



次世代バイオプロセスに資する酵素の機能発現技術の開発およびその事業化

湯川, 貴弘

(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8677号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482425>

※ 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

**次世代バイオプロセスに資する酵素の機能発現技術
の開発およびその事業化**

2023年01月

**神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科
湯川貴弘**

目次

第1章 序論

1. 世界の経済発展と社会課題の顕在化	6
2. 化石資源とは	6
3. エネルギー消費量と化石資源の占める割合	7
4. 化石資源の使用における課題	7
5. シェールガス革命に伴う天然ガス生産	8
6. 化石資源を用いたものづくり	9
6.1. 石炭化学	10
6.2. 石油化学および天然ガス化学	10
6.3. 合成ガスからの有用化合物の製造工程	12
6.4. 芳香族炭化水素の不足に対する懸念	12
6.5. 化学品生産プロセスの今後の動向	14
7. 微生物を用いたものづくり	14
7.1. 発酵飲食品と微生物の発見	15
7.2. 微生物の分類と分子生物学	16
7.3. 分子生物学から合成生物学へ	18
7.4. IT および自動化技術の進歩による合成生物学の高度化	21
引用文献	23

第2章 研究背景

1. 草本系・木質系バイオマスを原料とした次世代バイオプロセス	26
2. 草本系・木質系バイオマスの構造と利用プロセス	27
3. 微生物におけるキシロース資化能の付与	28
3.1. 従来型キシロース代謝経路	28
3.2. 新規型キシロース代謝経路	30
4. 原核生物を宿主とした新規型キシロース代謝経路の構築	31
5. 出芽酵母における新規の酸化的キシロース代謝経路構築における課題	32
6. 本研究の目的	33
引用文献	34

第3章 酵母の鉄代謝工学に基づく鉄硫黄タンパク質 XylID の活性強化

1. 緒言	40
-------	----

2. 酵母の鉄代謝機構の改変による XylID の活性強化	41
3. 考察	42
実験操作	43
付録	50
引用文献	51

第4章 出芽酵母の鉄代謝工学に基づく1,2,4-ブタントリオール生産法の開発

1. 緒言	54
2. 1,2,4-ブタントリオール生合成経路の工学	55
2.1. <i>L. lactis</i> 由来 <i>kdcA</i> の多コピー導入が1,2,4-ブタントリオール生産に与える影響	55
2.2. XylID 活性強化に基づく1,2,4-ブタントリオール生産量の向上	57
2.3. <i>ADH</i> の過剰発現による1,2,4-ブタントリオール生産	58
2.4. NADH キナーゼによる NADPH 供給の強化が与える1,2,4-ブタントリオール生産量への影響	59
3. フェドバッチ培養による高収率での1,2,4-ブタントリオールの高生産	60
4. 考察	61
実験操作	63
引用文献	69

第5章 アルカリ培養による酵素 XylID の活性強化とキシロネート再取り込みに基づく3,4-ジヒドロキシ酪酸の高生産

1. 緒言	74
2. 酵母での3,4-ジヒドロキシ酪酸生合成経路の構築	77
2.1. <i>ADH</i> の破壊による1,2,4-ブタントリオール生成の阻害	78
2.2. キシロネートから3,4-ジヒドロキシブタナールへのフラックス強化による3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産	79
2.3. <i>ALD</i> の過剰発現による3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量向上	80
3. 酵母を宿主とした3,4-ジヒドロキシ酪酸生産の培養プロセスの検討	81
3.1. pH 制御下での3,4-ジヒドロキシ酪酸生産	81
3.2. 弱アルカリ条件下での培養によるキシロネートの再取り込みと3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量向上	83
5. 3,4-ジヒドロキシ酪酸生産の中間生成物の代謝解析	85
6. 考察	86

実験操作	87
付録	96
引用文献	98

第 6 章 系統分類法による高活性酵素の同定と Dahms pathway および Weimberg pathway の構築

1. 緒言	102
2. 出芽酵母に対する新規キシロース代謝経路の導入	103
2.1. Dahms pathway の導入	103
2.2. Weimberg pathway の導入	104
3. 出芽酵母を宿主とした Weimberg pathway 構築に資する酵素同定	105
3.1 XylIX の系統分類による Weimberg pathway を介したキシロースを単一炭素源とした細胞増殖の実現	105
3.2. XylIA の系統分類による Weimberg pathway を介した有用酵素スクリーニング系の確立	108
4. Weimberg pathway 導入酵母株の混合糖培地での培養試験	109
5. 系統分類法による高活性酵素 XylID の同定	110
7. 考察	112
実験操作	113
引用文献	124

第 7 章 先端科学技術特定研究のまとめ

1. 技術的なブレイクスルーと研究開発状況	130
2. 研究開発で得られたインサイトと事業化に向けて	131
引用文献	132

第 8 章 バイオプロセスの事業化に向けた考察

1. バイオプロセスの開発を担うスタートアップ企業のベンチマーク分析	134
2. バイオプロセス開発の事業化のため戦略	140
2.1. サプライチェーン分析	141
2.2. 開発されたバイオプロセスによって生産される化合物	142
2.3. 小括	143
3. 半導体の「ファブレス×ファウンドリ」の事業モデル	143

3.1. 半導体と半導体集積回路とは	143
3.2. 半導体集積回路の提供価値	144
3.3. 半導体集積回路の製造に関わるサプライチェーン	145
3.4. 半導体産業での水平分業化の経緯	147
3.5. 半導体製造工程で重要な技術	149
3.6. ビジネスモデルのベンチマーク分析	150
4. イノベーションアイデア	152
4.1. バイオプロセス開発事業の事業範囲および開発対象	153
5. イノベーション戦略と成長戦略	155
5.1. 創業から短期経営計画（～2030 年まで）	157
5.1.1. 創業期のキャッシュフロー計画	159
5.1.2. 「バイオファブレス×培養ファウンドリ事業モデル」の成長戦略	160
5.1.3. 培養ファウンドリへの参入者	162
5.1.4. バイオプロセスを用いた化学品生産のコスト試算	163
5.1.5. バイオファブレスの技術開発における差別化戦略	165
5.3. 中期経営計画（2030 年から 2035 年）	166
5.4. 長期経営計画（2035 年から 2040 年）	167
6. 技術戦略	168
6.1. 各研究開発部門での開発項目	168
6.2. 創業期の研究開発戦略	171
6.3. 先端特定科学技術研究の成果の活用法	174
6.3. 微生物育種技術を受託開発する意義	174
7. 財務戦略	175
7.1. 財務諸表作成のための前提条件	175
7.2. 財務諸表	178
7.3. 今後の経営上のリスク	180
8. バイオプロセスの受託開発事業の展望	181
引用文献	183
論文一覧	186
特許一覧	186
謝辞	187

第1章 序論

1. 世界の経済発展と社会課題の顕在化

18 世紀の産業革命以降、化石資源の使用したプロセスの連続的な技術革新が起こってきた。その結果、各種産業の生産性や医療技術などが向上し、社会は急速に発展している。産業革命以降の経済発展は、世界人口の増加にも大きく貢献し、1900 年には約 20 億人であったのに対し、2013 年には約 70 億人にまで到達した。世界の人口は増加し続けており、2030 年に約 85 億人、2050 年には約 97 億人に到達すると予測されている。

このような輝かしい社会発展とは裏腹に、世界の至る所で社会課題が顕在化している。例えば、爆発的な人口増加は、食糧やエネルギー消費量の増加やその不足の懸念へと繋がる。また、化石資源に依存したプロセスは、温室効果ガスであるメタン CH_4 や二酸化炭素 CO_2 を排出した。その結果、大気中への温室効果ガスの大量排出は地球温暖化を引き起こしたとされ、年平均気温の上昇による氷解の融解や海面水位の上昇が問題視されている [1]。日本国内においても、台風や集中豪雨などの自然災害による農作物や住居への被害の程度および頻度が増している。2021 年 8 月に公表された気候変動に関する政府間パネルの報告書では、気候変動の多くは地球温暖化の進行が直接原因の一つであり、地球温暖化を抑制することが極めて重要であるとされた [2]。そのため、世界の温室効果ガスの排出量削減目標として、2010 年と比較して 2030 年の CO_2 排出量を約 45 %削減するという具体的な数値目標が掲げられている。世界の温室効果ガス排出量のうち、その排出源の約半数以上を化石資源に依存したプロセスによるものとされており [3]、化石資源の使用量を削減することが世界的に求められることとなった。

2. 化石資源とは

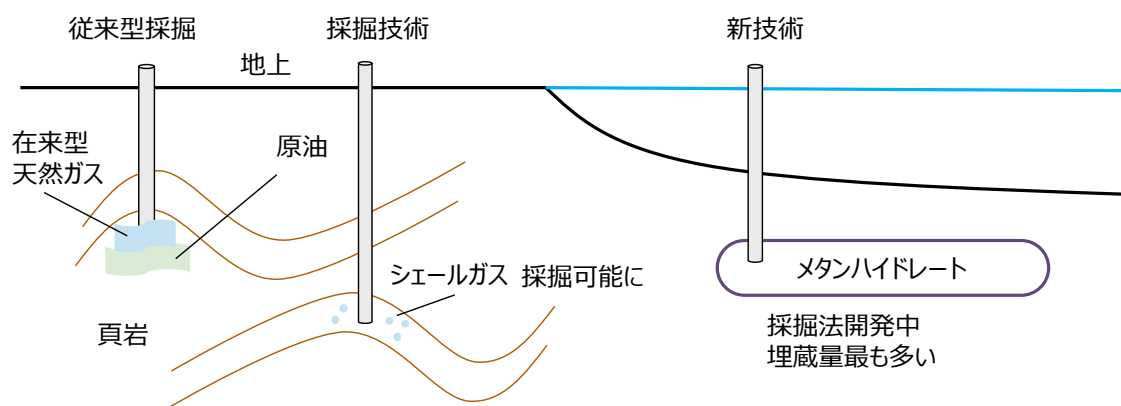


図 1-1 石油および天然ガスの賦存状況

化石資源とは、植物や動物の死骸が地中に堆積して長期間に渡って埋没した結果、地圧や地熱などの自然の作用によって生成した資源である。炭素 C が豊富な可燃性の岩石状物質が石炭、地中内部で液体になった物質が石油、地中内部でガス化した物質が天然ガスである。これらの化石資源は、地球の長年の生命活動により生成された貴重な資源であり、その生成過程から短期的な再生は不可能である。

3. エネルギー消費量と化石資源の占める割合

世界のエネルギーに関する重要な指標として、一次エネルギー消費量がある。一次エネルギーとは、石油、石炭、原子力、天然ガス、水力、地熱、太陽熱などの、自然界に存在していて加工などなんらかの処理を受けていないエネルギーのことである。一次エネルギーは、発電用途、輸送用燃料、化学品生産の原料として用いられている。日本政府経済産業省が発行したエネルギー白書 2021 によれば、世界の一次エネルギーの消費量は、1965 年の 37 億トンから年平均 2.5%で増加し続けており、2019 年には石油換算で 139 億トンに達した [7]。近年の一次エネルギー消費量のトレンドとして、2000 年代以降では、Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) に加盟する先進国の占める割合は減少しており、1965 年の 70.5 %から 2018 年には 40.0 %へと、約 30 %の低下を示した。先進国では、経済成長率および人口の増加率が低水準で推移しており、産業構造の変革や省エネルギー化の推進によって一次エネルギーの消費量の伸び率が鈍化しているためだ。一方で、アジアやアフリカなどの経済発展の著しい新興国の割合が著しく増加している。

2019 年の世界の一次エネルギー消費量を占める各資源別の割合では、石炭が 27.0 %、石油が 33.1 %、天然ガスが 24.2 %であり、以降、原子力、水力、その他再生可能エネルギーと続いている。日本の一次エネルギー消費量は、石炭が 25.3 %、石油が 37.1 %、天然ガスが 22.4 %であった。石油は、世界および日本の化石資源使用量の中でも最も大きな割合を占めている。

石油は、2018 年には、輸送用燃料としての消費が 65 %と最も大きな割合を占めており、石油化学の原料が 12 %、産業用が 7 %と続く。特に、人口増加による自動車保有台数の増大に伴い、ガソリンなどの輸送用燃料としての使用量が最も多い。天然ガスの使用用途に関して、OECD 諸国では、発電用途が 28 %、産業用途が 21 %、都市ガス等の利用が 51 %であった。日本国内では、天然ガスの使用用途のうち、約 70 %を発電が占めている。石炭の使用用途に関して、発電用の一般炭の利用が 78 %を占めており、コークスの製造用の原料炭が 12.7 %であった。

4. 化石資源の使用における課題

表 1-2 各化石資源の分布、可採年数および CO₂ 排出係数比

化石資源	石油	石炭	天然ガス
分布	OPEC 35.3 % アメリカ 18.5 % ロシア 12.0 %	世界に幅広く分布	世界に幅広く分布
可採年数	50年	134年	53年
CO ₂ 排出係数比	0.75	1	0.55

化石資源の使用に関する課題として、将来的な枯渇への懸念、および温室効果ガスの排出が挙げられる（表 1-2）。まず、化石資源の枯渇に関して、地球での可採埋蔵量および可採年数の 2 つの指標が存在する。可採埋蔵量とは、現状の技術力で採掘可能な化石資源の残埋蔵量を示

す。また、可採年数とは、可採埋蔵量をその年の年間消費量で割った値であり、その年以降に何年間採掘可能かを示す。2019 年において、世界の化石資源の埋蔵量は、石油が 1 兆 7,339 億バレル、天然ガスが 198.8 兆 m³、石炭が 10,696 億トンであった。また、それぞれの化石資源の可採年数は、石油が 49.9 年、天然ガスが 49.8 年、石炭が 132 年である [8]。

社会情勢や採掘技術の向上などにより、化石資源の可採埋蔵量や可採年数は増減する。例えば、石油メジャーの一角である The British Petroleum Company (BP) 社の統計によれば、1980 年の石油の可採年数は 29.7 年であったのに対し、現時点では約 50 年と増加している [8]。原油の生産では、技術的に採掘しやすいとされている在来型原油の約 80 %は、国営の石油メジャーの独占によって生産されてきた。しかしながら、産業の発展や人口増加に伴うエネルギー需要の増大により、長期間にわたり原油が採掘された結果、容易に採掘可能な在来型原油量は減少傾向にある。今後、たとえ化石資源が埋蔵されている土地であっても、極地や大深海底などの採掘が困難な土地では、高い採掘コストを支払わなければならない。そのため、石油メジャーは採掘コストの高い油田からの原油生産を余儀なくされ、原油価格は高騰し、化石資源の中でのコスト競争力は低下していくことが予測されている。

また、温室効果ガスの排出量を表す指標として、CO₂ 排出係数比が定められている。ここでの CO₂ 排出係数比とは、化石資源を直接燃料として使用した際に得られる熱量に対して放出される CO₂ の量を示す指標である [9]。石油、石炭、天然ガスのうち、最も CO₂ 排出係数比が高いのは石炭である。また、天然ガスが最も CO₂ 排出係数比が低く、化石資源のうちでは比較的クリーンな資源となっている。

石炭を用いた火力発電は、安定供給性と経済性に優れていたため、日本国内においても主要な用途として用いられてきた。しかしながら、天然ガスを用いた火力発電と比較して、石炭の火力発電では、CO₂ の排出係数が約 2 倍であり、CO₂ 排出量が著しく多いことが知られている。一方で、CH₄ が主成分である天然ガスを燃焼した場合、有害な一酸化炭素 CO、窒素酸化物 NO_x や CO₂ の排出量は少ない。よって、特に、発電事業に関して、石炭火力発電から脱却し、より環境負荷の少ない天然ガスを原料とした火力発電に切り替えることが望ましいとされる。

5. シェールガス革命に伴う天然ガス生産

採掘技術の向上のほか、新たな資源の発見も可採年数の増加要因の 1 つである。例えば、近年では、天然ガス的一种であるシェールガス、あるいは日本国内でも注目を浴びているメタンハイドレートがある。特に、シェールガスは、地下 100 m から 2,600 m の固く薄片上に剥がれやすい堆積岩である頁岩（シェール）から採掘される [10]。シェールガスは、石油と同様に地下深くに埋蔵されている。シェールは、石油が埋蔵されているより深い地中に存在しており、岩石の内部にガスが存在する点で採掘が困難とされていた（図 1-1）。2000 年代以降、アメリカでシェールの採掘技術に関する多くの技術的ブレイクスルーが起こった。シェールに 500 から 1000 気圧の高圧力水を当て、シェールにできた割れ目からシェールガスを採掘する水圧破碎法などの技術が開発された。この技術ブレイクスルーにより、アメリカでは、原油から天然ガスへの移行が進行した。2008 年には、過去に最大の

天然ガス産出国であったロシアを抜き、世界 1 位の天然ガス産出国となった。シェールガスの生産が主流になるにつれ、天然ガスの価格は石油価格の約 5 分の 1 程度にまで低下し、アメリカは天然ガス輸入国から天然ガス輸出国に転換することに成功した [11]。この一連の出来事は「シェールガス革命」と呼ばれ、エネルギー分野における 21 世紀最大の変革であった。2017 年、シェールガスから製造された液化天然ガスの輸入が日本国内で始まるなど、世界規模で石炭火力から天然ガス火力への移行が進められている。また、2011 年、アメリカの米国エネルギー情報局（Energy Information Administration: EIA）は、現状で技術的に採掘可能なシェールガスの埋蔵分布に関して、世界中に満遍なくしていることに加え、中国で最も埋蔵量が多いことを報告した。今後は、欧州や中国などで、更なる天然ガスの生産開発が進むことが予測されている。以上から、一次エネルギーに占める化石資源の使用割合に関して、CO₂ 排出係数に難のある石炭や可採埋蔵量に不安の残る石油と比較して、天然ガスの使用割合はますます増加することが予測される。

6. 化石資源を用いたものづくり

化石資源は、発電用、輸送用燃料のほかに、化学品生産の原料として使用されている。化学品生産の原料が占める一次エネルギーの消費量の割合は、約 12 %と小さい [7]。しかしながら、将来的な化石資源への依存から脱却した社会では、当然、石油化学に代表される化学品生産法も持続可能な方法に代替する必要がある。日本国内においても、石油化学産業は極めて重要な産業であり、自動車、家電製品、日用雑貨、衣料、医薬品、化粧品など、あらゆる製品が石油化学によって生産されている。ここでは、現在、化石資源を用いて化学品の原料がどのように製造されているかを、サプライチェーンに着目して述べる [13, 14]。

6.1. 石炭化学

化石資源である石炭は、自然燃料である薪や木炭に代わる熱エネルギー源として、19 世紀から 20 世紀前半にかけて産業革命後の社会発展に大きく貢献した [15, 16]。石炭を用いて化学品を生産する石炭化学の技術を用いて、化学品を生産するプロセスが活用されていた。まず、石炭を 1000 °C 付近の高温で乾留することで、コークスおよび石炭ガスが得られ、その副産物としてコールタールが精製する。コークスは、鉄鉱石を還元するための製鉄用途として用いられるのが主流である。また、副産物であるコールタールを原料に分留することで、染料の原料であるアニリン、アンモニア、プラスチック原料、ベンゼン、トルエン、ナフタレンなど、化学工業の基盤となる化合物が生産されていた。しかしながら、後述の石油化学の登場により、石炭化学は徐々に縮小していった。ただ、コークス生産の過程のコールタールから化合物を生産するプロセス自体は、小さい市場ではあるが現存している。

石炭から生産されるコークスは、バイオコークスによって置き換えられようとしている。また、鉄鉱石を還元する際には、コークスのみならず水素を還元剤として用いることにより、環境負荷の低い製造法が開発されている現状がある。

6.2. 石油化学および天然ガス化学

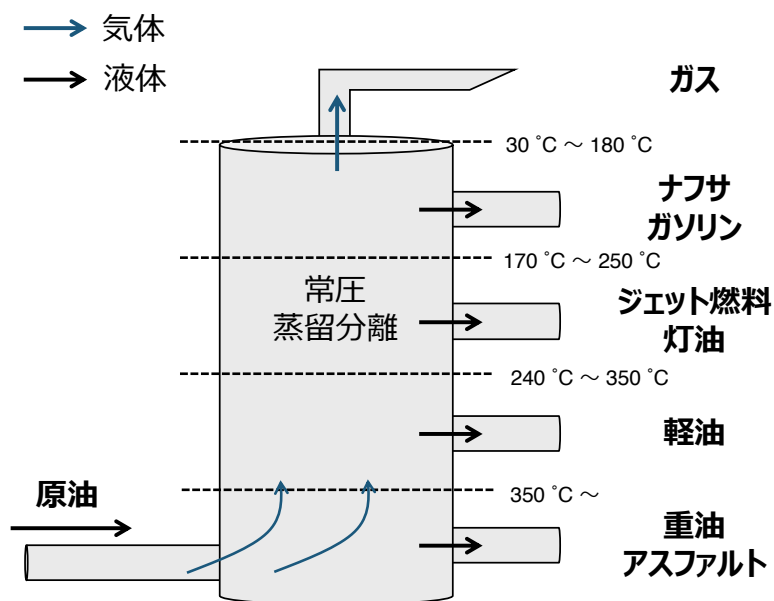


図 1-2 常圧蒸留による原油の成分分離

石炭化学に代わる新技術として石油化学が注目されるようになった。まず、石油化学では、原油を化学品生産の原料として用いるために、原油を構成する炭化水素の沸点の違いを利用して、常圧蒸留により各原料を分離する。その結果、原油は重油、アスファルト、軽油、ジェット燃料、灯油、ナフサ、ガスにそれぞれ分類される（図 1-2）。常圧蒸留の工程を担う日本国内の石油精製会社では、原油精製によって得られた各種の原材料を、以降のサプライチェーンを構成する川中や川下の企業に販売する。原油精製で得られる各種構成成分のうち、沸点 25 °C から 100 °C の軽質ナフサおよび沸点 80 °C から 200 °C の重質ナフサが、以降の化学品生産に用いられる。

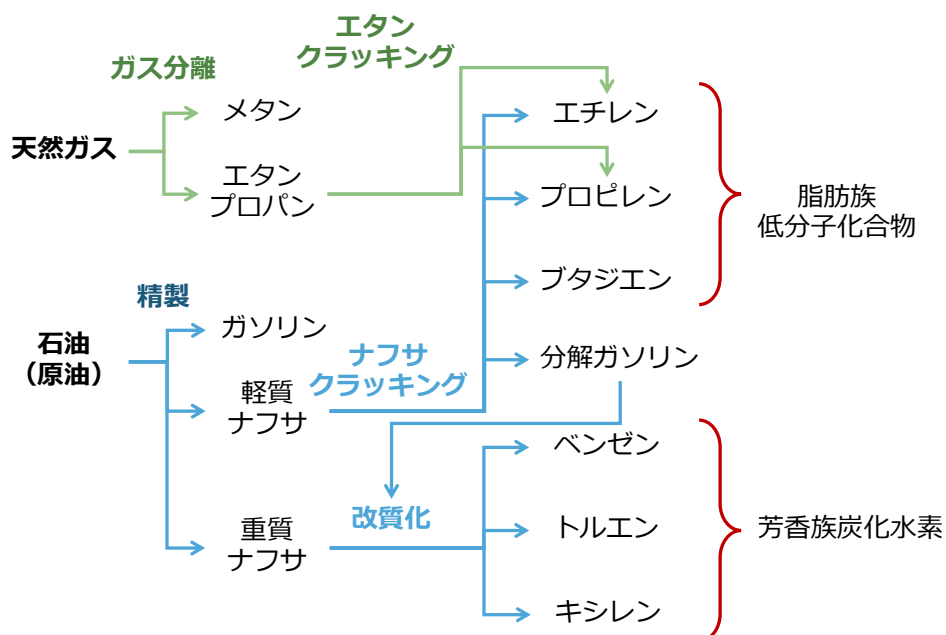


図 1-3 石油および天然ガスから生産される原料化合物のサプライチェーン

原油を原料とした石油化学、および天然ガスを原料とした天然ガス化学によってあらゆる化合物の基幹となる化合物が生産されている。原油から得られた軽質ナフサおよび重質ナフサ、あるいは天然ガスの主成分であるエタンやプロパンから、それぞれクラッキングと呼ばれる技術によって、エチレン、プロピレン、ブタジエン、ベンゼン、トルエン、およびキシレンが生産されている（図 1-3）。特に、エチレンは最も多く生産されている化合物であり、化学工業の市況を測定する指標としても用いられる重要な化合物である。

天然ガスを原料とした場合には、主成分であるメタン、エタンおよびプロパンをガス分離によってそれぞれ分離する。エタンクラッキングにより、エタンはエチレンに変換され、またプロパンはプロピレンに変換される。

原油を原料とした場合には、軽質ナフサから、ナフサクラッキングにより、エチレン、プロピレン、ブタジエンと副産物である分解ガソリンが得られる。また、軽質ナフサのクラッキングによって得られた分解ガソリン、および重質ナフサから、接触改質化によって、芳香族炭化水素であるベンゼン、トルエン、キシレンが得られる。日本では、国内の石油精製工場で生産されるナフサのみでは国内需要を満たすことができず、全ナフサ使用量のうち 57.9 %を輸入に頼っている [7]。

6.3. 合成ガスからの有用化合物の製造工程

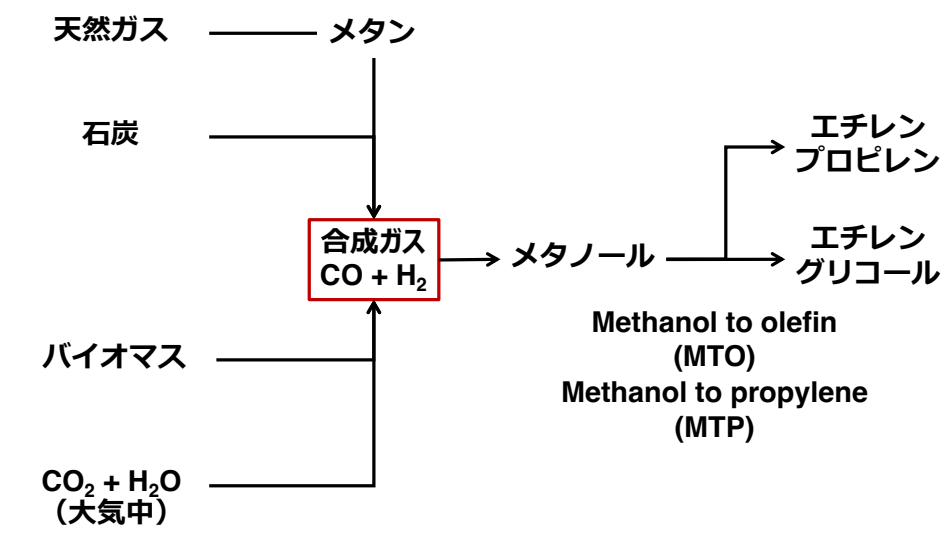


図 1-4 合成ガスを原料として化学品生産のサプライチェーン

図 1-4 に示したクラッキングによるエチレンなどの製造プロセスに加えて、天然ガスや石炭から一酸化炭素 CO と H₂ で構成される合成ガスを生産し、その合成ガスを用いて化学品を生産するプロセスが確立されている（図 1-4）。合成ガスは、メタノールへ変換されたのち、エチレンやプロピレン、エチレングリコールの生産に用いられる。特に、石炭資源が豊富な中国やオーストラリアでは、石炭を原料に合成ガスが生産されている。炭素の集合物である石炭は、900 度以上の高温の H₂ に晒すことで、CO と H₂ の合成ガスに変換される。また、新技術として、バイオマスや大気中の CO₂ および H₂O から合成ガスを製造する技術開発も行われている [17]。

6.4. 芳香族炭化水素の不足に対する懸念

表 1-3 各種クラッキング法による精製化合物の重量比

各クラッキング手法によって得られるエチレンの重量を 100 とした場合のその他化合物が得られる重量比

製造法と 生産量比率 (重量比率)	エチレン (C ₂)	プロピレン (C ₃)	ブタジエン (C ₄)	ベンゼン トルエン キシレン (C _{≥6})
ナフサ クラッキング	100	50-60	15	75
エタン クラッキング	100	9.1	3.5	5.6

表 1-3 に、ナフサクラッキングとエタンクラッキングによって得られるエチレン、プロピレン、ブタジエン、芳香族炭化水素の重量比を示した [18]。これまで、アジアや西ヨーロッパを中心に、化学品の原料は図 1-3 に示したナフサクラッキングのプロセスを経て製造されてきた。近年、石油、石炭および天然ガスの中で最も CO₂ の排出係数が低いこと、アメリカのシェールガス革命による天然ガスの生産量増

加などの背景から、天然ガスを原料としたエタンクラッキングによるエチレン等の製造は、ますます製造コストの低さによる市場の競争力を高めている。しかしながら、ナフサクラッキングと比較して、エタンクラッキングでは、特に炭素数 3 以上のプロピレン、ブタジエン、芳香族炭化水素であるベンゼン、トルエン、キシレンが得られる量が少ない（表 1-3）。そのため、今後、より世界の化学品製造がナフサクラッキングからエタンクラッキングへの移行する際に、炭素数 3 以上の化合物であるプロピレン、ブタジエン、ベンゼン、トルエン、キシレンの不足が懸念されている。また、図 1-4 に示したように、エチレンやプロピレンは、バイオマスや大気中の CO₂ などから得られる合成ガスを原料とした持続可能な生産法の開発が検討されている。一方、特に芳香族炭化水素であるベンゼン、トルエン、およびキシレンの持続可能な製造方法の技術開発は進展していない。

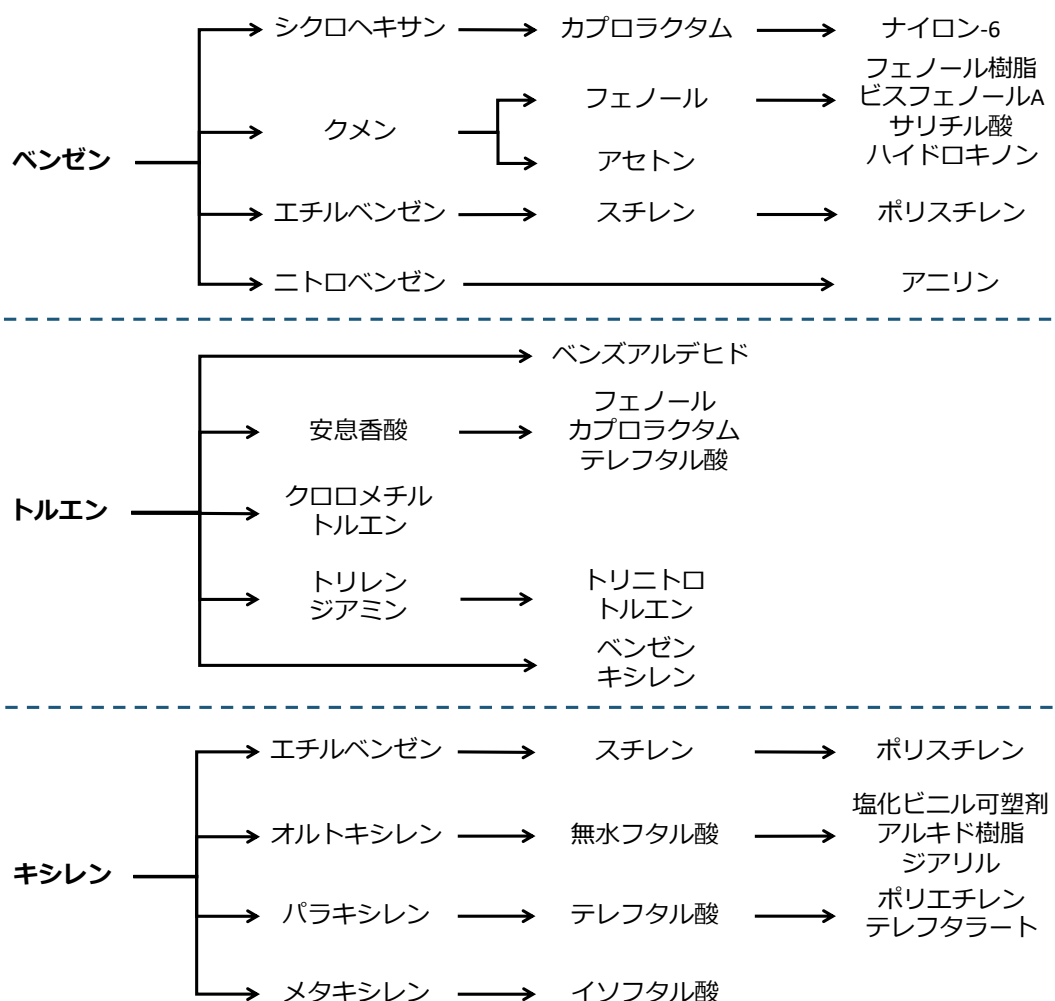


図 1-4 ベンゼン、トルエン、キシレンから合成される化合物とその化学品

このように、石油化学から天然ガス化学へ、および持続可能な社会への移行により、世界的な芳香族炭化水素および芳香族炭化水素を用いた化合物生産に関わるサプライチェーンの崩壊が危惧されている。図 1-4 に、芳香族炭化水素であるベンゼン、トルエン、キシレンを原料に製造されてい

る主要な化合物を示した [13]。化石資源から合成される芳香族炭化水素であるベンゼン、トルエン、キシレンが不足すれば、これらを原料に生産されている図中の化合物の製造企業、購入者を含むサプライチェーン全体が崩壊する恐れがある。

6.5. 化学品生産プロセスの今後の動向

化学品生産の今後の動向に関して、消費量全体のうち高い割合を占める発電用途や輸送燃料用途は、バイオエタノール燃料、バイオディーゼル燃料、あるいは水素燃料など多く代替技術が開発されつつある。発電用途に限れば、太陽光発電や原子力発電など CO₂ を排出しない発電方法も存在する。よって、長期的には、化石資源による発電や輸送用燃料としての使用は、他の持続可能な方法に置き換えられる可能性が高い。現代社会から持続可能な社会への移行期間において、環境負荷が最も低いとされる天然ガスは、発電用途、輸送燃料用途に主として使用されることが推測される。化石資源の化学品製造用途での消費量は全体の 10% であるため、ものづくりの原料も発電や輸送燃料用途と同じく天然ガスを用いたサプライチェーンに依存する可能性が高い。

ものづくりの原料としての天然ガスを用いたエタンクラッキングがより主流になるにつれて、世界でのベンゼン、トルエン、およびキシレン、あるいはその派生化合物の不足傾向はより顕著になるだろう。

日本では、1955 年に政府通産省による「石油化学工業の育成対策」によって石油化学工業の国産化が進められて以降、石油化学は国内産業の基盤となってきた [19]。しかしながら、建設時から長い年月を経た石油化学プラントは老朽化が進み、そのプラント設備の保全などが問題視されている。また、日本国内の人口減少による人材不足、および石油化学製品の国内需要減少とともに、石油の精製および流通に必要なプラント設備等は縮小されつつある。このように、石油化学による化学品製造に関わる環境は、次第に競争力を失うことが予測される。持続可能な新技術に基づいた化学品製造法を確立することが可能になれば、この競争力の失われた市場に効果的に参入できる可能性は十分にあると考える。

7. 微生物を用いたものづくり

エネルギー大量消費時代における化石資源の枯渇、および CO₂ などの温室効果ガスの排出に伴う環境問題への懸念が次第に高まっている。そこで、化石資源に代わる資源として、大気中の CO₂ を吸収して、比較的短期間に再生可能なバイオマス資源が大きな注目を浴びている。バイオマスとは、動物、植物、微生物などの生物に由来する有機物資源のうち、石油、石炭、天然ガスなどの化石資源を除いた比較的短期間に再生可能な有機物資源のことである [12]。バイオマスとしては、サトウキビやとうもろこしなどの可食性バイオマス、あるいは草や木、廃棄紙、食品廃棄物などの非可食性バイオマスに分類される。バイオマスを用いて製造された製品は、その焼却処分によって温室効果ガスの排出源となるが、その排出された一部の CO₂ は、光合成により植物などのバイオマス資源によって固定化される。よって、化石資源などの炭素非循環型資源に依存した産業から脱却し、炭素循環型資源である植物等のバイオマス資源を用いた持続可能な産業に基づいた社会の構築が求められている。

バイオマスを化学品生産に用いる場合には、バイオマスに含まれるグルコースなどの糖類から、微生物の代謝能により有用化合物を生産するバイオプロセスが注目を浴びている。これまで、微生物の代謝を活用して、エタノール、アミノ酸、核酸などが選択性高く生産されてきた。加えて、抗生物質などの極めて複雑な構造を有する化合物もバイオプロセスによって生産されているものが多数存在する。本章では、微生物によるものづくりの歴史から、微生物の育種開発技術がどのように発展してきたのかを確認する [20, 21]。

7.1. 発酵飲食品と微生物の発見

微生物によるものづくりの歴史は、およそ紀元前 8000 年から 6000 年に、メソポタミア文明で発見されたパン発酵にまで遡る。発酵とは、微生物が、稲や植物などに含まれる糖類を嫌気的な条件下でアルコールおよび CO_2 へ変換することを指す。パンなどに代表される微生物の発酵飲食品は、紀元前 5000 年のバビロニアでの酢の醸造、紀元前 4000 年のエジプトでのワイン醸造、紀元前 3500 年のビールの醸造が行われていたことが示唆されている [22]。その後も、世界各地で発酵飲食品の製造が確認されるようになった。清酒、ビール、焼酎などのアルコール飲料、あるいはパン、醤油、酒、味噌、チーズ、ヨーグルト、納豆などが代表例である。

発酵飲食品は、飲料や食品の腐食などを防いで長期保存を可能にするという目的のもと開発されたものが多い。アルコール飲料には、エタノールが数%から数十%含まれるため、バクテリアなどの腐食菌が飲料内に侵入してきても即座に死滅する。当時貴重であった水などの飲料をそのまま保管しておくよりも、発酵によりアルコール飲料に変換して保存したほうが保管可能な期間が長くなる。よって、人々は飲食料を安全に確保するため、発酵飲食品を製造していたと考えられている。

これらの発酵飲食品が製造された当時には、その現象の詳細な理解はされていなかった。この微生物による発酵に関して、詳細な現象が解明され始めたのは、16 世紀に入って以降のわずか数百年間の出来事である。まず、微生物による発酵現象を理解するためには、これらの現象を引き起こしている微生物の存在を明らかにする必要があった。微生物とは、肉眼では確認できない、およそ 0.1 mm 以下の生物のことを指す [23]。1590 年、オランダのハンス・ヤンセンらによって、レンズを重ね合わせることでモノが拡大して見える現象が確認された。これが初期の顕微鏡とされる。開発当初の顕微鏡は、十分な性能を有さなかったため、研究目的では使用されなかった。その後、オランダのアントニー・ファン・レーウェンフックが、倍率および解像度を向上した顕微鏡を新規に発明した。レーウェンフックは、その研究成果を約 100 以上の論文にまとめ、ロンドン王立協会の雑誌に発表した。その論文の内の 1677 年の報告書において、文章中に細菌を示すと思われる記載が記されている。

19 世紀には、顕微鏡を活用することで様々な微生物が発見された。また、微生物の発見に伴い、微生物が有する病原性や発酵などの化学的特性が解明されていくこととなる。特に、微生物発酵に関して、パスツールは、アルコール醸造などの化学的な現象が、微生物の存在無しでは起こり得ないことを証明したことでも有名だ。また、ロベルト・コッホは、伝染病が微生物の存在によるものだと結論づけた。この 2 人の功績により、世界の様々な現象や発酵飲食品が微生物の機能によるものだと認知されるようになった。

7.2. 微生物の分類と分子生物学

地球上に存在する生物は、簡便に、原核生物もしくは真核生物に分類される [24]。原核生物は、その細胞内に核を有さない生物であり、真正細菌（バクテリア）と古細菌（アーキア）に分類される。バクテリアとして、大腸菌 *Escherichia coli*、枯草菌 *Bacillus subtilis*、あるいは乳酸菌 *Lactococcus lactis* などが知られる。原核生物は、細胞の構造が比較的単純であり、細胞増殖が比較的早い。そのため、遺伝子組換え操作を伴う遺伝子工学の研究などに頻繁に用いられる。一方、真核生物は、その細胞内に核を有する生物であり、ヒトや動物、植物、真菌類などが当てはまる。生物の分類に関して、バクテリア、アーキア、真核生物に分類する 3 ドメイン説が主流である。

3 ドメイン説による生物分類法は、遺伝子の系統分類法などの分子生物学が発展したことによる功績が大きい。分子生物学とは、生物の形態・分類・進化・行動や遺伝に法則性を見だし、そこから生命の本質を探ろうとする学問である。1953 年にワトソンとクリックによってデオキシリボ核酸（Deoxyribo Nucleic Acid: DNA）の二重螺旋構造が解明された。細胞内において、2 本の一本鎖 DNA が水素結合によって互いに相補的に向かい合い、逆向きの二重らせん構造を形成することが発見された。この水素結合による相補的な構造は、ワトソン・クリック型塩基対とも呼ばれ、1962 年にノーベル生理・医学賞を受賞した。これを機に、生物学者が生物を分子のレベルで解明する分子生物学（Molecular Biology）が生まれた。1997 年には、Sanger によって簡便な塩基配列の決定法が開発され、今日までサンガーシーケンス法として用いられている。

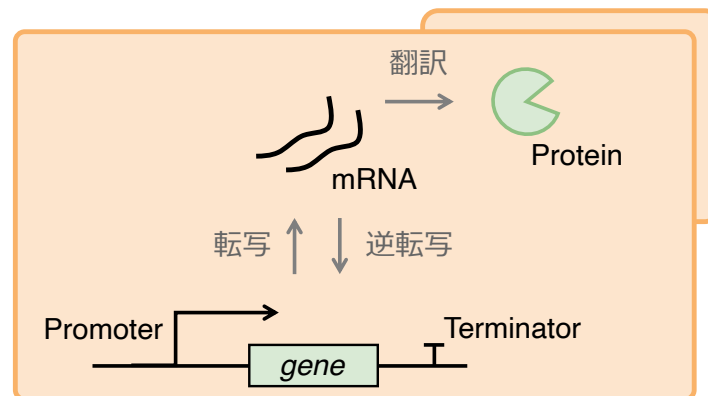
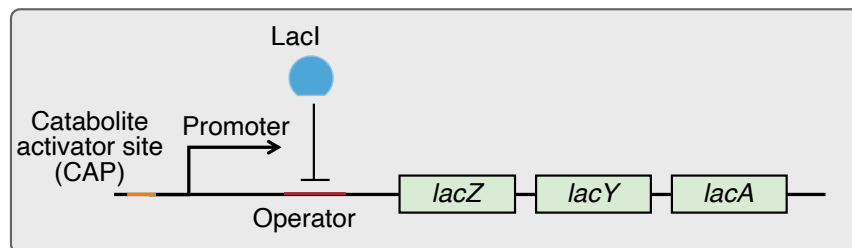


図 1-5 セントラルドグマの概念

1958 年、ワトソンは、セントラルドグマという概念を発表した（図 1-5）。DNA に存在する遺伝暗号を RNA ポリメラーゼによって RNA に写し取ることを転写、RNA に転写された遺伝暗号をリボソームによってタンパク質に映しとることを翻訳という。1970 年の RNA 逆転写酵素の発見に、セントラルドグマは DNA、RNA、タンパク質の方向のみならず相互に作用し合うものであることが明らかとなってきた。加えて、DNA から RNA への転写には、様々な調節機構が存在することが明らかとなってきた。転写開始地点を示すプロモーターの領域やその終了点を示すターミネーターの領域などである。例えば、転写により生成する RNA の量は、DNA の転写の開始点とされるプロモーター領域の

DNA 配列に依存し、RNA ポリメラーゼの結合強度が変化することにより決定される。このように、生物の持つ遺伝暗号がセントラルドグマの過程を経てタンパク質に翻訳されることを、遺伝子発現と呼ぶ。

ラクトース非存在下



ラクトース存在下

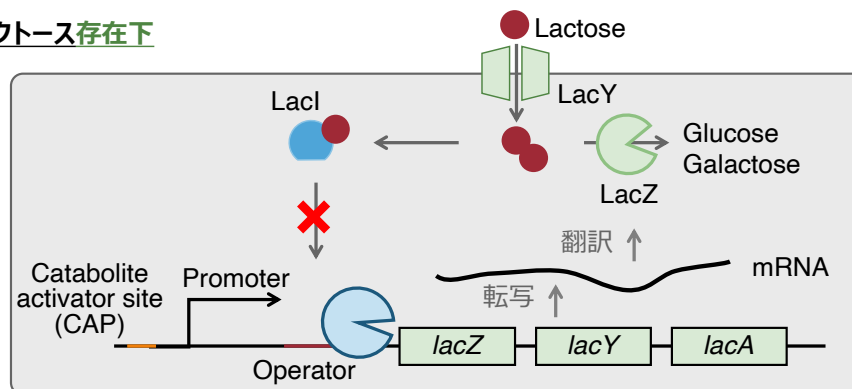


図 1-6 Lac オペロンによるラクトースに依存した遺伝子発現制御

現在では、この遺伝子発現に、非常に複雑かつ多様な制御機構が存在することが分かっている。代表的なものとして、1961 年、フランソワ・ジャコブ とジャック・モノーは、図 1-6 に示した、大腸菌がラクトースに応答して遺伝子発現を制御する機構を発見した [25]。これらの遺伝子発現に関わる遺伝子はゲノム DNA の一箇所に局在しており、Lac オペロンと呼ばれる [24]。この発見は、1965 年にノーベル・生理医学賞を受賞した。LacZ は、 β -ガラクトシダーゼであり、ラクトースをグルコースとガラクトースに分解する酵素である。LacY は、ラクトースパーメラーゼであり、細胞外に存在するラクトースを細胞内に取り込むタンパク質である。LacA は、ガラクトシドアセチルトランスフェラーゼであり、アセチル CoA から β -ガラクトシドの 6 位の炭素にアセチル基を転移させる酵素である。ラクトース代謝における役割は未だ明確ではないが、LacY によって細胞内に輸送されるその他の化合物を無毒化する。大腸菌では、ラクトース非存在下で、転写抑制因子である LacI が Lac オペロンのオペレーター配列に結合する。その結果、下流の遺伝子 lacZ、lacY、および lacA の転写が抑制される。一方、ラクトース存在下では、細胞外のラクトースが LacY によって細胞内に取り込まれる。取り込まれたラクトースは、まず、LacI と結合して、転写抑制因子としての機能を失活させる。その結果、RNA ポリメラーゼが Lac オペロンの遺伝子を転写し、それぞれのタンパク質が生成する。生成した酵素 LacZ は、細胞内のラクトースをグルコースとラクトースに変換する。大腸菌は、ガラクトースやラクトー

スを代謝し細胞増殖を行う。これは一例ではあるが、分子生物学の発展により、微生物内の構成要素である DNA、RNA、タンパク質の機能や役割が明らかとなってきた。

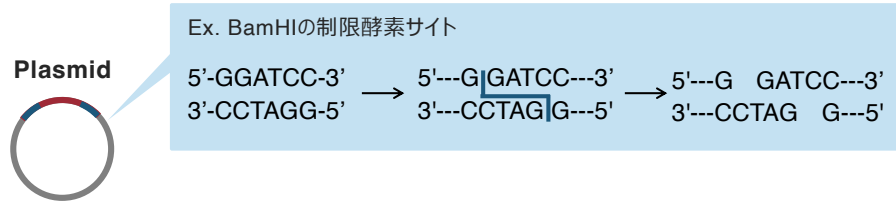
7.3. 分子生物学から合成生物学へ

合成生物学（Synthetic Biology）とは、遺伝子やタンパク質などの生物の構成要素を単なる部品と見なし、その部品を組み合わせる生命機能を人類や社会に資する目的で設計や構築し、所望の生物システムを開発する分野である [26]。従来の分子生物学では、生物の個体から組織や細胞を、DNA、RNA、タンパク質へと細分化して、それぞれの要素の機能を理解するため研究開発が行われてきた。分子生物学は、生体的な現象をなるべく少ない生体分子の機能で説明しようとするトップダウン的な学問だといえる [27]。一方、合成生物学では、分子生物学などで蓄積されたデータや知見を生かしながら、生物の構成要素である遺伝子を高度に合理的に設計して、目的物質を生産する機能を有する生物システムを創造するという、構成的アプローチを取る。人工的な生物を創造することで生物への理解を深めることや、その創造した人工物を利用して社会的に有用な物質を生産しようとする取り組みが世界中で行われている。

目的の微生物株を獲得するための方法に関して、合成生物学的なツールが開発される以前では、遺伝子組換え技術を用いない非組換えの育種方法が主流であった。この方法では、紫外線あるいはプラズマの照射などにより微生物が有する遺伝子にランダムな変異を導入する。変異が導入された微生物を選抜するための適切なスクリーニングすることにより、産業上重要な微生物がいくつも開発されてきた。また、紫外線などのランダムな変異導入のみならず、アナログ化合物に対する耐性を利用した方法や微生物が細胞増殖に必要なアミノ酸などの栄養を指標とした栄養要求性を活用した変異導入法が開発された。このような遺伝子組換えを伴わない微生物の育種開発手法は、その社会でも許容性から広く用いられてきた。グルタミン酸やリジンなどのアミノ酸生産菌、イノシンやグアノシンなどの核酸生産する微生物株は、非組換えの育種手法によって開発され、現在までアミノ酸などの生産に用いられている。

制限酵素

6から8程度の特定のDNA配列を認識し、切断する酵素



組換え酵素

特定の相同なDNA配列などを認識して、連結する酵素

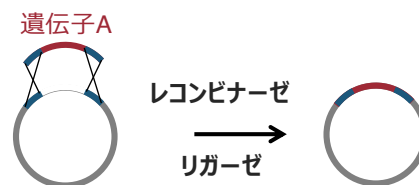


図 1-7 遺伝子組換え技術に資する酵素

一方、遺伝子組換えを伴う微生物の育種開発では、研究者の意図する遺伝子を生物に導入する技術が必要である。1973 年、コーエンとボイヤーは、生物の遺伝子組換えに必要な技術確立した。この遺伝子組換え技術の確立には、遺伝子配列を扱うための plasmid と呼ばれる DNA 配列の運び屋（ベクター）に対して、目的の箇所を特異的に切断する制限酵素、切断された DNA を修復する酵素（DNA リガーゼあるいは DNA レコンビナーゼ）が発見され、今日までの遺伝子組換え技術に重要な役割を果たした（図 1-7）。この制限酵素は、現在、約 3000 種類を超える酵素が発見されており、その制限酵素が認識する DNA 配列の多様性は 250 に及ぶとされている。また、任意の DNA 配列を自由に切断するのみならず、切断された DNA の末端の配列を区別して結合させることのできる DNA リガーゼ、あるいは 15 から 20 の同一の DNA 配列を認識し目的の遺伝子を組み込む DNA レコンビナーゼが発見された。この酵素によって、研究者は、任意の遺伝子を plasmid に自由に組み込むことができるようになった。この DNA の切断酵素などを利用した DNA の高効率な集積方法として、Gibson assembly 法 [28]や Golden Gate 法 [29]がよく知られている。構築された plasmid は、使用する微生物に応じた遺伝子組換え法によって微生物の細胞内に取り込まれ、その細胞内において plasmid 上に組み込まれた遺伝子が発現する。

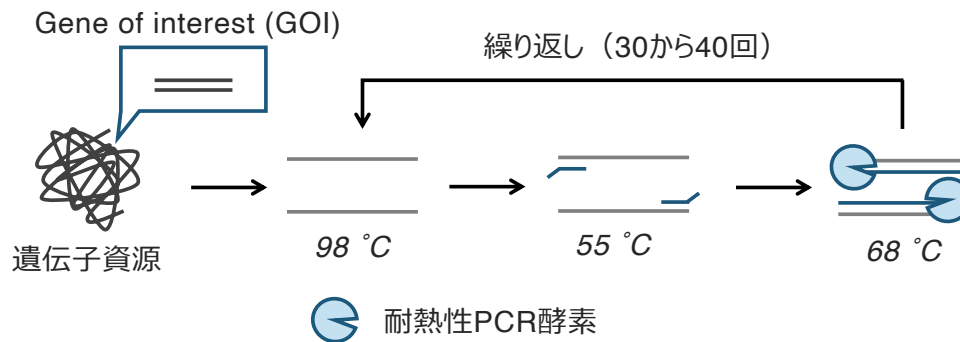


図 1-8 Polymerized chain reaction (PCR)の作用機序

Plasmid 上に導入する遺伝子を準備するために、導入候補となる遺伝子をコードする DNA を用意する必要がある。1983 年、キャリー・マリスは、目的の遺伝子配列のみを増幅するための、Polymerized chain reaction (PCR)法を発明した [[30]。PCR 法は、増幅させたい 2 本鎖 DNA を、98 °C での加熱により 2 本の 1 本鎖 DNA に乖離させる（図 1-8）。研究者は、それぞれの 1 本鎖 DNA に対して、20 塩基程度のプライマーと呼ばれる相補的な DNA を設計する。98 °C から 55 °C に温度を低下させると、プライマーは 1 本鎖 DNA に結合する。その後、プライマーが結合した地点から、DNA 複製する酵素 DNA ポリメラーゼによって、68 °C で DNA は複製される。この工程を 30 回から 40 回程度繰り返すことにより、DNA は指数関数的に増幅され、目的の遺伝子配列を容易に得ることができる。PCR は、98 °C から 55 °C までの広い温度範囲で繰り返されるため、これらの温度で失活しない耐熱性を持った PCR 酵素の発見に基づいた技術である。一般に、PCR 酵素はマグネシウムイオンを DNA の正確な複製に必要とする。一方で、PCR の反応系に存在するマグネシウムイオンをマンガンイオンに変更すると、DNA 複製の正確性が低下する。この原理を用いて、目的の DNA 配列にランダムな変異を導入して、酵素の機能を改変するためのエラー・プローン PCR 法も開発されている。

目的の DNA 配列を PCR 法によって増幅するためには、適切なプライマーを設計する必要があるため、目的とある遺伝子の DNA 配列を知る必要がある。DNA 配列を解読する方法として、サンガーシーケンス法があるが、この手法による既知の DNA 配列数は限られていた。1990 年に、アメリカ国立ヒトゲノム研究所（NHGRI）の前身であるアメリカ国立ヒトゲノム研究センター（NCHGR）は、ヒトゲノムプロジェクト（Human genome project）を開始した [31]。ヒトゲノム DNA に含まれる 30 億個の塩基対のうち、全ての DNA 配列を明らかにするためのプロジェクトであった。2003 年、ヒトゲノムプロジェクトは終了した。ヒトゲノムプロジェクトの過程により、デジタル技術の活用や塩基配列決定法が進歩することで、迅速かつ低コストに DNA 配列を解読するための技術が養成された。DNA シーケンス費用には、DNA シーケンサーの設備費用のみならず、人件費・試薬・消耗品・前処理費用・情報機器費用・間接経費も形状される。2001 年から 2010 年までの 10 年間に、1 人のヒトゲノムのシーケンス費用は 3300 分の 1 に、100 万塩基対の DNA シーケンス費用は 16500 分の 1 に低下した [32]。2016 年時点でのヒトゲノム解読に要する費用は 1000 USD であ

り、現在は 100 USD に到達しようとしている。また、サンガーシーケンス法の他に、ショットガンシーケンス法など画期的な技術が開発された。これらの技術発展の過程で、ジョン・クレイグ・ヴェンターは Celera Genomics 社を設立し、1995 年に、インフルエンザウイルスおよびマイコプラズマ菌の全ゲノム配列を解明することに成功した。また、1995 年以降、大腸菌 *E. coli*、枯草菌 *B. subtilis*、酵母 *S. cerevisiae* の全ゲノム配列が解読された。現在までに、約 7 万種以上の生物の全ゲノム配列が決定されている [33]。ゲノムプロジェクトの過程で発展したゲノムシーケンス技術により、現在では、これまで培養が不可能なために取得不可能であった DNA の配列情報も取得可能となり、公共のデータベース上（National Center for Biotechnology Information: NCBI、など）に登録されている遺伝子配列の情報は増加し続けている。

7.4. IT および自動化技術の進歩による合成生物学の高度化

2009 年、OECD は、バイオテクノロジーが経済発展へ貢献する市場としてバイオエコノミーという考えを提唱し、2030 年までに 200 兆円規模にまで拡大すると予測した [34]。この 200 兆円と予測されるバイオエコノミーは、健康医療分野、農林水産分野、工業分野の 3 つの領域に区分され、工業分野が 39 % と最も高い割合を占めている。このように、合成生物学の学問は、生物や DNA、RNA、タンパク質などのあらゆる生物の構成要素を用いて、医薬品、農業用肥料、エネルギー供給など幅広い分野への貢献が期待されている [35]。例えば、健康医療の分野では DNA を用いた遺伝子治療薬やモデルナ社による mRNA ワクチン、農林水産の分野では組換え植物や遺伝子組換え魚類による生産収率の向上など、多様な技術が次々に上市されつつある。

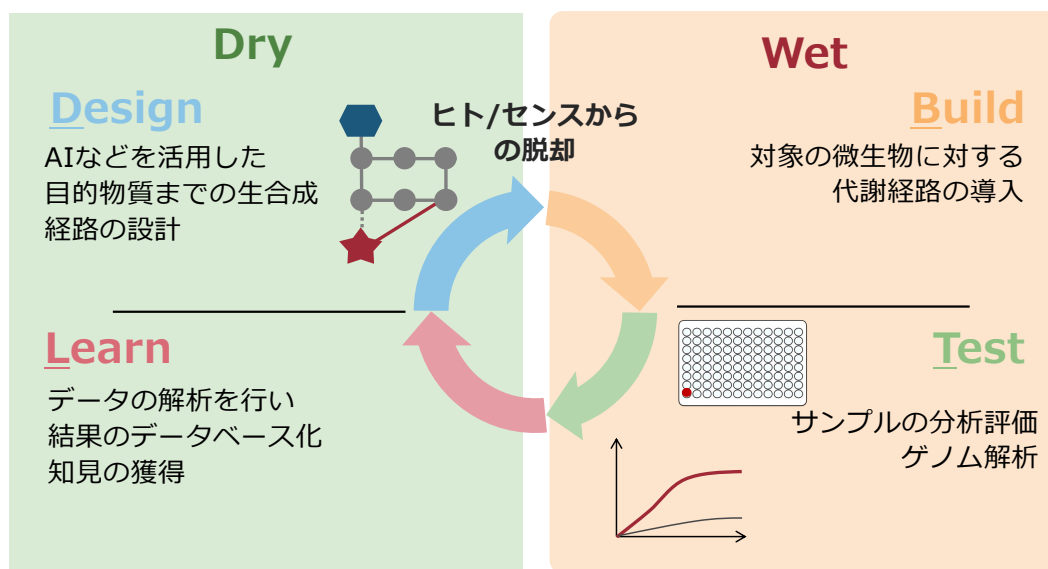


図 1-9 Design – Build – Test – Learn (DBTL) サイクルの概念図

一方、工業分野では、未だ目覚ましい成果物が乏しく、更なる技術の高度化が求められる。技術開発に関して、微生物の機能を改変する実験工程の最も代表的な概念として、図 1-9 に示す Design – Build – Test – Learn (DBTL) サイクルがある [36, 37]。DBTL サイクルとは、微生物

の設計（Design）、遺伝子組換え技術等を用いた微生物株の構築（Build）、培養および分析による測定（Test）、測定結果から得られた知見の獲得および知見からの次の工学への応用（Learn）という4つの工程を繰り返し、育種開発を行うサイクルのことである。近年は、この DBTL サイクルを、自動化技術や機械学習などを用いることで高度化しようとする動きが加速している。特に、筆者は、この DBTL サイクルに基づき、微生物の代謝を改変し有用な化合物を生産する微生物の開発を行っている。このような、DNA やタンパク質の機能をデータなどに基づき設計して代謝を改変し、特定の目的のために対象の微生物株を構築および解析する学問を代謝工学と呼ぶ。

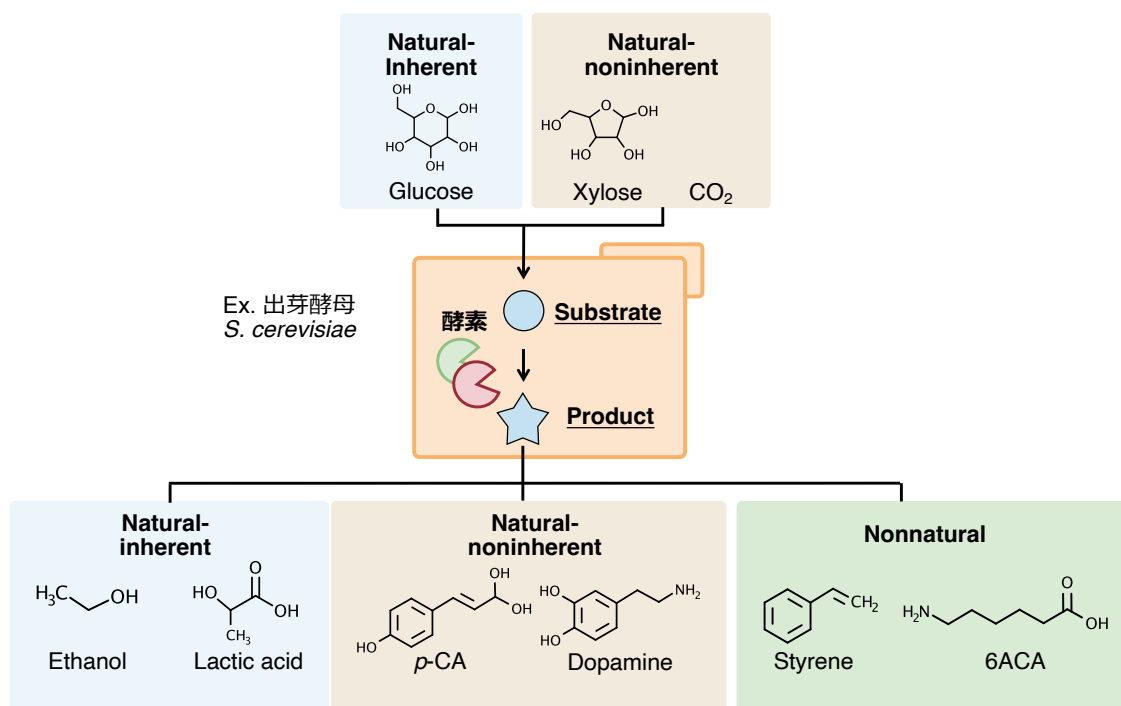


図 1-10 微生物によって代謝/生産される化合物に基づく分類

微生物が有する代謝経路の改変を行い目的の化合物を生産する代謝工学において、生育などに用いる基質および生産する化合物に基づき、図 1-10 のように分類することができる [38]。基質および目的化合物が、自然界に存在するか否か（Natural or Nonnatural）あるいは微生物が元来有する代謝経路を介して代謝もしくは生産できるか否か（Inherent or Noninherent）によって分類できる。出芽酵母 *S. cerevisiae* を例にとると、Natural-inherent 基質には、グルコース（Glucose）が挙げられ、自然界に存在し、且つ酵母が改変なしに代謝することが可能である。Natural-noninherent 基質では、キシロース（Xylose）や CO₂ が挙げられ、自然界に存在するが、酵母は基質を代謝するための代謝経路を持たず、他の微生物が有する代謝経路を導入することで代謝可能となる基質である。目的化合物に関して、Natural-inherent 物質では、自然界には存在する、かつその微生物が生産のための代謝経路を有し、エタノール（Ethanol）や乳酸（Lactic acid）が挙げられる。Natural-noninherent 物質では、自然界に存在する物質であるが、その微生物を用いて生産するためには、他の微生物宿主から代謝経路を同定し酵母に導入する必要がある、

p-クマル酸 (*p*-coumaric acid: *p*-CA) やドーパミン (Dopamine) が挙げられる。最後に、Nonnatural 物質とは、元来生物は生産しない、つまり目的化合物を生産するための代謝経路も存在しない化合物のことを指し、スチレン (Styrene) や 6-アミノカプロン酸 (6-aminocaproate: 6-ACA) が該当する。Nonnatural 物質を生産するためには、生産のための代謝経路を確立し、その代謝経路の反応を触媒する酵素を探索あるいは新規に開発する必要がある。

従来までは、Natural-inherent 基質を用いて Natural-inherent 化合物を生産する研究開発が行われてきた。特に、近年では、微生物を、Natural-noninherent 基質を代謝可能にする、Natural-noninherent 化合物を生産可能にする、あるいは Nonnatural 化合物を生産可能なように改変し、経済発展や持続可能な社会の構築に資することが求められている。現在、微生物によって代謝される基質あるいは生産される化合物は、非常に多岐にわたっている[39, 40]

引用文献

- [1] 環境省、令和 4 年版 環境・循環型社会・生物多様性白書、2022 年、
<https://www.env.go.jp/policy/hakusyo/r04/pdf.html>
- [2] 環境省、気候変動に関する政府間パネル 第 6 次評価報告書 第 I 作業部会報告書政策決定者向け要約、2021 年、<https://www.data.jma.go.jp/cpdinfo/ipcc/ar6/index.html>
- [3] United Nations Environment Programmed、Emissions Gap Report 2020.、2020 年、
https://j-unep.jp/publications/images/UN_EGR2020_ExSummary_jp_final.pdf
(Japanese version)
- [4] 南博ほか、SDGs-危機の時代の羅針盤、2020 年、岩波書店
- [5] 北川哲雄、バックキャスト思考と SDGs/ESG 投資、2019 年、同文館出版、
- [6] Joseph Alois Schumpeter, The Theory of Economic Development: An Inquiry Into Profits, Capital, Credit, Interest, and the Business Cycle, 1961, Oxford University Press
- [7] 経済産業省 資源エネルギー庁、令和 3 年度 エネルギーに関する年次報告 (エネルギー白書 2022) 、2022 年、<https://www.enecho.meti.go.jp/about/whitepaper/>
- [8] The British Petroleum Company plc, bp Statistical Review of World Energy 2022 71thedition, 2022, <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2022-full-report.pdf>
- [9] 環境省、温室効果ガス排出量 算定・報告・公表制度、<https://ghg-santeikohyo.env.go.jp/calc>
- [10] 経済産業省 資源エネルギー庁、「平成 26 年度エネルギーに関する年次報告」(エネルギー白書 2015) 、2015、<https://www.enecho.meti.go.jp/about/whitepaper/2015pdf/>
- [11] 伊原賢、シェールガス革命とは何か? -エネルギー救世主が未来を変える、2016 年、東洋経済新報社

- [12] シーエムシー出版編集部、クリーンエネルギーの技術と市場、2022 年、シーエムシー出版
- [13] ケミカルビジネス情報マップ 2022、2021 年、化学工業日報社
- [14] 橋川武郎、図解即戦力、化学業界のしくみとビジネスがこれ 1 冊でしっかりわかる教科書、2022 年、技術評論社
- [15] 三井化学、The Roots ～受け継がれる DNA・三井化学の歴史～、2023 年 12 月 2 日、<https://jp.mitsuichemicals.com/jp/corporate/history/>
- [16] NEDO、もっと知ろう 石炭に関する Q&A、2023 年 12 月 2 日、<https://www.nedo.go.jp/content/100079778.pdf>
- [17] J. A. Okolie, S. Nanda, A. K. Dalai, F. Berruti, and J. A. Kozinski, “A review on subcritical and supercritical water gasification of biogenic, polymeric and petroleum wastes to hydrogen-rich synthesis gas,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 119, p. 109546, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.rser.2019.109546.
- [18] 府川伊三郎、「石油化学」から「天然資源化学」へ (2016 年版)、2016 年、旭リサーチセンター、https://arc.asahi-kasei.co.jp/report/arc_report/pdf/rs-998.pdf
- [19] 石油化学工業協会、石油化学の 50 年、<https://www.jpca.or.jp/trends/50years.html>
- [20] 日本生物工学会、生物工学会誌 特別号 発酵工学 20 世紀のあゆみ-バイオテクノロジーの源流を辿る-、2000 年
- [21] 日本生物工学会 100 年史編集委員会ほか、日本生物工学会 100 年史、2022 年、生物工学会
- [22] 阪井康能ほか、遺伝子・細胞から見た応用微生物学、2020 年、朝倉書店
- [23] 阪口雅弘ほか、新バイオテクノロジーテキストシリーズ 微生物学 第二版、2013 年、講談社
- [24] 近藤 昭彦ほか、基礎生物学テキストシリーズ 10 遺伝子工学、2012 年、化学同人
- [25] Monod, J. & Jacob, F. Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 26, 389–401 (1961). DOI: 10.1101/sqb.1961.026.01.048
- [26] Cameron, D. E., Bashor, C. J., & Collins, J. J. (2014). A brief history of synthetic biology. *Nature Reviews Microbiology*, 12(5), 381–390. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3239>
- [27] Hartwell, L. H., Hopfield, J. J., Leibler, S., & Murray, A. W. (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature*, 402(S6761), C47–C52. <https://doi.org/10.1038/35011540>
- [28] Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- [29] Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2009). Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes. *PLoS ONE*, 4(5), e5553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005553>
- [30] 浅島誠ほか、現代生物科学入門 9 合成生物学、2010 年、岩波書店

- [31] Eric D. Green, James D. Watson & Francis S. Collins, (2016), Twenty-five years of big biology, *Nature digest*, 13 (1).
- [32] The Cost of Sequencing a Human Genome, National Institutes of Health (NIH) National Human Genome Research Institute, 2021, <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>,
- [33] Genome information by organism, NIH National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/overview/>
- [34] The Bioeconomy to 2030, 2009, OECD, <https://doi.org/10.1787/9789264056886-en>
- [35] Lawson, C. E., Harcombe, W. R., Hatzenpichler, R., Lindemann, S. R., Löffler, F. E., O'Malley, M. A., García Martín, H., Pfleger, B. F., Raskin, L., Venturelli, O. S., Weissbrodt, D. G., Noguera, D. R., & McMahon, K. D. (2019). Common principles and best practices for engineering microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 17(12), 725–741. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0255-9>
- [36] Lawson, C. E., Harcombe, W. R., Hatzenpichler, R., Lindemann, S. R., Löffler, F. E., O'Malley, M. A., García Martín, H., Pfleger, B. F., Raskin, L., Venturelli, O. S., Weissbrodt, D. G., Noguera, D. R., & McMahon, K. D. (2019). Common principles and best practices for engineering microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 17(12), 725–741. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0255-9>
- [37] Jarboe, L. R. (2018). Improving the success and impact of the metabolic engineering design, build, test, learn cycle by addressing proteins of unknown function. *Current Opinion in Biotechnology*, 53, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.12.017>
- [38] Lee, J. W., Na, D., Park, J. M., Lee, J., Choi, S., & Lee, S. Y. (2012). Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nature Chemical Biology*, 8(6), 536–546. <https://doi.org/10.1038/nchembio.970>
- [39] Lee, S. Y., Kim, H. U., Chae, T. U., Cho, J. S., Kim, J. W., Shin, J. H., Kim, D. I., Ko, Y.-S., Jang, W. D., & Jang, Y.-S. (2019). A comprehensive metabolic map for production of bio-based chemicals. *Nature Catalysis*, 2(1), 18–33. <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0212-4>
- [40] Jiang, W., Hernández Villamor, D., Peng, H., Chen, J., Liu, L., Haritos, V., & Ledesma-Amaro, R. (2021). Metabolic engineering strategies to enable microbial utilization of C1 feedstocks. *Nature Chemical Biology*, 17(8), 845–855. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00836-0>

第2章 研究背景

1. 草本系・木質系バイオマス为原料とした次世代バイオプロセス

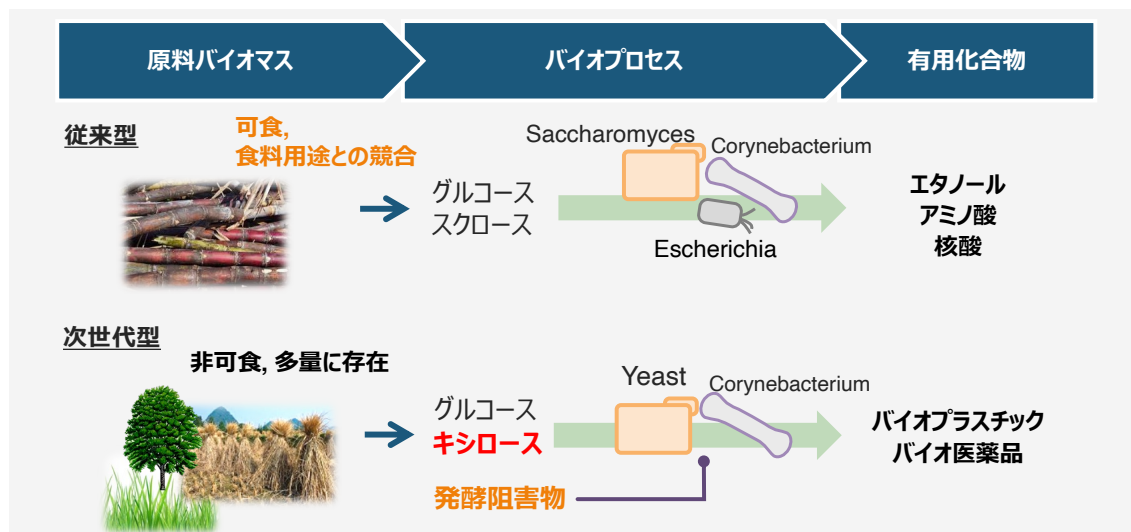


図 2-1 バイオマス为原料とした微生物発酵プロセスの転換

従来、微生物発酵の原料として、主にサトウキビ、テンサイ等に含まれる糖質、米、麦、トウモロコシ等の穀物に含まれるデンプン質などが用いられている。現在最もよく研究されているバイオマス由来の燃料はエタノールであり、アメリカでは主にトウモロコシを原料にバイオエタノールが生産されている。しかしながら、これらの農作物の微生物発酵への過剰な供給によって、食料用途との競合問題が顕在化した。例えば、トウモロコシをエタノール生産に大量に用いることで、トウモロコシ自体の価格の高騰、それを飼料とする家畜を加工して生産される食品の高騰、またトウモロコシ増産のために他の作物の作付面積の減少や土地価格の高騰といった社会問題を引き起こした。そこで、非可食で大量に存在し、再生可能な草本系・木質系の非可食性バイオマス、例えば、稲わら、麦わら、サトウキビ搾汁後の残渣であるバガス、コーンストーバーのような農産系の廃棄物、あるいはスイッチグラス、ネビアグラス、エリアンサス（いずれもイネ科の植物）、そして廃材、間伐材、林地 残材、古紙など、もともと未利用・処分されていたようなバイオマスが注目されている。これら次世代の草本系・木質系の非可食性バイオマスを原料として、微生物を用いた有用化合物を生産可能なバイオプロセスの開発が進められている。このような微生物を用いた化合物生産の例としては、これまでに、酵母や大腸菌などの微生物を用いた、抗マラリア薬の原料となるアルテミシニン [1]、汎用的なプラスチックの原料となる 1,4-ブタンジオール [2], [3]、1,3-プロパンジオール [4]などの生産が代表例として挙げられる。

この木質系バイオマスは、セルロース、ヘミセルロース、リグニンの主に 3 つの構成要素からなり、これらが強固に絡み合った構造を有している。そのため、木質系バイオマスを発酵原料として用いる際には、リグニンを除去する前処理の工程、バイオマスに含まれるセルロースやヘミセルロースの酵素による糖化の工程、微生物による発酵の 3 つのプロセスが必要である。上記前処理の工程では、酢酸やギ酸などの発酵阻害物が発生し、微生物の発酵能をしばしば阻害する。そのため、バイオマスの分解液から直接化合物を生産する際の微生物宿主には、物質生産の宿主としてよく用いられる

大腸菌 *Escherichia coli* などの原核生物ではなく、発酵阻害物や弱酸による低 pH に耐性のある出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* やコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* が有望な微生物宿主として注目を浴びている。

2. 草本系・木質系バイオマスの構造と利用プロセス

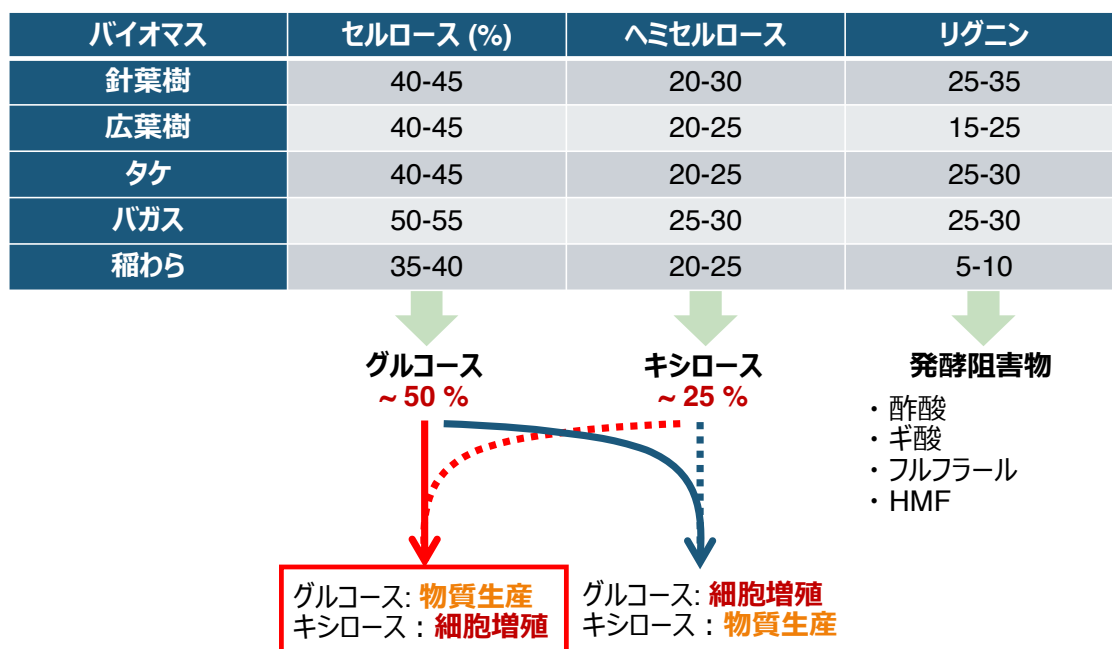


図 2-2 非可食バイオマスに含まれるセルロース、ヘミセルロース、リグニンの割合

非可食の草本系、木質系バイオマス木質系バイオマスは、セルロース、ヘミセルロース、リグニンの3種を主要構成成分として含む。セルロースは、グルコースが β -1,4-グリコシド結合により直鎖上に重合した無数の水素結合により結晶性の安定構造を有する。ヘミセルロースは、キシロースが β -1,4-グリコシド結合により重合したキシランを主成分とし、キシロース以外にもマンノースやアラビノースも構成成分とするヘテロ多糖である。リグニンは、ベンゼン側鎖が無数に結合した構造を有する。セルロース、ヘミセルロース、リグニン割合は、そのバイオマス資源の種別によるが、一般に、草本系、木質系バイオマスのうち、約 50 %のセルロース、および 20 %から 40 %のヘミセルロースで構成されている（図 2-1）。このような草本系、木質系バイオマスを微生物の発酵原料として用いる際には、多糖であるセルロースやヘミセルロースを得るための水熱処理を行う前処理の工程と、得られたセルロースとヘミセルロースを分解酵素等によって微生物の発酵基質へと分解する糖化の工程が必要である。得られたバイオマスの分解物には、セルロースおよびヘミセルロースの分解物であるグルコースやキシロース、および発酵阻害物である酢酸やギ酸などの有機酸が含まれる [5]。非可食性バイオマスから得られる基質の重量比は、グルコースが 30~50%、キシロース 20~25%である [6]。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、グルコース資化能力に優れ、酢酸、ギ酸、フルフラールなどの発酵阻害物に耐性を有する微生物である。また、遺伝子組換え技術が確立されていることから、

代謝工学を用いた非可食性バイオマスからの有用化合物生産の微生物宿主として用いられてきた。しかしながら、酵母 *S. cerevisiae* は、バイオマス分解物に 2 番目に多く含まれるキシロースを資化する能力を持たない。キシロースを有用化合物に変換することができなければ、バイオプロセス全体の物質生産収率が低下する。そのため、非可食性バイオマスを原料としたバイオプロセス開発において、異種生物由来の代謝経路を微生物に導入することで、グルコースのみならずキシロースを細胞増殖や有用化合物へ変換可能な酵母株の開発が求められている。非可食バイオマスに含まれる基質は、ほとんどの植物種でグルコースの方が多。そのため、グルコースを物質生産に、キシロースを細胞増殖に用いるほうが、グルコースを細胞増殖に、キシロースを物質生産に用いるよりも好ましい（図 2-2）。

加えて、非可食性バイオマスを原料としたバイオプロセスでは、バイオマスの前処理および糖化プロセスが必要となるため化合物の生産コストが増加する傾向にある。そのため、これまでバイオプロセスで生産されてきたエタノール、アミノ酸あるいは核酸に代わる、付加価値の高い化合物の生産をしようとする研究が盛んに行われている（図 2-1）。

3. 出芽酵母におけるキシロース資化能の付与

3.1. 従来型キシロース代謝経路

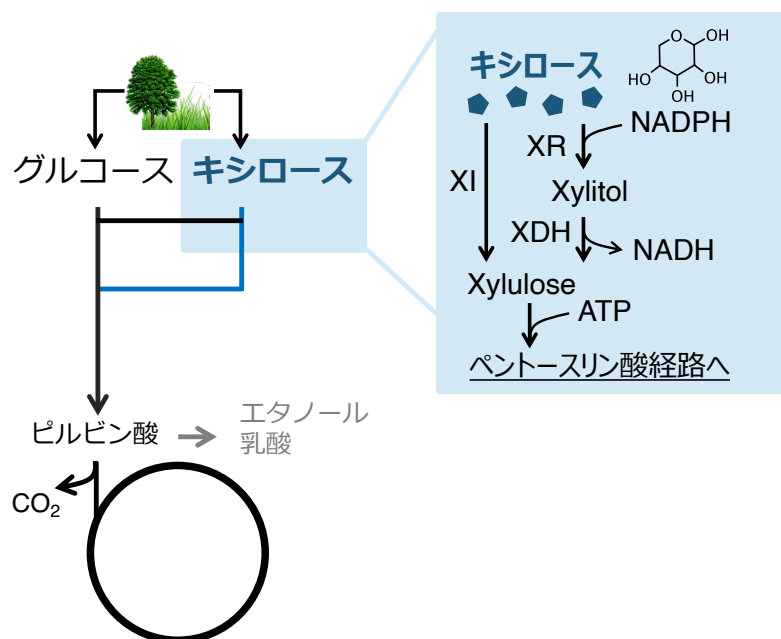


図 2-3 従来型経路を介したキシロースの代謝経路

そこで、酵母などの微生物宿主に、異種生物が有するキシロース代謝経路を導入し、キシロース代謝能を付与する研究が盛んに行われている。これまで、出芽酵母 *S. cerevisiae* に導入されてきたキシロース代謝経路として、キシロース異性化経路である Xylose isomerase (XI) pathway あるいはキシロース酸化還元経路である Xylose reductase / Xylitol dehydrogenase (XR/XDH)

pathway が知られている（図 5-3）。この従来型の代謝経路に関して、XI 経路では、酵素 XI によりキシロースはキシルロースに直接変換される。酵素 XI がキシロースはキシルロース（xylulose）に変換する際、反応を補助するような補酵素を必要としない点が大きな特徴となる。一方、XR/XDH 経路では、酵素 XR が NAD(P)H を補酵素として、キシロースをキシリトール（xylitol）へと変換する。続いて、酵素 XDH によって、合成されたキシリトールは NAD(P)⁺を補酵素に用いてキシルロースへ変換される。XI 経路、あるいは XR/XDH 経路によって生成したキシルロースは、酵素 Xylulokinase (XK)によってキシルロース-5-リン酸（X5P）に変換される。X5P は、微生物に内在の代謝経路であるペントースリン酸経路や解糖系を介して代謝され、細胞増殖や有用化合物の生産に用いることが可能である。

これまで、XI 経路あるいは XR/XDH 経路を構成する遺伝子を導入することで、出芽酵母 *S. cerevisiae* にキシロース変換能を付与する研究が盛んに行われてきた。しかしながら、これらの従来型経路を *S. cerevisiae* に導入した際、未だ多くの課題が存在する。XI 経路では、導入する酵素 XI に関して、*E. coli*, *B. subtilis*などのバクテリア由来の遺伝子が *S. cerevisiae*に導入されてきた。しかしながら、これらの生物種由来の酵素 XI を活性な状態で発現することは困難であり、キシロース取り込み速度が低いなどの課題がある。近年では、*Piromyces sp.*由来の酵素 XI などが *S. cerevisiae* を宿主に活性を持った状態で発現できる事が明らかとなった [7]。酵素 XI が導入された *S. cerevisiae* では、キシロースからのエタノール収率が非常に高いといった利点がある。しかしながら、後述する XR/XDH 経路が導入された組換え *S. cerevisiae* と比較して、キシロースの消費速度、およびエタノールの生産速度が非常に遅いといった課題が存在する。一方、XR/XDH 経路では、酵素 XR と酵素 XDH の補酵素バランスが悪く、中間生成物のキシリトールが細胞内外に蓄積する。これは、酵素 XR が NAD⁺を補酵素とするのに対し、酵素 XDH は NADPH を補酵素にして NADP⁺を生成するためである[8]。キシリトールの蓄積に伴い、生産する目的化合物の対キシロース収率が低下することが課題である [9]。また、XI 経路や XR/XDH 経路などの従来型経路では、キシロースから合成されたキシルロースは、酵素 XK によってペントースリン酸経路などの内在経路を介して代謝される。しかしながら、出芽酵母では、生成したキシルロースを X5P に変換する酵素 XK をコードする XKS1 の発現量が十分ではない [10]。また、*S. cerevisiae* は、酵素 XK によって合成された X5P を代謝するペントースリン酸経路の代謝のフラックスが弱い [11]。更には、微生物に必須の構成要素である核酸合成に関わるペントースリン酸経路には、複雑な代謝調節機構が存在するために、工学的な改良が困難である。このように、酵母を宿主とした従来型のキシロース代謝では、長年研究が行われてきたのにも関わらず、未だ多くの課題が存在する [5], [12]。

3.2. 新規型キシロース代謝経路

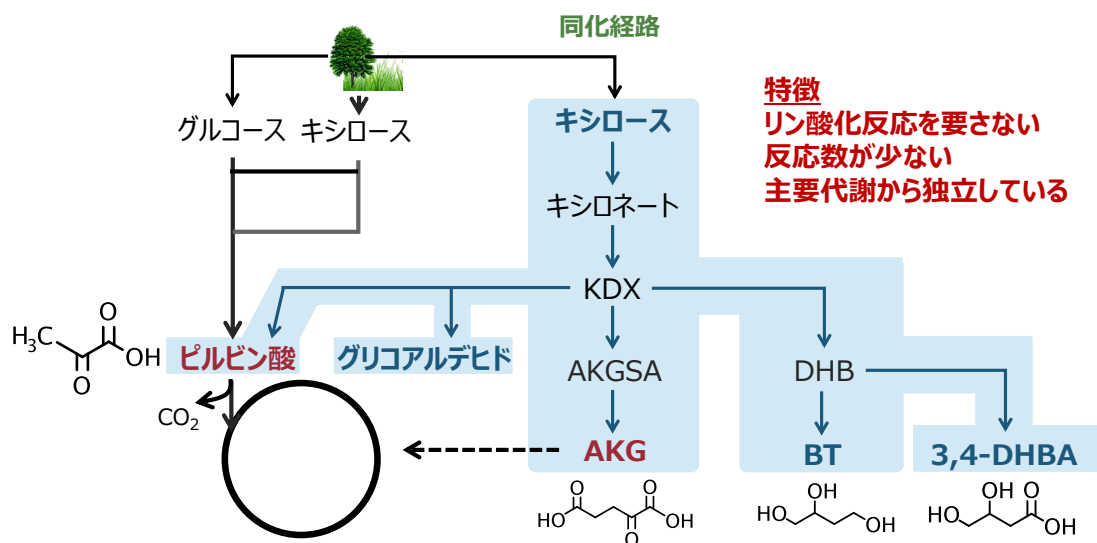


図 2-4 酸化的キシロース代謝経路および物質生産のための人工代謝経路図

そこで、従来型経路にかわる新規のキシロース代謝経路として、酸化的キシロース代謝経路（Xylose oxidative pathway）が注目を浴びている（図 5-4）[13]。酸化的キシロース代謝経路では、キシロースは 2-ケト-3-デオキシ-キシロネート（KDX）に酸化され、KDX は Weimberg pathway を介して α -ケトグルタル酸に（ α -ketoglutarate: AKG）[14]、あるいは Dahms pathway を介してピルビン酸（pyruvate）およびグリコアルデヒド（glycolaldehyde）に変換される [15]。このように、Weimberg pathway や Dahms pathway では、キシロースをわずか 3 から 4 段階の酵素反応で、微生物の主要代謝物質である α -ケトグルタル酸およびピルビン酸にそれぞれ変換可能である。 α -ケトグルタル酸やピルビン酸は、TCA サイクルや解糖系を介して代謝され、微生物宿主の細胞増殖や有用化合物の生産に用いることが可能である。

キシロースを細胞増殖に用いることに加え、Dahms pathway では、グリコアルデヒドからグリコール酸（Glycolate）やエチレングリコール（Ethylene Glycol: EG）が合成可能である [16], [17]。エチレングリコールは、ポリエチレンテレフタレート（Poly-ethylene terephthalate: PET）の構成モノマーの 1 つであり、非可食性バイオマスを原料とした生産が注目を集めている [18]。また、酸化的キシロース代謝経路を改変することで構築可能な人工代謝経路を介して、有用化合物である 3,4-ジヒドロキシ酪酸（3,4-dihydroxybutyrate ; 3,4-DHBA）[19]や 1,2,4-ブタントリオール（1,2,4-butanetriol ; BT）[20]、1,4-ブタンジオール（1,4-butanediol）[21]を生産することが可能である。

従来型経路と比較して、酸化的キシロース代謝経路では、基質であるキシロースをより少ない反応数で細胞増殖や有用化合物の生産に用いることが可能であるとされている。加えて、酸化的キシロース代謝経路は、全ての酵素反応が熱力学的に有利な反応で構成されており、ATP などの高エネルギー物質を補酵素とした反応を必要としない。以上から、グルコースとキシロースからの有用化合

物の生産において有利な特徴を多数有しており、酵母を微生物宿主とした酸化的キシロース代謝経路の確立が求められている [13]。

4. 原核生物を宿主とした酸化的キシロース代謝経路の構築

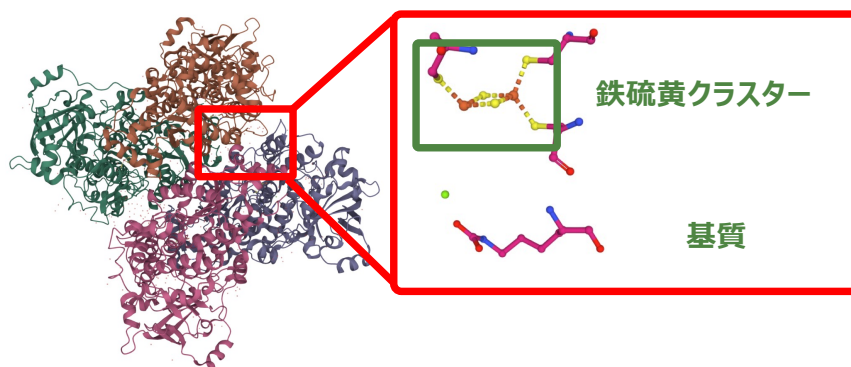
これまで、原核生物を宿主に遺伝子組換えを行い、非可食性バイオマスの有効利用するため、の優れた特徴を多数有する酸化的キシロース代謝経路を構築する研究開発が盛んに行われてきた。酸化的キシロース代謝経路である Weimberg pathway を構成する遺伝子は、*C. crescentus* を用いて研究が進められ、*xyIXABCD* オペロンとして同定された [22], [23]。この *C. crescentus* 由来の *xyIXABCD* オペロンを、*Pseudomonas putida* に導入することでキシロースを単一の炭素源とした細胞増殖が可能となり、比増殖速度は 0.21 h^{-1} であった [24]。その後、大腸菌 *Escherichia coli* [25], [26] やコリネ菌 *Corynebacterium glutamicum* [27] を宿主に、Weimberg pathway を介したキシロースを単一の炭素源とした細胞増殖が達成された。加えて、Weimberg pathway が導入された大腸菌や枯草菌を用いて、グルコースとキシロースからメサコン酸 [28]、イタコン酸 [29]、ポリグルタミン酸 [30] などの生産プロセスの開発が行われた。

酸化的キシロース代謝経路の構築は、遺伝子組換えが容易な大腸菌 *Escherichia coli* を宿主に研究開発が進められてきた。大腸菌 *E. coli* は、酸化的キシロース代謝経路のうち、キシロースデヒドロゲナーゼ (Xylose dehydrogenase) を有していないが、キシロネートデヒドラターゼ (Xylonate dehydratase) である YagF と YjhG、および 2-ケト-3-デオキシ-キシロネート (2-keto-3-deoxy-xylonate ; KDX) アルドラーゼである YagE および YjhH を有している [31]。そのため、キシロネートを単一の炭素源としてピルビン酸を合成することで細胞増殖、およびグリコアルデヒドから変換されるエチレングリコールやグリコール酸の生産が可能である [31], [32]。加えて、*C. crescentus* 由来のキシロースデヒドロゲナーゼ XylB を発現させることで、キシロースからのエチレングリコールやグリコール酸の生産プロセスの開発が盛んに行われてきた。特に、*E. coli* を宿主としたエチレングリコールの生産に関する研究開発は盛んに行われており [33]、エチレングリコールの生産量は 108.2 g/L 、生産速度は 2.27 g/L/h に達している [34]。また、キシロースから生産されたグリコール酸と乳酸をポリヒドロキシアリカノエート合成酵素 PHA (PHA synthase) により重合する事で、生分解性樹脂であるポリ乳酸-グリコール酸共重合体 (Poly(lactate-co-glycolate ; (PLGA)) やその派生物が合成されている [35]。近年では、解糖系と TCA サイクルを遺伝子破壊により分断し、グルコースを有用化合物の生産に、キシロースを Dahms pathway を介して細胞増殖に用いる事で、芳香族化合物である *cis,cis*-ムコン酸生産量が向上することが明らかとなっている [36]。このように、*E. coli* を宿主とした Weimberg pathway や Dahms pathway の研究開発は盛んに行われており、酸化的キシロース代謝経路を構築するのみならず、その構築された代謝経路を利用した高度な応用技術が開発されつつある。

5. 出芽酵母における新規の酸化的キシロース代謝経路構築における課題

Xylonate dehydratase (XylID)

from *Caulobacter crescentus* XylID (CcXylID)



出芽酵母において、XylIDが活性な状態で発現できない要因（仮説）

- 鉄硫黄クラスター合成機構の違いによるXylIDへ挿入される鉄硫黄クラスターの不足
- 酵素活性測定時と酵母培養時の環境pHの違い
- CcXylIDが活性の低い酵素である可能性

図 2-5 酵素 XylID が酵母内で低活性を引き起こす要因

このように、原核生物を宿主とした酸化的キシロース代謝経路の研究開発が進む一方で、出芽酵母 *S. cerevisiae* を宿主とした場合には、代謝経路の構築が困難であった。酵母 *S. cerevisiae* を宿主とした酸化的キシロース代謝経路の構築を阻む大きな要因の 1 つに、キシロネート (xylonate) から KDX への酵素反応を触媒する原核生物 *Caulobacter crescentus* 由来の酵素キシロネートデヒドラターゼ (XylID) が、*S. cerevisiae* の細胞内で活性な状態で発現できないことが挙げられた。酵母 XylID の活性が低いため、キシロネートから KDX への反応が律速段階となり、キシロースから合成されたキシロネートが培地中に多量に放出される [17], [33], [37]。酵素 XylID は、IlvD/EDD protein family に属するタンパク質であり、酵素反応を触媒するために鉄硫黄クラスターを要する鉄硫黄タンパク質であることが知られていた [38]。酵母を宿主とした場合には、異種生物由来の鉄硫黄タンパク質の発現が困難であることが、鉄硫黄タンパク質を含む代謝経路である Entner-Doudoroff 経路 [39]、1-デオキシ-D-キシロース-5-リン酸 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate 経路) [40], [41]、イソブタノール合成経路 [42]の研究で知られていた。このように、鉄硫黄タンパク質 XylID を *S. cerevisiae* を宿主に活性な状態で発現させるための機能発現技術が不足しており、バイオプロセス開発に資する酸化的キシロース代謝経路を含む有望な代謝経路の構築が困難であった。

6. 本研究の目的

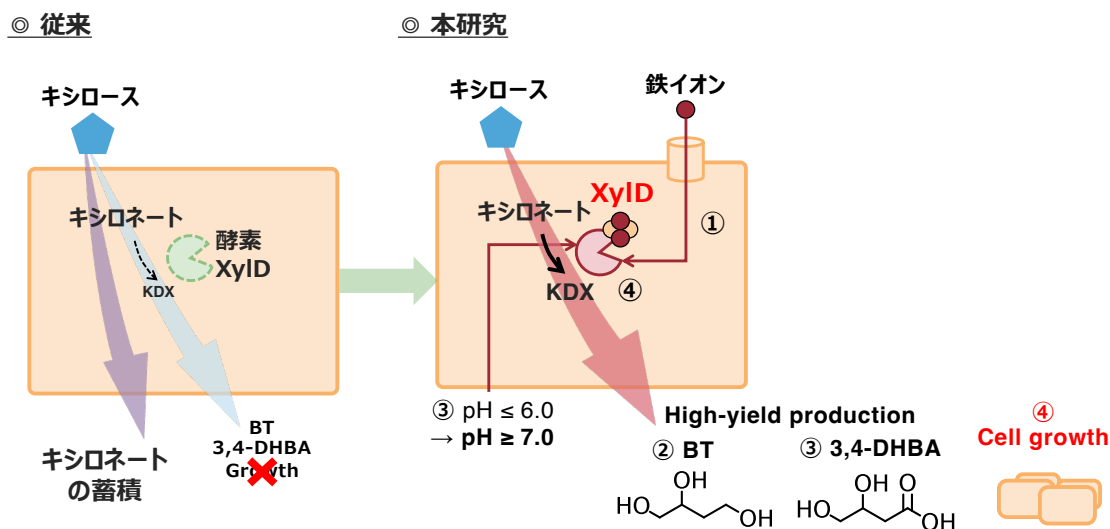


図 2-6 本研究での研究開発項目

本研究では、真核生物である酵母を宿主とした鉄硫黄タンパク質 XylID の高活性化技術の開発を試みた。加えて、酸化的キシロース代謝経路を機能させるための補酵素バランスの改善、アルカリ培養による中間生成物であるキシロネートの再取り込み系の構築、系統分類法による酵素探索システムの構築に取り組んだ（図 2-6）本研究で開発された 4 つの要素技術を用いて、酵母を宿主に、これまで構築が困難であった酸化的経路を介したキシロース利用を可能にし、高効率での物質生産、およびキシロースを細胞増殖に用いるための研究開発を行った。

研究開発項目①の成果を示した第 3 章では、「酵母の鉄代謝工学に基づく鉄硫黄タンパク質の高活性化技術の開発」と題し、*S. cerevisiae* を宿主とした鉄硫黄タンパク質 XylID の機能発現技術の開発に取り組んだ。出芽酵母を宿主とした場合に鉄硫黄タンパク質 XylID の活性が低い要因の 1 つとして、真核生物である出芽酵母と原核生物の鉄硫黄クラスター生合成機構が異なることに着目し、出芽酵母内に発現させた原核生物由来の鉄硫黄タンパク質 XylID に供給される鉄硫黄クラスターの量が十分でないのではないかとの仮説を立てた。酵素 XylID に挿入される鉄硫黄クラスターの供給量を向上するため、鉄硫黄クラスターの構成成分の 1 つである鉄イオンの代謝に着目した。細胞内への鉄イオンの取り込み能を向上させるため、酵母鉄代謝機構の改変することで酵素 XylID を活性な状態で発現する機能発現技術の開発に取り組んだ。

研究開発項目②の成果を示した第 4 章では、「出芽酵母の鉄代謝工学に基づく 1,2,4-ブタントリオール生産法の開発」と題し、第 3 章で開発された酵素 XylID の機能発現技術である鉄代謝工学に基づき、酸化的キシロース代謝経路の 1 つであるキシロースからの 1,2,4-ブタントリオール生合成経路の確立に取り組んだ。筆者らは、キシロースからの 1,2,4-ブタントリオール生合成経路の構築にあたり、これまで検討されてこなかった補酵素のバランスに着目した。1,2,4-ブタントリオール生合成経路の補酵素のアンバランスを解消するため、NADH を NADPH に変換することで 1,2,4-ブタントリ

オール生産量の向上に取り組んだ。また、フェドバッチ培養による 1,2,4-ブタントリオール生産に適した組換え酵母の培養法の確立を目指した。

研究開発項目③の成果を示した第 5 章では、「アルカリ培養による酵素 XylID の活性強化とキシロネート再取り込みに基づく 3,4-ジヒドロキシ酪酸の高生産」と題し、鉄代謝工学による XylID 活性強化技術が、キシロースからの 1,2,4-ブタントリオール生産経路の確立のみならず、その他の酸化的キシロース代謝経路の構築に応用可能かを検証することとした。特に、筆者らは、酵素 XylID 活性をの最も高い pH 帯と酵素 XylID が導入された組換え酵母を培養する pH が異なることに着目した。酵素 XylID 活性が最も高いのは pH = 8.5 の時であるのに対し [38]、酵素 XylID が導入された組換え酵母は、pH ≤ 6.0 の条件下で培養されるのが一般的であった。そのため、本研究では、pH ≥ 7.0 の培養条件が酸化的キシロース代謝経路が導入された *S. cerevisiae* に与える影響に関しては調査するとともに、キシロースからの 3,4-ジヒドロキシ酪酸生産量の向上を目指した。

最後に、研究開発項目④の成果を示した第 6 章では、「系統分類法による高活性酵素の同定と Dahms pathway および Weimberg pathway の構築」と題して、キシロースを単一の炭素源として細胞増殖可能な酵母 *S. cerevisiae* 株の開発を目指した。これまで、酵母 *S. cerevisiae* を宿主に、酸化的キシロース代謝経路を介したキシロースを単一炭素源とした細胞増殖は達成されていない [43], [44]。そのため、筆者らは、第 3 章で開発した鉄代謝工学による酵素 XylID の機能発現技術に基づき、細胞増殖を可能にする酸化的キシロース代謝経路である Dahms pathway および Weimberg pathway の構築を目指した。特に、酵母を宿主とした酸化的キシロース代謝経路の構築に関して、2007 年に同定された *C. crescentus* 由来の *xylXABCD* が同定されて以降、*C. crescentus* 由来の酵素が主に使用されてきた。酵母を宿主に導入された酸化的キシロース代謝経路を構成する遺伝子は、Dahms pathway を構成する *E. coli* 由来の *yagE* [17]、Weimberg pathway を構成する *C. glutamicum* 由来の *ksaD* 以外に知られていない。また、律速段階の酵素 XylID に関して、いくつかの由来生物から酵母内で機能する XylID が探索されたが、同定には至っていない [44], [45]。このように、出芽酵母を宿主とした場合、酸化的キシロース代謝経路を構成する酵素リソース、および酵素活性特性に関する情報の不足が、研究開発の律速となっていることが考えられた。この課題を解決するため、酸化的キシロース代謝経路を構成する酵素のうち、データベース上に登録されている全てのアミノ酸配列に対して、階層的クラスタリング手法に基づいた系統分類法を用いて、代謝経路構築に資する酵素の同定に取り組んだ。

引用文献

- [1] C. J. Paddon et al., “High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin,” *Nature*, vol. 496, no. 7446, pp. 528–532, Apr. 2013, doi: 10.1038/nature12051.
- [2] A. Burgard, M. J. Burk, R. Osterhout, S. Van Dien, and H. Yim, “Development of a commercial scale process for production of 1,4-butanediol from sugar,” *Current*

- Opinion in Biotechnology, vol. 42, pp. 118–125, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.copbio.2016.04.016.
- [3] H. Yim et al., “Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol,” *Nat Chem Biol*, vol. 7, no. 7, pp. 445–452, Jul. 2011, doi: 10.1038/nchembio.580.
 - [4] C. E. Nakamura and G. M. Whited, “Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 14, no. 5, pp. 454–459, Oct. 2003, doi: 10.1016/j.copbio.2003.08.005.
 - [5] S. Lane, J. Dong, and Y.-S. Jin, “Value-added biotransformation of cellulosic sugars by engineered *Saccharomyces cerevisiae*,” *Bioresource Technology*, vol. 260, pp. 380–394, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.04.013.
 - [6] S. R. Kim, Y.-C. Park, Y.-S. Jin, and J.-H. Seo, “Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism,” *Biotechnology Advances*, vol. 31, no. 6, pp. 851–861, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.03.004.
 - [7] M. Kuyper et al., “High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *S. cerevisiae*,” *FEMS Yeast Research*, vol. 4, no. 1, pp. 69–78, Oct. 2003, doi: 10.1016/S1567-1356(03)00141-7.
 - [8] A. Matsushika, H. Inoue, T. Kodaki, and S. Sawayama, “Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 84, no. 1, pp. 37–53, Aug. 2009, doi: 10.1007/s00253-009-2101-x.
 - [9] P. Kötter and M. Ciriacy, “Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 38, no. 6, pp. 776–783, Mar. 1993, doi: 10.1007/BF00167144.
 - [10] B. Johansson, C. Christensson, T. Hobley, and B. Hahn-Hägerdal, “Xylulokinase Overexpression in Two Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Also Expressing Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase and Its Effect on Fermentation of Xylose and Lignocellulosic Hydrolysate,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 67, no. 9, pp. 4249–4255, Sep. 2001, doi: 10.1128/AEM.67.9.4249-4255.2001.
 - [11] Z. J. et al., “Fermentation performance and intracellular metabolite patterns in laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 59, no. 4–5, pp. 436–442, Jan. 2002, doi: 10.1007/s00253-002-1056-y.
 - [12] S. Kwak, J. H. Jo, E. J. Yun, Y.-S. Jin, and J.-H. Seo, “Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains,” *Biotechnology*

- Advances, vol. 37, no. 2, pp. 271–283, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.12.003.
- [13] L. Shen et al., “A combined experimental and modelling approach for the Weimberg pathway optimisation,” *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 1098, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14830-y.
- [14] R. Weimberg, “Pentose Oxidation by *Pseudomonas fragi*,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 236, no. 3, pp. 629–635, Mar. 1961, doi: 10.1016/S0021-9258(18)64279-6.
- [15] A. Stephen Dahms, “3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 60, no. 4, pp. 1433–1439, 1974, doi: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(74\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(74)90358-1).
- [16] C. Alkim et al., “Optimization of ethylene glycol production from (d)-xylose via a synthetic pathway implemented in *Escherichia coli*,” *Microbial Cell Factories*, vol. 14, no. 1, Dec. 2015, doi: 10.1186/s12934-015-0312-7.
- [17] L. Salusjärvi et al., “Production of ethylene glycol or glycolic acid from D-xylose in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 101, no. 22, pp. 8151–8163, Nov. 2017, doi: 10.1007/s00253-017-8547-3.
- [18] B. Pereira et al., “Efficient utilization of pentoses for bioproduction of the renewable two-carbon compounds ethylene glycol and glycolate,” *Metabolic Engineering*, vol. 34, pp. 80–87, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.ymben.2015.12.004.
- [19] J. Wang, X. Shen, R. Jain, J. Wang, Q. Yuan, and Y. Yan, “Establishing a novel biosynthetic pathway for the production of 3,4-dihydroxybutyric acid from xylose in *Escherichia coli*,” *Metabolic Engineering*, vol. 41, pp. 39–45, May 2017, doi: 10.1016/j.ymben.2017.03.003.
- [20] X. Wang et al., “d -1,2,4-Butanetriol production from renewable biomass with optimization of synthetic pathway in engineered *Escherichia coli*,” *Bioresource Technology*, vol. 250, pp. 406–412, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.062.
- [21] J. Wang et al., “Rational engineering of diol dehydratase enables 1,4-butanediol biosynthesis from xylose,” *Metabolic Engineering*, vol. 40, pp. 148–156, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.ymben.2017.02.003.
- [22] C. Stephens, B. Christen, T. Fuchs, V. Sundaram, K. Watanabe, and U. Jenal, “Genetic Analysis of a Novel Pathway for D-Xylose Metabolism in *Caulobacter crescentus*,” *Journal of Bacteriology*, vol. 189, no. 5, pp. 2181–2185, Mar. 2007, doi: 10.1128/JB.01438-06.

- [23] S. Watanabe, T. Kodaki, and K. Makino, "A Novel α -Ketoglutaric Semialdehyde Dehydrogenase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 39, pp. 28876–28888, Sep. 2006, doi: 10.1074/jbc.M602585200.
- [24] J.-P. Meijnen, J. H. de Winde, and H. J. Ruijsenaars, "Establishment of Oxidative D-Xylose Metabolism in *Pseudomonas putida* S12," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 9, pp. 2784–2791, May 2009, doi: 10.1128/AEM.02713-08.
- [25] Y.-S. Tai et al., "Engineering nonphosphorylative metabolism to generate lignocellulose-derived products," *Nature Chemical Biology*, vol. 12, no. 4, pp. 247–253, Feb. 2016, doi: 10.1038/nchembio.2020.
- [26] L. Rossoni et al., "Engineering *Escherichia coli* to grow constitutively on D-xylose using the carbon-efficient Weimberg pathway," *Microbiology*, vol. 164, no. 3, pp. 287–298, Mar. 2018, doi: 10.1099/mic.0.000611.
- [27] C. Brüsseler, A. Späth, S. Sokolowsky, and J. Marienhagen, "Alone at last! – Heterologous expression of a single gene is sufficient for establishing the five-step Weimberg pathway in *Corynebacterium glutamicum*," *Metabolic Engineering Communications*, vol. 9, p. e00090, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.mec.2019.e00090.
- [28] W. Bai et al., "Engineering nonphosphorylative metabolism to synthesize mesaconate from lignocellulosic sugars in *Escherichia coli*," *Metabolic Engineering*, vol. 38, pp. 285–292, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.ymben.2016.09.007.
- [29] K. W. Lu, C. T. Wang, H. Chang, R. S. Wang, and C. R. Shen, "Overcoming glutamate auxotrophy in *Escherichia coli* itaconate overproducer by the Weimberg pathway," *Metabolic Engineering Communications*, vol. 13, p. e00190, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.mec.2021.e00190.
- [30] B. Halmschlag et al., "Comparison of Isomerase and Weimberg Pathway for γ -PGA Production From Xylose by Engineered *Bacillus subtilis*," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, p. 476, Jan. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2019.00476.
- [31] H. Liu, K. R. M. Ramos, K. N. G. Valdehuesa, G. M. Nisola, W.-K. Lee, and W.-J. Chung, "Biosynthesis of ethylene glycol in *Escherichia coli*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 97, no. 8, pp. 3409–3417, Apr. 2013, doi: 10.1007/s00253-012-4618-7.
- [32] X. Lu et al., "Ethylene glycol and glycolic acid production by wild-type *Escherichia coli*," *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 68, no. 4, pp. 744–755, Aug. 2021, doi: 10.1002/bab.1987.
- [33] L. Salusjärvi, S. Havukainen, O. Koivistoinen, and M. Toivari, "Biotechnological production of glycolic acid and ethylene glycol: current state and perspectives,"

Applied Microbiology and Biotechnology, Feb. 2019, doi: 10.1007/s00253-019-09640-2.

- [34] T. U. Chae, S. Y. Choi, J. Y. Ryu, and S. Y. Lee, "Production of ethylene glycol from xylose by metabolically engineered *Escherichia coli*," *AIChE J*, vol. 64, no. 12, pp. 4193–4200, Dec. 2018, doi: 10.1002/aic.16339.
- [35] S. Y. Choi et al., "One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in *Escherichia coli*," *Nature Biotechnology*, vol. 34, no. 4, pp. 435–440, Apr. 2016, doi: 10.1038/nbt.3485.
- [36] R. Fujiwara, S. Noda, T. Tanaka, and A. Kondo, "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for shikimate pathway derivative production from glucose–xylose co-substrate," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 279, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-019-14024-1.
- [37] A. B. Bañares, G. M. Nisola, K. N. G. Valdehuesa, W.-K. Lee, and W.-J. Chung, "Understanding D-xylonic acid accumulation: a cornerstone for better metabolic engineering approaches," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 105, no. 13, pp. 5309–5324, Jul. 2021, doi: 10.1007/s00253-021-11410-y.
- [38] M. Andberg et al., "Characterization and mutagenesis of two novel iron–sulphur cluster pentonate dehydratases," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no. 17, pp. 7549–7563, Sep. 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7530-8.
- [39] F. Benisch and E. Boles, "The bacterial Entner–Doudoroff pathway does not replace glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* due to the lack of activity of iron–sulfur cluster enzyme 6-phosphogluconate dehydratase," *Journal of Biotechnology*, vol. 171, pp. 45–55, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.11.025.
- [40] J. Kirby et al., "Engineering a functional 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) pathway in *Saccharomyces cerevisiae*," *Metabolic Engineering*, vol. 38, pp. 494–503, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.ymben.2016.10.017.
- [41] S. Partow, V. Siewers, L. Daviet, M. Schalk, and J. Nielsen, "Reconstruction and Evaluation of the Synthetic Bacterial MEP Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 12, p. e52498, Dec. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0052498.
- [42] N. Milne, S. A. Wahl, A. J. A. van Maris, J. T. Pronk, and J. M. Daran, "Excessive by-product formation: A key contributor to low isobutanol yields of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains," *Metab Eng Commun*, vol. 3, pp. 39–51, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.meten.2016.01.002.
- [43] C. Borgström et al., "Identification of modifications procuring growth on xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains carrying the Weimberg pathway,"

Metabolic Engineering, vol. 55, pp. 1–11, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.ymben.2019.05.010.

- [44] L. Wasserstrom, D. Portugal-Nunes, H. Almqvist, A. G. Sandström, G. Lidén, and M. F. Gorwa-Grauslund, “Exploring d-xylose oxidation in *Saccharomyces cerevisiae* through the Weimberg pathway,” *AMB Express*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1186/s13568-018-0564-9.
- [45] T. Bamba et al., “Production of 1,2,4-butanetriol from xylose by *Saccharomyces cerevisiae* through Fe metabolic engineering,” *Metabolic Engineering*, vol. 56, pp. 17–27, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.ymben.2019.08.012.

第3章 酵母の鉄代謝工学に基づく鉄硫黄タンパク質の高活性化技術の開発

1. 緒言

C. crescentis 由来の酵素 XylID は、IlvD/EDD ファミリーの属するタンパク質であり、その酵素活性に鉄硫黄 (Fe-S) クラスターを要する鉄硫黄タンパク質であることが知られている。出芽酵母 *S. cerevisiae* を微生物宿主とした場合、原核生物由来の鉄硫黄タンパク質を活性な状態で発現することは困難であることが知られており、原核生物に由来する物質生産に有望な代謝経路の構築が大幅に遅れをとる要因の 1 つとなっていた [1]–[3]。

原核生物は、Iron-sulfur cluster (ISC) マシナリーと SUF マシナリーと呼ばれる 2 つの鉄硫黄クラスター合成機構をサイトソルに有している [4]。一方で、真核生物である酵母は、ミトコンドリアに ISC マシナリーとサイトソルに CIA マシナリーをそれぞれ有している。原核生物の ISC マシナリーと真核生物のミトコンドリアに局在する ISC マシナリーのタンパク質は、おおよそ保存されている。一方で、真核生物のサイトソルに局在する CIA マシナリーによる鉄硫黄クラスター生合成の正確な作用機序は、未だ不明な点が多い。筆者らは、この鉄硫黄クラスター生合成機構の違いによって、酵母のサイトソルに発現させた酵素 XylID が鉄硫黄クラスターを十分量受け取ることができず、活性な状態で発現できないのではないかと仮説を立てた。

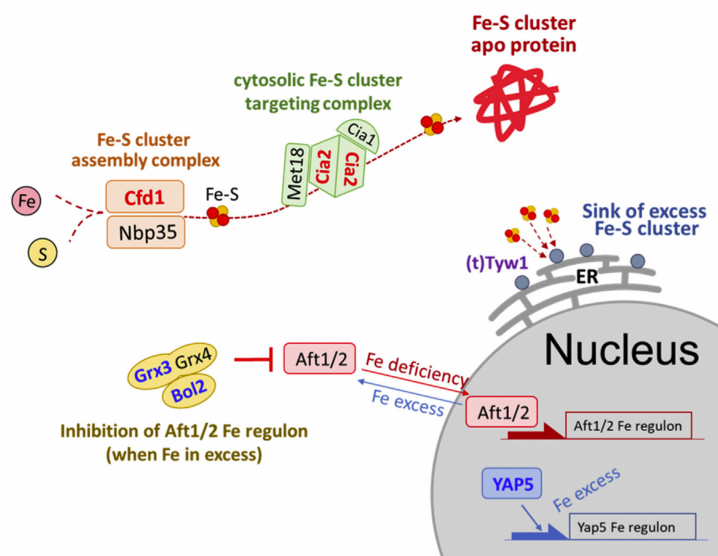


図 3-1 出芽酵母におけるサイトソルでの鉄硫黄クラスター生合成機構

出芽酵母 *S. cerevisiae* の鉄代謝に関わる遺伝子を過剰発現 (*CFD1* および *CIA2*; 赤)、破壊 (*GRX3*, *BOL2* および *YAP5*; 青)、あるいは過剰発現および欠失 (*TYW1* および *tTYW1*; 紫) を行い、BDΔD-2tkdcA 株をベースとした鉄代謝改変株のライブラリを構築した。

近年では、酵母の CIA マシナリーによる鉄硫黄クラスター生合成機構やその輸送に関与するタンパク質が徐々に明らかになりつつある。*S. cerevisiae* の細胞質では、図 3-1 に示すように、Cfd1 と Nbp35 がタンパク質複合体を形成して、鉄硫黄クラスター形成時の足場タンパク質として機能している [5], [6]。また、Cia1、Cia2、および Met18 からなるタンパク質複合体は、鉄硫黄クラスターをア

ポタンパク質に運搬し、鉄硫黄タンパク質のフォールディングに寄与する[4], [7]。Cia1、Cia2、および Met18 からなるタンパク質複合体の形成には、Cia2 が必須のタンパク質であると考えられている。

酵母細胞内への鉄イオンの取り込みは、転写因子である Aft1/Aft2 による鉄レギュロンによって制御されている。Aft1 および Aft2 は、特に、酵母細胞内の鉄イオンが不足した状態の時に、細胞膜の鉄イオントランスポーターを含む約 20 の遺伝子の発現を活性化する転写因子である。この Aft1/Aft2 による遺伝子発現の活性化は、Bol2、Grx3、および Grx4 のタンパク質複合体によって負に制御されている [8]–[10]。このタンパク質複合体は、細胞質内の鉄イオンの濃度を感知して、Aft1/Aft2 にシグナルを伝達すると考えられているが [11]、その詳細なメカニズムは未だ明らかにされていない。一方、BOL2 を破壊すると Aft1/2 鉄レギュロンが常に発現している状態になるため、鉄の取り込み能力が強化されることが分かっている [10]。

鉄イオンを感知する転写因子である Yap5 は、鉄イオンの細胞毒性を回避するため、細胞内の鉄イオンの隔離に関与する遺伝子の発現に寄与している [11]–[13]。Yap5 に遺伝子発現を制御される遺伝子のうち、RNA 4-demethylwyosine 合成酵素をコードする TYW1 は、wybutosine-modified tRNA の合成に関与している。Tyw1 は、細胞質の余剰な鉄硫黄クラスターと結合することで、高濃度の鉄硫黄クラスターの毒性から細胞を保護する役割があると考えられている [14]。

2. 酵母の鉄代謝機構の改変による XylID の活性強化

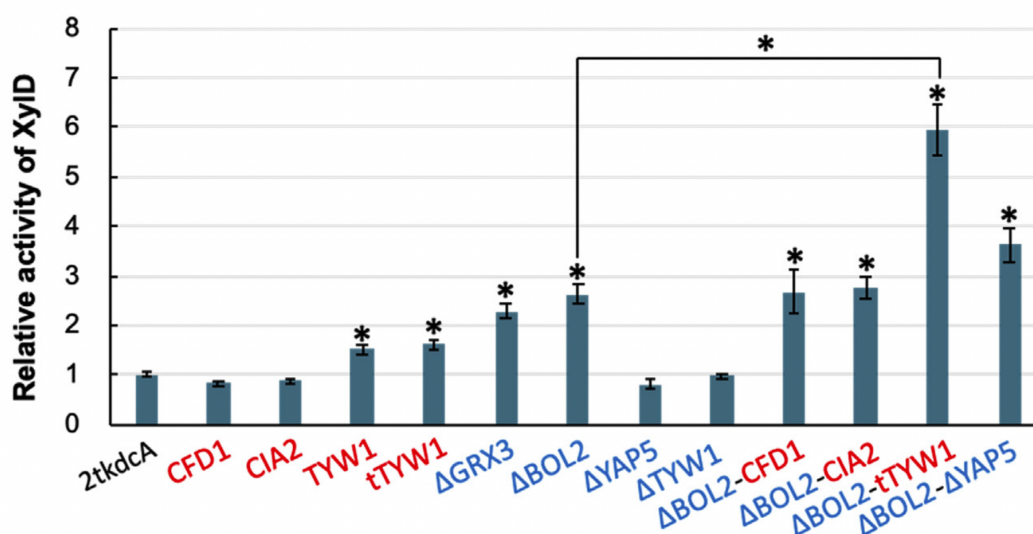


図 3-2 鉄硫黄クラスター合成機構あるいは鉄レギュロン改変株の XylID 活性向上

BDδD-2tkdcA 株の XylID 活性を基準値 (= 1.0) として、全てのデータセットを正規化した。アスタリスク (*) は、BDδD-2tkdcA 株と比較した際の XylID 活性の統計的有意差 ($p < 0.01$) を示し、Student の t 検定による一対比較で評価した結果である。また、BOL2 が破壊された酵母株と比較して、BOL2 の破壊と他の遺伝子組換えを組み合わせた際の XylID 活性値の統計的有意差 ($p < 0.01$) を評価した。エラーバーは独立した 3 回の実験による標準偏差を示している。

本研究では、鉄硫黄クラスター合成機構および鉄レギュロンを改変することにより、酵母細胞内への鉄イオン取り込み能の向上あるいは鉄硫黄クラスター合成能の強化により、XylIDを活性な状態で発現できるのではないかと考えた。出芽酵母に、*C. crescentus* 由来の XylID が導入された BD δ D-2tkdcA 株に対し、*CFD1*、*CIA2*、*TYW1* の過剰発現、*BOL2*、*GRX3*、*YAP5*、*TYW1* の破壊をそれぞれ行った。図 3-2 に示すように、*CFD1* あるいは *CIA2* の過剰発現、および *YAP5* あるいは *TYW1* の破壊では、XylID の酵素活性は向上しなかった。一方、*TYW1* の過剰発現、*GRX3* や *BOL2* を破壊した株では、XylID 活性の向上が確認され、それぞれ 1.5 倍、2.3 倍、および 2.5 倍に増加した。加えて、本研究では、BD δ D-2tkdcA 株では、Tyw1 の全アミノ酸配列のうち、鉄硫黄クラスター結合ドメインが欠失した truncated Tyw1 (tTYW1 ; TYW1 の 1 から 199 アミノ酸までをコードする遺伝子) を過剰発現させた。tTYW1 の過剰発現は、Aft1/Aft2 鉄レギュロンによって制御されている遺伝子の発現量を高め、細胞内への鉄イオンの取り込みを促進することを報告している [14]。その結果、tTYW1 を過剰発現させた酵母株では、親株と比較して、XylID の酵素活性が 1.6 倍向上した。

次に、本研究では、最も XylID 活性を向上した *BOL2* 遺伝子の破壊と、鉄硫黄クラスターの生合成機構および鉄レギュロンの改変を組み合わせることで、XylID の酵素活性への影響を調査した。図 3-2 に示すように、*BOL2* が欠損した酵母株に対して、*CFD1* あるいは *CIA2* の過剰発現、および *YAP5* を破壊した株では、XylID の酵素活性の向上は確認されなかった。一方、*BOL2* の破壊と、tTYW1 の過剰発現を組み合わせさせた酵母株では、*BOL2* が破壊された酵母株と比較して、XylID の酵素活性が 2.3 倍向上した。最終的に、未改変の酵母株である BD δ D-2tkdcA と比較して、*BOL2* の破壊と、tTYW1 の過剰発現を組み合わせさせた酵母株では、5.9 倍の XylID 活性の向上が達成された。

3. 考察

鉄イオンが有する細胞毒性のため、酵母細胞内への鉄イオンの取り込みは厳密に制御されている [11], [12], [15]。特に、異種生物由来の鉄硫黄タンパク質を酵母に発現させた際には、細胞内の鉄イオンの不測が鉄硫黄クラスターの生合成が律速となり、XylID を活性な状態で発現させることが困難だと推測された。先行研究では、*S. cerevisiae* の *BOL2* を破壊することで、*C. crescentus* 由来の XylID の活性が向上した [16]。また、本研究では、*BOL2* の破壊に加えて、*TYW1* および tTYW1 の過剰発現により鉄イオンの取り込み能が向上させることで、XylID の酵素活性を向上することに成功した。これは、細胞内の鉄イオン濃度が低いことが要因で、*S. cerevisiae* を宿主に発現させられた異種生物由来の鉄硫黄タンパク質の活性が低いという仮説を支持するだろう。

S. cerevisiae を宿主とした鉄イオンと鉄硫黄クラスターの関連性を更に検証するために、BD δ D-2tkdcA 株の XylID 活性に対する鉄イオン添加の影響を調べた。培地中に 2 mM のクエン酸第二鉄アンモニウムを含む培地で培養された BD δ D-2tkdcA 株の XylID 活性は、1.5 倍に向上した（補足図 4-1）。鉄イオンの添加による XylID の活性は、*BOL2* あるいは *GRX3* の破壊により向上した XylID 活性よりも低い（図 4-2）。*S. cerevisiae* は、細胞内に十分に鉄が存在する場合、鉄イオ

ンを取り込むトランスポーターの発現が抑制される。そのため、培地への鉄イオンの添加と比較して、*BOL2* や *GRX3* の破壊による鉄代謝機構の改変による鉄イオンの取り込み能の向上は、*XylD* の活性向上により適している。

Tyw1 は、その N 末端から 199 番目までのアミノ酸配列に、小胞体局在化ドメインを有している [11], [14]。実際に、*Tyw1* の 1 から 199 アミノ酸までをコードする *tTyw1* は、小胞体に局在する [14]。また、*TYW1* が過剰発現された酵母株と比較して、*tTYW1* が過剰発現された酵母株では、*Aft1/Aft2* によって制御される鉄イオントランスポーター *FET3* の転写を促進することが知られている [14,]。本研究では、*TYW1* および *tTYW1* の過剰発現により、異種生物由来の鉄硫黄タンパク質 *XylD* の活性を向上した。一方で、*Tyw1* に関する研究は少なく、*TYW1* の過剰発現がどのように *Aft1/Aft2* による鉄レギュロンを活性化して *XylD* の活性を強化したのかは不明である。興味深いことに、*tTyw1* のアミノ酸配列には、*Tyw1* に含まれている鉄硫黄クラスター結合ドメインが欠落している。小胞体局在化ドメインを含む *tTyw1* のアミノ酸配列は、未知の要因によって *Aft1/Aft2* 制御を活性化しているのかもしれない。

鉄硫黄クラスター合成のための足場タンパク質である *Cfd1* は、鉄硫黄クラスターの形成をサポートする [11]。図 4-2 に示したように、*CFD1* を過剰発現は、*XylD* の活性向上に寄与せず、鉄硫黄クラスターの生合成を促進するのに不十分だろう。

鉄硫黄タンパク質を機能させるために、CIA マシナリーによって細胞質で生合成された鉄硫黄クラスターは、アポタンパク質に鉄硫黄クラスターを移行させる必要がある。この鉄硫黄クラスターのアポタンパク質への移行には、キャリアタンパク質である *Met15*、*Cia1*、および *Cia2* のタンパク質複合体が必要である。この *Cia2* を含むタンパク質複合体は、原核生物の鉄硫黄クラスターのキャリアタンパク質と異なり [4]、*CIA2* の過剰発現は *XylD* の酵素活性に影響を与えなかった。この結果は、鉄硫黄クラスターのキャリアタンパク質が鉄硫黄クラスターの生合成を促進しないことが示唆された。加えて、*XylD* の更なる酵素活性の向上のためには、*XylD* に鉄硫黄クラスターを移行可能なタンパク質複合体が必要となることが示唆されている。

実験操作

使用した菌株および培地

プラスミドの増幅には、*Escherichia coli* NovaBlue (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いた。NovaBlue は、100 µg/mL アンピシリンを含む Luria-Bertani (LB) 培地 (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, and 5 g/L NaCl) で、37 °C で培養した。*XylD* 活性測定実験には、*S. cerevisiae* YPH499 [MAT α *ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-63 his3-Δ20 0 leu2-Δ1* (Stratagene, La Jolla, CA, USA)] を用いた。BY4741 の *GRE3* 破壊株は、Yeast Deletion Mat-A Complete Set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) より取得した。酵母の培養には、SD 培地 [6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 20 g/L glucose] に、組換え株の栄養要求性に合わせてアミ

ノ酸あるいは核酸を加えたもの、または YPD 培地 [10 g/L yeast extract, 20 g/L Bacto-peptone(Difco Laboratories), 20 g/L glucose] を用いて、30 °C で培養した。

プラスミドの構築

表 3-1 本研究で使用した Plasmid

Plasmid name	Description
pATP405	empty vector, <i>LEU2</i> marker
pIBG-SS	PCR template to amplify the pSED1 and tSAG1
pGK402	empty vector, <i>ADE2</i> marker
pTS-A-xylBD	pTDH3- <i>xylB</i> , pSED1- <i>xylD</i> , <i>ADE2</i> marker
pδW	δ-integration vector, <i>TRP1</i> marker
pδW-xylD	δ-integration plasmid, pADH1- <i>xylD</i>
pGK405	empty vector, <i>LEU2</i> marker
pIL pTDH3-tADH1	empty vector, pTDH3, <i>LEU2</i> marker
pIL pTDH3-kdcA	pTDH3- <i>kdcA</i> , <i>LEU2</i> marker
pGK406	empty vector, <i>URA3</i> marker
pIU pTDH3-tADH1	empty vector, pTDH3, <i>URA3</i> marker
pIU-pTDH3-kdcA	pTDH3- <i>kdcA</i> , <i>URA3</i> marker
pAUR101	empty vector, <i>AUR1-C</i> marker
pGK Aur	empty vector, pPGK1, <i>AUR1-C</i> marker
pIAur-CFD1	pPGK1-CFD1, <i>AUR1-C</i> marker
pIAur-CIA2	pPGK1-CIA2, <i>AUR1-C</i> marker
pIAur-TYW1	pPGK1-TYW1, <i>AUR1-C</i> marker
pIAur-tTYW1	pPGK1-tTYW1, <i>AUR1-C</i> marker

表 3-2 本研究で使用したプライマー配列

Primer name	Sequence
xylB F	gacacgcgtgcggccatgtcctccgccatctatc
xylB R	taaattcacgcggccttatctccaaccagcatcta
SED1p-SAG1t F	cttaatagagcgaacgtattttatttg
SED1p-SAG1t R	tgtacagttagtagattgagtc

xyID F	gttcgctctattaagatgagaagtgccctatccaatag
xyID R	tgtactaactgtacatcaatgggtatgtcttggcaacttg
pTDH3-xyIB F	cgggccccccctcgaggaataaaaaacacgctttttca
pTDH3-xyIB R	tatatccaatgctagcatcctggcggaataaattca
pSED1-xyID F	ccgccaggatgctagcattggatatagaaaattaacgta
pSED1-xyID R	accgcggtggcgccgcacccagtgagcgcgcgta
xyID 2F	cgcgggccggccggtttcaatgggtatgtcttggc
xyID 2R	atacacctagggtttatgagaagtgccctatccaatag
pADH1-xyID F	actagtggatccccctgtcctctgaggacataaaatac
pADH1-xyID R	gaattcctgcagcccggtgtacaatatggacttctc
tdh3p F	cgggccccccctcgacagttcgagtttatcattatc
tdh3p R	ttgtttgtttatgtgtgtttattc
adh1t F	acataaacaacaaacccgggccaatttcttatgatttatg
adh1t R	accgcggtggcgccgagcgacctcatgctatacctg
dGRE3 F	actggattaaaaggagcccaagg
dGRE3 R	ccgtggagtcttcgtcaagtagttg
HIS3 F	cgttttaagagcttggtagcgc
HIS3 R	tcgagttcaagagaaaaaaaagaaaaagc
dBOL2 up F	acgttctctccgttgttcaaacc
dBOL2 up R	gctcaccaagctcttaaacgatatatgtatatataacaccgaaaaacttattcc
dBOL2 down F	ctttttttctcttgaactcgaaggatgatattgttctattattaagtttcgaaagg
dBOL2 down R	gcaacgacgacaatgccaaaccaagg
dYAP5 up F	TTCGCACTCATATTGACGAACAAAAC
dYAP5 up R	ctagcgctcaccaagctcttaaacgGACTGTGATAATATGCTAGTTACAC
dYAP5 down F	ctttttttctcttgaactcgaAGAGAGAGAACTTCTTAATAC
dYAP5 down R	AATAATCAGTACGCATATTCGC
dTYW1 up F	AGTATACTAATTTCAAGCAAACCTGC
dTYW1 up R	ctagcgctcaccaagctcttaaacgAATTTACTTACTGTTACAGTTATTC
dTYW1 down F	ctttttttctcttgaactcgaAAGATACTGGTATATATTAAGAG
dTYW1 down R	GGTCATACCGTGGCGAAGAAGCCTAC
AUR1-C F	aaagtgcccatcagtggtcatatttg
AUR1-C R	agaggaaagaataacgcaaaaccaccc

dYAP5-Aur up R	caaatatgaacactgatgggcactttGACTGTGATAATATGCTAGTTACAC
dYAP5-Aur down F	gaaaagggtggttttgcgttattcttctctAGAGAGAGAACTTCTTAATAC

本研究で作成したプラスミドは全て、In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara) を用いて作成した。簡単には、制限酵素処理したベクターの末端 15 塩基の相同配列を、クローニングする塩基配列の両端に PCR で付加して、ベクターとクローニング配列、In-Fusion 酵素を混合したのち、50°C で 15 min インキュベートすることで作成した。本研究で使用した遺伝子のうち、*C. crecentus* 由来の *xylB* および *xylD*、*L. lactis* 由来 *kdcA* は *S. cerevisiae* のコドン使用頻度に遺伝子配列を最適化したものを GenScript (Piscataway, NJ, US) にて人工合成を行ったものを使用した。本研究で作成したプラスミドを表 3-1 に示した。また、本研究で使用した全ての DNA プライマーの配列を表 3-2 に示した。

pTS-A-*xylB*D の構築

xylB に *TDH3* プロモーターと *TDH3* ターミネーターを接続するために、コドン最適化した *xylB* (GenScript) をテンプレートにプライマー-*xylB* F と *xylB* R を用いて PCR により得られた DNA 断片を、NotI (New England Biolabs) で処理された pATP405 (*LEU2*) [17] にクローニングした。クローニングにより作成されたプラスミドをテンプレートに、プライマー-pTDH3-*xylB* F および pTDH3-*xylB* R を用いて PCR を行い、pTDH3-*xylB*-tTDH3 断片を作成した。また、pIBG-SS [18] をテンプレートにプライマー-SED1p-SAG1t F, SED1p-SAG1t R を用いて PCR を行った DNA 断片を得た、コドン最適化した *xylD* (GenScript) をテンプレートにプライマー-*xylD* F と *xylD* R を用いて PCR により得られた DNA 断片を In-fusion にてクローニングした。作成したプラスミドをテンプレートに、プライマー-pSED1-*xylD* F と pSED1-*xylD* R を用いて PCR を行い、pSED1-*xylD*-tSAG1 の DNA 断片を作成した。pSED1-*xylD*-tSAG1 断片と pTDH3-*xylB*-tTDH3 断片を、NotI-HF (New England Biolabs) と XhoI (New England Biolabs) で処理された pGK402 (*ADE2*) にクローニングすることで、pTS-A-*xylB*D を得た。

pδW-*xylD* の構築

xylD に、*ADH1* プロモーターと *ADH1* ターミネーターを接続するために、PmeI で切断した pATP405 [17] に、コドン最適化した *xylD* (GenScript) をテンプレートにプライマー-*xylD* 2F と *xylD* 2R を用いて PCR により得られた DNA 断片をクローニングした。作成されたプラスミドをテンプレートに、プライマー-pADH1-*xylD* F と pADH1-*xylD* R を用いて PCR を行い、ADH1p-*xylD*-ADH1t 断片を得た。この断片を SmaI で処理された δ-integration 用のベクター pδW [19] にクローニングして、*xylD* の δ-integration 用プラスミドである pδW *xylD* を作成した。

pIL-pTDH3-*kdcA* および pIU-pTDH3-*kdcA* の構築

S. cerevisiae のゲノム DNA をテンプレートに、プライマーTDH3 プロモーターと *ADH1* ターミネーターを含む DNA 断片をそれぞれ増幅した。*TDH3* プロモーターと *ADH1* ターミネーターを含む DNA 断片を、プライマーLEU2)および pGK406 (*URA3*) [17]にクローニングすることで、pIL pTDH3-tADH1 と pIU pTDH3-tADH1 を作成した。また、SmaI で切断した pIL pTDH3-tADH1 に、コドン最適化された *kdcA*を In-Fusion によりクローニングすることで、pIL-pTDH3-kdcA を作成した。pIL-pTDH3-kdcA をテンプレートにプライマー-opt kdcA F と opt kdcA F を用いて PCR により得られた断片を SmaI で切断した pIU pTDH3-tADH1 に In-Fusion によりクローニングすることで、pIU-pTDH3-kdcA を作成した。

pIAur-CFD1、pIAur-CIA2、pIAur-TYW1、および pIAur-tTYW1 の構築

PGK1 プロモーターおよび PGK1 ターミネーターを含む DNA 断片を得るため、プライマーAUR-pgk F および AUR-pgk R を用いて pGK406 [17]をテンプレートに PCR を行った。得られた DNA 断片を、SphI と SacI で処理された pAUR101 (Takara Bio, Shiga, Japan)にクローニングし、pGK Aur を作成した。プライマーCFD1 F および CFD1 R、CIA2 F および CIA2 R、TYW1 F および TYW1 R、あるいは TYW1 F および tTYW1 R を用いて PCR を行い、*S. cerevisiae* YPH499 ゲノム DNA から PCR にて増幅し、smaI で処理された pGK Aur にクローニングすることにより、pIAur-CFD1, pIAur-CIA2, pIAur-TYW1, and pIAur-tTYW1 を得た。

酵母株の構築

表 3-3 本研究で用いた酵母株

Strain name	description
YPH499	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1- 63 his3Δ200 leu2-Δ1</i>
YPH499ΔGRE3	YPH499, <i>gre3Δ::kanMX4</i>
BD	YPH499ΔGRE3, pTS-A-xyIBD
BDδD	BD, pδW-xyIBD
BDδD-tkdcA	BDδD, pIL-tkdcA
BDδD-2tkdcA	BDδD-tkdcA, pIU-tkdcA
BDδD-2tkdcAΔGRX3	BDδD-2tkdcA, <i>grx3Δ::HIS3</i>
BDδD-2tkdcAΔBOL2	BDδD-2tkdcA, <i>bol2Δ::HIS3</i>
BDδD-2tkdcAΔYAP5	BDδD-2tkdcA, <i>yap5Δ::HIS3</i>

BD δ D-2tkdcA Δ TYW1	BD δ D-2tkdcA, <i>tyw1</i> Δ :: <i>HIS3</i>
BD δ D-2tkdcA-CFD1	BD δ D-2tkdcA, pIAur-CFD1
BD δ D-2tkdcA-CIA2	BD δ D-2tkdcA, pIAur-CIA2
BD δ D-2tkdcA-TYW1	BD δ D-2tkdcA, pIAur-TYW1
BD δ D-2tkdcA-tTYW1	BD δ D-2tkdcA, pIAur-tTYW1
BD δ D-2tkdcA Δ BOL2-CFD1	BD δ D-2tkdcA, <i>bol2</i> Δ :: <i>HIS3</i> , pIAur-CFD1
BD δ D-2tkdcA Δ BOL2-CIA2	BD δ D-2tkdcA, <i>bol2</i> Δ :: <i>HIS3</i> , pIAur-CIA2
BD δ D-2tkdcA Δ BOL2-tTYW1	BD δ D-2tkdcA, <i>bol2</i> Δ :: <i>HIS3</i> , pIAur-tTYW1
BD δ D-2tkdcA Δ BOL2 Δ YAP5	BD δ D-2tkdcA, <i>bol2</i> Δ :: <i>HIS3</i> , <i>yap5</i> Δ :: <i>HIS3</i>

酵母の形質転換には、酢酸リチウムを用いた One-step transformation 法 [20]にて行った。本研究で構築された全ての株は、表 3-3 に示した。*S. cerevisiae* YPH499 株において *GRE3* を G418 耐性遺伝子で置換することで、*GRE3* 破壊株 YPH499 Δ *GRE3* 株を作成した。*GRE3* 破壊用の DNA 断片の作成は、Yeast Deletion Mat-A Complete Set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) より取得した BY4741 Δ *GRE3* のゲノム DNA をテンプレートに、プライマー-d*GRE3* F および d*GRE3* R を用いて、PCR により作成した。

YPH499 Δ *GRE3* 株に *EcoRV* で切断したプラスミド pTS-A-*xyIBD* を導入して、BD 株を作成した。*xyID* の多コピー導入株作成の為に、BD 株に *AscI* で切断したプラスミド p δ W-*xyID* を導入して、BD δ D 株を作成した。*L. lactis* 由来の *kdcA* の過剰発現株を作成するために BD δ D 株に、*EcoRV* で切断した pIL-pTDH3-*kdcA* を形質転換することで BD δ D-tkdcA 株を作成した。さらに BD δ D-tkdcA 株に *EcoRV* で切断した pIU-pTDH3-*kdcA* を形質転換することで BD δ D-2tkdcA 株を作成した。

GRX3, *BOL2*, *YAP5*, および *TYW1* は、栄養要求性マーカー *HIS3* で置換することで破壊した。プラスミド pGK403 (*HIS3*) [17] をテンプレートに、プライマー *HIS3* F および *HIS3* R を用いて PCR を行い、*HIS3* マーカー部位を増幅した。*GRX3*, *BOL2*, *YAP5*, *TYW1* 遺伝子の ORF 上流の 500bp を増幅するために、プライマー-d*GRX3* up F と d*GRX3* up R, d*BOL2* up F と d*BOL2* up R, d*YAP5* up F と d*YAP5* up R, d*TYW1* up F と d*TYW1* up R を用いて、*S. cerevisiae* のゲノム DNA をテンプレートに PCR を行った。また、*GRX3*, *BOL2*, *YAP5*, *TYW1* ORF の下流 500bp を増幅するために、YPH499 ゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー-d*GRX3* down F および d*GRX3* down R, d*BOL2* down F および d*BOL2* down R, d*YAP5* down F および d*YAP5* down R, または d*TYW1* down F とおよび d*TYW1* down R を用いてそれぞれ PCR を行った。*GRX3*, *BOL2*, *YAP5*, *TYW1* 破壊用の断片を調製するため、d*GRX3* up F および d*GRX3* down R, d*BOL2* up F および d*BOL2* down R, d*YAP5* up F および d*YAP5* down R, d*TYW1* up F および d*TYW1* down R を用いて、3 つの DNA 断片 (*HIS3*, ORF の上流 500 bp, ORF の下流 500 bp) をオーバーラップ PCR により接続した。*GRX3*, *BOL2*, *YAP5*, *TYW1* 破壊用

断片を、BD δ D-2tkdcA 株に形質転換することで、それぞれ BD δ D-2tkdcA- Δ GRX3, BD δ D-2tkdcA- Δ BOL2, BD δ D-2tkdcA- Δ YAP5, BD δ D-2tkdcA- Δ TYW1 を得た。

pIAur-CFD1, pIAur-CIA2, pIAur-TYW1、および pIAur-tTYW1 を BsiWI で処理して得られた DNA 断片を BD δ D-2tkdcA 株に形質転換し、それぞれ BD δ D2tkdcA-CFD1 株、BD δ D-2tkdcA-CIA2 株、BD δ D2tkdcA-TYW1 株、BD δ D2tkdcA-tTYW1 株を得た。また、pIAur-CFD1, pIAurCIA2, pIAur-TYW1、pIAur-tTYW1 を BsiWI で処理して得られた DNA 断片を BD δ D-2tkdcA Δ BOL2 に形質転換して、BD δ D-2tkdcA Δ BOL2-CFD1、BD δ D-2tkdcA Δ BOL2-CIA2、BD δ D-2tkdcA Δ BOL2-tTYW1 株を得た。

BD δ D2tkdcA- Δ BOL2 株から YAP5 を破壊するため、AUR1-C に置き換えることで破壊した。AUR1-C 断片は pAUR101 (Takara Bio)をテンプレートに、プライマー-AUR1-C F と AUR1-C Rを用いて PCR を行った。YAP5 ORF の上流 500 bp と下流 500 bp を含む DNA 断片を得るために、YPH499 ゲノム DNA をテンプレートにプライマー dYAP5 up F と dYAP5-Aur up R、および dYAP5-Aur down F および dYAP5 down R を用いてそれぞれ PCR を行った。YAP5 破壊用断片を作成するために、3 つの断片 (AUR1-C, YAP5 の上流 500bp, YAP5 の下流 500bp) を、プライマー-dYAP5-Aur up F と dYAP5-Aur down R を用いてオーバーラップ PCR により接続した。得られた DNA 断片を BD δ D-2tkdcA Δ BOL2 株に形質転換し、BD δ D-2tkdcA Δ BOL2 Δ YAP5 を作成した。

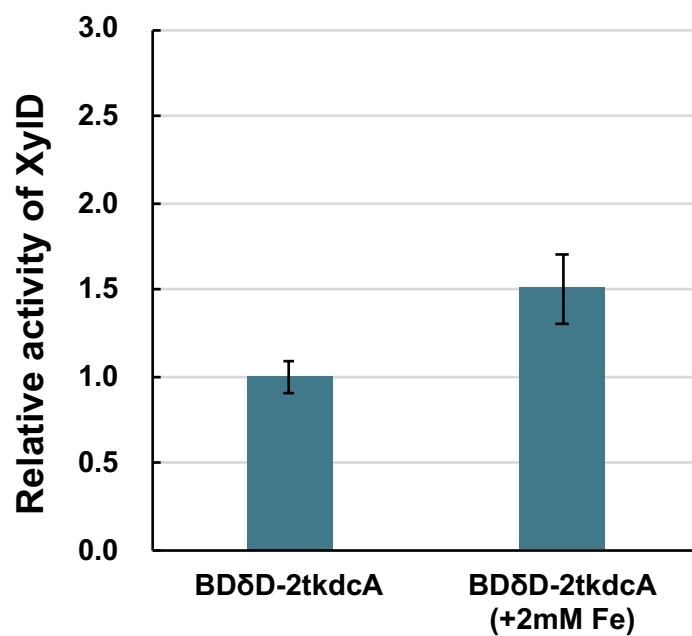
XylID 活性測定

キシロネートデヒドラターゼ (XylID) の活性測定は、チオバルビツール酸法により行われた [21]。5 mL の YPD 培地で 24 時間培養された酵母菌体を用いて、全タンパク質を抽出した。適宜、2 mM のクエン酸第二鉄アンモニウムを YPD 培地に添加した。YPD 培地で培養された菌体を、洗浄バッファー (10 mM Phosphate buffer、2 mM EDTA、pH = 7.5) を用いて 2 度洗浄した。その後、抽出バッファー (100 mM Phosphate buffer、2 mM MgCl₂、1 mM ジチオトレイトール、pH = 7.5) に懸濁した。抽出バッファーに懸濁された酵母細胞を、200 μ L の 0.5 mm 径ガラスビーズとともに Shake Master Neo (Biomedical Science, Tokyo, Japan) を用いて 1500 rpm で 5 分間振盪された。その後、21,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離を行い、上清を酵母の全タンパク質溶液として酵素活性測定に用いた。

酵素反応の溶液 (400 μ L; 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH = 8.0) , 5 mM, MgCl₂, 12 mM D-xylonate, 50 μ L 酵母の層タンパク質抽出溶液) を、30 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。10 分後、酵素反応は 100 μ L の 2 M HCl を加えて終結させた。50 μ L の反応停止後の溶液) に、125 μ L の 25 mM 過ヨウ素酸溶液 (0.125 M H₂SO₄に溶解) を加えて 20 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた。その後、250 μ L の 2 % (w/v) 亜ヒ酸ナトリウム溶液 (0.5 M HCl に溶解) を加えることで反応を終結させた。最後に 0.3 % のチオバルビツール酸水溶液を 1 mL 添加し、100 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートすることにより、赤色の発色団を生成させた。赤色発色団の発色強度を増強させるために、室温まで冷却した溶液に等量の DMSO を反応溶液に加えた。赤色発色団のモル吸

光係数には $6.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて [22]、549 nm の吸光を測定することで XylID の比活性を算出した。

付録



補足図 3-1 培養液中の鉄イオンが XylID 活性に与える影響

引用文献

- [1] F. Benisch and E. Boles, "The bacterial Entner–Doudoroff pathway does not replace glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* due to the lack of activity of iron–sulfur cluster enzyme 6-phosphogluconate dehydratase," *Journal of Biotechnology*, vol. 171, pp. 45–55, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.11.025.
- [2] S. Carlsen *et al.*, "Heterologous expression and characterization of bacterial 2-C-methyl-d-erythritol-4-phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 97, no. 13, pp. 5753–5769, Jul. 2013, doi: 10.1007/s00253-013-4877-y.
- [3] S. Partow, V. Siewers, L. Daviet, M. Schalk, and J. Nielsen, "Reconstruction and Evaluation of the Synthetic Bacterial MEP Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 12, p. e52498, Dec. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0052498.
- [4] R. Lill, "Function and biogenesis of iron–sulphur proteins," *Nature*, vol. 460, no. 7257, pp. 831–838, Aug. 2009, doi: 10.1038/nature08301.
- [5] D. J. A. Netz, A. J. Pierik, M. Stümpfig, U. Mühlhoff, and R. Lill, "The Cfd1–Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol," *Nat Chem Biol*, vol. 3, no. 5, pp. 278–286, May 2007, doi: 10.1038/nchembio872.
- [6] L. J. Pallesen, N. Solodovnikova, A. K. Sharma, and W. E. Walden, "Interaction with Cfd1 Increases the Kinetic Lability of FeS on the Nbp35 Scaffold," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 32, pp. 23358–23367, Aug. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.486878.
- [7] A. Vo *et al.*, "Identifying the Protein Interactions of the Cytosolic Iron–Sulfur Cluster Targeting Complex Essential for Its Assembly and Recognition of Apo-Targets," *Biochemistry*, vol. 57, no. 16, pp. 2349–2358, Apr. 2018, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00072.
- [8] M. Courel, S. Lallet, J.-M. Camadro, and P.-L. Blaiseau, "Direct Activation of Genes Involved in Intracellular Iron Use by the Yeast Iron-Responsive Transcription Factor Aft2 without Its Paralog Aft1," *Mol Cell Biol*, vol. 25, no. 15, pp. 6760–6771, Aug. 2005, doi: 10.1128/MCB.25.15.6760-6771.2005.
- [9] C. D. Kaplan and J. Kaplan, "Iron Acquisition and Transcriptional Regulation," *Chem. Rev.*, vol. 109, no. 10, pp. 4536–4552, Oct. 2009, doi: 10.1021/cr9001676.
- [10] A. Kumánovics *et al.*, "Identification of FRA1 and FRA2 as Genes Involved in Regulating the Yeast Iron Regulon in Response to Decreased Mitochondrial Iron-

- Sulfur Cluster Synthesis,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 16, pp. 10276–10286, Apr. 2008, doi: 10.1074/jbc.M801160200.
- [11] M. T. Martínez-Pastor, A. Perea-García, and S. Puig, “Mechanisms of iron sensing and regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 33, no. 4, p. 75, Apr. 2017, doi: 10.1007/s11274-017-2215-8.
- [12] J. Encinar del Dedo, N. Gabrielli, M. Carmona, J. Ayté, and E. Hidalgo, “A Cascade of Iron-Containing Proteins Governs the Genetic Iron Starvation Response to Promote Iron Uptake and Inhibit Iron Storage in Fission Yeast,” *PLoS Genet*, vol. 11, no. 3, p. e1005106, Mar. 2015, doi: 10.1371/journal.pgen.1005106.
- [13] L. Li, D. Bagley, D. M. Ward, and J. Kaplan, “Yap5 Is an Iron-Responsive Transcriptional Activator That Regulates Vacuolar Iron Storage in Yeast,” *Mol Cell Biol*, vol. 28, no. 4, pp. 1326–1337, Feb. 2008, doi: 10.1128/MCB.01219-07.
- [14] L. Li, X. Jia, D. M. Ward, and J. Kaplan, “Yap5 Protein-regulated Transcription of the TYW1 Gene Protects Yeast from High Iron Toxicity,” *J Biol Chem*, vol. 286, no. 44, pp. 38488–38497, Nov. 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.286666.
- [15] A. Hausmann, B. Samans, R. Lill, and U. Mühlenhoff, “Cellular and Mitochondrial Remodeling upon Defects in Iron-Sulfur Protein Biogenesis,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 13, pp. 8318–8330, Mar. 2008, doi: 10.1074/jbc.M705570200.
- [16] L. Salusjärvi *et al.*, “Production of ethylene glycol or glycolic acid from D-xylose in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 101, no. 22, pp. 8151–8163, Nov. 2017, doi: 10.1007/s00253-017-8547-3.
- [17] J. Ishii *et al.*, “A Simple and Immediate Method for Simultaneously Evaluating Expression Level and Plasmid Maintenance in Yeast,” *The Journal of Biochemistry*, vol. 145, no. 6, pp. 701–708, Jun. 2009, doi: 10.1093/jb/mvp028.
- [18] K. Inokuma, T. Hasunuma, and A. Kondo, “Efficient yeast cell-surface display of exo- and endo-cellulase using the SED1 anchoring region and its original promoter,” *Biotechnol Biofuels*, vol. 7, no. 1, p. 8, 2014, doi: 10.1186/1754-6834-7-8.
- [19] R. Yamada, T. Tanaka, C. Ogino, H. Fukuda, and A. Kondo, “Novel strategy for yeast construction using δ -integration and cell fusion to efficiently produce ethanol from raw starch,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, no. 5, pp. 1491–1498, Feb. 2010, doi: 10.1007/s00253-009-2198-y.

- [20] D.-C. Chen, B.-C. Yang, and T.-T. Kuo, "One-step transformation of yeast in stationary phase," *Current Genetics*, vol. 21, no. 1, pp. 83–84, Jan. 1992, doi: 10.1007/BF00318659.
- [21] S. Kim and S. B. Lee, "Identification and characterization of *Sulfolobus solfataricus* D-gluconate dehydratase: a key enzyme in the non-phosphorylated Entner–Doudoroff pathway," *Biochem J*, vol. 387, no. Pt 1, pp. 271–280, Apr. 2005, doi: 10.1042/BJ20041053.
- [22] L. Skoza and S. Mohos, "Stable thiobarbituric acid chromophore with dimethyl sulphoxide. Application to sialic acid assay in analytical de-O-acetylation.," *Biochem J*, vol. 159, no. 3, pp. 457–462, Dec. 1976.

第4章 出芽酵母の鉄代謝工学に基づく1,2,4-ブタントリオール生産法の開発

1. 緒言

本研究では、非可食系バイオマスに含まれるキシロースを基質に、微生物発酵により1,2,4-ブタントリオール（1,2,4-butanetriol ; BT）を高収率で生産することを試みた。目的生産物質である BT は、様々な医薬品や化成品の原料として利用できるのみならず、硝酸エステル爆薬である 1,2,4-ブタントリオールトリニトレート（1,2,4-butanetriol trinitrate ; BTTN）に変換することができる[1]。BTTN は、ロケットの推進剤としての利用や、ニトログリセリンの代替品として利用できる。BTTN とニトログリセリンの混合物、いわゆるダブルベース推進剤として使用することで、低温爆発、衝撃安定性、および使用の安全性を向上することが可能になる [2]–[4]。また BTTN は、抗がん剤や抗ウイルス剤などの医薬品の原料としても利用できる [5]。従来、1,2,4-ブタントリオールは、マレイン酸エステルを還元剤または触媒を用いて還元することで生産されている。その中でも、ジメチルマレイン酸を NaBH_4 により還元する方法がよく用いられているが、この方法では 1 t のマレイン酸エステルを還元した場合に、副生成物として 2 から 5 t のホウ酸塩が生成する。加えて、銅クロマイトを用いた還元法では、有害な六価クロムが放出され環境への負荷が懸念される。また、ルビジウムを用いる還元方法では 2900 から 5000 psi の高压と 135 °C の高温が必要で、副生成物の生成が問題となる。また、ルビジウム触媒が非常に高価であることも課題の 1 つである [4]。よって、このような製造方法で得られる 1,2,4-ブタントリオール は低収率で高価であり、非実用的で大量生産が困難であった。

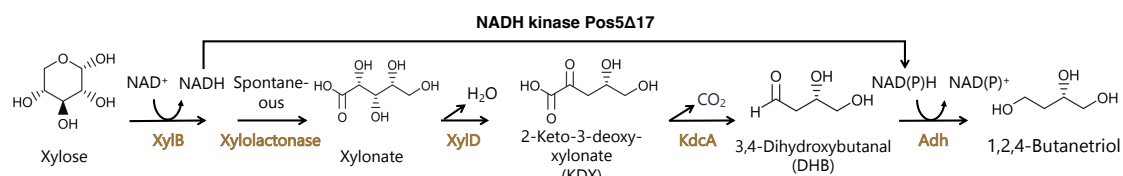


図 4-1 キシロースからの 1,2,4-ブタントリオール生成経路

XylB ; Xylose dehydrogenase from *Caulobacter crescentus*, XylD ; Xylonate dehydratase from *C. crescentus*, KdcA ; 2-ketoacid decarboxylase from *Lactococcus lactis*, Adh ; Alcohol dehydrogenase, Pos5Δ17 : NADH kinase from *Saccharomyces cerevisiae*.

そこで、穏やかな反応条件で環境付加の少ない、微生物発酵による 1,2,4-ブタントリオールの製造法が注目を浴びている。微生物を用いたキシロースからの 1,2,4-ブタントリオール生産経路は、5 段階の反応でキシロースから生産することができる（図 4-1）。まず、キシロース（Xylose）はキシロースデヒドロゲナーゼ（Xylose dehydrogenase ; XylB）によりキシロノラクトン（Xylonolactone）に変換される。キシロノラクトンは、キシロノラクトナーゼ（Xylonolactonase）、あるいは自発的な開環によりキシロネート（Xylonate）に変換される。キシロネートは、キシロネートデヒドラターゼ（Xylonate dehydratase）により、2-ケト-3-デオキシ-キシロネート（2-keto-3-deoxy-xylonate; KDX）に変換される。そして、KDX は、2-ケト酸デカルボキシラーゼ（2-ketoacid decarboxylase ; KDC）によって、3,4-ジヒドロキシブタナル（3,4-dihydroxybutanal; DHB）

に変換される。最後に DHB は、アルコールデヒドロゲナーゼ (Alcohol dehydrogenase ; ADH) によって 1,2,4-ブタントリオールに変換される。

近年、1,2,4-ブタントリオール生合成経路を大腸菌 *Escherichia coli* に導入することで、キシロースからの 1,2,4-ブタントリオール生産に関する成果が多数報告されている [6]–[8]。しかしながら、原核生物である大腸菌を宿主とした場合には、非可食性バイオマスを前処理した際に発生する発酵阻害物に弱く、バイオマスを原料としたバイオプロセスの微生物宿主としては不適であると考えられる [9]。一方、真核生物である *S. cerevisiae* は、原核生物である *E. coli* に比べ頑強な細胞構造を有し、酢酸塩やギ酸塩などの発酵阻害物や耐性が高い。そのため、非可食性バイオマスに含まれるキシロースを基質とした 1,2,4-ブタントリオール生産のための微生物宿主として適しているのではないかと考えた。

出芽酵母 *S. cerevisiae* における異種生物由来の代謝経路の構築における主な課題の 1 つに、DHB から 1,2,4-ブタントリオールへの反応が補酵素である NADPH/NADH のバランスが挙げられる [10], [11]。 *S. cerevisiae* では、NADPH などの必須補酵素はグルコースから本来の代謝経路で供給される。キシロースの消費は、両基質がヘキソーストランスポーターによって酵母細胞内に輸送されるため、グルコースによって強く阻害される [12]。したがって、この異種合成経路は宿主の増殖と連動していないため、1,2,4-ブタントリオール生産時には NADH/NADPH バランスが維持されない可能性がある。

本研究では、*S. cerevisiae* を宿主としたキシロースからの 1,2,4-ブタントリオールの生産収率を向上することを目指した。まず、*Lactococcus lactis* 由来の *kdcA* を *S. cerevisiae* のゲノム上に多コピー導入を行い、律速段階の反応である KDX から DHB へのフラックスを向上させた。次に、*S. cerevisiae* を宿主とした 1,2,4-ブタントリオール生産でこれまで検討されてこなかった、DHB から 1,2,4-ブタントリオールへの反応を促進した。特に、NADH キナーゼを過剰発現させることで、DHB から 1,2,4-ブタントリオールへの反応で重要となる補酵素バランスを改善することを目指した。最後に、1,2,4-ブタントリオール生産に適した培養プロセスの開発のため、フィードバッチ培養を行った。本研究は、*S. cerevisiae* で細胞増殖と連動しない物質生産において、NADH/NADPH のバランスとグルコースからの継続的な NAD(P)H 供給が重要であることが明らかになった。

2. 1,2,4-ブタントリオール生合成経路の工学

2.1. *L. lactis* 由来 *kdcA* の多コピー導入が 1,2,4-ブタントリオール生産に与える影響

キシロースからの 1,2,4-ブタントリオール生合成経路において、*L. lactis* 由来の KdcA が KDX から DHB への脱炭酸に適している [9], [13]。また、*S. cerevisiae* を宿主とした場合、*kdcA* を含む遺伝子発現カセットのコピー数を 2 コピーにすることで、1,2,4-ブタントリオールの生産量が向上した [13]。1,2,4-ブタントリオールの生合成では、KDX から DHB への脱炭酸反応が律速段階の反応であることが推察される。本研究では、*S. cerevisiae* に *L. lactis* 由来の *kdcA* を 3 コピー以上導入することで、高収率での 1,2,4-ブタントリオールの生産を目指した。

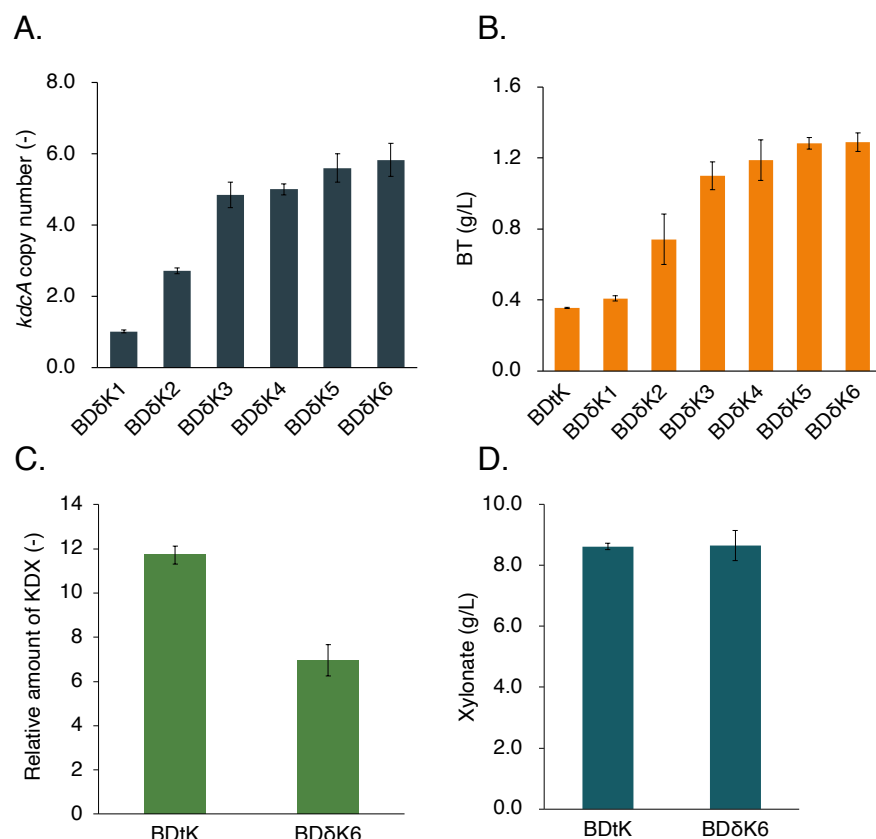


図 4-2 *Lactococcus lactis kdcA* がマルチコピー導入された組換え酵母を用いたキシロースからの 1,2,4-ブタントリオール生産の結果

(a) 各酵母株の *kdcA* のコピー数、(b) 1,2,4-ブタントリオール生産量、(c) BDtK 株および BD δ K6 株の発酵培地中に存在する KDX および (d) キシロネート蓄積量を示す。培養実験は、10g/L グルコースと 10g/L キシロースを含む培地で行われた。エラーバーは、独立した 3 つの実験からの標準偏差を示している。

C. crescentus 由来の *xyIB* および *xyID* が 1 コピーずつ導入され、キシロースをキシリトールに変換するキシロースレダクターゼである *GRE3* が破壊された BD 株を用いて [13]、 δ -integration 法 [14], [15] を用いて *kdcA* のマルチコピー導入を行った。作出された BD δ K1 から BD δ K6 株までの 6 株に導入された *kdcA* コピー数を測定した (図 4-2A)。BD δ K5 株および BD δ K6 株は、*kdcA* が 6 コピー導入されており、調査した中で最も多い *kdcA* のコピー数であった。次に、これら BD δ K1 から BD δ K6 株までの 6 株と、比較対象である BDtK 株を、10 g/L グルコースと 10 g/L キシロースを含む培地で培養した。BDtK 株は、BD 株に *kdcA* 発現用の遺伝子カセットが 1 コピーのみ導入された株である。図 4-2B に示すように、*kdcA* コピー数が増加するに従い、1,2,4-ブタントリオールの生産量は向上した。*kdcA* が 6 コピー導入された BD δ K6 株で 1,2,4-ブタントリオールの生産量が最も高く、1.3 g/L であった。また、BDtK 株と比較して、BD δ K6 株では培地中に放出される KDX の量が 41%減少していた (図 4-2C)。一方で、BDtK 株と BD δ K6 株では、培地中に放出されたキシロネートの蓄積量に変化は見られなかった (図 2D)。

2.2. XylID 活性強化に基づく 1,2,4-ブタントリオール生産量の向上

図 2D に示すように、BD δ K6 株は培地中に多量のキシロネートを放出していた。これは、キシロネートから KDX への反応を触媒する酵素 XylID の活性が低いためであると考えられる。*C. crescentus* 由来の XylID は、その酵素活性に鉄硫黄クラスターを必要とする鉄硫黄タンパク質であることが知られている [16]。酵母 *S. cerevisiae* では、異種生物由来の鉄硫黄タンパク質を活性な状態で発現することが困難であることが知られており [17], [18]、酵母細胞内での XylID 活性は低い [19], [20]。一方で、*S. cerevisiae* を宿主とした XylID の機能発現のため、鉄イオンの取り込みを制御する遺伝子である *BOL2* の破壊、および過剰発現により鉄イオンの取り込み能を向上する *tTYW1* (*Tyw1* の 1~199 アミノ酸残基をコード) が有効である (Bamba et al., 2019; Salusjärvi et al., 2017)。

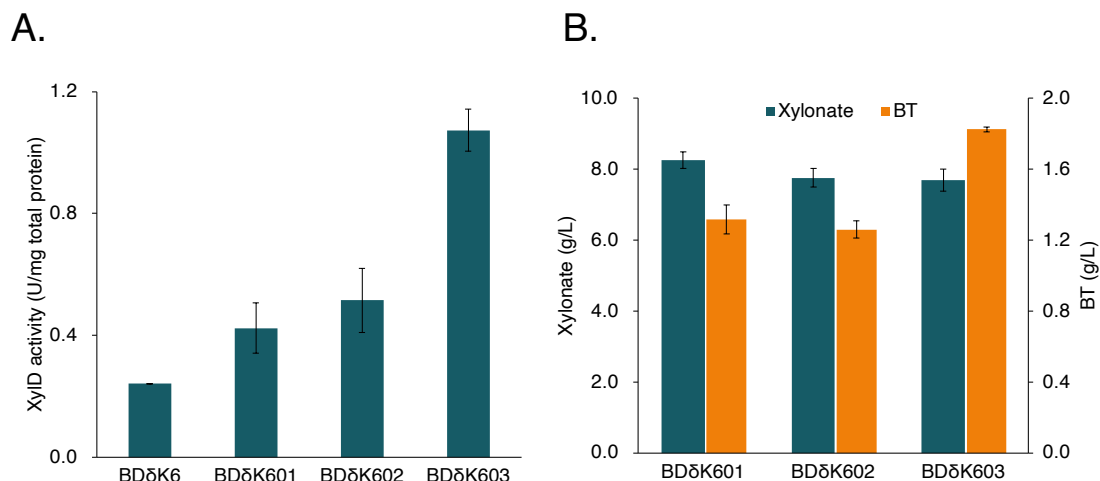


図 4-3 *BOL2* 遺伝子の破壊および *tTYW1* の過剰発現による XylID 活性 (A) と 1,2,4-ブタントリオール生産

エラーバーは、独立した 2 つ (A) あるいは 3 つ (B) の実験からの標準偏差を示している。

本研究では、BD δ K6 株の XylID 活性を向上させることで、更なる 1,2,4-ブタントリオール生産量の向上を目指した。BD δ K6 株の *BOL2* がノックアウトされた BD δ K601 株、*tTYW1* を過剰発現させた BD δ K602 株を構築した。図 4-3A に示すように、BD δ K601 株および BD δ K602 株の XylID 活性は BD δ K6 株よりも向上した。図 4-3B に示すように、BD δ K601 株と BD δ K602 株の 1,2,4-ブタントリオール生産量は、共に 1.3 g/L であった。また、*BOL2* の破壊と *tTYW1* の過剰発現を行った BD δ K603 株では、1.1 U/mg-total protein と、これらの株の中で最も高い XylID 活性を示した。BD δ K6 株では 8.7 g/L ものキシロネートが培地中に放出されていたが、BD δ K603 株では 7.7 g/L に減少した (図 4-3B)。BD δ K603 株は 1.8 g/L の 1,2,4-ブタントリオールを生産し、投入したキシロースに対するモル収率は 26 %であった。

2.3. ADH の過剰発現による 1,2,4-ブタントリオール生産

キシロースからの 1,2,4-ブタントリオールの生合成経路において、DHB から 1,2,4-ブタントリオールへの酵素反応は、微生物内在の ADH によって触媒される。*E. coli* を宿主とした 1,2,4-ブタントリオール生産では、この DHB から 1,2,4-ブタントリオールの変換を触媒する酵素として YqhD が同定された [21]。一方で、1,2,4-ブタントリオール生合成経路が導入された大腸に対して、*yqhD* を過剰発現させてたが、1,2,4-ブタントリオールの生産量は向上しなかった。そのため、*E. coli* を宿主とした 1,2,4-ブタントリオール生産では、DHB から 1,2,4-ブタントリオールへの変換は律速段階でないことが示唆されている[21]。

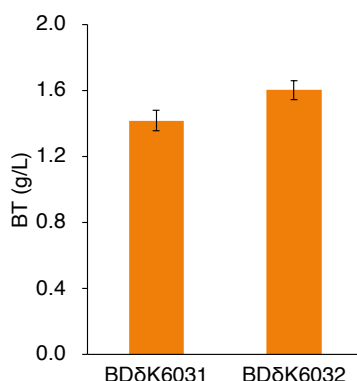


図 4-4 ADH 過剰発現株を用いた 96 時間後の 1,2,4-ブタントリオール生産量

BDδK6031 株は *E. coli* 由来の *yqhD*、BDδK6032 株は *S. cerevisiae* 由来の *ADH6* 遺伝子をそれぞれ過剰発現させたものである。培養試験は、10 g/L のグルコースと 10 g/L のキシロースを含む。エラーバーは、独立した 3 つの実験からの標準偏差を示している。

一方で、出芽酵母における *ADH* の過剰発現が、1,2,4-ブタントリオールの生産に与える影響は調査されていない。本研究では、BDδK603 株に対し、*E. coli* 由来の NADPH 依存型アルコールレダクターゼである *yqhD*、あるいは NADPH 依存型のアルコールデヒドロゲナーゼ *ADH6* を過剰発現させ、キシロースからの 1,2,4-ブタントリオールを行った。*S. cerevisiae* 由来の *Adh6* は、中鎖のアルデヒドをアルコールに変換するため [22]、DHB から 1,2,4-ブタントリオールへの反応を触媒する酵素として選択した。BDδK603 株に対し、*E. coli* 由来の *yqhD* および *S. cerevisiae* *ADH6* をそれぞれ過剰発現させた BDδK6031 株および BDδK6032 株を用いて、10 g/L グルコースと 10 g/L キシロースを含む培地で 1,2,4-ブタントリオール生産を行った。その結果、BDδK6031 株および BDδK6032 株は、それぞれ 1.4 および 1.6 g/L の 1,2,4-ブタントリオールを生産した（図 4-4）。

2.4. NADH キナーゼによる NADPH 供給の強化が与える 1,2,4-ブタントリオール生産量への影響

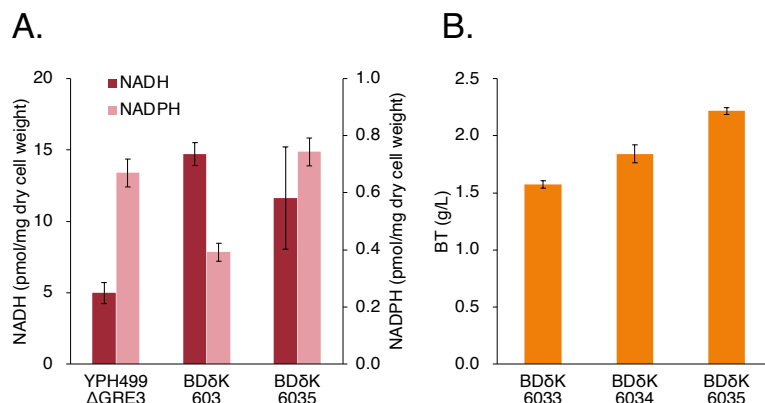


図 4-5 補酵素バランスが改良された酵母細胞内の NADH および NADPH 濃度 (A) と 1,2,4-ブタントリオール生産 (B)

BDΔK6033 株 ; *ZWF1* 過剰発現株、BDΔK6034 株 ; *POS5* 過剰発現株、BDΔK6035 株 ; *POS5Δ17* 過剰発現株。発酵試験は、10 g/L グルコースと 10 g/L キシロースを含む培地で行われた。エラーバーは、独立した 3 つの実験からの標準偏差を示している。

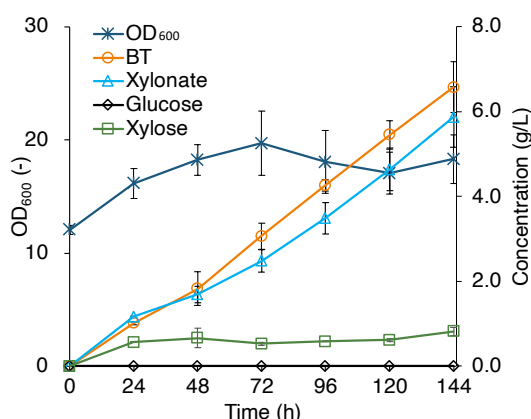
図 4-4 に示すように、単なる ADH の過剰発現のみでは、1,2,4-ブタントリオールの生産量を向上させることができなかった。次に、DHB からの 1,2,4-ブタントリオールの酸化還元反応に重要な NADPH/NADH バランスの工学に取り組んだ。1,2,4-ブタントリオール生合成経路に含まれる酸化還元反応を触媒する酵素のうち、酵素 *XylB* は、キシロースからキシロノラクトンへの反応を触媒する過程で NAD^+ を NADH に変換する [23], [24]。DHB から 1,2,4-ブタントリオールへの変換を NADH 依存型の ADH が触媒する場合、補酵素バランスは保たれる。一方で、*Adh6* などの NADPH 依存型 *Adh* がこの最後の反応を触媒する場合、補酵素のアンバランスを引き起こす可能性がある。筆者らは、*Adh* の発現量では無く (図 4-4)、補酵素のアンバランスによって DHB から 1,2,4-ブタントリオールへの反応が制限されているのではないかと考えた。実際、1,2,4-ブタントリオール生産時における BDΔK603 株の細胞内 NADPH 濃度は 0.4 pmol/mg-dry cell weight (DCW) であり、1,2,4-ブタントリオールを生産できない YPH499ΔGRE3 株と比較して 41 %低いことがわかった (図 4-5A)。そこで、1,2,4-ブタントリオール生産時の NADPH/NADH バランスを回復させるため、BDΔK603 株に対して、グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする *ZWF1*、と NADH キナーゼをコードする *POS5*、および *POS5* のミトコンドリア標的配列 [25], [26] を欠失させた *POS5Δ17* を *PGK1* プロモーター制御下で過剰発現させ、それぞれ BDΔK6033 と BDΔK6034 株、および BDΔK6035 株を得た。10 g/L グルコースと 10 g/L キシロースを含む培地で 96 時間培養し、1,2,4-ブタントリオールの生産量を確認した。BDΔK603 株では 1.8 g/L の 1,2,4-ブタントリオール生産量であったのに対し、BDΔK6033 株および BDΔK6035 株では生産量は向上せず、それぞれ 1.6 g/L お

よび 1.8 g/L の 1,2,4-ブタントリオールを生産した (図 4-5B)。一方、*POS5Δ17* を過剰発現させた BD δ K6035 株は、2.2 g/L の 1,2,4-ブタントリオールを生産し、投入したキシロースに対する 1,2,4-ブタントリオールのモル収率は 31 %に到達した (図 4-5B)。BD δ K6035 株の細胞内 NADPH 濃度は 0.7 pmol/mg-DCW であり、NADH キナーゼである *POS5Δ17* を発現させることで 1,2,4-ブタントリオールを生産しない YPH499 Δ GRE3 株と同程度まで回復した (図 4-5A)。

3. フェドバッチ培養による高収率での 1,2,4-ブタントリオール生産

最後に、BD δ K6035 株を用いて、1.0 L のバイオリアクターを用いてフェドバッチ培養を行った。発酵基質として、グルコース 130 g/L とキシロース 130 g/L の混合溶液を、培養開始時 500 mL の培地に 2 時間おきに 1 mL ずつ添加した。培養 144 時間後に添加されたグルコースとキシロースは 9.36 g であり、144 時間後のキシロース濃度は 16.4 g/L である。よって、全てのキシロースを 1,2,4-ブタントリオールに変換できたとすると、144 時間のフェドバッチ発酵後の 1,2,4-ブタントリオールの生産は 11.6 g/L となる。

A.



B.

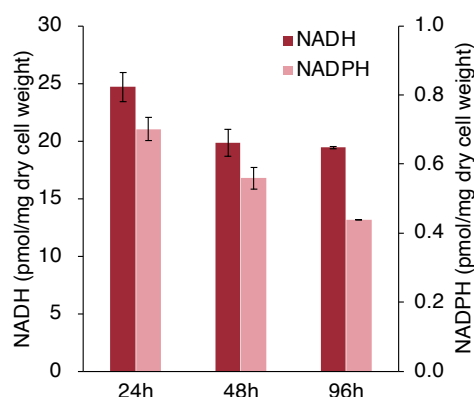


図 4-6 BD δ K6035 株を用いた 1.0L バイオリアクターでのフェドバッチ発酵における各化合物量の経時変化 (A.)、および 24 時間、48 時間、96 時間培養した酵母の細胞内 NADH および NADPH 量 (B.)

フェドバッチ発酵は、初期容量を 500 ml として、130 g/L キシロースと 130 g/L グルコースの混合液 1.0 ml を 2 時間おきに供給し、pH = 5.5、30 °C、攪拌速度による DO 制御して実施した。エラーバーは、3 回 (a)あるいは 2 回 (b)の独立した実験での標準偏差を示している。

BD δ K6035 株は、グルコースおよびキシロースの添加停止した 144 時間後までに、連続的にまで 1,2,4-ブタントリオールを生産した。1,2,4-ブタントリオールの生産速度は ($0.045 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) は、キシロネートの生成速度と ($0.041 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) とほぼ同等であった。培養を通じて、グルコースは培地中に確認されず、キシロースの残存量は常に 1.0 g/L 以下であった。培養 144 時間後、BD δ K6035 株は 5.9 g/L のキシロネートをモル収率 36 %で生成し、6.6 g/L の 1,2,4-ブタントリオ

ールをモル収率 57 %で生産した (図 4-6A) 。これは、*S. cerevisiae* を宿主とした 1,2,4-ブタントリオール生産で最も高い収率であった。バッチ培養の NADH (11.6 pmol/mg 乾燥細胞重量 ; 図 4-5A) と比較して、フェドバッチ培養中の BD δ K6035 株の細胞内の NADH 量は、24.7 (24 時間後) , 19.8 (48 時間後) , 19.5 pmol/mg-DCW (96 時間後) であった (図 4-6B) 。

4. 考察

バイオマスから得られるグルコースとキシロースを発酵原料とした 1,2,4-ブタントリオールのバイオ生産プロセスは、環境負荷の少ない生産法として注目を集めている。本研究では、*S. cerevisiae* を宿主として、キシロースからの 1,2,4-ブタントリオール生産に取り組んだ。グルコースから合成されるリンゴ酸からの 1,2,4-ブタントリオール生産と比較して、キシロースからの 1,2,4-ブタントリ奥ールの生産では、キシロースから理論収率が 100%で 1,2,4-ブタントリオールを生産できる点が魅力的である[3], [27]。先行研究では、キシロースから 1.7 g/L (モル収率 ; 25 %) の 1,2,4-ブタントリオール生産が報告された [13]。本研究では、1,2,4-ブタントリ奥ールの生合成経路を最適化するため、*kdcA* のマルチコピー導入による KDX から DHB ヘフラックス向上、NADH キナーゼである *POS5 Δ 17* の過剰発現による NADPH/NADH バランスの改善を行った。その結果、組換え酵母である BD δ K6035 株は、バッチ発酵で 10 g/L のキシロースから 2.2 g/L の 1,2,4-ブタントリオールを生産し (図 4-5B) 、グルコースとキシロースを連続的に供給したフェドバッチ培養では主要な複生成物であるキシロネートの蓄積量を抑えながら 6.6 g/L の 1,2,4-ブタントリオールを生産した (図 4-6A) 。キシロースからの 1,2,4-ブタントリ奥ールのモル収率は 57 %に到達し、筆者らの知る限り、これまでに報告された最も高い 1,2,4-ブタントリ奥ールの生産収率であった。

本研究では、*S. cerevisiae* を宿主に、DHB から 1,2,4-ブタントリオールへのフラックス向上に取り組んだ。残念ながら、BD δ K603 株を用いて、*E. coli* 由来の *yqhD*、あるいは *S. cerevisiae* の *ADH6* の過剰発現を行ったが、1,2,4-ブタントリ奥ールの生産は増加しなかった (図 4-4) 。*S. cerevisiae* を宿主とした場合、DHB を基質とする Adh は未だ同定されておらず、更なる研究開発が必要である。

また、DHB から 1,2,4-ブタントリオールへの反応に関して、NADPH/NADH バランスに着目して研究を進めた。実際に、親株 YPH499 Δ GRE3 株と比較して、キシロースから 1,2,4-ブタントリオールを生産する BD δ K603 株では細胞内の NADPH 濃度が低いことが明らかとなった (図 4-5A) 。そこで、本研究では、NADPH/NADH のアンバランスを解消するため、グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする *ZWF1*、NADH キナーゼをコードする *POS5* を過剰発現のターゲットとして選択した [28]–[31] が挙げられる。グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼである *Zwf1* は、ペントースリン酸経路のグルコース-6-リン酸を 6-ホスホグルコノラクトンへ変換する際に、NADP⁺から NADPH を生成する酵素である。*ZWF1* の過剰発現により酸化的ペントースリン酸経路のフラックスが強化されることで、細胞内の NADPH の供給量が向上する [30]–[32]。しかしながら、本研究では、*ZWF1* の過剰発現では 1,2,4-ブタントリオール力価を向上させなかった (図 4-5A) 。*S. cerevisiae* を宿主とした場合には、グルコースによるカタボライト抑制により、グルコースが消費されたのにキシロースが消費さ

れる [33], [34]。加えて、キシロースからの 1,2,4-ブタントリオール生産経路は、解糖系およびペントースリン酸経路から完全に独立している。そのため、ZWF1 の過剰発現によるグルコース代謝と紐づけられた NADPH の供給戦略は、キシロースからの 1,2,4-ブタントリオールの生産量の向上に寄与しなかったと考えられる。

ミトコンドリア局在型の NADH キナーゼである Pos5 は、*S. cerevisiae* のミトコンドリア内での鉄硫黄クラスターの生合成に必要であり [35]、*POS5* の過剰発現は *S. cerevisiae* の細胞内の NADH のリン酸化活性を高める [36]。また、*POS5* からミトコンドリア標的配列が取り除かれた *POS5Δ17* の過剰発現は、*POS5* の過剰発現よりも高い NADH のリン酸化活性を示す [29]。本研究では、ミトコンドリアに局在化する *POS5* の過剰発現株の 1,2,4-ブタントリオール生産量 (1.8 g/L) と比較して、細胞質に局在する *POS5Δ17* の過剰発現により、2.2 g/L と高い 1,2,4-ブタントリオールの生産を実現した。これは、報告された NADH キナーゼの活性値と正の相関がある [29], [36]。本研究においても、*POS5Δ17* を過剰発現させることで、細胞内の NADPH 量が増加した (図 4-5A)。このように、NADH キナーゼの過剰発現による NADPH/NADH バランスの改善は、*S. cerevisiae* を宿主としたキシロースから高効率の 1,2,4-ブタントリオール生産に効果的である。

本研究では、補酵素バランスの改善することにより、*S. cerevisiae* を宿主とした 1,2,4-ブタントリオールの生産収率が向上した。しかしながら、*POS5Δ17* が過剰発現された BDδK6035 株においても、10 g/L のキシロースから 6.4 g/L のキシロネートが培地中に蓄積していた。副生成物であるキシロネートの蓄積量を減少させることが、より高い収率で 1,2,4-ブタントリオールを生産するため必須である。例えば、キシロースデヒドロゲナーゼ XylB の発現量を調整し、キシロネートの合成速度を低下させることで、培地中へのキシロネートの蓄積を抑制することが有効だろう [6], [37]。

最後に、*POS5Δ17* が過剰発現された BDδK6035 株を用いたフェドバッチ培養により、高収率での 1,2,4-ブタントリオールの生産を目指した。筆者らは、BDδK6035 株では、NADH を NADPH に変換することは可能であるが、キシロースからの 1,2,4-ブタントリオールを生産する際に NADH が不足するのではないかと考えている。そこで、*POS5Δ17* の過剰発現株である BDδK6035 株において、NADH を連続的に生成し細胞のエネルギー供給を維持できるように、グルコースとキシロースを連続的に添加した。特に、培養期間中にグルコースを培地中に添加することで、解糖系を介した連続的な NADH の供給が可能になる。このように、グルコースとキシロースを連続的に供給した結果、また、1,2,4-ブタントリオールの収率は、バッチ培養では 31 %であったのに対し、フェドバッチ培養では 57 %にまで向上した (図 4-5B と図 4-6A)。フェドバッチ培養時において、BDδK6035 株の細胞にあの NADH と NADPH 量は徐々に低下し、NADH や NADPH が 1,2,4-ブタントリオールの生産に用いられていることが示唆された (図 4-6B)。 *S. cerevisiae* を宿主としたキシロースからキシリトリール生産の先行研究では、NAD(P)H の連続的な生成と細胞内のエネルギーを維持するため、グルコースとキシロースの同時代謝が必要であり、低量のグルコースを継続的に添加することでキシリトリール生産が促進された [38], [39]。以上から、補酵素の連続的な供給のため、低濃度でのグルコースとキシロースを連続的に添加するフェドバッチ培養は、細胞増殖と連動しない内在経路から独立した生合成経路を経て生産される目的化合物の収率を向上させる可能性が高い。

加えて、よりグルコースから効率的に補酵素を供給するためには、ヘキソーストランスポーターの改良やキシローストランスポーターを *S. cerevisiae* に発現させることで、グルコースとキシロースを同時に代謝可能にする研究戦略が有効であろう [33], [40]。あるいは、DHB から 1,2,4-ブタントリオールへの変換を触媒する NADH 依存型のアルコールデヒドロゲナーゼを導入することで、1,2,4-ブタントリオール合成経路における NADPH/NADH のアンバランスを解消し、1,2,4-ブタントリオールの生産量を向上できる可能性がある。

実験操作

使用菌体及び培地

プラスミドの増幅には全て、*Escherichia coli* NovaBlue (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いた。NovaBlue は、100 µg/mL アンピシリンを含む Luria-Bertani 培地 (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, and 5 g/L NaCl) で培養した。

表 4-1 本研究で用いた酵母株

Strain name	Description	Reference
YPH499	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA
YPH499ΔGRE3	YPH499, <i>gre3Δ::kanMX4</i>	(Bamba et al., 2019)
BD	YPH499ΔGRE3, pTS-A-xyIBD	(Bamba et al., 2019)
BDtK	BD, pIL-pTDH3-kdcA	This study
BDδK1–BDδK6	BD, pδW-pTDH3-kdcA	This study
BDδK601	BDδK6, <i>bol2Δ::HIS3</i>	This study
BDδK602	BDδK6, pIAUR-tTYW1	This study
BDδK603	BDδK601, pIAUR-tTYW1	This study
BDδK6031	BDδK603, pIU-yqhD	This study
BDδK6032	BDδK603, pIU-ADH6	This study

BDδK6033	BDδK603, pIL-pZWF1	This study
BDδK6034	BDδK603, pIL-pPOS5	This study
BDδK6035	BDδK603, pIL-pPOS5Δ17	This study

1,2,4-ブタントリオール生産の宿主には、*S. cerevisiae* YPH499 [*MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-63 his3-Δ200 leu2-Δ1* (Stratagene, La Jolla, CA, USA)]を用いて、形質転換には酢酸リチウム法 [41]を用いた。形質転換させた。本研究で使用した全ての酵母株を、表 4-1 に示した。BY4741 の *GRE3* 破壊株は、Yeast Deletion Mat-A Complete Set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) より取得した。酵母の培養には、SD 培地 [6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) , 20 g/L glucose] あるいは synthetic complete dextrose (SCD) 培地 [6.7 g/L of yeast nitrogen base without amino acids, 2 g/L amino acid dropout mix lacking appropriate amino acid for selection, and 20 g/L glucose)に株の栄養要求性に合わせてアミノ酸・核酸を加えたもの、又は YPD 培地 [10 g/L yeast extract, 20 g/L Bacto-peptone (Difco Laboratories) , 20 g/L glucose]を用いた。培養は 30 °C で行った。

表 4-2 本章で用いた Plasmid

Plasmid name	Description	Reference
pδW	δ-Integration vector, <i>TRP1</i> marker	(Yamada et al., 2010)
pδW-pTDH3-kdcA	δ-Integration vector, <i>P_{TDH3}-kdcA</i> , <i>TRP1</i> marker	This study
pIL-pTDH3-kdcA	<i>P_{TDH3}-kdcA</i> , <i>LEU2</i> marker	(Bamba et al., 2019)
pIAur-tTYW1	<i>P_{PGK1}-tTYW1</i> , <i>AUR1-C</i> maker	(Bamba et al., 2019)
pGK406	Empty vector, <i>URA3</i> marker	(Ishii et al., 2009)
pIU-yqhD	<i>P_{TDH3}-yqhD</i> , <i>URA3</i> marker	This study
pIU-ADH6	<i>P_{TDH3}-ADH6</i> , <i>URA3</i> marker	This study
pGK405	Empty vector, <i>LEU2</i> marker	(Ishii et al., 2009)
pIL-ZWF1	<i>P_{PGK1}-ZWF1</i> , <i>LEU2</i> maker	This study
pIL-POS5	<i>P_{PGK1}-POS5</i> , <i>LEU2</i> maker	This study
pIL-POS5Δ17	<i>P_{PGK1}-POS5Δ17</i> , <i>LEU2</i> maker	This study
Plasmid name	Description	Reference
pδW	δ-Integration vector, <i>TRP1</i> marker	(Yamada et al., 2010)
pδW-pTDH3-kdcA	δ-Integration vector, <i>P_{TDH3}-kdcA</i> , <i>TRP1</i> marker	This study
pIL-pTDH3-kdcA	<i>P_{TDH3}-kdcA</i> , <i>LEU2</i> marker	(Bamba et al., 2019)
pIAur-tTYW1	<i>P_{PGK1}-tTYW1</i> , <i>AUR1-C</i> maker	(Bamba et al., 2019)
pGK406	Empty vector, <i>URA3</i> marker	(Ishii et al., 2009)
pIU-yqhD	<i>P_{TDH3}-yqhD</i> , <i>URA3</i> marker	This study
pIU-ADH6	<i>P_{TDH3}-ADH6</i> , <i>URA3</i> marker	This study
pGK405	Empty vector, <i>LEU2</i> marker	(Ishii et al., 2009)
pIL-ZWF1	<i>P_{PGK1}-ZWF1</i> , <i>LEU2</i> maker	This study
pIL-POS5	<i>P_{PGK1}-POS5</i> , <i>LEU2</i> maker	This study
pIL-POS5Δ17	<i>P_{PGK1}-POS5Δ17</i> , <i>LEU2</i> maker	This study

表 4-3 本章で用いたプライマー

Primer name	Sequence (5' – 3')
d-int-kdcA F	ACTAGTGGATCCCCCAGTTCGAGTTTATCATTATCAATAC
d-int-kdcA R	GAATTCCTGCAGCCCGAGCGACCTCATGCTATACCTGAG
ADH6 F	TAAACAAACAAACCCATGTCTTATCCTGAGAAATTTGAAG
ADH6 R	ATAAGAAATTCGCCCTAGTCTGAAAATTCTTTGTCGTAG
prrr-7-1-F	ACTAGTGGATCCCCCATGAGTGAAGGCCCGTCAAATTCTG
prrr-7-1-R	GAATTCTCTAGACCCCTAATTATCCTTCGTATCTTCTGGC
prrr-7-2-F	ACTAGTGGATCCCCCATGTTTGTGAGGGTTAAATTGAATAAACC
prrr-7-2-R	GAATTCTCTAGACCCCTAATCATTATCAGTCTGTCTCTTGG
prrr-7-3-F	ACTAGTGGATCCCCCATGAGTACGTTGGATTACATTCCC
rt-kdcA F	GGTGTGTTGGTGAATTGTCCGC
rt-kdcA R	AGCAGCAACATCTACTGGCA

Plasmid の構築

本研究で使用したプラスミドおよびプライマーを、表 4-2 および 4-3 にそれぞれ示した。本研究で作成したプラスミドは全て、In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara) を用いて作成した。簡単には、制限酵素処理したベクターの末端 15 塩基の相同配列を、クローニングする塩基配列の両端に PCR で付加して、ベクターとクローニング配列、In-Fusion 酵素を混合したのち、50°C で 15 min インキュベートすることで作成した。本研究で使用した遺伝子のうち、*C. crecentus* 由来の *xylB* および *xylD*、*L. lactis* 由来 *kdcA*、*E. coli* 由来の *yqhD* は、*S. cerevisiae* のコドン使用頻度に遺伝子配列を最適化したものを GenScript (Piscataway, NJ, US) によって人工合成されたものを使用した。

L. lactis 由来の *kdcA* の δ -integration 用 plasmid (p δ W-pTDH3-kdcA) を構築するために、d-int-kdcA F および d-int-kdcA R を用いて、*TDH3* プロモーター (TDH3p) および *ADH1* ターミネーター (ADH1t) の制御下にある *L. lactis* *kdcA* を含む DNA 断片を pIL-pTDH3-kdcA [13] から増幅した。得られた DNA 断片を *Sma*I によって切断された p δ W ベクター [42] にクローニングした。*E. coli* 由来の *yqhD* あるいは *S. cerevisiae* 由来の *ADH6* の過剰発現のため、コドン最適化された *yqhD* を含む DNA 断片、またはプライマー ADH6 F および ADH6 R を用いて YPH499 ゲノム DNA から増幅された DNA 断片を、*Sma*I によって処理された pIU-pTDH3-tADH1 [13] に組み込み、pIU-yqhD および pIU-ADH6 それぞれ得た。

細胞内での NADPH 供給のため、*S. cerevisiae* YPH499 のゲノム DNA から、prrr-7-1-F および prrr-7-1-R、prrr-7-2-F および prrr-7-2-R、prrr-7-3-F および prrr-7-2-R を用いて、*ZWF1*、*POS5*、および *POS5 Δ 17* を含む DNA 断片を PCR により増幅した。それぞれの DNA 断片を制限酵素 *Sma*I で処理された pGK405 (*LEU2* maker) ベクター [43] にクローニングし、pIL-ZWF1、pIL-POS5、および pIL-POS5 Δ 17 をそれぞれ得た。

***L. lactis* 由来の *kdcA* のコピー数の測定**

BD δ K1 から BD δ K6 株に δ -integration 法によってランダムに導入された *L. lactis* 由来の *kdcA* のコピー数は、定量的リアルタイム PCR によって決定された。まず、BD δ K1 から BD δ K6 株のゲノム DNA を、Dr. GenTLE (yeast) high-recovery kit (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて抽出した。リアルタイム PCR には THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて、測定にはリアルタイム PCR Mx3005P (Agilent Technologies) を使用した。ハウスキーピング遺伝子として *PGK1* を選択した。

三角フラスコを用いた発酵試験

発酵試験に用いる菌体を用意するため、菌株を 5 mL の SD 培地で、30 °C、200 rpm で 24 時間培養した。その後、50 mL の YPD 培地に OD₆₀₀ = 0.1 となるように植菌し、30 °C、150 rpm で 24 時間培養した。培養後の菌体を 10 mL の滅菌した D. W. で 2 度洗浄し、1,2,4-ブタントリオール生産試験のため、10 g/L yeast extract, 20 g/L Bactopeptone, 10 g/L グルコース, 10 g/L キシロースを含む YPD_X 培地に 初期 OD₆₀₀ = 5.0 となるように植菌した。全量 20mL の系で、30°C、200 rpm で試験した。24 時間ごとサンプリングを行い、培養上清は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) およびガスクロマトグラフィー/質量分析計 (GC-MS)を用いて測定した。菌体密度は、UV-VIS 分光光度計 (UVmini-1240, Shimazu) を用いて波長 600 nm により測定された。

バイオリアクターを用いたフェドバッチ培養

前培養のため、BD δ K6035 株を 5mL の SCD 培地中に植菌し、30 °C、200 rpm で 24 時間培養した。続いて、培養液を 400mL の YPD 培地に接種し、30 °C、150rpm で 24 時間培養した。培養後の菌体を 1000 × g で 5 分間の遠心分離により回収し、D. W. を用いて 2 回洗浄した。フェドバッチ培養は、1.0 L のバイオリアクター (ABLE Biott, Tolyo, Japan) を用いて行った。培養開始時の 500 mL の 10 g/L yeast extract および 20 g/L Bactopeptone を含む培地に、初期 OD₆₀₀ = 10 となるように植菌した。10 g/L yeast extract、20 g/L Bactopeptone、130 g/L グルコース、および 130 g/L キシロースが含まれるフィード液は、培養開始から 2 時間ごとに 1.0 mL ずつ自動的に添加された。また、Antiform SI (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を適宜添加した。培養は、30 °C、pH = 5.5 で行われ、溶存酸素量は攪拌速度によって 20 % 以自動制御された。培地への通気量は、0.5 volume of air per volume of liquid per min (vvm)に設定された。培養液は 24 時間毎にサンプリングされ、各種の分析に用いられた。

代謝物解析

グルコース、キシロース、キシロネート、1,2,4-ブタントリオール、の濃度は GC-MS (Shimadzu) により決定された。5 μ L の培養上清に、2 μ L の 10 g/L リビトールを内部標準物質として加えて、CentriVap Benchtop Vacuum Concentrators (Labconco, Kansas City, MO, USA) を用いて乾燥させた。GC-MS 分析のためのトリメチルシリル化は以下の手順で行われた。まず、乾燥させたサンプルに、ピリジンに溶解させた 100 μ L の 20 mg/mL *O*-メチルヒドロキシルアミン塩酸塩溶液を加えて、1200 rpm, 30 $^{\circ}$ C で 90 分間振盪した (M-BR-022UP; Taitec, Saitama, Japan)。その後、50 μ L の *N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MSTFA) を加え、1200 rpm at 37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた (M-BR-022UP; Taitec)。反応後のサンプルは、室温で 3000 $\times$ g, 5 分間遠心分離を行い、上清を GC-MS 分析に用いた。

CP-Sil 8CB カラム (30 m length $\times$ 0.25 mm i.d., film thickness of 0.25 μ m; Agilent) を装着された GC-MS (GCMS-QP2010 Ultra; Shimadzu) は、以下の条件で運転された。まず、試料気化室の温度を 230 $^{\circ}$ C に設定した。サンプル注入量は 1 μ L とし、スプリット比は 1 : 25 に設定された。キャリアーガスとしてヘリウムを用い、流量は 1.12 mL/min であった。カラム温度の条件は、80 $^{\circ}$ C で 2 分間保温した後、15 $^{\circ}$ C/min で 330 $^{\circ}$ C まで昇温して、330 $^{\circ}$ C で 6 分間保温した。インターフェース温度およびイオン源の温度はそれぞれ、250 $^{\circ}$ C と 200 $^{\circ}$ C に設定された。イオン化 (Electron impact ionization; EI) は、70 eV で行われた。分析は、Fast Automated Scan/SIM (FASTT) モードにより、Scan モード (85–500 m/z) 及び Selected ion monitoring (SIM) モード (m/z 103, 129; 1,2,4-ブタントリオール, m/z 103; ribitol) を並行して行われた。

KDX の分析には、キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS; CE、アジレント G7100; MS, アジレント G6224AA LC/MSD TOF; Agilent Technologies) を用いた。KDX のリチウム塩は、Sigma Aldrich 社 (Burlington, United States) から入手された。サンプルの前処理のため、培養上清を等量のクロロホルムと混合した。14,000 g で 5 分間遠心分離したのち、上清を Amicon Ultra 0.5mL centrifugal filters (Merck Millipore) でろ過した。ろ過されたサンプルに、内部標準試料として 1,4-ピペラジンジエタンスルホン酸 (PIPES) を終濃度 400 μ M となるよう添加し、分析開始直前まで - 80 $^{\circ}$ C で保存した。KDX の分析は、Anion mode で行われた。CE-TOFMS の運転条件の詳細は先行研究に記載の通りである [44]。

細胞内の NADH および NADPH 分析は、NADH および NADPH は、Mastro C18 column (150 mm length $\times$ 2.0 mm ID, 3 μ m particle size; Shimadzu GLC, Ltd.) 液体クロマトグラフィー - トリプル四重極質量分析 (LC-QqQ-MS; LC, Agilent 1200 series; QqQ-MS, Agilent 6460; Agilent Technologies) を用いて行われた。酵母内からの代謝物抽出法 [45]、および LC-QqQ-MS の詳細な運転パラメータ [46] は、先行研究に記載の通り行われた。

引用文献

- [1] F. Gouranlou and I. Kohsary, "Synthesis and Characterization of 1,2,4-Butanetrioltrinitrate," *Asian J. Chem.*, vol. 22, no. 6, p. 8, 2010.
- [2] Y. Cao, W. Niu, J. Guo, M. Xian, and H. Liu, "Biotechnological production of 1,2,4-butanetriol: An efficient process to synthesize energetic material precursor from renewable biomass," *Sci Rep*, vol. 5, Dec. 2015, doi: 10.1038/srep18149.
- [3] X. Li, Z. Cai, Y. Li, and Y. Zhang, "Design and Construction of a Non-Natural Malate to 1,2,4-Butanetriol Pathway Creates Possibility to Produce 1,2,4-Butanetriol from Glucose," *Scientific Reports*, vol. 4, no. 1, May 2015, doi: 10.1038/srep05541.
- [4] W. Niu, M. N. Molefe, and J. W. Frost, "Microbial Synthesis of the Energetic Material Precursor 1,2,4-Butanetriol," p. 2, 2003.
- [5] T. Sato, S. Aoyagi, and C. Kibayashi, "Enantioselective Total Synthesis of (+)-Azimine and (+)-Carpaine," *Organic Letters*, vol. 5, no. 21, pp. 3839–3842, Oct. 2003, doi: 10.1021/ol030088w.
- [6] A. B. Bañares, K. N. G. Valdehuesa, K. R. M. Ramos, G. M. Nisola, W.-K. Lee, and W.-J. Chung, "Discovering a novel d-xylonate-responsive promoter: the Pyjhl-driven genetic switch towards better 1,2,4-butanetriol production," *Appl Microbiol Biotechnol*, Sep. 2019, doi: 10.1007/s00253-019-10073-0.
- [7] X. Lu, S. He, H. Zong, J. Song, W. Chen, and B. Zhuge, "Improved 1, 2, 4-butanetriol production from an engineered Escherichia coli by co-expression of different chaperone proteins," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 32, no. 9, Sep. 2016, doi: 10.1007/s11274-016-2085-5.
- [8] L. Sun *et al.*, "Synthetic pathway optimization for improved 1,2,4-butanetriol production," *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 43, no. 1, pp. 67–78, Jan. 2016, doi: 10.1007/s10295-015-1693-7.
- [9] X. Wang *et al.*, "d -1,2,4-Butanetriol production from renewable biomass with optimization of synthetic pathway in engineered Escherichia coli," *Bioresource Technology*, vol. 250, pp. 406–412, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.062.
- [10] E. J. Oh *et al.*, "Enhanced xylitol production through simultaneous co-utilization of cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*," *Metabolic Engineering*, vol. 15, pp. 226–234, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.ymben.2012.09.003.
- [11] R. J. Protzko *et al.*, "Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for co-utilization of d-galacturonic acid and d-glucose from citrus peel waste," *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-07589-w.

- [12] T. Subtil and E. Boles, "Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnol Biofuels*, vol. 5, no. 1, p. 14, 2012, doi: 10.1186/1754-6834-5-14.
- [13] T. Bamba *et al.*, "Production of 1,2,4-butanetriol from xylose by *Saccharomyces cerevisiae* through Fe metabolic engineering," *Metabolic Engineering*, vol. 56, pp. 17–27, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.ymben.2019.08.012.
- [14] J. Eichinger and J. D. Boeke, "The DNA Intermediate in Yeast Tyl Element Transposition Copurifies with Virus-like Particles: Cell-Free Tyl Transposition," *Cell*, vol. 54, no. 955–966, p. 12, 1988.
- [15] R. N. Parekh, M. R. Shaw, and K. D. Wittrup, "An Integrating Vector for Tunable, High Copy, Stable Integration into the Dispersed Ty δ Sites of *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnol. Prog.*, vol. 12, no. 1, pp. 16–21, Feb. 1996, doi: 10.1021/bp9500627.
- [16] M. Andberg *et al.*, "Characterization and mutagenesis of two novel iron–sulphur cluster pentonate dehydratases," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no. 17, pp. 7549–7563, Sep. 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7530-8.
- [17] F. Benisch and E. Boles, "The bacterial Entner–Doudoroff pathway does not replace glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* due to the lack of activity of iron–sulfur cluster enzyme 6-phosphogluconate dehydratase," *Journal of Biotechnology*, vol. 171, pp. 45–55, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.11.025.
- [18] S. Partow, V. Siewers, L. Daviet, M. Schalk, and J. Nielsen, "Reconstruction and Evaluation of the Synthetic Bacterial MEP Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 12, p. e52498, Dec. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0052498.
- [19] C. Borgström *et al.*, "Identification of modifications procuring growth on xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains carrying the Weimberg pathway," *Metabolic Engineering*, vol. 55, pp. 1–11, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.ymben.2019.05.010.
- [20] L. Salusjärvi *et al.*, "Production of ethylene glycol or glycolic acid from D-xylose in *Saccharomyces cerevisiae*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 101, no. 22, pp. 8151–8163, Nov. 2017, doi: 10.1007/s00253-017-8547-3.
- [21] K. N. G. Valdehuesa *et al.*, "Identification of aldehyde reductase catalyzing the terminal step for conversion of xylose to butanetriol in engineered *Escherichia coli*," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 38, no. 9, pp. 1761–1772, Sep. 2015, doi: 10.1007/s00449-015-1417-4.

- [22] C. Larroy, M. R. Fernández, E. González, X. Parés, and J. A. Biosca, "Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction.," *Biochem J*, vol. 361, no. Pt 1, pp. 163–172, Jan. 2002.
- [23] Y.-S. Tai *et al.*, "Engineering nonphosphorylative metabolism to generate lignocellulose-derived products," *Nature Chemical Biology*, vol. 12, no. 4, pp. 247–253, Feb. 2016, doi: 10.1038/nchembio.2020.
- [24] M. Toivari *et al.*, "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of d-xylose to d-xylonate," *Metabolic Engineering*, vol. 14, no. 4, pp. 427–436, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.ymben.2012.03.002.
- [25] H. Miyagi, S. Kawai, and K. Murata, "Two Sources of Mitochondrial NADPH in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *J. biol. chem.*, 2009.
- [26] M. K. Strand, G. R. Stuart, M. J. Longley, M. A. Graziewicz, O. C. Dominick, and W. C. Copeland, "*POS5* Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes a Mitochondrial NADH Kinase Required for Stability of Mitochondrial DNA," *Eukaryotic Cell*, vol. 2, no. 4, pp. 809–820, Aug. 2003, doi: 10.1128/EC.2.4.809-820.2003.
- [27] L. Shen *et al.*, "A combined experimental and modelling approach for the Weimberg pathway optimisation," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 1098, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14830-y.
- [28] J.-E. Kim, I.-S. Jang, B. H. Sung, S. C. Kim, and J. Y. Lee, "Rerouting of NADPH synthetic pathways for increased protopanaxadiol production in *Saccharomyces cerevisiae*," *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 15820, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-34210-3.
- [29] K. Paramasivan and S. Mutturi, "Regeneration of NADPH Coupled with HMG-CoA Reductase Activity Increases Squalene Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 65, no. 37, pp. 8162–8170, Sep. 2017, doi: 10.1021/acs.jafc.7b02945.
- [30] C. Zhao, Q. Zhao, Y. Li, and Y. Zhang, "Engineering redox homeostasis to develop efficient alcohol-producing microbial cell factories," *Microb Cell Fact*, vol. 16, no. 1, p. 115, Dec. 2017, doi: 10.1186/s12934-017-0728-3.
- [31] X. Zhao, F. Shi, and W. Zhan, "Overexpression of *ZWF1* and *POS5* improves carotenoid biosynthesis in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*," *Lett Appl Microbiol*, vol. 61, no. 4, pp. 354–360, Oct. 2015, doi: 10.1111/lam.12463.

- [32] D. Grabowska and A. Chelstowska, "The *ALD6* Gene Product Is Indispensable for Providing NADPH in Yeast Cells Lacking Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 16, pp. 13984–13988, Apr. 2003, doi: 10.1074/jbc.M210076200.
- [33] A. Farwick, S. Bruder, V. Schadeweg, M. Oreb, and E. Boles, "Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 14, pp. 5159–5164, Apr. 2014, doi: 10.1073/pnas.1323464111.
- [34] H. Li, O. Schmitz, and H. S. Alper, "Enabling glucose/xylose co-transport in yeast through the directed evolution of a sugar transporter," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 100, no. 23, pp. 10215–10223, Dec. 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7879-8.
- [35] J. Pain, M. M. Balamurali, A. Dancis, and D. Pain, "Mitochondrial NADH Kinase, Pos5p, Is Required for Efficient Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*," *J Biol Chem*, vol. 285, no. 50, pp. 39409–39424, Dec. 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.178947.
- [36] J. Hou, G. N. Vemuri, X. Bao, and L. Olsson, "Impact of overexpressing NADH kinase on glucose and xylose metabolism in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 82, no. 5, pp. 909–919, Apr. 2009, doi: 10.1007/s00253-009-1900-4.
- [37] A. B. Bañares, G. M. Nisola, K. N. G. Valdehuesa, W.-K. Lee, and W.-J. Chung, "Understanding D-xylonic acid accumulation: a cornerstone for better metabolic engineering approaches," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 105, no. 13, pp. 5309–5324, Jul. 2021, doi: 10.1007/s00253-021-11410-y.
- [38] G. Guirimand *et al.*, "Cell-surface display technology and metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhancing xylitol production from woody biomass," *Green Chem.*, vol. 21, no. 7, pp. 1795–1808, 2019, doi: 10.1039/C8GC03864C.
- [39] Lee, WOO-JONG, M.-D. Kim, M.-S. Yoo, Y.-W. Ryu, and J.-H. Seo, "Effects of Xylose Reductase Activity on Xylitol Production in Two-Substrate Fermentation of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Microbiol. Biotechnol.*, p. 6, 2003.
- [40] J. G. Nijland and A. J. M. Driessen, "Engineering of Pentose Transport in *Saccharomyces cerevisiae* for Biotechnological Applications," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, p. 464, Jan. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2019.00464.

- [41] D.-C. Chen, B.-C. Yang, and T.-T. Kuo, "One-step transformation of yeast in stationary phase," *Current Genetics*, vol. 21, no. 1, pp. 83–84, Jan. 1992, doi: 10.1007/BF00318659.
- [42] R. Yamada, T. Tanaka, C. Ogino, H. Fukuda, and A. Kondo, "Novel strategy for yeast construction using δ -integration and cell fusion to efficiently produce ethanol from raw starch," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, no. 5, pp. 1491–1498, Feb. 2010, doi: 10.1007/s00253-009-2198-y.
- [43] J. Ishii *et al.*, "A Simple and Immediate Method for Simultaneously Evaluating Expression Level and Plasmid Maintenance in Yeast," *The Journal of Biochemistry*, vol. 145, no. 6, pp. 701–708, Jun. 2009, doi: 10.1093/jb/mvp028.
- [44] T. Hasunuma, F. Kikuyama, M. Matsuda, S. Aikawa, Y. Izumi, and A. Kondo, "Dynamic metabolic profiling of cyanobacterial glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion," *Journal of Experimental Botany*, vol. 64, no. 10, pp. 2943–2954, Jul. 2013, doi: 10.1093/jxb/ert134.
- [45] H. Kato, Y. Izumi, T. Hasunuma, F. Matsuda, and A. Kondo, "Widely targeted metabolic profiling analysis of yeast central metabolites," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 113, no. 5, pp. 665–673, May 2012, doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.013.
- [46] T. Hasunuma, T. Sanda, R. Yamada, K. Yoshimura, J. Ishii, and A. Kondo, "Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*," *Microb Cell Fact*, vol. 10, no. 1, p. 2, 2011, doi: 10.1186/1475-2859-10-2.

第5章 アルカリ培養による酵素 XylID の *in vivo* 活性化によるキシロネート再取り込みと 3,4-ジヒドロキシ酪酸の高生産

1. 緒言

3-ヒドロキシブチロラクトン (3-hydroxybutyrolactone ; 3-HBL) は、アメリカのエネルギー省 (United States Department of Energy; DOE) の報告書において、バイオマスから生産されるべき付加価値の高い化合物の 1 つとして挙げられた化合物の 1 つである[1]。3-ヒドロキシブチロラクトンおよびその開環化合物である 3,4-ジヒドロキシ酪酸 (3,4-dihydroxybutyrate ; 3,4-DHBA) は、ポリヒドロキシアルカノエート (polyhydroxyalkanoate; PHA) の原料、あるいは医薬品の合成するための前駆体と用いられる [2]。2013 年、*Escherichia coli* を宿主に、グルコースおよびグリコール酸からの 3-ヒドロキシブチロラクトンおよび 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生合成が報告された [3]。その後、グリコール酸を添加せず、10 g/L のグルコースから 0.32 g/L の 3-ヒドロキシブチロラクトンおよび 0.70 g/L の 3,4-ジヒドロキシ酪酸が生産された [2]。しかしながら、グルコースからの 3-ヒドロキシブチロラクトンおよび 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生合成経路は、多段階の酵素反応を必要とし、酵素の低い基質特異性が原因で多くの副産物が産生されるため、グルコースからの対糖収率が低い [2]。一方で、酸化キシロース代謝経路を介した 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生合成経路では、キシロースから得られる 3,4-ジヒドロキシ酪酸の理論収率が 100%であり、高収率での生産が期待できる [4]。2017 年、*E. coli* を宿主に、キシロースからの 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生合成経路が初めて確立された [5]。その後、*Pseudomonas putida* 由来の 2-ケト酸でカルボキシラーゼ (KDC) である PpMdlC と *E. coli* を由来のキシロネートデヒドラターゼである YagF を酵素融合することにより、20 g/L のキシロースから 7.71 g/L の 3,4-ジヒドロキシ酪酸が生産され、キシロースからのモル収率は 60%であった [6] (表 5-1)。

表 5-1 酸化的キシロース代謝経路を介した物質生産の報告例

Host	Carbon source	Target Products	Mode of culuture	Titer	Yield	Referenc e
<i>Escherichia coli</i>	20 g/L Xylose	3,4-DHBA	Batch, Flask	1.27 g/L	Not determined	Wang et al. 2017
<i>Escherichia coli</i>	5 g/L Glucose and 20 g/L Xylose	3,4-DHBA	Batch, Flask	0.38 g/L	Not determined	Gao et al. 2017
<i>Escherichia coli</i>	20 g/L Xylose	3,4-DHBA	Batch, Flask	7.71 g/L	60%	Liu et al. 2021
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10 g/L glucose and 20 g/L Xylose	Glycolate	Batch, Flask	1.0 g/L	Not determined	Salusjärvi et al. 2017
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10 g/L glucose and 10 g/L xylose	1,2,4-butanetriol	Batch, Flask	1,7 g/L	25%	Bamba et al. 2019
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10 g/L xylose feeding glucose and xylose	1,2,4-butanetriol	Fed-batch, Bioreactor (pH ≥ 5.5)	6.6 g/L	57%	Yukawa et al. 2021
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10 g/L glucose and 10 g/L xylose	3,4-DHBA, 3-HBL	Batch, Bioreactor (pH ≥ 8.0)	6.5 g/L (3,4-DHBA) 0.2 g/L (3-HBL)	79%	This study

これまで、酸化キシロース代謝経路は、*E. coli* [7], [8]や *Corynebacterium glutamicum* [9]、*Bacillus subtilis* [10]など、原核生物を宿主に研究が進められてきた。特に、先行研究での組換え大腸菌株では、酸化キシロース代謝経路を介したキシロースからの細胞増殖が可能であり [11]、キシロネートの再取り込みを伴う高い目的物質の生産量や収率が達成されている [12]–[14]。

出芽酵母 *S. cerevisiae* は、バイオマスの前処理物に含まれる発酵阻害物に対する高い耐性やバクテリオファージに感染しないことなどから、非可食性バイオマスを原料とした物質生産の宿主として有望であるとされている [15], [16]。実際に、*S. cerevisiae* を宿主として用いることで、前処理および加水分解されたバイオマスからの直接発酵による 1,2,4-ブタントリオールの生産が可能である [17]。しかしながら、酸化キシロース代謝経路が導入された酵母は、キシロースを単一の炭素源として細胞増殖することができない [18], [19]。また、培地中のキシロースから変換されたキシロネートは、細胞内で KDX に変換される前に酵母細胞外に放出され、目的化合物の生産量や収率は未だ低い [17], [20], [21]。また、培地中に放出されたキシロネートは、*S. cerevisiae* の細胞内には取り込まれない。このように、*S. cerevisiae* を宿主とした酸化キシロース経路の構築は未だ発展途上である。特に、キシロースからの目的生産物の生産性を向上させるためには、培地中へ多量に放出されるキシロネートの量を減少させるための更なる研究開発が必要である。

培地中へのキシロネートの蓄積量を減少させるため、キシロネートから2-ケト-3-デオキシキシロネート (KDX) への反応を触媒する *Caulobacter crescentus* 由来の酵素 XylID の活性向上が効果的だ。例えば、転写因子 Aft1 / Aft2 の機能を抑制する遺伝子 *BOL2* を破壊することにより、細胞内への鉄イオンの取り込みを促進することで *S. cerevisiae* を宿主とした酵素 XylID の活性強化が可能である [20], [22]。*tTYW1* の過剰発現により酵母の鉄イオンの取り込みを促進することによっても酵素 XylID の活性は向上し、*BOL2* の破壊と *tTYW1* の過剰発現を組み合わせることで、*in vitro* での XylID 活性は更に向上した [17]。しかしながら、*BOL2* の破壊と *tTYW1* の過剰発現による XylID 活性の向上は、1,2,4-ブタントリオールの生産量に影響を与えなかった [17]。このように、*in vitro* での酵素活性測定の結果は、必ずしも *in vivo* での目的化合物の生産量の向上を、酵母を用いた酸化キシロース代謝経路を介した物質生産性の向上のための更なる研究が必要である。1,2,4-ブタントリオールの生産量が向上しなかった要因の1つとして、酵素活性を左右する環境要因の1つである pH が *in vitro* と *in vivo* で異なることが挙げられる。*C. crescentus* 由来の XylID 活性の至適 pH は 8.5 であり、pH が 7.0 から 9.0 の範囲で活性があると報告されているが [23]。一方、通常、*S. cerevisiae* の培養では、窒素源としてのアンモニウムイオンが用いられることなど複数の要因により、培養開始時以降に培地が酸性になる [24]。*S. cerevisiae* は、通常 pH ≤ 6.0 以下の条件で培養されており、pH が 6.0 以上の培養環境が酸化キシロース代謝経路が導入された *S. cerevisiae* に与える影響については、調査されていない。

本研究では、キシロースからの 3,4-ジヒドロキシ酪酸生合成経路が導入された酵母 *S. cerevisiae* を pH ≥ 7.0 の弱アルカリ条件下で培養することにより、酵母細胞内での XylID の活性化を試みた。まず、酵母を宿主に 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生合成を実現するため、アルコールデヒドロゲナーゼ (Alcohol dehydrogenase ; ADH) の破壊を行い、DHB から 1,2,4-ブタントリオールの

合成を阻害した。また、DHB から 3,4-ジヒドロキシ酪酸の反応を触媒するアルデヒドデヒドロゲナーゼ (Aldehyde dehydrogenase ; ALD) の検討を行った。次に、培養条件の最適化のため、pH = 6.0 の条件下で、攪拌速度の検討を行った。最後に、pH $\geq$ 7.0 や 8.0 の弱アルカリ条件での培養を行った結果、細胞外に放出されたキシロネートが酵母細胞に再取り込みされる現象を発見し、細胞内での KDX の合成を促進することで、10.9 g/L のキシロースから 6.5 g/L の 3,4-ジヒドロキシ酪酸を生産した。また、キシロースから 3-ヒドロキシブチラクトンが合成されることを明らかにし、キシロースからの 3,4-ジヒドロキシ酪酸と 3-ヒドロキシブチラクトンの総モル収率は、79.1%に達した。これらの結果は、酵母を宿主とした酸化的キシロース代謝経路の構築において大きな課題の 1 つであった培地中へのキシロネートの蓄積に関して、弱アルカリ条件での培養による酵母内での XylID の活性化が有効な戦略であることを示した。

2. 酵母での 3,4-ジヒドロキシ酪酸生合成経路の構築

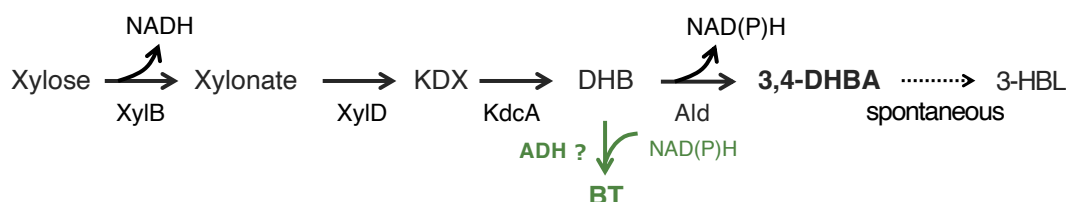


図 5-1 キシロースからの 3,4-ジヒドロキシ酪酸の人工生合成経路

XylB ; Xylose dehydrogenase from *Caulobacter crescentus*, XylID ; Xylonate dehydratase from *C. crescentus*, KdcA ; 2-ketoacid decarboxylase from *Lactococcus lactis*, Adh ; Alcohol dehydrogenase, Ald ; Aldehyde dehydrogenase,

キシロースからの 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生合成経路は、酸化的キシロース代謝経路の改変した人工代謝経路である [5]。まず、キシロースは、キシロースデヒドロゲナーゼ XylB によりキシロノラクトンに変換され、キシロノラクトンは酵母内で自発的にキシロネートに変換される。次に、キシロネートはキシロネートデヒドラターゼ XylID によって KDX に変換され、KDX は 2-ケト酸でカルボキシラーゼによって 3,4-ジヒドロキシブタナール (DHB) に変換される。先行研究により、この KDX から DHB への酵素反応には、*Lactococcus lactis* 由来の KdcA が脱炭酸に適している [17]。最後に、DHB は、酵素 Ald により 3,4-ジヒドロキシ酪酸に変換される。

2.1 ADHの破壊による1,2,4-ブタントリオール生成の阻害

筆者らは、まず、酵母 *S. cerevisiae* に対して、*C. crescentus* 由来の XylB、XylD、および *L. lactis* KdcA を 1 コピーずつ導入された BDK 株を用いて、キシロースから 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産が可能か検証した。しかしながら、BDK 株はキシロースから 3,4-ジヒドロキシ酪酸を生産することができなかった。

キシロースから高収率で 3,4-ジヒドロキシ酪酸を生産するためには、内因性酵素による DHB から 1,2,4-ブタントリールへの変換を防ぐ必要がある [5]。しかしながら、*S. cerevisiae* 内で、DHB から 1,2,4-ブタントリール (BT) への反応を触媒する酵素は、未だ同定されていない [21]。*S. cerevisiae* では、Adh1 から Adh7 に代表される Adh (s) が、アルデヒドとアルコールへの可逆的反応を触媒することが分かっている [25]。Adh の中でも、Adh6 や Adh7 は、広い基質特異性を示すことが知られている [26], [27]。しかしながら、DHB は非天然の化合物であるため[28]、先行研究での基質特異性に関する情報のみでは DHB から 1,2,4-ブタントリールへ変換する酵素を特定することは難しい。

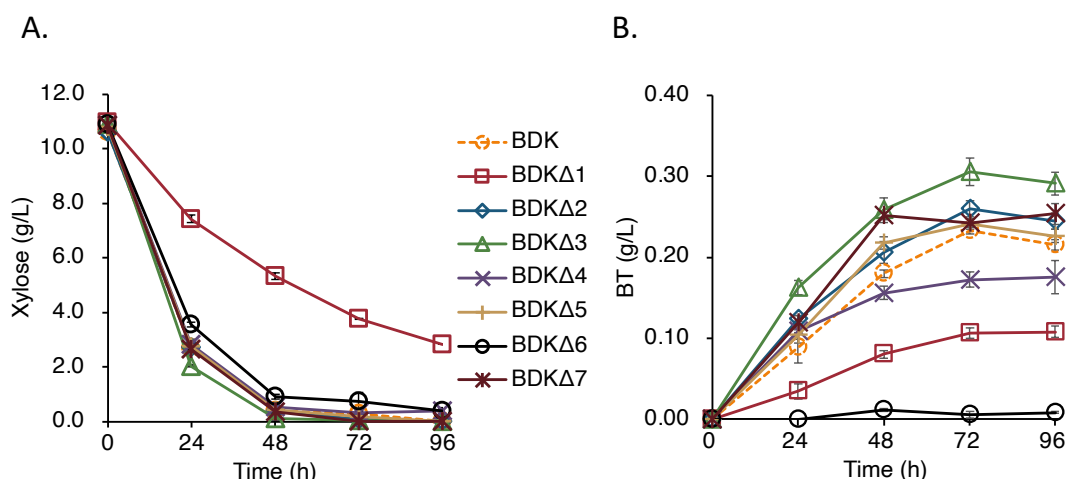


図 5-2 ADH破壊株によるキシロースの消費量 (A.) および 1,2,4-ブタントリールの生成量 (B.)
エラーバーは、独立した 3 つの実験からの標準偏差を示している。

そこで、BDK 株の *ADH1* から *ADH7* をそれぞれ破壊し、DHB から 1,2,4-ブタントリールの合成に与える影響を調査した。ADH 遺伝子が破壊された酵母株を、10 g/L のグルコースと 10 g/L のキシロースを含む培地で培養し、キシロースの消費量と 1,2,4-ブタントリオールの生産量を測定した (図 5-2)。親株の BDK 株は、10.6 g/L のキシロースから 0.22 g/L の 1,2,4-ブタントリオールを生産していた。次に、*ADH2*、*ADH5*、*ADH7* を欠損させた株では、1,2,4-ブタントリールの生成量に変化は見られなかった。興味深いことに、親株の BDK 株では 0.22 g/L の 1,2,4-ブタントリオール生成量であったのに対し、*ADH3* を破壊した BDKΔ3 株では 0.29 g/L の 1,2,4-ブタントリオールが生成した (図 5-2B)。一方、*ADH1*、*ADH4*、*ADH6* の破壊によって、親株の BDK 株と比較して、1,2,4-ブ

タントリオールの生成を抑制することができた。*ADH1* の欠損では、キシロースの消費量は減少しており（図 5-2A）、それに伴い 1,2,4-ブタントリオールの生成量も低下した（図 5-2B）。また、*ADH4* が破壊された BDK Δ 4 株では、0.18 g/L の 1,2,4-ブタントリオールの生成量であった（図 5-2B）。特に、*ADH6* が欠損した BDK Δ 6 株では、BDK 株の 0.22 g/L と比較して、わずか 0.01 g/L の 1,2,4-ブタントリオールが生成していた（図 5-2B）。このように、*ADH6* の破壊は副生成物である 1,2,4-ブタントリオールの生成を効果的に抑制することができた。一方で、BDK Δ 6 株は、3,4-ジヒドロキシ酪酸を生産することは出来なかった。

2.2. キシロネートから 3,4-ジヒドロキシブタナールへのフラックス強化による 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産

筆者らは、酵母を宿主としたキシロースからの 1,2,4-ブタントリオールの生産のため、BD δ K603 株を開発した [21]。BD δ K603 株には、1 コピーの *C. crescentus* 由来の XylB と XylD がゲノムに導入されており、KDX から DHB への高効率な変換を実現するために *L. lactis* 由来の KdcA が 6 コピー導入されている。また、鉄硫黄タンパク質である XylD の活性を向上させるため、*BOL2* の破壊と *tTYW1* の過剰発現により鉄代謝が改変されている [17], [21]。BD δ K603 株は、キシロースから DHB への高い代謝フラックスを実現できるため [21]、BD δ K603 株の *ADH6* を破壊することでキシロースから 3,4-ジヒドロキシ酪酸を生産できるのではないかと考えた。

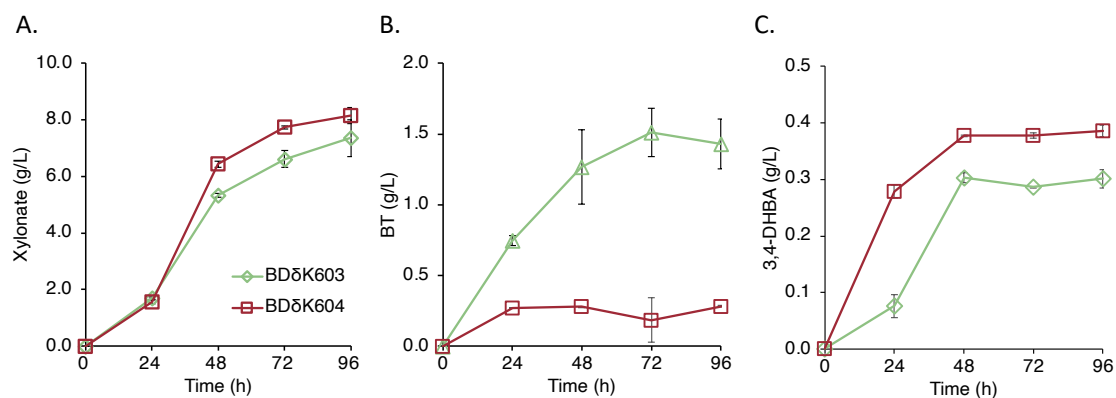


図 5-3 BD δ K603 株と BD δ K604 株によるキシロネート (A.)、1,2,4-ブタントリオール (B.) 3,4-ジヒドロキシ酪酸 (C.) の生産量

培養実験は、10g/L のグルコースと 10g/L のキシロースを含む培地で行われた。エラーバーは、独立した 3 つの実験からの標準偏差を示している。

BD δ K603 株のゲノム DNA 上から *ADH6* をノックアウトすることで、BD δ K604 株を構築した。親株である BD δ K603 株と *ADH6* が欠損した BD δ K604 株を、10 g/L のグルコースおよび 10 g/L のキシロースを含む培地で培養した。BD δ K603 株は、7.4 g/L のキシロネート（図 5-3A）、および 1.5 g/L の 1,2,4-ブタントリオール（図 5-3B）を生成した。興味深いことに、BD δ K603 株では DHB から 3,4-ジヒドロキシ酪酸への反応を触媒する Ald が導入されていないにもかかわらず、0.3 g/L の

3,4-ジヒドロキシ酪酸を生産した（図 5-3C）。この結果は、酵母内に存在する未知の Ald が DHB を 3,4-ジヒドロキシ酪酸に変換していることを示している。*ADH6* が欠損した BD δ K604 株では、8.2 g/L のキシロネート（図 5-3A）、0.3 g/L の 1,2,4-ブタントリール（図 5-3B）、および 0.4g/L の 3,4-ジヒドロキシ酪酸（図 5-3C）を生産していた。*ADH6* を破壊することにより、1,2,4-ブタントリールの生成量を 1.5 g/L から 0.3 g/L に抑制することができたが（図 5-3B）、3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産は、0.3 g/L から 0.4 g/L にしか向上しなかった（図 5-3C）。BD δ K604 株が生産した 3,4-ジヒドロキシ酪酸のキシロースに対するモル収率は、わずか 0.02 %であった。

3. *ALD* の過剰発現による 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量向上

キシロースから 3,4-ジヒドロキシ酪酸へのフラックスを向上させるため、DHB から 3,4-ジヒドロキシ酪酸の反応を触媒する *ALD* の過剰発現が有効であると考えられた。先行研究では、DHB とコハク酸セミアルデヒドの構造類似性に着目し、*E. coli* 由来のコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ *ynel* を過剰発現させることで、3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量が向上した [5]。このように、*S. cerevisiae* を宿主とした場合においても、*E. coli* 由来の *ynel* の導入は 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量を向上させる可能性がある。加えて、図 5-3C に示したように、BD δ K603 株、および BD δ K604 株は 3,4-ジヒドロキシ酪酸を生産した。そのため、酵母内在の Ald も、DHB から 3,4-ジヒドロキシ酪酸への反応を高効率に変換する可能性がある。そこで、酵母内在の Ald のうち、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ *Uga2*、NAD⁺依存型 Ald である Ald2 および Ald3 の過剰発現は、3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量を改善する可能性がある。

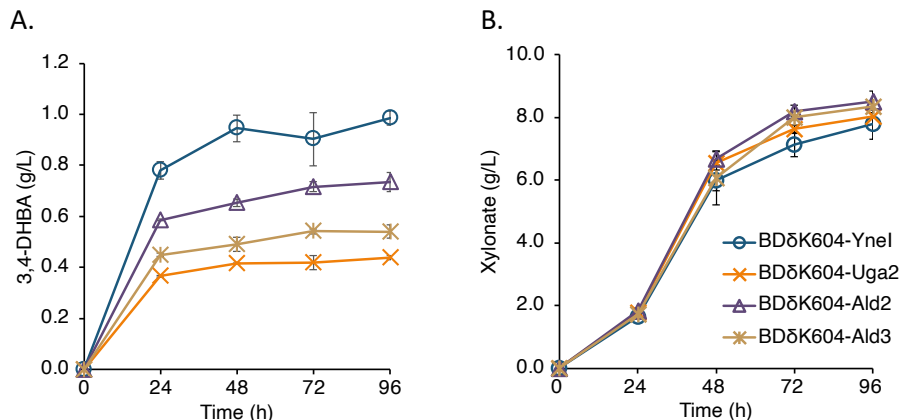


図 5-4 *ALD* 過剰発現株における 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量 (A.) およびキシロネート (B.) の生成量

培養実験は、10g/L のグルコースと 10g/L のキシロースを含む培地で行われた。エラーバーは、独立した 3 つの実験からの標準偏差を示している。

候補遺伝子である *ynel*、*UGA2*、*ALD2*、*ALD3* を *TDH3* プロモーターの制御下で BD δ K604 株のゲノム上に組み込み、BD δ K604-Ynel、BD δ K604-Uga2、BD δ K604-Ald2、BD δ K604-

Ald3 株を作出した。 *E. coli* 由来の *ynel* の過剰発現により、10.6 g/L のキシロースを消費して 1.0 g/L の 3,4-ジヒドロキシ酪酸を生産した（図 5-4A）。親株の BD δ K604 と比較して、3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量は 2.5 倍になった。残念なことに、*S. cerevisiae* 由来の *UGA2* を過剰発現させた株では、3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量は向上しなかった。*S. cerevisiae* 由来の *ALD2* および *ALD3* の過剰発現によって、3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量は向上し、BD δ K604-Ald2 株では 0.7 g/L、BD δ K604-Ald3 株では 0.5 g/L であった。

それぞれの ALD が過剰発現された酵母株のキシロネート蓄積量には大きな変化が見られなかったが、BD δ K604-Ynel 株のキシロネートの蓄積量は 8.2 g/L であった（図 5-4B）。すなわち、消費したキシロースのうち 66.5 %ものキシロネートが培地に排出されており、BD δ K604-Ynel 株の 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産収率が 11.8 %と低い要因の 1 つであると考えられる。

3. 酵母を宿主とした 3,4-ジヒドロキシ酪酸生産の培養プロセスの検討

3.1. pH 制御下での 3,4-ジヒドロキシ酪酸生産

実験室における三角フラスコを用いた培養試験では、微生物の培養に必須の因子である酸素供給量や pH などの制御が困難である。例えば、補足図 5-1 に示すように、BD δ K604-Ynel 株が 96 時間培養された培地の pH は培養後に pH = 4.0 であった。これは、弱酸であるキシロネートが培地を酸性にすることに加え [29]、目的化合物 3,4-ジヒドロキシ酪酸の pKa の値が 4.09 の弱酸性であることが要因として考えられる。そこで、キシロースからの 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産に影響を与える因子を探索するため、BD δ K604-Ynel 株を用いて、pH 制御下で通気量を変更し培養することとした。

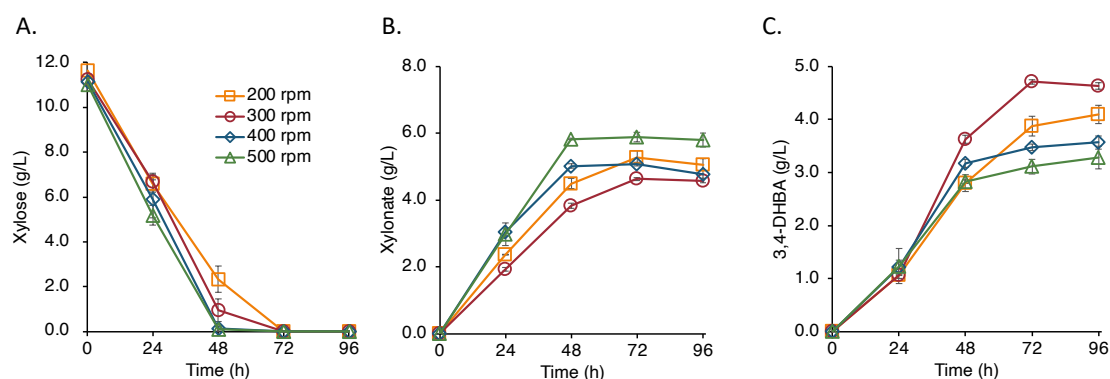


図 5-5 pH 制御下での各攪拌速度における、BD δ K604-Ynel 株のキシロースの消費量 (A.)、キシロネートの生成量 (B.)、3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量 (C.)

培養実験は、10g/L のグルコースと 10g/L のキシロースを含む培地で行われた。エラーバーは、独立した 2 つの実験からの標準偏差を示している。

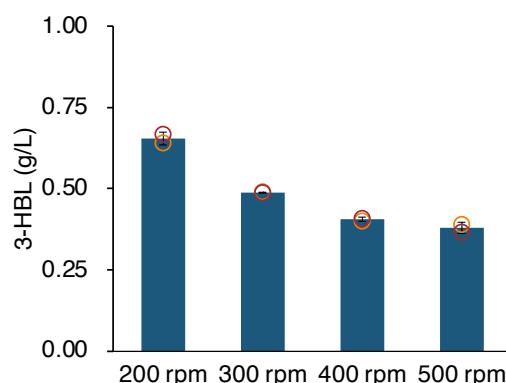


図 5-6 pH 制御下での各攪拌速度における BDδK604-YneI 株の 3-ヒドロキシブチロラクトン生産

培養実験は、10g/L のグルコースと 10g/L のキシロースを含む培地で行われた。エラーバーは、独立した 2 つの実験からの標準偏差を示している。

アルカリ溶液である NaOH の自動添加により培地中の pH を 6.0 に保ちつつ、攪拌速度を 200 から 500 rpm に変化させて BDδK604-YneI 株を培養した。攪拌速度に依存して、培地中の溶存酸素濃度は制御された（補足図 5-2）。各攪拌速度において、グルコースは 24 時間以内に消費された。攪拌速度が 500 rpm の条件において、培養 96 時間後にキシロースは完全に消費された（図 5-5A）、5.8 g/L のキシロネート（図 5-5B）、3.5 g/L の 3,4-ジヒドロキシ酪酸が生産された（図 5-5C）。攪拌速度が 500 rpm の場合と比較して、より遅い攪拌速度の場合には、キシロース消費速度およびキシロネートの蓄積量が減少し、3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量が向上した。特に、攪拌速度が 300 rpm の条件では、11.2 g/L のキシロースから 4.6 g/L の 3,4-ジヒドロキシ酪酸が生産された（図 5-5A および C）。投入したキシロースに対する 3,4-ジヒドロキシ酪酸のモル収率は 51.3 % に達した。また、それぞれの攪拌速度の条件において、0.64 (200 rpm), 0.49 (300 rpm), 0.40 (400 rpm), 0.39 g/L (500 rpm) の 3-ヒドロキシブチロラクトンの生産が確認された（図 5-6）。

pH および攪拌速度を制御することにより、キシロースからの 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産を向上することができた。主要な副生成物であるキシロネートの蓄積量は減少したが、未だ 4.8 g/L のキシロネートが蓄積しており、消費されたキシロースうち 38.7 % が培地中に放出されていた（図 5-5B）。

3.2. 弱アルカリ条件下での培養によるキシロネートの再取り込みと 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量向上

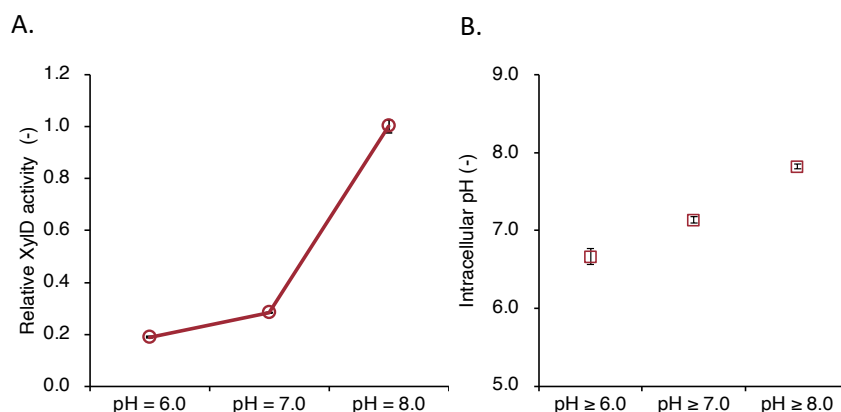


図 5-7 pH の変化が与える *in vitro* での XylID 活性 (A.) および酵母細胞内 pH (B.) への影響

XylID の活性測定は、チオバルビツール酸を用いた方法で行われた。酵母細胞内の pH は、pH 依存型の緑色蛍光タンパク質 (sfpHluorin) を用いた方法にて行われた。エラーバーは、独立した 2 つの実験からの標準偏差を示している。

C. crescentus 由来の XylID は、pH = 8.5 の条件で最も高い酵素活性を示すことが知られている [23]。酵素 XylID が活性を示す pH 帯は狭く、pH が 8.5 より低くなると XylID 活性が急激に低下する (Andberg et al., 2016、図 5-7A)。しかしながら、*C. crescentus* 由来の XylID が導入された遺伝子組換え酵母株は、慣習的に pH ≤ 6.0 の条件で培養されてきた [17], [18], [20]。酵母 *S. cerevisiae* の細胞内の pH は細胞外の pH の変化に応答するため [30]、pH ≤ 6.0 の条件下は酵母細胞内の pH の酸性化により XylID 活性が低下している可能性がある。また、弱アルカリ性の条件で培養することにより、*S. cerevisiae* の細胞内 pH は上昇した (図 5-7B) よって、弱アルカリ性で培養することで、酵母細胞内においても XylID を活性な状態に保つことができる可能性がある。しかしながら、弱アルカリ性の培養環境が、酵素 XylID を含む酸化的キシロース代謝経路が導入された *S. cerevisiae* に与える影響は調査されていない。

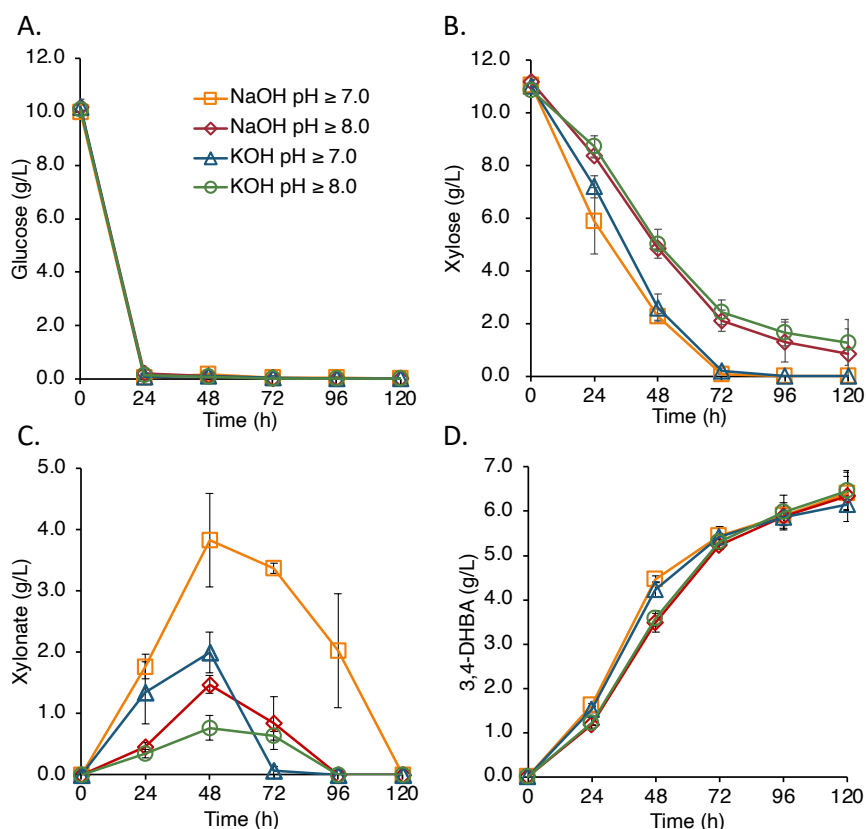


図 5-8 弱アルカリ条件下における BDδK604-Ynel 株のキシロース消費量 (A.)、キシロネートの蓄積量 (B.)、および 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量 (C.)

培養実験は、10g/L のグルコースと 10g/L のキシロースを含む培地で行われた。エラーバーは、独立した 2 つの実験からの標準偏差を示している。

このように、酵母の細胞増殖に適した pH と酵素 XylID の活性に適した pH の乖離を解消するため、培地の pH をアルカリ溶液である NaOH あるいは KOH を用いて pH ≥ 7.0 または pH ≥ 8.0 に保ちつつ BDδK604-Ynel 株を培養した。すべての培養条件下において、グルコースは 24 時間以内に消費されていた (図 5-8A)。pH ≥ 7.0 の条件と比較して、pH ≥ 8.0 の条件ではキシロースの消費速度は減少した (図 5-8B)。興味深いことに、pH ≥ 7.0 あるいは pH ≥ 8.0 の弱アルカリ性の条件で培養することにより、培地中に放出されたキシロネートが再度細胞内に取り込まれることが分かった (図 5-8C)。培養 120 時間後にキシロネートは全て再取り込みされ、KOH を用いて pH ≥ 8.0 に制御した条件において、10.9 g/L のキシロースから 6.5 g/L の 3,4-ジヒドロキシ酪酸を生産し、モル収率は 74.5 % に達した (図 5-8D)。

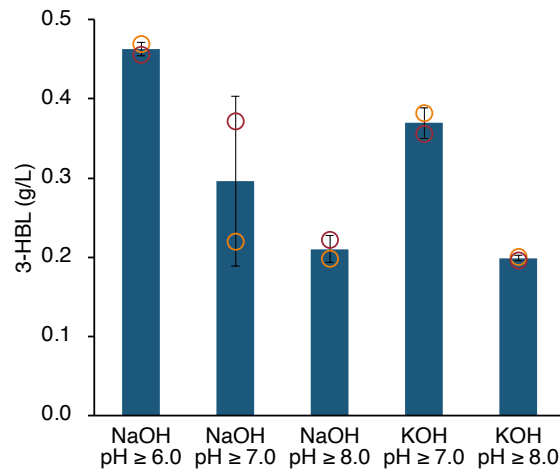


図 5-9 それぞれの pH 条件下における 3-ヒドロキシブチロラクトンの生産量の変化

培養実験は、10g/L のグルコースと 10g/L のキシロースを含む培地で行われた。エラーバーは、独立した 2 つの実験からの標準偏差を示している。

残念なことに、NaOH を用いて pH ≥ 6.0 の条件において 3-ヒドロキシブチロラクトンの生産量は 0.49 g/L であったが、弱アルカリ性の条件下では、0.30 (NaOH, pH ≥ 7.0), 0.21 (NaOH, pH ≥ 8.0), 0.37 (KOH, pH ≥ 7.0) および 0.20 g/L (KOH, pH ≥ 8.0) に減少した (図 5-9)。

5. 3,4-ジヒドロキシ酪酸生産の中間生成物の代謝解析

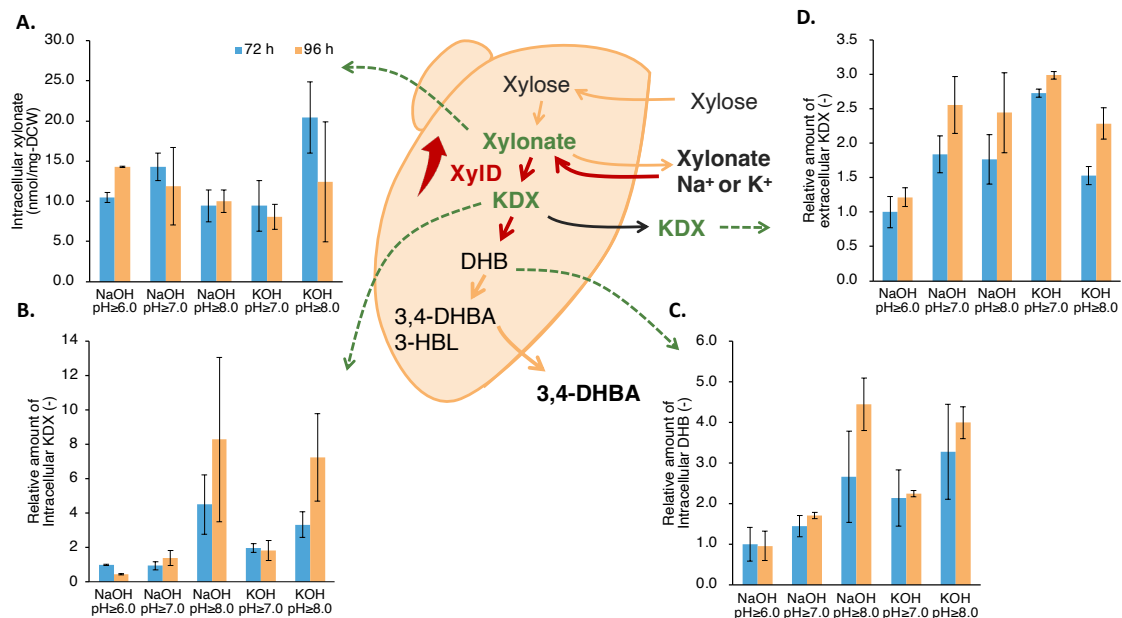


図 5-10 各 pH 条件下における酵母細胞内のキシロネート (A.)、KDX (B.)、DHB (C.) の蓄積量、および細胞外の KDX の量

培養実験は、10g/L のグルコースと 10g/L のキシロースを含む培地で行われた。エラーバーは、独立した 2 つの実験からの標準偏差を示している。

最後に、キシロースからの 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生合成に与える影響を調査するため、細胞内のキシロネート、KDX、DHB の蓄積量、および細胞外の KDX の生成量を測定した。培養 72 時間における KOH を用いた $\text{pH} \leq 8.0$ での培養結果を除けば、細胞内のキシロネートの蓄積量に大きな変化はなかった（図 5-10A）。一方で、 $\text{pH} \geq 8.0$ の条件下では、細胞内の KDX および DHB 蓄積量が増加した（図 5-10B および C）。これは、細胞内の pH の上昇による XylID 活性の向上により（図 5-7）、キシロネートから DHB へのフラックスが向上したためであると考えられる。細胞内の KDX の増加に伴い、 $\text{pH} \geq 7.0$ あるいは $\text{pH} \geq 8.0$ の培養条件において、細胞外の KDX の生成量も増加した（図 5-10C）。

6. 考察

本研究では、酸化キシロース代謝経路が導入された酵母を用いて、培地中に放出されるキシロネートの再取り込みが初めて確認された。弱アルカリ性の環境が酵母内に発現された XylID の活性を向上することがキシロネート再取り込みを引き起こし、キシロースから酸化キシロース代謝経路を介して生産される化合物の生産性を向上した。これらの結果は、中間体の還元と再同化、および宿主株と標的酵素の活性 pH 範囲に合わせた異種経路の働きについて、新たな知見を提供する。

pH 制御下の攪拌速度を検討によって 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量が向上した要因の 1 つに、XylID 活性の酸素感受性が挙げられる。XylID は IlvD/EDD ファミリーに属し、その酵素活性には鉄硫黄クラスターが必要であることが知られている（Andberg et al., 2016）。原核生物の鉄硫黄タンパク質の酵母 *S.セレビシエ*での機能発現は、鉄硫黄タンパク質の酸素感受性（Kirby et al., 2016）、あるいは考えられるように鉄硫黄クラスターの利用率が低いため、非常に困難であった（Bamba et al., 2019）。低い攪拌速度では培地中の溶存酸素量が低く抑えられ（補足図 5-2）XylID 活性の低下が抑制された結果、細胞内でキシロネートから KDX への反応が促進されて 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生産量が向上したと考えられる。

また、本研究では、キシロースから 3-ヒドロキシブチロラクトンが生産できることが初めて確認された。先行研究では、グルコースからの生合成経路では 3,4-ジヒドロキシ酪酸と 3-ヒドロキシブチロラクトンの生産が確認されていたが [2]、キシロースからの 3-ヒドロキシブチロラクトンが合成できることは確認されていなかった [5], [6], [31]

代謝物解析によって、アルカリ条件下での培養では、細胞内のキシロネートおよび KDX が蓄積していた（図 5-10B および C）、このように、キシロースからの 3,4-ジヒドロキシ酪酸生合成において、KDX から DHB への反応が律速段階である可能性が示唆された。各 pH の条件下で、3,4-ジヒドロキシ酪酸合成経路に関わる遺伝子の発現量は、*C. crescentus* 由来の *xyID* を除いて変化しなかった（補足図 5-3）。そのため、筆者らは、この KDX から DHB の反応が律速段階となるのは、

L. lactis 由来の *kdcA* の活性が低いことが原因であると考えている。例えば、KdcA の至適 pH は pH 6.0 [32]であり、本研究での培養条件である pH $\geq$ 7.0 や 8.0 とは乖離がある。また、3,4-ジヒドロキシ酪酸生成経路に含まれる酵素の至適 pH は、それぞれ *C. crescentus* 由来の XylB (pH 9.0) [29]、*C. crescentus* 由来の XylD (pH = 8.5) [23]である。*E. coli* 由来の Ynel 活性の pH 依存性は報告されていないが、本酵素は pH = 7.8 で活性測定が行われた [33]。したがって、弱アルカリ性の環境は、キシロースからの 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生合成経路に含まれるすべての酵素にとって好ましいというわけではない。よって、*S. cerevisiae* を宿主に異種生物由来の代謝経路を構築するためには、その代謝経路を構成する酵素の至適 pH 帯を考慮する必要がある [34]。

実験操作

標準試料と培地

(*R*)-3,4-ジヒドロキシ酪酸は商業的な入手が不可能なため、3,4-DHBA の標準試料は、(*R*)-3-ヒドロキシブチロラクトンの開環反応によって調製された (Martin et al., 2013)。(*R*)-3-ヒドロキシブチロラクトンは、Alfa Aesar 社 (Ward Hill, Massachusetts, United States) から購入した。キシロネートと KDX は、それぞれ Toronto Research Chemicals (North York, Canada)と Sigma-Aldrich (Burlington, MA, United States)から購入した。DHB は、商業的な入手がふかであったため、キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析(CE-TOFMS)を用いて $m/z = 103.0391$ の化合物として同定された。

プラスミドの構築

プラスミドの増幅には、*Escherichia coli* NovaBlue (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いた。NovaBlue は、100 μ g/mL アンピシリンを含む Luria-Bertani 培地 (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, and 5 g/L NaCl) で、37 $^{\circ}$ C で培養した。本研究で作成したプラスミドは全て、In-Fusion[®] HD Cloning Kit (Takara) を用いて作成した。簡単には、制限酵素処理したベクターの末端 15 塩基の相同配列を、クローニングする塩基配列の両端に PCR で付加して、ベクターとクローニング配列、In-Fusion 酵素を混合したのち、50 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートすることで作成した。本研究で使用した遺伝子のうち、*C. crescentus* 由来の *xylB* および *xylD*、*L. lactis* 由来 *kdcA*、*E. coli* 由来の *ynel* および pH 依存型の GFP である sfpHluorin は、*S. cerevisiae* のコドン使用頻度に DNA 配列が最適化されたものを GenScript (Piscataway, NJ, US) によって人工合成されたものを使用した。

表 5-1 本研究で用いたプラスミド

Plasmid Name	Description	Reference
pGK405	Empty vector, <i>LEU2</i> marker	[35]
pIL-pTEF1-tADH1	Empty vector, <i>TDH3p</i> , <i>LEU2</i> marker	This study
pIL-pTDH3-kdcA	<i>TDH3p-LI_kdcA</i> , <i>LEU2</i> maker	This study

pIL-pTEF1-LI_kdcA-tADH1	<i>TEF1p-LI_kdcA</i> , <i>LEU2</i> marker	This study
pTs-A-xylBD	<i>TDH3p-Cc_xylB</i> , <i>SED1p-xylD</i> , <i>ADE2</i> marker	[17]
pTs-A-xylBD-kdcA	pTs-A-xylBD, <i>TEF1p-LI_kdcA</i> , <i>ADE2</i> marker	This study
pSUP4t	2 μ ori, <i>URA3</i> marker, SUP4t	[36]
pGK426-ADH6	SNR52p-gRNA for CCW12-SUP4T, 2 μ ori, <i>URA3</i> marker	This study
pIL-pTDH3-tADH1	<i>TDH3p</i> , <i>LEU2</i> marker	[17]
pIL-pTDH3-Ec_ynel-tADH1	<i>TDH3p-Ec_ynel</i> , <i>LEU2</i> maker	This study
pIL-pTDH3-Sc_UGA2-tADH1	<i>TDH3p-Sc_UGA2</i> , <i>LEU2</i> maker	This study
pIU-pTDH3-tADH1	<i>TDH3p</i> , <i>URA3</i> marker	[17]
pIU-pTDH3-Sc_ALD2-tADH1	<i>TDH3p-Sc_ALD2</i> , <i>URA3</i> maker	This study
pIU-pTDH3-Sc_ALD3-tADH1	<i>TDH3p-Sc_ALD3</i> , <i>URA3</i> maker	This study
pIU-pTDH3-Sc_ALD2-tADH1	<i>TDH3p-sfpHluorin</i> , <i>URA3</i> maker	This study
pIL-pTDH3-Ec_ynel-tADH1	<i>TDH3p-sfpHluorin</i> , <i>LEU2</i> maker	This study

表 5-2 本研究でプラスミド構築に用いたプライマー

Primer name	Sequence (5' - 3')	Reference
TEF1p F	CGGGCCCCCCTCGACCTTGCCAACAGGGA GTTCTTCAGAG	This study
TEF1p R	TTTGTAATTAAAACTTAGATTAG	This study
adh1t F	TAAGTTTTAATTACAAACCCGAATTTCTTAT GATTTATG	This study
adh1t R	ACCGCGGTGGCGGCCGAGCGACCTCATGCT ATACCTG	Bamba et al., 2019
opt kdcA F	TAAACAAACAAACCCATGTACACCG	This study

opt kdcA R	ATAAGAAATTCGCCCTTACTTGTTCTG	This study
TEF1p-LlkdcA F	CGGGCCCCCCTCGACCTTGCCAACAGGGA GTTCTTCAGA	This study
LlkdcA-ADH1t R	ACCGCGGTGGCGGCCGAGCGACCTCATGCT ATACCTGAG	This study
SNR52p F	GGCGAATTGGGTACCTCTTTGAAAAGATAAT GTATG	Inokuma et al., 2021
SNR52p-ADH6 R	TTCTAGCTCTAAACCTGTTTGACTTGGGCC CTAGGATCATTTATCTTTCACTGCGG	This study
Sc_UGA2 F	ATAAGAAATTCGCCCTTAAATGCTGTTTGGCA AATTCCC	This study
Sc_UGA2 R	TAAACAAACAAACCCATGACTTTGAGTAAGTA TTCTAAACC	This study
Sc_ALD2 F	TAAACAAACAAACCCGGGATGCCTACCTTGT ATACTGATATCG	This study
Sc_ALD2 R	TAAACAAACAAACCCGGGATGCCTACCTTGT ATACTGATATCG	This study
Sc_ALD2 R	ATAAGAAATTCGCCCGGGTTAGTTGTCCAAA GAGAGATTTATG	This study
Δ ADH2 up F	TATCTAAAAATTGCCTTATGATCCG	This study
Δ ADH2 down R	TATATGAGGGTGTGTACATTGCAGTGC	This study
Δ ADH3 up F	TCTTATCATTCCACGCACATTATTTTCC	This study
Δ ADH3 down R	ATGAGGAAGAAATCCAAATCCTAATG	This study
Δ ADH4 up F	CCAGTATAATTGAGGCTGCTG	This study
Δ ADH4 down R	AATTAGAGATATCAAACCAAAAAAAGG	This study
Δ ADH5 up F	TAATTTTACAAGTAGTGTCTTCATG	This study
Δ ADH5 down R	TTCTCATAGGGGCAGGAGCCAGAGC	This study
Δ ADH6 up F	TTTTCATTTTCAACTTGGTAATGACG	This study
Δ ADH6 down R	AATTGTCTCGAGCCAAAAGTCGC	This study
Δ ADH7 up F	GCGAGCGACAAGTCAGAGTAACC	This study

ΔADH7 down R	TTTTAAAATTGAAGTGCTTTAAGAGG	This study
ΔADH1 up F	ACTGTAGCCCTAGACTTGATAGCC	This study
ΔADH1 up R	GGGATCCGTCGACCTGCAGCGTACGTGTAT ATGAGATAGTTGATTGTATGC	This study
ΔADH1 down F	CGAAAACGAGCTCGAATTCATCGATGCGAAT TTCTTATGATTTATG	This study
ΔADH1 down R	CGTAAAAAAGCATGCACGTATACAC	This study
KanMX F	CGTACGCTGCAGGTCGACGGATCCC	This study
KanMX R	ATCGATGAATTCGAGCTCGTTTTCG	This study
ΔADH6 up R	CTACATTTATCAAGAGCTTGACAACGATTTTG GCTTTTCTTGTTGTTGTG	This study
ΔADH6 down F	GTTGTCAAGCTCTTGATAAATGTAG	This study
Sc_UGA2 F	TAAACAAACAAACCCATGACTTTGAGTAAGTA TTCTAAACC	This study
Sc_UGA2 R	ATAAGAAATTCGCCCTTAAATGCTGTTTGGCA AATTCCC	This study
Sc_ALD2 F	TAAACAAACAAACCCGGGATGCCTACCTTGT ATACTGATATCG	This study
Sc_ALD2 R	ATAAGAAATTCGCCCGGGTTAGTTGTCCAAA GAGAGATTTATG	This study
Sc_ALD3 F	TAAACAAACAAACCCGGGATGCCTACCTTGT ATACTGATATCG	This study
Sc_ALD3 R	ATAAGAAATTCGCCCGGGTTATTTATCCAATG AAAGATCCAC	This study

本研究で使⽤したプラスミドおよびプライマーを、表 5-1 および表 5-2 に示す。*L. lactis* 由来の *kdcA* を *TEF1* プロモーターと接続するために、プライマー-TEF1p F および TEF1p R、あるいは TEF1p-*adh1t* F および *adh1t* R を⽤いて *S. cerevisiae* YPH499 のゲノム DNA をテンプレートに PCR を⾏い、*TEF1* プロモーターと *ADH1* ターミネーターを含む DNA 断片を増幅した [17]。これらの 2 つの DNA 断片を、プライマー-TEF1p F および *adh1t* R を⽤いたオーバーラップ PCR により接続し、NotI と XhoI で処理された pGK405 (*LEU2*) [35]にクローニングすることで、pIL-pTEF1-tADH1 を得た。pIL-pTDH3-*kdcA* [17]をテンプレートに opt *kdcA* F と opt *kdcA* R を⽤いて増幅された *L. lactis* 由来の *kdcA* の ORF を含む DNA 断片を、*smal* で処理された pIL-pTEF1-

tADH1 をクローニングすることで、pIL-pTEF1-LI_kdcA-tADH1 を得た。プライマー-TEF1p-LlkdcA F および LlkdcA-ADH1t R を用いて pIL-pTEF1-LI_kdcA-tADH1 をテンプレートに増幅された DNA 断片を、*sacI* で処理された pTS-A-xyIBD にクローニングすることで、pTs-A-xyIBD-kdcA を得た。

Guide RNA (gRNA) 発現用のプラスミドは、以下のように構築された。まず、プライマー-SNR52p F および SNR52p-ADH6 R (*ADH6* の gRNA 配列, 5' - CTAGGGCCCAAGTCAAACAG - 3')を用いて *S. cerevisiae* YPH499 のゲノム DNA をテンプレートに PCR を行い、SNR52 プロモーターに接続された *ADH6* gRNA の配列を得た。*ADH6* gRNA を含む DNA 断片を、プライマー-Guide F2 および Guide R2 を用いて pSUP4t [36]をテンプレートに増幅された DNA 断片にクローニングすることで、pGK426-*ADH6* を得た。

YPH499 のゲノム DNA からアルデヒド脱水素酵素 *UGA2*, *ALD2*, *ALD3* の ORF を増幅するために、プライマー-Sc_UGA2 F および Sc_UGA2 R、あるいは Sc_ALD2 F および Sc_ALD2 R、あるいは Sc_ALD3 F と Sc_ALD3 R を用いて PCR を行った。コドン最適化された *E. coli* 由来の *ynel* PCR によって増幅された Sc_UGA2 ORF の DNA 断片を *smaI* で処理された pIL-pTDH3-tADH1 にクローニングすることで、pIL-pTDH3-Ec_ynel-tADH1、および pIL-pTDH3-Sc_UGA2-tADH1 をそれぞれ得た。Sc_ALD2 および Sc_ALD3 の DNA 断片を *smaI* で処理された pIU-pTDH3-tADH1 にクローニングすることで、pIL-pTDH3-Sc_ALD2-tADH1、および pIL-pTDH3-Sc_ALD3-tADH1 をそれぞれ得た。

コドンを最適化した sfpHluorin の DNA 断片を、*smaI* で処理された pIL-pTDH3-tADH1 および pIU-pTDH3-tADH1 にクローニングすることで、pIL-pTDH3-sfpHluorin-tADH1 と pIL-pTDH3-sfpHluorin-tADH1 をそれぞれ得た。

酵母株の構築

表 5-3 本研究で用いられた酵母株

Strain Name	Description	Reference
YPH499	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>	Stratagene
YPH499 ΔGRE3	YPH499, <i>gre3Δ::kanMX</i>	Bamba et al. 2019
BDK	YPH499, pTs-A-xyIBD-kdcA	This study
BDKΔ1	BDK, <i>ADH1Δ::KanMX</i>	This study
BDKΔ2	BDK, <i>ADH2Δ::KanMX</i>	This study
BDKΔ3	BDK, <i>ADH3Δ::KanMX</i>	This study
BDKΔ4	BDK, <i>ADH4Δ::KanMX</i>	This study
BDKΔ5	BDK, <i>ADH5Δ::KanMX</i>	This study
BDKΔ6	BDK, <i>ADH6Δ::KanMX</i>	This study

BDK Δ 7	BDK, <i>ADH7Δ::KanMX</i>	This study
BD δ K603	YPH499 Δ GRE3, <i>tdh3p-CcxylB</i> , <i>sed1p-CcxylD</i> , six copies of <i>L. lactis kdcA</i> , <i>bol2Δ::HIS3</i> , <i>pgk1p-tTYW1</i>	Yukawa et al. 2021
BD δ K604	BD δ K603, <i>ADH6Δ::1 kbp fragment</i>	This study
BD δ K604-Ynel	BD δ K604, <i>pIL-tdh3p-Ec_ynel-adh1t</i>	This study
BD δ K604-Uga2	BD δ K604, <i>pIL-tdh3p-Sc_UGA2-adh1t</i>	This study
BD δ K604-Ald2	BD δ K604, <i>pIL-tdh3p-Sc_ALD2-adh1t</i>	This study
BD δ K604-Ald3	BD δ K604, <i>pIL-tdh3p-Sc_ALD3-adh1t</i>	This study
Ynel-sfpHluorin	BD δ K604-Ynel, <i>pIU-pTDH3-sfpHluorin-tADH1</i>	This study
Uga2-sfpHluorin	BD δ K604-Uga2, <i>pIU-pTDH3-sfpHluorin-tADH1</i>	This study
Ald2-sfpHluorin	BD δ K604-Ald2, <i>pIL-pTDH3-sfpHluorin-tADH1</i>	This study
Ald3-sfpHluorin	BD δ K604-Ald3, <i>pIL-pTDH3-sfpHluorin-tADH1</i>	This study

この研究で使用された全ての酵母株を表 5-3 に示した。3,4-ジヒドロキシ酪酸生産酵母として、*S. cerevisiae* YPH499 [*MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1- 63 his3- Δ 20 0 leu2- Δ 1* (Stratagene, La Jolla, CA, USA)] を用いた。酵母株の培養には、SD 培地 [6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 20 g/L glucose] に株の栄養要求性に合わせてアミノ酸・核酸を加えたもの、または SCD 培地 [6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 2 g/L synthetic complete mix, 20 g/L glucose] を用いた。30 °C で培養された。

EcoRV で処理された *pTs-A-xylBD-kdcA* を、相同組換えによって YPH499 の染色体 DNA に形質転換し、BDK 株を構築した。*ADH2* から *ADH7* までの遺伝子破壊用の DNA 断片を調製するため、G418 耐性遺伝子 *KanMX* を含む酵母株を、Yeast Deletion Mat-A Complete Set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) より取得された。プライマー Δ XXX (遺伝子名) up F および Δ XXX (遺伝子名) down R を用いて、*ADH2* から *ADH7* までの遺伝子破壊用の DNA 断片を得た。*ADH1* の ORF 上流あるいは下流の 500bp を増幅するために、プライマー Δ ADH1 up F および Δ ADH1 up R、あるいは Δ ADH1 down F および *ADH1* down R を用いて、

S. cerevisiae のゲノム DNA をテンプレートに PCR を行った。さらに、Yeast Deletion Mat-A Complete Set の BY4741 Δ ADH2 から KanMX F と KanMX R により増幅した *kanMX* 遺伝子を増幅した。*ADH1* 破壊用の DNA 断片を調製するため、プライマー Δ ADH1 up F と Δ ADH1 down R を用いて、3 つの DNA 断片 (*KanMX*、ORF の上流 500 bp、ORF の下流 500 bp) をオーバーラップ PCR により接続した。それぞれの ADH 破壊用の DNA 断片を BDK 株に形質転換し、BDK Δ 1、BDK Δ 2、BDK Δ 3、BDK Δ 4、BDK Δ 5、BDK Δ 6、BDK Δ 7 株を得た。

BD δ K603 株 [21] の *ADH6* を破壊するため、clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) - Cas9 system を用いた (Inokuma et al., 2021)。*ADH6* ORF の上流あるいは下流の 500 bp を増幅するため、プライマー Δ ADH6 up F および Δ ADH6 up R、あるいは Δ ADH6 down F および Δ ADH6 up R を用いて、*S. cerevisiae* のゲノム DNA をテンプレートとして、PCR により増幅した。pCL-Cas9、pGK426-ADH6 を BD δ K603 株に形質転換し、BD δ K604 株を構築した。

Ald の過剰発現株を構築するため、EcoRV で処理された pIL-pTDH3-Ec_{ynel}-tADH1 および pIU-pTDH3-Sc_{ALD2}-tADH1 を相同組換えにより BD δ K604 株の *LEU2* の遺伝子座に組み込み、BD δ K604-YneI および BD δ K604-Uga2 株をそれぞれ構築した。また、EcoRV で処理された pIU-pTDH3-Sc_{ALD2}-tADH1 と pIU-pTDH3-Sc_{ALD3}-tADH1 を相同組換えにより BD δ K604 株の *URA3* の遺伝子座に組み込み、BD δ K604-Ald2 および BD δ K604-Ald3 株をそれぞれ構築した。

細胞内の pH 測定用のための sfpHluorin 発現酵母株を構築するために、EcoRV により処理された pIU-pTDH3-sfpHluorin-tADH1 を相同組換えにより BD δ K604-YneI および BD δ K604-Uga2 株の *URA3* 遺伝子座に組み込み、それぞれ YneI-sfpHluorin および Uga2-sfpHluorin 株を構築した。また、EcoRV により処理された pIL-pTDH3-sfpHluorin-tADH1 を BD δ K604-Ald2 および BD δ K604-Ald3 株の *LEU2* 遺伝子座に組み込み、Ald2-sfpHluorin および Ald3-sfpHluorin 株をそれぞれ構築した。

3,4-ジヒドロキシ酪酸生産酵母の生産試験

3,4-ジヒドロキシ酪酸生産酵母株の三角フラスコを用いた発酵は、先行研究に記載の方法で行われた [17]。200 mL のバッフル付き三角フラスコで実施した。簡単に説明すると、発酵は、10 g/L yeast extract, 20 g/L Bactopeptone (Difco Laboratories), 10 g/L グルコース, 10 g/L キシロース含む YPDX 培地を用いて、液量 20 mL、初期 OD₆₀₀ = 5.0 で行われた。菌体密度は、UV-VIS 分光光度計 (UVmini-1240, Shimazu) を用いて波長 600 nm により測定した。

バイオリアクターを用いた各種パラメータ制御下での培養

バイオリアクターを用いたバッチ培養は、ABLE Biott 社の Bio Jar.8 を用いて行われた。400 mL YPD 培地を用いて 30 °C で 24 時間培養された酵母菌体を、2,200 × g で 5 分間遠心分離して回収した。10 mL の D. W. で 2 回洗浄された菌体は、初期 OD₆₀₀ = 5.0 となるように 100 mL の

YPDX 培地に植菌された。Antiform SI FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) は、適宜添加された。培養温度は 30 °C であり、培養液中の pH は、5N NaOH または 5N KOH を自動添加することにより制御された。通気量は、100mL/min に維持された。

代謝物解析

発酵培地中のグルコースおよびキシロース濃度は、SPR-Pb カラム (7.8 mm × 250 mm, particle size 8 µm; Shimadzu, Kyoto, Japan) と RID-10A 検出器が装着された高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (Shimadzu) を用いて定量された。HPLC は、カラム温度 80 °C、流速 0.6 mL/min で運転された。

培地中に含まれるキシロネート、1,2,4-ブタントリール、3,4-ジヒドロキシ酪酸および 3-ヒドロキシブチロラクトンは、およびガスクロマトグラフィー/質量分析計 (GC-MS) (GCMS-QP 2010 Ultra ;Shimadzu) によって定量された。GC-MS は、以前に記載の方法で運転された [17]

CE-TOFMS (CE, Agilent G7100;MS, Agilent G6224AA LC/MSD TOF ; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)を用いて、細胞内のキシロネート、KDX、DHB、および細胞外の KDX の定量を行った。培地に含まれる代謝物の抽出 [21]、酵母細胞内からの代謝物抽出法 [37]、および CE-TOFMS の運転条件 [38]に関しては、それぞれ先行研究に記載の方法で行われた。

定量的リアルタイム PCR による遺伝子発現量の測定

Primer Name	Sequence (5' - 3')	Reference
rt-ACT1-F	TGGATTCCGGTGATGGTGTT	[39]
rt-ACT1-R	TCAAAATGGCGTGAGGTAGAGA	[39]
rt-xylB F	CGCTAAGGCAGGTATCGAGG	This study
rt-xylB R	GGCTTCACCTTCTGGTGTGT	This study
rt-xylD F	CAGTTCCTGCCACCATGACT	This study
rt-xylD R	TCTTGGCAACTTGGCTGCTA	This study
rt-kdcA F	GGTGTGTTGGTGAATTGTCCGC	[21]
rt-kdcA R	AGCAGCAACATCTACTGGCA	[21]
rt-yneI F	TAGGTGGCAGCGATCCATTC	This study
rt-yneI R	GCAGCTGCAGCAACAAATCT	This study

定量的リアルタイム PCR に使用されたプライマーを、表 5-4 に示した。バイオリアクターを用いて、NaOH によって pH ≥ 6.0、7.0、および 8.0 に保たれた YPDX 培地で 24 時間培養された

BDδK604-YneI を回収し、mRNA の調製に用いた。定量的リアルタイム PCR は、先行研究に記載の通り行われた [36]。使用したプライマーによる PCR 反応の特異性を確認するため、融解曲線による解析を実施した。標的遺伝子の遺伝子発現量は、ハウスキーピング遺伝子 ACT1 の発現量で正規化された。

XylID 活性測定

キシロネートデヒドラターゼ (XylID) の活性測定は、チオバルビツール酸法により行われた [40]。5 mL の YPD 培地で 24 時間培養された酵母菌体を用いて、全タンパク質を抽出した。適宜、2 mM のクエン酸第二鉄アンモニウムを YPD 培地に添加した。YPD 培地で培養された菌体を、洗浄バッファー (10 mM Phosphate buffer, 2 mM EDTA, pH = 7.5) を用いて 2 度洗浄した。その後、抽出バッファー (100 mM Phosphate buffer, 2 mM MgCl₂, 1 mM ジチオトレイトール, pH = 7.5) に懸濁した。抽出バッファーに懸濁された酵母細胞を、200 μL の 0.5 mm 径ガラスビーズとともに Shake Master Neo (Biomedical Science, Tokyo, Japan) を用いて 1500 rpm で 5 分間振盪された。その後、21,000 × g、4 °C で 15 分間遠心分離を行い、上清を酵母の全タンパク質溶液として酵素活性測定に用いた。

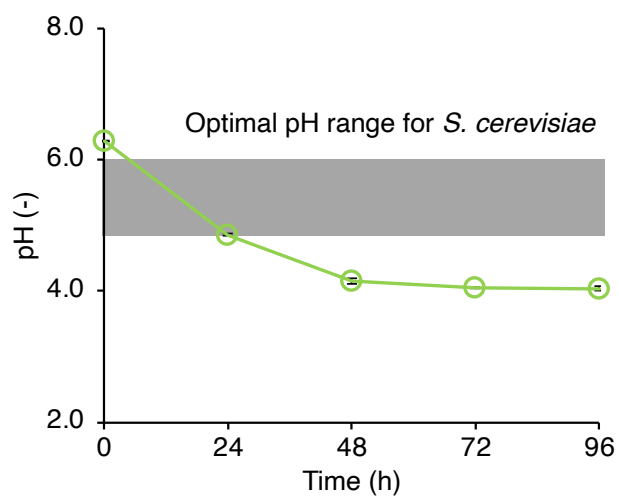
酵素反応の溶液 (400 μL; 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH = 8.0), 5 mM, MgCl₂, 12 mM D-xylonate, 50 μL 酵母の層タンパク質抽出溶液) を、30 °C で 10 分間インキュベートした。10 分後、酵素反応は 100 μL の 2 M HCl を加えて終結させた。50 μL の反応停止後の溶液に、125 μL の 25 mM 過ヨウ素酸溶液 (0.125 M H₂SO₄ に溶解) を加えて 20 °C で 20 分間反応させた。その後、250 μL の 2 % (w/v) 亜ヒ酸ナトリウム溶液 (0.5 M HCl に溶解) を加えることで反応を終結させた。最後に 0.3 % のチオバルビツール酸水溶液を 1 mL 添加し、100 °C で 10 分間インキュベートすることにより、赤色の発色団を生成させた。赤色発色団の発色強度を増強させるために、室温まで冷却した溶液に等量の DMSO を反応溶液に加えた。赤色発色団のモル吸光係数には $6.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて [41]、549 nm の吸光を測定することで XylID の比活性を算出した。

酵母細胞内外の pH 測定

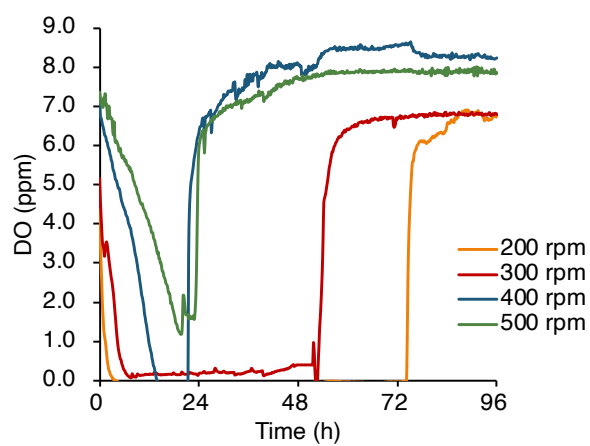
酵母細胞内の pH 測定法は、pH 感受性の緑色蛍光タンパク質 (GFP) の蛍光を指標とした手法を用いて行われた [42]。細胞内 pH の測定には、YPDX 培地で培養された sfpHluorin が導入された酵母株を用いた。pH 感受性の GFP である sfpHluorin を発現した酵母の励起スペクトルは、室温、石英キュベットを用いて蛍光分光器 F-2700 (HITACHI, Tokyo, Japan) により測定された。励起スペクトルの測定条件は、 $\lambda_{em} = 512 \text{ nm}$ 、スリット幅 10 nm、 $\lambda_{es} = 300$ から 500 nm、スリット幅 10 nm; スキャン速度 1500 nm/min であった。

また発酵培地中の pH は、コンパクト pH メーター LAQUA twin (HORIBA, Kyoto, Japan) を用いて測定された。

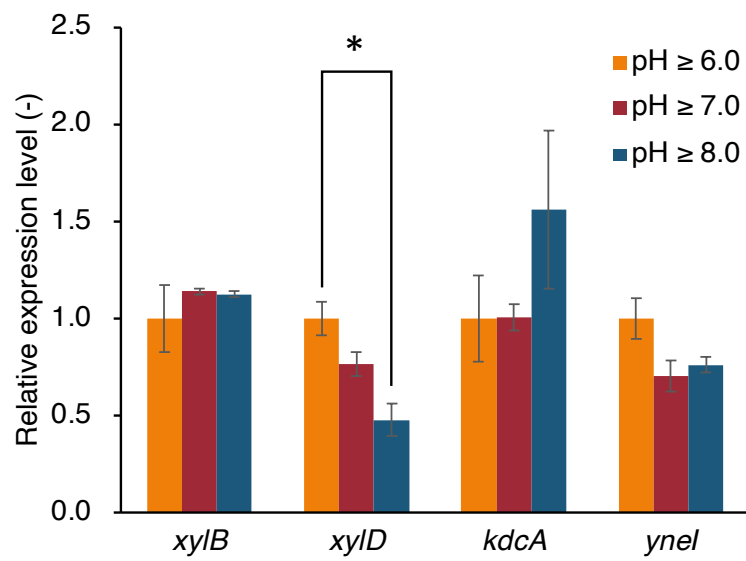
付録



補足図 5-1 BD δ K604-YneI 株三角フラスコ培養を用いた培養中における細胞外 pH の変化



補足図 5-2 バイオリアクターを用いた攪拌速度の変化が培地の溶存酸素量に与える影響



補足図 5-3 各 pH 条件がキシロースからの 3,4-ジヒドロキシ酪酸の生合成経路の遺伝子発現に与える影響

引用文献

- [1] T. Werpy and G. Petersen, "Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I -- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas," DOE/GO-102004-1992, 15008859, Aug. 2004. doi: 10.2172/15008859.
- [2] H. Dhamankar, Y. Tarasova, C. H. Martin, and K. L. J. Prather, "Engineering E. coli for the biosynthesis of 3-hydroxy- γ -butyrolactone (3HBL) and 3,4-dihydroxybutyric acid (3,4-DHBA) as value-added chemicals from glucose as a sole carbon source," *Metabolic Engineering*, vol. 25, pp. 72–81, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.ymben.2014.06.004.
- [3] C. H. Martin, H. Dhamankar, H.-C. Tseng, M. J. Sheppard, C. R. Reisch, and K. L. J. Prather, "A platform pathway for production of 3-hydroxyacids provides a biosynthetic route to 3-hydroxy- γ -butyrolactone," *Nature Communications*, vol. 4, no. 1, Dec. 2013, doi: 10.1038/ncomms2418.
- [4] L. Shen *et al.*, "A combined experimental and modelling approach for the Weimberg pathway optimisation," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 1098, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14830-y.
- [5] J. Wang, X. Shen, R. Jain, J. Wang, Q. Yuan, and Y. Yan, "Establishing a novel biosynthetic pathway for the production of 3,4-dihydroxybutyric acid from xylose in *Escherichia coli*," *Metabolic Engineering*, vol. 41, pp. 39–45, May 2017, doi: 10.1016/j.ymben.2017.03.003.
- [6] Y. Liu, X. Mao, B. Zhang, J. Lin, and D. Wei, "Modification of an engineered *Escherichia coli* by a combinatorial strategy to improve 3,4-dihydroxybutyric acid production," *Biotechnol Lett*, vol. 43, no. 10, pp. 2035–2043, Oct. 2021, doi: 10.1007/s10529-021-03169-z.
- [7] R. Fujiwara, S. Noda, T. Tanaka, and A. Kondo, "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for shikimate pathway derivative production from glucose–xylose co-substrate," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 279, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-019-14024-1.
- [8] K. W. Lu, C. T. Wang, H. Chang, R. S. Wang, and C. R. Shen, "Overcoming glutamate auxotrophy in *Escherichia coli* itaconate overproducer by the Weimberg pathway," *Metabolic Engineering Communications*, vol. 13, p. e00190, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.mec.2021.e00190.
- [9] C. Brüsseler, A. Späth, S. Sokolowsky, and J. Marienhagen, "Alone at last! – Heterologous expression of a single gene is sufficient for establishing the five-step Weimberg pathway in *Corynebacterium glutamicum*," *Metabolic Engineering Communications*, vol. 9, p. e00090, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.mec.2019.e00090.
- [10] B. Halmschlag *et al.*, "Comparison of Isomerase and Weimberg Pathway for γ -PGA Production From Xylose by Engineered *Bacillus subtilis*," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, p. 476, Jan. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2019.00476.
- [11] Y.-S. Tai *et al.*, "Engineering nonphosphorylative metabolism to generate lignocellulose-derived products," *Nature Chemical Biology*, vol. 12, no. 4, pp. 247–253, Feb. 2016, doi: 10.1038/nchembio.2020.
- [12] W. Bai *et al.*, "Engineering nonphosphorylative metabolism to synthesize mesaconate from lignocellulosic sugars in *Escherichia coli*," *Metabolic Engineering*, vol. 38, pp. 285–292, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.ymben.2016.09.007.

- [13] A. B. Bañares, G. M. Nisola, K. N. G. Valdehuesa, W.-K. Lee, and W.-J. Chung, "Understanding D-xylonic acid accumulation: a cornerstone for better metabolic engineering approaches," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 105, no. 13, pp. 5309–5324, Jul. 2021, doi: 10.1007/s00253-021-11410-y.
- [14] S. Y. Choi *et al.*, "One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in *Escherichia coli*," *Nature Biotechnology*, vol. 34, no. 4, pp. 435–440, Apr. 2016, doi: 10.1038/nbt.3485.
- [15] K.-K. Hong and J. Nielsen, "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 69, no. 16, pp. 2671–2690, Aug. 2012, doi: 10.1007/s00018-012-0945-1.
- [16] J. Sharma, V. Kumar, R. Prasad, and N. A. Gaur, "Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* as a consolidated bioprocessing host to produce cellulosic ethanol: Recent advancements and current challenges," *Biotechnology Advances*, vol. 56, p. 107925, May 2022, doi: 10.1016/j.biotechadv.2022.107925.
- [17] T. Bamba *et al.*, "Production of 1,2,4-butanetriol from xylose by *Saccharomyces cerevisiae* through Fe metabolic engineering," *Metabolic Engineering*, vol. 56, pp. 17–27, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.ymben.2019.08.012.
- [18] C. Borgström *et al.*, "Identification of modifications procuring growth on xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains carrying the Weimberg pathway," *Metabolic Engineering*, vol. 55, pp. 1–11, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.ymben.2019.05.010.
- [19] L. Wasserstrom, D. Portugal-Nunes, H. Almqvist, A. G. Sandström, G. Lidén, and M. F. Gorwa-Grauslund, "Exploring d-xylose oxidation in *Saccharomyces cerevisiae* through the Weimberg pathway," *AMB Express*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1186/s13568-018-0564-9.
- [20] L. Salusjärvi *et al.*, "Production of ethylene glycol or glycolic acid from D-xylose in *Saccharomyces cerevisiae*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 101, no. 22, pp. 8151–8163, Nov. 2017, doi: 10.1007/s00253-017-8547-3.
- [21] T. Yukawa, T. Bamba, G. Guirimand, M. Matsuda, T. Hasunuma, and A. Kondo, "Optimization of 1,2,4-butanetriol production from xylose in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of NADH/NADPH balance," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 118, no. 1, pp. 175–185, Jan. 2021, doi: 10.1002/bit.27560.
- [22] A. Kumánovics *et al.*, "Identification of FRA1 and FRA2 as Genes Involved in Regulating the Yeast Iron Regulon in Response to Decreased Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Synthesis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 16, pp. 10276–10286, Apr. 2008, doi: 10.1074/jbc.M801160200.
- [23] M. Andberg *et al.*, "Characterization and mutagenesis of two novel iron–sulphur cluster pentonate dehydratases," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no. 17, pp. 7549–7563, Sep. 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7530-8.
- [24] M. C. M. Hensing, K. A. Bangma, L. M. Raamsdonk, E. de Hulster, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk, "Effects of cultivation conditions on the production of heterologous α -galactosidase by *Kluyveromyces lactis*," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 43, no. 1, pp. 58–64, Apr. 1995, doi: 10.1007/BF00170623.

- [25] O. de Smidt, J. C. du Preez, and J. Albertyn, "The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review," *FEMS Yeast Research*, vol. 8, no. 7, pp. 967–978, Nov. 2008, doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00387.x.
- [26] C. Larroy, M. R. Fernández, E. González, X. Parés, and J. A. Biosca, "Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction," *Biochem J*, vol. 361, no. Pt 1, pp. 163–172, Jan. 2002.
- [27] C. Larroy, X. Parés, and J. A. Biosca, "Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family," *European Journal of Biochemistry*, vol. 269, no. 22, pp. 5738–5745, Nov. 2002, doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03296.x.
- [28] W. Niu, M. N. Molefe, and J. W. Frost, "Microbial Synthesis of the Energetic Material Precursor 1,2,4-Butanetriol," p. 2, 2003.
- [29] M. Toivari *et al.*, "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of d-xylose to d-xylonate," *Metabolic Engineering*, vol. 14, no. 4, pp. 427–436, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.ymben.2012.03.002.
- [30] R. Orij, J. Postmus, A. Ter Beek, S. Brul, and G. J. Smits, "In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth," *Microbiology*, vol. 155, no. 1, pp. 268–278, Jan. 2009, doi: 10.1099/mic.0.022038-0.
- [31] H. Gao, Y. Gao, and R. Dong, "Enhanced biosynthesis of 3,4-dihydroxybutyric acid by engineered *Escherichia coli* in a dual-substrate system," *Bioresource Technology*, vol. 245, pp. 794–800, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.09.017.
- [32] A. Yep, G. L. Kenyon, and M. J. McLeish, "Determinants of substrate specificity in KdcA, a thiamin diphosphate-dependent decarboxylase," *Bioorganic Chemistry*, vol. 34, no. 6, pp. 325–336, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.bioorg.2006.08.005.
- [33] T. Fuhrer, L. Chen, U. Sauer, and D. Vitkup, "Computational Prediction and Experimental Verification of the Gene Encoding the NAD⁺/NADP⁺-Dependent Succinate Semialdehyde Dehydrogenase in *Escherichia coli*," *J Bacteriol*, vol. 189, no. 22, pp. 8073–8078, Nov. 2007, doi: 10.1128/JB.01027-07.
- [34] J. H. Ahn *et al.*, "Enhanced succinic acid production by *Mannheimia* employing optimal malate dehydrogenase," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 1970, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15839-z.
- [35] J. Ishii *et al.*, "A Simple and Immediate Method for Simultaneously Evaluating Expression Level and Plasmid Maintenance in Yeast," *The Journal of Biochemistry*, vol. 145, no. 6, pp. 701–708, Jun. 2009, doi: 10.1093/jb/mvp028.
- [36] K. Inokuma *et al.*, "Improving the functionality of surface-engineered yeast cells by altering the cell wall morphology of the host strain," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 105, no. 14–15, pp. 5895–5904, Aug. 2021, doi: 10.1007/s00253-021-11440-6.
- [37] K. Inokuma, M. Matsuda, D. Sasaki, T. Hasunuma, and A. Kondo, "Widespread effect of N-acetyl-d-glucosamine assimilation on the metabolisms of amino acids,

- purines, and pyrimidines in *Scheffersomyces stipitis*,” *Microb Cell Fact*, vol. 17, Sep. 2018, doi: 10.1186/s12934-018-0998-4.
- [38] T. Hasunuma, F. Kikuyama, M. Matsuda, S. Aikawa, Y. Izumi, and A. Kondo, “Dynamic metabolic profiling of cyanobacterial glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion,” *Journal of Experimental Botany*, vol. 64, no. 10, pp. 2943–2954, Jul. 2013, doi: 10.1093/jxb/ert134.
- [39] K. Inokuma, H. Kurono, R. den Haan, W. H. van Zyl, T. Hasunuma, and A. Kondo, “Novel strategy for anchorage position control of GPI-attached proteins in the yeast cell wall using different GPI-anchoring domains,” *Metabolic Engineering*, vol. 57, pp. 110–117, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.ymben.2019.11.004.
- [40] M. Reifenrath and E. Boles, “A superfolder variant of pH-sensitive pHluorin for in vivo pH measurements in the endoplasmic reticulum,” *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 11985, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-30367-z.

第6章 系統分類法による高活性酵素の同定と Dahms pathway および Weimberg pathway の構築

1. 緒言

これまで、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした場合、酸化キシロース代謝経路は、1,2,4-ブタントリオール、3,4-ジヒドロキシ酪酸、エチレングリコールおよびグリコール酸の生産に用いられてきた。酸化キシロース代謝経路を介した細胞増殖が達成されれば、3,4-ジヒドロキシ酪酸などのキシロースに由来する化合物のみならず、イタコン酸 [8]、メサコン酸 [12]、ムコン酸などの芳香族化合物 [7] など、微生物内在の代謝経路を介した化合物生産が可能になる。よって、非可食性バイオマスを原料としたバイオプロセスの宿主として期待される *S. cerevisiae* を宿主に、Dahms pathway や Weimberg pathway を構築することが求められている。

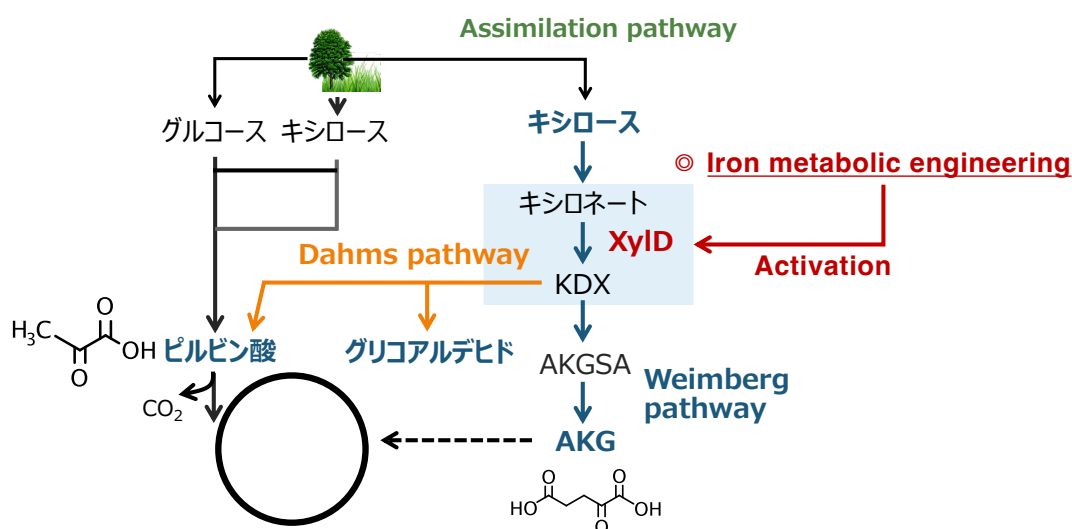


図 6-1 鉄代謝工学による XylID 高活性化に基づく Dahms pathway および Weimberg pathway の構築

XylB ; Xylose dehydrogenase, XylD ; Xylonate dehydratase, XylX ; 2-keto-3-deoxy-xylonate dehydratase, KsaD ; 2-ketoglutarate semialdehyde dehydrogenase, YagE ; 2-keto-3-deoxy-xylonate aldolase.

Dahms pathway では、まず、キシロースは、キシロースデヒドロゲナーゼ XylB によりキシロノラクトンに変換され、キシロノラクトンは酵母内で自発的にキシロネートに変換される。次に、キシロネートはキシロネートデヒドラターゼ XylD によって KDX に変換され、KDX は KDX アルドラーゼによりピルビン酸とグリコアルデヒドに変換される。また、Weimberg pathway では、KDX は、KDX デヒドラターゼ (XylX) により α-ケトグルタル酸セミアルデヒド (AKGSA) へと変換される。そして、AKGSA は AKGSA デヒドロゲナーゼ (XylA, KsaD) により α-ケトグルタル酸 (AKG) へ変換される (図 6-1)。

酵母 *S. cerevisiae* を宿主とした Weimberg pathway の構築では、 α -ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ XylA の検討が行われてきた。先行研究では、強力な恒常発現型の *FBA1* プロモーターの制御下で *xylA* を発現させた場合、*xylA* の転写産物である mRNA は確認されたが [19]、何らかの要因で mRNA の翻訳産物である XylA のタンパク質がほとんど確認されなかった [18]。この *Caulobacter crescentus* 由来の XylA に変わる酵素として、AKGSA を AKG に変換する酵素 *Corynebacterium glutamicum* 由来の KsaD が選択された [9]。その結果、*C. glutamicum* 由来の KsaD は、*S. cerevisiae* を宿主に発現可能であることが実証された [18]。その結果、グルコースおよびキシロースを含む培地で培養された組換え酵母の乾燥菌体重量が増加することが示された。しかしながら、キシロースを単一の炭素源とした場合には、細胞増殖は確認されなかった [18]。

本研究では、*S. cerevisiae* を宿主とし、酸化キシロース代謝経路を介したキシロースを単一の炭素源とした細胞増殖を目指した。筆者らは、*S. cerevisiae* を宿主に鉄硫黄タンパク質である XylD を活性な状態で発現するため、*BOL2* の破壊や *tTYW1* の過剰発現により酵母の鉄イオンの取り込みを促進する鉄代謝工学と呼ばれる手法が開発された [17]。*S. cerevisiae* を宿主とした Dahms pathway や Weimberg pathway の構築では、*BOL2* の破壊による XylD の高活性化が行われてきた [18], [20]。*BOL2* のみの破壊と比較して、*BOL2* の破壊および *tTYW1* の過剰発現の組み合わせではより XylD 活性が向上するため [17]、Dahms pathway や Weimberg pathway を介した細胞増殖を可能にすることが可能性がある。特に、Weimberg pathway の構築に関して、KDX デヒドラターゼ XylX やキシロネートデヒドラターゼ XylD の酵素ライブラリを作成し、酵素活性と細胞増殖の関係性を明らかにした。

2. 出芽酵母に対する酸化キシロース代謝経路の導入

2.1. Dahms pathway の導入

出芽酵母に酸化キシロース代謝経路である Dahms pathway を構築するため、本研究ではキシロースがキシリトールに変換されるのを防ぐため、*S. cerevisiae* YPH499 株を用いた。YPH499 株のキシロースレダクターゼ *GRE3* を破壊された YPH499 Δ GRE3 株に対して、*TDH3* プロモーターの制御下に *Caulobacter crescentus* 由来の *xylB* と、*SED1* プロモーターの制御下に *C. crescentus* 由来の *xylD* が導入された BD 株を使用した [17]。XylD を活性な状態で発現するため、BD 株に *BOL2* の破壊および *tTYW1* の過剰発現が行われた BD Δ BtT 株に対して、BD Δ BtT 株に *E. coli* 由来の *yagE* を導入した BD Δ BtT-E 株を作成した。

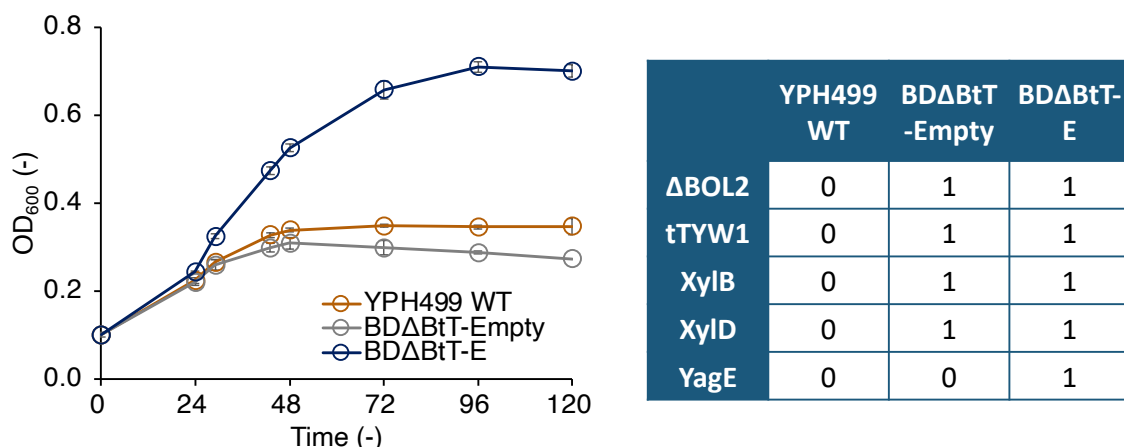


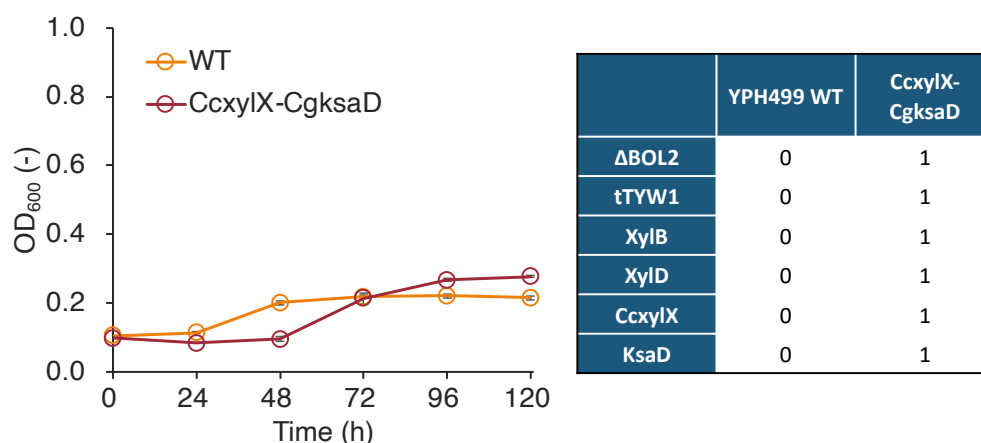
図 6-2 Dahms pathway 導入酵母によるキシロースからの生育試験の結果

増殖試験は 20 g/L のキシロースを単一の炭素源として含む培地で行われた。表は、各酵母株の遺伝子型を示している。

YPH499 WT 株、BDΔBtT 株に空ベクターが導入された BDΔBtT-empty 株、および Dahms pathway が導入された BDΔBtT-E 株を、キシロースを単一の炭素源として含む培地で培養した結果を図 6-2 に示す。初期 $OD_{600} = 0.1$ で培養を開始し、YPH499 の野生株および BDΔBtT 株では、培養 120 時間後の OD_{600} はそれぞれ 0.34 および 0.27 であった。BDΔBtT-E 株は 24 時間以降に OD_{600} が増加し、120 時間後の OD_{600} は 0.70 であった。このことから、Dahms pathway が導入された BDΔBtT-E 株は、キシロースを単一炭素源とした細胞増殖が可能であることが示された。

2.2. Weimberg pathway の導入

図 6-2 に示したように、大腸菌 *E. coli* を宿主とした場合のみならず、酵母 *S. cerevisiae* を宿主に用いた場合においても、キシロースを単一の炭素源として Dahms pathway を介した細胞増殖が可能であることを明らかにした。続いて、筆者らは、Weimberg pathway の構築を目指した。Weimbrg pathway を構成する酵素として、*C. crescentus* 由来の XylB、XylD、XylX、および *C. glutamicum* 由来の KsaD が導入された BDΔBtT-ksaD-CcxyIX 株を用いて、Weimberg pathway を介したキシロースからの細胞増殖が可能かを検証することとした



**図 6-3 Weimberg pathway が導入された酵母によるキシロースからの細胞増殖試験の結果
(オレンジ: WT 株, 赤:BD Δ BtT-ksaD-CcxyIX 株)**

増殖試験は 20 g/L のキシロースを単一の炭素源として含む培地で行われた。表は、各酵母株の遺伝子型を示している。

YPH499、BD Δ BtT-ksaD-CcxyIX 株を、20 g/L のキシロースを単一の炭素源として含む培地で培養した結果を図 6-3 に示す。YPH499 の野生株、および Weimberg pathway が導入された鉄代謝改変株である BD Δ BtT-ksaD-CcxyIX 株ともに、キシロースを単一炭素源として含む培地での細胞増殖は確認されなかった。

3. 出芽酵母を宿主とした Weimberg pathway 構築に資する酵素同定

3.1. XylIX の系統分類による Weimberg pathway を介したキシロースを単一炭素源とした細胞増殖の実現

これまで、酸化キシロース代謝経路である Weimberg pathway を構成するキシロースデヒドロゲナーゼ XylB [29], [43]、キシロネートデヒドラターゼ XylD [17], [19]、AKGSA デヒドロゲナーゼ XylA および KsaD [18]が酵母 *S. cerevisiae* を宿主に導入され、キシロースからの代謝動態が調査された。一方で、酵素反応に関わるパラメータや動的な挙動の解明は必要不可欠であるが、その知見は不足している [44]。特に、これまで多様な生物種由来の酵素が導入されてきたのに関わらず、KDX から AKGSA への反応を触媒する KDX デヒドラターゼには *C. crescentus* 由来の酵素 XylIX のみが導入されてきた。Weimberg pathway のその他の酵素と比較して、酵素 XylIX の *in vitro* での反応速度 K_{cat} および基質特異性が低く [11], [44]、*S. cerevisiae* においてもこの反応が律速である可能性がある。

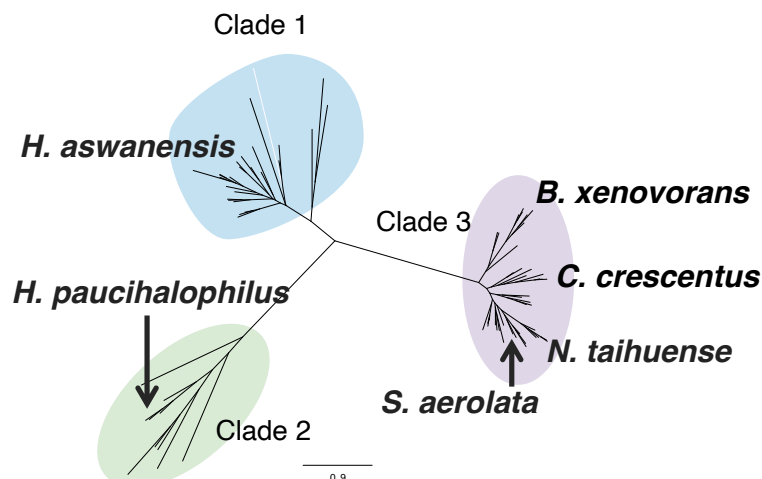


図 6-4 KDX デヒドラターゼ XylIX の系統樹解析

そこで本研究では、酵素 XylIX のライブラリを構築し、*S. cerevisiae* を宿主とした Weimberg pathway に与える影響を調査することとした。酵素 XylIX のライブラリを構築するために、階層的クラスタリング手法の 1 つである系統樹解析を用いた。系統樹解析手法は、対象となる酵素のアミノ酸配列の特徴に基づいて分類する手法であり、代謝工学において、より優れた酵素の同定に有効である [45], [46]。図 6-4 に示すように、酵素 XylIX は 3 つの Clade に分けられた。本件研究では、系統樹解析の結果に基づき、Clade 1 から *Halopiger aswanensis*、Clade 2 から *Halalkalicoccus paucihalophilus*、Clade 3 から *Burkholderia xenovorans*、*Sphingomonas aerolata*、あるいは *Novosphingobium taihuense* 由来の異なるアミノ酸配列を持つ XylIX を以降の研究に用いた。それぞれの xylIX を、*C. crescentus* 由来の XylB、XylD および *C. glutamicum* 由来の KsaD が導入された BDΔBtT-ksaD 株に導入し、キシロースを単一の炭素源として含む培地で培養した。

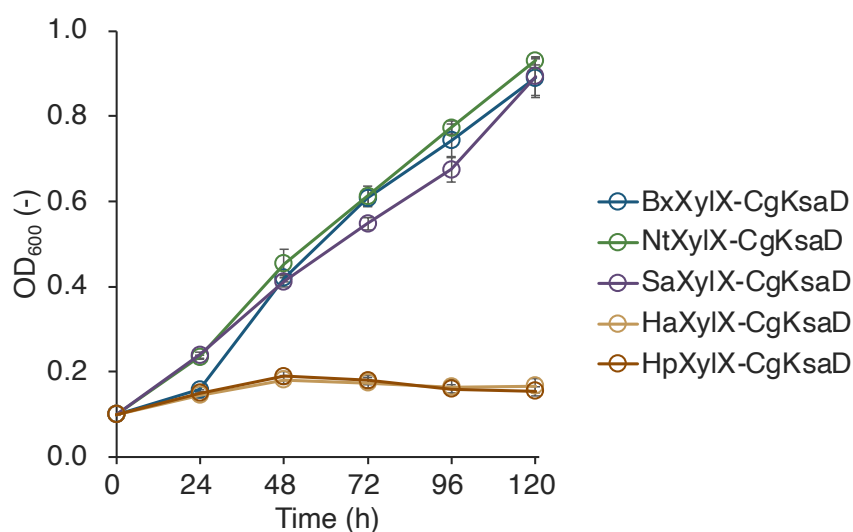


図 6-5 それぞれの KDX デヒドラターゼ XylIX を含む Weimberg pathway を介したキシロースからの細胞増殖

酵母の増殖試験は 20 g/L のキシロースを単一の炭素源として含む培地で行われた。エラーバーは、独立した 2 つ以上の実験における標準偏差を示している。

図 6-5 に示すように、Clade 1 に属する *H. aswanensis* 由来の XylIX、および Clade 2 に属する *H. paucihalophilus* 由来の XylIX を含む Weimberg pathway が導入された酵母株では、YPH499 の WT の増殖と比較して（図 6-3）、キシロースからの細胞増殖は確認されず、120 時間後の OD₆₀₀ は 0.17 および 0.15 であった。一方、Clade 3 に属する *B. xenovorans*、*S. aerolata*、*N. taihuense* 由来の xylIX を含む Weimberg pathway が導入された酵母株では、キシロースを炭素源とした細胞増殖が見られ、120 時間培養後の OD₆₀₀ は、0.89、0.93、0.89 に到達した。

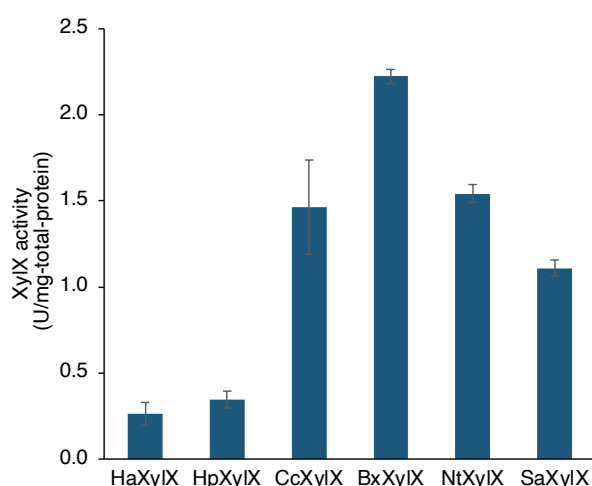


図 6-6 それぞれの生物種由来の XylIX の KDX デヒドラターゼ活性

XylIX の活性測定は、KDX を基質とした場合に酵素 XylIX によって生成した AKGSA が、酵母に発現された酵素 KsaD によって AKG に変換される際に放出される NADH の波長 340 nm の吸光によって測定された。エラーバーは、独立した 3 つの実験からの標準偏差を示している。

このように、Clade 3 に属する酵素のうち、*B. xenovorans*、*S. aerolata*、*N. taihuense* 由来の XylIX によって、キシロースを単一の炭素源とした細胞増殖が可能であった。一方、Clade 3 に属する *C. crescentus*、Clade 1 に属する *H. aswanensis*、Clade 2 に属する *H. paucihalophilus* 由来の xylIX が導入された酵母株は、キシロース培地で細胞増殖しなかった。キシロース代謝による細胞増殖と XylIX の酵素活性の関連性を調査すべく、本研究で用いたそれぞれの酵素 XylIX が有する KDX デヒドラターゼ活性を測定した。図 6-6 に示すように、Clade 1 に属する *H. aswanensis* 由来の XylIX、Clade 2 に属する *H. paucihalophilus* 由来の XylIX の KDX デヒドラターゼは、それぞれ 0.26 および 0.35 U/mg-total protein であった。このように、Clade 1 および 2 に属する *H. aswanensis* や *H. paucihalophilus* 由来の酵素 XylIX では、その酵素活性が低いため、キシロースを Weimberg pathway を介して代謝することが出来なかったことが示唆された。一方、Clade 3 に属する酵素のうち、*C. crescentus*、*B. xenovorans*、*S. aerolata*、*N. taihuense* 由来の XylIX の

KDX デヒドラターゼ活性は、それぞれ 1.46、2.22、1.54、および 1.11 0.35 U/mg-total protein であった。驚くべきことに、Clade 3 に属する *C. crescentus* 由来の XylIX は、同じく Clade 3 に属する *S. aerolata* あるいは *N. taihuense* 由来の XylIX と比較して KDX でデヒドラターゼ活性が高いにもかかわらず、キシロースを Weimberg pathway を介して細胞増殖に用いることができなかった（図 6-3）

3.2. XylIA の系統分類による Weimberg pathway を介した有用酵素スクリーニング系の確立

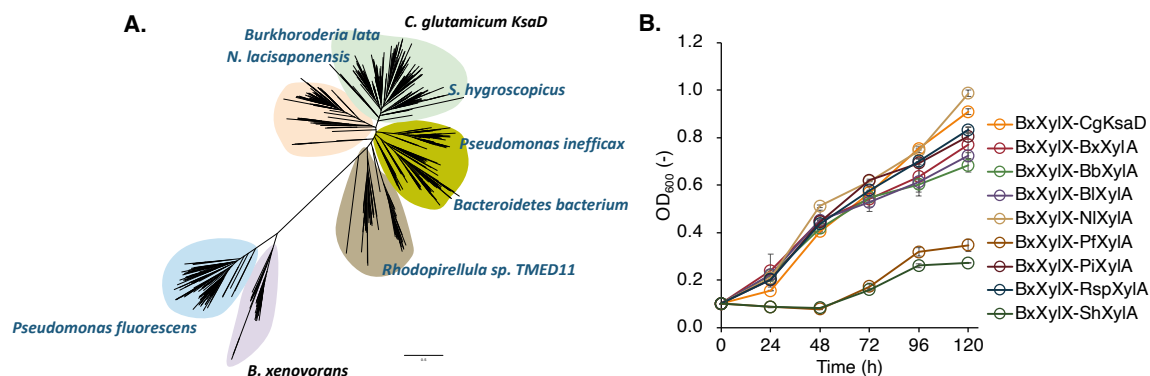


図 6-7 XylIA の系統樹解析 (A.) および XylIA 導入株を用いたキシロース培地での増殖試験
酵母の増殖試験は 20 g/L のキシロースを単一の炭素源として含む培地で行われた。エラーバーは、独立した 2 つ以上の実験における標準偏差を示している。

次に、KDX から酵素 XylIX により合成される AKGSA を AKG に変換する酵素 XylIA の検討を行った。XylIX と同様に、NCBI に登録されている全ての XylIA のアミノ酸配列に対して系統分類解析を行った結果を図 6-7A に示す。それぞれの Clade から、1 つのアミノ酸配列を選択し、それぞれの XylIA を含む酵母株を作成した。選択された XylIA の生物種は、*C. glutamicum* 由来の KsaD および *B. xenovorans* 由来の XylIA に加え、*Asticcacaulis endophyticus*、*Streptomyces hygroscopicus*、*Pseudomonas inefficax*、*Bacteroidetes bacterium*、*Rhodopirellula sp. TMED11*、*Pseudomonas fluorescens*、*Sphingomonas aurantiaca*、*Rhodobacteraceae bacterium*、*Burkholderia lata* を選択した。作成した XylIA 導入酵母をキシロースを単一の炭素源として含む培地で培養した結果を図 6-7B に示す。それぞれの XylIA が導入された組換え酵母は、キシロースを炭素源に様々な増殖能を示した。興味深いことに、Weimberg pathway の KDX 以降の反応において、*B. xenovorans* 由来の XylIX および XylIA が導入された酵母と比較して、*B. xenovorans* 由来の XylIX と *C. glutamicum* 由来の KsaD が導入された酵母や、*B. xenovorans* 由来の XylIX と *N. lacisaponensis* 由来の XylIA が導入された酵母の方が、キシロース培地での細胞増殖能が高いことが分かった。これは、ある特定の生物種から Weimberg pathway を構成する遺伝子を、オペロンごと酵母に導入するよりも、異なる酵素の組み合わせを検討する方が、出芽酵

母 *S. cerevisiae* を宿主とした Weimberg pathway の構築に資することを示唆している。このように、Weimberg pathway が導入された酵母を用いた細胞増殖は、キシロースを細胞増殖に用いるのみならず、優れた酵素の組み合わせを、細胞増殖を指標に簡便にスクリーニングすることをも可能にした。

4. Weimberg pathway 導入酵母株の混合糖培地での培養試験

酵母 *S. cerevisiae* を宿主に酸化的キシロース代謝経路を構築した際には、キシロネートから KDX への反応が律速段階となり、培地中にキシロネートが多量に蓄積することが知られている。また、先行研究では、キシロース培地で増殖しない酵母でも、グルコースとキシロースの混合糖培養の条件では、培養後に得られる菌体重量が増加することが報告されている [18]。筆者らは、*S. cerevisiae* を宿主とした Weimberg pathway を介したキシロース代謝をさらに理解するため、それぞれの生物種由来の XylIX を含む Weimberg pathway が導入された組換え酵母をグルコースとキシロースを含む培地で培養し、細胞増殖および培地中へのキシロネート蓄積量の変化を確認した。

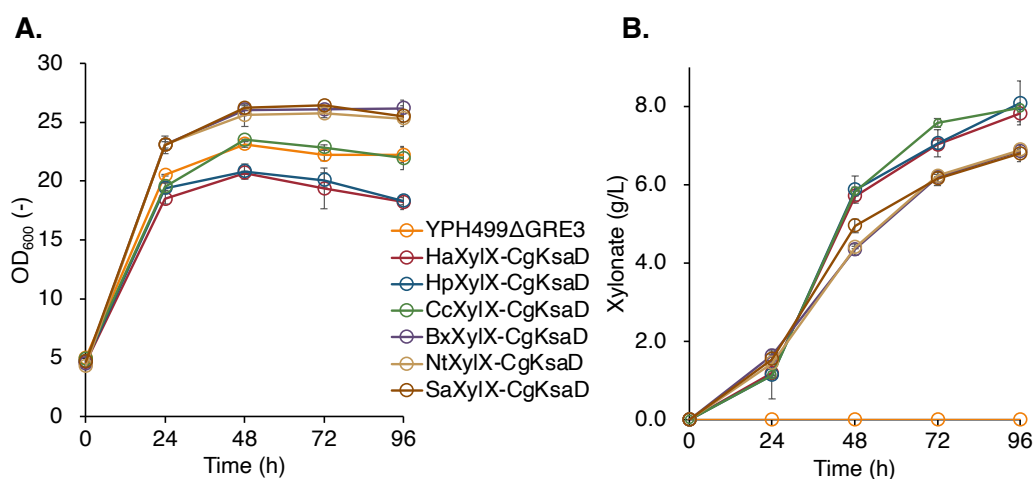


図 6-8 Weimberg pathway が導入された酵母株によるグルコースとキシロースの混合糖培養による細胞増殖 (OD₆₀₀, A.) およびキシロネートの蓄積量 (B.)

酵母の培養試験は 10 g/L のグルコースと 10 g/L のキシロースを含む培地で行われた。エラーバーは、独立した 2 つ以上の実験における標準偏差を示している。

図 6-8A に示すように、まず、キシロースを代謝することができない YPH499 株では、初期 OD₆₀₀ が 5.0 時点から増殖し、96 時間後の OD₆₀₀ は 22.2 であった。Clade 1 に属する *H. aswanensis* 由来の XylIX、Clade 2 に属する *H. paucihalophilu* 由来の XylIX を含む Weimberg pathway が導入された酵母株では増殖能は低下し、96 時間時点での OD₆₀₀ 18.2 および 18.3 であった。これらの株では、キシロースを Weimberg pathway を介して代謝することで、細胞増殖能が低下した。Clade 3 に属する *C. crescentus* 由来の酵素 XylIX を含む Weimberg pathway が導入された酵母は、YPH499ΔGRE3 株と同程度の細胞増殖を示し、96 時間後の OD₆₀₀ は 21.9 であった。

YPH499ΔGRE3 株のグルコースからの細胞増殖能と比較して、Clade 3 に属する酵素のうち、*B. xenovorans*, *S. aerolata*, *N. taihuense* 由来の XylIX を含む Weimberg pathway が導入された酵母では、高い細胞増殖能を示した。

次に、培地中へのキシロネートの蓄積量に関して、Clade 1 に属する *H. aswanensis*、Clade 2 に属する *H. paucihalophilus*、Clade 3 に属する *C. crescentus* 由来の xylIX が導入された酵母株では、96 時間後で 7.8、8.1、および 8.0 g/L のキシロネートが培地中に放出されていた（図 6-8B）。一方、Clade 3 に属する *B. xenovorans*, *S. aerolata*, *N. taihuense* 由来の酵素 XylIX の導入によって、キシロネートの蓄積量は減少し、96 時間後に 6.9、6.9、および 6.8 g/L であった。このように、キシロースを単一の炭素源として細胞増殖が可能な酵母株では、Weimberg pathway を介してキシロースを効率良く代謝することが可能であった。しかしながら、これらの酵母株においても、投入したキシロースのうち、48.0 から 48.9 %のキシロネートが培地中に蓄積していた。

5. 系統分類法による高活性酵素 XylID の同定

図 6-8B に示したように、未だキシロースから 5.9 g/L のキシロネートが培地中に蓄積していた。これは、Weimberg pathway を構成する酵素探索により酵母を宿主とした Weimberg pathway の構築に成功した一方で、その代謝フラックスは十分でないことが示唆されている。Weimberg pathway を構成する酵素のうち、酸化キシロース代謝経路を構成する酵素のうち、キシロネートから 2-ケト-3-デオキシキシロネート（KDX）への反応を触媒する酵素 XylID が活性に鉄硫黄クラスターを要する鉄硫黄タンパク質であることが知られている [23]。酵母 *S. cerevisiae* を宿主に酵素 XylID を発現させた場合には、活性な状態で発現させることが困難であり、律速段階の反応となることが知られている [17], [18], [20], [47]。そのため、酸化キシロース代謝経路が導入された酵母は、キシロースから変換されたキシロネートを培地中に多量に放出してしまう。そこで、酵素 XylID に関して、*Caulobacter. crescentus* 由来の XylID、そのホモログである *Burkholderia cenocepacia*、*Haloferax volcanii*、あるいは *Ellin329 bacterium* 由来の XylID 酵素 [19]、*Escherichia coli* 由来のキシロネートデヒドラターゼ YjhG が *S. cerevisiae* に導入されてきた [17], [19]。しかしながら、これらの酵素は、*C. crescentus* 由来の XylID と比較して、細胞増殖能や化合物の生産性などが向上することはなかった。酵素 XylID は、約 6000 ものアミノ酸配列が NCBI に登録されており、この中に *C. crescentus* 由来の XylID と比較して、より高い活性を示す XylID が存在する可能性は残されている。XylID 活性が向上すれば、更なるキシロースからの細胞増殖能の向上や物質生産への応用が可能になると考え、研究を進めた。

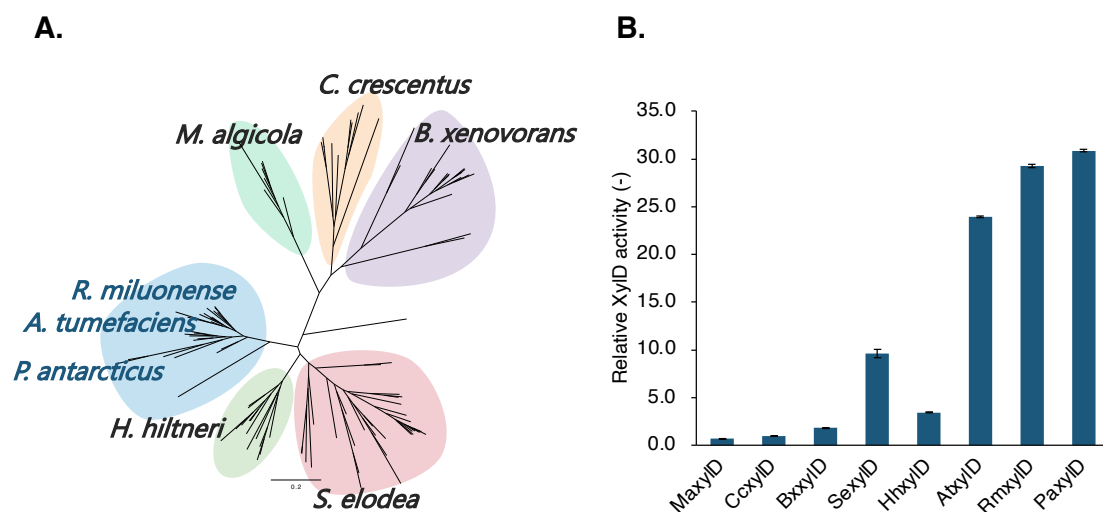


図 6-9 XylID の系統樹解析 (A.) およびそれぞれの生物種由来酵素の XylID 活性 (B)

XylID の活性測定は、チオバルビツール酸を用いた方法で行われた。エラーバーは、独立した 2 つの実験からの標準偏差を示している。

図 6-9A に、IlvD/EDD ファミリーに属するキシロネートデヒドラターゼの系統樹解析の結果を示した。その結果、それぞれの酵素のアミノ酸配列に従って、6 つの Clade に分類された。6 つの Clade の中からそれぞれ、*Marinovum algicola*、*Caulobacter crescentus*、*Burkholderia xenovorans*、*Herbaspirillum hiltneri*、*Sphingomonas elodea*、*Agrobacterium tumefaciens* 由来の XylID を選択した。選択された酵素 XylID を、*BOL2* の破壊および *tTYW1* の過剰発現により鉄代謝機構の改変された酵母 *S. cerevisiae* に発現させ、*in vitro* で酵素活性測定を行った。その結果、従来用いられてきた *C. crescentus* 由来の酵素 XylID と比較して、*B. xenovorans*、*H. hiltneri*、*S. elodea*、*A. tumefaciens* 由来の XylID は、1.85、9.62、3.46、および 23.9 倍高い酵素活性を示した (図 6-9B)。これらの中から最も高い XylID 活性を示した *A. tumefaciens* 由来の XylID を含む Clade から、さらに *Rhizobium miluonense* あるいは *Pseudooceanicola antarcticus* 由来の XylID を選択し、追加で活性測定を行った。その結果、*R. miluonense* および *P. antarcticus* 由来の XylID は、*C. crescentus* 由来の酵素と比較して、29.2 倍および 30.8 倍高い活性を示した (図 6-9B)。

7. 考察

非可食性バイオマスを原料としたバイオプロセスにおいて、キシロースを効率良く細胞増殖や物質生産に用いることは極めて重要である。本研究では、系統分類法による高活性酵素の同定に基づき、*S. cerevisiae* を宿主に、Dahms pathway や Weimberg pathway を介したキシロースを単一炭素源とした細胞増殖を初めて報告した（図 6-2 および 6-5）。酸化的キシロース代謝経路を構築する上で課題として挙げられていたキシロネートの蓄積量を減少させた。加えて、キシロネートから KDX への反応を触媒する酵素 XylID に関して、従来まで用いられてきた *C. crescentus* 由来の XylID と比較して、約 30 倍高い活性を示す *R. miluonense* および *P. antarcticus* 由来の XylID を新たに同定した。高活性な酵素 XylID によって、酸化的キシロース代謝経路によるキシロースをより効率的に細胞増殖や物質生産に用いることが期待される。

Weimberg pathway を介したキシロース代謝に関して、Clade 3 に属する酵素のうち、*C. crescentus* 由来の XylIX を含む Weimberg pathway が導入された酵母株では細胞増殖が見られなかった（図 6-3）。これは、先行研究と一致する結果である [18], [19]。一方で、図 6-6 に示すように、Clade 3 に属する *C. crescentus* 由来の XylIX は、細胞増殖を可能にした Clade 3 の *B. xenovorans*、*S. aerolata*、および *N. taihuense* 由来の酵素 XylIX と少なくとも同程度の活性を示しており、この結果は非常に興味深い。先行研究では、KDX デヒドラターゼの活性が、Weimberg pathway の中間代謝物であるキシロネートによって阻害されることが明らかとなっている。*S. cerevisiae* を宿主とした酸化的キシロース代謝経路の構築では、XylID の活性が低いため、細胞内外にキシロネートが多量に蓄積する [4], [20]。よって、*S. cerevisiae* 内に発現された CcXylIX の活性が細胞内の高濃度のキシロネートによって阻害された結果、キシロースを細胞増殖に用いることができなかったと考えられる。

実験操作

プラスミドの作成

表 6-1 本研究で用いたプラスミド

Plasmid name	Description
pTS-A-xylBD	pTDH3-xylB, pSED1-xylD, ADE2 marker
pIAur-tTYW1	PGK1p-tTYW1-PGK1t, AUR1-C marker
pLL-pTDH3 tADH1	pTDH3-tADH1, LEU2 marker
pLL-pTDH3-yagE	pTDH3-yagE-tADH1, LEU2 marker
pIU-pTDH3-tADH1	pTDH3-tADH1, URA3 marker
pIU-pTDH3-CgksaD	pTDH3-CgksaD-tADH1, URA3 marker
pLL-pSED1-tSAG1	pSED1p-tSAG1, LEU2 marker
pLL-pSED1-HaxylX-tSAG1	pSED1p-HaxylX-tSAG1, LEU2 marker
pLL-pSED1-HpxylX-tSAG1	pSED1p-HpxylX-tSAG1, LEU2 marker
pLL-pSED1-CcxylX-tSAG1	pSED1p-CcxylX-tSAG1, LEU2 marker
pLL-pSED1-BxxylX-tSAG1	pSED1p-BxxylX-tSAG1, LEU2 marker
pLL-pSED1-NtxylX-tSAG1	pSED1p-NtxylX-tSAG1, LEU2 marker
pLL-pSED1-SaxylX-tSAG1	pSED1p-SaxylX-tSAG1, LEU2 marker
pIA-pTDH3-tADH1	pTDH3-tADH1, ADE2 marker
pIA-pTDH3-xylB	pTDH3-xylB-tADH1, ADE2 marker
pGK406	Empty vector, URA3 marker

pIU-pTDH3-BxxylA	pTDH3-BxxylA-tADH1, URA3 marker
pIU-pTDH3-AexylA	pTDH3-AexylA-tADH1, URA3 marker
pIU-pTDH3-ShxylA	pTDH3-ShxylA-tADH1, URA3 marker
pIU-pTDH3-PixylA	pTDH3-PixylA-tADH1, URA3 marker
pIU-pTDH3-BbxylA	pTDH3-BbxylA-tADH1, URA3 marker
pIU-pTDH3-RspxylA	pTDH3-RspxylA-tADH1, URA3 marker
pIU-pTDH3-PfxylA	pTDH3-PfxylA-tADH1, URA3 marker
pIU-pTDH3-SaxylA	pTDH3-SaxylA-tADH1, URA3 marker
pIU-pTDH3-RbxylA	pTDH3-RbxylA-tADH1, URA3 marker
pIU-pTDH3-BlxylA	pTDH3-BlxylA-tADH1, URA3 marker
pIU-pSED1-tSAG1	pSED1p-tSAG1, URA3 marker
pIU-pSED1-MaxyID	pSED1p-MaxyID-tSAG1, URA3 marker
pIU-pSED1-CcxyID	pSED1p-CcxyID-tSAG1, URA3 marker
pIU-pSED1-BxxylID	pSED1p-BxxylID-tSAG1, URA3 marker
pIU-pSED1-HexylID	pSED1p-HexylID-tSAG1, URA3 marker
pIU-pSED1-SexylID	pSED1p-SexylID-tSAG1, URA3 marker
pIU-pSED1-AtxyID	pSED1p-AtxyID-tSAG1, URA3 marker
pIU-pSED1-RmxyID	pSED1p-RmxyID-tSAG1, URA3 marker
pIU-pSED1-PaxyID	pSED1p-PaxyID-tSAG1, URA3 marker

p2gRNA-CCW12	2μ ori URA3 pSNR52–gRNA for CCW12–tSUP4
pGK426-ADE2	2μ ori URA3 pSNR52–gRNA for ADE2–tSUP4
pGK426-ARS208	2μ ori URA3 pSNR52–gRNA for ARS208–tSUP4
pCL-Cas9	LEU2, PTEF1, Cas9, TCYC1
plcas-ADE2	homologous sequence of integration site ADE2
plCas-ARS208	homologous sequence of integration site ARS208
plcas-ADE2-pTDH3-xylB-pSED1-CcxylD	homologous sequence of integration site ADE2, pTDH3-xylB-tADH1, pSED1-CcxylD-tSAG1
plcas-ADE2-pTDH3-xylB-pSED1-RmxylD	homologous sequence of integration site ADE2, pTDH3-xylB-tADH1, pSED1-RmxylD-tSAG1
plcas-ADE2-pTDH3-xylB-pSED1-PaxyID	homologous sequence of integration site ADE2, pTDH3-xylB-tADH1, pSED1-PaxyID-tSAG1
plcas-ARS208-pTDH3-CgksaD-pSED1-BxxyIX	homologous sequence of integration site ARS208, pTDH3-CgksaD-tADH1, pSED1-bxxyIX-tSAG1

表 6-2 本研究で用いたプライマー

Primer	Sequence
xhoI-SED1p F	cgggccccccctcgagattggatatagaaaattaacgtaagg
xhoI-SED1p R	aactgtacacccgggcttaatagagcgaacgtattttatttg
SAG1t F	cccgggtgtacagttagtagacattgagtc
SAG1t R	accgcggtggcggccgcacccagtgagcgcgcgtaatacga c
dBOL2_ ADE2 F	ttcttgaataatacataacttttc
dBOL2_ ADE2 R	ataagtgatcttatgtatgaaattc
BOL2 up F	acgttctctccgttggtcaaacccc
BOL2 up R	agttatgtattattcaagaaatatatgtatatataacaccg

BOL2 down F	tcatacataagatcacttataaaggatgatattgttctattattaa g
BOL2 donw R	acagcaacgacgacaatgccaaacc
SNR52p-F	ggcgaattgggtacctctttgaaaagataatgtatg
SNR52p R-ADE2	ttctagctctaaaactgtggatagctctacaattgatcatttatctt tactgcgg
SNR52p R-ARS208	ttctagctctaaaacagatctttgttttagcggacgatcatttatctt tactgcgg
Guide-F2	gttttagagctagaaatagcaag
Guide-R2	ggtaccaattcgccctatagtgagtc
ADE2 up500 F	catcagagcagattggctagctttgaccagggtattataaaag aaac
ADE2 up500 R	gcggccgcctcgagccatggacttgattgtttgtccgattttctt g
ADE2 down500 F	ccatggctcgaggcgccgctatataagttattgatatacttg
ADE2 down500 R	agggaacaaaagctggctagccaagggaacattatagggt gttaag
ARS208 up F	catcagagcagattggctagcgggttctgttactgtccagatat g
ARS208 up R	gcggccgcctcgagccatgggtgtgtatggccctattggcac cg
ARS208 down F	ccatggctcgaggcgccgcgcatcttctaaactgtagtttatg
ARS208 down R	agggaacaaaagctggctagcattctggttgccaacctgttg g
prMEP1-13 F	cagctttgttcccttagtgaggg
prMEP1-13 R	caatctgctctgatgccgcatag
prMEP1-5 F	cagctttgttcccttagtgaggg
prMEP1-5 R	ttaccaacttaatcgccctgcagc
prMEP1-6 F	ttaccaacttaatcgccctgcagc
prMEP1-6 R	agggaacaaaagctgcatgggagctccaccgcggtggcg gccgagc

本研究で用いたプラスミドおよびプライマーを表 6-1 および表 6-2 に示す。プラスミドの増幅には、*Escherichia coli* NovaBlue (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いた。NovaBlue は、100 µg/mL アンピシリンを含む Luria-Bertani 培地 (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, and 5 g/L NaCl) で、37 °C で培養した。本研究で作成したプラスミドは、In-Fusion® HD

Cloning Kit (Takara bio, Shiga, Japan) および Ligation high Ver.2 (Takara bio) を用いて作成された。簡単には、制限酵素処理したベクターの末端 15 塩基の相同配列を、クローニングする塩基配列の両端に PCR で付加して、ベクターとクローニング配列、In-Fusion 酵素を混合したのち、50 °Cで 15 分間インキュベートすることで作成した。本研究で使用した全ての遺伝子は、*S. cerevisiae* のコドン使用頻度に DNA 配列が最適化されたものを GenScript (Piscataway, NJ, US) によって人工合成されたものを使用した。本研究で用いた遺伝子は、全て、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のコドン最適化された DNA 配列を用いた GenScript (Piscataway, NJ, United States) 。

酵母に Dahms pathway を導入するため、*smal* で処理された pIL-pTDH3 tADH1 [17]に人工合成された *E. coli* 由来の *yagE* をクローニングすることで、pIL-pTDH3-*yagE* を作成した。

酵母に Dahms pathway を導入するため、まず、*smal* で処理された pIU-pTDH3 tADH1 [17] に人工合成された *C. glutamicum* 由来の *ksaD* をクローニングすることで、pIU-pTDH3-CgksaD を作成した。YPH499 ゲノム DNA をテンプレートに、プライマー-xhoI-SED1p F および xhoI-SED1p R、または SAG1t F および SAG1t R を用いて PCR を行い、*SED1* プロモーター領域または *SAG1* ターミナーを含む DNA 配列を得た。得られた 2 つの DNA 断片を、XhoI と NotI によって処理された pGK405 (*LEU2*) [35]を In-fusion によりクローニングすることで、pIL-pSED1-tSAG1 を作成した。次に、*SmaI* で処理された pIL-pSED1-tSAG1 に対して、人工合成された *H. aswanensis*、*H. paucihalophilu*、*C. crescentus*、*B. xenovorans*、*S. aerolata*、*N. taihuense* 由来の *xylX* をそれぞれクローニングすることにより、pIL-pSED1-HaxylX-tSAG1、pIL-pSED1-HpxylX-tSAG1、pIL-pSED1-CcxyIX-tSAG1、pIL-pSED1-BxxyIX-tSAG1、pIL-pSED1-SaxylX-tSAG1、および pIL-pSED1-NtxylX-tSAG1 をそれぞれ構築した。

pIA-pTDH3-tADH1 を構築するため、XhoI と NotI で処理された pIL-pTDH3p-tADH1 および pGK402 (*ADE2*)を Ligation によりクローニングした。*SmaI* で処理された pIA-pTDH3-tADH1 に人工合成された *C. crescentus* 由来の *xylB* をクローニングすることで pIA-pTDH3-*xylB* を得た。

異種生物由来の *xylA* を発現するため、*smal* で処理された pIU-pTDH3 tADH1 [17]に人工合成された *B. xenovorans*、*Asticcacaulis endophyticus*、*Streptomyces hygroscopicus*、*Pseudomonas inefficax*、*Bacteroidetes bacterium*、*Rhodopirellula sp. TMED11*、*Pseudomonas fluorescens*、*Sphingomonas aurantiaca*、*Rhodobacteraceae bacterium*、*Burkholderia lata* 由来の *xylA* をクローニングすることで、pIU-pTDH3-BxxyIA、pIU-pTDH3-AexyIA、pIU-pTDH3-ShxyIA、pIU-pTDH3-PixyIA、pIU-pTDH3-BbxyIA、pIU-pTDH3-RspxyIA、pIU-pTDH3-PfxyIA、pIU-pTDH3-SaxyIA、pIU-pTDH3-RbxyIA、pIU-pTDH3-BlxyIA をそれぞれ作成した。

異種生物由来の *xylD* を発現する plasmid を作成するため、pGK406 (*URA3*) [35]および pIL-pSED1-tSAG1 を XhoI と NotI で処理し、Ligation によりクローニングすることで、pIU-pSED1-tSAG1 を作成した。*SmaI* で処理された pIU-pSED1-tSAG1 に対して、人工合成された *Marinovum algicola*、*Caulobacter crescentus*、*Burkholderia xenovorans*、

Herbaspirillum hiltneri, *Sphingomonas elodea*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium miluonense* あるいは *Pseudooceanicola antarcticus* をクローニングすることにより、pIU-pSED1-MaxylID、pIU-pSED1-CcxyID、pIU-pSED1-BxxyID、pIU-pSED1-HexylID、pIU-pSED1-SexylID、pIU-pSED1-AtxylID、pIU-pSED1-RmxyID、あるいは pIU-pSED1-PaxyID を作成した。

ガイド RNA 発現用 plasmid 作成のため、p2gRNA-CCW12 [36] をテンプレートに、SNR52p F と SNR52p R-ADE2、あるいは SNR52p R-ARS208 を用いて PCR を行うことで、SNR52 プロモーターの制御下に gRNA が接続された DNA 断片をそれぞれ得た。得られた DNA 断片と、p2gRNA-CCW12 をテンプレートに Guide-F2 と Guide-R2 を用いて PCR することにより得られた DNA 断片を In-fusion によりクローニングすることで、pGK426-ADE2、および pGK426-ADE2 を作成した。

pICas-ADE2 および pICas-ARS208 を作成するため、YPH499 のゲノム DNA をテンプレートに、プライマー-ADE2 up500 F および ADE2 up500 R、ADE2 down500 F および ADE2 down500 R、ARS208 up F および ARS208 up R、ARS208 down F および ARS208 down R を用いてそれぞれ PCR を行い、遺伝子を導入する遺伝子座の上流および下流の 500 bp 程度の DNA 配列を増幅した。また、pGK405 (*LEU2*) [35] をテンプレートに、prMEP1-13 F と prMEP1-13 R を用いて PCR を行うことで得られた DNA 断片に、遺伝子座の上流および下流の 500 bp の DNA 断片を In-fusion によりクローニングすることで、pICas-ADE2 および pICas-ARS208 を作成した。

pIL-pTDH3-tADH1 をテンプレートに、プライマー-prMEP1-5 F と prMEP1-5 R を用いて PCR を行い、TDH3 プロモーターおよび ADH1 ターミネーターを含む DNA 断片を得た。得られた DNA 断片を、pGK405 (*LEU2*) をテンプレートにプライマー-prMEP1-6 F と prMEP1-6 R を用いて PCR することで得られた DNA 断片にクローニングすることで、pIL-xho1-tdh3p-adh1t-ncol1 を作成した。SmaI で処理された pIL-xho1-tdh3p-adh1t-ncol1 に人工合成された xylB をクローニングすることで、pIL-xho1-pTDH3-xylB-tADH1-ncol1 を得た。NcoI と NotI で処理された pICas-ADE2、XhoI と NcoI で処理された SmaI で処理された pIL-xho1-pTDH3-xylB-tADH1-ncol1、および XhoI と NotI で処理された pIU-pSED1-CcxyID、pIU-pSED1-RmxyID、あるいは pIU-pSED1-PaxyID の計 3 つの DNA 断片を Ligation することにより、plcas-ADE2-pTDH3-xylB-pSED1-CcxyID、plcas-ADE2-pTDH3-xylB-pSED1-RmxyID、および plcas-ADE2-pTDH3-xylB-pSED1-PaxyID をそれぞれ得た。

また、SmaI で処理された pIL-xho1-tdh3p-adh1t-ncol1 に人工合成された CgksaD をクローニングすることで、pIL-xho1-pTDH3-CgksaD-tADH1-ncol1 を得た。NcoI と EagI で処理された pICas-ADE2、XhoI と NcoI で処理された SmaI で処理された pIL-xho1-pTDH3-xylB-tADH1-ncol1、および XhoI と EagI で処理された pIU-pTDH3-CgksaD-tADH1 の計 3 つの DNA 断片を Ligation することにより、plcas-ADE2-pTDH3-CgksaD-pSED1-BxxyIX を得た。

酵母株の作成

酵母の形質転換は、酢酸リチウムを用いた One-step transformation 法を用いた [48]。酸化のキシロース代謝経路の構築には、*S. cerevisiae* YPH499 [MATa *ura3- 52 lys2-801 ade2-101 trp1- 63 his3-Δ200 leu2-Δ1* (Stratagene, La Jolla, CA, USA)] を用いた。酵母株の培養には、SD 培地 (6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 20 g/L glucose) に株の栄養要求性に合わせてアミノ酸・核酸を加えたもの、または SCD 培地 (6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 2 g/L synthetic complete mix, 20 g/L glucose) を用いた。酵母の形質転換の際には、synthetic complete mix から株の栄養要求性に合わせて適切にアミノ酸・核酸を抜いたものを用いた。

表 6-3 本研究で構築した酵母株

Strain name	Description
YPH499ΔGRE3	YPH499, gre3Δ::kanMX4
BD	YPH499ΔGRE3, pTS-A-xylBD
BDΔB	BD, bol2Δ::HIS3
BDΔBtT	BDΔB, pIAur-tTYW1
BDΔBtT-E	BDΔBtT, pIL-tdh3p-yagE
BDΔBtT-ksaD	BDΔBtT, pIU-pTDH3-CgksaD
BDΔBtT-ksaD-HaxyIX	BDΔBtT-ksaD, pIL-pSED1-HaxyIX-tSAG1
BDΔBtT-ksaD-HpxyIX	BDΔBtT-ksaD, pIL-pSED1-HpxyIX-tSAG1
BDΔBtT-ksaD-CcxyIX	BDΔBtT-ksaD, pIL-pSED1-CcxyIX-tSAG1
BDΔBtT-ksaD-BxxyIX	BDΔBtT-ksaD, pIL-pSED1-BxxyIX-tSAG1
BDΔBtT-ksaD-NtxyIX	BDΔBtT-ksaD, pIL-pSED1-NtxyIX-tSAG1
BDΔBtT-ksaD-SaxyIX	BDΔBtT-ksaD, pIL-pSED1-SaxyIX-tSAG1
BDΔBtT-BxxyIX	BDΔBtT, pIL-pSED1-BxxyIX-tSAG1
BDΔBtT-BxxyIX-BxxyIA	BDΔBtT-BxxyIX, pIU-pTDH3-BxxyIA
BDΔBtT-BxxyIX-AexyIA	BDΔBtT-BxxyIX, pIU-pTDH3-AexyIA
BDΔBtT-BxxyIX-ShxyIA	BDΔBtT-BxxyIX, pIU-pTDH3-ShxyIA
BDΔBtT-BxxyIX-PixyIA	BDΔBtT-BxxyIX, pIU-pTDH3-PixyIA
BDΔBtT-BxxyIX-BbxyIA	BDΔBtT-BxxyIX, pIU-pTDH3-BbxyIA
BDΔBtT-BxxyIX-RspxyIA	BDΔBtT-BxxyIX, pIU-pTDH3-RspxyIA
BDΔBtT-BxxyIX-PfxyIA	BDΔBtT-BxxyIX, pIU-pTDH3-PfxyIA
BDΔBtT-BxxyIX-SaxyIA	BDΔBtT-BxxyIX, pIU-pTDH3-SaxyIA
BDΔBtT-BxxyIX-RbxyIA	BDΔBtT-BxxyIX, pIU-pTDH3-RbxyIA
BDΔBtT-BxxyIX-BlxyIA	BDΔBtT-BxxyIX, pIU-pTDH3-BlxyIA

pTDH3-B	YPH499ΔGRE3 , pIA-pTDH3-xyIB
BE	pTDH3-B, pIL-pTDH3-yagE
BEΔB	BE, bol2Δ::HIS3
BEΔBtT	BEΔB, pIAur-tTYW1
BEΔBtT-MaxyID	BEΔBtT, pIU-pSED1-MaxyID
BEΔBtT-CcxyID	BEΔBtT, pIU-pSED1-CcxyID
BEΔBtT-BxxylD	BEΔBtT, pIU-pSED1-BxxylD
BEΔBtT-HexylD	BEΔBtT, pIU-pSED1-HexylD
BEΔBtT-SexylD	BEΔBtT, pIU-pSED1-SexylD
BEΔBtT-AtxylD	BEΔBtT, pIU-pSED1-AtxylD
BEΔBtT-RmxylD	BEΔBtT, pIU-pSED1-RmxylD
BEΔBtT-PaxyID	BEΔBtT, pIU-pSED1-PaxyID
CcxyIBD	YPH499ΔGRE3, ade2:: pTDH3-xyB and pSED1-CcxyID
RmxylBD	YPH499ΔGRE3, ade2:: pTDH3-xyB and pSED1-RmxylID
PaxyIBD	YPH499ΔGRE3, ade2:: pTDH3-xyB and pSED1-PaxyID
CcxyIBDΔB	CcxyIBD, bol2Δ::ADE2
RmxylBDΔB	RmxylBD, bol2Δ::ADE2
PaxyIBDΔB	PaxyIBD, bol2Δ::ADE2
CcxyIBDΔBtT	CcxyIBDΔB, pIAur-tTYW1
RmxylBDΔBtT	RmxylBDΔB, pIAur-tTYW1
PaxyIBDΔBtT	PaxyIBDΔB, pIAur-tTYW1
CcxyIBDΔB-bXkD	CcxyIBDΔBtT, ARS208:: pSED1-BxxylX and pTDH3-CgksaD
RmxylBDΔB-bXkD	RmxylBDΔBtT, ARS208:: pSED1-BxxylX and pTDH3-CgksaD
PaxyIBDΔB-bXkD	PaxyIBDΔBtT, ARS208:: pSED1-BxxylX and pTDH3-CgksaD
CcxyIBDΔBtT-bX2kD	CcxyIBDΔB-bXkD, pIU-pTDH3-CgksaD
RmxylBDΔBtT-bX2kD	RmxylBDΔB-bXkD, pIU-pTDH3-CgksaD
PaxyIBDΔBtT-bX2kD	PaxyIBDΔB-bXkD, pIU-pTDH3-CgksaD

本研究で構築された酵母株を表 6-3 に示した。キシロースをキシリトールに変換する *GRE3* の破壊、およびキシロースからキシロネートまでの反応を触媒する *C. crescentus* 由来の *xyIB* および *xyID* が導入された BD 株 [17]の *BOL2* 遺伝子を *HIS3* で置換することにより、BDΔB 株を作成

した。*tTYW1* 過剰発現株を作成するために、*pIAur-tTYW1* [17]を $\text{BD}\Delta\text{B}$ 株に導入し、 $\text{BD}\Delta\text{BtT}$ 株を作成した。鉄代謝の改変された $\text{BD}\Delta\text{BtT}$ 株を宿主に Dahms pathway を導入するために、 $\text{BD}\Delta\text{BtT}$ 株に *pIL-tdh3p-yagE* を導入することで $\text{BD}\Delta\text{BtT-E}$ 株を作成した。

鉄代謝の改変された $\text{BD}\Delta\text{BtT}$ 株を宿主に Weimberg pathway を導入するために、まず *pIU-tdh3p-CgksaD* が導入された $\text{BD}\Delta\text{BtT-ksaD}$ 株を作成した。 $\text{BD}\Delta\text{BtT-ksaD}$ 株に *pIL-pSED1-HaxylX-tSAG1*、*pIL-pSED1-HpxylX-tSAG1*、*pIL-pSED1-CcxyIX-tSAG1*、*pIL-pSED1-BxxyIX-tSAG1*、*pIL-pSED1-NtxylX-tSAG1*、*pIL-pSED1-SaxylX-tSAG1* を導入することで、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-ksaD-HaxylX}$ 株、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-ksaD-HpxylX}$ 株、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-ksaD-CcxyIX}$ 株、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-ksaD-BxxyIX}$ 株、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-ksaD-NtxylX}$ 株、および $\text{BD}\Delta\text{BtT-ksaD-SaxylX}$ 株を作成した。

異種生物由来の *xyIA* を酵母に導入するため、 $\text{BD}\Delta\text{BtT}$ 株を宿主に、*pIL-pSED1-BxxyIX-tSAG1* を導入することで、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-BxxyIX}$ 株を作成した。 $\text{BD}\Delta\text{BtT-BxxyIX}$ 株を宿主に、*pIU-pTDH3-BxxyIA*、*pIU-pTDH3-AexylIA*、*pIU-pTDH3-ShxylIA*、*pIU-pTDH3-PixylIA*、*pIU-pTDH3-BbxyIA*、*pIU-pTDH3-RspxyIA*、*pIU-pTDH3-PfxylIA*、*pIU-pTDH3-SaxylIA*、*pIU-pTDH3-RbxyIA*、および *pIU-pTDH3-BlxylIA* を導入することで、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-BxxyIX-BxxyIA}$ 株、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-BxxyIX-AexylIA}$ 株、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-BxxyIX-ShxylIA}$ 株、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-BxxyIX-PixylIA}$ 株、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-BxxyIX-BbxyIA}$ 株、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-BxxyIX-RspxyIA}$ 株、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-BxxyIX-PfxylIA}$ 株、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-BxxyIX-SaxylIA}$ 株、 $\text{BD}\Delta\text{BtT-BxxyIX-RbxyIA}$ 株、および $\text{BD}\Delta\text{BtT-BxxyIX-BlxylIA}$ 株を作成した。

異種生物由来の *xyID* を酵母に導入するため、 $\text{YPH499}\Delta\text{GRE3}$ 株に、*pIA-pTDH3-xyIB* が導入された *pTDH3-B* 株を作成した。また、*pIL-pTDH3-yagE* が導入された BE 株を作成した。 BE 株を用いて、*HIS3* マーカーにより置換することで *BOL2* が破壊された $\text{BE}\Delta\text{B}$ 株を作成した。 $\text{BE}\Delta\text{B}$ 株に *pIAur-tTYW1* を過剰発現することで、 $\text{BE}\Delta\text{BtT}$ 株を作成した。 $\text{BE}\Delta\text{BtT}$ 株を用いて、*pIU-pSED1-MaxylID*、*pIU-pSED1-CcxyID*、*pIU-pSED1-BxxyID*、*pIU-pSED1-HexylID*、*pIU-pSED1-SexylID*、*pIU-pSED1-AtxylID*、*pIU-pSED1-RmxylID*、*pIU-pSED1-PaxylID* を形質転換することで、 $\text{BE}\Delta\text{BtT-MaxylID}$ 、 $\text{BE}\Delta\text{BtT-CcxyID}$ 、 $\text{BE}\Delta\text{BtT-BxxyID}$ 、 $\text{BE}\Delta\text{BtT-HexylID}$ 、 $\text{BE}\Delta\text{BtT-SexylID}$ 、 $\text{BE}\Delta\text{BtT-AtxylID}$ 、 $\text{BE}\Delta\text{BtT-RmxylID}$ 、 $\text{BE}\Delta\text{BtT-PaxylID}$ 株を作成した。

高活性な *XylID* を含む Weimberg pathway を酵母に構築するために、 YPH499 に *pCL-Cas9* および *NheI* で処理された *plcas-ADE2-pTDH3-xyIB-pSED1-CcxyID*、*plcas-ADE2-pTDH3-xyIB-pSED1-RmxylID*、あるいは *plcas-ADE2-pTDH3-xyIB-pSED1-PaxylID* を形質転換することで、*CcxyIBD*、*RmxylIBD*、および *PaxylIBD* 株をそれぞれ得た。*CcxyIBD*、*RmxylIBD*、および *PaxylIBD* 株の *BOL2* 遺伝子は、栄養要求性マーカー *ADE2* で置換することにより破壊された。プラスミド *pGK402 (ADE2)* [35] をテンプレートに、プライマー *dBOL2_ADE2 F* および *dBOL2_ADE2 R* を用いて PCR を行い、*ADE2* マーカーを含む DNA 配列を得た。*BOL2* の ORF 上流および下流の 500bp を増幅するために、プライマー *BOL2 up F* と *BOL2 up R*、*BOL2 down F* と *BOL2 down R* を用いて、*S. cerevisiae* のゲノム DNA をテンプレートに PCR を行った。

BOL2 破壊用の DNA 断片を調製するため、*BOL2* up F および *BOL2* down R を用いて、3 つの DNA 断片 (*ADE2*, ORF の上流 500 bp, ORF の下流 500 bp) をオーバーラップ PCR により接続した。*BOL2* 破壊用断片を、CcxyIBD、RmxylBD、PaxyIBD 株に形質転換することで CcxyIBDΔB、RmxylBDΔB、PaxyIBDΔB を得た。また、CcxyIBDΔB、RmxylBDΔB、PaxyIBDΔB 株に pIAur-tTYW1 を形質転換することで、CcxyIBDΔBtT、RmxylBDΔBtT、PaxyIBDΔBtT 株を得た。CcxyIBDΔBtT、RmxylBDΔBtT、PaxyIBDΔBtT 株に、pCL-Cas9、および *NheI* で処理された pIcas-ARS208-pTDH3-CgksaD-pSED1-BxxyIX を形質転換することで、CcxyIBDΔBtT-bXkD、RmxylBDΔBtT-bXkD、PaxyIBDΔBtT-bXkD 株をそれぞれ構築した。AKGSA から AKG への律速段階を解消するため、CcxyIBDΔBtT-bXkD、RmxylBDΔBtT-bXkD、および PaxyIBDΔBtT-bXkD 株に対し、pIU-pTDH3-CgksaD を形質転換することにより、CcxyIBDΔBtT-bX2kD、RmxylBDΔBtT-bX2kD、および PaxyIBDΔBtT-bX2kD 株を構築した。

キシロースを単一炭素源とした生育試験

SD 培地で 30 °C、200 rpm で 24 時間培養された菌体を、D. W. で 2 度洗浄した。洗浄された菌体を、生育試験用培地 (6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 1.46 g/L Yeast Synthetic Drop-out Media Supplements (Y1501, Sigma Aldrich, Burlington, United States)、76 mg/L ウラシル、20 g/L キシロース) に OD₆₀₀ = 0.1 となるように植菌し、30 °C、200 rpm で培養された。OD₆₀₀ は、菌体密度は、UV-VIS 分光光度計 (UVmini-1240, Shimazu) を用いて測定された。

グルコースとキシロースを用いた混合糖での培養試験

5 mL の SCD 培地で 24 時間で培養された菌体を 50 mL の YPD 培地に OD₆₀₀ = 0.1 となるように植菌し、30 °C、150 rpm で 24 時間培養した。培養後の菌体を D. W. で 2 度洗浄した後、YPDX 培地 (10 g/L yeast extract, 20 g/L tryptone, 10 g/L グルコース, 10 g/L キシロース) に OD₆₀₀ = 5.0 となるように植菌した。培養は、全量 20mL の系で、30 °C、200 rpm で行われた。

系統樹解析

系統樹解析のための酵素のアミノ酸配列は、NCBI から入手された。重複配列、および未知のアミノ酸含むアミノ酸配列を取り除いた。また、CD-HIT[49]を用いて、90 %以上の同一性を示すアミノ酸配列を取り除いた。MAFFT [50]を用いてアライメントを行い、アライメント後の配列を用いて RAxML [51]により系統樹が作成された。

XylIX 活性測定

YPD 培地 (10g/L yeast extract, 20g/L peptone, 20g/L glucose) を用いて 30°C、24 時間された酵母株を、10mM の洗浄用バッファー (10 mM Phosphate buffer, 2 mM EDTA, pH = 7.5) で 2 度洗浄した。洗浄された菌体を、タンパク質抽出バッファー (100 mM phosphate

buffer; pH = 7.5, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT) に懸濁して、200 μ L の 0.5 mm 径ガラスビーズとともに Shake Master Neo (Biomedical Science, Tokyo, Japan) を用いて 1500 rpm で 5 分間振盪された。その後、21,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離を行い、上清を酵母の全タンパク質溶液として酵素活性測定に用いた。

XylIX 活性測定は、基質として 5 mM 2-ケト-3-デオキシ-キシロネート (KDX)、20 mM Tris-HCl (pH = 8.0)、10 mM MgCl₂、1 mM NAD⁺ の 350 μ L の混合液に 50 μ L の酵母タンパク質抽出液を加え、30 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた。反応中の NADH 増加量を、波長 340 nm で経時的に観測して、XylIX を算出した。NADH のモル吸光係数は 6.3 mM⁻¹ cm⁻¹ を用いた。

XylID 活性測定

キシロネートデヒドラターゼ (XylID) の活性測定は、チオバルビツール酸法により行われた [40]。5mL の YPD 培地で 24 時間培養された酵母菌体を用いて、全タンパク質を抽出した。YPD 培地で培養された菌体を、洗浄バッファー (10 mM Phosphate buffer, 2 mM EDTA, pH = 7.5) を用いて 2 度洗浄した。その後、抽出バッファー (100 mM Phosphate buffer, 2 mM MgCl₂, 1 mM ジチオトレイトール, pH = 7.5) に懸濁した。抽出バッファーに懸濁された酵母細胞を、200 μ L の 0.5 mm 径ガラスビーズとともに Shake Master Neo (Biomedical Science, Tokyo, Japan) を用いて 1500 rpm で 5 分間振盪された。その後、21,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離を行い、上清を酵母の全タンパク質溶液として酵素活性測定に用いた。

酵素反応の溶液 (400 μ L; 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH = 8.0), 5 mM, MgCl₂, 12 mM D-xylonate, 50 μ L 酵母の全タンパク質抽出溶液) を、30 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。10 分後、酵素反応は 100 μ L の 2 M HCl を加えて終結させた。50 μ L の反応停止後の溶液) に、125 μ L の 25 mM 過ヨウ素酸溶液 (0.125 M H₂SO₄ に溶解) を加えて 20 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた。その後、250 μ L の 2 % (w/v) 亜ヒ酸ナトリウム溶液 (0.5 M HCl に溶解) を加えることで反応を終結させた。最後に 0.3 % のチオバルビツール酸水溶液を 1 mL 添加し、100 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートすることにより、赤色の発色団を生成させた。赤色発色団の発色強度を増強させるために、室温まで冷却した溶液に等量の DMSO を反応溶液に加えた。赤色発色団のモル吸光係数には 6.78 $\times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹ を用いて [41]、549 nm の吸光を測定することで XylID の比活性を算出した。

代謝物測定

培地中に含まれるキシロネートは、およびガスクロマトグラフィー/質量分析計 (GC-MS) (GCMS-QP 2010 Ultra ; Shimadzu) によって定量された。GC-MS の運転パラメータ、およびサンプルの前処理方法は、先行研究に記載の方法で行われた [17]。

引用文献

- [1] T. Werpy and G. Petersen, "Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I -- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas," DOE/GO-102004-1992, 15008859, Aug. 2004. doi: 10.2172/15008859.
- [2] H. Dhamankar, Y. Tarasova, C. H. Martin, and K. L. J. Prather, "Engineering *E. coli* for the biosynthesis of 3-hydroxy- γ -butyrolactone (3HBL) and 3,4-dihydroxybutyric acid (3,4-DHBA) as value-added chemicals from glucose as a sole carbon source," *Metabolic Engineering*, vol. 25, pp. 72–81, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.ymben.2014.06.004.
- [3] C. H. Martin, H. Dhamankar, H.-C. Tseng, M. J. Sheppard, C. R. Reisch, and K. L. J. Prather, "A platform pathway for production of 3-hydroxyacids provides a biosynthetic route to 3-hydroxy- γ -butyrolactone," *Nature Communications*, vol. 4, no. 1, Dec. 2013, doi: 10.1038/ncomms2418.
- [4] L. Shen et al., "A combined experimental and modelling approach for the Weimberg pathway optimisation," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 1098, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14830-y.
- [5] J. Wang, X. Shen, R. Jain, J. Wang, Q. Yuan, and Y. Yan, "Establishing a novel biosynthetic pathway for the production of 3,4-dihydroxybutyric acid from xylose in *Escherichia coli*," *Metabolic Engineering*, vol. 41, pp. 39–45, May 2017, doi: 10.1016/j.ymben.2017.03.003.
- [6] Y. Liu, X. Mao, B. Zhang, J. Lin, and D. Wei, "Modification of an engineered *Escherichia coli* by a combinatorial strategy to improve 3,4-dihydroxybutyric acid production," *Biotechnol Lett*, vol. 43, no. 10, pp. 2035–2043, Oct. 2021, doi: 10.1007/s10529-021-03169-z.
- [7] R. Fujiwara, S. Noda, T. Tanaka, and A. Kondo, "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for shikimate pathway derivative production from glucose–xylose co-substrate," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 279, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-019-14024-1.
- [8] K. W. Lu, C. T. Wang, H. Chang, R. S. Wang, and C. R. Shen, "Overcoming glutamate auxotrophy in *Escherichia coli* itaconate overproducer by the Weimberg pathway," *Metabolic Engineering Communications*, vol. 13, p. e00190, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.mec.2021.e00190.
- [9] C. Brüsseler, A. Späth, S. Sokolowsky, and J. Marienhagen, "Alone at last! – Heterologous expression of a single gene is sufficient for establishing the five-step

- Weimberg pathway in *Corynebacterium glutamicum*,” *Metabolic Engineering Communications*, vol. 9, p. e00090, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.mec.2019.e00090.
- [10] B. Halmschlag et al., “Comparison of Isomerase and Weimberg Pathway for γ -PGA Production From Xylose by Engineered *Bacillus subtilis*,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, p. 476, Jan. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2019.00476.
- [11] Y.-S. Tai et al., “Engineering nonphosphorylative metabolism to generate lignocellulose-derived products,” *Nature Chemical Biology*, vol. 12, no. 4, pp. 247–253, Feb. 2016, doi: 10.1038/nchembio.2020.
- [12] W. Bai et al., “Engineering nonphosphorylative metabolism to synthesize mesaconate from lignocellulosic sugars in *Escherichia coli*,” *Metabolic Engineering*, vol. 38, pp. 285–292, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.ymben.2016.09.007.
- [13] A. B. Bañares, G. M. Nisola, K. N. G. Valdehuesa, W.-K. Lee, and W.-J. Chung, “Understanding D-xylonic acid accumulation: a cornerstone for better metabolic engineering approaches,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 105, no. 13, pp. 5309–5324, Jul. 2021, doi: 10.1007/s00253-021-11410-y.
- [14] S. Y. Choi et al., “One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in *Escherichia coli*,” *Nature Biotechnology*, vol. 34, no. 4, pp. 435–440, Apr. 2016, doi: 10.1038/nbt.3485.
- [15] K.-K. Hong and J. Nielsen, “Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 69, no. 16, pp. 2671–2690, Aug. 2012, doi: 10.1007/s00018-012-0945-1.
- [16] J. Sharma, V. Kumar, R. Prasad, and N. A. Gaur, “Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* as a consolidated bioprocessing host to produce cellulosic ethanol: Recent advancements and current challenges,” *Biotechnology Advances*, vol. 56, p. 107925, May 2022, doi: 10.1016/j.biotechadv.2022.107925.
- [17] T. Bamba et al., “Production of 1,2,4-butanetriol from xylose by *Saccharomyces cerevisiae* through Fe metabolic engineering,” *Metabolic Engineering*, vol. 56, pp. 17–27, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.ymben.2019.08.012.
- [18] C. Borgström et al., “Identification of modifications procuring growth on xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains carrying the Weimberg pathway,” *Metabolic Engineering*, vol. 55, pp. 1–11, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.ymben.2019.05.010.

- [19] L. Wasserstrom, D. Portugal-Nunes, H. Almqvist, A. G. Sandström, G. Lidén, and M. F. Gorwa-Grauslund, "Exploring d-xylose oxidation in *Saccharomyces cerevisiae* through the Weimberg pathway," *AMB Express*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1186/s13568-018-0564-9.
- [20] L. Salusjärvi et al., "Production of ethylene glycol or glycolic acid from D-xylose in *Saccharomyces cerevisiae*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 101, no. 22, pp. 8151–8163, Nov. 2017, doi: 10.1007/s00253-017-8547-3.
- [21] T. Yukawa, T. Bamba, G. Guirimand, M. Matsuda, T. Hasunuma, and A. Kondo, "Optimization of 1,2,4-butanetriol production from xylose in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of NADH/NADPH balance," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 118, no. 1, pp. 175–185, Jan. 2021, doi: 10.1002/bit.27560.
- [22] A. Kumánovics et al., "Identification of FRA1 and FRA2 as Genes Involved in Regulating the Yeast Iron Regulon in Response to Decreased Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Synthesis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 16, pp. 10276–10286, Apr. 2008, doi: 10.1074/jbc.M801160200.
- [23] M. Andberg et al., "Characterization and mutagenesis of two novel iron–sulphur cluster pentonate dehydratases," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no. 17, pp. 7549–7563, Sep. 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7530-8.
- [24] M. C. M. Hensing, K. A. Bangma, L. M. Raamsdonk, E. de Hulster, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk, "Effects of cultivation conditions on the production of heterologous α -galactosidase by *Kluyveromyces lactis*," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 43, no. 1, pp. 58–64, Apr. 1995, doi: 10.1007/BF00170623.
- [25] O. de Smidt, J. C. du Preez, and J. Albertyn, "The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review," *FEMS Yeast Research*, vol. 8, no. 7, pp. 967–978, Nov. 2008, doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00387.x.
- [26] C. Larroy, M. R. Fernández, E. González, X. Parés, and J. A. Biosca, "Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction.," *Biochem J*, vol. 361, no. Pt 1, pp. 163–172, Jan. 2002.
- [27] C. Larroy, X. Parés, and J. A. Biosca, "Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family," *European Journal of Biochemistry*, vol. 269, no. 22, pp. 5738–5745, Nov. 2002, doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03296.x.

- [28] W. Niu, M. N. Molefe, and J. W. Frost, "Microbial Synthesis of the Energetic Material Precursor 1,2,4-Butanetriol," p. 2, 2003.
- [29] M. Toivari et al., "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of d-xylose to d-xylonate," *Metabolic Engineering*, vol. 14, no. 4, pp. 427–436, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.ymben.2012.03.002.
- [30] R. Orij, J. Postmus, A. Ter Beek, S. Brul, and G. J. Smits, "In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth," *Microbiology*, vol. 155, no. 1, pp. 268–278, Jan. 2009, doi: 10.1099/mic.0.022038-0.
- [31] H. Gao, Y. Gao, and R. Dong, "Enhanced biosynthesis of 3,4-dihydroxybutyric acid by engineered *Escherichia coli* in a dual-substrate system," *Bioresource Technology*, vol. 245, pp. 794–800, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.09.017.
- [32] A. Yep, G. L. Kenyon, and M. J. McLeish, "Determinants of substrate specificity in KdcA, a thiamin diphosphate-dependent decarboxylase," *Bioorganic Chemistry*, vol. 34, no. 6, pp. 325–336, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.bioorg.2006.08.005.
- [33] T. Fuhrer, L. Chen, U. Sauer, and D. Vitkup, "Computational Prediction and Experimental Verification of the Gene Encoding the NAD⁺/NADP⁺-Dependent Succinate Semialdehyde Dehydrogenase in *Escherichia coli*," *J Bacteriol*, vol. 189, no. 22, pp. 8073–8078, Nov. 2007, doi: 10.1128/JB.01027-07.
- [34] J. H. Ahn et al., "Enhanced succinic acid production by *Mannheimia* employing optimal malate dehydrogenase," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 1970, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15839-z.
- [35] J. Ishii et al., "A Simple and Immediate Method for Simultaneously Evaluating Expression Level and Plasmid Maintenance in Yeast," *The Journal of Biochemistry*, vol. 145, no. 6, pp. 701–708, Jun. 2009, doi: 10.1093/jb/mvp028.
- [36] K. Inokuma et al., "Improving the functionality of surface-engineered yeast cells by altering the cell wall morphology of the host strain," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 105, no. 14–15, pp. 5895–5904, Aug. 2021, doi: 10.1007/s00253-021-11440-6.
- [37] K. Inokuma, M. Matsuda, D. Sasaki, T. Hasunuma, and A. Kondo, "Widespread effect of N-acetyl-d-glucosamine assimilation on the metabolisms of amino acids, purines, and pyrimidines in *Scheffersomyces stipitis*," *Microb Cell Fact*, vol. 17, Sep. 2018, doi: 10.1186/s12934-018-0998-4.

- [38] T. Hasunuma, F. Kikuyama, M. Matsuda, S. Aikawa, Y. Izumi, and A. Kondo, "Dynamic metabolic profiling of cyanobacterial glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion," *Journal of Experimental Botany*, vol. 64, no. 10, pp. 2943–2954, Jul. 2013, doi: 10.1093/jxb/ert134.
- [39] K. Inokuma, H. Kurono, R. den Haan, W. H. van Zyl, T. Hasunuma, and A. Kondo, "Novel strategy for anchorage position control of GPI-attached proteins in the yeast cell wall using different GPI-anchoring domains," *Metabolic Engineering*, vol. 57, pp. 110–117, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.ymben.2019.11.004.
- [40] S. Kim and S. B. Lee, "Identification and characterization of *Sulfolobus solfataricus* D-gluconate dehydratase: a key enzyme in the non-phosphorylated Entner–Doudoroff pathway," *Biochem J*, vol. 387, no. Pt 1, pp. 271–280, Apr. 2005, doi: 10.1042/BJ20041053.
- [41] L. Skoza and S. Mohos, "Stable thiobarbituric acid chromophore with dimethyl sulphoxide. Application to sialic acid assay in analytical de-O-acetylation.," *Biochem J*, vol. 159, no. 3, pp. 457–462, Dec. 1976.
- [42] M. Reifenrath and E. Boles, "A superfolder variant of pH-sensitive pHluorin for in vivo pH measurements in the endoplasmic reticulum," *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 11985, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-30367-z.
- [43] M. H. Toivari, L. Ruohonen, P. Richard, M. Penttilä, and M. G. Wiebe, "Saccharomyces cerevisiae engineered to produce D-xylonate," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 88, no. 3, pp. 751–760, Oct. 2010, doi: 10.1007/s00253-010-2787-9.
- [44] S. Sutiono, B. Siebers, and V. Sieber, "Characterization of highly active 2-keto-3-deoxy-L-arabinonate and 2-keto-3-deoxy-D-xylonate dehydratases in terms of the biotransformation of hemicellulose sugars to chemicals," *Appl Microbiol Biotechnol*, Jun. 2020, doi: 10.1007/s00253-020-10742-5.
- [45] C. J. Vavricka et al., "Mechanism-based tuning of insect 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde synthase for synthetic bioproduction of benzylisoquinoline alkaloids," *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, p. 2015, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09610-2.
- [46] R. J. Protzko et al., "Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for co-utilization of d-galacturonic acid and d-glucose from citrus peel waste," *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-07589-w.

- [47] T. Yukawa et al., “Enhanced production of 3,4-dihydroxybutyrate from xylose by engineered yeast via xylonate re-assimilation under alkaline condition,” *Biotech & Bioengineering*, p. bit.28278, Nov. 2022, doi: 10.1002/bit.28278.
- [48] D.-C. Chen, B.-C. Yang, and T.-T. Kuo, “One-step transformation of yeast in stationary phase,” *Current Genetics*, vol. 21, no. 1, pp. 83–84, Jan. 1992, doi: 10.1007/BF00318659.
- [49] L. Fu, B. Niu, Z. Zhu, S. Wu, and W. Li, “CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data,” *Bioinformatics*, vol. 28, no. 23, pp. 3150–3152, Dec. 2012, doi: 10.1093/bioinformatics/bts565.
- [50] K. Katoh, “MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform,” *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 14, pp. 3059–3066, Jul. 2002, doi: 10.1093/nar/gkf436.
- [51] A. Stamatakis, “RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies,” *Bioinformatics*, vol. 30, no. 9, pp. 1312–1313, May 2014, doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.

第 7 章 先端科学技術特定研究のまとめ

1. 技術的なブレイクスルーと研究開発状況

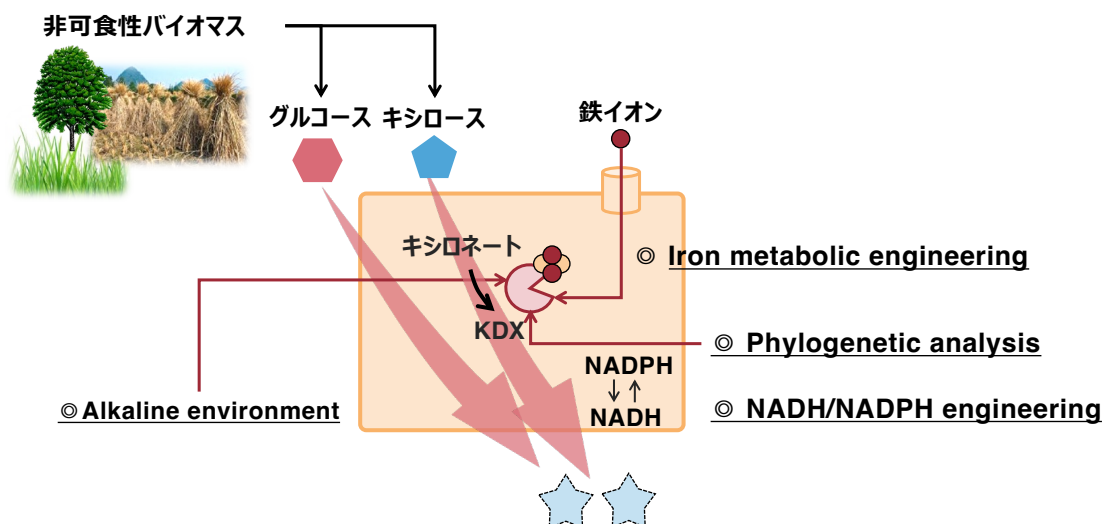


図 7-1 先端科学技術特定研究における次世代バイオプロセス開発の進捗

筆者らの先端科学技術特定研究において、出芽酵母 *S. cerevisiae* を宿主に、酸化的キシロース代謝経路の構築を目指して研究開発を行った。酸化的キシロース代謝経路構築に資する要素技術として、鉄代謝工学による鉄硫黄タンパク質 XylID の活性強化手法の開発、酸化的キシロース代謝経路の構築に資する酵母細胞内の補酵素バランスの改善技術、アルカリ培養法による中間生成物であるキシロネートの再取り込み系の構築、酵素リソースの拡充を目指した系統分類による有用酵素の同定および細胞増殖によるスクリーニング系の開発を行った。その結果、物質生産経路としてキシロースから 1,2,4-ブタントリオールおよび 3,4-ジヒドロキシ酪酸生産プロセスの開発に成功した。特に、3,4-ジヒドロキシ酪酸生産では、キシロースからのモル収率が 74.5 %に到達した。また、酸化的キシロース代謝経路を構成する遺伝子に関して、*Caulobacter crescentus* [1]などの一部のバクテリアで発見された既知酵素を酵母に導入するのみであった。本研究では、酵素リソースの拡充を目指し、出芽酵母を宿主とした際の酸化的キシロース代謝経路の構築に資する有望酵素を複数同定した。その結果、Dahms pathway や Weimberg pathway を介したキシロースを単一の炭素源とする細胞増殖を初めて実現することができた。一方で、図 2-2 に示す通り、次世代バイオプロセスに含まれる基質はグルコースの方が総じて多いため、今後は、グルコースとキシロースから生産する、あるいはキシロースを細胞増殖に用いつつグルコースから生産するための、目的化合物を選定する必要がある [2]–[8]。

7.2. 研究開発で得られたインサイトと事業化に向けて

先端科学技術特定研究では、律速段階の反応であった鉄硫黄タンパク質 XylID を含めた酵素の高活性化と有用酵素の同定に注力して取り組んだ。この研究戦略が、出芽酵母を宿主とした酸化的キシロース代謝経路の構築に大変有効であった。このように、微生物宿主に異種生物由来の代謝経路を実装するためには、活性が高いなどの優れた特徴を有する酵素、またその酵素を微生物宿主内で活性化状態で発現する技術が必要である。近年では、酵素の活性を向上するための手法として、酵素活性の指標である反応速度 (k_{cat})、および基質特異性 (K_m) の改良が取り組まれてきた [9], [10]。このように、アミノ酸配列へのピンポイントな変異を導入することで、 K_m や k_{cat} の値を向上させ、目的の機能を有する酵素を人工的に開発する研究開発が加速している [10]–[12]。筆者らは、特定の酵素の機能を改良するのではなく、データベース上に登録されている酵素を統計解析の手法である系統分類法を用いて、活性の高い酵素を探索した。その結果、これまで使用されてきた酵素と比較して、酵母を宿主とした場合に高い活性を示す酵素を複数同定することができた。

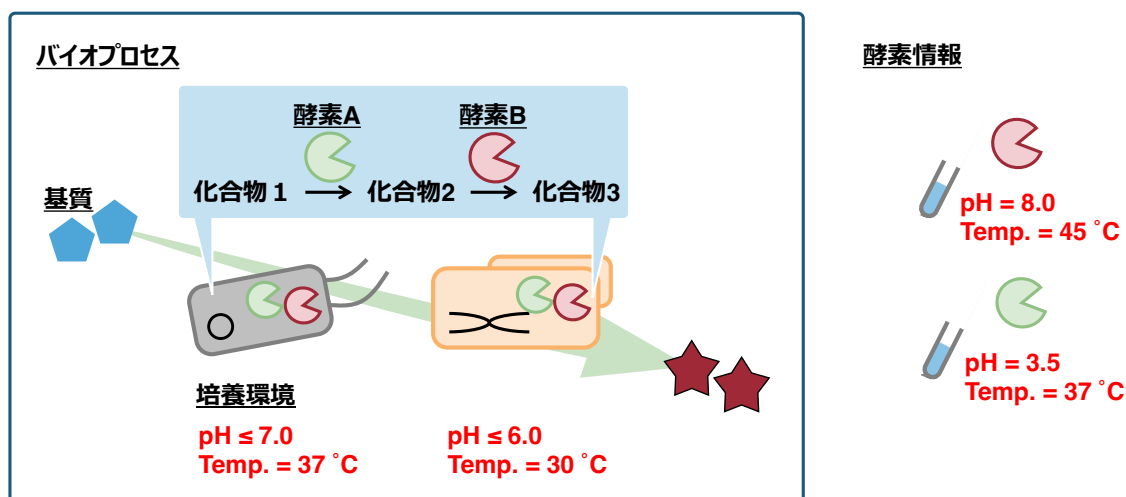


図 7-2 バイオプロセス開発における微生物と酵素の pH および温度の環境要因の違い

このような高活性酵素の探索、同定、および開発は、バイオプロセス開発において重要な項目の 1 つである。一方で、酵素活性をいくら向上しようとも、その高活性な酵素を微生物宿主内で活性化状態で発現する必要がある。活性化状態で発現することができない要因としては、本研究で示したような鉄硫黄クラスターなどの補因子、遺伝子発現、翻訳など複数考えられる。これらに加えて、本研究では、微生物宿主の培養と酵素活性に最適な pH や温度などのパラメータに着目する必要があることを見出した (図 7-2)。今後の研究の展開としては、この微生物の培養に適した pH と酵素活性に適した pH の乖離を埋めるための研究開発が想定される。つまり、酵素のアミノ酸配列に変異を導入して改変することで、目的の酵素の最適 pH を変化させ、微生物宿主に適した培養 pH と同一にする戦略などの新たな研究戦略に繋がることが期待している。基質特異性、反応速度、

pH、温度が全て検討された酵素開発技術を確立することが可能になれば、微生物宿主内で異種代謝経路を機能させ、迅速な商業的なバイオプロセスの開発が可能になるだろう。

特に、近年の遺伝子組換え技術の向上により、バイオプロセス開発に用いられる微生物宿主の数、およびその微生物に実装される代謝経路の数は多岐に渡っている。加えて、構築する代謝経路は非常に多くの反応を必要とし、研究開発の対象となる酵素の数も多い [13]–[15]。有望な特徴を有する代謝経路を微生物内で機能させるためには、その微生物宿主内で目的の酵素を活性な状態で発現するための技術力やノウハウはますます重要になるだろう。

引用文献

- [1] C. Stephens, B. Christen, T. Fuchs, V. Sundaram, K. Watanabe, and U. Jenal, “Genetic Analysis of a Novel Pathway for D-Xylose Metabolism in *Caulobacter crescentus*,” *Journal of Bacteriology*, vol. 189, no. 5, pp. 2181–2185, Mar. 2007, doi: 10.1128/JB.01438-06.
- [2] J. Wang, X. Shen, R. Jain, J. Wang, Q. Yuan, and Y. Yan, “Establishing a novel biosynthetic pathway for the production of 3,4-dihydroxybutyric acid from xylose in *Escherichia coli*,” *Metabolic Engineering*, vol. 41, pp. 39–45, May 2017, doi: 10.1016/j.ymben.2017.03.003.
- [3] J. Wang *et al.*, “Rational engineering of diol dehydratase enables 1,4-butanediol biosynthesis from xylose,” *Metabolic Engineering*, vol. 40, pp. 148–156, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.ymben.2017.02.003.
- [4] L. Shen *et al.*, “A combined experimental and modelling approach for the Weimberg pathway optimisation,” *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 1098, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14830-y.
- [5] K. W. Lu, C. T. Wang, H. Chang, R. S. Wang, and C. R. Shen, “Overcoming glutamate auxotrophy in *Escherichia coli* itaconate overproducer by the Weimberg pathway,” *Metabolic Engineering Communications*, vol. 13, p. e00190, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.mec.2021.e00190.
- [6] B. Halmschlag *et al.*, “Comparison of Isomerase and Weimberg Pathway for γ -PGA Production From Xylose by Engineered *Bacillus subtilis*,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, p. 476, Jan. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2019.00476.
- [7] S. Y. Choi, W. J. Kim, S. J. Yu, S. J. Park, S. G. Im, and S. Y. Lee, “Engineering the xylose-catabolizing Dahms pathway for production of poly(d-lactate-co-glycolate) and poly(d-lactate-co-glycolate-co-d-2-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*,” *Microb Biotechnol*, vol. 10, no. 6, pp. 1353–1364, Apr. 2017, doi: 10.1111/1751-7915.12721.

- [8] R. Fujiwara, S. Noda, T. Tanaka, and A. Kondo, "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for shikimate pathway derivative production from glucose–xylose co-substrate," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 279, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-019-14024-1.
- [9] R. J. Protzko *et al.*, "Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for co-utilization of d-galacturonic acid and d-glucose from citrus peel waste," *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-07589-w.
- [10] C. J. Vavricka *et al.*, "Mechanism-based tuning of insect 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde synthase for synthetic bioproduction of benzyloisoquinoline alkaloids," *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, p. 2015, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09610-2.
- [11] Y. Mori, S. Noda, T. Shirai, and A. Kondo, "Direct 1,3-butadiene biosynthesis in *Escherichia coli* via a tailored ferulic acid decarboxylase mutant," *Nat Commun*, vol. 12, no. 1, p. 2195, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-22504-6.
- [12] A. Farwick, S. Bruder, V. Schadeweg, M. Oreb, and E. Boles, "Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 14, pp. 5159–5164, Apr. 2014, doi: 10.1073/pnas.1323464111.
- [13] J. Zhang *et al.*, "A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine," *Nature*, vol. 609, no. 7926, pp. 341–347, Sep. 2022, doi: 10.1038/s41586-022-05157-3.
- [14] M. A. Huffman *et al.*, "Design of an in vitro biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir," *Science*, vol. 366, no. 6470, pp. 1255–1259, Dec. 2019, doi: 10.1126/science.aay8484.
- [15] P. Srinivasan and C. D. Smolke, "Biosynthesis of medicinal tropane alkaloids in yeast," *Nature*, vol. 585, no. 7826, pp. 614–619, Sep. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2650-9.

第 8 章 次世代バイオプロセスの事業化

1. バイオプロセスの開発を担うスタートアップ企業のベンチマーク分析

本章では、筆者の先端科学技術特定研究の成果を事業化するにあたり、どのような事業戦略に基づき事業を展開すれば良いかを考察する。事業戦略を考案するため、まずは、既存の合成生物学のスタートアップ企業がどのような事業を行っているのかを把握するため、ベンチマーク分析を行った。

Genomatica 社 (<https://www.genomatica.com/>)

Genomatica 社は、1998 年に Christophe Schilling らによって設立された。現在も、非上場のスタートアップ企業である。2011 年、大腸菌 *Escherichia coli* を宿主としたバイオベースでの 1,4-Butanediol 製造に成功し、その研究報告が一流の学術誌である Nature Chemical Biology 誌に掲載された [1]。

Genomatica 社の主たる事業内容は、大腸菌を用いた 1,4-ブタンジオール (1,4-Butanediol) の商業生産である。既存の大手化学メーカーである BASF 社や Novamont 社などと業務提携を結びつつ、1,4-ブタンジオールの製造事業を進めている [52]。2016 年 Novamont 社に 1,4-butanediol 生産に関する技術供与を行い、3 万トンまで生産可能な 1,4-ブタンジオールの商業培養設備への投資を行った。

生産する目的化合物およびターゲット市場に関して、当初の目的化合物であった 1,4-ブタンジオールの製造技術に基づき、代謝経路を改変することで生産可能なブタジエン (Butadiene) や 1,3-ブタンジオール (1,3-butanediol) の製造技術を有する。近年、Genomatica 社によって出願された特許情報では、ヘキサメチレンジアミン (Hexamethylenediamine) やアジピン酸 (adipic acid) などのナイロンの原料、長鎖の脂肪酸などのフレグランスなどの原料となる化合物の製造技術に関する研究開発を進めているようだ [3]。また、2016 年には、微生物の育種開発のプラットフォームを提供する Ginkgo Bioworks 社との戦略的業務提携を発表した。確立された製造技術を用いて Novamont 社などによって製造された化合物は、Genomatica 社の自社ブランドの製品として販売されており、Geno BDO™ (1,4-Butanediol)、Avela™ (3-hydroxybutyrate)、BRONTIDE® (1,3-Butanediol) などがある。

◎ Insight

既存の 1,4-ブタンジオール製造方法の競争力の弱さに勝機

Genomatica 社の主力製品である 1,4-ブタンジオールは、微生物が元来生産しない化合物であり、Genomatica 社によって人工的に考案された代謝経路を介して合成された。従来、1,4-ブタンジオールは、化石資源を原料に製造されており、ブタジエンと酢酸を原料に製造する方法、無水マレイン酸を水素化して製造する方法、アセチレンとホルムアルデヒドを原料に製造する方法などがある [4]。これらの製造方法では、1,4-ブタンジオールの選択性が低く不純物が多く含まれるため、1,4-ブタンジオールの分離精製にコストを必要とする。また、アセチレンは、炭化カルシウムと水を反応させることより得ることができ、炭化カルシウムは、酸化カルシウムとコークスを約 2000 °C にすることで得られる。

その酸化カルシウムは、炭酸カルシウムを約 900 °C 以上で熱分解すると得られる、このように、アセチレンの製造法は、極めて高い反応温度を必要とする、環境負荷の大きい方法であった。Genomatica 社が大腸菌による 1,4-ブタンジオールの製造を事業化できた要因として、既存の 1,4-ブタンジオールの製造法が非常に高コスト且つ環境負荷の大きい製造法であり、競争力が弱かったことが挙げられる。

Amyris 社 (<https://amyris.com/>)

Amyris 社は、2003 年、Jay keasling らによって設立されたスタートアップ企業である。Amyris 社の創業当時は、サトウキビの搾りかすに含まれるスクロースなどを基質に、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いたアルテミシニン酸の製造事業を行っていた。アルテミシニン酸から合成されるアルテミシニンは、高麗人參 *Artemisia annua* から得られる抗マラリア薬の原料である。この出芽酵母を用いたアルテミシニン酸の製造技術に基づき、現在では、生理活性などを有する優れた機能を有する植物二次代謝物であるテルペノイドと呼ばれる化合物群の製造技術の開発を行っている。

Amyris 社は、「Lab to Market」を企業理念として掲げており、微生物によるバイオプロセスによって生産された化合物を販売するのではなく、バイオプロセスによって生産された化合物を含む化粧品などの最終製品を製造し販売する。Amyris 社がこれまでに上市した化合物は、スクラレオール (Sclareol)、ヘミスクワラン (Hemi-squalane)、スクワラン (Squalane)、スクアレン (Squalene)、サンタロール (Santalols)、マノオール (Manool)、ビスアボロール (Bisabolol)、Bio-fene (*trans*-ファルネセン : *trans*-farnesene)、RebM (レバウディオサイド M: rebaudioside M)、カンナビゲロール (cannabigerol)、アルテミシニン (Artemisinin)、パチョリ (Patchouli)、バイオシリカ Bio-silica の 13 成分に及ぶ (<https://amyris.com/ingredients>)。また、2025 年までに、Amyris 社が有する技術によって、追加で 24 もの化合物の生産が可能になると発表されている。既存の 13 成分の主な使用用途は、高級フレグランス、高級保湿剤、甘味料などの高所得者向けの製品である。最終製品の販売のため、化粧品などの消費者用ブランドを積極的に買収しており、Biossance、Popette、Rose Inc などの消費者用ブランドを展開している。2021 年までに、8 つの自社プロダクトの消費者向けのブランドを立ち上げるとされており、完全な B to C 企業である。

Amyris 社がバイオプロセスにより生産する化合物および最終製品に関して、ターゲット市場はハイエンドであり、比較的高所得者層向け製品である。例えば、RebM は近年、天然の甘味料として注目を集めている化合物である。多くの飲料などに含まれる人工甘味料は、生活習慣病や癌などを引き起こす原因としてその健康リスクが問題視されている。対して、Amyris が生産する天然由来の甘味料である RebM は、人工甘味料と比較して、1 分子あたりの甘味度が数から数十倍高く、少量で甘みを感じることが可能である。一般に、このような天然由来の甘味料は、植物から直接抽出されるため、人工甘味料と比較して高価である。

Amyris 社が有するバイオプロセスの製造技術に関して、出芽酵母 *S. cerevisiae* を用いて、ヒトに対する生理活性を示すような植物二次代謝物であるテルペノイド系化合物を合成する技術を有している。Amyris 社は、優れた微生物育種開発のための自動化プラットフォームを有しており、迅速に目的の機能を示す微生物菌株を構築することが可能である。Amyris 社の IR 資料によると、2021 年時で、42 毎秒で遺伝子組換えされた酵母 1 株を構築できるとの報告がある。しかしながら、Amyris 社の特許情報では、現在製造可能とされている計 13 成分のうち、その合成方法が報告されていないものもあり、生産量や収率に関してどの程度の技術をそれぞれ有するのかは不明である。例えば、ビスボロールの酵母を用いた製造方法の記載は特許には見当たらず、オイルなどからのビスボロールの分離、抽出、同定に関する特許情報のみが公開されている。加えて、天然甘味料の RebM に関して、バイオマスに含まれるスクロースなどの基質から製造したことを示す情報は確認されず、RebM を合成するための代謝経路を構成する酵素の同定およびその改良が報告されている。

◎ Insight

アルテミシニン酸製造経験から市場の競争力の低い化合物の製造に取り組む

Amyris 社は、抗マラリア薬の原料であるアルテミシニンの製造に関して、最終的には既存の製造法である高麗人参からの直接抽出法とのコスト勝負に敗れた。高麗人参からの直接抽出法では、薬の需要を認知してから最終的な原薬の供給まで、約 18 ヶ月という非常に長い期間を必要とした。これは、原料である高麗人参の収穫量が天候などの外的要因に左右されるためである。Amyris 社は、このことに着目し、ビル&メルンダ ゲイツ財団から支援を受けながら、出芽酵母を用いたアルテミシニン酸を製造する技術を開発することにより、アルテミシニンの安定供給が可能になった。しかしながら、Amyris 社のアルテミシニン製造技術の確立により、アルテミシニンの需要が喚起されて、既存アルテミシニン供給のサプライチェーンが整備されたため、Amyris 社のバイオプロセスはコスト勝負に敗れた。

Amyris 社は、アルテミシニンの製造事業での経験を活かし、既存の製造法の競争力が弱く、ニッチではあるが高い性能を持つ化合物の製造法開発に取り組んでいる。Amyris 社が現在生産可能としている計 13 の成分のうち、スクラレオール、スクアレン、ヘミスクワラン、スクワランの既存の製造方法は、深海などに生息するサメからの直接抽出に依存している。この従来の製造法では、繁殖能力の低さによって、原料となるサメの種の絶滅が危惧されている。Amyris 社によってこれらの製造法が確立され、化合物の需要が喚起されたとしても、絶滅が危惧されるサメからの生産が容易に増加することは考えにくい。また、サンタロール、モノオール、ビスボロールは、種の存続が危惧されている樹木類から得られるオイルを原料に直接抽出され、製造されている化合物である。このように、絶滅や種の存続が危惧されるような、希少性の高い動物や樹木から製造されている化合物の製造事業は、仮に需要が喚起されたとしても、短期的に量産化が困難である。よって、Amyris 社が今後の研究開発により、これらの化合物を生産するためのバイオプロセスを確立することができれば、既存の製造法とのコスト勝負等に陥る可能性が低いと考えられる。

市場のハイエンドを目指す戦略は成功するのか？

Amyris 社がバイオプロセスによって生産する化合物は、市場のハイエンドを狙った、高い機能性や性能を示す化合物である。しかしながら、同様の性能を低コストで示す化合物は既に市場に存在しており、Amyris 社が製造に取り組む化合物が含まれる製品が市場競争を勝ち抜くことができるかは不明だ。Amyris 社は、バイオプロセスを経て製造している化合物が高い性能を示すニッチかつハイエンドであったとしても、世界中の企業や人々はいずれ市場のシェアを獲得している商品の健康や環境リスクなどを認識し、Amyris 社の製品を購入するようになるとしている。この考えを示す行動として、Amyris 社は、No Compromise®と呼ばれる、環境を破壊せずにクリーンな形で人類の健康を実現していく概念を掲げている。

Ginkgo Bioworks 社 (<https://www.ginkgobioworks.com/>)

Ginkgo Bioworks 社は、2009 年に、Massachusetts Institute of Technology (MIT)の研究者们によって設立された。Ginkgo Bioworks 社の事業内容は、微生物の育種開発に関わる技術プラットフォームを提供し、必要な研究設備やソフトウェア、微生物株の管理ノウハウなどを顧客に提供する事業を展開する。この事業の特徴的な点として、Ginkgo Bioworks 社のプラットフォームを用いて研究開発されたバイオプロセスを用いて生産される化合物や製品、自社ブランドの製品として販売しないことである。Ginkgo Bioworks 社は、既存の大手化学メーカーやスタートアップ企業と共同で、優れた性能を有する菌株および目的化合物の製造方法を開発する。その過程で得られたバイオプロセス全般は、そのバイオプロセスを用いた製品を開発するためのジェイントベンチャーを設立して、対象の企業に技術供与を行う。これまでに、Ginkgo Bioworks 社のスピンアウト企業として、窒素固定菌により農作物の収量を向上させる事業を展開する Bayer 社との合併スピンアウト企業である Joyn Bio 社、代替肉の製造販売事業を展開する Motif Foodworks 社、遺伝子組換えされた微生物を直接体内に摂取することで治療を行う事業を展開する Synlogic 社が設立されている。このように、あくまで Ginkgo Bioworks 社自身は、いかなる製品も自社発信で市場に供給するサプライヤーの立場を取らない。そのため、既存の大手化学メーカーやスタートアップ企業は、Ginkgo Bioworks 社に対して技術漏洩や競合などの不安無く、技術プラットフォームを活用することが可能である。

Ginkgo Bioworks 社の技術プラットフォームに関して、2017 年に買収した Gen9 社による独自の DNA 合成技術を持つことが特徴的である。Gen9 は、インクジェット法を採用したマイクロアレイの方式で、微生物育種開発の主要な原料である DNA を高効率に合成する要素技術を有する。Ginkgo Bioworks 社は、遺伝子の DNA 配列とプログラミング言語などのコードとの類似性から、自社の技術開発のプラットフォームの特徴として Code base という概念を提唱しており、複数の生物種由来の DNA 配列が混在したメタゲノム配列などの大規模な DNA 配列の解析に力を入れている。また、顧客が使用しやすい実験の自動化を伴った実験設備やソフトウェアの技術開発を行う。

◎ Insight

自社プロダクトを生産しないビジネスモデルによる微生物育種開発事業

Ginkgo Bioworks 社のビジネスモデルは、バイオプロセスの受託研究開発であり、スピンアウトにより設立されたジェイントベンチャー企業が Ginkgo Bioworks 社に支払う共同研究開発費が主な収入源となっている。最終製品まで製造販売する Amyris 社などのスタートアップ企業と比較して、Ginkgo Bioworks 社は自社プロダクト製品を上市するサプライヤーの立場を取らないため、同社の研究開発プラットフォームへのアクセスが多くなる。

現在、Ginkgo Bioworks 社の収益源は、主にスピンアウト企業として設立された企業の研究開発費である。よって、それらの企業の製品が上市され、市場での地位を確立して安定的に売上を上げることが Ginkgo Bioworks 社の成長にも不可欠である。しかしながら、これらのスピンアウト企業が手掛ける事業内容は、主に新市場をターゲットとした事業内容である。よって、筆者は、Ginkgo Bioworks 社が安定的に成長していくかは未だ不透明あると考えている。

スピンアウト企業の 1 つである Joyn Bio 社では、窒素固定菌を用いた農作物の肥料販売事業を展開している。農作物の化学肥料は、これまで、ハーバー・ボッシュ法によって製造される安価なアンモニア NH_3 を原料に製造されてきた。ハーバー・ボッシュ法は、400 から 600 °C、200 から 1000 気圧の高温高压下で行われるため、環境負荷の高い製造法である。近年、環境負荷の低いアンモニアの製造法として、水素燃料キャリアとしてアンモニア製造法、電力を用いた環境負荷の低い新規のアンモニア製造法が開発されつつある。また、遺伝子組換えでない窒素固定菌を用いた肥料事業も注目を浴びている。これらの競合技術開発の進捗などの外部環境の状況によっては、Joyn Bio 社の製造する遺伝子組換え肥料事業は市場の厳しい競争に晒される可能性がある。

Motif Foodworks 社では、代替肉をターゲット市場とし、代替肉の肉感を増すための添加剤をバイオプロセスによって製造し、大豆タンパク質などを原料に製造される代替肉の製造販売を行っている。Motif Foodworks の特許情報を見る限りでは、Ginkgo Bioworks 社と共同で開発された代替肉の肉感を補強するための添加剤の生産方法に関して、先行スタートアップ企業である Impossible Foods 社と比較して、技術的優位性は確認されなかった。

Synlogic 社では、遺伝子組換え微生物を直接ヒトに投与する医療品を製造販売する事業を展開している。Synlogic 社によって現在製造されている遺伝子組換え医薬品のうち、最も治験の進んでいる薬の治療対象はフェニルケトン尿症に対する医薬品である。フェニルケトン尿症とは、先天的にフェニルアラニンをチロシンに変換する活性が弱いという病床であり、食事などによるチロシン摂取が既存の主な治療法であった。フェニルケトン尿症の治療のため、遺伝子組換え大腸菌株を開発した Synlogic 社は、大腸菌株である SYNB1618 が治験の Phase2 に到達しており、今後の事業化が期待されている。しかしながら、既存のチロシン摂取による治療法や Synlogic 社の開発している治療法では、医薬品を継続的に摂取し続ける必要があるという点において、ゲノム編集などによる病床の寛解が達成可能な遺伝子治療薬と比較して、その有効性が疑問視されている。これらのスピンアウト企業の事業が失敗に終われば、Ginkgo Bioworks 社の収益源が絶たれることになる。

よって、Ginkgo Bioworks 社が展開する受託研究開発のビジネスモデルでは、共同で開発するバイオプロセスなどの事業領域を十分に検討し、市場ニーズを入念に分析することが重要である。

Zymergen 社（Ginkgo Bioworks 社による買収のため、URL なし）

Zymergen 社は、2013 年に設立され、微生物育種開発の技術プラットフォームを提供するスタートアップ企業である。2022 年に、Ginkgo Bioworks によって、約 3 億ドルで買収された。

事業内容は、新樹脂の原料となる化合物を生産するバイオプロセスの開発、あるいはメタゲノムライブラリなどから医薬品となるバイオを探索する（Drug discovery）など、新市場をターゲットとした技術開発を行っていた。具体的には、日本の大手化学メーカーである住友化学と共同で、折りたたみ式スマートフォンのフィルム用樹脂であるヒアリン（Hyaline）の製造技術の開発を行っていたことが知られている。しかしながら、2022 年度内に、ヒアリンによる収益の見込みが立たなかったこと、および折りたたみスマートフォンの市場が想定より小さかったことから、ヒアリン製造事業は失敗に終わった。その後、新しい CEO を迎え入れ、Zymergen の技術プラットフォームが有するメタゲノムのライブラリを活用し、ガンを標的とした医薬品となるタンパク質を同定する Drug Discovery 事業に注力することを表明した。

◎ Insight

新市場をターゲットにしたことによる樹脂製造事業の崩壊

Zymergen 社は、上場からわずか 1 年半でヒアリンの製造事業に失敗した結果、Ginkgo Bioworks 社によって買収された。その原因として、新市場をターゲットした研究開発を主力事業に据えたことが挙げられる。Zymergen 社は、スマートフォン市場の新製品である折りたたみ式スマートフォンのフィルムとなる樹脂原料の製造技術の開発を行った。新しい製品や市場は、将来の見通しが不安定である場合が多く、容易にそのターゲット市場が縮小する、最悪の場合には消滅してしまう可能性がある。実際に、Zymergen 社は、折りたたみ式スマートフォン市場規模が想定より小さく、売上が立たなかったと報告した。また、技術面に関して、Zymergen 社の特許情報などには、樹脂の原料となるヒアリンの生産方法に関する記載は無く、生産量や対糖収率でヒアリンを生産できたのかは不明である。

2. バイオプロセス開発の事業化のための戦略

このように、バイオプロセスの開発に関わる代表的なスタートアップ企業においても、それらの企業の事業は確立されているとはいえず、先行きは不透明である。筆者の先端科学技術特定研究の成果を事業化するために、これらのベンチマーク企業の分析を、事業範囲などのサプライチェーン分析、およびこれらの企業が生産している化合物に対して 2×2 分析を行った。

2.1. サプライチェーン分析

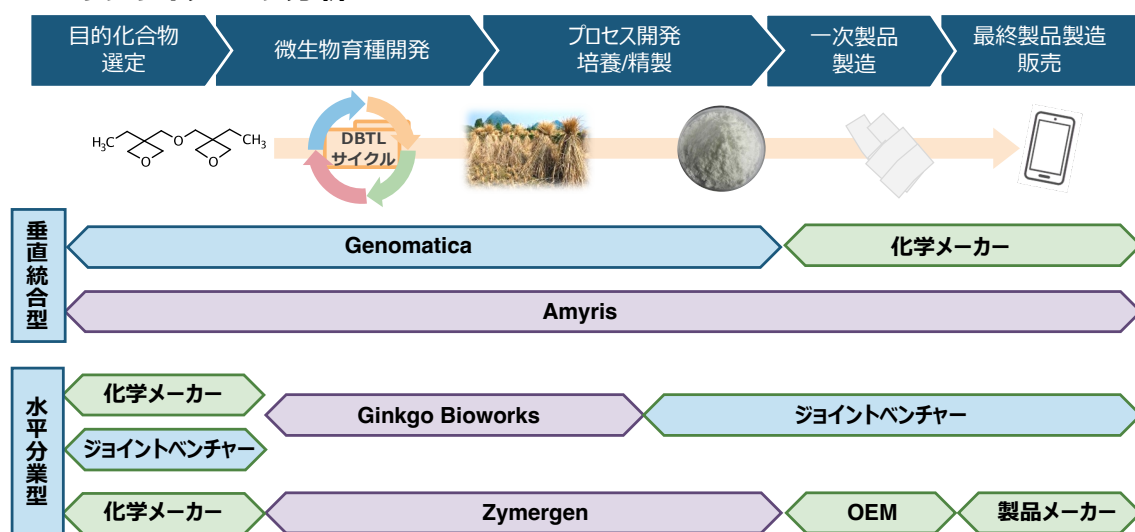


図 8-1 合成生物学のスタートアップ企業が形成するサプライチェーン

図 8-1 に、バイオプロセスの開発に関わるスタートアップ企業が取り組む事業領域に関して、サプライチェーンの観点から分析を行った結果を示した。Genomatica 社、Amyris 社、Ginkgo Bioworks 社、および Zymergen 社の事業範囲に関して、垂直統合型あるいは水平分業型に分類した。

垂直統合型の事業では、目的化合物の選定、微生物の育種開発に関する研究開発、培養/精製プロセス開発、大量生産のための商業培養、生産された化合物を用いた素材・樹脂などの一次製品の生産、最終製品の製造販売までを、自社内で一貫通貫の事業として展開する。これら垂直統合型の企業としては、Genomatica 社や Amyris 社が該当する。Genomatica 社は、1,4-ブタンジオールの製造技術を確立し、これまで化石資源から 1,4-ブタンジオールを製造していた BASF 社に販売している。また、ブタジエンなどの化合物に関しても、技術が確立された後に様々な企業と業務提携を発表している。Amyris 社に関しても、酵母を用いて生産された化合物を含む製品開発まで行いそれを販売しているため、垂直統合型のビジネスモデルと言えるだろう。

水平分業型の事業では、生産する目的化合物の選定から最終製品の製造販売までのサプライチェーンのうち、どこかの事業に特化して事業を展開しており、Ginkgo Bioworks 社や Zymergen 社はこれにあたる。Ginkgo Bioworks 社では、開発されたバイオプロセスによって生産される化合物や商品を含む最終製品の開発などを、スピンアウトした企業に任せる。Zymergen 社では、住友化学などのヒアリン生産に関するバイオプロセスの研究開発依頼を受託し、微生物の育種開発を行う。

生産された化合物を原料に製造される樹脂などの一次製品の製造以降の工程は、自社では行わず、外部企業によって行われる。

2.2. バイオプロセスによって生産される化合物

表 8-1 既存のスタートアップ企業によって生産された製品

社名	化合物	既存製造法の脅威	状況
Genomatica	1,4-ブタンジオール	弱い -製造法に複数の課題あり	生産中
Amyris	スクワラン	弱い -希少種や絶滅危惧種からの生産	生産中
	アルテミシニン	強い -植物からの直接抽出法	生産停止
	ファルネセン	無し -新市場	生産停止
Ginkgo Bioworks	代替肉添加剤 (Motif Foodworks社)	無し -新市場	継続中... (Patent revoked)
Zymergen	ヒアリン	無し -新市場	失敗

表 8-1 に、バイオプロセスの開発に関わるスタートアップ企業が生産している製品や化合物に関してまとめた。

Genomatica 社が生産している 1,4-ブタンジオール、あるいは DuPont Tate & Lyle Bio Products 社によって大腸菌を宿主に生産されている 1,3-プロパンジオール (1,3-propanediol) は、既存の製造法による脅威が弱く、商業生産が行われている化合物である。DuPont Tate & Lyle Bio Products 社は、2005 年に設立され、大腸菌を用いて 1,3-プロパンジオールの生産技術を確認し、その化合物を DuPont 社に納品している。DuPont 社は、購入した 1,3-プロパンジオールとテレフタル酸を縮合し、ポリトリメチレンテレフタレート樹脂として販売している。DuPont Tate & Lyle Bio Products 社の 1,3-プロパンジオール、および Genomatica 社の 1,4-ブタンジオールは、化石資源に依存したプロセスでの生産収率の低さなどから、既存の製造法 (=市場) による脅威が弱い。そのため、微生物を宿主としたバイオプロセスによって生産される化合物が市場での競争に勝利し、現在も生産が継続していると考えられる。

Amyris 社が商業生産していたスクワランは、Genomatica 社の生産している 1,4-ブタンジオールと同様に、既存の製造法による脅威が弱く、商業生産が行われている化合物である。スクワランは、動物や植物からの直接的な抽出法がほとんど唯一の既存の製造法である。動物から抽出されている化合物は容易に量産できないことから、既存の製造法の脅威は弱く、現在もスクアレンを含む化粧品として Amyris 社が市場に供給している。一方、動物から直接抽出される化合物と比較して、植物から直接抽出法による化合物の量産は比較的容易である。そのため、Amyris 社が生産していたアルテミシニンは、既存の製造法の脅威が強く、コスト勝負に敗れた。Amyris 社が過去にバイオ

燃料をターゲット市場として商業生産していたファルネセンは、これまでバイオ燃料として生産されてこなかった化合物であり、バイオ燃料としては新製品であった。ファルネセンは、バイオエタノール燃料やバイオディーゼル燃料と比較して、ファルネセンを用いたバイオジェット燃料の製造コストは高いため、現在では生産停止に追い込まれている。ファルネセンは、バイオジェット燃料用途以外にも、バイオ樹脂や付加価値の高い化粧品の原料としての使用用途が存在し、既存企業などと共同でゴムや化粧品原料としての新製品の用途開発を行っていた。しかしながら、最終的には2017年、Amyris社は、ファルネセンの製造プラントを含む設備を約1億ドルの金額でDSMに売却した。このように、新市場をターゲットにした場合の市場や製品開発の先行きが不透明であることなどによって、新製品を生産した場合には市場での競争に敗れる可能性が高い。

Ginkgo Bioworks社が生産する代替肉への添加剤は、代替肉市場に向けた新製品であるため、競争が激しい。執筆時においては、Impossible foods社の技術と比較して技術優位性に乏しく、特許を申請したが認められなかった。

Zymergen社が生産を試みたヒアリンは、新製品である折りたたみスマートフォン用途の樹脂原料であり、競争が激しく、また折りたたみスマートフォン市場が不安定であった。不安定な新市場の市場規模や成長性によって、バイオプロセスによって生産される化合物の市場定着性などが大きく左右される。すなわち、そのバイオプロセスを開発する企業の収益源も不安定化するため、リスクが大きく、創業期にターゲット市場とするには好ましくない。

2.3. 小括

近年、バイオプロセス開発工程の自動化やIT技術による微生物育種開発技術の高度化が注目を集めており、それぞれの要素技術の開発例がアカデミアを中心に報告されている[5]。しかしながら、大学などの研究機関で開発される微生物の育種開発に関する優れた要素技術は、各々が個別に開発しているため、それらを統合化して全ての要素技術を活用して技術開発を行うことは容易ではない。これらの統合化された微生物の育種開発の技術プラットフォームを提供するために、スタートアップ企業が起業されている。これらのスタートアップ企業と競合し勝利するために重要な点は、「バイオプロセスによってどの化合物を市場に提供しつつ、バイオプロセス開発の技術力を向上し続けるか」であろう。特に、合成生物学においては、遺伝子組換え技術を活用することで、あらゆる化合物を生産できる技術である可能性のある研究領域であるため、アルコール、アミノ酸から抗マラリア薬、ジェット燃料など、非常に多岐に渡る化合物が上市されてきた(表8-1)。

筆者らは、バイオプロセスの事業化に向けて、既存のスタートアップ企業に対する事業領域の分析、および市場に提供されている製品あるいは化合物の分析を行った。第一に、事業範囲に関して、垂直統合型から水平分業型の事業領域まで、それぞれの企業が異なる事業範囲でビジネスを展開していることが明らかとなった(図8-1)。次に、合成生物学を用いて生産する目的化合物は、既存の製造法による脅威が極めて小さいような化合物を生産対象に剪定するのが好ましいだろう。

3. 半導体の「ファブレス×ファウンドリ」の事業モデル

合成生物学を用いてバイオプロセス開発を行うスタートアップ企業のビジネスモデルは、垂直統合型あるいは水平分業型に分類することができ、それぞれの企業は既存市場あるいは新市場をターゲットとした多岐にわたる化合物や製品を販売している（図 8-1）。筆者は、ビジネスモデルに関する知見を深めるため、極めて水平分業化されている産業の1つである半導体製造の産業構造に着目することとした。実際に、Amyris 社あるいは Ginkgo Bioworks の事業はバイオファウンドリと呼ばれているが、これは半導体産業における半導体ファウンドリに由来していると考えられる。筆者は、バイオプロセスの事業化に向けて、半導体産業の構造が垂直統合型から水平分業型の事業構造に変化を分析することで、バイオプロセス開発の実用化に向けたヒントを得ることとした。

3.1. 半導体と半導体集積回路とは

世界に存在する物質は、物質中での電気の流れやすさの指標である電気伝導度に基づき、電気伝導度が $10^5 / \Omega \cdot m$ 以上を示す物質を導体、 $10^5 / \Omega \cdot m$ から $10^{-5} / \Omega \cdot m$ を示す物質を半導体、 $10^{-5} / \Omega \cdot m$ 以下を示す物質を絶縁体に分類される [6]。導体に分類される物質として金属が挙げられる。金属などの導体は、一般に、室温付近では電気を通すが、温度上昇に伴い導体の電気抵抗が上昇して電気が流れにくくなる。一方、半導体は、温度上昇に伴い電気抵抗が小さくなる逆の性質を有し、電気が流れやすくなる。よって、半導体の電気化学的特性は、加熱や光によって適切に制御することで意図的に制御することが可能である。

半導体は、シリコン（Si）やゲルマニウム（Ge）など 1 つの元素からなる元素半導体、および GaAs（ガリウムヒ素）など 2 つ以上の元素からなる化合物半導体が存在する。化合物半導体は、ネットワーク接続などに用いられる光ファイバーの製造に用いられる。また、シリコンなどの元素半導体は、パーソナルコンピューター（PC）を構成するメモリや中央処理装置（Central Processing Unit: PCU）などの半導体集積回路の製造に用いられている。シリコンは、元素半導体の元素うち地球上に最も多く存在しているため、現在の半導体集積回路の主要な原料である。シリコンは、最外殻の電子を 4 つ有しており、シリコン原子同士が共有結合を形成するため、分子として極めて安定な構造を有する。従って、純粋なシリコン原子が共有結合して形成された分子は、電気抵抗が高く、電気を通しにくい性質を有する。このシリコン分子に対し、不純物として振る舞うリン（P）やボロン（B）などの原子を添加することで、シリコン分子の電気抵抗が低下し、電気を通しやすくなる。また、シリコン分子を加熱して酸素ガスと接触させることで、シリコン分子の表面にシリコンの酸化膜（ SiO_2 ）が形成されて、電気抵抗が極めて高まり、電気を通さない絶縁体のように振る舞う。このようなシリコン分子の特徴を利用して、半導体集積回路が製造されている。

半導体集積回路とは、シリコン分子の表面上に、複数の抵抗体やコンデンサなどの素子を形成し、機能を発揮するよう設計され製造されている電子回路の総称である。半導体集積回路には、マイクロプロセッサ、メモリ、D-A（Digital to Analog）コンバーターディスプレイ、各種センサーなど、多様な製品がある。これらの半導体集積回路は、コンピューター、スマホ、テレビなどのデジタル家電製品、

クルマなど世の中に存在する様々な製品に使用されており、人が生活する上で欠かせない製品となっている。

3.2. 半導体集積回路の価値提供

半導体集積回路の価値は、シリコン表面の極めて小さな領域に電子回路を集積できることである。半導体集積回路の製造技術が確立される以前では、過去のラジオを例に出すと、コンデンサや抵抗などの必須の構成要素を組み込んで作成すれば、大きさは一辺 10cm、厚み 2cm 程度になる。一方、半導体集積回路の製造技術が確立されたことで、シリコン上の微細な領域に対して特定の機能を持った電子回路を集積できた結果、あらゆる電子機器などの小型化を実現することができた。上述したラジオの機能を現在の技術を用いてシリコン表面上に構築すると、その大きさは厚さ 200 分の 1、大きさ 10 万分の 1 となり、最終製品であるラジオの圧倒的な小型化を実現できる。このように、様々な機能を発揮する電気回路を小型化することによって、最終製品が小型化する、あるいは優れた機能を有する半導体を複数搭載することが可能になり、電子機器などの高機能化を実現することができる。

1965 年、Intel 社の創業者であるゴードン・ムーアは、ムーアの法則と呼ばれる半導体技術の進歩に関する経験則を発表した。ムーアの法則とは、半導体の製造に関して、コストを低減しつつ、半導体集積回路に搭載される電気回路の増幅端子の数が、約 18 ヶ月で 2 倍に増えているという経験則である。シリコン表面上への電子回路の高集積化に伴い、Intel 社の製品 corei7 の増幅端子の集積度は 14 億個にまで達したほか、量産化の恩恵を受け、原料費の低減などに削減により製造される半導体集積回路 1 個あたりの価格は劇的に低下していった。1971 年から 2012 年までに、シリコン上での集積度は 60 万倍になり、そのサイズは 1000 分の 1 に集約されたとされる。そして半導体集積回路 1 個あたりの価格は、1 億分の 1 になったとされている。この半導体の価格の低下の要因のうち、その 80%がシリコン表面の微細加工技術によるものであると言われている。この微細加工技術が、半導体集積回路の低コスト化はもちろんのこと、小型化に大きく貢献した。

3.3. 半導体集積回路の製造に関わるサプライチェーン

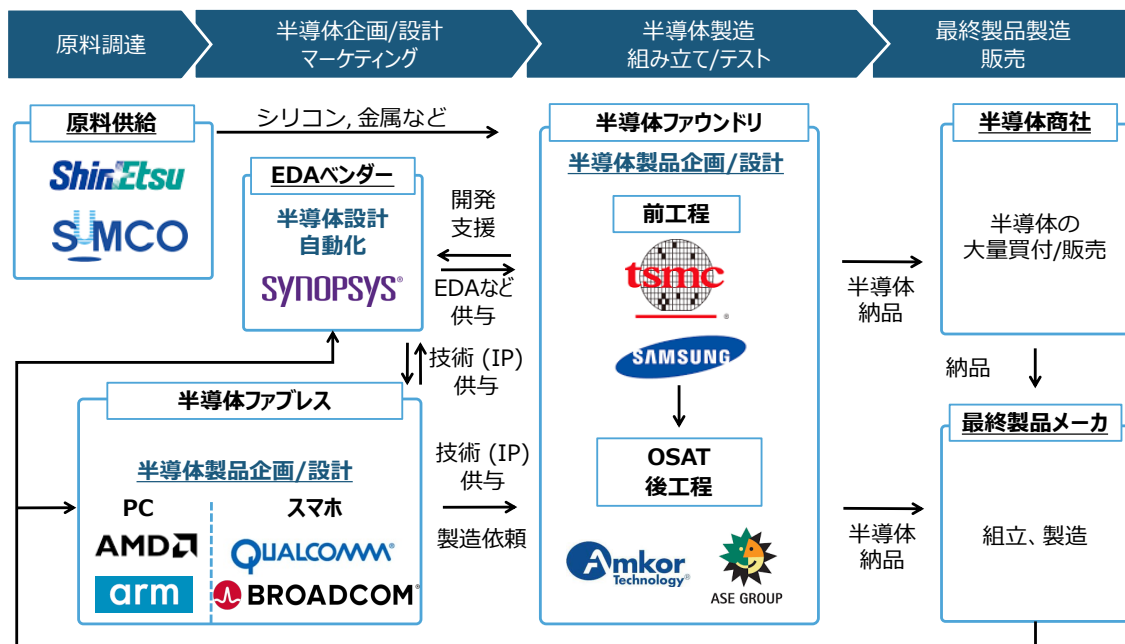


図 8-2 半導体集積回路製造のサプライチェーン

図 8-2 に示すように、半導体集積回路の製造工程は、原料調達、半導体の企画/設計、およびマーケティング、シリコンなどを原料とした半導体の製造、半導体が搭載された最終製品の製造および販売の工程に分類される [7]。半導体の企画/設計では、半導体の回路設計およびその組み合わせのパターン（レイアウト）設計が行われている。また、現在の半導体の製造は、その工程に従い前工程と後工程に分類される。過去の半導体の製造では、垂直統合型のビジネスモデルにより、前工程と後工程が、Intel 社や Texas Instrument 社などの Integrated Device Manufacturer（IDM）と呼ばれる事業者によって一気通貫で行われていた。現在では、半導体集積回路の高集積化に伴い、それぞれ前工程と後工程を専業で担う事業者が次々に現れ、高度に水平分業化されたビジネスモデルとなっている。

▼ 原料供給

原料供給事業では、半導体の製造に必要なシリコンウェハ、金属線、超純水、シリコン加工用の樹脂を供給する。

※ 該当企業： 信越化学工業、SUMCO 社など

半導体企画/設計

半導体の企画では、製造する半導体の機能や性能を定義する。企画の工程は、自社の半導体製品を有する半導体ファブレス、もしくは最終製品を製造する総合電気メーカーが行う。半導体の設計のうち、回路設計の工程では、半導体の企画の段階で定義された機能や性能を実現するような電子回路を設計するため、シミュレーションなどを繰り返すことで最適な電子回路を設計する。また、パターン設計では、シリコンウェハ上に最小面積となるように電子回路を構築する。

▼ Electronic Design Automation (EDA) ベンダー

EDA ベンダーでは、半導体集積回路の設計作業を自動化するツールやソフトウェア、知的財産（Intellectual property: IP）を半導体ファブレスや最終製品メーカーに提供する。また、半導体ファブドリが指定する設計手法で設計可能なソフトウェアを開発、提供している。近年では、半導体の電子回路は高度に集積されているため、手作業で設計することは不可能に近い。EDA ベンダーの顧客は、EDA ベンダーが提供するツールやソフトウェアを使用することで、自社に必要な半導体の集積回路を含む製品を迅速に市場に投入することが可能だ。多くの顧客に自社の設計ツールを使用してもらうため、自社ブランドの半導体集積回路の製品を有さない。なぜなら、自社ブランドの製品を有してしまえば、半導体の性能や機能に関する機密情報が漏洩することに対する懸念から、半導体集積回路の設計ツールを利用するのを控える顧客が増えるためだ。

※ 該当企業： Synopsys 社、Cadence Design Systems 社など

▼ 半導体ファブレス

半導体ファブレスでは、まず、最終製品に必要とされる半導体集積回路の機能を定義し、その半導体集積回路の機能をプログラミング言語を用いて記述する。また、半導体の設計では、シミュレーションを繰り返すことで、最適な電子回路およびパターンを決定する。特に、半導体ファブレスでは、半導体の電子回路のうち、特定の機能やセキュリティシステムを有する電子回路を IP 化し、その設計データを他社にライセンス方式で供与する。そのため、その機能を発揮する電子回路を使用する企業は、半導体ファブレスが保有する IP に対してライセンス料を支払う。また、世界に大量に存在する製品であるパーソナルコンピュータ（PC）やスマートフォンに使用される半導体の機能開発に関して、その最終製品メーカーなどが求める性能を調査し、それらのニーズを満たすような半導体集積回路を設計して自社ブランドの半導体製品として販売する。そのため、EDA ベンダーと異なり、マーケティングや販売などの機能を有している。

※ 該当企業： PC 用途： AMD 社、ARM 社など；スマートフォン用途： Qualcomm 社、Broadcom 社など

半導体製造

半導体の製造工程には、設計された電子回路を原料であるシリコンウェハの表面上に形成する前工程、および前工程で製造された剥き出しの電子回路を外部の衝撃などから保護するための樹脂による保護（パッケージング）や製造された電子回路が正常に動作するかを確認する後工程

(Outsourced Semiconductor Assembly and Test: OSAT) に分かれる。この、前工程と後工程には合計で、4ヶ月程度の期間を要する。

▼ 半導体ファウンドリ

半導体ファウンドリでは、半導体ファブレスで開発された機能が定義され、EDA ツールを用いて設計された半導体集積回路の仕様書に基づき、シリコン原料から有機化学の技術などに基づき製造する工程を担う。前工程には、シリコンウェハの製造、シリコンウェハ上に電子回路となる層を形成する「成膜」、設計された電子回路パターンを転写する「リソグラフィー」、転写された電子回路パターンにそって薄膜を削る「エッチング」、シリコンに不純物を混ぜて電気伝導率を上げるための「不純物添加」、表面の凹凸を磨いて平らにする「平坦処理」の工程が含まれる。前工程では、これらの工程を繰り返し、何層にもわたる電子回路を形成していく。

※ 該当企業： TSMC 社、Samsung Electronics 社など

後工程では、シリコンウェハ上に数百程度形成された同一の半導体を1つ1つ切り出す「ダイシング」、切り出された半導体を基盤フレームに固定する「ダイボンディング」、半導体に電気を流すために必要な金属線を接続する「ワイヤーボンディング」、樹脂で半導体を保護する「モールドイング」、製造された半導体が正常に動作するかを確認する「検査」などの工程が含まれる。

※ 該当企業： Amkor Technology、ASE Group など

▼ 半導体商社

半導体商社では、半導体ファウンドリで製造された半導体を各企業に納品する。

▼ 最終製品製造メーカー

最終製品製造メーカーでは、まず、自社の最終製品に必要な機能を定義する。その定義された機能を実現するため、EDA ベンダーが提供するソフトウェアなどを用いて半導体を設計し、半導体ファウンドリへ製造を依頼する。製造された半導体集積回路を用いて、自動車や各種電子機器を製造する。

3.4. 半導体産業での水平分業化の経緯

1947年、アメリカのAT&T社のベル研究所にて、電子回路により電気信号を増幅する装置であるトランジスタが開発された。トランジスタが開発されて以降、アメリカと日本を中心に半導体製造の産業が発展していった。日本国内においても半導体製造は主要な産業の1つとして位置づけられるようになった。1985年、半導体集積回路の1つであるDynamic Random Access Memory (DRAM)の市場では、日本企業によるシェアが約80%にまで到達した。当時の日本の半導体製造事業では、電子機器を製造販売する総合電気メーカーが中心となり、その製品に必要な半導体の機能設計および製造工程、半導体の製造に必要な製造装置の開発、半導体が搭載された最終製品の製造までを全て自社内で行う、垂直統合型の事業を展開していた。しかしながら、1990年代に入ると、半導体集積回路の製造に関わるそれぞれの要素技術や要素技術を集積するための

技術力が極めて高度化した。最終製品を製造する総合電気メーカーでは、自社ブランドの製品の製造に必要な半導体を製造する研究開発部門における研究開発費および製造設備投資費が急激に増大した。その半導体製造に必須の研究開発費は、次第に、自社ブランドの製品に使用する場合のみで投資可能な研究開発費を上回るようになった。その結果、単体の総合電気メーカーは、自社内で必要な半導体集積回路の製造を担うことが困難となっていった。

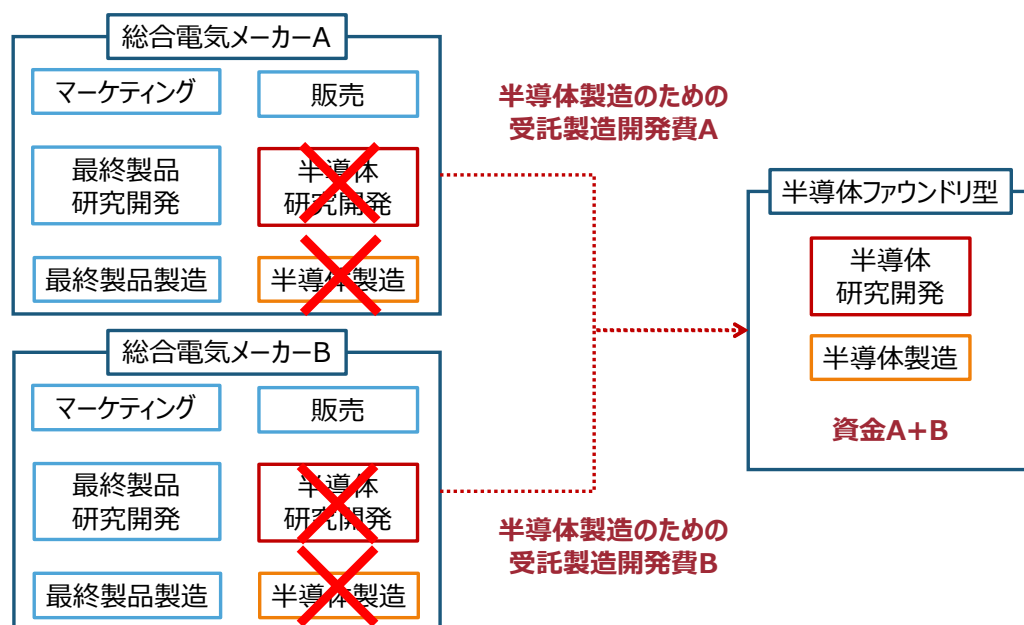


図 8-3 半導体産業の水平分業型のビジネスモデル

1 社のみでの半導体集積回路の製造が困難になる一方で、社会では、モノのインターネット（Internet of things: IoT）化が進み、世の中のあらゆる製品に半導体が使用されるようになった結果、半導体集積回路の需要がますます増大した。そこで、この半導体製造の工程を専業で担う、半導体ファウンドリが台頭してきた。また、半導体の製造のみならず、半導体の設計や設計ツールを提供する半導体ファブレスも現れた。このことにより、既存の総合電気メーカーは、自社の半導体製造部門を廃止して、半導体ファウンドリに自社の半導体の製造を外注するようになった。半導体の製造を担う半導体ファウンドリでは、複数の電子機器メーカーから半導体製造のための研究開発費や製造費用を受け取り、その集約された資金を最先端の設備投資に使用して最先端の技術力を手に入れることができる。また、社会の半導体製造ニーズに耐えうる、大規模な半導体の製造設備を保有することが可能になった（図 8-3）。また、シリコンウェハなど原材料の一括購入によるコスト低下により、半導体の大量生産を行えば行うほど、半導体ファウンドリによって製造される半導体集積回路の価格は低下していった。半導体ファウンドリに半導体の製造を外注することにより、これまで半導体の製造を担っていた既存の総合電気メーカーなども、自社内の経営資源を自社ブランドの製品開発に集中して投下できたため、経営リスクの低減などの恩恵を受けることができた。

3.5. 半導体製造工程で重要となる技術

半導体ファウンドリが保有する半導体の製造技術は、主に、要素技術、インテグレーション・量産化技術の2つに分類される [8]。要素技術とは、シリコン上に膜を形成する成膜技術、電子回路のパターンを転写するリソグラフィ技術、リソグラフィによって形成されたフォトマスクに従ってシリコン上を加工するエッチング技術、シリコン上の微細なゴミを除去する洗浄技術、形成されたパターンを測定する検査技術などがある。

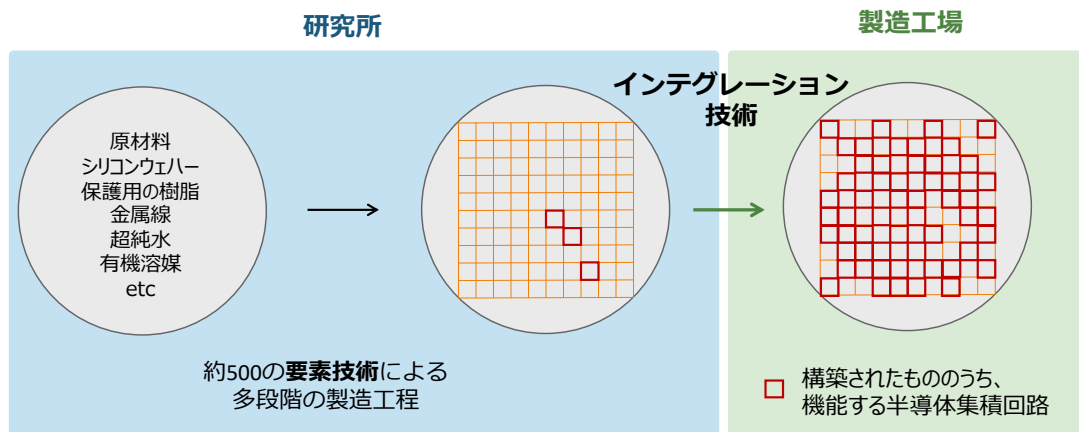


図 8-4 半導体製造における要素技術およびインテグレーション技術の概要

インテグレーション・量産化技術とは、設計された機能を発揮できるよう、シリコンウェハ上に少なくとも500を超える要素技術の組み合わせを検討して集積していくための技術全般である。研究所レベルでは、要素技術を組み合わせて形成される半導体は、シリコンウェハ上に少なくとも1つ以上の正常に機能する半導体を形成できれば良い。しかしながら、これでは、効率があまりにも悪く、量産化することは難しい。この製造された半導体集積回路のうち、機能する半導体集積回路の割合を示す指標を歩留まりと呼ぶ。研究所で開発された技術をもとに半導体集積回路を量産化するためには、歩留まりを向上させ、正常に動作する半導体をシリコンウェハ上になるべく多く形成する必要がある。この数百にも及ぶ要素技術を組み合わせる順序などの考慮し、歩留まりがなるべく高くなる製造工程を考案する技術がインテグレーション・量産化技術である（図 8-4）。半導体ファウンドリのインテグレーション技術者は、自社の研究所の要素技術の開発者あるいは製造に用いる半導体製造のための装置メーカーと密接に連携を取りつつ、歩留まりの高い製造工程を実現している。どうしても歩留まりが低い場合は、半導体の設計や要素技術を最初から見直す場合もあり、量産化のために非常に重要な技術となっている。インテグレーション技術者は、歩留まりが低い要因を正確に見抜く必要があり、半導体製造に関わるおおよそ全ての技術に精通している必要がある。

3.6. ビジネスモデルのベンチマーク分析

TSMC 社

TSMC は、現状、世界最大の半導体ファウンドリであり、半導体ファブレスが設計した半導体集積回路を製造する事業を展開している [9, 10]。1987 年、台湾政府の半導体産業を将来の基幹産業にしたいという考えから、国策会社として設立された [11]。メモリ、システム LSI（大規模集積回路、Large Scale Integration）、CMOS（Complementary Metal-Oxide-Semiconductor）イメージセンサーなど多岐にわたる半導体集積回路を製造している。創業時の出資者は、台湾の政府系ファンドである行政院国家発展基金、および Philips 社であった。創業者のモリス・チャンは、垂直統合型の半導体製造事業者である Texas Instrument 社での勤務経験などから、総合電気メーカーなどの当時半導体集積回路を製造していた企業が、コストカットのために半導体の製造機能を外部企業に外注することを迫られる、という考えがあったようだ [10]。当時、半導体集積回路の製造機能を維持するには多額の資金が必要となりつつあった。よって、半導体製造に要する技術に高度化するにつれて、垂直統合型の民間企業ではその投資額が大きな負担となりつつあった。

当時、台湾は半導体の製造に関わる産業全ての領域で遅れをとっており、台湾国内に半導体の機能設計を担えるような優秀な技術および人材が不足していた。そのため、半導体製造産業に後発参入の台湾は、半導体産業での地位を確立するため、半導体製造のうち、特定の分野に限られた資源を集中投入する戦略を取った。その結果、半導体集積回路の製造工程に特化した事業を展開し、現在までの事業成功を収めている。

創業期は、既存の半導体製造企業の非先端的な半導体の製造工程を受託し、収益を確保しながら、確保した資金を次第に先端的な技術への投資に用いた [12]。台湾国内の技術者と比較して、当時の半導体製造事業者であった日本国内の半導体の製造事業者は、半導体製造工程のインテグレーション技術が高かった。そのため、2000 年代以降、半導体製造のための装置や設備が高額になった際には、日本の技術者は先端的な設備に投資することなく、旧世代の設備をなんとかインテグレーションすることで半導体製造事業を継続していた。一方、TSMC 社に所属する台湾国内の技術者は、インテグレーション技術が乏しかったため、先端的な半導体の製造に必要な最先端の設備を次々に購入した、その結果、日本の国内企業の半導体製造の技術レベルは低下した一方で、TSMC 社の半導体製造の技術レベルが飛躍的に向上していった。

TSMC 社では、複数の企業から半導体の製造依頼を受託するため、最先端の製造設備を複数のプロジェクトで共用で製造することができ、設備費用を短期間で減価償却することが可能だ。素早く減価償却を終えた製造設備は強いコスト競争力を持つ。半導体製造の装置メーカーも、先端的な製造設備を開発すると TSMC 社が購入してくれるため、TSMC 社と戦略的提携などを結んで製造設備の開発を行った。TSMC 社は、その最先端の設備を優先的に導入することで、さらに製造設備を強化して参入障壁を高く保つことができ、製造を依頼する顧客にとっても魅力的な製造ラインを確保した。よって、TSMC 社は、世界最先端の半導体集積回路の製造技術を擁することができる。

◎ Insight

極めて高度な技術を必要とする半導体の製造工程において、これまで半導体の製造を担っていた垂直統合型の企業が、研究開発への投資が困難になっていた。そのニーズを捉え、受託製造型のビジネスモデルを展開することで、TSMC 社は現在までの成功を収めている。同業の半導体製造のシェア 2 位の UMC 社と比較して、TSMC 社は、市場での圧倒的なシェア 1 位を誇っている。その主要因は、① 半導体製造に関わる全ての技術開発を自社で進めたこと、② 事業範囲を明確にし、自社ブランドの半導体製品を持たなかったこと、③ 台湾政府の支援があったこと、が挙げられる。

①に関して、TSMC 社は、半導体製造工程に関わる技術を全て自社で開発して保有している。対して、競合の UMC 社は垂直統合型の半導体製造企業である IBM 社などと共同研究開発を行って、技術開発を進めていた [13]。その結果、UMC 社は TSMC 社よりも技術力で劣ってしまった。例えば、UMC 社では、前工程で必須の要素技術であるリソグラフィ工程で形成するフォトマスクの製造技術を保有していない。そのため、IBM 社などの技術を流用して製造している。半導体ファウンドリに製造を依頼する企業は、自社内で半導体を販売する IBM 社などの既存企業への機密情報の流出などを懸念して、UMC 社へ依頼することを躊躇う。そのため、半導体ファウンドリを展開するにあたり、TSMC 社のように自社内の技術で半導体製造工程を完結させ、情報漏洩などの不安なく製造を依頼することができるという点が重要であった。

②に関して、TSMC 社は、自社ブランドの半導体製品を有さず、半導体の製造依頼を受託するビジネスモデルを貫いている。仮に TSMC 社が自社の半導体製品を有してしまえば、半導体の製造を依頼する際に提供する情報を、TSMC 社自身の製品へ流用されてしまうのではないかと懸念する。これでは、受託製造型のビジネスモデルが成立しない。また、TSMC 社が半導体の受託製造のビジネスモデルを確立するまでは、半導体ファブレスは既存の垂直統合型の企業に半導体製造を依頼していた。垂直統合型の半導体製造企業は、自社ブランドの半導体製品を製造していたため、半導体ファブレスの製造依頼を後回しすることが多かった。一方、TSMC 社は、自社ブランドの半導体製品を有さないため、半導体ファブレスの依頼に対して迅速に製造を開始することができる。このように、TSMC 社は、受託製造のビジネスモデルを守り、1994 年の年次報告書では、「既存の半導体メーカーにとって競争相手ではなく、パートナーである」と対外的に表明している。半導体ファブレスは TSMC 社が繰り返し利用するため、社内での半導体設計工程の一部を TSMC 社と共通化するようになった。これが進み、TSMC 社の業務工程は、半導体製造の業界水準となった [14]。TSMC 社は、半導体ファブレスに対し、半導体設計時の技術的なアドバイスを行っている。半導体の設計に携わる半導体ファブレスと頻繁に情報交換を行う過程で、TSMC 社の半導体集積回路の製造工程も最適化される相乗効果が起きた。

③に関して、最先端の半導体製造の必要な設備を整えるには巨額の設備投資が必須となることから、台湾政府は、行政院国家発展基金を通じた資金提供や、税金優遇政策、あるいは減価償却期間に対する柔軟な対応を行った [15]。例えば、法人税の無税期間制度、設備投資額に応じた投資税額の控除制度、減価償却期間を自由に設定可能な制度などである。その結果、

TSMC 社などの半導体ファウンドリは、半導体の製造設備への投資が容易になり、高度な技術開発を進めやすい環境にあった。

4. イノベーションアイデア

現在、化石資源を原料に製造されている化学品やその原料となる化合物に関して、持続可能なバイオプロセスにより生産することが望まれている。微生物の代謝経路を高度に設計することで、合成生物学に基づいたバイオプロセスには、ありとあらゆる化合物を生産することができると世界中から期待されている。しかしながら、バイオプロセス開発で重要な微生物の育種開発技術は、未だ発展途上の過程にあるため、非常に低いコストで製造されている既存の製造法に対抗できるコスト水準で目的の化合物を製造することは困難である。

また、バイオプロセス開発に関して、従来の育種開発技術を有するような既存企業では、社会に望まれているレベルで既存の製造法を上回るバイオプロセスを開発することはできないと考えられる。既存企業では、自社ブランドの発酵飲食品を製造するための研究開発の一部門として、微生物の育種開発技術を保有している。バイオプロセスによる化合物生産の期待に応えるためには、非常に高度化された微生物の育種開発技術やその研究設備、および自動化装置が必要となる。しかしながら、既存企業、特に研究開発費を削減する傾向にある日本企業では、自社ブランドの製品を製造する目的のみで、合成生物学に関わる全ての高額な研究開発設備を揃えることは現実的ではない。また、仮に研究設備を整備することが可能になったとしても、それを活用する人材やノウハウは不足している。

また、自社でのバイオプロセス開発が困難であると認知した既存企業が、大学との共同研究によって技術開発を行う動きもある。大学や研究機関は、バイオプロセス開発に必要な要素技術開発のための最新鋭設備を有する場合もあるが、それらの要素技術の開発能力を全て有している場合は希少であり、それらの要素技術をインテグレーションするノウハウに乏しい場合も多い。バイオプロセス開発の委託先としてスタートアップ企業も考えられるが、半導体産業の高度に水平分業されたサプライチェーン上で見られるように、機密情報の漏洩などの懸念から、バイオプロセス開発を行い自社ブランドの製品を生産する既存の Amyris 社などのスタートアップ企業の活用は躊躇されるだろう。

以上から、筆者は、バイオプロセスが社会に普及しようとする社会において、現在化学品およびその原料化合物を生産する既存企業が、微生物を活用したバイオプロセスの開発を専業で受託開発してくれる事業を求めるのではないかと考えた。筆者は、先端科学技術特定研究において、出芽酵母の微生物育種に取り組み、特許出願に至るような技術的ブレイクスルーや知見、ノウハウを得ることができた。そのため、筆者の先端科学技術特定研究の成果を事業化するためには、ブレイクスルー技術を活用して生産する化合物を選定しなければならない（図 7-1）。表 8-2 に示したベンチマーク分析で得られたインサイト（）を活用して、目的化合物を生産する必要がある。また、図 8-1 に示したバイオプロセス開発の事業範囲に関して、選定された目的化合物を自社ブランドの製品として製造販売するのかどうかを決定する必要がある。これらを踏まえて、筆者は、本イノベーション・ア

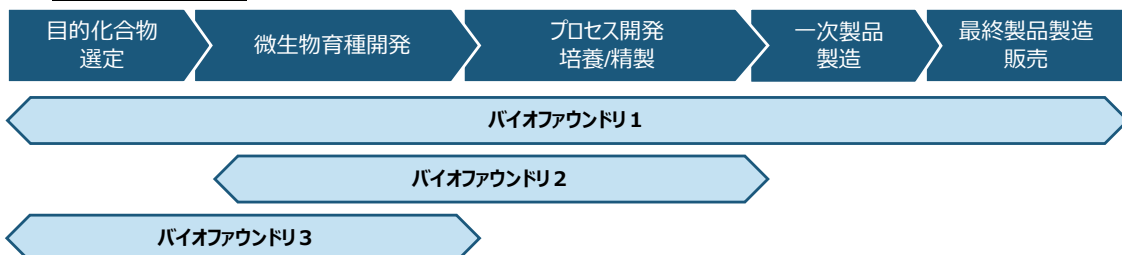
アイデア成果報告書において、「バイオファブレスによる、微生物育種技術に基づいた原料化合物製造法を受託研究開発する事業」を展開することを提案する。

4.1 バイオプロセス開発事業の事業範囲および開発対象

■ 半導体製造



■ バイオプロセス開発



■ 本書



図 8-5 筆者が提案するバイオプロセス受託開発事業の事業範囲

筆者は、化学品製造のためのサプライチェーン上において、原料となる化合物を生産するための製造法（バイオプロセス）を受託開発する事業を展開する（図 8-5）。半導体製造に関わる水平分業化に着想を得て、バイオファウンドリによって行われてきた「微生物の育種開発によるバイオプロセス開発」と「微生物の培養法および化合物の分離、精製工程のプロセス開発、および商業生産」の役割を、バイオファブレスと培養ファウンドリにそれぞれ分業することを提案する。

目的化合物の選定に関して、従来では、新規のスタートアップ企業が保有する技術によって一義的に決定される、あるいは既存企業のニーズによって決定される場合があった。提案するバイオファブレスでは、後者の既存企業のニーズに対応して目的化合物を製造する。既存企業が有する製造法を持続可能な製造法に代替したいというニーズに対応し、微生物を活用したバイオプロセスを受託開発する。開発したバイオプロセスは、自社でプラントを設立して商業培養および化合物の精製・販売を行うのでは無く、商業規模での培養や精製を受託してくれる事業者へ委託して、本工程を担う事業者を、培養ファウンドリと呼称した。バイオファブレスで開発されたバイオプロセスをもとに培養ファウンドリによって生産された化合物は、バイオプロセスの製造を依頼した既存企業の製品として、下流の化学メーカーに納品される。化学メーカーでは、納品された原料化合物を樹脂などに一次製品に変換する。製造された一次製品は、最終製品メーカーに納品され、以降の加工や最終製品の製造に用いられる。

表 8-2 創業期の目的化合物の現在の製造法、製造企業など

対象の化合物	従来の製造法	価格、製造量など	用途	製造企業 = バイオフィブレスの潜在的資金提供者
フェノール	ベンゼンとプロピレンから得られるクメンを原料にクメン法により製造	230~240 yen/kg 生産量=551,689 t 輸出=39,421,321 kg 輸入=104,070,535 kg	各種原料, 消毒剤,	三菱ケミカルHD 三井化学
ハイドロキノン	フェノールを過酸化水素と反応, クメン法の副産物である2,4-ジイソプロピルベンゼンを酸化,	1600~1700 yen/kg 生産量 = 10,000 t 輸出 = 不明 輸入 = 448,560 kg	スーパーインブラ PEEKなどの原料, MMA、アクリル酸の重合禁止剤	三井化学, 宇部興産 (6,000t)
サリチル酸	フェノールから得られるナトリウムフェノキシドをCO ₂ ガスと反応させる	550~650 yen/kg 生産量=2,600 t 輸出=13,681kg 輸入 = 804,848 kg	アゾ染料, 防腐剤, 医薬品原料	イービーアイコーポレーション
スチレン	エチルベンゼンを原料とし, 酸化鉄によって脱水素, ガソリン留分から分留	市場価格不明 生産量=1,874,776 t 輸出 = 648,908,965 kg 輸入=不明	ポリスチレン樹脂, 合成ゴム, ABS樹脂など	旭化成, 出光興産, 太陽石油など
ビスフェノールA	フェノールとアセトンを強酸存在下で脱水縮合	460 yen/kg 生産量=416,535 t 輸出 = 181,200,118 kg 輸入 = 36,157,010 kg	ポリカーボネート樹脂, エポキシ樹脂	三菱ケミカルHD 三井化学 日鉄ケミカル&マテリアル 出光興産
安息香酸	トルエンを下流酸マンガンをなどで直接的に酸化, 蒸留精製	市場価格不明 生産量不明 輸出=185,096 kg 輸入=6,262,011 kg	防腐剤、医薬品原料など	三菱ケミカルHD 三井化学
p-ヒドロキシ安息香酸	カリウムフェノキシドを加圧下でCO ₂ と反応させる	不明 (パラオキシ安息香酸メチル:6000t)	液晶ポリマー合成原料、パラオキシ安息香酸メチルの原料	上野製薬

▼ バイオフィブレスのターゲット市場

バイオフィブレス事業が開発したバイオプロセスにより製造される化合物を定めるため、石油化学サプライチェーンの崩壊によって石油化学市場全体の競争力が弱まることに着目した。創業期には、微生物の代謝によって製造される化合物のうち、シキミ酸経路から石油化学を経て生産されている芳香族化合物のバイオ生産法を開発する。特に、表 8-2 に示す化合物のうち、フェノール、ハイドロキノン、サリチル酸、スチレンの製造のための技術開発を行う。現在、フェノール、ハイドロキノン、サリチル酸、スチレンは、既存の大手石油化学メーカーらにより生産されている。しかしながら、これらの企業は、バイオプロセス開発の包括的な技術力を有してはいない。そのため、既存企業のバイオプロセス開発のニーズを埋めるべく、バイオプロセス開発を受託開発する。バイオプロセスの受託開発の過程で、酵素改変技術や代謝工学に関する技術力を高度化することを目指す。

5. イノベーションストラテジーと成長戦略

5.0. 筆者が描く将来のバイオプロセスの未来

筆者は、バイオプロセスの原料として、将来は CO_2 、ギ酸、メタノールなどの炭素数 1 の C1 化合物を用いることが理想的であると考えている。 CO_2 は、大気中に存在していて誰もが自由にアプローチ可能な原料の 1 つである。そのため、現在のバイオプロセスに用いられているバイオマス原料の生産、収集、前処理に多大なコストが必要な有機物原料と比較して、低コストで環境負荷の低いバイオプロセスを実現するために必須であると考えられる。加えて、現在の様々なプロセスから放出されている CO_2 をも活用することができる。 CO_2 を原料として用いることが可能になれば、現在の大量に収集されたバイオマス原料を大規模な培養設備を用いて化学品を生産するプロセスから、各地に分散して存在する比較的小規模な商業培養設備で化学品を生産するプロセスへの移行が予測される。このような小規模・分散型のバイオプロセスが実現すれば、より多くの企業がバイオプロセスを利用可能になり、バイオプロセスが加速度的に社会に普及する契機となる。これは、クレイトン・クリステンセンが提唱した破壊的イノベーションのうち、新市場創造型の破壊的イノベーションに当てはまる [16]。

一方で、自然界に存在する微生物の CO_2 固定化能は、バイオプロセスを通じて社会実装するには十分では無い。 CO_2 を基質とした場合の有用化合物の生産性は低いことに加えて、遺伝子組換え技術の不足により、 CO_2 を固定化可能な微生物を育種開発するには長い年月を要する [17, 18]。加えて、遺伝子組換えツールの豊富ではあるが C1 化合物を原料として用いることができない大腸菌 *E. coli* を宿主に、代謝工学により C1 化合物からの化学品生産プロセスの研究開発が加速している。これらの研究開発成果により、幾つものブレイクスルー技術が世界で生まれているが、社会に実装するためには未だ多くの開発課題が残されている [19, 20]。

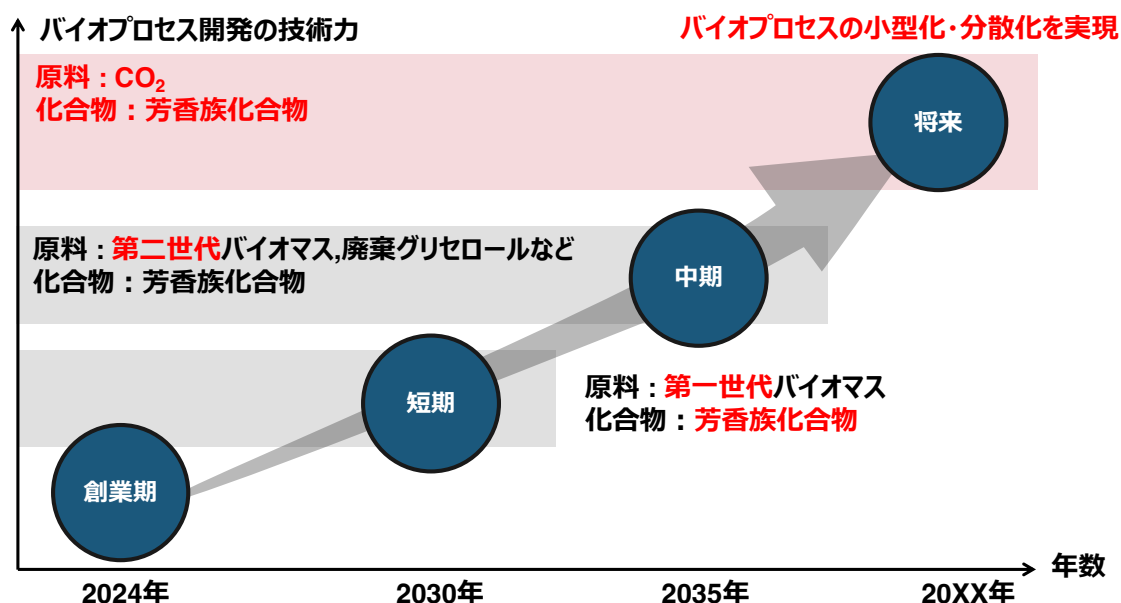


図 8-6 バイオフィアブレス事業の成長戦略

そのため、筆者は、将来的なバイオプロセスが普及した社会を見据え、 CO_2 などの C1 化合物を原料としたバイオプロセスを最終的に開発できる技術力を養うため、短期、中期、長期に分割して事業計画を立案した（図 8-6）。まず、短期には、ベンチマーク分析により選択した芳香族化合物のバイオ生産プロセスの開発を行う。創業期のバイオプロセスの原料としては、サトウキビやとうもろこしなどの第一世代のバイオマスから得られるグルコースやスクロースを想定している。次に、中期には、その芳香族化合物のバイオ生産プロセスを発展させ、より広範な芳香族化合物を生産可能にするためのバイオプロセスの開発に取り組む。最後に、長期には、短期および中期で開発したバイオプロセスの原料を低コスト化するための技術開発を行う。短期で使用することを想定しているサトウキビなどではなく、稲わらや麦わらなどの第二世代のバイオマス原料、そして、C1 化合物を基質として利用可能な微生物の育種開発を行う。この長期的な経営計画において、筆者らの開発した酸化的キシロース代謝経路を介したバイオプロセス開発の成果を活用可能である。以下、それぞれの期間においてサプライチェーン上のポジショニング、戦略について述べる。

5.1. 創業から短期経営計画（～2030年まで）

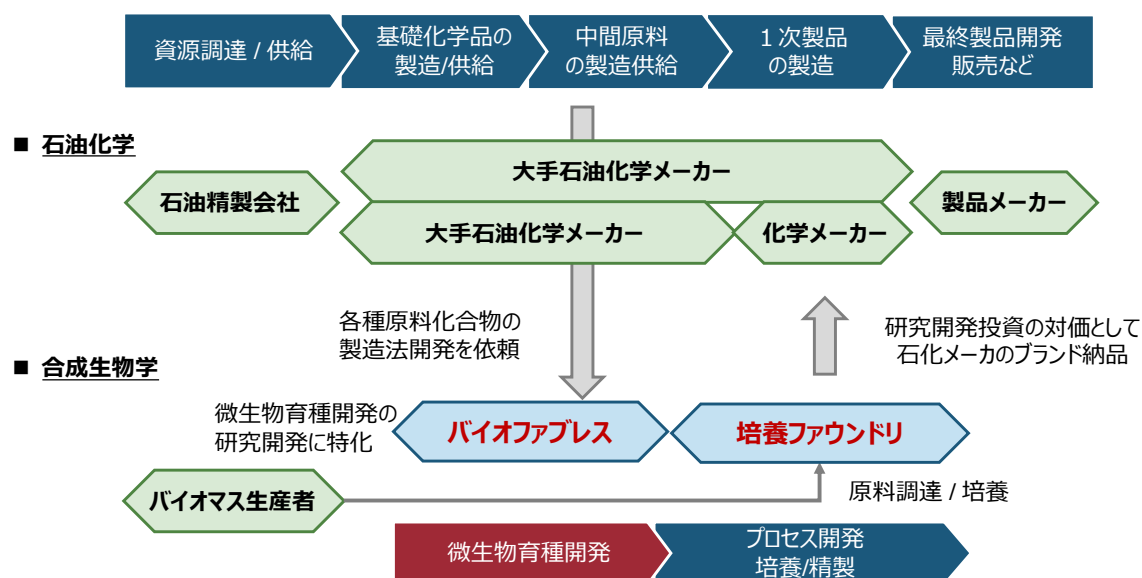


図 8-7 創業期のビジネスモデル

◎ 創業期におけるバイオフィアブレスの事業戦略

現在、持続可能な社会を構築するという世界的な潮流により、原油の精製やクラッキングに基づく石油化学産業は縮小および高コスト化を余儀なくされている。将来的なサプライチェーンの崩壊の危機に対処するため、既存のサプライヤーは、原油の分離精製およびクラッキングを経て生産されている化合物を生産し続けるための持続可能な製造法を開発したいというニーズを持つ。しかしながら、既存の石油化学メーカーなどは、これらのバイオプロセスを開発するための高度な微生物の育種開発技術などの経営資源を有していない。この状況に対処するため、バイオフィアブレスでは、原油由来の芳香族炭化水素から合成されている芳香族化合物、特にフェノール、ハイドロキノン、サリチル酸、スチレンを生産するためのバイオプロセスを受託開発する（図 8-7）。現状、合成生物学のスタートアップ企業のうち、本事業で製造を目指す芳香族化合物の製造を目指す企業は存在しない。

既存の石油化学のサプライチェーンでは、世界の石油メジャーによって国内に輸入された原油を、ガス、ナフサ、燃料、灯油、軽油、アスファルトなどへの分離精製を行う石油精製会社が存在する（※ 日本で該当する企業：ENEOS、出光興産など）。大手石油化学メーカーは、石油精製会社によって分離されたナフサを購入し、クラッキングを経てエチレンやプロピレンなど脂肪族炭化水素とベンゼン、トルエン、およびキシレンの芳香族炭化水素を生産する（※ 日本で該当する企業：三菱ケミカルホールディングス、三井化学、住友化学など）。石油化学メーカーは、原油のクラッキングからベンゼン、トルエン、およびキシレンを得て、図 7 に示したフェノールなど中間原料などを生産している。フェノールは、フェノールをサリチル酸に変換する化学メーカー等に販売されるか（※ 日本で該当する企業：旭化成、東レ、花王など）、さらに自社内でビスフェノール A などの一次製品である樹脂

等に変換される。樹脂などの一次製品は、樹脂の加工成形の工程を担う部品加工メーカー、あるいはその部品を集積して最終製品を製造する最終製品メーカーに販売される。

バイオファブレスでは、フェノール、ハイドロキノン、サリチル酸、スチレンを生産するためのバイオプロセスの開発を、既存のサプライヤーである三菱ケミカル HD や三井化学などから受託して、研究開発を進める。開発されたバイオプロセス技術は、培養ファウンドリに技術供与される。培養ファウンドリでは、化合物の発酵生産に必要な原料バイオマス、トウモロコシなどを扱う穀物メジャーあるいは廃糖蜜などの廃棄物発生源である製糖事業者から一括で購入する。原料となるバイオマスを一括購入することにより、個々の事業者が自社目的のみで培養する際と比較して、最終的な製造にかかるコストを低減することができる。原料となるバイオマスを用いて、商業用の大規模なスケールで目的化合物を大量生産、精製を行う。製造された化合物は、研究開発をバイオファブレスに依頼した企業の製品として、これまで通り下流のサプライチェーンに納品する。つまり、既存のサプライヤーは、バイオファブレスおよび培養ファウンドリの功績によって、従来通りサプライヤーとして振る舞うことができる。これによって、化合物のサプライヤーは、これまでの化合物の売上を守ることができる。また、化合物を購入する立場の化学メーカー以降のサプライチェーンのプレイヤーも、自社の売上や従業員を守ることができるだろう。

5.1.1. 創業期のキャッシュフロー計画

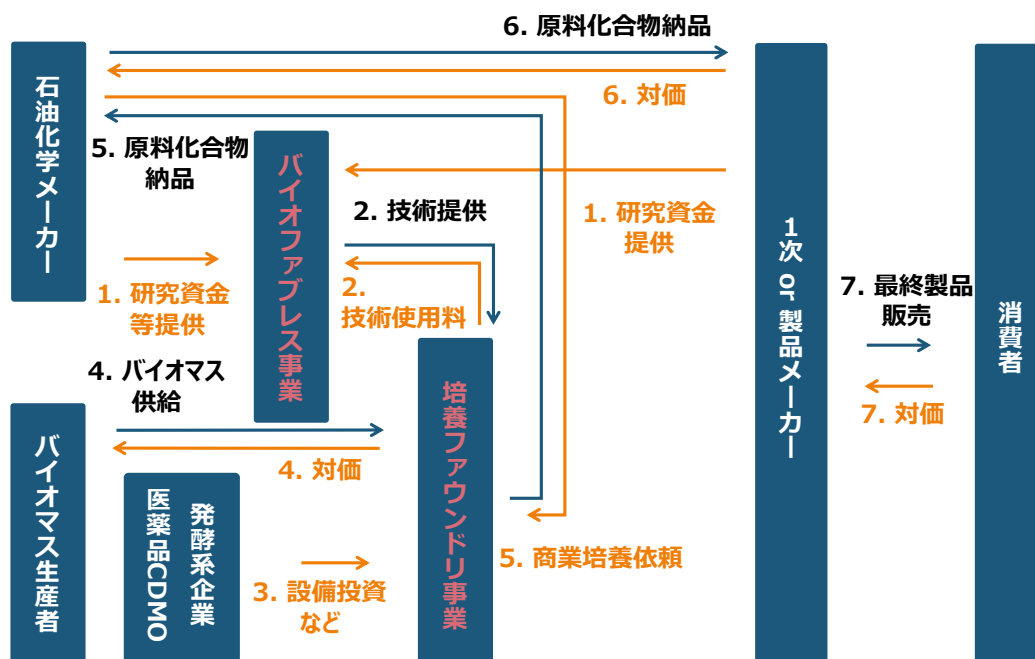


図 8-8 創業時のキャッシュフロー計画

図 8-8 に、創業期におけるバイオファブレスのキャッシュフロー計画を示した。創業期の資金提供先は、現在、既存の製造法でバイオファブレスの目的化合物を製造している石油化学メーカー、及びこれらの目的化合物を購入し一次製品や最終製品を製造しているメーカーである（1.）。現状の化合物サプライヤーは、バイオファブレスで開発される新規製造法がなければ、将来的に目的化合物の売上が減少する。上表に、創業期に生産を目指す化合物に関して、既存の製造法や現在製造している企業をまとめた。特に、原油由来の芳香族炭化水素化から製造されている化合物はその生産量が多く（表 8-2）、これらの化合物が製造できなくなると社会に甚大な影響を与える。また、これらの化合物の購入者に関しても、石油化学由来の化合物の新規製造法が確立されなければ、その化合物を加工などして製造している部品や製品を販売することができない。そのため、現在の化合物の販売企業および購入企業ともに、既存のサプライチェーンを維持したいというインセンティブが働くため、バイオプロセスの研究開発を提供してくれる可能性が高い。バイオファブレスでは、調達した受託研究のための資金により、微生物を用いた目的化合物の製造法を開発する。開発に成功した技術は、培養ファウンドリに対して技術供与を行い、バイオファブレスはその技術の対価を得る（2.）。バイオファブレスで商業生産可能な技術が確立された時点で、バイオ医薬品の受託製造を行う CDMO、あるいは既に微生物を用いて物質生産を行う垂直統合型の発酵系企業が、資金提供、ノウハウ、人材を提供する形で培養ファウンドリが設立される（3.）。培養ファウンドリでは、目的化合物の商業生産に際し、バイオマスの生産者から原料などを大量に購入する（4.）。大量購入されたバイオマスを原料に、バイオファブレスから供与された技術を用いて、目的化合物を大量生産する。

大量生産された化合物は、石油化学メーカーに納品される（5.）。石油化学メーカーは、生産された化合物あるいはその化合物をもとに製造された樹脂などを、既存のサプライチェーンに則って一次製品の製造企業あるいは最終製品の製造企業に納品し、その対価を得る（6.）。最終製品企業は、製造した自社製品を消費者に販売して、消費者から対価を得る（7.）。

5.1.2. 「バイオファブレス×培養ファウンドリの事業モデル」の成長戦略

表 8-3 バイオおよび半導体におけるファウンドリ型-ファブレスモデルの特徴

サービスの形態		設備投資費用の規模	自社ブランドの製品
バイオファウンドリ	バイオプロセス開発 商業培養生産	バイオプロセス開発および商業培養設備 年間 ～200億円 (Amyris社)	有する
バイオファブレス	バイオプロセス開発	バイオプロセス開発の研究設備 年間 ～10億円 不在	有さない
半導体ファブレス (自社製品を設計)	自社半導体の設計 回路設計技術の開発	自社半導体設計 - 年間1000～2000億程度 (ARM社)	有する
半導体ファブレス (他社製品を設計)	回路設計技術の開発	半導体設計ツールの開発 - 年間15億円程度 (Synopsys社)	有さない
培養ファウンドリ	商業培養生産	商業培養設備 ～100億円	有さない
半導体ファウンドリ	半導体の商業生産	半導体製造設備など 年間5兆 (TSMC社)	有さない

合成生物学における「バイオファブレス×培養ファウンドリの事業モデル」の成長戦略を立案するため、半導体製造事業におけるファブレス、ファウンドリ事業のビジネスモデルとの比較を行った。表 8-3 に、バイオと半導体産業のファブレス-ファウンドリのサービスの形態、設備投資の有無、自社プロダクトを有するか否かを示した。

◎ バイオファブレスの成長戦略

現在、バイオファウンドリでは、バイオプロセスの開発、およびそのバイオプロセスを用いた商業培養を行っている。そのため、バイオファウンドリの事業では、微生物の育種開発、および商業培養用の設備への投資には、多額の資金を必要とする（～200 億円、Amyris 社）。また、そのバイオプロセスにより生産される製品や化合物は、各バイオファウンドリ企業の自社プロダクトとして販売する。このバイオファウンドリと異なり、バイオファブレスでは、バイオプロセスの受託研究開発を行い、バイオプロセスおよびそれに関連する技術を顧客に提供する。また、バイオファウンドリとの決定的な差異として、自社で開発したバイオプロセスを商業化するための培養設備を有さない。Amyris 社が事業撤退に

伴いファルネセンの大量生産用のプラントを売却したように、自社プロダクトのために商業用培養プラントに設備投資を行えば、高額な設備はスタートアップ企業にとって大きな負債となってしまう。そのため、微生物の育種開発のための設備と商業培養のための設備を両方有することは、かなり経営リスクの高い行為である。そのため、バイオファブレスは、商業培養プラントを自社保有するよりも、外部企業に商業培養生産を委託することで経営リスクを低減することが期待できる。バイオファブレスでの微生物育種開発には、高価な試薬や研究設備、各種の自動化設備が必要となるが、その資金は商業培養設備を建設するよりは少額になることが予測される（～10 億円）。バイオファブレスにより開発されたバイオプロセスによって生産される化合物は、研究開発の依頼した企業に納品され、自社プロダクトとして販売される（図 8-8）。このように、バイオファブレスでは自社ブランドの化合物をあって販売しないことにより、市場での既存企業との価格競争を避けて、なるべく複数の企業からバイオプロセス開発の依頼を受けることを目指す。

他社向けに半導体の設計手法を提供する半導体ファブレスでは、製造方法を提供する、かつ自社プロダクトを持たない点で、バイオファブレスと同様の事業戦略を採用している。バイオファブレス事業では、バイオプロセスの開発に必要な設備投資に高額な資金が必要なため、自社プロダクトを有した場合には研究開発費用などの資金が不足する傾向にあり、事業失敗に追い込まれてしまう可能性を高めてしまうため、避けるべきだ。

◎ 培養ファウンドリの成長戦略

培養ファウンドリでは、バイオファブレスで開発されたバイオプロセス技術を用いて、バイオマスから原料化合物を生産して研究開発の依頼者に納品する。そのため、サービスの形態は直接的である。大量生産のための培養設備への投資には、巨額の資金が必要となる。バイオファブレスからの受託製造であるため、培養ファウンドリによって生産された化合物は、顧客に自社ブランドの製品として納品することはない。今後、バイオファブレスなどによって開発されるバイオプロセスは増加すると考えられ、それに伴い培養ファウンドリへの商業培養の依頼も増加すると考えられる。培養ファウンドリでは、微生物の育種開発技術などの経営資源を持たないため、バイオプロセスを開発する企業側の情報漏洩などの不安なく、複数企業からの商業培養の依頼を受託することが可能になると考えられる。

5.1.3 培養ファウンドリへの参入者

本イノベーションアイデアの特徴として、これまでバイオファウンドリが自社のみで担ってきた「微生物の育種開発によるバイオプロセス開発」と「微生物の培養法および化合物の分離、精製のプロセス開発、および商業生産」の2つの事業内容を分離し、それぞれバイオファブレスと培養ファウンドリが行う点にある。よって、バイオファブレスの成功のためには、培養ファウンドリの成功も重要な要素となる。

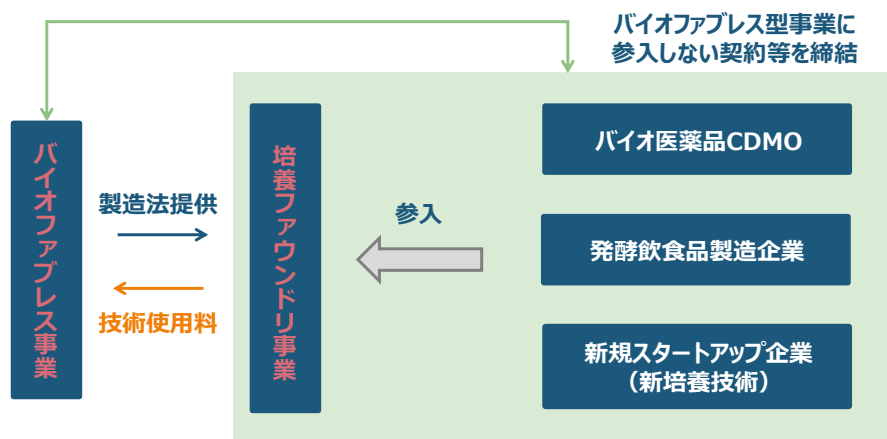


図 8-9 培養ファウンドリへの参入予測

この培養ファウンドリへの参入者として、バイオ医薬品の Contract Development and Manufacturing Organization（CDMO）事業を展開する企業、発酵食品関連企業、新培養技術を有するスタートアップ企業などが考えられる（図 8-9）。これらの企業にとって、培養ファウンドリに参入することは、自社で抱える微生物培養の技術やノウハウを活用して金銭的価値を生み出す機会であるといえる。日本国内では、AGC や富士フイルムなどのバイオ医薬品 CDMO 事業を展開する大手企業あるいは大手製薬企業は、微生物や培養細胞を商業用に培養したノウハウや実績を有する。加えて、日本の味の素などの発酵食品の製造企業は、微生物の育種開発と商業培養の両方の経営資源を有しており、参入が期待される。既存のバイオ医薬品 CDMO や発酵飲食品製造企業は、自社で微生物育種開発技術を有する場合がある。その場合には、培養ファウンドリへの参入者は、バイオファブレスによって開発された技術を自社プロダクトの製造に流用しないことが求められる。この点で、受託製造の実績および微生物培養のノウハウの両方を有するバイオ医薬品 CDMO 事業を展開している既存企業は、培養ファウンドリへの新規参入が有利である。

新規培養法を要素技術として有する、あるいは特定の微生物に対して培養法やそのノウハウを有したスタートアップ企業は、既存企業による培養ファウンドリに対して優位に参入することができる。例えば、地球環境総合研究所（RITE）は、コリネ型細菌に関する培養法を培養技術である「RITE バイオプロセス」を開発し、その技術成果をもとに Green Earth Institute（GEI）社を設立した。GEI 社は、日本の国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（New Energy and Industrial Technology Development Organization ; NEDO）の事業の一環として、「スマ

ートセル時代のバイオ生産プロセス実用化を促進させるための「バイオファウンドリ拠点の確立」に採択されている。GEI 社の 2020 年 9 月期決算資料では、微生物培養に関する熟練者の知識をデジタル化し、商業規模での微生物発酵設備やバイオマスの前処理設備を確立しようとしている。この NEDO 事業が進展し、デジタル技術を活用した優れた培養法を確立することが可能になれば、既存企業よりも優位に培養ファウンドリへ参入することが可能だ。

5.1.4. バイオプロセスを用いた化学品生産のコスト試算

バイオファブレス事業で開発したバイオプロセスで生産される化合物は、異なる製造法で既に市場に供給されている化合物とのコスト勝負を行うことになる。多くの場合、バイオプロセスによって生産される化合物の製造コストは高く、既存の高度に洗練されたプロセスによって生産される化合物の製造コストを上回ることができない。その結果、バイオプロセス開発に携わるスタートアップ企業は、市場での競争に敗れてしまう。つまり、バイオファブレスで開発したバイオプロセスが市場での競争力を有していなければ、そのバイオプロセスを経て生産される化合物は市場での競争に敗れしまう。これでは、培養ファウンドリ事業者が参入を躊躇するだろう。バイオファブレス事業のキャッシュフローモデルに記載の通り（図 8-8）、培養ファウンドリ事業者の参入および成功無くしてバイオファブレス事業者の成功もない。そのため、バイオファブレス事業での研究開発によって提供されるバイオプロセスは、培養ファウンドリ事業にとって魅力的なほど低コストである必要がある。一方で、本バイオファブレス事業で生産の対象と定めたフェノール、ハイドロキノン、サリチル酸、スチレンをバイオプロセスによって生産されたことがない。そのため、現状でのコスト試算は非常に困難である。

表 8-4 バイオプロセスのコスト試算

A.			B.				
コスト項目 (1Lあたり)	セルロース系 バイオエタノール	注釈 (1 万kLスケール想定)	(円/L, 1 万kLプロセス)				
			精製度合/ 微生物株の性能	エタノールと同等 (= 100 %)	50%	25%	10%
原材料費	75	微生物株の性能/精製度合に依存 -輸入ウッドチップ18円/L -稲わら 15円/L	エタノールと同等 (= 100 %)	266	416	566	1016
その他試薬・酵母費	20	変動無し	50%	416	566	716	1166
電力費	40	20円x2	25%	566	716	866	1316
運転費	56	変動無し 28円x2	10%	1016	1166	1316	1766
人件費	20	変動無し 10円x2					
減価償却費	40	変動無し					
その他経費	15	変動無し					
コスト合計	266						

そこで、バイオプロセスによって生産される化合物のコストを、非可食バイオマスを原料としたバイオエタノール生産事業における詳細な調査結果から概算することとした [22]。2018 年時点での NEDO 事業の報告書において、セルロース系バイオエタノールの生産コストのまとめを表 8-4A に示す。各項目の数値は、NEDO 事業の報告書に記載の数値を参考にし、端数は四捨五入した。まず、原料を日本で調達しようとした際、海外から輸入した木質系ウッドチップだと 18 円/L、国内で生産される稲わらだと 15 円/L である。バイオプロセスでは、最終生産物の 4 倍の量の原料が必要で

ある。本書では、余裕を見て 5 倍量が必要であるとした。培養系に投入する酵母を用意するための試薬費用に 20 円/L を想定した。電力費は 20 円/L、運転費は 28 円/L、人件費は 10 円/L であった。バイオエタノール生産は遅くとも 48 時間で培養が終了するが、本研究成果の酵母株は 96 時間スパンで培養するため、電力費、運転費、人件費それぞれ 2 倍のコストを想定した。減価償却費に関して、プラント建設費用 58 億円を 15 年で償却すれば、40 円/L であった。これらを合算するとセルロース系エタノール生産に必要なコストは、どれだけコストが高くなったとしても国内で 266 円/L とされた。

バイオファブレス事業において、生産対象をエタノールからフェノール、ハイドロキノン、サリチル酸、スチレンに変更したことを想定すると、変動するのは原料コストである。原料コストを左右するのは、①バイオファブレス事業によって開発された微生物株による基質から化合物への変換効率、および②培地中に生産された化合物を精製する際の回収割合である。この 2 つの変数が 50%、25%、10% になった際の生産コスト試算の結果を表 8-4B に示す。その結果、開発株の生産収率が 10 %、精製度が 10 % であった場合、目的化合物の生産コストが 1766 円となることがわかった。

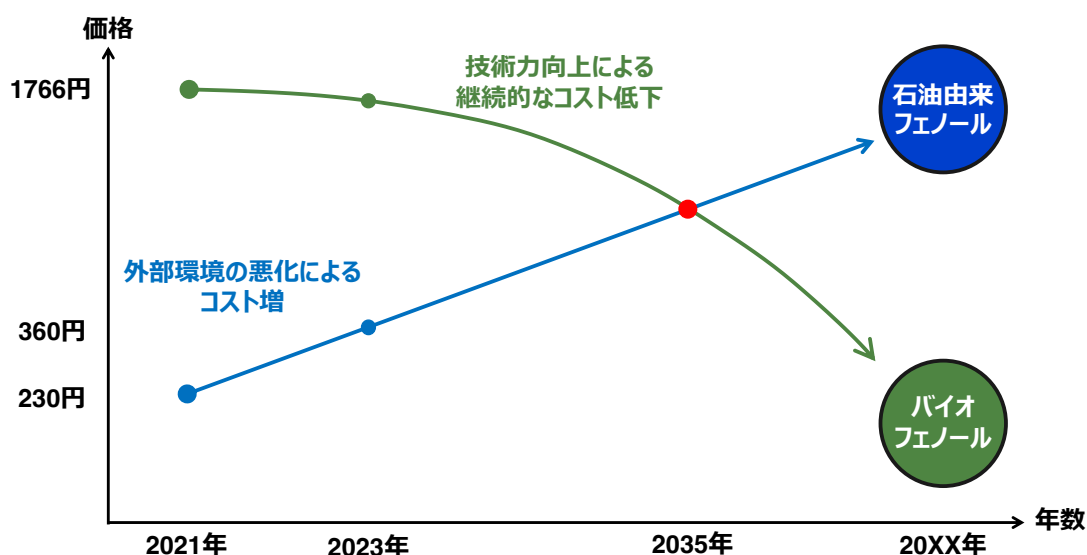


図 8-10 今後の芳香族化合物の価格推移の予測図（例：フェノール）

本バイオファブレス事業で生産の対象と定めたフェノール、ハイドロキノン、サリチル酸、スチレンも例外ではなく、既存の製造法のコストを下回ることができず、最終製品である化合物の価格が現在の技術力では高くなることが想定される。一方で、これらの既存の芳香族化合物の製造法は、化石資源である原油に依存したプロセスで生産されている、将来的な枯渇が懸念されている。加えて、化石資源に依存した製造プロセスの持続可能性は低いため、将来的な石油化学プロセスの廃止が想定される。これらの化石資源に関わる激しい外部環境の変動に加えて、本書執筆時においても、国際情勢（ロシア対ウクライナの戦争）、それに伴う世界的な物価高により、これらの化合物の取引価格は高騰している。そのため、化石資源由来の芳香族化合物の価格は継続的に上がって

いと予測している。一方、バイオファブレス事業の研究開発力の高度化によって、バイオプロセスのコストは低下していくことが予測される。バイオプロセスのコスト低下により、化石資源に依存したプロセスとバイオプロセスによって生産されるコストが一致する時が訪れることを期待する（図 8-10）。バイオファブレス事業の中で研究開発により、バイオプロセスのコスト低下を目指す。

5.1.5. バイオファブレスの技術開発における差別化戦略

表 8-5 既存のバイオファウンドリとバイオファブレスの差別化

企業	微生物育種開発事業に集中しているか？	ターゲット市場や化合物を限定しているか？	既存市場か？ 新市場か？	多岐に渡る微生物宿主を扱うか？
Genomatica	No	No	既存市場	No (<i>E. coli</i>)
Amyris	No	Yes	新市場	No (<i>S. cerevisiae</i>)
Ginkgo Bioworks	Yes	No	新市場	Yes
Zymergen	Yes	No	新市場	Yes
バイオファブレス事業	Yes	Yes	既存市場	Yes

バイオファブレス事業では、「微生物の育種開発によるバイオプロセス開発」のみを行う（表 8-5）。同様の事業戦略を採用しているバイオファウンドリ企業は、Ginkgo Bioworks 社、および Zymergen 社であった。しかしながら、Ginkgo Bioworks 社の研究開発によって提供されるバイオプロセスは、窒素固定菌による新農薬、あるいは微生物を用いた新規治療法など、新市場を目指した戦略となっている。加えて、あらゆる新市場を目指した製品や化合物を生産している。Zymergen 社のバイオプロセスによって生産が試みられたヒアリンの失敗例のように、新製品の開発を伴う新市場をターゲットとした場合にはバイオプロセス開発事業の成否が研究開発以外の要因に左右されるため、事業戦略として劣っていると考えられる。このように、バイオファブレス事業で成功を収めるには、① 事業範囲を微生物の育種開発に関するバイオプロセスの研究開発事業に専念すること、② 開発されたバイオプロセスを用いて生産した化合物を供給するターゲット市場を既存市場で地位を確立した、製品開発余地を必要としないものに限定するべきだ。

次に、バイオファブレス事業では、開発に取り組む微生物宿主は限定せず、有望な微生物宿主であれば開発対象として採用する。一方で、モデル生物である酵母 *S. cerevisiae*、大腸菌 *E. coli* 以外の微生物は、バイオプロセスの微生物宿主として用いるための知見が乏しい。そのため、Genomatica 社や Amyris 社は、バイオプロセス開発のための微生物宿主を大腸菌 *E. coli* や酵母 *S. cerevisiae* に限定している。創業期において、早急に技術確立を行う必要があるという観点から、開発対象となる微生物宿主を限定することは正しい。そのため、バイオファブレス事業の創業期は、筆者の先端科学技術特定研究の成果の知見やノウハウに基づき、酵母 *S. cerevisiae* および大腸菌 *E. coli* を用いたバイオプロセス開発を行う。競合他社の脅威から自社を守るため、創業期に開発するフェノール、ハイドロキノン、サリチル酸、スチレン生産のためのバイオプロセスに関しては、

合成するための代謝経路およびその代謝経路を構成する酵素を含めた微生物を用いた物質生産プロセスとして特許出願していく。

一方で、微生物宿主を限定すれば、競合他社によって異なる微生物宿主を用いた同一化合物のバイオプロセスによる製造法が開発された場合には、バイオファブレス事業は直ちに脅威に晒されることとなる。そのため、長期的な視点に立てば、複数の微生物宿主を開発可能な技術力を養成することが望ましい。

5.3. 中期経営計画（2030 年から 2035 年）

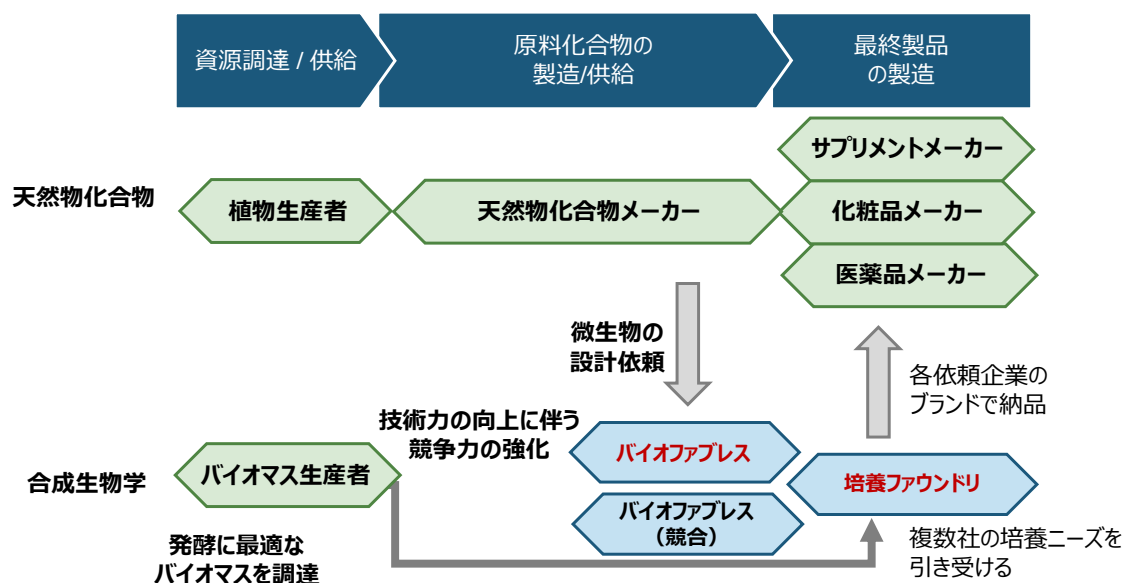


図 8-11 中期に想定されるビジネスモデル

◎ 中期におけるバイオファブレスの事業戦略

中期経営計画では、石油化学によって製造される芳香族化合物の製造法開発を完了し、石油化学サプライチェーンの崩壊に対応したと想定している。創業期からの研究開発で得られた技術やノウハウを活かし、シキミ酸経路から生産される芳香族化合物のうち植物 2 次代謝物の製造法開発を目指す（図 8-11）。植物二次代謝物とは、ヒトに対して生理活性を示す化合物の総称であり、これらはサプリメント、化粧品、医薬品に用いられる。このような機能性化合物は、市場での価値が高い一方で、現在の供給は植物からの直接抽出に依存している。植物生産者とは、現在、食用の果物、漢方などの医療用途などのために、植物を栽培している事業者を指す。天然物化合物メーカーは、植物生産者から原料となる植物を仕入れ、対象の植物から直接抽出することにより植物二次代謝物などの機能性を示す化合物を製造する企業を指す。原料となる植物の生産は、天候等に左右されるため安定供給に課題がある。また、植物には、生産対象となる化合物以外の多様な 2 次代謝物が含まれるため、直接抽出による生産法では抽出の選択性が低く、分離精製にコストがかかる。抽出された機能性化合物は、サプリメント、化粧品、医薬品などのメーカーに納品される。

バイオファブレスは、天然化合物メーカーの有するニーズに対応し、研究費の出資を受けて微生物を用いた植物 2 次代謝物の製造法を受託開発する。中期には、バイオファブレスの微生物育種開発に関わる技術力が向上して、植物からの直接抽出法と比較して、低い製造コストで植物二次代謝物が生産可能になるだろう。

5.4. 長期経営計画（2035 年から 2040 年）

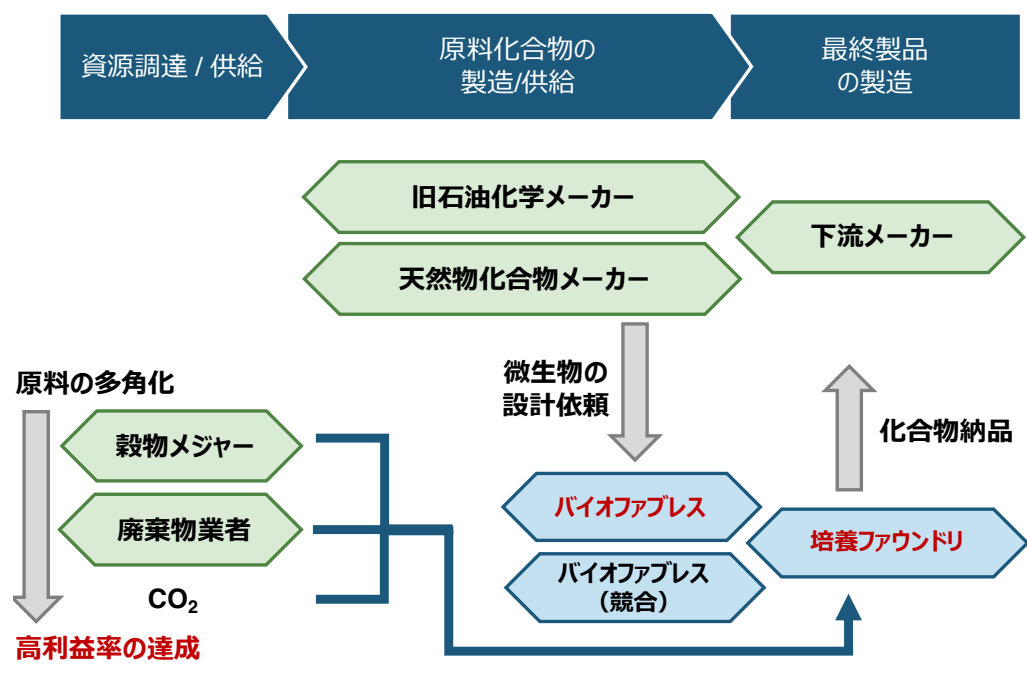


図 8-12 経営 15 期目以降の長期に想定されるビジネスモデル

◎ 長期におけるバイオファブレスの事業戦略

長期経営計画では、バイオファブレスや競合企業の研究開発の結果、多くの化合物がバイオプロセスによって生産されていると想定した。その場合、微生物を用いたバイオプロセスによる化合物生産プロセスの開発依頼件数は一定程度に落ち着いていることが推測される。一方、この長期においては、バイオプロセスの原料の多角化が進むことが想定される。なぜなら、多くのバイオプロセスが実用化されているため、それぞれのバイオプロセスで原料の調達が困難になり、より安価なバイオマス原料を求めると考えられるからだ。現代社会においても、バイオマス発電や SAF 製造のために、バイオマスの生産量および使用量は着実に増加傾向にある。短期、および中期で使用していたような原料バイオマスの価格高騰により、バイオプロセスによって生産される化合物の製造コストが増加する。その結果、バイオファブレスのステークホルダーである培養ファウンドリの経営状況の悪化等が予測される。

よって、現在用いられているとうもろこしの穂軸やサトウキビの搾りかすなどの主要なバイオマス原料から、徐々に通常廃棄されるようなバイオマス、あるいは近年注目を浴びている CO₂ を微生物によって直接化合物に変換するため、バイオプロセスの原料多角化に関する研究開発ニーズが生じると考

えた（図 8-12）。バイオファブレス事業では、この研究開発ニーズに応え、現在主流であるグルコースやスクロースに加え、キシロースやその他の基質あるいは CO₂ を用いて化合物を製造するためのバイオプロセスの研究開発を受託する。この段階において、筆者の先端科学技術特定研究で取り組んだ非可食性バイオマスを用いたバイオプロセス開発の研究成果や知見を十分に活かす、また、神戸大学では、既に光合成により化合物を生産する微細藻類を対象にした研究開発を進めているため、これらの成果を迅速に実用化し競争優位を目指す。

6. 技術戦略

6.1. 各研究開発部門での開発項目

バイオファブレスの職能

マーケティング部門

- 外部企業のニーズ探索
- 実現可能性の検討

微生物選定部門

- 目的化合物に耐性のある微生物の探索
- 微生物への化合物耐性の付与

代謝経路設計部門

- 原料基質から目的化合物までの代謝経路設計
- 代謝経路を実現する酵素の開発

微生物開発部門

- 原料基質からハブ化合物を量産する微生物宿主の開発
- 開発微生物への代謝経路の実装

培養法開発部門

- 開発済微生物の培養方法の確立
- 商業スケールでの培養法を確立

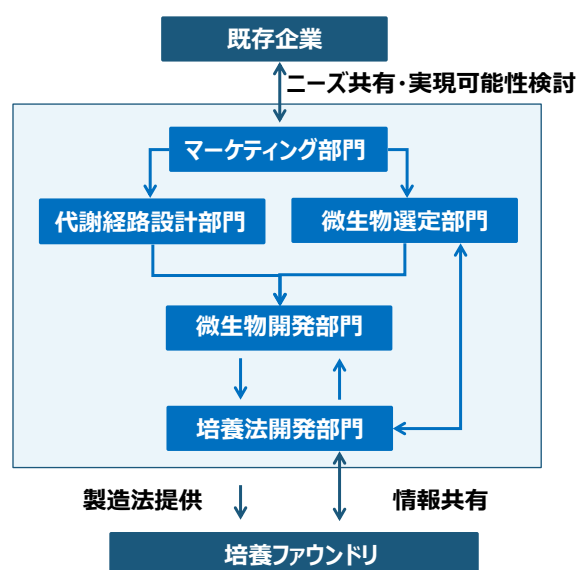


図 8-13 本バイオファブレスの 5 つの職能

バイオファブレスにおける研究開発部門の構成を図 8-13 に示した。バイオファブレスの職能として、マーケティング部門、微生物選定部門、代謝経路設計部門、微生物開発部門、培養法開発部門を設置して、それぞれの部門で分担して研究開発を進める。また、各プロジェクトは、マーケティング部門からスタートし、図に示したフローで進行する。このようなプロセスを経て最終的に開発された微生物宿主と培養法に関する情報を培養ファウンドリに技術供与を行い、商業培養を委託する。

6.1. 各研究開発部門での開発項目

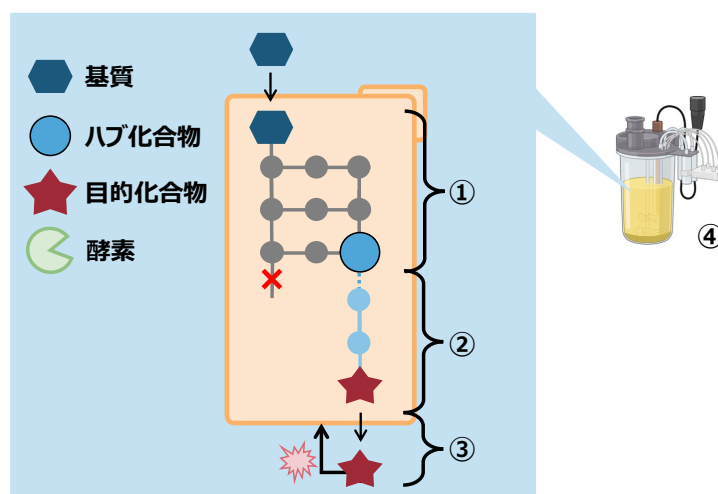


図 8-14 バイオファブレスで行う研究開発項目

① 基質からハブ化合物を高生産する技術開発 ② ハブ化合物から目的化合物までの生合成経路の構築 ③ 化合物耐性を有した頑強な微生物の開発 ④ 開発株の最適な培養法の確立

▼ マーケティング部門

マーケティング部門では、バイオファブレスで開発する技術を決定する機能を有する。決定された技術開発プロジェクトを、微生物育種開発に関わる各部門に共有する。既存企業の技術開発の責任者、取締役などに積極的にアプローチし、微生物を用いた持続可能な原料化合物製造法の開発ニーズの調査、および国プロジェクトや投資家からの資金の調達方法を立案する。

▼ 微生物探索部門

微生物探索部門では、「培養環境中に存在する化合物に対する耐性を有した頑強な微生物の開発」を行う。微生物を用いた物質生産では、培養環境中に存在するさまざまな化合物に細胞増殖や物質生産能を抑制され、目的化合物の生産量が低下することが課題である。特に、基質と目的化合物は、培養環境中に多量に存在することが想定される。そのため、基質および目的化合物に対する耐性を有する微生物の探索、およびそれらの化合物に耐性を有する微生物宿主の研究開発を行う。しかしながら、前者の微生物宿主の探索は、創業期においては人材のリソースの観点から力を入れない。初期に有望な微生物宿主が発見されたとして、遺伝子組換え技術が確立されていない場合も多く、より多段階の研究工程が必要となるためだ。創業期には、*S. cerevisiae*、*E. coli*、そして芳香族化合物に耐性を有するとされているコリネ菌 *Corynebacterium glutamicum* の3つの微生物宿主に集中して研究開発を行う。

▼ 代謝経路設計部門

代謝経路設計部門では、微生物に目的化合物の生産能を付与するために、「ハブ化合物から目的化合物までの生合成経路の構築」を行う。既知、あるいは新規の化合物の生合成経路の設計、生合成経路を微生物宿主内で機能させるための酵素開発を行う。特に、酵素開発に関して、先端科学技術特定研究で行ったように、データベース上からの網羅的な探索を行い活性の高い酵素を探索する。同定された酵素の基質特異性、反応速度、最適温度、最適 pH を改変し、より微生物内で高い性能を示す酵素を開発するための技術を養成する。

特に、微生物育種開発事業において、迅速に目的の性能を有する酵素を獲得することが重要である。まず、データベース上から目的の反応を触媒する酵素のアミノ酸配列を収集する。収集されたアミノ酸配列を機械学習的に分類し、目的の反応を高効率に触媒可能な酵素を単離する。単離された酵素に対し、ランダムな DNA への変異導入やミューテーション技術に基づいた合理的な DNA への変異導入に伴うアミノ酸配列の設計を行う。設計されたアミノ酸配列を有する酵素から、より高い活性を示す酵素を単離する。この工程を自動化することにより、迅速に目的の酵素を開発可能なプラットフォームを開発する。特に、酵素改変技術に関して、シミュレーション技術を用いた基質特異性や反応速度の改変技術の研究が進みつつある。一方で、筆者の先端科学技術特定研究の知見である最適 pH や温度などの酵素の存在環境に関して、工学に関する技術開発は行われていない。自動化技術を組み合わせて大量の酵素データを集積し、包括的な酵素工学プラットフォームを構築する。

▼ 微生物開発部門

微生物開発部門では、「基質からハブ化合物を高生産する技術開発」に取り組む。原料バイオマスから得られる基質として想定されるのは、先端科学技術特定研究で使用したグルコースおよびキシロースに加え、グリセロールが想定される。ハブ化合物とは、微生物が元来合成する化合物のうち、様々な有用化合物へ変換可能な化合物のことを指す。微生物内において、シキミ酸経路を介して合成される芳香族アミノ酸の 1 種であるチロシン (tyrosine: Tyr) はハブ化合物であり、クマル酸 (*p*-coumaric acid)、レスベラトロール (resveratrol)、ナリンゲニン (naringenin)、レチクリン (reticuline) などの有用物質を生産するための共通前駆体である。先端科学技術特定研究では、創業期において、フェノールなどを生産するための前駆体となるチロシンおよびコリスミ酸 (chorismate) を大量生産する微生物宿主を開発する。ハブ化合物を高生産することが、微生物による目的化合物の大量生産に直結する。

▼ 培養法開発部門

培養法開発部門では、「開発株の最適な培養法の確立」を行う。開発するバイオプロセス開発において、実験室レベルの三角フラスコを用いた培養から、微生物の培養環境のパラメータが制御されるバイオリクターを用いて商業培養を見据えた培養法を確立する必要がある。筆者は、先端科学技術特定研究の過程で、微生物の培養液の攪拌速度、pH を検討した。加えて、生産量を向

上するため、培養液への基質の継続的な添加方法を検討した。そのノウハウを活かし、バイオファブレスで開発された微生物の性能を最大限引き出す。また、バイオリアクターで培養法を開発する上で、副産物など、微生物の育種開発にフィードバックする知見が得られることが予測される。

6.2. 創業期の研究開発戦略

2023 年度以降、第 3 章から第 6 章で開発した技術やノウハウに基づき、微生物を用いた芳香族化合物生産のためのバイオプロセス開発を行う。

▼ フェノール

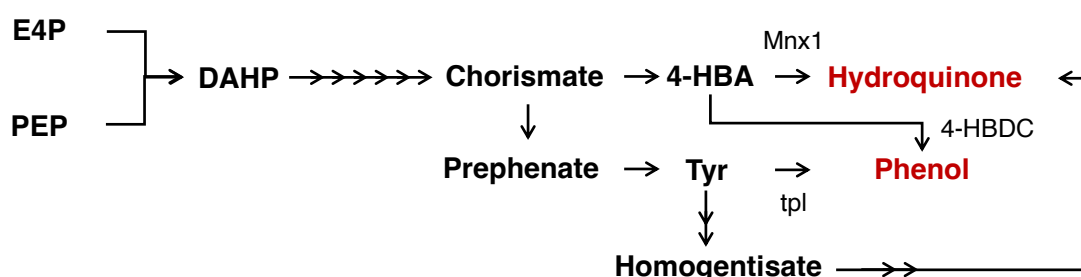


図 8-15 フェノールおよびハイドロキノンの生合成経路

フェノールの生合成に関して、コリスミ酸から得られる 4-ヒドロキシ安息香酸（4-hydroxybutyrate (4-HBA)）から合成する代謝経路と、チロシンから合成する代謝経路が存在する（図 8-15）。また、後述の salicylate から 1 段階の反応で合成する代謝経路も存在する [22]。

微生物を用いたフェノール生産の競合技術に関して、国内の住友ベークライトと RITE の合併会社である Green chemicals 社が、RITE で研究開発された技術を保有している。Green chemicals 社は、RITE で開発された技術ライセンス先の企業である。RITE は、コリネ菌を 2 段階の高密度菌体による非増殖依存型のプロセスで培養し、1 段階目でグルコースを 4-HBA に変換し、2 段階目で 4-HBA をフェノールに変換する。しかしながら、培養技術は特に特許性のある技術ではない。文献および特許情報を参照すると、コリスミ酸から 4-HBA へ変換する酵素 chorismate pyruvate-lyase UbiC と 4-HBA をフェノールへ変換する酵素 4-hydroxybenzoate decarboxylase (4-HBDC) に関して、様々な生物種由来の遺伝子の中から探索し高活性酵素を同定しており、これが特許取得の主要因である [23]。RITE での酵素探索方法は、筆者の先端科学技術特定研究で示したような合理的な探索手法ではなく、ランダムに選択された配列のようである。UbiC に関して、Green chemicals の技術で用いられている *Providencia rustigianii* 由来の UbiC の最適 pH に関する情報は得られなかった。参考として、*Synechocystis sp.* 由来の UbiC の最適 pH は 8.0 であり、pH = 7.0 で活性が約 50 % 減少する [23]。コリネ菌の培養 pH は 7.0 に調整されるため、先端科学技術特定研究で得られた微生物宿主と導入酵素の pH 環境の差異に関する知見を活かし、これらをバクテリアである大腸菌およびコリネ菌、あるいは出芽酵母に最適な酵素を研究開発する。

特に、酵素開発に関するコア技術は、筆者の先端科学技術特定研究の知見を活かし、神戸大学と共同で開発する。研究開発に成功した際には、その技術を持って三菱ケミカルあるいは三井化学に持ち込み、微生物のフェノール技術開発の研究費出資を募る。また、住友化学や Green chemicals と共同研究を行い、微生物を用いたフェノール生産事業の成功を目指す。

▼ ハイドロキノン

ハイドロキノン（hydroquinone）の生合成に関して、4-HBA から合成する代謝経路が存在する。微生物を用いてハイドロキノンを目的化合物として生産した報告は、筆者の知る限り無い。一方、微生物を用いて 4-HBA からハイドロキノンがグリコシル化した構造を有する Arbutin を目的化合物とした生産報告があり、ハイドロキノンは 4-HBA からアルブチン（Arbutin）合成までの中間体として合成されている [24]。また、微生物代謝経路のデータベースである Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) には、チロシンからホモゲンチジン酸（homogentisate）を介した多段階の反応を介して合成可能な代謝経路が登録されているが、この経路を用いて実際にハイドロキノンを生産した例はまだない。

ハイドロキノン合成酵素である 4-hydroxybenzoate 1-ヒドロキシラーゼ MNX1 に関して、最適 pH は調査されていない。また、異種生物種由来の 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase 活性に関する知見はない。ホモゲンチジン酸を介した合成経路に関しては、当該合成経路が hydroquinone の合成に最適かを含めて、Flux balance analysis (FBA) や機械学習を用いた新規合成経路確立を含めて、検討を進める。

▼ サリチル酸

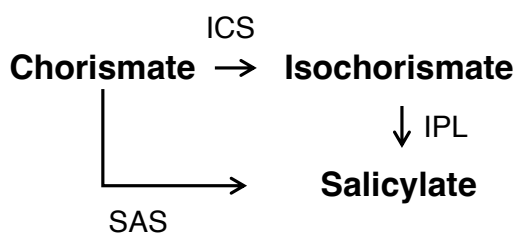


図 8-16 サリチル酸の生合成経路

サリチル酸（salicylate）の生合成に関して、図 8-16 に示すように、シキミ酸経路の中間体であるコリスミ酸から 1 段階の反応で合成する、あるいはイソコリスミ酸（isochorismate）を介して合成する代謝経路が存在する [25, 26]。コリスミ酸から合成する経路に関して、コリスミ酸 からサリチル酸へ変換する酵素 salicylate synthase (SAS) を導入する必要があるイソコリスミ酸を介する経路に関して、コリスミ酸をイソコリスミ酸 に変換する酵素 isochorismate synthase (ICS) およびイソコリスミ酸をサリチル酸に変換する酵素 isochorismate pyruvate lyase (IPL) を導入する必要がある。

▼ スチレン

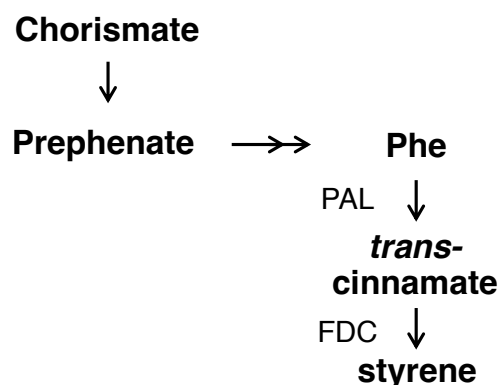


図 8-17 スチレンの生合成経路

図 8-17 に示す通り、スチレン (styrene) の生合成に関して、シキミ酸経路の中間体であるコリスミ酸から得られる芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン (phenylalanine) から 2 段階の酵素反応を経て合成することが可能である [27]。フェニルアラニンは、phenylalanine ammonia lyase (PAL)によって *trans*-桂皮酸 (*trans*-cinnamate) に変換され、*trans*-桂皮酸は ferulic acid decarboxylase (FDC)によって、スチレンが合成される。特に、酵素 FDC は、さまざまな芳香族化合物に対して活性を有する基質特異性の低い酵素であることが知られている [28]。そのため、酵素開発を行い、*trans*-桂皮酸に対する特異性の高い酵素を開発する必要がある。酵素 FDC の最適 pH は 6.0 であり、酵母 *S. cerevisiae* を宿主とする場合には問題ないが、大腸菌 *E. coli* やコリネ菌 *C. glutamicum* を宿主とする場合には問題となる可能性がある。

また、スチレンの合成が可能になれば、スチレンから安息香酸など合成することが可能になり、さらなる受託研究開発につながる可能性を秘めている [29]。

6.3. 先端特定科学技術研究の成果の活用法

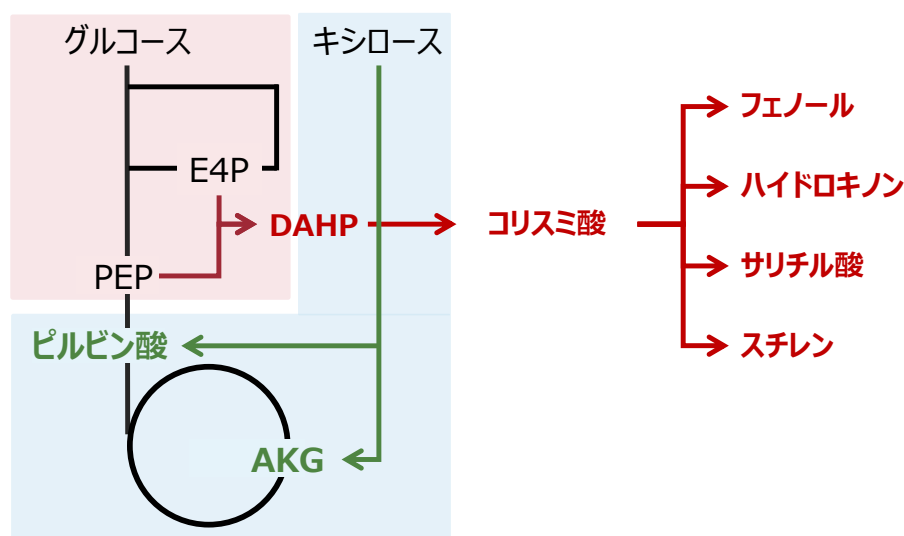


図 8-18 酸化的キシロース代謝経路を活用した芳香族化合物生産のための代謝経路

生産化合物として創業期のフェノール、ハイドロキノン、サリチル酸、スチレンを例に、グルコースとキシロースを含むバイオマス原料に含まれるグルコースとキシロースからの代謝経路図、グルコースとキシロースを物質生産と細胞増殖の両方に利用するほか、グルコースを物質生産に、キシロースを細胞増殖に用いる技術が開発されている。

創業期から中期には、フェノール、ハイドロキノン、サリチル酸、スチレンなどの芳香族化合物、および派生する芳香族化合物の生産を可能にするバイオプロセスの開発を行う（図 8-7、8-11）。これらの開発において、図 7-2 に示したように、筆者らの先端科学技術特定研究から得られたインサイトを活用する（図 8-18）。一方、筆者らが開発した酸化的経路によるキシロース利用の技術的成果は、長期には、図 8-12 に示すように、バイオプロセスに用いる原料バイオマスの多角化に関する研究開発時に競争優位の源泉となる技術として活用可能だ。先行研究では、酸化的キシロース代謝経路を用いた芳香族化合物の生産法が開発されている [30]。加えて、キシロースのみならず、アラビノース [31]、あるいはガラクトツロン酸 [32]を代謝するため酸化的な炭素同化経路が報告されている。このように、短期・中期では本書で得られた研究開発に関するインサイトを活用し、長期には本書で得られた研究開発成果を利用して、バイオプロセスの実用化に向けた研究開発を進める。

6.3. 微生物育種技術を受託開発する意義

バイオファブレスでは、既存企業の研究開発ニーズを受託するため、大学や国の研究機関などが共同研究と同じではないかという印象を抱かれるかもしれない。しかしながら、大学などの研究機関との共同研究の場合、所属する人材のうち、博士号保有者が専業で企業の研究開発プロジェクトを進めることはほとんどない。研究機関に所属する研究者は、自身が担当している研究開発を行いつつ、企業の研究開発を並行して行う。そのため、研究者が共同研究開発にさける時間は限定され、企業のプロジェクトの研究開発スピードは遅くなる。このように、専業の人材を採用できなかった点も、

微生物による目的化合物の製造技術の実用化を阻んでいた要因の1つであると考えられる。一方で、バイオファブレスでは、企業の求めるバイオプロセスの開発を、博士号保有者が専業で進めることが可能だ。

既存企業が微生物育種開発の経験を有する博士号保有者を雇用し、既存企業内で微生物の育種開発を行う場合も考えられる。しかしながら、バイオプロセス開発に要する微生物育種開発技術の高度化に伴い、知見やノウハウは膨大となり、機器を含む研究開発費はますます増加傾向にある。そのため、半導体の製造事業で見られたように、ある企業が自社ブランドの製品を製造する目的のみで、微生物の育種開発技術に対して投資することは、ますます困難になるだろう。一方、バイオファブレスでは、複数企業からバイオプロセス開発依頼を受託することで、その開発に必要な研究開発設備を、複数プロジェクトのために購入し利用することができる。そのため、微生物の育種開発技術の指数関数的な高度化が期待できるため、技術力が競合のバイオファブレスや現在微生物育種開発技術を有する発酵食品製造企業などに対する参入障壁となるだろう。

7. 財務戦略

7.1. 財務諸表作成のための前提条件

表 8-6 社内状況

	2023年	2024年	2025年	2026年	2027年	2028年	2029年	2030年	2031年	2032年	2033年	2034年	2035年	2036年	2037年	2038年	2039年	2040年
社内状況	0年目	会社設立	第1期	第2期	第3期	第4期	第5期	第6期	第7期	第8期	第9期	第10期	第11期	第12期	第13期	第14期	第15期	第16期
研究開発プロジェクト																		
総プロジェクト件数	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
獲得案件数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
終了案件数	0	0	0	1	2	3	4	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10
従業員数																		
役員	0	1	2	4	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
研究開発者	0	0	0	4	8	12	16	20	26	29	35	38	44	47	47	47	47	47
バックオフィス	0	0	0	0	1	1	2	2	3	3	4	4	4	5	5	5	5	5
総従業員	0	1	2	8	14	18	23	27	35	38	45	48	54	58	58	58	58	58

表 8-6 に、研究開発プロジェクトの数および社内の従業員数を示した。受託する研究開発プロジェクトに関して、2026 年から 2029 年まで 1 件ずつ、創業期に掲げた目的化合物の製造法の受託開発がスタートする。2030 年から 2035 年までは、創業期に培った技術力に基づき、毎年 1 件ずつの植物二次代謝物の製造法を受託できると仮定した。一方、技術開発が滞る、あるいは依頼企業の経営状況などで 2032 年から隔年で毎年 1 件ずつ、受託研究開発のプロジェクトが終了することを想定している。

社内の従業員数に関して、役員は、代表取締役社長 Chief Executive Officer (CEO)、最高技術責任者 (Chief Technology Officer (CTO))、最高財務責任者 (Chief Financial Officer : CFO) の常勤の取締役、および社外取締役 (非常勤) が 2 名、監査役 (非常勤) 1 名の合計 6 名が、第 16 期時に在籍している。監査役は、第 1 期の投資ファンドからの 1000 万円の調達時に配置する。社外取締役は、第 3 期の 3 億円調達時および第 7 期の 5 億円調達時に、それぞれ資金提供してくれる企業から受け入れる。資金提供企業からの出向であるため、給与は支払わない。監査役の報酬は月額 10 万円に設定した。第 2 期までの常勤の役員報酬を月額

30 万円、第 3 期から第 6 期までの役員報酬を月額 70 万円、第 7 期から第 11 期までの役員報酬を月額 100 万円、第 12 期から第 16 期までの役員報酬を月額 150 万円と設定した。

従業員数に関して、2026 年の受託研究開発時には受託した研究開発プロジェクト 1 件に対し 4 名の研究開発者を雇用する。それ以降は、終了する研究開発プロジェクト 1 件あたり 3 名を差し引き、受託した研究開発プロジェクト 1 件に対し 6 名を雇用する計画とした。

表 8-7 創業以降の主要なイベント

経営フェーズ	年次	主要イベント
創業前	2023年	・自身の資金500万円を開業資金とする
創業期経営	2024年	・会社設立 ・神戸大学と共同でコア技術の開始 ・500万円調達
	2025年	・コア技術開発に成功, 知財化
	2026年	・受託研究開発がスタート
	2027年	・3億円調達 ・研究開発のため2億円投資
	2030年	・研究開発に過去最大5億円の投資
中期経営	2031年	・5億円調達
	2032年	・創業依頼初めて、培養ファウンドリ事業での 商業培養可能な製造技術を確立
	2035年	・研究開発に、過去最大10億円の投資
長期経営	2036年	・以降、経営状況が変化しないと仮定

表 8-7 に、創業以降に起こる社内の主要なイベントを示した。まず、2024 年の会社設立に向けて、自己資本金 500 万円を準備する。2024 年に、これまでの筆者の先端科学技術特定研究の成果に基づき、バイオファブレス事業を行う会社を設立する。

第 1 期目に、芳香族化合物の生産のためのバイオプロセス開発に必要な追加のコア技術を、神戸大学と共同で開発する。共同研究のため、国などの競争的資金を 500 万円獲得して、神戸大学との研究開発費にそれを支払う。それらの技術に基づき、

第 2 期では、上述した技術戦略で列挙した化合物の受託研究開発が毎年 1 件のペースでスタートする。企業からの受託研究開発を 1 件獲得し、芳香族化合物の生産のためのバイオプロセスの開発をスタートさせる。主要な収入源である研究開発受託費に関して、契約一次金を案件獲得毎に 2 億円、研究開発等支援金を進行中のプロジェクトあたり 1 億円、各種マイルストーン達成金を達成毎に 1 億円と設定した。マイルストーンは、培養ファウンドリでの商業培養開始時、および商業培養に成功し依頼企業が実際に化合物を販売する時などを想定している。また。培養ファウンド

りからは、技術開発を依頼した企業に微生物培養により生産された化合物を納品して得られた対価の数%を技術ライセンス収入として受け取れるとして、1 億円を設定した。売上原価に、受託研究に必要な DNA や試薬などの材料費を研究者 1 人あたり 800 万円、研究者の給与は 1 人あたり 800 万円、諸経費に、研究開発スペースのリース代、水道光熱費、研究開発に必要なソフトウェアのライセンス代等にあたる通信費を計上した。販売費は必要ない。一般管理費として、役員報酬に加え、バックオフィス人員の給与を 1 人あたり 700 万円、特許取得や大学などの共同研究に必要な業務委託費を計上した。研究設備投資金額および研究に必要なソフトウェアなどへの IT 投資金額は 4 年で減価償却した。諸経費として、従業員の旅費交通費、バックオフィスのリース代、水道光熱費、勤怠管理や電話回線などの通信費、消耗品費を科目に設定した。

第 3 期には、受託開発を依頼してくれる企業やバイオファブレス事業に将来性を見出したベンチャーキャピタルなどから 3 億円を調達する。その資金を用いて、自社の研究所を拡充しつつ、研究開発設備などへ投資を行う。

第 6 期には、同様に、約 5 億円の資金調達を行い、研究開発へ投資を行う。第 8 期には、バイオファブレスで開発されたバイオプロセス技術を培養ファウンドリへ供与して、商業培養による化合物の生産がスタートする。第 11 期には、過去最大の 10 億円の研究開発投資を行い、自動化などの高度な微生物育種開発の技術プラットフォームを確立する。第 12 期以降には、経営上のイベントが起きず、大きな変化が起きないと仮定した。

7.2. 財務諸表

表 8-8 主要な財務指標の要約

財務指標の要約 (千円)	2023年	2024年	2025年	2026年	2027年	2028年
回次	0年目	会社設立	第1期	第2期	第3期	第4期
売上高	0	0	5,000	305,000	410,000	610,000
営業利益	0	▲ 3,600	▲ 7,800	216,216	73,034	201,486
営業利益率 (%)	0	0	▲ 156	71	18	33
経常利益	0	▲ 3,600	▲ 7,800	216,216	73,034	201,486
経常利益率 (%)	0	0	▲ 156	71	18	33
当期純利益	0	▲ 3,600	▲ 7,800	151,351	51,124	141,040
営業キャッシュフロー合計	0	▲ 3,600	▲ 7,800	151,351	179,249	294,790
投資キャッシュフロー合計	0	0	0	0	▲ 512,500	▲ 102,500
財務キャッシュフロー合計	5,000	0	10,000	0	300,000	0
期末現預金残高	5,000	1,400	3,600	154,951	121,700	313,990
従業員数	0	1	2	8	14	18

財務諸表のサマリー (千円)	2029年	2030年	2031年	2032年	2033年	2034年
回次	第5期	第6期	第7期	第8期	第9期	第10期
売上高	630,000	845,000	845,000	1,045,000	945,000	1,145,000
営業利益	91,076	88,378	78,134	▲ 30,952	▲ 198,286	40,028
営業利益率 (%)	14	10	9	▲ 3	▲ 21	3
経常利益	91,076	88,378	78,134	▲ 30,952	▲ 198,286	40,028
経常利益率 (%)	14	10	9	▲ 3	▲ 21	3
当期純利益	63,753	61,865	54,694	▲ 30,952	▲ 198,286	28,020
営業キャッシュフロー合計	268,753	394,990	285,319	430,298	237,339	361,145
投資キャッシュフロー合計	▲ 205,000	▲ 512,500	▲ 102,500	▲ 1,025,000	▲ 102,500	▲ 102,500
財務キャッシュフロー合計	0	0	500,000	0	0	0
期末現預金残高	377,743	260,233	943,052	348,350	483,189	741,833
従業員数	23	27	35	38	45	48

財務諸表のサマリー (千円)	2035年	2036年	2037年	2038年	2039年	2040年
回次	第11期	第12期	第13期	第14期	第15期	第16期
売上高	1,070,000	1,270,000	1,170,000	1,370,000	1,270,000	1,470,000
営業利益	▲ 102,892	258,860	187,462	402,462	312,262	502,262
営業利益率 (%)	▲ 10	20	16	29	25	34
経常利益	▲ 102,892	258,860	187,462	402,462	312,262	502,262
経常利益率 (%)	▲ 10	20	16	29	25	34
当期純利益	▲ 102,892	181,202	131,223	281,723	218,583	351,583
営業キャッシュフロー合計	204,608	232,452	156,848	281,723	218,583	351,583
投資キャッシュフロー合計	0	0	0	0	0	0
財務キャッシュフロー合計	0	0	0	0	0	0
期末現預金残高	946,441	1,178,893	1,335,742	1,617,465	1,836,049	2,187,632
従業員数	54	58	58	58	58	58

表 8-9 損益計算書

単位：百万円	2023年	2024年	2025年	2026年	2027年	2028年	2029年	2030年	2031年	2032年	2033年	2034年	2035年	2036年	2037年	2038年	2039年	2040年
損益計算書 (PL)	現時点	会社設立	第1期	第2期	第3期	第4期	第5期	第6期	第7期	第8期	第9期	第10期	第11期	第12期	第13期	第14期	第15期	第16期
売上高																		
研究開発受託費	0	0	0	300	400	600	600	800	800	900	900	1,000	1,000	1,100	1,100	1,200	1,200	1,300
・契約一時金	0	0	0	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
・研究開発等支援金	0	0	0	100	200	300	400	500	600	600	700	700	800	800	900	900	1,000	1,000
・各種マイルストーン達成金	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
競争的資金獲得	0	0	5	5	10	10	10	25	25	25	25	25	50	50	50	50	50	50
技術ライセンス収入	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
業務受託料	0	0	0	0	0	0	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
・酵素開発サービス	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
・分析・解析サービス	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
総売上高	0	0	5	305	410	610	630	845	845	1,045	945	1,145	1,070	1,270	1,170	1,370	1,270	1,470
売上原価																		
試薬など材料費	0	0	0	32	64	96	128	160	208	232	280	304	352	376	376	376	376	376
労務費（研究者給与）	0	0	0	32	64	96	128	160	208	232	280	304	352	376	376	376	376	376
諸経費	0	0	0	2	10	11	12	19	21	22	35	36	38	39	45	45	45	45
・研究所および作業場リース	0	0	0	0	2	2	2	5	5	5	9	9	9	9	12	12	12	12
・水道光熱費	0	0	0	0	4	4	4	7	8	8	15	15	15	15	19	19	19	19
・通信費	0	0	0	2	4	5	6	7	9	10	11	12	14	15	15	15	15	15
（ソフトウェアライセンス料）	0	0	0	2	4	5	6	7	9	10	11	12	14	15	15	15	15	15
総売上原価	0	0	0	66	138	203	268	339	437	486	595	644	742	791	797	797	797	797
売上総利益	0	0	5	239	272	407	362	506	408	559	350	501	328	479	373	573	473	673
販売費																		
販売費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
一般管理費																		
人件費	0	4	5	8	29	29	36	36	58	58	65	65	65	90	90	90	90	90
・役員報酬	0	4	5	8	22	22	22	22	37	37	37	37	37	55	55	55	55	55
・バックオフィス給与	0	0	0	0	7	7	14	14	21	21	28	28	28	35	35	35	35	35
業務委託費	0	0	8	11	29	20	25	39	38	51	48	61	57	71	61	71	61	71
研究設備の減価償却費	0	0	0	0	125	150	200	325	225	450	425	325	300	50	25	0	0	0
IT投資の減価償却費	0	0	0	0	13	3	5	13	3	25	3	3	0	0	0	0	0	0
諸経費	0	0	0	3	4	4	5	5	7	6	8	8	9	9	9	9	9	9
・旅費交通費	0	0	0	1	1	2	2	3	4	4	5	5	5	6	6	6	6	6
・バックオフィス面積リース代	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
・水道光熱費	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
・通信費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
・消耗品費	0	0	0	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1
販管費合計	0	4	13	22	199	206	271	418	330	590	548	461	431	220	186	171	161	171
営業利益	0	-4	-8	216	73	201	91	88	78	-31	-198	40	-103	259	187	402	312	502
営業外収益																		
雇用・事業助成金など	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
総営業外収益	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
営業外損失																		
株式交付費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
総営業外損失	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
経常利益	0	-4	-8	216	73	201	91	88	78	-31	-198	40	-103	259	187	402	312	502
特別収益																		
固定資産売却益	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
特別損失																		
固定資産売却損	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
特別損益	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
税引前当期純利益	0	-4	-8	216	73	201	91	88	78	-31	-198	40	-103	259	187	402	312	502
税金																		
法人税など	0	0	0	65	22	60	27	27	23	0	0	12	0	78	56	121	94	151
当期純利益	0	-4	-8	151	51	141	64	62	55	-31	-198	28	-103	181	131	282	219	352

表 8-10 貸借対照表

単位：百万円	2023年	2024年	2025年	2026年	2027年	2028年	2029年	2030年	2031年	2032年	2033年	2034年	2035年	2036年	2037年	2038年	2039年	2040年
貸借対照表 (BS)	0年目	会社設立	第1期	第2期	第3期	第4期	第5期	第6期	第7期	第8期	第9期	第10期	第11期	第12期	第13期	第14期	第15期	第16期
資産の部																		
流動資産																		
現金	5	1	4	155	122	314	378	260	943	348	483	742	946	1,179	1,336	1,617	1,836	2,188
固定資産																		
・研究設備	0	0	0	0	500	600	800	1,300	1,400	2,400	2,500	2,600	2,600	2,600	2,600	2,600	2,600	2,600
・IT資産	0	0	0	0	13	15	20	33	35	60	63	65	65	65	65	65	65	65
・減価償却累計額	0	0	0	0	-128	-282	-487	-820	-1,051	-1,512	-1,948	-2,281	-2,588	-2,639	-2,665	-2,665	-2,665	-2,665
資産合計	5	1	4	155	506	647	711	773	1,327	1,296	1,098	1,126	1,023	1,205	1,336	1,617	1,836	2,188
負債の部																		
流動負債																		
・短期借入金	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
固定負債																		
・長期借入金	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
負債合計	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
純資産																		
株主資本	5	1	4	155	506	647	711	773	1,327	1,296	1,098	1,126	1,023	1,205	1,336	1,617	1,836	2,188
・資本金	3	3	8	8	158	158	158	158	408	408	408	408	408	408	408	408	408	408
・資本剰余金	3	3	8	8	158	158	158	158	408	408	408	408	408	408	408	408	408	408
・利益剰余金	0	-4	-11	140	191	332	396	458	512	481	283	311	208	390	521	802	1,021	1,373
純資産合計	5	1	4	155	506	647	711	773	1,327	1,296	1,098	1,126	1,023	1,205	1,336	1,617	1,836	2,188
負債・純資産	5	1	4	155	506	647	711	773	1,327	1,296	1,098	1,126	1,023	1,205	1,336	1,617	1,836	2,188

表 8-11 貸借対照表

単位：百万円	2023年	2024年	2025年	2026年	2027年	2028年	2029年	2030年	2031年	2032年	2033年	2034年	2035年	2036年	2037年	2038年	2039年	2040年
キャッシュフロー計算書 (C/S)	0年目	会社設立	第1期	第2期	第3期	第4期	第5期	第6期	第7期	第8期	第9期	第10期	第11期	第12期	第13期	第14期	第15期	第16期
営業キャッシュフロー																		
当期純利益	0	-4	-8	151	51	141	64	62	55	-31	-198	28	-103	181	131	282	219	352
減価償却費	0	0	0	0	128	154	205	333	231	461	436	333	308	51	26	0	0	0
営業キャッシュフロー合計	0	-4	-8	151	179	295	269	395	285	430	237	361	205	232	157	282	219	352
投資キャッシュフロー																		
研究設備の取得	0	0	0	0	-500	-100	-200	-500	-100	-1,000	-100	-100	0	0	0	0	0	0
IT資産の取得	0	0	0	0	-13	-3	-5	-13	-3	-25	-3	-3	0	0	0	0	0	0
投資キャッシュフロー合計	0	0	0	0	-513	-103	-205	-513	-103	-1,025	-103	-103	0	0	0	0	0	0
財務キャッシュフロー																		
資本金の増減	5	0	10	0	300	0	0	0	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0
財務キャッシュフロー合計	5	0	10	0	300	0	0	0	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0
現金の増減	5	-4	2	151	-33	192	64	-118	683	-595	135	259	205	232	157	282	219	352
期首現金残高	0	5	1	4	155	122	314	378	260	943	348	483	742	946	1,179	1,336	1,617	1,836
期末現金残高	5	1	4	155	122	314	378	260	943	348	483	742	946	1,179	1,336	1,617	1,836	2,188

上述の仮定条件を反映して作成したバイオファブレス事業の財務諸表に関して、表 8-8 に、主要な財務指標の要約を示した。表 8-9 に損益計算書（Profit and Loss Statement: PL）、表 8-10 に貸借表（Balance sheet: BS）、表 8-11 にキャッシュフロー計算書（Cash Flow Statement: C/S）を示した。

7.3. 今後の経営上のリスク

バイオファブレスでは、有用化合物を生産するためのバイオプロセスを受託開発するビジネスモデルである。そのため、研究開発を依頼する企業の経営方針などに売上が大きく左右される可能性がある。また、微生物の育種開発を受託するためには、図 12 に示した DBTL サイクルのうち、全ての要素技術を包括的に保有している必要がある。よって、筆者の先端科学技術特定研究の成果、今後神戸大学と研究開発する予定の要素技術の他に、外部から要素技術を獲得する必要があるかもしれない。現在、微生物の育種開発技術はアカデミアを中心に高度な要素技術が開発されているため、それらの要素技術や関連特許を獲得するための資金が必要となる可能性がある。これらの不確定要素から、想定したよりも多額の資金調達を必要とする可能性がある。

本書では、財務諸表の作成を容易にするとの観点から、簡易なマイルストーンを設定した。化合物の製造技術開発後に受け取るマイルストーン達成金や技術ライセンス料などは、培養ファウンドリや依頼側企業の業務進行度に依存する不確実性の高い収入源である。よって、収益を安定させるため、事業を進める中で契約一次金、研究開発支援金の金額を調整する、あるいはマイルストーンの見直し等を行う必要がある。例えば、各種マイルストーンに関して、開発によって特定の活性値に達した酵素の数、特定の濃度に耐性を有する微生物の獲得など、図 8-10 に示した部門ごとにマイルストーンを設定するのが良いと考えられる。また、このような、受託研究開発案件の詳細を高度に設計することがマーケティング部門に求められる。

8. バイオプロセスの受託開発事業の展望

本書では、筆者の先端科学技術特定研究の成果を事業化するためのイノベーションアイデアとして、研究開発の過程で得られた知見に基づき、微生物を活用した持続可能な方法によって有用化合物を生産するためのバイオプロセスを受託開発する、バイオファブレスを提案した。

既存の合成生物学のスタートアップ企業では、自社の微生物の育種開発技術によって開発されたバイオプロセスを用いて化合物を大量生産して販売する事業を展開していた（図 8-1）。他方、近年では、市場や既存企業の技術開発ニーズに対して、自社の微生物の育種開発技術を活用してバイオプロセスを受託開発するようなビジネスモデルを展開する企業も現れた。例えば、現在、農業に用いられる化学肥料の多くは、ハーバー・ボッシュ法によって大気中の窒素 N_2 から合成されるアンモニア NH_3 を原料に製造されている。しかしながら、ハーバー・ボッシュ法は、高温高压の反応条件を要するため、環境負荷の高い製造法であった。よって、Ginkgo Bioworks 社では、Synlogic 社というスピンアウト企業を設立して、遺伝子組換えされた窒素固定菌を用いた肥料事業を展開している。

筆者の提案したバイオファブレスでは、石油化学のサプライチェーン崩壊に伴う、現在石油化学によって製造されているような化合物を生産するためのバイオプロセスを受託開発する。特に、芳香族化合物の製造法に関して、目立った競合技術はまだ出現していない。例として、三井化学は、2022 年 2 月 17 日に、アジアで初めてバイオマス由来のフェノールを出荷したことを報告している。このバイオマス由来のフェノールは、Neste 社から 3000 トン輸入したバイオマスナフサを原料に生産されている。バイオマスナフサとは、廃食油に含まれる油脂を分解し得られた脂肪酸を脱水することによって得られる炭化水素のことである。石油から得られるナフサの価格と比較して、バイオマスナフサの価格は約 3 倍高い。そのため、バイオファブレスによって十分高度なバイオプロセスを開発することができれば、これらの競合技術に対抗していけると考えている。加えて、バイオマスナフサは、老朽化した国内のエチレンクラッカーでベンゼンなどに分解されるので、今後の収益構造悪化も想定される。クラッキングは約 $500^{\circ}C$ という高温の反応条件を要するなど、環境負荷の高い製造法である。SDGs など、環境への配慮の必要性が高まっている社会情勢においては、バイオファブレスによって開発するバイオプロセスが市場の競争を優位に進める可能性は十分にあると考えている。近年の、合成生物

における、極端な付加価値の高い化合物を製造しようとするトレンドを踏まえると、バイオプロセスによって生産される目的化合物を、競合となりうる既存の製造法の側面から分析したことは議論に値する。

バイオファブレスでは、先発のスタートアップ企業と異なり、自社ブランドによる製品を販売しない。Amyris 社の酵母を用いた抗マalaria薬であるアルテミシニンの製造事業では、既存のアルテミシニンのサプライヤーと協力してバイオプロセスを受託開発するのではなく、Amyris 社自身のバイオプロセス技術としてアルテミシニンを市場に供給した。そのため、既存のアルテミシニンのサプライヤーと競合してしまい、コスト勝負に敗れる結果となった。一方、筆者が提案した「バイオファブレス×培養ファウンドリの事業モデル」では、バイオプロセスの開発依頼者の製品として納品され、既存のサプライヤーと競合を避ける。自社ブランドの製品を販売しない受託開発型の事業を展開することで、多種多様な企業がバイオファブレスの技術プラットフォームにアクセスして、複数の受託研究開発費を元に早期に事業を成長させることができると考えている。

また、バイオファブレスの成功には、培養ファウンドリの成功も不可欠である。培養ファウンドリでは、バイオファブレスによって開発されたバイオプロセスを、商業規模で実現するための技術開発および商業培養を行う。バイオファブレスで開発される複数の微生物株の商業培養ニーズを一手に引き受けることで、商業培養設備への高額な投資を十分に回収できる。

将来、バイオプロセスに用いられる微生物の種類は多岐に渡ることが推測される。使用される微生物によって、培養に用いられる培地成分やその培養方法は異なる。微生物が変われば、培養ファウンドリが保有する培養設備を複数の培養目的で共有することができず、高額な設備投資を回収できない可能性があるためだ。このように、複数のバイオファブレスが開発した複数のバイオプロセスの商業培養依頼を、培養ファウンドリが一手に引き受けることができるかは議論の余地がある。例えば、培養ファウンドリでは、現在の商業培養設備である巨大なプラントを建設するのみならず、シングルユースでの商業培養技術などの新しい技術が開発されていくのかもしれない。

一般に、微生物の商業培養の際には、微生物が商業培養規模の化合物の濃度に耐性を有していることが求められる。微生物の化合物に対する耐性には特徴があり、ある特定の化合物に耐性を有する場合、類似の構造を有する化合物に対しても耐性を有する場合が多い。そのため、バイオプロセスによって生産される化合物に対して、業界基準となる微生物株が設定されるのではないかと筆者は考えている。例えば、芳香族化合物を生産するためにはこの微生物を使用すると決められれば、その微生物の培養に特化した培養ファウンドリも現れるのではないだろうか。

総括として、筆者の先端科学技術特定研究の成果を事業化するため、微生物の育種開発技術を用いてバイオプロセスを受託開発するバイオファブレスを提案した。バイオファブレスの事業を提案するにあたり、事業範囲を明確に設定し、開発対象となる化合物およびターゲット市場を設定した。本イノベーションアイデアの実現により、持続可能な社会の構築の一助となり、社会的および経済的価値を創出していければと考えている。

引用文献

- [1] H. Yim et al., “Metabolic engineering of Escherichia coli for direct production of 1,4-butanediol,” Nat Chem Biol, vol. 7, no. 7, pp. 445–452, Jul. 2011, doi: 10.1038/nchembio.580.
- [2] A. Burgard, M. J. Burk, R. Osterhout, S. Van Dien, and H. Yim, “Development of a commercial scale process for production of 1,4-butanediol from sugar,” Current Opinion in Biotechnology, vol. 42, pp. 118–125, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.copbio.2016.04.016. [3] US patent, Microorganisms and methods for biosynthesis of adipate, hexamethylenediamine and 6-aminocaproic acid, 2018, Genomatica, US10150977B2
- [4] US patent, Production of 1,4-butanediol, Mitsubishi Chemical Corp, JP16716498A
- [5] R. Chao, S. Mishra, T. Si, and H. Zhao, “Engineering biological systems using automated biofoundries,” Metabolic Engineering, vol. 42, pp. 98–108, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.ymben.2017.06.003.
- [6] 水野文夫ほか、なるほどナットク！半導体がわかる本、2006 年、オーム社
- [7] 稲葉 雅巳、図解即戦力 半導体業界の製造工程とビジネスがこれ一冊でしっかりとわかる教科書、2022 年、エレクトロニクス市場研究会
- [8] 湯之上隆、イノベーションのジレンマ 日本「半導体」敗戦、2009 年、光文社.
- [9] 朝元 照雄、台湾積体回路製造（TSMC）における発展の謎を探る —工業技術研究院のスピンオフから世界最大のファウンドリー企業—（前編）、2013 年、<https://www.koryu.or.jp/Portals/0/images/publications/magazine/2013/12/201312-01.pdf>
- [10] 遠藤 誉、台湾の TSMC はなぜ成功したのか、2021 年、ニュースウィーク日本版、<https://www.newsweekjapan.jp/stories/world/2021/05/tsmc.php>
- [11] 水橋祐介、電子立国台湾-強さの源流をたどる、2000 年、ダブリュネット
- [12] 立本博文ほか、プロセス産業としての半導体前工程-アーキテクチャ変動のダイナミクス-、2009 年、有斐閣
- [13] 岸本 千佳司、半導体ファウンドリ・ビジネスにおける業績格差と成功要因 —台湾 TSMC と UMC の比較を通して -、2016 年、国際ビジネス研究第 8 巻第 1 号、https://www.jstage.jst.go.jp/article/jaibs/8/1/8_27/_pdf/-char/ja
- [14] 小石吉一、アジア半導体/液晶ハンドブック（2009-2010）年、2009 年、産業タイムズ社
- [15] 岸本 千佳司、台湾半導体産業におけるファウンドリ・ビジネスの発展 - 発展経緯、成功要因、TSMC と UMC の比較 -、2015 年、Working Paper Series Vol. 2015-08、<http://www.agi.or.jp/workingpapers/WP2015-08.pdf>
- [16] イノベーションのジレンマ 増補改訂版、Clayton M. Christensen、Harvard business school press

- [17] W. Jiang et al., "Metabolic engineering strategies to enable microbial utilization of C1 feedstocks," *Nat Chem Biol*, vol. 17, no. 8, pp. 845–855, Aug. 2021, doi: 10.1038/s41589-021-00836-0.
- [18] N. J. Claassens, D. Z. Sousa, V. A. P. M. dos Santos, W. M. de Vos, and J. van der Oost, "Harnessing the power of microbial autotrophy," *Nat Rev Microbiol*, vol. 14, no. 11, pp. 692–706, Nov. 2016, doi: 10.1038/nrmicro.2016.130.
- [19] S. Gleizer et al., "Conversion of *Escherichia coli* to Generate All Biomass Carbon from CO₂," *Cell*, vol. 179, no. 6, pp. 1255–1263.e12, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.11.009.
- [20] T. Gassler et al., "The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO₂," *Nat Biotechnol*, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41587-019-0363-0.
- [26] 「セルロース系エタノール生産システム 総合開発実証事業」事業原簿【公開版】、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 新エネルギー部、
<https://www.nedo.go.jp/content/100927215.pdf>、2023年1月
- [22] B. Thompson, M. Machas, and D. R. Nielsen, "Engineering and comparison of non-natural pathways for microbial phenol production," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 113, no. 8, pp. 1745–1754, Aug. 2016, doi: 10.1002/bit.25942.
- [23] Y. Kitade, R. Hashimoto, M. Suda, K. Hiraga, and M. Inui, "Production of 4-Hydroxybenzoic Acid by an Aerobic Growth-Arrested Bioprocess Using Metabolically Engineered *Corynebacterium glutamicum*," *Appl Environ Microbiol*, vol. 84, no. 6, pp. e02587-17, Mar. 2018, doi: 10.1128/AEM.02587-17.
- [23] C. Pfaff, N. Glindemann, J. Gruber, M. Frentzen, and R. Sadre, "Chorismate Pyruvate-Lyase and 4-Hydroxy-3-solanessylbenzoate Decarboxylase Are Required for Plastoquinone Biosynthesis in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 5, pp. 2675–2686, Jan. 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.511709.
- [24] X. Shen, J. Wang, J. Wang, Z. Chen, Q. Yuan, and Y. Yan, "High-level De novo biosynthesis of arbutin in engineered *Escherichia coli*," *Metabolic Engineering*, vol. 42, pp. 52–58, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.ymben.2017.06.001.
- [25] M. Zhang et al., "Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for High-Level Production of Salicin," *ACS Omega*, vol. 7, no. 37, pp. 33147–33155, Sep. 2022, doi: 10.1021/acsomega.2c03347.
- [26] C. Gaille, P. Kast, and D. Haas, "Salicylate Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 24, pp. 21768–21775, Jun. 2002, doi: 10.1074/jbc.M202410200.
- [27] L. Liang et al., "Genome engineering of *E. coli* for improved styrene production," *Metabolic Engineering*, vol. 57, pp. 74–84, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.ymben.2019.09.007.
- [28] Y. Mori, S. Noda, T. Shirai, and A. Kondo, "Direct 1,3-butadiene biosynthesis in *Escherichia coli* via a tailored ferulic acid decarboxylase mutant," *Nat Commun*, vol. 12, no. 1, p. 2195, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-22504-6.

- [29] Z. W. Luo and S. Y. Lee, "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of benzoic acid from glucose," *Metabolic Engineering*, vol. 62, pp. 298–311, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.ymben.2020.10.002.
- [30] R. Fujiwara, S. Noda, T. Tanaka, and A. Kondo, "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for shikimate pathway derivative production from glucose–xylose co-substrate," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 279, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-019-14024-1.
- [31] Y.-S. Tai et al., "Engineering nonphosphorylative metabolism to generate lignocellulose-derived products," *Nature Chemical Biology*, vol. 12, no. 4, pp. 247–253, Feb. 2016, doi: 10.1038/nchembio.2020.
- [32] R. J. Protzko et al., "Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for co-utilization of d-galacturonic acid and d-glucose from citrus peel waste," *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-07589-w.

論文一覧

第3章

T. Bamba, T. Yukawa, et al., “Production of 1,2,4-butanetriol from xylose by *Saccharomyces cerevisiae* through Fe metabolic engineering,” *Metabolic Engineering*, vol. 56, pp. 17–27, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.ymben.2019.08.012.

第4章

T. Yukawa, T. Bamba, G. Guirimand, M. Matsuda, T. Hasunuma, and A. Kondo, “Optimization of 1,2,4-butanetriol production from xylose in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of NADH/NADPH balance,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 118, no. 1, pp. 175–185, Jan. 2021, doi: 10.1002/bit.27560.

第5章

T. Yukawa et al., “Enhanced production of 3,4-dihydroxybutyrate from xylose by engineered yeast via xylonate re-assimilation under alkaline condition,” *Biotechnology and Bioengineering*, p. bit.28278, Nov. 2022, doi: 10.1002/bit.28278.

第6章

T. Yukawa, K. Tanaka, T. Bamba, Y.-S. Jin, A. Kondo, T. Hasunuma., “The construction of oxidative xylose pathway through the identification of active enzymes in yeast”, Under preparation.

特許一覧

湯川貴弘、番場崇弘、秀瀬涼太、蓮沼誠久、近藤昭彦、組換え宿主細胞及びそれを用いた有用物質の製造方法、神戸大学、2020 年 1 月 24 日、（特願 2020-010032）

湯川貴弘、番場崇弘、秀瀬涼太、蓮沼誠久、近藤昭彦、改良型鉄代謝工学による新規キシロース代謝系を介した有用物質の製造方法、神戸大学、2020 年 3 月 24 日、（PCT2020052453）

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多岐にわたるご指導、ご協力を頂きました先端バイオ工学研究センターのセンター長および神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科の蓮沼誠久教授に深くお礼申し上げます。蓮沼誠久教授には、研究計画や研究に対する取り組み方や心構えなどを密にご指導いただきました。また、研究成果の特許出願申請や海外での学会参加など、自身の成長できるような機会を常に与えてくださったことを心より感謝しております。蓮沼誠久教授の存在無くして博士課程後期への進学をしたと言えるほど、私自身のこれまでの人生において最も大きな存在でした。

また、博士課程前期および博士課程後期のアントレプレナーシップの講義科目、およびイノベーション・ストラテジー研究成果書の執筆に際して、御多忙の中にも関わらずご指導頂きました、主担当の山本一彦教授に深く御礼申し上げます。山本教授一彦からは、事業戦略の執筆が滞った、あるいは疑問が生じた際に、常に的確なアドバイスを頂戴しました。加えて、講義外においてもスタートアップ企業の事業戦略を立案する講座などに招待頂きました。山本一彦教授からご教授頂いた知識や経験は、通常の理系大学院には学べないことばかりであり、私の人生の選択に多大な恩恵がありましたこと、ここに御礼申し上げます。加えて、イノベーション・ストラテジー研究成果書の財務戦略の項に関して、スタートアップ企業の具体例を用いて丁寧かつ明瞭にご指導頂きましたバイオパレット社の岩田清和氏にお礼申し上げます。

また、本審査に関しましては、ご多忙の中、予備検討審査会を通じて多くの建設的なコメントを頂きました田口精一教授に感謝申し上げます。田口精一教授には、研究開発を進める筆者とは異なる視点から様々なアドバイスを頂き、自身の研究の価値やインパクトについて改めて考える機会となりました。ここに、御礼申し上げます。

先端科学技術特定研究に関して、同研究グループで研究の議論を深めて頂きました、秀瀬涼太博士、猪熊健太郎博士、Gregory Guirimand 博士、黒野浩幹氏、北田雄基氏、小林優真氏、雲北涼太氏、中野拓海氏、楊箸爽氏、福良光起氏、堀良美氏、松田真実氏、吉田崇伸氏に深く感謝申し上げます。特に、研究室に配属された初日からお世話になっている番場崇弘博士には、日々の研究の進め方や実験計画を構築する手法など密にご指導ご鞭撻頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。また、日々ご助言と励ましを頂きました神戸大学大学院工学研究科 応用化学専攻 バイオ生産工学研究室の皆様には深甚なる感謝の意を表します。最後になりましたが、日本で有数の素晴らしい研究環境を提供して頂きました神戸大学副学長の近藤昭彦研究科長に深く御礼申し上げます。

神戸大学博士論文「次世代バイオプロセスに資する酵素の機能発現技術の開発およびその事業化」全 187 頁

提出日 2021 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。

© 湯川 貴弘

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。

本論文に基づく学位審査にあたっては、以下の参考論文とともに審査されました。

T. Bamba, T. Yukawa, et al., “Production of 1,2,4-butanetriol from xylose by *Saccharomyces cerevisiae* through Fe metabolic engineering,” *Metabolic Engineering*, vol. 56, pp. 17–27, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.ymben.2019.08.012.

T. Yukawa, T. Bamba, G. Guirimand, M. Matsuda, T. Hasunuma, and A. Kondo, “Optimization of 1,2,4-butanetriol production from xylose in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of NADH/NADPH balance,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 118, no. 1, pp. 175–185, Jan. 2021, doi: 10.1002/bit.27560.

T. Yukawa et al., “Enhanced production of 3,4-dihydroxybutyrate from xylose by engineered yeast via xylonate re-assimilation under alkaline condition,” *Biotechnology and Bioengineering*, p. bit.28278, Nov. 2022, doi: 10.1002/bit.28278.