

産業技術研究開発（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）
（プロジェクト）

技術評価結果報告書（終了時評価）

（案）

平成29年8月

産業構造審議会産業技術環境分科会

研究開発・イノベーション小委員会評価ワーキンググループ

はじめに

研究開発の評価は、研究開発活動の効率化・活性化、優れた成果の獲得や社会・経済への還元等を図るとともに、国民に対して説明責任を果たすために、極めて重要な活動であり、このため、経済産業省では、「国の研究開発評価に関する大綱的指針」（平成24年12月6日、内閣総理大臣決定）等に沿った適切な評価を実施すべく「経済産業省技術評価指針」（平成26年4月改正）を定め、これに基づいて研究開発の評価を実施している。

経済産業省において実施した「産業技術研究開発（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）」は、これまで生物では合成が困難であった機能性材料等の生産に向け、目的に合わせて物質生産にかかわる遺伝子を設計し、DNAとして正確に合成し、微生物に導入して機能させることで、物質生産を超高効率に行うための新たな遺伝子工学技術の確立を目的として、平成24年度から平成28年度まで実施したものである。

今般、省外の有識者からなる「産業技術研究開発（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）」プロジェクト終了時評価検討会（座長：五味勝也 国立大学法人東北大学大学院農学研究科 教授）における検討の結果とりまとめられた、「産業技術研究開発（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）技術評価結果報告書」の原案について、産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・イノベーション小委員会評価ワーキンググループ（座長：小林 直人 早稲田大学研究戦略センター副所長・教授）において、審議し、了承された。

本書は、これらの評価結果を取りまとめたものである。

平成29年8月

産業構造審議会産業技術環境分科会

研究開発・イノベーション小委員会評価ワーキンググループ

産業構造審議会産業技術環境分科会

研究開発・イノベーション小委員会 評価ワーキンググループ

委員名簿

座長	小林 直人	早稲田大学研究戦略センター副所長・研究院副研究院長 教授
	大島 まり	東京大学大学院情報学環教授 東京大学生産技術研究所教授
	亀井 信一	株式会社三菱総合研究所政策・経済研究センター長
	齊藤 栄子	三菱UFJリサーチ&コンサルティング株式会社 政策研究事業本部主任研究員
	高橋 真木子	金沢工業大学大学院イノベーションマネジメント 研究科教授
	津川 若子	東京農工大学大学院工学研究院准教授
	西尾 好司	株式会社富士通総研経済研究所上席主任研究員
	浜田 恵美子	日本ガイシ株式会社 取締役
	森 俊介	東京理科大学理工学部経営工学科教授

(敬称略、座長除き五十音順)

産業技術研究開発（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）研究開発プロジェクト

終了時評価検討会

委員名簿

座長	五味 勝也	国立大学法人東北大学大学院 農学研究科 教授
	竹山 春子	学校法人早稲田大学 理工学術院 先進理工学部 生命医科学科 教授
	堀内 貴之	株式会社ちとせ研究所 取締役 最高技術責任者
	吉川 博文	学校法人東京農業大学生命科学部 バイオサイエンス学科 名誉教授

（敬称略、五十音順）

産業技術研究開発（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）研究開発プロジェクト
技術評価に係る省内関係者

【終了時評価時】

（平成29年度）

商務情報政策局 商務・サービスグループ
生物化学産業課長 上村 昌博（事業担当課長）

大臣官房参事官（イノベーション推進担当）
産業技術環境局 研究開発課 技術評価室長 竹上 嗣郎

【中間評価時】

（平成26年度）

製造産業局 生物化学産業課課長 江崎 禎英（事業担当課長）

大臣官房参事官（イノベーション推進担当）
産業技術環境局 研究開発課 技術評価室長 福田 敦史

【事前評価時】（事業初年度予算要求時）

製造産業局 生物化学産業課課長 荒木 由季子（事業担当課長）

産業技術研究開発（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）研究開発プロジェクト 終了時評価の審議経過

【終了時評価】

◆産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・イノベーション小委員会評価ワーキンググループ（平成29年8月8日）

- ・技術評価書（終了時評価）について

◆産業技術研究開発（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）研究開発プロジェクト評価検討会

第1回評価検討会（平成29年5月30日）

- ・事業の概要について
- ・プロジェクトの概要について
- ・評価の進め方について

第2回評価検討会（平成29年7月6日）

- ・技術評価書（終了時評価）について

【中間評価】

◆産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・評価小委員会評価ワーキンググループ（平成26年2月14日）

- ・評価報告書(案)について
- ・技術評価書（中間評価）について

◆産業技術研究開発（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）研究開発プロジェクト評価検討会

第1回評価検討会（平成26年11月26日）

- ・評価の方法等について
- ・プロジェクトの概要について
- ・評価の進め方について

第2回評価検討会（平成27年1月20日）

- ・評価報告書(案)について

【事前評価】（事業初年度予算要求時）

◆産業構造審議会産業技術分科会評価小委員会（平成23年7月1日）

- ・事前評価報告書(案)について

目 次

はじめに

産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・イノベーション小委員会評価ワーキンググループ
委員名簿

産業技術研究開発（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）研究
開発プロジェクト終了時評価検討会 委員名簿

上記事業 技術評価に係る省内関係者

上記事業 終了時評価の審議経過

目次

	ページ
I. 研究開発課題（プロジェクト）概要	2
1. 事業アウトカム	2
2. 研究開発内容及び事業アウトプット	3
3. 当省（国）が実施することの必要性	93
4. 事業アウトカム達成に至までのロードマップ	98
5. 研究開発の実施・マネジメント体制等	101
6. 費用対効果	113
II. 外部有識者（評価検討会等）の評価	
1. 事業アウトカムの妥当性	114
2. 研究開発内容及び事業アウトプットの妥当性	115
3. 当省（国）が実施することの必要性の妥当性	116
4. 事業アウトカム達成に至までのロードマップの妥当性	117
5. 研究開発の実施・マネジメント体制等の妥当性	118
6. 費用対効果の妥当性	118
7. 総合評価	119
8. 今後の研究開発の方向等に関する提言	121
III. 評点法による評点結果	124
IV. 産業構造審議会評価ワーキンググループの所見及び同所見を踏まえた改善点等	125

「産業技術研究開発（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）」技術評価結果報告書（終了時評価）

プロジェクト名	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			
行政事業レビューとの関係	行政事業レビューシート番号（平成28年 0046）			
上位施策名	科学技術・イノベーション			
担当課室	生物化学産業課			
プロジェクトの目的・概要				
<p>本事業では、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。</p> <p>遺伝子組換え微生物の生産性を現状より大幅に向上させると共に、抑制反応を起こさずに物質生産を行えるような複雑な遺伝子操作が可能となるよう、以下の研究開発を実施した。</p> <p>①計算機を用いたシミュレーションにより生物の複雑な反応を解析し、それを制御するための遺伝子の設計をする技術を開発する。</p> <p>②設計した複数遺伝子を合成・連結し、微生物に組入れ、遺伝子組換え微生物の培養を行う手法を開発する。</p> <p>③創製した工業用微生物を用いて、他の方法では合成困難な複雑な化合物の生産、超高効率な物質合成を実現する技術の開発を行う。</p> <p>●政策的位置づけ</p> <ul style="list-style-type: none"> ・技術戦略マップ：生物機能活用技術分野「生物機能を活用した物質生産【微生物を活用した物質生産】」 ・科学技術イノベーション総合戦略：“新規技術によるエネルギー利用効率の向上と消費の削減”等 				
予算額等（委託） （単位：百万円）				
開始年度	終了年度	中間評価時期	終了時評価時期	事業実施主体
平成24年度	平成28年度	平成26年度	平成29年度	高機能遺伝子デザイン技術研究組合
H26FY 執行額	H27FY 執行額	H28FY 執行額	総執行額	総予算額
635	198	429	2,376	2,458

I. 研究開発課題（プロジェクト）概要

1. 事業アウトカム

事業アウトカム指標		
「本事業で開発した技術を用いて製品化・事業化された数」		
指標目標値		
本事業において開発した技術シーズや知見を利用し、製品化、あるいは事業化を進めた数（件数）		
事業開始時（24年度）	計画：0	実績：
中間評価時（26年度）	計画：3	実績：3（達成）
終了時評価時（28年度）	計画：3	実績：6（達成）
目標最終年度（48年度予定）	事業化、製品化した技術群が、従来の生産プロセスの20-200倍の効率化を達成、今後の事業展開により以下のアウトカムが期待。 <ul style="list-style-type: none">世界で200兆円の市場となると予測されるバイオエコノミー創出に向け、ドライ・ウェット融合の革新的な基盤技術を展開、これまでの生産株開発期間を1/2-10に短縮し、国内産業の競争力を確保。フィブロイン構造ペプチド繊維材料の開発に貢献、プラスチック市場（市場の成長率は毎年5~10%、バイオプラスチックは25~50%の成長）での新素材展開を加速。国内農薬市場（約3000億円）における天然物由来農薬生産による環境負荷低減。国内市場500億円／年である制がん剤材料としてのテルペン化合物生産の国内競争力確保、および環境負荷低減。	

2. 研究開発内容及び事業アウトプット

(1) 研究開発内容

本事業においては、①次世代の遺伝子工学技術を確立するため、本事業の最終目標として掲げた「遺伝子組換え微生物による物質生産を向上させるための遺伝子設計技術を確立する、②設計に基づいて5万塩基対以上の長鎖DNAを正確に合成する手法を開発し、長鎖DNAを宿主となる微生物に安定に導入する技術を確立する、③作製した遺伝子クラスター導入微生物を用いることにより、従来、合成が困難であった産業上有用な物質群の合成、あるいは従来の数倍以上の高効率、大量生産、環境負荷低減での産業上有用な物質の生産を実現することを目指した研究開発事業として実施した。

遺伝子設計技術としては、これまでも、強力なプロモーター、発現制御するためのプロモーター、活性の高い酵素や強い構造をもつタンパク質などのDNA塩基配列の設計が行われていた。しかし、本事業で達成を目指したのは、ゲノムデザインの一部である長鎖DNAとして合成する遺伝子クラスターの設計技術である。そのためには、プロモーターの各要素やORFとの間の介在配列、あるいは遺伝子と遺伝子との間の介在配列をどのように設計するか、mRNAの二次構造の影響を考慮したDNA塩基配列の設計、さらに将来的には、ヌクレオソーム構造をどう配置させるかを考慮した遺伝子クラスターの設計が必要である。その第一歩として、本事業では、公開されているゲノムデータ、オミクスデータ、目的に応じて取得する実験データ等を取り入れて、物質生産を向上させるために必要なプロモーター、ORF、mRNAの二次構造等を含む5万塩基対の遺伝子クラスターのDNA塩基配列設計技術を確立する。

次に、設計に基づき、長鎖DNAを低コストで正確に合成することは、次世代遺伝子工学技術において極めて重要な課題である。DNA塩基配列解析であれば、解析回数を増やすことで正確性を向上させることができるが、DNA合成においては、細胞に導入されるDNA分子として利用されるため、合成のたびに正確に作製される必要がある。米国ベンター研究所のマイコプラズマのゲノム入れ替え実験が当初計画よりも数カ月遅れたのは、導入したゲノムに1塩基対の間違いがあったことだといわれている。このように、導入する遺伝子クラスターには、1塩基対でも間違いがあれば遺伝子として正常に機能しない可能性があるため、DNA合成における正確性は重要な指標となる。本事業においては、5万塩基対以上の長鎖DNAを間違いなく正確に合成するための技術の開発を目指した。

さらに、5万塩基対以上の長鎖DNAを細胞外に取り出した場合物理的に脆弱となり、その取り扱いには大学や研究機関など限られた研究室でしか行えない。産業用に利用されるためには、合成した長鎖DNAを安定に保存し、細胞から取り出して操作するなどDNAを不安定化させずに、他の生物種に移行させる技術の開発を合わせて行う必要がある。そのため、異種間接合などの現象を利用した技術発が必要となる。

また、設計・合成した遺伝子クラスターについては、産業生産のための微生物に導入し生産性を評価しなければならない。特に、従来生物プロセスでは合成が困難であった産業上有用な物質の合成ができることが本事業の目標である。そこで、次世代遺伝子工学技術が生産性の画期的な向上をもたらすことを示すために、戦略的に選定した有用化合物や革新的マテリアル原料について、従来の数倍以上の高効率生産、大量生産、あるいは生産における環境負荷低減などを実証することを試みる。そして、その結果を設計技術にフィードバックすることもきわめて重要である。

次世代遺伝子工学技術は、設計、合成、評価をして、その結果を設計にフィードバックするサイ

クルを回すことにより発展させることができる。本事業では、次世代遺伝子工学技術の各過程の開発を我が国のドライ系（計算科学分野）およびウェット系（分子生物学などの実験科学分野）の先端的研究グループがそれぞれを担当し実施した。ドライ系とウェット系の研究者は、データの種類も表記方法も異なるため、それぞれが扱っているデータそのままをやり取りしても、必要とされるコミュニケーションが成立しない。そこで、研究データを各研究グループの方法で共通サーバに入力し、各研究グループの研究者が把握しやすい様式で表示できるようにして、各グループ間でデータを共有し、容易に相互利用できるようにする。このデータに基づいて、設計、合成、評価し、その結果を設計にフィードバックするサイクルを、ゲノム・デザイン・サイクル（GDC）と定義し、この方法論をシステムとして機能させることにより、GDCを確立することを本事業の共通の目標とした。

（２）事業アウトプット

本事業では、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とにより、従来化学合成では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、生産における環境負荷の低減、およ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した。

本課題を達成するため、遺伝子組換え微生物による物質生産を向上させるための遺伝子設計技術を確立する（①遺伝子設計技術の開発）とともに、設計に基づいて5万塩基対以上の長鎖DNAを正確に合成する手法を開発し、長鎖DNAの宿主となる微生物を安定に導入する技術を確立する（②長鎖DNA合成・操作技術の開発）ことを目指した。さらに、作製した遺伝子クラスター導入微生物を用いることにより、従来化学合成では困難であった産業上有用な物質群の合成、あるいは従来の数十倍以上の高効率、大量生産、生産における環境負荷低減での産業上有用な物質の生産を実現する（③革新的バイオマテリアルの生産技術の開発）ことを目指した。具体的には、本事業では下記の課題構成を設けて研究開発を実施した。また、研究拠点および研究開発項目を横断的に推進するため、研究推進ワーキンググループを設定した。

研究推進ワーキンググループ

- （１）長鎖DNA合成自動化装置開発ワーキング
- （２）GDCのドライとウェットの融合化ワーキング

研究開発項目①「遺伝子設計技術の開発」

- （１）遺伝子クラスターの設計・構築技術の開発
 - （１－１）新たな合成経路の設計・実践的な遺伝子回路の構築 【神戸大学、早稲田大学、京都大学（植田、小川）、千葉大学】
 - （１－２）遺伝子クラスターの設計及び最適化 【産業技術総合研究所、国立遺伝学研究所】
- （２）遺伝子クラスターの効率的導入技術の開発 【慶應義塾大学、産業技術総合研究所、神戸大学、東北大学】

(3) GDCのプラットフォーム化技術開発

(3-1) リバースエンジニアリング技術開発 【産業技術総合研究所、神戸大学、アステラス製薬(株)】

(3-2) ユーザビリティの高いGDCプラットフォームの構築と、GDCの実施による高度化 【産業技術総合研究所、理化学研究所、神戸大学、インシリコバイオロジー(株)】

研究開発項目②「長鎖DNA合成・操作技術の開発」

(1) ドミノ法を利用した長鎖DNA合成技術の開発 【慶應義塾大学】

(2) GDCを加速するためのOGAB法の技術開発 【神戸大学、産業技術総合研究所】

(2-1) 自動化装置に適合した遺伝子集積材料DNAの設計手法の開発

(2-2) コンビナトリアル集積体の構成遺伝子の確認技術の開発

研究開発項目③「革新的バイオマテリアル生産技術の開発」

(1) 高機能人工ポリペプチド材料（人工フィブロイン）

(1-1) 高機能高生産を実現するための遺伝子開発及び、評価プロセスの開発 【Spiber(株)、小島プレス工業(株)】

(1-2) 革新的培養プロセスの開発 【Spiber(株)、味の素(株)】

(1-3) 人工フィブロインを用いたアプリケーション開発 【小島プレス工業(株)】

(2) 医薬原料

(2-1) パクリタキセル 【神戸大学、石川県立大学、鳥取大学、神戸天然物化学(株)】

(2-2) セスキテルペン類 【神戸大学、石川県立大学、鳥取大学、神戸天然物化学(株)】

(2-3) アルカロイド類、非天然アミノ酸類 【神戸大学、三菱化学(株)】

(3) 微生物抗生物質（環状ペプチド化合物、ストレス応答性化合物） 【産業技術総合研究所、クミアイ化学工業(株)、東北大学、北海道大学】

(4) バイオコモディティー

(4-1) 低コスト糖化プロセスの開発 【神戸大学、三菱化学(株)】

(4-2) 発酵阻害物質耐性微生物の開発 【神戸大学、三菱化学(株)】

(5) 関連技術の技術動向調査 【(一財)バイオインダストリー協会】

以下、事業実施内容および各課題におけるアウトプットを記載した。

研究推進ワーキンググループ

(1) 長鎖 DNA 合成自動化装置開発ワーキング

【慶應義塾大学、神戸大学、産業技術総合研究所】

ものづくりのための宿主微生物を短期間に育種するためには、ゲノムデザインサイクル(GDC) (図WG.1-1)をできる限り高速に廻すことが求められる。しかしながら、設計された数10kbに及ぶようなテキスト配列を実物の長鎖DNAに変換することは、従来困難であり、この長鎖DNA合成のステップがGDCにおける律速段階となっていた。

慶應義塾大学では、本プロジェクト開始以前に枯草菌のプラスミド形質転換系を用いた多重遺伝子連結法のOGAB法を用いた長鎖DNAの構築法を開発していた(図WG.1-2)。本方法は、集積対象のDNA断片と集積ベクターDNAを3~4塩基の特異的な配列を持つ突出を有するように準備し、これらのDNA断片を試験管内で1つの集積単位が繰り返し現れるようにタンデムリピート状に連結し、これを枯草菌のコンピテントセルに取り込ませることにより枯草菌菌体内で環状化させることにより集積する方法である。よく用いられるGibson Assembly法やGolden Gate法などといった試験管内で環状化DNAを構築し、これを大腸菌に導入する遺伝子集積方法に比較して、15断片程度までの多くのDNA断片を一度に連結できる点、OGAB法は、連結の正確性が高い点、集積単位の長さによる集積効率の変化が少ない点、連結に用いるDNAののりしろが3~4塩基と短くてよいという点、などで優位であった(図WG.1-2)。一方、タンデムリピート状連結産物を得るためには、材料のDNA断片ができるだけ等しいモル濃度に混合する必要があるが、人手によるDNA断片のモル濃度調整の限界により15断片を超える集積は困難であった。OGAB法を用いて化学合成したDNA断片を出発材料とした長鎖DNAを構築するためには、従来法(第1世代OGAB法)より多い断片のDNAを高い精度で材料のDNA断片を等モルに混合する技術が必要であった。従来法でのモル濃度の調整の困難さが、材料となる各DNA断片の長さが異なることに起因していたため、本プロジェクトではこの問題を解決するために、集積ベクターを除く全ての材料DNA断片がほぼ等しい長さになるように改良した、第2世代OGAB法を開発した(図WG.1-3)。第2世代OGAB法では、OGABブロックと呼ぶ材料となるDNA断片を、遺伝子の機能的な境界に関係なくほぼ等しい長さに分割できるように突出配列の特異性に注意しながらコンピュータシミュレーションにより最適な形に設計し、これに基づいて化学合成、あるいはPCRによりOGABブロックを調達し、全てのOGABブロックを同一の大腸菌プラスミドベクターにクローニングする。得られたプラスミド(OGABブロックプラスミド)集団は、OGABブロックとベクターが(ほぼ)同一長さのため全長もほぼ同一長さで、OGABブロックプラスミドの分光光度計を用いた光学濃度が一致すれば、OGABブロックも一致するという特徴があり、これに基づいて多数のDNA断片を従来法よりもより等モルに近づけることが可能となった。さらに、OGABブロックをクローニングベクターから切り出す際に、従来法では長さが異なっていたために個別に電気泳動後ゲルからの切り出しを行っていたが、第2世代OGAB法ではOGABブロックとクローニング用ベクターのどちらも長さが等しいため、制限酵素切断後のDNA断片を混合して電気泳動することによりまとめてDNA断片の切り出しが可能となった。これらの工夫により第2世代OGAB法では、従来の15断片から50断片以上のDNA断片を1回の連結操作で集積可能となった。

しかしながら、第2世代OGAB法でも熟練を要する工程が必要で、さらに取り扱うDNA断片の数

が増加したことによりサンプルを間違いなく取り扱う技術も必要となり、これがGDCの高速化に障害になっていた。そこで、従来よりも迅速かつ正確に処理することのできるGDCシステムの構築を目的として、平成27年4月に研究者の所属に縛られない拠点横断的な研究体制「長鎖DNA合成自動化装置開発ワーキンググループ（WG）」を立ち上げ、長鎖DNA合成の自動化に向けて研究開発を加速した（図WG.1-1）。

本WGでは、まず、OGAB法用のDNA断片の設計方法、遺伝子集積の材料となるDNA断片の精製方法、遺伝子集積装置、集積体の構造確認などといった個別工程の開発を行った（図WG.1-4）。OGAB法のDNA断片設計の設計方法においては、インシリコバイオロジーにより、断片の数や使用する制限酵素の種類をフレキシブルに変化可能なソフトウェアを開発した。また、遺伝子集積の材料となるDNA断片の精製法では、慶應義塾大学と神戸大学により、サブクローン化したプラスミドを持つ大腸菌を多種類一括培養し、どのプラスミドも一定の高純度で回収する方法を開発した。遺伝子集積装置については、プレジジョン・システム・サイエンスによりプラスミドDNAの濃度を測定し、測定値に基づいて等モル混合する長鎖DNA自動合成装置を開発した。なお、これらの個別研究については、平成26年度に本プロジェクトから派生して発足したAMEDプロジェクト「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術のうち高生産宿主構築の効率化基盤技術の開発に係るもの）」で行われた成果であるため、本報告書ではその結果の詳細には踏み込まない。

平成28年度は、これらの個別要素を長鎖DNA合成の自動化トータルシステムとするべく、材料となるプラスミドを持つ大腸菌の96穴プレートでの培養条件の検討、プラスミド精製カラム材質の検討、長鎖DNA自動合成装置のパラメーターのファインチューニングを行うことで、概ね全システムの自動化を達成した。実際に50 kbの長鎖DNAを50個のDNA断片を出発材料に用いて、本自動化システムにより合成できることを示した（図WG.1-5に1例を示す）。これによりGDCのボトルネックであった長鎖DNA合成を2か月程度で行うことが可能となった。

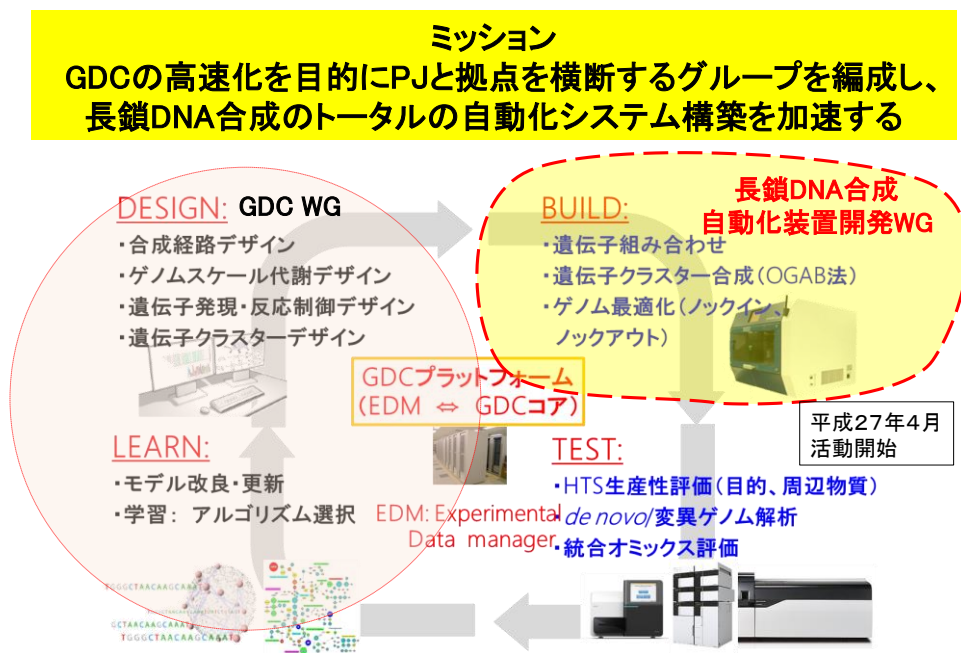


図 WG.1-1. 長鎖 DNA 合成自動化装置開発 WG 概要

OGAB法の概要

Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis*

枯草菌のプラスミド形質転換系と選択的ライゲーションを組み合わせた多重DNA断片集積法

- ・一回の連結操作で15断片程度の集積可能
- ・高い集積精度
- ・集積サイズ依存性なし
- ・3-4pbの短いのりしろで連結

Tsuge, K., Matsui, K. and Itaya, M. Nucleic Acids Res. 31,e133 (2003)

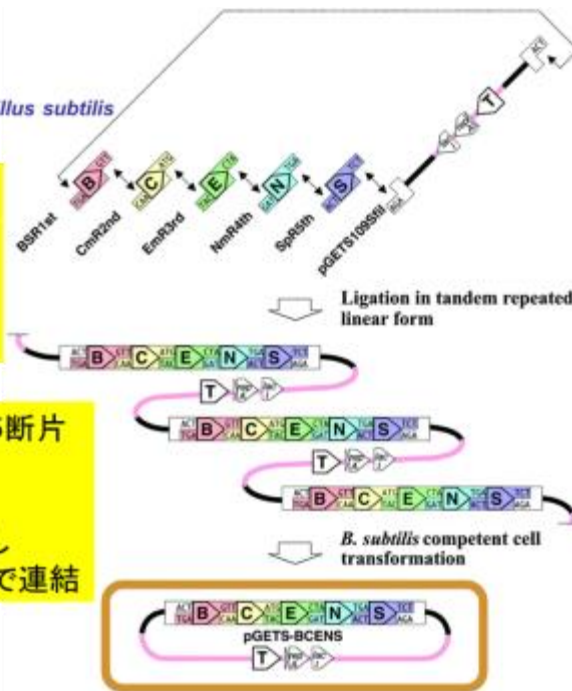


図 WG.1-2. OGAB 法の概要

第2世代OGAB法 50断片の一括集積が可能

Tsuge, K. et al. *Sci. Rep.*, 5, 10655 (2015)

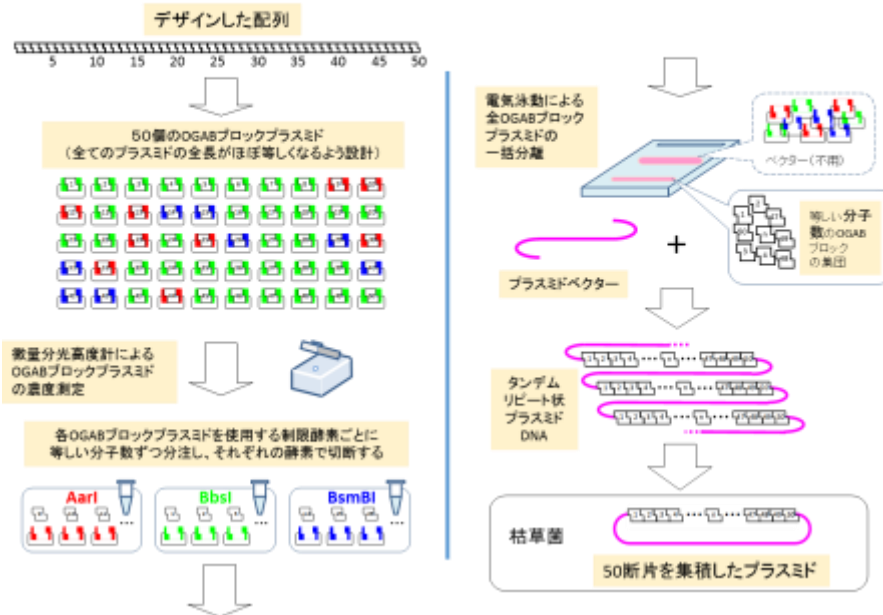


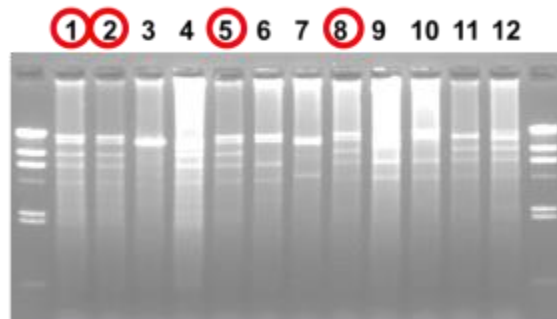
図 WG.1-3. 第2世代 OGAB 法の概要

長鎖DNA自動合成のトータルシステム開発進捗



図 WG.1-4. 長鎖 DNA 自動合成のトータルシステム開発

長鎖DNA合成自動化トータルシステムによる 50断片によるラムダファージ再構築の集積結果



ラムダファージのゲノム48.5kbを50個のOGABブロックに分割して集積した。

ランダムに選択した12個の枯草菌形質転換体からプラスミドを抽出し、制限酵素HindIIIとSfiIで切断し、出現する制限酵素断片のパターンを調べたところ、4個が正しく集積されていたことを確認した。

図 WG.1-5. 長鎖 DNA 合成自動化トータルシステム利用による長鎖 DNA 合成の 1 例

➤ 事業化、製品化（見込みも含む）の状況

受託長鎖DNA合成、長鎖DNA合成技術を用いた有用物質生産株の高速育種、及びこれらのコンサルティング業務を主要な事業とする神戸大学発のベンチャー会社、株式会社シンプロジェンを平成29年2月に設立した。今後数年のうちに方向性を固めて事業展開を行う見込みである。

(2) GDC のドライとウェットの融合化ワーキング

【神戸大学、理化学研究所、産業技術総合研究所、インシリコバイオロジー(株)】

GDC ワーキンググループにおいては、物質生産に向けた利用しやすい EDM, GDC コアからなる GDC プラットフォーム (GDCPF) を開発し、モデル生産宿主および、モデル物質を使用してその有効性検証する。本プロジェクトでは、研究開発項目③において、様々な用途から産業にとって重要な化合物を挙げ、それらの生産性向上を図っているが、GDC ワーキンググループにおいては、あえて産業上の重要性という要件をはずし、すでに論文などの実証データが豊富なモデル化合物を使って、より短期間に GDC 方法論および GDCPF の有効性を検証することとした (図 WG.2-1)。

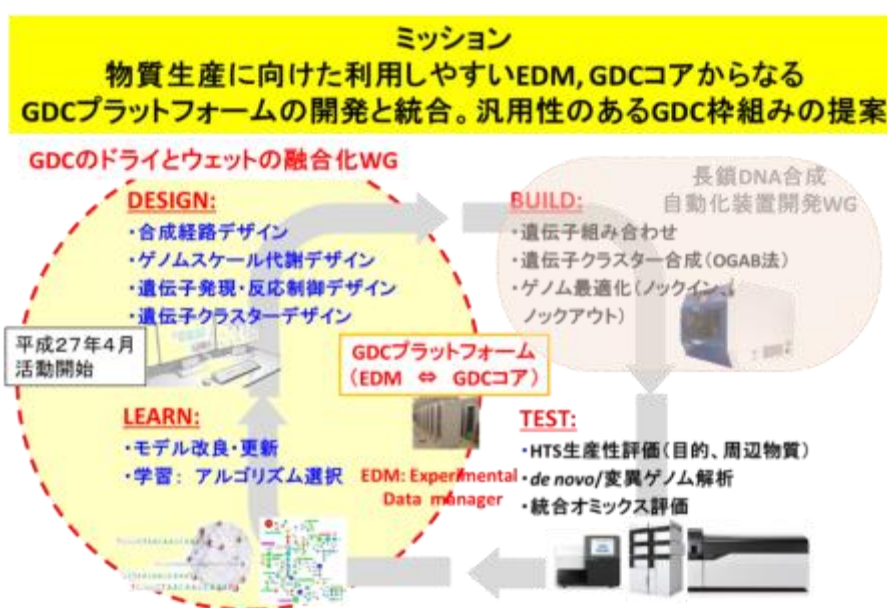


図 WG.2-1. GDC のドライとウェットの融合化ワーキングの概要

ワーキンググループのミッションとしては、Design, Build, Test, Learn からなる生産性向上サイクルを GDC プラットフォームの使用により、より簡単にサイクルをまわすことができる仕組みを短時間で提供することにある。このため、平成 27 年度は年度内にこのシステムを供用できることを目標とするため、あえて独自開発、全自動、オンラインという要件をはずし、ツールの外部からの導入、半自動 (手動)、オフライン操作をも含んだバラックモデルの有効性検証と供用開始を目標とした。平成 28 年度は、企業テーマへの適用に先行して GDCPF (ゲノムデザインサイクルプラットフォーム) の有用性検証を実施した。

検証に当たっては、生産量が計測しやすい評価用物質を検証用ターゲット物質として、イソブタノール、アスタキサンチン、ビオラセインを選定した。また、GDCの設計方法論のうち、利用頻度が高いと考えられる「ステップ1：新規代謝経路選択と導入設計」、「ステップ2：生産性向上遺伝子探索・破壊設計」、「ステップ3：代謝最適化・遺伝子発現バランス設計」を今回の検証対象とした（図WG.2-2）。

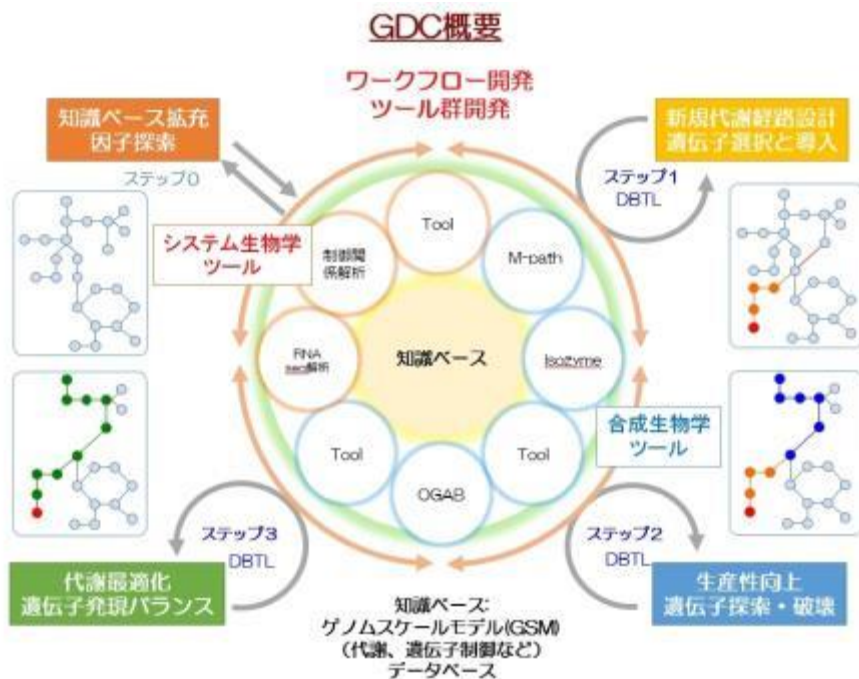


図 WG.2-2. GDCPF の概要

このような枠組みで検証を実施した結果、各検証対象において以下のように、GDCPFの有効性を示すことができた。

イソブタノール生産性向上検証作業では *Escherichia coli* を生産宿主として、他の微生物からの新規経路選択・導入設計、生産性向上遺伝子探索・破壊設計（生合成経路遺伝子のアイソザイム置換、FBAによる他経路遮断設計、アイソザイム置換による発現制御解除設計）を使用して生産宿主の構築を行った結果、世界最高レベルの生産株がきわめて短期間に得られた。

アスタキサンチン生産性向上作業においては、ふたたび *E.coli* を生産宿主として選び、生産宿主に存在しない7遺伝子について他の微生物から遺伝子毎に3種~5種のアイソザイムを化学合成し、combiOGAB法およびGibson AssemblyによるcombiOGAB代替法を用いて、新規経路選択・導入設計による生産株構築を行った。これにより最適なアイソザイムの組合せが短時間に得られただけでなく、GDCPFの機能や操作性の改良に対する有用な情報が多数得られた。

ビオラセイン生産性向上検証作業では *Saccharomyces cerevisiae* を生産宿主としてビオラセインの生合成経路遺伝子5個のうち下流の3遺伝子のプロモータ・ターミネータをコンビナトリアルに置換する発現バランス制御設計・構築を行った。この結果、Violaceinを含めて4種の化合物の生産量および生産量比率を変えることができることを実証した。

これらの検証結果を受けて、GDCPF ツールボックスの高度化・自動化、学習フローをさらに改良し、GDCPF を組合所属の大学、研究機関、企業に提供し、各テーマの効率的な遂行に供した。

イソブタノール生産性向上作業

理研で開発したツール (HyMeP) と当事業で開発した GDCPF を用いて、イソブタノール生産菌 *E.coli* の細胞内代謝設計を行った (図 WG.2-3)。

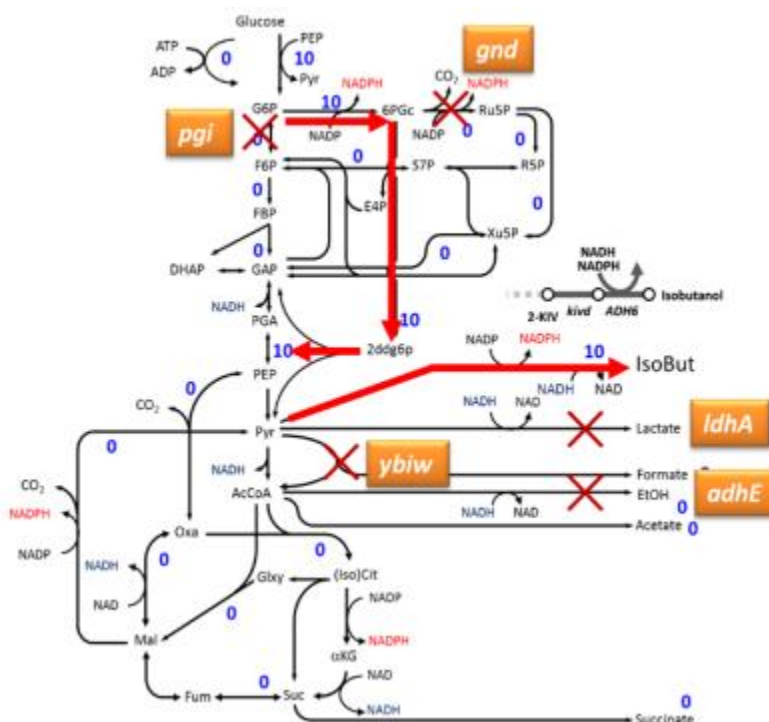


図 WG.2-3. イソブタノールを最大生産するための代謝設計

この設計図をもとにして *E.coli* に遺伝子改変を行い、さらにイソブタノール合成遺伝子を導入した。この株のイソブタノールの生産を評価したところ、培養 48 時間で 5 g/L で、対グルコース収率は理論最大収率の 31 %に止まっていた。FBA 解析の結果、その原因として、イソブタノールの他に副産物として酢酸が生成されており、ピルビン酸からイソブタノール合成よりも、ピルビン酸からアセチル-CoA へ向かうフラックスが 2.2 倍であることが明らかとなった。そこで、ピルビン酸からイソブタノールの前駆体である 2-ケトイソ吉草酸までの経路をアイソザイム導入により強化したところ、イソブタノール生産性を飛躍的に向上させることに成功し、48 時間の培養で 20g/L を達成した。さらに、この構築株のイソブタノールの菌体当りの生産速度とは公知の株 (WR 株) よりも高く、対糖収率も 51 %と、WR 株とほぼ同等のものであった (図 WG.2-4)。

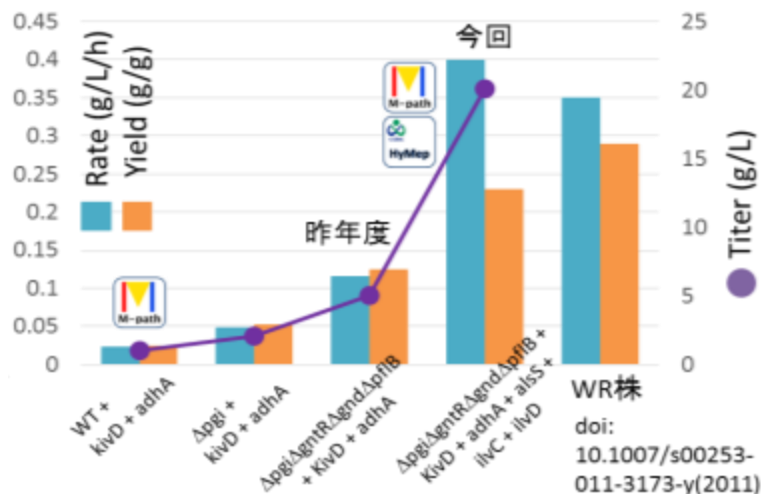


図 WG.2-4. 構築された生産宿主 *E.coli* のイソブタノール生産速度と対糖収率の達成度および記録株 (WR 株) との比較

GDCPF を用いて設計された生産株の生産性向上が実験で検証されたことにより、このプラットフォームが高いレベルで実用可能であるものと判断できた。

アスタキサンチン生産性向上および副産物生産制御作業

E.coli を生産宿主としてアスタキサンチンの 7 個の生合成遺伝子 (idi, CrtE, CrtB, CrtI, CrtY, CrtW, CrtZ) のアイソザイム 3~5 個を他の微生物株から取得し、combiOGAB 法を持ちいてそれらを組合せ、最適な異種アイソザイムの組合せ株を短期間かつ簡単な手順で取得できることを実証した。

GDCPF 新規経路導入ワークフロー

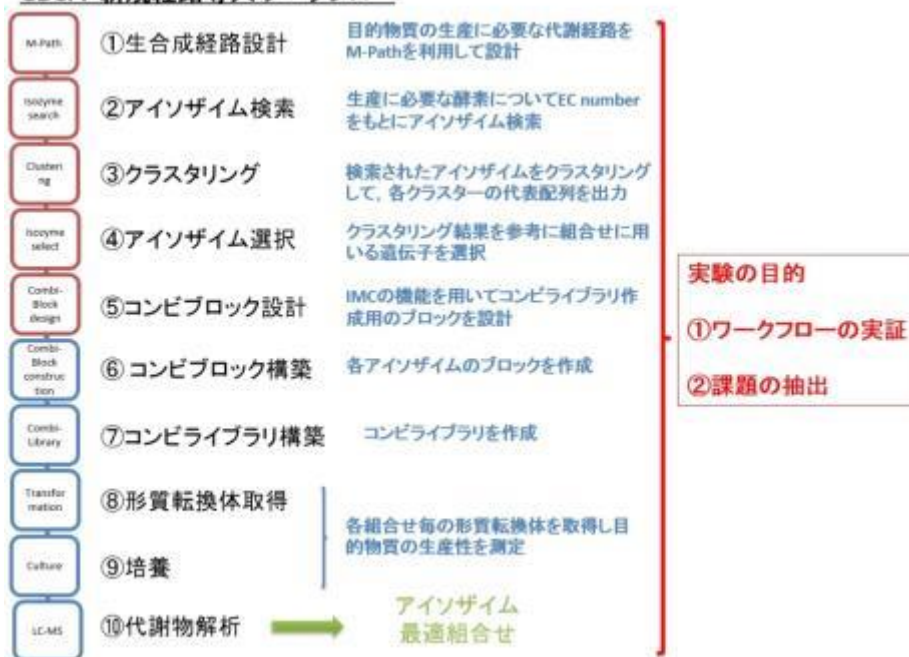


図 WG.2-5. GDCPF の新規経路導入・選択設計テンプレートを使用したワークフロー

具体的には図 WG.2-5 に示すように、GDCPF にあらかじめ登録された新規経路導入設計テンプレートを複製して、アスタキサンチン生産性向上のための最適酵素選定を行った。まず、GDCPF の① M-Path ツールを起動して、生産宿主に存在する Farnesyl PP からの生合成経路を決定した。次に、② Isozyme Search ツールにより経路上の遺伝子別アイソザイムのアミノ酸配列セットを自動生成した。このセットには多数のアイソザイムが含まれるため、コストおよび実験作業量を現実的なレベルに落とすためにマルチプルアラインメントにより 5 クラスターを同定し、それらのクラスターからの代表配列を③ MA & Clustering ツールにより抽出した。これを参照して、次のツールである④ Isozyme Selection で 3～5 個の検証対象アイソザイムを最終的に選択した。アイソザイムセットおよび遺伝子部品データベースからの最適プロモータ・ターミネータ配列情報を加えて、⑤ combiOGAB ツールにより、遺伝子間に必要な制限酵素部位などを付加した combiOGAB 用のクラスター配列を生成した。

続いて、このクラスター配列を分解し、コンストラクト作成に必要な部品を生成するために⑥ combiBlockDesign ツールを使用した。ここで各アイソザイムの塩基配列は生産宿主用に配列が最適化され、かつ RBS が付加された。これらの塩基配列は化学合成され、同時に自動設計されたプライマー群を使用して⑦ combiLibrary ツールより Gibson Assembly あるいは In-Fusion PCR により設計された combiOGAB 用クラスターに物質として再構築された。

これらのクラスターは鶴岡拠点にてコンビナトリアルなプラスミドライブラリーに変換され、⑧ 形質転換体取得実験、⑨ 培養実験を経て、LC-MS による⑩ 代謝物解析が実施された。

このようにして、自動設計 GDCPF を使用することにより、設計ミス、実験ミスが減少され、短時間で目的の生産性向上のための作業が可能となった。

結果としても、新規導入設計ステップ 1 でアイソザイム組合せ最適株によるアスタキサンチンの生産量約 4mg/L を達成した（図 WG.2-6）。

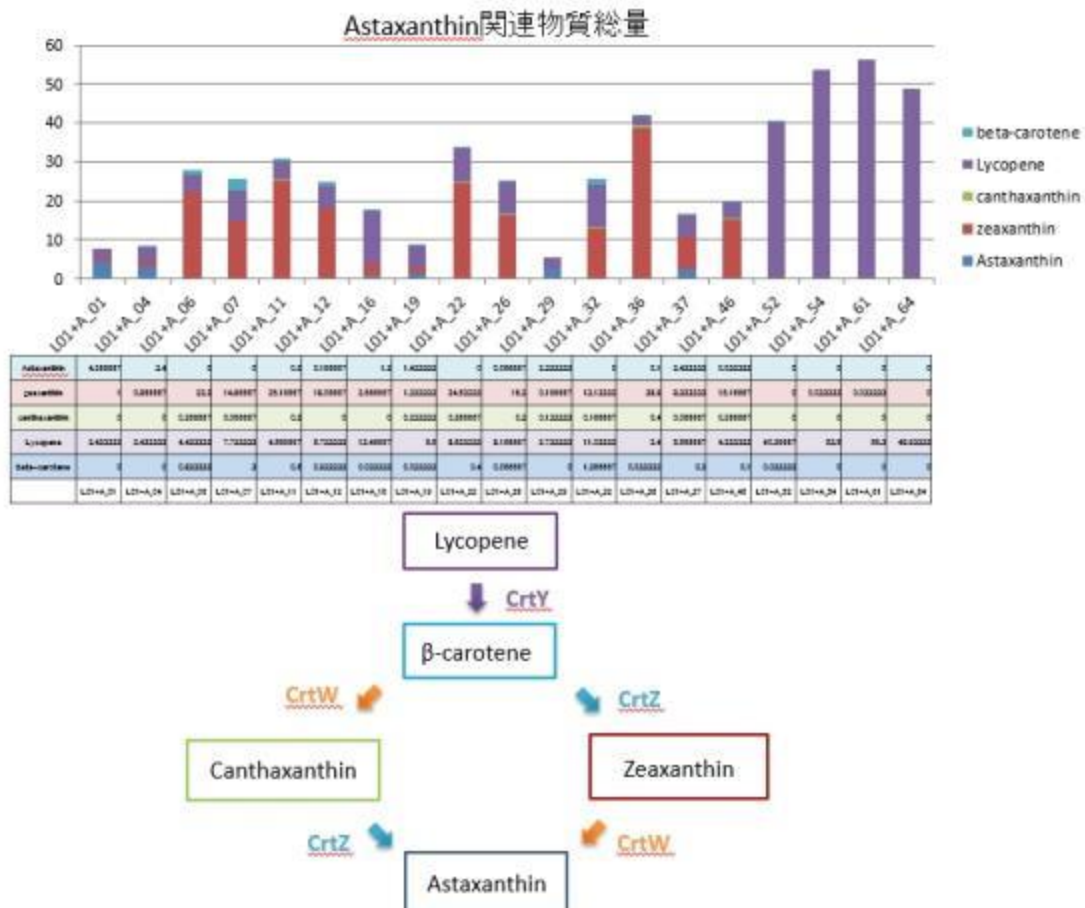
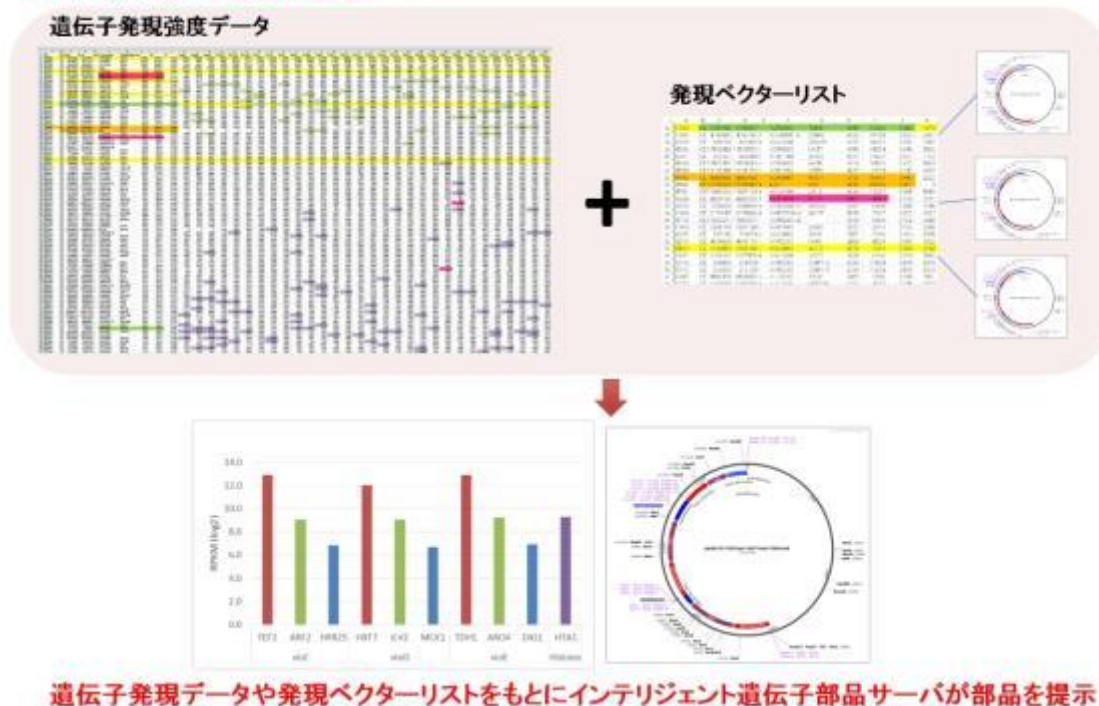


図 WG.2-6. 設計株別アスタキサンチン関連物質の総生産量およびその構成比

ビオラセイン生産バランス制御作業

生産宿主 *S.cerevisiae* にビオラセイン生合成5遺伝子を新規導入し、そのうち経路分岐点3遺伝子に関して強度の異なるプロモータ・ターミネータを置換し、ビオラセイン系4物質（Violacein, Deoxyviolacein, Proviolacein, Prodeoxyviolacein）の生合成比率を意図的に制御できることを実証した。プロモータ・ターミネータの強度については以前に行われたアレイによる酵母の発現解析結果を遺伝子部品データベースに登録し、GDCPFを経由してそれらの遺伝子パーツを今回の設計に供給した。

インテリジェント遺伝子部品サーバ



遺伝子発現データや発現ベクターリストをもとにインテリジェント遺伝子部品サーバが部品を提示

図 WG.2-7. インテリジェント遺伝子部品サーバからの部品提供

図 WG.2-7 に示す遺伝子部品データベースから、*S.cerevisiae* における発現強度が STRONG(RPKM 値が 7000~3000, TEF2p など)、MEDIUM(同 600~400、ARF2p など)、WEAK (同 20~10、DIG1p など) を得て、3 つの遺伝子がそれぞれ STRONG, MEDIUM, WEAK の異なる強度で発現するコンビナトリアルな組合せクラスターを GDCPF の combiOGAB ツールを用いて設計した。設計手順はアスタキサンチンの場合とほぼ同様であるため省略する。

今回の検証では、宿主ゲノムに組み込まずプラスミド上に 3 遺伝子を同時に集積することにしたため、1 遺伝子発現強化実験結果からデータにおいては、発現プラスミド上の位置が後方にずれるに従って予想通りの発現量が得られなかったケースがかなり生じた。このため、今後はプラスミド上の位置を加味した発現制御設計の必要性が示唆された。

強度の異なるプロモータ・ターミネータのコンビナトリアルな組合せ結果として得られたビオラセイン関連物質の生産量を測定した結果図 WG.2-8 に示すような生産量や物質構成比が得られた。これらにより、プロモータ・ターミネータのコンビナトリアルな置換による GDCPF 設計法が有効であることが示された。

Violacein関連物質総量

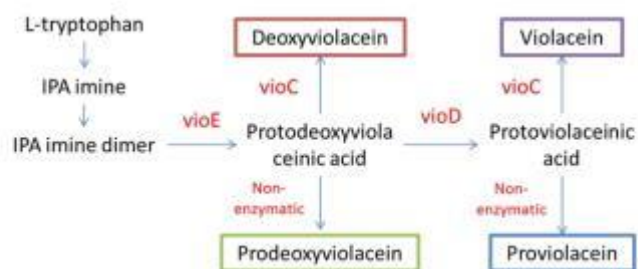


図 WG.2-8

プロモータ・ターミネータ強度の組合せによるビオラセイン関連物質の生産量と構成比

研究開発項目①「遺伝子設計技術の開発」

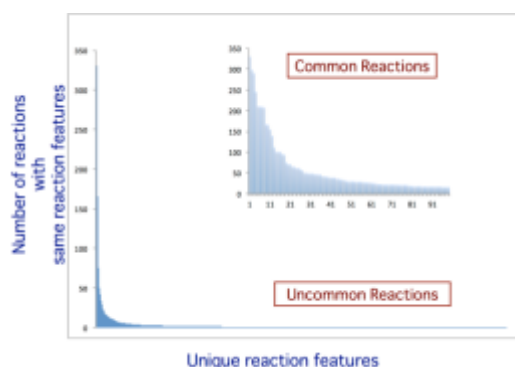
(1) 遺伝子クラスターの設計・構築技術の開発

(1-1) 新たな合成経路の設計・実践的な遺伝子回路の構築

【神戸大学、早稲田大学、京都大学（植田、小川）、千葉大学】

革新的なバイオマテリアル生産のための改変微生物を創出するためには、新たな合成経路を設計・構築する技術が不可欠である。たとえば、新たなバイオ合成経路を設計する技術を開発し、人工的な非天然型経路や未同定の天然型経路をデザインすることができれば、新規な機能性マテリアルの合成や、これまでは大量合成が困難であった化合物の生産、生産性・理論収率の向上など、革新的な代謝改変微生物の創製が可能となり、重要な GDC プラットフォームの一つとして利用できる。そこで、新たな合成経路を設計するためのバイオ合成経路の設計基盤を確立し、GDC プラットフォームとしての有用性を実証した。

バイオ合成経路の設計基盤には、データベース、反応比較方法、設計プロセス、代謝経路の評価技術、GUI(graphical user interface)などの要素技術の開発が必要である。そこで、代謝パスウェイの設計基盤をもとに、設計技術とユーザインターフェイスの高度化を行った。また、要素技術の高度化の一環として、KEGG・BRENDA データベースから得られる反応データの分類・整理を進めるとともに（図①-1-1-1）、合成経路の公開に向けた基盤構築を目的として、非天然アミノ酸・ケト酸を含む化合物データを PubChem データベースより取得し、網羅的な代謝パスウェイを出力した。得られた結果を独自に開発した化合物・パスウェイデータベース中に格納するとともに、これらの結果を統合したプラットフォームを構築した（図①-1-1-2）。



図①-1-1-1. 反応データ分類



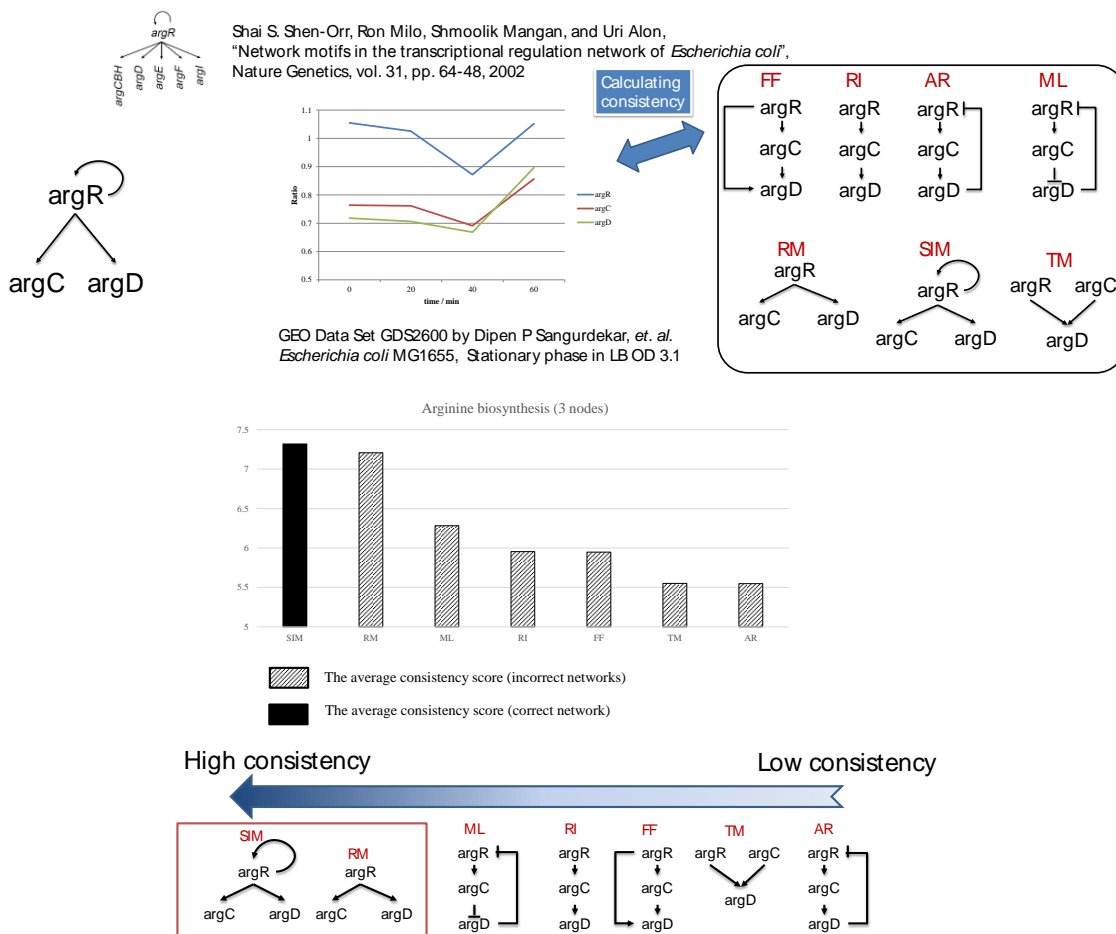
図①-1-1-2. 代謝パスウェイデータベース

合理的にデザインされた遺伝子回路を活用し、遺伝子発現や代謝フラックスを緻密に制御できる技術が確立できれば、バイオマテリアル生産微生物の生理的挙動を制御しつつ、ターゲット化合物の生産性を劇的に向上させることが可能となる。そこで、ネットワークの制御構造の候補が明らかである場合の人工遺伝子回路設計の基礎技術について、実データを用いる検討を行った。また、ネットワークの制御構造が不明である場合についても、効率的に動的ネットワーク推定を行うための技術開発を行った。

ネットワークの制御構造の候補が明らかである場合の人工遺伝子回路設計の基礎技術では、制御構造の候補を微分方程式モデルによって記述し、そこに測定時系列データ、および推定した微分値

を代入し、方程式系の残差を求めることにより、ネットワーク制御構造と測定データとの間の整合性を評価する。本手法により、複数のネットワーク制御構造の候補から測定データとの整合性があるものを選択することにより、効率的に制御構造を推定することが可能となる。本手法について、*E. coli*におけるアルギニン整合性経路およびサンプリングポイント数4点のマイクロアレイデータを用いた検証を行った。マイクロアレイデータに対する整合性を、7種類のネットワークモチーフに対応して任意に作成した制御構造についてそれぞれ計算した結果、正しい制御構造(SIMモデル)を選択することができた(図①-1-1-3)。

3 genes sub-network of Arginine Biosynthesis

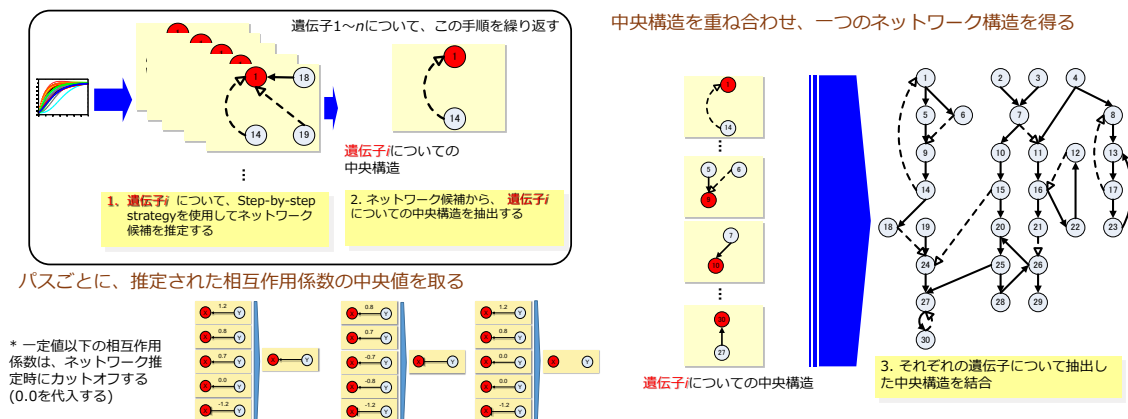


図①-1-1-3. ネットワーク制御構造と測定データとの間の整合性評価

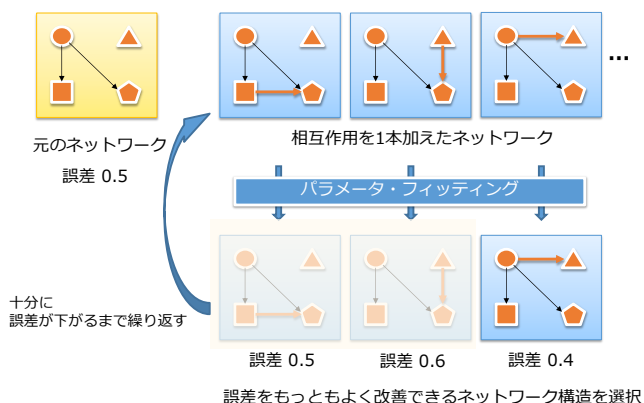
続いて、ネットワーク制御構造の候補が明らかでない場合の遺伝子ネットワーク推定技術について、Step-by-Step Strategy および Greedy Algorithm を導入することにより、ネットワーク推定の効率化を図った。Step-by-Step Strategy では、遺伝子数 n の動的ネットワーク推定において、同時推定が必要なパラメータ数が従来法の $O(n^2)$ から $O(n)$ へと減少するため、動的ネットワーク推定のスケーラビリティ向上を期待できる。また、Step-by-Step Strategy により推定されたネットワーク構造に対して、相互作用のカットオフを行いながら動的パラメータ・フィッティングと Greedy Algorithm とを組み合わせることで適用することにより、ネットワーク構造の簡素化を行う。以上の手順により、従来法では困難であった、30 遺伝子以上を対象とした動的ネットワーク解析を実現した(図

①-1-1-4)。

Step-by-Step Strategyによるネットワーク構造の推定



Greedy Algorithmによるモデルのリファイン



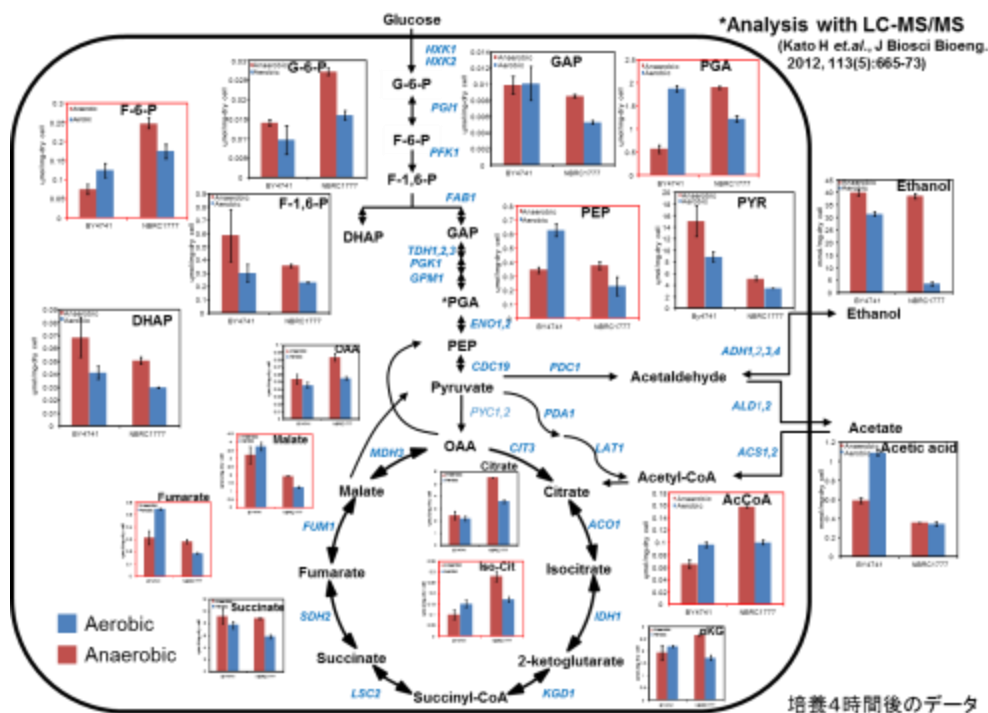
図①-1-1-4. ネットワーク制御構造の候補が明らかでない場合の遺伝子ネットワーク推定

Kluyveromyces marxianus は好気条件下において酸素消費抑制されず、エタノール蓄積が抑えられるクラブトリーネガティブの酵母であり、耐熱性も高いことからバイオマスからの有用物質生産の宿主として高いポテンシャルを秘めている。しかしながら、その糖代謝システムは詳しく分かっていない。そこで、*K. marxianus* の糖代謝システムを解明し、プロダクト高生産につながる代謝回路のボトルネックの絞り込みを行った。

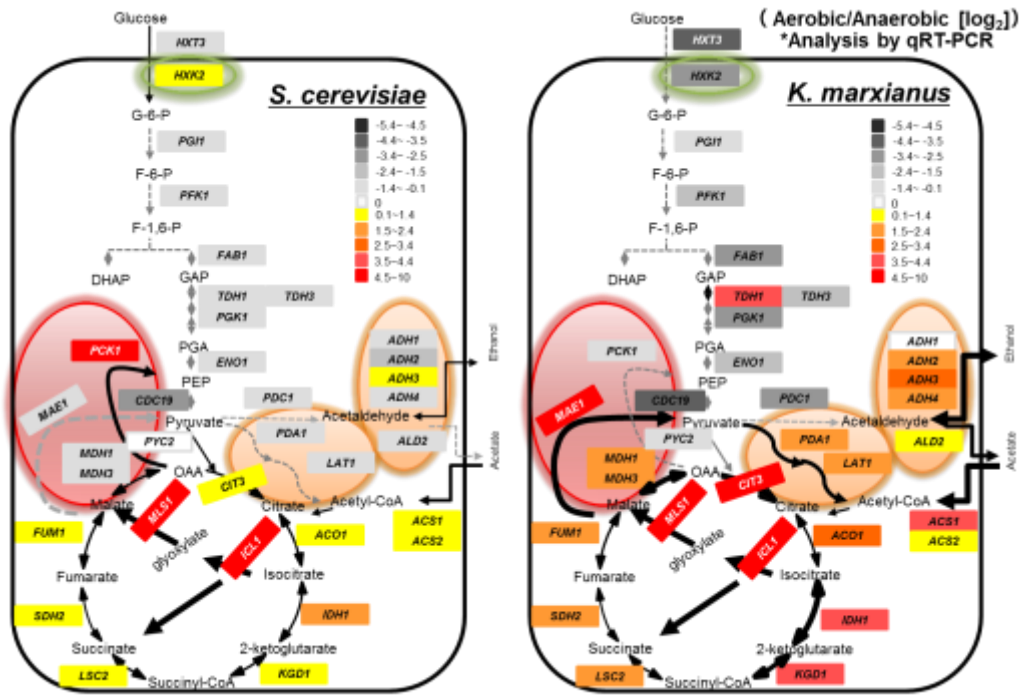
K. marxianus NBRC1777 株および *S. cerevisiae* BY4741 株を好気および嫌気条件で培養し、採取した細胞から RNA を抽出後、糖代謝系遺伝子、TCA 回路系遺伝子等の転写量を定量 PCR により測定し、好気条件が遺伝子発現に及ぼす影響を解析した。また、細胞内主要代謝産物を LC-MS/MS を用いてプロファイリングした。培養 4 時間後の、代謝物質測定の結果、G6P および F6P は好気、嫌気両条件において NBRC1777 株が BY4741 株より高濃度の蓄積がみられた (図①-1-1-5)。これは NBRC1777 株の方がグルコースの取り込みおよび解糖系上流の代謝が抑制されているためだと考えられる。また、代謝物質は測定した物質の大部分は嫌気で好気条件より高い蓄積量を示したが、BY4741 株において F-6-P、PGA、PEP の蓄積は逆転し、好気条件の方が約 2 倍増加していた。一

方で NBRC1777 では嫌気条件の方が高い蓄積量を示したことから、好気培養した時の両種間のピルビン酸以降のメインとなる代謝経路は異なっている可能性が推測された (図①-1-1-5)。また、転写量解析においては、好気条件の NBRC1777 株は BY4741 株と比較して *PDA1*、*LAT1*、*ADH2*、*ADH4*、*MDH1*、*MDH2*、*MAE1* で顕著に転写量の増大が認められた (図①-1-1-6)。代謝物量および転写物量測定の結果より NBRC1777 の好気条件での特徴は、ピルビン酸からアセチル CoA への変換反応が増大、TCA 回路の亢進、特にリンゴ酸の酸化脱炭酸反応が促進することであると推測される (図①-1-1-5、1-1-6)。また、NBRC1777 株の好気条件下について 2、4、6、8、10 時間培養した時の転写量および代謝物解析をした。その結果、グルコースが供給されている場合でもエタノール消費する回路およびグリオキシル酸回路、糖新生回路 (*ADH2*、*ALD2*、*ACS1*、*ICL1*、*MLS1*、*MDH1,3*、*MAE1*) の転写量が増大し、それに伴い糖新生の回路の代謝物量が増加する傾向が確認された (図①-1-1-7)。

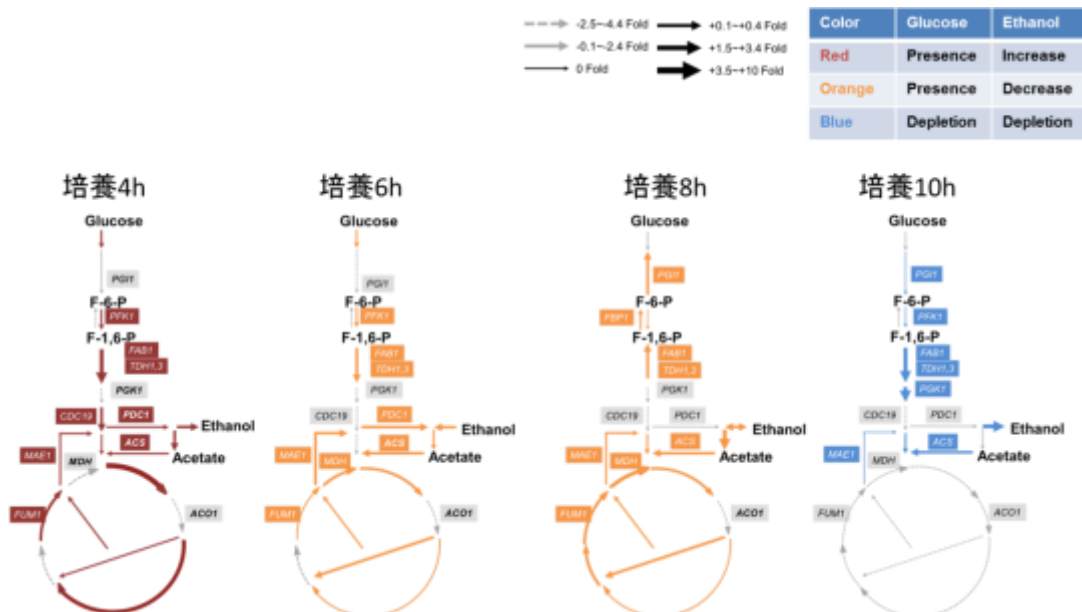
これらの結果より *K. marxianus* が *S. cerevisiae* より好気条件で積極的に酸素消費する理由として、グルコースの取り込みをコントロールできること、ピルビン酸およびエタノールを積極的にアセチル CoA へ代謝できること、さらにリンゴ酸を他の物質へ変換する回路を活発にすることが重要であることが示唆された。



図①-1-1-5. 培養 4 時間後の代謝物解析結果



図①-1-1-6. 培養4時間後の転写物量解析結果



図①-1-1-7. *K. marxianus* の好気条件下での代謝の経時的変化

長鎖 DNA を導入したイソブタノール生産酵母の構築

GDC プラットフォーム技術を利用した革新的なバイオマテリアル生産微生物の創出のための開発スキームを確立することを目的として、出芽酵母を宿主としたイソブタノール生産を行った。まず、酵母でのイソブタノール生産系においてこれまでに蓄積されている知見を元に、生産性向上に関わる 12 個の遺伝子をピックアップし (図①-1-1-8)、長鎖 DNA を用いて 1 つのベクターで 12 個

すべての遺伝子を過剰発現することを試みた。12個の遺伝子発現用に、グルコースでの発現用にカタログ化した中から発現強度の強いプロモーターを12種類選定し、これらのプロモーターを利用した酵母長鎖DNA発現用ベクターを作成し、さらに12個の遺伝子が挿入されるようOGAB法でアッセンブルし、イソブタノール生産用長鎖DNAを構築した(図①-1-1-9)。コントロールとして長鎖DNAのベクター(pGETS302)と構築したイソブタノール用の長鎖DNA(pGETS302-IBOH0001)を酵母に形質転換したところ問題なくコロニーを得ることができた(図①-1-1-9)。それぞれの形質転換体から10個ずつコロニーをピックアップし発酵したところ、イソブタノール用の長鎖DNAを形質転換した酵母はすべて50 mg/L以上のイソブタノールを生産し、うち2つのコロニーについては140~150 mg/L程度のイソブタノールを生産した(図①-1-1-10)。

真核生物での代謝工学

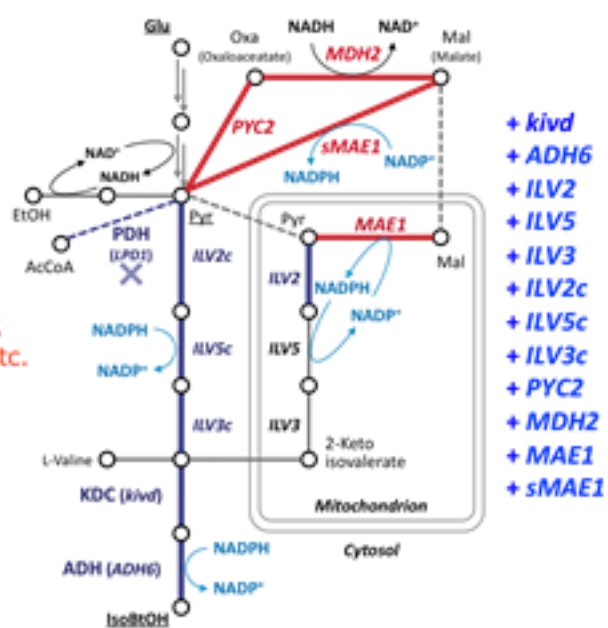
オペロン形式での発現ができないため、1遺伝子を発現するには、プロモーターとターミネーターをセットにした遺伝子発現ユニット(平均約3kbp)が必要

- ・ 標的代謝パスウェイの導入
- ・ 非天然パスウェイの予測
- ・ 基質特異性を改変した人工酵素の創出
- ・ 補酵素バランスを考慮したパスの最適化
- ・ フラックスを最大化するパスの最適化 etc.

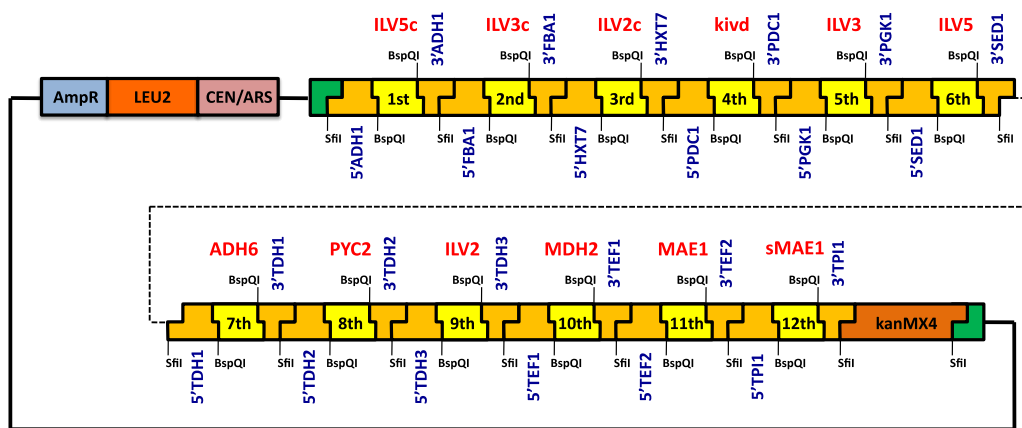
⇒ 最終的には、数十以上の遺伝子の発現、コントロールが必要

⇒ 数十kbp程度の長鎖DNA

酵母でのイソブタノール生産経路

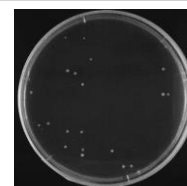


図①-1-1-8. 酵母でのイソブタノール生産性に関わる遺伝子群



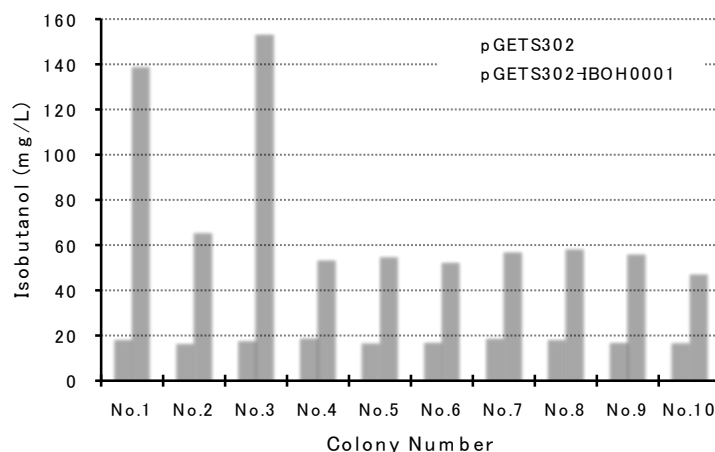
pGETS302-IBOH0001 (49463 bp)

□	DNA添加量(μL)	濃度(ng)	コロニー数	形質転換効率(cfu/μg)
pGETS302	2	79	84	1063
pGETS302-IBOH0001	1	179	8	45
pGETS302-IBOH0001	5	895	31	35



YPH499/pGETS302-IBOH0001
5μL(SD-Leu)□

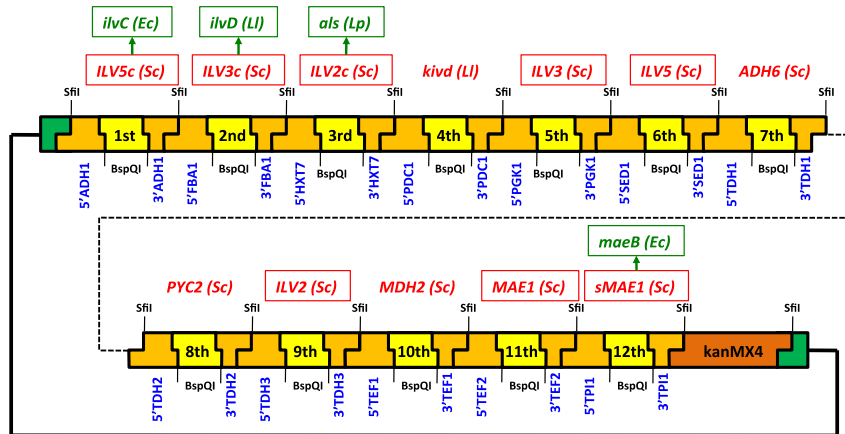
図①-1-1-9. イソブタノール生産用の 12 種類の遺伝子発現用長鎖 DNA の構築および形質転換



図①-1-1-10. 長鎖 DNA を導入した酵母菌体のイソブタノール生産性

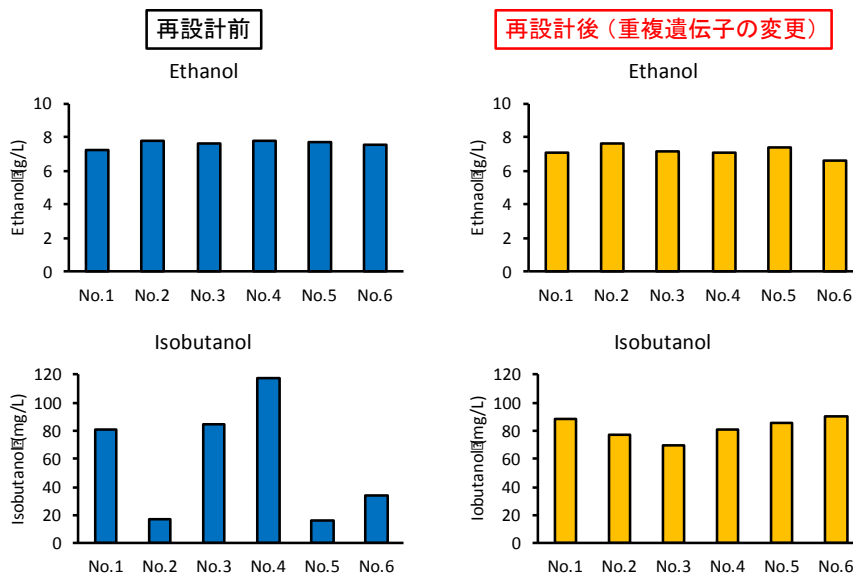
上述のようにイソブタノール生成に関与すると示唆された遺伝子群 12 個を挿入した酵母用の長鎖 DNA プラスミドを構築して酵母に導入することで、イソブタノールを生産する長鎖 DNA 保持酵母株の構築に成功したが、挿入した遺伝子群の中で野生型の酵素群 (Ilv2, Ilv5, Ilv3 および Mae1) とそれらのミトコンドリアシグナル配列を削除した Truncate 変異体群 (Ilv2c, Ilv5c, Ilv3c および sMae1) をコードする遺伝子が重複していたことから、長鎖 DNA 内で相同組み換えによる欠失 (ループアウト) が起こり、いくつかの遺伝子が抜け落ちた長鎖 DNA のバリエーションが生成されていることが分かった。そこで、これら重複する遺伝子配列を異なる微生物由来の遺伝子に置換することにより、遺伝子のループアウトが起こらないように考えた。

同じ配列を含む遺伝子（変異体）の間でループアウトすることがある
 → ソースとなる遺伝子配列を設計・変更



図①-1-1-11. 重複する遺伝子を置換したイソブタノール生産用長鎖 DNA

図①-1-1-11 に示すように、出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の *ILV2c*, *ILV5c*, *ILV3c* および *sMAE1* 遺伝子をそれぞれ、バクテリア由来の *als*, *ilvC*, *ilvD* および *maeB* 遺伝子に置換するように設計し、新たな長鎖 DNA を構築した。設計変更前の長鎖 DNA と設計変更後の長鎖 DNA をそれぞれ酵母に導入し、6 コロニーずつエタノールとイソブタノールの生産性を評価した。図①-1-1-12 に示すように、設計変更前の長鎖 DNA を導入した酵母ではエタノールの生産量に対してイソブタノール生産量がコロニー毎に大きくばらついていることが確認された（図①-1-1-12 左）。これは、重複する遺伝子間のループアウトによって、様々な長鎖 DNA のバリエーションが作られてしまったことを示している。一方、重複する遺伝子をバクテリア由来の遺伝子に置換した設計変更後の長鎖 DNA を導入した酵母では、エタノールの生産量とイソブタノール生産量の生成比がほぼ同じであることが明らかとなった（図①-1-1-12 右）。つまり、新しく作成した長鎖 DNA 内で遺伝子のループアウトが起こらず、同じ配列の長鎖 DNA が保持されていることを示唆している。このように、導入する遺伝子をデザインすることで、ループアウトの起きない長鎖 DNA の設計が可能となった。



図①-1-1-12. 重複遺伝子を置換した長鎖 DNA 導入後のエタノールとイソブタノール生産量

鍵となるタンパク質群の高活性化および基質特異性改変技術

代謝経路中における鍵酵素を高機能化するエネルギー・酸化還元バランス制御ツールの開発に関して、(I)還元力再生系の構築、(II) α -ケトグルタル酸 (α KG) 供給系の構築、(III) アシル CoA リサイクリング系の構築、(IV) ATP 再生系による高エネルギーリン酸化合物供給系の構築、(V)電子伝達効率化系の構築に貢献した。

転写因子改変による代謝経路の調節

本研究は、生体触媒反応を効率良く進めるために有用な形質を持った微生物の作製を目指している。具体的には立体選択的な還元反応に有用な生体触媒であり、工業的にも広く用いられている酵母を対象とした。複数の遺伝子上流で包括的制御を行う転写因子を改変することによって、生体触媒反応中の過酷な環境条件下でも生育可能となるようストレス耐性の付与を目的とし、物質生産の向上に貢献した。

実践的な遺伝子回路の設計・構築

本研究では、合成生物学による物質生産の基盤技術として、人工遺伝子回路による細胞の多様化を精緻に制御する技術の開発を計画した。研究の過程で、制御用の人工遺伝子回路が、物質生産系など下流の遺伝子によって、その動特性に影響を受けてしまうことが、モデリングによって判明した。そこで、顕微鏡を使用した細胞の内部状態の追跡の基盤を確立し、細胞内部状態の経時観察を行うことによって、人工遺伝子回路の挙動を示す数理モデルを検証し、新たなモデル化の手法を確立した。さらに、細胞種多様化に基づいた物質生産系の構築を進め、細胞の多様化を制御する細胞間通信分子の分解に相当する培地の希釈での多様化が可能であることを示すとともに、頑健な生産系を構築することに成功した。

遺伝子スイッチの進化工学技法の開発、及びその量産と改良

細胞内に人工の代謝経路を導入する際、それが最も高いパフォーマンスを発揮するためには、生合成経路を構成する酵素遺伝子ひとつひとつの発現量とタイミングを、任意かつ自由に制御できることが望ましい。そのためには、様々な化学・物理刺激を入力とする遺伝子発現誘導系をシリーズで取り揃える必要がある。また、その発現誘導の程度(出力強度)、緊縮性(漏れの少なさ)、誘導にかかる時間など、遺伝子誘導系の「スイッチ特性」へのスペック要求は、様々である。再委託先である千葉大学では、自然界の転写スイッチや翻訳開始スイッチを基本とし、これらを進化工学的に改変する技術の確立、それを用いて様々の遺伝子発現誘導系を組織的に作り揃えることをめざし、下記の項目を実施した。

- [1] 高速な遺伝子スイッチ工学を実現するセレクト系の開発
- [2] スwitchセレクトを用いた大腸菌のゲノム編集操作の高速化・自動化
- [3] コリン誘導系の進化デザイン
- [4] トリプトファンスイッチの高性能化
- [5] 新規誘導システムの進化デザイン

(1-2) 遺伝子クラスターの設計及び最適化

【産業技術総合研究所、国立遺伝学研究所】

効率的物質生産を実現するためには、必要な遺伝子回路を宿主細胞内で活性化させ遺伝子発現量の調節する転写段階と、転写産物から翻訳されるタンパク質を調整する翻訳段階の2つを統合的に制御する必要がある。本課題は、合成回路の構成要素であるタンパク質のコード領域および制御領域を含めた遺伝子クラスター全体を設計し、基質生産とエネルギー状態を考慮した培養条件の下で目的タンパク質の発現を最適化する技術の開発を目標としている。

与えられたアミノ酸配列に対して翻訳レベルでの制御に着目して最適な mRNA 配列を設計するため、アルゴリズムの改良を行った。また、RNA-seq による遺伝子発現解析を用いて、有用物質の合成遺伝子と高生産化のための鍵遺伝子の探索を行った。さらに、微生物による物質生産に活用するために改良してきた酵素データベース EzCatDB の公開を行ってきた。

[1] 2次構造のタンパク質発現への影響を考慮した配列設計

タンパクコード領域 (CDS) 内の RNA2 次構造は、mRNA の翻訳効率に影響を与えられられる。CDS 内部における2次構造の影響を調べるための配列設計、及び実験を平成27年度までに実施した。Codon Adaptation Index (CAI) や GC 含量などの配列特徴を固定し、2次構造だけが大きく異なる CDS の塩基配列を複数設計し、それら CDS から生産されるタンパク質を測定した。また、タンパク質生産量の違いが、2次構造のみに起因するものなのか、GC 含量などの他の配列特徴に起因するものなのかを切り分けるため、ほぼ同じ CAI を持つが、GC 含量や2次構造が大きく異なる CDS を、10種類設計した。タンパク質の測定は、神戸大学石井グループにより行われた。CDS 内の RNA2 次構造は、翻訳伸長を阻害し、結果としてタンパク生産量を下げる要因だと考えられてきたが、この実験により、その影響は単純ではないことが明らかとなった。

配列設計のアルゴリズムとしては、平成27年度までに、同じアミノ酸配列をコードしながら、多様な遺伝子配列を設計できるアルゴリズムをした。中でも、最も安定な2次構造を持つ配列を得る動的計画法のアルゴリズムと、安定な2次構造を持たない配列を高速に設計するアルゴリズムは上記の実験に活用された。これらのアルゴリズムを多様な条件で動作可能とするため、相同組み換え等を考慮したアルゴリズムを開発した。

[2] 抗菌性環状ペプチド化合物 KK-1 生産鍵遺伝子の探索 (クマイイ化学との共同)

Curvularia sp. はドラフトゲノムが解読済みの糸状菌で抗菌性環状ペプチド化合物 KK-1 の生産菌である。KK-1 生産にかかわる遺伝子クラスターはすでに同定されており、その中に TF と NRPS 遺伝子が存在する。TF を高発現化あるいは破壊することで、KK-1 の生産量は2倍に増えあるいは消失することがわかっている。また、培地に KK-1 の構成要素である Val や Ile の添加で KK-1 の生産が抑制され、Tyr 添加で遅延される。

TF の高発現化では、クラスター内遺伝子の多くの発現が向上するが、クラスター外では、N 源異化抑制遺伝子、分子シャペロン等少数が向上した (図①-1-2-1)。

一を大腸菌向けに構築した。それらの中から合成量の多いものを選抜することで従来報告されてきた量を上回るアスタキサンチン（カロテノイドの一種で商業利用される）を合成できた。

(2) 遺伝子クラスターの効率的導入技術の開発

(2-1) 遺伝子クラスターの効率的導入技術の開発

【慶應義塾大学、産業技術総合研究所、神戸大学】

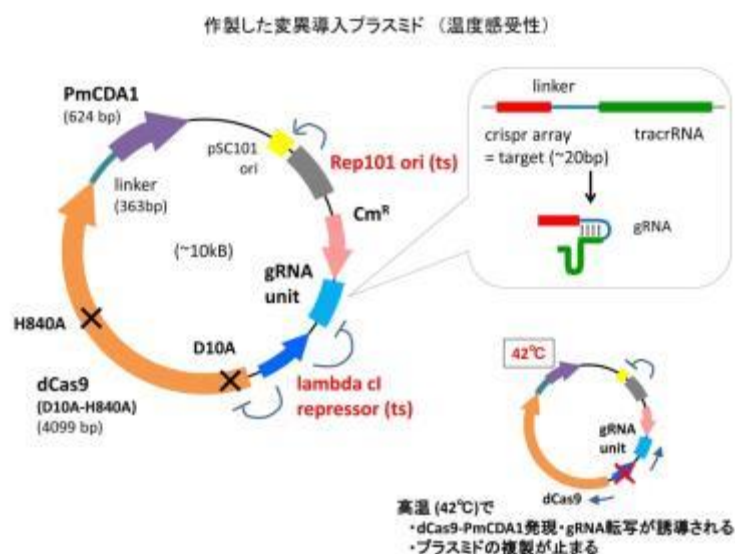
中間評価までに、酵母—大腸菌—枯草菌の複製単位を有する3者間ベクタープラスミド (pGETS3XXシリーズ)、糸状菌—大腸菌—枯草菌との3者間ベクタープラスミド (pGETS4XXシリーズ) を構築し、OGAB法での遺伝子クラスター作製に直接利用されている。中間評価後は麴菌への導入効率上昇に絞って開発した。麴菌へのDNA導入はプロトプラストPEG法で行い、導入効率を上げるためにOGABプラスミドを大腸菌から精製する過程に工夫を加えた。結論として40kb (4万塩基対) の長鎖DNAでも、条件を最適化し試行数を増やせば安定して麴菌の形質転換体は得られるが、そのために大量のDNAが必須な点と長鎖になれば効率低下は避けられない点が示された。第一世代の3者間ベクター (pGETS3XX)、(pGETS4XX) は50kbp以下のサイズのDNA保持は保証されているが、それより大きなサイズの遺伝子クラスターには第二世代のOGABプラスミドベクターの開発が必要である。100kbp (10万塩基対) を保持できる実績がある枯草菌プラスミドを対象に選んだが設計段階にとどまった。

(2-2) 遺伝子クラスター導入微生物におけるゲノム最適化技術開発

【神戸大学、産業技術総合研究所】

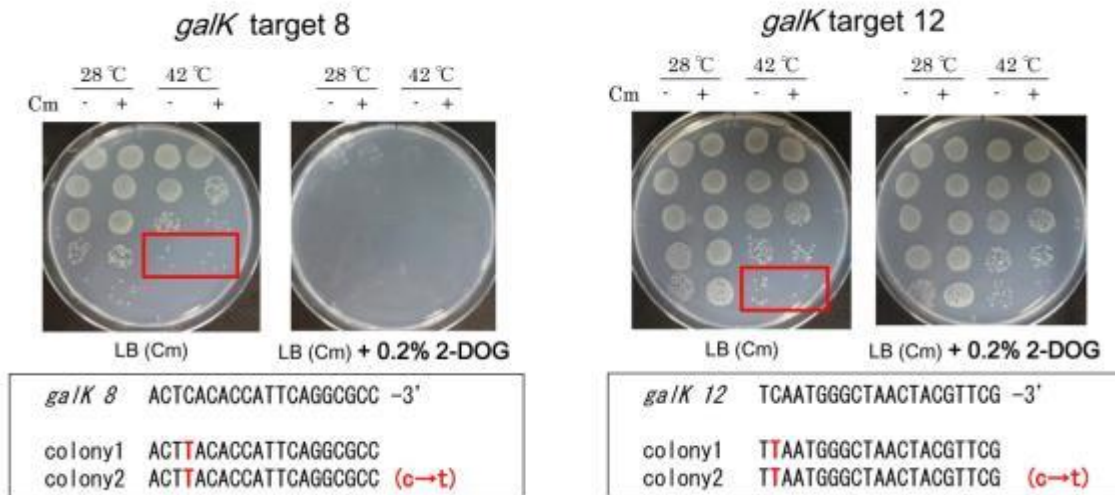
効率的なゲノムデザインによる有用物質生産を実現するには高度な遺伝子操作手法の開発が重要である。近年開発された ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 等の人工ヌクレアーゼによるゲノム編集技術は、様々な生物材料での遺伝子ターゲティングの可能性を飛躍的に高めたが、微生物等においては染色体を切断するプロセスによって致死的である場合が多く、現状そのままでは適応が困難である。本研究では、“DNA を切らないゲノム編集法”によって細胞内でゲノムを直接書き換えるという、新しい技術が大腸菌において開発して確立することを目的とした。

DNA を切断しないで直接標的配列に変異を導入できる技術が確立できれば、DNA シチジン脱アミノ化酵素を特異的 DNA 配列認識モジュールに結合させることで、標的配列において塩基変換反応を引き起こして変異を導入することを期待し、まず大腸菌を用いての実証と技術の確立を行った。DNA 配列認識モジュールとして nuclease 不活型の dCas9 とヤツメウナギのシトシン脱アミノ化酵素 PmCDA1 を融合した dCas9-PmCDA1 と配列認識に必要な gRNA-crispr-unit を乗せたプラスミドを構築し、大腸菌で直接変異導入する系を確立することが出来た。さらに改変型の温度依存性プラスミドとしてラムダリプレッサーの系を導入して再構築を行い、37°C で変異誘導をかけると共にプラスミドの脱落を行うことが出来るようになり、変異導入効率の最適化とプラスミド除去を行えるようにしてさらに実用性を向上させた (図①-2-2-1)。

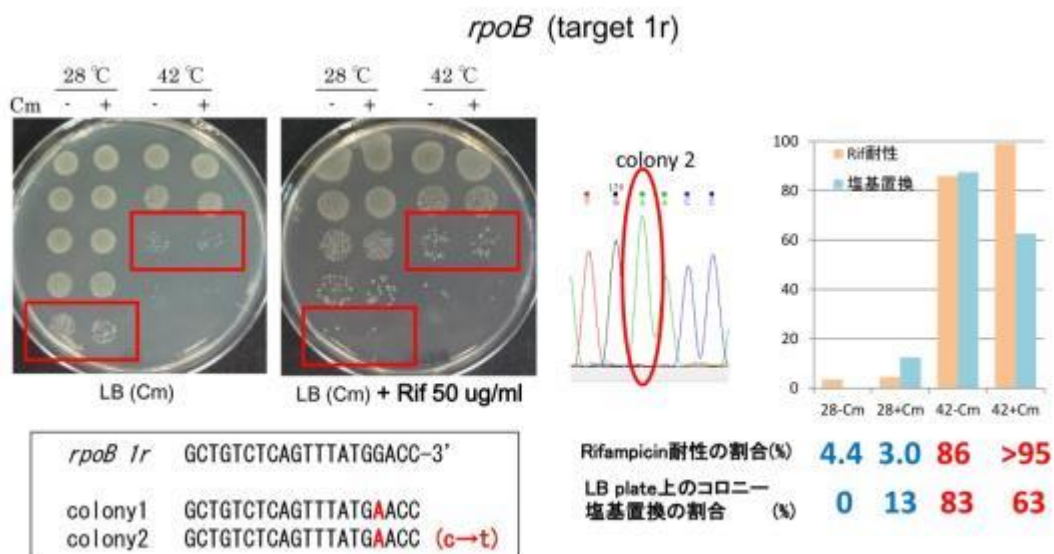


図①-2-2-1. 大腸菌用の切らないゲノム編集プラスミド

実際の変異導入実施例として大腸菌 *galK* 遺伝子の二つの領域をターゲットとした場合 (図①-2-2-2)、および *rpoB* 遺伝子をターゲットとした場合 (図①-2-2-3) の結果を示す。いずれの場合も高い効率で狙った点変異が導入されており、特に *rpoB* の場合は必須遺伝子であることから、必須遺伝子を直接書き換えることが出来る技術として非常に高い進歩性が示すことができたと考えている。



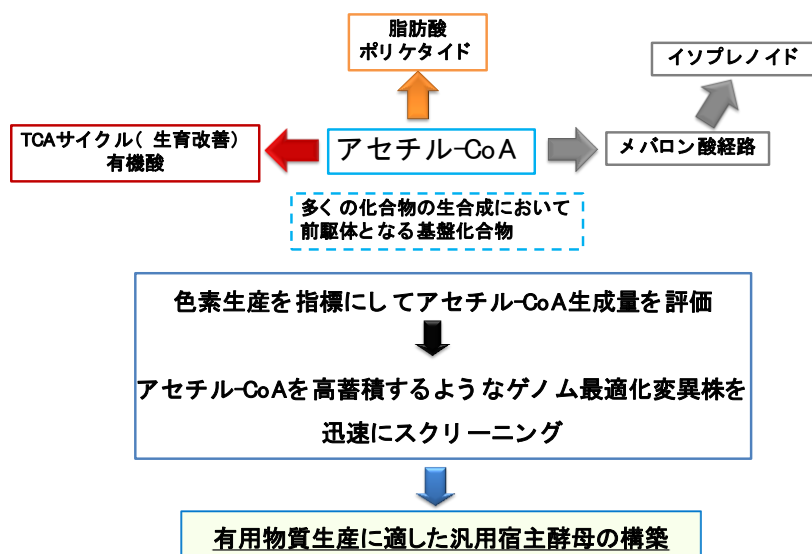
図①-2-2-2. 大腸菌 *galK* 遺伝子をターゲットとした変異導入例



図①-2-2-3. 大腸菌 *rpoB* 遺伝子をターゲットとした変異導入例

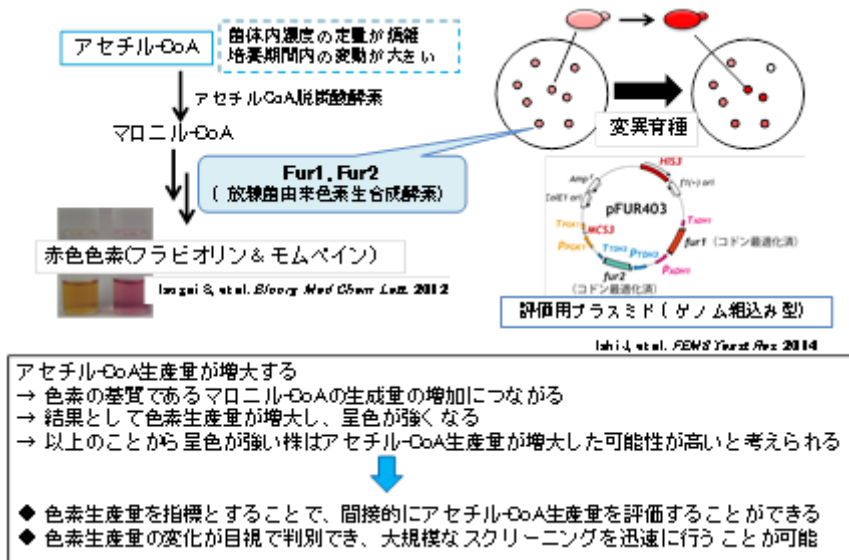
ゲノム最適化技術を考える上で、目的化合物の生産性を向上させるために、微生物体内における前駆体蓄積の増大や副産物生産の抑制が重要となる。そのような特性を有する宿主を開発するために、有用物質生産の基盤化合物であるアセチル-CoAに着目した。生育に必須であるだけでなく、有機酸や脂肪酸、ポリケタイドやイソプレノイドなどの多くの有用物質の生合成において、アセチル-CoAは経路の上流に位置する基盤化合物であり、アセチル-CoA高蓄積株は有用物質生産のための宿主として高いポテンシャルを持つと言える。そこで本研究では、アセチル-CoAを高蓄積するようなゲノム最適化変異株を迅速にスクリーニングすることを目的として、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を対象に色素を指標とした間接的なアセチル-CoA生産量評価アッセイ系を開発した。この評価アッセイ系を用いて大規模スクリーニングを行うことで、有用物質生産に適した汎用宿主の

構築が可能である。



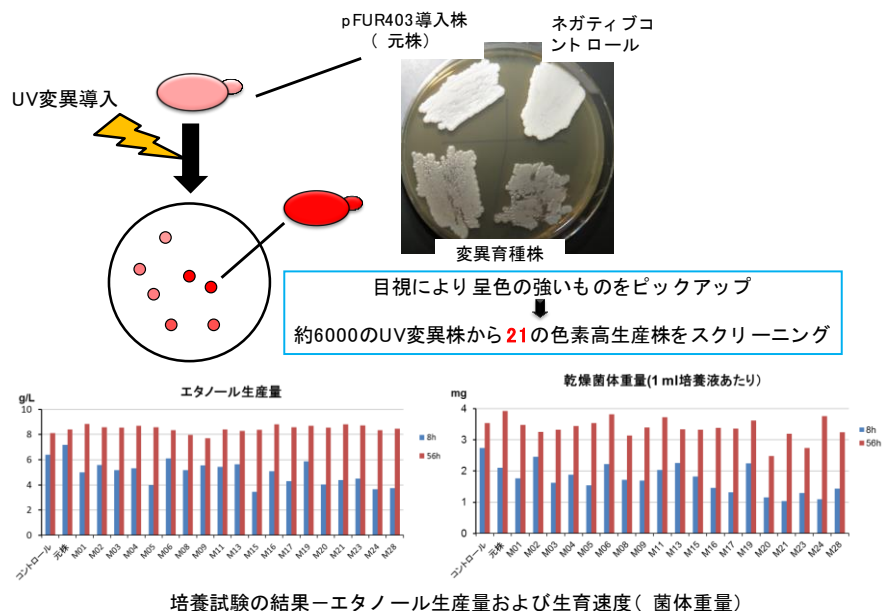
図①-2-2-4. 有用物質生産に適した汎用宿主構築

本研究で目的とするアセチル-CoA 高蓄積株の取得のためには、作製した変異育種株のアセチル-CoA 生産量を定量的に評価する必要がある。しかしながら、細胞内のアセチル-CoA 量の定量は煩雑で時間を要するため、大規模なスクリーニングを行うことが難しい。加えて生体内のアセチル-CoA は様々な経路で代謝されているため、培養期間内での変動が大きく実際のアセチル-CoA 生産能力を反映できていない可能性もある。そこでハイスループットに生産量を評価するために、マロニル-CoA を赤色色素へと変換する代謝経路を組み込んだ、色素生産量を指標とした間接的なアセチル-CoA 生産量評価アッセイ系の開発に取り組んだ。まず、アセチル-CoA 生産量が増大した場合、基質のプールが増加したことによりマロニル-CoA 生成量も増加すると推測できる。次にマロニル-CoA 生成量が増加すれば、マロニル-CoA を基質とする色素の生産量も増大し呈色が強くなると推測できる。以上の点を考え合わせれば、呈色の強い株（色素高生産株）ではアセチル-CoA 生産量が増大した可能性が十分に期待できると考えられる。また、呈色の差で有望株を選択することから、スクリーニングを目視で行うことができ、大規模スクリーニングが容易である。そこでマロニル-CoA を基質として赤色色素フラビオリンおよびモムペインを生合成する放線菌由来の遺伝子 *fur1* および *fur2* を用いて、評価用プラスミドを作製し評価アッセイ系を構築した。(図①-2-2-5)



図①-2-2-5. 色素生産を指標とした間接的なアセチル-CoA 生産量評価系

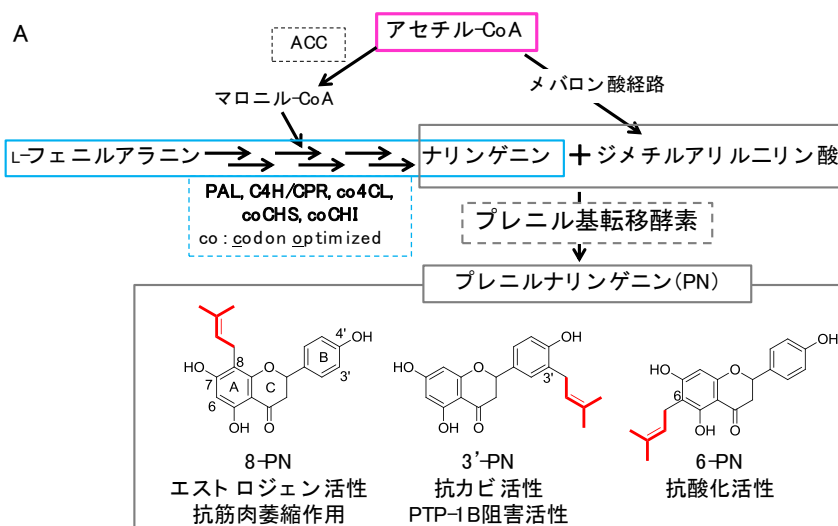
安定的に遺伝子が発現するように色素合成遺伝子をゲノムに組み込んだ株を作製し、その株に対してUV照射によるランダム変異導入を用いた大規模スクリーニングを行った。その結果、約6000の変異株ライブラリーから21の色素高生産株を取得した。さらに得られた全ての株に関して生育速度、グルコース消費量、エタノール生産量の比較を行った。その結果、有用な形質であるエタノール生産抑制を示す株を得ることはできなかった。一方で生育が大きく落ちた株は一株のみであった。(図①-2-2-6) 生産性向上に寄与する遺伝子変異の同定には至らなかったものの、アセチル-CoA生産量が増加したと期待できる株を複数取得できた。



図①-2-2-6. UV 変異導入によるスクリーニング結果と取得色素高生産株の培養試験結果

物質生産のモデルとして、*S. cerevisiae* におけるプレニルナリゲニン生産系の開発を行った。フラボノイド類は抗酸化活性に代表される多様な生理活性を有することが報告されており、一般に

も健康増進効果が期待できるとしてサプリメントなどが販売されている。さらにプレニル基転移酵素によって修飾されたプレニルフラボノイドは、抗ウイルス活性や女性ホルモン様活性などの有用な生理活性を示す化合物が単離されており、またプレニル化によって元のフラボノイドの数十倍の活性を発揮したり、新たな活性を取得したりする化合物も存在する。しかしながら、これらのプレニルフラボノイドは天然で植物体でのみ生産され、生産量が少なく精製が困難であることから利用可能な資源であるとは言い難い。そこで *S. cerevisiae* におけるプレニルナリンゲニン生産系の開発に取り組んだ。*Sophora flavescens* (クララ) 由来のプレニル基転移酵素 SfN8DT-1 を用いた先行研究において、クマル酸やナリンゲニンといった中間産物からの 8-プレニルナリンゲニンの生産例は報告されているものの、その他のプレニル化ナリンゲニンを植物体以外で生産した例の報告はない。そこで、生合成経路はナリンゲニンまでは同一のものを設計し、プレニル化を担うプレニル基転移酵素のみが異なる株を構築することで、8 位以外の位置が修飾された化合物を生産させることを試みた。そのために基質特異性が厳密な植物由来 SfN8DT-1 だけではなく、基質特異性が寛容で *in vitro* においてフラボノイドも基質とすることが報告されている放線菌、糸状菌から 11 のプレニル基転移酵素を選出した。

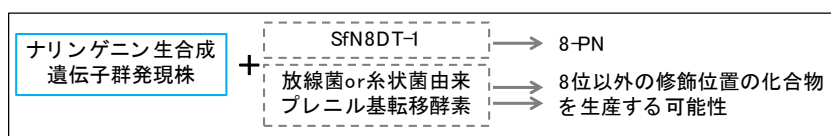


B

プレニル基転移酵素

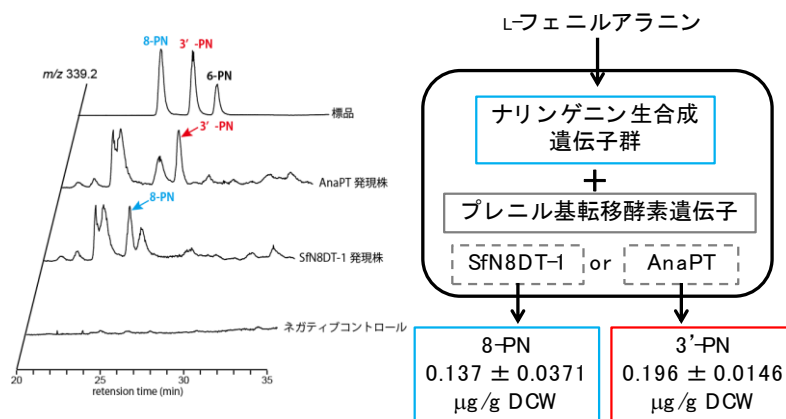
ソース	遺伝子名	基質特異性	活性	
			in vitro	in vivo
植物	SfN8DT-1	厳密	○	○
放線菌	SCO7190, NovQ	寛容	活性を示すものがあり	不明
糸状菌	5-DMATS, 6-DMATS, 7-DMATS, AnaPT, CdpC3PT, CdpNPT, FgaPT2, FtmPT1	寛容	活性を示すものがあり	不明

Sasaki, K, et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009
 Ha Oxu Li, et al. *Plant Physiology.* 2015



図①-2-2-7. A. プレニルナリンゲニン生産系の概要
 B. プレニル基転移酵素の種類と基質特異性

まず、酵母における、図①-2-2-7A で青枠で囲ったナリングニン生産に必要な6つの遺伝子の発現系を構築した。コドン最適化により発現を強化する、ゲノムに組み込むことで安定的に発現させるといった発現系の最適化により、ナリングニンを安定的に生産する系を開発できた。そこで、図①-2-2-7B に示した12のプレニル基転移酵素遺伝子をそれぞれ発現させ、プレニルナリングニンの生産を試みた。各遺伝子発現株の菌体破砕液を用いた酵素反応においてプレニル化活性が観察され、これらのプレニル基転移酵素は酵母内で活性を有することが確認できた。さらに生産試験を行った結果、プレニル基転移酵素 AnaPT (*Neosartorya fischeri* NRRL 181 由来)発現株において3'-プレニルナリングニンの生産に成功した。これは植物体以外で3'-プレニルナリングニンを生産した初めての例であり、基質特性の寛容なプレニル基転移酵素を用いることでプレニル基の修飾位置の可能性を広げることができた(図①-2-2-8)。3'-プレニルナリングニンはPTP-1B (protein tyrosine phosphatase 1B, チロシン脱リン酸化酵素)阻害活性を有しており、PTP-1Bは主にII型糖尿病治療のターゲットとなることから、今後生産性を向上させることで安価かつ多量な供給が可能になれば、PTP-1B 阻害活性における構造活性相関についての研究や、その知見をII型糖尿病治療薬へと応用が期待される。



- ◆ 基質特異性の寛容な酵素を利用することで、天然では未発見の酵素が触媒する反応を、in vivoで行うことができた
- ◆ プレニル基の修飾位置の可能性を広げることができた

図①-2-2-8. 構築した株における3'-プレニルナリングニンの生産

(3) GDCのプラットフォーム化技術開発

(3-1) リバースエンジニアリング技術開発

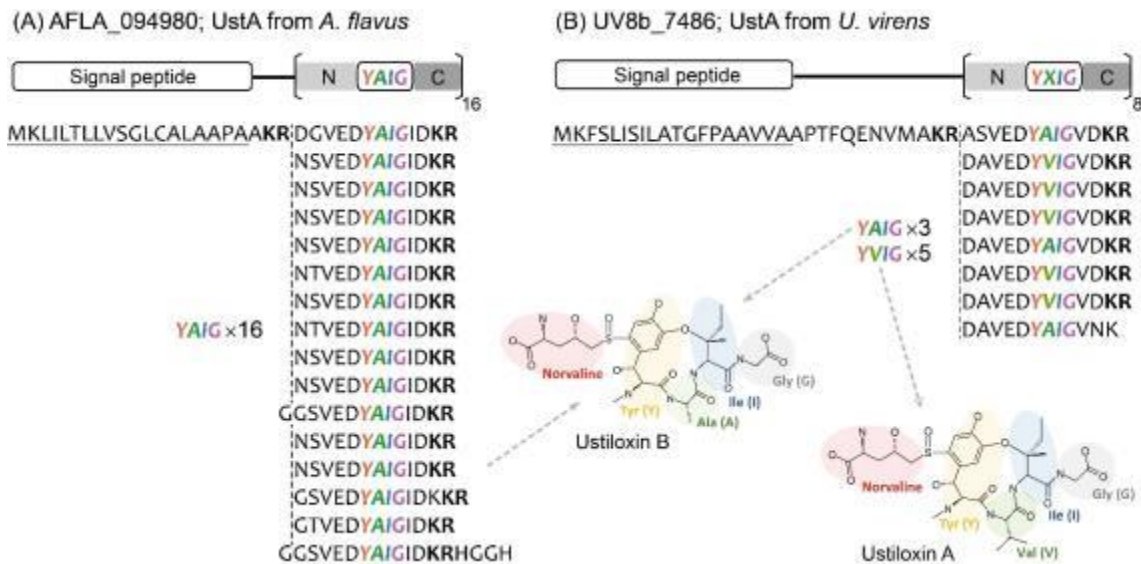
【産業技術総合研究所、神戸大学、アステラス製薬(株)】

二次代謝遺伝子クラスターの予測技術

[1] 転写発現情報を利用した配列情報に依存しない予測技術の開発とその応用

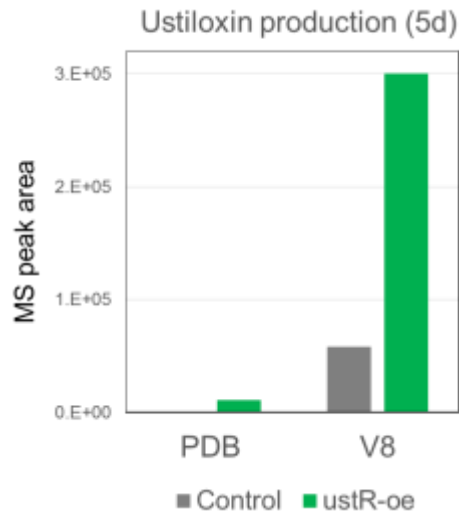
MIDDAS-M (Motif-Independent De novo Detection Algorithm for SMB gene clusters) 法の高感度化と高精度化を目的として、二次代謝物質を旺盛に生産することが知られている *Aspergillus flavus* を用いて、多数の発現情報から MIDDAS-M 法によって予測された二次代謝系遺伝子クラスターについて、遺伝子破壊と LC/MS によるバリデーションの生物実験を実施した。これにより、GCD 法によって検出された二次代謝系遺伝子クラスターのひとつが Ustiloxin B の生合成に関わっていることが明らかとなった。

Ustiloxin は、糸状菌 *Ustilaginoidea virens* によって産生される二次代謝物質である(諏訪 (1915) 医学中央雑誌 13:661-686)。これまでに、糸状菌 *Aspergillus flavus* においても本化合物を産生されることを、その生合成遺伝子クラスターとともに報告している (Umemura et al. (2013) Plos One 8:e84028)。さらに配列解析と遺伝子破壊による化合物産生確認から、ustiloxin 生合成遺伝子群は、化合物の骨格構造が前駆体遺伝子に直接コードされた、糸状菌で初めてのリボソームペプチド生合成 (RiPS) 経路であることを明らかにした (Umemura et al. (2014))。また本化合物を産生する *U. virens* 株のゲノム配列解析を行い、*U. virens* においても ustiloxin は RiPS 経路によって生合成されることを強く示唆する結果を得た (Tsukui, et al. (2015), Kumagai et al. (2016))。すなわち、*A. flavus* の前駆体タンパク質 UstA に対応する *U. virens* 前駆体タンパク質は化合物の骨格となるコアペプチドとして YVIG が 5 回、YAIG が 3 回繰り返したモチーフを持つ一方、*A. flavus* の UstA では YAIG のみ 16 回繰り返している (図 1-1-1)。これは、*U. virens* が YVIG および YAIG がそれぞれ環状化した ustiloxin A および B の双方を産生するのに対し (Koiso et al. (1994) J. Antibiot. 47:765-73)、*A. flavus* が後者のみを産生する事実に合致する。以上のことなどより ustiloxin は、*U. virens* においても、NRPS ではなく RiPS 経路によって生合成されることが強く示唆された。

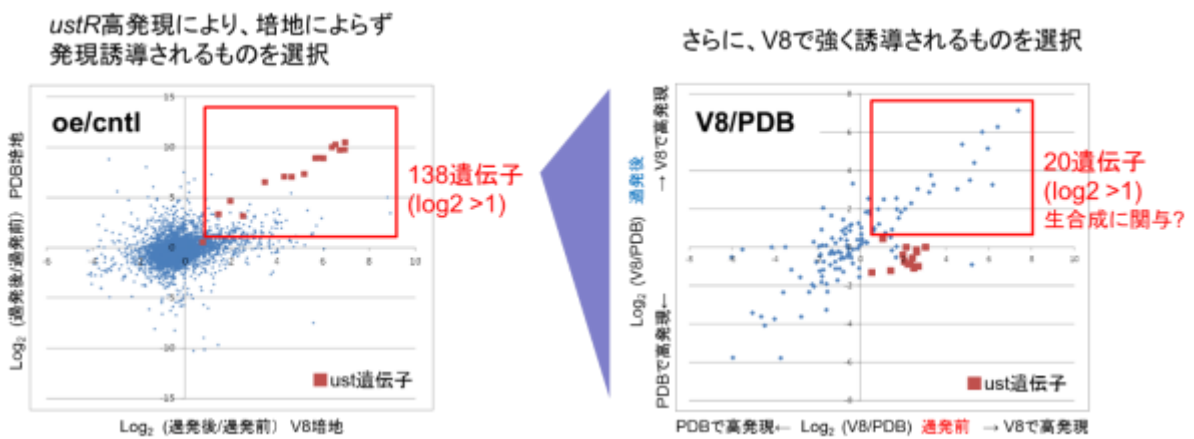


図①-3-1-1. *A. flavus* および *U. virens* における ustiloxin 前駆体タンパク質 UstA 配列

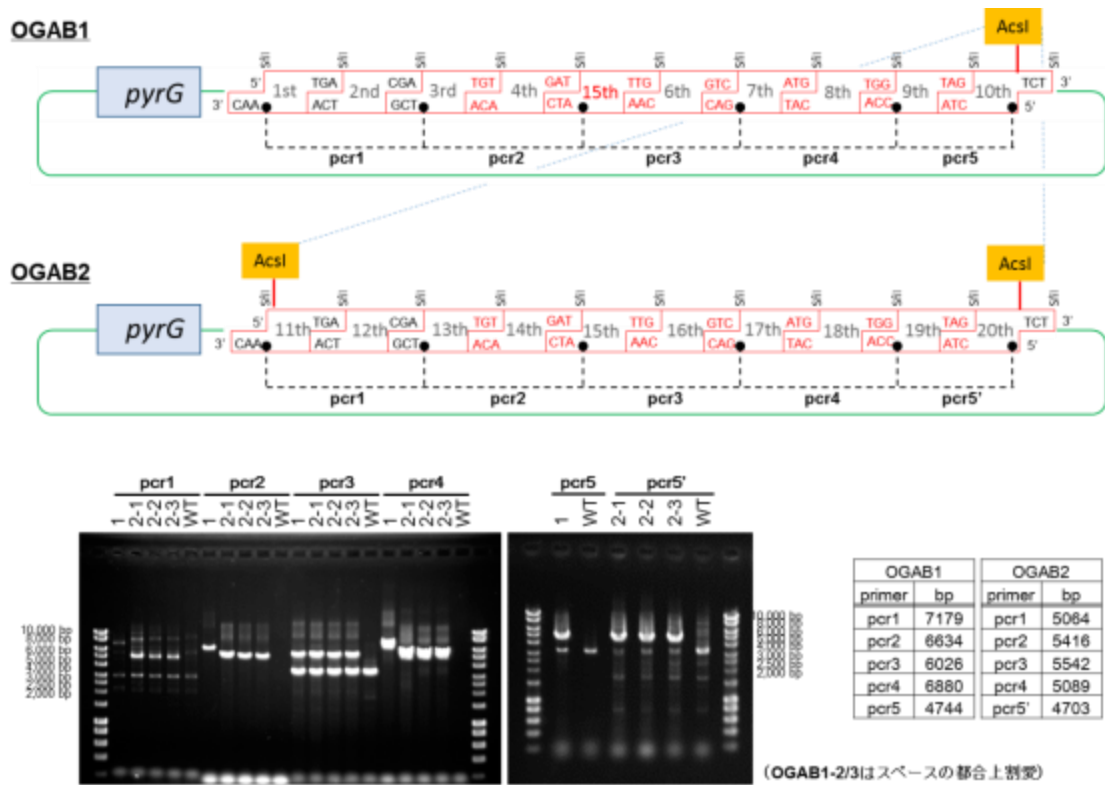
糸状菌で初めてのリボソームペプチドであることが明らかになった ustiloxin を対象として、化合物高生産に向けたゲノムデザインサイクルの一例として、ウェットとドライ解析を有機的に組み合わせることによる *A. flavus* での高生産に取り組んだ。ustiloxin は、生合成クラスター内 C6 型転写因子 *ustR* の 5'UTR 領域を例えば構成的遺伝子である *tef1* のプロモーター領域に付け替えるなどして高発現させることで高生産され、また V8 野菜ジュース培地とポテトデキストロース (PD) 培地においても大きく生産性が異なる (図 1-1-2)。そこで *A. flavus* コントロール株と *ustR* 高発現株のそれぞれについて V8 および PD 培地下でトランスクリプトーム解析を行い、生産性と連動して顕著に変動する遺伝子を *ustR* 高発現株/コントロール株および V8 培地/PD 培地の発現誘導比から 20 遺伝子に絞り込んだ (スクリーニング系 A、図 1-1-3)。V8 培地下での発現量順に並べた 20 遺伝子それぞれについて、5'UTR 部分を構成的に発現している遺伝子のものに付け替えて両端に SfiI 切り出しサイトを付加した配列を、pCR4 プラスミドにクローニングし配列を確認した。次に SfiI 酵素によって切り出した各遺伝子を 10 ずつ OGAB 法により pGETS401 ベクター上に集積し、2 種類の集積ベクターを得た (図 1-1-4 上)。なお OGAB1 集積ベクター上 5 番目の位置の遺伝子はプラスミドによる増幅が困難であったため、OGAB2 集積ベクター上の同位置の遺伝子で代用した。各集積ベクターを、*A. flavus* *ustR* 高発現 *pyrG* マーカー失活株にプラスミドのままプロトプラスト法によって形質転換し、ゲノムに導入した。2 種類の集積ベクター導入株それぞれについて、2 または 3 遺伝子にまたがった PCR 増幅により目的の集積ベクターが導入されていることを確認した (図 1-1-4 下)。



図①-3-1-2. 転写因子 *ustR* 高発現化によるウステロキシン高生産化
 左から、コントロール株・*ustR* 高発現株 (PD 培地)、コントロール株・*ustR* 高発現株 (V8 培地)。いずれも *A. flavus*。

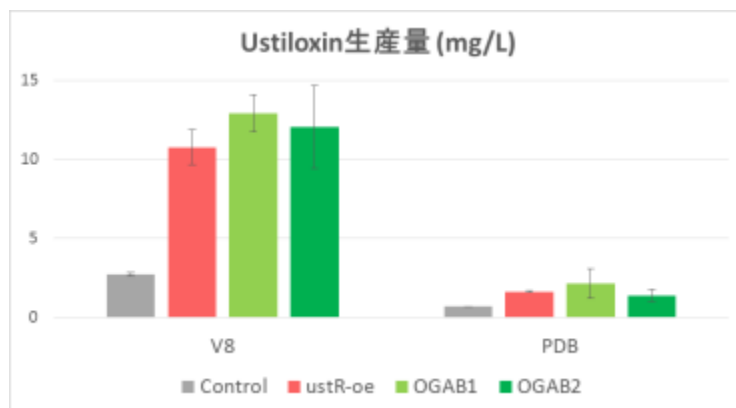


図①-3-1-3. 全遺伝子発現情報に基づいた ustiloxin B 生合成に関与する遺伝子の絞り込み (スクリーニング系 A)



図①-3-1-4. OGAB 法による遺伝子集積図とゲノム導入確認

集積ベクターの導入が確認できた 2 種類の形質転換体 (OGAB1, OGAB2) を、コントロール株および *ustR* 高発現株とともに V8 および PD 培地で培養し (30 mL, 30°C, 160 rpm, 7 日間, N = 3)、ウステロキシシン生産量を LC-MS ピーク面積によって定量した (図①-1-1-5)。すでに高生産化した株に導入していることもあり劇的な高生産化にはつながらなかったが、OGAB1 株において V8, PD 培地ともに *ustR* 高発現株のさらに約 1.2 倍の生産量の増加が見られた。



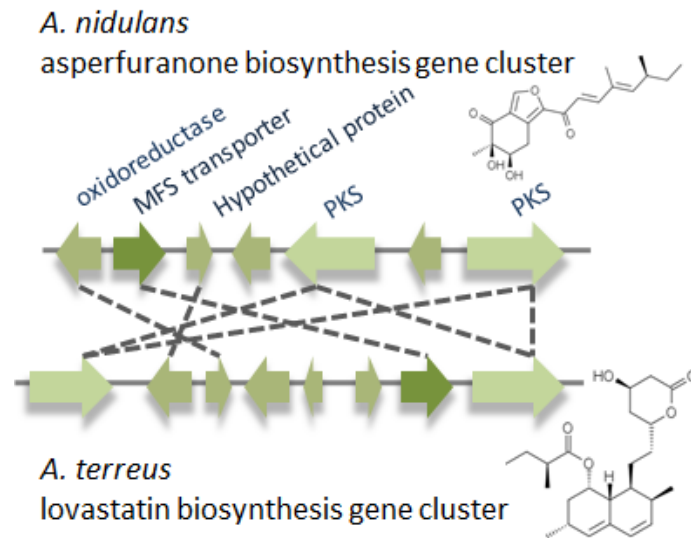
図①-3-1-5. 長鎖 DNA を導入した *A. flavus* 株のウステロキシシン生産 (7 日間培養)

MIDDAS-M 法は、クミアイ化学による KK-1 の生合成遺伝子クラスターの同定において、ゲノム塩基配列のミスアセンブリングによって分断されていたクラスターの発見に貢献し、同クラスターの全長の同定に導いた。また、アステラス製薬の FR901512 の生合成遺伝子クラスターの予測などに利用され、他の解析結果などと合わせて、これらの二次代謝遺伝子クラスターの同定に導いた。

[2] 比較ゲノム解析情報を利用した配列情報に依存しない予測技術の開発

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) のゲノム解析の結果、および他の *Aspergillus* 属 species のゲノム解析の比較によって、麹菌の二次代謝系と推定される遺伝子は、非シンテニー領域に集中していることが明らかとなった。この非シンテニー領域とは、麹菌と *A. nidulans* や *A. fumigatus* などの比較的近縁な種間での比較ゲノム解析によって、遺伝子の並びにシンテニーが見られないところであり、全ゲノム領域の 20%~30% を占める。二次代謝系の遺伝子は、特定の化合物の生合成に必要な複数の遺伝子が一般的にクラスターを為していることが知られている。このクラスター内には、PKS (polyketide synthase) や NRPS (non-ribosomal peptide synthetase) などの化合物の骨格部分を合成するコア遺伝子と呼ばれる遺伝子や、P450 などの修飾酵素、輸送体、クラスター全体を制御する転写制御因子などをコードする遺伝子が存在する。二次代謝生合成クラスターに関するこれまでの研究から、似た構造を有する化合物を生産する生合成クラスターは、構成遺伝子とその並びがよく似ていることが分かっている。例えば、*A. flavus* が生産するカビ毒の aflatoxin と *A. nidulans* が生産するカビ毒の sterigmatocystin では、前者のクラスターは後者のクラスターに対して遺伝子が追加されたような構造を持っている。

次世代シーケンサーの実用化によって高等動植物を含む多数の微生物のゲノム塩基配列が明らかになり、放線菌や糸状菌などの様々な二次代謝物を生産することが知られていた微生物のゲノム上には、予想を遙かに超える数の二次代謝系と考えられる遺伝子が存在することが明らかとなった。これにより、SMURF や antiSMASH などの二次代謝生合成クラスターを予測するソフトウェアが開発されたが、これまでの予測ツールはいずれもコア遺伝子を含むことが必要であり、これらを含まない新規な生合成メカニズムを有するクラスターを発見することはできなかった。そこで本研究では、比較ゲノム解析的手法を用いて、新規な遺伝子クラスターを含めて予測する方法を開発した。この方法では、上記の「二次代謝系遺伝子は非シンテニー領域上に存在する」という知見と、「異なる二次代謝遺伝子クラスター間でも配列が似た遺伝子からなる」との仮定を設けることで、2 つのゲノム塩基配列の比較によってコア遺伝子を含まない場合であっても、二次代謝生合成遺伝子クラスターを発見できる。



図①-3-1-6. 二次代謝生成遺伝子クラスター間の遺伝子の相同性の例

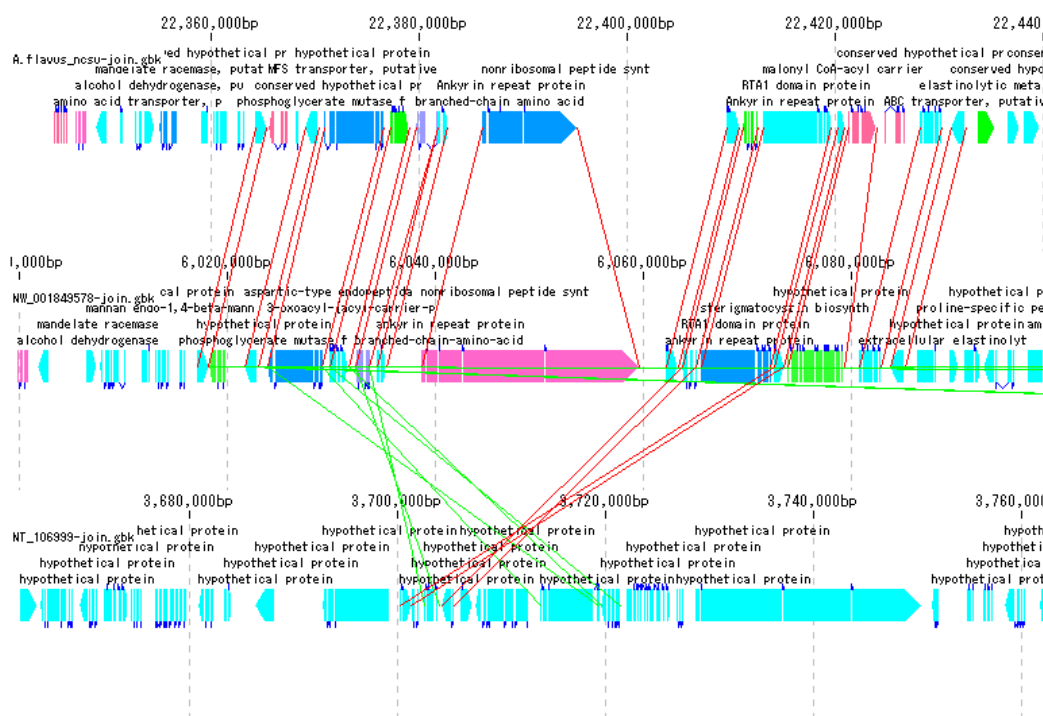
この方法では、最初に 2 つのゲノム間で全遺伝子についての相同性を解析し、スコアマトリックスと bidirectional best hit (BBH) 法を使ってオーソログを定義しておく。このスコアマトリックスを使って、Smith-Waterman アルゴリズムにより、似た遺伝子が並んでいる領域をリストアップする。次に、この領域に対して左右が同数の近傍の遺伝子を追加して 35 遺伝子からなる遺伝子クラスターを作製し、先に決定したオーソログからこのクラスター内の遺伝子のシンテニー領域を解析し、この領域がクラスターの一定以上の割合を占める場合にはそのクラスター全体を除外する。また、延長した遺伝子クラスターの中心に位置する遺伝子から外側に向かって両方向に遺伝子をずらしていき、それぞれの遺伝子が相手となる遺伝子クラスター内に一定以上の相同性を有する遺伝子が存在するかどうかによって遺伝子クラスターの境界を予測した。

Species	Product	Species	Product	Error	vs. Species
<i>A. flavus</i>	Aflatoxin	<i>A. nidulans</i>	asperfuranone	0	<i>A. terreus</i>
<i>A. flavus</i>	Gliotoxin				
<i>A. oryzae</i>	kojic acid	13	<i>A. flavus</i>		
<i>A. nidulans</i>	asperfuranone	0	<i>A. terreus</i>		
<i>A. nidulans</i>	asperthecin	-	-		
<i>A. nidulans</i>	Penicillin	3	<i>A. terreus</i>		
<i>A. nidulans</i>	sterigmatocystin	1	<i>A. terreus</i>		
<i>A. nidulans</i>	terrequinone	9	<i>F. graminearum</i>		
<i>A. fumigatus</i>	Ergot	2	<i>A. terreus</i>		
<i>A. fumigatus</i>	ETP	0	<i>A. nidulans</i>		
<i>A. fumigatus</i>	fumitremorgin				
<i>A. fumigatus</i>	Gliotoxin				
<i>A. fumigatus</i>	Melanin				
<i>A. fumigatus</i>	Pes1				
<i>A. fumigatus</i>	Pseurotin	8	<i>F. verticillioideis</i>		
<i>A. fumigatus</i>	siderophore	1	<i>F. graminearum</i>		
<i>A. terreus</i>	Lovastatin	4	<i>A. oryzae</i>		
<i>F. graminearum</i>	aurofusarin	2	<i>A. terreus</i>		
<i>F. graminearum</i>	zearalenone	6	<i>A. terreus</i>		
<i>F. verticillioideis</i>	Bikaverin	0	<i>C. globosum</i>		
<i>F. verticillioideis</i>	Fumonisin	2	<i>A. fumigatus</i>		
<i>F. verticillioideis</i>	fusaric acid	-	-		
<i>F. verticillioideis</i>	fusarin C	1	<i>M. grisea</i>		
<i>F. verticillioideis</i>	perithecium pigment	2	<i>A. flavus</i>		

図①-3-1-7. 比較ゲノム解析的手法を用いて予測された既知の遺伝子クラスターの例

遺伝子が相同であるとすると判断するための配列の相同性の値や Smith-Waterman での gap/mismatch スコアの最適化などによって、解析に使用した 10 種の糸状菌が有する 24 個の既知の二次代謝生合成遺伝子クラスターのうち、21 個のクラスターの検出に成功した。

MPS-CG による解析では、その後のクラスターとその構成遺伝子の可視化による解析が効果的かつ重要である。この目的のために、「比較ゲノム解析パネル」により、麹菌、酵母などの異なる微生物ゲノム間の同種二次代謝クラスター同士のクラスター内全遺伝子間オーソログ解析に基づく、遺伝子クラスター自動アラインメント表示機能を開発した。これにより MIPS-CG によって予測された遺伝子クラスターを含む、相同性を有する二次代謝遺伝子クラスターを取り込み、グラフィカルに描画する機能が可能となり、様々な二次代謝遺伝子クラスターの柔軟で効率的な解析が可能になった。



図①-3-1-8.

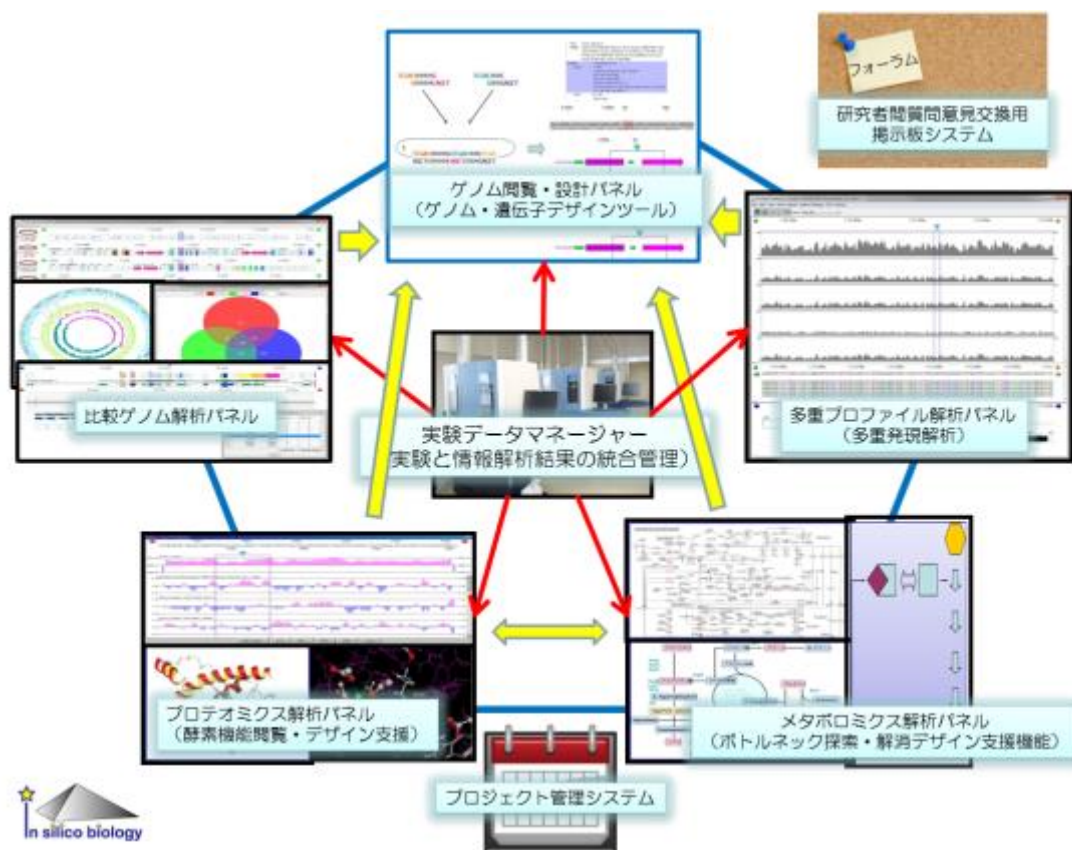
比較ゲノム解析パネル上に実装された遺伝子クラスター自動アラインメント表示機能

MIPS-CG 法は、クマイイ化学の KK-2 生合成遺伝子クラスターにおいて、分断されたと考えられる輸送体遺伝子などの探索に利用された。

(3-2) ユーザビリティの高いGDCプラットフォームの構築と、GDCの実施による高度化
 【産業技術総合研究所、理化学研究所、神戸大学、インシリコバイオロジー(株)】

ユーザビリティの高いGDCプラットフォームの構築

本事業開始当初は、スタンドアロンの「生産宿主ゲノム設計・解析支援システム」を主として開発する計画であった。生産宿主ゲノム設計・解析支援システムは5個の設計・解析パネルおよび実験データを管理する実験データマネージャー（EDM）から構成した（図①-3-2-1）。



図①-3-2-1. 当初開発予定の生産宿主ゲノム設計・解析支援システムの構成図

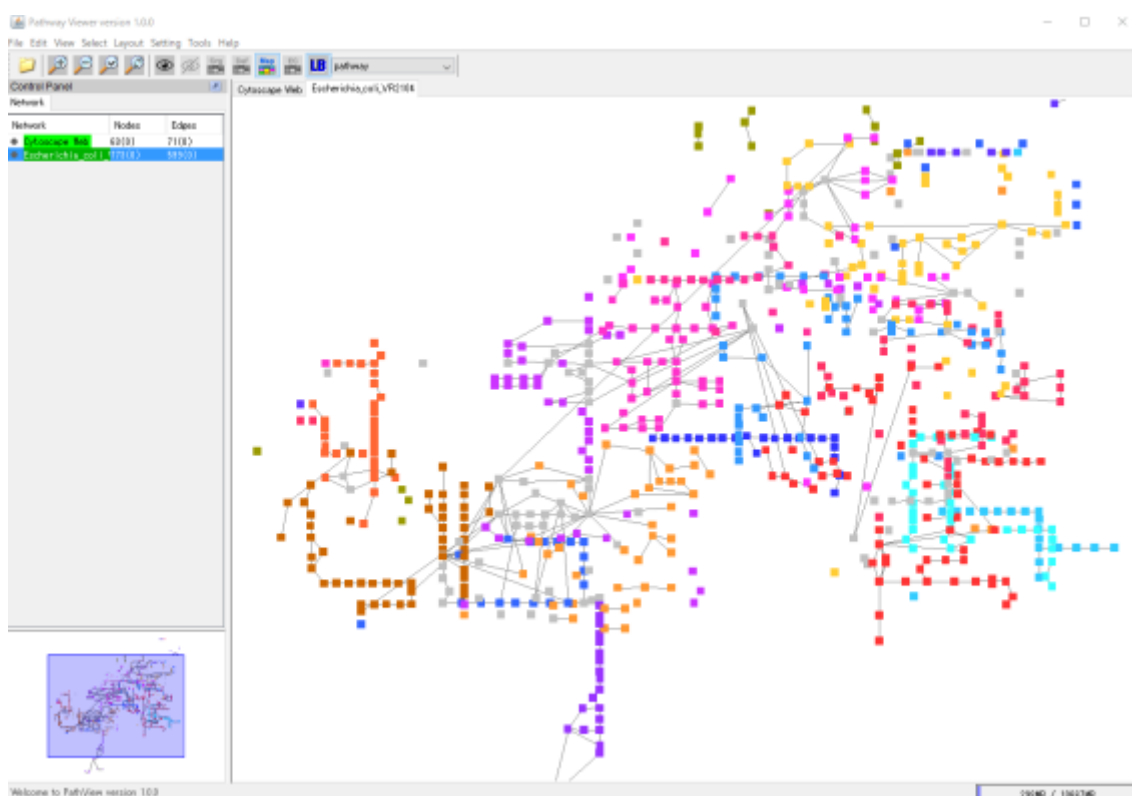
EDMと各設計・解析パネル間は相互に連携し自動的にデータ交換ができる。また、別途導入されたプロジェクト管理システムであるプロジェクトマネージャー（PJM）との連携で、多数の研究開発項目の進捗管理がなされた。情報交換用にフォーラムが開設され、ネットワーク上での議論が活発に行われた。しかし、デザイン方法論に基づく、ゲノムデザインサイクルが提唱され、それを司るGDCプラットフォームの開発が始まり、設計・解析パネルに実装された各種ソフトウェアは、GDCプラットフォームにも移植されることとなった。

本事業で開発された設計解析ソフトウェアは、IMC Design Suite、ISB Design Suite with GenomeTraveler、および GDCPlatform with EDM（いずれも仮称）として製品化している。このうちはじめの2製品はすでに販売開始準備を行っている。

IMC Design Suite は従来から製品化されていた IMC にクラスター設計機能をアドオンした製品（クラスター検査ツール以外は実装済）である。搭載機能は、ゲノムデザインツールとして、遺伝

子クラスター比較機能、コンビクラスター設計機能 (combiOGAB Cluster Designer、In-Fusion PCR Primer Designer、Gibson Assembly Primer Designer)、遺伝子部品操作ツールとして、Selection Marker、Promoter / Terminator Designer、Homology Arm Designer、Junction Designer、クラスター検査ツールとして、combiOGAB Construct Checker、Sequence Checker、が搭載されている。

ISB Design Suite with GenomeTraveler は、IMC Design Suite に NGS 解析機能や代謝設計機能をもつ GenomeTraveler を融合化する製品であり、IMC Design Suite に加えて以下の機能を追加する。搭載機能は、NGS による遺伝子発現解析ツールとして、NGS Mapping、RNA-Seq、代謝経路設計ツールとして、代謝 Model Generator、Model Editor、Model Viewer (図①-3-2-2) / Design Simulator、FBA Wrapper、である。



図①-3-2-2. ISB Design Suite に搭載される Model Viewer

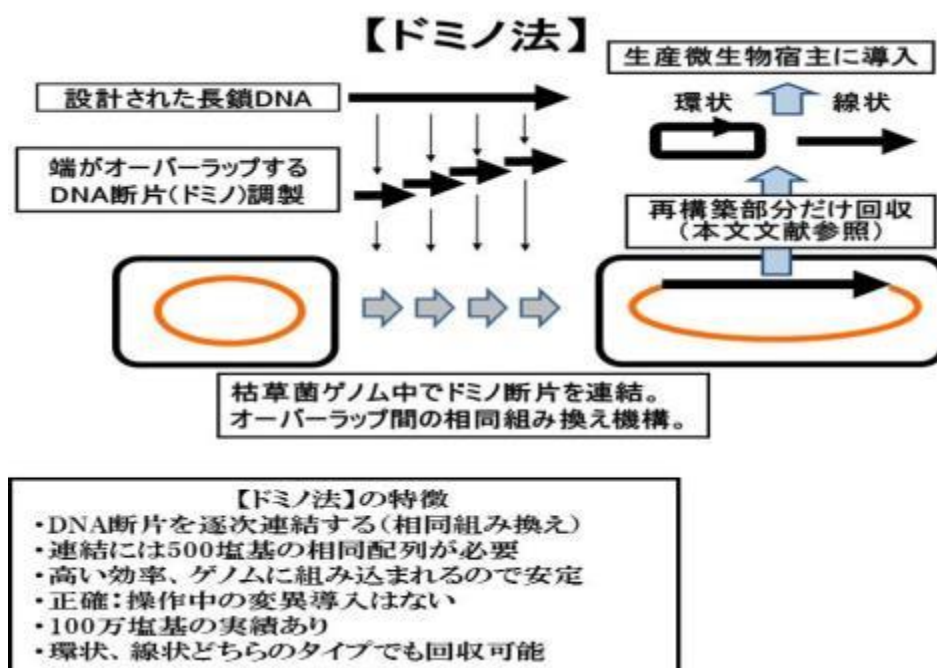
GDCPF with EDM は、GDCPF のデータ以外のプラットフォーム部分と EDM サーバを製品化して販売予定である。この製品は、管理者機能として、ツール登録機能 (GDC)、基本デザインワークフロー登録機能 (GDC)、実験・解析プロトコル登録機能 (EDM)、ユーザ管理機能 (共通)、グループ管理機能 (共通)、遺伝子部品データ自動抽出機能 (EDM) を搭載し、利用者機能として、デザインワークフロー登録機能 (GDC)、デザインプロジェクト登録機能 (GDC)、実験サンプル登録機能 (EDM)、試薬・培地登録機能 (EDM)、実験生成機能 (EDM、GDC)、実験フロー描画機能 (EDM)、実験ノート生成機能 (EDM)、実験データクロール検索機能 (EDM)、遺伝子部品供給機能 (GDC) を搭載する予定である。

研究開発項目②「長鎖 DNA 合成・操作技術の開発」

(1) ドミノ法を利用した長鎖DNA合成技術の開発

【慶應義塾大学】

慶應大学は枯草菌での長鎖DNA合成の手法として、OGAB法に加えてドミノ法（図1）を開発している。OGAB法とドミノ法では原理は異なるが、それぞれの利点を相互活用することで、所望の長鎖DNAが得られると期待されている。ドミノ法は枯草菌のゲノム中に巨大なDNAを安定に組み込めることが示唆されており、OGAB法で困難が予想されるサイズである100 kbp（10万塩基対）を超えるDNAでも迅速に構築できる手法を開発した。ドミノの担体としてBACを用いる第二世代ドミノ法を開発し、構築できるDNAサイズの上限を知る目的で平均GC含量55%の *Synechococcus elongates* ゲノムのドミノ法による組み込み再構築に取り組んだ（図②-1-1）。



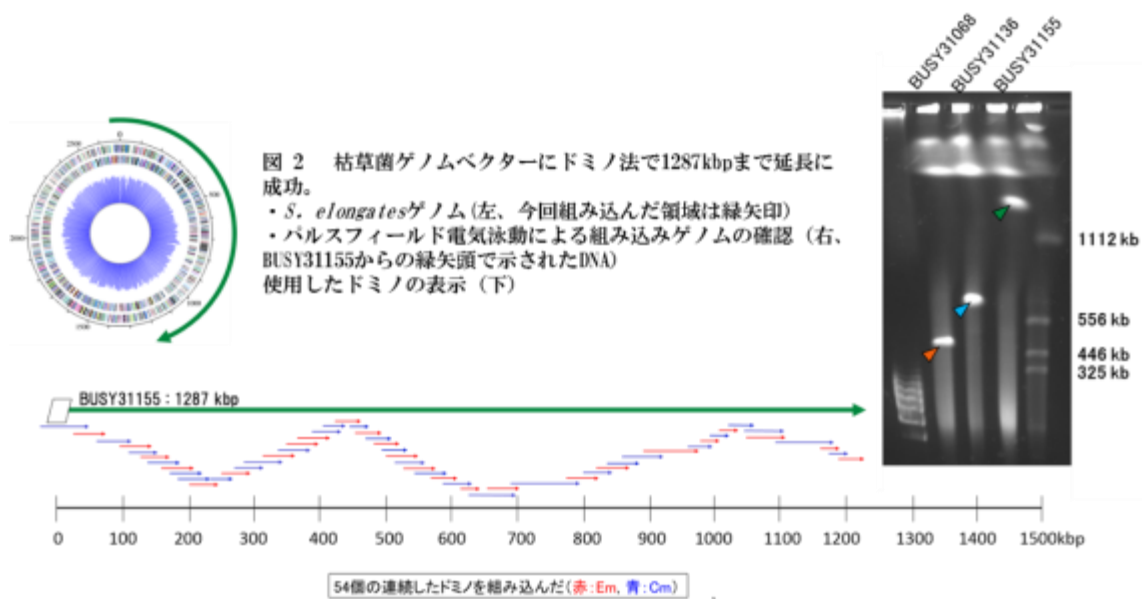
図②-1-1 ドミノ法の概略。

第二世代ドミノ法ではドミノ調製に大腸菌のBACを用いることで1つのドミノでのサイズ延長が数万塩基対まで保障され、全体の迅速化が達成された。

成果は明白で、*S. elongates* ゲノム（図②-1-2左）の部分（127万塩基）の再構築をドミノ法で達成した（図②-1-2左の緑の曲線矢印）。*S. elongates* ゲノムのサイズは265万塩基対なので、ほぼ半分のゲノムが枯草菌に安定に組み込まれた状態にある。平均GC含量55%のDNAでも問題なくドミノ法の対象となることも示された。組み込まれた*S. elongates* ゲノムはI-Ppol認識部位を両端に保持しているため、この枯草菌(BUSY31155)のゲノムから127万塩基だけを切り出すことで確認された（図②-1-2右）。この領域をカバーした54個のドミノは、ライブラリーから取得したものとlong-PCRで平均25kbpのBACドミノとして調製した（図②-1-2下）。

組み込みサイズが100万塩基対を超える成果もドミノ法の有効性を強化、保証するものである。将来の応用としてOGAB法で構築される長鎖DNAは連続していればドミノ法で延長できる。すなわち

OGAB単独での実用上限サイズ（5万塩基）をはるかに超える長鎖DNAでも、OGAB法で連続したドミノが用意できれば、OGAB法—ドミノ法の組み合わせで構築が可能になる点を示した画期的な成果である。



図②-1-2 ドミノ法による 127 万塩基の巨大 DNA の構築

(2) GDCを加速するためのOGAB法の技術開発

(2-1) 自動化装置に適合した遺伝子集積材料 DNA の設計手法の開発

【神戸大学、産業技術総合研究所】

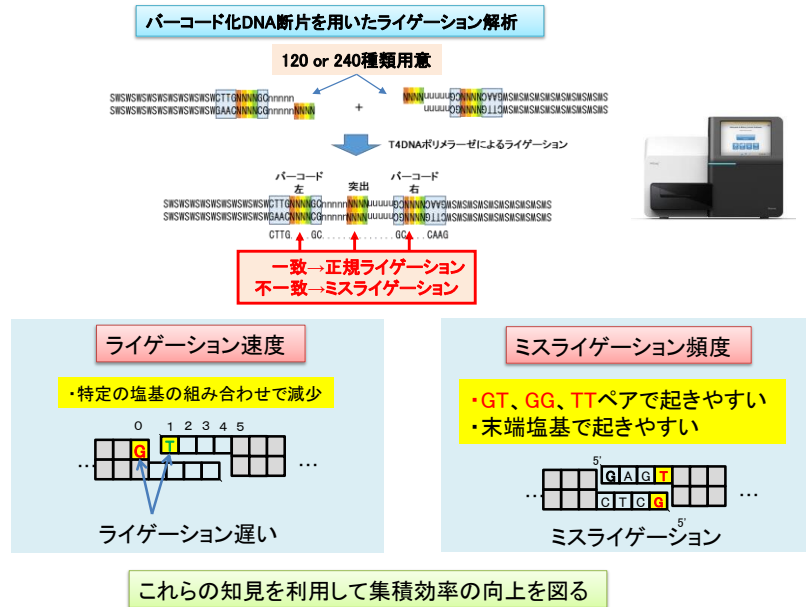
一度に集積する DNA 断片の数が 20 個以下の少ない数の場合、調べたクローンの過半数が正しく集積が行われているが、断片の数が 50 個程度になると、残念ながら過半数の集積体の構造が間違った構造になっている。これらの塩基配列を調べた結果、本来は連結しない間違った突出配列間でライゲーションが行われていることが原因と判明した。そこで、OGAB 法における、突出配列の違いによるライゲーションの効率、あるいはミスライゲーションの出現頻度を調べるために、各突出配列の出現頻度を任意にコントロールした化学合成 DNA により準備した突出断片を連結したものを、次世代シーケンサーにより解析し、突出配列別のライゲーション効率と、ミスライゲーション出現頻度を調べた。

具体的には、OGAB 法に良く用いる 4 塩基の 5'末端突出配列 120 種類と、あまり用いない突出を含めた合計 240 種類の 2 種類のライブラリーを、化学合成 DNA をクレノウフラグメントで二本鎖化したのち、制限酵素で切断することにより目的の突出を持った DNA 断片を調達し、OGAB 法のライゲーション条件で連結を行った (図 WG.1-2)。突出の塩基の根元の部分の DNA にその突出がどのような配列であったかを記したバーコードが取り付けられている (図 WG.1-2) ので、このライブラリーをライゲーション後、次世代シーケンサーにかけることにより、正しく連結されているものだけを取り出し、突出の種類ごとに頻度を調べることにより、どの突出のライゲーションスピードが速く、どの突出のスピードが遅いか調べた。その結果、図②-2-1-1 に示すように、5'末端突出の塩基配列の最も末端塩基が T で、そのリン酸エステル結合相手の塩基配列が G の場合、著しくライゲーションスピードが減少することを見出した。

また、バーコードの配列と実際の連結配列を比較することにより、間違った連結がどのような突出断片間で発生しているかを調べた。その結果、突出の配列の本来相補塩基であるべき塩基が、G と T、G と G、T と T などの非相補塩基間で多発していることを確認した (図 WG.1-2)。これらの結果により、ライゲーションスピードの遅い突出や、ミスライゲーションを起こしやすい突出を予測し、排除することが可能となった。

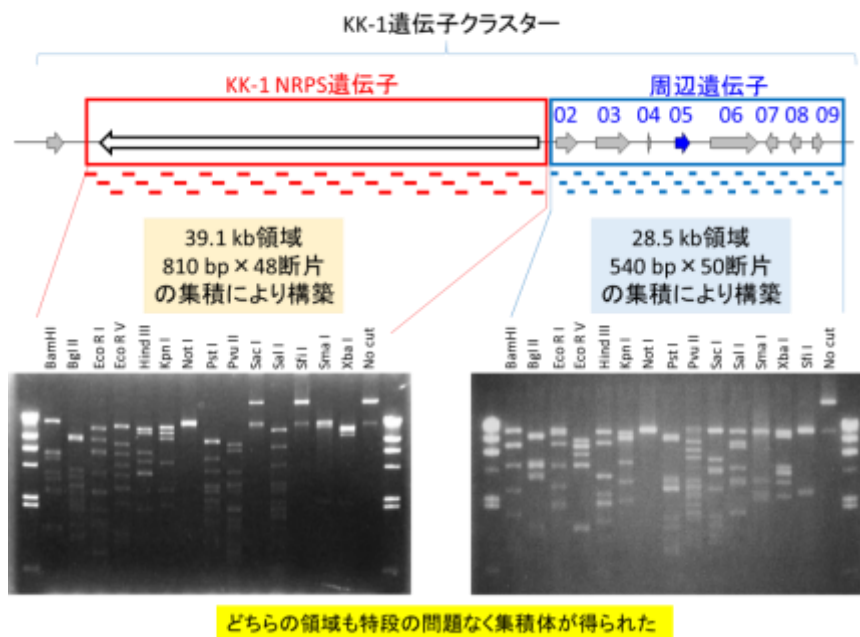
ここまで得られた、第 2 世代 OGAB 法において連結精度の高い突出の組み合わせに関する情報、を考慮して設計された DNA 断片を用いて、長鎖 DNA 合成の自動化トータルシステムを用いて、依頼を受けたサンプルの合成を行った。図②-2-1-2 には、一例としてクマイ化学、東北大学で検討を行っている KK-1 生産関連遺伝子群の 2 つの領域を第 2 世代 OGAB 法により構築した長鎖 DNA について、その構造を詳細に調べた結果を示す。どちらの領域も特段の障害なく正しい集積体を 1 度の集積実験で得ることが出来た。このように、本トータルシステムを用いることで第 2 世代 OGAB 法により高い精度で長鎖 DNA の集積が可能となった。

OGAB突出部位とライゲーション効率関連解析



図②-2-1-1. OGAB 突出部位とライゲーション効率関連解析

第2世代OGAB法によるKK-1遺伝子クラスターの再構築



図②-2-1-2. 突出配列の連結精度を考慮して設計したDNA断片による第2世代OGAB集積の例

(2-2) コンビナトリアル集積体の構成遺伝子の確認技術の開発

【慶應義塾大学、神戸大学、産業技術総合研究所】

1) 次世代シーケンサーを用いた高精度な解析技術の確立

OGAB 法では、少数の出発材料から、数千から数万種類に及ぶコンビナトリアルライブラリーを効率的に構築することが可能である。一方で、これらの内部がどのような材料の組み合わせであるかは、個別のサンプルに対して、PCR などを用いて調べるために膨大な作業が発生することが課題となっていた。GDC サイクルの加速化には、これらの評価時間を大幅に短縮する必要があるため、作業の迅速化を目的として次世代シーケンサーによる多種類並列的な集積体の構成遺伝子の確認方法を確立することに取り組んだ。

実験試料として、12 遺伝子からなるサッカロ酵母コンビナトリアルライブラリー48 株を用いた。当コンビナトリアルライブラリーは、34 種類の遺伝子が 12 個ずつ分かれて（そのため 2 種類は 2 個使用）一列に並べられた 3 つの長鎖 DNA を OGAB 法で構築後、それらを混合して *Sfi*I 切断で遺伝子部品に分解してから再度ライゲーションにより長鎖 DNA を再構築したものである。連結部位である制限酵素 *Sfi*I 突出配列が同じ並びとなる形で 3 つの長鎖 DNA が構築されていることから、再構築の際に無作為の組合せで DNA 断片が連結されコンビナトリアルライブラリーとなる。これらのコンビナトリアルに作られた長鎖 DNA は、OGAB 法ではプラスミド上にクローニングされる。したがって、この長鎖 DNA の配列を次世代シーケンサーにより解読して内部の遺伝子を確認するには、プラスミドの単離が、不要な染色体やミトコンドリアの DNA 解読情報を生み出さない点が重要と考えた。

そこで、下記 3 種類のキットで、長鎖 DNA を有するプラスミドの単離を試みた。

- ・ MasterPure Yeast DNA Purification Kit (Epicentre 製)
- ・ Easy Yeast Plasmid Isolation Kit (Clontech 製)
- ・ ChargeSwitch Plasmid Yeast Mini Kit (Thermo Fisher 製)

コンビナトリアルライブラリーのサッカロ酵母株を SD (-Leu)液体培地 2 mL で 30°C, 180 min⁻¹ 終夜振とう培養した培養液の 1~1.5 mL 分の菌体からプラスミドを単離した。今回は 1 コピー数であることから実験での取り扱いが難しいと一般的に言われている Cen を複製起点に持つプラスミドであったが、いずれのキットでも単離できた。

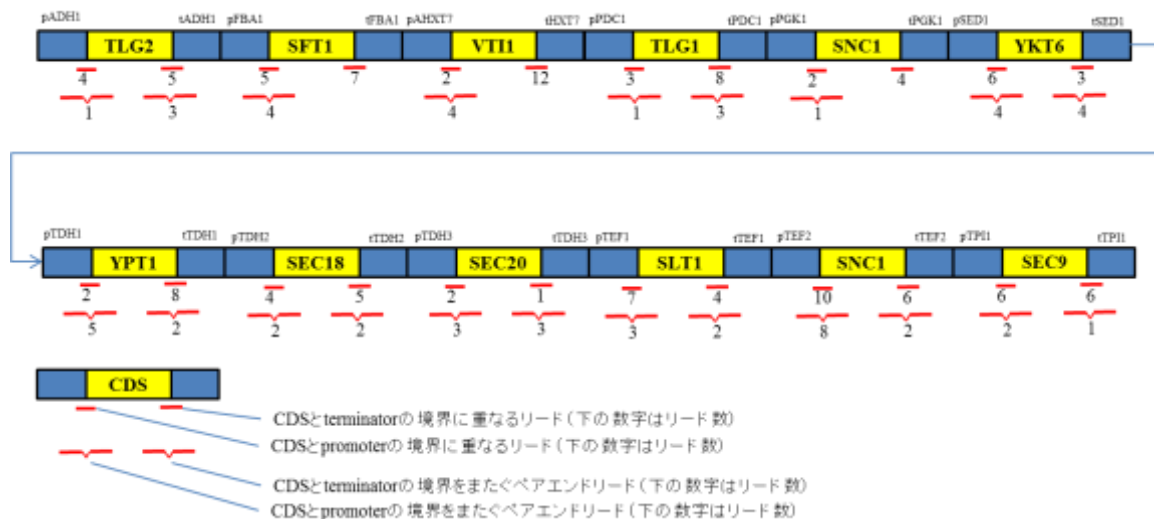
次に、単離したプラスミド 1 ng を用いて、Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina 製) により、次世代シーケンサー解読用サンプルを作製した。当 Kit では、改変型トランスポサゼによりプラスミドをランダムに切断して断片化し、さらにその両末端にシーケンスアダプターという識別用 DNA 配列を PCR により付加する反応を行う。今回は 24 株のプラスミドを一度に解読することを考えたため、当サンプル調製時に由来の株が識別できるよう株毎に異なるシーケンスアダプターを用いた。これで作製した 24 株のサンプルを混合して、次世代シーケンサーで解読した。次世代シーケンサーは Miseq (Illumina 製) を使用した。当シーケンサーの解読用バッファーキットには Reagent Kit v3 (Illumina 製) の 150 サイクル版を用い、これでサンプル DNA 断片の両末端を 75 base ずつ解読した。解読にかかる日数は約 1 日であった。

最後に、解読 DNA 情報は産総研臨海副都心研究センター拠点に送られ、情報解析による遺伝子確認が行われた。その結果、ChargeSwitch Plasmid Yeast Mini Kit が最もプラスミドの情報数が多く、次いで Easy Yeast Plasmid Isolation Kit であった。また、これらは両方共、最大で 24 株を一度の解読で遺伝子確認できるだけのプラスミドの情報量を出すことができた。表 1 は、当情報量を意味する各株の Sequencing depth (Coverage) を染色体・ミトコンドリア・プラスミドに分けて表示したものである。なお、Sequencing depth 計算に使ったベクター部分の配列が両 Kit 間で若干違うものの、誤差程度の違いであるため、表②-2-2-1 の数値で両プラスミド単離 Kit の性能を比較しても問題ないと考える。

表②-2-2-1. プラスミド単離 Kit 毎の Sequencing depth (Coverage)

Easy Yeast Plasmid Isolation Ki				ChargeSwitch Plasmid Yeast Mini Ki			
株	ゲノム	ミトコンドリア	プラスミド	株	ゲノム	ミトコンドリア	プラスミド
Mix1	5.78	120.28	11.62	Mix25	1.74	60.9	322.19
Mix2	4.09	136.39	25.8	Mix26	1.83	82.55	415.53
Mix3	4.65	127.22	24.55	Mix27	2.11	73.4	418.5
Mix4	4.61	96.7	21.52	Mix28	1.43	29.69	42.87
Mix5	6.09	112.93	21.48	Mix29	2.24	56.92	265.53
Mix6	4.96	222.22	39.2	Mix30	4.28	44.9	26.27
Mix7	7.06	89.99	7.44	Mix31	3	43.42	39.18
Mix8	5.21	120.08	8.74	Mix32	4.37	67.08	15.93
Mix9	10.17	158.54	7.03	Mix33	7.74	59.29	16.62
Mix10	7.48	186.2	12.7	Mix34	1.64	49.29	200.28
Mix11	6.66	240.41	65.55	Mix35	3.29	47.88	34.13
Mix12	6.06	129	7.27	Mix36	1.94	60.08	343.69
Mix13	5.91	153.62	9.77	Mix37	3.66	46.87	24.6
Mix14	4.69	161.47	12.58	Mix38	4.92	61.42	73.29
Mix15	5.36	89.3	18.77	Mix39	2.72	72.05	59.22
Mix16	4.03	135.08	13.03	Mix40	2.44	61.24	136.72
Mix17	6.24	178.06	11.87	Mix41	1.57	37.54	220.67
Mix18	5.82	79.32	9.62	Mix42	0.53	13.76	46.02
Mix19	5.47	89.85	4.03	Mix43	2.02	49.34	450.95
Mix20	5.35	148.7	8.56	Mix44	3.07	52.12	42.62
Mix21	5.91	168.62	35.87	Mix45	2.24	51.05	99.73
Mix22	3.72	74.85	22.67	Mix46	3.08	73.8	102.19
Mix23	5.75	135.82	6.01	Mix47	1.2	283.99	16.27
Mix24	8.59	136.79	8.06	Mix48	2.31	8.32	60.72

実際に、これらのプラスミド単離 Kit で遺伝子確認できたコンビナトリアル長鎖 DNA の例を、図②-2-2-1 に記した。



図②-2-2-1. 遺伝子確認に成功したコンビナトリアルライブラリー株の一例 (Mix9 の場合)

一方、MasterPure Yeast DNA Purification Kit は染色体やミトコンドリアの混入が多く、その分だけプラスミドの情報量は減少したことから、一度の解読で 24 株を遺伝子確認することは不可能であった。

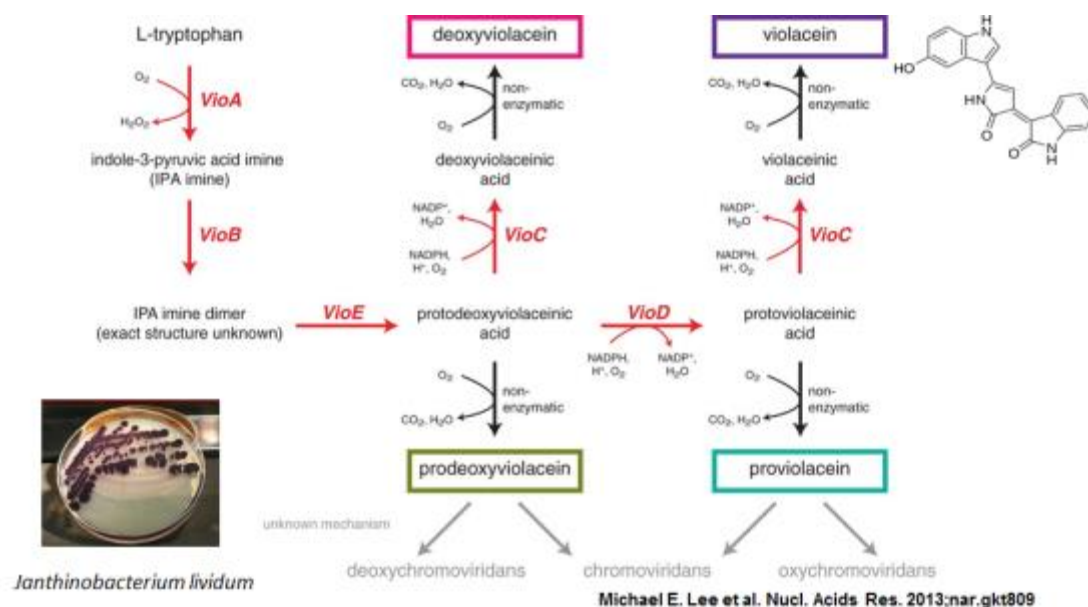
今回の遺伝子確認には、サッカロ酵母のコンビナトリアルライブラリーを用いた。サッカロ酵母のいくつかの実験用宿主は”2 micron DNA”という環状 DNA を本来内在させていることが知られている (Ludwig and Bruschi, 1991)。今回の宿主もこの 2 micron DNA を有していたと推察され、実際に 2 micron DNA に相当する配列が解読された。しかも、その解読の情報量はプラスミドの情報量の約 2.3 倍もあり、その分だけプラスミドの情報量は少なくなったと考えられる。もし今回の株が 2 micron DNA を有していないものであったとすれば、一度の解読で遺伝子確認できる株数は約 79 株 (=24 株×(1+2.3)倍で算出) まで高められたと推測される。そこで、今回と同じ仕様のコンビナトリアルライブラリーの遺伝子確認を今後行う場合、可能であれば 2 micron DNA を有しない株を宿主としてコンビナトリアルライブラリーを作製することが、一度の解読で確認できる株数を高められ、作業の迅速化や作業量と費用の低減がさらに可能になると考えられた。

2) TaqMan プローブによる低コスト化と迅速化

OGAB 法では、少数の出発材料から、数千から数万種類に及ぶコンビナトリアルライブラリーを効率的に構築することが可能である。一方で、これらの内部がどのような材料の組み合わせであるかは、個別のサンプルに対して、PCR などを用いて調べるために膨大な作業が発生することが課題となっていた。GDC サイクルの加速化には、これらの評価時間を大幅に短縮する必要があるため、前年度には、作業の迅速化を目的として次世代シーケンサーによる多種類並列的な集積体の構成遺伝子の確認方法を確立することに取り組んだ。これにより、OGAB 断片を含んだプラスミドの酵母細胞からの分離・抽出方法の改良などによって安定的な解析が可能になった。また、長鎖 DNA 断片である OGAB 断片に含まれる相同配列によって、リアレンジなどによって OGAB 断片の構造(配

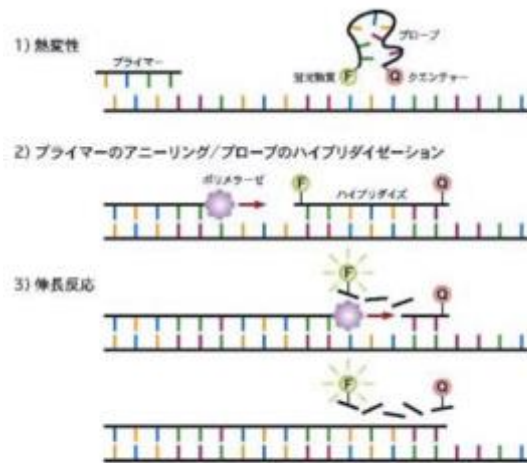
列)に大きな変化が生じ、部分的な欠落などが起こりえることが明らかとなった。この結果に基づいて、OGAB断片の設計時に相同配列が生じないようにするなどの変更を行い、OGAB断片の変化が生じにくく安定して保持されるDNA断片の設計法が考案された。そこで、より迅速・安価なOGAB断片の解析を可能にすることにより、コンビナトリアルファイブラリーのスクリーニングによって得られた多数の低分子抗体高生産株の効率的な解析を目的として、TaqManプローブを用いた解析技術の開発に取り組んだ。

本技術の開発と実証においては、Violaceinの生合成に関わる代謝経路バランスの最適化の課題をモデルとして設定し(図②-2-2-2)、生合成に関わる3つの各遺伝子を転写活性の異なる3種類のプロモーターで発現させることによる最適化を行った。Violaceinは色素であることから生産の確認は容易であるが、生合成経路によって構造や吸収特性が比較的似た異なる4種類の化合物が生成される。本課題では、これらの化合物を独立して検出する必要があることから、検出はLC/MSによって行った。



図②-2-2-2. Violaceinの生合成経路

TaqMan法とは、一本鎖DNA断片の両末端のそれぞれに、蛍光色素とクエンチャーを保持させたものであり、TaqMan反応を行う前は、クエンチャーによる消光によって蛍光を発しないようになっている。この一本鎖DNA断片は、サンプル中に存在するDNA断片の配列の一部からなっているため、PCRによってサンプル中のDNAが増幅された場合、個のDNA断片の一方のストランドにアニールすることができる。このストランドを鋳型としてDNAポリメラーゼによって反対ストランドが合成される際に、前記の結合したTaqManプローブ、DNAポリメラーゼが有するエンドヌクレアーゼ活性によって分解される。これによって、一本鎖DNA断片上に固定化されていた蛍光色素とクエンチャーが外されるため、消光が生じなくなって蛍光を発するようになる(図②-2-2-3)。



出典:タカラバイオ社カタログ

図②-2-2-3. TaqMan プローブによる検出原理

本課題は、最大で 12 個程度の遺伝子（スロット）からなる OGAB 断片に保持された遺伝子の種類を正確かつ簡便に解析する技術の開発である。分泌系の遺伝子の組み合わせ解析の場合には、各スロットには数個程度の異なる遺伝子が保持されることにより、 2×10^8 程度の異なる組合せが生じることになる。TaqMan プローブは 4 色の蛍光色素を使用してマルチプレックス化が可能であることから、各スロット毎に 2 反応、12 スロットで 24 反応を実行することにより、全てのスロットの遺伝子の種類を特定することができる。この反応は、マイクロプレートを使用した Real Time PCR によって自動的にモニターされることから、反応後の電気泳動やその解釈は必要がなく、人の判断を介さない効率的で正確な解析が可能である。

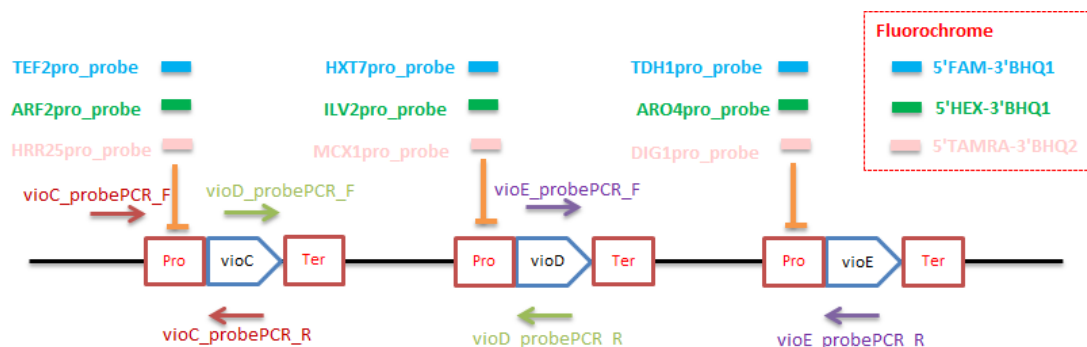
Violacein の生合成に関わる 3 遺伝子の発現を制御する 3 種類の異なる発現強度を有するプロモーターとしては、相同配列によるリコンビネーションなどを抑制することを目的として、3 つのそれぞれの遺伝子毎に異なるプロモーターを設定した（図②-2-2-4）。赤、緑、青の文字で表されたプロモーターは、それぞれ、強、中、弱の転写発現活性を持つとして同定され、遺伝子部品として登録・使用されるものを表す。

pVinf	P _{VioC}	P _{VioD}	P _{VioE}	pVinf	P _{VioC}	P _{VioD}	P _{VioE}	pVinf	P _{VioC}	P _{VioD}	P _{VioE}
01	TEF2	HXT7	TDH1	17	ARF2	HXT7	TDH1	33	HRR25	HXT7	TDH1
02			ARO4	18			ARO4	34			ARO4
03			DIG1	19			DIG1	35			DIG1
05		ILV2	TDH1	21		ILV2	TDH1	37		ILV2	TDH1
06			ARO4	22			ARO4	38			ARO4
07			DIG1	23			DIG1	39			DIG1
09		MCK1	TDH1	25		MCK1	TDH1	41		MCK1	TDH1
10			ARO4	26			ARO4	42			ARO4
11			DIG1	27			DIG1	43			DIG1

図②-2-2-4. Violacein の生合成遺伝子とプロモーターの組合せ

Violacein の生合成に関わる 3 遺伝子とそれらを発現させるプロモーター、ターミネーターの構造、および接続されたプロモーターを同定するための PCR プライマー、および TaqMan プローブによる

検出部位の位置を図②-2-2-5 に示した。各部位の 3 種類のプロモーターの検出用として TaqMan プローブの異なる色素を割り当てることによって、各プロモーターについて 1 回の PCR で同定が可能である。



図②-2-2-5. Violacein の生合成遺伝子発現カセットの構造

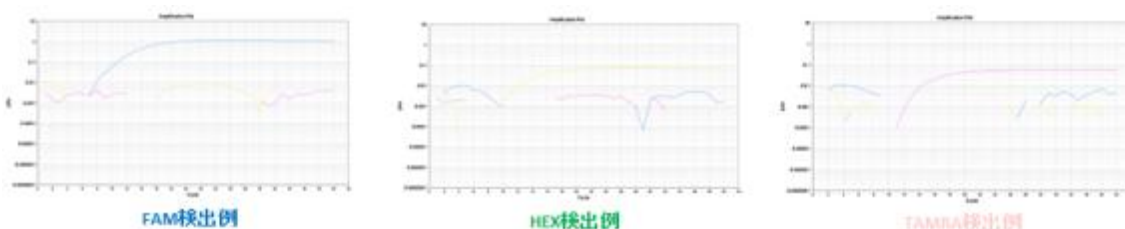
前記のプロモーターを解析するための PCR 用プライマーおよび TaqMan プローブの各配列を図②-2-2-6 に示した。マルチプレックス解析を容易にするために、各配列の T_m をできるだけ厳密に揃えるようにしてある。この図の右側にある条件によって PCR を行った。

Probe	Sequense	Fluorochrome	Primer	Sequense		Volume	Temperature	Time
TEF2pro_probe	TACACCCAGACCGGACAAATTACCC	5'FAM-3'BHQ1	vioC_probePCR_F	CAAGTCCGATCAGTCACTC	Probe qPCR MIX	10μL	1cycle	
ARF2pro_probe	TGTTGCATCTGCACCTCCAGTACTCC	5'HEX-3'BHQ1	vioC_probePCR_R	AATACTCACCTGTGCAGG	5μM Forward Primer	2μL	95°C	20s
HRR25pro_probe	TAGGCAGCCACGTTTGAATTTCTTTTT	5'TAMRA-3'BHQ2	vioD_probePCR_F	AGCACCTCCACTACAAGGC	5μM Reverse Primer	2μL	40cycle	
HXT7pro_probe	AATTCGGGCCCTGCGTGTCTT	5'FAM-3'BHQ1	vioD_probePCR_R	CAGCGATTTGTAATTGACGC	5μM Probe Mix	1μL	95°C	1s
ILV2pro_probe	AGCGCCCCACGCAAAAGGTT	5'HEX-3'BHQ1	vioE_probePCR_F	GATGAGCACCTTTATCGTCG	50× ROX	0.4μL	60°C	120s
MCX1pro_probe	AGCAGATTCTTGCTCCACTCAGTTCG	5'TAMRA-3'BHQ2	vioE_probePCR_R	TCCAGTAGGAAACATAGCGG	Water	3.6μL		
TDH1pro_probe	CTTCTAGGTGCATGCGACGGTATCCAC	5'FAM-3'BHQ1			Template	1μL		
ARO4pro_probe	ACTTTAAACGTGGCCCAACCGC	5'HEX-3'BHQ1			Total	20μL		
DIG1pro_probe	ATCCCCGAGTGGGTACCCG	5'TAMRA-3'BHQ2						

※ProbeのT_m値を70°C前後、PrimerのT_m値を60°C前後となるよう配列を設計

図②-2-2-6. PCR 用プライマー、TaqMan プローブの配列

図②-2-2-7 に、上記によって設計された PCR 用プライマー、TaqMan プローブを使用して各プロモーターを検出した例を示した。これによって、TaqMan プローブとマルチプレックス PCR によって簡便かつ安価に OGAB 断片に保持された遺伝子を確認できることが確認された。



図②-2-2-7. TaqMan プローブによる検出例

NGS を用いた解析では、遺伝子の存在・非存在だけでなく、接続順序、リアレンジの有無（ある場合にはどの様に変化したかなどを含めて）の解析も可能である。一方、長鎖 DNA を保持するためのコピー数の制限、長鎖 DNA による酵母細胞からの回収率の低さなどから、NGS で解析するために必要な DNA 量の確保は容易ではないことが分かっている。今回の方法は PCR を基本としている

ことから、感度的には NGS よりもはるかに有利であり、NGS の場合のようなライブラリーの調製を必要としないため、回収された長鎖 DNA を保持したプラスミドをそのまま解析に供することができる。従って、多数の形質転換体の OGAB 断片上に保持された遺伝子の有無を解析するためには本課題で開発された方法の利用が優れており、遺伝子の接続順序の確認やリアレンジなどを含めた変異に関する情報の取得が必要な場合には、前年度に開発した NGS を用いた方法を適用するなど、ケースバイケースでの解析方法の選択が可能である。

研究開発項目③「革新的バイオマテリアル生産技術の開発」

(1) 高機能人工ポリペプチド材料（人工フィブロン）

(1-1) 高機能高生産を実現するための遺伝子開発及び、評価プロセスの開発

【Spiber(株)、小島プレス工業(株)】

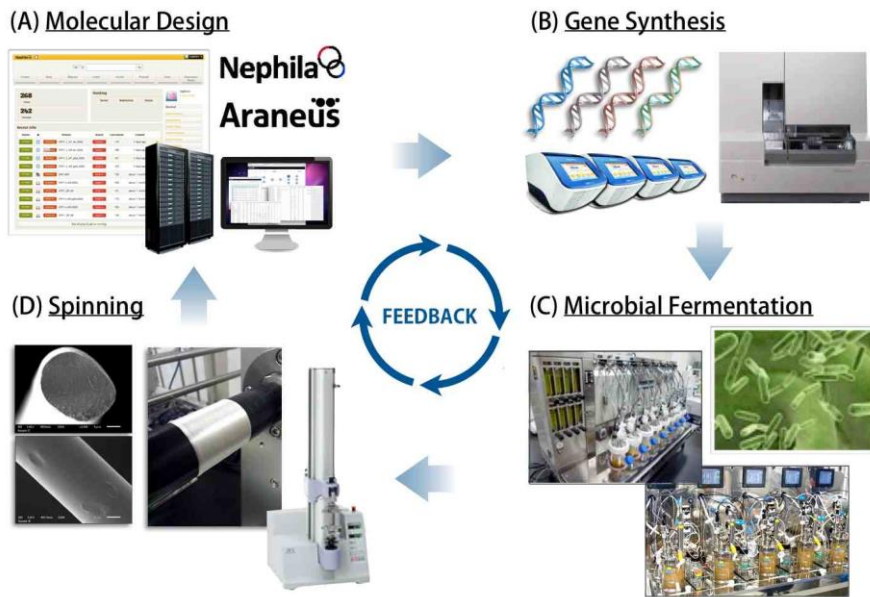
分子創出フィードバック研究（Spiber(株)）

本テーマでは生産性と機能性を両立する新規フィブロンタンパク質を創出することを目的とし、遺伝子の配列デザインから繊維化評価、及びアプリケーション性能評価までを一貫して行う、「分子創出フィードバック研究」に取り組んだ。本プロジェクト中に300を超える遺伝子を合成してきた。当初は0.5g/Lの生産性であったが、本テーマ推進の結果、生産性が10.1g/Lにまで達し、かつ、応力も向上するような遺伝子（GEN#495）の創出に成功した。今後、GEN#495をベースに人工クモ糸の実用化を進めていく。

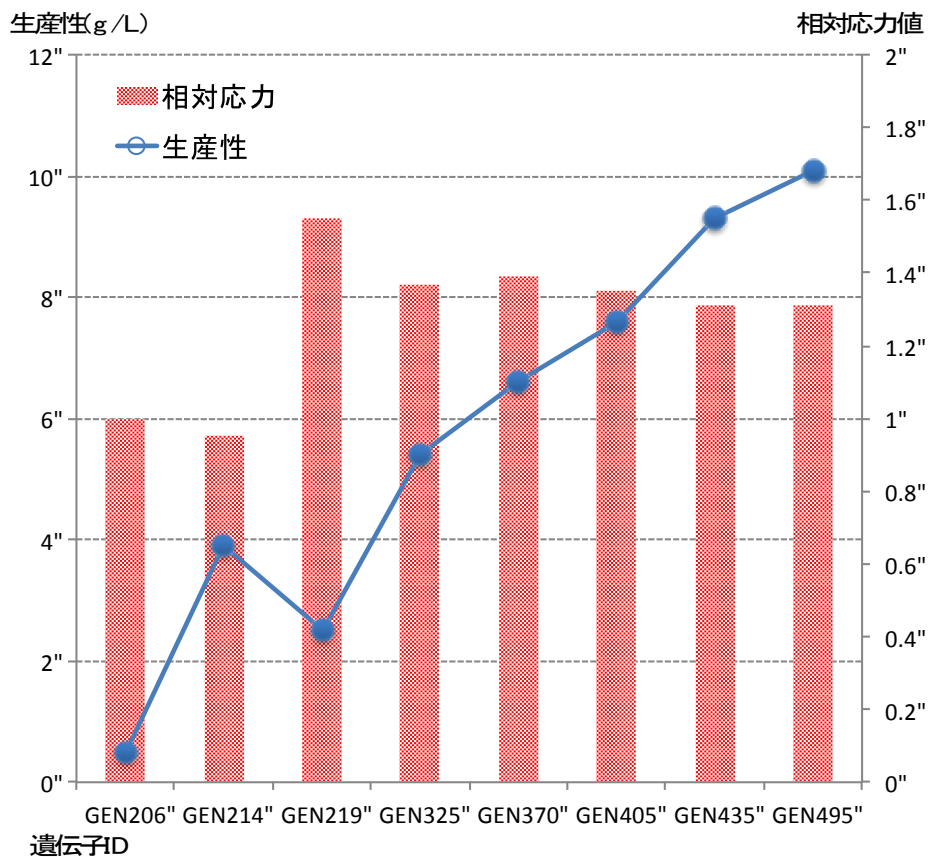
また、図③-1-1-1に示すように、遺伝子を起点としたフィブロンタンパク質の生産性と機能性の向上を目指す研究体制が存在している。従来的人工クモ糸研究では、天然配列そのものが用いられることが多かったため生産性が悪く、結果、機能性研究も進展しなかった。その一方で、フィブロンのような構成されるアミノ酸に偏りがあり、かつ長鎖反復配列でも遺伝子合成可能な技術を作り出したため、天然配列をベースにアミノ酸配列・塩基配列を任意に改変することができる。その強みを活かした研究が分子創出フィードバック研究であり、遺伝子の改変を繰り返すことで、どのような変異が生産性や機能性の向上に資するかを解明することができる。

本プロジェクトの開始当初は、アミノ酸配列の改変を中心に遺伝子創出に取り組み、生産性・精製可能性・紡糸性・繊維の機械的特性の観点から、工業生産可能な遺伝子の抽出を目指した。その結果、いずれの観点においても優れたGEN#435の創出に成功した。事業の進捗に伴い、GEN#435が様々なアプリケーション試作に使用され始めたことから、アミノ酸配列を改変してしまうと、繊維の性質が変わってしまい、アプリケーション評価に支障をきたすことが予想された。したがって、その後はアミノ酸配列はそのままに塩基配列を改変することで生産性を向上させるというアプローチを採用した。塩基配列の置換にあたっては、生産性に大きな影響を与えているとされている遺伝子配列上流の改変を中心に進めた。

その結果、10.1g/Lと生産性が大幅に向上したGEN#495が抽出された（図③-1-1-2）。GEN#495は本プロジェクト開始初期の遺伝子と比較し、20倍以上生産性が高くなった。また当然のことではあるが、アミノ酸配列はGEN#435と同一であるため、本遺伝子は、フィブロン抽出法の適応が可能であり、紡糸安定性も優れたものであった。



図③-1-1-1. 分子創出フィードバック概略図



図③-1-1-2. 遺伝子の生産性と応力の推移

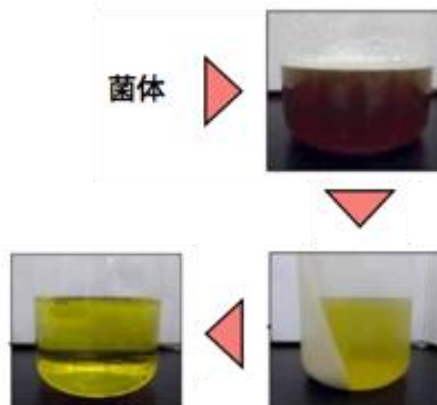
フィブロイン抽出適応分子の創出 (Spiber(株))

Spiberでは、フィブロインタンパク質を簡易に、かつ純度高く精製するためのフィブロイン抽出法をこれまでに開発してきた(図③-1-1-3)。しかしながらフィブロイン抽出法は、自社で開発した

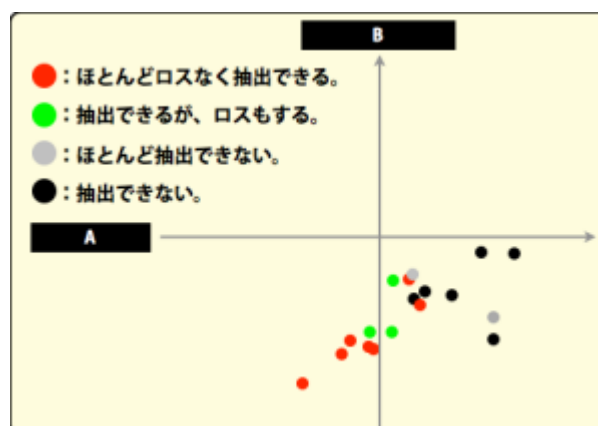
フィブロイン遺伝子全てに適応可能なわけではなかった。研究開発をスピードよく進めていく上で、予めフィブロイン抽出法により精製可能かどうかを判別できることは、非常に重要である。したがってフィブロイン抽出法に適する分子の傾向を明らかにすべく、研究に取り組んだ。

まず、フィブロイン抽出法で歩留まりよく精製可能な分子の特徴を明らかにするために、これまで作製した遺伝子ライブラリーから、配列組成が異なる遺伝子を18個ピックアップした。それら遺伝子について培養後、フィブロイン抽出法を実施し、「ほとんどロスなく抽出できる遺伝子」、「抽出できるが、ロスも見られる遺伝子」、「ほとんど抽出できない遺伝子」、「抽出できない遺伝子」の4つのカテゴリーに分類し、配列的な特徴を元にクラスター解析を行った。その結果、因子Aと因子Bの観点で遺伝子をグラフ上にプロットしたところ、抽出可否について、上手く分類することができた(図③-1-1-4)。

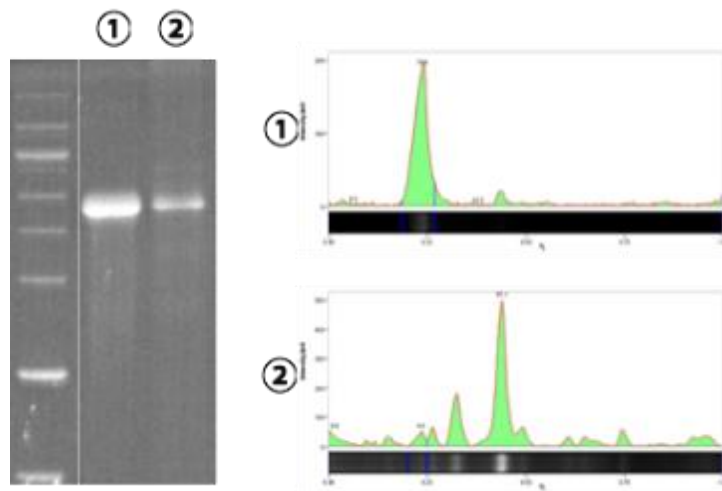
そこで因子A、因子Bの観点を元に、これまでフィブロイン抽出法でロスが大きかったGEN#325をベースとして遺伝子の改変を行った。その結果、GEN#370の開発に成功した。GEN#370は、フィブロイン抽出法に適応可能な分子であり、精製時のタンパク質のロス率は2割程度と、GEN#325と比較して歩留まりが大幅に改善された(図③-1-1-5)。さらにGEN#370の生産性は6.6g/Lであり、GEN#325の5.4g/Lを大きく上回るものとなり、物性もGEN#325と同等レベルであった。以上から、フィブロイン抽出法に適した配列的な因子を明らかにし、分子設計の段階で予め精製可能性を判別することができるようになった。



図③-1-1-3. フィブロイン抽出法



図③-1-1-4. 各遺伝子に対する抽出可否



図③-1-1-5. GEN#370の抽出時の泳動写真とデンシトグラム
①は抽出された GEN#370 であり、②はロスした GEN370 である。

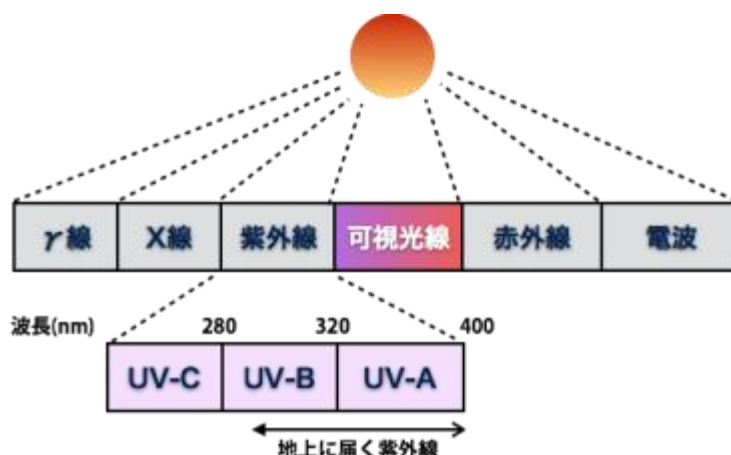
紫外線吸収分子の創出 (Spiber(株))

Spiberではこれまで、人工フィブロインの生産性及び、物性を重視して、遺伝子デザインフィードバック解析を実施してきた。その一方で出口となるアプリケーションを見据えると、フィブロインの特徴である物性面以外に、どのような機能性を付与できるかで、アプリケーションの方向性は大きく変わることもある。したがって、今後、分子デザインによる物性面以外の機能性強化を、素材ポテンシャルの幅を広げる非常に重要なテーマと位置付け、推進していく考えである。

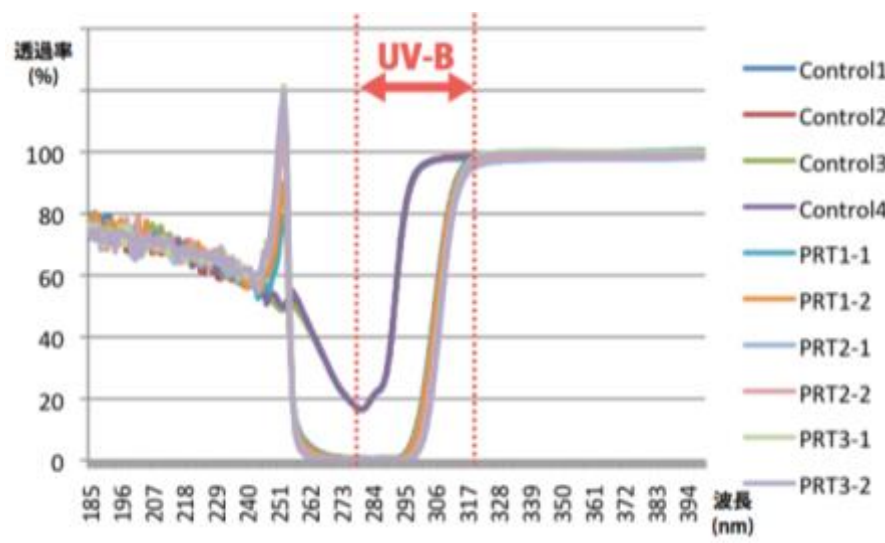
今回、機能性強化として、紫外線吸収能の向上を目指した。これは様々なアプリケーションメーカーと話を進めていく中、紫外線吸収は非常にニーズの高い分野であるとわかったためである。また、フィブロイン粉末を溶媒に溶かし、吸光度を測定するだけで評価が可能であるといった点も、ハイスループットに評価を進める上で、魅力的であった。

今回、紫外線の中でもUV-Bを吸収するような人工フィブロインの開発を行った。紫外線は大きく、UV-A (波長320nm~380nm)、UV-B (波長280nm~320nm)、UV-C (波長200~280nm)に分けることができる(図③-1-1-6)。このうちUV-Cは通常大気を通過できないため、地表には届かず、問題とならないが、UV-Bは日焼けの原因となるメラニンを生産する。またUV-Aはメラニンを酸化し、シミの原因となる。したがって、UV-Bを遮断できれば、日焼け防止効果があると言える。コントロールとして、GEN#325の紫外線吸収能の評価を行ったところ、295nm~315nmまでの波長はほぼ100%透過しており、280nm~295nmまでの波長については最も吸収している領域でも20%弱が透過していた(図③-1-1-7)。したがってUV-B吸収能に優れた材料であるとは言い難い結果となった。そこでGEN#325をベースに、分子改良を実施した。生産性が大きく損なわれてしまえば、材料としては使えないため、生産性を維持しつつも、UV-B吸収能が高まるようアミノ酸組成や並びを変更し、その結果GEN#370を抽出した。GEN#370は280nm~300nmまでの波長をほぼ完全に吸収することができ、GEN#325と比較すると、明らかにUV-Bを吸収できる領域が広がり、またその程度も高まっ

ていた（図③-1-1-7）。さらに生産性も5g/Lを超えるため、生産性を大きく損なうことなく、新たな機能を付加することに成功したと言える。ただし300nm~320nmの領域については、透過しているため、この領域の対処については課題が残った。



図③-1-1-6. UV-Bの波長領域



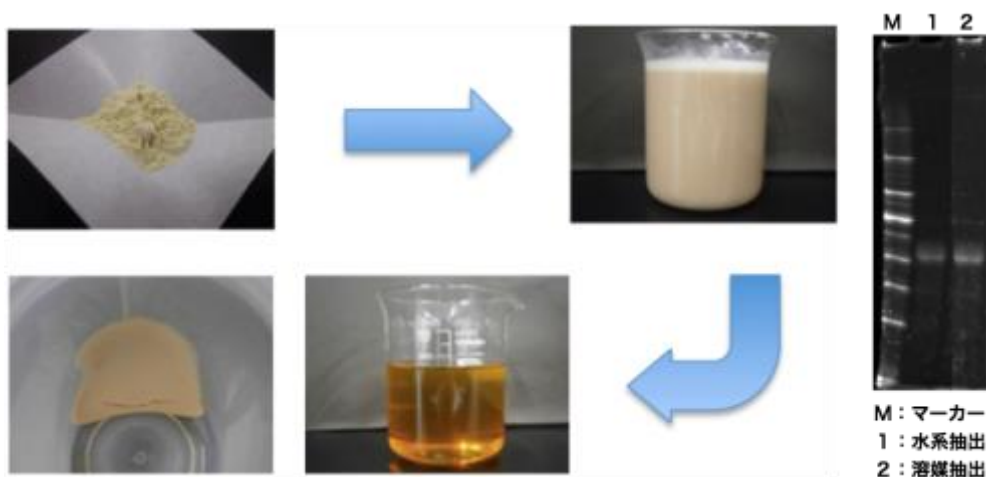
図③-1-1-7. GEN#370の紫外線吸収能
Control1~4とPRT1~3はそれぞれ、GEN#325とGEN#370の紫外線吸収曲線である。

革新的精製方法の開発 (Spiber(株))

精製工程のコストダウンは事業化する上で避けては通れない分野である。通常、ラボでのタンパク質の精製は超音波破碎機を用いたり、ニッケルセファロースを用いたアフィニティー精製などを行うが、同様の手法ではスケールアップができず、コストも非常に高くなってしまふ。したがって極力簡易な工程で、高価な試薬を用いず、純度高く精製できる方法を作り上げる必要がある。これまでに、人工フィブロンタンパク質を精製する上で、有機溶媒を用いたフィブロン抽出法を開発してきた。本抽出法は簡易な工程で純度高く精製できるため、非常に優れた精製法であるが、有

機溶媒を使用するため、コストの問題があった。本手法でもある程度の量産は可能であるものの、将来的に人工フィブロイン繊維を広く世の中で販売していくためには、極力コストを抑えた生産プロセスを構築しなければならない。したがって、フィブロイン抽出法のコストの問題を解決すべく、有機溶媒の使用を止め、水系でのフィブロイン抽出法の検討を進めた。

その結果、有機溶媒を用いた抽出法とほぼ変わらない純度で、人工フィブロインタンパク質を精製可能なプロセスの構築に成功した(図③-1-1-8)。工程としては、始めに菌体を用意する。次にフィブロインタンパク質を抽出可能な水溶液を用いて、菌体からフィブロインタンパク質を溶出させる。そして、不純物を含む固形分と液を分離し、抽出液からフィブロインタンパク質を析出させる。その後、凝集体を洗いこむことで不純物を取り除き、乾燥する。このようにして得られた粉末を SDS-PAGEにより電気泳動したところ、有機溶媒を用いたフィブロイン抽出法と変わらない純度となった。またこの新しい精製方法で得られた粉末を用いて、実際に紡糸を行ったところ、これまでとほぼ変わらない物性データを得ることができた。今後は本手法をスケールアップしていく予定である。



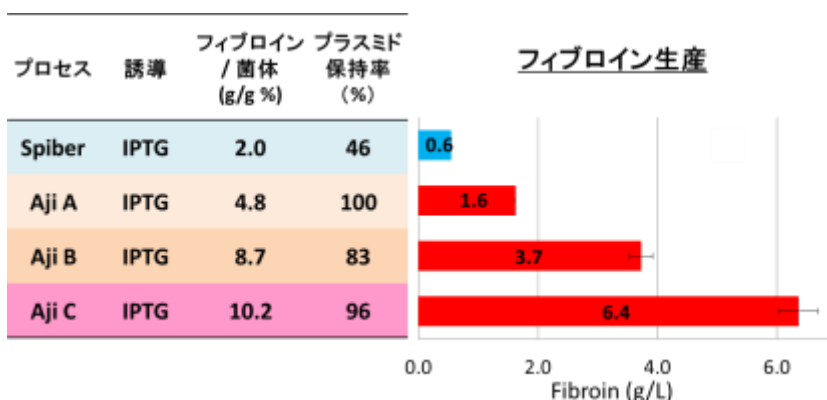
図③-1-1-8. 水系精製のフローと精製されたフィブロインタンパク質の電気泳動写真

(1-2) 革新的培養プロセスの開発

【Spiber(株)、味の素(株)】

革新的培養プロセスの開発 (味の素(株))

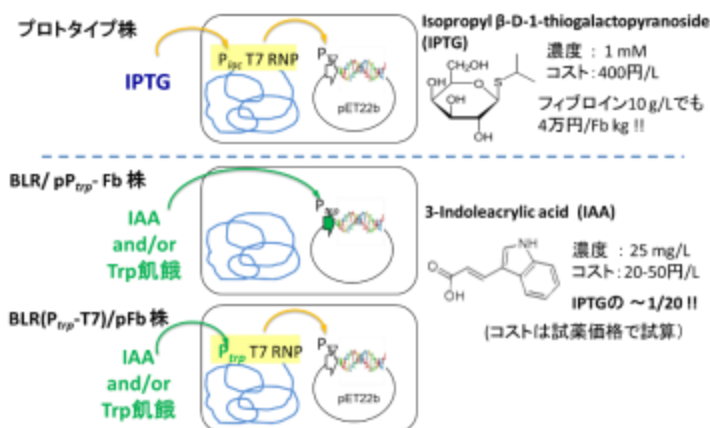
高機能ポリペプチド(クモ糸由来フィブロイン)の革新的培養プロセス開発に取り組んだ。革新的生産プロセス開発の第一段階として、スパイバー社より移管されたプロトタイプ株を用いて、培養ラボ基本プロセスを構築し(スパイバー社培養: 0.55 g/L、A社プロセスAで1.6 g/L、プロセスBで3.7 g/L)、50 Lスケールアップテストでも同等の成績を実証した。さらに高生産を目指すプロセスCを構築し、当初の10倍以上の6.4 g/Lと劇的に高いフィブロイン生産を達成した(特許出願2件、図③-1-2-1)。



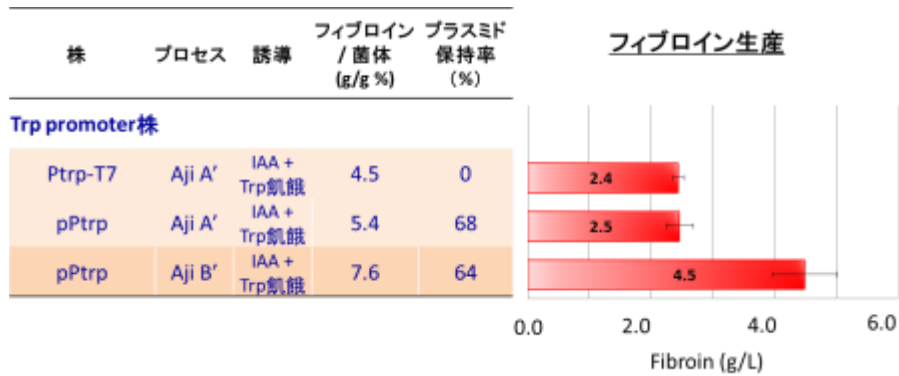
図③-1-2-1. 培養基本プロセス構築
プロトタイプ株での各プロセスでの培養成績を示した。

工業化可能な発現系の開発 (味の素(株))

将来工業化可能な生産プロセス構築のため、原料コストの観点から、プロトタイプ株で用いているIPTGによる誘導系に代え、*E. coli*のトリプトファンプロモーターを用いて、安価なインドールアクリル酸 (IAA) やトリプトファン飢餓条件で誘導可能な系を構築した(図③-1-2-2)。下記の培養基本プロセスを基に培養プロセスを開発し、IPTG誘導系と同等以上のフィブロイン生産を実現した(図3)。特許を1件出願した。



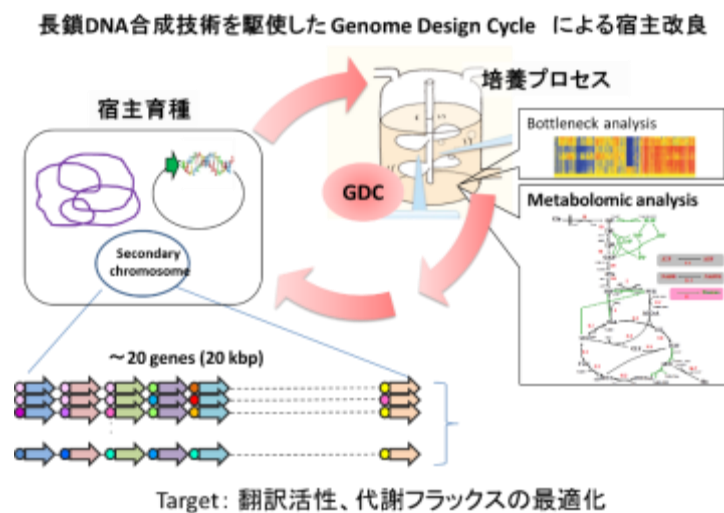
図③-1-2-2. フィブロイン遺伝子誘導方法の変更



図③-1-2-3. トリプトファンプロモーターを用いた株でのフィブロイン生産

GDC による更なる生産性向上 (味の素(株))

宿主開発と培養プロセス開発とを連動させてゲノムデザインサイクル (GDC) を回すことにより、更なる生産性向上に取り組んだ(図③-1-2-4)。



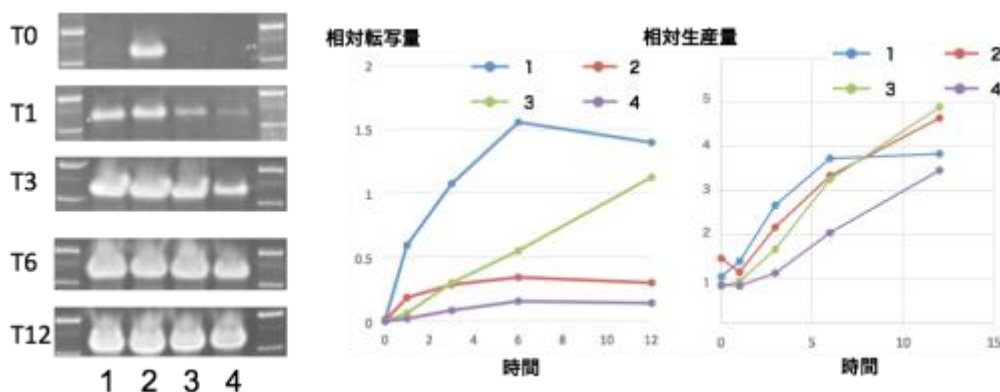
図③-1-2-4. OGAB 法を駆使した GDC による宿主開発

mRNA 量の最適化検討 (Spiber(株))

昨年度までの結果から、人工フィブロインタンパク質生産時の菌体を分析したところ、フィブロインタンパク質のmRNA量が誘導後に増えて行く一方で、フィブロインタンパク質の生産量は伸びが悪いことが明らかとなっていた。したがってタンパク質の翻訳が生産律速となっていることが示唆された。本年度、フィブロインタンパク質の生産性向上を目指して、2つのアプローチを取ることとしている。一つは、mRNA量の抑制である。これはmRNAの転写量が多すぎることで、細胞内で好ましくない状態になっている可能性が考えられたため、敢えてmRNA量を抑えることで、生産性を向上できるのではないかと仮説である。もう一つのアプローチは、翻訳活性を高めるために、翻訳因子を増強することで生産性を高めようというものである。ここでは前者のmRNAの発現

量抑制検討について述べる。

mRNAの発現量を減らすためにプロモーターの改変に取り組んだ。本来のプロモーター配列の一部を欠損したり、置換したりすることで、転写量の抑制を試みた。その結果、図③-1-2-5に示すようにコントロールと比較して、最終的に0.8倍～0.1倍程度にmRNA量が抑えることが可能なプロモーターを抽出することができた。これらプロモーターは、特に誘導直後において転写量が抑制されるという特徴を有していた。次に生産性評価を行ったところ、コントロールと比較して、一部プロモーターについては、生産性が約1.3倍程度向上していた。転写量と発現量の関係を観てみると、改変1および改変2については、誘導直後の転写量はコントロールに比べて少ないものの、最終的な生産性が高くなっていた。その一方で、改変3のような転写量の場合では、コントロールとほぼ変わらない生産性となっていた。したがって、改変2と改変3の間に、生産効率の良い転写量が存在する可能性がある。

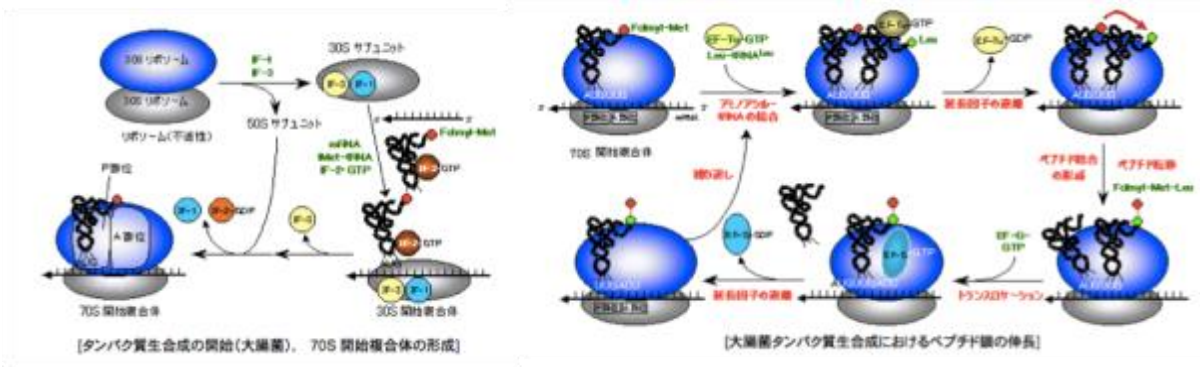


図③-1-2-5. 人工フィブリンタンパク質の mRNA 量と生産量
1: コントロール 2: 改変1 3: 改変2 4: 改変3

翻訳因子の強化 (Spiber(株))

菌株のフィブリンタンパク質生産性強化を進める上で、ここでは2つ目のアプローチである翻訳因子の増強について述べる。上述したようにフィブリンタンパク質の生産律速の一要因として翻訳効率が考えられている。したがって翻訳因子を強化することで、翻訳律速を解消し、結果としてフィブリンタンパク質の生産性が高まるのではないかという仮説を立てた。tRNAやアミノアシルtRNAシンセターゼの強化については、味の素社がすでに取り組みを始めているため、翻訳の開始や伸張に関わる因子 (図③-1-2-6) を強化することで、生産性の向上を実現できないかを検討することとした。

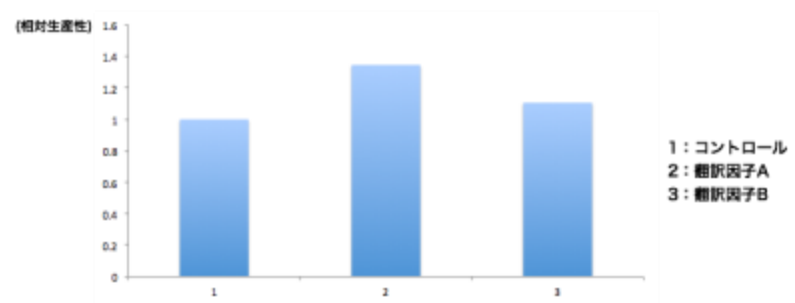
検討結果を図③-1-2-7に示す。今回、因子の組み合わせも含め、20種類以上の因子をのせたベクターを用意し、培養検討を行った。多くのベクターは特段、生産性に寄与するような結果とならなかったが、2つのベクターについてはコントロールと比較し、生産性が1.1～1.3倍となっていた。しかしながら、今回増強した因子について、細胞の中でそれらの発現が向上している結果をまだ取得できていない。したがってこれら翻訳因子が直接的に生産性向上に寄与したかは現時点で不明であり、引き続き解析を進めていく予定である。



図

③-1-2-6. 翻訳因子

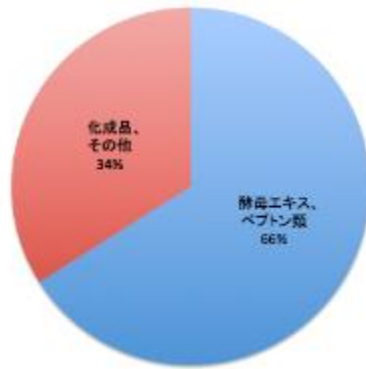
<http://www.sc.fukuoka-u.ac.jp/~bc1/Biochemtranslat.htm> より引用



図③-1-2-7. 翻訳因子を強化した菌株のフィブロインタンパク質生産性

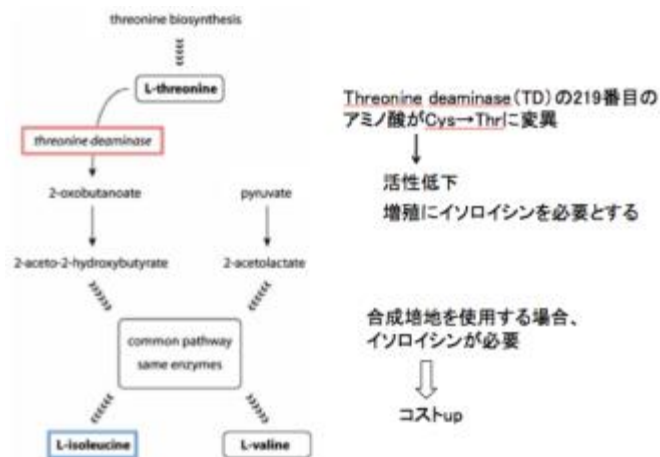
<合成培地で培養可能な宿主の創出>

今後のアプリケーション販売に向け、どのような価格帯でフィブロインファイバーを販売できるか、という観点は非常に重要である。特に発酵生産においては、培地コストが総コストに占める割合が大きく、培地コストを下げることは、トータルのコストダウンに直結する。本研究においても、これまで酵母エキスやペプトン類を培地に使用してきたが、これらの材料は非常に高価であるため、将来的に使い続けることができるものではない (図③-1-2-8)。したがって、天然物の使用を極力少なくし、化成品を中心とした合成培地に移行する必要がある。しかしながら、合成培地での培養試験の結果、使用菌株が増殖しないということが確認された。そのため、何かしらの栄養要求性があるのではないかと調査した結果、イソロイシン要求性があることが判明した。

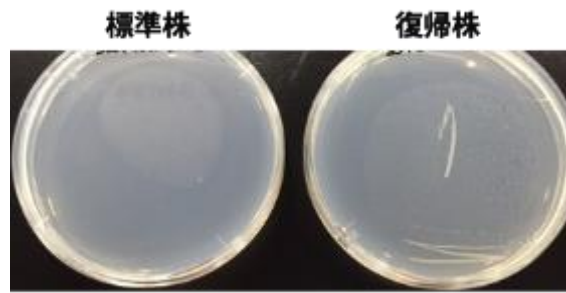


図③-1-2-8. 培地コストの内訳

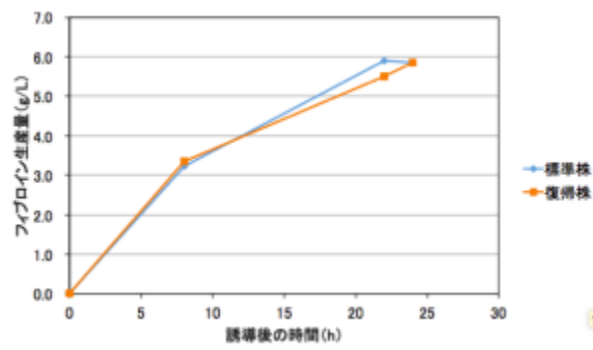
イソロイシン要求性がどのようなメカニズムによって起こっているかを調べたところ、L-threonineを2-oxobutanoateに変換する*threonine deaminase*について、本来219番目のアミノ酸はシステインであるが、それがスレオニンに置換されたことで、酵素としての働きを失っているようである（図③-1-2-9）。したがって、本遺伝子の219番目のアミノ酸をスレオニンから、システインに置換することで酵素活性を取り戻せると考えた。そこで本来の配列を合成し、相同組換えにより、遺伝子全体の置換を行った。遺伝子置換を行った菌株を合成培地にまいたところ、元株では観られなかったコロニーを観察できた（図③-1-2-10）。したがって本菌株はイソロイシン栄養要求性を復帰できたものと判断した。またこの栄養要求性復帰株について、高密度培養実施時に、元株との力価に違いがないかを確認した。天然物を含む培地を用いて、元株と同様の条件で培養を行ったところ、栄養要求性復帰株は元株と同等の濁度、フィブロリン生産性を示した（図③-1-2-11）。以上から、本栄養要求性復帰株は合成培地の検討を進める上で有用な菌株と判断できたため、今後、本菌株を用いて検討を進めていく予定である。



図③-1-2-9. 栄養要求性のメカニズム



図③-1-2-10. 合成培地におけるコロニー形成



図③-1-2-11. 栄養要求性復帰株の生産性

(1-3) 人工フィブロインを用いたアプリケーション開発

【小島プレス工業(株)】

小島プレス工業の持つ金属、樹脂、電子部品といった技術と、Spiberの持つ遺伝子設計・合成、紡糸、Textileといった技術を融合し、フィブロインタンパク質からなる繊維の応用とその製品化を目指している(図③-1-3-1)。Spiberはベンチャー企業であり、遺伝子設計・合成といったバイオ技術は得意であるものの、ものづくりや製品化の経験がない。そこでまず小島プレス工業の製品化等の経験をもとに紡糸工程の条件最適化や紡糸装置の開発から着手した。



図③-1-3-1. 小島プレス-Spiber コラボレーション

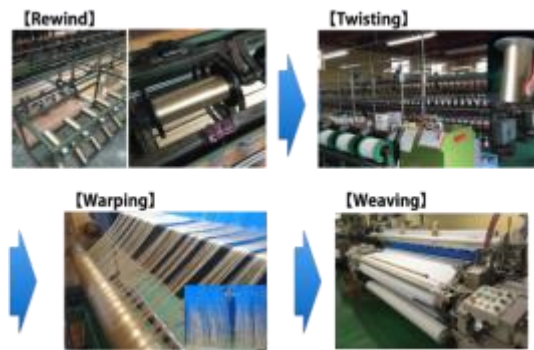
MOON PARKA の発表

2015年10月8日、表参道ヒルズにて株式会社ゴールドウィンのブランドである「THE NORTH FACE」のロゴをまとったMOON PARKAを発表した(図③-1-3-2)。このパーカは、ゴールドウィン社から実際に発売されているアンタークティカパーカの型を採用しており、金色に輝くアウター部分と、ロゴの刺繍にフィブロインファイバーが採用されている。本パーカは、世界で初めて工業ラインを使用して作られたフィブロインファイバーの生地が使用されており、今回のプロトタイプングによってアパレル向けの素材として、どのような機械特性や化学特性がファイバーに求められるかを把握することができた。また、フィブロインファイバーを工業ラインでテキスタイル化するために、どのような装置を使い、どのようなチューニングをすべきかという理解も進み、今後のアプリケーション販売に向けて、大きく前進することができた(図③-1-3-3)。

今後、スポーツアパレル分野はゴールドウィン社を中心に、アプリケーション販売を行っていく計画であり、上市のための準備を進めているところである。



図③-1-3-2. MOON PARKA



図③-1-3-3. テキスタイル工程

自動車内装品への応用

これまでの評価で、Textileの織りや積層枚数によって耐衝撃性に違いが出ることを見出した。またTextileのフィラメント数や目付と強度の相関といった基本特性データを取得することができた。一方、染色堅牢性に関しては耐光性や湿熱試験後に劣化が認められたが、添加剤の適用により改善の見通しを得ることができた。今後は試作品レベルでの評価と課題の抽出を行い、実車への採用を目指す。またオーナメント開発で得た知見を用いて他の内装部品への応用を実現する(図③-1-3-4)。



図③-1-3-4. 自動車内装品に求められる機能

(2) 医薬原料

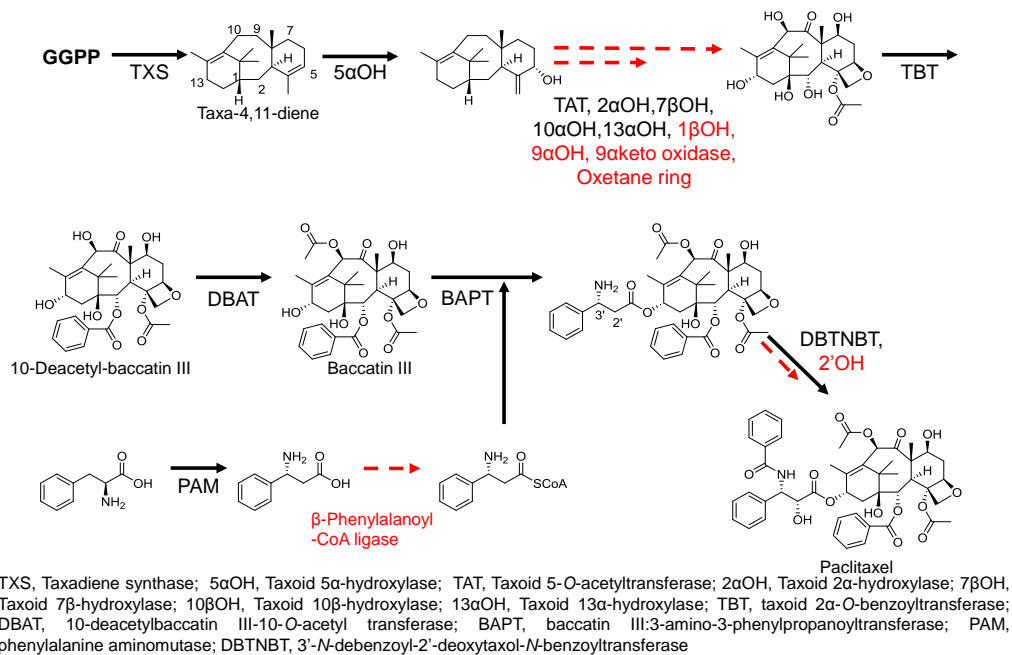
(2-1) パクリタキセル

【神戸大学、石川県立大学、鳥取大学、神戸天然物化学(株)】

中間体からの paclitaxel 生合成技術の開発

Paclitaxel (パクリタキセル, 商標: タキソール[®]) は、非小細胞肺癌・胃がん・子宮がん・乳がん・卵巣がん・子宮頸がんなど多くのがん治療に適用可能であることから化学療法における抗がん剤として外科療法、放射線療法などと組み合わせて、広くがん治療に利用されている。Paclitaxel 関連化合物の国内市場だけでも年間500億円規模が見込まれており、今後も需要拡大が期待されている医薬品の一つであるといえる。現在、paclitaxel 製造法は主としてイチイ培養細胞から生合成中間体を抽出、精製した後、半合成でpaclitaxelへの誘導を行っている。今後の需要拡大に対して代替の製造法の確立が求められており、微生物による製造は需要拡大に対する解決法の一つといえる。そこで高機能化ゲノムデザイン技術開発の一環として微生物を宿主としたpaclitaxel の基礎的な生合成技術を開発することにした。

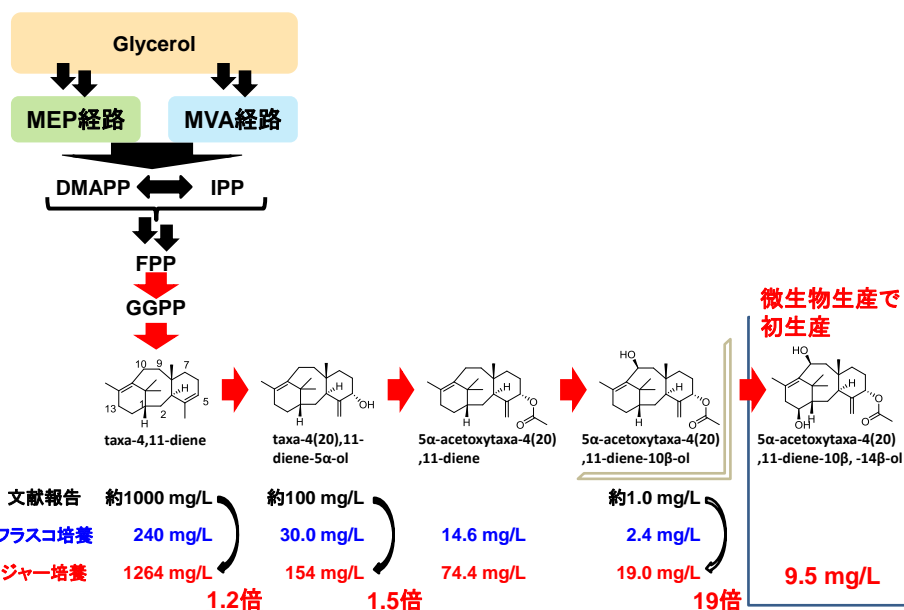
Paclitaxelはイチイから単離・構造決定されたジテルペン系化合物であり、taxa-4,11-dieneから約18段階の酸化、環化、アセチル化、ベンゾイル化反応等を経て生合成されると推定されている(図③-2-1-1)。このうち12段階の酸化、アセチル化反応等に対応する酵素遺伝子については報告されているが、生合成経路中段の残り3段階の酸化、環化反応及び後段の1段階の酸化及びβ-phenylalanoyl-CoA ligaseに対する酵素遺伝子については報告されてない。微生物によるpaclitaxelの生合成戦略としては①タキサン骨格とその酸化物の効率的生産法の開発、ならびに②半合成法に代わるバイオプロセスの開発という二通のアプローチが考えられる。事業開始時において、微生物によるパクリタキセル中間体の発酵生産の報告は大腸菌系及び出芽酵母系ではtaxa-4,11-dieneから一段階酸化のtaxa-4(20),11-diene-5α-olまでであった。そこで本事業では、大腸菌形質転換系を用いて既報¹⁾を越えるtaxa-4,11-diene等から高度に酸化された生合成中間体の生合成技術の開発を目的とした。さらに2通りのプロセスを実現するためには未同定の酵素の探索が必要となる。そこで、RNA解析技術を活用して新たに生合成関連遺伝子の探索を行うことにした。



図③-2-1-1. Paclitaxel 推定生成経路

Paclitaxel 中間体生成技術の開発（神戸天然物化学）

微生物を宿主にしたpaclitaxel中間体生成技術の開発には、メバロン酸経路を新たに導入した大腸菌株を生産宿主として利用した。メバロン酸経路導入の大腸菌にtaxa-4,11-dieneをはじめとする既知paclitaxel生成遺伝子を導入し、paclitaxel中間体の生産を検討した。本研究では、既報¹⁾を超える高酸化度のpaclitaxel中間体の大腸菌系での生産を目指して、taxa-4,11-diene合成酵素、シトクロームP450及びアセチル化酵素を複数導入し、さらにタンパク質可溶化等の条件検討を行った。得られた株をジャーファメンターによる高密度培養法を用いて生産量の検討を行った。その結果、最新の共培養系の報告²⁾を超える生産量を実現し、特に5α-acetoxytaxa-4(20),11-diene-10β-olでは19倍の生産量を実現した。さらに既報²⁾の大腸菌系、出芽酵母系及び共培養系を超える高酸化度を有する5α-acetoxytaxa-4(20),11-diene-10β,14β-diolの発酵生産に世界で初めて成功した（図③-2-1-2）。

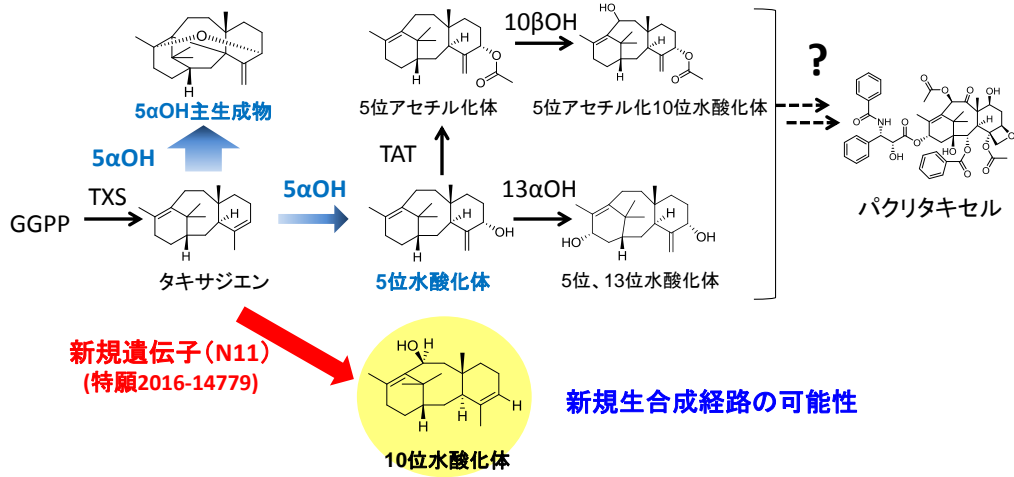


図③-2-1-2. 大腸菌生産系による paclitaxel 生合成中間体の生産
赤色の矢印は、大腸菌に導入した paclitaxel 生産に関連する反応ステップを示す。

生合成遺伝子の探索（神戸天然物化学）

Paclitaxelの生合成経路は図3に示したようにtaxa-4,11-dieneを出発物質として、taxa-4,11-dieneから5α位の水酸化及びアセチル化を経て、10位が酸化される経路、もしくは5位水酸化から13β位の水酸化を経る経路が提唱されているのみで、taxa-4,11-dieneから2、3段階の生合成が進んだ推定経路に過ぎない。また、他の2α位及び7β位の水酸化酵素はpaclitaxelと同様にタキサン骨格を有するtaxusin誘導体を基質として得られた酵素である。したがって、taxa-4,11-dieneを出発原料とした微生物生産系を構築するには、新たに生合成関連遺伝子の探索を同時に進める必要がある。そこで、特に酸化反応に着目しシトクロームP450（P450）をターゲットとした新規パクリタキセル酸化遺伝子の探索を行った。

Paclitaxel生産報告のあるイチイ樹木、イチイ培養細胞、イチイ内生菌の評価を行い、ニホンイチイの樹木を遺伝子資源として選抜した。産業技術総合研究所ならびにインシリコバイオロジー株式会社の協力を得て、選抜した遺伝子資源のRNAシーケンス解析を行い、イチイ樹木で発現している遺伝子の配列情報を網羅的に取得した。得られた遺伝子配列より新規候補配列を選定し、開発したpaclitaxel生産大腸菌系による機能解析、新規化合物の単離・構造解析を経て新規にtaxa-4,11-dieneの10位を酸化するP450遺伝子（N11）を取得した。本酵素は提唱されていた生合成経路とは別経路を示唆しており、従来経路のボトルネックであった5α位水酸化反応で生じる多量の副生成物の問題を回避できる可能性を秘めている（図③-2-1-3）。



図③-2-1-3. Paclitaxel 推定生成経路

- 1) Ajikumar P.K. et al. (2010) *Science* 330(6000):70–74.
- 2) Biggs B.W. et al.(2016) *PNAS* 113(12):3059-3214.
- 3) Zhou K. et al.(2015) *Nature biotechnol.* 33(4):377-383.

(2-2) セスキテルペン類

【神戸大学、石川県立大学、鳥取大学、神戸天然物化学(株)】

セスキテルペン類の効率的生合成技術の開発

セスキテルペンはテルペン化合物群最大の約3,000種が確認されている。Artemisinin（抗マラリア薬）やsantonin（回虫駆除剤）など医薬品として処方されているほか、精油や香料原料として広く利用されている。その他にも、セスキテルペンには炎症抑制活性、抗がん活性や抗ウイルス活性等様々な生理活性を有する化合物が多く報告されている。しかし、それらの化合物は概して植物体中の含有量が非常に低いものが多く、十分な研究及び用途開発が行われているとは言い難い。したがって、セスキテルペンの研究・用途開発において微生物等による代替供給源の開発が求められている。

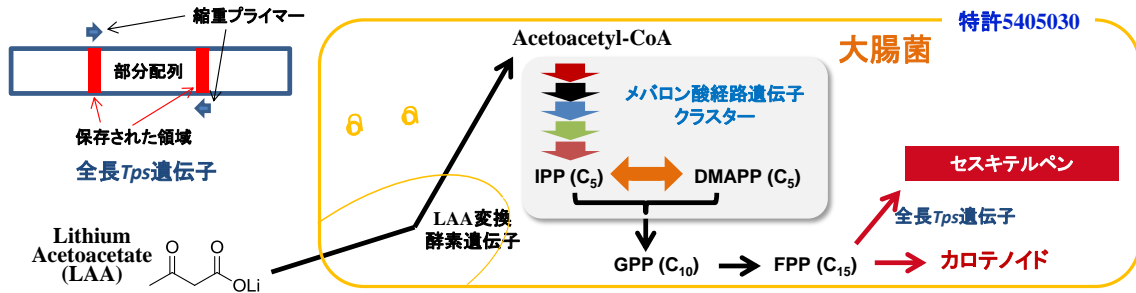
セスキテルペンはイソプレン単位が3個結合した炭素数15の化合物であり、鎖状から単環性、複環性など30種以上の様々な基本骨格が報告されている。しかし、植物種が違っていても、同様の骨格構造を有するセスキテルペンを生産する例は数多く報告されている。よって、微生物によるセスキテルペンの合成技術を開発する上で、薬用に供されている植物種の他にも、様々な植物種から数多くのセスキテルペンの基本骨格を持つセスキテルペン合成酵素を得ることが重要である。さらに、セスキテルペンはファルネシルニリン酸から環化反応等を経て合成されたのち、酸化、アセチル化、配糖化及び水素付加等の様々な修飾を受けて多様な化学構造へ導かれる。これらセスキテルペンの修飾酵素の代表的な例はシトクロームP450である。したがって、微生物によるセスキテルペン生産ではシトクロームP450の機能発現が化学修飾を受けたセスキテルペン生合成における重要な要素の一つとなる。そこで、本事業では多様なセスキテルペンの基本骨格を得るため石川県立大学で芳香植物からセスキテルペン合成酵素の探索を行うとともに、セスキテルペン類の効率的生合成技術の開発にあたりセスキテルペン合成に実績のある大腸菌系のゲノムデザインサイクルの基本技術を利用した改良とジャーファメンターによる生産検討を鳥取大学と神戸天然物化学で検討し、近年バイオディーゼルの生産により大量培養技術が確立されつつある油性酵母に着目し、メタボローム解析技術の適用と代謝改良への応用の可能性を神戸天然物化学で検討した。

植物からの有用セスキテルペン生合成遺伝子の探索（石川県立大学）

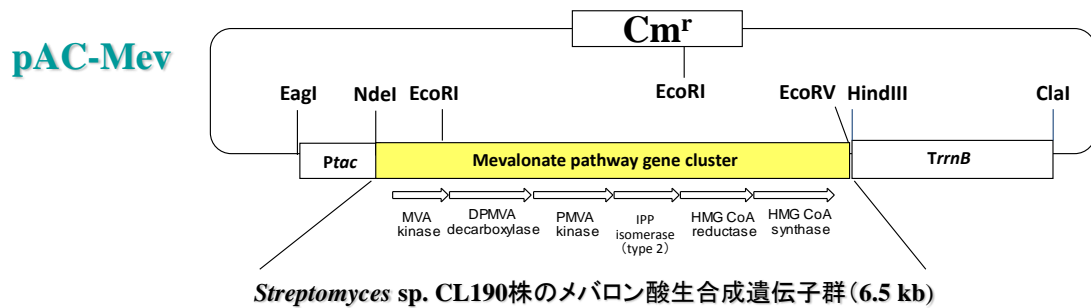
石川県立大学では、様々な食用植物や芳香植物からセスキテルペン合成酵素（terpene synthase; TPS）をコードする新規遺伝子（*Tps*）を単離し、大腸菌を用いた機能解析系（大腸菌機能解析系と呼ぶ；石川県立大学が独自に保有）により、TPS活性を評価することを通して、単離した遺伝子の機能を明らかにしてきた。すなわち、大腸菌用発現ベクターに挿入した*Tps*遺伝子を、リチウムアセト酢酸（アセト酢酸リチウム塩；LAA）の資化能を持つ組換え大腸菌（プラスミドpAC-Mev/Scidi/Aaclを保持）、またはエチルアセト酢酸（アセト酢酸エチルエステル；EAA）の資化能を持つ組換え大腸菌〔プラスミドpAC-Mev/Scidi/Aacl/pnbA（鳥取大学報告書を参照）を保持〕に導入した。この形質転換細胞を培養し、細胞抽出物のGC-MS分析によりセスキテルペンの生成を評価した。セスキテルペンの生成が確認されたものについては、必要に応じて、セスキテルペンの精製を行った後、NMR等の機器分析を行い、化学構造を決定した。さらに、生成したセスキテルペンの同定を効率的に行うため、高回収率、高純度での精製方法を確立した。さらに、効率よくセスキテルペンを生産する

ために、フラスコ培養の最適化条件の検討も行った。

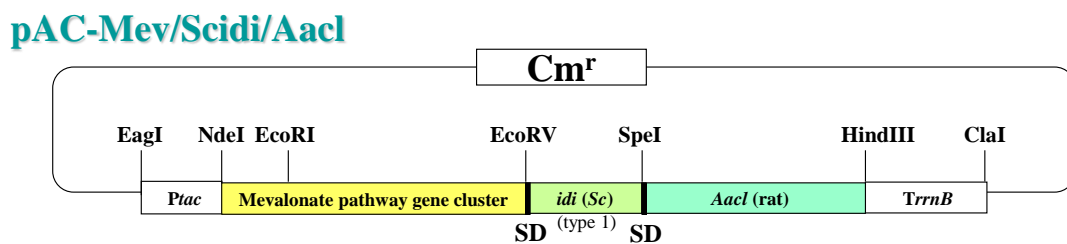
石川県立大学が保有する独自の大腸菌機能解析系の概要を図③-2-2-1に示した。なお、本図はプラスミド pAC-Mev/Scidi/Aacl を保持する組換え大腸菌の例である。図③-2-2-2にプラスミド pAC-Mev/Scidi/Aacl の構造を、図③-2-2-3に、同プラスミド内の遺伝子群がコードするメバロン酸経路酵素群の触媒機能と代謝経路を示した。



図③-2-2-1. セスキテルペン合成酵素遺伝子の大腸菌機能解析系の概要

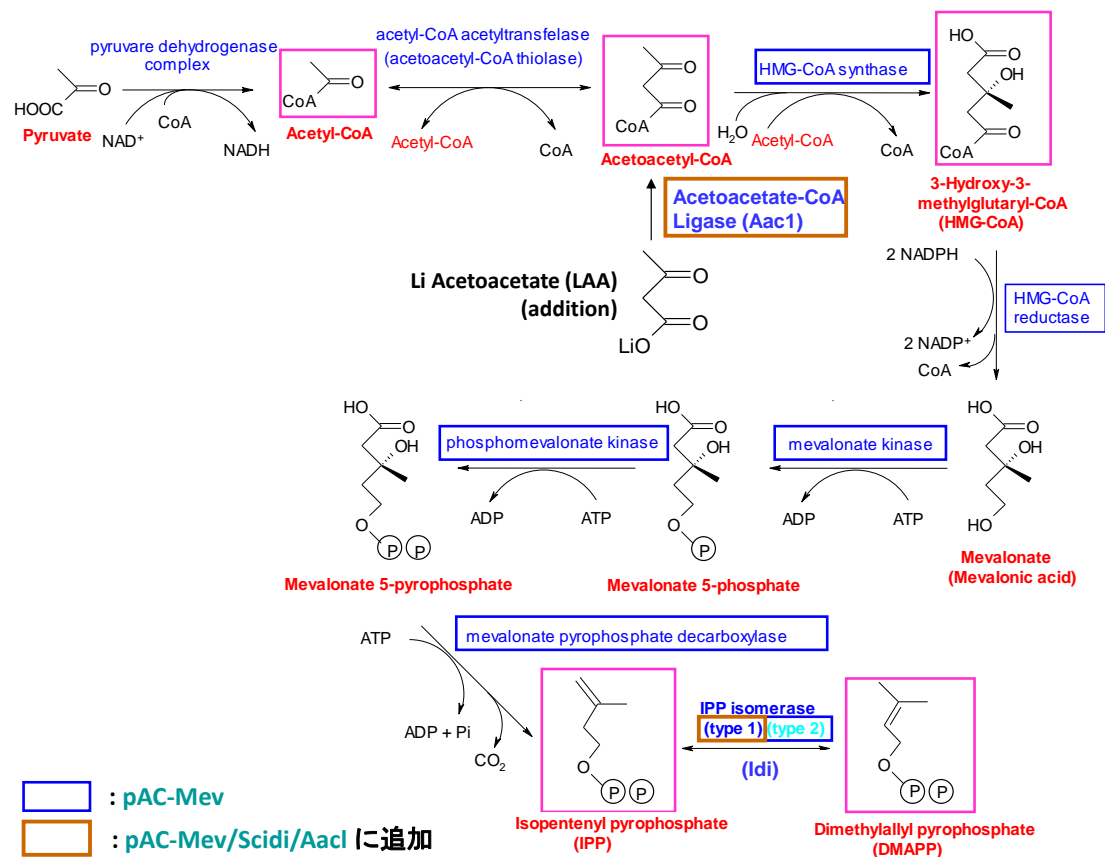


Streptomyces sp. CL190株のメバロン酸生合成遺伝子群 (6.5 kb)



*tac*プロモーター及び*rrnB*ターミネーターに放線菌*Streptomyces* sp. CL190由来のメバロン酸生合成遺伝子群配列、酵母*Saccharomyces cerevisiae*のIPP isomerase (*Scidi*)及びラットのacetoacetate-CoA ligase (*Aacl*)を連結し、これをpACYC184プラスミドに連結

図③-2-2-2. プラスミド pAC-Mev/Scidi/Aacl の構造



図③-2-2-3. プラスミド pAC-Mev/Scidi/AacI 内の遺伝子群がコードするメバロン酸経路酵素の触媒機能と代謝経路

基本代謝経路改変によるテルペン類高生産大腸菌株の作出（鳥取大学）

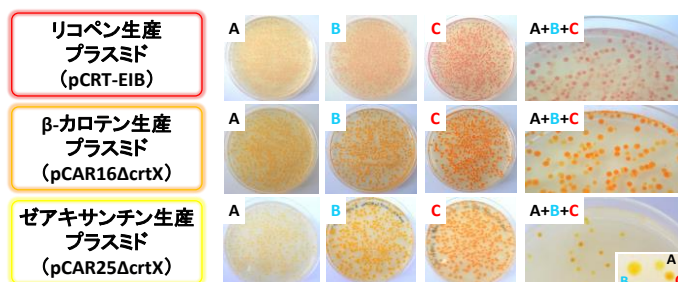
既存の代謝改変大腸菌を利用したテルペン生産システムにおいては、1) 生産量増加に向けた高機能な基本代謝経路関連遺伝子の選抜と最適化発現ベクター構築、2) 生産に用いる基質化合物の低コスト化が課題であった。そこで、新規高機能遺伝子の選抜、選抜した高機能遺伝子を利用した最適化発現ベクターの構築と機能評価、ならびに安価な基質からの生産系構築を通じ、最終的には有用テルペン類の実用レベル生産が可能な大腸菌株の作出を目指した。全ゲノム配列情報からの細菌由来メバロン酸経路遺伝子群の選抜および機能評価を行った結果、既存生産系の3倍程度の顕著な生産量増加を示す3種の細菌由来MVA経路遺伝子群を機能同定した。また、従来用いていたアセト酢酸リチウム塩 (LAA) よりも原料価格で1/100程度 (¥7/g) も安価なアセト酢酸エチルエステル体 (EAA) からの生産系構築により、大幅な基質のコストダウンを達成した。さらに、選抜した高機能遺伝子について、OGAB法による遺伝子集積を利用して発現ベクターを構築した。

高機能化遺伝子発現ベクターの構築と機能評価

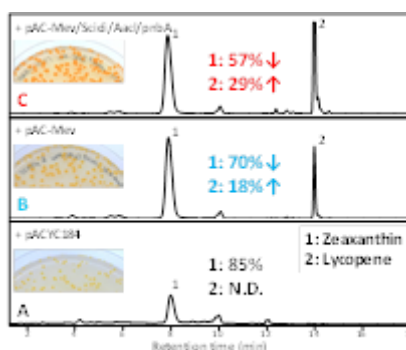
＜カロテノイド生産を指標とした高機能遺伝子発現株スクリーニング法の構築＞

高機能化発現ベクターの選抜を目的として、カロテノイド生産を指標としたスクリーニング法を構築した。3種類のカロテノイド（リコペン・β-カロテン・ゼアキサンチン）を生産する大腸菌株を用い、これに基質資化性の異なる3種類のプラスミド（pACYC184・pAC-Mev・pAC-Mev/Scidi/AacI/pnbA）を共導入することで、カロテノイド生産を菌体の呈色強度により比較し

た。その結果、導入プラスミドならびにカロテノイドの違いによって、呈色強度が異なり、中でもゼアキサンチン生産株においては顕著な呈色強度差が確認された（図③-2-2-4）。ゼアキサンチン生産株について、カロテノイド蓄積をHPLCにて分析した（図③-2-2-5）。その結果、生産量の増加に伴い中間体であるリコペンの蓄積割合が増加しており、これにより黄色のゼアキサンチンに赤色のリコペンが混ざることによって橙色が強くなると推察された。したがって、ゼアキサンチンによるスクリーニングが最適であると判断した。



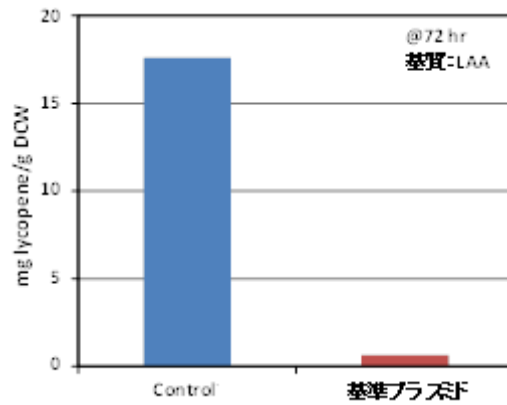
図③-2-2-4. 各カロテノイド生産株における呈色強度



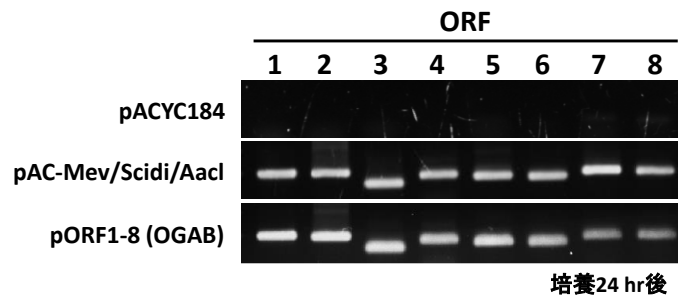
図③-2-2-5. ゼアキサンチン生産株分析

<OGAB 法による高機能化遺伝子発現ベクター構築>

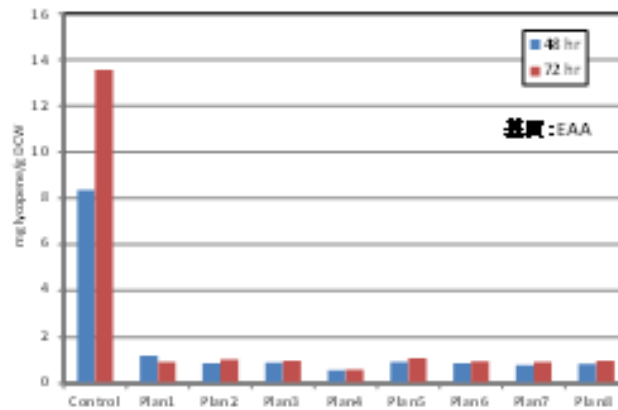
基本代謝経路8遺伝子を対象に、OGAB法による基準発現ベクターの構築を行った。ドナープラスミド構築時に高頻度に変異挿入される現象が見られたが、プライマー再合成により改善が見られた。そのため、プラスミド構築に使用するプライマー（50~65 mer）は、合成または精製の品質が重要であると予想された。各ORFドナープラスミドを用いてOGAB法による発現ベクター構築ならびに機能解析を行った結果、目的とする基準発現ベクターは非発現株と同等の生産性を示した（図③-2-2-6）。この発現プラスミド導入株の転写物解析を行ったところ、導入遺伝子全てについて転写産物が認められたことから、SD配列構造に起因する翻訳過程での障害が示唆された（図③-2-2-7）。次に、機能同定した2菌株由来のMVA経路遺伝子群を対象に、OGAB法で発現プラスミド8種を構築して機能評価を行った。その結果、こちらの場合においても基準プラスミドと同様の生産性を示したことから、SD配列構造の問題によりMVA経路酵素遺伝子群が機能発現していないことが示唆された（図③-2-2-8）。



図③-2-2-6. 基準プラスミドの生産性評価



図③-2-2-7. 導入プラスミドの転写物解析



図③-2-2-8. 最適化用プラスミドの生産性評価

<高密度培養法を用いたセスキテルペン生産の検討> (神戸天然物化学)

前述で開発した大腸菌系を用いて、より安価な基質であるアセト酢酸エチル(EAA)を利用した高密度培養にてセスキテルペン生産を検討した。石川県立大より提供を受けてきたセスキテルペン合成遺伝子群の中から、特にフラスコ培養で生産量が多かったγ-amorphene生産株(生産量19.6 mg/L)を用いて、高密度培養を検討した。EAA添加系で各種条件検討を行ったところ、γ-amorpheneの生

産量を175.4 mg/Lにまで増産させることに成功した。

油性酵母によるセスキテルペン生産系の開発（神戸天然物化学）

油性酵母は一般にバイオマスの20%以上の脂質を細胞内に高蓄積する酵母群の総称である。近年ではバイオディーゼルの生産宿主として注目され、各種油性酵母の大量培養技術が確立されつつある。脂肪酸はテルペン類と同じく acetyl-CoA を前駆物質とするため、acetyl-CoA 供給能力が高いと推定され、今後のテルペン生産における有望な宿主の一つであるといえる。事業開始時において数種の油性酵母の形質転換法の報告があるのみでテルペン生産については皆無であった。

セスキテルペンの生産系開発にあたっては、15種の油性酵母株を収集し各株の生育度、平均糖消費量及び網羅的な脂肪酸及びテルペン類分析等の比較解析の結果から、良好な生育と高い脂肪酸生産能を示す *Lipomyces* spp.1 を選抜した。取得株について形質転換などの遺伝子操作技術（遺伝子導入効率の改良、多重遺伝子導入、遺伝子発現調節）および代謝改良株の評価技術（メタボローム解析、テルペン生産能評価）等のゲノムデザインサイクル要素技術開発を行った結果、artemisinin の前駆体である amorpha-4,11-diene の生産に初めて成功した。さらに、セスキテルペンの修飾に重要な シトクローム P450 遺伝子を導入し artemisinic alcohol の生産にも成功した。次に、メバロン酸経路推定代謝律速点を改良することで amorpha-4,11-diene の生産性を約17倍に、artemisinic alcohol の生産性を約1.5倍に増大させることにも成功した。メタボローム解析を用いて代謝産物の解析を行い、さらに次の律速点を推定した。これらの結果から産業用酵母である *Lipomyces* spp.1 へのゲノムデザインサイクルの適用による代謝改変が可能であることを示した。

➤ 事業化、製品化（見込みも含む）の状況

天然有機化合物として植物や微生物など様々な生物種に数多く見出されるテルペン系化合物はテルペン合成酵素から酸化、還元、配糖化、アセチル化及びベンジル化等の化学修飾を受けて多様な構造に導かれる。特に生理活性を有する化合物は、植物体中にて高度に酸化されたものが多いことから、微生物によるテルペン類の生産技術確立にはテルペンから高度な酸化物まで効率よく作る技術が不可欠である。

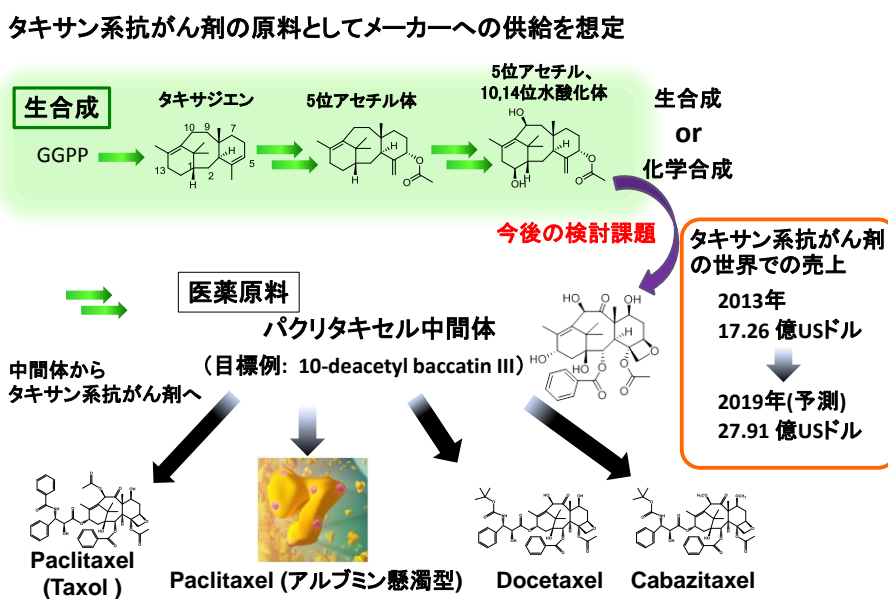
中間体からのパクリタキセル生合成技術の開発

タキサン系抗がん剤はアルブミン抱合型や誘導体型などが開発され、世界で17億米ドル以上(2013年推定値)の売り上げを誇る代表的な抗がん剤の一つであり、引き続き市場規模の拡大が期待される。主に植物培養細胞で中間体の生産がされた後、半合成で原体が製造されており、市場規模の拡大により代替生産法の開発が期待される。

パクリタキセルの化学構造は高度に酸化されており、多段階の酸化反応を必要とする代表的な化合物の一つである。本事業では大腸菌系を用いて、ジャーファメンター培養の最適化などにより taxa-4,11-diene の生産量を1,264 mg/Lまで向上させた後、3つのシトクローム P450 酵素及びアセチル化酵素を大腸菌内で連続的に反応させることで 5 α -acetoxytaxa-4(20),11-diene-10 β ,14 β -diol の生産に世界で初めて発酵生産に成功した。多段階の植物由来のシトクローム P450 を大腸菌系で効率よく発現させ、大腸菌発酵生産では既知の推定生合成経路の二酸化物をこえ、モデル化合物としての三酸化物の生産を行い、高度酸化物の製法を確立した。さらなるパクリタキセル新規生合成関連遺伝

子の導入・機能発現に対応できる基礎技術である。今後、生合成及び化学合成の両面から化合物構造の構築のための最適な手法を選択しパクリタキセル前駆体（目標例10-deacetyl baccatin III）の供給手段を検討する。

植物由来のシトクロームP450を含む多数の遺伝子を大腸菌内で機能発現させる技術は、酸化修飾が多数存在する生理活性物質の生産に必須である。本事業ではtaxa-4,11-dieneのリッターあたりグラムスケールの生産量を実現し、さらに高度酸化物を発酵生産で得ることができた。今後、パクリタキセルを含め酸化テルペン類の大腸菌系による発酵生産の事業化検討を引き続き行っていく。（図③-2-2-9）



図③-2-2-9. タキサン系抗がん剤への原薬供給事業

セスキテルペン類の効率的生合成技術の開発

植物中に微量に含まれるセスキテルペンは抗酸化、抗潰瘍、抗アレルギーなどの様々な有用生理活性が報告されていながら、これまでの植物体試料の抽出・精製では量的な面で問題になることが多く、用途開発やその後の製品化を阻む理由の1つとなっている。そのため代替供給源として微生物発酵等の手法が着目されている。本事業では様々な骨格を有するセスキテルペン合成酵素遺伝子を取得した。新たに開発した油性酵母系においてもシトクロームP450等の共発現によるさらなる化学修飾も可能であり供給可能な化合物群の幅を拡大することができた。大腸菌と油性酵母の両形質転換系の活用により、従来に生産できなかった化合物の供給検討が可能になった。

得られた新規13種のセスキテルペンの抗酸化や抗潰瘍、抗癌、抗血管新生などの様々な生理活性を調査するため、大学、企業等の研究機関と共同で研究開発を進めることを検討している。適宜、用途開発等の市場調査なども行いながら事業化に繋げたいと考えている。現在は、セスキテルペンの市場が確立されている香料等のマーケットに着目し調査を行っていく（図③-2-2-10）。

油性酵母(KNC)/大腸菌(鳥取大学)を宿主とした
テルペノイド生産プラットフォームを構築



- ・用途開発等の共同研究
(大学・研究機関にサンプル提供)
- ・市場調査

(想定分野)

香料 など



生合成遺伝子の提供

モノテルペン
Linalool 等

セスキテルペン

Hedycaryol

Hedycaryol

Elemol

α -Copaene

Germacrene A

Valerianol

α -humulene

α -Selinene

β -caryophyllene

Amorpha-4,11-diene 等

ジテルペン

Taxa-4,11-diene-10 β -ol

Taxa-4,11-diene

Oxidized taxanes 等

トリテルペン 等

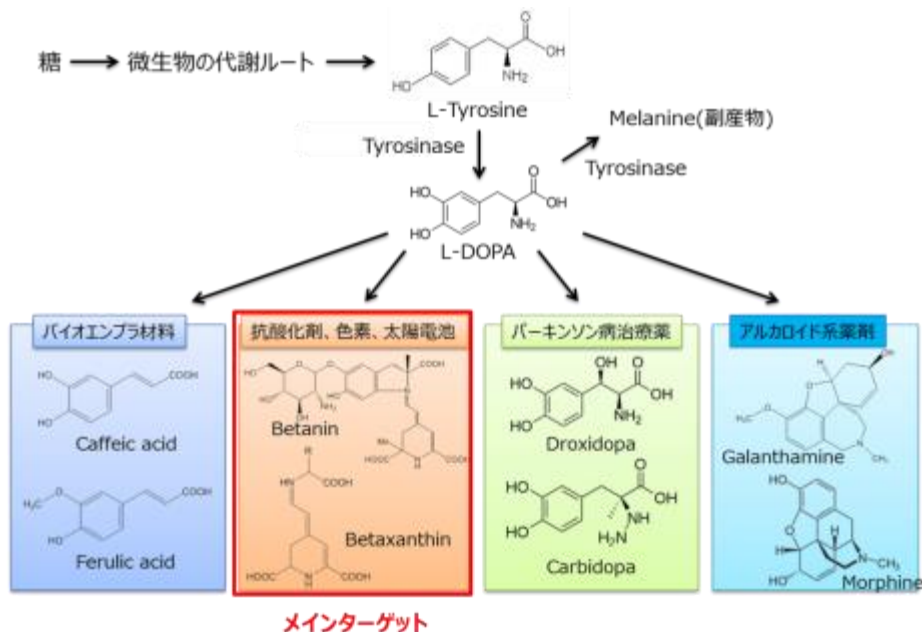
カロテノイド 等

青文字: 本PJで新たに得られた遺伝子

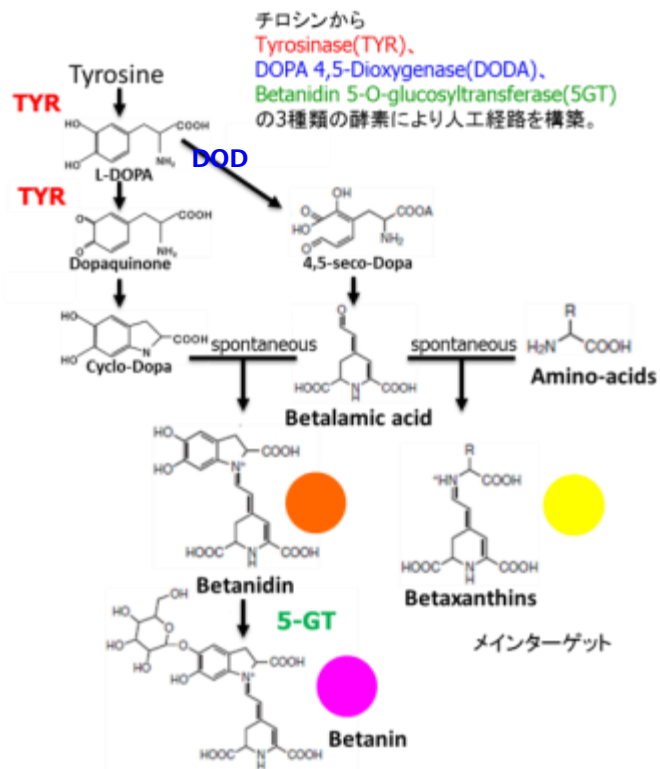
図③-2-2-10. 未利用セスキテルペン等の用途開発に向けて

本検討では、現在市場価値が高い、もしくは将来的に期待される高付加価値化学品の中で、工業化スケールでの生産が植物からの抽出等に依存している化学品をターゲットとして、高効率バイオ生産プラットフォームを構築することを目指した。バイオ合成ターゲットとして、色素増感型太陽電池の増感剤や抗酸化剤としての利用が期待されているアルカロイド類の一種であるベタレイン色素を設定した(図③-2-3-1)。ベタレイン色素は、マツバギク、ビート、サボテンなどの中心子目植物においてのみ生産され、希少価値が高く、安定供給が困難な化合物群である。その生合成経路は図2-3-2のように推定されているが、一部、生合成遺伝子が未知であるため、バイオ合成ルート探索ツールM-pathを利用することで実証可能性の高いルート設計を行った。実際に設計したバイオルートを大腸菌および酵母にて構築し、微生物製法特許を取得した。

次に、アルカロイド類全般の生産効率の向上を目的に、アルカロイド類の生合成ルートにおける鍵酵素であるチロシナーゼ(TYR)の酵素改変を実施した。ベタキサンチンの呈色を指標とするハイスループットスクリーニング(HTS)系を独自に構築し、17000株のスクリーニングを実施した結果、約20種類のベタキサンチン高蓄積型TYR変異体を取得した。さらに、変異箇所を掛け合わせ、組み合わせの最適化を実施し、野生型比で最大12.3倍のベタキサンチン生産性を有する変異体を取得した。また、取得したTYR変異体を用いて、アルカロイド類合成経路のハブ化合物であるL-DOPAの生産性を検証したところ、野生型と比較してL-DOPAの生産性が向上していることを確認した。本結果から、我々が獲得した変異型TYRはベタキサンチン生産性の向上だけでなく、アルカロイド類全般の生産性向上のために活用できる可能性が示唆された。今後は、L-DOPAやベタレイン色素以外の他のアルカロイド類の生産についても、取得したTYRの活用を念頭に評価を継続していく予定である。



図③-2-3-1. チロシンから派生するアルカロイド類



図③-2-3-1. ベタレイン色素バイオ合成ルート

(3) 微生物抗生物質（環状ペプチド化合物、ストレス応答性化合物）

【産業技術総合研究所、クミアイ化学工業(株)、東北大学、北海道大学】

環状ペプチド化合物 KK-1

糸状菌 *Curvularia* sp. が産生する抗菌性物質 KK-1 は、10 個のアミノ酸から成る環状ペプチド構造を基本骨格とした化合物であり、農薬としての利用が望める抗菌活性を有しているものの十分な生産性が確保できないことから産業利用に至っていない。そこで、本化合物の生合成遺伝子クラスターを同定し、GDC の活用により生産性の大幅な向上を図ることを目的として、研究開発を行った。

環状ペプチド化合物 KK-2

KK-2 は糸状菌 *Alternaria* sp. が産生する除草活性を示す化合物であり、4 個のアミノ酸から成る環状ペプチド構造を基本骨格としている。KK-1 と同様に農薬としての利用が望める活性を有しているものの十分な生産性が確保できないことから産業利用に至っていない。したがって KK-2 についても本プロジェクト内での生産性の大幅な向上を目的としている。具体的な方策としては、KK-1 の生産菌 *Curvularia* sp. を宿主とした検討を進めている。*Curvularia* sp. は野生株でも KK-1 生産能が高く、産生する二次代謝物の大部分が KK-1 である。さらに遺伝子操作が麹菌と同等以上に容易であることが明らかとなっており、環状ペプチド化合物を主とした二次代謝物の生産宿主として適している可能性があると考えた。そこで、KK-2 の生合成遺伝子を *Curvularia* sp. の KK-1 生合成遺伝子クラスターのローカスに導入し、さらに KK-1 の高生産化検討で得られた知見を応用することにより KK-2 の大量生産を実現することを目標とした。また、これらを通じて将来的には *Curvularia* sp. の NRPS 系化合物の大量生産ホストとしての実用化を検討したいと考えている。

➤ 事業化、製品化（見込みも含む）の状況

環状ペプチド化合物

KK-1 および KK-2 について、引き続き高生産化の検討を行うことで十分な生産量を確保する。その後、一般的な農薬開発のスキームに則り、安全性や環境動態等の実用化に必要な試験データを蓄積していく。また、KK-1 の生産性向上の検討を通じて、*Curvularia* sp. が環状ペプチド化合物の大量生産ホストとして有用であることが明らかとなり、この技術の実用化に向けた取り組みも継続していく。

(4) バイオコモディティ

【神戸大学、三菱化学(株)】

(4-1) 低コスト糖化プロセスの開発

燃料、プラスチック原料といった年間生産規模が高く、安価な汎用化学品（コモディティーケミカル）の低コストバイオ合成プロセスの確立のためには原料の低コスト化が鍵となる。安価な原料としてバイオマス、特に非可食資源(稲ワラ、バガスetc)の利用が注目されているが、バイオマス为原料として利用する際には、産業用微生物が基質として利用可能な糖へと分解する必要がある。バイオマス酵素糖化法では、希硫酸処理、蒸煮処理によるリグニン、ヘミセルロースの分解を目的とした前処理工程とセルラーゼによる糖化工程を経るが、本検討では各ステップの条件を最適化することで低コストプロセスの確立を目指した（図③-4-1-1）。



図③-4-1-1. バイオマス为原料としたバイオ化学品合成プロセス

第一段階として、糖化効率の向上を目的とし、糖化槽内の攪拌翼の形状検討を実施した。従来型の二枚翼の他に、リボン翼、アンカー翼を設計し、糖化効率の比較を行った。これらの中ではアンカー翼が最も攪拌効率が高く、200g/L以上の高濃度バイオマスを効率的に攪拌可能であること確認した。

第二段階として、糖収量、発酵阻害物質低減化を目的とし、バイオマス前処理における粉碎工程の有無、希硫酸処理濃度の最適化検討を実施した。バイオマスとしてバガスを使用し、希硫酸処理濃度を乾燥重量当たり0.5%~2.0%と設定して評価したところ、バイオマスに粉碎処理を追加し、希硫酸処理濃度を0.5%と低く設定することで、獲得糖収量の低下を回避し、さらにはアルデヒド系阻害物質蓄積量を低減化することが可能であることを確認した。

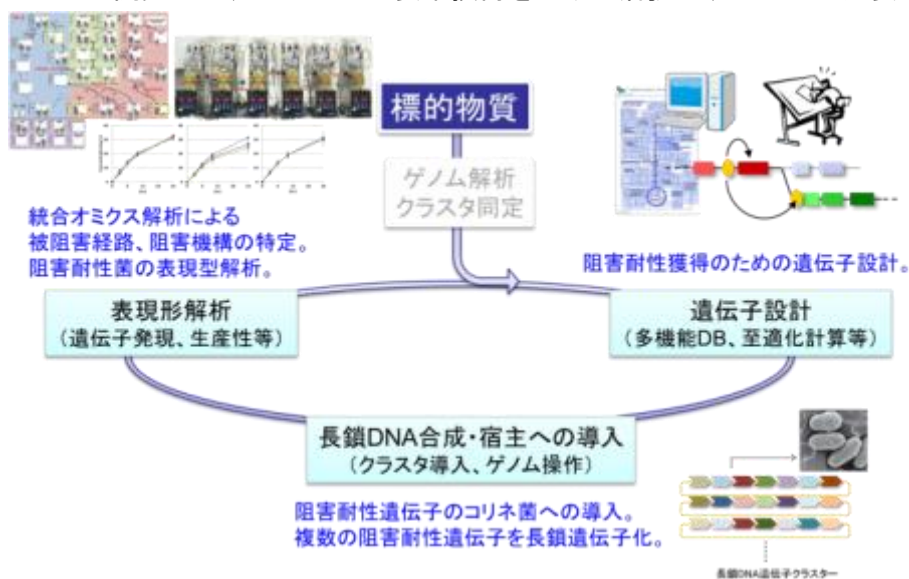
(4-2) 発酵阻害物質耐性微生物の開発

非可食資源由来原料の利用は経済的なバイオコモディティー生産には不可欠であるが、前処理工程にて生成する過分解物の中には発酵生産を阻害する物質が含まれており、阻害の影響を低減させることが発酵生産プロセス開発において大きな課題となっている。本開発項目においてはバガス糖化液を原料としたコリネ菌の有機酸生産をモデルケースとして、ゲノムデザインサイクルの要素技術を駆使することで、発酵阻害物質に耐性を有する微生物の開発に取り組んだ。

まず、バガス糖化液を原料として、コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 による微好気条件での発酵試験、および菌体内メタボローム解析を実施した。結果、バガス糖化液の条件では、試薬グルコースの条件と比較して、中央代謝経路内の複数のメタボライトの蓄積量低下が確認され、メタボライトの上流代謝反応が阻害されている可能性を見出した。また、トランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析により、上流代謝反応を触媒している遺伝子転写量およびタンパク発現量が低下していることが明らかとなり、転写レベルで阻害されている可能性を見出した。

上述の被阻害候補経路に関与する遺伝子について、単独発現増強株を作製し、発酵阻害試験を実施したところ、いくつかの増強株が阻害耐性を有することを確認した。阻害耐性（阻害回避率）は最大で 49.8%であった。次に、単独増強により阻害回避率が向上した遺伝子に関して、OGAB 法を用いて多重増強株を作製し、発酵阻害試験を実施したところ、単独増強株と比較して阻害回避率が向上し、74.4%に達した。また、自社 MCC 株（コハク酸生産）では、同様の方法で阻害回避率が 51.1%に達した。

以上のように、表現型解析→遺伝子設計→宿主への導入→評価といったゲノムデザインサイクル（GDC）の活用で阻害耐性を付与した微生物の育種において有効であることが実証された（図③-4-2-1）。一方で、GDC 活用における課題も明らかになってきた。課題の一つは、オミックスデータから、増強または改変すべきターゲット遺伝子を迅速かつ精度良く抽出することである。もう一つは、抽出した複数遺伝子の増強レベル等を迅速に最適化することである。これらの課題を克服するためには、メタボロミクス解析や OGAB 関連技術のハイスループット化やユーザーフレンドリーなドライ解析ツールの開発など、GDC PF の要素技術をより一層強化することが必要である。



図③-4-2-1. GDC の活用イメージ

(5) 関連技術の技術動向調査

【(一財)バイオインダストリー協会】

画期的なバイオマテリアル製造技術の創成を目的とし、取得されたゲノム、発現遺伝子、機能たんぱく質などの膨大なオミクス情報を、目的に沿った解析が効率よく遂行できるような、システム生物学の観点から活用するための技術調査を遂行した。当組合において、最新技術情報を駆使し、革新的バイオマテリアル創成のため酵素の設計図である遺伝子設計、或いは物質生産の向上である宿主細胞の創成を狙った技術開発のアイデアの創出を目的とした。具体的には、国際会議での情報収集、WEB 検索による情報収集等を行った他、海外の研究拠点、企業を訪問して調査を行った。収集した情報は組合内で共有した。

事業アウトプット指標		
①遺伝子設計技術の開発		
指標目標値（計画及び実績）		
事業開始時（24年度）	計画：-	実績：微生物から植物やヒトまで多種多様な生物のゲノム情報が解読され、データベース化されている。さらに、それぞれの遺伝子発現情報などのオミクス解析データが蓄積され、遺伝子の生化学的機能の解明が進み、それら膨大な情報もデータベースとして公開されている。
中間評価時（26年度）	計画：有用な物質生産、および生産性に鍵となる遺伝子を効率的に解析する技術および遺伝子クラスター設計のための要素技術を開発する。また、ゲノム設計・解析支援システムのプロトタイプを完成させ、利用者への提供を開始する。	実績：遺伝子クラスター設計のための要素技術として、MIDDAS-M 法や新規代謝経路探索ツール、多機能データベースなど、鍵となる遺伝子を解析する技術を開発した。また、ゲノム閲覧・遺伝子クラスター設計支援機能や実験データを管理する実験データマネージャーなどの開発を進め、利用者への提供を開始した。 (達成度 100%)
終了時評価時（28年度）	計画：バイオ産業プロセスの研究開発効率の革新的な向上を目的として、ウェットとドライの解析の高効率な連携システムを開発する。これにより、研究開発項目③の微生物による有用物質の高効率生産実現のために、5万塩基対以上に対応できる新規遺伝子クラスターの設計技術を確立する。	実績：遺伝子クラスター設計のための総合的要素技術として、ゲノムデザインサイクルプラットフォーム（GDCPF）の構築を行った。また、ゲノム閲覧・遺伝子クラスター設計支援機能や実験データを管理する実験データマネージャーなどの開発を進め、利用者が提供できるGDCPFの製品化も行った。 (達成度 100%)
②長鎖 DNA 合成・操作技術の開発		
指標目標値（計画及び実績）		
事業開始時（24年度）	計画：-	実績：慶應義塾大学の板谷教授グループが、枯草菌を用いて約350万塩基対からなる光合成細菌の全ゲノムDNAのクローニングに成功し、ゲノムサイズの長鎖DNAの合成及び

		操作技術を推進してきた。
中間評価時 (26 年度)	計画：遺伝子クラスター長鎖 DNA 合成技術の汎用プロトコルを確立すると共に、宿主微生物への速やかな導入システムを開発する。	実績：枯草菌をユニークな宿主とする DNA 合成法として、OGAB 法とドミノ法の改良に取り組み、それぞれ第 2 世代の手法開発に成功した。枯草菌を利用する有効性と汎用性を示すことに加えて、遺伝子クラスターを酵母、麹菌に迅速に導入するパイプラインも確立した。 (達成度 100%)
終了時評価時 (28 年度)	計画：設計された 5 万塩基対以上からなる遺伝子クラスター DNA を正確に迅速に合成する手法を開発し、長鎖 DNA を宿主となる微生物に組み込む技術を確立する。	実績：枯草菌を宿主とする DNA 合成法として、第 2 世代 OGAB 法の活用により、5 万塩基対の遺伝子クラスター DNA を正確に合成する技術開発に成功した。長鎖 DNA 合成技術についての知財化、その知財を活用したベンチャー企業を立ち上げ、本事業の事業化を進めた。 (達成度 100%)

③革新的バイオマテリアル生産技術の開発		
指標目標値（計画及び実績）		
事業開始時（24年度）	計画：-	実績：我が国における物質生産におけるバイオプロセスは、中・高分子量の物質を、省エネルギー・環境適合型で生産する上で化学プロセスに対して特に優位性を持っているが、複雑な構造を持つ化合物の生産を高収率に行うことは難しく、微生物の防御反応等により期待されるほどの生産性をあげることはできていなかった。
中間評価時（26年度）	計画：迅速な宿主ゲノムの改変技術を確立するとともに、研究開発項目①で設計された遺伝子を導入した微生物について、有用物質生産状態の細胞内応答の解析技術を開発する。また、タンパク質系、化合物系の物質群それぞれ1種類以上について、遺伝子クラスター導入微生物のプロトタイプを作製し、目的物質を生産させた際の微生物の応答について解析データを取得し、「①遺伝子設計技術の開発」に提供する。	実績：迅速に宿主ゲノムを改変する技術に加え、細胞内応答を解析するためのゲノム解析・発現解析・代謝解析からなるマルチオミクス解析技術を確立した。また、マルチオミクス解析技術を利用した。目的代謝経路のボトルネック探索法の開発を進めた。さらに、タンパク質系、化合物系の物質群の標的について、遺伝子クラスター導入微生物のプロトタイプを作製し、物質生産時の細胞内応答について解析データを取得し、「①遺伝子設計技術の開発」への提供を可能にした。 (達成度 100%)
終了時評価時（28年度）	計画：生産コストや環境負荷低減など社会から求められる産業上の観点から、創製した人工遺伝子組換え微生物を用いて、産業上有用な物質の革新的バイオプロセスを確立し、従来の数十倍以上の高効率、低コスト化あるいは環境負荷低減を実現する。また、従来合成できなかった有用物質群について、その合成を実現する。	実績：ゲノム編集の知財を活用したベンチャー企業を立ち上げ、事業化を行った。さらに、タンパク質系、化合物系の物質群の標的について、遺伝子クラスター導入微生物のプロトタイプを作製し、物質生産時の細胞内応答について解析データを取得し、「①遺伝子設計技術の開発」に提供しながら、GD CPF の洗練を行った。 (達成度 100%)

各研究開発項目に関する事業アウトプットの詳細について別添参考資料を参照されたい。

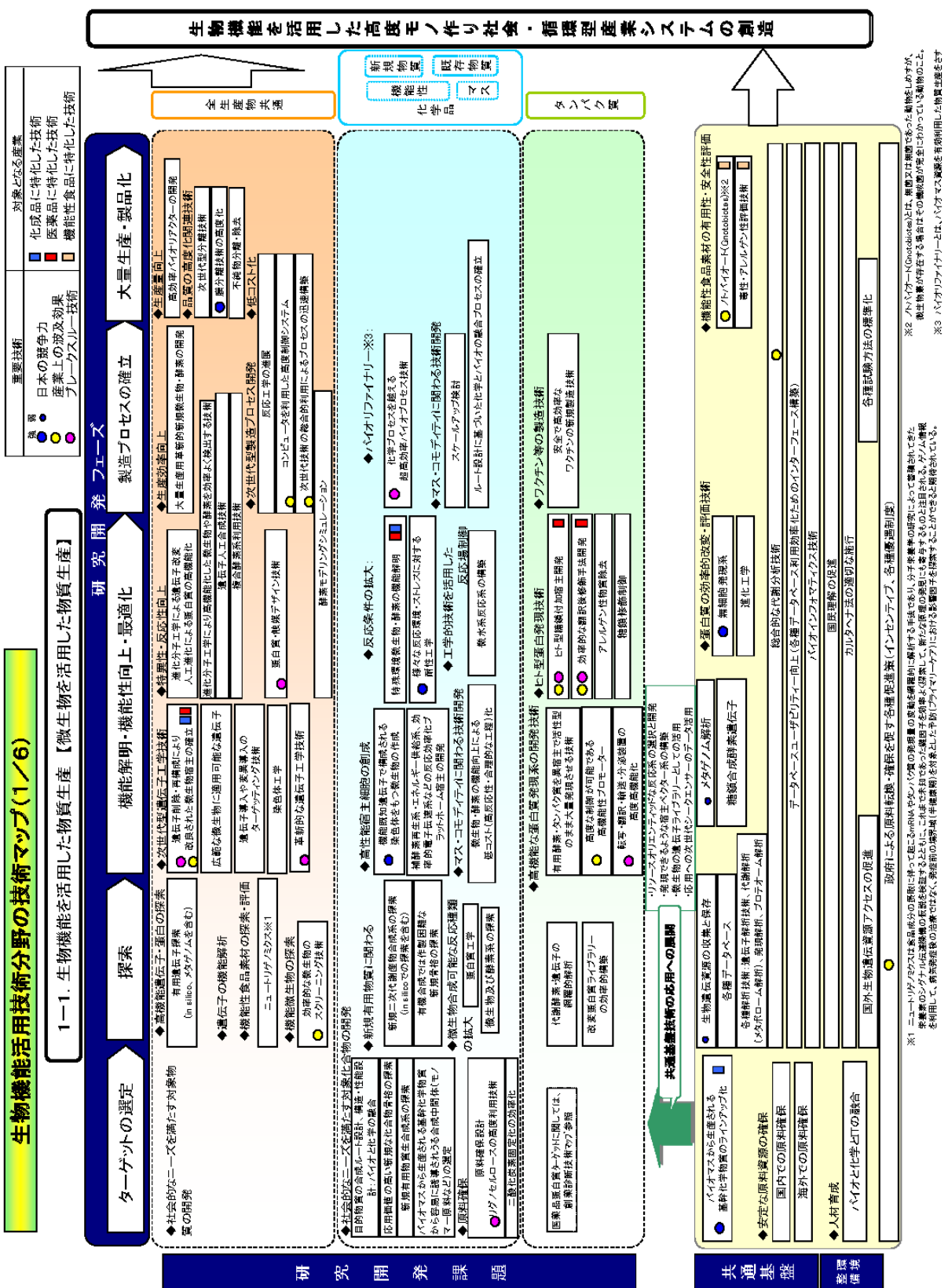
<共通指標実績>

論文数	論文の 被引用度数	特許等件数 (出願を含む)
71	157	22

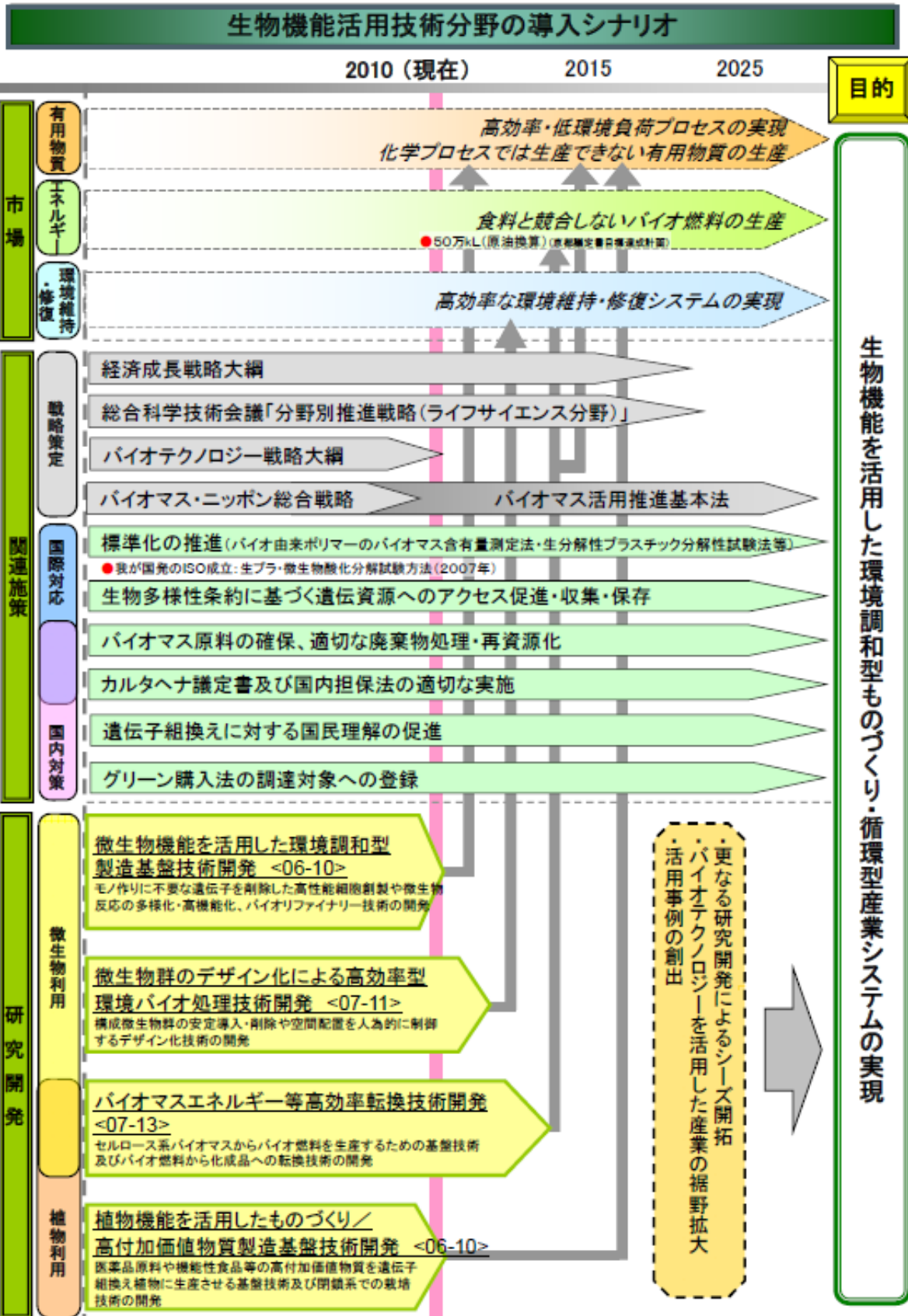
3. 当省(国)が実施することの必要性

本事業は、2010年経済産業省の技術戦略マップ（平成22年6月）中の「生物活用技術分野の技術戦略マップ」の中に、今後必要となる技術課題として「微生物を活用した物質生産」として分類されている。「生物機能を活用した高付加価値物質生産技術など、国または民間において取り組まれるべき重要度が高いと思われる技術」「バイオテクノロジーを活用した物質生産を実施する上で、市場インパクトが大きく、かつ技術的な難易度が高いと考えられるブレークスルー技術」として本事業は位置づけられる。

また、科学技術イノベーション総合戦略（平成25年6月7日閣議決定）において、「第2章・科学技術イノベーションが取り組むべき課題」の「I. クリーンで経済的なエネルギーシステムの実現」の重点課題である「新規技術によるエネルギー利用効率の向上と消費の削減（消費）」の「(5) 革新的構造材料の開発による効率的エネルギー利用」の記載において、「新材料開発、部材特性に適した設計及び接合技術等を研究開発する。これら高機能材料を、エネルギー消費の大きな輸送機器等に適用し、機器の軽量化や長寿命化による省エネルギー効果の向上を図る。この取組により、エネルギーの効率的な利用と、国際展開をねらう先端技術を有する社会を実現する。」とあり、本事業はこれに位置づけられる。

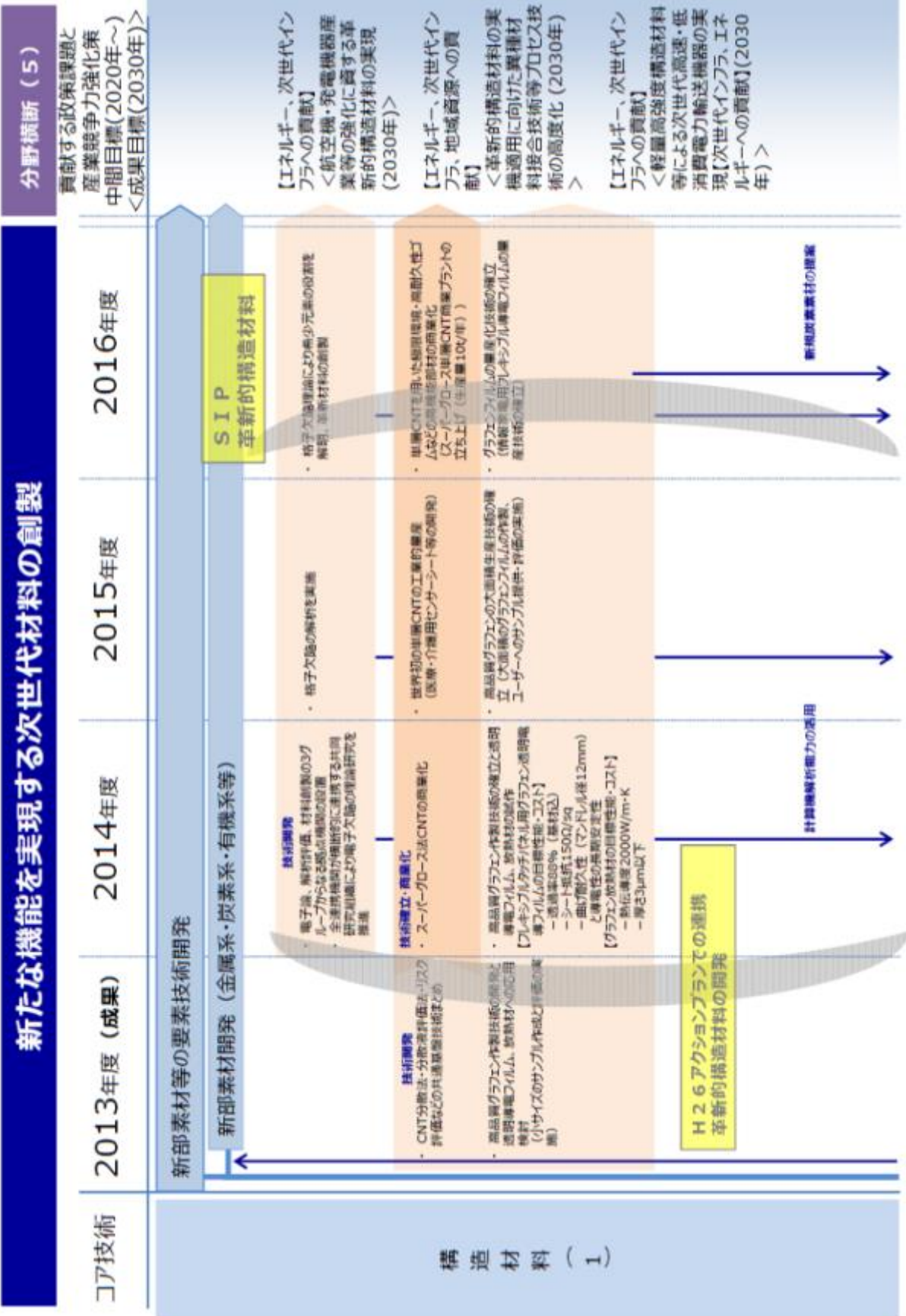


3-図1 生物機能活用技術分野の技術マップ
(出典: 技術戦略マップ 2010)



3-図 2 生物機能活用技術分野の導入シナリオ

(出典: 技術戦略マップ 2010)



3-図3 新たな機能を実現する次世代材料の創製

(出典: 科学技術イノベーション総合戦略 2014 ~未来創造に向けたイノベーションの懸け橋~)

本事業は、以下に詳細に述べるように、次世代型の遺伝子工学技術を確立しようとする科学的にも一大事業であり、一民間企業が単独で実施しうるものではなく、国の事業として実施すべきものである。

大規模な遺伝子組換え技術を利用して物質生産に適した微生物を作るとは、超高効率なエネルギー物質や機能性材料の生産を実現し、これまで存在しない新材料・医薬品を生産する微生物を作製するなど、バイオテクノロジーによるものづくり産業における「産業革命」にもなりうる波及効果の大きい技術である。また我が国が抱えるエネルギー問題や高齢化の解決に貢献する技術を実現する事業である。本技術を早急に実用化するためにも、国が積極的に推進すべき課題である

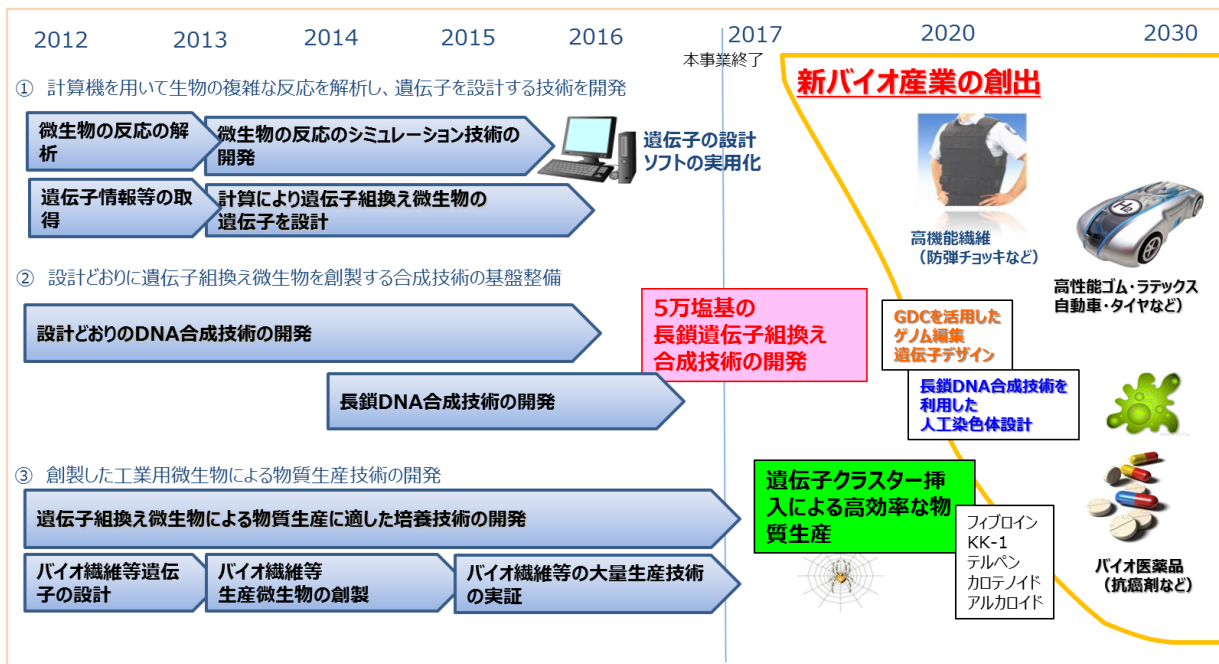
化学プロセスによる物質生産は、製造業のエネルギー消費の30%を占めるほどエネルギー消費量が多く、また、複雑な分子を合成することが困難である。そのためバイオ技術は、省エネで高効率にもものづくりができること、またこれまで存在しなかった複雑な化合物を生産できる技術として期待されている。これまでも部分的な遺伝子組換えの研究開発は多々行われていたが、本事業では高効率生産能力をもつ工業用微生物を作製するために、微生物の遺伝子を人工的に合成し、大規模に組み換える技術を開発し、バイオプロセスによるバイオマテリアルの生産技術を飛躍的に向上させるものである。

米国では、エネルギー省によるバイオ燃料創成プログラム（450億円／5年間）において、研究開発を多岐にわたり実施中である。また、2010年には、米国のベンチャー研究所が細菌の全遺伝子を化学合成し、別の細菌に移植して機能させることに成功した。さらに、欧州委員会が合成クモ糸の医療応用を目指して中小企業に資金提供するなど、欧米諸国では、政府系機関による数十億円単位の支援があり、関連企業が急速に発展してきている。このままでは我が国はバイオマテリアルの産業化で後塵を拝し、他のバイオ分野と同様、大きな遅れと損失を被ることになる。

ゲノムデザイン関連技術の世界市場は108億ドル、さらにその下流はそれぞれ数百億ドル以上にのぼる市場価値（2016年予測）がある。この巨大市場を獲得するためには、研究開発への投資が急務である。本事業は、我が国のバイオ分野での競争力の強化とそれに伴う経済効果が期待され、欧米との競争に打ち勝つためにも、緊急に国をあげて行うべきプロジェクトである。

4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ

下図に事業アウトカム達成のためのロードマップ（事業全体）を示す（4-図1）。



4-図1 事業アウトカム達成のためのロードマップ

本研究開発事業では、遺伝子組換え微生物による物質生産を向上させるための遺伝子設計技術を確立する（①遺伝子設計技術の開発）とともに、設計に基づいて5万塩基対以上の長鎖DNAを正確に合成する手法を開発し、長鎖DNAの宿主となる微生物を安定に導入する技術を確認した（②長鎖DNA合成・操作技術の開発）。さらに、作製した遺伝子クラスター導入微生物を用いることにより、従来化学合成では困難であった産業上有用な物質群の合成、あるいは従来の数十倍以上の高効率、大量生産、生産における環境負荷低減での産業上有用な物質の生産を実現する（③革新的バイオマテリアルの生産技術の開発）ことを目指してきた。

本研究開発事業において、遺伝子クラスター設計のための要素技術として、GDCPFの構築を行った。その要素技術として、MIDDAS-M法や新規代謝経路探索ツールなど、鍵となる遺伝子を解析する技術を開発し、ゲノム閲覧・遺伝子クラスター設計支援機能や実験データを管理する実験データマネージャーなどの開発を進め、利用者が提供できるGDCPFにおける個々の解析ツールプログラムの製品化を行った。既存製品に組込販売するものとして、「IMC Design Suite」、「ISB Design Suite」、単体販売するものとして、「Model Simulator」の製品化を進めている。今後これら開発された製品については、当組合参画機関のみならず、バイオマテリアル生産を推進している機関への普及を進めていく計画をしている。

また、OGAB法とドミノ法の改良に取り組み、それぞれ第2世代の手法開発に成功した。枯草菌を利用する有効性と汎用性を示すことに加えて、遺伝子クラスターを酵母、麹菌に迅速に導入するパイプラインも確立した。長鎖DNA合成についての知財化、その知財を活用したベンチャー企業を立ち上げ、本事業の事業化を進めた（4-図3）。

<p><概要> 株式会社シンプロジェン (Synplogen) 設立日：平成29年2月21日 (本社住所：神戸市灘区六甲台町1-1)</p> <p><事業目的></p> <ol style="list-style-type: none"> ① 長鎖DNA合成技術及び微生物利用製品に係る研究、開発及び販売 ② 長鎖DNA合成技術及び微生物利用製品に係る知的財産権の取得、実施、使用許諾、維持及び管理 ③ 長鎖DNA合成技術及び微生物利用製品に関する受託業務 ④ 長鎖DNA合成技術及び微生物利用製品に関するコンサルティング業務 ⑤ 前各号に付帯関連する一切の事業 <p><組織（役員）></p> <ul style="list-style-type: none"> ・代表取締役 村瀬 祥子 ・取締役（非常勤） 柘植 謙爾, 近藤 昭彦, 三宅 秀昭 ・監査役（非常勤） 高畑 豪太郎氏

4-図3 長鎖DNA合成会社概要

さらに、迅速に宿主ゲノムを改変する技術に加え、細胞内応答を解析するため、GDCPFを活用し、ゲノム解析・発現解析・代謝解析からなるマルチオミクス解析技術を確立した。また、マルチオミクス解析技術を利用した。目的代謝経路のボトルネック探索法の開発を進めた。ゲノム編集の知財を活用したベンチャー企業を立ち上げ、事業化を行った（4-図4）。

<p><概要> 株式会社バイオパレット (Bio Palette) 会社設立日：平成29年2月21日 (本社住所：神戸市灘区六甲台町1-1)</p> <p><事業目的></p> <ol style="list-style-type: none"> ① ゲノム編集技術に係る研究及び開発 ② ゲノム編集技術に係る知的財産権の取得、実施、使用許諾、維持及び管理 ③ ゲノム編集技術に関する受託業務 ④ ゲノム編集技術を用いた試薬等の研究、開発及び販売 ⑤ ゲノム編集技術を用いた動植物の研究、開発及び販売 ⑥ ゲノム編集技術を用いた医薬品及び治療法の研究、開発及び販売 ⑦ ゲノム編集技術に関するコンサルティング業 ⑧ 前各号に付帯関連する一切の事業 <p><組織（役員）></p> <ul style="list-style-type: none"> ・代表取締役 村瀬 祥子 ・取締役（非常勤） 西田 敬二, 近藤 昭彦, 三宅 秀昭 ・監査役（非常勤） 高畑 豪太郎氏
--

4-図4 ゲノム編集技術会社概要

また、革新的バイオマテリアル生産技術として、ヒトや動物の健康に有益な機能性イソプレノイド（カロテノイドやセスキテルペン等）およびその構造から機能性が期待される希少カロテノイド等を効率的に生産するための生産技術について、先端バイオテクノロジーを駆使して開発するベンチャー企業を立ち上げた（4-図5）。

<会社概要>

株式会社カロテノイド生産技術研究所 会社設立日：平成26年7月1日
(本社住所：石川県能美市坪野町77番地)

<事業目的>

- ① バイオテクノロジーによるカロテノイド色素等のバイオケミカル品の生産技術及び精製技術の開発、製造及び販売
- ② 遺伝子組換え微生物（大腸菌等）の生産技術及び加工技術の開発、生産、加工及び販売
- ③ 遺伝子組換え農作物類（レタス等）の生産技術及び加工技術の開発、生産、加工及び販売
- ④ バイオテクノロジーによる健康食品、健康飼料の生産技術の開発、製造及び販売
- ⑤ バイオテクノロジーによる動物の治療薬品、医薬品の生産技術の開発、製造及び販売
- ⑥ バイオテクノロジーによる微生物（大腸菌等）または農作物類（レタス等）を宿主とするバイオケミカル品等の生産技術の開発支援
- ⑦ 前各号に付帯関連するバイオテクノロジーのコンサルタント業務
- ⑧ 前各号に付帯する一切の業務

<組織（役員）>

・代表取締役：三沢 典彦

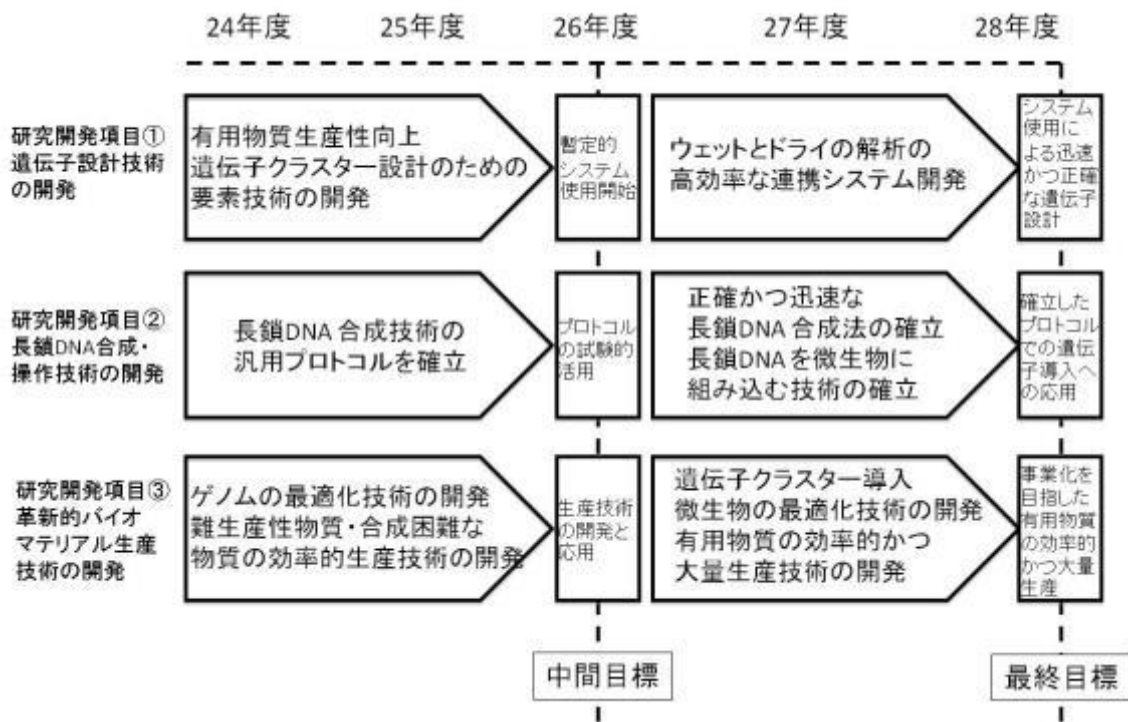
4-図5 セスキテルペン等バイオケミカル品の効率的生産技術会社概要

本事業での研究開発において、長鎖 DNA 合成およびゲノム編集に関する知財についてベンチャー企業による事業化ができたことは非常に意義深い。今後、本事業での知財のバイオマテリアル生産への活用として、素材・製品の開発、既存のバイオ生産効率のさらなる向上のために、さまざまな機関との連携を進める計画である。

5. 研究開発の実施・マネジメント体制等

5-1 研究開発計画

本研究開発事業は、経済産業省から高機能遺伝子デザイン技術研究組合への委託事業として、平成 24 年度から行われた。本事業の研究開発計画は、大規模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、従来は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、およ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している。本研究開発終了後には、研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを立案するとともに、実際に実行に移し、成果の活用を進めることを計画した。



5-1-図1 本事業の研究開発計画

また、本事業の技術開発項目毎の年度計画を以下に示す。

研究開発項目①「遺伝子設計技術の開発」

事業内容	24年度	25年度	26年度	27年度	28年度
(1) 有用物質生産に関与する遺伝子群の効率的な探索・解析・抽出技術の開発					
○ 有用物質合成経路に関与する遺伝子群を抽出する技術の開発					
■ 有用二次代謝産物生産で鍵となる遺伝子の探索・解析技術					
■ 有用物質の高生産性に鍵となる遺伝子の探索技術					
○ 遺伝子クラスター設計のための多機能データベースの構築					
■ 生合成回路データベースの開発					
■ 酵素情報データベースの開発					
■ 遺伝子ネットワークデータベースの開発					
(2) 物質生産に関わる遺伝子の設計・構築技術の開発					
○ タンパク質および制御系の設計					
■ 鍵となるタンパク質群の高活性化および基質特異性改変技術					
■ 合成経路の最適化のための転写制御技術					
○ 遺伝子クラスター設計及び最適化					
事業内容	24年度	25年度	26年度	27年度	28年度
■ 新たな合成経路の設計・構築					
■ 実践的な遺伝子回路の設計・構築					
■ 遺伝子クラスター全体の設計および最適化					
(3) 生産宿主微生物ゲノムの設計および解析支援システムの開発					
■ 生産宿主微生物ゲノムの設計および解析支援システムの開発					

研究開発項目②「長鎖 DNA 合成・操作技術の開発」

事業内容	24 年度	25 年度	26 年度	27 年度	28 年度
(1) 長鎖 DNA 合成技術の開発					
○ 長鎖 DNA 合成技術の開発：多数の遺伝子の一括集積法					
■ OGAB 法による遺伝子クラスター配列合成					
	→				
■ ドミノ法による遺伝子クラスター配列合成					
	→				
○長鎖 DNA 合成技術の開発：配列依存性の検討					
長鎖 DNA 合成技術の開発：配列依存性の検討					
	→				
(2) 長鎖 DNA による効率的遺伝子組込技術の開発					
■ 長鎖 DNA による効率的遺伝子組込技術の開発					
	→				
(3) 長鎖 DNA 合成の自動化技術の開発					
■長鎖 DNA 合成の自動化技術の開発					
	→				

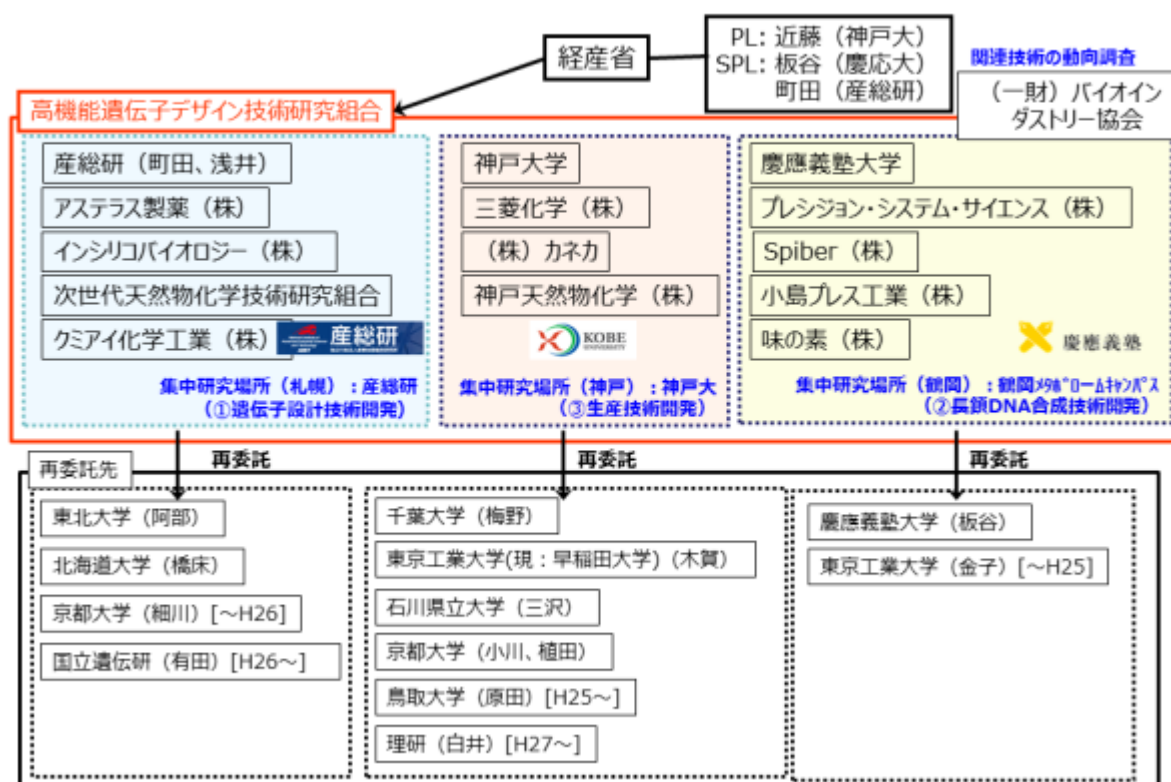
研究開発項目③「革新的バイオマテリアル生産技術の開発」

事業内容	24年度	25年度	26年度	27年度	28年度
(1) 有用物質生産に関与する遺伝子群の効率的な探索・解析・抽出技術の開発					
(1-1) 遺伝子クラスター導入微生物における迅速なゲノム最適化技術開発					
<ul style="list-style-type: none"> ■ 遺伝子クラスター導入微生物のゲノム最適化のための設計技術開発 ■ 迅速なゲノム改変技術開発 					
(1-2) 高生産化に向けた微生物解析評価技術の開発					
<ul style="list-style-type: none"> ■ 高生産化に向けた微生物解析評価技術の開発 					
(1-3) 周辺代謝系のボトルネックの解消技術の開発					
<ul style="list-style-type: none"> ■ 周辺代謝系のボトルネックの解消技術の開発 					
(2) 有用物質の効率的生産技術の開発					
(2-1) 高機能人工ポリペプチド材料（人工フィブロイン）					
<ul style="list-style-type: none"> ■ 新規高機能構造ポリペプチド遺伝子の創出 ■ 高効率生産を実現するための宿主・発現系の開発 ■ 革新的培養・精製プロセスの開発 					
(2-2) 難生産性タンパク質およびサーファクチン生産					
<ul style="list-style-type: none"> ■ エネルギー代謝効率およびアミノ酸供給効率を向上するための革新的技術開発 ■ 革新的分泌生産系の開発-1（バイオサーファクタント） ■ 革新的分泌生産系の開発-2（難発現タンパク質） 					

(2-3) テルペン類、カロテノイド類 (医薬原料)										
<ul style="list-style-type: none"> ■ 中間体からのバクリタキセル生成技術の開発 ■ セスキテルペン類の効率的生成技術の開発 										
	→									
(2-4) アルカロイド類、非天然型アミノ酸 (医薬原料)										
<ul style="list-style-type: none"> ■ アルカロイド類、非天然型アミノ酸 										
→										
(2-5) 非天然型放線菌二次代謝産物および非微生物生理活性物質 (医薬原料)										
<ul style="list-style-type: none"> ■ 非天然型放線菌二次代謝産物および非微生物生理活性物質 										
→										
(2-6) β-アミノ酸系化合物、環状ペプチド化合物、ストレス応答性化合物 (微生物抗生物質)										
<ul style="list-style-type: none"> ■ 環状ペプチド生産 ■ βアミノ酸系の化合物を生産 ■ ストレス応答性化合物 										
	→									
	→									
(2-7) バイオコモディティーの生産										
<ul style="list-style-type: none"> ■ 低コスト糖化プロセスの開発 ■ 非可食資源由来糖高効率利用微生物の開発 ■ 発酵阻害物質耐性微生物の開発 										
	→									
	→									
(2-8) 革新的バイオマテリアルの市場性・競合技術の世界動向調査										
<ul style="list-style-type: none"> ■ 革新的バイオマテリアルの市場性・競合技術の世界動向調査 										
→										

5-2 研究開発実施者の実施体制・運営

研究開発の実施に当たっては、研究開発を統括するためにプロジェクトリーダー（近藤昭彦・神戸大）、サブプロジェクトリーダー（板谷光泰・慶応大、町田雅之・産総研）を配置し、高機能遺伝子デザイン技術研究組合および再委託先機関と連携した研究開発体制を取った（5-2-図1）。プロジェクトリーダーおよびサブプロジェクトリーダーは、研究開発全体の管理・執行に責任を有する経済産業省と密接な関係を維持しつつ、本事業の目的および目標に照らして適切な運営管理を実施した。これらの各研究開発拠点では、各拠点のリーダー及び副拠点長を中心に定期的に研究報告会を開催し（後述）、研究計画に基づく研究開発が効率的に推進されているかを確認し、以降の研究がより成果を上げるように努めた。



5-2-図1 本事業の研究開発実施体制

プロジェクトリーダー(PL)及びサブプロジェクトリーダー(SPL)会議（全60回開催）

本委託事業を適切に推進するために、プロジェクトリーダー(PL)及びサブプロジェクトリーダー(SPL)を中心に、各拠点の副拠点長を交えてPLが招集し、研究開発を適切に推進した。

A. 平成24年度事業（4回）

- ・平成24年10月30日(火) 会場：(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成24年12月23日(日) 会場：高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成25年2月13日(水) 会場：高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成25年3月9日(土) 会場：高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室

B. 平成 25 年度事業 (12回)

- ・平成 25 年 9 月 5 日(木) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 25 年 9 月 27 日(金) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 25 年 11 月 17 日(日) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 25 年 12 月 29 日(日) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 26 年 1 月 14 日(火) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 2 月 1 日(土) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 2 月 10 日(月) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 2 月 18 日(火) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 2 月 25 日(火) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 26 年 3 月 9 日(日) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 3 月 11 日(火) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 3 月 13 日(木) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター

C. 平成 26 年度事業 (22回)

- ・平成 26 年 4 月 29 日(火)及び 30 日(水) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 5 月 25 日(日) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 7 月 15 日(火) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 8 月 7 日(木) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 8 月 11 日(月) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 26 年 9 月 15 日(月) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 26 年 9 月 26 日(金) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 9 月 29 日(月) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 10 月 17 日(金) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 10 月 25 日(土) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 11 月 3 日(月) 会場:神戸大学六甲台キャンパス
- ・平成 26 年 11 月 24 日(月) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 26 年 12 月 22 日(月)および 23 日(火) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 26 年 12 月 29 日(月) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 27 年 1 月 9 日(金) 会場:神戸大学六甲台キャンパス
- ・平成 27 年 2 月 1 日(日) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 27 年 2 月 8 日(日) 会場:東北大学川内キャンパス
- ・平成 27 年 2 月 13 日(金) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 27 年 2 月 15 日(日) 会場:(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 27 年 2 月 21 日(土) 会場:神戸大学六甲台キャンパス
- ・平成 27 年 3 月 14 日(土) 会場:神戸大学六甲台キャンパス
- ・平成 27 年 3 月 30 日(月) 会場:神戸大学六甲台キャンパス

D. 平成 27 年度事業（15回）

- ・平成 27 年 4 月 5 日(日) 会場:(国研)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 27 年 4 月 10 日(金) 会場:神戸大学統合研究拠点
- ・平成 27 年 4 月 29 日(水) 会場:(国研)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 27 年 5 月 6 日(水) 会場:(国研)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 27 年 5 月 17 日(日) 会場:(国研)産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ・平成 27 年 6 月 15 日(月) 会場:神戸大学東京オフィス
- ・平成 27 年 7 月 11 日(土) 会場:機械振興会館
- ・平成 27 年 8 月 13 日(木) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 27 年 10 月 8 日(木) 会場:神戸大学六甲台キャンパス
- ・平成 27 年 11 月 5 日(木) 会場:神戸大学統合研究拠点
- ・平成 27 年 11 月 15 日(日) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 27 年 11 月 24 日(火) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 28 年 2 月 6 日(土) 会場:神戸大学統合研究拠点
- ・平成 28 年 2 月 28 日(日) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 28 年 3 月 2 日(水) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室

E. 平成 28 年度事業（7回）

- ・平成 28 年 4 月 29 日(金) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 28 年 7 月 13 日(水) 会場:鶴岡市一久会議室
- ・平成 28 年 8 月 25 日(木) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 28 年 10 月 9 日(日) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 28 年 10 月 29 日(土) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 29 年 1 月 9 日(月) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室
- ・平成 29 年 3 月 7 日(火) 会場:高機能遺伝子デザイン技術研究組合会議室

研究討論会

本委託事業を推進する経済産業省製造産業局生物化学産業課担当者、委託事業委託先である高機能遺伝子デザイン技術研究組合員機関関係者、さらに委託事業の再委託先となっている大学の研究者が総勢約 100 名程度出席し、本委託事業のプロジェクトリーダーを原則大会委員長として、各年度の委託事業の実施計画に基づく、再委託先も含めた研究計画に沿った研究の推進成果を報告し、以降の研究方針を討論した。

A. 平成 25 年度事業

第 1 回研究討論会 平成 25 年 7 月 4 日（木）及び 5 日（金）

会場：産業技術総合研究所北海道センター

第 2 回研究討論会 平成 26 年 1 月 22 日（水）及び 23 日（木）

会場：神戸大学統合研究拠点

B. 平成 26 年度事業

第1回研究討論会 平成26年7月3日(木) および4日(金)

会場：鶴岡市先端研究産業支援センター

第1回研究討論会 平成27年2月5日(木)～7日(土)

会場：東北大学片平キャンパス、川内キャンパス

C. 平成27年度事業

第1回研究討論会 平成27年7月9日(木) および10日(金)

会場：機械振興会館

第2回研究討論会 平成28年2月4日(木) および5日(金)

会場：神戸大学統合研究拠点

D. 平成28年度事業

第1回研究討論会 平成28年7月11日(月) および12日(火)

会場：庄内産業振興センター マリカ市民ホール

第2回研究討論会 平成29年2月6日(月) 及び7日(火)

会場：神戸大学統合研究拠点

研究開発推進委員会

研究開発推進委員会により、外部委員から評価並びに適切な助言を得て、以降の研究開発の見直しを行いながら、研究開発を推進した。※()内は年度を示す

<外部委員(五十音順、敬称略)>

委員	柳川 弘志	慶應義塾大学 名誉教授(24・25)
委員	猪股 勲	日本バイオプラスチック協会 顧問(24・25)
委員	岡本 正宏	九州大学 教授(24～28)
委員	常田 聡	早稲田大学 教授(24・25)
委員	原島 俊	大阪大学(崇城大学) 教授(25～28)
委員	森 浩禎	奈良先端科学技術大学院大学 教授(24～28)
委員	養王田 正文	東京農工大学 教授(24～28)
委員	本多 裕之	名古屋大学 教授(26～28)
委員	山中 唯義	株式会社ベンチャーラボ 代表取締役(26～28)

<出席者>

実施者：経済産業省 生物化学産業課 担当者

事業委託先：

プロジェクトリーダー 近藤 昭彦 神戸大学教授

サブプロジェクトリーダー 板谷 光泰 慶應義塾大学教授

サブプロジェクトリーダー 町田 雅之 産業技術総合研究所主幹研究員

高機能遺伝子デザイン技術研究組合員機関 関係者

再委託先大学関係者

A. 平成24年度事業

第1回研究開発推進委員会

平成 25 年 3 月 28 日 (木) 13:30~17:30 会場：経済産業省 本館 2 階西会議室

B. 平成 25 年度事業

第 1 回研究開発推進委員会

平成 25 年 10 月 3 日 (木) 13:30~17:30 会場：経済産業省 本館 2 階西会議室

第 2 回研究開発推進委員会

平成 26 年 3 月 14 日 (金) 13:30~17:00 会場：経済産業省 本館 2 階西会議室

C. 平成 26 年度事業

第 1 回研究開発推進委員会

平成 26 年 9 月 16 日 (火) 13:00~17:35 会場：経済産業省 別館 1 階 104 各省庁共用会議室

第 2 回研究開発推進委員会

平成 27 年 2 月 16 日 (月) 13:30~16:40 会場：経済産業省 本館 17 階第 1 特別会議室

D. 平成 27 年度事業

第 1 回研究開発推進委員会

平成 27 年 9 月 9 日 (水) 14:00~17:00 会場：経済産業省 別館 1 階 103 各省庁共用会議室

第 2 回研究開発推進委員会

平成 28 年 3 月 7 日 (月) 13:15~16:45 会場：経済産業省 別館 1 階 104 各省庁共用会議室

E. 平成 28 年度事業

第 1 回研究開発推進委員会

平成 28 年 10 月 11 日 (火) 13:30~16:50 会場：経済産業省 別館 1 階 104 各省庁共用会議室

実施体制・運営を支援する仕組み

A. 遠隔地拠点間会議

Polycom および Skype の多地点間会議機能およびコンテンツ画面共有機能を利用した拠点間研究者会議を頻繁に実施している。

B. 研究情報共有

オープンソース CMS である Joomla! および Extension である Kunena をベースとした研究フォーラムを構築し、研究拠点内および拠点間の研究者間の意見交換、議論、および質疑応答、解析ソフトウェアのリリース情報などが共有されている。事業終了までに、フォーラム数 30、トピックス 337、フォーラム参加者数 83 名を数える。

C. プロジェクト進捗管理

技術開発スケジュール作成および業務進捗管理のためにオープンソースプロジェクト管理ソフトウェア RedMine をベースにしたプロジェクト管理システム PJM を実装した。PJM はプロジェクトを構成する研究開発項目別に階層構造をもつサブプロジェクトとして管理されている。全体概要スケジュールから詳細タスクまでの進捗状況はガントチャートとして視覚的な表示が可能となっている。平成 26 年 10 月末現在のスケジュール件数は 1,326 件である。

D. 実験・解析データ管理

実験データは、実験データマネージャーによって集中的に管理され、NGS データなどの一括転送など、拠点間の大量データ受け渡しに利用されている。事業終了までに運用されているセクション

数は8で、そのうちウスチロキシンの生産性向上に使用されている UST セクション上には、3,828 件の実験データが登録されており、その他のセクションには 6,515 件の実験データが登録されている。

E. 知財情報の管理

委託事業では基本的に特許出願を主たる成果として捉え、開発技術を確実に知財化することを優先。有効な開発技術は速やかに同事業実施企業への技術提供を行い、企業実施課題の実用化を加速させるマネジメントを実施。知財情報は研究者フォーラムと同様オープン CMS である Joomla! 上に実装され、運用が行われている。各研究者の発案、発明による知財情報が保存・管理されている。

F. 購買・予算管理情報、業務情報の統合管理

購買・予算管理情報は市販会計システム上に電子化されており、発注、納品・請求情報等の予算執行状況が数日遅れ程度で正確に把握可能である。

5-3 資金配分

本委託事業の平成24年度から平成28年度の予算の推移を、研究開発項目①「遺伝子設計技術の開発」、研究開発項目②「長鎖DNA合成・操作技術の開発」、さらに研究開発項目③「革新的バイオマテリアル生産技術の開発」毎に下表に示す。

5-3-表1 資金年度配分
(単位：百万円／上段：執行予定額、下段：執行額)

研究項目 / 年度	24年度	25年度	26年度	27年度	28年度	合計
研究開発項目① 「遺伝子設計技術の開発」	261.2	232.6	153.4	153.4	61.3	861.9
	235.2	243.8	163.0	150.7	65.2	857.9
研究開発項目② 「長鎖DNA合成・操作技術の開発」	37.0	58.0	8.3	8.3	4.0	115.6
	31.8	41.8	8.6	8.6	4.0	94.8
研究開発項目③ 「革新的バイオマテリアル生産技術の開発」	392.1	396.4	262.9	262.9	131.6	1445.9
	364.8	391.6	251.7	265.3	126.0	1399.4
関連技術の動向調査	9.7	9.5	6.0	6.0	3.0	34.2
	3.8	6.0	5.7	5.9	2.4	23.8
合計	700.0	696.5	430.6	430.6	199.9	2457.6
	635.6	683.2	429.0	430.5	197.6	2375.9

※ 平成26年度の委託事業として約40%の減額となったが、一方で「平成26年度次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術）」において、次世代抗体医薬製造技術の要素技術として「高生産宿主構築の効率化基盤技術の開発」が公募されたので、高機能遺伝子デザイン技術研究組合として提案書を提出し、採択された。

6. 費用対効果

本事業では、生物プロセスを利用したタンパク質・機能性化合物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を実施した。これにより、微生物機能を活用した生産効率の高い物質生産技術を確立するとともに、物質生産プロセスにおける低コスト化、環境負荷低減に貢献することを目標としている。事業開始から5年間で総額約24億6千万円の費用で行われた。

本事業においては、最終的に製品化・事業化を目的とする有用物質において波及効果が期待される市場規模は、例えばヒト用ワクチンの場合、我が国における市場規模は2,739億円（2012年、一般社団法人日本ワクチン産業協会）、世界規模では約2兆円（全医薬品の約3%）（UBS Investment Research (2012)）にのぼる。このような医薬品を含め、本事業の技術開発が波及する製品化・事業化対象分野の市場規模は、500億円（国内市場、制がん剤材料としてのテルペン化合物、2014）から約10兆円（バイオ由来の化学分野での世界市場規模、2010）と非常に大きい。コモディティケミカル、ポリマー、ファインケミカルなどの化学市場は今後も成長し、250兆円規模の市場になると予測（2025年における予測、USDA 2008）。その内、10-20%はバイオ由来の製品（約50兆円、バイオプロセスに転換可能。2025年における予測、USDA 2008）になると推定。本事業の成果は今後の持続的発展社会を形成において継続的に拡大していくものであると容易に推測される。

以下の項目が波及効果となり得ると考えられる。

1. ヒト・動物用医薬品、医薬品原材料、新規素材の製品化・事業化

安全・安心、低コストで高度な高付加価値有用物質の製造プロセスを確立し、実用化することで、人々の健康で快適な生活に貢献する。同時に、大規模な市場（例：制がん剤材料としてのテルペン化合物、500億円、国内）への参入による経済効果が見込まれる。

これまで利用されてこなかった新しいバイオ素材への展開。本事業では、機能性のクモの糸といった微生物生産をはじめとした新規バイオ素材生産技術開発に成功。れからのプラスチック市場成長は毎年5~10%、バイオプラスチックは25~50%の成長が見込まれている。

2. エネルギー・環境分野への貢献

従来の動物細胞製造に比べ、生産エネルギーコストを大幅削減し、省エネルギー型、持続的産業構造に基づいた生産系の構築と二酸化炭素排出量の低減化に貢献する。

3. 社会的受容性への寄与

遺伝子組換え微生物の有益性に関する正しい情報の発信により、国民の理解を深める。

II. 外部有識者(評価検討会等)の評価

1. 事業アウトカムの妥当性

本事業の成果により合成困難な低分子化合物や有用異種タンパク質などの生産効率の大幅に向上、培養にかかるエネルギーや副産物生産の低減が図れば、微生物による有用物質生産プロセスの開発効率を飛躍的に向上させることができると期待される。本事業の成果は、我が国が得意とする微生物を用いた生産技術の優位性をさらに高めると共に、国際競争力のある微生物産業の育成、新規参入の導入などが可能となる。研究成果の事業化に結びつけるためのベンチャー設立も実現している。以上の理由により、本事業が目指している方向性はきわめて妥当。

一方、国際競争力の確保にも向けた市場開拓の努力、設立ベンチャーの着実な運営をはじめとした開発技術の事業化の推進、さらに必要となる技術開発課題の精査など、今後のフォローアップが重要。

【肯定的所見】

- ・ 本プロジェクトの趣旨に相応しい事業化計画であり、新規参入の導入力にもなると考える。(A委員)
- ・ 本事業における研究開発課題は、ポストゲノム時代におけるシステム生物学と合成生物学の融合により、わが国が得意とする微生物を用いた有用物質生産の技術の飛躍的な発展を目的としたものである。本事業のアウトプットとして、合成が困難な低分子化合物や有用異種タンパク質などの生産効率を大幅に向上させるとともに、培養にかかるエネルギーや副産物生産の低減を図ることが可能となれば、微生物による有用物質生産プロセスの開発効率を飛躍的に向上させることができると期待される。したがって、研究開発の成果はわが国が得意とする微生物を用いた生産技術の優位性をさらに強めることにつながり、国際競争力のある微生物産業の育成・発展が可能となることから、本事業が目指している方向性はきわめて妥当なものと考えられる。(B委員)
- ・ 化学品市場の相当な部分がバイオマテリアルに置き換えられていこうとする世界的な流れの中で、我が国はその一歩を踏み出すことに遅れをとっています。システム生物学と合成生物学を融合して「何でも作る」というコンセプトは既に米国勢を主導に本格的な動きを見せています。そのような背景の中、これ以上は遅れまじと、日本国内の要素技術を集積して我が国独自のプラットフォームを整備し、一歩を踏み出すことができたことが、バイオマテリアル業界での国際競争力の観点から、まずは素晴らしい成果であると考えます。(C委員)
- ・ 研究成果を事業化に結び付けるためにベンチャーの立ち上げまで実現したことは評価できる。(D委員)
- ・

【問題あり・要改善とする所見】

- ・ 国際競争力の確保にも向けた市場開拓の努力も期待したい。(A委員)
- ・ 事業アウトカムについては上に述べたように、総論的には妥当なものと考えられるが、当初の指標や目標値がきわめて明確に設定されていたというわけではないように感じられる。これは生物を対象とする研究開発では致し方ないことであり、海外などの研究開発状況の変化により本プロジェクトの途中で研究の方向性や目標が変更された可能性もあることから、大きな問題と考える必要はないとは言えるが。(B委員)
- ・ Design-Build-Test-Learn のサイクルだけでは、実用的なプラットフォームとしては不十分です。工業生産に資する微生物を生み出すためには、BuildとTestの間に、「育種」(ファインチューニングのためのランダム変異導入とハイスループットスクリーニングによる菌株の最適化)を挿まなければならない

いと考えます。今後、「何でも工業生産する」という目的で、当該事業の発展形を計画されていると期待しますが、その際には是非とも、菌株のファインチューニングのための育種工程について十分な検討をお願いいたします。そこまで整備して初めて、我が国経済、国際競争力にインパクトを与える成果が得られると信じております。(C委員)

- ・ベンチャーは、作ることは可能であるが、それがオープンイノベーションに本当につながるのかが不明。今回の3社に関しても、各社の評価に関しては一切なかった。いくつかは可能性を感じるが、そうでないものもあるように思われる。(D委員)
- ・3つのベンチャーの2つは、社長以下役員構成がほぼ同じであり、2社が別会社として設立されていることに不明瞭さがある。(D委員)

2. 研究開発内容及び事業アウトプットの妥当性

本事業は、微生物による有用物質の高生産を迅速に達成するためのボトルネック課題に対し、システム生物学および合成生物工学的手法によって解決しようとするものであり、明確な研究開発要素を有している。海外の研究動向等を把握し、研究の方向性や目標をフレキシブルに変更しつつ研究開発が進められている。事業アウトプットとして各種要素技術が完成の段階に至っており、論文発表や戦略的な特許出願もなされている。これらの研究開発内容及び事業アウトプットは評価できる。

一方、開発した成果にはまだ改善の余地もあり、それらの事業化においても工夫の余地があると見受けられるため、今後の各事業者によるさらなる取り組みに期待したい。

【肯定的所見】

- ・ゲノムデザインサイクル(GDC)における各要素技術の研究開発内容は明確であり、その結果 GDC がシステムとして機能することを証明出来た点は評価出来る。(A委員)
- ・微生物を対象とした有用物質の高生産を迅速に達成するためのボトルネックと考えられる重要な課題のほぼ全てをシステム生物学および合成生物工学的手法によって解決しようとする事業プロジェクトであり、非常に明確な研究開発要素を有したチャレンジングな研究内容を含んでいる。海外の研究動向を適時に把握し、研究の方向性や目標がフレキシブルに変更されて研究が進められたように見受けられる。事業アウトプットとして各種要素技術が完成の段階に至っており、論文発表や特許出願もなされている。(B委員)
- ・長鎖 DNA 合成技術、ゲノム編集技術などの要素技術の完成度については目覚ましいものがあると思います。たとえば、長鎖 DNA 技術の強味はその合成期間が極めて短いことにある。といったように他技術との比較検討についても十分な配慮が行き届いていることが伺えました。また、ゲノム編集技術については、幾重にも特許戦略を重ねておられることも素晴らしいと思います。また、そのような技術を誰でも簡便に使えるようにする工夫などが随所にみられ、まさに世の役に立つ研究開発を目的として進めてこられたことがよく理解できました(C委員)
- ・論文、特許取得も順調に行われており、客観的な成果として高く評価できる。特に今回開発した技術等は、現時点で世界の同様な技術の中で新規性・進歩性がある。(D委員)

【問題あり・改善とする所見】

- ・遺伝子設計技術においてはユーザビリティは高いようであるが、一般ユーザーにフレンドリーとは言い難く、さらなる改善の余地がある。論文情報等が既に豊富な材料を初期のターゲットとした点は理解

出来るが、より一般化したシステムに進化させてくことも求められる。成果の論文化も遅れている。(A委員)

- ・ 事業は3分割されたプロジェクト(研究項目)ごとに実施され、それぞれのプロジェクトにおいて取り組まれた要素技術の完成度は高いものの、それらの技術が他のプロジェクトと十分に連携されて活用されたところまでは到達していないように思われる。ベンチャー企業が3社設立されたことは評価に値するが、いずれもビジネスプランが明確でなく、やや強引に設立されたように見受けられることは今後の懸念材料である。(B委員)
- ・ 優位性の高い技術をコアにしたベンチャー企業の立ち上げについては素晴らしいと思います。惜しむらくは、コア技術の素晴らしさとは裏腹に、ビジネスモデルに対しての検討が不十分なように見受けられ、その技術で本気で事業化しようとする意気込みが感じられなかったことが残念です。その技術を使って何としても事業をつくってやる！という意思がなければ、ベンチャー企業は立ち行きません。せっかくの起業にもかかわらず、会社としての成長に十分な期待を持たない状況の改善を期待します。(C委員)
- ・ 非常に競争激化の分野での技術開発であり、他の技術に対して現時点では優位性があっても永続的なものではないので、迅速な市場での実用化が必要。(D委員)

3. 当省(国)が実施することの必要性

本事業では、世界的な潮流である合成生物工学的手法により微生物を対象とした有用物質の高生産を目指し、計算科学やロボティクス、高速・高度分析技術の統合も含めた異分野融合と産学官連携を進め、総合的な技術プラットフォーム開発を開発している。微生物により「何でも作る」というコンセプトからのプラットフォーム整備、民間主導では起こり得ない事業であり、国が主導するプロジェクトとしては妥当。

一方で、産学連携課題の選定方法や、対象とする技術課題設定にはさらなる工夫の余地があり、今度の研究開発事業の立案時にはさらなる精査等が必要。また、開発技術を国内の学会等で活用、国内学会や産業に成果を還元する仕組みが必要である。

【肯定的所見】

- ・ 微生物利用産業の育成、企業横断型のノウハウの蓄積といった視点から国が率先して実施した意義は大きい。(A委員)
- ・ 世界的な潮流である合成生物工学的手法により微生物を対象とした有用物質の高生産を目指して、計算科学やロボット、高速・高度分析技術の統合も含めた異分野融合と産学官連携による研究開発内容は、国が主導するプロジェクトとしては妥当なものと判断できる。特に、研究項目①と②については大学や公的研究機関が有する研究基盤を活用したものであり、国の主導のもと産業界も連携して実施されたことは評価できる。(B委員)
- ・ 何を作ってどう売るかというところまで検討して短期的な回収が見込めなければ民間企業は動くことができません。したがって、「何でも作る」というコンセプトからのプラットフォーム整備は、民間主導では起こり得ない事業であり、国の事業としてふさわしいと考えます。また、メーカー各社の育種工程をアウトソースする受け皿として事業化できれば、長期的な視点で投資を回収することも可能ですし、我が国のバイオマテリアル産業の底上げにも直結すると考えます。(C委員)
- ・ 今回設定した3つの研究の柱の成果がうまく連携できるようなスパイラルが構築できている。このよう

な規模での総合的な技術プラットフォーム開発は、なかなか1企業では無理なことから、国プロジェクトでスタートしたことは評価できる。(D委員)

【問題あり・要改善とする所見】

- ・ 国際競争力の点からも、さらなる支援拡大および新しい体制づくりが望まれる。(A委員)
- ・ 産学連携で開発技術を活用して生産対象としたイソブタノールやフィブロインなどのコモディティケミカルは、比較的低価格で大量生産することによってのみ実用化につながるものであり、国主導のプロジェクトとしては適切ではなかったように感じられる。特に、イソブタノールの成果については、長鎖 DNA 合成技術を取り入れて生産が可能となったというものの、その生産量はmg/Lレベルであって実用化には程遠いように思われる。(B委員)
- ・ DesignしてBuildした微生物のファインチューニングのための育種工程が、現在のプラットフォームに盛り込まれていないため、産業に資するプラットフォームとしてはもう一段の迫りに欠けてしまっています。このような問題は、事業計画の時点で対応すべきものですので、本事業の後継のプロジェクトを計画するには是非ご留意頂きたい存じます。(C委員)
- ・ 国プロジェクトで行ったのであれば、日本のサイエンスに貢献できるような仕組みづくりまで考えるべき。このままでは、ある一部の参画企業、新規に作られたベンチャー企業の営利にのみ貢献することになる。(D委員)

4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップの妥当性

マスタープランに基づきながらも、海外の研究動向を把握しつつ研究内容や方向性を修正しながら事業を実施しており、事業アウトカム達成に至るまでのロードマップは妥当。
一方で、国際標準化や実証例、要素技術の開発達成度に関しては不十分な点もあり、今後事業者によるさらなる取り組みが重要。

【肯定的所見】

- ・ マスタープランに基づき、要素技術の計画的進展に伴ってベンチャーを立ち上げるなど、概ね的確なロードマップであったと考える。(A委員)
- ・ 海外の研究動向を適宜把握しつつ、研究内容や方向性を修正しながら事業を実施しており、事業アウトカム達成に至るまでのロードマップは妥当であったと判断できる。(B委員)
- ・ ゲノム編集技術の知財戦略、長鎖 DNA 合成技術を一般ユーザー向けに簡易化するための技術開発、菌株デザインソフトのインターフェイスの工夫によるユーザーフレンドリー化など、随所に事業化を見越したロードマップ戦略が練られていると考えます。また、実用的な技術フレームであることをいくつかの実証実験例をもって示されていることについても、当初目標とアウトプット計画が妥当に立てられ、かつ妥当に運用されてきたことを示すものです。(C委員)
- ・ 3つの柱がそれぞれの目標とするところまで、一応たどり着いている。(D委員)

【問題点・改善とする所見】

- ・ 国際標準化や実証例に関しては広範囲にわたっているとは言い切れず、さらなる実証拡大が求められる。(A委員)
- ・ 各技術要素(とくに Design-Build に関係する技術要素)については 100%達成度のアウトプットとして

成功をおさめておりますが、Test からの Learn と、Learn からの Design のプロセスの達成度は十分ではないように見受けられます。そのため、全体の事業アウトカムとしてはインパクトに欠ける印象です。Test を通して菌株をファインチューニングし、再現性の高いデータを Learn に流し込むという部分にウェイトをのせた形で、ロードマップが策定されるべきであったのではないかと考えます。(C委員)

- ・ 「成果のユーザー」という点では、このプロジェクトのポリシー等が感じられない。(D委員)

5. 研究開発の実施・マネジメント体制等の妥当性

研究開発計画は我が国の当該分野のエキスパートによって実施、マネジメントされ、実施体制は妥当。今後は、国民との科学・技術対話の実施などのコミュニケーション活動などに一層積極的に取り組むことが重要。

【肯定的所見】

- ・ 研究開発計画は我が国の当該分野のエキスパートによって実施、マネジメントされ、的確に進められた点は評価出来る。(A委員)
- ・ 神戸大学の強力なリーダーシップのもと、慶應義塾大学と産総研がサブとなってそれぞれのプロジェクトの実施と推進にあたっており、研究開発の実施体制は十分妥当なものであったと考える。(B委員)
- ・ 当初計画の時点から完成すべき技術要素が明確になっており、各技術に精通した研究開発者を適材適所に配置することで、各要素技術を計画どおりかそれ以上に達成できている点に深く感銘を受けています。また、技術間の連携からシステムを構築するためのワーキンググループ体制が有機的に機能し、活発な開発を後押ししている点からも、優れたマネジメント体制が伺えます。(C委員)
- ・ 中間報告以降、3つの柱の連携がわかりやすくなり、戦略的に推進された。(D委員)

【問題あり・要改善とする所見】

- ・ 必ずしも我が国の総力となっていない面もあり、こうした人員、分野も取り込むような発展が見られるとさらに良かった。(A委員)
- ・ 国民との科学・技術対話の実施などのコミュニケーション活動が十分あったとは考えられないが、これは本研究開発プロジェクトの研究内容からは致し方ないと思われる。
- ・ 合成生物学的なアプローチで Build した菌株を育種によってファインチューニングする工程に関する研究開発が計画されていない点が、やはり、システム全体のアウトカムからインパクトを損ねてしまっているように思います。(C委員)
- ・ 「国民との科学・技術対話の実施などのコミュニケーション活動」に関しては、知財的な秘匿の部分はあるかと思うが、あまり積極的に行われてきたとは言えない。(D委員)
- ・ 多くの参画企業が見られ、個々のミッションがある。このプロジェクト終了後、どのように個々の企業の展開があるのかは不明。(D委員)

6. 費用対効果の妥当性

研究予算に対して得られた事業アウトプットや事業アウトカムは妥当。今後は、本事業の成果の普及を各事業主体が進めることが重要。また、本分野の発展を加速する上で後続事業の推進に期待。また、国内の学会に成果を還元するようなオープンサイエンスの仕組みも考える

べき。

【肯定的所見】

- ・ 経費に対するアウトカムは極めて妥当であるとする。終了時におけるアウトプットは十分とは言えないが、基盤技術の確立によりアウトプットの増大が見込める。(A委員)
- ・ 微生物を対象とした有用物質の高生産を達成するための重要な課題について、合成生物工学的および情報科学的手法によって解決しようとするチャレンジングな研究開発プロジェクトであり、研究開発項目が多岐にわたっていたにもかかわらず、プロジェクトの途中で予算削減となったため、十分な予算措置がなされないままに当初の計画通りに研究が実施されたのではないかと推察される。そのような観点からは、研究予算に対して得られた事業アウトプットや事業アウトカムは十分に妥当なものであると判断する。(B委員)
- ・ 限られた資金のなかで、最大限の研究開発を実施されてこられたと思います。Design-Build-Test-Learnのサイクルの中で、主にDesign-Buildパートにウェイトがのった開発になっておりますが、全体資金の中から注力すべきパートを検討して吟味した結果のことと思われる。資金を分散することで全体的に中途半端な結果になることを避け、エッジの効いた資金運用で世界的に競争力の高い開発をアウトプットできている点が素晴らしいです。(C委員)
- ・ 新規技術の開発とそれを産業化に近いところまで導くことができていることに関しては評価できる。(D委員)

【問題あり・要改善とする所見】

- ・ 本事業における初期計画の達成を、いかに拡散していくかが重要な課題である。(A委員)
- ・ 開発目標に対しての予算総額が少ないことについては、後継の発展型プロジェクトにて挽回されるものと期待いたしております。(C委員)
- ・ 国費総額として考えると、イノベーションだけでなく日本のサイエンスに貢献するようなオープンサイエンスへの貢献も考えるべき。(D委員)

7. 総合評価

本プロジェクトは合成生物工学的および情報科学的な手法を駆使することによって、微生物を用いた有用物質生産の技術の飛躍的な発展を目的としたものである。参画機関はこの研究関連分野におけるトップ技術を有しており、技術的に優れた参画機関で構成された実施体制であり、明確な事業アウトカムや事業アウトプットの策定のもと、整備されたロードマップに従って実施されて十分な成果があげられたものと判断できる。研究課題は非常に多岐にわたっており、難易度の高い課題も見られたものの、それぞれの要素技術としてはほぼ目標を達成することができており、その技術の完成度は高いと評価できる。

今後、引き続き研究開発の推進が必要であり、関連分野に対し国主導による継続的な支援が必要である。さらに、国の事業として得られた成果の波及戦略(オープンサイエンスなど)を検討すべき。

【肯定的所見】

- ・ 事業計画で想定した課題に対しては結果として想定以上のアウトカムにつながったと考える。対象とした化合物がさまざまな知見の蓄積していたモノに絞った点が成功の大きな要因であったと思われ、そこから派生した多くの知見が対象を広げる基盤技術の確立につながったことは間違いのないであろう。(A委員)

- ・ 微生物による有用物質生産については、本来はわが国が得意とし世界をリードしてきた領域であるが、近年のゲノム科学や遺伝子工学の進展により、従来とは異なる新しい手法によって生産が困難であった物質も含めて高生産する技術開発が欧米の先進国を中心に活発に進められている現状にある。そのような状況下において、本プロジェクトは合成生物工学および情報科学的な手法を駆使することによって、微生物を用いた有用物質生産の技術の飛躍的な発展を目的としたものである。参画機関はこの研究関連分野におけるトップ技術を有しており、技術的に優れているメンバーで構成された実施体制であり、明確な事業アウトカムや事業アウトプットの策定のもと、整備されたロードマップに従って実施されて十分な成果があげられたものと判断できる。研究課題が非常に多岐にわたっており、難易度の高い課題も見られたものの、それぞれの要素技術としてはほぼ目標を達成することができており、その技術の完成度は高いと評価できる。また、プロジェクトの途中で予算削減となったため、十分な予算措置がなされずに当初の計画通りの研究を進めざるを得なかったことが推察されるが、そのような中で優れた成果を得ることができたのは評価に値する。(B委員)
- ・ システム生物学と合成生物学を融合して「何でも作る」というコンセプトのもと、日本国内の要素技術を集積して我が国独自のプラットフォームを整備して事業化する。その一步を踏み出すことができたことがまずは素晴らしい成果であると考えます。中でも、長鎖 DNA 合成技術、ゲノム編集技術などの各要素技術の完成度については目覚ましいものがあると思います。技術の強味が整理され、幾重にも特許戦略を重ねておられるだけでなく、そのような技術を誰でも簡便に使えるようにする工夫などが随所にみられ、まさに世の役に立つ研究開発を目的として進めてこられたことがよく理解できました。(C委員)
- ・ 「何でも作る」というコンセプトからのプラットフォーム整備は、短期的な回収の目途を立てることが難しいために民間主導では起り得ない事業であり、国の事業としてふさわしいものと考えます。また、メーカー各社の育種工程をアウトソースする受け皿として事業化できれば、長期的な視点で投資を回収することも可能ですし、我が国のバイオマテリアル産業の底上げにも直結すると考えます。実用的な技術プラットフォームであることをいくつかの実証実験をもって示されていることについても、当初目標とアウトプット計画のロードマップが妥当に立てられ、かつ妥当に運用されてきたことを示すものであり、たいへん素晴らしいと思います。また、当初計画の時点から完成すべき技術要素が明確になっていたこともあり、各技術に精通した研究開発者を適材適所に配置することで、各要素技術を計画どおりかそれ以上に達成できている点に深く感銘を受けています。要素技術間の連携からシステムを構築するためのワーキンググループ体制が有機的に機能している点も、優れたマネジメントが開発の進捗を後押しした成果であると拝察いたします。(C委員)
- ・ 投入された資金のなかでは、最大限の研究開発を実施されてこられたと思います。開発課題が多岐に渡るプロジェクトではありますが、資金を分散させず、注力すべき開発部分を十分に検討することで、結果として世界的に競争力の高い技術開発をアウトプットできている点がたいへん素晴らしいと思います。(C委員)
- ・ 3つの柱において目標を達成していると評価できる。日本初の技術も含まれていることから、世界的な競争の中で次のステップが期待される。それらを、活用できるようにするためのステップとしてベンチャーの立ち上げも目標通り達成している。(D委員)

【問題あり・要改善とする所見】

- ・ さらなる困難が予想される化合物や、新規物質の創成につながる技術であるだけに、新規分野の参入やさらなる発展を促すしくみ作りも必要であろう。(A委員)
- ・ プロジェクトの研究内容や計画は海外の研究動向も見据えて適宜修正されたようであり、それぞれの研究項目で開発された要素技術のレベルは高いと評価できる。しかし、最終的に目指す産業形態が Zymergen などの海外のバイオフィラウンドリーと同様のコンセプトであり、そのキャッチアップのような感が否めないのがやや残念である。また、本プロジェクトの大きな柱の一つとして「長鎖 DNA 合成技術」があるが、この技術自体の発想や独創性は高く、研究期間内にほぼ完成された技術に仕上げた成果は評価に値する(個人的には combi OGAB 法は興味深い技術と考えている)ものの、産業応用を考えた場合には課題が多くあるように感じられ、どの程度実用的に利用されるか懸念もある。(B委員)
- ・ Design-Build-Test-Learn のサイクルだけでは、実用的なプラットフォームとしては不十分です。工業生産に資する微生物を生み出すためには、Build と Test の間に、「育種」(ファインチューニングのためのランダム変異導入とハイスループットスクリーニングによる菌株の最適化)を挿まなければならないと考えます。このような問題は、事業計画の時点で対応すべきものですので、本事業の後継のプロジェクトを計画する際には是非ご留意頂きたく存じます。(C委員)
- ・ 優位性の高い技術をコアにしたベンチャー企業の立ち上げについては素晴らしいと思います。しかしながら、コア技術の素晴らしさとは裏腹に、ビジネスモデルに対しての検討が不十分なように見受けられます。せっかくの起業にもかかわらず、会社としての成長に十分な期待を持っていない状況の改善を期待します。(C委員)
- ・ 本事業の成果は、技術や計算プラットフォームであることから、ユーザーの動向や国際的な競合技術等の中で、その価値が決まる。いち早くユーザーからの成果が発信される状況を生まない限り、その波及効果が薄れるだけでなく、他の技術が潮流になることによってその価値も無くなってしまう。この状況を理解したうえで、莫大な国費を使って得られた成果の波及戦略をベンチャーに頼るだけでなく展開してほしい。(D委員)

8. 今後の研究開発の方向等に関する提言

今後、本分野の研究開発の方向性として、人工知能的学習など新しい分野の技術を積極的に取り入れた研究開発事業展開に期待したい。

事業成果を積極的に学会等に迅速に開示し、フィードバックを得る仕組みが必要である。ユーザー講習会やキット化を通して普及させるとともに、部分的に興味のある研究者への提供を通じて、さらに裾野を広げることがバイオ産業全般にとって極めて重要。

各研究項目における要素技術の完成度は高いと評価できるものの、それぞれの研究成果が他の研究項目に利用された成果がまだ十分に得られていない。それぞれの研究項目の成果を活用し、実用的な技術開発が進むことを期待。

本事業は国が主導で行うべき技術開発、事業構築として妥当。本事業の後継となる発展型事業の計画と実施に期待したい。その際、本事業で考慮されていない技術要素も精査し、有用な要素を積極的に組み込むよう期待したい。

【各委員の提言】

- ・ 審査会での発言にもあったが、他の生物種を宿主とした時に速やかに応用出来るプラットフォームの

構築が望まれる。本事業の成果はグラム陽性菌や動物細胞といった宿主による、新たな環境での物質生産にも寄与できるコンセプトであるので、特にデザインのステップにおける宿主環境の多様性を考慮したプラットフォームを期待したい。コンビナトリアルバイオエンジニアリングは既に多くの人々が発想出来る段階に来ており、新規抗生物質の開拓等、さらに大きな産業に繋げる分野への発展や、さまざまなアイデアを吸収して成長する人工知能的学習を取り込んで行くべきであろう。また、アカデミズムへのフィードバックも必要である。ユーザー講習会やキット化を通して普及させるとともに、部分的に興味のある研究者への提供を通じて、さらに裾野を広げることがバイオ産業全般にとって極めて重要である。(A委員)

- ・ 中間評価の際の指摘により、3つの研究プロジェクト(研究項目)間で連携して成果を出すような修正がなされて研究開発が進んだことは良かったと考えられる。研究項目①と②における要素技術の完成度は高いと評価できるものの、それぞれの研究成果が他の研究項目に利用された成果がまだ十分に得られているようには見られない。したがって、それぞれの研究項目の成果を活用して実用的な技術開発が進むことを期待したい。この点に関しては、本事業の成果の多くは NEDO プロジェクトである「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」事業に引き継がれている(2016年度が重なっているのは疑問であるが)ので、その事業の中で実用化までつなげることが強く望まれる。また、事業アウトカムとしてベンチャーを設立したことは評価できるとは言え、ベンチャー企業のビジネスプランが不明(どれだけのクライアントが獲得できるかなどの将来的な見通しがほとんど立たない)なため、現状では確実にキャッシュフローを確保できるかが明確でない。これらのベンチャー企業が有する技術は NEDO プロジェクトでも利用されることから、当面のキャッシュフローはそのプロジェクトから委託を受けることで確保できるかもしれないが、このような省庁プロジェクトの委託のみで企業形態を維持することは健全な企業としてあるべき姿ではない。(B委員)
- ・ 合成生物学とシステム生物学の融合による「何でも作れる」基盤技術の開発は、世界的には米国 zymergen 社などが牽引する形で着実に進みつつあります。日本は数歩ほど出だしが遅れている状況ではありますが、巨大な化成品市場の相当程度がバイオマテリアルに移行していく未来を思えば、さらなる開発を進め、世界に追いつき、さらには世界を牽引する存在にならねばなりません。基盤技術への投資ですので、短期的な回収の目途が立ちづらい点が懸念されますが、ならばこそ、国が主導で行うべき技術開発、事業構築であるだろうと考えます。是非とも、本プロジェクトの後継となる発展型のプロジェクトを引き続きご計画いただき、バイオと IT の融合による「何でも作れる」基盤技術の完成を目指していただきたいと存じます。(C委員)
- ・ その基盤技術が実用的なものであるためには、本プロジェクトで開発を目指した技術フレームワークでは物足りないものがあります。評価コメント中にも再三述べさせていただきましたように、Design して Build した微生物を、Fine-tuning するために育種(ランダム変異導入とハイスループットスクリーニングによる菌株の最適化および培養系の最適化)するというプロセスがなければ、Test において Learn に資するデータを取得することができません。後継のプロジェクトでは、Fine-tuning パートを新たに設置し、相応の予算配分と、育種に精通した開発担当の選任をお願いしたく存じます。(C委員)
- ・ 我が国がバイオマテリアル産業界で後れをとらぬよう、実用的な基盤技術の開発を目指して、引き続き宜しくお願いいたします。(C委員)
- ・ 総合評価にも記述したが、国費を使った責務として、その技術の普及戦略をよく考えてほしい。(D委員)

- ・ 最近の次世代シークエンサー技術の推移を参考に考えると、現時点でいくら日本初、新しい技術だとしても、その寿命は非常に短い。技術はユーザーが利用してみて、評価が決まるところがあるので迅速に高い評価をサイエンスコミュニティから得ることが重要。(D委員)

<上記提言に係る担当課室の対処方針>

○今後の関連研究開発につきましては、平成 28 年度より NEDO において、「植物工場の基盤技術」と「植物の二次代謝に 着目した有用物質生産」について、「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」プロジェクトを立ち上げ実施し、AI 技術開発を含め継続的に必要な研究開発の加速を進めています。引き続き、国内産業の競争力を確保するための取り組みを進めます。

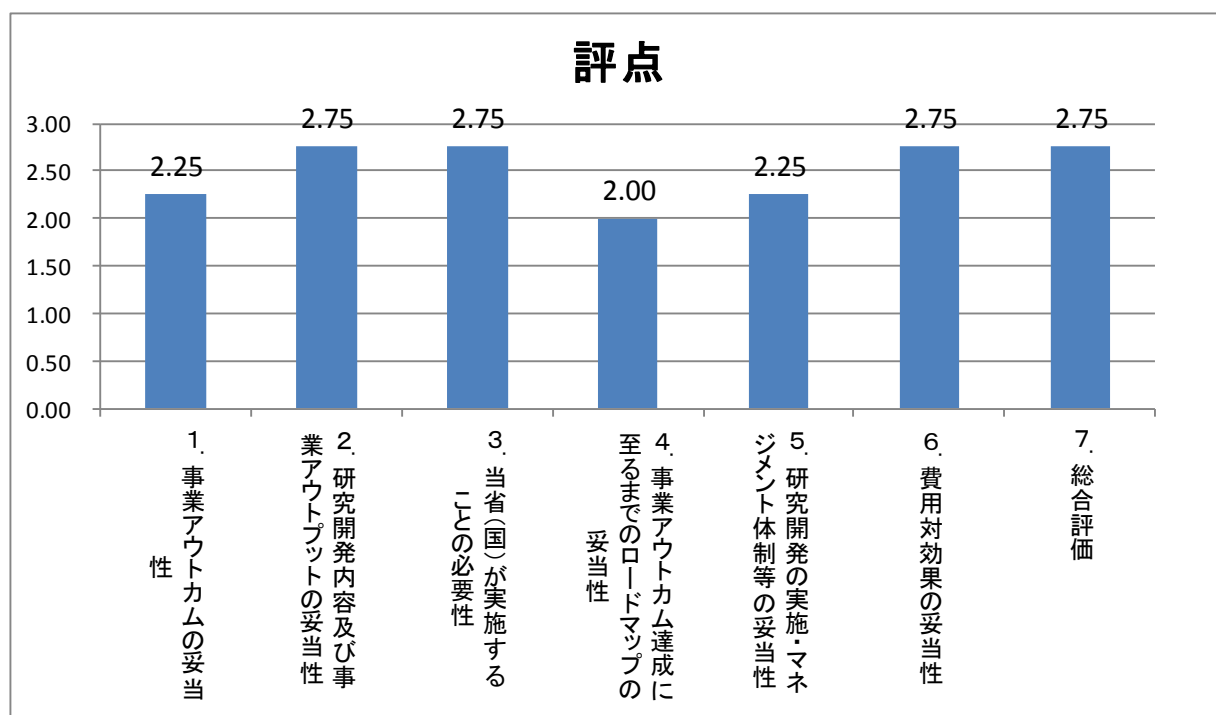
○研究開発成果につきましては、これまでも論文公表や学会での発表、学会展示会での成果普及などの取り組みを継続的に実施して参りました。今後はそれら成果普及に係る活動を強化し、広く学会にも成果を利用頂ける仕組みを検討いたします。

○今後経産省においては、各事業者が主体的に他事業者と連携しながら、開発技術を事業化していくためのサポートを実施する予定です。

○経済産業省においては、今後の新たな産業の事業化に向け、隘路となる技術的、制度的課題を抽出し、その解決に取り組んでおります。今後も将来の産業化をにらみながら、適切なシーズを発掘する取り組みを継続してまいる所存です。

Ⅲ. 評点法による評価結果

	評点	A委員	B委員	C委員	D委員
1. 事業アウトカムの妥当性	2.25	3	2	2	2
2. 研究開発内容及び事業アウトプットの妥当性	2.75	3	2	3	3
3. 当省(国)が実施することの必要性	2.75	3	2	3	3
4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップの妥当性	2.00	2	2	2	2
5. 研究開発の実施・マネジメント体制等の妥当性	2.25	2	2	2	3
6. 費用対効果の妥当性	2.75	3	2	3	3
7. 総合評価	2.75	3	2	3	3



【評価項目の判定基準】

評価項目 1. ～ 6.

- 3点：極めて妥当
- 2点：妥当
- 1点：概ね妥当
- 0点：妥当でない

評価項目 7. 総合評価

- 3点：実施された事業は、優れていた。
- 2点：実施された事業は、良かった。
- 1点：実施された事業は、不十分なところがあった。
- 0点：実施された事業は、極めて不十分なところがあった。

IV. 評価ワーキンググループの所見及び同所見を踏まえた改善点等

評価ワーキンググループの所見【終了時評価】

※評価WGの指摘を記載する。

・

所見を踏まえた改善点（対処方針）等【終了時評価】

※評価WGの指摘を踏まえ、各原課において記載する。

・

評価ワーキンググループの所見【中間評価】

- ① 評価検討会での評点も高く期待が大きい。今後はプロジェクトの重点化と拡大を期待する。
- ② 残された期間の中で、より効果的な知的財産マネジメントと標準化の進め方について検討を行うこと。
- ③ 技術開発を進めるとともに、本事業により開発される技術と物質について、リスク評価、リスク管理の視点からの検討も同時に進めること。

所見を踏まえた改善点（対処方針）等【中間評価】

- ① 評価検討会の各委員からは、事業のポテンシャルについて高い評価を頂いている。今後は、ゲノムデザイン技術を確立し、新素材を自在に開発できるようにするという最終目標に向けて、各グループの連携を強化し事業を進めていく。必要に応じて、メンバーの拡大も含めて機動的に検討していく予定。
- ② 技術開発した新素材（例えばクモの糸など）そのものを、単純な国際標準化により開示することは想定していない。新素材そのものの標準化にとどまらず、その評価・測定方法、新素材を用いた様々な製品（例えば自動車部品、衣類、防護服など）に対して適切な知財戦略及び標準化戦略を展開していく予定。
- ③ 本プロジェクトで開発する技術の発展の延長には、生物の多様性や自然の持続可能な利用に対して悪影響を及ぼすリスクなど、顕在化が予想される問題があり得ることから、安全性を確保するためのソフトウェアの開発などを視野に入れて検討を進める予定。また、生物多様性条約を担当する当課の事業環境整備室では、国際的に開発が進められている新たな技術のリスクについて、カルタヘナ議定書に基づく対策のあり方等も含め、省庁横断的に情報共有を進めており、上記開発など本事業において必要に応じて活用をすすめる。

評価ワーキンググループの所見【事前評価】

- ① バイオやライフサイエンスに投じてきた資金がなかなか産業に結びついていない現状で、産業化に向けた経済産業省の役割は非常に大きい。
- ② 人工遺伝子を使った微生物に何をさせるか、技術シーズ（工業微生物）をどの様に産業化や市場性に結びつけていくかといった視点を持って進めていくことが必要であり、その仕組みを組み込んだ計画とすべきである。物質生産を目指す場合既存の方式とのコス

ト競争力がポイントとなるが、汚泥等の処理に目的がある場合では処理コストが眼目であり副製品に割り付ける生産コストは第一義的には重要ではない。

所見を踏まえた改善点（対処方針）等【事前評価】

- ① 大学、公的研究機関、民間団体等、産学官が連携した体制で実施する。
- ② 生産コストおよび市場性から産業化が可能と判断される物質を選択した計画とする。