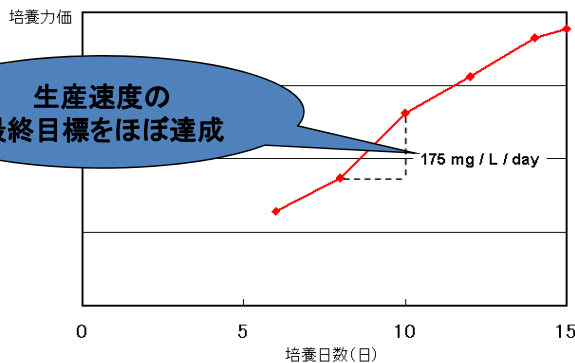
非天然型抗菌物質Bの発酵戦略



非天然型抗菌物質Bの生産性向上



ジャーフェンターによる培養生産性評価



発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発



高性能宿主細胞 DGF
有機溶媒耐性菌
・*R. opacus* B4株
・*K. rhizophila* DC2201株

産業利用

網羅的プロテオーム解析の開発・実施
定量的プロテオーム解析の開発・実施



- ・ショットガンプロテオーム
- ・ペプチドマスフィンガープリント
- ・多次元クロマトグラフ
- ・エドマン分解
- ・統計的定量法
- ・二次元電気泳動光学定量
- ・膜タンパク質検出



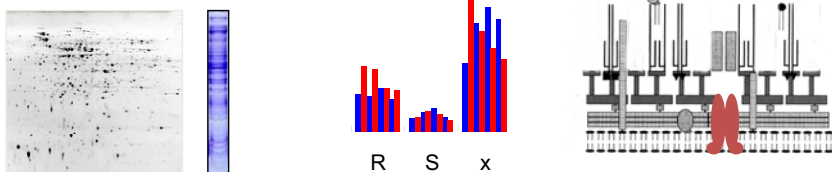
高性能性株

比較



野生株、機能欠損株

プロテオーム解析結果



DGF 同定タンパク質数: 1382
R. opacus B4株 同定タンパク質数: 3159
K. rhizophila DC2201株同定タンパク質数: 1446

代謝変化、高性能機能の解析

プロテオーム解析を終了。最終目標を達成。

新規バイオプロセスの実現

- ・新規バイオプロセスにおける菌体の機能・代謝状態データの提供
- ・NBRCによる保存・提供

3. バイオリファイナリー技術の開発

ソフトバイオマス糖化技術の開発

- ・地球環境産業技術研究機構 (RITE)
- ・バイオ・エナジー [平成18～19年度]
- ・月桂冠 [平成18～19年度]
- ・豊田中央研究所 [平成18～19年度]

バイオコンバージョン技術の開発

- ・地球環境産業技術研究機構 (RITE)
- ・東レ

3. バイオリファイナリー技術の開発

共同実施先と研究課題

〔RITE 再委託〕

- ・石川県立大学 熊谷 英彦 教授 「スーパーセルラーゼの創製」
- ・カリフォルニア大学デービス校 Roy H. Doi 教授 (平成18～19年度)
「セルロソーム構造の発現・機能解析」
- ・かずさDNA研究所 大石 道夫 所長
「メタゲノム的手法によるバイオリファイナリー酵素」
- ・北海道大学 横田 篤 教授
「*C. Glutamicum* におけるピルビン酸キナーゼ活性変異株の取得と解析」
- ・東京工業大学 和地 正明 准教授
「コリネ型細菌 *C. Glutamicum* の細胞増殖機構の解析」

〔平成18～19年度〕

- ・東北大学 阿尻 雅文 教授 「環境調和型ソフトバイオマス前処理技術」
- ・神戸大学 福田 秀樹 教授
「酵母によるHTS法の高効率化とセルラーゼの高機能化」
- ・名古屋大学大学院 中野 秀雄 教授
「SIMPLEX法の高効率化と新規スクリーニング法」
- ・神戸大学 近藤 昭彦 教授
「麹菌の組換えタンパク質の分泌生産と高密度培養に関する基盤技術」

バイオマス由来
混合糖
(C6, C5糖)

C₃~C₆化合物の生産システムの構築

- 有機酸(D-乳酸)
- アミノ酸(L-アラニン、バリン)
- 糖アルコール(キシリトール)

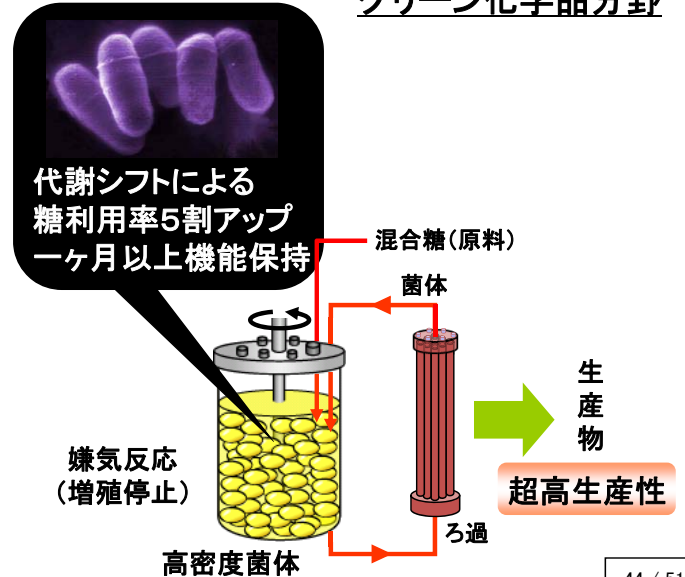
増殖非依存型バイオプロセス
~コリネ型細菌の代謝改変~

工業化研究
民間企業との共同開発

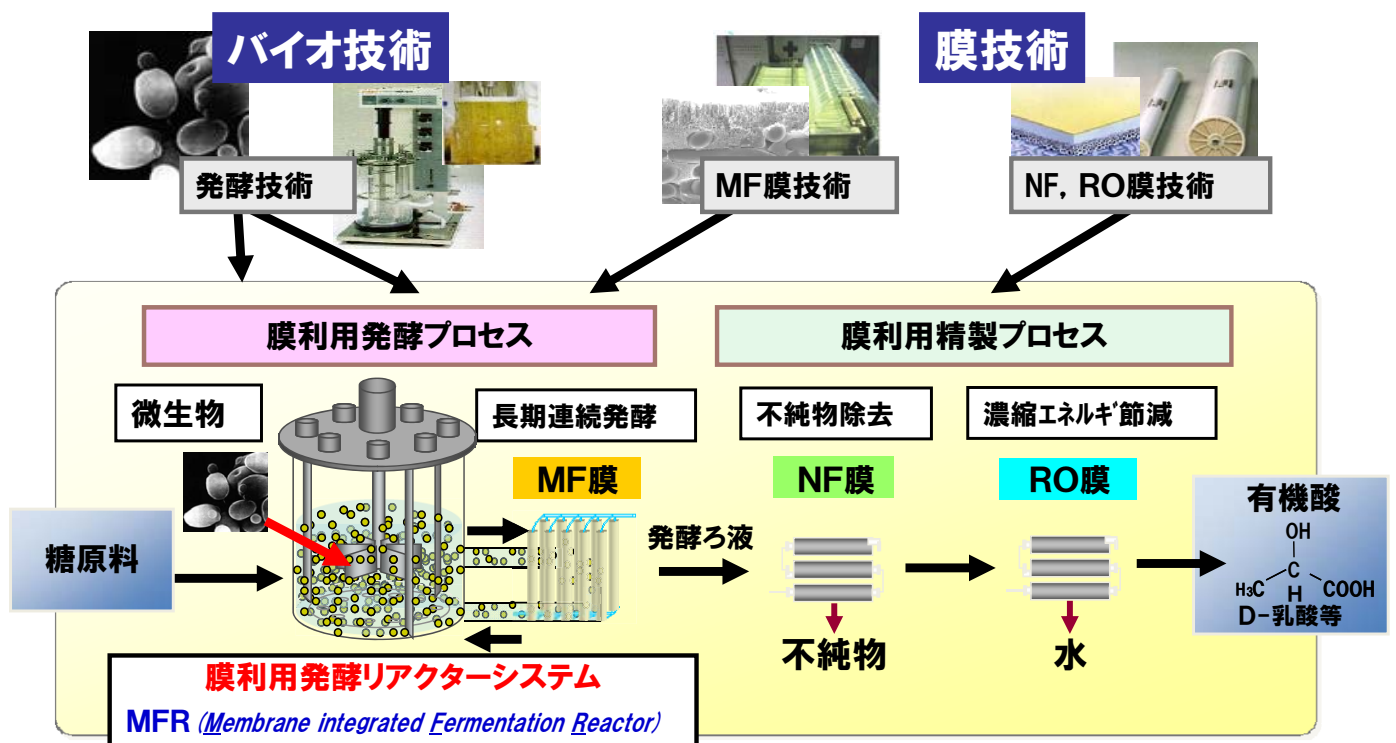
基盤要素技術の確立

グリーン化学品分野

- バイオマス原料有効利用
 - 混合糖(C₆、C₅糖)の完全同時利用
 - “醗酵阻害物質”に対する耐性
- 革新的生産性向上
 - 糖代謝機能の強化
 - 代謝遺伝子発現レベルの最適化
- 細胞機能の統合的解明
 - 糖取り込み・代謝系の解析
 - 遺伝子ネットワークの解析
 - 細胞増殖に関する解析



メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術(東レ)



微生物分離膜・有機酸分離膜を組み込んだ高効率膜利用発酵・精製プロセスを開発

4.1 主な特許

研究開発項目	国内	外国・PCT
①高性能宿主細胞創製技術	<ul style="list-style-type: none"> ・有用物質製造法 ・工業的有用微生物 ・異種タンパク質の製造法 ・細菌の溶菌抑制方法 	<ul style="list-style-type: none"> ・工業的有用微生物 改変微生物 ・異種タンパク質の製造法 ・乳酸製造法
②微生物反応の多様化・高機能化技術	<ul style="list-style-type: none"> ・新規発現ベクター ・水酸化酵素改良 ・分子シミュレーションプログラム ・新規脱水素酵素 ・酸化還元酵素変異体 	<ul style="list-style-type: none"> ・分子シミュレーションプログラム ・新規脱水素酵素 ・非天然型抗生物質製造方法
③バイオリファイナリー技術	<ul style="list-style-type: none"> ・有機化合物製造方法 ・細菌形質転換体 ・連続発酵による化学品製造方法 	<ul style="list-style-type: none"> ・細菌形質転換体 ・連続発酵による化学品製造方法

4.2 特許、論文、学会発表・プレス発表の実績

研究開発項目	特許 (国内)	特許 (外国)	特許 (PCT)	論文 (査読付)	外部発表等
①高性能宿主細胞創製技術	30	2	7	64	93
②微生物反応の多様化・高機能化技術	14	0	7	140	287
③バイオリファイナリー技術	66	13	12	108	320
合計	111	15	26	312	701

4.3 実用化・事業化の見通しについて(1)

1. 高性能宿主細胞創製技術の開発

協和発酵キリン	<ul style="list-style-type: none"> ・大腸菌DGF染色体縮小化株で物質生産 ・外部へライセンスアウト ・アカデミアのグループへの分与を計画
花王	<ul style="list-style-type: none"> ・枯草菌RGF高機能性宿主細胞でセルラーゼ、プロテアーゼなどの産業用酵素や異種タンパク質の工業生産 ・外部へライセンスアウト
旭硝子	<ul style="list-style-type: none"> ・分裂酵母IGFで異種タンパク質生産受託ビジネス ・外部へライセンスアウト ・公的・民間菌株分譲機関を活用して宿主や周辺ライブラリーを恒久的に保管・分譲

4.4. 実用化・事業化の見通しについて(2)

2. 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

ダイセル化学	<ul style="list-style-type: none"> ・有機溶媒耐性DC2201に各種酵素遺伝子を導入し、有機溶媒反応場で難水溶性化合物を原料にした医薬品中間体等の生産を3~5年後に実用化
メルシャン	<ul style="list-style-type: none"> ・水酸化ビタミンD誘導体の製造 ・独自に保有するP450水酸化酵素遺伝子ライブラリーを活用し、各種有用水酸化化合物の受託製造へ展開
NEC	<ul style="list-style-type: none"> ・抗体、酵素、アプタマーを利用したバイオセンサー(開発中)の高感度化へ利用 ・製薬企業や化学関連企業に向けた解析サービスやコンサルティング事業を展開
カネカ	<ul style="list-style-type: none"> ・非天然アミノ酸生産プロセスなど実用化レベルに達したプロセスをプロジェクト終了後数年以内に工業規模で実用化
明治製菓	<ul style="list-style-type: none"> ・非天然型抗生物質の培養生産について、精製プロセス開発後、3年後以降に生産実用化

4.5 実用化・事業化の見通しについて(3)

3. バイオリファイナリー技術の開発

RITE	・国内企業と、増殖非依存型バイオプロセスによる各種化学品・燃料の工業化研究を実施中。数年以内に実用化予定。
東レ	・膜利用発酵精製システムを有機酸以外へも応用可能な汎用性の高い発酵生産システムとしての展開を検討 ・段階的なスケールアップ実証を行い、実用化・事業化へ

4.6 波及効果について

