



藻類育種・培養法検討に基づく新規オイル生産方法 の開発及び事業化に向けた展望

小山, 智己

(Degree)

博士 (科学技術イノベーション)

(Date of Degree)

2023-03-25

(Date of Publication)

2024-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8675号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482423>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

藻類育種・培養法検討に基づく新規オイル生産方法の開発及び
事業化に向けた展望

2023年1月

神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科

小山 智己

第1章 全体概要.....	1-3
1.1 科学技術上のブレイクスルーを応用したイノベーションアイデア.....	1
1.2 イノベーションストラテジーの概要.....	2
1.2.1 事業戦略.....	2
1.2.2 技術戦略.....	2
1.2.3 知財戦略.....	2
1.2.4 財務戦略.....	3
1.2.5 ビジネスモデル.....	3
引用.....	3
第2章 背景・解決を目指す社会的課題.....	4-21
2.1 地球温暖化と原因.....	4
2.2 脱炭素社会の実現に向けた各産業領域における戦略.....	6
2.2.1 発電領域における現状と脱炭素戦略.....	7
2.2.2 熱生産領域における現状と脱炭素戦略.....	9
2.2.3 運輸領域における現状と脱炭素戦略.....	10
2.2.4 産業領域における現状と脱炭素戦略.....	14
2.3 各産業領域全体における現状と脱炭素戦略のまとめ.....	15
2.4 バイオマス資源を用いたオイル製造.....	16
2.5 第2章 まとめ.....	19
引用.....	20
第3章 微細藻類を用いたオイル生産の可能性と課題.....	22-27
3.1 微細藻類由来オイルにおける利点.....	22
3.2 微細藻類由来オイル生産における課題.....	23
3.3 科学技術研究における目的.....	26
引用.....	27
第4章 科学技術上のブレイクスルー① 窒素源存在下でオイルを高蓄積する微細藻類変異株の 開発.....	28-57
4.1 概要.....	28
4.2 序論.....	29
4.3 対象と手法.....	30
4.3.1 対象株.....	30

4.3.2 藻体への変異導入.....	30
4.3.3 オイル高蓄積細胞の選抜.....	30
4.3.4 オイル抽出.....	31
4.3.5 オイル分析.....	32
4.3.6 電子顕微鏡解析.....	32
4.3.7 バッチ培養によるオイル生産性の評価.....	32
4.3.7.1 対象株と培養条件.....	32
4.3.7.2 窒素源濃度の測定.....	32
4.3.7.3 オイル含有率・生産性の評価.....	33
4.3.8 代謝物プールサイズの分析.....	33
4.3.9 統計解析方法.....	33
4.4 結果と議論.....	34
4.4.1 窒素源存在下でオイル蓄積可能な藻類変異株の創出.....	34
4.4.2 窒素源存在下でオイルを高蓄積する藻類変異株の創出.....	36
4.4.3 窒素源存在下における変異株の細胞形態観察.....	38
4.4.4 窒素源存在下, バッチ培養条件下でのオイル生産評価.....	39
4.4.5 窒素源欠乏下, バッチ培養条件下でのオイル生産評価.....	41
4.4.6 先行研究と本研究で得られた変異株におけるオイル生産性比較.....	42
4.4.7 窒素源存在下, バッチ培養条件下での代謝解析.....	43
4.5 結論.....	45
引用.....	46
付録.....	50

第5章 科学技術上のブレイクスルー② 窒素源存在下でオイルを高蓄積する微細藻類変異株を用いた一段階オイル生産方法の開発とオイル増産機構の解明.....58-86

5.1 概要.....	58
5.2 序論.....	59
5.3 対象と手法.....	60
5.3.1 藻株と培養条件.....	60
5.3.2 バイオマス量の測定.....	61
5.3.3 窒素源濃度の測定.....	61
5.3.4 オイル分析.....	61
5.3.5 炭水化物分析.....	61
5.3.6 タンパク質分析.....	62

5.3.7 色素分析.....	62
5.3.8 メタボローム解析.....	62
5.3.9 動的メタボローム解析.....	62
5.3.10 トランスクリプトーム解析.....	63
5.3.11 統計解析.....	63
5.4 結果と議論.....	64
5.4.1 窒素源存在下, 半連続培養による新規オイル生産法の開発.....	64
5.4.2 炭水化物, タンパク質, 色素含有率の分析.....	69
5.4.3 窒素源存在下, 半連続培養時における代謝物プールサイズの解析.....	71
5.4.4 窒素源存在下, 半連続培養時における動的代謝解析.....	74
5.4.5 窒素源存在下, 半連続培養条件下における遺伝子発現解析.....	75
5.5 結論.....	82
引用.....	83
第6章 事業戦略.....	87-107
6.1 事業戦略概要.....	87
6.2 保有資源の強みを活かした事業方針の設定.....	88
6.3 事業内容.....	89
6.4 競争戦略.....	92
6.5 成長戦略.....	93
6.6 創業期における実施体制.....	95
6.7 事業アイデアの評価.....	96
6.7.1 PEST 分析.....	96
6.7.2 ファイブ・フォース分析.....	99
6.7.3 内部環境分析.....	103
6.8 外部環境分析・内部環境分析まとめ.....	104
6.9 第6章 まとめ.....	105
引用.....	106
第7章 技術戦略.....	108-118
7.1 技術戦略概要.....	108
7.2 対象株と方針.....	109
7.3 技術戦略①: 変異株開発.....	109
7.4 技術戦略②: 培養方法の開発.....	114

7.5 技術戦略③: 残渣活用方法の開発.....	115
7.6 実施体制.....	115
7.7 開発スケジュール.....	116
7.8 第7章 まとめ.....	117
引用.....	118
第8章 知財戦略.....	119-123
8.1 知財戦略概要.....	119
8.2 知財化されうる技術とオープン/クローズ戦略.....	120
8.3 特許出願方針.....	121
8.4 知財の活用方法.....	121
8.5 第8章 まとめ.....	122
引用.....	123
第9章 財務戦略.....	124-143
9.1 財務戦略概要.....	124
9.2 研究開発期間 (創業1~2年目)における財務戦略.....	125
9.2.1 必要資金と使用計画.....	125
9.2.2 資金調達方法.....	128
9.2.3 収益計画.....	128
9.2.4 創業1~2年目におけるキャッシュフロー予測.....	128
9.3 共同開発期間 (創業3~6年目)における財務戦略.....	130
9.3.1 必要資金と使用計画.....	130
9.3.2 資金調達方法.....	132
9.3.3 収益計画.....	132
9.3.4 創業3~6年目におけるキャッシュフロー予測.....	133
9.4 売上回収期間 (創業7~9年目)における財務戦略.....	134
9.4.1 必要資金と使用計画.....	134
9.4.2 資金調達.....	136
9.4.3 収益計画.....	136
9.4.3.1 受託研究・コンサルティングによる売上.....	136
9.4.3.2 SAFとして販売した際の売上予測.....	136
9.4.3.3 バイオナフサとして販売した際の売上予測.....	137
9.4.4 創業7~9年目におけるキャッシュフロー予測.....	138

9.4.4.1 SAFとしてオイルを販売した場合.....	138
9.4.4.2 バイオナフサとしてオイルを販売した場合.....	139
9.5 事業売却.....	140
9.6 第9章 まとめ.....	141
引用.....	142
第10章 全体総括.....	144-145
謝辞.....	146
研究業績.....	147-148

第1章 全体概要

1.1 科学技術上のブレイクスルーを応用したイノベーションアイデア

筆者が提案するイノベーションアイデアは、「細胞増殖と細胞内オイル蓄積を同時に可能かつ、海水を用いて培養可能な微細藻類からオイルを生産する新技術（科学技術上のブレイクスルー）」を応用し、「生産したオイルを石油化学品原料や石油由来燃料の代替として利用普及させる」事である（図1）。

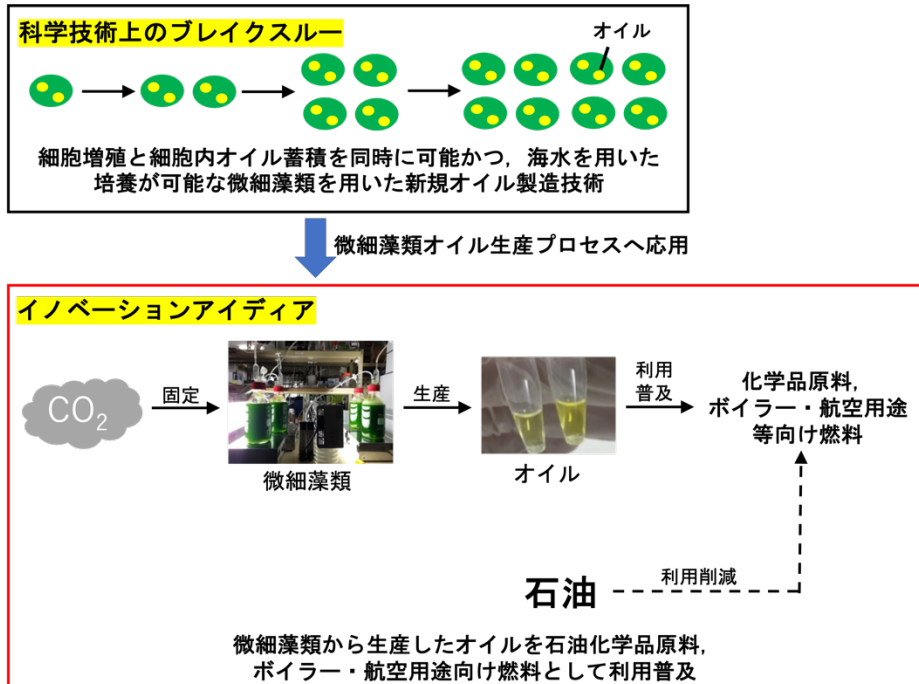


図1. 科学技術上のブレイクスルーを応用したイノベーションアイデア

微細藻類の画像は神戸大学バイオ生産工学研究室 HP から引用した^[1]。

これまで、微細藻類からオイルを生産する方法は窒素栄養源が豊富な条件下で細胞増殖をさせた後、窒素栄養源欠乏状態等でオイルを蓄積させる二段階の培養工程が必要であった。従来の方法ではオイルを蓄積する窒素栄養欠乏下で細胞増殖が著しく抑制される事、栄養欠乏によって細胞状態が悪化し、外来微生物による雑菌汚染リスクが増加する事等が課題となっていた。また、オイル生産藻類として有力視されている微細藻類の多くは培養に貴重な淡水資源を必要としており、持続可能性に問題がある。本研究では、窒素源存在下、一段階でオイルを生産可能な藻類変異株を創出する事で、細胞増殖を損なわないかつ良好な細胞状態でのオイル生産を実現した。また、海水を想定した培地で培養を行う事で淡水資源に依存しない培養方法を確立した。この事から、本研究は従来のオイル生産方法が抱える「複数段階の培養工程」、「雑菌汚染リスクの増大」、「貴重な淡水資源の使用」といった問題を解決し、微細藻類から簡易的かつ持続的にオイルを生産する方法を示した。

微細藻類から生産されるオイルは石油製品（化学品原料・燃料等）の代替資源として注目を集めている。微細藻類由来のオイルは原料として地球温暖化の原因である二酸化炭素（CO₂）を固定し、生成されるものである。このことから、石油由来オイルを微細藻類由来のオイルに代替する事で CO₂ 排出量の削減が期待できる。

本論文では、上記に示した科学技術上のブレイクスルーのコンセプトである「海水を用いた一段階オイル生産技術」を応用し、微細藻類由来のオイルを生産・利用普及させ、石油由来オイルを代替する事をイノベーションアイデアとして提案する。イノベーションアイデアを実現するために、イノベーションストラテジーとして事業戦略・技術戦略・知財戦略・財務戦略を考案し、まとめている。

1.2 イノベーションストラテジーの概要

1.2.1 事業戦略

科学技術上のブレイクスルーに加え、微細藻類からオイルを生産する上で必要不可欠な技術を開発・提供する「微細藻類由来オイル生産に向けた基盤技術開発・提供事業」を実施する事とする。潜在顧客は、「微細藻類オイル事業に参入している企業」、「これまで石油を用いた事業を展開してきたが、脱炭素社会の実現に向けて微細藻類を用いたオイル生産を検討している企業」とした。本事業は顧客に対して基盤技術を提供、顧客とともに製造体制を整え、オイルを販売する事で科学技術上のブレイクスルーをイノベーション創出に繋げていく事とする。

1.2.2 技術戦略

事業戦略で示したサービス提供を実現する為にどのような技術開発や準備が必要かといった事を考案し、纏めている。本事業では、技術戦略として「海水を用いて一段階でオイルを生産する」といった科学技術上のブレイクスルーのコンセプトを他の様々な藻類に応用し変異株を創出していく事で、微細藻類からオイルを生産する方法を一新していく。あわせて、オイル生産を行う上で必須条件である屋外環境での培養を想定した育種、培養方法・オイルを抽出後の残渣を活用する方法を開発していく。

1.2.3 知財戦略

知財戦略は、技術戦略の内容で特許化しておくべき技術・秘匿化すべき技術を検討した。本事業では、「オイル増産等に寄与する遺伝子および遺伝子操作を行った変異株を用いてオイルを生産する事」に関して特許を取得し、「変異株の育種方法」や「培養方法・残渣活用法」に関しては秘匿化する事とした。この理由として、変異株の特徴やその利用に関しては、特徴・利用の特定が可能である点、育種・培養・残渣活用方法に関しては特許侵害の特定が困難である事が挙げられる。

1.2.4 財務戦略

公的機関が行っている「研究開発型スタートアップ支援事業」を活用して事業を開始させる。創業時の自社技術が確立されていない段階ではコンサルティング等の方法で自社利益をあげていくとともに、公的機関から調達した資金を用いて自社技術を確立する。自社で開発した技術を元に、事業会社から出資を受け共同でオイル生産技術を開発・オイルを販売していく。この際、本事業の売上はオイル売上に対する本事業の寄与度（提携先の利益の10%）とする。

1.2.5 ビジネスモデル

本事業におけるビジネスモデルの概要を図2に述べる。①. 筆者が科学技術上のブレイクスルーを応用した「微細藻類基盤技術開発・提供企業」を設立する。企業設立とともに②. 公的機関から資金を調達し、研究開発を実施し、技術パッケージ（知財）を開発する。その後、③. 藻類オイル生産を検討している企業に対し、開発した技術をライセンスする事で自社サービスを提供する。④. サービスを提供するとともに共同でオイル生産体制を構築し、オイルを販売する事で科学技術上のブレイクスルーを社会的な価値に結びつけていく。⑤. オイルを販売した利益の一部を本事業の売上とする。

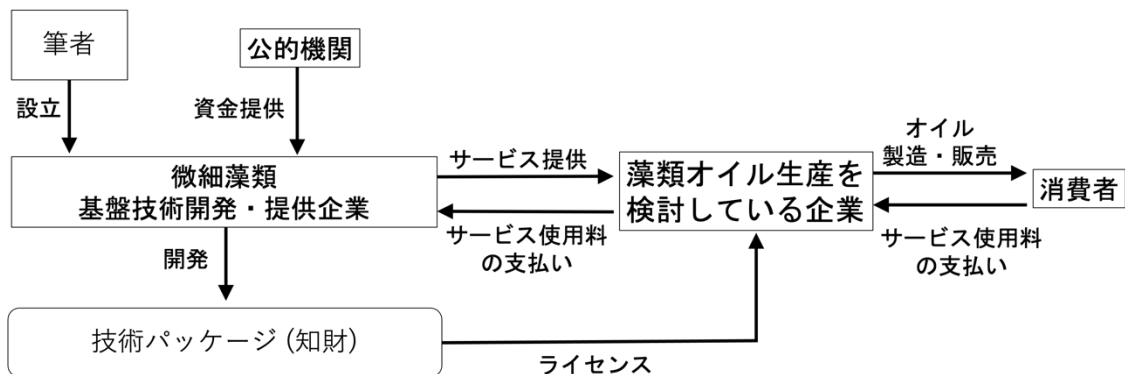


図2. 本事業におけるビジネスモデル

引用

[1] 神戸大学 バイオ生産工学研究室 ホームページ
http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/research_inv.html

第2章 背景・解決を目指す社会的課題

2.1 地球温暖化と原因

我々の豊かな生活や産業発展等は先人達の取り組みによって実現されてきた。18世紀中頃に起きた第一次産業革命では蒸気機関、内燃機関、鉄道が発明され、これまで人間が行ってきた活動の機械化が実現された。20世紀初頭に起きた第二次産業革命では電気の発明・発展により産業活動の電動化が実現された。1970年代に起きた第三次産業革命ではコンピューターやインターネットの発明・発展により各種作業の自動化が実現されてきた。2010年以降に起きた第四次産業革命ではAI, IoT, ビックデータ, クラウドの発明により産業活動の自律化が実現されてきている。これらの産業革命は石油や石炭といった化石燃料を動力源として実現されてきた。一方で化石燃料の大量消費によって地球温暖化といった環境問題を招いている。2020年現在、世界の平均気温の基準値は1981年から2010年の平均と比べて約0.45°C上昇している(図1)^[1]。これは1891年の統計開始後最も高い値を示しており、地球温暖化が確実に進行していると言える。

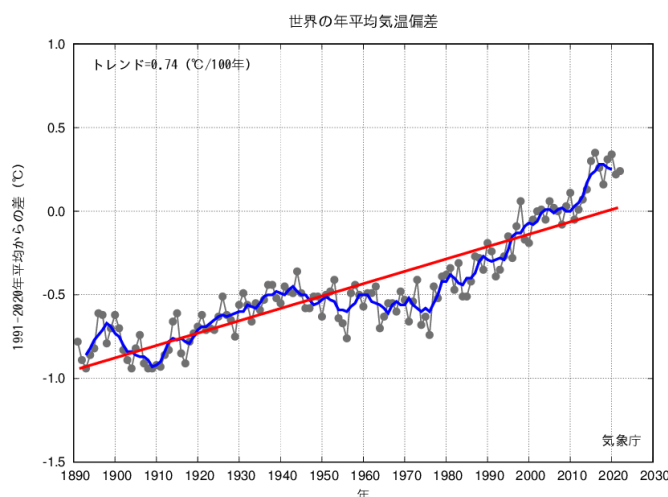


図1. 世界の年平均気温偏差^[1]

地球温暖化の進行は人々の生活にも大きな影響を与える事が予測されている。地球温暖化による影響が危惧されているものとして、海面上昇による陸地面積の減少、寒冷地域に生息する生物の絶滅、気候変動、食料収穫量の減少等が挙げられる^[2]。これらの問題が深刻化すると人々の豊かな生活の維持が困難になると予測される。その為、地球温暖化は人類が解決せねばならない問題である。

地球温暖化を引き起こしている原因として、大気中の温室効果ガス(二酸化炭素、一酸化二窒素、メタン、フロン)濃度の増加が挙げられる。温室効果ガスとは地表から放出される熱を吸収し、再放出する性質を持つ気体である。温室効果ガスがない地表面の温度は-19°C程度と見積もられており、温室効果ガスは現在の気温を保つ上で重要な役割を担っている。しかし、温室効果ガス濃度

の増加は大気温度を上昇させ、地球温暖化を招く。化石燃料は燃焼時にエネルギーを獲得できる一方、副産物として温室効果ガスとして知られる二酸化炭素、窒素酸化物等といった副産物を生成する。近年、温室効果ガス濃度は急激な増加が確認されている（図2）^[3]。気候変動に関する政府間パネル（IPCC）第4次評価報告書によると、20世紀半ば以降に観測された世界の平均気温上昇は人為起源の温室効果ガス（二酸化炭素、一酸化二窒素、メタン、フロン）によってもたらされた可能性が高いと言われており、地球温暖化問題の解決には大気中の温室効果ガス濃度の削減が急務とされている^[4]。

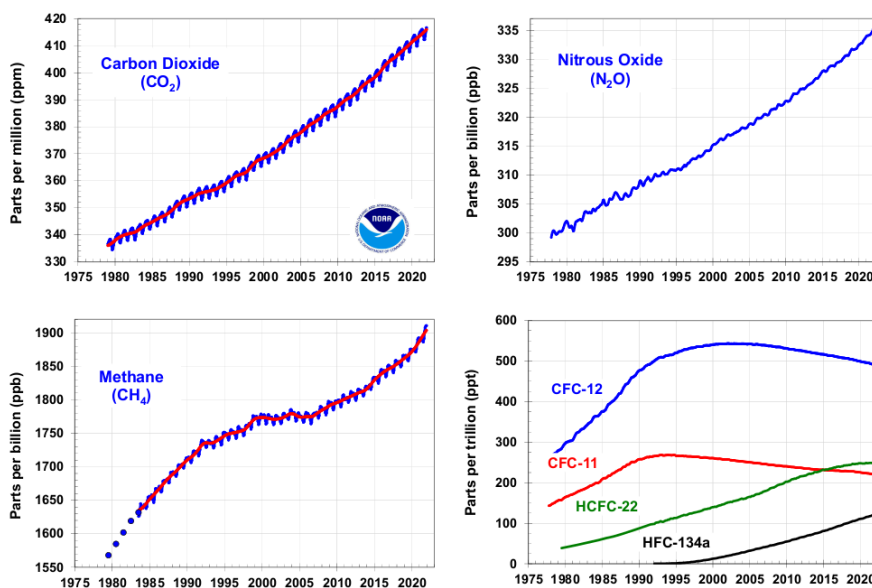


図2. 温室効果ガス濃度の推移^[3]

各々の温室効果ガスが地球温暖化へ与える影響（寄与度）を図3に示す。これらは、各々の温室効果ガスが大気中に存在する存在比と大気を温める温室効果をもとに推定された寄与度となっている。温室効果ガスのうち、地球温暖化へ寄与する割合は、二酸化炭素（CO₂）が60%、メタン（CH₄）が20%、一酸化二窒素（N₂O）が6%、フロン類（CFC, HFC）及びハロンが14%となっている。この事からも、温室効果ガスの中で二酸化炭素が最も地球温暖化への寄与率が高い^[5]。よってCO₂排出量削減が地球温暖化の解決に向けた有力なアプローチと言える。

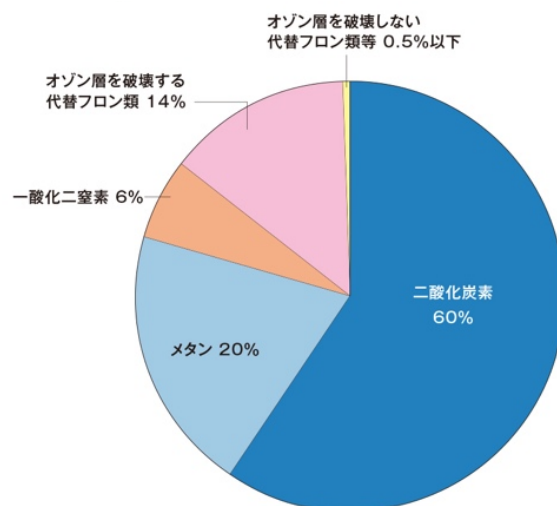


図3. 産業革命以降人為的に排出された温室効果ガスによる地球温暖化への寄与度^[5]

2.2 脱炭素社会の実現に向けた各産業領域における戦略

大気中の CO₂ 排出量を削減し、地球温暖化を解決する為には、現状、どのような社会活動から CO₂ が排出されているのかを特定し、社会全体として対策を講じる必要がある。図4に世界の CO₂ 排出量及びその内訳を調査した結果を示す。2019年、世界の CO₂ 排出量は 319 億トンであると報告されている。CO₂ 排出量のうち、44%が発電・熱生産由来、26%が運輸由来、20%が産業由来となっている^[6]。

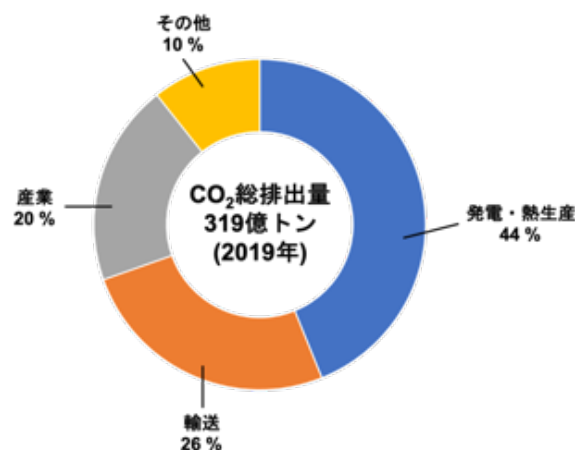


図4. 世界の CO₂ 総排出量と排出源

図は国際エネルギー機関 (IEA) が発表した CO₂ Emission From Fuel Combustion 2019^[6] を参考に筆者が作成

次項から、社会全体での脱炭素化に向けた戦略を可視化する為に、各々の領域における現状と CO₂ 排出削減戦略をまとめている。

2.2.1 発電領域における現状と脱炭素戦略

世界の電源構成と各電源における CO₂ 排出量を調査した結果を図 5、表 1 に示す。2020 年、世界の電源構成は石炭火力発電が 35.1 %、石油火力発電が 2.8 %、天然ガスを用いた火力発電が 23.4 %、原子力発電が 10.1 %、自然エネルギー（バイオマス、地熱、太陽光、風力、水力）が 27.8 % となっている^[7]。火力発電は石炭・石油・天然ガスをボイラーで燃焼し、蒸気を生成、生成した熱を用いてタービンを回転させ、電気を生成させる。原子力発電は、火力発電のボイラーにあたるものが原子炉であり、この中でウラン燃料が核分裂を起こし、熱を生成している。この熱によりタービンを回転させて発電をしている。バイオマス発電は、①. バイオマス燃料を燃焼して蒸気タービンを回す直接燃焼方式、②. 燃料を熱処理・ガス化し、ガスタービンを使って燃焼させる熱分解ガス化方式、③. 燃料の発酵等によってガスを発生させ、そのガスを用いてタービンを回転させて発電させる生化学的ガス化方式によって電気を生成している。バイオマス発電に用いられる原料はウッドチップ等木質系のバイオマス資源であり、燃焼して発生された CO₂ は再びバイオマスの光合成によって固定される。地熱発電は、地下のマグマの熱エネルギーを利用し、タービンを回転させる事で発電を行っている。太陽光発電はダイオードと呼ばれる電子素子を用い、太陽光を直接電気エネルギーに変換する事で発電を行っている。風力発電は風で風車を回転させ、その回転エネルギーを電気エネルギーに変換する事で発電を行っている。水力発電は、標高の高い場所に貯水された水を標高が低い場所に落とす事でエネルギーを生み出す位置エネルギーを利用して水車を回し、水車に接続されている発電機を回転させる事によって発電を行っている。

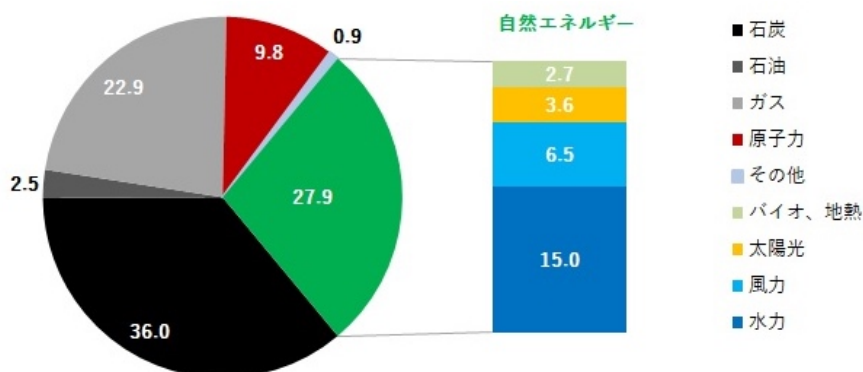


図 5. 世界の電源構成 (2020 年)^[7]

上記に挙げた、発電方法のうち、火力発電は石炭・石油・LNG (天然ガス) の燃焼、原子力発電はウラン燃料の燃焼、バイオマス・地熱・太陽光・風力・水力はそれぞれバイオマス資源の燃焼、地下熱、太陽光、風、水の位置エネルギーを利用して発電を行っている。この事から、火力発電・原子力発電・バイオマス発電は燃料資源の燃焼によって電力を生み出している事がわかる。その他の資源はもともと資源界に存在する自然エネルギーを電力に変換している。各種電源で 1 kWh

あたりの電力を発電する際における CO₂排出量を表 1 に示す。石炭火力、石油火力、LNG (天然ガス)火力による発電では、1 kwh の電力を発電した際に 0.943 kg, 0.738 kg, 0.599 kg の二酸化炭素を排出している。一方で原子力・地熱・太陽光・風力・水力を用いた発電は 0.019 kg, 0.013 kg, 0.038 kg, 0.026 kg, 0.011 kg と火力発電と比較して 1/10 以下の二酸化炭素排出となっている^[8]。このことから、電源構成の約 60 %を占めている火力発電は世界の主たる電力生産方法ではあるが、二酸化炭素を多量に排出していることがわかる(表 1)。

表 1. 各種電源別 (1kwh あたり)の CO₂排出量^[8]

	1kwhの電力を発電する際に生じるCO ₂ 量 (kg)
石炭火力	0.943
石油火力	0.738
LNG(天然ガス)火力	0.599
原子力	0.019
バイオマス	-
地熱	0.013
太陽光	0.038
風力	0.026
水力	0.011

発電領域では、業界全体での CO₂排出量を削減する為に、2000~2019 年の発電方法を見直し、2019 年以降(~2040 年)の電源構成比の再編を目指している。国際エネルギー機関 (IEA)が発表した 2040 年までの世界の電源別発電電力量の変化予測、目標を図 6 に示す。2019 年までは発電量が大きいものの二酸化炭素排出量の多い石炭、天然ガス等を用いた火力発電が主流であったが、2019 年以降は火力発電を用いた発電量を減少させることを目標としている (図 6、公表済みの政策シナリオおよび持続可能な開発シナリオ)^[9]。一方で、風力、太陽光といった自然エネルギーを利用した発電量の増加が目指されている。このことから発電業界は化石燃料を用いた発電から脱却し、自然エネルギーを用いた発電にシフトしていく事が予測される。



図 6. 2000～2040 年の世界の電源別発電電力量の変化^[9]

灰色: 2000 年～2019 年までの発電量, 水色: 2040 年に向けた公表済みの政策シナリオ (STEPS: Stated Policies Scenario), 緑: 2040 年に向けた持続可能な開発シナリオ (SDS: Sustainable Development Scenario)

2.2.2 熱生産領域における現状と脱炭素戦略

熱生産領域における現状を表 2 に示す. 熱は主に空調・給湯といった民生用途 (0 °C～100 °C), 食品加工などといった軽工業プロセス (100 °C～200 °C), 金属加工などといった重工業プロセス (200 °C～1,700 °C) に用いられている. 熱を供給する方法として, 化石燃料や電力によってボイラー, コージェネ, ヒートポンプ, 電気炉を稼働させる事によって熱を生産・供給している^[10] (表 2).

表 2. 主な熱利用用途と供給方法^[10]

	主用途	熱供給方法 (化石燃料由来)	熱供給方法 (電力由来)
0°C～100°C	民生用 (空調・給湯)	ボイラー コージェネ	ヒートポンプ
100°C～200°C	軽工業プロセス (食品加工など)	ボイラー コージェネ	電気炉 ヒートポンプ
200°C～1700°C	重工業プロセス (金属加工など)	燃焼炉 コージェネ	電気炉

熱生産領域における脱炭素戦略として, 燃料資源の変更・高効率燃焼・熱回収等が挙げられている^[11]. 燃料資源の変更に関しては, 化石燃料に代替するエネルギー資源として, バイオディーゼル, ウッドチップ, 抵抗加熱, 水素, 核融合といった非化石燃料を用いた様々なアプローチが検討されている^[12] (図 7). バイオディーゼルの燃焼によって約 2,200°Cの熱を生産できる. ウッ

ドチップは約 1,100°C・抵抗加熱では約 1,800°C, 水素熱は 2,100°C, 核融合は 300°C(現状)~850°C (将来)の熱を生産することができる。これらの燃料資源を用いた技術開発を進展させる事が脱炭素を実現する上で重要とされている。

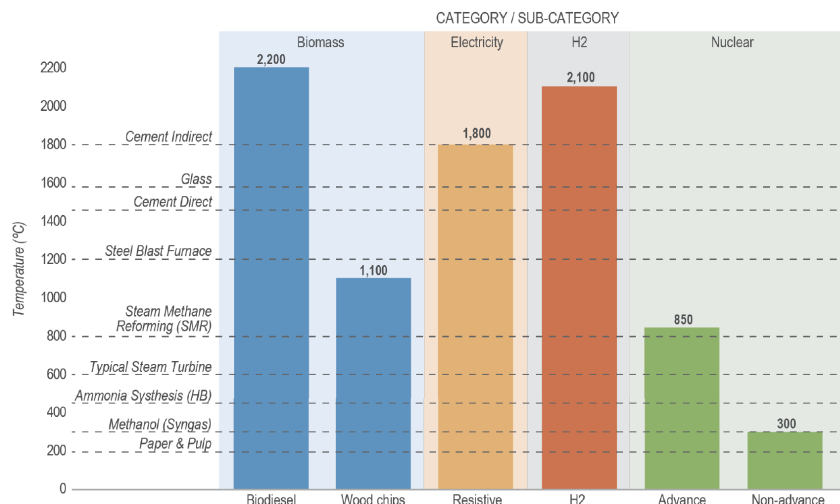


図 7. 主要な工業プロセスの温度要件と代替候補燃料によって生産が可能な温度^[12]

高効率燃焼については、酸素富化燃焼技術の発展が期待されている。酸素富化燃焼とは、空気に酸素を付加する事で、空気中の酸素濃度を現状(21%)よりも高くした酸素であり、空気燃焼と比較して高い火炎温度が得られるといった利点がある。熱回収に関して、工場等では日々モノづくりを行う際に原料の燃焼等によって熱が放出されている。この排出された熱を回収し、再利用する事で省エネルギー化を図る取り組みが検討されている。

2.2.3 運輸領域における現状と脱炭素戦略

世界の運輸部門における CO₂ 排出量とその内訳を調査した結果を図 8 に示す^{[13][14]}。世界の運輸は主に普通乗用車・重量車・鉄道・船舶・航空機が挙げられる。2014 年、世界の運輸領域における CO₂ 排出量は約 95 億トンとなっており、その内訳は普通自動車が 51%、重量車が 27%、鉄道が 3%、船舶が 10%、航空機が 10%となっている。

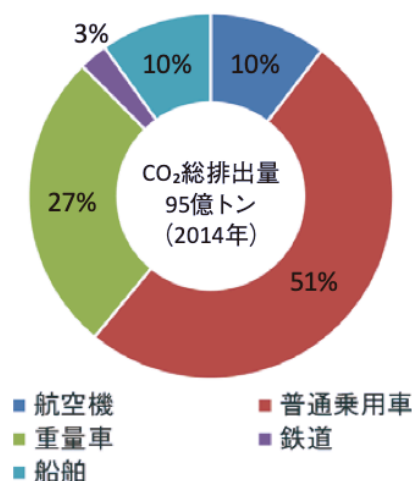


図 8. 世界の運輸部門における CO₂ 排出量の種別内訳^[13]

普通自動車および重量車は現在ガソリン燃料、ディーゼル燃料を動力源としている。ガソリン、ディーゼルは共に石油を精製する事によって得られる燃料資源である事から燃焼時に多量の CO₂ が生じる。このことから、将来の脱炭素社会の実現に向けて世界各国にてガソリン車・ディーゼル車の販売規制が行われる^[15]。具体的な内容として、英国では 2030 年までにガソリンとディーゼル車の販売を禁止する事、中国では 2035 年にはすべての車を Electric Vehicle (EV) 車等環境に配慮した車に限定する事、米国・カリフォルニア州では 2035 年までに新車の販売を EV 車等環境に配慮した車に限定する事、日本では 2030 年半ばに販売する車は全て電動車に限定するといった事を発表している。上記により、今後ガソリン・ディーゼル自動車の販売規制がかかる事から、大気中の CO₂ 排出を抑える事ができる電気自動車 (EV 車) やハイブリッド車の販売台数が増加し、2038 年には世界の新車販売台数の 50% 以上が EV 車になる事が予測されている(図 9)^[16]。以上から、自動車業界はガソリン・ディーゼル燃料から脱却し、電気での走行が行われていくと予測される。

世界で新車CO2▲90%には、2030年:25%、2050年:100%の次世代車普及が必要

「50年新車CO2▲90%」を達成するのに必要な新車販売台数の推移 (日米欧中印)

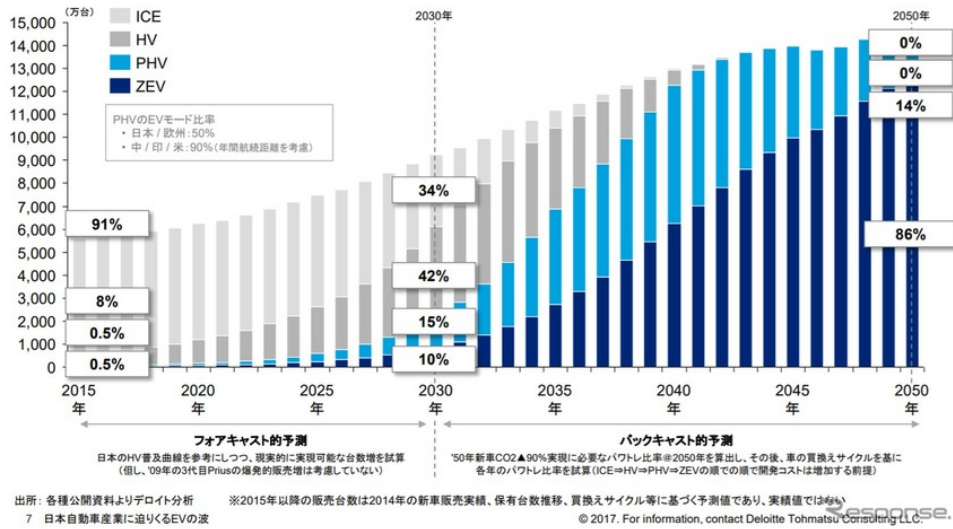


図 9. 世界の自動車販売台数の見通し^[16]

船舶業界のCO₂排出削減戦略は、「新造船の燃費規制の強化」、「オペレーションの効率化」、「市場メカニズム(MBM)の導入」、「低炭素、ゼロ炭素燃料の導入」といった事が挙げられている^[17]。低炭素、ゼロ炭素燃料の導入に関して、船舶業界は燃料源を重油から液化天然ガス(LNG: Liquefied natural gas, 図中の水色の部分)へ転換する事が予測されている(図10)^[18]。液化天然ガスは重油と比較して燃焼時の二酸化炭素排出量を削減できる事から、船舶業界の低炭素化を実現する上で有望な資源とされている。また、液化天然ガスの販売価格は重油と同等である。この事から、船舶領域では導入が容易な液化天然ガスを利用し、CO₂排出削減を目指している事が考えられる。

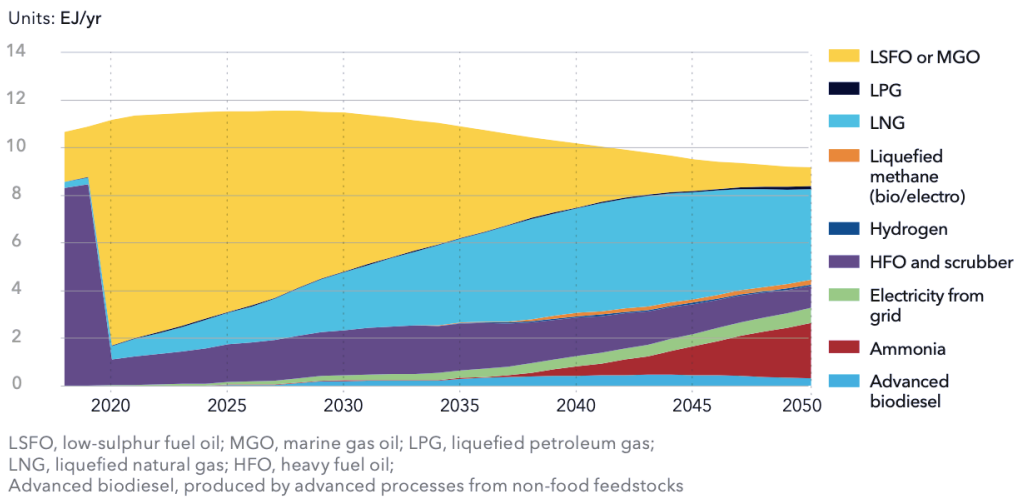


図 10. 船舶燃料の将来内訳予測^[18]

航空業界は現状の CO₂ 排出状況から、環境活動家のグレタ・トゥーンベリ氏によって「飛び恥」と揶揄されている。航空業界は脱炭素化の実現に向けて、「迂回の少ないルートの実現等に基づく運行方式の改善」、「機体の軽量化や燃費効率の向上を通じた新技術の導入」、「従来燃料(ケロシン)に代替する燃料および経済的手法の活用」が目指されている(図 11)^[19]。特に、代替燃料の利用によって、CO₂ の排出量を削減させていく取り組みが注目されている。ケロシンに代替する燃料は SAF (Sustainable Aviation Fuel) と呼ばれ、主にバイオ燃料のことを指す。

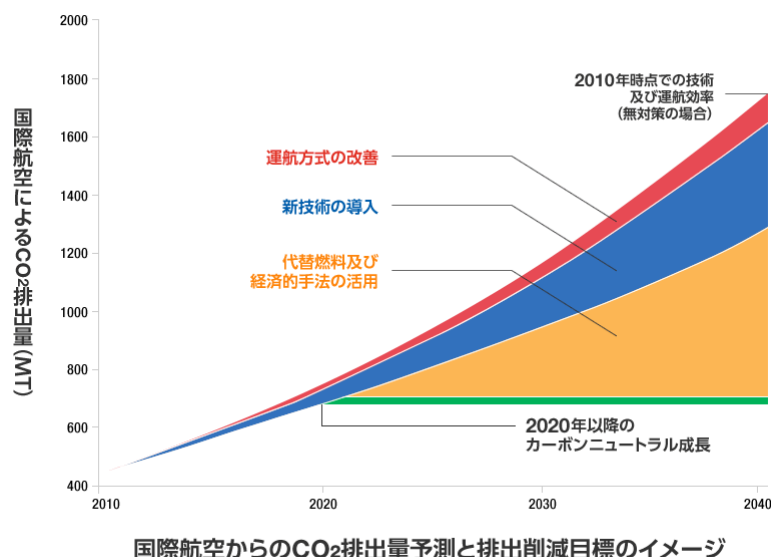


図 11. 航空業界における CO₂ 排出削減戦略^[19]

航空業界が SAF の利用を目指している理由として、①. SAF のような液体燃料は他の候補(電気・水素等)と比較してエネルギー密度が高い、②. 既存のインフラを大幅に変更する必要がないといった事が挙げられる。

図 12 に、液体燃料(ケロシン)、水素燃料、燃料電池のエネルギー密度を示す。ケロシンはリチウムイオン電池と比較して重量当たりのエネルギー密度が 60 倍、液体水素と比較して体積当たりのエネルギー密度が約 3 倍高い事が報告されている^[20]。SAF は石油由来ケロシンを代替するものである事から他の候補と比較してエネルギー効率が優れる。NEDO 技術戦略研究センターの調査によると、2030 年頃までの蓄電池の開発にて達成される飛行可能距離は大型ジェット旅客機で 2,000 km (距離換算で沖縄～北海道)、小型機で 160 km、ヘリコプターで 80 km とされている^[21]。この事から、航空機の電動化は国内線のみでは可能になるが、国際線での利用は困難になる。

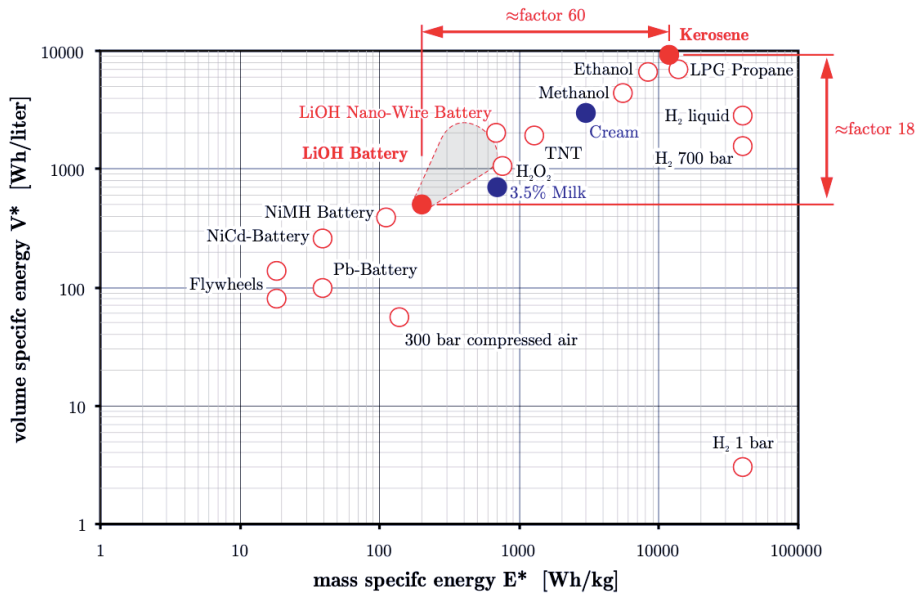


図 12. 各種燃料のエネルギー密度^[20]

また、航空機を電気や水素で飛行させようとした場合、航空機本体・燃料貯蔵タンク等空港のインフラを大幅に変更する必要がある。SAF の場合、石油由来ジェット燃料を代替するものである事から、既存のインフラを大幅に変更させる必要はなく、速やかな商用利用が期待できる。

2.2.4 産業領域における現状と脱炭素戦略

産業領域における CO₂ 排出の内訳は鉄鋼業が 28 %、セメント業が 27 %、化学産業が 13 %となっている (図 13)^[21]。

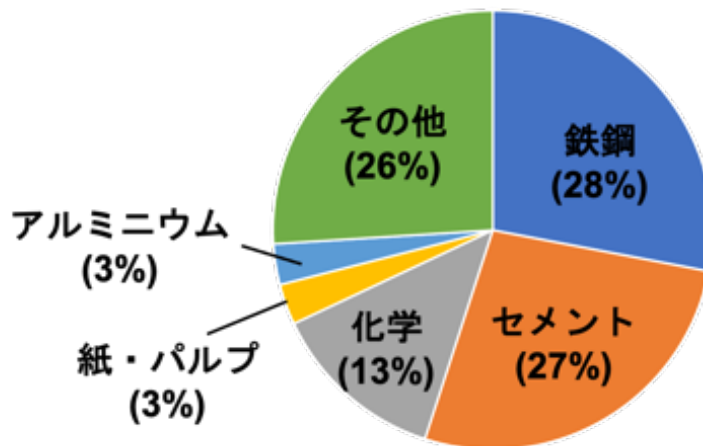


図 13. 産業セクターにおける二酸化炭素排出内訳^[21]

図は論文情報を元に筆者が作成した。

産業領域では、上記に挙げた熱の供給に加え、原料の燃焼によって二酸化炭素を発生させている。現状、鉄鋼業では、鉄鉱石・石灰・コークスを原料とし、1,200°Cで焼成させることで鉄鉱石の不純物が上に浮かび・鉄部分が下にたまる原理を利用して鉄を生産している。この際、コークス等の燃焼によって二酸化炭素が排出されている。セメント業では、石灰石、粘土、ケイ石を混合し、1,400°C以上の高温で焼成して得られるクリンカを原料としている。このクリンカを石こうなどと混合して粉末状にする事でセメントが製造されている。セメント業では、クリンカの生成工程でCO₂が発生している。化学産業では、石油由来ナフサを出発原料とした生産工程を経て樹脂、繊維原料、ゴムなど様々な化学製品を製造する際にCO₂が発生している。産業領域におけるCO₂排出削減戦略として、鉄鋼業・セメント業は熱供給の観点（水素等の有効利用、省エネルギー）からCO₂排出削減戦を目指している^[12]。また、化学産業では化学製品の生産を生物由来のものにするといった試みを目指されている^[22]。

2.3 各産業領域全体における現状と脱炭素戦略のまとめ

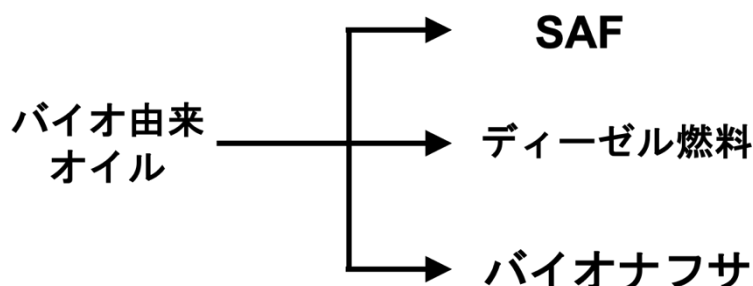
各領域全体におけるCO₂発生源と業界全体での脱炭素戦略のまとめを表3に示す。発電領域における脱炭素戦略として、自然エネルギーの利用普及が挙げられる。熱生産領域における脱炭素戦略は、装置の省エネ化、バイオ燃料、水素、電気、核融合等様々なエネルギー源の利用普及が予測されている。運輸領域の自動車部門は電気自動車の利用普及、船舶部門は、燃費強化、オペレーションの効率化、市場メカニズムの導入、低炭素（液化天然ガス）燃料の導入、航空部門は運航方式の改善、機体の軽量化・燃費改善、バイオ燃料（SAF）の利用普及が予測されている。産業領域の鉄鋼業・セメント業では、熱供給源の変更、化学産業ではバイオテクノロジーの利用普及が予測されている（表3）。

表3. 各産業領域におけるCO₂発生源とCO₂発生源に対する対策

	CO ₂ 発生源	CO ₂ 発生源に対する対策
発電領域	化石燃料の燃焼	自然エネルギーの利用普及
熱生産領域	化石燃料の燃焼	装置の省エネ化 燃料の変更
運輸領域（自動車部門）	化石燃料の燃焼	電気自動車の利用普及
運輸領域（船舶部門）	化石燃料の燃焼	燃費強化 オペレーションの効率化 市場メカニズムの導入 低炭素燃料（液化天然ガス）の導入
運輸領域（航空部門）	化石燃料の燃焼	運航方式の改善 機体の軽量化、燃費改善 SAF（バイオ燃料）の利用普及
産業領域 （鉄鋼業・セメント部門）	熱供給 原料の加工	熱供給源の変更
産業領域（化学部門）	熱供給 原料の加工	バイオテクノロジーの利用

2.4 バイオマス資源を用いたオイル生産

本研究では、大気中の CO₂ 排出量を削減するために、化石資源由来のオイルをバイオマス資源由来オイルに代替し、熱生産用途向け燃料・航空燃料・バイオナフサとしての利用普及を目指す(図 14).



バイオ由来オイルに着目した理由: 多様な用途への活用が期待できるため

図 14. バイオ由来オイルへの着目理由

バイオマス資源を用いたオイル製造方法を図 15 に示す^[23]. ここでは、例としてバイオジェット燃料 (SAF)向けオイルの製造方法を示している. バイオマス由来オイルの原料は主にセルロース系バイオマス (植物), 微細藻類, 都市ゴミ・排ガス, 廃食油等が挙げられる. 以下, 各々の原料を用いたオイル製造方法について概要を述べる^[23].

①. セルロース系バイオマス

①-1. 糖化発酵アルコール経由(図中の A): セルロース系バイオマスを前処理糖化し, 得られた糖の発酵によってアルコールを生成させる. 得られたアルコールを脱水・重合・水素化分解することで, 炭化水素燃料を生産する.

①-2. 糖化発酵高分子中間体経由(図中の B): セルロース系バイオマスを前処理糖化し, 得られた糖の発酵によってファルネセンといった高分子中間体を生成し, 水素化等の処理を経て炭化水素燃料を生産する.

①-3. ガス化 FT(Fischer-Tropsch)合成(図中の C): ガス化炉を用いてバイオマスをガス化, FT(Fischer-Tropsch)合成によって FT 合成油を生成する. 生成された油を蒸留・分留することで炭化水素燃料を生産する.

①-4. ガス化アルコール生物合成経由(図中の D): ガス化炉で製造した合成ガスを発酵槽に投入して微生物に発酵させる事でアルコールを生成させる. 生成されたアルコールは水素化分解処理

を行い、炭化水素燃料を生産する。

①-5. ガス化高分子中間体/油脂生物合成経路次世代バイオ燃料製造プロセス(図中の E): ガス化炉で製造したガスを用いて微生物から高分子中間体、油脂を生産し、水素化等の処理を施す事で炭化水素を生産する。

①-6. 急速熱分解処理による次世代バイオ燃料製造プロセス(図中の F): 高温高圧の急速な熱分解処理によってバイオ原油を生成、水素化処理・蒸留・分離等の工程を経て炭化水素を生産する。

②. 微細藻類

②-1. 油脂生産微細藻類を用いた次世代バイオ燃料生産プロセス(図中の G): 微細藻類の細胞内に油脂を生産させ、抽出する。抽出された油脂をメチルエステル化してバイオディーゼルを生成後、生成されたバイオディーゼルの水素化して炭化水素を生産する。

②-2. 炭化水素粗油生産藻類を用いた次世代バイオ燃料製造プロセス(図中の H): 炭化水素を生産する藻類を用いて粗油 (炭化水素)を生産する。

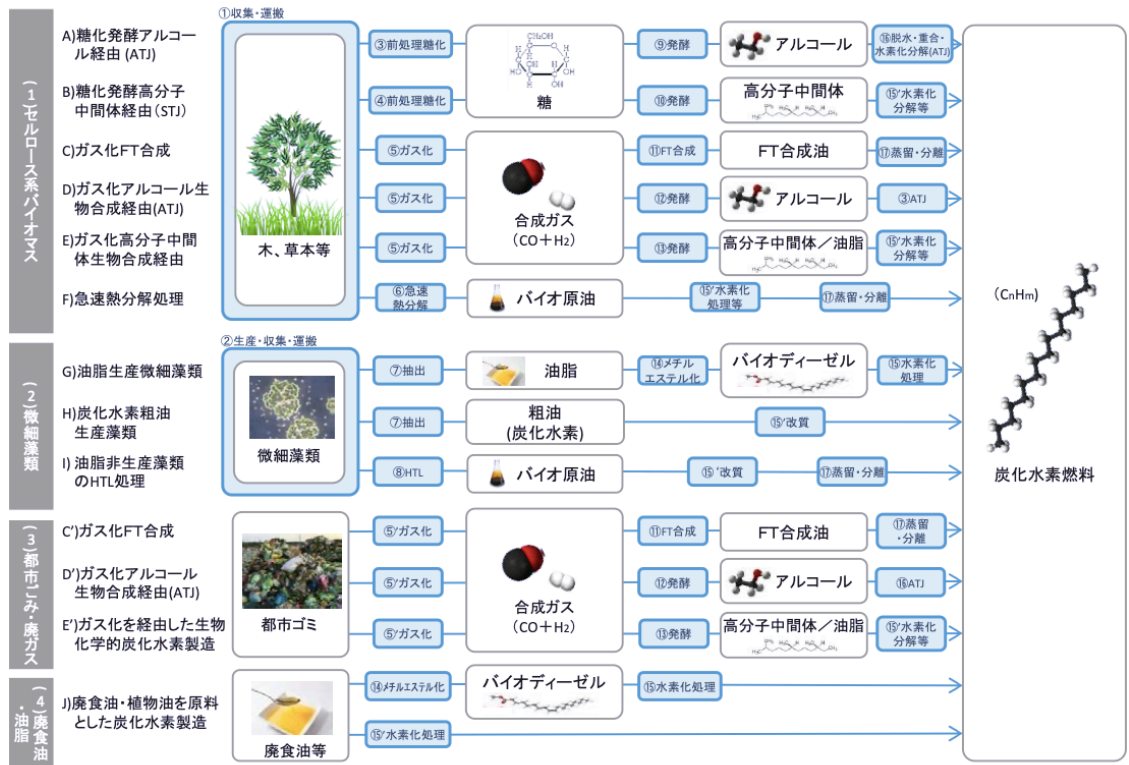
②-3. 油脂非生産藻類の HTL(Hydrothermal Liquefaction: 水熱液化)処理による次世代バイオ燃料製造プロセス(図中の I): 高成長する微細藻類を培養し、HTL 処理する事でバイオ原油を生産、精製する事で炭化水素を生産する。

③. 都市ごみ、廃ガス(図中の C', D', E')

都市ゴミといったセルロース系バイオマスを経由してガス化炉で処理し、合成ガスを生成する。合成ガスはセルロース系バイオマスから炭化水素を生産する方法と同様、FT 合成や微生物発酵によって FT 合成油・アルコール・高分子中間体等を生成する。これらを蒸留・分離、水素化処理等を行うことで炭化水素燃料を生産する。

④. 廃食油(図中の J)

廃食油を原料としてメチルエステル化を行う事でバイオディーゼルの製造、これを水素化処理する事で炭化水素燃料を製造する。



(注) ⑤'ガス化は廃棄物を対象としている点で⑤ガス化と差別化している
 ⑮'水素化処理等は、⑮バイオディーゼル (FAME) を対象としている水素化処理と差別化している

図 15. 様々な原料からのオイル (燃料用途)の製造方法^[23]

バイオマス資源とは、動植物等から生まれた再生可能な有機性の資源である。バイオマス資源由来の液体オイルは使用時に CO₂ が排出されるものの、植物バイオマス等の光合成によって再度 CO₂ が固定されるため、環境負荷が少なく、石油の代替資源として注目されている。よって、本論文ではバイオマス資源から生産したオイルを石油の代替として利用普及させていくことにより、大気中の CO₂ 排出削減を目指すこととした。

2.5 第2章 まとめ

本章では、筆者の科学技術上のブレークスルーを応用したイノベーションアイデアの考案に至った背景を述べた。第2章の内容を以下にまとめる。

- ・化石燃料の大量消費により人々の生活は発展を遂げたが、一方で化石燃料の燃焼時に生じる二酸化炭素等の温室効果ガスにより地球温暖化を招いている。温室効果ガスが温暖化に与える影響を調査した結果、温室効果ガスの中でも二酸化炭素が最も温暖化に影響を与えている事が分かった。

- ・各産業領域における二酸化炭素排出の現状と脱炭素戦略を調査したところ、「電力は化石燃料から自然エネルギーの利用へとシフトしていく」、「熱生産は燃料資源の変更や省エネ化・排熱利用が進められていく」、「自動車は電動化が進んでいく」、「船舶は液化天然ガスの導入、運航方式の改善等が実施されていく」、「航空機はバイオジェット燃料 (SAF)の導入や運航方式の改善等が行われていく」、「鉄鋼業・セメント業は原料の低炭素化、熱供給元の変更が行われていく」、「化学産業はバイオテクノロジーの活用が行われていく」といった事が分かった。

- ・バイオマス資源由来のオイルは加工の方法によって燃料・化学品原料等幅広く利用できる事から、汎用性が高い。また、バイオマス資源由来のオイルを石油の代替として利用普及させる事で大気中の二酸化炭素濃度削減に寄与する事が期待できる。以上のことから本論文ではバイオマス資源を用いてオイルを生産・利用普及させていくこととした。

引用

- [1] 世界の平均気温, 気象庁.
http://www.data.jma.go.jp/cpdinfo/temp/an_wld.html
- [2] 温暖化から地球を守る 適応への挑戦. 2009年. 環境省.
- [3] Butler James H and Stephen A Montzka. "The NOAA annual greenhouse gas index (AGGI)." *NOAA Earth System Research Laboratory* 58 (2016).
- [4] IPCC 第四次評価報告書
- [5] エネ百科 温室効果ガスの地球温暖化への寄与度
<https://www.ene100.jp/zumen/2-1-2>
- [6] CO₂ Emission From Fuel Combustion 2019. IEA
- [7] 自然エネルギー財団 ホームページ
<https://www.renewable-ei.org/statistics/international/>
- [8] 日本における発電技術のライフサイクル CO₂ 排出量総合評価. 2016年7月. 電力中央研究所報告.
- [9] IEA World Energy Outlook 2020.
<https://www.iea.org/data-and-statistics/charts/change-in-global-electricity-generation-by-source-and-scenario-2000-2040-2>
- [10] 資源エネルギー庁 ホームページ
<https://www.enecho.meti.go.jp/about/special/johoteikyo/netsu.html>
- [11] TSC Foresight 熱エネルギー分野の技術戦略策定に向けて. 2020年11月. 新エネルギー・産業技術総合開発機構
- [12] ICEF INDUSTRIAL HEAT DECARBONIZATION ROADMAP. 2019. ICEF
- [13] TSC Foresight 次世代バイオ燃料 (バイオジェット燃料) 分野の技術戦略策定に向けて. 2020年. 新エネルギー・産業技術総合開発機構
- [14] CO₂ Emissions From Fuel Combustion. IEA. 2017
- [15] 「脱ガソリン」政府号令. 2020年12月. 毎日新聞
<https://mainichi.jp/articles/20201204/ddm/003/010/089000c>
- [16] EVの本格普及は2025年から、2030年には販売シェア7%に…。Automotive media Response
<https://response.jp/article/2017/10/11/300895.html>
- [17] 国際海運分野における GHG 削減対策～最近の国際動向と日本の方針～
<https://www.mlit.go.jp/common/001302145.pdf>
- [18] Maritime forecast to 2050. 2019. DNV GL
- [19] 炭素市場エクспレス. 国際航空セクターにおける取り組み.

<http://carbon-markets.env.go.jp/mkt-mech/climate/icao.html>

[20] Hepperle, M. Electric Flight – Potential and Limitations. 2012.

[21] Yang *et al.* "Carbon capture and biomass in industry: A techno-economic analysis and comparison of negative emission options." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 144 (2021): 111028.

[22] TSC Foresight バイオマスからの化学品製造分野の技術戦略策定に向けて. 2017年. 新エネルギー・産業技術総合開発機構

[23] TSC Foresight 次世代バイオ燃料 (バイオジェット燃料)分野の技術戦略策定に向けて. 2020年. 新エネルギー・産業技術総合開発機構

第3章 微細藻類を用いたオイル生産の可能性と課題

第2章にて、本論文ではバイオマス資源から液体オイルを生産し、熱生産用途向け燃料・航空燃料・バイオナフサとしての利用普及を目指すこととした。バイオマス資源の中でも筆者は微細藻類に着目した。本章では、微細藻類を用いたオイル生産に関する可能性を示すとともに、商用利用を実現する上での課題を纏めている。

3.1 微細藻類由来オイルにおける利点

微細藻類は光合成によって大気中の二酸化炭素を固定するかつ、トリアシルグリセロール等といったオイルを生産する(図1)。この事から、微細藻類由来のオイルの利用によってカーボンニュートラルな社会の形成が期待できる。

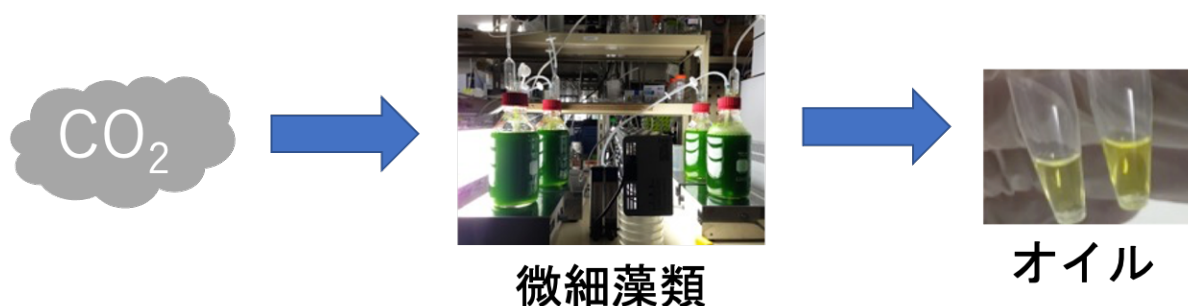


図1. 微細藻類を用いたオイル生産

以下に微細藻類由来のオイルを使用する利点について纏める。

利点①: 食糧と非競合

微細藻類を用いる利点の一つとして、食糧と競合しないといったことが挙げられる。植物バイオマス資源を用いたオイルは原料として、とうもろこし・大豆・菜種などを用いてオイルが生産されている。しかしながら上記の資源は食糧としての利用がされているものであり、燃料・化学原料向けの用途を拡大してしまうと食糧と競合してしまう恐れがある。微細藻類は非可食バイオマスであり食糧と競合しないことから、微細藻類の利活用によって持続的にオイルを生産することが期待できる。

利点②: 土地の有効活用が可能

微細藻類は水・光・肥料があればどこでも培養が可能である。植物を栽培する際は微細藻類と異なり、水・光・肥料といった要素に加え、土壌を必要とする。近年、世界の土壌は侵食、塩類集積、圧密、酸性化、化学物質等の影響により劣化が急速に進んでいる。国際食糧農業期間 (FAO) などが発表した2015年の世界土壌環境報告では、世界の土壌の約33%が劣化している事が報告されている^[1]。この事から、今後世界的なオイルの需要に対し、植物を栽培する土地面積が不足

していく事が予測される。一方で微細藻類は培養に土壌を必要としないため、持続的にオイルを生産可能である。

利点③: 水・光・肥料があればオイルを生産可能

現在、第2章で挙げた廃棄物を用いたオイル生産は技術開発が進んでいる。しかしながらこれら廃棄物由来のオイルのみでは需要量を賄う事はできない。三井住友銀行コーポレートアドバイザー本部の発表によると、上記廃棄物を用いた国内オイル製造可能量は合計で約960万kl/年とされている。SAFの国内需要は2050年時点で約2,300万kl/年にのぼる事が予測されている。この事から、廃棄物を用いたオイルのみでは需要量を賄うことができない(図2)^[2]。

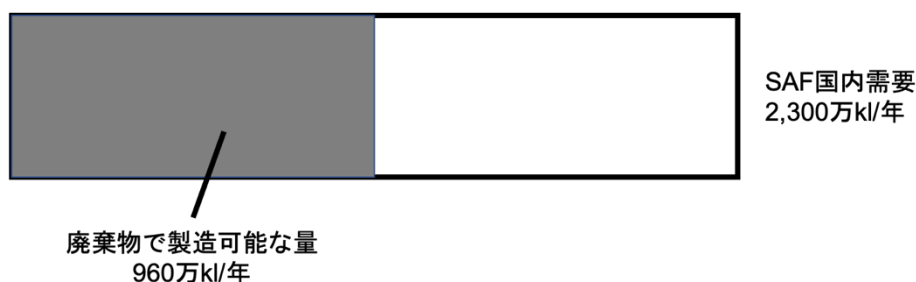


図 2. SAF 需要量

図は三井住友銀行コーポレートアドバイザー本部の発表^[2]を元に筆者が作成

また、廃棄物は人々の生活中で生じるものである。今後、日本国内では人口が減少していく事から排出される廃棄物の量も減少していく事が予測される。よって、廃棄物だけでは賄えない需要量を他の資源を用いて賄う必要がある。微細藻類は廃棄物とは異なり、水・光・肥料があればどこでも培養可能であり、オイルを生産する事ができる。この事から、微細藻類を活用していく事で廃棄物だけでは賄う事ができないオイルの需要量を賄う事が期待できる。以上の理由から、本研究では微細藻類由来のオイルを利用し、バイオ燃料（主に航空燃料・ボイラー等熱生産用途向け燃料）、石油化学品原料（ナフサ）の代替資源として利用普及させていく事を目的とした。

3.2 微細藻類由来オイル生産における課題

3.1 項で挙げたように、微細藻類由来のオイルは様々な利点を有するものの、生産コストが¥1,000/L以上と割高である。この事から、微細藻類由来オイルの利用普及を実現する為にはオイル生産コストの削減が不可欠である。また、オイルといったモノづくりを行う場合、持続的な利用可能性といった部分も念頭に入れておく必要がある。本項では、微細藻類由来オイルの低コスト化し、持続的にオイルを生産・利用していく際の課題の一例について述べる。

課題①: 細胞増殖とオイル蓄積がトレードオフ

微細藻類からオイルを生産する方法として、培地中の窒素源の濃度が重要な要因となる。図 3 に微細藻類を窒素源が存在する培地、窒素源が欠乏する培地で培養した際の結果を示す。窒素源が存在する条件下では Day 7 で培養液が濃緑色になっているのに対し、窒素欠乏条件下では細胞増殖が行われていない薄緑色の状態となっている。細胞内オイル含有率に関して、窒素源が存在する条件下ではほとんどオイルの蓄積が見られないのに対し、窒素源欠乏条件下では細胞内に多量の油滴が蓄積されている事がわかる。この事から、微細藻類は「窒素源存在下では良好な細胞増殖を示すが、オイルを生産する事ができない」、「窒素源欠乏条件下では細胞増殖は著しく抑制されるが細胞内にオイルを多量に蓄積可能である」といった事が言える。即ち、微細藻類における細胞増殖とオイル蓄積はトレードオフの関係にある。

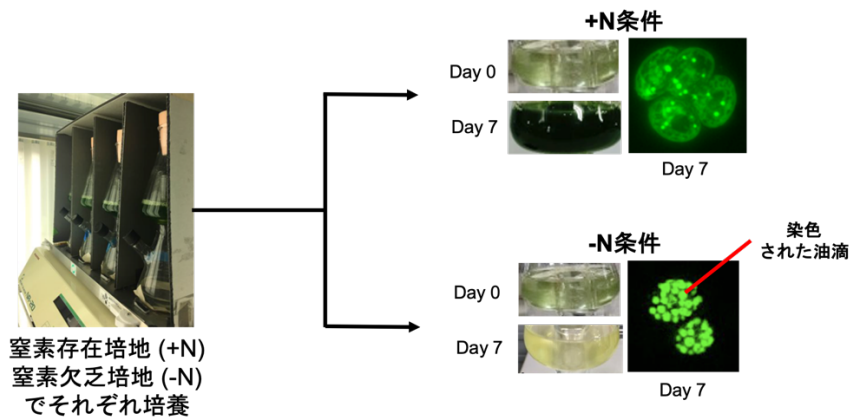


図 3. 窒素源の有無が微細藻類の生育とオイル蓄積に与える影響

上記のような特徴から、微細藻類からオイルを生産する際は、「窒素源存在下で細胞増殖させる工程」と「窒素欠乏下でオイル蓄積をさせる工程」といった 2 段階の工程に分かれている (図 4)^[3]。図 4a は培地中の窒素濃度と細胞増殖の関係、図 4b は細胞内オイル含有率と炭水化物含有率の推移を示している。培地中の窒素が存在している 4 日目までは、微細藻類の細胞増殖が確認されているが、窒素が欠乏した 4 日目以降は生育が抑制される。オイル含有率に関して、培地中の窒素源が存在している条件下ではオイル含有率が僅少であるが、窒素が枯渇する 4 日目以降はオイル含有率が増加している。現状、オイルの回収は細胞内のオイル含有率が一定程度に達した段階 (培養 7 日目以降)で行われている。

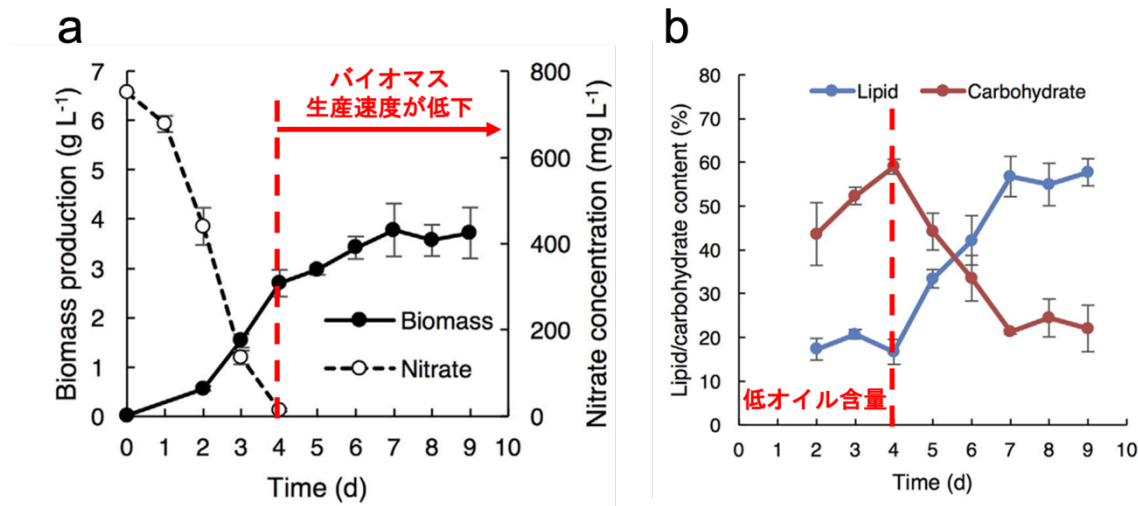


図4. 微細藻類におけるオイル生産方法^[3]

a. 細胞増殖と培地中の窒素濃度の関係, b. 細胞内のオイル・炭水化物含有率

現状上記のような方法でオイルが生産されているが、窒素源存在下でのオイル含有率が向上すれば一段階で簡易的にオイルを生産できるようになる。

課題②. 細胞状態が悪化した条件でのオイル生産

上述の通り、培地中の窒素欠乏は微細藻類のオイル蓄積を誘導するが細胞増殖が著しく抑制される。この問題に加え、窒素欠乏条件では微細藻類の必須栄養素である窒素源が枯渇していることから、細胞状態が悪化する。細胞状態の悪化は屋外環境で培養した際における雑菌汚染（コンタミネーション）リスクを増大させるといった事が知られている。図5は屋外で微細藻類を屋外環境で培養した際に雑菌によって培養槽が汚染されたものである^[4]。この事からも、窒素欠乏条件でのオイル生産は細胞増殖を著しく悪化させるだけでなく、細胞状態の悪化を招くことから、「安定的なオイル生産」を実現する意味でも課題となる。



図5. 外来微生物による雑菌汚染（コンタミネーション）が生じた培養池及び培養池内の顕微鏡写真^[4]

課題③: 淡水資源の利用

オイルを生産する微細藻類として、これまで *Euglena* 藻類, *Chlorella* 藻類, *Botryococcus* 藻類, *Pseudochoricystis* 藻類といった微細藻類が産業利用用途で研究開発が行われている。しかし、これらの微細藻類は淡水域に生息する微細藻類である事から培養には淡水資源を必要とする。人々が使用可能な淡水資源は約 0.001 億 km³ 程度と言われており、地球上に存在する水資源のうちの約 0.8% 程度とされている(海水資源は 13.5 億 km³ 存在)^[5]。この事からも、淡水資源は非常に貴重な資源である事が分かる。また、世界人口の増加予測により、今後水不足といった問題を招く恐れがあるといった事が予測されている。微細藻類は培養に水資源を大量に用いる事からも、水資源の活用について考慮しておく必要があり、使用する水資源としては豊富に存在する海水資源を利用することが望ましい。

3.3 科学技術研究における目的

本研究は、上記に示した「微細藻類における細胞増殖とオイル蓄積のトレードオフ問題」及び「雑菌汚染問題」の解決、「淡水資源を使用しない持続的な藻類培養方法」を確立する為に、「細胞増殖・良好な細胞状態の維持が可能な窒素源存在下でオイル蓄積できるかつ、海水資源を用いて培養可能な微細藻類変異株を用いた新規オイル生産方法を開発する事」を目的とした(図6)。

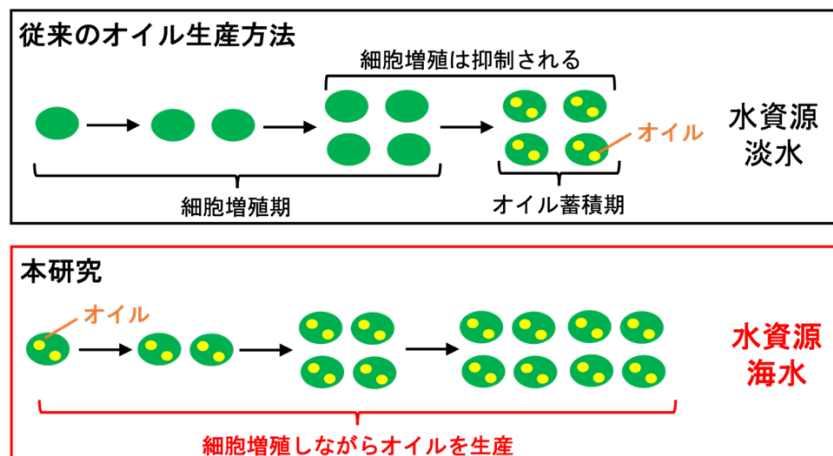


図6. 従来のオイル生産方法と本研究の相違点

上記目的を達成する為に、本研究では①. 窒素源存在下でオイル蓄積可能な変異株の創出及び、②. 変異株を用いた培養方法の検討・オイル増産機構の解明を実施した。①. 変異株の創出に関しては第4章、②. 変異株を用いた培養方法の検討・オイル増産機構の解明については第5章にて詳細を述べる。

引用

- [1] 世界土壌環境報告書. 国際食糧農業機関 (FAO), 2015.
- [2] 持続可能な航空燃料 (SAF)国産化に向けた取組と事業機会. 株式会社三井住友銀行 コーポレートアドバイザー本部. 2022.
- [3] Ho *et al.* "Dynamic metabolic profiling together with transcription analysis reveals salinity-induced starch-to-lipid biosynthesis in alga *Chlamydomonas* sp. JSC4." *Scientific reports* 7.1 (2017): 1-11.
- [4] 平成 24 年度～平成 27 年度成果報告書 バイオマスエネルギー技術研究開発 戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業 (次世代技術開発) 海洋性緑藻による油脂生産技術の開発
- [5] 国土交通省 ホームページ. 水資源
https://www.mlit.go.jp/mizukokudo/mizsei/mizukokudo_mizsei_tk2_000020.html

第4章 科学技術上のブレイクスルー①

窒素源存在下でオイルを高蓄積する微細藻類変異株の開発

本章は原著論文

Oyama T., Kato Y., Satoh K., Oono Y., Matsuda M., Hasunuma T., Kondo A. (2021).

Development of mutant microalgae that accumulate lipids under nitrate-replete conditions. *Algal Research*, 60, 102544.

を元に作成した。

4.1 概要

微細藻類由来のオイルは、石油由来オイルの代替として世界的な注目を集めている。微細藻類は一般に、培地中の窒素源が欠乏した条件下で細胞内にオイルを蓄積する。しかし、窒素欠乏条件下では細胞増殖が大幅に抑制される為オイルの生産性が低下する。また、窒素欠乏条件下では必須栄養素である窒素源が不足する事で細胞状態が悪化し、外来微生物による雑菌汚染リスクが増大する。オイル生産性を向上させ、安定的にオイルを生産させる為には、窒素源存在下で細胞増殖とオイル生産を同時に行う必要がある。よって本研究は、良好な細胞状態の維持、細胞増殖が可能な窒素源存在下でオイルを高蓄積可能な微細藻類変異株を創出する事を目的とした。上述した変異株を創出する為に、本研究では突然変異育種を実施した。海洋性オイル生産藻類 *Chlamydomonas* sp. KOR1 株に対し、炭素イオンビーム($^{12}\text{C}^{5+}$)を照射する事で多様な形質を有する変異細胞集団を作製した。変異細胞集団を窒素源が存在する条件下で培養し、細胞内の油滴を BODIPY で染色後、蛍光活性化セルソーター (FACS) を用いてオイル高蓄積細胞を選抜した。培養と選抜を繰り返し行うことにより、窒素源存在下でオイルを高蓄積可能な変異株”KAC1710”及び”KAC1801”を獲得した。KAC1710, KAC1801 は約 600 mg L^{-1} 以上の窒素源が培地中に存在する条件においても細胞内に多数の油滴を形成した。窒素源存在下・バッチ培養時におけるオイル含有率は KOR1 株と比較して KAC1710 株では 1.5 倍 (オイル含有率: 19.1%), KAC1801 株では 2.1 倍 (オイル含有率: 26.6%) 増加した。また、獲得した変異株のオイル増産機構の解明を目的とし、窒素源存在下・バッチ培養時における代謝プロファイルを解析した。その結果、KAC1710 株と KAC1801 株は KOR1 株と比較してピルビン酸の代謝物プールサイズが顕著に増加する事が明らかになり、窒素源存在下でのオイル蓄積を達成する要因の一つであると考えられた。本研究は、窒素源存在下でオイルを蓄積可能な微細藻類変異株の育種方法、微細藻類変異株を開発するとともに、ピルビン酸プールサイズの増加がオイル増産に関連する代謝現象であることを見出した。

キーワード：オイル, *Chlamydomonas*, 窒素源存在下, ランダム突然変異誘発, 蛍光活性化セルソーター (FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting), メタボローム解析

4.2 序論

微細藻類は、光合成によって大気中の二酸化炭素から産業用途向けのオイルを生成することができる。このことから、微細藻類由来オイルは持続可能な資源として世界的に注目を集めている^{[1][2]}。トウモロコシ、大豆、菜種といった陸上植物も微細藻類同様光合成によってオイルを生産することができる。微細藻類は陸上植物と比較して単位面積あたりより多くのオイルを生産する事ができ、食糧とも競合しないといった利点を有する^{[3][4]}。微細藻類の中でもクロレラ属、ナンノクロロプシス属、セネデスムス属、クラミドモナス属等の微細藻類は乾燥重量あたり約50%以上のオイルを蓄積する事ができる為、オイル生産者として有望視されている^{[5][6][7][8][9][10][11]}。

微細藻類は培養条件によって細胞構成成分を変化させる事が知られている。微細藻類におけるオイルの蓄積は、光^{[12][13]}、培地中の塩濃度^{[14][15]}、培地中の栄養源濃度^{[16][17]}などの環境要因によって調節されている。その中でも培地中の窒素源枯渇は、微細藻類細胞のオイル蓄積を促進するための一般的かつ重要な要因である。微細藻類は培地中の窒素源存在下では窒素含有化合物であるタンパク質等を主に蓄積する。この際、オイルの蓄積量は僅少である。また、窒素源存在下では窒素を消費しながら細胞増殖を行う。増殖とともに窒素を消費し、培地中の窒素が枯渇すると窒素栄養飢餓に応答してオイルを蓄積し始める^{[14][18]}。この際、微細藻類の細胞増殖は著しく抑制される。このことから、微細藻類における細胞増殖とオイル蓄積はトレードオフの関係にある^[19]。その為、現状微細藻類からオイルを生産する為には、①. 窒素源存在下で細胞増殖させる工程、②. 窒素欠乏条件下でオイルを蓄積させる工程の2段階の工程が必要である^[19]。また、窒素源は微細藻類にとって必須栄養素である事から培地中の窒素源が枯渇すると細胞状態が悪化する。微細藻類からオイルを安定的に高生産する為には培地中の窒素源が存在する条件で細胞増殖しながらオイルを蓄積可能な藻類変異株が必要となる。

窒素源存在下でオイルを高蓄積する株を創出する為に、本研究では突然変異育種に着目した。変異育種はエチルメチルスルホン・UV、常温常圧プラズマ等といったDNAに化学的・物理的に変異を導入可能な変異原を用い、変異株を取得する育種方法を指す^{[20][21][22][23][24]}。微細藻類の育種には突然変異育種の他遺伝子組換えやゲノム編集といった方法も挙げられるが、これらの方法で育種を行う場合は微細藻類株の形質転換方法の開発や標的遺伝子が必要となる。微細藻類においては形質転換方法が可能な株に限られているほか、増殖とオイル蓄積を両立させるよう標的遺伝子について知見が集積されていない。また、遺伝子組換えによってオイル高生産株が得られた場合でもカルタヘナ法への抵触から変異株を屋外環境で培養する事ができない。突然変異育種は形質転換方法が未確立の微細藻類にも適用可能であるかつ、標的遺伝子が定まっていない場合においても育種を行う事ができる。また、突然変異育種は微細藻類に突然変異を導入し変異株を取得する方法である事から育種を行うにあたって外来遺伝子を細胞内に導入していない。よって、カルタヘナ法に抵触しない事から獲得した変異株は屋外環境でも培養可能である。

突然変異育種を行う際の変異源として、重イオンビームはゲノムに劇的な変化を引き起こす有用

な変異源として知られており、ナンノクロロプシス^[25]、ユーグレナ^[26]、クラミドモナス^[27]などの微細藻類に用いられてきた。蛍光活性化セルソーター（FACS）は、変異細胞集団からオイルを高蓄積する細胞をスクリーニングするために用いられている。この際、生細胞内の油滴を染色する蛍光色素として、ボロンジピロメテン（BODIPY）とナイルレッドが用いられており、これらの蛍光色素の蛍光強度を FACS で分析、蛍光強度が高いオイル高蓄積細胞の選抜が行われてきた^{[26][28][29][30]}。しかし、これらの方法は窒素欠乏等、オイル蓄積に適した条件でのみ適用されてきた。本研究では、これまで用いられてきた方法を窒素源存在下といった従来オイルを蓄積しない条件においてもオイル蓄積可能な変異株の創出に応用し、変異株を取得した。得られた変異株に関しては、細胞内の代謝物を抽出・分析することで代謝プロファイルを可視化し、オイル増産に寄与した代謝反応の推定を行った。

4.3 対象と手法

4.3.1 対象株

対象株は海洋性オイル生産微細藻類 *Chlamydomonas* sp. KOR1 株^[30]を用いた。KOR1 株は *Chlamydomonas* sp. JSC4 株^[31]由来の変異株であり、デンプン枝切り酵素をコードする *ISA1* 遺伝子に欠損変異が導入された株である。窒素源欠乏下でのオイル含有率は約 40%程度である^[30]。株の保存は MIR-153 インキュベーター（SANYO, 日本）内で 25 °C、50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色蛍光灯による連続照明下で 1.5 %の寒天を含む BG-11^[32]（付録: 表 1, 表 2）培地上にて維持された。

4.3.2 藻体への変異導入（付録: 図 1）

藻株の培養には 2 段式フラスコ（付録図 2）を用いた。2 段式フラスコの上段には TAP 培地^[33]（付録: 表 3, 表 4）を 70 mL および細胞を投入した。下段に CO₂ 濃度を 2 %に調整した溶液^[34]（付録: 表 5）を 50 mL 投入する事でフラスコ内の気相を調整した。培養は BR-40LF インキュベーター（TAITEC, 日本）を用い、30 °C、100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、100 rpm の条件で振とう培養を行なった。前培養を 3 日間、本培養を 2 日間行い、本培養後再度 OD₇₅₀ を測定した。OD₇₅₀ の測定結果から培養液の OD₇₅₀ が 0.5 になるように TAP 液体培地で希釈し、希釈液を TAP 寒天培地の中央に 100 μL 添加し、液体を十分に乾燥させた。TAP 寒天培地に継代後、25 °C、50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色蛍光灯による連続照明下で 2 日間静置培養を行なった。培養後、滅菌したカプトン膜をプレートに取り付けパラフィルムで固定した。その後 50 Gy の炭素イオンビーム (¹²C⁵⁺, 220 MeV) を AVF サイトクロンにて加速させ藻体に照射した。炭素イオンビーム照射は高崎量子応用研究所のイオンビーム照射研究施設（TIARA: Takasaki Ion Accelerators for Advanced Research）にて行われた。

4.3.3 オイル高蓄積細胞の選抜（付録: 図 1）

前項で作製した変異細胞集団を BR-40LF インキュベーター（TAITEC, 日本）を用いて、100

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色蛍光灯による連続照明下で 3 日間培養した。培養には Modified Bold (MB) 12N 培地 (付録: 表 6) ^[35] に 2 % 海水塩 (Sigma-Aldrich, 米国) を添加した MB12N+2 % Sea salt 培地を用いた。培養後、血球計算版を用いて細胞密度を算出した。細胞密度が 5.0×10^6 cells/mL になるように細胞を遠心分離 ($8,000 \times g$, 1 min, 25 °C) によって回収、上清を除去し 1 mL のリン酸緩衝食塩水 (PBS) に懸濁した。懸濁液に蛍光標識試薬である BODIPY 505/515 (4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene; Thermo Fisher Scientific, 米国) を 50 μM になるように添加し、暗黒条件下、室温 (25 °C) で 5 分間インキュベートすることで細胞内の油滴を染色した。インキュベート後、蛍光活性セルソーター (Fluorescence Activated Cell Sorting: FACS) SH-800 (SONY, 日本) を用いて BODIPY の蛍光強度が高い上位 ~ 0.5 % の細胞を分取した。この際、オイル高蓄積細胞を濃縮する為に、上記の培養~オイル高蓄積細胞の分取を複数回繰り返して行った (付録: 表 7, 付録: 表 8)。

FACS によるオイル高蓄積細胞の分取後、培養液を TAP 寒天培地に接種し、コロニーが形成されるまで 1 週間培養した。形成されたコロニーを単離し、12 穴プレート (培養スケール: 2.5 mL) を用いて 30 °C, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 100 rpm, 2 % CO_2 の培養条件で前培養・本培養をそれぞれ 3 日間行なった。培地は MB12N + 2 % Sea salt 培地を用いて培養した。本培養 3 日目の細胞をサンプリングし、凍結乾燥を行なった。凍結乾燥を行ったサンプルからオイルを抽出し、細胞内のオイル含有率を算出した。

4.3.4 オイル抽出

乾燥細胞に含まれるオイルの抽出には脂肪酸メチル化キット (ナカライテスク, 日本) を用いて行なった^[30]。破碎用マイクロチューブに乾燥藻体 2 - 3 mg を秤量し、0.5 μm 径ガラスビーズ YB05 (安井器機, 日本) を 300 μL 投入した。その後メチル化試薬 A, メチル化試薬 B をそれぞれ 250 μL ずつ、内部標準として 20 mg/mL の濃度のマルガリン酸を 10 μL 投入した。試薬を混合したサンプルはマルチビーズショッカー MB1001C(S) (安井器機, 日本) を用いて、ON 条件 (4 °C, 2,700 rpm, 1 分間) + OFF 条件 (4 °C, 0 rpm, 1 分間) を 30 回繰り返して行い細胞を破碎した。細胞破碎したサンプルは恒温振盪培養機 M・BR-022UP (タイテック, 日本) を用いて 37 °C, 1,500 rpm で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、メチル化試薬 C を 250 μL 投入し、再度恒温振盪培養機で 20 分間インキュベートした。サンプルに抽出液を 500 μL 投入し、ボルテックスを 10 秒間行なった。その後上清 400 μL を 1.5 mL チューブに回収した。上清 400 μL に対し、超純水を 1 mL 投入しボルテックスを行なった。ボルテックス後上層を新しい 1.5 mL チューブに回収し、分析を行うまで -30 °C の冷凍庫で保存した。分析の際はサンプル 120 μL と 480 μL のヘキサンをバイアル瓶にて混合し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (Gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS) での分析に供した。GC-MS での分析に関する詳細は次項で述べる。

4.3.5 オイル分析

微細藻類から抽出したオイルの定量は GC-MS を用いて行った。使用したカラム、測定条件を付録: 表 9～付録: 表 11 に示す。カラム滞在時間 11.1~11.4 min までのピークから内標であるマルガリン酸の Area 値を求めた。カラム滞在時間の 12.5~12.7 min までのピークからオレイン酸, 13.0~13.2 min までのピークからリノール酸, 13.7~13.9 min までのピークからリノレン酸の Area 値を求め, その濃度を算出した^[30]。濃度の算出には各脂肪酸とマルガリン酸のピークの Area 値の比の検量線を作成し, 比較した。ピークの同定はパルミチン酸, オレイン酸, リノール酸, リノレン酸の標品を用いて滞在時間の一致を確認した。

4.3.6 電子顕微鏡解析

KOR1 株と KAC1710, KAC1801 株を MB12N + 2 % Sea salt 培地を用いて前培養を 3 日間, 本培養を 4 日間行なった。本培養 4 日目の培養液から 5 mL サンプリングを行い, カコジル酸緩衝液中にパラホルムアルデヒド, グルタルアルデヒドを含む固定液を用いて攪拌した。攪拌後, 4 °C の冷蔵庫にて 1 時間静置した。その後遠心分離を行い, 上清を除去した。再度固定液を 5 mL 投入し, ボルテックスでサンプルを攪拌することで細胞を化学固定した。固定されたサンプルの電子顕微鏡解析は株式会社東海電子顕微鏡解析にて行った。

4.3.7 バッチ培養によるオイル生産性の評価

4.3.7.1 対象株と培養条件

対象株は *Chlamydomonas* sp. KOR1, KAC1710, KAC1801 を用いた。オイル生産性評価は窒素源存在下・窒素源欠乏下を想定した条件で実施し, 培地はそれぞれ MB12N + 2 % Sea salt 培地, MB6N + 2 % Sea salt 培地 (MB12N 培地の半分の窒素量を含む培地)を用いて実施した。培養環境は昼白色蛍光灯 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の継続光, 30 °C, 2 % CO₂ 濃度, 100 rpm で振とう培養を行った。培養装置は BioTRON NC350 (日本医化器機製作所, 日本)を用い前々培養を 3 日間, 前培養を 3 日間行なった後に本培養を 10 日間行った。

4.3.7.2 窒素源濃度の測定

培養液中の窒素源 (硝酸態窒素) の測定は, 分光光度計 UVmini-1240 (島津製作所, 日本) を用いて波長 220 nm における吸光度を測定する紫外線吸光光度法 (UV 法) によって実施した^[36]。培養液を 25 °C, 8,000 rpm, 1 min で遠心分離し, 細胞と培養液上清を分離した。培養液上清を超純水で 20 倍希釈し, 吸光度測定に呈した。この際, 窒素濃度を調整した溶液を用い, 検量線を作成し, 培地中の窒素濃度を算出した。

4.3.7.3 オイル含有率・生産性の評価

オイル含有率の測定は、項目 4.3.4 および項目 4.3.5 と同様の手法で行った。細胞内に含まれるオイル含有率はサンプルの乾燥菌体重量のうち、定量した脂肪酸重量の割合とし、オイルの生産性は以下の計算式により算出した。

$$\text{オイル生産性(mg/L/Day)} = \frac{\text{菌体重量(mg/L)} \times \text{オイル含有率(\%)}}{\text{培養日数}}$$

4.3.8 代謝物プールサイズの分析

乾燥重量 5 - 10 mg の細胞を 10 μm 孔フィルター (Merck Millipore, 米国) にて回収し、20 mM の炭酸アンモニウムで洗浄した。細胞を回収したフィルターを、内部標準として 36 μM のピペラジン-1,4-ビス (2-エタンスルホン酸) (同仁化学研究所, 日本) を含む 1 mL の予冷したメタノールに直ちに懸濁し、-30 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。細胞懸濁液 (500 μL) を 0.5 mm ガラスビーズ (安井器械) を含むチューブに移し、マルチビーズショッカー MB1001C (S) (安井器械, 日本) を使用して 4 $^{\circ}\text{C}$, 2,700 rpm (1 min, ON; 1 min, OFF; 30 サイクル) で細胞を破碎した。細胞破碎後、150 μL のクロロホルムと 50 μL の超純水を加え溶液を 10 秒間ボルテックスで混合し、遠心分離 (14,000 $\times g$, 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) した。上清 (400 μL) を超純水 (200 μL) と混合し、ボルテックスを 10 秒間行った後、遠心分離 (14,000 $\times g$, 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) した^{[30][37]}。上相は、Amicon Ultra-0.5 遠心フィルターユニット UFC5003BK (Merck Millipore, 米国) を使用して、遠心分離 (14,000 $\times g$, 50 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) でろ過した。濾過された画分 (300 μL) を 1.5 mL チューブに移し、減圧下で一晩乾燥させた。乾燥後、サンプルを 20 μL の超純水に懸濁し、代謝物を G7100CE および G6224AALC /MSD 飛行時間型システム (Agilent Technologies, 米国) を使用したキャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析 (Capillary Electrophoresis Time-of-flight mass spectrometry: CE-TOFMS) で分析した^{[30][37]}。

4.3.9 統計解析方法

バッチ培養およびメタボローム解析データは、3 回の反復実験から得られ平均値 \pm 標準偏差として示した。統計的有意性 ($p < 0.05$) は、統計解析ソフト R version 3.3.3 を使用して、テューキーの検定を行った。

4.4 結果と議論

4.4.1 窒素源存在下でオイル蓄積可能な藻類変異株の創出

細胞増殖とオイル生産を同時に実現する為には、培地中の窒素源が存在する条件においてもオイルを蓄積可能な微細藻類株が必要である。このような株を獲得する為には、ランダムに突然変異を導入した変異細胞集団を窒素源存在下で培養し、そこからオイルを高蓄積している細胞を選抜する事によって獲得できるという仮説の下実験を行った。*Chlamydomonas* sp. KOR1 株に対し、炭素イオン ($^{12}\text{C}^{5+}$)ビームを照射し、変異細胞集団を作製した。変異細胞集団を MB12N + 2% (w/v) Sea salt 培地を用いて窒素源存在下、3日間培養した。MB12N 培地は窒素源が豊富に含まれている事から、本培地を用いて培養を行う事で窒素源存在下を維持する事ができる(付録: 図 3)。変異細胞集団を3日目培養した際、培地中の硝酸濃度は約 800 mg L^{-1} であり、培地中の窒素源が十分存在していた。その後 BODIPY505 / 515 を用いて細胞内に蓄積されたオイルを染色、FACS でオイル高蓄積細胞を選抜した。最初の選抜実験では、ほとんどの細胞のクロロフィル蛍光および BODIPY 蛍光強度はそれぞれ約 $1.0 \times 10^5 - 1.0 \times 10^6$ (a.u.) および約 $1.0 \times 10^4 - 2.0 \times 10^5$ a.u. だった (図 1)。これらの細胞から、 $1.0 \times 10^5 - 1.0 \times 10^6$ a.u. の BODIPY 蛍光を示す 1,000 細胞を分取した (付録: 表 7)。分取した細胞は再度窒素源存在下で培養・分取を合計 5 回繰り返した。5 回目の選別実験では、元の細胞よりも高い BODIPY 蛍光を示す細胞集団が得られ (図 1)、窒素源の存在下でオイルを蓄積する変異細胞の開発に成功したことが示唆された。

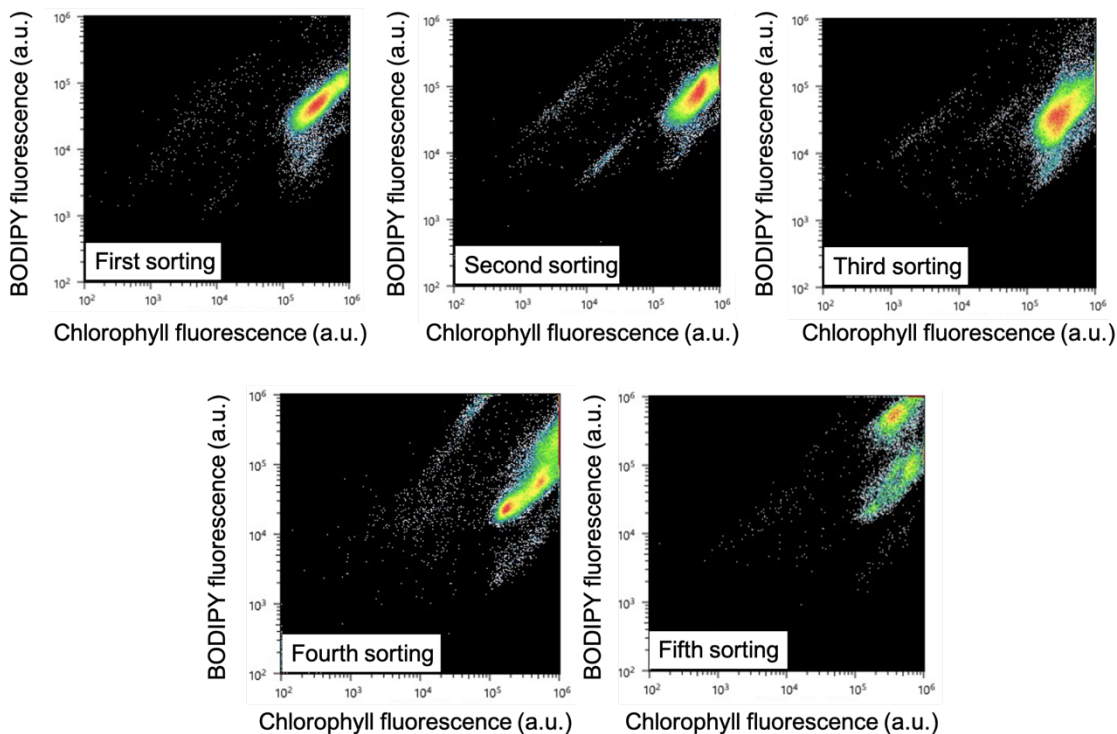


図 1. *Chlamydomonas* sp. KOR1 由来の変異細胞集団を用いた FACS 分析結果
縦軸: BODIPY の蛍光強度 (a.u.), 横軸: Chlorophyll の蛍光強度 (a.u.)

次に、細胞を TAP 寒天培地に継代することにより変異株を単離した。コロニーをランダムに選択し、窒素源を豊富に含む条件下で 12 ウェルプレートを用いて 3 日間培養した (付録: 図 4)。培養 3 日目の細胞を回収し、GC-MS を使用して変異株の細胞内オイル含有率を測定した結果、KAC1710 が最も高いオイル含有率 (18.3%) を示しており、この値は親株の KOR1 株 (7.2%) と比較して約 2.5 倍高かった (図 2)。

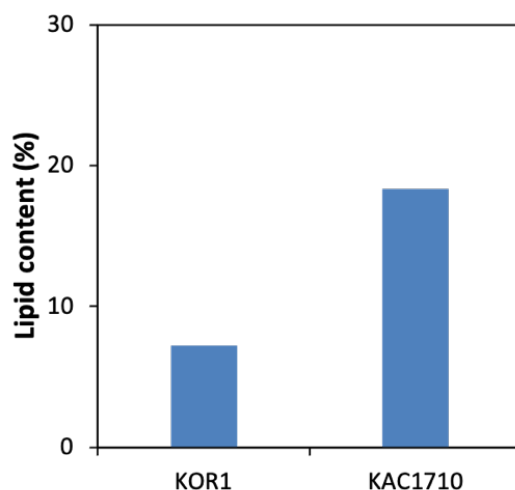


図 2. KOR1 株と KAC1710 株における細胞内オイル含有率 (N=1)

KOR1, KAC1710 は MB12N + 2 % Sea salt 培地を用い、白色発光ダイオードを $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光量子束密度で連続照射, 2 % CO_2 , 30 °C, 100 rpm 条件下で回転振とうしながら培養を行った。サンプリングした細胞を凍結乾燥し、GC-MS によるオイル分析に供した。

4.4.2 窒素源存在下でオイルを高蓄積する藻類変異株の創出

窒素源が豊富な条件下でのオイル含有率をさらに増加させるために、KAC1710 を親株として再度同様の育種を行った。KAC1710 に炭素イオンビームを照射，窒素源存在下で培養，オイル高蓄積細胞の選抜を行った。1 回目の選抜では，ほとんどの細胞のクロロフィル蛍光および BODIPY 蛍光強度は約 $1.0 \times 10^5 - 1.0 \times 10^6$ a.u., $1.0 \times 10^5 - 1.0 \times 10^6$ a.u.であった (図 3)。変異細胞集団から，約 3.0×10^6 a.u 以上の BODIPY 蛍光を示す 1,000 個細胞を分取した。分取された細胞は，窒素源が豊富な条件下で培養し，高 BODIPY 蛍光細胞の濃縮を計 4 回実施した。4 回目の分取実験では，ほとんどの細胞が 1.0×10^6 a.u を超える BODIPY 蛍光を示した (図 3)。これは，窒素源が豊富な条件下でオイル蓄積量が更に向上した事を示唆している。

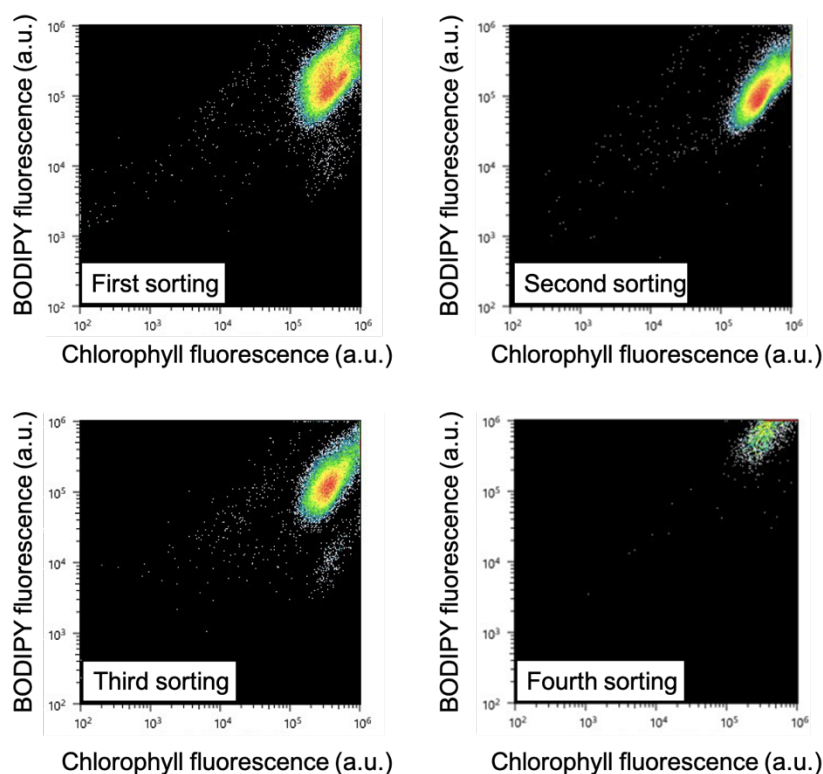


図 3. *Chlamydomonas* sp. KAC1710 由来の変異細胞集団を用いた FACS 分析結果

縦軸: BODIPY の蛍光強度 (a.u.)，横軸: Chlorophyll の蛍光強度 (a.u.)

4 回目の選別実験で得られた細胞を TAP 寒天プレートに広げて変異株を単離，コロニーをランダムに選択して窒素源を豊富に含む条件下で培養，オイル含有率を GC-MS で分析した。その結果，変異体の中で，KAC1801 は親株 KAC1710 の 15.2%と比較して最も高いオイル含有率(23.1 %)を示した (図 4)。

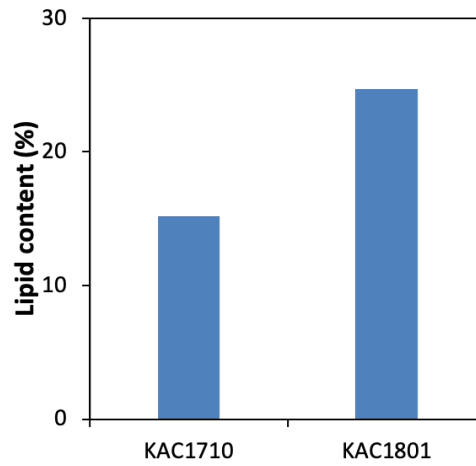


図 4. KAC1710 株と KAC1801 株の細胞内オイル含有率比較 (N=1)

KAC1710, KAC1801 は MB12N + 2 % sea salt 培地を用い, 白色発光ダイオードを $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光量子束密度で連続照射, 2 % CO_2 , 30 °C, 100 rpm 条件下で回転振とうしながら培養を行った. サンプルングした細胞を凍結乾燥し, GC-MS によるオイル分析に供した.

4.4.3 窒素源存在下における変異株の細胞形態観察

獲得した変異株の細胞形態を明らかにするために、KOR1 株、KAC1710 株及び KAC1801 株を MB12N + 2 % Sea salt 培地を用いて 4 日間培養し、電子顕微鏡解析を行った。その結果、KAC1710 および KAC1801 は窒素源の存在下でも油滴を蓄積し、KAC1801 は KAC1710 よりも多くの油滴を蓄積した(図 5)。KAC1710 および KAC1801 細胞は KOR1 細胞よりもサイズが大きく、KAC1801 における油滴形成の増加に起因する可能性がある。これらの結果は、窒素源が豊富な条件下での油滴の形成がランダム突然変異誘発および窒素源存在下でのスクリーニングによって達成されたことを示唆している。

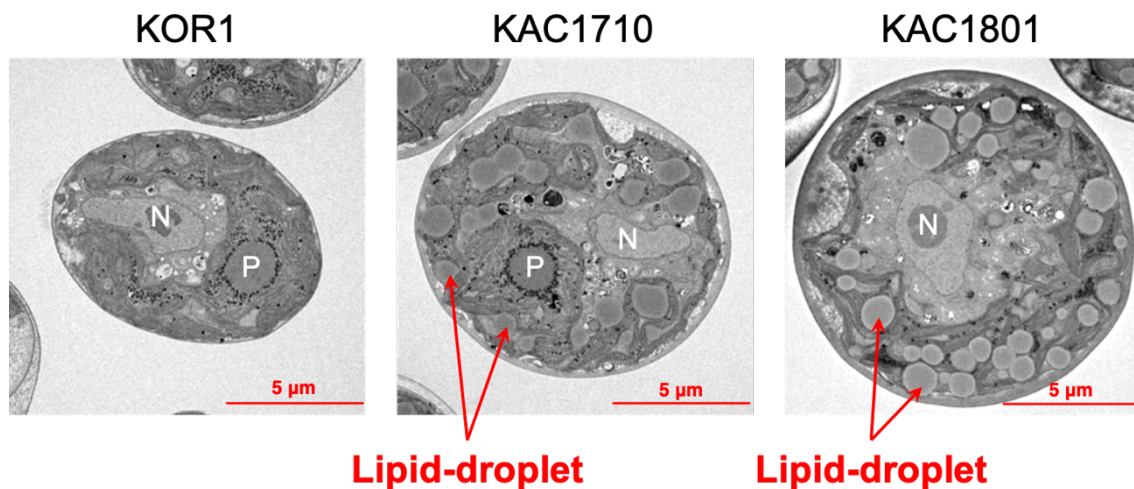


図 5. KOR1 株、KAC1710 株、KAC1801 株における窒素源存在下での電子顕微鏡解析結果
電子顕微鏡解析は微細藻類細胞を 2 % (w/v) の海水塩を含む MB 12N 培地を使用して窒素源存在下で 4 日間培養したものを用いた。電子顕微鏡解析時の培地中の窒素濃度は KOR1 株で約 400 mg L⁻¹、KAC1710 株で 600 mg L⁻¹、KAC1801 株で 800 mg L⁻¹であった。

写真中の N は核、P はピレノイドを各々示している。

4.4.4 窒素源存在下，バッチ培養条件下でのオイル生産評価

窒素源存在下でのオイル生産性を評価するために，KOR1，KAC1710，およびKAC1801をMB 12N + 2 % Sea salt 培地で培養し，細胞増殖，培地中の窒素消費および細胞内オイル含有率を分析した（図 6）．培養 5 日目における KOR1，KAC1710 及び KAC1801 のバイオマス密度はそれぞれ 3.6 g L^{-1} ， 3.2 g L^{-1} ，および 3.1 g L^{-1} であった（図 6a）．KAC1710 と KAC1801 では KOR1 と比較して窒素の消費量が減少した．KAC1710 と KAC1801 は，MB 12N 培地中の窒素をそれぞれ 79.8 % と 62.9 % 消費したが，KOR1 は 6 日間にわたって培地中の窒素源を全て消費した（図 6b）．培養 5 日目の KAC1710 と KAC1801 のオイル含有率はそれぞれ約 19.1 % と 26.6 % であり，それぞれ KOR1 のオイル含有率（12.5 %）の 1.5 倍，2.1 倍であった（図 6c）．

KAC1710 および KAC1801 での窒素同化の抑制は，窒素源が豊富な条件下で油滴を蓄積可能な要因であると仮定された．微細藻類におけるオイルの蓄積は，窒素同化と密接に関連している．本研究で用いた *Chlamydomonas* sp. 株と同属の藻類 *Chlamydomonas reinhardtii* では，栄養素感知に重要な役割を果たす Target of Rapamycin (TOR) が不活性化することで，窒素欠乏状態を模倣し，オイルの蓄積を誘導する^[38]．*Nannochloropsis gaditana* では，転写因子 $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ が増殖とオイル蓄積を両立させる遺伝子として報告されている^[39]． $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ の発現抑制変異体は，NRT2 遺伝子といった硝酸トランスポーター，Nir といった硝酸レダクターゼ，GS1，GS2 といったグルタミンシンターゼ，AMT1 といったアンモニウムトランスポーターなどの窒素同化遺伝子の発現量を低下させる事で，タンパク質の生合成を抑制し，オイル合成を強化している可能性を示唆している^[39]．

KAC1710，KAC1801 ではバイオマス生産量は減少したが，窒素源存在下でのオイル生産性は KAC1710 と KAC1801 で増加した．培養 5 日目の KAC1710 および KAC1801 のオイル生産性は，KOR1 (91.6 mg L^{-1}) のオイル生産性よりもそれぞれ 1.3 倍 (121.1 mg L^{-1})，1.8 倍 (162.1 mg L^{-1}) 高かった．

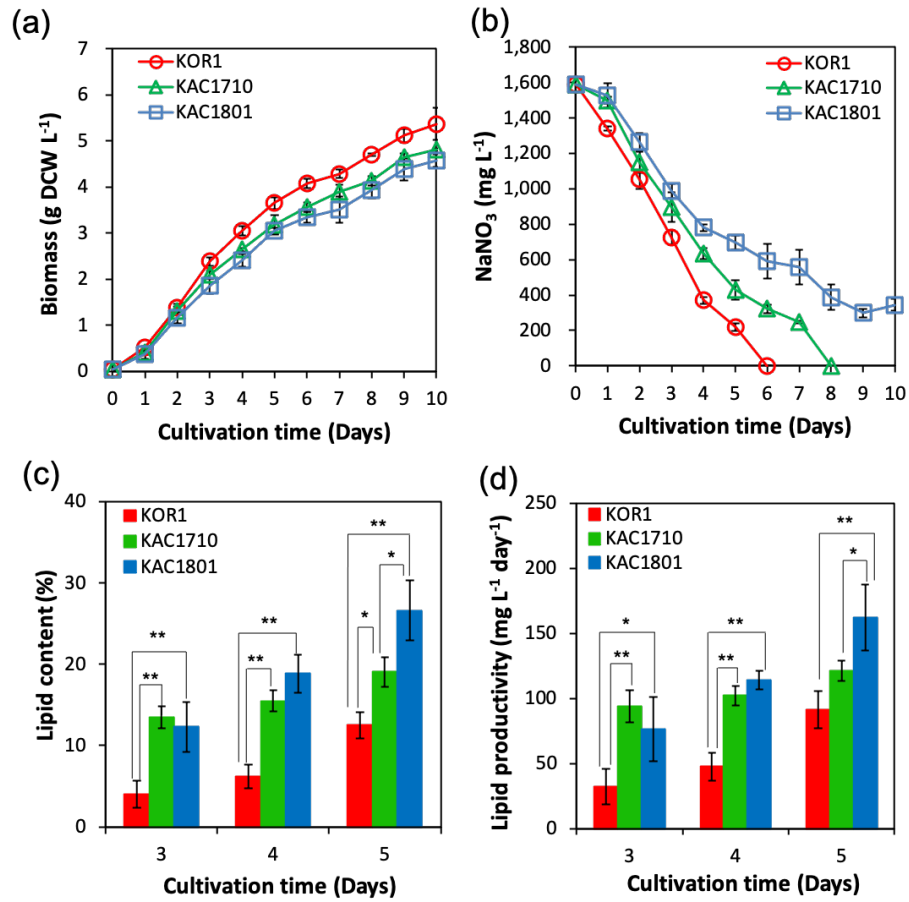


図6. 窒素源存在下での KOR1, KAC1710 および KAC1801 のオイル生産性評価
 (a) バイオマス密度 (g L⁻¹) (b) 培地中の窒素源濃度 (mg L⁻¹) (c) オイル含有率 (%) (d)
 オイル生産性 (mg L⁻¹ day⁻¹)

実験は3回の反復実験を行い、それぞれの標準偏差をエラーバーで示した。

(* : $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4.4.5 窒素源欠乏下、バッチ培養条件下でのオイル生産評価

窒素欠乏条件下での KAC1710 および KAC1801 のオイル生産性を評価する為に、MB 12N 培地に存在する窒素源の半分の量を含む MB 6N + 2 % Sea salt 培地を使用して培養試験を実施した (図 7). 10 日間培養後の KOR1, KAC1710, KAC1801 のバイオマス密度は乾燥重量あたりそれぞれ 5.7 g L^{-1} , 5.1 g L^{-1} と 4.4 g L^{-1} であった (図 7a). 培地中に存在する窒素源は KOR1 では 3 日以内に消費されたが, KAC1710 と KAC1801 では 4 日程度必要であった (図 7b). 10 日目の KOR1, KAC1710, および KAC1801 のオイル含有率はそれぞれ 43.5 %, 50.7 %, および 37.1 % であった (図 7c). 窒素欠乏条件下では, オイル蓄積の向上は KAC1710 でのみ確認された. KOR1 と KAC1710 のオイル生産性はそれぞれ $249.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ と $259.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であったが, KAC1801 の生産性は $163.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった (図 7d). この事から, 変異株においてオイル合成経路自体は一般的に改善されず, 窒素源に対する応答が変異株で変化した事が示唆された.

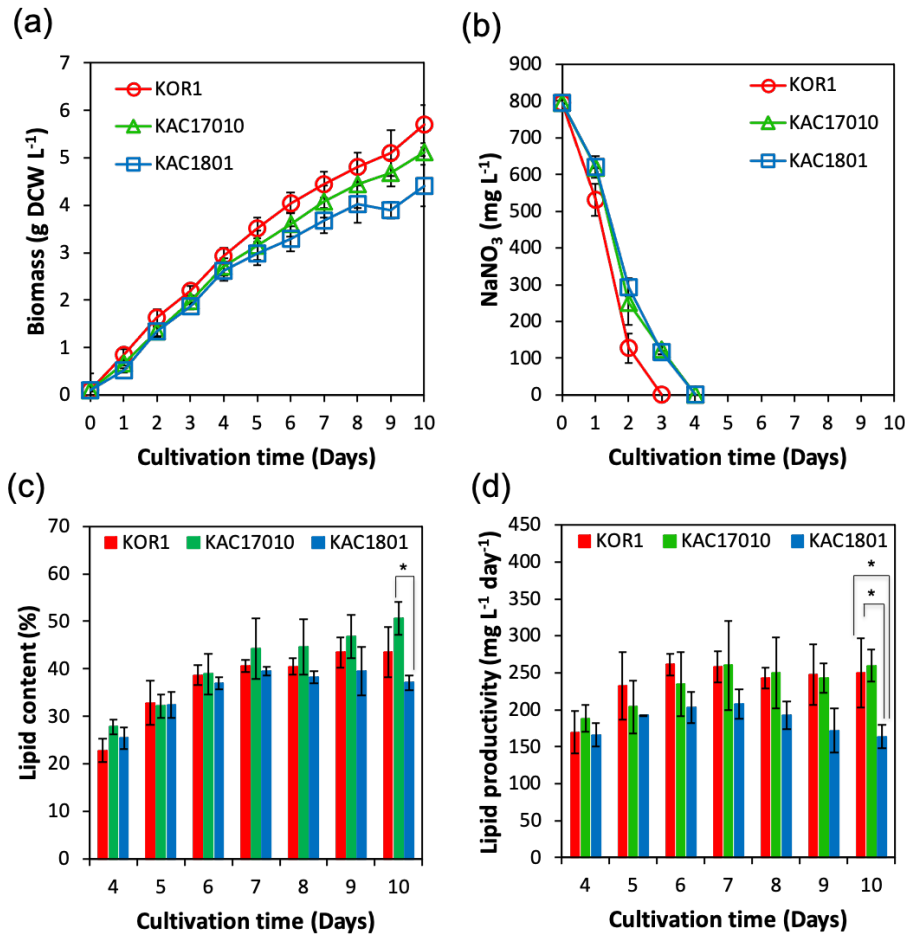


図 7. 窒素源欠乏下での KOR1, KAC1710 および KAC1801 のオイル生産性評価

(a) バイオマス密度 (g L^{-1}) (b) 培地中の窒素源濃度 (mg L^{-1}) (c) オイル含有率 (%) (d) オイル生産性 ($\text{mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$)

実験は 3 回の反復実験を行い, それぞれの標準偏差をエラーバーで示した.

(* : $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4.4.6 先行研究と本研究で得られた変異株におけるオイル生産性比較

窒素源存在下での KAC1801 のオイル生産性は、先行研究で報告された *Nannochloropsis* sp. ($55 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) [40], *Scenedesmus obliquus* ($78 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) [41], *Isochrysis zhangjiangensis* ($141 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) [42], および *Nannochloropsis oculata* ($142 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) [43] よりも高く, *Dunaliella salina* ($240 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) [46] および *Chlamydomonas* sp. ($306 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) [11] の生産性よりは低かった。これらの結果から、KAC1801 株は窒素欠乏条件下でオイルを蓄積可能な一部の微細藻類と比較しても高いオイル生産を実現できる株である事を示唆している (表 1)。

表 1. 先行研究で報告された微細藻類におけるオイル生産性と
本研究で獲得した変異株(KAC1710, KAC1801)のオイル生産性比較

株名	窒素源	オイル 含有率(%)	オイル生産性 ($\text{mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$)	引用
<i>Nannochloropsis</i> sp. F&M-M24	欠乏	31	55	[40]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	欠乏	39	78	[41]
<i>Isochrysis zhangjiangensis</i>	欠乏	41	141	[42]
<i>Nannochloropsis oculata</i> NCTU-3	欠乏	30	142	[43]
<i>Dunaliella salina</i>	欠乏	44	240	[44]
<i>Chlamydomonas</i> sp. JSC4	欠乏	57	306	[11]
<i>Chlamydomonas</i> sp. KOR1	欠乏	44	250	本研究
<i>Chlamydomonas</i> sp. KAC1710	欠乏	51	260	本研究
<i>Chlamydomonas</i> sp. KAC1801	欠乏	37	164	本研究
<i>Chlamydomonas</i> sp. KOR1	存在	12	92	本研究
<i>Chlamydomonas</i> sp. KAC1710	存在	19	121	本研究
<i>Chlamydomonas</i> sp. KAC1801	存在	26	162	本研究

4.4.7 窒素源存在下、バッチ培養条件下での代謝解析

窒素源が豊富な条件下でのオイル合成の増強に関連する代謝反応を調査するために、オイル合成に関連する細胞内代謝物蓄積量を CE-TOFMS を使用して分析した (図 8). KAC1801 は, KOR1 および KAC1710 よりも 3-ホスホグリセリン酸 (3-PGA) およびホスホエノールピルビン酸 (PEP) のプールサイズが小さくなる傾向が見られた. ピルビン酸 (Pyruvic acid) のプールサイズは, KAC1710 と KAC1801 で大幅に増加した. ピルビン酸のプールサイズは 3 日目に KOR1 よりもそれぞれ 2.4 倍および 3.0 倍大きかった. この結果は, 窒素が豊富な条件下でピルビン酸合成が強化されていることを示唆している. オイル合成の前駆体であるグリセロール 3-リン酸 (G3P) のプールサイズも, 5 日目の KAC1801 で増加した. *Chlamydomonas sp.* JSC4 においてもピルビン酸プールサイズの増加は, オイル蓄積を誘導する窒素欠乏および塩分条件下で報告されている^[11]. *Chlamydomonas reinhardtii* では, ピルビン酸プールのサイズは窒素欠乏条件下で増加する事が報告されている^[45]. よって, ピルビン酸プールサイズの増加はオイル生産に関連する一つの代謝表現型であることが示唆された. KAC1801 株では培養 3 日目にオイル合成の前駆体である Acetyl-CoA のプールサイズが低下した. また, KAC1801 株ではアセチル CoA (Acetyl-CoA) と同様オイル合成の前駆体であるグリセロール 3-リン酸 (G3P) のプールサイズが, 5 日目の KAC1801 で増加した. KAC1801 株においてオイルの含有率が増加した事からも, KAC1801 株ではオイル合成の前駆体であるアセチル CoA を供給する為に, アセチル CoA の前駆体であるピルビン酸への炭素フラックスを強化している可能性がある. 加えて, アセチル CoA のプールサイズの低下・グリセロール 3-リン酸のプールサイズの増加が起きているかつ, オイルの含有率が増加している事からアセチル CoA やグリセロール 3-リン酸からオイルを合成する反応が強化されている可能性がある.

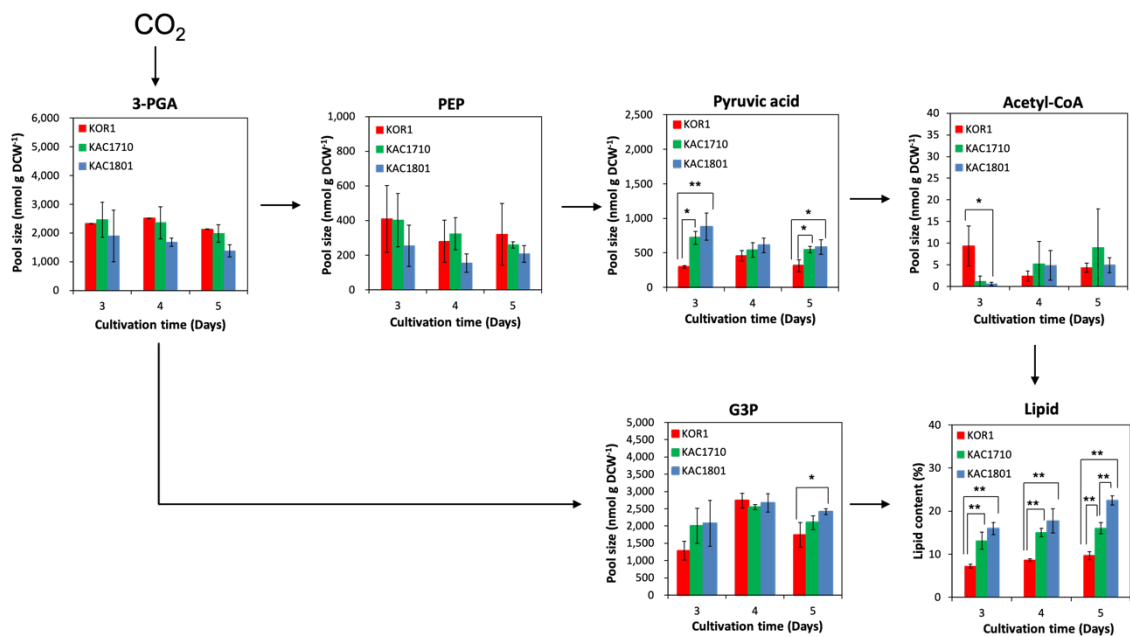


図 8. KOR1, KAC1710, KAC1801 株における窒素源存在下 (バッチ培養) における代謝物プールサイズ

3-PGA, 3-ホスホグリセリン酸; PEP, ホスホエノールピルビン酸; G3P, グリセロール 3-リン酸; Acetyl-CoA, アセチル補酵素 A

実験は 3 回の反復実験を行い, それぞれの標準偏差をエラーバーで示した.

(* : $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4.5 結論

本研究では、窒素源存在下でオイルを蓄積可能な微細藻類変異株を獲得するためのスクリーニング方法、変異株を開発するとともに得られた変異株におけるオイル増産機構の解析を行った。窒素源が豊富な条件下で、FACSを使用したスクリーニングによって得られた変異体 KAC1710 および KAC1801 は、培地中の窒素源が存在するにもかかわらず、細胞内に油滴を蓄積した。細胞内のオイル含有率は KOR1 株と比較して KAC1710 株で 1.5 倍、KAC1801 株で 2.1 倍増加した。オイル増産が達成された要因として、KAC1710 及び KAC1801 株では窒素同化の抑制が起きており、窒素源に対する応答が変化した事によってオイルを蓄積した事が仮説立てられた。また、代謝物プールサイズの解析結果から、KAC 株のピルビン酸のプールサイズの増加が明らかになり、KAC 株ではアセチル CoA といったオイルの前駆体を合成するためにピルビン酸への代謝フラックスを強化している事が示唆された。

引用

- [1] Li, Yanqun, *et al.* "Articles: biocatalysts and bioreactor design, biofuels from microalgae." *Biotechnol. Prog* 24.1 (2008): 815-820.
- [2] Singh, Jasvinder, and Sai Gu. "Commercialization potential of microalgae for biofuels production." *Renewable and sustainable energy reviews* 14.9 (2010): 2596-2610.
- [3] Ghasemi, Y., *et al.* "Microalgae biofuel potentials." *Applied Biochemistry and Microbiology* 48.2 (2012): 126-144.
- [4] Chisti, Yusuf. "Biodiesel from microalgae." *Biotechnology advances* 25.3 (2007): 294-306.
- [5] Feng, Pingzhong, *et al.* "Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors." *Bioresource technology* 102.22 (2011): 10577-10584.
- [6] Xiong, Wei, *et al.* "High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production." *Applied microbiology and biotechnology* 78.1 (2008): 29-36.
- [7] Bondioli, Paolo, *et al.* "Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33." *Bioresource technology* 114 (2012): 567-572.
- [8] Fakhry, Eman M., and Dahlia M. El Maghraby. "Lipid accumulation in response to nitrogen limitation and variation of temperature in *Nannochloropsis salina*." *Botanical studies* 56.1 (2015): 1-8.
- [9] Toledo-Cervantes, Alma, *et al.* "Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*." *Bioresource Technology* 130 (2013): 652-658.
- [10] L. Xin, H. Hong-ying, G. Ke, S. Ying-xue, Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp., *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 5494–5500.
- [11] Ho, Shih-Hsin, *et al.* "Dynamic metabolic profiling together with transcription analysis reveals salinity-induced starch-to-lipid biosynthesis in alga *Chlamydomonas* sp. JSC4." *Scientific reports* 7.1 (2017): 1-11.
- [12] Ho, Shih-Hsin, *et al.* "Dynamic metabolic profiling of the marine microalga *Chlamydomonas* sp. JSC4 and enhancing its oil production by optimizing light intensity." *Biotechnology for biofuels* 8.1 (2015): 1-17.
- [13] Nzayisenga, Jean Claude, *et al.* "Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater." *Biotechnology for Biofuels* 13.1 (2020): 1-8.
- [14] Ho, Shih-Hsin, *et al.* "Optimizing biodiesel production in marine *Chlamydomonas* sp. JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy." *Biotechnology for*

*Biofuels*7.1 (2014): 1-16.

[15] Kakarla, Ramesh, *et al.* "Application of high-salinity stress for enhancing the lipid productivity of *Chlorella sorokiniana* HS1 in a two-phase process." *Journal of microbiology*56.1 (2018): 56-64.

[16] Breuer, Guido, *et al.* "The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains." *Bioresource Technology*124 (2012): 217-226.

[17] Kamalanathan, Manoj, Roslyn Gleadow, and John Beardall. "Impacts of phosphorus availability on lipid production by *Chlamydomonas reinhardtii*." *Algal research* 12 (2015): 191-196.

[18] Ito, Takuro, *et al.* "Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxiophycean alga in nitrogen-deficient conditions." *Metabolomics* 9.1 (2013): 178-187.

[19] Tan, Kenneth Wei Min, and Yuan Kun Lee. "The dilemma for lipid productivity in green microalgae: importance of substrate provision in improving oil yield without sacrificing growth." *Biotechnology for biofuels* 9.1 (2016): 1-14.

[20] Liu, Shuyu, *et al.* "Improving cell growth and lipid accumulation in green microalgae *Chlorella* sp. via UV irradiation." *Applied biochemistry and biotechnology* 175.7 (2015): 3507-3518.

[21] Cao, Song, *et al.* "Improving of lipid productivity of the oleaginous microalgae *Chlorella pyrenoidosa* via atmospheric and room temperature plasma (ARTP)." *Bioresource Technology*244 (2017): 1400-1406.

[22] Choi, Jong-il, *et al.* "Development of microalga *Scenedesmus dimorphus* mutant with higher lipid content by radiation breeding." *Bioprocess and biosystems engineering* 37.12 (2014): 2437-2444.

[23] Zhang, Yi, *et al.* "Breeding of high biomass and lipid producing *Desmodesmus* sp. by ethylmethane sulfonate-induced mutation." *Bioresource technology*207 (2016): 268-275.

[24] Tu, Renjie, *et al.* "Improving of lipid productivity of the biodiesel promising green microalga *Chlorella pyrenoidosa* via low-energy ion implantation." *Journal of Applied Phycology*28.4 (2016): 2159-2166.

[25] Ma, Yubin, *et al.* "Increased lipid productivity and TAG content in *Nannochloropsis* by heavy-ion irradiation mutagenesis." *Bioresource Technology*136 (2013): 360-367.

[26] Yamada, Koji, *et al.* "Efficient selective breeding of live oil-rich *Euglena gracilis* with fluorescence-activated cell sorting." *Scientific reports* 6.1 (2016): 1-8.

[27] Kato, Yuichi, *et al.* "Evolutionary engineering of salt-resistant *Chlamydomonas* sp. strains reveals salinity stress-activated starch-to-lipid biosynthesis switching." *Bioresource technology*245 (2017): 1484-1490.

[28] Doan, Thi Thai Yen, and Jeffrey Philip Obbard. "Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting." *Algal Research* 1.1

(2012): 17-21.

[29] Cabanelas, Iago Teles Dominguez, *et al.* "Sorting cells of the microalga *Chlorococcum littorale* with increased triacylglycerol productivity." *Biotechnology for Biofuels* 9.1 (2016): 1-12.

[30] Kato, Yuichi, *et al.* "Enhancing carbohydrate repartitioning into lipid and carotenoid by disruption of microalgae starch debranching enzyme." *Communications biology* 4.1 (2021): 1-11.

[31] Nakanishi, Akihito, *et al.* "Development of lipid productivities under different CO₂ conditions of marine microalgae *Chlamydomonas* sp. JSC4." *Bioresource Technology* 152 (2014): 247-252.

[32] Waterbury, John B., and Roger Y. Stanier. "Isolation and growth of cyanobacteria from marine and hypersaline environments." *The prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1981. 221-223.

[33] Harris, Elizabeth H. *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use: Volume 1*. Vol. 1. Academic press, 2009.

[34] Hasunuma, Tomohisa, *et al.* "Overexpression of flv3 improves photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 by enhancement of alternative electron flow." *Biotechnology for biofuels* 7.1 (2014): 1-10.

[35] Berges, John A., Daniel J. Franklin, and Paul J. Harrison. "Evolution of an artificial seawater medium: improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades." *Journal of Phycology* 37.6 (2001): 1138-1145.

[36] Collos, Y., *et al.* "An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures." *Journal of Applied Phycology* 11.2 (1999): 179-184.

[37] Hasunuma, Tomohisa, *et al.* "Dynamic metabolic profiling of cyanobacterial glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion." *Journal of experimental botany* 64.10 (2013): 2943-2954.

[38] Couso, Inmaculada, *et al.* "Synergism between inositol polyphosphates and TOR kinase signaling in nutrient sensing, growth control, and lipid metabolism in *Chlamydomonas*." *The Plant Cell* 28.9 (2016): 2026-2042.

[39] Ajjawi, Imad, *et al.* "Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator." *Nature biotechnology* 35.7 (2017): 647-652.

[40] Rodolfi, Liliana, *et al.* "Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low - cost photobioreactor." *Biotechnology and bioengineering* 102.1 (2009): 100-112.

[41] Ho, Shih-Hsin, Wen-Ming Chen, and Jo-Shu Chang. "*Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production." *Bioresource technology* 101.22 (2010): 8725-8730.

[42] Feng, Dina, *et al.* "Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis*

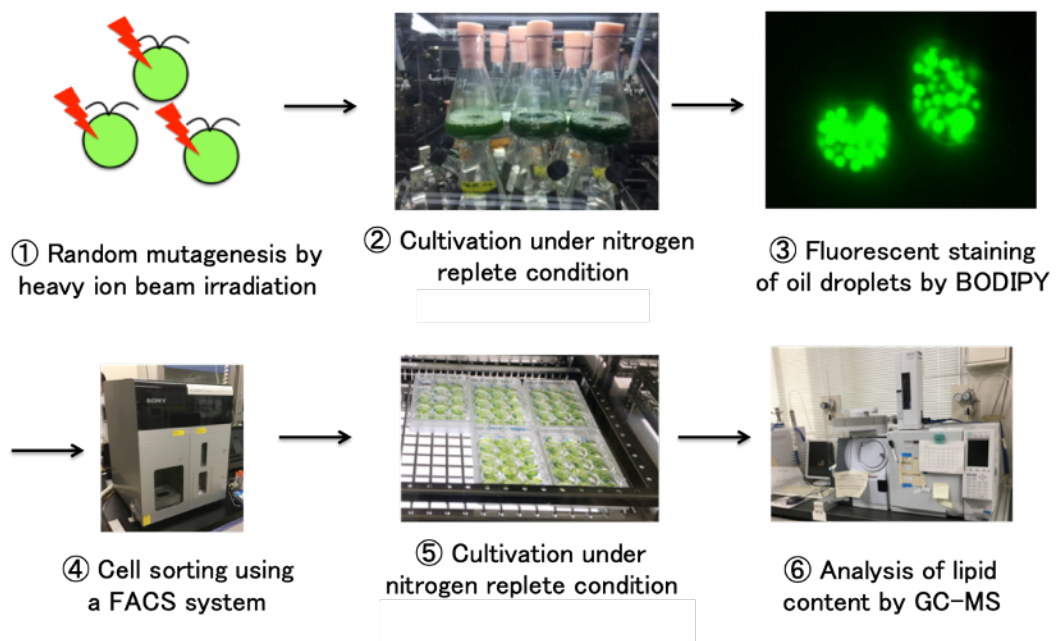
zhangjiangensis (Chrysophyta) by nitrogen supplement." *Bioresource Technology* 102.12 (2011): 6710-6716.

[43] Chiu, Sheng-Yi, *et al.* "Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration." *Bioresource technology* 100.2 (2009): 833-838.

[44] Yuan, Yizhong, Xuyang Li, and Quanyu Zhao. "Enhancing growth and lipid productivity in *Dunaliella salina* under high light intensity and nitrogen limited conditions." *Bioresource Technology Reports* 7 (2019): 100211.

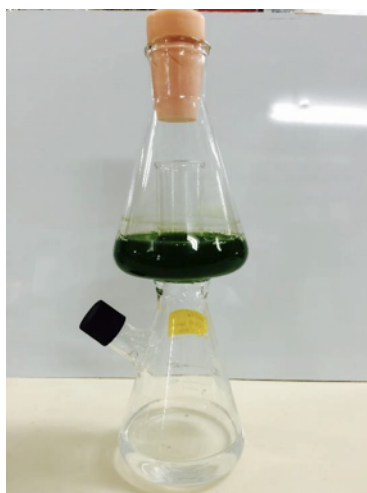
[45] Sun, Han, *et al.* "Novel insight of carotenoid and lipid biosynthesis and their roles in storage carbon metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Bioresource Technology* 263 (2018): 450-457.

付録

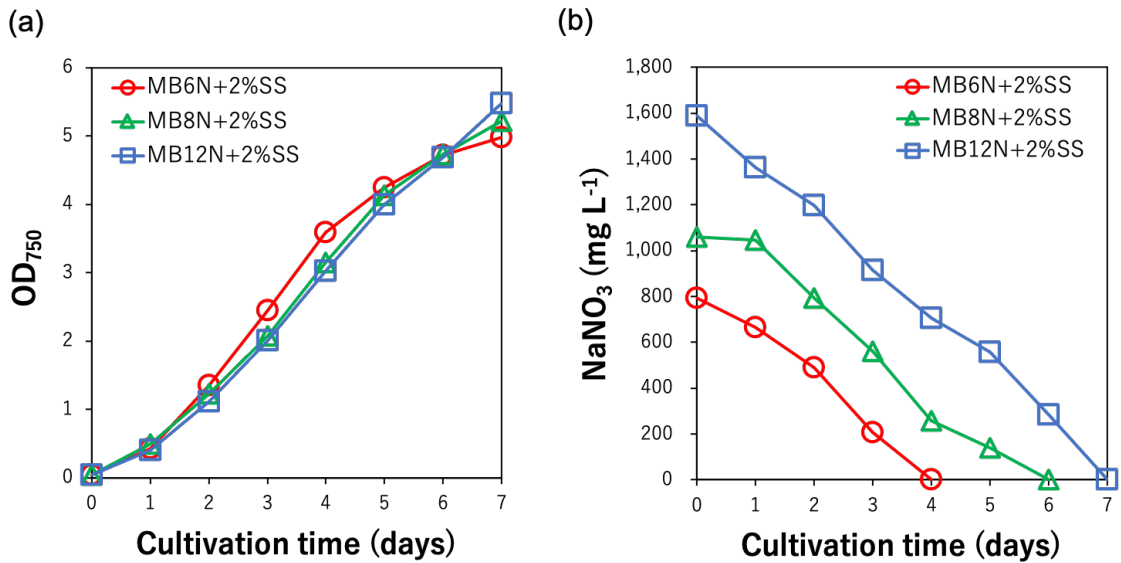


※② to ④ were repeated multiple times.

付録: 図 1. 育種手順



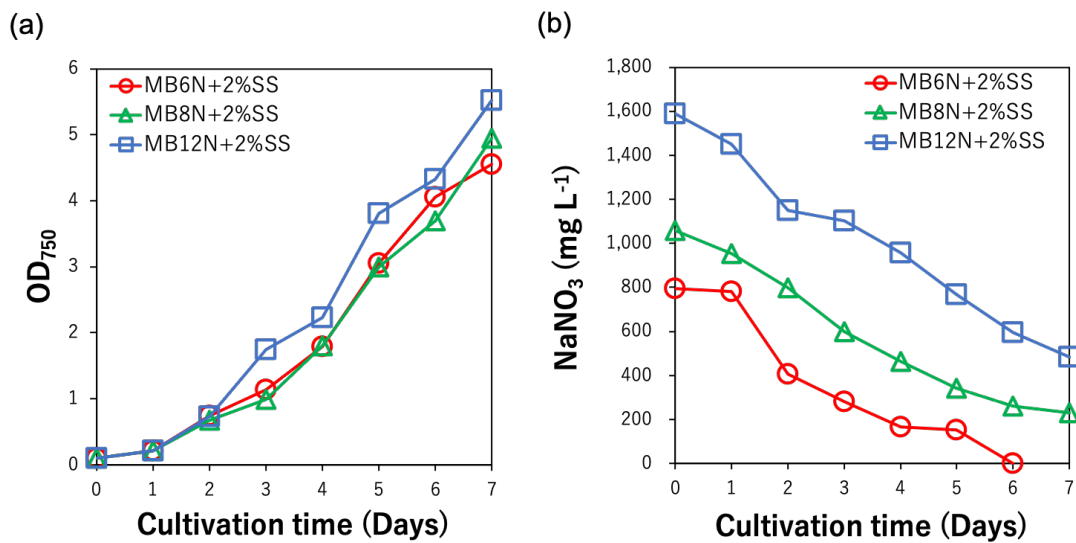
付録: 図 2. 2 段式フラスコ



付録: 図 3. 異なる窒素源濃度条件下における *Chlamydomonas sp. KOR1* の培養試験結果

(2 段階フラスコを用いた試験)

(a) 培養液の濁度 (OD₇₅₀) (b) 培地中の窒素量 (mg L⁻¹)



付録: 図 4. 異なる窒素源濃度条件下における *Chlamydomonas sp. KOR1* の培養試験結果

(12 穴プレートを用いた試験)

(a) 培養液の濁度 (OD₇₅₀) (b) 培地中の窒素量 (mg L⁻¹)

付録: 表 1. BG-11 培地の組成

Components	Conc.
NaNO ₃	150 mg
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	4 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.5 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	3.6 mg
Citric acid	0.6 mg
Ferric ammonium citrate	0.6 mg
Na ₂ EDTA – Mg	0.1 mg
Na ₂ CO ₃	2 mg
Trace metal mix A ₅ +Co	0.1 mL
Distilled water	99.9 mL

付録: 表 2. Trace metal mix A₅+Co の組成

Components	Conc.
H ₃ BO ₃	286 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	181 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22.2 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	3.9 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	7.9 mg
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	4.9 mg
Distilled water	100 mL

付録: 表 3. TAP 培地の組成

Components	Conc.
NH ₄ Cl	40 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	5.1 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg
K ₂ HPO ₄	11.9 mg
KH ₂ PO ₄	6.03 mg
Hunter's trace elements	0.1 mL
Acetic acid	0.1 mL
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	242 mg
Distilled water	99.8 mL

付録: 表 4. Hunter's Trace elements の組成

Components	Conc.
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	5 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.2 g
H ₃ BO ₃	1.14 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	506 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	499 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	161 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	157 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ · 4H ₂ O	110 mg
Distilled water	100 mL

付録: 表 5. 2% CO₂ 溶液の組成

Components	Conc.
K ₂ CO ₃	8.4 g
KHCO ₃	24 g
Distilled water	150 mL

付録: 表 6. MB12N 培地の組成

Components	Conc.
NaNO ₃	1,588.4 mg
K ₂ HPO ₄	38.3 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	75 mg
KH ₂ PO ₄	88 mg
NaCl	25 mg
Stock①	1 mL
CaCl ₂ · 2H ₂ O	25 mg/L
Stock②	1 mL
FeCl ₃ · 6H ₂ O	1.78 mg/L
Na ₂ · EDTA · 2H ₂ O	2.44 mg/L
Stock③	1 mL
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	7.32×10^{-3} mg/L
CoCO ₄ · 7H ₂ O	1.6×10^{-2} mg/L
MnSO ₄ · 5H ₂ O	5.84×10^{-1} mg/L
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1.48×10^{-4} mg/L
Na ₂ SeO ₃	1.73×10^{-3} mg/L
NiCl · 6H ₂ O	1.49×10^{-3} mg/L
Na ₂ EDTA	6.1 mg/L
Sea salt	20 g
Ultra-pure water	1L

付録: 表 7. KOR1 から KAC1710 株を育種する過程で分析した細胞数, 細胞分取数, 分取比率

	Analyzed cells	Sorted cells	Sorting ratio (%)
First sorting	1,554,028	1,000	0.06
Second sorting	172,163	1,000	0.58
Third sorting	358,127	1,000	0.28
Fourth sorting	122,853	1,000	0.81
Fifth sorting	14,124	1,000	7.08

付録: 表 8. KAC1710 から KAC1801 株を育種する過程で分析した
細胞数, 細胞分取数, 分取比率

	Analyzed cells	Sorted cells	Sorting ratio (%)
First sorting	832,159	1,000	0.12
Second sorting	357,806	1,000	0.28
Third sorting	31,825	1,000	3.14
Fourth sorting	2,418	1,000	41.36

付録: 表 9. GC 分析条件

GC condition	
Times of solvent washes before injection	3 times
Times of solvent washes after injection	5 times
Times of sample cleaning times before injection	3 times
Plunger inhalation speed	Fast speed
Inhalation waiting time	0.2 sec
Plunger injection speed	Fast speed
Syringe injection rate	Fast speed
Injection Mode	Generally
Column	DB-23 (Agilent technologies)
Film thickness	0.15 μm
Length	60 mm
Inner diameter	0.25 mm
Column oven temperature	50°C
Vaporization chamber temperature	250°C
Injection Mode	Split
Carrier gas	He
Control mode	Pressure
Pressure	230 kPa
Total flow velocity	16.8 mL/min
Column flow rate	2.3 mL/min
Linear velocity	28.9 cm/s
Purge flow rate	3.0 mL/min
Split ratio	5.0

付録: 表 10. オイル解析条件

Rate (°C/min)	Temperature (°C)	Holding time (min)
	50.0	1.00
25.00	175.0	0.00
4.00	230.0	5.00

付録: 表 11. MS 分析条件

MS condition	
Ion source temperature	230°C
Interface temperature	250°C
Solvent elution time	5.0 min
Analysis time	24 min
Event time	0.5 sec
Scan speed	1000

第5章 科学技術上のブレイクスルー②

窒素源存在下でオイルを高蓄積する微細藻類変異株を用いた一段階オイル生産方法の開発と オイル増産機構の解明

本章は原著論文

Oyama T., Kato Y., Hidese R., Matsuda M., Matsutani M., Watanabe S., Kondo A., Hasunuma T (2022). Development of a stable semi-continuous lipid production system of an oleaginous *Chlamydomonas* sp. mutant using multi-omics profiling. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 15(1), 1-14.

を元に作成した。

5.1 概要

微細藻類から窒素源存在下・一段階でオイル生産可能なプロセスを開発するために、本研究は窒素源の有無に関係なくオイルを蓄積することができる海洋性緑藻変異株”*Chlamydomonas* sp. KAC1801 株”の半連続培養による安定したオイル生産を達成する事を目的とした。18.6 mM の硝酸塩を含む MB12N+2 % Sea salt 培地を用い、24 時間おきごとに、0.8~0.9 g L⁻¹ のバイオマス密度となるように継代培養した結果、親株 KOR1 は乾燥重量あたり 9 % のオイルしか蓄積しなかったのに対し、KAC1801 株は乾燥重量あたり 20 % 以上のオイルを継続的に蓄積した。半連続培養中においても KAC1801 株の細胞増殖や窒素消費は維持されており、増殖とオイル蓄積を両立する培養方法が確立された。KAC1801 の半連続培養では、116.9 mg L⁻¹ day⁻¹ のオイル生産性が達成され、親株である KOR1 (50.5 mg L⁻¹ day⁻¹) の 2.3 倍であった。また、KAC1801 株におけるオイル増産機構を明らかにするために、確立した半連続培養条件下にて、メタボローム解析・トランスクリプトームを実施した。その結果、KAC1801 株では光合成能の低下や窒素同化経路の強化といった典型的な微細藻類の窒素飢餓応答が発生した。本研究は、半連続培養によって微細藻類から一段階でオイルを生産する方法を確立したとともに、KAC1801 株におけるオイル増産機構を明らかにした。

キーワード： *Chlamydomonas*, オイル, 半連続培養, 窒素源存在下, 窒素飢餓応答

5.2 序論

微細藻類は、大気中の二酸化炭素 (CO₂) からトリアシルグリセロール (オイル) を生産できる為、持続可能な資源として世界的な注目を集めている^{[1][2]}。クロレラ属、ナンノクロロプシス属、セネデスムス属、クラミドモナス属等の微細藻類株は、乾燥細胞重量あたり 50%を超えるオイルを蓄積可能である事から、オイル生産藻類として有望である^{[3][4][5][6]}。微細藻類のオイル生産は、光^{[7][8]}、塩分^{[9][10]}、栄養素^{[11][12]}、および温度^{[13][14]}といった要因が影響を与える。その中でも窒素飢餓は微細藻類のオイル蓄積を促進するための一般的で強力な要因であるが^{[15][16]}、細胞増殖が大幅に抑制する^[17]。その為、微細藻類からオイルを生産させる為には、①. 窒素源存在下で細胞増殖させる工程、②. 窒素欠乏条件でオイルを蓄積させる工程の 2 段階の工程が必要である。半連続培養は、一定量の培養液を定期的に採取し、同量の新鮮な培地を投入して目的の細胞密度に調節することによって実行される^{[17][18][19]}。この方法は、細胞を増殖段階に維持するのに有利である。しかし、オイル生産藻類は、細胞増殖とオイル蓄積が一般にトレードオフの関係にある為、半連続培養の利点を活かしきれていなかった^[20]。

先行研究では、細胞増殖と連動したオイル生産微細藻類変異株の創出がなされてきた。Ajjawi *et al.*, 2017 では、*Nannochloropsis gaditana* の "Zn (II)₂Cys₆" を増殖とオイル蓄積を両立させる転写因子として特定し、この転写因子を発現抑制させることでオイル生産を 2 倍に増加させた^[21]。Fukuda *et al.*, 2018 では、*Cyanidioschyzon merolae* におけるオイル生産の寄与要因としてグリセロール 3-リン酸アシルトランスフェラーゼ遺伝子 GPAT1 を同定し、GPAT1 過剰発現株が親株より 56.1 倍高いオイル生産性を示すことを明らかにした^[22]。Südfeld *et al.*, 2021 では、逆遺伝学アプローチによって *Nannochloropsis oceanica* の転写因子 NO06G03670 を同定し、そのノックアウト株が親株より 1.4 倍高いオイル蓄積を示すことを明らかにした^[23]。Oyama *et al.*, 2021 ではランダム突然変異誘発を利用した育種により、硝酸塩が豊富な条件下でもオイルを蓄積する *Chlamydomonas* sp. KAC1801 を獲得した^[24]。このように、細胞増殖を伴う微細藻類のオイル生産が実現されてきたが、変異株の培養戦略は十分に調査されていない。

本研究では *Chlamydomonas* sp. KAC1801 に焦点を当て、細胞増殖に適した窒素源存在下で安定的かつ継続的なオイル生産を実現することを目的とした。KAC1801 の半連続培養は、硝酸塩を豊富に供給して行った。この際、比較対象は窒素源の存在下でオイルをほとんど蓄積しない親株 KOR1^[25]とした。培養試験の結果、KAC1801 は窒素源存在下で細胞増殖を維持しながらオイルを高蓄積する事を確認した。オイル生産性においては KOR1 と比較して約 2.3 倍の増加が確認された。また、半連続培養・窒素源存在下におけるオイル生産機構を解明することを目的として、メタボロームおよびトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、KAC1801 は培地中に硝酸塩が豊富に存在するにもかかわらず光合成能の低下や窒素同化経路の強化といった微細藻類を窒素欠乏条件下で培養した際に見られる典型的な表現型を示した。本研究は、KAC1801 の半連続培養による安定したオイル生産方法の開発に成功するとともに、窒素源が豊富な条件下でオイルを生

産するための洞察を提供した。

5.3 対象と手法

本研究では、第一に KAC1801 株における半連続培養方法の検討を行った。半連続培養方法の確立後は KAC1801 株におけるオイル増産機構の解析を行った。オイル増産機構の解析にあたっては、細胞構成成分の分析・代謝物プールサイズ及びターンオーバーの解析・遺伝子発現の解析を行った。本項では、半連続培養によるオイル生産試験に関する手法を 5.3.1 から 5.3.4 項、オイル増産機構の解析に関する手法を 5.3.5 から 5.3.10 項に記載している。統計解析の手法については 5.3.11 項の通りである。

5.3.1 藻株と培養条件

本研究では、変異株 *Chlamydomonas* sp. KAC1801^[24]とその親株である KOR1 株^[25]を使用した。微細藻類の培養は、2 段式フラスコとインキュベーター BioTRON NC350（日本医療化学機器株式会社, 日本）を使用して、光強度を $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定した白色蛍光灯の連続照明下、30 °C、100 rpm で振とう培養を行った。2 段式フラスコの上段には、70 mL の Modified Bold (MB) 12N 培地（18.6 mM NaNO₃, 0.22 mM K₂HPO₄, 0.3 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.17 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.43 mM KH₂PO₄, 0.43 mM NaCl に微量元素を添加^[26]）に塩濃度が 2 % (w/v) になるように海水塩を（Sigma-Aldrich, 米国）添加した MB12N + 2 % Sea salt 培地、MB12N 培地の半分の窒素量を含む MB6N+2% Sea salt 培地をそれぞれ投入、下段に 2M K₂CO₃ / KHCO₃ 溶液 50mL を投入した。5 日間の前培養後、UV mini-1240 UV-Vis 分光光度計（島津製作所, 日本）を使用して 750 nm での光学密度 (OD₇₅₀) を測定し、OD₇₅₀ が 0.5, 1.0 になるよう継代し、培養を開始した。半連続培養中は、細胞を 24 時間ごとに初期 OD₇₅₀ が 0.5, 1.0 になるように継代した（表 1）。

表 1. 半連続培養方法の確立にあたって検討した条件

検討要因	条件①	条件②	条件③	条件④
使用培地	MB6N +2 % sea salt	MB12N +2 % sea salt	MB6N +2 % sea salt	MB12N +2 % sea salt
継代細胞密度 (OD ₇₅₀)	0.5	0.5	1.0	1.0

表 1 で示した 4 条件にてオイル生産試験 (N=1) を行い、KAC1801 がオイルを最も高生産する条件を確立した。確立した条件をもとに、実験を 3 反復行い、KOR1 株とオイル生産を比較した。

5.3.2 バイオマス量の測定

培養液を 8,000×g で 1 分間遠心分離し，超純水で 1 回洗浄後，細胞ペレットを凍結乾燥した．半連続培養時の 1 日あたりのバイオマス生産量は，以下の式で算出した．

$$\text{バイオマス生産量 (mg L}^{-1}\text{)} = \text{BCx (mg L}^{-1}\text{)} - \text{BCy (mg L}^{-1}\text{)}$$

BCx：継代 24 時間後のバイオマス密度

BCy：継代 0 時間後のバイオマス密度

5.3.3 窒素源濃度の測定

窒素源濃度の測定は第 4 章及び先行研究^[27]と同様の方法で行った．半連続培養時の 1 日あたりの窒素消費量は次式で算出した．

$$\text{窒素消費量 (mg L}^{-1}\text{)} = \text{NCx (mg L}^{-1}\text{)} - \text{NCy (mg L}^{-1}\text{)}$$

NCx：継代 0 時間後の窒素濃度

NCy：継代 24 時間後の窒素濃度

5.3.4 オイル分析

オイルの抽出・分析は第 4 章と同様の方法で行った．

半連続培養における 1 日のオイル生産量は，バイオマス密度と細胞内オイル含有率のデータを用いて以下の式で算出した．

$$\text{オイル生産性 (mg L}^{-1}\text{ day}^{-1}\text{)} = \text{BCx (mg L}^{-1}\text{)} \times \text{LCx (\%)} - \text{BCy (mg L}^{-1}\text{)} \times \text{LCy (\%)}$$

BCx：継代 24 時間後のバイオマス密度

LCx：継代 24 時間後のオイル含有量

BCy：継代 0 時間後のバイオマス密度

LCy：継代 0 時間後のオイル含有量

5.3.5 炭水化物分析

凍結乾燥した細胞 (2 - 3 mg) を 2 mL の 4 %硫酸に懸濁し，120 °C で 30 分間オートクレーブ処理する事で炭水化物をグルコースに加水分解した^[25]．オートクレーブ後 22 %炭酸ナトリウム 1 mL を加えて溶液を中和した．処理液を 10,000 × g で 10 分間遠心分離し，フィルターでろ過することにより細胞破片を除去した．グルコース濃度は，Aminex HPX-87H カラム (9 μm, 300 mm × 7.8 mm; Bio-Rad Laboratories, 米国) を備えた高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) (島津製作所, 日本) で測定した．可溶性デンプン

(CAS 番号：9005-84-9, ナカライテスク, 日本) をサンプルと同様の方法で処理し, 検量線を作成, サンプルの炭水化物含有率算出に使用した^[25].

5.3.6 タンパク質分析

凍結乾燥した細胞 (2 - 3 mg) を 0.2 mL の 1N NaOH に懸濁し, 80 °C で 10 分間インキュベートした. 1.8 mL の超純水を加え, 12,000 × g で 30 分間遠心分離した^{[28][29]}. 上清中のタンパク質濃度はタカラ BCA タンパク質アッセイキット (タカラバイオ株式会社, 日本) を用いて分析を行った.

5.3.7 色素分析

凍結乾燥細胞 (2 - 3 mg) を 500 μL のメタノール : アセトン = 5 : 5 (v/v) に懸濁し, 0.5 mm ガラスビーズとマルチビーズショッカー MB1001C (S) (Yasui Kikai) で破碎した. サンプルを 10,000 × g, 4 °C で 2 分間遠心分離し, 上清を新しい 2 mL マイクロチューブに移した. この抽出手順を 4 回繰り返し行い, 合計 2 mL の上清を得た. エバポレーター CEV-3100 (EYELA, 日本) を使用して, 330 μL の上清を真空下で乾燥させた. 乾燥したサンプルを内部標準として 1 μM の trans-β-apo-8'-carotenal を含む 500 μL のクロロホルム : アセトニトリル = 2 : 8 (v/v) に再懸濁し, 0.22 μm のコスモスピンフィルター G (ナカライテスク, 日本) にかけて夾雑物を除去した. フォトダイオードアレイ検出器と BEH シールド RP18 カラム (1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm; Waters, 米国) を備えた超高速液体クロマトグラフィー (Ultra-Performance Liquid Chromatography; UPLC) を使用してサンプルを分析し, 色素を同定・定量した^{[25][30]}.

5.3.8 メタボローム解析

メタボローム解析は第 4 章及び先行研究^[25]と同様の方法で行い, 代謝物のプールサイズを分析した.

5.3.9 動的メタボローム解析

CO₂ から新たに合成された代謝物の *in vivo*¹³C 標識を行うために, 10.0 μm 孔フィルター (Merck Millipore, 米国) を使用して半連続培養の 1.5 日目に細胞を回収し, 25 mM NaH¹³CO₃ (Cambridge Isotope Laboratories, 米国) を含む MB12N + 2 % sea salt 培地に再懸濁した. 白色蛍光灯の照明下で 250 μmol m⁻²s⁻¹ の条件下で, 100 rpm で振とうしながらインキュベートした後, 細胞を回収, 手順 4.3.8 と同様の方法で代謝物を抽出した. ¹³C 標識率は, 先行研究にて報告された方法^{[25][31]}と同様, 安定同位体 (¹³C) が含まれないイオンと ¹³C を含む同位体イオンの強度比を観測する事で算出した.

5.3.10 トランスクリプトーム解析

半連続培養 1.5 日目のサンプル 50 mL を $12,000 \times g$ で 1 分間遠心分離することで細胞を回収した。その後液体窒素で直ちに凍結して -80°C で保存した。RNA の抽出は RNeasy Plus Universal キット (QIZGEN, 日本) を用いて実施した。RNA の品質は Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, 米国) と Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, 米国) を使用して決定した。NEBNext Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module と NEBNextUltra II RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, 米国) を使用し、500 ng のトータル RNA から 12 サイクルの PCR によりライブラリー調製を行った。ライブラリーの濃度と品質は、Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, 米国) を使用した Agilent DNA1000 キットで評価した。ライブラリー濃度は、KAPA Library Quantification Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, 米国) および Step-One-Plus リアルタイム PCR-System (Applied Biosystems Laboratories, 米国) を使用して決定された。イルミナの NextSeq500 プラットフォームで cDNA ライブラリーのシーケンスを行い、150 bp のペアエンドリードを得た。RNA-Seq 解析は、CLC Genomics Workbench 21.0.3 を使用して実行された。各遺伝子のリファレンスゲノムへのリードマッピング、リードカウント、およびトランスクリプトパーミリオン (TPM) の計算は、CLC Genomics Workbench 21.0.3 (<http://www.clcbio.com>) を使用して実行した。発現変動遺伝子 (Differently Expressed Genes: DEG) は、edgeR を使用して計算した^[32]。この際、 $|\log_2 \text{FC (Fold Change)}| > 1$ および $\text{FDR} < 0.01$ を DEG とした。遺伝子オンロジー分析は、g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>) を使用して解析した^[33]。

5.3.11 統計解析

統計的有意性は、R Version 3.3.3 を使用したウェルチの t 検定によって p 値を算出し、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

5.4 結果と議論

5.4.1 窒素源存在下, 半連続培養による新規オイル生産法の開発

光と窒素の利用可能性は、微細藻類の細胞増殖とオイル蓄積に影響を与える重要な要因である [7][8][15][16]。したがって、本研究では半連続培養のための継代細胞密度と供給窒素濃度を検討し、半連続培養条件下における至適条件を確立した。KAC1801 と親株 KOR1 を、 $OD_{750} = 0.5$ (バイオマス密度: $0.4 - 0.5 \text{ g L}^{-1}$) または 1.0 (バイオマス密度: $0.8 - 0.9 \text{ g L}^{-1}$) の初期細胞濃度で、 9.3 mM (6N) または 18.6 mM (12N) の NaNO_3 を含む培地で培養した (図 1)。KAC1801 のバイオマス生産と窒素消費は KOR1 よりも低かった。平均して、5 日間の培養での KAC1801 のバイオマス生産は 480 mg L^{-1} (MB6N, $OD_{750} = 0.5$), 260 mg L^{-1} (MB6N, $OD_{750} = 1.0$), 240 mg L^{-1} (MB12N, $OD_{750} = 0.5$), および 410 mg L^{-1} (MB12N, $OD_{750} = 1.0$) であった。KOR1 株ではそれぞれ 690 mg L^{-1} (MB6N, $OD_{750} = 0.5$), 760 mg L^{-1} (MB6N, $OD_{750} = 1.0$), 610 mg L^{-1} (MB12N, $OD_{750} = 0.5$) および 730 mg L^{-1} (MB12N, $OD_{750} = 1.0$) であった。5 日間の培養における KAC1801 の平均オイル含有率は、 17.7% (MB6N, $OD_{750} = 0.5$), 27.1% (MB6N, $OD_{750} = 1.0$), 26.2% (MB12N, $OD_{750} = 0.5$), および 29.4% (MB12N, $OD_{750} = 1.0$) であった。KOR1 株ではそれぞれ 7.2% (MB6N, $OD_{750} = 0.5$), 6.9% (MB6N, $OD_{750} = 1.0$), 6.5% (MB12N, $OD_{750} = 0.5$), および 6.5% (MB12N, $OD_{750} = 1.0$) であった。これらの結果から、半連続培養時のオイル生産性を算出した (図 2)。5 日間の培養での KAC1801 の平均オイル生産性は、 $67.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (MB6N, $OD_{750} = 0.5$), $84.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ((MB6N, $OD_{750} = 1.0$), $66.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ((MB12N, $OD_{750} = 0.5$), $138.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ((MB12N, $OD_{750} = 1.0$) であった。KOR1 株ではそれぞれ $44.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ((MB6N, $OD_{750} = 0.5$), $42.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ((MB6N, $OD_{750} = 1.0$), $36.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ((MB12N, $OD_{750} = 0.5$) および $45.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ((MB12N, $OD_{750} = 1.0$) であった。以上から、KAC1801 の最大オイル生産性は MB12N 培地で培養し、 $OD_{750} = 1.0$ の初期細胞密度で継代培養したときに達成され、この条件が KAC1801 の半連続培養に適していることが示唆された。

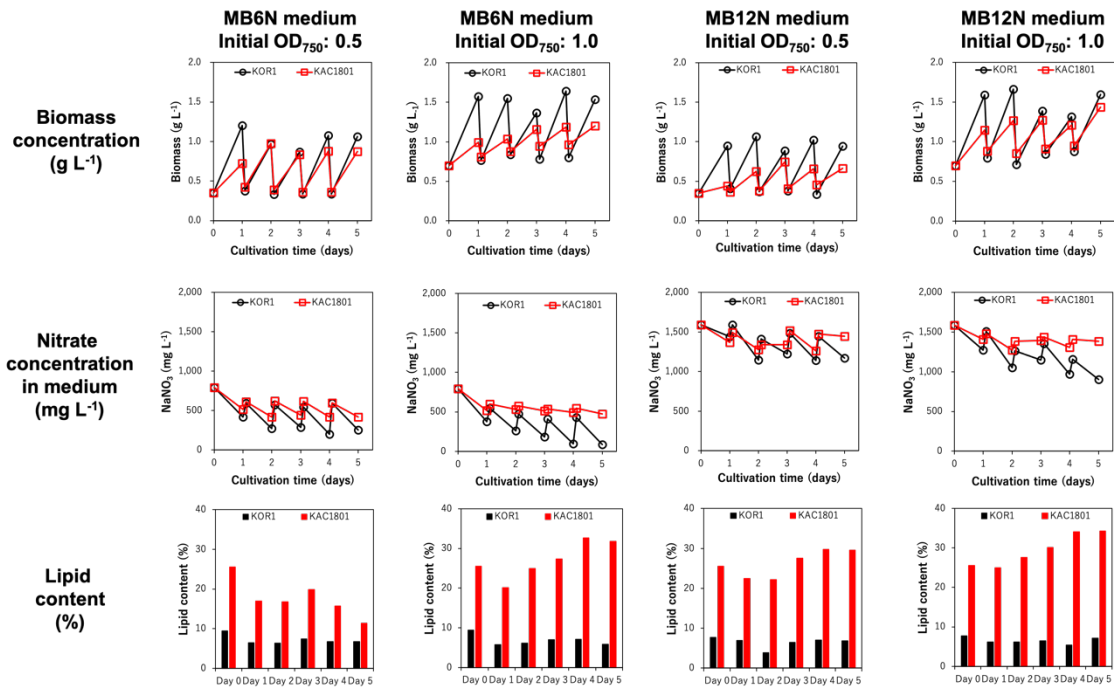


図 1. 継代細胞密度と供給窒素源濃度が *Chlamydomonas* sp. KOR1 及び KAC1801 の細胞増殖，窒素消費，細胞内オイル含有率に与える影響 (N=1)

微細藻類は 9.3 mM NaNO₃ (6N) または 18.6 mM NaNO₃ (12N) に 2% (w/v) 海水塩を添加した培地を使用して 250 μmol m⁻² s⁻¹ の光強度，30 °C，2% CO₂ 条件下，100 rpm で振とう培養した。

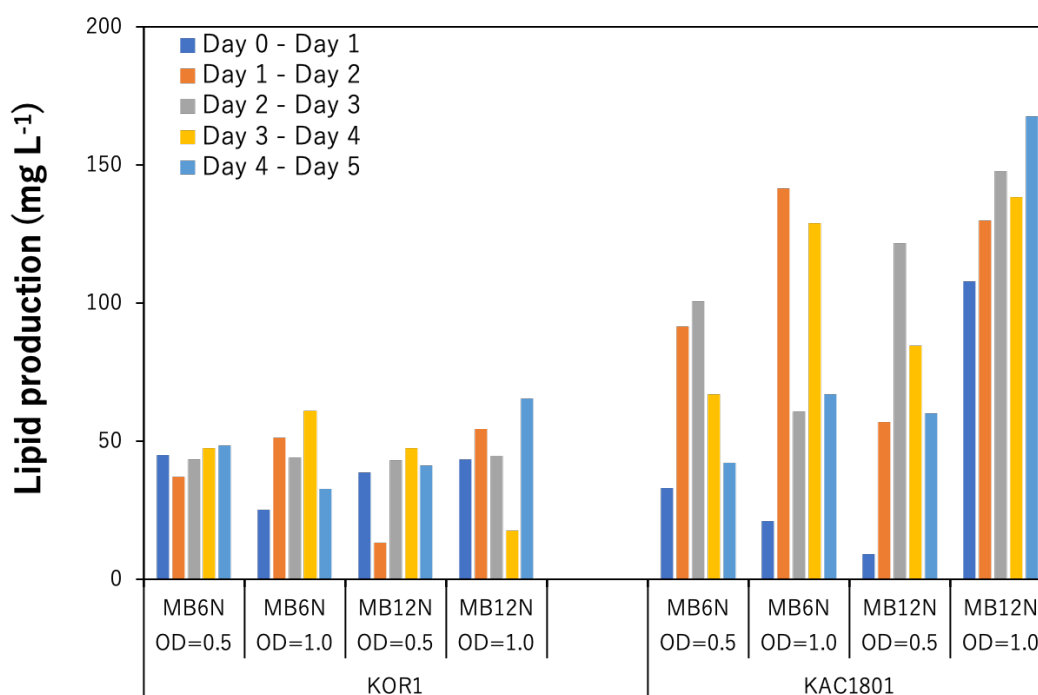


図 2. 継代細胞密度と供給窒素源濃度を変えて *Chlamydomonas* sp. KOR1 及び KAC1801 を培養した際のオイル生産量の比較結果 (N=1)

オイル生産を詳細に評価するために、前述の予備実験に従って初期継代細胞密度を $OD_{750} = 1.0$ 、24 時間ごとに細胞を継代培養し、5 日間の半連続培養を実施した (図 3)。

KAC1801 のバイオマス生産は 400.1 mg L^{-1} (Day 4 – Day 5) から 610.6 mg L^{-1} (Day 0 – Day 1) であった。KOR1 では、 709.2 mg L^{-1} (Day 2 – Day 3) から 925.1 mg L^{-1} (Day 0 – Day 1) であった。KAC1801 の窒素消費量は 89.6 mg L^{-1} (Day 4 – Day 5) から 251.3 mg L^{-1} (Day 2 – Day 3)、KOR1 の硝酸塩消費量は 303.0 mg L^{-1} (Day 1 – Day 2) から 515.1 mg L^{-1} (Day 2 – Day 3) であった。KAC1801 のオイル含有率は、培養期間中 KOR1 のオイル含有率よりも有意に高かった。KAC1801 は常に 20 % を超えるオイルを蓄積したが、KOR1 のオイル含有率は培養期間全体で 9 % 未満だった。KAC1801 のバイオマス生産量は KOR1 株よりも低かったものの、細胞内オイル含有率が増加した為、KOR1 よりも高いオイル生産性を示した。KAC1801 の平均オイル生産性は $116.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であり、KOR1 ($50.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) の 2.2 倍だった (表 2)。

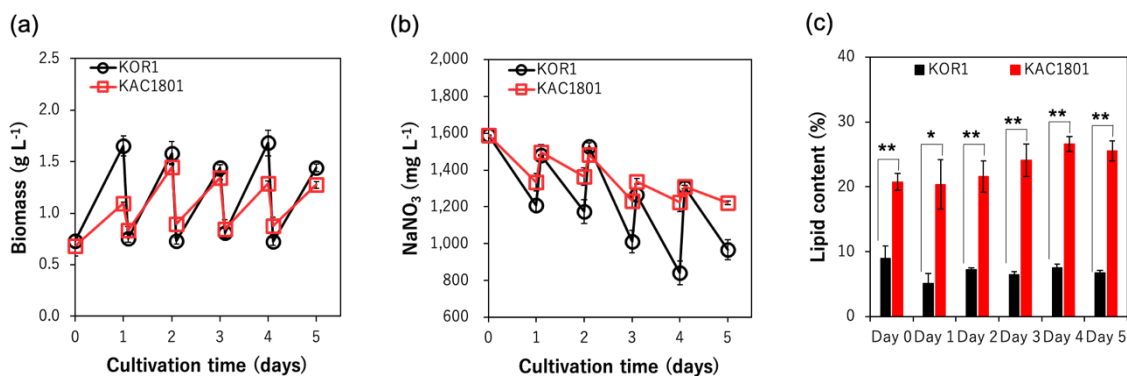


図 3. KAC1801 株と KOR1 株を用いた半連続培養によるオイル生産評価

(a) バイオマス密度 (g L⁻¹) (b) 培地中の窒素源濃度 (mg L⁻¹) (c) オイル含有率 (%)

エラーバーは、3 回の反復実験の標準偏差を示している

(* : p < 0.05, ** : p < 0.01)

表 2. 半連続培養中の KOR1 および KAC1801 のバイオマス生産 (g L⁻¹), 窒素消費 (mg L⁻¹), オイル生産性 (mg L⁻¹ day⁻¹)

株名	培養期間	バイオマス生産 (g L ⁻¹)	窒素消費 (mg L ⁻¹)	オイル生産性 (mg L ⁻¹ day ⁻¹)
KOR1	Day 0 – Day 1	925.1 ± 153.6	379.5 ± 37.1	20.2 ± 15.4
	Day 1 – Day 2	825.0 ± 139.3	303.0 ± 60.1	75.1 ± 23.2
	Day 2 – Day 3	709.2 ± 62.7	515.1 ± 60.9	40.5 ± 6.7
	Day 3 – Day 4	875.7 ± 115.5	423.0 ± 40.1	74.0 ± 5.0
	Day 4 – Day 5	717.9 ± 19.1	340.6 ± 52.0	42.5 ± 6.4
	平均	810.6 ± 95.4	392.2 ± 81.9	50.5 ± 23.7
KAC1801	Day 0 – Day 1	408.4 ± 111.8	247.5 ± 44.7	80.7 ± 22.6
	Day 1 – Day 2	610.6 ± 58.9	133.0 ± 27.6	140.0 ± 19.4
	Day 2 – Day 3	448.5 ± 80.3	251.3 ± 18.7	107.7 ± 20.0
	Day 3 – Day 4	442.6 ± 77.4	113.1 ± 66.4	140.2 ± 34.1
	Day 4 – Day 5	400.1 ± 50.0	89.6 ± 19.9	97.6 ± 21.4
	平均	462.0 ± 21.3	166.9 ± 76.9	116.9 ± 28.1

KAC1801 は、先行研究で報告された窒素制限下での半連続培養に匹敵するオイルを生産した (表 3). 半連続培養を行った先行研究では、窒素飢餓下でオイルを蓄積する微細藻類株を使用していたため、窒素制限条件を採用していた^{[17][18]}. Hsieh *et al.*, (2009) は、尿素制限条件下 (~30

mg L⁻¹) で半連続培養を行い、139 mg L⁻¹day⁻¹ のオイル生産性を達成した。Han *et al.*, (2013) は、NaNO₃制限条件下 (~200 mg L⁻¹) で半連続培養を行い、オイルの蓄積を誘導し、115 mg L⁻¹ day⁻¹ のオイル生産性を達成した。一方、本研究では硝酸塩が豊富な条件下でオイルを蓄積できる変異株を使用し、窒素源が豊富な状態 (> 1,000 mg L⁻¹ NaNO₃) で半連続培養を実施、117 mg L⁻¹ day⁻¹ の生産性を得た。本研究の成果は窒素欠乏条件での培養を経ずとも、オイルの高生産を実現したことを示唆している。

表 3. 半連続培養, 実験室規模での培養によるオイル生産性の比較

株名	窒素源濃度	オイル含有率 (%)	オイル生産性 (mg L ⁻¹ day ⁻¹)	引用
<i>Chlorella</i> sp.	尿素制限下 (~ 30 mg L ⁻¹)	38 – 47	139	[18]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	硝酸制限下 (~ 200 mg L ⁻¹)	20 – 30	115	[17]
<i>Chlamydomonas</i> sp. KAC1801	硝酸存在下 (> 1,000 mg L ⁻¹) 1)	20 – 27	117	本研究

5.4.2 炭水化物, タンパク質, 色素含有率の分析

KAC1801 は半連続培養中に KOR1 よりも多くのオイルを蓄積している事が明らかになった (図 1). この事から, KOR1 株と KAC1801 株では細胞内炭素分布が異なる可能性がある. この仮説を検証するために, 微細藻類の他の主要な細胞成分である炭水化物, タンパク質, および光合成色素含有率を分析した (図 4). クラミドモナス藻類の主要な炭素貯蔵分子の 1 つである炭水化物^{[6][25]}の含有率は, KOR1 と比較して KAC1801 株では類似しているかわずかに低かった (図 4a). KAC1801 のタンパク質含有率は, 培養全体を通して KOR1 のタンパク質含有率よりも有意に低かった (図 4b). KAC1801 のクロロフィルの含有率は, 培養期間全体で KOR1 の含有率よりも有意に低かった (図 4c). 本研究で使用したクラミドモナス藻類はカロテノイドとして β -カロテンとルテインを蓄積する^[25]. KAC1801 の β -カロテン含有率もほぼすべての培養期間全体を通じて大幅に減少した (図 4d). 一方, KAC1801 のルテイン含有率は KOR1 と同等またはわずかに低かった (図 4e). 以上の結果から, KAC1801 株において, オイルの蓄積とは対照的にタンパク質および光合成色素への炭素分配が減少した. この理由として KAC1801 の窒素消費能が KOR1 よりも低かった事が考えられる. KAC1801 株において, 窒素消費量が低下した事により, 細胞内窒素量が低下, それによりオイルの蓄積量の増加・タンパク質および光合成色素の低下といった窒素欠乏応答が引き起こされている可能性が示唆された. 先行研究では, 増殖期でオイルを蓄積可能なナンノクロプシス変異体における窒素同化関連遺伝子の発現低下とタンパク質含有量の減少が報告されている^[21]. また, 本研究で用いた変異株の親株である *Chlamydomonas* sp. 株においては窒素欠乏条件下でクロロフィルや β -カロテン含有量が減少する事が報告されている^[25]. その他, 一般的に微細藻類においてクロロフィルなどの光合成色素・タンパク質といった窒素含有化合物の細胞内含有量は, 窒素欠乏条件下で減少する^{[34][35][36][37]}. 以上のことから, 先行研究においても細胞内窒素量の低下に伴い, 細胞内オイル含有量の増加, 窒素含有化合物量の低下が確認されており, KAC1801 株においても細胞内窒素含有量の低下がオイル含有率の増加に繋がったと考えられる.

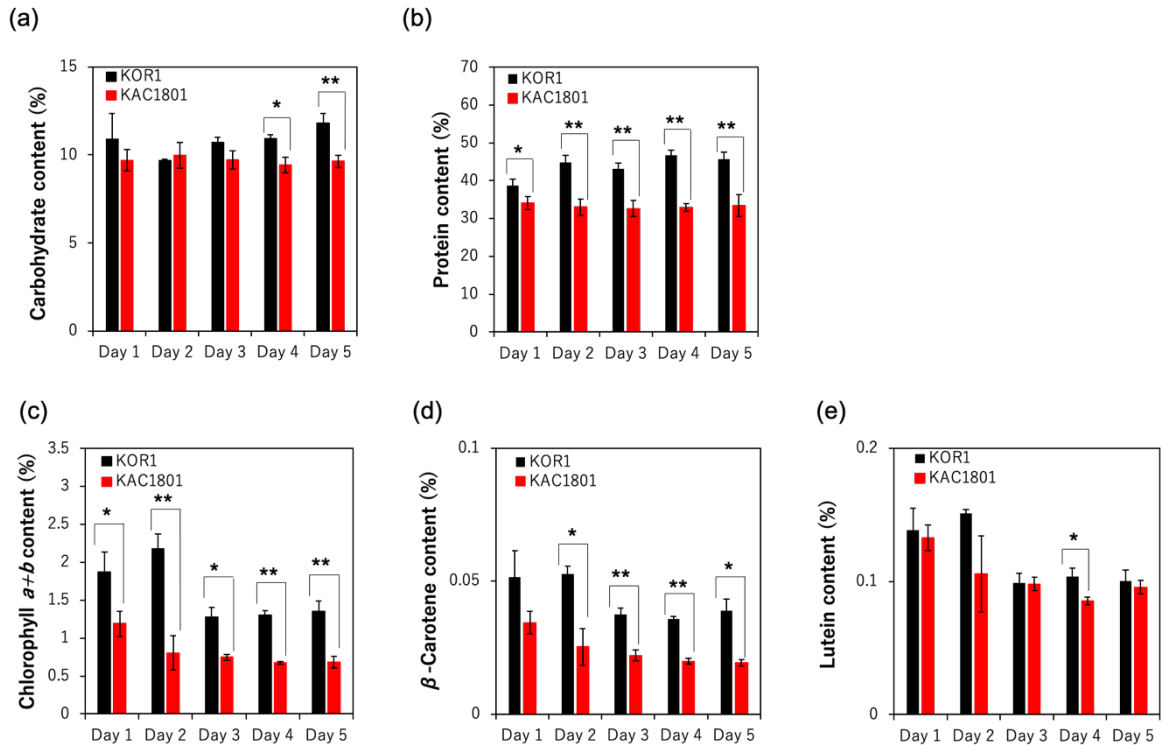


図 4. 半連続培養時におけるクラミドモナス株の細胞構成成分分析結果

(a) 炭水化物含有率 (%) (b) タンパク質含有率 (%) (c) クロロフィル含有率 (%)
 (d) β -カロテン含有率 (e) ルテイン含有率 (%)

エラーバーは3回の反復実験の標準偏差を示している。

(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

5.4.3 窒素源存在下，半連続培養時における代謝物プールサイズの解析

KOR1株とKAC1801株における代謝プロファイルを明らかにするために，半連続培養の1日目から2日目までの期間における代謝物プールサイズをCE-TOFMSで分析した．分析した代謝物とその関連経路を図5に示す．本研究では，カルビン・ベンソン回路，炭水化物合成経路，MEP(2-C-methylerythritol 4-phosphate) 経路，解糖系，オイル合成経路，TCA回路，窒素固定経路に関連する代謝物を分析した．

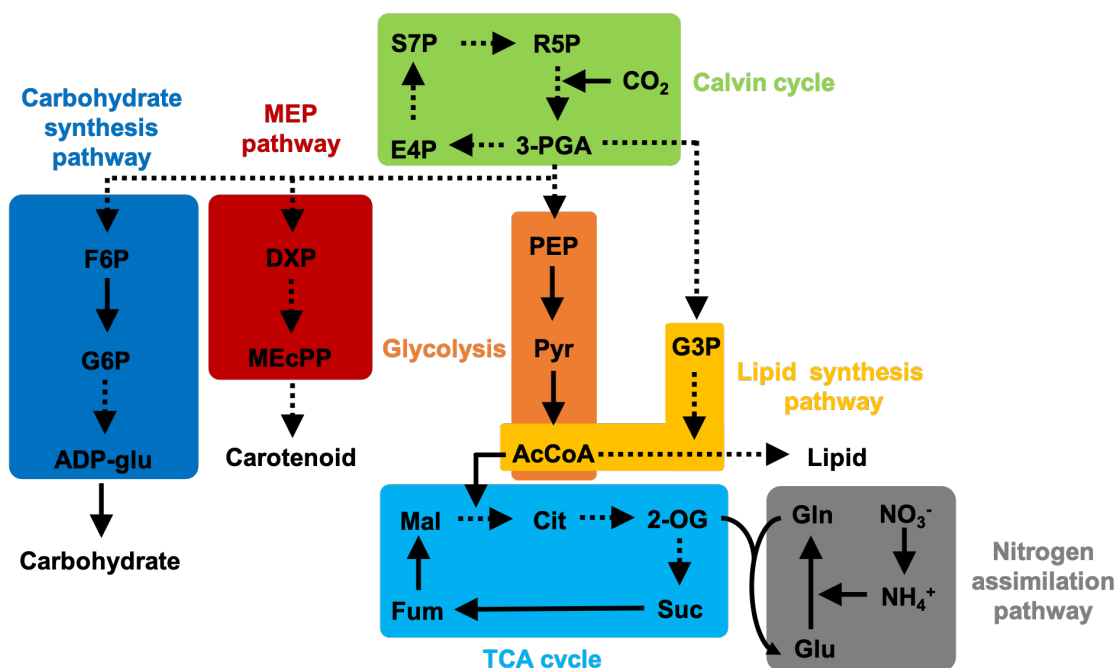


図5. 本研究で解析した代謝物とその関連代謝経路

S7P：セドヘプツロース 7-リン酸，R5P：リボース 5-リン酸，3-PGA：3-ホスホグリセリン酸，E4P：エリトロース 4-リン酸，F6P：フルクトース 6-リン酸，G6P：グルコース 6-リン酸，ADP-glu：ADP-グルコース，DXP：1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸，MEcPP：2-C-メチル-D-エリスリトール-2,4-シクロピロリン酸，PEP：ホスホエノールピルビン酸，Pyr：ピルビン酸，AcCoA：アセチル-CoA，G3P：グリセロール 3-リン酸，Cit：クエン酸，2-OG：2-オキソグルタル酸，Suc：コハク酸，Fum：フマル酸，Mal：リンゴ酸，Gln：グルタミン，Glu：グルタミン酸，TCA 回路：トリカルボン酸回路．

分析の結果 (図6)，カルビン回路ではいくつかの代謝物プールサイズがKAC1801で減少した．KAC1801のセドヘプツロース 7-リン酸 (S7P) と3-ホスホグリセリン酸 (3-PGA) のプールサイズは，KOR1のプールサイズよりも大幅に小さかったのに対し，リボース 5-リン酸 (R5P) とエリトロース 4-リン酸 (E4P) の差は有意ではなかった．これらの結果は，KAC1801の光合成色素含有率が低いことと一致しており，KOR1と比較して炭素固定能が低いことを示唆している．解糖系では，KAC1801のホスホエノールピルビン酸 (PEP) のプールサイズはKOR1のプールサイ

ズよりも有意に小さかった。PEP とは対照的に、ピルビン酸 (Pyr) のプールサイズは KOR1 よりも KAC1801 の方が大きくなる傾向があった。オイル合成に関しては、KOR1 と KAC1801 の間でアセチル CoA (AcCoA) とグリセロール 3-リン酸 (G3P) のプールサイズに違いはなかった。また、フルクトース 6-リン酸 (F6P)、グルコース 6-リン酸 (G6P)、ADP-グルコース (ADP-glu) などのデンプン合成経路の代謝物のプールサイズは KOR1 と KAC1801 の間で類似していた。これは炭水化物含有量の結果と一致している。微細藻類では、カロテノイドの前駆体 (イソペンテニルピロリン酸とジメチルアリルニリン酸) が MEP 経路を介して合成される^[38]。1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸 (DXP) や 2-C-メチル-D-エリスリトール-2,4-シクロピロリン酸 (MEcPP) などの MEP 経路の代謝物プールサイズは、KAC1801 では KOR1 と比較して有意に小さかった。この結果は、KAC1801 でのカロテノイド合成への炭素フラックスの減少を示唆しており、KAC1801 のカロテノイド含有率が低いことと一致している。TCA 回路では、クエン酸 (Cit)、リンゴ酸 (Mal)、およびフマル酸 (Fum) のプールサイズは 12 時間での Fum の有意な増加を除いて KAC1801 では変化しなかった。一方、2-オキソグルタル酸 (2-OG) とコハク酸 (Suc) のプールサイズは KOR1 に比べて KAC1801 の方が小さかった。窒素同化に関して、NO₃⁻ は最初に硝酸レダクターゼ (NR) と硝酸レダクターゼ (NiR) によって NH₄⁺ に変換される^[39]。次に、グルタミンシンターゼ-グルタミン酸シンターゼ (GS/GOGAT) サイクルでは、NH₄⁺ とグルタミン酸 (Glu) を基質としてグルタミンシンターゼ (GS) によりグルタミン (Gln) が合成され、さらに Gln と 2-OG がグルタミン酸シンターゼ (GOGAT) によって Glu に変換される^[40]。KAC1801 の Glu のプールサイズは、KOR1 のプールサイズよりも大きかった。ナンノクロロプシス藻類では、窒素欠乏条件下での GS および GOGAT 遺伝子の発現増加が報告されており、これも窒素飢餓応答の一部である可能性がある^[41]。

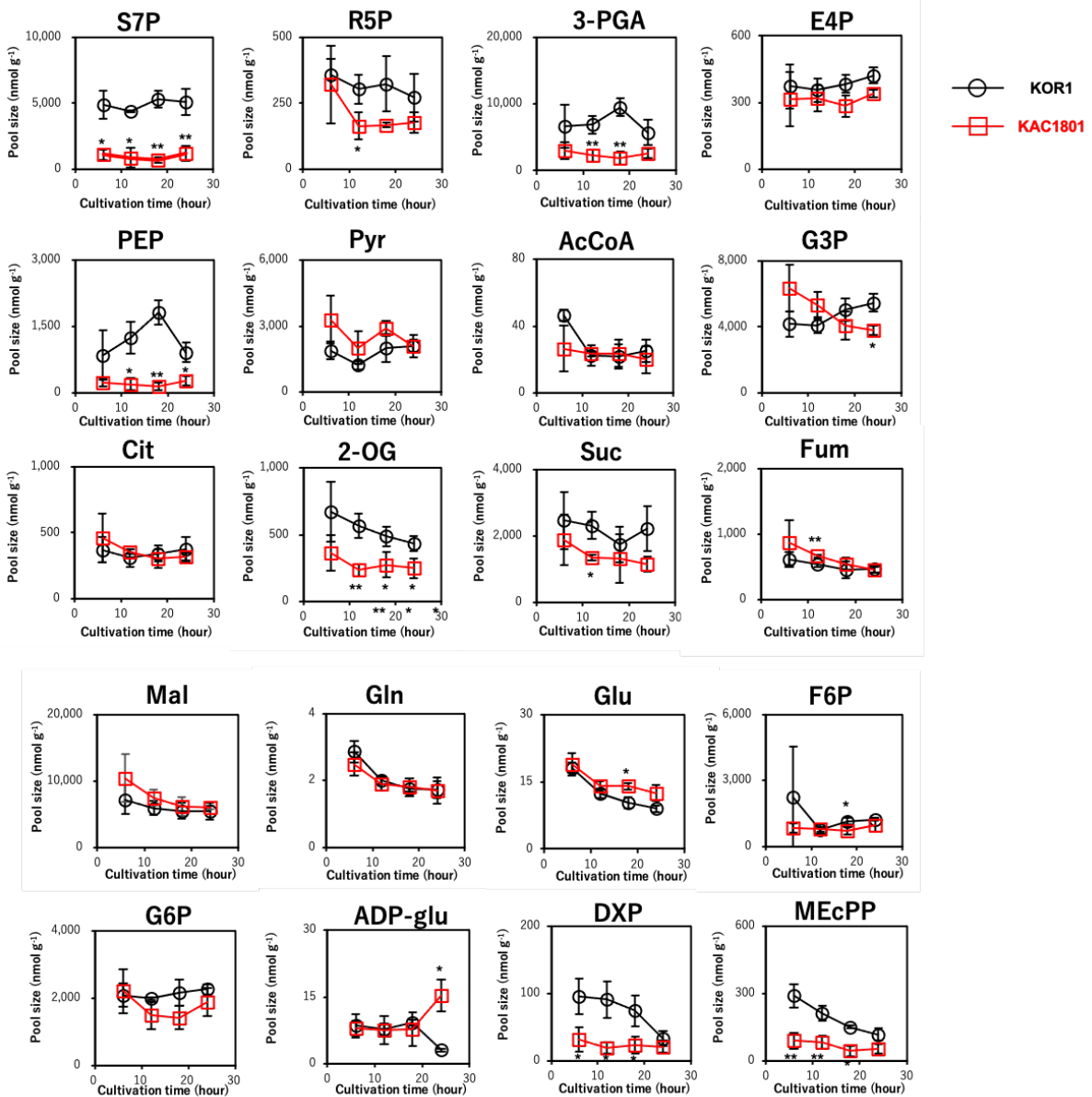


図 6. 半連続培養 1 日目から 2 日目における代謝物プールサイズ

エラーバーは 3 回の反復実験の標準偏差を示している

(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

5.4.4 窒素源存在下、半連続培養時における動的代謝解析

代謝物の動的変化も炭素分布の変化の代謝メカニズムを理解するための重要な情報である^{[6][25]}。代謝プロファイルを動的に評価するために、CO₂ から新たに合成された細胞内代謝物の *in vivo* ¹³C 標識を半連続培養 1.5 日目の細胞を用いて行った (図 7)。カルビン回路では、3-PGA と S7P の ¹³C 標識率が KOR1 と比較して KAC1801 で減少し、KAC1801 で CO₂ 固定が減少したことを示唆している。カルビン回路の下流にある解糖系では、PEP の ¹³C 標識率は変化せず、Pyr の ¹³C 標識率は KOR1 と比較して KAC1801 で減少した。AcCoA や G3P などのオイル合成に関連する代謝物の ¹³C 標識率は、KOR1 と KAC1801 の間で違いはなかった。KAC1801 株ではオイルの蓄積量が多いため、KAC1801 ではオイル合成の下流経路が強化、またはオイルの分解が減少したと仮定された。Cit, 2-OG, Suc, Fum, Mal などの TCA 回路の代謝物の ¹³C 画分は KOR1 と比較して KAC1801 ではほぼ同じか減少した。

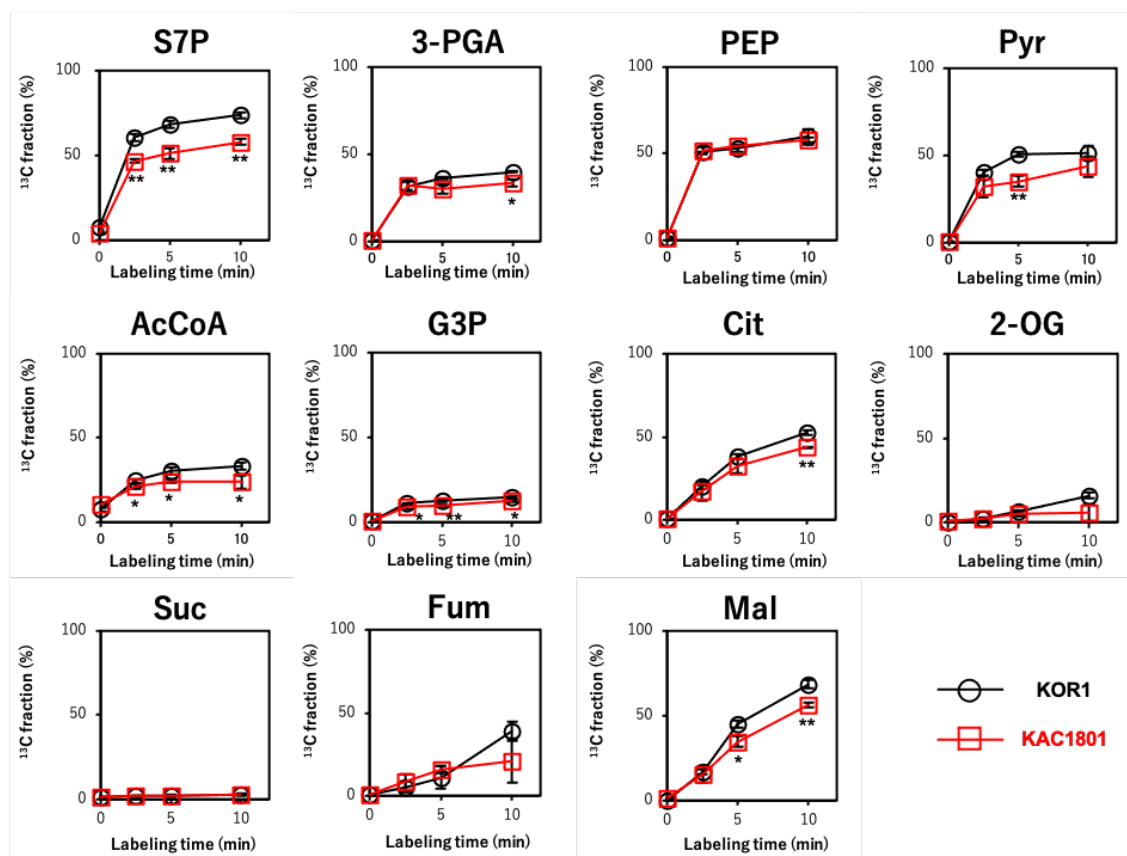


図 7. 半連続培養下における KOR1 株, KAC1801 株の動的代謝プロファイリング
(半連続培養 1.5 日目)

縦軸は ¹³C ラベリング率, 横軸は ¹³C 供給開始後のラベリング時間を示している。エラーバーは 3 回の反復実験の標準偏差を示している。

(* : p < 0.05, ** : p < 0.01)

5.4.5 窒素源存在下、半連続培養条件下における遺伝子発現解析

遺伝子発現レベルでの KAC1801 の炭素分布の変化を解明するために、半連続培養 1.5 日目にサンプリングした細胞を使用して RNA-seq 解析を行い、KAC1801 の網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、合計 899 個の遺伝子が KOR1 と KAC1801 の間で発現変動した遺伝子 (DEGs) として同定された。これらの中で、275 個の遺伝子が発現低下、624 個の遺伝子が KAC1801 で発現増加した。DEG の遺伝子オントロジー (Gene Ontology: GO) 解析により、KAC1801 では 22 のカテゴリーが発現低下され、12 のカテゴリーが発現増加された (図 8)。

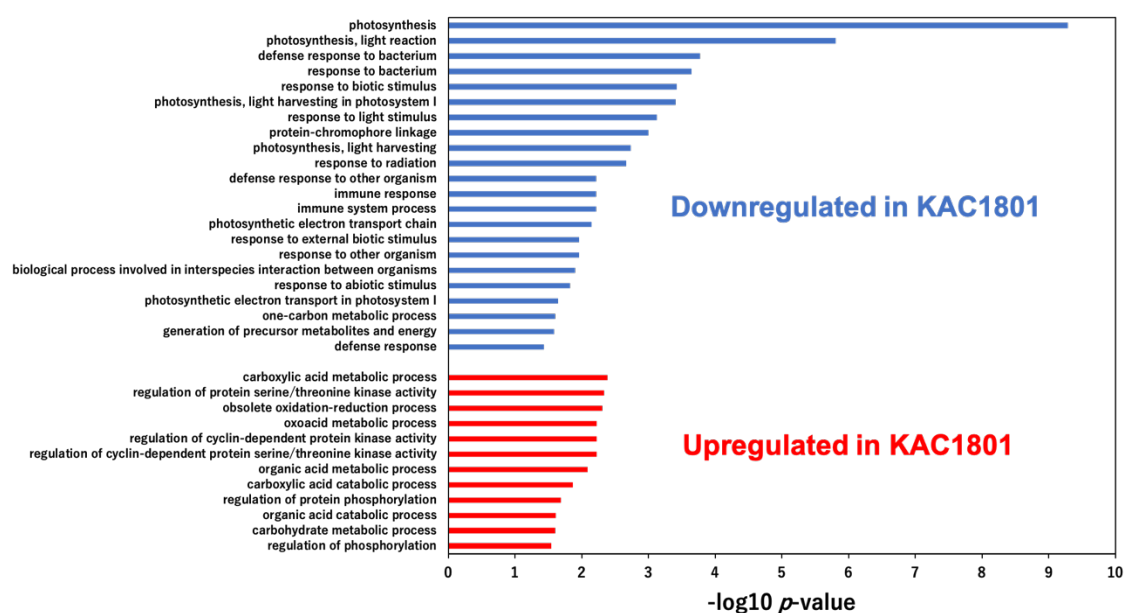


図 8. RNA-seq 分析によって同定された差次的に発現する遺伝子の遺伝子オントロジー分析

発現低下したカテゴリーでは、光合成に関連する遺伝子の発現低下が KAC1801 で最も顕著であった。KAC1801 の発現低下された遺伝子のうち、“Photosynthesis”および“Photosynthesis, light reaction”に属する遺伝子を表 3 に示す。 *Lhcl-2*, *Lhcl-3*, *LHCA2*, *LHCA9*, *LHCB4*, *lhcb5* などのクロロフィル a-b 結合タンパク質は、光収穫で機能する遺伝子である。さらに、*SEBP1* (セドヘプツロース-1,7-ホスファターゼ) や *CHLRE_02g120150v5* (リブロースニリン酸カルボキシラーゼ小サブユニット) などのカルビン回路に関連する遺伝子も同定された (表 4)。これらの結果は光合成活性、特に光収穫と炭素固定が KAC1801 で減少したことを示唆しており、これがバイオマス生産、S7P や 3-PGA などの代謝産物プールのサイズおよび代謝回転が減少した原因である可能性がある。

表 4. “Photosynthesis”および“Photosynthesis, light reaction”カテゴリーに属する KAC1801 で発
現低下した遺伝子リスト

Protein ID (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	Gene IDs assigned by AUGUSTUS	Product	Gene name	log ₂ FC	<i>p</i> - Value	FDR
PNW83466	g3062	Thylakoid membrane protein	-	-3.2	9.4 × 10 ⁻⁶	2.8 × 10 ⁻⁴
PNW86335	g958	PsaN	<i>psaN</i>	-2.6	6.5 × 10 ⁻⁴	8.8 × 10 ⁻³
PNW74812	g11087	Chlorophyll <i>a-b</i> binding protein, chloroplatic	<i>LHCA</i> 2	-2.6	1.4 × 10 ⁻⁴	2.4 × 10 ⁻³
PNW76422	g4297	Chlorophyll <i>a-b</i> binding protein, chloroplatic	<i>Lhcl-2</i>	-2.4	2.8 × 10 ⁻⁴	4.4 × 10 ⁻³
PNW87372	g10441	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygena se small chain	-	-2.4	7.5 × 10 ⁻⁵	1.5 × 10 ⁻³
PNW77185	g6306	Chlorophyll <i>a-b</i> binding protein, chloroplatic	<i>Lhcl-3</i>	-2.2	5.0 × 10 ⁻⁴	7.1 × 10 ⁻³
PNW81164	g4727	Chlorophyll <i>a-b</i> binding protein, chloroplatic	<i>LHCA</i> 9	-2.2	4.8 × 10 ⁻⁴	6.8 × 10 ⁻³
PNW70449	g84	Chlorophyll <i>a-b</i> binding protein, chloroplatic	<i>LHCB</i> 4	-2.1	4.3 × 10 ⁻⁴	6.3 × 10 ⁻³
PNW84943	g6871	Photosystem I reaction center subunit VIII	<i>PSAI</i>	-2.0	5.7 × 10 ⁻⁴	7.9 × 10 ⁻³
PNW76554	g492	Rieske iron-sulfur subunit of the cytochrome b6f complex, chloroplast	<i>petC</i>	-2.0	9.1 × 10 ⁻⁵	1.7 × 10 ⁻³
PNW72305	g10904	Chlorophyll <i>a-b</i> binding protein, chloroplatic	<i>lhcb5</i>	-1.9	4.9 × 10 ⁻⁴	6.9 × 10 ⁻³
PNW79927	g6573	Oxygen evolving enhancer protein 3	<i>PSBQ</i>	-1.7	5.3 × 10 ⁻⁴	7.5 × 10 ⁻³
PNW76414	g6783	Chloroplast ATP synthase delta chain	<i>ATPD</i>	-1.6	6.8 × 10 ⁻⁴	9.1 × 10 ⁻³
PNW74805	g7396	OEE2-like protein of thylakoid lumen	<i>PSBP3</i>	-1.6	1.6 × 10 ⁻⁴	2.7 × 10 ⁻³
PNW85419	g2199	Sedoheptulose-1,7- biphosphatase	<i>SEBP1</i>	-1.6	6.7 × 10 ⁻⁴	9.0 × 10 ⁻³
PNW71360	g3212	Cytochrome c6	<i>petJ</i>	-1.5	1.0 × 10 ⁻⁴	1.9 × 10 ⁻³

ストレス応答に関連する遺伝子, すなわち“defense response to bacterium”, “response to bacterium”, “response to biotic stimulus”, “response to radiation”, “defense response to other organism”, “immune response”, “immune system process”, “response to external biotic stimulus”, “response to other organism”, “biological process involved in interspecies interaction between organisms”, “response to abiotic stimulus”, 及び “defense response”に属する遺伝子も同様に KAC1801 株で発現が低下されていた (図 8). 上記のうち, Rubisco アクチベース (*Rca*), シトクロム b6f 複合体(*petC*), ATP シンターゼ(*ATPD*), ペプチジル-プロリルシス/トランスイソメラーゼ (*CYN38*) など光合成に関連していた(表 5). これらの遺伝子は窒素欠乏条件下で *Dunaliella tertiolecta* と *Chlamydomonas reinhardtii* で発現低下することが報告されている^{[42][43]}. 光化学系 II の構築と修復に寄与する *CYN38* 遺伝子^[44]は, KAC1801 で発現が低下していた. この遺伝子は, *C. reinhardtii* のを窒素欠乏条件下で培養された際も発現が低下した遺伝子としても報告されている^[45].

表 5. ストレス応答に関連する遺伝子カテゴリーに含まれる
KAC1801 で発現低下した遺伝子リスト

Protein ID (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	Gene IDs assigned by AUGUSTUS	Product	Gene name	Log ₂ FC	<i>P</i> - Value	FDR
PNW84312	g5506	Rubisco activase	<i>Rca</i>	-3.5	3.6 × 10 ⁻⁶	1.3 × 10 ⁻⁴
PNW76554	g492	Rieske iron-sulfur subunit of the cytochrome b6f complex, chloroplast	<i>petC</i>	-2.0	9.1 × 10 ⁻⁵	1.7 × 10 ⁻³
PNW85507	g2317	Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase, cyclophilin-type	<i>CYN38</i>	-1.9	4.7 × 10 ⁻⁴	6.7 × 10 ⁻³
PNW77146	g6279	Inorganic pyrophosphatase	<i>ppa1</i>	-1.9	1.1 × 10 ⁻⁴	2.0 × 10 ⁻³
PNW76414	g6783	Chloroplast ATP synthase delta chain	<i>ATPD</i>	-1.6	6.8 × 10 ⁻⁴	9.1 × 10 ⁻³
PNW85419	g2199	Sedoheptulose-1,7- bisphosphatase	<i>SEBP1</i>	-1.6	6.7 × 10 ⁻⁴	9.0 × 10 ⁻³
PNW82314	g9690	SCP domain- containing protein	-	-4.2	8.9 × 10 ⁻⁷	4.6 × 10 ⁻⁵
PNW88037	g4289	Predicted protein	-	-4.3	1.3 × 10 ⁻⁵	3.4 × 10 ⁻⁴
PNW83466	g3062	Thylakoid membrane protein	-	-3.2	9.4 × 10 ⁻⁶	2.8 × 10 ⁻⁴
PNW74812	g11087	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>LHCA2</i>	-2.6	1.4 × 10 ⁻⁴	2.4 × 10 ⁻³
PNW76422	g4297	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>LhcI-2</i>	-2.4	2.8 × 10 ⁻⁴	4.4 × 10 ⁻³
PNW77185	g6306	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>LhcI-3</i>	-2.2	5.0 × 10 ⁻⁴	7.1 × 10 ⁻³
PNW81164	g4727	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>LHCA9</i>	-2.2	4.8 × 10 ⁻⁴	6.8 × 10 ⁻³
PNW70449	g84	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>LHCB4</i>	-2.1	4.3 × 10 ⁻⁴	6.3 × 10 ⁻³
PNW72305	g10904	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>lhcb5</i>	-1.9	4.9 × 10 ⁻⁴	6.9 × 10 ⁻³

一方、カルボン酸の代謝過程に関連する遺伝子は、KAC1801 で発現増加されることが示された (図 9)。具体的には、*CIS2* (クエン酸シンターゼ)、*ICL1* (イソクエン酸リアーゼ)、*MS1* (リンゴ酸シンターゼ)、*MDH2* (リンゴ酸デヒドロゲナーゼ) などのグリオキシル酸回路に関与する遺伝子の発現増加が確認された (図 9, 表 6)。グリオキシル酸回路は、イソクエン酸 (Icit) からグリオキシル酸への変換から始まり、グリオキシル酸はリンゴ酸シンターゼによってリンゴ酸 (Mal) に変換される。オキサロ酢酸 (OAA) は、リンゴ酸デヒドロゲナーゼによって Mal から合成され、クエン酸シンターゼによってクエン酸 (Cit) に変換される。このサイクルは TCA 回路の一部であり、2つの酸化反応のバイパスとして機能^{[46][47]}し、CO₂ の発生を防ぐ。これらの遺伝子の発現増加は、KAC1801 のグリオキシル酸回路の強化を示唆した。KAC1801 は光合成能力が低下している事から、KAC1801 は細胞状態を維持する為にグリオキシル酸回路を活性化することで炭素源の不必要な放出を防ぐと仮定された。

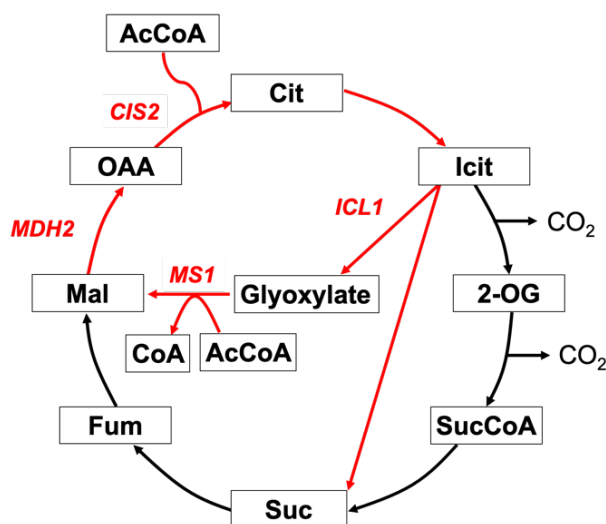


図 9. KAC1801 で発現増加されたグリオキシル酸回路に関連する遺伝子

グリオキシル酸回路に関与する反応は赤い矢印で示されている。

Icit : イソクエン酸, SucCoA : スクシニル CoA, CoA : 補酵素 A, OAA : オキサロ酢酸

表 6. KAC1801 で発現増加する”Carboxylic acid metabolic process”カテゴリーに属する遺伝子

Protein ID (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	Gene IDs assigned by AUGUSTUS	Product	Gene name	log ₂ FC	<i>P</i> - Value	FDR
PNW82533	g3710	Isocitrate lyase	<i>ICL1</i>	6.3	2.1 × 10 ⁻⁹	7.0 × 10 ⁻⁷
PNW84433	g6394	Malate synthase	<i>MS1</i>	5.2	2.6 × 10 ⁻⁹	8.1 × 10 ⁻⁷
PNW77089	g10773	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD ⁺ dependent]	-	3.7	3.6 × 10 ⁻⁸	4.8 × 10 ⁻⁶
PNW71982	g10416	Acyl-coenzyme A oxidase	-	3.5	2.3 × 10 ⁻⁸	3.6 × 10 ⁻⁶
PNW77134	g2963	Threonine aldolase family protein	-	3.4	2.2 × 10 ⁻⁷	1.7 × 10 ⁻⁵
PNW78716	g5722	Aspartate aminotransferase	<i>AST1</i>	3.2	1.7 × 10 ⁻⁸	2.9 × 10 ⁻⁶
PNW85164	g2104	Cysteine dioxygenase	<i>CDO1</i>	2.8	6.2 × 10 ⁻⁵	1.3 × 10 ⁻³
PNW87457	g1547	<i>N</i> -Acetylglutamate synthase	<i>LCI8</i>	2.7	2.1 × 10 ⁻⁶	8.8 × 10 ⁻⁵
PNW76677	g6902	Acyl-coenzyme A oxidase	-	2.6	9.2 × 10 ⁻⁶	2.7 × 10 ⁻⁴
PNW71299	g11698	EF-hand domain- containing protein	-	2.4	7.8 × 10 ⁻⁵	1.5 × 10 ⁻³
PNW74464	g11056	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	<i>GAPC</i>	2.3	4.2 × 10 ⁻⁵	9.1 × 10 ⁻⁴
PNW70527	g9413	Acetyl-CoA acyltransferase	<i>ATO1</i>	2.0	7.0 × 10 ⁻⁶	2.2 × 10 ⁻⁴
PNW75961	g8276	Phosphofructokinase family protein	<i>PFK2</i>	1.9	2.4 × 10 ⁻⁵	5.9 × 10 ⁻⁴
PNW85759	g1229	Acetohydroxyacid dehydratase	<i>AAD1</i>	1.9	1.5 × 10 ⁻⁵	4.0 × 10 ⁻⁴
PNW82425	g3665	Arogenate/prephenate dehydrogenase	<i>AGD1</i>	1.9	6.6 × 10 ⁻⁶	2.1 × 10 ⁻⁴
PNW77127	g2953	Malate dehydrogenase	<i>MDH2</i>	1.9	3.5 × 10 ⁻⁵	7.8 × 10 ⁻⁴
PNW72803	g9028	SOR_SNZ domain- containing protein	-	1.8	1.5 ×	3.9 ×

PNW75447	g7819	6-Phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	<i>gnd</i>	1.7	1.0 × 10 ⁻⁵	2.9 × 10 ⁻⁴
PNW85614	g2474	Malate dehydrogenase	<i>MDH2</i>	1.6	5.6 × 10 ⁻⁵	1.2 × 10 ⁻³
PNW75399	g7836	Cysteine desulfurase	<i>SUFS1</i>	1.5	3.1 × 10 ⁻⁴	4.8 × 10 ⁻³
PNW70105	g11069	Pseudouridine synthase domain-containing protein	-	1.7	1.4 × 10 ⁻⁴	2.4 × 10 ⁻³

KAC1801 は β -カロテンの含有量と MEP 経路への炭素フラックスを減少させたが、カロテノイド合成に関連する遺伝子発現は KAC1801 と KOR1 の間で違いはなかった。この関係についてはさらなる研究が必要であるが、KAC1801 の β -カロテン含有量が低い理由の 1 つは、窒素消費量が少ないことであるとの仮説が立てられる。先行研究において、クラミドモナス属の β -カロテン含有量は、窒素が豊富な状態と比較して、窒素が不足している状態では減少した^[25]。

KAC1801 は KOR1 よりも有意に高いオイル含有率を示した (図 3c) 一方、オイル合成に関連する遺伝子の発現は KAC1801 と KOR1 の間で違いが見られなかった。また、オイル蓄積の原因となる遺伝子を特定するために KAC1801 の変異解析を実施し、811 個の CDS (CoDing Sequence) における変異を特定したが、同定された遺伝子のほとんどは機能的に特徴付けられておらず、原因遺伝子の特定には至らなかった。窒素源が豊富な条件下での KAC1801 のオイル蓄積メカニズムを詳細に解明するにはさらなる研究が必要だが、本研究において、KAC1801 はオイル合成が強化、あるいはオイル分解が減少されていると仮定された。先行研究において、*Cyanidioschyzon merolae* では、グリセロール 3-リン酸アシルトランスフェラーゼ *GPAT1* の過剰発現により成長阻害なしでオイル生産性が 56.1 倍増加した^[22]。*Chlamydomonas reinhardtii* では、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (*DGAT1* および *DGAT2*)、リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (*PDAT*)、およびオイル合成に寄与するリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (*LPAT*) をコードする遺伝子が窒素欠乏条件下で発現増加されている^{[48][49]}。さらに、オイル分解に寄与するホスホリパーゼ A₂ をコードする遺伝子のノックアウトは、増殖条件下でのクラミドモナスのオイル生産性を向上させる事が報告されている^[50]。以上のことから、現状微細藻類におけるオイル増産機構はオイル合成経路の強化、あるいはオイル分解の抑制であると言われており、KAC1801 株においてもどちらかに該当している可能性がある。

5.5 結論

本研究は、*Chlamydomonas* sp. KAC1801 の窒素の供給と細胞密度を最適化することによって半連続的かつ安定したオイル生産を達成した。KAC1801 は、5 日間の半連続培養中に常に乾燥重量あたり 20 %を超えるオイルを蓄積し、 $117 \text{ mgL}^{-1} \text{ day}^{-1}$ のオイル生産性を達成した。これは、窒素制限条件下で試験を行った先行研究で得られた生産性に匹敵する。メタボローム解析、トランスクリプトーム解析から、KAC1801 では微細藻類を窒素欠乏条件で培養した時のような応答をしている事が明らかになった。本研究は微細藻類から一段階でオイルを生産する方法を開発し、窒素源が豊富な条件下での継続的なオイル生産に寄与しうる洞察を提供した。

引用

- [1] Chisti, Yusuf. "Biodiesel from microalgae." *Biotechnology advances* 25.3 (2007): 294-306.
- [2] Ghasemi, Y., *et al.* "Microalgae biofuel potentials." *Applied Biochemistry and Microbiology* 48.2 (2012): 126-144.
- [3] Yeh, Kuei-Ling, and Jo-Shu Chang. "Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31." *Bioresource technology* 105 (2012): 120-127.
- [4] Ma, Yubin, *et al.* "Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production." *Bioresource technology* 167 (2014): 503-509.
- [5] Xin, Li, *et al.* "Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp." *Bioresource technology* 101.14 (2010): 5494-5500.
- [6] Ho, Shih-Hsin, *et al.* "Dynamic metabolic profiling together with transcription analysis reveals salinity-induced starch-to-lipid biosynthesis in alga *Chlamydomonas* sp. JSC4." *Scientific reports* 7.1 (2017): 1-11.
- [7] Ho, Shih-Hsin, *et al.* "Dynamic metabolic profiling of the marine microalga *Chlamydomonas* sp. JSC4 and enhancing its oil production by optimizing light intensity." *Biotechnology for biofuels* 8.1 (2015): 1-17.
- [8] Liu, Junhan, *et al.* "Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation." *Applied biochemistry and biotechnology* 166.8 (2012): 2127-2137.
- [9] Takagi, Mutsumi, and Toshiomi Yoshida. "Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells." *Journal of bioscience and bioengineering* 101.3 (2006): 223-226.
- [10] Wang, Tao, *et al.* "Salt stress induced lipid accumulation in heterotrophic culture cells of *Chlorella protothecoides*: mechanisms based on the multi-level analysis of oxidative response, key enzyme activity and biochemical alteration." *Journal of biotechnology* 228 (2016): 18-27.
- [11] Gao, Yingying, Maochun Yang, and Changhai Wang. "Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae." *Bioresource Technology* 147 (2013): 484-491.
- [12] Fernandes, Bruno, *et al.* "Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*." *Bioresource technology* 144 (2013): 268-274.
- [13] Xin, Li, Hu Hong-Ying, and Zhang Yu-Ping. "Growth and lipid accumulation properties of a

freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature." *Bioresource technology* 102.3 (2011): 3098-3102.

[14] Ma, Ruijuan, *et al.* "Co-production of lutein and fatty acid in microalga *Chlamydomonas* sp. JSC4 in response to different temperatures with gene expression profiles." *Algal Research* 47 (2020): 101821.

[15] Breuer, Guido, *et al.* "The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains." *Bioresource Technology* 124 (2012): 217-226.

[16] Rodolfi, Liliana, *et al.* "Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low - cost photobioreactor." *Biotechnology and bioengineering* 102.1 (2009): 100-112.

[17] Hsieh, Chih-Hung, and Wen-Teng Wu. "Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation." *Bioresource technology* 100.17 (2009): 3921-3926.

[18] Han, Feifei, *et al.* "Enhanced lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* through the culture strategy of semi-continuous cultivation with nitrogen limitation and pH control by CO₂." *Bioresource technology* 136 (2013): 418-424.

[19] Yang, Haijian, Qiaoning He, and Chunxiang Hu. "Feasibility of biodiesel production and CO₂ emission reduction by *Monoraphidium dybowskii* LB50 under semi-continuous culture with open raceway ponds in the desert area." *Biotechnology for biofuels* 11.1 (2018): 1-14.

[20] Tan, Kenneth Wei Min, and Yuan Kun Lee. "The dilemma for lipid productivity in green microalgae: importance of substrate provision in improving oil yield without sacrificing growth." *Biotechnology for biofuels* 9.1 (2016): 1-14.

[21] Ajjawi, Imad, *et al.* "Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator." *Nature biotechnology* 35.7 (2017): 647-652.

[22] Fukuda, Satoshi, *et al.* "Accelerated triacylglycerol production without growth inhibition by overexpression of a glycerol-3-phosphate acyltransferase in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*." *Scientific reports* 8.1 (2018): 1-12.

[23] Südfeld, Christian, *et al.* "High-throughput insertional mutagenesis reveals novel targets for enhancing lipid accumulation in *Nannochloropsis oceanica*." *Metabolic Engineering* 66 (2021): 239-258.

[24] Oyama, Tomoki, *et al.* "Development of mutant microalgae that accumulate lipids under nitrate-replete conditions." *Algal Research* 60 (2021): 102544.

[25] Kato, Yuichi, *et al.* "Enhancing carbohydrate repartitioning into lipid and carotenoid by disruption of microalgae starch debranching enzyme." *Communications biology* 4.1 (2021): 1-11.

[26] Berges, John A., Daniel J. Franklin, and Paul J. Harrison. "Evolution of an artificial seawater medium: improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades." *Journal of Phycology* 37.6 (2001): 1138-1145.

- [27] Collos, Y., *et al.* "An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures." *Journal of Applied Phycology* 11.2 (1999): 179-184.
- [28] Ma, Xiaonian, *et al.* "Physiological and biochemical changes reveal stress-associated photosynthetic carbon partitioning into triacylglycerol in the oleaginous marine alga *Nannochloropsis oculata*." *Algal Research* 16 (2016): 28-35.
- [29] Li, Yuelian, *et al.* "Storage carbon metabolism of *Isochrysis zhangjiangensis* under different light intensities and its application for co-production of fucoxanthin and stearidonic acid." *Bioresource technology* 282 (2019): 94-102.
- [30] Hasunuma, Tomohisa, *et al.* "Single-stage astaxanthin production enhances the nonmevalonate pathway and photosynthetic central metabolism in *Synechococcus* sp. PCC 7002." *ACS synthetic biology* 8.12 (2019): 2701-2709.
- [31] Hasunuma, Tomohisa, *et al.* "Dynamic metabolic profiling of cyanobacterial glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion." *Journal of experimental botany* 64.10 (2013): 2943-2954.
- [32] Robinson, Mark D., Davis J. McCarthy, and Gordon K. Smyth. "edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data." *bioinformatics* 26.1 (2010): 139-140.
- [33] Reimand, Jüri, *et al.* "g: Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update)." *Nucleic acids research* 44.W1 (2016): W83-W89.
- [34] Pancha, Imran, *et al.* "Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077." *Bioresource technology* 156 (2014): 146-154.
- [35] Sun, Han, *et al.* "Novel insight of carotenoid and lipid biosynthesis and their roles in storage carbon metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Bioresource Technology* 263 (2018): 450-457.
- [36] Shaikh, Kashif Mohd, *et al.* "Molecular profiling of an oleaginous trebouxiophycean alga *Parachlorella kessleri* subjected to nutrient deprivation for enhanced biofuel production." *Biotechnology for biofuels* 12.1 (2019): 1-15.
- [37] Ito, Takuro, *et al.* "Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxiophycean alga in nitrogen-deficient conditions." *Metabolomics* 9.1 (2013): 178-187.
- [38] Paniagua-Michel, Jesús, Jorge Olmos-Soto, and Manuel Acosta Ruiz. "Pathways of carotenoid biosynthesis in bacteria and microalgae." *Microbial carotenoids from bacteria and microalgae*(2012): 1-12.
- [39] Crawford, Nigel M. "Nitrate: nutrient and signal for plant growth." *The plant cell* 7.7 (1995): 859.
- [40] Fischer, Petra, and Uwe Klein. "Localization of nitrogen-assimilating enzymes in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant Physiology* 88.3 (1988): 947-952.
- [41] Carpinelli, Elisa Corteggiani, *et al.* "Chromosome scale genome assembly and transcriptome

- profiling of *Nannochloropsis gaditana* in nitrogen depletion." *Molecular plant* 7.2 (2014): 323-335.
- [42] Tan, Kenneth Wei Min, *et al.* "Nitrogen-induced metabolic changes and molecular determinants of carbon allocation in *Dunaliella tertiolecta*." *Scientific reports* 6.1 (2016): 1-13.
- [43] Lee, Do Yup, *et al.* "System response of metabolic networks in *Chlamydomonas reinhardtii* to total available ammonium." *Molecular & Cellular Proteomics* 11.10 (2012): 973-988.
- [44] Colina, Francisco, *et al.* "Low UV-C stress modulates *Chlamydomonas reinhardtii* biomass composition and oxidative stress response through proteomic and metabolomic changes involving novel signalers and effectors." *Biotechnology for biofuels* 13.1 (2020): 1-19.
- [45] Miller, Rachel, *et al.* "Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism." *Plant physiology* 154.4 (2010): 1737-1752.
- [46] Eastmond, Peter J., and Ian A. Graham. "Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds." *Trends in plant science* 6.2 (2001): 72-78.
- [47] Lauersen, Kyle J., *et al.* "Peroxisomal microbodies are at the crossroads of acetate assimilation in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*." *Algal Research* 16 (2016): 266-274.
- [48] Boyle, Nanette R., *et al.* "Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*." *Journal of Biological Chemistry* 287.19 (2012): 15811-15825.
- [49] Lv, Hexin, *et al.* "Transcriptome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* during the process of lipid accumulation." *Genomics* 101.4 (2013): 229-237.
- [50] Shin, Ye Sol, *et al.* "Targeted knockout of phospholipase A₂ to increase lipid productivity in *Chlamydomonas reinhardtii* for biodiesel production." *Bioresource technology* 271 (2019): 368-374.

第6章 事業戦略

6.1 事業戦略概要

筆者が掲げるイノベーションアイデアは、科学技術上のブレイクスルーである「海水を用いて一段階で微細藻類由来オイルを生産する技術」を応用し、「石油化学品原料(ナフサ)や石油由来燃料(SAF, ディーゼル燃料)として利用普及させる」事であった。第4章・第5章では、従来のオイル生産方法が抱える「細胞増殖とオイル蓄積がトレードオフの関係にある」、「細胞状態が悪化した条件でしかオイルを生産することができない」等の課題を解決し、微細藻類から簡易かつ安定的にオイルを生産する方法(科学技術上のブレイクスルー)を示した。しかしながら、微細藻類由来オイルの利用普及を実現する為には、さらなる生産性向上やその他関連技術の開発等が必要となる。本事業では、微細藻類由来オイルの利用普及を実現すべく、科学技術上のブレイクスルーを応用した育種、屋外環境を想定した培養プロセス検討、オイル抽出残渣の活用法検討、受託研究、コンサルティングを行う「基盤技術開発・提供企業」を設立し、「微細藻類を用いたオイル(燃料・化学品用途)生産を目指している者」に対してサービスを実施する。サービス提供先は本事業から提供されたサービスを利用して本事業とともに製造体制を構築、オイルを製造し、販売する事で微細藻類由来オイルの利用普及を実現させていく(図1)。

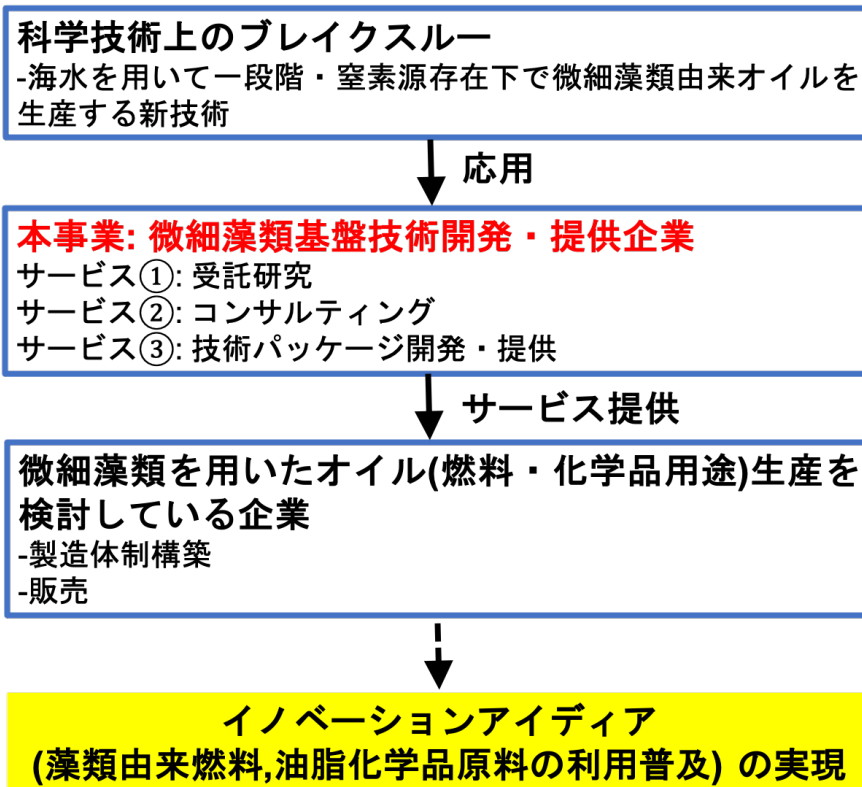


図1. 本事業における事業戦略

6.2 保有資源の強みを活かした事業方針の設定

事業戦略を立案するためには、自社の強みとなる部分はどこなのかを理解する必要がある。そこで筆者は微細藻類からオイルを生産・販売するまでに想定される流れ（図2）を調査し、筆者が強みを活かせる領域はどの部分になるのかを定義した。微細藻類からオイルを生産する際、第一に、自然界からオイルを高生産する藻類株を単離し、対象株とする。その後、生産性向上や生産プロセスを効率化する為の育種を実施し、培養方法の検討（供給栄養源の検討、ベンチスケール培養技術の開発等）を行う。培養方法を検討した後は培養規模のスケールアップ（大規模培養）を行う。培養後は藻体を回収し、細胞からオイル抽出（オイル回収）を行う。抽出されたオイルはバイオジェット燃料（SAF）、化学品原料（バイオナフサ）等の使用用途に応じて加工（変換）される。その後、流通・消費者によって利用されることによって社会的な価値を有するようになる^[1]。この一連の流れで、株選択～培養方法の検討は「研究開発」、大量培養～貯蔵・変換は「製造」、流通は「販売」、利用は「消費」と分類できる。この中で、筆者が強みを発揮できる領域は育種と培養方法検討といった「研究開発部分」である。よって、本事業では研究開発要素に強みを持つ企業として事業を行っていく事とした。



図2. 微細藻類からオイルを製造・消費するまでの想定バリューチェーンと筆者の保有資源（科学技術上のブレイクスルー）が強みを発揮できる領域

6.3 事業内容

本事業が強みを発揮できる領域の検討結果から、本事業では研究開発要素に強みを持つ企業として事業を行っていく事とした。具体的な内容として、筆者は「微細藻類からオイル生産を検討している企業に対して、基盤技術を開発・提供する事業」を提案する。サービス提供内容は、主に①. 受託研究、②. コンサルティング、③. 技術パッケージの開発・提供である（図3）。

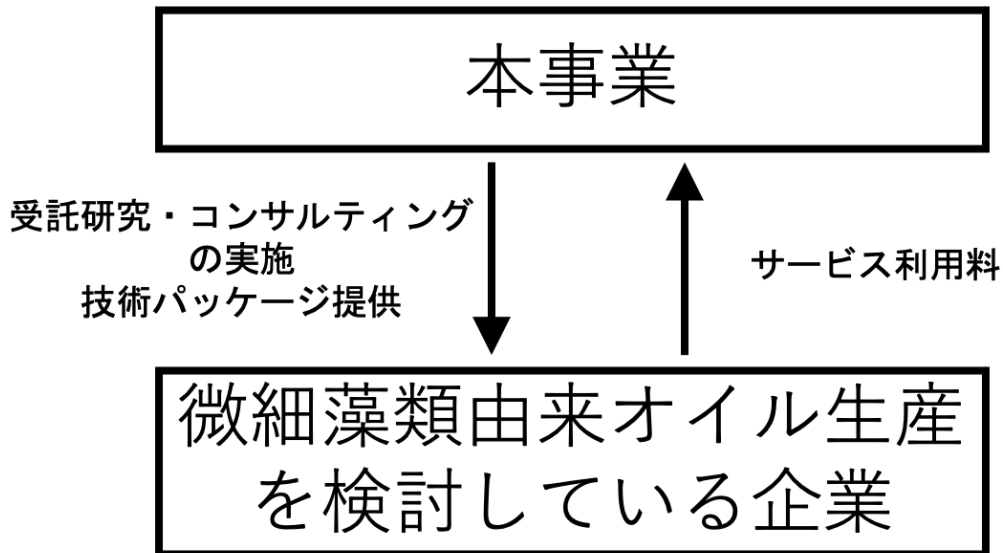


図3. 本事業における提供サービス

① . 受託研究

微細藻類オイル事業に参入している企業や今後微細藻類オイル事業へ参入を検討している企業に向けて、受託研究を実施する。受託研究内容は基礎研究～応用研究まで顧客から指定された幅広い領域の研究を受託する。

② . コンサルティング

微細藻類オイル事業に参入している企業、これから参入を検討している企業に向けて、コンサルティングを実施する。具体的には文献調査に基づく技術動向の調査・研究戦略の立案、微細藻類を用いた事業化に関する知見提供等を行っていく事で微細藻類由来オイル生産を検討している企業の事業化をサポートする。

③ . 技術パッケージ開発・提供

微細藻類からオイル生産を行う上で重要となる技術パッケージを開発し、提供する。技術パッケージ開発の詳細は第7章技術戦略で述べるため、本項ではそれぞれの開発項目における概要を示す。

③-1. オイル生産に適した藻類変異株の創出

第4章・第5章（科学技術上のブレイクスルー）で用いたクラミドモナス株に加え、産業利用が期待されている多種多様な微細藻類に対し、科学技術上のブレイクスルーのコンセプトである「海水を用いた一段階オイル生産」能を付与するとともに、屋外環境特有の環境変動に対応可能（屋外環境に適応可能）な藻類株の創出を行う。このようなサービスを提供する理由として、現状産業利用が期待されている微細藻類の多くは培養に貴重な淡水資源を必要としている事、複数工程の複雑な方法でオイルを生産している事、屋外での培養は屋内環境での培養と比較してオイルの生産性が低下する事が挙げられる。そこで本事業で「海水を用いた一段階オイル生産が可能な藻類株を創出」するとともに、屋外環境での培養に適した株（屋外環境でオイル生産性を低下させない株）を創出し、屋外環境で簡易的にオイルを高生産可能な株を創出する（図4）。

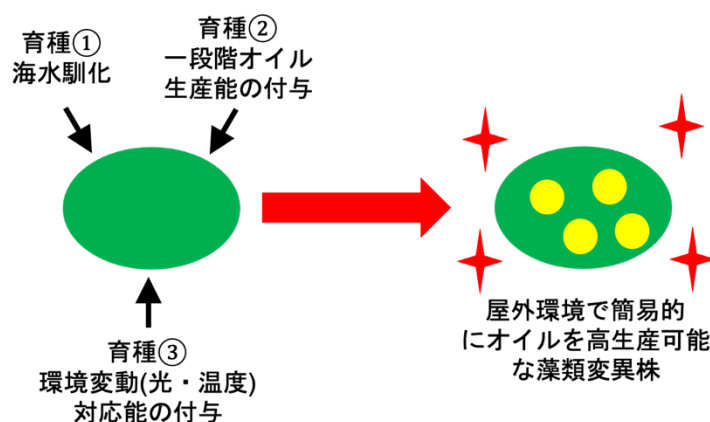


図4. オイル生産に適した藻類株の創出

③-2. 屋外での培養を見据えた培養プロセス検討

微細藻類からオイルを生産する際、屋外環境での培養が求められる。その理由として、燃料や化学品原料として用いられるオイルが非常に安価（¥50~100/L）であるといった事が挙げられる。微細藻類を培養する方法として、光条件・温度条件を一定に保って培養する閉鎖系での培養、屋外で農業のように培養するといった二通りの培養方法が挙げられる。閉鎖系での培養は光・温度条件等を一定に保つ事ができるものの、環境制御にコストがかかる。この事から、オイル生産藻類の培養は屋外環境で行う必要がある。そこで本事業では、屋外環境でのオイル生産に向け、③-1で育種した微細藻類変異株の培養プロセス検討を行う。具体的には、光・温度条件を自在に操作可能な培養装置を用い、研究室内での小規模培養試験を実施する。その後、培養規模をベンチスケール規模にスケールアップするとともに、光・温度条件を自在に操作可能な培養装置（レースウェイポンド、チューブ型リアクター、パネル型リアクター）を用いて培養試験を行い、屋外環境を想定したベンチスケール規模での培養方法を確立させていく。小規模培養試験、大規模培養試

験の結果から明らかになった課題に関しては育種やその他培養方法の再検討等を通じて、ベンチスケール規模での培養方法を最適化していく。

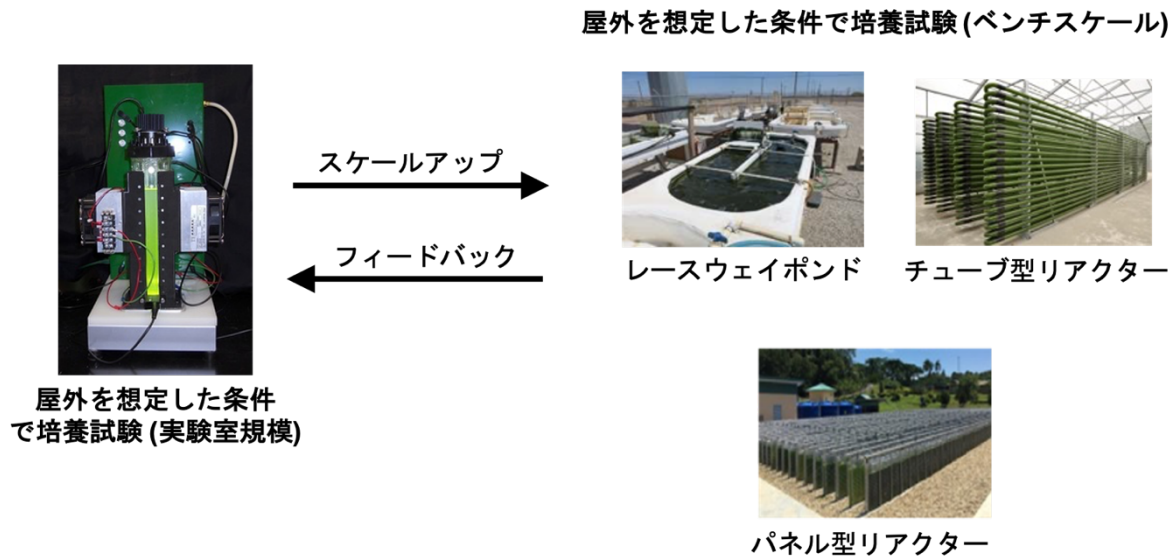


図 5. 屋外環境を想定した培養プロセス検討

実験室規模で使用する培養装置の図は BIODIESEL MAGAGINE^[2], レースウェイポンドの図は NEDO プロジェクト報告書^[3], パネル型リアクターの図はメガソーラービジネス Web サイト^[4], チューブ型リアクターの図は藻ディア Web サイト^[5]から引用した。

③-3. オイル抽出残渣の活用法検討

微細藻類からオイルを回収する際、細胞を破碎しオイルを抽出する。この際、オイルを抽出した後の細胞残渣が発生する。細胞残渣にはタンパク質や色素等様々な物質が含まれている。オイル自体は安価であることから、微細藻類由来オイルの商用利用を実現し、採算の取れる事業にする為にはオイル抽出残渣の有効利用が必要である。よって、本事業ではオイルを抽出した後の残渣の活用方法についても検討を行い、バイオマス(細胞)全体に対して価値を持たせる方針を立てる事を提供価値とする (図 6)。

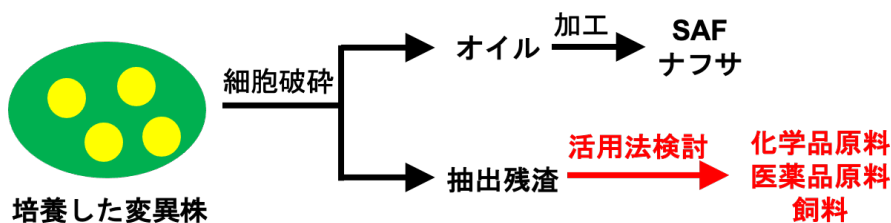


図 6. オイル抽出残渣の検討

これらのサービスを実施するためには、顧客を探す必要がある。顧客を探す方法として①. 学会参加, ②. 藻類の利活用を検討している企業が参加している団体^[6]への参加等を通じて他社と

の交流を行う。特に創業当初は本事業の取り組みが認知されているかといった部分が重要である事から積極的に外部との交流を進めて行く。

6.4 競争戦略

競争戦略とは、競合他社の存在を認識し、自社の顧客を獲得する為の戦略を指す。米国の経営学者であるマイケル・ポーター博士は、この競争戦略をコスト・リーダーシップ戦略、差別化戦略、集中戦略の3つに分類している^[7]。コスト・リーダーシップ戦略は企業が生み出す製品の価格を安価にする事によって他社へ競争力を生み出す戦略を指す。差別化戦略は、自社製品等、サービスの独自性を強調し、他社との差別化を図る事で業界内でのポジションを築く戦略を指す。集中戦略は、経営資源を特定のターゲットに絞り込む戦略を指し、他社との差別化を図る事で自社の業界内でのポジションを築く戦略のことを言う。

これらの中で、本事業は「集中戦略」を適用する。図7に本事業における戦略と既に藻類オイル事業に参入している企業が取っている戦略を示す。本事業は、研究開発に特化、強みを持った事業を行っているのに対し、他社は研究開発から製造までを一貫して実施する戦略を取っている。また、対象藻類について、本事業は微細藻類全般を対象とするが、他社は特定種のみを取り扱いとなっている。この事から、本事業と他社との違いとして、本事業は「微細藻類全般に対応する研究開発特化型」企業と言える。

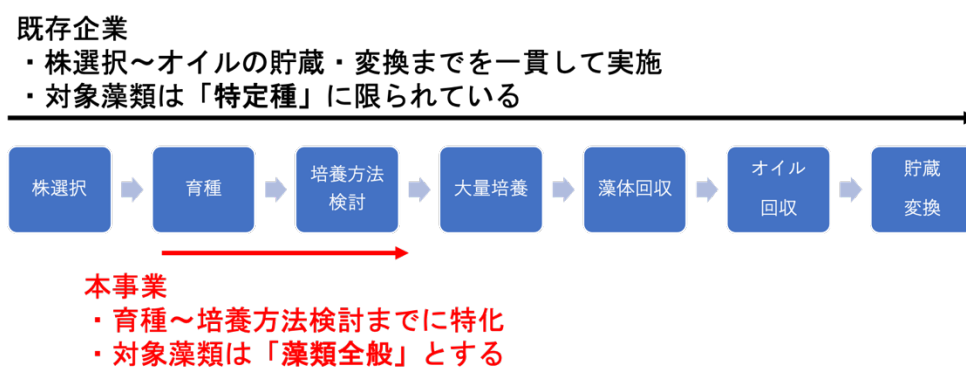


図7. 既存企業の戦略と本事業における相違点

本事業において集中戦略を選択した理由は、既に藻類オイル業界に参入している企業に加え、これから藻類オイル事業に参入を検討している企業に対してもサービスの提供が期待できる為である。これまで、石油を利用してきた化学メーカーや石油メーカー等は脱炭素化の風潮から石油に代替する新たな資源の確立が求められている。しかし、社内のノウハウや技術がないといった課題があり、大学等との共同研究を実施しながら事業化に向けた可能性を検討している。そのような状況の元、多種多様な藻類に対応ができ、事業化に向けた研究開発を実施してくれるような

企業にはニーズがあるといった回答をヒアリング調査から得ている(詳細は参考資料イノベーションストラテジー研究成果書に記載)。また、近年のオープンイノベーションの風潮から、大企業がスタートアップと連携して新規事業を開発する例も誕生してきている。

企業が持続的な競争力を生み出すためには、競合他社について把握し、対策を講じておく必要がある。現状、本事業における競合他社は存在しないが、ユーグレナ社、IHI 社、ちとせ研究所社、デンソー社、電源開発社といった企業が微細藻類由来オイルの事業化に向けた開発に取り組んでおり、将来的にはこれらの企業が本事業と同様のサービスを他社に実施する可能性は否定できない。その為、本事業では創業期から参入障壁を高める為の取り組みを実施しておく必要がある。参入障壁を高めるために、本事業では、開発する技術の特許化を入念に検討しておく事、微細藻類全般に関する社内ノウハウを蓄積しておく事で他社が参入してきた際においても優位性のあるサービスを提供できるようにしておく。

6.5 成長戦略

創業した企業がどのような成長を遂げていくか、成長戦略を考案していく事は事業の存続のみならずイノベーションアイデアが実現された際の社会的なインパクトにも影響する。そこで本事業においても、創業した「微細藻類オイル生産に関連する基盤技術開発・提供事業」がどのような成長を遂げていくかといった事を考案した。本事業の最終目的は微細藻類から生産したオイルを用いて石油由来ジェット燃料・石油由来化学品原料の代替を行う事であった。この目標を達成する為に、微細藻類由来オイルの利用普及を目指している企業に対して育種・培養プロセス検討・オイル抽出残渣の活用法検討といった基盤技術の提供、受託研究、コンサルティングを行う事業を提案した。本項では、本事業における事業の成長戦略について考案した結果をまとめる。

本事業における成長戦略を図8に示す。創業期、自社技術の構築ができていない時期にはコンサルティング等を実施する事によって事業を行っていく。コンサルティングにより利益を挙げるとともに、本事業で提供するサービスに必要な技術(育種・培養・残渣の活用法検討)の開発は公的基金を利用しながら行う(Stage. 1)。必要技術の開発が完了後、事業会社から出資を受けて共同研究を実施し、オイル製造体制の構築等、藻類オイルの事業化に向けた検討を行っていくとともに、コンサルティングや受託研究を実施していく(Stage. 2)。製造体制の構築後は製造したオイルを販売していき、オイル売上の一部から本事業の寄与度を回収する(Stage. 3)。本事業における出口戦略は、M&Aによって事業を売却し、共同研究先の研究開発部門として機能させていく事とする(Stage. 4)。

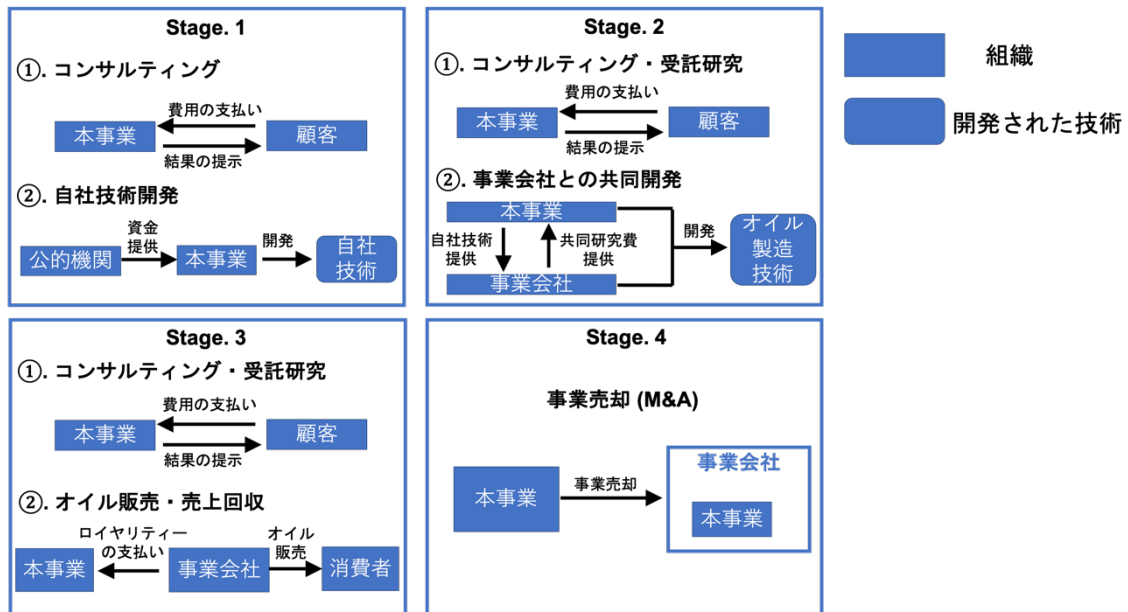


図 8. 本事業における成長戦略

この理由として、微細藻類由来のオイルは既存の石油由来原料を代替するものであり、既存のサプライチェーンを活用できるといった事が挙げられる。事業会社（共同研究先）と合併する事で、新たにサプライチェーンを構築する必要がなく、微細藻類由来オイルの速やかな事業化を実現できると考え、出口戦略を M&A による他社への事業売却とした。

6.6 創業期における実施体制

創業期の従業員は筆者、研究開発責任者、マーケティング・財務責任者の3名とした。筆者は科学技術イノベーション研究科にて、微細藻類の育種・培養方法の検討に関する研究の他、本論文を執筆する上で必要な事業・知財・財務戦略の構築に取り組んでいる。しかし、筆者一人では業務量が多すぎる事、経験やノウハウが不足している事から事業を円滑に遂行する事が困難であると思われる。よって、筆者だけでは不足している役割を新たに研究開発責任者やマーケティング、財務担当者を雇用する事によって補う事とする。

オフィスの拠点は神戸大学のインキュベーション施設とする。研究開発は神戸大学バイオ生産工学研究室との共同研究を実施し、研究を進めていく。また、ベンチスケール培養技術の検討は、各種培養装置が整備されている一般社団法人日本微細藻類技術協会 (IMAT)にて実施する(表3)。

表3. 本事業における実施体制

創業メンバー	・筆者 ・研究開発責任者 ・マーケティング、財務責任者
所在地	神戸市中央区港島南町1-5-6 (神戸大学インキュベーション施設)
共同開発先	神戸大学バイオ生産工学研究室 一般社団法人日本微細藻類技術協会 (IMAT)

共同開発先①: 神戸大学バイオ生産工学研究室^[8]

神戸大学バイオ生産工学研究室はオイル、カロテノイド、バイオプラスチック等の有用物質を生産する微細藻類 (シアノバクテリア、緑藻、ハプト藻等)の育種、育種した藻類株の有用物質増産メカニズムの解明、育種株の培養条件検討等を行っている研究室である。

共同開発先②: 一般社団法人日本微細藻類技術協会 (IMAT)^[9]

IMAT は微細藻類に関する研究基盤を構築し、微細藻類を用いた物質生産を普及させることを目的に設置された一般社団法人である。広島県の大崎上島町に整備中の研究拠点にはオープンポンド、フラットパネル型フォトバイオリクター、チューブ型PBRといった3種類の培養装置が完備予定であり、法人会員登録 (入会金40万円、年会費40万円)をすれば研究拠点の利活用が可能になる。よってIMATの法人会員となり、神戸大学で育種した変異株を用いた培養方法の確立をIMATの研究拠点にて行う。

事業規模の拡大に伴い、将来的には自社研究拠点を整備する事も検討する。具体的な拠点としては、クリエイティブラボ神戸 (CLIK)を検討する。CLIKには神戸大学の研究成果を利用して創業されたバイオパレット社、バックス・バイオイノベーション社、シンプロジェン社が入居しており、これらの企業との協定を結ぶ事で本事業の技術開発も進展しやすくなるのではと考えている。

6.7 事業アイデアの評価

筆者が提案する事業アイデアは微細藻類からオイルを生産する上で必要となる基盤技術を開発・提供する企業である。提案した事業アイデアを評価する為に、外部環境分析 (PEST 分析, ファイブ・フォース分析), 内部環境分析 (VRIO 分析)を行った。

6.7.1 PEST 分析

本事業が取り巻くマクロ環境を明らかにする為に微細藻類オイル業界における PEST 分析を行った (表 4)。PEST 分析はノースウェスタン大学のフィリップ・コトラー教授が提供したフレームワークである^[10]。自社を取り巻く外部環境 (マクロ環境)を把握する際に用いられ、分析項目は「政治的要因 (Political)」、「経済的要因 (Economical)」、「社会的要因 (Social)」、「科学的要因 (Technological)」の 4 つの要因が挙げられる。PEST 分析の結果、本事業に関連する微細藻類オイル業界は脱炭素社会の実現に向けて期待が集まる業界である点、市場規模の拡大が予測されている点、オープンイノベーションによって他社との協力関係を結びやすくなっている点、合成生物学やバイオリアクターの発展により技術開発が容易になってきている事から有望な業界である事が分かった。

表 4. 微細藻類オイル業界における PEST 分析結果

要因	対象となる情報
政治的要因 (Political)	<ul style="list-style-type: none"> ・パリ協定 ・カーボンニュートラル宣言 ・新しい資本主義実現会議
経済的要因 (Economical)	<ul style="list-style-type: none"> ・バイオエコノミーの市場拡大 ・SAFの市場規模拡大 ・オレオケミカルの市場規模拡大
社会的要因 (Social)	<ul style="list-style-type: none"> ・SDGs ・オープンイノベーション
科学的要因 (Technological)	<ul style="list-style-type: none"> ・合成生物学の発展 ・バイオリアクター

政治的要因 (Political)

- ・パリ協定^[11]

2015年に採択されたパリ協定は2020年以降の気候変動問題に対応する為の国際的枠組みであり、200国以上の国々が合意した条約である。パリ協定における長期的な目標として、「今世紀後半までに化石燃料から脱却し、世界の平均気温上昇を産業革命前と比較して2°C以内に保ち、1.5°C以内に抑えるように努める事」としている。この目標を達成する為に、世界各国に対して二酸化炭素をはじめとした温室効果ガスの削減目標が定められている。日本が課された目標は2013年度比と比較して温室効果ガスの排出量を2030年までに26%削減する事とされている。

- ・カーボンニュートラル宣言とバイオテクノロジーの活用
- ・2020年10月に行われた臨時国会で菅義偉前内閣総理大臣によって、2050年まで日本は温室効果ガスの排出量を実質ゼロにするといった「カーボンニュートラル」の実現を宣言した^[12]。
- ・2022年3月に行われた第4回新しい資本主義実現会議にて、政府が重点投資する4つの科学技術分野の一つにバイオテクノロジーが選出されている^[13]。

経済的要因 (Economic)

- ・バイオエコノミーの市場規模^[14]

経済協力開発機構 (OECD)の予測によると2030年のバイオエコノミーは1.6兆ドルに達する事が予測されている。

- ・SAFの市場規模^{[15][16]}

SAFの市場規模(2050年)は日本国内で2.3兆円、アジアで22.0兆円、世界で65.0兆円に昇ると予測されている。

- ・オレオケミカルの市場規模^[17]

オレオケミカル事業とは、植物系の油脂を原材料として製品を生み出す事業を指す。石油を原料とする「ペトロケミカル」に対して、上記のように呼ばれている。環境問題や資源の枯渇の観点から、オレオケミカルへの注目が高まっており、市場規模は2030年に約60兆円程度になる事が予測されている。

社会的要因 (Social)

- ・SDGs

持続可能な開発目標の実現の為に、大企業は石油資源から脱却し、環境負荷の少ないバイオテクノロジーの活用を検討している。

- ・オープンイノベーション

1 社ではもはやビジネスが作れず、異業種連携が必要である為、外部資源を自社ビジネスに取り入れるオープンイノベーションの風潮が高まってきている（図8）^[18]。

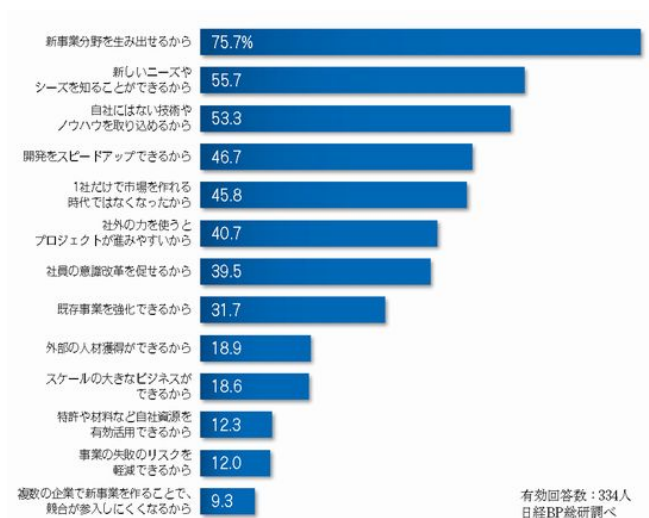


図 8. オープンイノベーションに関するアンケート^[18]

科学的要因 (Technological)

- ・ 合成生物学の発展^[19]

-ゲノム 100 万塩基を解読するシーケンスコストは 2001 年では\$10K であったのに対し、2017 年で\$0.1 以下になっている。

-CRISPR Cas9, Target AID 等の誕生により生物のゲノム編集が容易になってきている。

-AI の発展、実験自動化装置の発展により、有用物質を高生産する微生物の創出効率が向上してきている。

- ・ バイオリアクター

従来まではレースウェイ型オープンポンドのようなプール内で微細藻類を培養していたのに対し、現在はチューブラー式フォトバイオリアクター等といった培養槽に効率的に光を透過させて培養するといった培養装置が誕生している。

6.7.2 ファイブ・フォース分析

ファイブ・フォース分析もまた、外部環境を分析する際に用いられるフレームワークであり、ハーバード大学経営大学院のマイケル・E・ポーター博士によって提唱されたものである^[7]。PEST分析との違いは、PEST分析が事業を取り巻く”マクロ環境”を分析する手法であるのに対し、ファイブ・フォース分析は事業を取り巻く”ミクロ環境”を分析するものであるといった点が挙げられる。ファイブ・フォース分析は「業界内の競争」、「売り手の交渉力」、「買い手の交渉力」、「代替品の脅威」、「新規参入の脅威」といった5つの要素の力関係を分析する事で、業界が現状置かれている状況を理解する為に用いられる。本項では、本事業に関連する微細藻類オイル業界及び、微細藻類基盤技術開発業界において分析を行い、現状を可視化するとともに今後の方針を考案した。

微細藻類オイル業界におけるファイブ・フォース分析

微細藻類オイル業界におけるファイブ・フォース分析結果を図9に示す。分析の結果、業界内の競争は「強い」、売り手の交渉力は「弱い」、買い手の交渉力は「強い」、新規参入の脅威は「強い」、代替品の脅威は「弱い」という結果になった。

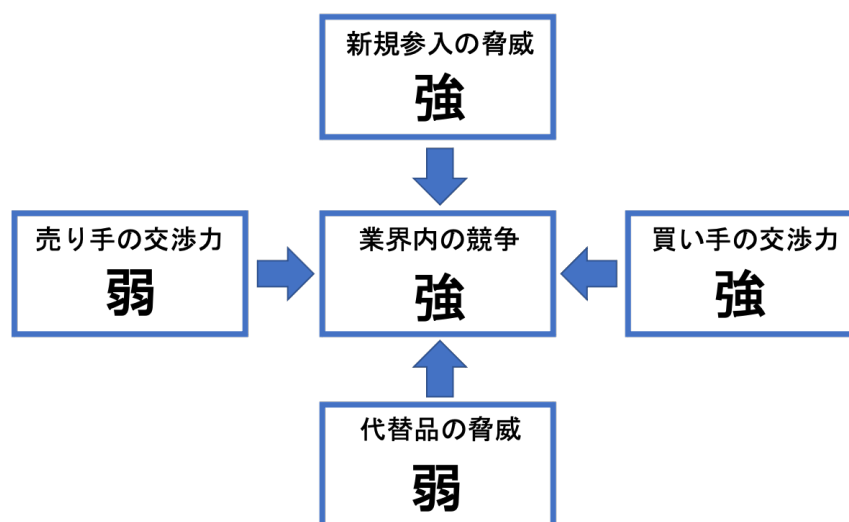


図9. 微細藻類オイル業界におけるファイブ・フォース分析結果

以下にファイブ・フォース分析結果における詳細を示す。

・業界内の競争

現在、国内外問わず様々な企業が微細藻類由来オイルの商用利用に向けた開発を進めている。製造するオイルは燃料・化学品原料を対象としたものであり、差別化は困難であることから業界内の

競争は強いと言える。

- ・売り手の交渉力

オイルを生産するためには、微細藻類を培養するための栄養源、培養槽等が必要である。これらは試薬メーカーやプラントエンジニアリング企業からの調達が考えられる。試薬メーカーやプラントエンジニアリング企業は多数存在している事から売り手の交渉力は弱いと言える。

- ・買い手の交渉力

微細藻類由来オイルの買い手として、航空会社や石油関連企業、化学メーカー等が挙げられる。現状微細藻類由来のオイルは 1L あたり¥1,000 以上の生産コストがかかる。石油が 50~100 円/L で販売されている事からも、微細藻類由来オイルは高価であると言える。この事からも買い手としては高価な微細藻類由来オイルよりも安価な石油由来オイルを利用している事から買い手の交渉力は強い。しかし、今後地球温暖化の対策に関する政策が立てられている事から、地球温暖化の原因となっている石油の利用が制限される可能性が高い。石油の利用規制が実施された場合には買い手は環境負荷の少ない微細藻類由来のオイルを高価でも購入する可能性があり、買い手の交渉力は弱くなる。

- ・代替品の脅威

微細藻類由来オイルの代替として、第 2 章で挙げた廃棄物由来オイル・植物由来オイルが挙げられる。第 3 章でも述べたように、微細藻類由来オイルは廃棄物由来オイルだけでは賄えないオイル需要を賄える事が期待できる。また、植物とは異なり水・光・肥料があれば土壌環境に左右されずにオイルを生産可能である。微細藻類由来オイルは他の候補と比較して優れた特徴を持つ事から代替品の脅威は弱いと言える。

- ・新規参入の脅威

新規参入者として、現状石油を利用した事業を展開しているが、今後の石油利用規制の懸念から新たな資源の探索を行っている企業が挙げられる。企業は政策等のもとで事業を行っている事、今後石油の利用規制が見込まれる状況下である事からも新規参入の脅威は強くなる。

以上から、微細藻類由来オイルは様々な企業が注目している資源であるが現状コストが高い。そのため、業界としてはいち早く低コスト生産技術を開発する事が重要な要素であると言える。低コスト化を実現するためには、製造技術の開発のみならず研究開発といった基礎的な部分も重要になると考え、筆者は微細藻類オイル生産に向けた基盤技術開発・提供事業を考案している。

筆者が考案した事業アイデアの評価を行うために、微細藻類関連技術の開発・提供を行う業界におけるファイブ・フォース分析もあわせて実施した。結果を図 10 に示す。分析の結果、業界内の競争は「弱い」、売り手の交渉力は「弱い」、買い手の交渉力は「弱い」、新規参入の脅威は「強い」、代替品の脅威は「強い」という結果になった。

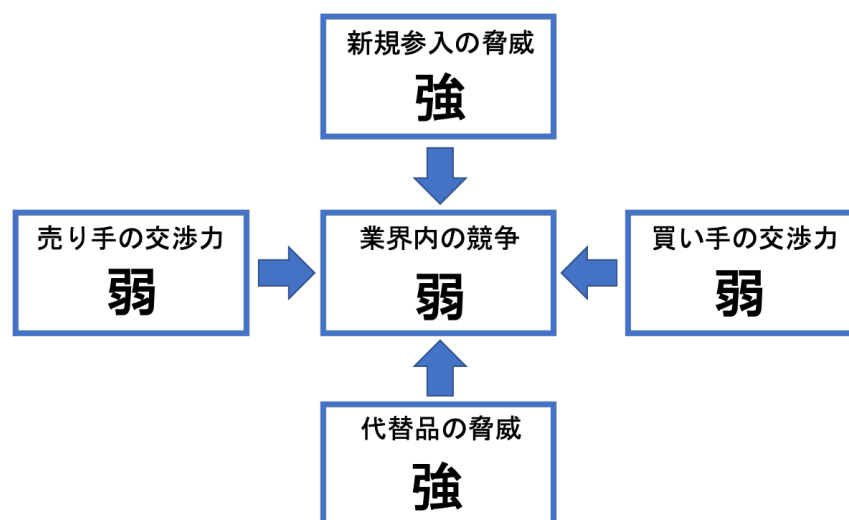


図 10. 微細藻類由来オイル生産に向けた基盤技術開発・提供事業取り巻くファイブ・フォース分析結果

以下に、ファイブ・フォース分析結果における詳細を示す。

・業界内の競争

業界内のプレーヤーを「藻類の育種や培養プロセス、オイル抽出残渣の活用法検討等を実施している企業」としたが、対象となる企業はほとんど見つからなかった。この事から、業界内の競争は弱いと言える。

・売り手の交渉力

本事業を実施する上で、実験試薬等を購入する必要がある為、試薬メーカーを売り手とした。試薬メーカーは一社だけではなく、多数存在している。よって本事業が購入先を選定できる状況にある事から売り手の交渉力は弱くなる。しかし、近年資源枯渇が懸念されている事から情勢によっては資源の提供が滞る可能性がある。そのような場合になった際には売り手の交渉力が強くなる事が予測される。

・買い手の交渉力

買い手は、石油を利用してきた石油関連企業や化学メーカー、微細藻類オイル事業に取り組んでいる企業が考えられる。また、オープンイノベーションの風潮から自社内にはない技術を外部から取り入れる動きが活発化している。石油を用いてきた企業は現状微細藻類に関する研究ノウハウや研究設備を有していない事から、本事業のような微細藻類に関連する基盤技術を開発・提供する企業は重要性の高い位置づけとなる。よって買い手の交渉力は弱い。

・代替品の脅威

微細藻類オイルを生産している企業による育種が該当する。微細藻類由来オイルの研究開発を行っている企業はその企業で用いている藻類の育種や培養プロセスの検討を行っている。この事から、本事業の代替品となりうる事から代替品の脅威は強い。

・新規参入の脅威

Amyris 社、Ginko Bioworks 社、Zymergen 社といった従属栄養生物のバイオフィアウンドリー企業が挙げられる。今後藻類オイルの重要性が高まってくる中、上記の企業がビジネスチャンスとして藻類の育種やプロセス検討に参入する可能性がある事から新規参入の脅威は強い。

以上、本事業のような基盤技術を開発・提供する事業は競合いないかつ、ニーズがある事業である事が分かった。しかしながら今後代替品や新規参入者によって業界内の競争が激化してくる可能性が高い。よって、本事業が持続的に競争優位な立場に立つ為には、事業の早い段階から特許の出願・登録を行う事、微細藻類に関するノウハウを蓄積しておき、他社を排除しておく必要がある。本事業において、どのような特許出願・登録するかについての詳細は知財戦略にて述べる。

6.7.3 内部環境分析

本事業における内部環境分析（VRIO 分析）を実施した結果を表 5 に示す。VRIO 分析はオハイオ州立大学経営学部のジェイ・B・バーニー教授によって提唱されたものであり、経済的価値（Value）に関する問い、希少性（Rarity）に関する問い、模倣困難性（Inimitability）に対する問い、組織（Organization）に対する問いといった観点から分析するものである^[20]。VRIO 分析の結果、Value（価値）は Yes、Rarity（希少性）は Yes、Inimitability（模倣困難性）は No、Organization（組織体制）は Yes であり、「一時的な競争優位」の状況にある。

表 5. 本事業における VRIO 分析

	Value (価値)	Rarity (希少性)	Imitability (模倣困難性)	Organization (組織体制)
判断結果	Yes	Yes	No	Yes
判断基準	市場 顧客ニーズ	類似ビジネス	知財の取得 参入障壁	人員 実施場所

Value（価値）

価値は「Yes」とした。理由は以下の 2 点である。

- ・微細藻類由来のオイルは今後市場規模の拡大が予測されている SAF 業界やオレオケミカル業界での利用普及が期待されている。
- ・ヒアリング調査（参考資料：イノベーションストラテジー研究成果書参照）の結果から、本事業のような微細藻類オイル生産に関連する基盤技術開発・提供事業はオイルの製造をメインに行っている企業、これから藻類オイル事業へ参入してくる企業の「研究開発は外部に委託したい」、「藻類の利用可能性を検討したい」といったニーズを満たすことを確認している。

Rarity（希少性）

本事業と類似するビジネスを行っている企業は僅少であったことから、希少性は「Yes」とした。

Imitability（模倣困難性）

模倣困難性は「No」とした。理由は以下の 3 点である。

- ・Amyris 社、Ginko Bioworks 社、Zymergen 社等、従属栄養生物（酵母・大腸菌等）の育種、プロセス検討を行っている企業が、知見を活かして微細藻類の育種やプロセス検討を行う可能性がある。

- ・現在製造をメインに行っている企業が、育種も本格的に実施してくる可能性がある。
- ・他社が参入した時に自社ビジネスを保護できるような特許がない。

Organization (組織体制)

- ・事業，研究開発を推進する上で必要な人材が揃っている。
- ・育種拠点，培養プロセス検討拠点の候補先の選定を実施済みである。

6.8 外部環境分析・内部環境分析まとめ

微細藻類に関する基盤技術を開発する事業は参入他社がほぼおらず，ブルーオーシャンな状況である。しかし，今後微細藻類オイルの需要が高まってくる中，従属栄養生物のバイオフィアウンドリー事業を行っている企業の参入や，既に藻類オイル事業に取り組んでいる企業内での育種といった新規参入の脅威が強い。新規参入社が現れたとしても，自社事業を保護できるような特許を取得できていれば脅威を弱めることができるが，現状そのような特許を有していない。よって，本事業が持続的な競争を維持する為には，「技術開発でオリジナリティを持ち，開発した技術の特許で保護する戦略」を詳細に練る必要がある。

6.9 第6章 まとめ

本章では、イノベーションアイデアを実現する為の事業戦略について述べた。事業戦略を考案する上で、自社保有資源（科学技術上のブレイクスルー）を活かせる領域を特定する為に、微細藻類からオイルを生産・消費するまでのバリューチェーンを分析した。その結果、本事業の強みは微細藻類の育種や培養プロセスの検討といった「研究開発」の部分である事を特定した。その上で、本事業では主に①. 受託研究, ②. コンサルティング, ③. 技術パッケージ開発（育種及び培養プロセス検討）等、微細藻類からオイル生産を行う上で必要な基盤技術を開発・提供する企業を設立する。考案した事業アイデアの評価を外部環境・内部環境分析を通じて行った結果、本事業のような「微細藻類オイル生産に必要な基盤技術開発・提供事業」はブルーオーシャンであるが、従属栄養生物を対象としたバイオフィアウンドリーが今後参入してくる可能性もある。よって、事業の早い段階から自社の強みを活かした技術開発や開発技術の特許化を通じて参入障壁を高くしておく必要がある。

引用

- [1] 微細藻類の大量生産・事業化に向けた培養技術. 情報機構
- [2] BIODIESEL MAGAGINE. Phenometrics set to begin photobioreactor production
<https://biodieselmagazine.com/articles/8077/phenometrics-set-to-begin-photobioreactor-production>
- [3] 平成 24 年度～平成 27 年度成果報告書 バイオマスエネルギー技術研究開発 戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）海洋性緑藻による油脂生産技術の開発
- [4] メガソーラービジネス. マレーシアで 5ha の藻類培養設備, ジェット燃料を製造
<https://project.nikkeibp.co.jp/ms/atcl/19/news/00001/01203/?ST=msb>
- [5] 藻ディア. フォトバイオリアクターを用いた微細藻類バイオマスの生産コスト
<https://modia.chitose-bio.com/articles/18/>
- [6] PR Times. ウェブサイト
<https://prtimes.jp/main/html/rd/p/000000015.000034251.html>
- [7] 中野明. マイケル・ポーターの競争戦略 54. 朝日新聞出版, 初版, (2011).
- [8] 神戸大学バイオ生産工学研究室. ホームページ
http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/research_inv.html
- [9] 一般社団法人日本微細藻類技術協会. ホームページ
<https://imat.or.jp/entry/>
- [10] フィリップ・コトラー, ケビン・レーン・ケラー著 (監修: 恩藏 直人, 訳: 月谷真紀). コトラー&ケラーのマーケティング・マネジメント. 第 12 版, 丸善出版, (2014).
- [11] 全国地球温暖化防止活動推進センター ホームページ
https://www.jccca.org/global-warming/trend-world/paris_agreement
- [12] 資源エネルギー庁 ホームページ
<https://www.enecho.meti.go.jp/about/whitepaper/2021/html/1-2-3.html>
- [13] 第 4 回新しい資本主義実現会議. 2022 年 3 月
- [14] The Bioeconomy to 2030. OECD. 2009
- [15] CO₂等を用いた燃料製造技術開発プロジェクトの研究開発・社会実装の方向性 (案). 2021 年. 資源エネルギー庁
- [16] 共同レポート 2050 年 航空輸送における CO₂排出実質ゼロへ向けて. 2021. 全日空株式会社. 日本航空株式会社
- [17] Oleochemicals Market by Type (Fatty Acid, Fatty Alcohol, Glycerol, and Others) and Application (Pharmaceuticals, Personal Care & Cosmetics, Food & Beverages, Soap & Detergents,

Polymers, and Others): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2021–2030

[18] 日経 BP ホームページ

<https://www.nikkeibp.co.jp/atcl/newsrelease/corp/20170630/>

[19] Meng Fankang and Tom Ellis. "The second decade of synthetic biology: 2010–2020." *Nature Communications* 11.1 (2020): 1-4.

[20] ジェイ・B・バーニー著 (訳: 岡田正大). 企業戦略論【上】基本編. 競争有意の構築と持続, ダイヤモンド社. (2003).

第7章 技術戦略

7.1 技術戦略概要

本章では、イノベーションアイデアを実現するための技術戦略を述べる。本事業で提供する技術パッケージを図1に再掲する。本事業では、①. 屋外環境で簡易的にオイルを高生産可能な藻類変異株、②. 変異株を用いた培養方法、③. 変異株からオイルを抽出した後の残渣活用方法といった技術パッケージを開発・提供する。本章では、①～③の技術パッケージを開発する上での技術戦略を考案し、纏めている。

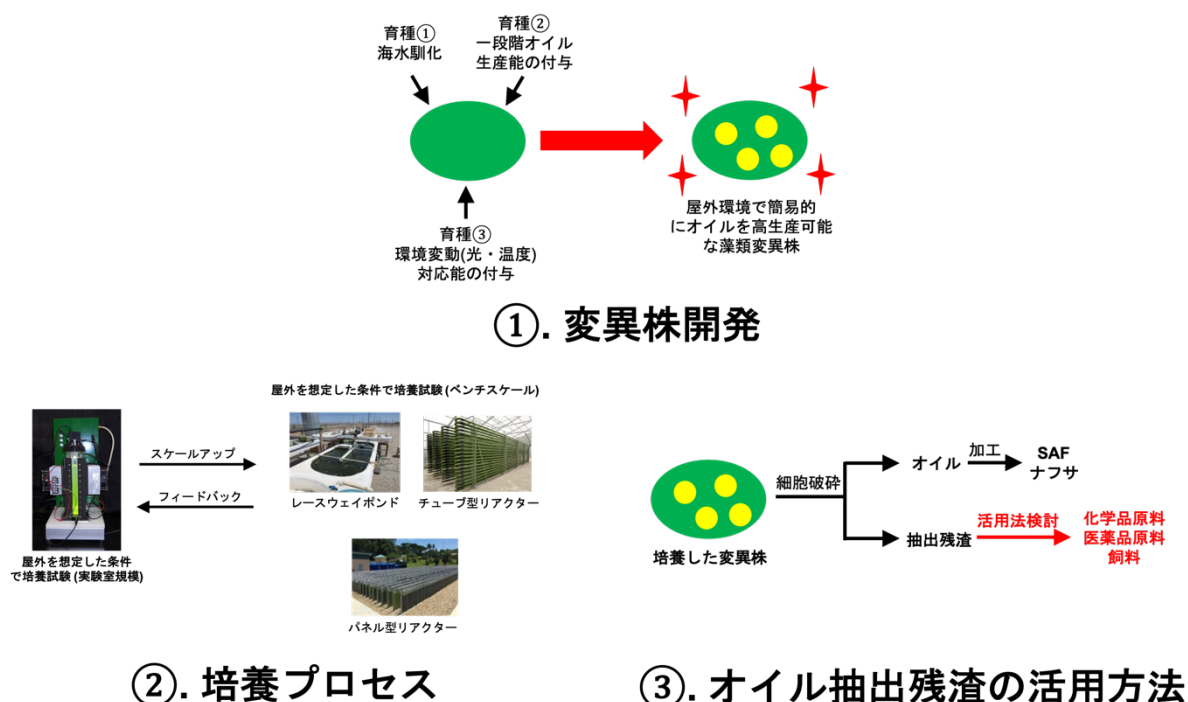


図1. 本事業で開発する技術パッケージ

培養プロセス検討にて掲載している図の引用は第6章図5を参照。

変異株の開発に関しては、「変異育種」・「ゲノム編集」・「実験室進化（馴化）」といった3つの育種方法を駆使して、科学技術上のブレイクスルーのコンセプトである「海水を用いた一段階オイル生産」を実現するとともに、「屋外環境での培養に適した特徴」を付与していく。

培養プロセス検討に関しては、事前準備として微細藻類における過去の培養研究を網羅的に調査・リスト化しておく。その上で、培養戦略を立案し、実験室規模～ベンチスケール規模での培養方法を検討・確立していく。

残渣の活用方法は微細藻類の細胞内に含まれる成分の分析、分析結果で明らかになった成分の市場規模等を調査しておくことで、残渣の活用法を提案できるようにしておく。

7.2 対象株と方針

対象藻類を産業利用が期待されている *Euglena* 藻類, *Coccomyxa* 藻類, *Botryococcus* 藻類, *Fistulifera* 藻類, *Nannochloropsis* 藻類, *Chlamydomonas* 藻類とする。各々の株に関して、屋外環境で簡易的にオイルを生産させるために、①. 海水への馴化、②. 窒素源存在下（増殖条件下）でのオイル生産能の付与、③. 屋外環境への馴化を実施する。①～③に関する特徴を付与した後は、ゲノム解析等を通じて特徴付与に寄与した遺伝子を特定していく。その後、屋外培養を想定した培養プロセス検討、オイルを抽出した後の残渣活用方法を検討していく。

7.3 技術戦略①: 変異株開発

海水馴化

海水資源を用いたオイル生産藻類の培養を可能にする為に、*Euglena* 藻類, *Coccomyxa* 藻類, *Botryococcus* 藻類といった淡水性藻類を海水に馴化させる方法及び海水馴化に寄与する遺伝子の特定を行う (*Fistulifera*, *Nannochloropsis*, *Chlamydomonas* は海水を用いて培養が可能である為、ここでは対象株としない)。海水に馴化させる方法として、生物の進化の仕組みを利用した「実験室進化法」を適用する。生物は環境変化に応じて細胞内部の状態を変化させ、環境に適応する能力を有する。例えば、微生物を一定のストレス条件下で長期間培養するとストレス条件下に適応し、増殖速度が向上する事が知られている (図 2)。

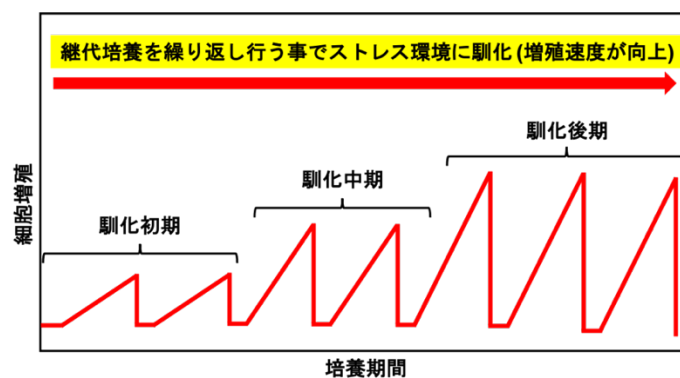


図 2. 実験室内進化によるストレス条件下への馴化イメージ

微細藻類においてもこの実験室進化を利用して海洋性藻類を海水よりも更に塩分濃度が高い条件下に馴化させた例が報告されている^[1]。本事業においても同様の手法を用い、淡水性藻類を海水条件に馴化させる。その後、海水に馴化させた株のゲノム配列を解読し、海水馴化に寄与した遺伝子の特定を行っていく。

窒素源存在下（増殖条件下）、一段階オイル生産能の付与

窒素源存在下、一段階でのオイル生産を実現する為に、変異源を用いた「変異育種」と「特定遺伝子の編集（ゲノム編集）」によって、一段階オイル生産株の創出を目指す。変異育種とは、変異源を用いて細胞集団にランダムな突然変異を導入し、得られた変異細胞集団から目的形質を有する細胞を選抜する育種方法を指す。本手法は形質転換方法が確立していない微細藻類においても適用可能である。ゲノム編集は、生物が有するゲノム DNA 上の特定の塩基配列を改変する方法である。ゲノム DNA 上の狙った遺伝子の改変が可能といった利点がある。変異育種・ゲノム編集は両方とも外来遺伝子の導入等を行っていないことからカルタヘナ法に抵触しない。よって、これらの方法によって改変された変異株は屋外環境で培養可能である。本事業では変異育種・ゲノム編集双方を活用し、窒素源存在下・一段階でオイル生産可能な変異株を創出していく。

①. 変異育種

変異育種を行う際、微細藻類では変異導入源として UV^[2]、重イオンビーム^[3]、常温常圧プラズマ（Atmospheric room temperature plasma : ARTP）^[4]、エチルメチルスルホン（EMS）^[5]等が報告されている。これらの変異導入源を用い、*Euglena*、*Coccomyxa*、*Botryococcus*、*Nannochloropsis*、*Fistulifera*、*Chlamydomonas* といった藻類に変異を導入し、得られた変異細胞集団から増殖条件下でオイルを高蓄積している細胞を選抜する。この際、変異処理の条件（変異源の強度、変異導入時間）を事前に検討・最適化しておく。変異を導入した変異細胞集団からオイルを高蓄積している細胞を選抜する方法に関しては、筆者が創出してきた科学技術上のブレイクスルー（第4章）と同様の方法で行なっていく（図3）。

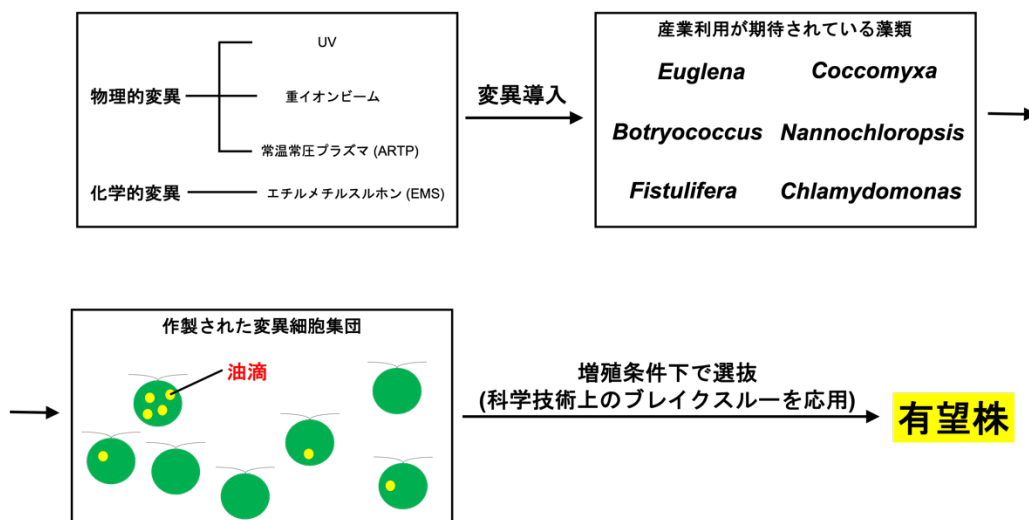


図3. 変異育種による育種フロー

②. ゲノム編集

変異育種に加え、本事業ではゲノム編集を用いた有用株の創出を目指す。ゲノム編集を行う為には、標的となる遺伝子ターゲットが必要である。しかし、本事業で目指す増殖条件下、一段階でオイル生産を行う遺伝子に関する報告はほとんどない。そこで、本事業では逆遺伝学的アプローチによって一段階オイル生産に寄与する遺伝子ターゲットを特定し、ゲノム編集に応用していく。

近年、薬剤耐性マーカー入りの遺伝子カセットを藻類細胞内に導入する変異導入法が報告されている^[6]。本アプローチの特徴として、変異育種に用いる変異源とは異なり、ゲノム上の1ポイントにノックアウト変異を導入する事ができる。ゲノム上の1ポイントに変異が導入された変異細胞集団から増殖条件下でオイルを高蓄積している細胞を選抜する事で(方法は第4章と同様)、有望株を取得する。取得した有望株のゲノム配列を親株と比較し、遺伝子カセットが導入されている遺伝子領域を有効変異とする(図4)。

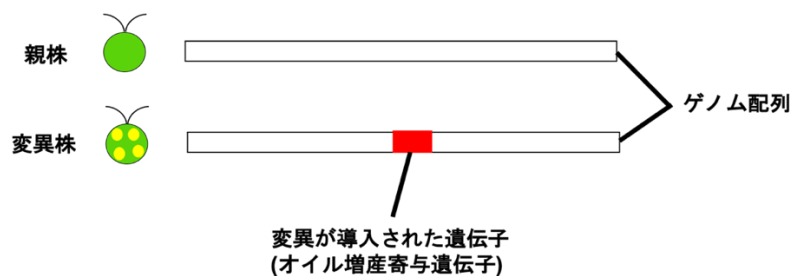


図4. オイル増産寄与遺伝子の特定

特定した有効変異は、ゲノム編集を施すことによって、有望株を創出していく。

屋外環境でのオイル生産に向けた育種

ここまでで、産業利用が注目されている微細藻類を「海水を利用できるかつ一段階でオイル生産を可能にする」為の育種方針について述べた。海水馴化・一段階オイル生産能の付与によって微細藻類からのオイル生産プロセスは持続可能かつ効率的になる事が期待されるが、商業利用を行う為には、留意しておくべき点がある。それは、「屋外での生産を見据えたプロセス検討」である。微細藻類を培養する方法として、研究室等閉鎖空間で培養を行う方法、屋外環境で培養を行うといった方法が挙げられる。本事業で生産を目指すオイルは、現状の石油価格で考えると1Lあたり50円~100円程度で生産しなければならない。よって、安価な生産方法が求められる。研究室室内での生産は光条件や温度条件等といった培養環境の調整、外来微生物による雑菌汚染を防止できる事から安定的に高密度培養が可能になるが、生産コストが割高になる。屋外での生産は生産コストは安価になるものの、環境変化や外来微生物による雑菌汚染リスクが増加する。雑菌汚

染リスクに関しては海水利用を可能にする事で淡水性微生物の混入を防ぐ事、元々大量培養技術が確立されている微細藻類を育種対象としていることから懸念は少ないと仮定した。一方で屋外環境特有の環境変動については、オイル生産性を低下させる要因となっている。本項では、屋外環境特有の環境変動として、光条件・温度条件に着目し、それぞれの環境要因の変動への対応を可能にさせる育種方針を考案した。

① . 低温耐性能の付与

Chlamydomonas sp. JSC4 株を屋外環境で培養した結果, 室内培養時と比較して増殖速度が 1/10 に低下する事が報告されている^[7]。その原因の一つとして、早朝における温度低下であると特定されている。屋外培養時における光合成量子収率(光合成効率の指標)を測定した結果、水温の低い朝方 (7:00 前後)に光合成量子収率が大きく低下する事が明らかになっている (図 5a, b)。培養槽を加温し (7:00, 水底温度 20°C), 同様の培養を行なった結果、光合成量子収率 (光合成効率) の大きな低下は見られなかった。この結果は、炭酸同化能が低い朝方の低温度環境条件下で至適光強度以上の光が照射されると光合成量子収率 (光合成効率) が大きく低下する事が示唆されている (図 5c, d)^[7]。

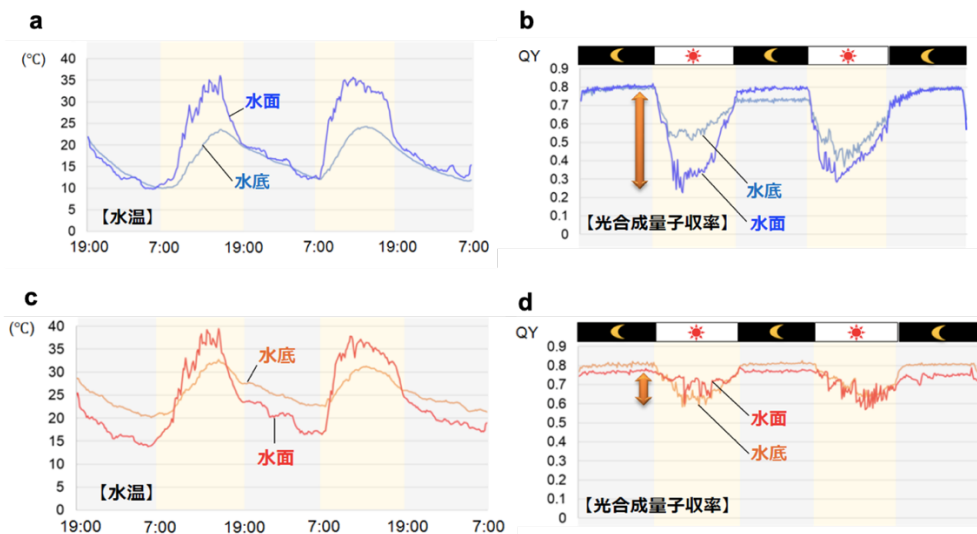


図 5. 温度条件と光合成量子収率 (光合成効率)の関係^[7]

- a. 培養槽内の水温 (加温なし), b. 光合成量子束密度の測定結果 (加温なし), c. 培養槽内の水温 (加温あり), d. 光合成量子束密度の測定結果 (加温あり)

朝方の低温環境においても高い光合成効率を維持する為に、低温に馴化した株の創出を行う。創出方法は「実験室進化法」を適用する。JSC4 株を用いた実験室進化では、15°Cといった低温環境下で 1 年間継代培養を行う事で生育が 1.2 倍向上された細胞集団の獲得がされている^[7]。よって、他の微細藻類においても低温環境に馴化させ、低温耐性株を作出する。低温耐性株の取得後、

変異株のゲノム解読や遺伝子発現解析を行い、低温耐性獲得に寄与した遺伝子を特定する（図6）。

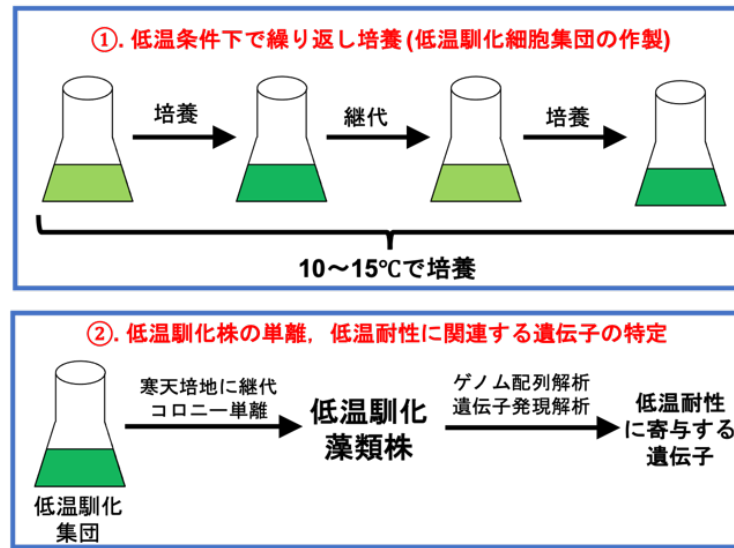


図6. 低温度耐性株の創出方針

②. 強光耐性能の付与

微細藻類をはじめ光合成生物は地球上に降り注がれる太陽光を効率的に利用できていない。地球上の植物等光合成生物が光合成によって獲得したエネルギー量は投入された光エネルギーの～3%ほどであり、光エネルギーを効率的に変換できていないことがわかる。緑藻のモデル生物である *Chlamydomonas reinhardtii* を用いた例では、太陽光に相当する数千 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光条件にさらされると光合成に重要な光化学系が損傷し、生育が著しく抑制されるといった問題が生じている。図7は、*C. reinhardtii* を通常光 ($600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、強光 ($2,500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を用いて培養した結果である。通常光では培養48時間後には培養液が濃緑色になっているのに対し、太陽光に相当する強光条件では84時間培養を行っても培養液が薄緑色となっている^[8]。以上から、太陽光に相当する強光は光合成を阻害する要因となっている事が示唆されている。

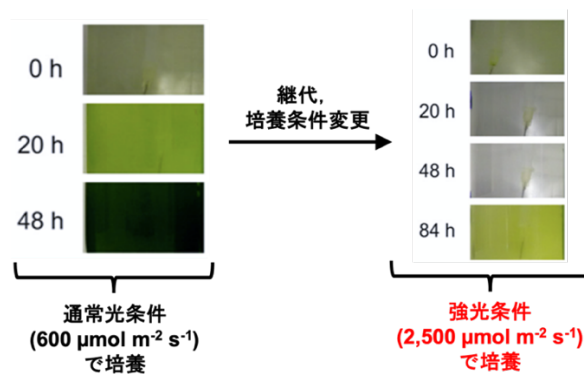


図7. 通常光条件下と強光条件下で培養時における *Chlamydomonas reinhardtii* の生育調査^[8]

強光に耐性を持ち、太陽光の利用効率を向上させる為に、実験室進化による強光耐性株の創出を行う。強光条件で長期間微細藻類を培養し、強光条件に馴化後、変異株のゲノム解読や遺伝子発現解析を行い、強光耐性に寄与した遺伝子を特定する（図8）。

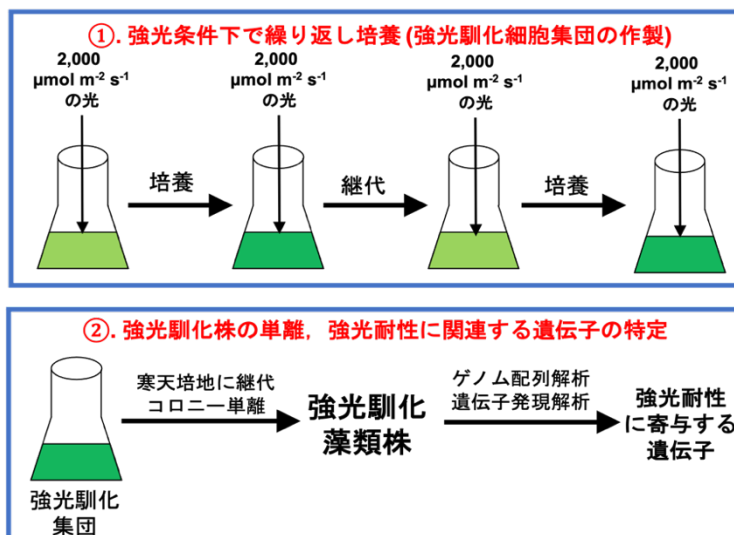


図8. 強光耐性株の創出の創出方針

7.4 技術戦略②: 培養方法の開発

育種した変異株における培養方法を確立する為に、育種対象微細藻類における先行研究をまとめたリストを作成しておく。調査内容としては、培地中の成分、培養環境、培養規模、培養装置が育種対象藻類のオイル生産に与える影響について調査が行われた論文を纏め、リスト化しておく（図9）。調査結果をもとに、培地成分の考案や使用する培養槽、培養方法を考案・実践していく。

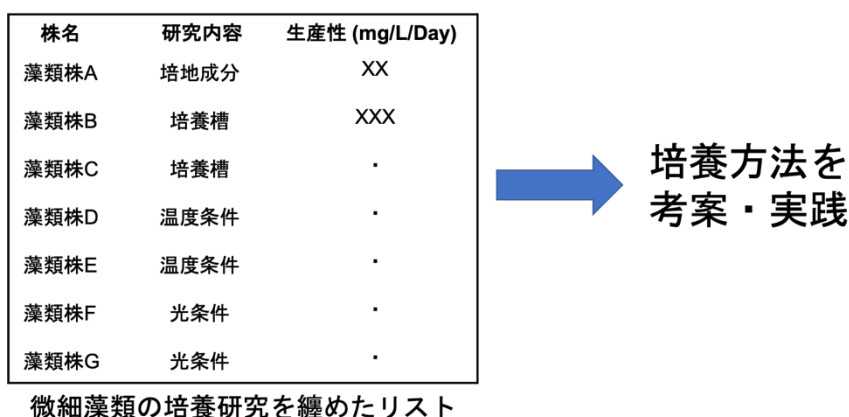


図9. 培養条件の検討に向けた予備調査

7.5 技術戦略③: 残渣活用方法の開発

微細藻類由来のオイルのみでは採算が取れない為、微細藻類由来のオイルは他の高付加価値物質と共に売り出す必要がある。微細藻類は細胞内にオイルのみならず色素成分、糖質、タンパク質等も含んでおり、オイル以外への用途も期待できる。よって、オイルを抽出した後の残渣の活用方法を検討する為に、①. 抽出残渣に含まれる成分の分析を行う。それと共に、②. 先行研究で報告された微細藻類からオイルを抽出した後の残渣利用に関する研究、③. 残渣に含まれている成分がどの程度の価格帯で売れるのか、市場規模はどの程度なのかといった事を調査し、残渣の利用方法を検討する。本技術戦略では、残渣成分の抽出方法、抽出残渣の用途に関する先行研究をリストアップするとともに、残渣成分の価格帯を纏めたリストを作成しておき(図10)、顧客に対して残渣をどのように活用したら良いかといった事を提案できるようにしておく。

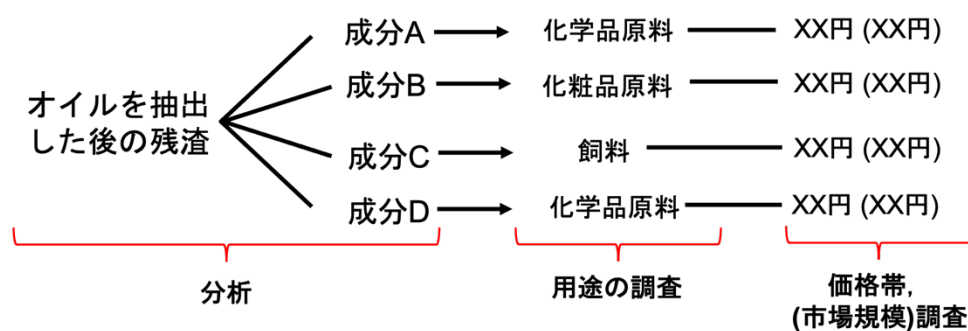


図10. 残渣の活用方法の検討

7.6 実施体制

本事業の創業期における実施体制を図11に示す。本事業の役割は、研究開発方針の策定・研究開発の実施、培養方法・残渣活用方法等の提案を行うための文献調査を実施する。この際、研究開発は神戸大学バイオ生産工学研究室、一般社団法人日本微細藻類技術協会(IMAT)に本事業の研究員を派遣し、共同研究を行っていく。神戸大学バイオ生産工学研究室との共同研究では、変異育種方法、ゲノム編集方法等を開発する他、屋外での培養に適した藻株の創出、屋外環境を模した小規模スケールでのオイル生産試験、細胞構成成分の分析に基づくオイル抽出残渣の活用法検討を行う。また、一般社団法人日本微細藻類技術協会とも共同研究を実施し、育種した株のオイル生産をベンチスケール規模で評価する。

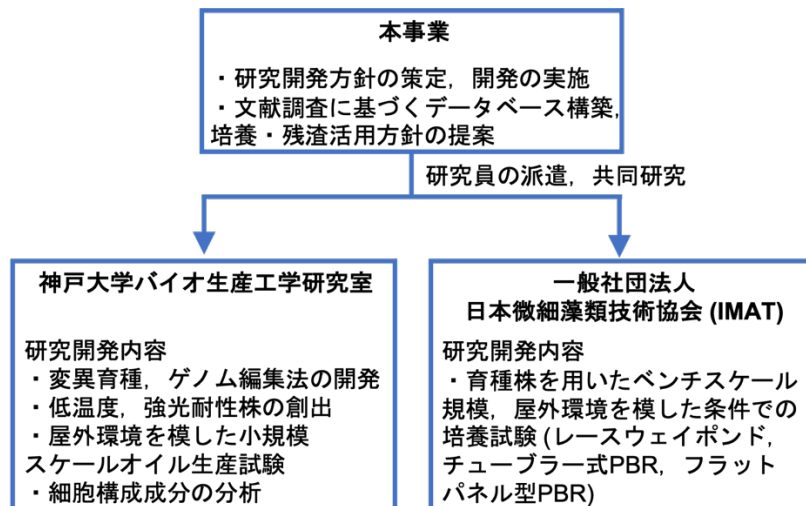


図 11. 本事業における実施体制

7.7 開発スケジュール

本事業における開発スケジュールを表 1 に示す。1 年目に「海水を用いて一段階でオイル生産が可能な変異株の創出」，「強光・低温に耐性を有する変異株の創出」を行う。2 年目では，前年に確立した手法を用いて，全ての特徴を融合した藻類株の創出を目指す。培養方法の確立に向けた調査は，1 年目に調査を完了させ，リストを構築・培養方法の検討を実施する，2 年目以降は前年に作成したリストを更新していくと共に，培養試験を実施し，最適培養条件を探索する。残渣の活用に向けた調査も，1 年目中に調査を完了させ，2 年目には情報リストを更新していく。基本的な開発を 2 年目までに完了させ，3 年目以降に本格的にサービスを提供できるような状態しておく（表 1）。

表 1. 技術開発要素と開発計画

技術開発要素	1年目	2年目
技術戦略① オイル生産に適した微細藻類 変異株の開発	①.海水に馴化した変異株の創出方法， 馴化株の創出 ②. 一段階でオイル生産可能な藻類株の 創出 ③. 屋外環境での培養に適した藻類変異 株の創出	・①～③の特徴を統合した変異株 の創出
技術戦略② 培養プロセス開発	・論文調査，データベース構築	・培養試験の実施，最適培養条件の 探索
技術戦略③ オイル抽出残渣の活用法開発	・細胞構成成分の分析 ・論文調査，データベース化	・残渣活用方針の考案

7.8 第7章 まとめ

本章では、イノベーションアイデアを実現する為の技術戦略について纏めた。本事業で提供する価値は①. 屋外環境で簡易的にオイル生産可能な変異株, ②. 変異株を用いた培養プロセス, ③. オイル抽出残渣の活用法の3つである。①. に関しては変異育種・ゲノム編集により一段階オイル生産能を付与するとともに, 実験室進化によって海水馴化・強光耐性能の付与・低温耐性能の付与を行っていく。②. については事前に微細藻類の培養研究を網羅的に調査することで培養戦略を立案できるように準備を進めていくとともに, 実験室規模～ベンチスケール規模での培養試験を実施する。③. については先行研究の網羅的な調査, 細胞残渣に含まれる成分の分析結果, 残渣に含まれる成分の市場規模等から残渣をどのように活用していくか, 考案できるような体制を整えていく。

引用

- [1] Kato, Yuichi, *et al.* "Evolutionary engineering of salt-resistant *Chlamydomonas* sp. strains reveals salinity stress-activated starch-to-lipid biosynthesis switching." *Bioresource technology* 245 (2017): 1484-1490.
- [2] Liu, Shuyu, *et al.* "Improving cell growth and lipid accumulation in green microalgae *Chlorella* sp. via UV irradiation." *Applied biochemistry and biotechnology* 175.7 (2015): 3507-3518.
- [3] Kato, Yuichi, *et al.* "Enhancing carbohydrate repartitioning into lipid and carotenoid by disruption of microalgae starch debranching enzyme." *Communications biology* 4.1 (2021): 1-11.
- [4] Zhang, Xue, *et al.* "Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool." *Applied microbiology and biotechnology* 98.12 (2014): 5387-5396.
- [5] Xie, Bo, *et al.* "High - throughput fluorescence - activated cell sorting for lipid hyperaccumulating *Chlamydomonas reinhardtii* mutants." *Plant biotechnology journal* 12.7 (2014): 872-882.
- [6] Südfeld, Christian, *et al.* "High-throughput insertional mutagenesis reveals novel targets for enhancing lipid accumulation in *Nannochloropsis oceanica*." *Metabolic Engineering* 66 (2021): 239-258.
- [7] 平成 24 年度～平成 27 年度成果報告書 バイオマスエネルギー技術研究開発 戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）海洋性緑藻による油脂生産技術の開発
- [8] Schierenbeck, Lisa, *et al.* "Fast forward genetics to identify mutations causing a high light tolerant phenotype in *Chlamydomonas reinhardtii* by whole-genome-sequencing." *BMC genomics* 16.1 (2015): 1-15.

第8章 知財戦略

8.1 知財戦略概要

本事業における知財戦略の概要を図1に示す。本事業における知財戦略は、技術戦略にて開発した①、「海水馴化株，増殖条件下・一段階でオイル生産が可能な株，低温耐性株，強光耐性株を用いたオイル製造(各々の特徴付与に寄与した遺伝子を改変した変異株の利用)」について，国際特許(取得必須国: 日本国内，東南アジア地域)を取得すること，②. 変異株の育種方法・培養方法・残渣活用法はノウハウ化すること，③. 開発した技術パッケージ(特許・ノウハウ)を顧客にライセンスし，オイルの売り上げから技術パッケージの寄与度を回収することである。

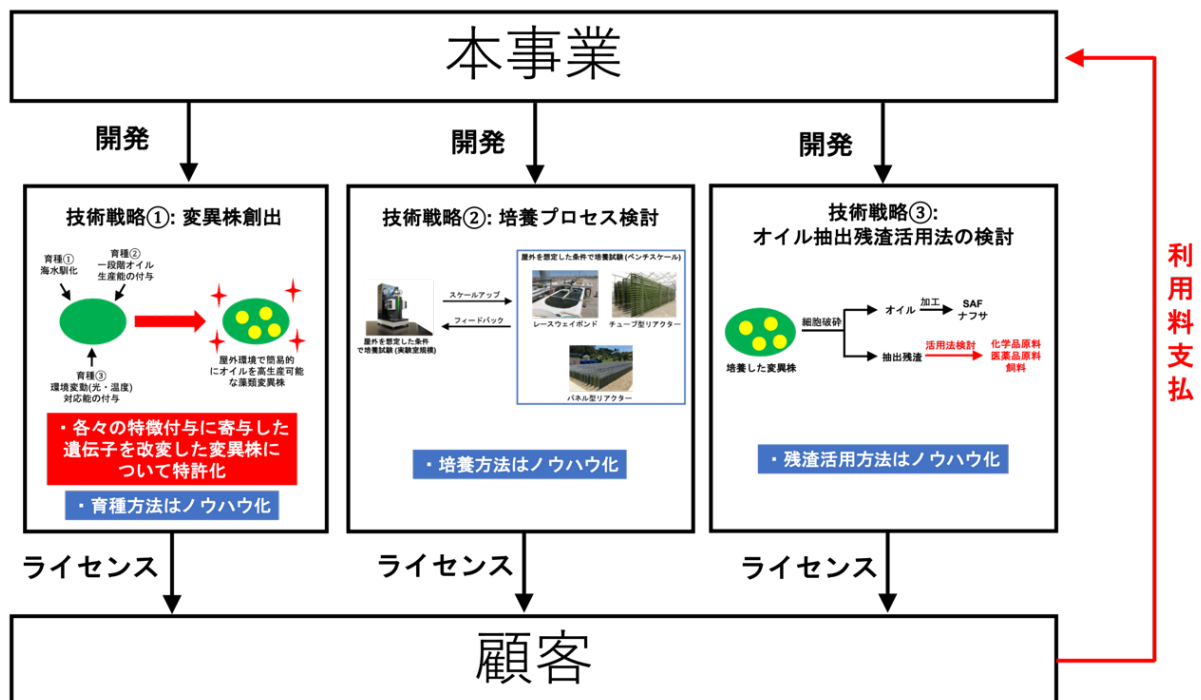


図1. 本事業における知財戦略

8.2 知財化される技術とオープン/クローズ戦略

本事業における技術戦略内容を表1に示す。本事業では、微細藻類からオイルを生産する上で必要な基盤技術を開発・提供する事業を行う為に、科学技術上のブレイクスルーを応用する事で様々な微細藻類から、海水を用いて一段階でオイル(TAG, ワックスエステル)生産可能な藻類変異株の創出を行う。それに加え、屋外でのオイル生産を見据えた強光耐性能、朝方の低温耐性能を付与していく。上記に挙げた特徴を有する藻類株を創出するとともに、創出した変異株の特徴付与に寄与した遺伝子を特定する。変異株を作出後は変異株を用いたベンチスケール規模での培養試験を行い、オイルを生産、オイル抽出残渣の検討を行う事が本事業における技術戦略である。

表1. 技術戦略で開発する項目

開発項目	実施内容
海水馴化株の創出	<ul style="list-style-type: none"> ・淡水性藻類を海水へ馴化 ・海水馴化寄与遺伝子の特定
一段階オイル生産株の創出	<ul style="list-style-type: none"> ・一段階オイル生産株の創出 ・一段階オイル生産寄与遺伝子の特定
強光耐性株の創出	<ul style="list-style-type: none"> ・強光条件への馴化 ・強光耐性寄与遺伝子の特定
低温耐性株の創出	<ul style="list-style-type: none"> ・低温条件への馴化 ・低温耐性寄与遺伝子の特定
変異株を用いたベンチスケール培養試験	<ul style="list-style-type: none"> ・関連研究のリストアップ ・データベース化 ・培養試験
残渣分析, 活用法検討	<ul style="list-style-type: none"> ・残渣分析法の確立 ・論文のリストアップ ・データベース化

上記技術戦略で開発する項目の中で、特許になりうるものとして、①. 海水馴化株、一段階オイル生産株、強光耐性株、低温度耐性株の育種方法、②. 変異株 (変異遺伝子)を用いたオイル製造、③. 培養方法 (培地成分等)が挙げられる。これら①～③の中で、本事業では②の変異株を用いた製造に関して特許を取得していく。この理由として、育種方法に関しては得られた変異株からはどのように育種をしたのか判別がつきにくい、変異株の特徴 (遺伝子)はゲノム配列の解読からどのように操作して変異株を取得したか判別可能であることが挙げられる。その他、ゲノム編集生物を屋外環境のような開放系で使用する際はゲノム編集の方法や改変した遺伝子及びその機能を関係省庁に報告する必要があることが挙げられる^[1]。編集する有効遺伝子を他社に使用されないよう特許で保護しておく必要があることから、遺伝子に関しては特許化することとした。育種方法・オイル生産方法 (培養方法)・残渣の活用方法はモノを見ただけではどのようにして生産したか判別がつきにくい為、特許化は行わない事とした。

8.3 特許出願方針

各々の特許の明細書執筆方針は表2のように実施する。請求項に記載する内容は、主に「特徴付与に寄与する遺伝子に関する情報」、「宿主」、「変異株を用いた培養」、「培養方法」、「変異株を用いたオイル生産」とする。請求項1では、創出する変異株の特徴やどのような変異が導入されたかを記載する。請求項2では、遺伝子操作された生物がどのような生物であるかといったことを記載する。本事業では、複数種に共通する遺伝子を特定することから、宿主を微細藻類全般と主張する。請求項3～5では、変異株の使用及び、変異株を用いてオイルを製造するといった旨を記載する。

表2. 明細書に記載する内容

	海水馴化株	一段階オイル生産	低温耐性株	強光耐性株
【請求項1】	海水馴化に寄与する遺伝子	一段階オイル生産(ワックスエステル, TAG)に寄与する遺伝子	低温耐性に寄与する遺伝子	強光耐性に寄与する遺伝子
【請求項2】	宿主(微細藻類)	宿主(微細藻類)	宿主(微細藻類)	宿主(微細藻類)
【請求項3】	変異株を用いた培養	変異株を用いた培養	変異株を用いた培養	変異株を用いた培養
【請求項4】	培養方法(バッチ, 半連続)	培養方法(バッチ, 半連続)	培養方法(バッチ, 半連続)	培養方法(バッチ, 半連続)
【請求項5】	変異株を用いてオイルを生産	変異株を用いてオイルを生産	変異株を用いてオイルを生産	変異株を用いてオイルを生産

8.4 知財の活用方法

研究開発型ベンチャー企業における知財の活用方法として、取得した知財を他社にライセンスアウトし、得られた利益から知財の寄与度を回収するといった活用方法が行われている^[2]。人工蜘蛛糸を製造している Spiber 社は生産設備を有していなかった創業期には基盤技術の特許化し、他社にライセンスアウトする戦略を取っていた。ペプチドリーム社は創薬開発プラットフォームに関する特許を他社にライセンスアウトする戦略を取る事で売上・研究開発資金を獲得している^[3]。本事業は研究開発型ベンチャー企業である事から、製造設備や製造体制を有していない。よって、本事業では開発した技術パッケージを藻類オイル事業へ参入している企業、これから参入を検討している企業へライセンスする。この際、ライセンス料はオイルの売上から変異株の寄与度とする。知財のライセンス料金は通常実施権の場合だと売上の 3~5%、専用実施権の場合だと 10%程度とされている^[2]。本事業の場合、自社で生産体制を整えオイルを生産するわけではなく、オイル生産体制の構築～製造はライセンス先企業が実施する。よって本事業の寄与度は上記よりも低くなる事が想定される。そこで本事業では、本事業の寄与度は提携先の利益の 10%を知財(技術パッケージ)ライセンス料と仮定し、料金を回収する。

8.5 第8章 まとめ

本章では、イノベーションアイデアを実現する為の知財戦略について纏めた。本事業では、「特定遺伝子を改変した微細藻類変異株を用いたオイル製造方法」といったコンセプトの特許を取得する他、育種方法、培養方法等を秘匿化する事とした。この際、取得する特許は日本国内の他、オイル生産の拠点ともなりうる東南アジア地域での出願とした。特許出願内容は主に「各々の特徴付与に寄与した遺伝子」、「遺伝子の操作方法」、「宿主（微細藻類全般）」、「遺伝子操作を行った変異株を用いたオイル製造」の4項目とした。開発した技術パッケージに関しては、ライセンスといった方法を通じて活用し、利益を得ていく事とした。

引用

[1] ゲノム編集技術で作出された生物のカルタヘ法上の取扱について. 経済産業省.

https://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/mono/bio/cartagena/detailed_info/genome.html

[2] 特許出願ラボ.

<https://tokkyo-lab.com/co/info-license>

[3] 一歩先行く国内外ベンチャー企業の知的財産戦略 事例集. IP Strategies for Startups. 平成29年度. 経済産業省 特許庁.

第9章 財務戦略

9.1 財務戦略概要

本章では、イノベーションアイデアを実現する為の財務戦略についてまとめている。本事業は、事業戦略で述べたように研究開発期間（創業1~2年）、他社との共同開発期間（創業3~6年）、オイル売上の回収期間（創業7年目~）を経て事業を売却する（創業10年目~）。研究開発期間における資金運営方法として、公的機関等から資金を調達し、自社技術の開発を実施していく。同時にコンサルティング等の実施により利益を挙げていく。共同開発期間では、事業会社との共同開発を実施する際に共同開発先からの出資を得る。同時に受託研究・コンサルティングを実施する事で利益を挙げて行く。オイルの売上回収期間では他社と共同で開発した技術を利用し、オイルを販売していく。この際、オイルの売上から本事業で開発した技術パッケージの寄与度を本事業の利益として享受し、成長を加速させる。最終的には、事業会社に本事業を売却する事でエグジットとする（図1）。

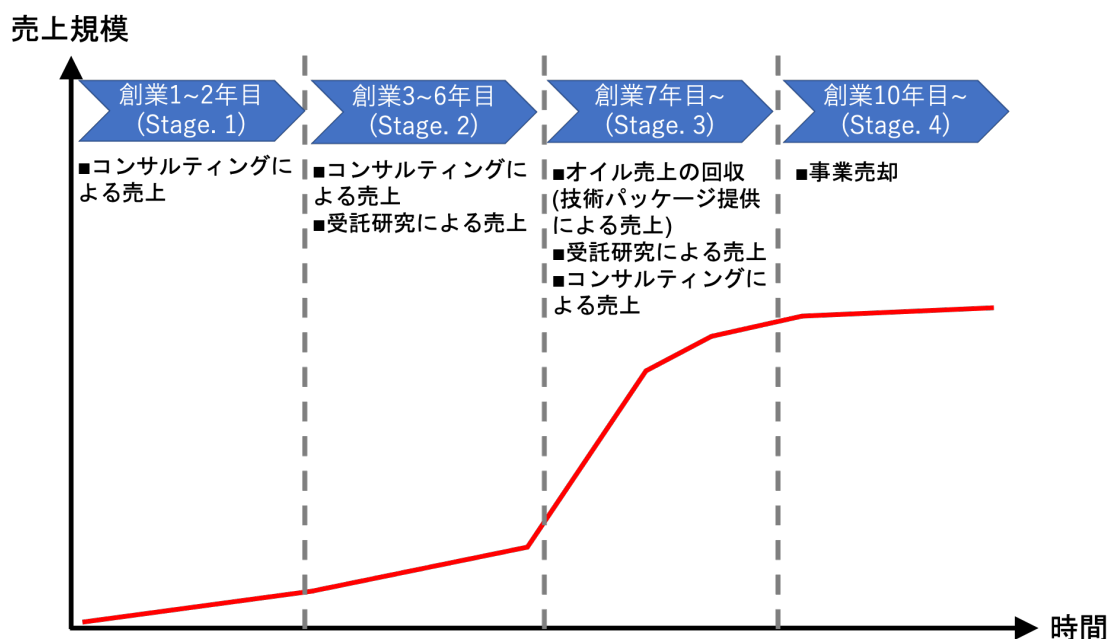


図1. 財務戦略概要

次項からは Stage. 4, 事業を売却するまでの期間 (Stage. 1~3)におけるキャッシュフローを予測した結果を述べる。

9.2 研究開発期間（創業 1~2 年目）における財務戦略

9.2.1 必要資金と使用計画

研究開発期間における必要資金一覧を表 1 に示す。研究開発期間に必要な費用として、会社運営費（30 万円/月）、事務所代（2 万円/月）、共同研究を実施する神戸大学との共同研究費（1,000 万円、200 万円/件）、大学に設置されている分析機器のリース費用（30 万円/月）、培養プロセス検討を実施する IMAT の設備利用費（40 万円/年）、研究を実施する上で必要な試薬・消耗品費用（60 万円/月）、変異株のゲノム配列解析等、外部に実験を委託する外注費（120 万円/年）、特許出願費用（200 万円、50 万円/件）、その他予備費用（10 万円/月）が挙げられる。

表 1. 必要費用の前提条件

必要費用	必要金額
会社運営費	30万円/月
事務所	2万円/月
神戸大学との共同研究費	1,000万円 (200万円/件)
機器利用リース	30万円/月
IMAT(培養プロセス研究拠点) 設備利用費	40万円/年 (初年度は入会料として別途40万円 を支払い)
試薬・消耗品費用	60万円/月/2人
外注費	120万円/年
特許出願	200万円 (50万円/件)
その他費用	10万円/月

各々資金における設定根拠は下記の通りである。

①. 会社運営費

会社運営費は、会社で使用する事務用具、出張費等に使用する。必要金額は相場が不明であったことから 30 万円/月と仮定した。

②. 事務所費用

事務所費用について、本事業では神戸大学のインキュベーション施設に事務所を借り、事業を開始していく。調査の結果、インキュベーション施設のオフィス利用料は一ヶ月あたり 2 万円であったことから 2 万円/月と設定した^[1]。

③. 共同研究費

ヒアリング結果(詳細は参考資料: IS 成果書参照)をもとに、神戸大学との共同研究費を1,000万円(一件あたり200万円)と設定した。本事業では、神戸大学と①. 海水を用いた一段階オイル生産微細藻類変異株の開発、②. 低温耐性株の創出、③. 強光耐性株の創出、④. 屋外環境を見据えた小規模培養プロセスの検討、⑤. オイル抽出残渣の検討といった5件のテーマにて共同研究を実施する。よって2年間で1,000万円の共同研究費となる。

④. 機器利用リース費用

研究開発期間では大学に設置されている分析機器を用いて分析等を行う。分析機器の利用費は、神戸大学研究基盤センターに設置されている分析機器の利用料金をもとに仮定を行った。研究基盤センターに設置されている分析機器の利用費は一時間あたり2,000円~5,000円程度であった^[2]。よって、30万円の機器利用リースを確保することで一ヶ月あたり最大で60時間分析機器を利用できることになる。筆者の経験から、一ヶ月あたり60時間の分析時間を確保することで十分な量のサンプルを分析できると考える。

⑤. IMAT 設備利用費

IMATの設備利用費は2年間で120万円として設定した。これはIMATの設備利用を行う際、初年度の利用費が80万円/年、2年目は40万円/年であることが挙げられる^[3]。

⑥. 試薬・消耗品費用

共同研究費と同様、ヒアリング結果を参考に設定した。

⑦. 外注費

本事業では、変異株を取得し、取得した変異株のゲノム解析を通じてオイル増産に寄与した遺伝子を特定していく。ゲノム配列の解析等特別な機器が必要なものについては外注する必要があるため、外注費を設定・仮定している。

⑧. 特許出願

本事業では、変異株の創出に関する4件の国際特許を出願する予定である。国際特許の出願費用の相場は50万円/件である^[4]ことから合計で200万円を特許出願費用として設定している。

⑨. その他

予備資金として一ヶ月あたり10万円を必要資金として仮定した。

表1の前提をもとに、必要費用の使用計画を表2・表3に示す。表2に示した1年目の使用計画に関して、会社運営費は30万円/月であるため毎月30万円としている。事務所費用についても同様に2万円/月としている。共同研究費は4月に1,000万円を支払う。分析機器利用リースは30万円/月としている。IMATの利用費に関しては、4月に80万円を支払う。試薬・消耗品は毎月60万円/月を上限とし、残った額は翌月に持ち越せるようにする。外注費についても同様に毎月10万円を上限とし、残った額は翌月に持ち越せるようにする。その他、予備費用を10万円/月として設定している。

表2. 創業1年目における資金利用計画（単位は百万円）

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
会社運営費	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
事務所	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
共同研究費	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
分析機器 利用リース	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
設備利用費 (IMAT)	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
試薬・ 消耗品	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
外注費	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
その他費用	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
合計支出額	12.2	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4

表3に、創業2年目における必要費用の使用計画を示す。会社運営費、事務所費用は前年と同様である。神戸大学との共同研究費は1年目に支払済である（表2）。分析機器利用リース、IMATの設備利用費、試薬・消耗品費用、外注費も前年と同様の額を使用予定とする。特許出願を創業2年目の12月に実施する予定であり、200万円を設定している。その他費用は毎月10万円ずつとしている。

表3. 創業2年目における資金利用計画（単位は百万円）

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
会社運営費	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
事務所	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
分析機器 利用リース	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
設備利用費 (IMAT)	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
試薬・ 消耗品	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
外注費	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
特許出願	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0
その他費用	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
合計使用額	1.8	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	3.4	1.4	1.4	1.4

9.2.2 資金調達方法

研究開発期間における資金調達は、

- ・ 自己出資金 (1,000 万円)
- ・ 公的機関から調達 (4,000 万円)とする。

公的機関からの調達に関しては、近年国立研究開発法人 科学技術振興機構 (JST)、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)といった公的機関が研究開発型のスタートアップ企業の支援を実施している^{[5][6]}。例えば、NEDOが実施している研究開発型スタートアップ支援では、NEDOがシード期のスタートアップ企業に対して研究開発費 (助成費用の 2/3 以下)を補助するとともに、NEDOが認定したベンチャーキャピタル (VC)もスタートアップ企業に資金を補助する (助成費用の 1/3 以上)といった取り組みがなされている。助成期間は 2 年以内であり、NEDOからの助成額は 200 百万円以内/2 年とされている。これらのような制度を活用して、4,000 万円の資金調達を実施する。この額を設定した理由として、本事業と同様微細藻類を用いたビジネスを展開しているアルガルバイオ社が創業時に 4,000 万円の資金調達を実施した事が挙げられる^[7]。アルガルバイオ社はカロテノイド等の機能性物質を生産する微細藻類のライブラリ開発・提供事業を行っているスタートアップ企業であり、本事業と事業内容も類似している事から同様の資金を獲得できると仮定した。

9.2.3 収益計画

研究開発期間では、公的基金等を活用しながら研究開発を行い、自社技術を開発するとともに、コンサルティング等の実施により自社で利益を挙げていく。コンサルティング料の相場は 120 万～400 万円/年とされている^[8]。本事業では、公的機関等から得た資金を用いて自社技術を開発すると共に、コンサルティング等を通じて自社でも利益を挙げられるようにする。尚、本事業におけるコンサルティングの売上は 200 万円/年と仮定する。

9.2.4 創業 1~2 年目におけるキャッシュフロー予測

9.2.1~9.2.3 を踏まえ、創業 1~2 年目におけるキャッシュフローの予測を行った。結果を表 4・表 5 に示す。1 年目の 4 月に自己資本金 1,000 万円、助成金 4,000 万円の合計 5,000 万円の資金調達を実施する。10 月にコンサルティングを行う先を確保し、200 万円を自社利益として計上する。これらを前提とした企業活動を一年間実施した際、年度末に手元に残る資金は約 2,400 万円となる。

表 4. 創業 1 年目におけるキャッシュフロー予測 (単位は百万円)

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	備考
売上	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9月にコンサルティングによる収益を計上 (計上額は9.2.3参照)
費用	12.2	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	表2参照
営業利益	▲12.2	▲1.4	▲1.4	▲1.4	▲1.4	▲1.4	0.6	▲1.4	▲1.4	▲1.4	▲1.4	▲1.4	売上-費用
法人税	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	30%と仮定・1年目は赤字なため法人税の支払いは無し
税引後 営業利益	▲12.2	▲1.4	▲1.4	▲1.4	▲1.4	▲1.4	0.6	▲1.4	▲1.4	▲1.4	▲1.4	▲1.4	営業利益-法人税
資本収支	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4月に自己出資金10百万円、助成金40百万円を調達
現金残高	37.8	36.4	34.9	33.5	32.1	30.7	31.3	29.8	28.4	27.0	25.6	24.2	4月分は資本収支・税引後営業利益から算出 5月以降は前月現金残高・当月税引後営業利益から算出

創業 2 年目におけるキャッシュフロー予測を表 5 に示す。前年と同様、9月にコンサルティングの継続契約を締結する。これら前提をもとにキャッシュフローを予測した結果、創業 2 年目の年度末の現預金残高は 670 万円となった。

表 5. 創業 2 年目におけるキャッシュフロー予測 (単位は百万円)

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	備考
売上	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9月にコンサルティングによる収益(前年の案件を継続)を計上
費用	1.8	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	3.4	1.4	1.4	1.4	表3参照
営業利益	▲1.8	▲1.4	▲1.4	▲1.4	▲1.4	0.6	▲1.4	▲1.4	▲3.4	▲1.4	▲1.4	▲1.4	売上-費用
法人税	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	30%と仮定・2年目は赤字なため法人税の支払いは無し
税引後 営業利益	▲1.8	▲1.4	▲1.4	▲1.4	▲1.4	0.6	▲1.4	▲1.4	▲3.4	▲1.4	▲1.4	▲1.4	営業利益-法人税
資本収支	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	資金調達は1年目に実施済
現金残高	22.3	20.9	19.5	18.1	16.7	17.2	15.8	14.4	11.0	9.6	8.1	6.7	前月現金残高・当月税引後営業利益から算出

9.3 共同開発期間（創業3~6年目）における財務戦略

9.3.1 必要資金と使用計画

共同開発期間における必要資金一覧を表6に示す。共同開発期間に必要な費用として、会社運営費（500万円/年）、人件費（2,500万円/年）、自社研究拠点・事務所（300万円/年）、機器費用（5,000万円/年）、IMATの設備利用費（40万円/年）、研究を実施する上で必要な試薬・消耗品費用（1,000万円/年）、外注費（300万円/年）、特許登録・維持費用（800万円・100万円/年）、その他費用（200万円/年）が挙げられる。

表6. 共同開発期間における必要資金一覧

	費用
会社運営費	500万円/年
人件費 (社会保険料込)	2,500万円/年 -役員: 600万円/年×3人 -研究員: 400万円/年×1人 -事務職員: 300万円/年×1人
自社研究拠点・事務所費	300万円/年
機器費用	5,000万円/年
設備利用費 (IMAT)	40万円/年
試薬・消耗品費	1,000万円/年
外注費	300万円/年
特許登録・維持費	特許登録費用: 800万円 (200万円×4件) 特許維持費: 100万円/年 (25万円×4件)
その他費用	200万円/年

各々資金における設定根拠は下記の通りである。

①. 会社運営費

会社運営費は、会社で使用する事務用具、出張費等に使用する。本期間では研究開発期間よりも外部に赴く機会が増加する事が考えられるため、研究開発期間よりも多額の会社運営費用を設定している。

②. 人件費

他社との共同開発に伴い、社員を3名から5名に増員する。増員するメンバーは研究員1名と事務職員1名とする。他社との共同開発に伴い、業務量の増加が見込まれる事から社員を追加した。創業メンバーである役員の人件費を600万円/年/人、研究員の人件費を400万円/年/人、事務職員の人件費を300万円/年/人と仮定した。

④ . 自社研究開発拠点・事務所費

研究開発期間(創業1-2年目)では神戸大学に研究員を派遣して研究開発を行っていた。共同開発期間(創業3-6年目)では、自社で研究開発拠点を設ける事で研究開発の自由度を向上させる。研究開発拠点・事務所はクリエイティブラボ神戸 (CLIK)内に設置する。CLIKの設備利用費はシェアラボが月額約13,000円、シェアオフィスが約30,000円、ウェットラボ(自社のみが使用)が月額賃料3,600円/m²、共益費1,100円/m²であった^[9]。本事業ではCLIKの41 m²のウェットラボを使用する予定である。これらを全て合わせると月額25万円程度、年間で約300万円程度となる。

④. 機器費用

共同開発期間では、自社で研究開発拠点を設ける。ラボに分析機器や培養装置を設置する関係上、本項目を追加した。分析機器(GC-MS等)のリース費用は150万円~200万円/月が相場である。また、培養に必要な人工気象器は一台あたり200万円程度が相場である。本事業では、培養設備等年間を通じて必要なものは購入、分析装置等実験の都度必要なものはリースといった方針をとる。設定金額は現段階では仮定のものではあるが、必要な分析装置等のリース費用は5,000万円を仮定しておく事で研究開発を滞りなく実施できると考えられる。

⑤. 設備利用費 (IMAT)

研究開発期間(創業1~2年目)と同様の額を計上している。

⑥. 試薬・消耗品費

研究員の増員に伴い年間使用額を増加し1,000万円/年とした。

⑦. 外注費

研究員の増員に伴い年間使用額を増加し、300万円/年とした。

⑧. 特許登録・維持費用

特許登録費用・維持費用を計上した。登録料・維持費用はそれぞれ国際特許の登録・維持費用の相場から引用している^[10]。

⑨. その他費用

従業員の増加に伴い、その他費用の額を120万円/年から200万円/年に増加した。

表6の前提をもとに、必要費用の使用計画を表7に示す。会社運営費は毎年500万円としてい

る。人件費は毎年 2,500 万円を計上している。自社研究拠点・事務諸費用は毎年 300 万円，機器費用は毎年 5,000 万円，IMAT 設備利用費は毎年 40 万円，外注費は毎年 300 万円，特許登録費用は創業 4 年目に 800 万円，その後維持を行う為に毎年 100 万円ずつ使用する。その他費用は毎年 200 万円としている。

表 7. 共同開発期間（創業 3~6 年目）における資金利用計画（単位は百万円）

	3年目	4年目	5年目	6年目
会社運営費	5.0	5.0	5.0	5.0
人件費	25.0	25.0	25.0	25.0
自社研究拠点・事務所	3.0	3.0	3.0	3.0
機器費用	50.0	50.0	50.0	50.0
設備利用費 (IMAT)	0.4	0.4	0.4	0.4
試薬・消耗品	10.0	10.0	10.0	10.0
外注費	3.0	3.0	3.0	3.0
特許登録・維持	0.0	8.0	1.0	1.0
その他費用	2.0	2.0	2.0	2.0
支出合計	98.4	106.4	99.4	99.4

9.3.2 資金調達方法

共同開発期間では，事業会社のコーポレートベンチャーキャピタル (CVC)等からの出資を受ける予定である。近年，大企業がスタートアップ企業に出資し，共同で技術開発を行うといった取り組みがなされてきている。例えば，島津製作所がバックス・バイオイノベーション社に出資し，業務提携契約を締結した例などが挙げられる^[11]。筆者が事業戦略を構築する際にヒアリングを行った三菱ケミカル社においては，有望なスタートアップ企業に対して戦略的出資及び協業推進を実施する子会社を設立しており，脱炭素化を実現する上で重要となる技術を有するスタートアップ企業との連携を検討している^[12]。その他，食品メーカーであるニチレイ社が昆虫食の利用普及を目指しているスタートアップ企業である TAKEO 社に出資を行った事例^[13]，日立製作所の子会社である日立エナジー社が水素を活用した鉄鋼生産に関する技術を有するスタートアップ企業である H₂ グリーンスチール社に出資を行った事例^[14]等が挙げられる。本事業に出資される金額は 4 億円とする。この理由として，本事業と同様の事業を行っているアルガルバイオ社においても創業 3 年程度で約 4 億円の資金調達を行っていた事例が挙げられる為である^[7]。

9.3.3 収益計画

創業 1-2 年の時と同様，コンサルティングも継続して行う事で利益を挙げて行く。合わせて，外部からの受託研究を実施する事で利益をあげていく。受託研究の相場は研究内容によって異なる

が、費用は受託研究遂行のために必要となる直接経費（謝金・消耗品等購入代金）に加え、間接経費（直接経費の30%）とされている^[15]。

9.3.4 創業3~6年目におけるキャッシュフロー予測

共同開発期間（創業3~6年目）におけるキャッシュフロー予測結果を表8に示す。創業3年目以降受託研究・コンサルティングの件数を増加し、自社利益をあげていく。受託研究・コンサルティングは3年目で2件、5-6年目で3-4件実施し、それぞれ400万円、1,000万円を売り上げる。事業会社からの出資は創業3年目で受ける。活動を通じて、6年目末の年度末残高は約3,100万円となる。

表8. 創業3~6年目におけるキャッシュフロー予測結果（単位は百万円）

	3年目	4年目	5年目	6年目	備考
売上	4.0	4.0	10.0	10.0	3年目以降、コンサルティング・受託研究の実施件数を増加
費用	98.4	106.4	99.4	99.4	9.3.1項参照
営業利益	▲94.4	▲102.4	▲89.4	▲89.4	売上-費用
法人税	0.0	0.0	0.0	0.0	30%と仮定・赤字なため法人税の支払いは無し
税引後営業利益	▲94.4	▲102.4	▲89.4	▲89.4	営業利益-法人税
資本収支	400.0	0.0	0.0	0.0	3年目に資金調達400百万円を実施
現金残高	312.3	209.9	120.5	31.1	3年目残高は2年目末残高・3年目税引き後営業利益・3年目資本収支を元に算出 4年目以降は前年度現金残高と当年税引後営業利益を元に算出

9.4 売上回収期間（創業7~9年目）における財務戦略

9.4.1 必要資金と使用計画

売上回収期間における必要資金一覧を表9に示す。売上回収期間に必要な費用として、会社運営費（500万円/年）、人件費（4,000万円/年）、自社研究拠点・事務所（500万円/年）、分析機器利用リース（7,000万円/年）、IMATの設備利用費（40万円/年）、研究を実施する上で必要な試薬・消耗品費用（1,200万円/年）、外注費（500万円/年）、特許維持費用（100万円）、特許出願費用（200万円）、その他費用（200万円/年）が挙げられる。

表9. 売上回収期間（創業7~9年目）における必要資金一覧

	費用
会社運営費	500万円/年
人件費 (社会保険料込)	4,000万円/年 -役員: 1,000万円/年×3人 -研究員: 650万円/年×1人 -事務職員: 350万円/年×1人
自社研究拠点・事務所費	500万円/年
機器費用	7,000万円/年
設備利用費 (IMAT)	40万円/年
試薬・消耗品費	1,200万円/年
外注費	500万円/年
特許維持費	100万円/年 (25万円×4件)
特許出願費用	200万円 (50万円×4件)
その他費用	200万円/年

各々の資金の設定根拠を下記に示す。

①. 会社運営費

共同開発期間と同様である。

②. 人件費

従業員の取り組みを評価し、増給した値を設定している。

③. 自社研究開発拠点・事務所費

研究開発を強化するために、実験スペースを拡大(41 m²→74 m²)した分の費用を追加している。

④. 機器費用

研究開発を強化するために、機器費用を増額した。

⑤. 設備利用費 (IMAT)

研究開発期間 (創業 1~2 年目)と同様の額を計上している。

⑥. 試薬・消耗品費

研究開発を強化するために、1,200 万円/年に増額した。

⑦. 外注費

研究開発を強化するために、500 万円/年に増額した。

⑧. 特許維持費用

共同開発期間の値と同様である。

⑨. 特許出願費用

研究開発の強化による新たな技術開発を通じて、既存特許の強化に寄与する 4 件の特許を出願する。費用は表 1 と同様である。

⑩. その他費用

共同開発期間と同様の額として仮定を行った。

表 9 の前提をもとに、必要費用の使用計画を表 10 に示す。会社運営費は毎年 500 万円としている。人件費は毎年 4,000 万円を計上している。自社研究拠点・事務諸費用は毎年 500 万円、機器費用は毎年 7,000 万円、IMAT 設備利用費は毎年 40 万円、試薬・消耗品費用は 1,200 万円、外注費は毎年 500 万円、特許維持費用を毎年 100 万円ずつ使用する。創業 9 年目に新たに特許出願を行う関係から 200 万円を支払う。その他費用は毎年 200 万円としている。

表 10. 売上回収期間（創業 7~9 年目）における資金利用計画（単位は百万円）

	7年目	8年目	9年目
会社運営費	5.0	5.0	5.0
人件費	40.0	40.0	40.0
自社研究拠点・事務所	5.0	5.0	5.0
分析機器利用リース	70.0	70.0	70.0
設備利用費 (IMAT)	0.4	0.4	0.4
試薬・消耗品	12.0	12.0	12.0
外注費	5.0	5.0	5.0
特許維持費用	1.0	1.0	1.0
特許出願費用	0.0	0.0	2.0
その他費用	2.0	2.0	2.0
支出合計	140.4	140.4	142.4

9.4.2 資金調達

9.4.1 で示した資金使用計画を実現するために、新たに VC 等から資金調達を実施する。資金調達額は本事業と類似した事業を展開しているアルガルバイオ社の出資額を参考にして仮定する。アルガルバイオ社は創業期に 0.4 億円，創業 1 年後に 4 億円，創業 5 年後に 5.9 億円の資金調達を実施している。本事業では，アルガルバイオ社の資金調達額^[7]を参考に創業 7 年目に 5 億円の資金調達ができたと仮定する。

9.4.3 収益計画

9.4.3.1 受託研究・コンサルティングによる売上

共同開発期間と同様に実施する。

9.4.3.2 SAF として販売した際の売上予測

売上回収期間では，開発した技術を用いて SAF を製造し，SAF の売上から本事業の寄与度を回収する。売上額を予測するために，表 11 に石油由来ジェット燃料の市場規模を算出した。市場規模の算出は過去 10 年間，「日本国内の航空機」と「日本から海外に飛行する航空機」で使用したジェット燃料量を調査^[16]し，使用量の平均値を求めた。使用量の平均値からジェット燃料の価格 100 円を乗じ市場規模を算出した。算出の結果，石油由来ジェット燃料の市場規模は約 6,000 億円となった。

表 11.石油由来ジェット(日本国内, 日本発の飛行機に搭載)燃料の市場規模

	2012年	2013年	2014年	2015年	2016年	2020年	平均
消費量 (kL)※	5,938,473	6,825,538	6,620,581	6,796,224	7,055,205	4,307,502	6,257,254
市場規模 (億円)※※	5938	6825	6620	6796	7055	4307	6257

※: SAF 消費量は過去 10 年間の国内便で使用したジェット燃料の使用量, 日本から海外に飛行するジェット燃料の使用量である. 2017 年~2019 年は統計データが確認できなかった(1 月~12 月全ての統計データが確認できなかった)為, 省略している.

※※: 1L あたり 100 円として計算

石油由来ジェット燃料の市場規模を 6,000 億円とし, 本事業における売上予測を行った結果を表 12 に示す. この際, SAF を既存の石油由来ジェット燃料に 10%混合する事とし, SAF の市場規模を 600 億円とした. この理由として, 2030 年までに SAF を既存の石油由来燃料に 10%以上混合する事が目標とされているためである^[17]. 本事業が技術を提供する企業における SAF のシェアを 10%~50%とすると提携先の売上は 60 億円~300 億円になる. 石油企業の利益率が 5%程度であることから, 提携先の利益は約 3 億円~15 億円とした. オイルは本事業と提携先との共同開発技術によって開発されたものであることから提携先の利益のうちから本事業の取り分を 10%と仮定した. これらの前提をもとに本事業の売上を予測した結果, 3,000 万円~1.5 億円となった.

表 12. 国内発航空機に搭載する SAF の市場規模と本事業の売上予測

ジェット燃料の市場規模(億円)	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000
SAFの混合率(%)	10	10	10	10	10
SAFの市場規模(億円)	600	600	600	600	600
提携先のシェア(%)	10	20	30	40	50
提携先の売上(億円)	60	120	180	240	300
オイルの利益率(%)	5	5	5	5	5
提携先の利益(億円)	3	6	9	12	15
利益の取り分(%)	10	10	10	10	10
本事業の売上(億円)	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5

9.4.3.3 バイオナフサとして販売した際の売上予測

微細藻類から製造したオイルをナフサの代替として販売した場合の売上予測を行うために, ナフサの①. 国内市場規模を予測し, ②. 本事業と提携する企業が獲得するシェアを仮定, ③. 本事業が売上に寄与する割合の仮定のもと, 本事業の売上予測を行った(表 13・表 14). 2016 年~2020 年, ナフサは平均で 17,300,000 kL 製造されている^[18]. ナフサ 1 L あたり¥100 とし, 市場規模予

測を行った結果ナフサの国内市場は 1.7 兆円程度となった。

表 13. ナフサの国内市場規模^[15]

	2016年	2017年	2018年	2019年	2020年	平均
生産量 (kL)	19,930,000	18,760,000	16,420,000	18,050,000	13,350,000	17,300,000
市場規模 (億円)	19,930	18,760	16,420	18,050	13,350	17,300

SAF 同様、ナフサも 10%をバイオ由来のオイルで代替すると仮定し、バイオナフサの市場規模を予測した結果、約 1,730 億円となった。本事業と提携する事業会社におけるシェアを 10%~50% とすると提携先の売上は 173 億円~850 億円となる。利益率を 5%とすると提携先の利益は 8.7 億円~42.5 億円となる。SAF と同様、提携先利益から本事業の取り分を 10%とすると本事業の年間売上は約 9,000 万円~4.3 億円程度となった（表 14）。

表 14. バイオナフサとして販売した際の売上予測

ナフサの市場規模 (億円)	17,300	17,300	17,300	17,300	17,300
バイオオイルでの代替率 (%)	10	10	10	10	10
バイオナフサの市場規模 (億円)	1,730	1,730	1,730	1,730	1,730
提携先のシェア (%)	10	20	30	40	50
提携先の売上 (億円)	173	346	519	692	865
オイルの利益率 (%)	5	5	5	5	5
提携先の利益 (億円)	8.7	17.3	26.0	34.6	43.3
利益の取り分 (%)	10	10	10	10	10
本事業の売上 (億円)	0.9	1.7	2.6	3.5	4.3

9.4.4 創業 7~9 年目におけるキャッシュフロー予測

9.4.4.1 SAF としてオイルを販売した場合

生産したオイルを SAF として販売した際のキャッシュフロー予測結果を表 15・表 16 に示す。受託研究はこれまでと同様引き続き実施していく。創業 7 年目に VC 等から 5 億円の資金調達を実施する。SAF の売上は表 12 を参照し 3,000 万円~1.5 億円とし、企業活動を実施すると、創業 9 年目末の現金残高は約 2.3 億円~5.9 億円程度となった。

表 15. 生産したオイルを SAF として販売した時のキャッシュフロー予測（単位は百万円）

ケース①: SAF 売上を 30 百万円とした場合

	7年目	8年目	9年目	備考
売上	40.0	40.0	40.0	コンサルティング・受託研究での売上10百万円+SAF販売による売上30百万円
費用	140.4	140.4	142.4	表10参照
営業利益	▲100.4	▲100.4	▲102.4	売上-費用
法人税	0.0	0.0	0.0	30%と仮定・赤字なため法人税の支払いは無し
税引後営業利益	▲100.4	▲100.4	▲102.4	営業利益-法人税
資本収支	500.0	0.0	0.0	7年目に資金調達500百万円を実施
現金残高	430.7	330.3	227.9	7年目残高は6年目末残高・7年目税引き後営業利益・7年目資本収支を元に算出 8年目以降は前年度現金残高と当年税引後営業利益を元に算出

表 16. 生産したオイルを SAF として販売した時のキャッシュフロー予測（単位は百万円）

ケース②: SAF 売上を 150 百万円とした場合

	7年目	8年目	9年目	備考
売上	160.0	160.0	160.0	コンサルティング・受託研究での売上10百万円+SAF販売による売上150百万円
費用	140.4	140.4	142.4	表10参照
営業利益	19.6	19.6	17.6	売上-費用
法人税	0.0	0.0	0.0	前年までの営業利益の赤字分を控除した関係から支払いはなし
税引後営業利益	19.6	19.6	17.6	営業利益-法人税
資本収支	500.0	0.0	0.0	7年目に資金調達500百万円を実施
現金残高	550.7	570.3	587.9	7年目残高は6年目末残高・7年目税引き後営業利益・7年目資本収支を元に算出 8年目以降は前年度現金残高と当年税引後営業利益を元に算出

9.4.4.2 バイオナフサとしてオイルを販売した場合

生産したオイルをバイオナフサとして販売した際のキャッシュフロー予測結果を表 17・表 18 に示す。SAF の際と同様、受託研究はこれまでと同様引き続き実施していく。創業 7 年目に VC 等から 5 億円の資金調達を実施する。バイオナフサの売上は表 13 を参照し 9,000 万円～4.3 億円とした。これらの前提をもとに企業活動を実施すると、創業 9 年目末の現金残高は約 4.1 億円～12.8 億円程度となった。

表 17. 生産したオイルをナフサとして販売した時のキャッシュフロー予測

(単位は百万円)

ケース①: ナフサ売上を 90 百万円とした場合

	7年目	8年目	9年目	備考
売上	100.0	100.0	100.0	コンサルティング・受託研究での売上10百万円+ナフサ販売による売上90百万円
費用	140.4	140.4	142.4	表10参照
営業利益	▲40.4	▲40.4	▲42.4	売上-費用
法人税	0	0	0	30%と仮定・赤字なため法人税の支払いは無し
税引後営業利益	▲40.4	▲40.4	▲42.4	営業利益-法人税
資本収支	500	0	0	7年目に資金調達500百万円を実施
現金残高	490.7	450.3	407.9	7年目残高は6年目末残高・7年目税引き後営業利益・7年目資本収支を元に算出 8年目以降は前年度現金残高と当年税引後営業利益を元に算出

表 18. 生産したオイルをナフサとして販売した時のキャッシュフロー予測

(単位は百万円)

ケース①: ナフサ売上を 430 百万円とした場合

	7年目	8年目	9年目	備考
売上	440.0	440.0	440.0	コンサルティング・受託研究での売上10百万円+ナフサ販売による売上430百万円
費用	140.4	140.4	142.4	表10参照
営業利益	299.6	299.6	297.6	売上-費用
法人税	0	54.18	89.28	7年目は前年度までの営業利益を控除した結果赤字なため法人税の支払いは無し 8年目は前年度までの赤字を控除した上で法人税を30%として算出 9年目は営業利益の30%を法人税として算出
税引後営業利益	299.6	245.42	208.32	営業利益-法人税
資本収支	500	0	0	7年目に資金調達500百万円を実施
現金残高	830.7	1076.12	1284.44	7年目残高は6年目末残高・7年目税引き後営業利益・7年目資本収支を元に算出 8年目以降は前年度現金残高と当年税引後営業利益を元に算出

9.5 事業売却

創業 10 年目以降、本事業を売却する事でエグジットとする。売却先の候補として、SAF の製造・販売を検討している石油関連企業、微細藻類オイルの製造・販売を行っている企業、バイオナフサの製造・販売を検討している化学メーカー等が挙げられる。売却価格は本事業を売却する際の企業価値を元に決定する。本事業は売却後、売却先の研究開発部門として引き続き研究開発を実施する。売却後は売却先企業の事業方針を元に製造ターゲット物質をオイルだけに限定せず、機能性色素等の製造に向けた研究開発を実施する事で多種多様な物質を微細藻類から製造可能にしていく。

9.6 第9章 まとめ

本章では、イノベーションアイデアを実現するための財務戦略について述べた。本事業は研究開発期間、共同開発期間、売上回収期間といった流れを想定している。研究開発期間では公的機関の援助を受けながら自社技術の開発を行うと共にコンサルティング等によって自社利益を獲得することとした。共同開発期間では、事業会社と連携し、事業会社からの出資を受けてオイル製造技術の開発・企業の運営を行なっていくとともに、コンサルティング・受託研究によって利益を得る事とした。売上回収期間では、オイル（SAF・ナフサ）の売上から本事業の寄与度（提携先利益の10%）を回収することで本事業の売上とすることとした。この際、製造したオイルをSAFとして販売した場合の年間売上は0.3億円～1.5億円（創業9年目末残高は約2.3億円～5.9億円）、バイオナフサとして販売した際は0.9億円～4.3億円（創業9年目末残高は約4.1億円～13.0億円）の年間売上が見込まれた。今後、技術開発の進展やバイオマス由来オイルの市場規模拡大が予測されることから、上記の売上額・現金残高はより大きなものになると考えられる。

引用

- [1] 神戸大学インキュベーションセンター 公募要領
<http://www.innov.kobe-u.ac.jp/sangaku/downloads/news/incu-applicationguide2018-2.pdf>
- [2] 神戸大学研究基盤センター ホームページ 機器利用料金 (学外)
http://www.csrea.kobe-u.ac.jp/out_ryoukin.html
- [3] IMAT 一般財団法人日本微細藻類技術協会 ホームページ
<https://imat.or.jp/entry/>
- [4] 比較 biz 国際特許 (PCT 国際特許出願) の費用
<https://www.biz.ne.jp/matome/2003459/>
- [5] 科学技術振興機構 (JST) 研究成果展開事業 大学発新産業創出プログラム START
<https://www.jst.go.jp/start/>
- [6] 国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 研究開発型スタートアップ支援事業
https://www.nedo.go.jp/activities/ZZJP_100091.html
- [7] 株式会社アルガルバイオ ホームページ
<https://algalbio.co.jp/aboutus/#history>
- [8] コンサルティングの費用と料金相場 【2022 最新版】
<https://imitsu.jp/cost/consulting/article>
- [9] スタートアップ・クリエイティブラボ (SCL) 募集要項
https://www.kups.jp/assets/img/clik/pdf/startup_bosyu0831.pdf
- [10] ASEAN における出願費用・権利化期間について
https://www.jetro.go.jp/ext_images/world/asia/asean/ip/pdf/meeting20140515_5.pdf
- [11] 島津製作所 ホームページ 「バイオ×デジタル技術で脱炭素社会実現に更なる貢献を 神戸大学発ベンチャー バッカス・バイオイノベーション に出資」
<https://www.shimadzu.co.jp/news/press/6b8px9cldk0qz5o6.html>
- [12] コーポレートベンチャーキャピタル活動- 三菱ケミカルグループ
https://www.mitsubishichem-hd.co.jp/csr/download/pdf/21_4_6_4.pdf
- [13] PR Times 昆虫食の TAKEO、ニチレイと資本提携
<https://prtimes.jp/main/html/rd/p/000000027.000058584.html>
- [14] 日立製作所 ニュースリリース 「日立エネジーとスウェーデン・H2 グリーンスチールが電化、デジタル化、水素を活用したグリーンな鉄鋼生産の実現に向けて覚書を締結」
<https://www.hitachi.co.jp/New/cnews/month/2022/07/0721a.html>
- [15] 神戸大学産官学連携本部

<http://www.innov.kobe-u.ac.jp/sangaku/collaboration.html>

[16] 政府の統計窓口

<https://www.e-stat.go.jp>

[17] 共同レポート 2050年 航空輸送におけるCO₂排出実質ゼロに向けて. 全日本空輸株式会社、日本航空株式会社. 2021年10月8日

<https://press.jal.co.jp/ja/items/uploads/29b739f32e77631451b59a6c03bf77b906ac9e8a.pdf>

[18] 石油化学協業協会 ホームページ 「石油製品需要に占めるナフサ」

<https://www.jpca.or.jp/statistics/annual/nafusa.html>

第10章 全体総括

本研究では、筆者が創出してきた科学技術上のブレイクスルー”海水を用いた一段階オイル生産微細藻類株の創出方法、微細藻類変異株及び変異株を用いた培養方法”を応用してオイルを製造する事で、石油由来燃料・石油化学品原料（ナフサ）を代替する事をイノベーションアイデアとして提案した。

先端科学技術研究（科学技術上のブレイクスルー）に関して、本研究では海洋性オイル生産藻類”*Chlamydomonas* sp. KOR1 株”に対し、重イオンビームを照射することで多様な形質を有する変異細胞集団を作製、窒素源存在下で FACS を用いてオイル高蓄積細胞を選抜するといった方法によって、窒素源存在下においてもオイルを乾燥重量あたり約 30%蓄積可能な KAC1801 株を獲得した。獲得した KAC1801 株を半連続的に培養することで、細胞増殖を維持したままオイルを高蓄積する方法を示すと共に、メタボローム解析・トランスクリプトーム解析を実施した結果、KAC1801 株では光合成機能の低下や窒素同化の強化といった微細藻類を窒素欠乏条件で培養した際に見られる典型的な窒素欠乏応答を示した。本研究はこれまで実現されてこなかった窒素源存在下でオイルを蓄積可能な藻類変異株の育種方法、変異株、変異株を用いた培養方法、変異株におけるオイル増産機構の解析を通じて微細藻類からのオイル生産を簡略化する為の知見を獲得した。

事業戦略に関して、筆者は科学技術上のブレイクスルーを起点とした「微細藻類基盤技術開発・提供事業」を設立し、「微細藻類を用いたオイル(燃料・化学品用途)生産を目指している企業や自治体」に対してサービス（技術提供）を実施する事業を提案した。本事業は今後市場規模の拡大が予測されるバイオマス由来オイルの利用普及に寄与するものであるため、社会的価値の高いものである。また、本事業が取り巻く環境は、競合他社が少ないことから”ブルーオーシャン”な状態にある。

技術戦略に関して、微細藻類基盤技術開発・提供事業を行うために、科学技術上のブレイクスルーのコンセプトである「海水を用いた一段階オイル生産株の創出方法・培養方法」の開発に加え、屋外環境でのオイル生産に適した変異株の創出方法、屋外環境を想定した培養プロセス検討、オイル抽出残渣の活用法検討を行うために、論文等の情報を纏めたデータベースを構築する事とした。これらを行う事により、屋外環境でのオイル生産性向上を実現すると共にオイルを抽出した残渣の活用用途を提案できるようにする事とした。

知財戦略に関して、本事業では「特定遺伝子を改変した微細藻類変異株を用いたオイル製造方法」といった内容の特許を出願し、育種方法、培養方法、先行研究のデータベースを秘匿化する事とした。特許化した技術に関しては、他社へのライセンスを実施し、オイルの売上から特許の寄与度(提携先利益の 10%)を本事業の売上として回収する事とした。

財務戦略に関して、本事業は創業期に公的機関が実施している研究開発型スタートアップ支援

事業を活用し自社技術を開発するとともに、コンサルティング等によって利益を挙げていく事とした。自社技術の開発後は事業会社からの出資受け、共同でオイル製造体制を構築していく。オイル製造体制の構築後はオイルを販売していき、提携先の利益の10%を本事業の寄与度・売上とした。製造したオイルをSAFとして販売した際、ナフサの代替として販売した際の年間売上はそれぞれ0.3億円～1.5億円、0.9億円～4.3億円と予測された。

本事業では、「微細藻類を利用したオイル製造・普及」をターゲットとしてきた。微細藻類はオイル以外にも化粧品原料・医薬品原料等様々な物質を製造できる事から注目を集めている。本事業においても今後オイル以外の物質にも焦点を当てて研究開発を行う事で、様々な有用物質を微細藻類から製造できるような体制を構築していきたい。

謝辞

本博士論文の執筆にあたり、神戸大学先端バイオ工学研究センターの蓮沼誠久教授には研究テーマの設定から実験結果の議論、論文執筆、技術・知財戦略の議論等様々な場面で指導頂きました。加藤悠一特命助教には実験計画作成、実験結果の議論、学術論文の添削等様々な場面で指導いただきました。秀瀬涼太特命准教授にはRNA-seq解析の実施のご支援、実験結果の議論等をしていただきました。神戸大学科学技術イノベーション研究科の松田真実助手には代謝物の測定を実施して頂きました。近藤昭彦教授には進捗状況や実験結果を議論して頂いた事に加え、研究を社会的価値に結びつける大切さをご教授頂きました。石川周准教授には学位論文の予備検討において、詳細に確認いただいたとともに有益なご指摘等をいただきました。国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構の大野豊上席研究員、佐藤勝也上席研究員には窒素源存在下でのオイル高生産藻類変異株を創出する際、重イオンビームの照射実験を行っていただいたほか、論文原稿の添削等を行って頂きました。東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの渡辺智准教授、松谷峰之介博士研究員には、RNA-seq解析実験の実施、論文原稿の添削等を行って頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。

イノベーションストラテジーの構築にあたり、科学技術イノベーション研究科、尾崎弘之教授には、事業戦略・技術戦略・知財戦略・財務戦略等を議論していただきました。科学技術イノベーション研究科、山本一彦教授、蔭山広明教授、福家信洋准教授には主に知財戦略・財務戦略にてご助言を頂きました。神戸大学先端バイオ工学研究センターの松本圭司氏にはご自身が研究成果を実装された際のお話し、技術を実装していく際に考えておくべき事等をご教授いただきました。株式会社ユーグレナの稲葉遊氏、株式会社帝人の濱田慎之介氏には事業戦略の構築を行う際、ヒアリングにご協力頂き、現場のニーズを把握する上で重要な知見をご教授頂きました。以上の方々のご支援の元、イノベーションストラテジーを構築する事ができました。ここに感謝申し上げます。

研究活動を行うにあたり、公益財団法人木下事業団、公益財団法人井植記念会から修学ご支援を頂きました。金銭的なご支援頂いた事で研究活動に専念する事ができました。ここに感謝申し上げます。

最後に、博士論文執筆まで支えてくださった父、母、姉、祖父母に心から感謝申し上げます。

2023年1月 小山 智己

研究業績

論文発表

- ・ Kato Y., **Oyama T.**, Inokuma K., Vavricka CJ., Matsuda M., Hidese R., Satoh K., Oono Y., Chang JS., Hasunuma T., Kondo A. (2021). Enhancing carbohydrate repartitioning into lipid and carotenoid by disruption of microalgae starch debranching enzyme. *Communications biology*, 4(1), 1-11.
- ・ **Oyama T.**, Kato Y., Satoh K., Oono Y., Matsuda M., Hasunuma T., Kondo A. (2021). Development of mutant microalgae that accumulate lipids under nitrate-replete conditions. *Algal Research*, 60, 102544.
- ・ **Oyama T.**, Kato Y., Hidese R., Matsuda M., Matsutani M., Watanabe S., Kondo A., Hasunuma, T. (2022). Development of a stable semi-continuous lipid production system of an oleaginous *Chlamydomonas* sp. mutant using multi-omics profiling. *Biotechnology for biofuels and bioproducts*, 15(1), 1-14.

学術発表

- ・ **Oyama T.**, Kato Y., Hasunuma T., Ogino C., Satoh K., Oono Y., Kondo A. (2021) Nitrogen-Conditioned Screening of *Chlamydomonas* Mutants That Do Cell Growth and Lipid Accumulation Simultaneously Under Nitrate-Replete Condition, QST Takasaki Annual Report 2019. QST-M-29, 99

特許

- ・ 窒素源存在下で油脂蓄積に呈する藻類株の創出 (特開2021-023234)

研究発表

口頭発表

- ・ **小山智己**, 加藤悠一, 佐藤勝也, 大野豊, 蓮沼誠久, 近藤昭彦. “窒素源存在下で油脂を高蓄積する海洋性クラミドモナス変異株の選択的育種”. 第71回日本生物工学会. 岡山県. 2019/9.
- ・ 加藤悠一, 小山智己, 佐藤勝也, 大野豊, 張嘉修, 蓮沼誠久, 近藤昭彦. “海洋性クラミドモナス油脂高蓄積変異株における油脂・カロテノイド増産メカニズムの解明”. 第71回日本生物工学会. 岡山県. 2019/9.

ポスター発表

- ・ **Oyama T.**, Kato Y., Hasunuma T., Kondo A. Breeding of high lipid accumulating mutant from *Chlamydomonas* sp. JSC4 under nitrogen-replete condition. 2017年度革新的研究開発推進プログラムImPACT “セレンディピティの計画的創出”プログラム会議. 群馬県, 2017/9.
- ・ 加藤悠一, 藤原悠右, **小山智己**, 張嘉修, 蓮沼誠久, 近藤昭彦. “油脂高蓄積クラミドモナス株の選抜育種によるバイオ燃料生産「明暗周期問題」の克服”. 第69回日本生物工学会. 東京都. 2017/9.
- ・ **Oyama T.**, Kato Y., Hasunuma T., Kondo A. Selective breeding for improving lipid accumulation in *Chlamydomonas* sp. mutant under nitrogen-replete condition. 2018年度革新的研究開発推進プログラムImPACT “セレンディピティの計画的創出”プログラム会議. 山梨県, 2018/9.
- ・ Kato Y., **Oyama T.**, Hasunuma T., Kondo A. Dynamic metabolic profiling and morphological analysis of an oleaginous *Chlamydomonas* sp. mutant provide breeding strategy for increasing lipid accumulation under light/dark cycling. 2018 年度革新的研究開発推進プログラム ImPACT “セレンディピティの計画的創出”プログラム会議. 山梨県, 2018/9.
- ・ **Oyama T.**, Kato Y., Hasunuma T., Kondo A. Selective breeding for improving oil accumulation in *Chlamydomonas* sp. under nitrogen-replete condition. BASF International Summer Course. Germany. Ludwigshafen am Rhein. 2019/8.
- ・ 加藤悠一, **小山智己**, 荻野千秋, 蓮沼誠久, 佐藤勝也, 大野豊, 近藤昭彦. 微細藻類油脂・カロテノイド高蓄積株の育種と高蓄積メカニズムの解明. 2019QST 高崎サイエンスフェスタ. 群馬県. 2019/12
- ・ **小山智己**, 加藤悠一, 荻野千秋, 蓮沼誠久, 佐藤勝也, 大野豊, 近藤昭彦. 窒素源存在下で油脂を高生産する海洋性クラミドモナス変異株の選択的育種. 2020QST 高崎サイエンスフェスタ. 群馬県. 2020/12
- ・ **小山智己**. 藻類育種技術に基づくオイル生産プロセスの見直しと事業化に向けた考察. 第1回先端バイオ工学研究センター成果発表会～若手研究者による先端バイオ工学の展開に向けて～. 兵庫県. 2021/10. 優秀ポスター発表賞

神戸大学博士論文

「藻類育種・培養法検討に基づく新規オイル生産方法の開発及び事業化に向けた展望」全 148 頁

提出日 2023 年 1 月 25 日

本博士論文が神戸大学機関リポジトリ Kernel にて掲載される場合、掲載登録日(公開日)はリポジトリの該当ページ上に掲載されます。

© 小山 智己

本論文の内容の一部あるいは全部を無断で複製・転載・翻訳することを禁じます。