

「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」

事業原簿

公開版

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
-----	---

概要	1
プロジェクト用語集	8
I. 事業の位置づけ・必要性について	20
1. 事業の背景	
2. 政策上の位置づけ	
3. NEDO が関与することの意義	
4. 実施の効果（費用対効果）	
5. 国内外の状況	
II. 研究開発マネジメントについて	23
1. 事業の目標	
2. 事業の内容	
3. 事業の計画	
4. 事業の実施体制	
5. 研究開発の運営管理	
6. 研究開発成果の実用化・事業化に向けたマネジメントの妥当性	
7. 情勢変化への対応	
8. 中間評価結果への対応	
9. 評価に関する事項	
III. 研究開発成果について	32
1. 事業全体の成果	32
2. 研究開発項目毎の成果	34
2.1 研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」【委託】	34
2.1.1 ゲノム編集技術	34
2.1.2 代謝系遺伝子発現制御技術	73
2.1.3 代謝系遺伝子発現制御技術／栽培・生育環境による発現制御技術	111
2.2 研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」【助成】	150
2.2.1 高機能組換え植物組織培養によるビタミン D3 高効率生産技術の開発	150
2.2.2 医薬品中間体原料植物の代謝変換によるアルカロイド製造技術の開発	157
2.2.3 組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	162
2.2.4 イチイ細胞培養技術を用いたタキサン系医薬中間体 10-DAB の効率生産法開発	168
2.2.5 シソ代謝系制御技術による健康機能性成分の高効率増産技術開発	176
2.3 研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」【委託】	183
2.3.1 ハイスループット合成・分析・評価手法の開発	190
2.3.2 高生産性微生物設計システムの開発	270
2.3.3 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証	385

IV. 成果の実用化・事業化に向けた取組及び見通しについて	525
1. 事業全体の取組及び見通し	525
2. 研究開発項目毎の取組及び見通し	526
2.1 研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」【委託】	
実用化に向けた取組及び見通し	526
2.1.1 ゲノム編集技術	526
2.1.2 代謝系遺伝子発現制御技術	529
2.1.3 代謝系遺伝子発現制御技術／栽培・生育環境による発現制御技術	531
2.2 研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」【助成】	
事業化に向けた取組及び見通し	532
2.2.1 高機能組換え植物組織培養によるビタミン D3 高効率生産技術の開発	532
2.2.2 医薬品中間体原料植物の代謝変換によるアルカロイド製造技術の開発	533
2.2.3 組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	534
2.2.4 イチイ細胞培養技術を用いたタキサン系医薬中間体 10-DAB の効率生産法開発	536
2.2.5 シソ代謝系制御技術による健康機能性成分の高効率増産技術開発	538
2.3 研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」【委託】	
実用化に向けた取組及び見通し	540
2.3.1 ハイスループット合成・分析・評価手法の実用化	540
2.3.2 高生産性微生物設計システムの実用化	543
2.3.3 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証に関する実用化	550
添付資料	556
(添付資料 1) プロジェクト基本計画	
(添付資料 2) 事前評価書、NEDO POST 結果	
(添付資料 3) TSC Foresight 生物機能を利用した物質生産分野の技術戦略策定に向けて	

概要

		最終更新日	2018年8月15日
プロジェクト名	植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発	プロジェクト番号	P16009
担当推進部/ PMまたは担当者	材料・ナノテクノロジー部 PM 梅田 到 (2016年4月～2016年7月) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 後藤 謙太 (2016年4月～2017年3月) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 中井 岳 (2016年4月～2016年7月) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 尾野 直紀 (2016年9月～2017年3月) 材料・ナノテクノロジー部 PM 林 智佳子 (2016年8月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 大竹 淳之 (2016年4月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 河辺 智康 (2016年5月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 齋藤 貴博 (2017年4月～現在) 材料・ナノテクノロジー部 担当者 尾上 尚子 (2017年4月～現在)		
0. 事業の概要	<p>本プロジェクトでは、植物等の生物が持つ物質生産能力を人工的に最大限引き出した細胞“スマートセル”を構築し、化学合成では生産が難しい有用物質の創製、又は従来法の生産性を凌駕することを目的に、必要となる基盤技術を開発するとともに、特定の生産物質における実用化技術を確立する。なお、物質生産に係るコストや安全性の面から、本プロジェクトでは植物と微生物による生産技術を対象とし、それぞれの特性を踏まえて技術開発を実施する。これにより、持続可能な社会の構築に資するスマートセルによるものづくり“スマートセルインダストリー”の実現を目指す。</p> <p>研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」(委託) 研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」(助成) 研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」(委託) 研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」(助成)(2019年度開始)</p>		
1. 事業の位置付け・必要性について	<p>バイオテクノロジーは、経済活動の様々な分野で利用される技術体系となっており、近年欧米を中心にバイオテクノロジーを用いた経済活動をバイオエコノミーと称して政策提言に取り上げている。OECDでは2030年にはバイオエコノミー市場が成長すると予想し、これまで中心であった健康・医療分野での利用から工業利用の市場が拡大していくと見込んで、取組を先行している。一方で、2015年に国連本部が掲げた持続可能な開発目標(SDGs)が採択され、深刻化する環境課題などへの解決に向けて世界的に持続可能な社会の構築を目指す必要がある。</p> <p>技術面では、次世代シークエンサーをはじめとした各種解析装置が急速に進化しゲノム解読技術の進展・IT/AI技術の進展・ゲノム編集技術等の最先端バイオ技術の進展により、生物による高効率物質生産技術に基づく新たな市場拡大の期待が高まっている。我が国としても同分野での競争力強化が急務である。現状は、基礎学理が構築されコンセプト形成ができてきた段階で実用化に向けた課題が多くあることから、国として生物機能を活用した高機能品生産技術の開発に取り組むことが重要である。</p>		
2. 研究開発マネジメントについて			
事業の目標	<p>研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」(委託) 【中間目標】 (2018年度末) (1)ゲノム編集技術 ・既存のゲノム編集技術では対応できない独自の新しい機能を有するゲノム編集関連技術(対象領域、精密性、ゲノム設計、細胞毒性、導入効率等)の基本技術を確立し、その新規性、有用性を検証する。</p>		

・開発した成果の産業利用に向けて、他国の動向も踏まえた知財戦略を策定する。

(2)代謝系遺伝子発現制御技術

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

(3)栽培・生育環境による発現制御技術

- ・栽培環境因子と代謝系主要遺伝子の半数の解析を終了させる。

【最終目標】（2020年度末）

(1)ゲノム編集技術

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

(2)代謝系遺伝子発現制御技術

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

(3)栽培・生育環境による発現制御技術

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

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」（助成）

【中間目標】（2018年度末）

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

【最終目標】（2020年度末）

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

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」（委託）

【中間目標】（2018年度末）

(1)ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

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

(2)高生産性微生物設計システムの開発

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

(3)高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

	<ul style="list-style-type: none"> ・(1)(2)で開発したシステムを用いて、生産性の大幅な向上に資することを最低1つのターゲットで実証する。 ・各国の類似事業・研究開発動向を調査し、我が国の優位性を生かした独自の知財戦略及び事業化モデル(案)を策定する。 <p>【最終目標】(2020年度末)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・(1)(2)で開発したシステムを用いることにより、従来育種と比較し、物質生産株の開発期間を1/10に短縮することを実証する。 ・(1)(2)で開発した要素技術、システムを維持・運営するための事業化モデルを策定する。 <p>研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」(助成) (2019年度開始予定)</p>						
事業の計画内容	主な実施事項	2016fy	2017fy	2018fy	2019fy	2020fy	
	研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」	—————▶					
	研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」	—————▶					
	研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」	—————▶					
	研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」				—————▶		
事業費推移 (単位:百万円)	会計・勘定	2016fy	2017y	2018fy	2019fy	2020fy	総額
	一般会計	-	-	-	-	-	-
	特別会計(需給)	1,613	2,007	2,286	-	-	5,906
	総NEDO負担額	1,613	2,007	2,286	-	-	5,906
	(委託)	1,433	1,815	2,099	-	-	5,347
	(助成) : 助成率 2/3, 1/2	180	192	187	-	-	559
開発体制	経産省担当原課	商務情報政策局 生物化学産業課					
	プロジェクトリーダー	PL: 国立大学法人九州大学 名誉教授 久原 哲 SPL: 国立研究開発法人産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 植物分子工学研究グループ長 松村 健					
	委託先	研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」 (1)ゲノム編集技術 【委託先】徳島大学、明治大学、理化学研究所、九州大学、東京医科歯科大学、神戸大学、広島大学、東京大学、(国研)産業技術総合研究所、エディットフォース(株)、知的財産ネットワーク(株)、筑波大学 【再委託】近畿大学 (2)代謝系遺伝子発現制御技術					

		<p>【委託先】(公財)かずさDNA研究所、京都大学、(国研)産業技術総合研究所、北海道大学、奈良先端科学技術大学院大学、横浜国立大学</p> <p>【再委託】東北大学</p> <p>(3)栽培・生育環境による発現制御技術</p> <p>【委託先】千葉大学、(公財)北海道科学技術総合振興センター</p> <p>研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」</p> <p>【助成先】竹中工務店(株)、キリン(株)、神戸天然物化学(株)、味の素(株)、ホクサン(株)、北海道三井化学(株)、(株)アミノアップ化学</p> <p>【共同実施】北海道医療大学、大阪府立大学、大阪大学、神戸大学、京都大学、千葉大学、玉川大学、(国研)産業技術総合研究所、(公財)北海道科学技術総合振興センター</p> <p>研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」</p> <p>【委託先】神戸大学、(国研)産業技術総合研究所、旭化成ファーマ(株)、味の素(株)、江崎グリコ(株)、神戸天然物化学(株)、JSR(株)、(株)島津製作所、長瀬産業(株)、日本テクノサービス(株)、不二製油グループ本社(株)、プレジジョン・システム・サイエンス(株)、三菱ケミカル(株)、(公財)地球環境産業技術研究機構、(国研)理化学研究所、石川県立大学、東北大学、長岡技術科学大学、新潟薬科大学</p> <p>【委託先(2017年度～)】京都大学、九州大学、日立製作所(株)、東京大学、Spiber(株)、筑波大学、(株)ニコンインステック</p> <p>【再委託】岡山大学、千葉大学、慶應義塾大学、大阪大学、(株)インテック(～2017年度)、(株)バイオジェット、信州大学、鹿児島大学、九州大学、(一財)バイオインダストリー協会、花王(株)、</p> <p>【再委託(2017年度～)】東京大学、(独)製品評価技術基盤機構、(国研)理化学研究所</p>
<p>情勢変化への対応</p>		<ul style="list-style-type: none"> 調査事業等により、高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発は欧米が先行、「学習(AI)」による高度な制御を取り込んだ工業プロセスは開発段階であることを把握。これを受け、2017年度の追加公募で、AI基盤開発等の実施者を新たに採択し研究体制を強化した。また、実施者に先行技術調査・解析を精力的に進めるよう促し、現行実施体制の強み・弱みを明確にした上で開発戦略を策定するよう働きかけた。 ゲノム編集技術に関して欧米の出願数増加、周辺技術である導入技術の出願数増加を把握。国内外での特許成立状況の動向を把握。2017年度に新規ゲノム編集技術、導入技術等の開発内容に予算を重点配分した。また、関連情報はプロジェクト内事業者には速やかに情報共有されているかどうかを確認し、開発成果の知財化方針変更の必要性について実施者に検討を促した。 2017年から総合科学技術・イノベーション会議の政策討議を受け、バイオテクノロジーによるイノベーションの推進に向けた政府の戦略(バイオ戦略)の検討が開始された。政策サイドとの情報交換を密に行って状況を把握している。他省庁事業との連携可能性による成果の最大化を意識して関係機関との調整を随時行っている。

中間評価結果への対応	本プロジェクトは 2018 年度に中間評価の実施を予定しており、現時点において未実施のため記載すべき事項は無い。			
評価に関する事項	事前評価	2015 年度実施		
	中間評価	2018 年度実施		
	事後評価	2021 年度実施（予定）		
3. 研究開発成果について	研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」			
	研究開発項目	目標	成果	達成度
	(1) ゲノム編集技術	<ul style="list-style-type: none"> 既存のゲノム編集技術では対応できない独自の新しい機能を有するゲノム編集関連技術（対象領域、精密性、ゲノム設計、細胞毒性、導入効率等）の基本技術を確立し、その新規性、有用性を検証する。 開発した成果の産業利用に向けて、他国の動向も踏まえた知財戦略を策定する。 	新規認識モジュール、切断酵素（特許 2 件）、他	○
	(2) 代謝系遺伝子発現制御技術	<ul style="list-style-type: none"> メチル化誘導、遺伝子発現制御因子解析等の基本技術を確立する。 目的代謝系遺伝子の発現を 2 倍以上増強又は 1/5 以下に抑制する。 	モデル実験系において、目的代謝系遺伝子の発現を 2 倍以上増強、および 1/5 以下への抑制が確認できた	○
	(3) 栽培・生育環境による発現制御技術	<ul style="list-style-type: none"> 目的代謝系における主要遺伝子/産物の発現を 5 倍程度増強させる技術を確立する。 研究開発項目②で対象とする実用植物において、栽培・生育環境による発現制御技術の有効性を示す。 	設定した栽培環境因子の半数以上において代謝系主要遺伝子の発現変動解析を終了した	○
	研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」			
	研究開発項目	目標	成果	達成度
植物による高機能品生産技術開発	<ul style="list-style-type: none"> 対象とする実用植物の栽培、培養系の確立及び遺伝子組換え技術を確立する。 生産性向上に寄与する遺伝子を明らかにし、コスト、性能等の面で総合的に競争力があるとの見通しを得る。 	これまで報告例の少ない実用目的植物種において、一過性遺伝子発現系、および比較的効率の良い遺伝子組換え系の開発に成功した。また、人工環境下栽培技術、および、細胞培養技術開発により、目的植物体および	○	

		細胞の飛躍的増収が可能になりつつある。	
研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」			
研究開発項目	目標	成果	達成度
(1)ハイスループット合成・分析・評価手法の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・30kb 超の DNA 合成時間を従来の 1/2 に短縮する技術を確立する。 ・LC-MS のハイスループット化により、現状と比較して 10 倍の分析速度を実現する。 ・その他、高生産性微生物設計システムを効率的に運用するために必要となるハイスループット評価技術を確立する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・自動 DNA 合成装置、プラスミド自動構築装置により目標値は達成できた。 ・LC-MS の自動前処理装置により目標値を達成できた。 	○
(2)高生産性微生物設計システムの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・階層内、階層間の制御ネットワークを推定する階層縦断的な情報解析手法を開発する。 ・上記解析手法や代謝流束推定、人工酵素設計技術等を統合し、特定物質の生産性向上に資する重要因子、改変すべき遺伝子配列を提示する汎用的な設計システムを構築する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・多数の情報解析手法を搭載した遺伝子配列設計システムの基盤を構築し、有効性検証課題での有効性を試した。 	○
(3)高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証	<ul style="list-style-type: none"> ・(1)(2)で開発したシステムを用いて、生産性の大幅な向上に資することを最低 1 つのターゲットで実証する。 ・各国の類似事業・研究開発動向を調査し、我が国の優位性を生かした独自の知財戦略及び事業化モデル（案）を策定する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・少なくとも 2 つのターゲットでシステムの有効性を検証できた。 ・知財戦略に基づく事業化モデル（案）を作成した。 	○
投稿論文	2016 年度：査読付き 6 件、その他 4 件 2017 年度：査読付き 10 件、その他 11 件 2018 年度：査読付き 6 件、その他 4 件(2018 年 6 月末時点)		
特 許	2016 年度：国内出願 2 件、外国出願 0 件、PCT 出願 0 件 2017 年度：国内出願 6 件、外国出願 0 件、PCT 出願 2 件 2018 年度：国内出願 7 件、外国出願 1 件、PCT 出願 0 件(2018 年 6 月末時点)		
その他の外部発表 (プレス発表等)	2016 年度：66 件 2017 年度：183 件 2018 年度：74 件(2018 年 6 月末時点)		

<p>4. 成果の実用化・事業化に向けた取組及び見直しについて</p>	<p>研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」（委託） 個々の物質生産目的に特化したものではなく、植物を利用した有用化合物高効率生産に資する共通・基盤技術の開発を行っており、個々の技術開発要素において以下の取組を行っている。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・基本的に特許等の知財化を前提に、技術の優位性、有効性を学会・シンポジウム等々において広く周知する活動を実施していく。 ・上記の結果から、実用化・事業化を担う企業等との新たな連携・共同研究等を開始、個々の事業目的物質において当該開発技術の有効利用を図る。 <p>研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」（助成） 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。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。 <p>研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」 先行技術調査とその分析により、D (Design) B (Build) T (Test) L (Learn) の領域ごとに以下の方針で取組み、実用化の核とする。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・DL 領域：ノウハウとして保全し実用化レベルとする。 ・BT 領域：本プロジェクトにおいても出願、公開化を積極的に推し進める。 <p>また、海外のベンチマーク企業 17 社を公開情報等に基づき詳細に調査。一部の企業については、国内においてキーマンインタビューと米国企業 5 社を抽出して現地訪問調査を実施。それらの知見に基づき、我が国の優位性を生かし得る複数のビジネスモデルの抽出と分析を行い本研究開発項目の事業化を見据えて技術の実用化を進める取組をしている。</p>	
<p>5. 基本計画に関する事項</p>	<p>作成時期</p>	<p>2016 年 3 月 制定</p>
	<p>変更履歴</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・2016 年 8 月、プロジェクトマネージャー交代 改訂 ・2018 年 3 月、研究開発項目③の細目順序入替え及び記載表現の見直し等 改訂

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用語集

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

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

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

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」【委託】（遺伝子制御・環境制御）

用語	説明
EYFP	黄色蛍光タンパク質の一種。
IPP	イソペンテニルニリン酸。イソプレノイド（テルペノイド）の共通前駆体。
BY-2細胞	タバコ由来の培養細胞。倍加時間が早く、形質転換が容易である特徴を持つ。
PDS遺伝子	カロテノイド生合成遺伝子のひとつで、フィトエン不飽和化酵素（phytoene desaturase）をコードする遺伝子。
アクチノマイシン	放線菌がつくるポリペプチド系抗生物質。
アグロインフィルトレーション	目的遺伝子を含むT-ベクターを組み込んだアグロバクテリウムの培養液を植物組織に浸潤させることで感染させ、T-ベクター（内の目的遺伝子）を細胞内に導入する技術。
アグロバクテリウム	土壌細菌の一種（リゾビウム属）の内、植物に対する病原性をもつものの総称。感染時に遺伝子を植物細胞に導入する特性を持つため、植物遺伝子工学に用いられる（それらの株は病原性遺伝子を除去してある）。
アゴニスト	生体内の受容体分子に働いて神経伝達物質やホルモンなどと同様の機能を示す作動薬。
アプロチニン	タンパク質分解阻害剤の一種。
アポプラスト	細胞膜の外を指す言葉で、植物では細胞壁及び細胞間隙などのスペースを指す。
アンチセンス鎖	ある配列のDNAやRNAに対して相補的な配列をもつDNA断片やRNA断片を指す。
イソプレノイド	炭素数5のイソプレン単位であるイソペンテニルニリン酸、あるいはその異性体であるジメチルアリルニリン酸を前駆体として生合成される天然化合物、または、それらを構造の一部として有する天然化合物。テルペノイドと呼ばれることもある。
ウイルスベクター	ウイルスに目的のDNA断片を挿入し、ウイルスの感染・複製系を利用して目的DNA断片を細胞内に導入するベクターのこと。
エピジェネティック	DNAの配列変化によらない遺伝子発現を制御・伝達するシステムのこと。
エピトープタグ	特定の抗体と特異的に結合する短いアミノ酸配列（抗原）のこと。

カタルポール	地黄（ジオウ）の主要成分。
カナマイシン	アミノグリコシド系抗生物質。
カルス	分化していない（未分化、脱分化）状態の植物細胞の塊のこと。通常、固形培地上で培養されている状態のものを指す。
クロマチン	真核細胞の核内に存在する、DNAやヒストンタンパク質などで構成される複合体のこと。
シコニン	ムラサキの根（紫根）から得られるナフトキノンの赤色化合物。紫根の薬効本体とされる。また、染料としてもつかわれる。
ジャスモン酸メチル	植物において傷害ストレス応答などを誘導する、植物ホルモンの一種。
テルペノイド	イソプレノイドと同義。
テロメラーゼ	染色体末端部にテロメアの反復配列を追加する酵素。
トライコーム	植物の茎や葉に覆われている毛状突起のこと。
トランスクリプトーム	転写産物（mRNA）の全体像を把握することによって、目的の遺伝子発現の全体像を判断する手法。
トランスポゾン	細胞内においてゲノム上の位置を転移することのできる塩基配列のこと。薬剤耐性決定遺伝子をもつものも多く見つかっている。
バイサルファイトシーケンス法	バイサルファイト処理を施したDNAを次世代シーケンサーを用いて配列決定し、シトシンのメチル化を検出する方法。
パクリタキセル	タイヘイヨウイチイなど、イチイ属樹木の樹皮から単離された物質で、商品名「タキソール」として世界中で流通。抗ガン作用があり、種々の悪性腫瘍に対して臨床の現場で使われる天然物。
プロトプラスト	植物細胞から細胞壁を取り除いた細胞のこと。
ホモログ	同一の祖先から派生した類似配列をもつ遺伝子、また類似の機能を持つ遺伝子。広義では、類似性の高い組織や器官をさす。
モノクローナル抗体	単一の抗体産生細胞に由来するクローンから得られた抗体（免疫グロブリン）分子のこと。
リファンピシン	抗生物質の一種。他の抗生物質に比べて自然耐性を持たれやすい特徴を持つ。

根圏部	植物の根からの分泌物と土壌微生物とによって影響されている土壌の領域のこと。
白化	植物の葉中のクロロフィル濃度が低下し、葉が黄色から白色となっている状態。
耐性遺伝子	特定あるいは複数の薬剤に対する耐性を細菌や細胞に与える遺伝子。
腺鱗	トライコームの一形態で、植物の葉の表面に発達する器官。精油等を蓄積する。
野生型	生物において、野生の集団に最も多くみられる型のこと。

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」【助成】

用語	説明
10-deacetylbaaccatin III	タキサン骨格を有するジテルペノイド化合物であり、paclitaxelよりも樹木中の含有量が多いことからタキサン系抗がん剤を製造する際の間体として利用される。10-deacetylbaaccatin IIIのC-13位に側鎖を人工的に付加するなどして抗がん剤paclitaxelやdocetaxelが生産される。
10-DAB	10-deacetylbaaccatin IIIの略称。
GUS	β -glucuronidaseの略称である。大腸菌由来の酵素で、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル β -D-グルクロニド (X-Gluc)を含む発色反応液で処理することによりインジゴン色素生成・蓄積するため、GUS 遺伝子の導入・発現を確認できる。
paclitaxel	タキサン骨格を有するジテルペノイド化合物であり、含有量が多いとされるイチイ樹木の樹皮でさえ400ppm以下である。細胞分裂において、微小管を安定化することによる微小管脱重合阻害作用を示すことから抗がん剤として用いられている。複雑な構造を有することから化学合成による産業供給は困難であり、10年にわたる栽培や細胞培養法により生産されている。
PTX	paclitaxelの略称。
SDGs	Sustainable Developmental Goals 持続可能な開発目標の略。国連で採択された持続可能な開発のための2030アジェンダに盛り込まれた目標
VD3	本事業原簿(Ⅲ.2.2.1、Ⅳ.2.2.1)では、ビタミンD3(コレカルシフェロール)を指す略語。血中のカルシウム濃度を調節するビタミンDの一種で、活性型ビタミンD3生合成前の形態である。
VD3前駆体	植物体内のビタミンD3は、何段階もの化学反応(代謝)などを経て生合成される。こうしたビタミンD3に至るまでの植物体内有機化合物をビタミンD3前駆体と総称する。
アグロインフィルトレーション	弱い減圧下で植物体を直接アグロバクテリウム菌液に浸し感染させる方法である。感染させたアグロバクテリウム目的遺伝子の一過性発現等を可能にする方法である。
イチイ	イチイ科イチイ属の常緑針葉樹。北海道、本州の日本海側の寒冷地に分布し、生長が極めて遅い。1960年代に米国国立がん研究所が植物由来品の抗腫瘍活性スクリーニングを行い、同属のタイヘイヨウイチイ樹皮よりタキソール(一般名:paclitaxel)が見出され、ニホンイチイ(<i>Taxus cuspidata</i>)にも含まれることが明らかとなっている。
イソプレノイド	イソプレン(化学式 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}_2$)を炭素骨格単位としてもつ有機化合物の総称。
一過性発現、一過性抑制	物理的あるいは電気的方法により遺伝子を大量に細胞内に導入すると、細胞内のRNA ポリメラーゼや転写因子が導入遺伝子のプロモーターに結合することにより一時的に急激な遺伝子発現が起こる。これにより導入した遺伝子の効果を評価することが出来る。
遺伝子ノックアウト	ゲノム編集などの技術により、遺伝子コードを変更することで特定遺伝子の機能を欠損させる遺伝子工学の技法。

用語	説明
遺伝子ノックダウン	RNA干渉(RNAi)により配列特異的に遺伝子の発現を阻害し機能を抑制する遺伝子工学の技法。
活性型VD3	本事業原簿(Ⅲ.2.2.1、Ⅳ.2.2.1)では、活性型ビタミンD3(カルシトリオール)を指す略語。生体への活性を高めたビタミンD3の形態である。
カルス	分化した植物組織(外植片)の一部を適当な培地に移して培養すると、脱分化が起こり、細胞分裂を繰り返して無定形の組織塊を生ずる。これをカルスという。
脂質蓄積能	植物細胞中に存在する脂質には、脂溶性ビタミンが溶解して局所的に蓄積していると予想される。こうした脂質によるビタミンなど成分蓄積能力を指す。
ジャガイモシストセンチュウ (potato cyst nematode: PCN)	ジャガイモの難防除病害虫。卵を内包するシストを形成し、このシストの薬剤耐性が高いため、防除が困難である。
ジャガイモシロシストセンチュウ	ジャガイモシストセンチュウと同じく、ジャガイモの難防除病害虫。これまで日本では未発生だったが、平成27年8月に北海道で初めて発生が確認された。
ジャスモン酸メチル	植物の病害虫への防御反応や種子発芽、根の伸長、開花、果実の熟成、老化といった種々の生理活性を有する植物ホルモンであり、またジャスミンの香りの主成分であることから香料としても利用される。植物によるファイトアレキシン、ニコチンなど様々な種類の防御化学物質の産生を誘導することが知られている。
植物細胞培養技術	植物細胞を未分化の状態が無菌的に培養する技術。有用成分の高生産が可能であるだけでなく、Ecology、Traceability、Sustainabilityの点でも優位性がある。ムラサキ細胞培養によるシコニン生産、オタネニンジン細胞培養によるジンセノサイド含有エキス生産、ヤマブドウ細胞培養によるレスベラトロール生産などの実用化例がある。
植物ステロール	植物細胞膜を構成する脂質の一種で、ビタミンD3生合成に関係する成分である。
ストレス栽培	光、温度、栄養、水分等の条件を植物に対して不適な環境条件下(ストレス)にして栽培し、植物が持つ環境適応能力を誘導する技術である。環境条件の変化への適応に伴い植物の代謝経路が変動することを利用し、有用な物質生産を意図する。
セージ	シソ科アキギリ属の多年草または常緑低木で、抗酸化作用を持つハーブとして食品、機能性素材に利用されている。
タキサン化合物	タキサン骨格を有するジテルペノイド化合物。
丹参(たんじん)	シソ科アキギリ属の多年草で、血流改善や抗酸化作用があり、生薬として日本薬局方に収録されている。
土壌改良資材	地力増進法にて「植物の栽培に資するため土壌の性質に変化をもたらすことを目的として土地に施される物」
トリプル四重極LC/MSシステム	質量分析計の1種で、2つの四重極質量分析計の間に衝突室を挟み、連結した構造の測定装置である。前処理装置として、液体クロマトグラフが連結されており、高精度な定量分析と同時に定性分析が可能である。

用語	説明
バイオリアクター	生体触媒を用いて生化学反応を行う装置の総称。植物細胞の場合、細胞を容器内で培養液中に浮遊させ、酸素を供給しながら無菌的に培養を行う。従来からのステンレス製培養装置の他、近年ではポリエチレン製の袋型培養装置が開発されている。
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
袋培養	数L程度の容量の袋内で、液体培地により大量組織培養を行う手法を指す。
不定芽	不定芽とはカルスや葉片など培養組織から分化した芽である。
マイクロチューバー (microtuber: MT)	組織培養条件下で形成される小塊茎(ジャガイモ)
ムラサキ	ムラサキ科の多年草である。抗炎症作用、創傷治癒促進作用があり、生薬として日本薬局方に収録されている。

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」【委託】

用語	説明
スパイクイン	未定量試料における特定の物質に対して一定程度の定量性を持たせるための高い精度で定量された物質を添加すること。
RPKM	RNA-seq による発現頻度解析に用いられる用語で、遺伝子産物鎖長を考慮した発現頻度の数値表記。reads per kilobase of exon per million mapped の略。
代謝フラックス	細胞内の代謝の流れを、時間当たりの化学反応量としてあらわすこと。各代謝反応へどれだけの代謝物が流れているかを把握する事は、スマートセルをデザインする上で重要であるが、遺伝子発現量、タンパク質量、代謝物量だけでは間接的な推定にとどまる。直接的に代謝フラックスを得るには、 ¹³ C flux 解析を用いた測定が必要となる。
超臨界流体抽出 (SFE)	超臨界流体の CO ₂ を媒体に用いた物質抽出方法。超臨界流体の CO ₂ は脂溶性物質の溶解度が高く、細胞内の水溶性/脂溶性成分を効率よく分離することができる。また、超臨界流体の CO ₂ の極めて高い拡散性により、破碎操作なしに細胞内の代謝物を抽出できる。CO ₂ の臨界温度が 31℃ と低いことも、生体物質の解析に対して有利な点である。
トラップカラム	SFE と LC をオンラインで連結する際に両者の間に配置し、SFE からの抽出物を一旦保持する構成要素。SFE と LC は移動相の組成が全く異なるため、SFE 条件下 (CO ₂ /メタノール) では抽出物を保持し、LC 条件下 (水/アセトニトリル) では溶出する性質を持つ新規充填剤を用いた。
イオンペア剤	逆相分配クロマトグラフィーにおいて、イオン性化合物の保持を高めるために移動相へ添加する試薬。目的化合物イオンとは異符号のイオン性試薬でイオン対を形成させることで目的化合物イオンの電荷を中和・疎水性を高め、ODS 等の逆相系充填剤への保持を高める。
13C flux 解析	代謝フラックスを直接測定することができるほぼ唯一の解析手法。 ¹³ C 同位体標識した炭素源を培地に添加し、各代謝物に蓄積される ¹³ C 量を、質量分析計を用いて測定する。これにより、代謝経路上の代謝物量の流れ、分岐を解析することができる。

用語	説明
SFE-LC-MS/MS オンラインシステム	SFE と LC-MS/M をオンラインで連結することにより、スループットと操作性の向上を目指すシステム。SFE の特徴として煩雑な試料前処理が不要であり、MS/MS 測定までを完全自動化できる。さらに、全行程が遮蔽された流路内で完結する事で酸化などによる代謝物の劣化が抑制され、確度の向上が見込まれる。
MRM アッセイメソッド	定量プロテオミクスでタンパク質毎に作成する定量用のメソッド。三連四重極質量分析装置の多重反応モニタリング (Multiple Reaction Monitoring、MRM) モードに由来する。
定量プロテオミクス	タンパク質を定量する方法の一つ。タンパク質をトリプシン消化し、分解生成したペプチドを液体クロマトグラフで分離し、三連四重極質量分析装置の多重反応モニタリング (Multiple Reaction Monitoring、MRM) 法で検出する。
人工内部標準タンパク質	定量プロテオミクス用に設計された人工 (非天然型) の内部標準タンパク質。これを安定同位体標識したものを、内部標準として同位体希釈法による定量を行う。
xcp マシナリー	細菌が細胞外にタンパク質を分泌するためのシステムの一つで、複数のタンパク質が会合した巨大な複合体 (分子装置) として細胞膜を貫通するように存在する。グラム陰性菌に 3 種類存在すると考えられており、xcp マシナリーは Type II 型の分泌装置として知られている。
ポイントオブケアテスト	Point of Care Testing。検査室の無いクリニックや診療所内で、医療従事者が行う検査。検査時間が短縮でき、その場での判断が期待できる。
誘導発現プロモーター、構成発現プロモーター	DNA から RNA の合成 (転写) が開始される遺伝子上流にある配列領域をプロモーターと呼ぶ。直下の遺伝子を特定の物質の存在下や条件化でのみ転写するプロモーターを誘導発現プロモーターといい、恒常的に転写するプロモーターを構成発現プロモーターという。
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。
カラムクロマトグラフィー	化合物の精製法のひとつ。例) イオン交換樹脂をつめた筒状の容器 (カラム) に緩衝液に溶かした CEN 流し、CEN とイオン交換樹脂のイオン結合の差を利用して利用して分離を行う。

用語	説明
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。
P450	シトクロム P450 は細菌から植物、哺乳動物に至るまでのほとんどすべての生物に存在する酸化還元酵素ファミリーに属する酵素の総称である。様々な基質を酸化し、薬物代謝、ホルモンの生合成、脂肪酸の代謝や植物の二次代謝など多くの役割を果たしている。
QConCAT	タンパク質定量法的一种。測定したいタンパク質の定量ペプチドを複数つないだ人工タンパク質 (QConCAT タンパク質) を設計する。QconCAT タンパク質を発現する大腸菌を構築し、安定同位体標識 QConCAT タンパク質を調製する。安定同位体標識 QConCAT タンパク質と測定したいサンプルと混合した後、トリプシン消化により断片化して質量分析を行うことで、複数のタンパク質の濃度比を簡便に相対定量する方法。
非可食バイオマス	食料として利用できない生物由来の再利用可能資源。ここでは植物由来で、分解することで糖類を生成し得るものを指す。
ホスホトランスフェラーゼシステム	ここではホスホエノールピルビン酸依存ホスホトランスフェラーゼシステムを指しており、グルコースをグルコース-6リン酸に変換して細胞内に取り込む際にグルコースと等モルのホスホエノールピルビン酸をリン酸基供与体として消費する。
湿菌体重量	高密度菌体反応において回収、再懸濁した際の菌体の濃度 (g/100 ml)。
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。
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。
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。
azaphilone 骨格	PubChem CID: 57384025。分子式 C ₂₁ H ₂₂ O ₇ で示される化合物。紅麴色素はいずれもこの骨格を持つ。
ドミナントネガティブ法	活性部位や相互作用部位を欠損した機能欠損変異体を高発現することにより、野生型の遺伝子産物の機能をノックダウンする方法。

用語	説明
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。
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。
バイオリファイナリー	生物由来の資源を原料源とする物質生産技術
オイルリファイナリー	化石資源を原料源とする物質生産技術
複数遺伝子制御因子	複数の糖質加水分解酵素遺伝子の発現を個別に制御するタンパク質。既知の転写調節因子はセルラーゼ群やヘミセルラーゼ群の発現を一括で制御するのに対し、複数遺伝子制御因子は一部の酵素の発現を個別に制御する。
バイオマス糖化率	バイオマス酵素糖化で完全分解された場合の単糖量を 100% として、そのうちの何%の単糖が得られたのかを示す指標。酵素糖化反応が進行すると難分解性の部分が残存するため、高い糖化率を達成するために必要な酵素量は飛躍的に増加する。

I. 事業の位置付け・必要性について

1. 事業の背景

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



（図 1）我が国のバイオエコノミー俯瞰図

（出所：2016 年度 NEDO 委託調査「バイオエコノミーの現状分析とスマートセルが変える未来像に関する調査」）

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

2. 政策上の位置づけ

2016年3月に経済産業省産業構造審議会 商務流通情報分科会 バイオ小委員会で「スマートセルインダストリーの可能性」について議論がなされ、同年6月に中間報告書がまとめられた。バイオテクノロジーが生み出す新たな潮流としてスマートセルインダストリーの実現を掲げており、取組の一つとして本事業は位置づけられている。

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

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

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

3. NEDOが関与することの意義

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

4. 実施の効果（費用対効果）

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

に拡大すると予想されている。本プロジェクトでは開発する技術がその内 1 割となる 7 兆円の市場に貢献することを目標としている。

5. 国内外の状況

①我が国の状況

これまで経済産業省及び NEDO にて生物機能活用分野の事業に複数取り組んできた。植物機能の活用に関しては、「植物機能改変技術実用化開発（1999～2005 年度）」を契機に植物代謝工学が認知されるようになり、「植物の物質生産プロセス制御基盤技術開発（2002～2009 年度）」では代謝系の一連の遺伝子群を制御する調節因子の探索や基幹代謝系改変植物の作出等の成果が得られている。また、「植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発／植物利用高付加価値物質製造基盤技術開発（2006～2010 年度）」では、閉鎖型植物栽培施設を活用してタンパク質を物質生産させる技術開発が行われた。その後、経済産業省で実施した「植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発（2011～2015 年度）」の成果により、ホクサン株式会社が世界で初めて遺伝子組換え植物による医薬品原料生産の事業化に成功するなど、組換え植物の栽培に必要な密閉型植物工場における生産技術を大きく進展させてきた。

一方、微生物機能の活用に関しては、「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発（ミニマムゲノムファクトリーPJ）（2001-2005 年度）」及び「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発（2006-2010 年度）」を通じて、物質生産のために不要な不要な遺伝子を削除し必要最小限（ミニマム）のゲノムを残すミニマムゲノムファクトリー戦略を打ち立てて、物質生産のための宿主細胞創製技術等を開発した。また、「革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発」において、目的に応じた最適な遺伝子配列デザインに資する解析、合成手法等を開発し、要素技術を構築してきたところである。

しかし、前述のとおり、特定遺伝子の編集が容易なゲノム編集技術は米国に後れを取っている状況であり、また、遺伝子情報やその発現情報、生産物情報を統合的に解析する技術も未確立であることなど、多様な生物情報の活用や実用システムとして機能させるための技術融合・プラットフォーム化の課題があると認識している。

②世界の取組状況

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

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

アウトプット目標

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

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

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

研究開発項目毎の目標は以下の通り。

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」

【中間目標（2018年度）】

（1）ゲノム編集技術

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

（2）代謝系遺伝子発現制御技術

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

（3）栽培・生育環境による発現制御技術

- ・栽培環境因子と代謝系主要遺伝子の半数の解析を終了させる。

【最終目標（2020年度）】

（1）ゲノム編集技術

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

(2) 代謝系遺伝子発現制御技術

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

(3) 栽培・生育環境による発現制御技術

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

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」

【中間目標（2018年度）】

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

【最終目標（2020年度）】

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

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」

【中間目標（2018年度）】

(1) ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

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

(2) 高生産性微生物設計システムの開発

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

(3) 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

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

【最終目標（2020年度）】

- ・（１）（２）で開発したシステムを用いることにより、従来育種と比較し、物質生産株の開発期間を1/10に短縮することを実証する。
- ・（１）（２）で開発した要素技術、システムを維持・運営するための事業化モデルを策定する。

研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」（2019年度から開始）

【最終目標（2020年度）】

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

2. 事業の内容

本プロジェクトでは以下4つの研究開発項目を実施する。

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」

（１）ゲノム編集技術

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

（２）代謝系遺伝子発現制御技術

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

（３）栽培・生育環境による発現制御技術

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

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」

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

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」

（１）ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

（２）において情報解析技術を用いて構築するシステムで提示される遺伝子配列

の効率的な導入のために、DNA断片の合成からプラスミドの構築、精製、長鎖DNA合成までをハイスループットで行う長鎖DNA合成技術を開発する。

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

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

(2) 高生産性微生物設計システムの開発

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

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

(3) 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

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

研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」（2019年度から開始）

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

3. 事業の計画

全体の研究スケジュールは以下のとおり。

	2016FY	2017FY	2018FY	2019FY	2020FY	2021FY
①植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発（委託）	国産ゲノム編集技術の開発			中間評価 ターゲット	実用植物への適合性の検証及び技術改良	事後評価
	代謝系遺伝子発現制御技術の開発					
	栽培・生育環境による発現制御技術の開発					
②植物による高機能品生産技術開発（助成）		代謝経路、鍵遺伝子の特定 形質転換技術の開発			栽培環境条件の最適化、生産性の実証	
③高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発（委託）	高生産性微生物設計システムの開発		有効性検証	開発システムの改良及びパッケージ化		
	ハイスループット合成・分析・評価手法の開発					
④微生物による高機能品生産技術開発（助成）					システム活用による実用ターゲット開発	

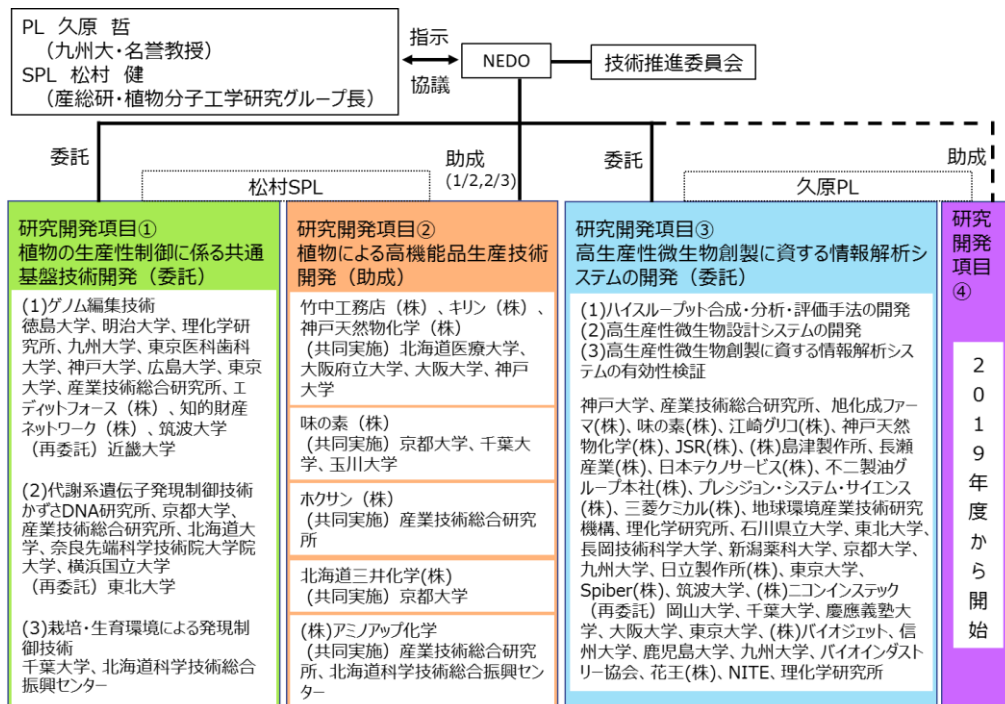
表 2-1 研究開発予算

研究開発項目	2016	2017	2018	2019	2020	合計
①植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発（委託）	519	618	730	-	-	1,867
②植物による高機能品生産技術開発（助成）	180	192	187	-	-	559
③高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発（委託）	885	1,187	1,216	-	-	3,288
④微生物による高機能品生産技術開発（助成）	-	-	-	-	-	-
その他（調査研究等）	29	10	153	-	-	192
合計	1,613	2,007	2,286	-	-	5,906

4. 事業の実施体制

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

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



5. 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や研究開発実施者と緊密に連携し、研究開発の進捗状況を把握する。また、外部有識者で構成する技術検討委員会を組織し、定期的に海外の技術動向も踏まえた評価を受け、目標達成の見通しを常に把握するとともに、必要に応じて研究開発の加速、中止を検討する。

② 技術分野における動向の把握・分析

PMは、プロジェクトで取り組む技術分野について、内外の技術開発動向、政策動向、市場動向等について調査し、技術の普及方策を分析、検討する。なお、調査の効率化の観点から、本プロジェクトにおいて委託事業として実施する。

③ 研究開発テーマの評価

研究開発を効率的に推進するため、研究開発項目①及び②を対象として、ステージゲート方式を適用する。PMは、外部有識者による審査を活用し、2019年度以降の研究開発テーマの継続是非を2018年12月に決定する。

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

表 2-2 研究開発の進捗管理

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

6. 研究開発成果の実用化・事業化に向けたマネジメントの妥当性

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

「実用化」の考え方

当該研究開発に係る新規手法、試作品、ツール等の社会的利用（顧客への提供等）が開始されることをいう。

また、研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」については実用化技術開発に取り組む事業化を目指している。

「実用化・事業化」の考え方

当該研究開発に係る商品、製品、サービス等の販売や利用により、企業活動（売り上げ等）に貢献することをいう。

上記のような考え方のもと、以下の取組を進めている。

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」（委託）

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

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

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」（助成）

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

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

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」

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

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

また、海外のベンチマーク企業 17 社を公開情報等に基づき詳細に調査。一部の企業については、国内においてキーマンインタビューと米国企業 5 社を抽出して現

地訪問調査を実施。それらの知見に基づき、我が国の優位性を生かし得る複数のビジネスモデルの抽出と分析を行い本研究開発項目の事業化を見据えて技術の実用化を進める取組をしている。

本件に関して NEDO がマネジメントを行ったのは以下の点。

- ・「NEDO プロジェクトにおける知財マネジメント基本方針」に基づき、参画機関において「知財の取扱いに関する合意書」を策定させた。合意書では、知財運営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。
- ・研究開発項目③において独立行政法人 工業所有権情報・研修館の知財プロデューサ派遣事業を活用して知財マネジメント支援を強化した。
- ・研究開発成果の普及・利用に向けた取組として、プロジェクト内での連携が促進されるようテーマ連携会議を開催し関係者の情報交換・交流機会を設けた。また、プロジェクトの取組内容の紹介・成果発信・マッチングを目的にイベントへの出展やシンポジウムの開催を年に 1～2 回実施している（表 2-3）。

表 2-3 研究開発成果の普及・利用に向けた取組

方法	概要	頻度	備考
植物テーマ連携推進会議	研究開発項目①と②の連携推進を目的とした会議。	1回／年度	研究開発項目①と②の全事業者が参加。研究開発項目③の代表者も参加し情報共有。
シンポジウム開催、イベント出展（BioJapan等）	本プロジェクトの成果発信とマッチングを目的に、NEDOセミナー、展示を実施。	1～2回／年度	初年度、一般向けにキックオフシンポジウムを実施。2017年度からは、Bio Japanに出展。2018年度は技術相談スペースを設け技術利用マッチングを増やす取組を行う。また、個別の成果発表シンポジウム等も企画・実施。

7. 情勢変化への対応

- ・調査事業等により、高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発は欧米が先行、「学習（AI）」による高度な制御を取り込んだ工業プロセスは開発段階であることを把握。これを受け、2017 年度の追加公募で、AI 基盤開発等の実施者を新たに採択し研究体制を強化した。また、実施者に先行技術調査・解析を精力的に進めるよう促し、現行実施体制の強み・弱みを明確にした上で開発戦略を策定するよう働きかけた。
- ・ゲノム編集技術に関して欧米の出願数増加、周辺技術である導入技術の出願数増加を把握。国内外での特許成立状況の動向を把握。2017 年度に新規ゲノム編集技術、導入技術等の開発内容に予算を重点配分した。また、関連情報はプロジェクト内事業者に速やかに情報共有されているかどうかを確認し、開発成果の知財化方針変更の必要性について実施者に検討を促した。
- ・2017 年から総合科学技術・イノベーション会議の政策討議を受け、バイオテクノロジーによるイノベーションの推進に向けた政府の戦略（バイオ戦略）の検討が開始

された。政策サイドとの情報交換を密に行って状況を把握している。他省庁事業との連携可能性による成果の最大化を意識して関係機関との調整を随時行っている。

8. 中間評価結果への対応

本プロジェクトは2018年度に中間評価の実施を予定しており、現時点において未実施のため記載すべき事項は無い。

9. 評価に関する事項

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

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

III. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」

研究開発項目	目標	成果	達成度
(1) ゲノム編集技術	<ul style="list-style-type: none"> 既存のゲノム編集技術では対応できない独自の新しい機能を有するゲノム編集関連技術（対象領域、精密性、ゲノム設計、細胞毒性、導入効率等）の基本技術を確立し、その新規性、有用性を検証する。 開発した成果の産業利用に向けて、他国の動向も踏まえた知財戦略を策定する。 	新規認識モジュール、切断酵素（特許2件）、他	○
(2) 代謝系遺伝子発現制御技術	<ul style="list-style-type: none"> メチル化誘導、遺伝子発現制御因子解析等の基本技術を確立する。 目的代謝系遺伝子の発現を2倍以上増強又は1/5以下に抑制する。 	モデル実験系において、目的代謝系遺伝子の発現を2倍以上増強、および1/5以下への抑制が確認できた	○
(3) 栽培・生育環境による発現制御技術	<ul style="list-style-type: none"> 目的代謝系における主要遺伝子/産物の発現を5倍程度増強させる技術を確立する。 研究開発項目②で対象とする実用植物において、栽培・生育環境による発現制御技術の有効性を示す。 	設定した栽培環境因子の半数以上において代謝系主要遺伝子の発現変動解析を終了した	○

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」

研究開発項目	目標	成果	達成度
植物による高機能品生産技術開発	<ul style="list-style-type: none"> 対象とする実用植物の栽培、培養系の確立及び遺伝子組換え技術を確立する。 生産性向上に寄与する遺伝子を明らかにし、コスト、性能等の面で総合的に競争力があるとの見通しを得る。 	これまで報告例の少ない実用目的植物種において、一過性遺伝子発現系、および比較的効率の良い遺伝子組換え系の開発に成功した。また、人工環境下栽培技術、および、細胞培養技術開発により、目的植物体および細胞の飛躍的増収が可能になりつつある。	○

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」

研究開発項目	目標	成果	達成度
(1) ハイスループット合成・分析・評価手法の開発	<ul style="list-style-type: none"> 30kb超のDNA合成時間を従来の1/2に短縮する技術を確立する。 LC-MSのハイスループット化により、現状と比較して10倍の分析速度を実現する。 その他、高生産性微生物設計システムを効率的に運用す 	<ul style="list-style-type: none"> 自動DNA合成装置、プラスミド自動構築装置により目標値は達成できた。 LC-MSの自動前処理装置により目標値を達成できた。 	○

	<p>るために必要となるハイ スループット評価技術を確立す る。</p>		
<p>(2) 高生産性微生物設計システムの開発</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ 階層内、階層間の制御ネットワークを推定する階層縦断的な情報解析手法を開発する。 ・ 上記解析手法や代謝流束推定、人工酵素設計技術等を統合し、特定物質の生産性向上に資する重要因子、改変すべき遺伝子配列を提示する汎用的な設計システムを構築する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 多数の情報解析手法を搭載した遺伝子配列設計システムの基盤を構築し、有効性検証課題での有効性を試した。 	○
<p>(3) 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ (1)(2)で開発したシステムを用いて、生産性の大幅な向上に資することを最低1つのターゲットで実証する。 ・ 各国の類似事業・研究開発動向を調査し、我が国の優位性を生かした独自の知財戦略及び事業化モデル(案)を策定する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 少なくとも2つのターゲットでシステムの有効性を検証できた。 ・ 知財戦略に基づく事業化モデル(案)を作成した。 	○

2. 研究開発項目毎の成果

2.1 研究開発項目① 植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発【委託】

2.1.1 ゲノム編集技術

(1) 背景と目的

本事業で開発を目指す技術の全体像

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

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

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

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

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

最終的な仕上がりのイメージ

「A. DNA認識モジュール」においては、我が国独自のシーズであるPPR技術の実用化に加えて、既存の技術より優位な特性をもつ新規モジュール（特にCRISPRのような簡便かつ安価な運用が可能な核酸性モジュール）を開発し、ゲノム編集における基幹技術を確立、拡充する。

「B. ゲノム改変技術」においては、既存のゲノム編集では対応できない独自の新しい機能を有する改

変技術（改変方法、精密性、ゲノム設計、対象領域）を開発する。

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

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

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

開発する技術の利用されるイメージ

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

この目的のため、「ゲノム編集グループ」では、A. 認識モジュール、B. ゲノム改変技術、C. 導入技術、D. インフォマティクスによる支援、E. 知財戦略の5つの重点領域を設定し、13の個別開発課題を推進している。

A. 認識モジュール（数十億塩基対のゲノムから一箇所の配列を認識）

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

A02. 日本発新規ゲノム編集技術の研究開発（産総研、筑波大学）

A03a. 計算科学的手法を利用した新規タンパク質性ゲノム編集モジュールの開発
（東京医科歯科大）

A03b. 進化工学と計算科学的手法を利用した新規核酸性ゲノム編集モジュールの開発（神戸大）

A03c. 核酸化学的手法を利用した新規核酸性ゲノム編集モジュールの開発（産総研）

A03d. 人工核酸および核酸触媒を利用した新規核酸性ゲノム編集モジュールの開発（産総研）

A04. 進化工学および分子動力学的手法による新規ゲノム編集システムの創出
（徳島大、理研、明治大、近畿大）

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

B01～03. 多様なゲノム改変技術の開発（神戸大・西田敬二）

B04. 精密なゲノム設計技術の開発（医科歯科大）

B05. DNA 切断ドメインの改良、および1塩基置換基盤技術の開発（広島大）

B06. オルガネラゲノムの編集技術の開発（理研）

B07. RNA 結合型 PPR によるゲノム機能編集技術の開発（九大）

C. 導入技術、の開発

C01. 高効率かつ低毒性のゲノム編集モジュール導入技術の開発（産総研）

D. インフォマティクスによる支援

D01. インフォマティクスコア（東大；個別開発課題のサポートユニットとして対応）

E. 知財戦略

E01. 各要素技術の知財戦略およびパッケージ化（知的財産戦略ネットワーク株式会社）

(2) 位置づけ、目標値

位置づけ

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

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

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

目標値

（中間目標）

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

（最終目標）

開発したゲノム編集技術が、種々の実用作物の植物体で比較的容易に応用可能であることを実証する。

操作性、性能（精度等々）が CRISPR/Cas9 と同程度かそれ以上で、特段の高度な技術・装置等を要しない技術を開発する。

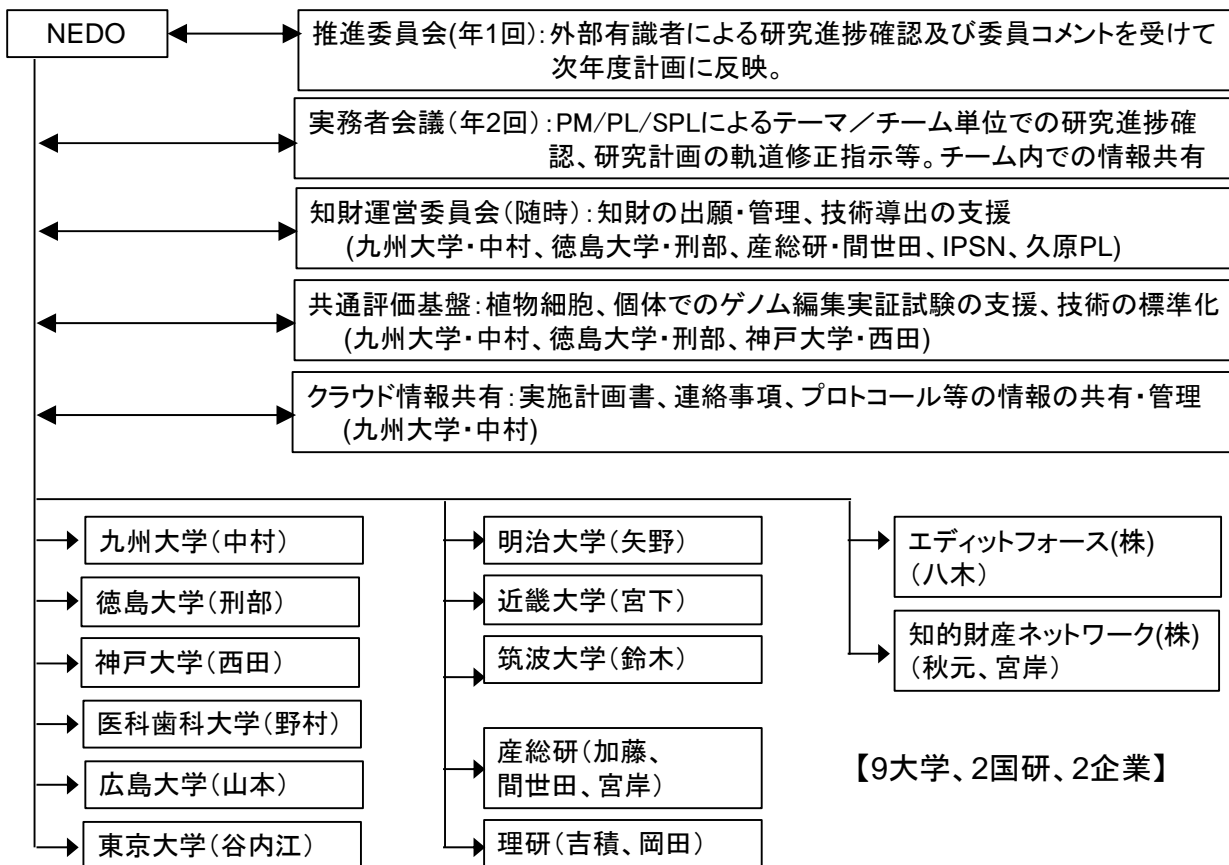
(3) 全体計画

ゲノム編集グループでは、A 認識モジュール、B. ゲノム改変技術、C. 導入技術、D. インフォマティクスによる支援、E. 知財戦略に大別して本事業を推進している。

認識モジュールに7課題；B. ゲノム改変技術に7課題；C. 導入技術、D. インフォマティクスによる支援、E. 知財戦略にそれぞれ1課題の計17課題を設定している。

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

(4) 実施体制



(5) 運営管理

- ・年一回の推進委員会の開催：外部有識者による研究進捗の確認、及び委員コメントを受けて次年度計画に反映する。該当年度（2018年）にステージゲートを実施する。
- ・年二回の実務者会議の開催：PM、PL、SPLによるテーマ・チーム単位での研究進捗の確認、研究計画の軌道修正等を指示する。チーム内での情報共有、課題間連携の調整、などを行う
- ・グループメールによる連絡網、クラウドを利用したファイル共有システム（書類、プロトコル等）
- ・知財運営委員会による組織的な知財戦略の実施（詳しくは11. 知的財産権などの確保に向けた取り組みで記述）
- ・共通評価基盤の整備による開発した技術の標準化、および植物への適用の促進

(6) 実施の効果

ゲノム編集市場の市場規模は2014年時点で2千億円と報告されている。各技術の市場占有率はCRISPR/Cas9が48%、TALEが23%、ZFが12%、その他アンチセンス等で18%とされている。ゲノム編集市場の市場規模は2025年に1兆円に達すると予想されており、本事業で開発する独自のゲノム編集技術により2033年（平成45年）時点でのシェア5%（500億円/年）獲得を目指す。本事業の経費（11億円/5年）から鑑みるに、その費用対効果は著しく高い。

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

ゲノム編集市場

(百万ドル)

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

*piggy bac, flip-in, jump-inなど

(7) 中間目標の達成度

全ての課題において、計画通りに2018年度中に中間目標が達成できる見込みであり、一部の課題では計画を前倒しで進めている状況である。

研究開発項目	中間目標	成果	達成度	今後の課題と解決方針
A. 認識 モジュール	既存のゲノム編集技術では対応できない独自の新しい機能、または多くの機能において上回る性能を有するゲノム編集関連要素技術を開発しモデル生物で実証する。 海外技術に依存せずに産業利用が可能なゲノム編集要素技術を開発する。	・dPPR(基本特許有り)でのPOC獲得。 ・新規モジュールの知財出願 ・新規モジュール候補同定	○ (2018年度中) (一部前倒し)	競争の激しい領域であるため、継続的な特許調査、開発計画への反映が必須。
B. ゲノム改変 技術		・モデル植物細胞での実証試験完了	○ (2018年度中) (一部前倒し)	
C. 導入技術		・モデル植物細胞での実証試験完了	○ (2018年度中)	課題間連携を密にする。
D. インフォ支援		・新規モジュール探索完了 ・編集生物評価系の確立	◎ (計画前倒し)	
E. 知財戦略		・先行特許調査の実施、研究開発計画への反映 ・特許出願3件 ・課題間連携の促進	○ (2018年度中)	

(8) 研究開発の成果と意義

- ・ バイオ市場では、工業、農業分野での飛躍的な伸びが期待される。
- ・ ゲノム編集技術は、実用生物の遺伝子改変を可能にし、遺伝子改変生物作出の期間を 1/5 に短縮できる生産性革命技術であり、中間コストの削減、これまでに作出し得なかった高度な品種改良が可能である。
- ・ 様々な産業分野での利用が可能なゲノム編集の基盤技術プラットフォームを形成する。
- ・ ゲノム編集市場 1 兆円（2025 年予想）の 5%（500 億円/年）のシェア獲得を目指す。

テーマ間連携に向けた取り組み

（ゲノム編集グループ内）ゲノム編集技術の植物への適用には、認識モジュール、酵素ドメイン、導入、が必須であり、それらのパッケージ化を目的としているため、グループ内連携は当初計画から盛り込んでいる。共通評価基盤（九大、徳島大、神戸大）を整備し、開発した各要素技術の植物への適用、プロトコル等の整備、標準化、等を進めている。

（プロジェクト内外）ゲノム編集 G は有用形質に紐づく標的遺伝子を有しておらず、探索も計画していない。そのため、プロジェクト内外との連携も必須事項として計画に盛り込んでいる。

(9) 最終目標の達成可能性

プロジェクト開始時点より現在 2018 年 6 月までの特許動向調査を行ったところ、外的環境の変化に想定外の動きはないため、当初計画通りに進める予定である。欧米、中国の組織的な取り組みが顕在化してきており、さらなる加速の必要があると思慮する。現在、計画通りに進捗しており、最終目標も達成できると考えている。植物での高機能品生産に資する我が国独自のゲノム編集技術プラットフォームの形成を目指す。

研究開発項目	現状	最終目標(2020年度末)	達成見通し
A. 認識モジュール	PPRの実証試験完了、新規モジュール候補の同定	開発した技術の有効性を、1つ以上の植物体、もしくは再分化能を有した培養細胞系で実証する。かつ操作性、性能等が先行技術と同程度であることを示す。 海外技術に依存せずに植物等での高機能品生産に関する産業利用が可能なゲノム編集技術基盤を開発し、パテントプールを形成する。	新規モジュール確保 植物での有用性実証
B. ゲノム改変技術	モデル生物での実証試験完了		認識モジュールとの連結、植物での有用性実証、など
C. 導入技術	モデル生物での実証試験完了		新規導入技術の確立
D. インファマティクス	新規モジュール候補同定、評価系確立		新規モジュール確保、ゲノム編集植物の評価
E. 知財戦略	先行知財調査、知財戦略の第一次案策定		ゲノム編集関連技術特許の取得

(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	
2016	2	3	26	0	0	2	1
2017	5	7	39	10	3	6	1
2018 (実施済み) ()内は予定数	2 (11)	0 (4)	0 (19)	3 (4)	0 (3)	0 (1)	0 (0)
2020年度末までの 累積の見通し	32	10	123	25	6	0	3

(2018年6月30日時点)

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

ゲノム編集グループでは、知財戦略を専門に取り扱う課題（課題担当者：知的財産ネットワーク株式会社）を設定し、先行技術調査の実施、および研究開発計画へのフィードバックを行うとともに、先行技術調査を踏まえた産業に有効かつ進歩性・新規性を有する特許出願支援を行っている。

特許出願、情報開示等においては、知財運営委員会を設置している。プロジェクト内で特許出願の可否を迅速に決定するとともに、国内およびPCT出願費用を事業経費で支援する体制を構築しており、迅速かつ効果的な知財確保が可能である。

また、各課題で開発される技術に関しての第三者による実施を介した技術およびプロトコールの標準化およびデバック作業、開発した技術の植物への適用等を組織的に運用する体制を構築している。

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	1	0	1
2018 出願済み ()内は予定数	0 (4)	1 (0)	0 (0)
2020年度末までの 累積の見通し	15	15	15

(2018年6月30日時点)

2.1.1.1 「A. DNA 認識モジュールの開発」

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

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

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

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

中間目標 ①高性能 dPPR モチーフを連結し、カスタム dPPR 蛋白質を最低 3 個作成する。正常構築確率 10%を目標とする。②試作型 dPPR と FokI を融合し、dPPR-FokI の正常動作確率 2%を達成する。これにより、dPPR-FokI によってゲノム編集が可能であることを立証する。

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

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み PPR 技術の産業利用への道筋は、弊社で進める。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

研究開発項目(1)では、DNA 結合型 PPR 蛋白質によるゲノム編集の実用化を目指している。そのために、① dPPR モチーフの選抜及び任意の DNA 配列に結合する dPPR 蛋白質構築手法の確立、②dPPR 蛋白質を用いたゲノム編集技術の確立を行っている。生化学的手法を用いて dsDNA へのアフィニティー及び特異性を有する天然型 dPPR のスクリーニングを行い、配列特異性を有する dPPR を複数得た(項目①)。さらに、様々な dPPR モチーフ配列を用いて任意の配列に結合する dPPR の作製理論の構築を進めている。また、HEK293T において、ゲノム編集イベント検出のための reporter assay を行い解析を行ったところ、項目①で得られた天然型 dPPR でレポーターの活性化が認められた。また、切断配列の確認のため次世代シーケンシングで配列を確認した結果、標的配列間で in-del が入っていることが分かり、dPPR によるゲノム編集が実証できた(項目②)。

(2) 最終目標の達成可能性

2018 年度中に中間目標値は達成できる見通しであり、概ね計画通りに進捗しているため、最終目標も達成できると考えている。植物での実証試験のための有用遺伝子については選定できていないが、GFP を挿入した植物を用いてまずは進めてみる予定である。

A02「日本発新規ゲノム編集技術の研究開発」（産総研・間世田英明、筑波大学・鈴木石根）

プロジェクトにおける位置づけ 正確なゲノム編集と国内に知財が存在する新しいゲノム編集ツールの開発を行う。すなわち、編集後の配列をデザイン可能で、かつ、ヌクレアーゼユニットも必要としないゲノム編集ツールを開発し、実用植物に利用・適応していく。最終的に、編集ツールのキット化を目指す。

技術的な重要性 現在のゲノム編集のツールは、ターゲットサイトの認識因子（核酸 or タンパク質）とヌクレアーゼユニットの二つから構成され、編集後の配列も予想できない。また、多くのゲノム編集に関する知財が国外に存在する。ここで開発するゲノム編集法は、細菌の抗生物質耐性機構の解析から見いださせた自己ゲノム編集機構（PODiR システム）を利用するゲノム編集法（PODiR 型 GE 法）であり、現時点では国外に未だライセンスされていない新規の手法となり得る。外来ヌクレアーゼを導入せずともゲノム編集可能であり、正確性に優れ（off-target なし）、編集後の配列もデザインすることが可能である。

実施概要（解決する手法） 開発者らは、細菌の抗生物質耐性機構を解析している際に、遺伝子の存在しないゲノム領域から遺伝子が生み出される現象を発見した。そして、この機構が微生物のみならず、動物細胞にも存在していることを突き止めた。そこで、2019年3月までに、自己ゲノム編集機構（PODiR システム）が、広く植物（細胞）等に存在することを明らかにすべく、①ゲノム編集後に機能型となる GFP を作成し、植物体および植物細胞に導入することで、アッセイ植物体およびアッセイ植物細胞を作成する。さらに、②アッセイ藻類を作成するとともに、植物での③PODiR システム稼働の可否を確認する。さらに自己ゲノム編集機構を利用した新規のゲノム編集法（PODiR 型 GE 法）を植物で利用可能なものとするべく、④種々のサイズ・量の核酸を導入し、その効率化を進めるとともに、PODiR システムをさらに応用し、⑤配列に依存しないゲノム編集法を構築する。最終的には PODiR 型 GE 法の効率化と広範な利用を目指し、⑥PODiR 因子の導入や⑦キット化を促していく。

中間目標 ①PODiR 型ゲノム編集（PODiR 型 GE 法）検証用植物体・藻類細胞の構築と検証； ②導入核酸の最適サイズ、最適導入核酸種の決定・検討； ③PODiR システム応用による配列に依存しないゲノム編集法の検討

最終目標 植物での PODiR システムによるゲノム編集法の確立と PODiR システムを応用した配列に依存しないゲノム編集法の構築；② PODiR 因子の発現導入による PODiR 型ゲノム編集法の効率化；③ PODiR 型ゲノム編集キットの作成

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み PODiR システムの産業化を目的としたベンチャー企業設立に向け、VC との面談および PODiR システム関連知財の取得等を行っている。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

細菌の抗生物質耐性機構の解析から見いだした自己ゲノム編集機構 PODiR システムを植物でのゲノム編集に応用すべく、以下検討した。

① PODiR 型ゲノム編集検証用植物体・藻類細胞の構築と検証：

I. アッセイ植物の作成と検証

アグロバクテリウムを用いた感染実験を実施して植物体のゲノムに EGFP および PODiR もしくは任意の配列（nonPODiR）を含む EGFP を導入するためのベクターを構築した。

これらベクターをそれぞれ *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 に導入し、最終的にアッセイ用植物体を作成した。この植物を栽培し、緑色を発する植物体のスクリーニングを行っている。なお GFP を導入した植物体の蛍光の確認、および任意の配列 nonPODiR を導入した植物体の非蛍光の確認は終了している。核酸の導入・発現によるゲノム編集の可否について検討を進めている。

II. アッセイ植物細胞の作成と検証

(独)理化学研究所バイオリソースセンターから購入した T87 細胞に、上記作成したベクターを導入した組換え T87 アッセイ細胞を作成した。コントロールである EGFP を導入した細胞のみからのみ緑蛍光を示す細胞魂を確認している。形質転換体から、ゲノム DNA を調製し、PCR により目的遺伝子が導入されていることを確認し、さらに塩基配列を決定することで、意図したアッセイ細胞が構築されていることを確認した。

III. アッセイ藻類細胞の作成と検証

i) *P. carterae* 種でのアッセイ細胞の構築

P. carterae 種に、藻類で発現可能なプロモーター、GFP 遺伝子、ターミネーターからなる一連のアッセイカセットを導入し、検証用組換え藻類を作成した。コントロールである EGFP を導入した藻類のみ緑蛍光を示すことを確認した。形質転換体から、ゲノム DNA を調製し、PCR により目的遺伝子が導入されていることを確認し、さらに塩基配列を決定することで、意図したアッセイ細胞が構築されていることを確認した。アッセイ細胞で自己ゲノム編集機構が稼働し、GFP を発現し緑色蛍光を発色する細胞を検出することに成功した。GFP を発現し、緑色蛍光を発色する細胞の検出に成功した。

IV. アッセイ藻類細胞の作成と検証 2

上記同様に *Tisochrysis lutea* 種を用いて、III と同様の検討を行ったが、ゲノムの不安定さが確認されたことから、先の検討を断念した。

② 導入核酸の最適サイズ、最適導入核酸種を決定・検討：

PODiR システムでの導入核酸の最適サイズを決定するために、クロラムフェニコール耐性遺伝子を PODiR 配列 (non-ODiR 配列) を融合させ、フレームシフトによりゲノム編集が起きてはじめてクロラムフェニコール耐性を示すアッセイカセットを作成した。そのアッセイカセットを大腸菌に導入し、導入核酸の量および最適サイズを検討し、導入核酸の最適サイズを決定した。

③ PODiR システム応用による配列に依存しないゲノム編集法の構築

PODiR システム応用による配列に依存しないゲノム編集は、申請時、バクテリアにおいてのみ成功していた。そこで、①同様に、アッセイカセット、アッセイ細胞・藻類を作成した。これから検証を行うところである。

(2) 最終目標の達成可能性

2018 年度中に中間目標値を達成すべく、PODiR システムの植物の検証系を多数作成し、いままさに検証を並行して行っている。予定以上の検証系を構築し、栽培時間がどうしても植物の場合はネックになるが、邁進して取り組んでいる。概ね計画通りに進捗しており、最終目標も達成できると考えている。申請時点での計画では、2n の植物での実証は計画に入っていなかったが、検証に向け取り組んでいる。

A03a 「計算科学的手法を利用した新規タンパク質性ゲノム編集モジュールの開発」

(東京医科歯科大学・野村渉)

プロジェクトにおける位置づけ ゲノム中の任意の DNA 配列を認識して操作改変するための新たな国産 DNA 認識モジュールを開発する。知財戦略に基づき、新たな要素技術を創出して我が国のバイオ産業競争力の強化へ結びつける。

技術的な重要性 幅広い産業ニーズに応えるためには、国産ゲノム編集技術として多様な編集手法や配列デザイン性を有する技術群を提供して選択肢を広げることが必要である。

実施概要 (解決する手法) 計算科学的手法を用いて、タンパク質配列データベース (Pfam) を基にした検索、あるいはメタゲノムからタンパク質一次配列への変換 (ORF 予測シミュレーション) で得られる配列情報と BLAST 検索を組み合わせ、繰り返し配列から構成される DNA 結合性タンパク質モチーフ候補を見出す。得られた候補について他のタンパク質データベースを参照して機能予測を行う。候補タンパク質モチーフの DNA 結合親和性、結合特異性を実験的に検証する。リピート構造のモジュール性を利用し、所望の標的 DNA 配列に結合する人工タンパク質を構築するとともに、ゲノム編集酵素としての実用性を検証する。

中間目標 ①リピート性 DNA 結合タンパク質のモジュール性の実証。リピート性モジュールで既存の TALE と比較して分子量が 75%以下のタンパク質を見出す。②標的配列への DNA 結合親和性で 1 (μ M) 以下のモジュールを見出す。既存のタンパク質性のゲノム編集技術との性能比較を行う。

最終目標 モデル実験系 (動物培養細胞) での新規 DNA 切断技術を確立する (反応効率 10%) 。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み 既存技術における問題点である分子量、融合タンパク質構築における適用性においてより優れた技術シーズとなる。ヌクレアーゼのみでなくリコンビナーゼなど他のゲノム編集技術にも適用可能なため汎用的な DNA 結合ドメインが得られる。個別開発課題 (10) 「知財戦略」のサポートを得て、特許性の優れた技術開発を推進して積極的に知財化する。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

タンパク質ドメインの配列がファミリーに分類されているデータベース Pfam から 3 回以上で繰り返し配列が出現する 20-40 アミノ酸の長さの配列を抽出し、それらを一次候補集団とした (各アミノ酸長で抽出された配列の総計が約 720,000 配列)。一次候補集団からの絞込みについて 2 種類の方法を適用した。一つめの方法では、候補配列は属するファミリーに分類されていることから、各ファミリーで 100 以上の配列を含むものについてマルチプルアラインメントをとり、代表配列の抽出を行った。また、核酸結合性能に関連するキーワードで機能分類を行い、標的配列候補を抽出した。二つめの方法では、機械学習を配列抽出に適用した。機械学習では Pfam に収蔵されている配列情報について DNA 結合に関連する配列群とそれ以外の配列群に分類し、配列の特徴からサポートベクターマシン (SVM) を作成した。ディープラーニングにおいてもディープニューラルネットワーク (DNN) を作成した。SVM における高いスコアと配列類似性の低さを基準に一次候補集団のフィルタリングを行い、繰り返し単位が 25-30 アミノ酸の配列について SVM スコアが高く、かつ類似性の低い候補を抽出し、絞込みを行い、5 個に絞込まれた。本成果は、既知の DNA 結合モチーフとの類似性の低い配列候補を抽出し、かつ分子量についてもより短い配列を対象とすることで低分子化が可能であるため、新規 DNA 結合モチーフとして特許を取得し、ゲノム編集技術における標的配列の認識という部分の既存の特許をクリアできる技術につながると考えられる。

(2) 最終目標の達成可能性

2018 年度中に中間目標値は達成できる見通しであり、概ね計画通りに進捗しているため、最終目標も達成できると考えている。当初の想定と比較して多数の候補配列があることが判明したが、機械学習に留まらずディープラーニング技術を活用することで比較的少数への絞込みに成功しており、目標達成に障壁となる段階はクリアしたと考えられる。

A03b 「進化学と計算科学的手法を利用した新規核酸性ゲノム編集モジュールの開発」

(神戸大・西田敬二)

プロジェクトにおける位置づけ 既存の技術よりも優れた特性のある、知財性を有する新たなゲノム編集技術を開発し、産業応用化する。具体的には新規ガイド核酸性ゲノム編集モジュールの開発を行い、その有用性を実証する。

技術的な重要性 ガイド核酸性の DNA 配列認識機構はデザインしやすさから優位性がある。既存の CRISPR は PAM 配列の制約や、サイズの大きさが課題であるため、これらの点においてより優れたモジュールを開発する必要がある。

実施概要 (解決する手法) 自然界に存在するガイド核酸依存的に DNA に結合する分子機構の中から優れた特性のあるものを候補とし、ゲノム編集技術としての利用可能性を実験的に検証しつつ必要に応じて改変を加える。

中間目標 新規モジュール候補の配列選択的な DNA 結合性を実証する。

最終目標 ゲノム編集効率としてオリジナルの 10 倍ないし編集効率 1%以上

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み 2016 年に設立したベンチャー企業、バイオパレット株式会社、を主に介して事業化を進める。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

新規モジュール候補として分子量が従来の SpCas9 よりも小さく、配列デザインの制約が小さいと予想される分子を採用した。まずその機能性を評価するため、ガイド RNA および標的 DNA との結合性を試験管内について試験し、新たなゲノム編集モジュールとしての基本機能を確認できた。さらに、より生理的な条件での動作と、遺伝子発現への作用を検証した。今後は細胞内での活性を検証するとともに、エフェクター酵素活性を付与することによる DNA 配列編集を実証する段階に進む。

(2) 最終目標の達成可能性

中間目標値はほぼ達成できており、概ね計画通りに進捗しているため、最終目標も達成できると考えている。

A03c 「核酸化学的手法を利用した新規核酸性ゲノム編集モジュールの開発」 (産総研・加藤義雄)

プロジェクトにおける位置づけ 核酸塩基をタンパク質のポリペプチド鎖に直接導入する手法により、核酸塩基を持つタンパク質を作り出し、新規のゲノム編集モジュールを構築する。

技術的な重要性 ゲノム編集酵素には、DNA 認識ドメインと DNA 改変ドメインの融合分子が必要であり、細胞への送達や酵素分子の改変や構築を考慮すると、できるだけ小さな融合分子の方が望ましいと考えられる。

実施概要 (解決する手法) 核酸塩基を側鎖として有する人工アミノ酸を取り込ませる独自の手法により、極めて小さな認識ドメインを持つ融合分子を創製する。

中間目標 4 種類の核酸塩基 (T, A, C, G) を持つアミノ酸を化学合成し、タンパク質配列上の任意の箇所への導入効率を検証する。

最終目標 核酸塩基を含むタンパク質を用いた新規のゲノム編集モジュール (CRISPR の半分以下の分子量) を構築し、in vitro 及び in vivo での適用を試みる。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み プロジェクト開始前に出願した特許について、技術移転を通して実用化を目指す。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

新規ゲノム編集モジュールを創製する上では、酵素タンパク質と共有結合等の強固な結合により DNA 認識ドメインが連結している必要があり、その最小構成要素として、酵素タンパク質と同一のポリペプチド鎖上に、DNA と塩基対を形成しうる核酸塩基を提示する手法を考案している。本年度までにおいて、チミン塩基、アデニン塩基及びシトシン塩基を有する人工アミノ酸を合成し、タンパク質ポリペプチド鎖の目的位置へと導入する手法を検証した。

(2) 最終目標の達成可能性

2018 年度中に中間目標値は達成できる見通しであり、概ね計画通りに進捗している。申請時点での当初計画では、植物での検証についてプロジェクト内助成事業との連携を考えていたが、ゲノム編集基盤技術の汎用性を考慮し、培養細胞での検証を見据えて研究開発を進めている。

A03d「人工核酸および核酸触媒を利用した新規核酸性ゲノム編集モジュールの開発」(産総研・宮岸真)

プロジェクトにおける位置づけ 人工核酸を利用した新たな核酸性ゲノム編集モジュール(配列認識、および核酸触媒)の開発を行い、新たなゲノム編集技術のための基盤技術とする。

技術的な重要性 核酸を利用したゲノム編集法はまだ、世界的に発展途上であり、開発の余地がかなりある。今回開発するゲノム編集モジュールを利用することで、既存のゲノム編集法と組み合わせも含め、様々な応用技術の開発が期待できる。

実施概要(解決する手法) 開発ステップとしては①二本鎖DNAを認識および解離する配列認識モジュールと、②DNAを切断する核酸触媒モジュールを別個に開発しつつ、最終的に一つのシステムとして高い機能性が発揮される仕組みを意識した設計とする。また修飾塩基や人工核酸について合成や設計の自由度が実用的なレベルになるように行い、in vitro から in vivo への移行を前提として、連携課題として細胞内への導入および評価する実験系も構築して試験する。

中間目標 ①配列認識モジュールの開発: トリプレット構造により二本鎖DNAを認識して解離させることができる人工核酸PNAおよびLNA等の修飾核酸をベースに、より実用的であり、かつ核酸触媒モジュールとの融合形態が可能な設計を行い、試験管内での機能性を試験し、候補となるデザインを獲得する。核酸認識モジュールを細胞内に導入し、核酸モジュールが実際にゲノムを認識・解離していることを検証する。②核酸触媒モジュールの開発: 核酸触媒としてRNA/DNAをベースに修飾塩基ないし補因子を利用して、細胞内と同様の生理的条件下で一本鎖DNA切断能のある配列をスクリーニングによって獲得する。さらに修飾を施すことにより、細胞内で安定な核酸触媒モジュールに最適化する。2倍以上の活性を持ち、10倍以上の細胞内安定性を有する核酸触媒モジュールを取得する。

最終目標 核酸認識モジュールと核酸触媒モジュールとの機能融合を評価細胞で検討し、有効なモジュール複合体形態を得る。さらに標的となる実用植物種への導入とゲノム編集能を評価し、最適化を図って実用化を進める。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み 各モジュール技術に関して知財を取得し、ベンチャー企業等へのライセンスにより、事業化を進める。ゲノム編集を促進する配列認識核酸モジュール、DNA/RNAを切断する核酸触媒モジュールとして、各モジュールごとでの導出も進めていきたい。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

人工核酸および核酸触媒を利用した新規核酸性ゲノム編集モジュールの開発

研究開発項目(2-d)では、核酸認識モジュール、核酸触媒モジュール、それぞれに対する実験系の構築及び検証実験を行うことを目的としている。核酸認識モジュールの評価系として、ゲノム編集効率の高感度測定のための細胞株の構築を行った。この評価系では、ドナーDNAの相同組換え効率を測定することにより、核酸認識モジュールの動作効率を細胞レベルで調べることができる。核酸触媒モジュールに関しては、in vitro での触媒活性を検証した核酸触媒を基に、ランダム化ライブラリーを構築し、スクリーニング系の検証を行った。スクリーニング効率の最適化後、反応性官能基を有する修飾核酸を用いたライブラリーを構築し、効率の高い核酸触媒の取得を行う。

(2) 最終目標の達成可能性

配列認識モジュールに関しては、有効な配列認識モジュールのデザインを可能にするシステムの構築を既に行い、現在、動物細胞での動作の確認を残すのみである。動作を示唆する類似研究の報告があるので、ゲノム編集効率の促進効果が得られる可能性は十分にあると考えている。核酸触媒モジュールに関しては、現在、スクリーニングにより、高活性な核酸触媒モジュールの取得に取り組んでおり、得られる公算はあると考えている。

A04 「進化工学のおよび分子動力学的手法による新規ゲノム編集システムの創出」

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

プロジェクトにおける位置 ゲノム中の任意の DNA 配列を認識して操作改変するための国内に知財を有する、新たな標的認識モジュールからなるゲノム編集技術を開発する。さらに新規のゲノム編集技術を産業応用化し、我が国のバイオ産業競争力の強化へ結びつける。

技術的な重要性 微生物由来のゲノムからゲノム編集システムに利用できる新規機能ドメインを解析し、さらには見出したドメインを基にアミノ酸置換やドメイン置換などの進化工学的手法およびタンパク質構造学的な分子動力学解析をあわせて行い、従来には存在しない高活性型新規ヌクレアーゼシステムを創出すること、さらに、植物細胞を利用したスクリーニングおよび評価を行って、最終的に植物における高活性型新規ゲノム編集ツール基盤を構築する。

実施概要 (解決する手法) ① 微生物ゲノムから探索した未同定の新規ゲノム編集ツール候補の機能を明らかにし、植物細胞における変異導入を実証する。また新規ゲノム編集ツールを構成するタンパク質のアミノ酸置換やドメイン置換などの進化工学的手法によりゲノム編集ツールの機能性を高める。② 微生物由来のゲノムからゲノム編集システムに利用できる新規機能ドメインを解析し、広範な知財権獲得の基盤を作る。③ 新規ゲノム編集ツールのタンパク質結晶構造学および分子動力学解析を行い、タンパク質因子の改変を行い、高活性型新規ゲノム編集ツール基盤を構築する。

中間目標 ① 未同定の新規ゲノム編集ツール候補を解析し、ゲノム編集ツールとして利用可能なことを実証する (植物細胞/個体での変異導入効率 10-20%)。② 新規ファミリーの探索。新規取得ゲノムデータからの DNA 切断に関わる新規ドメインを探索する。③ 新規ゲノム編集ツールのタンパク質精製、結晶構造解析を行う。また新規ゲノム編集ツールを構成するタンパク質の構造モデリングと分子動力学解析を実施する。

最終目標 ① 植物細胞/個体を用いた変異導入における高活性型ヌクレアーゼシステムの構築 (個体レベルにおける変異導入効率 70 - 100%) ② 微生物由来のゲノムからゲノム編集システムに利用できる新規機能ドメインを解析し、広範な知財権獲得の基盤を作る。③ タンパク質結晶構造学および分子動力学解析をあわせて行い、従来には存在しない高活性型新規ゲノム編集ツール基盤を構築する。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み 新規ゲノム編集システムとして知財を取得し、既存企業 (ベンチャー企業を含む) へのライセンスアウトにより、事業化を進める。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

① 進化工学的手法による新規ゲノム編集ツールの開発: 従来技術 ZFN、TALEN、および CRISPR/Cas9 とは異なる特徴を有する新規ゲノム編集システムを用いて、植物ゲノム上の標的遺伝子改変を検討した。その結果、新規ゲノム編集システムを用いることにより、植物ゲノム上の標的配列上において体細胞変異を導入できることが明らかとなった (中間目標達成)。

② in silico 解析による新規ゲノム編集機能ドメインの探索: H28 年度に構築した新規ゲノム編集システムの検索システムを用いて、メタゲノム DNA 配列データベースより、新たにゲノム編集ツールとして新規に利用可能と考えられる候補遺伝子群を複数見出した (中間目標達成)。

③ 構造学的・分子動力的解析による新規ヌクレアーゼシステムの改変技術確：H28年度に見出した新規ゲノム編集ツールについて、タンパク質精製および結晶構造解析に着手した。また、分子動力的解析を実施するために、新規ゲノム編集ツールについてタンパク質モデリングを検討した（中間目標達成；見込みを含む）。

(2) 最終目標の達成可能性

計画通りに進捗しており、中間目標値はほぼ達成できている。このことから最終目標も達成できると考えている。

2.1.1.2 「B. ゲノム改変技術の開発」

B01、B02、B03 「多様なゲノム改変技術の開発」 (神戸大学・西田敬二)

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

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

実施概要 (解決する手法)

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

中間目標 高効率育種を実現する標的バリエーション変異ライブラリ技術 (Target-G) の構築によって 500 塩基長変異導入 1%、植物での物質生産性を高める新規ノックイン技術として効率 0.5%、多彩な生物材料を対象にできる多コピー改変技術として多コピー細胞 1%を目標とする。

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

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み 2016 年に設立したベンチャー企業、バイオパレット株式会社、を主に介して事業化を進める。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

① 植物でのゲノム特定領域バリエーション化

ゲノムの配列を人為的に操作する技術として、様々なバリエーションを導入するようなことはこれまで直接的には実現できなかった。我々は Target-G 技術によって、任意のゲノム特定領域のバリエーション化に成功した。本プロジェクトではこの技術の植物細胞での適用可能性を検証すべく植物培養細胞を用いて植物に最適化した Target-G 発現コンストラクトを導入した。その結果、標的としたゲノム領域周辺に様々な変異導入が確認された。これにより植物育種を超高効率化できるオンリーワンの技術である特定遺伝子進化加速が実証でき、効率としても中間目標とする 500塩基長1%を達成している見込みである。形質転換植物の作成を進めている。

② 高等植物での高効率ノックイン技術

遺伝子挿入は物質生産等において必須の技術である一方、特に高等植物においては効率が非常に低く、多くの種では実質的にほぼ不可能であった。これに対して本プロジェクトでは植物細胞への導入手法の開発とともにゲノムへの新奇なノックイン機構を採用することで解決を図る。植物細胞は DNA 等の分子の細胞内へのデリバリーが困難である。これまでは細胞壁を消化酵素によって除去したプロトプラストが用いられたが、その場合はその後の再分化効率が悪く、かつ適用できる種が限られるなど、実用性の面で問題があった。近年では電気穿孔法において複雑なパルス进行操作するパラメーター設定が可能になってきたこと、またリポソーム技術についても改良が進んでいることから、前処理が容易でありかつ再分化可能な状態の植物細胞に直接導入する可能性を検討することとした。植物培養細胞を用いて、GFP 発現ベクターを導入すべく様々な条件を検討した結果、細胞壁を保持した状態での植物細胞に高効率に直接導入できる条件を見出すことができた。これによって遺伝子導入効率が飛躍的に高まり、中間目標としての 0.5% のノックイン効率も十分に実現可能となるとともに、さらには新しいゲノム編集技術を迅速に評価する基盤としても活用できるものと期待される。

③ 多コピーゲノム改変

植物は種によってゲノム倍数性が高いものがあり、また一般に葉緑体やミトコンドリアといったオルガネラは多コピーのゲノムを有している。このため、遺伝的表現型の強化と安定性を得るには、すべての遺伝子コピーが均一に改変されることが望ましいが、そのような技術はまだ確立されていない。オルガネラゲノム改変においては、細胞内への送達からさらに二重膜を経てオルガネラ内に至る必要があることがあるが、それに加えて、多コピーゲノム内で純化させるには、①導入オルガネラのみ生存させる選抜マーカー、②非改変ゲノムの積極的排除が必要と考えられる。そのような中で、特定の実験条件下で、葉緑体内において蛍光タンパク質の発現を確認することができた。また導入遺伝子を保持したままの植物体も再生することができた。中間目標として多コピー改変技術として多コピー細胞 1% については、モデルとしている大腸菌において多コピー遺伝子であるトランスポゾン遺伝子を点変異ゲノム編集によって標的とすることで達成されており、これらの知見を併せて植物オルガネラへのゲノム編集技術の導入によって多コピーゲノムの純化手法の確立を達成できるものと考えている。

(2) 最終目標の達成可能性

2018 年度中に中間目標値は達成できる見通しであり、概ね計画通りに進捗しているため、最終目標も達成できると考えている。

B04 「精密なゲノム設計技術の開発」 (医科歯科大学・野村渉)

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

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

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

中間目標 ZFR について酵母での反応効率で 20%を達成する。植物培養細胞では 5%以上の反応効率を達成する。他の DNA 結合モジュールに移植可能な高活性酵素ドメインを 2 種以上得る。

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

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み 既存技術における問題点である線状 DNA に最適化されていない組み換え酵素ドメインではなく、スクリーニングによって線状 DNA に対して高い反応性を有する酵素ドメインが得られるため、より優れた技術シーズとなる。個別開発課題「E. 知財戦略」のサポートを得ることで、特許性の優れた技術開発を推進して積極的に知財化、実用化に取り組む。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

①酵母を利用した高活性型酵素ドメインのスクリーニング：リコンビナーゼは環状 DNA に対する活性に比較して線状 DNA に対しては同じ標的配列に対しても活性が大きく低下することが課題であった。ゲノム編集技術としてより活性の高いリコンビナーゼを開発するために必要なスクリーニング系の開発に着手した。セレクションに用いる酵母は標的配列毎に作成する必要があるため、目的の酵母を効率よく取得するために薬剤で選抜できる系とした。DNA 結合ドメインにジンクフィンガーをもつリコンビナーゼ ZFR の酵母用発現ベクターを構築し、ガラクトースで発現誘導/制御できる系とした。ZFR を発現ベクターに搭載して組み換え活性の評価を行った。ZFR の発現誘導は HA タグを利用してウェスタンブロット法で確認し、ガラクトース濃度の最適化を行った。ZFR 発現ベクターを酵母にトランスフォームし、得られたコロニーについて PCR で組み換え反応の検出を行った。その結果、すべてのコロニーで 100%ゲノムが組み換えられた酵母が得られていた。また、酵母ゲノムを抽出してシーケンス解析を行ったところ予想された組み換え反応が起こり、正確に配列が生成されていることが確認された。最大で 20%程度の効率で組み換え反応が起こることも確認された (中間目標の達成)。植物培養細胞における組み換え反応の評価についてはナズナゲノムから候補となる標的配列を探索してきた。2018 年度中に類似性の高い配列から評価を実施する。上記の酵母での活性検出法を利用して組み換え反応を評価し、活性の高い配列から植物細胞での評価を実施する。

本成果は、リコンビナーゼの分子進化による高活性化のみだけでなく、定量的な評価系としても利用でき、広汎な標的配列に対して活性の高い酵素ドメインを取得する方法論の確立として価値が高い。また、薬剤選抜によって組み換え反応が起こった酵母が 100%得られるため、組み換え反応の検出系としても優れている。

②新規 DNA 結合モジュールと組み合わせた組換え酵素の開発：上記の酵母ゲノムにおける組み換え活性の評価系が新規組み換え酵素の活性評価にも適用できるため、新規 DNA 結合ドメインを利用したリコンビナーゼ遺伝子構築、発現ベクターへの搭載を行うとともに、標的配列を有する酵母の構築も行った。

構築手法は①で示したとおりである。①で構築した酵母での評価系を利用することで組み換え活性の有無の判定を迅速に行え、必要に応じて活性向上のための分子進化実験が行える。

(2) 最終目標の達成可能性

2018 年度中に中間目標値は達成できる見通しであり、概ね計画通りに進捗しているため、最終目標も達成できると考えている。特に申請時点での酵母を用いた評価系に工夫を加え、より優れた評価系を構築できたことで分子進化による高活性化、新規組み換え酵素の評価、最適化を効率的に行えるようになった。そのため最終目標の達成も十分に見通せる成果を挙げていると考えられる。

B05 「DNA 切断ドメインの改良、および1塩基置換基盤技術の開発」 (広島大学・山本卓)

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

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

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

中間目標 ①FokIとDNA切断特性の異なる新規のDNA切断ドメイン1種以上を獲得；②培養細胞での正常動作率(10%)。

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

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み 広島大が知財を有するPlatinum TALENのベンチャー設立の構想があり、当該ベンチャーにて新規NDを含むゲノム編集ツールの事業化に取り組む予定である。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

ゲノム編集におけるDNA切断エフェクタードメインについては、FokI以外のツールがほとんど開発されていない。そこで本研究開発項目では、FokIよりも高い機能性を有する新規ヌクレアーゼドメイン(ND)の開発を進める。FokIとは異なる種に由来する4種の新規ND(ND1~ND4)について機能性検証を実施したところ、ND1およびND2において、切断活性や標的配列の選択性の面でFokIを上回る特性を有することが明らかとなった。また、ヘテロダイマー化やキメラ化などの検証を通じて、これらの新規NDが有する更なる優位性も示唆されている。これらの特徴から、本研究で見出された新規NDは、FokIに代わるスタンダードな技術となり得るものと期待される。

(2) 最終目標の達成可能性

既に中間目標値を達成しており、計画通りに進捗しているため、最終目標も達成できると思われる。なお申請時点での当初計画では、一塩基置換技術への展開を見据えていたが、確立した新規ND技術が、高い切断活性や高い柔軟性を有し、また温度特性の違いもみられていることから、これらの性質を活用した植物ゲノム編集技術の確立を進める予定である。

B06 「オルガネラゲノムの編集技術の開発」 (理研・吉積毅)

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

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

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

中間目標 複数のモデル植物を用いて、Cp および Mt ゲノムを一過のかつ選択的に編集する技術の確立と、モデル植物であるタバコを用いた Cp および Mt ゲノム編集植物体の作出。

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

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み 個別開発課題「E. 知財戦略」のサポートを得ることで、特許性の優れた技術開発を推進して積極的に知財化、実用化に取り組む。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

核酸運搬ペプチドを利用して、①選択的オルガネラゲノム編集技術の確立、②安定的オルガネラゲノム編集実用植物の確立、を行うことを目的としている。これまでに項目①では、モデル植物であるシロイヌナズナ、タバコ、そしてイネの葉緑体におけるゲノム編集 (knock-in) を一過的な解析系で確認した。さらにこれら植物のミトコンドリアゲノム編集に必要な最小相同配列長を同定した。項目②ではタバコ葉緑体ゲノム編集を行い、編集が遺伝した次世代の安定的編集個体を得た。加えて、タバコミトコンドリアゲノム編集では、編集したカルスからの植物体再生を行っている。なお、この個体における編集されたゲノムは PCR で確認した。

(2) 最終目標の達成可能性

2018 年度内に中間目標値は達成できる見通しであり、概ね計画通りに進捗していることから最終目標も達成できると考えている。申請時点での当初計画では、プロジェクト内助成事業との連携を考えていたが、現在のところ実用植物での高機能品生産に関する計画はない。そのため、実用遺伝子として細胞質雄性不稔遺伝子をタバコ Mt ゲノムへ導入する研究を開始した。

B07 「RNA 結合型 PPR によるゲノム機能編集技術の開発」 (九州大学・中村崇裕)

プロジェクトにおける位置づけ ゲノム編集技術の発展型として、世界初の汎用的な RNA 編集を可能にする RNA 結合型 PPR (rPPR) の開発、および実用植物への適用を行う。特に生存に必須な代謝系遺伝子の機能制御などに有用な技術を確立する。

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

実施概要 (解決する手法) 現在、動物培養細胞の系で開発を進めている rPPR を利用した①翻訳活性化技術、②スプライシング制御技術、の植物での有用性を示しつつ、実用化に適した改良を施す。

中間目標 ①植物モデル実験系での翻訳効率を 2 倍に向上、植物個体での検証；②植物モデル実験系でのスプライシング制御 5%。

最終目標 植物モデル実験系 (培養細胞) での rPPR 技術の確立 (①翻訳効率を 10 倍に向上；②スプライシング制御 20%)、および実用植物での rPPR 技術の有用性の実証。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み PPR 技術の産業化を目的に 2015 年に設立したベンチャー企業、エディットフォース株式会社、を介して、事業化を進める。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

① 翻訳制御技術：植物でゲノム編集ツールをコードした DNA を導入する効率は、動物等と比べて著しく低い (動物培養細胞、80%以上；植物培養細胞 10%以下)。そこで、翻訳活性化技術の開発と並行して、本プロジェクトで開発するゲノム編集ツール等の評価および改良を高速かつ多検体で量的に実施できる植物培養細胞を利用した評価系の構築をシロイヌナズナ T87 細胞を用いて行った。合わせて、動物培養細胞での発現、大腸菌での組み換えタンパク質発現、植物形質転換等のベクター構築を統合的に行えるベクター構築システム、および植物用高感度レポータ遺伝子を整備した。本成果は、開発したゲノム編集等ツールの迅速かつ量的な評価や改良に利用できる。

植物における翻訳活性化技術の開発のため、植物で翻訳活性化に機能すると想定されるタンパク質ドメイン十数種を RNA 結合型 PPR の C 末端側に融合したツールを作成した。PPR タンパク質の標的配列を搭載したレポータ遺伝子とともに、上記の植物培養細胞実験系で検証したところ、2~5 倍のレポータ活性、すなわちタンパク質合成量、の向上を観察できた (中間目標値達成)。本成果は、任意の配列を標的として、特定の植物内在遺伝子の翻訳 (最終遺伝子産物量) を向上させるものであり、植物での高機能品生産に利用することができる。実用植物個体での実証試験に着手している。

② スプライシング制御技術：上記の翻訳制御技術と同様に、植物でスプライシングに機能すると想定されるタンパク質ドメイン十数種を RNA 結合型 PPR (rPPR) に融合したツールを作成した。当初計画では、レポータ遺伝子を構築する予定であったが、実用植物の標的遺伝子への適用を先に進めることとした。現在、標的 mRNA に対応する rPPR の構築、生化学的な評価に着手している。

(2) 最終目標の達成可能性

2018 年度中に中間目標値は達成できる見通しであり、概ね計画通りに進捗しているため、最終目標も達成できると考えている。申請時点での当初計画では、プロジェクト内助成事業との連携を考えていたが、RNA 制御のニーズが乏しく、実用植物での独自の Proof-of-Concept (概念実証) の獲得を進めている。

2.1.1.3 「C. 導入技術の開発」

C01 「高効率かつ低毒性のゲノム編集モジュール導入技術の開発」 (産総研・加藤義雄)

プロジェクトにおける位置づけ ゲノム編集を植物で実施するためには、細胞壁を乗り越えて核内まで酵素分子を送達する必要がある。タンパク質分子の物理化学的な性質をアミノ酸配列上で制御し、植物細胞の処理条件の最適化を行った上で、タンパク質導入方法の最適化を行う。

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

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

中間目標 植物培養細胞において従来型のゲノム改変が 10%以上生じる条件を探索する。

最終目標 発現ベクターを用いることなく、植物個体においてゲノム編集効率が 10%に達する条件を見出す。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み 細胞壁を持つ植物において効率的にタンパク質を導入する手法について特許出願を進め、技術移転を通して実用化を目指す。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

ゲノム編集を植物で実施するためには、細胞壁を乗り越えて核内まで酵素分子を送達する必要がある。タンパク質分子の物理化学的な性質をアミノ酸配列上で制御し、植物細胞の処理条件の最適化を行った上で、タンパク質導入方法の最適化を行う。動物細胞においては、遺伝子発現ベクターと比較してタンパク質を導入した場合に、オフターゲット等の副作用が少ないことを明らかにしてきたが、植物細胞の核内へタンパク質を導入する手法が確立されていない。そこで、動物培養細胞の系で開発を進めてきたタンパク質の直接導入法と物理的な導入法の植物での有用性を示す。これまでの研究により、物理的な手法を用いることによって、植物細胞内への生体分子の導入に成功した。

(2) 最終目標の達成可能性

中間目標値はすでに達成しており、概ね計画通りに進捗しているため、最終目標も達成できると考えている。国産のゲノム編集モジュールの開発状況に応じて、本課題との連携を進めていく。

2.1.1.4 「D. インフォマティクスによる支援」

D01 「インフォマティクスコアの開発」 (東大・谷内江望)

プロジェクトにおける位置づけ 新規の国産ゲノム編集モジュールの開発のために、大規模なゲノム、メタゲノムリソースから高速でゲノム編集モジュール関連遺伝子候補群を高速で抽出するソフトウェアを開発し、遺伝子候補のリストアップおよび評価実験を行った。

技術的な重要性 現在実用化されているジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZNF)、TAL エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、CRISPR といったゲノム編集ツールは全て生物がコードしている周期的リピート配列に由来している。例えば、ジンクフィンガーや TAL エフェクターは DNA に二本鎖に結合するための周期的なアミノ酸リピート配列を有し、各リピートユニット内の一部のアミノ酸配列が特異的な DNA 配列との結合様式を定義している。また、原核生物の CRISPR システムにおける免疫獲得課程においても外来 DNA 由来の配列が周期的なリピート配列に挟まれる形で経時的にゲノム上に獲得される。ゲノムプロジェクト以降現在までに、リピート配列を評価するソフトウェアは多数開発されたが、汎用的に配列周期性を高速に評価するソフトウェアは開発されていない。この点に注目し、*k*-mer 評価によって周期的リピート配列を高速かつ教師なしで大規模ゲノムリソースから抽出するソフトウェア SPADE (Search for Patterned DNA Elements) を開発し、ゲノム編集モジュール候補遺伝子群を得て、それらのゲノム編集モジュールとしての性能を評価する計画とした。

実施概要(解決する手法) 周期的リピート配列を高速に捕捉するアルゴリズム SPADE を開発した。これらが既存のゲノム編集関連配列やその他の既知のタンパク質リピート配列を補足できるか検証した。またこれをソフトウェアとしてパッケージ化し、新規ゲノム編集モジュール候補遺伝子群を得た。今後、これらの DNA 結合性、DNA 結合様式を評価する予定である。

中間目標 ①周期的リピート配列を高速に捕捉するアルゴリズムの開発(達成)。②アルゴリズムの評価(達成)。③ソフトウェアのパッケージ化(達成)。④NCBI から取得可能な原核生物ゲノムを SPADE で解析し、タンパク質性の新規国産ゲノム編集モジュール候補遺伝子 20 以上のスクリーニング(達成)。

最終目標 国産ゲノム編集モジュール候補遺伝子として、これまでのゲノム編集モジュールよりも優位なものを 1 以上得る。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み エディットフォース株式会社、バイオパレット社を介して事業化を進める。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

①周期的リピート配列を高速に捕捉できるアルゴリズムを開発した(達成)。

②周期的リピート配列捕捉アルゴリズム評価のために、NCBI で公開されている原核生物ゲノムおよびヒトゲノムを解析し、既知の CRISPR 領域および TAL エフェクター、ジンクフィンガーのアミノ酸リピート配列を高い精度で捕捉できることを示した。DNA 性の周期的リピート配列として捕捉されたものの中には既知の CRISPR 領域、tRNA オペロンなどが含まれた。これらの内、既存の CRISPR 予測ソフトウェアである CRISPRFinder を参考に、周期 58-81 bp およびスペーサー配列長 25-60 bp となるものを得た結果、これが CRISPRFinder および CRISPRDetect と同等の精度で既知の CRISPR 領域を再捕捉した。TAL エフェクターおよびジンクフィンガーについては TPR、ANK、WD40 などを含めて、リピート配列を教師なしで予測する他のソフトウェア XSTREAM および TREKS と比較し、本アルゴリズムが最も高い精度を持つことを示した。また、他のソフトウェアと比較して SPADE は正確にリピート周期を捕捉した。これをもって、ソフトウェアの精度評価とした(達成)。

③本周期的リピート配列捕捉アルゴリズムをソフトウェア SPADE としてパッケージ化した(達成)。

④SPADE をもちいて NCBI で公開されている全原核生物ゲノムをスクリーニングし、アミノ酸周期配列をもつ遺伝子を得た。さらに配列クラスタリングによって、ここからアミノ酸周期配列クラスターを得ることで、新規国産ゲノム編集モジュール候補を収集した。

⑤得られた新規ゲノム編集モジュール候補の検証パイプラインを設計し、検証に着手した。

(2) 最終目標の達成可能性

2018 年度中に達成すべき中間目標は全て達成され、先行して新規タンパク質性ゲノム編集モジュール 128 候補の検証実験を実施中であり、極めて順調に研究開発が進んでいる。また CRISPR のようなガイド RNA 性のゲノム編集ツールが現在世界的にもちいられているが、これまでに SPADE によって核酸性の周期的リピート配列 (7,006 原核生物ゲノム中に 2.3 万領域)も多く捕捉しており、これらの計算機的な分類と検証実験についても他の実施課題テーマと連携して進める。

2.1.1.5 「E. 知財戦略」

E01 「各要素技術の知財戦略およびパッケージ化」（知的財産ネットワーク株式会社・秋元浩）

プロジェクトにおける位置づけ 競合他者の特許調査に基づき効果的な知財化を促進する。各機関知財管理部門と協力して、バックグラウンド IP (BGIP)、フォアグラウンド IP (FGIP) の仮想的な集約を行い、産業化に即したライセンスアウトまでを含む総合的な知財戦略を策定する。

技術的な重要性 知財の各要素技術を共有し、その有効利用に向けた運用が可能なプラットフォームをプロジェクト内で構築する。これにより、知財戦略に基づく開発された知財のパッケージ化が可能となる。

実施概要（解決する手法） ① 知財合意書に基づく開発基礎となる BGIP の共有と、知財運営委員会による運用。② ゲノム編集技術に関する先行技術調査による研究や情報提供および開発への反映と FGIP 取得による知財化支援。③ 知財戦略策定及び推進の支援業務を行う。④ 企業へのライセンスアウトを試行する。

中間目標 個別テーマについて先行技術調査を行い、暫定的な知財戦略を検討し、研究開発内容に反映させる。継続的に知財支援業務を行う。

最終目標 知財の仮想的な集約と知財戦略を策定、実効性のある枠組みを構築するための必要要素の抽出し、ライセンスアウト・インまでを含めた産業に即した総合戦略を策定する。

実用化・事業化に向けた具体的な取り組み 大学の知財部と連携して、成果の知財化を進め、実用化・知財化を推進する。

(1) 中間目標の達成度及び研究開発成果の意義

① 知財の集約： プロジェクト開始早期に A02, A04, A06 の各研究機関と知財合意書を締結し、各研究者の BGIP をグループ内で共有できる体制を構築した。これにより、各研究者の知財の内容を共有できる体制が可能となった。

② 先行技術調査： Cas9 の登場によりゲノム編集関連技術の研究が加速的に拡大する中で、第一次 (H27)、第二次 (H28) と先行技術調査を行い、プロジェクトの各研究の立ち位置を継続的に確認してきた。一方で各研究成果を早期に知財化する必要性が増していることも確認され、各研究者との面談をより密にする必要が出てきている。

③ 知財化支援： 知財運営委員会とそれに続く出願の支援により、円滑な知財化が可能な体制を構築した。研究成果は FGIP として、知財運営委員会の承認を得て NEDO の支援の下に機関からの出願となる。IPSN は、知財運営委員会前後の知財内容の確認、承認後の出願の各段階で支援を行ってきた。また、知財運営委員会では知財合意書範囲外への情報開示、共同研究についても審議を行い、知財の有効活用への道筋の把握も行う。今後、植物等での高機能品生産技術・制御へ繋がる知財の有用活動に向けて、情報開示、共同研究等の増加が予想されるので、具体的ルールなどの整備の対応を行っている。

④ 知財戦略： 研究の各段階で暫定的な知財マップを作成し、それをもとにした知財戦略を立てることが有効と考えられる。PPR 蛋白質を始めとする各要素技術を組み合わせた知財価値の高いゲノム編集ツールの開発、その植物への応用に結びつけるために、知財マップの作成をもとにした暫定的な知財戦略の作成を通じて解決すべき課題の抽出を行った。

(2) 最終目標の達成可能性

競合他者を含む俯瞰的な知財戦略の策定及びゲノム編集グループ内外への情報共有プラットフォームの構築を行うことにより、最終目標の達成は十分に可能であると考えられる。

添付資料

●特許論文等リスト

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名 称	発明者
1	国立大学法人徳島大学	(非公開)	国内	2017年8月21日	出願	(非公開)	刑部敬史他1名
2	国立大学法人東京大学	62663632	米国	2018年4月27日	仮出願	Fast and global detection of periodic sequence repeats in large genomic resources	谷内江望, 森秀人

(Patent Cooperation Treaty: 特許協力条約)

【論文】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ 番号	査読	発表年月
1	Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z & Kondo A	神戸大、東大	Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems.	Science 353, aaf8729	有	2016/09/16
2	山本-エヴァンス 楠、増山 七海 & 谷内江 望 (東京大学)	東大	バーコードフー ジョン遺伝学	医学のあゆみ 259, No. 8, 832-838	無	2016/11/19
3	八木祐介	エ ディッ ト フォー ス	PPR 技術を利用し た新しい DNA/RNA 操作ツールの開発	実験医学、All about ゲノム編 集	無	2016/12/01
4	石黒 宗、森 秀人 & 谷内江 望 (東京大学)	東大	DNA バーコードに よる生命科学実験 の限界突破	実験医学増刊 35, No.5	無	2017/03/09
5	Zenpei Shimatani, Sachiko Kashojiya, Mariko Takayama, Rie Terada, Takayuki Arazoe, Hisaki Ishii, Hiroshi Teramura, Tsuyoshi Yamamoto, Hiroki Komatsu, Kenji Miura, Hiroshi Ezura, Keiji Nishida, Tohru Ariizumi and Akihiko Kondo.	神戸大、東大	Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion	Nature Biotechnology 35, pages 441-443	有	2017/03/27
6	Yachie N, Robotic Biology Consortium & Natsume T	東大	Robotic crowd biology with Maholo LabDroids	Nature Biotechnology 35, 310-312	有	2017/04/11
7	Ghanegolmohammadia F, Yoshida M, Ohnuki	東大	Systematic analysis of Ca ²⁺	Molecular Biology of the	有	2017/05/31

	S, Sukegawa Y, Okada H, Obara K, Kihara A, Suzuki K, Kojima T, Yachie N, Hirata D & Ohya Y		homeostasis in Saccharomyces cerevisiae based on chemical-genetic interaction profiles	Cell 28, 3415-3427		
8	Jo M (共同筆頭著者), Chung AY (共同筆頭著者), Yachie N (共同筆頭著者), Seo M, Jeon H, Nam Y, Seo Y, Kim E, Zhong Q, Vidal M, Park HC, Roth FP & Suk K	東大	Yeast genetic interaction screen of human genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: identification of MAP2K5 kinase as a potential drug target	Genome Research 27, 1487-1500	有	2017/06/08
9	田村泰造、中村崇裕	九大	新規ゲノム編集ツール	化学同人	無	2017/07/14
10	Mitsunobu H, Teramoto J, Nishida K, Kondo A.	神戸大	Beyond Native Cas9: Manipulating Genomic Information and Function.	Trends in Biotechnology 35, 983-996	有	2017/07/21
11	石黒 宗, 増山 七海 & 谷内江 望	東大	オミクス科学における実験数の組合せ爆発に挑む DNA バーコード技術	生化学 89, No 4, 538-545	無	2017/08/25
12	野村 渉	東京医科歯科大	生体分子間相互作用を基盤とする機能分子の創製とケミカルバイオロジーへの展開	Yakugaku Zasshi	無	2017/10/01
13	野村 渉	東京医科歯科大	DNA メチル化制御から精密エピゲノム編集へ	MEDCHEM NEWS	無	2017/11/01
14	谷内江 望	東大	長鎖 DNA 合成のオートメーション化による生命科学の未来	実験医学別冊 あなたのラボに AI×ロボットが	無	2017/12/05

				やってくる, 80-91		
15	山本-エヴァンス 楠, 谷内江 望	東大	AI・LabDroid と交 わす言葉をつくり だす	実験医学別冊あ なたのラボに AI×ロボットが やってくる, 124-129	無	2017/12/05
16	Anne-Ruxandra Carvunis & Trey Ideker 翻訳: 森 秀 人 & 谷内江 望	東大	Siri of the Cell- 生物学は iPhone か ら何を学べるだろ うか	実験医学別冊あ なたのラボに AI×ロボットが やってくる, 116-123	無	2017/12/05
17	Banno S, Nishida K, Arazoe T, Mitsunobu H, Kondo A.	神戸大	Deaminase- mediated multiplex genome editing in Escherichia coli.	Nature Microbiology 3, 423-429	有	2018/02/05
18	T. Imai., Y. Yagi, T. Nakamura	エ ディッ ト フォー ス	Recent Progress Toward RNA Manipulation with Engineered Pentatricopeptide Repeat Proteins	Applied RNA Bioscience 151-160	有	2018/04/11
19	Endo H, Hanawa Y, Araie H, Suzuki I and Shiraiwa Y*	筑波大 学, 関 東学院 大学	Overexpression of Tisochrysis lutea Akd1 identifies a key cold-induced alkenone desaturase enzyme.	Scientific Reports 8, 11230.	有	2018/07/25

【外部発表】

(a) 学会発表・講演

番号	発表者	所属	タイトル	会議名	発表年月
1	西田敬二 *招待講演	神戸大	DNA 塩基変換反応を利用した点変異導入型ゲノム編集技術	新化学技術推進協会 ライフサイエンス技術部会・材料分科会 講演会	2016/08/17
2	野村 渉	東京医科歯科大	TALE および dCas9 を利用した化合物による標的遺伝子特異的な転写活性制御技術	第 10 回バイオ関連化学シンポジウム	2016/09/07
3	西田敬二、荒添貴之、島谷善平、坂野聡美	神戸大	切らないゲノム編集技術	日本植物学会 第 80 回大会 P-1515	2016/09/16
4	野村 渉 *招待講演	東京医科歯科大	生体分子間相互作用を基盤とする機能分子の創製とケミカルバイオロジーへの展開	第 60 回日本薬学会関東支部大会	2016/09/17
5	中村崇裕 *招待講演	九大	PPR モチーフを利用した DNA/RNA 操作技術の開発	日本植物学会 第 80 階大会 理事会主催シンポジウム：ゲノム編集～現状と未来	2016/09/18
6	谷内江 望 *招待講演	東大	オミクス計測限界の破壊—超マルチプレクス化、AI、ロボティクス	第 5 回生命医薬情報学連合大会, お台場	2016/09/30
7	八木祐介 *招待講演	エディットフォース	Beyond the genome editing	BioJapan2016	2016/10/12
8	中村崇裕 *招待講演	九大	PPR タンパク質を利用したゲノム編集技術の開発	第 4 回 TR 推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会	2016/10/31
9	中村崇裕 *招待講演	九大	PPR モチーフを利用した DNA/RNA 操作技術の開発	第 9 回 DNA 鑑定学会	2016/11/11
10	谷内江 望 *招待講演	東大	BARCODE FUSION GENETICS FACILITATES	International Conference on	2016/11/16

			MEASURING THE DYNAMICS OF MOLECULAR NETWORKS	Single Cell Research 2016, Tokyo	
11	野村 涉	東京医 科歯科 大	化学誘導二量体形成法を応用したゲノム編集ツールの開発	「細胞を創る」研究会 9.0	2016/11/21
12	野村 涉	東京医 科歯科 大	化合物による誘導が可能な分割型人工ヌクレアーゼの構築とその評価	第 39 回日本分子生物学会年会	2016/12/01
13	野村 涉	東京医 科歯科 大	分割型メチル化酵素の会合様式が与えるメチル化効率への影響	第 39 回日本分子生物学会年会	2016/12/02
14	中村崇裕 *招待講演	九大	PPR モチーフを利用した DNA/RNA 操作技術の開発	植物科学シンポジウム 2016 植物科学とイノベーション	2016/12/07
15	谷内江 望 *招待講演	東大	DNA バーコードによる分子・細胞動態計測の拡張	定量生物学の会 第八回年会	2017/01/08
16	野村 涉	東京医 科歯科 大	Improved split DNA methylase activity by optimization of assembly on target sites	2017 Keystone Symposia Conference	2017/01/09
17	野村 涉	東京医 科歯科 大	Chemical-inducible artificial transcription factors based on sequence-specificity of TALE and dCas9	2017 Keystone Symposia Conference	2017/01/10
18	西田敬二 *招待講演	神戸大	Genome editing by targeted deaminase	PAG XXV- Plant & Animal Genome Conference.	2017/01/15
19	谷内江 望 *招待講演	東大	DNA barcode technologies for high-throughput measurements of molecular and cellular dynamics	Physical Approaches for Growing and Evolving Populations, Tokyo	2017/02/11
20	中村崇裕 *招待講演	九大	第 4 世代ゲノム編集技術	次世代バイオ産業創出研究会	2017/02/13

21	西田敬二 *招待講演	神戸大	切らないゲノム塩基編集の 多様な生物への応用	第 60 回日本放線 菌学会学術講演会	2017/03/10
22	谷内江 望 *招待講演	東大	Development of synthetic cell systems to understand molecular and cellular dynamics	Annual Meeting in Awaji for Systems and Synthetic E. coli Biology, Hyogo	2017/03/15
23	吉積毅	理研	ペプチドを用いたゲノム編 集周辺技術の開発	第 58 回植物生理 学会年会シンポジ ウム「植物機能の 解明を目指すゲノ ム編集技術」	2017/03/17
24	野村 渉	東京医 科歯科 大	分割型部位特異的ヌクレ アーゼを利用した化合物誘 導型ゲノム編集技術の開発	日本化学会 第 97 春季年会	2017/03/19
25	西田敬二、荒 添貴之、坂野 聡美、近藤昭 彦 *招待講演	神戸大	塩基変換による切らないゲ ノム編集	日本農芸化学 2017 年度大会 シ ンポジウム 3SY05 ゲノム編 集技術の実用化へ の期待と課題	2017/03/19
26	西田敬二 *招待講演	神戸大	より精密なゲノムデザイン 改変を可能とする点変異ゲ ノム編集	第 2 回デザイン生 命工学研究会	2017/03/21
27	Yachie N *Invited Talk	東大	Dissecting dynamic progression of heterogeneous cell populations using DNA barcode and genome editing technologies	Canada, CIFAR Genetic Networks Workshop, Tokyo	2017/04/27
28	Yachie N *Invited Talk	東大	DNA barcode technologies for high-throughput measurements of molecular and cellular dynamics	50th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Tokyo	2017/05/10
29	谷内江 望 *招待講演	東大	生物学における様々な計測 限界の突破ー分子バーコー ド、ロボティクス、AIー	バイオインダスト リー協会"未来へ のバイオ技術"勉	2017/05/15

				強会「生物学実験における限界の破壊と新素材革命の加速」	
30	西田敬二 *招待講演	九大	DNA塩基を書き換えるゲノム編集技術の開発	第58回ヒューマンサイエンス・バイオインターフェースーバイオ技術移転のための交流の場ー	2017/05/23
31	中村崇裕 *招待講演	九大	DNA、RNAの両方を操作する次世代型ゲノム編集技術の開発	第58回ヒューマンサイエンス・バイオインターフェースーバイオ技術移転のための交流の場ー	2017/05/23
32	西田敬二 *招待講演	神戸大	Development of a Targeted Nucleotide Editing Tool Target-AID and its Applications	第17回日本蛋白質科学会年会	2017/06/20
33	谷内江望 *招待講演	東大	細胞プログラミングと現実世界プログラミング	研究産業・産業技術振興協会	2017/06/29
34	今井崇喜、八木祐介、中村崇裕	エディットフォー	PPRタンパク質の基質認識機構の解明とそれを用いた新規DNA/RNA操作技術への応用	日本ゲノム編集学会第2回大会	2017/06/29
35	森川萌音、高野勇太、山岸彩奈、加藤義雄、中村史	産総研	ナノニードルアレイを用いたCas9蛋白質の直接物理的輸送	日本ゲノム編集学会第2回大会	2017/06/29
36	谷内江望 *招待講演	東大	生物学者の現実世界プログラミング	ロボット・シェアリング共同研究開発キックオフシンポジウム「AI×ロボットが切り拓くライフサイエンスの未来」	2017/07/06
37	西田敬二 *招待講演	神戸大	DNA塩基変換反応を利用した点変異導入型ゲノム編集技術	日経バイオテクプロフェッショナルセミナー「ゲノ	2017/07/10

				ム編集が生み出す新ビジネス」	
38	中村崇裕 *招待講演	九大	PPR 技術による物質生産から創薬応用まで	日経バイオテクプロフェッショナルセミナー「ゲノム編集が生み出す新ビジネス」	2017/07/10
39	八木祐介、中村崇裕	エディットフォース	PPR 蛋白質を利用した RNA 操作技術の開発	第 19 回日本 RNA 学会	2017/07/19
40	西田敬二 *招待講演	神戸大	Targeted base editing in plants by Target-AID, the CRISPR/Cas9 deaminase fusion.	XIX international Botanical Congress	2017/07/25
41	青木 裕美・吉積 毅・沼田 圭司	理研	植物オルガネラゲノム編集を可能にする DNA-ペプチド複合体の創製	第 27 回バイオ・高分子シンポジウム	2017/07/27
42	吉積 毅・沼田 圭司	理研	植物への導入を目的とした巨大 DNA とカチオン性ペプチドから成る複合体の機能解析	第 27 回バイオ・高分子シンポジウム	2017/07/27
43	谷内江 望 *招待講演	東大	DNA バーコードによる分子・細胞動態計測の加速	日本プロテオーム学会 2017 年大会 JHUPO 第 15 回大会	2017/07/27
44	西田敬二 *招待講演	神戸大	DNA を直接書き換えるゲノム編集技術「Target-AID」	第 46 回植物バイオシンポジウム	2017/08/10
45	Wataru Nomura, Daisuke Matsumoto, Tsukasa Hashimoto, Taisuke Sugii, Hirokazu Tamamura	東京医科歯科大	Development of chemical-inducible artificial transcription factors based on sequence-specific DNA binders	the 254th ACS National Meeting and Exposition	2017/08/23

46	青木 裕美・吉積 毅・沼田 圭司	理研	DNA-ペプチド複合体を用いたミトコンドリアゲノムへの遺伝子導入	第 35 回日本植物細胞分子生物学会	2017/08/28
47	吉積 毅・沼田 圭司	理研	ペプチド法を用いて組換えたシロイヌナズナ葉緑体の in planta 選抜	第 35 回日本植物細胞分子生物学会	2017/08/28
48	中村崇裕	九大	DNA、RNA の両方を操作する第四世代ゲノム編集技術	Innovation Japan	2017/08/31
49	西田敬二 *招待講演	神戸大	点変異導入型のゲノム編集技術 Target-AID の開発	第 83 回酵母研究会講演会	2017/09/05
50	野村 渉 *招待講演	東京医科歯科大	生体分子間相互作用を制御する機能性ペプチド/タンパク質の設計と応用	熊本大学先端科学研究部セミナー	2017/09/06
51	野村 渉 *招待講演	東京医科歯科大	Development of genome editing and gene regulation systems utilizing specific DNA binding domains	熊本大学 HIGO program seminar	2017/09/07
52	八木祐介、中村崇裕	エディットフォース	PPR タンパク質の核酸認識機構を利用した新規 DNA/RNA 操作技術の開発	第 69 回生物工学会	2017/09/12
53	西田敬二 *招待講演	神戸大	Targeted nucleotide substitution by genome editing artificial enzyme	IBS-Nature Conference on Frontiers in Genome Engineering	2017/09/27
54	八木祐介	エディットフォース	PPR タンパク質を用いた新しい核酸編集技術について (ゲノムからトランスクリプトームまで)	Bio Japan	2017/10/13
55	中村崇裕 *招待講演	九大	Genome/Transcriptome Editing technologies, based on PPR protein engineering	BioJapan 主催者セミナー	2017/10/13
56	西田敬二 *招待講演	神戸大	生命プログラムの書き換え、ゲノム編集技術とその応用	CSJ 化学フェスタ	2017/10/19

57	中村崇裕 *招待講演	九大	PPR motif as a New DNA/RNA Binding Module for Genome/Transcriptome Editing	AFELISA	2017/11/08
58	八木祐介、中村崇裕	エディットフォース	PPR蛋白質を応用したRNA操作技術の開発	第40回日本分子生物学会年会	2017/12/07
59	猪股梨華、Jing Zhao、加藤義雄、宮岸真	産総研	三重鎖人工核酸(TFO)による二本鎖DNAの認識とゲノム編集応用への試み	第40回日本分子生物学会年会	2017/12/08
60	Wataru Nomura, Daisuke Matsumoto, Taisuke Sugii, Takuya Kobayakawa, Hirokazu Tamamura	東京医科歯科大	Differential regulation of endogenous genes in an orthogonal manner by distinct chemically inducible systems	International Conference on Epigenetics and Bioengineering	2017/12/15
61	中村崇裕 *招待講演	九大	国産ゲノム・RNA編集技術の医療での展開	シンポジウム「革新的医薬・核酸医薬の開発」	2018/01/10
62	八木祐介 *招待講演	エディットフォース	日本発のゲノム・トランスクリプトーム編集技術～エディットフォースの挑戦～	第17回IPSN講演会	2018/01/12
63	西田敬二 *招待講演	神戸大	Genome Editing with Non-Nuclease Editors from Bacteria to Plants	Keystone Symposia	2018/01/27
64	木村光宏・吉積毅・沼田圭司(理研)	理研	ハイスループット解析を可能にするペプチド-DNA複合体による遺伝子導入法の開発: Centrifugation-Assisted Peptide mediated plant	園芸学会 平成30年度春季大会	2018/03/25

			Transformation (CAPT) 法の簡便性と遺 伝子導入効率の評価		
65	吉積 毅・沼田 圭司 (理研)	理研	融合ペプチドを用いたシロ イヌナズナ葉緑体形質転換 体作出の試み	第 59 回日本植物 生理学会年会	2018/03/30

(b) 新聞・雑誌等への掲載

番 号	所属	タイトル	掲載誌名	発表年月
1	九大	「ゲノム編集 日本出遅れ」	日本経済新聞	2017/04/07
2	エディットフォー ス	「九大発 VB3 億円調達」	日本経済新聞	2017/04/12
3	神戸大	「ゲノム編集 海外開拓」	日本経済新聞	2017/07/14
4	エディットフォー ス	「九州大学における産学官の 取り組み」	飛翔	2017/07/15
5	エディットフォー ス、九大	「新バイオ技術始動」	読売新聞	2017/08/31
6	エディットフォー ス	「日本の未来企業」	日刊工業新聞	2017/11/20
7	神戸大	「ゲノム編集に新たに基礎技 術 ミチをひらく」	朝日新聞	2017/12/07
8	東京医科歯科大	ゲノム編集技術に関する紹介 記事	日経産業新聞	2017/12/19
9	神戸大	「安全性高いゲノム編集技 術」	日経産業新聞	2018/02/01
10	(エディット フォー ス)	「ゲノム編集関連技術の近年 の動向」	日本ゲノム編集 学会メルマガ第5 号	2018/02/21

2.1.2 代謝系遺伝子発現制御技術

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

(1) 背景と目的

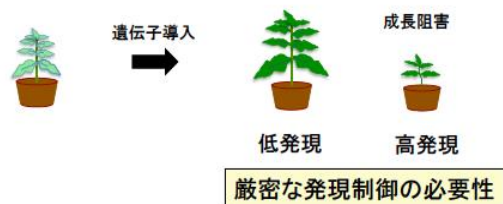
遺伝子組換え作物を実用化する際の深刻な問題として、導入遺伝子の高発現は成長阻害をもたらす現象や世代が進むにつれて導入した遺伝子発現が不安定化する現象が頻繁にみられることがよく知られている (Stam et al., 1997) (図2.1.2.1-1)。遺伝子組換え植物の商品化に際しては、多数の遺伝子組換えシステムを作製し、それらを

長期間にわたって検査し、安定なシステムを選抜する必要があるために、時間がかかり、かつ、膨大な開発コストがかかることが主に問題となっている。組換え遺伝子発現の不安定化は、遺伝子導入部位でのクロマチン構造のエピジェネティックな修飾変化に起因すると推定されているが、未だに不安定化を防ぐ方法は確立されていない。また、従来の遺伝子組換え作物においては、単独あるいは数種類の遺伝子を組換えることに重点が置かれていたが、合成生物学の

世界的な急展開を考えれば、代謝経路の全体を遺伝子導入するなど、数十の遺伝子セットを遺伝子導入し、安定的に発現させる新たな技術の需要が高まっている。さらに、開発した遺伝子組換えシステムを、次のニーズに応じて、最小限の時間とコストで改変できることを可能とするために、「ゲノム編集」の機能を持たせた染色体領域の開発も急務である。遺伝子の発現抑制・サイレント化は、酵母やショウジョウバエ、哺乳動物では、詳細な解析がなされており、エピジェネティックなクロマチン構造変換によることが知られている。一般的には、遺伝子からの転写はオープンなクロマチン構造の場合にONになり、クローズなクロマチン構造（所謂ヘテロクロマチン構造）の場合には転写はOFF・サイレント化される（図2.1.2.1-2）。植物でも、導入遺伝子のクロマチンの構造を人為的に操作可能になると、前述の遺伝子組換え体における多くの問題も解決可能になる。

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

・ 過剰発現による成長阻害回避



・ 世代を越えた安定発現の達成

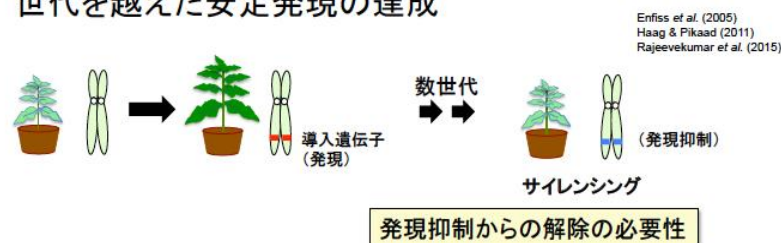


図 2.1.2.1-1 植物での遺伝子組換え体技術の課題

課題解決への着想

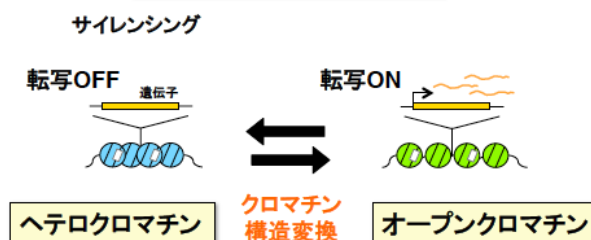


図 2.1.2.1-2 課題解決へ向けての着想

(2) 位置づけ、目標値

本技術開発では、染色体工学の手法と植物への長鎖 DNA 導入技術を駆使し、「遺伝子発現制御カセット」を植物ゲノム上で構築を進める(図 2.1.2.1-3)。これをベースに「ゲノム編集」を行う。ここに多重連結した合成経路遺伝子群を導入し、植物内で安定に発現させる方法を開発する。平成 30 年度までに、複数の代謝系遺伝子を含む長鎖の遺伝子コンストラクトを植物に遺伝子導入し、数世代にわたって安定的に遺伝子を発現させる技術を確認する。その際、植物バイオテクノロジー分野での有用性が高い代謝産物の多くがイソプレノイド経路で生合成されていることを鑑み、長鎖遺伝子コンストラクトにはイソプレノイド主要経路の 7 個ないし 8 個の遺伝子を発現制御可能な形で導入し、目的代謝系遺伝子を 5 倍以上発現させることを目標にする。平成 32 年度までの最終目標は、「ゲノム編集」機能を有する染色体領域を確立し、目的代謝系遺伝子を 20 倍以上発現させること、世代を超えて

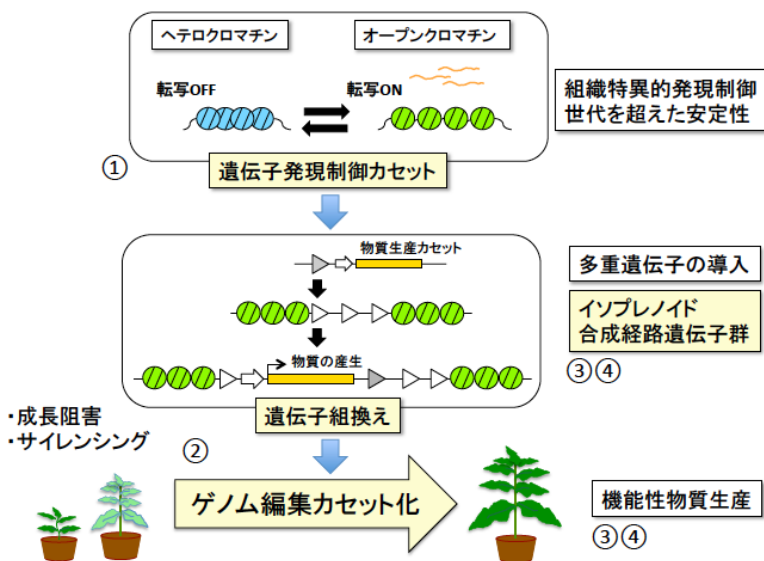


図 2.1.2.1-3 本プロジェクト全体の構想

で遺伝子発現が安定的に維持されていることとする。具体的な中間目標値と最終目標値を以下に示した。

・中間目標値(H30年度)

①「遺伝子発現制御カセット」をタバコ BY-2 細胞で 50 系統、シロイヌナズナ植物体で 5 系統得る。レポーター遺伝子の発現量が 5 倍以上増減した BY-2 細胞を 5 系統得る。特許仮出願する。②「遺伝子発現制御カセット」を「ゲノム編集」が可能になる構築に改変する。③ BY-2 (5 系統)、シロイヌナズナ (5 系統) のゲノム挿入部位を決定し、シングルコ

・最終目標値(H32年度)

①「遺伝子発現制御カセット」をタバコ BY-2 細胞とシロイヌナズナ植物体で最適化し、レポーター遺伝子の発現量が 20 倍増減した系統をそれぞれ 5 系統得る。②「遺伝子発現制御カセット」挿入部で「ゲノム編集」可能であることを示す。③④「遺伝子発現制御カセット」に IPP 生合成経路に加え異種テルペノイド合成酵素遺伝子を連結挿入する。これを導入したシロイヌナズナ植物体および細胞株を作製し、導入遺伝子の発現が 20 倍変動し、かつ、IPP (下流テルペノイド) 量が 5 倍上昇した系統を 5 系統得る。2 世代後のシロイヌナズナ形質転換体 (T4 世代) における mRNA 発現誘導率が 20% 以上低下しない系統を得る。

(3) 全体計画

事業項目	28年度				29年度				30年度				31年度	32年度
	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期		
①遺伝子発現制御カセットの構築		→			→				→					
		→			→				→					
					→				→		→			
									→		→			
									→		→			
									→		→			
									→		→			
②遺伝子発現制御カセット部位でのゲノム編集		→			→				→					
		→			→				→					
					→				→		→			
									→		→			
									→		→			
									→		→			
③「ゲノム編集後の安定性評価」		→			→				→					
		→			→				→					
					→				→		→			
									→		→			
									→		→			
									→		→			
									→		→			
④「イソプレノイド合成経路遺伝子群の発現制御技術の開発」(再委託担当:東北大学)		→			→				→					
		→			→				→					
					→				→		→			
									→		→			
									→		→			
									→		→			

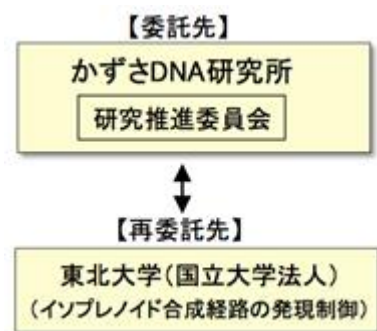
本計画では、① 遺伝子発現制御カセットをゲノムへ挿入するベクターの構築を進める。遺伝子発現制御カセットをレポーター遺伝子と共にタバコ培養細胞 BY-2 及びシロイヌナズナ植物個体へ遺伝子導入する。共焦点レーザー蛍光顕微鏡などにより異所的部位でのクロマチンの構造変換とレポーター遺伝子の発現を検出する。

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

③ タバコ培養細胞と世代交代が早いシロイヌナズナを用いて導入遺伝子の発現を検討する。染色体構造への影響を調べる目的で組換え体シロイヌナズナのゲノムを解析する。

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

(4) 実施体制



(5) 運営管理

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

(6) 実施の効果

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

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度	今後の課題と解決方針
①遺伝子発現制御カセット導入部の開発・②ゲノム編集技術の開発・③安定性評価	遺伝子発現制御カセット導入株を、タバコBY-2細胞で50系統、シロイヌナズナ植物体で5系統得る。レポーター遺伝子の発現量が5倍以上増減したBY-2細胞を5系統得る。BY-2(5系統)、シロイヌナズナ(5系統)のゲノム挿入部位を決定し、シングルコピーで生育・増殖に影響のない系統を選抜する。	遺伝子発現制御カセット導入株が、タバコBY-2細胞で200系統以上、シロイヌナズナ植物体で16系統得られた。BY-2細胞では、制御因子により、レポーター遺伝子の発現量が1/5に減少する結果を得た。これまでに解析した遺伝子発現制御カセット導入株、BY-2(17系統)、シロイヌナズナ(16系統)のうち、シングルコピーでのゲノム挿入部位を持つ系統をそれぞれ4系統と6系統を得た。	○ (H31年3月までに中間目標を100%達成見込み)	遺伝子発現制御カセット導入株が多数得られたので、今後は制御因子で発現量が5倍以上増減し、生育・増殖に影響のない1コピー系統をさらに増やし、ゲノム挿入部位を決定する。遺伝子組換の実例を示し「ゲノム編集」化を完成する。
④イソプレノイド合成経路遺伝子の発現制御技術の開発	遺伝子発現制御カセット導入ベクターにIPP合成経路全遺伝子を連結挿入し、シロイヌナズナ植物体および細胞株へ導入する。導入遺伝子の発現が5倍変動し、かつ、IPP(下流イソプレノイド)量が2倍以上昇した系統を3系統以上得る。	放線菌及び分裂酵母由来のIPP合成経路の7遺伝子について、各発現カセットを連結したバイナリーベクターを作製し、それをタバコで一過的に発現させることで、全遺伝子が一斉に過剰発現することを確認した。それを遺伝子発現制御カセットに導入するためのバイナリーベクターを作製した。形質転換培養細胞の評価を行うための代謝物の抽出・解析条件を確立した。	○ (H31年3月までに中間目標を100%達成見込み)	独立形質転換培養細胞ラインを多数得て、制御カセットの効果を統計的に評価する。形質転換の際、IPP合成経路遺伝子が発現してしまっていると生育に影響が出る可能性があるため発現カセットのプロモーターも誘導型にした(対応済み)。

(8) 研究開発の成果と意義

①- (1) アグロバクテリウムバイナリーベクターpRIBACの作製

遺伝子発現制御カセットのマーカージ遺伝子には、薬剤選択マーカであるNPTII遺伝子、顕微鏡を用いた蛍光観察に適したEYFPタンパク質をコードする遺伝子、植物における組織染色に適したGUSタンパク質をコードする遺伝子の3つ

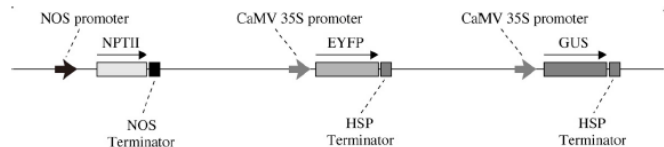


図 2.1.2.1-4 遺伝子発現制御カセット上のマーカージ遺伝子

が配置されている(図2.1.2.1-4)。これらの遺伝子の上流にはプロモーター、下流にはターミネーターが配置された、遺伝子発現カセットとなっている。各遺伝子発現カセットのうち、NPTIIとGUS遺伝子カセットはpRI-201-AN-GUSベクター(TAKARA)を、EYFP遺伝子はpJET3ベクター(Ohzeki et al., 2012)を鋳型として、PCR法により作成した。また、3つの遺伝子カセットは、それぞれ共通の対合末端を持つNheIとSpeIサイトを利用したライゲーションにより連結し、3つの遺伝子が連なったマーカージ遺伝子カセットを遺伝子発現制御カセット導入用アグロバクテリウムバイナリーベクターpRIBAC(TACベクターを参考に改良:Liu et al., 1999; Shibata and Liu, 2000)のNheIとSpeIサイトへ挿入した(図2.1.2.1-5)。

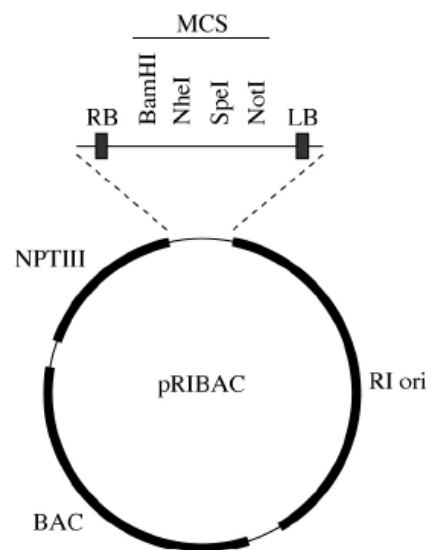


図 2.1.2.1-5 アグロバクテリウムバイナリーベクターpRIBACの構築

次に、これらの大腸菌由来の遺伝子発現制御カセットベクタープラスミドをSpeIで切断し、パルスフィールドゲル

電気泳動 (PFGE) でサイズを確認した (図2.1.2.1-6A)。これらのプラスミドの泳動パターンには異常は観察されなかった。プラスミドを大腸菌からアグロバクテリウムの細胞に導入し、T-DNAとして植物ゲノムに組み込ませる必要がある。このため、アグロバクテリウム細胞株LBA4404 (TAKARA) のエレクトロコンピテントセルを用いてプラスミドの導入を行った。プラスミドを導入したアグロバクテリウム細胞を、カナマイシン (30 μ g/ml) を含んだLBプレートに撒き、コロニーを形成させた。シングルコロニーを複数個拾い培養し、ここからDNAを回収してFGE解析をした。アグロバクテリウムの持つプラスミドDNAは、大腸菌の場合と同様にアルカリ-SDS法で回収し、制限酵素NheIとXhoIで処理したのち、PFGEで解析した (図2.1.2.1-6B)。解析した半数以上の株で、導入したBACプラスミドと同じ泳動度のバンドが確認され、アグロバクテリウム細胞内においても、構築プラスミドは安定に維持されることが確認できた。

①- (2) 遺伝子発現制御カセット導入タバコ培養細胞BY-2の取得タバコ培養細胞BY-2の培養

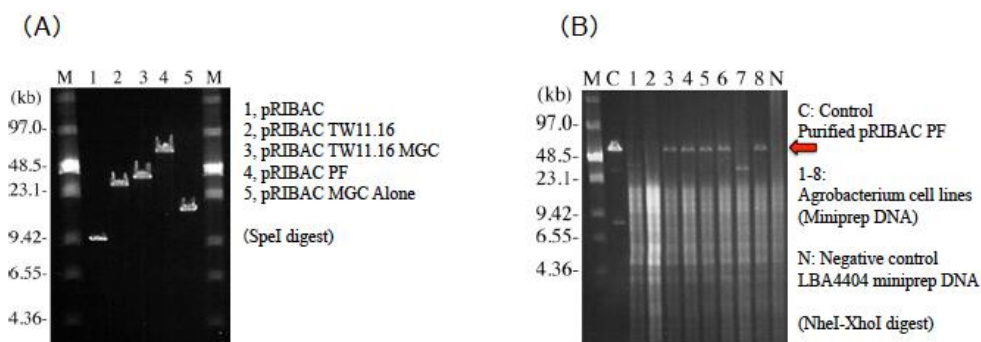


図 2.1.2.1-6 アグロバクテリウムバイナリーベクターpRIBAC の大腸菌での構築 (A) とアグロバクテリウムでの安定性確認 (B)

理化学研究所バイオリソース研究センター実験植物

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

タバコ培養細胞 BY-2 への遺伝子発現制御カセットの導入

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

EYFP 観察

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

GUS 染色

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

ゲノム DNA の精製

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

qPCR

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

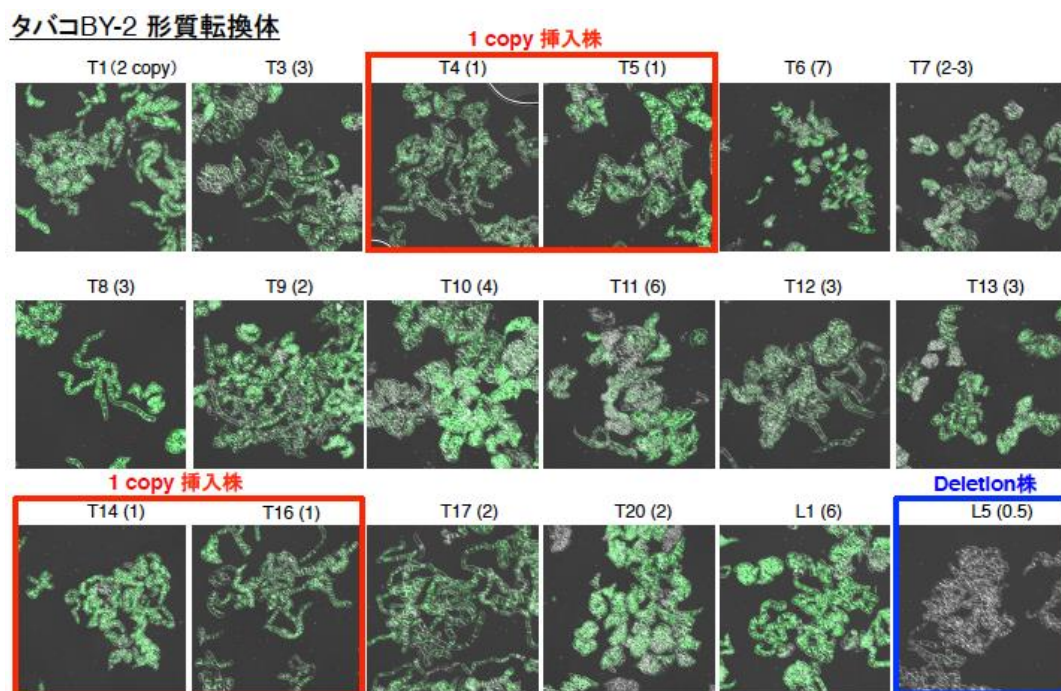


図 2. 1. 2. 1-7 遺伝子発現制御カセット導入タバコ BY-2 系統におけるマーカー遺伝子の発現 (EYFP 蛍光顕微鏡観察)

遺伝子発現制御カセットを、アグロバクテリウムを利用してタバコ培養細胞 BY-2 に導入した。その結果、28 個の選択薬剤耐性カルスが形成された。さらに、0.5 mg/ml セフトアックスと選択薬剤 (100 μ g/ml カナマイシン) を含む寒天培地で 28°C で植え継ぎを繰り返した。最終的に 19 個のカルス (PF 株) について安定に培養維持することが出来た。

遺伝子発現制御カセットには、NPTII (カナマイシン耐性)、EYFP (EYFP 蛍光)、GUS (β -グルクロニダーゼ) 遺伝子の 3 種類のマーカー遺伝子が連結されている (図 2.1.2.1-4)。取得した 19 株について、遺伝子発現制御カセットの挿入

を確認するために、EYFP 蛍光観察 (図 2.1.2.1-7, -8 高倍率)、GUS 染色 (図 2.1.2.1-9) を行った。その結果、L5 系統を除いたすべての系統で EYFP 遺伝子と GUS 遺伝子の発現を確認出来た (図 2.1.2.1-7, -8, -9)。

さらに、遺伝子発現制御カセットの挿入コピー数を確認するために、ゲノム DNA を精製して qPCR による定量を行った (図 2.1.2.1-10)。その結果、1 コピーで含む株も 4 株取得できていることが確認できた (図

2.1.2.1-7, -8, -10)。唯一 EYFP 蛍光と GUS 活性を示さなかった L5 系統に

ついては、ゲノム当たりのコピー数が 0.5 以下と見積もられたことから、DNA 左側半分から NPTII (カナマイシン耐性を示す) までの T-DNA しかゲノム挿入されていないと考えられる (図 2.1.2.1-7, -9, -10)。残りの全ての系統で EYFP 蛍光強度、GUS 活性、NPTII 耐性は、コピー数計測結果と整合性があり、コピー数計測結果の信頼性の高さを示している。また、遺伝子発現制御カセット挿入系統ではコピー数に依存して EYFP 遺伝子からの発現量は増えるが、細胞ごとに非常に均一な発現を維持することが判明し、クロマチン構造の安定性が示唆された (図

タバコBY-2 形質転換体

ほぼ全ての細胞でEYFPの均一な発現を確認

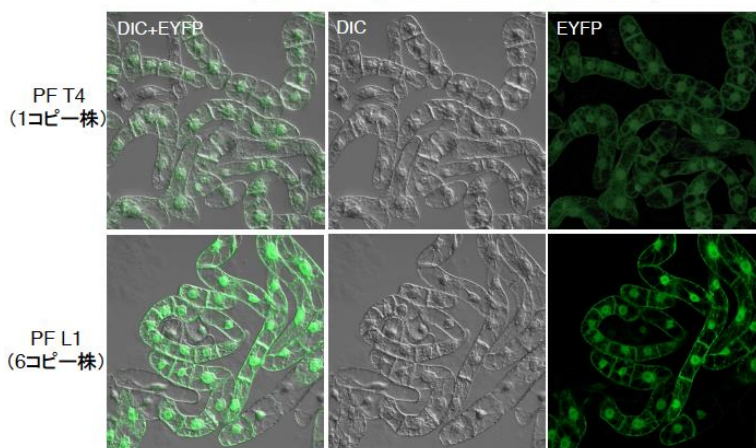


図 2.1.2.1-8 遺伝子発現制御カセット導入タバコ BY-2 系統における EYFP 遺伝子の発現 (高倍率)

2.1.2.1-8)。

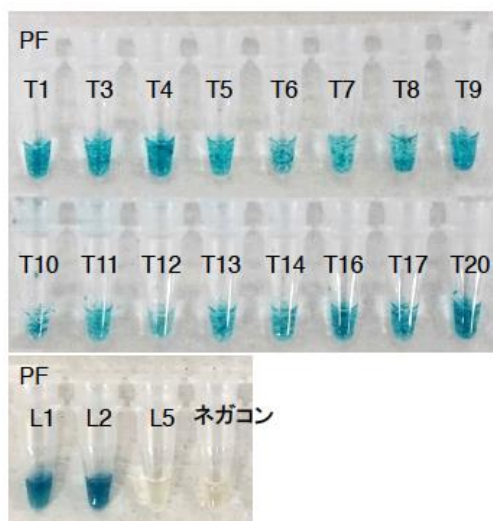


図 2.1.2.1-9 遺伝子発現制御カセット導入タバコ BY-2 系統におけるマーカー遺伝子の発現 (GUS 染色)

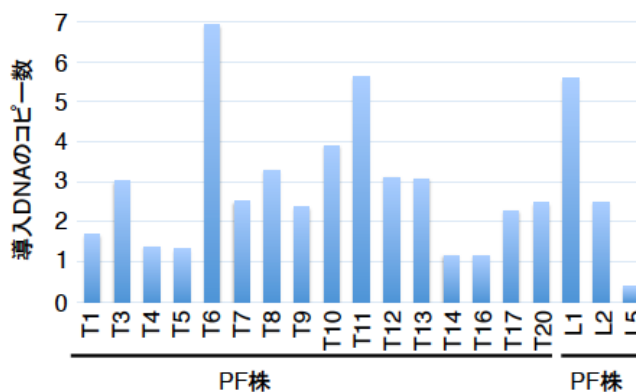


図 2.1.2.1-10 遺伝子発現制御カセット導入タバコ BY-2 系統における qPCR による導入 DNA のコピー数解析

①- (3) BY-2 遺伝子発現制御カセット導入株のクロマチン免疫沈降 (ChIP) によるクロマチン構造の解析

BY-2 細胞からの粗核画分調製とクロマチンのクロスリンク

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

クロマチン免疫沈降 (ChIP)

-80℃保存した粗核画分の沈殿 (約 0.2ml、約 0.4g の細胞に由来) を 0.5ml のソニケーションバッファー (20mM トリス塩酸 pH8.0、1mM EDTA、0.025%SDS、0.5mM DTT、1.5 μ M アプロチニン、20 μ M ロイペプチン、40 μ M MG132) に懸濁し、ピコラプター (ダイアジェノード) の適当な条件で (例えば 30 秒 ON/30 秒 OFF のサイクルを 15 サイクル) 核破壊とクロマチンの切断を行った。4℃で 20,000x *g* (スイングローター) の遠心を 10 分行い、上清をクロマチン画分として回収した。クロマチン画分の容積が 2~5 倍量の範囲でそのバッファー組成が 0.3M NaCl、20mM トリス塩酸 pH8.0、0.5mM EDTA、5%グリセロール、0.05%SDS、1%TritonX-100、0.5mM DTT、1.5 μ M アプロチニン、20 μ M ロイペプチン、20 μ M MG132 になるように整え、予め抗体を結合させた Protein G 磁気ビーズ (Dynabeads, サーマフィッシャー) を混合した。インプット DNA として免疫沈降反応に使った 1/10 のクロマチン画分を 4℃に保持した。0.5ml の免疫沈降反応あたり 1 μ g のモノクローナル抗体と 5 μ l の Protein G 磁気ビーズを用いた。ローテーターで緩やかに攪拌しながら一晩 4℃の反応をさせた後、ビーズを磁気で集め、0.3ml の洗浄バッファー (0.55M NaCl、20mM トリス塩酸 pH8.0、1mM EDTA、5%グリセロール、0.1%SDS、1%TritonX-100) で 3 回洗った。以後の処理はインプット DNA に対しても同様に行った。磁気ビーズを 80 μ l の溶出バッファー (0.15M NaCl、50mM トリス塩酸 pH8.0、10mM EDTA、0.5%SDS、0.1mg/ml RNase A) で懸濁して 37℃1 時間以上の処理をした後、20 μ l の 0.2mg/ml Proteinase K を加え、50℃で 1 時間以上蛋白質を消化した。その後 65℃で一晩加熱してクロスリンクを外した。磁気でビーズを除いた溶液 0.1ml から、DNA を MinElute PCR Purification Kit (キアゲン) を用いて精製し、50 μ l の TE で溶出した。溶出した DNA の 2.5 μ l を SYBR Green 蛍光色素を用いたリアルタイム PCR の鋳型に用いた。

免疫沈降に用いた抗体

normal mouse IgG (SantaCruz SC2025)
anti-H3K9me2 (モノクローナル抗体研究所 MABI0307)
anti-H3K27me3 (モノクローナル抗体研究所 1E7)
anti-H3K36me3 (モノクローナル抗体研究所 MA333B)
anti-H3K4me3 (モノクローナル抗体研究所 MA304B)

PCR に使用したプライマーセット

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

PCR 条件

2xSYBR premix ExTaq (Takara)	5 μ l
50 μ M プライマー 1	0.1 μ l
50 μ M プライマー 2	0.1 μ l
鋳型 DNA	2.5 μ l
H2O	to final 10 μ l

95°C60 秒の後、以下の 3 ステップを 40 サイクル。

95°C10 秒

62°C30 秒

72°C60 秒

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

BY-2 遺伝子発現制御カセット導入株を 2 ヶ月間、挿入遺伝子の発現の選択圧であるカナマイシンを含まないムラシゲスクグ培地で培養し、挿入領域である合成 DNA、カナマイシン耐性遺伝子 (NPTII)、蛍光マーカー遺伝子 (EYFP)、酵素マーカー遺伝子 (GUS)、およびゲノム上の発現遺伝子としてのテロメラーゼ遺伝子 (TERT)、ヘテロクロマチン化されている領域として 3 種のトランスポゾン (MITE, I-94, g31i) のヒストン修飾をクロマチン免疫沈降 (ChIP) で評価した (図 2.1.2.1-11)。挿入遺伝子は、いずれもオープンクロマチン型修飾であるヒストン H3 の 36 番目のリジンのトリメチル化 (H3K36me3) とヒストン H3 の 4 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3) のレベルは、共に必須遺伝子 TERT よりも高いレベルである。一方、抑制型クロマチンであるトランスポゾン領域は、H3K36me3 や H3K4me3 修飾はほぼ検出できないのに対して、クロズドクロマチン (ヘテロクロマチン) 型修飾であるヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) とヒストン H3 の 9 番目のリジンのジメチル化 (H3K9me2) のレベルは非常に高いレベルで検出された。逆に、遺伝子発現制御カセットは、抑制型の H3K27me3 や H3K9me2 修飾は殆ど検出されていない。これらの解析結果から、クロマチン構造変換を誘導しない条件では、選択圧なしの長期間にわたって、遺伝子発現制御カセットは、オープンなクロマチン構造を安定に維持できることが判明した。

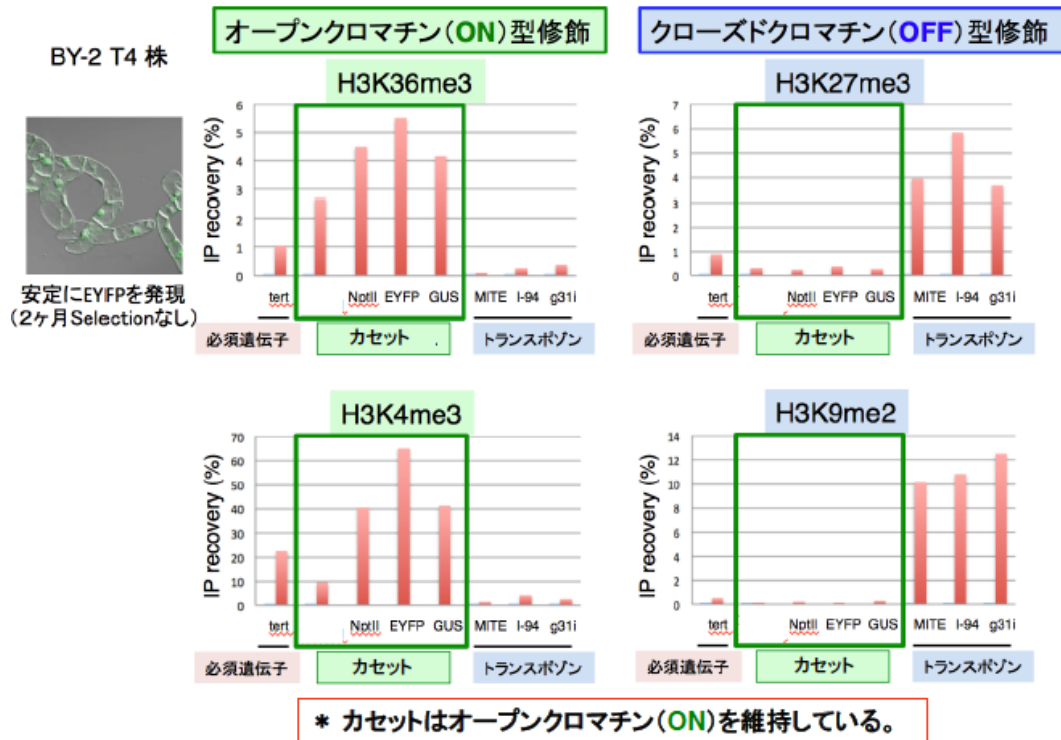


図 2. 1. 2. 1-11 遺伝子発現制御カセットを 1 コピーで持つタバコ BY-2 系統の ChIP によるクロマチン構造の解析

①- (4) 遺伝子発現制御カセット 1 コピー導入株への ON/OFF 制御因子の導入

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

EYFP 観察

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

PCR 条件 :

2xSYBR premix ExTaq (Takara)	5 μl
50 μM プライマー 1	0.1 μl
50 μM プライマー 2	0.1 μl
鋳型 DNA	1.0 μl
H2O	to final 10 μl

95°C60 秒の後、以下の3ステップを40 サイクル。

95°C10 秒

62°C30 秒

72°C60 秒

ON/OFF 制御因子の効果の検証を行った。EYFP 遺伝子と GUS 遺伝子の発現を示し、1 コピーで遺伝子発現制御カセットを含む株 T4 と T5 に、OFF 側抑制因子の導入を行った。その結果、T4 株、T5 株共に、各制御因子について200 程度の耐性カルスが生じた。選択培地にはテトラサイクリン系の薬剤は含まれておらず、OFF 側の効果が現れていることが期待できる。その可能性を検証するために、各因子について10 個のカルスを

ランダムに選択し、挿入遺伝子のセレクションなし、かつ制御因子のセレクションありの状態（カナマイシンなし、ハイグロマイシンありの寒天培地）で約1 ヶ月継代を行い、EYFP 蛍光の観察を行った。その結果、レスポンスの違いはあるものの、EYFP の蛍光が大幅に低下したカルスが複数個観察された（図 2.1.2.1-12:

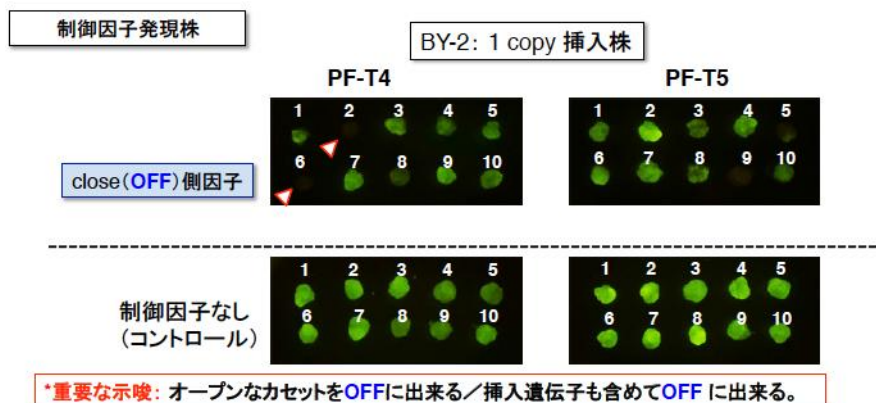


図 2.1.2.1-12 BY-2 遺伝子発現制御カセットの OFF 側因子結合による ON から OFF への転換 (EYFP 蛍光観察)

特に△印ではコントロールに比べ EYFP 蛍光量が 1/5 以下に減少)。カセット DNA の定量の結果、1 コピーで維持されていることが判明した。これらの結果は、期待通りに ON から OFF へ変換されたことを示している。これら EYFP 発現が抑制されたカルスが複数得られたことは、遺伝子カセット全域が期待通り OFF 側へ転換された可能性を強く示唆している。制御因子を導入していないカルスについてはその様な傾向は観察されなかった。

①- (5) 遺伝子発現制御カセットの導入シロイヌナズナの取得

シロイヌナズナへの遺伝子発現制御カセットの導入

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

地 (Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (和光純薬), 3% Sucrose, 2.3 mM MES, pH 5.7, Gamborg's Vitamin Solution (Sigma), 0.8% Agar) に播種し、セレクションを行った。

EYFP 観察

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

遺伝子発現制御カセットを、アグロバクテリウムを利用してシロイヌナズナに導入した。約 40000 粒の種について選択を行い、9 粒の種からカナマイシン耐性システムを取得できた。さらに、遺伝子発現制御カセットの挿入を確認するために、マーカー遺伝子 EYFP の発現を EYFP 蛍光の観察により行った。その結果、その全てで EYFP の蛍光

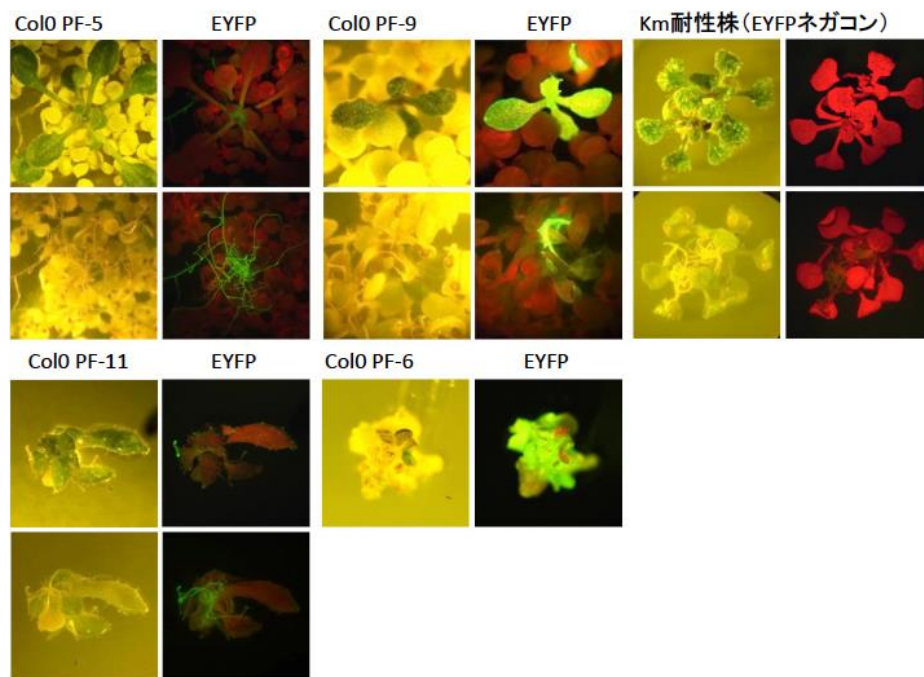


図 2.1.2.1-13 遺伝子発現制御カセット導入シロイヌナズナにおける EYFP 蛍光観察の例 各系統上段が葉側からの観察 下段が根側から観察

確認できた (図 2.1.2.1-13)。6 系統については、主に根で EYFP 蛍光が観察された。1 系統については、植物体全体で強い EYFP 蛍光が観察された。この系統では、発現しやすいかつ発生や生育への影響の少ないゲノム領域にカセットが挿入された可能性がある。今後このようなカセット挿入システムをより多く取得する必要がある。2 系統については根などで EYFP 蛍光が観察されたが、異常な形態を示した。発生や生育に影響を及ぼす領域にカセットが挿入されたと考えられる。これらの結果から、少なくとも遺伝子発現制御カセットがシロイヌナズナのゲノムに挿入された系統も多数取得することも可能であり、タバコ BY-2 細胞同様遺伝子発現制御カセット上の EYFP 遺伝子からの発現も安定に維持されていることが判明した。

② 遺伝子発現制御カセットの遺伝子それぞれを、他の任意の遺伝子や配列とカセット交換反応により、別々に入れ替えることのできる「ゲノム編集」を行う。組換え反応実験に使う材料はすべて揃えたので、今後は組換え反応の実例を示し、「ゲノム編集」カセット化を完成させる。

③ 「多重遺伝子の安定性評価」

タバコ BY-2 細胞とシロイヌナズナのゲノム解析を行った。これらを参照として今後は遺伝子発現制御カセットのシングルコピー導入システムで導入部位の決定と安定性について調べる。

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

④- (1) MVA 経路遺伝子の取得

IPP 合成経路には、メバロン酸 (MVA 経路) と非メバロン酸経路 (2-C-メチル-D-エリトリトール 4-リン酸経路、MEP 経路) の2種類が存在する。一般に、真核生物、古細菌は MVA 経路を有しており、原核生物は MEP 経路を有している。高等植物は、主にサイトゾルで機能する MVA 経路と色素体内の MEP 経路を併せ持つ。また、原核生物の中でも、一部の放線菌は MEP の他に MVA 経路を有するものが存在する。そこで、異種生物由来 MVA 経路を植物に導入し、その効果を検証することとした (図 2.1.2.1-14)。

MVA 経路は、3 分子のアセチル CoA を

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

各遺伝子は、バイオリソースセンターから入手、あるいは、ゲノムを鋳型とした PCR にて増幅し、シーケンシングにて確認した。各遺伝子のコード配列を特異的に増幅する PCR プライマーに制限酵素サイトを付加することで、開始コドン直上に Aat II、ストップコドン直下に Sac I サイトを導入した。

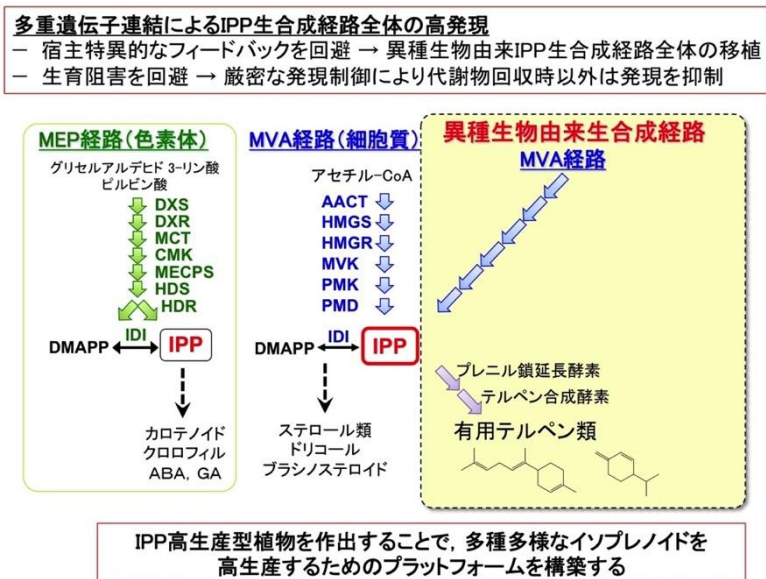


図 2.1.2.1-14 開発構想～イソプレノイド高生産プラットフォーム構築～

④- (2) エストラジオール誘導型発現カセットの作製

遺伝子発現制御カセットに導入する MVA 経路の各遺伝子は、エストラジオール発現誘導系で二重に制御することとした (図 2.1.2.1-15)。

この系では、各遺伝子は LexA-CaMV35S ミニマルプロモーター (O_{lexA} TATA) 制御下にあり、 O_{lexA} TATA に対し結合する人工転写因子 (XVE) を同時に発現させる。この XVE は、LexA-VP16 人工転写因子にヒトのエストロゲン受容体が融合されており、植物細胞内で発現させた場合、外部から添加されたエストロゲン依存的にコンフォメーション変化を起こし核内に移行するため、エストロゲン誘導的に O_{lexA} TATA 下流の遺伝子を発現させることが可能となる (Jianru et

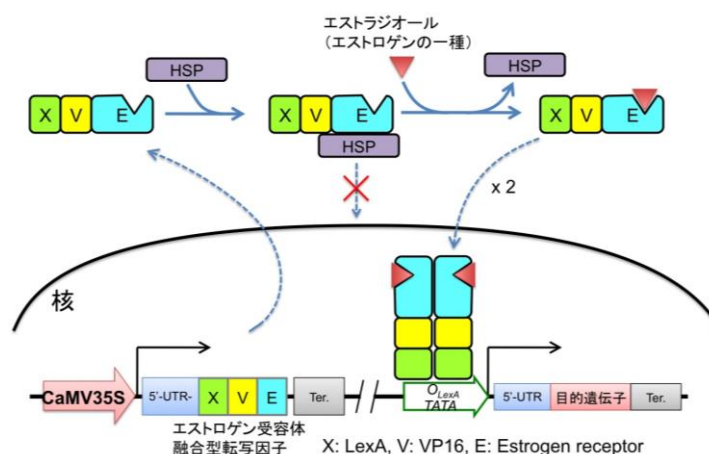


図 2.1.2.1-15 エストラジオール誘導型遺伝子発現システム

et al., 2008)。

al., 2000)。まず、MVA 経路の各酵素のコード配列を、エストラジオール誘導系の個別の発現カセットに導入した。この発現カセットは、 O_{1exA} TATA、シロイヌナズナ由来ストレス応答遺伝子の 5' -UTR 配列 (5' -UTR)、目的遺伝子コード配列、シロイヌナズナ由来ストレス応答遺伝子のターミネーター、クロラムフェニコール耐性遺伝子より構成される。このカセットの O_{1exA} TATA の 5' 側末端には Spe I が、また、ターミネーターの 3' 側末端には Avr II、Not I の制限酵素認識配列が導入してある。Spe I-Not I カセット断片を、先にベクターに導入されたカセットの 3' 側の Avr II、Not I サイトにライゲーションすると、Spe I/Avr II の連結部位の制限酵素サイトがどちらの酵素でも認識できない配列となるため、新たに導入されたカセットの 3' 末端の Avr II、Not I サイトに再び別の Spe I-Not I カセット断片を導入することが可能となる (図 2.1.2.1-16)。このエストラジオール誘導型発現カセットを pBluscript II SK (+) に導入し、各目的コード配列がカセット内部のサイトに導入された基本プラスミドを作製した。シロイヌナズナ由来 5' -UTR およびターミネーターは、奈良先端大学の加藤晃博士より分与された (Yamasaki et al., 2018) (Matsui et al., 2014)。また、 O_{1exA} TATA は、University of Zurich の Dr. Ueli Grossniklaus より分与された pLB12 (Brand et al., 2006) に由来する。

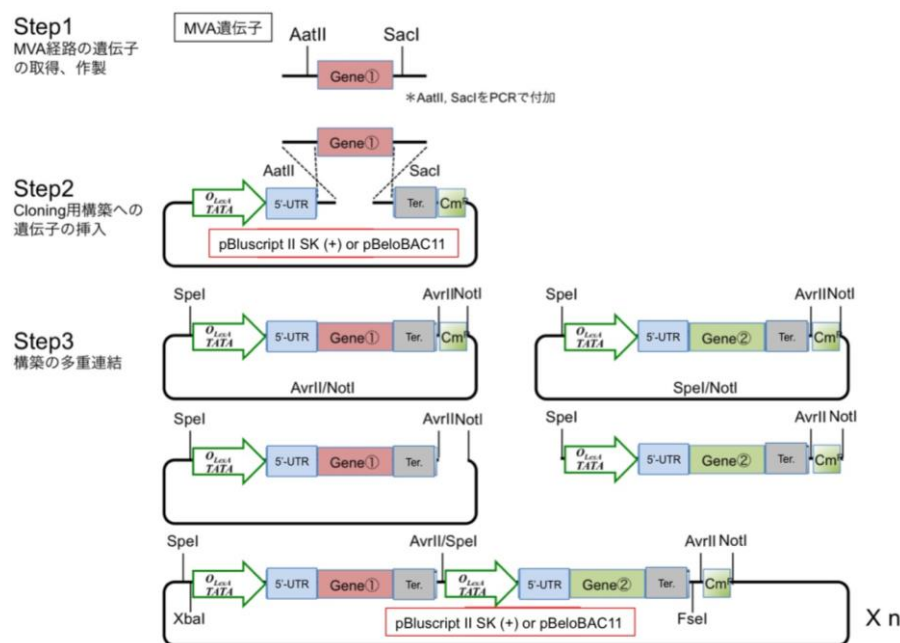


図 2.1.2.1-16 エストラジオール誘導型発現カセットのデザインとその多重連結の流れ

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

④-(2) で使用した pLB12 に由来する *XVE* に 5'-UTR、ターミネーターを連結し、CaMV35S プロモーター制御下で植物内で構成的に *XVE* を発現させるバイナリーベクター (pRI-35S-*XVE*) を作製した。

④- (4) エストラジオール誘導型発現カセットの多重連結

MVA 経路の 7 つの酵素遺伝子の発現カセットを連結するため、まず、一つめのカセットが導入された pBluscript II SK (+) に対し、④-(2) に記述した様に、2 番目、3 番目、4 番目の発現カセット (Spe I-Not I 断片) を順次導入した。4 つのカセットが連結された配列を Spe I-Not I で切り出し、制限酵素サイトを改変した pBeloBAC11 に導入した。また、pBluscript II SK (+) に 5 番目のカセットのみが導入されたプラスミドに、6 番目、7 番目のカセットを連結導入したのち、3 つのカセットが連結した断

片を、改変型 pBeloBAC11 に導入された4番目のカセットの下流に導入した。ここで、カセットの連結順は、5'側から、AACT、HMGS、HMGR、MK、PMK、PMD、IDI である。PCRにより隣接する2つのカセット間を増幅し、その産物のサイズを確認することで、7つの発現カセットが正しい向きに欠損なく導入されていることが確認された(図2.1.2.1-17)。

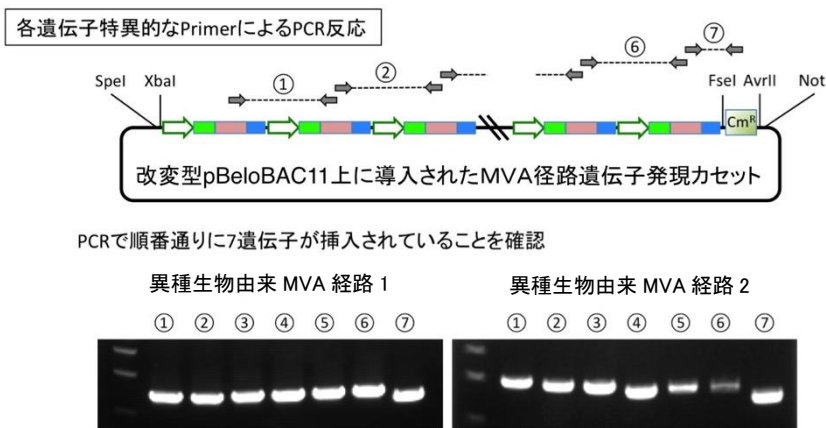


図 2.1.2.1-17 BAC 上で多重連結された MVA 経路遺伝子発現カセット

④- (5) MVA 経路発現用バイナリーベクターの作製

MVA 経路の7つの酵素遺伝子の発現カセットを導入するバイナリーベクターを作製するため、実施者(柴田)らがアグロバクテリウムを介して長鎖DNAを植物に導入する目的で開発していたTACベクター(pYL7AC7)(Liu et al., 1999)を改変した。pYL7AC7に、2種類の異種生物由来MVA経路の連結酵素カセット断片をライゲーションし作製した各バイナリーベクター(39,801 bpおよび42,127 bp)は、パルスフィールド電気泳動(PFGE)でサイズを確認した(図2.1.2.1-18)。

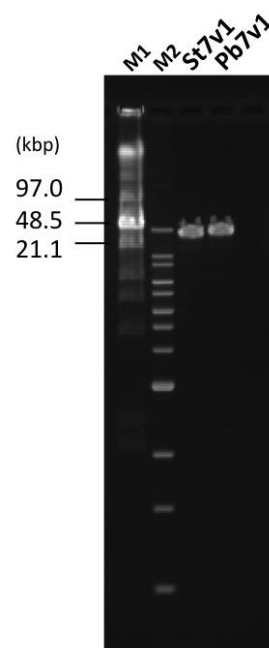


図 2.1.2.1-18 PFGE による泳動確認
St7v1: pYL7AC7-MVA7St (39801 bp)
Pb7v1: pYL7AC7-MVA7Pb (42127 bp)
M1, M2: マーカー

④- (6) 植物内におけるエストロゲン誘導的遺伝子発現系の動作確認

上記の④-(2)、(4)、(5)で作製された、エストロゲン誘導的遺伝子発現系の植物内での動作を簡便に確認するため、pYL7AC7由来のバイナリーベクターにレポーター遺伝子として mVenus を導入した pYL7AC7-mVenus を作製し、ベンサミアナタバコ(*Nicotiana benthamiana*)へのアグロインフィルトレーションにより一過的に発現させた。植物宿主として使用するベンサミアナタバコはMS寒天培地上で25°C、長日条件(16時間明期)で約2週間育成させたのち、実生を培養土に移植しさらに二週間栽培した。各バイナリーベクターを導入した *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株を、20 μM Acetosringone を含む LB 培地で培養したのち菌体を回収し、アグロバクテリウム懸濁液で3回洗浄したのちに、OD₆₀₀=0.05-0.2の懸濁液を調整した。アグロバクテリウム懸濁液を針無しシリンジでベンサミアナタバコの葉の裏側に注入することで表皮細胞に浸潤させ、25°C、長日条件で育成させた。

ここで、アグロインフィルトレーション直後、または24時間後にβエストラジオール溶液を葉さじを用いてアグロバクテリウム懸濁液を注入した部分へ塗布した。

アグロインフィルトレーションから48時間後に、アグロバクテリウム懸濁液注入部を蛍光顕微鏡で観察した結果、pYLTA7-mVenusのみ導入した系統や、pYLTA7-mVenusとpRI-35S-XVEを導入したサンプルにエストラジオール処理をしなかった場合には有意なmVenusに由来する蛍光が検出できなかったため、今回作製した発現誘導系における制御の厳密性が示された(図2.1.2.1-19)。また、エストラジオール処理後24時間よりも48時間経過したサンプルにおける発現が高いことが、蛍光強度から示唆された。さらに、感染させるアグロバクテリウムの菌体濃度も、OD₆₀₀=0.05よりもOD₆₀₀=0.2に調整してインフィルトレーションさせたサンプルの方で蛍光強度が高いことが示された。

pYLTA7-mVenus (OD)	○ (0.05)	○ (0.05)	○ (0.05)	○ (0.05)	○ (0.2)	○ (0.05)	○ (0.2)	○ (0.05)	○ (0.2)	○ (0.05)	○ (0.2)
XVE(OD=0.05)	-	○	-	○	○	-	-	○	○	-	-
XVE(改変型)(OD=0.05)	-	-	○	-	-	○	○	-	-	○	○
10μM β-Estradiol (処理時間)	-	-	-	○ (24h)	○ (24h)	○ (24h)	○ (24h)	○ (48h)	○ (48h)	○ (48h)	○ (48h)
発現	-	-	-	+	+	++	++	+	++	+++	++++

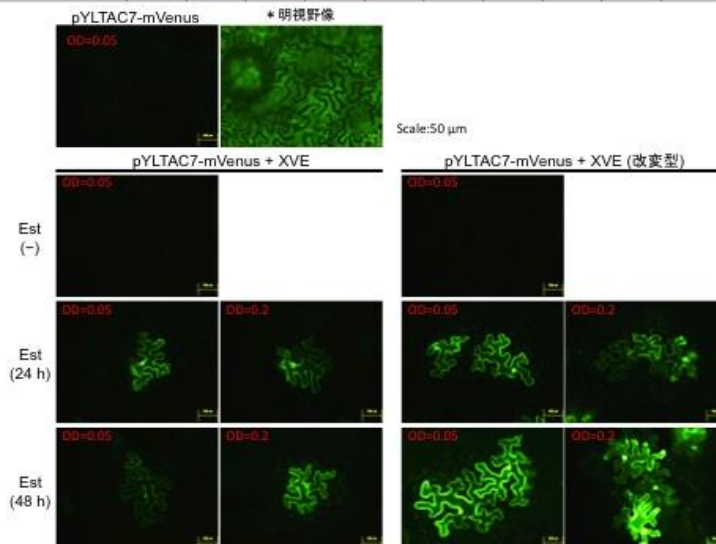


図2.1.2.1-19 エストラジオール処理によるmVenus発現誘導
20倍対物レンズで観察。+: 数視野に1-2個発現している、++: 数視野に1-2個発現している、+++ : 一視野に1個発現している、++++: 一視野に数個発現している

次に、定量的な遺伝子発現解析を行った。上述のように、アグロインフィルトレーションし、それと同時に50 μMのエストラジオール処理を施してから24、48 h後に接種部位をサンプリングし、Total RNAを抽出したのち、Real-Time RT-PCRでmVenusのコピー数を定量した。その際に、遺伝子発現の変動が少ないことが報告されているPP2A遺伝子をハウスキーピング遺伝子として同様にコピー数を定量し、PP2Aに対するmVenusのコピー数の相対値を算出した。結果として、mVenusの発現は、エストラジオール処理後24 hから48 hで約16倍に上昇していた(図2.1.2.1-20)。また、エストラジオール処理後48 h後のサンプルのmVenus発現量は、溶媒のみのコントロール(エストラジオール処理無)の50倍であった。蛍光観察の結果から、少なくともエストラジオール処理後72時間までは明確な蛍光が観察されたため、発現の持続性が示された。

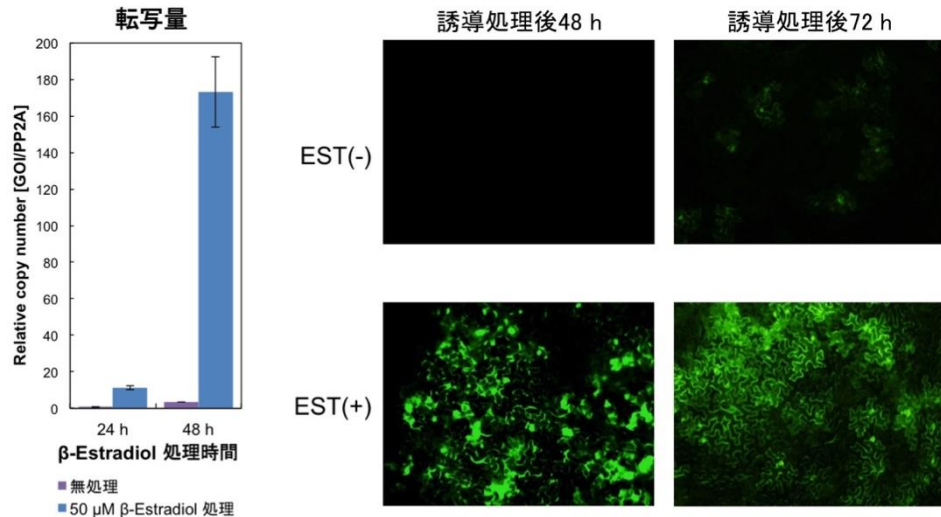


図 2.1.2.1-20 エストロゲン誘導的遺伝子発現の定量的解析

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

異種生物由来の MVA 経路の酵素タンパク質の一次配列は真核生物の酵素と異なる（同一性は 16%~36%）。また、シロイヌナズナの MVA 経路酵素の中で、HMGR は ER 膜局在、PMK、PMD はペルオキシゾーム、IDI の一部はミトコンドリアに局在性を示す（図 2.1.2.1-21）が、異種生物由来酵素を植物細胞内で発

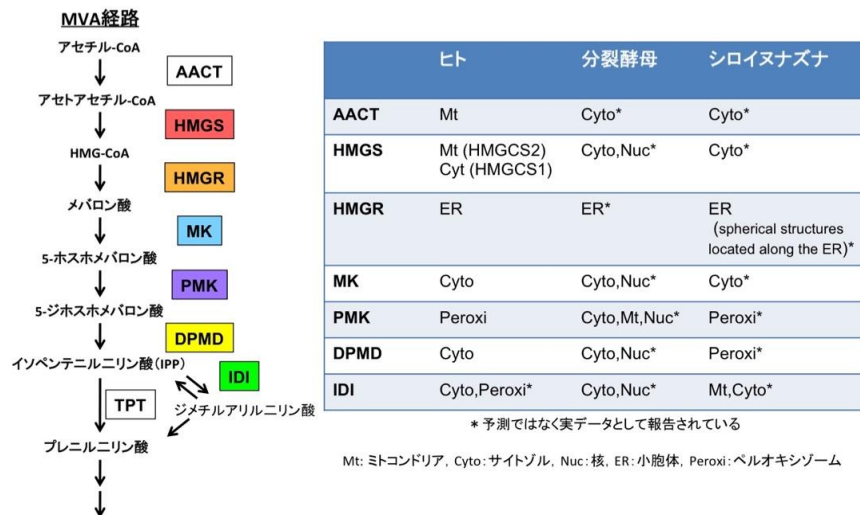


図 2.1.2.1-21 MVA 経路酵素の細胞内局在

現させた際の細胞内の挙動は未知であった。そこで、各 MVA 経路の各酵素を蛍光タンパク質融合型としてベンサミサミアナタバコ内で発現させ、細胞内局在性を解析した。

PCR により、各酵素の ORF 配列の 5' 末端及び 3' 末端にそれぞれ Nco I サイト、Spe I サイトを付加した。pDOE13 バイナリーベクター(Gookin and Assmann, 2014) (Arabidopsis Biological Resource Center より入手) の Nco I-Spe I サイトに導入することで、目的遺伝子の C 末端に mTurquoise2 (mTq2) を融合させたタンパク質を発現するコンストラクトを作製した。このコンストラクトを *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) に導入し、それを用いて、④- (6) と同様の手法でベンサミサミアタバコの葉で一過的に発現させた。感染後 48 時間生育させた植物の感染部位を回収し、可溶性および不溶性粗タンパク質を得たのち、抗 GFP 抗体を用いた Western ブロッキングで発現タンパク質を解析した結果、全ての放線菌由来 MVA 経路酵素が蛍光タンパク質融合型として存在していることが確認された。そ

ここで、同様に感染させた植物の感染部位を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。その結果、多くの MVA 経路酵素がサイトゾルまたは核局在であることが明らかとなったが、一部の酵素はサイトゾル以外の局在性を示したため、部位特異的変異導入によりサイトゾル局在型へ改変した。

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

上記の④- (5) で作製した、pYLTA-MVA7St あるいは pYLTA-MVA7Pb が導入されたアグロバクテリウムと、pRI-35S- XVE が導入されたアグロバクテリウム株を混合し、④- (6) と同様の手法により、ベンサミアナタバコの葉で一過的に発現させた。アグロインフィルトレーションと同時に 50 μ M のエストラジオール処理を施してから 24、48 h 後に接種部位をサンプリングし、Total RNA を抽出し、Real-Time RT-PCR で各遺伝子のコピー数を定量した。発現量は同じサンプルの *PP2A* のコピー数に対する相対値として算出した。

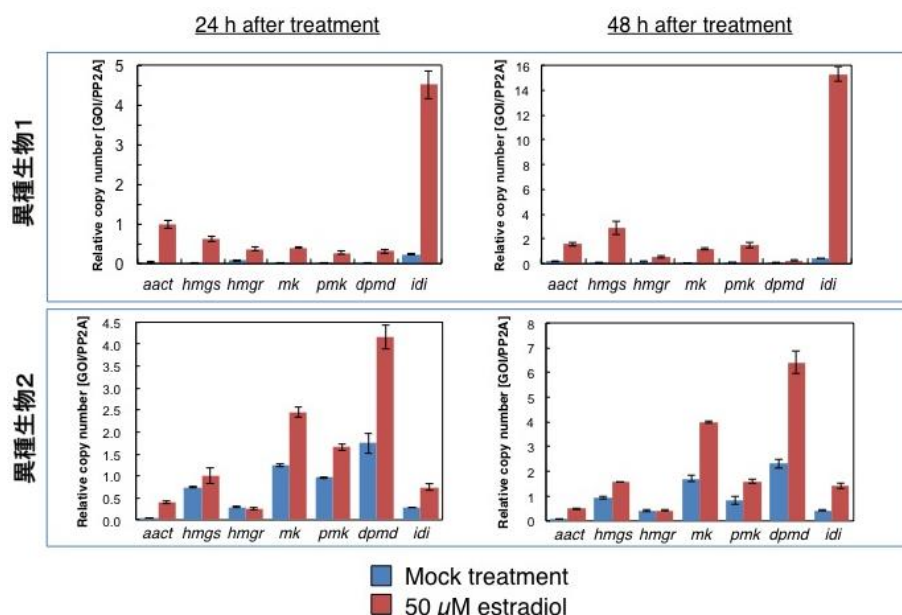


図 2.1.2.1-22 ベンサミアナタバコにおける MVA 経路酵素のエストラジオール誘導的一斉発現

異種生物 1 の MVA 経路遺伝子を導入したサンプルでは、発現レベルに違いはあるものの、全てエストラジオール依存的に発現誘導されていた (図 2.1.2.1-22)。

また、発現レベルはエストラジオール処理時間に相関し上昇していることがわかった。この際、エストラジオールによる発現誘導率は、3.7 倍から 61 倍であった。一方で、異種生物 2 の MVA 経路の酵素遺伝子も異種生物 1 の遺伝子とほぼ同様のレベルで全て発現していたものの、エストラジオール未処理のサンプルでも発現をしまっていることが示された。酵素のコード配列以外の発現カセットの構成は異種生物 1 の MVA 経路のコンストラクトと同様であることから、異種生物 2 の隣接した遺伝子配列が何らかの影響を与えていることが示唆されたため、比較として異種生物 2 の *HMGR* の発現カセットのみを導入したコンストラクトを作製し、エストラジオールによる発現誘導を試みたところ、エストラジオール未処理のサンプルではほとんど発現していなかった (図 2.1.2.1-23)。

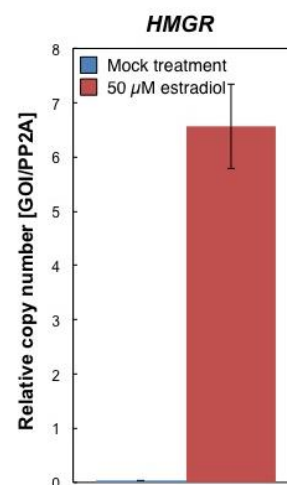


図 2.1.2.1-23 異種生物 2 由来 *HMGR* のベンサミアナタバコにおけるエストラジオール誘導的発現

これらの結果から、やはり異種生物2のMVA経路の発現カセットが多重連結の影響でXVE非依存的に発現していることが示唆された。この現象が、ベンサミアナタバコに対するアグロインフィルトレーションによる一過的な発現の際にのみ見られる現象かを検証するため、今後、これらを導入したシロイヌナズナのT87培養細胞株を作製し、各遺伝子の発現誘導を解析する。

④- (9) 多重連結 MVA 経路遺伝子カセットの遺伝子発現制御カセットへの導入

上記の④- (5) で作製した pYL7AC7 をベースとしたバイナリーベクターが含まれるエストロゲン誘導型 MVA 経路遺伝子発現カセット (異種生物 1 由来: 19.6 kbp 異種生物 2 由来: 17.3 kbp) を、遺伝子発現制御カセットが導入されたバイナリーベクターに導入した。作製した各バイナリーベクターを制限酵素で処理後に PFGE で泳動した結果、想定通りの約 90 kbp のバンドが検出され、長鎖の遺伝子カセットの導入に成功したことがわかった。今後、これらの MVA 経路遺伝子が導入された遺伝子発現制御カセットを含むバイナリーベクターを精製し、アグロバクテリウム感染法により植物培養細胞に導入する。

(9) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	研究開発目標(中間)	研究開発目標(最終)	根拠
①遺伝子発現制御カセット導入部の開発・ ②ゲノム編集技術の開発・③安定性評価	遺伝子発現制御カセット導入株を、タバコBY-2細胞で50系統、シロイヌナズナ植物体で5系統得る。レポーター遺伝子の発現量が5倍以上増減したBY-2細胞を5系統得る。BY-2(5系統)、シロイヌナズナ(5系統)のゲノム挿入部位を決定し、シングルコピーで生育・増殖に影響のない系統を選抜する。	遺伝子発現制御カセット導入タバコBY-2細胞とシロイヌナズナ植物体で制御因子を最適化し、レポーター遺伝子の発現量が20倍増減した系統をそれぞれ5系統得る。②遺伝子発現制御カセット上で「ゲノム編集」を可能にする技術開発を行う。	ヒト細胞ではクロマチン構造を変換することで遺伝子の発現量を20倍以上増減させることができた。遺伝子発現制御カセット導入株、BY-2で50系統以上(シロイヌナズナで数十系統)から、シングルコピー挿入株を多数得て、その中から、制御因子で、レポーター遺伝子の発現量が5倍程度増減する株を5系統選出することは可能と考えた。最終目標として、制御因子の最適化により、発現量を20倍程度増減させることも可能と期待できる。遺伝子発現制御カセットの遺伝子組換えの実証準備は進んでおり、「ゲノム編集」可能にする技術開発を行う。
④イソプレノイド合成経路遺伝子の発現制御技術の開発	遺伝子発現制御カセット導入ベクターにIPP合成経路全遺伝子を連結挿入し、シロイヌナズナ植物体および細胞株へ導入する。導入遺伝子の発現が5倍変動し、かつ、IPP(下流イソプレノイド)量が2倍上昇した系統を3系統以上得る。	最適遺伝子発現制御カセットにIPP合成経路に加え異種イソプレノイド合成酵素遺伝子を連結挿入したシロイヌナズナ植物体および細胞株を作製し、導入遺伝子の発現が20倍変動し、かつ、IPP(下流テルペノイド)量が5倍上昇した系統を5系統得る。2世代後のシロイヌナズナ形質転換体(T4世代)におけるmRNA発現誘導率が20%以上低下しないことを確認する。	実施者らの報告では、IPP合成経路の複数の酵素遺伝子の発現を2~3倍に上昇させた際に、下流のイソプレノイドも2~3倍程度まで上昇した。これらの知見から、遺伝子発現制御カセットにより経路の酵素遺伝子の全てが一斉に5倍以上過剰発現することで、下流のイソプレノイドの蓄積量は2倍以上となることが期待出来る。また、遺伝子発現制御カセットの最適化により、その効果はさらに上昇することが見込める。後代でサイレンシングが起きた場合は、外来遺伝子の発現は極端に低下することから、2世代後の発現誘導率の低下は20%までを許容変動範囲とした。

(10) 成果の普及

年度	論文		その他外部発表		
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌への掲載	その他
2016 ~ 2020	(5)	(3)	4 (10)	5 (関連) (2)	3 (関連受賞)

() 内は今後の予定数

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

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

※2018年6月31日現在

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018（出願済みのもの） （）内は今後の予定数	1	(1)	(1)
2020年度末までの 累積の見通し	(3)	(3)	(3)

引用文献

- Hirose, Y., Suda, K., Liu, Y. G., Sato, S., Nakamura, Y., Yokoyama, K., Yamamoto, N., Hanano, S., Takita, E., Sakurai, N., Suzuki, H., Nakamura, Y., Kaneko, T., Yano, K., Tabata, S. and Shibata, D. The Arabidopsis TAC Position Viewer: a high-resolution map of transformation-competent artificial chromosome (TAC) clones aligned with the Arabidopsis thaliana Columbia-0 genome. *The Plant Journal* (2015) 83, 1114-1122
- Ikeno, M., Grimes, B., Okazaki, T., Nakano, M., Saitoh, K., Hoshino, H., McGill, N.I., Cooke, H. and Masumoto, H. Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nature Biotechnology* (1998) 16, 431-439
- Lee G, Saito I. Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene*. (1998) Aug 17;216(1):55-65.
- Liu, Y. G., Shirano, Y., Fukaki, H., Yanai, Y., Tasaka, M., Tabata, S. and Shibata, D. Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96, 6535-6540
- Nakano M, Cardinale S, Noskov VN, Gassmann R, Vagnarelli P, Kandels-Lewis S, Larionov V, Earnshaw WC, Masumoto H. Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers. *Dev Cell*. (2008) Apr;14(4):507-22.
- Okada, T., Ohzeki, J, Nakano, M., Yoda, M., Brinkley, W.R., Larionov, V. and Masumoto, H. CENP-B Controls Centromere Formation Depending on the Chromatin Context. *Cell* (2007) 131, 1287-1300
- Okamoto Y, Nakano M, Ohzeki J, Larionov V, Masumoto H. A minimal CENP-A core is required for nucleation and maintenance of a functional human centromere. *EMBO J*. (2007) Mar 7;26(5):1279-91.

Ohzeki J, Nakano M, Okada T, Masumoto H. CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA. *J Cell Biol.* (2002) Dec 9;159(5):765-75.

Ohzeki J, Bergmann JH, Kouprina N, Noskov VN, Nakano M, Kimura H, Earnshaw WC, Larionov V, Masumoto H. Breaking the HAC Barrier: histone H3K9 acetyl/methyl balance regulates CENP-A assembly. *EMBO J.* (2012) May 16;31(10):2391-402.

Ohzeki J, Shono N, Otake K, Martins NM, Kugou K, Kimura H, Nagase T, Larionov V, Earnshaw WC, Masumoto H. KAT7/HBO1/MYST2 Regulates CENP-A Chromatin Assembly by Antagonizing Suv39h1-Mediated Centromere Inactivation. *Dev Cell.* (2016) Jun 6;37(5):413-27.

Shibata, D. and Liu, Y. G. Agrobacterium-mediated plant transformation with large DNA fragments. *Trands in Plant Science* (2000) 5, 354-357

Stam, M, Mol, J. N. M. and Kooter J. M. The Silence of Genes in Transgenic Plants, *Annals of Botany* (1997) 79, 3-12 (Review)

Suzuki E, Nakayama M. VCre/VloxP and SCre/SloxP: new site-specific recombination systems for genome engineering. *Nucleic Acids Res.* (2011) Apr;39(8):e49.

Takita E, Kohda K, Tomatsu H, Hanano S, Moriya K, Hosouchi T, Sakurai N, Suzuki H, Shinmyo A, Shibata D. Precise sequential DNA ligation on a solid substrate: solid-based rapid sequential ligation of multiple DNA molecules. *DNA Research* (2013) 20(6), 583-592
doi:10.1093/dnares/dst032

特許第 5336592 号：新規な部位特異的組換え酵素とその認識配列を用いた部位特異的組換え方法、中山学

特許第 5336676 号：新規な部位特異的組換え酵素によって認識される配列及びその認識配列を用いた部位特異的組換え方法、中山学

Brand, L., Hörler, M., Nüesch, E., Vassalli, S., Barrell, P., Yang, W., Jefferson, R.A., Grossniklaus, U., and Curtis, M.D. (2006). A Versatile and Reliable Two-Component System for Tissue-Specific Gene Induction in Arabidopsis. *Plant Physiology* 141, 1194-1204.

Gookin, T.E., and Assmann, S.M. (2014). Significant reduction of BiFC non-specific assembly facilitates in planta assessment of heterotrimeric G-protein interactors. *The Plant Journal* 80, 553-567.

Ishii, J., Izawa, K., Matsumura, S., Wakamura, K., Tanino, T., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A. (2009). A Simple and Immediate Method for Simultaneously Evaluating Expression Level and Plasmid Maintenance in Yeast. *The Journal of Biochemistry* 145, 701-708.

Jianru, Z., Qi - Wen, N., and Nam - Hai, C. (2000). An estrogen receptor - based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal* 24, 265-273.

Liu, Y.-G., Shirano, Y., Fukaki, H., Yanai, Y., Tasaka, M., Tabata, S., and Shibata, D. (1999). Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 6535.

Matsui, T., Sawada, K., Takita, E., and Kato, K. (2014). The longer version of *Arabidopsis thaliana* heat shock protein 18.2 gene terminator contributes to higher expression of stably integrated transgenes in cultured tobacco cells. *Plant Biotechnology* 31, 191-194.

Mnaimneh, S., Davierwala, A.P., Haynes, J., Moffat, J., Peng, W.-T., Zhang, W., Yang, X., Pootoolal, J., Chua, G., Lopez, A., *et al.* (2004). Exploration of Essential Gene Functions via Titratable Promoter Alleles. *Cell* *118*, 31-44.

Takagi, M., Kuzuyama, T., Takahashi, S., and Seto, H. (2000). A Gene Cluster for the Mevalonate Pathway from *Streptomyces* sp. Strain CL190. *Journal of Bacteriology* *182*, 4153-4157.

Yamasaki, S., Sanada, Y., Imase, R., Matsuura, H., Ueno, D., Demura, T., and Kato, K. (2018). *Arabidopsis thaliana* cold-regulated 47 gene 5' -untranslated region enables stable high-level expression of transgenes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* *125*, 124-130.

特許・論文リスト

(1) 特許

番号	出願者	出願番号	国内外国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
	かずさ DNA 研究所	(非公開)	国内	2018 年 8 月 10 日		(非公開)	舛本寛、柴田大 輔、大関淳一郎、 岡崎孝映、久郷和 人、大竹興一郎

(2) 論文

なし

(3) 外部発表

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	田部井仁美, 山家史 大, 大竹興一郎, 和 氣駿之, 舛本寛, 柴 田大輔, 中山亨, 高 橋征司	かずさ DNA 研究所、 東北大学	真核生物で異種発 現させた放線菌由 来メバロン酸経路 の機能解析	日本生物工学会 2017年度北日本 支部シンポジウ ム、福島	2017 年 12 月 25 日
2	大竹興一郎, 山家史 大, 田部井仁美, 和 氣駿之, 舛本寛, 柴 田大輔, 中山亨, 高 橋征司	かずさ DNA 研究所、 東北大学	異種生物由来メバ ロン酸経路の移植 による高等植物に おけるイソプレノ イド高生産プラッ トフォームの構築	第59回日本植物 生理学会年会、 札幌	2018 年 3 月 30 日
3	田部井仁美, 山家史 大, 大竹興一郎, 和 氣駿之, 舛本寛, 柴 田大輔, 中山亨, 高 橋征司	かずさ DNA 研究所、 東北大学	植物におけるイソ プレノイド代謝工 学系構築に向けた 放線菌由来メバロ ン酸経路酵素群の 機能解析	第36回日本植物 細胞分子生物学 会年会、金沢	2018 年 8 月 28 日
4	角掛陽、茂木大介、 菊池洋平、末永美 樹、和氣駿之、中山 亨、高橋征司	東北大学	セイヨウトウキ由 来新奇非環式モノ テルペノイド生合 成酵素AaTPS12の 機能解析	第36回日本植物 細胞分子生物学 会年会、金沢	2018 年 8 月 28 日

(4) 新聞・雑誌等への掲載

番号	所属	タイトル	掲載誌名	発表年月

(5) その他

なし

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

(1) 背景と目的

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

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

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

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

(2) 位置づけ、目標値

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

実施項目1) 腺鱗の分化制御による蓄積技術：前者の「蓄積の場」を増やす技術開発は、多くの機能性成分が植物の組織表面に発達する「腺鱗」という生産と蓄積に特化した小さな組織のみに

集約される事に着目し、転写因子とゲノム編集技術を用いるアプローチと、ケミカルを用いた汎用性の高いアプローチの両方を計画している。

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

プロジェクト 3 年目の中間目標値 (H30) :

実施項目 1) に関しては、腺鱗／トライコームの発生を制御する転写因子遺伝子のノックアウトによる腺鱗分化促進手法の有効性をトマトにおいて検証するとともに、もし有効性が低かった場合には、新規側方抑制関連遺伝子の同定へとつながる情報を得る。ケミカルライブラリからは、腺鱗／トライコーム増加に活性を示す化合物をスクリーニングにより絞り込む。

実施項目 2) に関しては、「輸送カーゴ」のメンバー候補に関して、細胞内局在解析やタンパク質相互作用解析などの手法を用いて、分泌プロセスに関与すると考えられるタンパク質を見出す。また、脂溶性物質の分泌に付随する膜脂質とマトリックス脂質分子を同定する。さらに脂溶性物質の細胞外蓄積において重要と考えられる酵素遺伝子の解析を介し、プロジェクト成果の高度化を図る。

プロジェクト 5 年後の最終目標値 (H32) :

実施項目 1) に関しては、転写因子からのアプローチでは、実用植物の RNA-Seq 解析をし、腺鱗分化促進に役立つ相同転写遺伝子のカタログ化を行い、遺伝子ノックアウトによる腺鱗分化促進法を、形質転換が可能な植物に用いることのできる一般的な技術として確立する。また、ケミカルライブラリを用いた腺鱗数分化誘導物質からのアプローチでは実用植物にもそれらを適用し、その適用スペクトラムと利用可能な濃度範囲を決定し、一般的な腺鱗数分化誘導技術として確立する。

実施項目 2) に関しては、タバコなどの植物体を事例とし、輸送カーゴに必要な遺伝子を導入した組換え体を作成する。その組換え体を用い、内在性脂溶性物質を指標として細胞外蓄積を評価する。

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

(3) 全体計画

事業項目	28年度				29年度				30年度				31年度	32年度
	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期		
① 腺鱗の分化制御 による蓄積技術	トマト転写因子の同定				トマトへの遺伝子導入と評価				実用植物の転写因子同定と応用					
	小分子ライブラリのプレスクリーニング				小分子ライブラリの本スクリーニング				小分子の実用植物への応用					
② 輸送マシナリー による蓄積機構 の制御技術開発	鍵酵素の抗体作成と評価				輸送カーゴメンバーの抗体作成と評価				モデル植物への応用展開					
	cDNAの整備と抗体準備				免疫沈降とプロテオーム									
					分泌脂質の分析									
					タンパク質相互作用解析									
									分泌関連酵素の解析					

(4) 実施体制
体制図

【委託先】

国立大学法人京都大学
矢崎一史（生存圏研究所）
代表

(5) 運営管理

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

(6) 実施の効果

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

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	実施内容	中期目標値	達成度
1) 腺鱗の分化制御による蓄積技術	i. 転写因子を用いたゲノム編集による腺鱗数の制御技術の開発	トマトの転写因子遺伝子のノックアウトによる腺鱗分化促進手法の有効性を検証する。有効性が低かった場合には、新規側方抑制関連遺伝子の同定へとつながる情報を得る。	○
	ii. ケミカルライブラリを用いた腺鱗数増加物質の開拓	腺鱗トライコーム増加に活性を示す化合物をスクリーニングする。植物ホルモンを比較対象として用いる。	○
2) 輸送マシナリーによる蓄積機構の制御技術開発	i. 輸送カーゴによる脂溶性物質の分泌機構の要素化と応用	「輸送カーゴ」のメンバー候補に関して、細胞内局在解析や免疫沈降などの手法を用いて、分泌プロセスに関与すると考えられるタンパク質を絞り込む。また、脂溶性物質の分泌に付随する膜脂質とマトリックス脂質分子を同定する。さらに脂溶性物質の細胞外蓄積において重要と考えられる酵素遺伝子の解析を介し、プロジェクト成果の高度化を図る。	○
	ii. 輸送コンプレックスコンポーネントの応用	平成 31 年以降の実施項目。	平成 31 年以降の実施項目。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	実施内容	現状	最終目標	達成見通し
1) 腺鱗の分化制御による蓄積技術	i. 転写因子を用いたゲノム編集による腺鱗数の制御技術の開発		実用植物の RNA-Seq 解析をし、腺鱗分化促進に役立つ相同転写遺伝子のカタログ化を行い、遺伝子ノックアウトによる腺鱗分化促進法を、形質転換が可能な植物に用いることのできる一般的な技術として確立する。	H31～H32 年度の実施項目を行うことで達成は見込まれる。
	ii. ケミカルライブラリを用いた腺鱗数増加物質の開拓		シロイヌナズナのトライコーム分化誘導活性が高いと認められた化合物を使って、実用植物に適用し、その適用スペクトラムと利用可能な濃度範囲を決定し、一般的な腺鱗数分化誘導技術として確立する。	H31～H32 年度の実施項目を行うことで達成は見込まれる。
2) 輸送マシナリーによる蓄積機構の制御技術開発	i. 輸送カーゴによる脂溶性物質の分泌機構の要素化と応用	「輸送カーゴ」に存在する候補遺伝子の細胞内局在は解析を終了し、現在相互作用の解析を行っている。脂溶性物質とともに分泌される脂質分子の同定を終了した。	タバコ植物体などをホストとし、輸送カーゴに必要な遺伝子を導入した組換え体を作成する。その組換え体を用い、内在性脂溶性物質を指標として、細胞外蓄積を評価する。	H31～H32 年度の実施項目を行うことで達成は見込まれる。
	ii. 輸送コンプレックスコンポーネントの応用	平成 31 年以降の実施項目。		

(9) 研究開発の成果と意義

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

実施項目 1) 腺鱗の分化制御による蓄積技術開発

植物機能性成分の多くが、植物の組織表面に発達するトライコームの一種である腺鱗という組織で生産、蓄積されている(図1)。

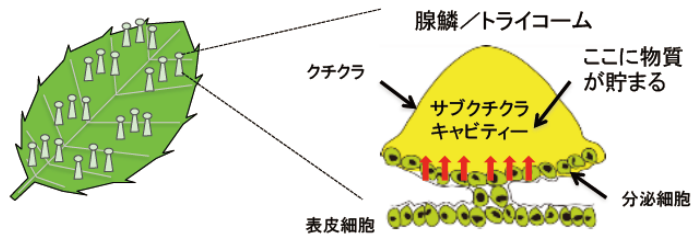


図1. 腺鱗は有用物質生産の「スマートセル」

そこで実施項目1) では、機能性成分を蓄積する「場所（腺鱗）を増やす」ための技術確立を目的とし、以下の2種のアプローチ、すなわち1-1) ゲノム編集による腺鱗分化促進技術の開発、そして1-2) ケミカルライブラリスクリーニングによる腺鱗分化誘導化合物の探索、に取り組む（図2）。

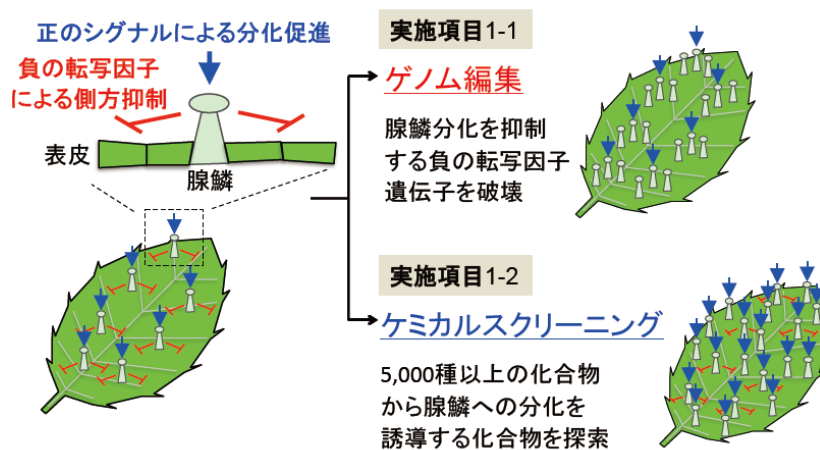


図2. 腺鱗分化の制御技術のストラテジー

1-1) ゲノム編集による腺鱗分化促進技術の開発

本実施内容においては、トライコームの発生を負に制御する転写因子遺伝子のホモログをトマト (*Solanum lycopersicum*) において同定し、CRISPR/Cas9 系を用いたゲノム編集による遺伝子破壊を行うことで腺鱗分化の促進を試みる（図3）。



図3. ゲノム編集ベクターと遺伝子導入法

これまでに同定された2種類のトマト相同遺伝子に対する合計8種類のCRISPR/Cas9用コンストラクトの全てをアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) を介してトマトのカルスへ導入した。その後、それぞれのコンストラクトに対してカルスからの再生植物個体を複数得て、そのゲノム遺伝子中のCRISPR/Cas9標的配列の変化を調べた。その結果、それぞれ2種の相同遺伝子に対して機能的なタンパク質をコードしないような変異を、相同染色体対立遺伝子の一方に有する個体を複数得ることができた。

これらの再生植物個体はヘテロ接合体であり劣性形質を示さないので、後代でホモ接合体を得てトライコームにおける変異形質を観察する予定である。また、両遺伝子の二重変異体を得る目的で、再生植物個体を用いた掛け合わせ実験を行なっている。

1-2) ケミカルライブラリスクリーニングによる腺鱗分化誘導化合物の探索

本実施内容においては、トライコームで強い活性を持つGL2遺伝子プロモーター制御下にGFP-GL2融合遺伝子を配置したレポーター遺伝子 (GL2p-GFP-GL2) を *g12* 突然変異体に導入した形質転換シロイヌナズナを用いて、トライコームの分化誘導を行う化合物を5,000種化合物からなるケミカルライブラリに対するスクリーニングにより同定する (図4)。

これまでに、設定されたケミカルライブラリスクリーニングの条件に加えて、ハイスループットスクリーニングのためにマイクロタイターウェル中でシロイヌナズナ植物体を発芽、生育させる方法を開発した (図4)。本手法に関しては、本学の知財部を通じて特許出願を完了した。

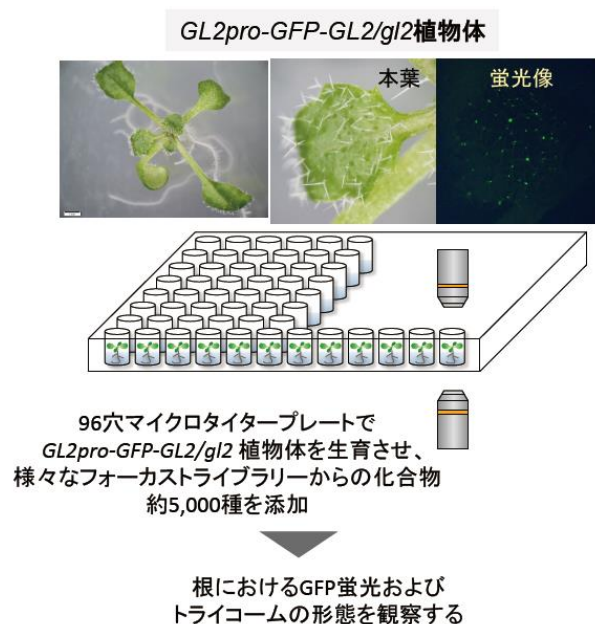


図4. High throughput screening 系の確立

本実施項目においては、これまでに生理活性を持つ既存の薬物約 1,000 種類を含むドラッグライブラリに対してスクリーニングを行った。その結果、根表皮における GFP-GL2 の蛍光強度を変化させる化合物数種を同定している。今後、新たな生物学的観点によりフォーカスされたケミカルライブラリに対して、この系を用いたスクリーニングを継続させる予定である。

実施項目 2) 輸送マシナリーによる蓄積機構の制御技術開発

医薬品原料や機能性食品の有効成分とされる化合物には脂溶性が高いものが多い事に着目し、脂溶性物質のアポプラスト蓄積を制御する技術を開発する。実施項目 2) では、2-1) 細胞内輸送カーゴによる脂溶性物質の分泌機構の要素化と、2-2) 輸送コンプレックスコンポーネントの応用、に取り組む(図5)。平成30年度までは前者を実施する。

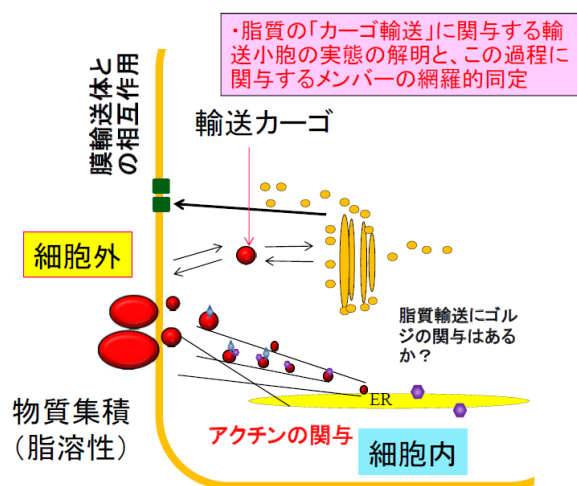


図5. 輸送マシナリーのモデル図

2-1) 細胞内輸送カーゴによる脂溶性物質の分泌機構の要素化

脂溶性物質の蓄積を担う「輸送カーゴ」のコンポーネントを明らかにするため、これまでに6つの項目を推進した。

1) 鍵酵素の抗体作成と評価として、シコニン生合成の鍵酵素である膜結合型プレニル化酵素 LePGT1 に GFP を付与した発現ベクターを作製し、*Nicotiana benthamiana* にアグロインフィルトレーションにより導入発現させ、細胞内局在解析を行った。

2) オミクスデータを組み合わせ、輸送カーゴ・メンバーの cDNA データの整理を進めた。その結果、シコニンの細胞外蓄積とリンクすることが示唆された遺伝子・蛋白質が 16 個リストアップされた。これらを輸送カーゴ要素の候補遺伝子として全長 cDNA を取得し、エントリークローンの作製に進めた。

ベクターを構築していく過程で、データベース解析の結果、輸送因子ではないと判断されたもの、細胞内の発現レベルが検出限界以下だったもの、発現解析から極めて発現レベルが低かったもの、シコニン生産と遺伝子発現が相関していなかったものを除いた。それら 10 遺伝子に関して、植物発現用のバイナリーベクターにサブクローニングし、*Nicotiana benthamiana* の一過的発現系において細胞内局在を解析した。その結果、サイトゾル局在のもの、ドット状の構造を示すもの、小胞体ネットワークに乗るもの、液胞膜に局在するものなどが認められた。これらのうち、液胞膜局在の 2 種は本研究開発の目的とは合致しないため、以降の解析からは除く事とした。

3) 輸送カーゴメンバーの抗体作成と評価を平成 28 年度から検討してきたが、これまでに生合成酵素以外にシコニンの分泌や蓄積に関係することが分かっている蛋白質に、114 アミノ酸からなる LeDI2 がある。これに着目した。LeDI2 は酵素とは考えられない小さな蛋白質分子であるが、その発現はシコニン生産と緊密にリンクしており、antisense RNA でその発現を低下させると、シコニン生産が顕著に低下する (Yazaki et al., Plant Physiol., 2001)。LeDI2 の抗体を入手し、イムノブロットに供した。しかし、ムラサキの培養細胞ではバンドの出現が明確でなかったことから、LeDI2 を GFP と融合し、LeDI2-GFP として解析を進めることとした。

4) 免疫沈降とプロテオーム解析に関しては、平成 30 度にかけて計画している実施項目である。本研究開発で対象とする蛋白質は膜系に結合するものが多いため、ネイティブなポリクローナル抗体の作成は現実的ではない。そこでタグを用いた融合蛋白質でこの項目を推進することとした。最初にムラサキ毛状根における LeDI2-GFP の導入発現に着手した。現在毛状根が誘導されてきている段階であり、今後遺伝子の発現確認に進む。

5) 分泌脂質の分析は、サイトゾルや培地など水系では針状結晶となるシコニンが、どのように可溶状態のまま細胞外に分泌されるかを理解する上で重要である。平成 29 年度はシコニン誘導体と共存する脂質を LC-MS によって分析し、シコニン生産時に明確に含量が増える膜脂質とマトリックス脂質を見出した。これらの分子に関してさらに詳細な構造解析を行い、データを取りまとめた。

6) タンパク質間相互作用の検証を目的として実施予定である酵母 two hybrid アッセイの準備に関して検討を行った。膜結合型蛋白質相互作用解析に適している Split-ubiquitin 系を利用する事を考えたが、上記の実施内容でエピトープタグをつけたタンパク質を作成している事を利用すれば、共免疫沈降実験の方が効率的で本研究目的には適していると考え、酵母のアッセイに変えて実施する予定にしている。

2-2) 輸送コンプレックスコンポーネントの応用
平成31年度以降の実施項目である。

上記委託事業以外に、スマートセルプロジェクトの助成研究として実施中である2つの研究課題において、分担研究として2企業と共同で研究開発を実施した。

これまでの研究開発より得られた成果は、従前手付かずであった高付加価値化合物の細胞外高蓄積の基盤となる知見であり、広く物質生産へ応用されることが期待される。これらの成果に関係し、受賞歴が1件ある(2016年、第34回日本植物細胞分子生物学会学術賞受賞)。

(10) 成果の普及

年度	特許出願			論文		その他外部発表		
	国内	外国	PCT出願	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌への掲載	その他
H28～ H30	1	0	0	0	0	13	0	1

論文は、現在リバイズ中のものが1報ある。

学会発表は、8月26日～28日の日本植物細胞分子生物学会(金沢)の発表までを含めた。

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許区分等	特許の名称
H30	出願国内	(非公開)

これ以外、成果の内容により、知財の出願とするのが適当か、あえて公開を避けノウハウ登録とするかを検討しつつ研究開発を進める。

特許・論文リスト

(1) 特許

番号	出願者	出願番号	国内/外国 /PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	京都大学	(非公開)	国内	H30.06.26	出願	(非公開)	藤原 青山 矢崎

(2) 論文

なし

(3) 外部発表

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	矢崎一史	京都大学	脂溶性物質のアポ プラスト集積に関 わる生物学的イベ ント	第36回日本植物 細胞分子生物学会	平成30年8月26日 ～28日
2	市野 琢爾, 棟方 (齊田) 有桂、 巽 奏、矢崎一史	京都大学	ムラサキにおける 脂溶性二次代謝産 物シコニンの分泌 機構の解明に向け て	第36回日本植物 細胞分子生物学会	平成30年8月26日 ～28日
3	巽 奏、岡咲洋 三、佐藤繭子、豊 岡公德、市野琢 爾、梶川昌孝、福 澤秀哉、斉藤和 季、矢崎一史	京都大学	脂溶性二次代謝産 物シコニンの分泌 系におけるトリア シルグリセロール の役割	第36回日本植物 細胞分子生物学会	平成30年8月26日 ～28日
4	Kazufumi Yazaki, Kanade Tatsumi, Takuji Ichino, Hideaki Matsuoka, Fumihiko Sato, Mayuko Sato, Taku Tsuyama, Kiminori Toyooka	Kyoto Universi ty	Shikonin production of <i>Lithospermum</i> <i>erythrorhizon</i> , a model system of secondary metabolic lipids in plants	The 23rd International Symposium on Plant Lipids	平成30年7月9日

5	Takuji Ichino, Yuka Saida- Munakata, Kanade Tatsumi, Kazufumi Yazaki	Kyoto Universi ty	Molecular basis for secretory trafficking of lipophilic metabolites shikonin derivatives in a medicinal plant <i>Lithospermum erythrorhizon</i>	The 23rd International Symposium on Plant Lipids	平成30年7月8日～ 13日
6	Hayato Ueoka, Kanao Sasaki, Tatsuya Miyawaki, Takuji Ichino, Kyoko Yamamoto, Kazuaki Ohara, Nozomu Sakurai, Hideyuki Suzuki, Daisuke Shibata, Kazufumi Yazaki	Kyoto Universi ty	Characterization of cytosol- localized geranyl diphosphate synthase in <i>Lithospermum erythrorhizon</i>	The 23rd International Symposium on Plant Lipids	平成30年7月8日～ 13日
7	Kanade Tatsumi, Yozo Okazaki, Masataka Kajikawa, Takuji Ichino, Mayuko Sato, Kiminori Toyooka, Kazuki Saito, Hideya Fukuzawa, Kazufumi Yazaki	Kyoto Universi ty	Lipid molecules concomitantly secreted with shikonin, a lipophilic secondary metabolite, produced in <i>Lithospermum erythrorhizon</i>	The 23rd International Symposium on Plant Lipids	平成30年7月8日～ 13日
8	巽 奏、岡咲洋 三、梶川昌孝、市 育代市野琢爾、齊 藤和季、福澤秀 哉、矢崎一史	京都大学	ムラサキ培養細胞 における脂質の細 胞外分泌とシコニ ンとの関わり	第59回日本植物生 理学会（札幌）	平成30年3月28日 ～30日
9	矢崎一史	京都大学	ムラサキのシコニ ン生産誘導系を用 いたオミックス解 析	日本農芸化学会 2017年度大会 （シンポジウム講 演）	平成 29 年 3 月 19 日

10	Ueoka, H., Miyawaki, T., Sasaki, K., Ichino, T., Yamamoto, K., Ohara, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Yazaki, K.	京都大学	Functional analysis of geranyl diphosphate synthase localized in cytosol in Lithospermum erythrorhizon	The 2nd Asia Resear ch Node Symposium on Humanosphere Science (京都)	平成29年7月19日 ～ 20日
11	市野琢爾、藤原 崇志、棟方有桂、 矢崎一史、青山卓 史	京都大学	植物における代謝 産物の蓄積機構の 制御技術の開発	BioJapan2018 (横 浜)	平成29年10月11日 ～13日
12	Ueoka, H., Miyawaki, T., Sasaki, K., Ichino, T., Yamamoto, K., Ohara, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Yazaki, K.	京都大学	Characterization of geranyl diphosphate Synthase (GPPS) in Lithospermum erythrorhizon	JSBBA KANSAI 4th Student Forum	平成29年11月4日
13	矢崎一史	京都大学	植物二次代謝の生 合成と輸送の統合 を目指して	第34 回日本植物 細胞分子生物学会 学術賞受賞講演	平成28年9 月2日

(4) 新聞・雑誌等への掲載
なし

(5) その他
なし

2.1.3 代謝系遺伝子発現制御技術／栽培・生育環境による発現制御技術

「遺伝子発現制御および栽培環境制御の融合による代謝化合物高生産基盤技術開発」

(担当機関：産業技術総合研究所、北海道大学、奈良先端技術大学院大学、横浜国立大学、千葉大学、北海道科学技術総合振興センター)

(1) 背景と目的

基本計画：研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」における

①- (2) 「代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発」に関して以下の4つの個別研究開発テーマ、研究開発テーマ 2.1.3-1

【CMVベクターとクロマチンリモデリングによる植物内在性遺伝子のメチル化制御技術開発】
(国立研究開発法人産業技術総合研究所)

研究開発テーマ 2.1.3-2

【目的遺伝子の特異的メチル化解除による発現制御技術開発】
(国立大学法人北海道大学/国立研究開発法人産業技術総合研究所)

研究開発テーマ 2.1.3-3

【代謝系関連遺伝子の安定化技術開発】
(国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学)

研究開発テーマ 2.1.3-4

【転写・発現調節因子等による遺伝子発現制御技術】
(国立大学法人横浜国立大学)

①- (3) 「栽培・生育環境による発現制御技術の研究開発」に関して2つの個別研究開発テーマ

研究開発テーマ 2.1.3-5

【環境ストレスを活用した植物の二次代謝系制御による高効率物質生産】
(国立大学法人千葉大学)

研究開発テーマ 2.1.3-6

【人工環境・栽培技術における代謝系遺伝子変動解析を利用した化合物高効率生産技術開発】(公益財団法人北海道科学技術総合振興センター)

の共同提案から構成され、最終的に個々の技術開発要素を単独、もしくは、適宜組み合わせることで、目的代謝化合物の高生産を可能にする基盤技術を開発するものである。

以下に、各課題の詳細について記載する。

2.1.3-1. CMVベクターとクロマチンリモデリングによる植物内在性遺伝子のメチル化制御技術開発

(担当機関：国立研究開発法人産業技術総合研究所)

植物は、他の生物種と異なり複雑・多様なメチル化・脱メチル化機構を有している。例えば、哺乳類等のDNAメチル化はCGメチル化が基本であるが、植物の場合はCGメチル化のみならず、CHG、CHH(Hは、G以外の塩基)のメチル化も行われ、これら塩基配列の変化を伴わないメチル化機構により遺伝子の発現が制御されている。しかしながら、現在、植物の特定の内在性遺伝子に対してDNAメチル化を誘導出来た例は数えるほどでしか無く、未だ効果的な手法は無い。そこで、本研究では、キュウリモザ

イクウイルス (Cucumber mosaic virus : CMV) ベクター、および DNA のメチル化・脱メチル化過程において重要なクロマチン構造を遺伝子操作により改変する技術の両方を融合させることで、新規の効率的な植物内在性遺伝子のメチル化誘導技術を開発するものである。

2. 1. 3-2. 目的遺伝子の特異的メチル化解除による発現制御技術開発

(担当機関：国立大学法人北海道大学)

植物の遺伝子発現はエピジェネティクスによって DNA やヒストンのメチル化調節を受けている。植物の機能性成分の蓄積レベルの調節もこのエピジェネティクスに依存している。DNA のメチル化や脱メチル化を自在に操作することができれば、植物由来の機能性有用成分の生産に大いに貢献する。本研究は DNA のメチル化を特異的に解除する技術開発であり、DNA メチル化を誘導する産総研の技術と対をなす。

2. 1. 3-3. 代謝系関連遺伝子の安定化技術開発

(担当機関：国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学)

植物の二次代謝系遺伝子を強化／改変する上で、植物へ導入した遺伝子を高発現させる技術（高転写：プロモーター、高翻訳：5' UTR）の幾つかは既に確立されている。しかし、導入した遺伝子由来の mRNA 蓄積量が意図せず極めて低い場合がしばしば報告されている（mRNA の不安定性）。仮に多量の mRNA が転写合成されても、不安定な場合は細胞内で速やかに分解され、残存する翻訳可能な mRNA 量が少ないものとなる。その場合には、目的代謝系の強化は十分には達成できない。そこで、植物 mRNA のどのような配列／構造が認識されて分解されているかをゲノムスケールでの解析とインフォマティクス解析を駆使することで明らかにし、植物へ導入する外来遺伝子由来の mRNA の不安定要因を特定するとともに、細胞へ導入する目的遺伝子内に想定される不安定要因をあらかじめ排除し、安定化できる技術の開発を目指す。

2. 1. 3-4. 転写・発現調節因子等による遺伝子発現制御技術

(担当機関：国立大学法人横浜国立大学)

「転写・発現調節因子等による遺伝子発現制御技術」では実施者らがこれまでに取り組んできた発光レポーターを用いた遺伝子発現制御モニタリング技術を中心として、各種遺伝子発現制御配列、転写調節因子の活性評価技術、低分子化合物等の生理活性物質探索技術のノウハウに関する技術的蓄積を活用・高度化し、植物の二次代謝関連遺伝子等の高効率同時発現制御（抑制/向上）を目的とした研究開発を行う。

2. 1. 3-5. 環境ストレスを活用した植物の二次代謝系制御による高効率物質生産

(担当機関：国立大学法人千葉大学)

植物は環境変化に適応するための様々な能力を有している。この環境応答は、生育期間中の環境、特に物理環境要因（光、温度、水分、気流など）および化学環境要因（空気中ガス、培養液など）の変化で誘導され、要因によって応答する器官（葉、花、茎など）は異なる点が特徴である。そこで本テーマでは複合的な環境ストレスを与えて二次代謝系の生合成の挙動を解明し、目的とする有用成分の高発現を器官特異的に誘導する手法を確立し、植物工場で高効率物質生産を実証する。

2. 1. 3-6. 人工環境・栽培技術における代謝系遺伝子変動解析を利用した化合物高効率生産技術開発

(担当機関：公益財団法人北海道科学技術総合振興センター)

本テーマは、栽培環境や栽培技術をどのように変更すれば、目的とする二次代謝産物の生合成増加が期待できるかの情報提示・示唆が可能になる技術開発を目的とする。

一般的に、植物が生合成、蓄積する二次代謝産物は20万から100万種類に及ぶとも言われるが、気候条件や外的ストレス等の外的要因、生長段階や植物ホルモンなどの内的要因によって、その成分含量は大きく変化することが知られている。したがって、機能性を有する産業上有用な二次代謝産物を、栽培環境や方法を変えることで高生産を試みた研究例は数多くあるが、植物種や目的産物がそれぞれ異なり、当然関与する代謝系も異なっている。

そこで、迅速に植物二次代謝産物高生産の実用化に直結する技術を開発することを主目的として研究開発を実施する。

(2) 位置づけ、目標値

研究項目（担当機関）	中間目標値(H30)	最終目標値（H32）	目標の見える化の達成度
①-（2）代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発 （国立研究開発法人産業技術総合研究所、国立大学法人北海道大学、国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学、国立大学法人横浜国立大学）	・メチル化誘導、遺伝子発現制御因子解析等の基本技術を確立する。 ・目的代謝系遺伝子の発現を2倍以上増強又は1/5以下に抑制する技術の確立。	・目的代謝系遺伝子の発現を5倍程度増強又は1/10以下に抑制する技術を確立する。 ・研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した遺伝子発現制御技術の有効性を示す。	最終目標を十分に達成、又は最終目標達成の見込みが十分にある。

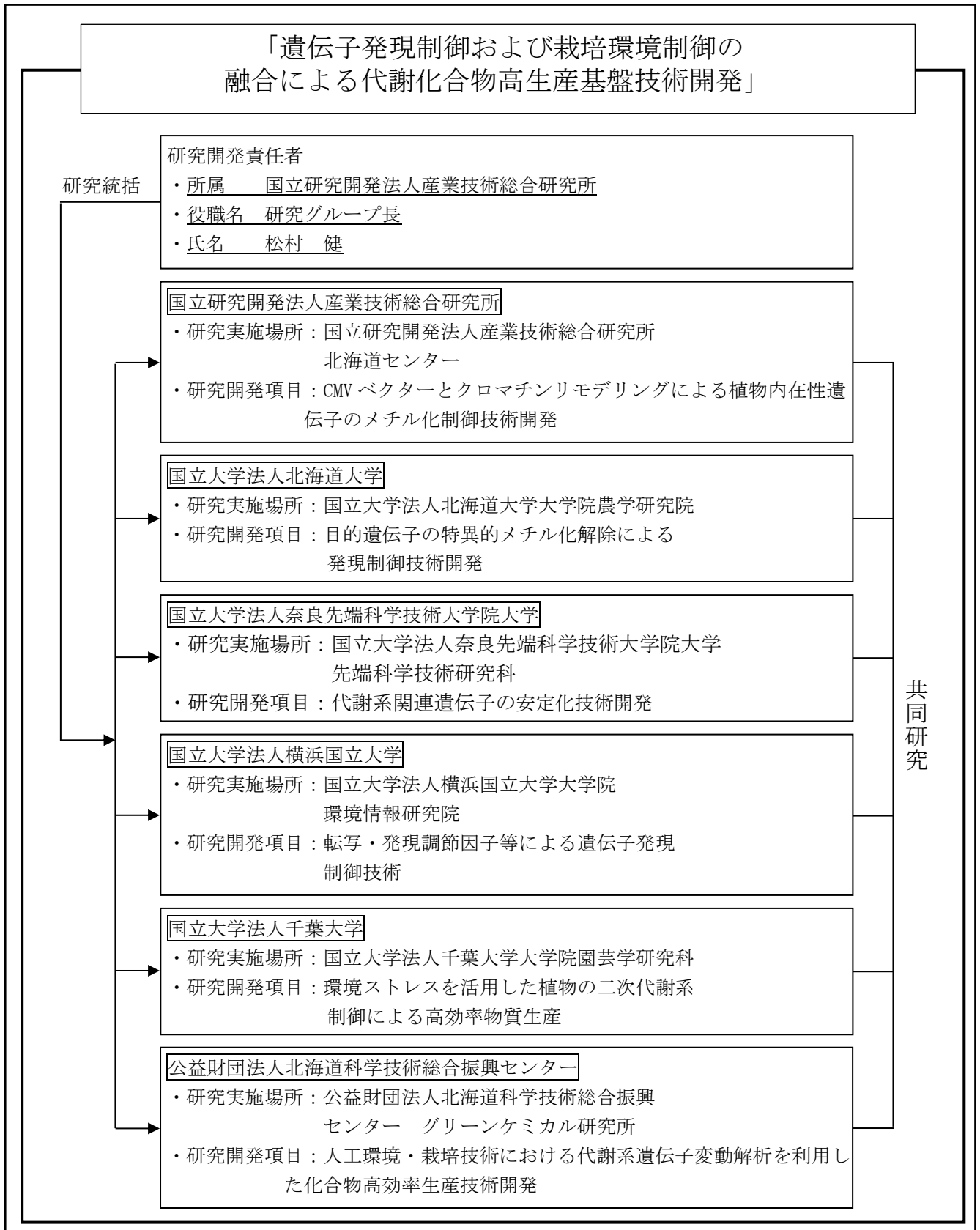
①-（3）栽培・生育環境による発現制御技術の研究開発 （国立大学法人千葉大学、公益財団法人北海道科学技術総合振興センター）	・栽培環境因子と代謝系主要遺伝子の半数の解析の完了。	・目的代謝系における主要遺伝子／産物の発現を5倍程度増強させる技術を確立する。 ・研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した栽培・生育環境による発現制御技術の有効性を示す。	最終目標を十分に達成、又は最終目標達成の見込みが十分にある。
--	----------------------------	--	--------------------------------

(3) 全体計画

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」

事業項目	平成28年度				平成29年度				平成30年度				平成31年度	平成32年度
	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期		
①- (2) 代謝系 遺伝子発現制御技術 の研究開発 (国立研究開発法人産業技術総合研究所、国立大学法人北海道大学、国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学、国立大学法人横浜国立大学)														
①- (3) 栽培・ 生育環境による発 現制御技術の研究 開発 (国立大学法人千葉大学、公益財団法人北海道科学技術総合振興センター)														

(4) 実施体制



(5) 運営管理

これまでに以下の会議を実施している。

平成 28 年	12 月	20 日	全体会議（横浜国立大学 みなとみらいキャンパス）
平成 29 年	6 月	6 日	全体会議（産業技術総合研究所 北海道センター）
平成 29 年	6 月	7 日	テレビ会議（参加機関：産総研、千葉大、ノーステック）
平成 29 年	6 月	16 日	テレビ会議（参加機関：産総研、千葉大、ノーステック）
平成 29 年	6 月	26 日	テレビ会議（参加機関：産総研、千葉大、ノーステック）
平成 29 年	8 月	9 日	会議（産総研、北大、奈良先、ノーステック）
平成 29 年	11 月	24 日	テレビ会議（参加機関：産総研、千葉大、ノーステック）
平成 29 年	12 月	13 日	全体会議（千葉大学 松戸キャンパス）
平成 30 年	1 月	9 日	会議（産総研、千葉大、ノーステック）
平成 30 年	4 月	18 日	テレビ会議（参加機関：産総研、北大、奈良先）
平成 30 年	5 月	11 日	全体会議（北海道大学 農学部）
平成 30 年	5 月	16 日	テレビ会議（参加機関：産総研、北大）

* ノーステック：公益財団法人北海道科学技術総合振興センターの略称

(6) 実施の効果

本課題（6 課題）は、代謝系の新規遺伝子操作技術の開発・提供、および遺伝子操作を伴わない（対象植物種個々の代謝系情報・遺伝子情報に依らず）生育・栽培環境改変による目的代謝産物生合成増強を目指す基盤技術の開発である。

当該技術は、基本的に植物種・対象代謝産物を選ぶこと無く広範囲に応用・展開できるモノであるため、当該技術の産業利用上の効果は非常に大きいと期待できる。

例えば、植物由来代謝産物利用産業の一つとして容易に考えられる薬用植物を利用した漢方薬国内市場は、約 1,400 億円強、健康食品等国内市場は、約 7,500 億円、薬用入浴剤や化粧品等の市場は約 2 兆円規模である。

当然、当該研究成果がいきなりこれら広範囲の産業において利用されるとは言い難いが、一方、生物由来（動物・植物）、合成による有用成分 50 品目の 2016 年実績は約 2,000 億円超との報告もあり、産業上主要な特定の代謝産物数種類においてでも実用化されれば、その費用対効果は非常に大きいと期待される。

http://www.tsumura.co.jp/zaimu/business/bsn/pdf/business_of_tsumura.pdf?20170110

<https://www.yano.co.jp/press/press.php/001804>

柴田敏郎（2011）「薬用植物の特性と栽培・生産技術」より

<https://www.fuji-keizai.co.jp/market/17125.html>

(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	成果
①- (2) 代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発 (国立研究開発法人産業技術総合研究所、国立大学法人北海道大学、国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学、国立大学法人横浜国立大学)	○	<ul style="list-style-type: none"> ・メチル化誘導、遺伝子発現制御因子解析等の基本技術を確立した。 ・目的代謝系遺伝子の発現を3倍以上増強又は1/5以下に抑制する技術を確立した。
①- (3) 栽培・生育環境による発現制御技術の研究開発 (国立大学法人千葉大学、公益財団法人北海道科学技術総合振興センター)	○	<ul style="list-style-type: none"> ・栽培環境因子と代謝系主要遺伝子の半数の解析を完了した。

(8) 最終目標の達成可能性

研究項目 (担当機関)	現状	最終目標	達成見通し
①- (2) 代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発 (国立研究開発法人産業技術総合研究所、国立大学法人北海道大学、国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学、国立大学法人横浜国立大学)	<ul style="list-style-type: none"> ・メチル化誘導、遺伝子発現制御因子解析等の基本技術を確立した。 ・目的代謝系遺伝子の発現を3倍以上増強又は1/5以下に抑制する技術を確立した。 	<ul style="list-style-type: none"> ・目的代謝系遺伝子の発現を5倍程度増強又は1/10以下に抑制する技術を確立する。 ・研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した遺伝子発現制御技術の有効性を示す。 	各機関で開発される技術を融合させることにより、十分達成可能である。
①- (3) 栽培・生育環境による発現制御技術の研究開発 (国立大学法人千葉大学、公益財団法人北海道科学技術総合振興センター)	<ul style="list-style-type: none"> ・栽培環境因子と代謝系主要遺伝子の半数の解析を完了し、また、各種条件下における栽培試験を実施中。 	<ul style="list-style-type: none"> ・目的代謝系における主要遺伝子/産物の発現を5倍程度増強させる技術を確立する。 ・研究開発項目②で対象とする実用植物において、開発した栽培・生育環境による発現制御技術の有効性を示す。 	既に各種処理による遺伝子変動解析の系は確立できているので、充分到達可能である。

(9) 研究開発の成果と意義

2.1.3-1. CMV ベクターとクロマチンリモデリングによる植物内在性遺伝子のメチル化制御技術開発

(担当機関：国立研究開発法人産業技術総合研究所)

植物では、塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御をすることで、育成環境変動に対応している現象が多数報告されており、これらの発現制御にはDNAのメチル化・脱メチル化が関与している。特に植物は独自のメチル化制御機構を発達させており、哺乳類等で見られるCG配列のシトシンメチル化のみならず、CHG (H=C, A, T)、CHHを合わせた3種類のコンテキストにおいて別々の機構でメチル化を制御することで遺伝子発現を制御することが大きな特徴である。

植物では、導入した外来性遺伝子が高頻度にメチル化される例や、外来性遺伝子に人為的にメチル化を誘導することで、容易にtranscriptional gene silencing (TGS)が誘導可能な例が多数報告されている。その一方で、植物内在性遺伝子に対する人為的なDNA配列特異的メチル化・脱メチル化の誘導およびTGSの誘導は容易ではないとされている。そこで本研究では、植物内在性遺伝子に対してTGS誘導を試みた際の標的遺伝子に関連する分子生物学的変動について知見を得るため、phytoene desaturase (*PDS*) 遺伝子のプロモーター配列をモデルとして、タバコ的一种である *Nicotiana benthamiana* を用いてTGS誘導試験を実施した(図2.1.3-1-1)。

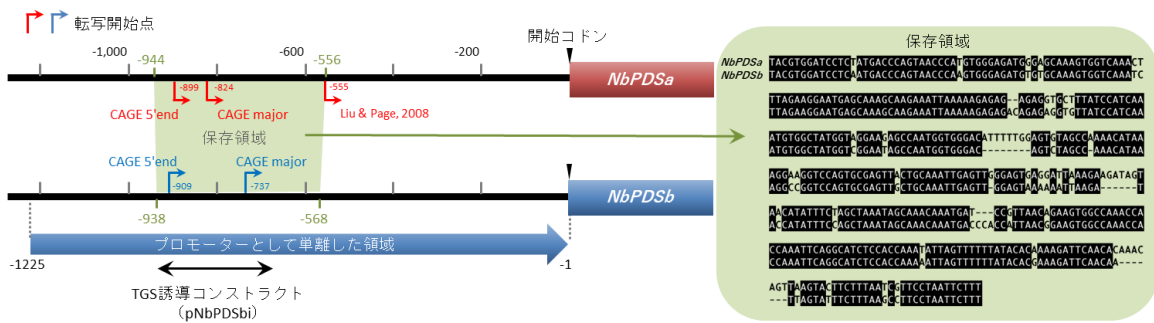


図 2.1.3-1-1 *PDS* 遺伝子プロモーター領域の概略

転写開始点の位置解析データ(図中 CAGE)は奈良先端大加藤晃先生から提供していただいた。

CAGE 5end=検出された一番上流の位置。CAGE major=最も多く検出された位置。

i) モデル遺伝子プロモーター領域の機能解析

本研究で用いる *PDS* 遺伝子は、発現抑制効果が表現型として判別しやすく、また容易に post transcriptional gene silencing (PTGS) を誘導しやすい一方で TGS の誘導が困難だとされている。そこで、*N. benthamiana* から *PDS* 遺伝子のプロモーター配列として、その翻訳領域上流配列を単離し、その下流に β -グルクロニダーゼ (*GUS*) 遺伝子を挿入したコンストラクトを T-DNA ベクター上に構築した (pNbPDSb-*GUS*)。本ベクターを用いて *N. benthamiana* における *GUS* 遺伝子の一過性発現試験を行った結果、*GUS* 染色試験により *GUS* 遺伝子の発現が認められたことから、単離した翻訳領域上流配列はプロモーターとして機能することを確認した。

ii) *PDS* 遺伝子プロモーター領域に対する TGS 誘導試験

まずは従来法により *PDS* 遺伝子プロモーターに対する TGS を誘導するため、*PDS* 遺伝子プロモーター領域の一部配列について逆反復配列を持つバイナリーベクター (p35S-pNbPDSbi) を構築した。p35S-pNbPDSbi を用いて TGS が誘導可能かを確認するため、アグロインフィルトレーション法により p35S-

pNbPDSbiを一過的に *N. benthamiana* に導入した。バイサルファイトシーケンス法 (BS-Seq 法) により *PDS* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化状態を解析した結果、p35S-pNbPDSbi を植物体に導入した組織において、DNA のメチル化が誘導されていることが明らかとなった (図 2.1.3-1-2)。*PDS* 遺伝子の発現をリアルタイム PCR で解析した結果、ベクターコントロールである p35S-GUS 導入組織の 50%以下へと低下していた (図 2.1.3-1-2)。また、DNA メチル化誘導に重要な 21, 22, 24nt small-RNA を解析した結果、inducer 配列特異的な small RNA の蓄積が認められた。

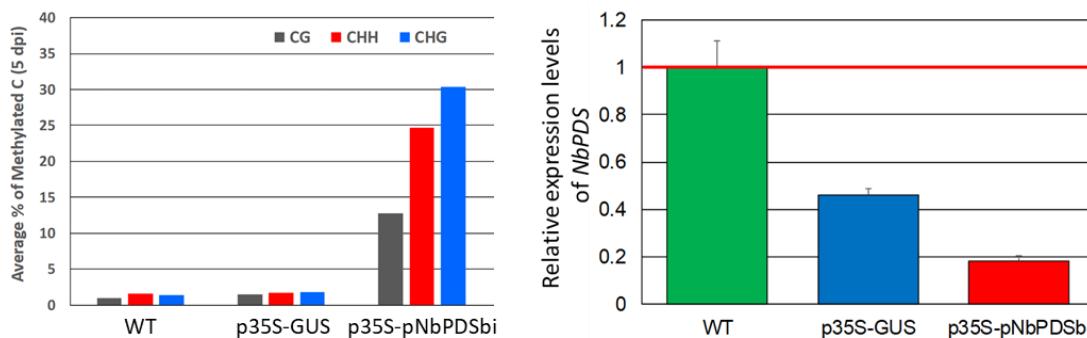


図 2.1.3-1-2 インフィルトレーション 5 日目における *NbPDSb* プロモーター領域の DNA メチル化解析結果 (左) と *PDS* 遺伝子発現解析結果 (右)

以上から本ベクターにより DNA メチル化が誘導可能なことを確認したので、アグロバクテリウム法により *N. benthamiana* の組換え体の作出を進めた。これまでに作出した 129 系統の内、*PDS* 遺伝子の発現が抑制された系統は 50 系統であり、その抑制割合は最大で約 40%程度であった (図 2.1.3-1-3)。このように従来技術を用いた TGS 誘導では、最大約 40%程度の発現抑制にとどまるため、抑制度をさらに向上させる技術の開発が必要であると考えられた。

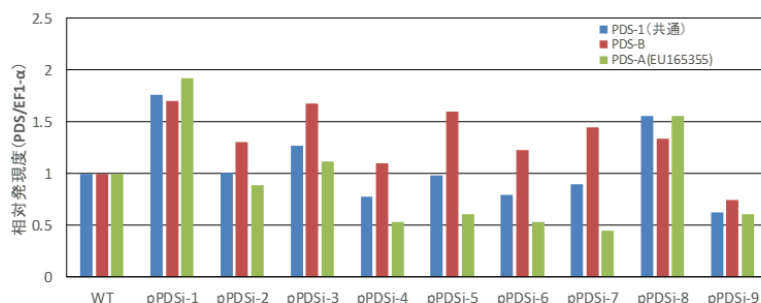


図 2.1.3-1-3 *PDS* 遺伝子抑制タバコ植物体の *PDS* 遺伝子発現解析結果

p35S-pNbPDSbi ベクターを用いた形質転換の結果得られた再分化個体について、リアルタイム RT-PCR による *PDS* 遺伝子発現解析を行った。その結果の一部をここに示す。

iii) ウイルスベクターによる植物内在性遺伝子抑制試験

iii)-1. 標的領域特異的な DNA メチル化誘導系の構築

従来技術より迅速・簡便で高効率な TGS 誘導を可能にする技術を開発するため、キュウリモザイクウイルス (CMV) ベクターを用いて研究を進めた。プロモーターと同じ配列を有する CMV ベクターを *N. benthamiana* に感染させ、ウイルスの複製過程で生じる 2 本鎖 RNA から大量の siRNA を供給することで、RNA directed DNA Methylation (RdDM) による DNA メチル化および転写抑制を試みた。通常植物の RdDM 機構では、まずポリメラーゼ IV (Pol IV) がメチル化される特定のゲノム領域を転写する。Pol IV 転写産物は RDR2 により 2 本鎖 RNA となり、DCL3 により 24 塩基の siRNA に切断される。siRNA は AGO4 に

取り込まれ、siRNA と相補な配列を持つ scaffold RNA と複合体を形成する。Scaffold RNA は、クロマチンリモデリング因子 DRD1 などがゲノム DNA の 2 本鎖構造をほどいた領域において、ポリメラーゼ V (PoIV) により転写される。次に、RDM1 により AGO4 複合体に DNA メチル基転移酵素 DRM2 がリクルートされることで、標的領域特異的に DNA のメチル化が誘導されると考えられている。

N. benthamiana は *PDS* 遺伝子を 2 コピー (*NbPDSa*, *NbPDSb*) 持つため、両者を同時にターゲットできるように、保存配列を中心に標的配列 (inducer) を設計した (図 2.1.3-1-4)。inducer はセンス鎖、アンチセンス鎖の両方を比較検討した。また、対照としてウイルスベクターとして世界的に利用されているタバコ茎えそウイルス (TRV) ベクターを使用した。なお TRV は国内未発生ウイルスであり、植物防疫法による輸入禁止措置がなされ、実用化には適さないことから、本研究では国産の CMV ベクターを軸として進めている。

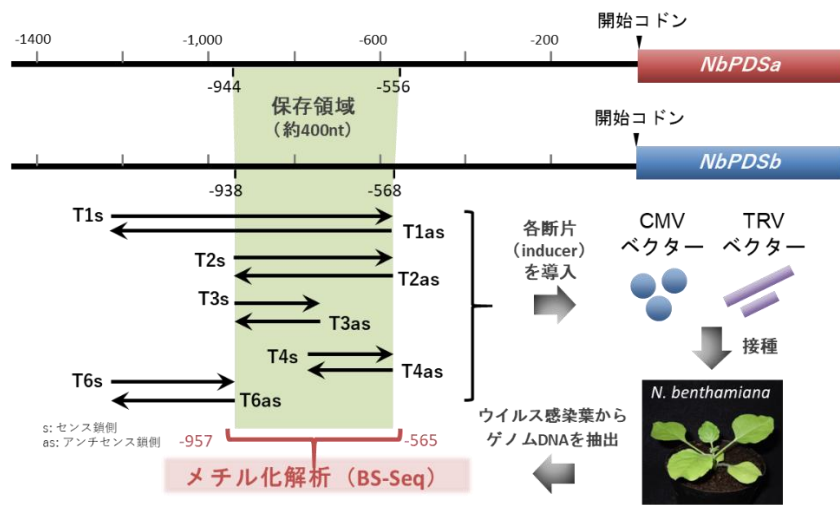


図 2.1.3-1-4 CMV・TRV ベクターによる *PDS* 遺伝子に対する TGS 誘導についての概要

mRNA の定量はリアルタイム PCR により *NbPDSa* と *NbPDSb* を同時に検出することで実施した。その結果、ウイルス接種 21 日後において mRNA は最大で約 37% (inducer が T3as の場合) までの減少が見られるものの、*PDS* 遺伝子の発現が大きく抑制された際に現れる組織の白色化は認められなかった (図 2.1.3-1-5)。またセンス鎖・アンチセンス鎖の間で顕著な違いは認められなかった。

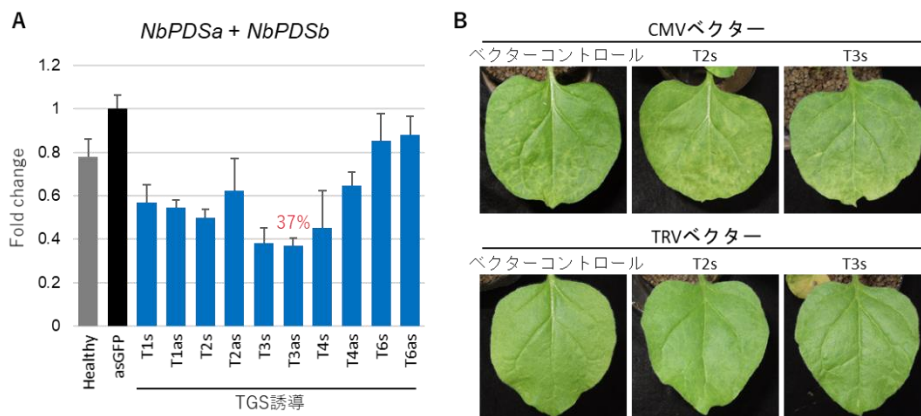


図 2.1.3-1-5 CMV・TRV ベクターを用いた TGS の誘導 (A) CMV ベクターで TGS を誘導した際の *PDS* 遺伝子 mRNA の定量結果 (接種 21 日後)。ベクターコントロール (asGFP) に対する相対発現量を記載した。(B) CMV・TRV ベクターで TGS を誘導した際の葉の表現型。

標的ゲノムDNA領域のDNAメチル化状態を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いたBS-Seq法によりDNAのシトシンメチル化頻度を解析した。その結果、CMV・TRVともに標的領域特異的なシトシンメチル化が認められた(図2.1.3-1-6A)。また、inducerとしてセンス・アンチセンスいずれを用いた場合でも同程度誘導されていた。植物ゲノムのシトシンはCG、CHG、CHH(H=A, C, T)3種類のコンテキストについて別々の機構によりメチル化状態が制御されているが、CMV・TRVベクターいずれも全てのコンテキストでメチル化されており、メチル化頻度はCHG>CHH>CGの順で高かった。また、RdDMによるDNAメチル化には21, 22, 24 ntのsiRNAが関与するため、次世代シーケンサーを用いたSmall RNA-Seq法でsiRNAの蓄積状態を解析した結果、CMV・TRV感染個体では、標的配列に対する21, 22, 24 ntいずれのサイズのsiRNAも蓄積しており、両ベクター間で顕著な差異は認められなかった(図2.1.3-1-6B)。

これまで植物ウイルスベクターを用いたTGS誘導について詳細な解析が行われた例はない。そこでまず、CMVベクター接種後のDNAメチル化およびmRNA量の低下が生じるタイミングを明らかにするために、inducerとしてT3sを挿入したCMVベクターを接種した後4, 6, 10, 14日におけるmRNA量およびDNAメチル化頻度を解析した。その結果、ウイルスが感染・移行した上位葉では、接種4日後にmRNA量が減少しはじめ、接種10日後で最も減少していた(約49%; 図2.1.3-1-6C)。一方、DNAメチル化は接種6日後から誘導が認められ、接種14日後までメチル化の割合が継続して上昇していた(図2.1.3-1-6D)。また、接種14日後までの間、TGS誘導個体において*PDS*遺伝子の発現が大きく低下した際に現れる葉組織の白化は生じないものの、ベクターコントロールと比較して葉の退色が認められた(図2.1.3-1-6E)。以上の結果より、*PDS*遺伝子のDNAメチル化を接種1週間以内という非常に早い段階から誘導可能なことが明らかとなった。

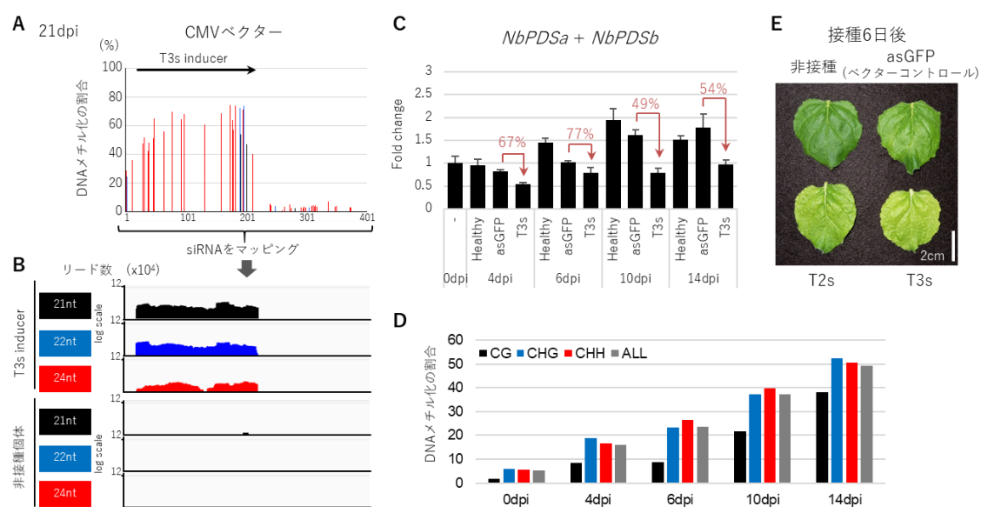


図2.1.3-1-6 T3s inducerを挿入したCMVベクターの接種21日後における標的ゲノム領域周辺のDNAメチル化状態(A)およびsiRNA蓄積状態の解析結果(B)。(C-D)接種前(0dpi)および接種4, 6, 10, 14日後の*PDS*遺伝子mRNAの定量(C)、DNAメチル化の割合(D)および表現型(E)。Cでは0dpiの発現量に対する相対発現量を記載した。dpi=接種後日数。

次に、*N. benthamiana*は*PDS*遺伝子を2コピー(*NbPDSa*, *NbPDSb*)持つため、*NbPDSa*と*NbPDSb*でTGSの誘導程度に違いがあるかを検証した。上述の経時変化を解析したサンプルを用いて、*NbPDSa*と*NbPDSb*を区別してreal-time PCRにより定量したところ、*NbPDSb*より*NbPDSa*の方が顕著にmRNA量が減少しており、*NbPDSa*と*NbPDSb*の間でTGS誘導効果に違いがあることが判明した。

これまでの inducer は全て *NbPDSb* の配列をベースに作成したため、*NbPDSa* の配列との間に塩基のミスマッチが存在する (図 2.1.3-1-1)。*NbPDSa* の方が *NbPDSb* より TGS 誘導効率が高いことが判明したため、*NbPDSa* の配列と 100%一致する inducer (*NbPDSa*-T30s) を用いることで、TGS 誘導効率の上昇が見込めると推察した。その結果、*NbPDSa* 由来の inducer の方がより効率的な TGS の誘導が可能であり、*NbPDSa* の発現量を 28%まで低下させることに成功した (図 2.1.3-1-7)。

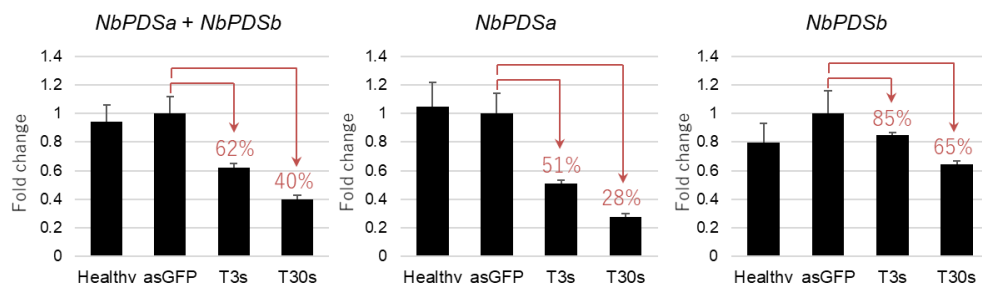


図 2.1.3-1-7 *NbPDSa* 由来 inducer の T30s および *NbPDSb* 由来の T3s 発現個体における *PDS* 遺伝子 mRNA の定量結果 (接種 12 日後)。ベクターコントロール (asGFP) に対する相対発現量を記載した。

iii)-2. 2b 発現組換え体を用いた検討

CMV がコードする 2b 遺伝子は DNA のメチル化を抑制する報告がある一方で (参考文献 1, 2)、メチル化の促進を示唆する報告もある (参考文献 3)。そこで、我々が独自に保有している 2b 発現組換え体を用いて、標的プロモーター領域のメチル化状態を解析した。2b 発現組換え体 2 系統 (#28、#41) について解析した結果、非接種個体 (inducer を発現させていない個体) において、野生型 (WT) と比較して CG、CHG、CHH いずれのコンテキストにおいてもメチル化レベルの上昇が認められた (図 2.1.3-1-8)。この結果は 2b 遺伝子の発現のみでメチル化が促進されることを示唆する。今後は 2b 発現組換え体を素材候補として用い研究開発を進める。

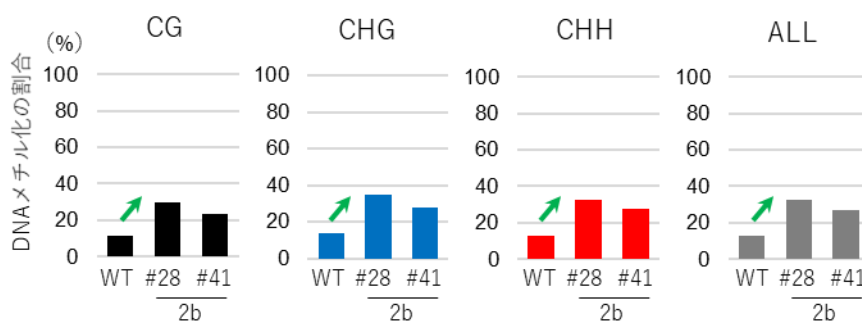


図 2.1.3-1-8 2b 発現形質転換体 (非接種個体) におけるシトシンメチル化状態

【参考文献】

- (1) Guo, H. S. & Ding, S. W., The EMBO Journal, 2002, 21, 398-407
- (2) Duan, C. G. et al., Plant Cell, 2012, 24, 259-274
- (3) Kanazawa, A. et al., The Plant Journal, 2011, 65, 156-168.

iv) メチル化誘導目的の内在性遺伝子プロモーター配列を導入した組換え体の作出

内在性遺伝子と比較して外来性遺伝子に対する TGS の誘導は比較的容易である。これは外来性遺伝子が組み込まれたゲノム領域ではクロマチン構造にゆがみが生じ、TGS を誘導した際に、初期 siRNA の大量合成が効率よく進むことで、メチル化が誘導されやすい状態になったためだと推察される。我々はこの考えをもとに、内在性遺伝子と同一な配列を“外来性”配列として導入した後、この外来性配列に対して TGS を誘導することで、初期 siRNA の大量合成を狙い、本来の標的である内在性遺伝子のメチル化を誘導する戦略を立てた。

そこでまずは前項 i) で構築した pNbPDSb-GUS を用いて形質転換した *N. benthamiana* を 132 系統得た。形質転換当代の葉組織について GUS 染色した結果、43 系統 (32.6%) で GUS 発現を確認したが、植物体を維持する過程で GUS 発現が減少・消失し、最終的に GUS 発現が確認された個体は 22 系統 (16.7%) となった。得られた全 132 系統の組換え体において、PDS 遺伝子の発現抑制に起因する葉の白色化は認められなかったことから、外来性 PDS プロモーター配列のみに DNA メチル化が誘導された可能性が考えられた。現在、外来性と内在性配列を区別してメチル化状態の比較解析を進めている。

v) クロマチンリモデリングを利用した発現制御技術

上述の初期 siRNA の大量生成が成功した場合においても、クロマチン構造を緩めることで、より高効率に RdDM 機構が働くのではないかと考えた。シロイヌナズナからクロマチンリモデリングファクター (CRF) を 2 種類 (CRF-A、CRF-B) 単離し、植物発現用 T-DNA ベクターに導入した。これらの発現ベクターで *N. benthamiana* を形質転換し、サザンブロット解析により 1 コピー挿入系統と判断した組換え体を、CRF-A は 56 系統、CRF-B は 30 系統得た。

vi) クロマチンリモデリング因子を用いた TGS 誘導効率の上昇

CRF-A 過剰発現体 (コンストラクト 2 種類 2 系統ずつ)、CRF-B 過剰発現体 (2 種類 3 系統ずつ) に inducer 配列を挿入した CMV (inducer=NbPDSa-T17s)、TRV ベクター (inducer=NbPDSb-T2s) を混合接種した。その結果、*NbPDSa* の発現量について、野生型植物体でウイルス非接種個体の 40.2% まで発現量が減少するのに対して、CRF-A 過剰発現体ではすべての系統でさらに減少し、最大で 17.5% までの減少が認められた (図 2.1.3-1-9)。また、CRF-B に関しては、野生型植物体でウイルス非接種個体の 41.7% まで減少するのに対して、CRF-B 過剰発現体はすべての系統でさらに減少し、最大で 22.9% までの減少が認められた (図 2.1.3-1-9)。以上の結果から、CRF-A または CRF-B 遺伝子を過剰発現することで、TGS 誘導効率を顕著に上昇させることに成功した。

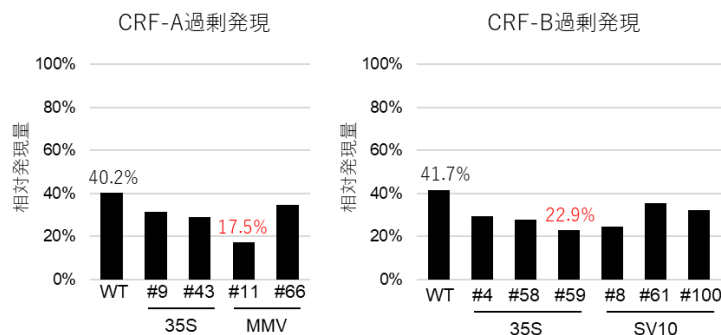


図 2.1.3-1-9 CRF-A、CRF-B 過剰発現体において TGS を誘導した際の mRNA の減少程度 (接種 21 日後)。各系統について非接種個体を 100%とした際の発現量を記載。35S、MMV、SV10 は CRF-A、CRF-B の過剰発現に用いたプロモーターを示す。

2.1.3-2. 目的遺伝子の特異的メチル化解除による発現制御技術開発

(担当機関：国立大学法人北海道大学)

本研究は、DNA のメチル化によって発現が抑制されている特定の配列に対して、特異的に脱メチル化を誘導する技術開発である。機能性成分の蓄積に関与する遺伝子などに将来応用できれば、脱メチル化の誘導によって、ターゲットとする代謝系遺伝子の発現を上昇させることが可能である。以下に現時点まで得られた研究成果について報告する。

i) ウィルスベクターにより発現する脱メチル化誘導配列によるメチル化解除

本研究においては、脱メチル化誘導配列が効率よく、メチル化部位から合成される RNA (以下ターゲット RNA とする) をターゲットできることを利用して、ウィルスベクターから供給される脱メチル化誘導配列によってプロモーター領域から生じるターゲット RNA をターゲットし、DNA のメチル化解除を行う。この「メチル化解除に関して、メチル化部位で合成される RNA (ターゲット RNA) を消去する」というアイデアは DNA メチル化のステップを阻害することによって脱メチル化を誘導するというものであり、すでに付加されたメチル基をはずすという常識的な考え方とは大きく異なる。この技術開発の要点を以下に箇条書きにする。

①DNA からの遺伝子発現はメチル化によって抑制される。

②メチル化は P4 RNA や、Pol IV や Pol V によって、メチル化部位から合成される RNA が起点となる。

③本研究は、ウィルスベクターを感染させた植物でこの RNA を消去し、メチル化を抑制する。この RNA をターゲットに脱メチル化誘導配列をウイルスから発現させる。脱メチル化誘導配列は RNA を配列特異的にターゲットする 50~60 塩基の RNA である。

本研究ではまず、35S プロモーターなどのトランスジーンの脱メチル化誘導を試みるため、ウィルスベクターに 35S プロモーターの部分配列 (転写開始点上流 208 塩基対) を導入し、GFP を発現するベンタミアーナに接種してメチル化を誘導した。メチル化の誘導により transcriptional gene silencing (TGS) を起こしたベンタミアーナの後代 (図 2.1.3-2-1; 対象区) において、構築した脱メチル化誘導配列によるメチル化解除を試みた (図 2.1.3-2-1)。脱メチル化誘導配列は 35S プロモーター (-鎖) の転写開始点上流 80 塩基あたりをターゲットするように設計され、ベンタミアーナ (対象区) にウィルスベクターを接種した。脱メチル化誘導配列をいれたウィルスベクターを接種したベンタミアーナ後代 (図 2.1.3-2-1; 脱メチル化誘導区) において、ターゲット部位周辺のメチル化レベルが対象区と比較して減少し、GFP の発現も復帰していることが確認された (図 2.1.3-2-1; B と C の赤枠)。図 2.1.3-2-1B 及び C の赤枠領域の CG メチル化は下流の遺伝子の発現に極めて重要であることが過去の研究から判明している。

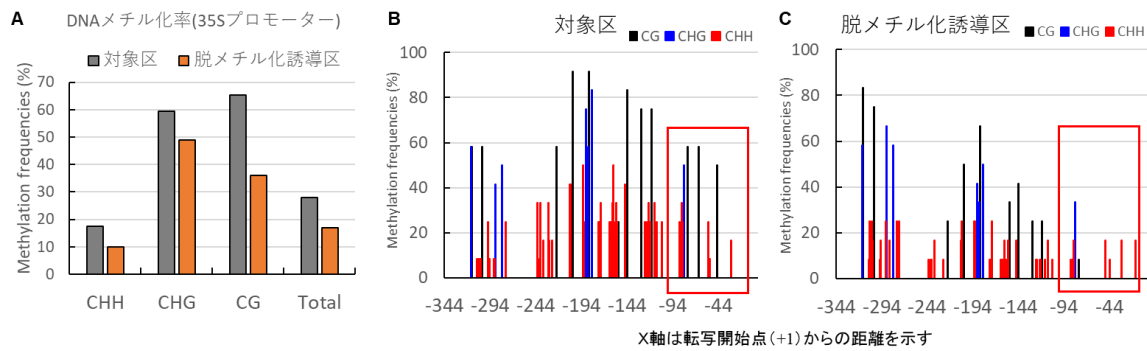


図 2.1.3-2-1 ウィルスベクターによって脱メチル化誘導配列を発現させたベンタミアーナ後代での 35S プロモーター領域のメチル化

(A) バイサルファイトシーケンシングによって検出した 35S プロモーター領域での DNA メチル化率。(B, C) (A) の結果を各メチル化部位を X 軸にして、35S プロモーター領域(+鎖)での DNA メチル化ピーク図を示したもの。赤枠は脱メチル化誘導配列によって顕著にメチル化が減少した領域を示す。A に示す通り、いずれのメチル化率も減少している。特に CG でのメチル化で顕著。

また、35S プロモーター領域に生じる RNA 断片を次世代シーケンサーによるデグラドーム解析によって検出したところ、メチル化部位から合成される RNA は、転写開始点上流約 100 塩基までに集中して蓄積していた。転写開始点から脱メチル化誘導配列によってターゲットされる部位までの領域に集中してターゲット RNA が蓄積していることから、脱メチル化誘導配列で生じたターゲット RNA 断片を検出できているものと判断される。ウィルスベクターによって脱メチル化誘導配列を発現させた植物では、この領域の脱メチル化ターゲット RNA レベルが顕著に減少していた。さらに、全ゲノムバイサルファイトシーケンスによって、35S プロモーターの+鎖、-鎖のメチル化レベルを比較したところ、脱メチル化誘導配列によってターゲットされた領域周辺のメチル化レベルが+鎖と-鎖の両方で減少していた(+鎖の結果を図 2.1.3-2-2 に示す)。

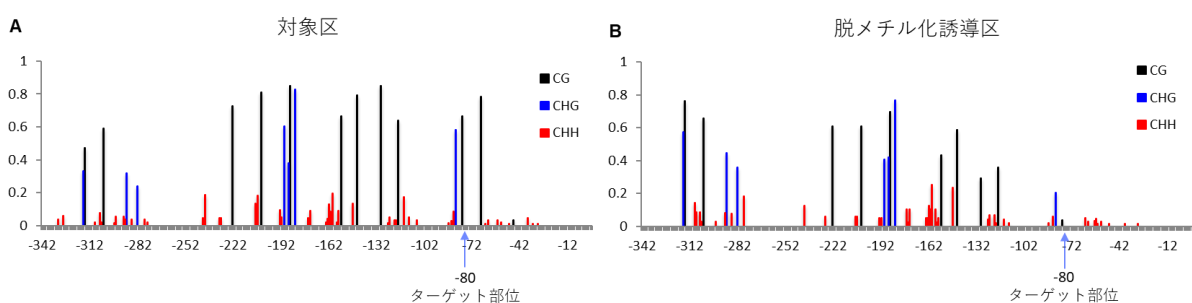


図 2.1.3-2-2 全ゲノムバイサルファイトシーケンスによる 35S プロモーター領域のメチル化

(A, B) 対象区と脱メチル化誘導区の 35S プロモーター領域(+鎖)のメチル化。脱メチル化誘導配列によるターゲット部位周辺でメチル化率が顕著に減少している。

以上の結果から、ウィルスベクターによって発現した脱メチル化誘導配列により、ターゲット RNA の特異的かつ効率的な消去と、標的のメチル化解除に成功したと判断する。

ii) トランスジーンにより発現する脱メチル化誘導配列によるメチル化解除

本研究では 35S プロモーター (+鎖) で生じる、メチル化部位から合成される RNA を標的とする脱メチル化誘導配列を設計した。GFP を発現するアラビドプシスから TGS を起こす個体 (2-NT-2, 5-NT-1) を選抜し、トランスジーンによって脱メチル化誘導配列を発現させ、脱メチル化を誘導する系を構築した。脱メチル化誘導配列を形質転換したアラビドプシス (2-A2BC-1, 5-A2BC-1) において GFP の蛍光が確認され、GFP の発現レベルの増加が確認された (図 2.1.3-2-3)。

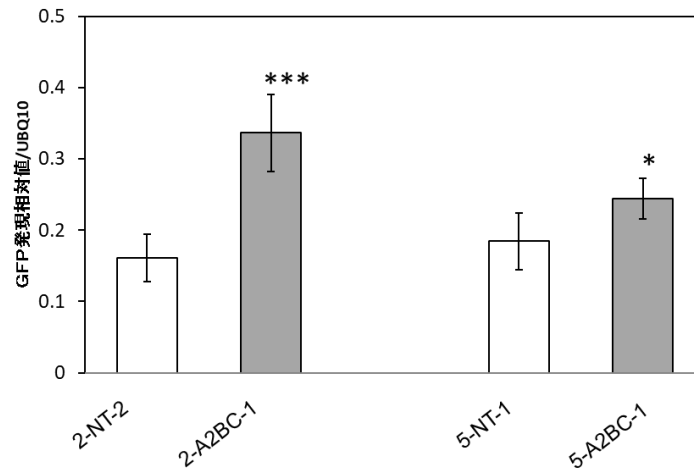


図 2.1.3-2-3 脱メチル化誘導配列発現アラビドプシスにおける GFP 発現量

TGS を起こす個体 (2-NT-2, 5-NT-1) と、脱メチル化誘導配列を形質転換したアラビドプシス (2-A2BC-1, 5-A2BC-1) における GFP 発現量。テクニカルリピート (n=4)、エラーバーは標準偏差を示し、スターは対象区と試験区の間にて検定で有意差があることを示す。

この GFP 蛍光が復帰してきた個体のメチル化レベルをバイサルファイトシーケンシングによって解析したところ、35S 全域にわたってメチル化が減少している個体や転写開始点から上流 100 塩基あたりのメチル化レベルが特に減少している個体が存在した。すべてのメチル化パターンで脱メチル化誘導配列形質転換体では減少がみられた (図 2.1.3-2-4)。

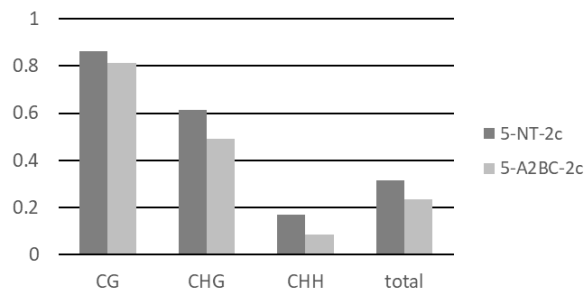


図 2.1.3-2-4 GFP 蛍光が戻ってきた植物個体 (5-A2BC-2c) から抽出した DNA のバイサルファイトシーケンシング

全部のメチル化部位における合計比率。脱メチル化誘導配列発現個体では、トータルで 25%ほどメチル化率が減少している。この個体では CHH メチル化の減少が顕著であった。

以上の結果からトランスジーンからの脱メチル化誘導配列発現においても、標的のメチル化解除に成功したと判断する。

2.1.3-3. 代謝系関連遺伝子の安定化技術開発

(担当機関：国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学)

本研究は、植物 mRNA のどのような配列／構造が認識されて分解されているかをゲノムスケールでの解析とインフォマティクス解析を駆使することで明らかにし、細胞へ導入する目的遺伝子内に想定される不安定要因をあらかじめ排除し、安定化できる技術を開発するものである。以下にこれまでに実施した研究の概要を示す。

i) Truncated RNA End sequencing (TREseq)法の確立

mRNA の分解機構は、ポリ A 鎖の短縮に依存する分解と内部配列の切断に依存する分解に大別することができる。ポリ A 鎖の短縮依存的な分解は、酵母において詳細な解析が行われているが、内部配列の切断に依存する分解機構に関しては、動植物を問わず不明な点が数多く存在している。また、共通のプロモーター (5' UTR を含む) とターミネーターで目的遺伝子を発現させる場合は、特に目的遺伝子の内部配列に依存した分解が問題となり、その切断に関わる配列的特徴を明らかにするためには、正確な切断部位の情報と切断のされやすさ (切断率) を数値化する必要がある。これまでに、ゲノムワイドに切断部位を同定する手法が植物においても報告されており、シロイヌナズナやイネにおいて mRNA の切断部位や miRNA のターゲットサイトが同定されている。しかし、これらの手法は、ポリ A 鎖付き mRNA を濃縮しているため、検出される切断部位が mRNA の 3' 側に偏りやすくなることや、同一 mRNA 上の複数の切断部位を正確に同定できていないことが問題として挙げられ、先行研究からの情報を用いて切断率を正確に数値化することはできず、切断に関わる配列的特徴は不明であった。

そこで本研究開発では、これらの問題点を改善するために、キャップ構造を有する完全長の mRNA (未分解の mRNA) の 5' 末端配列を解析する手法である CAGE (cap analysis gene expression) 解析を改良して、キャップ構造を持たず分解された mRNA の 5' 末端配列を 5' 側から網羅的に解析できる Truncated RNA End sequencing (TREseq) 法を確立した (図 2.1.3-3-1)。具体的には、培養 3 日目のシロイヌナズナ培養細胞から調製した全 mRNA から、リボソーム RNA 除去キットである Ribo-Zero によりリボソーム RNA を Cap trap によりキャップ構造が付加された mRNA をそれぞれ取り除き、その後ランダムプライマーを用いてライブラリーを構築し、次世代シーケンサーにより解析した。Cap trap を行うことで大部分のキャップ構造を持つ mRNA を取り除くことができるが、この処理は完全ではない。そこで、キャップ構造が付加された mRNA についても同様に解析することで、両者に共通するリードを後のステップでノイズとして取り除いた。これらの解析は生物学的な 2 反復で行った。

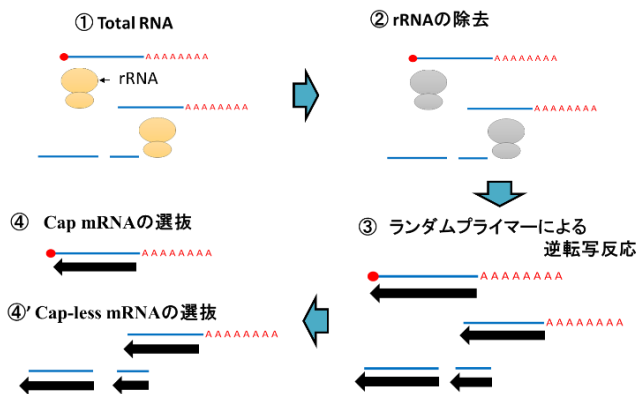


図 2.1.3-3-1 Truncated RNA end sequencing (TREseq) 法の概念図

今回の解析では、ランダムプライマーを用いてライブラリーを作製したが、比較用として先行研究と同様にオリゴ dT プライマーを用いたライブラリーも別途作製した。両者での結果を比較すると、オリゴ dT プライマーを使用した場合と比較し、ランダムプライマーの場合、検出される切断部位が 3' 側に偏るバイアスを大きく軽減することができた (図 2. 1. 3-3-2)。

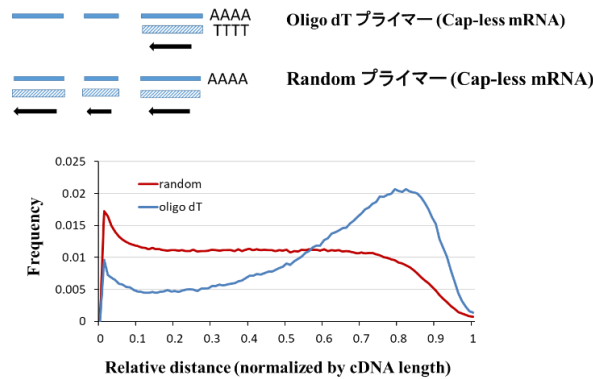


図 2. 1. 3-3-2 遺伝子内における検出された切断部位の分布
横軸の 0、1 はそれぞれ相対的な遺伝子の 5' および 3' 末端を示す。

次世代シーケンサーを用い配列情報を取得後、rRNA、クオリティが低いリードを除去しマッピングを行った。アノテーションに関しては Tair10 representative gene models を使用した。アノテーション後、tRNA / 偽遺伝子 / ミトコンドリア、葉緑体ゲノムに存在する遺伝子を解析から除外した。今回の実験は 2 反復行っているため、2 反復で共通して検出された末端のみを解析対象とした。個別遺伝子を対象とした結果の例を図 2. 1. 3-3-3 に示す。上段は切断部位である Cap less mRNA、中段は mRNA 本来の末端である Cap mRNA、下段は oligo-dT を使用した場合の切断部位の結果である。上段には中段の Cap mRNA に由来すると思われるリードが存在している (白抜き)。双方のデータを比較しそれらのリードをノイズとして取り除いた。また、先行研究と同様な解析を行った下段を見ると、個別遺伝子単位で見た場合においても、3' 側に切断部位が偏る傾向が認められる。言い換えると、先行研究での解析では、中央部分にも切断部位があるにも関わらず、3' 末端側のみを検出していたこととなる。以上のように、Cap less mRNA および Cap mRNA 双方のデータからノイズを取り除き、最終的な解析対象は遺伝子数 13,908、切断部位数 1,556,580、リード数 12,737,082 となった。

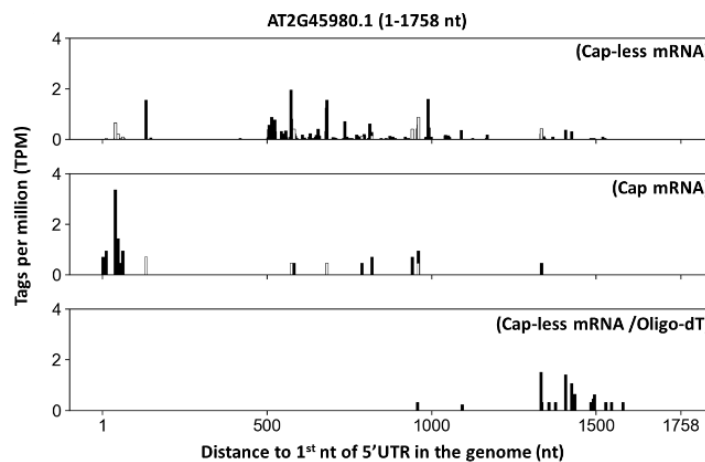


図 2. 1. 3-3-3 個別遺伝子を対象とした解析結果の例

上段：切断部位である Cap less mRNA、中段：mRNA 本来の末端である Cap mRNA、下段：oligo-dT を使用した場合の切断部位

次に、取得したデータを用いて切断に関わる配列的特徴の解析を行った。mRNA の切断に関わるトランス因子の一つとして、microRNA が想定される。そこで、まず PsRNA ターゲットを用いて microRNA のターゲットサイトを予測した結果、全切断部位の約 0.1%にあたる 1923 の切断部位が該当した。今回の解析では、大部分を占める microRNA の非ターゲットサイトに着目した。また、各切断部位に対応するリード数（末端数）は、mRNA の蓄積量に依存する可能性がある。そのため、各切断部位の末端数を mRNA の蓄積量で補正した値を Cleavage Score (CS) と定義し、遺伝子単位での切断のされやすさとして、各遺伝子の CS 値を合計した値を CS gene 値とした。これらの指標値を用いて、切断部位周辺の塩基比率を解析した（図 2.1.3-3-4）。その結果、切断部位の周辺には G リッチな傾向が認められた（図 2.1.3-3-4 左）。また、CS 値の高い切断部位（より切断されやすい部位）において、より顕著な傾向が観察され（図 2.1.3-3-4 中央）、CS 値の低い切断部位（切断されにくい部位）では認められなかったことから（図 2.1.3-3-4 右）、G リッチな配列が切断に関与していることが示唆された。

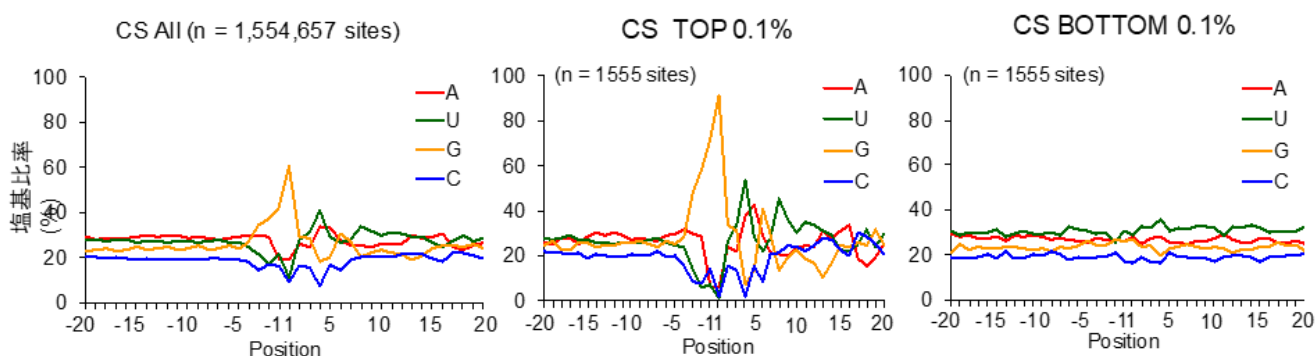


図 2.1.3-3-4 切断部位周辺の塩基比率

横軸の 1 は切断部位の 5' 末端を示す。左：すべての切断部位、中央：CS 値の上位 0.1%の切断部位、右：CS 値の下位 0.1%の切断部位

ii) mRNA の半減期データの取得

これまで mRNA の半減期の測定方法として、アクチノマイシン D などの転写阻害剤を用いる方法が主に行われてきたが、細胞内環境に様々な悪影響を与えるなど、正確な mRNA の半減期を測定できていないことが指摘されていた。そこで本研究開発では、細胞に対する悪影響が少ない合成核酸アナログである 5-Bromo-Uridine (BrU) を用いて mRNA 半減期の測定を行った。具体的には、シロイヌナズナ T87 培養細胞の培養 2 日目に BrU を培地に添加しラベリングを行い、培養 3 日目にチェイス用の培地へと交換し、その後 0h、1h、3h、6h の 4 点で細胞を回収した。解析は生物学的な 2 反復で行った。BrU を用いてラベリングを行うことで、BrU を含む mRNA が合成され、その後チェイス用の培地に交換することで、時間とともにラベリングされた mRNA の蓄積量が減少していくこととなる。各タイムポイントにおける mRNA 蓄積量を次世代シーケンサーにより定量することで、mRNA 半減期を算出することができる。最終的に各タイムポイントにおいて少なくとも 2000 万リード以上がマッピングされ、以降の解析に十分なリード数が確保できた。

CS gene 値は各遺伝子の切断率を示しているため、その値が高ければ、切断、分解されやすいと考えられる。そこで、CS gene 値が高い順、低い順からそれぞれ 10%ずつ遺伝子を選抜し、半減期データと CS gene 値を比較した（図 2.1.3-3-5）。統計検定を行ったところ、CS gene 値が高いほど、半減期が短い傾向が示された。この結果は、CS gene 値が生体内における切断のされやすさ、分解のされやすさを反映した結果であると考えられる。また、このような正の相関関係は、従来手法から得られた

データセットでは認められなかったことから、今回の解析手法は、より正確に切断部位を同定できていると考えられる。

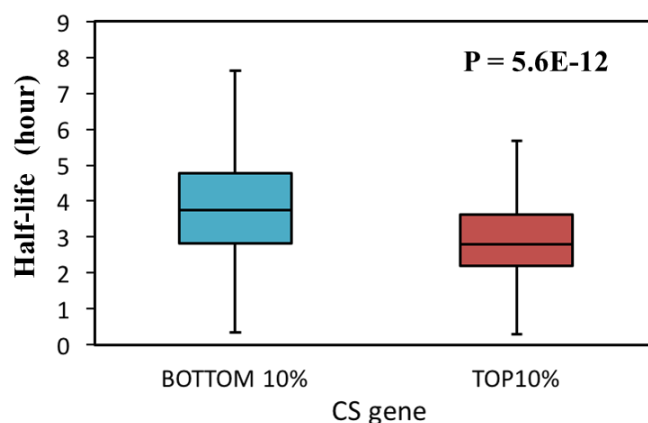


図 2.1.3-3-5 mRNA の切断に関わる配列モチーフ

iii) 他の植物種での mRNA 分解産物の 5' 末端解析

切断部位について、植物種間の共通性／特殊性の情報を得るという観点から、別の植物種であるイネ培養細胞を対象としても、mRNA の分解産物の 5' 末端配列に関するデータの取得をシロイヌナズナでの解析と同じく行った。

iv) Prediction model of Cleavage Score (PCS) の構築

TREseq により得られたデータを活用して、各切断部位での切断のされやすさの指標値 (CS 値) を分解産物の切断部位周辺の配列情報 (切断部位前後 50 塩基) から予測できるインフォマティクス予測システム (Prediction model of Cleavage Score; PCS) のプロトタイプ構築を行った。予測システムの構築には、複数のパラメータを説明変数 (x)、目的の値を目的変数 (y) として計算的に説明変数の重み (目的変数に与える影響の大きさ) を評価する重回帰分析法の一つである Partial least squares (PLS) regression 法に、重要な特徴を選抜する forward stepwise selection 法を組み合わせたものと、機械学習の一つである Random forest regression 法を用いた。それぞれ、10 万のデータを使ってシステムを構築し、145 万 6580 のデータを予測した。

v) mRNA の分解に翻訳過程が関与する可能性

次に、各切断部位の遺伝子内での分布に着目した。その結果、開始コドンおよび終止コドン近傍に非常に多くの切断部位が存在することが明らかとなった (図 2.1.3-3-6)。リボソームの翻訳伸長は開始、終止コドンで停滞しやすいこと、また、リボソームの停滞により mRNA が切断されるという酵母での知見から、これら開始コドンおよび終止コドン近傍で検出される切断部位には、翻訳過程が関与していることが考えられた。加えて、コード領域内で切断部位の 3 塩基単位での周期性が確認されたことから、翻訳過程、特にリボソームの停滞と mRNA の内部切断に何らかの関係があると思われる (図 2.1.3-3-6 内)。

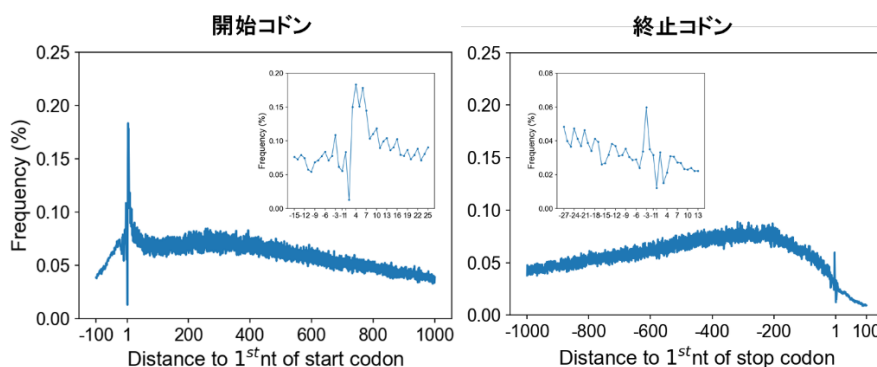


図 2.1.3-3-6 遺伝子内での切断部位の分布

vi) リボソームプロファイリングによるリボソーム停止位置の解析

翻訳過程、特にリボソームの停滞と mRNA の内部切断に何らかの関係があることが明らかとなった。そこで、mRNA 上でのリボソームの停止、停滞位置を推定できるリボソームプロファイリング解析を行うこととした。培養 3 日目のシロイヌナズナ培養細胞から調製した全 mRNA を RNase で処理した後、スクロース密度勾配上に重層し超遠心を行うことで、リボソームが 1 個ないし 2 個結合した画分を分画した。その後、タンパク質を除去することで、リボソームによって保護された RNA 断片を回収し、イルミナのキットを用いてライブラリーを構築し、次世代シーケンサーにより解析した。

今後、翻訳阻害剤等を用いた解析から、翻訳に共役的、もしくはそれ以外の要因に場合分けを行っていく。また、mRNA は tRNA によって運搬されるアミノ酸によりペプチド鎖を合成するため、コドンに対応する tRNA 量が多い最適コドンの割合が高い mRNA 上では、リボソームの翻訳伸長速度は早く、その一方で、最適コドンの割合が低い mRNA 上では、リボソームの翻訳伸長速度は遅いと考えられている。リボソームが停止、停滞した場合、エンドヌクレアーゼにより mRNA が切断されるとすると、最適コドンが多く存在する mRNA は切断されにくく、安定的だと考えられる。この視点からも解析を行っていく予定である。

vii) 一過性発現実験による不安定要因の検証

インフォマティクス予測システム (Prediction model of Cleavage Score; PCS) の構築によって抽出された内部切断に関わる要因については、「一過性発現実験による同定/検証/最適化」により、実際に不安定性に寄与するかを、各種レポーター遺伝子を用いた一過性発現実験により同定/検証する。具体的には、同一のプロモーターならびにターミネーターにレポーター遺伝子に対象領域を組み込んだものを連結した発現カセットを構築し、PEG 法によりプロトプラストへ導入した後、レポーター活性と蓄積 mRNA 量を指標にレポーター mRNA の安定性を評価する (図 2.1.3-3-7)。現時点では予備実験が終了し、随時対象領域の検証を行っていく。また、現在までに取得した情報および技術の一部については、複数の企業への提供を行った。

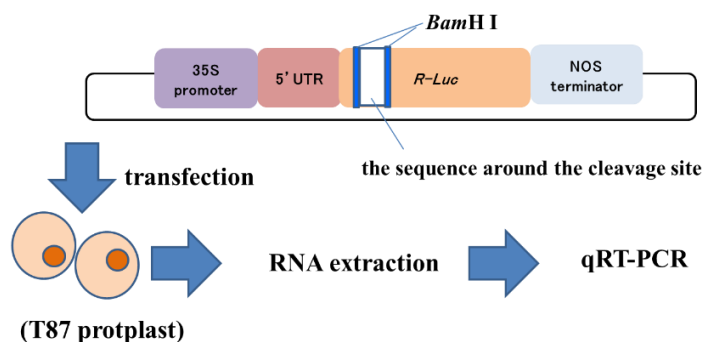


図 2. 1. 3-3-7 一過性発現実験による検証の概念図

2. 1. 3-4. 転写・発現調節因子等による遺伝子発現制御技術

(担当機関：国立大学法人横浜国立大学)

i) 新規介在配列付加による多重遺伝子導入発現系の高性能化

高等植物の二次代謝は、複数の遺伝子産物によって制御される。従って、遺伝子組換え技術を用いて二次代謝産物の高効率な蓄積を達成するためには効率よい多重遺伝子導入発現技術が必要となる。そこで、本研究ではこれまでの実績を活かした IRES、イントロン等を用いた高効率多重遺伝子発現系研究開発に取り組んだ。先ず、96 穴プレートを用いたアグロインフィルトレーション法によりイントロン挿入型ルシフェラーゼ (iLUC) の発光モニタリングにより発現効率を評価する方法を用いて、RNA ウィルス由来のサイレンシングサプレッサー (RSS) を IRES で連結して発現させ、外来遺伝子の高効率発現に使用可能なプラットフォーム植物としての応用について検討した。さらに、成葉を用いた方法により、その有効性について検証した。具体的には、各種 RSS を導入したタバコ葉にシリンジを用いて iLUC を発現するアグロバクテリウムを注入し、経時的にその発現誘導活性を発光モニタリング法により評価し、高効率発現系に有効であることを明らかにした (図 2. 1. 3-4-1)。

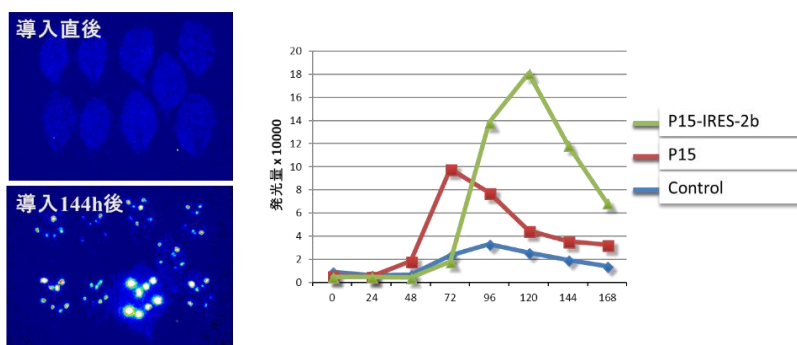


図 2. 1. 3-4-1 アグロインフィルトレーション法による RSS 発現タバコ葉における発光レポーターの一過性発現

左：導入直後および導入 144h 後の発光の様子。右：発光定量の経時的観察。

一方、多重遺伝子発現評価に応用可能な新規レポーターアッセイ系として、共通した発光基質としてルシフェリンを用いるホタルルシフェラーゼ、緑色発光型および赤色発光型ヒカリコメツキルシフェラーゼ (Click beetle luciferase: CBG および CBR) の 3 種類のルシフェラーゼに対する特異的発光活性阻害剤の探索を実施し、優れた阻害活性を有する化合物を複数同定することが出来た。特に、

比較的安価な既存の薬物を用いて、図 2. 1. 3-4-2 に示すような新規レポーターアッセイ系の開発に成功した。

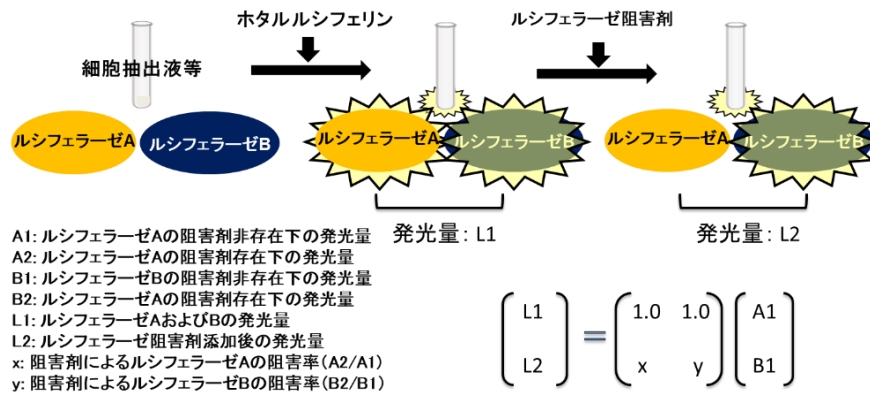


図 2. 1. 3-4-2 特異的阻害剤を用いたホタルルシフェリンを共通基質として用いた新規デュアルアッセイ法

ii) 導入遺伝子発現制御、目的物質の高発現に有効な生理活性物質・因子等の探索と利用

生理活性物質等の添加や栽培環境により、二次代謝物質の蓄積量を人為的に制御することが可能であり、病虫害防御応答誘導性ジャスモン酸メチル (MeJA) 処理でタキソール合成が増強される例などが知られている。本研究では、これまでに実績がある防御応答系遺伝子発現制御を指標とした探索系をフル活用することで、特に二次代謝物質合成と関連する防御応答系の新規生理活性物質・制御因子等を見出すことを目的とした研究開発を実施した。特に、MeJA のアゴニストなどの探索を中心に、サリチル酸 (SA) 系防御応答遺伝子発現制御物質のスクリーニング系も用いて複数の生理活性物質を見出した。これらのうち、YNU-001 と仮称する化合物については、極めて強力な二次代謝物質生産活性化能を有することが供与先の研究により実証された(本研究プロジェクト内外の共同研究)。さらに、YNU-001 の類似物質を新規に合成し、それらの生理活性についても検討し、同等以上の活性を有する新規化合物の情報も得ることが出来た。また、MeJA のアゴニストについては、化合物ライブラリースクリーニングを進めたところ、低濃度で MeJA 誘導性遺伝子発現を誘導する新規化合物を新たに複数見出したが、それらのうちの一つ (化合物 X と仮称) は、SA 系遺伝子発現にも誘導的に働くという、合成低分子化合物としては新規な活性を有する可能性が示唆された (図 2. 1. 3-4-3)。

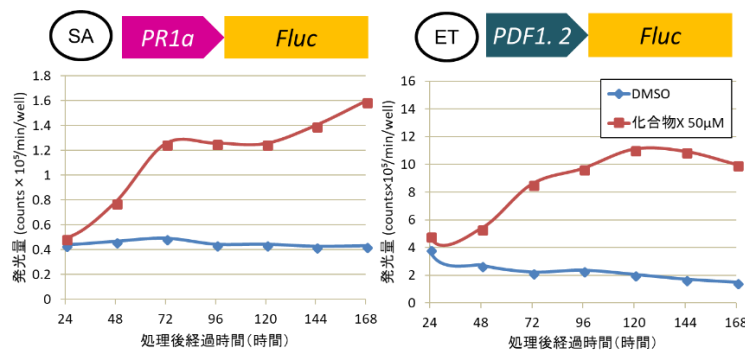


図 2. 1. 3-4-3 新規化合物 X のサリチル酸誘導性 (SA) およびエチレン・ジャスモン酸誘導性 (ET) 系の各遺伝子発現誘導の経時観察結果

一方、新規な高性能探索系の開発を確立する目的で、ジャスモン酸系の生理活性物質の探索・特徴付けに有効な JAZ タンパク質の融合タンパク質を用いたシステムを構築し、複数の JAZ タンパク質を用いることにより特異的応答性のモニタリングが可能であることを示した。また、新たにアブシシン酸

応答性または解毒系の各種遺伝子プロモーターにルシフェラーゼを連結した発光レポーターを用いた、ストレス応答性遺伝子発現を指標とした、生理活性物質の評価・探索系の構築も行った。

iii) 人工転写因子等を用いた植物遺伝子転写制御の検討

遺伝子編集に用いられる CAS9 タンパク質の DNA 切断能を欠失させた dCAS9 系を用いた新規な転写制御因子評価方法を検討し、GAL4 系のシス制御配列である UAS をターゲットとする dCAS9 融合タンパク質の転写制御能の一過性遺伝子発現による評価系を構築した。それを用いた転写活性化ドメインの探索・評価を試みた結果、テッポウユリから単離された植物固有の転写因子である GRAS タンパク質の一種である、L1SCL (*Lilium longiflorum* SCARECROW-LIKE) が有する N 末端側の酸性アミノ酸に富む領域が、dCAS9 系において VP16 等の既存の転写活性化因子を上回る強力な転写活性化能を示すことが明らかとなった (図 2.1.3-4-4)。さらに、L1SCL 相同遺伝子の cDNA を、イネとタバコから単離し、それらの N 末端側の酸性アミノ酸に富む領域について転写活性化能を比較検討した結果、それらが L1SCL と同等以上の転写活性化ドメインとして機能することを明らかにした (図 2.1.3-4-4)。これらの転写活性化ドメインは、dCAS9 融合タンパク質系を用いた内在遺伝子の選択的活性化に有効利用可能であると考えられる。

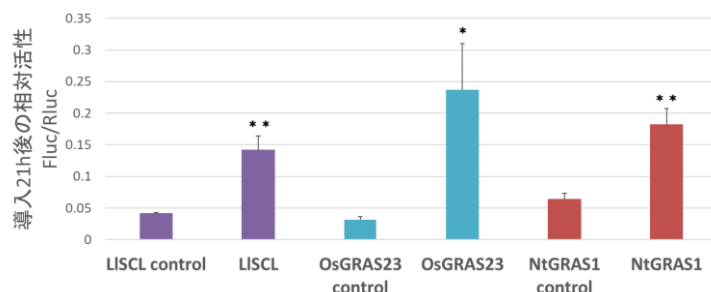


図 2.1.3-4-4 L1SCL とイネおよびタバコ由来相同遺伝子の N 末端領域の転写活性化能の比較

iv) 転写制御に有効な標的配列探索方法の開発

内在プロモーターの標的配列を探索するのに先立ち、標的配列候補の要件について dCAS9 融合タンパク質の GAL4-UAS 系による一過的発現系をもちいて検討した結果、Pam 配列 (CRISPR/Cas9 システムにおいて DNA 二本鎖切断に必要な NGG 3 塩基の配列) 付加が切断効率のみでなく、転写活性化効率にも大きく影響することが判明した。従って、内在プロモーターをターゲットとする場合においても、当該プロモーターの Pam 配列を有する領域を優先すべきである可能性が示唆された。

2.1.3-5. 環境ストレスを活用した植物の二次代謝系制御による高効率物質生産

(担当機関：国立大学法人千葉大学)

(1) はじめに

本研究では環境ストレス因子に光 (紫外線と光質)、オゾンガス、低温、水分を選び、単独または複合的なストレス環境を、生育ステージごとに、短期・長期の処理を付与する。対象植物にはトランスクリプトーム解析のできる実用植物としてタバコ (*N. benthamiana*) とセイヨウアブラナ (*B. napus*) を用いる。複数のストレス要因を付加・除去しながら株全体または器官局所的に与えて、生合成が変化する状態を人為的に作り、転写および生合成を解析する。葉のトランスクリプトーム解析 (DNA マイクロアレイ解析)、遺伝子発現解析、代謝物測定を行った。この解析により、紫外線特異的な遺伝子

発現、オゾンガス特異的な遺伝子発現、低培養液温特異的な遺伝子発現を明らかにした。ここではベンタミアーナの結果を中心に記載する。

(2) 材料及び方法

供試植物はベンタミアーナとセイヨウアブラナとし、実験は人工気象室内で行った。播種後 20 日から 25 日目に、ストレス処理を開始して 3~5 日間程度処理を行った。

UV 照射

UV-A と UV-B を照射する紫外線蛍光ランプと可視光 LED を組み合わせたハイブリッド光源を製作した。PPFD は $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ で一定として、異なる紫外線強度 (UV-A と B の総照射強度が 0, 0.3, 0.6 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$) の照射条件を定めて葉への照射を行った。

オゾン曝露

オゾン濃度の制御には、自作のオゾン濃度制御システムを用いた。オゾンガスは中濃度 (200 ppb) と高濃度 (400 ppb 前後) の短期・中長期処理を行った。

低培養液温

水耕栽培の培養液を投げ込みクーラーで冷却し、5、10、15、20、22°C の試験区を設けた。気温は生育適温の 22°C で一定であり、根圏部のみを冷却する点が特徴である。

生育調査の調査項目は、生体重、乾物重、葉面積および抗酸化能とした。抗酸化成分含有量の指標として抗酸化能を用いた。抗酸化能は ORAC 法で、子葉から数えて第 2、3、4 葉を測定した。ORAC は水溶性の H-ORAC と脂溶性の L-ORAC を測定し、これらを合計したものを総 ORAC とした。総フラボノイド濃度は、カテキン当量で示した。DNA マイクロアレイ解析ではアジレント・テクノロジー社の「Tabacco オリゴ DNA マイクロアレイ」を用いた。

(3) 結果および考察

i) ベンタミアーナ 試験 1: 環境ストレスの単独処理が生育および抗酸化能に及ぼす影響

環境ストレスが植物に付与されると、活性酸素 (ROS) の増加により二次代謝物である抗酸化物質が増加することが知られている。そこで、試験では生育を抑制せずに抗酸化能を高められるストレス条件を明らかにするために、低培養液温、オゾン、高気温 (掲載なし) の環境ストレスを単独で付与し、ベンタミアーナの生育および抗酸化能を調査した。

i)-1. オゾン曝露

オゾン濃度および曝露期間によらず、葉乾物重は Cont. (対象区) よりも小となった。曝露期間によらず、200 ppb 区の各 ORAC は Cont. との有意差がなかった。400 ppb 区の 1 日処理で H-ORAC および総 ORAC が Cont. より有意に大となった (図 2.1.3-5-1)。このことから、400 ppb 区で 200 ppb 区より多くのオゾン葉内に吸収したことで ROS が増加し、これらの消去や生成抑制に関わる抗酸化物質の産生が促進された可能性がある。以上より、400 ppb のオゾン曝露を 1 日間行うことで、抗酸化能を高められると結論した。

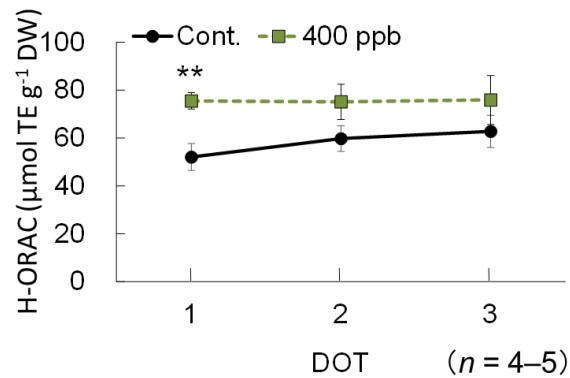


図 2.1.3-5-1 3日間のオゾン曝露がベンタミアーナの抗酸化能に及ぼす影響

i)-2. 低培養液温

低培養液温処理による地上部の顕著な生育抑制はみられなかった。10、15℃区の3日間でH-ORACが24℃区よりも大となる傾向がみられた(図2.1.3-5-2)。以上より、10℃または15℃の低培養液温処理を3日間行うことで、地上部の生育を抑制せずに抗酸化能を高められた。

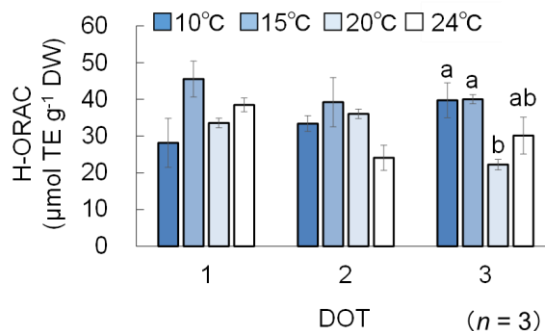


図 2.1.3-5-2 3日間の低培養液温処理がベンタミアーナの抗酸化能に及ぼす影響

ii) ベンタミアーナ 試験2：環境ストレスの単独処理が二次代謝遺伝子発現に及ぼす影響

試験1の環境ストレスの単独処理が二次代謝遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析した。試験1の低培養液温処理15℃区(1、2、3日目)、オゾン曝露200 ppb区(1日目)、400 ppb区(1、2日目)とこれらの処理区と同じ日のCont.について網羅的発現解析を行った。網羅的発現解析にはタバコオリゴDNAマイクロアレイを用い、各生合成経路の酵素遺伝子の増減を調査した。

マイクロアレイの結果から、9つの二次代謝物の生合成経路の内、変動の大きい4つの生合成経路について考察した。フェニルプロパノイド、フラボノイド、アスコルビン酸の3つの生合成経路では400 ppb区の1日目、イソプレノイドは200 ppb区の1日目で発現が増加した酵素遺伝子数が最大となった。よって、これらのストレス処理および処理日数において、各生合成が促進されたことが示唆された。次に各生合成経路の酵素遺伝子発現の増減について考察した。

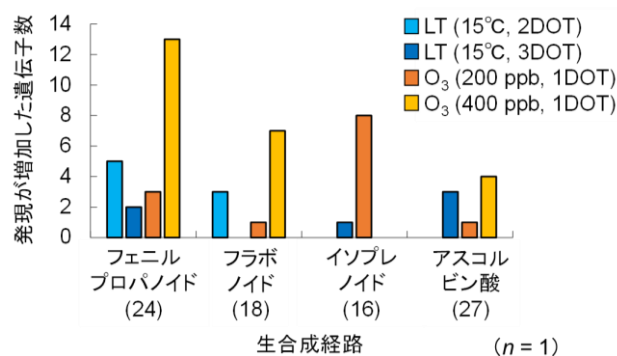


図 2.1.3-5-3 低培養液温処理およびオゾン曝露により発現が増加した遺伝子数

[フェニルプロパノイド]

15°C区の1日目で主に上流の酵素遺伝子の発現が増加し、400 ppb 区の1日目で上流および下流の酵素遺伝子の発現が増加した。このことから、400 ppb のオゾン曝露ではフェニルプロパノイドの生合成全体に影響を及ぼすことが示唆された。

[フラボノイド]

15°C区の2日目で上流の酵素遺伝子の発現が増加し、400 ppb 区の1日目で変化がなかった。フラボノイドの生合成はフェニルプロパノイドの上流の p-クマロイル CoA を起点に分岐しているため、低培養液温処理ではフラボノイドへの分岐以降のフェニルプロパノイドよりもフラボノイドの生合成をより促進していた可能性がある。

[イソプレノイド]

15°C区の3日目で上流および下流の酵素遺伝子の発現が減少し、200 ppb 区の1日目で増加した。このことから、さらに下流のテルペノイドの生合成は低培養液温処理で抑制され、200 ppb のオゾン曝露によって促進された可能性がある。

[アスコルビン酸]

15°C区の3日目で上流の酵素遺伝子および AsA を酸化する酵素遺伝子 (APX など) の発現が増加し、400 ppb 区の1日目でも APX などの発現が増加した。したがって、低培養液温処理およびオゾン曝露で AsA の酸化反応の促進により ROS の消去が活発に行われていた可能性がある。

以上の結果をふまえ、各生合成経路のキー遺伝子としてフェニルプロパノイドの PAL1、C4H、フラボノイドの CHS、イソプレノイドの HMGR1、アスコルビン酸の APX を選び、リアルタイム RT-PCR により様々なストレス条件下で定量解析を行った (図 2.1.3-5-4)。

PAL1 の発現は 15°C区の2日目、200 ppb 区の1日目で増加した。C4H の発現は 15°C区の2日目、200ppb 区の1、5日目で増加した。また、400 ppb 区を除いて PAL1 と C4H は同じ処理区内で同じ挙動を示した。CHS の発現は 15°C区の3日目で増加した。HMGR1 の発現は 15°C区の2、3日目、200 ppb 区の1、3日目、400 ppb 区の1、2日目で増加した。また、15°C区で経日的に増加し、200 ppb 区で減少する傾向がみられた。しかし、マイクロアレイでは 15°C区の3日目で HMGR 以外の酵素遺伝子の発現が減少したことから、1日間のオゾン曝露がイソプレノイドの生合成を促進することが示唆された。APX の発現は 200 ppb 区の1日目、400 ppb 区の3日目で増加した。また、200 ppb 区で経日的に減少する傾向がみられた。このことから、200 ppb 区で APX によって ROS が消去されるのに伴って、APX の発現が経日的に減少した可能性がある。以上より、15°Cの低培養液温処理でフェニルプロパノイドおよびフラボノイド、400 ppb のオゾン曝露でフェニルプロパノイド、200 ppb のオゾン曝露でイソプレノイドの二次代謝遺伝子発現が増加し、各生合成が促進されることが示唆された。

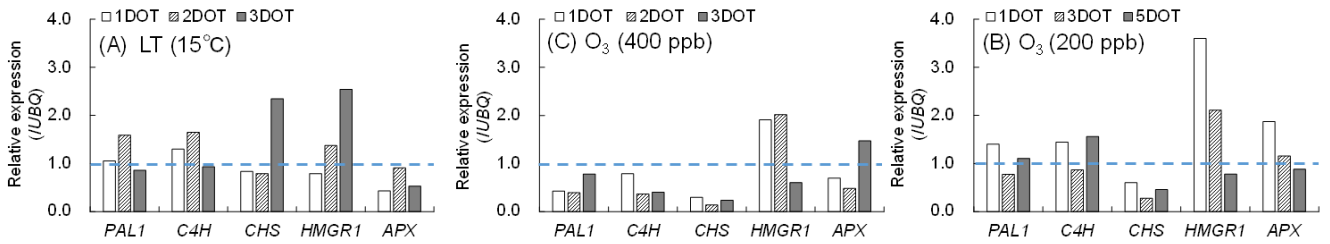


図 2.1.3-5-4 低培養液温処理およびオゾン曝露が二次代謝遺伝子発現に及ぼす影響
 (A):低温培養液温処理 15°C、(B):オゾン曝露 200 ppb、(C):オゾン曝露 400 ppb。
 内部標準遺伝子はUBQ とし、対照区の発現量を1として相対発現量で示した。

iii) セイヨウアブラナ 試験 1: 環境ストレス下の二次代謝遺伝子発現の経日変化

UV 照射およびオゾン曝露を行った際の遺伝子発現の経日変化をマイクロアレイ解析から求めた。二次代謝系のうち、テルペノイド系とアルカロイド系の主要遺伝子の発現量の変化は小さかったので、ここではフェニルプロパノイド系とフラボノイド系を示した(図 2.1.3-5-5、図 2.1.3-5-6)。

フェニルプロパノイド系では、PAL は UV 照射で増加しなかったが、オゾン曝露では増加した。C4H と F5H はいずれのストレス下でも増加した。UV 照射下では 5 日間ほぼ同程度の高い発現を示し、オゾン曝露では経日的に増加する傾向を示した。

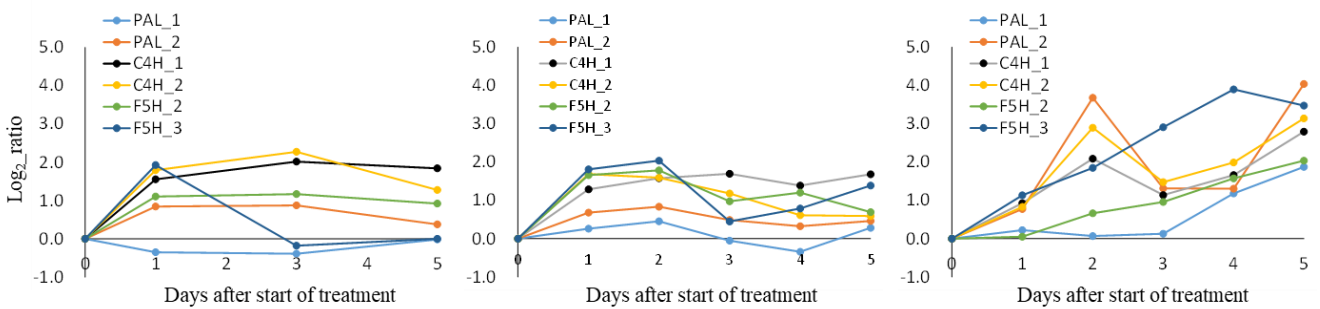


図 2.1.3-5-5 UV 処理とオゾン曝露におけるフェニルプロパノイド系の遺伝子発現の経日変化
 (左: UV 0.6 W·m⁻² 第2葉、中央: UV 0.6 W·m⁻² 第3葉、右: オゾン曝露 200 ppb)

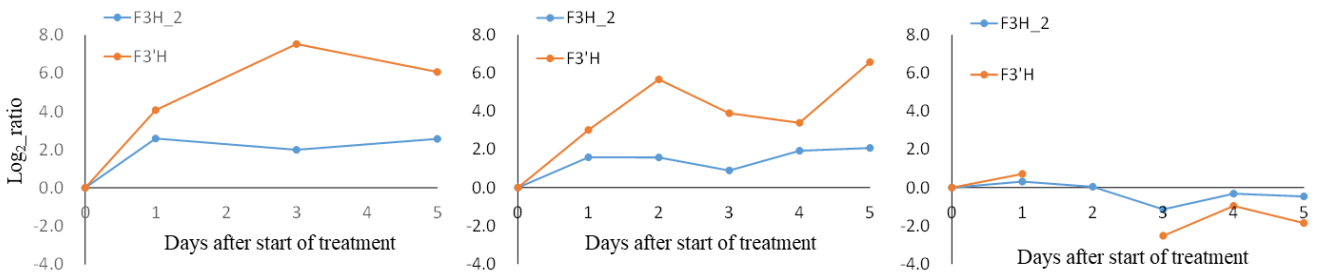


図 2.1.3-5-6 UV 処理とオゾン曝露におけるフラボノイド系の遺伝子発現の経日変化
 (左: UV 0.6 W·m⁻² 第2葉、中央: UV 0.6 W·m⁻² 第3葉、右: オゾン曝露 200 ppb)

フラボノイド系は、F3H、F3'H とも、UV 照射で増加した。とくに F3'H は 5 倍以上の増加を示した。オゾン曝露では両遺伝子とも発現量は変化しなかった。

以上のことから、セイヨウアブラナでは、UV 照射でフェニルプロバノイド系とフラボノイド系の生合成が促進される可能性が示された。現在は、様々なストレス条件を付与して、リアルタイム RT-PCR でキー遺伝子の発現解析、および HPLC/MS/MS による主要代謝物の定量解析を進めている。

iv) セイヨウアブラナ 試験 2：複合的な環境ストレスが二次代謝物に及ぼす影響

次に、UV 照射と低培養液温処理を組み合わせたストレス付与下でのフラボノイド量の定量を行った (図 2.1.3-5-7)。その結果、0.3 W・m⁻² の UV 照射と 10℃ の低培養液温処理の複合処理は、単独処理よりも効果が高いことが明らかになった。複合処理効果のメカニズムについては、様々な条件で試験を行い、明らかにする予定である。

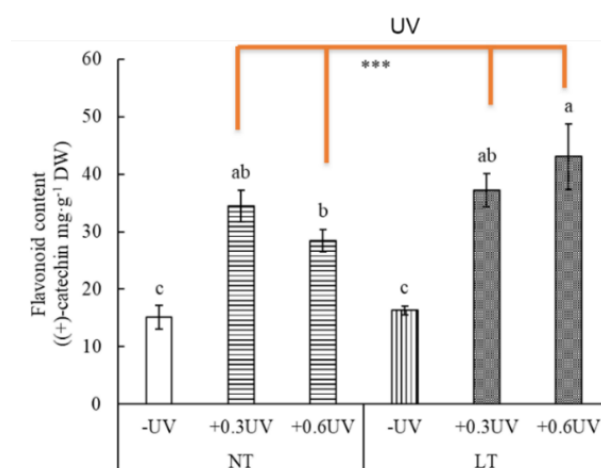


図 2.1.3-5-7 UV 処理とオゾン曝露の複合処理がフラボノイド量に及ぼす影響

(NT：常温 25℃、LT：低温 10℃、-UV：UV なし、+0.3UV：0.3 W・m⁻²、+0.6UV：0.6 W・m⁻²)

2.1.3-6. 人工環境・栽培技術における代謝系遺伝子変動解析を利用した化合物高効率生産技術開発

(担当機関：公益財団法人北海道科学技術総合振興センター)

本研究の目的は、人工的に栽培環境ストレスを付与した場合における植物二次代謝系の変動を解析し、その情報を利用することによって、多くの植物種において目的代謝産物生合成の増強を可能とすることである。そこで、栽培環境や栽培技術を変更したときに、主要代謝経路の中でも律速段階・代謝反応分岐点を司るキーエンザイム遺伝子の発現がどのように変動するか解析し、インデックスを作成することとした (図 2.1.3-6-1)。対象植物種としては、ゲノム情報が公開されており、他機関での共同研究課題において共通に取り扱われている *Nicotiana benthamiana* を用いた。*N. benthamiana* は気温・相対湿度、光強度等を一定に制御可能な人工環境下において水耕栽培し、栽培環境変動・ストレス付与処理を行って real-time PCR による遺伝子発現や代表的な産物を解析した。さらに、得られたインデックスの実効性を検討するため、薬用植物ジオウにおける実証試験を開始した。

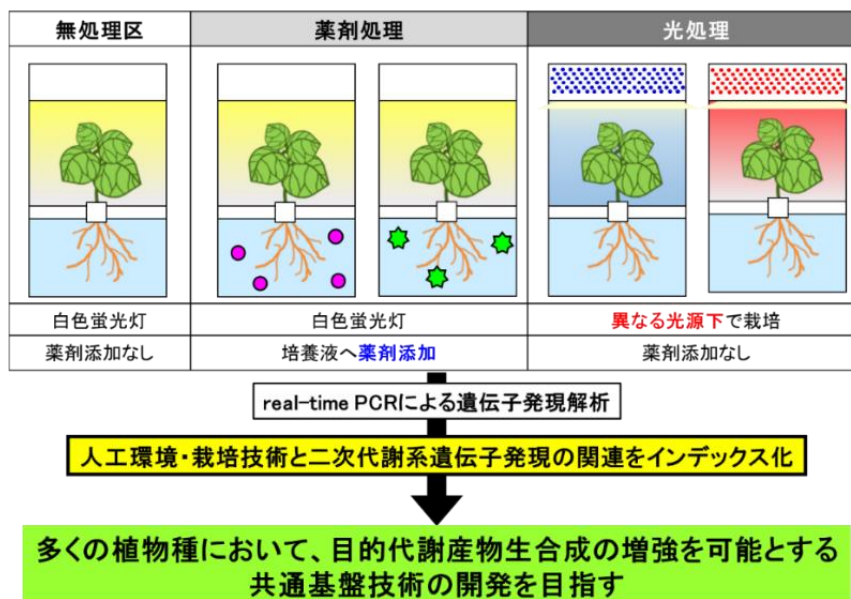


図 2. 1. 3-6-1 本研究開発テーマの目的

i) 栽培・環境処理区における二次代謝経路主要遺伝子の発現解析
遺伝子発現解析における処理栽培方法

本課題では、栽培・環境処理区として水耕養液に各種の薬剤を添加する栽培（薬剤処理栽培）と異なる光波長下での栽培（光処理栽培）を行うこととした。*N. benthamiana* は水耕栽培し、播種後 19 日目に処理栽培を開始した。薬剤処理栽培は薬剤を添加した水耕養液に更新して行い、光処理栽培はそれぞれの光源下に移して行った。薬剤処理栽培は平成 29 年度までに計 26 種を実施し、平成 30 年度には、さらに新規薬剤を追加して合計 30 種類程度を検討する。光処理栽培は、3 種類の LED 光源で 3 段階の光強度を設定して行った。

N. benthamiana における real-time PCR 系の確立

本課題では、二次代謝経路の中でも律速段階・代謝反応分岐点を司るキーエンザイム遺伝子について real-time PCR 系を確立した。発現解析対象遺伝子は、テルペノイド系 10 遺伝子、アルカロイド系 7 遺伝子、フェニルプロパノイド系 3 遺伝子、フラボノイド系 2 遺伝子、アントシアニン系 2 遺伝子の計 24 遺伝子である。

発現解析対象である 24 遺伝子の配列情報は、*Nicotiana benthamiana* draft genome sequence v1.0.1 (https://solgenomics.net/organism/Nicotiana_benthamiana/genome) より収集し、解析対象とする配列の real-time PCR 系の設計には Universal ProbeLibrary Assay Design Center (https://lifescience.roche.com/global_en/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center) を利用した。

N. benthamiana における二次代謝経路主要遺伝子の発現解析

本年度までに、26 種類の薬剤処理栽培と 3 種類の光処理栽培を実施し、上記の real-time PCR 系によって二次代謝経路主要遺伝子の発現がどのように変動するか解析を行った。real-time PCR により得られた発現解析結果は、処理後 1 日目、3 日目の各タイミングでサンプリングした無処理区における発現量を 1 として相対値で評価し、インデックスを作成した。

葉で発現している 20 遺伝子においては、すべての遺伝子について mRNA 発現量を 5 倍以上に増加させる処理栽培法があることが明らかとなった。また、これらの遺伝子において、4 遺伝子については mRNA

発現量を 1/10 以下に減少させる処理栽培法が明らかとなった。他の 16 遺伝子については、少なくとも mRNA 発現量を 1/2~1/10 まで減少させる処理栽培法が見つかった。

根で発現している 24 遺伝子においては、17 遺伝子について mRNA 発現量を 5 倍以上に増加させる処理栽培法が明らかとなり、6 遺伝子について mRNA 発現量を 2~5 倍まで増加させる処理栽培法が確認された。また、これらの遺伝子のうち、17 遺伝子については mRNA 発現量を 1/10 以下に減少させる処理栽培法が明らかとなり、その他の 7 遺伝子については mRNA 発現量を 1/2~1/10 まで減少させる処理栽培法が確認された。

ii) 変動した主要遺伝子代謝経路延長上の代表的な二次代謝産物の解析

real-time PCR 解析で得られた結果をもとに、キーエンザイム遺伝子の mRNA 量の増加に伴って、代謝経路の下流に位置する産物が期待通りに増加するか検証することを目的とした。現在までに、アルカロイド系のニコチンとプトレシンの増減が関連するキーエンザイム遺伝子の mRNA 量を反映していることを示すことができた。

二次代謝分析における処理栽培

二次代謝産物分析のための処理栽培は播種後 28 日目に開始し、処理 3 日目のタイミングで葉と根をサンプリングした。

ニコチンの定量分析

薬剤 Y で処理すると、根ではニコチン生合成に関わるアルカロイド系遺伝子群の発現量が著しく上昇した。一方葉では、これらの遺伝子群が 2 倍以上に上昇することはなかった。ニコチンは根で生成されて葉に転流する特徴をもつことから、薬剤 Y 処理によってニコチンの生合成量が増加することが期待された。そこで本試験では、発現解析結果から予測されるようにニコチン含量の変動がみられるか二次代謝分析することとした。

ニコチンは薄層クロマトグラフィー (TLC) による簡易定量分析、および液体クロマトグラフ/タンデム四重極質量分析計 (LC/MS/MS) による定量を行うこととした。

TLC 分析の結果、発現解析結果から期待されたように薬剤 Y 処理により葉でも根でも明らかにニコチン含量が増加していた。さらに増加量を正確に定量するため LC/MS/MS を行ったところ、薬剤 Y 処理によりニコチン含量が約 6 倍に上昇していることが示された。以上の結果から、ニコチンに関しては、mRNA 量の解析から代謝産物量の増減をある程度予測できることを明らかに出来た。

プトレシンの定量分析

薬剤 Y で処理すると、根ではプトレシン生合成酵素遺伝子の発現量が著しく上昇したが、葉では 2 倍以上に上昇することはなかった。これらの発現解析結果から、薬剤 Y 処理により根ではプトレシンが増加し、葉では増加しないことが期待された。

遊離プトレシンの TLC 分析の結果、根では明らかに薬剤 Y 処理によってプトレシンの増加が認められ、葉では顕著な量の差が認められなかった。発現解析結果から期待されたように、薬剤 Y 処理によりプトレシン含量が変動することを確認した。

iii) 薬用植物を用いた解析結果の実効性検討

本課題では、薬剤処理・光処理した *N. benthamiana* の遺伝子発現変動インデックスを用いた実効性検討を行う。実証モデル植物には薬用植物ジオウを用い、目的の二次代謝産物であるカタルポールが

増加すると期待される処理栽培を選定する。選定した処理条件下でジオウの水耕栽培を行い、カタールポール含量が平成30年度の間目標である対照区の2倍以上になるのかを検証する。

薬剤処理・光処理した *N. benthamiana* の遺伝子発現変動インデックスにおいて、薬剤Cを処理するとカタールポール生合成の上流にある代謝経路を司る遺伝子群の発現が、葉では無処理区の2倍以上に上昇していた。さらに、薬剤C処理は、その他の経路においても多くの二次代謝経路主要遺伝子の発現量を上昇させた。以上より、薬剤Cは、テルペノイド系二次代謝経路上のキーエンザイム遺伝子発現を促進する作用を持ち、カタールポールの合成を促進する可能性が示唆される。

現在までに、ジオウの水耕栽培技術と、ジオウにおけるカタールポールのTLC分析系、およびそれに関連する合成酵素遺伝子のreal-time PCR系を確立した。発現解析対象とした遺伝子はカタールポール生合成経路上の遺伝子であり、*N. benthamiana* とも共通する4遺伝子とジオウに特有の1遺伝子を合わせた5遺伝子である。なお、処理栽培として薬剤Cをジオウに処理し、カタールポール含量が2倍以上になるのかをTLCにより簡易定量分析した。

(10) 成果の普及

研究項目	年度	論文		その他外部発表			
		査読付き	その他	国内学会発表/講演	国際学会発表/講演	プレス発表	その他
(2) 代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発	H28-30	2(4)	2	13(4)	4(2)	1	5
(3) 栽培・生育環境による発現制御技術の研究開発	H28-30	(2)	0	3(1)	5(1)	1(1)	0

()内は予定

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

研究項目	年度	特許出願			ノウハウ化
		国内	外国	PCT出願	
(2) 代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発	H28-30	2(4)	0	0	0
(3) 栽培・生育環境による発現制御技術の研究開発	H28-30	0	0	0	※

()内は予定

※知的財産等に関する戦略

本研究開発により得られる成果は、人工環境・栽培技術によって発現変動する遺伝子リスト、ならびに増加する二次代謝産物の候補である。これらの情報は特許で公開されると容易に乱用されやすいため、詳細情報を秘匿してノウハウ化する。

特許・論文リスト

(1) 特許

番号	出願者	出願番号	国内外 国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	横浜国立 大学	2017- 039903		2017年3 月2日		ルシフェリンールシフェ ラーゼ反応の阻害剤、阻 害方法、光識別方法、物 質の検出方法、レポー ターアッセイ方法及び キット	平塚和之、小倉 里江子、伊藤早 紀
2	北海道大 学、産業 技術総合 研究所	(非公 開)		2018年7 月25日		(非公開)	増田税、犬飼 剛、松永航、磯 田玲華、松村 健、厚見剛

(2) 論文

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ 番号	査読	発表年月日
1	加藤晃、 山崎将太 朗	奈良先端 科学技術 大学院大 学	植物でのタンパク質の高 効率翻訳を可能にする数 理モデル	バイオサイエンス とインダストリー (2017) 75: 240- 241 (解説)	無	2017年5月 10日
2	平塚和之	横浜国立 大学	特異的阻害剤を用いた新 規なルシフェラーゼレ ポーターアッセイ	ケミカルエンジニ ヤリング (2017) 62: 646-651 (解説)	無	2017年9月 1日
3	山崎将太 朗真田裕 司、今瀬 諒司、松 浦秀幸、 上野大 心、出村 拓、 加藤晃	奈良先端 科学技術 大学院大 学	Arabidopsis thaliana cold-regulated 47 gene 5-untranslated region enables stable high- level expression of transgenes.	J. Biosci. Bioeng. (2018) 125: 124-130	有	2018年1月

4	上野大 心、山崎 将太郎出 村拓、 加藤晃	奈良先端 科学技術 大学院大 学	Comprehensive analysis of mRNA internal cleavage sites in Arabidopsis thaliana.	J. Biosci. Bioeng., (2018) in press	有	2018年
---	-----------------------------------	---------------------------	--	---	---	-------

(3) 外部発表

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	加藤晃	奈良先端科 学技術大学 院大学	Transgene expression system optimizing translation process	PepTalk2017 (San Diego, USA)	2017年1月 11日
2	後藤英司	千葉大学	Environment Control in Value-added Plant Production	2017 International Symposium on Environment Control Technology for Value- added Plant Production (Beijing, China)	2017年4月 25日
3	上野大心、山 崎将太郎、出 村拓、加藤晃	奈良先端科 学技術大学 院大学	植物での転写開始点 の網羅的な同定と遺 伝子発現制御におけ る転写開始点の重要 性	NGS現場の会、第5回研究 会（仙台市）	2017年5月 22～24日
4	山崎将太郎、 上野大心、出 村拓、加藤晃	奈良先端科 学技術大学 院大学	mRNAの内部切断に関 わる配列的特徴の解 明（転写終結に関わ るシス配列の同定）	NGS現場の会、第5回研究 会（仙台市）	2017年5月 22～24日
5	So-Ra Lee	千葉大学	Low root-zone temperature enhances biosynthesis of phenolic compounds in Rape (<i>Brassica napus</i> L.)	Annual Meeting of Korean Society for Horticultural Science	2017年5月 25日
6	加藤晃	奈良先端科 学技術大学 院大学	Transgene expression system in plants optimized translation process.	The 2nd Japan-Korea- China Trilateral JointSymposium on Plant Biotechnology (Oomiya, Japan)	2017年8月 29日

7	石田浩高、小倉里江子、平塚和之	横浜国立大学	発光レポータータグを用いた JAZs 分解を指標とする JA アゴニスト探索	第35回日本植物細胞分子生物学会大会（さいたま市）	2017年8月29日
8	石田和希、坂田拓也、小倉里江子、平塚和之	横浜国立大学	アグロインフィルトレーション法を用いたハイスループット評価系の改良	第35回日本植物細胞分子生物学会大会（さいたま市）	2017年8月29日
9	山崎将太郎、上野大心、出村拓、加藤晃	奈良先端科学技術大学院大学	導入した目的遺伝子の配列に特化した翻訳エンハンサーの選抜システム	第35回日本植物細胞分子生物学会大会（さいたま市）	2017年8月31日
10	上野大心、山崎将太郎、出村拓、加藤晃	奈良先端科学技術大学院大学	植物mRNAの内部切断部位に関する解析	第35回日本植物細胞分子生物学会大会（さいたま市）	2017年8月31日
11	阿部修人、小倉里江子、平塚和之	横浜国立大学	植物細胞における dCas9/sgRNA系を用いた転写制御因子活性評価について	第35回日本植物細胞分子生物学会大会（さいたま市）	2017年8月31日
12	松尾幸毅、厚見剛、福澤徳穂、松村健	産業技術総合研究所	植物内在性遺伝子における人為的な配列特異的DNAメチル化誘導機構の解析(1)	第35回日本植物細胞分子生物学会大会（さいたま市）	2017年8月31日
13	厚見剛、福澤徳穂、松村健	産業技術総合研究所	植物内在性遺伝子における人為的な配列特異的DNAメチル化誘導機構の解析(2)	第35回日本植物細胞分子生物学会大会（さいたま市）	2017年8月31日
14	井手みずき	千葉大学	植物工場における環境ストレス付加によるセイヨウアブラナの機能性成分の高含有化	日本生物環境工学会2017年松山大会（松山市）	2017年8月31日
15	後藤英司	千葉大学	植物の生産性制御による高機能品生産技術の開発	第69回日本生物工学会大会（東京）	2017年9月13日
16	山崎将太郎、出村拓、加藤晃	奈良先端科学技術大学院大学	Mathematical approach to improvement of transgene	The 1st Asian Conference for Plant Made Pharmaceuticals (Pohang, Korea)	2017年9月22日

			expression focus on efficiency of mRNA translation		
17	Ki-Ho Son	千葉大学	Transcriptome analysis of secondary metabolite pathways in <i>Brassica napus</i> L. and <i>Nicotiana benthamiana</i> by environmental stress	APHPF2017	2017年11月24日
18	末田香恵、南谷健司、上田一郎、田坂恭嗣、松村健	北海道科学技術総合振興センター、産業技術総合研究所	<i>Nicotiana benthamiana</i> における二次代謝経路主要遺伝子発現に対する薬剤処理の影響解析	園芸学会平成30年度春季大会（奈良市）	2018年3月25日
19	阿部修人、千葉さつき、石田浩高、小倉里江子、高谷創、木内あゆみ、平塚和之	横浜国立大学	防御応答性遺伝子発現におけるGRASタンパク質の機能の解析	平成30年度日本植物病理学会大会（神戸市）	2018年3月25日
20	石田浩高、小倉里江子、平塚和之	横浜国立大学	ルシフェラーゼ融合タンパク質を用いた病原接種時のJAZファミリータンパク分解パターンモニタリング	平成30年度日本植物病理学会大会（神戸市）	2018年3月25日
21	石田和希、小倉里江子、平塚和之	横浜国立大学	アグロインフィルトレーション法を用いた病害応答遺伝子発現のハイスループットモニタリング系について	平成30年度日本植物病理学会大会（神戸市）	2018年3月26日
22	Kouki Matsuo, Go Atsumi, Noriho Fukuzawa, Takeshi	産業技術総合研究所	Comparative analysis of agrobacterium and plant virus vector in induction of	3rd Conference of the International Society of Plant Molecular Farming (Helsinki, Finland)	2018年6月11日

	Matsumura		targeted endogenous DNA methylation		
23	Wataru Matsunaga, Reika Isoda, Tsuyoshi Inukai, Takeshi Matsumura, Chikara Masuta	北海道大学、産業技術総合研究所	A technique to reduce DNA methylation in a sequence-specific manner by using a ribozyme-expressing cucumber mosaic virus vector	International Congress of Plant Pathology 2018 (Boston, USA)	2018年7月29日～8月3日
24	Noriho Fukuzawa, Chikara Masuta, Takeshi Matsumura	北海道大学、産業技術総合研究所	Development of high expression system of a foreign gene replacing a coat protein region in the cucumber mosaic virus vector through agroinfection	International Congress of Plant Pathology 2018 (Boston, USA)	2018年7月29日～8月3日
25	Hirota Ishida, Rieko Ogura, Kazuyuki Hiratsuka	横浜国立大学	Development of a protein-luciferase-based high-throughput screening system to monitor degradation of Jasmonate ZIM-domain family proteins	International Congress of Plant Pathology 2018 (Boston, USA)	2018年7月29日～8月3日
26	Go Atsumi, Noriho Fukuzawa, Kouki Matsuo, Takeshi Matsumura	産業技術総合研究所	Analysis of endogenous gene DNA methylation using plant RNA virus vectors	12th Congress of the International Plant Molecular Biology (Montpellier, France)	2018年8月6日
27	末田香恵、南谷健司、上田一郎、平塚和之、田坂恭嗣、松村健	北海道科学技術総合振興センター、横浜国立大学、産業技術総	Effects of chemical treatments on expression of genes involved in secondary metabolite of	12th Congress of the International Plant Molecular Biology (Montpellier, France)	2018年8月7日

		合研究所	<i>Nicotiana benthamiana</i>		
28	三上真希、上野大心、山崎将太郎、出村拓、加藤晃	奈良先端科学技術大学院大学	成長、発達、環境応答などさまざまな条件下でのmRNA内部切断部位の解析	第36回日本植物細胞分子生物学会大会（金沢市）	2018年8月27日
29	仙崎紗織、上野大心、田部記章、山崎将太郎、出村拓、加藤晃	奈良先端科学技術大学院大学	植物mRNAの内部切断に関わる配列的特徴の解析	第36回日本植物細胞分子生物学会大会（金沢市）	2018年8月27日
30	阿部修人、千葉さつき、石田浩高、小倉里江子、高谷創、木内あゆみ、平塚和之	横浜国立大学	防御応答性遺伝子発現制御に関連するGRASタンパク質の機能解析	第36回日本植物細胞分子生物学会大会（金沢市）	2018年8月27日
31	厚見剛、福澤徳穂、松尾幸毅、松村健	産業技術総合研究所	植物内在性遺伝子に対する人為的な配列特異的 DNA メチル化誘導機構の詳細解析	第36回日本植物細胞分子生物学会大会（金沢市）	2018年8月28日
32	石田和希、鶴之沢敦志、石田浩高、小倉里江子、平塚和之	横浜国立大学	アグロインフィルトレーション法を用いた遺伝子発現制御のハイスループットモニタリング系について	第36回日本植物細胞分子生物学会大会（金沢市）	2018年8月28日

(4) 新聞・雑誌等への掲載

番号	所属	タイトル	掲載誌名	発表年月

(5) その他

アグリテクノフェア in 北海道、2018年3月13日（札幌市）
松村健（産業技術総合研究所）「植物による高付加価値物質生産」

バイオジャパン、2017年10月10日～13日（横浜市）
産業技術総合研究所、北海道大学、奈良先端科学技術大学院大学、横浜国立大学、千葉大学、北海道科学技術総合振興センター

イノベーション・ジャパン 2017、2017年8月31～9月1日

奈良先端科学技術大学院大学

「オーダーメイド、植物の外来遺伝子高発現システム」に関してポスター展示、

プレス発表

改良版蛍光タンパク遺伝子を導入した「光るペチュニア」の開発に成功 ～フィルターなしでの鑑賞を実現～

2017年6月27日

奈良先端科学技術大学院大学、千葉大学（株式会社インプラントイノベーションズ、千葉大学との共同）

2.2 研究開発項目 「植物による高機能品生産技術開発」【助成】

2.2.1 高機能組換え植物組織培養によるビタミン D3 高効率生産技術の開発（株式会社竹中工務店、キリン株式会社、神戸天然物化学株式会社）

(1)背景と目的

ビタミン D₃ (VD₃) は脂溶性ビタミンの一種であり、食物からの摂取または体内で生合成された後、肝臓および腎臓で代謝され、活性型 VD₃ へ変換される。活性型 VD₃ は動物体内において主にカルシウムやリン等の吸収調節に関わっており、不足することにより骨軟化症や骨粗鬆症の原因の一つになる。近年高齢化社会へと進むにしたがい、健康寿命の観点から骨粗鬆症等が特に問題視されている。活性型 VD₃ はこれら骨粗鬆症の治療薬として有効である。

現在、これらの活性型 VD₃ は化学合成によって市場に供給されている。それと並行して、植物の研究により活性型 VD₃ および VD₃ が植物にも存在することが報告されている。しかしながら、植物体中の VD₃ 関連化合物の含有量は数～数十 ng/gFW レベルと極めて低く、その利用は困難であった。しかし近年、植物分野における遺伝子組換え技術、ゲノム編集技術および培養技術等が著しく発展し、植物細胞が持つ物質生産能力を最大限に引き出したスマートセルの構築が可能になりつつある。

そこで、本課題では ゲノム編集、外来遺伝子等の導入を行った形質転換植物の作製、ならびに生育環境制御を行うことによる VD₃ および活性型 VD₃ 含有量向上技術の確立 植物の袋培養等をもちいた大量栽培技術の開発と抽出・精製技術の構築を行い、VD₃ 関連化合物の事業化に向けた基盤技術確立を目的とした。

(2)位置づけ、目標値

市場調査資料によると、平成 32 年度の VD₃ 関連製品（医薬品、食品添加物および飼料添加物）市場は 3000 億円に達するものと推定されている。そのうち活性型 VD₃ 市場規模は、平成 21 年の 420 億円に対して平成 26 年には 600 億円へ拡大しており、年率 7%の成長を示している。VD₃ は世界人口の大半が摂取不足とされており、VD₃ 関連商品の今後の需要拡大が期待できる。現在、VD₃ 関連商品は主として化学合成によって供給されており、需要拡大に対応する代替供給源として、形質転換植物の利用が期待されている。

そこで、VD₃ 関連化合物の事業化に向けた基盤技術を確立することにより、形質転換植物を供給源とした活性型 VD₃ 販売価格が、既製品と同等価格帯を達成する見込みをたてることを目標とした。

(3)全体計画

基礎的な形質転換植物の作製および培養・抽出の研究開発を本事業期間に行ったのち、順次作製した形質転換植物のさらなる改良、大量培養や工業スケールでの抽出・精製プロセスの検討および形質転換植物の導入遺伝子の発現安定性などを検討していく事業化準備期間へ移行する計画としている。

(4)実施体制

スマートセル作出から生産プロセス構築までに開発が必要な技術を抽出した。民間企業3社と大学機関4者の計7機関で共同開発体制を構築し、各要素技術ごとに専門とする機関が主担当として研究開発を進めている。研究開発成果は最終的に一つの生産プロセスに集約することが重要である。そこで民間企業3社で事業化検討グループを構成し、事業化の観点から定期的な研究開発成果の評価を行うとともに、成果統合に向けたスケジュール調整などを実施して事業の推進を図っている。

(5)運営管理

プロジェクト全体は、大きく4つの方針で運営を行っている。

1. 研究開発重点討議のための全体会議開催 (年2回)
2. 研究開発に関係する外部有識者を招いた勉強会実施 (年1~2回)
3. 関係者メーリングリストによる日常的な情報共有 (適宜)
4. 開発技術知財化に向けた大学-企業間の知財取得体制構築 (研究進捗に応じて適宜)

以上の取り組みに加え、民間企業3社間での事業化に向けた打合せの実施や、NEDO事務局のPL巡回による研究開発指導を受審することで、研究開発推進を図っている。

(6)実施の効果

本研究開発は、1) 数多くの研究プロジェクトの中で培われたゲノム編集・遺伝子組換え技術を軸とした高機能植物組織開発、2) 生産効率を飛躍的に高めて事業展開を行った実績を持つ袋型培養槽を用いた大量組織培養法、3) 省エネルギー施設環境制御実績を応用した代謝促進環境制御法 という独自技術を組み合わせることで、植物組織の有用物質生産機能を最大限に引き出そうとするものである。これまで異なる分野で発展してきた各技術を、本プロジェクトを契機に統合し、培われてきた技術の相乗効果により、産業としての展開、成果・知的財産の創出を実現する。

(7)中間目標の達成度

中間目標として大きく3項目を設定した。1) 形質転換植物作製など要素技術の確立、2) 要素技術統合の着手、3) 事業性試算による競争力把握

1) 要素技術の確立については、VD3前駆体増産形質転換植物の作製に成功するなど、一部技術で当初計画以上の成果が得られている。また2018年6月段階で実施中の活性型VD3生合成関連酵素遺伝子導入などのその他技術についても2018年度中に目標達成見込みが得られている。

2) 要素技術統合の着手については、形質転換植物に対して環境制御技術を適用するなど、要素技術の統合をすでに開始している。

3) 事業競争力把握については、これまでに得られた研究成果をもとに事業化見込みを確認するとともに要素技術統合方針の確認を完了している。

以上のように、本プロジェクト申請時に設定した中間目標に対して、一部課題で中間目標以上の成果を得ることが出来た。また、それ以外の中間目標についても2018年度中に達成できる見込みが得られている。

(8) 研究開発の成果と意義

VD3 関連化合物の蓄積報告があり、かつ遺伝子等の配列情報の整備がされている植物を供試植物に選定し、1) 形質転換植物の作製、2) 環境制御の検討、3) 開発対象植物の袋培養法の検討、4) VD3 関連成分の抽出・精製法の検討の 4 課題について研究開発を行った。

- 1) VD3 前駆体までの上流代謝フラックス増強、不要代謝経路の遮断、VD3 高蓄積のための植物体の脂質蓄積能増強および活性型 VD3 生合成関連遺伝子の導入した各形質転換植物組織の作製をおこなった。

上流代謝フラックス増強に関する研究開発では、イソプレノイド代謝上流の調節および植物ステロール分岐に関わる各酵素をターゲットとして外来酵素遺伝子を導入した形質転換植物を得た。なかでも内在遺伝子の過剰発現による転写後抑制のリスク低減のため、供試植物とは系統分類上遠縁な植物から当該酵素と同様の機能を持つ遺伝子を発見することができた。これは学術的なインパクトのある発見にとどまらず、今後の酵素活性増強につながる有益な情報になりえる。

また、ゲノム編集技術を利用し、不要代謝経路の遮断を行った形質転換植物組織では、野生種に比べて VD3 前駆体の含有量が飛躍的に向上したことが確認できた。さらに同様の技術を利用して、脂質蓄積能増強を確認した。これに加えて、化学処理による脂質蓄積能増強についても知見が得られている。

活性型 VD3 生合成に関する形質転換植物の作製では、動物または微生物由来の活性型 VD3 生合成関連酵素遺伝子を導入した形質転換植物組織を作製した。今後、植物体中での遺伝子発現確認を行い、VD3 外部投与による機能評価試験を予定している。

以上、要素技術の確立が進んでいることから、VD3 前駆体高蓄積形質転換体をベースに各技術の統合を行っている。

- 2) モンテカルロ法レイトレーシングに基づき光環境制御時の袋内植物組織密度や照明照射方向など最適な袋型培養槽光照射条件を検証するシミュレーションプログラムの作成をした。並行して、実際の植物への照射条件の予備検討を進めている。VD3 前駆体高蓄積形質転換植物組織に光環境制御を適用したところ、植物体内における VD3 への変換が確認できた。今後、詳細な光環境条件の検討を行っていく。
- 3) 袋培養法を用いた供試植物の高密度培養を実証できた。さらに、低コストの増殖に向け、より安価な資材/設備を用い、スペースを有効活用した増殖システムの検討も開始した。諸条件の検討の結果、大幅な設備簡素化の可能性が得られた。
- 4) 植物体には VD3 関連化合物が微量にしか存在しないため、最初に ng オーダーの微量定量分析法の開発を行った。次に VD3 関連化合物の標準品を用いた植物試料への添加回収試験をおこない、抽出精製の基礎的知見をえた。今後は上記の研究成果として得られた VD3 関連化合物が高蓄積した形質転換植物を用いて抽出精製の検討をおこなう。

それぞれの分野で当初計画に沿った成果を 2018 年度中に得られる見込みが立った。本成果は VD3 スマートセルインダストリー事業実施に向けた基盤技術となる。

(9)最終目標の達成可能性

最終目標である形質転換植物を供給源とした活性型 VD3 販売価格の既製品同等価格帯達成見込みをたてることについては、(8) 研究開発の成果と意義に示した通り ゲノム編集などにより VD3 までの代謝増強見込みが得られたこと、 活性型 VD3 生合成関連遺伝子の植物体への導入が完了し、2018 年度中に植物体を用いた酵素機能評価を行う予定であること、 袋型培養槽による対象植物の培養および目的化合物の抽出・精製に関する基礎検討が出来たこと、以上の三点から、最終目標達成に向けて当初計画通り研究開発を進めることが出来ていると判断できる。

今後は、特に活性型 VD3 変換に関する研究開発進捗をグループ全体で重点フォローするとともに、研究成果統合スケジュールに則った生産プロセス基礎を確立を目指す。

(10)成果の普及

研究開発および知財取得の進捗をみながら、順次成果を公表することを検討している。これまでに行った成果普及活動の集計を表 2.2.1-1 に示した。

表 2.2.1-1 成果普及活動集計

年度	論文		その他外部発表				受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	1	3	0	3	0
2017	0	0	1	0	1	0	0
2018(実施済みのもの)	0	0	0	0	0	0	0
()内は今後の予定数	(4)	(0)	(3)	(1)	(1)	(0)	(0)
2020年度末までの累積の見通し	4	0	5	4	2	3	0

(11)知的財産権などの確保に向けた取り組み

開発の成果については、開発技術の内容にしたがい知財化またはノウハウ化を検討した後、担当の大学および企業で権利化を順次行っている。2017 年度に VD3 前駆体の蓄積に関する特許出願を行った。2018 年度には脂質蓄積能増強に関する出願をおこなう予定である。

表 2.2.1-2 特許出願計画

年度			
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	1	0	0
2018 (出願済みのもの)	0	0	0
()内は今後の予定数	(1)	(0)	(0)
2020 年度末までの累積の見通し	3	0	0

特許・論文等リスト

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	神戸天然物化学株式会社、国立大学法人神戸大学	特願 2018-32173	国内	平 30.2.26	出願	形質転換植物、およびその利用	水谷正治、鈴木宗典

【外部発表（研究発表、講演）】

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	柳橋 邦生	株式会社竹中工務店	バイオ分野における建設会社のチャレンジ 骨粗鬆症予防薬の原料を植物でつくる	NEDO スマートセルプロジェクトキックオフシンポジウム	2016.11.14
2	川島 哲文	株式会社竹中工務店	高機能品生産植物の開発をはじめとしたバイオ医薬品への取り組み	JBA バイオエンジニアリング研究会公開講演会	2018.1.19

【外部発表（新聞・展示会）】

番号	公表機関	公表内容	会議名、媒体名	発表年月日
1	株式会社竹中工務店 キリン株式会社 神戸天然物化学株式会社 大阪大学 大阪府立大学 神戸大学 北海道医療大学	活性型ビタミン D3 植物で高効率生産	日刊工業新聞	2016.09.30
2	株式会社竹中工務店 キリン株式会社 神戸天然物化学株式会社 大阪大学 大阪府立大学 神戸大学 北海道医療大学	ビタミン D3 生産技術の開発着手	建設工業新聞	2016.09.30

3	株式会社竹中工務店 キリン株式会社 神戸天然物化学株式会社 大阪大学 大阪府立大学 神戸大学 北海道医療大学	骨粗鬆症予防へ研究 改良植物から有効成分生産	建設産業新聞	2016.09.30
4	株式会社竹中工務店 キリン株式会社 神戸天然物化学株式会社 大阪大学 大阪府立大学 神戸大学 北海道医療大学	植物の代謝多段改変と高効率培養による活性型ビタミン D3 生産システムの開発	BioJAPAN2017	2017.10.11

2.2.2 医薬品中間体原料植物の代謝変換によるアルカロイド製造技術の開発（味の素株式会社）

(1)背景と目的

本研究開発においては、多くの生理活性物質を含むモノテルペンインドールアルカロイド(MIA)の生産プラットフォームとして、キョウチクトウ科に分類されるニチニチソウを定め、MIA 原体製造のための高品質な植物原料を安定的、かつ持続的に製造するための技術開発を目指す。ニチニチソウには、およそ60年前に見いだされ、現在もホジキン病などの悪性リンパ腫などの治療に使用されるピンカアルカロイドが含まれる。ピンカアルカロイドは、化学的にはMIAに分類され、その生合成経路については、多くの知見が集積している(図2.2.2-1)。本プロジェクトにおいては、このような基礎知見を活用し、ピンカアルカロイドの生合成にかかる代謝経路を改変する技術開発をおこない、ピンカアルカロイドそのもの、および、その生合成中間体に由来しうる特定のMIAをニチニチソウに蓄積させることを可能とすることを旨とする。さらに、比較的小型の植物であるニチニチソウを人工光型植物工場で有効に栽培生産することも可能とし、これらを組み合わせることで、MIAの安定的で持続的な原料供給のため技術パッケージの開発を目的とする。

【ニチニチソウのピンカアルカロイド生合成経路】

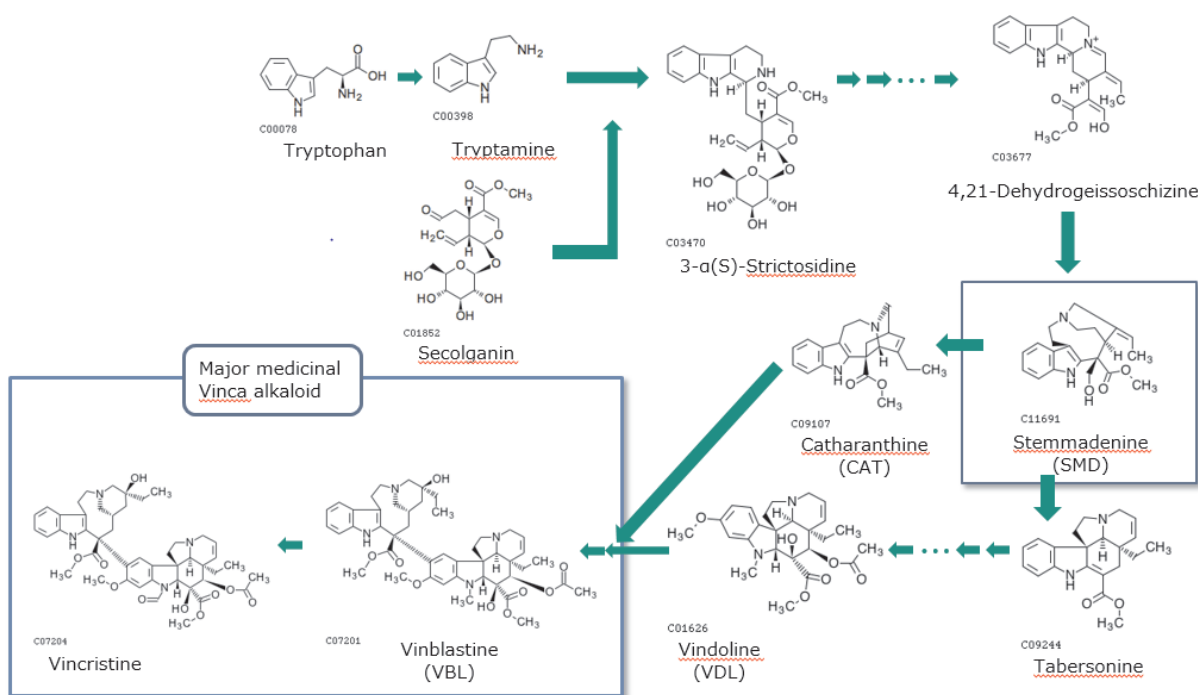


図 2.2.2-1 ニチニチソウのピンカアルカロイド生合成経路の概略

(2)位置づけ、目標値

上記を実現するための技術戦略は、ニチニチソウのピンカアルカロイド合成の代謝フラックスを増大させ、合成量のキャパシティーを増加させることを、プロジェクトの前半(3年目まで)に実現し、さらに、プロジェクトの後半(5年目まで)に、そのようなバックグラウンドを有するニチニチソウにゲノム編集を応用し、特定の代謝中間体の蓄積が可能であることも示す。また、合わせて、当

該ニチニチソウの人工光型植物工場での栽培技術を確立し、安定的持続的な植物生産技術の開発もおこなう。

(3)全体計画

上述のとおり、中間目標においては、ピンカアルカロイド生合成系への代謝フラックスを増大させる遺伝子を特定し、実際に、それらの遺伝子が導入されたニチニチソウの形質転換体を作成することが最大の目標である。特に、ニチニチソウの形質転換系は、再現性のある系の報告もなく、中間目標までに、最も困難なチャレンジとなる。さらに、当該形質転換体を人工光型植物工場で、栽培評価をおこない、制御された環境でのアルカロイド蓄積量の評価、および、そのパフォーマンスの安定性の評価をおこなう。

最終目標においては、さらに、代謝フラックスが増加したニチニチソウの作出を目指しつつ、当該植物にゲノム編集をおこない、特定の代謝中間体を蓄積するための技術開発を目指す。

(4)実施体制

事業実施にあたっては、京大大学生存圏研究所、千葉大学環境健康フィールド科学センター、および、玉川大学農学部との共同研究を実施している。共同研究先が分担する具体的な課題は、京大は遺伝子発現分析、および、輸送体遺伝子の単離、千葉大学はニチニチソウの形質転換系の開発、玉川大学はニチニチソウの人工光型植物工場での栽培技術の開発、となる。

(5)運営管理

テーマ運営については、年に一度、主に年度の前半において、サブテーマリーダーが研究現場に出向き、ヒアリングという形式で、テーマ進捗を報告し、技術的な課題について議論助言をいただく場が設けられている。また、年に一度、主に年度の後半において、外部有識者による技術推進委員会が開催され、テーマの進捗、および、課題へのアプローチ法、さらに、実用化の見通しとその課題等への議論と助言の場が設けられている。

研究グループ間の連携は、上述のヒアリング、あるいは技術推進委員会の内容をレビューする目的でのミーティングを開催する。また、テーマ代表者は、半年に一度の頻度(必要があれば、さらに多くの頻度で)で、共同研究先を訪問し、個別に議論をおこなうことも実施している。また、大きな進捗、あるいは、外部からの情報が得られた際は、電子メール等での情報共有を遅滞なくおこなっている。

(6)実施の効果

本技術開発が適用しうる市場は、例えば、先述の悪性白血病等の治療に用いられるピンカアルカロイドであるピンブラスチン、ピンクリスチン等であれば、その世界市場は、年間 200-300 億円となる。

(7)中間目標の達成度

中間目標については、ピンカアルカロイド合成を強化する遺伝子の特定、ニチニチソウの形質転換系の確立、および、ニチニチソウの人工光型植物工場栽培条件の改良をおこない、概ね、目標は達成されたと評価される。

(8) 研究開発の成果と意義

アルカロイド合成経路を亢進する遺伝子群の特定と同時にニチニチソウの形質転換体作出に向けた技術開発にも着手した。医療用タンパク質の製造等で、植物での一過性遺伝子発現技術は実用化されているが、本テーマが目指す化合物のように、植物としての大量のバイオマスが必要な場合、遺伝子組換え植物を利用する方が有利であることは想像に難くない。一方で、ニチニチソウにおいては、再現性の高い形質転換技術の報告はなく、本技術についても、自力で開発することとなった。図 2.2.2-2 に、その概念図を記載する。

ニチニチソウ形質転換体の作出

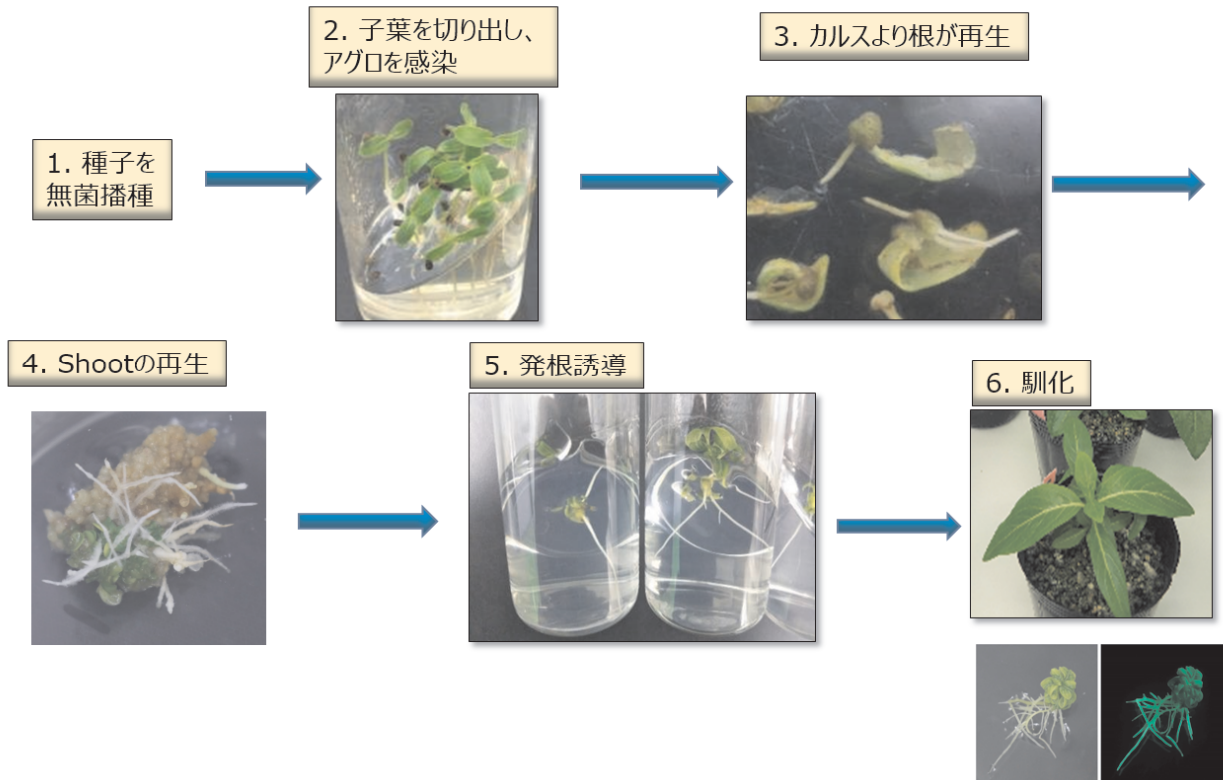


図 2.2.2-2 ニチニチソウ形質転換体作出の概念図

プロジェクト内のテーマ間連携については、遺伝子発現誘導系の導入について、かずさ DNA 研究所、ゲノム編集技術の導入について徳島大学、および、遺伝子発現量の改良について奈良先端科学技術大学と協議を開始した。

(9) 最終目標の達成可能性

最終目標では、注目する生合成中間体を代謝する酵素、および、その遺伝子が特定されており、中間評価までに開発された技術とゲノム編集技術を組み合わせることにより、当該化合物を蓄積する植物体を取得することが可能と見込んでいる。また、形質転換体の人工光型植物工場環境での栽培技術を精緻化し、化合物の蓄積を最大化・安定化することも達成可能と見込んでいる。

(10) 成果の普及

成果の普及については、以下を予定している。

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	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	0	0	0	0	0
2018(実施済みのもの) ()内は今後の予定数	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)
2020年度末までの 累積の見通し	3	0	3	0	1	0	0

※2018年6月20日現在

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

特許出願については、以下が出願済み、および、見込みの件数となる。

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 (出願済みのもの) ()内は今後の予定数	1 (1)	0 (0)	0 (1)
2020年度末までの 累積の見通し	4	2	3

※2018年6月20日現在

特許・論文等リスト

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	味の素 株式会社	特願 2018- 73800	国内	平 30 4.6	出願	アルカロイドの 製造方法	木坂弘明 三輪哲也

2.2.3 組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産（ホクサン株式会社）

(1) 背景と目的

本事業は、ジャガイモシストセンチュウ（以下、PCN と記載）防除剤の主成分となる PCN 孵化促進物質（Hatching factor：HF、以後、PCN-HF）の大量生産系の開発を目指すものである。

PCN は、ジャガイモの根に寄生する農作物害虫のひとつで、発生圃場から根絶させることが困難とされている。現状、北海道のジャガイモ圃場の少なくとも約 20%（11,000ha）において PCN の発生が確認されている¹⁾。また、海外のほとんどのジャガイモ栽培地域においても、すでに甚大な被害がもたらされているため、100 か国以上で植物検疫上の法規制（汚染土の移動制限等）が執られている。欧州に限った PCN 被害額は、年間 €300M（約 406 億円）と試算される²⁾。このように、世界的に PCN の被害は、農業上甚大なものであるにも関わらず、現在、PCN 防除に効果的な薬剤の開発は成功していない。

PCN は、図 2.2.3-1 に示す生活環を有し、薬剤耐性の高いシストを形成する。卵は、ジャガイモの根から分泌される PCN-HF に反応して孵化する特性を持つ。幼虫に効果のある農薬は開発されているが、処理時期がジャガイモ作付け前の 1 回に制限されているため、ジャガイモ作付け後に孵化する幼虫に対して有効な防除はできていない。

一方、ジャガイモ作付け前の土壤に PCN-HF を施用することにより、シスト中の PCN 卵を強制的に

孵化させ、シストから遊出した幼虫を餓死させる PCN 防除法が考えられるが、元々、植物体から分泌される PCN-HF 量は少なく、合成であっても PCN-HF を量的、コスト的に産業上利用可能なまでには生産することが不可能であったため、未だ実現はしていない。本事業では、この PCN-HF の大量生産系の構築を目標とする。

参考文献

1) 農畜産業振興機構ホームページ2016年3月

2) J.F. Moxnes and K. Hausken, Ecol. Model., 207, 339 (2007)

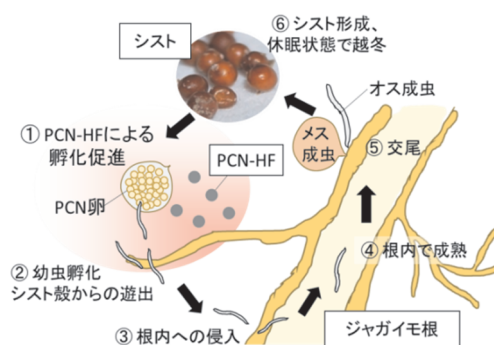


図 2.2.3-1 PCN 生活環

(2) 位置づけ、目標値

【対象市場・製品や競合技術との対比】

PCN 防除に適用登録のある農薬は、先述の通り使用回数がジャガイモ作付け前の 1 回に制限されており、防除効果が不十分である。また、開発予定品は既存の防除剤との併用で殺虫効果を高めることも可能であることから、既存剤と共存し得る。一方、PCN-HF を有効成分とする PCN 防除剤は、世界的にも同等品は存在しない。開発品予定品の想定単価と既知の PCN-HF の価格(10a あたりの必要量より算出)を比較すると、試薬 A の市販価格は開発予定品の 830 倍、物質 B（市販品なし）は桁違いに高価と試算される。

【目標値】

中間目標

研究開発項目	研究開発目標	根拠
組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	遺伝子導入による二次代謝経路の制御と栽培環境の最適化により、最終的に、現状の45倍量のPCN-HFの生産を目標とする。	最終開発目標である現状の100倍量のPCN-HF生産の達成にあたり、中間目標では遺伝子導入による二次代謝変化の誘導により現状の15倍量、栽培環境最適化により現状の3倍量のPCN-HFの生産を目標とする。

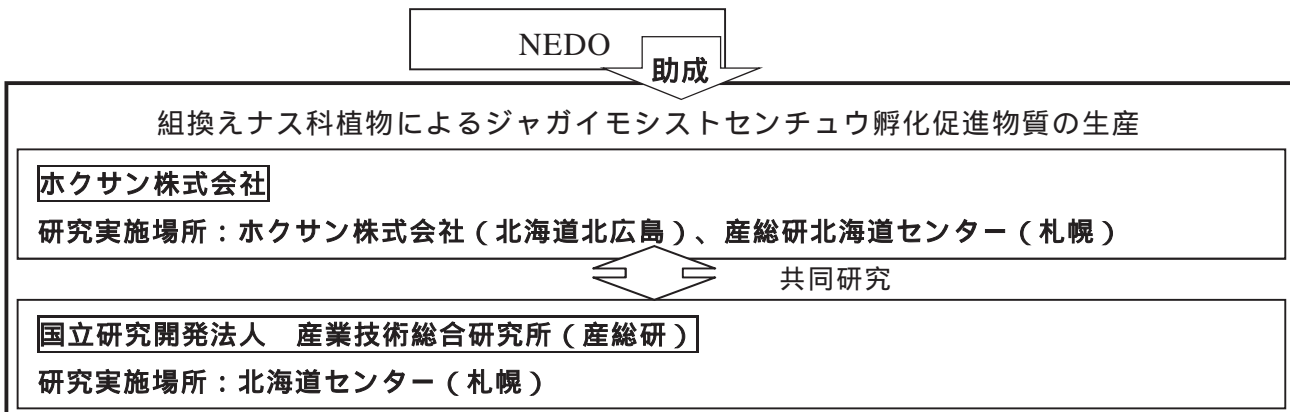
最終目標

研究開発項目	研究開発目標	根拠
組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	最終的に現状の100倍量のPCN-HFの生産を目標とする。	事業化に必要とされる年間PCN-HF生産量から、最終開発目標を設定した。

(3)全体計画

年度	2016年度	2017年度	2018年度	2019年度	2020年度
研究開発項目					
組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	遺伝子導入による二次代謝変化の誘導				
	栽培環境の最適化				
	PCN 孵化試験の精度向上				

(4)実施体制



(5)運営管理

表 2.2.3-1 打合せ実績一覧

内容	回数	開催日
PL, sPL, NEDO への進捗状況報告	3	2016/12、2017/4、2017/11
テーマ間連携に向けた打ち合わせ	3	2017/12、2018/1、2018/3
進捗共有・試験検討	18	2016/8～2018/6（1回/月程度）

主要研究員による進捗状況確認、試験検討をほぼ毎月実施し、情報共有に努めている。

(6)実施の効果

【予測市場】 販売開始 5 年後に国内の殺センチュウ防除剤の市場の 4%シェアを見込む。海外市場への展開も想定し、年間 10.3 億円の売上を想定。

(7)中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度	今後の課題と解決方針
組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	遺伝子導入による二次代謝経路の制御と栽培環境の最適化により、最終的に、現状の 45 倍量の PCN-HF の生産を目標とする。	<ul style="list-style-type: none"> ・ PCN シスト無菌化技術の特許出願。 ・ 標的代謝酵素遺伝子 4 種類について発現抑制に成功、下流の目的外代謝物量の減少を確認。 ・ ジャガイモの組換え体における孵化活性の増加を確認。 ・ 環境条件の最適化により、従来法と比較して 1 株あたりから得られる PCN-HF 量が飛躍的に増加。 ・ 上記結果より現状の 54 倍の PCN-HF の生産を達成した。 	○	

(8)研究開発の成果と意義

1)代謝系遺伝子発現制御検討

本研究では、PCN-HF 高生産植物の開発を最終目的として、PCN-HF 代謝関連遺伝子の発現量を操作し、代謝系の改変を行う。代謝操作戦略の有効性を迅速に評価するために、水耕栽培タバコと植物ウイルスベクターを用いた一過的発現調節による評価系の構築を進めた。これまでに同定した標的代謝酵素遺伝子 a-d それぞれについて virus induced gene silencing (VIGS) 法による一過的な発現抑制を試み、real-time

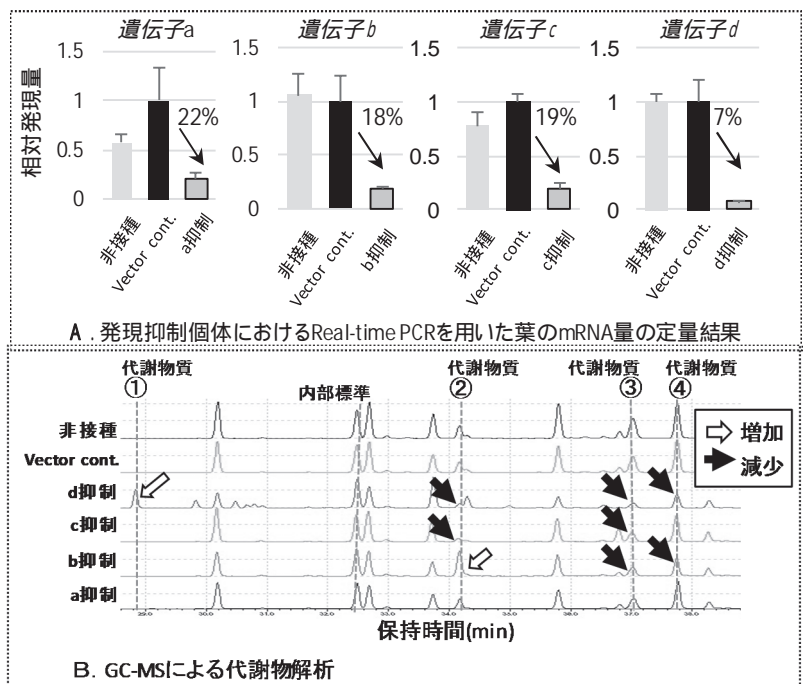


図 2.2.3-2 VIGS 法による標的代謝系遺伝子の一過的発現抑制

PCR により各遺伝子の mRNA 量を評価した。

その結果ウイルスベクター接種 15 日後の葉組織において、遺伝子 a-d の発現量を減少させることに成功 (図 2.2.3-2A)、また、茎・根組織においても発現量を抑制することに成功した。さらに、代謝物量が変動しているかを確認するため、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を

用いて代謝物量を解析した結果、各標的酵素遺伝子の下流代謝物量の減少と上流代謝物量の増加が認められた(図 2.2.3-2B)。

2) PCN 孵化試験の精度向上

PCN 孵化試験による評価には、安定的に同程度の孵化率を示す PCN 卵の準備が必須である。現状の温室土壌等を用いた PCN 増殖方法では、寄生菌による PCN 卵の汚染率が高く、孵化率の変動要因のひとつとなっている。そこでこの要因を排除するため、PCN 孵化幼虫の無菌化を検討した。まず、

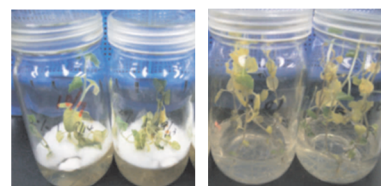


図 2.2.3-3 薬剤検討試験の様子

PCN 幼虫表面に付着するカビを単離し、顕微鏡観察および ITS 領域配列解析を行ない、菌を同定した。当該真菌に対する抗菌性試験及び PCN 幼虫の生存率より、表面殺菌に最適な薬剤とその処理濃度を確定した(図 2.2.3-3)。当該薬剤を用いた無菌化処理にて得られたシストから抽出した PCN 卵は、無処理シストより抽出した PCN 卵と比較して汚染卵率が減少し、孵化率が上昇する傾向となった。これらの PCN 幼虫の無菌化技術の特許出願した。

3) 目的物質高生産のための組換え体の作出

1)の結果を踏まえて、PCN-HF 代謝関連遺伝子を導入した組換え体を得た。得られたジャガイモ系統を用いて孵化試験を実施した結果、非組換え体と比較して 1.5 倍の孵化率をもつ系統が確認された(図 2.2.3-4)。

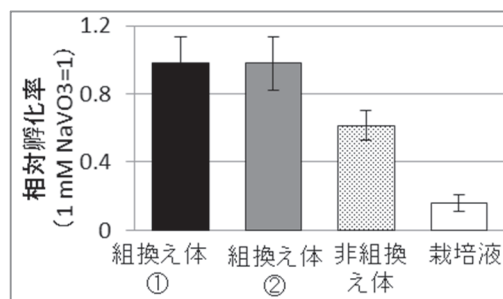


図 2.2.3-4 ジャガイモ栽培液を用いた孵化試験

4) 栽培条件の検討

PCN-HF を効率的に生産するための栽培方法として、複数の養液栽培法を比較検討した。回収した栽培液中に含まれる PCN-HF 量をスコア化し、1 株当たりからの PCN-HF 生産量を評価した結果、検討した養液栽培法の中のひとつは従来法と比較して PCN-HF 回収量が 7 倍以上となった(図 2.2.3-5)。さらに、各栽培方法における 1 株あたりに要する栽培面積を PCN-HF 生産量の評価に加味した結果、最終的に従来法より 54 倍の PCN-HF の生産が可能と試算された。

5) 回収方法の検討

PCN-HF を効率的に精製・回収する方法を構築するため、PCN-HF 粗精製用の吸着担体、処理条件等の検討を行なっている。本検討により得られた粗精製物について、PCN 孵化活性を確認し、PCN 汚染土壌への処理を行った。その結果、対照区と比べ、有意に孵化幼虫数の増加が認められ、回収した粗精製物の土壌における有効性が確認された。

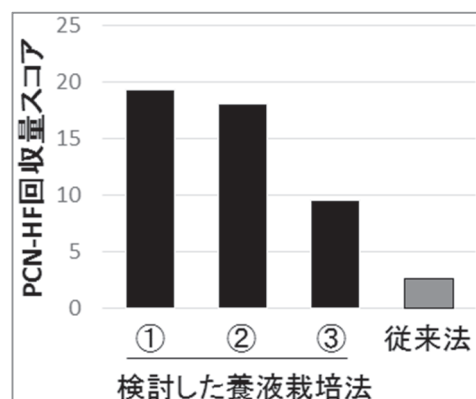


図 2.2.3-5 PCN-HF 回収量スコアの比較

テーマ間連携への取り組み 連携先：内容

- ・研究開発項目 委託事業機関（国研）産業技術総合研究所：遺伝子発現抑制制御検討
- ・研究開発項目 委託事業機関（公財）北海道科学技術総合振興センター：環境制御検討
- ・研究開発項目 委託事業機関 国立大学法人京都大学大学院：遺伝子探索

(9)最終目標の達成可能性

研究開発項目 (担当)	現状	最終目標 (2020年度末)	達成見通し、根拠
組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産	中間目標である現状の45倍以上のPCN-HF生産を達成した。	現状の100倍量のPCN-HFの生産。	遺伝子発現制御および栽培方法の更なる進捗により、現状の2倍量のPCN-HF生産の達成を見込む。

(10)成果の普及

年度	論文		その他外部発表		
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌の掲載	その他
2016	0	0	0	0	0
2017	0	0	1	0	1
2018（実施済みのもの） （ ）内は今後の予定数	0 (1)	0	0 (1)	0	0 (1)
2020年度末までの 累計の見通し	2	0	4	0	4

(11)知的財産権などの確保に向けた取り組み

遺伝子組換え植物の栽培・生産技術の新規の技術は、技術流出のリスクがあるためノウハウ化する。一方、PCN-HF孵化試験の精度向上に係る技術は知財化を進める。

特許件数

年度	国内	外国	PCT出願
2016	0	0	0
2017	1	0	0
2018（実施済みのもの） （ ）今後の予定数	0 (1)	0	0 (1)
2020年度末までの 累計の見通し	2	0	2

特許・論文等リスト

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	ホクサン株式会社	特願 2018-26286	国内	平成 30 年 2 月 16 日	出願	無菌化シストセンチュウを得る方法	林琴美、 宮代裕子、 鰐淵恭子、 小野貞子、 田林紀子

【外部発表】

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	林琴美* 宮代裕子・鰐淵恭子・小野貞子・田林紀子	ホクサン株式会社 *発表者	ジャガイモシストセンチュウの in vitro 増殖系の確立 (Establishment in vitro reproductive system of potato cyst nematode.)	平成 30 年度日本植物病理学会大会 (口頭発表)	2018 年 3 月 27 日
2	厚見 剛 1*、 一町田 紀子 2、加賀谷 羽衣子 2、長谷田 茜 2、林琴美 2、古田和義 2、田林紀子 2、松村健 1	1) 国立研究開発法人産業技術総合研究所 2) ホクサン株式会社 *発表者	Development of the VIGS system towards enhancing the production level of hatching factors for potato cyst nematode using <i>Nicotiana benthamiana</i>	11th International Congress of Plant Pathology (poster session)	2018 年 7 月 31 日

2.2.4 イチイ細胞培養技術を用いたタキサン系医薬中間体 10-DAB の効率生産法開発（北海道三井化学株式会社）

(1)背景と目的

タキサン系抗がん剤である paclitaxel は微小管の脱重合阻害作用を有し、1990年代ではイチイの樹皮より採取されていたが、含量が極めて低く、また樹皮を剥ぐことで樹木が枯死することから代替え供給法の確立が必要とされていた。2000年代に入るとイチイ細胞培養法での paclitaxel 生産法が確立され、BMS社は本法での生産供給を可能とした。しかしながら paclitaxel 特許は2003年に、抗腫瘍効果や溶解性が改良された docetaxel は2010年に特許切れとなった現在では、これらの後発品に加えて、ヒト血清アルブミンに結合させ水溶性を改善した abraxane が市場に投入されているものの、これらのほとんどはプランテーション或いは天然のイチイ樹木より供給されている。イチイは樹木の中でも生長が非常に遅く、1年で枝が10cm程度伸長するのみであり、また paclitaxel 等タキサン類の含有量が高めるためには10年以上の生育期間が必要となる（10年生のイチイ中 paclitaxel 含量:数 ppm~400ppm、総タキサン含量:最大1000ppm）。国内で使用されているタキサン系抗がん剤は原料の全てが海外からの輸入であり、この現状は重要な天然物医薬品の安定確保の観点から問題である。タキサン系抗がん剤製造において、イチイ茎葉原料中には paclitaxel 以外に多種タキサン化合物が含まれ、これらは医薬中間体 10-deacetylbaaccatin III (10-DAB) に一度戻してから paclitaxel などのタキサン系医薬原体へと再度合成されている。そこで、イチイ培養細胞の paclitaxel 生合成酵素の遺伝子をノックダウン(KD)またはノックアウト(KO)し、生産される多様なタキサン類を paclitaxel、docetaxel、cabazitaxel いずれもの合成中間体である 10-DAB に集約させ、またタキサン輸送に関わるトランスポータを特定、制御することで、輸送・蓄積の最適化を行い 10-DAB の生産性を飛躍的に高めることを目的とした。

(2)位置づけ、目標値

タキサン系抗がん剤は卵巣ガン、乳ガン、子宮頸ガン等に用いられ、Paclitaxel、docetaxel については後発品も数多く出ているが、タキサン系抗ガン剤の市場規模は拡大を続けている。現在、タキサン系抗がん剤は、イチイ植物体からの抽出、精製、10-DABからの半合成、イチイ細胞培養法により生産されているが、供給の約80%はイチイ植物体を用いており、細胞培養法は20%程度に過ぎず、イチイ細胞の増殖速度が遅いことから培養設備拡大に対する投資が容易ではないことがその要因として考えられる。

平成30年度の間目標は、イチイ細胞への遺伝子組換え技術開発における導入法の確立、タキサン系化合物生産性向上に資するアルカロイド輸送体の解明に向けた情報獲得、小試験用バイオリアクターの開発、イチイ培養細胞の増殖試験の実施しスケールアップ試験用データの獲得である。また、平成32年のプロジェクト最終目標は、10-DAB生産性：1g/L/28dの達成、2 m³レベルの袋培養技術確立である。

(3)全体計画

1) イチイ細胞への遺伝子組換え技術開発（担当：北海道三井化学）

当社の過去の検討より、アグロバクテリウム法を用いた結果、ストレスによりイチイ細胞が生育阻害を起こすという結果を得ており、また一般的にアルカロイド生産性の培養細胞は安定した形質転換が困難で且つイチイ培養細胞の増殖は極めて遅い。そのため形質転換について難航が予想されることから、H30年度末にイチイ細胞の形質転換法を確立する。

2) 10-DAB 高生産イチイ培養細胞株の作出 (担当：北海道三井化学)

タキサン高生産イチイ培養細胞株を作出、合わせてノックダウン、ノックアウト用コンストラクトを作成し、1)で確立された形質転換法を用いて遺伝子を導入し、得られた株にて10-DAB 生産性評価を実施する。

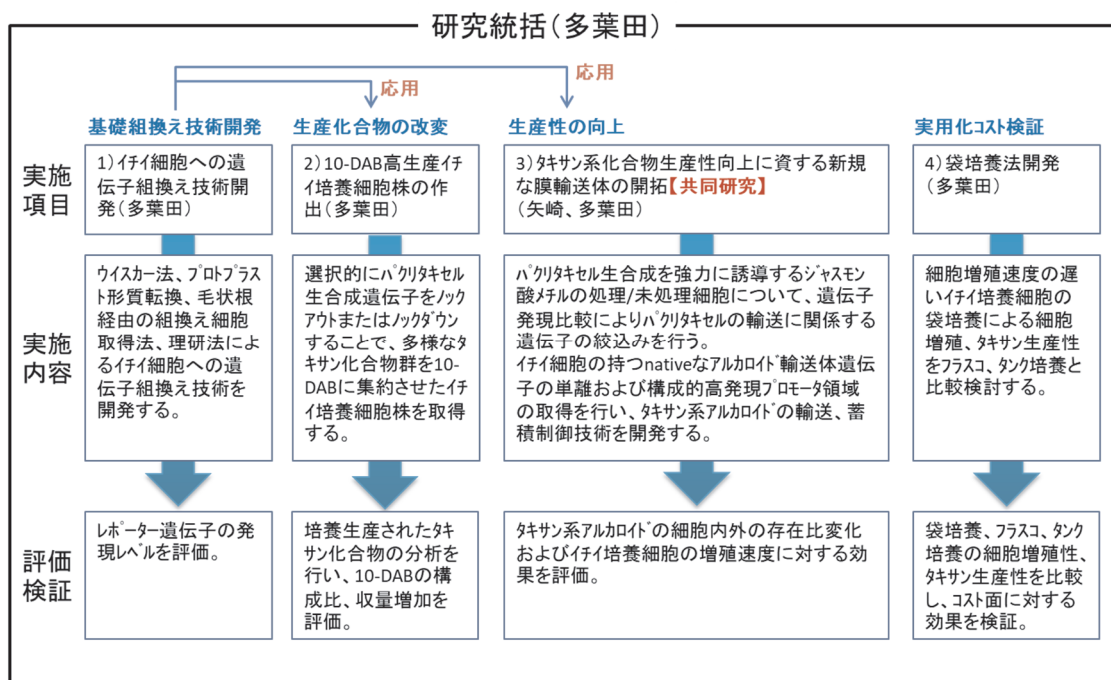
3) タキサン系化合物生産性向上に資する新規な膜輸送体の開拓 (担当：京都大学)

アルカロイド輸送に関する遺伝子、高発現プロモータ取得のための高発現遺伝子特定のため、cDNA 配列解析を行い、得られた情報を基に cDNA クローン化及びコンストラクトを作、イチイ培養細胞へ導入し評価する。

4) バイオリアクター培養法開発 (担当：北海道三井化学)

小試、中試用バイオリアクターの設計、試作検討を行う。バイオリアクターはカルチャーバッグ部と外側支持部を当社で設計し作成を外注することで、安価に培養が可能な系の作成を目指し、最終的に 1 m³ 又は 2 m³ のバイオリアクターを試作する。

(4) 実施体制



(5) 運営管理

研究進捗については、月に一度の進捗ミーティングを開催して結果を共有した。共同研究先との連携については、共同研究者間での相互訪問や、学会等の機会を利用した研究打合せ、情報交換を平均2か月に1度のペースで実施した。その他、メールや月報でデータの共有やディスカッションをタイムリーに実施した。

(6)実施の効果

本テーマ開発により、現在は100%海外に依存しているタキサン系抗がん剤を国内で安定生産し原料を確保することが可能となる。加えて、広大な土地での栽培が現実的ではない日本において、小さな土地面積で管理された培養技術を用い、高効率に有用成分を生産できれば、イチイ樹木が生産するタキサン系抗がん剤のみにとどまらず、他の植物細胞での有用物質生産にも応用可能である。更に、細胞培養により10-DABを直接高生産することが可能となれば、溶剤の使用量を劇的に減らすことが可能となる。Green Chemistry in the Pharmaceutical Industryにおいて半合成法と細胞培養法の使用溶剤の比較がなされており、細胞培養法にすることで10種類の溶剤(toluene, isobutyl acetate, heptanes, acetone, methanol, tetrahydrofuran, methyl t-butyl ether, ethanol, ethyl acetate, glacial acetic acid)、5年間で溶剤合計約600kLの置き換えが可能であることが示されている。

(7)中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果(18年7月現在)	達成度	今後の課題と解決方針
1) イチイ細胞への遺伝子組換え技術開発	形質転換法の確立、ノックダウンイチイ培養細胞の作成を開始	ウィスカー法、パーティクルボンバードメント法などによるイチイ培養細胞への遺伝子導入をGFP蛍光により確認した。	○(2019年3月達成予定)	ノックダウンイチイ培養細胞の作成
2) 10-DAB 高生産イチイ培養細胞株の作出	タキサン系化合物生産株の獲得、アセチルトランスフェラーゼ、アシルトランスフェラーゼのリスト化、KD、KO用コンストラクトの構築、Paclitaxel局在性の確認	タキサン化合物生産株としてイチイ培養細胞株 OJRD A6, B2, B7 および HM13 株を獲得した。最もタキサン生産性が高かった OJRD B7 株では、総タキサン生産量 478.6mg/L(21d)であった。RNA-seq 発現解析を行いアセチルトランスフェラーゼ、アシルトランスフェラーゼのリストを作成した。ノックダウンに用いるコンストラクト計6種を構築した。	○(2019年3月達成予定)	生産性向上検討および細胞固定法検討による局在性情報の取得
3) タキサン系化合物生産性向上に資する新規な膜輸送体の開拓	イチイの RNA-seq 発現解析及び輸送体遺伝子のリスト化、細胞内局在性確認用コンストラクトの構築及び局在性の確認・paclitaxel、10-DAB の輸送評価、イチイ細胞内性輸送体遺伝子のクローン化及び発現コンストラクトの構築	RNA-seq 発現解析を行い輸送体遺伝子ファミリーのリストを作成した。細胞内局在確認及び輸送評価に用いるコンストラクト計16種の構築を完了した。解析結果で強発現を示した遺伝子のプロモータ配列を決定した。	○(2019年3月達成予定)	プロモータ配列の知財化
4) バイオリクター培養法開発	小試験用バイオリクター	小試験用袋型バイオリクターを設計試	○(2019年3	中試験(数十~

	での増殖試験実施及び留意 箇所のデータ獲得、中試験 用バイオリアクターの設計	作し、イチイ培養細胞増殖試験を実施し た。袋型バイオリアクターの改良等によ り、既存ジャーフェーマンターと同等の 細胞増殖倍率を達成した。	月達成予 定)	数百L)用バイオ リアクターの試 作
--	--	--	------------	--------------------------

(8) 研究開発の成果と意義

・ 目標に対する達成状況

1) イチイ細胞への遺伝子組換え技術開発

取得したイチイ培養細胞 5 株についてウィスカー法、パーティクルボンバードメント法及びアグロバクテリウム法を用いて GFP 遺伝子を導入し、GFP の発現を確認した (図 2.2.4-1)。

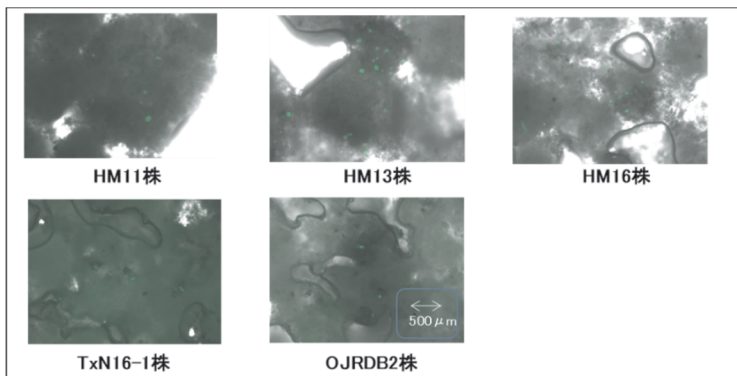


図 2.2.4-1 パーティクルボンバードメント法での形質転換

2) 10-DAB 高生産イチイ培養細胞株の作出

・ タキサン高生産培養株の取得

タキサン高生産に資する培養株の取得を目指し、北海道三井化学構内の日本イチイ (*T. cuspidata*) 21 個体より needle 部を採取し、N5MWP 寒天培地を用いて 15 個体から誘導したカルスを取得した。得られたカルスより液体培養での安定継代増殖可能な株 (OJRD A6, B2, B7 および HM13) を確立した (図 2.2.4-2)。

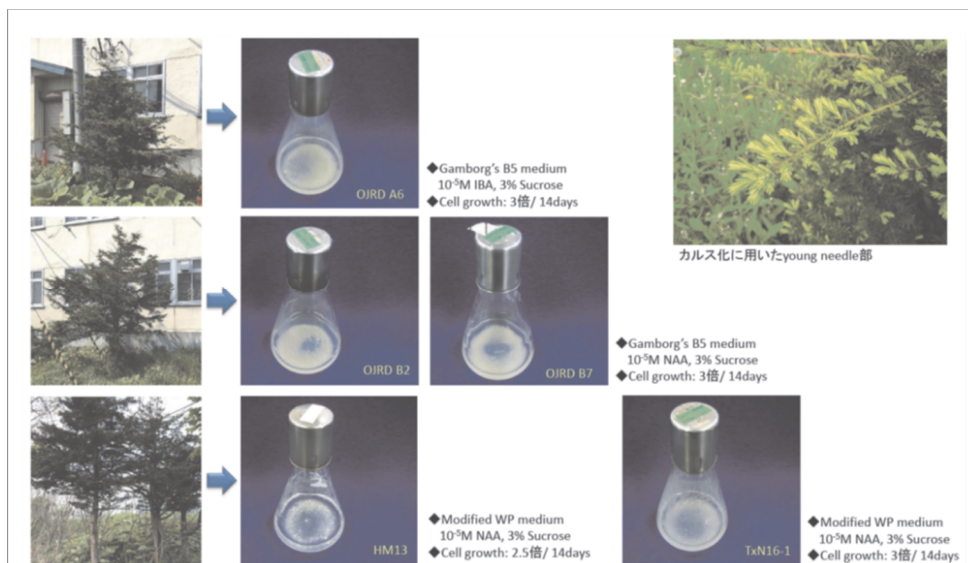


図 2.2.4-2 イチイ細胞の株化

得られたイチイ細胞株をジャスモン酸メチルで処理し、最もタキサン系化合物生産性の高かった OJRD B7 株では 478.6mg/L の総タキサン生産性であった。(表 2.2.4-1)

表 2.2.4-1 タキサン系化合物生産性評価

	Taxane yield (mg/L)					Total taxanes (%)
	1, baccatin III	2, 10-deacetyl-PTX	3, cephalomannine	4, paclitaxel (PTX)	5, baccatin VI	
Cells	20.5	36	70.4	135.4	187.5	449.7 (94)
Medium	10.6	2.6	3.7	1.8	10.2	28.9 (6)
Cells + Medium	31.1	38.6	74.1	137.2	197.7	478.6 (100)

3) タキサン系化合物生産性向上に資する新規な膜輸送体の開拓

・ 10-DAB 生産

アルカロイド輸送に関する遺伝子、高発現プロモータ取得を目指し、ジャスモン酸メチルでタキサン系化合物誘導、未誘導のイチイ培養細胞より RNA を抽出し cDNA 配列解析 (de novo RNA-seq) を試みた。解析結果より遺伝子の発現変動比較を行い、ジャスモン酸メチル誘導区で高い発現を示す Transporter 遺伝子ファミリーのリストを作成した (図 2.2.4-3、表 2.2.4-2)。

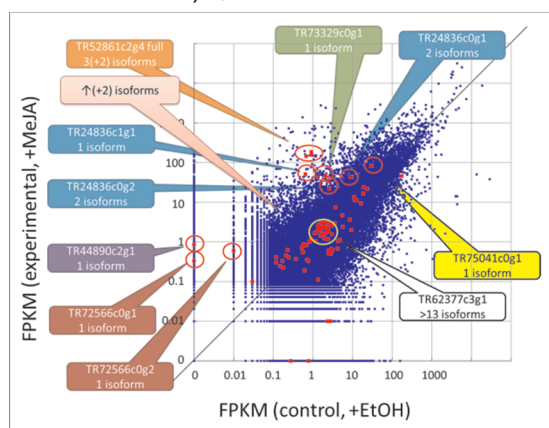


図 2.2.4-3 ジャスモン酸メチル誘導区での発現変動比較

表 2.2.4-2 輸送体遺伝子リスト

ID	hit contig数	総contig数	最長contig	最大変動値
TR76497	7	21	5477	34倍
TR55858	2	12	4345	7.5倍
TR80578	3	6	2149	7.1倍
TR65646	2	4	2545	3.6倍
TR78121	3	15	865	15倍
TR66244	2	17	685	25倍
TR14801	1	1	2234	3.8倍
TR81163	4	8	3591	2.2倍
TR82259	5	26	2996	13倍
TR73017	5	17	5854	11倍
TR74400	6	9	5361	8.9倍
TR32743	2	2	1629	3.1倍
TR43878	2	2	601	26倍
TR36024	2	3	3331	10倍
TR52861	10	13	2545	360倍
TR72566	2	2	2086	60倍
TR24836	5	5	2303	76倍
TR73329	1	1	2341	22倍
TR87901	2	4	1191	3.3倍
TR44958	1	12	1051	3.7倍

また RNAseq 発現解析で強発現を示した遺伝子のプロモータ領域を TAIL-PCR で伸長し、開始コドンより上流領域を単離し配列を決定した。

・ 輸送体評価

細胞内局在性確認及び paclitaxel、10-DAB の輸送評価を行うため、2 種のプロモータ、C 末端 GFP タグ、及びタグ無しの 2 種と組み合わせた 4 種類の構成を JAT1、JAT2 及び DTX1 遺伝子について構築し計 12 種、加え N 末端に GFP タグを付加した JAT1、DTX1 遺伝子の計 4 種、合わせて 16 種のコンストラクトを構築した。

4) バイオリアクター培養法開発

・ 袋型バイオリアクター設計、細胞の袋培養最適化

シングルユース小試験用バイオリアクターの基本設計を北海道三井化学で行い、袋型バイオリアクター試作品を作成した。イチイ細胞培養において、当初培養条件の不適合によ

るストレスでの細胞の赤褐色化が起こったが、バイオリアクターの改良、通気量の最適化、細胞移植密度の検討により改善され、既存ジャーファーマンターと同等の細胞増殖倍率となる条件を確立した。またイチイ以外の植物培養細胞（L細胞、H細胞）株を用いて細胞増殖性を比較し、いずれの細胞株においても既存ジャーファーマンターと同等の細胞増殖倍率を示し、イチイ細胞のみならず多植物細胞株の培養に広く適用できることを確認した。

(9)最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状	最終目標(2020年度末)	達成見通し
1) イチイ細胞への遺伝子組換え技術開発	遺伝子導入法を確立、ノックダウン用遺伝子の導入検討中	導入法の確立及び 10-DAB 生産遺伝子改変イチイ培養細胞の獲得	2020 年度末までに達成の見込み
2) 10-DAB 高生産イチイ培養細胞株の作出	タキサン系化合物生産イチイ培養細胞の株化、導入コンストラクトの作成中	10-DAB 生産株の生産性評価	2020 年度末までに達成の見込み
3) タキサン系化合物生産性向上に資する新規な膜輸送体の開拓	アルカロイド輸送体評価系の確立、アッセイの実施	アルカロイド輸送体遺伝子の導入及び局在性特定	2020 年度末までに達成の見込み
4) バイオリアクター培養法開発	中試験(数十～数百 L)用バイオリアクターの設計、検討の開始	本培養用バイオリアクターの試作検討実施、スケールアップ検討時の留意箇所データ獲得	2020 年度末までに達成の見込み

(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	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	2	1	0	0	0
2018(実施済みのもの) ()内は今後の予定数	0 (1)	0 (0)	2 (2)	0 (1)	0 (1)	0 (0)	0 (0)
2020 年度末までの累積の見通し	6	0	12	4	1	0	0

2018 年 7 月現在

(11)知的財産権などの確保に向けた取り組み
特許計 6 件の出願を予定

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018(出願済みのもの)	0	0	0
()内は今後の予定数	(2)	(0)	(2)
2020 年度末までの累積の見通し	6	0	6

2018 年 7 月現在

特許・論文等リスト

【外部発表】

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	多葉田誉	北海道三井化学株式会社	植物培養で抗がん剤原料	化学工業日報	2017年10月13日
2	○多葉田誉 ¹ 、南洋 ¹ 、加藤嘉博 ¹ 、草野博彰 ² 、矢崎一史 ²	¹ 北海道三井化学株式会社、 ² 京都大学生存圏研究所	形質転換利用に向けたイチイ培養細胞株の評価(27PA-am158)	日本薬学会第138年会	2018年3月27日
3	○草野博彰 ¹ 、南洋 ² 、多葉田誉 ² 、矢崎一史 ¹	¹ 京都大学生存圏研究所、 ² 北海道三井化学株式会社	イチイ培養細胞におけるタキサン化合物生合成の解析(P-253)	第59回日本植物生理学会年会	2018年3月28-30日
4	○南洋 ¹ 、草野博彰 ² 、矢崎一史 ² 、多葉田誉 ¹	¹ 北海道三井化学株式会社、 ² 京都大学生存圏研究所	Evaluation for transformation of yew-cultured cell line (PO-97)	The 23rd International Symposium on Plant Lipids (ISPL2018)	2018年7月8-13日
5	○草野博彰 ¹ 、南洋 ² 、多葉田誉 ² 、矢崎一史 ¹	¹ 京都大学生存圏研究所、 ² 北海道三井化学株式会社	A Study for Taxoid Biosynthesis in Yew Suspension Cultured Cells (PO-28)	The 23rd International Symposium on Plant Lipids (ISPL2018)	2018年7月8-13日

2.2.5 シソ代謝系制御技術による健康機能性成分の高効率増産技術開発（株式会社アミノアップ化学）

(1) 背景と目的

本事業は、健康成分として利用されるシソの機能性成分 A 及び機能性成分 B 群を飛躍的に高生産する技術開発を目的とする。

弊社の輸出用機能性素材（製品名：Benegut）は、機能性成分である機能性成分 A や機能性成分 B 群含有量を規格化しており、2012年に上市して以来、好評を博し、主にドイツの代理店 VITAL SOLUTION を通し、ヨーロッパ、アジア、オセアニア地域への販売を拡大している。

原料の乾燥シソ葉は、露地栽培及び天日干しにより生産されている。乾燥シソ葉中の機能性成分含有量は、天候等の自然環境や年次間差や地域間差に影響されるため、規格を下回り、原料として不適なシソが多い。よって、現状の露地栽培及び栽培品種を用いた不安定な原料生産では原料需要の伸びに対して、原料供給不足が予想され、販路・市場拡大の妨げの主要因となる。これらを解決するために機能性成分を高効率かつ安定的に生産できる技術開発が不可欠である。そこで、本研究開発では、遺伝子組換え技術により代謝系を制御し、さらに人工環境下における栽培技術を用いてシソの機能性成分 A 及び機能性成分 B 群を飛躍的に高生産する技術開発を行う。

(2) 位置づけ、目標値

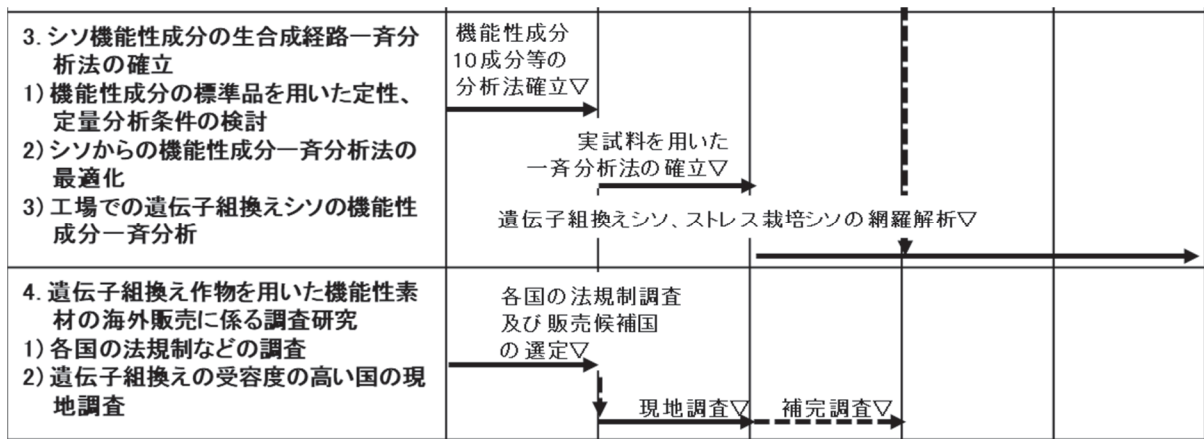
表 2.2.5-1 中間目標と最終目標

	目標値	根拠
中間 (平成30年度)	シソ乾燥葉1g当り機能性成分A含量を5倍に、機能性成分B群含量を2倍へ増加させる。	遺伝子組換え技術:シソ科植物丹参において、機能性成分A合成の上流遺伝子を過剰発現し、毛状根培養により最大600mg/L(培養液)に成功している。 栽培技術:セージやムラサキの培養細胞において、フェニルアラニン処理やUV-B照射により機能性成分B群が4倍～5倍に増加することが報告されている。 上記報告から、各技術で中間目標値を達成可能と判断している。
最終 (平成32年度)	シソ乾燥葉1g当り機能性成分A含量を10倍に、機能性成分B群含量を5倍に増加させる。	上記、遺伝子組換えとストレス栽培いずれかもしくは両技術の併用効果により、機能性成分の高含有化により目標値を達成するものと考えられる。

(2) 全体計画

表 2.2.5-2 事業全体計画

事業年度	H28年度	H29年度	H30年度	H31年度	H32年度
研究開発項目					
1. シソ機能性成分代謝系遺伝子の操作 1) 関連代謝系遺伝子の単離 2) 遺伝子組換えシソの作出と解析	候補遺伝子の単離▽	遺伝子組換え条件の検討▽			
	候補遺伝子の選抜▽ 遺伝子組換えの実施▽				
2. 栽培技術によるシソ機能性成分製造基盤技術 1) 人工環境下におけるシソ高収量条件の検討 2) 機能性成分の高生産を目的としたストレス栽培技術の確立	高収量条件の検討▽				
	阻害剤添加栽培、光波長A処理の実施▽		遺伝子組換えシソを用いた促進剤添加栽培の実施▽		
	促進剤添加栽培、光波長B処理の実施▽	遺伝子組換えシソを用いた阻害剤添加栽培の実施▽			
				遺伝子組換えシソを用いた薬剤多重添加栽培の実施▽	



(4) 実施体制

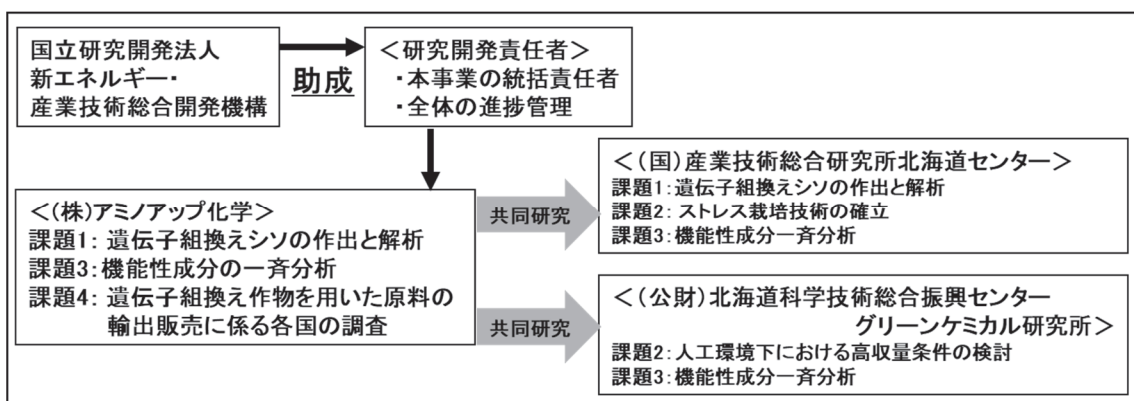


図 2.2.5-1 実施体制図

(5) 運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有する NEDO、プロジェクトリーダー及びサブプロジェクトリーダーと密接な連絡を維持しつつ、本事業の目的及び進捗について運営管理を実施した（プロジェクト会議）。また弊グループ内において、研究進捗の打合せをその都度実施した（グループ内会議）。開催実績は表 2.2.5-3 の通りである。

表 2.2.5-3 打合せ実施一覧

年度	プロジェクト会議	グループ内会議
2016年度	3	10
2017年度	5	24
2018年度	1	4
合計	9	38

(6) 実施の効果

(1) 本事業の技術開発による費用について

平成 31、32 年度のプロジェクト継続となった場合、本事業計画では技術開発成果を基に植物工場の建設、製造原料の安全性試験などを実施する。プロジェクト終了 5 年後（平成 37 年度）から製品の上市を行い、事業終了後に掛かる設備投資を 5 年で回収する計画である。

(2) 本事業の技術開発により温室効果ガスの削減見込み（機能性成分 A 換算）

・本事業で計画中の植物工場で 1 年間生産可能と推定した機能性成分 A 量 74kg を基準に、化学合成による生産と、人工環境下で生産した場合の CO₂ 排出量を求めた。

表 2.2.5-4 化学合成と人工栽培の CO₂ ガス排出量比較

方法	CO ₂ 排出量	算出根拠
化学合成	2,698トン	攪拌動力50 kW/m ³ × 5 m ³ × 16,000h 原油1,030 kL × 2.619 ¹
	17,508トン	原油6,685 kL × 2.619 ¹
人工栽培	112トン	灯油45kL × 2.489 ²
削減量	20,094トン	(2,698トン + 17,508トン) - 112トン

¹ 原油の CO₂ 排出係数 (tCO₂/kL)、² 灯油の CO₂ 排出係数 (tCO₂/kL)

(7) 中間目標の達成度

表 2.2.5-5 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度	今後の課題と解決方針
シソ代謝系制御技術による健康機能性成分の高効率増産技術開発	シソ乾燥葉1 g当り機能性成分A含量を5倍に、機能性成分B群含量を2倍へ増加させる。	ストレス栽培により機能性成分Aは13.8倍、機能性成分B群は2.2倍となり、中間目標値を達成した。	(目的機能性成分の中間目標値を達成)	

(8) 研究開発の成果と意義

本事業ではシソの遺伝子組換え技術及び栽培環境を制御したストレス栽培技術を併用し、機能性成分 A 及び B 群の高生産方法を開発する。シソ遺伝子組換え技術による機能性成分の高含有化においては、機能性成分 A や機能性成分 B 群の合成、代謝に関わる酵素遺伝子を過剰発現もしくは発現抑制する。

また、人工環境下において、栽培環境を制御するとともに各種薬剤処理や光波長処理により、機能性成分 A や B 群を高含有化させるストレス栽培技術も開発する。同時に遺伝子組換えやストレス栽培技術による機能性成分の変動を捉えるため、機能性成分及びその前駆体物質、周辺物質の一斉分析法も開発する。遺伝子組換え技術及び栽培環境を制御したストレス栽培技術を併用することで、従来の栽培法では不可能な高含有化を実現し、機能性成分 A 及び B 群の含有量をそれぞれ 10 倍、5 倍にする。

さらに本事業で作出された遺伝子組換えシソを原料とした機能性素材を開発し、海外において原料及び最終製品の販売を計画している。そのため、遺伝子組換えシソを利用した製品の海外販売に係る調査研究を実施し、販売に向けた情報収集を行う。

課題 1 シソ機能性成分代謝系遺伝子の操作 (担当 主: アミノアップ化学、副: 産業技術総合研究所)

本課題では、機能性成分 A 及び B 群の高含有化を目的として機能性成分代謝系遺伝子を組換えたシソを作出する。そのため、シソ代謝系遺伝子を単離し、その遺伝子が機能性成分の高含有化にどの程度寄与しているのかを評価する。また同時にシソの形質転換法を確立し、得られた成果を合わせて代謝系遺伝子組換えシソの作出を実施する。

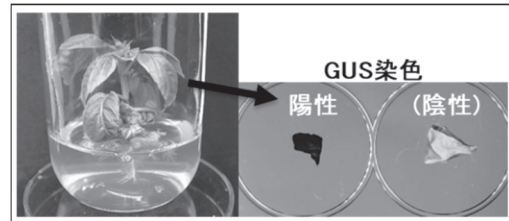
まず機能性成分 A 生合成系及び B 群の代謝に関与する遺伝子の単離を行った。両代謝系遺伝子の内、既に単離済みであった 3 遺伝子 (機能性成分 A 生合成系遺伝子、機能性成分 B 群生合成系遺伝子 2 種) に加え、機能性成分 A 生合成系の 1 遺伝子、機能性成分 B 群代謝系の 1 遺伝子の単離を実施した。

次に単離したシソ代謝系遺伝子をアグロインフィルトレーション法によりタバコ葉 (*Nicotiana benthamiana*) に一過性発現もしくは発現抑制を行い、機能性成分含有量

の変化量から高含有化に対して効果の高い遺伝子を評価した。代謝系の 5 つの遺伝子について解析した結果、機能性成分 B 群の合成に関わる 2 遺伝子がそれぞれ過剰発現したタバコ葉において、B 群と推定される HPLC ピークの面積が増大していることから、両遺伝子の過剰発現は機能性成分 B 群合成に効果があると考えられた。

シソの遺伝子組換え実施例は世界的にも数例であり、モデル植物のような遺伝子組換え方法は確立していない。まずシソの使用部位、カルス培養、遺伝子導入後の薬剤耐性等の条件検討を実施した。その結果、カルス誘導率・不定芽誘導率を基準に最適な使用部位と植物ホルモンの条件が明らかとなった。

最適な条件を用いてマーカー遺伝子を用いた組換え試験を実施した。マーカータンパク質が触媒する酵素-基質反応を利用した染色法により、マーカー遺伝子がシソ植物体に組み込まれていることが確認でき、シソの形質転換法が確立された。



(図 2.2.5-2)。

図 2.2.5-2 GUS 遺伝子組換えシソの GUS 活性測定

現在、目的とする代謝系 5 遺伝子についてシソへの遺伝子組換えを実施している。抗生物質耐性を持つ不定芽が得られているため、順次導入遺伝子の確認を実施する。

課題 2 ストレス栽培技術によるシソ機能性成分の製造基盤技術 (担当 主：産業技術総合研究所、副：北海道科学技術総合振興センター)

本事業では人工環境下でシソの高収量化技術及び機能性成分 A や B 群の高蓄積化技術を開発する。

高収量化については、シソの乾燥葉を高効率に生産することを目的とした人工環境下における水耕栽培技術を開発した。具体的には、栽培環境では、光強度や光質を、栽培方法では、栽植密度や養液組成をそれぞれ検討した。その結果、光強度は強光条件で収量が高く、各 LED 光源下の収量には試験区間で大きな差が見られず、栽植密度は密植条件で、養液処方の濃度は高濃度で、それぞれの収量が高かった。各環境および栽培条件を好適化した中規模栽培の実証試験では、既存法と改良法で 4 週間栽培した。その結果、改良法では、既存の水耕栽培より 2 倍以上の収量が得られ、高収量栽培法が確立された。

機能性成分 A 及び B 群を高生産するストレス栽培技術の開発においては、代謝系酵素の阻害剤や促進剤の添加あるいは特定光波長を照射し、効果的な条件を検討した。シソの水耕栽培液に 11 種類の薬剤を添加し 3、5、7 日間栽培したところ、そのうち 1 種類において機能性成分 A と B 群の両方濃度の増加が認められた。機能性成分 A の濃度は処理前の 13.8 倍となり最終目標値を達成し、機能性成分 B 群の濃度は処理前の 2.2 倍となり中間目標値を達成した。一方で特定光波長 2 種を照射したシソ葉においても機能性成分 A 濃度の増加が確認された。

課題 3 シソ含有機能性成分のハイスループット解析技術の確立 (担当 アミノアップ化学)

本課題では、栽培条件の最適化や生合成遺伝子の導入検討の効果を評価するため、機能性成分 10 成分に加えて、その生合成に関わる前駆物質や周辺物質の含量を測定する

ことが必須である。そこでトリプル四重極 LC/MS システムを導入し、生合成経路における各成分を一度の分析で一斉解析することで開発技術の効果を評価する。

機能性成分 A 合成経路及び機能性成分 B 群合成経路上の 35 化合物を対象として、まず標準品を用いて分析条件を検討した。その結果、35 化合物中 31 化合物について、標準品を用いた場合一斉分析が可能となった。次に凍結乾燥処理を行ったシソ葉をサンプルとして、抽出溶媒、液体クロマトグラフィー分離条件、トリプル四重極 MS の検出条件等を検討した。その結果、19 化合物について検出可能となり、18 化合物について定量可能となった。

課題 4 遺伝子組換え作物を用いた機能性素材の海外販売に係る調査研究（担当 アミノアップ化学）

本事業で作出される遺伝子組換え植物由来の機能性素材の海外展開を計る場合、各国の当該法規制に関して調査する必要がある。また販売候補国の担当機関等の現地調査が必要である。

平成 28 年度は遺伝子組換え作物に関わる法規制の概要、遺伝子組換え食品を流通させるのに必要な試験データや担当機関等について、6 カ国及び 2 地域を対象とした調査を実施した。調査内容： 遺伝子組換え作物を原料とした機能性素材の規制状況、 遺伝子組換え作物を原料とした機能性素材販売に必要な手続き、製品情報、データ、 担当規制当局、 関連法規、 規制状況

平成 29 年度は平成 28 年度に調査した 6 カ国、2 地域から販売候補国 1 国を選定し、当該国の遺伝子組換えを管轄する機関、機能性素材を管轄する機関、食品全般を管轄する機関及び現地 3 企業と面談した。

テーマ間連携に向けた取り組み

本事業では、遺伝子組換え技術の開発によりシソの代謝系を制御し、機能性成分を高含有化することを目的としている。本プロジェクトでは、委託事業者においてゲノム編集技術開発が進められており、その開発された技術と本事業の連携が可能と考えられる。特に植物のゲノム編集に向けた新規ツール開発を実施している委託グループと連携し、シソの代謝系遺伝子のノックアウト組換え体の作出を期待する。

(9)最終目標の達成可能性

表 2.2.5-6 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状	最終目標(2020年度末)	達成見通し
シソ代謝系制御技術による健康機能性成分の高効率増産技術開発	<ul style="list-style-type: none"> 代謝系遺伝子の組換えシソの作出を実施中である。 人工環境下での高収量栽培条件を確立した。 ストレス栽培により機能性成分A及び機能性成分B群の含有量中間目標値を達成した。 機能性成分のハイスループット分析技術を確立した。 	シソ乾燥葉当りの機能性成分Aを10倍、機能性成分B群を5倍へと増加させる。	ストレス栽培技術により既に中間目標値を達成しており、作出中の遺伝子組換えシソとの併用により、最終目標を達成できると考える。

(10) 成果の普及

表 2.2.5-7 成果一覧

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	展示会へ の出席	その他	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	2	0	0	1	0
2018(実施済みのもの) ()内は今後の予定数	0 (1)	0 (0)	0 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2020年度末までの累積の見通し	1	0	6	0	0	1	0

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

表 2.2.5-8 特許出願一覧

年度	特許出願		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	1	0	0
2018(出願済みのもの) ()内は今後の予定数	0 (1)	0 (0)	0 (0)
2020年度末までの累積見通し	2	0	0

本プロジェクトで見出した新規性が高くかつ進歩性のある成果の一部について特許出願する予定である。一方、栽培技術など模倣されやすい成果については秘匿してノウハウ化する。

特許・論文等リスト

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
1	株式会社アミノアップ化学、 国立研究開発法人産業技術総合研究所	特願 2018-002334	国内	平成30年 1月11日	出願	植物の栽培方法及び植物におけるロスマリン酸含有量を増加させる方法	田坂恭嗣、松村健、阿部圭馬、後藤一法

【外部発表】

番号	発表者	所属	タイトル	会議名、媒体名	発表年月日
1	田坂恭嗣 ¹ 、 阿部圭馬 ² 、 後藤一法 ² 、 松村健 ¹	¹ 国立研究開発法人産業技術総合研究所、 ² 株式会社アミノアップ化学	薬剤添加によりシソのロスマリン酸を増加させる水耕栽培方法の開発	園芸学会平成30年度春季大会	平成30年3月25日
2	南谷健司 ¹ 、 阿部圭馬 ² 、 後藤一法 ² 、 田坂恭嗣 ³ 、 松村健 ³	¹ 公益財団法人北海道科学技術総合振興センター、 ² 株式会社アミノアップ化学、 ³ 国立研究開発法人産業技術総合研究所	密植条件下における光環境がエゴマの生育および機能性成分に及ぼす影響	園芸学会平成30年度春季大会	平成30年3月25日

2.3 研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」【委託】

(1) 背景と目的

新規情報解析技術を開発することにより、微生物が持つ物質生産能力を人工的に最大限引き出した細胞を短時間で構築し、従来法の生産性の凌駕、または生産が難しい有用物質の創製を目指す。そのために必要となる基盤技術を開発するとともに、特定の生産物質における実用化技術を開発する。

具体的には、わが国の独自技術である長鎖 DNA 合成技術を超高速化することで、高度の多様性を有する微生物を短時間で構築する技術を開発するとともに、情報解析に必要な生産性データおよびオミクスデータを高精度かつ高スループットで取得する分析・評価技術、すなわち「ハイスループット合成・分析・評価技術」を開発する。

次に、取得したデータを基に、有用物質の生産性を画期的に高め、従来と比較して圧倒的に現実性を高めた代謝モデル、遺伝子発現制御モデル、統合モデル（これらをスマートセルモデルと称する）を構築し、スマートセルモデルを具現化する遺伝子配列を設計するシステム、「高生産性微生物設計システム」を開発する。

本システムは、出芽酵母や大腸菌等の汎用宿主だけでなく、産業用微生物にも適用性を広げ、民間企業が標的とする特定の生産物質で有効性を検証するとともに実用化技術を開発する。さらには、上記の基盤技術を集約した「スマートセル創出プラットフォーム」を構築し、微生物物質生産における新規産業形態の創出を目指す。

(2) 位置づけ、目標値

生体細胞を産業利用するためには、細胞の高次生命システムを理解し、細胞プロセスを制御することが求められる。そのためには細胞構成物質群全体の挙動の観測が必要であり、次世代シーケンサー (NGS) や質量分析器 (LC-MS) などの科学技術が進展してきた。さらに最近では、NGS や LC-MS 等による DNA、mRNA、タンパク質、代謝物というそれぞれの階層の物質の細胞内全量測定が積極的に実施され、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームという各種オミクス研究が盛んに行われている。今後は、これらオミクス情報を高精度かつ網羅的・体系的に取得し、機械学習等の情報科学的な手法によって階層縦断的なオミクスデータ解析を実施する統合オミクス解析技術の確立が期待されている。これにより、例えば主要代謝経路上にない転写因子間の相互作用、代謝物と転写因子との関係性など、従来の実験的知見では得られなかった重要因子が特定され、革新的な生産性の向上、全く新規の物質創製に貢献すると考えられる。近年進展著しい情報解析技術が微生物の物質生産能を向上させることが期待されている。バイオ生産に有用な情報を抽出することにより、特定の微生物で特定の物質を効率的に生産させるための代謝経路の設計、酵素および遺伝子の選択が可能になる。その結果、これまでの代謝改変戦略の限界を超え、戦略の選択肢が拡大すると期待される。また、代謝改変戦略の立案に要していた膨大な時間を短縮し、研究開発効率を向上させることができる。

【中間目標（平成30年度）】

(1) ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

- ・ 30kb 超の DNA 合成時間を従来の 1/2 に短縮する技術を確立する。

- ・ LC-MS のハイスループット化により、現状と比較して 10 倍の分析速度を実現する。
- ・ その他、高生産性微生物設計システムを効率的に運用するために必要となるハイスループット評価技術確立する。

(2) 高生産性微生物設計システムの開発

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

(3) 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

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

【最終目標 (平成 32 年度)】

- ・ スマートセル創出プラットフォームを用いることにより、従来育種と比較し、物質生産株の開発期間を 1 / 10 に短縮することを実証する。
- ・ 開発した要素技術、システムを維持・運営するための事業化モデルを策定する。

(3) 全体計画

(1) ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

(2) の情報解析技術を用いて構築するシステムで提示される遺伝子配列の効率的な導入のために、DNA 断片の合成からプラスミドの構築、精製、長鎖 DNA 合成までをハイスループットで行う長鎖 DNA 合成技術を開発する。また、メタボロームを高速に取得するために、前処理や解析の自動化、分析装置の改良等を行い、ハイスループット化した LC-MS を開発する。その他、高生産性微生物設計システムを効率的に運用するために必要となるハイスループット評価技術を開発する。

(2) 高生産性微生物設計システムの開発

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

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

(3) 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

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

(4) 実施体制

運営組織として、事業化検討委員会、知財運営委員会、データベース委員会、事務局を設けた。

（運営組織：事業化検討委員会、知財運営委員会、データベース委員会の役割については、(5) 運営管理にて述べる）

(5) 運営管理

1) テーマ独自に運営管理している会議体等を以下に示した。

- ・ 拠点会議、全体会議
研究進捗管理、技術共有、研究者育成のため定期開催（略半年に一度）
- ・ 研究管理委員会
プロジェクト運営検討（拠点会議、全体会議時に開催を基本とする）
- ・ 事業化検討委員会
事業環境分析、ベンチマーク企業分析を基にしたビジネスモデルの検討（随時開催）
- ・ 知財運営委員会
成果公開時の審議承認、知財合意書周知の為の会合、他（随時開催）
- ・ DB委員会
実験データの集積、管理ルール・方法の策定（随時開催）
- ・ その他
イベント企画（展示、公開セミナーへの参加・開催、出版）
ワークショップ（技術共有ミーティング）など

また、各課題検討の際には、例えば「有効性検証課題にD r y 担当者が参画した会合」など、課題ごとに定期的な会合（略1カ月ごと）を開催し、課題抽出、進捗管理の打合せを行っている。

2) 会議体以外に、進捗管理や情報共有のための取組みとして、有効性検証における基盤技術の活用促進、課題研究の進捗加速を目的として、基盤技術の開発状況、有効性検証の進捗状況をプロジェクト全体で共有していく仕組み（基盤技術目録、DBTLサイクル図・ワークフロー）を策定し、定期的に更新している。

- ・ 基盤技術目録
開発している基盤技術ごと、技術水準、強み（弱み）、実用性、知財観点から一覧表とし、全機関が共有する仕組みを運用している。
- ・ DBTLサイクル図・ワークフロー

有効性検証課題ごとの進捗を「DBTLサイクル図」で表現し、サイクルがどのように回転しているか、定期的に更新している。また、対象の微生物、生産物ごと課題解決に向けて活用した技術を組みこんだワークフローを策定している。

基盤技術目録、ワークフローはプロジェクトの大きな成果物であり、将来的な実用化、事業化検討の礎にする。

これらの実施に際しては課題（１）～（３）の領域代表者（進捗、課題抽出など情報のとりまとめ役）、およびそれぞれの要素技術（基盤技術）を開発する技術開発責任者を定め、取り組んでいる。

課題（１）ハイスループット合成・分析・評価手法の開発：Build、Test領域

課題（２）高生産性微生物設計システムの開発：Design、Learn領域

課題（３）高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証：有効性検証課題

その他に、実験データの格納、会議資料の共有のため、グループウェアを立ち上げて運用している。また、研究者目線での情報共有の為、事務局が情報収集し、月例レポートを発行している。

3) 実用化・事業化に向けた取り組み

(1) 実用化に向けた戦略（目的と達成手段）

①目的

プロジェクトで開発した基盤技術を、企業等を含む産業微生物に適用して有効性（超高速育種の実現、従来育種を超える生産性向上、新規の物質生産株の創出）を実証し、実用化技術とする。

②最終目標と達成手段

（最終目標）

本プロジェクトで得られた基盤技術を「有効性を実証した実用化技術」として確立し、事業化に向け蓄積する。

（達成手段）

開発している基盤技術を企業等の産業微生物に適用し、実証データをフィードバックすることによって、基盤技術を実用化技術として確立する。

(2) 実用化に向けた具体的取り組み

開発している基盤技術を複数の有効性検証課題に適用し、得られた実証データは基盤技術開発にフィードバックされ、さらなる改良を進めている。

戦略に沿った具体的取り組みの例として、「長鎖DNA合成技術の開発」、「自動前処理システムの開発」を示す。両者とも参画している企業とアカデミアが共同で開発をしており、当初の実施計画を前倒しして、事業化に進める予定である。

「長鎖DNA合成技術の開発」

（課題名（１）－４「ハイスループット長鎖DNA合成技術の開発」）

当初実施計画では、2018年度から実用化の検討を開始し、2021年度に市販用装置の設計を完了、生産開始としていた。

現時点（2018年6月）、試作装置の開発を進め、試作2号機で有効性検証課題に参画している機関からの要請で合成し引き渡すことができた。同時多数本、短時間処理によって、低コスト化できることを実証できた。さらなる合成高精度化と低コスト化を目指している（試作3号機）。この試作3号機には装置販売の引き合いが来ている。

「自動前処理システムの開発」

（課題名（1）－2「高速メタボローム解析技術」）

当初実施計画では、2019年度にプロトタイプ完成予定としていた。

現時点（2018年6月）、前処理部のプロトタイプ機を神戸大学に設置し、スループット・再現性の検証を進めている。また、培養サンプリング部の要素技術を確立し、前処理部とのオンライン化設計を進めている。2018年度中にプロトタイプ機の設置を予定している。

（3）事業化に向けた戦略（目的と達成手段）

①目的

本プロジェクトの研究開発成果を、生物による物質生産「スマートセルインダストリー」の領域で国際的な競争力を持つバイオフィュードリーの構築に繋げる。

②最終目標と達成手段

（最終目標）

本プロジェクト開始後の3年間で、研究開発成果を維持・運営するための基本戦略とビジネスモデルの検討を行い、プロジェクト終了後には事業化に向けた準備を完了する。

（達成手段）

研究管理委員会の統括のもと、神戸拠点、産総研拠点、知財運営委員会、事務局と連携をとりながら、事業化検討委員会を中心にした検討を行う。

（4）事業化に向けた具体的取り組み

①事業化に向けた具体的検討取り組み（アプローチ）

事業化検討委員会を立ち上げて以降、事業環境分析、ベンチマーク企業分析、ビジネスモデルの検討等を進めてきた。

②ベンチマーク企業の選定及び絞り込み

公開情報や入手可能な調査報告書等を幅広く分析することを通じて、「スマートセルインダストリー」の領域に関する、事業環境分析を行った。さらに、同領域に関係する既存企業の洗い出し（予備調査）を行った。事業環境を理解した上で、洗い出した企業群から、ベンチマーク対象候補企業として約40の企業を選定し、更に詳しい分析を行い、事業内容、企業規模等を考慮し、17社に調査対象を絞り込んだ。その後、外部有識者や日本を訪

問してきた欧米のバイオベンチャー関係者等との意見交換等も行い、特に参考にすべき米国企業5社を選定し、現地調査を行った。

③ビジネスモデルの検討

ベンチマーク企業分析の結果から、本プロジェクトの研究開発成果を、生物による物質生産「スマートセルインダストリー」の領域で国際的な競争力のある事業化につなげるための、ビジネスモデルを検討し、「スマートセルインダストリー」のバリューチェーンの中における当該企業のポジショニング及び提供する機能（事業内容）、収益モデル等の複合的な観点に基づいて、ビジネスモデルのパターン化を行った。

(5) 事業化の見通し（検討状況）

随時更新される基盤技術目録、DBTLサイクル図・ワークフローと、上述の取り組みから導かれた複数のビジネスモデルとの関係性等を分析し、具体的な事業化モデルの検討を開始している。

例えば、基盤技術を集約した「スマートセル創出プラットフォーム」を活用する、バイオワークス型企業立ち上げの具体的な検討に入っているなど、事業化モデルの実現に向けた取り組みもすでに始まりつつある。

4) 知的財産管理

先行技術調査を行った結果を基に知的財産化方針を定め、また知的財産合意書、知財運営委員会運営規則を全参画機関と策定し、運用している。また、成果の公表の事前承認を中心に知財運営委員会を定常的に運営している。

【基盤技術開発結果の知的財産化方針】

外部調査機関（（独）工業所有権情報・研修館）を用い、先行技術調査（特許文献、非特許文献）を行った結果を基に、領域ごと以下の方針で取り組む。

- ・Design、Learn領域は先行する企業の例と同じく、開発した技術の多くはノウハウとして保全し、実用化レベルとする。
- ・Build、Test領域は出願、公開化を積極的に推し進める。

【知的財産合意書、知財運営委員会運営規則の策定】

知的財産合意書、知財運営委員会運営規則を策定し（平成28年12月14日）、運用している。

【知財運営委員会の運用】

メンバーは、全委託先、再委託先代表者で構成し、知財合意書の改廃、構成機関の追加、成果公表時の事前承認について審議、決議を行っている

(6) 実施の効果

本プロジェクトの達成目標を実現した場合、世界的な競争力をもった画期的な新製品（バイオ医薬品や機能性食品、機能性化粧品、バイオ素材、バイオ燃料等々）の開発と新規事業の創造を通じた雇用の創出、輸出やライセンス収入の拡大等が期待でき、国内のバイオ産業が2015年の約3.1兆円から、2030年に20兆円へと約7倍拡大し、そのうちで工業分野の市場規模が2015年の約0.3兆円から、2030年には約8兆円へと約26倍まで大きく拡大すると予想される。

(7) 研究開発成果

次ページ以降参照。

2.3.1 ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

2.3.1.1 情報解析に適したゲノム・トランスクリプトーム解析技術の開発

担当機関：産総研

(1) 背景と目的

微生物を利用した物質生産においては、その生産性と遺伝子発現の関連性が考えられており、例えば、生産対象物質の直接の代謝関連遺伝子の変動は、とりわけ、より下流側のものの発現変動と生産性の関連性が高いと考えられる。実際、これまでに多くの生産系において、代謝経路の遺伝子をプラスミド等で導入し過剰発現させることで、目的産物の生産性を高めることに成功している例が認められる。他方、こうしたやり方には限界があることも確かであり、より詳細かつ直接は関係していない代謝経路との関連性も踏まえた、大規模な遺伝子発現変動解析からのアプローチが求められていた。こうした中、最近では、いわゆる次世代シーケンサにより大量の配列情報がより短時間で取得可能な状況となっており、より大規模かつ包括的な遺伝子発現変動解析が比較的小規模な研究室でも実施可能となってきた。さらに情報工学の発展により、大規模データを機械学習等の手法により、より高速かつ高精度に各種シミュレーションが可能になりつつある。しかしながら、こうした手法を、いわゆる産業微生物に取り入れ、物質生産性の向上に利用しようとする動きは世界的に見てもまだ始まったばかりであり、RNA 抽出手法の最適化、取得された RNA の品質と RNA-seq データの相関、データ量と発現変動解析結果の相関性などトランスクリプトームデータの質及び量をきちんと管理する方法論が整っていないのが現状である。そこで、本研究開発項目においては、信頼性の高い RNA-seq 解析のためのスパイクインを含むプロトコルの策定を行い、特に、スパイクイン物質に関しては、PJ 内での頒布体制を確立し、平成 30 年度内に頒布を開始する。また、短時間で大量のデータを取得するために、ハイスループット化を進めることを目的として各種市販装置を活用して mRNA 抽出法の半自動化プロセスを構築する。さらに、取得が難しいとされる長鎖 cDNA に関して、より完全長に近い cDNA を解析するための技術開発を行う。これらの開発技術に関しては、PJ 内での共同研究体制の中で、産業微生物に適用を進める。

(2) 位置づけ、目標値

・中間目標値 (H30)

1 種類の信頼性の高い RNA-seq 解析のためのスパイクインを含むプロトコルの策定、1 件の情報解析に適した mRNA 抽出法の半自動化プロセスの構築と最適化、1 件の完全長 cDNA 解析技術の開発、及び 1 件の産業微生物のゲノム・トランスクリプトーム解析データの取得を行う。

・最終目標値 (H32)

情報解析に適した mRNA 抽出の半自動化システムが産業微生物に適用可能であることを実証する。また、スパイクインとして利用する核酸標準物質の開発・高度化・評価技術の整備、および PJ 内における 10 種類以上の二次標準物質の頒布体制を確立するなど、信頼性の高い RNA-seq 解析のためのスパイクインを含むプロトコルの策定を行う。さらに、プロトコルの有効性に関する産業微生物を利用した実証を行う。

(3) 全体計画

事業項目	28年度				29年度				30年度				31年度	32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		
情報解析に適した ゲノム・ トランスクリプトーム 解析技術の開発	原核微生物を対象にした解析プロトコルの標準化				信頼性の高い RNA-seq 解析のためのスパイクインを含むプロトコルの策定								標準化した解析プロトコルの実用性検証	
	情報解析に適した mRNA 抽出法の開発				情報解析に適した mRNA 抽出法の半自動化プロセスの設計				情報解析に適した mRNA 抽出の半自動化プロセスの構築と最適化				mRNA 抽出の半自動化システムの適用性の検証	
					完全長 cDNA 解析技術の開発				完全長 cDNA 解析技術の開発				産業微生物を利用した検証実験	
					産業微生物のゲノム・トランスクリプトーム解析データの取得									

(4) 実施体制

- ・ 産総研北海道センター：課題統括、信頼性の高い RNA-seq 解析のためのスパイクインを含むプロトコルの策定など
- ・ 産総研つくばセンター：スパイクイン物質の開発および完全長 cDNA 解析技術の開発など

(5) 運営管理

半年に一回程度の全体会議において PJ 全体の動向を把握するとともに、必要に応じて個別に議論し、情報共有を行なった。また、個別課題の担当者は札幌とつくばに在籍することから、常時メールにて情報共有や進捗管理を行うとともに、2 ヶ月に一回程度はセミナー形式での進捗報告と研究推進に関する議論並びに関連情報共有を行なった。さらに、PJ 全体の研究の方向性などの整合性を確認することも含め、およそ半年に一回、産総研拠点長も交えた進捗報告会を行なった。

(6) 実施の効果

スパイクイン物質のPJ内での頒布体制が整い、頒布を開始した。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
信頼性の高いRNA-seq解析のためのスパイクインを含むプロトコルの策定	1種類の信頼性の高いRNA-seq解析のためのスパイクインを含むプロトコルの策定	市販キット等の組み合わせによるRNA抽出を行い、最適条件を決定した	○	スパイクインを使用した際のデータ検証のためのデータ取得拡充が必要。
情報解析に適したmRNA抽出法の半自動化プロセスの構築と最適化	1件の情報解析に適したmRNA抽出法の半自動化プロセスの構築と最適化	市販キットの組み合わせに加え、市販RNA自動抽出装置の適用を実施	○	mRNA抽出法については、原核生物では概ね良好なデータが出ているが、麹菌等で最適化に至っていない。
完全長cDNA解析技術の開発	1件の完全長cDNA解析技術の開発	従来法では不可能であった3kbp以上のcDNA合成が可能	○	特定の菌株で長鎖cDNA取得が可能に。適用範囲の拡充に向けデータ取得が必要。
産業微生物のゲノム・トランスクリプトーム解析データの取得	1件の産業微生物のゲノム・トランスクリプトーム解析データの取得	PJ参画企業の所有する産業微生物での解析を実施	○	複数実施済み。産業株でのデータ拡充が必要。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
情報解析に適した mRNA 抽出の半自動化システムが産業微生物に適用可能であることを実証	市販キット等の組み合わせによる RNA 抽出を行い、最適条件を決定した	1 種類の信頼性の高い RNA-seq 解析のためのスパイクインを含むプロトコルの策定	○
信頼性の高い RNA-seq 解析のためのスパイクインを含むプロトコルの策定	市販キットの組み合わせに加え、市販 RNA 自動抽出装置の適用を実施	1 件の情報解析に適した mRNA 抽出法の半自動化プロセスの構築と最適化	○
プロトコルの有効性に関する産業微生物を利用した実証	従来法では不可能であった 3kbp 以上の cDNA 合成が可能	1 件の完全長 cDNA 解析技術の開発	○

(9) 研究開発の成果と意義

■信頼性の高い RNA-seq 解析のためのスパイクインを含むプロトコルの策定

遺伝子発現情報を網羅的に取得する手法として RNA-seq の普及が著しいが、その際の RNA の取得方法やその品質評価、得られたデータにおける発現頻度差の解釈などは経験的な感覚で行われているケースが多いと考えられる。プロジェクト参加者は多様な業態からなり、原核生物から真核生物まで、また、一般的な菌株から産業利用に特化した菌株まで幅広い種を利用して物質生産を目指している。それぞれのケースにおいて、特に企業等で育種歴が長く利用実績が豊富にあるケースでは菌体破砕法や RNA 抽出に関して独自のノウハウを築いていることもあるが、そうでない場合には多様なラインナップの揃う現在の RNA 抽出法などからいずれの手法を選択すべきかの指針を見出すことは意外と難しいと考えられる。しかしながら、これら市販キット類を一律に特定の菌株に適用し、その際の得られる RNA の品質や得られる RNA-seq データの再現性などを確認することは困難である。また、そうしたデータの取得には多大な労力を要するため、実際にはいずれかのキットによる抽出を行い、十分な RNA が得られればそのまま実験を進めるケースが多いと考えられる。実際、よほど特殊な菌株でない限りは通常必要とされる RNA を取得することは、いずれのキットでも可能であり、通常はキット間での差異はあまり意識されていないものと考えられる。こうした状況下にあって、「スマートセル」創出に求められる大規模データセットに基づく機械学習等に提供するトランスクリプトームデータには、何らかの品質管理の目安を設け、再現性を担保できる実験系の構築が求められる。そのため本課題では、まずはモデル微生物に関して、各種細胞固定法や細胞破砕法と市販各種キット類の組み合わせによる RNA 抽出を行い、それぞれの場合に得られる収率やその品質についての評価を実施した。その際の大まかなスキームを図に示す (図 2.3.1.1-1)。

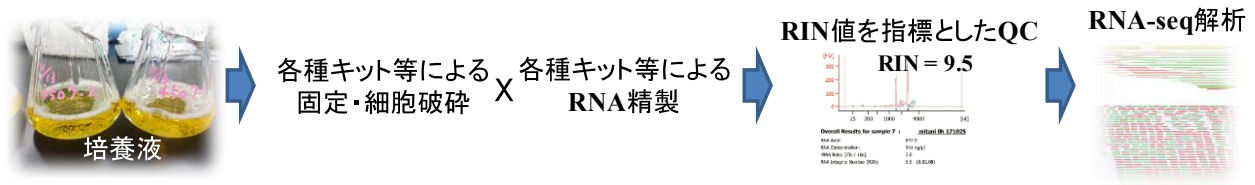


図 2.3.1.1-1 培養から RNA-seq 解析までのスキーム

スマートセル PJ 内での使用菌株を想定して、モデル微生物として、大腸菌（1 種）、放線菌（計 4 種）を対象として、一連の評価を行った。得られた RNA については、まずは一般的に品質管理指標として用いられている OD260/280、OD260/230 や濃度を基本データとして取得した。さらに、分解の程度の指標として用いられているバイオアナライザーによる RIN 値を取得した。RNA-seq 受託解析では一般的に、OD260/280、OD260/230 のいずれもが 1.8 以上、16S/23S の値が 1.4 以上、かつ、RIN 値が 8.0 以上程度のもを基準として、これらを上回る試料に関して一定の結果を担保しているケースが多い。今回の一連の実験結果から、いずれの方法においても概ねこれらの数値は確保されることがわかった。しかしながら、一部の産業微生物として用いられている放線菌においては、いずれの方法であっても 4 程度の低い RIN 値しか得られないケースがあり、こうした試料についていかにして品質管理をするかが重要な課題として生じている。また、今回実施した解析においては、いずれも RNA-seq 解析のためのライブラリ構築に十分な量の RNA が回収できているが、収量は各群で大きな開きがあり、その傾向は大腸菌、放線菌とも類似したものであった（図 2.3.1.1-2）。また、ここでは示していないが、放線菌に関しては 2 属 4 種について検討を行ったが、いずれも図と同様の結果が得られている。特に産業微生物では、長時間培養を経て、少なくなった菌体から RNA を抽出する必要があるケースもあることから、より収率の高い手法を提案するための基本データが得られたものと考えられる。

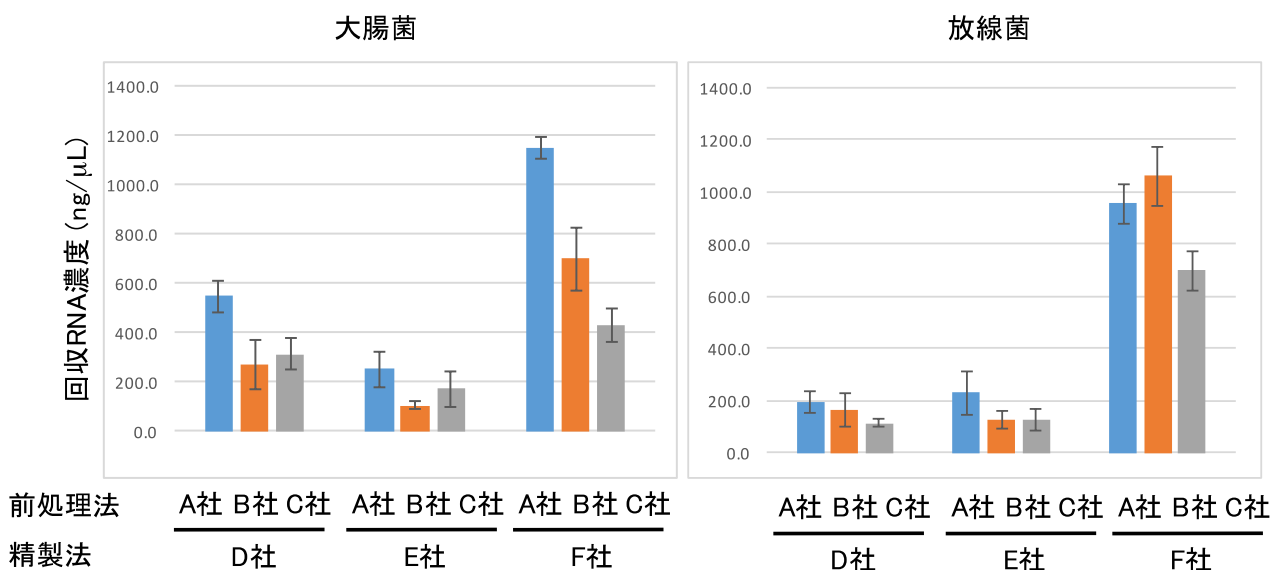


図 2.3.1.1-2 各種キット類を用いて大腸菌及び放線菌から RNA 抽出を行った際の収量の比較。各手法につき n=3 でデータを取得し、その平均値と標準偏差を示した。

次に、トランスクリプトーム解析データの品質向上を目的に、信頼性の高い RNA-seq 解析プロトコルの策定を行うための一環として、RNA 試料へのスパイクイン標準 RNA として利用する核酸標準物質の開発・高度化・評価技術の整備を行った。具体的には 500nt から 2000nt 程度の人工的な RNA 配列を設計・準備した。この設計された配列情報に基づき、RNA 発現用プラスミドを作製し、in vitro 転写システムによりスパイクイン標準 RNA を大量に合成した。in vitro 合成したスパイクイン標準 RNA を所定の純度になるまで精製を繰り返して行った。得られたスパイクイン標準 RNA の候補品を核酸低吸着チューブに分注して、プロジェクト内での頒布や利用に備えた（図 2.3.1.1-3）。これまでに作製したスパイクイン標準 RNA の候補品は 500-1、500-2、500-3、500-4、1000-1、1000-3、1000-4、2000-1、L1500-1、L2000-1 の 10 種類である。

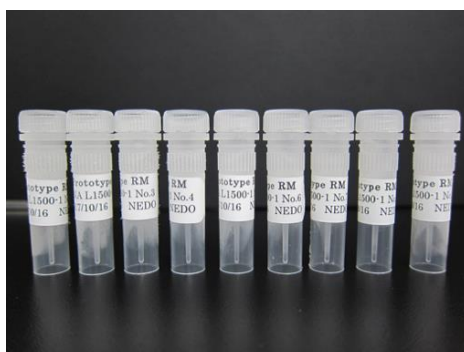


図 2.3.1.1-3 核酸低吸着チューブに分注されたスパイクイン標準 RNAL1500-1

作製したスパイクイン標準 RNA の候補品のうち 5 種類の配列を選択して、スパイクイン用 RNA 標準物質の混合溶液を作製した。すなわち、RNA 試料へスパイクイン標準 RNA を添加した際に 5 種類の配列の最終濃度が 10 倍ずつ異なるように濃度調整した混合溶液を作製した。この調整済みスパイクイン用 RNA 標準物質混合溶液の作成標準プロトコルと RNA 試料への添加方法を示した標準プロトコルを同時に整備した。RNA 試料へのスパイクイン用 RNA 標準物質の添加における課題は最適な添加量を見いだすことと、Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria) 等の rRNA 除去プロセスにおいて特定の配列の RNA 標準物質が除去されてしまうなどのバイアスの有無を評価することの二つである。実際に大腸菌等の微生物から抽出した RNA 試料に対してスパイクイン用 RNA 標準物質混合溶液の量を変えつつ添加することで、これらの課題を解決するための検討を行った。添加量は抽出した total RNA に対して 0.001%、0.01%、0.1%、1%とした。スパイクイン用 RNA 標準物質を添加し、rRNA 除去プロセスなどを行った後に、次世代シーケンサーで RNA-Seq を行った。得られた結果について、添加したスパイクイン用 RNA 標準物質の量と RPKM の関係を解析した（図 2.3.1.1-4）。

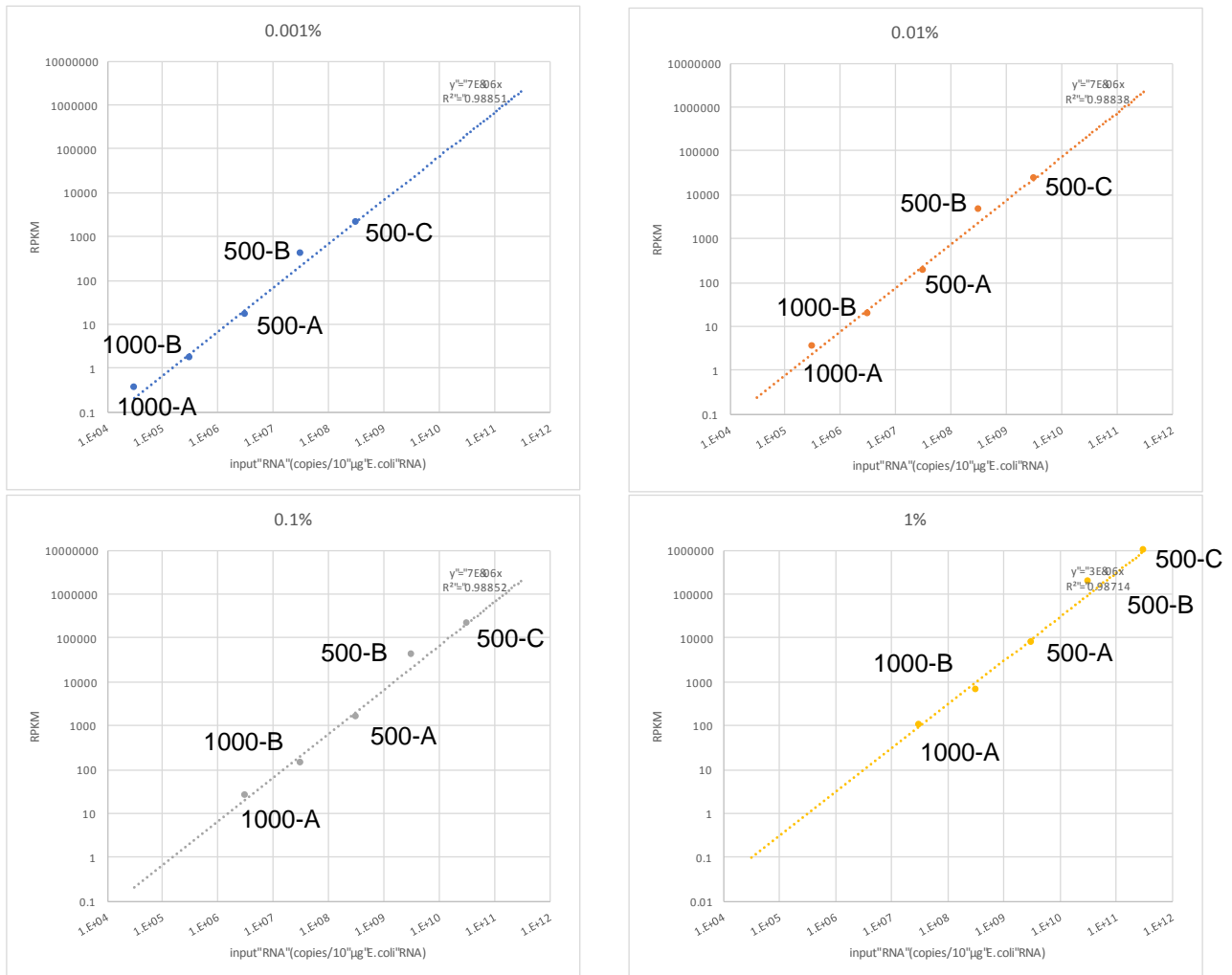


図 2.3.1.1-4 添加したスパイクイン用 RNA 標準物質の量と RPKM の関係

いずれの添加量においても 5 種類の RNA 標準物質の RPKM と初期添加量の間には直線性が認められた。この結果から、RNA-Seq の前処理プロセスの一つである rRNA 除去工程において、特定の配列の RNA 標準物質だけが除去されるなどのバイアスが起これないことがわかった。また、RNA 標準物質の添加量が total RNA に対して 0.01%であった時の、各遺伝子の発現量を RPKM で示したときのヒストグラムを図 2.3.1.1-5 に示す。図 2.3.1.1-5 中の上部にはこの時に添加した 5 種類 RNA 標準物質の RPKM 値をプロットした。この結果から今回用いた大腸菌由来の RNA 試料では発現している遺伝子の RPKM は 0 から 1,050,000 の範囲に含まれていた。また、遺伝子の発現量の最頻値は RPKM で 8 から 16 の間であった。添加した 5 種類 RNA 標準物質の RPKM 値は 4 から 30000 程度の間に分散していた。ほとんどの遺伝子の発現量が RPKM で 10000 以下であったことから、RNA 標準物質の RPKM 値も 1 から 10000 程度を網羅するように濃度調整することが望ましいとわかった。

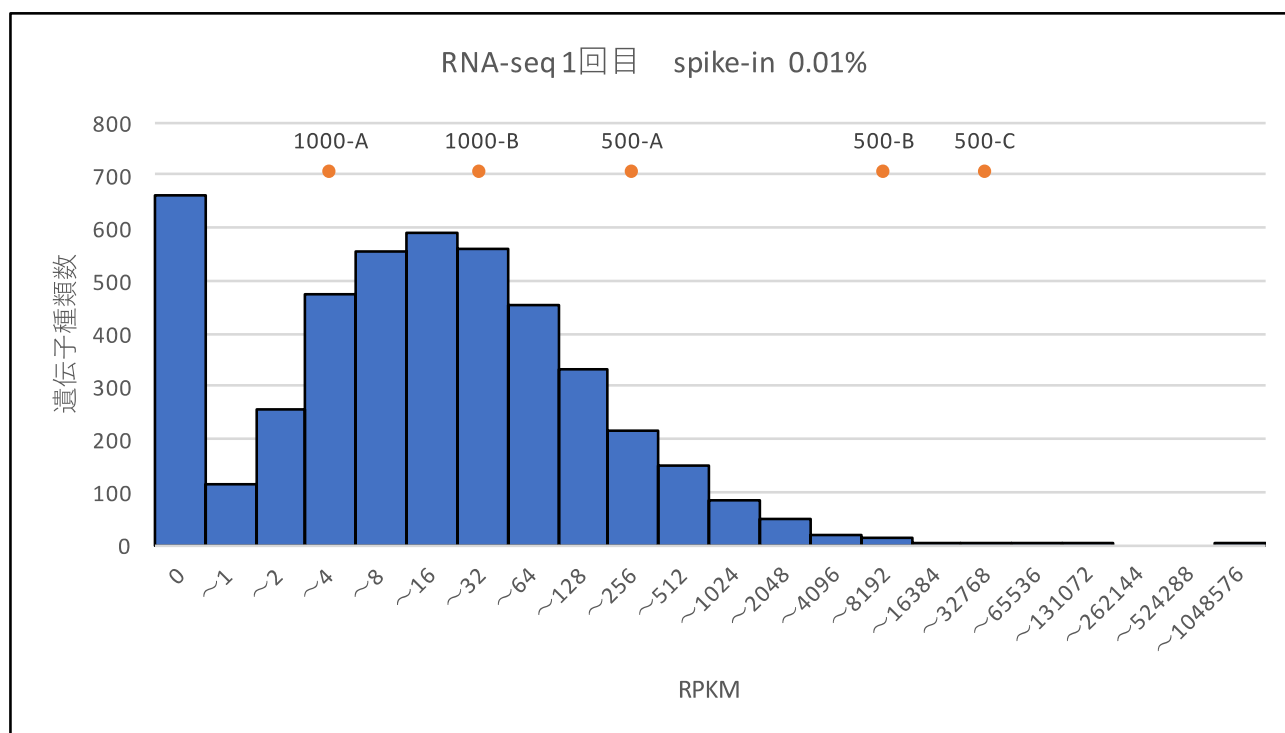


図 2.3.1.1-5 添加したスパイクイン用 RNA 標準物質と大腸菌遺伝子の RPKM の比較

これまでにスパイクイン用 RNA 標準物質の種類を拡張し、RNA-Seq におけるデータ品質管理のための内部標準物質として利用可能なことを示した。また、頒布体制の整備のために、作製した RNA 標準物質をすぐに利用できる形態で分注・保存し、同時に利用のための標準プロトコルを整備した。

■長鎖・完全長 cDNA 合成技術の開発

高付加価値な化合物の微生物生産を効率化するうえで、その生合成遺伝子群の発現実態を把握することは極めて重要である。細菌の RNA の大半は複数の遺伝子からなるポリシストロン転写単位（オペロン）として存在し、二次代謝産物生合成遺伝子群は一般に数 kb から数十 kb の複数のオペロンから構成されることが知られる。しかし、既存の RNA-seq 解析で汎用されるイリミナ社の次世代シーケンサー（NGS）では、1 リード長が数百 bp と短いために、シーケンスデータの機能推定にはゲノム配列へのマッピングや de novo アセンブルが必要となり、数 kb を超える転写産物の全長をありのままに解析することが出来ない。すなわち、二次代謝産物生合成遺伝子群における各ポリシストロニック mRNA の発現単位のばらつき（転写開始位置や転写終結位置の不均一性）を、1 分子レベルで捉えることは不可能であった。複雑な代謝経路の組立て等により有用物質の高効率なバイオものづくりが実現可能な合成生物学の時代にあつて、細菌宿主に導入されたポリシストロニックな代謝遺伝子群がデザイン通りに発現しているかを迅速に評価するためには、新たなトランスクリプトーム解析技術の開発が望まれる。

本研究は、既存の RNA-seq と比較して、長鎖トランスクリプト情報の取得に優れた解析手法の開発を目指す。開発技術の検証には、全ゲノムおよび転写開始位置の網羅的解析結果から各オペロンの領域と長さが既に分かっており、数十の二次代謝産物合成遺伝子群を持つことが知られる、モデル放線菌の *Streptomyces coelicolor* A3(2) 株の菌体を用いた。この株は、二次代謝化合物

の遺伝子が発現しているかどうかを培地の色によって推測することができ、多様な化合物の生産誘導培地および抑制培地にて定常期初期まで培養した菌体を実験に使用した（図 2.3.1.1-6）。



図 2.3.1.1-6 抗生物質生産のモデル放線菌株 *S. coelicolor* A3(2)の菌体培養の様子

まず、なるべく RNA を壊さずに細胞から抽出する必要があるため、酵素溶菌（リゾチーム法）、ケミカル、（Isogen によるフェノール・クロロホルム抽出）、物理破碎（ガラスビーズ破碎法）といった異なる原理の RNA 抽出工程を検討した。それぞれ調製した RNA の品質を評価したところ、ガラスビーズ破碎法で唯一 rRNA の顕著な分解が見られず収率にも優れていたため、こちらを採用することとした（図 2.3.1.1-7）。

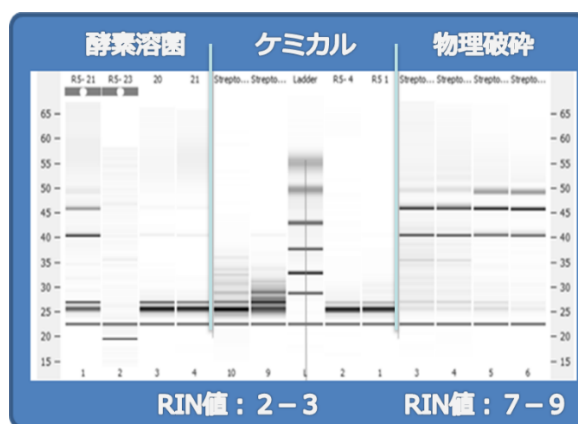


図 2.3.1.1-7 異なる手法で抽出した total RNA の Bioanalyzer（アジレント社）を用いた品質比較

次に、真核生物 Iso-seq の cDNA 調製法を細菌に発展的に応用することで、通常手法と比較して長鎖 cDNA 調製に優れる逆転写メソッドを開発した。具体的には、3' 末端に polyA を人工的に付与した mRNA を total RNA から調製し、オリゴ dT プライマーと SMARTScribe 逆転写酵素の組み合わせによって、ターミナルトランスフェラーゼ活性を利用した完全長逆転写産物の選択的調製を検討した（図 2.3.1.1-8）。試験菌株の 9 つの二次代謝産物合成遺伝子群内の 15 オペロンを対象に、調製 cDNA の長さを PCR 増幅により検証した結果、通常手法と比較して約 2kb 程度長い cDNA を調製することに成功した。さらに、RNA の高次構造の形成解除や逆転写酵素の安定

性向上に資する化合物を逆転写反応時に添加することで、取得 cDNA 長をさらに伸長させることを確認しており、本開発技術へ発展的に応用する。

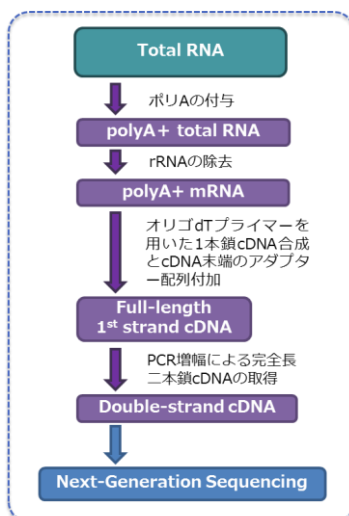


図 2.3.1.1-8 長鎖・完全長 cDNA の調製方法のワークフロー

続けて、上記手法にて調製した cDNA をシーケンス原理の異なる NGS 機種で解析し、取得情報の違いを比較することで、本研究の目的に合致する NGS 機種の選定を試みた（表 2.3.1.1-1）。その結果、ナノポア社 MinION や PacBio を用いた解析によって 10kb を超えるトランスクリプトを 1 リードとして検出することに成功した。一方で、イルミナ社の HiSeq や MiSeq はデータ量に優れるため遺伝子発現の定量的な評価には適するものの、1 リード長が短いために発現単位をデータから推測することは出来ないことが明らかとなった。MinION の解析結果より、興味深いことに、転写開始/終結位置は厳密に制御されておらず、試験菌株の二次代謝産物合成遺伝子群は多様なオペロンバリエントで構成されている可能性が示唆された。本解析技術の広範な適用によって、真核生物 mRNA のスプライシングバリエントを想起させるこの不均一なバクテリアオペロンの発現実態が、今後明らかになる可能性があり学術的に大きなインパクトが期待できる。

解析原理	Sequencing by Synthesis	
機種名	HiSeq (Illumina)	MiSeq (Illumina)
1リード長 *	100 bp	300 bp
リード数 *	2000万リードペア	5000万リードペア

解析原理	Single Molecule Real-Time	
機種名	PacBio Sequel (PacBio)	MinION (Nanopore)
1リード長 *	平均10kb, 最大60kb	平均2-4kb, 最大100kb
リード数 *	36.5万リード	6-10万リード

* メーカーウェブサイト情報を参考

表 2.3.1.1-1 次世代シーケンサの各機種の解析原理と解析長の違い

以上より、これまでに、(1)RNA 抽出、(2)cDNA 調製、(3)cDNA 情報解析の各工程の検討と要素技術の開発を完了し、微生物のトランスクリプトの発現単位を 1 分子レベルで解析することが可能であることを示した。今後は、得られた知見を参考に各要素技術を組み合わせたプロトコルを策定し、きたるスマートセル開発時代のニーズに即した新規評価技術として基盤構築を進める。

さらに、プロトコルの有効性に関する産業微生物を利用した実証を行い、有用物質の生産性向上に資する新たな発現情報の提供を目指す。

(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	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	2	0	0	0	0
2018 *1	0 (1)	1 (1)	2 (3)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (?)
2020 *2	3	2	7	?	3	0	?

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	1	1	1

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.1 ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

2.3.1.2 高精度メタボローム解析技術の開発（担当機関：神戸大学、株式会社島津製作所）

(1) 背景と目的

細胞に含まれる低分子化合物（代謝物質）の蓄積量を網羅的に定量するメタボローム解析は、ゲノム情報である遺伝子の発現、翻訳産物であるタンパク質の生化学反応を経て形成される細胞の表現型を特徴づけることができる。数十種類の代謝物質の蓄積量の増減を計測することにより、細胞の代謝状態を俯瞰することが可能であり、微生物が生産する高機能性化合物の生産性に寄与するバイオマーカーの特定、バイオマーカーに基づく優良変異株の選抜と培養条件の最適化が可能になる。神戸大学では、これまでに、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計（CE-TOFMS）や液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）を用いた微生物メタボローム解析技術のプラットフォームを構築し、メタボローム解析結果に基づく微生物育種により、ストレス耐性能の向上、細胞内酸化還元バランスの改良、細胞内代謝フラックスの改良に成功してきた。また、メタボローム解析結果に基づく優良変異株の選抜や培養条件の改良にも成功し、有用物質生産におけるメタボローム解析の有効性を示してきた実績がある（Hasunuma *et al.*, (2011) *Microb. Cell Fact.*, 10: 2、Morita *et al.*, (2011) *Anal. Chem.*, 83: 4023-4029、Hasunuma *et al.*, (2013) *J. Exp. Bot.*, 64: 2943-2954、Ho *et al.*, (2014) *Biotechnol. Biofuels*, 7: 97、Hasunuma *et al.*, (2014) *Biotechnol. Biofuels*, 7: 493、Wan *et al.*, (2015) *Metallomics*, 7: 322-332、Ho *et al.*, (2015) *Biotechnol. Biofuels*, 8: 48、Hasunuma *et al.*, (2016) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1027-1038）。

しかしながら、多くの場合、バイオマーカーは実験研究者の深い知識や経験に基づいて同定され、それらなしには物質生産に有用な情報を抽出することが困難であった。そもそも、広範な代謝経路の制御メカニズムの全貌を把握している研究者は稀有であり、実際には、生産性に寄与する代謝物質を見落とすことの方が多く、メタボローム解析で得られる多様で大規模なデータを十分に活用できていたとは言えないのが現状である。加えて、人の目を介する有用情報の抽出には、文献検索等からはじまる情報の収集や整理、思考に膨大な時間を必要とする。つまり、従来の研究手法では、育種戦略の導出に時間が必要となり、高速性が求められる世界的な微生物育種競争に勝ち抜くことが困難になってきた。

本プロジェクトでは、機械学習等の情報解析技術を用いて「高度な生産細胞モデル（スマートセルモデル）」を構築し、育種戦略の導出と、戦略を具現化する遺伝子配列の設計の短期間での実現を目指すわけであるが、スマートセルモデルを構築するためには、“再現性とスループットの高い”メタボローム解析データが必須である。従来の技術では以下の課題があり、情報解析で求められる精度とスループットを得ることが困難であった。

- (1) 前処理が煩雑で時間がかかる（スループットが低い）。
- (2) 夾雑物質（脂質、タンパク質）との分画が困難なため分析精度が不十分。
- (3) 全工程がマニュアル操作であるため、スループットや正確性に限界がある。

本研究開発項目では、これらの課題を全て解決する高精度メタボローム解析システムを開発する（図 2.3.1.2-1）。

(1)に対して、① 代謝を瞬時に停止させるクエンチング手法と代謝物を溶媒抽出する手法を菌株（酵母、大腸菌、放線菌等）に応じて開発し、細胞からの代謝物抽出工程を自動化する。

(2)に対して、② 超臨界流体抽出(SFE)を用いて脂溶性化合物を除去して、高純度の親水性化合物を回収する新規抽出システムを開発する。加えて、イオンペア剤を用いない LC-MS/MS 分離・検出条件の検討と、LC-MS/MS のクロマトグラムから代謝物濃度を自動的に定量するシステムの構築を行い、分析精度とスループットの向上を目指す。

(3)に対して、③ SFE と LC-MS/MS をトラップカラムで連結することにより、ユーザーフレンドリーかつロバストなオンライン導入システムの検討を行う。抽出システムと分離・検出システムの連結は試料の劣化、人為操作によるデータのばらつきを回避するために極めて重要である。最終的には、①～③を統合したトータルプロセスを開発する。

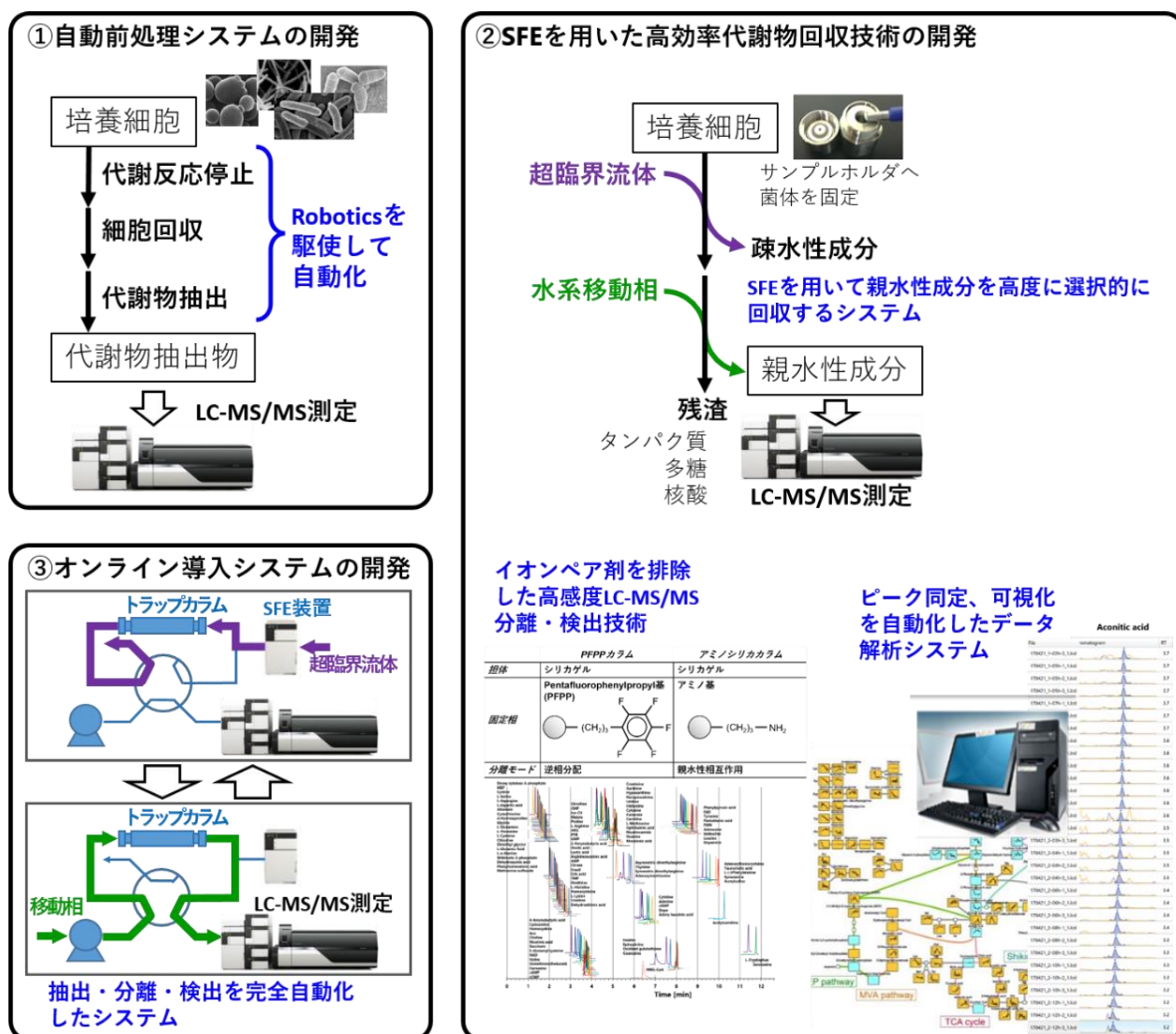


図 2.3.1.2-1 本研究で開発する高精度メタボローム解析技術

(2) 位置づけ、目標値

バイオテクノロジーを駆使し、CO₂ 排出や化石燃料枯渇といった問題に対処しつつ高効率に物質生産を行う新たな産業構造の構築を目指す潮流を「バイオエコノミー」と呼ぶ。この分野にお

いて、低分子化合物である細胞内外の代謝物を網羅的に測定する事の重要性が急激に増している。この領域は Triple stage LC-MS の有力な用途の 1 つであり、今後の市場拡大が期待される (図 2.3.1.2-2)。

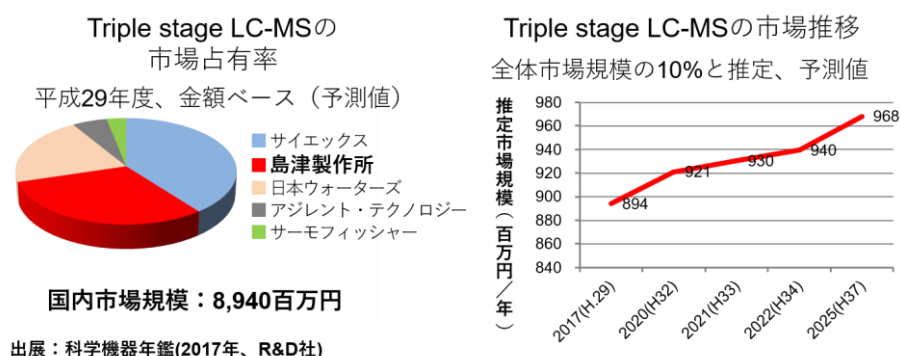


図 2.3.1.2-2 Triple stage LC-MS/MS の市場動向

本プロジェクトの中で、参画企業との共同研究を通して顧客・研究ニーズを把握し、ニーズにフィットした製品をいち早く開発・商品化し、顧客の現場へ提供できる。

(平成 30 年度目標)

- 前年度までに開発に着手した前処理プロセスをユニット化した自動前処理システムを構築する。(神戸大学)
- 前年度までに検討した抽出プロセスをユニット化した連続抽出システムを構築する。(島津製作所)
- オンライン導入システムを連続化するための課題を抽出する。(島津製作所)
- 既存のシステムと比較して 10 倍の速度でメタボロームを取得する技術を開発する。(神戸大学)

(平成 32 年度最終目標)

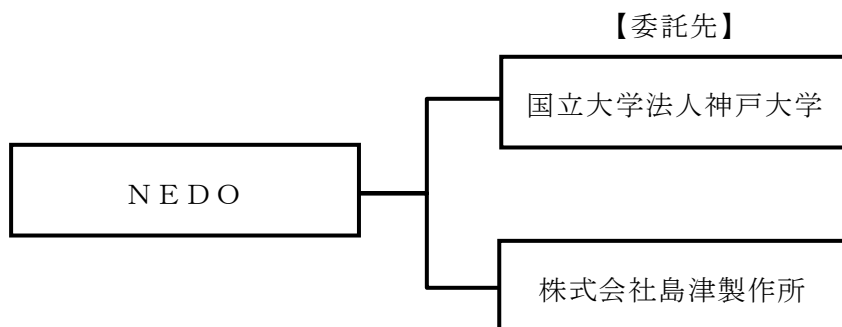
- 標的物質を生産する産業微生物での実証を行う。
- スループット性に加え、100 以上の代謝化合物の一斉検出が可能で、既存のシステムより 10 倍以上感度 (数 10 nM の定量下限) が高く、再現性の高い (相対標準偏差 10%以内)、高精度メタボローム解析技術を開発する。
- 世界初のオンライン化と自動化により、ユーザーフレンドリーで安定性の高いメタボローム解析システムを構築する。

(3) 全体計画

平成 28 年 (2016 年度)	平成 29 年度 (2017 年度)	平成 30 年度 (2018 年度)	31 年度 (2019 年 度)	32 年度 (2020 年 度)
前処理条件 の検討	自動前処理 のプロセス 検討 新規の機	自動前処理システムの開 発	産業微生物での実 証とシステムの最 適化	
	代謝物連続抽出 プロセスの開発	代謝物連続抽 出システムの 開発	産業微生物での実 証とシステムの最 適化	
標的代謝物の分 離・検出の検討	超臨界流体抽出物 の分離・検出の評 価			
	オンライン導入 システムの検討	連続化の検討、トータル プロセスの開発		

(4) 実施体制

神戸大学が自動前処理システム、および LC-MS/MS 測定条件検討を中心に取り組む。
島津製作所が SFE-LC-MS/MS オンラインシステムを中心に取り組む。



(5) 運営管理

月に 2 回以上の頻度で島津製作所と打ち合わせを行い、進捗状況の確認と研究開発方針の検討を行っている。

(6) 実施の効果

バイオエコノミー分野は分析装置の有力な用途の1つであり、今後の市場拡大が期待される。本プロジェクトの中で、参画企業との共同研究を通してバイオエコノミー分野における顧客・研究ニーズを収集・分析し、ニーズにフィットした製品をいち早く開発・商品化し市場へ投入できる。現在、LCMS (TQ) の国内市場規模は約 9,000 百万円で島津製作所のシェアは 30.7%であり、プロジェクト終了時にはシェア 40%を目指す。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
①自動前処理システムの開発	菌株（酵母・大腸菌・放線菌）ごとに構築した前処理条件に沿って、ユニット化した自動前処理システムを構築する。（神戸大学）	自動サンプリング・自動抽出装置に搭載する要素技術の仕様を決定し、要素技術を連結した自動化プロセスを構築した。それらをユニット化した自動前処理システムの構築に着手した。	◎ (自動抽出ユニットの設置、自動サンプリングユニットの設計を完了した。)	各「要素技術」の連結を最適化する。構築したユニットを連結し、自動前処理システムの開発を進める。
②SFEを用いた高効率代謝物回収技術の開発	[1]SFE プロセスをユニット化した連続抽出システムを構築する。（島津製作所） [2]既存のシステムと比較して 10 倍の速度でメタボロームデータを取得する技術を開発する。（神戸大学）	[1]クリーンアップ工程を含むステップワイズ超臨界流体抽出法を構築し、細胞からの抽出を実施した。 [2]イオンペア剤を排除した分離条件を確立し、解析可能代謝物を 99 成分から 147 成分へ拡張した。 新たな Peak picking・データ可	○ (2018 年度末に達成する予定)	[1]定量精度・感度を担保するための、試料の粉碎・充填方法および適切な試料量の詳細な検討を行う。 [2]有効性検証課題からのニーズに応じて、特定の重要化合物の検出感度を向上させる条件を検討する。 スループット性を上げるため

		視化の半自動化システムを構築し、解析時間を大幅に短縮した。		の、デュアルカラムシステムの検討を行う。
③オンライン導入システムの開発	オンライン導入システムを連続化するための課題を抽出する。 (島津製作所)	SFEによるステップワイズ抽出法を確立し、要素技術を検討した。 各要素をオンラインでつなぐ流路構築を完了した。実試料(乾燥菌体)を用いた抽出・分離確認を行った。	△ (解析可能代謝物を拡張するための条件最適化を2018年度中に完了する予定)	測定可能代謝物の拡張を行う。 トラップカラム等抽出・分離条件の最適化を行う。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
①自動前処理システムの開発	自動抽出ユニットの設置を完了し、制御ソフトウェアの最終調整を行っている。自動サンプリングユニットの設計を完了し、実験機による要素技術の検証を行っている。	<ul style="list-style-type: none"> ・各ユニットを連結し、システムとして最適化する。 ・¹³C flux 解析に対応したシステムを開発する。 ・産業微生物での実証実験を行う。 ・安定的な運用を目指しシステムを最適化する。 	達成できる。
②SFEを用いた高効率代謝物回収技術の開発	2種類のカラムの組み合わせにより、目的代謝物147種の一斉検出に成功した。新たなデータ解析システムに依る大幅な時間短縮に成功した。	<ul style="list-style-type: none"> ・産業微生物での実証実験を行う。 ・分析条件とデータ解析方法の検討によりさらなるハイスループット化を検討する。 ・安定的な運用を目指しシステムを最適化する。 	達成できる。
③オンライン導入システムの開発	トラップカラムの選定が完了し、抽出から検出までの全過程を完全自動化した。細胞から、いくつかの代謝物の検出に成功した。	<ul style="list-style-type: none"> ・条件を最適化し、代謝物の網羅性を拡張する。 ・自動サンプリングユニットと連結する。 ・産業微生物での実証実験を行う。 ・安定的な運用を目指しシステムを最適化する。 	達成できる。

(9) 研究開発の成果と意義

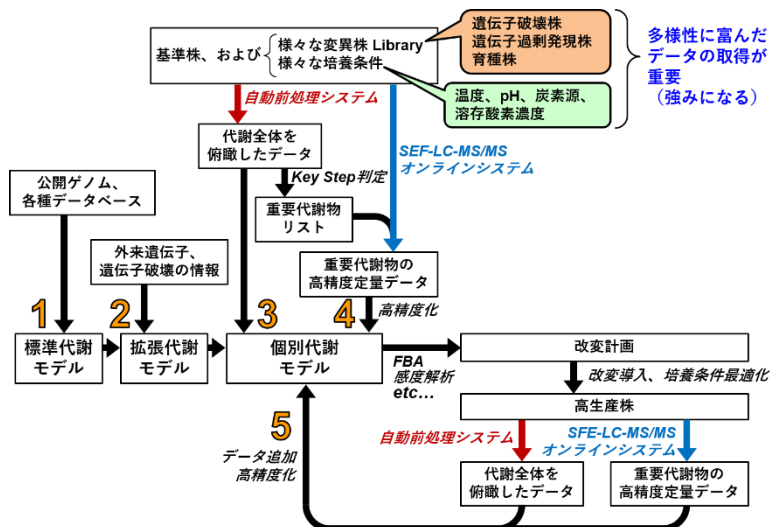


図 2.3.1.2-3 DBTL に寄与するデータ取得フロー

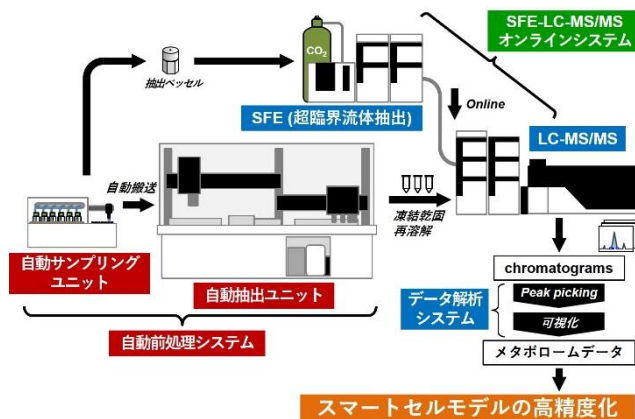


図 2.3.1.2-4 システムの全体の構成

スマートセルの迅速な構築を目指す DBTL サイクルにおいて、スマートセルモデルを設計するために、以下の流れに沿って高精度メタボロームデータを活用する(図 2.3.1.2-3)。

1. 公開ゲノム、各種 DB を元に「標準代謝モデル」を構築する。
2. 標準代謝モデルへ外来の導入遺伝子や遺伝子破壊の情報を組み込んだ「拡張代謝モデル」を構築する。
3. 目的化合物を生産する株には遺伝子破壊株、遺伝子過剰発現株、育種株といった様々なものがある。それらの株から効率よく物質生産を行うには、温度、pH、炭素源の種類、溶存酸素濃度など様々な培養条件の検討が必要である。これら様々な条件の「代謝全体を俯瞰したメタボロームデータ」を取得し、拡張代謝モデルへ加えることで、「個別代謝モデル」のプロトタイプを構築する。

このステップは網羅性が高くハイスループットな「自動前処理システム」を用いる。

4. 3 で得たデータから Key となる代謝経路を判定し、注目すべき代謝物をリストアップする。このリストを元に「重要代謝物の高精度定量データ」を所得し、さらに個別代謝モデルを高

精度化するために加える。

このステップは「SFE-LC-MS/MS オンラインシステム」を用いる。

5. 高精度化した個別代謝モデルを元に各種シミュレーションを行い、改変計画を立案、高生産株を構築し、再びメタボロームデータを取得する。

このデータをモデルへフィードバックするサイクルを回すことで、個別代謝モデルを高精度化する。

最終的なシステム構成は図 2.3.1.2-4 の通りである。現在、各ユニットが完成、もしくは設計完了の段階にあり、今年度中のシステム稼働を目指す。

以下、研究開発項目に沿って詳細を述べる。

① 自動前処理システムの開発

細胞の培養から LC-MS/MS 測定へ供するための代謝物を抽出するまでを「前処理」と称する。従来、手技で行われる前処理は煩雑で実験操作には熟練を要し、操作の精度は熟練度に大きく依存した。また、処理できるサンプル数は一人当たり 1 日二十数本が限界であり、本プロジェクトで必要となる多様性に富んだデータセットの取得には全く不十分であった。前処理工程では多くの段階を要するにも関わらず、サンプルとサンプル ID の紐づけは人間頼りであり、信頼性、トレーサビリティに問題があった。

これらの課題を解決するためには、ロボティクスを駆使した自動前処理システムの開発が必須であった。本システムは以下の 3 つのユニットから構成される(図 2.3.1.2-5、6)。

1. 細胞培養から代謝反応停止までを行う「自動サンプリングユニット」
2. 培養液から細胞を回収し、細胞から代謝物の抽出液を作製する「自動抽出ユニット」
3. 抽出液を減圧乾固する「乾固ユニット」

ここでは、多くの要素技術開発を要した 1 と 2 について述べる。

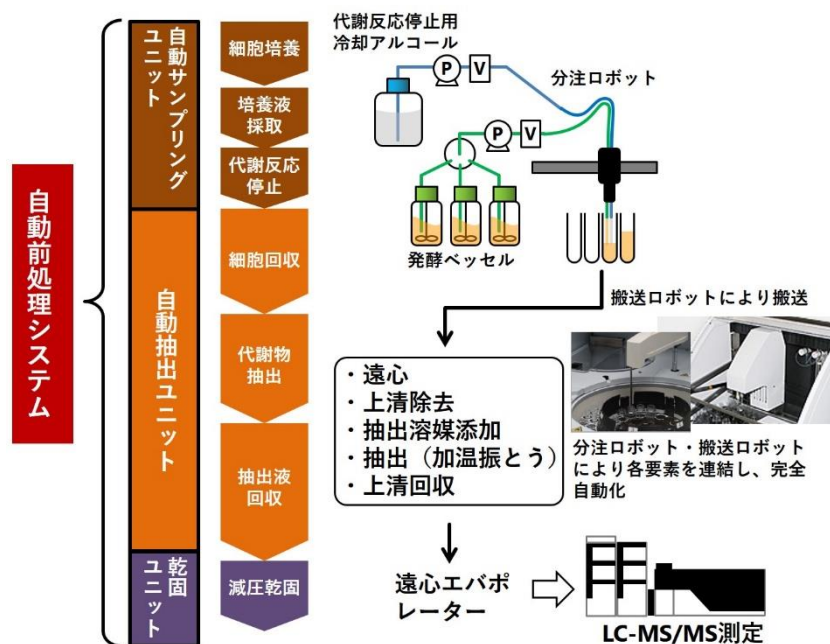


図 2.3.1.2-5 自動前処理システムの構成



図 2.3.1.2-6 自動前処理システムの完成予想図

①-1 自動サンプリングユニット

ジャーファーメンターを用いた細胞培養は、培養条件を自動制御できるため高い再現性が期待できるが、煩雑な操作に加え高額の初期投資と運用コストが必要で、多検体の解析には不向きであった。

フラスコ振盪による細胞培養は、簡便である事と引き換えに再現性が低く、サンプリング作業を手技に頼るためスループットの向上も困難であった。フラスコ振盪培養の再現性が低い原因の一つは溶存酸素濃度の制御が困難な点である。振盪速度、気相体積、容器形状、培地組成等々、多くの要因が複雑に絡み、溶存酸素濃度の制御を困難にした。中でも、溶存酸素濃度を確保するためには十分な気相体積が必要であり、これは容器、ひいては装置の大型化を招き、多検体解析の妨げとなった。

本プロジェクトでは、溶存酸素濃度と温度の制御が可能で、手技による煩雑なサンプリング操作を必要としない、多検体に対応した省スペースの自動培養装置の開発を行った。

要素技術実験機での検証実験を経て策定した仕様の概略は以下となる(図 2.3.1.2-7)。本機は繰り返し使用できるリアクター12本の同時運転を行い、溶存酸素濃度と温度を自動制御する。

サンプリングはロボットアームではなく、ポンプと電磁バルブによって制御された配管によって行う。培養液採取と同時に冷却アルコールを加え、代謝反応を停止させる(図 2.3.1.2-8)。サンプリング間隔を短縮するために図 2.3.1.2-9 のような流路構成とすることで、ロボットアームの移動が不要となり、15 秒というサンプリング間隔を実現する。これは従来の液体ハンドリングロボットではできなかった仕様である。この機構により、短いスパンでの細胞回収が必要な ^{13}C flux 解析のための自動サンプリングが可能となり、本機の大きな特徴の一つとなっている(特許出願予定)。溶存酸素濃度の制御に必要な容器体積を抑えることで省スペース、低価格な本体仕様となり、また繰り返し使用するリアクターによって運用コストを低く抑えた。

現在、培養ベッセル 3 本を運用できる実験機(図 2.3.1.2-10)により、実際の菌体培養実証実験を行っている。

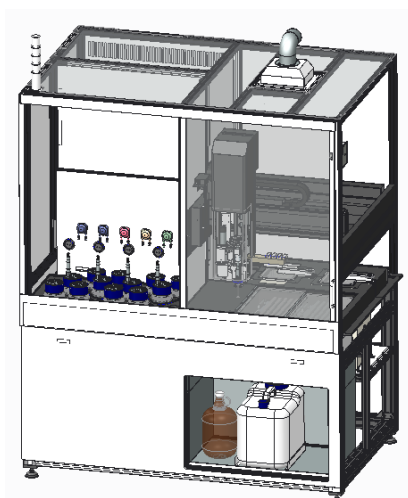


図 2.3.1.2-7 自動サンプリングユニットの完成予想図

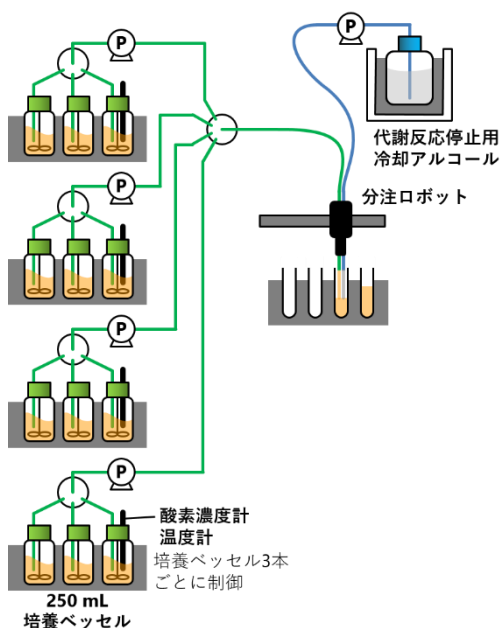


図 2.3.1.2-8 自動サンプリングユニットの構成

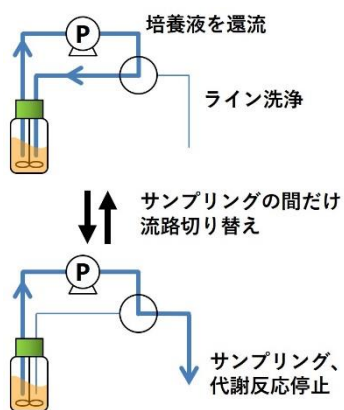


図 2.3.1.2-9 サンプリング時間間隔短縮のための流路構成

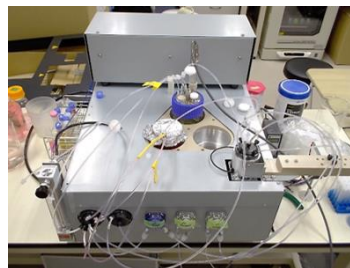


図 2.3.1.2-10 実験機

①-2 自動抽出ユニット

従来手技によって行ってきた培養細胞からの代謝物抽出過程には、図 2.3.1.2-11 に示す通り、精度、スループット共に多くの課題があった。

遠心後の上清をピペットで除去する際、どこまで吸い取るかは作業者の判断であり、残液量のバラつきを招く。その際、細胞ペレットを吸ってしまう事は定量精度の低下に直結する。目視による沈殿懸濁の確認が不十分な場合も、同様に定量精度の低下が懸念される。

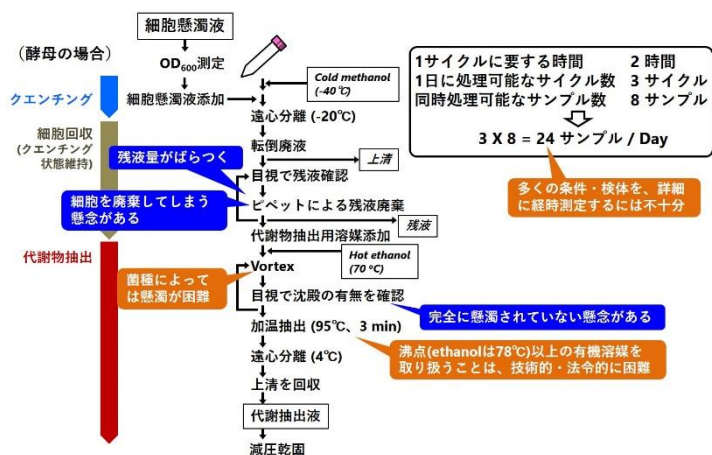


図 2.3.1.2-11 手技による前処理スキームと技術的な課題

手技による前処理は一人当たり 1 日二十数本が限界であるため、多くの検体・条件を網羅的に解析する必要がある本プロジェクトには対応できない。また、菌種によっては懸濁が非常に困難な場合が存在する、有機溶媒を高温で扱う処理が含まれているなどの要素は、ハイスループット化を困難にする。

本プロジェクトでは、ロボティクスによる自動化と、手技では困難な処理を組み込むことにより、相対標準偏差 5%以内、かつ手技の 10 倍以上のスループットを実現する自動抽出装置の開発を目指している。

汎用の液体ハンドリングロボットは数多く実用化されているが、専用の要素技術開発と複雑な工程が必要なメタボローム解析試料作製専用機はこれまでに例が無い。本プロジェクトでは、汎用機では実現不可能な精度、スループットを目指したシステム開発を行った。島津製作所には尿・血液検体からの薬毒物サンプル調整を自動化する装置(ATLAS)の開発実績があり、メタボローム解析試料作製専用機開発の十分が素地を有する。

これまでの研究で、手技で行っていた抽出過程は自動化に不向きな工程を含んでいることが明らかとなったので、代表的なモデル生物ごとに、自動化に向けた抽出プロトコールの最適化を行った(図 2.3.1.2-12)。

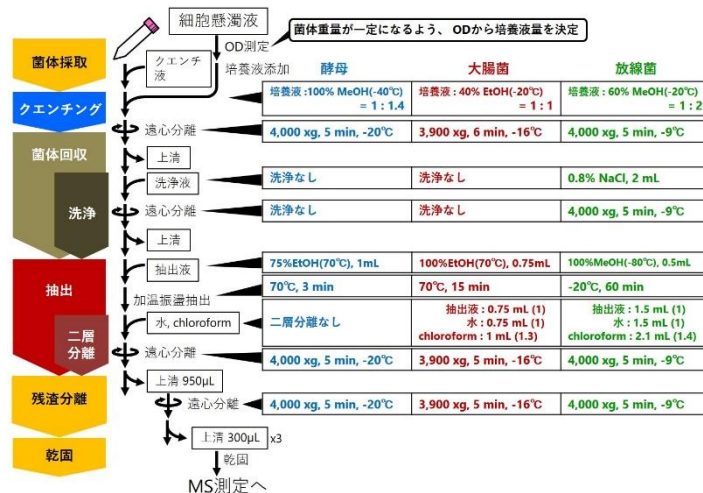


図 2.3.1.2-12 モデル生物の自動抽出工程

各工程の装置を運搬ロボット・分注ロボットで連結し、完全自動化されたユニットを構成した(図 2.3.1.2-13)。さらに、高温加熱したまま振とう攪拌を行うといった、人手では困難な処理を組み込むことで、人の動きのトレースを超えた効率と精度を実現した(図 2.3.1.2-14、15)。新たに開発した4つの要素技術について特許出願を予定している(図 2.3.1.2-16)。また、多数のサンプルとデータを誤りなく紐づけするために、バーコードによるID管理システムを実装した。



図 2.3.1.2-13 自動抽出ユニット全景

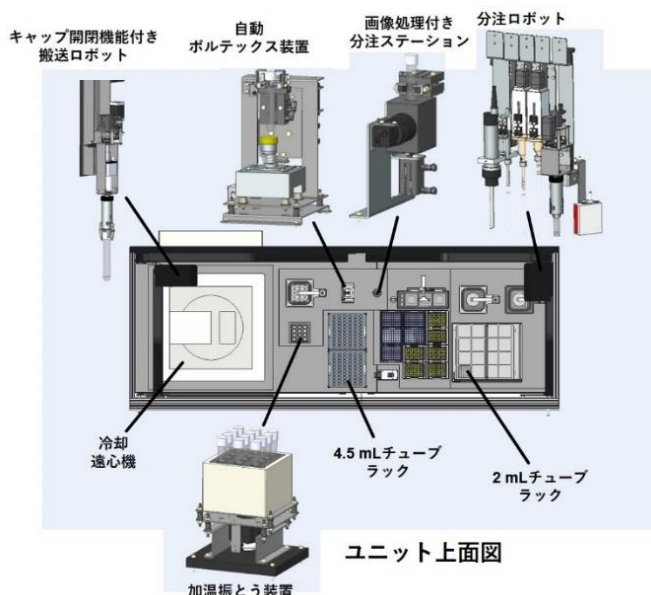
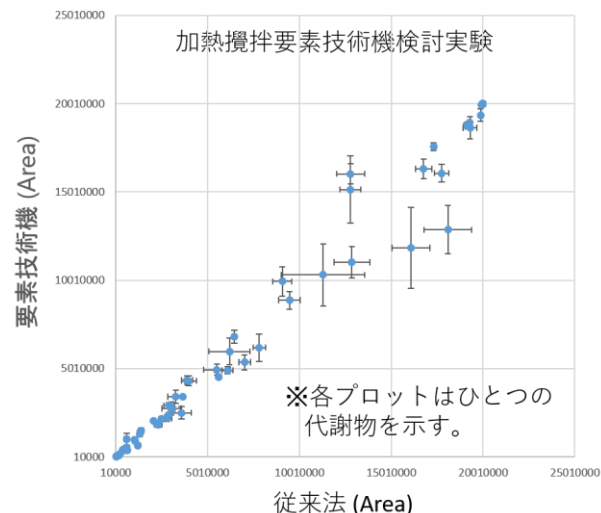


図 2.3.1.2-14 自動抽出ユニット俯瞰図と、組み込まれた要素装置



従来法に比べ、要素技術機を用いて抽出を行うと誤差が小さい。

図 2.3.1.2-15 要素技術機と従来法(手技)の

名称	概要
1 カメラ	1 固液界面の検出方法 沈殿を含む溶液から、上清のみを自動採取する機構において、精度良く固液界面を検出する方法。 液面だけでなく、沈殿も同時に検出している点が新規。これにより、沈殿の混入を防ぎつつ、損失無く上清を採取可能となった。
2, 3 光学センサ	2 ポルテックス正逆回転機構 懸濁しにくい試料を攪拌する際、ポルテックス装置にて発生した渦流に逆回転を与える方法。 逆回転を行う点が新規。これにより、正回転のみよりも格段に懸濁が容易となった。 3 懸濁確認機能を備えたポルテックス装置 ポルテックス装置（懸濁装置）にチューブ先端の沈殿をセンシングする機構を具備し、懸濁が完了したことを自動で判別する装置。 ポルテックスと沈殿センシングを組み合わせた点が新規。これにより、沈殿の残留を防ぐと共に、懸濁時間を常に必要最低限に制御できるようになった。
4 キャップ開閉装置	4 自動キャップ開閉装置 上下動作・旋回動作を連動させ、1軸のモータ駆動でキャップ開閉を行う機構。 ひとつのモーターで動作する点が新規。これにより、設計の自由度が上がり、かつコストが削減された。

図 2.3.1.2-16 自動抽出ユニットに組み込まれた要素技術の優位性

② SFE を用いた高効率代謝物回収技術の開発

SFE を用いて脂溶性化合物を除去して高純度の親水性化合物を回収する新規抽出システムを開発した。さらに、イオンペア剤を用いない LC-MS/MS 分離・検出条件の検討と、LC-MS/MS のクロマトグラムから代謝物濃度を自動的に定量し可視化するデータ解析システムの構築を行った。

②-1 SFE を用いた高効率代謝物回収技術

スマートセルモデルの高精度化には、上述①の自動前処理システムを用いた網羅性の高いメタボロームデータに加え、特に重要な代謝物の高精度定量メタボロームデータが必要である。本プロジェクトでは、イソプレノイド生合成経路・メバロン酸経路・メチルエリスリトールリン酸経路など、機能性成分の生合成経路へとつながるハブ代謝物(図 2.3.1.2-17)を一斉分析できる SFE を用いた自動多段階抽出システムを開発した。

本システムは、③で後述するように、LC-MS/MS とオンライン接続することで、前処理から測定までを自動で行えるシステムを構築することを最終目的としている。

メソッド検討にあたり、重要代謝経路のうち、機能性成分の合成経路へとつながる代謝経路に含まれる化合物を選択し、実サンプルには、大腸菌および酵母を使用した。

今回ターゲットとした代謝物は、modifier が 0-10%の条件下では抽出されず 20%以上の条件下で抽出されることが確認された。これより、modifier 濃度を 0%と 20%にステップワイズに変える多段階抽出法を採用した。リン酸化合物は金属吸着性であるため、SFE 抽出はできなかった。

多段階抽出により、特別な前処理を行うことなく、細胞からの代表的な代謝物の自動抽出を行うことができた。また一段階目のクリーンアップ抽出により、MS 検出におけるバックグラウンドの低減を実現した。(図 2.3.1.2-18)

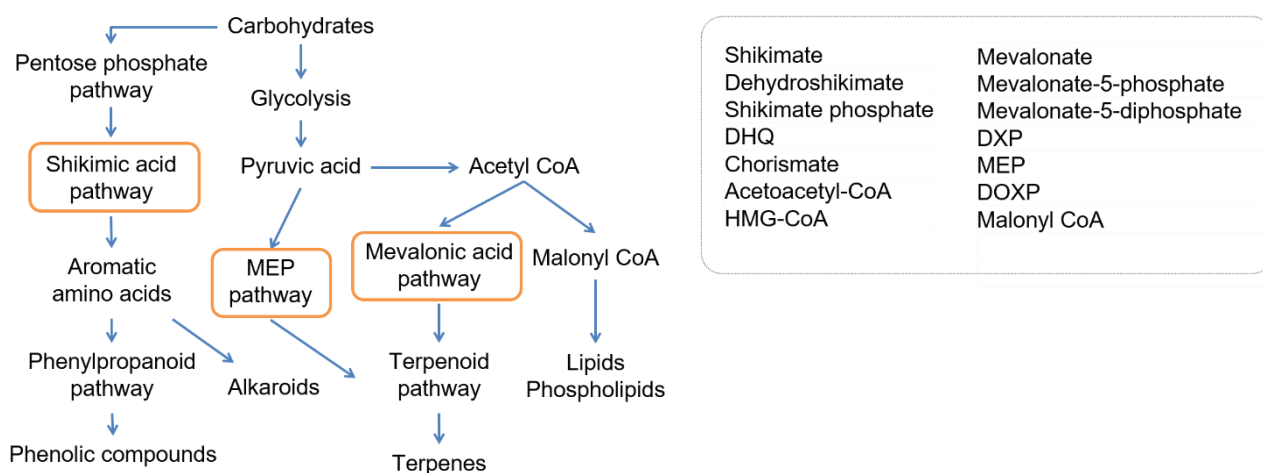


図 2.3.1.2-17 主な代謝経路

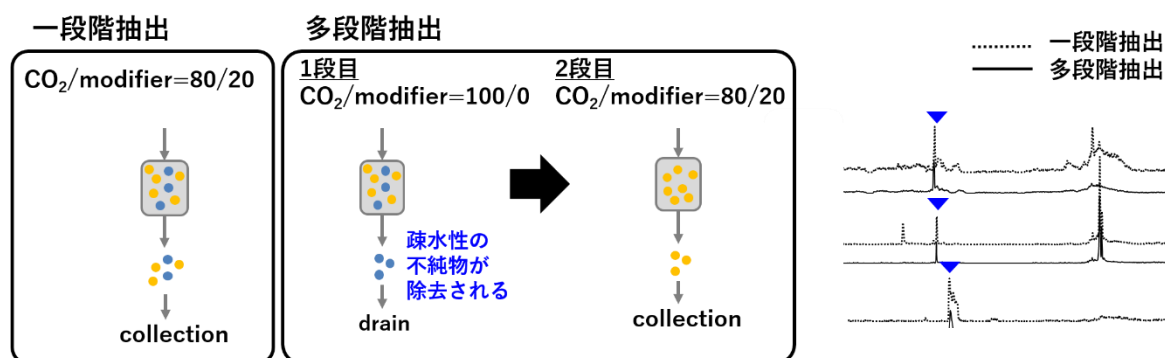
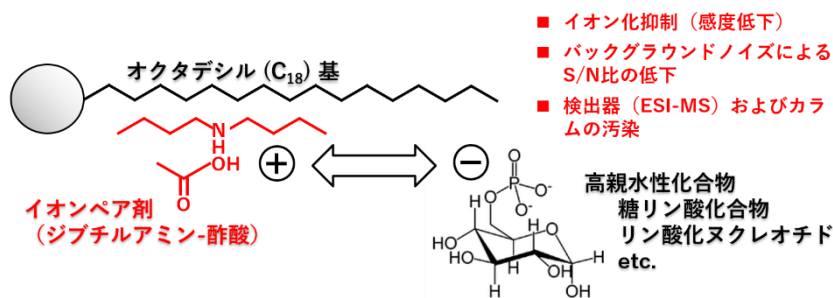


図 2.3.1.2-18 SFE による一段階/多段階抽出手順

②-2 イオンペア剤を排除した LC-MS/MS 測定条件

従来、LC/MS を用いて親水性の高い代謝物を分離・検出する場合、逆相分配クロマトグラフィーにおいて、移動相にイオンペア剤を添加することで固定相への保持を強める方法が行われてきた。しかし、イオンペア剤の添加は、イオン化抑制による感度低下、およびバックグラウンドノイズによる S/N 比の低下を招き、精度の観点から深刻な課題を含んでいる。また、イオンペ

ア剤の使用はイオン源や検出器の汚染を招く事から、多検体の測定が必須である本プロジェクトの運用形態には不適と言わざるを得ない。



- イオン化抑制 (感度低下)
- バックグラウンドノイズによる S/N比の低下
- 検出器 (ESI-MS) およびカラムの汚染

図 2.3.1.2-19 従来の、イオンペア剤を用いた逆相クロマトグラフィー

本プロジェクトではイオンペア剤を用いない分離・検出技術の開発を行った。その結果、PFPPカラム、アミノシリカカラムを用いた手法が極めて有効である事を確認した(図 2.3.1.2-19)。現在、標的とする 147 代謝物の測定条件を確立し(表 2.3.1.2-1)、各代謝物の定量範囲を確認した。この 147 代謝物は、本プロジェクト参加者へのヒアリングにより、スマートセルモデルの高精度化に必要と思われるものを選抜した結果である。

解糖系/ ペントースリン酸経路	TCA回路/ 有機酸	必須アミノ酸	その他
PGA	2-ketoglutarate	Alanine	Acetylcholine
Dihydroxyacetonephosphate	Acetyl-CoA	Arginine	Adenine
Fructose 1,6-bisphosphate	Acconitate	Asparagine	Adenosine
Fructose 6-phosphate	Citrate	Aspartic acid	Adenylsuccinic acid
Glucose 1-phosphate	Fumarate	Cysteine	ADP-glucose
Glucose 6-phosphate	Isocitrate	Glutamic acid	Allantoin
Glyceraldehyde 3-phosphate	Lactate	Glutamine	Carnitine
Glycerol 3-phosphate	Malate	Phenylalanine	Cholic acid
Phosphoenolpyruvate	Oxaloacetate		Choline
Pyruvate	Succinate		Citicoline
6-phosphogluconate	Succinyl CoA		Creatine
Erythrose 4-phosphate	Malonyl CoA		Creatinine
Ribose 5-phosphate			Cysteamine
Ribulose 1,5-bisphosphate	メバロン酸経路		Cytidine
Ribulose 5-phosphate	Acetoacetyl CoA		Cytosine
Sedoheptulose 7-phosphate	HMG-CoA		Dopa
Xylulose 5-phosphate	MEV		Dopamine
	MEV-5P		Epinephrine
	MEV-5PP		Guanine
	シキミ酸経路		Guanosine
	3-dehydroquininate		Histamine
	3-dehydroshikimate		Hypoxanthine
	4-hydroxyphenylpyruvate		Inosine
	Chorismate		Norepinephrine
	Phenylpyruvate		Orotic acid
	Shikimate		Serotonin
	Shikimate 3-phosphate		Taurocholic acid
	MEP経路		Thymidine
	DOXP		Thymine
	HDMAPP		Uracil
	cMEPP		Uric acid
	MEP		Uridine
	DMAPP		Xanthine
	IPP		
		ヌクレオチド・補酵素	
		cAMP	
		ADP	
		AMP	
		ATP	
		CDP	
		CMP	
		CTP	
		cCMP	
		FAD	
		FMN	
		GDP	
		GMP	
		GTP	
		cGMP	
		NADH	
		NAD	
		NADPH	
		NADP	
		Niacinamide	
		Nicotinic acid	
		pantothenic acid	
		SAH	
		SAM	
		TMP	
		アミノ酸・ペプチド	
		4-Hydroxyproline	
		5-Glutamylcysteine	
		Acetylcarnitine	
		2-Aminobutyric acid	
		4-Aminobutyric acid	
		Argininosuccinic acid	
		ADMA	
		Carnosine	
		Citrulline	
		Cystathionine	
		Cystine	
		Dimethylglycine	
		Glutathione	
		Homocysteine	
		Homocystine	
		Kynurenine	
		Methionine sulfoxide	
		Ophthalmic acid	
		Ornithine	
		Oxidized glutathione	
		SDMA	

表 2.3.1.2-1 2種類のカラムで測定可能な代謝物

②-3 データ解析システムの高速化

LC-MS/MS 測定によって得られるデータは各代謝物のクロマトグラムである。各代謝物の存在量(メタボロームデータ)を得るためには、この波形データから目的代謝物のピークを同定し、その面積を求める Peak picking という作業を行う。従来、LC-MS/MS 装置付属の解析ソフトウェアを用いて Peak picking を行った場合、測定可能な 147 代謝物に対し、20 検体/Day の作業時間を要していた。これは代謝物抽出と LC-MS/MS 測定を合わせた作業時間に匹敵する長さであり、スループットの大きな律速であった。

本プロジェクトでは、あらたなアルゴリズムを実装したクロマトグラム解析ソフトウェア「TraverseMS(Reifics 社)」をベースに、高速 Peak picking システムを構築した。このソフトウェアは優れたピーク同定機能と結果の視認性を有しており、Peak picking 作業が半自動化された(図 2.3.1.2-20)。その結果、測定可能な 147 代謝物に対し、従来 20 検体/Day を要した作業が 100 検体/Day で処理可能となり、大幅な省力化に成功した。

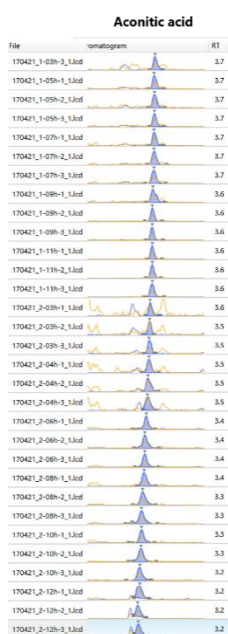


図 2.3.1.2-20 TraverseMS によるピーク同定結果の例

本プロジェクトにおけるメタボローム解析の意義の第一は、スマートセルモデルの高精度化に資する事にある。メタボロームデータを人間が理解できる形に加工し(可視化)、代謝の変化を目視で検討することは十分に意味がある。従来、汎用的な表計算・作図ソフトウェア(Excel、PowerPoint 等)を用いた手作業での可視化が行われてきたが、多くの手間と時間がかかり、測定可能代謝物全てを可視化する事は現実的ではなかった。

本プロジェクトでは、オミックスデータ解析のためのオープンプラットフォームである「GARUDA」と、GARUDA 上で島津製作所製 LC-MS/MS からのデータを解析するためのツール「Shimadzu Multi-omics Analysis Gadget Pack(島津製作所)」を用い、メタボロームデータを簡便に代謝マップ上へ反映させる方法を確立した(図 2.3.1.2-21)。これにより、多検体の全代謝物のメタボロームデータを、1 時間以内で可視化できるようになった。また、この方法をあ

らかじめ共有する事で、連携先(味の素、長瀬産業、三菱ケミカル、RITE、新潟薬科大学、AIST)とのデータ共有の簡便化を実現した。

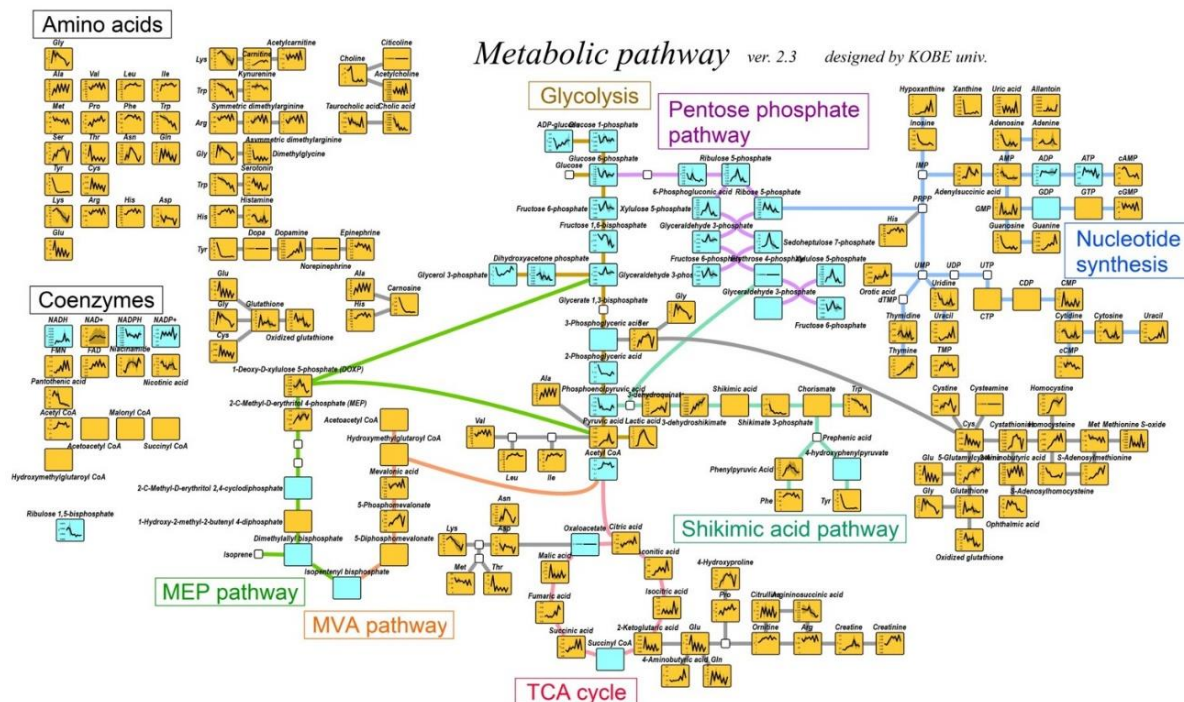


図 2.3.1.2-21 大腸菌 Phenyllactic Acid 高生産株のメタボローム経時測定結果

③ SFE-LC-MS/MS オンラインシステム

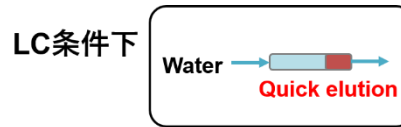
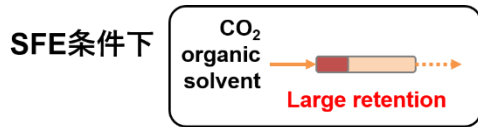
SFE を用いた高効率代謝物回収技術のスループット、作業性を向上させるためには、SFE と LC-MS/MS をオンラインで接続するシステムを開発する必要がある。本プロジェクトでは、SFE と LC-MS/MS の間をトラップカラムで連結する事でオンライン化した。両者をオンライン化したシステムは世界初の試みである。完全自動化に加え、遮蔽流路内で全行程が完了することで代謝物の酸化などの劣化が抑制され、確度の向上が見込まれる。

SFE と LC では移動相条件が異なることから、SFE 抽出物を LC カラムに導入する前に、一旦トラップカラムに捕集し移動相の置換を行う必要がある。SFE 条件下 (CO₂/メタノール) では高い保持力を示し、LC 条件下 (水/アセトニトリル) では化合物を速やかに溶出するカラムとして、新規に開発したポリマー系トラップカラムを使用した。(図 2.3.1.2-22)

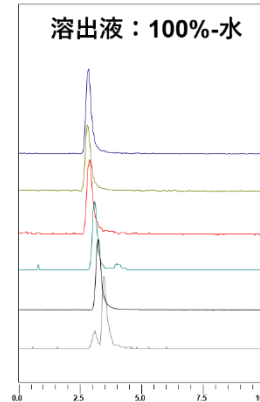
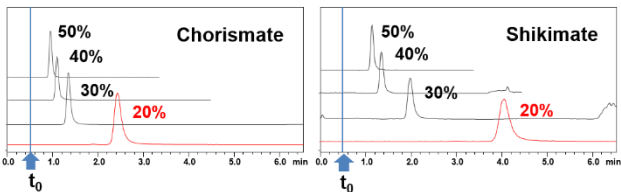
オンライン SFE-LC-MS/MS の構成・測定の流れを図 2.3.1.2-23、24 に示す。

オンライン SFE-LC-MS/MS による実サンプルの測定では、大腸菌および酵母 (培養液を遠心し、回収した細胞を水で洗浄したもの) を用いた。特別な前処理を施すことなく、実サンプルからいくつかの代謝物を検出することができた(図 2.3.1.2-25)。オンライン化技術について特許出願を予定している。

後は SFE 抽出における回収率・再現性の検証とメソッド最適化と、オンライン SFE-LC-MS/MS の測定可能対象成分の拡張、それに伴うメソッド改良を実施する。



(a) Modifier濃度の効果



(b) modifier塩濃度の効果 (modifier濃度 20%)

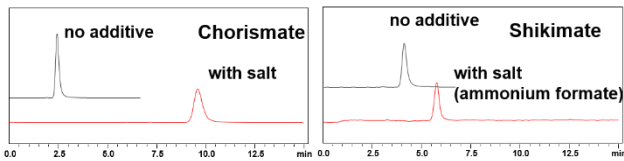


図 2. 3. 1. 2-22 代表的な代謝物の、SFE 条件下と LC 条件下での溶出挙動

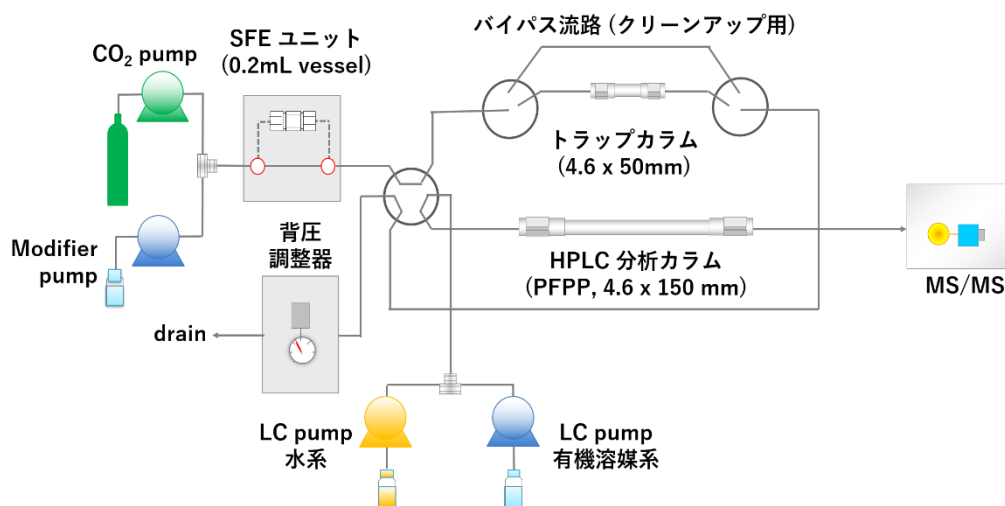
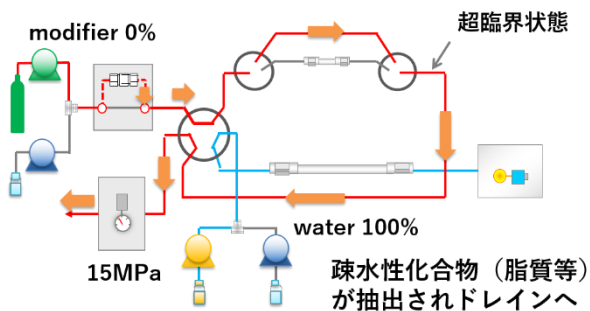
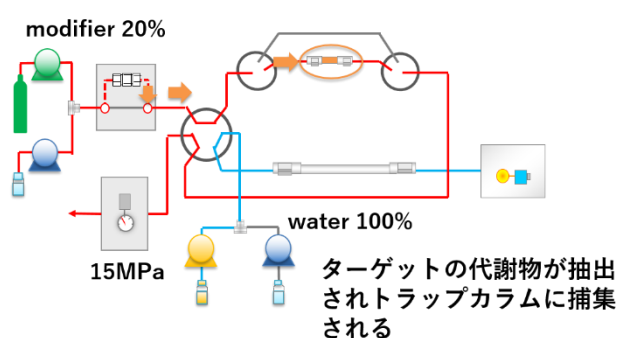


図 2. 3. 1. 2-23 オンライン SFE-LC-MS/MS の流路

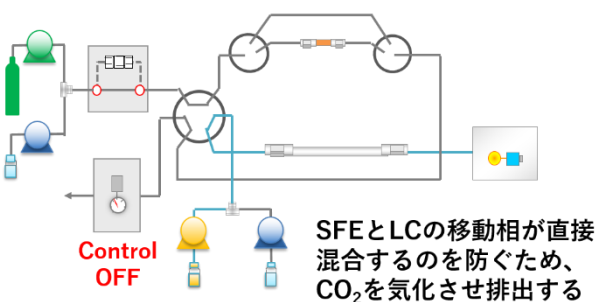
1. 抽出 (1段階目)



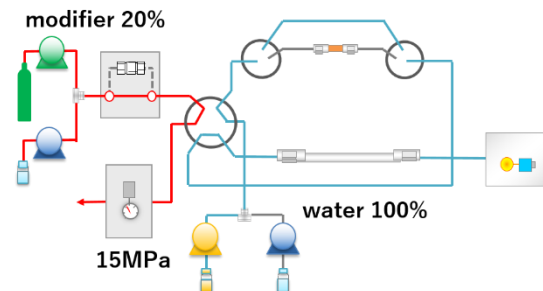
2. 抽出 (2段階目)



3. 背圧の開放



4. コンディショニング



5. LC/MS 分析

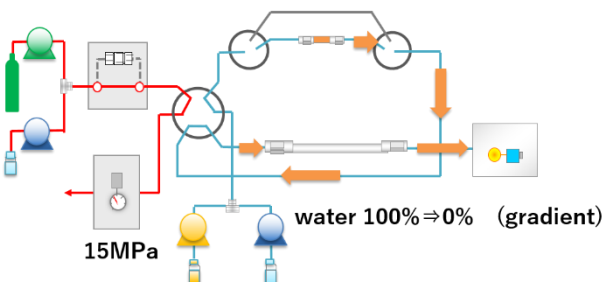


図 2. 3. 1. 2-24 オンライン SFE-LC-MS/MS 測定の流れ

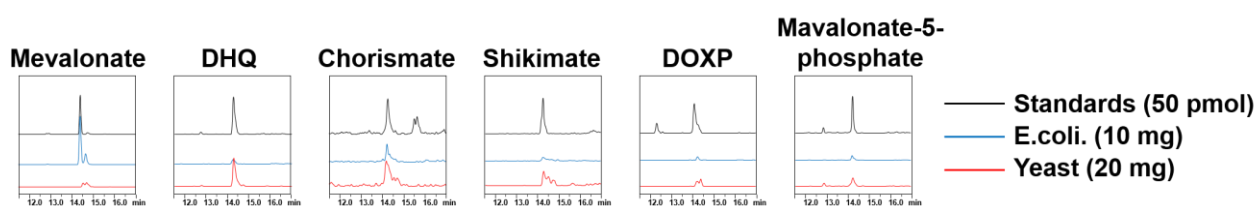


図 2. 3. 1. 2-25 大腸菌および酵母のオンライン SFE-LC-MS/MS 測定結果

[まとめ]

自動前処理システム

前処理のスループットが、手技と比較し、10倍以上向上できる目途が立った。

煩雑な操作の自動化により精度が向上した。

サンプル ID 管理システムにより、データの信頼性と可用性を大幅に向上できる。

LC-MS/MS 測定条件の検討

イオンペア剤を排除する事で、10倍の感度向上を達成した。

2種類のカラムで、147代謝物の定量測定を実現した。

高速データ解析システム

TraversMS をベースとした解析システムの構築により、5倍以上の解析スループット向上を実現した。

GARUDA をベースとした解析システムの構築により、簡便なデータ可視化環境とデータ共有環境を実現した。

上記の効果が作業全体のスループットにどの程度影響を及ぼすかを見積もるため、本プロジェクト開発開始当初と新規ワークフローを比較した(図 2.3.1.2-26)。自動化が進んだ新方法では、自動前処理システムにおいて、逐次並列処理と終夜運転を駆使する事で10倍以上のスループット向上が見込まれる。LC-MS/MS測定とデータ解析においても大幅なスループット向上を実現した。今後、条件の最適化や自動化など、自動前処理システムの性能に見合う更なるスループット向上の余地は十分にあると考えられる。

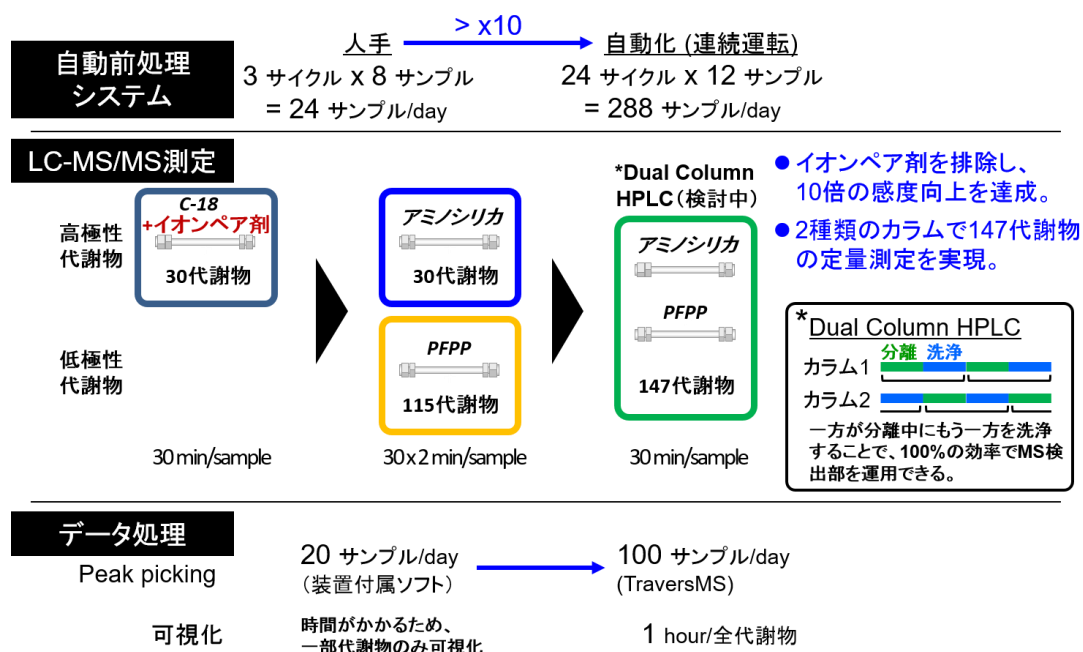


図 2.3.1.2-26 システムの効果

参画機関との連携

システム開発と並行して、連携機関からの要請に応じたメタボロームデータの提供は既に頻繁に行っており、スマートセルの設計に貢献している(図 2.3.1.2-27)。

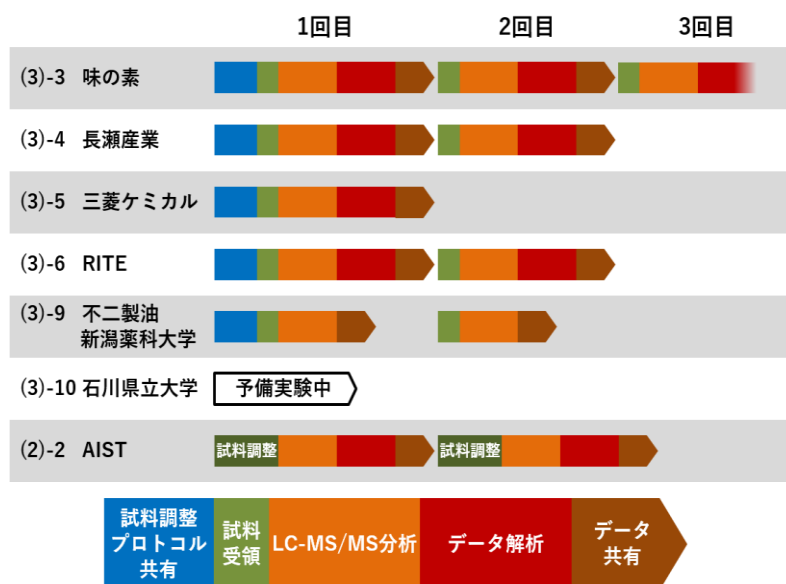


表 2.3.1.2-27 参画機関との連携状況

(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	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	1	9	0	1	0	1
2018 *1	0 (1)	0 (0)	1 (5)	8 (8)	1 (0)	4 (0)	0 (0)
2020 *2	3	2	21	18	4	6	1

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	0 (6)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	8	0	0

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.1.3 高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術の開発

担当機関：大阪大学（再委託）

(1) 背景と目的

有用物質生産微生物の分子育種では代謝経路の合理的な改変が求められる。代謝経路の改変とは、宿主微生物のゲノムを人為的に書き換え、(1)新規酵素タンパク質を発現させて、細胞内に新たな代謝経路を構築する、(2)遺伝子破壊で不要な経路を除く、(3)酵素タンパク質量を増減させて、各反応の触媒活性を調節する、作業であるといえる。

近年の代謝設計技術の進展により、目的物生産に最適な代謝経路の設計が可能となり、それを実現するためのゲノム編集技術や長鎖 DNA 合成技術が実用化されつつある。また、設計通りにスマートセルを構築できたのか評価する手法として、発酵試験による目的物生産収率、比速度の測定に加えて、メタボローム解析による細胞内代謝中間体含量の一斉定量などが広く用いられてきた。このように、酵素タンパク質の細胞内存在量の測定は、スマートセルの評価に重要な役割を果たすと期待される。

そこで本研究では、スマートセルの評価に最適なタンパク質量定量法である定量プロテオミクス法に注目し、定量プロテオミクス法の高感度、確実性を生かしつつ、技術的な課題となっている網羅性、スループットを向上する技術開発を行うことで、多数の酵素発現量を高精度に一斉定量可能な測定技術を開発することを目標とする。これにより、高生産微生物のタンパク質量発現量が設計通り通りに調節できたのか確認することを可能とする。さらに、新規代謝経路の設計、代謝モデル構築に資するデータを取得することを可能とする。そのために必要な項目を4つ挙げ、研究開発項目として設定した。

1. 高速 MRM アッセイメソッド構築法の開発課題

課題：MRM アッセイメソッド構築に時間がかかる。

定量プロテオミクス法では、測定タンパク質毎に質量分析装置の設定を最適化した MRM アッセイメソッドを構築する必要がある。5 タンパク/日程度のスループットしかなく、100 種以上の酵素を測定するメソッドの作成には不十分だった。そこで、20 タンパク/日までスループットを向上することを目指した技術開発を行う。

2. MRM アッセイメソッド構築

課題：宿主微生物毎に MRM アッセイメソッドの構築が必要

定量プロテオミクス法で用いる、MRM アッセイメソッドは測定タンパク質の配列に依存する。このため、同じ反応を触媒する酵素であっても、生物種ごとに MRM アッセイメソッドを作成しなおす必要がある。開始時は、酵母、シアノバクテリアの中心炭素代謝経路にかかわる酵素について MRM アッセイメソッドの構築が完了していた。そこで、本プロジェクト実用化課題、神戸大学で取り扱う大腸菌、酵母、糸状菌などの宿主微生物について、ターゲット代謝経路の関わる酵素 200 種の MRM アッセイ法を構築することを目指す。

3. 定量の高精度化

課題；定量精度が低い

プロジェクト開始時の定量プロテオミクス法では、異なるスマートセル株間でのタンパク質量発現量の相対比較が可能である。しかしながら、同じスマートセル内で2種類のタンパク質を発現

した時、この2種の発現量を比較することができず、代謝モデル構築には精度が不足していた。そこで、人工内部標準タンパク質を用いた高精度な定量法を確立し、代謝設計へと活用する技術を開発する。

4. 試料調整法の効率化

課題：サンプル調製のスループットが低い

定量プロテオミクス法では、スマートセルからの粗酵素液の抽出、タンパク質定量、還元アルキル化、トリプシン消化、脱塩にいたるサンプル調整作業を手作業で行っているため、大量サンプルの取り扱いに必要なスループットが欠けていた。そこで、作業の効率化により1.5倍のハイスループット化を目座す。

(2) 位置づけ、目標値

これまでも様々なタンパク質定量法が開発されてきたが、スマートセルの評価には、定量プロテオミクス法が最適である。ウェスタンブロッティングは古典的なタンパク質存在量の測定法として、現在でも広く用いられている。目的タンパク存在量を高感度に評価できるが、抗体作成の必要性、網羅性、スループットなどの課題も多い。また、プロテオミクス分野では2次元電気泳動法の感度、網羅性、再現性などの課題を解決すべく、発見型プロテオミクス法が開発された。粗タンパク質抽出物から調製したトリプシン消化ペプチド混合物を、液体クロマトグラフータンデム型質量分析装置（LC-MS/MS）に供し、自動取得したプロダクトイオンスペクトルデータをもとにペプチド同定を行い、サンプル中に含まれるタンパク質の網羅的なカタログ化を目指している。一方、スマートセルの評価では、あらかじめ決定した測定対象タンパク質の存在量を定量したい。そこで、LC-MS/MSの検出器を、より定量性に優れたトリプル四重極型質量分析装置に変更すれば、選択反応モニタリングモード（MRM）を用いることで、数十種のタンパク質をより確実に高感度で一斉定量することが可能となる。このターゲット（定量）プロテオミクス法が、スマートセルの評価に最適であることに注目し、筆者らは島津製作所と共同で純国産ターゲットプロテオミクス分析システムの開発を進めてきた。

表 2.3.1.3-1 他技術との比較

	感度	網羅性	スループット	確実性
ウェスタンブロッティング	◎	×	×	◎
二次元電気泳動	△	△	×	△
発見型プロテオミクス	○	◎	○	△
定量プロテオミクス	◎	△	○	◎

中間目標値(H30)と最終目標値 (H32)

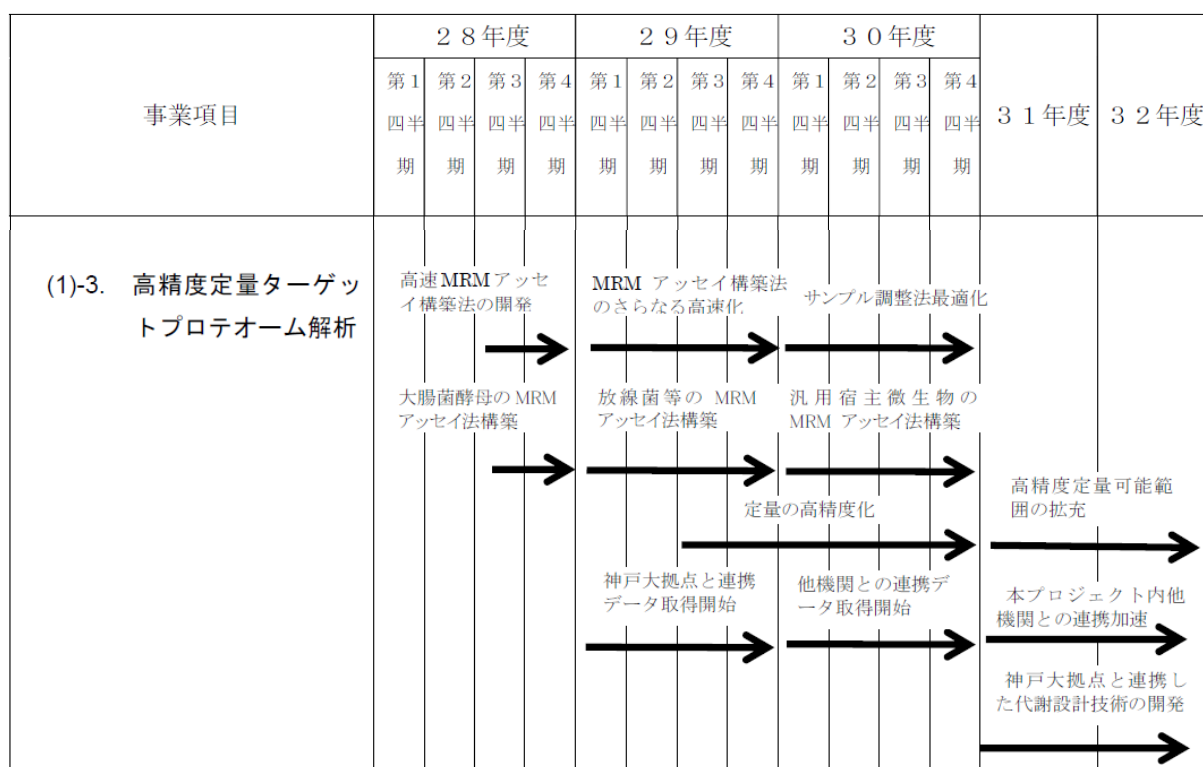
研究開発項目	開始時 (H26)	中間目標値(H30)	最終目標値 (H32)
①高速MRMアッセイメソッド構築法の開発	5 タンパク/日	20 タンパク/日	20 タンパク/日
②MRMアッセイメソッド構築	酵母、光合成微生物の酵素 200 種の MRMアッセイ法	汎用宿主微生物について3種以上の物質生産ターゲット代謝経路の関わる酵素について、500 種以上のMRMアッセイ法の構築を進める。	物質生産ターゲット代謝経路の100種以上の酵素発現量を高精度に一斉定量可能
③定量の高精度化	タンパク/タンパク間の相対定量不可	タンパク/タンパク間の相対定量可能とする。高精度に定量可能なターゲット酵素タンパク質数を50種に拡大する。	本プロジェクト内の他機関との連携研究を10件以上行い、年間300検体以上から酵素発現量データの取得を行い、配列設計の評価、検証を可能とする。
④試料調整法の効率化	5-10 検体/日	酵素触媒酵素発現量データの取得スループットを1.5倍以上向上させる。	神戸大学拠点との連携研究を行い、年間100検体以上から酵素発現量データの取得を行い、プロテオームデータを用いた代謝設計技術の開発を行う。

(3) 全体計画

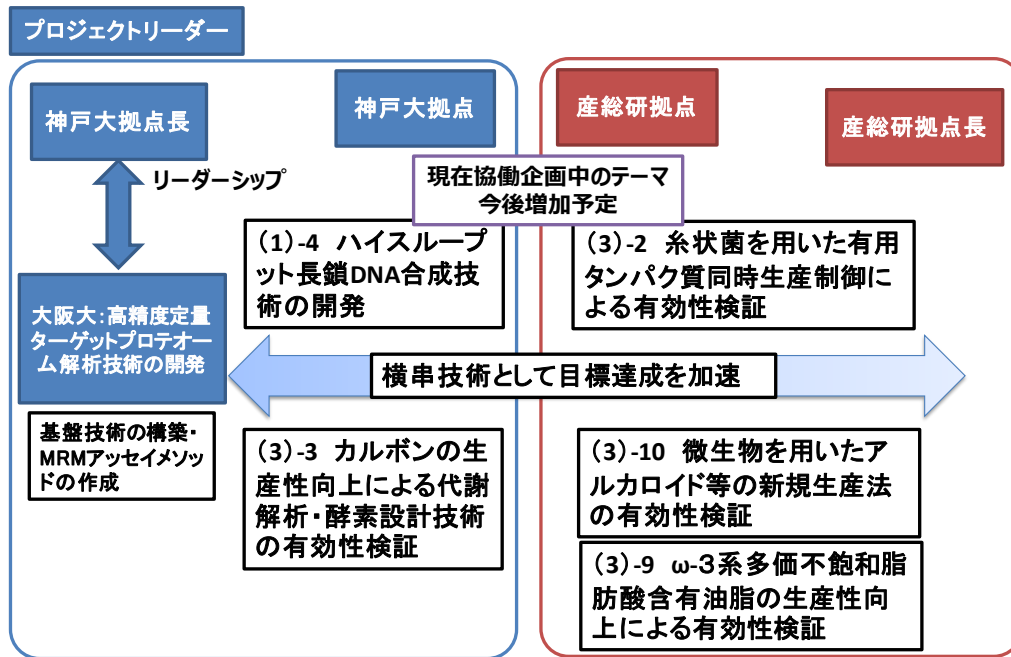
本研究では、まず、①高速MRMアッセイメソッド構築法の開発に着手し、これをもとに②MRMアッセイメソッド構築を進め、技術的な課題となっている網羅性、スループットを向上する技術開発を行う。さらに平成29年度からは、④神戸大拠点と連携したデータ取得を開始し、さらに、③定量高精度化技術の開発に着手して、平成30年度までに基礎的な技術開発にめどをつける。平成31年度以降は、高程度に定量可能な範囲の拡大、本プロジェクト実用化課題との連携、神

戸大拠点と連携した新規代謝経路の設計、代謝モデル構築に資するデータの取得へと展開する。
特に、

- 平成 30 年度までに構築した要素技術を組み合わせ、超高精度なターゲットプロテオーム測定技術へと発展させる。酵素発現量の測定に必要な人工内部標準タンパク質遺伝子のデザインと発現を他機関と連携して進め、高精度に定量可能な酵素を拡充する。
- 本プロジェクト内の「(3)新規情報解析システムの有効性検証」「(1)-5.ハイスループット微生物構築・評価技術の開発」で作成される改変微生物について酵素触媒酵素発現量データの取得をすすめ、代謝系酵素発現向上の評価、検証を可能とする。
- 神戸大学拠点で実施される「(2)-1. 代謝系を設計する情報解析技術遺伝子配列設計システムの開発」と連携し、代謝系の設計および検証に必要な酵素触媒酵素発現量データを取得する。



(4) 実施体制



(5) 運営管理

小規模なグループであるが、内部では2回/週のグループ内進捗確認ミーティングを実施している。連携研究期間とは、1-2回/週程度の頻度で情報交換を行い、研究開発の進捗管理と情報共有を行っている。

(6) 実施の効果

受託分析の競合はいまのところ存在しない。また、微生物をターゲットに定量プロテオーム解析の技術開発を行っている機関は国内に存在しない。きわめて独自性の高いデータをプロジェクトに提供し、研究開発を加速する横串技術として実施の効果がある。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
①高速 MRM アッセイメソッド構築法の開発	20 タンパク/日	20 タンパク/日	○	ノウハウ化とソフトウェア開発を行う。
②MRMアッセイメソッド構築	汎用宿主微生物について3種以上の物質生産ターゲット代謝経路の関わる酵素について、500種以上のMRMアッセイ法の構築を進める。	汎用宿主微生物について3種以上の物質生産ターゲット代謝経路の関わる酵素について、400種以上のMRMアッセイ法の構築を進める。	△ (2018年10月達成予定)	MRMアッセイメソッドデータベース開発を行う。
③定量の高精度化	タンパク/タンパク間の相対定量可能とする。高精度に定量可能なターゲット酵素タンパク質数を50種に拡大する。	タンパク/タンパク間の相対定量可能とした。高精度に定量可能なターゲット酵素タンパク質数を8種に拡大した。	△ (ターゲット数は連携実用化グループのニーズによる)	実用化課題との連携を拡大する
④試料調整法の効率化	酵素触媒酵素発現量データの取得スループットを1.5倍以上向上させる。	試料調整法のノウハウ化を行った。条件検討に着手	△ (2019年3月達成予定)	省略可能な工程を同定する。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
①高速MRMアッセイメソッド構築法の開発	20タンパク/日	20タンパク/日	達成済み。ノウハウ化とソフトウェア開発を行う。
②MRMアッセイメソッド構築	汎用宿主微生物について3種以上の物質生産ターゲット代謝経路の関わる酵素について、400種以上のMRMアッセイ法の構築を進める。	物質生産ターゲット代謝経路の100種以上の酵素発現量を高精度に一斉定量可能	今年度中に達成可能。成果を踏まえてMRMアッセイメソッドデータベース開発を行う。
③定量の高精度化	タンパク/タンパク間の相対定量可能とした。高精度に定量可能なターゲット酵素タンパク質数を8種に拡大した。これを用いて本プロジェクト内の他機関との連携研究を5件行った。	高精度定量技術等を用い、本プロジェクト内の他機関との連携研究を10件以上行い、年間300検体以上から酵素発現量データの取得を行い、配列設計の評価、検証を可能とする。	プロジェクトリーダーのリーダーシップのもと、実用化課題との連携を拡大する。
④試料調整法の効率化	ハイスループット化に向け、省略可能な工程の同定に着手した。また、神戸大学拠点との連携研究を行い、5検体から酵素発現量データの取得を行った。	ハイスループット試料調製技術等を用い、神戸大学拠点との連携研究を行い、年間100検体以上から酵素発現量データの取得を行い、プロテオームデータを用いた代謝設計技術の開発を行う。	ノウハウ化とソフトウェア開発を行う。

(9) 研究開発の成果と意義

1. 高速MRMアッセイメソッド構築法の開発

1-1. 目的

定量プロテオーム解析では、定量対象タンパク質をトリプシン消化し、得られたペプチドから LC-MS で最も効率よくイオン化し、高感度に検出可能な定量ペプチドを事前に選抜する必要がある (図 2.3.1.3-1)。また、定量ペプチドを他のペプチドと区別して選択的に検出するために、トリプル四重極質量分析装置の多重反応モニタリング (MRM) 法で検出を行うが、これも事前に最適な定量断片 (フラグメント) を選抜する必要がある。事前の検討で設定した、定量ペプチドと定量断片の組み合わせを MRM アッセイメソッドと呼ぶ。1つの対象タンパクについて MRM アッセイメソッドを作成するには、すべての定量ペプチドと定量断片の組み合わせで実測したデータから、最適なものを選抜する必要がある。これには総計 500-1000 程度の組み合わせを網羅する必要があり、トリプル四重極質量分析装置を 6 時間程度使用してデータを取得する必要がある。そこで、本研究課題では、作業時間を 1.5-3h に減らすことを目標として 1. 定量ペプチドの候補を減らす技術の開発、2. 定量断片候補を事前に減らす技術の開発、の 2 つの項目について検討を行った。

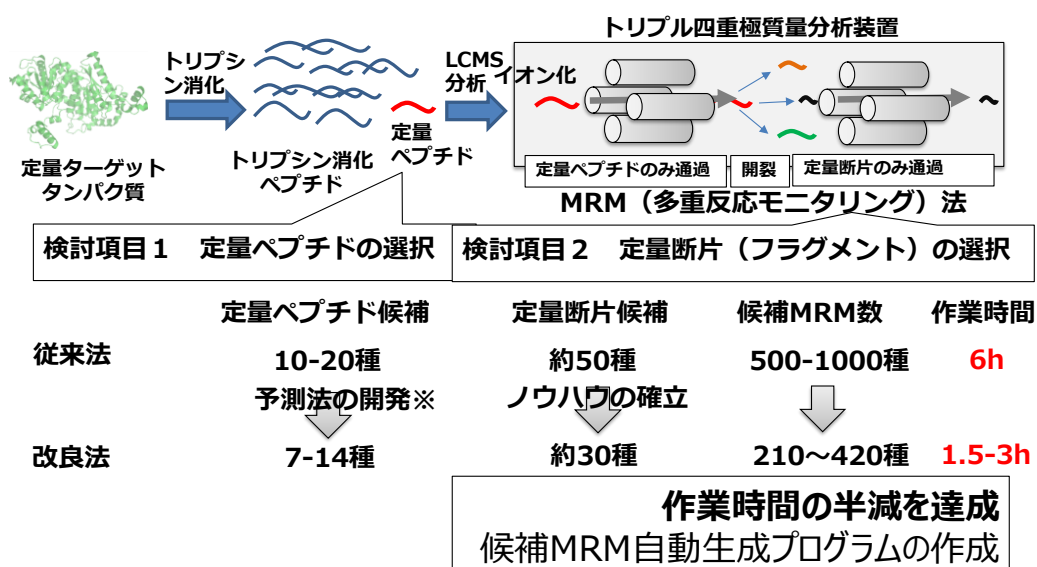


図 2.3.1.3-1 高速 MRM アッセイメソッド構築法の開発の概要

1-2. 定量ペプチド候補を減らす技術の開発

CONSeQuence や PeptideRank などの既存の技術はペプチドのアミノ酸配列から、有望な定量ペプチドの予測が試みられてきた (Methods 61: 287-298, 2013)。しかしながら、本来定量ペプチドとすべきものを、誤って有望ではないと判定する偽陰性が多いという課題があった。そこで、本研究では発想を逆転し、測定対象になりそうにない有望ではない (Hopeless) ペプチドを予測し、定量ペプチド候補を減らすことを目指した。

そこで、ペプチド配列からシグナル強度を予測する回帰式の作成を試みた。研究開発項目 2. MRM アッセイメソッド構築では、大腸菌の中心代謝酵素 203 種からトリプシン消化ペプチドの LC-MS 分析でのシグナル強度を測定していた。機械学習技術を用いて、10 万件超のデータを用いて、二種類のペプチド A, B の配列から、シグナル強度比を予測する式を作成した。本式では、比較的高精度に相対強度値を予測することが可能となった。

そこで本式を用いて、大腸菌中心代謝酵素 203 種のトリプシン消化ペプチド全 3856 ペプチドの予測を行ったところ、1275 個 (33%) を期待できないペプチドと判定された。このうち、本来定量ペプチドとするべきペプチドを誤って、期待できないとした誤りは 3% と許容できるレベルだった。以上の検討から定量ペプチド候補を事前に 3 割削減可能な技術を開発できた。

1-3. 定量断片候補を減らず技術の開発

ついで、定量断片候補を減らず技術の開発を試みた。トリプル四重極質量分析装置の多重反応モニタリング (MRM) 法は、途中でペプチドイオンの断片化を行う。生成しやすい定量断片 (フラグメント) の予測モデルの作成が試みられているが、有効なモデルの作成は困難なことが知られている。本研究においても、研究開発項目 2. MRM アッセイメソッド構築で取得した定量断片の定量データを用いた予測モデルの開発を試みているが、有用な結果は得られていない。

そこで、これまでの経験から、定量断片候補を減らずノウハウの確立を試みた。トリプシン消化ペプチドは、LC-MS 分析のイオン化時に、プロトンが 2 つ付加した 2 価イオンと、プロトンが 3 つ付加した 3 価イオンが生成することが知られている。前述の「1-2 定量ペプチド候補を減らず技術の開発」で作成した予測モデルとその検証結果から、主に 2 価イオンが生成し、側鎖にポジティブチャージがあるアミノ酸を持つペプチドで、3 価イオンが主に生成する傾向があることが明らかとなった。そこで、これまでは全ペプチドで 2 価イオンと 3 価イオンを候補に加えていたが、このノウハウをもとに、特定の条件でのみ 3 価イオンを候補とするルールを作成した。さらに、定量断片についても、b シリーズと呼ばれるタイプの定量断片がある特定の条件で高頻度に生成することに注目し、特定の条件でのみ b シリーズの断片を候補とするルールを作成した。これらのノウハウを組み合わせると、定量断片候補を 40% 程度削減できた。

1-4. 支援プログラムの作成

「1-2 定量ペプチド候補を減らず技術の開発」と「1-3 定量断片候補を減らず技術の開発」を組み合わせると 1 定量対象タンパク質の MRM アッセイメソッドを作成するために必要な時間を 1.5h 以下にすることが可能になった。さらに、作成した技術・ノウハウを集約した支援プログラムを作成して作業効率を向上させ、目標値である 20 タンパク質/日の作成効率を可能とした。

2. MRM アッセイメソッド構築

2-1. MRM アッセイメソッド構築

これまでに、神戸大拠点と連携し、大腸菌中心代謝、アミノ酸、核酸代謝に関わる酵素タンパク質 203 種の MRM アッセイメソッドを構築した。さらに「糸状菌を用いた有用タンパク質同時生産制御による有効性検証に関する実用化」グループと連携して、ターゲットタンパクの MRM アッセイメソッド構築を完了させ、「 ω -3 系多価不飽和脂肪酸含有油脂の生産性向上による有効性検証に関する実用化」グループと連携して油性酵母の MRM アッセイメソッド構築を進めている。

2-2. MRM アッセイメソッドデータベースの構築

いったん作成した MRM アッセイメソッドは、トリプル四重極質量分析装置のメーカー、機種に依存せず利用可能なことが知られている。また、非常に多数の MRM アッセイメソッドを作成しているため、データの管理、閲覧、改訂履歴の確認、活用の手間が煩瑣となった。そこで、サー

バークライアント形式の MRM アッセイメソッドデータベースを構築し、ウェブブラウザを用いて MRM アッセイメソッドデータベースの閲覧、データ改訂を可能とした。これまで本研究及び、他プロジェクトで作成した、大腸菌、枯草菌、シアノバクテリア等の MRM アッセイメソッドを収集したデータベースを構築した（図 2.3.1.3-2）。

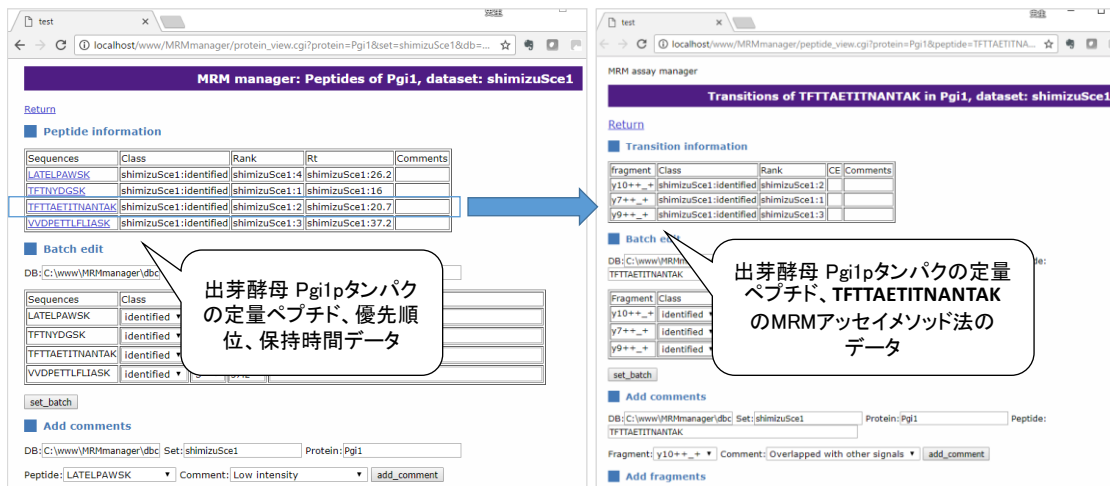


図 2.3.1.3-2 MRM アッセイメソッドデータベース

4. 試料調整法の効率化

4-1. 試料調整法のノウハウ化

ターゲットプロテオミクス法で用いる前処理法（タンパク質抽出、定量、還元アルキル化、トリプシン消化、脱塩）について、本課題の実施を通じて得た知見をノウハウ化し文書化した。これを連携研究機関と共有開始し、また、前処理法の技術移転のための講習を実施した（図 2.3.1.3-4）。

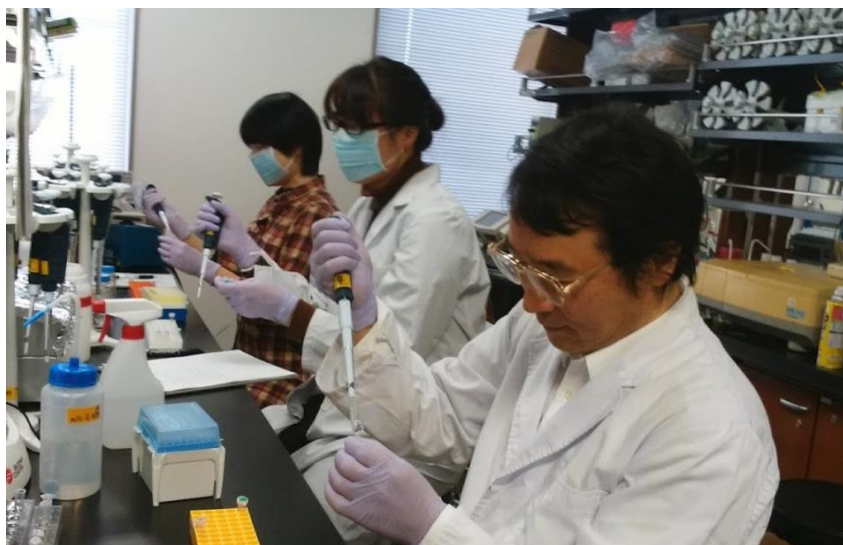


図 2.3.1.3-4 前処理法の技術移転のための講習（2017.12.20@大阪大学）

(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	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	1	0	0	0	0	0	0
2018 *1	0 (0)	0 (0)	0 (1)	〇〇 (〇〇)	〇〇 (〇〇)	〇〇 (〇〇)	1 (0)
2020 *2	3	0	3	0	0	0	1

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	1	0	0

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.1.4 ハイスループット長鎖 DNA 合成技術の開発

担当機関：神戸大学、日本テクノサービス株式会社、プレシジョン・システム・サイエンス、慶應義塾大学

(1) 背景と目的

近年の合成生物学の進展に伴い、長鎖 DNA に対する需要が高まっている。例えば、新規の代謝経路を構築するためには多数の遺伝子を導入する必要があるが、これらの遺伝子を一括して導入可能な長鎖 DNA は、生産株の開発期間短縮のために必須である。また、「スマートセル設計システム」の出力として、超高速に実物の長鎖 DNA に変換する技術を開発することは、目的の微生物を短時間に構築することを実現するのに重要である。しかしながら、世界的にみても、10kb を超える長鎖 DNA の合成を引き受ける受託合成会社は多くなく、しかも合成に 1～2 か月かかる場合もあり、さらに価格も 1 塩基当たり 20 円という高価格がネックとなりなかなか長鎖 DNA を気軽に試せる状況ではなかった。

神戸大学の有する、第二世代 OGAB 法と呼ぶ枯草菌のプラスミド形質転換系を利用した高効率な長鎖 DNA 合成技術は、世界最多となる 50 個以上の DNA 断片を一度に連結可能で、これにより長鎖 DNA を構築することが可能となった。しかしながら 50 個以上の長鎖 DNA の材料を準備することは、一部の合成困難な DNA の合成を受託会社が受注しなかったり、あるいは、人手で大量のサンプルを短期間に取り扱うことは困難であり、30kb 超の長鎖 DNA の合成に 2 か月以上の時間を要していて、より短期間に、低コストで、ハイスループットに長鎖 DNA を合成する方法が望まれていた。

(2) 位置づけ、目標値

<目的>

「スマートセルモデル」を具現化する「スマートセル設計システム」によりデザインされる配列を、超高速に実物の長鎖 DNA に変換する技術を開発することにより、目的の微生物を短時間に構築することを実現する。

中間目標値 (H30)

新規 DNA 化学合成機の開発と遺伝子集積のハイスループット化により、OGAB 法による 30 kb 超の長鎖 DNA 合成時間を従来の 2 ヶ月から 1/2 程度に短縮する技術を確立する。

最終目標値 (H32)

新規 DNA 化学合成機の開発と遺伝子集積のハイスループット化により、OGAB 法による 30 kb 超の長鎖 DNA 合成時間を従来の 2 ヶ月から 10 日程度に短縮する技術を確立する。

<達成手段>

- ・ 新規 DNA 化学合成装置を開発し、20 時間以内に 200 塩基以上の化学合成 DNA を材料コスト 3 円以下/塩基で 96 種類同時合成可能な DNA 化学合成システムを構築する。

- 液体分注ロボットを用いて OGAB 法による長鎖 DNA の一回に合成に必要な 48 個のプラスミドのセットを 4 日程度で行う手法を構築する。
- OGAB 法において必要な 48 断片以上の DNA 断片を、新規磁性ビーズおよび反応プロトコルの改良を行いハイスルーブットに自動回収する技術を確認する。
- 100kbp 以上の酵母染色体の再構成を題材に、合成した長鎖 DNA の有用性を実証する

(3) 全体計画

事業項目	28年度				29年度				30年度				31年度	32年度
	第1四半期	第2四半期	第3四半期	第4四半期	第1四半期	第2四半期	第3四半期	第4四半期	第1四半期	第2四半期	第3四半期	第4四半期		
(1)-4. ハイスルーブット長鎖 DNA 合成技術の開発														
(1)-4-1. ハイスルーブット DNA 化学合成技術の開発	現行機種 <small>の</small> 24本同時合成機への改良				96サンプル同時合成可能な試作2号機の作成				96wellフォーマットに対応した試作3号機開発				プログラム改良によるコストダウン	
					分注機型送液機構の開発				量産試作					
	化学合成 DNA アセンブル法開発				ハイスルーブットプラスミド構築法の				統合プラスミド自動構築システムの開発				課題抽出によるさらなるハイスルーブット	
(1)-4-2. プラスミド自動構築技術の開発					ハイスルーブット高純度プラスミド精									
					変異 DNA 校正法開発か開									
	レセプター分子の設計				レセプター結合磁性粒子調製法開発				DNA断片除去プロトコル自動化				磁性粒子および反応プロトコル改良	
(1)-4-3. 磁性ビーズを用いた配列特異的 DNA 断片除去法の開発														
	OGAB法によるドミノクローンの構築と連結				ドミノ法による酵母染色体再構成				酵母染色体スワッピング検証					

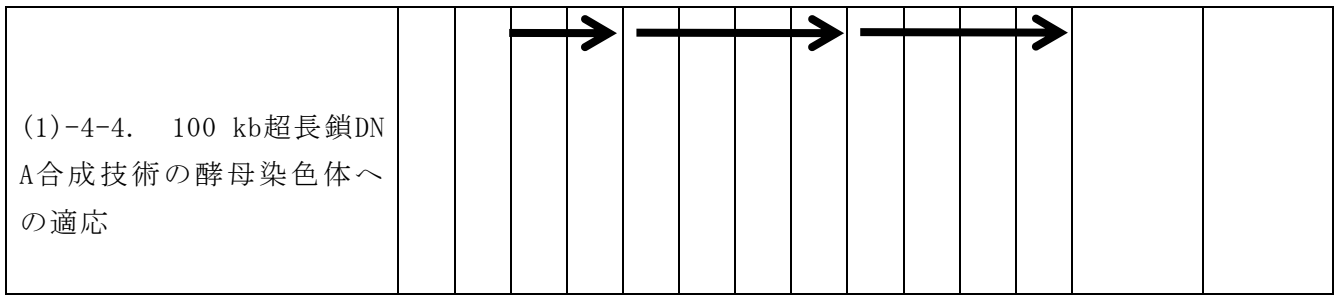


図 2.3.1.4-1 全体計画線図

(4) 実施体制

神戸大学が全体の調整を図りながら、長鎖 DNA 合成の上流から、日本テクノサービス、神戸大学、プレジジョン・システム・サイエンス、慶應義塾大学の順で連携して行っている（図 2.3.1.4.2）。

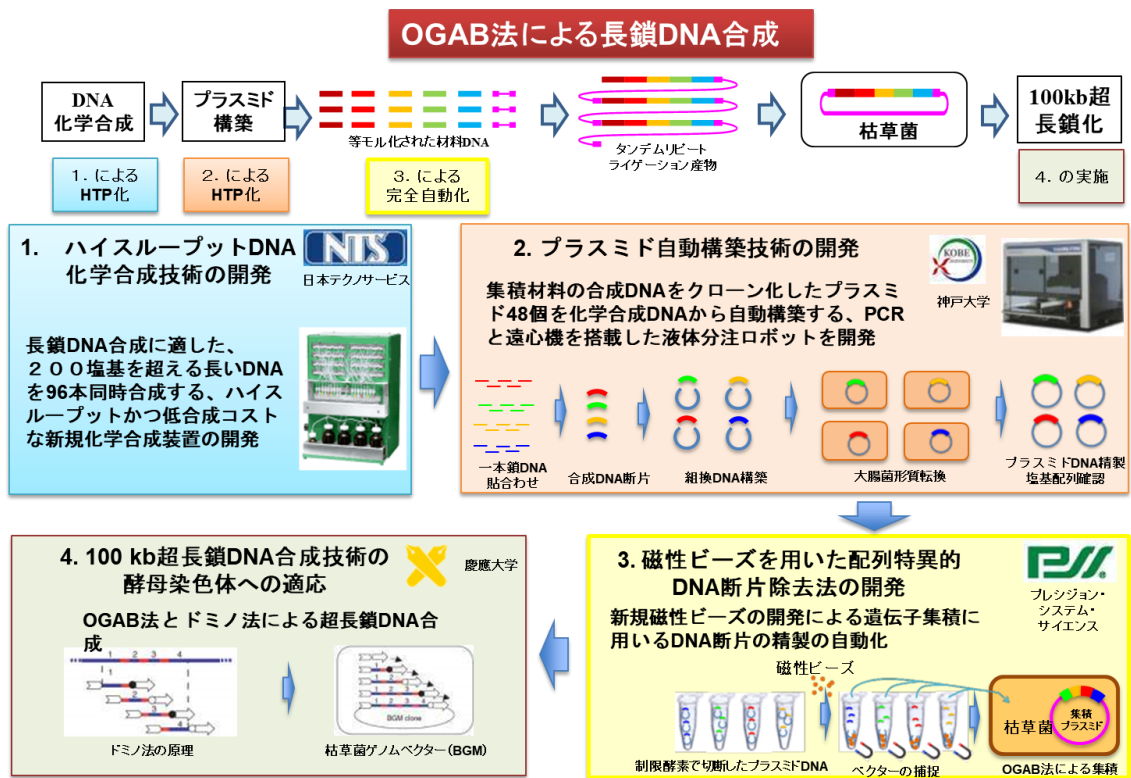


図 2.3.1.4-2 実施体制図

(5) 運営管理

神戸大学を拠点として、3か月に1回程度の会議を開催している。また、半年に一度全体会議開催などの際にも会議を行い、月に1回程度の高い頻度で連絡を取り合っている。

(6) 実施の効果

2017年度の世界の5 kb以上のDNA合成の市場規模は、24百万US\$（26億円）であり、この5年間に約1.7倍の勢いで成長している。仮に2030年の世界市場の長鎖DNA合成市場の規模が

今までと同じ成長率で進んだ場合、100 億円程度になる予想である。このうちの 20%の市場を確保できるのであるとすれば 20 億円となり、本研究開発の対費用効果は大きい。さらに、合成された長鎖 DNA を用いたスマートセルインダストリーによる、CO2 削減、省エネルギー化を含めた波及効果は計り知れない。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
ハイスループット DNA 化学合成技術の開発 (日本テクノサービス)	20 時間以内に 200 塩基までの化学合成 DNA を、材料コスト約 3 円/塩基で 96 種類同時合成可能な試作 3 号機を製作する。	20 時間以内に 200 塩基までの化学合成 DNA を、材料コスト約 3 円/塩基で 96 種類同時合成可能な試作 3 号機を製作する。	△目標時間、コストを達成する送液プログラムは構築済。現在装置製作中にて 2018 年 7 月中完成予定。	さらなるコストダウン、合成精度上昇(変異率減少)の為の送液プログラムを構築する。
プラスミド自動構築技術の開発 (神戸大学)	36 kb の長鎖 DNA の合成に必要な 48 個のプラスミド DNA の構築し、高純度にプラスミドを精製する工程を、4 日程度で行う、統合プラスミド自動構築システムを構築する。	液体分注ロボットのプログラム策背により 16 サンプル×3回の分割により 48 個のプラスミド構築を達成した。	◎ (既に達成している)	さらなるハイスループット化、試薬の低コスト化を目指す。
磁性ビーズを用いた配列特異的 DNA 断片除去法の開発 (プレシジョン・システム・サイエンス)	ベクターDNA とレセプター固定化磁性粒子が特異的に結合する反応条件を見出し最適化する。	複数種のターゲット (オリゴ DNA、PCR 産物、pUC19 ベクター) を用いて、磁性粒子による配列特異的回収試験を実施し、長いターゲットに対しての条件検討がまだ必要であるこ	△ (現手法ではない配列特異的回収試験も平行して実施していること、方法論が確立できればシステムはできているため、H30 年度中には目標を達成できる見込み)	回収法の条件見直しと、方法の変更により課題を達成する。

		とを見出した。		
100 kb 超長鎖 DNA 合成技術の酵母染色体への適応 (慶應義塾大学)	100kbp 以上の酵母染色体を枯草菌ゲノムから切り出し、酵母に導入することにより目的とする野生型の酵母 III 番染色体との間でスワッピングが可能であることを実証する。	酵母 III 番染色体を完全にカバーするドミノを設計し完全にカバーするドミノセットを得た。現在ドミノ法で枯草菌に組み込み中である。50 kb の領域を大腸菌から酵母へ接合伝達法で導入できた。	○ (2019年3月達成予定)	100kb 以上の酵母染色体が構築でき次第、酵母に接合伝達により導入し、染色体分断後、スワッピングを試みる。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2022年度末)	達成見通し
ハイスループット DNA 化学合成技術の開発 (日本テクノサービス)	20 時間以内に 200 塩基の化学合成 DNA を材料コスト約 3 円/塩基で 96 種類同時合成可能な DNA 化学合成システムを構築。	20 時間以内に 200 塩基以上の化学合成 DNA を材料コスト 3 円以下/塩基で 96 種類同時合成可能な DNA 化学合成システムを構築する。	おおむね達成しており、さらなるコストダウン、合成精度上昇(変異率減少)の為の送液プログラムを構築する。
プラスミド自動構築技術の開発 (神戸大学)	36 kb の長鎖 DNA の合成に必要な 48 個のプラスミド DNA の構築し、高純度にプラスミドを精製する工程を、4 日程度で行う、統合プラスミド自動構築システムを構築する。	36 kb の長鎖 DNA の合成に必要な 96 個のプラスミド DNA の構築し、高純度にプラスミドを精製する工程を、4 日程度で行う、統合プラスミド自動構築システムを構築する。	達成する見込み
磁性ビーズを用いた配列特異的 DNA 断片除去法の開発 (プレジジョン・シ	オリゴ DNA をターゲットにした配列特異的回収法は開発できたが、ベクターを	磁性ビーズおよび反応プロトコルの改良を行い、48 断片以上のベクター-DNA 断片を	方法の開発にかなり時間を要すると思われるが、体制の変更もを行い、達成する見

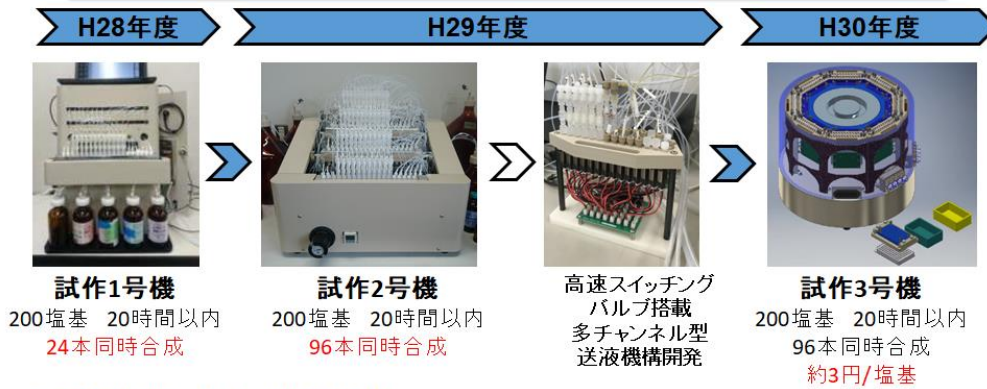
ステム・サイエンス)	ターゲットとした場合は非特異的に磁性ビーズがベクターおよびインサートに吸着してしまうため条件の見直しが必要となっている。	ハイスループットに自動回収する技術を完成させる。	込み
100 kb 超長鎖DNA合成技術の酵母染色体への適応 (慶應義塾大学)	酵母 III 番染色体を完全にカバーするドミノを設計し完全にカバーするドミノセットを得た。現在ドミノ法で枯草菌に組み込み中である。50 kb の領域を大腸菌から酵母へ接合伝達法で導入できた。	100kbp 以上の酵母染色体を枯草菌ゲノムから切り出し、酵母に導入することにより目的とする野生型の酵母 III 番染色体との間でスワッピングが可能であることを実証する。	達成する見込み

(9) 研究開発の成果と意義

1. ハイスループット DNA 化学合成技術の開発 (日本テクノサービス)

平成28年度に開発した24本型試作1号機を基に、96本同時合成可能な試作2号機の開発を行った。試作2号機では、200塩基の比較的長いDNAを20時間以内に合成することが可能であるが、合成のコストが8.2円/塩基と目標よりも高く、また、合成されたDNAの正確性に問題がある場合もあった。そこで、試作3号機用に、低コスト化に向けて、高速スイッチングバルブにて微量送液制御が可能な多チャンネル型送液機構の試作開発を行った。その結果、合成されたDNAの変異出現率が、0.2% (500塩基に1塩基) に減少し、十分に実用的なレベルの合成が可能となった。これにより従来外注していたDNA配列を内製で調達することが可能となった。

DNA化学合成装置試作機開発の進捗



● 合成時間、合成コストの推移

実施年度		H28年度	H29年度	H30年度		
実施装置	現行機	試作1号機	試作2号機	試作3.1号機	試作3.2号機 (現在)	試作3.3号機 (目標)
同時合成本数	8本	24本	96本	96本	96本	96本
合成時間(200塩基)	約42h	約19h	約19h	約19h	約25h	約25h
合成コスト(円/塩基)	42円	16.8円	8.2円	2.8円	7.8円	3円
			変異率の検証	1.70%	0.20%	0.1%

目標コスト達成かつ変異率が少ない合成DNAの実現に向けた合成方法を開発する。

図 2.3.1.4-3 DNA化学合成装置試作機開発の進捗

2. プラスミド自動構築装置の開発 (神戸大学)

多段階PCRを用いた新規二本鎖DNA合成法の開発

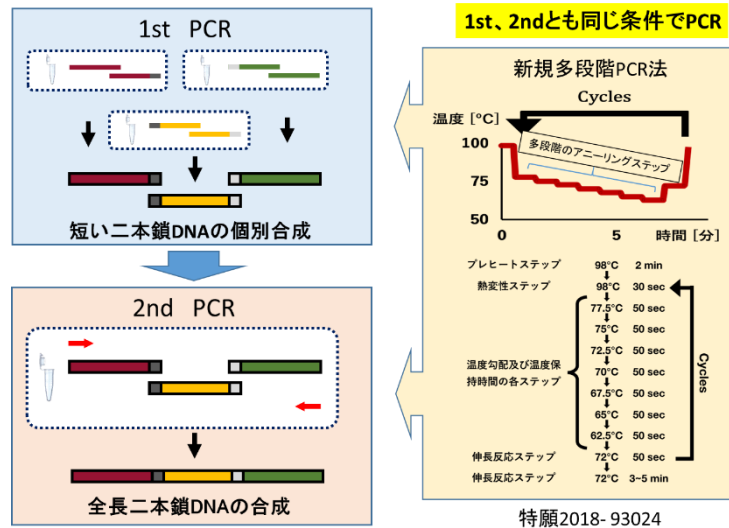


図 2.3.1.4-4 新規二本鎖DNA合成法

液体分注ロボットを用いて化学合成 DNA を自動的にアセンブルするシステムを開発した。本システムでは、まず、1つの OGAB ブロック (750~1,000 bp) を構築する6本の DNA を図 2.3.1.4.4 のように隣り合う2本の DNA を3個に分けて、それぞれを PCR により伸長し (第一段階)、その後、その3つの溶液と両末端に設計したプライマーの1つの容器に統

合後、オーバーラップエクステンション PCR を行う（第二段階）ことで目的とする DNA 断片を調達する 2 段階 PCR 法である。どちらの PCR の反応条件も同じであるが、特に、PCR のアニーリングのステップが多段化になっていることを大きな特徴としている。

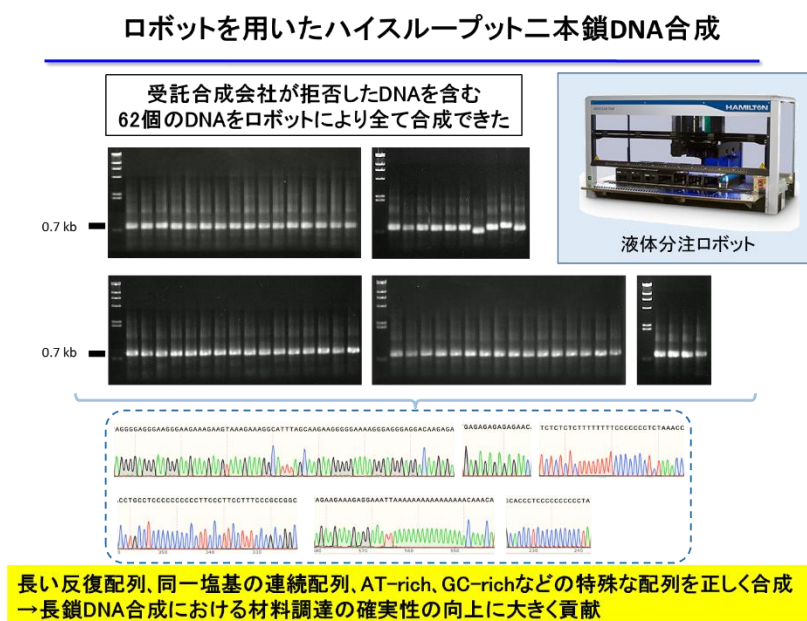


図 2.3.1.4-5 ロボットによる二本鎖 DNA 合成

本システムにより図 2.3.1.4-5 に示すように DNA 受託合成会社から合成を拒否された難易度の高い DNA 61 個を同時合成したところ、全ての DNA が問題なく合成することに成功した。ここで得られた二本鎖 DNA を大腸菌のプラスミドベクターに連結し、形質転換するプロセス、及び、得られた形質転換体からハイスループットに高純度のプラスミド DNA を精製するプロセスも同じ液体分注ロボットにより構築した。これにより 48 個のプラスミドを同時構築し、96 個のプラスミドを同時精製するハイスループットシステムを完成した。また、化学合成 DNA に由来する変異導入率を 1/10 程度に減少する変異 DNA 校正方法を確立した。参画研究機関からの要請のあった多数の長鎖 DNA を構築した。

3. 磁性ビーズを用いた配列特異的 DNA 断片除去法の開発（プレジジョン・システム・サイエンス）

レセプター分子を磁性粒子に固定化する方法として SA 磁性粒子を使用した方法を検討し、ベクター DNA とレセプター固定化磁性粒子が配列特異的に結合する反応条件を検討した。プラスミド DNA のベクター配列を配列特異的にキャプチャーして除去する方法として、光クロスリンク能を有する光応答性人工ヌクレオチドを利用した。光応答性人工ヌクレオチドは、CNVK をオリゴヌクレオチドに組み込んだ場合、366nm の光照射により、相補鎖のチミン塩基、シトシン塩基と共有結合での架橋が誘導され、強固な結合となる。この光応答性人工ヌクレオチドをベクター配列キャプチャー用 Probe として利用し、キャプチャー用 Probe に付加したラベルを介して磁性ビーズによるベクターの回収を試みた。

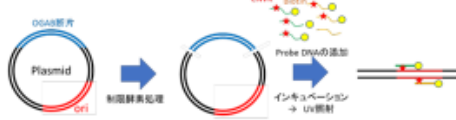
光応答性人口ヌクレオシドとのハイブリダイゼーション

制限酵素処理したベクター配列とCNVK組み込みBiotinラベルProbeを95°Cで5分、60°Cで1分間反応

Probe-1: 3'-CT^XAGTTCTCGCTATCAATG-Biotin-5'
 Probe-2: 3'-GXATCTCTTGTGTCATAAACCAT-Biotin-5'
 Probe-3: 3'-CX^TTCTCGCTCCATACATCCG-Biotin-5'

光照射による固定

クロスリンカーで365nmを1分間照射



磁性ビーズによる回収

20mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 2M NaCl (pH8.0)で洗浄した磁性ビーズ (Streptavidin beads) とProbe架橋ベクターを反応させ、磁石で磁性ビーズを分離することでベクターを回収

上清を電気泳動法で解析

図 2.3.1.4-6 配列特異的 DNA 断片回収法の概要

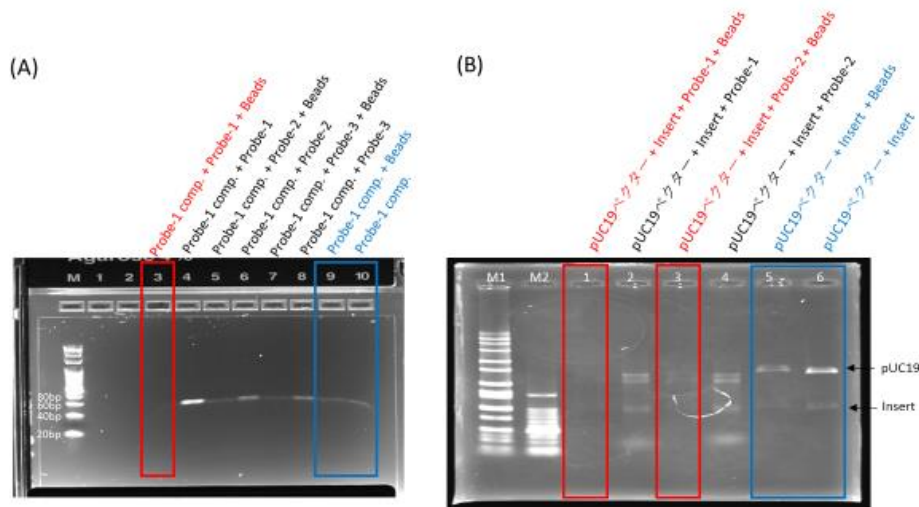


図 2.3.1.4-7 配列特異的 DNA 回収の結果

Probe 1 と完全相補な配列である合成オリゴヌクレオシド (Probe-1 comp) に対し、CNVK 組み込み Biotin ラベル各 Probe を反応させ回収試験を実施した (図 2.3.1.4-7 A)。結果、磁性ビーズ分離後の上清に合成オリゴヌクレオシドが含まれていなかったのは、完全相補な配列である Probe 1 のみであった。また、Biotin ラベルされていない Probe-1 comp は、磁性ビーズ分離後の上清に Probe-1 comp が存在し、磁性ビーズによる配列特異的な回収が示された。

OGAB ブロックの回収評価として、制限酵素で処理した pUC19 ベクターおよび Insert に対し、CNVK 組み込み Biotin ラベル各 Probe を反応させ回収試験を実施した (図 2.3.1.4-7 B)。結果、Biotin 化ラベルしていない Insert も回収されている様子があり、Beads が非特異的に Insert に吸着していることが示された。

4. 100 kb 超長鎖 DNA 合成技術の酵母染色体への適応

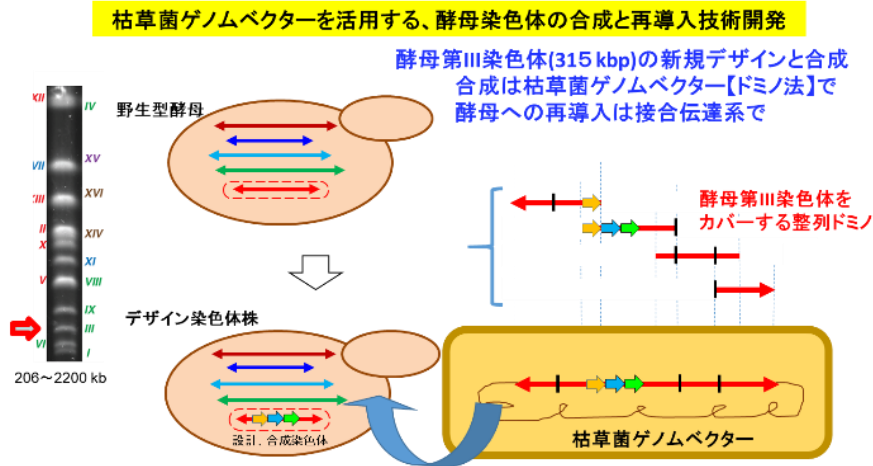


図 2.3.1.4-8 枯草菌による酵母染色体の合成と導入

酵母第 III 染色体全長 (315 kb) をカバーするドミノが必要である (図 2.3.1.4-8)。必要なドミノを再設計し、Long PCR 法により全ての染色体領域をカバーする 22 個のドミノクローンの構築に成功した (図 2.3.1.4-9)。枯草菌へのドミノ法による組み込みにより、最大で 80 kb の連続した領域の構築に成功した。現在、鋭意組み込みを継続中である。特に cenIII 配列を含む 50 kb のクローンを大腸菌の接合伝達プラスミドに連結し、サッカロ酵母に接合伝達法での導入に成功した。

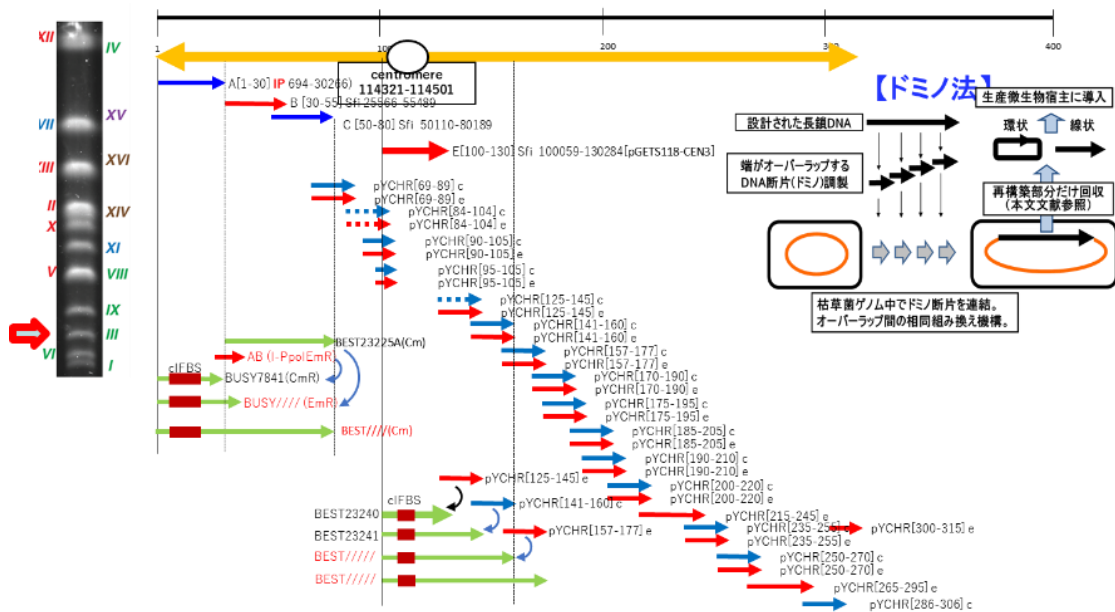


図 2.3.1.4-9 酵母 III 番染色体のドミノクローンの準備状況

(10) 成果の普及

日本テクノサービス株式会社：2018年度内、開発機構を搭載した装置を製品化。プレスリリースを予定している。

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	
2016	0	0	1	1	0	1	0
2017	0	0	0	0	1	0	0
2018 *1	0 (2)	1 (1)	0 (4)	0 (2)	0 (2)	3 (3)	0 (0)
2020 *2	5	2	11	4	4	4	0

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	1 (1)	0 (1)	0 (0)
2020 *2	0	0	2

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

日本テクノサービス株式会社：30年度(2018)試作3号機にて、送液機構に基づく送液プログラムについてノウハウ化を検討している。

2.3.1.5 ハイスループット微生物構築・評価技術の開発

担当機関：神戸大学 千葉大学

(1) 背景と目的

有用物質を高生産する微生物開発のための従来の方法では、①論文等の生物学的知見に基づく改変ターゲット（酵素、タンパク質、代謝経路）の設定、②ターゲット遺伝子の構築、③形質転換による菌株の作出、④生産性の評価、というスキームをトライ&エラーで行い、このスキームを何十回・何百回と繰り返すため、～十数年という長い開発期間を要してきた。しかしながら、激化する微生物での有用物質生産における世界との競争に打ち勝っていくためには、微生物の育種開発期間を短縮することが一つの重要な課題となっており、Design-Build-Test-Learn (DBTL) サイクルに代表される効率的かつ効果的な微生物ゲノムの設計技術とともにゲノム改変微生物を高速に構築・評価できる技術が必須となりつつある。

本事業では、情報解析技術を利用して有用物質の高生産微生物（スマートセル）を短期間で作出するための技術開発を主たる目的としており、公開データを含む既知情報のみならず、公開情報からは得られないデータをインハウスで独自に取得してモデルに反映することで、導出されるデザインの精度や正答率を向上させていけるかどうか成否の鍵を握る。具体的には、①多様な菌株（DNA形質転換株など）を多数構築し、②生産性評価や高精度オーミクス解析によりモデル高度化に必要なデータを取得し、③取得したデータと情報解析を用いて代謝モデル等を高精度化していくことが重要な課題となる。

そこで本研究開発項目では、モデル高度化に必要な多様なデータを取得していくために、形質転換体を高速に構築してその生産性を評価するためのハイスループットな微生物構築・評価技術を開発する。本項目で開発する基盤技術は、モデル高度化に資するインハウスのデータを多数取得するだけでなく、モデルから導出された設計を反映した改変微生物の構築・評価にも利用できるため、モデルの有効性を検証することにも活用することができる。また、部分的に作業を自動化（オートメーション）するシステムを構築していくことで、膨大な数の形質転換体の構築や評価が可能となるため、モデル高度化に必要なデータを取得していく過程で、高生産微生物開発に有用な発現遺伝子や破壊遺伝子も同時に選定することができる。このように、有用物質の高生産微生物を作出する上でも極めて有効な情報を得ることが可能となることから、研究開発全体を大きく加速して微生物の育種開発期間を大幅に短縮することに繋がることが期待される。

(2) 位置づけ、目標値

従来の微生物育種方法では、数百株程度の菌株を構築して評価するだけでも相当の労力と時間が必要となる。例えば、ケミカル法やエレクトロポレーション法による形質転換が一般的に行われているが、操作の確実性は高いものの処理できる速度や検体数に限りがあり、通常では一度に数株～数十株程度を処理するのが限界である（表 2.3.1.5-1）。一方で、自動分注装置等を用いたオートメーション法による形質転換法を確立できれば、一度に数百～数千程度の形質転換体を作成することが可能となる（表 2.3.1.5-1）。さらに作出された莫大な数の形質転換体について生産性や生育等の性能を評価することが可能となれば、遺伝型との関連性や予測不能な有用因子などの有益な情報を多数得ることができる。

Amyris や Ginkgo Bioworks などの微生物の菌株開発に特化したベンチャーのように自社で利用できるオートメーションシステムをインハウスで構築している企業も複数存在しているが、その技術の詳細やプロトコルについてはノウハウとしてオープンにされていない部分がほとんどである。そのため、厳密な比較は難しいものの、本研究開発項目で開発するハイスループットな微生物構築・評価技術は、情報解析やモデル高度化に必須となる莫大な数の形質転換体や生産性データを独自の観点で選定して取得したり、高生産微生物開発に有用な発現遺伝子や破壊遺伝子を選定するための国産技術として不可欠な技術となりうる。また、本事業内の長鎖 DNA 構築技術や高精度なメタボローム・プロテオーム解析などの基盤技術と組み合わせることで、より独自性の高いデータ取得も可能となってくる。本事業では、様々な標的化合物に対応していく必要があることとコストパフォーマンスを重視して、完全にスキームを固定したフルオートメーションではなく、フレキシブルな対応が可能なセミオートメーション形質転換法とハイスループットな生産性評価が可能な技術を開発することを目標とする。

表 2.3.1.5-1 他技術との比較

	処理速度	検体数	コスト	確実性
ケミカル法	○	△	○	◎
エレクトロポレーション法	△	×	△	○
オートメーション法	◎	◎	○	○

中間目標値(H30)

- ・ 微生物を自動で形質転換するために、自動分注機による 96 穴プレートに対応可能な自動形質転換プログラムを確立する。
- ・ 一度に～数千株の評価が可能な生育もしくは吸光・呈色評価系と、200 サンプル/日程度の分析を可能とするターゲット限定超高速定量分析メソッドを開発する。
- ・ 生産性評価をさらにハイスループット化するために、目的の代謝産物（メタボライト）を特異的に検知して遺伝子発現を引き起こす“メタボライトセンサ”を開発する。

最終目標値 (H32)

情報解析システムを高度化することを目的として、ハイスループット自動形質転換・分析評価法の運用とシステムの改良・拡張を行うことでインハウスのデータを多数取得する。



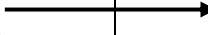

(3) 全体計画

本研究開発項目では、最低でも数百以上の菌株を一度に自動で構築できるハイスループット微生物構築技術を開発する（神戸大学）。微生物を自動で形質転換するための自動分注機のプログラムは一般に公開されていないことから、遺伝子組換え技術が確立されており、宿主微生物としても広く使用されているモデル微生物を開発対象とする。具体的には、大腸菌と出芽酵母を宿主として、96 穴プレートに対応可能なセミオートメーションによる自動形質転換プログラムを確立する。

また、得られた形質転換体を高速かつ大量に評価できるハイスループット生産性評価技術も併せて開発する（神戸大学）。スループットの高い評価系として、一度に数千株以上の評価が可能な生育評価系もしくは吸光・呈色評価系の構築を行う。また、クロマトグラフや質量分析装置による分析系として、200 サンプル/日程度の測定が可能な、標的代謝物を限定したハイスループット分析システムを開発する。

さらに、生産性評価技術のさらなるハイスループット化を目指すため、目的の代謝産物（メタボライト）を特異的に検知して遺伝子発現を引き起こす“メタボライトセンサ”の開発を行う（千葉大学）。これまで開発してきた独自の超高速遺伝子選抜系を駆使して、有価化合物への連結点となる主要前駆体物質に対するセンサを開発することを目指す。

表 2.3.1.5-2 全体計画

事業項目	28年度				29年度				30年度				31年度	32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			
ハイスループット微生物構築・評価技術の開発		簡略化した形質転換プロトコルの開発 			自動分注プログラムと長鎖 DNA 用形質転換プロトコル 				再現性の高い形質転換体培養技術と菌株・データ管理法の 				ハイスループット微生物構築・評価技術の運用によるデータ取得とシステムの改良 		
		生育評価または吸光・呈色評価法の開発 			測定する代謝物のリストアップとターゲットイオン 				ハイスループット分析システムの開発 						
		代謝物センサの試作と機能評価 			代謝物センサの進化工学的改良技術の開 				改良型の代謝物センサの開発 						

(4) 実施体制

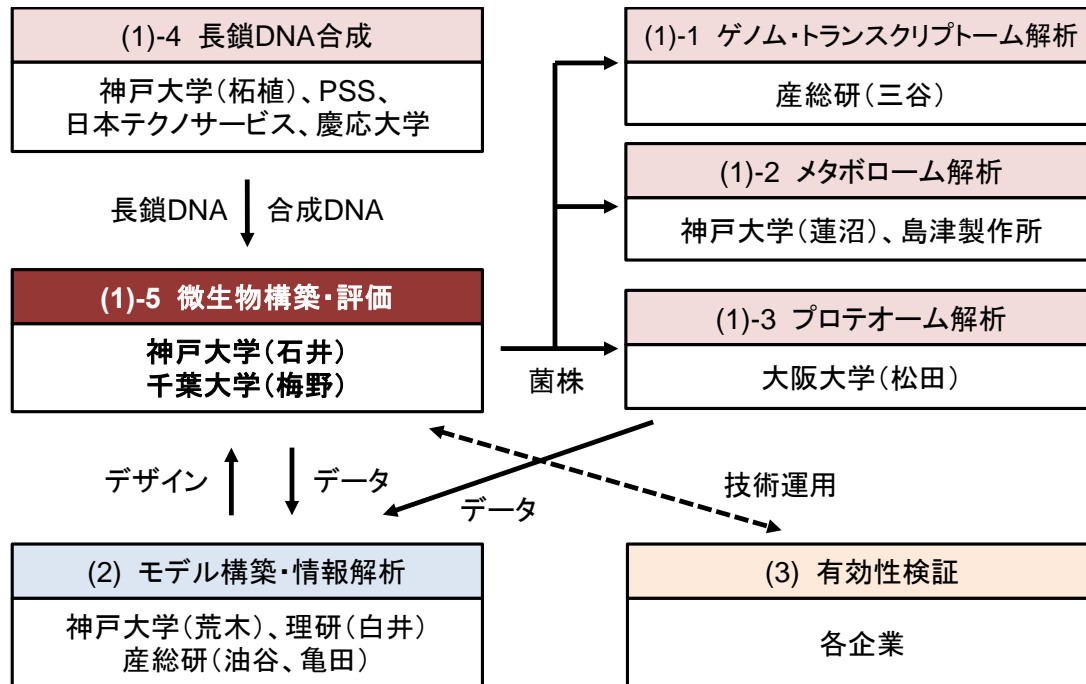


図 2.3.1.5-1 実施体制図

(5) 運営管理

半年に一度程度の頻度で全体会議および拠点会議（神戸拠点）をそれぞれ実施しており、各研究テーマとの連携や互いの要望について議論を行なっている。また、神戸大内部では2-3ヶ月に一度程度の頻度で報告会を実施しており、基盤技術間の連携を議論したり進捗を共有している。研究テーマ内部では随時、進捗確認とミーティングを実施している。また、他機関を含む連携研究機関とも、必要に応じてメールやTV会議も活用しながら、1回/週～1回/2ヶ月程度の頻度で情報交換や進捗確認を行っている。

(6) 実施の効果

本研究開発項目で開発するハイスループットな微生物構築・評価技術は、情報解析やモデル高度化に必須となる莫大な数の形質転換体や生産性データを独自の観点で選定して取得できる国産技術として重要な技術となる。また、長鎖DNA構築技術や高精度なメタボローム・プロテオーム解析などの基盤技術と組み合わせることで本プロジェクト独自のデータを取得していく予定であるが、たとえば数千以上の候補菌株の中からより詳細に解析する特徴的な菌株をハイスループットに選定する上でも必須の技術となる。本技術は、完全にスキームを固定したフルオートメーションではなくセミオートメーションシステムとしているため、コストパフォーマンスが高く、様々な標的化合物に対してフレキシブルな対応が可能な技術となっている。さらに、情報解析やモデル高度化に必要なデータだけでなく、事業化を見据えた菌株開発における有用な発現遺伝子や破壊遺伝子の選定においても膨大な数の形質転換体を評価できる極めて有効な手段となることから、研究開発全体を大きく加速することができる。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
ハイスループット自動形質転換技術の開発 (神戸大学)	微生物を自動で形質転換するために、自動分注機による96穴プレートに対応可能な自動形質転換プログラムを確立する。	自動分注機による96穴プレートに対応可能な自動形質転換プログラムを確立し、微生物をセミオートメーションで形質転換できる技術を開発した。	◎ (前倒しで目標を達成したため、大幅達成と評価)	ハイスループット自動形質転換技術の運用によるデータ取得とシステムの改良・拡張
ハイスループット評価技術の開発 (神戸大学)	一度に～数千株の評価が可能な生育もしくは吸光・呈色評価系と、200サンプル/日程度の分析を可能とするターゲット限定超高速定量分析メソッドを開発する。	一度に～数千株の評価が可能な吸光・呈色評価系および96穴ベースでの生育評価系と、100～200サンプル/日の分析が可能な標的代謝物を限定したハイスループット分析メソッドを開発した。	○ (2019年1月達成予定)	ハイスループット評価技術の運用によるデータ取得と、新たな標的化合物に対するメソッド拡張・改良
メタボライトセンサの開発 (千葉大学)	生産性評価をさらにハイスループット化するために、目的の代謝産物(メタボライト)を特異的に検知して遺伝子発現を引き起こす“メタボライトセンサ”を開発する。	目的の代謝産物(メタボライト)を特異的に検知して遺伝子発現を引き起こすことで生産性評価をさらにハイスループット化することが可能な“メタボライトセンサ”を開発した。	○ (2019年1月達成予定)	メタボライトセンサの運用によるデータ取得と、新たな標的化合物に対するセンサの拡張・改良

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
ハイスループット微生物構築・評価技術の開発	ハイスループット自動形質転換とメタボライトセンサを含む分析評価の基盤となる技術を確立し、これらの運用が可能な体制を整えつつある。	情報解析システムを高度化することを目指すとして、ハイスループット自動形質転換・分析評価法の運用とシステムの改良・拡張を行うことでインハウスのデータを多数取得する。	ハイスループット自動形質転換とメタボライトセンサを含む分析評価の基盤となる技術を確立しており、これらの本格運用を開始することでインハウスのデータ取得を行うとともに、システムを改良・拡張するためのノウハウを蓄積できる見込み。

(9) 研究開発の成果と意義

本委託事業では、情報解析やモデル高度化に必須となる莫大な数の形質転換体や生産性データを取得することのできるハイスループット微生物構築・評価のための基盤技術を確立することを目的として、1.ハイスループット自動形質転換技術の開発、2.ハイスループット評価技術の開発、3.メタボライトセンサの開発に取り組んだ。以下に研究開発の詳細を記す。

1. ハイスループット自動形質転換技術の開発（神戸大学）

情報解析やモデル高度化には莫大な数の形質転換体を評価してデータを取得することが重要である。また、事業化を見据えた菌株開発においては、膨大な数の形質転換体を作成・評価して有用な発現遺伝子や破壊遺伝子を選抜することも極めて重要な開発要素となる。そこで、本委託事業では最低でも数百以上の菌株を一度に自動で構築できるハイスループット微生物構築技術を開発することを目指した。微生物を自動で形質転換するための自動分注機のプログラムは一般に公開されていないため、遺伝子組換え技術が確立されており、宿主微生物としても広く使用されている大腸菌と出芽酵母を宿主として、96穴プレートに対応可能なセミオートメーションによる自動形質転換プログラムを確立することを目標とした。

セミオートメーションによる自動形質転換プログラムを確立するために、図 2.3.1.5-1 に示す自動分注装置（EDR-384 SX：バイオテック社）を使用した。出芽酵母と大腸菌において、それぞれケミカルコンピテントセル調製法を改変した形質転換方法を開発し、96穴フォーマットで形質転換体を取得可能なセミオートメーションによる自動分注プログラムを構築した（図 2.3.1.5-2）。

これらのハイスループット自動形質転換のためのセミオートメーションによる基盤技術を確立したことにより、一度に数百～数千以上の酵母・大腸菌の形質転換体を作成することが可能となり、情報解析やモデル高度化に必要な膨大な数の形質転換体を準備できる体制が整った。

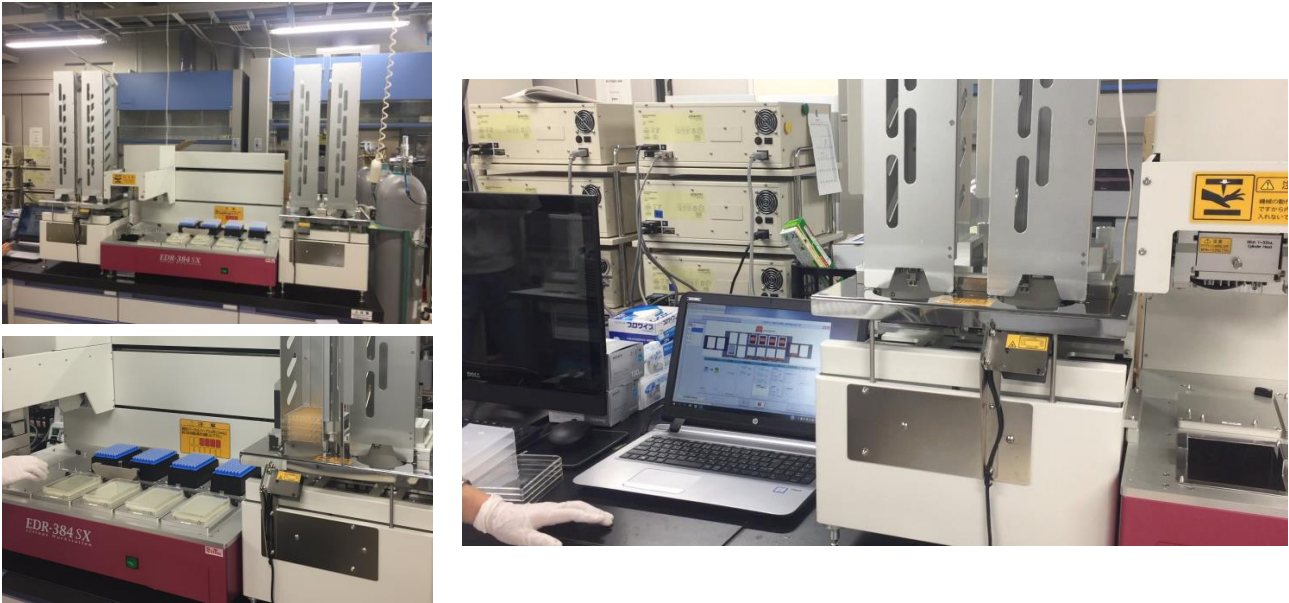


図 2.3.1.5-1 セミオートメーションによる自動形質転換プログラム構築に用いた自動分注装置

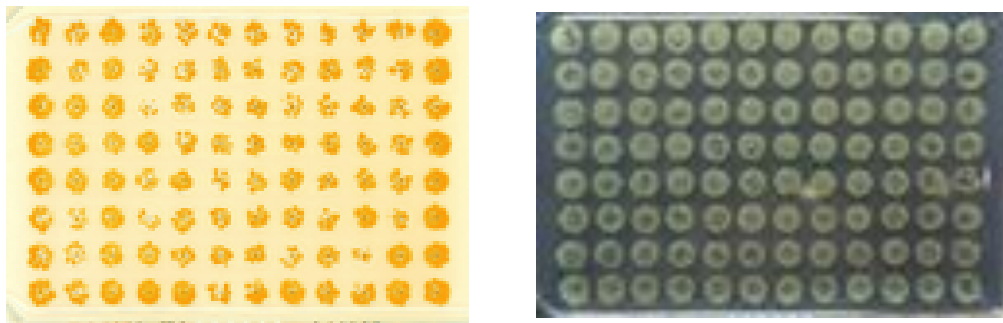


図 2.3.1.5-2 自動形質転換プログラムを用いた 96 穴フォーマットでの酵母（左： β -カロテン生産プラスミド）と大腸菌（右：GFP 発現プラスミド）の形質転換体の作出

2. ハイスループット評価技術の開発（神戸大学）

上記のハイスループット自動形質転換技術を用いて得られる形質転換体は、一度の作業で数百～数千以上の数になるため、これらを高速かつ大量に評価できるハイスループット生産性評価技術が必要となる。特にスループットの高い系として、付加価値および市場ニーズともに比較的高い化合物としてカロテノイド色素を標的とした評価系を構築することにした。スキャナによる形質転換体の画像取得と画像解析ソフトを利用したカラー値解析により色素生産量を間接的に見積もることのできる呈色評価系を開発し、数千株以上の評価が可能なシステムを構築した（図 2.3.1.5-3）。また、菌体を 96 穴ベースで破碎する方法を検討することで吸光による色素生産量の間接評価系と、同様に 96 穴ベースで生育速度をモニタできる評価系も併せて構築した。さらに、クロマトグラフ/質量分析装置のカラムや分析メソッドを検討して、いくつかの特定の標的代謝物を対象に 100～200 サンプル/日の定量が可能なハイスループット分析メソッドも構築した。

開発したハイスループット評価技術と前述のハイスループット自動形質転換技術を合わせることで、本プロジェクトで標的としている主要な化合物について大量の形質転換体の生産性データを取得できる準備もほぼ整いつつあり、今後のデータ取得に向けて順調に研究が進捗している。

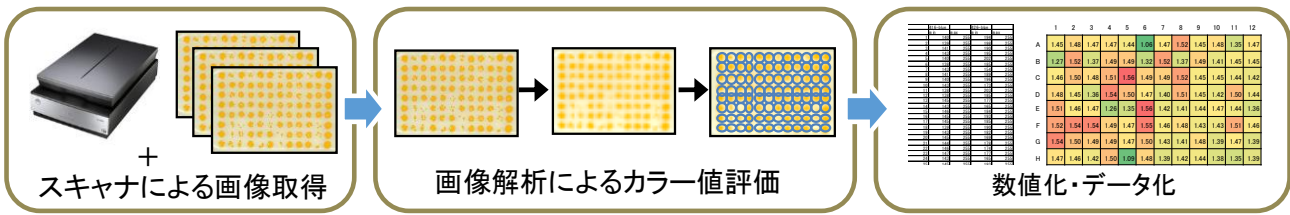


図 2.3.1.5-3 画像解析によるカロテノイド色素生産量の呈色評価系

特許準備中のため秘匿

3. メタボライトセンサの開発（千葉大学）

上述のハイスループット評価技術では、本プロジェクトで事業化を目指す化合物を主な分析対象としており、現時点において直ちに活用することを前提とした現実的な路線でのハイスループット分析手法の開発を進めている。一方で、より汎用性が高く、生産性評価のさらなるハイスループット化が期待できる将来を見据えた技術として、目的の代謝産物を特異的に検知して遺伝子発現を引き起こす“メタボライトセンサ”の開発も並行して進めた。

自然界には、さまざまな代謝物に応答する転写因子が知られている。これらの制御下に GFP やルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入することによって、細胞内部の代謝物濃度を蛍光・発光などの強度として読み出すことができる「バイオセンサ」が構築できる。これらは、代謝工学や微生物育種において不可欠なスクリーニングツールとして非常に重要である。しかし、すべての重要な代謝物についてこのような系が構築できるわけではない。本研究では、この転写因子型バイオセンサの標的代謝物の拡張を実現するために、新規な2つのバイオセンサ構築技術の開発、応用を試みた。

[1] 見るための生合成経路の設計による代謝物センサのラインナップ拡大

多くの代謝物は、それを直接のリガンドとする転写因子を持たないが、その一方で、標的となる分子が幾つかの酵素ステップを踏めば、転写因子の標的分子として知られる化合物に変換できることもある。この酵素変換を実現する「人工経路」さえ敷設してしまえば、天然の転写因子/レポーター遺伝子を用いて、間接的に標的化合物をハイスループット検知・定量できる（図 2.3.1.5-8）

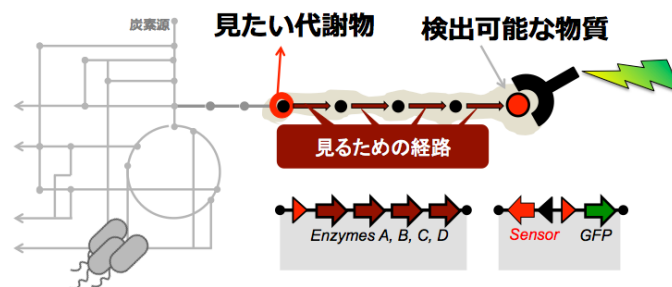


図 2.3.1.5-8 見るための生合成経路の設計による代謝物センサの概念図

世界中で「みることのできる代謝物」のラインナップの拡張が目指されているが、多くのプロジェクトでは、転写因子のリガンド結合ドメインの再構築による、新規センサタンパク質の創出が試みられている。これらの研究は、基本的に天然の標的分子に似た化合物にしか適用できないのみならず、得られたセンサの標的特異性が低いことがしばしば問題となる。これに対して、上記「みるための生合成経路」設計による標的代謝物の拡張では、天然の特異性高いセンサをそのまま使う利点がある。転写因子型センサの標的となることが知られている化合物・代謝物の Comprehensive なリストが整備できれば、M-path をはじめとする経路予測ツールなどを駆使して、蛍光/一細胞モニタリングできる代謝物の数は飛躍的に拡大することができると期待される。

特許準備中のため秘匿

[2] センサの新しい創出原理を用いた代謝物センサの高速開発

多くの代謝物は、それを直接のリガンドとする転写因子を持たないが、代謝物である以上、それに特異的に結合して下流の代謝物に転化する酵素は知られていることが殆どである。もしこれらをセンサの「素子」として流用する普遍的技術が確立できれば、もはや「天然のセンサの不在問題」は解消し、殆ど任意の代謝物を「見える化」（蛍光出力などでハイスループット検出/定量）できるに違いない。再委託先の千葉大学がごく最近開発した技術では、レセプタタンパク質と標的分子との結合を、ほかのタンパク質の機能の有無として読み出すことができる（図 2.3.1.5-11）。

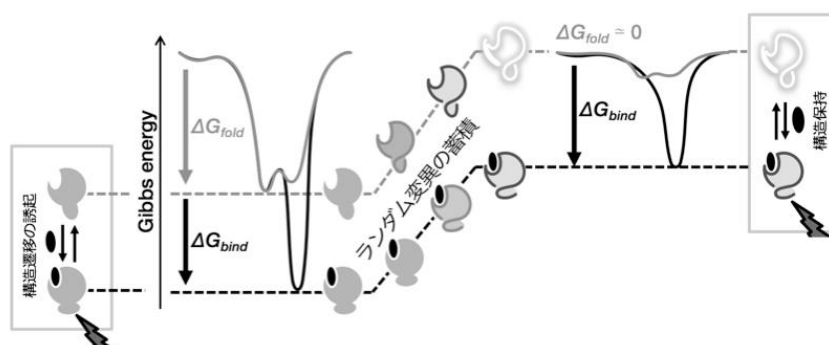


図 2.3.1.5-11 センサの新しい創出原理を用いた代謝物センサの高速開発のイメージ図

この検出原理は、結合による安定化効果の可視化に基づくものであり、酵素と基質の「結合イベント」も読み出せることが期待される。つまり、他の方法では標的化が困難であった代謝物で

も、それを基質とする酵素さえあれば、それを素子とした迅速なセンサの設計・試作が可能となる。そこで、本プロジェクトで事業化を目指す化合物群に対するセンサの加速的供出のため、2018年7月から、約1年間の年限を打って、本技術を転用したメタボライトセンサの開発研究を実施することにした。実際、加速期間をまたずして、幾つかの酵素を素子としたセンサが完成しており、本技術は酵素をもセンサ素子として用いることが可能であることが明らかとなっている。これから、芳香族アミノ酸、そしてイソプレノイド前駆体を直接標的とするセンサの開発を実施してゆく予定である。最終的な目標として、本プロジェクトで事業化を目指す代謝物の前駆体レベルをひとつの出力フォーマット（蛍光など）でハイスループットにスコア化・レポートするバイオセンサの開発とラインナップ化を行い、その増産効果をもたらす遺伝子や変異体、宿主の探索取得を可能とすることである。

(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	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	0	0	0	0	0
2018 *1	0 (1)	0 (0)	0 (2)	0 (0)	0 (2)	1 (1)	0 (0)
2020 *2	4	0	6	1	2	0	0

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	0 (2)	0 (0)	0 (2)
2020 *2	6	1	3

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.1.6 長鎖 DNA、ゲノム合成技術と自動化システムの開発

担当機関：東京大学、Spiber 株式会社

(1) 背景と目的

本研究開発課題では微生物による有用物質生産のために、高リピート配列を含む DNA を高効率かつ安価にアセンブリ・選抜する技術を開発し「高速にデザインされた全ゲノムや遺伝子群を全自動で合成する」システムの開発に貢献する。NEDO プロジェクト「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」における遺伝子合成関連研究開発プロジェクトと連携し、相乗効果的な研究開発成果を挙げるとともにその有用性を実証する。

現在、長鎖 DNA 合成とクローニングは、いずれも短鎖 DNA のアセンブリ反応からはじまる。一方で、アセンブリ反応効率自体が必ずしも高くないために、反応産物から目的産物をクローン化する必要がある。通常はアセンブリ反応産物によって微生物細胞の形質転換を行い、細胞クローンを無作為かつ大量に単離、正しいアセンブリ産物を持つ細胞クローンを同定し、そこから目的の DNA を回収する。しかしながら、長鎖 DNA やリピート配列を含む DNA のアセンブリ効率は必ずしも高くなく、大量の細胞クローンの単離とそれらがもつ DNA の同定を必要とすることが長鎖 DNA 合成におけるボトルネックである。自動化技術においても同様の課題がその拡張性のハードルとなる。本事業では Spiber 株式会社が無細胞系によって高効率に DNA をアセンブリする技術および高リピート配列を高精度でアセンブリする技術を開発し、東京大学が DNA 分子バーコード技術と長鎖 DNA シークエンシング技術によって、大量かつ無作為な細胞クローンの単離と同定を必要とせずに、高効率に目的のアセンブリ反応産物のみをクローニングする技術を開発する。これらの技術群を組み合わせることによって長鎖 DNA 合成技術の底上げを図る。

(2) 位置づけ、目標値

有用微生物ゲノムや人工遺伝子のデザイン、合成とそれらの機能の試験サイクルを素早く繰り返すことで高機能物質生産を行う際、DNA 合成がそのプロセスのボトルネックであってはならない。現時点では特に、全ゲノムレベルの DNA 断片の全自動合成とその並列化技術の開発が喫緊の課題である。人工的に設計された長鎖 DNA を合成するためには、化学合成された DNA 断片のアセンブリとその評価が不可欠である。長鎖 DNA アセンブリ法として有効なものには出芽酵母細胞を用いた Gap Repair Cloning 法や枯草菌を用いた OGAB 法が知られているが、長鎖 DNA アセンブリ及びその自動化をさらに効率化するためには、これらの技術に利用する DNA 断片をある程度の長さにし、安価かつより単純な手法でアセンブルでき、従来技術では困難である高リピート配列を含む DNA 断片も合成可能な技術が必要である。

本研究開発課題では、Spiber 社がさらに高効率・低コストの DNA アセンブリ技術を樹立させる。特に細胞を用いずに酵素反応のみによって 100 程度の化学合成された DNA 断片をアセンブルする技術、高リピート配列を高効率でアセンブルする技術を確立する。また現在の DNA クローニング技術では、アセンブリ反応産物から正しくアセンブルされた DNA 分子を単離するために、これ

らを細胞クローンの形で複数（場合によっては大量に）分取、それぞれを DNA シークエンシングによって評価し、正しくアセンブルされた DNA 分子を含む細胞クローンを同定する必要がある。東京大学は DNA アセンブリをこのようなプロセスから解放するために、DNA アセンブリ反応産物の全ての分子を DNA バーコードで標識し、ナノポアシークエンシングなどの長鎖 DNA シークエンシング技術を利用して夾雑物の含まれるアセンブリ反応産物を DNA バーコードとともに高速に評価することで、目的の DNA バーコード（と目的のアセンブリ反応産物）を保持する細胞クローンを蛍光ラベル化して単離できる手法を開発する。

最終目標（H30 年度）

①無細胞系で高効率且つ安定的に数十断片以上を連結する技術の開発（Spiber 株式会社）
試験管内で高効率且つ安定的に数十断片以上を連結するの汎用性実証試験、改良研究開発を進める。2,000 塩基程度 50 種類以上の DNA について、化学合成された短鎖 DNA オリゴマー（50～100 塩基程度）から無細胞系酵素反応によって高効率な DNA アセンブリが可能であることを実証する。

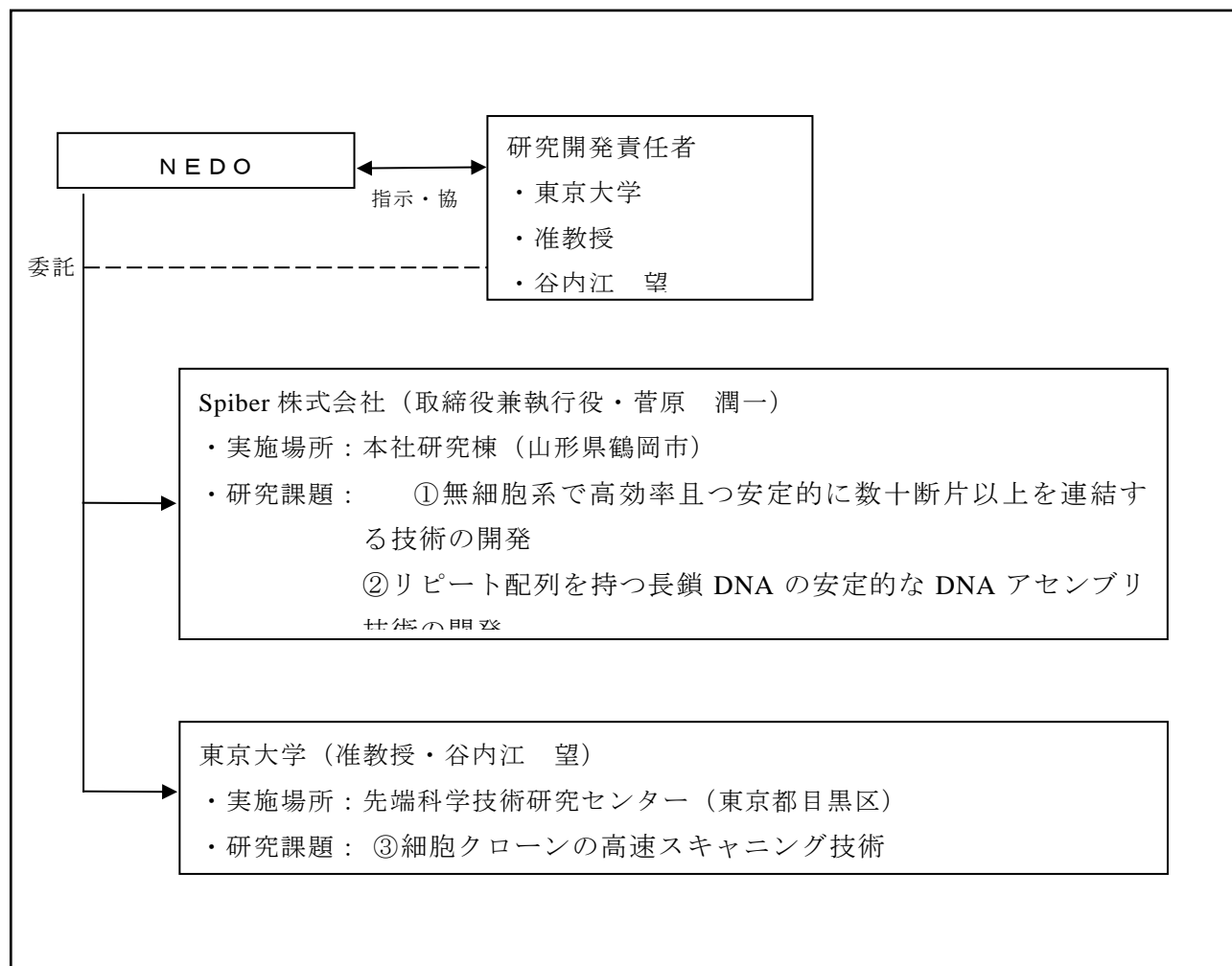
②リピート配列を持つ長鎖 DNA の安定的な DNA アセンブリ技術の開発（Spiber 株式会社）
高リピート配列を含む 10,000 塩基程度の遺伝子について、5 つの DNA 断片の高効率アセンブリ反応を 3 回階層的に繰り返し、計 125 断片のアセンブリによって技術実証を行う。また、プロセス全自動化のために DNA サイズセレクションを必要としない階層的 DNA アセンブリ技術を達成する。

③細胞クローンの高速スキャニング技術（東京大学）
DNA バーコード化されたアセンブリ反応産物 1,000 クローン混合した試料から Clone Select 法 1 回によって任意の DNA バーコードを持つクローンを感度 50%以上、特異度 80%以上で単離する反応系を確立する。これによって、DNA アセンブリ反応後、個別のアセンブリ反応産物クローンの単離とシークエンシングによる評価プロセスを排除し、これを長鎖 DNA シークエンシング法によるアセンブリ反応産物の一斉評価と目的のアセンブリ反応産物に紐付いた DNA バーコードを持つ細胞クローンを単離するというプロセスに切り替えるための基礎技術とする。

(3) 全体計画

研究開発項目	第 1 年度 (H29 年度)		第 2 年度 (H30 年度)	
	前	後	前	後
① 無細胞系で高効率且つ安定的に数十断片以上を連結する技術の開発 (Spiber 株式会社)				→
② リピート配列を持つ長鎖 DNA の安定的な DNA アセンブリ技術の開発 (Spiber 株式会社)				→
③ 細胞クローンの高速スキャニング技術 (東京大学)				→

(4) 実施体制



(5) 運営管理

年 4 回研究進捗報告会を開催することで進捗状況の共有と研究戦略の改訂を行っている。

(6) 実施の効果

1 遺伝子アセンブリの現状コストを合成コスト+評価コスト (500 円/クローン×平均 100 クローン) とした場合、月産 1,000 遺伝子を前提とするパイプラインにおいては、アセンブリの効率化による必要なクローン評価数の低減と超並列クローン評価パイプラインの樹立によって、評価コストを 1/1,000 とすることを期待できる (月 5,000 万円のコスト削減)。

(7)、(8) 最終目標の達成可能性

	研究開発項目	最終目標	現状	達成見通し
①	無細胞で高効率且つ安定的に数十断片以上を連結する技術の開発 (Spiber 株式会社)	2,000 塩基程度 50 種類以上の DNA アセンブリによって技術の汎用性デモンストラーションを達成する。	10 種類の DNA アセンブリについて汎用的にアセンブリ可能な反応条件の最適化が完了した。	50%。アセンブリ反応自体は順調に進んでいるが、10 種類の DNA アセンブリを進め、本手法と既存の PCR 法による最適化を進めるなかで、本手法の進歩性が認められない可能性が出てきた。
②	リピート配列を持つ長鎖 DNA の安定的な DNA アセンブリ技術の開発 (Spiber 株式会社)	高リピート配列を含む 10,000 塩基の遺伝子を 5×5×5 断片の階層的アセンブリによって合成する。	25 種の 5 断片アセンブリが完了し、2 階層目のアセンブリを開始した。	75%。順調にアセンブリ作業が進んでおり、2 階層目のアセンブリまでは完了する見込み。10,000 塩基の DNA 産物を得る 3 階層目のアセンブリはクローニングの観点からも挑戦的なものとなる。
③	細胞クローンの高速スクランニング技術 (東京大学)	1,000 クローン混合試料から任意の DNA バーコードを持つクローンを感度 50%以上、特異度 80%以上で単離する。	哺乳動物で目的の DNA バーコードを単離できることを示し、酵母細胞においても目的の DNA バーコードをもつ細胞を特異的に蛍光ラベリングできることを示した。	90%。哺乳動物細胞における実験においても 100 クローン混合サンプルから目的のクローンを単離することに成功し、酵母での同様の結果が得られる見込みがあるが、複雑性の高い集団から目的の感度と特異度で単離できるかが課題である。

(9) 研究開発の成果と意義

研究開発の成果

①無細胞で高効率且つ安定的に数十断片以上を連結する技術の開発 (Spiber 株式会社)

無細胞系において 80 断片程度の短鎖 DNA をアセンブリすることによって 3,000 塩基程度の大腸菌プラスミド DNA を試験管内で構築できることを示した (図 1)。本研究開発項目ではこれまでに本技術の汎用化を目指し、2,000 塩基程度の DNA アセンブリを 10 例程度実施した。最終目標である 50 例実施の達成については問題がない一方で、反応を最適化する課程において汎用的な観点から本手法が従来の PCR 法を用いた短鎖 DNA アセンブリと比較して進歩性が大きい訳ではない可能性が出てきた。本技術については開発の停止も視野に入れつつさらに検討を進めることとしている。

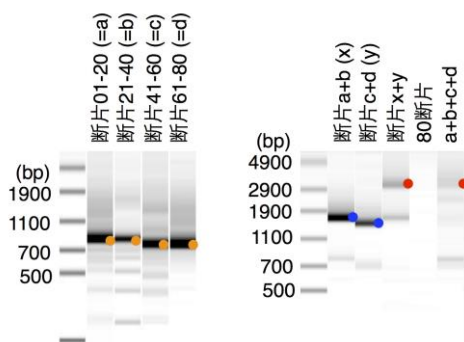


図 1 無細胞系における 80 断片の DNA アセンブリ。a) 20 断片毎にアセンブリしたものを 4 断片得る。b) 得られた 4 断片はさらに PCR 反応によって 2 段階の連結を得て、全て連結される。

②リピート配列を持つ長鎖 DNA の安定的な DNA アセンブリ技術の開発 (Spiber 株式会社)

開発手法によって、計画通り順調に 5 断片のアセンブリ計 25 種類を達成した。さらに 5 断片アセンブリ産物の 2 階層目のアセンブリを実施している。また Golden Gate 法と並列に同アセンブリを実施した結果、Golden Gate 法よりも高効率のリピート配列アセンブリが観察された。

③細胞クローンの高速スクニング技術 (東京大学)

はじめに哺乳動物細胞をもちいた原理証明実験によって、開発中の特定の DNA バーコードを保持する細胞を単離する手法が高い感度と特異性をもった技術であることを示した。約 100 種類の異なる DNA バーコードをレンチウイルスによって HEK293Ta 細胞に導入後、目的の DNA バーコードを保持する細胞クローンを蛍光ラベル化 (EGFP 発現) し、蛍光ラベル化された細胞をフローサイトメトリーセルソーティングによって単離する実験を 16 の DNA バーコードについて繰り返した。その結果、15 回において目的の DNA バーコードが最も濃縮された DNA バーコードとして得られた。さらに出芽酵母においても同様の手法の実装を進めた。3 種類のバーコードを保持する出芽酵母細胞を準備し、特定の DNA バーコードがラベル化される条件化で 3 種類全ての細胞のラベル化を試みた場合、目的の DNA バーコードのみが特異的にラベル化されることを示した。出芽酵母においては、哺乳動物細胞より高い感度と選択性が期待されることから、1000 クローン程度の混合から目的の DNA バーコードを保持する出芽酵母細胞を効率良く単離する技術 (最終目標) が達成できる可能性が高い。

(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	
2017	1	3	7	0	0	0	0
2018 *1	0 (未定)	0 (未定)	10 (未定)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

3件（準備中）

2.3.1.7 細胞の反射光・自家蛍光を用いたハイスループット評価技術の研究開発

担当機関：筑波大学、ニコンインステック

(1) 背景と目的

物質生産性などの代謝変化を一細胞レベルで分析・評価出来る技術を開発することで、革新的ハイスループット一細胞分析・評価システムの基盤構築を行う。これまで、目的物質高生産菌の取得には、育種（形質転換等）を施した形質転換体を単離し96穴プレートなどで培養し、代謝産物を定量分析するため、煩雑な機器（操作）と多くの時間がかかっている。そのためにハイスループットスクリーニング（HTS）が米国を中心に発展してきた。現在、ロボット工学を取り入れたHTS自動化システムが主流になっている。しかし、それらは培養・代謝物解析などの一連の流れを小型化・自動化したにすぎない。つまり、HTSの中からヒットする細胞（およびその細胞が産生する代謝物）を選択するには培養を介さざるをえないのが現状である。

本課題では、目的物質高生産による細胞内の代謝の変化を非破壊で一細胞を評価することを旨とする。よって、培養を介さずあるいは細胞が混合のまま高生産菌を確認することが出来、飛躍的時間短縮のみならず、一細胞で評価が可能となることから、これまでのHTSから次元の異なる革新的次世代ハイスループット評価技術の基盤となることが期待される。

さらに、本事業の成果は、得られた細胞ごとの自家蛍光プロファイルのデータベース化（リファレンスとして利用）につながる。つまり、微生物自家蛍光でデータでデータベース構築のための国際規格策定に資することが期待される。

以上、本課題のゴールイメージは、培養を介さず一細胞レベルで有用株を見出す非破壊評価系を構築することで、革新的次世代ハイスループット細胞評価技術の基盤創製を行うことである。

(2) 位置付け、目標値

自家蛍光パターンを目印として異なる代謝などの性質をもった細胞を見分ける新しい手法「Meta-Spectral Imaging法」（特願2016-249896）を利用して、物質生産性などの代謝変化を一細胞レベルで分析・評価出来る技術を開発することで、革新的ハイスループット一細胞分析・評価システムの基盤構築を行う。細胞内のタンパクや代謝産物は様々な種類・強弱の自家蛍光を発しており、それらを総合した各細胞の自家蛍光パターン（面）が細胞の代謝を表現する“指紋”として機能することを見いだし、よって、一細胞ごとの非破壊評価が可能となる。通常の蛍光イメージングでは、細胞内の様々な物質から発せられる蛍光を分離することができず、これらが混合した光の強弱だけを測定しており、結果として、細胞内の特徴となる蛍光波長のパターンを捉えることが出来なかった。

これに対して、本技術では蛍光を色（波長）ごとに分離することで、個々の物質に由来する蛍光を検出し、さらにその励起波長を少しずつ変えながら行うことで、一細胞から発せられる様々な種類の蛍光を網羅的にスキャンできるのが特色である。その

結果、細胞内のタンパクや代謝産物を総合した自家蛍光パターンを面として捉えることが出来、細胞の物質生産の強弱の判定が細胞を殺さずに培養を介さず行う事が可能となった。本研究では、この手法を有用微生物のハイスループットスクリーニングに応用するための基盤を創製する。具体的には、微生物変異株を用いたシステム評価系の構築、3次元画像処理評価系の構築、多点選択的スキャン制御の開発を行うことで、「Meta-Spectral Imaging 法」の高速化と高感度化を図り、ハイスループット細胞分析・評価システムの基盤構築を行う。

①微生物変異株を用いたシステム評価系構築のための情報収集とマーカー開発（担当：筑波大学）

システムの有効性を検証するために、すでに本「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」（以下、「スマートセルPJ」と略す）で使用されている微生物を使用し研究を進める。具体的には、酵母において脂質生産性が変化した変異株と、大腸菌においてアミノ酸生産性が変化した変異株を用いる。1年目には、生産性が大幅に異なるもの、すなわち非生産株と過剰生産株を用いる。生産性が大幅に異なるものを用いて、自家蛍光パターンに現れる有用物質生産性の特徴を把握する。

3次元空間中に分布する細胞一つ一つの自家蛍光パターンを観測して記録する。これは共焦点顕微鏡を用いて特殊なスキャン（断層撮影）をして得る。具体的には自家蛍光パターンを観測するために、複数の励起波長で順番に細胞を照明し、それぞれの励起波長について戻ってきた蛍光の強さと波長つまりスペクトルを記録する。特別に作成した顕微鏡制御アルゴリズムを用いて、この際に同時に共焦点反射顕微鏡法を用いて細胞の位置情報も記録する。

2年目には、各種有用物質の生産能が段階的に異なる変異株群について進める。その他、本事業はスマートセルPJの既存の各開発テーマにおける発現制御技術開発などの細胞育種に柔軟に対応したい。

（平成30年度目標）

- 各種有用物質の生産能が段階的に異なる変異株群を用いて、生産性のより微妙な違いが自家蛍光パターンに与える影響を検証し、現状のシステムで達成可能な判別解像度を明らかにする。

②3次元画像処理評価系の構築（担当：筑波大学）

顕微鏡制御ソフトウェアの評価のために、3次元共焦点画像データから自家蛍光を一細胞レベルで取得して機械学習で解析する画像処理評価系を構築する。具体的にはまず共焦点反射顕微鏡法を用いて得られた細胞の位置情報を利用して、個々の細胞の内部から発せられた蛍光のスペクトルを抽出し、細胞ごとに発している蛍光を網羅的にカタログ化する。このプロセスは顕微鏡撮影の後に画像解析として行う。識別を行うためには、機械学習モデルを訓練するフェイズ（学習フェイズ）では、予めカテゴリ分けされた自家蛍光パターン（教師データ）を与えて訓練する。判別フェイズでは、与えられた未知の一細胞自家蛍光パターンがどのカテゴリに属するかを識別させる。

また上記①で有用物質生産性の変異株群を用いて、顕微鏡制御ソフトウェアの実用性を検証し、チューニングを進め完成させる。

(平成30年度目標)

- 3次元空間中に分布する細胞一つ一つの自家蛍光パターンを再構築する。

③多点選択的スキャン制御の開発 (担当：株式会社ニコンインステック)

NikonでiPSCで実績のある早期識別ソフトウェアCLQをベースに対象微生物向けに機械学習を実施することにより、視野内の細胞の90%から自家蛍光と形態の情報を抽出することを目指す。

(3) 全体計画

事業項目	平成29年度				平成30年度			
	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期
①微生物変異株を用いたシステム評価系の構築		→						
				①-1 ①-2				
								①-3
②3次元画像処理評価系の構築		→						
				②-1				
③多点選択的スキャン制御の開発								
		→						
				③-1 ③-2				
								③-3

①の実施内容

システムの有効性を検証するために、すでに本NEDOプロジェクトで使用されている油脂酵母あるいは大腸菌などを使用し、各種自家蛍光パターンを共焦点顕微鏡を用いた特殊なスキャン(断層撮影)をして得る。2年目は、さらに生産性のより微妙な違いが

自家蛍光パターンに与える影響を検証する。

平成 29 年度目標

①-1 酵母において脂質生産性が変化した変異株を用いて、自家蛍光パターンに現れる有用物質生産性のマーカーを把握する。

①-2 大腸菌においてアミノ酸生産性が変化した変異株を用いて、自家蛍光パターンに現れる有用物質生産性のマーカーを把握する。

平成 30 年度目標

①-3 各種有用物質の生産能が段階的に異なる変異株群を用いて、生産性のより微妙な違いが自家蛍光パターンに与える影響を検証する。

②の実施内容

顕微鏡制御ソフトウェアの評価のために、3次元共焦点画像データから自家蛍光を一細胞レベルで取得して機械学習で解析する画像処理評価系を構築する。

平成 29 年度目標

②-1 3次元空間中に分布する細胞一つ一つの蛍光スペクトルを取得する。

平成 30 年度目標

②-2 3次元空間中に分布する細胞一つ一つの自家蛍光パターンを再構築する。

③の実施内容（担当：株式会社ニコンインステック）

選択的範囲に特化した励起を可能にする制御系の開発と、微生物の形態・スペクトラム・微生物間のデータベース構築の関連ソフトウェア開発を行う。

H29 目標

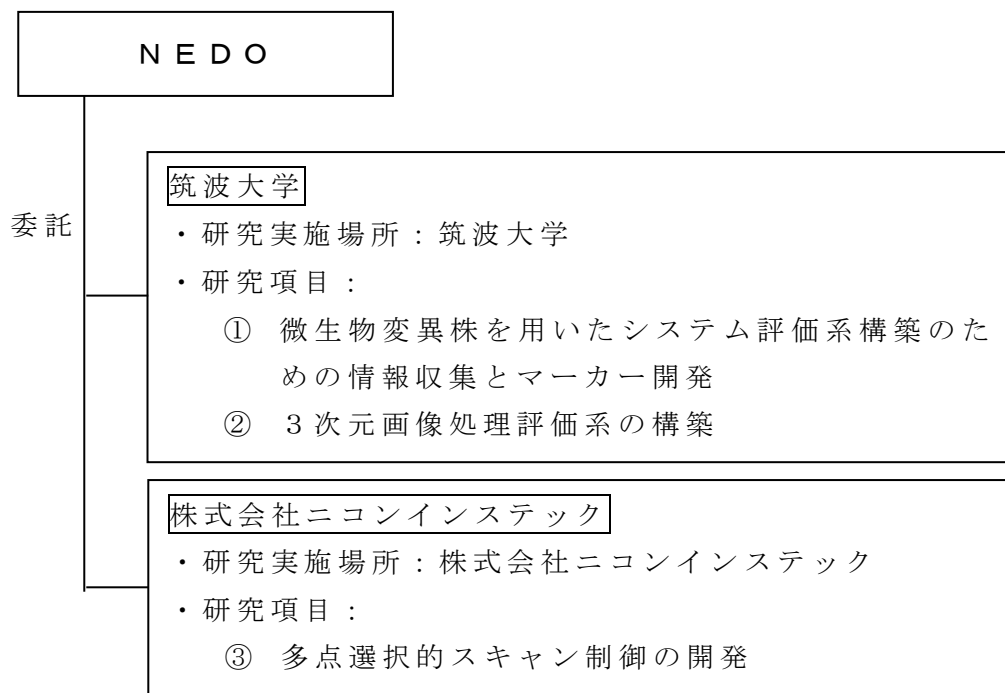
③-1 機械学習のソフトウェアを用いることにより、視野内網羅率 99%（現状 30%）を目指す。

③-2 プロジェクター技術を用いて時間分解能の向上を目指す。

H30 目標

③-3 液体レンズを用いて高速 3次元制御系を実現し時間分解能を更に向上させる。

(4) 実施体制



(5) 運営管理

半年に一度程度の頻度で全体会議および拠点会議（神戸拠点）をそれぞれ実施しており、各研究テーマとの連携や互いの要望について議論を行なっている。また、筑波大学 - ニコンインステックでは1ヶ月に1回程度の頻度で報告会を実施しており、進捗を共有している。

(6) 実施の効果

微生物は、健康・食・油脂酵母・環境などさまざまなシーンで活躍できる潜在力を秘めており、科学的にBiomicroを人類が活用して得られる対価は計り知れない。それら全ての分野において、生の（微生物）サンプルをマーカーレスで非破壊・非侵襲でそのまま、同定・機能の差別化出来ることが強く望まれている。しかし、現状ではそれは不可能と考えられている。よって、現時点では市場が形成されておらず本製品により市場が新規に創造される。

(7) 中間目標の達成度

本年度が最終年度のため、中間目標はなし。「(8) 最終目標の達成可能性」を参照。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
①微生物変異株を用いたシステム評価系構築のための情報収集とマーカー開発	まずは、特徴的な酵母において脂質生産性が変化した変異株を用いて、自家蛍光パターンに現れる有用物質生産性の自家蛍光シグネチャー（マーカー）を把握した。	酵母・カビの変異株を用いて、自家蛍光パターンに現れる代謝変化マーカーを把握する。	現時点までに、基盤の構築に成功したことから順調に進展することが見込める。
②3次元画像処理評価系の構築	3次元空間中に分布する細胞一つ一つの蛍光スペクトルを取得する事に成功した。	3次元空間中に分布する細胞一つ一つの蛍光スペクトルを取得する。	鍵となる3次元空間中の細胞の蛍光スペクトルに成功したことから順調に進展することが見込める。
③多点選択的スキャン制御の開発	細胞領域の認識精度向上の概念実証に成功した。	機械学習のソフトウェアを用いることにより、視野内網羅率60%を達成する。	細胞領域の認識精度向上に成功したことより、順調に進展することが見込める。

(9) 研究開発の成果と意義

①微生物変異株を用いたシステム評価系構築のための情報収集とマーカー開発（担当：筑波大学）

酵母において脂質生産性が変化した変異株を用いて、自家蛍光パターンに現れる有用物質生産性の自家蛍光シグネチャー（マーカー）を把握した。微生物変異株を用いたシステム評価系構築のための主要ステップの一つをクリアした。

②3次元画像処理評価系の構築（担当：筑波大学）

ニコン製共焦点顕微鏡システムを用いて3次元空間中に分布する細胞一つ一つの蛍光スペクトルを取得する事に成功した。3次元画像処理評価系の入口部分のコンポーネントが作成された。

③多点選択的スキャン制御の開発（担当：株式会社ニコンインステック）

細胞領域の認識精度向上の概念実証が成功した。

(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	
2016	-	-	-	-	-	-	-
2017	0	0	3(Y)	0	0	0	0
2018 *1	0 (1)	0 (0)	0 (3)	0 (0)	0 (2)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	2	0	3	0	0	0	0

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	-	-	-
2017	0	0	0
2018 *1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	0	0	0

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

3次元解析については特許出願はせずノウハウとして保有する。

2.3.2 高生産性微生物設計システムの開発

2.3.2.1 新規代謝経路の設計・最適化手法の開発

担当；神戸大学、産総研、石川県立大学、江崎グリコ(株)、NITE（再委託）、(株)島津製作所、理研

(1) 背景と目的

スマートセル設計システムの構築を目指して、目的の化合物を最高の理論収率で生産する微生物の細胞内代謝経路を最適化することは必須の課題である。しかし、高機能化合物として挙げられる二次代謝産物などについては代謝経路が知られていない、または限られた情報しかないというのがしばしばある。そのため、現行の代謝経路設計基盤（M-path）では予測できない新規反応の予測アルゴリズムの開発が必要となる。酵素反応データのキュレーション・新規酵素反応予測手法を開発する必要があるのと同時に、ゲノム・トランスクリプトームデータを考慮したモデル微生物における代謝経路設計技術の開発が望まれる。また、二次代謝反応について、微生物宿主に導入する遺伝子は植物由来であることが多く、大腸菌や酵母等での発現量や活性が低いことも問題となる。そこで、新規な非天然反応を設計し、他のバイパス経路を導入することによりボトルネックの解消を行うことで目的化合物の高生産化を目指す。同時に NBRC 株を用いた微生物由来の遺伝子のスクリーニングを行うことで有用で独自の情報を整備し、目的化合物の高生産化を目指す。また、酵素反応情報からそれを保有する微生物の情報およびアイソザイムの検索、有用文献や特許情報の取得など、現状は全てを手作業で行っておりこの部分がロースループトである。したがって、目的の情報（化合物や微生物名、抽出された遺伝子情報など）に文献や特許情報から自動的にアクセスできる情報マイニングツールを開発する。

(2) 位置づけ、目標値

本研究項目が対象とする新規代謝経路の設計・最適化技術の位置づけは、DBTL サイクルの設計(Design)部分における目的化合物を効率良く生産する宿主及び遺伝子情報の迅速な提案である。これまで、様々な微生物で有用な二次代謝化合物が生産されてはいるが、それらの反応経路や酵素反応情報はごく限られたものであり、しばしば特定の酵素反応がボトルネックとなってきたという問題がある。これに対し、本研究項目では、対象をスマートセル開発に特化し、目的の化合物を高生産する宿主開発のための代謝設計の提案、またはボトルネックの解除を行うための提案を行うことでこれまでの技術や知見との差別化を行う。

研究開発項目としては、①新規酵素反応の予測アルゴリズムの開発と二次代謝系を含む新規代謝経路設計、②NBRC 株を用いたスクリーニング技術の開発と有用遺伝子の整備と情報提供に大別する。①では酵素反応データのキュレーション・新規酵素反応予測手法ならびにこれらを利用した新規代謝経路設計アルゴリズムの開発とカロテノイドおよびアルカロイドといった二次代謝系を含む新規代謝経路の設計を行い、②ではカロテノイドおよびアルカロイドを合成する微生物をゲノム情報や文献・特許情報より絞り込み、NBRC 株を用いて実際にスクリーニングを行うことにより、生産性の高い酵素反応を持つ遺伝子情報を整備する。また文献・特許情報の絞り込み検索を行う情報マイニングツールを開発する。

表-2.3.2.1-1 研究開発項目と目標

研究開発項目	中間目標 (平成 30 年度末)	最終目標 (平成 32 年度末)	根拠
① 新規酵素反応の予測アルゴリズムの開発と二次代謝系（カロテノイドとアルカロイド）を含む新規代謝経路の設計	新規酵素反応予測技術の開発と各目的化合物への新規代謝経路設計の適用	二次代謝系を含む新規代謝設計の適用拡大	プロジェクト全体への展開およびプロジェクト以外への利活用を視野に入れ設定。限定された情報だけを利用した有用化合物の生産性において、それを向上させる新規代謝経路の設計が可能になれば、新規の産業宿主や目的化合物に対して幅広い展開が望める。
② NBRC 株を用いたスクリーニング技術の開発と有用遺伝子の整備と情報提供	NBRC 株スクリーニングによる遺伝子の有効性検証および情報処理ツールの拡大・検証	H30 年度で終了予定	

(3) 全体計画

平成 28 年度に、酵素反応データのキュレーション・新規酵素反応予測手法ならびにこれらを利用した新規代謝経路設計アルゴリズムの開発を行った。ゲノム・トランスクリプトーム情報を利用し、生合成に關与する酵素反応データの取得を行った。

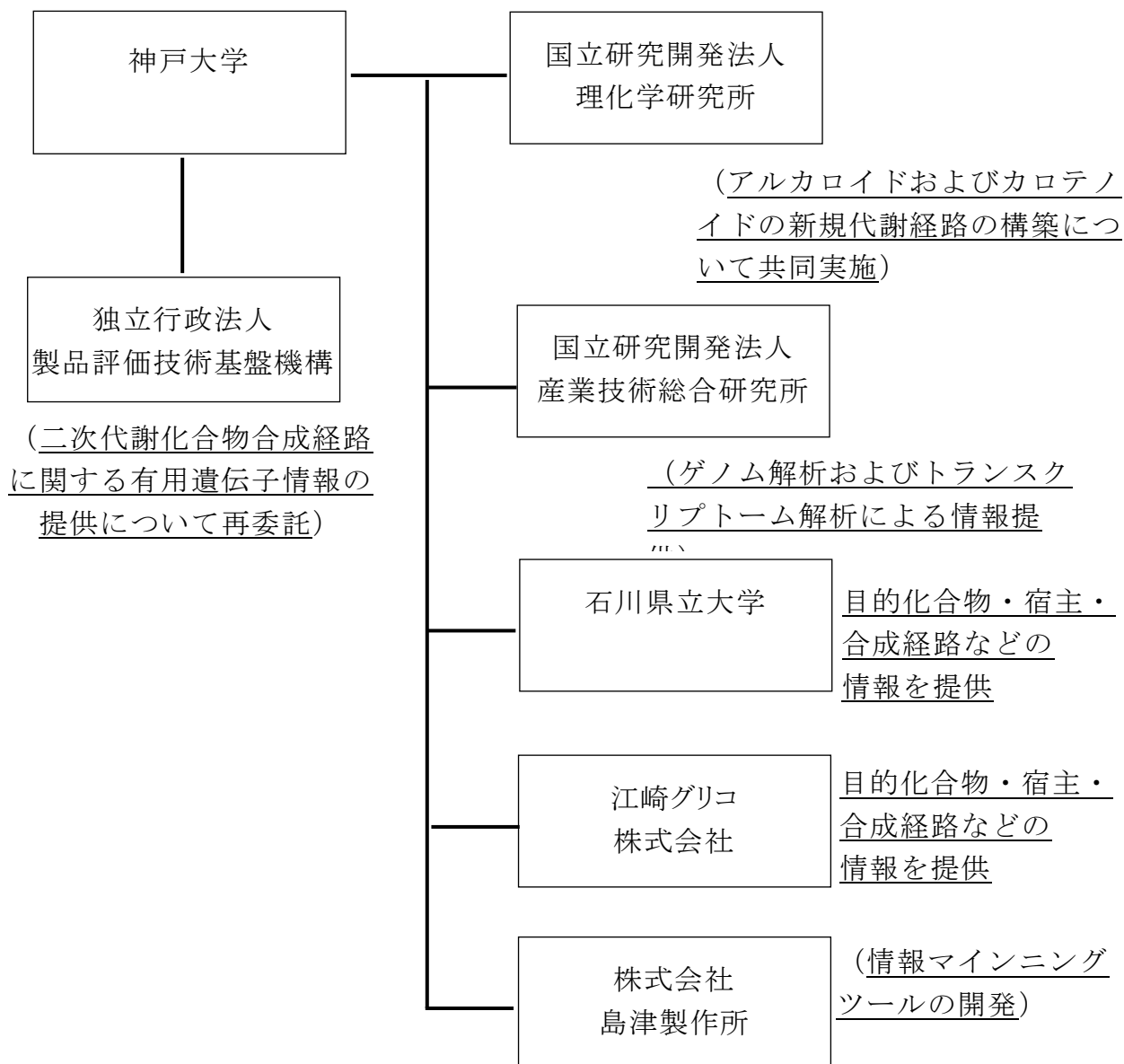
平成 29 年度に、ハブ化合物・各企業の目的化合物を中心に新規代謝経路設計を行い、実験検証を行うことにより、新規代謝経路設計アルゴリズムの高精度化を実施した。カロテノイドとアルカロイドを中心に取得される反応データをもとに酵素反応データベースの構築を行うとともに、新規代謝経路設計と実験検証を行った。また、カロテノイドおよびアルカロイドを合成する微生物をゲノム情報や文献・特許情報より絞り込み、生産性の高い酵素反応を持つ遺伝子情報を整備した。さらに目的の情報（化合物や微生物名、抽出された遺伝子情報など）に文献や特許情報から自動的にアクセスできるテキストマイニングツールの開発を行った。

平成 30 年度は、実験による検証データをもとに、二次代謝系を含む反応データベースの品質向上と拡充を行う。これを代謝経路設計に実装し、プロジェクト内における新たな目的化合物の新規代謝経路設計と原料（ハブ）化合物の特定を行う。また、NBRC(Nite Biological Resource Center)株のスクリーニングによって抽出された遺伝子情報の有効性を検証し、代謝モデル構築や OGAB 設計のための基盤情報とする。さらに 29 年度に実装したテキストマイニングツールを他グループにも提供し、より汎用性の高いツールとすべく使用結果の高精度化を目指す。

平成 31 年度以降は、新規代謝経路設計の適用を拡大し、プロジェクト内外の目的化合物に対して網羅的に代謝経路設計を実施する。得られる新規代謝経路についてデータベース化し、情報提供を行っていく。

(4) 実施体制

研究の実施体制としては、酵素反応や遺伝子情報データベースを利用した新規反応の予測アルゴリズムの開発については神戸大学が中心となり、石川県立大学、江崎グリコ(株)の個別の目的化合物について情報を共有し研究を進める。また宿主微生物のゲノム解析やトランスクリプトームデータの取得については産総研が中心になる。具体的な目的化合物として、アルカロイドおよびカロテノイドを合成する新規代謝経路については、神戸大および理研が中心となり提案を行う。その情報をもとに神戸大学の再委託先である NITE が NBRC 株を用いて有用な遺伝子情報を取得し、検証実験を進める。また、目的の情報（化合物や微生物名、抽出された遺伝子情報など）に文献や特許情報から自動的にアクセスできる情報マイニングツールの開発については島津製作所が主に開発し、NITE で行われている情報検索のノウハウを導入する。これらの体制は、短期的には現行のスマートセルの設計、特に情報の限定された二次代謝化合物の生産に関して、開発期間の短縮と省力化を支援するツールの開発を支援し、長期的には様々な新規有用化合物の生産を対象とした有効なツールの開発に向けて適用・拡大を目指していく。



(5) 運営管理

テーマの運営に関しては、研究開発項目①の担当機関（神戸大学、理研、産総研、石川県立大学、江崎グリコ）と、研究開発項目②を担当する各機関（神戸大学、理研、産総研、島津製作所、NITE（再委託））との間で、1カ月に一度を目安に連絡会議を実施し、開発進捗を共有している。また、更に、四半期に一度全体の情報を共有化し、各課題の進捗を共有している。研究開発項目②で得られた知見を随時フィードバックすることで、①で開発中の新規酵素反応の予測アルゴリズムの高精度化を図る。

(7) 中間目標の達成度

秘密情報を含むため秘匿。

(8) 最終目標の達成可能性

秘密情報を含むため秘匿。

(6) 実施の効果

本研究項目が対象とする二次代謝化合物に関する新規知識代謝経路の設計技術の開発は、特定の宿主・生産物に依らず、植物への展開など微生物の枠組を超えて、スマートセルが対象とする事業全般において開発を効率化するための技術であり、多分野での適用が期待される。特にアルカロイドやカロテノイドを目的化合物とする新規代謝経路の設計が成功し、ボトルネックの解除ができれば、この手法を有用なハブ化合物やそこから派生する機能性化合物にも応用でき、スマートセル設計システムの有効なツールとなりうる。

(9) 研究開発の成果と意義

① 新規酵素反応の予測アルゴリズムの開発と二次代謝系（カロテノイドとアルカロイド）を含む新規代謝経路の設計

平成 28 年度に、酵素反応データのキュレーション・新規酵素反応予測手法ならびにこれらを利用した新規代謝経路設計アルゴリズムのプロトタイプ開発を行った。新規酵素反応予測手法としては、機械学習的アプローチを利用し、酵素配列のみならず、基質・生成物といった化学構造を考慮して、学習データをもとに酵素反応の判別を行った。

平成 29 年度には、M-path・BioProV といった代謝経路設計ツールでは予測できない、未知の酵素反応予測と代謝経路設計を目的とした技術開発を中心に実施した。

② NBRC 株を用いたスクリーニング技術の開発と有用遺伝子の整備と情報提供

平成 29 年度に、現行の代謝経路設計基盤（M-path）および理研で開発中の BioProV を利用して、カロテノイドとアルカロイドを中心に新規代謝経路設計を行った。

また、候補となる微生物のゲノム情報や文献・特許情報より絞り込み、生産性の高い酵素反応を持つ遺伝子情報を整備した。さらに目的の情報（化合物や微生物名、抽出された遺伝子情報など）に文献や特許情報から自動的にアクセスできるテキストマイニングツールの開発を行った。

(10) 成果の普及

表-2.3.2.1-5 論文、外部発表等の件数（平成 30 年 8 月現在）

区分 年度	論文		その他外部発表				展示会	受賞	フォーラム等※
	査読付き	その他	学会・発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	プレス発表	その他			
H28	0	0	3	0	0	0	0	0	0
H29			7				2		1
H30	0	0	7	0	0	0	0	0	0
合計	0	0	0	0	0	0	0	0	0

※実施者が主体的に開催するイベント（フォーラム、シンポジウム等）

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

知財戦略に関しては、新規代謝経路の設計・提案だけでは権限性が乏しく、特許網の構築困難なため、新規代謝反応を触媒する有用遺伝子のスクリーニングおよび有効性の検証を持って知財とする。具体的には、アルカロイド合成に関するハブ化合物に至る新規代謝経路について、候補となる遺伝子を産業微生物である大腸菌で発現し、目的の反応の活性を検証することで知財化を行う。また、NITE の遺伝子情報の絞り込みなどのノウハウを導入した情報マイニングツールに関しては、ノウハウとして蓄積するか知財化を行うかを検討する。

表-2.3.2.10-4 特許件数（平成 30 年度 8 月現在）

区分 年度	特許出願		
	国内	外国	PCT 出願
H28	0	0	0
H29	0	0	0
H30	0	0	0
合計	0	0	0

2.3.2.2 代謝モデル構築・解析技術の開発と実用微生物への技術展開

担当機関：神戸大学、理研、味の素(株)、長瀬産業(株)、三菱ケミカル(株)、JSR(株)、地球環境産業技術機構

(1) 背景と目的

代謝モデルを用いた物質生産改善のためのシミュレーション・解析の有用性はこれまで多く示されてきた。モデル微生物(大腸菌・酵母)など一部微生物については代謝モデルとしてゲノムスケールモデル(GSM)が提供されているが、このモデルも物質生産への応用面からは不完全である。また、GSMが提供されていない非モデル微生物や産業宿主(放線菌、コリネ菌など)については、新たに公開データや配列・測定データから得られる情報により代謝モデルを構築する必要がある。そのため、公開データおよび配列・測定データなどから汎用的かつ高速に代謝モデルを構築する技術開発が必要である。また、物質生産のための代謝経路の設計には M-path および HyMep を利用し、これらにより予測された代謝経路を宿主の代謝モデルに追加・統合することで、目的化合物に応じた物質生産のための代謝モデルへの効率的な拡張が可能となる。一方で、より効率的な物質生産株の開発・構築には遺伝子改変候補・収率などの高い予測精度をもつ高精度な代謝モデルが必要である。したがって、公開データ・測定データなどから汎用的かつ高速に宿主・目的化合物毎の代謝モデルを構築する手法および種々のデータにより予測精度の高い代謝モデルへと高精度化・最適化する手法を開発する。

(2) 位置づけ、目標値

本研究項目が対象とする代謝モデル構築・解析技術の開発と実用微生物への技術展開は、研究項目としては、代謝モデル構築とシャーシ株構築の二つに大別される。代謝モデル構築の位置づけは、DBTL サイクルの設計(Design)部分における目的化合物を効率良く生産する宿主及びその生産改善方策の迅速な提案である。これまでも、代謝モデルを用いた目的化合物の生産改善の有用性は多く示されており、代謝モデルの構築ツール、代謝シミュレーションツール、オミクスデータ反映ツールなど様々なツール・手法が現在も提案され続けている。代謝シミュレーションツールは比較的よく使用されているようではあるが、一方で、代謝モデルの構築ツールの使用はまだ一部にとどまっており、2017年に発表された論文でもデータベース情報を利用しつつも人の手によるところが多いような状況である。また、オミクスデータの反映ツールについては、遺伝子発現データは比較的長い期間にわたって、利用・研究がなされていたが、メタボロームデータの反映については、我々の知る限り、最近発表された論文があるくらいの状況である。そのため、本研究項目では、本プロジェクトで同一宿主に対して取得される様々なオミクスデータなどの測定データをモデルに反映する高精度化の部分で差別化を行う。

シャーシ株構築については、対象となるシャーシ株が用意されてさえいれば、任意の設計に基づく代謝経路を人工ゲノムで構成し、ゲノムスワッピングにより宿主シャーシ株へと導入することにより様々なバリエーションの菌株を短期間で構築できる。そのため、本プロジェクトでは、シャーシ株の構築とその化合物生産に対する有効性を検証することを目標とする。

研究開発項目として、代謝モデル構築では公開データ、配列・測定データを利用した汎用的かつ高速な代謝モデル構築手法、代謝シミュレーションによる収率予測・目的化合物生産の改善

のために改変すべき遺伝子の探索・提案方法、測定データの反映によるモデルの高精度化・最適化手法を開発する。シャーシ株構築ではモデル微生物である大腸菌、酵母のシャーシ株を構築し、その目的化合物生産についての有効性検証を実施する。

表 2.3.2.2-1 研究開発目標と根拠

研究開発項目	中間目標 (平成 30 年度末)	最終目標 (平成 32 年度末)	根拠
代謝モデル構築	モデル微生物(大腸菌、酵母)および産業(放線菌、コリネ菌)宿主の個別・最適代謝モデルの構築	モデル微生物及び産業宿主の最適代謝モデル構築技術の確立	新たな知見など情報の更新による代謝モデルの再構築や産業宿主を含む非モデル生物での物質生産の予測などに必要。

(3) 全体計画

平成 28 年度に、代謝モデル構築については、モデル微生物に関する代謝モデルの構築として、大腸菌を対象に既知の公開データをもとに代謝ゲノムスケールモデル(GSM)の再構築を行った。代謝 GSM の提供されていない産業宿主については、モデル微生物の代謝モデルをベースとして、新たに公開・測定ゲノムデータから得られる情報によりモデルを更新することで、代謝 GSM の構築を行った。得られる代謝モデルをもとに、代謝流束バランス解析による収率予測の基盤構築を行った。

平成 29 年度に、モデル微生物および産業宿主の拡張代謝モデルの構築においては、標準代謝モデルをもとに目的化合物に応じて、新規代謝経路設計・HyMep による代謝経路拡張を行った。また、測定データ(ゲノム・トランスクリプトームなど)を拡張代謝モデルに反映させていくことで、目的化合物・宿主毎の個別代謝モデルを構築し、データベース化してきた。得られる代謝モデルをもとに、代謝流束バランス解析による収率予測と改変すべき遺伝子の提示を行うシステムを構築した。

平成 30 年度は、個別代謝モデルをもとに、代謝流束バランス解析・代謝感度解析・収率予測等を行うことで、目的化合物・宿主毎に最適な代謝経路を見出し、目的化合物・宿主毎の最適代謝モデルを構築していく。

平成 31 年度以降は、様々な目的化合物・宿主に対応できる最適代謝モデルを迅速に構築するためのワークフロー及びシステムを開発する。腸菌・酵母シャーシ株を利用して、プロジェクト内の目的化合物を生産する株の構築を行う。新たな目的・ハブ化合物の設定とこれに付随して設計される一連の代謝経路の人工ゲノムを OGAB 法により構築し、それぞれのシャーシ株に導入し、生産性の評価を行う。この評価に基づいて新たな人工ゲノムを設計し、シャーシ株に導入するサイクル繰り返すことで、従来 5 年程度必要とした有用物質高生産株を 6 か月という短期間で構築可能であることを実証する。

表 2.3.2.2-2 全体計画

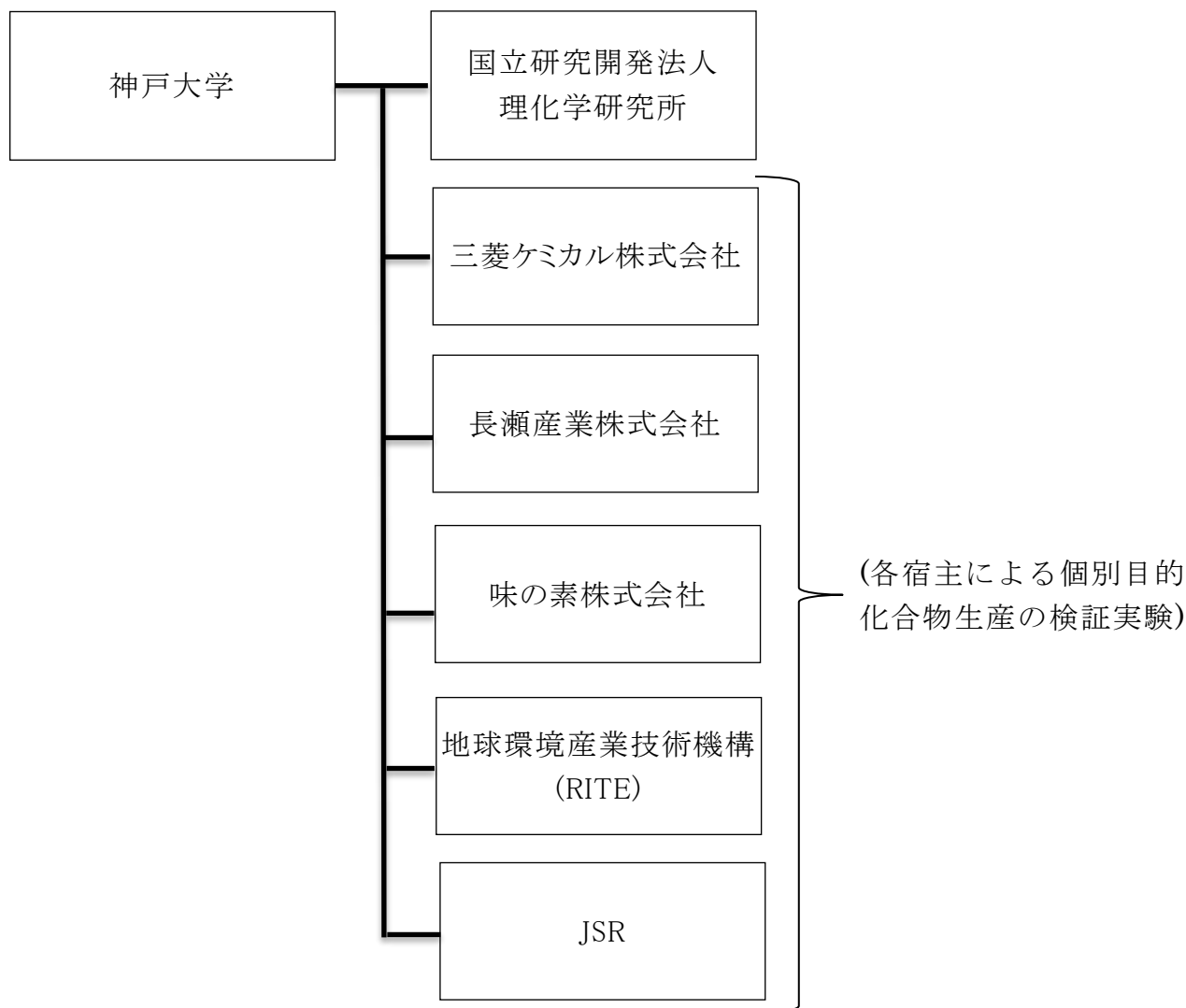
事業項目	平成 28 年度				平成 29 年度				平成 30 年度				平成 31 年度	平成 32 年度
	第 1 四半期	第 2 四半期	第 3 四半期	第 4 四半期	第 1 四半期	第 2 四半期	第 3 四半期	第 4 四半期	第 1 四半期	第 2 四半期	第 3 四半期	第 4 四半期		
2.3.2.2 代謝モデル構築・解析技術開発と 実用微生物への技術展開														
代謝モデル構築														
シャーシ株構築														

(4) 実施体制

研究の実施体制としては、公開データベースなどを利用した代謝モデルの構築およびそのアルゴリズムの開発、目的化合物の生産改善のための代謝系デザインなどの提案については、神戸大学および理化学研究所が中心となり行う。また、代謝モデルの測定データ反映による高精度化・個別最適化についても、神戸大学、理化学研究所が中心となり、三菱ケミカル(株)、長瀬産業(株)、味の素(株)、地球環境産業技術機構(RITE)、JSR の個別の目的化合物について情報を共有し研究を進める。シャーシ株については神戸大学が構築・開発する。

(代謝モデル構築・高精度化
およびシャーシ株構築)

(代謝モデル構築・高精度化)



(5) 運営管理

テーマの運営に関しては、神戸大学および理研と有効性検証担当機関(三菱ケミカル、長瀬産業(株)、味の素(株)、RITE、JSR 株)との間で、1カ月に一度を目安に連絡会議を実施し、開発進捗を共有している。また、更に、四半期に一度全体の情報を共有化し、各課題の進捗を共有している。これまでに代謝モデルによるシミュレーションから得られた予測を各機関で検証し、得られた知見をフィードバックすることで代謝モデルの高精度化が図られつつある。

(6) 実施の効果

本研究項目における代謝モデルやシャーシ株構築を用いた高生産性微生物の構築は、本プロジェクトにおいて、目的化合物生産のための菌株開発を効率化するための技術である。これらの技術の適用により、開発期間が短縮されれば、従来の開発期間に生じていた開発コスト(費用、

CO₂ の排出量やエネルギー消費量など)の削減にも大いに寄与すると考えられる。また、これらの技術は汎用性が高いため、本プロジェクト以外でもその適用が期待できる。

(7) 中間目標の達成度

代謝モデル構築については、以下の表のとおり。シャーシ株構築については、中間目標である大腸菌を利用したシャーシ株構築を達成しているが、酵母については実施検討中である。

研究開発項目	中間目標 (2018 年度末)	達成度* (2018 年 6 月)	今後の課題と解決方針
代謝モデル構築	モデル微生物(大腸菌、酵母)および産業(放線菌、コリネ菌)宿主の個別・最適代謝モデルの構築	△	現在遺伝子改変とデータ測定結果の代謝モデルへの反映に力点をおいており、代謝モデルを高精度化するには、どのようなデータをどのように反映させるかが課題。この方法部分の改善により達成できる見通し。

(8) 最終目標の達成可能性

代謝モデル構築については、以下の表のとおり。シャーシ株構築についても達成見込みである。

研究開発項目	現状 (2018 年 6 月)	最終目標 (2020 年度末)	達成見通し
代謝モデル構築	大腸菌、放線菌、コリネ菌のベースとなる代謝モデルを構築し、目的化合物毎の拡張が完了。測定データの反映によるモデルの高精度化手法を開発中で、代謝モデルによる予測精度の向上を目指している。	モデル微生物および産業宿主の最適代謝モデル構築技術の確立	○達成見込み

(9) 研究開発の成果と意義

■ 代謝モデル構築

平成 28 年度にモデル微生物である大腸菌の代謝モデルを公開データなどを利用し再構築した。代謝モデルの再構築には開発中のツールである GSM generator を使用した(図 2.3.2.2-1)。このツールは公開データ(KEGG などのデータベースを含む)を用い指定した菌株について代謝フラッ

クスバランス解析によるシミュレーションが可能な代謝モデルを出力することを目指している。しかしながら、シミュレーションに供するには、反応の追加・削除、修正などが必要であった。そこで大腸菌の代謝モデルをシミュレーションに供するために施した修正方策から得られたノウハウを用い、産業宿主(放線菌、コリネ菌)についての代謝モデルを構築した。平成 29 年度には本プロジェクト構築した代謝モデルの妥当性検証を実施した。平成 30 年度はこれまでに構築した代謝モデルとそれらに基づく予測の検証実験の結果(オミクスデータを含む)などからモデルの高精度化を図り、目的化合物・宿主毎の最適代謝モデルを構築していく。

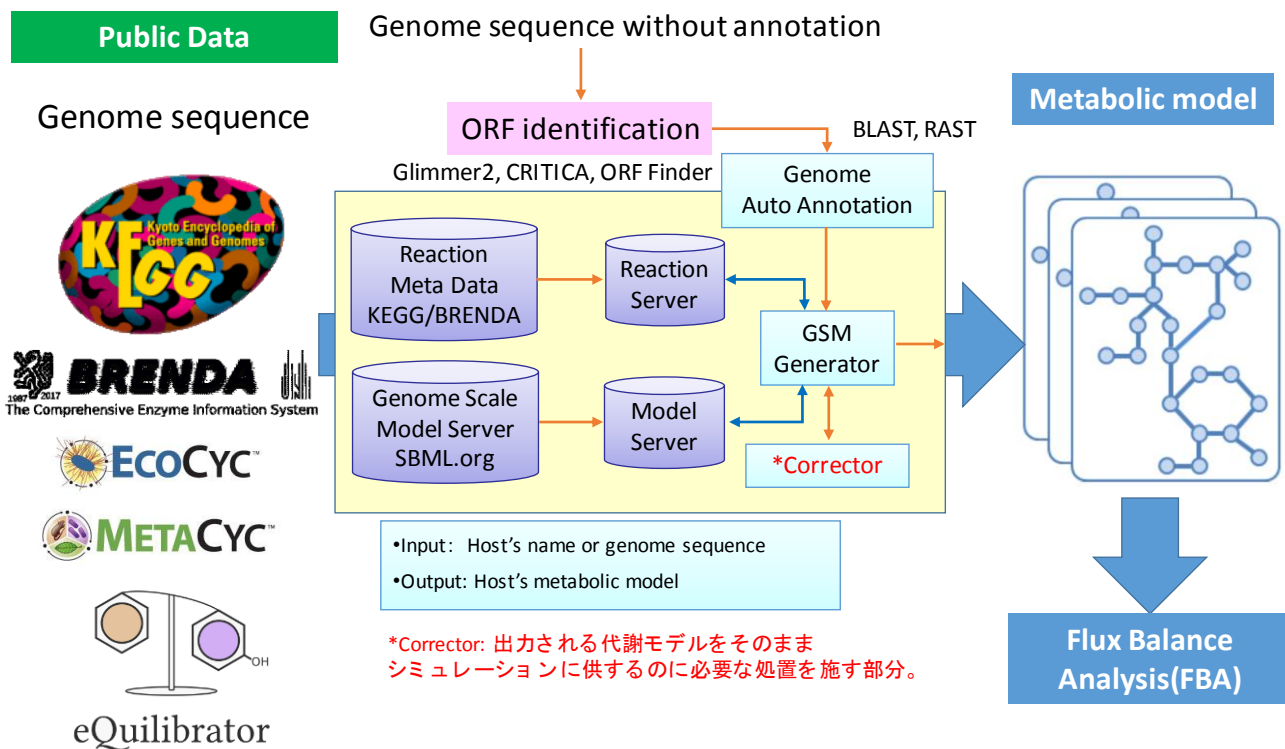


図 2.3.2.2-1 代謝モデル構築ツール GSM generator によるモデル構築フロー

(10) 成果の普及

区分	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	
年度							
2016	2	0	8	0	0	0	0
2017	0	0	5	0	1	0	0
2018 *1	0 (2)	0 (0)	0 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	8	0	32	0	1	0	0

*1: 2018年6月時点での件数、()内は2018年度末の予定件数

*2: 2020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

情報解析技術・ツールなどの基盤的技術は特許化しにくいという背景のもと、各種技術・ツール・データベースに関しては論文投稿による技術優位性のアピールを行うとともに、ユーザへのインターフェイスとしてはノウハウ蓄積(秘匿化)、オープンクローズ戦略を使い分けることで競争的優位性を維持していく。

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	0	0	1

*1: 2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2: 2020年度末までに予定している累積件数

2.3.2.3 反応機構推定に基づく酵素選択・機能改変

担当；神戸大学、産総研、神戸天然物化学(株)、味の素(株)

(1) 背景と目的

新規代謝経路の最適化には、設計された新規代謝経路における適切な酵素候補の選択とその改変が重要なテーマの一つである。また、酵素選択に関しては、基質特異性 (promiscuity) などを考慮した上で、多様な遺伝子リソースから候補を選択していく必要がある。このため本研究では、論文・酵素反応データベース・測定データから網羅的に酵素反応・化合物データを抽出し、酵素 (配列) と基質 (化学構造) の相関について機械学習を実施し、酵素・基質ペアと酵素反応の特徴選択・パターン抽出を行う。また、ハイスループット微生物構築・評価技術を活用して、酵素への変異導入やスクリーニングなどの実験も行うことで、実測データも追加する。これにより、設計された新規代謝経路に対応した適切な酵素・基質ペアと酵素反応候補の推定を実施していく。さらに、高精度な酵素候補の推定・選択が必要なケースについては、分子動力学 (MD) 計算等による構造計算により検証も実施していく。

(2) 位置づけ、目標値

新規代謝経路における適切な酵素候補の選択とその改変については、これまで配列解析を中心に類似配列の選択の観点から行われているが、新規代謝経路の実装には、異種由来の配列を宿主で発現させる場合が多く、遺伝子発現・機能発現の点からも、必ずしも類似配列の選択が有用でないケースも多い。ここでは、酵素 (配列) と基質 (化学構造) の相関について機械学習を実施し、酵素・基質ペアと酵素反応の特徴選択・パターン抽出を行う点に優位性がある。また、ドッキングと MD とを組み合わせた研究はほとんど報告されておらず、本項目で実施する MD シミュレーションによる酵素機能の改変技術の開発についても、先端的な技術開発である。

研究開発項目としては、①酵素選択手法の開発、②構造計算・スクリーニングによる酵素設計技術の適用に大別する。①では酵素 (配列) と基質 (化学構造) の酵素反応データ学習による新規酵素反応予測手法の開発を行い、プロジェクト内テーマにて検証を行い、②ではプロジェクト内テーマについて、分子動力学 (MD) 計算等による構造計算により酵素設計技術の開発を実施する。

研究開発項目	中間目標 (平成 30 年度末)	最終目標 (平成 32 年度末)	根拠
① 酵素選択手法の開発	酵素反応データ学習による酵素選択手法の開発	酵素選択技術のワークフロー構築	プロジェクト全体への展開およびプロジェクト以外への利活用を視野に入れ設定
② 構造計算・スクリーニングによる酵素設計技術の適用	MD シミュレーションに基づいた人工酵素設計と実験による検証	酵素改変技術のワークフロー構築	

(3) 全体計画

平成 28 年度に、①論文・酵素反応データベースから網羅的に酵素反応・化合物データを抽出し、酵素（配列）と基質（化学構造）の相関について機械学習を実施し、酵素・基質ペアと酵素反応の特徴選択・パターン抽出を行った。②酸化反応等をモデルとして、酵素機能評価系及び分析系などの実験系の構築を行い MD シミュレーションに供する P450 等の選定を行った。選定酵素を題材として、X 線結晶解析やホモロジーモデリングにより酵素の初期構造を作成し、MD シミュレーションを行うことで、酵素の活性部位近傍のアミノ酸側鎖配置の動き・構造揺らぎなど動的な性質も含めた立体構造を詳細に調査し、選定した P450 の改変に向けて活性部位近傍のアミノ酸改変提案を行った。

平成 29 年度に、①酵素反応データ学習による酵素・基質ペアと酵素反応の特徴選択・パターン抽出により、酵素の位置選択性や基質特異性などの評価法を開発した。②触媒活性及び、生成物選択性の向上のために、MD シミュレーションにより提案された活性部位周辺にあるアミノ酸の改変を行った。アミノ酸改変酵素の設計・MD シミュレーションを行い、実験での実証を繰り返すことで、選択性・反応性の高い酵素を創出した。

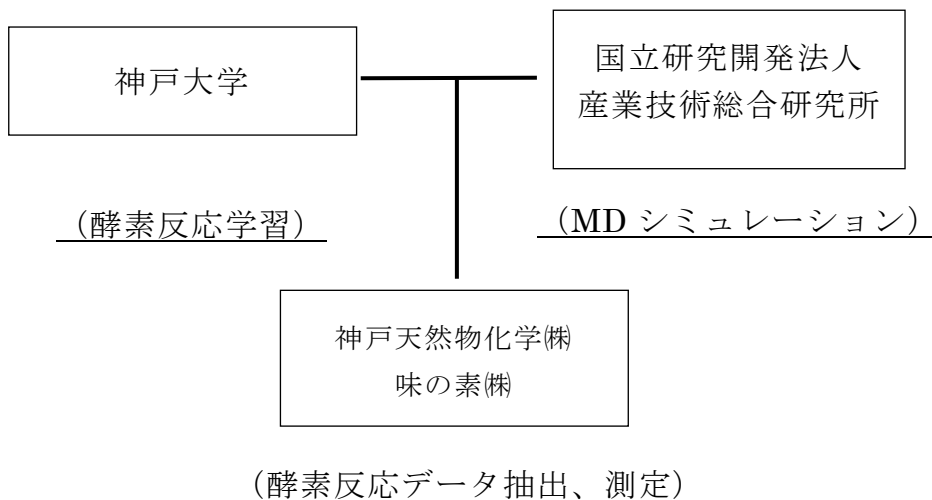
平成 30 年度は、①酵素反応データの高精度化とともに様々な学習方法について検討を実施する。②触媒活性・生成物選択性向上だけでなく、様々な基質に対しても位置特異的に修飾出来るように酵素改変手法を改良する。以上の手法に基づき、基質・位置特異的修飾酵素を 3 個以上創出する。

平成 31 年度以降は、新規代謝経路の開発プロセスにおいて、酵素反応データ学習をもとに改変酵素候補を選択し、構造計算・スクリーニングによる酵素設計技術を適用することで、一連のワークフローを構築し、人工酵素として改変できる汎用的なシステムを開発する。

事業項目	28年度				29年度				30年度				31年度	32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		
2.3.2.1 新規代謝経路の設計・最適化手法の開発														
① 酵素選択手法の開発														
② 構造計算・スクリーニングによる酵素設計技術の適用														

(4) 実施体制

研究の実施体制としては、①神戸大学を中心に論文・酵素反応データベース・測定データから網羅的に酵素反応・化合物データを抽出し、酵素（配列）と基質（化学構造）の相関について機械学習を実施し、酵素・基質ペアと酵素反応の特徴選択・パターン抽出を行う。また、P450データについては、神戸天然物化学㈱を中心にデータ抽出を行う。②産業技術総合研究所を中心に、MDシミュレーションによる酵素機能の改変技術の開発を行い、神戸天然物化学㈱、味の素㈱にて検証を実施する。



(5) 運営管理

テーマの運営に関しては、①酵素選択手法の開発は神戸大学を中心に推進しつつ、P450 データについては、産業技術総合研究所、神戸天然物化学㈱の各機関よりデータ集積について適時情報共有を行い、②構造計算・スクリーニングによる酵素設計技術の適用では、産業技術総合研究所を中心に技術開発を行い、神戸天然物化学㈱、味の素㈱と1カ月に一度を目安に連絡会議を実施し、開発進捗を共有している。いずれの項目も、更に、四半期に一度全体の情報を共有化し、各課題の進捗を共有している。

(6) 実施の効果

本研究項目は、スマートセル設計に不可欠とされる、新規代謝経路設計における適切な酵素候補の選択とその改変を対象としており、プロジェクト全体への展開およびプロジェクト以外への利活用を視野に入れ設定しており、スマートセル設計システムの有効なツールとなりうる。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標 (2018年度末)	達成度※	達成に向けた状況
① 構造計算・スクリーニングによる酵素設計技術の適用	MDシミュレーションに基づいた人工酵素設計と実験による検証	○	酵素・基質複合体のMDシミュレーションに基づき、効果的と考えられる変異体を提案する手法を提案した。実験により、変異体が高活性を持つことを確認した。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
① 構造計算・スクリーニングによる酵素設計技術の適用	酵素・基質複合体のMDシミュレーションに基づき、効果的と考えられる変異体を提案する手法を開発した。	酵素改変技術のワークフロー構築	○達成見込み

(9) 研究開発の成果と意義

② 構造計算・スクリーニングによる酵素設計技術の適用

平成28年度に、酸化反応等をモデルとして、酵素機能評価系及び分析系などの実験系の構築を行いMDシミュレーションに供するP450等の選定を行った。当初は、基質選択性の高い真核生物由来のP450を用いる予定であったが、立体構造が分かっているものが少なく、ホモロジーモデリングでの作成も困難であった。そこで、立体構造が分かっている微生物由来のP450を用い

ることとした。微生物由来の P450 は活性が高いものの、副産物を多く生成してしまうという欠点があったため、活性を保ちつつ、副産物生成を減らす変異体作成を試みることにした。

選定酵素を題材として、MD シミュレーションを行うことで、酵素の活性部位近傍のアミノ酸側鎖配置の動き・構造揺らぎなど動的な性質も含めた立体構造を詳細に調査したところ、P450 の活性部位であるヘム周辺の側鎖の配置は多様であり、非常に長時間のシミュレーションを行わなければ調査が難しいことが分かった。そこで、構造サンプリングを高速に行うことができる ALSD 法を用いることで、ヘム周辺および基質の構造配置を詳細に調べることを可能とした。

平成 29 年度に、昨年度までに作成した計算プロトコールに基づき、P450 活性部位周辺に基質を配置した系に対して、シミュレーションを行い、基質の特定箇所を酸化するために重要と思われるアミノ酸を特定した。その結果を元に、1 アミノ酸変異体を複数選出し、神戸天然物化学が微生物での酵素生産及び活性を調べたところ、反応量、及びターゲットとなる生成物の比率が向上する変異体を発見した。反応量は最大 3.5 倍、生成物比率は最大 2 倍向上させることに成功した。本手法について、特許取得及び論文発表に向けて準備を進めている。

平成 30 年度は、これまで得られた結果に加え、さらに変異箇所を増やした変異体に対するシミュレーションを行い、さらに性能の良い変異体選出を目指している。また、異なる反応生成物に対する変異体選出を行っている。

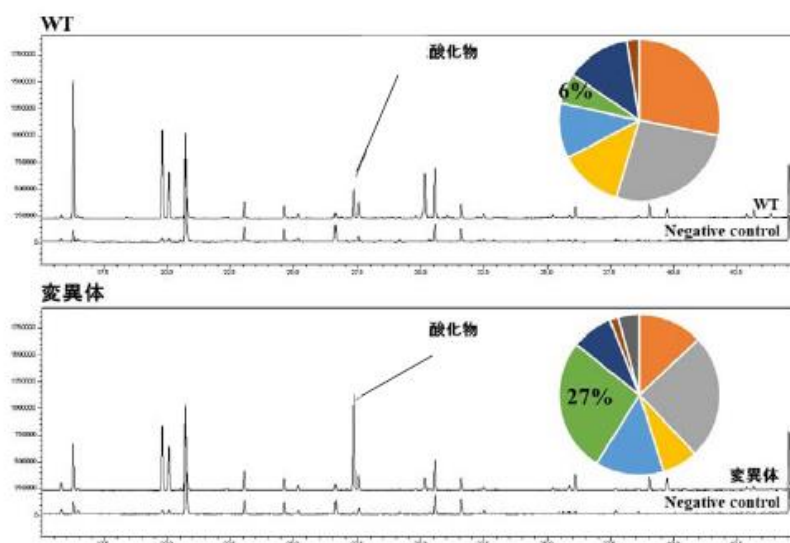


図-2.3.2.3-3 P450 の反応生成物 WT と変異体の比較

(10) 成果の普及

区分 年度	論文		その他外部発表				展示会	受賞	フォー ラム等 ※
	査読付 き	その他	学会・ 発表・ 講演	新聞・ 雑誌等 への掲 載	プレス 発表	その他			
H28	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H29	0	0	1	0	0	0	0	0	0
H30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	0	0	1	0	0	0	0	0	0

※実施者が主体的に開催するイベント（フォーラム、シンポジウム等）

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

情報解析技術・ツールなどの基盤的技術は特許化しにくいという背景のもと、各種技術・ツール・データベースに関しては論文投稿による技術優位性のアピールを行うとともに、ユーザへのインターフェイスとしてはノウハウ蓄積(秘匿化)、オープンクローズ戦略を使い分けることで競争的優位性を維持していく。

区分 年度	特許出願		
	国内	外国	PCT 出願
H28	0	0	0
H29	0	0	0
H30	0	0	0
合計	0	0	0

2.3.2.4 代謝設計に資する支援ツールの開発

担当；神戸大学、産総研

(1) 背景と目的

スマートセル設計システムの開発には、DBTL の各項目の要素技術の組み合わせを検討しつつ、様々な目的物質ならびに宿主に対応したワークフロー開発が必要である。このためには、各要素技術について明確なインプットとアウトプットが明示されたプロトコル・ツール開発が必要である。特に情報処理に関しては、代謝設計・解析・学習といった各プロセスについて、単に情報処理技術者に依存するだけではなく、情報サイドから各種ツールを提供することで、スマートセル開発者に広く利用を促していくことが重要である。このために、本項目では、2.3.2.1 新規代謝経路の設計・最適化手法の開発、2.3.2.2 代謝モデル構築・解析技術開発と実用微生物への技術展開、2.3.2.3 反応機構推定に基づく酵素選択・機能改変で開発する各要素技術を実用展開していくためのツール開発を目的とする。

(2) 位置づけ、目標値

スマートセル開発においては、DBTL に分類される各要素技術群から、目的物質と宿主に応じて適切な技術選択を行い、それらを連結していくことが重要である。本研究項目の位置づけは、スマートセル設計システムの一部として利用可能な独自ツールの開発であり、これにより各情報解析技術の利用促進と二次利用可能性を拡げていく。

研究開発項目としては、①代謝設計基盤のインターフェース開発、②代謝モデルのデータ集積・構造化、③酵素反応データ集積・構造化、④測定データのデータ集積・構造化、に大別する。①では新規代謝経路設計のアルゴリズム開発により得られるプログラムをユーザが利用しやすい形式に実装したインターフェース開発、②ではモデル微生物および産業宿主の代謝モデルを集積・構造化、③では論文・酵素反応データベース・測定データからの酵素反応データおよび酵素反応学習・構造計算などにより得られるデータを集積・構造化、④では各種測定データを集積・構造化、を目標とする。

研究開発項目	中間目標 (平成 30 年度末)	最終目標 (平成 32 年度末)	根拠
① 代謝設計基盤のインターフェイス開発	開発アルゴリズムを利用したインターフェイスを開発する。	代謝設計基盤の公開と運用を行う。	スマートセル設計システムへの組み込みを想定し、プロジェクト全体への展開およびプロジェクト以外への活用を視野に入れ設定。
② 代謝モデルのデータ集積・構造化	拡張・最適代謝モデルの集積・構造化を行う。	代謝モデルデータベースの構築と運用を行う。	
③ 酵素反応データ集積・構造化	酵素反応データ集積・構造化とデータベース開発を行う。	酵素反応データベースの構築と運用を行う。	
④ 測定データのデータ集積・構造化	測定データの集積と構造化を行う。	測定データのデータベース構築を行う。	

(3) 全体計画

平成 28 年度に、①新規代謝経路設計のアルゴリズム開発（レトロ合成基盤）により得られるプログラムをユーザが利用しやすい形式に実装したインターフェイスのプロトタイプを構築した。②モデル微生物（大腸菌）および産業宿主（放線菌、コリネ菌）の標準代謝モデルを SBML 形式で集積した。③論文・酵素反応データベースからの酵素反応データおよび酵素反応学習・構造計算により得られるデータを集積した。④各企業・大学のテーマで測定する（オーミクス）データについて、集積を開始した。

平成 29 年度に、①ユーザビリティの高い新規代謝経路設計のユーザインターフェースを構築した。②目的化合物、モデル微生物（大腸菌）および産業宿主（放線菌、コリネ菌）に対応した拡張・個別代謝モデルを SBML 形式で集積した。③キュレーションされた酵素反応データおよび学習・構造計算により予測される酵素反応データについてデータ標準化を行った。④各企業・大学のテーマで測定する（オーミクス）データについて、情報解析に必要なデータ整理・標準化を行う。

平成 30 年度は、①新規代謝経路設計のユーザインターフェースをプロジェクト内テーマにて運用する。②目的化合物とモデル・産業宿主に対応した最適代謝モデルを SBML 形式で集積し、宿主・代謝経路の情報による検索・情報抽出が可能なデータ要件を整理する。③酵素遺伝子・改

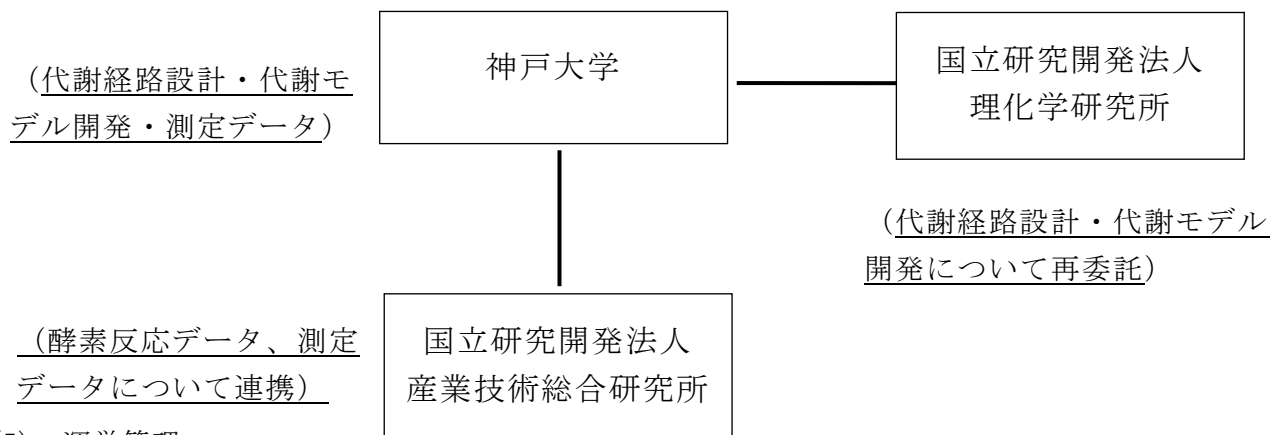
事業項目	28年度				29年度				30年度				31年度	32年度
	第1 四 半 期	第2 四 半 期	第3 四 半 期	第4 四 半 期	第1 四 半 期	第2 四 半 期	第3 四 半 期	第4 四 半 期	第1 四 半 期	第2 四 半 期	第3 四 半 期	第4 四 半 期		
2.3.2.4 新規代謝経路の設計・最適化手法の開発														
① 代謝設計基盤のインターフェース開発														
② 代謝モデルのデータ集積・構造化														
③ 酵素反応データ集積・構造化														
④ 測定データのデータ集積・構造化														

変候補を提示する酵素反応データベースの構築を行う。④各企業・大学のテーマで測定する（オーミクス）データについて、情報解析に必要なデータベース構築を行う。

平成 31 年度以降は、①新規代謝経路設計の適用を拡大し、プロジェクト内外の目的化合物に対して網羅的に代謝経路設計を実施する。得られる新規代謝経路についてデータベース化し、情報提供を行っていく。②目的化合物とモデル・産業宿主に対応した代謝モデルのケーススタディを拡張するとともに、代謝モデルデータベースの運用を開始する。③酵素反応データベースのアップデートと高精度化をはかり、データベースを運用する。④各企業・大学のテーマで測定する（オーミクス）データを集積拡大し、データベースを構築する。

(4) 実施体制

研究の実施体制としては、①代謝設計基盤のインターフェイス開発、②代謝モデルのデータ集積・構造化、は神戸大学が中心となり、理化学研究所と情報を共有し研究を進める。また、③酵素反応データ集積・構造化、④測定データのデータ集積・構造化については神戸大学と産業技術総合研究所が連携して進める。



(5) 運営管理

テーマの運営に関しては、①代謝設計基盤のインターフェイス開発、②代謝モデルのデータ集積・構造化、③酵素反応データ集積・構造化、④測定データのデータ集積・構造化のいずれにおいても、神戸大学を中心に進め、理化学研究所、産業技術総合研究所との間で、1カ月に一度を目安に連絡会議を実施し、開発進捗を共有している。また、更に、四半期に一度全体の情報を共有化し、各課題の進捗を共有している。

(6) 実施の効果

本研究項目は、スマートセル設計システムへの組み込みを想定し、プロジェクト全体への展開およびプロジェクト以外への利活用を視野に入れ設定しており、スマートセル設計システムの有効なツールとなりうる。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標 (2018年度末)	達成 度※	達成に向けた状況
① 代謝設計基盤のインターフェイス開発	開発アルゴリズムを利用したインターフェイスを開発する。	○	開発アルゴリズム (M-path, BioProV, レトロ合成, SVM 予測など) のインターフェイス実装済みであり、高機能化について検討中。
② 代謝モデルのデータ集積・構造化	拡張・最適代謝モデルの集積・構造化を行う。	△	目的化合物とモデル・産業宿主に対応した最適代謝モデルを集積済みであり、データベース化に向けた要件について検討中。
③ 酵素反応データ集積・構造化	酵素反応データ集積・構造化とデータベース開発を行う。	○	キュレーションされた酵素反応データおよび学習・構造計算により予測される酵素反応データについてデータ集積とデータベース化を実施。
④ 測定データのデータ集積・構造化	測定データの集積と構造化を行う。	△	測定データの集積については、各企業・大学に散逸したデータ集積の枠組み構築とデータベース構築に向けて実施中であり、達成できる見込み。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
① 代謝設計基盤のインターフェイス開発	M-path, BioProV, レトロ合成基盤などの代謝設計基盤のインターフェースの公開、運用展開について検討中である。	代謝設計基盤の公開と運用を行う。	○達成見込み
② 代謝モデルのデータ集積・構造化	目的化合物とモデル・産業宿主に対応した最適代謝モデルを集積済みであり、データベース化に向けた要件を整理すると共に、代謝モデルのケーススタディ拡張を検討中である。	代謝モデルデータベースの構築を行う。	○達成見込み
③ 酵素反応データ集積・構造化	酵素反応データベースのプロトタイプを構築し、酵素遺伝子・改変候補を提示する酵素反応データベースの構築中である。	酵素反応データベースの構築と運用を行う。	○達成見込み
④ 測定データのデータ集積・構造化	各企業・大学のテーマで測定する(オーミクス)データを集積し、情報解析に必要なデータベース構築を行っている状況である。	測定データのデータベース構築を行う。	○達成見込み

(9) 研究開発の成果と意義

本項目に関する各種ツール開発の概要を図 2.3.2.4-1 に示す。

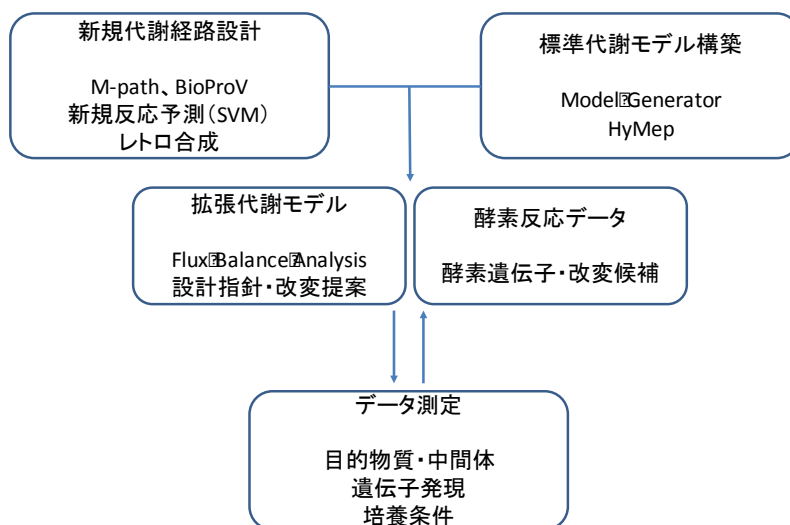


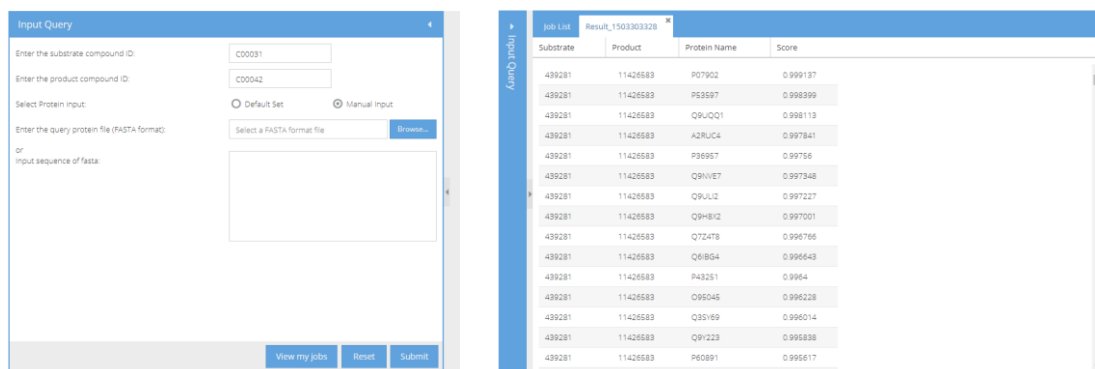
図-2.3.2.4-1 代謝設計支援ツールの概要

① 代謝設計基盤のインターフェイス開発

平成 28 年度に、代謝経路設計アルゴリズム（レトロ合成設計基盤、SVM 予測）を開発し、平成 29 年度にはインターフェイスを実装した（図 2.3.2.4-2、3）。代謝経路設計アルゴリズム（M-path, BioProV, レトロ合成, SVM 予測）の各ツールの高機能化と公開・運用については検討中である。



図-2.3.2.4-2 レトロ合成設計基盤



入力情報

出力結果

図-2.3.2.4-3 SVM 予測基盤

② 代謝モデルのデータ集積・構造化

平成 28 年度に、代謝モデルの再構築には開発中のツールである GSM generator を利用して、モデル微生物（大腸菌）および産業宿主（放線菌、コリネ菌）の標準代謝モデルを SBML 形式で集積した。平成 29 年度には、モデル微生物（大腸菌）および産業宿主（放線菌、コリネ菌）の標準代謝モデルを目的物質の代謝経路を導入した拡張代謝モデルへと展開、集積するとともに、GSM generator、フラックスバランス解析（FBA）、HyMep の各ツールの整備を行った。平成 30 年度はこれまでに構築した代謝モデルとそれらに基づく予測の検証実験の結果（オミクスデータを含む）などからモデルの高精度化を図り、目的化合物・宿主毎の最適代謝モデルを構築し、データベース化に向けた要件整理を行うとともに、各解析ツールのインターフェイスを開発する。

③ 酵素反応データ集積・構造化

平成 28 年度に、論文・酵素反応データベースからの酵素反応データおよび酵素反応学習・構造計算により得られるデータを集積した。平成 29 年度には、酵素反応データのキュレーションおよび学習・構造計算により予測される酵素反応データについてデータ集積と一部データについてインターフェイスを開発した（図-2.3.2.4-4）。平成 30 年度は、酵素遺伝子・改変候補を提示する酵素反応データベースの構築を行う。

EC番号	生物種	基質・生成物	活性	...					
4.3.1.17	L-Serine ammonia-lyase	Deamination: elimination	Glutus galus	L-SER	STRUCTURE_SUB	Product	STRUCTURE_PROD	Km	Condition
4.3.1.17	L-Serine ammonia-lyase	Deamination: elimination	Corynebacterium sp.	L-SER	STRUCTURE_SUB	Product	STRUCTURE_PROD	NA	NA
4.3.1.17	L-Serine ammonia-lyase	Deamination: elimination	Chaetidium acidivivis	L-SER	STRUCTURE_SUB	Product	STRUCTURE_PROD	7.8	-
4.3.1.17	L-Serine ammonia-lyase	Deamination: elimination	Peptostreptococcus asaccharolyticus	L-SER	STRUCTURE_SUB	Product	STRUCTURE_PROD	0.8	-
4.3.1.17	L-Serine ammonia-lyase	Deamination: elimination	Aerobacter gothicus	L-SER	STRUCTURE_SUB	Product	STRUCTURE_PROD	7	-
4.3.1.17	L-Serine ammonia-lyase	Deamination: elimination	Chaetidium acidivivis	L-SER	STRUCTURE_SUB	Product	STRUCTURE_PROD	NA	NA
4.3.1.17	L-Serine ammonia-lyase	Deamination: elimination	Lactobacillus fermentum	L-SER	STRUCTURE_SUB	Product	STRUCTURE_PROD	0.5	-

図-2.3.2.4-4 酵素反応データベース

④ 測定データのデータ集積・構造化

平成 28 年度に、各企業・大学のテーマで測定する（オーミクス）データについて、集積を開始した。平成 29 年度には、各企業・大学のテーマで測定する（オーミクス）データについて、情報解析に必要なデータ整理・標準化を行った。平成 30 年度は、各企業・大学のテーマで測定する（オーミクス）データについて、情報解析に必要なデータベース構築を行う。

(10) 成果の普及

区分	論文		その他外部発表				展示会	受賞	フォーラム等※
	査読付き	その他	学会・発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	プレス発表	その他			
年度									
H28	0	0	3	0	0	0	0	0	0
H29	0	0	6	0	0	0	2	0	1
H30	0	0	6	0	0	0	1	0	0
合計	0	0	15	0	0	0	3	0	1

※実施者が主体的に開催するイベント（フォーラム、シンポジウム等）

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

情報解析技術・ツールなどの基盤的技術は特許化しにくいという背景のもと、各種技術・ツール・データベースに関しては論文投稿による技術優位性のアピールを行うとともに、ユーザへのインターフェイスとしてはノウハウ蓄積(秘匿化)、オープンクローズ戦略を使い分けることで競争的優位性を維持していく。

区分 年度	特許出願		
	国内	外国	PCT 出願
H28	0	0	0
H29	0	0	0
H30	0	0	0
合計	0	0	0

2.3.2.5 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子の探索

担当機関：産業技術総合研究所 旭化成ファーマ(株)、長岡技術科学大学、花王(株)（再委託）、バイオインダストリー協会（再委託）、九州大学（再委託）

(1) 背景と目的

微生物による効率的物質生産を実現するためには、物質生産時に微生物細胞内で起こっている現象をメカニズムとして理解し、それを一つの稼働システムとして制御することが求められる。ターゲットとする生産物質がタンパク質の場合も化合物等の代謝産物である場合も、細胞を制御するために実際に行われる人為的操作は、遺伝子導入や破壊等の遺伝子改変が中心となる。そこで、ターゲット物質の生産性に寄与するために必要な改変候補遺伝子を提示するためには、遺伝子レベルで細胞内で行われている制御システムをネットワークグラフとしてモデル化する事が有効であると考えられる。

本研究開発項目の目的は、遺伝子の操作による収量向上を行うため、遺伝子発現データから遺伝子相互間の制御関係を明らかにし最適な操作を提示する数理科学的手法を開発することである。

ここでは、限られた量の実験観測データを解析し、収量向上のために改変すべき遺伝子を提示するシステムティックな手法を開発する。これは、遺伝子相互間の発現制御関係のネットワーク構造をデータから同定または推定する（ネットワーク推定）手法を核として、その前段階となるネットワークに組み入れるべき遺伝子のリストアップを行う（遺伝子抽出）手法、その後段階となるネットワーク構造からの制御因子探索手法からなる。遺伝子抽出を適切に行うことにより、発現制御関係ネットワーク構造の推定に必要なデータの量を低減することができ、物質生産時に生体細胞内で起こっている現象をより高精度にネットワークモデルとして表現することが可能になる。さらにはネットワーク構造をもとに、ターゲット遺伝子の発現量を最大化もしくは最小化するために必要な制御因子をシステムティックに探索する手法を開発することにより、収量向上のプロセスを大幅に加速することが可能になる。上記目的を達成するため、本研究開発項目では下記3つの技術を技術開発項目として設定する。

- 1) ターゲット物質生産性に寄与する可能性のある遺伝子群の推定技術（遺伝子選択技術）
- 2) 推定した遺伝子間の制御構造をネットワークグラフとしてモデル化する技術（ネットワーク構造推定技術）
- 3) 推定したネットワーク構造からターゲット遺伝子発現量の最適制御因子を探索する技術（制御因子探索技術）

それぞれの技術について詳細を下記に記載する。

1) 物質生産性に寄与する可能性のある遺伝子群の推定技術

生体細胞において、物質生産等の細胞内現象に必要な遺伝子は約 10%～20%と推定されている。しかしながら、現在、物質生産時に実際に貢献している遺伝子の多くは未同定である。そこで、本研究課題では、遺伝子発現データや変異株ゲノムデータ等のオーミクスデータから、効率よくかつ高精度に物質生産に寄与している遺伝子群を同定する情報技術を開発する。遺伝子選択を適切に行わないと、次のネットワーク構造推定において数値データから計算した遺伝子間の制

御構造が結局なんの意味も持たない、ただの数値遊びに終わってしまう。遺伝子選択を高精度に行うことで、この後に行うネットワーク構造推定でモデル化したものが、生体細胞内でおこっている現象をモデル化したものとなる。

2) 遺伝子間の制御構造をネットワークグラフとしてモデル化する技術

ターゲット物質生産性が、細胞内における多数の因子の影響に起因すると仮定すると、ターゲット物質生産量を結果変数とし、細胞内因子を説明変数とした確率モデルとして表現可能になる。ターゲット物質の生産性を効率的に強化するためには、係数が最大値である説明変数を同定し、それを改変候補として提案すべきである。そこで、まずはこれらの説明変数群と目的変数間の関係性を明らかにするために、多変量解析を基盤とした統計モデルによるネットワーク構造推定手法を開発し、適用する。具体的には、1. で推定された遺伝子群についてベイジアンネットワークや共分散構造解析を基盤としたネットワーク構造推定手法の改良を行うとともに、実験結果から得られた情報を反映した改良型ネットワークグラフ再推定手法を開発する。

3) ネットワーク構造からターゲット遺伝子発現量の最適制御因子を探索する技術

1. 2. の技術によって、ターゲット物質の生産量に直結するターゲット因子をノードとして包含した遺伝子間の制御構造がネットワークグラフとして推定される。ここで推定されるネットワークグラフの構造は往々にて単純な階層構造にとどまらず、場合によっては再帰的構造を包含した複雑な構造を有する。そのため、ネットワークグラフに存在するどのノード（遺伝子）がターゲット因子の量を調節する上で効率的な制御因子となりうるかについて推定・検証する技術が必要である。そこで、再帰的構造を含め、ネットワークグラフの構造およびエッジの係数からターゲット因子の量を調節（最大化・最小化）するために必要な制御因子を探索する技術を開発する。

上記、3つの技術開発を行うために、以下2つの研究課題を設定し、それぞれ2.3.3.1（コレステロールエステラーゼの生産性向上による有効性検証）、2.3.3.2（糸状菌を用いた有用タンパク質同時生産制御による有効性検証）の実証課題と連携しながら技術の開発を実施する。

研究課題① 単一標的タンパク質生産を制御するネットワーク推定手法の開発（2.3.3.1と連携）

研究課題② 複数標的タンパク質生産を制御する最適制御法の開発（2.3.3.2と連携）

(2) 位置づけ、目標値

微生物を利用した物質生産の効率化は、古くは「醗酵」に始まり、最近では「合成生物学」を利用した効率化が求められている。その中で、欧米ではいち早く「情報解析技術」を微生物生産技術向上に組み込んだ取り組みが行われており、バイオエタノール等でいくつかの成功を収めている。欧米型の取り組みにおいて一番の特徴は機械学習を基盤とした大量データからの特徴量抽出であり、データ数に応じて、物質生産の指針となる育種方針の提案精度は向上する。しかしながら、このような手法の短所として、高精度な結果を得るためには、ターゲット物質毎に偏向していないデータを大量に取得する必要がある、高コストであることが挙げられる。

本課題では、上記のように先行している欧米の微生物物質生産分野に対抗するため、欧米型の短所である「ターゲット物質毎に大量データを必要とする」部分を最小限にするための情報解析技術としてシステム生物学的アプローチを基盤とした技術開発を行っている。本手法により、①より少量のデータで（低コスト）、②より正確に（細胞内メカニズムを基本とする）、③汎用的に（数理モデル構築）の3つが可能になると考えている。

	中間目標値 (H28)	最終目標値 (H32)
1. 遺伝子選択技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ システムティックな実験デザイン技術の開発 ・ 物質生産関連遺伝子群の同定技術の開発 ・ 各株 (<i>Burkholderia</i> および <i>Trichoderma</i>) にて物質生産に寄与する遺伝子を選択する手法の確立 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 各実証課題の検証結果を反映した、遺伝子再選択手法の改良
2. 遺伝子間のネットワーク構造推定手法の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ 物質生産に寄与すると考えられた遺伝子群において、少数のデータから制御構造を推定する技術の開発と適用 ・ 遺伝子ネットワークモデル構築と高精度化 ・ 産業微生物で改変ターゲット遺伝子選定技術の有効性を実証 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 発現ダイナミクスの解析シミュレーションによって、最大収量実現にむけた有効性の実証 ・ 恣意的に選択された遺伝子を入れたネットワーク構造推定手法への改良と一般化
3. 推定したネットワーク構造からの制御因子探索技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ 改変ターゲット遺伝子選択技術の確立 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ネットワーク構造上のすべての遺伝子について、ターゲット因子への影響力を数値化する技術の開発

(3) 全体計画

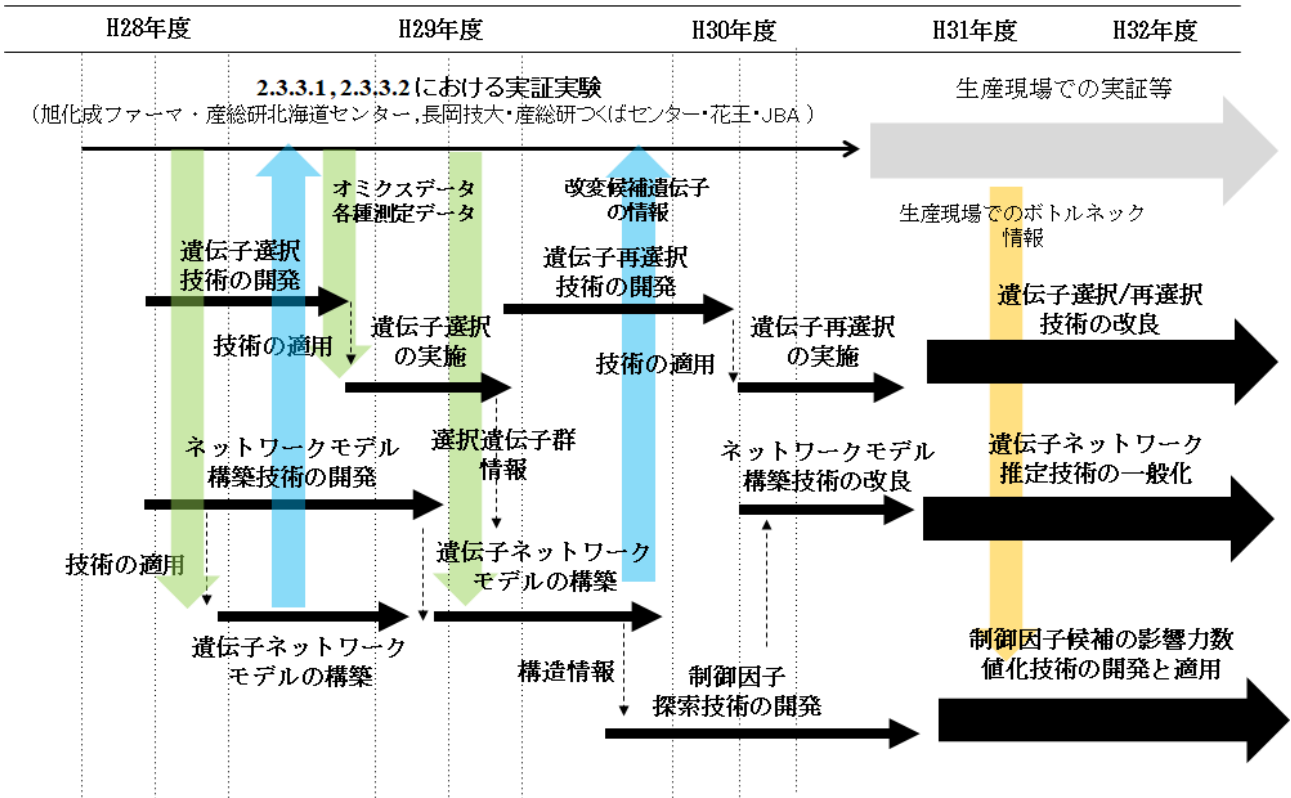


図 2.3.2.5-1 設定した技術課題と年次計画

本研究開発項目は以下3つの技術開発を実施する。1) 遺伝子選択技術の開発、2) ネットワークモデル構築技術の開発、3) 制御因子探索技術の開発。当初は実データをもとに1)の技術開発を行い、ある程度技術が開発できたところで、2)の技術開発を実施する。1)については、実証課題における検証結果をもとに改良等を行いつつ、2)で開発した技術を実データへ適用する。実データから2)による結果が得られたところで、3)の技術開発を実施する。1), 2), 3)は並行して実施するのではなく、シークエンシャルに技術開発、実データへの適用、適用結果からの改良を実施する。

初年度はデータ蓄積が多い2.3.3.2の実データを利用し、特に1)の遺伝子選択技術の開発に注力する。また、既存の手法によるネットワークモデル構築を実施することで、既存手法における課題を洗い出す。

平成29年度までに第1弾のネットワークモデル構築を実施し、2.3.3.2課題に改変候補遺伝子を提案する。その実証実験を行っている間に、平成28年度に実施した遺伝子選択手法での課題を再検討し、遺伝子選択手法の改良を実施する。また、2.3.3.1課題についても平成29年度に各種オミクスデータが取得され始めることを受けて、開発・改良した遺伝子選択手法の適用、遺伝子ネットワークモデル構築技術の適用を実施する。計算結果は各実証課題に適宜フィードバックし、手法の精度について検証してもらう。平成29年度中に1~2回、各実証課題についてネットワーク構築を実施し、ネットワークモデル構築上の課題等を洗い出す。平成30年度は前年度までに洗い出された課題について解決法を検討するとともに、技術課題3)について開発を実施する。課題3)は、実際のネットワークモデルが構築されないと、アルゴリズム開発を実施することができないことから、平成30年度からの開始とする。

(4) 実施体制

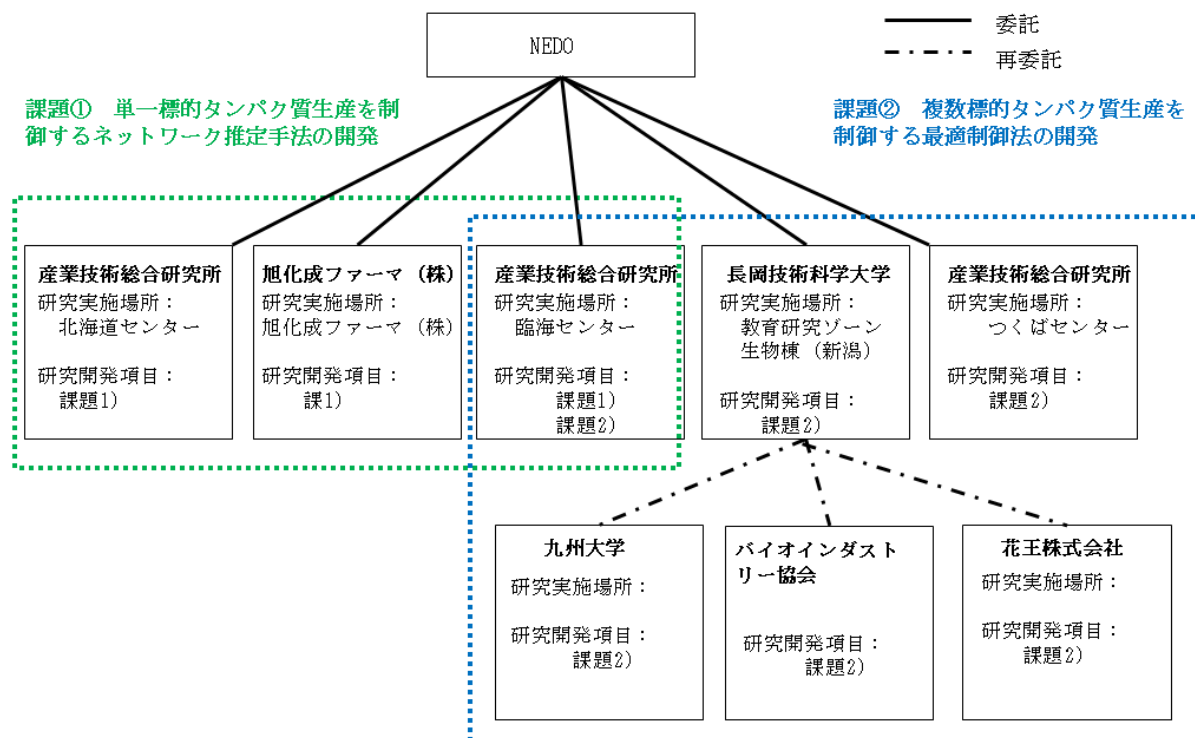


図 2.3.2.5-2 本研究開発項目の実施体制

本研究開発項目は、2.3.3.1 および 2.3.3.2 の実証課題と連携しながら技術開発を実施している。情報解析技術は産総研臨海センターがすべて実施している。本情報解析技術を開発する上で必要なゲノム、トランスクリプトーム等の各種オーミクスデータ、およびターゲット物質の生産量データ、また遺伝子発現ネットワークモデルで推定された制御因子の正誤判定等の検証実験等については、2.3.3.1 および 2.3.3.2 の各参画機関が実施している。各参画機関で実施された検証結果を元に技術の改良を実施している。

(5) 運営管理

- ・情報解析技術の開発と適用については、中心機関である産総研臨海センターにて実施機関で週1度以上の研究打ち合わせ、および研究内容についての打ち合わせを行い、研究の方向性を確認しながら本課題を実施した。
- ・実証課題関係者とは、研究実施者レベルでは適宜月1度～複数回の研究打ち合わせを行った。
- ・2～3カ月に1度程度、課題関係者全員が集まり、NEDO、PLを含めた進捗報告会と研究方針についての会議を実施した。

(6) 実施の効果

本研究開発項目の実施により、従来法では発見が難しい改変候補遺伝子を探索することが可能になる。具体的な成果は後述するが、事実、従来育種では発見することが困難と予想される複数の制御因子の同定を実現してきた。従来法によって、これらの制御因子を同定するためには、長

期間におよぶ育種および大量の変異株作成が必要と予想されることから、少なくとも育種期間の短縮(1/2~1/3)、さらに変異株作成コスト削減(1/2程度)の効果が期待される。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
1. 遺伝子選択技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ システムティックな実験デザイン技術の開発 ・ 物質生産関連遺伝子群の同定技術の開発 ・ 各株 (<i>Burkholderia</i> および <i>Trichoderma</i>) にて物質生産に寄与する遺伝子を選択する手法の確立 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子選択に必要な実験条件検討を実施し、実証課題にて実行した。 ・ 遺伝子同定技術を開発し、さらに実証結果を考慮した手法の改良を実施した。 ・ 各実証課題において遺伝子選択技術を適用し、遺伝子選択を実施した。 	◎ (予定していた論理演算による遺伝子選択や相関解析による遺伝子選択手法に加え、ネットワーク構造推定手法を組み合わせた新規遺伝子選択手法を確立した。また、実証実験の結果を受けて、遺伝子選択手法の第1段階目の改良を実施した。)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 今後の課題として、開発手法の一般化が必要。 解決方針としては、取得されえているデータから適切な遺伝子選択手法をシステムティックに決定するフローを開発する。
2. 遺伝子間のネットワーク構造推定手法の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ 物質生産に寄与すると考えられた遺伝子群において、少数のデータから制御構造を推定する技術の開発と適用 ・ 遺伝子ネットワークモデル構築と高精度化 ・ 産業微生物で改変ターゲット遺伝子選定技術の有効性を実証する 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ベイジアンネットワークモデルと構造方程式モデルを基盤としたネットワーク構造推定手法を開発/改良し、少数データからのネットワーク構造推定を実現した。 ・ 実証課題において遺伝子ネットワークモデル構築と高精度化を実施した。 	◎ (中間評価時点で一度ネットワークモデルからの改変ターゲット遺伝子選択を行う予定だったが、全般的に前倒しで実施することができ、遺伝子ネットワーク構築を複数回実施した。)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 実証課題からの検証結果を受け、オーミクスデータの追加を必要としないでネットワークモデルを高精度化する手法の開発が必要。

		<ul style="list-style-type: none"> 産業微生物で改変ターゲット遺伝子選定技術の有効性の実証研究を実施中である。 		
3. 推定したネットワーク構造からの制御因子探索技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> 改変ターゲット遺伝子選択技術の確立 	<ul style="list-style-type: none"> 推定したネットワーク構造から、グラフ上の係数値を利用した改変ターゲット遺伝子の選定手法を開発し、適用した。 	○ (2019年1月完成予定)	<ul style="list-style-type: none"> 複数ターゲットを同時制御するためにはもっとシステムティックに制御因子を探索する技術が必要。解決法として、ネットワーク構造上のすべての遺伝子について、ターゲット因子への影響力を数値化する手法を開発する。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
1. 遺伝子選択技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子選択に必要な実験条件検討済。 ・ 遺伝子同定技術を開発済。 ・ 各実証課題において遺伝子選択技術を適用し、遺伝子選択を実施済。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 各実証課題の検証結果を反映した、遺伝子再選択手法の改良 	<p>達成可能</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 実証課題からの検証結果を受けた遺伝子再選択手法については、方針が決まっているので達成可能。
2. 遺伝子間のネットワーク構造推定手法の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ ベイジアンネットワークモデルを実データへ適用可能。 ・ 構造方程式モデルを基盤としたネットワーク構造推定手法を開発済。 ・ 改変候補遺伝子を実証課題に提案し、産業微生物での検証実験を実施中。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 発現ダイナミクスの解析シミュレーションによって、最大収量実現にむけた有効性の実証 ・ 恣意的に選択された遺伝子を入れたネットワーク構造推定手法への改良と一般化 	<p>達成可能</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ダイナミクスについては、ブーリアンモデルによる解析は試行済のため達成可能。 ・ 恣意的に選択された遺伝子を導入したネットワーク構造推定手法については、ほぼ方針が決まっているので達成可能。
3. 推定したネットワーク構造からの制御因子探索技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ 推定したネットワーク構造から、グラフ上の係数値を利用した改変ターゲット遺伝子の選定手法を開発し、適用した。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ネットワーク構造上のすべての遺伝子について、ターゲット因子への影響力を数値化する技術の開発 	<p>達成可能</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ネットワーク構造上すべての遺伝子の影響力を数値化する手法については、2項関係から逆算する方法で開発中であり、達成可能。

(9) 研究開発の成果と意義

本課題において、ターゲット物質は単一ターゲット・複数ターゲット共にタンパク質である。そのため、ターゲットタンパク質をコードしている1つの遺伝子または複数の遺伝子群をターゲット遺伝子として、これらターゲット遺伝子の遺伝子発現量を調節するために必要な改変候補遺伝子探索のための情報解析技術の開発を行った。

1) 物質生産性に寄与する可能性のある遺伝子群の推定技術の開発（平成28年度～平成29年度）

・システマティックな実験デザイン技術の開発

生産量の違いが生じる複数の実験条件についての各種知見をもとに、ターゲット物質の生産量に寄与する遺伝子群を選択するうえで、最適な実験条件の選択手法を開発した。情報解析を実施する場合、物質生産に寄与する遺伝子同定のためにはポジティブデータのみならずネガティブデータも必要である。本開発では、ターゲット物質生産性という特徴を抽出するための寄与する実験条件の組み合わせ選定の定式化を行った。データの実験条件を可能な限りカテゴリ化することでデータの層別をシステマティックに行った。具体的には、培地条件、培養時間、株の種類、変異状態などの条件を洗い出し、必要なネガティブデータ取得のための条件組み合わせを推定するフローを開発した。その結果を参画機関に提示し、追加で必要な実験条件を提示した。

・物質生産関連遺伝子群の同定技術の開発

生産量によって実験データを複数のクラスに分類し、多群検定によって発現に変化が見られた遺伝子群を物質生産関連遺伝子として抽出した。特に、各クラス内において、生産量の推移と遺伝子発現量の推移に相関がみられる遺伝子群を、物質生産量に寄与する遺伝子として絞り込む手法の開発を実施した。具体的には、生産量に対応して変動している遺伝子群の抽出に必要な数値パラメータの算出方法を開発した。データの正規化手法を含め、各サンプルからの積集合から発現変動している遺伝子群を判断し、関連遺伝子候補として推定する手法として下記4つの遺伝子選択技術の開発を行った。

- ① 統計検定に基づく遺伝子選択技術
- ② 相関解析による遺伝子選択技術
- ③ 論理演算を組み合わせた遺伝子選択技術
- ④ ベイズ推定を組み合わせた遺伝子選択技術

① 統計検定に基づく遺伝子選択技術

データ群を着目している遺伝子の高発現のサンプル群と低発現のサンプル群に分類し、それぞれの群で分布に差がある遺伝子を検定により抽出する方法を開発した。検定手法は Welch の t 検定、Wilcoxon 検定、Brunner-Munzel 検定の3種類を候補とし、実験観測データに適用して検討を実施した。検定手法を実証課題のデータに適用した結果、有意水準 5%で Bonferroni の補正を適用した場合、有意となる遺伝子数は

Welch の t 検定 < Wilcoxon 検定 < Brunner-Munzel 検定

という結果となった。Wilcoxon 検定で有意となった遺伝子数は、Welch の t 検定の 3-5 倍、Brunner-Munzel 検定で有意となった遺伝子数は、Welch の t 検定の 10-20 倍であった。

発現データでは高発現群と低発現群で分散が大きく異なったことから、Wilcoxon 検定では擬陽性が増えたと考えられた。等分散性の検定である F 検定によって確認をしたところ、遺伝子によって等分散性は成り立っていない場合が多々あることが明らかになった。一方、Brunner-Munzel 検定の傾向として Wilcoxon 検定よりも P 値が低くなっていることから、擬陽性がさらに増えていると判断し、検定手法として採用しないこととした。

Welch の t 検定は、高発現のサンプル群と低発現のサンプル群で、母集団の平均が等しいという帰無仮説 H_0 を検定するものである。このため、着目している遺伝子と同様の発現挙動を示す遺

伝子、逆の発現挙動を示す遺伝子の両者が同時に検定できる。挙動が逆になる場合、検定統計量の符号で判断することにした。

② 相関解析による遺伝子選択技術

実験データが少ない状態から、ターゲット物質の生産量に寄与している遺伝子選択手法として相関解析による遺伝子選択技術を開発した。具体的には、ターゲット物質（タンパク質）をコードしている遺伝子の発現パターンと同様のパターンを持つ遺伝子群を全遺伝子から選択するため、下記プロセジャーを確立した。

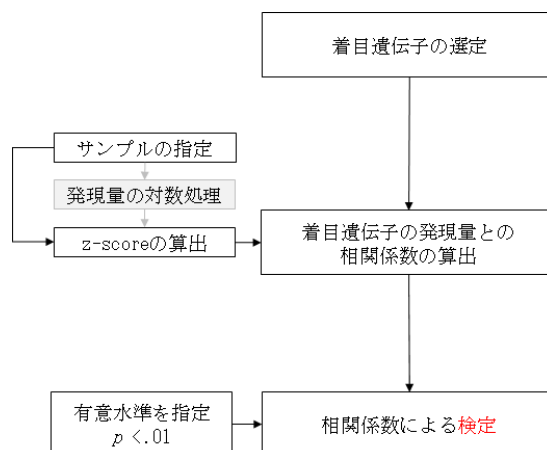


図 2.3.2.5-4 相関解析による遺伝子選択フロー

③ 論理演算を組み合わせた遺伝子選択技術

複数のターゲット遺伝子を同時制御するためには、どのような制御を求めるかによって選択すべき遺伝子が異なることが予想される。そこで、これまでに開発した統計検定による遺伝子選択手法および相関係数を利用した遺伝子選択手法相当に、論理演算を組み合わせた下記の遺伝子選択手法を開発した。

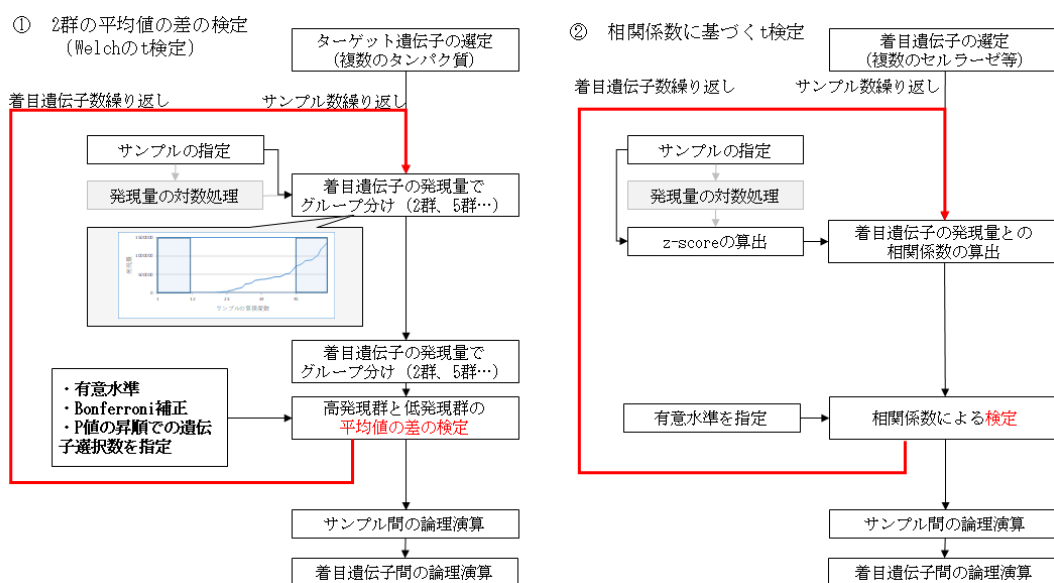


図 2.3.2.5-3 論理演算を組み合わせた遺伝子選択フロー

④ ベイズ推定を組み合わせた遺伝子選択技術

これまでに開発してきた遺伝子選択手法を実証課題に適用したところ、実際に選択される遺伝子数は 100 個以上になる場合が多く、遺伝子ネットワークとしてベイジアンモデルのみが適用可能であった。そこで、より高精度な遺伝子選択を実施するため、①～③のいずれかの手法で選択された遺伝子群について制約ベースのアルゴリズムを適用したベイジアンネットワークを構築し、ターゲット遺伝子と直接相互作用を有する遺伝子群を選択する手法を開発した。

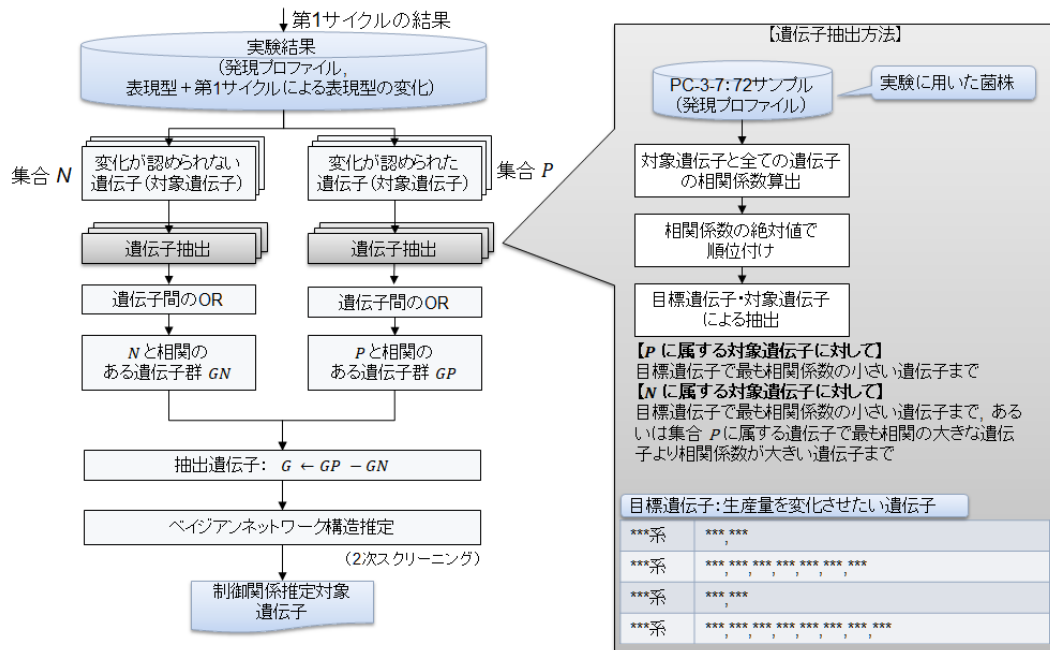


図 2.3.2.5-4 ベイズ推定を組み合わせた遺伝子選択フロー

・各株 (*Burkholderia* および *Trichoderma*) にて物質生産に寄与する遺伝子を選択する手法の確立

これまでに開発した物質生産に関する遺伝子選択技術を実証課題 2.3.3.1, 2.3.3.2 の *Burkholderia* および *Trichoderma* の各産業微生物に適用した。各種パラメータの最適値を求め、実際に物質生産に寄与している遺伝子群の数について、全遺伝子の 1%以下にまで絞り込みを行った。

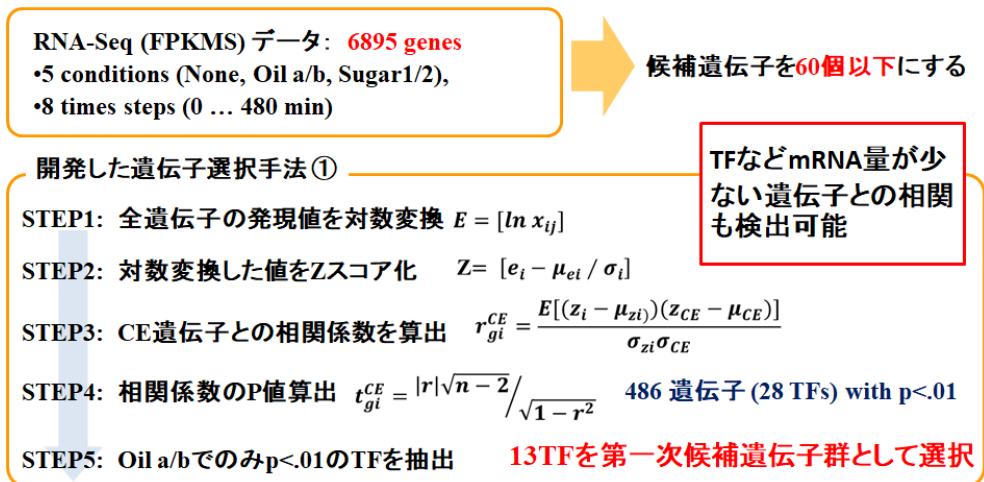


図 2.3.2.5-5 *Burkholderia* における遺伝子選択結果

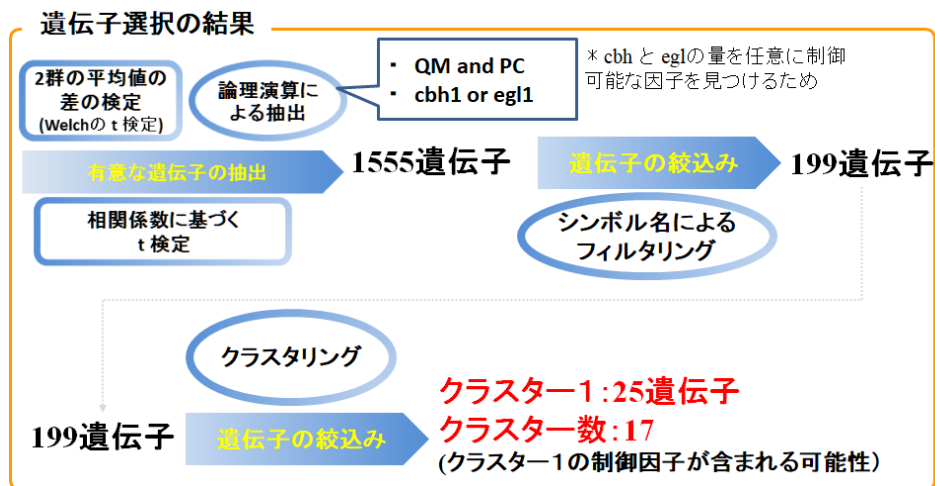


図 2.3.2.5-6 *Trichoderma* における遺伝子選択結果

2) 遺伝子間の制御構造をネットワークグラフとしてモデル化する技術の開発 (平成 29 年度～平成 30 年度)

・物質生産に寄与すると考えられた遺伝子群において、少数のデータから制御構造を推定する技術の開発と適用

遺伝子選定技術により選定された遺伝子群にターゲット遺伝子を加えた遺伝子群の発現データを元に、それらの遺伝子間の制御構造をモデル化した。まずは少数の実験データからモデル化するため、簡便なブーリアンネットワークと偏相関を基盤とした数理モデル手法を適用した。

開発した手法は以下の通りである。

- (1) 時系列データから kmeans クラスタリングを利用し、バイナリー (0/1) 状態のデータを作成。
- (2) バイナリーの時系列データを入力して確率ブーリアンネットワークによる構造推定を実施。
- (3) 構造推定結果のオブジェクト内容の出力。
- (4) 20 ステップのシミュレーション。
- (5) 各ステップの状態を時系列で可視化。

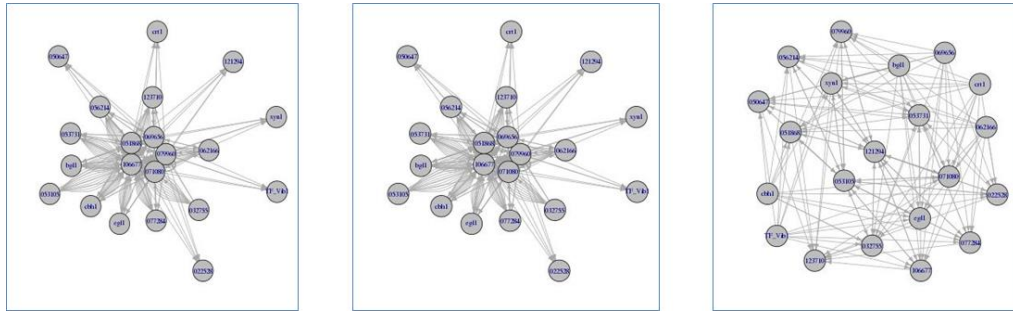


図 2.3.2.5-7 *Trichoderma* におけるブーリアンネットワーク結果

推定されたブーリアンネットワークの構造を、図 2.3.2.5-7 に示した。菌株、実験条件によりネットワークの形は異なっているが、始点、終点となる node は共通していた。また、確率ブーリアンネットワークとして推定されているため、一つの node に多数の arc が接続される結果となり、制御構造を明らかにするうえで構造が煩雑になることが明らかになった。

偏相関に基づいたネットワーク構造については、遺伝子選択の段階でターゲット遺伝子と発現データの相関性が高い遺伝子を選択しているため、各遺伝子の発現データベクトルの類似性が高く、逆相関を計算することが難しいことから、現段階で使用するのは不適切であると判断した。

・ 遺伝子ネットワークモデル構築あるいは解析の高度化

ベイジアンネットワーク、構造方程式モデルなどの手法を少数の取得データ数でも適用できるように改良を行った。さらに、上記の複数の手法で構築した複数のネットワークモデル中に存在する共通の遺伝子-遺伝子間制御関係を抽出し、制御ネットワークモデルの再構築を行った。検討したベイジアンネットワークモデルは以下の通りである。

表 2.3.2.5-1 ベイジアンネットワークモデルの検証アルゴリズム一覧

パラメータ	検討			
	連続値	離散値		
推定アルゴリズム (制約ベース)	Grow-Shrink	Incremental Association	Fast Incremental Association	Interleaved Incremental Association
推定アルゴリズム (スコアベース)	Hill-Climbing	Tabu Search		
推定アルゴリズム (ハイブリッド)	Max-Min Hill-Climbing	Restricted Maximization		
制約条件	有	無		
Bootstrap	有 (10000サンプリング)	無		

上記アルゴリズムによるネットワーク構造推定を可能にするために、以下の技術を開発し構造推定プログラムを構築した。

- 1) 制約ベースの推定手法において、無向 arc を順番に抽出し、巡回エラーにならない場合は強制的に方向を設定するロジックを追加

- 2) スコアとして BIC (Bayesian Information Criterion)、AIC (Akaike Information Criterion) を算出
- 3) 実験観測データによるパラメータ学習による線形回帰係数の算出
- 4) 条件付き独立の検定に基づき、arc の強度として P 値算出

・産業微生物で改変ターゲット遺伝子選定技術の有効性を実証する

開発した手法を実証課題データに適用し、実データからの遺伝子ネットワーク構築を行った。

2.3.3.1 課題については、遺伝子選択によって 13 個の転写因子が選択された。これらの遺伝子群についてまずは構造方程式モデリングによるネットワーク推定を行った。

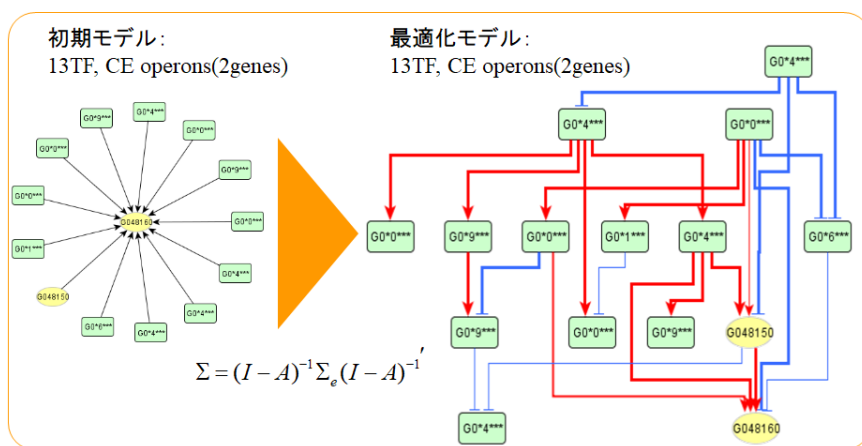
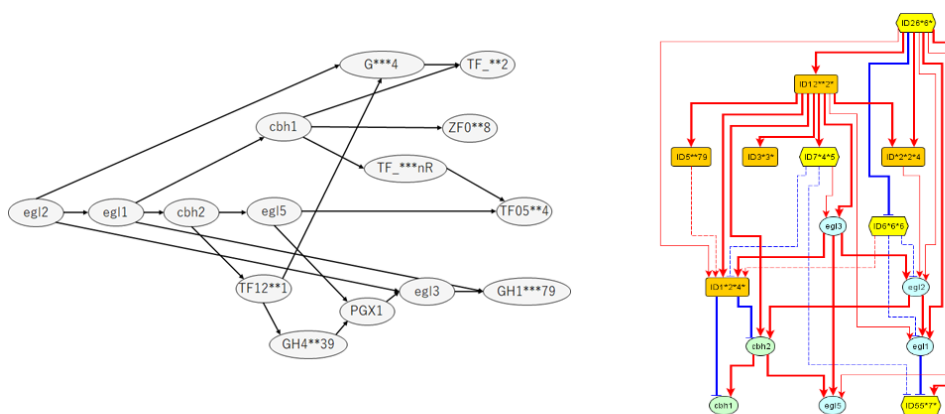


図 2.3.2.5-8 *Burkholderia* における遺伝子ネットワーク推定結果

2.3.3.2 課題については第一段階の遺伝子選択によって 15 個の遺伝子が選択された。これらの遺伝子群についてベイジアンネットワークと構造方程式モデリングによるネットワーク推定を行った。



a. ベイジアンネットワークによる構造推定 b. 構造方程式モデリングによる構造推定

図 2.3.2.5-9 *Trichoderma* における遺伝子ネットワーク推定結果

ここから得られた改変候補遺伝子の結果を、2.3.3.1 および 2.3.3.2 参画機関にフィードバックし、ネットワーク構造の精度についての検証実験を行った。その結果を受け、ネットワーク構造の高精度化を行った。各課題における最新のネットワーク構造を以下に示す。

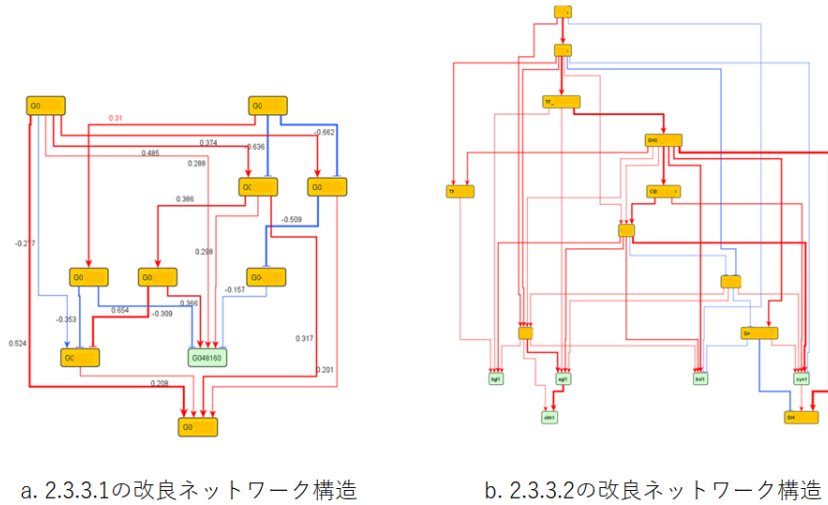


図 2.3.2.5-10 産業微生物における改良型遺伝子ネットワーク推定結果]

図 2.3.2.5-10 で示した改良ネットワーク構造は、第一弾で推定したネットワーク構造と比較し、測定データとの適合度はすべての指標において高く、より高精度なモデル構築を実現した。

3) ネットワーク構造からターゲット遺伝子発現量の最適制御因子を探索する技術（平成 30 年度以降）

・改変ターゲット遺伝子の選定技術の確立

構築した高精度のネットワークモデルから各宿主の生産性を増強するために、操作する遺伝子の選定技術を開発した。具体的には、推定したネットワークモデルからターゲット遺伝子上流構造だけから構成されるサブグラフを抽出し、測定データが時系列データである場合はブーリアンモデルを適用し改変候補遺伝子を推定する技術を開発した。

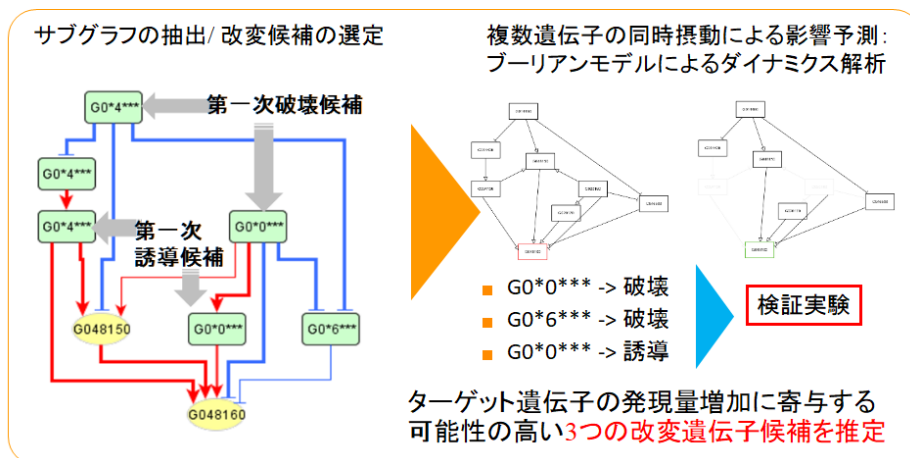


図 2.3.2.5-11 ブーリアンモデルによる改変候補遺伝子推定結果

次に複数のターゲット遺伝子毎に上流構造をサブグラフとして抽出し、それらサブグラフからターゲット遺伝子の発現調節を行う可能性の高い制御因子候補を選択する技術を開発した。

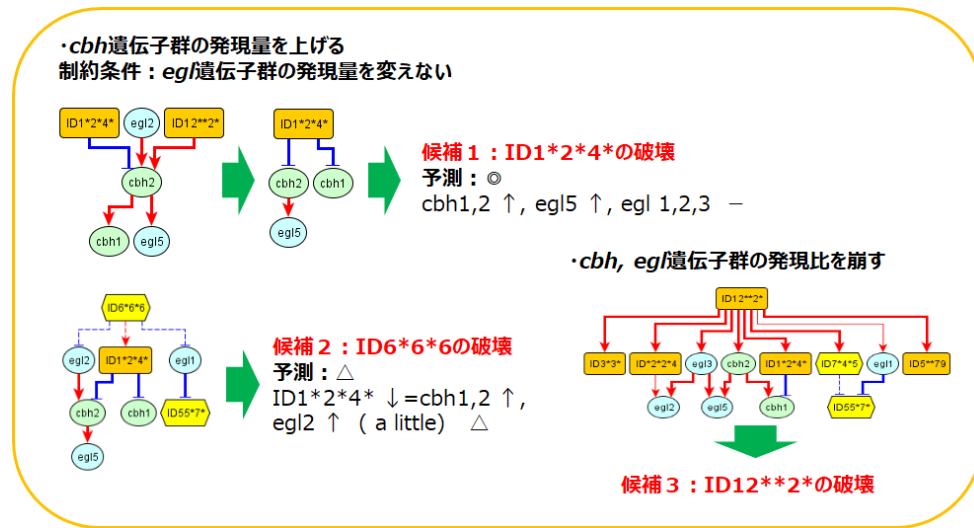


図 2.3.2.5-12 サブグラフ抽出による改変候補遺伝子推定結果

現在、各種検証実験を行っているところではあるが、特に 2.3.3.2 については、上記改変候補遺伝子のうち、ターゲット遺伝子群を調節する遺伝子の発見に成功した。

(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	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	1	0	5	0	1	0	0
2018 *1	0 (1)	0 (1)	6 (10)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	3	2	15	2	2	0	0

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	1	0	0
2018 *1	2 (0)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	5	0	0

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.2.6. タンパク質発現・機能制御のための遺伝子配列設計

担当機関：産業技術総合研究所、神戸大学、東北大学、岡山大学（再委託）

(1) 背景と目的

酵素や機能性タンパク質を産業利用するには、生産量増大のための高発現化や、高機能化が重要となる。また、代謝経路を作成するためには、その経路内にある、生合成酵素、転写制御因子等に対応する遺伝子を導入する必要があるが、そのタンパク質の発現量を調節することによって、代謝経路の流量（化学反応量）を考慮した改変が可能になる。本項目では、配列改変によるタンパク質発現・機能制御法の開発を行う。

(2) 位置づけ、目標値

課題①:対象市場, 製品

蛋白質発現量向上のため
コドン頻度を用いた最適化が
一般的に行われている
(例: GenScript社)



一方、蛋白質発現量を向上させる要因は
はっきりしておらず、この分野の研究は
しばしばトップジャーナルに掲載される

ARTICLE

Codon influence on protein expression in *E. coli* correlates with mRNA levels

Grigory BalF¹, Hiko Letao², Jihun Seoh³, W. Nicholas Price^{1*}, Kun-Ho Wee⁴, Min-Ho An⁵, An D. Laif⁶, Myoung Yehosh⁷, John K. Sweatt⁸, Thomas B. Acton⁹, Bing Xiao⁹, Gaetano T. Monteleone¹⁰, Daniel P. Aalberts¹¹ & John F. Hazel¹

課題①: 様々な特徴量を用いた配列改変による蛋白質発現量調節法の確立
目標値(中間) 高発現化時、発現量3倍、低発現時1/3程度(最終) 学術研究で用いられない、企業所有宿主でも中間目標値を達成

課題②:対象市場, 製品

機能性蛋白質が耐熱性の問題などから
利用できない事態がしばしば発生する
(例: ワクチン蛋白質)



ワクチンの市場規模: 280億ドル(2010)
コールドチェーン(冷蔵流通)が整っていない
発展途上国を市場として拡大するためには
耐熱性向上が重要

課題②: 分子動力学(MD)シミュレーションを用いた機能性蛋白質高機能化法の確立
目標値(中間) 変性温度10度以上向上(最終) 学術研究で用いられない、企業所有蛋白質でも中間目標値を達成

(3) 全体計画

		H28	H29	H30	H31	H32
課題①	配列設計法の構築					
	企業所有宿主での実証					
課題②	高機能化法の構築					
	企業所有酵素での実証					

(平成 28 年度実施内容)

課題①：翻訳に関する最新研究の妥当性・他宿主への適用性を、産総研独自データに基づいて検証し、得られた結果に基づき新規遺伝子改変法を開発する。これまで、遺伝子改変手法では特徴量としてコドン頻度を用いてきたが、最新の研究で翻訳に関与すると示唆されている、遺伝子の mRNA 量、mRNA の二次構造形成度、翻訳に使われる tRNA の種類、SD 配列が ORF 内に出現する頻度、ヒストンとの結合安定性、人工イントロン導入なども考慮した遺伝子改変による発現量制御法の開発を行う。その際、産総研・田村らが独自に行ってきた蛋白質生産実験に関するデータも用いて、手法を開発する。遺伝子改変法が出来次第、原核生物、真核生物を用いた、蛋白質発現による検証実験を開始し効果を検証する。

課題②：MD シミュレーションを用いた機能性蛋白質高機能化法の開発を行い変異体の予測を行う。具体的には、機能性蛋白質の熱安定性を予測するための MD シミュレーションを用いた手法を開発する。高温での MD による熱安定性の測定だけでなく、蛋白質に外力を加えることで変性しやすくする計算系の開発など、多角的な検討を加える。機能性蛋白質としては、家畜用ワクチンなどを用い、X線結晶解析やホモロジーモデリングにより MD 計算の初期構造を作成する。計算系構築後、変異体の熱安定性予測を行う。耐熱性向上のための配列改変としては、(a) 蛋白質内部の疎水性向上、(b) SS 結合、塩橋、水素結合の導入、(c) 変性構造の不安定化、などが考えられるが、まずはいずれか一つを導入した改変を行う。また、高機能化の検証実験を開始する。具体的には、アミノ酸改変体の発現・熱安定性測定を行う。

(平成 29 年度実施内容)

課題①：前年度行った蛋白質生産実験データを元に、遺伝子改変による蛋白質発現量調節法をさらに改良する。データ数が増えた時点で、機械学習などの人工知能に関する手法を導入した、新規遺伝子改変法の開発も検討する。また、本年度に開発した手法の検証も継続して行う。さらに、蛋白質の発現量が増加するにつれて、アミノ酸の枯渇による他蛋白質の発現量低下、凝集体形成などにより、酵母が死滅するなどの悪影響を生じることが予想される。そこで、蛋白質の発現量に応じて、酵母内にどのような現象・影響が及ぼされるのか簡便に調査する手法を開発する。

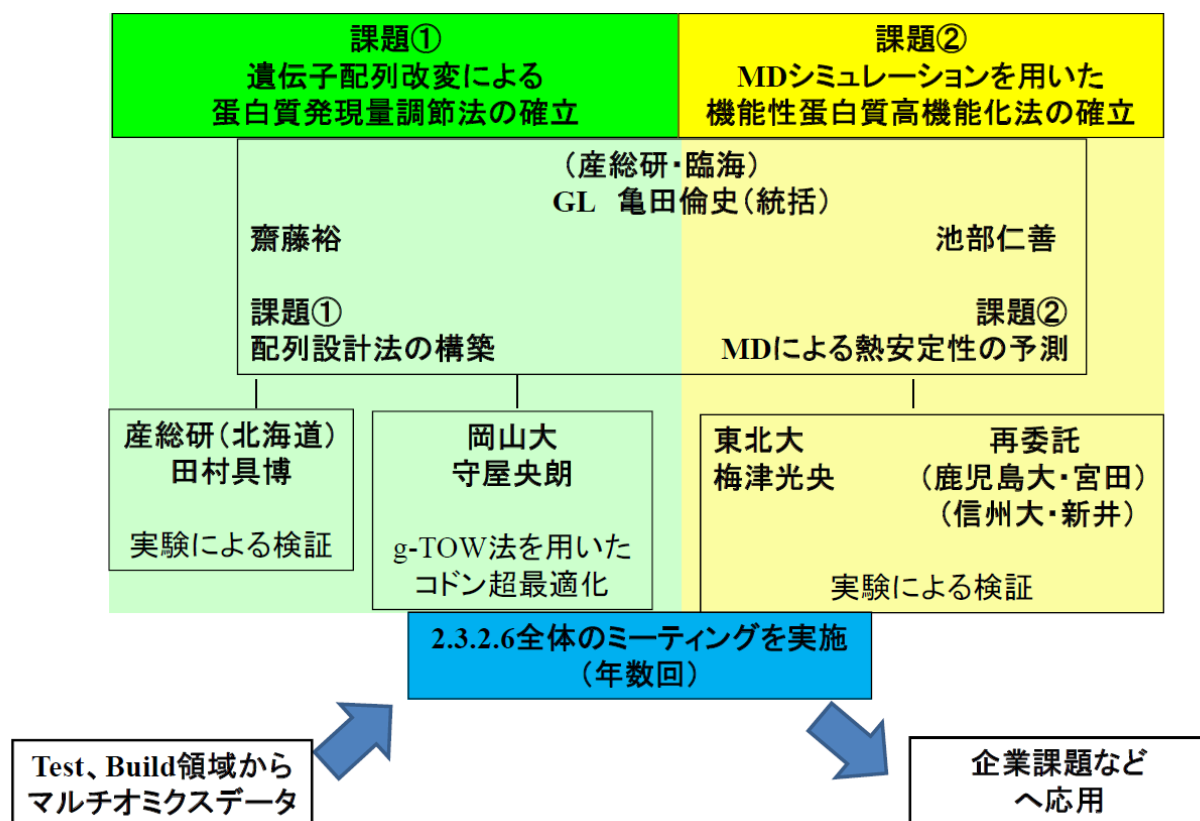
課題②：前年度の結果を元に、機能性蛋白質の熱安定性予測法の改良を行う。それに基づいたアミノ酸改変体の設計を行い、熱安定性予測を行う（産総研）。また、アミノ酸変異体の検証実験（発現・安定性測定）を継続する。

（平成 30 年度実施内容）

課題①：これまでに開発した新規遺伝子改変法を用いた蛋白質生産実験データを元に、遺伝子改変法をさらに改良・検証実験を継続して行い、原核生物、真核生物を宿主とした生産に対して手法を確立する。本年度終了までに、高発現化に関しては改変前の発現量比 3 倍以上、低発現時は 1/3 倍の達成を目標とする。また、蛋白質の発現量に応じて、酵母内にどのような現象・影響が及ぼされるのか簡便に調査する手法を確立し、少なくとも 5 遺伝子以上について調査を行うことを目標とする。

課題②：これまでの結果を元に、機能性蛋白質の熱安定性を予測する手法の改良・アミノ酸改変体の設計・検証実験を継続して行い、高機能化法を確立させる。本年度終了までに耐熱性向上に関しては改変前の変性温度を 10 度以上向上することを目標とする。

(4) 実施体制



(5) 運営管理

各課題とも、概ね月に 1 度報告会を行い、研究進捗に関して確認を行っている。また、年に 1 度程度、全体でのミーティングを開催している。

(6) 実施の効果

実験による 100~1000 のオーダーでの変異体作成による検証をすることなく、計算・シミュレーションによる予測に基づき、100 以下の変異体作成による実験で高発現・高機能化などの成果を得ることができる。それにより、消耗品・設備に関する費用、人件費などを大きく削減することができる。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
原核生物に対する配列設計法の開発	改変前の発現量比 3 倍以上、低発現時は 1/3 倍の達成	放線菌（ロドコッカス）に対して、ほとんど発現が確認されない遺伝子の発現量を 100%向上させる配列設計法を確立した。また、その量も大幅に向上することを確認した。	◎ (倍率が定義できないくらい大幅に発現量を向上できたため、◎と評価)	
真核生物に対する配列設計法の開発	改変前の発現量比 3 倍以上、低発現時は 1/3 倍の達成	酵母に対して、プロモータ改変による手法、質量分析データに基づくコドン最適化による手法で 3 倍以上向上できることを確認した。麴菌に関しては、プロモータ改変等を組み合わせた手法で、発現量を最大 2.8 倍向上した	△ (酵母については目標値 (3倍) を達成したが、麴菌については、最大 2.8 倍と目標値を超えていないため。ただ、目標値まであと少しであるため、H30年度末には目標値を達成すると思われる)	原核生物宿主向けの配列設計法を、真核生物にも適用し、これまでに試した方法と組み合わせることで、目標値達成を目指す。
MD シミュレーションを用いた機能性蛋白質高	耐熱性向上に関して、変性温度 10 度以上向上	複数の蛋白質に対する変異体を大量に計算機上	◎ 変性温度が目標値の 10℃よりも	

機能化法の確立		<p>に作成し、それに対する MD シミュレーションを行い、耐熱性が向上すると予想される変異体について、実験で確認したところ、変性温度が10度以上向上した例が見られた。</p>	<p>大きく改善した変異体を取得することに成功した。</p>	
---------	--	--	--------------------------------	--

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
原核生物に対する配列設計法の開発	放線菌（ロドコッカス属）について、75%の確率で発現量増大。発現量がかなり低い状態からだ、100%の確率で増大。ほとんど発現量がないところから、大幅に蛋白質発現量を増やすことができおり、目標値（3倍）を達成。	高発現化に関して、改変前の発現量比3倍以上を目標とする。また、科学研究ではあまり用いられない企業所有の宿主・蛋白質に対しても、本方法が有効であることを確認し、実際の生産に生かす。	コリネバクテリウムについても発現量が増大することをすでに確認しており、すでに最終目標は達成したと考えている。現在、放線菌（ストレプトマイセス属）などについても実証中。
真核生物に対する配列設計法の開発	酵母については目標値（3倍）を達成、麴菌については未達成（最大2.8倍）	高発現化に関して、改変前の発現量比3倍以上を目標とする。また、科学研究ではあまり用いられない企業所有の宿主・蛋白質に対しても、本方法が有効であることを確認し、実際の生産に生かす。	麴菌での目標値達成まであと少しであるため、原核生物で用いた設計法も組み合わせることで、目標値達成を目指す。完成した方法を、トリコデルマ（長岡技科大）、油脂酵母（新潟薬科大）などの産業用宿主に適用し、実証する。
MD シミュレーションを用いた機能性蛋白質高機能化法の確立	MD シミュレーション結果に基づいて熱耐性を予測できることを3蛋白質について実証終了。計算結果に基づき、熱耐性が向上することも確認しており、手法は確立したと考えられ、現在特許取得に向けて手続き中。	確立された蛋白質高機能化法を、企業所有蛋白質の高機能化に適用し実証を続ける。	新たに NEDO に参画する企業が所有する酵素に対して、本手法を適用し、その有効性を再確認する。

(9) 研究開発の成果と意義

課題①・原核生物向けの手法として、最新の翻訳制御研究に基づいた、遺伝子改変による新規高発現化手法の開発を行った。近年、良く用いられるコドン利用頻度に加え、遺伝子の mRNA 量、mRNA の二次構造形成度、翻訳に使われる tRNA の種類、SD 配列が ORF 内に出現する頻度、ヒストンとの結合安定性なども翻訳量に寄与することが分かってきた (Boel G et al.; 2016 Nature, 529, 358-363)。本研究では、これらの最新研究の妥当性・他宿主への適用性を、独自データに基づいて検証した。具体的には、産総研・田村らが所有している放線菌などを宿主とするタンパク質生産を数多く行った際の、遺伝子配列、タンパク質生産量情報に関するデータに基づき最新の翻訳研究の検証を行った。すると、mRNA の二次構造形成傾向が蛋白質発現量と最もよく相関し、コドン使用頻度も比較的相関することが分かった。そこで、まず、mRNA 二次構造形成を減らすよう、遺伝子配列を設計し、10 以上の遺伝子に対して蛋白質発現を試みたところ、平均で 50% の確率で発現量を向上させることに成功した。さらに、コドン使用頻度も取り込んだ設計法を開発し、実証したところ、平均で 75% の確率で発現量が向上した。特に、ほとんど発現しなかった遺伝子に対しては、100% の確率で発現量が向上した。また、その際には発現量が大幅に向上しており、目標値の 3 倍を大きく超えている。今後も配列設計法をさらに改良しているが、現時点ですでに目標値を達成したと考えられる。

また、学術研究ではあまり用いられない企業所有宿主への適用も始めており、すでにコリネバクテリウムでの蛋白質生産量の大幅向上に成功している。今後は、さらにさまざまな宿主への適用を行っていく。

課題②・真核生物向けの手法として、ヒストンとの結合安定性を考慮した配列設計法を開発した。これは、遺伝子中のプロモータ配列とヒストンとの結合能を下げることで、mRNA 転写量を増やし、結果蛋白質発現量を増やすことを狙ったものである。この設計法を酵母 (3 遺伝子) ・麴菌 (2 遺伝子) で、実証したところ、酵母に関しては目標値を達成したが (発現量 3 倍以上)、麴菌については最大 1.5 倍までしか向上しなかった。現在、酵母について知られている他の特徴量も導入することで改善を図っているが、最大で 2.8 倍と目標値は達成できていない。今後は原核生物向け手法も組み合わせることで、目標値達成を目指す。

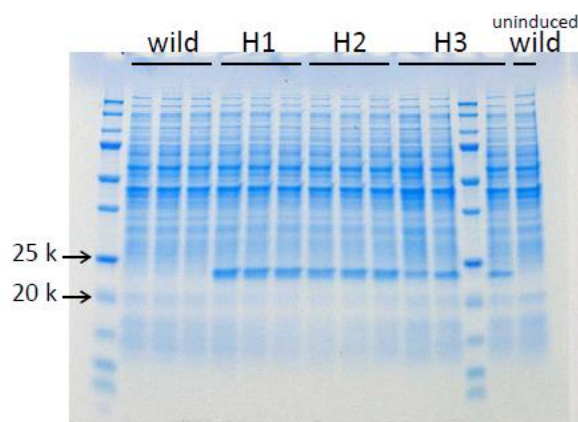


図 2.3.2.6-1 課題①原核生物向け配列設計法：発現量がほとんどない遺伝子 (WT)、本手法で設計 (H1-3)。H1-3 は明確なバンドが確認でき、発現量が大幅に向上したことが分かる

また、課題①・真核生物向けの手法として、出芽酵母での細胞内タンパク質発現について、従来知られている限界を超えた機能発現を可能にする配列設計技術の構築を行う。これまでに岡山大・守屋らは、g-TOW法により、出芽酵母の6000種類すべてのタンパク質の発現限界を調査して酵母細胞における一般的なタンパク質の発現限界（タンパク質発現キャパシティ）を評価することに成功した。一方、キャパシティの限界まで発現できるタンパク質はもともと高発現の解糖系の酵素に限られること、発現できない理由は、コドンの使用頻度・細胞内局在・酵素活性などに起因していることを見出している。特に解糖系の酵素のコドンは、他の大半のタンパク質に比べて高度に最適化（超最適化）されており、それがタンパク質発現の障害となっていた。

そこで、まず、酵母解糖系以外の酵素を標的としたコドンの超最適化を行い、タンパク質発現を評価した。具体的には、発現が困難とされる膜蛋白質や酵素約10種について超最適化を行った。次に、タンパク質発現量が酵母の代謝に与える影響や細胞内局在の異常、凝集体を形成する事を簡便に評価する系を構築し、評価したところ、最大に全蛋白質の2%程度まで発現させることに成功した。現在、発現が困難である企業所有酵素についての超発現化・毒性評価による発現限界量の測定にも取り組んでいる。

簡便な毒性評価系

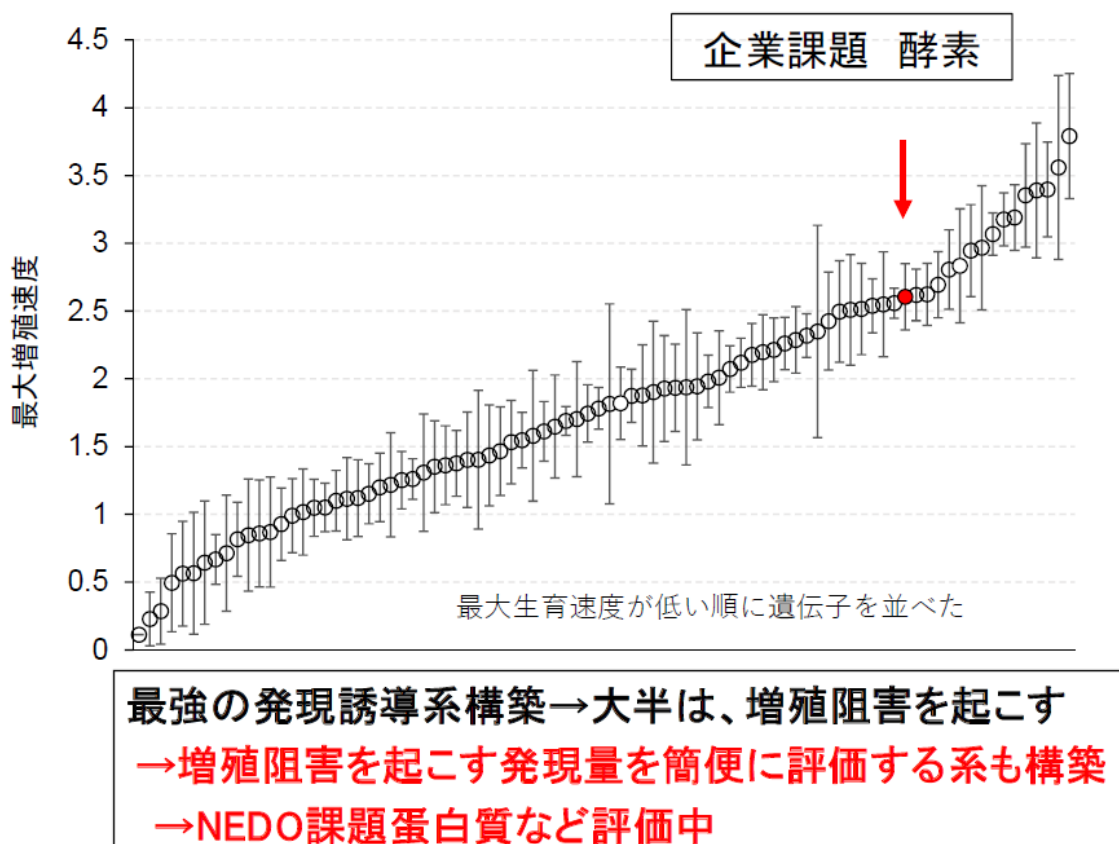


図 2.3.2.6-2 課題①真核生物向け配列設計法：g-TOW法超最適化及び簡便な毒性評価による蛋白質発現：限界量の測定

課題②として、MD シミュレーションを援用した配列設計による、タンパク質高機能化法の開発を行う。様々な高機能化のうち、本研究では耐熱性向上を取り上げた。というのは、機能性タンパク質をワクチンなどとして利用する際に、そのタンパク質の熱安定性が低いために実用化が妨げられることがあるためである。これまで、タンパク質を高機能化するための手法として、フェージディスプレイ法などの人工進化系を用いたタンパク質改変や、X 線結晶解析・NMR 解析によって得られた立体構造に基づくアミノ酸置換を行う試みがなされてきた。しかし、人工進化系による高機能化には、時間を要するために、結果として、人手・コストがかかってしまうという問題がある。また、立体構造に基づく高機能化では、酵素反応に伴う立体構造の動きを考慮できないために、高温下でタンパク質が変性する過程を考慮した高機能化ができない、などの問題がある。そこで、タンパク質構造の動きに関する情報を短時間で得られる手法として知られている、MD シミュレーションを利用した、タンパク質高機能化に期待が集まっていたが、計算機性能の面からその利用は阻まれてきた。しかし、最近になって、MD シミュレーションを用いたタンパク質の高機能化に成功したという報告例が出始めている (Domani SC et al., 2016, Nature Chemistry; Wijma HJ et al., Angew. Chem., 2015)。

そこで、MD シミュレーションを援用した配列設計によるタンパク質機能制御法の開発に取り組んだ。

耐熱性向上のための配列改変としては、(a) タンパク質内部の疎水性向上、(b) SS 結合、塩橋、水素結合の導入、(c) 変性構造の不安定化、などが考えられるが、実験に基づく手法ではそのような設計に基づいたタンパク質を実際に生産し・熱安定性測定を行い、効果を確認する必要があるが、時間・コスト・人手の問題から、試すことができるタンパク質の数は限られてしまう。そこで、様々なアミノ酸配列改変を行ったタンパク質を計算機上に大量に作成し、高温条件下でそれらの MD シミュレーションを行う。MD 計算後、立体構造が崩れなかったタンパク質を、耐熱性が向上した改変候補として絞り込み、実験での確認を行う。これにより、大量の配列改変候補を安価に高速に絞り込むことが可能となる。以上の手順で、MD を用いた配列設計法を確立させる。

これまでに、3つのワクチン蛋白質に対して、高温での網羅的な MD シミュレーションを行い、耐熱性が向上すると思われる変異体について、その変性温度、ワクチン蛋白質・ターゲット物質間の結合能を測定しているが、数十度以上の変性温度の向上、98℃での熱処理後の活性の残存率が 100%近い変異体の取得に成功している。



例:耐熱性向上

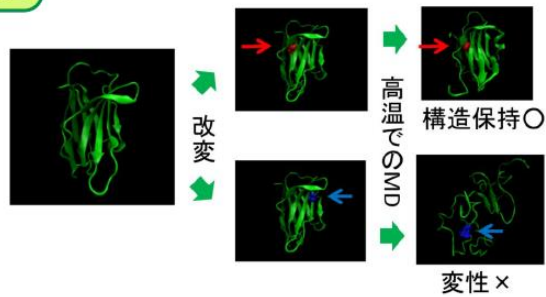


図 2.3.2.6-3 課題②MD シミュレーションを用いた蛋白質高機能化法の開発：研究 protocol

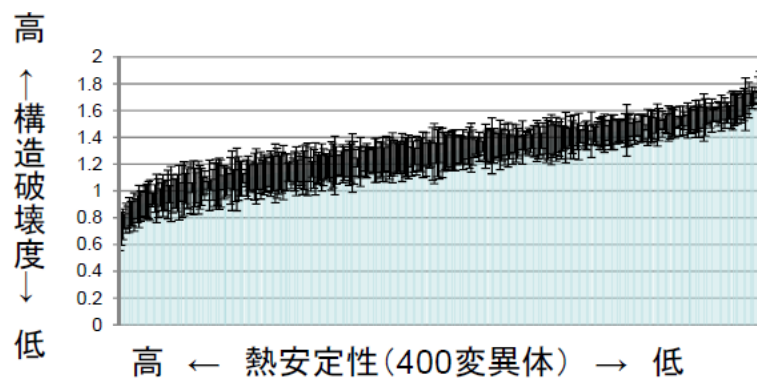


図 2.3.2.6-4 課題②MD シミュレーションを用いた蛋白質高機能化法の開発：ワクチン 400 変異体を高温で MD シミュレーションした際の構造破壊度の分布。このうち、熱安定と予想された変異体を実験で検証したところ、実際に熱耐性が向上した 2 変異体の取得に成功した。

(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	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	1	0	1	0	0
2018 *1	0 (1)	0 (0)	0 (4)	0 (0)	0 (2)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	3	0	10	0	7	0	0

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	0 (1)	0 (0)	0 (1)
2020 *2	1	0	1

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.2.7 Combi-OGAB 法と機械学習による迅速なDNA配列因子組み合わせの探索技術の開発

担当機関：神戸大学、東北大学、東京大学、鹿児島大学

(1) 背景と目的

本研究項目では、Combi-OGAB 法を用いた微生物ライブラリーの構築と機械学習を繰り返すことにより、微生物による物質生産量を上げていくためのプラットフォームを開発する。Combi-OGAB 法では、いくつかの DNA をバラバラにして再構成することにより、多様なバリエーションを持つ DNA を一度に生成することができる（図 1 左）。作成された多様な DNA はプラスミドにクローン化された状態で得られるため、容易に微生物に導入することが可能である（以下、Combi-OGAB 法により作成したプラスミドを導入することで得られる微生物群を“微生物ライブラリー”と記述する）。得られた微生物ライブラリーに含まれる細胞の物質生産量とプラスミド DNA 配列のデータを多数取得し、機械学習により分析する（図 1 右）。機械学習により物質生産を向上させる DNA 配列因子を予測し、この予測に基づき次に探索すべき DNA 配列を設計する。このサイクルを繰り返すことにより、微生物による物質生産量を上げていく。

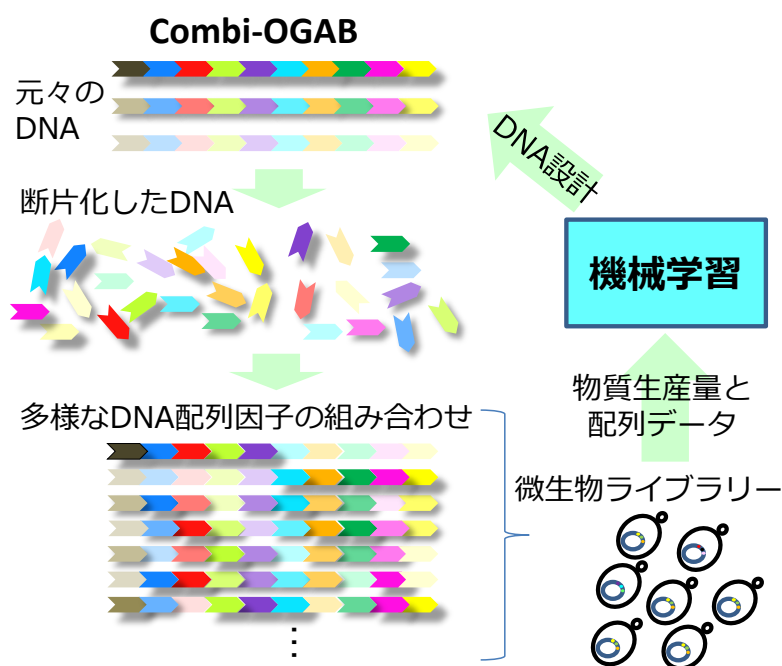


図 1 本項目の研究開発の流れ

プロジェクト期間中に、3 つの具体的な個別課題に対してこのサイクルを回すことにより、このサイクルを効率よく回すために必要な要素技術を開発する。個別課題①「代謝経路最適化技術の開発」では、代謝経路の最適化において、有効な遺伝子改変の組み合わせを探索する技術を開発する。個別課題②「タンパク質コード領域の探索技術の開発」では、目的タンパク質の発現量を最適化するために必要なタンパク質コード領域断片の組み合わせを探索する技術を開発する。個別課題③「タンパク質高生産菌の作成」においては、目的タンパク質の発現量を最大化するこ

とを目的として、必要な遺伝子情報の組み合わせを探索する技術を開発する。個別課題①を神戸大学、②を東京大学、③を東北大学と鹿児島大学が中心となり実施する。

(2) 位置づけ、目標値

ライブラリー作成と機械学習の組み合わせという観点では、競合研究として Sympromics 社（英国）の事業があげられる。同社は、遺伝子治療用の組織特異的プロモーター配列を創出し、100 億円もの資金を獲得している。転写因子結合部位を含む DNA 断片を組み合わせることで多様なプロモーター配列を作成し、これを細胞に導入する。それら細胞から得られる配列と発現量のデータを人工知能により分析するとされているが、その詳細は非公開である。図 2 に Sympromics 社によるプロモーター開発法のイメージを記す。本研究項目で用いる Combi-OGAB 法は、既存技術よりも多数の DNA 断片を組み合わせることが可能である。具体的には、既存手法では困難な 15 以上の DNA 断片を組み合わせることも可能である。断片数に制約の少ない Combi-OGAB 法は、得られるデータの自由度が高いという点で機械学習との相性が良いと言える。

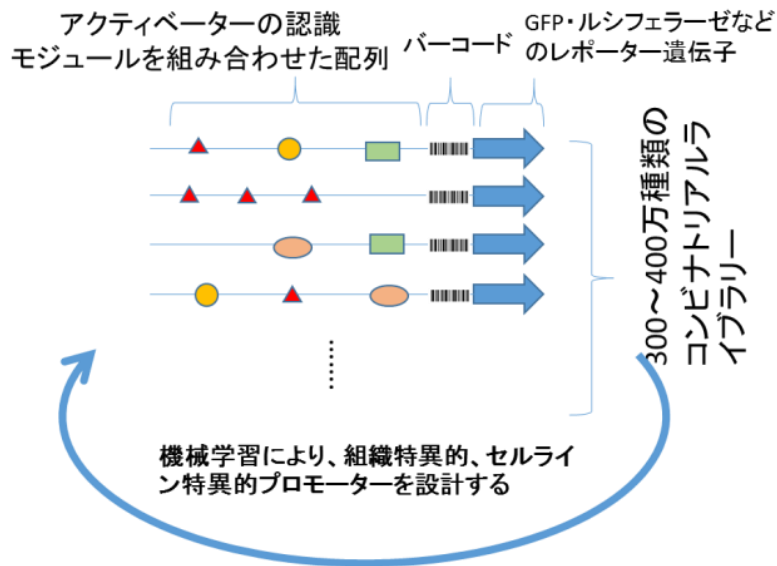


図 2 Sympromics 社のプロモーター開発

(3) 全体計画

図 3 に全体計画を示す。中間評価までは本プラットフォームを実施するための要素技術の開発に注力する。中間評価以降は、本プラットフォームの有効性検証および適用拡大を実施する。また個別課題①～③を実施するのと並行し、仮想的なデータを利用した機械学習の予備実験などを行い、実データの解析のための機械学習環境を整備する。

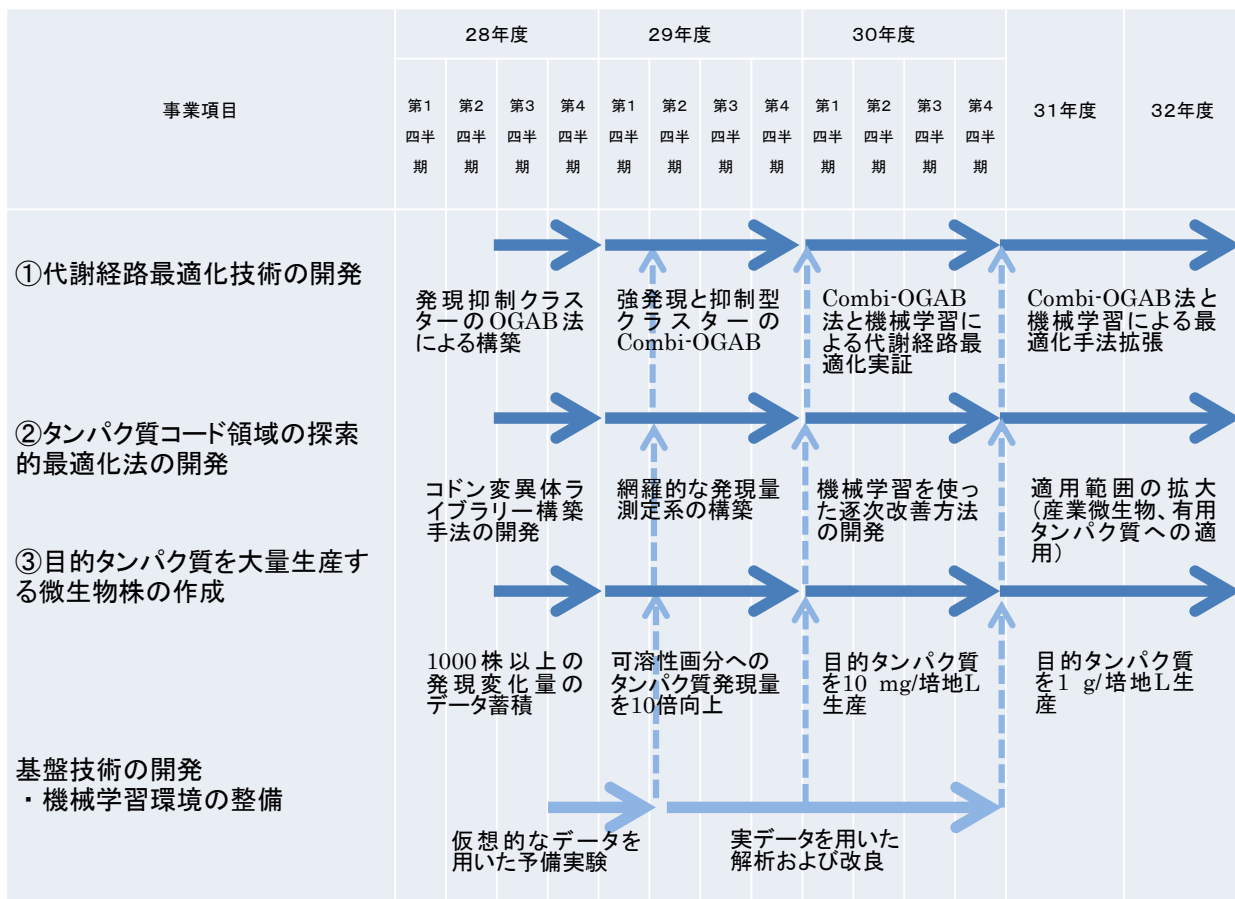


図3 全体計画

(4) 実施体制

図4に本研究項目の実施体制を示す。機械学習を中心とした情報解析を東京大学で担当し、Combi-OGAB法を用いた微生物ライブラリーの作成を神戸大学が担当する。この体制の元で、3つの個別課題を実施する。本研究項目で作成された情報解析技術は、研究項目2.3.2.8(遺伝子発現制御に資する支援ツールの開発)に提供する。また、個別課題②で得られた知見は、研究項目2.3.2.6(タンパク質発現・機能制御のための遺伝子配列設計)の岡山大学グループと共有しながら進める。また、Combi-OGABライブラリーの作成とその評価においては、2.3.1.4(ハイスループット長鎖DNA合成技術の開発)と2.3.1.5(ハイスループット微生物構築・評価技術の開発)とそれぞれ連携して行う。また、本研究項目で開発したプラットフォームの全部あるいは一部を、有効性検証課題である2.3.3.1-10に必要な応じて提供する。

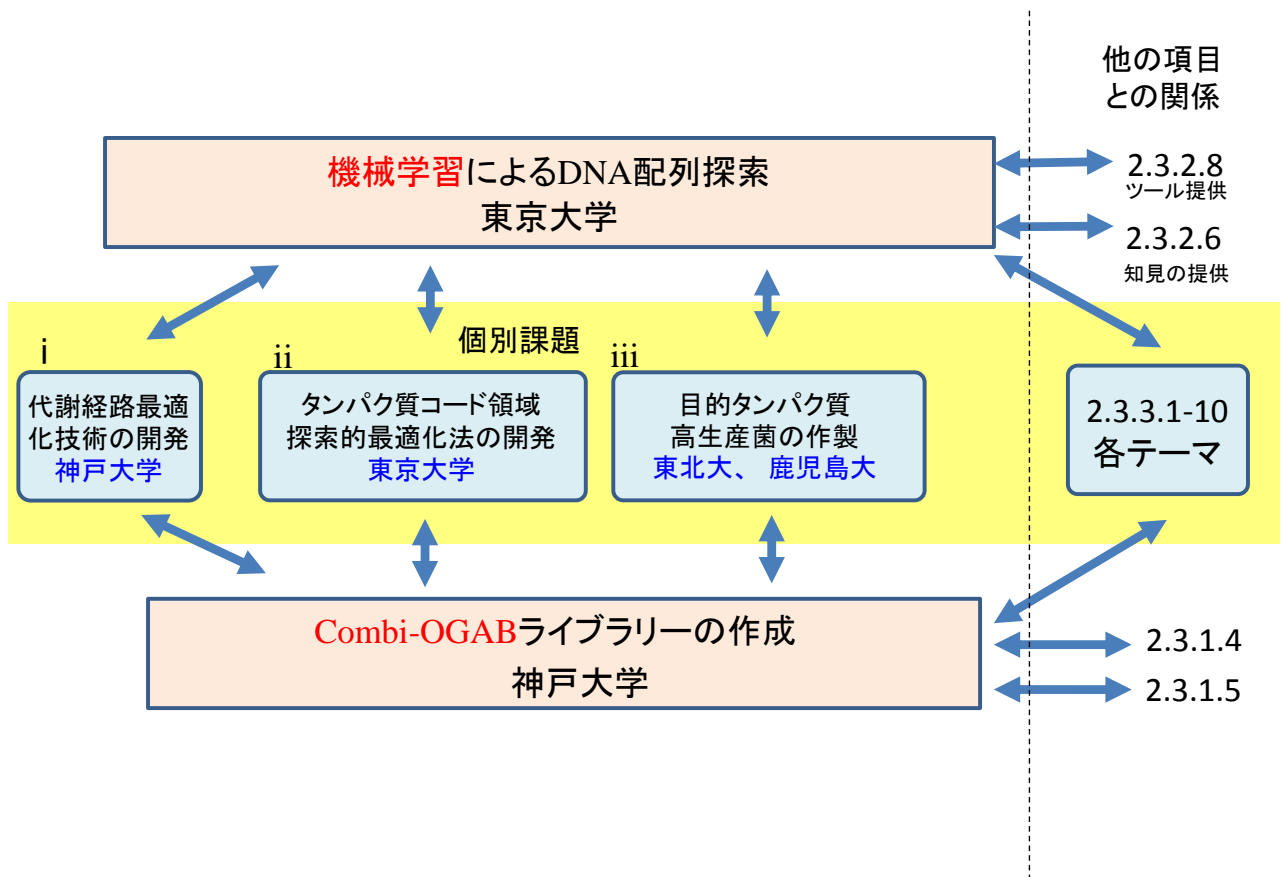


図4 研究実施体制

(5) 運営管理

本研究項目の参加者による全体会議を年に1～2回の頻度で実施し、進捗報告と研究方針に関する打ち合わせを行っている。個別の研究に関する日常的な打ち合わせは、担当者間による電子メールあるいは電話にて実施している。より密な議論が必要な場合には、Polycom や Skype などによるテレビ会議を活用している。直接顔を合わせる機会よりも、頻繁に連絡を取り合うことを重視して研究を進めている。

(6) 実施の効果

本研究項目を実施することにより作成されるプラットフォームは、代謝バランスの調整による目的化合物の高生産や、タンパク質コード領域などの遺伝子情報の最適化による目的タンパク質の高生産を効率よく実現させるものである。具体的な費用対効果の見積もりは、目的物質の価格にも依存するため計算が難しいが、高生産株の作成コストを大きく削減するものと考えられる。また個別課題③を実施することにより創出される目的タンパク質高生産株は、タンパク質の大量生産に直接利用できる可能性がある。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
代謝経路最適化技術の開発	代謝系遺伝子の過剰発現や破壊ライブラリーを構築し、生産量の向上した株を得る。それら株の配列情報を取得する。	多重遺伝子破壊の有効性を示す計算機シミュレーションを実施した。	△	多重遺伝子破壊の効率が低い場合には、プラスミドベクターの変更などを迅速に検討する。
タンパク質コード領域の探索的最適化法の開発	多様なタンパク質コード領域を持つ微生物ライブラリーを作成し、その配列と発現量のデータを収集する。	緑色タンパク質(GFP)を対象としたモデルケースにおいて、実際に微生物ライブラリーを作成し、100株以上のデータを収集した。	○	100株程度のデータ量でも最適化の指針を得ることは可能であるが、さらに高精度な指針を得るため、次世代シーケンサーを利用した大規模データの取得を検討する。
タンパク質を大量生産する微生物株の作製	タンパク質を大量生産する微生物株の作製(目標値:培地Lあたり10mg以上の生産)	10種以上のタンパク質について、精製後の収量換算で5~18mg/L培地を達成している。	○	今後は高生産株の持つ遺伝子配列を決定し、改善の指針を得ることが重要である。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
代謝経路最適化技術の開発	代謝経路を最適化するために必要な、多重遺伝子破壊法の有効性を検証中である。	Combi-OGAB ライブラリーを構築し、本手法による遺伝子発現バランスの最適化が3～6か月の短期間に行えることを実証する。	検証中の多重遺伝子破壊法が確立すれば、その後のステップには大きな技術的課題はなく予定通りに進むと想定できる。
タンパク質コード領域の探索的最適化法の開発	緑色タンパク質(GFP)を対象としたモデルケースにおいて、探索的最適化の実施に必要な、遺伝子配列と発現量に関する効率の良いデータ取得法を確立させた。	探索的なタンパク質コード領域の設計方法の適用範囲を拡大する。	中間までに、技術的な大きなハードルであった多様性(コドンと発現量の両方)の創出に成功している。来年度からは適用拡大に取り組むことが出来る。
タンパク質を大量生産する微生物株の作製	厳選した遺伝子配列を導入することにより、タンパク質の生産量が向上することを確認した。	高密度培養条件でタンパク質を培地Lあたり1g以上生産する微生物の作製(目標値: 高密度培養条件で培地Lあたり1g以上のタンパク質の生産)	予定通りに生産量が上昇しているうえに、微生物ライブラリーの探索もさらに拡大できる余地がある。したがって、目標値を十分に達成可能である。

(9) 研究開発の成果と意義

本研究項目では、プロジェクト期間中に3つの研究テーマ(個別課題)を設定し、それぞれに対して Combi-OGAB 法による微生物ライブラリー作成と有用な DNA 因子の組み合わせ抽出を行う。これにより、幅広い対象に対するプラットフォームを構築するとともに、その有効性を実証する。本プラットフォームの完成により、目的の性質を持つスマートセルを短期間に作成できるようになることが期待される。また、本研究項目を実施する過程で得られた高生産株は、有用物質の工業生産に直接利用できる可能性がある。以下では、個別課題ごとに研究成果を報告する。

① 代謝経路最適化技術の開発

長鎖 DNA 合成技術の発展により、異種由来の代謝経路を丸ごと微生物に導入することが可能となりつつある。新たな代謝経路を導入された微生物は、その代謝経路による物質生産に最適化さ

れているはずはない。したがって、導入した代謝経路による物質生産を最大化するためには、宿主となる微生物の内在性の代謝経路を最適化する必要がある。そこで、本個別課題では、微生物の内在性代謝経路を効率よく最適化するプラットフォームを開発する。具体的には、Combi-OGAB法を利用して、複数の内在性遺伝子を過剰発現あるいは破壊した微生物ライブラリーを作成する。そして、作成した微生物の物質生産量と改変した遺伝子の関係を分析することにより、各遺伝子の過剰発現、あるいは破壊といった改変の方向性を機械学習により予測し、これを反映した新たな微生物ライブラリーを構築する。この繰り返しにより、さらに物質生産性を向上させることを目指す。

・多重遺伝子破壊の有効性に関する計算機シミュレーションの実施

多重遺伝子破壊を用いた目的物質の高生産の有効性を評価するため、Flux Balance Analysisを利用した計算機シミュレーションを実施した。一例として、カロテノイドを大腸菌に生産させた場合のシミュレーション結果を示す。図6は、破壊した遺伝子数と、カロテノイドの最大生産量の関係を示したものである。ここで、2個以下の遺伝子破壊においてはすべての可能な組み合わせで遺伝子を破壊して最大生産量を計算した。3個以上の遺伝子破壊においては、1遺伝子破壊でカロテノイド生産が変動する遺伝子群からランダムに選択して破壊を行った。図で示されているように、1遺伝子破壊と比較して6遺伝子破壊では5倍以上の生産量向上が観測された。

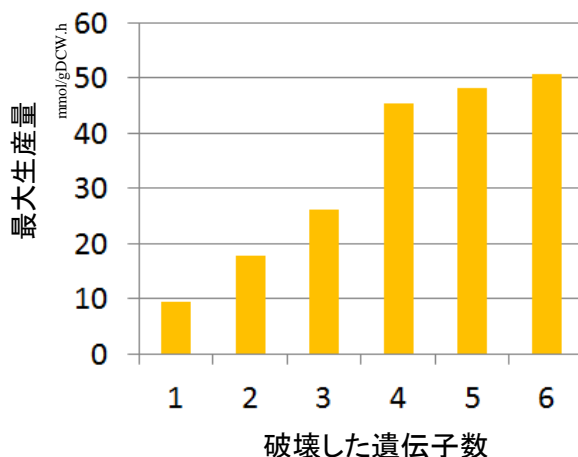


図6 破壊する遺伝子数とカロテノイド生産量に関する計算機実験

② タンパク質コード領域の探索的最適化法の開発

タンパク質コード領域の塩基配列、つまりはコドンの最適化は異種タンパク質発現における重要な要素の一つである。しかしながらコドンが発現量に影響を与える分子メカニズムは完全には解明されておらず、また既存のコドン最適化法がうまくいくとは限らない。特に、組換え体の作成に手間のかかる真核生物においては、コドンと発現量の関係を調べるのが難しく、両者の関係にはいまだに不明な点が非常に多い。

本個別課題では、Combi-OGAB法による微生物ライブラリーの作成と機械学習を利用して、タンパク質コード領域の塩基配列を最適化する技術を開発する。まずは真核生物のモデル生物であり産業利用も進んでいる出芽酵母を対象として技術開発を行っている。本個別課題で実施する研

究の流れを図 7 に記載する。以下、この図に従ってこれまでの研究成果を記述する。まず、同じ GFP をコードするが異なるコドンを持つ ORF を複数設計し (図 7①)、これを断片化したものを Combi-OGAB 法で再構成することによりキメラ GFP (②) を作成した。これを出芽酵母に導入した後、得られた酵母株に対する GFP の蛍光強度の測定と、キメラ GFP の配列決定を行った (③)。現在、得られた配列情報と GFP 発現量の関係を分析中である。

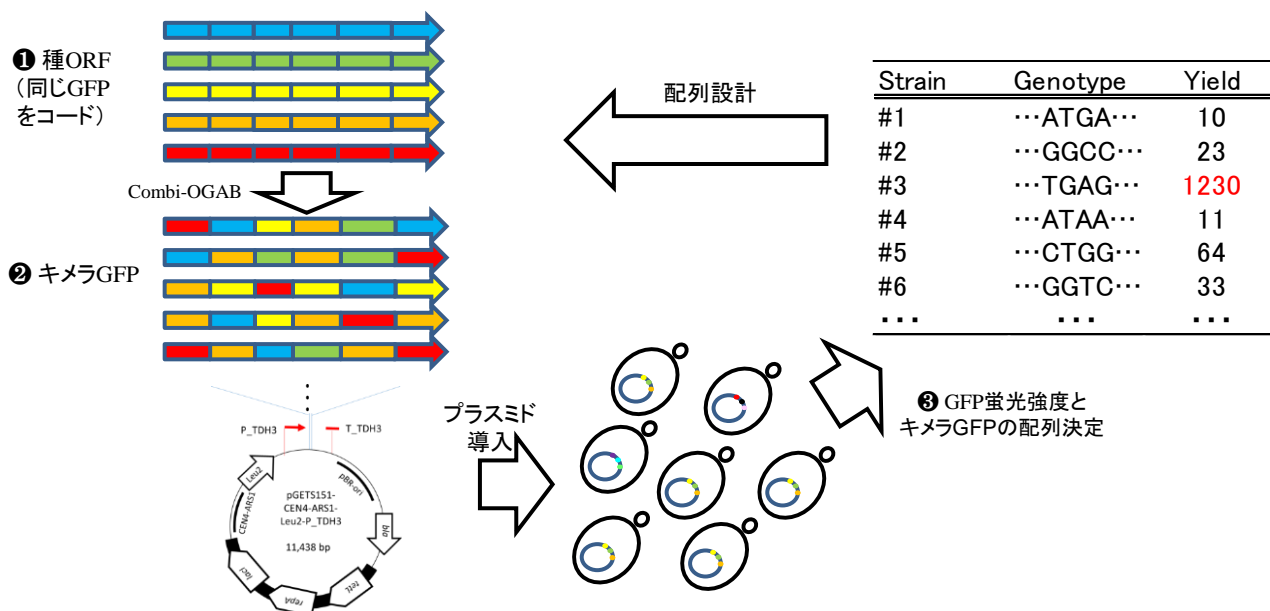


図 7 GFP に対するタンパク質コード領域の探索的最適化の実施手順

③ タンパク質を大量生産する微生物株の作製

本個別課題では、タンパク質を高生産させる微生物を開発する。そのためのアプローチとして、タンパク質発現に関与する遺伝子配列を微生物へ複数導入する。複数の遺伝子配列を導入した場合、それら遺伝子配列がどのように影響し合ってタンパク質の生産量がどのように変化するかはわからない。そこで、導入する複数の遺伝子配列の組み合わせを変えたベクターライブラリーを combi-OGAB で作製し、微生物を形質転換させた。そして、1000 株以上をクローン化し、それら微生物ライブラリーから得られるタンパク質生産量を迅速に測定するため、ELISA を用いて 96 株のタンパク質生産量を並列に測定する実験系を構築した。この系を用いれば、1 か月に 1000 株程度のタンパク質生産量を測定することが可能である。この系を用いて現在までにタンパク質の生産量を向上させる遺伝子配列の組み合わせを数種類同定することに成功している。

(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	
2017	0	0	1	0	0	0	0
2018 *1	0 (0)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	3	0	6	0	0	0	0

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

本研究項目を実施する過程で作成された高生産株を順次、特許化する。情報解析部分については特許出願せずにノウハウとして保有するが、情報解析の結果見出された有用な法則については、個別の検証実験を行ったうえで特許化を行う。

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2017	0	0	0
2018 *1	0 (1)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	3	0	3

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.2.8 遺伝子発現制御に資する支援ツールの開発

担当機関：産業技術総合研究所

(1) 背景と目的

微生物による効率的物質生産の実用化を実現するためには、適切な改変候補遺伝子を如何に早く同定し、高機能な微生物細胞を人為的に作成するかが重要である。適切な改変候補遺伝子を提案する一つのアプローチとして、情報解析技術を利用することが求められているが、現段階では情報解析の研究者が個々の課題について情報解析手法を適用するにとどまっている。

本研究開発項目は、本プロジェクトにおいて開発された遺伝子発現制御に関わる各情報解析技術をツール化し、実際に産業微生物にて物質生産を行っている新規課題についても、開発してきた技術が適用できるよう情報解析システムとして整備することを目的としている。具体的には以下2つの支援ツールの構築を行う。

支援ツール 1) 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子探索を実行するツールの開発

支援ツール 2) 適切な導入配列を設計するための遺伝子配列設計ツールの開発

各ツールの詳細については、下記に記載する。

1) 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子探索を実行するツールの開発

計算する上で基盤となるデータとして遺伝子発現データを想定する。実験条件やターゲット物質の生産量情報が紐づけされた遺伝子発現データを入力として、そこから自動的にターゲット物質生産に関連する遺伝子群を推定し、推定した遺伝子群間で制御構造を推定するためのネットワーク構造推定を行い、推定されたネットワーク構造を出力するシステムを構築する。実際のデータ解析の現場では、実験研究者によって測定された生データが、数段階の処理を経たのちに情報解析担当者によって解析されることが多い。そこで、この生データからの処理フローをできるだけシステムティックに行うために必要なデータ共有環境を整備する。共有環境を構築することで、データやり取りの際に生じるヒューマンエラーを最小限にするとともに、数段階におよぶデータ処理・解析フローにおけるボトルネックの明確化を実現する。ネットワーク構造推定については、2.3.2.5 で開発する情報解析基盤技術を一般化し、宿主微生物種や実験条件に依存しない形でのネットワーク構造推定を実現する。

2) 適切な導入配列を設計するための遺伝子配列設計ツールの開発

物質生産現場において必要な情報は、「どの遺伝子」を「どのように改変」すればよいかという情報である。本ツールは、ターゲット物質生産性を向上するために必要な導入遺伝子について、最適な配列を設計する支援ツールを構築する。最適配列を決定するための情報技術基盤は、2.3.2.6 および 2.3.2.7 で開発する。平成 30 年度までは、基盤となる情報解析技術の開発を行う。平成 31 年度以降にそれまでに開発した技術のうち、一般化できる技術の選定を行い、ツール開発を実施する。

上記、2つの支援ツール開発を実現するため、以下3つのシステム開発項目を設定した。

システム開発項目① 遺伝子発現データの共有環境構築 (2.3.2.5 と連携)

システム開発項目② 遺伝子発現に関するデータ解析ツールの構築 (2.3.2.5 と連携)

システム開発項目③ 遺伝子配列設計システムの構築 (2.3.2.6 および 2.3.2.7 と連携)

システム開発項目①と②は 2.3.2.5 (遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子の探索)、システム開発項目③は 2.3.2.6 (タンパク質発現・機能制御のための遺伝子配列設計) および 2.3.2.7 (Combi-OGAB 法と機械学習による迅速な DNA 研究所配列因子組み合わせの探索技術の開発) と連携する。特に、平成 30 年度までは 2.3.2.5 で開発した技術を中心に支援ツール構築を実施する。

(2) 位置づけ、目標値

微生物を利用した物質生産の効率化のためには、「情報解析技術」を「どのように」微生物生産現場へ適用するかが一つの課題となっている。欧米では、形式化されたデータを大量に取得し、特定のデータ形式に適した形のビッグデータ解析技術が適用されている。しかし実際の生産現場では、ターゲット物質、宿主微生物の種類もしくは実験技術の違いなどによって画一的な形式を有したデータが取得されることは難しく、ある程度の汎用性を有した支援ツールの開発が必要である。本プロジェクトでは先行している欧米の微生物物質生産分野に対抗するため、システム生物学的アプローチを基盤とした技術開発を行っている。

本課題では、開発した情報解析の基盤技術に汎用性をもたせ支援ツールとして構築することで、開発技術の実用化をめざしている。本支援ツールの利用によって、データ解析にかかる人的費用および時間的コストの削減が期待できる。

	中間目標値 (H28)	最終目標値 (H32)
支援ツール 1) 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子探索を実行するツールの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子発現に関する取得データを格納するデータベース構築 ・ 遺伝子発現に関する取得データ格納インターフェース構築 ・ DB 内部拡充とインターフェースの改良 ・ 開発した遺伝子発現制御ネットワーク推定手法のツール化 	<ul style="list-style-type: none"> ・ インタラクティブなグラフ表示を可能としたインターフェースを包含した DB システム構築と運用
支援ツール 2) 適切な導入配列設計ツールの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ 配列設計のための基盤技術として細胞内における遺伝子発現量、タンパク質発現、機能制御に影響を与える配列上の特徴を検出する技術の開発 (2.3.2.6, 2.3.2.7 で実施) 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 開発した技術のツール化

(3) 全体計画

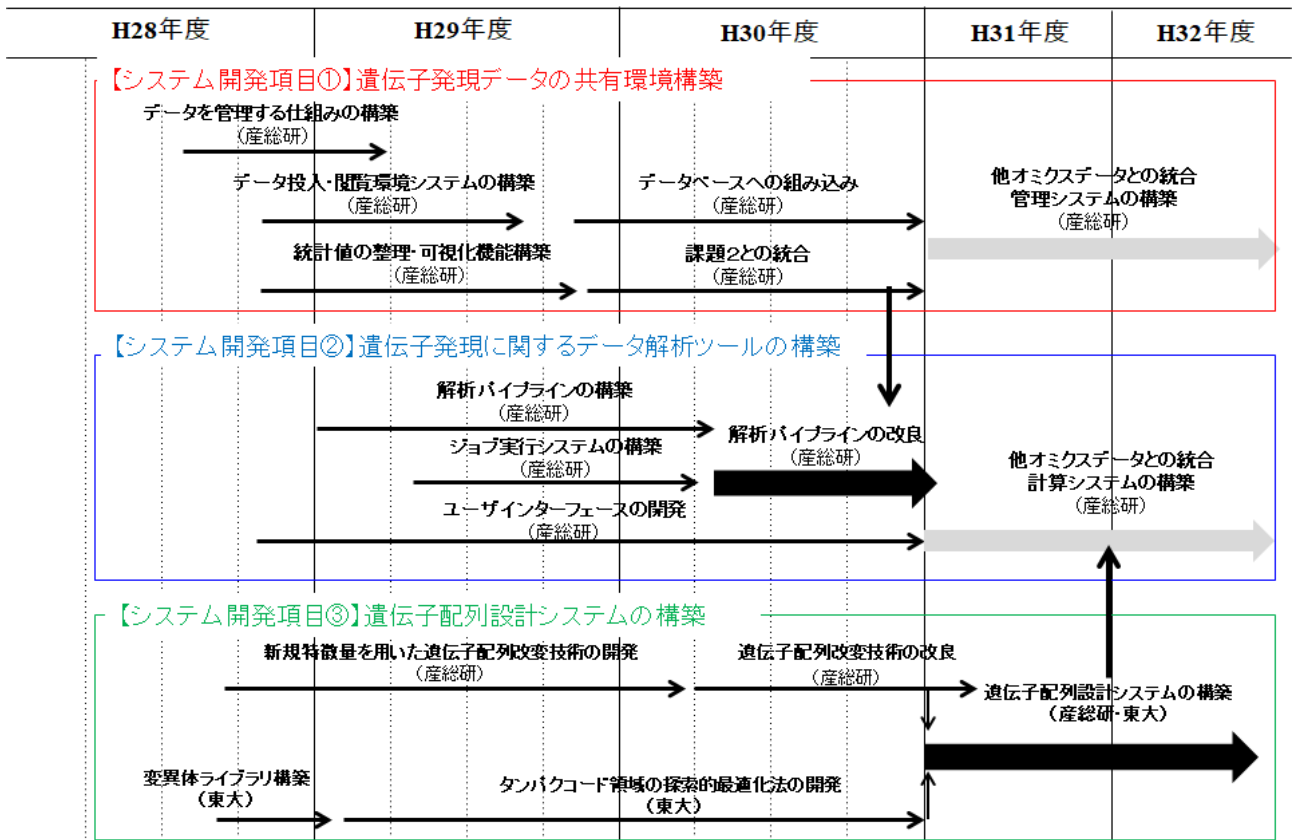


図 2.3.2.8-1 設定したシステム開発項目と年次計画

本研究開発項目では大きくは以下 2 つのツールの開発を実施する。1) 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子探索を実行するツールの開発、2) 適切な導入配列設計ツールの開発。当初 3 年間は情報解析技術としての開発が先行している 1) のツール化を実現する。2) のツールに関しては、基盤となる情報解析技術自体の開発を 2.3.2.6 および 2.3.2.7 で実施し、後半の 2 年間で開発した技術の一般化を通じてツール構築を実現する。

初年度は支援ツール 1) を構築する上で重要となる課題①「遺伝子発現データの共有環境構築」を中心的に実施する。2.3.1.6 で標準化データベースを構築しているが、特にマイクロアレイで測定された遺伝子発現データはプロジェクト開始時に百サンプルを超えるデータが存在し、それぞれについて必要な情報解析を実施する必要がある。そのため、情報解析研究者と実験研究者間でデータを共有できるシステムが早急に必要である。

平成 29 年度以降は、支援ツール 1) のうち課題②「遺伝子発現に関するデータ解析ツールの構築」に注力する。ここでは研究課題 2.3.2.5 で開発する遺伝子発現制御ネットワークモデル構築技術とそれに付随する各種データ解析技術のツール化を実施する。

支援ツール 2) の課題③「遺伝子配列設計システムの構築」は平成 31 年度以降に支援ツールとしての構築を開始する。平成 30 年度末までは遺伝子配列設計に必要な、遺伝子発現量やタンパク質量・機能改変に必要な配列上の特徴量を検出する技術の開発を実施し、平成 31 年度以降にそれまでに開発した基盤技術をツールとしてシステム化していく。

(4) 実施体制

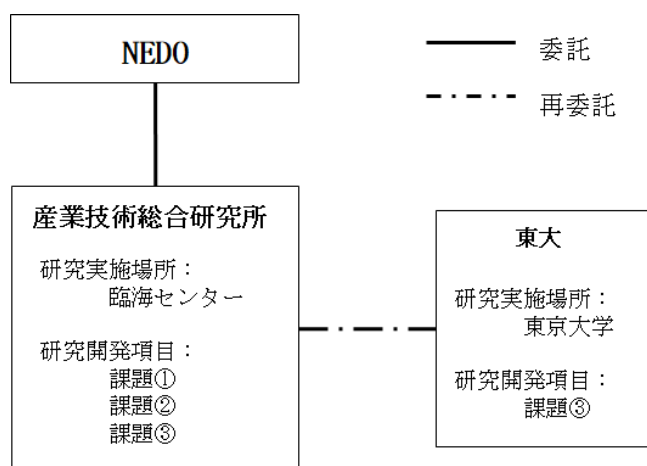


図 2.3.2.5-2 本研究開発項目の実施体制

本研究開発項目は、2.3.2.5、2.3.2.6および2.3.3.7連携しながら、開発した基盤技術を支援ツールとして提供するためのシステム構築を実施している。システム構築については産総研臨海センターが行っている。

(5) 運営管理

支援ツール構築について、2.3.2.5 の情報解析基盤技術の開発を実施している研究実施者間で産総研臨海センターにて週1度以上の研究打ち合わせ、および進捗報告、作成したプロトタイプツールの検証を行いながら本課題を実施した。

(6) 実施の効果

本研究開発項目の実施により、開発した情報解析の基盤技術が支援ツールとして利用可能になる。これにより、データ解析にかかる人的費用（1/10）および時間的コスト（1/10以下）の削減が期待できる。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
1. 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子探索を実行するツールの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子発現に関する取得データを格納するデータベース構築 ・ 遺伝子発現に関する取得データ格納インターフェース構築 ・ DB 内部拡充とインターフェースの改良 ・ 開発した遺伝子発現制御ネットワーク推定手法のツール化 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子発現のデータベースを構築した ・ 取得データ格納インターフェースを構築した ・ インターフェースとして簡単な統計解析機能を付加し、改良した。 ・ 遺伝子発現制御ネットワーク推定をツールとして実行可能にした。 	○ (2019年2月には標準化データベースと連結作業が終了予定)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 今後の課題として、特にネットワークモデルのグラフィカルインターフェースの整備が挙げられる。インタラクティブなインターフェースは技術的に可能だが、グラフの最適配置やインタラクティブにすることによって生じる計算量負荷を考慮したシステム構築を行う必要がある。
2. 適切な導入配列設計ツールの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ 配列設計のための基盤技術として細胞内における遺伝子発現量、タンパク質発現、機能制御に影響を与える配列上の特徴を検出する技術の開発 (2.3.2.6, 2.3.2.7で実施) 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 基盤技術の開発を実施し、適宜各実証課題と連携して開発した技術の検証を実施中。 (2.3.2.6, 2.3.2.7で実施) 	○ (複数の配列上の特徴量を同定)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 今後は、開発した技術についてツール化可能な部分の選定が必要。解決法としては、開発技術のうち一般化できる技術を選定し、ツールとして開発していく予定。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
1. 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子探索を実行するツールの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子発現データベースを構築・実装済 ・ データ格納および解析インターフェース構築・実装済。 ・ 遺伝子発現制御ネットワーク推定ツール開発・実装済。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ インタラクティブなグラフ表示を可能としたインターフェースを包含したDBシステム構築と運用 	<p>達成可能</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 実証課題からの検証結果を受けた遺伝子再選択手法については、方針が決まっているので達成可能。
2. 適切な導入配列設計ツールの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ 基盤技術の開発を実施中。 (2.3.2.6, 2.3.2.7で実施) 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 開発した技術のツール化 	<p>達成可能</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ダイナミクスについては、ブーリアンモデルによる解析は試行済のため達成可能。 ・ 恣意的に選択された遺伝子を導入したネットワーク構造推定手法については、ほぼ方針が決まっているので達成可能。

(9) 研究開発の成果と意義

平成30年度までは支援ツール1)の構築を行った。

1) 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子探索を実行するツールの開発（平成28年度～平成30年度）

・ 遺伝子発現に関する取得データを格納するデータベース構築

マイクロアレイデータを一定の形式で蓄積することによって、データ解析担当者による必要なマイクロアレイデータ取得を可能にし、実験担当者が実験条件・実験結果等のデータを格納し、さらにデータのバージョン管理が可能なデータストレージシステムを構築した。第一にマイクロアレイによって測定された遺伝子発現データが百サンプル以上存在することから、これらの既存の遺伝子発現データについてデータフォーマットおよび実験条件等の情報を実験担当者から収集した（測定データ項目、実施機関、株名、培地、反復数、培養時間等）。そのうえで、データフォーマットに基づく要素の確定と確定した要素で構成するDB構造設計を行った。具体的には、解析のための複数サンプル間を参照するインターナルIDとして遺伝子のシステムティックな名

称を設定した。同条件での測定データが複数回存在することから、サンプル識別子としては登録時に自動的に割り振る ID が有効であると判断した。将来的に各企業の公開レベルに対応するため、登録データのアクセス権に制限をつけた形で構造設計を行い、WEB アプリケーションとして実装した。

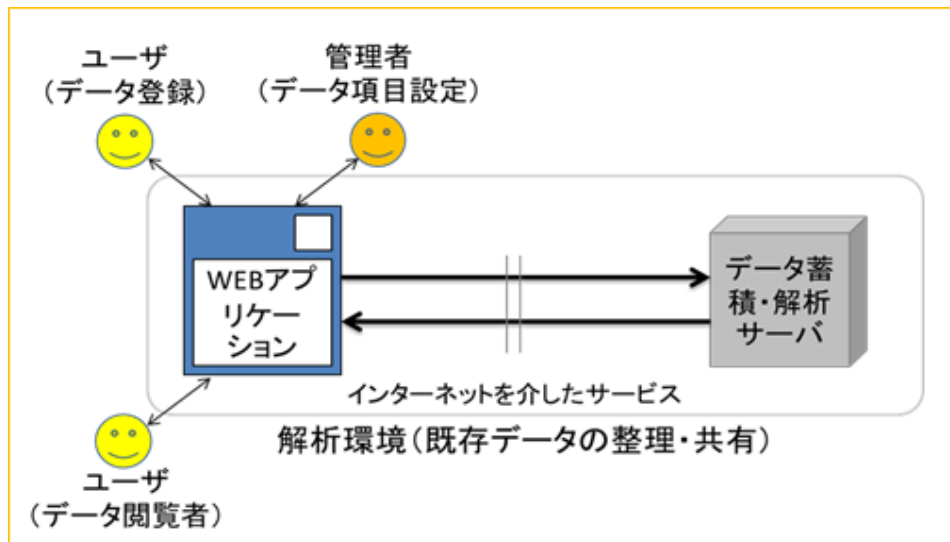


図 2. 3. 2. 5-3 Web アプリケーションとしてのシステム概要

・遺伝子発現に関する取得データ格納インターフェース構築

構築した DB の内部構造に自動的にフィットした形でデータを格納するためのインターフェースの構築を行った。具体的には、マイクロアレイデータ投入するためのユーザインターフェースとバックエンドの機能と、投入されたデータを閲覧するためのユーザインターフェースからなる環境を構築した。本システムは以下に示す機能を有する。

- ① 直感的に操作手順が分かる WEB ブラウザベースのユーザインターフェース
- ② 複数の異なる課題実施機関による利用を可能にするユーザ/グループ管理機能 (自分たちが投入したデータを自分たちのみで閲覧できるようにする機能)
- ③ 暗号化通信 (SSL 等) によるセキュリティの確保

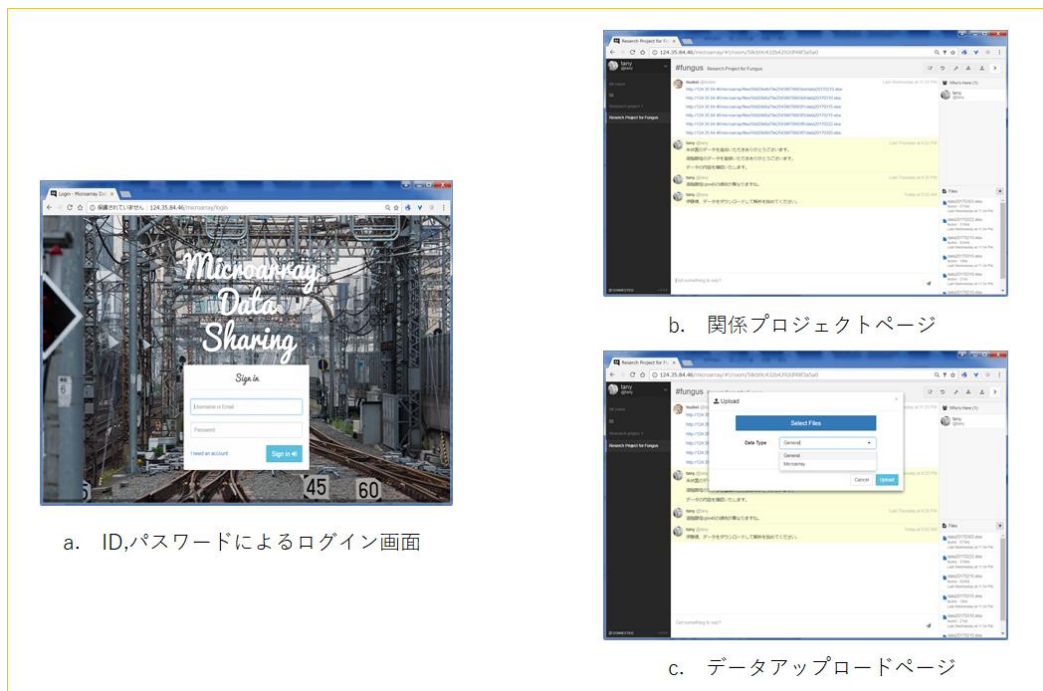


図 2.3.2.5-4 ユーザ管理とデータアップロードのインターフェース

・DB 内部拡充とインターフェースの改良

上記プロトタイプを実際にプロジェクト参画者に使用してもらい、使用者からの不具合、改良点等の情報の収集を行った。その結果、定型化された遺伝子発現データについては、投入された遺伝子発現データの統計値を整理・可視化する機能を統合した。また、投入された複数の実験に対して、実験条件をテーブル形式で整理することや、どのような実験条件が多いかをグラフで可視化する機能、個々の発現プロファイルデータにおける発現値の度数分布等をグラフで可視化する機能を追加した。

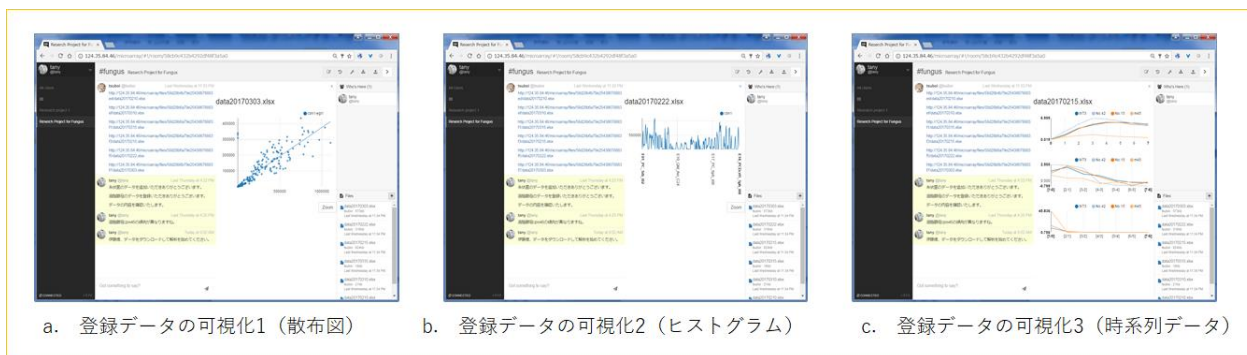


図 2.3.2.5-4 データ可視化インターフェース

・開発した遺伝子発現制御ネットワーク推定手法のツール化

2.3.2.5 で開発した遺伝子発現制御ネットワーク推定手法について、まずは開発した手法をウェブツールとして整備した。ブーリアンモデル、ベイジアンネットワークおよび構造方程式によるネットワークモデリング技術についてツールとしての公開を実施し、グラフ構造の表示までをシステムとして整備した。

遺伝子発現制御ネットワークのモデリングにおいて、その前段階となる遺伝子選択の解析ジョブは時間がかかる場合があり、抽出される遺伝子数が多くなると遺伝子ネットワーク構造推定も相応の時間がかかることになる。そこで、ユーザが投入したデータ、解析結果を保護し、後からでも識別可能となるように、ユーザ認証機能を追加した。さらに、ジョブ選択画面を設置することで、遺伝子選択を実行するか、遺伝子ネットワーク構造推定を実行するかを選択可能にした。

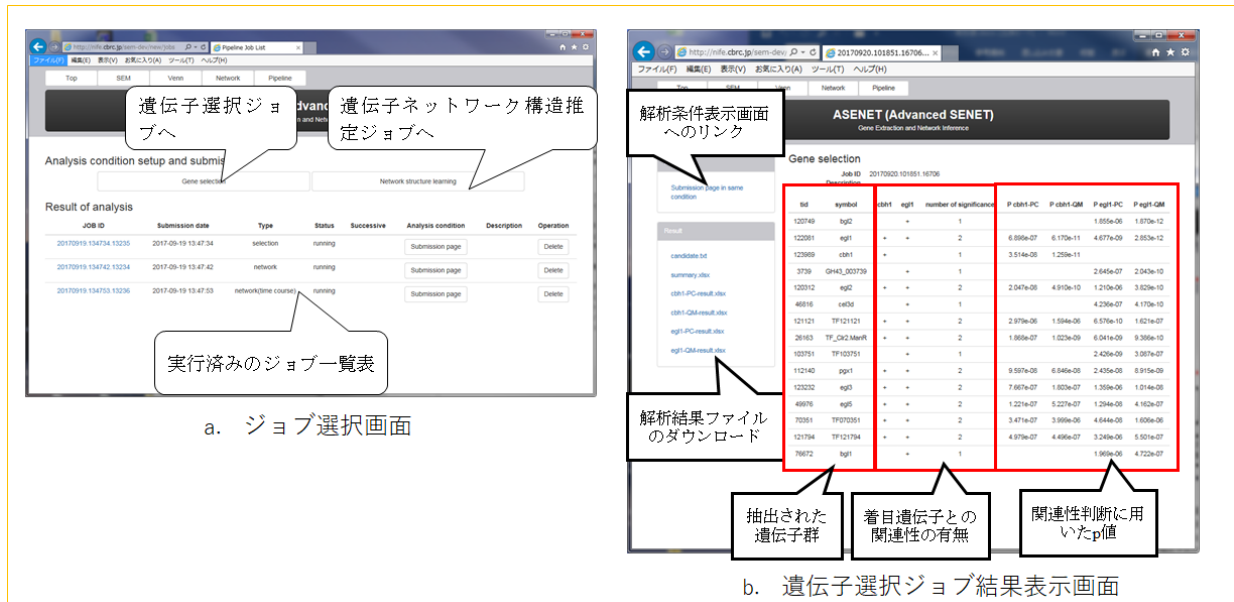


図 2.3.2.5-5 遺伝子発現制御ネットワーク推定ツールのインターフェース（遺伝子選択）

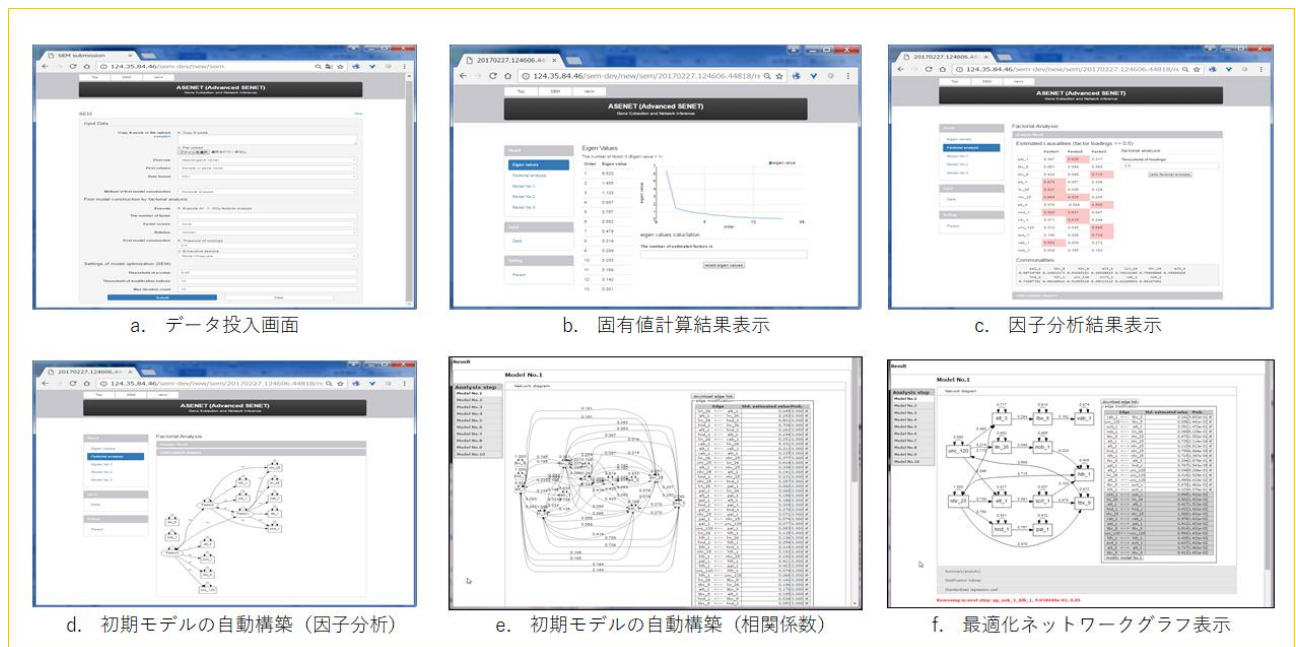


図 2.3.2.5-6 遺伝子発現制御ネットワーク推定ツール（構造方程式モデリング）

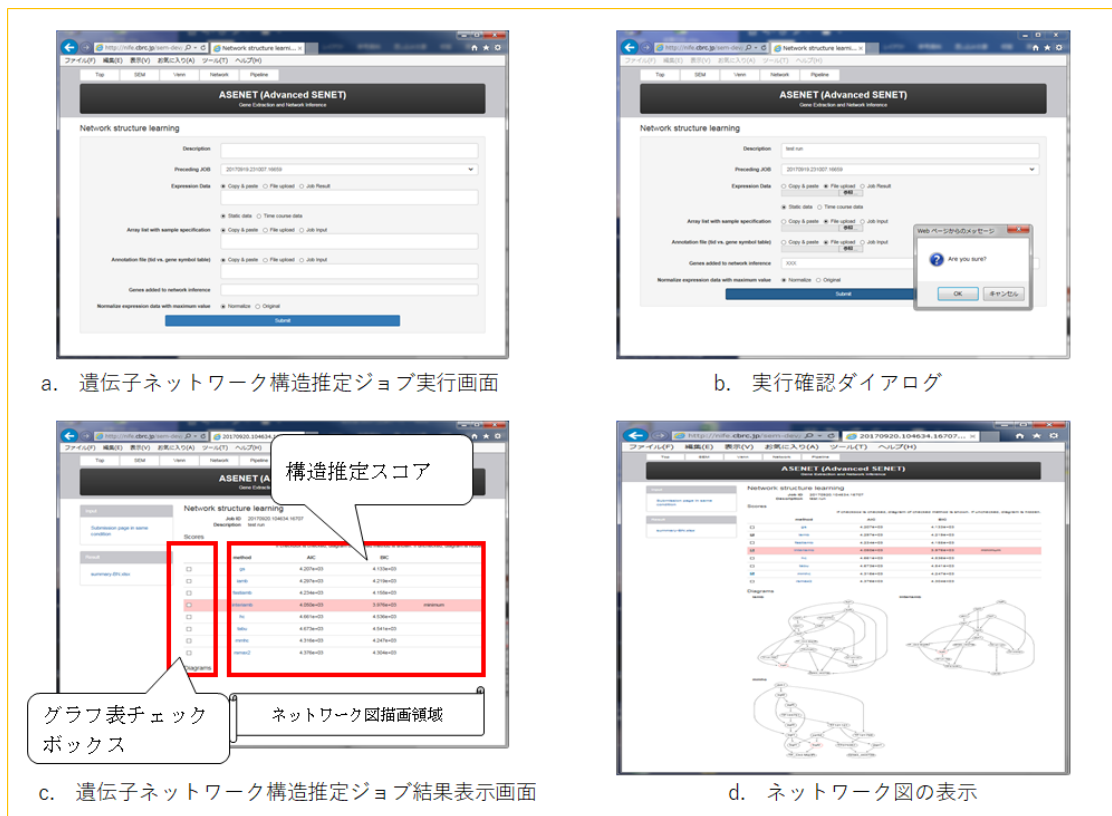


図 2.3.2.5-7 遺伝子発現制御ネットワーク推定ツール（ベイジアンネットワーク）

時系列データに対するネットワーク構造推定実行機能を解析パイプラインに組み込み WEB インターフェースから使用できるようにした。その際、システムユーザが、時系列データであることを指定し、ブーリアンモデルによるネットワーク構造推定機能を使用するための入力フォームを WEB インターフェースに組み込んだ。

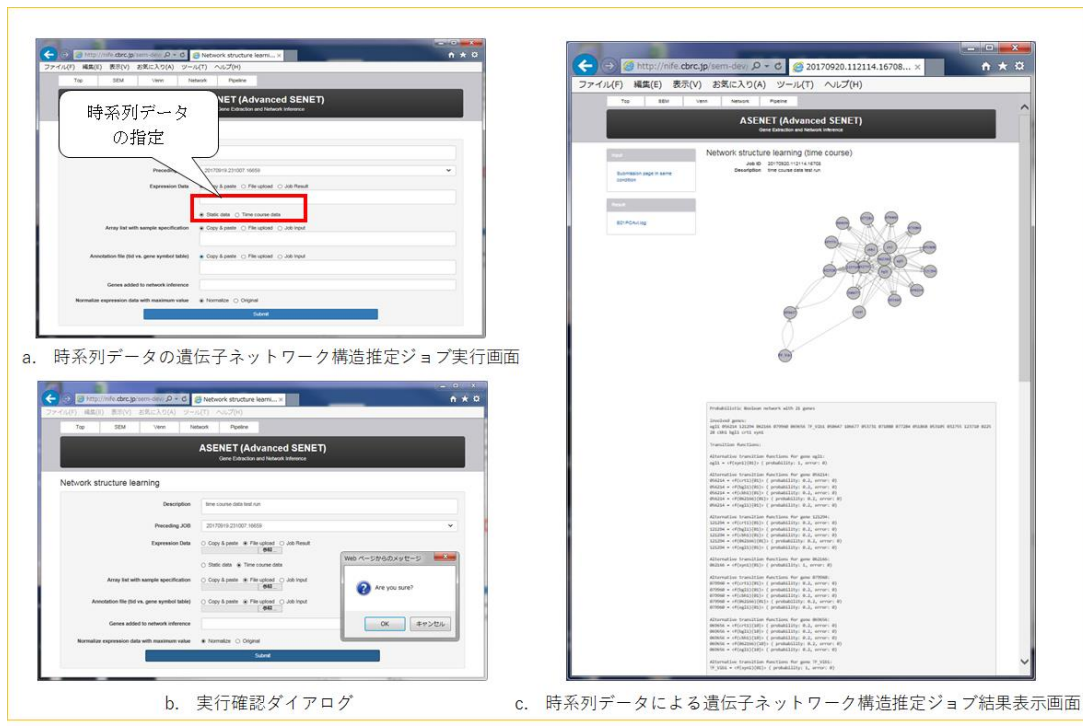


図 2.3.2.5-8 遺伝子発現制御ネットワーク推定ツール（ブーリアンモデル）

・ ツール化したネットワーク推定手法と DB システムへの組み込み

これまでに開発したネットワーク推定手法について、標準化 DB への組み込みを行った。ツール開発は Web インターフェースの開発もあったことから、すでに公開されている産総研所有サーバ上にて実施していたが、データベースシステムの概要が整備されたことをうけて、すべてのシステムを本プロジェクトで運用するサーバ内へ移設した。これにより、サーバ内の格納データから遺伝子発現制御ネットワークモデル構築までを一気に実施可能ツールとして運用が可能になった。

DB 内におけるデータストレージ部分から、計算に必要なデータを選択し、解析ツールへ流すシステムについては現在構築中である。

・ DB システムに組みこんだネットワーク推定手法に適したインターフェースの開発

DB システムへの組み込みとともに、DB 上で動作させるために必要なシステム構築を行っている。また、実際の動作確認を実施しており、必要なグラフィカルインターフェースについて検討を行っている。

2) 遺伝子間の制御構造をネットワークグラフとしてモデル化する技術の開発（平成 31 年度～）

(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	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	0	0	0	0	0
2018 *1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	0	0	0	0	0	0	0

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	0	0	0

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.2.9 統合オーミクス解析技術の開発

担当機関：産業技術総合研究所 不二製油(株)、新潟薬科大学、長岡技術科学大学、九州大学（再委託）、江崎グリコ(株)、(株)バイオジェット（再委託）

(1) 背景と目的

代謝経路設計や最適代謝経路の探索、遺伝子制御ネットワークは、実際にはひとつである生命システムをそれぞれの視点から解釈したものである。それぞれの技術によって、各視点から収量改善のための指針を得ることはできるが、実際にターゲット物質の生産量を実用化レベルにまで引き上げるためには、複数の視点からの情報を統合し、細胞システムの制御をより高精度に行うことが必要となる。生命現象においては、セントラルドグマに従う遺伝子（ゲノム）からタンパク質（プロテオーム）、その機能発現へという情報の流れがあるが、微生物等による物質生産時には、生合成された化合物やタンパク質がセントラルドグマの各階層の各要素にフィードバック的に影響を与えることが多々行われている。これらの多階層にわたる制御構造を理解することによって、より本質的な改変指針を提案することが可能になる。

物質生産時に発生している、生体内での多階層の制御構造を明らかにするためには、オーミクスの各階層において行われている現象、特に物質生産を連続した化学反応で制御している代謝経路/生合成経路の調節と、それを行うプレーヤーである酵素タンパク質の発現を制御している遺伝子制御系を連結した統合的な解析手法が求められる。特に、微生物による物質生産という目標に特化した場合、現実的な規模の観測データで構築される各階層のモデルを統合した統合モデルの開発が必要である。

本研究開発項目の目的は、オーミクス階層ごとに確立される数理科学的手法を統合することで微生物の挙動を生命システムとして包括的に解析する手法を開発し、収量向上ために微生物に加えるべき改変と培養における最適な制御などを提示する手法を確立することである。

微生物による物質生産における収量向上を最大化するためには、ターゲット物質の生合成経路を制御し、改良するための遺伝子改変候補を効率的に探索する技術が必要である。本研究開発項目によって開発する統合オーミクス解析技術によって、物質生産時における遺伝子発現制御から生合成経路の調節までの制御システムをモデルとして表現することが可能になり、生合成経路の調節のために①複数の関連酵素タンパク質の生産量を制御し、②生合成経路全体のバランス調整を実現するために必要な実験的改変候補の提案が可能になる。上記目的を達成するため、本研究開発項目では、下記2つを開発項目として設定する。

- 1) 代謝モデルと遺伝子発現制御ネットワークの連結技術の開発
- 2) 統合モデルによる高生産システム設計支援ツールの開発

それぞれの技術について詳細を下記に記載する。

1) 代謝モデルと遺伝子発現制御ネットワークの連結技術の開発

最適化された代謝モデルを遺伝子発現制御ネットワークモデルと連結する数理的手法を開発し、複数のタンパク質生産の制御を可能にするアルゴリズムとして整備する。代謝モデルと遺伝子発現制御ネットワークモデルを連結する上での課題として以下が考えられる。代謝モデルと遺伝子発現制御ネットワークモデルはヘテロ構造を有する異なったグラフ構造であり、かつ各グラフ構

造においてノードの定義が異なる。遺伝子発現制御ネットワークモデル上では遺伝子がグラフ上のノードであるのに対し、代謝モデルではグラフ上のノードは化合物であり、遺伝子がコードするタンパク質はエッジとして記載される。そのため、単純に階層毎に構築されたグラフ構造同士のノードを連結する事は難しい。最終目的はターゲット化合物の収量の最大化、つまり代謝モデル上の特定のノードの数値を最大化することであることから、始点としては代謝モデルを設定し、第一に代謝モデル上で必要な酵素バランスを算出し、そのエッジバランスを実現するために必要な人為操作を遺伝子発現制御ネットワークモデル上から探索することで上記課題の解決を目指す。

2) 統合モデルによる高生産システム設計支援ツールの開発

1) で開発した複数のタンパク質生産制御を可能にするアルゴリズムとゲノム情報からの生合成経路探索アルゴリズムを情報ツールとして供与する。特に、本プロジェクトで得られた実験データを、必要な計算に使用しながらも、その結果については特定のユーザーのみが見ることができるようなデータ管理と連動したインターフェース構築も行う。具体的には、ユーザーが標的株の発現データ、ゲノムデータ、メタボロームデータを入力とし、標的となる高生産物質を指定することで、推定されたネットワーク構造と、制御候補遺伝子を出力するシステムを開発する。このシステムは次のような年次展開により段階的に開発する。平成 30 年度にモデル生物に基づいた統合モデルによる情報ツールを開発する。開発したツールはプロジェクト参加企業に公開する。平成 30 年度以降、プロジェクト参加企業データの解析に使用することで拡張すべき点を明確にし、必要なアルゴリズムの開発と実装を行う。プロジェクト終了時には本統合オーミクス解析に基づいた高生産システムをスマートセルインダストリーの根幹を構成するツールとして、プロジェクト参加企業のみならず、広く利用が可能なツールとして公開する。

上記、2 つの技術開発を行うために、以下 4 つの研究課題を設定し、それぞれ 2.3.3.9 (ω -3 系多価不飽和脂肪酸含有油脂の生産性向上による有効性検証)、2.3.3.7 (紅麴菌を用いた色素生産制御による有効性検証)、2.3.3.10 (微生物を用いたアルカロイド等の新規生産法の有効性検証) の実証課題と連携しながら技術の開発を実施する。

研究課題① 単一代謝産物の生産量制御技術の開発 (2.3.3.9 と連携)

研究課題② 複数の代謝産物の生産量同時制御技術の開発 (2.3.3.7 と連携)

研究課題③ ゲノム情報と発現情報からの統合モデル構築 (2.3.3.10 と連携)

研究課題④ 統合モデルによる高生産システム設計支援ツールの開発

(2) 位置づけ、目標値

微生物を利用した物質生産の効率化は、古くは「醗酵」に始まり、最近では「合成生物学」を利用した効率化が求められている。その中で、欧米ではいち早く「情報解析技術」を微生物生産技術向上に組み込んだ取り組みが行われており、バイオエタノール等でいくつかの成功を収めている。欧米型の取り組みにおいて一番の特徴は機械学習を基盤とした大量データからの特徴量抽出であり、データ数に応じて、物質生産の指針となる育種方針の提案精度は向上する。しかしながら、このような手法の短所として、高精度な結果を得るためには、ターゲット物質毎に偏向していないデータを大量に取得する必要がある、高コストであることが挙げられる。

本課題では、上記のように先行している欧米の微生物物質生産分野に対抗するため、欧米型の短所である「ターゲット物質毎に大量データを必要とする」部分を最小限にするための情報解析技術としてシステム生物学的アプローチを基盤とした技術開発を行っている。本手法により、①より少量のデータで（低コスト）、②より正確に（細胞内メカニズムがベース）、③汎用的に（数理モデル構築）の3つが可能になると考えている。

	中間目標値 (H28)	最終目標値 (H32)
1. 代謝モデルと遺伝子発現制御ネットワークの連結技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ゲノム情報から生物種特有の代謝経路再構築技術の開発 ・ゲノム情報と遺伝子発現情報を統合し、活性化生合成経路を探索する技術の開発 ・活性化している経路を制御するための遺伝子発現ネットワークモデル構築手法の開発 ・油脂生産モデルと複数色素生産モデルにこれまでに開発したモデル構築技術を適用 	<ul style="list-style-type: none"> ・開発した様々なタイプの統合モデルの検証および高度化 ・階層内、階層間の制御ネットワークを推定する階層縦断的な情報解析手法を開発
2. 統合モデルによる高生産システム設計支援ツールの開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ゲノム情報から生物種固有の代謝経路を探索するためのインターフェース開発 ・ゲノム情報からの自動計算システムの構築 ・代謝経路上で DB 内実験データを表示するためのインターフェース開発 ・遺伝子発現ネットワークのグラフ構造と特定代謝経路の連結 	<ul style="list-style-type: none"> ・実用株のゲノム情報＋発現情報等から代謝経路上で活性化すべき経路の出力と改変すべき遺伝子名を提案するシステムの構築 ・特定物質の生産性向上に資する重要因子、改変すべき遺伝子配列を提示する汎用的な情報解析システムを構築

(3) 全体計画

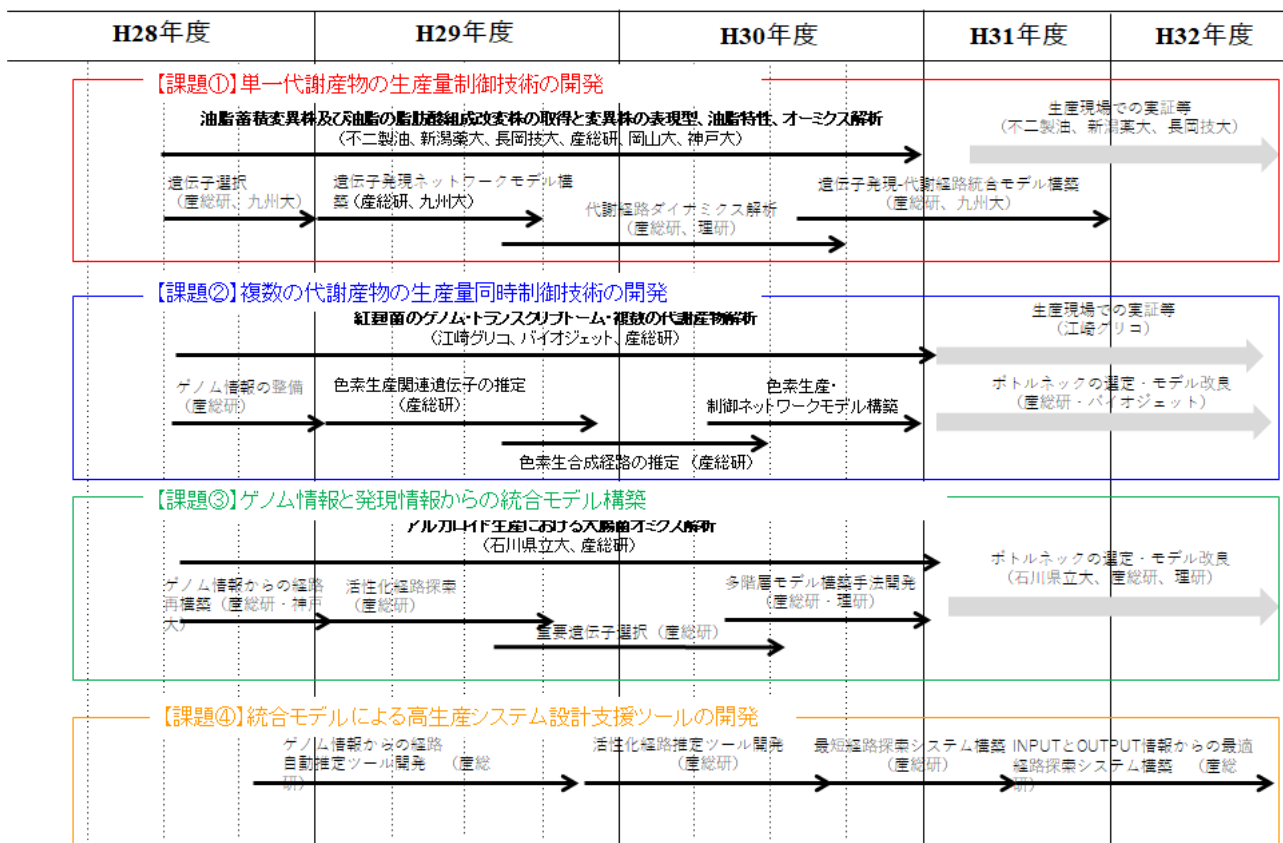


図 2.3.2.9-1 設定した研究課題と年次計画

本研究開発項目は以下 2 つを実施する。1) 代謝モデルと遺伝子発現制御ネットワークの連結技術の開発、2) 統合モデルによる高生産システム設計支援ツールの開発。特に項目 1) については、課題①～③の 3 つの実課題を設定し、アルゴリズムの開発や実データへの適用を実施する。1) で開発・適用された技術を 2) で支援ツールとして整備する。1) については、開発した情報解析技術を実データの的に適用し、適宜実証課題へフィードバックすることで検証実験を行ってもらう。検証実験で得られた情報解析による推定の正誤判定を元に、1) の技術の改良を重ね、高精度化を実現する

初年度はデータ蓄積が多い 2.3.3.9 の実データを利用し、代謝経路上の酵素遺伝子のうち、改変候補となる遺伝子の探索および既存の手法によるネットワークモデル構築を実施する。

平成 29 年度から平成 30 年度にかけて、各課題において遺伝子発現データが取得されることを受けて、それぞれの課題に第 1 弾のネットワークモデル構築を実施し、各実証課題に改変候補遺伝子を提案する。具体的には、多層オーミクス解析技術を開発するため、モデル生物である大腸菌を扱っている 2.3.3.10 の実データから、ゲノム情報と遺伝子発現データから活性化経路探索技術の開発を実施する。また、2.3.3.7 ではゲノム情報からのターゲット物質合成経路の推定および遺伝子発現データからの改変候補遺伝子推定のためのネットワーク構築を実施する。その実証実験を行っている間に、酵素タンパク質量バランスの最適化計算手法を開発する。計算結果は各実証課題に適宜フィードバックし、手法の精度について検証してもらう。

(4) 実施体制

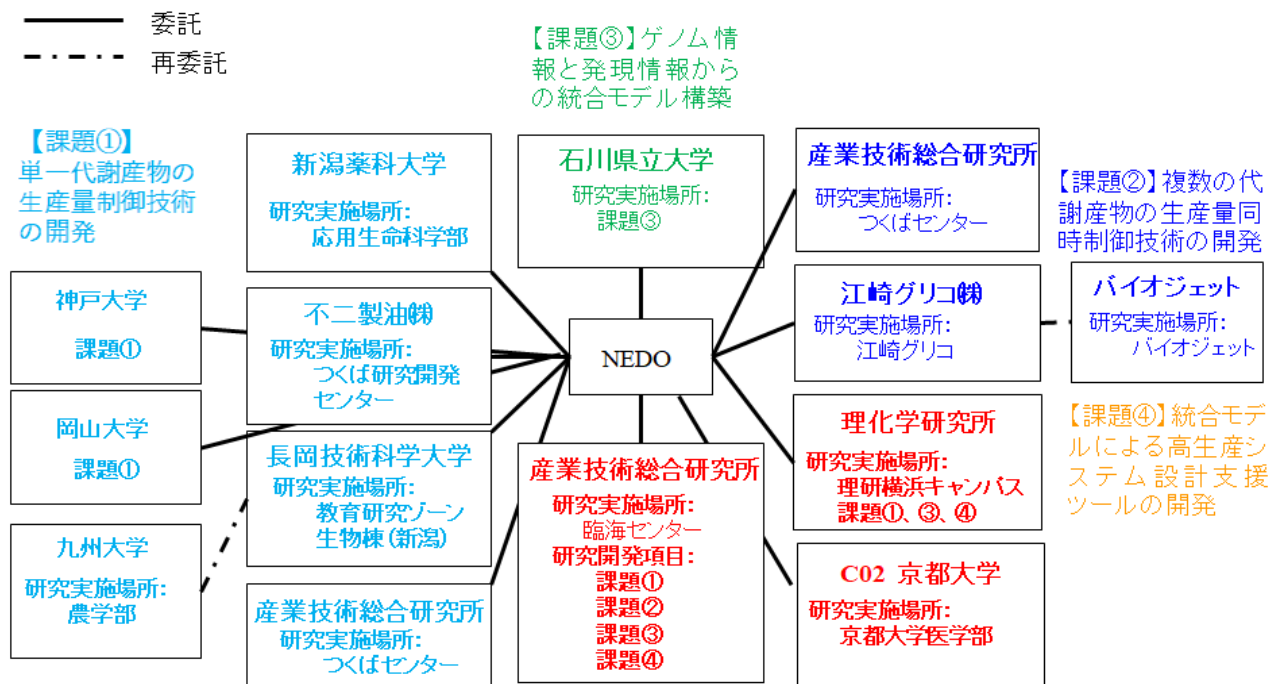


図 2.3.2.9-2 本研究開発項目の実施体制

本研究開発項目において、1) 代謝モデルと遺伝子発現制御ネットワークの連結技術の開発については、2.3.3.9 (ω -3 系多価不飽和脂肪酸含有油脂の生産性向上による有効性検証)、2.3.3.7 (紅麹菌を用いた色素生産制御による有効性検証)、2.3.3.10 (微生物を用いたアルカロイド等の新規生産法の有効性検証) の実証課題と連携しながら技術開発を実施している。また、2) 統合モデルによる高生産システム設計支援ツールの開発については、理化学研究所や京都大学とも連携し、情報交換を積極的に実施している。

実証課題における情報解析技術は産総研臨海センターが中心となり、最適代謝経路探索については、理化学研究所、および適宜京都大学とも連携して実施している。本情報解析技術を開発する上で必要なゲノム、トランスクリプトーム等の各種オーミクスデータ、およびターゲット物質の生産量データ、また開発した技術によって推定された遺伝子改変指針の正誤判定等の検証実験等については、2.3.3.7、2.3.3.9、2.3.3.10 の実証課題における各参画機関が実施している。

(5) 運営管理

- ・ 情報解析技術の開発と実証課題への適用については、中心機関である産総研臨海センターにて週1度以上の研究打ち合わせ、および研究内容についての打ち合わせを行い、研究の方向性を確認しながら本課題を実施した。
- ・ 情報解析技術開発において、代謝モデルとの連結については、京都大学および理化学研究所の課題担当者とは月に1度程度の打ち合わせを行い、方向性の確認や進捗の報告を行った。
- ・ 実証課題関係者とは、研究実施者レベルでは適宜月1度～複数回の研究打ち合わせを行った。
- ・ 2～3カ月に1度程度、課題関係者全員が集まり、NEDO、プロジェクトリーダーを含めた進捗報告会と研究方針についての会議を実施した。

(6) 実施の効果

本研究開発項目の実施により、従来法育種では探索に時間がかかっていた改変遺伝子探索の時間が大幅に短縮可能になる。また、理論値ではあるが生合成経路を最適化するための酵素量バランスの提案や、それを実現するために必要な遺伝子改変の提案も行うことが可能になり、結果的に化合物生産量に必要とするコスト削減効果が期待される。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
1. 代謝モデルと遺伝子発現制御ネットワークの連結技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> ・代謝経路データの取得とゲノム情報から生物種特有の代謝経路再構築技術の開発 ・ゲノム情報と遺伝子発現情報を統合し、活性化生合成経路を探索する技術の開発 ・活性化している経路を制御するための遺伝子発現ネットワークモデル構築手法の開発 ・油脂生産モデルと複数色素生産モデルにこれまでに開発したモデル構築技術を適用 	<ul style="list-style-type: none"> ・ゲノム情報から生物種特有の代謝経路再構築可能になった。 ・ゲノム情報と遺伝子発現情報から物質生産時に活性化している生合成経路が同定可能になった。 ・複数の酵素タンパク質量を調節するための遺伝子発現ネットワークモデル構築を実現した。 ・油脂生産モデルと複数色素生産モデルにおいて、ネットワークモデル構築を行い、実証課題による検証段階に至った。 	○ (2019年2月完成予定)	<ul style="list-style-type: none"> ・ゲノム情報からの推定した代謝経路とGSMモデルや拡張代謝モデルの整合性が課題。解決方針としては、すでにGSMモデルや拡張代謝モデルが構築されている生物種については、そちらを優先して生合成経路を探索する方法を考えている。 ・複数酵素の同時制御を遺伝子ネットワークモデルに落とし込むためには、遺伝子選択に使う論理演算を精緻化が必要。現行の論理演算式をできるだけ定式化する予定。
2. 統合モデルによる高生産システム設計支援	<ul style="list-style-type: none"> ・ゲノム情報から生物種固有の代謝経路を探索 	<ul style="list-style-type: none"> ・ゲノム情報から生物種固有の代謝経路を探索 	△ (データベース上のデータ登録)	<ul style="list-style-type: none"> ・データベース上のデータをどのように表示す

ツールの開発	<p>するためのインターフェース開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ゲノム情報からの自動計算システムの構築 代謝経路上でDB内実験データを表示するためのインターフェース開発 遺伝子発現ネットワークのグラフ構造と特定代謝経路の連結 	<p>し、表示するインターフェースを構築した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ゲノム情報からの自動計算システムについてはシステムとして開発済。 DB内実験データを表示し、簡単な統計データを出力するシステムは構築済。 遺伝子発現ネットワークのグラフ構造と特定代謝経路の連結は開発中。 	<p>が少なく、また化合物のメタボロデータ数が予定より少ないもあり、代謝経路の最適化タンパク質量バランス計算のツール化が遅れている。ただし、情報技術自体は開発済であり実装だけなので、H30年度中にインターフェースとして整備予定である。）</p>	<p>るか、グラフィカルインターフェースをどの程度まで作りこむかが課題。解決法としては、できるだけ早くにプロトタイプを構築し、実際に実験研究者に使用してもらうことで課題点を洗いだし、適宜改良していくことで支援ツールとして使いやすいものを作るようすることを検討中。</p>
--------	---	---	--	---

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
1. 代謝モデルと遺伝子発現制御ネットワークの連結技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> ゲノム情報から代謝経路の再構築可能。 ゲノム情報と遺伝子発現情報から物質生産時に活性化している生合成経路が同定可能。 複数の酵素タンパク質量を調節するための遺伝子発現ネットワークモデル構築可能。 油脂生産モデルと複数色素生産モデルにおいて、ネット 	<ul style="list-style-type: none"> 開発した様々なタイプの統合モデルの検証および高度化 階層内、階層間の制御ネットワークを推定する階層縦断的な情報解析手法を開発 	<p>達成可能</p> <ul style="list-style-type: none"> 統合モデルの検証と高度化については、各実証課題に開発した手法を用いた改変指針の検証結果を受けて、課題の洗い直しを行っている。特にゲノム情報からの活性化経路探索については、方法論の改良を実施する予定。 階層縦断的な情報解析手法を開発については、モデル生物

	ワークモデル構築を行い、実証課題による検証中。		において一次代謝経路上のハブ化合物生産量増加に必要なタンパク質量バランス計算と遺伝子発現量からのタンパク質量推定モデルを構築中であり、これらを組み合わせることで階層縦断的な解析手法を開発可能。
2. 統合モデルによる高生産システム設計支援ツールの開発	<ul style="list-style-type: none"> ゲノム情報から生物種固有の代謝経路を探索し、表示するインターフェースを構築した。 ゲノム情報からの自動計算システムについてはシステムとして開発済。 DB 内実験データを表示し、簡単な統計データを出力するシステムは構築済。 遺伝子発現ネットワークのグラフ構造と特定代謝経路の連結は開発中。 	<ul style="list-style-type: none"> 実用株のゲノム情報＋発現情報等から代謝経路上で活性化すべき経路の出力と改変すべき遺伝子名を提案するシステムの構築 特定物質の生産性向上に資する重要因子、改変すべき遺伝子配列を提示する汎用的な情報解析システムを構築 	<p>達成可能</p> <ul style="list-style-type: none"> ゲノム情報と発現情報から活性化経路を推定し、必要酵素遺伝子を出力することは可能。ただし、酵素バランスまでを計算するモデルについては自動化するのは今の段階では難しい。 遺伝子配列の設計については、ある程度の自動化は可能であり、改変すべき遺伝子配列を提供するシステムは構築可能。

(9) 研究開発の成果と意義

1) 代謝モデルと遺伝子発現制御ネットワークの連結技術の開発

・代謝経路データの取得とゲノム情報から生物種特有の代謝経路再構築技術の開発

統合モデルで重要になる代謝経路についての情報を網羅的に取得した。具体的には有償 KEGG データや BRENDA、UniProt を利用し、酵素反応情報の取得を行った。次に、宿主微生物のゲノム情報から遺伝子領域を推定し、推定した遺伝子領域から全遺伝子について機能アノテーションを実施した。推定した遺伝子機能から、宿主微生物ゲノム中に存在する全酵素の同定を行った。これら全酵素情報と、上記で取得した酵素反応情報から、その株において可能な酵素反応のみを抽出した。

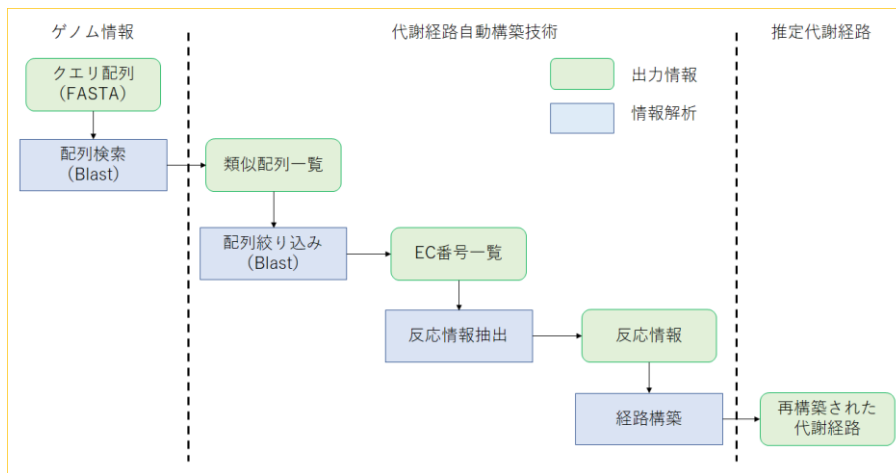


図 2.3.2.9-3 ゲノム情報からの代謝経路再構築プロシージャー

・ゲノム情報と遺伝子発現情報を統合し、活性化生合成経路を探索する技術の開発

先に開発した技術によって、ゲノム配列が決定された産業微生物それぞれについて、そのゲノム情報からの生物種特有の代謝経路を構築した。そのうえで、本プロジェクトで取得された宿主微生物の遺伝子発現データと物質生産量の双方を代謝経路情報に反映した。具体的には、代謝経路上の酵素遺伝子群の発現データについて GSEA 解析を適用し、ターゲット物質生産時に有意に変動している代謝サブグラフを検出する技術を開発した。ブートストラップ法を適用し、各代謝サブグラフの活性化指標を P 値として算出した。

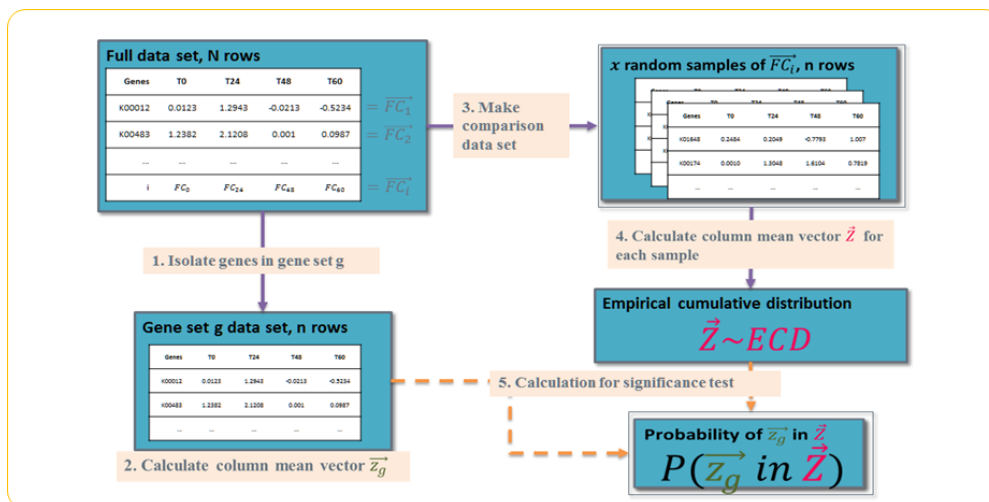


図 2.3.2.9-4 ゲノム情報と遺伝子発現データからの活性化経路検出手法

・活性化している経路を制御するための遺伝子発現ネットワークモデル構築手法の開発

ゲノム情報と代謝経路情報、さらに遺伝子発現情報までを統合した結果得られた知見から、活性化している経路を調節し、さらに高生産性を実現するための改変遺伝子候補を推定する技術を開発した。具体的には、2.3.2.5 で開発した遺伝子発現制御ネットワークモデル構築手法を基盤とし、これまでに開発した統合モデルから抽出した生合成経路構成遺伝子群と先に選択した遺伝子群による遺伝子発現制御ネットワークモデルを構築した。特に課題③「ゲノム情報と発現情報

からの統合モデル構築」として 2.3.3.10 課題と連携し、ターゲット物質生産時における活性化経路の同定と、これを制御するための改変候補遺伝子の同定を行った。

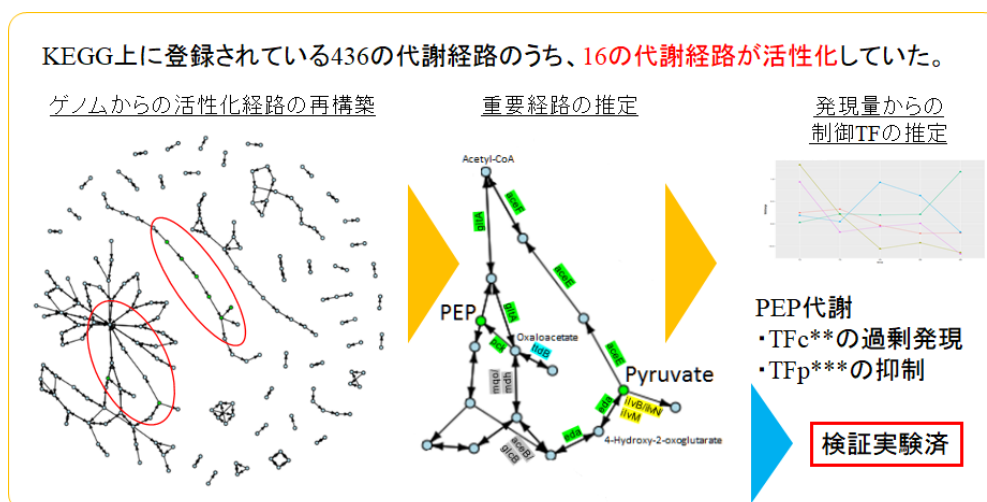


図 2.3.2.9-5 2.3.3.10 課題における活性化経路検出と改変候補遺伝子推定

開発した手法を実データに適用し、2.3.3.10 実証課題での改変候補として 3 遺伝子を提案した。検証実験の結果、予測していた成果は得られなかったことから、下記問題点が挙げられた。

1. 宿主微生物がプラスミド導入株である事に由来する生物学的な問題
2. 活性化経路推定技術の高精度化

そこで、2. についてターゲット物質の生合成経路を調節し、さらに高生産性を実現するための改変酵素遺伝子を推定する技術の開発を行った。開発した技術フローを以下に示す。

- **ゲノムスケール代謝ネットワークモデルの構築**
 - 遺伝子機能情報の収集
 - 酵素および反応情報（基質・生成物）から代謝反応ネットワーク構築
- **代謝反応の絞込み**
 - Flux balance analysis (FBA)
 - 脂質生産に関わる反応に絞込み（ゲノムスケールモデル→動的モデル）
- **動的モデルの構築**
 - 脂質生産量の経時変化のモデル
 - 反応速度式を用いた常微分方程式モデル
- **動的モデルのパラメータの推定**
 - メタボローム、プロテオームなどのデータを利用
 - 実測データを再現する初期値、反応定数の推定
- **動的モデルによる予測**
 - 酵素のノックアウト・ノックインによる生産量変化

図 2.3.2.9-6 生合成経路における調節候補酵素遺伝子推定フロー

調節すべき酵素を同定する方法としては、微分方程式を利用した動的モデルを適用した。各代謝反応について常微分方程式を定義し、代謝経路を常微分方程式で表すことで、シミュレーションを実施した。

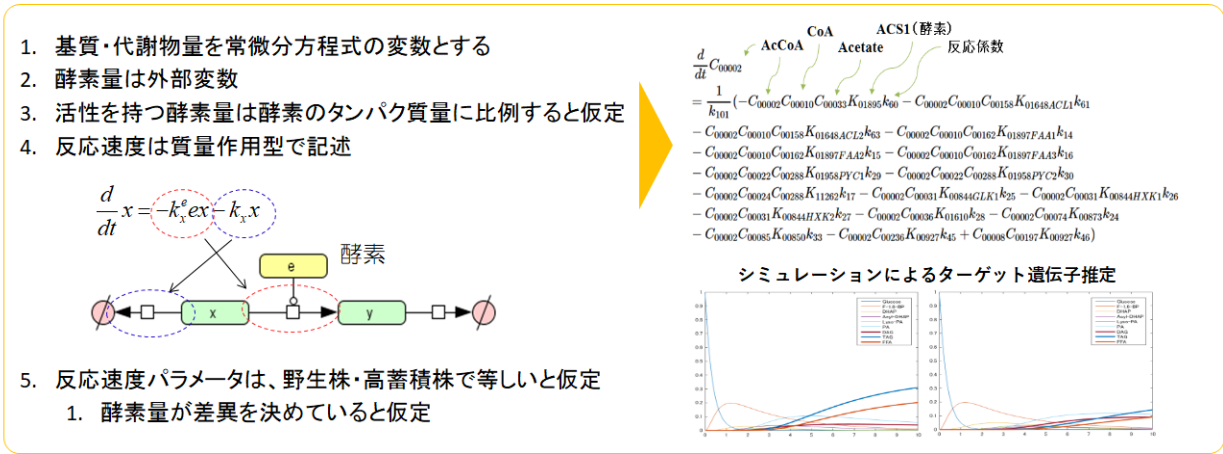


図 2.3.2.9-7 動的モデルによる化合物量シミュレーション例

・油脂生産モデルと複数色素生産モデルにこれまでに開発したモデル構築技術を適用

開発したすべての技術を、課題①「単一代謝産物の生産量制御技術の開発」として 2.3.3.9 の ω-3 系多価不飽和脂肪酸含有油脂の生産性向上による有効性検証、課題②「複数の代謝産物の生産量同時制御技術の開発」として 2.3.3.7 の紅麹菌を用いた色素生産制御による有効性検証のそれぞれに適用し、目的とする代謝産物量を実現するために必要な遺伝子改変の提案を行った。

課題①では、同一条件での発現データとメタボライト量データから、前項目で開発した動的モデルを適用し、生合成経路をさらに活性化するための遺伝子を検出し提案した。

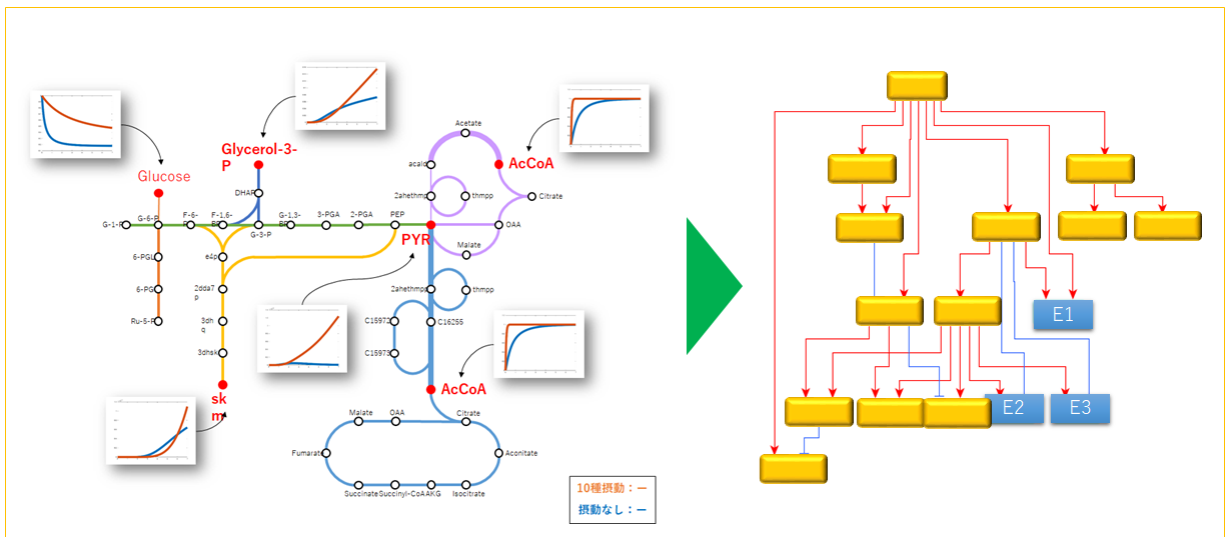


図 2.3.2.9-8 油脂生産モデルでの解析結果

色素生産モデルでは、ゲノム情報かターゲット物質の生合成経路を予測し、そのゲノム上の位置から生合成クラスターの推定を行った。推定した生合成クラスターと遺伝子発現データを組み合わせ、ターゲットとする遺伝子を決定したのち、複数のターゲット遺伝子量を同時に調節するネットワークモデルを構築した。

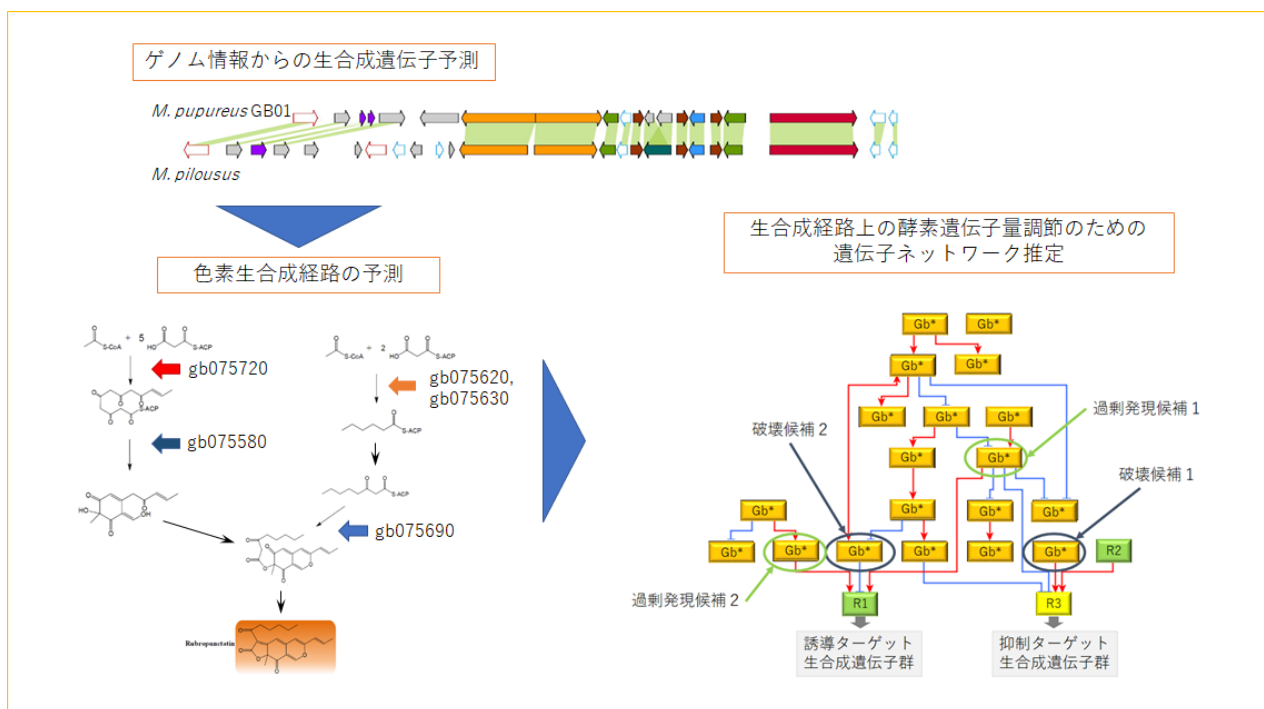


図 2.3.2.9-9 色素生産モデルでの解析結果

それぞれの実証課題において、検証実験を実施中である。

2) 統合モデルによる高生産システム設計支援ツールの開発

・ゲノム情報から生物種固有の代謝経路を探索するためのインターフェース開発

様々な実用株では、ゲノム情報を取得し、ゲノム情報を元にそのゲノム中に存在する酵素を特定し、上記で取得した全酵素反応情報から、その株において可能な酵素反応のみを抽出するツールの開発を行った。本システムでは、酵母や大腸菌等にはすでに KEGG 等で同様のツールがあることから、使用できる場合はその情報を使用するようにした。しかし、企業案件のような実証株については、ゲノム情報からの代謝経路探索を実施する必要がある。ゲノム情報の入力と、代謝経路の出力を備えたインターフェースの開発を行った。

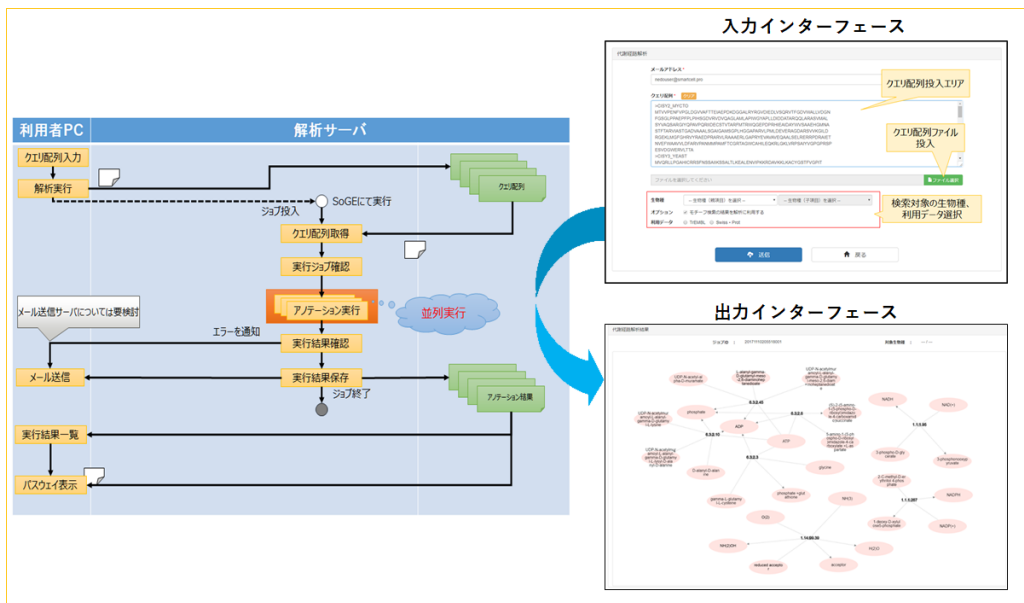


図 2.3.2.9-10 ゲノム情報からの代謝経路探索インターフェース

・ゲノム情報からの自動計算システムの構築

ゲノム情報から遺伝子部位を自動計算するシステムを構築した。さらに、各遺伝子の遺伝子発現情報と、生物種特有の代謝経路情報を自動的に表示するシステムを開発した。

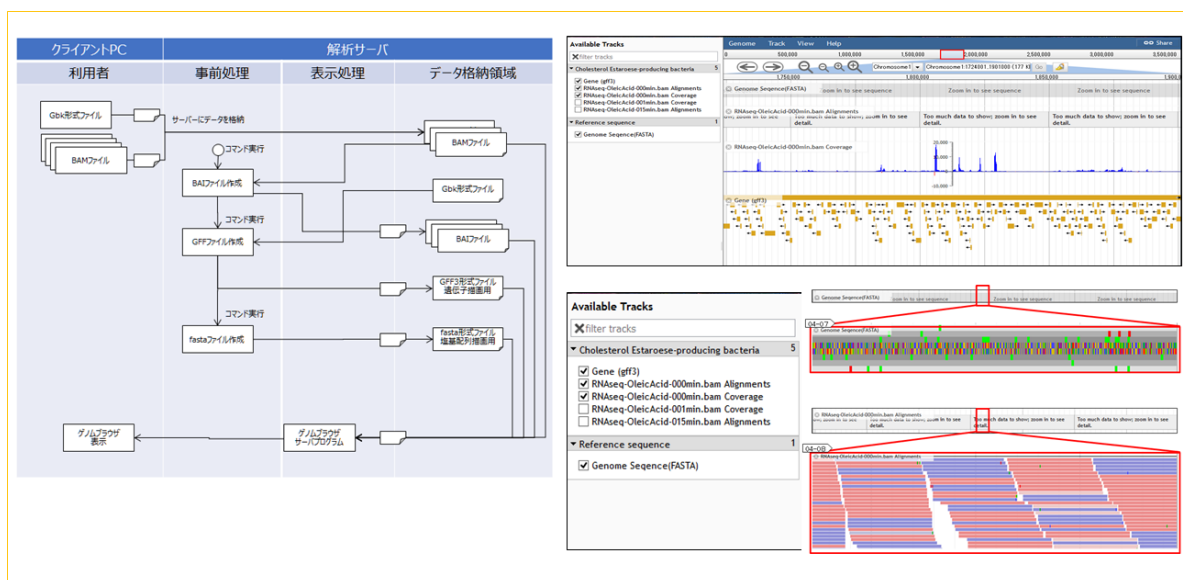


図 2.3.2.9-11 ゲノム情報からの自動計算システム

・代謝経路上でDB内実験データを表示するためのインターフェース開発

ある条件下で活性化・不活性化している代謝経路を明示的に表示するシステムの開発を行った。システムとして開発済であるが、データベース内データ整備が整い次第インターフェースを整備する。データベース内に拡充している各種代謝経路、酵素タンパク質に関するデータについては、紐づけされているDB内各種データから、ユーザーが必要とするデータの種類を表示できるインターフェースの開発を行った。

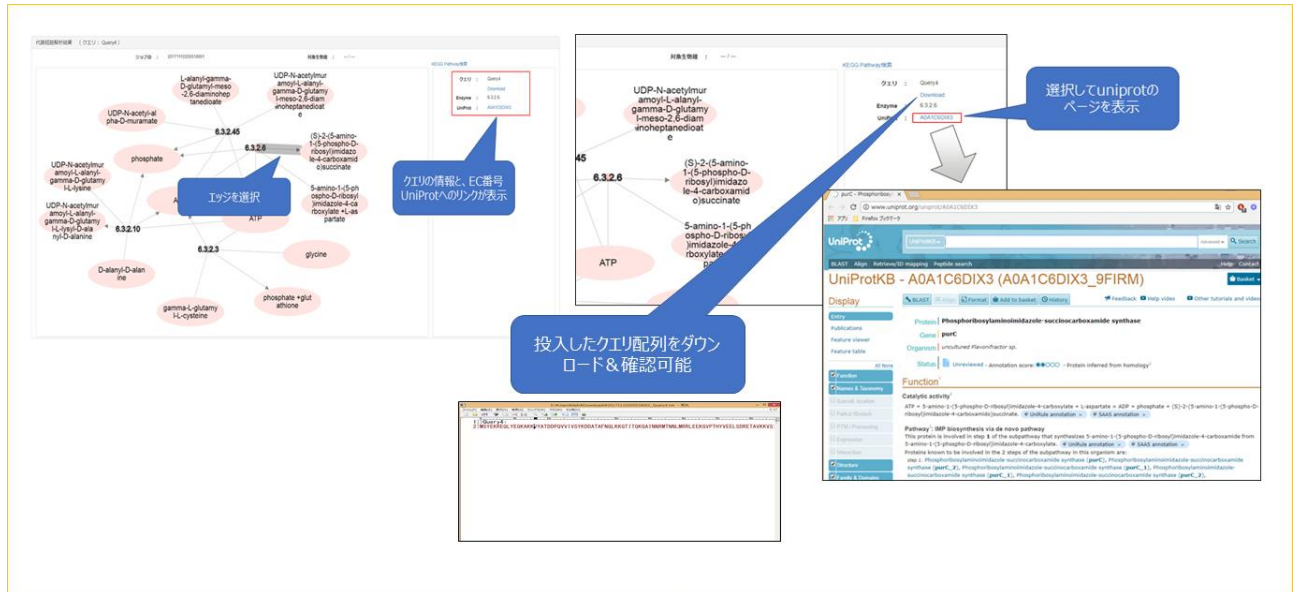


図 2.3.2.9-12 DB 内データの表示インターフェース

・ 遺伝子発現ネットワークのグラフ構造と特定代謝経路の連結

生物種特有の代謝経路情報から、経路上に存在する特定の酵素を選択した場合に、その酵素が遺伝子ネットワーク上でどの位置に存在するかを示す技術の開発を実施中である。具体的な課題としては、代謝経路上で選択した酵素が、遺伝子発現データでは特異的な発現変動を行っていないことから、遺伝子発現ネットワークグラフ上はノードとして存在しないことが考えられる。そこで、2.3.2.5 の遺伝子発現制御ネットワークモデル構築技術において、恣意的な遺伝子導入モデルの構築手法を開発し、その場合には先に計算によって選択された他遺伝子群に、酵素遺伝子を加えてネットワークモデルを構築する技術を開発中である。

(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	
2016	0	〇〇	0	0	0	0	0
2017	0	0	9	0	1	0	0
2018 *1	1 (1)	0 (1)	0 (6)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	3	2	15	2	2	0	0

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	0 (1)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	2	0	0

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.1.6 測定データのクオリティコントロール、標準化データベースの構築

担当機関：産業技術総合研究所、神戸大学

(1) 背景と目的

高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発には、高生産性微生物設計システムが重要な基盤技術となる。設計のためには既知の知識や、本プロジェクトの標的生物に特化した新規の知識が必要である。新規の知識については、本プロジェクト内で測定された実験結果を活用するが、高品質の実験結果であるほど、設計システムに用いられる予測計算の精度が向上すると期待できるため、測定データの品質管理を行いつつ、一定の品質基準を満たす測定データによって標準化されたデータベースを構築し、本プロジェクトの測定データを一元化し、高生産性微生物設計システムの開発に活用する。

(2) 位置づけ、目標値

・位置づけ

一定の品質基準に基づき、基準を満たした測定データのみでデータベース化するという理想的なデータベースは、公共データベースでは実現困難である。本プロジェクトの実証課題で用いられる標的生物は、それぞれ独自の研究によって得た測定データが不可欠であるが、これらの独自データを集積することによって、データベースとして世界的にみても独自性の高い位置を占めることになる。実証課題で用いられる標的生物の有用性が高ければ高いほど、本データベースの価値も高くなる。

・中間目標値(H30)

情報システムとしてのデータベースは、データベースとしての基本機能の実装をH30年度までに完了する。基本機能は大別して次の2つの機能である：測定データの登録機能、品質検査機能。測定データの登録機能とは、ファイルのアップロード機能、ファイルの検疫機能（ウイルス検査）、基本的なメタデータ（実験付随情報）の構造、データ閲覧機能、データ検索機能、情報ツール連携インタフェースである。連携インタフェースとは、高生産性微生物設計システムと本データベースが人間を介さず、両者のプログラムが連携して動作できるように設ける通信手段である。品質検査機能とは、RNA-Seqデータの品質検査機能である。

・最終目標値(H32)

本プロジェクト内で測定されたデータの収容をH32年度までに完了する。本プロジェクト内の測定データは、次世代シーケンサーによるものや質量分析装置によるもの、マイクロアレイによるものなど、多岐にわたるが、これらの多様な測定データを単一のデータベース内で収容できるよう、特にメタデータの拡張および改訂をH31年度からH32年度の間で実施する。

(3) 全体計画

中項目	小項目	H 28	H 29	H 30	H 31	H 32
測定データのクオリティコントロール	品質検査機能		→			
	データ登録機能	→				
標準化データベースの構築	メタデータ構造		→		→	
	データ登録作業		→			
			→			

(4) 実施体制

項目	担当
データベース開発の監督	産総研
データベースの開発	産総研
産総研側実証課題参画企業からの測定データ集積	産総研
神戸大側実証課題参画企業からの測定データ集積	神戸大
高生産性微生物設計システムとの連携	産総研

(5) 運営管理

- ・拠点会議 半年1回
- ・全体会議 年1回

(6) 実施の効果

大規模データベースへの統合等を NEDO、METI と検討中。

(7) 中間目標の達成度

中項目	小項目	達成度
測定データのクオリティコントロール	品質検査機能	○
標準化データベースの構築	データ登録機能	○
	メタデータ構造	○
	データ登録作業	○

(8) 最終目標の達成可能性

中項目	小項目	現状	最終目標	達成見通し
測定データのクオリティコントロール	品質検査機能	H30年度までに開発完了の見込み。	H30年度までに完了。	問題なし。
標準化データベースの構築	データ登録機能	H30年度までに開発完了の見込み。	H30年度までに完了。	問題なし。
	メタデータ構造	H30年度までにRNA-Seqに関するメタデータ構造作成完了の見込み。	質量分析装置からの測定データについてメタデータ構造作成完了。	十分な開発期間が見込めることから、大きな問題なし。
	データ登録作業	登録要請の基づき随時実施中。	H32年度までにデータ登録完了。	随時実施中で大きな問題なし。

(9) 研究開発の成果と意義

本課題における主たる成果物はデータベースのものである。本データベースは、プロジェクト終了後も引き続き、高生産性微生物の設計システムの一部として活用されることが期待されている。

(10) 成果の普及

書籍「スマートセルインダストリー ―微生物細胞を用いた物質生産の展望―」第4章測定データのクオリティコントロール、標準化データベースの構築（光山統泰）監修：久原 哲 シーエムシー出版

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

特許出願はせずノウハウとして保有する。

2.3.2.10 遺伝子配列設計システム（情報解析技術）のうち、文献情報等の公開データからの知識整理を補完するためのデータ処理・AI 基盤技術の研究開発

担当機関：京都大学、九州大学、神戸大学、株式会社日立製作所、理化学研究所（再委託）、大阪大学（協力）

(1) 背景と目的

スマートセルの開発における各種データ・モデルの解釈と、それをもとにした設計指針・仮説提案の多くは、現状は開発者個人の知識背景と人手による文献調査・データベース検索に依存している。その結果、検索・調査という知識獲得プロセスが律速であるとともに、体系的な知識蓄積と知識再利用が困難であるなど、技術的に解決すべき大きな課題となっている。こうした DBTL サイクルの学習 (Learn) 部分については、世界でも方法論が模索されている状況であり、データの解釈・学習を経て、次の設計指針に対して意思決定を支援する技術あるいはシステムの開発が望まれている状況である。

こうした背景のもと、本研究項目では、スマートセル開発に特化した文献データ・公開データ等からの情報抽出および知識ベース構築を行う AI 基盤技術の開発と、スマートセル開発の一連のプロセスに応じたデータ処理・学習技術の開発を行う。これにより、オミクス測定データや代謝モデルの解釈の迅速化、代謝経路設計・酵素反応選択の意思決定支援、更には遺伝子・代謝物に関する新たな知識発見と獲得を目指す。更には、有効性検証と連動した知識ベース拡充と AI 基盤技術高度化を進め、本プロジェクトが対象とする宿主・生産物への適用拡大を狙う。

(2) 位置づけ、目標値

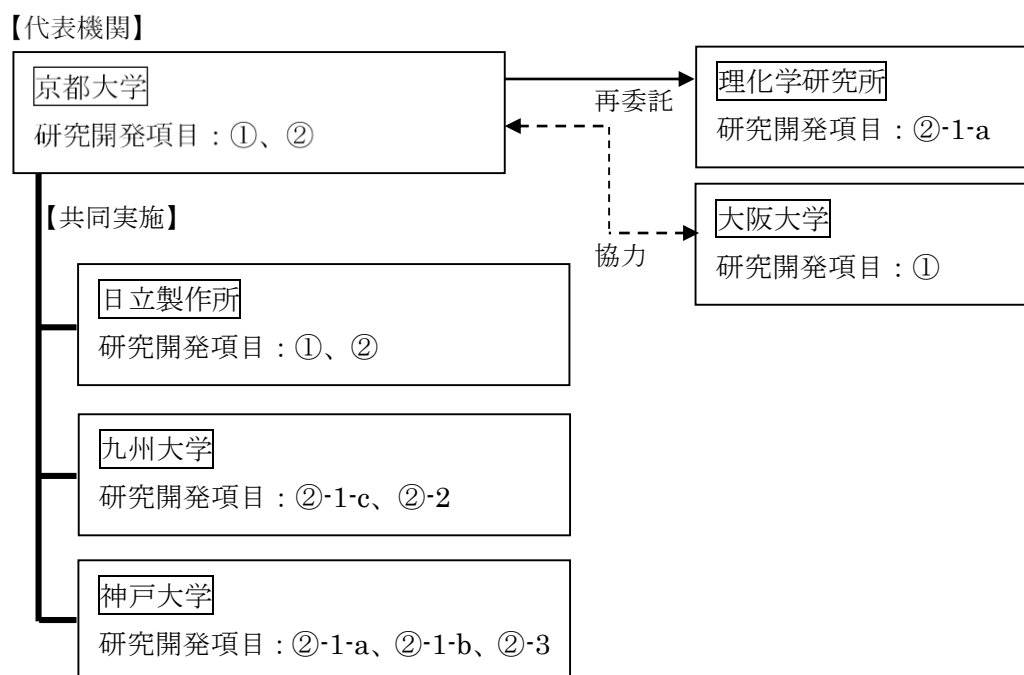
本研究項目が対象とする知識ベースおよびデータ処理・AI 基盤技術の位置づけは、DBTL サイクルの学習 (Learn) 部分におけるデータ解釈・意思決定の迅速化である。これまで、文献等からの情報抽出により、酵素反応・代謝パスウェイ・遺伝子制御ネットワーク等に関するデータベース・知識ベースが数多く構築されてきているが、その多くは生物機能の解明といった、人間のバイオ研究者向けに情報を整理する目的で構築されてきた。そのため、スマートセル開発に資する知識の抽出には、依然として人手による検索・整理に依存している状況である。これに対し、本研究項目では、対象をスマートセル開発に特化し、知識の抽出と整理に AI 技術を活用することで差別化を狙う。

研究開発項目としては、①文献データ・公開データ等からの知識ベース構築と②知識ベースの有効性検証と AI 基盤構築に大別する。①では文献・公開データベース等からのデータ抽出・処理技術から汎用的な知識ベース構築技術の開発を主として設定し、②では各機関と共同で各種スマートセル開発課題（サブテーマ）を実施することで、データ解釈・学習システムの開発とそれに伴う①の知識ベース拡充を行う仕組みとした。それぞれの目標値は、プロジェクト全体への展開およびプロジェクト以外への利活用を視野に入れ、DBT 技術開発を行う機関・企業が将来要望する工数レベルから算出し設定した。

(3) 全体計画

平成 29 年度に、②において各サブテーマと連携して知識ベース構築のワークフロー開発を進めるとともに、①知識ベース基盤のプロトタイプ構築および AI 基盤技術の方法論の確立を行った。平成 30 年度は、構築した知識ベース基盤のプロトタイプへ AI 基盤技術を組み込み、各サブテーマに順次展開することで、各サブテーマにおける知識ベースの構築を進める。また、必要に応じて知識ベース基盤の機能拡張を行う。平成 31 年度以降はサブテーマで収集した実験データと照らし合わせ、知識ベースの有効性を検証する。更には、現行プロジェクト含めてサブテーマを拡充し、実運用を見据えた有効性の検証を実施する。

(4) 実施体制



(5) 運営管理

テーマの運営に関しては、主として研究開発項目①を担当する機関（京都大学・日立製作所）と、研究開発項目②を担当する各機関（神戸大学、九州大学、理化学研究所（再委託））との間で、1カ月に一度を目安に連絡会議を実施し、開発進捗を共有している。また、更に、四半期に一度全体会議を開催し、サブテーマを含めた研究開発項目全体の進捗を共有している。研究開発項目②で得られた知見を随時フィードバックすることで、データ処理・AI 技術基盤の開発および知識ベース基盤の概念設計を促進できた。

(6) 実施の効果

本研究項目が対象とする知識ベースおよびデータ処理・AI 技術は、特定の宿主・生産物に依らず、スマートセルが対象とする事業全般において開発の効率化する技術であり、多分野での適用が期待される。本プロジェクトにおいて、各テーマへの展開と有効性検証により工数削減の見通しを立て、具体的な費用対効果を算出する。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目①「文献データ・公開データ等からの知識ベース構築」において、知識ベース構築ワークフロー開発（①-1）については、これまでに知識ベース基盤のプロトタイプ構築と、各サブテーマにおけるワークフローの策定を完了し、中間目標を達成した。また、知識ベース基盤に必要なデータ抽出・処理技術（①-2-a、①-2-b）については、知識抽出の方法論の確立した。今後、知識ベース基盤プロトタイプへ統合するとともに、ユースケースに特化したデータセットの収集と改良を実施することで、2019年3月に中間目標を達成する見込みである。

研究開発項目②「知識ベースの有効性検証と AI 基盤構築」については、これまでに、策定したワークフローに応じたデータ・文献収集、推定モデルの設計、インタフェースの設計を完了した。今後、知識ベースの構築を進め、2019年3月に中間目標を達成する見込みである。

(8) 最終目標の達成可能性

最終年度までに、知識ベース基盤の運用とプロジェクト全体へのテーマ展開、および知識ベースによるスマートセル設計工数短縮効果の確認を実施する。現状、中間目標として、各サブテーマにおけるワークフローの概念設計を完了しており、今後テーマに応じた対応ユースケースの拡充と、データ処理・AI 技術のアルゴリズムカスタム化を進めることで、最終目標の達成が見込まれる。

(9) 研究開発の成果と意義

①-1. 知識ベース構築ワークフロー開発（担当機関：京都大学、日立製作所、大阪大学（協力））

平成 29 年度は、スマートセル開発ワークフローに沿って知識を蓄積するために、知識抽出部、知識提示部、および制約条件設定部からなる知識ベース基盤の基本処理構造を設計した（図-2.3.2.10-1）。設計した基本処理構造に基づき、知識ベース基盤プロトタイプを、項目②-1-b をテストケースとして、計算サーバ上に構築した。

具体的には、知識抽出部として、(1) スマートセル開発に関連する公開データ・文献を大量に収集する文献・データ収集機能、(2) 機械学習・自然言語処理でデータの特徴を抽出したり、関係性を解析する抽出・解析機能、(3) スマートセル開発で横断利用できる知識形態(マップ・ネットワーク)で蓄積する知識蓄積機能を備えた処理構造を設計した。また、知識提示部として、蓄積された知識を探索・提示する Web インタフェースの設計、および開発課題ごとの制約条件や、知識抽出に使用する文献情報を整理・蓄積する Web インタフェースを設計した。設計した基本処理構造に基づいて、項目②-1-b に沿って収集した文献情報を用いて、オミクス情報の共起関係の抽出結果を、ネットワーク図として提示するプロトタイプを計算サーバ上に構築し、フローの妥当性を確認した。

平成 30 年度は、開発した知識ベース基盤プロトタイプのテーマ展開を見据え、オミクス数理特徴量抽出技術（項目①-2-a）を統合と、抽出・解析機能の拡充に取り組んでいる。並行して、サブテーマにおいて策定した知識ベース構築ワークフローを統合し、サブテーマにおける有効性検証に着手する。

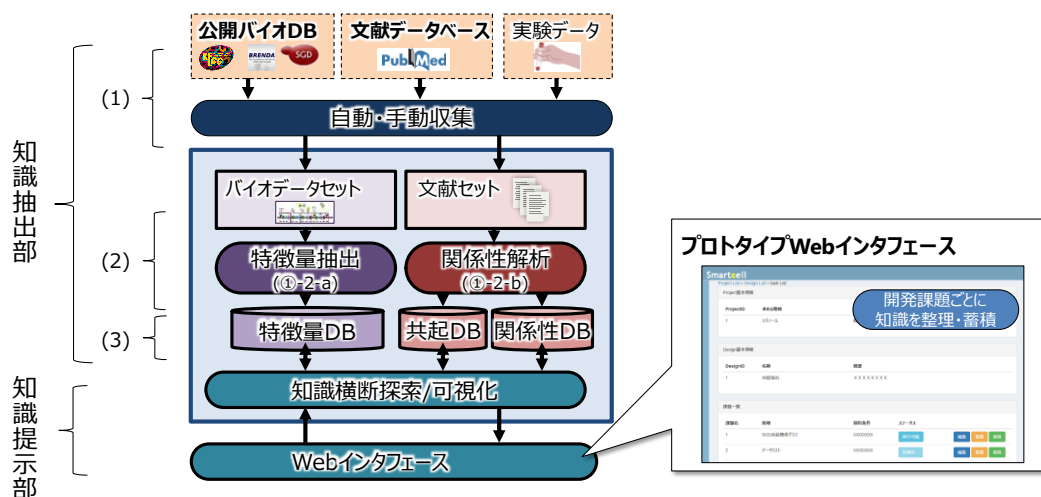


図-2.3.2.10-1 構築した知識ベース基盤プロトタイプの基本処理構造

①-2-a. 文献・公開データからのオミクス数理特徴量抽出技術の開発（担当機関：日立製作所）

人の知見によらない新規代謝・合成経路設計の実現を目指し、平成 29 年度は、低分子化合物および酵素反応予測を対象に数理特徴量抽出技術の方法論を確立した。

①-2-b. 文献横断オミクスデータ解読支援技術の開発（担当機関：京都大学、日立製作所、大阪大学（協力））

文献・DB に散在した物質生産に資するオミクスデータ因果関係の解読と整理を目的に、平成 29 年度は、公開文献を収集し、物質生産関連のオミクス情報の共起関係を抽出し可視化するワークフローを構築した。また、Saccharomyces Genome Database (SGD) に公開される情報を起点に文献情報を収集し、フローの検証を行った。

②-1-a. 知識ベースを利用した最適な代謝設計の提案技術の開発（担当機関：理化学研究所（再委託）、神戸大学、日立製作所、京都大学）

平成 29 年度から 30 年度にかけて、目的化合物と遺伝子改変候補の相関を推定する遺伝子改変情報推定モデルを設計し、妥当性の検証を完了した。また、設計代謝経路を入力として、推定モデルを用いて遺伝子改変候補を提案する知識ベースの概念設計、およびワークフローの構築を完了した。

また、本推定モデルを用いて遺伝子改変候補を提案する知識ベースの概念設計を行い、インタフェースを設計した（図-2.3.2.10-6）。本インタフェースは、導入・削除といった遺伝子改変候補の提案と共に、その提案の根拠となった文献を提示する。同時に、実験結果等の開発者のフィードバックを入力できるようにしたことで、遺伝子改変に関する知見の収集を行い、知識としての蓄積と、推定モデルの改良に活用する。これらの設計に基づき、知識ベース基盤プロトタイプへ統合作業を先行着手し、知識ベースとして運用する枠組みを概念設計に取り組んでいる。また、有用大腸菌構築方法の確立に向けた知識抽出方法およびデータベース化のモデルケースに加えて、対象宿主ならびに代謝パスウェイの知識拡張を行う。

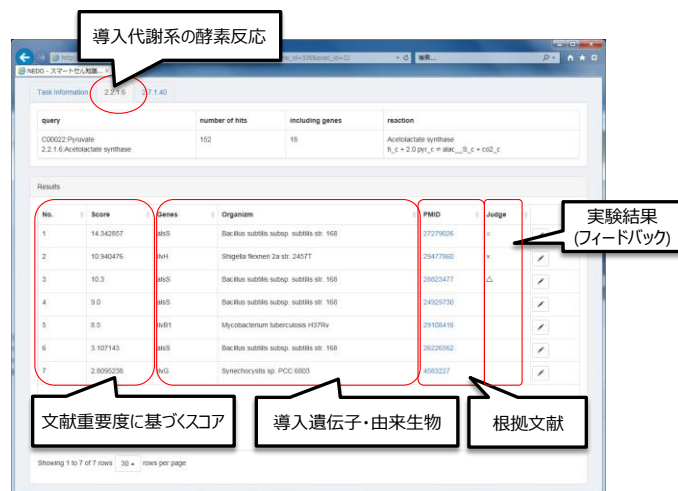


図-2.3.2.10-6 設計した代謝設計提案知識ベースインタフェース

②-1-b. 菌株設計に資する遺伝子-表現型関係情報取得技術の開発（担当機関：神戸大学、日立製作所、京都大学）

平成 29 年度から平成 30 年度にかけて、微生物によるカロテノイド、アルカロイド生産に関する文献の調査・収集を完了した。収集した論文をもとに、オミクスデータの共起関係を抽出し、ネットワーク情報として可視化するインタフェースを設計した（図-2.3.2.10-7）。

本項目は、基盤技術として開発する項目①-2-b の直接的な実用展開例として、プロジェクトのニーズに応じた、表現型などスマートセル開発に特化した共起・関係性の解析インタフェース

の拡張に取り組んでいる。並行してサブテーマ展開を通じて知識ベースとして運用する枠組みの構築を進める。



図-2.3.2.10-7 設計した共起関係可視化インターフェース

②-1-c. シアノバクテリアによる物質生産に関する代謝および生産条件に関する知識ベースの構築（担当機関：九州大学、日立製作所、京都大学）

平成 29 年度は、PubMed central を中心とした文献データベースから、遺伝子組換えシアノバクテリアを用いた物質生産に関する論文 100 報弱を選別し、導入した遺伝子、培養条件などを含む、物質生産に重要な項目のデータを抽出した。抽出した重要項目に基づいて、データを格納、整理する物質生産情報データベースを設計した。また、選別した文献情報から一つの文献を選び、その文献情報に基づいて、物質生産するシアノバクテリアを構築し、生産実験を行った。

②-2. アミノ酸配列情報から酵素活性を推定する知識ベースの有効性検証（担当機関：九州大学、日立製作所、京都大学）

平成 29 年度から平成 30 年度にかけては、文献データを整理するデータベースの設計と、塩基配列情報を解析する基本的な予測モデル設計の検討を行った。

②-3. 長鎖 DNA のデザインを対象とした論文データの知識ベース化有効性検証（担当機関：神戸大学、日立製作所、京都大学）

平成 29 年度から平成 30 年度にかけて、長鎖 DNA の設計を自動化する目的で、文献・公開データベースから DNA 配列情報を収集し、支援情報として提示するワークフローを設計した。設計したワークフローの一部を自動化し、フローの妥当性を検証した。また、自動抽出した知識を基とした長鎖 DNA デザイン設計支援知識提示手法および知識ベース概念設計を完了した。

また、構築した知識ベースより長鎖 DNA 構築可能性の判断を支援する、クエリと結果の可視化インターフェースを設計した。同インターフェースの表示画面を図-2.3.2.10-11 に示す。具体的には、設計したい代謝経路関連遺伝子のアミノ酸配列をクエリとして入力し、出力として長鎖 DNA を構成する塩基配列を FASTA 形式で提示するものである。各クエリおよび長鎖 DNA デザインの提示結果を事例として蓄積し、異なる代謝経路の導入時などに設計知識として再利用できる形

とした。今後は、知識抽出において項目①-2-a, b 技術の応用や推定ツール技術を検討し、一連のフローの完全自動化を目指すと同時に、長鎖 DNA デザイン設計支援知識提示手法の確立をめざす。

遺伝子配列設計情報収集ツール

Enter FASTA sequence(s)
 MRIGHGFDVHAFGEGPIIIGGVRIPEKGLLAHSDGDVALHALTDALLGAAALDGIKLPDTP
 AFKGDLSRELLREAWRRRQAKGYTLGNVDVTEIAQAKMLPHIQMRVFAEDLGCHMDVDVNVK
 ATTEKLGFTGRGEACEAVALLIKATK

Or, upload file

Select Database **Nucleotide collection (nr/nt)**
 Patent sequences(pat)

Expect threshold 0.01

Sequence length 200

Result (1 count)

#	name	promoter seq	seq(5'-3')	terminator seq	pair
1	Query_1	tctaaATGAAGgcgacta.....	TGAGAAATTGGTCACGGCTC.....	TTGAGTTTGATAATCTCACT.....	<input type="button" value="🔍"/>

```
>Query_1
tctaaATGAAGgcgactattaccGACGAAGCctcgCgcgtGTAGAAATTGGTCACGGCTTCGATGTTTCATGCGTTTGGAGGTGAAGGTCGATAATAATAGGA
GGAGTAAAGAAATTGCGTACGAGAAAGCTCTGTTGGCTCACTCTGATGGCGATGTGGTTTACATCGCGTAAACAGATGCTCTTTTGGGTGGCCGACGCT
TGGGGACATCGGAACTTTTTCAGATACAGAAACGAGGATTAAGGGAGGTGATAGGAGAAATTGTTACGTGAAGCATGGCGTGTATTACAAAG
DAAAAGTTTACAGTTTADGTAACGTAGATGTGACAATTATTGGTCAGGCTCCAAAGATGTTGGCCGATATTCCGAGATGGGTGTCTTTATTGGCGA
GGACTTGGTTGTACATGGATGACGTAACGTTGAAGGOTACGACCACTGAAAAATGGGCTTACAGGAAAGGGGTGAGGGTATCGCTTGTGAAGC
AGTGGCTTGTGATCAAGGCAACGAAATTAATTGAGTTTGATAATCTCACTACCTCCAGGTAAACCGCAAGGCGACCGGCTGTGAAAGCAAT
OCCGAAAGCTTTGTGGTGGTGAAGATTGGGCTTGAAGCCTGATGGTGAAGGTGAGCATATTCTGTTAGAACTCTCAAAAACGGGTGCAATAACC
GTTTTGTGGCGGATGCACGGCGAAATTCGTGAAA
```

図-2. 3. 2. 10-11 設計した長鎖 DNA デザイン知識ベースの配列提示インターフェース

②-4. 知識ベースを利用した化合物産生可能性判定の検証（担当機関：日立製作所）

平成 29 年度から 30 年度にかけて、オミクス数理特徴量（項目①-2-a）を利用した化合物賛成可能性判定のワークフロー構築を完了した。

(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	
2016							
2017	0	0	3	2	0	0	0
2018 *1	0 (0)	0 (0)	0 (3)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	5	0	9	4	0	0	0

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

知財戦略に関しては、データ処理・AI基盤技術などの情報基盤的技術は権限性が乏しく、特許網の構築困難なため、オープンクローズ戦略の使い分けで競争優位性を維持する方針としている。具体的には、各種データ処理・AI基盤技術・ツール・データベースに関しては、論文投稿・学会発表で技術優位性アピール、知識ベース基盤やそのユーザインターフェイスの開発に関しては詳細を秘匿化し、ノウハウとして各機関に蓄積する。

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016			
2017	0	0	0
2018 *1	0 (1)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	3	1	0

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.2.12 排出ボトルネック解消に向けた化合物排出輸送体探索プラットフォームの構築

担当機関：東北大学、産業技術総合研究所

(1) 背景と目的

微生物を利用した物質生産において、細胞内の代謝系の改変が広く行われている。しかしながら、膜透過性の低い化合物や新規の化合物の生産においては、細胞内代謝の強化により生産物が細胞内に蓄積し、負のフィードバックにより生産反応を阻害する。そこで、本研究では生産物を細胞外に排出する輸送体の機能を強化することにより細胞内の生産反応の効率化をめざす。膜輸送体は通常可溶性酵素と比較して研究の推進が困難であるため、現在までのところ膜輸送体の機能について、信頼できるデータベースは存在していない。そこで、本研究では、目的化合物の生産を効率化するための排出輸送体の探索技術の開発を実施する。

(2) 位置づけ、目標値

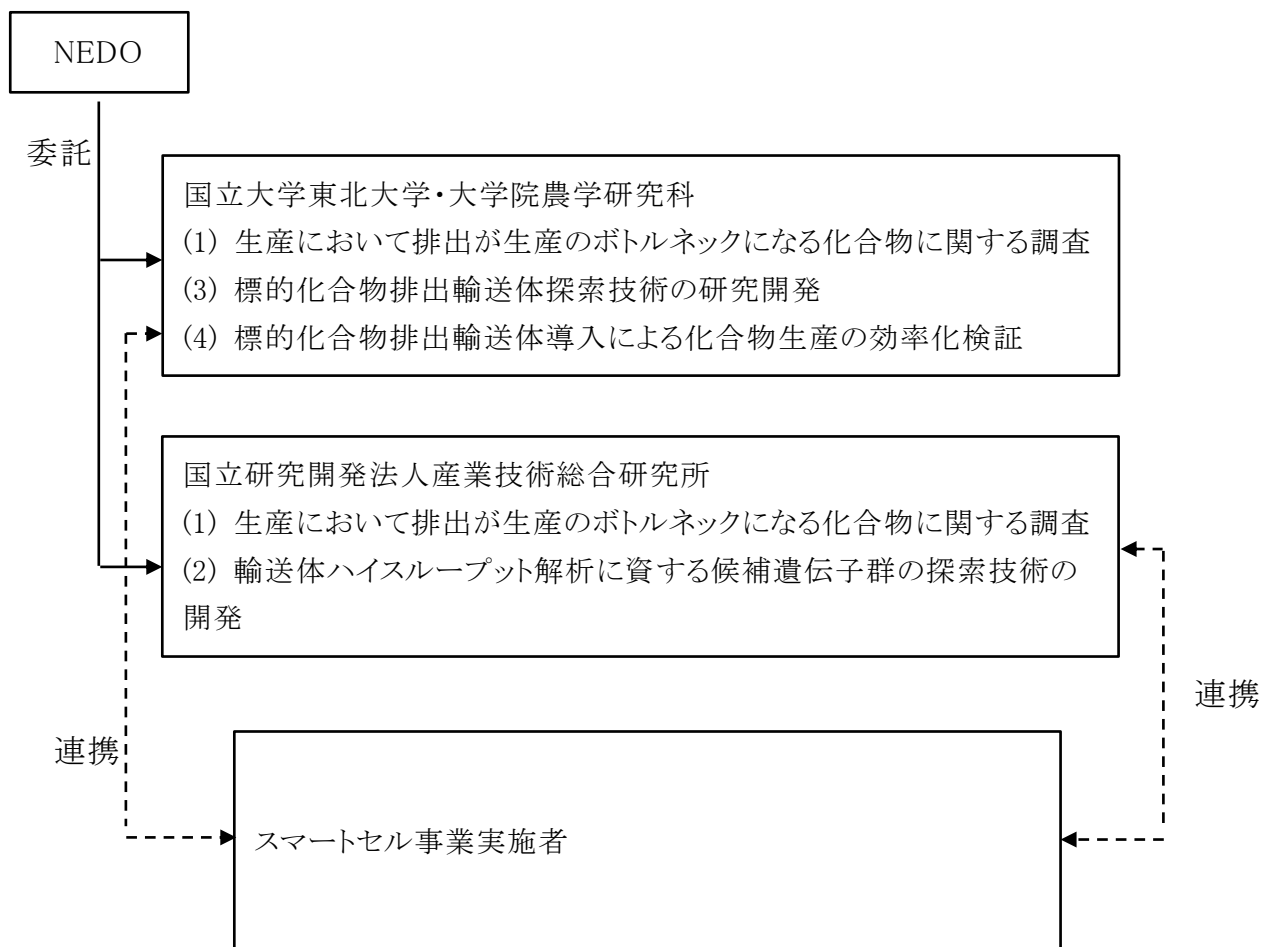
研究開発項目	位置づけ	目標値（2018年度末）
① 生産において排出が生産のボトルネックになる化合物に関する調査（東北大・産総研）	化合物の生産において、排出がボトルネックとなっている化合物の調査を実施する。	排出がボトルネックとなっている化合物（3化合物以上）を選定する。
② 輸送体ハイスループット解析に資する候補遺伝子群の探索技術の開発（産総研）		
輸送体ハイスループット解析に資する候補遺伝子群の探索技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> 目的化合物産生微生物群のゲノム情報からの化合物輸送体候補遺伝子群リストの作成 公開されている微生物ゲノム情報からの網羅的輸送体候補遺伝子群リストの作成 輸送体候補遺伝子群探索技術のツール化 	
オミクスデータからの輸送体候補遺伝子のスコアリング技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> 遺伝子発現データを用いた有用化合物排出輸送体候補遺伝子群のスコアリング技術の開発 質量分析データからの化合物特性と輸送体遺伝子の配列特徴量の検出技術の開発 	
③ 標的化合物排出輸送体探索技術の研究開発（東北大）		
標的化合物排出輸送体候補遺伝子発現微生物ライブラリの構築	標的化合物（3化合物）の排出に関与すると推定される輸送体遺伝子のライブラリを構	各標的化合物につき10遺伝子以上

	築する。	
輸送体発現ライブラリへの標的化合物代謝系の導入	標的化合物生産遺伝子（群）を PCR により増幅し、輸送体探索に使用する宿主で発現が可能なプラスミドベクター等にクローニングし、生合成系遺伝子の導入を実施する。	各標的化合物につき 1 遺伝子以上
標的化合物排出輸送体の同定	質量分析装置等を用いて標的化合物排出輸送体候補から有効な標的化合物排出輸送体を選抜する。	各標的化合物につき 1 遺伝子以上
④ 標的化合物排出輸送体導入による化合物生産の効率化検証（東北大）	③において、同定した標的化合物排出輸送体を用いて、生産実証試験を実施する。	各標的化合物につき 1 遺伝子以上、輸送体非導入株に対して、1.3-3 倍の増産

(3) 全体計画

事業項目	29年度		30年度			
	第3 四半期	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期
(1) 生産において排出が生産のボトルネックになる化合物に関する調査	←→					
(2) 輸送体ハイスクループット解析に資する候補遺伝子群の探索技術の開発						
(2)-1. ゲノム情報からの輸送体候補遺伝子群リストの作成と既知情報の整理		←→				
(2)-2. オミクスデータからの輸送体候補遺伝子のスコアリング技術の開発		←→		←→		
(3) 標的化合物排出輸送体探索技術の研究開発						
(3)-1. 標的化合物排出輸送体候補遺伝子発現微生物ライブラリの構築	← 化合物 (1) →	← 化合物 (2) →	← 化合物 (3) →			
(3)-2. 輸送体発現ライブラリへの標的化合物代謝系の導入	← 化合物 (1) →	← 化合物 (2) →	← 化合物 (3) →			
(3)-3. 培養液分析による標的化合物排出輸送体の同定				← 化合物 (1) →	← 化合物 (2) →	← 化合物 (3) →
(4) 標的化合物排出輸送体導入による化合物生産の効率化検証					← 化合物 (1) - (3) →	

(4) 実施体制



(5) 運営管理

研究グループ（東北大）において月1回の研究進捗会議を実施、研究グループ間（東北大-産総研）では、適宜、スカイプ等での会議を実施し、連携を図っている。半年に一度、全体会議を実施し、進捗及び方向性について重点的に議論している。

(6) 実施の効果

連携している企業において売上等の効果がある。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
① 生産において排出が生産のボトルネックになる化合物に関する調査	3件程度の候補を選定	東北大独自化合物として3件、連携しているプロジェクト参加者との連携化合	◎ (目標とする件数を超えたため、大幅達成と評価)	引き続き排出がボトルネックとなる化合物に関する調査を実施し、本開発技術

(東北大・産総研)		物として2件、計5件の化合物を選定した。		の波及効果拡大に努める。
② 輸送体ハイスループット解析に資する候補遺伝子群の探索技術の開発 (産総研)				
輸送体ハイスループット解析に資する候補遺伝子群の探索技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> 目的化合物産生微生物群のゲノム情報からの化合物輸送体候補遺伝子群リストの作成 公開されている微生物ゲノム情報からの網羅的輸送体候補遺伝子群リストの作成 輸送体候補遺伝子群探索技術のツール化 	<ul style="list-style-type: none"> <i>A. oryzae</i> 情報および遺伝子発現情報から輸送体候補遺伝子群リストを作成した 公開されている微生物ゲノム情報からの網羅的輸送体候補遺伝子群を抽出する手法を開発。 	○ (2019年2月完成予定)	今後の課題としては、本情報を多種の宿主微生物群について整備する必要がある。解決方針としては、ゲノム情報や公的データベースで物質生産の遺伝子発現データが存在する宿主については、これまでに開発した手法を適用することが可能であると考えている。
オミクスデータからの輸送体候補遺伝子のスコアリング技術の開発	<ul style="list-style-type: none"> 遺伝子発現データを用いた有用化合物排出輸送体候補遺伝子群のスコアリング技術の開発 質量分析データからの化合物特性と輸送体遺伝子の配列特徴量の検出技術の開発 	<ul style="list-style-type: none"> 遺伝子発現データから有用化合物排出輸送体候補遺伝子群のスコアリングを実施した。 質量分析データからの化合物特性と輸送体遺伝子の配列特徴量の検出技術を開発中 	○ (2019年2月完成予定)	今後の課題として、現在開発中の質量分析データからの化合物特性と輸送体遺伝子の配列特徴量の検出技術の検証が必要である。解決法としては、実験を担当する東北大に何度か提案を実施し、その実験結果をフィードバックすることで、手法の高精度化を実現する。

③ 標的化合物排出輸送体探索技術の研究開発（東北大）				
標的化合物排出輸送体候補遺伝子発現微生物ライブラリの構築	標的化合物（3化合物）の排出に関与すると推定される輸送体遺伝子のライブラリを構築する。（2018年6月までの目標：2標的化合物）	5つの標的化合物の内、3化合物についてはライブラリの構築を終了した。	◎ （2019年2月完成予定）	目標とした2標的化合物を超える3化合物に関してライブラリの構築を終えた。残りの2化合物についても、ライブラリの構築を進め、探索を実施する。
輸送体発現ライブラリへの標的化合物代謝系の導入	標的化合物生産遺伝子（群）をPCRにより増幅し、輸送体探索に使用する宿主で発現が可能なプラスミドベクター等にクローニングし、生合成系遺伝子の導入を実施する。（2018年6月までの目標：1標的化合物）	5つの標的化合物の内、1化合物については生合成系遺伝子の導入を終了した。	○ （2019年2月完成予定）	残りの標的化合物についても、生合成系遺伝子のクローニングと遺伝子導入を進める。
標的化合物排出輸送体の同定	質量分析装置等を用いて標的化合物排出輸送体候補から有効な標的化合物排出輸送体を選抜する。（2018年6月以降実施の予定）	1化合物について、輸送体の探索を実施し、新規排出輸送体の同定に成功した。	◎ （2019年2月完成予定）	ライブラリの構築が終了した化合物から、排出輸送体の探索を実施する。
④ 標的化合物排出輸送体導入による化合物生産の効率化検証	③において、同定した標的化合物排出輸送体を用いて、生産実	2018年10月以降、実施の予定	— （2019年2月完成予定）	

(東北大)	証試験を実施する。			
-------	-----------	--	--	--

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2018年度末)	達成見通し
① 生産において排出が生産のボトルネックになる化合物に関する調査(東北大・産総研)	化合物の生産において、排出がボトルネックとなっている化合物の調査を実施した。東北大独自の標的化合物として、3化合物、連携しているプロジェクト参加者との連携化合物2化合物を選定した。	排出がボトルネックとなっている化合物(3化合物以上)を選定する。	達成済み
② 輸送体ハイスループット解析に資する候補遺伝子群の探索技術の開発(産総研)			
輸送体ハイスループット解析に資する候補遺伝子群の探索技術の開発	ゲノム情報と文献情報を組み合わせ、輸送体候補遺伝子群リストを作成する技術は開発済。		達成可能
オミクスデータからの輸送体候補遺伝子のスコアリング技術の開発	・遺伝子発現データを用いた有用化合物排出輸送体候補遺伝子群のスコアリング技術は開発済。		達成可能
③ 標的化合物排出輸送体探索技術の研究開発(東北大)			
標的化合物排出輸送体候補遺伝子発現微生物ライブラリの構築	5つの標的化合物の内、3化合物についてはライブラリの構築を終了した。	3つ以上の標的化合物について、排出輸送体ライブラリを構築する。	達成済み
輸送体発現ライブラリへの標的化合物代謝系の導入	1つの標的化合物について、生合成系遺伝子のクローニングと遺伝子導入に成功した。	3つ以上の標的化合物について、生合成系遺伝子の導入を実施する。	達成可能
標的化合物排出輸送	1つの標的化合物に	3つ以上の標的化合	達成可能

体の同定	ついて探索を実施し、新規排出輸送体の同定に成功した。	物について、排出輸送体の探索を実施する。	
④ 標的化合物排出輸送体導入による化合物生産の効率化検証（東北大）	③において、同定した標的化合物排出輸送体をモデル微生物に導入し、生産実証試験を実施する。	2018年10月以降、新規輸送体の探索を終了した化合物から、順次生産試験を実施の予定	達成可能

(9) 研究開発の成果と意義

(9).1 生産において排出が生産のボトルネックになる化合物に関する調査

微生物を用いた化合物生産において、細胞内代謝系の強化や改変を施しても生産を効率化できない化合物がある。そのような化合物は、生産菌の菌体内からの生産化合物の排出が律速となっている可能性があり、本研究の標的化合物となりえる。本研究開発では、プロジェクト参画者を含め、企業が生産技術の開発を進めている化合物の中から、化合物の排出がボトルネックとなり生産の効率化が達成されていない化合物を探索し、本技術開発でモデルとして輸送体の探索と有効性の検証を行うための標的化合物の調査を実施した。

(9).1-1 アラニン

化合物生産における排出輸送体の有効性検証を目的として、これまでに細胞内代謝に関する研究がある程度進んでおり、排出輸送体に関する知見もある L-アラニンを標的化合物とした。L-アラニンは、タンパク質を構成するアミノ酸（20種）の一つで、甘味を有するアミノ酸である。L-アラニンは、生体内で糖新生や脂肪酸合成などに利用される重要なアミノ酸である。飼料用添加物、食品添加物、低栄養状態などにおけるアミノ酸補給等を目的として、ヒト用医薬品として用いられている。本研究開発においては、輸送体ライブラリ発現大腸菌に対して L-Ala-L-Ala ジペプチドをもちいたペプチドフィーディング法による新規の排出輸送体の探索を実施することとした。

(9).1-2 コウジ酸

コウジ酸は、チロシナーゼの活性化に必要な銅イオンをキレートすることでその活性を阻害し、メラニンの生成を抑制することから、化粧品の成分などに利用されている麹菌が生産する有用二次代謝化合物である。コウジ酸生合成に関しては、すでにコウジ酸の生合成に関わる酸化還元酵素 KojA, 生産されたコウジ酸の細胞外排出に関わると予想される輸送体 KojT とそれらの遺伝子の発現制御を司る転写因子 KojR の 3 遺伝子がクラスターを構成していることが明らかとなっている。KojA 高発現に加えて輸送体 KojT を高発現した株を作製したところ、KojA 単独高発現株に比べてコウジ酸生産量の顕著な増加を認めた一方で、KojT 破壊株でも量は少ないもののコウジ酸は細胞外に生産されており、他にもコウジ酸を排出できる輸送体の存在が示唆されている (Zhang et al. 2017 JBB)。そこで、麹菌ゲノム情報等からコウジ酸の排出能を有する新規輸送体を探索し、コウジ酸排出をし得る新規輸送体の探索を実施することとした。

(9).2. 輸送体ハイスループット解析に資する候補遺伝子群の探索技術の開発

(9).2.1. 目的化合物産生微生物群のゲノム情報からの化合物輸送体候補遺伝子群リストの作成

目的化合物産生微生物のゲノム情報から膜輸送体に関連する遺伝子群の抽出をおこなった。麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム情報から GO による機能アノテーションを実施し、目的化合物であるコウジ酸の輸送に関わる可能性がある輸送体関連遺伝子群の抽出を行った。さらに、推定された遺伝子群のそれぞれについて、KEGG, ChEBI, TransportDB および TCDB などの文献情報やデータベース情報を用いて化合物に関連する情報を収集し、推定した輸送体候補遺伝子群の付加情報として蓄積、整備をおこない、候補遺伝子群のリストを作成した。

(9).2.2. オミクスデータからの輸送体候補遺伝子のスコアリング技術の開発

産生微生物の遺伝子発データをもとに、ターゲット化合物生合成関連遺伝子群の発現プロファイルや、関連すると考えられる各種細胞内応答と相関が高い遺伝子発現プロファイルを有する輸送体候補遺伝子群の同定を行った。具体的には、麹菌 *A. oryzae* で測定された 150 条件以上の遺伝子発現データを利用し、遺伝子配列情報から輸送体候補と推定された候補遺伝子群と、ターゲット化合物であるコウジ酸生合成遺伝子群の多対多の全組み合わせにて相関解析を実施した。ここで、コウジ酸生合成遺伝子群と有意に相関が高いと判断された遺伝子群について、上記で付加された文献情報棟を元に、輸送体候補遺伝子群のリストについて、順位付けを実施した。

(9).3 標的化合物排出輸送体探索技術の研究開発

(9).3.1 標的化合物排出輸送体候補遺伝子発現微生物ライブラリの構築

(9).3.1-1 アラニン

アラニン排出輸送体の探索には、東北大学が保有する新規排出輸送体ライブラリに、さらに新規排出輸送体を追加した排出輸送体ライブラリを構築し探索に用いた。新規の排出輸送体候補遺伝子を大腸菌発現用ベクターにクローニングし、L-Ala-L-Ala 感受性大腸菌を形質転換し、排出輸送体候補遺伝子発現微生物ライブラリを構築した。

(9).3.1-2 コウジ酸

産総研油谷グループにおいて、コウジ酸排出輸送体候補として抽出された 10 遺伝子を麹菌ゲノムをテンプレートとした PCR により増幅した。増幅断片を麹菌用高発現プロモーター (*amyB* プロモーター) 下流にクローニングした。探索で用いる麹菌株 (*kojA* を過剰発現する *kojT* 遺伝子破壊株) の形質転換を実施している。

(9).3.2 輸送体発現ライブラリへの標的化合物代謝系の導入

(9).3.2-1 アラニン

ピルビン酸の還元的アミノ化反応を行う Ala 脱水素酵素遺伝子をクローニングしたプラスミドを大腸菌 Ala 排出輸送体欠損株を形質転換し宿主として用いた。

(9).3.2-2 コウジ酸

麹菌におけるコウジ酸の生成には、少なくともコウジ酸の生合成に関わる酸化還元酵素 KojA、生産されたコウジ酸の細胞外排出に関わると予想される輸送体 KojT とそれらの遺伝子の発現制御を司る転写因子 KojR をコードする 3 遺伝子が必要であることが明らかとなっている (Terabayashi, 2010)。Zhang らの研究により、コウジ酸の排出には KojT 以外の輸送体の関与が示唆されており (Zhang, 2017)、酵母発現系を利用したコウジ酸排出輸送体の迅速な探索系の構築を試みた。KojA-3HA および KojT-GFP をコードする遺伝子を酵母高発現プロモーターであるグリセルアルデヒド-3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) プロモーター下流に連結したプラスミドを構築した。これらプラスミドを導入した酵母において、ウェスタンブロット法にて、KojA-3HA タンパク質および KojT-GFP タンパク質の発現を確認した。さらに、蛍光顕微鏡観察により、KojT-GFP タンパク質は原形質膜上に局在することを明らかにした。この株を培養した後、10%グルコース溶液に懸濁し、コウジ酸の生成を試みた。しかし、コウジ酸による鉄イオンのキレートで生じる暗赤色の呈色は見られなかった。従って、グルコースからのコウジ酸生成に必要な KojA 以外の酵素が存在する可能性が考えられた。そこで、現時点では異種宿主を用いたコウジ酸排出輸送体の探索は困難であると考えられたため、コウジ酸生産能が確実に発現する麹菌を宿主としてコウジ酸排出輸送体の探索を行うこととした。酵母宿主系に比較して探索速度は落ちるという欠点はあるが、コウジ酸高生産株の構築にスムーズに移行できる利点がある。

(9). 3. 3 培養液分析による標的化合物排出輸送体の同定

(9). 3. 3-1 アラニン

本研究開発において、L-アラニンの排出輸送体の探索は、L-アラニンの細胞内代謝系をすべて欠損し、同定されている排出輸送体を欠損した大腸菌を宿主として、L-Ala-L-Ala ジペプチドを用いたペプチドフィーディング法により実施した。本株はジペプチド Ala-Ala 存在下で生育が阻害される。これは、取込んだ Ala-Ala 由来の L-アラニンを菌体外に排出できず、細胞内で過剰蓄積するためである。この株を用いて、排出輸送体ライブラリから Ala 排出能を有する輸送体候補遺伝子を探索した結果、複数の候補遺伝子が同定された。

(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	
2017	0	0	0	0	0	0	0
2018 *1	0 (1)	1 (1)	0 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

*1 : 2018 年 6 月時点での実施済み件数、() 内は 2018 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	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2017	0	0	0
2018 *1	0 (1)	0 (0)	0 (0)

*1 : 2018 年 6 月時点での出願済み件数、()内は 2018 年度末の予定件数

2.3.3 新規情報解析システムの有効性検証

2.3.3.1 コレステロールエステラーゼの生産性向上による有効性検証（担当機関：産業技術総合研究所、旭化成ファーマ株式会社）

(1) 背景と目的

旭化成ファーマ株式会社ではグラム陰性桿菌 *Burkholderia stabilis* (図 1) を培養し、培養液からエステル型コレステロールをコレステロールと脂肪酸に加水分解する酵素、コレステロールエステラーゼ (CEN) を抽出精製し販売している。

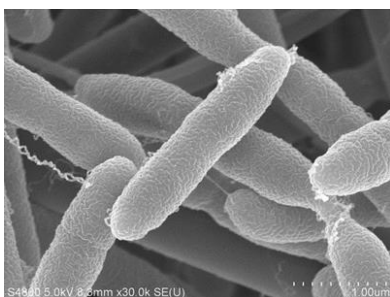


図 1. *Burkholderia stabilis* の電子顕微鏡写真

この CEN の製造には 2 つの課題がある；

i) 複雑な発現制御と分泌機構：

i-1) オイルを使用する発現誘導：CEN は *B. stabilis* の培養液にオイルを添加することで発現・分泌が誘導されるタンパク質である。水溶性が低いオイルを含む培養液は乳化により白濁しており(図 2)、そのままではカラムクロマトグラフィーを用いた精製等に適さないため、CEN の製造は極めて困難である。



図 2. オイルを含む誘導培地による CEN 生産

i-2) CEN 分泌機構：CEN の組換え体生産は、以下に示すように発現・分泌機構が複雑であるために、困難である。まず不活性体として細胞内に発現した CEN は分泌シグナルによりペリプラズムに輸送される。不活性体 CEN は、内膜を通過するときに分泌シグナルが切断され、内膜を貫通している foldase の作用によりペリプラズムで活性化し、*xcp* マシナリーで細胞外へ分泌されることが考えられている(図 3)。

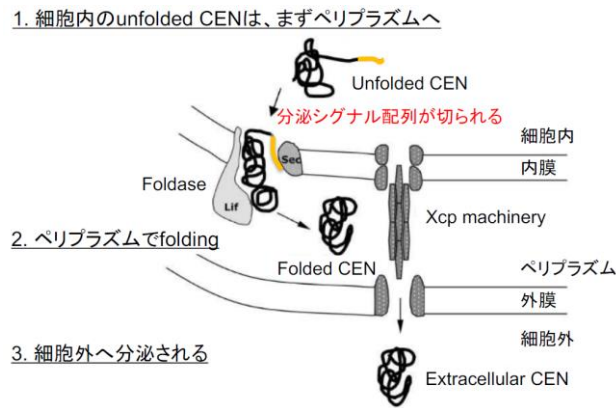


図3. CENの活性発現機構 (Rosenau et al. 2004 chembiochem)

ii) 育種の限界: 上記の理由により、旭化成ファーマ株式会社では生産性を改善するために、*B. stabilis*の育種と選抜を繰り返してきた。*B. stabilis*野生株のCEN生産性は約7 U/mLである。しかし、育種と選抜を7回繰り返した結果CEN活性は約17 U/mLまで上昇したものの、生産性の向上はほぼ限界に達していると考えられる(図4)。

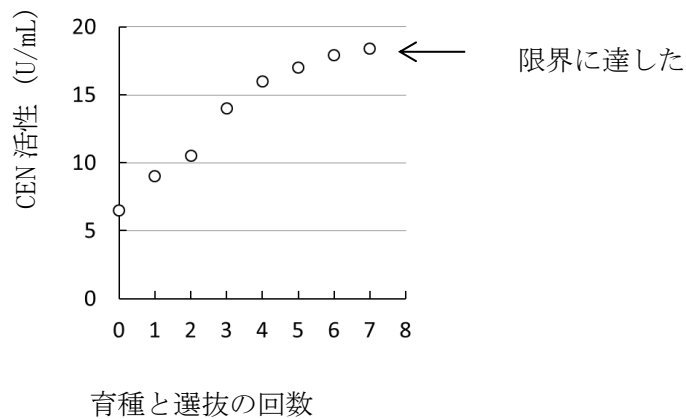


図3. 育種と選抜の回数とCEN活性の関係

そこで我々は精製が容易な培養条件(例えばオイルを必要としない条件)でCENを高発現する細胞株を開発することを本有効性検証の目的とした。

(2) 位置づけ、目標値

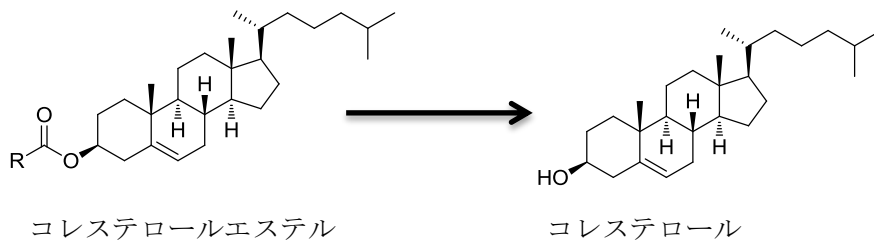


図4. コレステロールエステラーゼ (CEN)の作用

図4にコレステロールエステラーゼ (CEN)の作用を示した。CENは、血清または血漿中のコレステロールを測定するためのポイントオブケアテストティング(POCT)試薬の原料の一つである。2016年の米

国コレステロール POCT 市場は\$ 145,000,000 であり、2009 年から 2019 年迄の growth rate は 6.9～7.6%と報告されている (FROST & SULLIVAN 2013 年調べ)。そして、POCT 市場のうち原料である CEN が占める割合は 0.5～1%と推定している。

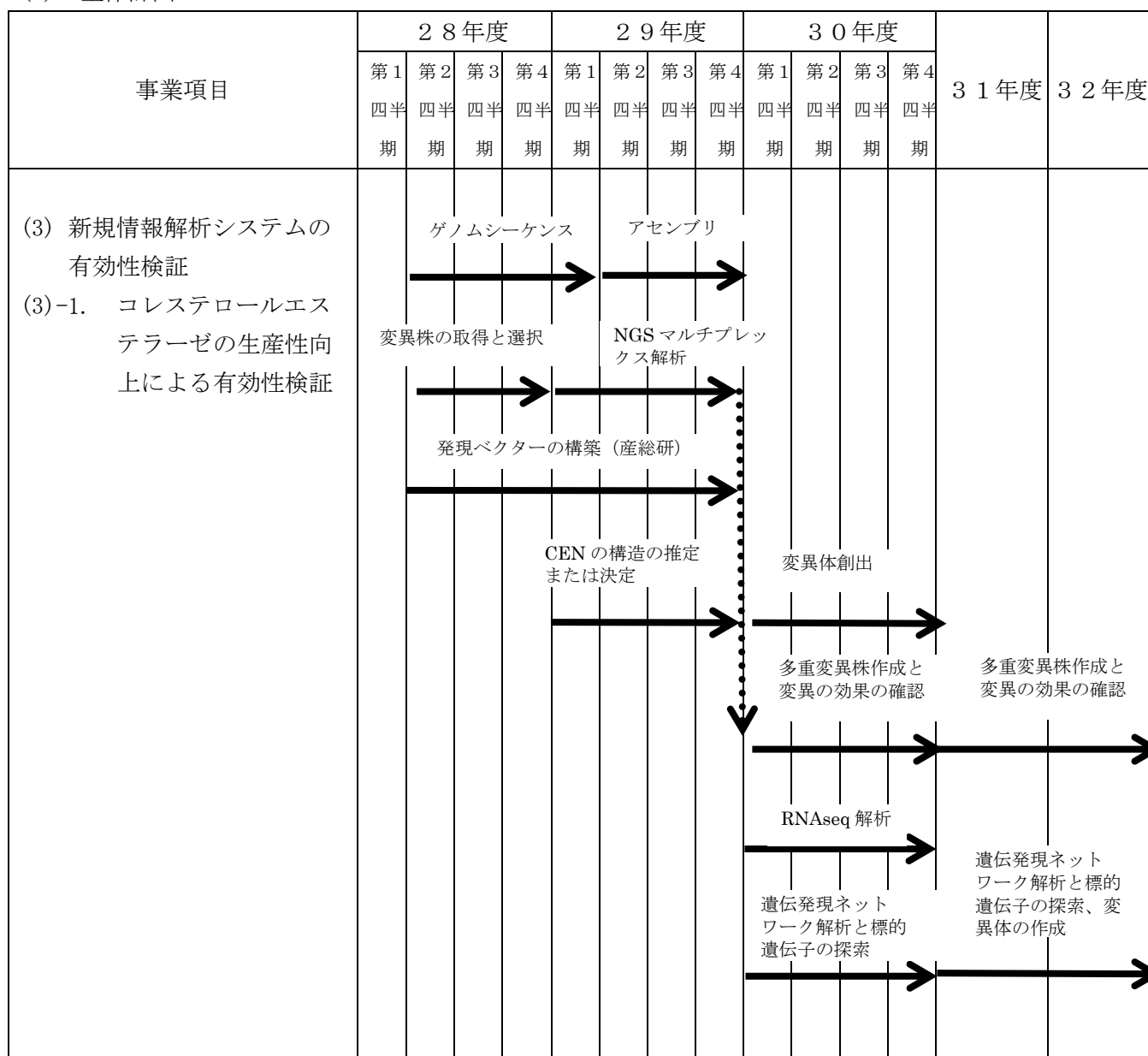
中間目標値 (H30)

- 高活性型 CEN 変異体作成
- CEN 発現に寄与する遺伝子や配列領域を多重導入した *B. stabilis* 変異株の作成
- 遺伝子ネットワークを構築し、CEN 発現に寄与する標的遺伝子を見出す

最終目標値 (H32)

CEN の誘導又は恒性発現、分泌発現、及び活性化に関わるシステムが最適化できる条件を明らかにし、培養力価が 35 U/mL 以上 (350 mg/L 以上) の CEN 生産株 (スマートセル) を得る。

(3) 全体計画



(平成 28 年度目標)

- *B. stabilis* 野生株のゲノムシーケンス
- *B. stabilis* 変異株の取得と選択 (目標値 : 約 50 株)
- 発現ベクターの構築

(平成 28 年度実施内容)

- *B. stabilis* 野生株のゲノムシーケンス
ゲノム解析を開始し、NGS より得られたリードを解析しアセンブリする (産総研、旭化成ファーマ)。
- *B. stabilis* 変異株の取得と選択 (目標値 : 約 50 株)
変異株は、*B. stabilis* 野生株を親株として、Survival rate 0.001%以下の突然変異導入によって得る (目標値 3000 株)。1 回の変異処理により得られた培地中の CEN 活性が低下、未変化、もしくは向上した *B. stabilis* 変異株の中から約 50 株を選択し (旭化成ファーマ)、ゲノム精製の後 NGS でマルチプレックス解析する (産総研)。
- 発現ベクターの構築
B. stabilis を宿主とした発現系構築のため、*B. stabilis* 内で自律増殖可能なベクターの構築を開始する (産総研)。

(平成 29 年度目標)

- *B. stabilis* 野生株のゲノム解析完了
- *B. stabilis* 変異株の取得と選択 (目標値 : 約 50 株)
- 発現ベクターの構築
- 高活性型 CEN 変異体作成

(平成 29 年度実施内容)

- *B. stabilis* 野生株のゲノムシーケンス
各 ORF の同定とアノテーションを予想し、ゲノム解析を完了する (産総研、旭化成ファーマ)。
- *B. stabilis* 変異株の取得と選択 (目標値 : 約 50 株)
B. stabilis 変異株取得を継続して約 50 株選択し (旭化成ファーマ)、ゲノム精製後マルチプレックス解析する (産総研)。前項①で得られた野生株のゲノム上に約 100 変異株由来の変異点をマッピングし、CEN 発現の下方制御、無変化、あるいは上方制御する変異点を分類し、制御に関与する遺伝子や配列領域を予測する。予測部位は複数に及ぶと考えられることから、それぞれについて相同組換え技術を用いて野生株に導入し CEN の発現量を比較する (産総研、旭化成ファーマ)。
- 発現ベクターの構築
CEN 発現誘導剤添加の有無で遺伝子発現解析 (RNAseq 解析) を行い、添加剤で大きく変動するプロモーターと、添加剤非依存的に高い転写活性を示すプロモーターを同定し、3 から 4 種のプロモーターを発現ベクターへ導入し CEN 発現量を比較する (産総研)。
- 高活性型 CEN 変異体作成
CEN の構造を相同タンパク質より推定、あるいは決定し (産総研)、酵素活性の高機能化が期待できるアミノ酸残に変異を入れた変異体を創出する (旭化成ファーマ)。

(平成 30 年度目標)

- 高活性型 CEN 変異体作成

- CEN 発現に寄与する遺伝子や配列領域を多重導入した *B. stabilis* 変異株の作成
- 遺伝子ネットワークを構築し、CEN 発現に寄与する標的遺伝子を見出す

(平成 30 年度実施内容)

- 高活性型 CEN 変異体作成

引き続き、推定あるいは決定した CEN の構造から、酵素活性の高機能化が期待できるアミノ酸残を推定し（産総研）、変異体を作成する（旭化成ファーマ）。

- *B. stabilis* 変異株作成

「*B. stabilis* 変異株の取得と選択（目標値：約 50 株）」で得られたデータをもとに、CEN 発現制御に関与する遺伝子や配列領域を野生株に導入する。確認された各変異点を順次追加し多重変異株を作成し、それぞれ活性比較を行うことで導入の効果を確認する（旭化成ファーマ）。

- 遺伝子ネットワークの構築

B. stabilis 野生株に対し、培養条件を変えることで細胞内の遺伝子発現変動を誘導し、10~20 の異なる条件下で培養・回収した細胞より RNA を抽出して RNAseq 解析を行い RNA の発現データを獲得する（産総研）。それらのデータは変異株②のデータと合わせて(2)-2-1 の課題と連携して遺伝発現ネットワークの解析と CEN 発現に寄与する標的遺伝子の探索を行う（産総研、旭化成ファーマ）。

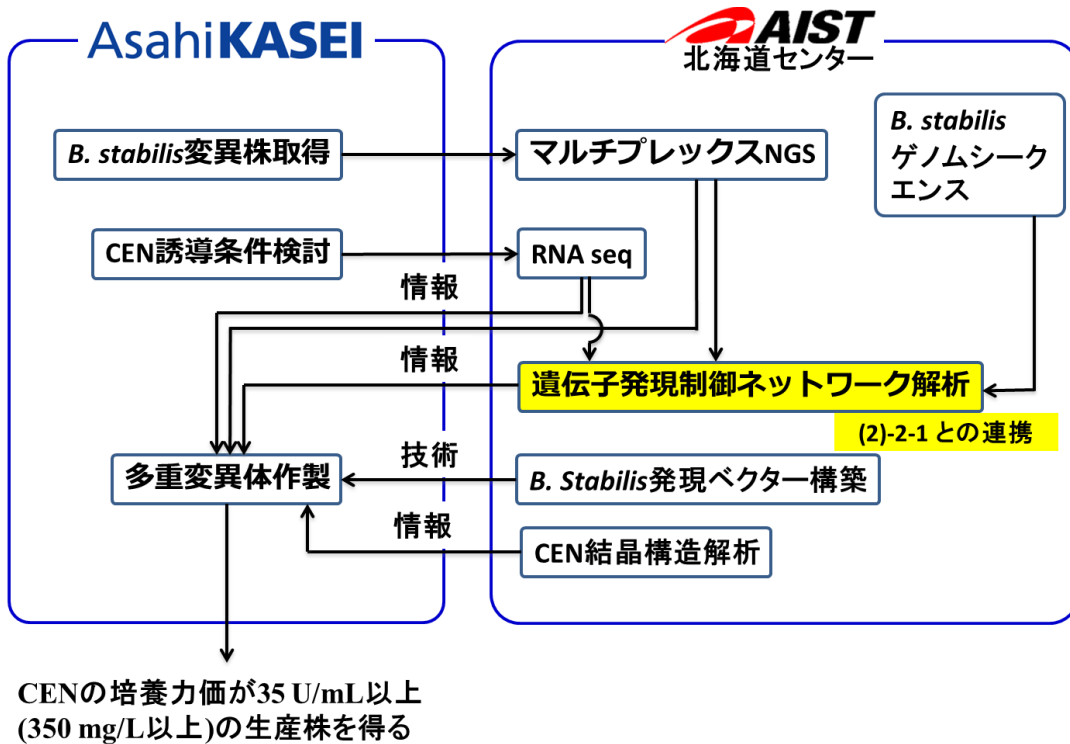
(平成 32 年度最終目標)

CEN の誘導又は恒性発現、分泌発現、及び活性化に関わるシステムが最適化できる条件を明らかにし、培養力価が 35 U/mL 以上（350 mg/L 以上）の CEN 生産株（スマートセル）を得る。

(平成 31、32 年度想定実施内容)

引き続き「*B. stabilis* 変異株の取得と選択（目標値：約 50 株）」で得られたデータをもとに、CEN 発現制御に関与する遺伝子や配列領域を順次追加し多重変異株を作成する。そして、これらの多重変異と、継続する RNAseq 解析で得た RNA の発現データ、さらに (2)-2-1 の課題と連携して遺伝発現ネットワークの解析と CEN 発現に寄与する標的遺伝子の探索を行う。また、酵素活性の高機能化が期待できるアミノ酸残基に変異を入れた変異体の作成も続行する。

(4) 実施体制



(5) 運営管理

下記実績の通り、四半期に1回以上、班会議を実施している。また、平成30年からはスカイプによる会議も実施している。

平成28年11月21日	産総研臨海副都心センター	産総研拠点会議
平成29年1月31日	NEDO	技術推進委員会
平成29年2月24日	産総研北海道センター	
平成29年3月30~31日	神戸大学	全体会議
平成29年4月25日	産総研北海道センター	
平成29年5月31日	産総研臨海副都心センター	産総研拠点会議
平成29年8月24日	産総研北海道センター	
平成29年11月21日	旭化成株式会社本社	
平成29年11月29~1日	産総研つくばセンター	全体会議
平成30年1月18日	旭化成ファーマ株式会社大仁支社	
平成30年1月30~31日	NEDO	技術推進委員会
平成30年4月5日	スカイプ会議	
平成30年5月14日	スカイプ会議	
平成30年5月29~30日	産総研北海道センター	
平成30年6月11~13日	神戸大学	全体会議

(6) 実施の効果

オイルを使用しない培地となることによる精製コスト、および生産量の向上による製造コストの削減により、利益率が上昇する。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
コレステロールエステラーゼ (CEN) の生産性向上による有効性検証	高活性型 CEN 変異体作成	CEN の高分解能 X 線結晶構造解析を行い、CEN の三次元構造を明らかにした。これにより類似構造を持つホモログ (リパーゼ) との詳細な構造比較、さらには基質である脂肪酸コレステロールエステルとのドッキングシミュレーションが可能となった。これらの結果により、CEN の高活性化に有効と考えられる変異点を明らかにした。	○ (2018年8月達成予定)	候補変異点の総変異体を取得する。野生型酵素と各変異体について比活性を測定・比較し、高活性化に向けた構造モデルの有効性を検証する。
コレステロールエステラーゼの生産性向上による有効性検証	CEN 発現に寄与する遺伝子や配列領域を多重導入した <i>Burkholderia stabilis</i> 変異株の作成	<i>B. stabilis</i> 実用株についても全ゲノム解析を行い、野生株ゲノムとの比較を行った。その結果、全 6895 遺伝子のうち、199 遺伝子に塩基変異が入っており、そのうち 128 遺伝子にアミノ酸置換があることを見出した。また、野生株に変異原を使用した変異導入を行い、約 4000 株の変異体を作製した。そのうち、野生株に対して活	○ (2020年3月達成予定)	変異株 72 株の変異点解析を行い、野生株に対して活性低下や活性上昇する原因を情報解析により絞り込む。特定の変異が抽出できれば、野生株に変異を導入後活性測定等を実施し有効性を検証する。

		<p>性の低下・上昇した株 72 株についてマルチプレックスゲノムシーケンスを実施中である。</p> <p>(2.2.1 との連携)。</p>		
<p>コレステロールエステラーゼの生産性向上による有効性検証</p>	<p>遺伝子発現ネットワークモデルを構築し、CEN 発現に寄与する標的遺伝子の探索</p>	<p>遺伝子発現プロファイルを取得するため、CEN 誘導条件として誘導化剤 5 条件における、CEN 誘導前後の 8 時点（計 40 条件）での、遺伝子発現変動を、RNAseq 解析により解析した。各条件で遺伝子総数と同等の 6875 遺伝子の発現量 (FPKM 値) が算出されるため、得られた FPKM 値のデータは 28 万データであった。このデータを用いて遺伝子発現制御ネットワークを解析し、1 ラウンド目として転写因子を標的とし、2 ラウンド目として転写因子に限定しないモデルをそれぞれ構築した。</p> <p>また、上記 28 万データを情報解析に供し比較検討することで、オイル添加を含む培養条</p>	<p>○ (2020 年 3 月達成予定)</p>	<p>得られた遺伝子発現制御ネットワークモデルから、CEN 高発現に寄与する候補遺伝子について、過剰発現株や遺伝子破壊株を作製し、CEN 生産性を比較検討し情報解析の有効性を検証する。</p>

		<p>件によって変動しない構成発現プロモーター候補を複数抽出した。得られたプロモーター候補について実証実験を行ったところ、CEN 生産に有用な構成型プロモーターであることが実証でき、特許出願を行った（特願 2018-103382）。</p> <p>(2.2.1 との連携)。</p>		
--	--	---	--	--

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
コレステロールエステラーゼの生産性向上による有効性検証	CEN の構成発現が達成できた。分泌発現、及び活性化に関わるシステムの最適化候補遺伝子が明らかになった。実用株と同等の培養力価の構成発現 CEN 生産株を得た。	CEN の誘導または構成発現、分泌発現、及び活性化に関わるシステムが最適化できる条件を明らかにし、培養力価が 35 U/mL 以上(350 mg/L 以上)の CEN 生産株を得る。	2020 年度末 達成予定

(9) 研究開発の成果と意義

・ *B. stabilis* の野生株と CEN 生産に利用している実用株の両株についてゲノムシーケンスを行い、全ゲノムを解読した。この成果により、以降の変異点解析や RNAseq 解析と CEN 生産性の関連性を検討することが可能となった。

・ 異なる培養条件で解析した大量の RNAseq 解析データをもとに情報解析を行った結果、培養条件にかかわらず安定に発現可能な新規恒性型プロモーターを見出した。この恒性型プロモーターを使用することでオイル誘導しない CEN 発現を実現した。

・ CEN の高分解能 X 線結晶構造解析を行い、CEN の三次元構造を明らかにした。この成果により、構造類似性が高いものの基質特異性が異なるリパーゼとの構造比較が可能になり、CEN の基質特異性や高活性化に有効と考えられるアミノ酸残基を明らかにした。

(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	
2016	0 報	0	0	0	0	0	0
2017	1 報	0	0	0	0	0	0
2018 *1	0 報 (2 報)	0	0 (2)	0	0	0	0
2020 *2	5 報	0	5	1	0	0	1

*1 : 2018 年 6 月時点での実施済み件数、()内は 2018 年度末の予定件数

*2 : 2020 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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	1 件 (2 件)	0	0
2020 *2	5 件	1 件	1 件

*1 : 2018 年 6 月時点での出願済み件数、()内は 2018 年度末の予定件数

*2 : 2020 年度末までに予定している累積件数

2.3.3.2 糸状菌を用いた有用タンパク質同時生産制御による有効性検証

担当機関：長岡技術科学大学、バイオインダストリー協会、花王株式会社、九州大学、産業総合研究所

(1) 背景と目的

現在、化石資源に代わる新たなエネルギー源・原料源として食糧と競合しないセルロース系バイオマスが注目されている。セルロース系バイオマスは、植物細胞の主要な構成成分として地球上に最も多く存在するバイオマスであり、その分解によって生じた二酸化炭素は、植物生育時に光合成により大気中から固定された二酸化炭素であるため、大気中の二酸化炭素量の増加を引き起こすことがなく、再生可能でカーボンニュートラルな資源である。また、セルロース系バイオマスの分解により生じるグルコースなどの糖は食品産業で広く利用できるほか、化成品やファインケミカルの原料、エタノールなど様々なものに変換することができる。そのためセルロース系バイオマスからのバイオリファイナリーは化石燃料からのオイルリファイナリーに替わる新たな物質生産技術として非常に期待されている。セルロース系バイオマスは、セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンから構成されている。主成分であるセルロースはグルコースが直鎖状に β -1,4 結合した高分子ホモ多糖である。セルロースはそれぞれのセルロース鎖間で水素結合を形成することで強固な結晶構造をとるため、化学処理によってグルコースまで分解することは極めて困難である。細胞壁成分の中でセルロースに次ぐ含有量であるヘミセルロースはヘテロ多糖であり、その構成成分によりキシラン、グルコマンナン、キシログルカンおよびアラビノガラクトンなどに分けられる。リグニンは、フェノール性の高分子性化合物であり、セルロースとヘミセルロースや細胞同士を接着している。セルロースおよびヘミセルロースは、それぞれグルコースおよびキシロースなどの単糖へと分解することが可能である。しかし、セルロースはその強固な結晶構造から容易に糖化できず、かつては硫酸を用いた化学的な分解処理による糖化が行われてきた。しかし、化学的処理は環境負荷が大きいため、微生物が産生する糖質加水分解酵素であるセルラーゼおよびヘミセルラーゼを用いた環境低負荷な酵素処理による糖化技術が研究されている。セルラーゼはセルロースの β -1,4 結合を加水分解する酵素の総称であり、Endoglucanase (EG)、Cellobiohydrolase (CBH)、 β -glucosidase (BGL) の3種類に分類される。EGはセルロース鎖内部の β -1,4 結合を無作為に加水分解するエンド酵素であり、CBHはセルロース鎖末端からセロビオース単位に加水分解するエキソ酵素である。また、Xylanase (XYN)はヘミセルロースの主要成分であるキシランを加水分解する酵素である。BGLはセロビオースまたはセロオリゴ糖を非還元末端からグルコース単位に加水分解する酵素である。セルロースには結晶領域と非結晶領域が存在し、分解過程ではまずEGがセルロースの非結晶領域を分解することで多数の末端を作り、この末端をCBHが順にセロビオース単位に分解する。そして最後にBGLが遊離されたセロビオースをグルコースに分解する。このように3種類のセルラーゼの相乗作用によりセルロースは効率よく分解される(図 2.3.3.2-1)。そのため、セルロースの分解効率を高めるには、3種のセルラーゼが適切な割合で存在することが重要である。糖質加水分解酵素群を生産する生物は、原生生物、細菌、真菌、植物、動物と多岐にわたる。その中でも糸状菌 *Trichoderma reesei* は、セルロース系バイオマスの分解に必要とされている全ての糖質加水分解酵素を大量に分泌生産することから、産業的な糖質加水分解酵素源として広く研究が進められて

きた。これまでに、*T. reesei*の野生株であるQM6a株を唯一の起源とするセルラーゼ生産性向上株群が世界中で開発されてきた。

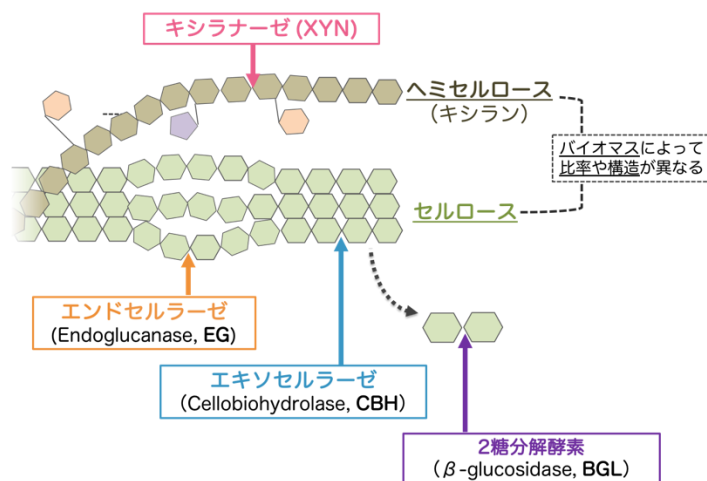


図 2.3.3.2-1 セルロース系バイオマスの構造と加水分解酵素

我が国においては、「新燃料油開発技術研究組合（RAPAD）」が第二次オイルショック後の昭和55年に設立され、石油9社、発酵4社、プラント7社、化学2社の計22社が7ヵ年計画のバイオマス利活用研究を目的とした大型国家プロジェクトを推進した。この中で *T. reesei* の世界的標準株 QM9414 株を起源とした菌株改良が行われ、工業酵素開発ベース株である高生産変異株 PC-3-7 株が獲得されてきた。*T. reesei* PC-3-7 株の酵素生産性、酵素遺伝子発現制御メカニズムに関して長岡技術科学大学において30年にわたり研究が進められ、2008年～2017年に実施された NEDO プロジェクトにおいて、世界最高レベルのバイオマス糖化能を示すセルラーゼ生産菌株の造成に成功している（図 2.3.3.2-2）。

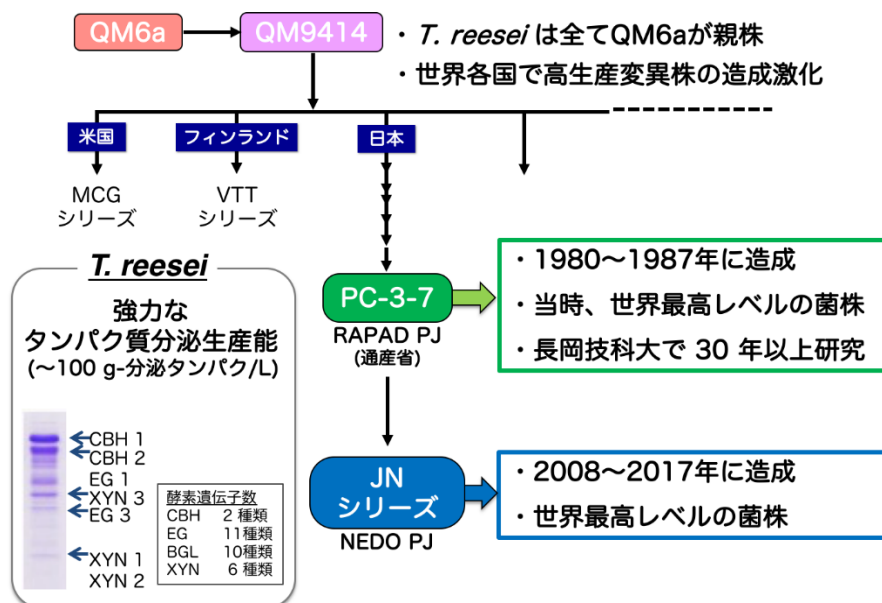


図 2.3.3.2-2 日本で開発されている *T. reesei* セルラーゼ高生産変異株

バイオマス酵素糖化において、セルロース・ヘミセルロースを被覆しているリグニンが反応を阻害する。そのため、酸・アルカリ・機械的処理を用いた前処理によってリグニンを除いた前処理済みバイオマスを使用することで、効率的な酵素糖化が可能となる。しかしながら、前処理済みバイオマスの多糖成分の組成は用いるバイオマスの由来や前処理の手法によって異なる。そのため、より効率的なバイオマス糖化には各バイオマスに応じた酵素成分で構成される糖化酵素が必要である。これまでの *T. reesei* 菌株開発方針は、特定のバイオマスを糖化ターゲットに定め、これまでの *T. reesei* 研究で得られた知見を活かして進めてきた。例として、セルラーゼ遺伝子群全体をコントロールする既知転写抑制因子の破壊、*T. reesei* の各種セルラーゼ遺伝子のプロモーター解析の結果から、遺伝子発現に最適なプロモーターを選択して目的の酵素を発現させる、といったことが挙げられる（図 2.3.3.2-3）。しかしながら、菌株の開発に長時間を必要とし、ある特定のバイオマスにしか効力を最大限に発揮できないという問題を抱えていた。また、これまでに特定のセルラーゼやヘミセルラーゼのみを制御する調節因子は見いだされていないため、糖質加水分解酵素群の生産比率制御は、比率を変更したい酵素遺伝子を多コピーで導入する必要があり、ゲノム上の組み込み位置をコントロールすることが困難であること、多コピーで導入されても想定した発現量を発揮しないなど、安定した菌株を得ることが困難であった。そのため、数種類の酵素を個別に制御する因子「複数遺伝子制御因子」の発現量操作を介して簡便に酵素の生産比率を操作する手法の確立が必要である。しかし、複数遺伝子制御因子の同定は研究者の経験や直感に頼ったこれまでの研究手法では新規制御因子を見出すことは困難である。そこで、本研究開発では大量のオーミクスデータを活用しバイオインフォマティクス手法によりセルラーゼ遺伝子群とそれらの発現を制御する因子のネットワークモデルを推定し、実際の菌株を用いてそのネットワークモデルの検証、高精度化を行うことによって複数の特定セルラーゼ遺伝子を同時に制御することができる新規因子の同定およびその活用を目的とする（図 2.3.3.2-4）。最終的には、複数の酵素遺伝子を制御するネットワークならびにターゲット遺伝子の発現量制御のモデル構築し、日本で開発された *T. reesei* の工業用酵素生産菌株のベース株（PC-3-7 株）およびその派生株を用いて、任意の酵素の発現量を同時制御できる技術の開発を行う。

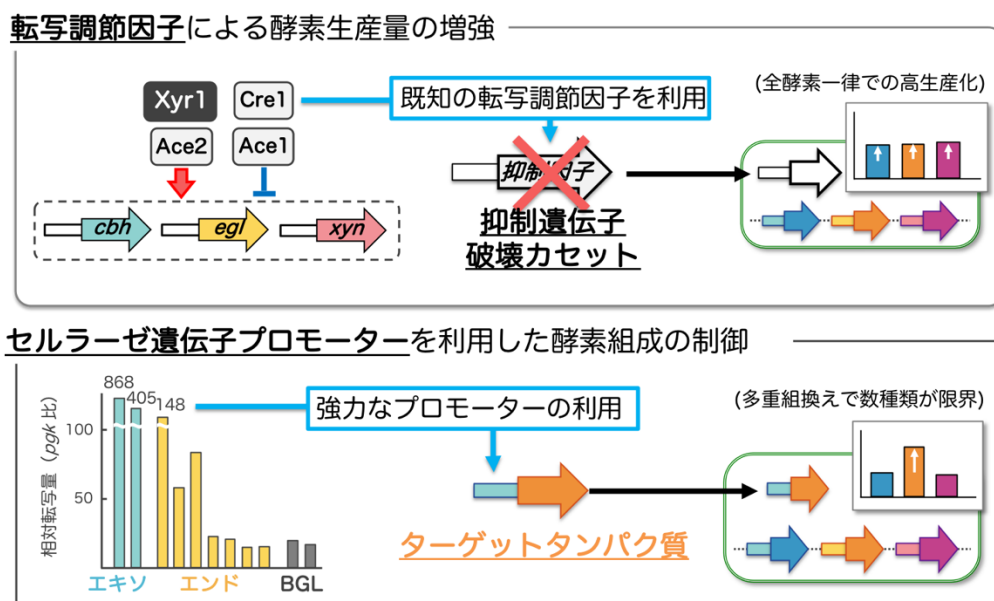


図 2.3.3.2-3 機能・形質に基づいた従来の菌株開発

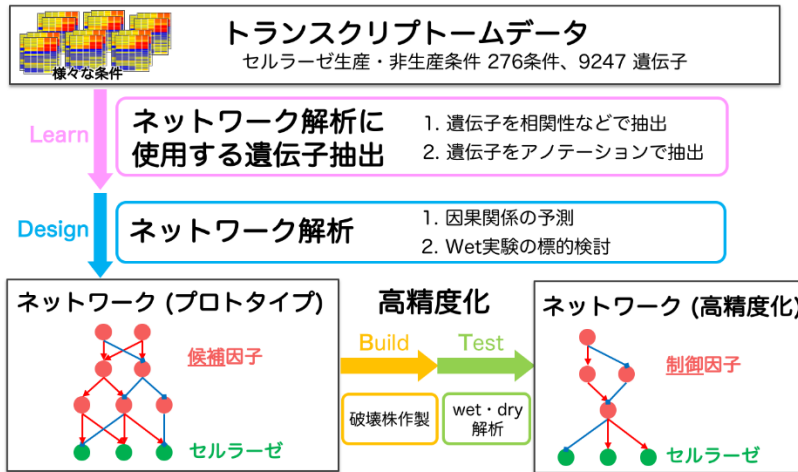


図 2.3.3.2-4 本PJで行うデータ駆動型菌株開発

(2) 位置づけ、目標値

位置づけ：世界有数の酵素メーカーが提供しているバイオマス糖化酵素は依然として製造コストが高く、糖化性能が不十分と思われる。本研究開発を実施し、酵素組成を自由に制御できる技術が確立できれば、バイオマスリファイナリーを目指した企業へコストパフォーマンスの高い酵素を提供できる。本研究開発の成果を活用することで、広くユーザーのニーズを取り入れ、そのプロセスに適した酵素（テーラーメイド酵素）を開発可能となり、優位に展開可能と思われる。

中間目標値：バイオインフォマティクス手法と実際の菌株を用いた解析の連携より得られた酵素遺伝子群コントロール因子についての知見を活用することで、高効率糖化酵素生産菌株の構築を行う。開発株において、糖化性能については特定のバイオマスの80%糖化に必要な酵素量を5-10%低減、酵素比率については全分泌酵素の10%以上の範囲にて組成改変されていることを目標とする。

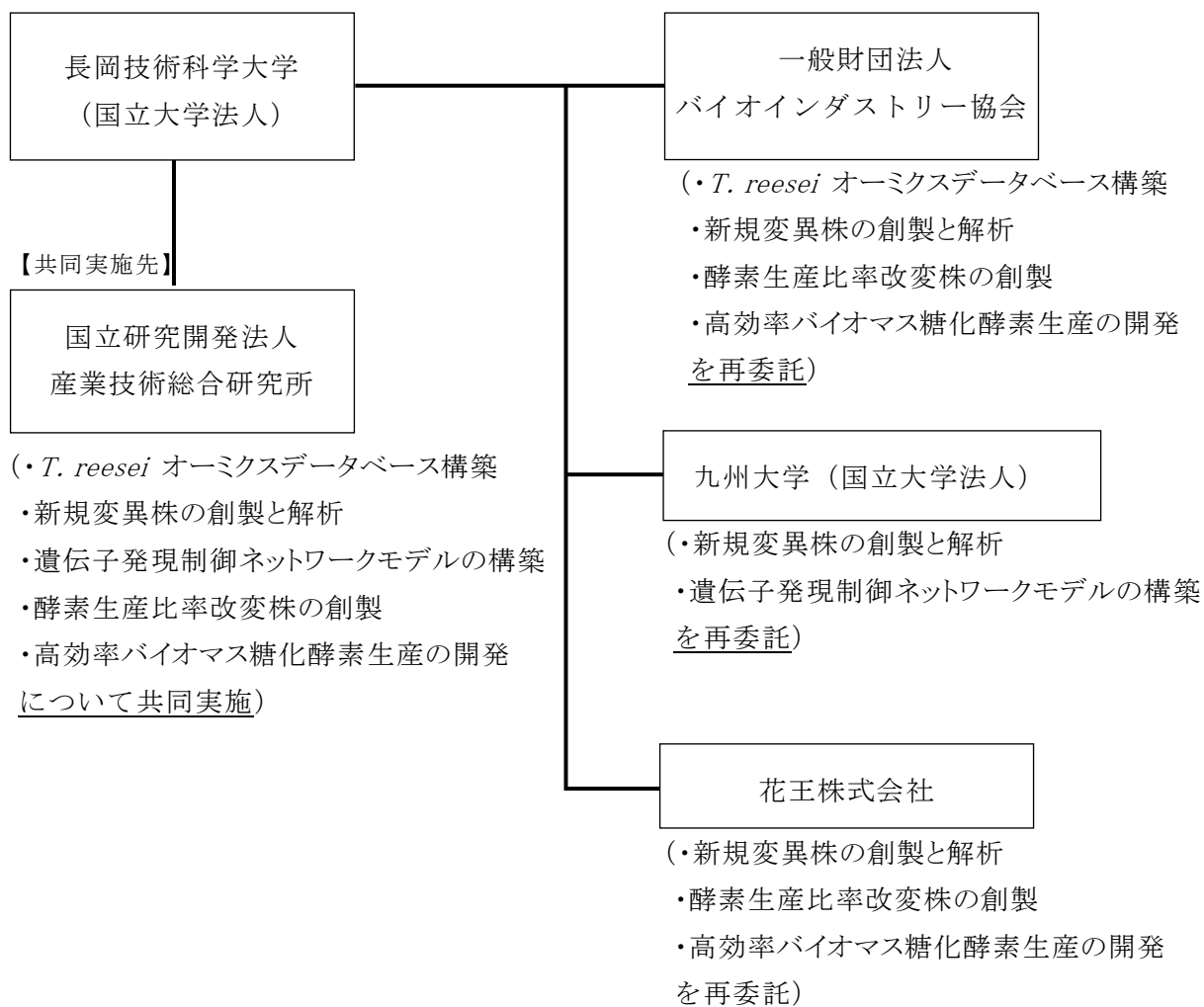
最終目標値：全分泌酵素の20%以上の範囲での組成改変を実現する。任意の組成比での生産により、特定のバイオマスの80%糖化に必要な酵素量を10-30%低減させた高効率バイオマス糖化酵素生産菌株を開発する。

(3) 全体計画

2016年	2017年	2018年	2019年	2020年
	<i>T. reesei</i> オミクスデータベース構築			
	新規変異株の創製・解析			
	遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子探			
	酵素生産比率改変株の創製			
		高効率バイオマス糖化酵素生産菌の開発		

工業用酵素生産ベース株である PC-3-7 株を中心としてその派生株や *T. reesei* 日本型系統樹変異株のオーミクスデータ（トランスクリプトーム、ゲノム、プロテオーム）を整備する。得られたトランスクリプトームデータを基にバイオインフォマティクス手法により酵素遺伝子発現制御ネットワークモデルを構築する。ネットワークモデルから予測された発現制御因子について PC-3-7 株をベースとして検証し、その結果をフィードバックすることによってネットワークモデルの高精度化を図る。また、セルラーゼ生産性が変化した変異株を作出し、そのオーミクスデータもネットワークモデル構築のために活用する。その効果が明らかとなった酵素遺伝子発現制御因子を活用し、工業用酵素の生産菌株において酵素発現比率の改変および高効率バイオマス糖化酵素生産菌の開発を行う。

(4) 実施体制



(5) 運営管理

半年に一度、本テーマに関与する機関が一同に介して進捗報告会を行い、それぞれの期間における研究開発の進捗を報告するとともに今後の研究開発は方針についての会議を開催している。また、2ヶ月に1~2回のペースで実務者レベルでのミーティングを開催している。

(6) 実施の効果

競合他社のバイオマス糖化酵素は依然として、コストおよび糖化性能が不十分。本 PJ にて、酵素組成を自由に制御できる技術が確立することで、バイオマスリファイナリーを目指した企業へコストパフォーマンスの高い酵素を提供できる。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
<i>T. reesei</i> オーミクスデータベースの構築	表現型データ基盤の整備 ・高生産系統樹株 8株 ・単一酵素欠損株 13株 ・ターゲット遺伝子群の発現コントロール因子の検証 5因子以上	高生産系統樹株8株、単一酵素欠損株13株の表現型データを整備した。また、ネットワーク予測因子は4因子の表現型データを整備した。	○ (2019年1月達成予定)	
遺伝子発現ネットワークモデルの構築	ターゲット遺伝子の発現コントロール因子を5因子以上予測	ターゲット遺伝子の発現コントロール因子を14因子以上予測	◎ (目標値以上の因子を予測できたため、大幅達成と評価)	
新規変異株の創製	変異株の創製 15株、解析 15株、オーミクス解析 15株、比較ゲノム解析 15株	変異株の創製 41株、解析 41株、オーミクス解析 3株	○ (2019年3月までに比較ゲノム解析終了)	
酵素生産比率改変株の創製	酵素比率を10%以上改変	PC-3-7株にて達成	◎ (目標値を超えて達成できたので大幅達成と評価)	
高効率バイオマス糖化酵素生産株の開発	バイオマスの80%糖化に使用する酵素量を親株に対して5~10%低減	アルカリ処理エリアンサスの50%糖化に使用する酵素量の10%低減に成功	○ (2019年3月までに達成見込み)	

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
酵素生産比率改変株の創製	<i>T. reesei</i> が生産する酵素比率を10%以上改変	<i>T. reesei</i> が生産する酵素比率を20%以上改変	複数酵素遺伝子の制御因子の解析が加速しており、現状の成果と今後得られる成果を組み合わせることで達成可能
高効率バイオマス糖化酵素生産株の開発	アルカリ処理エリアンサスの50%糖化に使用する酵素量を親株に対して10%低減	バイオマスの80%糖化に使用する酵素量を10~30%低減	ネットワークモデルの高精度化に伴う複数酵素遺伝子の制御因子を活用した菌株開発および種々のバイオマスに対する糖化試験を進めることで達成可能

(9) 研究開発の成果と意義

- 遺伝子発現ネットワークモデルの構築
- 酵素生産性改変株の創製
- 高効率バイオマス糖化酵素生産菌株の開発

*T. reesei*において、遺伝子発現制御ネットワークを構築する上で全遺伝子の発現量データ（トランスクリプトームデータ）を取得する必要がある。プロジェクト開始時点までに、*T. reesei*日本型変異系統樹株のうち世界的標準株であるQM9414株およびセルラーゼ高生産変異株であるPC-3-7株についてセルラーゼ生産条件下および非生産条件下での取得していたため（QM9414株：117条件、PC-3-7株：72条件）、これらのトランスクリプトームデータを活用してネットワークモデルの構築を課題2.3.2.5「遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子の探索」と共同して行った。*T. reesei*のすべての遺伝子（約9174遺伝子）を用いたネットワークモデル構築には計算機の能力の観点から困難であり、実際的には取得不可能な極めて膨大な量のトランスクリプトームデータが必要である。そこで、計算機の負荷を軽減し、取得済みのトランスクリプトームデータを最大限に活用するためには、ネットワークモデルの構築に用いる遺伝子を抽出する必要がある。そこで、図2.3.3.2-4のスキームに基づき、セルラーゼ遺伝子である*cbh1*に着目してネットワークモデル構築のための遺伝子を15個抽出した（図2.3.3.2-5）。これら遺伝子について、全トランスクリプトームデータを用いてStructural Equation Modellingによって緩やかな相関関係を推定し、ネットワークモデル（プロトタイプ）とした（図2.3.3.2-6）。ここで、因子1、2および3がその下流の酵素遺伝子の発現に影響を与えると推測されたため、

PC-3-7 株を宿主として因子 1~3 の破壊株をそれぞれ構築し、酵素遺伝子の発現、酵素タンパク質の生産性を評価するとともに、因子 1~3 の破壊株のトランスクリプトームデータを取得してネットワーク解析にフィードバックすることでネットワークモデルの高精度化を図る。

ネットワークモデル構築に必要な遺伝子を抽出する手法について、種々のコンセプトを実施する必要がある。そこで、エンド型酵素、エキソ型酵素遺伝子の同時発現制御、エンド型酵素、エキソ型酵素遺伝子の発現を別々に制御、個々の酵素遺伝子を個別に制御というコンセプトで遺伝子抽出を行い、ネットワークモデル（プロトタイプ）をそれぞれ構築した。それぞれのネットワークモデル（プロトタイプ）から推定された制御因子と PC-3-7 株における制御因子の破壊解析の結果を表 2.3.3.2-1 にまとめた。この中で、特に良好な結果を示した因子 1 および因子 2 の成果について以下に示す。

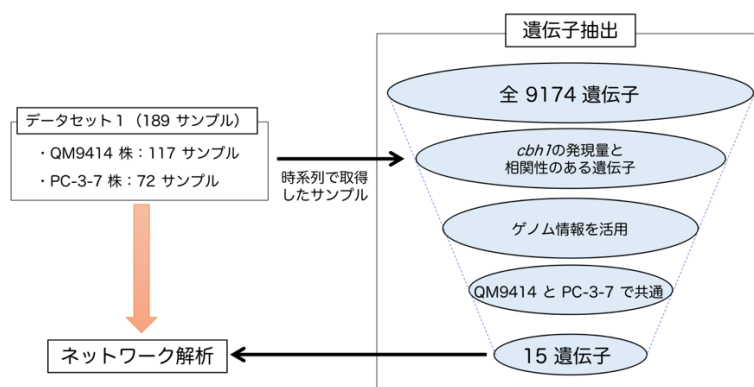


図 2.3.3.2-5 ネットワーク構築に用いる遺伝子抽出法
(セルラーゼ遺伝子 *cbh1* に着目)

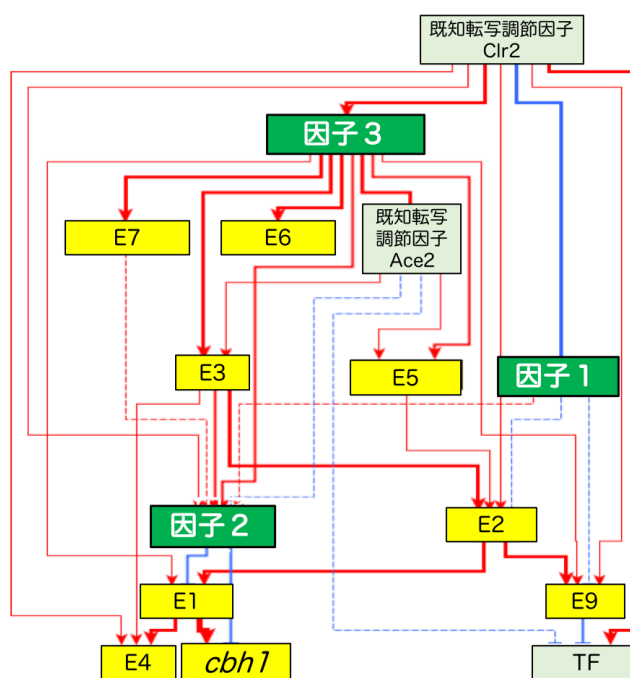


図 2.3.3.2-6 構築したネットワークモデル（プロトタイプ）

表 2.3.3.2-1 ネットワークモデルから推測された酵素遺伝子発現制御因子の *T. reesei* 菌株における検証結果

遺伝子抽出コンセプト	因子No.	破壊がタンパク質生産に与える影響	備考
セルラーゼ発現全般	1	全体的に増加	特許取得中
	2	全体的に減少	糖化能向上
	3	全体的に増加	
エンド/エキソ 同時制御	4	培養後期活性上昇	
	5	変化無し	
	6	解析予定	
	7	全体が減少	
エンド/エキソ 独立制御	8	変化無し	
	9	解析予定	
個別 制御	<i>xyn</i> 抑制、その他誘導	10	解析予定
	<i>xyn1</i> 特異的抑制	11	解析予定
	<i>bg11</i> 特異的誘導	12	解析予定
	活性化	13	解析予定
	<i>bx11</i> 抑制、 <i>bx11</i> 誘導	14	解析予定

因子 1 をコードする遺伝子をターゲットとした遺伝子破壊用 DNA 断片を構築し、相同組換えによって PC-3-7 株の因子 1 遺伝子を破壊した。因子 1 破壊株 (PCΔ因子 1) をセルラーゼ生産条件で培養を行い、培養液中に分泌されたタンパク質を解析したところ、親株よりも高いタンパク質の生産量を示すことが明らかとなった (図 2.3.3.2-7)。本研究開発の目的は生産される酵素の組成比率改変であり、タンパク質の生産性向上は副次的な結果である。しかしながら、工業用酵素の生産コスト削減という観点からは非常に有用な効果であったため、工業用酵素生産株のタンパク質生産性を向上させる因子として特許出願準備中である。タンパク質の生産性向上と連動して、PCΔ因子 1 株の培養上清中のセルラーゼ活性およびキシラナーゼ活性は親株よりも大きく上回っていた (図 2.3.3.2-8)。生産された酵素を 2 次元電気泳動にて解析し、糖質加水分解酵素群の組成比率を親株と比較すると、大きく異なっていることが明らかとなった (図 2.3.3.2-9)。以上のことから、因子 1 の破壊はタンパク質生産性を向上させ、なおかつ生産される酵素組成比率を変化させることができることが明らかとなった。

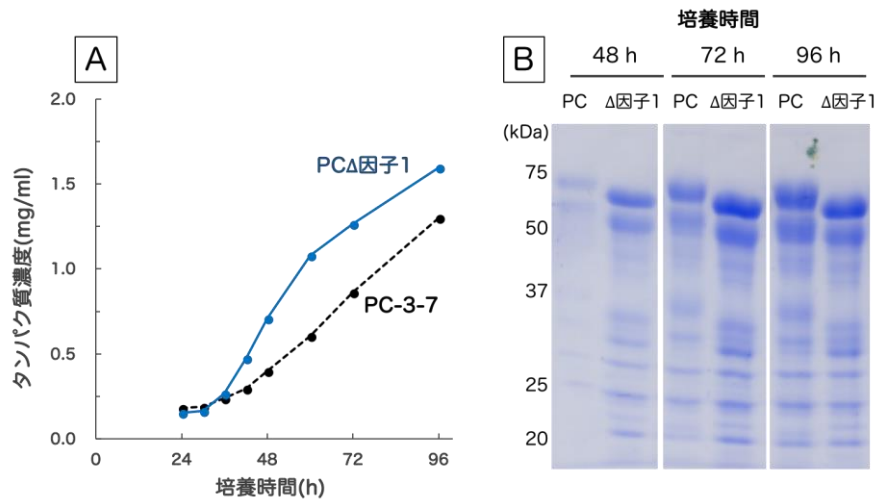


図 2.3.3.2-7 因子 1 破壊が PC-3-7 のタンパク質生産性に与える影響 A: 培養上清中のタンパク質濃度 B: 培養上清の SDS-PAGE

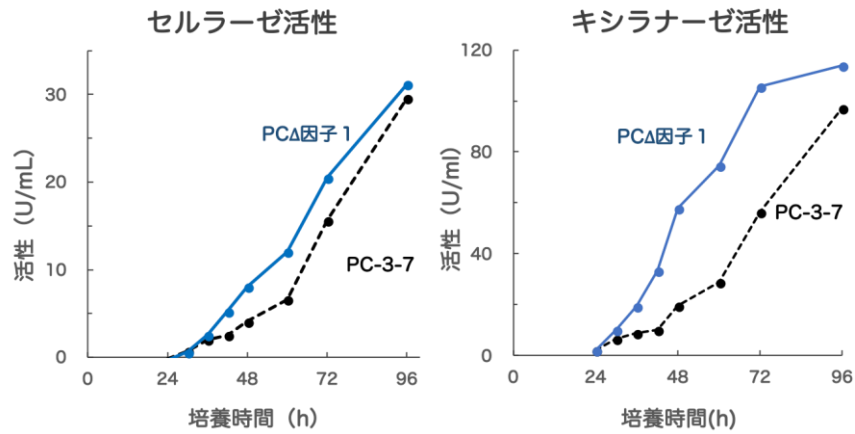


図 2.3.3.2-8 因子 1 破壊株が生産する酵素の活性

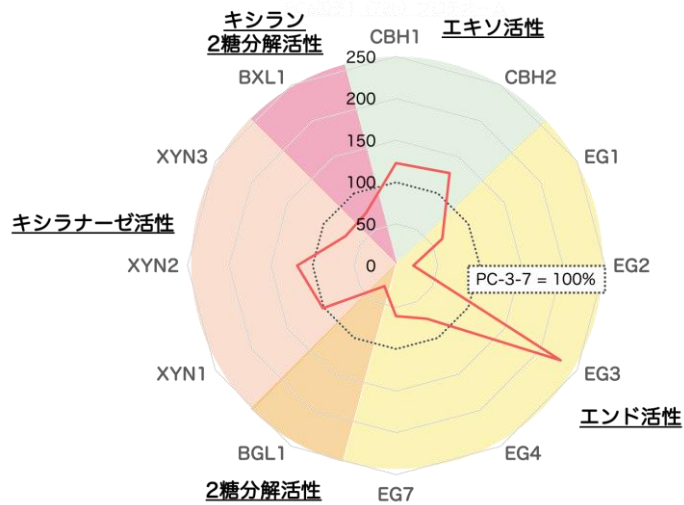


図 2.3.3.2-9 因子 1 破壊株が生産する酵素組成比率 (PC-3-7 に対する相対値)

因子2をコードする遺伝子を相同組換えによって破壊した。因子2破壊株（PC Δ 因子2）をセルラーゼ生産条件で培養を行った結果、当初の予想に反して親株よりも低いタンパク質の生産量を示した（図 2.3.3.2-10）。さらに、培養上清中の酵素活性も親株に比べて低下していた（図 2.3.3.2-11）。以上のことから、因子2は破壊が酵素生産性に影響を与えることから、酵素遺伝子群の生産を活性化する働きを持つことが示唆された。生産された酵素の組成比率を親株と比較すると大きく異なっており、特にバイオマスの糖化に重要な酵素成分である BGL1 の生産比率が向上していた（図 2.3.3.2-12）。PC-3-7 株と PC Δ 因子2 の分泌タンパク質 100 mg あたりの酵素の量を2次元電気泳動にて解析し、それぞれの株の酵素の生産比率を比較したところ、全体で 27 mg の変動が観察された（図 2.3.3.2-13）。すなわち 27%の酵素の発現比率を変動させることに成功した。今後は、目的の複数酵素の発現をコントロールするためにさらなる解析を行う必要がある。

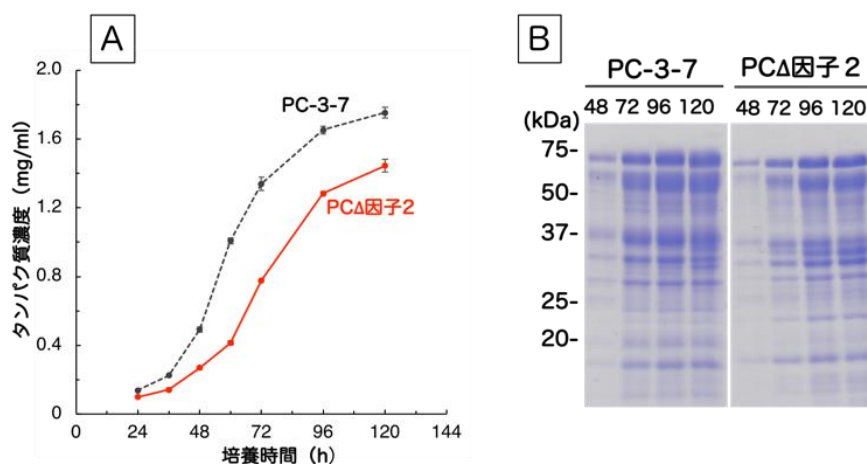


図 2.3.3.2-10 因子2破壊がPC-3-7のタンパク質生産性に与える影響 A: 培養上清中のタンパク質濃度 B: 培養上清のSDS-PAGE

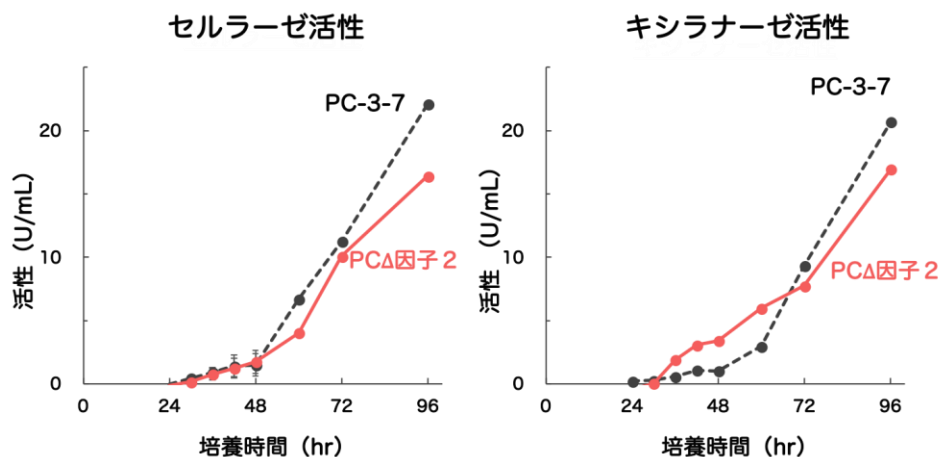


図 2.3.3.2-11 因子2破壊株が生産する酵素の活性

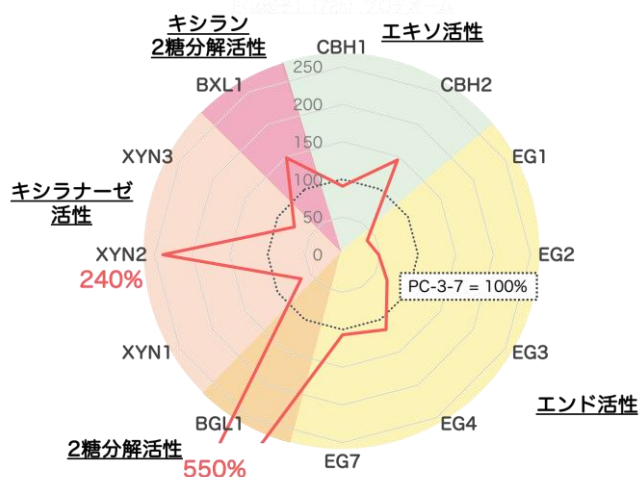


図 2.3.3.2-12 因子 2 破壊株が生産する酵素組成比率 (PC-3-7 に対する相対値)

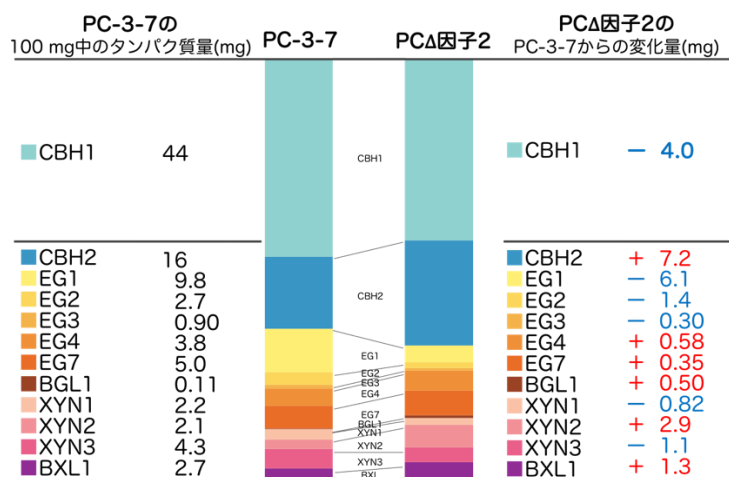


図 2.3.3.2-13 因子 2 破壊株が生産する酵素組成の変動量

因子 1 および因子 2 の破壊株から得られた酵素生産比率が変化した酵素標品を用い、植物バイオマスの糖化を行った。用いたバイオマスは、アルカリ処理にてリグニンを除いたエリアンサスである。バイオマス 1 g あたり 3 mg の酵素タンパク質を添加し、50°C で反応させた。その結果、PCΔ因子 1 の酵素を用いた場合には、親株に比べて糖化率の向上は観察されなかったが、PCΔ因子 2 の酵素では糖化率が向上しており、セルロースの 50%糖化に必要な酵素タンパク質量を約 10%低減できた。さらに、工業用糖化酵素生産菌株を想定し、糖化反応系に糖化促進効果のある BGL を添加した場合、PCΔ因子 2 の糖化率が親株よりも高くセルロースの 80%糖化を達成した。このことから、BGL ではない他の酵素の比率が変更したことで糖化率が向上していることが示唆された (図 2.3.3.2-14)。

以上のことから、因子 1 の破壊は酵素生産性を向上させ、生産される酵素の組成比率を改変できること、因子 2 の破壊はアルカリ処理エリアンサスの糖化能を向上させる酵素組成比率を達成できることが明らかとなった。この知見は、複数の酵素の発現を制御し、各種バイオマスの糖化に最適な酵素比率で生産させるという目的を達成す

る上で大きな意義がある。従来法では見出すことができなかったネットワーク（プロトタイプ）から予測された因子（図 2.3.3.2-15）の検証を通して、*T. reesei* の糖質加水分解酵素遺伝子の発現制御メカニズムについて新たな側面を見出すために、本研究開発で行ったバイオインフォマティクス手法というアプローチが強力であることが示された。

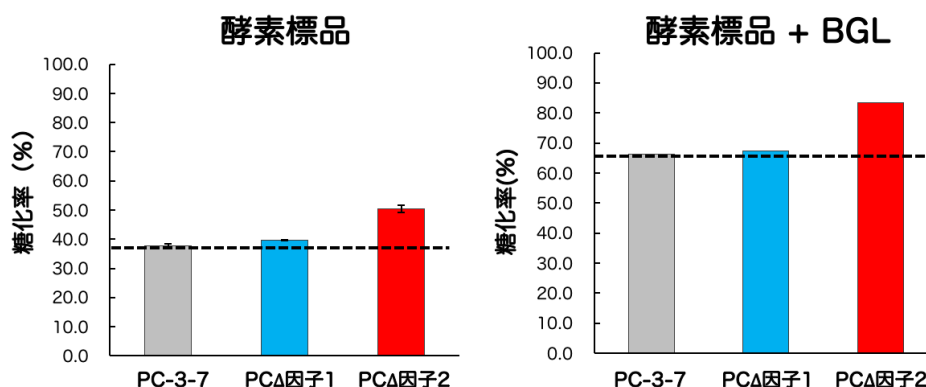


図 2.3.3.2-14 因子 1 破壊株および因子 2 破壊株の培養上清を用いたバイオマス糖化試験

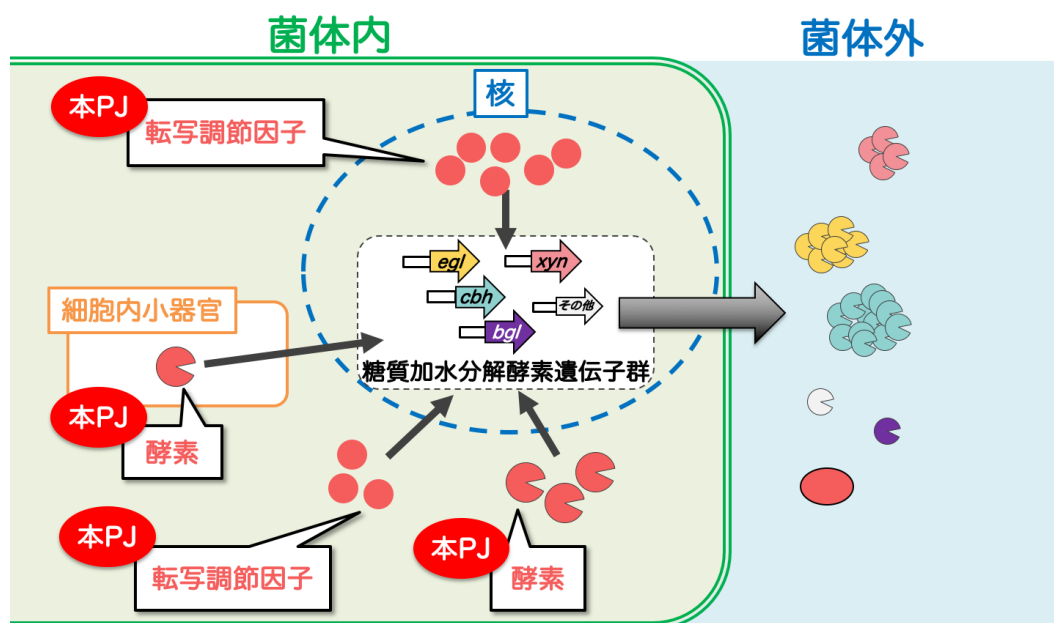


図 2.3.3.2-15 ネットワーク解析で明らかとなりつつある *T. reesei* の糖質加水分解酵素遺伝子の発現制御メカニズム

- 新規変異株の創製

酵素タンパク質生産性が変化している株のオーミクス解析（トランスクリプトーム、ゲノム、プロテオーム）を行うことによって複数の酵素タンパク質の発現を制御している因子の情報が得られると考えられる。しかしながら、これまでの突然変異による菌株開発は酵素生産性の増加が第一目標であり、生産される酵素の組成比率の観点から菌株開発は行われてこなかった。そこで、バイオインフォマティクスによるネット

ワーク解析に投入するデータとして、炭素源異化抑制解除株、タンパク質非生産株、タンパク質生産性強化株を突然変異によって作出し、そのオーミクス解析を行うこととした。セルラーゼ遺伝子のプロモーター支配下にレポーター酵素であるβ-グルクロニダーゼ（GUS）の遺伝子を連結した株に紫外線照射によって変異導入を行った。その後、セルラーゼ生産条件、非生産条件下で GUS の発現をモニタリングし、その発現挙動が変化した株を取得した（レポーターアッセイ）。並行して、培地中のセルロースが分解されることで培地が透明になることを利用した変異株スクリーニングを行った（ハローアッセイ）（図 2.3.3.2-16）。

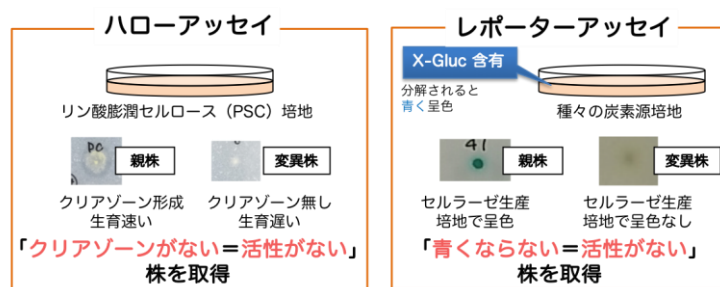


図 2.3.3.2-16 新規変異株のスクリーニング（セルラーゼ生産性低下株の例）

スクリーニングの結果、約 4300 コロニーをレポーターアッセイに供した場合に酵素低生産株が 14 株、高活性株が 3 株得られた。また約 6700 コロニーのハローアッセイの結果低活性株が 15 株、高活性株が 1 株、生産パターン変化株が 8 株得られている。これら変異株のうち、特徴的な表現系を示した株についてオーミクスデータを取得し、ネットワーク解析のためのデータセットとして活用する。

(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	
2016	1		1				
2017	1		14				1
2018 *1	(2)		1 (10)	1			
2020 *2	6		50	2			1

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016			
2017			
2018 *1	0 (1)		
2020 *2	2		

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.3.3 カルボンの生産性向上による代謝解析・酵素設計技術の有効性検証

担当機関：味の素株式会社、神戸天然物化学株式会社

(1) 背景と目的

微生物を用いた発酵生産においては、近年、アミノ酸、糖類、脂肪酸等の一次代謝産物だけでなく、二次代謝産物の重要性が増している。特にテルペン（イソプレノイド）化合物は、医薬品原料やフレーバー・フレグランスに加えて、米国を中心にバイオ燃料としても注目を集め微生物による発酵生産が検討されている。食品用香料（フレーバー）としては、天然香料が望まれているが、一般的には植物由来の精油から単離する必要があり、高価であると同時に植物原料によっては大量生産が難しいことが障壁となっている。

テルペンの化合物である(R)-カルボンはスペアミントに主として含まれる光学活性体であり、リモネンからカルベオールを経て生産される。リモネンからカルベオールの反応はシトクロムP450（以下 P450 と略す）に触媒される水酸化反応で、一般的には位置選択性並びに活性も低いことから、これらを向上させることがカルボン生産性を上げる重要な鍵となる。

本研究の目的は、テルペン系のフレーバーであるカルボン（carvone）をモデル化合物として、代謝設計や酵素設計など情報解析を駆使したスマートセル設計に資する基盤技術を開発する。そこで培った基盤技術と生産技術を他の化合物に展開し、市場ニーズを探るマーケティングに係る技術開発期間を短縮する事と、P450 に触媒される水酸化反応を使いこなすことにより、より付加価値の高いターゲット化合物の開発を狙うことである。

(2) 位置づけ、目標値

(R)-カルボンはスペアミントに主として含まれる光学活性体であり、スペアミント様のフレーバーとしてチューインガム、歯磨き粉や医薬原料としての用途があり、世界市場規模は 2400 トン/年で、売り上げは 120 億円以上と推定される。その生産はスペアミントからの抽出あるいは、比較的安価に入手可能なリモネンからの化学合成が主な方法となっている。一般的に植物原料から抽出されるフレーバーは、その供給の不安定性から高価となる傾向にあり、そのために安価な合成品が使用されることが多い。近年の消費者のナチュラル志向の高まりにより、フレーバーにも糖原料からの微生物による直接発酵や天然原料からの微生物変換といったナチュラルな製法が求められているが、未だ直接発酵による製法は開発されていない。我々は酵素設計及び代謝設計などの情報解析を駆使し、従来よりも効率的に、且つ早期にカルボン等のテルペン系フレーバー等を高品質で安価なナチュラル製品として供給することにより、需要の伸びにも対応可能な安定供給を実現することを目標とする。

（平成 30 年度目標）

- リモネン水酸化酵素における触媒反応の位置選択性等を向上させる
- 20 種以上の変異株からのプロセス開発用のリモネン合成酵素とカルボン生合成経路を集積したプロトタイプカルボン生産菌を選択し、カルボン生成能を確認する

(平成 32 年度最終目標)

- リモネン蓄積量及び P450 触媒反応の位置選択性の向上により、更なるカルボン蓄積向上を達成する。

(3) 全体計画

本研究は二つの課題を各研究機関で分担して開発を行う。課題 1 のシトクロム P450 の選択と人工酵素の設計は神戸天然物化学 (KNC) (株)と産総研が担当する。課題 2 のカルボン生産菌構築と代謝経路の最適化は味の素(株)と神戸大が担当する (図 2.3.3.3-1)。

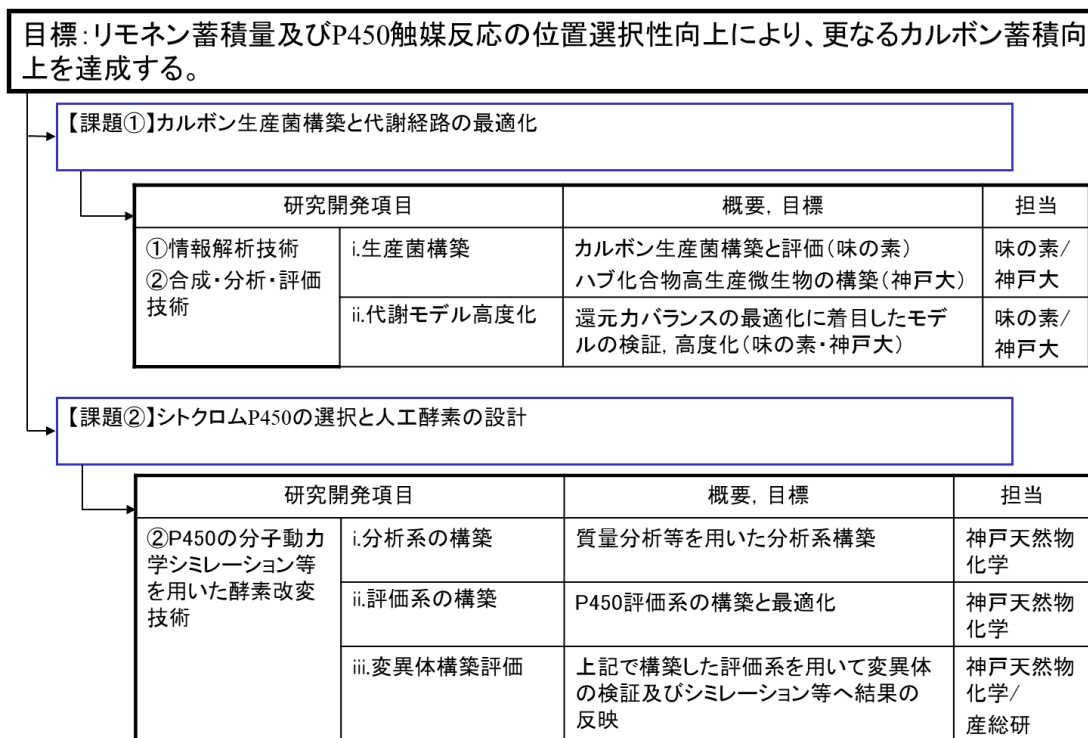


図 2.3.3.3-1 カルボン技術開発の全体計画 1

また、開発のスケジュールは、1 年目に実験系の構築や分析系の立ち上げを行い、2 年目から酵素設計及び代謝設計などの情報解析を駆使し、有効因子の探索及び変異体の構築評価を本格的に行う。3 年目の H30 年度末までにモデル生産菌を構築し、製法の基本方針を策定する。また、新たな課題の克服などを検討しながら最後の 2 年間で、基本プロセスの構築と P450 の特異性の向上及び他品目への技術展開を行う予定である (図 2.3.3.3-2)。

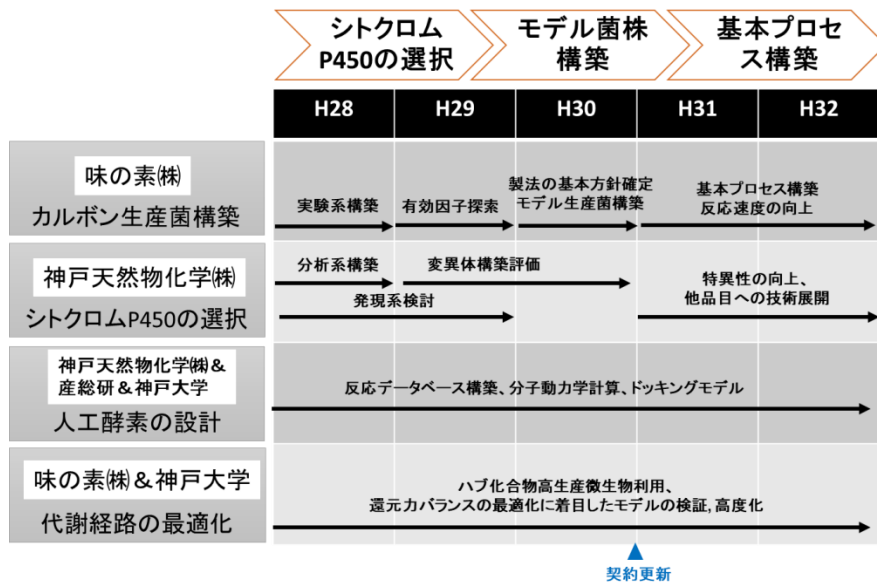


図 2.3.3.3-2 カルボン技術開発の全体計画 2 (実施スケジュール)

(4) 実施体制

課題 1 のシトクロム P450 の選択と人工酵素の設計は神戸天然物化学(株)を中心に産総研と協力して実施。課題 2 のカルボン生産菌構築と代謝経路の最適化は味の素(株)を中心に神戸大と協力して実施。また、各技術開発における研究協力先は表 2.3.3.3-1 の通りである。

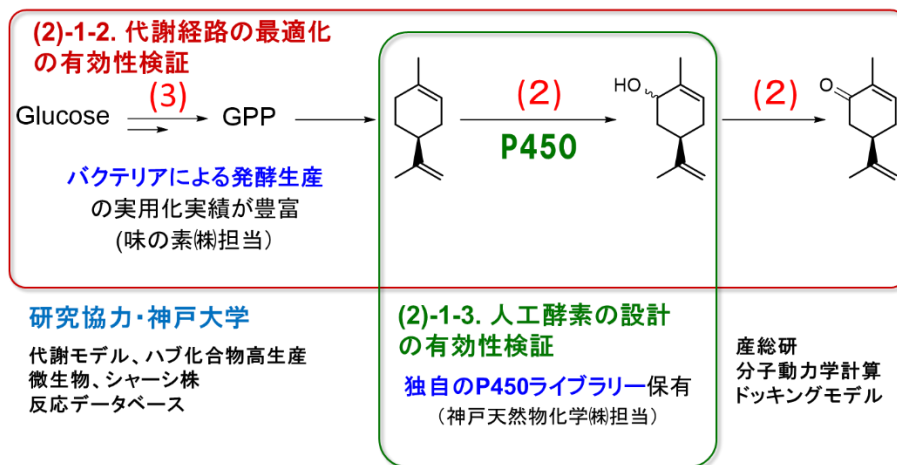


図 2.3.3.3-3 カルボン技術開発の実施体制

表 2.3.3.3-1 各技術開発における研究協力先一覧表

(1) HTP合成・分析・評価手法の開発

高精度メタボローム解析技術	神戸大学
高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術	大阪大学
HTP長鎖DNA合成技術	神戸大学
HTP微生物構築・評価技術	神戸大学

(2) スマートセル設計システムの開発

代謝系情報解析

代謝モデル構築と解析	神戸大学
反応機構推定に基づく酵素選択、機能改変	産業技術総合研究所

発現制御系情報解析

Combi-OGAB 法と機械学習による迅速な DNA 配列因子組み合わせ探索技術	東京大学
排出ボトルネック解消に向けた化合物排出輸送体探索	東北大学

(5) 運営管理

全体会議を半年に1度、拠点会議は年1回、個別会議は必要に応じて行い、相互訪問会議の他、Web会議システムも活用し、2016年度は21回、2017年度は39回行い、情報共有を行っている。2018年度からは研究進捗会議を3か月に一回行い、また個別会議は6月末現在10回行い、プロジェクト内で情報共有化を行っている。

(6) 実施の効果

本プロジェクトで基盤技術を構築した後、各社でカルボンや他のテルペン系フレーバーの工業化に向けた開発を継続して実施する。これによりカルボンや他のテルペン系フレーバーのナチュラル製品市場の数%を本プロジェクトで開発した発酵生産品に置き換える。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
シトクロム P450 の選択と人工酵 素の設計 (神戸天然物化 学㈱、産総研)	変異体の作製と 評価 微生物変換にお ける有効因子の 改良により生産 性の向上	微生物由来 P450 の シ ン グ ル ミュータントに おいて 6 位選択 性が向上 カルベオール変 換量がカルボン 中間目標量相当 量以上	○ 6位選択性向上の 改変酵素が得ら れた カルベオール変 換量向上	変異個所を増や すことにより、 選択性の向上 輸送体関連の技 術を利用し変換 量のさらなる向 上を検討
カルボン生産菌 構築と代謝経路 の最適化 (味の素㈱と神 戸大と神戸天然 物化学㈱)	モデル菌株にて カルボン生成能 を確認する。リ モネン生産株ラ イブラリー作製 と評価を行い、 基準株の 100 倍 のリモネン生産 株を構築する。	定量プロテオー ム解析 QconCAT 法の立ち上げと 効率的なカルボ ン生成のための カルボン変換酵 素発現量比率を 確認した。 リモネン生産量 を基準株の 16 倍 に向上した。	△ カルボン変換酵 素の最適比率を 実現する生産菌 を構築すれば達 成予定。 2回目のライブラ リーでリモネン 生産性を 10 倍以 上向上させる予 定。	カルボン変換酵 素の最適比率で 発現する株の構 築。 リモネン生産株 の大幅な生産量 向上のため、強 プロモーターの 使用を検討す る。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
課題1 シトクロム P450 の選 択と人工酵素設計	位置選択性等の向上	P450 触媒反応の位置 選択性等	選択性向上等につい ては、変異個所を増 やすことによりさら なる向上の見込み
課題2 カルボン生産菌構築 と代謝経路の最適化	カルボン変換酵素に よる変換反応でカル ボン生産を確認。リ モネン生産菌は基準 株の 16 倍量のリモ ネンを生産。	リモネン蓄積量を更 に向上させ、カルボ ン蓄積向上を達成す る。	機械学習とオーミク ス解析データの結果 より現在より 10 倍リ モネン生産量を上 げ、適正酵素発現量 比を実現でき、且つ 課題1の結果を反映 したカルボン生産菌 を構築し、プロセス 開発も同時に行うこ とで達成可能と考 えている。

(9) 研究開発の成果と意義

9-1 分子動力学計算(MD)による P450 の改変

P450 を利用するにあたって酸化反応の位置選択性と低い反応性が問題になることがある。モデル化合物の香料原料の(R)-カルボン生産を念頭に置くと、低い位置選択性による不純物の増加は最終製品の香調変化の原因となり、低い反応性は生産コストの増大原因となりえる。本有効性検証では特に前者の位置選択性に着目し、MD シミュレーションによる位置選択性の制御、すなわち選択性向上及び変更を目指した酵素改変を産総研とともに実施することとした。

従来、酵素改変手法としては PCR 法を利用して無作為に変異を導入する方法が広く用いられている。しかし、この手法は数千以上の変異体の作製・評価を行う必要があるため、目的の改変酵素を得るのに多大な時間と労力が必要となる。ハイスループットな酵素改変の手法を確立させるためには、変異を導入すべき残基を絞り込み、実際に作製・評価する改変酵素数を低減させる必要がある。本課題では酵素の反応ポケット内部のリモネンの立体構造を *in silico* 上で探索し、ドッキングに関与する残基を予測することで、変異を導入すべき残基の絞り込みを行った。

P450 とリモネンの酵素反応は、酸化反応位置の異なる複数の生成物を生じることから、複数のドッキング構造が存在すると考えられる。最も一般的なドッキング構造予測法であるドッキングシミュレーションは、高速な構造探索を可能とする反面、酵素を剛体として扱うため、酵素ポケット内部の構造変化を考慮することができない。モデル P450 (アポ体) の結晶構造のポケット内部には、リモネンが活性部位に接触するのを妨げるように残基側鎖が突出しているため、ドッキング構造を網羅的に探索するためには、P450 ポケット内部の構造変化を考慮できる手法

が必須である。そこで、酵素、基質、またそれらを取り囲む水分子などの溶媒を構成する各原子が相互作用しながら運動を行う MD シミュレーションによる構造探索を行うこととした。

最初に、文献情報及び KNC P450 ライブラリーからリモネンを基質として、カルボン前駆体のカルベオールへ酸化する植物及び微生物由来の 2 つの P450 を改変候補とした。植物由来の P450 のホモロジーモデルを用いて一定温度における MD シミュレーションをおこなった。その結果、結晶構造が決定されている微生物由来の P450 と比較して植物由来の P450 のホモロジーモデルは主鎖構造が大きく構造変化してしまうことが観測された。よって、ホモロジーモデルの立体構造は不安定でありリモネンとヘムの安定したドッキング構造を推定することが困難であることから、微生物由来の P450 をもとに実験を進めることにした。次に、MD シミュレーションが実験結果を正しく再現できるのかを確認するため、モデル P450 のポケットにリモネンの光学異性体である S 体と R 体を配置した 2 つの MD シミュレーションをそれぞれ実行し、計算結果と実験の比較を行った。リモネンの S 体と R 体の両光学異性体それぞれをモデル P450 導入大腸菌にて微生物変換を行い、生成物を GC-MS を用いて分析すると、リモネンの 2, 3, 6, 9 位が単独または複数個所が酸化された化合物が検出される。これらの酸化物でも最も特徴的なのは 3 位酸化物で、S 体では 6%なのに対して R 体では 37%検出される。MD シミュレーションで R 体と S 体のリモネンの酸化部位と P450 の活性部位であるヘム酵素のコンタクト率について解析を行うと、実験と同様に R 体の 3 位コンタクト率が S 体に比べ有意に高い値をとることが示される。以上の結果により、MD シミュレーションがリモネンの光学異性体の違いによる反応性の違いを正しく判別できる精度を持つことが確認された。

次に、P450 酸化反応の位置選択性を向上させるため、野生型 P450 の MD シミュレーション結果を用いて以下のような解析をおこなった。まず、MD シミュレーションから得られた全立体構造集団から、目的反応物（カルベオール）の酸化位置に相当するリモネン 6 位水素とヘム酸素がコンタクトしているドッキング構造集団（6 位構造群）を抽出し、各反応副生成物についても同様に構造群の抽出をおこなった。目的反応物のドッキング構造を維持しつつ、反応副生成物のドッキング構造を不安定化させるため、6 位構造群中ではリモネンとコンタクトせず、その他の構造群中ではコンタクトする P450 のアミノ酸残基を推定した。推定したアミノ酸残基 3 か所を置換候補とし、それぞれに野生型と異なるアミノ酸を変異導入した改変酵素を作製および機能評価した。その結果、野生型ではカルベオールの生成比率が改変酵素では向上した。得られた改変酵素に対して MD シミュレーションを行い、コンタクト率解析をおこなったところ 6 位酸化に対応する水素コンタクト率の増加が確認できた。しかし、実験において主成分を占めた 1,2 エポキシ体に対応するコンタクト率が減少するという実験との不一致も見られた。今後、変異体酵素の実験結果を再現するシミュレーション方法の一般則を確立するため、産総研と共同で計算方法や解析法を検討していく予定である。

並びに、P450 発現大腸菌の宿主改良を行っている。カルボンを生産する過程で律速と想定されるのは、リモネンからカルベオールを生産する P450 を利用した酸化反応である。P450 は一般的に活性が非常に低いことが知られている。原因として、P450 は、活性部位に結合するヘムや P450 レダクターゼからの電子供給、空気中からの酸素分子の供給など複雑なメカニズムにより反応が進行するため、宿主細胞内環境からの影響を非常に受けやすいことが報告されている。そこで、本課題では、P450 反応メカニズムに基づき、カルベオール生産性向上に寄与する有効因子の探索及び、情報解析技術を利用した有効因子の改善を検討した。

まず、リモネンは揮発性物質のため、揮発性物質に適した微生物変換系の構築を行った。反応条件の最適化により、カルベオール生産量を初期条件と比較して約 60 倍向上させた。さらに、P450 反応メカニズムに基づき有効因子の探索を行い、カルベオール生産性向上に寄与する因子を見出すとともに、生産検討を行いカルベオールの生産量をカルボン中間目標生産量まで引き上げることに成功した。見出した因子の中で、ヘムの細胞質内蓄積とリモネンの細胞内外輸送の 2 つを有効性の高い因子として特定した。ヘムは細胞内にて生合成された後、そのほとんどが細胞外へ排出されるため、細胞質内で発現した P450 との結合率が低く、活性の低下を引き起こす。一方で、リモネンは水溶性が極めて低く、細胞内への取り込みが制限されることに加え、細胞外へ排出されやすいため P450 との反応性は非常に低い。そのため、ヘム及びリモネンの排出に関与する輸送体を欠損させることで、細胞質内高蓄積が可能となり、P450 の反応性が飛躍的に向上することが期待される。現在、東北大学と連携して内膜輸送体の探索及びその欠損株の作製を行い、カルベオール生産性向上について検討を行っている。

9-2 カルボン生産菌構築

カルボンはリモネンを出発物質とした P450、CPR (Cytochrome P450 reductase) 及び CDH (Carveol dehydrogenase) による変換反応で生成される。我々は植物由来のリモネン 6 位水酸化 P450、CPR 及び CDH の 3 種の遺伝子を発現するプラスミドを導入した大腸菌株を用いた検討で、カルボンが生成されることを確認した。しかし、副生物の生成が確認され、カルボンの蓄積量が予想より低いことが判明した。また、P450、CPR 及び CDH 発現量の確認を行ったが、P450 の発現量は SDS-PAGE で検出できないレベルであったため、P450、CPR、CDH の最適発現比を定量的に求めることが出来ない事も開発上の重要な課題であった。そこで発現量比率検討のため、変換酵素を簡便に相対的定量ができる定量プロテオーム解析 QConCAT 法の構築を大阪大学と共同で行った (図 2.3.3.3-4)。QConCAT 法の構築は測定したい 5 種のタンパク質 (P450: 1 種、CPR: 1 種、CPR 複合型 P450: 1 種、CDH: 2 種) の各々単独強発現株のサンプルより、プロテオーム解析でターゲットとするペプチドの選定を行い、選定した測定ペプチドをつなぎ合わせた人工タンパク質 QConCAT を 2 種デザインした。大腸菌で人工タンパク質を発現精製して得た QConCAT タンパク質は、トリプシン分解の後 LC-MS/MS 分析により目的のペプチドを検出できることを確認した。次に、¹³C ラベルした QConCAT タンパク質を発現精製し、約 150 回分の解析が実施できる収量を得た。

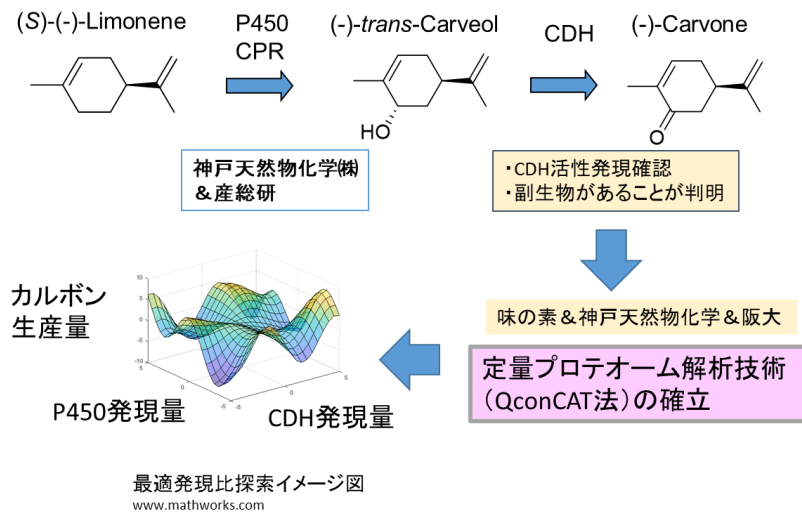


図 2.3.3.3-4 カルボン変換酵素発現株を用いた変換反応と副生物の生成の概略図

P450、CPR 及び CDH の発現量比率の検討には、P450 及び CPR を発現するプラスミドと CDH を単独で発現するプラスミドを用いた。両プラスミドを導入した株で P450、CPR 及び CDH の発現量を QConCAT 法で確認したところ、初めて P450 の発現量を確認することができた。今後はこれらの酵素の最適発現比を求めることにより、カルボン蓄積量向上を試みる予定である。

9-3 リモネン生産菌構築

カルボン生産における重要な中間体であるリモネンの生産菌の高発現株を取得するために、我々は①リモネン生合成経路の最適化、②代謝モデルによる宿主代謝の最適化を最初に行い、その結果を解析した後、③個別酵素遺伝子の改変を行う予定である。①のリモネン生合成経路の最適化には、神戸大((1)-4)が構築したシャーシ株 (*E. coli* 内の MEP 酸経路の遺伝子を欠損させた株)から、OGAB 法 (長鎖 DNA 合成技術) を用いて MEP 酸経路の遺伝子を発現するオペロンと、リモネン生産経路の 2 遺伝子 (植物由来リモネン合成酵素と微生物由来の GPP 合成酵素) を発現させるオペロンが挿入された合計 11 遺伝子を導入した株を構築し、これを基準株とした (図 2.3.3.3-5)。また、リモネンは揮発性が高く、通常の場合で培養を行うと生成したリモネンは細胞毒性を示すと同時に揮発してしまうので、ミリスチン酸イソプロピル (IPM) のようなリモネンが溶けやすい溶媒を培地に添加する培養系を構築した。

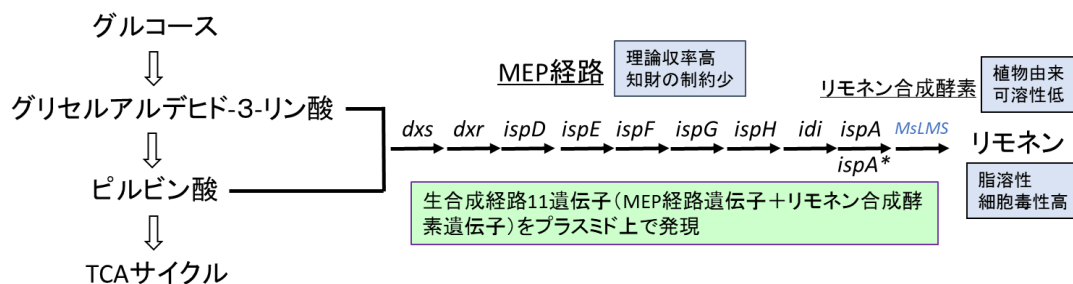


図 2.3.3.3-5 グルコースからのリモネン生産菌構築の概念図

最初に基準株のリモネンの生産性及び解析条件を検討した。リモネンの生産性は、IPM 添加太試験管培養でリモネン生産を確認し、リモネンの光学純度は目的の(S)-リモネン 100%であった。オーミクス解析用の IPM 添加フラスコ培養でも同等のリモネン生産を確認した。メタボローム解析については神戸大のサンプル前処理プロトコールに従い、サンプリング時間の検討を行い、10 時間及び糖枯渇前の 26 時間が解析に適切であると判断した。プロテオーム解析については大阪大にて分析メソッドを構築し、基準株の解析を行い各遺伝子の発現量の確認を行った。また、煩雑なサンプル前処理法の労力軽減及びサンプル調製の均一化のために、味の素(株)で保有する双腕ロボット“まほろ”で前処理検討も現在行っている。

次に、神戸大にて OGAB 法によるリモネン生産菌ライブラリーの構築を行った。初めのライブラリーでは恒常発現型の Strong プロモーター、Medium プロモーター、プロモーターなしの 3 種類が適宜組み合わせられた、Strong-11、Strong-2、Medium-11 の 3 種類を、神戸大の技術により構築した。しかし、Strong-11 は遺伝子過剰発現による負荷が大きく、一部の遺伝子パーツの脱落が起こる現象が確認された。以降は Strong-2 と Medium-11 を対象に実験を進めた。また、Strong-2 は構築できたが生育が極めて遅く、菌体に相当なストレスがかかっていることが示唆された。Medium-11 は問題なく生育し、菌体への過剰なストレスは確認されなかった。これら 2 種類の菌体の配列情報を参考にして新たにライブラリーを構築し、96 株のクローンを得た。このリモネン生産菌ライブラリー株 (96 株) の太試験管培養評価を行ったところ、リモネンを明確に生産した株は 32 株で、最大リモネン生産量は基準株の 13 倍であった。一方、リモネン生産が確認できなかった株を数株解析したところ、目的通りのプラスミドを保持していないことが判明した。現在、神戸大でこのライブラリー株のプロモーター配列を解析中である。

また、東京大学に模擬データを用いた機械学習シミュレーションを依頼し、ライブラリー株に関する基本的な情報提供を行った。現在 MEP 経路の反応順番を加味したモデルの使用を新たに検討中である。

続いて以下の 2 種類のデザインに基づいて新たなライブラリーを構築した。デザイン 1 はリモネン生産能が高い傾向の株に共通して見られたプロモーター配列のパターンより、3 種の遺伝子のプロモーターを固定した。デザイン 2 ではデザイン 1 と同様にすべてのプロモーター配列の組み合わせを維持するように設計した。このうち、デザイン 1 のライブラリー株より 100 株の太試験管培養評価を実施した結果、最大リモネン生産量は基準株の 16 倍で、このライブラリーの 9 割以上は明確なリモネン生産能を示したため、このライブラリーのプロモーター配列を解析することで機械学習に十分な量のデータを収集することが出来ると考えている。

また、オーミクス解析に関しては、最初のライブラリー株より 10 株を選抜し、メタボローム解析のためのサンプル調製 (78 サンプル) を行い、神戸大へ送付し解析中である。プロテオーム解析に関しては、同様に最初のライブラリー株よりメタボローム解析と同じ 10 株を培養し、サンプル調製を実施中である。また、得られた 10 株分のオーミクスデータは神戸大へ提供し、代謝モデルを用いた解析に供する予定である。

(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	
2016	0	0	講演 1	0	0	0	0
2017	0	0	0	雑誌 1	0	0	0
2018 *1	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	書籍 1 (0)	0 (0)
2020 *2	2	0	5	1	0	1	0

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

P450 改変技術とカルボン生産菌構築で各1件特許出願予定。

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	2	0	2

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.3.4 機能性アミノ酸の生産性向上による代謝モデルの有効性検証

担当：長瀬産業(株)、神戸大学

(1) 背景と目的

ストレプトマイセス属細菌は主として土壌中に存在する放線菌の一群で、古くからストレプトマイシン等の抗生物質生産菌として産業利用されている。また、食品産業で大量に使われているトランスグルタミナーゼやグルコースイソメラーゼ等の汎用酵素も本細菌由来である。産業上極めて有用な微生物であるにも関わらず、多くのストレプトマイセス属細菌関連研究はそれらの生産する新規化合物の発見とその生合成機序解析に重点が置かれ、遺伝子工学技術や分子生物学的知見は、大腸菌や酵母のそれらに比べて遅れを取っている状況と言える。長瀬産業(株)は、放線菌の物質生産能力と多種多様な酵素に着目し、長い年月をかけて「ものづくり」のための基盤技術を磨いてきた。この技術を新規バイオ事業創出のための核と位置付け、既に N-STePP® という名称で商標登録も行い、基盤技術をさらに高度化するとともに、有用酵素や有用化学品の実用化を目指している。既に、グループ会社のナガセテムテックス株式会社では、ストレプトマイセス属細菌を宿主として各種酵素を発酵生産し、酵素製品を多数販売している。一方、有用化学品の生産技術については、ストレプトマイセス属細菌の改変技術、酵素に関する知識、培養ノウハウ等の活用が可能と考え、鋭意研究開発を進めている状況にある。

長瀬産業(株)では、新規バイオ事業創出を見込める素材として、現在市場で注目を浴び始めている希少アミノ酸の一種、エルゴチオネイン（以下 EGT）に着目した。EGT はビタミン E の 7,000 倍といわれる強い抗酸化活性により老化防止や免疫力向上が期待されるだけでなく、摂取することで脳へと運ばれ神経の再生を誘導するなど、他の抗酸化剤にはない特徴的な機能が論文等で報告されている。こういった機能をもつことから、健康食品や化粧品素材として既に配合されている他、医薬品や医療材料への用途も提案されている。一方、EGT の市場価格は純品換算で 1 キロ当たり 1,000 万円を超えるものも多く、優れた機能が認知されながらも安価な製造方法が開発されていないゆえに普及していない。そこで長瀬産業(株)では、ストレプトマイセス属細菌が EGT を生合成する数少ない微生物であることに着目し、発酵法による EGT の安価な製造プロセスの開発を目指した。これまでの予備検討において、同菌の EGT 合成遺伝子の発現強化により、発酵法による EGT 生産が可能であることを確認しており、今後は事業化へ向けた生産性向上が課題となっている。糖を主な原料とする場合、生産性向上には EGT 生合成の 3 つの前駆アミノ酸、L-システイン、L-グルタミン酸、L-ヒスチジンの効率的な供給が必要である（図 2.3.3.4-1）が、これら 3 つのアミノ酸すべての供給量を、細胞に負荷（毒性、生育不良等）をかけずに増加させることは容易ではない。しかも、ストレプトマイセス属細菌については、上述の通り学術的知見に乏しいため、大腸菌や酵母のようにコンピュータ上で代謝をデザインして最適宿主を構築することが現時点では不可能である。そのため、本事業を活用して各種オミックスデータの取得及び解析を行い、代謝モデルを構築し、有効性を検証して、目的とする物質（=EGT）の生産量を効率良く増加させる技術の開発を行うことが必須である。ある目的物質を増産するには、従来行われてきた紫外線や化学物質を用いた突然変異の誘発による高生産株取得の方が効果的とする見方もある。しかし、冒頭述べたように、長瀬産業(株)では N-STePP® を新規バイオ事業創出のための核と

位置付けているため、近い将来に開発を計画している他の有用化学品を早期に実用化するためには、代謝モデルの構築は早期に実施しておかねばならない最重要研究課題の一つである。

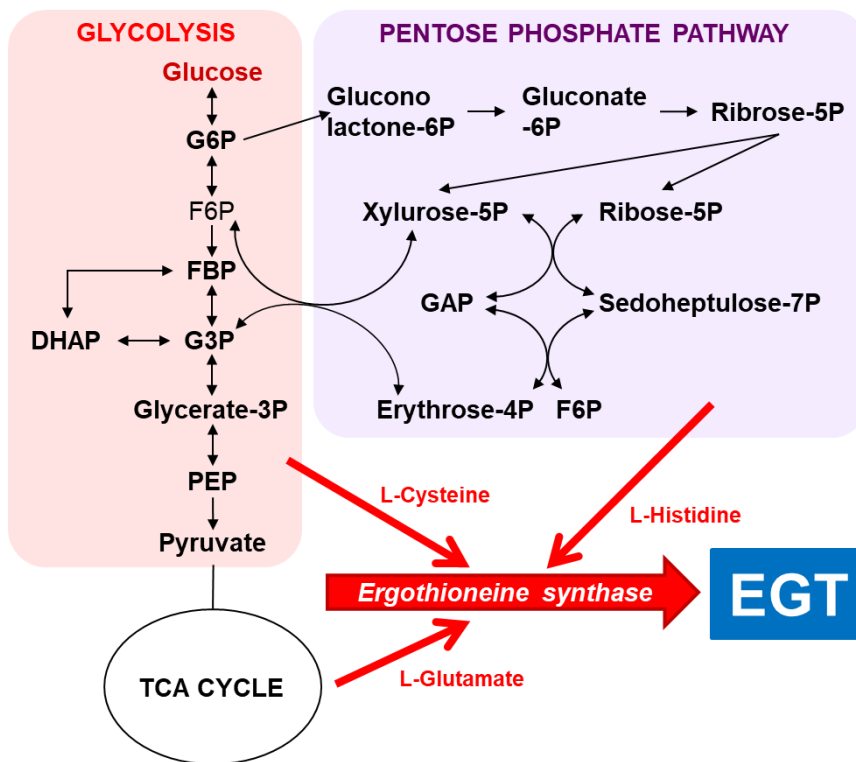


図 2.3.3.4-1 *Streptomyces lividans* によるエルゴチオネイン生合成経路

(2) 位置づけ、目標値

現在の EGT の市場価格（100%品として換算）は、弊社が把握しているもので 1 kg あたり 1,000 万円以上と非常に高価である。また、EGT の微生物生産方法開発は世界中で活発化しており、いち早く安価な供給を実現する、すなわちどこよりも単位当たりの生産量を大きくすることが事業化およびその後のプライスリーダーとなるための最低限の条件である。また、これまでは主要前駆体である L-ヒスチジンを出発原料としたバイオコンバージョン法の開発に関する報告のみであるが、弊社ではより安価な糖からの直接発酵法の開発を目指すことで、製造コストの削減を目指す。しかし、微生物を用いて、糖から複数のアミノ酸を効率よく供給することは非常に困難であり、育種に長い年月を必要とする。そこで本委託事業では、代謝モデルによる *in silico* 解析を活用することで、原料となるアミノ酸や補酵素等の供給を最適化し、EGT 発酵生産菌の開発を高速化する。発酵生産による最終製品の価格を既存製法よりも劇的に下げることが可能な生産量として、最終目標値 (H32) ◆◆ g/L を設定した。また、生産量の間目標値 (H30) は◆◆ g/L とした。

(3) 全体計画

本委託事業の全体計画を以下の表 2.3.3.4-1 に示す。

表 2.3.3.4-1 全体計画（5年間）

事業項目	28年度				29年度				30年度				31年度	32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		
機能性アミノ酸の生産性向上による代謝モデルの有効性検証	生産用培地でのメタボローム解析用サンプル調製方法及び分析方法の確立				トランスクリプトーム解析による実働遺伝子の同定				炭素フラックス解析による主要代謝経路の解明				代謝デザインに基づく宿主改良と生産性検討による代謝モデルの検証	
	生産用培地でのメタボローム解析による代謝副産物の同定				不要な遺伝子を削除した株の構築				目的物生産量を最大化する代謝ルートへのデザイン					
									デザインに基づく宿主改良とデザインの有効性検証					

平成 28 年度は主要な代謝副産物を明らかにすることを目的として、長瀬産業(株)が独自に保有している菌株および物質生産用プロモーターを利用して、プロモーターの違い、宿主の違い、生育ステージの違い等を考慮して、4 つ以上の異なる条件でメタボローム解析を実施する。特に、メタボローム解析が容易な合成培地とは大きく組成が異なる生産用培地（目的物を実際に生産する際に使用）でのデータ取得を可能とするサンプル調製方法および分析方法を確立する。上記メタボローム解析実施の結果、炭素源がどのような代謝副産物へと浪費されているかを明らかにすることにより、放線菌の主要代謝ルート（解糖系、ペントースリン酸経路など）を推定する。さらに得られたデータを代謝モデルへフィードバックし、放線菌の生育に必須および不要な代謝ルートを明らかにする。

平成 29 年度は、前年度に引き続き 10 以上の異なる条件でメタボローム解析を実施するとともに、上記同様長瀬産業(株)が独自に保有している菌株および物質生産用プロモーターを利用して、10 以上の異なる条件でトランスクリプトーム解析を実施する。これらのデータから遺伝子発現の変化と代謝の変化を明らかにし、主要代謝経路に関与すると考えられている複数の候補遺伝子から実際の代謝機能に関与する（実際に代謝反応を触媒している）“本物”の遺伝子と実際の代謝機能には関与していない（実際にはデータベース上でのアノテーションとは異なる）“偽物”の遺伝子を割り出す。そして、“本物”遺伝子の発現と代謝副産物の関連を明らかにする。得ら

れたデータを代謝モデルへフィードバックするとともに、放線菌代謝モデルに基づき、不要な遺伝子を削除した放線菌株を5株以上育種する。

平成30年度は、上述のメタボローム解析、トランスクリプトーム解析の結果をサポートするため、これらに加えて炭素フラックスを解析することで、放線菌の炭素源代謝（主としてグルコースを想定）の主要ルートを解明する。そのために、長瀬産業㈱がこれまでに改良を重ねてきた宿主菌株および目的物生産遺伝子を導入した生産菌株を利用して、6つ以上の異なる条件で炭素フラックス解析を実施する。この炭素フラックス解析によって目的物生産量を最大化する代謝ルートや次点ルートをデザインする。このデザインに従って放線菌に改良を加え、収率の向上を図ると同時にデザインの有効性を検証するデータを取得する。得られたデータを代謝モデルへフィードバックするとともに、代謝プロファイル、遺伝子発現プロファイルと合わせて、別の目的物を効率良く生産することができる宿主を今後の研究開発のために複数個デザインする。

平成31、32年度は、デザインに基づいて宿主を改良し、その生産性に与える効果を検証する。この繰り返しにより、放線菌代謝モデルの確立と機能性アミノ酸を高生産する放線菌株を開発する。

(4) 実施体制

本委託事業の実施体制を図2.3.3.4-2に示す。長瀬産業㈱はEGT生産に用いる宿主株、およびEGT生産を阻害する要因を解除した突然変異株について全ゲノム解析を担当している。ストレプトマイセス属放線菌のトランスクリプトーム解析(RNA-seq)については、解析方法の構築も含めて産総研の木村・三谷グループの協力を得ている。そしてメタボローム解析については、解析方法の構築も含めて蓮沼グループの協力を得て研究を進めている。

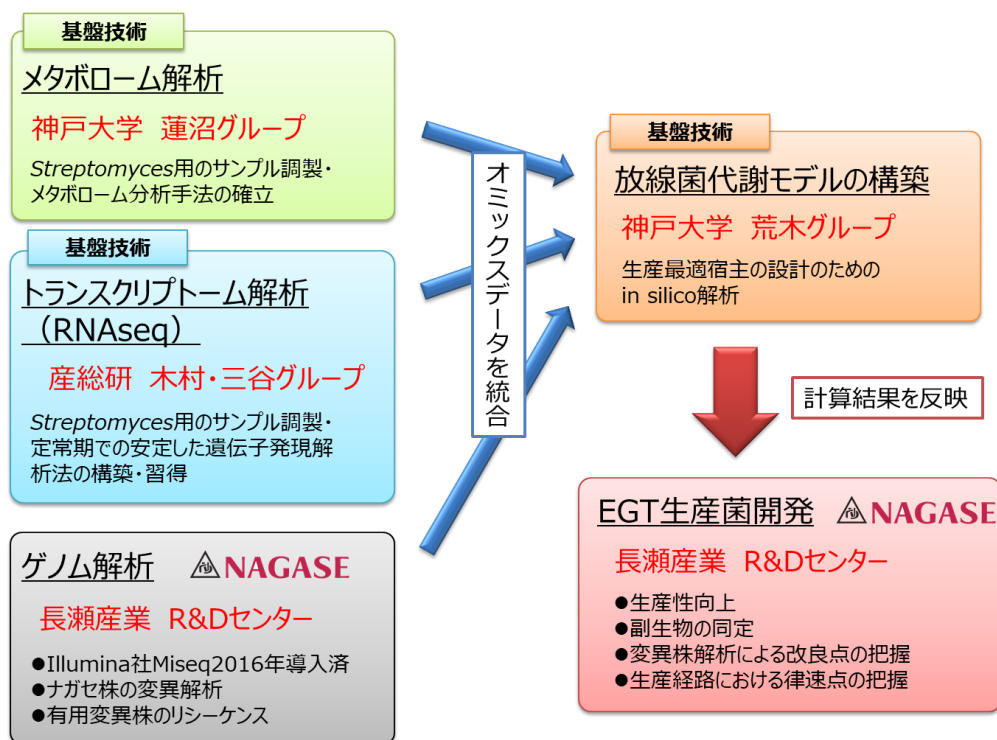


図 2.3.3.4-2 実施体制図

(5) 運営管理

長瀬産業㈱・ナガセ R&D センターから神戸大学の六甲台キャンパス（灘区）、統合研究拠点（ポートアイランド）までは、車でわずか40分程度の距離である。そのため、Eメールや電話での頻繁な情報交換の他に、3か月に1回以上の頻度で関係者が集まって研究に関する進捗報告および議論を重ねている。また、RNA-seq に関しても、Eメールや電話での頻繁な情報交換の他に、研究員を産総研に派遣して実験方法の習得を図った他、機会を見つけては互いの研究室を訪れて、実験データの解析方法および解析結果、研究の方向性等について積極的に議論を重ねている。

(6) 実施の効果

長瀬産業㈱では、本委託事業開始前に物質生産の宿主として用いる重要な株に関して本格的なRNA-seq解析を行っていなかったため、効率的なRNA抽出方法の開発から結果の解析までの一連の研究開発に関して、種々の細菌からのRNA抽出等の取り扱い経験が豊富でその分野の専門家である産総研の木村・三谷グループの協力を得られて進められていることによって、生産株が物質生産を行う際の網羅的な遺伝子発現情報を得ることが可能となった。また、メタボローム解析についても、先駆的研究を続けている神戸大・蓮沼グループの協力を得ており、RNA-seq同様に、主要な代謝マップおよび代謝産物についてもまだ未解明である当社株の主要な代謝経路の化合物を定量することが可能となり、情報解析に必要なデータを取得することが可能となった。さらに、後述する代謝モデルの構築により、目的物質生産を最大化するために改変すべき遺伝子候補のリストを得ることができた。これらは我々の知識だけでは得られなかった結果である。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
(3)-4 機能性アミノ酸の生産性向上による代謝モデルの有効性検証	◆◆ g/L	◆◆ g/L	○ (中間目標値◆◆ g/Lを上回ったため)	最終目標値◆◆ g/Lを達成するための代謝モデルに基づいた菌株改良

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
(3)-4 機能性アミノ酸の生産性向上による代謝モデルの有効性検証	◆◆ g/L	◆◆ g/L	△ EGT ◆◆ g/Lに相当する前駆体ヒスチジンを◆◆ g/L生産済み

(9) 研究開発の成果と意義

本委託事業では、ストレプトマイセス属放線菌用のメタボローム解析手法の確立に取り組んだ（平成 28 年度）。長瀬産業(株)の目的物質である EGT を大量生産するためには、実生産用の培地を使用した際の宿主細胞の代謝および代謝産物を把握する必要がある。また、代謝モデルを構築する上でも、細胞内外の代謝産物量は重要かつ必須のデータである。しかしながら、栄養源および塩類を高濃度に含む実生産用培地からメタボローム解析に適したサンプルを調整可能かどうかは未知であった。そこで、神戸大・蓮沼グループと協力しながら、塩類の影響、細胞洗浄工程の省略可否、サンプルの希釈倍率等、一つ一つの工程を着実に確認しながら検討を進め、実生産用の培地使用時でも信頼度の高い解析結果を得ることに成功した（図 2.3.3.4-3）。EGT の主要前駆体であるヒスチジンの高生産株（HA 株）を親株として、ペントースリン酸経路上のトランスケトラーゼ遺伝子を破壊することで、改変の目的通り、同反応の上流代謝物リボース-5 リン酸、リブロース-5 リン酸などが有意に増加するとともに、ヒスチジン合成経路上の代謝物の増加が確認された。

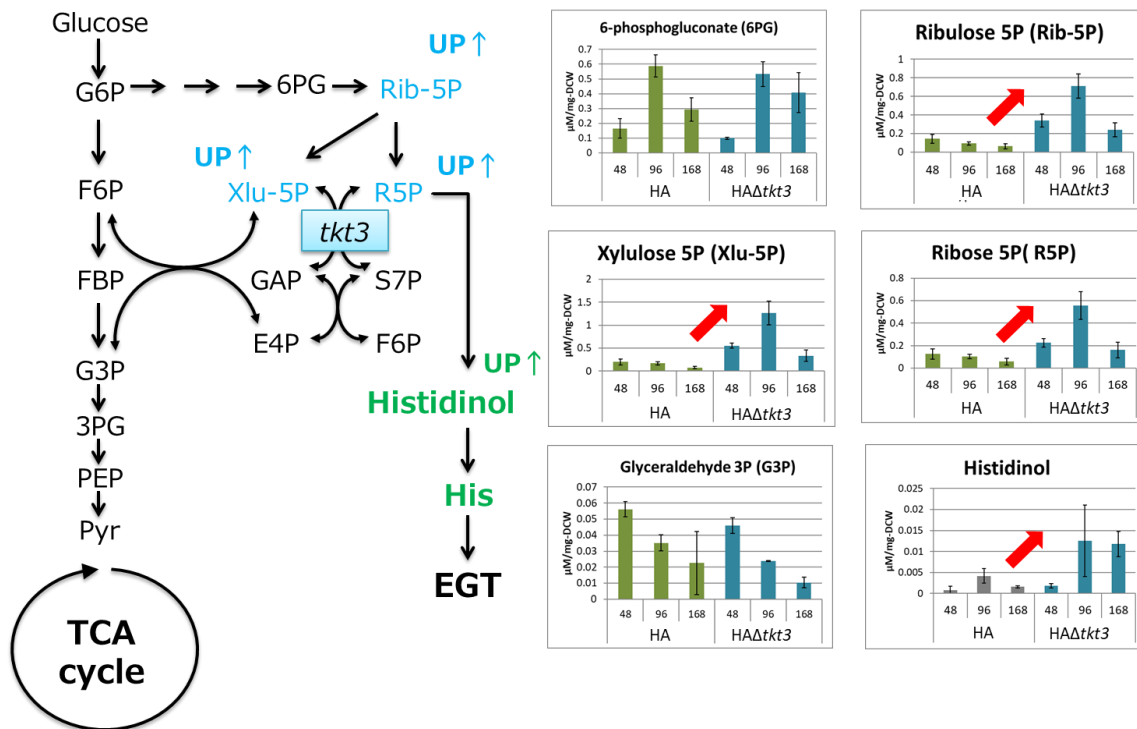


図 2.3.3.4-3 *S. lividans* TK64 株のメタボローム解析結果

次に、産総研の木村・三谷グループと協力し、ストレプトマイセス属放線菌のトランスクリプトーム解析(RNA-seq)方法を新たに開発した（H29 年度）。その理由は二つあり、一つ目は、本属細菌は対数増殖期（培養開始から約 1-2 日間）には物質を生産する機能が活発に働かず、定常期（培養開始から約 2 日後）になると急激に物質生産を開始するため、通常の RNA-seq 用サンプル（対数増殖期の RNA）では、物質生産に関与する遺伝子ではなく、生育に深く関与する遺伝子の挙動を主に検出する可能性が高いからである。二つ目は、定常期の細胞から抽出した RNA は分解されていることが多く、RNA-seq には適さないことが知られていたため、このような RNA でも解析可能な条件（RIN 値、電気泳動パターンなど）を新たに決定する必要があったからである。

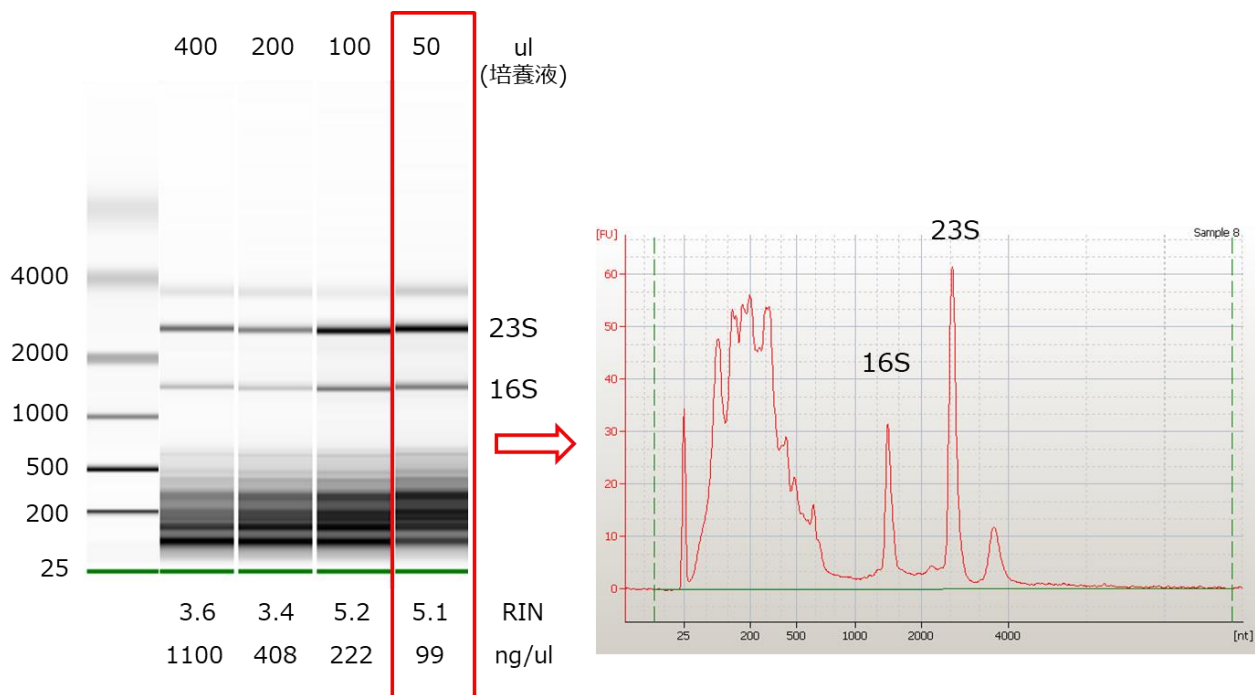


図 2.3.3.4-4 RNA-seq 用サンプルの解析結果

EGT 生産菌を培養して定常期に入った培養液から菌体を分離し、RNA を抽出したところ、図 2.3.3.4-4 に示す通り、低分子 RNA がかなりの量で存在していることを確認した。この低分子 RNA の混入により、RNA の品質を示す指標である RIN 値も、RNA-seq に適するとされる値 (7.0 以上) に比べかなり低い 3.5~5.0 程度であった。しかし、16S rRNA、23S rRNA とともに、それらのピーク自体は非常にシャープで分解されている様子は見られないことから、HA 株の培養 48、96 時間目 (定常期) のサンプルで RNA-seq が可能かどうかの検討を実施した。得られたトランスクリプトームデータのうち、ハウスキーピング遺伝子に着目した。各サンプルの RIN 値に対する、4 種のハウスキーピング遺伝子の発現量 (TPM 値) をプロットし、RIN 値と TPM に相関関係があるかを調べた (2.3.3.4-5)。その結果、TPM と RIN 値に相関関係は認められず、確認された低分子量 RNA は mRNA 等の分解物ではないことが示唆された。また、ヒスチジンを高生産する HA 株では、細胞内の鉄などの金属の枯渇応答に関連する遺伝子が 17 種類誘導されていた。この転写応答は His を蓄積させた他の微生物でも報告されており、ヒスチジンがもつ強いキレート効果によるものと考えられた。このように、既知の知見とも合致する転写変動を捉えられていることから、信頼し得る RNA-seq データを取得可能な放線菌用の RNA 抽出法が開発できたと考えられた。また、放線菌の RNA 抽出サンプルのクオリティ評価の指標として、RIN 値に代わるものが必要であるという課題も明らかとなった。

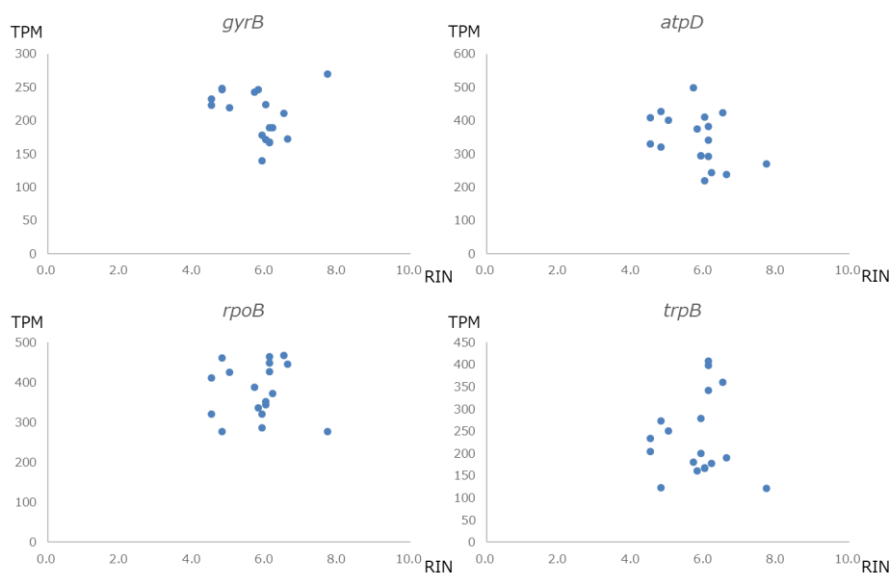


図 2.3.3.4-5 RNA-seq 用サンプルの解析結果

上述のように、弊社放線菌用のメタボローム解析法およびトランスクリプトーム解析法を開発し、メタボローム解析とトランスクリプトーム解析で取得したデータについては、本プロジェクトの目的である生物情報蓄積のために既に提供しており、のちのちのモデル高度化に活用されることを期待している。これらオミックス解析と並行して、長瀬産業(株)では、神戸大・荒木グループと共同で代謝モデルを活用した EGT 生産菌の育種についても検討を行った。EGT 生産用宿主として用いている *S. lividans* TK64 株の代謝モデルが存在しないため、まずは *S. lividans* と分類上は同種である *S. coelicolor* A3(2) 株の公開ゲノムスケールモデル (GSM) でフラックスバランス解析を実施した。これにより、EGT 生産株の最適な育種法のシミュレーションを行い、改変候補遺伝子リストを取得した。現在、予測された改変の有効性を検証中であるが、一部の改変で予測通り有意に生産性が向上することが確認できている。

また、弊社使用の *S. lividans* TK64 株の代謝モデル構築にも取り組んでいる。具体的には、神戸大荒木グループが開発している、ゲノム情報から代謝モデルを生成可能なソフトウェアである GSM generator を、弊社で取得した *S. lividans* TK64 のゲノム情報に適用した。現在は得られた TK64 モデルのキュレーション、及ぶ動作確認を実施中である。

(10) 成果の普及

年度	論文			その他外部発表			受賞実績 *4
	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 *3	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	0	0	0	1	0
2018 *1	0 (0)	1 (1)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1)
2020 *2	0	1	3	0	0	5	1

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

*3：顧客へのサンプル提供

*4：2018年度生物工学会トピックスに選定

(11) 知的財産権などの確保に向けた取り組み

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016 *1	1	0	0
2017 *1	0	0	1
2018 *2	0 (1)	0 (0)	0 (1)
2020 *3	2	0	2

*1：本委託事業開始前の出願

*2：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*3：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.3.5 有用イソプレノイドの生産性向上による代謝解析技術の有効性検証

担当機関：神戸大学、担当機関A、担当機関B

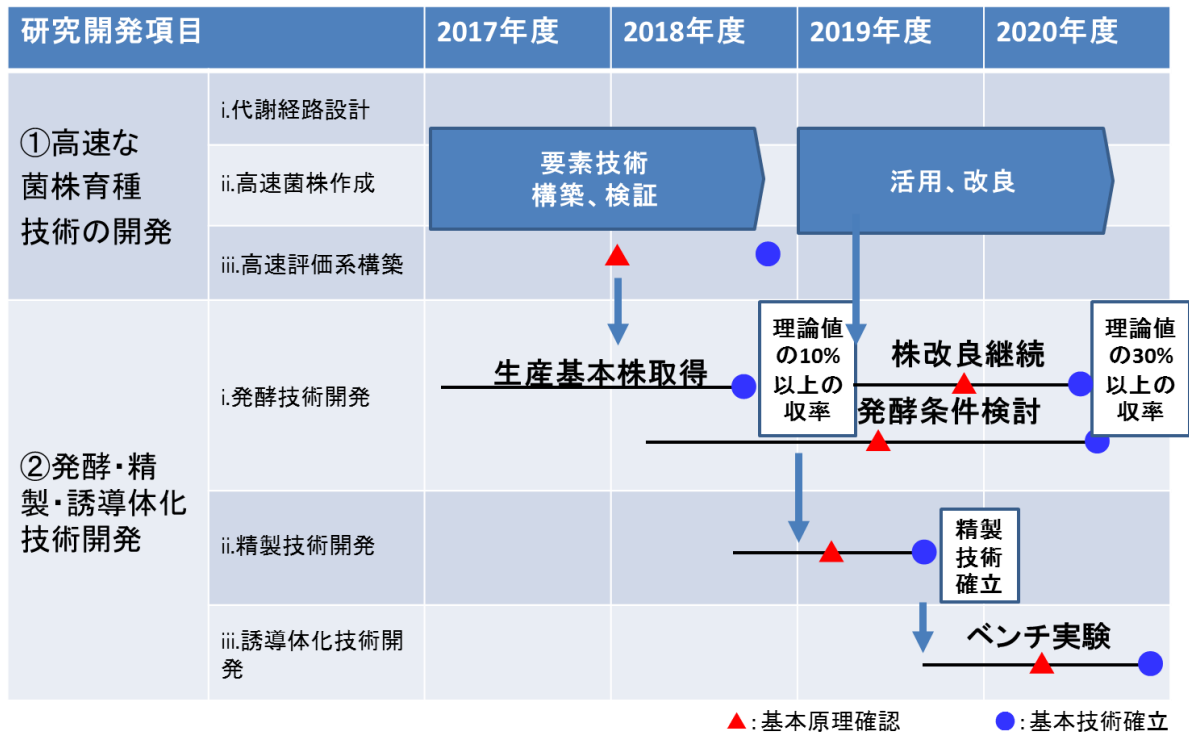
(1) 背景と目的

イソプレノイドとは 2-メチル-1,3-ブタジエン骨格を基本構造単位として生合成される天然物の総称であり、これらには生体内において代謝、構造形成、及び、情報伝達などの重要な機能を有する分子が少なくなく、医薬品、化粧品、または、栄養補助食品としての実用化が期待されている。また、現状の産業において高分子化合物の原料となっている天然資源の枯渇やそれらの使用による環境悪化といったリスクを回避するため、高分子化合物の原料や燃料としての活用が期待されるイソプレノイドも存在する。しかしながら、こうした化合物は少なからず複雑な構造をとるがゆえに天然資源からの抽出や化学合成は容易ではない、または、天然資源を用いる既存の物質や技術を代替できるほどの性能や生産レベルに達していない、という理由から実用化される例は限られている。我々は産業上有用な各種イソプレノイドの高効率かつロバストな生産に利用可能な共通プラットフォームとなる微生物菌株の構築を目指しており、本経路の重要中間体であるイソペンテニルピロリン酸（IPP）及びジメチルアリルピロリン酸（DMAPP）を効率よく生産しうる代謝経路を合成生物学的手法により構築することを目的として研究に取り組んでいる。しかしながら、これらの中間体の蓄積は細胞内で厳密に制御されていることから、IPP 及び DMAPP を生産する代謝経路の構築とそのポテンシャル評価は容易ではないと考えられる。このため、本研究を進めるにあたり、標的とするイソプレノイドとして、産業上の有用性があり、IPP または DMAPP の蓄積を回避するためのカーボンシンクになりえる化合物を検討して、標的イソプレノイドを決定し、その対原料重量収率をもって生産能力の指標とすることとした。

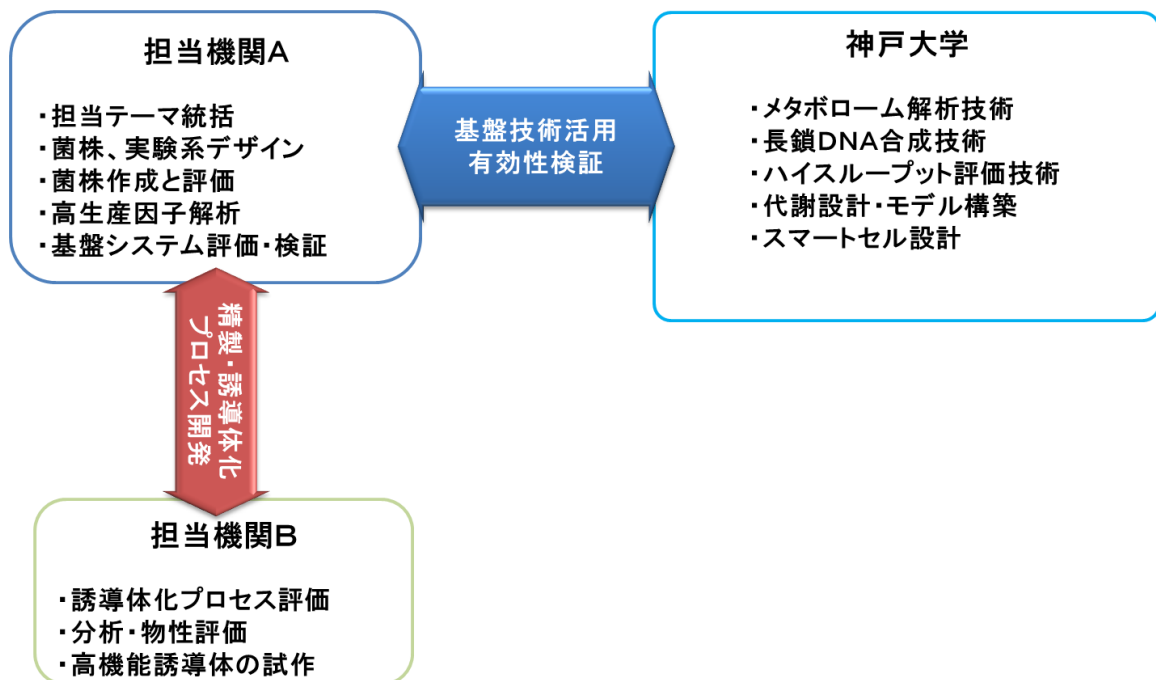
(2) 位置づけ、目標値

	目標	根拠
中間目標	原料から標的イソプレノイドへの変換収率が理論値の 10%以上となる微生物菌株を構築する。	代表的なイソプレノイドの製造コストに関する文献に記載の発酵成績の 1/3 以上の性能を有する菌株
最終目標	原料から標的イソプレノイドへの変換収率が理論値の 30%以上となる微生物菌株を開発する。発酵・精製の各プロセス、及び、その後の誘導体化プロセスへの適用について、実験室レベルでその実施が可能であることを示す	標的イソプレノイドの製造コストに関する文献に記載の発酵成績を上回る性能を有する菌株

(3) 全体計画



(4) 実施体制



(5) 運営管理

- ・全体会議開催（2回／年）：全テーマについて、進捗、課題、及び、今後の予定を共有し、基盤技術の開発状況やその有用性、及び、有効性検証テーマにおける基盤技術の活用効果や課題について共有・意見交換する。

- ・テーマ進捗会議（1回／月）：本テーマの進捗及び課題をテーマ関係者で共有し、技術課題に対する各種基盤技術の活用可能性などを踏まえ、その後の計画を議論する。

(6) 実施の効果

発酵生産したイソプレノイドを原料とする高機能誘導体が実用化された場合、2030年ごろにはイソプレノイド生産量が大きく増加し、テーマ実施者は当該市場にて主要なポジションを占めると期待される。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
有用イソプレノイドの生産性向上による代謝解析技術の有効性検証	原料から標的イソプレノイドへの変換収率が理論値の10%以上となる微生物菌株を構築する。	原料から標的イソプレノイドへの変換収率が理論値の1.6%である微生物菌株を取得した。	△（律速反応の酵素を現行より触媒活性の高い酵素に置き換えようとしている。これを改善できれば、目標達成が見込める。）	イソプレノイド経路上の律速反応を解消することで目標達成を見込めると考える。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
有用イソプレノイドの生産性向上による代謝解析技術の有効性検証	原料から標的イソプレノイドへの変換収率は理論値の1.6%である微生物菌株を取得した。	原料から標的イソプレノイドへの変換収率が理論値の30%以上となる微生物を開発する。	これまでの検討結果、及び、先行技術文献の情報から、イソプレノイド経路の流束、及び、一部の酵素活性について目標を達成するためのキャパシティーは十分と考える。
有用イソプレノイドの生産性向上による代謝解析技術の有効性検証	発酵槽におけるイソプレノイド生産条件の検討を実施した。	発酵・精製の各プロセス、及び、誘導体化プロセスへの適用について、実験室レベルでその実施が可能であることを示す。	菌株開発を進めつつ、発酵及び誘導体化の基礎条件検討を進める計画である。

(9) 研究開発の成果と意義

①高速な菌株育種技術の開発

i) 代謝経路設計 (神戸大学、担当機関A)

標的イソプレノイド発酵生産の代謝経路をデザインするため、既報の反応を組み合わせた代謝経路で収率を最大化する代謝流束バランスのデザインを行い、次いで、新規反応を盛り込むことでより高効率な代謝経路のデザインに取り組んでいる。

a) 既存反応の組み合わせによる代謝経路の設計

代謝経路をデザインするため、公開されている代謝モデルを用いて Flux Balance Analysis (FBA) を行い、標的イソプレノイドを最大収率で生産する代謝流束分布、及び、そのときの収率を予測した。このとき、代謝モデルにおけるイソプレノイド経路を構成する各反応について、反応式の妥当性を論文情報に照らして確認したところ、3つの反応について反応式を修正またはモデルから削除を行うことが必要であった。なお、イソプレノイド合成経路として、メバロン酸経路 (MVA 経路)、または、非メバロン酸経路 (MEP 経路)、あるいは、その両方を活用するケースに分け、それぞれについて制約条件を詳細に変化させることによる代謝流束バランスの変化を解析した。

b) 新規反応を取り込んだ代謝経路の設計検討

嫌気条件におけるイソプレノイド合成の効率よい代謝経路をデザインするため、主要代謝経路中間体のうち新規反応も含めた数段の反応経路にて標的イソプレノイドへの高い収率及び高いエネルギー収支のバランスが期待できる化合物とその経路を M-Path にて予測し、その反応経路を成立させるための酵素候補を探索している。

ii) 高速菌株作製 (神戸大学、担当機関 A)

各種の代謝改良株の作製において、一部の代謝改良についてはゲノム組込みを活用する。このため、効率よいゲノム上の遺伝子加工方法としてゲノム編集方法を試験している。具体的にはゲノム編集方法を活用して 2 種類の遺伝子を一度に破壊できることを確認した。

iii) 高速評価系の構築 (神戸大学、担当機関 A)

標的イソプレノイド高蓄積菌株を効率よく構築するため、各種遺伝子の発現量や代謝産物の蓄積量などのマルチモーダルなデータを効率よく取得し菌株の性能を高速に評価・解析する手法の構築に取り組んでいる。まず、実験室における標的イソプレノイドの測定にはガスクロマトグラフィーを利用することとして分析条件を構築した。しかしながら、当初、イソプレノイド定量のスループットは高くなかったため、分析条件を抜本的に見直したところ、分析時間を約 1/6 に短縮することが可能になり大幅にスループットが改善した。また、標的イソプレノイド以外の代謝産物の蓄積を把握するためのメタボローム解析にも取り組んでいる。現状はキャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) を用いたターゲットメタボロームにより多種類の化合物を一斉に分析することが可能となっている。しかしながら、分析のスループットは高くない。この理由は、主に、サンプルの前処理に時間を要することと、マニュアルでのピーク検出を行っていることによると考えられる。このため、現在、神戸大学で取り組んでいる LC-MS の自動前処理装置導入やピーク自動検出技術の実装がスループット改善に貢献することが期待される。

②イソプレノイド発酵・精製・誘導体化技術開発

i) 発酵技術開発 (担当機関 A、神戸大学)

本テーマで用いる微生物菌株は標的イソプレノイドの合成に必要な酵素遺伝子を持っていないので、異種由来の酵素遺伝子を導入した菌株 (X01 株) を作製し、目的とするイソプレノイドの蓄積を確認した。その後、本株を元にイソプレノイド合成経路を構成する各種酵素の発現を強化した菌株を作製し、それらのイソプレノイド蓄積量等を解析した。その結果、異種由来遺伝子に加え、当該微生物菌株内在の 2 種類の遺伝子を発現強化した菌株 (X02 株) でイソプレノイド蓄積量が X01 株の約 20 倍に増加する結果を得た。この X02 株について、イソプレノイド合成経路及びその他の経路に特化したメタボロームを測定したところ、代謝の分岐にあたる部分が律速反応である可能性があることを見出した。そこで、その分岐においてイソプレノイド生産に流束が増加する育種を行いつつ、合わせてイソプレノイド合成経路の酵素遺伝子を一部発現強化した菌株を取得した。この菌株は X01 株の約 26 倍高い標的イソプレノイド蓄積量を示し、理論値の 1.6% の収率にて標的イソプレノイドを蓄積していた。今後これらの株のメタボロームを取得し解析を進め、各反応において触媒活性の高い異種由来酵素や変異体の遺伝子を発現強化することにより標的イソプレノイド及び各種代謝物の蓄積量を測定したのち、計算的に律速反応や最も効率の良いイソプレノイド合成経路をデザインできるか確認する予定である。

ii) 精製技術開発 (担当機関 A、神戸大学)

今年度後半に発酵槽で標的イソプレノイドを試作し、そのイソプレノイドを担当機関Bにて評価する計画である。現在は、先行技術文献等でその精製方法を調査しており、実際の検討は発酵槽での試作に合わせて実施する計画である。

iii) 誘導体化技術開発 (担当機関B)

まずは、今年度後半に計画している発酵槽で試作する標的イソプレノイドを用いて誘導体化の反応性を確認する計画である。その後は標的イソプレノイドから誘導体化した化合物の物性を確認した上で、標的イソプレノイドの品質及び誘導体化の条件によるイソプレノイド誘導体の品質への影響を踏まえ、ラボレベルでの誘導体化の基礎条件を確立する計画である。

(10) 成果の普及 (2018年7月11日現在)

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	0	0	0	0	0
2018 *1	0	0	0	0	0	0	0
2020 *2	0	0	1	0	0	0	0

*1 : 2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2 : 2020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 (2018年7月11日現在)

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	0 (1)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	2	0	2

*1 : 2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2 : 2020年度末までに予定している累積件数

2.3.3.6 コリネ菌を用いた有用芳香族化合物の生産性向上による代謝解析技術の有効性検証

担当；地球環境産業技術研究機構、神戸大学

(1) 背景と目的

現在ほとんどの芳香族化合物は原油等の化石資源を原料とした化学法によって生産されているが、再生可能な非可食バイオマス为原料としたバイオ法による生産に転換することで環境負荷の低減、CO₂ 排出量の削減が可能になる。しかし芳香族化合物の多くは高い細胞毒性を示すことや、生合成経路の反応ステップ数が多いことから、菌体増殖を伴う通常の発酵法では生産性は極めて困難であると予想されてきた。今回ターゲットとして選定した芳香族化合物の生産においても、通常の増殖依存型の発酵法ではその細胞毒性により高い生産性は実現できておらず、実用化レベルにはない。

一方で、我々地球環境産業技術研究機構(以下、RITE)が用いるコリネ菌は非可食バイオマス由来の原料を用いる場合に発生する発酵阻害物質(フルフラールや有機酸)に耐性であるだけでなく、様々な芳香族化合物に耐性を示すことがわかっている。実際、溶媒耐性菌とされる *Pseudomonas putida* S12 株などと比較してコリネ菌は様々な芳香族化合物に対して耐性が強いことを我々独自の検討により見出している。また、コリネ菌は培養槽に高密度充填し増殖を停止させた状態でも細胞が溶菌しにくく代謝活性を維持することがわかっている。我々はこの特徴を活かして高密度菌体反応技術(RITE Bioprocess®)を開発した。この技術を応用することでこれまでにアルコール類、有機酸類、アミノ酸類の超高生産を達成している。また、一部の芳香族化合物生産にもこの技術は応用可能で、すでに複数の論文等でその実績を公開済みである。このように芳香族化合物耐性に優れたコリネ菌を宿主として用いることは、目的とする芳香族化合物を高生産するには大きなメリットになる。

本研究開発項目では、コリネ菌の代謝モデルの構築を目指すとともに、この代謝モデル解析を通じて産業上価値の高い化合物の高生産株の開発を行う。糖を原料として目的の芳香族化合物を生産する場合、まず「解糖系」と「ペントースリン酸経路」の2つの代謝経路を利用する。続いて「シキミ酸経路」を経由した後、数ステップの酵素反応を利用した経路が、生産経路候補として挙げられる。このような従来の生産株構築手法に加え、代謝モデル解析等から提案される代謝経路をさらに反映させることで高生産株の開発を目指す。従来法とは異なるアプローチで育種を進めることでこれまでの生産レベルを大きく超えられると期待できる。

(2) 位置づけ、目標値

(位置づけ)

本研究開発では市場規模が大きいにもかかわらず、通常の発酵法では生産が困難な有用芳香族化合物をターゲット化合物として選択した。この化合物は医薬品、香料等の原料、ポリマー原料等、非常に幅広い用途がある。事業化後の販売先は、化学メーカー、医薬品メーカー、香料メーカー、ゴムメーカー、食品メーカー等を予定している。

(目標値)

中間目標値(H30)

- ・ 芳香族化合物耐性に関連する変異を集積し、高耐性株を獲得する
- ・ 代謝モデル解析システムから得られた生合成経路（2 経路以上）を反映させた生産株を構築、生産性の検証(5 g/L 以上)とオーミクス解析データのフィードバックを繰り返すことによりさらに高精度な解析システムを開発する

最終目標値(H32)

- ・ コリネ菌に特化した代謝モデル解析システムを確立し、生産性向上による代謝解析技術の有効性を検証する
- ・ 目的芳香族化合物を 10 g/L 以上生産可能な高生産株を育種する

(3) 全体計画

表 2.3.3.6-1 全体計画

		2016年度	2017年度	2018年度	2019年度	2020年度
2.3.3.6.1 代謝と異し産種 変映生育	・壊産育 化破生の 強子の株 現伝よ本 発遺に基 種(RITE)	設な一 路適ソ 経最子 謝と伝 代計遺 ス	・壊産育 化破生の 強子の株 現伝よ本 発遺に基 種	合本性 族産生 香生の 芳物株 検証	有統生育 のを高 のをの 項目の 各効合 産種 討	有統生育 のを高 のをの 項目の 各効合 産種 討
	ゲノム ノよ關 全析性 にに 変異 特定 (RITE)	解耐す の連 ムる ノよ關 ゲノム にに 変異 特定 (RITE)	解耐す の連 ムる ノよ關 ゲノム にに 変異 特定	變に性 連積耐 關集高 性の育 耐異よ 株	株さ 基本 反映 性 生等 へ生 産等 せ討	株さ 基本 反映 性 生等 へ生 産等 せ討
2.3.3.6.2 菌しモ析ムと ネ化謝解テ立 リ特代ルス確 コにたデシの有	オ一ミク 解析得 の供、ル 代取、開 有取、開 証取、開 (RITE・神 戸大)	オ一ミク 解析得 の供、ル 代取、開 有取、開 証取、開 (RITE・神 戸大)	オ一ミク 解析得 の供、ル 代取、開 有取、開 証取、開 (RITE・神 戸大)	代謝改 変の 株の 提案、 構築 の有 効性 検証	代謝改 変の 株の 提案、 構築 の有 効性 検証	代謝改 変の 株の 提案、 構築 の有 効性 検証
	代謝有 効性 の 証 (RITE・神 戸大)	代謝有 効性 の 証 (RITE・神 戸大)	代謝有 効性 の 証 (RITE・神 戸大)	代謝改 変の 株の 提案、 構築 の有 効性 検証	代謝改 変の 株の 提案、 構築 の有 効性 検証	代謝改 変の 株の 提案、 構築 の有 効性 検証
2.3.3.6.3 遺列よ質調確 立	蛋白質高 現遺伝子 列の設計 (産総研)			ゲノム配 か代謝關 連遺伝子 現量予測 低発現し いを高蛋 をせる白 配列た 設計		
	遺伝子の 改変の 有効性 検証 (RITE)			コリネ菌 の蛋白質 現量確認 で發 現確認	株さ 基本 反映 性 生等 へ生 産等 せ討	株さ 基本 反映 性 生等 へ生 産等 せ討
2.3.3.6.4 C5 排出輸 送体探索	大腸菌を いた、の ネ菌コ排 体探索出 (東北大)			排体ライ 出リ用 の排を の排出 の特定		
	コ排有 効性 の 証 (RITE)		目的物 驅体 タゲ として 選定	生株構 情報提 コネ菌 産株の 効性有 検証	株さ 基本 反映 性 生等 へ生 産等 せ討	株さ 基本 反映 性 生等 へ生 産等 せ討

(注)プロジェクト開始当初は 2 つの大開発項目だったが、2018 年度から新たに産総研、東北大とも連携を開始したため、大開発項目を追加した。

(4) 実施体制

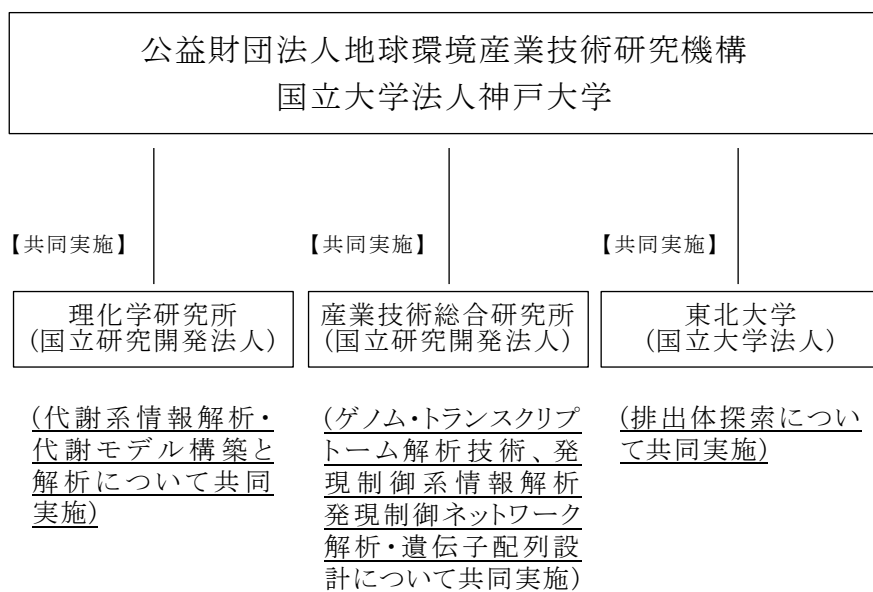


図 2.3.3.6-1 体制図

(5) 運営管理

開発テーマの進捗管理のためこれまでに以下の会議・個別打合せを行った。

表 2.3.3.6-2 運営管理に関わる会議・打合せ

開催日	場所	会議
H28年10月24日	神戸大	知財合意書等についての説明・検討会
H28年12月12日	神戸大 統合研究拠点	神戸拠点会議
H29年1月10日	神戸大 六甲台	メタボローム解析条件についての個別打合せ
H29年1月30日	神戸大 統合研究拠点	代謝モデル構築についての個別打合せ
H29年1月31日	川崎	技術推進委員会
H29年6月21日	Web 会議	進捗状況報告
H29年7月19日	神戸大 統合研究拠点	神戸拠点会議
H29年7月31日	Web 会議	メタボローム解析条件についての個別打合せ
H29年8月9日	産総研 つくば	トランスクリプトーム解析条件について個別打合せ
H29年8月28日	神戸大 統合研究拠点	プロジェクトにて開発中のツールの技術説明会
H29年10月12日	横浜 パシフィコ横浜	バイオジャパン
H29年10月16日	神戸大 統合研究拠点	神戸拠点会議
H29年10月20日	大阪御堂橋	知的財産化説明会
H29年11月27日	Web 会議	モデルの有効性検証について個別打合せ
H29年11月29日	産総研 つくば	微生物全体会議
H29年12月27日	神戸大 六甲台	研究進捗ヒアリング
H30年1月12日	Web 会議	C05 連携について個別打合せ
H30年1月26日	京大 神宮丸太町	オーミクスデータ解析について個別打合せ
H30年1月30日	川崎	技術推進委員会
H30年3月28日	Web 会議	C05 連携について個別打合せ
H30年4月17日	神戸大 六甲台	研究進捗と今後の進め方について打合せ
H30年5月2日	RITE	配列設計技術について個別打合せ
H30年5月10日	Web 会議	モデルの有効性検証について個別打合せ
H30年6月12日	神戸大 統合研究拠点	微生物全体会議
H30年6月13日	神戸大 統合研究拠点	C05 連携の進捗について個別打合せ
H30年6月25日	九州大	プロジェクトリーダーとの意見交換

(6) 実施の効果

本研究開発により、高精度化された代謝モデルから理想的な代謝経路を設計できるため、ターゲット化合物を高収率で高生産可能となる。その結果、原単位やエネルギーコスト、濃縮・精製等のダウンストリームコスト、生産時間等が低減され、安価な製品を提供可能となる。また、化石資源を原料として用いたエネルギー消費型の化学的製造法とは異なり、バイオ法は常温常圧条件下で環境負荷を低く抑えた生産が可能となる。さらに再生可能な非可食バイオマスを原料とし

て用いることを目指すため、CO₂ 排出量の大幅な削減を可能とする。本研究開発で芳香族化合物の生産性を飛躍的に高めることができれば、製品競争力が高まり、市場拡大、利用用途拡大が期待できる。また、日本発のグリーン化学品として消費者や社会にアピールでき、販売や使用する企業のイメージ向上にも役立つ。

(7) 中間目標の達成度

表 2.3.3.6-3 中間目標の達成状況

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
全ゲノム解析による耐性に関連する変異点の特定	芳香族化合物耐性に関連する変異を集積し、高耐性株を獲得する	耐性株を取得して全ゲノム解析を行い、耐性向上に関わる変異点を特定した	◎ (高耐性株を得たため、大幅達成と評価)	別の耐性関連遺伝子を追加で見出し、より高耐性株を育種する
発現強化・遺伝子破壊による生産基本株の育種代謝モデルの有効性検証	代謝モデル解析システムから得られた生合成経路(2経路以上)を反映させた生産株を構築、生産性の検証(5 g/L以上)	複数の提案に対して検討を進めており、生産濃度上昇等の有効性を示すデータを得ている	◎ (代謝モデルの有効性を示すことができたため大幅達成と評価)	個別の有効組換えを統合し、より高濃度に生産可能な生産株を育種する
オーミクス解析データの取得と提供代謝モデル開発	オーミクス解析データのフィードバックを繰り返すことによりさらに高精度な解析システムを開発する	オーミクス解析データの取得と提供を終えており代謝モデル開発の段階である	△ (2018年12月達成予定 代謝モデルの構築と提案を受け次第、次のサイクルに入る)	新規代謝モデルを高精度化するため実データの取得を継続する

(8) 最終目標の達成可能性

表 2.3.3.6-4 最終目標の達成見通し

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
オーミクス解析データの取得と提供代謝モデル開発	オーミクス解析データの取得と提供を終えており代謝モデル開発の段階である	コリネ菌に特化した代謝モデル解析システムを確立する	既にオーミクス解析データの取得と提供を終えており、達成できる見通しである
代謝モデルの有効性検証	複数の提案に対して検討を進めており、有効性を示すデータを得ている	生産性向上による代謝解析技術の有効性を検証する	既に有効性を示すデータが得られており、達成できる見通しである
発現強化・遺伝子破壊による生産基本株の育種 全ゲノム解析による耐性に関連する変異点の特定	10ヶ所以上の組換えを施すことで生産基本株の育種を行った。また、耐性株を取得して全ゲノム解析を行い、耐性向上に関わる変異点を特定した	目的芳香族化合物を10 g/L以上生産可能な高生産株を育種する	既に目標値の直前まで到達しており、さらに代謝モデルからの提案を統合することで達成できる見通しである。また、耐性向上に関わる変異点を特定済みである

(9) 研究開発の成果と意義

〈具体的な研究成果〉

- ・ターゲット芳香族化合物を7 g/L以上の濃度で生産した。これは世界最高水準の生産濃度である。
- ・ターゲット芳香族化合物の新規な分解経路を見出した。
- ・芳香族化合物耐性を向上させる遺伝子変異を見出した。
- ・代謝モデルを用いた計算結果からの提案により、ターゲット芳香族化合物の生産性が向上した。
- ・コリネ菌に特化した代謝モデル構築のためのオーミクスデータを取得、提供した。
- ・ゲノム情報を元にした mRNA の二次構造予測およびコドン使用頻度解析結果からの提案により、生産経路上の蛋白質発現量が向上した。
- ・ターゲット芳香族化合物の細胞外排出促進および前駆体の排出抑制を目指し、排出輸送体の探索を開始した。

2.3.3.6.1 代謝モデルと耐性変異を反映した高生産株の育種

2.3.3.6.1.1 発現強化・遺伝子破壊による生産基本株の育種 (RITE)

発現強化・遺伝子破壊による生産基本株の育種については、5 g/L以上の生産濃度を示したため、順調に進んでいる。

グルコースからターゲット芳香族化合物までの代謝経路は複数考えられる。最も生産効率の良い経路を判断するため、神戸大が FBA (Flux Balance Analysis) による代謝予測を行った。その結果、複数の候補から最も高い収率予測を示した経路を採用し、RITE が遺伝子組み換えを施した。コリネ菌の野生株に対し乳酸生産遺伝子の破壊、中間代謝物およびターゲット化合物の分解遺伝子の破壊をまず行った。次にペントースリン酸経路遺伝子の発現強化とシキミ酸経路上の一部の遺伝子の発現強化を行った。これにより代謝経路上で合計 10 ヶ所以上の遺伝子発現強化・破壊を施した。さらにターゲット芳香族化合物の生産遺伝子を高発現させることで生産基本株を育種した。この株を湿菌体重量 5%の細胞濃度でジャーファーメンターに充填し、温度、pH、溶存酸素濃度の制御下で 24 時間流加培養を行った。その結果、5 g/L を超える濃度でターゲット芳香族化合物が培養液中に蓄積することを確認した(図 2.3.3.6-2)。

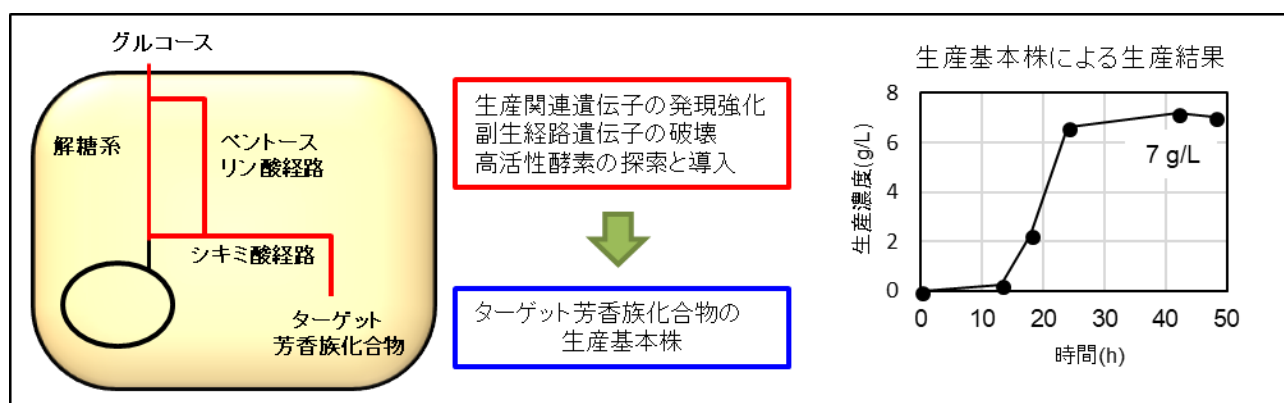


図 2.3.3.6-2 生産基本株の育種と生産結果

さらに、生産時に蓄積し未同定だった複数の副生物の特定に成功した。副生反応を推定し、複数の候補遺伝子について破壊および高発現させた株を育種し検討を行った。これによりターゲット芳香族化合物の新たな代謝分解経路とその前駆体の他の副生物への変換に関わる内在酵素遺伝子を実験的に突き止めることに成功した。得られた知見はターゲット芳香族化合物生産性の向上を目指した菌株育種に大きく寄与するものと期待できる。

2.3.3.6.1.2 全ゲノム解析による耐性に関連する変異点の特定 (RITE)

全ゲノム解析による耐性に関連する変異点の特定については、全ゲノム解析情報から耐性関連変異の抽出に成功しており、順調に進んでいる。

ターゲット芳香族化合物は微生物に対して強い毒性を示す。コリネ菌は発酵生産に用いられる他の微生物と比べて高い耐性を芳香族化合物全般に対して示すが、より高い耐性を生産菌に付与することでターゲット芳香族化合物の生産濃度の向上を図る。この目的のため、ターゲット芳香族化合物に対する耐性株を複数取得し、全ゲノム解析を行うことで耐性に関わる遺伝子を特定する戦略を取った。耐性菌を得るために 2 種類の変異導入法を用いた。従来から行われてきた変異剤による方法と、ミューテーター高速育種法を用いた。ミューテーター高速育種法とは細胞分裂の度に一定の確率でゲノムに変異を入れることができ、選択圧を与えながら耐性株を選抜可能な技術である。これらの手法により変異を導入した株群から、耐性向上を確認できた株を 60 株得た。その内 10 株について全ゲノム解析を行いそれぞれが持つ変異の抽出、比較を行った。変異の影響の大きさと、複数の株に共通して同じ遺伝子に変異が入ったかという点を指標として検討

候補を選び、野生株に改めて変異導入を行った。その結果、3つの株で耐性の向上が確認できた。次にターゲット化合物の生産株に今回見出した変異をそれぞれ導入して生産検討を行った。しかし今回は生産濃度の向上は見られなかった。今後、耐性が確認できた別の株についても全ゲノム解析を進め、別の耐性変異点が生産性向上に寄与するか確認する予定である。

2.3.3.6.2 コリネ菌に特化した代謝モデル解析システムの確立と有効性検証

2.3.3.6.2.1 オーミクス解析データの取得と提供、代謝モデル開発 (RITE・神戸大)

オーミクス解析データの取得と提供、代謝モデル開発については、データの取得と提供が済みであり、順調に進んでいる。

ターゲット芳香族化合物を生産させる際の重要な中間代謝物であるシキミ酸をハブ化合物として定め、ハブ化合物生産株を育種して代謝モデル開発のためのオーミクスデータを取得した。シキミ酸高生産株を育種する過程の株として、乳酸生産遺伝子破壊、シキミ酸代謝遺伝子破壊、シキミ酸経路上の遺伝子の発現強化をそれぞれ順次重ねた株を育種した。これに野生株を加えた計4株について同じ条件でシキミ酸生産検討を行い生産条件下で経時的に3点ずつサンプリングすることで培地中に蓄積した代謝物の濃度測定を行った。培養上清を分析したところ野生株では乳酸が蓄積し、シキミ酸は検出されなかった。乳酸生産遺伝子を破壊した株では乳酸の蓄積が検出されなくなった。さらにシキミ酸代謝遺伝子を破壊した株ではシキミ酸を検出でき、加えてシキミ酸経路遺伝子の発現強化株ではさらに高濃度にシキミ酸が蓄積した。これらの挙動は全て株の設計通りであった。このサンプリングの際に菌体の一部を分け、total RNAの抽出と全代謝物の抽出にそれぞれ供した。total RNAサンプルは産総研に提供し、トランスクリプトーム解析に使用した。その際コリネ菌からのtotal RNA抽出法について検討を行い、汎用法とコリネ菌に特化した方法を比較した。結果、コリネ菌用に作成したプロトコルを用いた場合に汎用法と比較して約10倍量のtotal RNAを得ることができ、さらにRIN値も9以上と解析に十分な値だった。細胞抽出液は神戸大にてメタボローム解析に使用した。その際も内部標準濃度の調整など抽出法の検討も行った。解析が終了した2種のオーミクスデータセット(4株×3サンプリングポイント)は神戸大に提供済みである。これらのデータを反映させたコリネ菌の代謝モデルから得られる新規な代謝設計が提示され次第、2サイクル目の計画を立て生産株の育種とデータ取得を進める。

2.3.3.6.2.2 代謝モデルの有効性検証 (RITE・神戸大)

代謝モデルの有効性検証については、代謝モデルからの提案を生産株で再現することでターゲット芳香族化合物の生産濃度の向上が認められており、順調に進んでいる。

神戸大からはFBAの結果から生産性向上が期待できる遺伝子組換えの提案を受けた。菌体増殖速度を最大にする条件での計算と、ターゲット芳香族化合物の細胞外排出速度を最大にする計算をそれぞれ行い、各酵素反応の速度比を求めた。これにより、生産時に発現を強化すべき遺伝子、抑制すべき遺伝子、破壊しても構わない遺伝子をそれぞれ優先度と共に提案された。このうち遺伝子組換えの効果が比較的明確に判別できる、遺伝子破壊についてまず検討を進めた。候補遺伝子を破壊した株をそれぞれ構築し、ターゲット芳香族化合物の生産経路をさらに組み込むことで検討株を複数育種した。育種できた検討株から順次生産検討を行ったところ、対照と比較して約

1.4 倍の生産濃度を示す遺伝子破壊株を見出した(図 2.3.3.6-3)。今後は未検討の残りの遺伝子組換え株についても生産検討を進め、有効な遺伝子組換えの探索を継続する。

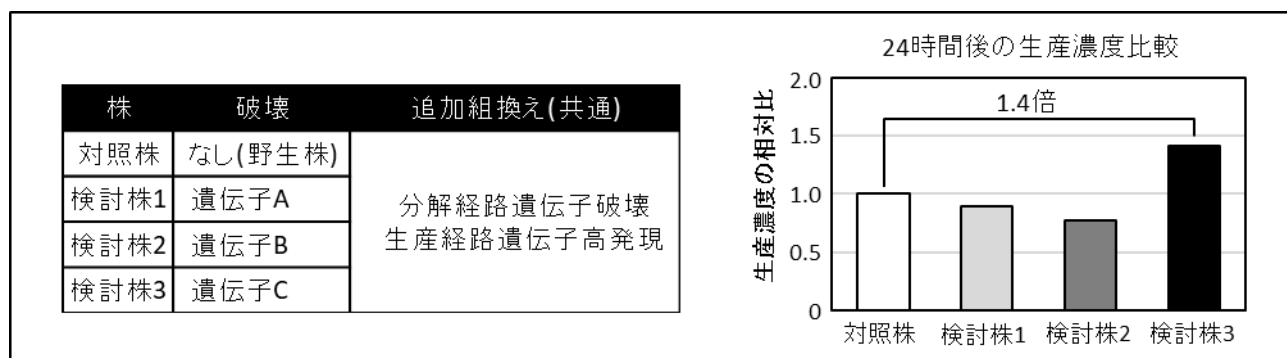


図 2.3.3.6-3 FBA からの提案の、生産検討による有効性検証

神戸大・理研からは FBA と HyMeP の計算から生産性向上が期待できる遺伝子組換えの提案を受けた。具体的には① グルコースの取り込み経路をホスホトランスフェラーゼシステム(PTS)からグルコーストランスポーターに変更、② NADH 消費を伴う生産経路の追加であった。コリネ菌は通常 PTS を利用してグルコースをリン酸化しつつ細胞内に取り込む。その際ホスホエノールピルビン酸(PEP)をリン酸供与体として利用するためグルコースと等モル消費する。一方で PEP はシキミ酸経路に入る反応の基質であるため消費を抑える必要があった。この問題を解決するため PTS を構成する遺伝子を破壊し、グルコーストランスポーター遺伝子とヘキソキナーゼ遺伝子の導入を行った(提案①)。次に、解糖系で生じる NADH は解糖系の酵素へ強いフィードバック阻害を示す。今回用いている生産株は前述のように乳酸生産遺伝子を破壊しているため、嫌氣的に NADH を酸化することは難しい。酸素を過剰に利用して NADH を再酸化した場合は CO₂ が発生し収率の低下が懸念される。そこで NADH を酸化する反応を新たに生産経路に追加することでこの問題の解決を図った(提案②)。これらの提案を受け、まず NADH を利用する酵素の探索を行い、さらに提案を反映した遺伝子組換えを施した株を育種して生産検討を行った。その結果、対照株と比較してこちらも約 1.4 倍の生産濃度向上を示す生産株を見出した(図 2.3.3.6-4)。

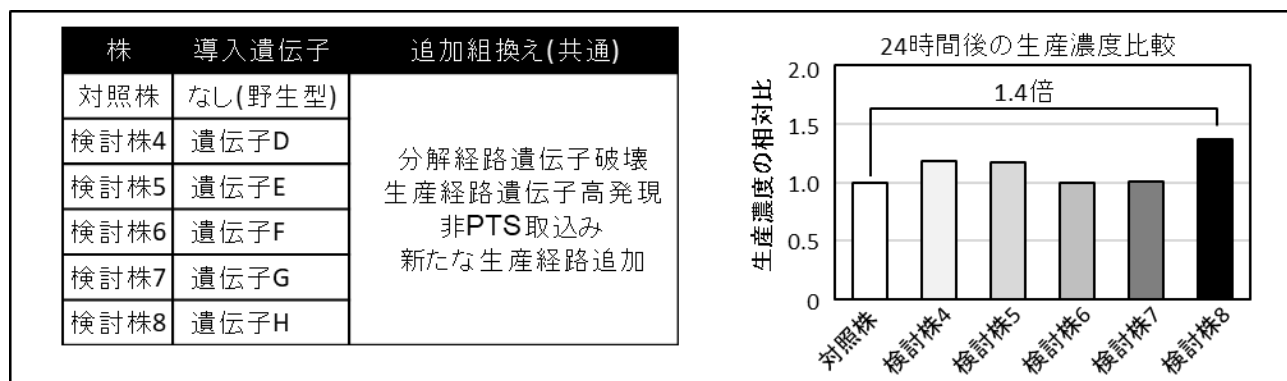


図 2.3.3.6-4 FBA と HyMeP からの提案の、生産検討による有効性検証

以上のように、代謝モデルを利用した情報解析技術を生産株育種に取り入れることで生産性が大幅に向上した実例を複数示すことができた。従来法とは異なるアプローチで育種を進めたこと

でこのようなブレークスルーが得られたと考えられる。今後は開発項目 2.3.3.6.1.1 で育種した生産基本株に有効性が見られた遺伝子組換えを反映させ、さらなる生産性の向上を目指す。

2.3.3.6.3 遺伝子配列改変による蛋白質発現量調節法の確立

2.3.3.6.3.1 蛋白質高発現遺伝子配列の設計（産総研）

蛋白質高発現遺伝子配列の設計については、蛋白質発現量が低いと予測できる酵素の抽出とその発現量向上のための遺伝子配列改変を複数提案しており、順調に進んでいる。ゲノム上にコードされる全遺伝子について N 末 11 残基分の 33 塩基の特徴量を抽出し、発現量予測を実施した。特徴量として mRNA の二次構造形成能に着目し、より安定な構造を形成し得るものほど翻訳効率が低く、結果として蛋白質発現量が低いと予測した。本予測により、発現量が全遺伝子の下位 20%に含まれる遺伝子のうち、ターゲット芳香族化合物の生合成経路上に位置する二つの酵素遺伝子 A、B を選択し、発現量向上が期待される配列改変を計算により算出した。具体的には上記 33 塩基の二次構造形成能が小さくなるように、かつ、コドン使用頻度が高いものが極力含まれるように同義置換によるコドン改変パターンを計算した。二つの酵素遺伝子はゲノム上で 3' 末端、5' 末端が重複するオペロンを形成する。先頭の遺伝子は同じフレーム内に位置した二つの開始コドンそれぞれ (A1、A2 と命名) について計算を実施し、各 2 パターンの改変候補を提案した。下流の遺伝子 B については単独で発現させた場合 (2 パターン) およびオペロン A1B もしくは A2B で発現させた場合それぞれについて計算を実施、後者についてはオペロン内の重複領域を固定して計算を実施し、1 パターンを提案した。さらに、生合成経路を構築するうえで導入した外来遺伝子 C についても同様に配列改変を 2 パターン提案した。

2.3.3.6.3.2 遺伝子配列改変の有効性検証（RITE）

遺伝子配列改変の有効性検証については、蛋白質発現量の向上が確認できており、順調に進んでいる。各遺伝子の野生型、改変型およびオペロン構造を考慮した計 24 種の発現プラスミドを構築した。発現量への効果は各プラスミド導入株の細胞抽出液の SDS-PAGE 解析により評価した。単独発現時には二つの酵素遺伝子はどちらも改変により発現量が 1.5 倍から 3 倍程度まで上昇した。一方、外来遺伝子 C については発現量向上効果が見られなかった。オペロンからの発現については先頭遺伝子 A の改変により両遺伝子の発現量が単独発現時と同様に上昇した。一方、下流の遺伝子 B への改変は発現量抑制効果が見られた。このように計算により得た配列改変を施すことで複数の遺伝子について転写量を変えずに蛋白質の発現量を増加させることに成功し、本手法の有効性を実証した。今後、効果が見られたオペロン先頭遺伝子への改変を生産株へ導入し生産性への効果の評価する予定である。図には単独発現時の効果を示す。野生型を WT、提案された 2 つの改変を V1、V2 で示す。NC、PC はそれぞれネガティブ、ポジティブコントロールを示す (図 2.3.3.6-5)。

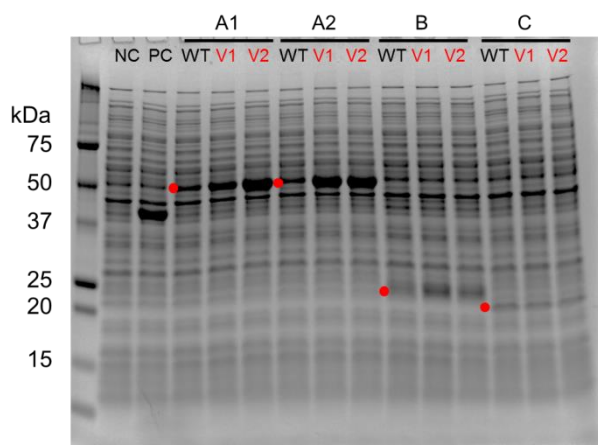


図 2.3.3.6-5 配列改変提案の SDS-PAGE 解析による有効性検証

2.3.3.6.4 排出輸送体探索

排出輸送体探索については、2017 年度から協議を開始し 2018 年度から検討を始めた。RITE のターゲット芳香族化合物の排出輸送体と、その前駆体である化合物について、排出体の特定を目指す。東北大は大腸菌を宿主とし、排出体ライブラリを用いて排出体の特定を行う。RITE はターゲット化合物の生産株構築情報提供、コリネ菌生産株での有効性検証を行う予定である。

2.3.3.6.4.1 大腸菌を用いた、コリネ菌の排出体探索（東北大）

2.3.3.6.4.2 コリネ菌の排出体探索と有効性検証（RITE）

(10) 成果の普及

表 2.3.3.6-5 外部成果発表のまとめ

年度	論文			その他外部発表			受賞実績
	査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載	展示会への出展	その他	
2016	0	0	2	0	1	0	0
2017	0	0	8	0	2	1	0
2018 *1	0 (1)	0 (1)	8 (11)	0 (2)	2 (3)	1 (2)	0 (0)
2020 *2	4	3	17	4	5	4	0

*1：2018 年 6 月時点での実施済み件数、()内は 2018 年度末の予定件数

*2：2020 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

得られた技術については特許出願し、その後学会、論文等で発表する。必要であればノウハウとして保有する。

表 2.3.3.6-6 知的財産権のまとめ

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	1 (2)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	2	2	2

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.3.7 紅麴菌を用いた色素生産制御による有効性検証

担当機関：江崎グリコ株式会社、株式会社バイオジェット（再委託）、産業技術総合研究所

(1) 背景と目的

紅麴菌 *Monascus purpureus* の生産する紅麴色素は、日本国内の食用色素の年間需要の約 1/6 を占める代表的な天然色素である。本色素は、様々な色の調合に必要な基本色の一つであること、中性域で自然な赤色を呈することなどから、恒常的な需要がある。近年、グローバル食品企業が、合成色素を天然系色素に切り替える方針転換を示しており、世界的に天然系色素へのニーズが高まっている。また、紅麴色素は食品色素以外の用途として、医薬品・化粧品・健康食品・サプリメント・工業用化学品などへの用途拡大も期待されるが、それには生産性の飛躍的拡大をもたらす新規技術の開発が必要である。

紅麴色素生産菌は、共通の azaphilone 骨格を持つ赤色色素、橙色色素、黄色色素を同時に生産する。これらは紅麴菌の二次代謝物であり Acetyl-CoA 及び Malonyl-CoA 代謝経路を利用して作られる。代謝経路の途中までは共通であることは分かっているが、個々の成分色素合成経路や関連する酵素の一部は明らかにされておらず、商業上利用価値の高い橙色・赤色色素の成分比率を高めることも実用上の課題の一つである。また、紅麴色素生産菌は色素生産と同時に、少量のシトリニン（カビ毒の一種）を生産する。紅麴色素中のシトリニン含量は 0.2 ppm 以下と定められており（第 9 版食品添加物工程書）、精製等によるシトリニン除去を必要としないシトリニン含量の少ない紅麴菌・色素生産プロセス技術の開発は、色素生産性向上とともに重要かつ必要不可欠な課題の一つとなっている。

このように、紅麴菌は、食経験もある微生物の一種で、すでに商業利用されてもいるが、紅麴色素生産技術は四半世紀以上も前に確立されたものである。従来技術では目標を達成することそのものが困難であり、時間・労力もかかる。一方で、これまで紅麴色素の生産性向上に関する研究は少なく、紅麴色素の生産性は大幅な改良の余地があると考えられる。そこで、本研究開発課題では、紅麴色素の実生産菌株を用いて、「紅麴色素の生産性向上」と「シトリニンの生産性低下」という 2 つの指標を同時に達成しうる、「生合成モデルと遺伝子発現制御ネットワークモデルの連結技術により構築する統合数理モデル」の有効性の検証を行う。

(2) 位置づけ、目標値

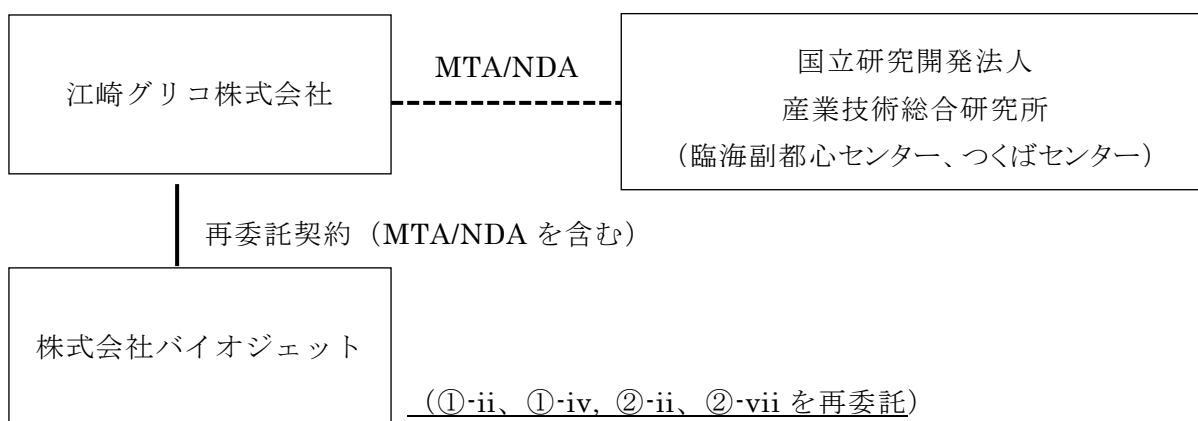
中間目標	紅麴色素生産性を対基準株比で 2 倍以上、シトリニン含量を対基準株比で 1/2 以下を達成する。
最終目標	紅麴色素生産性を対基準株比で 3 倍以上、シトリニン含量を対基準株比で 1/3 以下を達成する。

(3) 全体計画

開発項目	開発小項目（実施内容）	28年	29年	30年	31年	32年
① 紅麴	i. 基準株の選定：グリコ社が保有する紅麴生産菌株	→				

色素生産性向上基盤技術開発	の中から、安定して高い生産を示す基準株を選定する。							
	ii. 基準株ゲノム・遺伝子情報の取得：紅麹色素生産基準株の高精度ゲノム・遺伝子情報を整備する。	→						
	iii. 生産性バリエーション株の取得：ネットワークモデル構築に適したデータを提供するために、生産性バリエーションを示す菌株を6株以上取得する。		→					
	iv. 生産性が異なる培養条件の取得：ネットワークモデル構築に適したデータを提供するために、生産性バリエーションを示す培養条件等を3以上取得する。		→					
② 統合オーミクスモデルの有効性検証	i. 紅麹色素生合成モデルの構築：取得した紅麹菌ゲノム情報より、Acetyl-CoA から紅麹色素・シトリニ生合成に関連する遺伝子検索を行い、ターゲット遺伝子候補の抽出及び生合成モデルを構築する。						→	
	ii. 有用遺伝子情報取得：選別したバリエーション株・培養条件において、RNA-seq 法によりトランスクリプトームデータをそれぞれ9件以上取得し、数理モデル構築に提供する。							→
	iii. 紅麹菌遺伝子組換え技術の開発：紅麹菌の形質転換技術を確立する。			→				
	iv. 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築：取得したトランスクリプトームデータから紅麹色素生合成に関する遺伝子発現制御ネットワークモデルを構築する。							→
	v. 統合オーミクスモデルの構築と遺伝子改変方法の提案：②-i, ②-iv を統合した新しい統合数理モデルを構築し、紅麹色素生産性向上に資する転写因子、酵素遺伝子等の導入・破壊方法を提案する。							→
	vi. 数理モデル予測に基づく遺伝子組換え紅麹菌の作成：ii. を用いて統合オーミクスモデルの結果に基づいて遺伝子組換え菌を作成する。							→
	vii. 統合オーミクスモデル予測精度の検証：iii. で開発した菌株のラボレベル、実製造スケールにおける生産性を検証し、情報解析チームへフィードバックする。							→
	viii. パイロット試験装置を用いた実用化検討：開発した新規紅麹生産菌の性能評価を行い、色素生産性3倍、シトリニン1/3を達成できるかどうか3tパイロット試験装置を用いて実用化の検証を行う。							→

(4) 実施体制



(5) 運営管理

半年に一度の全体会議、一年に一度の外部有識者による技術推進委員会に参加し、進捗状況を発表するとともに、テーマの推進に有益な助言等を他の参画メンバー及び推進委員より受けた。チームの運営に関しては、江崎グリコ社が主体となって、約3か月に1度（年4回程度）、各参画機関の当該期間における実施サブテーマについて、進捗状況の報告・情報共有を行うため、数理モデルチームメンバーとともにチームミーティングを開催した。本研究テーマでは、江崎グリコ社の保有する実用生産菌株の一つであるGB-01株を用いて複数機関で一体として実施するため、基準株、変異体、遺伝子組換え体等の研究成果物を参画機関内で迅速に共有し、相互に利用できるようにするために、MTA/NDA契約を締結した。また、江崎グリコ社の研究所（実験場所）及び実際に実験を行う手順等を実地体験する機会を設ける等、本プロジェクトで得られた成果や技術（ノウハウを含む）を、本テーマに参画する各機関が共有できるような運営を行った。知財戦略については、本研究開発プロジェクトで使用する菌株は江崎グリコ社のGB-01（基準株）であるため、その派生物についても江崎グリコ社が権利を保有する。変異体に関する情報及び新規情報解析技術によってもたらされる色素生産性向上やカビ毒低減に資する遺伝子改変方法等については、産総研・江崎グリコ社・バイオジェット社と協議の上、しかるべき知的財産権の確保に努める。

(6) 実施の効果

商業用紅麹色素生産菌改良株が完成後、色素生産性が現在より約3倍に上昇することで、色素製造コストは飛躍的に下がることが期待でき、アジアを中心とした新興国企業に対し、圧倒的なコスト競争力を生み出すことができる。これにより2022年度国内シェア30%（海外7%）、2030年度国内シェア60%（海外50%）を見込む。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目		達成度	成果
① 紅麴色素生産性向上基盤技術開発	i. 基準株の選定 (H28)	○	目標とする安定した生産を示し、かつ高い生産性を示す株を基準株として選定。さらに、基準株を用いることで、評価のための標準培養法・標準測定法を整備した。
	ii. 基準株ゲノム・遺伝子情報の取得 (H28-H29)	○	以後の研究開発に必要な紅麴色素生産基準株ドラフトゲノムを構築した。現在、ver. 2.1。
	iii. 生産性バリエーション株の取得 (H28-H30)	○	異なる色素/カビ毒生産を示す菌株を up 株 3 株、down 株 3 株取得済み。
	iv. 生産性が異なる培養条件の取得 (H29-H30)	○	色素生産性が大きく異なる培養条件 3 条件について再現性と 5 L ミニジャーにおけるスケールアップ時の安定性を確認済み。
② 統合オミクスモデルの有効性検証	i. 紅麴色素生合成モデルの構築 (H29-H32)	○	類縁種との比較解析により、紅麴菌における色素合成遺伝子クラスターを同定した。また、同定した遺伝子クラスターから、生合成経路モデルを推定した。
	ii. 有用遺伝子情報取得 (H29-H32)	◎	基準株・変異株と培養条件を組み合わせることで、異なる色素生産条件において予定を大幅に上回る 84 件 (H30/6 現在) の RNA-seq. データを取得した。
	iii. 紅麴菌遺伝子組換え技術の開発 (H29-H30)	△	紅麴菌の遺伝子組換えプロトコル、外来遺伝子発現ベクターを確立した。遺伝子破壊は現時点では未達成のため、ドミナントネガティブ法によりノックダウン法を確立する予定。
	iv. 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築 (H29-H32)	◎	②-ii でこれまで取得した RNA-seq. データを元に、色素生産、カビ毒生産を制御する pigR1/2, citR を制御するネットワーク構造の推定を行い、4 候補遺伝子を見出した (H30/06 現在)。
	中間目標：色素生産性 2 倍、カビ毒 1/2	△	H30 年 6 月現在、本プロジェクトで得られている株の細胞あたりの色素生産性は 1.6 倍。(8)に記載の通り、現在、②-vii において数理モデルの予測精度検証を行っているところ。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	成果	達成見通し
②統合 オーミクスモデルの有効性 検証 (続)	v. 統合オーミクスモデルの構築と遺伝子改変方法の提案 (H30-H32)	色素生合成モデル、遺伝子発現制御ネットワークモデルを統合した新規統合数理モデルを開発した結果、新たに4候補遺伝子を見出した (H30/06 現在)。
	vi 数理モデル予測に基づく遺伝子組換え紅麹菌の作成 (H30-H32)	すでにプラスミド法は確立済。現在、②-iv及び②-vで得られた提案を元に遺伝子組換え紅麹菌を作成中。
	vii. 統合オーミクスモデル予測精度の検証 (H30-H32)	②-vi 株の色素生産性・カビ毒低減については、数理モデルの予測が正しければ目標を達成できる見込み。
	viii. パイロット試験装置を用いた実用化検討 (H31-H32)	②-viiの結果を、江崎グリコ社が保有するパイロット試験装置において生産性・経済性評価を行い、実用化の検討を行う。
	最終目標：色素生産性3倍、カビ毒1/3	現在、基準株比1.6倍の色素生産性 up 株をベースに、本スマートセル技術を用いることにより、細胞あたりの色素生産性を1.8倍上げることは可能と考えられる。また、カビ毒についても、シトリン合成遺伝子の制御により同様に低減可能と考えられる。

(9) 研究開発の成果と意義

①紅麹色素生産性向上基盤技術開発

i. 基準株の選定 (H28、江崎グリコ)

グリコ社内育種で分離された紅麹色素実生産兄株の中から、培養後期 (7~9 日) で安定した生産性を示す菌株を基準株として選定することを試みた。まず、*Monascus purpureus* の培養

に一般的に使用される培地組成で 500 mL フラスコを使用して培養し、培養産物の分析方法、評価方法の標準化を行った。そのうえで、図 2.3.3.7-(1)に示す菌株のうち、最も色素生産性の高いグリコ B 株を選定した。本菌株を N=5 にて同条件で培養し、図 2.3.3.7-(2)に示す通り培養後期で色素生産性にばらつきのない安定した菌株であることを確認し、これを基準株として選定した。

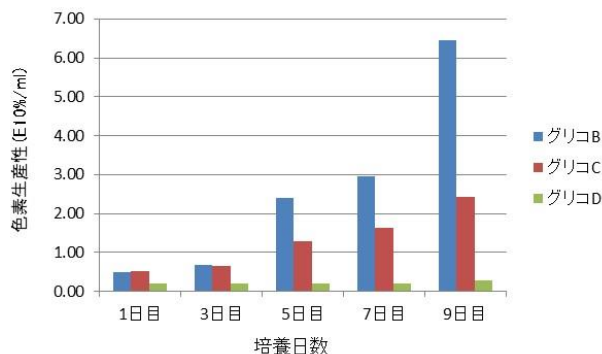


図 2.3.3.7-(1) 実生産兄弟株の色素生産性

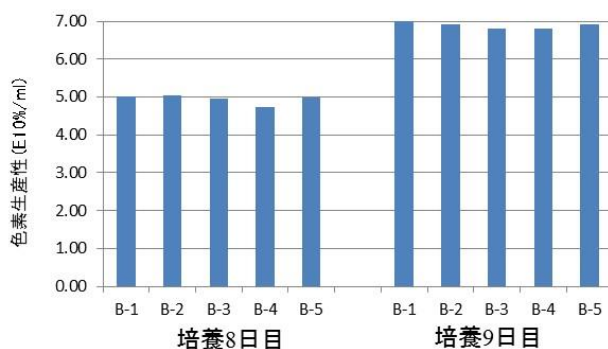


図 2.3.3.7-(2) グリコ B 株の色素生産安定性

ii. 基準株ゲノム・遺伝子情報の取得 (H28-29、産総研、バイオジェット)

本プロジェクトで使用する基準株 GB-01 よりゲノム DNA を抽出し、ゲノムアセンブルは、ゲノム DNA の PacBio RSII long read library および Illumina short read library を用いて行った。複数の long read アセンブラおよび hybrid assembler を検討した。最終的に Canu 1.4 および MaSuRCa 3.2 による出力を採用した (図 2.3.3.7-(3))。それらをマージおよびフィルタリングした結果 150 コンティグ、総延長 24.4 Mb のドラフトゲノム配列を得た。ドラフトゲノム配列に対し RNA-Seq の結果を用いて exon 構造を同定し、また、*ab initio* 遺伝子予測ソフトウェアの予測結果と併せて 8,402 個の遺伝子 (コーディングシーケンス) を取得した。得られた遺伝子・アミノ酸配列の機能解析を行い、麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 ゲノムと比較したところ、多くの遺伝子は共通するが糖代謝関係、細胞壁、二次代謝関係の遺伝子が少ないことが判明した。

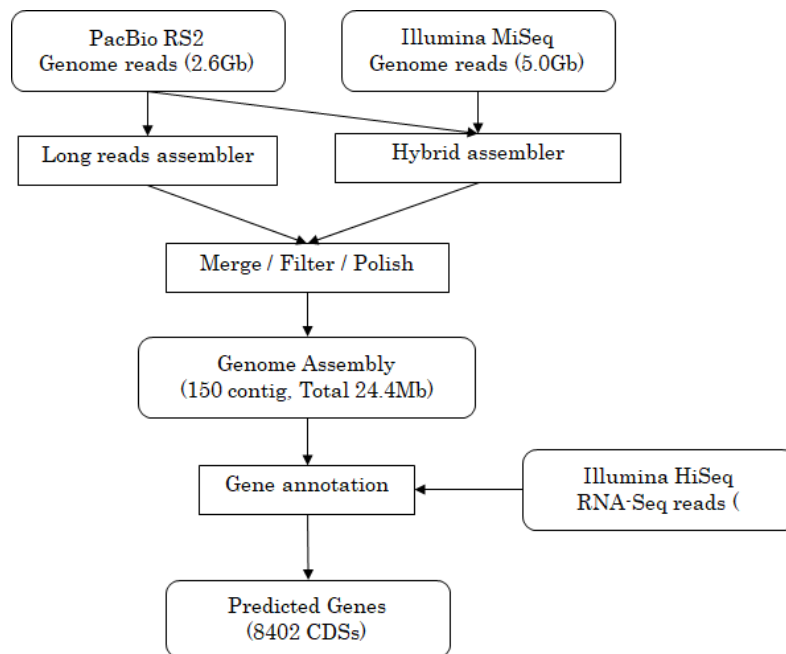


図 2.3.3.7-(3) 紅麹菌ゲノムアセンブリフロー

iii. 生産性バリエーション株の取得 (H28-30、江崎グリコ)

異なる紅麹色素生産性を示す菌株 (バリエーション株) を、異なった条件で培養することで、より多くのトランスクリプトーム情報を得ることができる。

i で選定した基準菌株に対し、UV 照射により自然変異を生じさせ、さまざまな色素生産性を示すバリエーション株の取得を試みた。得られた自然変異菌株を、100 mL フラスコスケールにて液体培養し、色素の生産性を調べた。その結果、基準菌株と比較して、最大で色素生産性が 1.6 倍に上昇した菌株 (Up 株)、1/8 倍に色素生産性が低下した菌株 (Down 株)、それらの間に位置するさまざまなバリエーション株が得られた (図 2.3.3.7-(4)、結果の一部を掲載)。

これらバリエーション株の中から、500 mL フラスコ培養、あるいは 5 L ミニジャーで安定して Up あるいは Down の形質を維持するものを探索することで、Up 株 3 株、Down 株 3 株、計 6 菌株のバリエーション株を得たことを確認した (図 2.3.3.7-(5))。

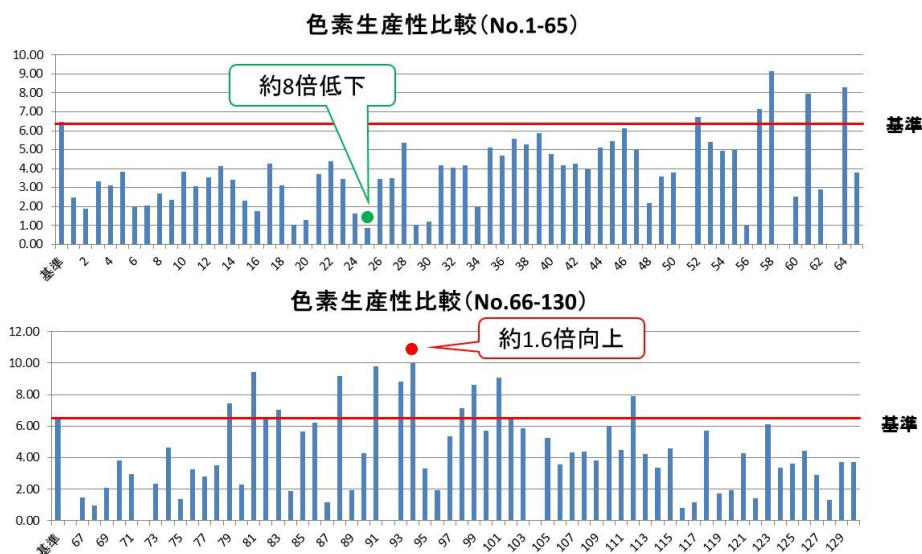


図 2.3.3.7-(4) 色素生産性バリエーション株の取得

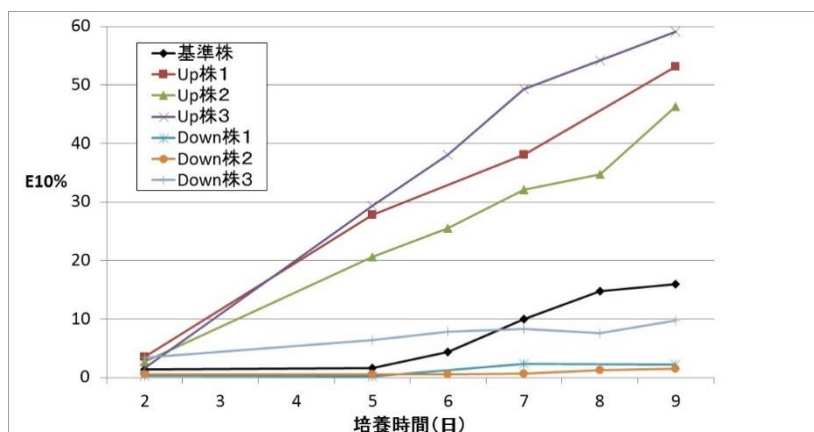


図 2.3.3.7-(5) ミニジャーによる Up 株、Down 株の色素生産性

iv. 生産性が異なる培養条件の取得 (H29-30 江崎グリコ、バイオジェット、産総研)

紅麴色素生産性に寄与する遺伝子群を推定するために、同一株でも色素生産性が大きく異なる培養条件を見出し、それぞれの条件下での RNA-Seq. データを取得する必要がある。そのため、まずは基準株について、培地成分、通気、攪拌、温度、添加剤などさまざまな培養条件を変化させて色素生産性を比較した。その結果、色素生産性の大きく異なる条件として、

- (1) 培地の種類
- (2) 培地中の炭素源/窒素源の比率 (C/N 比)
- (3) 炭素源の添加タイミング
- (4) 菌糸分散剤の種類

を変化させることで、大きく色素生産性あるいはシトリン生産性が異なることを見出した。具体的には、(1)に関しては、グルコースをメインの C 源とした紅麴菌標準培地に対し、組成を変えた培地 2、培地 3 において、5 L ミニジャーを用いた評価系で最大約 3 倍の色素生産性に違いがあることを確認した。(2)に関しては、グルコース/ペプトン比を変えることで最大 9 倍の色素生産性に違いがあること (図 2.3.3.7-(6))、(3)に関しては、培養スタート時のグルコース濃度を変え、培養中に枯渇した時点でグルコースを添加することでシトリンの生産性が大きく異なること (図 2.3.3.7-7)) を見出した。(4)については、培養開始時に培地中に添加する菌糸分散剤の種類によって、色素生産性が大きく異なることを見出した (図 2.3.3.7-(8))。

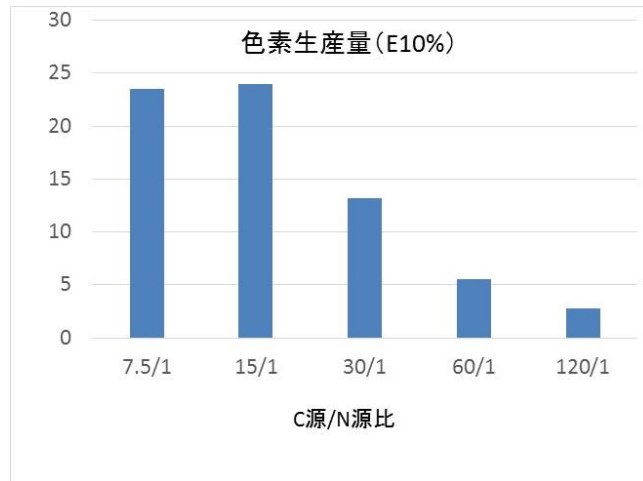


図 2. 3. 3. 7-(6) 培地中の C 源/N 源比率変化時の色素生産性の比較

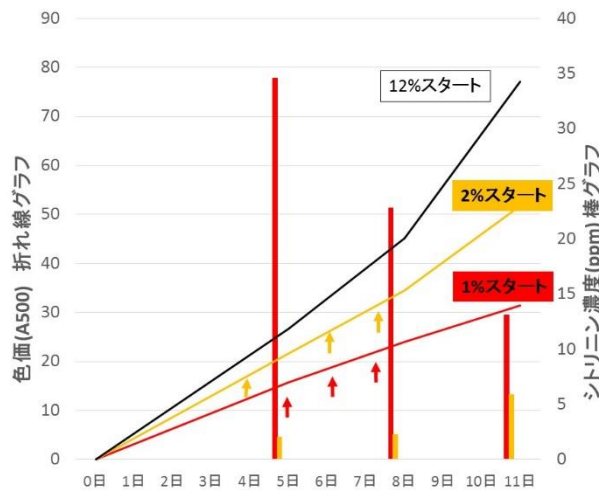


図 2. 3. 3. 7-(7) C 源添加タイミングとシトリン生産量の比較

↑はグルコースが枯渇したためスタート時と同じ濃度のグルコースを添加したことを示す。



図 2. 3. 3. 7-(8) 分散剤の種類による色素生産性の比較。

②統合オーミクスモデルの有効性検証

i. 紅麴色素生合成モデルの構築 (H29-H32、産総研)

①-ii で予測された全遺伝子から、色素合成に関与する二次代謝クラスターの予測を行った。既知の遺伝子クラスターとの相同性検索を実施し、20 遺伝子からなる色素生合成遺伝子クラスターおよび、13 遺伝子からなるシトリン生合成遺伝子クラスターを同定した。同定したクラスターを構成する遺伝子群の機能アノテーションを実施し、色素生合成モデルを構築した。予測

された色素生合成遺伝子クラスターと、近縁種である *Monascus pilosus* の公開されているゲノム情報との比較を行った結果、クラスター内の遺伝子の多くに高い相同性がみられた（図 2.3.3.7-(9)、一部のみ抜粋）。

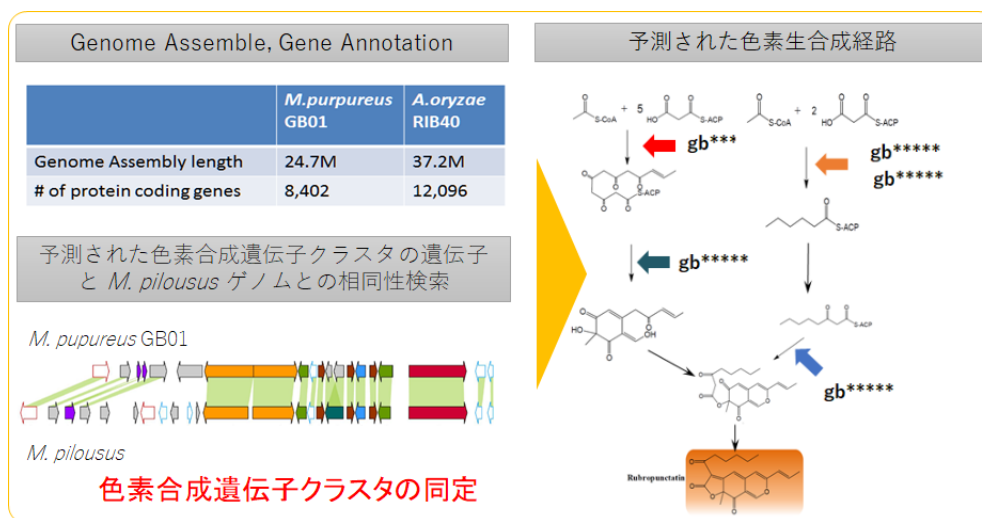


図 2.3.3.7-(9) 紅麴菌ゲノム情報からの色素合成経路の同定

ii. 有用遺伝子情報取得 (H29-H32、産総研、バイオジェット)

次世代シーケンサーを用いた紅麴菌基準株 GB-01 の Whole genome analysis によってドラフトゲノムを構築した (②-i)。また、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現情報解析 (RNA-seq.) を行うために、紅麴菌基準株と up 株/down 株、さらに異なる培養条件を組み合わせる異なる色素生産性条件を作り出した (①-iv)。これらの培養条件下で培養を行い、培養日数ごとにサンプリングを行い total RNA を抽出した。紅麴菌菌体から RNA-seq. グレードの高品質の total RNA 調製は、他のモデル微生物等にと比べると著しく困難であると予想されたため、(1)-1 チームと連携しつつ、紅麴菌に特化したプロトコルの開発を行ったところ、通常の培養法であれば RIN 値=6 程度の品質の total RNA を安定して取得することが可能になった。当初の目標では、採取する RNA-seq. データポイント数を 9/年としていたが、表 2.2.2.7-(1) に示すように目標を大幅に超える 84 点の RNA-seq. データを取得した。また、異なる次世代シーケンスプラットフォーム (HiSeq, MiSeq, IonProton) を駆使して RNA-seq. データを取得したが、プラットフォーム間でのバイアスは認められなかった (データ非掲載)。

表 2.3.3.7-(1) RNA-seq. サンプルの一覧

Exp. No.	株	条件	NGS	Sampling time (days)	Replication	No. of data
H28-3	GB01	0	MiSeq	4	1	1
H28-4	GB01	99	MiSeq	4	1	1
H29-2	GB01	0	Hiseq	3/5/7/9	3	12
H29-3	GB01	0	IonProton	3/5/7/9	3	12
H29-4	GB01/変異株 4 種	0	IonProton	3/7	1	10
H29-5	GB01/変異株 1 種	1	IonProton	2/3/5/7/9	1	10
H29-6	変異株 5 種	1	IonProton	3/7	1	10
H29-7	GB01/変異株 1 種	5	IonProton	3/7	1	12
H29-8	GB01/変異株 1 種	4	MiSeq	3/7	1	4
H30-1	GB01/変異株 2 種	5	IonProton	3/7	1	12
TOTAL						84

iii. 紅麴菌遺伝子組換え技術の開発 (H29-30、産総研、江崎グリコ)

紅麴菌の遺伝子組換え技術は文献上で数例あるのみで、これまでほとんど検討されてこなかった。また、今回使用する菌株は江崎グリコ社の実用生産菌株であり、分譲機関株とは性状が大きく異なることも分かっていた（データ非掲載）。統合数理モデルによって提案される遺伝子改変法は、大きく分けて2つに分類できる。一つは、遺伝子過剰発現であり、もう一つは遺伝子破壊である。シトリニンの低減には、②-i で明らかになった、GB-01 株のシトリニンクラスター遺伝子のうち、重要な役割を果たす遺伝子を破壊することによってシトリニン非生産株を作成することは容易に想像できる。しかし、少なくとも一部の生合成経路を色素合成とシトリニン合成で共有することから、シトリニン合成遺伝子を破壊することによって色素生産性が影響を受ける可能性も考えられる。したがって、シトリニン合成遺伝子の破壊の場合には、色素生産性を低減させない遺伝子を統合数理モデルによって導き出す必要がある。

遺伝子組換えに必要な要素技術として、紅麴菌内で任意の外来遺伝子（遺伝子破壊のための抗生物質耐性遺伝子も含む）を必要なタイミングで必要な量を発現させることが第一の課題である。①-ii により、GB-01 株のゲノム配列が明らかになり、約 8400 の Gene model 情報と紅麴菌全遺伝子と標準状態における RNA-seq. による遺伝子発現データを合わせることで、すべての紅麴菌遺伝子プロモーターのランキングを行い、紅麴菌で作動すると考えられるプロモータープロファイルを取得した。強い遺伝子発現が可能なものとして表 2.3.3.7-(2) に示す 13 種を、また、培養日数に応じて変化の少ない安定した発現が期待でき、かつ様々な強さのプロモーターとして表 2.3.3.7-(3) に示す 9 種を選抜した。pKEF 番号は、構築したプラスミド番号、Contig No. は、ド

ラフトゲノムで当該遺伝子プロモーターの存在する contig 番号、Length はプロモーターの塩基配列長 (bp)、TATA-box はコアプロモーターとして TATA-box binding protein の結合する予測される部位、3~9 の数字は各培養日数とそのときの相対発現量 (緑: 低~黄: 中~赤: 高) をヒートマップで、Expression は平均発現量を示す。また、実際に、当該配列をゲノム DNA から PCR により取得した。ターミネーターは *Ashybia gossipii* の Elongation factor 1-alpha (TEF) ターミネーターを用いることとした。これらのプロモーターに対し、目的とする遺伝子をこの間に挿入する Basic ベクターラインナップを構築した。

表 2.3.3.7-(2) 紅麹菌遺伝子組換えに利用可能なプロモーター (強)

pKEF	Contig No.	Length (bp)	TATA box (bp)	3	5	7	9	Expression (Mean±SD)
120	2	1185	-164	黄	黄	黄	黄	5334.4±529.4
121	3	651	ND	黄	黄	黄	黄	2979.9±821.1
103	6	808	ND	黄	黄	黄	黄	2428.6±305.6
104	6	981	-609	黄	黄	黄	黄	2357±460.1
105	9	319	-216	黄	黄	黄	黄	2270.4±412.3
106	4	416	-37	黄	黄	黄	黄	1781.6±367.5
107	2	383	ND	黄	黄	黄	黄	2182.5±381.8
108	8	608	-67	黄	黄	黄	黄	4814.1±2734.9
109	6	1246	-698	黄	赤	黄	黄	11570.8±12385.4
110	3	1071	-189	黄	黄	黄	黄	6815.5±6212.1
111	8	482	-93	黄	黄	黄	黄	3049±1369
112	3	1013	-132	黄	黄	黄	黄	3005.9±1084.5
113	4	1289	-103	黄	黄	黄	黄	1871.1±2403.1

表 2.3.3.7-(3) 紅麹菌遺伝子組換えに利用可能なプロモーター (安定)

pKEF	Contig No.	Length (bp)	TATA box (bp)	3	5	7	9	Expression (Mean±SD)
114	5	606	ND	黄	黄	黄	黄	395.7±36.3
102	1	415	-124	黄	黄	黄	黄	206±20.5
116	2	554	-536	黄	黄	黄	黄	176.4±16.3
117	1	381	ND	黄	黄	黄	黄	141.4±13.6
118	3	390	ND	黄	黄	黄	黄	88.6±7.5
119	6	417	ND	黄	黄	黄	黄	60.3±4.8
101	3	344	-209	黄	黄	黄	黄	30.7±6
122	17	892	ND	黄	黄	黄	黄	9.6±0.4
123	4	287	-125	黄	黄	黄	黄	0.5±0

iv. 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築 (H29-32、産総研)

これまでに測定された異なる色素生産量を示す Up 株/Down 株・培養条件におけるトランスクリプトームデータから、紅麴色素生合成に重要な役割を果たすと予測される転写因子及び酵素遺伝子の絞り込みを行い、2.3.2.9 で開発した技術を適用し、遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築を行った。

対象とする生合成クラスターを制御するために必要な転写因子をターゲット遺伝子とし、遺伝子制御ネットワークモデル構築するための遺伝子選択を実施した。具体的には、糸状菌の転写因子に共通する PFam ID, Superfamily ID を調査し、紅麴ゲノム中の全転写因子候補 423 個のセットを作成した。次に、72 条件の RNA-Seq. による発現解析結果を元に、色素生合成クラスター内転写制御因子および、シトリニン生合成クラスター内転写制御因子との発現相関関係を計算した。そのうえで、両クラスター内転写制御因子のいずれかと高い相関を持つ遺伝子を幾つかの条件で、ネットワークを構成する転写制御因子からのサブセットおよび、全遺伝子からのサブセットを合計 9 セット作成した (図 2.3.3.7-(10))。

作成したセットの中から特に Criterial を用いて、第一弾のネットワークモデルを構築し、色素生産性を向上させる 2 つの過剰発現候補遺伝子、2 つの破壊候補遺伝子を提案した (図 2.3.3.7-(11))。このうちの 1 つの候補は、色素生産性を向上させると同時に、シトリニンを低減させる可能性があるものであった。

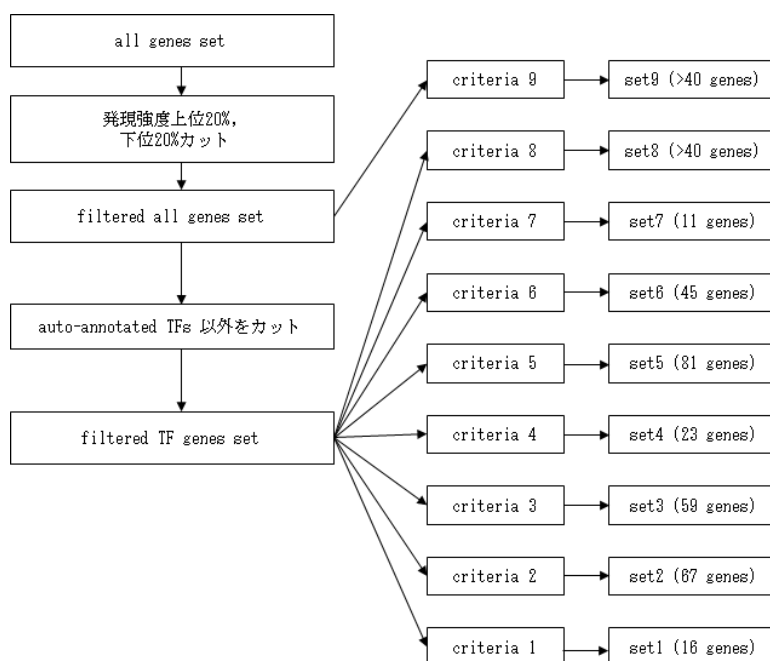


図 2.3.3.7-(10) 紅麴菌色素合成量に関する遺伝子選択フロー

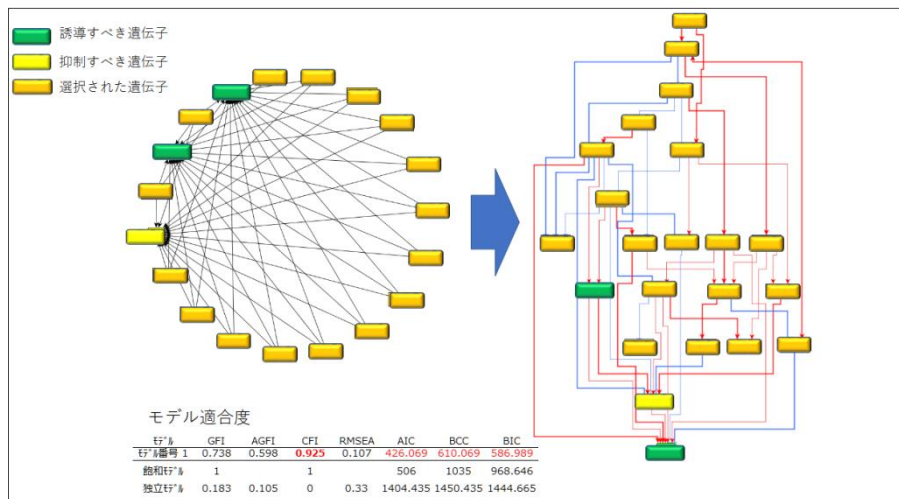


図 2.3.3.7-(11) 紅麹菌色素合成量調節のための遺伝子ネットワーク

v. 統合オーミクスモデルの構築と遺伝子改変方法の提案 (H30-32、産総研)

色素生合成経路モデル、遺伝子発現制御ネットワークモデルを統合し、生合成経路遺伝子を原因変数、各種色素を結果変数とする統合数理モデルの構築を行った。具体的には、先に推定した色素生合成クラスターを構成する遺伝子群の発現量制御を実現するため、クラスター内に存在する転写因子を誘導ターゲット遺伝子と設定するとともに、抑制すべきシトリン合成クラスター内の転写因子を抑制ターゲット遺伝子と設定した。第一段階で推定した遺伝子ネットワークモデルを高精度化するため、先に選択した9セットについて遺伝子ネットワークを構築した結果、特にCriteria 7とCriteria 8のセットにおいてネットワーク精度が高いことが予測された。そこで、新たに構築した2つの遺伝子ネットワークモデルについて、構築したネットワークモデル構造から、特に係数が高いエッジ（制御関係）のみで構築したサブグラフを抽出し、サブグラフ上でそれぞれのターゲット遺伝子の上流にある遺伝子を、改変候補遺伝子として提案した（図2.3.3.7-(12)）。

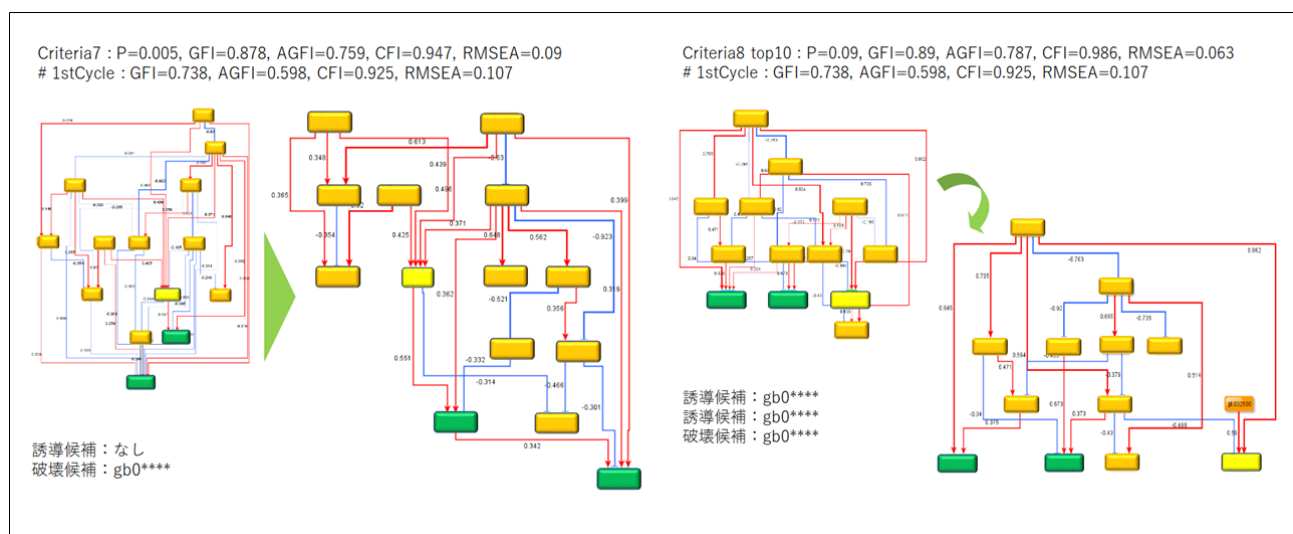


図 2.3.3.7-(12) 複数のターゲット遺伝子調節のための改良型遺伝子ネットワーク

vi. 数理モデル予測に基づく遺伝子組換え紅麹菌の作成 (H30-32、産総研)

遺伝子組換え紅麹菌の作成技術は、上述のように未確立であるため、プロトプラスト形質転換法の検討から行った。同じ糸状菌であっても、*Aspergillus* 属の手法は全く適用できなかったため、2.3.3.2 長岡技大の協力を得て、*Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) の手法を参考に紅麹菌形質転換のためのプロトプラスト調製法を確立した。上記②-iv 及び②-v の数理モデルによって提案された合計 8 遺伝子のうち 4 つの遺伝子破壊候補及びシトリンクラスター内の生合成経路においてより下流に位置する（色素生産には影響しにくい）と考えられる 5 遺伝子について、15 回ノックアウトを試みたが、GB-01 は形質転換効率が著しく低く、いずれも形質転換体は得られなかった。そこで、プラスミド法を試したところ、pAUR316 (TakaraBio) を用いた形質転換に成功した。また、このプラスミドベクターは Aureobasidin A 存在下であれば、胞子形成を経てもプラスミドの脱落が無いことを確認した。プラスミド法では、標的遺伝子の破壊は困難である。提案された候補遺伝子は基本的に転写調節因子であるため、ドミナントネガティブ法によるノックダウンが適用可能であると考え、現在、新しい数理モデルにより示唆された 8 候補遺伝子に関してプラスミド法による形質転換体の作成を行っているところである。

vii. 統合オームクスモデル予測精度の検証 (H30-32、産総研、江崎グリコ、バイオジェット)

②-vi 及び本項は H32 年度までに行う予定の項目であるが、②-vi で形質転換体を作成しているところであり、取得次第、フラスコスケール及び 5 L ミニジャースケールでの色素生産性評価を行うとともに、得られた形質転換体では、どのように遺伝子発現が変化したかを RNA-seq. により網羅的遺伝子発現データを取得し、色素生産性と併せて数理モデルへフィードバックし、有効性評価を行う予定。

viii. パイロット試験装置を用いた実用化検討 (江崎グリコ、産総研)

本項は、H31 年度から実施予定。

(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	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	0	0	0	0	0
2018 *1	0 (2)	1 (1)	0 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	5	1	4	0	0	0	0

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	0 (0)	0 (0)	0 (1)
2020 *2	2	10	2

知財戦略については、(5)運営管理に記載の通り。

2.3.3.8 微生物を用いたパプリカ由来カロテノイドの新規生産法の有効性検証

担当機関：江崎グリコ株式会社、石川県立大学、神戸大学、産業技術総合研究所

(1) 背景と目的

食品用色素には天然色素と合成色素が存在するが、近年、天然色素のニーズが急激に上昇している。現在、天然色素の原料となる植物の調達に関しては、その大半を中国に依存しているのが現状である。原料を植物に頼らず微生物において色素生産が実現できれば、原料調達の問題が回避でき、日本企業が世界をリードできると考えられる。一方、カロテノイド色素は、可視光、紫外線の吸収機能、活性酸素の消去機能、完全な共役電子系、などの特徴を有する機能材料であり、色素としての利用以外に、生理機能素材としての健康食品、化粧品への利用が世界的に進むと考えられている。これまでの研究で、パプリカ中には、アスタキサンチンを上回る非常に高い抗酸化活性を有するカロテノイドが多く存在することが確認されており、パプリカ由来カロテノイドは生理機能素材として食品、化粧品、医薬部外品で事業化が期待できる。しかし、パプリカ植物中のカロテノイド含有量は非常に低く、パプリカ植物からの抽出によってカロテノイドを大量生産するには実用化に問題がある。

本研究では、パプリカ由来カロテノイドの微生物生産実現のため、カロテノイド代謝工学技術、酵母による物質生産技術、及び代謝を設計するための情報解析技術、など、ドライ技術とウェット技術を組み合わせ、実用的な生産系を構築することで、世界に先駆けて国際競争力のあるカロテノイド生産系を構築し、事業活用する。

(2) 位置づけ、目標値

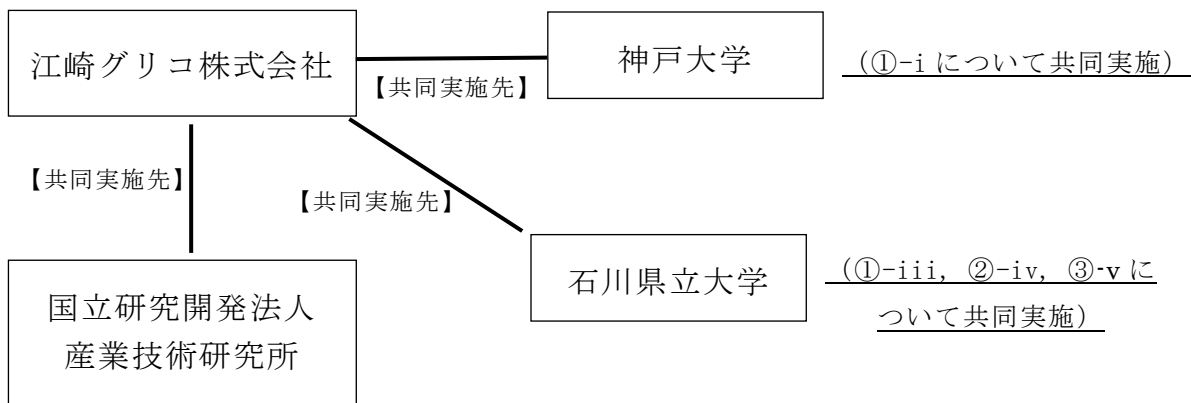
中間目標	<ul style="list-style-type: none"> 代謝酵素候補遺伝子導入株の改良（目標値：改良株の構築2株以上） 大型発酵装置等での生産性の検証（目標値：パプリカ由来希少カロテノイドの生産性 0.3 g/L 以上） 構築微生物等におけるトランスクリプトーム解析（目標値：2株以上）
最終目標	<ul style="list-style-type: none"> パプリカ由来カロテノイドのより高効率な生産（1 g/L 以上）が可能な微生物を構築する

(3) 全体計画

開発項目	開発内容	28年	29年	30年	31年	32年
①カロテノイドA生産微生物の構築と実生産スケールでの検証	i. 未同定酵素の予測：ドライ技術で候補遺伝子を予測する。			→		
	ii. 検証用微生物の構築：大腸菌、酵母を宿主微生物として生産菌株を構築する。			→		
	iii. 候補遺伝子の導入・評価：大腸菌、酵母、植物に導入して生産性の評価を行う。					→
	iv. 微生物の構築、解析、改良：構築した組換					
		→				

	え大腸菌、酵母での生産条件検討、トランスクリプトーム解析を実施する。							
	v. 生産性検証(ラボ機、実機) : 構築、改良された組換え大腸菌、酵母のカロテノイド生産性をミニジャーあるいは大型発酵槽を用いて検証する。							→
②カロテノイド B 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証	iv. 微生物の構築、解析、改良 : 構築した組換え大腸菌、酵母での生産条件検討、トランスクリプトーム解析を実施する。							→
	v. 生産性検証(ラボ機、実機) : 構築、改良された組換え大腸菌、酵母のカロテノイド生産性をミニジャーあるいは大型発酵槽を用いて検証する。							→
③カロテノイド D、カロテノイド E 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証	iv. 微生物の構築、解析、改良 : 構築した組換え大腸菌、酵母での生産条件検討、トランスクリプトーム解析を実施する。							→
	v. 生産性検証(ラボ機、実機) : 構築、改良された組換え大腸菌、酵母のカロテノイド生産性をミニジャーあるいは大型発酵槽を用いて検証する。							→

(4) 実施体制



(①-i, ii, iii, ②-iv, v, ③-iv, v について共同実施)

(5) 運営管理

半年に一度の全体会議、一年に一度の外部有識者による技術推進委員会に参加し、進捗状況を発表するとともに、テーマの推進に有益な助言等を他の参画メンバー及び推進委員より受けた。チームの運営に関しては、江崎グリコ株式会社が主体となって、約3か月に1度(年4回程度)、各参画機関の当該期間における実施サブテーマについて、進捗状況の報告・情報共有を行うため、

ドライチームメンバーとともにチームミーティングを開催した。本研究テーマでは、石川県立大学で開発されたカロテノイド合成遺伝子/プラスミドベクター系を基本に、そのパブリカ由来各種カロテノイド合成遺伝子を付加したディリバティブを複数機関で活用する。そのため、遺伝子情報、遺伝子組換え体等の研究成果物を参画機関内で迅速に共有し、相互に利用できるようMTA/NDA 契約を締結した。

(6) 実施の効果

商業用カロテノイド生産菌改良株が完成すれば、植物抽出に頼るアジアを中心とした新興国企業に対し、圧倒的なコスト競争力を生み出すことができると考えられる。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度	今後の課題と解決方針
①カロテノイド A 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証	i. 未同定酵素の予測を行う	ドライ技術で候補遺伝子を 26 種類予測し、ウェットチームに提供した。	○	
	ii. 検証用微生物の構築を行う	i の候補遺伝子を合成し、大腸菌、酵母を宿主微生物として生産菌株を構築できた。	○	
	iii. 候補遺伝子の導入・評価を行う	大腸菌、酵母、植物に導入して生産性の評価を行った。	○	
	iv. 微生物の構築、解析、改良を行う	構築完了は確認できたが、大腸菌、酵母での生産には至っていない。	×	26 個の遺伝子を同時発現させる検討実施中。ネガティブな結果なら本開発項目は終了予定。
	v. 生産性検証（ラボ機、実機）を行う		×	
②カロテノイド B 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証	iv. 微生物の構築、解析、改良を行う	カロテノイドB合成用微生物（大腸菌ならびに酵母）を構築し、カロテノイドBの直前の物質（中間体 a）までの生産性を確認できた。	△	キー遺伝子産物の酵素と基質との反応局在性を解明し、物質生産を実現し、生産条件の最適化を行う。
	v. 生産性検証	iv で構築した微生物	△	

	(ラボ機、実機)を行う	の中間体a生産性をミニジャーで検証できた。		
③カロテノイドD、カロテノイドE生産微生物の構築と実生産スケールでの検証	iv. 微生物の構築、解析、改良を行う	2種類の微生物(大腸菌、ならびに酵母)におけるカロテノイドD生産菌株を構築できた。	○	生産性改良のための課題抽出と情報取得のため、構築微生物のトランスクリプトーム解析を実施予定。
	v. 生産性検証(ラボ機、実機)を行う		×	

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目		現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
①カロテノイドA生産微生物の構築と実生産スケールでの検証	i. 未同定酵素の予測を行う	ドライ技術で候補遺伝子を26種類予測し、ウェットチームに提供した。	パプリカ由来カロテノイドのより高効率な生産(1g/L以上)が可能な微生物を構築する	現在進行中の、26個の遺伝子を同時発現させる検討において、大腸菌ならびに酵母両方について良い結果が得られない場合は、最終目標達成は困難と思われる。
	ii. 検証用微生物の構築を行う	iの候補遺伝子を合成し、大腸菌、酵母を宿主微生物として生産菌株を構築できた。		
	iii. 候補遺伝子の導入・評価を行う	大腸菌、酵母、植物に導入して生産性の評価を行った。		
	iv. 微生物の構築、解析、改良を行う	構築完了は確認できたが、大腸菌、酵母での生産には至っていない。		
	v. 生産性検証(ラボ機、実機)を行う	同上		
②カロテノイドB生産微生物の構築と実生産	iv. 微生物の構築、解析、改良を行う	カロテノイドB合成用微生物(大腸菌ならびに酵母)を構築し、カロテノイドBの直前の	パプリカ由来カロテノイドのより高効率な生産(1g/L以上)が可能な微生物を構築する	今後「トランスクリプトーム解析で得られた情報に基づく代謝経路の最適化」と「構築した大腸菌あ

スケールでの検証		物質（中間体 a）までの生産性を確認できた。		るいは酵母株の改良・評価」のサイクルを回すことで、最終目標である高効率な希少カロテノイド生産（1 g/L以上）の生産菌株構築、ならびに実機での検証ができる見込み。
	v. 生産性検証（ラボ機、実機）を行う	iv で構築した微生物の中間体 a 生産性をミニジャーで検証できた。		
③カロテノイド D、カロテノイド E 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証	iv. 微生物の構築、解析、改良を行う	2 種類の微生物（大腸菌、ならびに酵母）におけるカロテノイド D 生産菌株を構築できた。	パプリカ由来カロテノイドのより高効率な生産（1 g/L以上）が可能な微生物を構築する	
	v. 生産性検証（ラボ機、実機）を行う	同上		

(9) 研究開発の成果と意義

① カロテノイド A 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証

i. 未同定酵素の予測：ドライ技術で候補遺伝子を予測する。（H28-30、神戸大、江崎グリコ、産総研）

2.3.2 代謝系を設計する情報解析技術の開発のうち、2.3.2.1 新規代謝経路の設計・最適化手法の開発において、機械学習による新規酵素反応予測手法の開発に資する適用例として、カロテノイド A の生合成遺伝子 (*EnzX*) 配列の予測を実施した。具体的には、1) 機械学習による酵素遺伝子の判別器を利用した予測、2) マルチプルアラインメントをもとにした配列解析との比較検証、を実施した。研究開発の成果は以下の通り。

1) 機械学習による酵素反応判別

機械学習による新規酵素反応予測手法は、酵素配列のみならず、基質・生成物といった化学構造を考慮して、学習データをもとに酵素反応の判別を行う。この際、酵素配列・化学構造を特徴ベクトル化し、学習データ（正例・負例）データをもとに、サポートベクターマシン（SVM）によって判別器を作成する。正例としては、予測する酵素反応に関して既知の EC 番号に分類される酵素反応情報（配列・化学構造）を利用し、負例はそれ以外の EC 番号に分類される酵素反応情報、または酵素配列と化学構造情報を任意に組み合わせた情報を利用する。学習データとしては、与えられた課題を考慮して、正例・負例の組合せを数種準備し、複数の学習判別器を生成し、各結果を平準化することで、学習そのものの偏りを軽減することとした。テストデータとしては、トウガラシの成熟フェーズにおいて、顕著に発現のみられる遺伝子発現データを利用して、遺伝子配列候補を抽出し、これらを判別器で予測した。

2) 配列解析との比較検証

配列解析では、当該代謝パスウェイ上の酵素遺伝子と予測に利用した遺伝子発現データ由来の酵素遺伝子の各配列情報を利用し、クラスタリングを実施したところ、配列解析のみでは類似と判定されない酵素遺伝子配列であっても、機械学習においてスコアが高いケースもあることが示され、酵素遺伝子候補の提示という観点から、多様性を有する配列を提示することができた。

ii. 検証用微生物の構築：大腸菌、酵母を宿主微生物として生産菌株を構築する。（H28-30、江崎グリコ、産総研）

1) 検証用大腸菌の構築

カロテノイド産生細菌 *Pantoea ananatis* は、大腸菌 (*Escherichia coli*) と同じクラス（綱）である γ -Proteobacteria に属することもあり、*P. ananatis* 由来のカロテノイド合成遺伝子群は大腸菌で容易に機能発現し、大腸菌に、リコペン（リコピン）、 β -カロテン、ゼアキサンチン生産能を与える（図 2.2.3.8-1）。

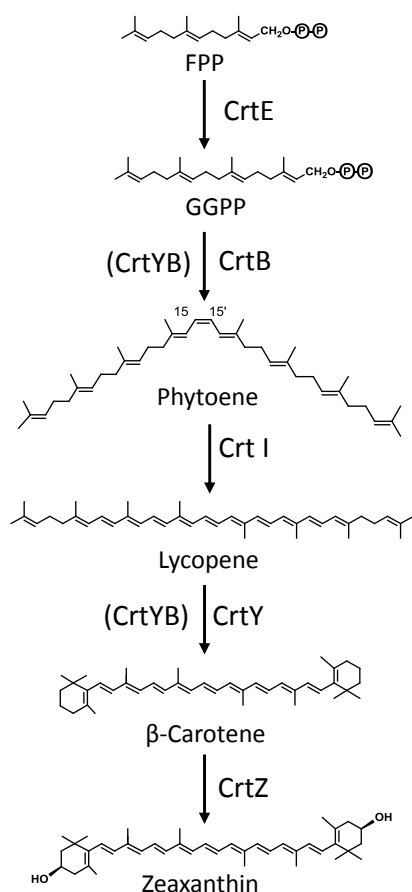


図 2.3.3.8-1 微生物のゼアキサンチン合成系

大腸菌を用いてカロテノイド A 生産微生物を構築するため、ゼアキサンチン合成に必要な *P. ananatis* の *crt* 遺伝子群を含むプラスミド pAChP-Zea を導入したゼアキサンチン合成大腸菌株にターゲット遺伝子を導入し、カロテノイド A 合成の中間産物である中間体 b の合成を試みた。過去に、藻類由来のターゲット遺伝子が大腸菌では機能しないことが分かっていたため、様々な植物由来のターゲット遺伝子の大腸菌での機能評価を試みた。*Capsicum annuum*、*Arabidopsis thaliana*、*Zea mays*、*Ipomoea nil*、*Prunus armeniaca* 各由来のターゲット遺伝子を導入した結

果、*C. annuum* 由来ターゲット遺伝子が*E. coli*で良く機能することが分かり、中間体 b および中間体 a 合成株を作出することができた。

*E. coli*には様々な株が存在するため、*P. ananatis* 由来のリコペン生合成遺伝子群などを利用して、カロテノイド生産能、生産の安定性、できるだけ変異の数が少ないこと等を指標に、種々の*E. coli*菌株の評価を行った。その結果、最適なカロテノイド生産用宿主株として、JM101 (DE3)、BL21(DE3) の2株を選出した。さらに、これら2株について全ゲノム配列を解読した。

これまでに構築したカロテノイド生産*E. coli*は、プラスミド導入により獲得しており、今後の安定的かつ経済的な生産のためには、プラスミドではなく*E. coli*ゲノムに直接カロテノイド生合成遺伝子を挿入することが望ましい。そこで、相同組換えにより*E. coli*ゲノムにカロテノイド生合成遺伝子を挿入する試みを行った。その結果、すでに相同組換えが報告されている*E. coli*菌株での予備実験を経て、実際に生産に使用する予定の BL21(DE3)、JM101(DE3)で IPP isomerase をコードする *idi* 遺伝子 (イソプレノイド合成の鍵遺伝子) をゲノムに挿入した相同組換え株を獲得することができた。相同組換えを繰り返すことにより、*idi* 遺伝子以降の遺伝子をゲノムに挿入し、カロテノイド安定生産株を構築する。

2) 検証用酵母株の構築

酵母におけるカロテノイド生産に関わる研究は、これまで様々な研究結果が報告されているが、その多くが本来カロテノイドの生産能を有する酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* などにおける生産性の改善や、また、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* などのカロテノイド非生産酵母でのリコペン、 β -カロテン、アスタキサンチンなどの生産に関わるものである。本課題のターゲットであるカロテノイド A やカロテノイド B・カロテノイド C は、前駆体として中間体 b からの生合成が示唆されており、そのため、ドライ技術によって予測される候補遺伝子の検証のためには、中間体 b 生合成酵母株が必須である。しかしながら、酵母におけるこれらカロテノイドの生産の報告は、これまでほとんどなされていない。

そこで初めに、本課題における検証用酵母株の構築に適した酵母株を選抜するため、カロテノイド生産性が比較的高く、複数種類の遺伝子の同時保持のため、多数の選択マーカー遺伝子が使用可能な酵母株の選抜を行った。用いた酵母株は、これまでの研究において出芽酵母におけるタンパク質生産において比較的高い生産性を有する株として、INVSc1 株 (Thermo Fisher Scientific 社)、内在性プロテアーゼを欠損させた BY4743 株、および YPH500 株を用いた。

酵母でのカロテノイド生産において主に利用されているカロテノイド生合成遺伝子群としては、*Pantoea ananatis* 由来 *crtE* (以後 *PaCrtE* と記載)、*crtI* (以後 *PaCrtI* と記載)、*crtB* (以後 *PaCrtB* と記載)、*crtY* (以後 *PaCrtY* と記載)、または、カロテノイド生産酵母である *Xanthophyllomyces dendrorhous* 由来 *CrtE* (以後 *XdCrtE* と記載)、*CrtI* (以後 *XdCrtI* と記載)、*CrtYB* (以後 *XdCrtYB* と記載) が利用されており、これらの遺伝子セット (*PaCrtE/PaCrtI/PaCrtB/PaCrtY*、または *XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB*) を導入することで、出芽酵母においても β -カロテンの生産が報告されている。そのため、これらの遺伝子セットを用いた発現プラスミドを構築し、それぞれ3種類の宿主酵母株へ導入した。その結果、いずれの宿主酵母株においても、*P. ananatis* 由来遺伝子セット (*PaCrtE/PaCrtI/PaCrtB/PaCrtY*) を導入した株よりも、*X. dendrorhous* 由来遺伝子セット (*XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB*) を導入した株において、主に β -カロテンの蓄積による比較的強い酵母細胞の着色 (橙色) が観察され、酵母細胞におけるカロテノイド生産において *X. dendrorhous* 由来遺伝子セットが適していることが示唆され、

以後の実験では主に本遺伝子セット (*XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB*) を用いて行なった。また、宿主酵母株として用いた3株において、INVSc1 株は酵母細胞の着色が弱く、カロテノイド生産には適していないことが明らかとなった。一方、BY4743 株および YPH500 株は、いずれも酵母細胞の強い着色が観察され、特に YPH500 株は高いカロテノイド生産性が示唆されたことから、以後の実験では、本酵母株を用いて行なった。

次に、中間体 b の前駆体の生合成のため、*XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB* 遺伝子セットに加え、*P. ananatis* 由来 *crtZ* (以後 *PaCrtZ* と記載) を用いた発現プラスミドを作製した。本プラスミドを YPH500 株に導入した結果、 β -カロテンは中間代謝産物として残存してはいるが、ゼアキサントンの生産が確認でき、中間体 b の前駆体生産株を構築することができた。

次に、パプリカが有するターゲット遺伝子を用いた発現プラスミドを構築し、ゼアキサントニン生合成遺伝子セット (*XdCrtE/XdCrtI/XdCrtYB/PaCrtZ*) を用いた発現プラスミドと合わせて YPH500 株に導入した株を作製した。これらの酵母株における中間体 b・中間体 a の生産について、HPLC によるカロテノイド組成分析を行なった結果、少量ではあったがその生産に成功した。以上の実験結果から、カロテノイド A の前駆体と考えられる中間体生合成株の構築に成功し、検証用微生物の構築を完了した。

iii. 候補遺伝子の導入・評価：大腸菌、酵母、植物に導入して生産性の評価を行う。(H28-30、江崎グリコ、石川県立大、産総研)

1) 大腸菌における候補遺伝子の評価

i の項で予測された EnzX 候補遺伝子を実験室大腸菌中間体 b/中間体 a 合成株に導入し、カロテノイド A の蓄積の有無で EnzX の *in vivo* 活性を評価した。まず、タンパク質構造予測のスコアの高い7候補遺伝子について検証を行ったが、カロテノイド A の蓄積は見られなかった。そこで、新たに異なる観点(登熟期の遺伝子発現パターン、局所予測、既知のカロテノイド酵素群とのアミノ酸配列の相同性)から絞り込まれた19遺伝子について検証を行ったが、カロテノイド A の蓄積は見られなかった。

2) 酵母における候補遺伝子の評価

カロテノイド A の生合成に関わる未知遺伝子について、ドライ解析によって予測された候補遺伝子の評価のため、各候補遺伝子と改変型候補遺伝子を用いた各種発現プラスミドを構築し、検証用酵母株への導入と発現による検証を現在進めている(図 2.3.3.8-2)。構築株の一次スクリーニングとして、カロテノイド A の生合成による酵母細胞の着色の変化が予測されたが、現在、着色の変化が観察された構築株は得られていない。引き続き検証を進め、本年度中に完了予定である。

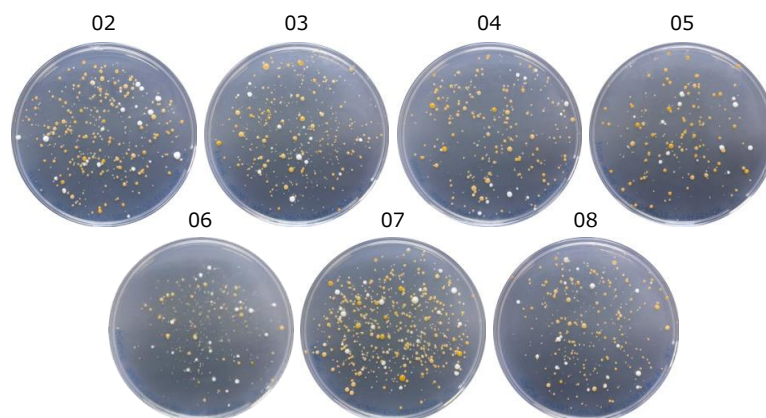


図 2.3.3.8-2 予測された候補遺伝子導入株の検証（一部）

3) 植物を用いた候補遺伝子の評価

これまでに、植物形質転換用ベクターpZH2B にユリ由来のターゲット遺伝子を挿入したプラスミドを、アヤメ科のクロコスミア (*Crocoshia ×crocoshiiiflora*)、ヒルガオ科のサツマイモ (*Ipomoea batatas*)、タバコ科のタバコ (*Nicotiana tabacum*) にアグロバクテリウム感染法によって導入する実験を行った。その結果、クロコスミアやサツマイモでは赤色をしたカルスが得られ（特にクロコスミアの赤色が濃かった）、ターゲット遺伝子の導入を確認し、カロテノイド C の生産を検出した（図 2.2.3.8-3）。また、タバコにおいても、赤色かかった根やメシベ等が得られ、ターゲット遺伝子の機能発現が示唆された。なお、候補遺伝子の機能を評価するにあたり、最も生育速度が早いタバコ植物を利用することにした。そのためにまず、植物形質転換用ベクターpZH2B にそれぞれの候補遺伝子を挿入した。次に、これらの候補遺伝子ベクターを、アグロバクテリウム感染法を用いてタバコを形質転換した。これまでに、およそ半数の遺伝子の形質転換を行い、抗生物質耐性カルスが得られつつある。また、未知反応に関わる遺伝子が複数であった場合を想定して、長鎖 DNA を利用して一連の候補遺伝子を同時に導入することも検討中である。

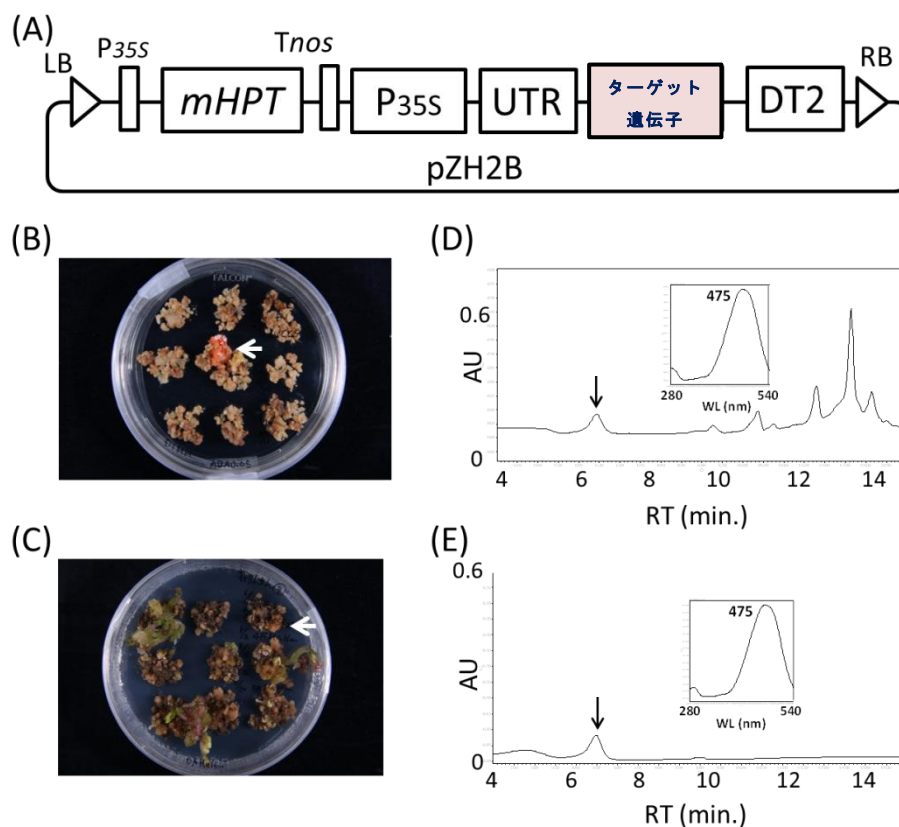


図 2.2.3.8-3 ユリ由来ターゲット遺伝子導入植物体

(A) ユリ由来 ターゲット遺伝子導入用プラスミド

(B) ユリ由来 ターゲット遺伝子導入クロコスミアカルス (矢印で示す赤いカルス)

(C) ユリ由来 ターゲット遺伝子導入サツマイモカルス (矢印で示す赤いカルス)

(D) 形質転換サツマイモカルスから抽出したカロテノイドの HPLC クロマトグラム (インセットはカロテノイド C と思われるピークの吸収曲線を示す)

(E) カロテノイド C 標品の HPLC クロマトグラム (インセットはカロテノイド C の吸収曲線を示す)

② カロテノイド B 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証

iv. 微生物の構築、解析、改良：構築した組換え大腸菌、酵母での生産条件検討、トランスクリプトーム解析を実施する。(H28-30、江崎グリコ、石川県立大、産総研)

1) 大腸菌におけるカロテノイド B の生産株の構築

①-ii で作成された中間体 a 合成大腸菌株に対し、ターゲット遺伝子を導入し、カロテノイド C 合成を試みた。カロテノイド C およびカロテノイド B を蓄積することが分かっている *Capsicum annuum* および *Lilium lancifolium* 由来のターゲット遺伝子と、これらターゲット遺伝子と同一性が高い *Citrus sinensis* 由来遺伝子を導入したが、カロテノイド C およびカロテノイド B の蓄積は認められなかった。しかし、リコペン合成株にこれらターゲット遺伝子を導入すると、副活性である lycopene β -cyclase 活性が認められ、*in vivo* でターゲット遺伝子は活性型で存在することが分かった。ターゲット遺伝子産物及びその他のカロテノイド合成関連酵素の局在性予測結果から、ターゲット遺伝子産物と疎水性の高いカロテノイド基質との局在性の不一致が原因の一つと予想し、膜輸送シグナル構造が知られている *crtZ* 遺伝子のシグナル領域をターゲット遺

伝子に結合することを試みたが、ターゲット遺伝子産物は機能しなかった。また、CrtZ や ZEP などの局在性が既知でターゲット遺伝子産物より代謝の上流で機能しているタンパク質とターゲット遺伝子産物の融合タンパク質化を試みたが、*in vivo*でのターゲット遺伝子産物活性は確認できなかった。

2) 酵母におけるカロテノイド B 生産株の構築

カロテノイド C およびカロテノイド B の前駆体は、それぞれ、中間体 b および中間体 a であり、また、カロテノイド C・カロテノイド B の中間体 b・中間体 a からの変換は、カロテノイド B・カロテノイド C 合成酵素（ターゲット酵素）が触媒することが報告されている。そのため、前述の検証用酵母株に用いた中間体 a 生合成遺伝子セットに加えて、ターゲット酵素遺伝子を有する植物であるパプリカおよびオニユリ由来のターゲット酵素遺伝子を用いて、酵母におけるカロテノイド C・カロテノイド B 生産株の構築を試みた。

パプリカ由来ターゲット酵素遺伝子の発現プラスミドを構築し、中間体 a 生合成遺伝子セットを含む発現プラスミドを用いて形質転換株を作製した。また、ターゲット酵素は、植物体内では色素体に局在していることが知られており、その N-末端には葉緑体（色素体）への移行シグナルが含まれている。そのため、本移行シグナルが出芽酵母細胞内において、その触媒活性等に影響を及ぼすことも考慮し、全長型ターゲット酵素、および葉緑体移行シグナルを除いた成熟型ターゲット酵素を導入した酵母株をそれぞれ作製した。これらの酵母株において、カロテノイド C・カロテノイド B の生産について検証を試みたがそれらの生合成は確認できなかった。

これらの構築株においてカロテノイド C・カロテノイド B の生合成が確認できなかったことから、宿主酵母細胞内におけるターゲット酵素遺伝子発現が困難であることが示唆された。そのため、宿主酵母細胞内においてターゲット酵素タンパク質の発現を確認するため、ターゲット酵素タンパク質の過剰発現を試みた。本実験では、低温条件下において目的タンパク質を高度に発現・蓄積させることが可能である出芽酵母低温誘導発現系を用いて行なった。本発現実験の結果、ターゲット酵素タンパク質は可溶性画分にはその発現が確認できなかったが、全細胞タンパク質サンプルにおいてターゲット酵素の発現・蓄積を確認できた。さらに、構築株における導入カロテノイド生合成遺伝子についてのターゲットプロテオーム解析（(1)-3. 高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術の開発との連携による依頼分析）を試みた結果、1 遺伝子産物以外の遺伝子産物の発現を可溶性画分に確認することができた。以上の結果から、これらの遺伝子産物が出芽酵母細胞内においてタンパク質として発現に成功していることが示唆された。

ターゲット酵素は、中間体 b・中間体 a からカロテノイド C・カロテノイド B への変換だけでなく、副反応として、リコペンから β -カロテンへの反応を触媒することが知られている。そのため、リコペン生合成遺伝子セット（PaCrtE/PaCrtI/PaCrtB）を導入した発現プラスミドを構築し、ターゲット酵素発現プラスミドと合わせて、YPH500 株に導入した形質転換株を構築した。本形質転換株のカロテノイド組成分析の結果、僅かではあるが β -カロテンの生合成を確認できた。このことから、出芽酵母細胞内においてターゲット酵素タンパク質は少なくとも副反応を触媒できる形で発現できていることが示唆された。

また、オニユリが有するターゲット酵素遺伝子の発現も試みた。ターゲット酵素遺伝子の発現同様、完全長ターゲット酵素および葉緑体移行シグナルを除いた成熟型ターゲット酵素遺伝子を用いて発現プラスミドを構築し、中間体 a 生合成遺伝子セットを含む発現プラスミドと共に用い

て、形質転換株を作製した。本構築株の HPLC によるカロテノイド組成分析の結果、カロテノイド C・カロテノイド B の生産は、現在のところ確認できていない。

以上の結果から、ターゲット酵素タンパク質の発現によるカロテノイド C・カロテノイド B 生産酵母株の構築は、ターゲット酵素タンパク質の酵母細胞内での発現はできているものの、主反応である中間体 b・中間体 a からカロテノイド C・カロテノイド B への触媒反応が困難であることが示唆された。本年度も引き続きカロテノイド B 生産酵母株の構築のため、さらなる改変を進める予定である。

v. 生産性検証(ラボ機、実機) : 構築、改良された組換え大腸菌、酵母のカロテノイド生産性をミニジャーあるいは大型発酵槽を用いて検証する。(H28-32、江崎グリコ、産総研)

中間産物である中間体 a の大腸菌での生産について、ミニジャー (3 L) を用いて培養条件を検討した。大腸菌 JM109 株に pAHP-Zea および pUC18-CaZEP を導入した組換え大腸菌中間体 a 合成株を用いた。2xYT 培地 2.0L を調製し、培地の pH および溶存酸素濃度を経時的に測定しながら条件①200rpm・通気無し、条件②200rpm・通気あり、条件③400rpm・通気あり、の3条件で25℃で培養した。その結果、①と②は大腸菌の対数増殖期以降に溶存酸素が枯渇した環境となり、③では一定の溶存酸素濃度を維持した環境となった。pH に大きな違いは見られなかった。培養開始後 40 時間後および 63 時間後にサンプリングを行い、大腸菌からカロテノイドを抽出し、HPLC を用いてカロテノイド組成を調べた結果、溶存酸素濃度の高い③の条件で中間体 a が多く合成されることが確認された(図 2.3.3.8-4)。この結果は、中間体 b および中間体 a 合成反応において、エポキシド形成のために酸素が必要であることが関連していると思われる。

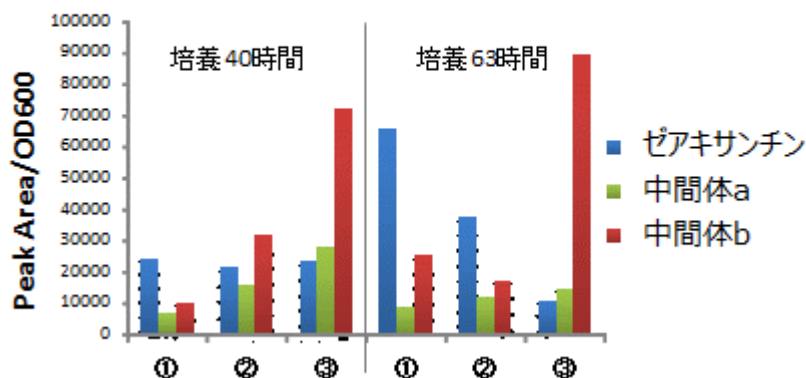


図 2.3.3.8-4 培養条件によるカロテノイド組成の変化

③ カロテノイド D、カロテノイド E 生産微生物の構築と実生産スケールでの検証

iv. 微生物の構築、解析、改良 : 構築した組換え大腸菌、酵母での生産条件検討、トランスクリプトーム解析を実施する。(H29-30、江崎グリコ、産総研)

1) 大腸菌におけるカロテノイド D 生産株の構築

カロテノイド D は分子の両端の β 環の一方に水酸基が付加された構造をもち、両端の β 環の両方に水酸基が付加されるとゼアキサンチンとなる。この反応を触媒する酵素は CrtZ (微生物)

もしくは β -carotene hydroxylase (β CH, 植物) と呼ばれ、両端の β 環に作用する。そのため、中間産物であるカロテノイド D までで反応を止めるのは難しいと考えられてきた。カロテノイド D 合成株を構築するため、リコペン合成株 (石川県立大学にて構築) に *Lycopene β -cyclase* 遺伝子および β CH 遺伝子を導入した。温州ミカン (*Citrus unshiu*) で多くのカロテノイド D を蓄積することが分かっていることから、*C. unshiu* 由来 β CH 遺伝子を用いた。 β CH と同じ反応を触媒する細菌由来の CrtZ をコードする遺伝子を導入した場合と比較して、ゼアキササンチンの生成量が抑えられることが分かったが、ゼアキササンチンの蓄積を完全に抑えることはできていない。そのため、カロテノイド D の合成に最適な遺伝子の予測をドライチームに依頼し、候補遺伝子の検証を行う予定である。

2) 大腸菌におけるカロテノイド E 生産株の構築

カロテノイド E を生産するために、フィトエン生産大腸菌にゼニゴケ由来の *LCYb*, *LCYe* 遺伝子、ならびにゼニゴケ由来の *BHY*, *CYP97C* 遺伝子を導入した大腸菌を構築した (図 2.3.3.8-5)。この大腸菌は、カロテノイド E を主生産物として蓄積し、中間産物であるゼイノキササンチン (ゼイノキササンチン) および α -カロテンも蓄積していた。石川県立大学は、カロテノイド E 合成のための独自遺伝子を用いた製法を特許化済み (特許 5965932) である。

これまで我々は、大腸菌にパスウェイエンジニアリングを施すことで、3 円/g と安価なアセト酢酸エチルエステル

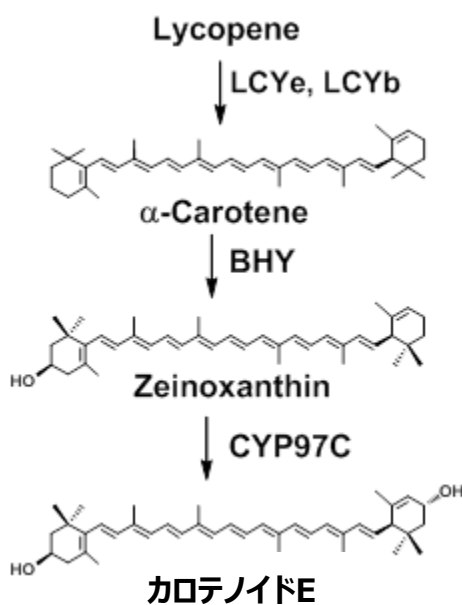


図 2.3.3.8-5 カロテノイド E の生合成系

(EAA) を基質としてテルペン類を合成する取り組みを行ってきた。メバロン酸 (Mev) 経路酵素群、アセト酢酸 CoA リガーゼ、およびパラニトロベンジルエステラーゼ等をコードする一連の遺伝子を大腸菌に導入し、EAA からテルペンの構成単位となるイソペンテニルニリン酸 (IPP) を合成する経路を新たに付与することができた。さらに、大腸菌株によっては、フルクトース等の糖を培地に添加することによって、大腸菌の増殖とテルペン生産が促進されることを見出している。そこで、EAA とフルクトースの添加を特徴とする組換え大腸菌の培養により、カロテノイド E 生産を試みることにした。

用いたプラスミドは以下の 4 種、すなわち 1) pAC-Mev/AacI/pnbA、2) pRK-Hpidi/crtEBI、3) pET-MpLCYb4/e2、4) pRSF-MpCYP97C/BHY7 である。1) は EAA から Mev 経路経由で IPP を合成、2) は IPP からジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) の合成と、ファルネシルニリン酸 (FPP) からリコペンを合成、3) はリコペンから α -カロテン、4) は α -カロテンからカロテノイド E を合成するそれぞれの酵素遺伝子を有する。これらのプラスミドを導入した大腸菌 JM101 (DE3)、および BL21 (DE3) を、2 ml LB 培地を用いて培養した結果を以下のグラフに示した。なお、LB 培養には、糖無添加、フルクトース 1% 添加、グルコース 1% 添加の 3 種類を使用した。また、導入遺伝子発現のための IPTG 添加は、本培養開始後 24 hr (1d) または同 48 hr (2d) に行い、トータルの培養時間はいずれも 72 hr とした。

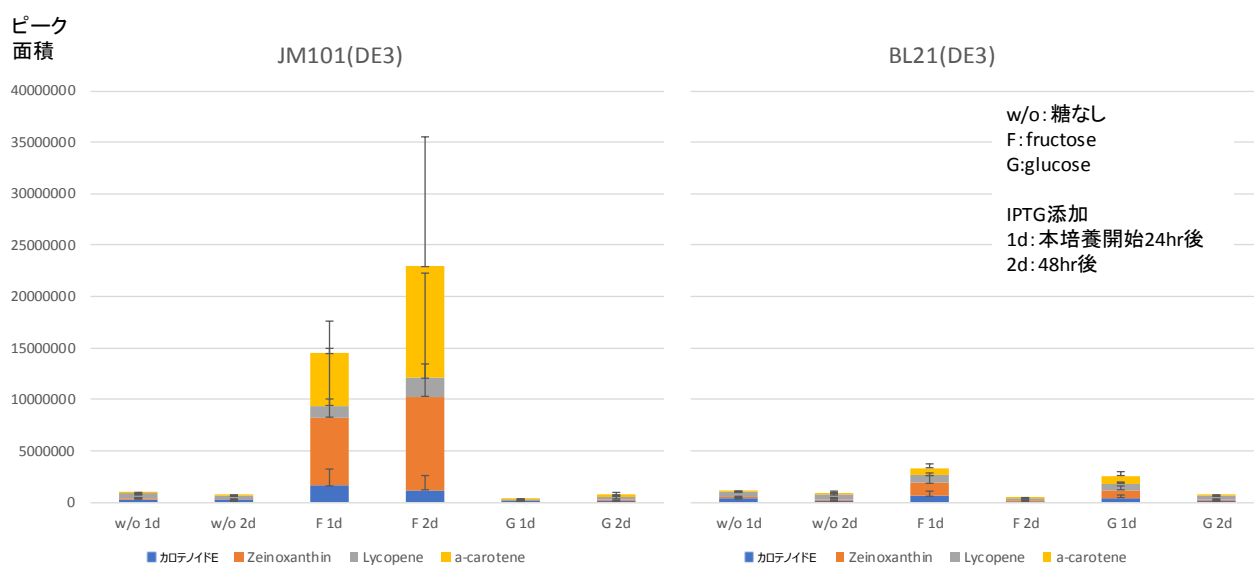


図 2.3.3.8-6 大腸菌におけるカロテノイド E の生合成

図 2.3.3.8-6 のようにクローン間のばらつきが非常に大きかったが、傾向としては JM101 (DE3) 株をフルクトース入り培地で培養時、カロテノイド生産性が高かった。その際、IPTG を 48 hr で添加したものが 24 hr で添加したものより生産性が高く、大腸菌生重量に対する全カロテノイド生産量は $13.22 \mu\text{g/g FW}$ 、培地 1 L 当たりでは $3185.4 \mu\text{g/L}$ となった。一方、カロテノイド E の生産量は $0.74 \mu\text{g/g FW}$ 、 $178.8 \mu\text{g/L}$ となった。今後、培養条件、RBS 改変、アミノ酸置換等の検討により、カロテノイド E 生産量の向上を目指したい。

3) 酵母におけるカロテノイド D・カロテノイド E 生産株の構築

前述の出芽酵母における研究結果において、カロテノイド D は、ゼアキササンチン生合成遺伝子セット (XdcrtE/XdcrtI/XdcrtYB/PacrtZ) を用いることで、中間代謝産物として生産が可能であることがわかった。しかしながら、PacrtZ 遺伝子を用いた場合、ゼアキササンチン含量が比較的高く、その前駆体であるカロテノイド D の含量が低いことも明らかになった。そのため、PacrtZ に代わる酵素として、温州ミカン由来 β -カロテン水酸化酵素 (以後、CuCHX2 と記載) を利用することで、カロテノイド D の含量の改善を試みた。

CuCHX2 遺伝子、および改変型 CuCHX2 遺伝子を用いた発現プラスミドを構築し、 β -カロテン生合成遺伝子セット (XdcrtE/XdcrtI/XdcrtYB) を含む発現プラスミドを合わせて YPH500 株に導入

した株を構築した。これらの構築株の HPLC によるカロテノイド組成分析の結果、PaCrtZ 遺伝子を用いた場合と比較して、CuCHX2 遺伝子を用いることで、ゼアキサンチン含量を低下させることができ、また、改変型 CuCHX2 遺伝子を用いることで、ゼアキサンチン含量の増加は伴うが、カロテノイド D の含量をある程度増加させることにも成功した（図 2.2.3.8-7）。また、これらの遺伝子セットを、メバロン酸経路を強化した宿主酵母株のゲノムに導入したカロテノイド D 生産酵母株の構築を一部完了しており（図 2.3.3.8-7）、本年度中にこれら構築株の生産性の評価と、引き続き、生産性向上のための改良を進める予定である。

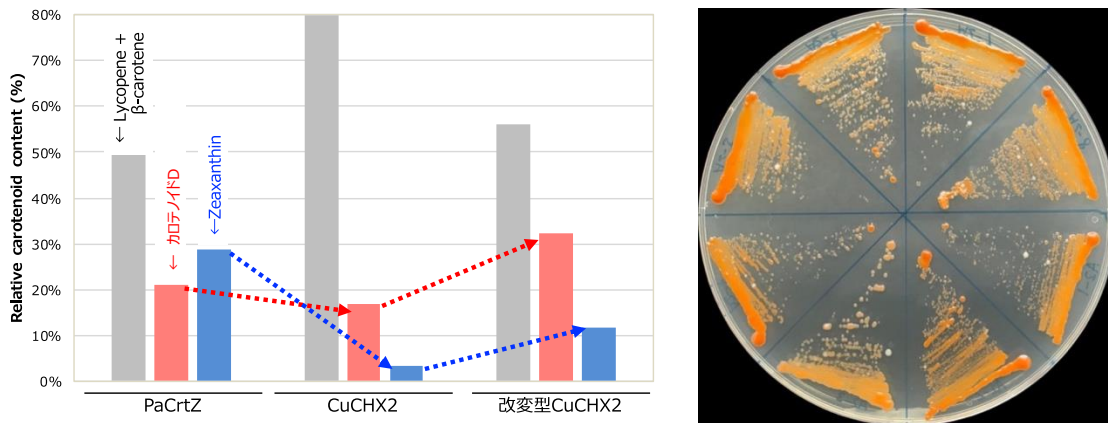


図 2.3.3.8-7. カロテノイド D 生産酵母株の改良（左図）および構築したカロテノイド D 生産酵母株（ゲノム導入株、右図）

また、カロテノイド E の酵母での生産は報告がほとんどなく、未だ実現されていない。本実験におけるカロテノイド E 生産酵母株の構築は、リコペン生合成遺伝子セット（XdCrtE/XdCrtI/PaCrtB）、およびリコペンからカロテノイド E に至る生合成経路は、ゼニゴケ由来の遺伝子群を用いることで、カロテノイド E 生産酵母株の構築を現在進めており、幾つかの構築株についてその生産について評価を行っている。本年度中に構築を完了する予定である。

v. 生産性検証（ラボ機、実機）：構築、改良された組換え大腸菌、酵母のカロテノイド生産性をミニジャーあるいは大型発酵槽を用いて検証する。（H30-32、江崎グリコ、産総研）

組換え安全委員会に答申後、H30 年度 8 月頃に検証開始予定。

(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	
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	0	0	0	0	0
2018 *1	0 (3)	0 (1)	0 (6)	2 (1)	0 (1)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	6	3	14	3	3	0	0

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	0 (2)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	4	0	6

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

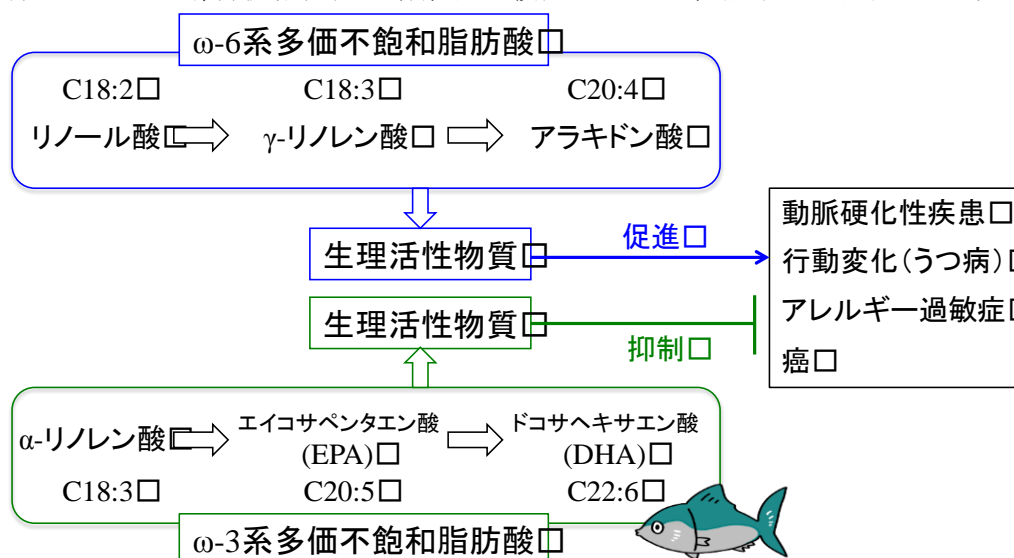
2.3.3.9 ω-3系多価不飽和脂肪酸含有油脂の生産性向上による有効性検証

担当機関：新潟薬科大学、不二製油グループ本社株式会社、長岡技術科学大学、産業総合技術研究所、九州大学、神戸大学

(1) 背景と目的

多価不飽和脂肪酸のω-3系及びω-6系脂肪酸は、人間の生体内では合成できないため、必須脂肪酸として知られている。ω-6系脂肪酸は成長、生殖生理を保つのに必須であり、ω-3系脂肪酸は、脳・網膜の働きを保つのに必須である。ω-6系脂肪酸は様々な食材に多く含まれているが、ω-3系脂肪酸を多く含む食材は一部の植物油や魚油に限られるため、意識して摂取しなければ、ω-6/ω-3が上昇して生体内の必須脂肪酸バランスが崩れる。また、ω-3系脂肪酸のα-リノレン酸は、人体内で動脈硬化予防効果を有するエイコサペンタエン酸(EPA)や認知症予防効果を有するドコサヘキサエン酸(DHA)へ変換されることもあり、世界各国で摂取目安量が決められ、積極的に摂取することが求められている(図2.3.3.9-1)。ω-3系脂肪酸の世界市場は急成長しており、新興国を中心に更なる需要が期待できる。その一方でω-3系脂肪酸の原料である魚油は、乱獲により供給量が減少続けており、需要を賄うだけの供給量を将来確保できない可能性がある。海外では、微細藻類(従属栄養)による商業生産が行われ始めているが、生産効率が悪く、価格が魚油由来に比べ数倍と割高であり、市場に十分供給できるものではない。このような状況を考慮して、本研究では、油脂酵母によるω-3系脂肪酸含有油脂の高生産技術開発を行う。油脂酵母は、細胞内に脂肪球という形で油脂を高蓄積できる酵母で、その中には乾燥菌体重量の60%以上も細胞内に油脂を蓄積する酵母も存在し、他の油糧微生物と比較してもその油脂蓄積能は高い。本研究では、乾燥菌体重量の70%以上の油脂蓄積能をもつ *Lipomyces starkeyi* を中心に開発を進める。実用化、事業化へ向けての課題として、①油脂生産性の向上(油脂量、対糖収率)、②脂肪酸組成の改変(ω-3系脂肪酸含有率)があげられる。油脂生産性向上においては、油脂蓄積変異株を取得し、オーミクス解析を行うことで得られるデータを活用した

2.3.2.3 統合オーミクス解析技術開発の有効性を検証しながら、油脂生産性向上に寄与する遺伝



子の同定及び活用を目指す。脂肪酸組成の改変においては、ω-3系脂肪酸のα-リノレン酸からEPAやDHAへの合成経路を構築し、EPA、DHAの含有率を向上させる酵素選択、改変を行う。

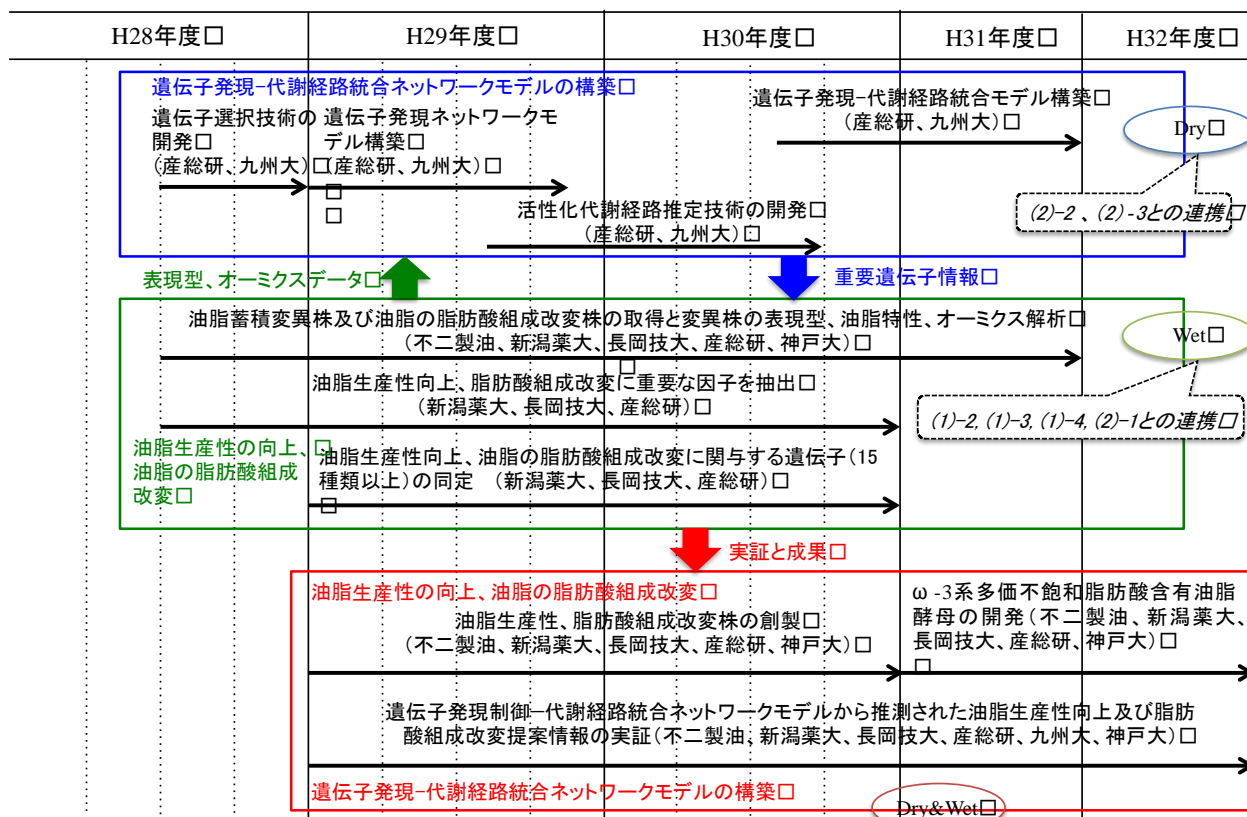
図 2.3.3.9-1 ω-3 系及び ω-6 系多価不飽和脂肪酸の種類とその機能

(2) 位置づけ、目標値

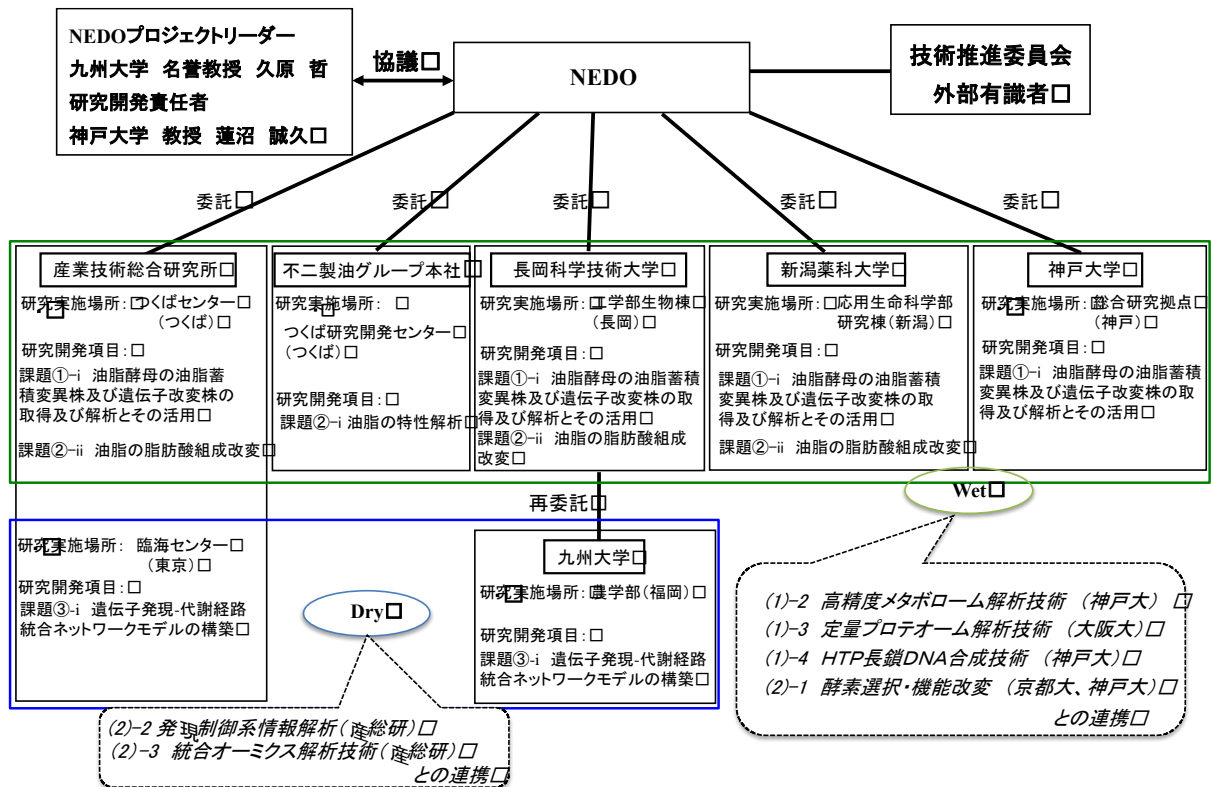
中間目標値 (H30) と最終目標値 (H32)

項目		中間目標値 (H30)	最終目標値 (H32)
油脂生産性の向上	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	30 株	—
	油脂生産性向上及び脂肪酸組成変化に関する遺伝子の同定	10 種類	—
	油脂生産性	Xg/L/Ydays	Xg/L/Ydays
	対糖油脂収率	X%	X%
油脂の脂肪酸組成変化	ω-3 系多価不飽和脂肪酸生産性	Xg/L/Ydays	Xg/L/Ydays

(3) 全体計画



(4) 実施体制



(5) 運営管理

(5).1 テーマ全体会議・・・本テーマ全参画機関（新潟薬大、不二製油、長岡技大、産総研、神戸大、九大、みずほ総研、三菱総研、大阪大、京都大）、NEDO、久原 PL が参加し、半年に一度開催

H28. 9. 5（新潟）、H28. 12. 4（神戸）、H29. 6. 28（新潟）、H30. 2. 22（新潟）

(5).2 Wet 会議・・・本テーマの油脂蓄積変異株取得と解析、オーミクス解析、油脂生産性向上、脂肪酸改変に関する Wet 研究者の会議。

H29. 2. 2（長岡）、H29. 2. 17（大阪）、H29. 6. 27（新潟）、H29. 6. 30（九州）、H29. 8. 2（つくば）、H29. 10. 26（九州）、H29. 12. 14（新潟）、H29. 12. 15（神戸）、H30. 2. 21（新潟）、H30. 5. 18（長岡）

(5).3 Dry 会議・・・産総研、神戸大、京都大、みずほ総研、三菱総研の Dry 研究者と新潟薬大、産総研の Wet 研究者の Dry 解析技術の油脂酵母を利用した有効性検証に関する会議

H28. 11. 4（お台場）、H29. 1. 18（お台場）、H29. 4. 20（お台場）、H29. 9. 29（新潟）、H30. 2. 9（長岡）、H30. 4. 18（神戸）、H30. 5. 11（お台場）、H30. 5. 31（長岡）

以上のようにテーマ関連の会議を 20 回以上開催し、綿密に情報共有を行っている。

また、Wet 実験で得られたオーミクスデータは情報共有システムにアップロードし、Dry 研究者が活用できる体制が整っている。

(6) 実施の効果

2030 年度には ω -3 系多価不飽和脂肪酸市場は現状の X 倍に拡大していることが予測され、事業化目標品質の ω -3 系多価不飽和脂肪酸含有油脂を生産し、売上げ X 円/年以上を目指す。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018 年 6 月)	今後の課題と解決方針
油脂生産性の向上（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）	30 株	<ul style="list-style-type: none"> ・ 油脂蓄積変異株 180 株、脂肪酸組成改変株 28 株を取得。 ・ 油脂蓄積変異株の表現型（油脂生産性）評価 67 株 ・ 油脂蓄積変異株、脂肪酸改変株の油脂特性解析 43 株 ・ トランスクリプトーム解析 17 株（136 サンプル） ・ メタボローム解析 3 株（24 サンプル） ・ ゲノム比較解析 15 株 	◎ （効率的な油脂蓄積変異株取得法の開発により目的より多数の変異株が取得できた。さらに、24 株については、詳細な表現型解析を実施した。また、トランスクリプトーム解析、メタボローム解析、ゲノム比較解析を行い、情報解析の有効検証に有効な大量のデータを獲得できたため、大幅達成と評価）	油脂蓄積変異株は十分有るので、有効性検証に必要な場合にのみオーミクス解析を実施する。脂肪酸改変株においては、 ω -3 系多価不飽和脂肪酸含有率向上のための酵素選択、導入を行い、油脂特性解析を継続する。
油脂生産性の向上（油脂生産性向上及び脂肪酸組成改変に関する遺伝子の同定）	10 種類	<ul style="list-style-type: none"> ・ 油脂生産性向上に関する遺伝子 7 種類同定 ・ 脂肪酸組成改変に関する遺伝子 11 種類同定 	◎ （18 種類の遺伝子同定の他、脂肪酸組成改変では、それぞれの同定遺伝子の組み合わせ効果まで検討したため、大幅達成と評価）	脂肪酸改変株において、 ω -3 系多価不飽和脂肪酸含有率向上のための酵素選択、導入を行い、効果の大きい遺伝子を同定する。
油脂生産性の向上（油脂生産性）	Xg/L/Ydays	・ 油脂生産性向上の研究で同定された変異型遺伝子を導入した組換え株	◎ （新たに同定した油脂生産性を向上させる遺伝子の導	他の油脂生産性向上に寄与する同定遺伝子の導入による相乗効

		による油脂生産性は、Xg/L/Ydays	入株において油脂生産性目標を大幅に達成と評価)	果を検討し、更なる生産性向上を目指す。
油脂生産性の向上 (対糖油脂収率)	X%	<ul style="list-style-type: none"> ・ 油脂生産性向上の研究で同定された変異型遺伝子を導入した組換え株の対糖油脂収率は X% ・ 油脂超高蓄積変異株 E15-25 の対糖油脂収率は 21.4% 	◎ (新たに同定した油脂生産性を向上させる遺伝子の導入株において対糖油脂収率目標を達成し、さらに高収率の変異株を取得したため、大幅達成と評価)	宿主として、油脂生産性向上に寄与する上記同定遺伝子の導入株及び油脂超高蓄積変異株の活用により、更なる対糖油脂収率向上を目指す。
油脂の脂肪酸組成改変 (ω-3 系多価不飽和脂肪酸生産性)	Xg/L/Ydays	<ul style="list-style-type: none"> ・ ω-3 系多価不飽和脂肪酸含有率 X% ・ EPA 含有率 X% 	○ (ω-3 系多価不飽和脂肪酸含有率は目標値を超えたが、高付加価値化のため EPA の含有率をさらに向上させる)	脂肪酸改変株において、ω-3 系多価不飽和脂肪酸含有率向上のための酵素選択、導入を行う。
遺伝子発現-代謝経路統合ネットワークモデルの構築	油脂生産モデルにこれまでに開発したモデル構築技術を適用する	油脂生産モデルにおいて、ネットワークモデル構築を行い、実証課題による検証段階に至った。	○ (2019 年 2 月完成予定)	動的モデルからの酵素量の最適バランス算出の精緻化が必要。プロテオームデータ等が測定されれば、精緻化は可能。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
油脂生産性の向上	<ul style="list-style-type: none"> ・油脂生産性 Xg/L/Ydays ・対糖油脂収率 油脂生産性向上の研究で同定された変異型遺伝子を導入した組換え株の対糖油脂収率は X%、油脂超高蓄積変異株 E15-25 の対糖油脂収率は 21.4%	<ul style="list-style-type: none"> ・油脂生産性 Xg/L/Ydays ・対糖油脂収率 X% 	油脂を発酵生産する宿主として、油脂生産性向上に寄与する同定遺伝子の導入株及び油脂超高蓄積変異株の活用により達成可能。
油脂の脂肪酸組成改変	<ul style="list-style-type: none"> ・ω-3系多価不飽和脂肪酸含有率 X% ・EPA含有率 X% 	Xg/L/Ydays	ω -3系多価不飽和脂肪酸の合成に利用する効果の高い伸長酵素及び不飽和化酵素の選択、導入により達成可能。
遺伝子発現-代謝経路統合ネットワークモデルの構築	<ul style="list-style-type: none"> ・油脂生産モデルにおいて、ネットワークモデル構築を行い、実証課題による検証中。 	<ul style="list-style-type: none"> ・開発した様々なタイプの統合モデルの検証および高度化 ・階層内、階層間の制御ネットワークを推定する階層縦断的な情報解析手法を開発 	達成可能 <ul style="list-style-type: none"> ・改変指針の検証結果を受けて、課題の洗い直しを行い、モデルの高度化を実現する予定。 ・代謝経路上の酵素タンパク質量バランス計算と遺伝子発現量からのタンパク質量推定モデルを構築中であり、これらを組み合わせることで階層縦断的な解析手法を開発可能。

研究開発項目に対して、現状と最終目標、達成見通しを表に記入してください。

(9) 研究開発の成果と意義

(9).1 油脂生産性の向上

(9).1.1 油脂蓄積変異株の取得

油脂蓄積変異株取得のための効率的な油脂蓄積変異株取得法（Percoll 密度勾配遠心分離法）を考案した。油脂と水の密度の違いより、油脂高蓄積細胞と油脂低蓄積細胞の密度も同様に異なる。この密度の違いを利用することにより、油脂高蓄積細胞と油脂低蓄積細胞の分離が可能であり、油脂高蓄積株画分及び油脂低蓄積画分の効率的な濃縮法を確立した。この手法を利用して油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 油脂超高蓄積変異株 96 株、油脂高蓄積変異株 27 株、油脂低蓄積変異株 46 株を取得、さらに油脂酵母 *Rhodospiridium torulooides* 油脂高蓄積変異株 8 株、油脂低蓄積変異株 3 株を取得し、合計 180 株の油脂蓄積変異株を取得した。

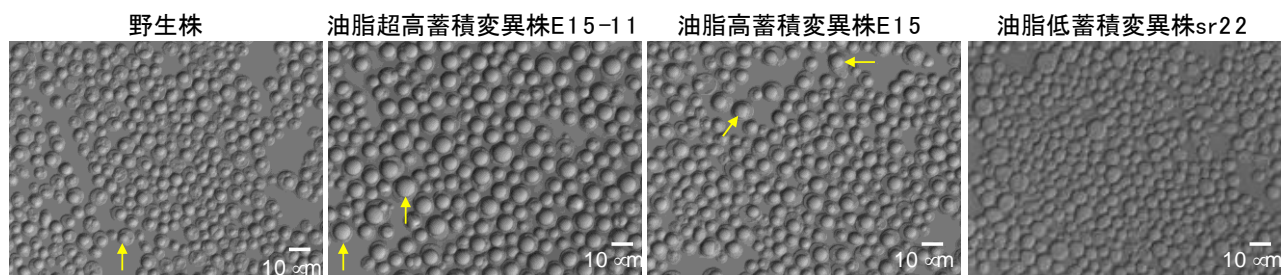


図 2.3.3.9-2 油脂酵母 *L. starkeyi* 野生株及び油脂蓄積変異株の顕微鏡写真による油脂生産性比較（矢印は脂肪球を示す）

(9).1.2 油脂蓄積変異株の表現型解析

上記獲得油脂蓄積変異株 180 株の油脂生産性を脂肪球の大きさを指標にして、顕微鏡で観察した。さらに *L. starkeyi* 油脂超高蓄積変異株 24 株、油脂高蓄積変異株 27 株、油脂低蓄積変異株 7 株、*R. torulooides* 油脂高蓄積変異株 8 株、油脂低蓄積変異株 3 株、合計 67 株の油脂蓄積変異株の油脂量を定量して、その油脂生産性を評価した。また、*L. starkeyi* 野生株、油脂超高蓄積変異株 E15-11, E15-15, E15-25、*L. starkeyi* 油脂高蓄積変異株 E15, E47, A35, A42, A60, K13, K14、*L. starkeyi* 油脂低蓄積変異株 m45, m47, s5, s27, sr5, sr17, sr22、*R. torulooides* 野生株、油脂高蓄積変異株 E1-11, E2-32、*R. torulooides* 油脂低蓄積変異株 E2L3, E2L8, E2L33 の合計 24 株においては、経時的（day0-7）に細胞数、濁度、平均粒子径、乾燥菌体重量、油脂 (TAG) 量、糖消費量を測定後、細胞あたりの油脂量、培地あたりの油脂量、対糖油脂収率、油脂含有率を算出し、それぞれの油脂蓄積変異株

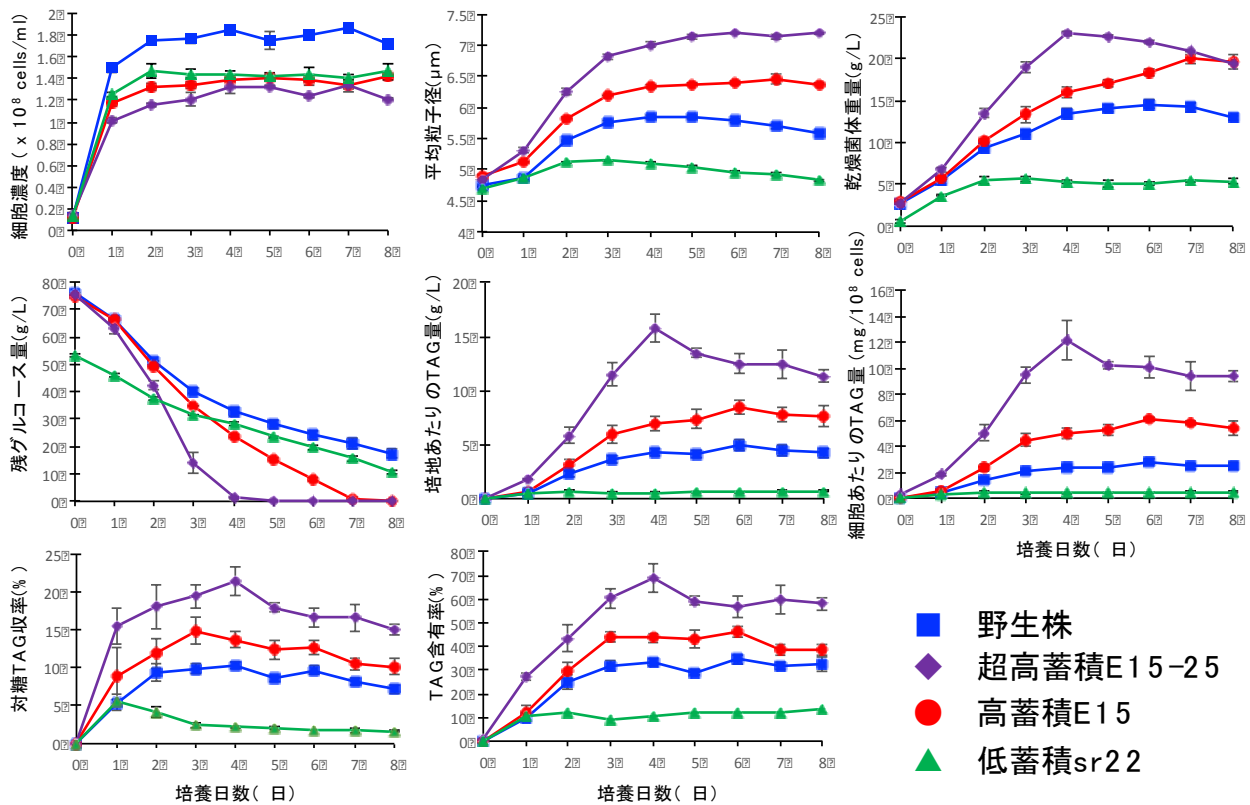


図 2.3.3.9-3 油脂酵母 *L. starkeyi* 野生株及び油脂蓄積変異株の油脂生産性比較

の油脂生産性を詳細に評価した。油脂超高蓄積変異株 E15-25 の培地あたりの TAG 量、細胞あたりの TAG 量、対糖 TAG 収率、TAG 含有率は、野生株の 3.7 倍、5 倍、2 倍、2 倍に上昇していた。また、油脂高蓄積変異株 E15 の培地あたりの TAG 量、細胞あたりの TAG 量、対糖 TAG 収率、TAG 含有率は、超高蓄積変異株ほどではないが、野生株の 1.7 倍、2.1 倍、1.4 倍、1.4 倍に上昇していた。油脂低蓄積変異株 sr22 の培地あたりの TAG 量、細胞あたりの TAG 量、対糖 TAG 収率、TAG 含有率は、野生株の 0.12 倍、0.14 倍、0.21 倍、0.31 倍しかなかった。このように油脂生産性がそれぞれ大きく異なる油脂蓄積変異株 24 株の詳細な表現型データを取得し、情報解析システムの有効性を検証するためのオーミクス解析を実施した。

(9). 1.3 油脂蓄積変異株のゲノム比較解析

L. starkeyi CBS1807 基準株 (WT)、油脂低蓄積変異株 m45、m47、sr5、sr17、sr22、高蓄積変異株 A42、K13、K14、E15、E47、および超高蓄積変異株 E15-11、E15-15、E15-25 について、Illumina Miseq ショートリードシーケンサーを用いたゲノムシーケンシングを行なった。公開されている基準株ドラフトゲノム配列をリファレンスとして各株に生じた変異を比較することによって原因遺伝子を探索した結果、低蓄積株 m45 および m47 に共通する遺伝子 X の変異、sr5 および sr17 に共通する遺伝子 X の変異、高蓄積株 A42 および E15 に共通する遺伝子 X の変異、K13 および K14 に共通する遺伝子 X の変異を見出した。超高蓄積株 E15-11、E15-15 および E15-25 は、遺伝子 X に変異を持っていた。上記遺伝子の油脂低蓄積変異株における遺伝子相補実験、また遺伝子破壊株及び遺伝子過剰発現株を作製し、それらの油脂生産性の比較検討を行い、油脂生産性の向上に関与する遺伝子として同定した。特に遺伝子 X を導入した組換え株は野

生株の2倍以上の油脂生産性を示し、油脂生産性向上において大きく貢献できる遺伝子としての同定に成功した。

(9).1.4 油脂蓄積変異株のメタボローム解析 (2.3.1.2 高精度メタボローム解析技術の実用化と共同)

L. starkeyi CBS1807 基準株 (WT)、高蓄積変異株 E15、K14 の経時的な培養 (day0-7) を実施し、図 2.3.3.9-4 に示す解糖系、ペントースリン酸系、TCA 回路、アシル CoA 合成系の代謝産物 (赤字) のメタボローム解析を実施した。TCA サイクルで生じたクエン酸はミトコンドリアから細胞質に放出され、一般的な微生物には存在せず、油脂酵母や哺乳類特有の酵素である ATP クエン酸シンターゼ (ACL1, 2) によりオキサロ酢酸とアセチル CoA に変換される。オキサロ酢酸はその後リンゴ酸を経てリンゴ酸酵素によりピルビン酸に変換される。この時にピルビン酸と同時に生産される NADPH は、脂肪酸合成のために脂肪酸合成酵素複合体に利用される。アシル CoA 合成系では、主にクエン酸から生じたアセチル CoA がアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC1) によりマロニル CoA に変換される。その後、脂肪酸合成酵素複合体により炭素数が 16 又は 18 の飽和脂肪酸が合成され、アシル CoA が生じる (図 2.3.3.9-4)。野生株と油脂高蓄積変異株の代謝産物比較の結果、野生株と比較して油脂高蓄積変異株のアシル CoA 合成経路における細胞あたりのクエン酸量は低下し、アセチル CoA、マロニル CoA 量は増加していた。また、リアルタイム PCR による発現解析の結果も油脂高蓄積変異株において、アシル CoA 合成経路に関与する遺伝子が野生株と比較して高発現していたことから油脂生産性の向上とアシル CoA 合成経路の活性化の関係が明らかとなった。さらに、油脂高蓄積変異株のペントースリン酸経路は野生株と比較して活性化されており、脂肪酸の合成に必要な NADPH の供給は、リンゴ酸酵素よりむしろペントースリン酸経路が主要となっていることが示唆された。そこで油脂酵母野生株に上記遺伝子 *ACL1*, *ACL2*, *ACC1* を導入し、高発現させたところ、それぞれの遺伝子の高発現株において油脂生産性が向上したが、特に 3 つの遺伝子を同時に高発現させた組換え株において、野生株の約 1.9 倍の油脂生産性を示した。すなわち、油脂生産性向上に関与する 3 種類の遺伝子の同定に至った。

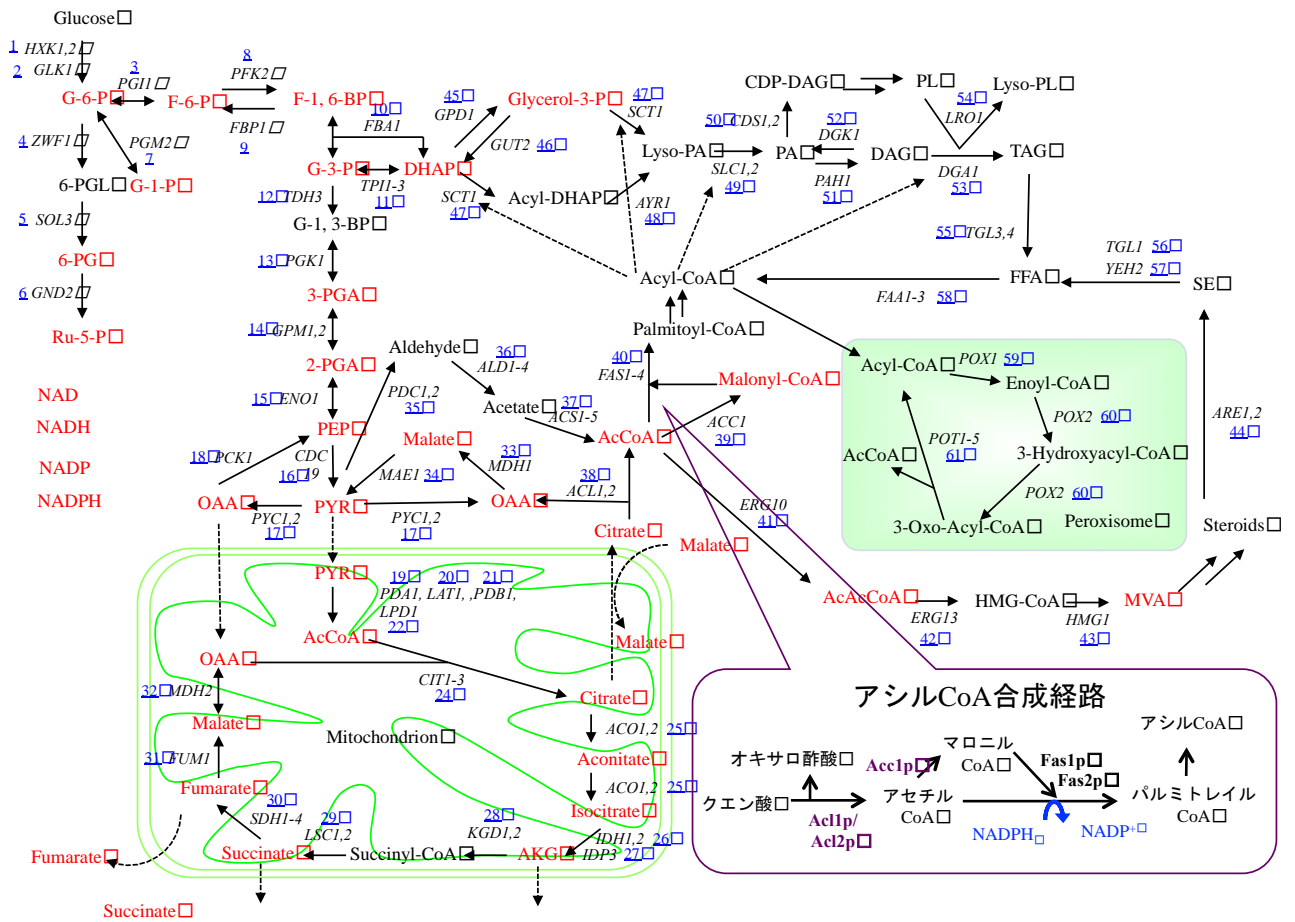
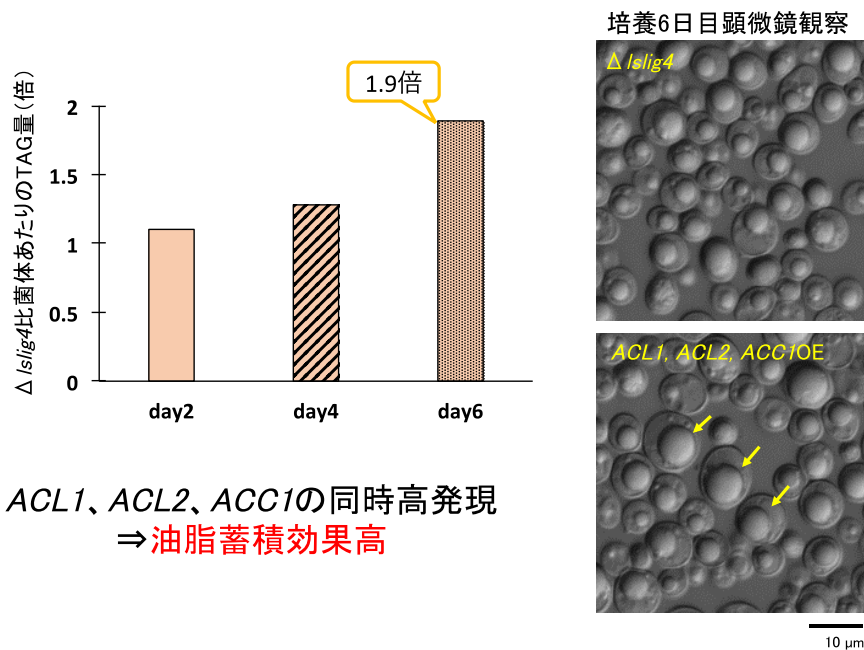


図 2.3.3.9-4 油脂酵母の油脂合成・分解経路の代謝マップ



**ACL1、ACL2、ACC1の同時高発現
⇒油脂蓄積効果高**

図 2.3.3.9-5 油脂酵母における ACL1, ACL2, ACC1 の同時高発現の油脂生産性向上

(9).1.5 油脂蓄積変異株のトランスクリプトーム解析 (2.3.2.5 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子の探索に関する実用化と共同)

L. starkeyi CBS1807 基準株 (WT)、油脂低蓄積変異株 m45、m47、sr5、sr17、sr22、高蓄積変異株 A42、K13、K14、E15、E47、および超高蓄積変異株 E15-11、E15-15、E15-25 について、DNA マイクロアレイを用いて各々培養日数 0-7 または 1-8 の時系列 8 点からなる遺伝子発現解析を行った。これらの発現解析データを活用して、図 2.3.3.9-6 の TAG 合成と分解に直接関与している DGA1, TGL3, TGL4 の発現制御に関する遺伝子 5 種類を推定後、遺伝子破壊株を作製し、油脂生産性を検討したが、関連性は見いだせなかった。次に (9).1.4 で見出された油脂生産性の向上に大きく関与している ACL1, ACL2, ACC1 及び TAG 合成に関与している SCT1, SLC1, PAH1, DGA1 に注目し、遺伝子発現制御ネットワークを推定構築し、13 種類の制御に関与する遺伝子を推定した。現在、それぞれの遺伝子の過剰発現株及び欠失株を作製し、油脂生産性を解析し、遺伝子発現制御ネットワークモデルの有効性を検証中である。

(9).2 油脂の脂肪酸組成改変 (2.3.1.4 ハイスループット長鎖 DNA 合成技術の実用化、
2.3.2.3 反応機構推定に基づく酵素選択・機能改変の実用化と共同)

油脂酵母 *L. starkeyi* はモデル酵母である *Saccharomyces cerevisiae* とは異なり、リノール酸 (C18:2) や α -リノレン酸 (C18:3) などの多価不飽和脂肪酸を僅かながら蓄積する。培養条件と脂肪酸組成の解析から、*L. starkeyi* は低温 (20°C) においてより多価不飽和脂肪酸を蓄積することが明らかになった (表 2.3.3.9-1)。

表 2.3.3.9-1 *L. starkeyi* の低温培養時における不飽和脂肪酸の組成

	脂肪酸組成		
	オレイン酸 (C18:1)	リノール酸 (C18:2)	α -リノレン酸 (C18:3)
30°C培養	36%	15%	0.2%
20°C培養	33%	23%	13%

L. starkeyi がリノール酸や α -リノレン酸などの多価不飽和脂肪酸を蓄積することは、本油脂酵母が脂質中のオレイン酸 (C18:1) をリノール酸に変換する $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素及びリノール酸を α -リノレン酸に変換する $\Delta 15$ 脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子を有することを示唆している。この *L. starkeyi* が有する $\Delta 12$ 及び $\Delta 15$ 脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子の同定と発現強化は *L. starkeyi* において ω -3 多価不飽和脂肪酸を生産するための根幹となる。

既知の $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素との相同性検索の結果、*L. starkeyi* において $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素をコードしている可能性のある 2 つの遺伝子 (D12d-1 及び D12d-2) の推定に成功した。*L. starkeyi* の D12d-1 及び D12d-2 は *Fusarium verticillioides* 由来 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素とそれぞれ約 50%及び 44%の同一性を示した。次に、これらの遺伝子が $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素をコードしているかを明らかにするために、モデル酵母 *S. cerevisiae* 及び油脂酵母 *L. starkeyi* において両遺伝子の過剰発現を試みた。*L. starkeyi* 由来 D12d-1 を過剰発現した *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* + D12d-1) ではオレイン酸がリノール酸に変換されていたのに対し、D12d-2 を過剰発現した株 (*S. cerevisiae* + D12d-2) ではリノール酸だけでなく α -リノレン酸の蓄積も観察された。また同様に、D12d-1 及び D12d-2 を過剰発現した *L. starkeyi* (*L.*

starkeyi + D12d-1 及び *L. starkeyi* + D12d-2) ではそれぞれリノール酸と α -リノレン酸の蓄積が観察された (表 2.3.3.9-2)。

表 2.3.3.9-2 D12d-1 及び D12d-2 過剰発現株の脂肪酸組成解析

	脂肪酸組成		
	オレイン酸	リノール酸	α -リノレン酸
<i>S. cerevisiae</i> 親株	28%	0%	0%
<i>S. cerevisiae</i> + D12d-1	21%	9.1%	0%
<i>S. cerevisiae</i> + D12d-2	29%	0.4%	1.3%
<i>L. starkeyi</i> 親株	36%	15%	0.2%
<i>L. starkeyi</i> + D12d-1	20%	35%	1.1%
<i>L. starkeyi</i> + D12d-2	28%	20%	8.8%

次に、D12d-1 及び D12d-2 をコードする遺伝子の破壊と、その破壊株の脂肪酸組成の解析を行った。低温培養条件において蓄積していたリノール酸及び α -リノレン酸は D12d-1 破壊株において劇的に低下した。また、D12d-2 破壊株ではリノール酸の含量は低下しなかったが、 α -リノレン酸の蓄積が全く見られなくなった (表 2.3.3.9-3)。

表 2.3.3.9-3 低温培養時における D12d-1 破壊株及び D12d-2 破壊株の脂肪酸組成

	脂肪酸組成		
	オレイン酸	リノール酸	α -リノレン酸
<i>L. starkeyi</i> 親株	33%	23%	13%
D12d-1 破壊株	64%	0.5%	1.5%
D12d-2 破壊株	28%	44%	0%

以上の結果から、*L. starkeyi* 由来 D12d-1 は $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素であること、また、D12d-2 は $\Delta 12/\Delta 15$ 不飽和化酵素であることが明らかになった。*L. starkeyi* の多価不飽和脂肪酸生産に重要な脂肪酸不飽和酵素を発見とその発現強化によって ω -3 多価不飽和脂肪酸合成の上流物質であるリノール酸及び α -リノレン酸を高生産する *L. starkeyi* の作製に成功した。

L. starkeyi の内在性遺伝子の強化により、*L. starkeyi* においてリノール酸などの効率的な生産が可能になった。次に、より高付加価値な EPA などの ω -3 多価不飽和脂肪酸の合成ため、図 2.3.3.9-6 に記載した *L. starkeyi* の新規 EPA 合成経路を設計し、 $\Delta 9$ 脂肪酸伸長酵素や $\Delta 8$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 17$ 脂肪酸不飽和化酵素の酵素遺伝子の導入を試みた (図 2.3.3.9-6)。

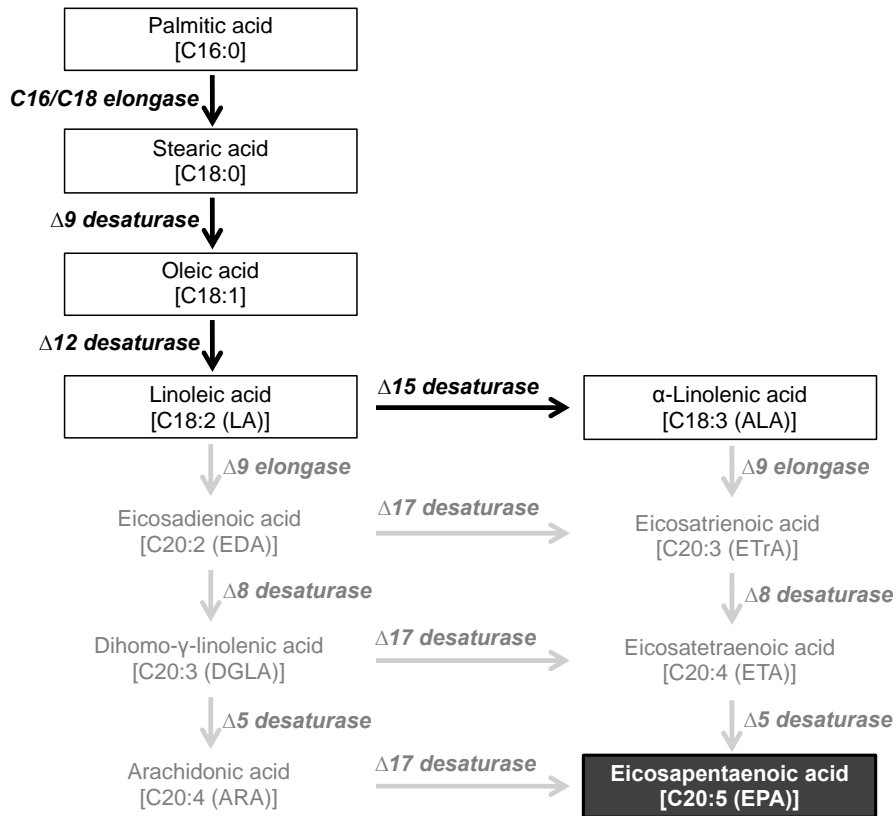


図 2.3.3.9-6 EPA 生産に必要な脂肪酸関連酵素

白い四角で囲った脂肪酸は *L. starkeyi* に含まれる脂肪酸、グレーは *L. starkeyi* が有していない脂肪酸及び脂肪酸関連酵素を示す。また、高付加価値 ω -3 多価不飽和脂肪酸 (EPA) は黒い四角で囲っている。

L. starkeyi において EPA を生産するためのコンストラクトは、一度に 4 つの酵素遺伝子を導入するため、長鎖 DNA 合成技術を利用して作製した (図 2.3.3.9-7)。また、*L. starkeyi* の 18S リボソーム DNA 領域に相同組換えによって多コピー挿入することが可能であることから、相同組換え領域は 18S リボソーム DNA 領域とし、各遺伝子は恒常的に高発現すると期待されるプロモーターの制御下で発現を試みた。

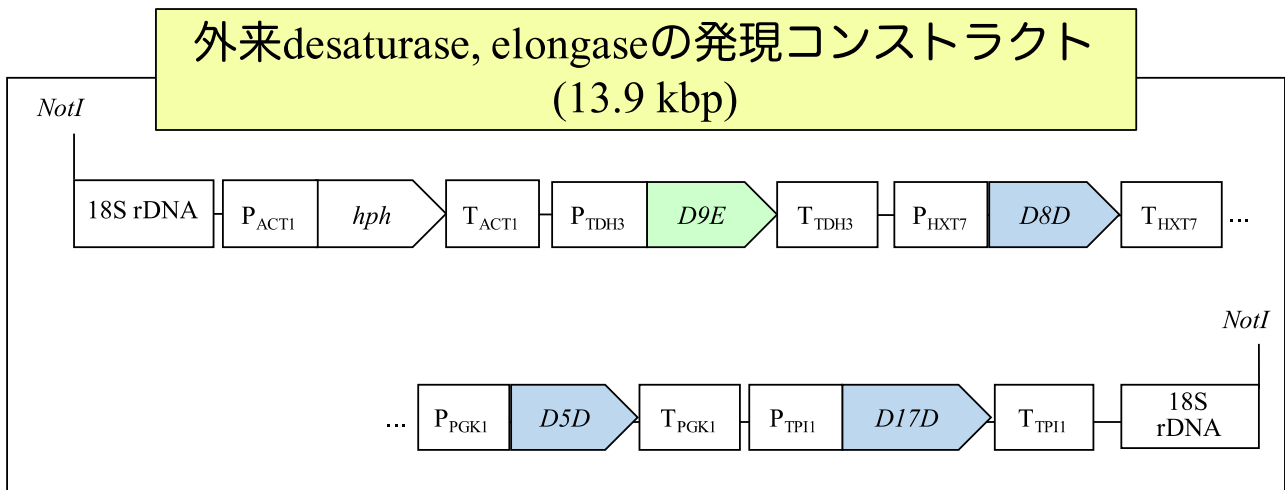


図 2.3.3.9-7 EPA 生産に資する長鎖 DNA の合成

本コンストラクトを D12d-1 などの内在性の発現を強化した *L. starkeyi* に導入したところ、約 1% の EPA の生産が確認された。このことから、長鎖 DNA を利用することにより多段階反応を一度に油脂酵母に導入し、高付加価値 ω-3 多価不飽和脂肪酸の生産が可能であることが明らかになった。

(9).3 遺伝子発現-代謝経路統合ネットワークモデルの構築

ターゲット物質である油脂生合成経路を調節し、さらに高生産性を実現するための改変酵素遺伝子を推定する技術の開発を行った。開発した技術フローを図 2.3.3.9-8 に示す。

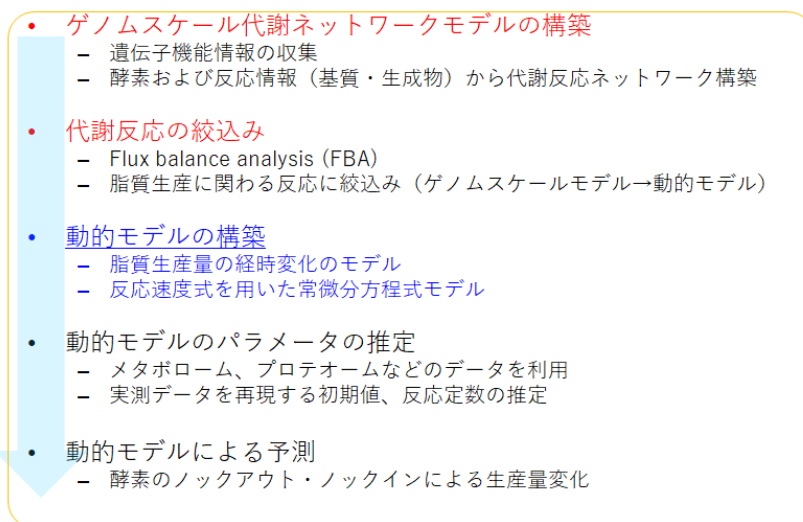


図 2.3.3.9-8 生合成経路における調節候補酵素遺伝子推定フロー

調節すべき酵素を同定する方法としては、微分方程式を利用した動的モデルを適用した。各代謝反応について常微分方程式を定義し、代謝経路を常微分方程式で表すことで、シミュレーションを実施した（図 2.3.3.9-9）。

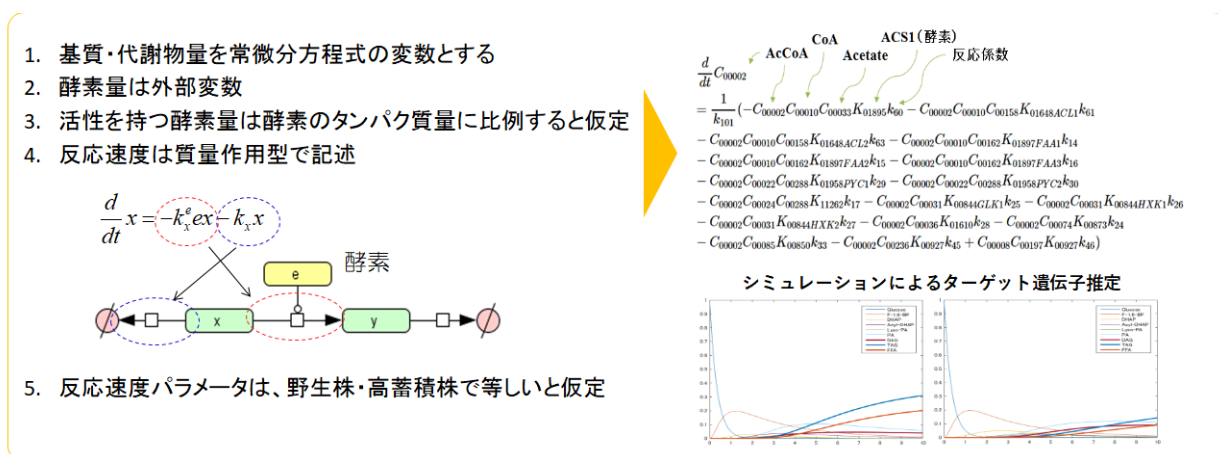


図 2.3.3.9-9 動的モデルによる化合物量シミュレーション概要

開発したすべての技術を、油脂生産モデルに適用した。同一条件での発現データとメタボライト量データから、前項目で開発した動的モデルを適用し、生合成経路をさらに活性化するための遺伝子 10 個以上を検出し提案した。

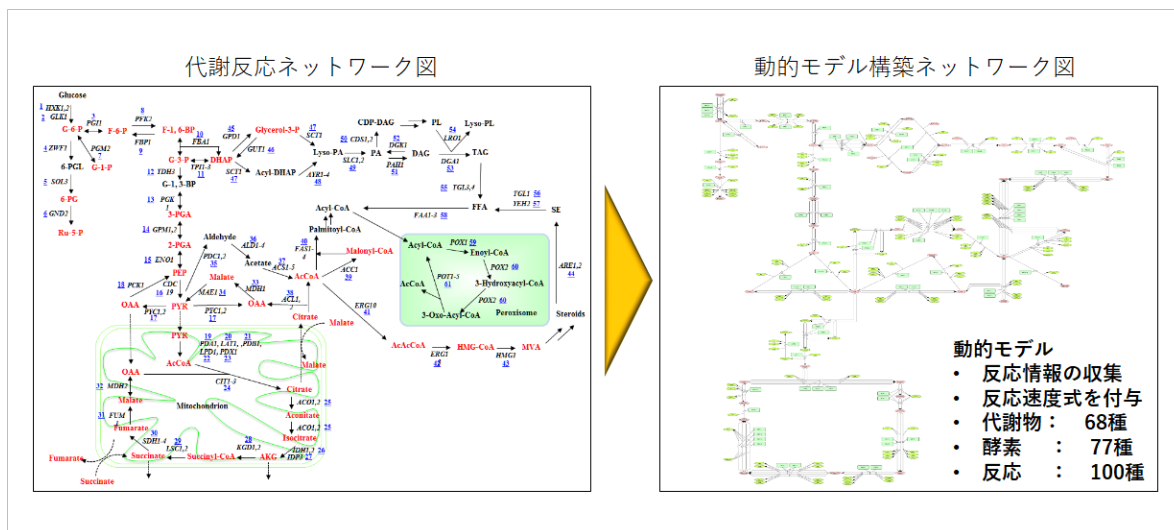


図 2.3.3.9-10 油脂生産モデルにおける動的モデル構築

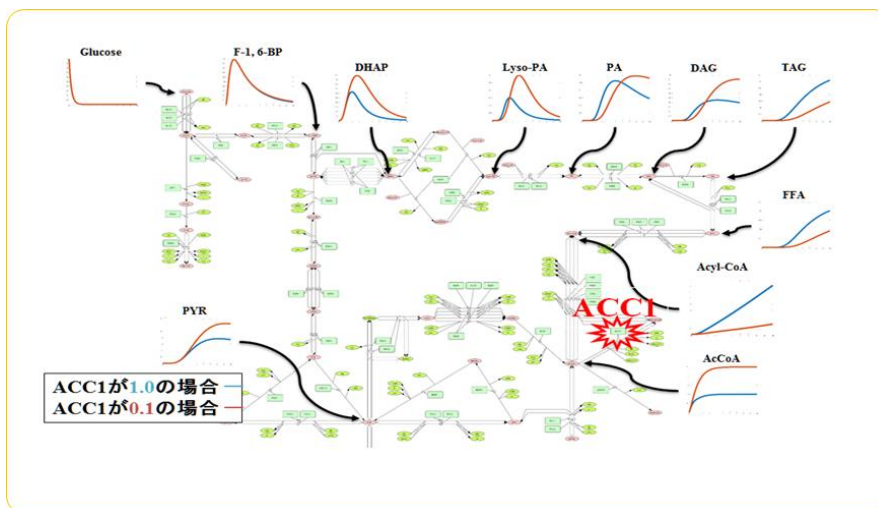


図 2.3.3.9-11 油脂生産経路上の化合物量のシミュレーション

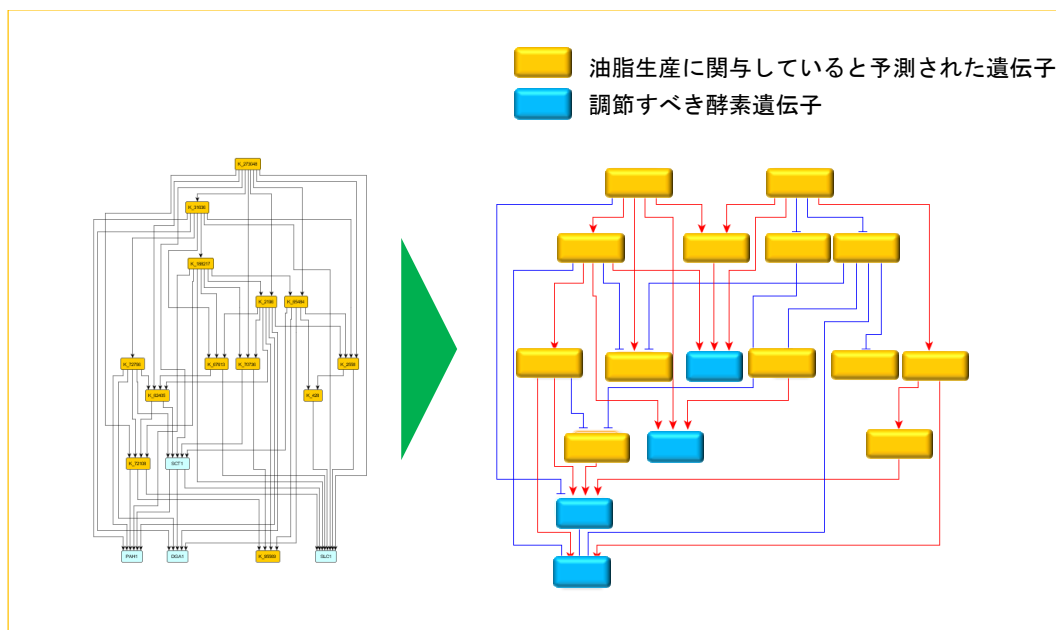


図 2.3.2.9-12 油脂生産モデルでの解析結果

(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	
2016	1	1	6	0	0	0	0
2017	0	1	9	0	0	0	0
2018 *1	0 (2)	0 (0)	0 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	7	3	30	1	1	0	0

*1：2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020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

特許戦略について記載。特許出願はせずノウハウとして保有するなど。

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	1	0	0
2018 *1	0 (1)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	3	0	0

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

2.3.3.10 微生物を用いたアルカロイド等の新規生産法の有効性検証に関する実用化

担当機関：石川県立大学

(1) 背景と目的

背景

植物アルカロイドは様々な生理活性を有しており、新規高機能品のシーズとして有効だが、植物における含有量は低く、製品化されていない。そのほとんどが、生薬、漢方として利用されている。

生合成工学の進展により、植物アルカロイドの生合成経路を微生物内に構築し、生産することが可能となっている。しかしながら、そのほとんどが植物の生合成経路の再構成であり、微生物内において効率的な経路となっていない。必要となる生合成経路の反応は10~20段階におよぶため、最適な経路の構築は行われておらず、実用レベルの生産には成功していない。そのため、実用生産には、微生物宿主に適応した新規生合成経路を構築する必要がある。

目的

情報解析技術開発により、新規代謝経路の設計・最適化手法の共同開発ならびに有効性の検証を行う。これにより、植物アルカロイド等の二次代謝産物の新規生合成経路を実現させ、微生物による実用生産を目的とする。

(2) 位置づけ、目標値

位置づけ

1) 対象市場, 製品

- i) テバイン (Nakagawa et al., 2016 *Nature Communications*)
 - ・オピオイド系鎮痛剤原料(市場規模2兆円)
 - ・30 mg/Lの生産に成功(1菌体)
- ii) モルヒネ(未発表)
 - ・合成生物学的に意義がある
 - ・0.2 mg/L(3菌体)
- iii) マグノフロリン(Minami et al., 2008 *PNAS*)
 - ・漢方薬の有効成分
 - ・抗HIV作用、抗ガン活性がある
 - ・8 mg/L程度
- iv) ベルベリン
 - ・漢方薬の一種、糖尿病、止瀉等に効果がある
 - ・瘦身効果からサプリメントとしても利用される
 - ・1 mg/L程度
- v) テトラヒドロパパベリン
 - ・鎮痙剤アトラクリウムの原料
 - ・WHOの必須医薬品リストの1つ
 - ・20 mg/L程度

2) 競合技術との対比(目標値)

- ・植物からの抽出により生産
- ・希少アルカロイドに関しては、生産されていない

競合技術との対比

- ・酵母による生産効率は、我々の1/2000以下
(酵母:レチクリン0.08 mg/L)

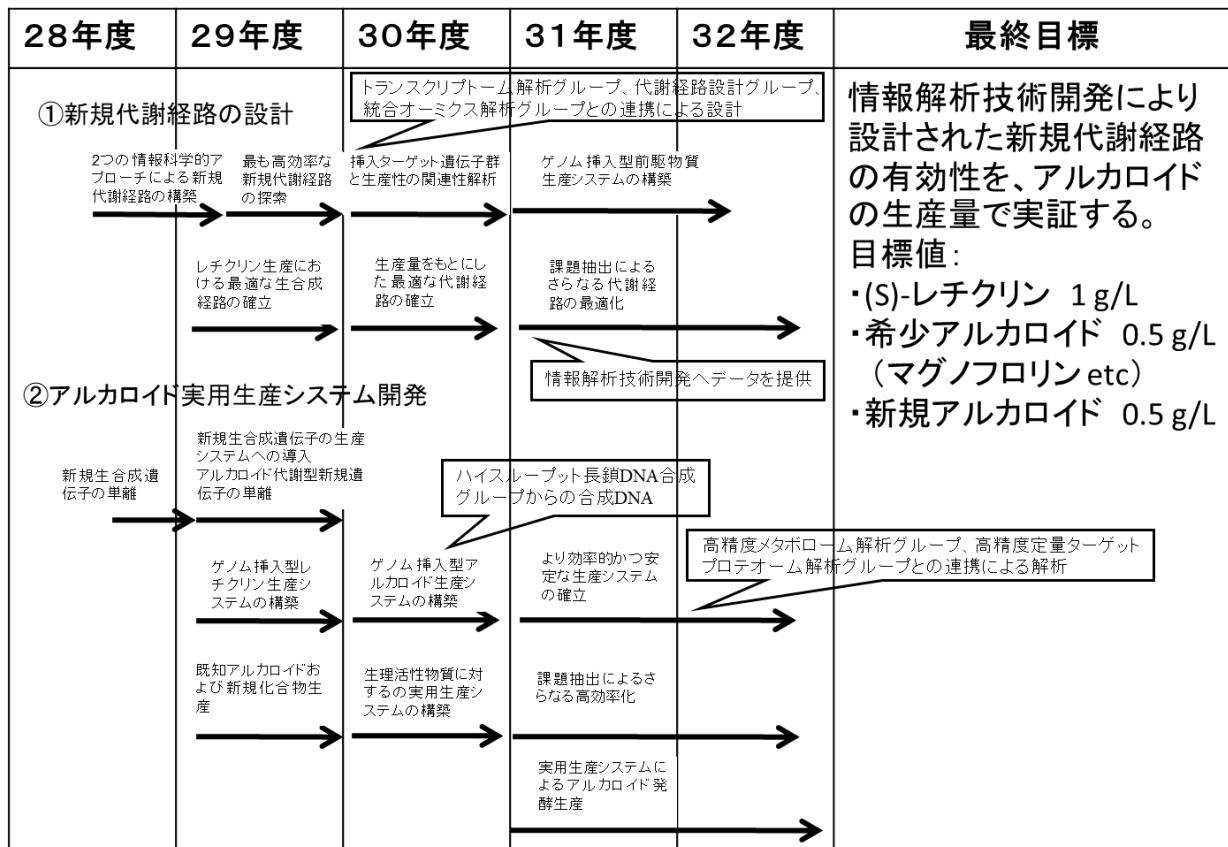
中間目標値(H30)

- 新規代謝経路の設計による前駆物質生産システムの構築
目標：ゲノム挿入型チロシン、ドーパミン生産システムの構築
- 実用生産に適した菌株の作製
目標：ゲノム挿入型レチクリン生産システムの構築

最終目標値 (H32)

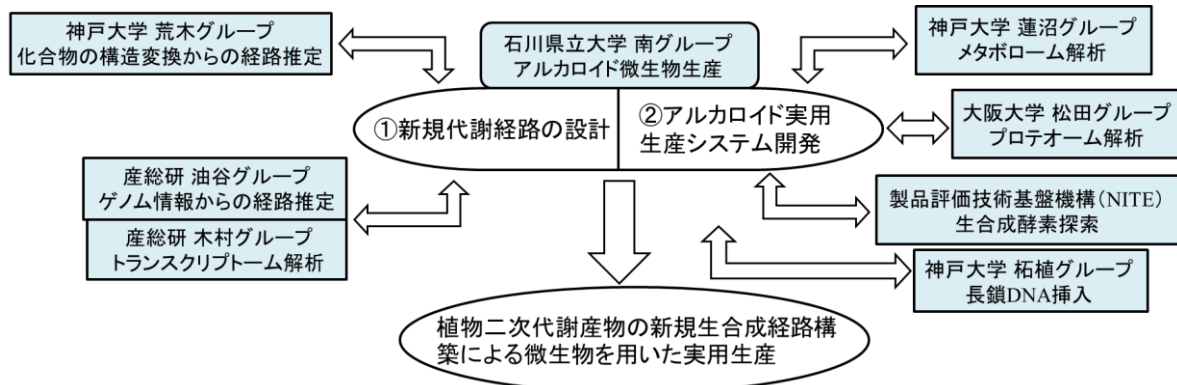
- メタボローム解析による高効率な培養条件の確立
目標：生産量をもとにした最適な代謝経路の確立
- 実用生産システムを確立し、下記化合物に対して目標生産量を達成する。
レチクリン：1 g/L
マグノフロリン、新規アルカロイド：0.5 g/L
- 植物由来生理活性物質および新規化合物の生産
各々の生理活性（5種類程度を想定）に対して最も有効な値を示した化合物の実用生産システム構築（生産目標値：0.5 g/L）

(3) 全体計画



(4) 実施体制

体制図



(5) 運営管理

3ヶ月を目安に、連携グループでの進捗および情報共有のための会議を開催。

(6) 実施の効果

漢方薬、生薬の市場規模は年々増加しており、2013年度は1361億円である。微生物発酵法によるアルカロイドの安価な生産により、漢方薬やそれらを利用した健康食品関連の市場規模の拡大が期待できる。また、生活習慣病等の予防・健康サービスの市場規模は年間4兆円と試算されており、本研究成果を生産現場へ導入することによる経済効果は非常に高いものと考えられる。

(7) 中間目標の達成度

研究開発項目	中間目標	成果	達成度 (2018年6月)	今後の課題と解決方針
i.化合物の構造変換からの経路推定 (神戸大学、石川県立大学)	チロシンから 3,4-DHPAA までの生合成経路に対する複数候補の新規生合成経路の選定、および各生合成遺伝子の大腸菌発現株構築と生産システムへの導入。	M-path および BioProV により、5種類の新規生合成経路を選定済み。さらに、微生物遺伝子機能検索データベース (MiFuP) による各生合成遺伝子候補の選定を行い、2種類の経路については発現株を構築済み。ケト酸脱炭酸経路については、生合成経路を構築し、有効性を実証。	○ (2019年3月達成予定)	新規生合成経路の選定を引き続き行い、順次大腸菌プラットフォームに導入することで有効性を検証し、最も効率的な新規経路を決定する。
ii.ゲノム情報からの経路推定 (産総研、石川県立大学)	ゲノム情報からの代謝経路の再構築、およびトランスクリプトーム解析によるアルカロイド生産時における活性化経路の探索。代謝変化による大腸菌プラットフォームの改良。	代謝経路の再構築およびトランスクリプトーム解析による活性化経路は探索済み。トランスクリプトーム解析からの代謝経路変化と大腸菌プラットフォームへの導入を行ったが、生産効率は改	○ (2019年3月達成予定)	安定的なゲノム挿入型レチクリン生産システムに対して解析を行うことで、より精度よく代謝経路改変と大腸菌プラットフォームへの導入を行う。さらに、レチクリン以降のアルカロイド生産

		善されなかった。		株に対しても解析を行う。
iii.ゲノム挿入型生産システムの構築 (石川県立大学)	チロシンからレチクリンまでの生合成酵素をチロシン高生産大腸菌ゲノムに挿入し、より安定なレチクリン生産システムを構築する。	これまでのプラスミド型よりも高効率なゲノム挿入型チロシンおよびドーパミン高生産大腸菌を作製済み。 また、プラスミド併用型レチクリン高生産大腸菌株の作製にも成功。	△ 順次、プラスミド併用型からゲノム挿入型へと移行予定。各々の生合成遺伝子のゲノム挿入における活性は確認済みのため、ゲノム挿入を安定的に行えれば、その構築に問題はないと考えている。	ドーパミンからレチクリンまでの生合成酵素をドーパミン高生産大腸菌ゲノムに挿入し、ゲノム挿入型レチクリン生産システムを構築する。
iv.生合成遺伝子ライブラリの構築 (石川県立大学)	二次代謝産物を産生する生物種からの cDNA ライブラリーを生産システムに導入し、その生産物を解析することで、新規生合成遺伝子の単離を行う。 また、微生物遺伝子機能検索データベース (MiFuP) により生合成酵素を探索する。	アルカロイド分解性微生物 (<i>Pseudomonas putida</i>) からの cDNA ライブラリーを構築済み。 MiFuP により、チロシン水酸化酵素、モノアミン酸化酵素に対して、同様の機能を持つ酵素を選定し遺伝子を取得済み。大腸菌発現株の構築および大腸菌プラットフォームへの導入を行い、代替酵素として生産効率改善に有効であることを実証。	○ (2019年3月達成予定)	構築したライブラリーからの生合成遺伝子の単離を引き続き行う。千葉大学梅野グループ (ハイスループット微生物構築・評価技術の実用化) と連携し、アルカロイドに対する微生物センサを開発することで、効率的なスクリーニング技術を構築する。

(8) 最終目標の達成可能性

研究開発項目	現状 (2018年6月)	最終目標 (2020年度末)	達成見通し
i.化合物の構造変換からの経路推定 (神戸大学、石川県立大学)	チロシンから 3,4-DHPAA までの5種類の新規生合成経路を選定済み。さらに、各生合成経路における候補遺伝子の選定を行い、2種類の経路については発現株を構築し、レチクリン生産の確認を行った。	5種類の新規生合成経路に対して、レチクリン生合成経路を構築し、レチクリン生産量を比較することで情報解析システムの有効性を実証する。さらに、複数の経路を組み合わせた生産システムを構築することで、最も効率的なアルカロイド生産システムを構築する。	各生合成経路の構築に対して、候補遺伝子の組み合わせが数多くあり、その構築が律速となっている。神戸大学石井グループ (ハイスループット微生物構築・評価技術の実用化) と連携することで、経路構築の効率化を図り、最終目標を達成予定である。
ii.ゲノム情報からの経路推定 (産総研、石川県立大学)	プラスミド型のレチクリン生産株に対して、代謝経路の再構築およびトランスクリプトーム解析による活性化経路は探索済み。トランスクリプトーム解析からの代謝経路改変と大腸菌プラットフォームへの導入は現在検討中。	ゲノム挿入型レチクリン生産システムに対して解析を行い、代謝経路改変と大腸菌プラットフォームへの導入を行う。さらに、レチクリン以降のアルカロイド (テバイン、モルヒネを予定) 生産株に対しても同様の解析を行う。	プラスミド型の生産株では不安定であり、トランスクリプトーム解析が十分に行えなかった。安定的なゲノム挿入型生産株に対して解析を行うことで、活性化経路の探索を精度よく行い、代謝経路改変と大腸菌プラットフォームへの導入を行う予定である。
iii.ゲノム挿入型生産システムの構築 (石川県立大学)	ゲノム挿入型ドーパミン高生産大腸菌を作製済み。また、ドーパミンからレチクリンまでの生合成酵素のゲノム挿入における活性は確認済み。	ゲノム挿入型レチクリン生産システムを構築する。さらに、ゲノム挿入型レチクリン高生産大腸菌にモルヒネまでの生合成遺伝子を導入し、オピオイド実用生産システムを確立する。	これまでの研究により、大腸菌ゲノムへの生合成遺伝子の多段階のゲノム挿入の技術は確立済み。我々独自の本技術を用いることで、ゲノム挿入型アルカロイド生産株の構築が可能である。
iv.生合成遺伝子ライブラリーの構築 (石川県立大学)	アルカロイド分解性微生物 (<i>Pseudomonas putida</i>) からの cDNA ライブラリーを構築済	二次代謝産物を産生する生物種からの cDNA ライブラリーからの生合成遺伝子の単離を行	これまでに実績のある MiFuP を引き続き活用することで、新規生合成遺伝子の単離の効率

	<p>み。 MiFuP により、チロシン水酸化酵素、モノアミン酸化酵素に対する代替酵素を単離し、大腸菌プラットフォームへの導入を行い、レチクリンの生産効率を改善した。</p>	<p>う。さらに、MiFuP を活用することで、新規生合成遺伝子の単離を行い、人工的に生合成経路を構築し、新規化合物（非天然型アルカロイド、もしくは他二次代謝産物との融合型アルカロイド）生産を行う。</p>	<p>化を図る。さらに、微生物センサを用いることで、これまでは LC-MS を用いて網羅的に行っていたアルカロイド解析を特異的に行う。</p>
--	---	---	---

(9) 研究開発の成果と意義

京都大学荒木グループおよび理研白井グループとの連携による情報解析（M-Path および BioProV）により、チロシンから 3,4-DHPAA までの 5 種類の新規代謝経路の設計を行った。さらに、NITE の MiFuP を用いて、それらの生合成遺伝子群を選定した。実際に選定された *Kulyveromyces marxianus* 由来フェニルピルビン酸デカルボキシラーゼを用いた生産システムでは、従来の経路よりも 2 倍のレチクリン生産量を示した（図 1）。さらに、レチクリン生産において律速反応であったチロシンからドーパへの変換反応を触媒する酵素、tyrosinase に対して、MiFuP を用いて代替酵素を予測した結果、4 種類の生物種、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、うずら (*Phasianidae sp.*)、うなぎ (*Anguilla anguilla*)、ラット (*Rattus norvegicus*) 由来のチロシン水酸化酵素が選抜された。チロシン水酸化酵素は、その反応にテトラヒドロビオプテリン (BH₄) を補酵素として必要とする。そこで、BH₄ 生産に必要な 3 種類の生合成酵素、guanosine triphosphate cyclohydrolase I (MtrA)、6-pyruvoyltetrahydropterin synthase (PTPS)、sepiapterin reductase (SPR) とともに、4 種類のチロシン水酸化酵素をそれぞれ生合成経路に導入し比較した結果、ショウジョウバエ由来のチロシン水酸化酵素が生産効率の改善に有効であることが明らかとなった。

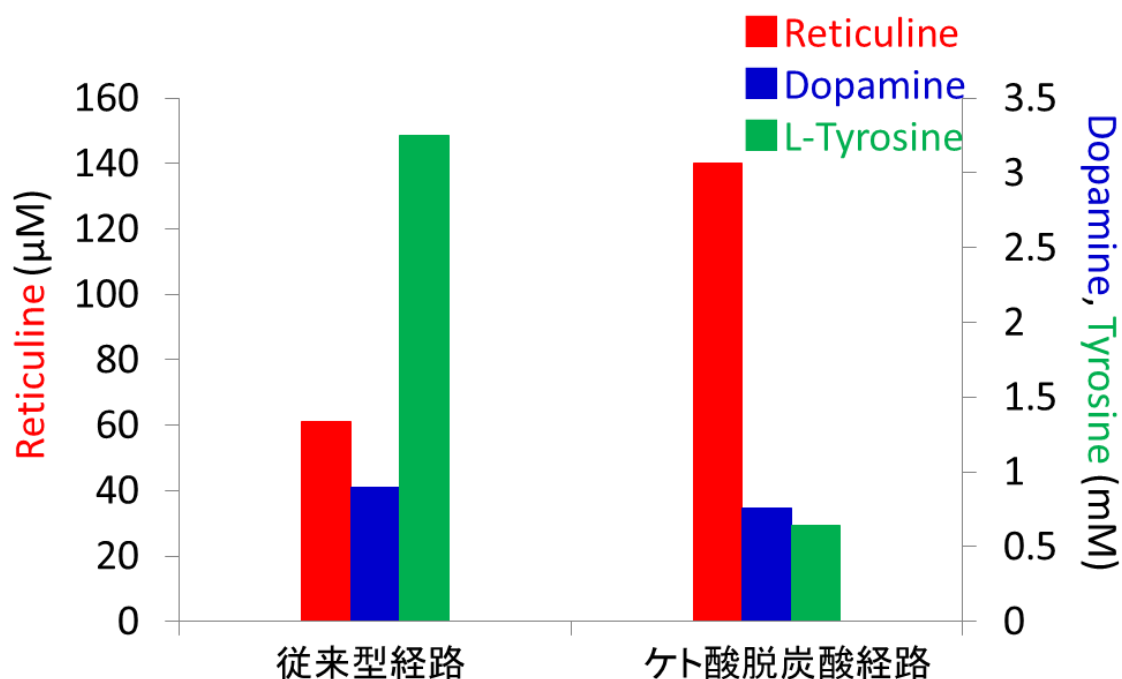


図1 ケト酸脱炭酸経路を用いた最少培地でのReticuline生産

産総研油谷、矢追グループおよび木村グループとの連携により、大腸菌ゲノム情報からの代謝経路の再構築および遺伝子発現データからアルカロイド生産時に活性化している経路を推定した結果、KEGG上に登録されている436の代謝経路のうち、16の代謝経路が活性化していた(図2)。アルカロイド生産時にピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合遺伝子(*aceEF*)の発現量低下によるアセチルCoAの枯渇、7-carboxy-7-deazaguanine synthase(*queE*)によるBH4生成阻害の可能性が示唆された。*aceEF*のリプレッサーである*pdhR*の破壊による生産能向上、および*queE*破壊による生産能向上を検討したが、レチクリン増産は達成できなかった。しかし、ゲノム情報からの経路推定の有効性は実証できたため、安定的なゲノム挿入型レチクリン生産株において同様の解析を行うことで、活性化経路の探索の精度を向上させ代謝経路改変と大腸菌プラットフォームへの導入を行う予定である。

KEGG上に登録されている436の代謝経路のうち、16の代謝経路が活性化していた。

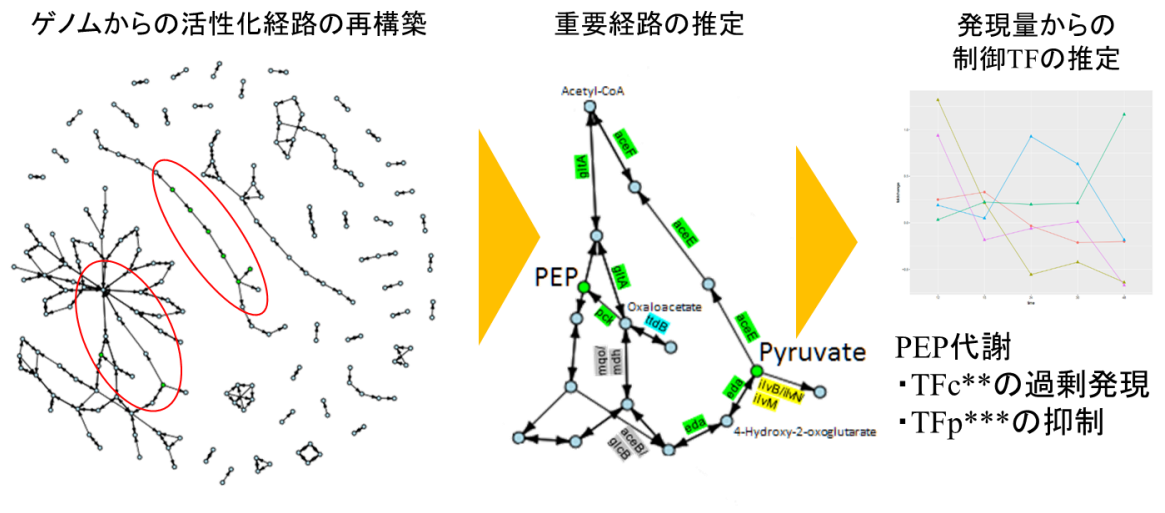


図2 活性化経路からの重要経路探索

また、実用生産システム確立のために、ゲノム挿入型チロシン、ドーパミン高生産大腸菌株をそれぞれ作製した。ゲノム挿入型チロシン生産株では 24 mM (4.4 g/L)、プラスミド株のおよそ 5 倍のチロシンを生産した (図 3)。

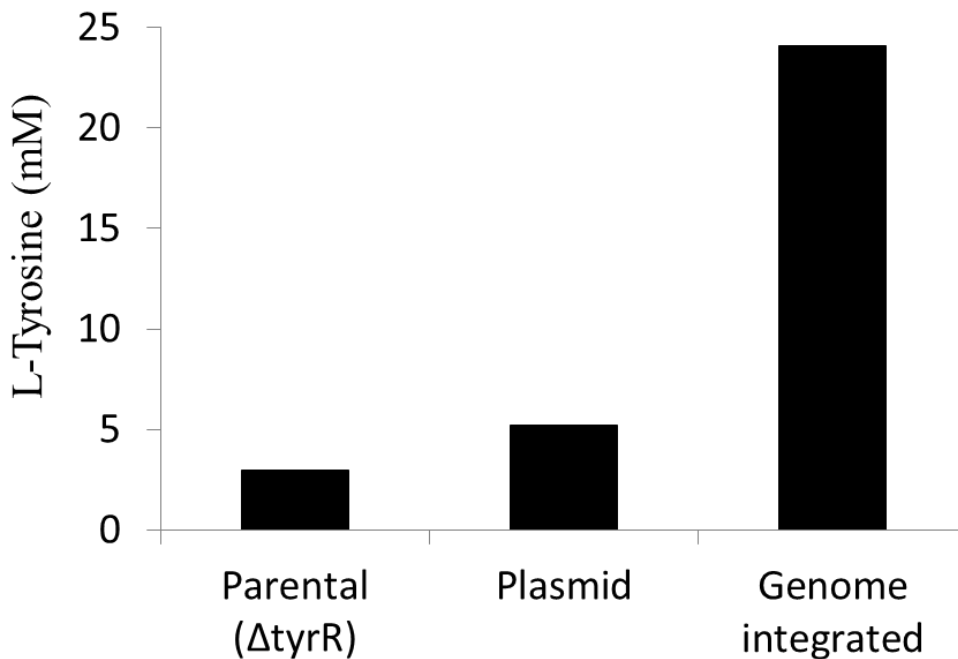


図3 ゲノム挿入型チロシン高生産大腸菌の作製

アルカロイド生合成経路には P450 酵素が関与していることが多く、大腸菌における効率的な発現システムの構築が不可欠となっている。P450 酵素の機能的な発現には補酵素としてヘムが必要であり、通常はヘム前駆体である 5-アミノレブリン酸 (5ALA) を培地に添加してい

る。しかしながら、5ALA は非常に高価なため、実用生産での使用には不向きである。そこで、ヘム過剰生産系（ヘムの共発現系）の導入により、大腸菌における効率的な真核生物由来 P450 酵素の発現システムを確立した。その結果、5ALA 添加依存的な CYP719A1 において、2 倍以上の効果があつた（図 4）。さらにこれを利用し、グルコースからのコリツベリン発酵生産に成功した。ヘム共発現系導入により、P450 の機能的な発現を必要とする物質生産を安価に行うことが可能となった。

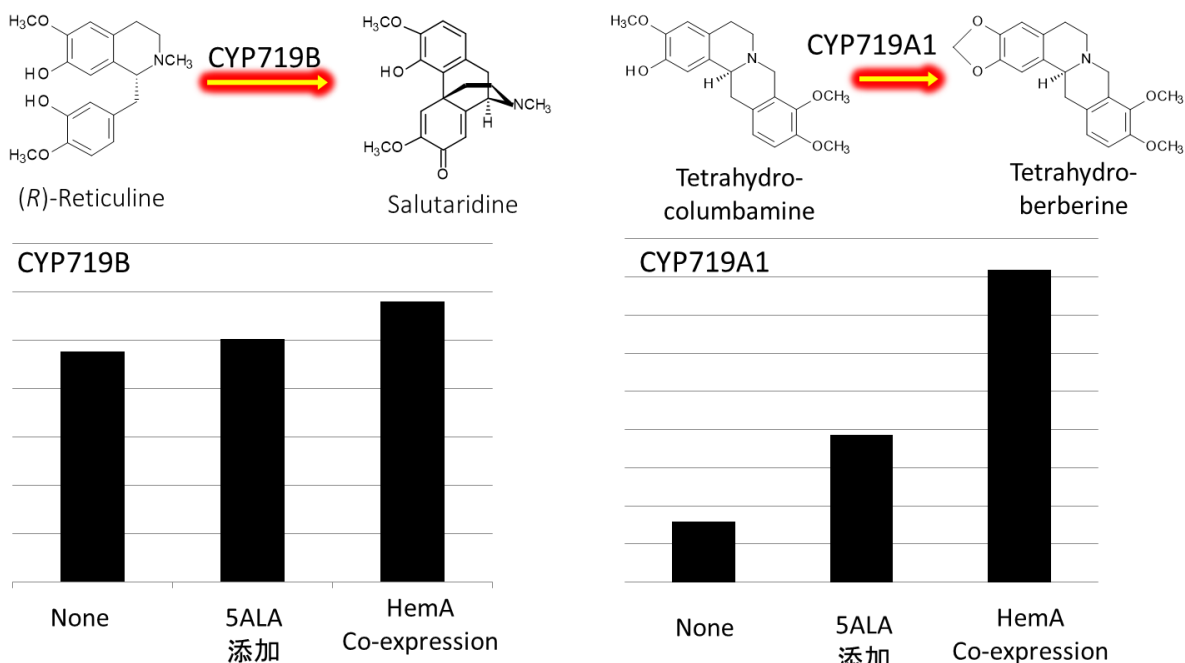


図4 大腸菌における効率的な真核生物由来P450酵素の発現システム

メチオニン はレチクリン生産においてメチル基の供給源として重要であり、安価なため培地に添加することが可能である。そこで、培地へのメチオニン添加の影響を検討した結果、すでに確立済みのプラスミド型レチクリン高生産株（Jar を用いた Batch 培養で 165.9 mg/L の生産量）において、三角フラスコを用いた培養条件において 213 mg/L の生産に成功した（図 5）。レチクリン高生産株ではメチル基の供給が律速であり、培地へのメチオニン添加によって律速が改善されることが明らかとなった。

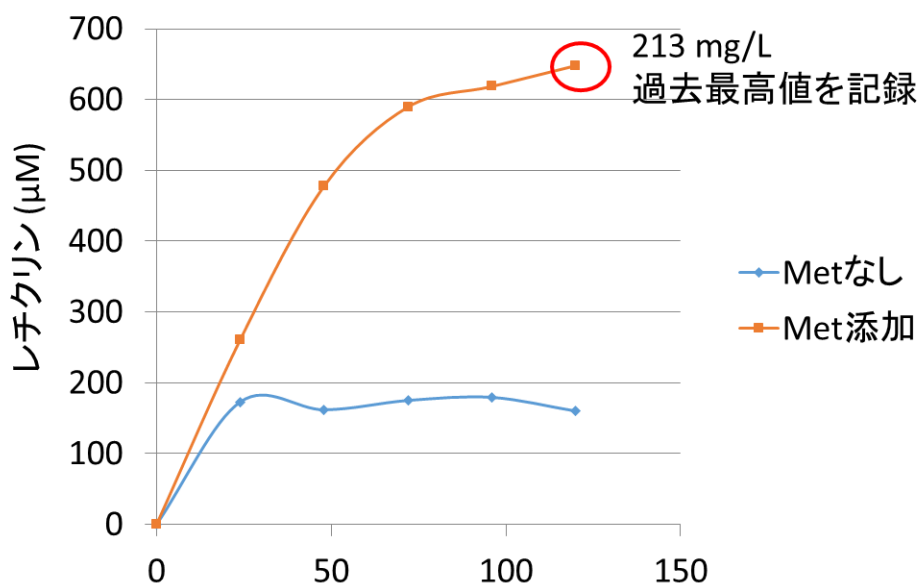


図5 メチオニン添加による生産量向上

(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	
2016	0	0	2	0	0	0	0
2017	0	0	3	0	1	0	0
2018 *1	1 (3)	0 (0)	0 (3)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	9	2	14	3	3	0	0

*1 : 2018年6月時点での実施済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2 : 2020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

年度	特許出願件数		
	国内	外国	PCT
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018 *1	0 (2)	0 (0)	0 (0)
2020 *2	5	1	2

*1：2018年6月時点での出願済み件数、()内は2018年度末の予定件数

*2：2020年度末までに予定している累積件数

成果リスト

(1) 研究発表・講演（口頭発表も含む）

(1)-1 論文

1. Yoshifumi Oguro, Harutake Yamazaki, Satoshi Ara, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara, Masamichi Takagi and Hiroaki Takaku: Efficient gene targeting in non-homologous end-joining-deficient *Lipomyces starkeyi* strains; *Curr. Genet.* (2017) First Online 20 February
2. Daisuke Tominaga, Hideo Kawaguchi, Yoshimi Hori, Tomohisa Hasunuma, Chiaki Ogino, Sachiyo Aburatani, "Analyses of metabolic system dynamics for time series data of small samples", *Bioinformatics and Biology Insights* (in press)
3. Vavricka, C.J., Muto, C., Hasunuma, T., Kimura, Y., Araki, M., Wu, Y., Gao, G.F., Ohrui, H., Izumi, M., Kiyota, H. (2017) Synthesis of sulfosialic acid analogues: potent neuraminidase inhibitors in regards to anomeric functionality, *Scientific Reports* 7 (1): 8239
4. Fumio Matsuda, Atsumi Tomita, Hiroshi Shimizu. (2017) Prediction of hopeless peptides unlikely to be selected for targeted proteome analysis. *Mass Spectrometry (Tokyo) 2017*; 6(1): A0056
5. Konishi Kenji, Kumagai Toshitaka, Shin-ich Sakasegawa, Tomohiro Tamura. (2017) Complete Genome Sequence of *Burkholderia stabilis* FERM P-21014. *Genome announcements* Jul 20;5(29). pii: e00636-17.
6. Matsumura E., Nakagawa A., Tomabechi Y., Ikushiro S., Sakaki T., Katayama T., Yamamoto K., Kumagai H., Sato F. and Minami H. Microbial production of novel sulphated alkaloids for drug discovery *Scientific Reports* 8, 7980 (2018)
7. Daisuke Tominaga, Hideo Kawaguchi, Yoshimi Hori, Tomohisa Hasunuma, Chiaki Ogino, Sachiyo Aburatani: Mathematical Model for Small Size Time Series Data of Bacterial Secondary Metabolic Pathways; *Bioinformatics and Biology Insights*, 12:1-7 (2018)
8. 石黒 宗, 増山 七海 & 谷内江 望 (2017) オミクス科学における実験数の組合せ爆発に挑む DNA バーコード技術. *生化学* 89, No 4, 538-545

(1)-2 総説

1. Yosuke Shida, Takanori Furukawa, Wataru Ogasawara: Deciphering the molecular mechanisms behind cellulase production in *Trichoderma reesei*, the hyper-cellulolytic filamentous fungus; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80(9), 1712-1729 (2016)
2. 高久 洋暁, 山崎 晴丈: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における遺伝子組換えシステムの構築とその応用; *オレオサイエンス*, 17(3), 107-116 (2017)

3. 小林直也, 木村尚弥, 新井亮一: バイナリーパターン配列デザインによるデノボ蛋白質の創出と蛋白質ナノブロックによる超分子複合体の創生; 生物工学会誌, 94(8), 485-488 (2016).
4. Naoya Kobayashi, Ryoichi Arai: Design and construction of self-assembling supramolecular protein complexes using artificial and fusion proteins as nanoscale building blocks; Curr. Opin. Biotech. 46, 57-65 (2017).
5. 蓮沼誠久, バイオリファイナリー実現を加速する先端バイオ技術と情報技術の融合, アグリバイオ, 11月号, vol.1(12), 24-29 (2017)
6. Fumio Matsuda, Yoshihiro Toya and Hiroshi Shimizu. (2018) Learning from quantitative data to understand central carbon metabolism. Biotechnology Advances 35(8):971-980
7. 柘植謙爾・石井純・荒木通啓・近藤昭彦, ゲノム合成の潮流のインパクト 微生物による物質生産, 現代化学, 562, 36-41 (2018)
8. 梅野太輔, 「生物をつくる 新薬を生み出すスーパー酵母を創る」, バイオベンチャーの冒険者たち 世界をアップデートする6人のバイオ研究者, 千葉大学ベンチャービジネスラボラトリー編, 幻冬舎 (2018年3月20日発行) ISBN 978-4-344-91602-9 C0045
9. 蓮沼誠久, バイオリファイナリー実現を加速する先端バイオ技術と情報技術の融合, アグリバイオ, 11月号, vol.1(12), 24-29 (2017/11)
10. 松田史生: 微生物によるモノづくりのためのトランスオミクスデータ解読をめぐる; AI導入によるバイオテクノロジーの発展、監修植田允美、pp149-156 (2018).
11. 石黒 宗 & 谷内江 望 (2018) 全ゲノム合成時代における長鎖 DNA 合成の考え方. スマートセルインダストリー-微生物細胞を用いた物質生産の展望-, 32-38
12. 谷内江 望 (2017) 長鎖 DNA 合成のオートメーション化による生命科学の未来. 実験医学 別冊あなたのラボに AI×ロボットがやってくる, 80-91
13. 山本-エヴァンス 楠 & 谷内江 望 (2017) AI・LabDroid と交わす言葉をつくりだす. 実験医学 別冊あなたのラボに AI×ロボットがやってくる, 124-129
14. Anne-Ruxandra Carvunis & Trey Ideker 翻訳: 森 秀人 & 谷内江 望 (2017) Siri of the Cell-生物学は iPhone から何を学べるだろうか. 実験医学 別冊あなたのラボに AI×ロボットがやってくる, 116-123

(1)-3 口頭発表およびポスター発表

1. 石井純「酵母でのモノづくり細胞のエンジニアリング」第11回日本ゲノム微生物学会（慶應義塾大学 湘南藤沢キャンパス），平成29年3月
2. 荒木通啓「代謝経路デザインの限界」第11回日本ゲノム微生物学会（慶應義塾大学 湘南藤沢キャンパス），平成29年3月

3. 蓮沼誠久「日本独自の超高速微生物育種プラットフォーム“スマートセルフアウ
ンドリ”の開発」NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」キック
オフシンポジウム（東京），平成 28 年 11 月
4. 蓮沼誠久「バイオリファインリーの構築に資する微生物細胞工場の創製」第 21
回 関西大学 先端科学技術シンポジウム「地域資源の高度利用を図るバイオリ
ファインリーの基盤形成とその実用化（関西大学），平成 29 年 1 月
5. 富永大介，川口秀夫，堀良美，蓮沼誠久，油谷幸代，“時系列データと代謝マッ
プからの実反応経路の推定”，化学工学会第 82 年会，東京，2017 年 3 月（口頭）
6. 臼田佳弘：「生物機能を活用したものづくりにおける味の素（株）の取組とプロ
ジェクトへの期待」；植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発プロジェク
ト キックオフシンポジウム，平成 28 年 11 月
7. Takeshi Kubota: Challenges to the production of high value-added
chemicals: aromatic compounds; BioJapan 2016（パシフィコ横浜），平成 28
年 10 月
8. 乾 将行：バイオリファインリー社会の実現を目指したバイオ燃料・グリーン化
学品生産；RITE 革新的環境技術シンポジウム 2016～エネルギー・環境技術のイ
ノベーションによるゼロエミッション社会の構築～（東京大学伊藤謝恩ホー
ル），平成 28 年 12 月
9. 南博道：微生物発酵法による植物アルカロイド生産と生薬生理活性物質の創製；
日本農芸化学会 2017 年度大会（京都女子大学），平成 29 年 3 月
10. 中川明，佐藤文彦，南博道：創薬研究を目指した大腸菌を用いたベンジルイソキ
ノリンアルカロイド生産系の構築；日本薬学会第 137 年会（東北大学），平成
29 年 3 月
11. 小笠原 渉：微生物がかかわる生活（環境・食料・健康など）；第 6 回緑水工業
水環境フォーラム「水に映す未来。」（ホテルニューオータニ長岡 NC ホー
ル），2016 年 10 月
12. Nguyen Le Quynh Anh, 藤原 南帆, 南郷 修司, 大隅 正子, 志田 洋介, 小
笠原 渉：糸状菌 *Trichoderma reesei* の形態学的解析；第 1 回高専生サミット
on Bioinspired Chemistry（鶴岡工業高等専門学校）2016 年 9 月
13. 平沢 大樹, 志田 洋介, 田代 康介, 久原 哲, 小笠原 渉：有用糸状菌
Trichoderma reesei 日本型変異株の網羅的表現型解析；第 68 回日本生物工学会
大会（富山国際会議場）2016 年 9 月
14. Dung Pham Khanh, Atsushi Miyata, Yosuke Shida, Harutake Yamazaki, Kazuo
Masaki, Kazuki Mori, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara, Hiroaki Takaku,
Wataru Ogasawara: Analysis of light response mechanisms in carotenoid
synthesis of the yeast *Rhodospiridium toruloides*; 第 68 回日本生物工学会
大会（富山国際会議場），2016 年 9 月
15. Hiroki Hirasawa, Yosuke Shida, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara, Wataru
Ogasawara: Identification of the novel pH-responsive cellulase
regulating factor in filamentous fungus *Trichoderma reesei*; The 5th

- International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学) , 2016年10月
16. Ayana Nakamura, Machiko Takahashi, Tomohiko Matsuzawa, Yosuke Shida, Katsuro Yaoi, Wataru Ogasawara: The physiological role of BGLII in *Trichoderma reesei*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学) , 2016年10月
 17. Atsushi Miyata, Pham Khanh Dung, Yosuke Shida, Harutake Yamazaki, Kazuo Masaki, Kazuki Mori, Satoru Kuhara, Hiroaki Takaku, Wataru Ogasawara: ANALYSIS OF RELATIONSHIP BETWEEN LIGHT RESPONSE AND LIPID PRODUCTION IN THE OLEAGINOUS YEAST *Rhodospiridium toruloides*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学) , 2016年10月
 18. Nayani D. Daranagama, Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Haruna Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Transcriptional regulation mechanism of proteases in *Trichoderma reesei*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学) , 2016年10月
 19. Kazumasa Yoshizawa, Hiroki Taniguchi, Takanori Furukawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Functional analysis of C terminal-tail of putative tranceptor CRT1 involved in lignocellulase production in *Trichoderma reesei*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学) , 2016年10月
 20. Minaho Fujiwara, Shingo Tahara, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: FUNCTIONAL ANALYSIS of CHITIN SYNTHASES in *Trichoderma reesei*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学) , 2016年10月
 21. Dung Pham Khanh, Atsushi Miyata, Yosuke Shida, Harutake Yamazaki, Kazuo Masaki, Kazuki Mori, Satoru Kuhara, Hiroaki Takaku, Wataru Ogasawara: ANALYSIS OF LIPID PRODUCTION IN THE OLEAGINOUS YEAST *Rhodospiridium toruloides*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学) , 2016年10月
 22. Nguyen Le Quynh Anh, Minaho Fujiwara, Nobuhito Nango, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Visualization of nuclei in *Trichoderma reesei*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学) , 2016年10月
 23. Keitaro Takahashi, Hiroki Aita, Hiroki Hirasawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Elucidation of cellobiose-responsive cellulase production mechanism in *Trichoderma reesei*; The 5th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学) , 2016年10月

24. 平沢 大樹, 志田 洋介, 小笠原 渉:糸状菌 *Trichoderma reesei* における新規 pH 依存的セルラーゼ生産制御因子の解析; 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス (京都大学), 2016 年 11 月
25. 吉澤 和将, 谷口 大樹, 古川 隆紀, 志田 洋介, 小笠原 渉: *Trichoderma reesei* における推定トランセプター CRT1 の C 末端テール領域の解析; 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス (京都大学), 2016 年 11 月
26. 藤原 南帆, 志田 洋介, 小笠原 渉: ガラクトース異性化酵素遺伝子 gal10 の機能から見る *Trichoderma reesei* が生産する繊維状物質の特性解明; 第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜), 2016 年 11 月
27. 宮田 淳史, 志田 洋介, 山崎 晴丈, 正木 和夫, 森 一樹, 田代 康介, 久原 哲, 高久 洋暁, 小笠原 渉: 油脂生産酵母 *Rhodospirium toruloides* の突然変異導入による油脂生産向上因子の同定; 第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜), 2016 年 11 月
28. 北原 雪菜, 吉澤 和将, 谷口 大樹, 古川 隆紀, 志田 洋介, 小笠原 渉: *Trichoderma reesei* における推定トランセプター CRT1 のシグナル伝達機構; 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会 (慶応大学・藤沢), 2017 年 3 月
29. 岩本 孝信, 宮田 淳史, Pham Khanh Dung, 志田 洋介, 山崎 晴丈, 正木 和雄, 森 一樹, 久原 哲, 高久 洋暁, 小笠原 渉: 油脂生産酵母 *Rhodospiridium toruloides* の油脂およびカロテノイド生産の相関解析; 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会 (慶応大学・藤沢), 2017 年 3 月
30. Pham Khanh Dung, Atsushi Miyata, Yosuke Shida, Harutake Yamazaki, Kazuo Masaki, Hiroaki Takaku, Wataru Ogasawara: Lipid production in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*; 地域活性に関する国際会議 (ISLife2017) (鹿児島県出水郡長島町), 2017 年 3 月
31. Ebina, S., Abe, S., Yamazaki H. and Takaku H.: Isolation of Industrial Oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* Mutants Accumulating a High Level of Lipid; International Conference on Food for Health in Niigata 2016 (日本・新潟) 平成 28 年 11 月
32. Kobayashi S., Yamazaki H. and Takaku H.: Expression profile of genes responsible for lipid production in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* mutant K13 exhibiting high lipid accumulation; International Conference on Food for Health in Niigata 2016 (日本・新潟) 平成 28 年 11 月
33. Sano M., Yamazaki H. and Takaku H.: Metabolic engineering of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* for over production and secretion of fatty acids from glucose; International Conference on Food for Health in Niigata 2016 (日本・新潟) 平成 28 年 11 月
34. 小林 鈴花, 海老名 沙也佳, 阿部 史歩, 山崎 晴丈, 志田 洋介, 小笠原 渉, 高久 洋暁: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂高蓄積変異株の取得と油脂合成・分解関連重要遺伝子の同定; 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都女子大学) 平成 29 年 3 月

35. 海老名 沙也佳, 春日 琴葉, 志田 洋介, 小笠原 渉, 山崎 晴丈, 高久 洋暁: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における油脂高蓄積変異株の育種; 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都女子大学) 平成 29 年 3 月
36. 佐野 真那理, 志田 洋介, 小笠原 渉, 山崎 晴丈, 高久 洋暁: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における脂肪酸の分泌発酵生産; 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都女子大学) 平成 29 年 3 月
37. 木村尚弥, 小林直也, 新井亮一: 超安定化二量体新規人工蛋白質 Super WA20 (SUWA) の創出と自己組織化蛋白質ナノブロック複合体構築; 日本生物工学会 2016 年度大会 (富山国際会議場), 2016 年 9 月
38. Naoya Kobayashi, Naoya Kimura, Ryoichi Arai: Self-assembling supramolecular nano-architectures created from de novo protein nano-building blocks; 日本生物工学会 2016 年度大会 (富山国際会議場), 2016 年 9 月
39. Ryoichi Arai, Naoya Kobayashi, Naoya Kimura, Michael H. Hecht: De Novo Protein Nano-Building Block Approach for "Synthetic Structural Biology" to Create Artificial Supramolecular Protein Complexes; The 42nd Naito Conference (シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ), 2016 年 10 月
40. Naoya Kobayashi, Naoya Kimura, Ryoichi Arai: Design and construction of supramolecular nanostructures by using de novo protein nanobuilding blocks; 第 54 回日本生物物理学会大会 (つくば国際会議場), 2016 年 11 月
41. 木村尚弥, 小林直也, 新井亮一: 蛋白質ナノブロック用超安定化人工蛋白質 SUWA (Super WA20) の特性解析及び構造解析; 第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜), 2016 年 12 月
42. 小林直也, 木村尚弥, 新井亮一: 人工蛋白質ナノブロックによる多様な自己組織化超分子ナノ構造複合体: ネオバイオ超分子の創生を目指して; 第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜), 2016 年 12 月
43. 新井亮一: 信州発! 微生物によるナノバイオものづくりイノベーションに向けて: 人工タンパク質ナノブロック開発による自己組織化超分子複合体の創出; 菌類・微生物ダイナミズム創発研究センター キックオフシンポジウム (信州大学), 2016 年 12 月
44. Naoya Kimura, Naoya Kobayashi, Ryoichi Arai: Dynamical Ordering Nanostructures Constructed from Protein Nanobuilding Blocks; The 5th International Symposium of Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions (東京大学), 2017 年 1 月
45. Ryoichi Arai: Self-assembling supramolecular nanostructures created from de novo protein nanobuilding blocks; The 11th Annual Symposium on Nanobiotechnology (川崎市産業振興会館), 2017 年 2 月
46. 木村尚弥, 小林直也, 新井亮一: タンパク質ナノブロックによる動的秩序構造形成, 日本化学会第 97 春季年会 (慶応大学), 2017 年 3 月

47. Naoya Kimura, Naoya Kobayashi, Ryoichi Arai: Self-assembling supramolecular nanostructures created from de novo protein nanobuilding blocks; Okazaki Conference 2017 on Grand Challenges in Small-angle Scattering (岡崎コンファレンスセンター), 2017年3月
48. 菅野学, 三谷恭雄, 野田尚宏, 木村信忠, 田村具博: バクテリアのポリシストロニックオペロンの発現実態の解明を目指した長鎖 cDNA 調整手法の開発; 第17回 LS-BT 合同発表会 (つくば), 2018年2月
49. 菅野学, 三谷恭雄, 野田尚宏, 木村信忠, 田村具博: 放線菌の長鎖 mRNA の発現情報取得の新規アプローチ ~二次代謝産物生合成遺伝子群の発現をありのまま捉える~; 日本農芸化学会 2018年大会 (名古屋), 2018年3月
50. 齋藤裕, 北川航, 田村具博, 亀田倫史; コドン最適化による放線菌蛋白質発現量の調節; 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017); 神戸ポートアイランド, 2017年12月
51. 亀田倫史: MD シミュレーションを用いた機能性タンパク質の高機能化法の開発; 日本農芸化学会 2018年大会 (名古屋), 2018年3月
52. Sachiyo Aburatani, "Network Inference by Structural Equation Modeling for systems biology", Escherichia coli biology workshop, Awaji Yumebutai, Hyogo, Japan, Mar. 2018
53. Sachiyo Aburatani, Tomohiro Tamura, "Statistical Inference of Gene Regulatory Network from Gene Expression Profiles", ISPROF2017, Lisbon, Portugal, Sep. 2017
54. 富永大介, 川口秀夫, 堀良美, 蓮沼誠久, 荻野千秋, 油谷幸代, "酵素反応の速度モデリングにおける補酵素やエネルギー分子の影響", LS-BT 合同発表会, つくば市 (2018).
55. Wong Pui Shan, Sachiyo Aburatani, "Elucidation of the sequential transcriptional activity in Escherichia coli using time-series RNA-seq data", Metabolomics & Systems Biology, Prague, Czech Republic, Aug. 2018
56. Wong Pui Shan, Sachiyo Aburatani, "Elucidation of the sequential transcriptional activity in Escherichia coli using time-series RNA-seq data", 第17回 LS-BT 合同発表会 (つくば), 2018年2月
57. 松沢智彦, 前原智子, 神坂泰, 荒学志, 高久洋暁, 矢追克郎: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の delta 12-fatty acid desaturase の機能解析; 日本農芸化学会 2018年大会 (名古屋), 2018年3月
58. 蓮沼誠久, スマートセルインダストリーの創出に資する微生物育種プラットフォームの開発, 新化学技術推進協会 (JACI) ライフサイエンス技術部会・反応分科会講演会講演会「スマートセルインダストリーに関する研究開発動向」, 東京, 2018.2.26
59. 蓮沼誠久, 藻類オイル生産の実用化に向けた代謝メカニズム解析の重要性, 微細藻燃料開発推進協議会 (JMAF) 開催 シンポジウム, 東京, 2018.1.29

60. Tomohisa Hasunuma, Production of highly functional biomaterials using “Smart Cells” , iBioS-2017, Singapore, 2017.12.20
61. Tomohisa Hasunuma, Development of dynamic metabolomics and its application to metabolic engineering in the “Smart Cell” project, The 8th Kobe University Brussels European Centre Symposium, Brussels, 2017.11.21
62. 蓮沼誠久, 動的メタボロミクスの開発とスマートセル・インダストリーへの展開, 第11回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2017.11.14
63. 蓮沼誠久, Engineering Biologyによるバイオリファインリーの構築とスマートセルインダストリーへの展開, 静岡大学グリーン科学研究所 第4回シンポジウム, 浜松, 2017.11.9
64. 蓮沼誠久, スマートセルを創出する合成バイオプラットフォームの開発, BioJapan, 横浜, 2017.10.12
65. 蓮沼誠久, 代謝工学的手法による海洋性ラン藻でのアスタキサンチン生産, 第31回カロテノイド研究談話会, 京都, 2017.9.16
66. 蓮沼誠久, スマートセルを創出する合成バイオプラットフォームの開発と応用への挑戦, iBioK 第7回 合成生物学シンポジウム, 神戸, 2017.8.3
67. Tomohisa Hasunuma, Cell surface engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for biomass breakdown, SB7.0 (The seventh international meeting on synthetic biology), Singapore, 2017.6.13-16
68. 蓮沼誠久, 進化した細胞表層工学によるバイオマス変換プロセスの開発と機能性物質生産への新展開, 新化学技術推進協会 (JACI) エネルギー・資源技術部会 バイオマス分科会 講演会「バイオマス資源変換触媒の研究動向」, 東京, 2017.4.2
69. 高橋俊介, 柘植謙爾, 近藤昭彦, 第二世代 OGAB 法に適した, 新規二本鎖 DNA 調達方法の開発, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 神戸, 2017 年 12 月 7 日
70. 志田洋介, 小笠原渉: 糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるセルロース認識メカニズム; セルラーゼ研究会第 31 回大会 (佐久平プラザ 21), 2017 年 7 月
71. Nayani D. Daranagama, Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Haruna Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: The proposed mechanism of *Trichoderma* pepsin induction in *Trichoderma reesei* ; セルラーゼ研究会第 31 回大会 (佐久平プラザ 21), 2017 年 7 月
72. 平沢大樹, 高橋圭太郎, 会田広樹, 志田洋介, 小笠原渉: 糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるセロビオース応答性セルラーゼ生産制御; セルラーゼ研究会第 31 回大会 (佐久平プラザ 21), 2017 年 7 月
73. 大川欣英, 平沢大樹, 志田洋介, 小笠原渉: *Trichoderma reesei* におけるキシラナーゼ生産に関わるプロテインキナーゼの同定; セルラーゼ研究会第 31 回大会 (佐久平プラザ 21), 2017 年 7 月

74. 北原雪菜, 吉澤和将, 谷口大樹, 古川隆紀, 志田洋介, 小笠原渉: 糸状菌 *Trichoderma reesei* における膜タンパク質 Crt1 によるセルラーゼ誘導機構; 第 12 回トランスポーター研究会年会 (東北大学片平キャンパスさくらホール), 2017 年 7 月
75. 北原雪菜, 吉澤和将, 谷口大樹, 藤原南帆, 田原伸悟, 古川隆紀, 志田洋介, 小笠原渉: 糸状菌 *Trichoderma reesei* の生き様への理解; 第 2 回高専サミット (沖縄高専), 2017 年 9 月
76. Hiroki Hirasawa, Keitaro Takahashi, Hiroki Aita, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Cellobiose-dependent Cellulase Production Mechanism in Filamentous Fungi *Trichoderma reesei*; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2017 年 10 月
77. Nayani D. Daranagama, Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Haruna Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Contribution of Transcription Factors to Protease Regulation in *Trichoderma reesei*; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2017 年 10 月
78. Yoshihide Ohkawa, Hiroki Hirasawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Identification of the Protein Kinase Contributes to Xylanase Production in *Trichoderma reesei*; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2017 年 10 月
79. Daichi Okayama, Hiroki Hirasawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: Analysis of the nitrogen-responsive transcription factor in filamentous fungus *Trichoderma reesei*; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2017 年 10 月
80. Nguyen Le Quynh Anh, Minaho Fujiwara, Nobuhito Nango, Yosuke Shida, Masako Osumi, Wataru Ogasawara: The nuclear dynamics in cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2017 年 10 月
81. Kazuya Otani, Yukina Kitahara, Yosuke Shida, and Wataru Ogasawara: Analysis of Putative Sugar Transporter Tr67752 by Global Analysis of Transporter in *Trichoderma reesei*; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学), 2017 年 10 月
82. Nguyen Le Quynh Anh, Minaho Fujiwara, Nobuhito Nango, Yosuke Shida, Masako Osumi, Wataru Ogasawara: Education of the relationship between nuclear dynamics and cellulose productivity in filamentous fungus *Trichoderma reesei*; 2017 2nd STI-Gigaku (長岡技術科学大学), 2017 年 10 月
83. Nayani D. Daranagama, Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Haruna Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara: The involvement of

- transcription factors for protease induction in *Trichoderma reesei*; 2017 2nd STI-Gigaku (長岡技術科学大学), 2017年10月
84. Yukina Kitahara, Kazumasa Yoshizawa, Hiroki Taniguchi, Takanori Furukawa, Yoshuke Shida, Wataru Ogasawara: Functional analysis of C-terminal tail of putative transceptor Crt1 involved in lignocellulase production in *Trichoderma reesei*; 2017 2nd STI-Gigaku (長岡技術科学大学), 2017年10月
85. 大谷和也: *Trichoderma reesei* におけるによる二糖トランスポーターの網羅的解析; 第10回北陸合同バイオシンポジウム (富山県立大学), 2017年11月
86. 鈴木義之, Nayani Daranagama, 志田洋介, 森一樹, 油谷幸代、小笠原渉: 糸状菌 *Trichoderma reesei* における分泌プロテアーゼの生産応答機構の解析; 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス (佐賀市立東与賀文化ホール), 2017年11月
87. 佐藤直美, 鈴木義之, 志田洋介 小笠原渉: 比較ゲノム解析のための *Trichoderma reesei* のセルラーゼ生産性変異株の取得と解析; 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス (佐賀市立東与賀文化ホール), 2017年11月
88. NGUYEN LE QUYNH ANH, 藤原南帆, 志田洋介, 小笠原渉: *Trichoderma reesei* における核挙動とセルラーゼ生産性との相関の解明; 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス (佐賀市立東与賀文化ホール), 2017年11月
89. 志田洋介, 北原雪菜, 森一樹, 油谷幸代, 小笠原渉: 糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるトランセプター CRT1 の機能解析; 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス (佐賀市立東与賀文化ホール), 2017年11月
90. 乾将行: 未利用バイオマスから100%グリーンジェット燃料の生産; 第4回GOJO大学 (五條市中央公民館), 2017年6月
91. 乾将行: 低炭素社会の実現を目指したバイオ燃料・グリーン化学品生産技術の開発; 第93回バイオマス利用研究会 (京都高度技術研究所), 2017年7月
92. 乾将行: グリーン化学品・バイオ燃料の生産技術開発と実用化; 第5回奈良まほろば産学官連携懇話会 (奈良先端科学技術大学院大学), 2017年9月
93. 乾将行: 低炭素社会の実現を目指したバイオリファイナリー生産技術の開発; 高分子学会 17-2 エコマテリアル研究会 (京都工芸繊維大学), 2017年10月
94. 乾将行, 平賀和三, 須田雅子, 豊田晃一, 久保田健: コリネ菌を用いた有用芳香族化合物の生産性向上による代謝解析技術の有効性検証; BioJapan 2017 (パシフィコ横浜), 2017年10月
95. 乾将行: 低炭素社会の実現を目指したバイオリファイナリー生産技術の開発; RITE 革新的環境技術シンポジウム 2017 (東京大学), 2017年12月
96. 中川明、佐藤文彦、片山高嶺、南博道 「創薬研究を目指したベンジルイソキノリンアルカロイドの大腸菌を用いた生産系の構築」 日本生物工学会 2017年度大会 (早稲田大学、東京)、2017年9月

97. Akira Nakagawa. Alkaloid production using an engineered *Escherichia coli*. 19th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology, (Rostock, Germany) 2017年9月
98. 南博道 「微生物発酵法による生薬生理活性物質生産」 BioJapan2017 (パシフィコ横浜、横浜)、2017年10月
99. 中川明、松村栄太郎、小柳喬、片山高嶺、山本憲二、佐藤文彦、南博道 「大腸菌を用いた単純な炭素源からのモルヒネ発酵生産系の構築」日本分子生物学会2017年度大会(神戸ポートアイランド、神戸)2017年12月
100. 石井純, 森田啓介, 伊田賢吾, 加藤寛子, 木下翔平, 旗谷章子, 清水浩, 近藤昭彦, 松田史生「出芽酵母における代謝経路デザインと高級アルコール生産」第3回デザイン生命工学研究会, 2018年3月9-10日, 今帰仁村コミュニティセンター
101. Daisuke Umeno, Directed evolution of carotenoid and terpenoid biosynthetic pathways., The 9th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products, 2017年5月30日~6月4日, Lake Arrowhead, CA
102. 梅野太輔「カロテノイド生合成経路の進化能の探索」, 第81回植物学会シンポジウム, 2017年9月8日, 東京理科大学
103. 梅野太輔「テルペノイド生合成経路の兵站体系を再検討する」, 第69回生物工学会シンポジウム, 2017年9月13日
104. 李伶, 古林真衣子, 河合繁子, 眞岡孝至, 斎藤恭一, 梅野太輔「カロテノイド生合成におけるリコペルセン経路の構築」, カロテノイド研究談話会, 2017年9月17日, 京都薬科大
105. Daisuke Umeno, Directed evolution of carotenoid and terpenoid biosynthetic pathways., The 1st Chiba-Japan Symposium on Natural Product Biosynthesis, 2017年10月2日~3日, 上海日航ホテル
106. 佐伯和哉, 湯本達也, 小林一幾, 木村友紀, 梅野太輔, 「遺伝子制御ネットワークのコンパクト化技術」, 細菌の構造と代謝の根幹解析研究会, 2017年10月20日, 三島遺伝学研究所
107. Shigeko Kawai-Noma, Kazuya Saeki, Tatsuya Umoto, Kyoichi Saito, and Daisuke Umeno, "Identification and assembly of genes that boost the genomic incorporation of mutagenic nucleoside for the development of highly-efficient negative selection platform", 2nd Symposium of Chiral Molecular Science and Technology, 2018年1月11-12日, 千葉大学
108. 梅野太輔, センサーと制御ネットワークの進化デザイン, 第3回産学連携・分子組織シンポジウム, 2018年1月20日, 九州大学医学系キャンパス
109. 木村友紀, 湯本達也, 栗原健人, 渡邊荘爾, 小林一幾, 佐伯和哉, 梅野太輔, 「情報処理機能の実験室内「創発」」, 生命の起源および進化学会第43回学術講演会, 2018年3月15~17日, 埼玉大学
110. 梅野太輔, 非天然トリテルペノイド生合成の進化合成生物学, 日本農芸化学会2018年大会シンポジウム, 名城大学

111. 寺井悟朗、高橋俊介、中村朋美、柘植謙爾、石井純、浅井潔；Combi-OGAB法を利用した最適コドンの探索；日本農芸化学会 2018 年度大会；名城大学 天白キャンパス、2018 年 3 月
112. 風間春香、岡由佳、小林鈴花、荒学志、山崎晴丈、志田洋介、小笠原涉、矢追克郎、森一樹、油谷幸代、荒木秀雄、高久洋暁：赤色油脂酵母 *Rhodospiridium toruloides* の油脂高蓄積変異株の取得及びその油脂蓄積性の解析；日本農芸化学会 2018 年度大会（名城大学）平成 30 年 3 月
113. 春日琴葉、海老名紗也佳、荒学志、山崎晴丈、志田洋介、小笠原涉、矢追克郎、森一樹、油谷幸代、荒木秀雄、高久洋暁：油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂超高蓄積変異株の取得及び油脂蓄積重要遺伝子の同定；日本農芸化学会 2018 年度大会（名城大学）平成 30 年 3 月
114. Khanh Pham Dung, Atsushi Miyata, Yosuke Shida, Harutake Yamazaki, Kazuo Masaki, Kazuki Mori, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara, Wataru Ogasawara: Analysis of carotenoid production in the yeast *Rhodospiridium toruloides* by light response; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学) 平成 29 年 10 月
115. Kota Oshiro, Takanobu Iwamoto, Takeru Takamizawa, Yoshiyuki Suzuki, Harutake Yamazaki Hiroaki Takaku, Yosuke Shida, and Wataru Ogasawara: Comparison of Transformation Method in *Rhodospiridium toruloides*; The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (長岡技術科学大学) 平成 29 年 10 月
116. KhanhPham Dung, Atsushi Miyata, Yosuke Shida, Harutake Yamazaki, Kazuo Masaki, Kazuki Mori, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara, Wataru Ogasawara: Analysis of light response mechanisms in carotenoid synthesis of the yeast *Rhodospiridium toruloides*; 第 69 回日本生物工学会大会（早稲田大学）平成 29 年 9 月
117. Khanh Dung Pham, Yosuke Shida, Harutake Yamazaki, Kazuki Mori, Sachiyo Aburatani, Kasuke Tashiro, Satoru Kuhara, Hiroaki Takaku, Wataru Ogasawara: Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild type and hyper carotenoid strains of the yeast *Rhodospiridium toruloides*; 第 12 回日本ゲノム微生物学会年会（京都大学）平成 30 年 3 月
118. 酒井里佳子、荒学志、山崎晴丈、志田洋介、小笠原涉、矢追克郎、荒木秀雄、高久洋暁：油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂低蓄積変異株の取得及びその油脂蓄積性の解析；日本農芸化学会 2018 年度大会（名城大学）平成 30 年 3 月
119. 宮島温美、荒学志、山崎晴丈、志田洋介、小笠原涉、矢追克郎、荒木秀雄、高久洋暁：脂質工学への展開を視野に入れた油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の簡易的形質転換系の開発；日本農芸化学会 2018 年度大会（名城大学）平成 30 年 3 月
120. 厨祐喜、大山彰、荒木通啓：大腸菌による有用物質生産の改善のためのコアモデル；第 69 回日本生物工学大会（早稲田大学西早稲田キャンパス），2017 年 9 月（ポスター）

121. 石井純（神戸大学）、「長鎖 DNA 合成技術による高機能遺伝子デザインの可能性」第 69 回日本生物工学会大会（ランチョンセミナー），2017 年 9 月 11-14 日，早稲田大学 西早稲田キャンパス
122. Yuki Kuriya, Akira Ohyama, Michihiro Araki. : Construction of metabolic model using genomic sequence and reaction database for improving valuable chemical productions by microorganisms ; IIBMP2017（北海道大学 札幌キャンパス），2017 年 9 月（ポスター）
123. 村田昌浩，藤花佐依子，小川哲平，荒木通啓：新規代謝経路の設計・最適化手法の開発 / 反応機構推定に基づく酵素選択 ; BioJapen2017（パシフィコ横浜），2017 年 10 月（展示：ポスター）
124. 厨祐喜，大山彰，荒木通啓：代謝モデル構築・解析技術の開発と実用微生物への技術展開 ; BioJapen2017（パシフィコ横浜），2017 年 10 月（展示：ポスター）
125. 厨祐喜，大山彰，荒木通啓：ゲノム配列および反応データベースを用いた有用物質生産の主要バクテリア宿主の代謝モデル構築 ; 第 12 回日本ゲノム微生物学会年会（京都大学桂キャンパス），2018 年 3 月（口頭）
126. 厨祐喜，大山彰，荒木通啓：微生物による有用物質生産の改善に資する代謝モデルの反応データベースおよび配列データからの自動構築 ; 日本農芸化学会 2018 年度大会（名城大学天白キャンパス），2018 年 3 月（口頭）
127. 三谷 恭雄、野田 尚宏、菅野 学：スマートセルプロジェクト～情報解析に適したゲノム・トランスクリプトーム解析技術の開発～ ; モノづくり日本会議（TKP ガーデンシティ PREMIUM 神保町）2018 年 7 月
128. 菅野 学、三谷 恭雄、野田 尚宏、木村 信忠、田村 具博：ロングリード RNA-seq が明らかとするバクテリアオペロンの発現実態～二次代謝産物生合成遺伝子群のオペロンバリエーションを捉える～ ; 第 70 回日本生物工学会大会（関西大学千里山キャンパス）2018 年 9 月
129. 蓮沼誠久、スマートセル創出プラットフォームに資する微生物構築・評価技術の開発、モノづくり日本会議 第 20 回新産業促進技術検討会，東京，2018. 7. 19
130. 蓮沼誠久、動的メタボロミクスの開発とスマートセル・インダストリーへの展開、第 13 回アジレントセミナー，東京，2018. 7. 25
131. 蓮沼誠久，スマートセルインダストリーの創出に資する微生物育種プラットフォームの開発，新化学技術推進協会（JACI）ライフサイエンス技術部会・反応分科会講演会講演会「スマートセルインダストリーに関する研究開発動向」，東京，2018. 2. 26
132. 蓮沼誠久，Engineering Biology によるバイオリファインリーの構築とスマートセルインダストリーへの展開，静岡大学グリーン科学研究所 第 4 回シンポジウム，浜松，2017. 11. 9
133. 蓮沼誠久，スマートセルを創出する合成バイオプラットフォームの開発と応用への挑戦，iBioK 第 7 回 合成生物工学シンポジウム，神戸，2017. 8. 3

134. 蓮沼誠久, 進化した細胞表層工学によるバイオマス変換プロセスの開発と機能性物質生産への新展開, 新化学技術推進協会 (JACI) エネルギー・資源技術部会バイオマス分科会 講演会「バイオマス資源変換触媒の研究動向」, 東京, 2017.4.21
135. 鈴木 義之, 佐藤 直美, 志田 洋介, 小笠原 渉, 内山 拓, 尾崎 克也, 小林 良則, 掛下 大視, 五十嵐 一暁, 田代 康介, 森 一樹, 油谷 幸代: *Trichoderma reesei* の新規糖質加水分解酵素発現制御因子の同定; セルラーゼ研究会第31回大会 (佐久平プラザ 21), 2018年7月
136. 富永大介、森一樹、油谷幸代「スマートセル創成のための遺伝子発現解析とネットワーク・ダイナミクス解析」モノづくり日本会議第20回新産業技術促進検討会 (東京都千代田区)、平成30年7月
137. 高久洋暁: 機能性油脂生産へ向けた油脂酵母の改良; 第20回新産業技術促進検討会 (東京), 2018年7月
138. 荒木通啓: 代謝パスウェイ設計・解析におけるAI活用, 発酵と代謝研究会平成29年度第1回勉強会 (バイオインダストリー協会), 2017年10月
139. 武田志津: バイオとデジタルの融合によるスマートセル創製プラットフォームの構築, BioJapan2017 NEDO セミナー (パシフィコ横浜), 2017年10月
140. 武田志津: バイオ×デジタルが拓く未来, NoMaps 札幌パネルディスカッション (札幌), 2017年10月
141. 伊藤潔人: バイオ×デジタル融合に向けたAI技術とスマートセル創製に向けた取組み、日本農芸化学会2018年度大会シンポジウム (名城大学), 2018年3月
142. 谷内江 望 (2018/6/28) 生命現象を記録する人工メモリデバイスとしてのDNA. BIO tech 2018, 東京
143. 谷内江 望 (2018/6/19) Chasing cellular and molecular dynamics using DNA barcodes and genome editing. 日本ゲノム編集学会第3回大会
144. Yachie N (2018/6/2) A genetic trick to isolate and analyze a same cell clone from different heterogeneous cell population samples. CIFAR Genetic Networks Workshop, Toronto, Canada
145. Yachie N (2018/5/28) Chasing molecular and cellular dynamics using synthetic DNA memory devices. University of British Columbia, Vancouver, Canada
146. Yachie N (2018/5/23) Chasing cell lineages and hunting cell clones using DNA barcodes and genome editing. University of Toronto, Toronto, Canada
147. Yachie N (2018/5/18) Chasing Molecular and Cellular Dynamics Using DNA Barcodes (PLENARY TALK). PROTEO 18th Annual Symposium, Quebec City, Canada
148. Yachie N (2018/5/16) Outils d'édition de génome pour disséquer des populations cellulaires hétérogènes. Club d'édition génomique de l'Université Laval, Quebec City, Canada
149. 谷内江 望 (2018/5/11) DNA バーコードによる分子・細胞動態計測. 日本医科

大学，東京

150. Yachie N (2018/4/18) Chasing molecular and cellular dynamics using DNA barcodes. Osaka University IPR Seminar: BioNetworks in Health and Diseases, Osaka, Japan
151. 谷内江 望 (2018/4/26) DNA data memory devices and robotics to accelerate biology and medicine. 新経営研究会異業種・独自企業研究会，東京
152. 谷内江 望 (2018/3/12) DNAプログラミングとロボットによる生命科学実験の加速. 技術同友会，東京
153. 谷内江 望 (2018/3/23) DNA バーコードとゲノム編集をもちいた分子・細胞動態計測の加速. 第 17 回日本再生医療学会総会，横浜
154. Yachie N (2018/3/20) Chasing cell clones using DNA barcode and genome editing. Annual Meeting for Systems and Synthetic E. coli Biology, Awaji, Japan
155. 谷内江 望 (2018/3/5) DNA バーコードによる分子・細胞動態計測. 基礎生物学研究所基生研セミナー，岡崎
156. 谷内江 望 (2017/12/6) DNA バーコードを用いたタンパク質インタラクトームと細胞系譜計測. 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) シンポジウム シン・バイオ-分野を超えるインパクト-, 神戸
157. 谷内江 望 (2017/10/20) 大規模な分子、細胞動態を計測する DNA バーコード技術. 「細胞を創る」研究会 10.0, 京都
158. 谷内江 望 (2017/9/20) DNA バーコードを用いたタンパク質インタラクトームと細胞系譜計測. 京都大ウイルス・再生医科学研究所学第 1 回個体の中の細胞社会学セミナー，京都
159. 八幡穰「Microfluidics and Robotics for Ecological Studies of Marine Microbes」第 33 回国際生物学賞記念シンポジウム、平成 29 年 12 月
160. 八幡穰「Robotics と AI を用いたビブリオ生態の研究技術」第 51 回ビブリオシンポジウム、平成 29 年 10 月

(2) 特許等

1. 出願日：2018 年 2 月 15 日、出願番号：特願 2018-025394、名称：組換え宿主細胞及び D-ブタントリオールの新規製造方法、出願人：神戸大学
2. 出願日：2018 年 2 月 28 日、出願番号：特願 2018-034748、名称：油脂高蓄積株、油脂高蓄積株を製造する方法、油脂高蓄積株を用いて油脂を製造する方法、及び、油脂高蓄積株の抽出物、出願人：新潟薬科大学、不二製油グループ本社株式会社
3. 出願日：2018 年年 5 月 1 日、出願番号：特願 2018-088424、名称：コリネ型細菌の形質転換体およびそれを用いる有用化合物の製造方法、出願人：公益財団法人地球環境産業技術研究機構
4. 出願日：2018 年 5 月 14 日、出願番号：特願 2018-93024、名称：二本鎖 DNA 合成方法、出願人：神戸大学

5. 出願日：2018年5月30日、出願番号：特願2018-103382、名称：新規プロモーター、および同プロモーターを用いたタンパク質の製造方法、出願人：国立研究開発法人産業技術総合研究所、旭化成ファーマ株式会社
6. 出願日：2018年7月17日、出願番号：特願2018-134169、名称：サンプリング装置、出願人：国立大学法人神戸大学、株式会社島津製作所
7. 出願日：2018年7月17日、出願番号：特願2018-134171、名称：キャップ着脱装置、並びに、これを備えたサンプリング装置及び前処理装置、出願人：神戸大学、島津製作所
8. 出願日：2018年7月17日、出願番号：特願2018-134174、名称：攪拌装置及び前処理装置、出願人：国立大学法人神戸大学、株式会社島津製作所
9. 出願日：2018年7月17日、出願番号：特願2018-134177、名称：攪拌装置及び前処理装置、出願人：国立大学法人神戸大学、株式会社島津製作所
10. 出願日2018年7月17日、出願番号：特願2018-134179、名称：固液界面検出装置及びこれを備えた前処理装置、出願人：国立大学法人神戸大学、株式会社島津製作所

(3) 受賞実績

1. 長岡技術科学大学研究・産学官連携活動表彰（2016）
2. 第39回日本分子生物学会年会優秀ポスター賞，木村尚弥：蛋白質ナノブロック用超安定化人工蛋白質 SUWA（Super WA20）の特性解析及び構造解析（パシフィコ横浜），2016年12月
3. 蓮沼誠久，神戸大学第9回学長表彰
4. 長岡技術科学大学研究・産学官連携活動表彰（2017）
5. セルラーゼ研究会第31回大会 ポスター賞3等，Nayani D. Daranagama, Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Haruna Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara：The proposed mechanism of Trichodermapepsin induction in *Trichoderma reesei*；（佐久平プラザ21），2017年7月
6. 2018年度 日本質量分析学会奨励賞 松田史生（2018年5月）

3. その他特記事項

(1) 成果普及の努力（プレス発表等）

・プレスリリース

1. プレシジョン・システム・サイエンス(株)；2016.9.15、「NEDO プロジェクト（植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発）の参画について」
2. 長岡技術科学大学；2018年5月28日、「長岡技術科学大学のグローバルトップ技術とは、『脱石油社会を目指した非可食バイオマスからの安価な「糖」を生産する技術』」；日刊工業新聞
(<https://www.nikkan.co.jp/articles/view/00472179>)
3. 神戸大学、島津製作所；2018.5.24、「細胞の代謝物をハイスループット分析可能な解析技術を開発 ー多種類・高感度・自動化により、スマートセルインダス

トリーの実現に貢献一」；新聞・雑誌掲載（日本経済新聞、産経新聞、京都新聞、日刊工業新聞、化学工業日報、日経バイオテク、TV放映（KBS京都））

・出版

1. 微生物専門書「スマートセルインダストリー」 2018.6.20 - 微生物細胞を用いた物質生産の展望 - （シーエムシー出版）

・成果報告会開催

1. 日刊工業新聞社主催「モノづくり日本会議 第20回新産業技術促進検討会」テーマ「バイオで切り拓くモノづくりの新潮流」～スマートセル創出プラットフォームの構築と実証～2018.7.19

(2) その他

1. 蓮沼誠久「研究者が語る 今、バイオテクノロジーの現場で起こっていること」METI Journal 経済産業ジャーナル；2016年12・1月号
2. HP トピックスに NEDO 事業参画のお知らせを掲載（神戸天然物化学(株)；URL；<http://www.kncweb.co.jp/>）
3. 日経バイオテク 2017年8月28日号「合成生物学の最前線 ゲノムの合成技術を武器に、日本から国際プロに参加へ」（神戸大学）
4. BioJapan2017（2017.10.11-13）ポスター展示（プロジェクトブース）、ハイスループット DNA 合成機試作 1号機実機を展示した。（日本テクノサービス）
5. 日経バイオテク 2017年12月4日号「微生物を利用した物質生産 合成生物学で米国はビジネス活況、AIで微生物株の開発期間10分の1へ」（神戸大学、味の素）
6. RITE Today Annual Report 2017 Vol.12（地球環境産業技術研究機構）
7. 臼田佳弘（味の素株式会社）、「微生物を利用した物質生産 合成生物学で米国はビジネス活況、AIで微生物株の開発期間10分の1へ」、日経バイオテク特集記事インタビュー（2017年12月4日）
8. 「日立神戸ラボの取り組み」（神戸新聞 2017年11月16日）
9. 「微生物を利用した物質生産」（日経バイオテク 2017年12月4日号）

IV. 成果の実用化・事業化に向けた取組及び見通しについて

1. 事業全体の取組及び見通し

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」（委託）

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

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

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」（助成）

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

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

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」

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

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

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

2. 研究開発項目毎の取組及び見通し

2.1 研究開発項目① 植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発【委託】実用化に向けた取組及び見通し

2.1.1 ゲノム編集技術

2.1.1.1 個別テーマ

(1) 成果の実用化・事業化に向けた戦略

先行技術調査に基づき、以下の戦略のもとに研究開発を推進する。

1. ゲノム編集の要素技術の一つである「A. 認識モジュール」に関しては、海外技術に席卷されているのが現状である。そこで、我が国独自の技術シーズである dPPR 技術の中核として、既存技術とは異なる認識モジュールを開発する。
2. ゲノム編集の要素技術の一つである「B. ゲノム改変技術」に関しては、現在主流となっている FokI を利用した DNA 切断による遺伝子破壊（切断後は細胞の機能に依存）でなく、高度なゲノム改変を可能にする技術群を開発する。
3. ゲノム編集ツールの効率の良い「C. 導入技術」が開発されておらず、植物改変の技術的な障害になっている。そこで、我が国独自の技術シーズを基盤として、新規の導入技術を開発する。

上記の3項目を重点領域とすることで、海外技術に依存せずに、植物等での物質生産に利用できるゲノム編集要素技術を開発する。さらにゲノム編集適用に必須な要素技術をパッケージ化して、パテントプールを形成することで、実用化・事業化を促進させる枠組みを構築する。

(2) 成果の実用化・事業化に向けた具体的取り組み

ゲノム編集技術開発グループ全体として以下の取組を行っている。

2016年：知財運営委員会発足。知財合意書の締結（BG-IP、FG-IPの取扱を決定）。

2017年：先行知財調査、研究課題ヒアリング。

2018年：関連知財のパッケージ化、カタログ作成、ライセンス活動開始。

（予定）2019年～：実効的な体制構築のための検討事項の抽出。

実用化に向けた4件の情報開示、1件の実施許諾検討を行った。

また、ゲノム編集技術開発グループ構成員の一部は、バックグラウンドIPをコア技術としたベンチャー企業を設立し、事業化検討をすでに開始している。

- ・九大発ベンチャー・エディットフォース社、2015年5月、設立

（コア技術：PPRを利用したDNA/RNA編集）

- ・神戸大発ベンチャー・バイオパレット社、2017年2月、設立

（コア技術：deaminase, glycosylaseを利用した切らないゲノム編集）

ゲノム編集の適用には複数の技術要素（DNA認識、酵素による改変、導入技術、等）が必要である。そのため、プロジェクト終了後は、ゲノム編集関連技術群のツールボックスの整備、窓口としての機能を担う枠組みの構築に着手することで、成果の実用化・事業化を促進させる計画である。

また、それぞれ個別の技術シーズをもとにビジネスモデルの構築、資金や経営人材の確保が可能である場合にはベンチャー設立も検討している。その際には先行するベンチャー企業と情報交換を行うことで事業化を支援することが可能であり、本プロジェクトにおけるゲノム編集技術開発の成果の実用化、事業化の道筋は整いつつあると思慮する。

(3) 成果の実用化・事業化の見通し

ゲノム編集技術は、精密かつ理論的な実用生物の遺伝子改変を可能にし、かつ作出期間を1/5程度に短縮できる生産性革命技術である。中間コストの削減、これまでに作出し得なかった高度な品種改良が可能である。ゲノム編集技術は本プロジェクトで目的とする物質生産以外にも、医療や農業での応用も期待されている。そのため、様々な産業分野での利用が可能なゲノム編集の基盤技術プラットフォームを形成することで、ゲノム編集市場1兆円（2025年予想）の5%のシェア獲得（500億円/年）を目指す。

2.1.2 代謝系遺伝子発現制御技術

2.1.2.1 ゲノム編集技術および代謝系遺伝子発現制御技術の研究開発

(1) 成果の実用化・事業化に向けた戦略：

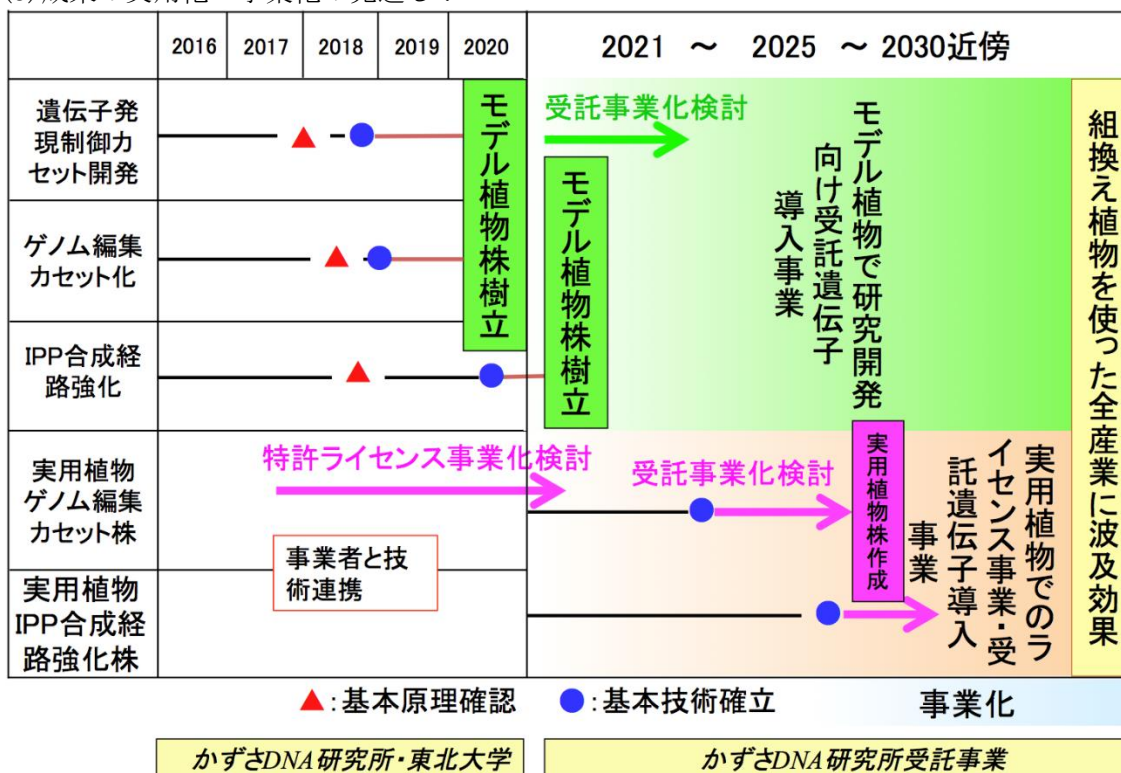
本研究開発技術では、複数の遺伝子を導入し発現制御可能となるため、多様な遺伝子組換え技術に利用されるので、特許ライセンスを通して製品化に反映される。かずさDNA研究所受託事業を通して助成事業者や民間企業などとのライセンス契約を結び、産業化に貢献する。

(2) 成果の実用化・事業化に向けた具体的取り組み：

本研究開発で達成する遺伝子組換え体植物での遺伝子発現安定化技術は、国内外において類を見ない新規性、独創性のある技術である。通常の遺伝子組換え体を産業化する際に、導入遺伝子の安定性をチェックするために、多くの系統の作製が必要となり膨大なコスト負担があるが、本技術を用いることによって、優良系統を迅速に得ることができ大幅なコストダウンが可能になるので、従来技術に比べて優位性が高い。

国際アグリバイオ事業団の報告によると、遺伝子組換え作物は、1996年から2009年にかけて、経済効果は650億USドル(約5.67兆円)に達し、2010年、遺伝子組換えの種だけでも世界的価値は112億USドル(約9,800億円)と見積もられ、遺伝子組換えトウモロコシ、大豆、ワタの市場規模は年間約1,500億USドル(約13.1兆円)と見積もられている。日本たばこ産業が開発した穀物の遺伝子組換え技術ライセンスはこのような世界の遺伝子組換え作物の作製に多く使われており、多くの収益が我が国にもたらされている。本技術開発の成果をライセンスすることによって、同様な効果が期待できる。

(3) 成果の実用化・事業化の見通し：



2.1.2.2 植物における代謝産物の蓄積機構の制御技術の開発

(1) 成果の実用化・事業化に向けた戦略

本プロジェクトで得られた開発技術に関しては、本学の知的財産部を通して特許出願を行う、あるいは内容により知財としてノウハウ登録を行い、ここで開発する物質の蓄積制御技術を実用植物での高機能品生産に結びつける戦略をとる。

(2) 成果の実用化・事業化に向けた具体的取り組み

本プロジェクトの助成事業に参画している複数の企業との共同研究開発を推進し、得られた開発技術に関して、実用化の模索を行う。

(3) 成果の実用化・事業化の見通し

本プロジェクトから得られた開発技術に関して、企業との連携に向けた開発技術周辺の動向調査の実施、調査に基づく知財戦略の策定をおこなう。具体的に、本プロジェクト内の助成事業に参画している複数の企業と連携を行い、実用化に向けた技術の利用を模索する。

2.1.3 代謝系遺伝子発現制御技術／栽培・生育環境による発現制御技術

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本技術開発の実用化への取り組みについては、所属機関の知財ポリシーに従い、取得した特許をもとに技術のライセンス契約を主眼に実施される。従って、基本的には本研究で開発した技術について世界スタンダードとなる特許の取得を目指すとともに、技術およびノウハウを代謝関連遺伝子に限らず、遺伝子組換え技術を活用した植物バイオテクノロジーの実用化を目指す企業等に広く提供する。

また、横浜国立大学で取り組んでいる、新規にスクリーニングされた化合物等においては、特許取得後に大学または大学発ベンチャー企業等（横浜バイオテクノロジー株式会社または新規設立会社）を通じて、有体物供与、ライセンス契約、受託生産、ノウハウ提供、受託研究等により提供し、当該企業等の生産性効率化に貢献する。

栽培環境関係課題については、環境変動による遺伝子変動情報自体を特許等で公開した場合、容易にその情報だけを利用され、特許侵害を証明することも困難と予想されるため、特許取得の戦略は執らず、ノウハウ化を目標とする。基本戦略としては、一部インデックスの有用性を示す実験的な成果のみを公表し、実施に必要な詳細情報はノウハウとして秘匿する。本成果情報に興味を有する企業との秘密保持もしくは共同研究契約後に、情報もしくは実施に必要な技術を供与することで実用化を図る。成果概略情報の対外的発信や利用先企業の探索には、北海道科学技術総合振興センターのネットワーク活動や学会、シンポジウム、講演会なども活用していく。将来的に各企業への技術供与の結果、ある特定目的化合物の増産や事業化の目処が成立した段階で、個別に特許出願していく。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

本技術を積極的に使用してもらえるように、研究期間終了後には特許技術のフォロー・強化に努め、学会発表はもとより、企業への技術紹介に関わるチャンスやルートも活用して、特許の宣伝を積極的に行い、国内外の企業にライセンス契約による実用化を働きかける。場合によっては、企業との個別共同研究等を立ち上げることによって、事業化への取り組みを開始する。また、大学発ベンチャー企業として活動を始めている横浜バイオテクノロジー株式会社を通じた技術提供・受託研究等についても有効に活用する（横浜国立大学）。また、北海道科学技術総合振興センターにおいては、様々な企業の事業支援や研究開発支援を実施するクラスター事業部・研究開発支援部・産学連携支援部がある。これらの部署と連携して、成果概略情報の対外的発信や企業との情報交換等を行う、もしくは、北海道科学技術総合振興センターが有する事業化の支援体制などを活用していく。

(3) 成果の実用化の見通し

本実施課題は、既に本プロジェクト成果の進捗において、プロジェクト内外の企業において、コンタクトが執られつつある。

今後、プロジェクトの進行に伴い成熟化していく技術・情報においても積極的に学会等およびマッチングイベントへ参加し、当該開発技術を広く周知する。

例えば、奈良先端科学技術大学院大学においては、すでに複数の学会およびイノベーション JAPAN2017 等に参加し情報発信を行うことで、7社から問い合わせを受け、内5社とは共同研究を立ち上げており、横浜国立大学においては、発光レポーターを用いた技術サービスに関しては既に一部は提供開始している。

上記のような、特許化、ライセンスによる実用化戦略において、産総研、奈良先端科学技術大学院大学、横浜国大等においては、過去の研究成果において実際に実用化へ向けた取り組みを実施してきた経緯も有する。

また、産総研においては、開発した技術成果を基に、世界初となる遺伝子組換え植物を利用した医薬品製造に関して、共同研究先企業において事業化に成功した実績も有し、これらの経験も生かせることから、開発技術の実用化は期待できる。

一方、ノウハウ化による実用化を目指す課題においては、個々の詳細情報は秘匿するものの、何が、どういうことが当該インデックスで実現できるかの実証例を学会、一般公開シンポジウム等で広く周知することに加え、実用化するのに特段の施設設備や技術等が不要なことから、普及化のハードルは高くないと想定している。

2.2 研究開発項目 「植物による高機能品生産技術開発」【助成】

2.2.1 高機能組換え植物組織培養によるビタミン D3 高効率生産技術の開発（株式会社竹中工務店、キリン株式会社、神戸天然物化学株式会社）

(1) 成果の事業化に向けた戦略

【市場動向】

VD3 関連の世界市場規模は約 3000 億円と推定されている。なかでも活性型 VD3 は、生体カルシウム・リン代謝を調節する成分として骨粗鬆症、運動機能低下の予防・治療、慢性腎不全、副甲状腺機能低下症などへの原薬として市場がある。先発製剤（カルシトリオール）の世界市場は約 100 億円（2012 年）であるが、高齢化社会へ向けた市場の拡大が期待される。

【研究成果概略及びそれを活用した事業体制例】

今後の研究開発成果及び製品群等を踏まえた事業形態の具体化過程において、個々の製品における投資・収益からみた費用対効果、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）やクライアントとなる企業との協議やニーズの中で事業体制や事業化の可能性を評価していく。

(2) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

【事業化ステップ】

今後の研究開発の進行を鑑みて、成果に基づく研究開発の継続・事業化への可能性の判断を行う予定である。本研究開発に参加している民間企業による事業化の推進決定がなされた後は、事業化に向けた各社の役割と具体的な対応に関する体制を整える。

(3) 成果の事業化の見通し

【競合製品との比較・競争力の確保】

製品候補の一例として現在市販されている活性型 VD3 製剤の薬価（2017 年度薬価 7.6 円/0.25 μ g、約 3,000 万円/g）を参考として開発製品の目標販売価格を設定し、価格競争力が確保できるように研究開発および事業体制構築を推進する。

【波及効果】

本事業は、ゲノム編集などによる“多段の代謝改変を行ったスマートセル開発”と、高密度植物組織培養や高効率抽出精製を中心とした“生産プロセス構築”という、今後の植物スマートセルを活用した高機能物質生産事業の二本柱とし研究開発を並行して進めている。

これらの研究開発で得られた知見は、本事業の目標物質である活性型 VD3 の生産事業だけでなく、ほかの植物スマートセル高機能物質生産事業にも展開できる基礎技術となることが期待できる。目標達成に向けた研究開発を進めると同時に、基盤技術関係の知財化やノウハウ集積を図ることで、スマートセルインダストリー構想の推進に寄与していくことを目指す。

2.2.2 医薬品中間体原料植物の代謝変換によるアルカロイド製造技術の開発（味の素株式会社）

(1) 成果の事業化に向けた戦略

本プロジェクトで開発された医薬品中間体原料植物は、当社グループの医薬品中間体事業での活用を意図する。

植物系の医薬品中間体は、原料植物に、品質の安定性(広義の Safety)、供給の安定性(Stability)、および、供給の持続性(Sustainability)の課題のあることが多い。すなわち、野外での採集によるときはもちろん、栽培される場合でも、天候の影響等を受け、成分の含量、あるいは、不純物の含量、さらに、収量の変動もおこる。また、化合物の需要が増加した場合、その需要に見合う原料植物を調達すると、野外採集であれば、当該植物種が絶滅する、あるいは、栽培の場合も農地の開拓による環境負荷が増大し、供給の持続性を担保することの大きな障害となる。

このような原料植物の課題を一挙に解決する手段が人工光型植物工場での栽培である。ニチニチソウは、比較的小型の植物であり、人工光型植物工場での栽培は可能である。ピンカアルカロイド、および、その生合成中間体の原料植物にニチニチソウをエンジニアできれば、高品質・安定的・持続的な原料調達手段として、当社グループのポートフォリオの範囲で十分に活用されることが期待される。

(2) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

成果の事業化に向けた取り組みは、本プロジェクトで得られる基本技術を活用し、比較的小規模の植物工場モジュールで最適化を達成し、そのモジュールを増設することで、スケールアップを実現することを意図している。抽出・取上げは、基本的には既存・現行技術でカバーされる。順調であれば、2022年から、サンプル提供が可能となる見込みである。

(3) 成果の事業化の見通し

上述のとおり、本技術開発は、すでに存在する事業スキームへの取込みであるため、基本的に事業化が前提となっている。また、市場・ユーザーのニーズは、高品質原料の安定的・持続的供給であるので、本技術開発は、そもそもその実現を目指している。さらに、生態系の保全につながる技術でもあり、SDGs 達成の観点からもアピールしうる技術と見られる。

したがって、事業化の実現のリスクのうち、最も重大なものはコストである。現在の試算では、実用化・商業化されている人工光型植物工場のパフォーマンスがニチニチソウで実現すれば、コストは事業化の障害にならないと考えられるが、上記のパフォーマンスが実際に実現するかは、必ずしも確かではない。この点をクリアにするため、プロジェクトの残り期間では、ある程度の規模の人工光型植物工場で、実際にニチニチソウの栽培をおこない、上記の要件、すなわち、実用化・商業化されている人工光型植物工場のパフォーマンスに近づけるかを実証する予定である。ニチニチソウの光要求性は、決して大きいものではなく、光合成有効光量子束密度が 100-150 $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{s}$ で正常に生育可能であることを勘案すると、相当程度のパフォーマンスが得られることが期待される場所である。

2.2.3 組換えナス科植物によるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生産（ホクサン株式会社）

(1) 成果の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。

【市場動向】

本予定品は、PCN-HF を有効成分とする PCN 防除剤であり、世界的にも同等品は存在しない。加えて、国内未発生であったジャガイモシロシストセンチュウの確認が 2015 年に報じられ大きな問題となっていることから、PCN 防除剤の需要は更に拡大すると見込まれる。また、ジャガイモは世界的にも主要な作物で、そのほとんどの地域で PCN は蔓延している。PCN 防除に効果的な薬剤が存在しないことから、世界でも PCN 防除剤の需要は、さらに拡大すると見込まれる。

【売上損益見通し】

事業期間内に目標値に到達できた場合、農薬は 2025 年から販売を開始できる見込みである。販売初年度は、北海道内のジャガイモ圃場の約 2% への処理に相当する数量の販売を目指す。次年度以降は、実施者が通常利用する販売ネットワークまで拡大活用し、販売数の増加を見込む。さらに、海外展開を販売開始 3 年目から実施、販売数を増加させる見込みである。

(2) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

表 2.2.3-1 農薬として事業化する場合の具体的取り組み

年度	2021 年度	2022 年度	2023 年度	2024 年度	2025 年度
段階	製品開発段階		登録審査段階		市場段階
製剤化検討	→				
大量製造法検討		→			
登録申請・審査関係			→		
製造・販売				→	

【事業化に向けた課題と解決方針】

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、開発段階毎に関係省庁への相談等を随時行っていく予定である。

(3) 成果の事業化の見通し

【市場ニーズ・ユーザーニーズに合致しているか、競合する技術・事業との比較】

PCN-HF を有効成分とする PCN 防除剤は、原料コストが高額であることから、世界的にも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。開発予定品は安全性と防除効果の高い新規センチュウ防除剤として期待される。

【量産技術への見通しの観点】

実施者の主たる事業は農薬の製造販売であり、以下の経験・知識を持つことから、確度高く、量産化・製品化が可能となる見込みである。

農薬等の登録審査に関する豊富な実績。

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。

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。

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。

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）。

遺伝子組換え植物体を用いた医薬品の生産・事業化に成功し、事業を継続。

【技術確立、事業化による波及効果】

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 8 月に確認され、大きな問題となっている。汚染調査の結果、ジャガイモシロシストセンチュウ確認圃場は 682ha に広がっていた（農林水産省対策検討会議：平成 29 年報告）。急ぎ、まん延防止対策を執る必要があり、緊急防除に関する省令（平成 28 年 9 月 23 日農林水産省令第六十一号）が発令された。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。開発予定品の普及は、国内外の農作物の安定供給に貢献することが可能となる。

2.2.4 イチイ細胞培養技術を用いたタキサン系医薬中間体 10-DAB の効率生産法開発（北海道三井化学株式会社）

(1) 成果の事業化に向けた戦略

Paclitaxel の市場調査レポートより、直近 5 年間で生産能力が年 10%程度の割合で拡大し、それに伴って生産量も年 13-16%の伸びを示している。生産能力に対して 85%程度の実生産量が示されていることに加え、cabazitaxel 等の新規タキサン系抗がん剤が市場拡大を更に押し広げていることから、10-DAB の安定需要はさらに高まると推測される。paclitaxel の単価に対しプランテーションについては栽培面積の拡大

10-DAB グローバル市場規模（想定）	
平成 36 年度	339,800 百万円
平成 37 年度	356,800 百万円
平成 38 年度	374,600 百万円
平成 39 年度	393,300 百万円
平成 40 年度	413,000 百万円

による供給量増が主たる製品確保の方法であるが、長期栽培のリスク改善にはつながらないため価格の低下は少ないものと予想される。その一方で収穫に影響が出た場合にはおそらく単価の急激な高騰につながるものと考えられる。また、イチイの茎葉に含まれるタキサン化合物含有量が低いため、溶剤を用いて大量の茎葉から抽出を行う必要がある。10-DAB の含量が高まれば再結晶等で容易に高純度の 10-DAB を生産できる可能性がある。

(2) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

・事業化に向けたマイルストーン

	平成33年度	平成34年度	平成35年度	平成36年度	平成37年度
生産検討	ハイオリアクター 本培養生産検討 10-DAB 疎抽出検討 精製委託先の選定	大量培養系の確立 ▽10-DAB 1g/L達成 培養生産 SOP確立 委託での10-DAB 精製検討	精製標品 評価		
設備投資			ハイオリアクター増設		
製品設計	販売先選定	パートナー候補 との調整	製品形態確定		
生産			10-DAB 生産開始		
			10-DAB精製委託開始		
製品				10-DAB 販売開始	

・事業化に向けた課題、及び解決方針

想定している事業は、医薬中間体である 10-DAB を高効率で安定的に取得するための原料を供給するものであり、プランテーションにより収穫されたイチイ植物と同等の位置づけにあたる。従って、販売先は 10-DAB を原料として PTX などのタキサン化合物を生産する企業になるが、原料レベルでの求められる純度が現時点では不明である。本品は Paclitaxel 生合成遺伝子を不活化することで多種タキサン化合物を 10-DAB に留めることが可能と考えており、イ

チイ植物抽出物に含まれるタキサン化合物の多様性に比べ、培養生産の場合は 10-DAB の純度が遥かに高いものになることが期待される。

(3) 成果の事業化の見通し

現在の流通単価と比べて製造コストが流通価格の 1/2 以下となる試算結果であり、最終目標が達成できれば、現行と同等あるいはそれ以下の価格で安定した原料供給が可能になるものと考えられる。また、10-DAB の純度が高いことで、以降の抽出精製工程での収率向上の観点でも細胞培養生産品が有利になるとも考えられる。最終目標達成に向け、ほぼ計画通りに進捗している状況である。

2.2.5 シソ代謝系制御技術による健康機能性成分の高効率増産技術開発（株式会社アミノアップ化学）

(1) 成果の事業化に向けた戦略

事業化を目指す製品のターゲットとしては「整腸作用」と「アレルギー症状緩和」が中心となるが、機能性成分 A や B 群の機能性から「抗酸化」「メタボ対策」「ダイエット」「脳機能改善」といった分野も対象となる。2015 年 健康・機能性食品素材市場規模は 1,009 億円となっている（株式会社 矢野経済研究所）。「整腸作用」「アレルギー症状緩和」に加え、「抗酸化」「メタボ対策」「ダイエット」「脳機能改善」の市場規模は全体の 7 割程度の大きさと考えられ、当社としても非常に魅力的な市場であり是が非でも上市・販売したいと考えている。

海外の市場に関しては、国内同様、海外の機能性食品市場においてもプロバイオティクスが脚光を浴びはじめている。世界規模でのプロバイオティクス市場は、2016 年には市場規模 426 億ドル（約 4.3 兆円）に達するとされている（リサーチステーション合同会社）。また、「アレルギー性鼻炎治療」の世界市場は、2014 年に 113 億ドル（約 1.2 兆円）に達し、2024 年にかけてさらに拡大すると予想されている（リサーチステーション合同会社）。国内・海外あわせて 5 兆円以上の市場規模があり、大きなビジネスチャンスと考えている。弊社の経営計画上、海外売上を全体の 50 %まで伸ばすことを掲げているため、既存ルートを含めて海外市場へも販売を拡大する予定である。

本事業では、「遺伝子組換え技術の国民的理解に関する調査研究」（2）によるとオーストラリアのように遺伝子組換えを国として積極的に取り入れ、国民理解の高い国もある。そこで本事業では、遺伝子組換えに対して比較的受容度がありかつ遺伝子組換え製品の輸出販売に係る法規制が整備された国において、開発した遺伝子組換えシソを原料とした機能性素材の販売を計画している。本事業では、課題 4「遺伝子組換え作物を用いた機能性素材の海外販売に係る調査研究」を設定し、調査を実施した。平成 28 年は 6 カ国 2 地域について、遺伝子組換え製品に関する輸出、販売に係る窓口機関や手続き方法などの調査を実施した。平成 29 年度は前年度の調査結果より、販売候補国を選定し、現地調査を実施した（ 2.2 研究開発項目毎の成果を参照）。

引用文

1. 遺伝子組換え作物・食品に関するシンポジウム（平成 24 年 9 月 8 日）配布資料
2. 平成 20 年度・平成 21 年度科学技術振興調整費「重要政策課題への機動的対応の推進」プログラム

(2) 成果の事業化に向けた具体的取り組み

事業化スケジュールは平成 32 年度に製品設計行い、平成 34 年度までに各種安全性試験、産業利用第 2 種申請を実施する。さらに平成 37 年度の上市に向けて、生産量の検討や生産設備を用いた試験製造検討、製品の安定性試験を実施する予定である。

実用化・事業化の中断や延期など、実用化・事業化全体の計画変更を考慮する必要がある重大なポイントは、遺伝子組換えの安全申請（厚生労働省）の承認の可否によるが、まずは現在使用している完全密閉型植物工場において「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成 15 年法律第 97 号）」に基づき第 2

種使用に係る申請として、独立行政法人製品評価技術基盤機構への事前審査、経済産業省へ本申請を行う。

(3) 成果の事業化の見通し

本事業における技術開発は、露地栽培による生産の問題点を克服し、また弊社製品の販売拡大に対して十分なシソ乾燥葉の生産を達成するものである。提案時には、建設予定の栽培面積 1,500m² の植物工場を用いた場合、3.2 トンのシソ乾燥葉を生産すると試算した。本事業の成果において、人工環境下の高収量栽培条件及びストレス栽培技術のそれぞれに最適条件が明らかになりつつある。最適条件が併用可能な場合においては、必要なシソ乾燥葉を生産する栽培面積 1,500m² から半分程度まで減らせる試算である。そのため、量産化に向けた事業化のハードルが下がると考えられる。

2.3 研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」【委託】実用化に向けた取組及び見通し

2.3.1 ハイスループット合成・分析・評価手法の実用化

2.3.1.1 情報解析に適したゲノム・トランスクリプトーム解析技術の実用化

担当機関：産業技術総合研究所

(1) 成果の実用化に向けた戦略

ユーザーの利用形態やニーズなども踏まえ、トランスクリプトームデータの質保証に貢献する核酸標準物質の普及基盤整備を進め、ISO/TC276 バイオテクノロジーのような横断的技術の標準化を担う標準化の舞台において開発した標準化技術の国際化を見据えた検討を進める。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

実際の多様な用途に応じるため、標準物質の数を拡充するとともに、RNA-seq への適用可能性を検証しているところ。

(3) 成果の実用化の見通し

すでに5種類の物質については絶対定量による評価技術を確立し、その頒布体制も整っており、本PJの成果についても同じスキームで実用化が可能と考えられる。なお、一部の二次標準物質に関しては、PJ内限定で頒布を開始している。

2.3.1.2 高精度メタボローム解析技術の実用化

担当機関：神戸大学、島津製作所

(1) 成果の実用化に向けた戦略

プロジェクトの中で、参画企業との共同研究を通してバイオエコノミー分野における国内外の情勢や動向を把握する。そこから得られた研究ニーズにフィットした技術・製品をいち早く開発し、研究現場へ提供する。そうすることで参画企業から更なる研究ニーズが入手可能となり、技術・製品の完成度を効率よく向上させていく。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

スループットを向上させる自動前処理システム、定量精度を向上させる超臨界流体連続抽出技術、スループットと再現性を高めるオンライン導入システムを開発するとともに、これらを統合した新規メタボローム解析技術を開発する。これら技術・製品を課題(3)有効性検証に適用して標的物質を生産する産業微生物での実証を行うことにより実用化技術とする。

(3) 成果の実用化の見通し

プロジェクト中にプロトタイプシステムは完成していると想定している。更に、参画企業との検証実験を通して必要な改良を行うなどして実用化技術として確立し、事業化の準備に取り組む。

2.3.1.3 高精度定量ターゲットプロテオーム解析技術の実用化

担当機関：大阪大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本プロジェクトで構築したスマートセルについて、設計通りに細胞内代謝酵素発現量を増減できたか評価するため、酵素発現量を高精度に一斉定量可能な方法を開発する。それに最適な液体クロマトグラフ三連四重極質量分析装置を用い、各酵素を高感度に定量するためのMRMアッセイ法を開発する。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取組

機械学習法を用いたMRMアッセイ法構築作業の高速化技術を開発した。本プロジェクトで利用する大腸菌、出芽酵母について100種以上の酵素のMRMアッセイ法を構築した。複数の酵素発現量の比較を可能とする人工内部標準タンパク質の開発を行った。

(3) 成果の実用化の見通し

作成したMRMアッセイ法をデータベース化し、メソッドパッケージとして活用可能とする。また、本プロジェクト内の「(3)新規情報解析システムの有効性検証」「(1)-5.ハイスループット微生物構築・評価技術の開発」で作成される改変微生物について酵素発現量データの取得をすすめ、代謝系酵素発現向上の評価、検証を可能とする。

2.3.1.4 ハイスループット長鎖DNA合成技術の実用化

担当機関：神戸大学、日本テクノサービス株式会社、プレジジョン・システム・サイエンス、慶應義塾大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略／(2) 成果の実用化に向けた具体的取組／(3) 成果の実用化の見通し

長鎖DNA合成の材料の合成に特化したDNA化学合成機、即ち従来の合成機で合成されるDNA(～100塩基)よりも長いDNAをハイスループット(96サンプル同時)合成するDNA化学合成機は、試作3号機まで試作を繰り返し、合成パラメーターの調節により実用的なレベルにまで改良された。近々販売の予定である。本合成機で合成されたDNAを二本鎖DNAに変換する工程は、実用レベルであり既に特許を出願している。両者により、長鎖DNA合成の受託事業に道筋がついた。

2.3.1.5 ハイスループット微生物構築・評価技術の実用化

担当機関：神戸大学・千葉大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本基盤技術は基本的にインハウスでの多数のデータ取得に活用していく。一部必要なものがあるれば基盤技術の特許で保護する戦略も視野に入れているが、基本的にはインハウスでの利用を進める中でノウハウを蓄積していくことで、独自性を磨いていくとともに、より広範な宿主や化合物に対する拡張性を持たせていく。逆に、本技術により見出した有用な遺伝子等について特許化を推進していくことで、事業化に向けた高生産株開発やライセンス収入を狙う。各種バイオセンサは、それぞれ、開発者が単独で特許化して保護してゆくが、その使用許諾（ライセンシング）においては、プロジェクト内の団体・企業を優先する。最終的には、プロジェクト外の企業・団体へも広く展開し、ライセンス収入の獲得を狙う。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

自動形質転換技術やハイスループット評価技術を利用して、すでにインハウスでのデータ取得を開始している。今後、評価するターゲット化合物やライブラリの種類をさらに増やしていくことでさらなるデータ蓄積と有用な遺伝子等の特許化を推進する。

(3) 成果の実用化の見通し

自動形質転換技術やハイスループット評価技術についてはインハウスでの利用を想定しているが、将来的に外部機関からの要請に応じて本技術を利用した共同研究実施や委託業務が可能な体制を構築する予定である。また、得られたデータは情報解析用のデータベースに登録していくとともに、有用遺伝子に関する情報は特許化による保護を行いつつ、実用化株の開発を進める。

2.3.1.6 長鎖 DNA、ゲノム合成技術と自動化システムの実用化

担当機関：東京大学、Spiber 株式会社

(1) 成果の実用化に向けた戦略

様々な長鎖 DNA アセンブリに汎用的に対応できる技術に精緻化するために、数十例の遺伝子アセンブリについて条件検討実験を進めている。また実用化においては遺伝子合成の超並列自動化システムの樹立が必須であるが、各プロセスについて人間の介入を必要としない自動化専用のプロトコルを開発している。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

最終的な遺伝子合成自動化装置の設計を進め、各プロセスおよびコストパフォーマンスの検討を行い、本研究開発の上流にあるオリゴ合成の低価格化などについてオリゴ合成企業や本 PJ 内の研究機関と議論を進めている。

(3) 成果の実用化の見通し

既にこれまでの遺伝子企業のもつパイプラインと比較して優れた要素技術が生まれつつあり、実用化に資するものになりつつあるが、具体的にどのような企業連携、体制において実用化を実施するかについては議論を重ねる必要がある。

2.3.1.7 細胞の反射光・自家蛍光を用いたハイスループット評価技術の実用化

担当機関：筑波大学、ニコンインステック

(1) 成果の実用化に向けた戦略

- ・実用化に向けた課題や課題解決
⇒微弱シグナルサンプルの場合は、高感度検出器の開発が必要
- ・既存・競合技術と比較し、性能面、コスト面等の優位性
⇒非侵襲での観察は、応用範囲が爆発的に増加する。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み／(3) 成果の実用化の見通し



2.3.2 高生産性微生物設計システムの実用化

2.3.2.1 新規代謝経路の設計・最適化手法の実用化

担当機関：神戸大学、産総研、石川県立大学、江崎グリコ(株)、NITE、(株)島津製作所、理研

(1) 成果の実用化に向けた戦略

新規代謝経路設計ツールに関しては、すでに担当機関にて個別テーマに対し実装を行い、提案された代謝設計をもとに検証を実施している。こうした取り組みを POC として、新規代謝設計の質的・量的な拡張を実施していくと共に、他テーマにも展開していくことで、実用化を目指す。目的の情報(化合物や微生物名、抽出された遺伝子情報など)に文献や特許情報から自動的にアク

セスできる情報マイニングツールについては、高精度化を目指し、より汎用性の高いツールにした上で各参画機関に提供を行う。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

新規代謝設計技術の汎用的な活用を目指して、設計における検証実験を実施し、また微生物スクリーニングによる新規データ取得をもとに設計ツールの高精度化を行う。情報マイニングツールについては、アルカロイド化合物をターゲットにし、目的の情報を得るべく精度向上を目指している。

(3) 成果の実用化の見通し

新規代謝設計ツールについては、目的化合物を合成する新規代謝経路を提案できる状態にあり、すでに個別テーマにおいて実用化済みである。情報マイニングツールに関しては、煩雑な手作業を自動化し、有効性についての検証実験を効率良く行えることが新規であり、完成したツールを顧客への提供を開始すべく調整中である。

2.3.2.2 代謝モデル構築・解析技術開発と実用微生物への技術展開に関する実用化

担当機関：神戸大学、理研、味の素(株)、長瀬産業(株)、三菱ケミカル(株)、JSR(株)、地球環境産業技術機構

(1) 成果の実用化に向けた戦略

代謝モデル構築に関しては、すでに担当機関にてモデル微生物ならびに産業微生物の標準代謝モデルの構築フローを開発し、代謝設計提案をもとに検証を実施している。こうした取り組みをPOCとして、代謝モデル・代謝設計の質的・量的な拡張を実施していくと共に、他テーマにも展開していくことで、実用化を目指す。シャーシ株については、ハブ化合物生産株を構築し、テーマ展開のためのベース株として供給していく。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

代謝モデルの汎用的な活用を目指して、標準代謝モデルの構築フローを開発し、代謝設計に至る部分のワークフローを開発するとともに、設計提案の検証から得られる測定データを利用した設計高度化を行う。シャーシ株については、IPP経路・シキミ酸生産の株開発を実施する。

(3) 成果の実用化の見通し

現時点の代謝モデルにおいても一定の代謝設計提案が可能であり、検証による成果も見られている。シャーシ株についても、計画通りに株構築を達成できる見通しである。このことから、他テーマへの展開、実用化についても見通しは良好である。

2.3.2.3 反応機構推定に基づく酵素選択・機能改変の実用化

担当機関：神戸大学、産総研、神戸天然物化学(株)、味の素(株)

(1) 成果の実用化に向けた戦略

酵素反応データ学習に関しては、酵素反応データの集積・データベース開発に加えて、酵素反応データ学習に関するツール開発を行い、データベース・ツールを検証しつつ、質的・量的な改良と拡張を行うことで、他テーマにも展開していくことで、実用化を目指す。構造計算では、現在基質との結合様式を調べるために計算機資源を削減する手法を開発し、各企業でも計算できるようにすることで実用化することを目指している。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

酵素反応データ学習に関しては、酵素反応データの集積・データベース開発に加えて、酵素反応データ学習に関するツール開発を行う。構造計算では、通常の分子動力学計算ではなく、構造探索を高速に行うことができる、ALSD法を用いて計算を行っている。この手法よりもさらに計算時間を短縮する手法を開発している。

(3) 成果の実用化の見通し

すでに、酵素反応データの集積・データベースに加えて、酵素反応データ学習に関するツールなどのプロトタイプは完成しており、他テーマへの展開、実用化についても見通しは良好である。構造計算に関して、現在用いているALSD法を用いることで、通常的手法と比べて少なくとも、計算効率は数倍向上しており、現在様々な企業テーマに対して適用することが可能となっている。現在、さらに計算時間を短縮する手法を開発している。

2.3.2.4 代謝設計に資する支援ツールの実用化

担当機関：神戸大学、産総研

(1) 成果の実用化に向けた戦略

代謝設計に資する支援ツールに関しては、代謝設計基盤のインターフェース開発、代謝モデルのデータ集積・構造化、酵素反応データ集積・構造化、測定データのデータ集積・構造化の各項目で開発するツールを試行しつつ、質的・量的な改良と拡張を行うことで、他テーマにも展開していくことで、実用化を目指す。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

代謝設計基盤のインターフェース開発、代謝モデルのデータ集積・構造化、酵素反応データ集積・構造化、測定データのデータ集積・構造化の各項目において、インターフェイス・ウェブサーバ構築を行う。

(3) 成果の実用化の見通し

すでに、新規代謝経路設計、代謝モデルを利用した代謝設計提案、酵素反応データベース・予測ツール、測定データベースなどのプロトタイプは完成しており、他テーマへの展開、実用化についても見通しは良好である。

2.3.2.5 遺伝子発現制御ネットワークモデルの構築と標的遺伝子の探索に関する実用化

担当機関：産業技術総合研究所 旭化成ファーマ(株)、長岡技術科学大学、花王(株)、バイオインダストリー協会、九州大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本課題における実用化は、モデル生物はもちろん、産業利用されている宿主微生物においても適用可能な汎用的な情報解析手法を開発する事を目的としている。これにより、実際に産業界で利用されている多種多様な宿主微生物においても情報解析による改変遺伝子候補の提案が可能になり、情報解析技術としての実用化を実現する。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

上記に記載しているように、産業利用されている宿主微生物への適用を実現するため、「2.3.3 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証」において、ターゲット物質が本課題開発に適している「2.3.3.1 コレステロールエステラーゼの生産性向上による有効性検証」「2.3.3.2 糸状菌を用いた有用タンパク質同時生産制御による有効性検証」の2課題と協力している。上記2課題にて実際に測定されたオーミクスデータ等を利用し、従来のモデル生物へ適用してきた情報解析技術を基盤としながらも、新規宿主微生物において必要な情報解析技術の改良を行い、技術の汎用性を高めている。また、実際に開発した技術によって得られた改変遺伝子候補等の成果は、協力課題において実用化を実現する。

(3) 成果の実用化の見通し

プロジェクト終了時には汎用化できた技術すべての実用化を実現可能である。本課題で開発した技術は、すでに「2.3.2.8 遺伝子発現制御に資する支援ツールの実用化」にてツール化を実施しており、プロジェクト終了時は一般公開できる部分は公開するなどの方法にて実用化を実現する。

2.3.2.6. タンパク質発現・機能制御のための遺伝子配列設計

担当機関：産業技術総合研究所、神戸大学、東北大学、岡山大学(再委託)

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本項目で開発した設計手法を用いて、遺伝子配列(DNA 配列)を改変し、微生物宿主に導入することで、産業用酵素・抗体などのバイオ医薬品のタンパク質発現量を大幅に向上させることができることを示した。また、遺伝子配列(アミノ酸配列)を改変し、産業用酵素・バイオ医薬品の熱耐性を向上させるシステムの構築も行った。現在、これらの設計システムを、より高速に実行できるようにし、企業が容易に利用できるようにすることで、実用化することを目指している。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

現在、計算の高速化に取り組んでおり、並列化で行うことで、当初 1 週間程度かかっていた計算を数日で行えるようにするなどの成果を上げている。

(3) 成果の実用化の見通し

現時点でも、設計を短時間で行える体制はできている。今後は、コンピューターに慣れていない企業ユーザーでも、web に入力することで計算することができるなどの実用化を目指している。

2.3.2.7 Combi-OGAB 法と機械学習による迅速な DNA 配列因子組み合わせの探索技術の実用化

担当機関：神戸大学、東北大学、東京大学、鹿児島大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本研究項目を実施することにより作成される高生産株の産業利用を見据え、その知財を確保する。また、本項目で作成される組み合わせ探索技術は、ノウハウとして保持する部分と公開する部分に切り分け、優位性を確保しつつ普及に努める。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

高発現株の具体的な産業利用方法を模索している。また、本項目で開発する要素技術を、有効性検証課題である 2.3.3.1-10 において活用する方法を検討している。

(3) 成果の実用化の見通し

本項目により作成される高発現株は、有用物質の大量生産に直接利用できる可能性がある。また、作成する情報技術は、ゲノム編集技術などと組み合わせることで、スマートセル創出に貢献できる。

2.3.2.8 遺伝子発現制御に資する支援ツールの実用化

担当機関：江崎グリコ株式会社、神戸大学、石川県立大学、産業技術総合研究所

(1) 成果の実用化に向けた戦略

江崎グリコ社傘下のグリコ栄養食品(株)では、カロテノイド色素の製造・販売の実績を持つ。また、食品添加物分野における遺伝子組み換え技術利用に関するノウハウを有している。これら知見と実績を有効に活用して、本プロジェクトの成果を実用化につなげていく。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

本プロジェクトで取得した遺伝子組換えカロテノイド生産菌株について、遺伝子組換え対応パイロット発酵槽(江崎グリコ社保有 3,000 L)における生産性検証を行う。また必要に応じて商業利用に耐えうるよう菌株に改良を施す。遺伝子組換え体を用いたカロテノイド生産の速やかな商業利用のために、各種安全性試験、国内外の各種法令への対応(スマートセルにより生産した高純度カロテノイド色素の食品添加物としての妥当性確認)について準備を進める。

(3) 成果の実用化の見通し

生産性検証により採算ベースに乗ることが確認でき次第、工場導入の検討に入る(～2022年度)。その上で、経済性試算及び競争他社に対する優位性を確認した後、工場へ導入し、世界市場展開を図る(2028年～)。

2.3.2.9 統合オーミクス解析技術の実用化

担当機関：産業技術総合研究所 不二製油(株)、新潟薬科大学、長岡技術科学大学、九州大学、江崎グリコ(株)、(株)バイオジェット

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本課題では、代謝経路上の物質調整を推定する情報解析技術と、それを実現するための改変遺伝子候補選定技術を連結させ、産業利用されている宿主微生物において適用可能な基盤技術を開発するとともに、データベースと連結させたツールとして公開を目指している。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

本課題では、代謝経路上の物質調整を推定する情報解析技術と、それを実現するための改変遺伝子候補選定技術を連結させるため、「2.3.3 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証」において、ターゲット物質が本課題開発に適している「2.3.3.7 紅麹菌を用いた色素生産制御による有効性検証」「2.3.3.9 ω -3系多価不飽和脂肪酸含有油脂の生産性向上による有効性検証」「2.3.3.10 微生物を用いたアルカロイド等の新規生産法の有効性検証」の3課題と協力している。上記3課題にて実際に測定されたオーミクスデータ等を利用し、生体内代謝経路推定技術の開発、化合物量推定技術の開発、ターゲット酵素量の同時制御技術の開発等の情報解析技術の開発を実施し、開発した技術のツール化を実施している。実際に開発した技術によって得られた改変遺伝子候補等の成果は、協力課題において実用化を実現する。

(3) 成果の実用化の見通し

プロジェクト終了時までにはゲノム情報からの代謝経路推定技術や、オーミクスデータからの活性化経路推定技術は実装可能である。化合物量推定技術については、オンデマンドな解析が必要であるため、実用化に重要なハブ化合物量の推定技術を開発し、その結果をデータベース内に組み込むことでプロジェクト終了時にはツールとして利用可能にする。

2.3.2.10 測定データのクオリティコントロール、標準化データベースの構築に関する実用化

担当機関：産業技術総合研究所

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本課題の成果はクオリティコントロールされた測定データが蓄積された標準化データベースという再利用可能な情報資源そのものであり、実態としては情報システムとして随時利用可能な実

用品である。一方、この情報資源の有用性は、これを用いて構築される情報ツール群の有用性によって評価されることとなる。また、データベースに収容される情報の質や量は、本プロジェクトの実証課題等からの蓄積によるものである。すなわち、本課題の価値は他の課題に大きく依存している。他の課題に依存しない部分は、データの品質検査と、情報システムとしてのデータベースの基本機能である登録、検索機能である。特に重要な部分はメタデータを効果的に整理・格納するためのデータベーススキーマである。一般的にデータベーススキーマの設計は容易ではないことから、よく設計されたスキーマを実現することは、データベースの実用性に大きく貢献する。スキーマの設計は具体的なデータに沿ったものである必要があるため、十分練られたスキーマを設計するためには多数のデータを集積する必要がある。本プロジェクトでは多様なデータがデータベースに登録されることから、これを利用してスキーマ設計を充実させることができると考えている。本プロジェクトで測定されるデータは、概ね定型のオーミクスデータであることから、基本的なメタデータは既存のオーミクスデータベースのスキーマを再利用することが可能である。定型以外の測定データについては独自に設計が必要である。独自設計に際しては、測定者によるスキーマのレビューを実施してフィードバックを働かせることで、実用的なスキーマ設計が可能になるよう対策を講じる。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

データベースはプロジェクト早期に稼動して運用されることが求められている。最初から完成品を準備することは難しいため、最小限の構成から運用を開始し、徐々に充実させる方法が有効である。本課題の実施そのものが実用化へ向けた取り組みそのものであり、先に述べた具体的な戦略に沿って開発を進めている。

(3) 成果の実用化の見通し

情報システムとしてのデータベースは既に稼動しており、データの蓄積とともに成熟してくと考えている。そのため実用化そのものには問題は無いと見ている。一方、その価値はデータの蓄積に比例するものと考えている。

2.3.2.11 遺伝子配列設計システム(情報解析技術)のうち、文献情報等の公開データからの知識整理を補完するためのデータ処理・AI 基盤技術の実用化

担当機関：京都大学、九州大学、神戸大学、株式会社日立製作所、理化学研究所、大阪大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本研究開発項目の成果の実用化形態としては、知識ベースおよびデータ処理・学習技術単独をツール化し、パッケージもしくはサービスとして提供する他、スマートセル開発のための統合プラットフォームとしてのソリューション提供も念頭に入れる。特に、本研究開発の成果は、本プロジェクトで開発する遺伝子配列設計システム他成果およびハイスループット合成・分析・評価手法を補完するものとして位置づけられ、これらと統合したプラットフォームとして構成することで、ソリューションとしての差別化を図る。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

2018年度以降に計画するテーマと連動した有効性検証の中で、ユーザーとの議論を通じて実用化に向けた課題の整理を行う。具体的には、各テーマへの適用に必要なワークフローのカスタム化並びに知識ベースの高度化を実施する。最終的に、本研究開発成果による工数短縮効果を確認し、実用化を判断する。

(3) 成果の実用化の見通し

文献・実験データの解釈から設計指針の導出までの期間短縮は、スマートセル開発における主要課題の一つであり、本研究開発成果実用化へのニーズは非常に大きい。従って、プロジェクト期間の中で、本研究開発成果による工数短縮効果を具体的に示すことで、実用化への道筋をつける。

2.3.2.12 排出ボトルネック解消に向けた化合物排出輸送体探索プラットフォームの実用化

担当機関：東北大学、産総研

(1) 成果の実用化に向けた戦略

本プロジェクトにおいて参画企業と連携して実施した研究の成果は、知財化後、知財合意に基づいた知財権の移転または実施手続きを取った上で、連携先企業に技術移転し、連携先企業等における標的化合物の生産に貢献する。東北大学独自の探索化合物についても可能な限り知財化し、連携先企業が決まり次第、すみやかに連携先に技術移転できる体制を整える。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

本プロジェクト内で新たに探索した輸送体については、標的化合物の生産を効率化する技術としてすみやかに知財化できる体制を整えている。また、連携先企業とは権利化に関する相談を進め、すみやかに知財の移転あるいは実施ができる体制を整えている。

(3) 成果の実用化の見通し

本プロジェクトでは、連携先企業において実用化を目指す化合物を主軸に輸送体の探索を進めており、研究開発の成果が実用化につながる見通しは高いと考えている。

2.3.3 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証に関する実用化

2.3.3.1 コレステロールエステラーゼの生産性向上による有効性検証に関する実用化

担当機関：旭化成ファーマ、産総研

(1) 成果の実用化に向けた戦略

コレステロールエステラーゼ(CEN)を高発現するスマートセルの開発の続行と同時に、実用化に向けた以下の戦略を遂行する。

- ① カルタヘナ法に基づく第二種使用等拡散防止措置確認申請
- ② CEN 高発現 *Burkholderia stabilis* の培養方法と CEN 精製方法の確立とスケールアップ
- ③ 品質管理基準などの設定

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

- ① CEN 高発現スマートセルは、*B. stabilis* 宿主にプロモーターと CEN を発現カセットとしてゲノムに挿入するセルフクロニングを目指しているが、*B. stabilis* 組換え体製造の可能性も想定される。*B. stabilis* の使用区分がカテゴリー 1 に該当する場合、大臣確認申請のための設備投資を計画する。
- ② 至適培養条件(培地組成、温度、pH、回転数、通気など)を決定し、現在の 10 mL 培養スケールを段階的にスケールアップする。工場設備で対応可能な精製方法をラボスケールで確立し、スケールアップする。
- ③ ②で試作したサンプルの顧客評価を通じて社内・対外規格を設定する。設定した規格を満たす精製工程管理基準および品質管理基準と管理方法を決定する。

(3) 成果の実用化の見通し

※2021 年中の製品化提案および販売開始を見通している。

- ① 2018 年度中に計画する。必要に応じて 2019 年度予算化する。
- ② 2019 年度中に実用スケール培養を実施し、パイロットスケール精製する。2020 年度中に実用スケール精製のプロセスバリデーションを実施する。
- ③ 2020 年度の実用スケール精製のプロセスバリデーションまでに決定する。

2.3.3.2 糸状菌を用いた有用タンパク質同時生産制御による有効性検証に関する実用化

(1) 成果の実用化に向けた戦略／(2) 成果の実用化に向けた具体的取組／(3) 成果の実用化の見通し

本 PJ で開発する糸状菌における複数のバイオマス糖化酵素の同時生産制御技術によって、H32 最終目標としている生産される酵素組成比率が全体の 20%以上改変されること、特定のバイオマスの酵素糖化において 80%糖化に必要な酵素量を 10~30%削減できることを確認する。

H33 年以降は実用化を目指し、本技術をこれまでの NEDO PJ で開発してきた工業用酵素高生産菌株、タンパク質高生産大規模培養法と組み合わせ、テーラーメイド酵素生産のスケールアップ試験を実施する。並行して様々な基質に適した酵素の提案・生産を行い、酵素性能の評価を行う。H35 年度以降、実生産を目指す。

2.3.3.3 カルボンの生産性向上による代謝解析・酵素設計技術の有効性検証に関する実用化

担当機関：味の素(株)、神戸天然物化学(株)

(1) 成果の実用化に向けた戦略

事業化可能なレベルまで生産性を向上及び生産コストの低減を行う。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

本プロジェクトで基盤技術を構築し、各社でカルボンや他のテルペン系フレーバーの工業化に向けた開発を継続して実施する。事業環境(知財を含む)調査と分析を行い、事業計画を策定する。

(3) 成果の実用化の見通し

カルボンや他のテルペン系フレーバー製品市場の数%を本プロジェクトで開発した発酵生産品に置き換える。

2.3.3.4 機能性アミノ酸の生産性向上による代謝モデルの有効性検証に関する実用化

担当機関：長瀬産業株式会社

(1) 成果の実用化に向けた戦略

生産菌の改良、培養法の検討により、当初の予定通りの目標生産性を達成した。また、培養液からのエルゴチオネインの単離・精製については、各種検討によって高度精製グレードサンプルを安定取得可能な精製法の開発にも成功している。今後は、生産菌のさらなる生産性向上だけでなく、工業スケールでの生産に向けた培養工程、精製工程の検討についても進めていく。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

得られたサンプルは、その生理的機能を社内で検討する一方、エルゴチオネインに興味を持つ企業に既に提供してその評価が行われている状況にある。今後増えることが予想されるサンプル請求に対し、より大きな製造設備(100-300 L タンクおよび付随する精製設備)の必要性が高まっており、導入を検討中である。

(3) 成果の実用化の見通し

グループ会社に培養から精製までの一連の設備を有しているため、生産量が目標に到達してから1-2年後の実用化を見込んでいる。

2.3.3.5 有用イソプレノイドの生産性向上による代謝解析技術の有効性検証に関する実用化

担当機関：神戸大学、三菱ケミカル、JSR

(1) 成果の実用化に向けた戦略

発酵生産した有用イソプレノイドについて、いち早く想定ユーザーにてテストを実施し、実用に足るという評価を得る。そのために、生産性向上の検討、および品質の確認を進める。また、速やかなユーザテスト実施を可能にするため、ユーザテストへ向けた体制の構築を事業期間中に進める。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

本年度は有用イソプレノイドの試作を行い、その品質を確認する。本事業後半で有用イソプレノイドの発酵生産性や品質向上に努め、ラボレベルでの発酵等のプロセス基礎情報を獲得するとともに、ユーザテストの体制を構築する。本事業終了後、発酵生産したイソプレノイド等のユーザテストを進め、パイロットスケールのプロセス設計を行う。

(3) 成果の実用化の見通し

有用イソプレノイド発酵生産の技術開発が進んで生産性及び品質が高まれば、実用化の可能性が高まる。

(3) 成果の実用化の見通し

技術開発が進んでバイオイソプレンやポリイソプレンの生産性及び品質が高まれば、実用化の可能性も高まる。

2.3.3.6 コリネ菌を用いた有用芳香族化合物の生産性向上による代謝解析技術の有効性検証に関する実用化

担当機関：地球環境産業技術研究機構、神戸大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

2020 年度末までに基盤技術を活用してターゲット芳香族化合物の生産性を実用化レベルまで向上させる。加えて知財戦略に基づき必要な特許等の確保を進める。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

代謝モデルや遺伝子配列設計技術からの改善提案を実生産株で検討し、生産性向上に寄与する結果を複数得ている。今後も提案の検討を継続し、最終的に有効な提案を統合することで高生産株の作製を目指す。生産性の中間目標値は既に超えており最終目標値も達成できる見通しであるが、実用化を見据えて更なる生産性の向上を目指す。

(3) 成果の実用化の見通し

上述のように順調に進んでおり、実用化できる見通しである。

2.3.3.7 紅麹菌を用いた色素生産制御による有効性検証に関する実用化

担当機関：江崎グリコ株式会社、株式会社バイオジェット、産業技術総合研究所

(1) 成果の実用化に向けた戦略

江崎グリコ社傘下のグリコ栄養食品（株）では、紅麹色素の製造・販売の実績を持つ。また、食品添加物分野における遺伝子組み換え技術利用に関するノウハウを有している。これら知見と実績を有効に活用して、本プロジェクトの成果を実用化につなげていく。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

本プロジェクトで取得した遺伝子組換え紅麹菌株について、遺伝子組換え対応パイロット発酵槽における生産性検証を行う。また必要に応じて商業利用に耐えうるよう菌株に改良を施す。遺伝子組換え体を用いた紅麹色素生産の速やかな商業利用のために、各種安全性試験、国内外の各種法令への対応（スマートセルにより生産した高純度紅麹色素の食品添加物としての妥当性確認）について準備を進める。

(3) 成果の実用化の見通し

生産性検証により採算ベースに乗ることが確認でき次第、工場導入の検討に入る（～2022年度）。その上で、経済性試算及び競争他社に対する優位性を確認した後、工場へ導入し、世界市場展開を図る（2028年～）。

2.3.3.8 微生物を用いたパプリカ由来カロテノイドの新規生産法の有効性検証

担当機関：江崎グリコ株式会社、神戸大学、石川県立大学、産業技術総合研究所

(1) 成果の実用化に向けた戦略

江崎グリコ社傘下のグリコ栄養食品（株）では、カロテノイド色素の製造・販売の実績を持つ。また、食品添加物分野における遺伝子組み換え技術利用に関するノウハウを有している。これら知見と実績を有効に活用して、本プロジェクトの成果を実用化につなげていく。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

本プロジェクトで取得した遺伝子組換えカロテノイド生産菌株について、遺伝子組換え対応パイロット発酵槽における生産性検証を行う。また必要に応じて商業利用に耐えうるよう菌株に改良を施す。遺伝子組換え体を用いたカロテノイド生産の速やかな商業利用のために、各種安全性試験、国内外の各種法令への対応（スマートセルにより生産した高純度カロテノイド色素の食品添加物としての妥当性確認）について準備を進める。

(3) 成果の実用化の見通し

生産性検証により採算ベースに乗ることが確認でき次第、工場導入の検討に入る（～2022年度）。その上で、経済性試算及び競争他社に対する優位性を確認した後、工場へ導入し、世界市場展開を図る（2028年～）。

2.3.3.9 ω -3系多価不飽和脂肪酸含有油脂の生産性向上による有効性検証に関する実用化

担当機関：長岡技術科学大学、バイオインダストリー協会、花王株式会社、九州大学、産業総合研究所

(1) 成果の実用化に向けた戦略／(2) 成果の実用化に向けた具体的取組／(3) 成果の実用化の見通し

油脂酵母による ω -3系多価不飽和脂肪酸含有油脂生産は、H32最終目標としている培養時間X時間、 ω -3系多価不飽和脂肪酸生産性X g/L、対糖油脂収率X%以上の達成。H33年以降は実用化を目指し、最適培養条件下で、培養時間X時間、 ω -3系多価不飽和脂肪酸生産性X g/L、対糖油脂収率X%以上を達成すべく、スケールアップ試験を実施する。H36年度以降、事業化へ向けた ω -3系多価不飽和脂肪酸含有油脂を製造し、市場での評価を行う。

2.3.3.10 微生物を用いたアルカロイド等の新規生産法の有効性検証に関する実用化

担当機関：石川県立大学

(1) 成果の実用化に向けた戦略

最適化の難しい多段階のアルカロイドの代謝経路に対して、情報解析システムによる複数の新規経路構築を行い、実効性の高い代謝経路を効率的に設計する計画である。

アルカロイドの中でも最も医薬品原料として需要のあるオピオイド(テバイン、コデイン、モルヒネ)に対して実用生産システムを確立する。生合成工学研究が進展しているアメリカにおいて、オピオイドの販路を有する製薬メーカーに対して技術供与を行うことで、微生物発酵法によるアルカロイド生産の有効性をアピールする。

(2) 成果の実用化に向けた具体的取り組み

M-pathおよびBioProVによる新規代謝経路の構築と同時に、実用生産に適したゲノム挿入型アルカロイド生産株の構築を行っている。また、アルカロイドは植物における含有量の低さから生理活性の不明なものが多く、ほとんどが製品化されていない。そのため、ゼブラフィッシュやマウスを用いた生理活性評価についても検討しており、実用生産システム確立とともにアルカロイドの具体的な利用方法の提案が可能である。

(3) 成果の実用化の見通し

今年度中に、アルカロイド中間体であるレチクリンのゲノム挿入型生産システムが完成予定である。レチクリンをハブ化合物とすることで、様々なアルカロイドの実用生産が可能となる。

また、ゼブラフィッシュ等を用いた生理活性評価系によって、実際にレチクリンに対する新たな生理活性も解明済みである。そのため、オピオイド以外の生理活性が不明な希少アルカロイドに対しても製品化が期待できる。

(添付資料 1) プロジェクト基本計画

(添付資料 2) 事前評価書、N E D O P O S T 結果

(添付資料 3) TSC Foresight 生物機能を利用した物質生産分野の技術戦略
策定に向けて

「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」基本計画

材料・ナノテクノロジー部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

①政策的な重要性

バイオテクノロジーは、経済活動の様々な分野で利用される技術体系となっており、近年欧米や米国を中心に、バイオテクノロジーを用いた経済活動を“Bioeconomy”と称して政策提言に取り上げられている。OECD では 2009 年に「The Bioeconomy to 2030: Designing a policy Agenda」というレポートを取りまとめ、2030 年にはこの“Bioeconomy”が OECD 諸国の GDP の 2.7% (約 192 兆円) に成長すると予想し、中でもこれまで中心であった健康・医療分野での利用から、物質生産などの工業利用の市場が拡大していくと見込んでいる。

このような“Bioeconomy”の成長見込みの背景には、次世代シーケンサーをはじめとした各種解析装置が急速に進化し、遺伝子情報や生産物情報を正確かつ高速に入手できるようになったこと、及び2000年代前半からゲノム上の遺伝子を能動的に組み替える、いわゆるゲノム編集技術が開発されたことが挙げられる。これらの技術により、例えば特定の物質の生産量が最大になる条件など、目的に適した遺伝子配列をコンピュータ上で設計し、更にその設計に基づき、様々な生物の遺伝子を能動的に操作することが可能になってきたことで、様々な物質生産への適用拡大に期待が高まっている。

しかしながら、このような取り組みは欧米が先行しており、我が国としても同分野での競争力強化が急務である。また、現状は基礎学理が構築され、コンセプトが上がってきた段階であることから、国として生物を利用した高機能品生産に寄与することを実証していくことも重要である。

②世界の取り組み状況

米国では、遺伝子配列の設計、構築、評価、学習に係るサイクルを圧縮するツール開発と、そのツールを用いて全く新しい物質の創製、既知物質の高効率生産を狙った Living Foundries program を立ち上げ、160 億円もの研究投資を行っている。

また、EU においても、Horizon2020 の枠組み等を活用し、生物資源の持続可能な活用による材料、化学薬品等の加工・生産に関する研究開発を産官学連携で推進しているところである。加えて、英国では、生物学的デザインに係る研究推進の場として 30 もの機関・企業が集まるセンターを設立し、最重要政策課題として本分野を推進している。

③我が国の状況

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

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

④本事業の狙い

本プロジェクトでは、植物等の生物が持つ物質生産能力を人工的に最大限引き出した細胞“スマートセル”を構築し、化学合成では生産が難しい有用物質の創製、又は従来法の生産性を凌駕することを目的に、必要となる基盤技術を開発するとともに、特定の生産物質における実用化技術を確立する。なお、物質生産に係るコストや安全性の面から、本プロジェクトでは植物と微生物による生産技術を対象とし、それぞれの特性を踏まえて以下の技術開発を実施する。

植物については、植物自身が有する豊富な代謝系を最大限活用することを前提に、生産性向上に資するゲノム編集技術等の基盤技術の開発、代謝系遺伝子発現制御の基盤技術、及び人工栽培環境による代謝系の効率化技術開発を行うとともに、実用植物における高機能品生産の実用化技術を開発する。

微生物については、動物や植物に比べてゲノムサイズが小さく、実験的に全細胞レベルの観察が可能である。これらの特徴を活かして特定物質を生産する細胞プロセスをコンピュータ上で解析し、最適なプロセス設計を可能とする統合オミクス解析等の情報解析技術を開発する。また、細胞における物質生産プロセス解明のために必要なオミクス情報の取得に資する分析・評価手法や、解析結果に基づく遺伝子改変を効率的に行う長鎖DNA合成関連技術も並行して開発する。これら技術を複合的に活用する仕組みを構築し、具体的な高機能品生産の実用化技術を開発する。

以上の研究開発により、持続可能な社会の構築に資するスマートセルによるものづくり“スマートセルインダストリー”の実現を狙う。

(2) 研究開発の目標

①アウトプット目標

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

研究開発項目ごとの目標については、別紙1にて定める。

②アウトカム目標

本プロジェクトの成果により、化学プロセスから植物等による生産に代替されることで、2030年時に85.8万kl相当の原油削減に資する。また、OECDにおいて、2030年にバイオテクノロジーを用いたものづくり等の工業関連市場は世界で70兆円に拡大すると予想されており、その内1割となる7兆円市場の獲得に資する。

③アウトカム目標達成に向けての取組

研究開発と並行して、海外の知財動向やビジネス動向を調査し、開発成果の円滑な実用化・事業化に資する知財戦略及び事業化モデルを検討する。加えて、本プロジェクトで開発した成果を広く社会に普及させるために、ワークショップ等を通じた成果発信も積極的に行う。

(3) 研究開発の内容

上記目標を達成するために、以下の項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施するとともに、国内外の関連情報の収集及び調査等を行う。研究開発事項は以下の通り設定する。

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」

研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」

研究開発項目①、③については、実用化まで長時間を要するハイリスクな基盤的技術に対して、産学官の複数事業者が互いのノウハウ等を持ちより協調して実施する事業であるため、委託事業として実施する。

研究開発項目②、④については、実用化に向けて企業の積極的な関与により推進されるべき研究開発であり、助成事業として実施する（NEDO負担率：大企業1／2助成、中堅・中小・ベンチャー企業2／3助成）。

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

プロジェクトマネージャー（PM）にNEDO 材料・ナノテクノロジー部 林 智佳子を任命して、プロジェクトの進行全体を企画・管理や、そのプロジェクトに求められる技術的成果及び政策的効果を最大化させる。

本プロジェクトは、NEDOが単独ないし複数の企業、大学等の研究機関（原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別の研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点から国外企業との連携が必要な部分はこの限りではない。）から、原則公募によって実施者を選定し実施する。

なお、各実施者の研究開発能力を最大限に活用し、効率的かつ効果的に研究開発を推進する観点から、NEDOは研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を選定し、各実施者はプロジェクトリーダーの下で研究開発を実施する。

(2) 研究開発の運営管理

NEDOは、研究開発全体の管理及び執行に責任を負い、研究開発の進捗のほか、外部環境の変化等を適切に把握し、必要な措置を講じるものとする。運営管理は、効率的かつ効果的な方法を取り入れることとし、次に掲げる事項を実施する。

①研究開発の進捗把握・管理

PMは、プロジェクトリーダーや研究開発実施者と緊密に連携し、研究開発の進捗状況を把握する。また、外部有識者で構成する技術検討委員会を組織し、定期的に海外の技術動向も踏まえた評価を受け、目標達成の見通しを常に把握するとともに、必要に応じて研究開発の加速、中止を検討する。

②技術分野における動向の把握・分析

PMは、プロジェクトで取り組む技術分野について、内外の技術開発動向、政策動向、市場動向等について調査し、技術の普及方策を分析、検討する。なお、調査の効率化の観点から、本プロジェクトにおいて委託事業として実施する。

③研究開発テーマの評価

研究開発を効率的に推進するため、研究開発項目①及び②を対象として、ステージゲート方式を適用する。PMは、外部有識者による審査を活用し、平成31年度以降の研究開発テーマの継続是非を平成30年12月に決定する。

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDOは、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な関係を維持しつつ、事業の目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目

標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて、技術検討委員会等における外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、適宜プロジェクトリーダーとともに事業の進捗について報告を受けること等により進捗の確認及び管理をものとする。

また、必要に応じて、ユーザーとの連携を促す等、成果の早期達成が可能になるよう努める。早期実用化が可能と認められた研究開発については、期間内であっても研究を完了させ、実用化へ向けた実質的な研究成果の確保と普及に努める。

3. 研究開発の実施期間

研究開発項目①～③については、平成28年度から平成32年度までの最長5年間とする。

研究開発項目④については、平成31年度から平成32年度までの最長2年間とする。

4. 評価に関する事項

NEDOは技術評価実施規程に基づき、技術的及び政策的観点から研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、プロジェクト評価を実施する。

評価の時期は中間評価を平成30年度、事後評価を平成33年度とし、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

また、中間評価結果を踏まえ、必要に応じて事業の加速・縮小・中止等、見直しを迅速に行う。

5. その他の重要事項

(1) 研究開発成果の取扱い

①成果の普及

研究開発実施者は、研究成果を広範に普及するよう努めるものとする。NEDOは、研究開発実施者による研究成果の広範な普及を促進する。

②研究開発項目間の連携

研究開発成果のうち研究開発項目①及び③の共通基盤技術に係るものについては、研究開発項目を超えてプロジェクト内で共有し、継続的に相互利用の可能性を検討すること。また、研究開発項目①と②並びに③と④については、①及び③で開発する共通基盤技術の有効性検証のために、必要に応じて秘密保持契約や共同研究契約を締結し、密接に産学官で連携すること。連携の枠組みはPMとPLが主導して構築する。

③標準化等との連携

得られた研究開発成果は、標準化等との連携を図るため、標準化に向けた評価手法の提案、データの提供等を必要に応じて実施する。

④知的財産権の帰属

研究開発成果に関わる知的財産権については、「国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、全て委託先に帰属させることとする。なお、プロジェクトの初期段階から、事業化を見据えた知財戦略を構築し、適切な知財管理を実施する。

⑤知財マネジメントに係る運用

「NEDOプロジェクトにおける知財マネジメント基本方針」を適用する。

(2) 基本計画の変更

NEDOは、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済的状況、国内外の研究開発動向、政策動向、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) 根拠法

本事業は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第十五条第一号ニ及び第三号、第九号に基づき実施する。

6. 基本計画の改訂履歴

- (1) 平成28年3月、制定。
- (2) 平成28年8月、プロジェクトマネージャー交代に伴う改訂
- (3) 平成30年3月、研究開発項目③の細目順序入替え及び記載表現の見直し等

(別紙1) 研究開発計画

研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」

1. 研究開発の必要性

これまで医薬品原料や機能性食品、各種化学品などの有用物質が植物を利用して生産され、品種改良等により生産性向上が図られてきた。しかし、大きな機能改変は難しく、かつ、開発に相当の時間がかかることから、その効果は限定的であった。また、従来の遺伝子組換え技術も同様の課題を克服できているとは言えない。

このような状況下、特定の遺伝子を認識し、その遺伝子を能動的に操作可能なゲノム編集と呼ばれる技術が 2000 年代前半の ZFN 登場以降、TALEN、そして CRISPR と次々と開発されてきた。中でも 2013 年に開発された CRISPR は、扱いの簡便さや効率の良さなどから様々な分野の研究者がゲノム編集技術を活用するきっかけともなり、例えば 2013 年以降のゲノム編集関連論文数の伸びは目覚ましい。

これらゲノム編集技術は米国が主導権を握っており、我が国の技術開発は後塵を拝している状況である。しかし、CRISPR は、狙った遺伝子以外を編集してしまう Off-target の問題や分子の大きさから導入細胞がある程度限定されることなど、技術的な課題が残っている段階であることから、我が国技術が追い上げる余地も十分あるものと考えられる。

また、植物による生産性を高める上では、遺伝子ノックアウトを誘導するゲノム編集だけではなく、遺伝子ノックダウンを目的としたゲノムへの化学修飾を制御するエピゲノム編集技術や転写された RNA の機能を制御する技術、逆に代謝系遺伝子の発現を向上させる技術等も組み合わせて遺伝子発現を制御していくことが重要となる。加えて、これまで栽培環境、特にストレス付与が植物の二次代謝系を大きく変動させることが一部のストレス源と植物種では知られている。近年の人工環境栽培技術の進歩に伴い、遺伝子制御だけではなく、環境制御による生産効率向上技術の開発も期待される場所である。

そこで、これらの遺伝子制御技術及び環境制御による変動誘因技術を融合させた新たな有用化合物の効率的生産技術確立が求められているところである。

2. 研究開発の具体的な内容

(1) ゲノム編集技術

植物等による物質生産機能の制御・改変及びその産業化に向けて、既存のゲノム編集では対応できない新規の国産のゲノム編集関連技術を開発し、生物を利用した物質生産における我が国の産業競争力を向上させるための新たな技術基盤の形成を目指す。また、研究開発項目②と連携し、開発した技術の有効性を検証する。

研究開発と並行して、他国の特許動向等を調査し、開発した成果の実用化を睨んだ知財戦略を策定する。

(2) 代謝系遺伝子発現制御技術

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

(3) 栽培・生育環境による発現制御技術

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

3. 達成目標

【最終目標（平成32年度）】

(1) ゲノム編集技術

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

(2) 代謝系遺伝子発現制御技術

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

(3) 栽培・生育環境による発現制御技術

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

【中間目標（平成30年度）】

(1) ゲノム編集技術

- ・ 既存のゲノム編集技術では対応できない独自の新しい機能を有するゲノム編集関連技術（対象領域、精密性、ゲノム設計、細胞毒性、導入効率等）の基本技術を確立し、

その新規性、有用性を検証する。

- ・ 開発した成果の産業利用に向けて、他国の動向も踏まえた知財戦略を策定する。

(2) 代謝系遺伝子発現制御技術

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

(3) 栽培・生育環境による発現制御技術

- ・ 栽培環境因子と代謝系主要遺伝子の半数の解析を終了させる。

研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」

1. 研究開発の必要性

これまで次世代シーケンサーや質量分析器を用いて、生物個々の遺伝子配列や代謝経路が解読され、特にモデル植物におけるトランスクリプトームやメタボローム解析の進捗に伴い、近年それら情報を基にした遺伝子発現制御により、代謝産物の生産制御が植物で可能となってきた。また、植物の栽培環境が代謝系に影響を与えることを利用し、栽培環境を自在に制御可能な密閉型植物工場を活用して、生産効率を向上させるノウハウも蓄積してきている。

しかし、実際には、植物内の代謝経路は複雑に絡み合っており、標的遺伝子を改変し、特定の代謝経路の促進・抑制を誘起したとしても、様々な因子が関連した副反応により、予想通りの結果が得られるとは限らない。また、植物によっては栽培方法が異なり、さらには現状ではモデル植物以外に遺伝子組換え手法が確立されていないものが多いといった課題があり、実用植物において遺伝子組換え技術を適用し、生産性を向上させるためには、植物に応じた栽培及び遺伝子組換え技術を開発する必要があるなど、実用化に向けては技術的なハードルが高い。

従って、本分野の産業応用を促進するためには、個々の実用植物種における特定物質の生産実用化技術を個別に開発・実証する必要がある。

2. 研究開発の具体的な内容

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

3. 達成目標

【最終目標（平成32年度）】

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

【中間目標（平成30年度）】

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

研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」

1. 研究開発の必要性

細胞は DNA、RNA、タンパク質、代謝物など多様な化学物質で構成されている。これまでの研究では、この細胞構成物質を明らかにすることを主目的にしており、過去にはゲノムプロジェクトやターゲットタンパクプログラムなどによって、多くの生体化学物質の存在やその構造を明らかにしてきた。しかし、これは生体細胞内におけるプレーヤーを明らかにしたに過ぎない。生体細胞を産業的に利用するためには、細胞の高次生命システムを理解し、細胞プロセスを制御することが求められる。高次生命システムの理解とは、細胞内で起こる現象のメカニズム解明に他ならず、同一階層又は異なった階層の細胞構成物質間の相互作用ネットワークを明らかにすることである。そのためには先の様々なプロジェクトによって明らかになった細胞構成物質群全体の挙動の観測が必要であり、事実これらの要望に呼応する形で、次世代シーケンサー（NGS）や質量分析器（LC-MS）などの科学技術が急激に進展してきた。最近では、NGS や LC-MS 等による DNA、mRNA、タンパク質、代謝物というそれぞれの階層の物質の細胞内全量測定が積極的に実施され、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームという各種オミクス研究が盛んに行われている。

今後は、これらオミクス情報を高精度かつ網羅的・体系的に取得し、機械学習等の情報科学的な手法によって階層縦断的なオミクスデータ解析を実施する統合オミクス解析技術の確立が期待されている。これにより、例えば主要代謝経路上にない転写因子間の相互作用、代謝物と転写因子との関係性など、従来の実験的知見では得られなかった重要因子が特定され、革新的な生産性の向上、全く新規の物質創製に貢献すると考えられる。

本研究開発項目では、これら統合オミクス解析を基盤とする情報解析技術を開発するとともに、オミクス情報の網羅的に取得に資する分析・評価手法の開発、解析結果に基づく遺伝子改変を効率的に行う長鎖 DNA 合成関連技術の開発を行い、高生産性微生物創出のためのプラットフォームを構築する。並行して、開発した各要素技術及びシステムを維持・運営するための知財戦略及び事業化モデルの検討を行う。

2. 研究開発の具体的な内容

(1) ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

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

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

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

(2) 高生産性微生物設計システムの開発

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

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

(3) 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

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

3. 達成目標

【最終目標(平成32年度)】

- ・(1)(2) で開発したシステムを用いることにより、従来育種と比較し、物質生産株の開発期間を1/10に短縮することを実証する。
- ・(1)(2) で開発した要素技術、システムを維持・運営するための事業化モデルを策定する。

【中間目標(平成30年度)】

(1) ハイスループット合成・分析・評価手法の開発

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

(2) 高生産性微生物設計システムの開発

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

(3) 高生産性微生物創製に資する情報解析システムの有効性検証

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

研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」

1. 研究開発の必要性

微生物は、植物に比べて産出する代謝物は多くないものの、その単純さゆえに、大幅なゲノム改変を行い、目的とする遺伝子配列を人工的に設計することが容易である。また、一般的に培養時間も短く、コスト的に優位である。そのため、研究開発項目③で開発したシステムを用い、最適な遺伝子配列を設計し、微生物の細胞に導入することで、従来法と比べて圧倒的な生産性の実現、又は全く新しい機能を有する物質創製の実現に寄与する可能性があり、ものづくりの核となる技術として期待される。

2. 研究開発の具体的な内容

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

3. 達成目標

【最終目標（平成32年度）】

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

(別紙2) 研究開発スケジュール

中間評価
▽

事後評価
▽

	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	平成 31 年度	平成 32 年度	平成 33 年度
研究開発項目①「植物の生産性制御に係る共通基盤技術開発」(委託)	国産ゲノム編集技術の開発		ステージゲート	実用植物への適合性の検証及び技術改良		
	代謝系遺伝子発現制御技術の開発					
	栽培・生育環境による発現制御技術の開発					
研究開発項目②「植物による高機能品生産技術開発」(助成)	代謝経路、鍵遺伝子の特定 形質転換技術の開発		有効性 検証	栽培環境条件の最適化 生産性の実証		
研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」(委託)	高生産性微生物設計システムの開発			開発システムの改良及びパッケージ化		
	ハイスループット合成・分析・評価手法の開発					
研究開発項目④「微生物による高機能品生産技術開発」(助成)				システム活用による実用ターゲット開発		

研究開発事業に係る技術評価書(事前評価) (経済産業省)

事業名	遺伝子組み換え植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発			推進課室名	生物化学産業課		
事業開始年度	平成28年度	事業終了(予定)年度	平成32年度	主管課室名	生物化学産業課		
事業の目的	本事業は、大規模な遺伝子組換え技術と情報技術を利用した合理的な遺伝子設計技術とを融合させることで、植物、微生物等による物質生産機能を制御・改変し、省エネルギー・低コストな高機能品(試薬・香料・化粧品など)の生産技術を開発する。						
事業概要	別紙記載のとおり。						
平成28年度概算要求額	2150 (百万円)						
成果目標(アウトカム)	成果指標			単位	目標最終年度42年度		
	原油使用の削減量		目標値	万kl	85.8万kl		
活動指標(アウトプット)	活動指標			単位	28年度活動見込		
	高機能品生産細胞の開発数		当初見込み	件	1		
事業所管部局(推進課、主管課)による自己点検・改善状況							
	項目			評価	評価に関する説明		
国費投入の必要性	事業の目的は国民や社会のニーズを的確に反映しているか。			○	省エネ型の次世代ものづくり産業基盤の構築に資する技術開発であり社会のニーズを反映している。		
	地方自治体、民間等に委ねることができない事業なのか。			○	本事業の遂行には遺伝子工学、化学、薬学等の各種分野融合が必要不可欠であり、企業や地方自治体で実現することは難しい。		
	政策目的の達成手段として必要かつ適切な事業か。政策体系の中で優先度の高い事業か。			○	省エネルギーな高機能品の生産技術を実現する上でも、経済産業省が積極的に進めるべき事業である。		
事業の効率性	競争性が確保されているなど支出先の選定は妥当か。			-	平成28年度新規実施事業のため、実績なし		
	受益者との負担関係は妥当であるか。						
	単位当たりコスト等の水準は妥当か。						
	資金の流れの中間段階での支出は合理的なものとなっているか。						
	費目・用途が事業目的に即し真に必要なものに限定されているか。						
	不用率が大きい場合、その理由は妥当か。(理由を右に記載)						
事業の有効性	成果実績は成果目標に見合ったものとなっているか				平成28年度新規実施事業のため、実績なし		
	事業実施に当たって他の手段・方法等が考えられる場合、それと比較してより効果的あるいは低コストで実施できているか。						
	活動実績は見込みに見合ったものであるか。						
	整備された施設や成果物は十分に活用されているか。						
関連事業	関連する事業がある場合、他部局・他府省等と適切な役割分担を行っているか。(役割分担の具体的な内容を各事業の右に記載)						
	所管府省・部局名		事業番号	事業名			
点検・改善結果	点検結果	契約時や確定検査時に点検を行うとともに、事業者へのヒアリングや研究開発に係る有識者委員会、研究開発進捗報告会(年2回開催予定)での議論を聴取することにより、出先、用途の把握・状況確認を行い、また、適性かつ効率的な予算使用がなされていることを確認する。また、中間目標に対して実績がどうであったかを中間年度に評価し、事業の見直し等も実施することで、より効率的な事業の推進に努める。					
	改善の方向性						

外部有識者(産業構造審議会評価WG)の所見【技術評価】

- ・この事業はベンチャーへの転換がロードマップ上に示されており、ゴールがはっきりしているが、戦略的に技術組合でやっていることを全部引き継いでビジネスになるかどうかを精査しつつ、それをブラッシュアップする仕組みづくりに取り組むこと。(微生物等)
- ・本事業の狙いが、植物工場でしかできない新しいことをやるのか、省エネなのか、又、植物を作るプロセスなのか、バイオメカニズムなのか等について、実施体制を含めて整理し、明確化すること。(植物)
- ・全体のプロジェクトの構成、整合性及び個々のテーマと企業との関係等を十分詰めて進めること。そのことを中間評価で確認することとする。(植物)

外部有識者(産業構造審議会評価WG)の所見を踏まえた改善点等

- ・事業成果のうち産業技術基盤に関するテーマについてはベンチャー企業として事業化することを前提にしつつも、知財戦略やマーケティング等に関して十分に精査して進める。また、個別要素技術の開発成果については、参画企業が責任を持って事業化を進める。(微生物等)
- ・本事業の狙いは、ゲノム編集などの新育種技術を利用して植物の物質生産機能を制御・改変することにより、高機能品の生産技術を開発・実証することである。(植物)
- ・本事業により、高機能品の生産方法を「化学合成」から「遺伝子組換え植物を利用した生物合成」に転換することで、生産工程の省エネルギー・低コスト化が見込まれる。そのためには、組換え植物の物質生産技術の実証、及び生産量を増加させるための栽培環境の制御を行う密閉型植物工場が必要不可欠となる。(植物)
- ・また、幅広い高機能品の生産に適用するためにはこれまで利用されてきたモデル植物(シロイヌナズナ、トマトなど)以外の植物を対象とした遺伝子組換え技術の確立とゲノム編集技術が必須となることから、これらの開発も併せて進める。プロジェクト管理は(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構が行い、事業者を公募して進める予定である。(植物)
- ・全体のプロジェクトの構成としては、企業を中心とした実証開発のグループと、実証開発へ適用することを前提とした基盤研究を行う研究グループとで進める予定である。プロジェクトの構成、整合性及び個々のテーマと企業との連携等に関しては中間評価で確認する。(植物)

「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発プロジェクト基本計画（案）」に対するパブリックコメント募集の結果について

平成28年3月24日

NEDO

電子・材料・ナノテクノロジー部

NEDO POSTにおいて標記基本計画（案）に対するパブリックコメントの募集を行いました結果をご報告いたします。
お寄せいただきましたご意見を検討し、別添の基本計画に反映させていただきました。
貴重なご意見を頂き、ありがとうございました。

1. パブリックコメント募集期間
平成28年2月25日～平成28年3月9日
2. パブリックコメント投稿数<有効のもの>
計9件
3. パブリックコメントの内容とそれに対する考え方

ご意見の概要	ご意見に対する考え方	基本計画・技術開発課題への反映
全体について		
<p>[意見1]（6件） 植物に関する本プロジェクトは、日本における植物バイオテクノロジーと植物工場研究の実績を事業化へ繋げるために必要な施策であると考えられる。 国内における植物組織培養技術、遺伝子組換え技術、植物工場等での栽培技術等、物質生産における個々の要素技術には特筆すべき研究成果も認められる。それらをパッケージ化できれば、海外にキャッチアップすることも十分に可能と思われ、本プロジェクトがそのようなハブ機能を発揮することを期待する。 化学合成では合成できない機能性成分を植物で効率的に生産できる技術が開発されると、省エネルギー社会へ向けたブレークスルーになると思われる。本プロジェクトの産学官連携研究で新しいゲノム編集技術や形質転換技術等の学術基盤が形成されるとともに、植物や微生物を用いた機能性成分の効率的生産が実用化されることを期待する。</p>	<p>[考え方と対応] ご意見を頂きまして、ありがとうございます。 本プロジェクトを通じて、当該分野における我が国の産業競争力強化に努めて参ります。</p>	<p>[反映の有無と反映内容] 特になし。</p>

<p>[意見2] (1件) 植物と微生物を活用した物質生産であるが、微生物を「等」に含めることに違和感を覚える。植物、微生物以外も含めるのであれば、植物・微生物等とするのが自然ではないか。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。 ご指摘の通りプロジェクト名では「植物等」と記載しておりますが、基本計画中には植物及び微生物を宿主の対象とすることを明記しております。</p>	<p>特になし。</p>
<p>[意見3] (1件) バイオテクノロジーを塗り替えようとするゲノム編集やシステム生物学に基づく物質生産（合成生物学）の関連技術に遅れをとる中、追従型のプロジェクトで一発逆転が狙えるものか。既に技術的に先行する欧米が予算規模も桁の違う中でさらに加速し、多くのバイオベンチャーも発足する中、今から国産技術を育てましようというシナリオで勝ち目はあるか。現状認識や論文・知財調査などは適切に行われているか。 研究者のアイデアで逆転を狙うのであれば、提案公募型も含めたプロジェクト体制がふさわしいと思われるが如何か。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。 本プロジェクトにて扱う技術分野について、現状認識を含む技術戦略を別途策定しており、当該戦略に基づいてプロジェクトを推進して参ります。 また、継続的に海外における技術動向等を調査し、その分析結果に応じて柔軟に運営管理して参ります。 公募にあたっては、基本計画に記載の課題に沿った提案を広く受け付けます。</p>	<p>特になし。</p>
<p>[意見4] (1件) 本プロジェクトが目指す生産技術の基盤として、「植物などの生物が持つ物質生産能力を人工的に最大限引き出した細胞（スマートセル）」を挙げているが、植物などの遺伝子を発現させるのに適したモデル細胞の開発は、今後当該研究を推進するにあたり非常に有用なツールになると予想され、このような独創的な構想はもっとアピールすべきと考える。例えば、1(1)④「本事業の狙い」でこの構想の意義を強調する、「研究開発計画」項目①②にスマートセルに関する記述を盛り込むことを提案する。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。 スマートセルの意義は「本事業の狙い」としてしっかりと記載しておりますので、現状案の通りとさせていただきます。</p>	<p>特になし。</p>
<p>1. 研究開発の目的 (1) 研究開発の目標</p>		

<p>[意見1] (1件)</p> <p>目標設定においては、既存生産系に対する品質面やコスト面での優位性を想定した設定とすることが求められる。一方で、生産物質は既存生産系で確立された物質よりも、植物や微生物による生産系ならではの独自の機能性や品質、製品などをターゲットとしたほうが、より競争力の高い技術や製品が成果として期待できるものと考えられる。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。 頂いた視点を踏まえ、本プロジェクトにおける生産対象物質を検討して参ります。</p>	<p>特になし。</p>
<p>[意見2] (3件)</p> <p>研究開発項目①(2)及び(3)について、発現濃度のみの目標値を設定している点に疑問を感じる。</p> <p>植物においてはリニアな代謝制御だけではなく、生合成経路への原料物質の供給、あるいは、生成物の貯蔵部位への輸送など、3次元的な広義の代謝制御を念頭に置く必要があり、発現濃度のみでは最終的な物質生産性が明確とならない場面も想定される。</p> <p>従って、発現量変化の目標値は、想定した作用メカニズムで異なると思われ、目標物質やテーマ設定などに応じて柔軟に目標設定やプロジェクトの運営管理を行っていくことも検討すべき。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。 最終的な目的物質の生産性は、研究開発項目②にて実用植物を用いて個別に検証いたします。 研究開発項目①では基盤技術として遺伝子発現制御技術を確立することを目的としており、当該項目では発現変化を目標として設定しております。</p>	<p>特になし。</p>
<p>(2) 研究開発の内容</p>		
<p>[意見1] (1件)</p> <p>研究開発項目①(3)では環境ストレスの付与が前提となっているようだが、一般的には環境ストレスによって植物の生育量自体は低下する傾向にあり、最終的な物質生産にも影響を及ぼす場合がある。従って、ストレス処理に限らず、発現制御に有効な環境調節や環境制御技術を探してもよいのではないかと考える。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。 本プロジェクトではストレス処理に限らず、環境制御技術全般を対象として考慮しております。</p>	<p>研究開発項目①2. 研究開発の具体的な内容における文章において、「ストレス」の文言を、「栽培環境」に置き換えました。</p>
<p>[意見2] (1件)</p> <p>研究開発項目②2. 研究開発の具体的な内容の中で「生産させる実用植物の栽培及び遺伝子組換え技術を開発するとともに」とあるが、植物を用いたターゲット物質生産は、栽培のみならず培養によるアプローチも生産性向上に効果的である。従って、「生産させる実用植物の栽培、培養系の確立及び遺伝子組み換え技術を開発するとともに」のように培養生産アプローチも含まれる形で記載すると栽培に限定されないことが明確に解ると思う。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。 ご指摘の通り、「生産させる実用植物の栽培、培養系の確立及び遺伝子組換え技術を開発するとともに」とすることで検討いたします。</p>	<p>研究開発項目②2. 研究開発の具体的な内容及び中間目標において、「培養系の確立」を追記しました。</p>

<p>[意見3] (1件)</p> <p>植物など生物は生合成した物質を、生合成の場であるオルガネラや細胞から別の場所へ輸送したり蓄積したりするための輸送体をもっているが、有用物質生産遺伝子(代謝酵素)と一緒に、輸送体遺伝子をモデル細胞に導入・発現できれば、抽出・精製工程を簡略化でき、実用化に近づくと考える。</p> <p>この実現のためには輸送・蓄積機構を理解する必要があり、代謝系遺伝子にとどまらず、輸送遺伝子や蓄積機構の解明まで網羅することを提案する。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。</p> <p>研究開発項目①(2)の研究開発内容に記載の通り、本プロジェクトでは輸送・蓄積機構を制御する技術の開発も考慮しております。</p>	<p>特になし。</p>
<p>2. 研究開発の実施方式 (1) 研究開発の運営管理</p>		
<p>[意見1] (1件)</p> <p>研究開発項目①と②だけがステージゲート方式の対象になっているのは何故か。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。</p> <p>研究開発項目①②については、委託・助成先事業者が個別の研究開発を進める中で、中間時点で有望案件を精査し、4年目以降は集中的投資の下に実用化に向けた研究開発を進めることがマネジメント上重要と判断し、ステージゲートを設定しております。</p> <p>一方、研究開発項目③は、委託先事業者が一体的に一つの統合システムを開発するものであり、途中で一つでも要素技術が欠けることは不適切として、ステージゲートは設定しておりません。また、④は平成31年度から開始することを予定しておりますので、ステージゲートの予定はありません。</p>	<p>特になし。</p>
<p>その他</p>		

<p>[意見1] (1件)</p> <p>研究開発項目①(2)の説明文に「蓄積機構を制御する技術等」とあり、研究開発項目①の目指す具体的な方向性が示されていると思うが、「1. 研究開発の必要性」にも同様の文言を加えては如何か。例えば「代謝・輸送系遺伝子」もしくは「有用物質の高蓄積をデザインする」という文言を入れるとさらに具体性と統合感が加えられ、実用化に資する基盤技術開発にふさわしいと感じる。</p> <p>同様に、達成目標の項目(2)にも補足して「目的代謝・輸送系遺伝子の発現を」とするのは如何か。</p>	<p>ご意見を頂きまして、ありがとうございます。</p> <p>本項目では輸送・蓄積に関与する遺伝子も考慮しており、代謝系遺伝子に包含しております。</p>	<p>特になし。</p>
--	--	--------------

以上

生物機能を利用した物質生産分野の 技術戦略策定に向けて

2017年2月

1 章	生物機能を利用した物質生産技術の概要	2
1-1	バイオエコノミーと工業用途の拡大予測	2
1-2	我が国におけるバイオエコノミーへの対応と物質生産分野への期待	3
2 章	生物機能を利用した物質生産技術の置かれた状況	4
2-1	市場規模(国内・海外)	4
2-2	個別技術の研究開発動向	6
2-3	各国のバイオエコノミー関連政策と研究開発投資	8
3 章	生物機能を利用した物質生産分野の技術課題	11
3-1	細胞内プロセスの設計	11
3-2	設計に基づいた遺伝子改変	12
3-3	生物を利用した物質生産の最適化	12
4 章	おわりに	13

TSCとはTechnology Strategy Center(技術戦略研究センター)の略称です。

生物機能を利用した物質生産分野の技術戦略策定に向けて

1章

生物機能を利用した物質生産技術の概要

1-1

バイオエコノミーと工業用途の拡大予測

生物の機能を利用した技術（バイオテクノロジー）は、健康・医療（新治療法や診断法など）、一次生産（食料、飼料、繊維など）、工業（酵素、バイオ燃料、バイオプラスチックなど）といった幅広い分野で使われている（図1）。また、公衆衛生の向上、省エネルギー、地域社会の発展など、

幅広い社会課題の解決にも貢献が期待され、米国や欧州などでは、OECDの「The Bioeconomy to 2030: Designing a Policy Agenda」（2009年）以降、バイオテクノロジーと経済活動を一体化させた「バイオエコノミー」という概念に基づく総合的な戦略を発表している。

上述のOECDのレポートによると、バイオエコノミー市場は、2030年にはOECD諸国のGDPの2.7%（約1.6兆ドル、約192兆円）に成長し、特に、酵素やバイオ燃料、バイオプラスチックといった物質生産等の工業用途が、全体の39%に達すると予測されている。

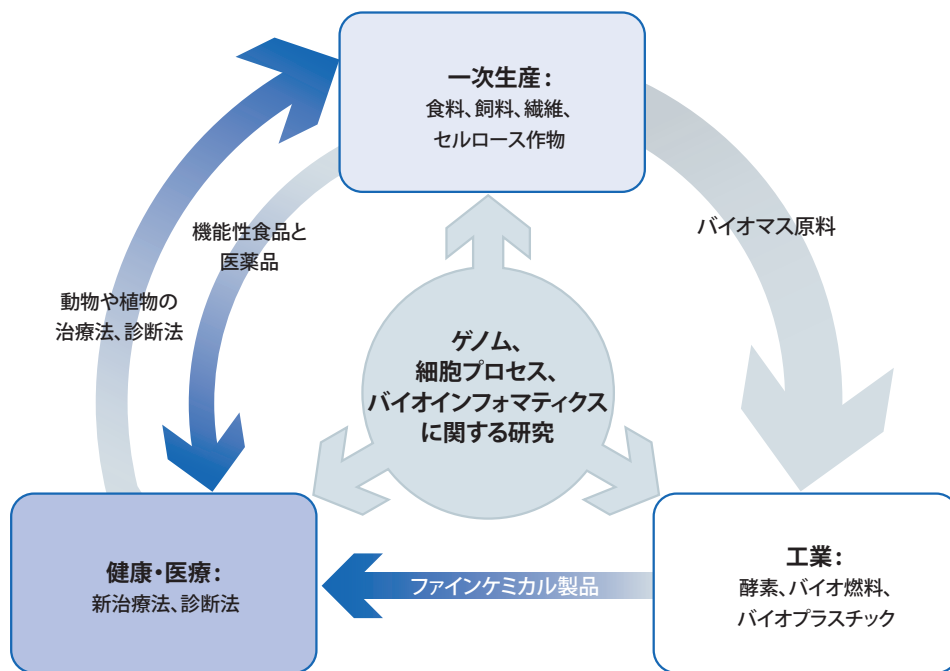


図1 バイオテクノロジーの関係図^{※1}

出所：OECD『The Bioeconomy to 2030: Designing a Policy Agenda』（2009）

DOI：10.1787/9789264056886-en

※1 NEDO 技術戦略研究センターにて翻訳。

生物機能を利用した物質生産分野の技術戦略策定に向けて

1 我が国におけるバイオエコノミーへの -2 対応と物質生産分野への期待

我が国には、微生物を用いた物質生産（特に発酵）に関する長年の蓄積があり、この分野の研究開発では広い裾野を持つ。また2015年の大村智先生のノーベル賞受賞に代表されるように、バイオテクノロジーの基礎研究も盛んに行われてきている。

さらに、近年の次世代シーケンサー等分析装置の急速な進歩により、各種オミクスデータ（遺伝子やその発現系に関わる生物情報）が蓄積されつつあり、これらの情報を基にターゲット物質の品質や生産性を向上させる遺伝子改変の設計が現実味を帯びてきた。また、新しいタイプの遺伝子改変技術であるゲノム編集技術（表1）の登場によって、高確率で意図したとおりの遺伝子改変を行うことや、これまで遺伝子改変のために多大な手間と費用を必要としていた倍数体生物（植物等）の改変を効率的に行える可能性が広がってきた。このような背景により、「細胞内プロセスの設計」、「設計に基づいた遺伝子改変」、「生物を利用した

表1 主な遺伝子改変・制御技術の種類^{※2}

	主な種類	主要な方法
遺伝子改変技術	突然変異導入	化学変異原曝露、放射線放射、重イオンビーム
	遺伝子組換え	
	ゲノム編集	ZEN、TALEN、CRISPR/Cas9
遺伝子制御技術	発現制御	RNAi、エピゲノム
	発現場所制御	オルガネラ改変

■ は従来技術

出所：NEDO技術戦略研究センター作成（2016）

物質生産の最適化」というサイクル（図2）を構築し、ターゲット物質を計画的に高効率・高品質で生産することが可能になってきたと言える。

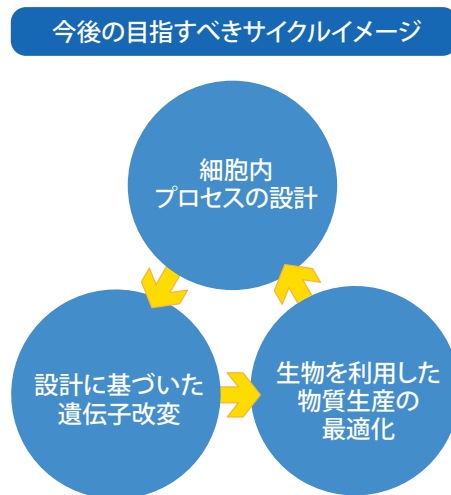


図2 生物を利用した物質生産の課題解決サイクルイメージ
出所：NEDO技術戦略研究センター作成（2016）

米国国防高等研究計画局（DARPA）における「Living Foundries」プログラム（2011年～）においても、「設計（design）⇒構築（built）⇒試験（test）⇒学習（learn）」という同様の物質生産サイクルが提唱され、ロボットと多数のDNAシーケンサーを用い、試行数を増やすことで有用な改変を多く獲得するアプローチが採られている。

一方、資金や人員が限られる我が国では、複雑なオミクス情報全体をあらかじめ総合的に計算した上で緻密な設計を行うアプローチで、より複雑で高度な物質生産を高効率に行えるトータルシステムを開発することを狙って、ビッグデータや人工知能等の情報処理技術と最先端のバイオ技術を融合させ、より高度に機能をデザインした生物細胞「スマートセル」を活用した産業を「スマートセルインダストリー」と定義し、その構築に向けた取組を始めている。

※2 ZFN (Zinc Finger Nuclease)、TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)、CRISPR / Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins)、RNAi (RNA interference)

生物機能を利用した物質生産分野の技術戦略策定に向けて

2章 生物機能を利用した物質生産技術の置かれた状況

2-1 市場規模（国内・海外）

我が国のバイオ産業の市場規模は2015年に約3兆円で、そのうち工業分野は11%である（図3）。一方、米国では、約38兆円超^{※3}の市場規模があり、工業分野の割合は32%超に達している（図4）^{※4}。米国のバイオテクノロジー収益の推移（図5）からは、工業分野の成長率が2000年代初頭から約10%、2008年頃からは約20%と加速的に拡大していることがわかる。

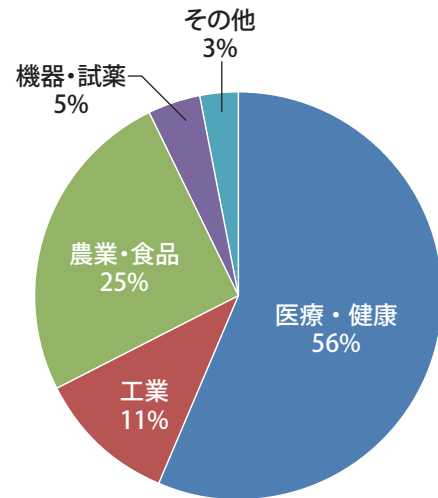


図3 国内バイオ産業の市場内訳(2015年)

出所：日経バイオ年鑑2016(日経BP社)を基にNEDO技術戦略研究センター作成(2016)

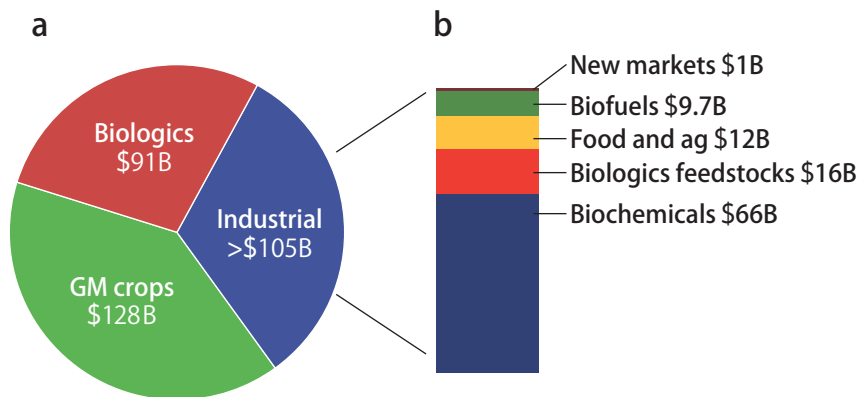


図4 2012年の米国バイオテクノロジー業界の収益(3240億ドル超)。(A) 総収益に対するサブセクター毎の貢献 (B) 工業分野の内訳

出所：NATURE BIOTECHNOLOGY VOLUME 34 NUMBER 3 MARCH 2016

※3 3240億ドル超を1ドル=117円で換算。

※4 積み上げている個々の製品・サービスは日本国内と米国では異なる。

生物機能を利用した物質生産分野の技術戦略策定に向けて

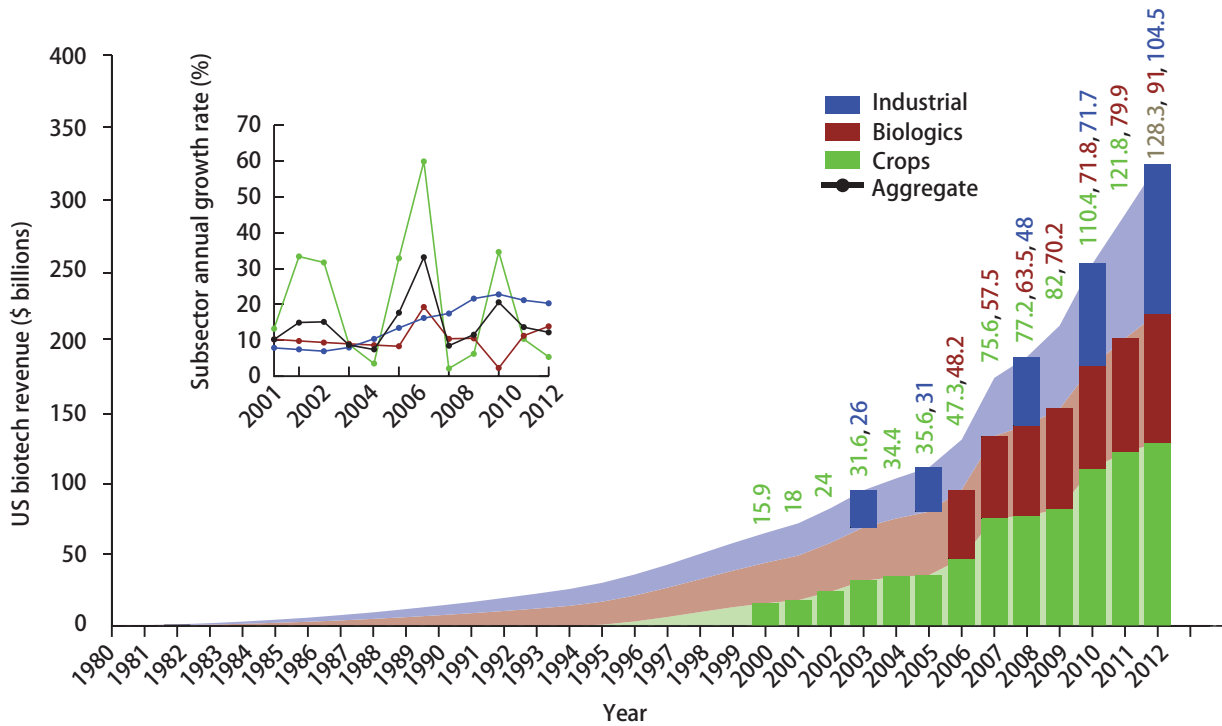


図5 1980年～2012年の米国バイオテクノロジー業界の収益推移（推計値）

出所：NATURE BIOTECHNOLOGY VOLUME 34 NUMBER 3 MARCH 2016

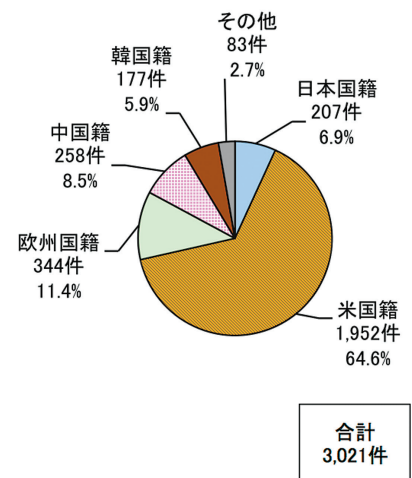
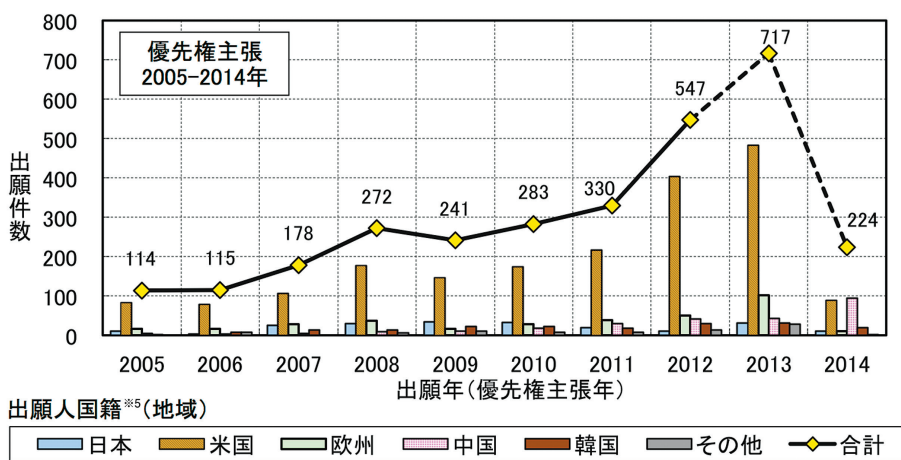
生物機能を利用した物質生産分野の技術戦略策定に向けて

2-2 個別技術の研究開発動向

(1) ゲノム編集技術の特許

遺伝子改変技術のうち、ゲノム編集技術では、TALEN (2010年) や CRISPR/Cas9 (2012年) が開発されて以

降、出願数が加速的に増加している。また、出願人を見ると、米国籍が非常に多く、ランキング上位もほぼ米国が独占している (図6)。



順位	出願人	出願件数
1	Sangamo BioSciences, Inc. (米国)	86
2	Harvard College (米国)	64
3	Massachusetts Institute of Technology (米国)	61
4	Dow AgroSciences LLC (米国)	30
5	DuPont (米国)	28
6	Cellectis (フランス)	26
7	University of California (米国)	25
8	Sigma-Aldrich Co. (米国)	23
9	University of Texas System (米国)	21
10	BASF (ドイツ)	16
	General Hospital Corporation (米国)	16

図6 ゲノム編集技術に関する特許出願件数とランキング (2005 ~ 2014年)

出所：平成28年度 NEDO 委託調査「バイオエコノミーの現状分析とスマートセルが変える未来像に関する調査」(委託先：三菱化学テクノリサーチ、2016)

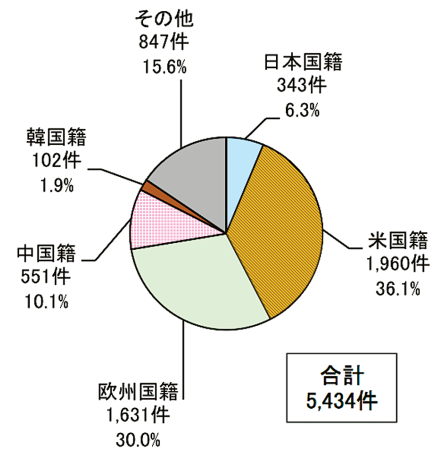
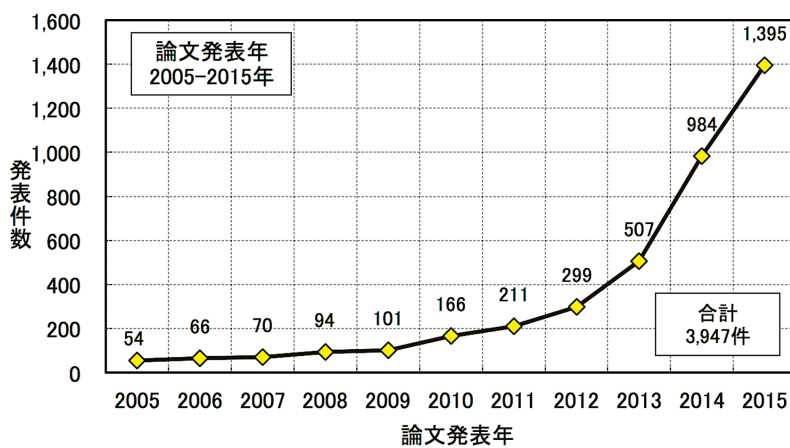
※5 出願人国籍は、最先の優先権主張国で代用。

生物機能を利用した物質生産分野の技術戦略策定に向けて

(2) ゲノム編集技術の論文

ゲノム編集技術に関する研究は、2012年以降、急激に発表論文数が増加している分野であることがわかる。特許出願人に比べて米国籍の割合は低いが、ランキングの1位から6位までが全て米国で占められている（図7）。

なおランキングの大半は大学が占めているが、特許件数で1位であった米国企業のSangamo BioSciencesがランキングされていることは注目に値する。同社はゲノム編集技術の医療応用に取り組んでいる。



順位	研究機関・企業	論文件数
1	Harvard Medical School (米国)	163
2	University of California, Berkeley (米国)	100
3	Massachusetts Institute of Technology (米国)	88
4	Massachusetts General Hospital (米国)	80
5	Sangamo BioSciences, Inc. (米国)	78
6	Broad Institute (米国)	71
7	中国科学院 (中国)	63
8	京都大学	60
	広島大学	
	Institut Pasteur, Paris (フランス)	

図7 ゲノム編集技術に関する論文発表件数とランキング (2005 ~ 2015年)

出所：平成28年度NEDO委託調査「バイオエコノミーの現状分析とスマートセルが変える未来像に関する調査」(委託先：三菱化学テクノリサーチ、2016)

2 各国のバイオエコノミー関連政策と -3 研究開発投資

1章に記載したように、OECD のレポートを契機に各国でバイオエコノミーに関するレポートが発表されるようになった。近年の各国における主なバイオエコノミー関連政策は以下のとおりである。

(1) 欧州連合 (EU)

EU は、2012年にバイオエコノミー戦略である「Innovation for Sustainable Growth: A Bioeconomy for Europe」(European Commission, 2012)を公表、7年間で約5,180億円を投資し、2030年までに石油由来製品の30%、輸送燃料の約25%を生物由来に置換するとした。また、2014年にはHorizon 2020において、EU はICT 等とともにバイオを重要課題に位置付け、社会的な課題解決に向けて、「食糧安全保障」、「持続可能な農業及びバイオエコノミー」、「安全かつクリーンで、効率的なエネルギー」、「気候への対処、資源効率及び原材料」等を取り上げた。

(2) 英国

英国では、2015年にバイオエコノミー指針である「Building a High value bioeconomy」(HM Government, 2015)を公表、合成生物学の実用化を加速してバイオエコノミーを推進する戦略として、目標値を明確化した。2016年には、バイオエコノミー戦略として、「Biodesign for the Bioeconomy UK Synthetic Biology Strategic Plan」(Synthetic Biology Leadership Council, 2016)が発表され、「合成生物学は、設計・構築・試験・分析のサイクルを加速させて生物をデザイン(BIO-DESIGN)する方法に進化し、経済的、社会的ベネフィットを与える」としている。また、バイオエコノミーを達成するツールとして合成生物学を位置付け、社会実装の段階に入りつつあると宣言している。

(3) ドイツ

ドイツでは、2010年にハイテック戦略2020 (Hightech-Strategie 2020) が発表され(2006年に発表されたハイテック戦略の更新)、石油依存の製造プロセスを見直し、2013年にバイオエコノミー国家戦略、2014年に行動計画を打ち出すことが示された。また、この年に発表された「National Research Strategy BioEconomy 2030」(Federal Ministry of Education and Research) では、知識ベースのバイオエコノミーが創出するチャンスを活かし、バイオベースの製品の成長を加速することで、ドイツが主要なイノベーションセンターとなって国際競争力を強化することが示された。2015年には、世界での主導的役割を目指し、第1回グローバルバイオエコノミーサミット(バイオエコノミー会議)をベルリンで開催した。

(4) 米国

米国では、2012年に「National Bioeconomy Blueprint」(The White House)が発表された。さらに、Biomass Research and Development (R&D) Boardによる「Billion Ton Bioeconomy Vision」や2016年の「Federal Activities Report on the Bioeconomy」(Federal Agencies, 2016)には、2030年に10億トンのバイオマスを用い、化石由来燃料25%を代替、約2,300万トンのバイオ由来製品と850kWhの電力供給を目指すとともに、110万人の雇用と約28兆円の市場の創出といった目標も記載されている。

他にも、フィンランドやマレーシア等でもバイオエコノミーに関する政策が近年発表されており、バイオエコノミーに関する様々な取組が世界各国で行われ始めている状況にある。また、我が国を含む各国では、バイオテクノロジー関連研究への投資も進められている(表2)。

生物機能を利用した物質生産分野の技術戦略策定に向けて

表2 バイオテクノロジー関連研究への投資

国・地域	プロジェクト名 (団体名)	研究開発費	支援母体	主な実施者	プロジェクト概要
欧州連合	Bio-Based Industries Joint Undertaking (2015～)	約96億円 (7,800万ユーロを1ユーロ＝123円で換算)	EU、 産業界	—	化石燃料ベースの素材を代替するバイオ素材に関する研究から、不毛な耕作限界地で育てられたカルドン等の油料作物やバイオ潤滑剤、化粧品、バイオプラスチックへの変換を狙った工業規模の検証等、合計10プロジェクトが始動。
英国	Industry Biotechnology Catalyst (2010～2015)	約92億円 (7,500万ユーロを1ユーロ＝123円で換算)	Innovate UK, BBSR, EPSRC	Biome Technologies, Algaecytes Ltd, Palm Paper Ltd, Institute of Food Research 等	生物資源の持続可能な活用による材料、化学薬品、バイオエネルギーの加工・生産に関する研究開発支援を目的としたプログラム。セルロース化合物からバイオポリエステル生産、海草からの嫌気性消化によるバイオメタン燃料の生産等、20以上のテーマを実施。
	SynbiCITE (2013～)	約14億円 (1,000万ポンドを1ポンド＝142円で換算)	EPSR, BBSR, TSB	Imperial College London, Microsoft, FUJIFILM Diosynth, Cambridge University, Oxford University 等	合成生物学での産学両セクターの研究を融合し、研究の事業化推進を目的としたセンターを設立。拠点はImperial College London。英国国内の17の大学・学術機関の研究資源と研究者、及び13の企業(マイクロソフト、シェル、グラクソ・スミスクライン等)が参加。
ドイツ	BioSC	約71億円 (5,800万ユーロを1ユーロ＝123円で換算)	ノルトライン・ヴェストファーレン(NRW)州 イノベーション科学研究省	—	NRWは欧州の主導的なバイオエコノミー拠点を目指すため、ユーリッヒ研究センター、アーヘン工科大学、ボン・デュッセルドルフ総合大学を中心に、統合的なバイオエコノミーの基盤開発に向けたバイオエコノミー科学センター(BioSC)を設立。「バイオポリマー/機能化表面及び材料」、「バイオ燃料」、「バイオ医薬品、診断及び診断技術」の3つの重点プロジェクトを実施。
米国	Advanced Tools and Capabilities for Generalizable Platforms (ATCG) (2011～2013)	約35億円 (3,000万ドルを1ドル＝117円で換算)	DARPA	MIT, J. Craig Venter Institute等	生物学的なデザイン、構築、評価、学習のサイクルに係る時間とコストを10分の1にし、新素材、燃料、医薬品等の開発の効率化を狙う。
	1000 Molecules Program (2013～)	約129億円 (1.1億ドルを1ドル＝117円で換算)	DARPA	MIT, Harvard University等	ATCGで開発したツールを活用し、従来の石油系原料を使用して作成することが不可能な物質の創製、既知物質の高効率生産、新規物質の開発のための、1,000分子もの原料化合物の合成を目指す。

生物機能を利用した物質生産分野の技術戦略策定に向けて

国・地域	プロジェクト名 (団体名)	研究開発費	支援母体	主な実施者	プロジェクト概要
日本	革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発 (2012～2016)	約25億円	経済産業省	高機能遺伝子デザイン技術研究組合 (TRAHED)など	大規模なゲノム情報を基盤とした遺伝子設計技術と長鎖DNA合成技術の融合により、新たに設計された遺伝子クラスターを組み込んだ微生物を作製する。これにより、従来は合成が困難であった物質の生産、有用物質生産効率の大幅な向上、環境負荷の低減及びこれら微生物による生産プロセスの開発効率を飛躍的に向上させる技術の開発を目指す。
	密閉型植物工場を活用した遺伝子組換え植物ものづくり実証研究開発 (2011～2015)	約5億円	経済産業省	産総研など	密閉型遺伝子組換え植物工場において、ワクチン・機能性食品等の高付加価値な有用物質を高効率に生産するための基盤技術開発及び実証研究事業。
	植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発 (2016～2020)	約17億円 (28年度)	経済産業省、 NEDO	産総研、 神戸大など	情報技術を利用した合理的な遺伝子設計と、大規模な遺伝子組換えの融合による物質生産を目指す。
	ImPACT 「超高機能構造タンパク質による素材産業革命」 (2014～2018)	—	内閣府、 科学技術振興機構	理化学研究所、 慶應義塾大、 スパイバーなど	生物由来の構造タンパク質の異次元性能発現メカニズムの解明と基盤技術群を確立し、超高機能なタンパク質をつくる遺伝子を微生物に組み込んで人工的に大量生産し、産業用素材として活用することを目指す。
	SIP「次世代農林水産業創造技術(アグリイノベーション創出)」 (2014～2018)	約30億円 (26年度)	内閣府、 農研機構	農研機構、 筑波大、 東京大、 森林総合研究所、 水産総合研究センターなど	ロボット、ICT、ゲノム等の先端技術による超省力・高生産な日本型スマート農業モデルを確立し、知財化・標準化によって海外展開を狙う。育種技術関係では、ゲノム編集技術、放射線育種技術、オミクス解析技術等を利用して、これまで長い年月を要した品種開発の期間を短縮する技術を確立し、国内外の多様なニーズに対応した作物の開発を目指す。
	新学術領域「生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学」(2016～2020)	—	文部科学省、 日本学術振興会	東京大、 北里大、 東京工業大など	生合成システムの合理的な再構築による効率的、実用的な物質生産系を構築し、希少有用物質の安定供給や、天然物を凌ぐ新規有用物質の創出等を目指す。

出所：各種資料を基に NEDO 技術戦略研究センター作成 (2016)

生物機能を利用した物質生産分野の技術戦略策定に向けて

3章 生物機能を利用した物質生産分野の技術課題

我が国のバイオエコノミー、とりわけ物質生産分野を発展させるためには、1章で示した図2の課題解決サイクルを構成する「細胞内プロセスの設計」、「設計に基づいた遺伝子改変」、「生物を利用した物質生産の最適化」の各技術についての迅速な研究開発が必要である。以下にそれぞれの課題を記す。

3-1 細胞内プロセスの設計

近年、シーケンス技術の向上や低コスト化などにより、大量のゲノム情報が蓄積されつつある(図8)。また、その他の各種オミクス情報に関する基礎研究も盛んに行われている。しかし、これらのオミクス情報を統合した細胞内プロセスの完全な再構築には至っていない。

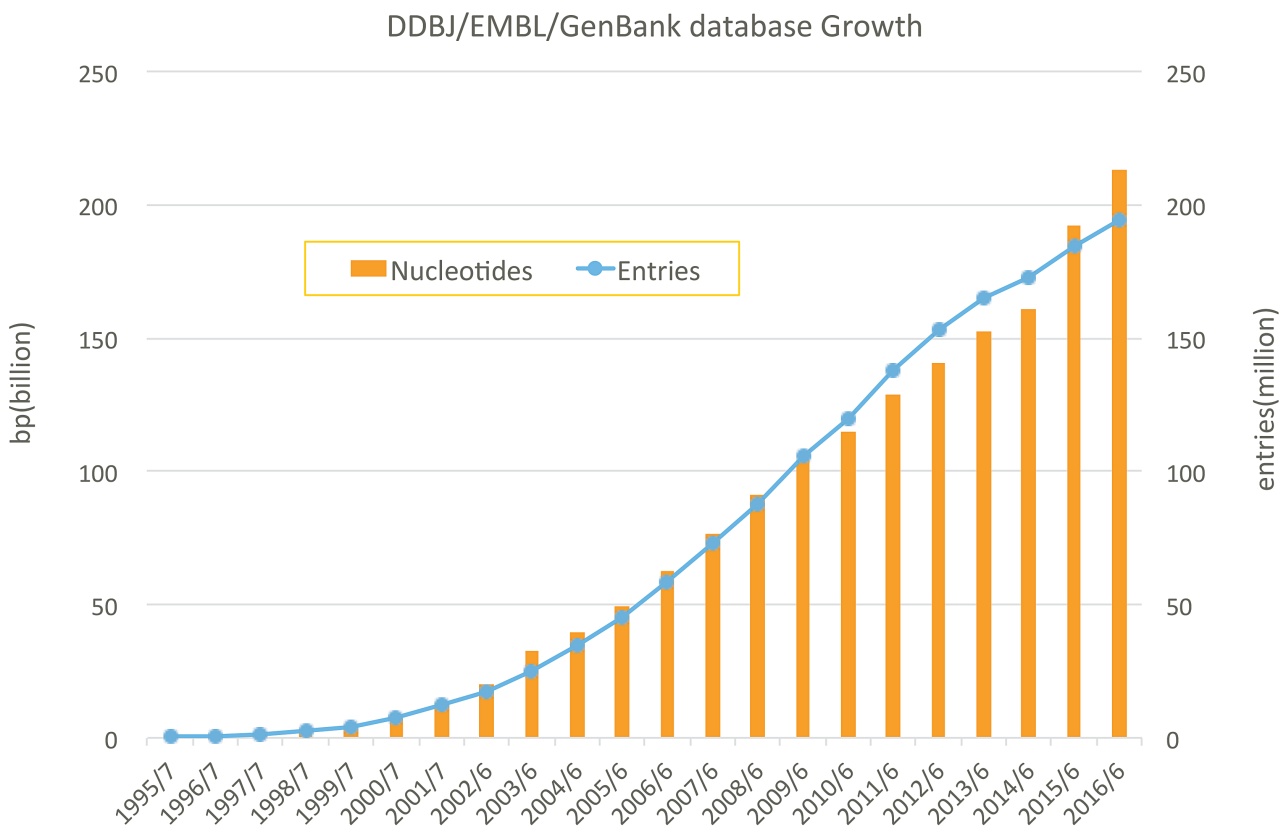


図8 日米欧の塩基配列データベースの推移

出所：DDBJ (DNA Data Bank of Japan) ホームページを基に NEDO 技術戦略研究センター作成 (2016)

生物機能を利用した物質生産分野の技術戦略策定に向けて

今後は、これらのオミクス情報を高精度かつ体系的に取得し、機械学習等の情報科学・統計学的な手法によって統合的に解析する技術の確立が必要である。すなわち、多階層のオミクス情報を互いに紐付けするためのマルチオミクス計測技術（同一検体の各種オミクスデータの連続した変化を取得する技術）と、各階層で情報形式が異なるオミクスデータを統合的に扱うための新規理論・情報処理技術の開発が課題となる。

これらの技術の確立は細胞による物質生産の、よりシステムティックな制御を可能とし、高性能な生産生物の作出の試行錯誤に要していた時間コストやエネルギーコストの大幅な削減が期待される。また、細胞が本来持っている代謝経路の利用だけでなく、新たな代謝経路の導入・制御により、細胞の生産能力を最大限に活用することも期待できる。

3 -2 設計に基づいた遺伝子改変

1章で述べたとおり、近年、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9といったゲノム編集技術が次々と登場したことにより、高度な正確性をもって遺伝子改変を行えるようになっただけでなく、これまで遺伝子改変が困難であった生物における改変の成功確率も上がってきた。しかし、これらのゲノム編集技術にも、以下のような課題がある。

① ZFN

最初に開発されたゲノム編集技術であり、広く産業利用されているが、標的遺伝子の認識部位に制限が多く、設計と合成に時間と費用がかかる。また、編集の際には二量体の形成が必要であり、1回の操作で編集できるのは1遺伝子のみ、標的DNAの立体構造（クロマチン構造やメチル化）によって改変効率に影響を受ける、といった課題があるほか、免疫応答などによる細胞毒性の問題が起りやすい。

② TALEN

標的遺伝子の認識の正確性は比較的高いが、認識部位の作成はZFNよりは簡便であるものの、やはり時間がか

かる。またZFNと同様、二量体の形成が必要であり、1回の操作で編集できるのは1遺伝子のみ、標的DNAの立体構造による影響を受ける、といった課題があるほか、細胞毒性の問題が起りやすい。

③ CRISPR/Cas9

標的遺伝子の認識にRNAを使うため、タンパク質を使うZFNやTALENに比べて、デザインした認識部位の配列の導入が簡便である。また、一度に複数の遺伝子の編集ができる。ただし、オフターゲット（目的以外の部位で編集が起こること）の影響が指摘されている。

また、物質生産の効率を高めるためには、ゲノム編集技術だけでなく、化学修飾を制御するエピゲノム編集技術や、転写後遺伝子サイレンシング等も組み合わせて遺伝子発現を制御していかなければならない。

3 -3 生物を利用した物質生産の最適化

(1) 生物を利用した物質生産における生物種ごとの特徴

生物を利用した物質生産においては、利用する生物種によって、生産できる物質や生産速度・開発速度、製造コスト等に違いがあるため、目的の物質生産に合った生物を選択する必要がある。一般的に、微生物での生産は開発速度が早いですが、生産できる物質に限られる。動物細胞や昆虫は、医薬品原料などの有用な物質の生産が可能だが、製造コストが高くなりやすい。植物個体での生産は、製造コストが比較的安く、環境安全性も高いと言えるが、植物個体の成長に時間がかかるため、開発速度は遅くなる。植物細胞を用いると植物個体より開発速度は上がるが、製造コストは多くの場合、上がってしまう。

(2) 植物と微生物の課題

(1) で示した物質生産に利用する生物種から、工業用途として植物と微生物を選択し、以下に各課題を述べる。

①植物

植物は、栽培環境が二次代謝系を大きく変動させることが知られており、近年の人工環境栽培技術の進歩に伴い、遺伝子制御に加えて、環境制御による生産効率向上技術の開発が期待されている。密閉型の植物工場では、環境制御による生産効率を向上させるノウハウが蓄積されてきているが、個々の植物に特定の物質を生産させるためには、その植物ごとの最適化が必要であることが多い。従って、新たな有用化合物を効率的に生産するためには、遺伝子制御技術に加えて環境制御による変動誘因技術の研究開発が重要である。

②微生物

微生物は、ゲノムが小さく単純であるため、長鎖DNAの導入など大幅な遺伝子改変が可能であり、設計図さえ決めれば、目的の改変生物をつくるのが比較的容易である。また、増殖期間が短いため、開発速度を上げることが可能である。

一方、微生物は植物のように多様な代謝物を作ることができないため、工業利用においては、量産化のための培養条件等の最適化を行うとともに、優れた細胞内プロセスの設計を行うことが重要となる。

4章 おわりに

「細胞内プロセスの設計」、「設計に基づいた遺伝子改変」、「生物を利用した物質生産の最適化」のサイクルに基づく効率的な物質生産システムの構築により、生産効率の著しい増加が期待できるだけでなく、これまで安定的な生産が困難であった物質や高機能（高付加価値）物質の生産も可能になることが期待される。

さらには、これまで化学合成でしか生産されなかった新規物質（有機モノマー・ポリマー等）を、生物を利用して生産できるようになる可能性もある。このような、化学合成プロセスから生物合成プロセスへの置き換えが実現すれば、複雑な合成過程が必要であった物質を1ステップで簡便・低コストに生産できるのみならず、省エネルギー・CO₂排出削減の面からも画期的な物質生産システムになると期待される。

技術戦略研究センターレポート

TSC Foresight Vol.16

生物機能を利用した物質生産分野の技術戦略策定に向けて

2017年2月10日発行

TSC Foresight Vol.16 生物機能を利用した物質生産分野 作成メンバー

国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構
技術戦略研究センター (TSC)

■ センター長 川合 知二

■ センター次長 矢島 秀浩

■ 新領域・融合ユニット

・ユニット長 白井 正人

・研究員 西村麻里江

長谷川健太

林 智佳子

山崎 彰子

・フェロー 加藤 紘 国立大学法人山口大学 名誉教授

・客員フェロー 湯元 昇 国立循環器病研究センター 特任部長

● 本書に関する問い合わせ先
電話 044-520-5150 (技術戦略研究センター)

● 本書は以下URL よりダウンロードできます。
<http://www.nedo.go.jp/library/foresight.html>

本資料は技術戦略研究センターの解釈によるものです。
掲載されているコンテンツの無断複製、転送、改変、修正、追加などの行為を禁止します。
引用を行う際は、必ず出典を明記願います。