



非可食バイオマス由来糖と糸状菌による糖化酵素製造技術を基盤とした循環型タンパク質生産プラットフォームの展開

新井, 俊陽

(Degree)

博士 (科学技術イノベーション)

(Date of Degree)

2023-09-25

(Date of Publication)

2024-09-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8750号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100485934>

※ 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

非可食バイオマス由来糖と
糸状菌による糖化酵素製造技術を基盤とした
循環型タンパク質生産プラットフォームの展開

2023年7月

神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科

新井 俊陽

1. 序論	4
1-1 本論文の構成.....	4
1-2 バイオエコノミー社会実現に向けて.....	4
1-2-1 脱石化に向けた世界的な動き.....	4
1-2-2 生物機能を利用したものづくり.....	5
1-2-3 バイオ生産による価値づくりの動向.....	6
1-3 タンパク質の生産技術.....	8
1-4 これまでに検討されたベースとなるイノベーション・ストラテジー.....	9
1-4-1 ベースとなる花王の糖化酵素の高機能化・オンサイト安価製造技術.....	9
1-4-2 都市型セルロース系バイオマスからの非可食糖製造ビジネス.....	12
1-5 新規事業構築の根幹となる技術的ブレイクスルー.....	13
1-6 本研究の目的.....	14
1-7 参考文献.....	15
2. 誘導物質フリー糖化酵素の生産系の開発	17
2-1 背景.....	18
2-2 結果.....	21
2-2-1 リプレッサーの破壊と変異型 XYR1 ^{V821F} の恒常的発現による影響.....	21
2-2-2 セルラーゼ転写関連因子と変異型 XYR1 ^{V821F} の共発現による誘導物質フリー条件下におけるセルラーゼ発現の促進.....	23
2-2-3 誘導物質フリー生産に必要な因子の最適な組み合わせの検証.....	26
2-2-4 XYR1 ^{V821F} と PT-ACE3 の単独または共発現下でのセルラーゼおよびキシラナーゼの発現および活性解析.....	30
2-3 考察と討論.....	34
2-4 材料と方法.....	37
2-5 本章のまとめ.....	42
2-6 参考文献.....	42
3. 誘導物質フリー生産系の異種タンパク質生産への応用	48
3-1 背景.....	48
3-2 結果.....	51
3-2-1 <i>T. reesei</i> の内因性分泌酵素を利用した誘導物質フリー組換えタンパク質生産の概念検証.....	51
3-2-2 <i>T. reesei</i> における 3 種類のナノボディの異種タンパク質の誘導物質フリー分泌産生.....	53
3-2-3 プロテアーゼ阻害剤を添加したナノボディの生産.....	57
3-2-4 <i>T. reesei</i> で生産したナノボディの基質結合能力の確認.....	60

3-2-5 <i>cbh1</i> 及び <i>cbh2</i> のカプラシズマブへの二重置換による高生産性と高占有率化	61
3-3 考察と討論	63
3-4 材料と方法	66
3-5 本章のまとめ	73
3-6 参考文献	73
4. 事業環境分析と向かうべき方向性を見定め	79
4-1 タンパク質生産を利用した他社の事業	79
4-1-1 タンパク質の受託生産事業	79
4-1-2 タンパク質の外販事業	86
4-1-3 ベンチマーク企業: DYADIC 社の分析 (酵素外販事業及びバイオ医薬品生産受託)	90
4-2 事業環境分析	95
4-2-1 ファイブフォース分析: タンパク質生産受託事業の場合	95
4-2-2 SWOT 分析	97
4-2-3 タンパク質生産企業のポジショニングと環境分析の総括	97
4-3 トリコデルマを利用したタンパク質生産系の特長整理	100
4-4 タンパク質に求められる社会的価値	102
4-4-1 タンパク質がもたらしてきた価値と今後の展開方向性	102
4-4-2 食料分野におけるタンパク質の可能性	103
4-4-3 素材分野におけるタンパク質の可能性	105
4-5 タンパク質素材の既存ビジネス	107
4-5-1 タンパク質素材市場	107
4-5-2 タンパク質素材ビジネスの主要プレイヤー調査	108
4-6 コアとなるイノベーションの方向性	115
4-7 参考文献	116
5. 技術戦略	123
5-1 非可食糖由来タンパク質素材事業に必要な技術の全体像	123
5-2 タンパク質生産プラットフォームの開発	123
5-2-1 開発した技術ポートフォリオ	123
5-2-2 今後の開発方針	124
5-3 タンパク質素材の開発	124
5-3-1 プロトタイピング	124
5-3-2 今後の開発方針	124
5-4 技術開発ロードマップ	125
5-5 技術戦略のまとめ	126
5-6 参考文献	126

6. 知財戦略	127
6-1 タンパク質生産系の自社及び他社の出願状況	127
6-2 タンパク質素材の他社の出願状況	128
6-3 事業化に向けた知財構築計画	131
6-4 知財戦略のまとめ	131
6-5 参考文献	132
7. 事業戦略	133
7-1 シナリオ構築に向けたモデルターゲットの設定	133
7-2 ビジネスモデル	134
7-3 事業環境分析と競争優位性	136
7-3-1 事業環境と PEST 分析	136
7-3-2 ファイブフォース分析	138
7-3-3 バリューチェーン・VRIO 分析	140
7-3-4 3つの基本戦略に照らした分析	140
7-4 事業戦略のまとめ	140
7-5 参考文献	141
8. 財務戦略	142
8-1 非可食糖及びタンパク質樹脂製造のコスト試算	142
8-2 事業ロードマップとモデルケースにおける収益シミュレーション	142
8-3 事業価値算出と今後の課題	143
8-4 財務戦略のまとめ	143
8-5 参考文献	144
9. 将来的なイノベーション・アイデア	145
9-1 原料バイオマスの拡張	145
9-2 新規タンパク質素材の可能性	146
9-3 将来的なイノベーション・アイデアのまとめと今後	146
9-4 参考文献	146
10. 結論	147
謝辞	149

1. 序論

1-1 本論文の構成

本論文は全 10 章で構成される。

第1章では、本研究に関わるバイオリファイナリー、タンパク質生産技術、これまでに検討されたイノベーション・ストラテジーの背景について述べる。

第2章では、技術的ブレイクスルーの1つである誘導物質フリーでの糖化酵素生産研究について述べる。第2章は次の学術論文からなる。

Arai, T., Ichinose, S., Shibata, N. *et al.* Inducer-free cellulase production system based on the constitutive expression of mutated XYR1 and ACE3 in the industrial fungus *Trichoderma reesei*. *Sci Rep* **12**, 19445 (2022).

第3章では、第2章の誘導物質フリーでの糖化酵素生産系を拡張し、異種タンパク質の高効率生産プラットフォームの構築を目指した研究について述べる。第3章は次の学術論文からなる。

Arai, T., Wada, M., Nishiguchi, H. *et al.* Inducer-free recombinant protein production in *Trichoderma reesei*: secretory production of endogenous enzymes and heterologous nanobodies using glucose as the sole carbon source. *Microb Cell Fact* **22**, 103 (2023).

第4章では、第1章で述べた背景やこれまで構築されてきたイノベーション・ストラテジー、及び第2章、第3章で構築してきた技術、さらに既存ビジネスの調査を総合的に検討し、本研究としてのイノベーション・ストラテジーをどのような方向性の事業とすべきか考察について述べる。

第5章では、技術戦略について述べる。現時点で有する技術プラットフォームの整理、不足しているポートフォリオ、プロトタイピング、今後の開発方針について整理した。

第6章では、知財戦略について述べる。自社の糖化酵素/タンパク質生産系の出願と、タンパク質素材に関する他社の出願状況について整理し、今後の戦略立案を行った。

第7章では、事業戦略について述べる。第9章で財務戦略について考察するためのターゲット及びビジネスモデルを構築した。その上で、事業環境分析と競争優位性について評価した。

第8章では、財務戦略について述べる。第8章でのモデルに基づき財務・収益性の分析を行った。さらに、財務計画をもとにした事業価値の評価を行った。

第9章では、イノベーション・ストラテジーのまとめと、第8章のモデルからさらに拡張した、将来的なイノベーション・アイデアについて述べる。

第10章では、本研究の成果をまとめた上で、本研究の波及効果について述べる。

1-2 バイオエコノミー社会実現に向けて

1-2-1 脱石化に向けた世界的な動き

経済協力開発機構(OECD)は、2009年に発表したレポート「The Bioeconomy to 2030: designing a policy agenda」において、経済生産に大きく貢献できる市場(産業群)として“バイオエコノミー”という考え方を初めて提唱した¹。バイオエコノミーとは、再生可能な生物資源(バイオマス)やバイオテクノロジーなどを利活用し、持続的で再生可能性のある循環型の

経済社会のことである。この提唱を発端に世界でバイオエコノミーに対する機運が一気に高まり、各国でバイオエコノミーに関する国家戦略が策定される契機となった²。米国では、バイオエコノミーを今後の経済成長と社会問題の解決を牽引する重要な分野と位置付け、2012年にバイオエコノミーに関する戦略「National Bioeconomy Blueprint」を発表した³。この戦略は、ライフサイエンス、環境エネルギー、バイオ製造プロセス、食糧・農業分野と幅広い分野を包含している。欧州委員会は、2012年にバイオエコノミー戦略「Innovation for Sustainable Growth – A Bioeconomy for Europe」を策定し、持続可能なバイオエコノミーを欧州に構築することで、革新的なアイデアを製品やプロセスに転換し、成長と雇用を創造することを掲げている⁴。また、英国⁵、ドイツ⁶についても独自のバイオエコノミー戦略を掲げ、バイオエコノミー社会の実現に向けて具体的な提言とアクションを実施している。

また、日本においても2019年6月に「バイオ戦略」⁷を策定し、2020年にこれを更新した⁸。この「バイオ戦略」では、「2030年に世界最先端のバイオエコノミー社会を実現」することを目標に、4つの社会像、9つの市場領域を設定し、課題と今後の方針、取組の方向性を示した。また、2020年12月25日に、経済産業省が他省庁と連携して策定した「2050年カーボンニュートラルに伴うグリーン成長戦略」においても、バイオ燃料、バイオマス由来化成品等がカーボンリサイクル産業の中に位置付けられており⁹、カーボンニュートラル社会の実現に向けた重要な要素となっている。

このように地球規模の温暖化、気候変動問題に対処することを目的に、国際社会が一体となって脱炭素社会構築に向けて動き始めている。こういった脱石化の世界的な流れの中で、バイオエコノミーにおける工業分野はバイオリファイナリー(バイオマスリファイナリー)とも呼ばれ、様々なバイオマスから異なるバイオ化成品を生産することをコンセプトとしており、オイルリファイナリーに代わる新たな産業として期待されている。

1-2-2 生物機能を利用したものづくり

化合物を人工的に合成する方法として、微生物や植物等を利用して合成する「バイオ合成法」と、化学工程を用いて製造する「化学合成法」の2つがある。生物は大きくて複雑な構造を持った分子を作ることが得意とし、これを化学合成のみで作ろうとすると多段階操作が必要で、エネルギーもコストも膨大となり、事実上合成できない場合も少なくない。この非効率さを克服するのがバイオ合成の強みである。他方、化学合成の方がはるかに安価で大量に生産できる化合物に対してバイオを活用するには解決すべき課題があり、特に化学合成に肩を並べる生産コストの低減が求められる。

社会実装に向けて各種課題を解決しながら、原料にもプロセスにも石油資源を多く使うものづくりからバイオによるものづくりへ転換すると、そこには多くの価値が生まれることになる。バイオだからこそ作れるモノの価値、そして便利さと引き換えに蓄積される地球環境への負の影響を取り戻す価値である。

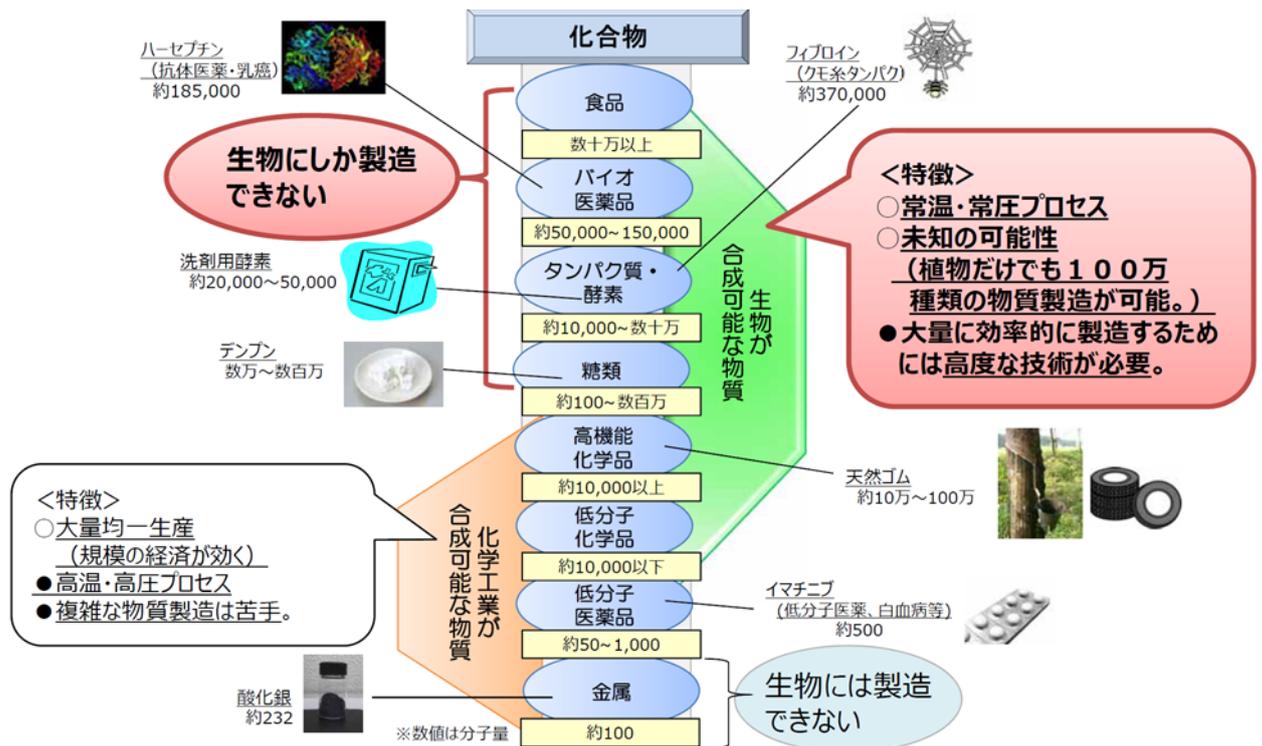


図 1-1 生物が生み出す物質の範囲のイメージ 出展: 10

1-2-3 バイオ生産による価値づくりの動向

近年、ゲノム解読やゲノム編集における技術革新や、バイオテクノロジーと人工知能及び情報技術との融合により、バイオテクノロジーが広範な産業の基盤を支えるバイオエコノミー社会が世界的に到来しつつあると言われる。特に遺伝子配列・代謝の設計の分野は新たな機能性物質の開発や価値出しを大きく加速させることが予想される。バイオ×デジタルを牽引する企業として、特筆すべき企業について以下に述べた。

OGinkgo Bioworks

- ・2008 年に MIT のコンピューター科学者が ボストンに設立した民間企業。2017 年に評価額が約 14 億ドル(約 1530 億円)に達した合成生物系では世界初のユニコーン企業。
- ・高度にオートメーション化されたラボや買収した企業(Gen9)の高速 DNA 合成技術を駆使し、顧客企業の要求する生産株を開発、提供する「プラットフォーム」ビジネスモデル。
- ・近年では、ベンチャーキャピタルの YC や Petri と連携し、自身が有する合成プラットフォームを新規スタートアップに開放するなどのアクセラレーターとしての役割も開始。
- ・2022 年 7 月、Zymergen(下記)を約 3 億ドル相当で買収¹¹、合成生物学プラットフォームを更に強化した。

OZymergen Inc.

- ・Amyris 出身の研究者が 2013 年に創業した世界最大規模の Biofoundry。

- ・800人を超える従業員(うち100人以上がIT技術者)、企業買収により得た大規模遺伝子情報ライブラリー、高度にオートメーション化された細胞製造プラットフォームを有する。
- ・高速かつ網羅的な DBTL サイクルから産出されるビックデータ(BD)と AI による機械学習(ML)を組み合わせ、人知の及ばない代謝経路設計により生産細胞を最適化。
- ・農業から化学品や基礎原料、医薬品に至るまで、あらゆる産業分野における新規分子の発見や材料の性能向上に携わる。

○Amryris Inc.

- ・UC バークレーの研究者が 2003 年に設立し、2010 年に NASDAQ に上場。
- ・サトウキビから抽出した糖を原料に、化成品原料物質(ファルネセン)を組換え酵母により製造する技術を強みに、抗マラリア薬の前駆体、バイオ燃料、化粧品等を製造。
- ・酵母を宿主とした独自プラットフォーム、およびブラジルに設立したファルネセン大量培養製造インフラが強み。
- ・近年では、化粧品会社を立ち上げ B2C ビジネスにも進出。

このように、少なくとも低分子化合物の生産や代謝改変に関しては急速な進展を見せ、実用化が始まっている。また、上記企業は糖などもバイオマス資源からの物質生産を行っており、バイオリファイナリーの牽引者でもある。

一方で、バイオ技術を利用して生産した低分子の化合物だけでなく、「タンパク質」も従来から産業を支えてきた。タンパク質はアミノ酸のポリマーで構成される天然の高分子であり、生物が合成可能な物質として特徴的なものである。これまでも組換えタンパク質は数々のブレイクスルーを起こし、これまでにない価値を提供してきた。例えば、1979 年には大腸菌で生産させたヒト型インスリンが発売された¹²。インスリンは、膵臓に存在するランゲルハンス島のβ細胞から分泌されるペプチドホルモンの一種であり、組換えタンパク質医薬品第1号として1型糖尿病に対する薬物療法として人類に大きく貢献した。また、1996年に糸状菌由来フィターゼが飼料添加物に指定された¹³。フィターゼは、フィチン酸を分解して、無機リンを遊離する酵素群の総称であり、フィターゼを飼料に添加することにより飼料中のリン遊離が促進され動物がより効率的にリン酸を吸収できるようになった。これによりフィターゼの産業利用は飼料の栄養価を高めるとともに、糞尿中の有機リン低減により臭い・環境汚染低減の価値を生み出した。また、1997年に動物用医薬品原薬(羊毛の収穫薬)として *Brevibacillus* を宿主としたヒト上皮細胞成長因子(hEGF)が発売された¹⁴。オーストラリアにて羊毛を収穫する薬剤として使用され、この技術は次世代の羊毛収穫法として注目された。このように、新たな組換えタンパク質はこれまでも新たな価値を生み出し、市場を開拓してきた歴史がある。

近年においても、酵素や単純な構造のタンパク質のみならず、複雑な構造タンパク質・生体材料の開発が進められてきている。従来は自然界から目的の触媒能を持つタンパク質(酵素)の分離生産、生理活性タンパク質の利用が中心であったが、今後は作るモノ自体の多様化が予想され、より複雑で難発現機能性タンパク質の生産や、タンパク質をバイオテクノロジーにより製造・機能をプログラムできるポリマー素材・生体材料として捉える動きもみられる。バイオエコノミー

社会に向けて生物機能を利用したモノづくりが加速しつつある中、タンパク質のもたらしうる潜在価値は大きいと考えられる。

1-3 タンパク質の生産技術

微生物を利用してタンパク質を生産するにあたり、宿主の選択は極めて重要な要素である。全てのタンパク質を万能に生産可能な宿主は現状存在せず、生産対象のタンパク質によって得意/不得意が存在する。例えば、大腸菌は最も一般的なタンパク質生産宿主として利用されているが、分子量の大きなタンパク質の発現は困難であり、糸状菌由来のセルラーゼは大腸菌で生産できないものもある。また、逆に細菌由来のタンパク質は糸状菌で生産が困難なものもあり、適切な宿主の選択はタンパク質生産においては生産成功の鍵を握る¹⁵。

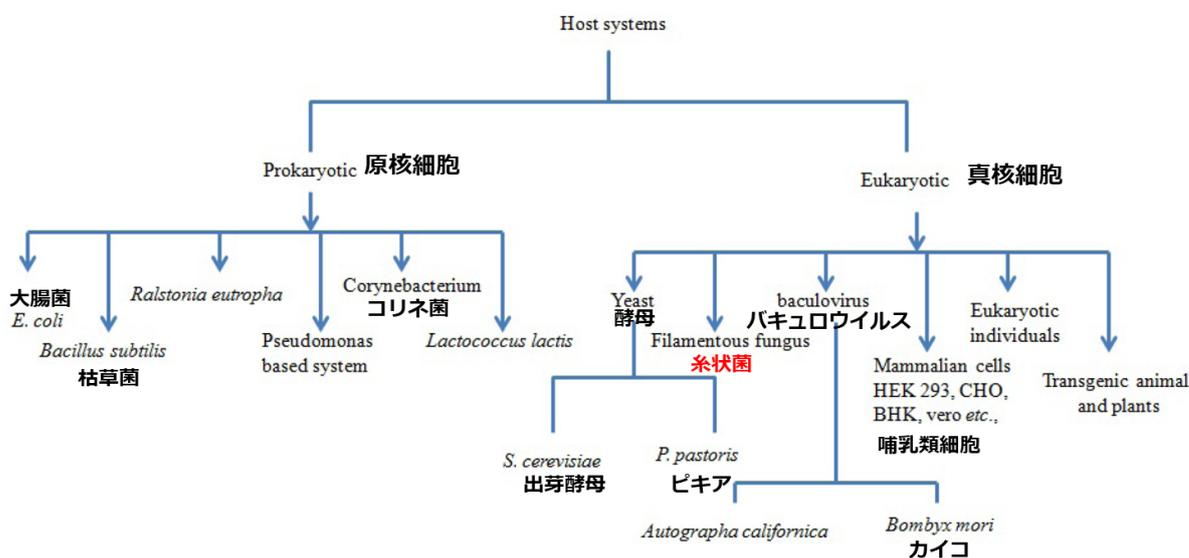


図 1-2 様々なタンパク質生産宿主 参考文献 15 を参考に筆者改変

一般的に、真核生物は真核生物由来のタンパク質の方が生産しやすく、原核生物は原核生物由来のタンパク質生産の方が相性は良いと言われる。このように様々な宿主が一本化されず開発されているのは各宿主の特徴、メリット、デメリットが存在するためである。大腸菌は最もよく使われるタンパク質生産宿主であり、生物実験の第 1 選択である。発現成功率が高いが、一方で一般には菌体内発現であり、分泌生産と比較して高生産しにくいこと、分子量の大きなタンパク質生産が不得意であることなどがデメリットとして挙げられる。バチルス属菌も原核生物としてよく使用され、分泌生産も可能である。このような原核生物が生産したタンパク質には、一般に真核生物でみられるようなタンパク質への糖鎖付加などの翻訳後修飾がない。すなわち、アミノ酸配列としては同一でも、生産物として全く同一のものとはならない。一方で真核生物においては糖鎖が付加されることも多いが、その付加される糖鎖の形態が異なることもある。このような糖鎖はタンパク質の機能性やヒトへのアレルゲンとなることもあり、特に医薬用途では注意を要するものである。そこで、医薬用途ではヒト胎児腎細胞 293 (Human Embryonic Kidney

cells 293, HEK293) などの細胞を用いて生産することが多いが、培養制御の煩雑さや生産周期などから高コストとなりやすい。また、産業用酵素の生産には、真核生物として酵母(サツカロマイセス、ピキア)、糸状菌(アスペルギルスなど)も汎用される。これらは分泌生産が可能であり、かつ培養条件を整えることで極めて高い生産性を示すことが選択の理由である。一方で糸状菌はその名の通り糸状に連なって成長し、原核生物よりも細胞サイズが大きいことから、ラボオートメーションなどの適用開発は遅れており、比較的スループット性は低い。このような様々なメリット・デメリットがあるため、目的に応じて宿主を選択する、または宿主のメリットを活かすような応用先産業を選択する必要がある。

本ストラテジーで主に扱う *Trichoderma reesei* は真核生物であり、Filamentous fungus (糸状菌) に属す。トリコデルマは、次世代原料やサステナブル社会に向けてバイオマス糖化酵素の生産用宿主に利用を想定して開発を進めている。本宿主の高い酵素(タンパク質)生産性を応用することで、糖化酵素のみならず幅広い産業へ展開できると考えており、第 4 章にて向かうべき方向性の分析を行った。

1-4 これまでに検討されたベースとなるイノベーション・ストラテジー

本論文に先立ち、2021 年に「バイオマス糖化酵素製造技術を基にした都市型バイオリファイナリーの実現」という題のもと、ベースとなるイノベーション・ストラテジー及び博士論文¹⁶ が構築された。本論文に関連する部分について、以下に概説する。

1-4-1 ベースとなる花王の糖化酵素の高機能化・オンサイト安価製造技術

バイオリファイナリーは、サトウキビなどから得られる糖蜜、トウモロコシなどのデンプン、すなわち可食バイオマスを原料とする第 1 世代のバイオリファイナリーと、木質系・草本系バイオマス(リグノセルロース系バイオマス)、すなわち非可食バイオマスを原料とする第 2 世代のバイオリファイナリーに大別される。

これまでに、本論文の執筆者が所属する花王株式会社(以下、花王)では自社開発及び NEDO プロジェクトなどを活用しながら糖化酵素自体の高機能化、及びその糖化酵素を安価に製造する技術開発を実施してきた。2013 年度から 2016 年度にかけて、NEDO プロジェクト「バイオ燃料生産のための効率的な要素技術の開発」に参加し、非食用バイオマスを原料としたバイオエタノール製造の各工程の技術開発を推進し、パイロット規模での実証を目指した。本プロジェクトにおける花王の役割は有用な糖化酵素の製造技術を開発することであり、糖化酵素性能の向上を実現し、糖化酵素製造技術の開発を行った。その後も技術開発のために、「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発(スマートセルプロジェクト)」、「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」、「データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム(Data-driven iBMS)の研究開発」に参画し、宿主開発を続けている(図 1-3)。

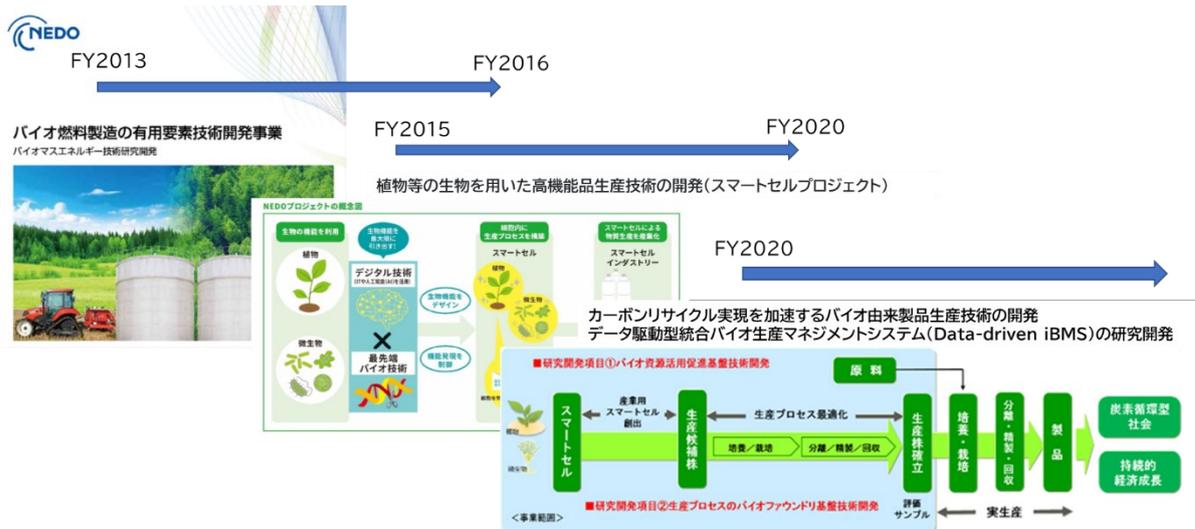


図 1-3 NEDO プロジェクトにおける糖化酵素技術の開発

糖化酵素の性能向上研究を行う中で、バイオマス中のセルロースに強固に結合したヘミセルロースの一種のキシランが糖を得る上での律速となっていることを見出し、その（特殊な）キシランを効率的に分解可能な新規酵素としてキシラーゼ PsPXyn10 を発見した¹⁷。さらに、セルロースを糖に変換する上で重要な糖化酵素として AaBGL を選定し、複数の変異を導入することで、高効率・高安定性化した変異 AaBGL の構築に成功した¹⁸。これらの酵素を配合した糖化酵素製剤を開発し、飛躍的にバイオマスからの糖収量を向上させることに成功した（図 1-4）。

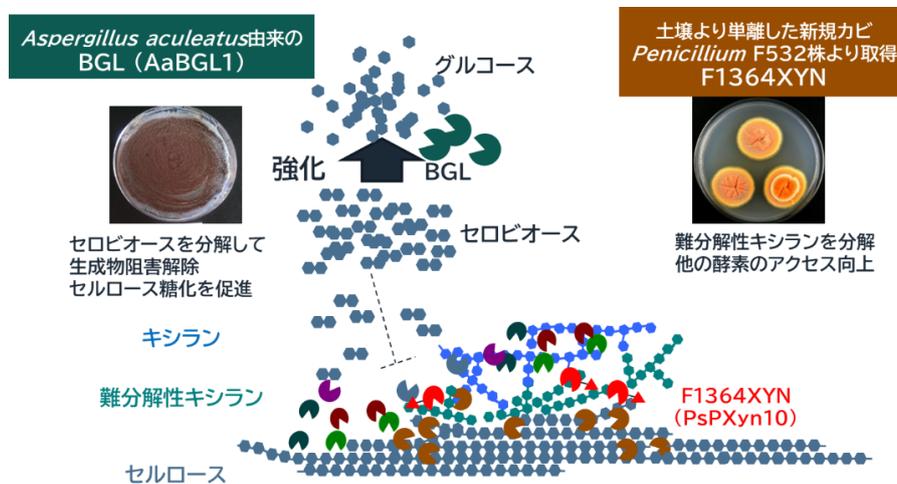


図 1-4 バイオマス糖化酵素の高機能化

また、酵素生産技術に関しても宿主開発、培養技術開発ともに精力的に進め実生産レベルまで引き上げてきた。トリコデルマは糖化酵素を生産する際に、酵素生産を誘導する物質としてセルロースやその分解物であるセロビオースを必要とする。これらは栄養源（炭素源）でありかつ誘導物質として必要で、これらを用いることで酵素生産が行われる。しかしセルロースは水に溶解しないため、高濃度のセルロースのみを用いての培養は難しく、またセロビオースは非常に高

価であり炭素源としての利用は現実的でない。このため、誘導物質としてセルロースを用いても、別途安価な炭素源糖を流加して培養することが望ましい。この安価糖の代表がデンプンからも得ることができる（可食）グルコースである。しかしグルコースのような資化しやすい糖を用いて糖化酵素を生産する際には、カタボライト抑制と呼ばれる機構により酵素生産が抑制されることが知られている。

そこで、カタボライト抑制を回避しながら酵素生産を行うために、培養技術面では流加制御のノウハウ構築などを実施してきた。また、菌株としてもカタボライト抑制が生じにくくなり、グルコースの利用性が向上する変異株の取得に成功した¹⁹（図 1-5）。

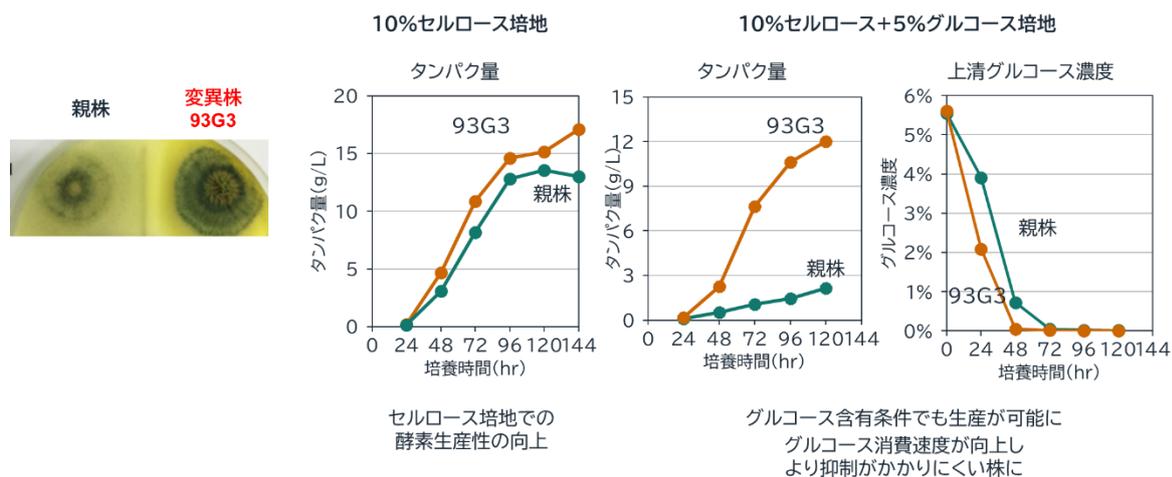


図 1-5 カタボライト抑制緩和変異株の取得

さらに、このような優良変異株に対し上記高機能酵素を発現させるように多重組換えを実施することで、1つの菌株で高機能酵素を生産できるようになった。これにより、1ポットで高機能酵素が製造可能となり、「オンサイト生産」の可能性が広がった。一般的な酵素の製造形態である「オフサイト生産」では、酵素生産工場生産した酵素を（場合によっては複数ブレンドし）製剤化、輸送するものであるが、「オンサイト生産」はバイオリファイナリー工場に酵素生産設備も構えるものであり、精製・濃縮・製剤化・輸送が不要であり、バイオリファイナリーのボトルネックとなっていた糖化酵素の高価格という課題を打破する可能性があるものである。

オフサイト製造



オンサイト製造



図 1-6 オフサイト生産とオンサイト生産

このような要素技術の開発と生産システム自体の革新を統合することで安価大量に高機能酵素生産を行うための技術を実生産レベルで開発してきており、他社の技術と比較しても安価にバイオマス糖化を実施することができると考えられた。

1-4-2 都市型セルロース系バイオマスからの非可食糖製造ビジネス

上記のような花王が保有するバイオマス糖化酵素のオンサイト製造技術をコア技術とし、日本におけるバイオ化学コンビナートモデルの立案とオンサイト酵素及び非可食糖製造ビジネスについて詳細に検討された。

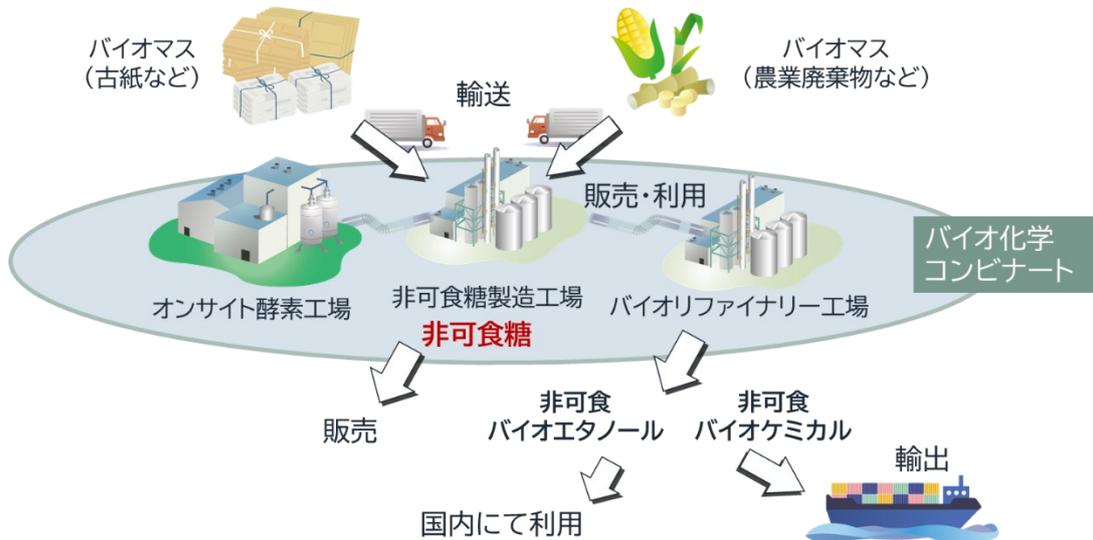


図 1-7 オンサイト生産の拡張による非可食糖を原料としたバイオ化学コンビナート

主なリグノセルロース系バイオマスとして、稲藁、麦藁、籾殻、バガス（サトウキビ搾汁後の残渣）、コーンストーバー（トウモロコシ茎葉）のような草本系バイオマスと、廃材、木材チップなど

の木質系バイオマスが挙げられる。一方で、日本に目を向けると、世界に比べると農業規模が小さく農業系廃棄物の集積量が比較的少ない。H29 年度における、稲わら、麦わら、籾がらの発生量は総計で 1,100 万 t/年とされる。これに対し、産業廃棄物や都市廃棄物に目を向けると、日本において廃棄される古紙は 1,600 万 t/年以上にのぼり、特に一般廃棄物の発生量としては世界でも有数の量である。従って、農業系残渣のみならず、古紙などの廃棄物もセルロース系バイオマスと捉えられた。

事業、技術、知財、財務の 4 つの試験から分析を行った結果、基質に合わせた更なる糖化酵素性能の向上と、技術パートナーシップの拡張、または技術導入を図ることにより、非可食糖製造事業は高い競争力を維持した事業として実施可能であると考えられた。また、DCF 法による事業価値の算出においても、2021 年換算で約 35 億円の価値であると算出された。この価値は、昨今の環境への意識の高まりから、さらに高まることも予想された。

1-5 新規事業構築の根幹となる技術的ブレイクスルー

図 1-5 にて、グルコースによる酵素生産抑制が生じにくい変異株の取得について記載したが、上記生産システムにはまだ課題が存在した。それは、誘導物質としてのセルロースの使用である。変異株の取得や培養技術開発により、グルコースを用いてもカタボライト抑制が生じにくくなったものの、酵素生産の「誘導物質」であるセルロースは必要であった。酵素生産に利用するセルロースは精製された微結晶セルロースが好ましく、グルコースと比較しても数倍程度高価である。また、不溶性である性質から、実生産プロセス運用上のハンドリングが悪く、粉塵の舞い上がり、配管の詰まり、培養液性状の悪化など、デメリットも多い。

そこで、セルロースやその他の誘導物質を使用せずに、グルコースなどの非誘導性・安価可溶性糖のみを利用して糖化酵素を生産する技術開発を実施し、2 つの転写因子 (X_{YR}1, ACE3) を改変しながら発現制御することで、誘導物質フリーで糖化酵素を高生産する菌株技術の構築に成功した²⁰。誘導物質フリーでの糖化酵素生産の研究については、第 2 章で詳細に述べる。

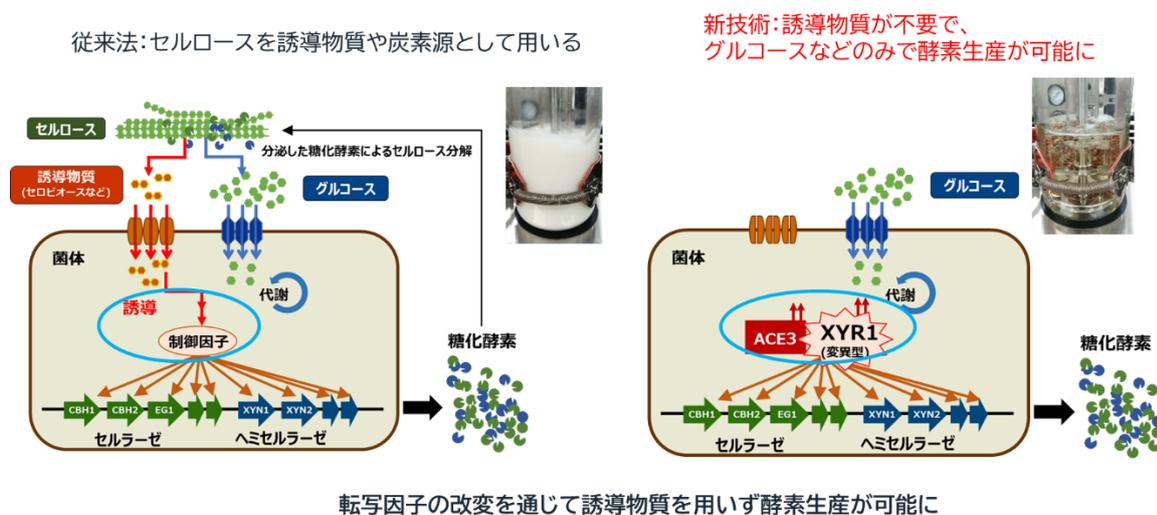


図 1-8 誘導物質フリーでの糖化酵素生産

これにより、高価なセルロースを用いず、不溶性固体を培地原料に用いないで済むため、より簡便で安価な培養生産が可能となる。また、酵素生産の原料炭素源の縛りが大幅に緩和され、グルコースのみならずトリコデルマが資化可能なあらゆる糖、油脂、グリセリンなどからも酵素生産が可能となった。従って、可食糖からの酵素生産のみならず、古紙由来の非可食バイオマス糖からの酵素生産も可能となったと言える。

さらに本技術開発が拓げた可能性は、トリコデルマを利用した異種タンパク質生産である。トリコデルマは、100 g/L を超えるその高いタンパク質生産能力から異種タンパク質生産に有望な宿主とされる。しかしながら、トリコデルマは異種タンパク質生産宿主として汎用的に利用されるまでに至っていない。その大きな原因として、トリコデルマを利用したタンパク質生産は一般的に上記のような特殊な誘導発現系を使用することが挙げられる。誘導物質フリーでの生産系においては、セルロースの分解に酵素生産を依存しないため、セルロースを用いた誘導系では達成できていなかった誘導物質を遊離させるためのネイティブセルラーゼ（CBH1、CBH2、その他）を多重で削除しながら目的タンパク質の生産を行うことが可能となり、目的タンパク質を高純度で高生産することも可能であると想定される。誘導物質フリーでの異種タンパク質生産の研究については、第3章で詳細に述べる。

本システムを用いることで、セルラーゼ・ヘミセルラーゼを目的タンパク質に入れ替え、100 g/L を超える生産能力を異種タンパク質生産に拡張することが可能であると想定された。さらに、原料炭素源も高価な誘導性糖を利用せずに、安価、汎用的なグルコースを利用可能となることで、トリコデルマを利用した異種タンパク質生産の欠点を払拭し、極めて高いタンパク質生産性を活かした安価高生産プラットフォームとなることが期待されるものである。

1-6 本研究の目的

本研究において、非可食バイオリファイナリーの推進に向け、糖化酵素の安価製造技術を開発しコストに関する課題解決を試みることで、加えてその糖化酵素の生産システムを拡張することで、糖化酵素のみならず様々なタンパク質を安価に製造する技術を構築することを目指した。

さらに、それらの技術を活用しながら、「極めて高いタンパク質生産性を示すトリコデルマの生産系を今後どのように事業展開すべきか」という問いに対し、戦略構築を行うことを目的とした。既に検討された糖化酵素ビジネスや非可食糖製造ビジネスとは切り離して、誘導物質フリーでのその特異なタンパク質生産能を活かすのか、糖化酵素の生産自体もシステムに組み込みながら活かすべきなのか、有する技術ポートフォリオ、社会的な潮流、競合となるプレイヤーの存在など、総合的に判断しながらその方向性を見定め、イノベーション・ストラテジーを構築することを目指した。

1-7 参考文献

1. The Bioeconomy to 2030: designing a policy agenda, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日), <https://www.oecd.org/futures/long-term-technological-societal-challenges/the-bioeconomy-to-2030-designing-a-policy-agenda.html>
2. Bioökonomierat - German Bioeconomy Council, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日), <https://knowledge4policy.ec.europa.eu/organisation/bio%C3%B6konomierat-german-bioeconomy-council-en>
3. NATIONAL BIOECONOMY BLUEPRINT, <https://obamawhitehouse.archives.gov/sites/default/files/microsites/ostp/national-bioeconomy-blueprint-april-2012.pdf>
4. Innovating for sustainable growth, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日), <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/1f0d8515-8dc0-4435-ba53-9570e47dbd51>
5. Growing the Bioeconomy, https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1037343/181205_BEIS_Growing_the_Bioeconomy_Web_SP_.pdf
6. National Bioeconomy Strategy Summary, Bundesministerium für Bildung und Forschung/Federal Ministry of Education and Research (2020)
7. 内閣府, バイオ戦略 2019, <https://www.kantei.go.jp/jp/singi/tougou-innovation/pdf/biosenryaku2019.pdf>
8. 内閣府, バイオ戦略 2020, https://www8.cao.go.jp/cstp/bio/bio2020_honbun.pdf
9. 経済産業省, 2050年カーボンニュートラルに伴うグリーン成長戦略, <https://www.meti.go.jp/press/2020/12/20201225012/20201225012-2.pdf>
10. 経済産業省, スマートセルインダストリーの可能性, <https://www.meti.go.jp/shingikai/sankoshin/shomuryutsu/bio/pdf/0030800.pdf>
11. Pharmaceutical Technology, Ginkgo to acquire Zymergen for \$300m, ウェブサイト (閲覧日:2022年9月1日), <https://www.pharmaceutical-technology.com/news/ginkgo-acquire-zymergen/>
12. DITN, 遺伝子工学によるヒトインスリン製剤, <http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/mnaika4/pdf/ditn2012-04.pdf>
13. 農林水産省, 飼料添加物の効果安全性について, <https://www.maff.go.jp/j/council/sizai/siryuu/46/attach/pdf/index-26.pdf>
14. ヒゲタ醤油 応用微生物事業, ウェブサイト (閲覧日:2020年5月1日), <http://www.higeta.com/316094916>
15. Puetz J, Wurm FM. Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. *Processes*. **7(8)**:476 (2019).
16. 柴田 望, バイオマス糖化酵素製造技術を基にした都市型バイオリファイナリーの実現, 博士論文 甲第

8384 号.

17. Shibata, N., Suetsugu, M., Kakeshita, H. *et al.* A novel GH10 xylanase from *Penicillium* sp. accelerates saccharification of alkaline-pretreated bagasse by an enzyme from recombinant *Trichoderma reesei* expressing *Aspergillus* β -glucosidase. *Biotechnol Biofuels* **10**, 278 (2017).
18. 若宮 汐里 *et al.*, *Aspergillus aculeatus* 由来 β -glucosidase 1 の植物バイオマス糖化残渣への吸着が緩和された変異酵素の獲得. 日本農芸化学会 2019 年度大会
19. 柴田 望ら, *Trichoderma reesei* を用いたバイオマス糖化酵素の開発, 日本応用糖質科学会誌, 9(4), p. 249-253 (2019).
20. 日経バイオテク, 花王、カビの転写因子制御で誘導物質不要の酵素生産を実現, ウェブサイト (閲覧日: 2021 年 10 月1日), <https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/news/p1/21/04/14/08062/>

2. 誘導物質フリー糖化酵素の生産系の開発

第2章では、技術的ブレイクスルーの1つである誘導物質フリーでの糖化酵素生産研究について述べる。第2章は次の学術論文からなる。

Arai, T., Ichinose, S., Shibata, N. *et al.* Inducer-free cellulase production system based on the constitutive expression of mutated XYR1 and ACE3 in the industrial fungus *Trichoderma reesei*. *Sci Rep* **12**, 19445 (2022).

本研究において、セルロース、ラクトース、ソホロースなどの糖化酵素の誘導物質を使用せずに、単純なグルコースのみを炭素源として使用して酵素生産を可能にする工業用 *Trichoderma reesei* の菌株改変戦略を構築した。最も汎用的な炭素源であるグルコースを炭素源とした場合、*T. reesei* においては一般的に糖化酵素をほとんど生産しない。これは、大きく分けて二つの理由があると考えられる。一つ目は Carbon catabolite repression (CCR) とよばれる資化しやすい炭素源（例えばグルコース）が存在する環境下では資化しにくい炭素源（今回の場合セルロース）を分解するための酵素群の発現が抑制される機構の存在である。数%以上のグルコースが存在する場合、一般的に糖化酵素は生産されない。そして二つ目は、誘導物質が存在しないことである。*T. reesei* は CCR 緩和条件下（例えば低濃度グルコース）で、セルロースの分解物であるセロビオースなどが存在すると、強力な糖化酵素生産の誘導が起こる。グルコースのみを炭素源とした場合にはこのような誘導物質が存在しないため、グルコース枯渇後においても糖化酵素はほとんど生産されない。

これらの課題に対し、一つ目の CCR については、これまで変異育種で獲得されてきた（部分的）CCR 脱抑制の株を使用しつつ、さらに複数のリプレッサー（ACE1, RCE1）を破壊しているが、CCR の完全解除には至っていない可能性がある（詳細は P.21, P.37 に記載）。本研究は主に二つ目の課題に対する研究であり、遺伝子改変により誘導物質が存在しない環境においても誘導時の状態を模倣することを試みた。

これまで、糖化酵素生産制御のマスターレギュレーターである XYR1 について、変異型 XYR1^{V821F} や XYR1^{A824V} はグルコースのみを炭素源としてヘミセルラーゼやセルラーゼを一部生産することが知られていた。これは、誘導物質が存在しないにも関わらず、酵素生産状態を一部模倣する菌体状態を誘発できる可能性を示した。しかしながら酵素組成がヘミセルラーゼに偏っており、リグノセルロースを効率よく分解するために重要なセルラーゼの誘導発現が不十分であった。そこで本研究では、変異型 XYR1^{V821F} と組み合わせて発現させ、ヘミセルラーゼのみならずセルラーゼ生産についても誘導状態を模倣するための必要因子を探索した。

結果として、変異型 XYR1^{V821F} 発現株に対する ACE3 とよばれる転写因子の共発現がセルラーゼ発現を促進することが示され、さらに従来の変異型 XYR1^{V821F} の単独発現と比較し 1.5 倍の総タンパク質生産性を示した。また、ACE3 の DNA 結合ドメインは誘導物質フリーでのセルラーゼ生産に必須であると考えられていたが、部分的に切断された DNA 結合ドメインを持つ ACE3 は、変異型 XYR1^{V821F} と共発現させると、セルラーゼ生産においてより効果的であることがわかった。本研究により、2 つの転写因子、変異 XYR1^{V821F} と ACE3 の共発現に

より、誘導物質を使用せずともセルラーゼ及びヘミセルラーゼの両者を誘導状態に近い状態で発現させることが可能となることが示された。

以下、本研究の詳細を記載する。

2-1 背景

化石燃料を環境に優しく再生可能なエネルギー源に置き換えることは、持続可能な社会を築く上で不可欠である。リグノセルロースバイオマスは、バイオリフィナリーやバイオ燃料生産において最も豊富な持続可能な原料である。したがって、リグノセルロースバイオマスを効果的に利用することは、問題の解決に有効であると期待されている^{1,2}。

リグノセルロースバイオマスを原料として利用するためには、セルラーゼとヘミセルラーゼを用いて、リグノセルロースバイオマスを単糖に加水分解する必要がある。リグノセルロースバイオマス分解のための細胞外セルラーゼとヘミセルラーゼは、主に菌糸状菌によって産生される³。特に、菌糸状菌 *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) は、リグノセルロースバイオマスの分解に必要な混合細胞外セルラーゼとヘミセルラーゼを大量に産生することで知られている微生物である^{4,5}。産業用株の *T. reesei* を用いることで、細胞外タンパク質を 80 g/L 以上得ることができるという報告があることから、商業的なセルラーゼ生産の主力として期待されている^{4,6,7,8}。しかし、リグノセルロースバイオマスの酵素加水分解には大量のリグノセルロース分解酵素が必要であり、酵素の高コストはリグノセルロースバイオ燃料の生産において主要なボトルネックとして認識されている^{9,10,11,12}。

また、酵素生産能力を向上させ、グルコースなどの安価な炭素源を利用することが解決策の1つである。そのため、セルラーゼ発現の調節機構をよく理解する必要がある、精力的に研究が行われている。しかし、セルラーゼ発現は、複数の転写因子によって複雑に調節されており、これらの因子が直接的または間接的にセルラーゼ遺伝子発現に影響を与える可能性がある¹³。そのため、さまざまな要因の具体的な役割と完全な調節ネットワークはまだ完全には理解されていない。

過去の研究では、さまざまなセルラーゼ調節因子の役割が示されてきた。XYR1、HAP2/3/5、ACE2、VEL1、ACE3、ARE1、CRZ1、STR1、および VIB1 は正の調節因子であり、CRE1、ACE1、RCE1、CTF1、LAE1、および PAC1 は負の調節因子として特定されている^{14,15}。セルラーゼ遺伝子の発現には、炭素代謝抑制（Carbon catabolite repression: CCR）からの解放が必要である¹⁶。そのため、遺伝子操作によるセルラーゼ調節因子の改変が効果的であると考えられている。

転写抑制因子である CRE1 は、CCR の主要な調節因子であり、グルコース存在下で糸状菌のセルラーゼ発現を間接的に抑制することが知られている¹⁶。*Trichoderma* においては、CRE1 の部分破壊¹⁷、削除¹⁸、または変異¹⁹により CCR が緩和されることが知られており、グルコース、ラクトース、ソフオロース、セルロースなどのさまざまな炭素源存在下でのセルラーゼ遺伝子発現が顕著に向上する可能性が示されてきた^{20,21,22,23}。特に、*cre1* の削除または切断は、CRE1 変異株をグルコース含有培地で培養した場合に、セルラーゼおよびヘミセルラーゼの

部分的な CCR 抑制解除を達成することができる^{16,17,18,24}。しかし、誘導糖を含まないグルコースのみの培地中では、CRE1 変異株は CCR を完全に解除することができていない。そのため、セルラーゼまたはヘミセルラーゼの発現を抑制する、または発現が誘導されないため、グルコースのみを炭素源とする培地ではセルラーゼの効率的な発現量は達成されない。また、抑制因子 *ace1*²⁵、*rce1*²⁶、および *cre1* を削除することで、セルラーゼ遺伝子発現レベルを向上させることができると示されているが、セルラーゼ発現には誘導物質を必要としている。

一方でセルラーゼおよびヘミセルロース遺伝子の発現に必要な正の調節因子である XYR1 は、改変により誘導物質フリーでセルラーゼ・ヘミセルラーゼを発現させることができる可能性が示された。XYR1 は、セルラーゼ/ヘミセルロース遺伝子上流領域に直接結合する Zn(II)₂Cys₆ タイプの DNA 結合ドメインを有する^{27,28}。*xyr1* の破壊はセルラーゼの生産能を欠失する²⁹ ため、セルラーゼ誘導の必須因子であると考えられている。野生型 XYR1 を恒常発現させた場合、誘導条件下においてはセルラーゼ遺伝子発現を増加させるが、唯一の炭素源としてグルコースを使用した培地中ではセルラーゼ生産はほとんど生産されない¹²。XYR1 の工学的改変もセルラーゼ発現を増加させるために実施されており、XYR1 を他の転写因子と融合した人工転写因子が開発され、グルコースを唯一の炭素源としてセルラーゼを恒常的に産生しようと試みられたが、タンパク質の生産性は誘導時の生産性には至らず、低生産性であった^{30,31}。しかしながら、変異型 XYR1^{V821F} または XYR1^{A824V} 発現株では、グルコースを唯一の炭素源として、キシラナーゼおよびセルラーゼが発現し、タンパク質の生産性が向上することが発見された^{8,32,33}。このような現象を、XYR1^{A824V} 変異を見出した著者らは glucose blind phenotype と称している³²。ただし、変異型 XYR1^{V821F} または XYR1^{A824V} によって誘導され生産された酵素は、キシラナーゼの比率が高く、セルラーゼが低組成であるため、リグノセルロースの効率的な分解には十分ではなかった^{32,33}。したがって、グルコースを唯一の炭素源とする培地中でも、誘導された状態と同等のセルラーゼ/ヘミセルロースを産生するには、XYR1 と協調してセルラーゼ発現を活性化する因子を追加する必要があると考え、変異型 XYR1^{V821F} と共に発現する協調因子を探索する必要があると考え、本研究で検討を行った。

協調因子として、転写活性化因子 ACE2³⁴、ACE3³⁵、および VIB1³⁶ を候補とした。さらに、*xyr1* 遺伝子発現の調節に関与するセルロース応答型トランスポーターである CRT1^{37,38} と β -グルコシダーゼ活性化因子である BGLR³⁹ も候補とした。

ACE2 は、セルロース誘導時の *T. reesei* における *cbh1*、*cbh2*、*egl1*、*egl2*、および *xyn2* の転写活性化を増強する転写因子である³⁴。しかし、ACE2 はソフォロース誘導には関与していない。ACE2 は XYR1 と共有するプロモーター配列に結合し、ACE2 が目的プロモーターに結合するためには、リン酸化と二量体化が必要であると言われている⁴⁰。

ACE3 はラクトース誘導によるセルラーゼ生産に関与することが知られている³⁵。ACE3 は XYR1 と相互作用し、セルラーゼ生産を開始する⁴¹。*ace3* の多数の遺伝子コピー導入によりセルラーゼ遺伝子発現が増強され、キシラナーゼ遺伝子発現が調節される³⁵。さらに、C 末端の切断型 ACE3 は、グルコースを用いた誘導物質フリー条件下で高いレベルのセルラーゼおよびヘミセルラーゼ発現を誘導し、ラクトースまたはグルコース-ソフォロース混合物を用いた誘導条件下でさらに発現を改善することができる^{42,43}。これにより、誘導物質の有無に関わらず、セルラ

ーゼの誘導が改善されることが示されている。また、野生型 XYR1 または変異型 XYR1^{A824V} と C 末端切断型 ACE3 を過剰発現する株では、炭素源としてラクトースを用いた場合にタンパク質生産性が改善された。ただし、炭素源としてグルコースのみを用いた場合、C 末端切断 ACE3 にさらに変異型 XYR1^{A824V} を過剰発現しても C 末端切断型 ACE3 以上の改善は見られなかった⁴²。

*T. reesei*において、VIB1 はセルラーゼの産生にも不可欠であり、セルラーゼ誘導の重要な調節因子として機能すると言われている^{36,44}。炭素源としてセルロースを用いた $\Delta vib1$ および $\Delta xyr1$ の転写パターンを比較すると、VIB1 と XYR1 のターゲットが部分的に重なることが高頻度で観察された⁴⁵。これは、VIB1 が XYR1 を介してセルラーゼ遺伝子発現を部分的に調節していることを示唆していると言われている⁴⁵。

*T. reesei*において CRT1 はセルラーゼ誘導に関与する最も重要な輸送体の 1 つと考えられている^{37,38}。その欠失は、セルロースおよびラクトース誘導下でのセルラーゼ遺伝子発現を完全に欠失する³⁸。また、近年、CRT1 がラクトース、セロビオース、グルコース、およびソフォロースを輸送することが確認された⁴⁶。また、グルコース含有条件下で XYR1 を過剰発現させると、*crt1* の転写は低いレベルで維持されることが分かった⁴⁷。

BGLRは、Zn(II)₂-Cys₆型 DNA 結合ドメインを持つ β -グルコシダーゼ活性化因子であり、特定の β -グルコシダーゼ遺伝子を上方調節する機能があると言われている³⁹。また、*bglr* 遺伝子が欠失した変異株は、セロビオース増殖時においてセルラーゼ産生が増加することが観察された³⁹。

以上、セルラーゼ生産に関連すると報告されているこれら 5 つの因子が、変異 XYR1^{V821F} をベースとしたグルコースを炭素源とした誘導剤フリー条件下でのセルラーゼおよびヘミセルラーゼ産生の調節に影響を与えるかどうか検討した。

なお、本研究では、グルコースにおいて CCR が緩和され、高い酵素生産性を示す変異株である *T. reesei* PC-3-7 の派生株である E1AB1 株を使用した。*T. reesei* は、誘導条件下で CBH, EG 等の複数のセルラーゼ群を分泌する。*T. reesei* の CBH および EG 活性は他の微生物よりも高いことが知られているが、その BGL 活性は他の生物由来のセルラーゼ混合物よりも低いことが報告されており、これによりセロビオースの蓄積、CBH の生成物阻害が起こり、バイオマスの分解活性が低下する。この問題を解決するために、PC-3-7 株のゲノム DNA に *Aspergillus aculeatus* 由来の β グルコシダーゼ遺伝子 (*Aabgl*) を組み込んだ株が E1AB1 株である。E1AB1 株は、CCR が緩和された酵素高生産変異株でありつつ、BGL を過剰発現することで、酵素コストを低減することが可能となった、より実用的な酵素生産株である。

本研究の目的は、セルラーゼ産生に誘導物質を必要としない株、生産系を開発することである。非誘導条件下で高レベルのキシラナーゼ産生を誘導することができる変異型 XYR1^{V821F} の技術をベースとし、さらに候補となる 5 つのセルラーゼ生産関連因子を共発現させることにより、誘導物質フリー条件下においても誘導時と同等にセルラーゼを発現させることを試みた。本研究を通し、変異型 XYR1^{V821F} の課題であったセルラーゼ発現の不足が ACE3 の恒常的な発現により解消されることが見出され、高価なセルラーゼの誘導物質を使用せずに安価・一般的な炭素源であるグルコースを利用した安価な糖化酵素の生産が実現できると考えられる。

2-2 結果

2-2-1 リプレッサーの破壊と変異型 XYR1^{V821F} の恒常的発現による影響

変異型 XYR1^{V821F} とその協調因子候補の発現を組み合わせるためには、変異型 XYR1^{V821F} と各因子を発現させるための 2 つのゲノム挿入部位が必要である。そこで、転写抑制因子をコードする *ace1* 遺伝子領域と *rce1* 遺伝子領域を挿入部位として使用することとした。

まず、*ace1* および *rce1* リプレッサー遺伝子の破壊を行い、その効果を確認した。その結果、E1AB1 株、 $\Delta ace1$ 株、 $\Delta rce1$ 株のタンパク質生産性は、親株である E1AB1 株のセルロースを炭素源とする誘導条件と比較して、グルコースを炭素源とする非誘導条件では 10%以下にまで低下した (図 2-1a)。さらに、*ace1* または *rce1* を破壊しても、図 2-1b に示すように、分泌タンパク質の組成に変化はなかったが、Open arrowhead で示した高強度のバンドが確認され (図 2-1-b、レーン 2-4)、ナノ LC-MS/MS 分析により Glycoside hydrolase family 55 (GH55) タンパク質 (Trire2_121746) であることが確認された。このタンパク質は、*Phanerochaete chrysosporium* の β -1,3-glucanase Lam55A と類似していることがわかった (表 2-1)。結果として、グルコースを唯一の炭素源とした場合、E1AB1 株、 $\Delta ace1$ 株、 $\Delta rce1$ 株の 3 株では、セルラーゼの生産はほとんど見られなかった。

続いて炭素源利用に影響されない恒常発現プロモーターとして、*act1* プロモーターを選択し、*ace1* 遺伝子座に恒常発現 *act1* プロモーター下に *xyr1^{V821F}* を有するカセットを導入し、その菌株を E1AB1-X と命名した。*act1* プロモーターは、E1AB1 株⁵⁴ のセルロースおよびグルコース含有培養条件下で得られた RNAseq 結果において、ピルビン酸デカルボキシラーゼ 1 (Trire2_121534) と同様の発現量を示した恒常発現プロモーターである。E1AB1-X 株は、非誘導条件下で 2.08 g/L の細胞外タンパク質を産生した。これは親株と比較して、細胞外タンパク質の生産量が 4 倍増加したことになる (図 2-1a)。また、SDS-PAGE 解析ではバンドパターンの変化が観察された (図 2-1b)。推定分子量と既報⁵³ から、このタンパク質バンドは、主要キシラナーゼ (XYN1、XYN2) と β -キシロシダーゼ (BXL1) に相当すると考えられた。しかし、その組成は、親株 E1AB1 が誘導条件下で生産したタンパク質 (図 2-1b、レーン 1) とは異なっており、セルラーゼ (CBH1、CBH2、EG1) に相当するバンド強度も低かった。

このように、変異型 XYR1^{V821F} の構成的発現により、誘導物質フリー条件下でもキシラナーゼを生産することができたが、セルラーゼは十分に生産することができず、これは既報と一致した。E1AB1-X 株でさらに *rce1* 遺伝子を破壊すると、タンパク質の生産性は向上したが (図 2-1-a)、酵素組成に大きな変化はなかった (図 2-1b、レーン 6)。そこで、*rce1* 遺伝子座を利用して、セルラーゼ生産の協調因子候補を共発現させることで、セルラーゼ生産性が向上可能か検証した。

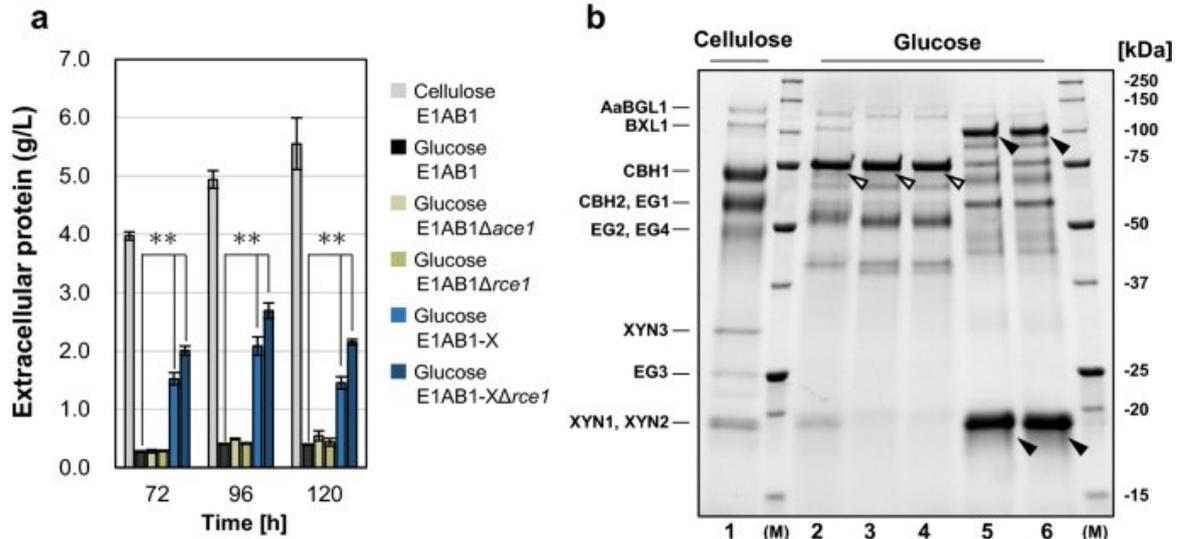


図 2-1 Xyr1^{V821F} の構成的発現とリプレッサーの破壊がグルコース培養に及ぼす影響

(a) 72 時間、96 時間、120 時間後のサンプルの培養による細胞外タンパク質濃度。 *Trichoderma reesei* 株 E1AB1 は 3%セルロースを含む誘導培地でフラスコ培養し、組換え株 E1AB1Δ*ace1*、E1AB1Δ*rce1*、E1AB1-X (Δ*ace1-Pact1-xyr1*^{V821F}) および E1AB1-XΔ*rce1* は 3%グルコースを含む非誘導培地で培養をした。(b) 72 時間後の分泌タンパク質の SDS-PAGE 解析。3%セルロース(レーン 1)および 3%グルコース (レーン 2)培養の *T. reesei* 株 E1AB1 と、3%グルコース培養の組換え株 E1AB1Δ*ace1* (レーン 3)、E1AB1Δ*rce1* (レーン 4)、E1AB1-X (レーン 5) および E1AB1-XΔ*rce1* (レーン 6)。Open arrowhead は、グルコース培養で強く発現が確認されたものを示す(レーン 2-4)。Closed arrowhead は、Xyr1^{V821F} の導入により明らかに過剰発現したタンパク質を示し、主要なキシラナーゼ(BXL1、XYN1、XYN2、レーン 5 および 6)に対応すると考えられた。エラーバーは標準偏差を示す。統計的有意性は、Student's *t*-test によって決定された。***p* < 0.01。

表 2-1

nanoLC/MS-MS による図 2-1b の open arrowhead で示したタンパク質同定

Protein	MW	Score	Peptide	Coverage	Accession	Note		
1 Glycoside hydrolase family 55	83,086	669	33	30	G0RJ25	XP_006965432.1		
2 Glycoside hydrolase family 55	79,800	275	11	22	G0R927	XP_006961802.1	TRIREDRAFT_121746_EGR48699	(GH55)
3 Glycoside hydrolase family 55	79,376	76	6	8	G0RX78	XP_006969845.1		
4 Alpha-galactosidase 3	AGL1	68,455	40	3	Q92451	sp Q92451.1 AGAL3_HYPJE	TRIREDRAFT_72704_EGR44740	AGL1

2-2-2 セルラーゼ転写関連因子と変異型 XYR1^{V821F} の共発現による誘導物質フリー条件下におけるセルラーゼ発現の促進

E1AB1-X ゲノムの *rce1* 遺伝子座に、*crt1*、*bglr*、*vib1*、*ace2* および *ace3* のセルラーゼ転写活性化関連因子、セルラーゼ発現必須因子の相同組換えを行い、*act1* プロモーター下で恒常的に発現させた。E1AB1-X 株で CRT1、BGLR、VIB1、または ACE2 を構成的に共発現させた場合、分泌タンパク質濃度 (図 2-2a) および CBH1、CBH2 などのセルラーゼに相当する分子量のバンド (図 2-2b、レーン 2-5) に大きな変化はなかった。一方、恒常的 ACE3 発現株である E1AB1-XA3 は、E1AB1-X と比較して 1.5 倍のタンパク質生産量の増加が見られた (図 2-2a)。酵素組成分析では、キシラナーゼ (XYN1、XYN2、BXL1) に相当するバンドが減少し、E1AB1-XA3 では closed arrowhead で示すように強度が増加したいくつかのバンドが見られた (図 2-2b、レーン 6)。これらのバンドは、ナノ LC-MS/MS 分析により、主にセルラーゼ (CBH1、CBH2、EG1)、キシラナーゼ (BXL1、XYN4)、少量のセルロース分解に関わるタンパク質 (SWO1、CIP2、EG4) であることが同定された (表 2-2)。

ACE3 恒常共発現株の培養上清の酵素活性を測定するため、CBH1 活性は pNPLase を、BGL 活性は pNPGase を測定した。その結果、E1AB1-XA3 株は E1AB1-X 株と比較して、pNPLase が 4.9 倍、pNPGase が 5.5 倍と高いことが確認された。E1AB1 株では、*A. aculeatus* 由来の β -グルコシダーゼ (*Aabgl1*) を *egl1* プロモーター下で発現させているため、pNPGase 活性の増加は E1AB1-XA3 株における *egl1* プロモーターの転写が促進されたことを示唆する。このようにセルラーゼ活性を示す pNPGase と pNPLase の活性値は約 5 倍に増加したが、一方でキシラナーゼ活性を示す pNPXase と pNPX2ase の活性値は、最大で 1.8 倍と 0.8 倍と、キシラナーゼ活性に大幅な向上は見られなかった。従って、ACE3 がセルラーゼ特異的な発現向上に寄与していると考えられた。

また、ACE3 恒常発現株の上清では、非誘導条件下で観察された GH55 のバンド (図 2-1b、レーン 2-4、open arrowhead) が消失した。 β -1,3-グルカンを加水分解する Lam55A は、外部栄養源の代謝を制御する可能性が示唆されている⁵⁵。したがって、E1AB1-XA3 株では、誘導物質非存在下でもセルラーゼが誘導され、セルラーゼ生産の活性誘導状態に類似していることが推察された。以上のことから、変異型 XYR1^{V821F} と ACE3 の恒常発現を組み合わせた E1AB1-XA3 株は、誘導物質フリー条件下でもセルラーゼとキシラナーゼの同時高生産が可能であることが明らかとなった。

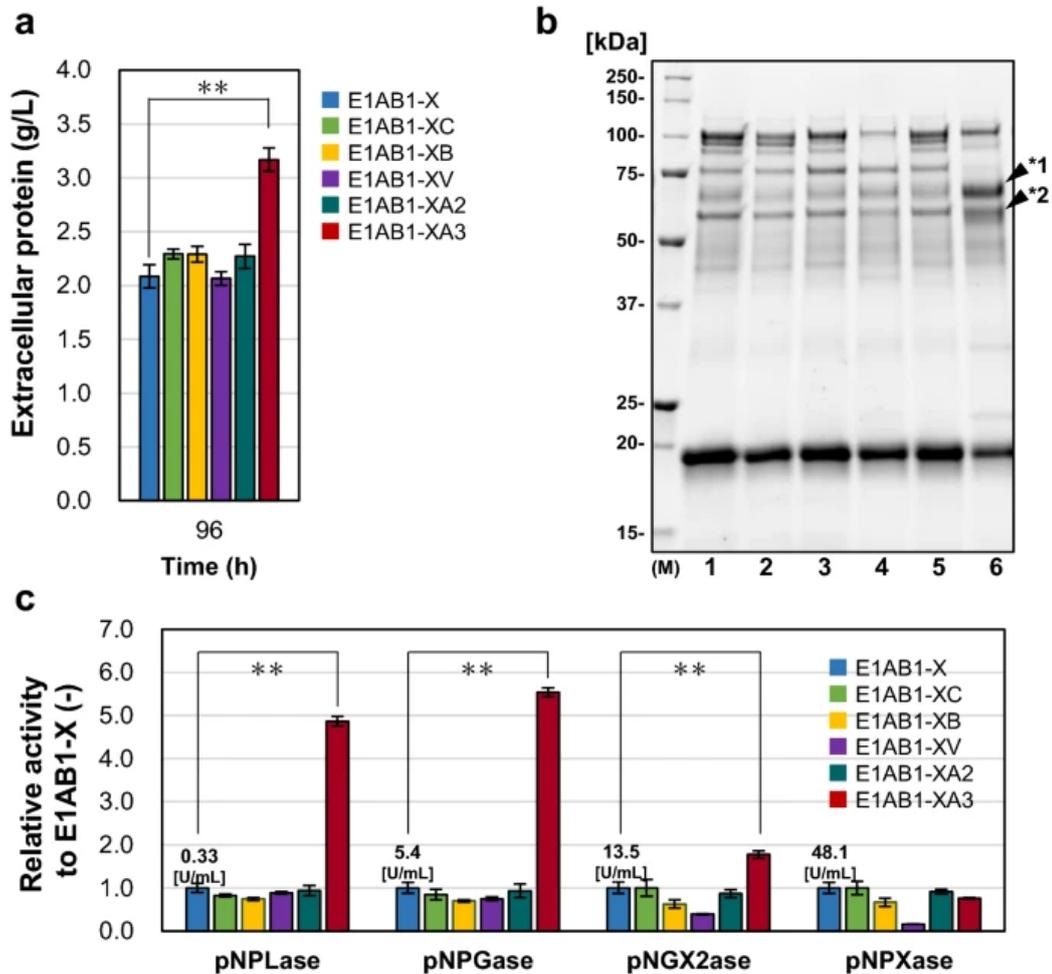


図 2-2 E1AB1-X 株におけるセルラーゼの転写に関わる因子の共発現

Trichoderma reesei E1AB1-X 株にセルラーゼの発現に関わる各種因子を共発現させ、3%グルコースを含む非誘導培地でフラスコ培養を実施した。(a)96 時間後の培養サンプルからの細胞外タンパク質濃度。(b)グルコース培養で 72 時間後に分泌されたタンパク質の SDS-PAGE 解析。*T. reesei* E1AB1-X(レーン 1、 $\Delta ace1-Pact1-xyr^{N821F}$ 、コントロール)、E1AB1-XC(レーン 2、 $\Delta ace1-Pact1-xyr^{N821F}$ と $\Delta rce1-Pact1-crt1$)、E1AB1-XB(レーン3、 $\Delta ace1-Pact1-xyr^{N821F}$ と $\Delta rce1-Pact1-bglr$)、E1AB1-XV(レーン 4、 $\Delta ace1-Pact1-xyr^{N821F}$ および $\Delta rce1-Pact1-vib1$)、E1AB1-XA2(レーン 5、 $\Delta ace1-Pact1-xyr^{N821F}$ および $\Delta rce1-Pact1-ace2$)および E1AB1-XA3(レーン 6、E1AB1-XA3、 $\Delta ace1-Pact1-xyr^{N821F}$ および $\Delta rce1-Pact1-ace3$ (PT))。(c)72 時間培養上清の酵素活性(体積合わせ)。1 単位の活性は、50°Cで基質から培養上清 1 mLあたり 1 分間に 1 μ mol の p-ニトロフェノールを生成した酵素量と定義する。棒グラフは、E1AB1-X のものに対する相対値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。統計的有意性は、Student's *t*-test によって決定した。** $p < 0.01$ 。

表 2-2 nanoLC/MS-MS を用いた図 2-2b の closed arrowhead で示したタンパク質の同定

1	Protein	MW	Score	Peptide	Coverage	Accession	Note			
1	Exoglucanase 1	CBH1	54073	442	20	25	P62694	<i>pdb1/CEL1A</i>	TRREEDRAFT_123989_EGR44817	CBH1
2	Non-Catalytic module family expansin	SWO1	51524	255	11	33	GORVK3	<i>XP_006060225.1</i>	TRREEDRAFT_123992_EGR44818	SWO1
3	Xylan 1,4-beta-xylosidase	BXL1	87191	140	8	13	GORG23	<i>XP_006064075.1</i>	TRREEDRAFT_121127_EGR49702	BXL1
4	Alpha-glucuronidase	GLR1	93424	31	2	2	Q99024	<i>sp Q99024.1 AGU4_HYPJE</i>	TRREEDRAFT_72526_EGR44925	GLR1
*2	Protein	MW	Score	Peptide	Coverage	Accession	Note			
1	Exoglucanase 2	CBH2	49653	409	19	17	A0A024SH76	<i>sp A0A024SH76.1 GUX2_HYPJR</i>	TRREEDRAFT_72567_EGR51017	CBH2
2	Exoglucanase 1	CBH1	54111	240	13	17	A0A024RXP8	<i>sp A0A024RXP8.1 GLX1_HYPJR</i>	TRREEDRAFT_123989_EGR44817	CBH1
3	Endoglucanase EG-1	EG1	48208	139	4	14	A0A024SNB7	<i>sp A0A024SNB7.1 GLNI_HYPJR</i>	TRREEDRAFT_122081_EGR48251	EG1
4	Glycoside hydrolase family 5	XYN4	52845	439	15	29	GORVK4	<i>XP_006060226.1</i>	TRREEDRAFT_111849_EGR44819	XYN4
5	4-O-methyl-galacturonoyl methyltransferase	CIP2	48296	56	1	2	GORV93	<i>sp GORV93.1 GCE_HYPJQ</i>	TRREEDRAFT_123940_EGR44948	CIP2
6	Endoglucanase-4	EG4	35511	46	2	5	O14405	<i>sp O14405.1 GLN4_HYPJE</i>	TRREEDRAFT_73643_EGR52697	EG4
7	Cell wall protein		41197	37	1	2	GORTC0	<i>XP_006060530.1</i>	TRREEDRAFT_68067_EGR45612	

2-2-3 誘導物質フリー生産に必要な因子の最適な組み合わせの検証

E1AB1-XA3 株は誘導物質非存在下でも高いセルラーゼ生産性を示し、セルラーゼ活性の上昇には ACE3 と変異 XYR1^{V821F} の組み合わせが有効であることが示された (図 2-2)。また、V821F 変異に加え、A824V 変異は、誘導物質フリーでキシラナーゼとセルラーゼの発現を可能にする XYR1 変異の一つであることが以前に報告されている³²。そこで、有用な XYR1 変異体を確認するため、このような glucose blind phenotype を示す V821F 変異体と A824V 変異体を野生型とともに評価した。

また、*ace3* には複数の転写開始点が存在する可能性が示唆された報告がある^{41,43}。図 2-2 に用いた E1AB1-XA3 の *ace3* は、JGI ゲノムデータベースを参照してクローニングし、イントロンの抜け方にも依存するが、651 または 629 アミノ酸と言われている。

(<http://genome.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>)

一方で、近年正しいイントロンと 2 つの推定転写開始部位が提案された^{41,43}。推定される完全なアミノ酸配列は 734 アミノ酸であり、JGI に登録されている配列は N 末端の DNA 結合ドメインが一部切断されたものであると推定された。そこで、ゲノム DNA から両方の推定翻訳開始部位をクローニングし、部分切断型 ACE3 (PT-ACE3) および完全長 ACE3 (FL-ACE3) の恒常発現を検討した (図 2-3)。さらに、非相同組換えを用いて XYR1 と ACE3 の恒常発現を行い、2 つのリプレッサー (*ace1* および *rce1*) の破壊が必須であるかどうか検討を行った。本研究で使用した菌株、炭素源、遺伝子型は、表 2-3 に記載した。

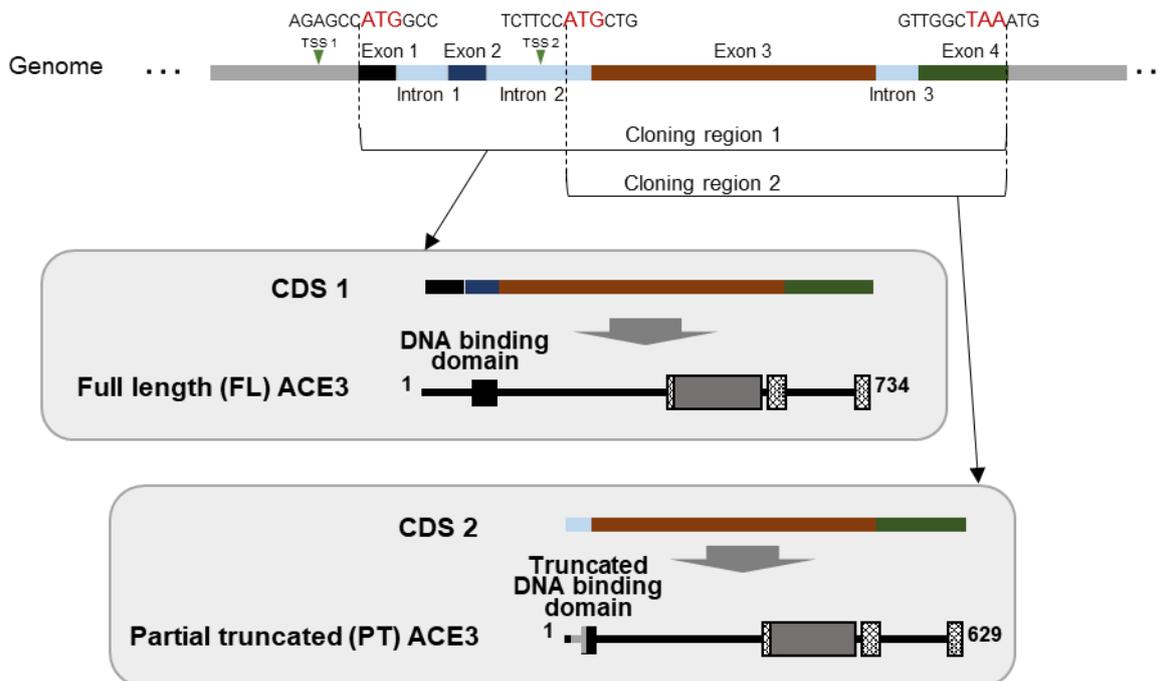


図2-3 *ace3*のゲノム配列、クローニング領域、およびそれらの配列から翻訳されたFL-ACE3および PL-ACE3 の推定配列

以前の報告^{40, 42}によると、*ace3*では2つの異なる転写物が同定され、一方の転写物は最初の開始コドン(TSS1)の~78 bp上流の位置で開始するようにマッピングされ、もう一方は推定上の第2開始コドン(TSS2)の~148 bp上流のイントロン2内で開始するようにマッピングされた。これらの2つの転写物には5' UTRが存在することから、これらは代替スプライシングによるものではなく、2つの異なる転写開始部位に由来することが示唆された⁴²。そこで、領域1と領域2をクローニングし、*act1*プロモーターを用いて、これらのACE3を構造的に発現させた。

表2-3 図2-4で使用した菌株、炭素源、遺伝子型

Lane No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Strain		E1AB1	E1AB1	E1AB1 -X	E1AB1 -A3	E1AB1 -XA3	E1AB1 -XA3fl	E1AB1 -XA3nhr	E1AB1 -X824A3nhr	E1AB1 -XwtA3nhr	
Carbon Source		Cel	Glc	Glc	Glc	Glc	Glc	Glc	Glc	Glc	
Genotypes	<i>xyr1</i>										
	native	<i>xyr1</i> ^{WT}	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>act1</i>	<i>xyr1</i> ^{WT}	-	-	-	-	-	-	-	+	
	<i>act1</i>	<i>xyr1</i> ^{V821F}	-	-	+	-	+	+	-	-	
	<i>act1</i>	<i>xyr1</i> ^{A824V}	-	-	-	-	-	-	+	-	
	native	<i>ace3</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>ace3</i>	<i>act1</i>	<i>ace3</i> (PT)	-	-	-	+	+	-	+	+
	<i>act1</i>	<i>ace3</i> (FL)	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	<i>ace1</i>		-	-	deletion	-	deletion	deletion	-	-	-
	<i>rce1</i>		-	-	-	deletion	deletion	deletion	-	-	-

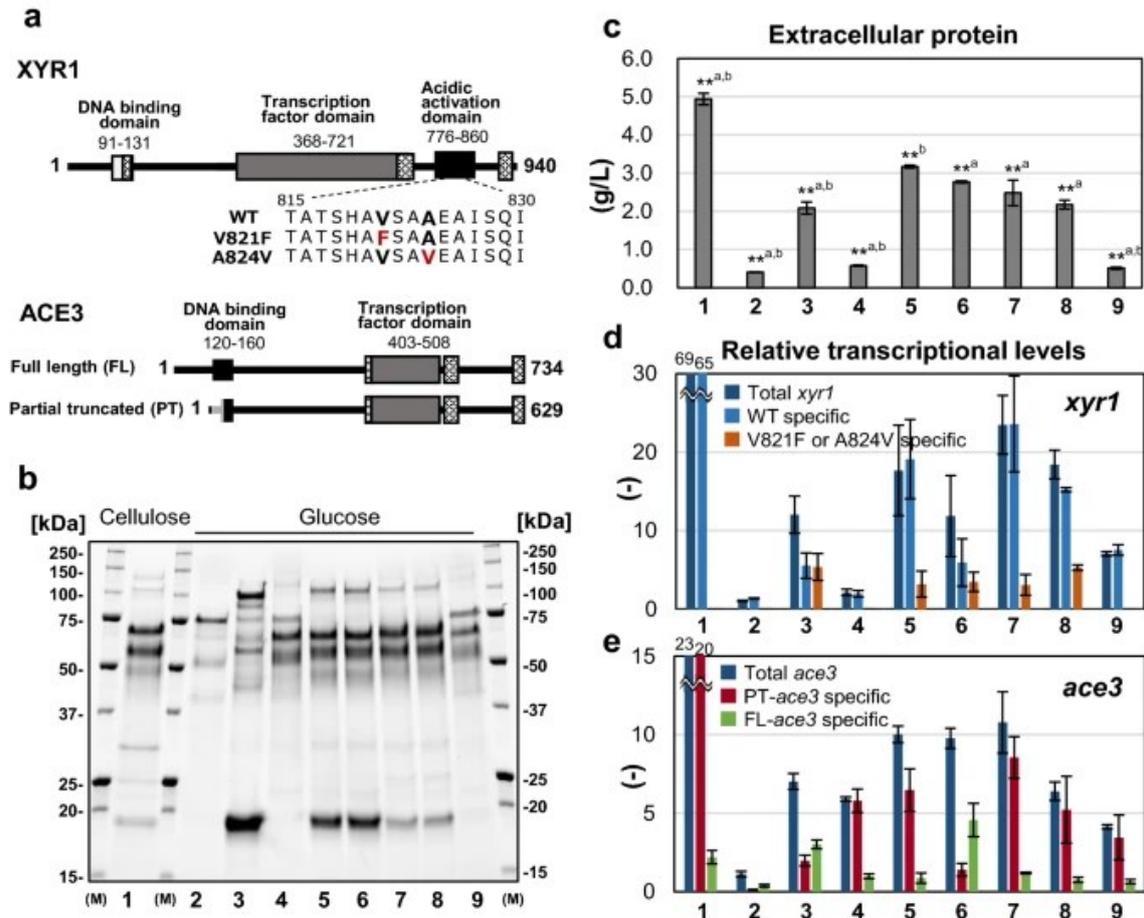


図 2-4 誘導物質フリー条件下での高いセルラーゼ生産に必要な遺伝子組み合わせの確認

(a) 本研究で用いた XYR1 および ACE3 の推定ドメイン、XYR1 のアミノ酸変異体、ACE3 の推定変異体。レーン 1: 3%セルロース、レーン 2-9: 3%グルコースを用いてフラスコ培養を行った。本図に使用した菌株は、Lane1, 2: E1AB1、Lane3: E1AB1-X($\Delta ace1$ -*Pact1*-*xyr1*^{V821F})、レーン 4: E1AB1-A3($\Delta rce1$ -*Pact1*-*ace3* (PT))、レーン 5: E1AB1-XA3($\Delta ace1$ -*Pact1*-*xyr1*^{V821F} および $\Delta rce1$ -*Pact1*-*ace3* (PT))、レーン 6: E1AB1-XA3fl($\Delta ace1$ -*Pact1*-*xyr1*^{V821F} と $\Delta rce1$ -*Pact1*-*ace3*(FL))、レーン 7: E1AB1-XA3nhr(非相同組換えによる *Pact1*-*xyr1*^{V821F} と *Pact1*-*ace3*(PT))、レーン 8: E1AB1-X824A3nhr(非相同組換えによる *Pact1*-*xyr1*^{A824V})、レーン 9: E1AB1-XwtAnhr(非相同組換えによる *Pact1*-*xyr1*^{WT} および *Pact1*-*ace3*(PT))。この図で使用した炭素源、菌株、遺伝子型は、表 2-3 に整理した。

(b) 72 時間培養後の分泌タンパク質の SDS-PAGE (2.5 μ g-protein/lane)。(c) 96 時間後の細胞外タンパク質濃度。(d) *xyr1* と (e) *ace3* の相対的な転写レベル。48 時間後に採取したサンプルに対してリアルタイム PCR を行い、基準計算とデータ正規化のために *pgk1* と E1AB1 株のグルコース培養での転写レベルをそれぞれ測定し、 $\Delta\Delta Ct$ 法で解析した。エラーバーは標準偏差を示す。統計的有意性は、Student's *t*-test により決定した。**a はレーン 5(E1AB1-XA3)を用いた試験について $p < 0.01$ を、**b はレーン 7(E1AB1-XA3nhr)を用いた試験について $p < 0.01$ を示している。

ACE3 を恒常的に発現させた全ての株において、分泌タンパク質の酵素組成は主にセルラーゼであった (図 2-4b、レーン 4、5、6、7、8、および 9)。また、PT-ACE3 を発現する E1AB1-A3 株 (図 2-4c、レーン 4) および ACE3 を野生型 XYR1 と共発現する E1AB1-XwtA3 株 (図 2-4c、レーン 9) の総タンパク質生産量はそれぞれ 0.57g/L および 0.51g/L であった。これらの結果から、ACE3 と変異型 XYR1^{V821F} の共発現は、高い生産性を得るために有効であることが示された。組み合わせる変異型 XYR1 は、必ずしも V821F 特異的である必要はなく、少なくとも変異型 XYR1^{V821F} や XYR1^{A824V} のように glucose blind phenotype を示すものであればよいと考えられた (図 2-4b、c、7、8 レーン)。さらに、ACE3 の共発現は、部分切断配列と完全長配列いずれも有効であり、どちらの ACE3 を用いてもセルラーゼ主体の酵素組成を示し、XYR1^{V821F} の単独発現よりも高い生産性を示した (図 2-4b、c、レーン 6)。しかしながら、FL-ACE3 を導入した E1AB1-XA3fl 株の生産性は、PT-ACE3 を導入した E1AB1-XA3 株よりも 14% 低かった (図 2-4c、レーン 5)。DNA 結合ドメインの一部が切断された ACE3 は優れた生産性を有していたため、この結果は意外なものであった。変異型 XYR1^{V821F} と ACE3 を非相同組換えで発現させた場合 (図 2-4c、レーン 7、E1AB1-XA3nhr 株)、上記と同様の共発現効果が認められた。しかし、タンパク質の生産性は、*ace1*、および *rce1* 破壊 E1AB1-XA3 株 (図 2-4c、レーン 5) に比べて低いものであった。

表 2-3 に示す 9 株において、*xyr1* と *ace3* の転写量を比較した。*xyr1* の総転写量は、非変異領域のプライマーペアを用いて測定し、WT、V821F、A824V については、変異位置にリバープライマーを設計して特異的に測定した。総 *ace3* 転写物の測定に用いたプライマーは全ての *ace3* の共通配列に対してプライマー設計し、全長 (エクソン 2) または部分切断 (イントロン 2~エクソン 3 内) の *ace3* 転写物の定量は各々ユニークな配列で設計した (表 2-4)。

表 2-4 *xyr1* 及び *ace3* のリアルタイム PCR に用いたプライマー

Gene	Forward Primer(5'→3')	Reverse Primer(5'→3')
Total <i>xyr1</i>	GATGAGCACGACTTGAACAGAAA	ACGATGTAACGAGCCACCA
<i>xyr1</i> ^{WT} specific	CATGTCCTCCACATCCTCCTT	ATAGCTTCGGCAGCCGATAC
<i>xyr1</i> ^{V821F} specific	CATGTCCTCCACATCCTCCTT	ATAGCTTCGGCAGCCGAGAA
<i>xyr1</i> ^{A824V} specific	CATGTCCTCCACATCCTCCTT	GAGAATCTGGCTAATAGCTTCGAC
Total <i>ace3</i>	AAGGACATTTTCCCGAAGG	GGAGGCAGTTGGAGTGAAG
PT- <i>ace3</i> specific	ACCACTGACCAATGCTCTTCC	TCGCTCTTCTTCTCGCTTT
FL- <i>ace3</i> specific	ACCACCTCGCCGAGTCT	GGGATGGTGGTGAACGAG
<i>cbh1</i>	ACGAGTTCTCTTTCGATGTTGATG	GCGGTGTTGGTGGGATACTT
<i>cbh2</i>	GTCGCAAAGGTTCCCTCTTTT	CGGCAAGTCATACACCACAAA
<i>eg1</i>	GCTCGTGTTGAGCATTGGA	TGCGTGTTGGGTTGTTG
<i>xyn1</i>	AGCATCAACTACGACAAAACCTACC	ACCAACGCCCAACAACAAG
<i>xyn2</i>	TCAACACGGCGAACCCTT	AACCCTCCACGGCAACAA
<i>bxl1</i>	TTGAGTTTGGTGGTGGGAGA	AGGTGTAGCATCCTTGATCTGTTG
<i>pgk1</i>	TCTGGGCGACATCTACAT	GTAGTCGAGCTCCTTCTTCA

変異型 XYR1^{V821F} を恒常的に発現する E1AB1-X 株では、グルコースを炭素源とする培地での親株 E1AB1 株に比べ *xyr1* の転写量が 11.5 倍に増加した。その増加は、*xyr1*^{V821F} だけでなく、*xyr1*^{WT} (ネイティブ *xyr1*) についても 4.2 倍であった (図 2-4d、レーン 2 および 3)。さらに、E1AB1-X 株では、*ace3* の発現は直接改変していないにもかかわらず、*ace3* の

総転写量が 6.2 倍に増加した (図 2-4e)。このことから、変異型 XYR1^{V821F} によって、ネイティブの *xyr1* および *ace3* の発現が直接/間接的に著しく増強されることがわかった。さらに、変異型 *xyr1*^{V821F} と PT-*ace3* を共発現させた E1AB1-XA3 株では、*xyr1* および *ace3* の総転写量が親株に比べてそれぞれ最大 16.8 倍および 8.9 倍に増加した (図 2-4d, e、レーン 5)。変異型 *xyr1* を利用せずに *xyr1*^{MT} と PT-*ace3* を共発現させた場合 (E1AB1-XwtA3nhr 株)、*xyr1* および *ace3* の総転写量はそれぞれ 6.7 倍 (図 2-4d、レーン 9)、3.7 倍 (図 2-4e、レーン 9) 上昇した。しかし、分泌タンパク質の総量は増加しなかった (Fig.2-4c, レーン 9)。これらの結果から、高いセルラーゼ生産には、総 XYR1、または変異 XYR1^{V821F} や XYR1^{A824V} などの変異 XYR1 が一定レベル以上必要であることが示唆された。

以上、これらの結果から、glucose blind phenotype を示す変異型 XYR1 (V821F、A824V など) および ACE3 (全長および部分切断型) の構成的発現が、誘導物質非存在下で高いセルラーゼ生産性に必要であることがわかった。さらに、ACE3 の DNA 結合ドメインの部分切断、*ace1* および *rce1* の破壊が高いタンパク質生産性に寄与し、E1AB1-XA3 株の遺伝子型が本研究で最も有効な組み合わせであることが判明した。

2-2-4 XYR1^{V821F} と PT-ACE3 の単独または共発現下でのセルラーゼおよびキシラナーゼの発現および活性解析

XYR1^{V821F} の単独発現 (E1AB1-X 株)、PT-ACE3 の単独発現 (E1AB1-A3 株)、XYR1^{V821F} と PT-ACE3 の共発現 (E1AB1-XA3 株) におけるセルラーゼとキシラナーゼの遺伝子発現と活性を解析した。

タンパク質生産性は E1AB1-XA3 株が最も生産量、生産速度ともに優れた (図 2-5a) が、菌体バイオマス量も最も低く推移したことから (図 2-5c)、菌体当たりのタンパク量生産効率も向上していると考えられた。グルコースの消費速度は E1AB1 株、E1AB1-A 株など菌体バイオマス量が多く到達する株ほど早く、E1AB1-XA3 株が最も遅かった (図 2-5c)。変異型 XYR1^{V821F} 導入株 (E1AB1-X 株及び E1AB1-XA3 株) においては分泌タンパク質の生産に多量の炭素源が分配されることにより菌体増殖が抑制される傾向を示した。また、E1AB1-X 株及び E1AB1-XA3 株においても、菌体量が増加しながら上清中にグルコースが残存している状態 (24-30h) では殆どタンパク質は生産されておらず、glucose-blind phenotype を有する株においても高グルコース条件では構成的な転写誘導よりもカタボライト抑制による転写抑制の方が支配的となっているものの、その閾値は改善している可能性が考えられた。

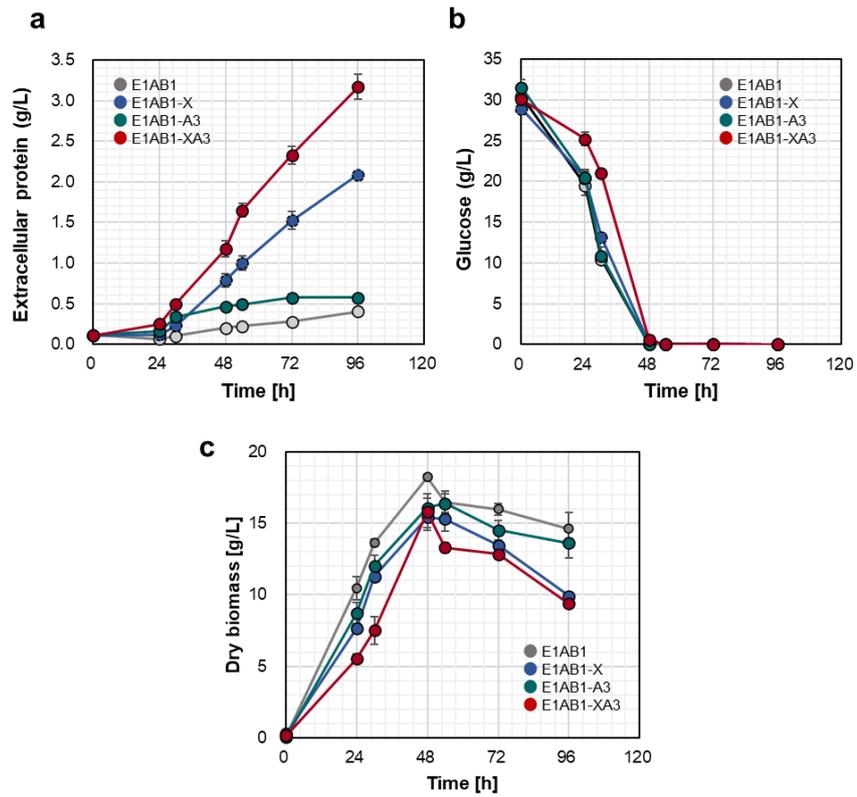


図 2-5 誘導物質フリータンパク生産時の培養挙動

E1AB1 株、E1AB1-X 株、E1AB1-A3 株、E1AB1-XA3 株をフラスコで 3%グルコースからなる非誘導培地で培養し、0、24、30、48、54、72、96 時間後にサンプリングを行った。(a) 細胞外タンパク質濃度、(b) 上清中のグルコース濃度、(c) 乾燥固形分量。エラーバーは標準偏差を示す。

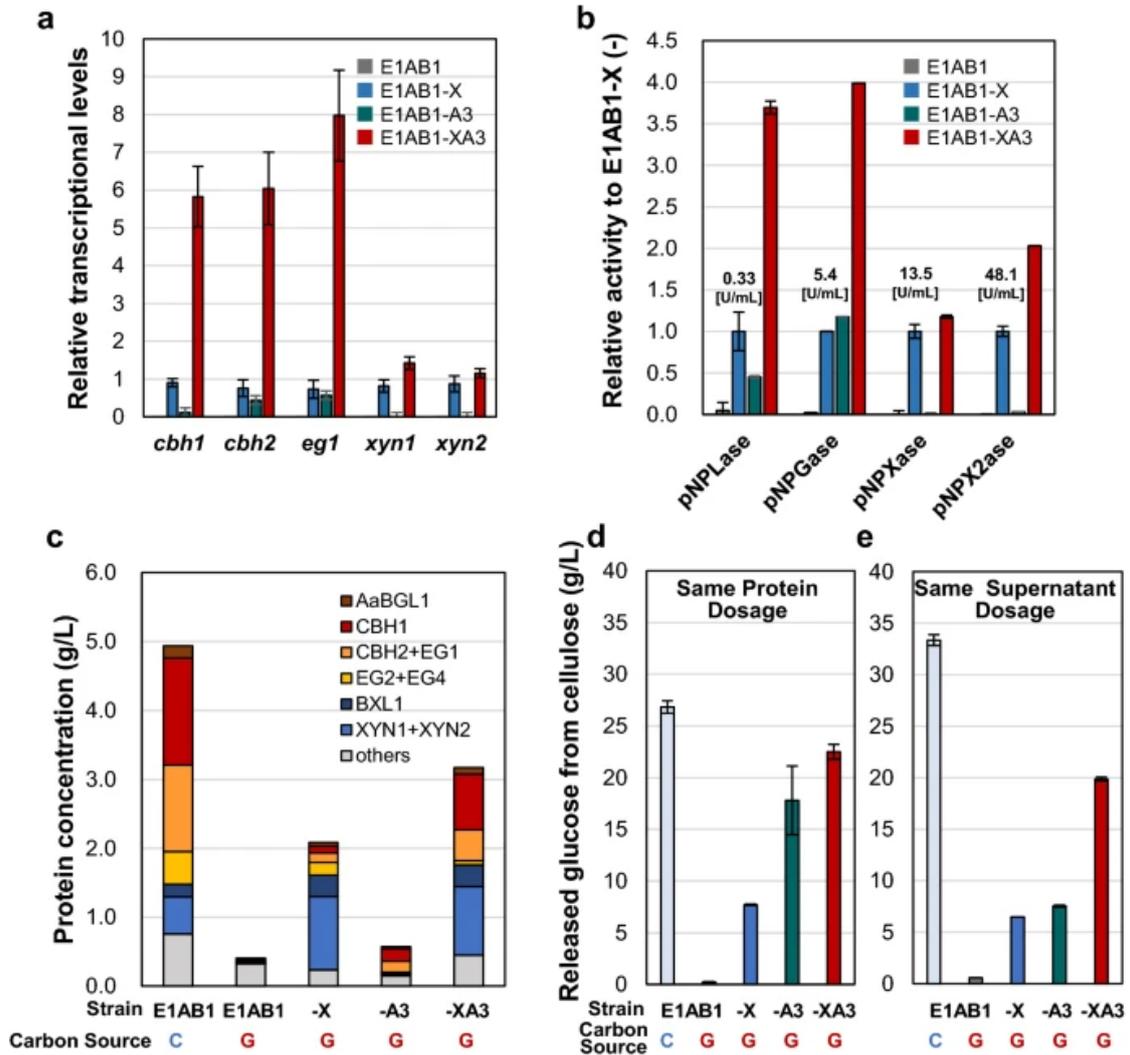


図 2-6 主要菌株における遺伝子発現、酵素活性、組成、微結晶セルロースの糖化性分析

(a) 主要なセルラーゼとキシラナーゼの相対的な遺伝子発現量。グルコースを炭素源として 48 時間培養したサンプルに対して、リアルタイム PCR を行った。データ正規化のために *pgk1* および E1AB1-X 株の RNA の転写量をそれぞれ測定し、 $\Delta\Delta Ct$ 法で解析した。(b) グルコースを炭素源として 72 時間培養した後に得られた培養上清中の各酵素の体積活性を示す。活性の 1 単位は、50°C の基質からの培養上清 1 mL あたり 1 分間に 1 μmol の p-ニトロフェノールを生成した酵素量と定義する。棒グラフは、E1AB1-X に対する相対活性を示す。(c) 酵素組成と全分泌タンパク質濃度から各酵素成分の濃度を算出した。酵素組成は、E1AB1 (セルロース:C、グルコース:G を用いて培養)、E1AB1-X (G)、E1AB1-A3 (G)、E1AB1-XA3 (G) 株由来の SDS-PAGE 後のバンドパターンから算出した。タンパク質濃度は 96 時間の値から求めた。(d) 同酵素添加量 (2.0mg タンパク質/g セルロース) を用いた微結晶セルロースの糖化。(e) 同容量の培養上清 (0.87 mL 培養上清/g セルロース) を使用した微結晶セルロースの糖化。エラーバーは標準偏差を示す。統計的有意性は、Student's *t*-test によって決定した。** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

XYR1^{V821F} 変異の影響により、E1AB1-X 株の主要セルラーゼの転写量は、親株の E1AB1 に比べて約 4 桁増加した (図 2-6a)。さらに、E1AB1-XA3 株では、PT-ACE3 の恒常発現により、セルラーゼの転写量が E1AB1-X 株と比較してさらに 6.4 倍増加した (図 2-6a)。主要なキシラナーゼである *xyn1* および *xyn2* の発現量の増加は最大で 1.7 倍であり (図 2-6a)、その酵素活性と一致した (図 2-6b)。さらにこれらの結果と一致して、E1AB1-XA3 株の生産する酵素は、E1AB1-X 株と比較して、キシラナーゼが同程度の量を示し、セルラーゼ (CBH1、CBH2、EG1) 成分が特異的に増加した (図 2-6c)。グルコースを用いた非誘導培養における E1AB1-XA3 株のセルラーゼ/キシラナーゼ組成は、セルロースを用いた親株 E1AB1 株の誘導培養と類似していた (図 2-6b)。E1AB1-A3 株では、pNPXase および pNPXase の分解活性はほとんど検出されず (図 2-6b)、BXL1、XYN1 および XYN2 のバンドはほとんど確認できなかった (図 2-4b、レーン 4)。したがって、ACE3 の恒常的単独発現は、セルラーゼ生産を活性化することはできるが、キシラナーゼ生産を十分に活性化することはできなかった。さらに、SDS-PAGE から推定されるタンパク質濃度と組成から、E1AB1-X 株、-A3 株、-XA3 株では、CBH1、CBH2、EG1 の絶対量がそれぞれ 0.24、0.34、1.25g/L となった。このことから、変異型 XYR1^{V821F} と ACE3 の共発現により、セルラーゼが相乗的に上昇することが確認された (図 2-6c)。

セルロースを用いた誘導条件下とグルコースを用いた非誘導条件下で生産した酵素を用いて、微結晶セルロースの糖化を評価した。セルロース 1g あたり 2.0 mg-酵素を用いた評価では、セルロースで誘導した親株 E1AB1 の生産する酵素が 26.8 g-glucose/L と最も多くのグルコースを放出した。一方、非誘導条件では、E1AB1-XA3 株の産生する酵素が 22.5 g-glucose/L と最も優れていた (図 2-6d)。E1AB1-A3 株の酵素は 17.8 g-glucose/L を放出した。この結果は、E1AB1-X 株の酵素の 2.3 倍であった (図 2-6d)。これは、タンパク質内のセルラーゼ成分の組成比が高いためと推察された。しかし、前述のように、E1AB1-A3 株が生産した分泌酵素の総量は 0.57 g/L (図 2-6c)であり、セルラーゼの絶対量は 0.34 g/L であった。一方、E1AB1-X 株由来の酵素カクテルは、タンパク質濃度が 2.09 g/L と E1AB1-A3 株よりも生産性が高かったが、キシラナーゼが主成分であり、その結果、セルラーゼの絶対量は 0.24 g/L となった。したがって、E1AB1-A3 株および E1AB1-X 株が生産するセルラーゼ成分は、E1AB1-XA3 株の 1.25 g/L よりも低い値であった。そこで、同量の培養上清を 0.87 mL 用いて糖化を行った。その結果、E1AB1-A3 株由来の酵素は 6.5 g-グルコース/L、E1AB1-X 株由来の酵素は 7.5 g-グルコース/L を放出し、両酵素は同等の性能を有することがわかった。一方、E1AB1-XA3 株由来の酵素は 19.9 g-glucose/L と著しく高い量を放出した (図 2-6e)。このことから、E1AB1-XA3 株は、既存の XYR1^{V821F} 過剰発現株よりも優れた酵素を、誘導物質フリー条件下で生産することができることが示された。

以上より、E1AB1-XA3 株は、ACE3 の恒常発現によるセルラーゼ組成比の増大と、変異型 XYR1^{V821F} の導入による非誘導条件下での高いタンパク質生産性という二つの重要な表現型を持つことが確認された。このように、セルラーゼ分解酵素の最も重要な特性であるセルラーゼ生産量の増加を、非誘導生産系で実現した。

2-3 考察と討論

これまでに報告されていた変異型 XYR1^{V821F} または XYR1^{A824V} を用いた *T. reesei* による誘導物質フリー酵素生産系は、主にキシラナーゼを生産し、セルラーゼの発現は不十分であった^{32,33}。そこで、セルラーゼとキシラナーゼの両方を誘導条件と同レベルで生産する遺伝子組換え戦略を開発した。その結果、誘導物質フリー条件下においてもセルラーゼとキシラナーゼを大量に生産することに成功した。変異型 XYR1^{V821F} または XYR1^{A824V} と ACE3、特に DNA 結合ドメインの一部が切断された ACE3 の恒常発現により、グルコースを唯一の炭素源とする培養生産におけるセルラーゼ生産性の向上が達成された。

今回の報告では、XYR1^{V821F} とセルラーゼ調節関連因子である CRT1、BGLR、VIB1、ACE2 との共発現はセルラーゼ発現量を増加させなかった (図 2-2)。これまでにこれらの因子を欠失させると、セルラーゼの発現が消失または低下することが報告されていた^{38,39,40,45}。また、これらの因子は、XYR1 や ACE3 の発現によっても影響を受けることが知られていた (例えば、*crt1* は ACE3 によって制御される^{38,47})。このことから、変異型 XYR1^{V821F} の恒常発現とそれに続く ACE3 の発現増強により、これらの因子がすでに十分量発現していたため、XYR1^{V821F} とこれらの因子の共発現による効果が生じなかった可能性が考えられた (図 2-4e、レーン 3)。一方、ACE3 の共発現の効果はセルラーゼ生産量の向上に寄与することが確認され (図 2-2)、変異型 XYR1^{V821F} により導かれる発現強化以上に ACE3 の発現を高めることが必要であると考えられた。また、ACE4 が *ace3* プロモーターに直接結合し、ACE3 の発現を制御してセルラーゼ産生を促進することは、これまでに報告されている⁵⁶。すなわち、ACE3 は XYR1 だけでなく、ACE4 を含む他の因子によっても制御されている可能性があり、XYR1 以外の因子による ACE3 の発現量増加がセルラーゼ発現の鍵を握っている可能性が示唆された。また、メインのセルラーゼ/ヘミセルラーゼの発現制御だけでなく、(XYR や ACE3 の制御下でない) マイナー酵素が発現していない可能性もあり、今後さらに様々な制御因子や glycoside hydrolase family の網羅的発現プロファイル解析を行う必要があると考えている。

XYR1 は、セルラーゼおよびキシラナーゼ生産の重要な制御因子の一つとして研究されているが、その詳細な制御機構は不明なままである。本研究では、野生型 XYR1 と PT-ACE3 を共発現させた株 (E1AB1-XwtAnhr 株) では、PT-ACE3 を構成的に発現させた株 (E1AB1-A3 株) と比較してセルラーゼ生産性の向上が見られなかった (図 2-4)。さらに、Rut-C30 株由来の工業用菌株では、ネイティブ *xyr1* プロモーターを phosphoglycerate kinase, histone 3, basic-leucine zipper transcription factor 遺伝子などの構成的プロモーターに置換しても、セルラーゼ誘導物質非存在下でセルラーゼ生産性は上昇しなかった¹²。一方、*T. reesei* QM9414 株において、銅抑制性プロモーター *Ptcu1* を用いて野生型 XYR1 を過剰発現させると、グルコースを用いた培養でセルラーゼ生産の向上が見られた⁵⁷。本研究では恒常発現プロモーターとして *act1* プロモーターを選択したが、野生型 *xyr1* の発現量を高めるには不十分であった可能性があり、条件によっては野生型 XYR1 の過剰発現によりセルラーゼを誘導することができる可能性もある。一方、同じ *act1* プロモーターを用いた変異型 *xyr1*^{V821F} の発現では、非誘導条件下で顕著なキシラナーゼ生産が見られた (図 2-1)。また、セルラーゼやヘミセルラーゼ遺伝子の転写を完全に活性化するためには、XYR1 の翻訳後修飾が

必要である可能性が示唆されている¹²。A824V や V821F といった XYR1 の酸性活性化ドメインの変異は、翻訳後修飾を模倣し、野生型 XYR1 よりも低いレベルで少なくともキシラナーゼの発現を活性化することができた。したがって、野生型と変異型 XYR1 で同じプロモーター強度を用いてもセルラーゼ／ヘミセルラーゼの発現プロファイルは異なることが示唆され、変異型 XYR1^{V821F} の発現レベルが本研究で最適であったかなど、野生型／変異型 XYR1 の発現におけるプロモーター強度の影響について、さらなる検討が必要である。

もう一つの改変因子である ACE3 は、セルラーゼ制御において重要な役割を果たすことが示されているが、その詳細機能は未だ不明である。*T. reesei* NG14 株および由来する RUT-C30 株、RL-P37 株の ACE3 は、C 末端から 11 アミノ酸切断されており、これによりセルラーゼ生産性が向上していると報告されている⁴²。さらに、Luo らは、RL-P37 株を親株として、C 末端を 7-17 アミノ酸に切断した ACE3 を過剰発現させることにより、誘導物質フリー条件下でも高いセルラーゼ生産性を示すことを報告している⁴³。この報告系では、どの *ace3* も完全な野生型 C 末端を有していなかった⁴³。一方、本研究では、PC-3-7 株由来の E1AB1 株において、ゲノム中の *ace3* は完全な C 末端を持ち、さらに発現を高めた *ace3* は C 末端に変異を持たなかった。しかし、変異型 XYR1^{V821F} との共発現により、非誘導条件下で高いセルラーゼ生産が達成された (図 2-4a)。Luo らは、ACE3 の C 末端 17 アミノ酸は、リプレッサドメインそのものか、リプレッサと相互作用するドメインの一部である可能性を示唆した⁴³。今回の結果から、ACE3 の C 末端変異は、誘導物質フリーでのセルラーゼ生産に必須ではなく、変異 XYR1^{V821F} との相互作用により、ACE3 の C 末端による抑制機能が直接的または間接的に解除される可能性が示された。

また、Luo らは、誘導物質フリーセルラーゼ生産には、N 末端の 6 つのシステインがすべて揃った Zn(II)₂Cys₆ 型 DNA 結合ドメインと特異的な C 末端変異 (欠損) が必要であると報告している⁴³。一方、本研究では、N 末端の DNA 結合ドメインが完全である FL-ACE3 を発現させることでセルラーゼの生産性が向上したが、驚くべきことに、不完全な DNA 結合ドメインを持つ PT-ACE3 の方が生産性が高かった (図 2-4)。ACE3 は、ACE3 同士のホモダイマー、XYR1 とヘテロダイマーを形成することが示されている⁴¹。今回の研究においては、PT-ACE3 は、完全な DNA 結合ドメインを持つ Native-ACE3、DNA 結合ドメインを部分欠損した PT-ACE3、Native-XYR1、または変異 XYR1^{V821F} と相互作用する可能性がある。また、セルロースを用いた誘導条件下では、FL-*ace3* の転写レベルは有意に上昇せず、主に PT-*ace3* に対応する転写レベルが上昇し (図 2-4e, レーン 1)、これまでの報告⁴³ と一致した。したがって、セルラーゼの発現には DNA 結合能を有する ACE3 が必要であるが、この FL-ACE3 の発現量を必ずしも増加させる必要はなく、PT-ACE3 に相当する ACE3 は、誘導剤を用いたセルラーゼ生産時にも、二量体形成や他の因子との相互作用を通じてセルラーゼ発現を制御している可能性が考えられた。ACE3 の DNA 結合ドメインは Gal4-like Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster に分類され、Gal4 はホモ二量体として DNA に結合することが知られている⁵⁸。そのため、DNA 結合ドメインの一部が切断された PT-ACE3 とのホモ二量体 (PT-ACE3 またはネイティブ FL-ACE3 との二量体) は、DNA 結合能を失うと推測された。しかし、図 2-4e の共発現と誘導生産時に転写が増加する領域の結果から、PT-ACE3 の存在はセルラーゼ生産を

ポジティブに制御していることが示唆された。したがって、ACE3 の DNA 結合は、状態によっては阻害の役割も果たしている可能性もある。また、DNA と結合可能な XYR1 とヘテロマー化することで、セルラーゼ生産を活性化する可能性も考えられたが、DNA 結合ドメインの一部を切断した ACE3 の機能については、さらなる検討が必要であると考えられた。

xyr1^{M821 F} などのセルラーゼ制御関連因子を挿入するために用いた *ace1*²⁵ および *rce1*²⁶ 遺伝子は、リプレッサーとして知られていた。本研究では、これらの破壊は必須ではなく、総分泌タンパク質濃度は増加したものの、セルラーゼ組成の改善には寄与しなかった (図 2-4b, c)。グルコースを用いた E1AB1-XA3 株の酵素生産性は、E1AB1-X 株および E1AB1-A3 株に比べ向上したが、セルロースを用いた親株 E1AB1 株にはやや劣った (図 2-1a, 2-4c, 2-5c)。これは、炭素源としてのセルロースの性質とその誘導性に大きく依存していると思われる。グルコースは非常に資化しやすく、急速に消費されるため、本試験では 48 時間後には枯渇していた (図 2-5b)。一方、セルロースは資化されにくく、ゆっくりと分解され、長い時間をかけてセロビオースやグルコースを放出するため、CCR を誘導する可能性は低いと考えている。今回使用した E1AB1 株は、突然変異育種を繰り返した工業株であり、*cre1* 変異⁵⁰ や α -チューブリン (*tubB*) 破壊⁵⁴ により、CCR を含む様々な抑制規制が排除されている。しかし、この株でも、グルコース濃度が高い期間は酵素生産がわずかであった (図 2-5a)。また、Luo ら⁴³ は、(ハミ) セルラーゼの生産は、グルコースがある閾値以下に枯渇した後にしか行われず、CCR を完全に克服することはできなかつたと述べている。現状では、セルロースを用いた培養と同等の高いセルラーゼ生産性を導くためには、CCR を回避するための技術 (例えば、フェッドバッチ培養^{59,60}) が必要であり、現状 XYR1 や ACE3 などの活性化因子の恒常発現だけでは CCR を克服できていないと考えている。したがって、今回実施した活性化因子の遺伝子操作だけでなく、抑制機構のさらなる解明が必要である。

最後に、*T. reesei* は、その高い生産能力から、異種タンパク質生産に有望な宿主である。しかし、従来のセルロース系酵素生産系を用いることは、異種タンパク質生産には課題が存在する^{61,62}。それはセルラーゼ遺伝子を目的のタンパク質の遺伝子に置き換えた場合、セルロースが分解できないため誘導物質が放出されず、結果として大幅にタンパク質生産能が低下することである。対照的に、セルラーゼを破壊しなければ、大量のネイティブセルラーゼが混入することになる⁶²。これまでの報告では、*xyr1*^{A824V} を用いた *xyn1* および *xyn2* プロモーターを用いた異種タンパク質生産が報告されている⁶³。しかし、今回の結果から、*cbh1* や *cbh2* のような極めて強力なセルラーゼプロモーターを用いて、セルラーゼを共生産することなく異種タンパク質生産を実施できる可能性を秘めると考えられた。このような可能性について、第3章にて詳細に検討を実施した。このような強力なセルラーゼプロモーターは、バイオエタノール生産のための糖化酵素や様々な価値あるタンパク質の発現に利用できる優れた生産性ツールになることが期待される。

2-4 材料と方法

菌株と培養方法

本研究で使用した *T. reesei* の菌株を表 2-5 に示した。*T. reesei* 菌株 E1AB1⁵³ および E1AB1 Δ *pyr4* (ウラシル/ウリジン要求性株)は、小笠原 渉 教授 (長岡技術科学大学) から提供された。菌株はポテトデキストロース寒天培地 (PDA; Difco Laboratories) プレート上で維持された。

表 2-5 本研究で用いた *T. reesei* 菌株

Strain	Genotypes	References
PC-3-7	-	48
E1AB1	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i>	53
E1AB1 Δ <i>ace1</i>	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i> , Δ <i>ace1</i>	This study
E1AB1 Δ <i>rce1</i>	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i> , Δ <i>rce1</i>	This study
E1AB1-X	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i> , Δ <i>ace1::Pact1-xyr1</i> (V821F)	This study
E1AB1-X Δ <i>rce1</i>	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i> , Δ <i>ace1::Pact1-xyr1</i> (V821F), Δ <i>rce1</i>	This study
E1AB1-XC	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i> , Δ <i>ace1::Pact1-xyr1</i> (V821F), Δ <i>rce1::Pact1-crt1</i>	This study
E1AB1-XB	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i> , Δ <i>ace1::Pact1-xyr1</i> (V821F), Δ <i>rce1::Pact1-bglr</i>	This study
E1AB1-XV	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i> , Δ <i>ace1::Pact1-xyr1</i> (V821F), Δ <i>rce1::Pact1-vib1</i>	This study
E1AB1-XA2	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i> , Δ <i>ace1::Pact1-xyr1</i> (V821F), Δ <i>rce1::Pact1-ace2</i>	This study
E1AB1-XA3	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i> , Δ <i>ace1::Pact1-xyr1</i> (V821F), Δ <i>rce1::Pact1-ace3</i> (PT)	This study
E1AB1-XA3fl	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i> , Δ <i>ace1::Pact1-xyr1</i> (V821F), Δ <i>rce1::Pact1-ace3</i> (FL)	This study
E1AB1-A3	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i> , Δ <i>rce1::Pact1-ace3</i> (PT)	This study
E1AB1-XA3nhr	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i> , <i>Pact1-xyr1</i> (V821F), <i>Pact1-ace3</i> (PT)	This study
E1AB1-X824A3nhr	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i> , <i>Pact1-xyr1</i> (A824V), <i>Pact1-ace3</i> (PT)	This study
E1AB1-XwtA3nhr	<i>amdS</i> ⁺ , <i>Peg11-Aabg1</i> , <i>Pact1-xyr1</i> (WT), <i>Pact1-ace3</i> (PT)	This study

培地調製とフラスコ培養

前培養は、10 mL の培養培養管に入れた 1% (w/v) グルコースを含む基礎培地⁴⁸ 2 mL に、各菌株の胞子を 4×10^5 個接種した。胞子は Thoma 血球計数器 (Sunlead Glass Corp.) で計数した。基礎培地組成は、0.14% (w/v) (NH₄)₂SO₄、0.2% (w/v) KH₂PO₄、0.03% (w/v) CaCl₂·2H₂O、0.03% (w/v) MgSO₄·7H₂O、0.1% (w/v) ポリペプトン、0.05% (w/v) 酵母エキス、0.1% (w/v) Tween 80、0.1% (w/v) 微量元素溶液を 50mM 酒石酸緩衝液 (pH4.0) である。微量元素溶液は、100 mL の蒸留水に 6 mg H₃BO₃、26 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O、100 mg FeCl₃·6H₂O、40 mg CuSO₄·5H₂O、8 mg MnCl₂·4H₂O および 200 mg ZnCl₂ を含む。前培養は 220 rpm で振盪し、28°C で 2 日間行った。

本培養は、500 mL 容 の三角フラスコに、3% (w/v) の粉末セルロース (KC FLOCK W-400G、日本製紙) または 3% (w/v) グルコースと、1.28% (w/v) のクエン酸水素二アンモニウムを含む基礎培地 50 mL に前培養液のを 500 μ L を植菌した。本培養は、28°C、220rpm で 3~5 日間振盪した。サンプリングは、16,000 g、5 分間の遠心分離により培養ブロスから細胞を除去し、上清を 0.20 μ m の酢酸セルロースメンブランフィルター (13CP020AN; アドバンテック東洋) で濾過した。すべての実験は三重で行った。

遺伝子クローニングと遺伝子導入コンストラクトの作製

*T. reesei*株 PC-3-7 のゲノム DNA から目的遺伝子を増幅し、pUC118 (Takara Bio) をテンプレートとして逆ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によってベクター断片を増幅した。SwaI 切断部位を追加するプライマーを用いて設計された増幅フラグメントは、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) のメーカーの手順に従ってライゲーションした。クローニングホストに *Escherichia coli* DH5a を使用し、NucleoSpin® Plasmid miniprep kit (Takara Bio) を用いてプラスミド DNA を精製した。クローニングされた遺伝子とプライマーの詳細については、表 2-6 に記載した。

表 2-6 遺伝子クローニングに用いたプライマー

Plasmid	fragment	Forward Primer	Reverse Primer	Template
pUC-K001	pUC-118	-	-	-
pUC-K002	pUC-act1	1 CTAGAGTATTTAAATACGGGGTACGGTAAAATTG 2 ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	TGCAGGTATTTAAATGTGACTGATTAAATGATGA ATTTAAATACCTAGAGGATCCCCGGGT	Genome DNA pUC-K001
pUC-K003	pUC-ace1	1 CTAGAGTATTTAAATTAACCTGATTTCAAC 2 ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	TGCAGGTATTTAAATAGAGGTAGTCTAGTC ATTTAAATACCTAGAGGATCCCCGGGT	Genome DNA pUC-K001
pUC-K004	pUC-rce1	1 CTAGAGTATTTAAATGGTCAACGGAGGCCAGAAGA 2 ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	TGCAGGTATTTAAATTTTGGCATGACGGGCGA ATTTAAATACCTAGAGGATCCCCGGGT	Genome DNA pUC-K001
pUC-K005	pUC-xyr1	1 CATTAAATCAGTCACAATGTTGTCGAATCCTCTCCG 2 ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	TTTCGCCACGGAGCTTTAGAGGGCCAGACGGTTC ATTTAAATACCTAGAGGATCCCCGGGT	Genome DNA pUC-K001
pUC-K006	pUC-crt1	1 CATTAAATCAGTCACAATGAAGGAGCCCAAGGC 2 ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	TTTCGCCACGGAGCTTTAAGCCTTCTCGATATTGA ATTTAAATACCTAGAGGATCCCCGGGT	Genome DNA pUC-K001
pUC-K007	pUC-bglr	1 CATTAAATCAGTCACAATGACATCGGCCGTCAAGCG 2 ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	TTTCGCCACGGAGCTCTACCGAGTGTGTGAAGT ATTTAAATACCTAGAGGATCCCCGGGT	Genome DNA pUC-K001
pUC-K008	pUC-vib1	1 CATTAAATCAGTCACAATGACCGACCTCAGAGGAGA 2 ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	TTTCGCCACGGAGCTTTAATACCATGCCAGGAGT ATTTAAATACCTAGAGGATCCCCGGGT	Genome DNA pUC-K001
pUC-K009	pUC-ace2	1 CATTAAATCAGTCACAATGGACCTCCGGCAAGCATG 2 ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	TTTCGCCACGGAGCTTCACTCAGCAGTCTGGCAC ATTTAAATACCTAGAGGATCCCCGGGT	Genome DNA pUC-K001
pUC-K010	pUC-ace3	1 TAATCAGTCACAATGGCCACAGCGCCGCGGCAGC 2 ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	CGCCACGGAGCTTAGCCAAACCGGTAGTGGAGC ATTTAAATACCTAGAGGATCCCCGGGT	Genome DNA pUC-K001
pUC-K011	pUC-cbh1	1 CTAGAGTATTTAAATAGCTCCGTGGCAAGCCCTG 2 ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	TGCAGGTATTTAAATGGACCATAGTGGGGGAAC ATTTAAATACCTAGAGGATCCCCGGGT	Genome DNA pUC-K001
pUC-K012	pUC-pyr4	1 CTAGAGTATTTAAATCAACACCGCAAGGTAGGTA 2 ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	TGCAGGTATTTAAATATCACATGTCAATGTCAAA ATTTAAATACCTAGAGGATCCCCGGGT	Genome DNA pUC-K001
pUC-K013	pUC-Tr120830	1 CTAGAGTATTTAAATTTTCGCCTTAGCGGTTCCAT 2 ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	TGCAGGTATTTAAATTTAATCTCGGCAGTCTCGTCAG ATTTAAATACCTAGAGGATCCCCGGGT	Genome DNA pUC-K001
pUC-K014	pUC-Tcbh1-Tr120830-3'	1 CTAGAGTATTTAAATAGCTCCGTGGCAAGCCCTG 2 AAGTACCCGCGCTTGACAA	AAGCGCGGTACTTCTCGGCTAGTGTGTCATCGT TGCAGGTATTTAAATCTGAATGCCCGGTGTAAGC	pUC-K011 pUC-K013
pUC-K015	pUC-pyr4-Tr120830-3'	1 CTAGAGTATTTAAATCAACACCGCAAGGTAGGTA 2 ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	CCATCACATGTCAATGTGAC TGCAGGTATTTAAATTTGGTCTTGGTTGGAGGG	pUC-K012 pUC-K013
pUC-K016	pUC-Tcbh1-Tr120830-3'-pyr4-Tr120830-3' (pyr4*)	1 CTAGAGTATTTAAATAGCTCCGTGGCAAGCCCTG 2 CCACCGGCATTCAGCAACCGCAAGGTAGGTA	CTGAATGCCCGGTGTAAGC TGCAGGTATTTAAATTTGGTCTTGGTTGGAGGG	pUC-K014 pUC-K015

pUC-K017 は、*ace1* 挿入プラスミド (pUC-K003) と *pyr4* マーカーカセット (pUC-K016) に由来するインバース PCR プロダクトとのライゲーションによって生成した。*ace1* 破壊コンストラクト (pUC-K017) と *act1* プロモーター、*xyr1* ORF、*cbh1* ターミネーターの断片をインバース PCR により増幅し、プラスミド ΔAce1-Pact1-xyr1-pyr4 (pUC-K019) を作製した。このプラスミドを鋳型としてさらにインバース PCR を行い、821 位のバリンをフェニルアラニンに変異させた ΔAce1-Pact1-xyr1V821F-pyr4 (pUC-K020) を取得し、824 位のアラニンを変異させた ΔAce1-Pact1-xyr1A824V-pyr4 (pUC-K021) を得た。同様にして、*rce1* 破壊コンストラクトのインバース PCR 断片 (pUC-K018) と *act1* プロモーター、各種 ORF (*crt1*, *bglr*, *vib1*, *ace2*, PT-*ace3*, FL-*ace3*) および *cbh1* ターミネーターの断片をライゲートして、それぞれプラスミド pUC-K022, pUC-K023, pUC-K024, pUC-K025, pUC-K026 および pUC-K027 を構築した。PT-*ace3* および FL-*ace3* については、pUC-K010 をテンプレートとして、2 種類の推定開始コドンに基づくフォワードプライマーを設計した。ベクターの構築と使用したプライマーに関する詳細は、表 2-7 に記載した。

表 2-7 発現カセットとプライマーペア

Plasmid	Homologous region	Promoter	Gene	Terminator	Maker	Homologous region	Fragment	Forward Primer(5'→3')	Reverse Primer(5'→3')	Template	
pUC-K017	pUC-ΔAce1	ace1-5'	-	-	-	pyr4*	ace1-3'	1	CAAAACCAAGAACCAAAAAGATTGGACACATACAA	TTTCGCCACGGAGTGGCGCCGAGATCTGTGTC	pUC-K003
								2	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	TTGGTCTTGGTTGGAGGG	pUC-K016
pUC-K018	pUC-ΔRce1	rce1-5'	-	-	-	pyr4*	rce1-3'	1	CAAAACCAAGAACCAACAATACTGAGAGAACCAGAA	TTTCGCCACGGAGTGGCGCCGAGATCTGTGTC	pUC-K004
								2	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	TTGGTCTTGGTTGGAGGG	pUC-K016
pUC-K019	pUC-ΔAce1-Pact1-Xyr1	ace1-5'	act1	xyr1	cbh1	pyr4*	ace1-3'	1	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	GGCGCCGAGATCTGTGTC	pUC-K017
								2	CAGATCTGGCGCCACGGGTACCGGTGAAATTG	TGCAGTATTTAAATGTGACTGATTAATGATGA	pUC-K002
pUC-K020	pUC-ΔAce1-Pact1-Xyr1 ^{VEBP}	ace1-5'	act1	xyr1 ^{VEBP}	cbh1	pyr4*	ace1-3'	1	CACCGCTTCTGGCTGCCGAAGCTATT	AGCCGGAAGCGGTGCTGCTGCGCTG	pUC-K020
								3	ATGTTGTCCAATCTCTCCG	TTTCGCCACGGAGCTTAGAGGGCCAGACCGGTC	pUC-K005
pUC-K021	pUC-ΔAce1-Pact1-Xyr1 ^{AB84V}	ace1-5'	act1	xyr1 ^{AB84V}	cbh1	pyr4*	ace1-3'	1	TCGCTGTGCGAAGCTATTACCCAGATT	AGCTTCGACGCGGATACCCTGCTGGCT	pUC-K020
								2	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	TGTGACTGATTAATGATGA	pUC-K018
pUC-K022	pUC-ΔRce1-Pact1-Crt1	rce1-5'	act1	crt1	cbh1	pyr4*	rce1-5'	1	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	TGTGACTGATTAATGATGA	pUC-K018
								2	CATTAATCAGTCACAATGAAGGAGCCGCCAAGGC	TTTCGCCACGGAGCTTAGCCCTCTCGATATTGA	pUC-K006
pUC-K023	pUC-ΔRce1-Pact1-BglR	rce1-5'	act1	bglr	cbh1	pyr4*	rce1-5'	1	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	TGTGACTGATTAATGATGA	pUC-K018
								2	CATTAATCAGTCACAATGAAGGAGCCGCCAAGGC	TTTCGCCACGGAGCTTAGCCAGTGTGGAAGT	pUC-K007
pUC-K024	pUC-ΔRce1-Pact1-Vib1	rce1-5'	act1	vib1	cbh1	pyr4*	rce1-5'	1	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	TGTGACTGATTAATGATGA	pUC-K018
								2	CATTAATCAGTCACAATGAAGGAGCCGCCAAGGC	TTTCGCCACGGAGCTTAGCCAGTGTGGAAGT	pUC-K008
pUC-K025	pUC-ΔRce1-Pact1-Ace2	rce1-5'	act1	ace2	cbh1	pyr4*	rce1-5'	1	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	TGTGACTGATTAATGATGA	pUC-K018
								2	CATTAATCAGTCACAATGAAGGAGCCGCCAAGGC	TTTCGCCACGGAGCTTAGCCAGTGTGGAAGT	pUC-K009
pUC-K026	pUC-ΔRce1-Pact1-PT-Ace3	rce1-5'	act1	PT-ace3	cbh1	pyr4*	rce1-5'	1	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	TGTGACTGATTAATGATGA	pUC-K018
								2	CATTAATCAGTCACAATGAAGGAGCCGCCAAGGC	TTTCGCCACGGAGCTTAGCCAGTGTGGAAGT	pUC-K010
pUC-K027	pUC-ΔRce1-Pact1-FL-Ace3	rce1-5'	act1	FL-ace3	cbh1	pyr4*	rce1-5'	1	TAAAGCTCTGGCGAAAGCCTG	CATTGTGACTGATTAATGATGA	pUC-K018
								2	TAATCAGTCACAATGGCCACAGCGCCGCCGAGC	CGCCACGGAGCTTAGCCAACAACGGTGTGAGC	pUC-K010

T. reeseiの形質転換

上記構築したプラスミドは、*T. reesei*の形質転換前に *Swa*I 制限酵素で線状化するか、あるいは PCR により必要部分を増幅して使用した。形質転換は、Novozyme 234 (Novozymes Bagsværd, Denmark) の代わりに 20 mg/mL の Yatalase (タカラバイオ)を用いた改良プロトプラスト PEG 法⁶⁴で実施した。形質転換されたプロトプラストは、最小形質転換培地[2.0% (w/v) グルコース, 18.27% (w/v) ソルビトール, 0.5% (w/v) (NH₄)₂SO₄, 0.2% (w/v) CaCl₂, 0.06% (w/v) MgSO₄, 0.21% (w/v) CsCl, 0.1% (w/v) 微量元素溶液及び 100mM KH₂PO₄ buffer (pH5.5)]にプレーティングした。微量元素溶液は、100 mLの蒸留水に 500 mg FeSO₄-7H₂O, 200 mg CoCl₂, 160 mg MnSO₄-H₂O, および 140 mg ZnSO₄-7H₂O を含む。30°Cで 2 週間培養した後、形質転換体候補を選択プレート (ソルビトールを含まない各最小形質転換培地) 上で 2 回、30°Cで数日間ストリーキングし、シングルコロニーを分離した。その後、シングルコロニーを PDA プレートに移し、30°Cで 1 週間、分生子を形成させた。製造元のプロトコルに従い、KOD One (東洋紡)を用いたコロニーPCRにより、目的の形質転換体を確認した。再度形質転換するためには、得られた形質転換体を、0.2%(w/v)の 5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) 一水和物を含む PDA 培地を用いて再度 5-FOA 耐性を獲得した株 (相同組み換えによる *pyr4* ポップアウト株) を選抜して用いた。

培養上清の分析

メーカーのプロトコルに従い、タンパク質濃度は bovine gamma globulin を標準として Bradford タンパク質アッセイ (Bio-Rad) を用いて測定した。上清中のグルコース濃度は、Glucose C^{II} Test Wako Kit (Wako Chemicals) を使用して定量した。具体的には、96 ウェルプレートに 1 μL の希釈した上清を加え混和後、室温で 15 分間インキュベーションし、反応液 150 μL を添加した。すべてのサンプルおよび標準の吸光度を、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) で 505 nm で測定した。

リアルタイム定量 PCR (RT-qPCR) 分析

遠心分離で集めた培養 48 時間後の細胞ペレットを軽く脱水し、液体窒素で凍結した。凍結サンプルにメタルコーンを入れ、マルチビーズショッカー（安井機工株式会社）を用いて 1700 rpm、10 秒間破碎した。その後、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて、メーカーのプロトコルに従って RNA 抽出を行った。gDNA 消化および cDNA 合成は、それぞれ ezDNase™ Enzyme (Invitrogen) および SuperScript™ IV VIL0™ Master Mix (Invitrogen) を用いて行われた。RT-qPCR 実験は Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mixes (Agilent) を用いて行い、転写レベルは *pgk1* 遺伝子をノーマライザーとして、E1AB1 株 (図 2-4d,e) または E1AB1-X 株 (図 2-6a) をキャリアレーターとして、 $\Delta\Delta Ct$ 法で評価した。すべてのサンプルは、少なくとも 3 回の独立した実験で分析した。リアルタイム PCR に使用したプライマーは、Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) を用いて設計し、表 2-8 に記載した。

表 2-8 Real-Time PCR で用いたプライマー

Gene	Forward Primer(5'→3')	Reverse Primer(5'→3')
Total <i>xyr1</i>	GATGAGCACGACTTGAACAGAAA	ACGATGTAAACGAGCCACCA
<i>xyr1</i> ^{WT} specific	CATGTCCTCCACATCCTCCTT	ATAGCTTCGGCAGCCGATAC
<i>xyr1</i> ^{V821F} specific	CATGTCCTCCACATCCTCCTT	ATAGCTTCGGCAGCCGAGAA
<i>xyr1</i> ^{A824V} specific	CATGTCCTCCACATCCTCCTT	GAGAATCTGGCTAATAGCTTCGAC
Total <i>ace3</i>	AAGGACATTTTCCCGAAGG	GGAGGCAGTTGGAGTGGAAAG
PT- <i>ace3</i> specific	ACCACTGACCAATGCTCTTCC	TCGCTCTTCTCCTCGCTTT
FL- <i>ace3</i> specific	ACCACCTCGCCCGAGTCT	GGGATGGTGGTGGAAACGAG
<i>cbh1</i>	ACGAGTTCTCTTTTCGATGTTGATG	GCGGTGTTGGTGGGATACTT
<i>cbh2</i>	GTCGCAAAGGTTCCCTCTTTT	CGGCAAGTCATACACCACAAA
<i>eg1</i>	GCTCGTGTTTTCAGCATTTGGA	TGCGTGTTGGGGTTGTTG
<i>xyn1</i>	AGCATCAACTACGACCAAACTACC	ACCAACGCCCAACAACAAAG
<i>xyn2</i>	TCAACACGGCGAACCCTT	AACCCTCCACGGCAACAA
<i>bxl1</i>	TTGAGTTTGAGTTGGTGGGAGA	AGGTGTAGCATCCTTGATCTGTTG
<i>pgk1</i>	TCTGGGCGACATCTACAT	GTAGTCGAGCTCCTTCTTCA

酵素組成分析

SDS-PAGE は、Any kD Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels (Bio-Rad) を用いて、200 V で 35 分間実施した。ゲルを 5 分間アクチベートし、ChemiDoc MP イメージングシステム (Bio-Rad) を使用して画像化した。Precision Plus Protein Unstained Standard (5 μ L; Bio-Rad) を分子量マーカーとして使用した。特に断りのない限り、各ウェルに 2.5 μ g のタンパク質をロードした。15kDa 以下では明確なバンドが検出されなかったため、ゲルは 15-250kDa の範囲で切り取った。タンパク質バンドの分子量は、Image Lab ソフトウェア(Bio-Rad)を用いて推定し、タンパク質バンドは、これまでに報告されたセルラーゼおよびキシラナーゼ⁵³ に対応する位置を用いて注釈を付けた。nano LC-MS/MS システムを用いたタンパク質の同定は、Japan Proteomics Co.LTD.に委託し実施した。

酵素活性の分析

基質として p-ニトロフェニル- β -D-ラクトシド (pNPL)、p-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド (pNPG)、p-ニトロフェニル- β -キシロビオサイド (pNPX2)、p-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシド (pNPX)それぞれを用いてセロビオヒドロラーゼ、 β -グルコシラーゼ、キシラナーゼ及び β キシロシダーゼの酵素活性を測定した。反応は、50mM 酢酸ナトリウムバッファ pH5.0、50°Cで 10 分間行い、1M Na₂CO₃を反応液と等量加えることで停止させた。放出された p-ニトロフェノールは、420 nm の吸光度を測定することにより定量した。1 単位の活性は、50°Cで 1 分間に 1 μ mol の p-ニトロフェノールを生成した酵素量と定義した。セルロースの糖化は、9 mL のガラス製スクリュートップボトルに、1 mL 溶液スケールで、100mM 酢酸ナトリウムバッファ pH5.0 で pH を合わせ、基質として 5% (w/v) 微結晶セルロース (Avicel®PH-101, Sigma-Aldrich)、酵素添加量を 2.0 mg タンパク質/g セルロースとして行った。なお、タンパク質濃度は前述のように測定した。反応は、50°Cで 150 rpm の振とう下で 72 時間行った。糖化後に得られたサンプルをろ過し(0.2 μ m フィルター)、酵素アッセイと Multifunction Biosensor BF-7 (王子計測機器) を用いて、メーカーのプロトコルに従って、グルコース濃度を測定した。

統計分析

すべての実験は、少なくとも 3 つの独立したサンプルで行われた。エラーバーは、3 連の平均値の標準偏差(SD)を示す。統計的有意性は、両側無対称の Student's *t*-test によって決定された。各実験セット内では、 $p < 0.05$ を有意とみなした。

データの入手可能性

本研究で使用したタンパク質およびヌクレオチド配列は、Uniprot から以下のアクセッション ID で参照することができる: ACE1_G0RCC6、RCE1_G0RBV8、XYR1_G0RLE8、CRT1_G0RGH7、BGLR_G0RVU2、VIB1_G0R8Z5、ACE2_G0RKV9、ACE3 (部分切断)_G0RIA0、ACE3(全長)_A0A5C1J077。

略語

BGL: β -Glucosidase

BXL: β -Xylosidase

CBH: Cellobiohydrolase

CCR: Carbon catabolite repression

EG: Endoglucanase

pNPG: p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside

pNPL: p-Nitrophenyl- β -D-lactoside

pNPX: p-Nitrophenyl- β -D-xylopyranoside

pNPX2: p-Nitrophenyl- β -xylobiosid

XYN: Xylanase

2-5 本章のまとめ

本章では、*T. reesei*の誘導物質フリーでのセルラーゼ・ヘミセルラーゼ生産のための菌株改変技術を構築した。従来の変異型 XYR1^{V821F}を利用した誘導物質フリー系の課題であるセルラーゼの発現不足を今回の検討により克服し、ヘミセルラーゼのみならず、セルロース系バイオマス糖化酵素として重要なセルラーゼに関しても誘導物質フリーで効率的に生産することが可能となった。また、本研究により、誘導物質が存在しない環境においても誘導時と類似した菌体内状態を再現することができたと考えられ、糖化酵素制御メカニズムの解析においても重要な知見を提供する可能性がある。

今回構築した技術と、これまで培ってきた培養技術を組み合わせることにより、最も一般的で汎用的なグルコースを利用して安価に糖化酵素を生産可能となることを見込まれる。さらに可食糖のグルコースだけでなく、非可食を利用した糖化酵素生産の可能性も出てくる。続く第2章では、さらにこの誘導物質フリーでの糖化酵素生産系を異種タンパク質生産にまで展開した検討について記す。

2-6 参考文献

1. de Paula, R. G. *et al.* Engineered microbial host selection for value-added bioproducts from lignocellulose. *Biotechnol. Adv.* **37**, 107347 (2019).
2. Cristina, A. *et al.* Engineering of holocellulase in biomass-degrading fungi for sustainable biofuel production. *J. Clean. Prod.* **371**, 133488 (2022).
3. Nevalainen, H. & Peterson, R. Making recombinant proteins in filamentous fungi- Are we expecting too much? *Front. Microbiol.* **5**, 1-10 (2014).
4. Cherry, J. R. & Fidantsef, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: An update. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 438-443 (2003).
5. Bischof, R. H., Ramoni, J. & Seiboth, B. Cellulases and beyond: The first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb. Cell Fact.* **15**, 1-13 (2016).
6. Martinez, D. *et al.* Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (*syn. Hypocrea jecorina*). *Nat. Biotechnol.* **26**, 553-560 (2008).
7. Gusakov, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends Biotechnol.* **29**, 419-425 (2011).
8. Fonseca, L. M., Parreiras, L. S. & Murakami, M. T. Rational engineering of the *Trichoderma reesei* RUT-C30 strain into an industrially relevant platform for cellulase production. *Biotechnol. Biofuels* **13**, 1-15 (2020).
9. Johnson, E. Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* **10**, 164-174 (2016).

10. Klein-Marcuschamer, D., Oleskowicz-Popiel, P., Simmons, B. A. & Blanch, H. W. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 1083–1087 (2012).
11. Adsul, M. *et al.* Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. *Enzyme Microb. Technol.* **133**, 109442 (2020).
12. Fischer, J., Schroeckh, V. & Brakhage, A. A. Awakening of Fungal Secondary Metabolite Gene Clusters. In: Schmoll, M., Dattenböck, C. (eds) Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications. *Fungal Biology*, 253–273 (2016)
13. Kubicek, C. P., Mikus, M., Schuster, A., Schmoll, M. & Seiboth, B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol. Biofuels* **2**, 19 (2009).
14. Adnan, M., Ma, X., Olsson, S., Wang, J. & Liu, G. Promoter regulation and genetic engineering strategies for enhanced cellulase expression in *Trichoderma reesei*. *Microbiol. Res.* **259**, 127011 (2022).
15. Shida, Y., Furukawa, T. & Ogasawara, W. Deciphering the molecular mechanisms behind cellulase production in *trichoderma reesei*, the hyper-cellulolytic filamentous fungus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 1712–1729 (2016).
16. Adnan, M. *et al.* Carbon catabolite repression in filamentous Fungi. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–23 (2018).
17. Ilmén, M., Thrane, C. & Penttilä, M. The glucose repressor gene cre1 of *Trichoderma*: Isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Molecular and General Genetics.* **251**, 451–460 (1996).
18. Campos Antoniêto, A. C. *et al.* *Trichoderma reesei* CRE1-mediated Carbon Catabolite Repression in Response to Sophorose Through RNA Sequencing Analysis. *Curr. Genomics* **17**, 119–131 (2015).
19. Han, L. *et al.* Redesigning transcription factor Cre1 for alleviating carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei*. *Synth. Syst. Biotechnol.* **5**, 230–235 (2020).
20. Mandels, M. & Reese, E. T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.* **79**, 816–826 (1960).
21. Mandels, M., Parrish, F. W. & Reese, E. T. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *J. Bacteriol.* **83**, 400–408 (1962).
22. Sternberg, D. & Mandels, G. R. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.* **139**, 761–769 (1979).
23. Morikawa, Y., Ohashi, T., Mantani, O. & Okada, H. Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 106–111 (1995).

24. Cziferszky, A., Mach, R. L. & Kubicek, C. P. Phosphorylation positively regulates DNA binding of the carbon catabolite repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *J. Biol. Chem.* **277**, 14688–14694 (2002).
25. Aro, N., Ilmén, M., Saloheimo, A. & Penttilä, M. ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 56–65 (2003).
26. Cao, Y. *et al.* Rce1, a novel transcriptional repressor, regulates cellulase gene expression by antagonizing the transactivator Xyr1 in *Trichoderma reesei*. *Mol. Microbiol.* **105**, 65–83 (2017).
27. Stricker, A. R., Grosstessner-Hain, K., Würleitner, E. & Mach, R. L. Xyr1 (Xylanase Regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot. Cell* **5**, 2128–2137 (2006).
28. Mach-Aigner, A. R. *et al.* Transcriptional regulation of xyr1, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6554–6562 (2008).
29. Lichius, A. *et al.* Genome sequencing of the *Trichoderma reesei* QM9136 mutant identifies a truncation of the transcriptional regulator XYR1 as the cause for its cellulase-negative phenotype. *BMC Genomics* **16**, 1–20 (2015).
30. Zhang, X., Li, Y., Zhao, X. & Bai, F. Constitutive cellulase production from glucose using the recombinant *Trichoderma reesei* strain overexpressing an artificial transcription activator. *Bioresour. Technol.* **223**, 317–322 (2017).
31. Derntl, C., Mach, R. L. & Mach-Aigner, A. R. Fusion transcription factors for strong, constitutive expression of cellulases and xylanases in *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Biofuels* **12**, 1–18 (2019).
32. Derntl, C. *et al.* Mutation of the Xylanase regulator 1 causes a glucose blind hydrolase expressing phenotype in industrially used *Trichoderma* strains. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 1–11 (2013).
33. Ellilä, S. *et al.* Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. *Biotechnol. Biofuels* **10**, 1–17 (2017).
34. Aro, N., Saloheimo, A., Ilmén, M. & Penttilä, M. ACEII, a Novel Transcriptional Activator Involved in Regulation of Cellulase and Xylanase Genes of *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* **276**, 24309–24314 (2001).
35. Häkkinen, M. *et al.* Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production. *Biotechnol. Biofuels* **7**, (2014).
36. Ivanova, C. *et al.* Genome sequencing and transcriptome analysis of *Trichoderma reesei* QM9978 strain reveals a distal chromosome translocation to be responsible

- for loss of *vib1* expression and loss of cellulase induction. *Biotechnol. Biofuels* **10**, 1–15 (2017).
37. Ivanova, C., Bååth, J. A., Seiboth, B. & Kubicek, C. P. Systems Analysis of Lactose Metabolism in *Trichoderma reesei* Identifies a Lactose Permease That Is Essential for Cellulase Induction. *PLoS One* **8**, 1–10 (2013).
 38. Zhang, W. *et al.* Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **288**, 32861–32872 (2013).
 39. Nitta, M. *et al.* A new Zn(II) 2Cys 6-type transcription factor BglR regulates β -glucosidase expression in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet. Biol.* **49**, 388–397 (2012).
 40. Stricker, A. R., Trefflinger, P., Aro, N., Penttilä, M. & Mach, R. L. Role of Ace2 (Activator of Cellulases 2) within the *xyn2* transcriptosome of *Hypocrea jecorina*. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 436–445 (2008).
 41. Zhang, J. *et al.* The transcription factor ACE3 controls cellulase activities and lactose metabolism via two additional regulators in the fungus *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* **294**, 18435–18450 (2019).
 42. Chen, Y. *et al.* Engineering of *Trichoderma reesei* for enhanced degradation of lignocellulosic biomass by truncation of the cellulase activator ACE3. *Biotechnol. Biofuels* **13**, 1–14 (2020).
 43. Luo, Y. *et al.* Modification of transcriptional factor ACE3 enhances protein production in *Trichoderma reesei* in the absence of cellulase gene inducer. *Biotechnol. Biofuels* **13**, 1–16 (2020).
 44. Zhang, F., Zhao, X. & Bai, F. Improvement of cellulase production in *Trichoderma reesei* Rut-C30 by overexpression of a novel regulatory gene *Trvib-1*. *Bioresour. Technol.* **247**, 676–683 (2018).
 45. Chen, X., Song, B., Liu, M., Qin, L. & Dong, Z. Understanding the Role of *Trichoderma reesei* *Vib1* in Gene Expression during Cellulose Degradation. *J. Fungi* **7**, 613 (2021).
 46. Havukainen, S., Valkonen, M., Koivuranta, K. & Landowski, C. P. Studies on sugar transporter CRT1 reveal new characteristics that are critical for cellulase induction in *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Biofuels* **13**, 1–20 (2020).
 47. Wang, Z. *et al.* Functional Characterization of Sugar Transporter CRT1 Reveals Differential Roles of Its C-Terminal Region in Sugar Transport and Cellulase Induction in *Trichoderma reesei*. *Microbiol. Spectr.* **10**, (2022).
 48. Kawamori, M., Morikawa, Y. & Takasawa, S. Induction and production of cellulases by L-sorbose in *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol.* **24**, 449–453 (1986).

49. Shida, Y. *et al.* The impact of a single-nucleotide mutation of *bgl2* on cellulase induction in a *Trichoderma reesei* mutant. *Biotechnol. Biofuels* **8**, 1–18 (2015).
50. De Oliveira Porciuncula, J. *et al.* Single nucleotide polymorphism analysis of a *Trichoderma reesei* hyper-cellulolytic mutant developed in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 534–543 (2013).
51. Schmoll, M. & Schuster, A. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 787–799 (2010).
52. Baba, Y., Sumitani, J. Ichi, Tani, S. & Kawaguchi, T. Characterization of *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 accelerating cellulose hydrolysis with *Trichoderma* cellulase system. *AMB Express* **5**, 0–8 (2015).
53. Nakazawa, H. *et al.* A high performance *Trichoderma reesei* strain that reveals the importance of xylanase III in cellulosic biomass conversion. *Enzyme Microb. Technol.* **82**, 89–95 (2016).
54. Shibata, N. *et al.* Disruption of alpha-tubulin releases carbon catabolite repression and enhances enzyme production in *Trichoderma reesei* even in the presence of glucose. *Biotechnol. Biofuels* **14**, 1–16 (2021).
55. Zevenhuizen, L. P. T. M. & Bartnicki-Garcia, S. Structure and Role of a Soluble Cytoplasmic Glucan from *Phytophthora cinnamomi*. *J. Gen. Microbiol.* **61**, 183–188 (1970).
56. Chen, Y. *et al.* *Trichoderma reesei* ACE4, a Novel Transcriptional Activator Involved in the Regulation of Cellulase Genes during Growth on Cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* **87**, 1–16 (2021).
57. Zheng, F. *et al.* Engineering *Trichoderma reesei* for Hyperproduction of Cellulases on Glucose to Efficiently Saccharify Pretreated Corncobs. *J. Agric. Food Chem.* **68**, 12671–12682 (2020).
58. Hong, M. *et al.* Structural Basis for Dimerization in DNA Recognition by Gal4. *Structure* **16**, 1019–1026 (2008).
59. T. G. Watson, Nelligan, I. & Lessing, L. Cellulase production by *Trichoderma reesei* (RUT-C30) in fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.* **6**, 667–672 (1984).
60. Jourdier, E. *et al.* Cellulase activity mapping of *Trichoderma reesei* cultivated in sugar mixtures under fed-batch conditions. *Biotechnol. Biofuels* **6**, (2013).
61. Nevalainen, H. & Peterson, R. Heterologous Expression of Proteins in *Trichoderma* in New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: *Aspergillus* System Properties and Applications 89–102 (2016)
62. Rantasalo, A. *et al.* Novel genetic tools that enable highly pure protein production in *Trichoderma reesei*. *Sci. Rep.* **9**, 1–12 (2019).

63. Zhang, J., Wu, C., Wang, W., Wang, W. & Wei, D. A versatile *Trichoderma reesei* expression system for the production of heterologous proteins. *Biotechnol. Lett.* **40**, 965–972 (2018).
64. Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E. & Knowles, J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* **61**, 155–164 (1987).

3. 誘導物質フリー生産系の異種タンパク質生産への応用

第3章では、第2章の誘導物質フリーでの糖化酵素生産系を拡張し、異種タンパク質の高効率生産プラットフォームの構築を目指した研究について述べる。第3章は次の学術論文からなる。

Arai, T., Wada, M., Nishiguchi, H. *et al.* Inducer-free recombinant protein production in *Trichoderma reesei*: secretory production of endogenous enzymes and heterologous nanobodies using glucose as the sole carbon source. *Microb Cell Fact* **22**, 103 (2023).

2-3の末尾でも述べたように、*T. reesei*はタンパク質生産における高いポテンシャルを持つと考えられるが、異種組換えタンパク質生産にはまだ広く用いられていない。一般的にセルラーゼ遺伝子の転写誘導は、*T. reesei*の高レベルタンパク質生産に必須であるが、グルコースはこの転写誘導を抑制する。そのため、主要なセルラーゼ (*cbh1* 及び *cbh2*) 遺伝子の強力なプロモーターを活性化するための誘導剤であるセロビオースなどの遊離糖を提供するための炭素源として、セルロースが一般的に使用される。しかし、高い生産性と組換えタンパク質の占有率を得るために、*cbh1* および/または *cbh2* を目的タンパク質 (POI) をコードする遺伝子に置き換えると、セルロースから可溶性誘導剤を放出する能力が著しく損なわれ、その結果 POI の生産量が減少してしまうという課題が存在する。この課題を克服するため、第2章で構築されたグルコースを唯一の炭素源としてセルラーゼとヘミセルラーゼを生産する誘導物質フリーのバイオマス分解酵素発現系を、*T. reesei* を用いた組換えタンパク質生産に展開した。この場合、セルロースの分解物がなくともセルラーゼプロモーターは高転写活性を示すため、CBH1 及び CBH2 を欠損しながらその強力なプロモーターを異種タンパク質生産に利用可能であると想定された。

結果として、セルロースを使用した誘導系では困難であった CBH1 及び CBH2 の二重破壊 (目的タンパク質への置換) においても高い総タンパク質生産性を維持し、さらにこれら主要なネイティブタンパク質の欠損により目的タンパク質の占有率を向上させた POI の高分泌生産を達成した。また、キャリアペプチドの使用、プロテアーゼ阻害など、異種タンパク質生産に向けた検討も併せて実施した。

以下、本研究の詳細を記載する。

3-1 背景

工業用酵素として利用されてきた組換えタンパク質は、近年、先端材料 (クモの糸など)¹ や代替食用タンパク質² (乳清タンパク質や卵タンパク質など)³ としての可能性が示されている。さらに、抗体はその特異性の高い結合特性から、生物学的治療 (乳がんや急性リンパ性白血病の治療など)⁴、ラテラルフローテスト、免疫学的検査 (SARS-CoV-2、妊娠、食品中の有害物質の検出など)⁵、細胞・組織イメージング⁶ など、さまざまな用途に利用されている。しかし、タンパク質の生産コストが高いことが、抗体をはじめとする高機能バイオマテリアルの実用化の障壁

となっている。そのため、価値のあるタンパク質そのものの開発と、その生産宿主の両方を改良する研究開発が盛んに行われている^{7,8,9}。

近年、二重特異性 T 細胞エンゲージャー (BiTE; blinatumomab)¹⁰ や、単鎖可変フラグメント (scFv) や抗原結合フラグメント (Fab) などの小型抗体フラグメントが、次世代抗体開発のためのコンポーネントとして注目されている¹¹。さらに、ラクダ科の単ドメイン抗体 (sdAbs) 由来の重鎖抗体の可変ドメイン (VHH; ナノボディ) は、小さな抗体断片としての利用が期待されている^{12,13}。ナノボディは、重鎖のみで軽鎖を持たない単純な構造であるため、機能的に最も小さい抗体断片の一つである。この特徴から、ナノボディは二重特異性抗体や二価・三価のタンデムリピート抗体の構築に適している¹⁴。その他、ナノボディは低分子であること、タンパク質分解や熱変性に強いこと、溶解性が高いこと、微生物による生産が容易であることなどが重要な特徴である^{15,16}。一般的にチャイニーズハムスター卵巣細胞で生産される完全長の免疫グロブリン G 抗体とは対照的に、scFv やナノボディ (特に sdAb ナノボディ) などの小さな抗体断片は微生物生産に適しており、生産コストを削減する大きな可能性を秘めていると言われる¹⁷。

細菌と酵母は、組換えタンパク質の微生物生産のためのプラットフォームとして頻繁に使用される^{7,18}。糸状菌である *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) は、組換えタンパク質生産のための魅力的な宿主細胞候補である¹⁹。*T. reesei* は、セルロース系バイオマス分解酵素を大量に工業生産するための宿主微生物として長年育種されてきた^{20,21,22}。*T. reesei* は分泌タンパク質の生産に大きな可能性を持つことから、セルラーゼやキシラナーゼなどのリグノセルロース分解酵素以外の組換えタンパク質を生産する研究も実施されている^{19,23,24,25}。

しかし、*T. reesei* は組換えタンパク質生産のための宿主生物として汎用的には使用されていない。組換えタンパク質生産のための宿主としての *T. reesei* の大きな課題は、高いタンパク質生産が一般的に天然の特殊な誘導性セルラーゼ発現系を使用する必要があることである。具体的には、セルロース由来の糖 (セロビオースなど) を誘導物質として放出するためには、自身の遺伝子がこの転写誘導系の制御下にある主要なセルラーゼであるセロビオヒドロラーゼ 1 および 2 (CBH1 および CBH2) の発現が必要となる (図 3-1a-i)。セルラーゼの発現が誘導されると、セルロースの分解により誘導物質が放出される²⁶。セルロースを炭素源とする誘導性条件下では、多量のセルラーゼおよびヘミセルラーゼが培養液中に分泌され、適切な条件下では生産量が 100 g/L を超えると言われる^{20,21,22}。*T. reesei* の分泌タンパク質は、4 つの主要なセルラーゼ (CBH1、CBH2、エンドグルカナーゼ 1 および 2 [EGL1 および EGL2]) で全体の 90% 以上を占めており²⁷、そのうち 60% および 20% がそれぞれ CBH1 および CBH2 である²⁸。*T. reesei* における組換えタンパク質生産のためのアプローチとして、最も強力なプロモーターである *cbh1* を利用することが一般的に行われる^{29,30}。

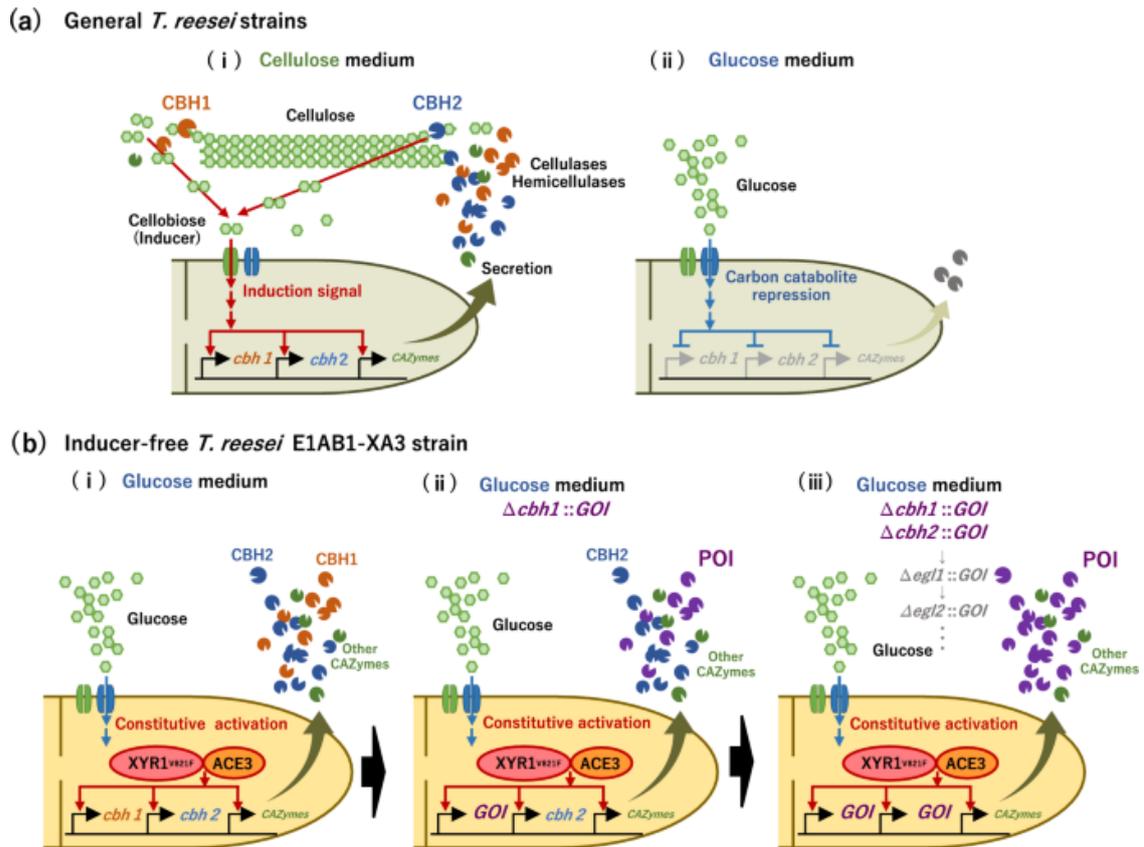


図 3-1 *Trichoderma reesei* を用いたタンパク質生産システムの概略

(a) *T. reesei* 株では、(i) セロビオヒドロラーゼ(CBH)1 および CBH2 により放出されるセルロース由来の糖(セロビオースなど)により、大量のセルラーゼおよびヘミセルラーゼの産生が誘導される。(ii) グルコースを炭素源とする場合、炭素異化抑制(CCR)によりセルラーゼとヘミセルラーゼの生産が抑制される。(b) 誘導物質フリー *T. reesei* E1AB1-XA3 株においては、CCR からの解放と転写因子の改変により、(i) グルコースのみを炭素源としてセルラーゼやヘミセルラーゼを生産することが可能である。異種タンパク質生産戦略として、(ii) 最も豊富なネイティブセルラーゼである *cbh1* を標的タンパク質遺伝子に置換し、かつ (iii) *cbh2* や他の CAZymes を目的異種タンパク質遺伝子に置き換えることで、高純度・高生産が可能となると考えられる。

T. reesei における組換えタンパク質の生産量と純度(全分泌タンパク質中の目的タンパク質占有率)を高めるためには、2つの主要なセルラーゼ遺伝子、*cbh1* および/または *cbh2* を、目的のタンパク質(POI)をコードする遺伝子(gene of interest, GOI)に置き換えることが望ましい。しかし、*cbh1* および/または *cbh2* のノックアウトは、*T. reesei* のセルロース分解能力および可溶性誘導物質の放出能力を著しく低下させ、成長低下および誘導障害をもたらす^{31,32}。したがって、*T. reesei* の組換えタンパク質生産に *cbh* プロモーターを使用するには、高価で不溶性のセルロースから誘導剤を放出するために主要なネイティブセルラーゼを保持するか³⁰、または直接誘導物質として高価で可溶性の二糖類(cellobiose, sophorose, lactose など)を使用する必要がある²⁵。可溶性で安価な一般的な炭素源(すなわちグルコース)の使用は、コスト削減の観点からは好ましいが、炭素異化抑制(CCR)によりセルラーゼやヘミセルロースの発現が極端に抑制されている³³。そのため、グルコースを炭素源として使用

すると、天然のセルラーゼ誘導発現系が阻害され、主要なセルラーゼプロモーターはタンパク質生産に使用することは困難である(図 3-1a-ii)。

第2章で述べたように、*T. reesei*において、内因性バイオマス分解酵素を簡便かつコスト効率よく生産するための、誘導物質フリー転写活性化システムを用いた組換えタンパク質生産の代替戦略をこれまでに開発した³⁴。誘導物質フリーで操作した菌株は、セルロースやその他の糖類をインデューサーとして必要とせず、安価なグルコースを唯一の炭素源として、高レベルのセルラーゼとヘミセルラーゼを生産した(図 3-1b、E1AB1-XA3 株)。この株は、酵素生産性の高い変異体 E1AB1³⁵ をベースに、セルラーゼおよびヘミセルラーゼ遺伝子の転写制御因子について、転写抑制因子($\Delta ace1$ および $\Delta rce1$) の欠失と主要転写活性因子(変異 XYR1^{V821F} および DNA 結合ドメイン部分欠損 ACE3) の構成発現という複数の改変を加えたものである(図 3-1b-i)。この株には強力な転写活性化因子が存在するため、セルロースの分解による誘導は必要ない。本株は、組換えタンパク質の高い生産性と占有率が期待できることから、*cbh1* と *cbh2* を GOI に置き換えて、本株の強力な *cbh* プロモーターを利用し、POI を発現することを目指した。

本研究では、セルロースの代わりにグルコース(最も一般的に使用される炭素源)を用いた組換えタンパク質生産に、*T. reesei* の誘導物質フリーセルラーゼ/ヘミセルラーゼ発現系を使用した。概念実証として、まず、誘導物質フリーE1AB1-XA3 株を親株として、主要なネイティブセルラーゼの一つをコードする *cbh1* を POI 遺伝子(GOI) に置換した(図 3-1b-ii)。セルロースなどの誘導物質を含まないグルコース培地で 2 種類の内在性分泌酵素と 3 種類のラクダ科ナノボディをそれぞれ選択し、内在性タンパク質と異種タンパク質の産生を試みた。シグナル配列の種類(キャリアポリペプチドと切断リンカーの有無)とプロテアーゼ阻害剤の添加に検証を行い、異種 POI として *cbh2* を二価のナノボディ遺伝子に追加置換すると、*T. reesei* の全分泌タンパク質における生産性と POI の占有率がさらに高まった(図 3-1b-iii)。本アプローチは、グルコースを唯一の炭素源とする低コストで高分泌性の組換えタンパク質生産のための微生物プラットフォームとしての *T. reesei* の応用に関する新しい知見を提供する。さらに、この戦略は、特殊な転写活性化機構や、比較的高価で複雑な炭素源であるセルロースを使用する必要性に伴う課題を解決することができると思われる。

3-2 結果

3-2-1 *T. reesei* の内因性分泌酵素を利用した誘導物質フリー組換えタンパク質生産の概念検証

まず、誘導物質を必要とする従来型 E1AB1 株のセルラーゼおよびヘミセルラーゼの生産量を、誘導時(セルロース)および非誘導時(グルコース)の両条件で評価した。E1AB1 株は、セルロースを炭素源とした場合、大量のセルラーゼとヘミセルラーゼを培養液中に分泌したが(図 3-2a、b-レーン 1)、同株はグルコースを炭素源とした場合にはほとんど分泌しなかった(図 3-2a、b-レーン 2)。一方、我々の先行研究³⁴ 及び第2章で示したように、誘導物質フリーの E1AB1-XA3 株は、非誘導性のグルコース培地で培養した場合においても、誘導時の E1AB1

株と同程度の生産量で主要なセルラーゼとヘミセルラーゼを生産した（図 3-2a、b-lane3）。

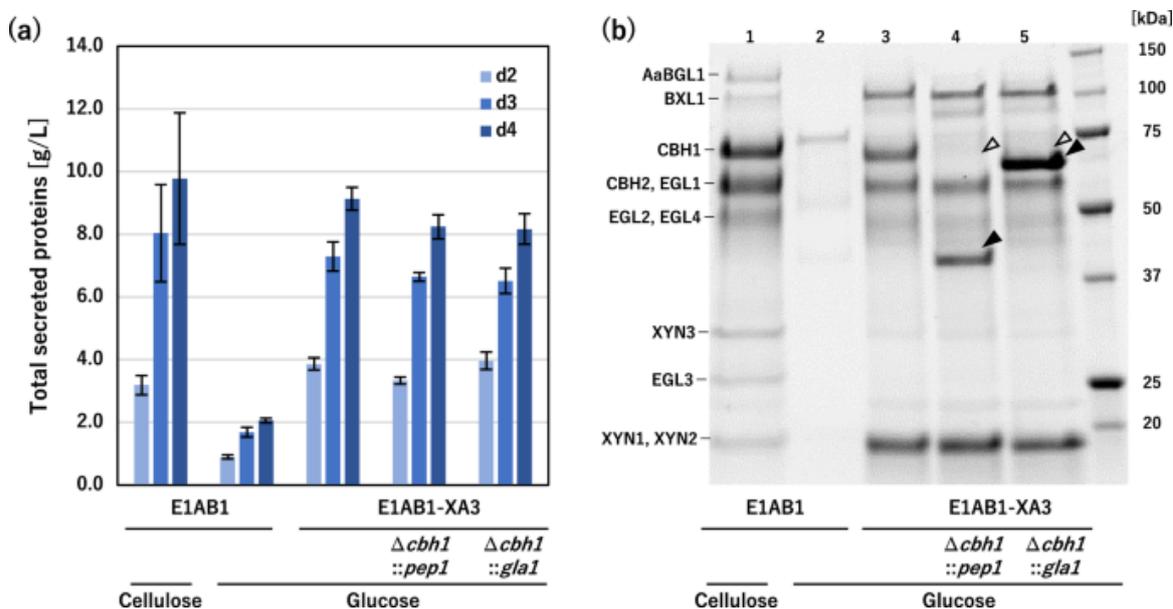


図 3-2 誘導剤フリーシステムを用いた *T. reesei* からの内因性分泌プロテアーゼおよびグルコアミラーゼの生産

T. reesei E1AB1 株をフラスコでセルロース 3%を含む誘導培地とグルコース 3%を炭素源とする非誘導培地で培養した。E1AB1-XA3、E1AB1-XA3 $\Delta cbh1::pep1$ (tre74156、アスパラギン酸プロテアーゼ)、E1AB1-XA3 $\Delta cbh1::gla1$ (tre1885、グルコアミラーゼ)組換え株は 3%のグルコースを含む非誘導培地で培養した。(a) 培養 2、3、4 日後の全分泌タンパク質濃度 (b) 分泌タンパク質の SDS-PAGE 解析。培養 3 日後の上清を 8 倍希釈し、5 μ L をロードした。Open arrowhead は、欠失したタンパク質を示し、CBH1 に相当する。Closed arrowhead は、明らかに過剰発現したタンパク質を示し、プロテアーゼとグルコアミラーゼに相当する。エラーバーは標準偏差を示す。

誘導物質フリー転写活性化システムを用いた組換えタンパク質生産の概念検証として、E1AB1-XA3 株において、主要なネイティブセルラーゼ *cbh1* を *T. reesei* の内因性分泌酵素をコードする GOI に置換しました。内因性酵素のモデル組換えタンパク質として、アスパラギン酸プロテアーゼ PEP1 (gene ID: tre74156)³⁶ とグルコアミラーゼ GLA1 (gene ID: tre1885)³⁷ を選択した。これらの遺伝子の相同組換えを E1AB1-XA3 株の *cbh1* ゲノム遺伝子座で行い、グルコースを炭素源としてタンパク質生産を試験した。

pep1 および *gla1* を保有する E1AB1-XA3 株をグルコース培地で培養したところ、親株の E1AB1-XA3 株と比較して、分泌タンパク質の総量に大きな変化は見られなかった（図 3-2a）。しかし、組換え E1AB1-XA3 株では、CBH1 タンパク質の消失（図 2b、Open

arrothead)、PEP1 および GLA1 タンパク質に対応する明確なバンドパターンの出現 (図 2b、Closed arrothead) がそれぞれ観察された。このように、主要なネイティブ CBH1 タンパク質の分泌発現を欠く誘導物質フリーの *T. reesei* E1AB1-XA3 系組換え株は、グルコース培地においても強力な *cbh1* プロモーターを用いた内在性酵素の組換えタンパク質生産が可能であることが示された。

3-2-2 *T. reesei*における3種類のナノボディの異種タンパク質の誘導物質フリー分泌産生

異種タンパク質の分泌生産に対する誘導物質フリー発現システムの適用性をさらに実証するため、生産モデルとして3つのナノボディを選択した (図 3-3a)。1つ目は、PDB ID が 1ZVH として登録されている1価の抗リゾチームナノボディである^{38,39}。2つ目は2価のナノボディであるカプラシズマブで、後天性血栓性血小板減少性紫斑病 (aTTP) の治療薬として承認されている、トリアニンリンカーを介して結合した抗 von Willebrand 因子 (vWF) の VHH をタンデムに繰り返すものである^{40,41}。3つ目は、3価の二重特異性ナノボディであるオゾラリズマブで、抗ヒト血清アルブミン (HSA) 用の VHH フラグメントの両脇に抗腫瘍壊死因子 α (TNF- α) 用の2つの VHH フラグメントを Gly-Ser リンカーを介して連結し、関節リウマチの治療のための生物製剤として承認されたものである⁴²。これらのナノボディは、柔軟なリンカーによって複数の VHH フラグメントが連結された2価および3価のタンパク質を含み、*T. reesei*における1価のナノボディと比較して、タンパク質の生成および分解のレベルの違いを検証するために選択した。

さらに、各ナノボディについて、3つの異なる形態の分泌タンパク質の発現をテストした。1つ目は、CBH2 の分泌シグナルペプチドを付与する、最も一般的な戦略である (図 3-3a、S)⁴³。2つ目は、CBH2 のセルロース結合ドメイン (CBD) とリンカーをキャリアポリペプチドとして分泌シグナル配列と融合させるもの (図 3-3a、SC) で、これは糸状菌の異種タンパク質の分泌性を向上させる戦略として報告されている⁴⁴。3つ目は、上記の方法を少し改良したもので、融合したキャリアポリペプチド (分泌シグナルを含む) を内在性プロテアーゼで切断する方法である⁴⁴。本研究では、CBD とナノボディの間に KEX2 プロテアーゼ (RDKR; KEX2 リンカー) の切断部位を挿入し、ゴルジ体で切断されるように設計した (図 3-3a、SCK)。各ナノボディの発現コンストラクトは、C 末端にヒスチジンタグ (His-tag) 配列を付加するように設計し、E1AB1-XA3 株で *cbh1* 遺伝子座への相同組換えを実施した。

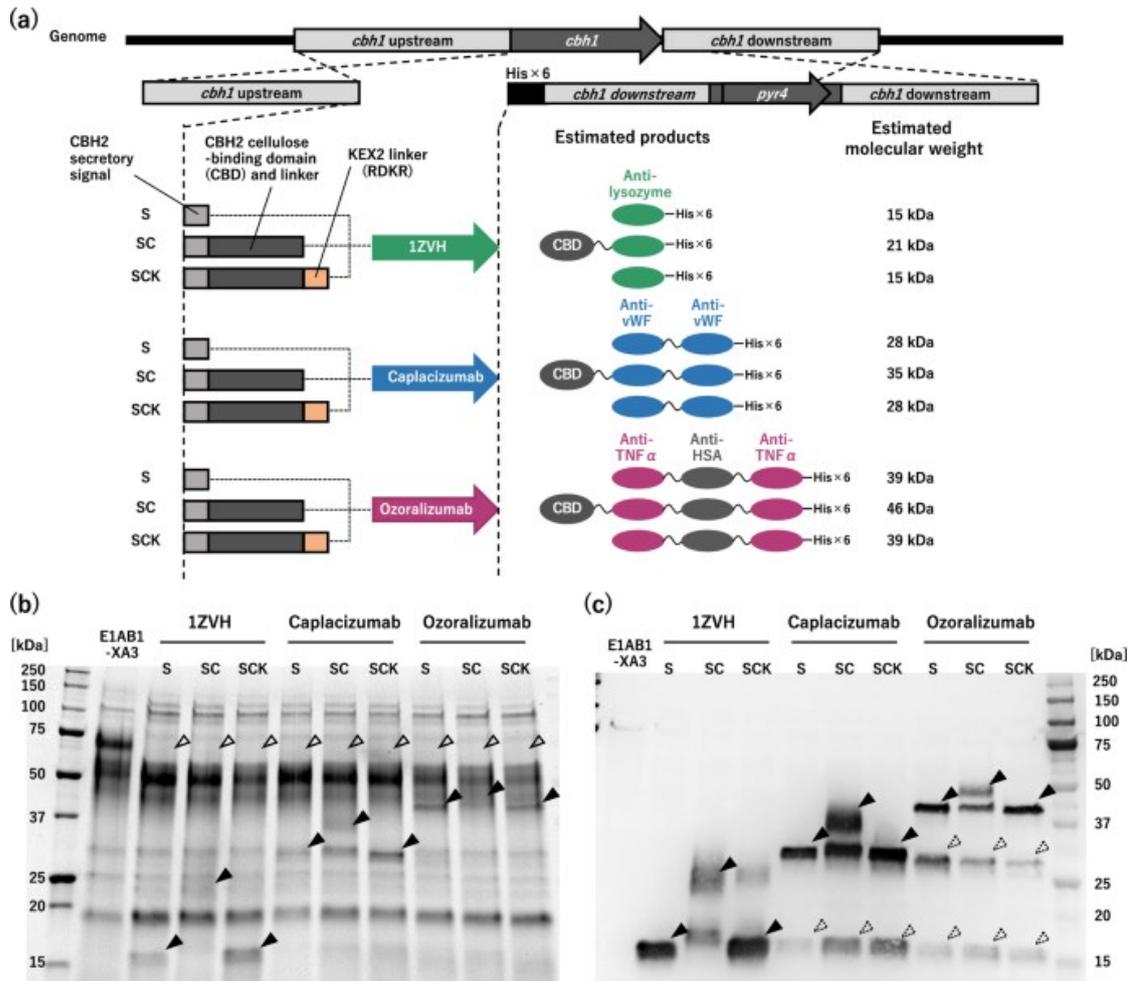


図 3-3 *cbh1* の単一置換による 3 つの発現パターンによる誘導物質フリーナノボディ生産

(a) ナノボディ発現カセットの構成図。各ナノボディは、CBH2 の分泌シグナルペプチド(S)、分泌シグナルペプチドとセルロース結合ドメイン(CBD)(SC)、CBD とナノボディの間の KEX2 プロテアーゼの切断部位を挿入した(SCK)。各ナノボディの C 末端には 6×His-tag 配列を付加した。E1AB1-XA3 株で *cbh1* 遺伝子座の相同組換えを実施した。*T. reesei* E1AB1-XA3 株および形質転換体は、3%グルコースを含む非誘導培地でフラスコ培養した。(b) 分泌タンパク質の SDS-PAGE 分析。培養 2 日後の上清を 3 倍希釈し 5 μ L でロードした。Open arrowhead は、CBH1 に対応する欠失されたタンパク質を示す。Closed arrowhead は、分子量から推定される目的ナノボディを示す。(c) 抗 His タグ抗体を用いたウエスタンブロット解析。Closed arrowhead は分子量から推定される目的ナノボディを示す。Dashed arrowhead は切断されたナノボディを示す。(d) 4 日目に培養上清に分泌されたナノボディの濃度。ナノボディの濃度は、精製ナノボディを検量線として用いたウエスタンブロットングにより決定した。エラーバーは標準偏差を示す。統計的有意性は、Student's *t*-test を用いて決定した。* $p < 0.05$.** $p < 0.01$

ナノボディの分泌産生について SDS-PAGE で確認したところ (図 3-2)、CBH1 タンパク質の消失 (Open arrowhead) とともに、すべての組換え株が各ナノボディとほぼ同じ分子量と推定される位置に新しいタンパク質バンドとして現れた (Closed arrowhead) (図 3-3b)。目的組換えタンパク質の発現をより確認するため、抗 His タグ抗体を用いたウェスタンブロット分析を行った (図 3-3c)。CBH2 分泌シグナルペプチド (S) の付加は、3つのナノボディの分泌産生いずれにおいても有効であることがわかった。一方、カプラシズマブとオゾラリズマブについては、複数の VHH をつなぐリンカー周辺で切断されたと思われる望ましくない (非標的) タンパク質バンドも一価または二価のサイズ位置に観察された (Dashed arrowhead) (図 3-3c, S)。CBH2 分泌シグナルと CBD キャリアポリペプチドを有するナノボディ (SC、KEX2 リンカーなし) の場合、正しい CBD-ナノボディ融合タンパク質が発現すると推定される位置にバンドが観察され (図 3c, SC, Closed arrowhead)、他のバンドもやや低い位置に観察された (SC, arrowhead なし)。しかし、これらの低い位置のバンドは、分泌シグナルを付加したナノボディのバンド (S, Closed arrowhead) とはわずかに異なる (高い) サイズを示しており、CBD キャリアポリペプチド (SC) が内在性のプロテアーゼによって CBH2 の CBD リンカーの途中で切断された可能性がある。一方、CBH2 分泌シグナルと CBD-キャリアポリペプチドを KEX2 リンカーとともに保有するナノボディ (SCK) は、CBH2 分泌シグナルを有するもの (S) と比較して、同様のバンドサイズと比較的高い生産性を示した (図 3-3c)。

いずれの発現コンストラクトを発現する誘導物質フリー株も、グルコース培地で培養した上清中の総分泌タンパク質量は有意に減少しなかった (図 3-4a)。ウェスタンブロットティングでナノボディを定量したところ、分泌シグナルのみ、CBD キャリアペプチド、CBD キャリアペプチド + KEX2 リンカー (SCK) を有するナノボディの分泌産生レベルは、1ZVH、カプラシズマブ、オゾラリズマブの分泌シグナル配列 (S) を有するものと比較して、それぞれ 3.85 倍 (図 3-4b-i)、3.14 倍 (図 3-4b -ii)、1.79 倍 (図 3-4b -iii) 高いことが確認された。

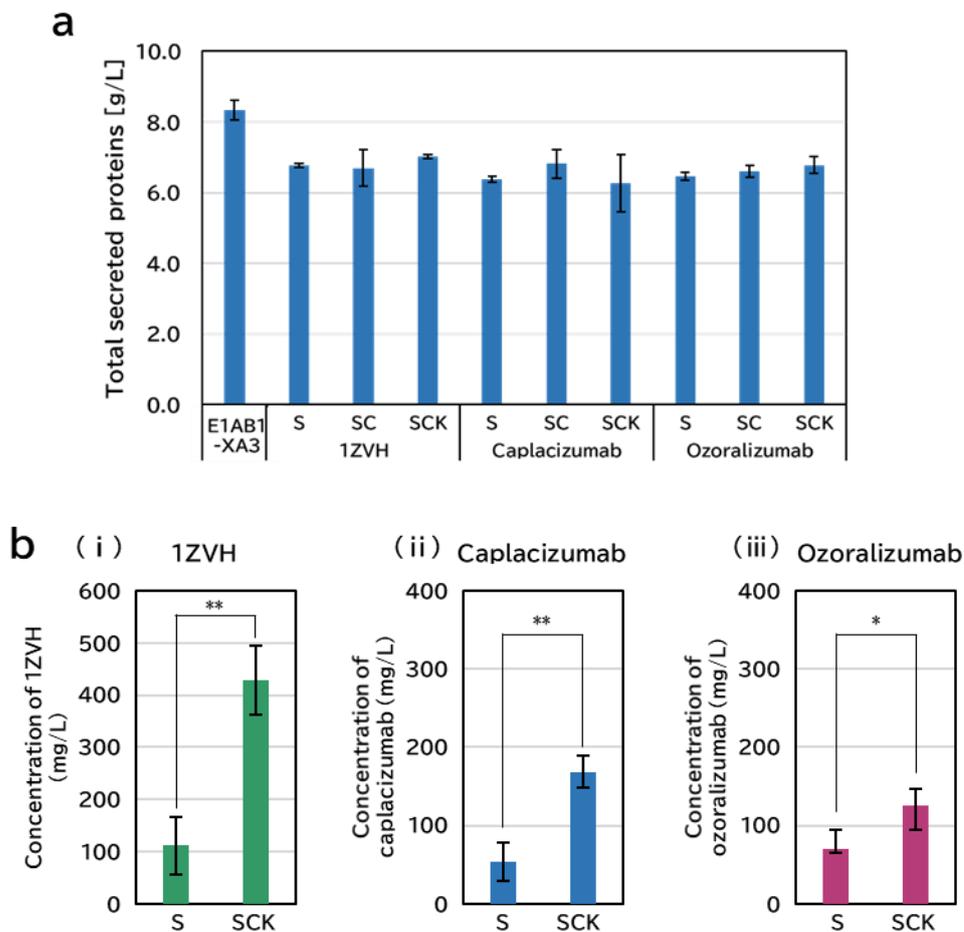


図 3-4 *cbh1* の単一置換による 3 つの発現パターンによる誘導物質フリーナノボディ生産性

T. reesei E1AB1-XA3 株および形質転換体は、3%グルコースを含む非誘導培地でフラスコ培養した。(a) 上清中の総タンパク質濃度 (b) 4 日目に培養上清に分泌されたナノボディの濃度。ナノボディの濃度は、精製ナノボディを検量線として用いたウェスタンブロットングにより決定した。エラーバーは標準偏差を示す。統計的有意性は、Student's *t*-test を用いて決定した。* $p < 0.05$.** $p < 0.01$

これらの結果から、*T. reesei* の誘導物質フリー転写活性化システム³⁴ を利用し、ゲノム中の *cbh1* を GOI に置換することで、グルコースを炭素源とした培養で異種組換えタンパク質の分泌産生が可能であることが示された。さらに、CBD キャリアポリペプチドと KEX2 リンカーを CBH2 分泌シグナル配列とともに使用⁴⁴ することで、誘導物質フリー E1AB1-XA3 株における異種組換えタンパク質 (ナノボディ) の生産レベルを向上させることに成功した。

3-2-3 プロテアーゼ阻害剤を添加したナノボディの生産

組換えタンパク質の分泌生産において、抗体を含む組換えタンパク質の細胞外プロテアーゼによる分解は、しばしば起こりうる問題である⁴⁵。実際、2 価および 3 価のナノボディの分泌生産では、分解産物と推定されるバンドが検出された (図 2-3c)。そこで、プロテアーゼ分解を阻害する可能性を検討するため、セリンおよびシステインプロテアーゼ阻害剤カクテルがナノボディの分解に及ぼす影響を評価した。生産性が最も高かった SCK ポリペプチドを用いた発現パターン (図 2-4b) を採用し、3%グルコースを炭素源とする誘導物質フリー系に EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) を加えて培養を行った。

3 種類のナノボディを生産する全ての菌株は、プロテアーゼ阻害剤の添加により、上清中の全分泌タンパク質の量がほとんど減少しなかった (図 3-5)。

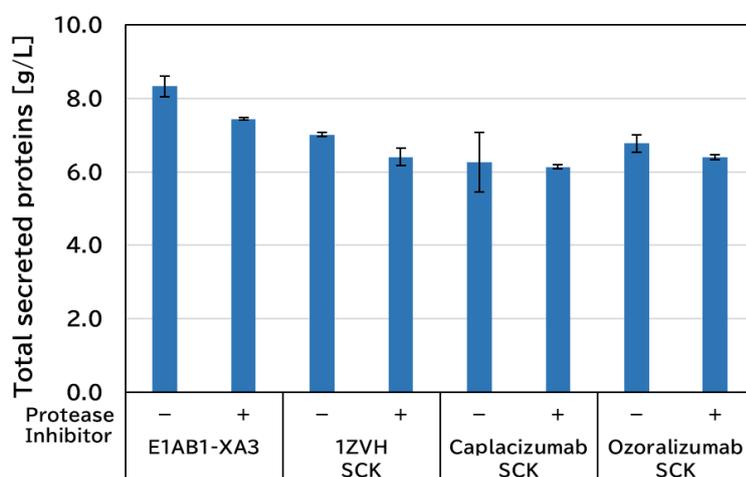


図 3-5 プロテアーゼ阻害剤添加(+)/無(-)条件下での総分泌タンパク質量

T. reesei E1AB1-XA3 株ベースの形質転換体を、3%グルコースを含む非誘導性培地で(+)/(-)プロテアーゼ阻害剤カクテルを用いてフラスコ培養した。培養 4 日後の総分泌タンパク質濃度を示した。

続いて、His タグ付きタンパク質のウェスタンブロット解析を実施した結果を示す。

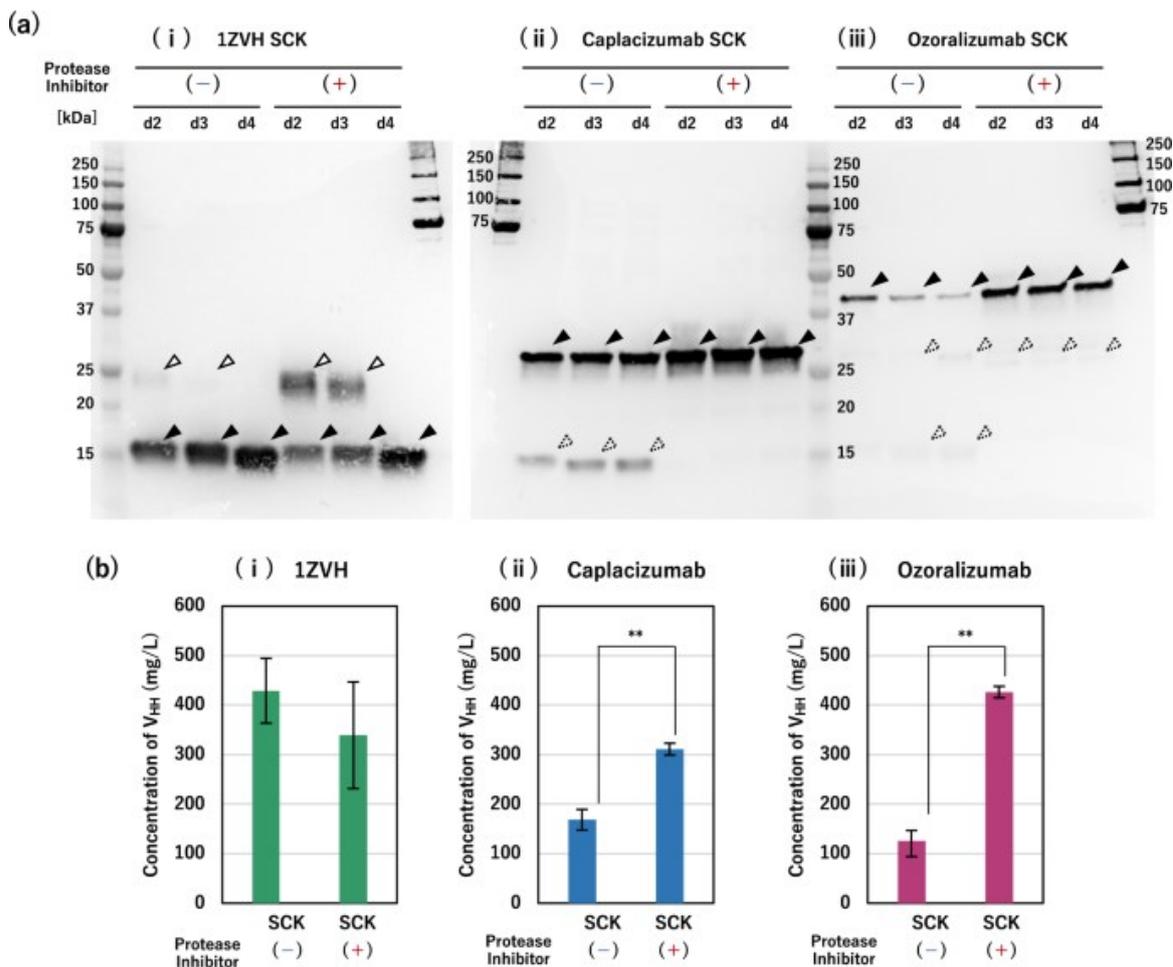


図 3-6 プロテアーゼ阻害剤を添加したナノボディの生産

T. reesei E1AB1-XA3 株ベースの形質転換体は、3%グルコースを含む非誘導培地で、プロテアーゼ阻害剤カクテルを添加(+)/無添加(-)の培養を実施した。(a) 8 倍希釈上清 5 μ L をロードした SDS-PAGE ゲルに対する抗 His タグ抗体によるウェスタンブロット分析。Closed arrowhead は、分子量から推定されるターゲットナノボディを示す。Open arrowhead は、CBD-1ZVH 融合タンパク質に対応する、KEX2 リンカーで切断されていないタンパク質を示す。Dashed arrowhead は切断されたナノボディを示す。(b) 4 日目に培養上清に分泌されたナノボディ濃度。ナノボディ濃度は、精製ナノボディを検量線として用いたウェスタンブロットングにより決定した。エラーバーは標準偏差を示す。統計的有意性は、Student's *t*-test によって決定した。* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$

一価の 1ZVH の生産 (図 3-6a-i) について、プロテアーゼ阻害剤を添加した条件と添加しない条件の両方で、培養日数とともに標的バンド (Closed arrowhead) の強度が徐々に増加した。一方、プロテアーゼ阻害剤を添加した培養では、2 日目と 3 日目に分子量の大きい明確なバンド (Open arrowhead) が観察された (図 3-6a-i, +)。また、阻害剤を添加しない条件では、2 日目または 3 日目に、少量ではあるが同じ大きさのバンドが観察された (図 3-6a-i, -)。これらの高い分子量のバンドは、KEX2 リンカーで切断されていない CBD-1ZVH

融合タンパク質であると推定された。

これを確認するために、セルロースへの吸着試験を実施した。精製タンパク質をセルロースに吸着させたところ、1ZVH と推定される低分子量バンドは残り、CBD-1ZVH と推定される高分子量バンドは消失した（図 3-7）。

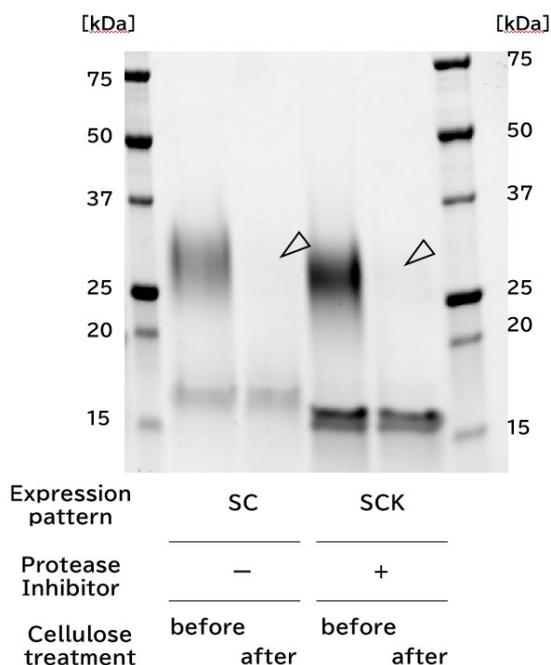


図 3-7 1ZVH-CBD 融合タンパク質のセルロース吸着試験

SC(プロテアーゼ阻害剤なし)および SCK(プロテアーゼ阻害剤あり)パターンで発現させた 1ZVH の 2 日目上清から、Ni-NTA ビーズを用いて His タグ付きタンパク質を精製した。遠心分離した上清をセルロースへの吸着処理(10wt%微結晶セルロース添加、混合、室温で 10 分間静置)したものと、未処理の精製サンプルを SDS-PAGE に供した。Open arrowhead は吸着したタンパク質を示し、1ZVH-CBD 融合タンパク質に相当すると考えられた。

このことから、高分子量バンドは CBD を含み、まだ KEX2 プロテアーゼで切断されていない CBD-1ZVH 融合タンパク質であると考えられた。しかし、培養 4 日後、阻害剤添加条件、非添加条件どちらにおいても、高分子量バンドは完全に消失し、低分子量バンドのみが残存したことから、キャリアポリペプチド (CBD-KEX2 リンカー) が切断された 1ZVH となっていると考えられた (図 3-6a-i)。一価の 1ZVH の場合においては、KEX2 リンカーの切断不良が起き、プロテアーゼ阻害剤の添加によるタンパク質の生産性への好影響は見られなかった。

一方で、プロテアーゼ阻害剤の添加により、2 価のカプラシズマブ (図 3-6a-ii) および 3 価のオゾラリズマブ (図 3-6a-iii) の生産では、分解物 (Dashed arrowhead) のバンド強度が低下し、標的ナノボディのバンド強度が上昇することが確認された。特に、3 価のオゾラリズマブのターゲットバンド強度は、プロテアーゼ阻害剤非存在下では培養した日数に応じて減少したが、阻害剤存在下では維持された (図 3-6a-iii)。また、KEX2 部位での切断不良に起因す

る CBD 融合タンパク質のバンドは検出されなかった (図 3-6a-ii, iii)。生産されたナノボディの定量を行ったところ、プロテアーゼ阻害剤非添加条件と比較して、カプラシズマブおよびオゾラシズマブの生成量がそれぞれ 1.85 倍 (図 3-6b-ii) および 3.38 倍 (図 3-6b-iii) 増加した。

以上のように、ナノボディの製造におけるプロテアーゼ活性の阻害は、特に柔軟なリンカーで連結された 2 価と 3 価の形態において、製品の生産性と品質の両方を向上させるという点で重要であることが示された。一方、1ZVH の製造では、KEX2 プロテアーゼによる CBD キャリアポリペプチドの切断が、標的タンパク質の配列やサイズに依存する可能性が示された。

3-2-4 *T.reesei*で生産したナノボディの基質結合能力の確認

プロテアーゼ阻害剤で培養した 4 日目の培養上清から、nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) を用いて His タグ付きナノボディを精製した。SDS-PAGE による解析の結果、精製されたナノボディは、所望の大きさのほぼ単一バンドとして確認できた (図 3-8a)。

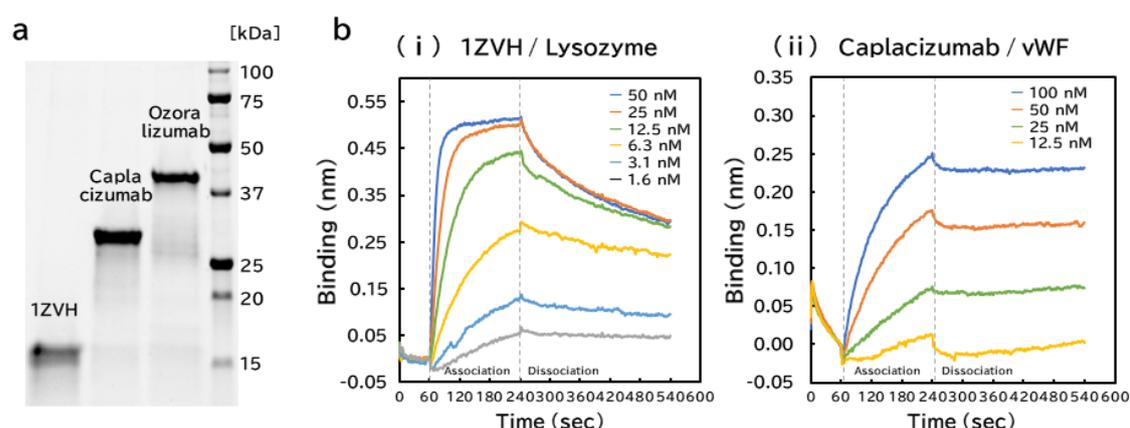


図 3-8 精製ナノボディの抗原との結合乖離曲線

(a) Ni-NTA ビーズを用いて精製した His タグ付きナノボディを示す。精製には培養 4 日目のプロテアーゼ阻害剤添加培養上清を用いた。(b) 1ZVH/lysozyme およびカプラシズマブ/vWF のカインेटクス解析。His-tag を介して結合したナノボディと様々な濃度の抗原をセンサーに反応させ、結合・解離速度を測定した。

次に、Bio-Layer Interferometry⁴⁶ に基づく BLItz システム (ForteBio) を用いて、各対応抗原に対する結合親和性を評価した。3 価のオゾラシズマブの場合、His タグを介してセンサーに固定化できるオゾラシズマブ (38 kDa)⁴² に比べて TNF- α 抗原は 17 kDa⁴⁷ と小さく、BLItz を用いて抗原結合解離シグナルを正確に解析することは困難であると考えられた。そこで、1ZVH/リゾチーム、カプラシズマブ/vWF に対する結合親和性をそれぞれ評価した。1ZVH については、結合/解離速度論から算出した抗体-抗原の平衡解離定数は $K_D=1.5\text{nM}$ (図 3-8b-i) であり、これは適切な値であると考えられた^{38,39}。カプラシズマブについては、抗

原の結合曲線は得られたものの、解離はほとんど観察されず（図 3-8b-ii）、 K_D 値は算出できなかった。この結果は、カプラシズマブの平衡解離定数が極めて小さい ($K_D=3.76$ pM) ことを反映しており、過去の報告からも一致する⁴¹。以上から、*T. reesei* で生産されたカプラシズマブの正確な K_D 値を導くことはできなかったものの、本研究で生産されたナノボディ（少なくとも 1ZVH とカプラシズマブ）は抗原への結合能を有することが確認できた。

3-2-5 *cbh1* 及び *cbh2* のカプラシズマブへの二重置換による高生産性と高占有率化

ナノボディの生産性をさらに高めるために、*cbh1* だけでなく *cbh2* を GOI に置換することを試みた。CBH2 は CBH1 に次いで 2 番目に支配的なネイティブ分泌タンパク質であるため、誘導物質フリー株で *cbh2* を GOI へとさらに置換すると、POI の生産量が増加するだけでなく、全分泌タンパク質におけるその占有率も増加すると考えられた。この仮説を検証するために、ターゲットナノボディとしてカプラシズマブを選択し、その二重置換株を構築した。*cbh1* プロモーターの制御下で SCK ポリペプチドを持つカプラシズマブを生産する誘導物質フリー E1AB1-XA3 株を親として、さらにカプラシズマブをコードする同じ遺伝子と SCK ポリペプチドを相同組換えして *cbh2* と置換する株を構築した。コントロールとして、誘導にセルロースを炭素源として必要とする E1AB1 株にも同様の組換えを実施した。

従来の E1AB1 株を用いたセルロース誘導生産では、*cbh1* および *cbh2* の二重置換により、総分泌タンパク質の生産性が著しく低下した（図 3-9a）。これは、CBH1 および/または CBH2 の欠損に伴い、主要なセルラーゼの生産量が著しく低下し、セルロースの分解・利用能力が大きく低下していることを示唆している。一方、E1AB1-XA3 株を親株とする誘導物質フリー生産では、CBH1 および CBH2 の両方を欠損させても、総分泌タンパク質の生産性の著しい低下は見られなかった（図 3-9a）。SDS-PAGE 解析の結果、E1AB1 株は、*cbh1* および *cbh2* の両方を置換（Open arrowhead）した場合、E1AB1-XA3 株（Closed arrowhead）に比べてカプラシズマブの生産量が著しく減少した（図 3-9b、2 日培養後）。

ウェスタンブロット分析で定量されたカプラシズマブの量も、培養 2 日目、4 日目ともに、*cbh1* と *cbh2* の二重置換を行った E1AB1-XA3 ベースの誘導物質フリー株が最も多かった（図 3-9c）。特に 2 日目には、グルコース培地で培養した E1AB1-XA3 二重置換の誘導物質フリー株が、セルロースの誘導培地で培養した E1AB1 二重置換株よりも有意に高い生産性を示した（図 3-9c-i）。4 日目には、プロテアーゼ阻害剤非存在下および存在下の条件で、E1AB1-XA3 二重置換株は E1AB1-XA3 の *cbh1* 単一置換株に比べてそれぞれ 1.76 倍（296 mg/L）および 1.63 倍（508 mg/L）のカプラシズマブ生産性を示した（図 3-9c-ii）。

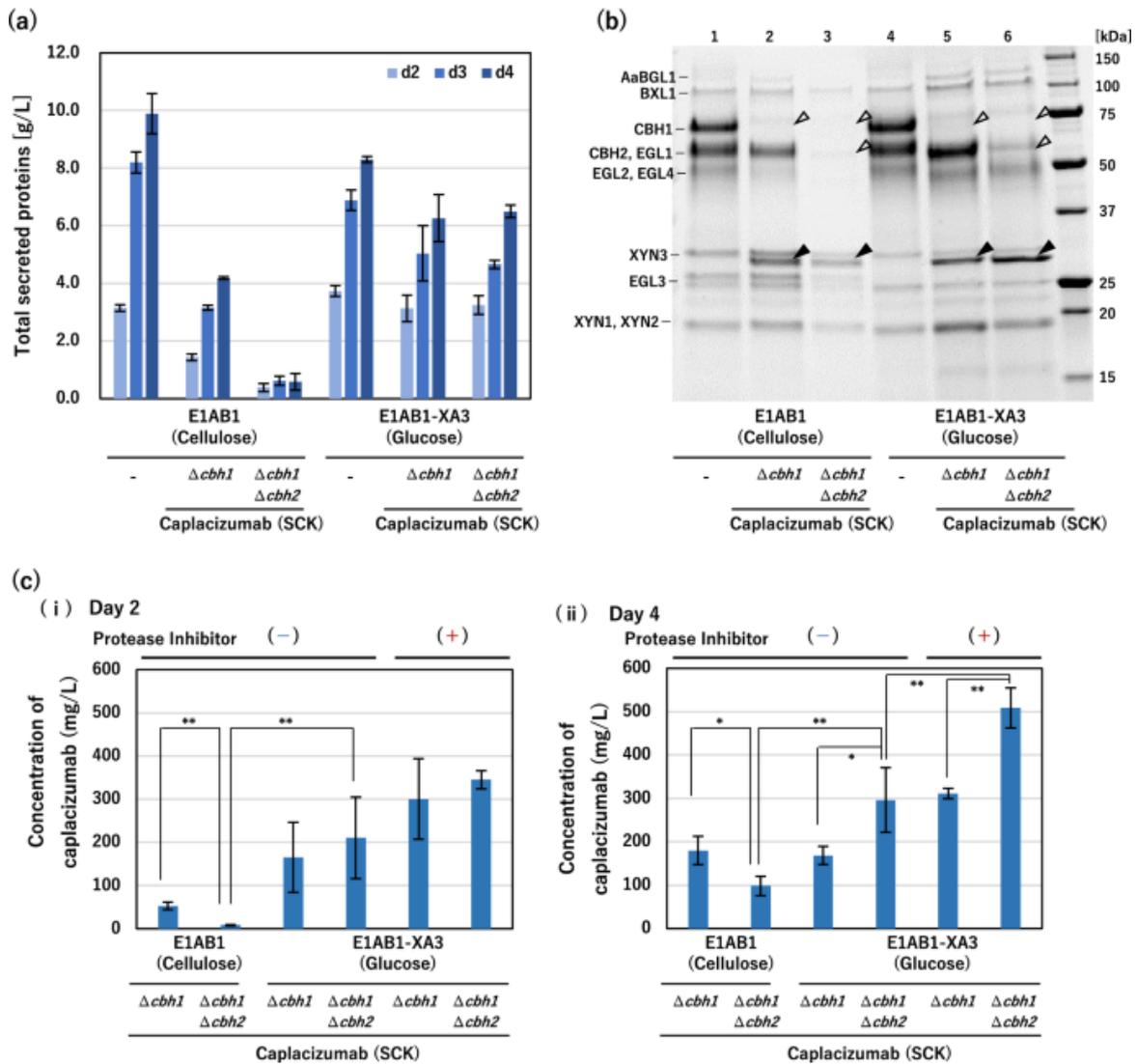


図 3-9 *cbh1* 及び *cbh2* のカプラシズマブへの二重置換による高生産性と高占有率化

T. reesei E1AB1 株および E1AB1-XA3 株を親株として、CBD-キャリアポリペプチドと KEX2 リンカー (SCK) パターンを適用したカプラシズマブ発現カセットによる *cbh1* の単一置換および *cbh1*, *cbh2* の二重置換を実施した。E1AB1 株および形質転換体は 3%セルロースを含む誘導培地でフラスコ培養し、*T. reesei* E1AB1-XA3 株ベースの形質転換体は 3%グルコースを含む非誘導培地でフラスコで培養した。(a) 2、3、4 日培養後の総分泌タンパク質生産量。(b) 2 日培養後の上清を 4 倍希釈し 5 μ L でロードした分泌タンパク質の SDS-PAGE 分析。Open arrowhead は、CBH1 および CBH2 に対応する欠失タンパク質を示す。Closed arrowhead はカプラシズマブを示す。(c) 2 日目と 4 日目に培養上清に分泌されたカプラシズマブの濃度を示す。カプラシズマブの濃度は、精製したカプラシズマブを検量線として用いたウェスタンブロットティングにより決定した。エラーバーは標準偏差を示す。統計的有意性は、Student's *t*-test を使用して決定した。
* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$

表 3-1 に、SDS-PAGE の結果から算出した上清中の分泌タンパク質の相対比率を示す。

表 3-1 SDS-PAGE を用いて分析した分泌タンパク質の組成 (day2)

	E1AB1			E1AB1-XA3		
	-	Δ CBH1 Caplacizumab	Δ CBH1 Δ CBH2 Caplacizumab	-	Δ CBH1 Caplacizumab	Δ CBH1 Δ CBH2 Caplacizumab
AaBGL1	1.6	1.0	0.6	0.6	0.4	2.0
BXL1	4.5	3.6	4.9	2.0	4.5	5.7
CBH1	26.9	0.0	0.0	31.2	0.0	0.0
CBH2 + EGL1	26.6	24.0	2.5	29.0	34.4	9.8
EGL2 + EGL4	17.7	9.5	1.9	19.6	20.0	26.0
XYN3	4.3	7.8	9.8	2.1	2.0	3.1
Caplacizumab	0.0	12.2	23.2	0.2	9.4	21.1
EGL3	6.3	10.9	17.2	3.2	3.2	5.6
XYN1 + XYN2	5.0	9.1	13.2	4.3	11.9	11.0
others	7.1	21.8	26.7	7.9	14.2	15.6
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

E1AB1 系列の誘導生産、E1AB1-XA3 系列の非誘導生産ともに、*cbh1* と *cbh2* の置換により、目的タンパク質であるカプラシズマブの相対含有量が分泌タンパク質全体の約 20%まで増加した (表 3-1)。ただし E1AB1 系列は E1AB1-XA3 系列に比べ分泌タンパク質総量が大幅に少なかったため、カプラシズマブの生産量として低い (図 3-9a, b)。また、以前の報告³¹と同様に、CBH1 および CBH2 を欠失させると、他のネイティブエンドグルカナーゼおよびキシラナーゼの比率が増加した (図 3-9b, 表 3-1)。

以上から、E1AB1-XA3 ベースの誘導物質フリー株における改良点と結果をまとめる。カプラシズマブの生産性はプロテアーゼ阻害剤非存在下での *cbh1* の単一置換および CBH2 分泌シグナル配列 (S) の使用時の 53.6 mg/L (図 3-4b-ii) と比較し、*cbh1* および *cbh2* を標的ナノボディ遺伝子に二重置換し、SCK ポリペプチド (CBH2 分泌シグナルおよび CBD-キャリアポリペプチドと KEX2 リンカー) を使用しプロテアーゼ阻害剤を添加することにより、508 mg/L (図 3-9c-ii) と 9.49 倍にまで増加させることに成功した。

3-3 考察と討論

本研究では、第2章で示した *T. reesei* の誘導物質フリーでのセルラーゼ・ヘミセルラーゼ発現系³⁴を組換えタンパク質生産に適用した。このシステムは、タンパク質生産にセルロースの分解物である誘導物質を必要としないため、安価で使いやすい糖であるグルコースを唯一の炭素源としながら、POI 生産に強力なセルラーゼ発現プロモーターを用いて組換えタンパク質を生産することが可能となった。さらに、誘導物質フリーシステムにより、主要なセルラーゼをコードする複数のゲノム遺伝子を削除し、GOIに置換することが可能となり(本研究では二重置換を実証)、組換え POI の生産性と分泌タンパク質全体におけるその占有率 (%) を高めることに成功した。このように、本アプローチは、上記のようなトリコデルマを用いた組換えタンパク質生産における最大の問題点である、グルコース培地における目的の組換えタンパク質の生産性を高

めつつ、多量のネイティブセルラーゼの混入を低減するという 2 点を同時に解決できる可能性がある。

従来（非誘導物質フリー）系では、セルロースからの糖の遊離（主にセロビオースなどの二糖類）が細胞増殖やセルラーゼ遺伝子のアップレギュレーションの誘導因子となるため、主要セルラーゼの破壊（置換）に伴うセルロース分解性の低下により POI 生産性が低下する（図 3-9c-i, ii）。一方、本誘導物質フリー系では、グルコースを炭素源として組換え POI の生産を促進できるため、培養初期（2 日目、図 3-9c-i）から、*cbh1* および *cbh2* 二重置換株の POI 生産性は高く、細胞増殖への悪影響も回避できる結果となった（data not shown）。第 2 章の図 2-5b で示したように、グルコース（本研究で使用した仕込み 3%）は培養 3 日目までに枯渇したため、バッチ培養の後期（4 日目、図 3-9c-ii）ではタンパク質生産活性が低下している可能性がある。今後、グルコースを供給し続ける流加培養と組み合わせることで、誘導物質フリー-E1AB1-XA3 株系列がさらに高い組換えタンパク質の生産レベルを示すことが期待される。

本研究で示されたように、我々の誘導物質フリーシステムは、糖化酵素以外の酵素や異種ナノボディなど、様々なタンパク質の生産に応用することができる。様々な微生物を宿主としたナノボディの生産が注目されているが、数百 mg/L 以上の高生産量の報告は比較的少ない⁴⁸。糸状菌、特に *Aspergillus oryzae* や *Aspergillus awamori* はナノボディ生産の宿主として注目されているが、数十 mg/L と比較的低い収率にとどまっている⁴⁸。また、*T. reesei* を宿主とした例では、フラスコ培養で CBH1-キャリアポリペプチドを融合させ、150 mg/L のマウス Fab 抗体フラグメントを生産したという報告がある⁴⁹。最近、*T. reesei* で SARS-CoV-2 中和ナノボディの生産が報告されたが、収量も 47.4 mg/L にとどまっていた⁵⁰。一方、本研究では、誘導物質フリー株がフラスコ培養でナノボディの高い生産性を示し（カプラシズマブで 500 mg/L 以上、1ZVH と ozoralizumab で 400 mg/L 以上、図 3-6b, 図 3-9c）、*T. reesei* がナノボディ生産の有望な宿主となり得ることを示している。

CBD キャリアポリペプチドと KEX2 リンカーを分泌シグナルとともに融合させる戦略も、ナノボディ産生に有効であった（図 3-3）。一方、2 価のカプラシズマブと 3 価のオゾラリズマブの分泌産生では、1 価の 1ZVH では見られなかった His タグ付きタンパク質の分解産物と思われるバンドが認められた（図 3-3c）。分解産物と思われるバンドは、1 価および 2 価のナノボディとほぼ同じ位置に現れたことから、VHH 断片を連結する柔軟なリンカー（カプラシズマブはトリアラニン（AAA）リンカー、オゾラリズマブは Gly-Ser リンカー（GGGGSGGGG）をそれぞれ使用）の周辺で切断が起こっていることが推測される。プロテアーゼ阻害剤を添加することで、これらの分解物を大幅に減少させ（図 3-6a）、目的のナノボディの生産性を高めることができた（図 3-6b）。今後、ナノボディの結合活性や生産性を保持しつつ、プロテアーゼによって切断されないリンカー配列を設計することが重要であると考えられた。

1ZVH では、予想外にも、KEX2 リンカーで切断されていないと思われる CBD-VHH 融合タンパク質がプロテアーゼ阻害剤存在下で観察された（2 日目と 3 日目、図 3-6a, 図 3-7）。この結果は、プロテアーゼ阻害剤が KEX2 リンカーの切断に直接または間接的に作用した可能性を示唆している。直接的な作用としては、プロテアーゼ阻害剤が細胞内に侵入し、一般的にゴルジ装置で切断される KEX2 リンカーの切断過程を阻害することが必要である⁵¹。間接的な影

響としては、泌タンパク質の総量に変化はなかったものの、プロテアーゼ阻害剤の添加によって実施された細胞増殖の遅延(data not shown) が、分切断効率に影響を与えた可能性がある。今後、ナノボディの分解産物の生成に重要な役割を果たすプロテアーゼを同定し、阻害剤を使用する代わりに遺伝子工学によって削除することが重要であると考えられる。*T. reesei* を宿主としたインターフェロン α -2b (IFN α -2b) の生産では、障害となるプロテアーゼを特定し、プロテアーゼを破壊することで高レベルの IFN α -2b 生産が達成された⁴⁵。さらに最近、*T. reesei* の効率的なゲノム編集システムを用いて、反復的な遺伝子欠失法が開発され、11 個の遺伝子を欠失させることにより、細胞外プロテアーゼと本来のセルラーゼ/ヘミセルラーゼの分泌量が低い株の構築に成功した研究報告がある²⁵。特定の有害なプロテアーゼ遺伝子の欠失とともに、セルラーゼ/ヘミセルラーゼ、*cbh1*、*cbh2* の内因性遺伝子の多重置換(欠失)により、誘導物質フリー *T. reesei* 株は組換えタンパク質生産に有望なプラットフォームとなることが期待される。

真核細胞で生産される生物製剤では、しばしばグリコシル化が問題となることがある。糖組成が多様で大きく複雑な構造を持つため、特に注意すべきは N-結合型グリコシル化の潜在的コンセンサス配列(NXS/T)であるが、本研究で用いた CBD-リンカーとナノボディの配列には存在しなかった(後述の表 3-4)。一方、比較的単純な構造を持つ O-結合型オリゴ糖は、任意のセリンまたはスレオニン残基で修飾できる可能性があるため、本研究で生産したナノボディに付与されていた可能性がある。診断薬ではなく医薬品として製造を検討する段階では、O-結合型糖鎖の有無や修飾位置を特定し、薬理効果や抗原性に与える影響を詳細に検討する必要がある。本研究では、O-結合型糖鎖修飾の解析は行っていないが、*T. reesei* で生産された少なくとも 1ZVH とカプラシズマブが、対応する各抗原に対して結合能を有することを確認した(図 3-8)。

我々の誘導物質フリーシステムでは、いくつかの転写抑制因子($\Delta ace1$ および $\Delta rce1$)の欠失に加えて、セルラーゼおよびヘミセルラーゼ遺伝子の 2 つの転写活性化因子を共発現させている³⁴。*Aspergillus niger* XlnR のホモログである XYR1 はセルラーゼおよびヘミセルラーゼ遺伝子のマスターレギュレーターであり、その変異体(XYR1^{V821F} および XYR1^{A824V})は *T. reesei* において CRE1 依存性の CCR から一部開放することが知られている^{52,53,54}。しかし、グルコース存在下で、変異型 XYR1(本研究では XYR1^{V821F} を使用)を発現させると、強いキシラナーゼ発現を誘導するが、セルラーゼ誘導には限られた効果しか得られなかった^{34,53,54}。そこで、セルラーゼ/ヘミセルラーゼのポジティブレギュレーターとしても知られ、XYR1 とヘテロ二量体を形成することが示唆されている ACE3 の共発現が、*T. reesei* のセルラーゼ発現を強く誘導することを見出した(部分切断 ACE3 はさらに強い誘導を示した)³⁴。ACE3 はトリコデルマ属に特異的な転写因子であるため、これは属特異的な戦略である⁵⁵。しかし、セルラーゼ誘導のメカニズムが類似する他の糸状菌に対しても同様の戦略を確立することが可能かもしれない。

トリコデルマ属は、過去数十年にわたり、セルラーゼとヘミセルラーゼのカクテルなど、酵素の生産に商業規模で使用されてきた⁵⁶。バイオリファイナリーのための酵素生産にはまだ大きなコストがかかるが、リグノセルロース系バイオリファイナリーでは、オンサイトで統合的に酵素を製造するような費用対効果の高い戦略が検討されている^{56,57}。特に、一次炭素源の選択は、酵素

製造の総コストの 50%以上を占める^{34,58}。したがって、グルコースを唯一の炭素源とする我々の誘導物質フリーシステムは、*T. reesei*における費用対効果の高い組換えタンパク質生産に貢献する可能性がある。*T. reesei*を用いた酵素生産の有用性と蓄積された工業的知見に基づき、我々の誘導物質フリーシステムを用いた商業規模の組換えタンパク質生産は、将来的に経済的に実現可能であると考えられる。

3-4 材料と方法

菌株と培地

本研究で使用した *T. reesei* 株は、表 3-2 に記載した。

表 3-2 使用した菌株と遺伝子型

Strains	Description	Genotypes
PC-3-7 (ATCC 65589)	Need for induction, Hyper-secreting mutant	-
E1AB1	Need for induction, More released from CCR	<i>amdS+</i> , <i>ΔtubB::egl1p-aabgl1</i>
E1AB1-XA3	Inducer-free	E1AB1, <i>Δace1::act1p-xyr1(N821F)</i> , <i>Δrce1::act1p-ace3</i>
E1AB1-XA3ΔC1-Pep1	Inducer-free	E1AB1-XA3, <i>Δcbh1::cbh1p-pep1</i>
E1AB1-XA3ΔC1-Gla1	Inducer-free	E1AB1-XA3, <i>Δcbh1::cbh1p-gla1</i>
E1AB1-XA3ΔC1-1ZVH-S	Inducer-free	E1AB1-XA3, <i>Δcbh1::cbh1p-1zvhh (cbh2 SS)</i>
E1AB1-XA3ΔC1-1ZVH-SC	Inducer-free	E1AB1-XA3, <i>Δcbh1::cbh1p-1zvhh (cbh2 SS+CBD)</i>
E1AB1-XA3ΔC1-1ZVH-SCK	Inducer-free	E1AB1-XA3, <i>Δcbh1::cbh1p-1zvhh (cbh2 SS+CBD+Kex2 linker)</i>
E1AB1-XA3ΔC1-Cap-S	Inducer-free	E1AB1-XA3, <i>Δcbh1::cbh1p-caplacizumab (cbh2 SS)</i>
E1AB1-XA3ΔC1-Cap-SC	Inducer-free	E1AB1-XA3, <i>Δcbh1::cbh1p-caplacizumab (cbh2 SS+CBD)</i>
E1AB1-XA3ΔC1-Cap-SCK	Inducer-free	E1AB1-XA3, <i>Δcbh1::cbh1p-caplacizumab (cbh2 SS+CBD+Kex2 linker)</i>
E1AB1-XA3ΔC1-Ozo-S	Inducer-free	E1AB1-XA3, <i>Δcbh1::cbh1p-ozoralizumab (cbh2 SS)</i>
E1AB1-XA3ΔC1-Ozo-SC	Inducer-free	E1AB1-XA3, <i>Δcbh1::cbh1p-ozoralizumab (cbh2 SS+CBD)</i>
E1AB1-XA3ΔC1-Ozo-SCK	Inducer-free	E1AB1-XA3, <i>Δcbh1::cbh1p-ozoralizumab (cbh2 SS+CBD+Kex2 linker)</i>
E1AB1-XA3ΔC1ΔC2-Cap-SCK	Inducer-free	E1AB1-XA3ΔC1-Cap-SCK, <i>Δcbh2::cbh2p-caplacizumab (cbh2 SS+CBD+Kex2 linker)</i>
E1AB1ΔC1-Cap-SCK	Need for induction	E1AB1, <i>Δcbh1::cbh1p-caplacizumab (cbh2 SS+CBD+Kex2 linker)</i>
E1AB1ΔC1ΔC2-Cap-SCK	Need for induction	E1AB1ΔC1-Cap-SCK, <i>Δcbh2::cbh2p-caplacizumab (cbh2 SS+CBD+Kex2 linker)</i>

菌株はポテトデキストロース寒天(PDA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)プレート上で維持した。基礎培地は、0.14% (w/v) (NH₄)₂SO₄, 0.2% (w/v) KH₂PO₄, 0.03% (w/v) CaCl₂·2H₂O, 0.03% (w/v) MgSO₄·7H₂O, 0.1%(w/v) ポリペプトン、0.05%(w/v) 酵母エキス、0.1%(w/v) Tween 80、および 0.1%(w/v) 微量元素溶液、50 mM Na-酒石酸緩衝液(pH 4.0)である。微量元素溶液は、100mL の蒸留水に 6 mg の H₃BO₃、26 mg の(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O、100 mg の FeCl₃·6H₂O、40 mg の CuSO₄·5H₂O、8 mg の MnCl₂·4H₂O、200 mg の ZnCl₂ からなる。

遺伝子クローニングと発現カセットの構築

T. reesei 株 PC-3-7 のゲノム DNA から目的の遺伝子を増幅し、pUC118 (Takara Bio) を鋳型として逆ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) でベクター断片を増幅した。プライマーを用いてあらかじめ SwaI 切断部位を付加した増幅断片を、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech Laboratories) を用いて、メーカーのプロトコールに従ってライゲーションした。

クローニングホストとして *Escherichia coli* DH5a を用い、プラスミド DNA の精製には NucleoSpin®Plasmid miniprep kit (Takara Bio) を使用した。クローニングした遺伝子とプライマーの詳細は、表 3-3 に記載した。

表 3-3 クローニングに用いたプライマー

Plasmid	fragment		Forward Primer	Reverse Primer	Template
pUC-V001	pUC-118		-	-	-
pUC-V002	pUC-Tcbh1	1	CTAGAGTATTTAAATAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	TGCAGGTATTTAAATGGAGCCATACTGGCGGGAAC	Genome DNA
		2	ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	ATTTAAATACTCTAGAGGATCCCCGGGT	pUC-V001
pUC-V003	pUC-pyr4	1	CTAGAGTATTTAAATCAAACCGACCAAGGTAGGTA	TGCAGGTATTTAAATATCACATGTCAATGTCACAA	Genome DNA
		2	ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	ATTTAAATACTCTAGAGGATCCCCGGGT	pUC-V001
pUC-K004	pUC-Tr120830	1	CTAGAGTATTTAAATTTTCGCTTAGCGGTTCCAT	TGCAGGTATTTAAATTTAAATACTCGGCAGTCTCGTCAG	Genome DNA
		2	ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	ATTTAAATACTCTAGAGGATCCCCGGGT	pUC-V001
pUC-V005	pUC-Tcbh1-Tr120830-3'	1	CTAGAGTATTTAAATAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	AAGCGCGGCTACTTCTCGGTACGTTGTCATCGT	pUC-V002
		2	AAGTACCGCGCGCTTGACAA	TGCAGGTATTTAAATCTGAATGCCCGGTGGTAAGC	pUC-V004
pUC-V006	pUC-pyr4-Tr120830-3'	1	CTAGAGTATTTAAATCAAACCGACCAAGGTAGGTA	CCATCACATGTCAATGTCAC	pUC-V003
		2	ATTGACATGTGATGGAAGTACCGCGCTTGACAA	TGCAGGTATTTAAATTTGGTCTTGGTTGGAGGG	pUC-V004
pUC-V007	pUC-Tcbh1-Tr120830-3'-pyr4-Tr120830-3' (pyr4')	1	CTAGAGTATTTAAATAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	CTGAATGCCCGGTGGTAAGC	pUC-V005
		2	CCACCGGCATTGCAAGCAACCGACCAAGGTAGGTA	TGCAGGTATTTAAATTTGGTCTTGGTTGGAGGG	pUC-V006
pUC-V008	pUC-cbh1	1	CTAGAGTATTTAAATACTCGTATTGCGCCCTAAACC	TGCAGGTATTTAAATCAACACAGTTTCAGCCCTAG	Genome DNA
		2	ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	ATTTAAATACTCTAGAGGATCCCCGGGT	pUC-V001
pUC-V009	pUC-cbh2	1	CTAGAGTATTTAAATCTCCAGAAGTTACCCAACC	TGCAGGTATTTAAATGAAGGACCAAGAACCTCGC	Genome DNA
		2	ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	ATTTAAATACTCTAGAGGATCCCCGGGT	pUC-V001
pUC-V010	pUC-pep1	1	CTAGAGTATTTAAATATTGGCCATACGAGGCCTG	TGCAGGTATTTAAATCATAGCATGAGACGCTTCC	Genome DNA
		2	ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	ATTTAAATACTCTAGAGGATCCCCGGGT	pUC-V001
pUC-V011	pUC-gla1	1	CTAGAGTATTTAAATATCCTGCTCTCCAGCCAC	TGCAGGTATTTAAATAAGCGCTCTCATTGTCCAAC	Genome DNA
		2	ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT	ATTTAAATACTCTAGAGGATCCCCGGGT	pUC-V001

ナノボディ発現カセットは、CBD キャリアポリペプチドと KEX2 リンカーを有するナノボディ (図 3-3a, SCK) のアミノ酸配列 (表 3-4) に対応する人工遺伝子合成断片 (表 3-5) と表 3-6 に示すプライマー対による PCR 断片で構築した。分泌シグナルペプチド (図 3-3a, S) および CBD-キャリアポリペプチド (図 3-3a, SC) 付加の発現カセットは、CSK パターンの発現カセット (pUC-V014, pUC-V017, pUC-V020) をテンプレートとしてインバース PCR により構築した。

T. reeseiの形質転換

上記構築したプラスミドは、*T. reesei* の形質転換前に SwaI 制限酵素で線状化して使用した。形質転換は、Novozyme 234 (Novozymes Bagsværd, Denmark) の代わりに 20 mg/mL の Yatalase (タカラバイオ) を用いた改良プロトプラスト PEG 法⁶⁰ で実施した。形質転換されたプロトプラストは、最小形質転換培地[2.0% (w/v) グルコース, 18.27% (w/v) ソルビトール, 0.5% (w/v) (NH₄)₂SO₄, 0.2% (w/v) CaCl₂, 0.06% (w/v) MgSO₄, 0.21% (w/v) CsCl, 0.1% (w/v) 微量元素溶液及び 100mM KH₂PO₄ buffer (pH5.5)]にプレーティングした。微量元素溶液は、100 mL の蒸留水に 500 mg FeSO₄-7H₂O, 200 mg CoCl₂, 160 mg MnSO₄-H₂O, および 140 mg ZnSO₄-7H₂O を含む。30℃で 2 週間培養した後、形質転換体候補を選択プレート(ソルビトールを含まない各最小形質転換培地)上で 2 回、30℃で数日間ストリーキングし、シングルコロニーを分離した。その後、シングルコロニーを PDA プレートに移し、30℃で 1 週間、分生子を形成させた。製造元のプロトコルに従い、KOD One (東洋紡) を用いたコロニーPCR により、目的の形質転換体を確認した。再度形質転換するためには、得られた形質転換体を、0.2%(w/v)の 5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) 一水和物を含む PDA 培地を用いて再度 5-FOA 耐性を獲得した株 (相同組み換えによる *pyr4* ポップアウト株) を選抜して用いた。

BCA アッセイによるタンパク質濃度分析

タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準物質とする Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、製造元のマイクロプレートプロトコルに従って測定した。すべてのサンプルとスタンダードの吸光度は、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を用いて 562 nm で測定した。

タンパク質の組成分析(SDS-PAGE)

SDS-PAGE は、Any kD Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels (Bio-Rad Laboratories) を用いて、200 V で 30 分間実施した。ゲルを 5 分間活性化し、ChemiDoc MP イメージングシステム (Bio-Rad Laboratories) を使用して画像化した。Precision Plus Protein Unstained Standard (5 µL; Bio-Rad Laboratories) を分子量マーカーとして使用した。タンパク質バンドの分子量は、Image Lab ソフトウェア (Bio-Rad Laboratories) を用いて推定し、タンパク質バンドは、以前に報告されたセルラーゼおよびヘミセルラーゼに対応するバンドサイズをもとに注釈をつけた³⁵。

ウェスタンブロット分析

SDS-PAGE 後、Trans-Blot Turbo Mini PVDF Transfer Packs (Bio-Rad Laboratories) と Trans-Blot Turbo System (Bio-Rad) を用いて、タンパク質を PVDF 膜に転写した。HRP-conjugated Anti-6x-His Tag Monoclonal Antibody (3D5) (Thermo Fisher Scientific) を iBind Western System (Invitrogen) を用いて結させ、1-Step Ultra TMB-Blotting Solution (Thermo Fisher Scientific)

で His タグ付きタンパク質を検出した。

His タグ付きタンパク質の精製

pH9.0 に調整した培養上清 1.5 mL に Ni-NTA Agarose (FUJIFILM Wako Chemicals) 150 μ L を加え、4°C、30 分間ローターで混合した。500 g で 5 分間遠心分離した後、上清を除去し、Wash Buffer (20 mM imidazole、500 mM NaCl、20 mM Tris-HCl pH8.0) 500 μ L を添加した。ボルテックスで懸濁した後、500 g で 5 分間遠心分離を行い、上清を除去した。この洗浄を 2 回繰り返した後、50 μ L の Elution Buffer (300 mM imidazole、500 mM NaCl、20 mM Tris-HCl pH8.0) を加え、4°C、30 分間、ローターで混合した。500 g で 5 分間遠心した後、上清を新しいチューブに移し、His タグ付きタンパク質を得た。

培養上清中のナノボディ濃度の定量

培養上清中のナノボディ濃度は、適切に希釈した培養上清を用いたウェスタンブロットティングにより推定した。標準として、各 His タグ付き精製ナノボディの濃度を BCA アッセイ (上記参照) により定量し、バンド強度とナノボディ濃度の直線性の範囲内で定量を行った。

ナノボディと抗原のカイネティクス解析

カイネティクス解析には、Bio-Layer Interferometry を搭載した BLItz System (Fortebio) を使用した。センサーとして Anti-Penta-HIS (HIS1K) を選択し、PBS-T (0.1% Tween-20 を含むリン酸緩衝生理食塩水) 中に 10 分間浸漬して親水化した。次に、ナノボディを 100 mg/L に希釈し、希釈系列の抗原 (1ZVH: 鶏卵白由来のリゾチーム、Sigma-Aldrich、カプラシズマブ: Human von Willebrand Factor (vWF)、Haematologic Technologies) を調製した。測定は、開始 (サンプル希釈液バッファ、60 秒)、ロード (ナノボディ、90 秒)、ベースライン (サンプル希釈液バッファ、60 秒)、結合 (抗原、180 秒)、解離 (サンプル希釈液バッファ、300 秒) の方法を用いて行った。抗原を含まないセンサーグラムをリファレンスとし、バックグラウンドを補正した後、グローバルフィッティングを行い、 K_D 値を算出した。

統計解析

すべての実験は、少なくとも 3 つの独立したサンプルで行われた。エラーバーは、3 連の平均値の標準偏差 (SD) を示す。統計的有意性は、両側無対称の Student's *t*-test によって決定された。各実験セット内では、 $p < 0.05$ を有意とみなした。

データの入手可能性

本研究で使用した *T. reesei* のタンパク質および塩基配列は、JGI ゲノムデータベース <https://mycocosm.jgi.doe.gov/pages/search-for-genes.jsf?organism=Trire2>

より、以下のアクセッション ID で参照することができる: CBH1_tre123989, CBH2_tre72,567, PEP1_tre74156, GLA1_tre1885
ナノボディについては、抗リゾチーム VHH として PDB ID: 1ZVH、DrugBank Accession number: caplacizumab_DB06081, ozoralizumab_DB12014 として登録されている。

略語

CAZy: Carbohydrate active enzyme

CBD: Cellulose-binding domain

CBH: Cellobiohydrolase

CCR: Carbon catabolite repression

POI: Protein of interest

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

V_{HH}: Variable domain of heavy chain of heavy chain antibody

3-5 本章のまとめ

本章では、*T. reesei* の誘導物質フリーでのセルラーゼ・ヘミセルラーゼ発現系を利用した組換えタンパク質生産について検討した。この新しいプラットフォームは、不要なセルラーゼ遺伝子を置き換え、一般的で安価な可溶性糖であるグルコースを唯一の炭素源としながら、極めて強力なセルラーゼプロモーターを組換えタンパク質生産に利用可能であることを実証した。これは *T. reesei* の組換えタンパク質生産に関する課題を解決するものであり、本アプローチは、他の従来型微生物を用いた組換えタンパク質生産の新しい代替法として大きな可能性を秘める。セルラーゼやプロテアーゼの多重欠損など異種タンパク質生産用ベース株の構築は必要であるものの、100 g/L を超える生産性を糖化酵素以外のタンパク質生産についても利用可能となれば、これまでコストが課題となり拡張が困難であった分野にもタンパク質を利用できる可能性が拡がると考えられた。

以上から、第2章で述べた誘導物質フリーでの糖化酵素生産技術、第3章で述べた異種タンパク質生産への展開により、極めて高い生産性を誇るトリコデルマの生産系を利用した糖化酵素及び安価非可食糖の獲得、及びその糖を利用した糖化酵素と目的タンパク質の安価生産の可能性が見えてきた。続く第4章以降では、この誘導物質フリーでのタンパク質生産系を利用した事業として向かうべき方向性について考察した。

3-6 参考文献

1. Ramezaniaghdam M, Nahdi ND, Reski R. Recombinant spider silk: promises and bottlenecks. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;**10**:1-18.
2. Molfetta M, Morais EG, Barreira L, Bruno GL, Porcelli F, Dugat-Bony E, *et al.* Protein sources alternative to meat: state of the art and involvement of fermentation.

- Foods*. 2022;11:1–30.
3. Aro N, Ercili-Cura D, Andberg M, Silventoinen P, Lille M, Hosia W, *et al*. Production of bovine beta-lactoglobulin and hen egg ovalbumin by *Trichoderma reesei* using precision fermentation technology and testing of their techno-functional properties. *Food Res Int*. 2023;163:112131.
 4. Zahavi D, Weiner L. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Antibodies*. 2020;9:34.
 5. Di Nardo F, Chiarello M, Cavallera S, Baggiani C, Anfossi L. Ten years of lateral flow immunoassay technique applications: trends, challenges and future perspectives. *Sensors*. 2021. <https://doi.org/10.3390/s21155185>.
 6. Traenkle B, Rothbauer U. Under the microscope: single-domain antibodies for live-cell imaging and super-resolution microscopy. *Front Immunol*. 2017;8:1–8.
 7. Gomes AR, Byregowda SM, Veeregowda BM, Balamurugan V. An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. *Adv Anim Vet Sci*. 2016;4:346–56.
 8. Whittall DR, Baker KV, Breitling R, Takano E. Host systems for the production of recombinant spider silk. *Trends Biotechnol*. 2021;39:560–73.
 9. Frenzel A, Hust M, Schirrmann T. Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol*. 2013;4:1–20.
 10. Nagorsen D, Kufer P, Baeuerle PA, Bargou R. Blinatumomab: a historical perspective. *Pharmacol Ther*. 2012;136:334–42.
 11. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*. 2005;23:1126–36.
 12. Arbabi-Ghahroudi M. Camelid single-domain antibodies: historical perspective and future outlook. *Front Immunol*. 2017;8:1–8.
 13. de Marco A. Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments. *Microb Cell Fact*. 2011;10:44.
 14. Saerens D, Ghassabeh GH, Muyldermans S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8:600–8.
 15. Muyldermans S, Nanobodies. Natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:775–97.
 16. Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;77:13–22.
 17. de Marco A. Recombinant expression of nanobodies and nanobody-derived immunoreagents. *Protein Expr Purif*. 2020;172:105645.
 18. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*. 2009;27:297–306.
 19. Nevalainen H, Peterson R. Heterologous Expression of proteins in *Trichoderma*.

- Biotechnol Biol Trichoderma*. 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00007-2>.
20. Cherry JR, Fidantsef AL. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol*. 2003;**14**:438–43.
 21. Fonseca LM, Parreiras LS, Murakami MT. Rational engineering of the *Trichoderma reesei* RUT-C30 strain into an industrially relevant platform for cellulase production. *Biotechnol Biofuels*. 2020;**13**:1–15.
 22. Noguchi T, Saito H, Nishiyama R, Yoshida N, Matsubayashi T, Teshima Y, *et al*. Isolation of a cellulase hyperproducing mutant strain of *Trichoderma reesei*. *Bioresour Technol Reports*. 2021;**15**:100733.
 23. Rantasalo A, Vitikainen M, Paasikallio T, Jäntti J, Landowski CP, Mojzita D. Novel genetic tools that enable highly pure protein production in *Trichoderma reesei*. *Sci Rep*. 2019;**9**:1–12.
 24. Zhang J, Wu C, Wang W, Wang W, Wei D. A versatile *Trichoderma reesei* expression system for the production of heterologous proteins. *Biotechnol Lett*. 2018;**40**:965–72.
 25. Chai S, Zhu Z, Tian E, Xiao M, Wang Y, Zou G, *et al*. Building a versatile protein production platform using engineered *Trichoderma reesei*. *ACS Synth Biol*. 2022;**11**:486–96.
 26. Mandels M, Reese ET. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J Bacteriol*. 1960;**79**:816–26.
 27. Pakula TM, Nygren H, Barth D, Heinonen M, Castillo S, Penttilä M, *et al*. Genome wide analysis of protein production load in *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Biofuels*. 2016;**9**:1–26.
 28. Zhang Y-HP, Lynd LR. A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase. *Biotechnol Bioeng*. 2006;**94**:888–98.
 29. Zhang X, Li X, Xia L. Heterologous expression of an alkali and thermotolerant lipase from *Talaromyces thermophilus* in *Trichoderma reesei*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015;**176**:1722–35.
 30. Ma L, Zhang J, Zou G, Wang C, Zhou Z. Improvement of cellulase activity in *Trichoderma reesei* by heterologous expression of a beta-glucosidase gene from *penicillium decumbens*. *Enzyme Microb Technol*. 2011;**49**:366–71.
 31. Seiboth B, Hakola S, Mach RL, Suominen PL, Kubicek CP. Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. *J Bacteriol*. 1997;**179**:5318–20.
 32. Ren M, Wang Y, Liu G, Zuo B, Zhang Y, Wang Y, *et al*. The effects of deletion of cellobiohydrolase genes on carbon source-dependent growth and enzymatic lignocellulose hydrolysis in *Trichoderma reesei*. *J Microbiol*. 2020;**58**:687–95.

33. Adnan M, Zheng W, Islam W, Arif M, Abubakar YS, Wang Z, *et al.* Carbon catabolite repression in filamentous fungi. *Int J Mol Sci.* 2018;**19**:1–23.
34. Arai T, Ichinose S, Shibata N, Kakeshita H, Kodama H, Igarashi K, *et al.* Inducer-free cellulase production system based on the constitutive expression of mutated XYR1 and ACE3 in the industrial fungus *Trichoderma reesei*. *Sci Rep.* 2022;**12**:1–14.
35. Nakazawa H, Kawai T, Ida N, Shida Y, Shioya K, Kobayashi Y, *et al.* A high performance *Trichoderma reesei* strain that reveals the importance of xylanase III in cellulosic biomass conversion. *Enzyme Microb Technol.* 2016;**82**:89–95.
36. Landowski CP, Huuskonen A, Wahl R, Westerholm-Parvinen A, Kanerva A, Hänninen AL, *et al.* Enabling low cost biopharmaceuticals: a systematic approach to delete proteases from a well-known protein production host *trichoderma reesei*. *PLoS ONE.* 2015;**10**:1–28.
37. Häkkinen M, Arvas M, Oja M, Aro N, Penttilä M, Saloheimo M, *et al.* Re-annotation of the CAZy genes of *Trichoderma reesei* and transcription in the presence of lignocellulosic substrates. *Microb Cell Fact.* 2012;**11**:1–26.
38. Koide A, Tereshko V, Uysal S, Margalef K, Kossiakov AA, Koide S. Exploring the capacity of minimalist protein interfaces: interface energetics and affinity maturation to picomolar KD of a single-domain antibody with a flat paratope. *J Mol Biol.* 2007;**373**:941–53.
39. Rouet R, Dudgeon K, Christie M, Langley D, Christ D. Fully human VH single domains that rival the stability and cleft recognition of camelid antibodies. *J Biol Chem.* 2015;**290**:11905–17.
40. Peyvandi F, Scully M, Kremer Hovinga JA, Cataland S, Knöbl P, Wu H, *et al.* Caplacizumab for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 2016;**374**:511–22.
41. European Medicines Agency (EMA). *Cablivi: assessment report.* 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/cablivi-epar-public-assessment-report_en.pdf
42. Ishiwatari-Ogata C, Kyuuma M, Ogata H, Yamakawa M, Iwata K, Ochi M, *et al.* Ozoralizumab, a humanized anti-TNF α NANOBODY® compound, exhibits efficacy not only at the onset of arthritis in a human TNF Transgenic mouse but also during secondary failure of administration of an anti-TNF α IgG. *Front Immunol.* 2022;**113**:8008.
43. Meng F, Wei D, Wang W. Heterologous protein expression in *Trichoderma reesei* using the cbhII promoter. *Plasmid.* 2013;**70**:272–6.
44. Paloheimo M, Mäntylä A, Kallio J, Suominen P. High-yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. *Appl Environ Microbiol.*

- 2003;**69**:7073–82.
45. Landowski CP, Mustalahti E, Wahl R, Croute L, Sivasiddarthan D, Parvinen AW, *et al.* Enabling low cost biopharmaceuticals: high level interferon alpha – 2b production in *Trichoderma reesei*. *Microb Cell Fact.* 2016;**15**:1–15.
 46. Kumaraswamy S, Tobias R. Label-free kinetic analysis of an antibody-antigen interaction using biolayer interferometry. *Methods Mol Biol.* 2015. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2425-7_10.
 47. Aggarwals BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, *et al.* Human tumor necrosis factor. production, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 1985;**260**:2345–54.
 48. Schirrmann T, Al-halabi L, Dübel S, Hust M. Production systems for recombinant antibodies. *Front Biosci.* 2008. <https://doi.org/10.2741/3024>.
 49. Nyssönen E, Penttilä M, Harkki A, Saloheimo A, Knowles JKC, Keränen S. Efficient production of antibody fragments by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Nat Biotechnol.* 1993;**11**:591–5.
 50. Zhang J, Li J, Gao L, Waghmare PR, Qu J, Liu G. Expression of a SARS-CoV-2 neutralizing nanobody in *Trichoderma reesei*. *Chin J Biotechnol.* 2022;**38**:2250–8.
 51. Coller SP, Schoisswohl D, Baron M, Parriche M, Kubicek CP. Role of endoproteolytic dibasic proprotein processing in maturation of secretory proteins in *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol.* 1998;**64**:3202–8.
 52. Fonseca LM, Parreiras LS, Murakami MT. Rational engineering of the *Trichoderma reesei* RUT-C30 strain into an industrially relevant platform for cellulase production. *Biotechnol Biofuels.* 2020;**13**:93.
 53. Derntl C, Gudynaite-Savitch L, Calixte S, White T, Mach RL, Mach-Aigner AR. Mutation of the Xylanase regulator 1 causes a glucose blind hydrolase expressing phenotype in industrially used *Trichoderma* strains. *Biotechnol Biofuels.* 2013;**6**:62.
 54. Ellilä S, Fonseca L, Uchima C, Cota J, Goldman GH, Saloheimo M, Sacon V, Siika-Aho M. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for brazilian biorefineries. *Biotechnol Biofuels.* 2017;**10**:30.
 55. Zhang J, Chen Y, Wu C, Liu P, Wang W, Wei D. The transcription factor ACE3 controls cellulase activities and lactose metabolism via two additional regulators in the fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem.* 2019;**294**:18435–50.
 56. de Lima EA, Mandelli F, Kolling D, Matsusato Souza J, de Oliveira Filho CA, Ribeiro da Silva M, *et al.* Development of an economically competitive *Trichoderma*-based platform for enzyme production: bioprocess optimization, pilot plant scale-up, techno-economic analysis and life cycle assessment. *Bioresour Technol.* 2022;**364**:128019.
 57. Novy V, Nielsen F, Seiboth B, Nidetzky B. The influence of feedstock characteristics

- on enzyme production in *Trichoderma reesei*: a review on productivity, gene regulation and secretion profiles. *Biotechnol Biofuels*. 2019;12:238.
58. Humbird D, Davis R, Tao L, Kinchin C, Hsu D, Aden A, Schoen P, Lukas J, Olthof B, Worley M, Sexton D, Dudgeon D. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Volume NREL/TP-5100-47764. NREL; 2011. <http://www.nrel.gov/docs/fy11osti/47764.pdf>.
 59. Kawamori M, Morikawa Y, Takasawa S. Induction and production of cellulases by L-sorbose in *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol Microbiol Biotechnol*. 1986;24:449–53.
 60. Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M, Salminen E, Knowles J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*. 1987;61:155–64.

4. 事業環境分析と向かうべき方向性の見定め

有する強みや重要視する視点によって、バイオ生産のビジネス分野も多岐に渡る。例えば、シーズ開発や改変・高機能化など有用なターゲットを見つけて育てることを生業とする企業（図 4-1, 1. 価値づくり）、1.で見出された有用物質の研究用途での少量生産や実生産に繋げ、望まれるものを生産し具現化する企業（図 4-1, 2. 生産受託）、またはそれらを一貫して実施する企業（図 4-1, 3. 価値づくりから提供まで）も存在する。

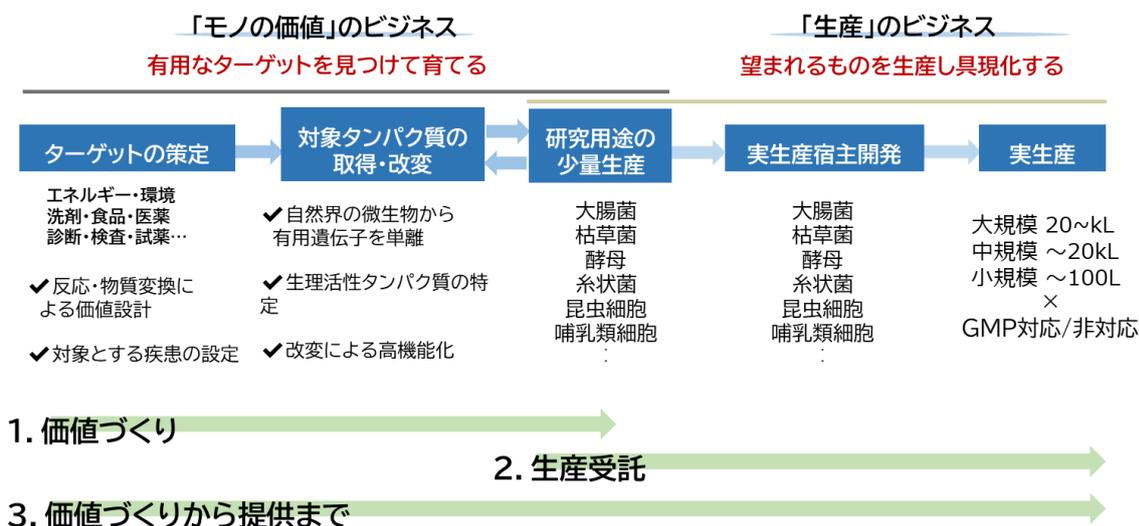


図 4-1 バイオ生産のビジネス

本章では、他社がどのようなことを強みとしてどのような事業を展開しているのか分析を実施した。その上で、自社が持ちうる技術と事業環境を照らし合わせ、このようなバリューチェーンの中でトリコデルマのタンパク質生産技術をどこに活かしていくか、向かうべき方向性を見定めていくことを目的とした。

トリコデルマをコアとしたタンパク質生産に関わる事業として、大きく分けて、①タンパク質の受託生産事業（図 4-1, 2. 生産受託）、②タンパク質の外部販売事業（図 4-1, 3. 価値づくりから提供まで）が考えられた。図 4-1, 1 のタンパク質の生産がほとんど関与しないタンパク質の改変、高機能化のみのビジネスはトリコデルマの生産系を活用したビジネスとしてのスコープからは外れると考え、生産性の高さを優位性とし受託生産を行う場合と、特定の価値あるタンパク質を定めトリコデルマの生産系を用いて提供まで行うビジネスを対象として調査と分析を実施した。

4-1 タンパク質生産を利用した他社の事業

4-1-1 タンパク質の受託生産事業

生産受託事業として、①研究用タンパク質の小スケール生産受託（発現受託）、②商業用タンパク質の実生産・提供まで請け負う大スケール生産受託の 2 つに大別されると思われる。①は差別化された要素技術などを持つベンチャーが多く、比較的投資額は小さい。②は大型設備の必要性・GMP 設備の必要性など投資額が比較的大きいと考えられる。また、工業用途と食品・医

薬用途に使用用途を細分化して調査した。なお、生産受託は、Original Equipment Manufacturing (OEM) 形式で宿主と培養系も依頼者が持ち込み、設備運転のみを受託者が実施するパターンも存在するが、今回のスコープではトリコデルマを宿主として活かすことを想定し、他の宿主の持ち込みではなく製造したいタンパク質はあるものの生産系を有しておらず委託生産を行う場合 (Original Design Manufacturing: ODM) を想定した。

まず、タンパク質の生産受託を請け負っていると web サイト上に記載がある企業をリストアップし、その企業が使用している宿主、及び培養スケールについて表 2-1、表 2-2 にまとめた。

表 2-1 タンパク質生産受託 (国内)

社名	宿主	最大スケール	
日本	Protein express	細菌 <i>Brevibacillus</i>	~20L 100L~からは提携の委託先
		細菌 <i>Escherichia coli</i>	
		哺乳類細胞 -	
		昆虫細胞 -	
	UNITECH	細菌 <i>Escherichia coli</i>	~100L
		酵母 -	
		昆虫細胞 <i>SF9</i>	
		昆虫細胞 <i>SF21</i>	
		哺乳類細胞 <i>CHO</i>	
		哺乳類細胞 <i>HEK293</i>	
	哺乳類細胞 <i>COS7</i>		
	ホクドー	細菌 <i>Escherichia coli</i>	
	カルナバイオサイエンス	細菌 <i>Escherichia coli</i>	~3L
	セルフリーサイエンス	無細胞 コムギ胚芽	
	大関	昆虫細胞 カイコ	~数L
		糸状菌 <i>Aspergillus oryzae</i>	
	AGC	無細胞 カイコ由来	~4500L
		細菌 <i>Escherichia coli</i>	
		酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	
	アーケ・リソース	酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
昆虫細胞 -			
シスメックス	哺乳類細胞 -	-	
免疫生物研究所	昆虫細胞 カイコ	-	
AMBIS	細菌 <i>Escherichia coli</i>	~60L	
	細菌 <i>Bacillus subtilis</i>		
	酵母 -		
味の素	細菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	-	
	糸状菌 <i>Talaromyces cellulosus</i>		
Beacle	細菌 <i>Escherichia coli</i>	-	
	酵母 -		
Abclonal	細菌 <i>Escherichia coli</i>	-	
	昆虫細胞 -		
	哺乳類細胞 -		

表 2-2 タンパク質生産受託（海外）

アメリカ	BPS Bioscience	細菌	<i>Escherichia coli</i>	-
		昆虫細胞	SF9	
		哺乳類細胞	HEK293	
	GenScript	細菌	<i>Escherichia coli</i>	~1000L
		昆虫細胞	-	
		哺乳類細胞	-	
	Profacgen	細菌	<i>Bacillus subtilis</i>	~2000L
		細菌	<i>Escherichia coli</i>	
		細菌	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	
		酵母	<i>Pichia pastors</i>	
		酵母	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
		昆虫細胞	-	
		哺乳類細胞	CHO	
	GenWay Biotech	細菌	<i>Escherichia coli</i>	-
		哺乳類細胞	CHO	
		細菌	<i>Bacillus subtilis</i>	
	exonbio	細菌	<i>Bacillus subtilis</i>	-
		哺乳類細胞	-	
	Boster Bio	細菌	<i>Escherichia coli</i>	~100L
		哺乳類細胞	-	
		昆虫細胞	-	
	OriGene	細菌	-	-
		酵母	-	
		昆虫細胞	-	
		哺乳類細胞	-	
	ARVYS Proteins	細菌	-	-
		酵母	-	
		昆虫細胞	-	
		哺乳類細胞	-	
biogramatics	酵母	<i>Pichia pastors</i>	-	
Creative BioMart	細菌	<i>Escherichia coli</i>	-	
	細菌	Bacillus属		
	酵母	<i>Pichia pastors</i>		
	酵母	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
	昆虫細胞	SF9		
	昆虫細胞	SF21		
	昆虫細胞	S2		
	昆虫細胞	<i>T. ni</i>		
無細胞	-			
Bio Synthesis	哺乳類細胞	CHO	-	
	哺乳類細胞	HEK293		
Creative Biolabs	細菌	-	-	
	昆虫細胞	-		
	細菌	<i>Escherichia coli</i>		
	細菌	Bacillus属		
	酵母	<i>Pichia pastors</i>		
	酵母	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
Novus Biologicals	昆虫細胞	-	-	
	哺乳類細胞	CHO		
	哺乳類細胞	HEK293		
	細菌	<i>Escherichia coli</i>		
	酵母	-		
ProMab Biotechnologies	細菌	<i>Escherichia coli</i>	-	
	酵母	-		
	昆虫細胞	-		
	哺乳類細胞	-		
Creative Enzymes	細菌	<i>Escherichia coli</i>	-	
	細菌	Bacillus属		
	酵母	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
	酵母	<i>Pichia pastors</i>		
	酵母	<i>Pichia angusta</i>		
	糸状菌	-		
Pro Mab	昆虫細胞	-	-	
	哺乳類細胞	-		
	細菌	<i>Escherichia coli</i>		
	酵母	-		
Bio-Technical Resources	細菌	<i>Escherichia coli</i>	~250L	
	細菌	<i>Bacillus subtilis</i>		
	酵母	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
	酵母	<i>Pichia pastoris</i>		
	糸状菌	<i>Trichoderma reesei</i>		
DYADIC	糸状菌	<i>Mycelophthora thermophila</i>	-	
Ginkgo Bioworks	細菌	<i>Escherichia coli</i>	1, 5, 10, 30, and 3,000 L and all the way up to the 50,000 L	
	細菌	<i>Bacillus subtilis</i>		
	細菌	<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
	酵母	<i>Pichia pastoris</i>		
	酵母	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
	酵母	<i>Yarrowia lipolytica</i>		
糸状菌	<i>Aspergillus niger</i>			

このように、特に①少量受託生産ビジネスを行っている企業は複数宿主を取り揃えていることがほとんどであり、幅広い生産要望に応えられるようにしていることがわかった。

以下に、詳細は割愛するが、各社が受託事業を行う上で競合との優位性を出していたポイントや必要事項について整理した。

受託形態と宿主の関係

- ・少量提供をメイン
→細菌/酵母/昆虫/哺乳類細胞など
豊富な宿主バリエーションを持つ
概ね最低限4種は揃える
- ・商業生産まで見越した受託
→生産量と易スケールアップ性から、
宿主数を絞り独自の技術を磨く
- ・医薬向け受託
→哺乳類細胞はほぼ必須
加えて微生物生産系をサブで持つ傾向



優位性を出すオプション

- ・高い発現確率
 - ・高純度
 - ・分泌生産
 - ・目的物の改変ースクリーニングとセット
- ×
- ・高い生産濃度
 - ・数百～数万Lクラスの設備を持つ
- ×
- ・抗体の改変技術
 - ・GMP設備を持つ

図 4-2 受託事業を行う上で競合との優位性を出していたポイント

調査の結果から、大企業ほど複数のポイントを持ち、最低限 1 つはアピールポイントがあり、どの部分で優位性を出すかが非常に重要であり、受託生産ビジネスを実施する上での差別化ポイントとなっていた。

また、受託生産ビジネスを行う企業が公表している宿主ラインナップ頻度について図 4-3 に示した。

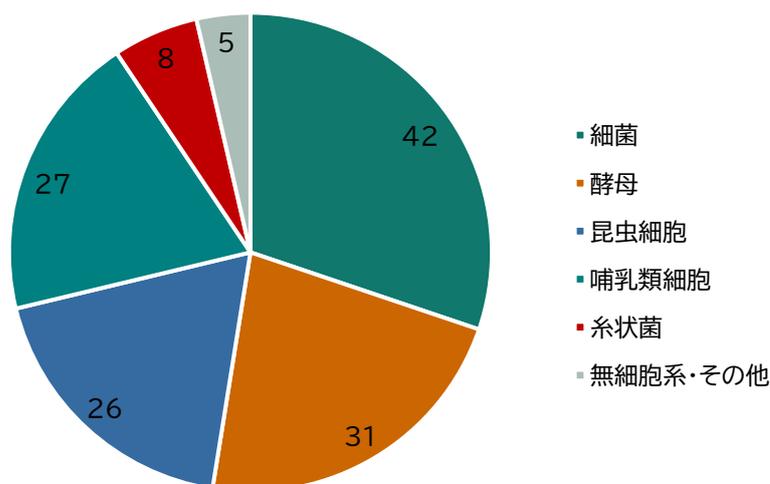


図 4-3 受託生産向けの宿主ラインナップ頻度

トリコデルマを含む糸状菌を受託生産用の宿主として利用している例は僅少であることが分かった。以下の表 2-3 に糸状菌を利用した受託生産を公表している企業についてリスト化した。

表 2-3 糸状菌を利用した受託生産

日本	大関	糸状菌	<i>Aspergillus oryzae</i>
日本	味の素	糸状菌	<i>Talaromyces cellulolyticus</i>
中国	Vland Biotech	糸状菌	<i>Trichoderma</i> 属
中国	Vland Biotech	糸状菌	<i>Aspergillus</i> 属
アメリカ	Bio-Technical Resources	糸状菌	<i>Trichoderma reesei</i>
アメリカ	Creative Enzymes	糸状菌	-
アメリカ	DYADIC	糸状菌	<i>Myceliophthora thermophila</i>
アメリカ	Ginkgo Bioworks	糸状菌	<i>Aspergillus niger</i>

Vland Biotech は中国の大手バイオテクノロジー企業であり、細菌と酵母の系と合わせて 2 種類の糸状菌に関しても宿主として用いていることを記載していた¹。Bio-Technical Resources, Creative Enzymes については割愛するが、DYADIC は糸状菌を活用した受託生産ビジネスにおける技術・事業戦略上参考になる点が多く、後の 4-1-3 で詳細に述べた。

また、2022 年 12 月 8 日に Ginkgo Bioworks が、Ginkgo Enzyme service を発表した²。Ginkgo は当初合成生物学を利用し低分子化合物のハイスループット・高効率生産を行っていたが、それをタンパク質生産にも活用した形である。Ginkgo のサービスは、20 億以上の遺伝子と 800 万以上の天然物遺伝子クラスターを網羅する Ginkgo 独自の遺伝子データベースと、高度な機械学習ツール、超高処理自動化、独自の細菌・真菌生産ホストを活用して、広大な生物デザイン空間を探索し、新規酵素活性の発見、酵素機能の最適化、発現改善、酵素生産プロセスのスケールアップを行うとのことであり、タンパク質生産をベースとした受託生産事業を考える上では大きな競合となり得る。

Ginkgo は以下の点を本サービスの利点としていた。

新規酵素探索

- ・独自のゲノム配列と公開ゲノム配列の広範なデータベースから、新しい酵素活性を発見し、さらなるタンパク質工学の出発点を特定する。
- ・社内の計算ツールを使ってゲノムデータベースを解析し、数千のヒット候補を特定する。
- ・メタゲノミックスクリーンを活用し、開発の妨げとなる既存知的財産を回避する設計を行う。
- ・高度な超高速スクリーニング法を用いて候補をスクリーニングし、目的の活性を持つユニークな酵素を同定する。

酵素の機能・安定性を最適化

- ・進化的、計算的、合理的なタンパク質工学のアプローチによる広範かつ継続的なツールキットを使用して、触媒活性、酵素の安定性、特異性、および発現を反復的に改善する。
- ・超高処理アッセイから得られたデータをもとに、Ginkgo 独自のプラットフォームの教師付き機械学習を活用し、酵素の機能を劇的に向上させる。

- ・ベストインクラスのプロダクションホストにアクセスし、堅牢な発現を実現する。
- ・次世代メタノールフリー *Pichia pastoris* や低粘度 *Aspergillus niger* など、タンパク質生産に最適な独自の細菌・菌類宿主で酵素を発現させる。
- ・酵素の最適な発現をサポートし生産コストを削減するために、高発現ホスト株で酵素の発現を最適化するために、菌株工学の専門知識を活用する。

最適化された発酵プロセスの開発

- ・数百台の Sartorius Ambr® 250 バイオリアクターを使用して、ラボスケールでの実験計画を自動化し、商業スケールに移行できる実績のある発酵プロセスを迅速に開発する。

発酵のスケールアップ、プロセス設計と技術移転

- ・1、5、10、30、3,000L の容器、GMP 生産を含む製造パートナーとの 50,000L スケールまで発酵能力を利用することができる。
- ・ダウンストリームプロセスと精製方法の最適化
- ・熱的、物理的、化学的分離能力を利用して、さらなる分析、テスト、コンセプトの実証のためにサンプル精製
- ・コスト・モデリングとフィージビリティ・アセスメントを提供し、意思決定を支援する。

また、2023年2月16日、GinkgoはZymtronix社と無細胞生物製造の産業化に向けた酵素の製造に関する提携を発表した³。Zymtronix社が独自に開発したセルフリー・プラットフォームで使用する酵素を、食品、農業、化粧品、医薬品の重要な成分の生産に最適化することを目指すとのことである。

Ginkgoは自社独自のデータベース、自動化、改変技術をコアにしながら積極的に他社と協業し、ベースタンパク質の探索・改変・さらにはスケールアップまで一貫したサービスを提供可能であると推測される。また、宿主としても糸状菌 (*Aspergillus niger*) を有することも公表しており、タンパク質生産の受託サービスを実施する上では大きな競合となり得る。

国内では大関が糸状菌 *Aspergillus oryzae* を利用し、醸造産業で培ってきた技術を異種タンパク質生産に応用し、事業展開している。また、味の素は糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* を利用した受託サービス(TALAMAX®)を2019年に開始した⁴。本菌もセルラーゼの生産菌として知られているが、同株に高い異種タンパク質分泌能を確認しタンパク質分泌発現系として開発を進め、新規の抗体・バイオ医薬タンパク質分泌発現系として受託ビジネスを開始した。TALAMAX®を用いた抗体・バイオ医薬タンパク質発現の特徴⁵として、①短い開発期間と製造コストの優位性、②糖鎖の付加の無い抗体生産、③多様なタンパク質発現を挙げている。特に②に関して、通常糸状菌を用いたタンパク質分泌生産では糖鎖の付加があり、ヒト型と異なることで医薬用途での利用は懸念が示されることもあるが、*Talaromyces cellulolyticus* で抗体を生産した場合は糖鎖が付加しないことを他の微生物宿主を用いた発現系と比較した際の優位性として宣伝している。また、③に関しても抗体医薬の宿主として世界標準のCHO細胞と同等の生産性であり、生産コストは1/10程度になる見込みを示している。

味の素はこれまでもコリネ細菌 *Corynebacterium glutamicum* を用いた CORYNEX®⁶ によるタンパク質の受託生産を行ってきており、宿主を拡大させる形で事業展開を行っている。50 年以上にわたるアミノ酸生産で培われた技術を駆使した高密度培養や培養スケールアップ等を活用して、酵素などのタンパク質のみならず従来の微生物発現系では製造が難しかったタンパク質、特にバイオ医薬、創薬用途タンパク質の高効率生産受託を既に開始していることはトリコデルマを利用した戦略立案をする上では考慮する必要があった。

<受託生産事業分析で得たインサイト>

受託生産ビジネスを行っている企業は非常に多く存在し、厳しい競争環境にあることが分かった。さらに近年では Ginkgo の参入も発表され、受託生産サービスとして真向から事業化を目指すことは困難であると考えられた。少なくとも web サイト上で受託生産事業を公言し、広く一般に生産受託ビジネスを受け付けている企業では糸状菌の取り扱いは稀であったが、糸状菌の取り扱いを記載している企業では少量の受託生産よりも発現-実生産までをスコープに入れた一気通貫での受託生産ビジネスを行っている例が多かった。他社においても糸状菌は「発現系」としての利用(高確率で目的タンパク質を提供可能)という側面よりも、「生産系」として安価大量に製造することを意図した利用が主であるという傾向見て取れ、これらの企業は自社で大型の実生産設備も保有しも酵素やアミノ酸などを発酵生産し外部販売している企業や、外部連携として大型槽も使用可能なパートナーシップを結んでいる企業であった。考察についてはインベーション・ストラテジー研究成果書に記載した。

<医薬用途の受託生産ビジネス>

上記はタンパク質全般として記載したが、医薬用途に絞って詳細な調査を実施した。タンパク質医薬品は、医薬品製剤開発・製造支援事業 (Contract Development and Manufacturing Organization:CDMO)⁷ として、製薬企業等から医薬品や治験薬の製剤開発や製造を受託する事業が行われている。経営リソースを医薬品の研究開発に集中させたい製薬会社の思惑に応え米国で誕生し、CDMO の世界市場規模は約 50 億米ドル(2020)であり、年平均10%近くの成長率を維持している⁸。CDMO 事業を実施している企業は多数存在するが、上記の表 2-1, 表 2-2 で示した調査からも、医薬用タンパク質の生産には哺乳類細胞を利用することが多く、幅広く少量受託生産を請け負うためには哺乳類細胞の生産系を有していることはほぼ必須であることが分かった。

特筆すべき CDMO 企業として、以下 Lonza について記載した。

○ Lonza

本部: スイス バーゼル、設立: 1897 年

従業員数: 15,375 (2018 年)

総資産: 139.2 億スイス・フラン

医薬品の受託製造開発サービス大手の Lonza は、多様なバイオ医薬品、低分子医薬品製造を網羅し、鋳型遺伝子から最終製剤に至るまで受託可能となっている。バイオ医薬品に関しては、

XS Technologies™と名付け宣伝を行っている⁹。

Multiple Host Options for Different Products

大腸菌 (原核生物) <i>Escherichia coli</i>	ピキア酵母 (真核生物) <i>Pichia pastoris</i>	枯草菌 (原核生物) <i>Bacillus subtilis</i>
		
<ul style="list-style-type: none"> - Expresses >80% of commercial microbial products - Cytoplasmic and periplasmic production - Produces aglycosylated proteins 	<ul style="list-style-type: none"> - Protein folding issues in <i>E. coli</i> may be solved with <i>Pichia</i> - Secretes for easier recovery and downstream processing - Lacks endotoxin 	<ul style="list-style-type: none"> - Expresses and secretes simple monomeric proteins - Lacks endotoxin - Produces aglycosylated protein



**70 L – 15'000 L
Microbial Pharma
cGMP Production**

**Speed
Robustness
Reliability
Processability**

図 4-4 Lonza の XS Technologies 出典⁹

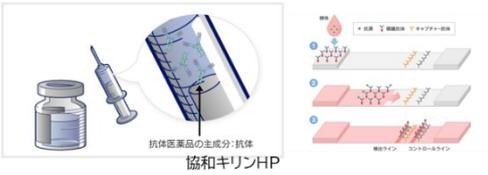
Lonza ではスケールアップ可能な 3 宿主を中心に展開している。ここに糸状菌宿主はラインナップされておらず、真核生物としては哺乳類細胞と酵母でカバーし、微生物培養では枯草菌よりも *Pichia* 酵母に注力しているとのことであった。

また、Lonza は GMP 対応の大型培養槽を自社で保有していることも大きな強みであり、GMP 対応哺乳類細胞培養槽としては世界一位、微生物培養槽としても世界二位の総容量を誇る⁸。このように、低分子医薬品のみならずバイオ医薬品においても哺乳類細胞と微生物生産の併用で目的物を大規模かつ医薬品グレードで提供可能なプラットフォームがすでに構築されていた。

4-1-2 タンパク質の外販事業

タンパク質は幅広い分野で活用されており、ひとえに外販事業といっても応用先、必要量、グレード、価格も多岐にわたる。

医療応用



バイオ医薬品
診断薬
抗体医薬
酵素医薬
免疫クロマト

工業応用



洗剤・食品
洗剤用酵素
食品加工

工業的物質変換プロセス
環境・エネルギー・化学変換
バイオマス分解
有用物質の合成・変換

高価 ←—————→ 安価

図 4-5 タンパク質の応用範囲

特に、医薬用途のタンパク質は必要量が比較的少なく小規模かつ安全性を担保した GMP 設

備で生産する必要があるため、kg-protein あたり約 1 億円という極めて少量高価なタンパク質である¹⁰。一方で、工業用途のセルラーゼなどは大規模かつ安全性の担保も医薬品グレードである必要がなく、kg-protein あたり数千～数万円という価格帯である。したがって、タンパク質の外販事業を考えるにあたり、宿主・生産系・作るモノの物性-安全性-有効性の担保度合いがコストに影響を与え、価格帯が大幅に異なることを認識した上でターゲットを絞っていく必要があった。

表 2-4 様々なタンパク質の価格^{出典:10}

Pharmaceutical Protein			
Product	Cell Line	Application	Retail Price per Kg
Rituximab	Hamster	Lymphoma	\$9,500,000.00
Eculizumab	Murine Myeloma	PNH	\$23,000,000.00
rHGH	<i>E. coli</i>	GH deficiency	\$137,000,000.00
rFVIIa	Hamster	Hemophilia with Inhibitor	\$2,070,000,000.00
rHepatitis B Surface Antigen	<i>S. cerevisiae</i>	vaccine	\$5,400,000,000.00
rFVIII	Hamster	Hemophilia	\$9,600,000,000.00
Industrial Protein			
Product	Cell Line	Application	Retail Price per Kg
Cellulase	<i>T. reesei</i>	Fuel Ethanol	\$10.00
rβ-Glucosidase	<i>E. coli</i>	Fuel Ethanol	\$37.00

Note: due to fluctuating prices, calculations were based on the best available published sources; errors are those of the authors. Calculations used can be found in Appendix A.

イノベーション・ストラテジー研究において、新規タンパク質医薬品を自社開発し外販することは技術ポートフォリオを有さず極めて困難であると判断し、外販用タンパク質として新規バイオ医薬品はスコープから外した（バイオ医薬品の受託製造に関しては後の 4-1-3 で検討した）。今回はすでに市場が形成されている酵素タンパク質について、他社の外販事業の概況・プレイヤーについて調査を行った。

以下に酵素の推定市場を示した。

表 2-5 酵素タンパク質の市場¹¹

用途別項目	市場 (億円)	
	世界	日本
食品用酵素	1,000	180
飼料用 "	300	-
燃料用 "	250	-
繊維用 "	200	10
洗剤用 "	700	60
医薬(バルク)用 "	600	65
研究用 "	500	55
診断用 "	350	40
精密化学用 "	100	
その他	200	20
合計	4,200	430

酵素の市場について調査を進めたところ、最終製品の中の酵素の割合が正確に表示されないこと、自社製造の場合、酵素のコストを明示せず数字として表れない等の理由から、酵素の市場を正確に把握することは困難であることが分かってきた。また、酵素の“触媒”という性質上、酵素単独での市場価格は小さいが、仮に酵素で製造される末端製品の価格の1~2%を酵素が占めると仮定すれば、実質的には数百兆円の市場の形成に貢献しているとも考えることができることが分かった¹²。

この酵素市場について、主要プレイヤーの調査を行い、図 4-6 に示した。

◆産業用酵素の主要企業

- ・NOVOZYMES
- ・DUPONT
- ・DSM
- ・BASF
- ・KERRY GROUP
- ・DYADIC INTERNATIONAL
- ・ADVANCED ENZYMES
- ・CHR. HANSEN
- ・天野エンザイム株式会社
- ・AUMGENE BIOSCIENCES
- ・MEGAZYME
- ・ENZYME SUPPLIES
- ・CREATIVE ENZYMES
- ・ENZYME SOLUTIONS
- ・ENZYMATIC DEINKING TECHNOLOGIES
- ・BIOCATALYSTS
- ・SUNSON INDUSTRY GROUP
- ・METGEN
- ・DENYKEM
- ・TEX BIOSCIENCES

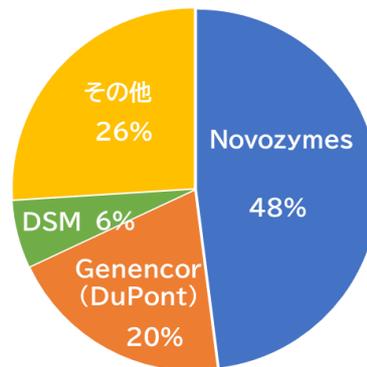


図 4-6 産業用酵素の主要企業

産業用酵素の三大メーカーは、Novozymes、Genencor (DuPont)、DSM であり、これらの企業で市場の 3/4 を占めた¹³。また、これらの企業はいずれも第 2 世代バイオエタノール生産用酵素の開発を実施しており、花王の糖化酵素事業の競合でもある。2 世代バイオエタノール生産用糖化酵素の販売に用いられる生産系のプラットフォームは大きく分けて 3 つあり、Dyadic 社が開発してきた *Myceliophthora thermophila* 菌を利用した C1 プラットフォーム、花王と同様に *Trichoderma* 菌を利用したシステム (Novozymes や DuPont もここに含まれる)、さらに DSM のシステムである¹⁴。



図 4-7 第 2 世代バイオエタノール生産用酵素の 3 大プラットフォーム

Novozymes, DuPont とともに *Trichoderma* や *Aspergillus* などの糸状菌を利用したプラットフォームを展開し、バイオエタノール向け酵素以外の産業用酵素生産においても低コストを目指すために高い生産性を発揮可能な糸状菌が使用されているといわれ、4-1-1 の (小規模) 受託生産ビジネスでは糸状菌の利用は僅少である一方、酵素市場の最大手は糸状菌を利用しながら低コストで酵素の生産を行っている傾向があった。

○ Novozymes

工業用酵素の世界トップシェア、世界酵素市場の約 50% 独占

バイオテクノロジー会社

収益: 143.7 億デンマーク・クローネ

従業員数: 6,125 (2019 年)

酵素産業に関する圧倒的な技術力とネームバリューを有する企業であり、酵素の外販事業において世界一の企業である。同社は *Trichoderma* 属、*Aspergillus* 属、*Bacillus* 属菌など、様々な独自開発の高生産宿主を有する。また、大型の生産拠点を複数有し¹⁵、低コストで大量に供給する技術及びサプライチェーンを持つ。

- ・自社設備で一括生産し、世界各国の企業へと販売する (オフサイト生産)
- ・小規模な委託生産は行わず、大型案件に関して酵素供給を行う (場合によっては自社で酵素開発も行う)
- ・一気通貫でのケミカルス変換、パッケージビジネスなどは行っている様子はなく、酵素の販

売事業である

「酵素」が必要とされるシーンにおいては新規プロジェクトにも積極的に参画しており、近年では例えばPETのリサイクルプロジェクトにおいてCARBiOSと提携し、酵素を使用してPETプラスチックと繊維を分解する生物学ベースのソリューションの開発を発表した¹⁶。また、NovozymesとSaipemが酵素を利用した炭素回収でコラボレーションを開始したと発表された¹⁷。既存の洗剤用酵素、食品用酵素、バイオマス分解酵素などに留まらず、時代の潮流に合わせたニーズに応え企業価値を向上させていることが分かる。その根底には、酵素開発や生産打診が集まってくるようなネームバリューと実績があると考えられ、少量の(研究用途の)タンパク質発現ではなく、実生産を見越した酵素事業コラボレーションの第1選択であると考えられる。

これらの企業のように、一般的な酵素の外販事業は既に大手の競合により市場が形成されており、かつ同じトリコデルマを利用した酵素生産がすでに実施されている。したがって、これまでにない新規で価値あるターゲット酵素を策定しない限りは、一般的なオフサイト酵素外販による参入は非常に難しいと考えられた。

4-1-3 ベンチマーク企業: DYADIC 社の分析 (酵素外販事業及びバイオ医薬品生産受託)

図4-7で第2世代バイオエタノール生産用酵素の3大プラットフォームの1つとして紹介されているDyadic社のC1プラットフォームは、バイオマス糖化酵素の生産系をバイオ医薬品生産受託に展開した例であり、糸状菌を利用したビジネス展開を考える上で重要な位置づけの企業であるため詳細な分析を実施した。分析目的は、糸状菌を用いたタンパク質生産システムで、どのように技術構築し、事業展開したかの知見を得るためである。

ODYADIC

創立 1979年

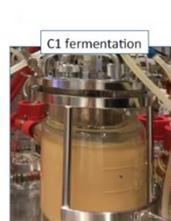
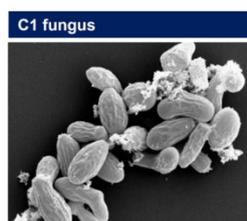
会社規模 社員 50名以下

本社 Florida Jupiter

上場 NASDAQ: DYAI (2019)、時価総額は2億1850万ドル(2020年8月31日)

<技術戦略・事業戦略分析>

DYADIC社はC1プラットフォームを酵素やその他のタンパク質の開発・生産のための汎用性の高い糸状菌の発現システムと銘打っており、*Myceliophthora thermophila*という糸状菌を利用した生産系である。



クリソスポリウム・ラクノウェンス
Chryso sporium lucknowense
Sporotrichum thermophile
Myceliophthora thermophila

➡ 通称C1

図 4-8 C1 プラットフォームで利用している菌^{出典 18}

1990年代から、UV 変異による突然変異育種・継続的な研究開発を実施し、2005～2010年にかけて、自社主導で C1 のゲノム配列を決定した。その後、戦略的な遺伝子改変・酵素改変が可能となり、C1 の改変と研究開発が本格化した。特に菌株に関しては、培養生産時に培養液が低粘度な株、かつ酵素生産性が高い株を変異育種により取得してきた。

さらに、HC 菌株/LC 菌株という 2 つ技術を作り分けたことがビジネスとして発展する上で必要な点であったと考えられる。

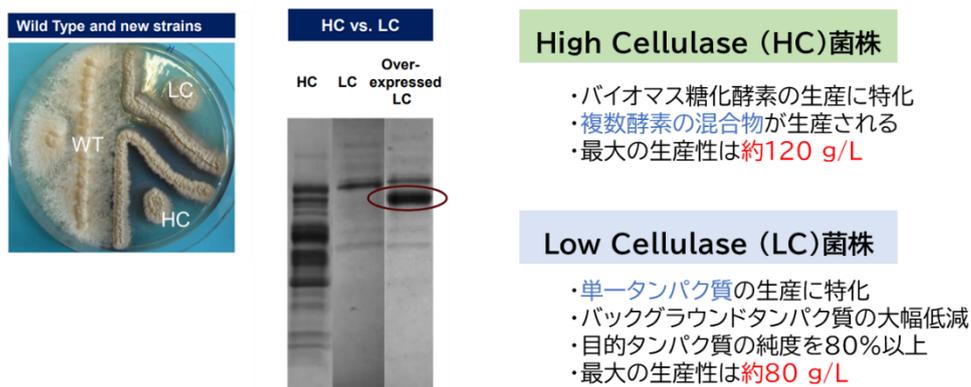


図 4-9 HC 菌株と LC 菌株^{出典 18}

HC 菌株はバイオマス糖化酵素の生産に特化し、複数酵素の混合物が生産される。その際の最大の生産性は約 120 g/L であるといわれる¹⁸。バイオマス糖化酵素は複数酵素の混合物であり、これらの mixture が協同的にバイオマスを分解する。一方で、LC 菌株は単一タンパク質の生産に特化し、バックグラウンドタンパク質の大幅低減に成功している。目的タンパク質の純度を 80%以上に高め、最大の生産性は約 80 g/L であると言われる¹⁸。

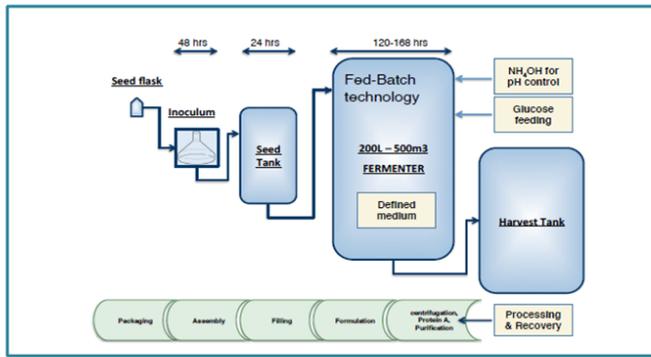
さらに、菌株だけでなく培養技術も洗練してきた。

C1 Expression Technology



Fermentation

- Easily available defined media components – glucose, salts, micro and macro elements, AA.
- Fed-batch technology with glucose feeding **グルコース流加**
- **低粘度** Low viscosity culture due to morphology changes (propagule)
- **誘導物質フリー** No need for induction
- Protein is secreted to the media
- **広いpHレンジ** pH: 5-8, Temp: 25 - 42°C.
- 1L to 500,000L fermentation scale



From MTP to Large scale mAbs productivity

24 wells MTP – 1mg/4ml
 1L fermentor – 1.5/g/l/d
 30L fermentor – 1.71 g/l/d

図 4-10 C1 プラットフォームの培養系概略^{出典 18}

C1 プラットフォームの培養系の特徴として、大規模なスケールアップに耐えうる培養液粘度低減菌株、誘導物質フリーでのグルコース流加培養、広い培養 pH レンジでタンパク質を分泌生産するという点を挙げている¹⁸。これらの多くは花王がトリコデルマを用いて開発してきた方向性と一致しており、バイオマス分解酵素を安価大量に生産するために必要な要素であったと考えられる。実際にC1プラットフォームはバイオマス分解酵素生産としてのスケールアップ実績は豊富であり、1996年～2011年で150 kLサイズでの培養に成功している(表 2-6)¹⁸。

表 2-6 C1 プラットフォームのスケールアップ実績 (～2011)^{出典 18}

Major C1 enzyme manufacturing sites				
Year production began	Manufacturing site	Company	Country	Fermenter size
1996	FermPro/Martek (now DSM)	Dyadic	USA	150,000L
2000	Polfa Tarchomin	Dyadic	Poland	50,000L
2009	EnMex	Dyadic	Mexico	30,000L
2011	Antibiotics	Abengoa	Spain	50,000L
2011	Fermic	Codexis	Mexico	25,000L
2011	logen	Codexis	Canada	150,000L

これらの技術を駆使し、Dyadic は酵素の販売事業としてセルラーゼ・キシラナーゼ・β-グルカ

ナーゼ・アミラーゼ・プロテアーゼなどのラインナップで食品、飼料、パルプ&ペーパー、繊維などの市場にニッチな製品を販売してきた。また、この C1 プラットフォームをライセンスすることで、ライセンス収入ビジネスを行ってきた¹⁸。

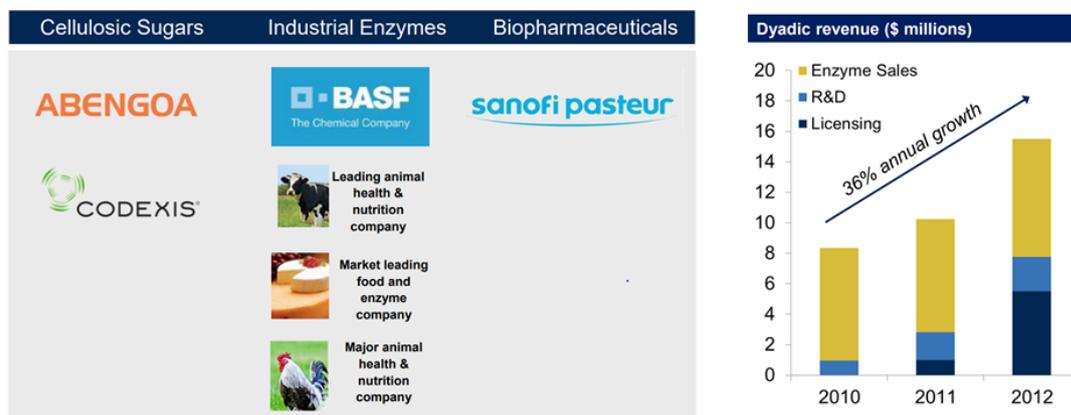


図 4-11 Dyadic のビジネス形態^{出典 18}

その後 Dyadic は 2015 年に大きな転機を迎え、7500 万ドルで C1 の工業用タンパク質生産技術を売却した¹⁹。これにより多額の cash を獲得し、価値の回収を行った。一方で C1 技術を利用し、ヒト/動物用バイオ医薬品を製造するための共同使用权・独占的サブライセンス権を保持（2015～2029 年）し、LC 菌株技術をバイオ医薬品分野へ展開する大きな転換を行った。

バイオ医薬品の受託製造にピボットするに至った強みとビジネスチャンスは、以下の点を挙げている。

C1 プラットフォームの強み

<迅速化な開発スピード>

- ・豊富な遺伝子ツール（+遺伝子組換えの容易さ）
- ・迅速な生育（動物細胞より明確に優れる）
- ・ハイスループットスクリーニング可能

<大規模生産への適合性>

- ・単一タンパク質の高生産性
- ・豊富なスケールアップの実績（～500m³）
- ・分泌生産であり精製が容易（大腸菌は菌体内）
- ・低粘度（培養時のハンドリング良好）
- ・広範囲な培養条件レンジに適用（目的生産物によって様々な温度/pH を設定可能）

これらの利点を利用しながら、高収率で低コストの大規模な産業用バイオテクノロジーと低収率で高コストの小規模なバイオ医薬品に大きなギャップがあり、この溝を埋めること、すなわち

C1 によって医薬品の市場投入のスピードとコスト効率を一変させることにビジネスチャンスを見出していた。さらに、バイオ医薬品向けに追加で必要な技術（糖鎖制御など）は VTT Technical Research Center of Finland（フィンランド最大の国立標準研究機関かつ実用的なソリューションに活用する研究技術会社）とも共同研究を行いながら技術補填し、既存のバイオ医薬品製造手法と同等以上の生産性を達成し、技術アピールを行っている。

ここまでの技術戦略・事業戦略を以下のようにまとめた。

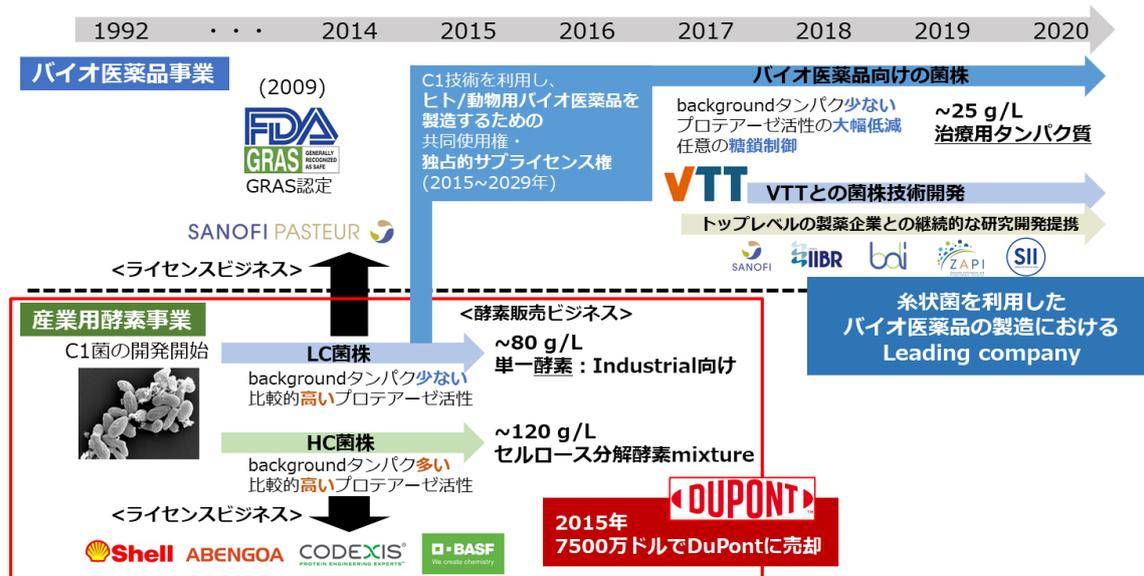


図 4-12 Dyadic の技術戦略・事業戦略の overview

C1 プラットフォームの知財面としては、(単一) タンパク質高生産の技術的内容は出願されておらず、ノウハウ秘匿という形をとったと考えられる。基本はライセンス契約を結んだ企業にのみ開示し、特許で縛られてはいないが模倣困難な状態を作り出していた。また、財務分析から、売上は伸びているものの損失を出しており、DuPont への売却で得た現金を流動資産として持つことで負債はなく運用しているが、現状有価証券を売却しながら耐え忍んでいる状況と考えられた。一方で、2019 年からの Covid-19 のパンデミックによりバイオ医薬品並びにその研究材料を提供する技術に注目が集まり、株価が急上昇した。イスラエル生物学研究所(IIBR)やヨーロッパのパートナーなどが SARS-CoV-2 ワクチン候補を大量に生産する C1 細胞株を共同開発し、フレデリック国立研究所から COVID-19 ワクチン候補の製造を受託し、国立衛生研究所の国立アレルギー・感染症研究所(NIAID)のワクチン研究センター(VRC)で使用された²⁰。Dyadic としては追い風の状況であり、時価総額の上昇、堅牢な Balance Sheet は経営の強みであると考えられた。

<分析から得られたインサイト>

Dyadic 社は花王と同様に糸状菌を利用してバイオマス糖化酵素の外販/ライセンスビジネスを実施していたが、その後バイオ医薬品の受託生産へと舵を切った数少ない前例として捉える

ことができる。Dyadic は Biofuel 分野の大手がひしめく競争環境から、その系を活かしてどこへ向かうか、という問いの中で、コスト勝負の産業用酵素分野を大手（DuPont）に譲与し、バイオ医薬品生産を選択し、コスト集中戦略を取ったと考えられた（資金繰りもあり、そうせざるを得なかった側面もあると推定される）。糸状菌の高い生産性を糖化酵素以外にも展開したい、という考え自体は新規ではなく、少なくともバイオ医薬品分野においては先行されていた。

Dyadic は現時点で糸状菌を利用したバイオ医薬品の製造における Leading company と考えられ、トリコデルマの生産系を利用してバイオ医薬品の受託生産ビジネスを考える上では強力な競合となり得る。考察に関してはイノベーション・ストラテジー研究成果書に記載した。

一方で、Dyadic のバイオ医薬品受託製造事業も Lonza をはじめとする競合がひしめき、競争環境としては厳しい部分もあると考えられる（後述の 4-2-1 においても述べた）。本イノベーション・ストラテジー研究としてはどう方向性を定めるべきか、続くセクションにおいて更なる分析を行った。

4-2 事業環境分析

花王全社としては、脱炭素社会の実現に向け 2009 年に環境宣言²¹を発表し、原材料調達から生産、物流、販売、使用、廃棄までの製品が関わるライフサイクル全体を通して、ステークホルダーと協働で環境負荷低減を目指していくことを掲げている。2019 年には気候変動、高齢化社会、資源枯渇、海洋プラスチックといった社会的課題解決に向け、持続可能な暮らしを「Kirei Lifestyle」と定義し、それを実現するための ESG 戦略「Kirei Lifestyle Plan」を策定・発表した²²。この中で、脱炭素、ごみゼロ、サステナブルなライフスタイルの推進、責任ある原材料調達などのアクションが掲げられ、2021 年 5 月には花王が取り組む新たな「脱炭素」の目標を発表し、事業活動に伴い排出される CO₂ を 2040 年までにカーボンゼロ、2050 年までにカーボンネガティブを目指すことを掲げている状況である²³。そのような中で、花王がトリコデルマを活用したタンパク質の受託生産ビジネスを行うと仮定した場合、およびタンパク質の外販事業を行うと仮定した場合に分けて事業環境の分析を実施した。

4-2-1 ファイブフォース分析：タンパク質生産受託事業の場合

まず、タンパク質の受託生産ビジネスを実施する場合の競争環境について図 4-13 に示した。

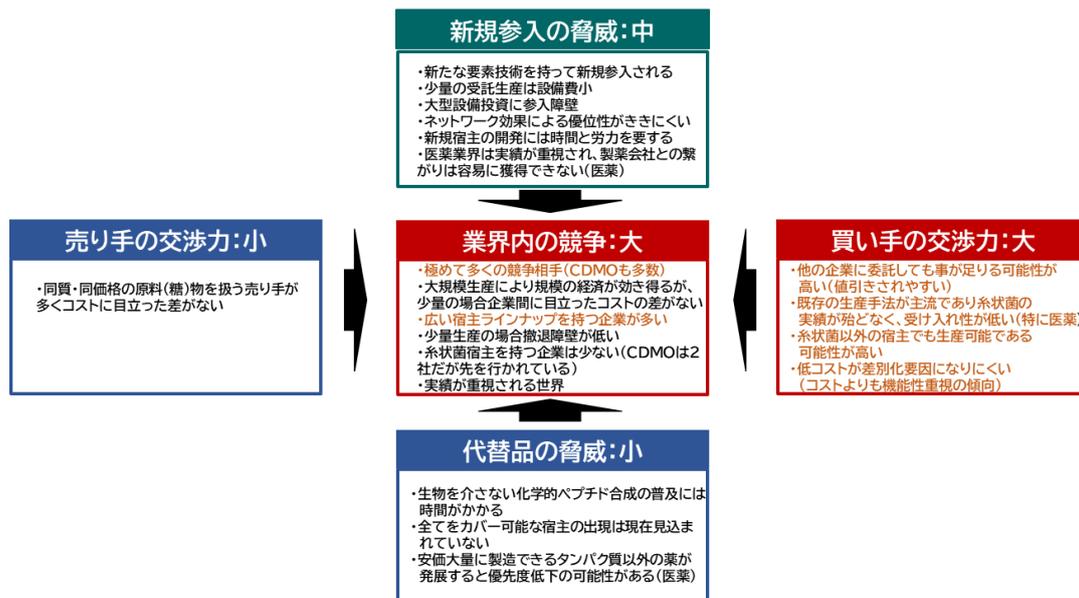


図 4-13 バイオ生産市場におけるタンパク質生産受託事業の競争環境分析

4-1-1でも示してきたように、受託生産事業は業界内の競争が激しく、かつ現時点で花王の糸状菌をベースとしたシステムでの明確差別化ポイントが「コスト」であるが、それも大手他社が有するものと差別化が難しく、そのコストは規模の経済とリンクする。大規模な委託案件を獲得できなければ規模の経済を効かせることが難しい。また一般的な受託の場合、糸状菌の系でなければならぬコスト以外の明確な理由がなく、特に医薬分野においては実績とこれまでの繋がりが重視される傾向が強いため競争環境や買い手からの交渉力は厳しいと予想される。

2-2-2 ファイブフォース分析:タンパク質外販事業の場合

続いてタンパク質外販事業(工業用酵素)の競争環境について図 4-14 に示した。

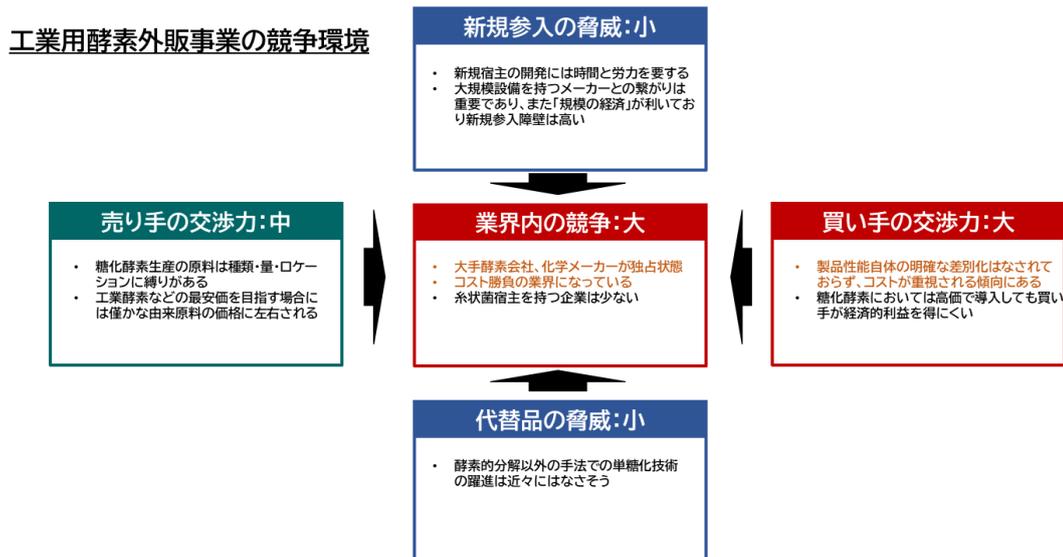


図 4-14 バイオ生産市場におけるタンパク質外販事業(産業用酵素)の競争環境分析

こちらでも 4-1-2 で示したように、Novozymes をはじめとする大手企業の独占状態にある。さらに、一般的な工業用酵素に関しては製品性能自体の明確な差別化よりもコスト重視の傾向が強く、参入障壁は比較的高い。一方で、明確に差別化された有望なターゲットを探す(もしくは他企業と組む)ことができれば、コスト優位性を出しながら参入できる可能性がある。

4-2-2 SWOT 分析

続けてタンパク質の受託生産ビジネスを実施する場合、及びタンパク質外販事業を行う場合の SWOT 分析を実施し、詳細はイノベーション・ストラテジー研究成果書に記載した。花王では枯草菌による長年の酵素生産実績があるものの、枯草菌及びトリコデルマを利用したタンパク質受託生産事業を実施するための基盤となる環境が整っていないと考えられた。一方で外販事業に関しては、受託生産事業と共通する部分も多いが、花王のケミカル会社としての強みを発揮できる可能性が考えられた。

また、タンパク質の外販事業を考える上で重要な外部環境機会として、環境配慮型のモノづくりに対する急速な需要の高まりがある。国連においても加盟国 193 国が 2016 年から 2030 年にかけて達成する目標として SDGs を掲げている。SDGs の第 13 項には「気候変動に具体的な対策を」が定められており、脱炭素社会への具体的なアプローチが望まれている。

4-2-3 タンパク質生産企業のポジショニングと環境分析の総括

続いて、4-1 で調査を進めたタンパク質生産企業のポジショニング分析を行った。

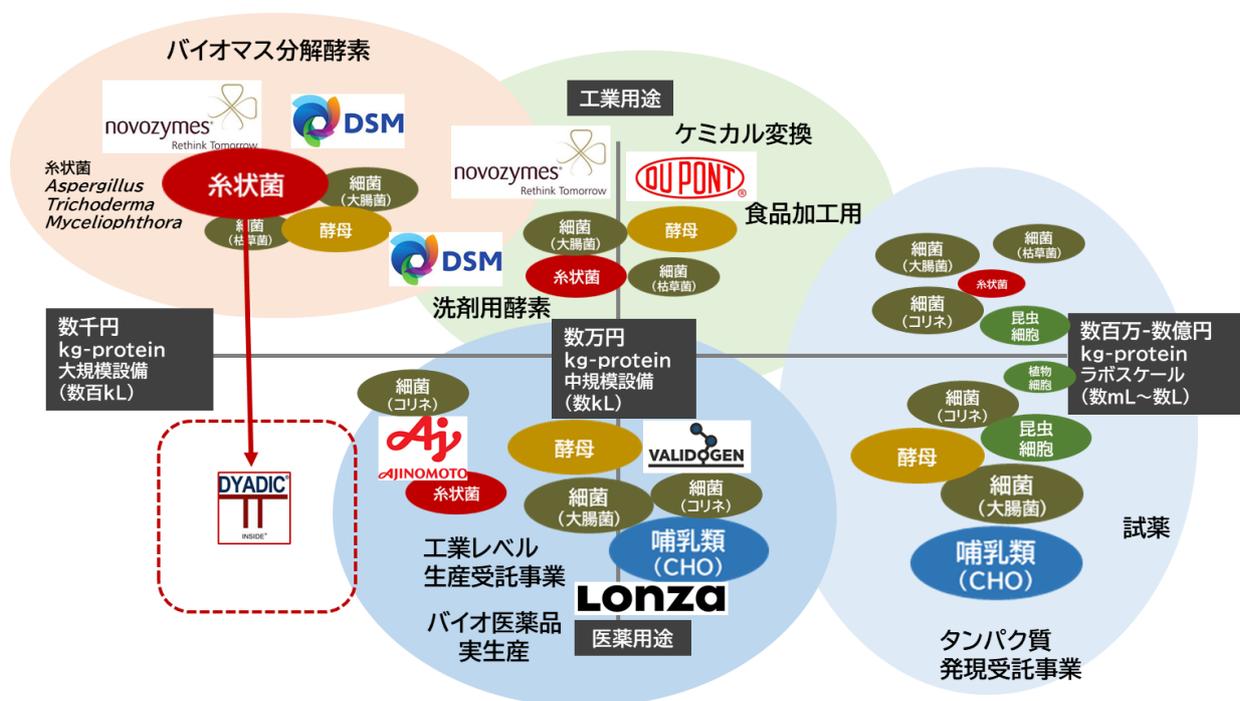


図 4-15 タンパク質生産企業のポジショニング

大型発酵槽を有さずに受託生産ビジネスを行っている企業は生産規模が小さいため、タンパク質の価格としては極めて高価となっている。しかしユーザーも大量のタンパク質を必要しているわけではないため、タンパク質あたりの価格は高価であっても問題はない。複数の生産宿主をラインナップとして揃え、高いタンパク質発現成功率やスクリーニング技術、タンパク質の改変技術を売りとして、少量ながら確実に良いものを提供することをベースとして事業を行っている。大規模な設備投資が必要なく、秀でた要素技術を有すれば事業を開始できるため少量受託生産ビジネスを行っている企業は極めて数が多く、競争環境としては厳しい。また、トリコデルマの生産系の最大の特徴である高い生産性×タンパク質あたりの製造コストが少量生産の場合には優位性にならない点が、少量受託生産ビジネスを実施する上では大きなマイナスポイントであると考えられた。

そこから受託生産ビジネスが順調に進行した企業や、酵素の外販事業などを自社で既に行っている企業は中型～大型槽(数 kL～数十 kL)の発酵槽を保有する傾向にある。高い生産性(数十 g/L)と中型槽以上の規模の経済から、一般的な産業用酵素の価格である数万円/kg-protein まで下がってくる。医薬向けの場合は GMP 準拠設備や精製度の兼ね合いからさらに価格は高いと予想されるが、医薬品の許容単価が高いためにコストよりも品質の方が重視される傾向にあり、価格が安価である方が好ましいものの低コストが必須の業界ではないと考えられた。また、中型槽以上のスケールで安定的に製造を行うためには培養技術、精製技術、工程管理などのスケールアップに関する技術も必要であり、設備投資と合わせてタンパク質の発現技術とは異なるノウハウが必要となり、参入障壁となり得る。結果として少量受託生産ビジネスと比較してプレイヤーの数は減少する。

さらに大規模にタンパク質を生産する企業は、産業用酵素の業界における最大手企業となってくる。価格帯は数千円～数万円/kg-protein であると言われる。これらの企業は酵素の自製・外販を中心とした自社のビジネスとして行っていることが多い。他社の開発したタンパク質を生産することも見受けられるが、受託生産を広く受け付けている訳ではなく、事業としてのコラボレーションといった形式である(例えば P.88 のような Novozymes と CARBios の連携)。産業用酵素の主要プレイヤーは宿主としても、培養技術としても極めて高い酵素生産技術を有しており、希少性が高い。酵素の外販事業としては大手が独占状況にあり、一般的な酵素の外販事業に参入することは競争環境として厳しいと考えられた。

4-1-3 で分析を実施した Dyadic 社は、大手企業がバイオマス糖化酵素分野でひしめく競争環境から、一部技術ポートフォリオの切り離しキャッシュを回収する形をとりながら、産業用酵素レベルの価格帯で生産する菌株の技術、スケールアップノウハウとライセンスビジネスを通じた医薬業界との繋がりを強みとして活かすことでバイオ医薬品の製造受託へと舵を切った。技術的・事業的背景も類似していたこともあり技術的開発の方向性が近く、糸状菌を利用してバイオ医薬品を製造する事業を目指す場合強力なコンペティターとなり得る。

以上のように、少量受託生産ではトリコデルマの生産系の優位性を発揮することが難しく、中～大規模生産による高生産系×規模の経済性を希少性として展開すべきであると考えられた。詳細な考察はイノベーション・ストラテジー研究成果書に記載したが、現在の花王の新規事業形態として一般的な受託生産ビジネスは適合性が低く、自社で製造量をコントロールしながら価値

出しも自社で実施するタンパク質の外販事業を中心として戦略立案すべきと考えた。

そこで極めて重要なのが、製造するターゲットタンパク質である。前述のように、産業用酵素分野においては Novozymes をはじめとする大手企業が席卷しており、コストのみでの参入は容易ではない。また、医療分野においても Dyadic 社が類似の生産系を用いてリードしている。従って、既存酵素、および既存バイオ薬品の製造販売とは異なる、花王のシステムで目指すべきターゲットを見定め、新たな価値軸でポジショニングを取る必要がある。そこで、トリコデルマを利用した生産でなければ目指すことができない/目指すべき事業領域を見定めるために、一度強みの整理を行うこととした。

向かうべき方向性を見定めていくにあたり、何を作るか？というのが最も重要で、難しい問いである。特に、今回はどのように作るかのソリューション（How）が先にあるケースであり、何を作るか、なぜ作るか（Why, What）の選択の幅が非常に広く、自由度が高い。そこで何等かの視点で整理しながら絞り込む必要があった。

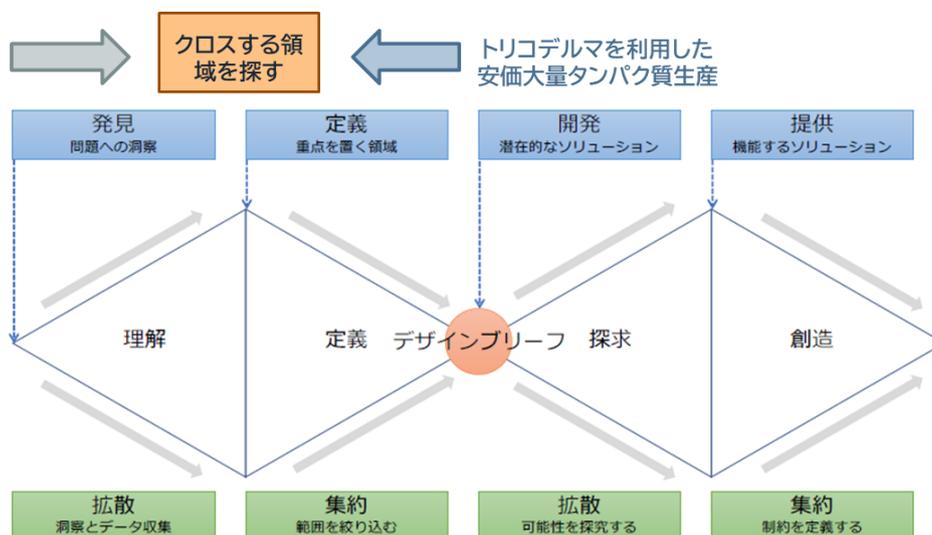


図 4-16 Double Diamond model

そこで、続く 4-3 においては、「糖などの炭素源からタンパク質を低コストで生産する」という事象をさらに深堀し、その背景にある「システム」を整理した。これまでに挙げてきたトリコデルマの生産系の強みは、高生産及びスケールアップ可能であること、及び糸状菌であるが故の強み（酸性条件下を至適とするタンパク質の生産に長けている、など）が中心であり、宿主としての強みという視点が主であった。一方で、技術的な特徴は宿主の能力だけでなく、その周辺技術や生産物の特殊性も強みとなるであろうと考え、続く 4-3 において本技術と社会が必要とする価値がクロスする領域を探することで、4-6 のコアとなるイノベーションの方向性に繋げることとした（図 4-16）。

4-3 トリコデルマを利用したタンパク質生産系の特長整理

最もシンプルなモノの流れは、「糖などの炭素源からタンパク質を低コストで生産する」ことであるが、その「糖の由来」にも差別化可能であると考えられた。

今回中心となる技術的なブレイクスルーは「誘導物質フリーでのタンパク質生産技術」であり、従来はトリコデルマを利用してタンパク質を高生産するためには誘導物質（粉末セルロースなど）が必要であったが、可溶性のグルコースなどの糖のみでのタンパク質高生産が可能となった（詳細は第 2 章、第 3 章に記載）。これにより、バイオマス糖化酵素を安価に製造可能となっただけでなく、その由来原料の自由度が大幅に向上した。一般的にはセルロース及びデンプン由来などの可食糖を原料として糖化酵素の生産を行うが、生産誘導が不要となったために、菌体が資化可能であればどのような炭素源であってもタンパク質生産が可能となった。具体的には可食糖のみならず、廃カーボン資源（モラセスや廃グリセリンなど）の利用なども視野に入るが、バイオマス糖化酵素事業との兼ね合いから、「非可食バイオマス由来の糖」が最も相性が良いと考えられた。この「非可食バイオマス由来」についても、1-4 で記載したように、過去のイノベーション・ストラテジー研究で検討された都市型のセルロース系バイオマスである古紙を由来とするパターンや、バガスなどの農業系残渣のパターンが想定された。これらの非可食バイオマス由来の糖から、セルロース系バイオマスの糖化に必要な糖化酵素及びターゲットとするタンパク質を生産することで、バイオマス糖化酵素と同等程度の価格でありながら、非可食バイオマス由来の持続可能なタンパク質の生産が可能であると考えられた（図 4-17）。

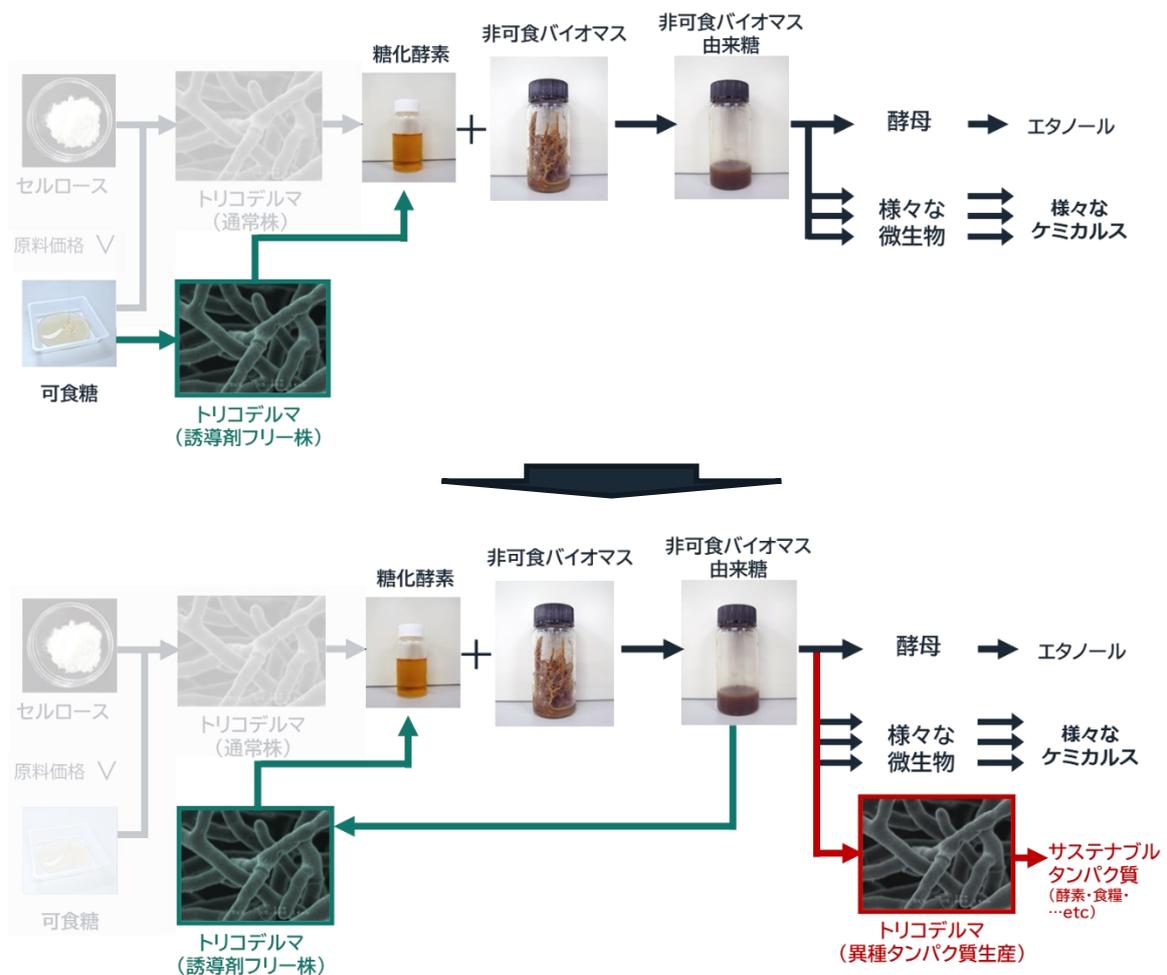


図 4-17 非可食バイオマス由来糖を利用したタンパク質の生産

このような、単純にタンパク質を高生産するだけでなく、糖化酵素の生産系を持ち、非可食バイオマスを利用可能であることは活用すべき重要な強みであり、数万トンスケールの非可食バイオマスからのタンパク質生産が可能な企業は極めて限られると考えられた。

さらに、生産系のプラットフォームだけでなく、トリコデルマを利用した生産物自体の「振る舞い」にも特殊性があると考えた。トリコデルマにより高生産されたバイオマス糖化酵素は極めて高濃度であることから、この性質は他のタンパク質生産系とコスト面以外でも一線を画すと考えた。この点についての詳細は、イノベーション・ストラテジー研究成果書内に記載している。

以上のことから、トリコデルマの生産系も「糖からのタンパク質生産」だけでなく、「非可食バイオマスから」「数万トンレベルで」「安価に」「大量・高濃度であるが故の側面を発揮可能なタンパク質」を製造可能であることを特長とすることが認識された (図 4-18)。

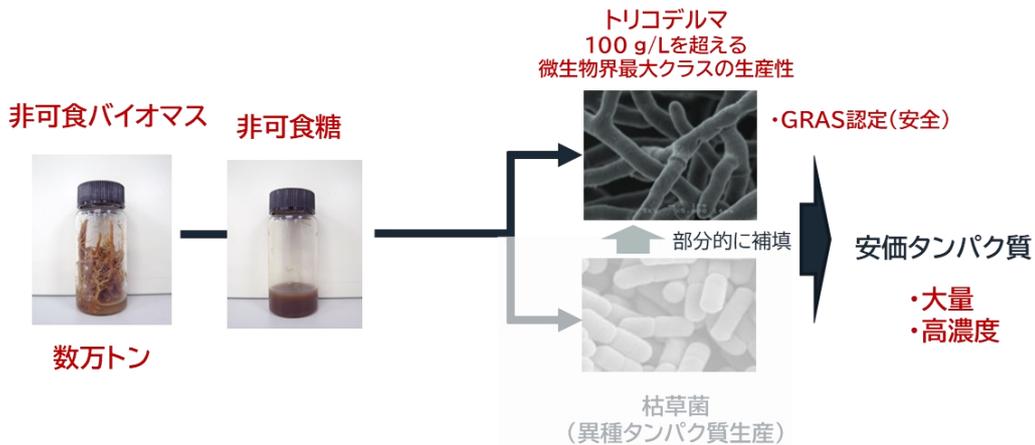


図 4-18 トリコデルマの生産系の特長

その他、付随的な情報として、トリコデルマで生産した酵素(セルラーゼ)は国際的に広く認知されている米国における食品安全に関する認証制度である GRAS (Generally Recognized As Safe) を取得²⁴しており、生産宿主としての *Trichoderma reesei* は一般的に安全であると認識されている。

これらの特長を持って、タンパク質生産により貢献することが可能な社会が求める価値の探索を続くセクションで検討した。

4-4 タンパク質に求められる社会的価値

4-4-1 タンパク質がもたらしてきた価値と今後の展開方向性

微生物によるタンパク質生産がこれまでどのような価値を生み出してきたのか、さらにこれからどのような活用が想定されるのか考えるため、Value graph を作成した。

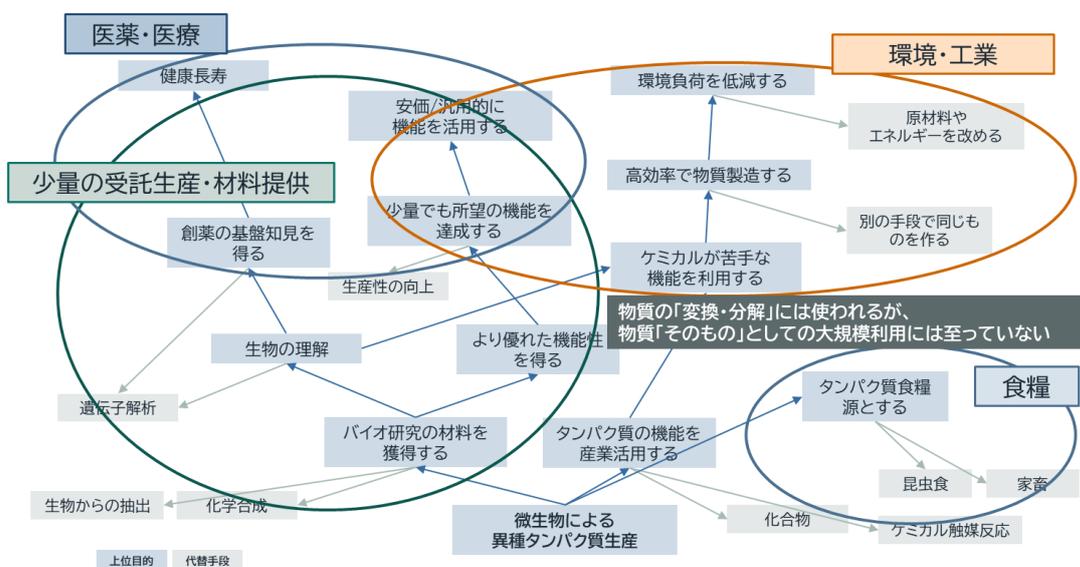


図 4-19 微生物によるタンパク質生産の Value graph

これまでタンパク質の生産は少量生産（発現）による研究用途を通過点として、主に医薬分野、及び環境・工業分野で用いられてきた。抗体をはじめとするバイオ医薬品や工業利用されている酵素も、何らかの分子と結合することでの阻害/活性化や、物質の合成・置換・分解などのケミカル反応の触媒として利用されてきた側面が強い。このような、物質の「変換・分解」には使われてきたが、物質「そのもの」としての大規模利用は近年なされていない。4-3 で示したように、トリコデルマの生産系は安価・大量を特長としているため、触媒としての利用だけでなく、タンパク質を「そのものとして利用する」という考え方は強みと合致する。そのため、トリコデルマの生産系を活かす先は大量に、バルクで必要とされる分野で価値を発揮すると考えられた。

ここで、タンパク質をそのものとして利用する際に、2 つの大枠を考えた。①食料としての利用と②素材(材料)としての利用である。これらについて、トリコデルマの生産プラットフォームとの相性と可能性について検討した。

4-4-2 食料分野におけるタンパク質の可能性

食料とタンパク質に対する需要は増加する一方であり、2050年までに、世界人口が100億人に到達すると推定されており、それに伴い世界的なタンパク質の需要も2倍近くに増えると考えられている²⁵。現在の生産システムでは、タンパク質の将来的な需要は満たすことができず、持続可能な開発目標(SDGs)およびパリ協定で掲げる目標を達成することが難しく、包摂的、効率的、持続可能な世界の食料システムを構築するためには、タンパク質の生産方法の変革が不可欠であると考えられている。

そこで代替タンパク質の登場は、食料システムを大きく改善し、畜産などによる食料生産が気候変動に及ぼす影響を軽減させるだけでなく、経済成長の絶好の機会と捉えられている。代替タンパク質の分野を構成する主な柱は、植物由来のタンパク質、培養肉、発酵の3つが挙げられる。植物由来のタンパク質の売上高は急速に伸びており、従来型の食肉の成長率を上回っている。培養肉(クリーンミート)は、動物の細胞を生体外で培養し、組織化することで肉に近い触感を示すものである。この分野をリードするスタートアップ大手2社であるメンフィス・ミーツとモサ・ミートは、今年、シリーズBの資金調達で2億4,000万ドル余りを調達した²⁶。そして第3の柱として発酵が注目されている。

発酵によるタンパク質においてもさらに大きく2つに大別され、①ホールバイオマス発酵と②精密発酵生産である。①のホールバイオマス発酵は、培養して得た培養物そのものを主成分として食用に供すものであり、クオーン社の肉を使わないマイコプロテインのナゲットやパテ、切り身などが既に上市されている²⁷。また、菌糸体から代替肉を開発するAtlast FoodがシリーズAで4000万ドル(約43億円)を調達したことを発表した²⁸。同社の菌糸体ベースの代替肉が肉のような質感があるのは、菌糸体繊維が筋肉組織のような網目状に成長する特長を活かしたものであると言われる。

②精密発酵生産は微生物を対象のタンパク質の遺伝子を導入し、目的のタンパク質のみを高収率で得るものである。Perfect Day社、精密発酵を利用してホエイやカゼインタンパク質を製造しており、すでにアメリカ国内ではPerfect Day社の乳タンパク質を使用したアイスクリームやクリームチーズなどが販売されている²⁹。また、アメリカのThe Every Company社も

精密発酵によって卵たんぱく質を製造するスタートアップ企業であり、2020年には原料メーカーと共同で動物性原料を使用しないペプシンを開発、発売し、2021年には世界初となる鶏を一切使用しない卵たんぱく質の販売を開始した³⁰。また、2022年には世界で初めて精密発酵によって製造された卵白を商品化し、カリフォルニアの有名パティスリーChantal Guillonと共同で、動物性原料を使用しないマカロンの販売を開始した³¹。Remilk社は、精密発酵による代替乳たんぱく質の開発を手掛けるイスラエルの企業であり、同社は2022年4月に、デンマークに75万平方フィート以上に及ぶ、世界最大規模の精密発酵工場を建設することを発表した³²。また6月には、アメリカFDAよりGRAS自己認証を取得したため、今後アメリカ国内で同社のタンパク質を使用して、アイスクリームやヨーグルト、クリームチーズなどの代替乳製品の製造、販売が可能となった³³。

これらのような代替タンパク質業界に対するベンチャーキャピタル投資は、過去10年間で急速に増加しており、特にここ数年は伸びが急激に加速している。この業界における資金調達額は、2020年上半期だけで2019年通年の調達額を大幅に上回り、初めて10億ドルを突破した。このような成長業界に対し、産業用酵素としても主要なメーカー（DSM、DuPont、Novozymesなど）が、現時点では直接的に代替タンパク質を生産しているわけではないものの代替タンパク質産業に適したソリューションの開発を表明³⁴しており、競争は激化することが予想される。

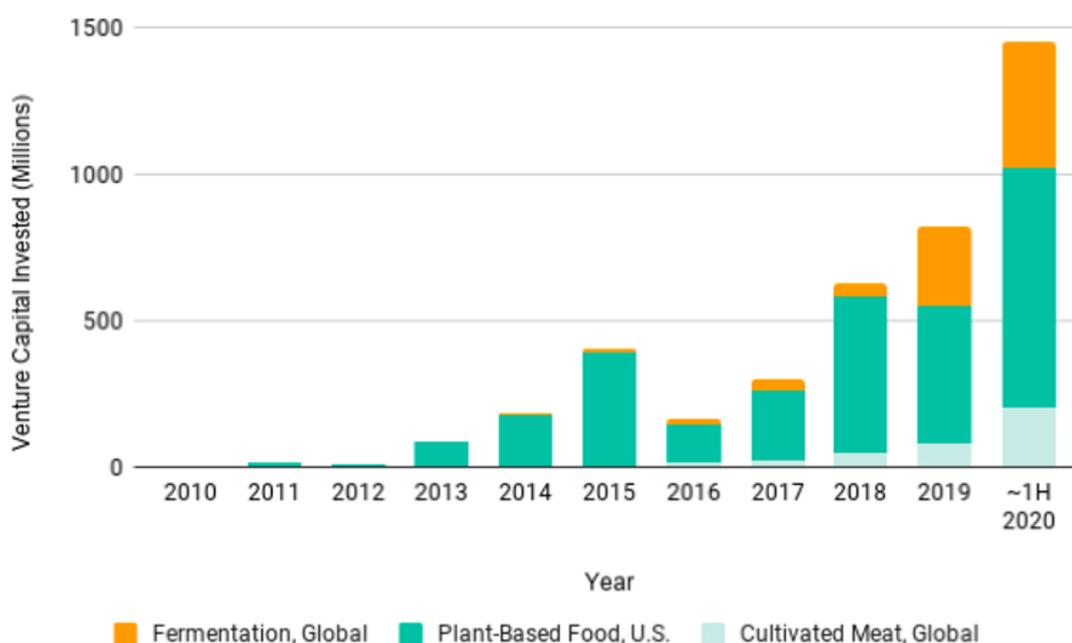


図 4-20 代替タンパク質市場に対する投資^{出典:35}

このような代替タンパク質の業界にトリコデルマの生産系を適用することについて考察を行った。

技術面では、トリコデルマの生産系を展開することで現在の酵母などを利用した食料タンパク質の生産性に対してコスト面での優位性を出せる可能性はあると考える。宿主として GRAS 認

定された実績からも、トリコデルマを食用タンパク質生産系へと展開する可能はあると考える。

一方で、大きな障壁となり得るのが「受け入れ性」であると考えられた。古来より醸造分野で麹菌は利用されてきたが、ホールバイオマス発酵物としてトリコデルマのような糸状菌（カビ）を直接食すことには抵抗を示される可能性がある。さらに消費者からの受け入れ性だけでなく、花王としてのブランドイメージと合致せず、スピアウトした企業としての事業性が求められる可能性がある。また、発酵の原料においても、トリコデルマの生産系における特長である「非可食バイオマス由来の糖」を利用するという点に関しても受け入れ性が低い可能性がある。バガスなどの農業系残渣からの変換であれば可能性があるかもしれないが、古紙などのバイオマス（間接的に）食すことは受け入れ性が低いと予想され、食用タンパク質も「可食糖」からの生産が近々は主要路線で検討されると考えた。将来的に、現在の可食糖のみならず非可食部も食さなければならぬ逼迫した需要が生じる際には検討されるべきだが、スタートアップの昨今においては可食糖からの精密発酵生産の方が業界に適合し、その場合はトリコデルマの生産系の特殊性を發揮しきれないと考えた。

4-4-3 素材分野におけるタンパク質の可能性

石油系プラスチックは、その汎用性の高さや優れた特性（剛性、弾性、絶縁性など）から現代社会において重要な役割を担っている。エチレン、プロピレン、スチレンなど、多くの種類のプラスチック原料は原油から直接抽出されるため、プラスチックの生産は石油の消費に直接影響を及ぼし、原油の消費量を増やしている³⁶。2009年、世界の石油消費量は1日あたり9,830万バレルであった。この消費量が続くと、約1兆2400億バレルある石油の埋蔵量が41年分しか持たないことになる³⁷。また、石油系プラスチックの製造と利用により、相当量の廃棄物が発生しており、米国の自治体から出る廃棄物は、約10%がプラスチックで占められている³⁸。また、大量のプラスチックが廃棄され、最終的には埋立地や水域に運ばれている。これらのプラスチックの投棄は、海洋、淡水、陸上、砂漠を含むほとんどすべての生態系を汚染し、多くの環境問題を引き起こしている³⁹。石油系プラスチックの健康被害や環境被害は、欧州連合(EU)諸国、オーストラリア、中国、サンフランシスコ市の大部分でレジ袋の使用禁止につながり、カリフォルニア州でも禁止が試みられた⁴⁰。

そこで、石油系プラスチックの代替となるバイオプラスチックの開発が盛んである。バイオプラスチックとは、植物などの再生可能な有機資源を原料とするバイオマスプラスチックと微生物等の働きで最終的に二酸化炭素と水にまで分解する生分解性プラスチックの総称である。バイオマス由来かつ生分解性を有するプラスチックとしてPLA（ポリ乳酸）やPHA（ポリヒドロキシアルカン酸）などが有名である。また、植物由来のバイオプラスチック（小麦グルテン、リグノセルロース、セルロース由来のバイオプラスチックなど）は、その特異なポリマー形成と生分解性により、石油由来プラスチックの貴重な代替品となる⁴¹。最大手のプラスチックメーカーであるデュポンは、2010年までに自社製品の25%を再生可能資源で製造することを目標として示した⁴²。

プラスチック材料の形成にタンパク質を利用することは、1930年代に始まり、1940年代まで活発に行われた。この時代のプラスチック原料タンパク質は、主にミルクカゼイン、大豆、コー

ンゼインであった⁴³。さらに古来に遡れば、千年以上も昔から膠などがタンパク質ベースの素材として用いられてきた歴史がある⁴⁴。しかし、プラスチック製造に石油を使用する技術が構築されたため、タンパク質のプラスチック製造への使用は減速された。このような状況から、タンパク質性バイオプラスチック材料や農業用包装フィルムの開発への関心が再び高まっている。

タンパク質は、多くの異なる種類のポリマーネットワークを形成する可能性を持つ理想的なバイオマテリアルとして機能し、バイオプラスチック製造のための有力な選択肢となり得ると言われている⁴⁵。幅広い機能的特性と構造的確認を有するポリマーを形成する能力により、タンパク質は包装用フィルムの形成に適している。例えば、トウモロコシのゼインタンパクから作られたフィルムは、乾燥食品や生鮮食品、ビタミンの保存、薬用(活性化合物の放出制御)に利用されており、Opta Food Ingredients 社により商業的に製造された⁴⁶。また大豆タンパク質とフェノールホルムアルデヒド樹脂の混合物は、自動車の部品の製造にも使われている⁴⁷。また、農業用タンパク質フィルム素材は非常に低コストで分解された後、追加の窒素源として機能する可能性も示されている⁴⁸。このようにタンパク質は、優れた特性を有しながら、かつ生分解性を有するという点で再度注目を集めている。

近年においては、植物や乳などから抽出されたタンパク質だけでなく、精密発酵によって生産された素材用のタンパク質を活用するスタートアップも非常に盛んである。詳細なプレイヤーや業界については 4-5 で後述するが、Spiber、AMSilk、Bolt Threads などの企業が高機能かつサステナブルコンセプトを謳うタンパク質素材の商品化を開始している。

このようなタンパク質素材の分野にトリコデルマの生産系を適用することについて考察を行った。

再生可能なバイオマス資源を原料とするバイオリファイナリーに向けた技術開発が推進されている中の一つにバイオプラスチックの開発があり、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA)、ポリ乳酸 (PLA) などの生分解性樹脂が実用化されつつある。しかしながら、現時点においてこれらのバイオプラスチックはプラスチック全体生産量の僅か 1%にも満たない⁴⁹。また、「物性の安定性」は「生分解性」とトレードオフの関係にあり、全ての求められる機能性(物質安定性と特定環境での生分解性や)を兼ね備えることは難しい。従って今後循環型樹脂に転換していくためには、物性の安定性と任意の生分解性、機能性を併せ持つ樹脂を「デザイン」する取り組みが求められる。タンパク質は多数のアミノ酸が異なる組み合わせで配列された天然の生分解性ヘテロポリマーであり、多くの極性および非極性アミノ酸が存在することで幅広い機能および構造特性を提供するため、バイオプラスチック製造の理想的な原料であると考えられる。さらにタンパク質は構造体を形成するだけでなく、DNA 配列によりアミノ酸配列を操作し、所望の触媒活性や機能性を「デザイン」することが可能であるという特殊なポリマーと捉えられる。このように、タンパク質の特性を活かしながら、再生可能樹脂の選択肢を増やすことは非常に重要であり、社会的に求められる価値であると考えられる。

一方で、調達性(動物・植物からの抽出)、コスト面、機能デザインを含めた技術開発の成熟度が課題となり、未だ大規模に普及していない。機能デザインに関しては開発の余地が残るが、調達性・コスト面においては非可食バイオマスから製造し、コスト面もこれまでのタンパク質素材よりも安価で製造可能である可能性が考えられた。また、素材の分野においては非可食バイオマス

由来という点の受け入れ性は良好であると考えられた。さらに、花王としては包装容器をはじめとする素材の開発、リサイクルにも取り組んでおり、社内利用としての親和性も高い。以上から、素材の分野に関してはトリコデルマを利用した非可食バイオマス由来のプラットフォームは有効に合致し、社会的に求められる価値ともクロスする領域であると考えられた。

4-5 タンパク質素材の既存ビジネス

4-5-1 タンパク質素材市場

タンパク質素材事業を目指すにあたり、既存の市場や主要プレイヤーについて調査を行った。

まず、タンパク質素材市場にも大きく分けて 2 つの分野があり、① 抽出タンパク質由来: 残渣タンパク質などから抽出し、樹脂やフィルム様に再構築を行うもの、② 発酵タンパク質由来: 素材に適したタンパク質を組換え発酵生産し、精製、加工するものである。①は本来素材として利用されるものではないが、タンパク質としての(一般的な)特性を活かして製品化したものである。②はタンパク質のうち細胞骨格やクモの糸のような構造的役割を果たす「構造タンパク質」とよばれるものを精密発酵生産により人工的に大量合成して利用するものである。

① 抽出タンパク質由来:

抽出タンパク質由来のタンパク質素材は、主に大豆タンパク質、乳清由来のホエイ、牛乳やチーズなどの主要構成タンパク質であるカゼインなどから作られている。牛乳に酸を加えるなどするとカゼインは沈澱して、象牙に似た外観の熱可塑性のプラスチックとなる。1898 年にドイツで発明され、これをカゼインプラスチック、ラクトカゼインなどと呼び、印章やボタンなどの材料として工業的に利用されている。また、特にこれらのタンパク質で成形されたものは生分解性があり、ものによっては可食性であるものもある。現在は持続可能なパッケージング・ソリューション業界として、包装容器、食用パッケージング、コーティングフィルムとして利用されている。

食用フィルムとコーティングの世界市場は、予測期間 2020-2025 年に、CAGR8.03%で登録されると予測されている⁵⁰。

② 発酵タンパク質由来:

発酵タンパク質による素材は、現在では殆どが合成スパイダーシルクである。クモの糸は、自然界に存在する繊維の中で最も強度が高く、高級鋼に匹敵する引っ張り強度を持つ。その生体適合性と生分解性により、さまざまな産業にとって魅力的な素材であるが、コストが高いため、短期的には利益率の高い用途に限定されている。また、クモは共食いしてしまうという特性から、蚕のように養殖することはできない。したがって、繊維の合成には、クモの糸タンパク質の生産を可能にする微生物の遺伝子組換え、発酵、および生体模倣または人工紡糸プロセスのいずれかが必要である。

合成クモ糸の世界市場規模は、2020 年に 10 億 9,000 万ドル、2021 年から 2030 年にかけて年率 19.4%で増加し、2030 年には 70 億 2,000 万ドルに達すると予測されている⁵¹。こちらでも現在スタートアップのフェーズであり、既存の工業用酵素などに比較すると成長段

階の市場である。

4-5-2 タンパク質素材ビジネスの主要プレイヤー調査

① 抽出タンパク質由来:

市場の主要プレイヤーは数少ないが、Xampla、Lactips、Aeropowderなどが挙げられる。また、Xampla のスピンアウト元であるケンブリッジ大学や、スウェーデン王立工科大学も本分野で存在感を示している。なお、生分解のある持続可能な包装容器としては、タンパク質を用いない方法での企業として、Craste、SwapBox、Notpla、INVISIBLE、LOLIWARE、LivingPackets、ColorSensing などがある。

<Xampla>

Xampla は、ケンブリッジ大学のスピンアウト企業であり、分離大豆タンパク質(SPI)の溶液をベースとして、クモが絹を作るのと同じようにタンパク質が自己集合して超分子構造になる能力(自己組織化)を利用し、フィルム、ゲル、カプセルなどのプラスチックに似た材料に再構成させている⁵²。

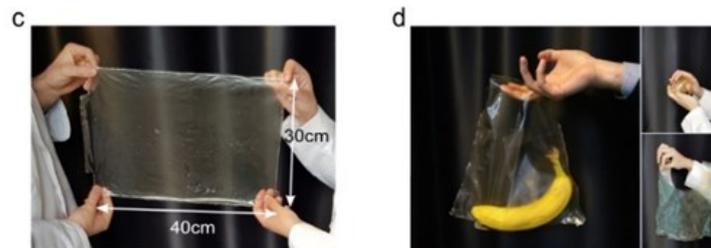


図 4-21 大豆タンパク質由来のフィルム^{出典 52}

同社は、工業、農業、FMCG、化粧品業界において、製品パッケージの代替品としてバイオベースプラスチックの提供を目指している。

- ・可溶性フィルム: 現在トップブランドの食器洗い用タブレットに使用されているポリビニルアルコール (PVOH) の代替想定
- ・食用・調理用ラッピングフィルム: レシピボックスを提供する Gousto 社は、Xampla の食用・調理用ラッピングフィルムを、インド風スパイスキャロット&レンズ豆スープの作成パッケージの一部として採用
- ・高性能フレグランスマイクロカプセル: フレグランス、家庭用品、パーソナルケア分野でマイクロカプセルを提供

<Lactips>

2014 年に設立された Lactips は、フランスのジャンモネ大学発ベンチャーであり、乳タンパク質であるカゼインをベースに、水溶性・生分解性の熱可塑性ペレットを開発した。海洋プラスチック、廃プラスチック問題の解決に資する環境対応素材の一つとして用途開発や顧客提案に取り

組み、EVOH 樹脂の代替を想定している⁵³。

一般家庭での堆肥化に対する OK Compost Home 認証も取得し、可食性であり、透明な表面に印字できる。ガスバリア性もあり食品包材にも適している。土壌環境や水環境だけでなく、海水の中でも生分解できることを確認しており、海洋プラスチック問題の解決に向けたソリューションの一つになると期待されている。

ラクティプスの原料であるカゼインは、欧州で生乳生産量の上限規制が廃止されたため余剰状態にある。接着剤原料としても用途もあるが使い切れていないのが実情で、ラクティプスはカゼインの新たな使い道としても有望視されている。欧州ではすでにBASFと固形粉末洗剤用フィルムに関する取り組みを開始しており、食洗機や洗濯機向け固形洗剤の包装用フィルムとして使用されている。そのため、本社内には年産 1500 トンのペレット生産ラインを保有⁵³。外部協力工場でもフィルム加工も行っている。今後、増産も計画しており、真空成形と射出成形用途への展開も視野に入っている。

具体的な用途としては、紙パッケージ、食品包材、洗剤包装フィルム、化粧品向けマイクロビーズ、ゴルフのティーなどを想定している。価格も既存樹脂と同等になる見込みであるという。



図 4-22 Lactips のカゼインプラスチックペレットと包装材

また、最近では伊藤忠商事、味の素、東洋インキ、伊藤忠プラスチックとともに、ヒートシール剤（アクワシール®）に使用した環境配慮型の紙製包材を共同開発した⁵⁴。東洋インキが開発したヒートシール剤「アクワシール(R)」は、製袋時に包装材を接着するために用いられる本包材のキーマテリアルであり、ここに Lactips の素材が使用されている。

[包装材の層構成]

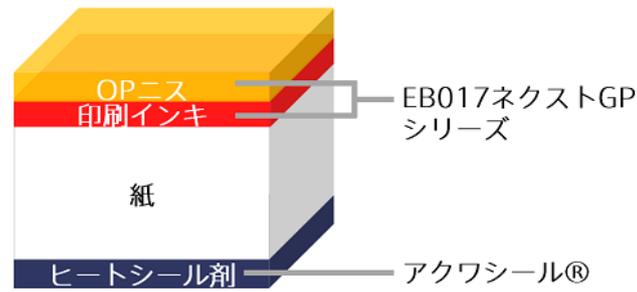


図 4-23 Lactips のカゼイン由来素材が使用されたヒートシール材

本包装材は、味の素の「パルスweet® スリムアップシュガー®」<スティック 20 本入袋>のパッケージの外袋に同包材が採用され、2022 年 4 月中旬の出荷分より順次リニューアルされている。

抽出タンパク質由来の素材では、上記 Lactips が存在感を有している。実際に 1500 トンのパレット生産ラインを有し、実際に包装材として流通が始まっている点も大きい。大豆分離タンパク質、(余剰)カゼインなどは、出発物質の価格が安いことも素材展開比較的早く進んでいる要因だと考えられる。タンパク質の自己組織化構造から薄膜を形成することは、リゾチーム、 β -ラクトグロブリン、ホエイタンパク質、シルクフィブロイン、リコンビナントタンパク質など、さまざまなタンパク質について報告されているが、このような原料から自己組織化材料を生成するには、生産収率の低さと大がかりな精製工程が課題となり、生産コストは 1kg あたり 100 ドルを超えていると言われている⁵²。一方、精製された植物性タンパク質の原料、例えば大豆やエンドウ豆の分離タンパク質(タンパク質含有量 80-90% w/w)は、世界的に大規模に生産されており、はるかに低コスト(3.5-4.6 ドル/kg)で入手できると言われている。カゼインに関しては Lactips が使用しているグレードでの価格は定かではないが、約 1000 円/kg 程度で輸入されている⁵⁵。



図 4-24 カゼイン輸入価格の推移⁵⁵

このような比較的安価なタンパク質を出発物質とし、加工により樹脂・フィルム化することで既

存の石化由来樹脂の代替を目指している。選択するタンパク質の物性に特殊性を見出しているわけではなく、言い換えればタンパク質であればどのようなものでもよく、安価または残渣のタンパク質であることが重要視されていると考えられた。一方で、特定の(残渣)タンパク質であるが故、機能としての拡張性は低いと考えられた。次に述べる発酵タンパク質由来の素材は、そのタンパク質自体が特異な物性を示すことを重要視しており、重きを置く視点が異なるものであると考えられる。

② 発酵タンパク質由来:

市場のプレイヤーには、AMSilk GmbH、Spiber, Inc、Bolt Threads、Kraig Biocraft Laboratories, Inc、Seevix、Inspidere BV、Technology Holdings LLC、Spintex Engineering Ltd、Spiber Technologies ABなどが挙げられる。また、ミュンヘン工科大学、タフツ大学などが研究をリードし、研究所や学術機関も存在感を示している。

○ 主要プレイヤーの技術比較

クモ系タンパク質素材をベースとしたプレイヤーの比較を以下に行った。

表 4-1 クモ系タンパク質素材の主要プレイヤー比較

企業	Spiber Inc.	AMSilk	Bolt Threads	Spiber Technologies	Kraig Biocraft	Seevix Material Sciences
宿主	大腸菌、酵母(その他)	大腸菌	酵母	大腸菌	カイコ	昆虫細胞(S9 TS9)
生産規模	2018年12月に開始したタイでの新生産設備が2021年完工、数百トン/年の規模見込み。また、米国でのADMとの協業プラントは、数年先であるが数千トン/年の生産能力となる見込み。	一桁t-protein 現在は50kLの発酵槽を使用	主に1Lの発酵槽を使用しているが、ミシガン州立大学とともに3,800L、さらに250kLの発酵槽を利用を目指している	パイロット・スケール(規模不明)	ベトナム・クアンナム省にある生産工場では、フル稼働で40 t/y年を生産可能、2020年には8tを生産予定	数百Lの小型バイオリアクター、数年以内に数kL規模への拡張を予定
紡績	精製タンパク質とDMSOを混合し、ポリエステル紡糸と同様のプロセスで繊維を紡糸	特許に記載された紡糸、処理用マイクロ流体システムも特許取得	シルクドープでシルクタンパク質を溶解し、湿式紡糸装置で押し出し、シルク繊維を生産	タンパク質プロセスを繊維束などの形状に自己組織化させる	カイコ自体のシステム	—
アプリケーション	アパレル、建設、自動車	履物、化粧品、医療用インプラント、複合材料(軽量化)	菌系を使ったレザー(クモ系分野からシフトを始めている可能性)	医薬用溶媒、組織培養用生体材料	主に米軍でのアプリケーション開発を担当。プレミアム・テキスタイルとアパレル製品に軸足	当初は3次元組織培養試験をターゲットとしていたが、より高強度で柔軟な複合材料や外科用縫糸などを計画
特許	遺伝子、発酵システム、紡糸に関する多数の特許を取得、他の人工クモ系の開発者と重複する可能性あり	シルクタンパク質の製造方法と下流への応用を含む30件の特許を取得。バイオポリマーを化粧品に応用する特許だけでも10件出願	特許10件出願中。技術プロセスが類似しているため、知財範囲の重複が懸念されるが、酵母を宿主とすることで差別化を図っている	発酵プロセスおよび生体分子・遺伝子改変に関する特許を7件出願中	発酵プロセスおよび生体分子・遺伝子改変に関する特許を7件出願中	エルサレム大学より特許権を取得、合成スパイダーシルクの組成と製造方法およびその複合材料応用に関する2件の特許を出願中

主要プレイヤーが使用している宿主は大腸菌・酵母を中心とした生産系と思われた。糸状菌をメインに使用しているプレイヤーは存在していない可能性がある。タンパク質ベースの素材として非常に注目を集めているクモ系業界であるが、その生産規模は現時点で年間数トン～数十トン程度に留まり、大規模な産業化には至っていない。現在では生産設備・量が小規模であるが、限定商品への導入や開発導入段階であり、コモディティ化には至っていないことが伺える。

Spiber がタイに建設した設備では最大数百トンレベルで生産可能といわれる⁵⁶が、現在の稼働率含め実際の生産量は不明である。

続いて、用途別に各社のアクションを以下にまとめた。

○ アパレル・テキスタイル

上記主要プレイヤーは、主にこの分野をターゲティングして事業の開始を試みている。アパレル業界は持続可能性に関する感度が高く、欧米を筆頭に大量生産・大量消費のファストファッションから持続可能性を意識したサステイナブルファッションへのトレンドが発生していることから生分解性のあるタンパク質を基材とした繊維の受け入れ性が高いためだと考えられた。

<Spiber>

2013年、世界初の合成クモ系のドレスを作り、QMONOS と名付けたハンドスパンのコバルトブルーの素材を使ったノースリーブのシルエットを発表した⁵⁷。その後、Goldwin とのパートナーシップを結び、タンパク質素材「ブリュード・プロテイン(Brewed Protein)」を採用した T シャツ、アウトドアジャケット（いずれも「THE NORTH FACE」ブランドより発売）、セーターを発表した。また、2021年11月には「タンパク質繊維」に天然由来のタンパク質だけでなく人工的に製造されたタンパク質も含まれるように経産省とともに働きかけ、ISO2076 の「タンパク質繊維」の定義が改訂・発行された⁵⁸。この改訂により、タンパク質繊維中のタンパク質成分の基準値が新たに 80%以上と設定された。これは僅かに混合するだけの品を省くためと考えられる。本規格の発行は、初めて人工構造タンパク質素材が国際的に認められ製品規格化された事例と捉えられ、自身のポジショニングを保つための活動と考えられる。

<AMSilk>

2014年、アディダスと提携し、合成クモの糸を使った生分解性シューズを開発した⁵⁹。adidas Futurecraft Biofabric プロトタイプシューズ(試作品)は、Biosteel ファイバーと呼ばれる完全に生分解可能な高性能繊維を使用していることが特徴である。この素材は従来の合成繊維より 15%も軽量である上、利用可能な天然素材の中で最も強いといった、シューズの性能に極めて重要かつユニークな特性を兼ね備えると言われる。

<Bolt threads>

2017年、柔らかく、鉄の 5 倍の強さを有する合成スパイダーシルクを用いたネクタイを制作。その後、マイクロシルク(Microsilk)と、ランブイエウル(メリノウールに似た羊毛)を混合させたビーニー(限定品)を展開した⁶⁰。マイクロシルク(Microsilk)を取り入れている代表的なブランドは、STELLA McCARTNEY で、2017年の7月にパートナーシップを締結⁶¹。デザインにマイクロシルクを取り入れたコレクションを、パリコレで発表した。また、2016年に PATAGONIA との契約にも調印している⁶²。現在は菌糸体素材の Mylo に注力していると考えられ、STELLA McCARTNE が、Mylo を利用したバッグ「Frayme Mylo™」をローンチした⁶³。また、この Mylo の開発において Ginkgo と Bolt Threads が協業(菌糸の成長コン

ール)を開始した⁶⁴。



図 4-25 Bolt Threads の菌糸体素材 Mylo 出典⁶³

<Kraig Biocraft>

2015 年に開発し、現在も進めている用途は防弾チョッキである。その防弾チョッキは、スパイダーシルクの極めて高い引張強度と柔軟性の両方を生かし、弾丸の運動性をよりよく吸収・分散させる⁶⁵。2019 年、テキスタイル開発会社 Polartec と提携し、スパイダーシルクファブリックを商品化した⁶⁶。2021 年、スパイダーシルクをカジュアルウェアで商品化するために合弁会社を設立した⁶⁷。

<Seevix>

2020 年には、シービックス(SVX)とアシックススポーツ科学研究所が、SVX スパイダーシルクを活用したスポーツ用品を共同開発する予定と発表された⁶⁸。SVX の引き糸は同じ直径の高張力鋼板よりも強度が高いうえに、重さは約 5 分の 1 と軽量。さらに温度耐性は $-200\sim+230^{\circ}\text{C}$ と広く、弾性も高張力鋼板の 35 倍と高い。ナイロンやケブラー(アラミド繊維)といった合成繊維と比較しても強度に優れるとしている。

○ 航空宇宙、自動車、建設分野

アパレル業界以外にも、素材としての物理的特性を活かした展開も試みられている。

<Spiber>

自動車分野において、2017 年に Lexus と提携し、Lexus Kinetic Seat Concept を発表⁶⁹。また、2019 年にはブリヂストンと提携し、同社の Brewed ProteinTM 素材を活用することで、自動車シート用ポリウレタン複合フォームを開発した⁷⁰。さらに、トヨタグループ数社とのコラボレーションにより自動車のドアの衝撃吸収材を開発している。建設分野においては、

2019 年三井住友建設(SMCC)と提携し、Spiber の構造タンパク質を使用した建設資材を開発した⁷¹。

<AMSilk>

航空宇宙分野において、2018 年秋 AMSilk は航空宇宙用途のスパイダーシルクに関する Airbus 社との提携を発表した⁷²。AMSilk の Biosteel 繊維が炭素繊維の既存品と比較して柔軟で、メンテナンスを減らし、飛行機を軽量化し、最終的に燃料を節約できるかどうかをテストしているとのことである。また、Airbus 社は、スパイダーシルクを使った複合材料のプロトタイプを今後発表すると公表している。

○ 化粧品分野

化粧品分野も比較的成本許容性があり、展開が比較的進んでいる。

<AMSilk>

2019 年 5 月、大手化粧品会社 Givaudan は、事業の 4 分の 1 を占める収益性の高い AMSilk の化粧品事業を買収した⁷³。この買収は、同社の高機能素材開発が市場投入に近づいていることを示していると考えられる。

<Bolt threads>

2019 年 3 月、Bolt Threads は新しいイニシアチブである Beebe Lab または Bolt Beauty を通じて、クモの糸タンパク質ベースのパーソナルケア製品のプロトタイプを発表した⁷⁴。

以上のように、発酵タンパク質、特にクモ糸タンパク質の展開は、全体を通して高いコスト許容がある業界、及び用途に利用が限られていることが分かる。特性は優れるが、依然としてコストの壁に直面しており、その使用用途は限られているのが現状であると考えられた。現在でも大規模なマテリアルとしての産業は確立されていないように思われた。

クモの糸タンパク質が汎用化されるための課題にタンパク質の生産と紡績工程の開発、及び大規模スケールアップによるコスト低減がある。タンパク質の生産に関しても改善されてきているが、紡糸工程のスケールアップにはまだ非常にコストがかかっており、紡糸していないクモの糸タンパク質の用途を開発も進められている。また、Spiber によれば、「発酵の世界には微生物によるリコンビナントタンパク質の製造コストは 1kg あたり 100 ドル（約 1 万円）を下回ることは困難であるという「100ドルの壁」があり、一方で素材の世界では 1kg あたり 20 ドル（約 2000 円）～30 ドル（約 3000 円）を下回らなければ普及せず、1kg あたり 10 ドル（約 1000 円）以下にならなければ巨大市場にはならないという「常識」があった」との記載がある⁷⁵。一方で、トリコデルマの生産系をはじめとする Biofuel 分野の酵素は数千円/kg であり、発酵タンパク質として 100 ドルの壁を突破していると考えられるため、ここに技術展開の余地があると考えられる。

また、特筆すべき投資及び Spiber のパートナーシップとして、2020 年 10 月、米国に人工タンパク質素材「Brewed Protein」の原料の量産工場を建設することを発表した⁷⁶。原料プラントの年産能力は数千トン規模になると言われる。米国の穀物メジャーの全面的なバックアップは、次世代素材の大本命とも言われる人工タンパク質素材の世界規模での拡大につながる可能性がある。ADM はスパイバーの増資を引き受け、約 59 億円を出資するとのことであり、ADM は昨年 12 月にも 43 億円を出資しており、今回の増資でゴールドウインを抜き合成樹脂材料大手の KISCO につぐ第 2 位の株主(出資比率 9.80%)になる。ADM は、米国における植物由来のグルコースを原料とする Brewed Protein™ 発酵生産のオペレーションを担当し、さらに ADM がこれまで蓄積してきた商業規模での発酵生産における深い知見、プラントエンジニアリングやオペレーションに関するノウハウを、Spiber が独自に確立した発酵生産技術と統合することで更なる生産の拡大を進めると発表している。ADM の生産ノウハウとの統合、及び発酵原料として安価糖の提供を受ける体制を構築することは、植物由来原料かつ低コストを目指す上で脅威となり得る。

加えて、Novo Holdings が Cargill とともに AMSilk への 3500 万ドルのシリーズ C 投資を実施すると発表があった⁷⁷。この資金調達により、AMSilk の産業用プロジェクトの世界規模での継続的なスケールアップが加速され、新規市場への顧客基盤の拡大を継続しながら、商業活動の国際化が進行する可能性がある。

このように、穀物メジャーである ADM、Cargill などが出資を始めており、糖を利用した大規模工業化に向けた動きが始まっている。ただし、これらの穀物メジャーが提供する糖は一般に「可食糖」であり、本戦略において花王が実施しようとする「非可食バイオマス由来糖」の利用とは異なる。Spiber に関しては、「将来的に同素材が広く普及、あるいはバイオ素材産業が拡大していくと、食料供給源と競合する可食バイオマス由来の原材料から、非可食バイオマス由来の原材料に転換していく必要があります。この移行を実現するために、現在私たちは、バガス(サトウキビの搾汁残渣)やコーンストーバー(トウモロコシの茎葉)などセルロースを多く含む農業副産物を糖化して、Brewed Protein ポリマーの主原料として活用する技術を共同研究しており、数年以内の実用化を目指しています」と述べており⁷⁸、将来的には非可食糖を利用していく意思を示している。

4-6 コアとなるイノベーションの方向性

以上の調査と分析を総括する。

- ・少量受託生産ビジネスはプレイヤー企業数が極めて多く競争環境としては厳しい。また、トリコデルマの生産系の最大の特徴である高い生産性≒タンパク質あたりの製造コストが少量生産の場合には優位性にならない
- ・中～大規模生産による高生産系×規模の経済性を希少性として展開すべき
- ・規模の経済性を活かした低コストを価値の中心とした受託生産ビジネスを実施する場合も、高い稼働率となるような受注を維持することが難しい
- ・生産受注を見込みにくい状況下における新規設備投資はスタートアップ時におけるリスクが高

- く、新規設備投資と低稼働率は「低コスト」という優位性を発揮するのが難しい
- ・産業用酵素の外販事業は Novozymes をはじめとする大手企業が席卷しており、コストのみでの参入は容易ではない
 - ・医療分野においても Dyadic 社が類似の生産系を用いてリードしている
 - ・安価、大量を優位性として目指す、産業用酵素及びバイオ医薬品とは異なる展開軸を持つことが望ましい
 - ・花王では、セルロース系バイオマス糖化酵素の安価・大量製造技術を磨いてきており、非可食原料を使い込むための素地となる技術を有する
 - ・タンパク質そのものを利用する、という分野は高濃度でタンパク質を生産できるからこそ目指せる事業領域
 - ・食料分野への展開は、「受け入れ性」の視点から適合性が低いと推定
 - ・素材分野への展開は、「非可食バイオマスから」「数万トンレベルで」「安価に」「大量・高濃度であるが故の側面を発揮可能」という点と、社会的な価値からも適合性が高いと想定
- 以上から、トリコデルマの生産系を利用して向かうべき方向性を以下のように見定めた。

コアとなるイノベーション・ストラテジーは、糖化酵素を基盤として得られた非可食バイオマス由来の糖、及び安価大量のタンパク質生産技術を用いて、「発酵生産タンパク質そのものを素材として活用する」という新たな循環型素材を提供するプラットフォームの提案である。

- ① 由来原料：石化由来から、非可食バイオマス由来(古紙・製紙パルプ、農業系残渣)へ転換する。非可食バイオマスを糖化し、タンパク質の発酵生産原料となる糖を獲得するための糖化酵素の生産技術開発、酵素開発を花王にて実施中である。
- ② コスト面：糖化酵素の生産宿主として利用している糸状菌トリコデルマは極めて高濃度にタンパク質を分泌生産可能であり、発酵生産タンパク質としては最も安価な価格帯である。
- ③ 機能性面：タンパク質素材ならではの機能性及び生分解性を有する樹脂デザインが今後可能になると想定される。

このような、非可食バイオマス由来、安価で、機能をデザイン可能な新規素材により、石化由来の樹脂から持続可能樹脂へと転換する基盤の提供をイノベーション・ストラテジーの根幹に据えた。

続く第5～9章において、素材分野へ本プラットフォームを適用する際の分析及び戦略について詳細に述べた。

4-7 参考文献

1. Qingdao Vland Biotech Inc., ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日),
<http://www.vlandbiochem.com/>
2. Ginkgo Bioworks プレスリリース, Ginkgo Enzyme Services, ウェブサイト (閲覧日:2023年4月)

- 月12日), <https://www.ginkgobioworks.com/offerings/enzyme-services/>
3. Ginkgo Bioworks プレスリリース, Optimizing Enzyme Expression and Performance with Zymtronix, ウェブサイト (閲覧日:2023年4月12日),
<https://www.ginkgobioworks.com/2023/02/16/optimizing-enzyme-expression-and-performance-with-zymtronix/>
 4. 日経バイオテク, 味の素、糸状菌でヒト蛋白質を 5g/L 超分泌発現、受託サービス「TALAMAX」を開始, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日),
<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/news/p1/19/10/08/06111/>
 5. 味の素株式会社, バイオフィン事業:タンパク質分泌発現系 TALAMAX®, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日), https://www.gmp-platform.com/article_detail.html?id=8822
 6. 味の素株式会社, バイオフィン事業:CORYNEX®の特徴, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日), <https://www.ajinomoto.co.jp/corynex/jp/characteristic/>
 7. 日経バイオテク, 超巨大産業“医薬品業界”で進む変革 水平分業化の進展でイノベーション創出が加速, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日),
<https://project.nikkeibp.co.jp/atclmono/business/061200015/>
 8. 株式会社シード・プランニング調査資料, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日),
<https://www.seedplanning.co.jp/archive/press/2017/2017090101.html>
 9. Lonza, Fast-Track Expression and Production of Next-Generation Therapeutics with Lonza's XSTM Pichia Platform, ウェブサイト (閲覧日:2020年5月1日)
 10. Puetz J, Wurm FM. Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. *Processes*. **7(8)**:476 (2019).
 11. 日本酵素協会編:日本酵素産業小史, p.97 (2009)
 12. 紀藤邦康:世界の酵素市場, 第7回酵素応用シンポジウム講演要旨, p.14-15 (2007)
 13. Computational and Structural Biotechnology Journal : Volume No: 2, Issue: 3, 2012
 14. DYADIC INTERNATIONAL, INC., UNITED STATES SECURITIES AND EXCHANGE COMMISSION Washington, D.C. 20549, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日),
<https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1213809/000114036114037770/form10-12ga.htm>
 15. Santonu Kashyap, Enabling the 2G Ethanol Industry Globally –A Novozymes perspective (2020)
 16. Carbios プレスリリース, ウェブサイト (閲覧日:2020年5月1日),
<https://www.carbios.com/en/carbios-enters-joint-development-agreement-with-novozymes-to-produce-its-proprietary-enzyme-for-complete-recycling-of-pet-plastics-and-fibers/>
 17. Novozymes プレスリリース, ウェブサイト (閲覧日:2020年5月1日),
<https://www.novozymes.com/en/news/news-archive/2021/12/novozymes-to-deliver-on-strategy-with-carbon-capture-collaboration-agreement>

18. DYADIC, AN INDUSTRIAL SCALE PLATFORM FOR ENZYMES AND OTHER PROTEINS, https://www.bio.org/sites/default/files/legacy/bioorg/docs/MON_PLAZAA_Dyadic%20-%20Overview%20Presentation%20-%20December%202013%20Bio%20-%20vFinal.pdf
19. Outsourcing, Dyadic to sell fungal expression system to DuPont for \$75m, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日), <https://www.outsourcing-pharma.com/Article/2015/11/18/Dyadic-to-sell-fungal-expression-system-to-DuPont-for-75m>
20. Zach's SCR, DYAI: Another Partnership, Another Step Closer To Immunizing The World, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日), <https://scr.zacks.com/news/news-details/2020/DYAI-Another-Partnership-Another-Step-Closer-to-Immunizing-the-World/default.aspx>
21. Kao Corporation, CSRレポート2009, ウェブサイト (閲覧日:2022年10月1日), https://www.kao.com/content/dam/sites/kao/www-kao.com/jp/ja/corporate/sustainability/pdf/pdf_reports_01_05_01_001.pdf
22. Kao Corporation, 花王、ESG戦略「Kirei Lifestyle Plan」を発表, ウェブサイト (閲覧日:2022年10月1日), <https://www.kao.com/jp/corporate/news/sustainability/2019/20190422-001/>
23. Kao Corporation, 2040年カーボンゼロ、2050年カーボンネガティブ実現に向けた活動を加速, ウェブサイト (閲覧日:2022年10月1日), <https://www.kao.com/jp/corporate/news/sustainability/2022/20220426-002/>
24. GRAS Notice 891, Cellulase produced by *Trichoderma reesei*, ウェブサイト (閲覧日:2022年10月1日), <https://www.fda.gov/media/153008/download>
25. Daniel Smith *et al.*, Internet of Animal Health Things (IoAHT) Opportunities and Challenges
26. Good Food Institute, UPSIDE Foods' \$161 million Series B is a turning point for the meat industry, ウェブサイト (閲覧日:2022年9月1日), <https://gfi.org/blog/memphis-meats-series-b-cultivated-meat/>
27. Quorn: Vegetarian & Vegan Products, Meat Free Recipes, ウェブサイト (閲覧日:2022年9月1日), <https://www.quorn.co.uk/>
28. Foovo, 菌糸体から代替肉を作る Atlast Food が約 43 億円を調達, ウェブサイト (閲覧日:2022年9月1日), <https://foodtech-japan.com/2021/04/17/atlast-food/>
29. PERFECT DAY, ウェブサイト (閲覧日:2022年9月1日), <https://perfectday.jp/>
30. FOODnavigator-usa, The EVERY Company raises \$175m to expand 'animal-free' protein platform, ウェブサイト (閲覧日:2022年9月1日), <https://www.foodnavigator-usa.com/Article/2021/12/07/The-EVERY-Company-raises-175m-to-expand-animal-free-protein-platform#>
31. FOODnavigator-usa, The EVERY Co unveils 'world's first animal-free egg white,'

- road-tested in 'holy grail' application: the macaron, ウェブサイト (閲覧日:2022年9月1日), <https://www.foodnavigator-usa.com/Article/2022/03/23/The-EVERY-Co-unveils-world-s-first-animal-free-egg-white-road-tested-in-holy-grail-application-the-macaron>
32. CISION PR Newswire, REMILK TO BUILD THE WORLD'S LARGEST PRECISION FERMENTATION FACILITY, ウェブサイト (閲覧日:2022年9月1日), <https://www.prnewswire.com/il/news-releases/remilk-to-build-the-worlds-largest-precision-fermentation-facility-301533113.html>
 33. Food ingredients 1st, Remilk secures self-affirmed GRAS for non-animal, real dairy protein, (閲覧日:2022年9月1日), <https://www.foodingredientsfirst.com/news/fda-greenlights-remilks-proteins-paving-way-for-non-animal-real-dairy-products-in-us.html>
 34. Food ingredients 1st, Fonterra and DSM introduce precision fermentation start-up for dairy-like proteins, ウェブサイト (閲覧日:2022年9月1日), <https://www.foodingredientsfirst.com/news/fonterra-and-dsm-introduce-precision-fermentation-start-up-for-dairy-like-proteins.html>
 35. WORLD ECONOMIC FORUM, 効率的で、持続可能な食料システムの構築の鍵となる「発酵」, ウェブサイト (閲覧日:2022年9月1日), <https://jp.weforum.org/agenda/2020/12/de-na-shisutemuno-no-tonaru/>
 36. Gervet, B. 2007. The use of crude oil in plastic making contributes to global warming.
 37. Momani, B., Assessment of the Impacts of Bioplastics: Energy Usage, Fossil Fuel Usage, Pollution, Health Effects, Effects on the Food Supply, and Economic Effects Compared to Petroleum Based Plastics. Worcester Polytechnic Institute, 1-58 (2009)
 38. Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C. and Barlaz, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Phil. Trans. R. Soc.*, **364**, 1985-1998 (2009)
 39. Thompson, R. C., Moore, C. J., Saal, F. S., and Swan, H. S., Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, **364**: 2153-2166 (2009)
 40. Mooney, B.P., The second green revolution? Production of plant-based biodegradable plastics. *Biochem. J.* **418**: 219-232 (2009)
 41. Wretfors, C., Cho, S-W., Hedenqvist, M. S., Marttila, S., Nimmermark, S. and Johansson, E., *J. Polym. Environ.*, **17**: 259-266 (2009)
 42. Dupont. 2001. プレスリリース: Genencor International and Dupont expand R&D collaboration to make key biobased polymer. ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日), <http://www1.dupont.com/NASApp/dupontglobal/corp/index.jsp?page=/content/U>

[S/en US/news/product/2001/pn03_12_01.html](https://www.nippon.com/en/US/news/product/2001/pn03_12_01.html)

43. Verbeek, C. J. R. and Berg, L. E. V., Recent Developments in Thermo-Mechanical Processing of Proteinous Bioplastics. *Recent Patents on Materials Science*, **2**: 171-189 (2009)
44. 山形大学, 明治43年、旧米沢高等工業学校の設立—産業革命と化学工業の歴史—, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日), https://edu.yz.yamagata-u.ac.jp/Public/53202/53202_01.asp
45. Guilbert, S and Cuq, B., Material formed from proteins. In: C. Bastioli, Editor, *Handbook of Biodegradable Polymers*, Rapra Technology Limited, United Kingdom (2005)
46. Cuq, B., Gontard, N. and Guilbert, S., Proteins as Agricultural Polymers for Packaging Production. *Cereal chem.*, **75**: 1-9 (1998)
47. Jane, J., Lim, S., Paetau, I., Spence, K., and Wang, S., Biodegradable plastics made from agricultural biopolymers. in: *Polymers from Agricultural Coproducts*. M. L. Fishman, R. B. Friedman, and S. J. Huang, eds. *ACS Symposium Series*, **575**: 92-100 (1994)
48. Montain, L., Dez, I. and Madec, P., Development of new composites material, carriers of active agents, from biodegradable polymers and wood. *C.R. Chim.*, **7**: 635-640 (2004)
49. 環境省, バイオプラスチックを取り巻く 国内外の状況, https://www.env.go.jp/recycle/ref2101193_1.pdf
50. 株式会社グローバルインフォメーション, 食用フィルムとコーティングの市場 - 成長、動向、予測(2020年~2025年), ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日), <https://www.gii.co.jp/report/moi754847-edible-films-coating-market-segmented-by.html>
51. Allied Market Research, Synthetic Spider Silk Market, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日), <https://www.alliedmarketresearch.com/synthetic-spider-silk-market-A13098>
52. Kamada, A., Rodriguez-Garcia, M., Ruggeri, F.S. *et al.* Controlled self-assembly of plant proteins into high-performance multifunctional nanostructured films. *Nat Commun* **12**, 3529 (2021)
53. Lactips, A natural polymer that's biodegradable in aquatic, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日), <https://www.lactips.com/?lang=en>
54. 伊藤忠商事, 100%自然由来の生分解性樹脂を使用した包材の展開について, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日), <https://www.itochu.co.jp/ja/news/press/2022/220502.html>
55. GD Freak!, カゼイン(たんぱく系物質)の輸入動向 HS350110, ウェブサイト (閲覧日:2021年10月1日), <https://jp.gdfreak.com/public/detail/jp010090001210167i5a/4>
56. Nippon.com, 鶴岡市のバイオベンチャー・スパイバー タイに大規模量産工場, ウェブサイト (閲覧日:2022年10月1日), <https://www.nippon.com/ja/news/ks202104018898/>

57. 日経 XTECH, 日本の若者が世界の研究チームに勝てたワケ, ウェブサイト (閲覧日:2021 年 10 月 1 日), <https://xtech.nikkei.com/dm/article/COLUMN/20130626/290053/>
58. 経済産業省, タンパク質繊維の名称・定義に関する国際標準が発行されました, ウェブサイト (閲覧日: 2022 年 10 月 1 日),
<https://www.meti.go.jp/press/2021/12/20211203003/20211203003.html>
59. PR TIMES, アディダス、世界初となる Biosteel ファイバー製 高性能シューズを発表, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月 1 日),
<https://prtimes.jp/main/html/rd/p/000000324.000003301.html>
60. Bolt Threads, Microsilk, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月 1 日),
<https://boltthreads.com/technology/microsilk/>
61. Bolt Threads プレスリリース, Stella McCartney and Bolt Threads Announce a New Partnership Focused on Sustainable Fashion and Luxury Materials Development, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月 1 日), <https://boltthreads.com/2017/07/20/stella-mccartney-and-bolt-threads-announce-a-new-partnership-focused-on-sustainable-fashion-and-luxury-materials-development/>
62. Bolt Threads プレスリリース, Bolt Threads Will Bring Its Spider Silk Fabric to Patagonia, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月 1 日),
<https://boltthreads.com/2016/05/11/fortune-silk-patagonia/>
63. Bolt Threads プレスリリース, Stella McCartney creates world's first clothes, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月 1 日), <https://boltthreads.com/2021/03/17/stella-mccartney-creates-worlds-first-clothes-made-from-mushroom-leather/>
64. Bolt Threads プレスリリース, Bolt Threads Announces Latest Collaboration with Ginkgo Bioworks to Optimize its Mylo™ Material, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月 1 日),
<https://www.prnewswire.com/news-releases/bolt-threads-announces-latest-collaboration-with-ginkgo-bioworks-to-optimize-its-mylo-material-301654340.html>
65. WWD, 50 年ぶりの大革命!? 人工「蜘蛛の糸」は何がすごいのか, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月 1 日), <https://www.wwdjapan.com/articles/452786>
66. Kraiglabs プレスリリース, POLARTEC AND KRAIG BIOCRAFT LABORATORIES TO BRING FIRST SPIDER SILK FABRICS TO THE PERFORMANCE APPAREL MARKET, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月 1 日), <https://www.kraiglabs.com/polartec-and-kraig-biocraft-laboratories-to-bring-first-spider-silk-fabrics-to-the-performance-apparel-market/>
67. Kraiglabs プレスリリース, KRAIG BIOCRAFT LABORATORIES AND MTHEMOVEMENT BY KINGS GROUP SIGN EXCLUSIVE PURCHASE AND SALES AGREEMENT FOR UP TO POTENTIALLY \$40 MILLION, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月 1 日),
<https://www.kraiglabs.com/kraig-biocraft-laboratories-and-mthemovement-by-kings-group-sign-exclusive-purchase-and-sales-agreement-for-up-to-potentially->

40-million/

68. 日経 XTECH, アシックス、未来のシューズに人工クモ糸活用 強度に優れ軽量, ウェブサイト (閲覧日: 2022 年 5 月1日), <https://xtech.nikkei.com/atcl/nxt/news/18/10792/>
69. TOYOTA プレスリリース, Lexus Kinetic Seat Concept World Premiere at the 2016 Paris Motor Show, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月1日),
<https://global.toyota/en/detail/13490544/>
70. Synbio beta, Spiber' s biomaterials stack: From new production facility to fashion runway, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月1日),
<https://www.synbiobeta.com/read/spibers-biomaterials-stack-from-new-production-facility-to-fashion-runway>
71. Sumitomo Mitsui Construction Co., Ltd. プレスリリース, Development of novel materials and technologies using structural proteins for use in the construction industry, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月1日),
https://www.smcon.co.jp/topics/assets/uploads/2019/03/release_20190325_EN.pdf
72. AMSilk プレスリリース, AMSilk announces partnership with Airbus, ウェブサイト (閲覧日: 2022 年 5 月1日), <https://www.amsilk.com/2018/09/12/amsilk-announces-partnership-with-airbus/>
73. Givaudan プレスリリース, Givaudan to acquire cosmetics business of AMSilk, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月1日), <https://www.givaudan.com/media/media-releases/2019/givaudan-acquire-cosmetics-business-amsilk>
74. Bolt Threads, Beebe Lab, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月1日),
<https://boltthreads.com/boltbeauty/>
75. Gigazine, ナイロン以来の技術的進歩をもたらしそうな「人工合成クモ糸」, ウェブサイト (閲覧日: 2022 年 5 月1日), <https://gigazine.net/news/20160707-synthetic-spider-silk/>
76. Spiber プレスリリース, Spiber と米国穀物メジャーADM、構造タンパク質素材「ブリュード・プロテイン 罎」の米国での量産に関する提携のお知らせ, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月1日),
<https://spiber.inc/news/detail/id=464>
77. Novo holdings プレスリリース, Novo Holdings leads EUR 29M investment in bio-based silk supplier AMSilk, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月1日),
<https://www.novoholdings.dk/news/novo-holdings-leads-eur-29m-investment-in-bio-based-silk-supplier-amsilk/>
78. Spiber Inc., Brewed Protein™, ウェブサイト (閲覧日:2022 年 5 月1日),
<https://spiber.inc/brewedprotein/>

5. 技術戦略

本セクションでは、非可食糖由来タンパク質素材事業を進めるにあたって、現在保有している技術、現在保有していないが、事業実施に必要な技術、競争力維持のために必要な技術の戦略について述べる。

5-1 非可食糖由来タンパク質素材事業に必要な技術の全体像

非可食糖由来タンパク質素材事業には、複数の重要な要素技術が必要である。大きく分けて、タンパク質（バイオマス糖化酵素・素材用タンパク質）の生産プラットフォームの部分、及びタンパク質素材自体の技術が必要となる。さらに、実際には古紙の収集、糖化液から非可食糖を製造する部分が必要となるが、これについてはすでに前者のイノベーション・ストラテジー成果書で検討されたため、本報告書では詳細は割愛する。以下、生産プラットフォームの部分とタンパク質素材の部分に分けて検討を行った。

5-2 タンパク質生産プラットフォームの開発

5-2-1 開発した技術ポートフォリオ

タンパク質生産プラットフォームとして現在有する技術ポートフォリオについて、以下にまとめた。



図 5-1 非可食糖からのタンパク質生産プラットフォームにおいて
花王が有する技術ポートフォリオ

非可食糖からのタンパク質生産プラットフォームは、大きく分けて 4 つの技術要素から構成され、菌株技術(生産宿主)、培養技術、その菌株と培養系を利用して実製造まで実施するための技術、及び原料となる非可食糖を得るための技術である。

菌株技術については、1-3 及び 1-4 でも述べたが、1 ポットでの高機能酵素生産株、グルコー

ス耐性強化技術、誘導物質フリー生産株技術が主に挙げられる。多くは知財化も進めており、具体的には 6-1 で述べる。この中でも特に、1-4-1 及び第 2, 3 章で述べた誘導物質フリーでのタンパク質生産のための改変技術を有することは、後に示す非可食糖を利用したタンパク質生産という大きな差別化ポイントにも繋がる技術であり、タンパク質生産プラットフォームのベース技術として重要な位置づけである。

ラボ～ベンチスケールでの生産検討を実施している研究機関、企業は多いと考えられるが、事業化を目指して数十 kL の実機スケール検証、及び、オンサイト製造に適した実製造プロセスの技術を有している企業は比較的少ない。

「非可食糖を利用した」タンパク質製造を行うためには、非可食糖をタンパク質生産に利用なレベルまで加工する技術が必要であるこの部分は技術ポートフォリオの拡充が必要であると考えられるが、少なくとも糖化酵素を、競争力を持って非可食糖から製造するための技術ポートフォリオは概ね揃っていることが考えられた。

5-2-2 今後の開発方針

トリコデルマを利用した分泌型酵素（セルラーゼ・ヘミセルラーゼ、アミラーゼなど）の異種タンパク質生産は比較的経験が豊富だが、スパイダーシルクタンパク質など、様々なタンパク質を作りこなすための技術ポートフォリオは不足している。また、トリコデルマの高生産性は、「複数タンパク質の混合物として」極めて高いという特性がある。この点も、目的タンパク質の単一ないしは二・三種のみを高純度で得たいという視点では課題となり得る。

したがって、異種タンパク質の生産技術として、

- ① 特殊なタンパク質の生産検討（土俵に立つための開発）
- ② 異種タンパク質の生産効率を高める開発（コスト視点）
- ③ 目的タンパク質の単一高生産開発（純度視点）

について実施し、プラットフォームとしての完成度を高めていく必要があると考えている。

5-3 タンパク質素材の開発

5-3-1 プロトタイピング

これまで、花王では素材用としてタンパク質を展開するための開発を積極的に実施してきておらず、現状技術ポートフォリオを有さない。5-2 ではタンパク質の生産にフォーカスしてきたが、事業を実施するためには、タンパク質素材としての開発と、その後、生産、製剤化を経た上での加工の技術も必要となると想定される。これらの技術は非可食糖が製造されてくるまでに開発または技術導入を行うことを想定する。本報告書においては、プロトタイピングを実施したが、詳細はイノベーション・ストラテジー研究成果書内に記載した。

5-3-2 今後の開発方針

タンパク質素材の実用化に向けた技術は、いまだ一般化されていない特殊な技術・ノウハウが

必要であると想定される。どのようにタンパク質素材の開発体制を構築するか、という点が、本事業実施の上での課題であると捉えている。

- ① 自社内に働きかけ、自社製品への配合を目指すことで社内開発を進める可能性
現在のところそのような動きはなく、発端となるような価値出しが必要である。単純な生分解性樹脂ではなく、+αの機能が必要であると考え、9-2 で検討した。
- ② タンパク質生産プラットフォームを提供することで、加工成形に関する知見を得る可能性
非可食糖の利用、トリコデルマでの生産を花王で実施し、タンパク質の選定や加工の部分を社外から獲得する可能性である。独自の（優れた）発酵生産系を持たないが、素材用の加工技術を有する企業と同開発など実施することも有効だと考えた。例えば、新田ゼラチン株式会社は、ゼラチンや膠の販売を実施してきたが、ゼラチンを加工することによってビニル系ポリマー、融雪防止、フィルム、マイクロカプセル、生コンクリートの乾燥抑制、塗料改質、人工皮革、エッチング、食品模型、製錬、研磨剤の結合、合板の接着など多様な用途を開発してきた¹。このような会社に限らず、Spiber 社や Bolt Threads 社をはじめ、サステナブルな発酵生産技術とタンパク質の加工技術を相互補完することでお互いが事業を拡大できる可能性は存在すると考えている。

まずは、社内外の協業者を集めるためにも、「何ができるか」「どのくらいの価格帯か」「+αの価値はどこにあるか」という点を検証する期間が非常に重要であると考えられた。

5-4 技術開発ロードマップ

上記を時系列にして、仮想技術開発ロードマップとして記した。

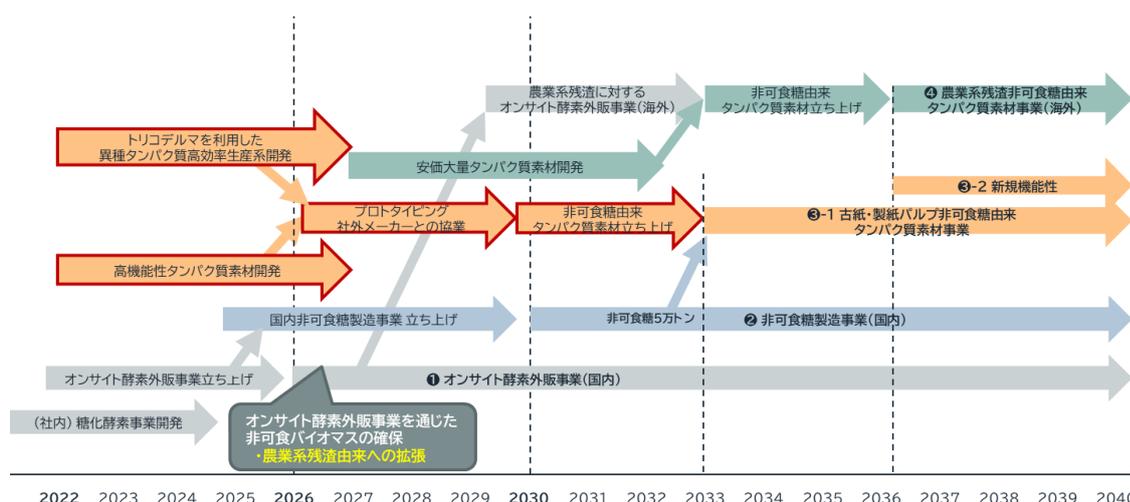


図 5-2 仮想技術開発ロードマップ

糖化酵素を利用した樹脂から、さらに所望の高性能を示す素材へと繋げていくためには、異種タンパク質生産のための菌株の技術を開発しておくことが望ましく、それにより高純度、低価格

での安価大量タンパク質素材に繋がっていくと考えられる。それと並行してタンパク質素材自体の開発や価値の洗い出しが必要であり、そのような活動とプロトタイピングを通して社内外との協業体制を構築することが重要であると考えた。2030年に非可食が製造開始となる仮想スケジュールの場合、それよりも前の4年間で共同開発、その前の4年間をかけてベースとなる価値を開発するプランを想定した。

5-5 技術戦略のまとめ

本セクションでは、非可食糖からのタンパク質素材事業を実施するにあたって、現在保有している技術ポートフォリオ、現在は保有していないが、必要不可欠な範囲について整理を行った。

タンパク質の製造面では、糖化酵素の製造技術を磨いてきていることからポートフォリオを多く有しており、基本的には転用可能であると想定された。ただし、特殊な素材タンパク質の生産検討は実施してきておらず、トリコデルマを利用した更なる異種タンパク質生産系の開発が必要と思われた。

最も不足している部分は素材タンパク質に関する知見、さらにはその開発体制の不足であった。そのためにはまずタンパク質素材自体の価値を明確化し、「仲間集め」を行う必要があると考えられた。これに関しては、10章の将来的なイノベーション・アイデアにおいても一部記載した。

5-6 参考文献

1. 新田ゼラチン スペシャルティーズ, ウェブサイト (閲覧日:2022年5月1日), <https://www.nitta-gelatin.co.jp/ja/product/specialities.html>

6. 知財戦略

本セクションにおいては、タンパク質生産系とタンパク質素材に分けて、自社の知財出願状況、他社の出願状況を整理した。詳細はイノベーション・ストラテジー研究成果書内に記載した。

6-1 タンパク質生産系の自社及び他社の出願状況

糖化酵素及びタンパク質生産系の技術に関しては、これまで糖化酵素の事業を進める上で知財化を進めてきている。技術ポートフォリオと照らし合わせながら、その状況を整理した。

まず、糖化酵素及び菌株技術の特許出願状況について、一部を図 6-1 に示した。

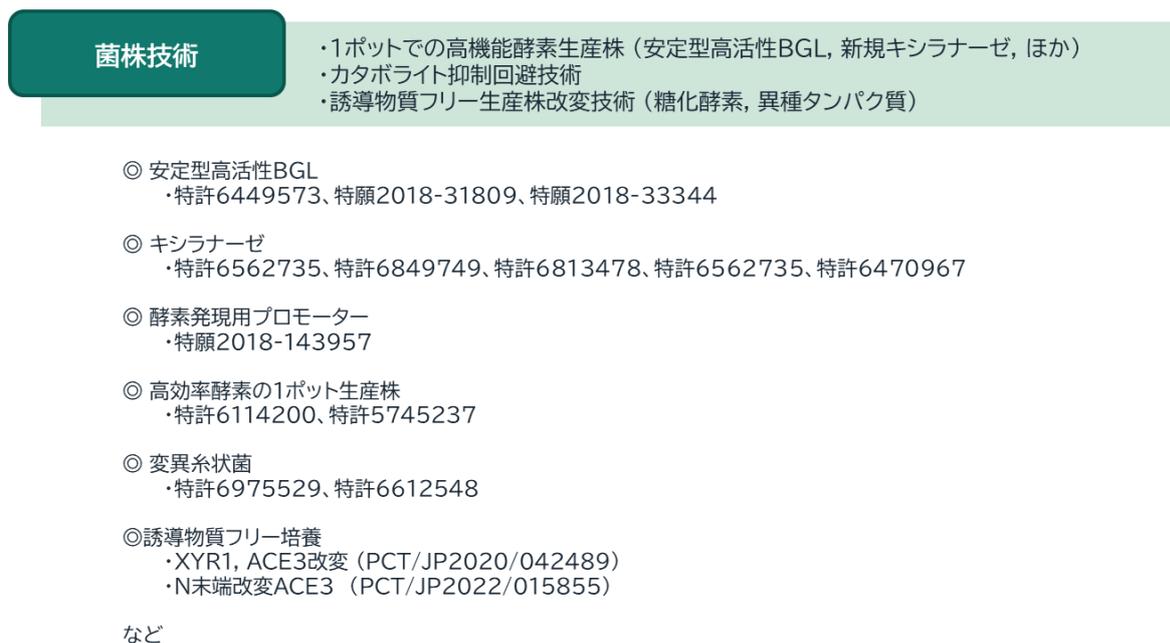


図 6-1 糖化酵素及び菌株技術の特許出願状況

まず、バイオマスを糖化するための糖化酵素について、糖化に適した新規酵素、改変酵素、その酵素を発現させるためのプロモーターに関して複数の特許を出願している。

それらの酵素を生産するための宿主として、グルコース耐性強化技術について出願している。

今回のイノベーション・ストラテジーにおいて重要技術と位置付ける誘導物質フリー生産についても2つの特許を出願している。ここで注目している因子は、XYR1、ACE3という2つの転写因子である。1つは変異型のXYR1とACE3を共発現するものであり、2つ目はACE3の「N末端」を改変するものである。一方で、ダニスコ社（DuPont）もトリコデルマを利用した誘導物質フリー生産に関して技術開発を実施しており、改変型ACE3について2件出願を実施している（WO2018/067599、WO2021/216302）。ダニスコの出願はいずれもACE3の「C末端」を改変するものである。

◎ 培養方法
・特願2019-207894、特願2019-521219

など

図 6-2 培養技術に関する特許出願状況

続いて、培養技術に関する特許出願状況について図 6-2 に示した。カタボライト抑制回避について、菌株技術と併せて培養に関する複数の特許を出願している。

以上から、オンサイトで糖化酵素を製造し、さらに異種タンパク質を生産し事業を展開していく上でのタンパク質生産系については、複数の視点で登録済、出願済の状況であり、国内での糖化酵素ならびに異種タンパク質の製造については高い競争力を今後も維持できると考えられた。

糖化酵素及びタンパク質の製造系として、以前のイノベーション・ストラテジー研究¹において特許クリアランス及び競合他社の特許解析が実施された。上記詳細については本報告書では詳細は割愛する。

6-2 タンパク質素材の他社の出願状況

他社のタンパク質素材に関する出願の調査を行った。現在は事業実施形態が確定していないため、詳細なクリアランスではなく主要な競合の調査とした。主要プレイヤーについては 4-5 で述べたが、ここではそのプレイヤーの出願状況について述べる。

① 抽出タンパク質由来

<Xampla>

Xampla は 2 件の特許を出願しており、うち 1 件は植物由来のマイクロカプセルを含む組成物、製造方法、ならびに組成物の用途に関するもの (WO2022/053553) であり、もう 1 件は植物由来タンパク質ハイドロゲルスラリーの調製方法、及構造体 (例えば、フィルム、鋳造物、成形物等) を調製する方法に関するもの (WO2022/053553) であり、いずれも審査請求前または審査請求中である。後者の出願はタンパク質素材に関するものであるが、請求項からも主な視点は植物類からのタンパク質抽出技術 (溶媒、剪断など) であり、植物タンパク質も「大豆タンパク質、エンドウ豆タンパク質、米タンパク質、ジャガイモタンパク質、小麦タンパク質、トウモロコシゼインタンパク質、またはソルガムタンパク質から選択される」と記載があり、植物から糖を経て発酵生産タンパク質を製造する思想とは異なる。

<Lactips>

Lactips は 3 件の特許を出願していた。1 つ目はカゼインおよび/またはカゼインベースの生分解性熱可塑性プラスチック (WO2019/122726) であり、日本でも成立している (JP7078746 B2)。物質または組成物の特許であり、カゼイン、水、可塑剤、疎水化剤、界面活性剤の組成を規定したものである。2 つ目はプラスチックの分野で技術的補助として、または

活性剤のカプセル化システムとして使用できるエマルジョンの調製方法および用途 (WO2021/084211) である。これは Lactips と国立科学研究センターCNRS、リヨン第一大学 UCBL、リヨン国立応用科学研究所、サンティエヌヌ大学によって共同出願されたものである。3 つ目はカゼインおよび／またはカゼインと水溶性高分子との結合を利用した熱可塑性材料 (FR3107529) であり、上記 1 つ目の類似特許である。耐薬品性を向上させるために水溶性ポリマーとの併用で開発を進めていることがうかがえた。いずれの特許もベースとしてカゼインを利用することが必須の構成要素であった。

② 発酵タンパク質由来

<Bolt threads>

Bolt threads は 34 件の特許を出願していた。そのうち、Mylo に代表される菌糸体を素材として利用するものが 5 件、スパイダーシルクをはじめとする発酵タンパク質の利用に関するものが 29 件であった。

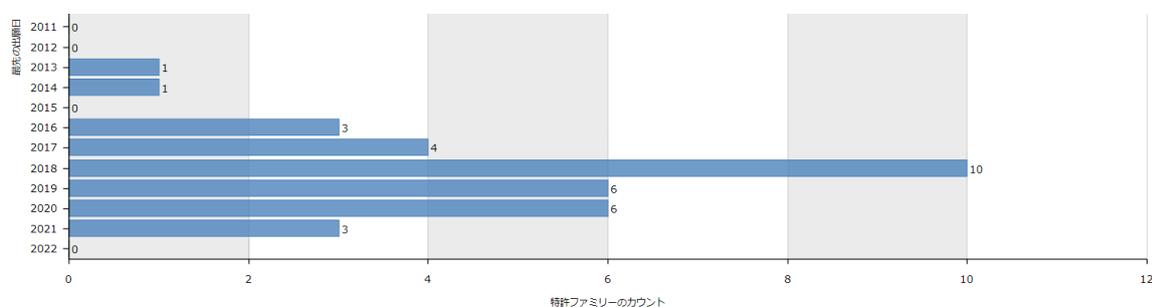


図 6-3 Bolt threads 社の出願数推移

近年は Mylo を利用したビジネスを加速させていることと一致し、2020 年の 2 件、2021 年の 3 件は Mylo に関するものであり、スパイダーシルクに関する出願は 2021 年以降見られない。これまでに申請してきたスパイダーシルクに関する特許は遺伝子から加工まで幅広く出願されているが、これに関しては Spiber 社の分析と並列で議論する。

<Spiber>

Spider silk を名称、要約、請求項に含む出願を図 6-4 に示した。

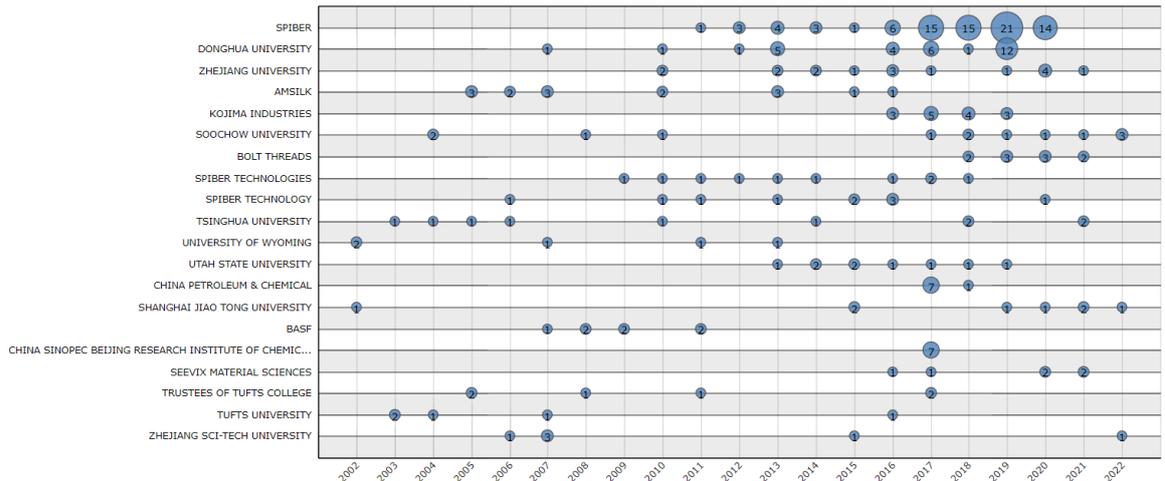


図 6-4 Spider Silk を含む出願

特許の出願数としては、Spiber 社が圧倒的である。このように、「特許の数」で競合を圧倒する戦略を取っていると考えられた。特に 2017 年以降その出願数は増加し、最大で年間 40 件以上の特許出願を行っている。また、特徴的な点として、他社との共同出願比率が高く、2018 年のものでは Spiber 社単願のものが約半数、残りの半数が共同出願（小島プレス工業、スーパーレジン工業、テクノハマ、理化学研究所、味の素など 14 団体）であった。このように、積極的に他社とも協業を行うことで技術構築を行ってきたことが伺える。

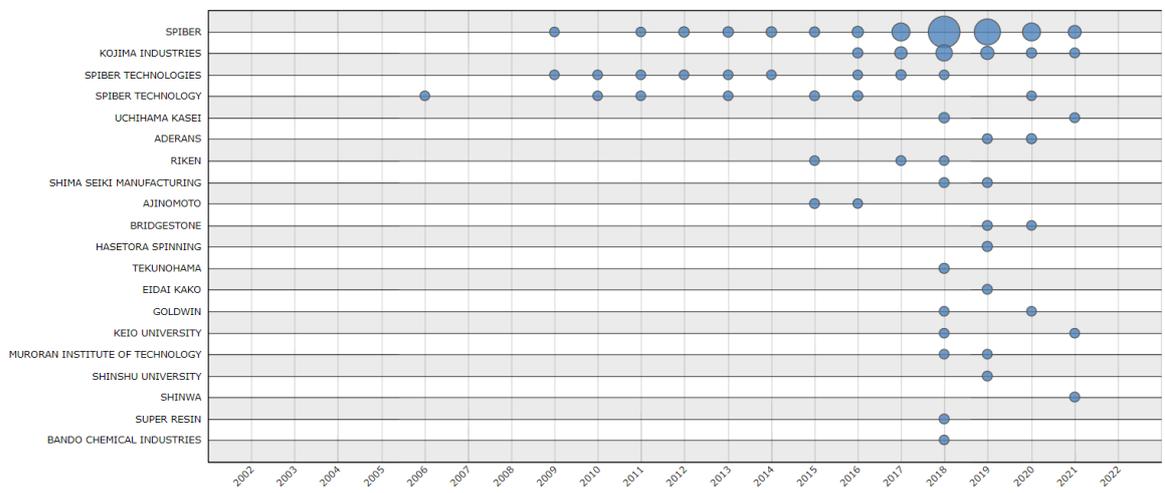
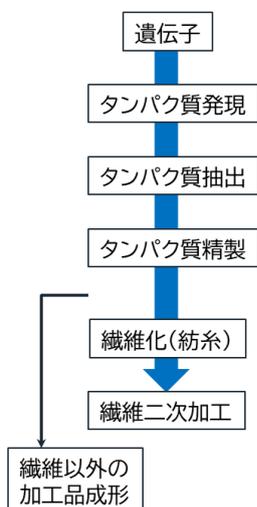


図 6-5 Spiber 社の出願動向

また、出願の内容についても変遷が見られ、2017 年以前は発明の効果として半数程度が生産性・コストに触れられていたが、それ以降は 3/4 程度が品質面の効果、特に収縮性の課題解決に寄与する出願が増えた。これは、クモ糸は水に濡れると収縮してゴムのような材料に変化してしまい、 Apparel 製品の要求を満たせないという課題が生じ、技術開発を実施したためだと考えられた。

続いて、Bolt Threads 及び Spiber 社について、製造フローごとにその出願傾向を整理した。

クモ系タンパク繊維製造フロー



出願数と割合

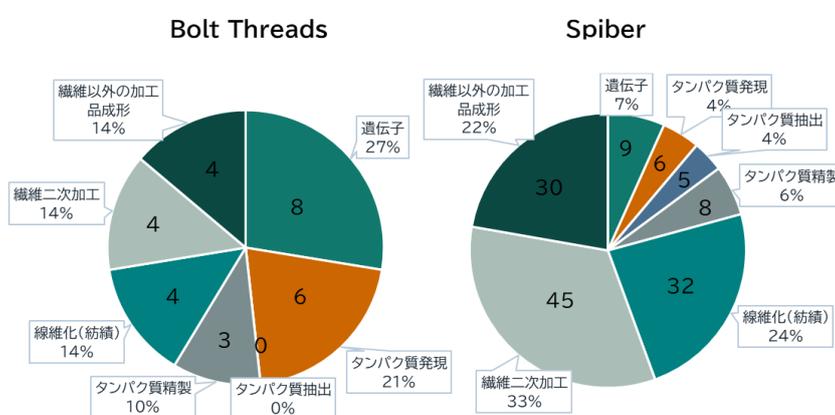


図 6-6 クモ系タンパク質の製造フローごとの出願傾向

Bolt Threads 社は Spiber 社よりも出願数は少ないものの、遺伝子から線維化、成形まで幅広く出願されている傾向がある。一方で Spiber は、遺伝子設計、タンパク質発現など上流の部分については出願が少なく、下流の紡績、加工の部分については手厚く出願していることが分かった。このように Spiber 社では、数で他社を圧倒しつつも、技術の出願公開 or 秘匿を棲み分ける知財活動を行っていると考えられた。実際に、Spiber 社の生産系に関しては外部に出ている情報も少なく、模倣困難性を高めるためにノウハウ化していると考えられた。

以上のように、スパイダーシルクを例にとると、加工法の特許が多数出願されており、注意を要する。また、その中には用いるタンパク質を規定されていない（スパイダーシルク以外も含む）出願もあり、タンパク質を加工するには詳細なクリアランスが必要であると思われる。

6-3 事業化に向けた知財構築計画

上記の分析をもとにした知財面での戦略・計画については、イノベーション・ストラテジー研究成果書に記載した。

6-4 知財戦略のまとめ

花王の保有する知財は糖化酵素、及び糖化酵素を含むタンパク質の製造技術に集中しており、この部分については競争力の高い知財を獲得できていると考えられる。糖化酵素を基盤とした非可食糖製造、並びにトリコデルマを利用した極めて高濃度のタンパク質を製造するという点で

は、他社は容易に参入することは難しいと考えられる。

一方で、タンパク質素材に関しては花王としては新規事業であり、こちらは中長期的に構築する必要がある。特に紡績・加工の部分は他社から多数の出願があり、詳細なクリアランスを必要とする。

6-5 参考文献

1. 柴田望, バイオマス糖化酵素製造技術を基にした都市型バイオリファイナリーの実現, イノベーション・ストラテジー研究成果書 (2021)

7. 事業戦略

7-1 シナリオ構築に向けたモデルターゲットの設定

イノベーション・ストラテジーとしてビジネスモデル及びシナリオを構築するにあたり、タンパク質素材としてのモデルターゲットを設定する必要がある。

4-5 で示してきたように、タンパク質素材にも安価な残渣タンパク質をベースとして既存品を代替する市場と、現在は高価であるものの物理的・機能的に新規な素材を提供している市場がある。このような、最低限の機能を有した上で安価・持続可能性・生分解性の付加価値で既存品代替市場に参入することはタンパク質自体の種類に依らず構成が可能であるため、比較的短期目線で参入可能であると考えられた（図 7-1, 1st Step）。

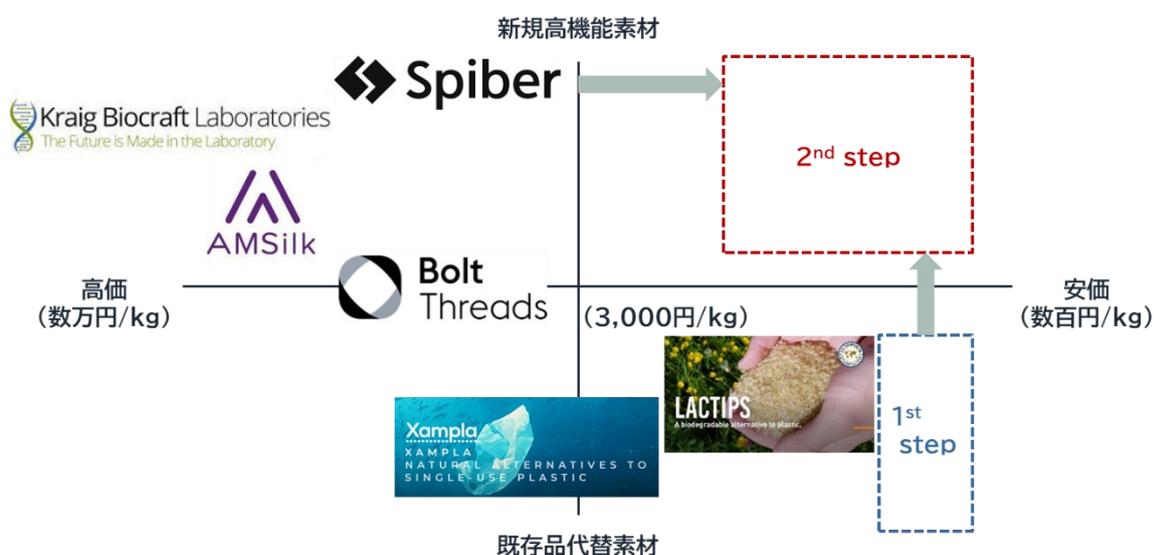


図 7-1 タンパク質素材の 2×2

その後、2nd Step として、大規模に海外展開しコストを下げつつ、ターゲットタンパク質自体もスパイダーシルクのような優れた物理的特性を有するものや、これまでにない新規な機能を発揮しつつ、持続可能である素材を目指すことを想定した。なお、このような安価かつ既存品にならない高機能なタンパク質素材に関して、Spiber はタイプラントの増設や穀物メジャーとの提携など安価原料及び規模の経済性を活かした低コスト化戦略を取ると予想されることから、機能性に加えて低価格を達成することで、本ストラテジーの 2nd Step と類似したポジショニングを狙っていると推定される。

本イノベーション・ストラテジーでは、ビジネスモデル・事業の競争優位性・収益分析を実施する上で、1st Step の既存樹脂の持続可能品代替としてのターゲット設定することとした。具体的な検討のターゲットとして、規模、価格帯、特性が合致すると想定されるものをモデルとして選択したが、詳細はイノベーション・ストラテジー研究成果書に記載した。

7-2 ビジネスモデル

ここまでの分析をもとに、目指す事業形態の概要について概説する。

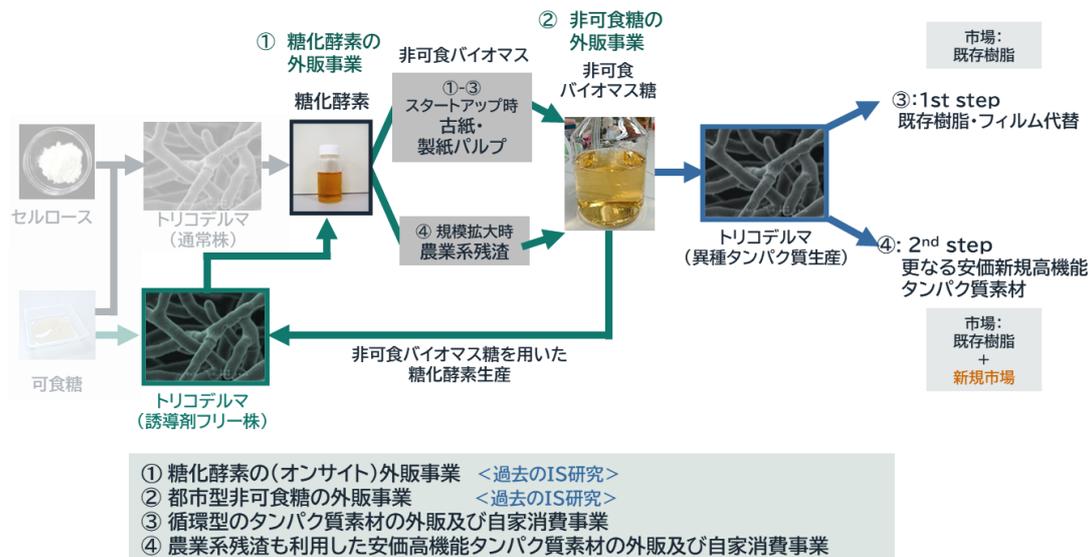


図 7-2 事業の概要

詳細は 1-3 で述べたが、本戦略のベースに位置するのは、過去のイノベーション・ストラテジー研究において考察された、糖化酵素技術を利用した、①オンサイトでの糖化酵素外販事業であり、さらに②非可食糖を他社に販売・供給し、日本のバイオエコノミーを推進するという仮想ビジネスモデルである。本イノベーション・ストラテジーは中長期的なビジネスモデルとして、さらにトリコデルマの異種タンパク質生産技術を統合することで、②で製造される非可食糖を利用して非可食糖由来のタンパク質素材を製造するビジネスモデルである。以降、非可食糖が製造されると仮定された 2030 年以降に合流を目指すという想定のもと検討を行った。

【③、④のタンパク質素材のパターン】

タンパク質素材も、素材化するタンパク質の種類と特性、機能、価格から段階を踏んで展開することを想定した。詳細については、イノベーション・ストラテジー研究成果書に記載した。

①、②については、既にイノベーション・ストラテジーが検討されたため、③、④のタンパク質素材販売事業について想定ビジネスモデルを以下に記載した。

【ビジネスモデル概要】

- 都市型バイオマスからの非可食糖製造事業と、トリコデルマのタンパク質生産系を掛け合わせることで、石化由来の樹脂から持続可能樹脂へと転換するプラットフォームである
- 国内で収集された古紙や一般廃棄物を原料として製造された非可食糖を利用し、非可食バイオマス由来、安価で、機能をデザイン可能な新規タンパク質素材の販売を行う
- タンパク質素材に限らず自社で非可食糖をバイオベースケミカルへと変換し自社製品への配合も検討するが、自社供給用の製造量だけでは規模の経済性が効かないと想定される

め、非可食糖の販売事業とそれをタンパク質素材に変換して販売する事業を並行して実施する

- 安価な非可食糖の製造のため、糖化酵素生産～非可食糖製造はオンサイトで実施し、非可食糖からタンパク質素材への変換も同サイトで製造するが、素材自体はその後各地へ輸送する

【顧客】

- 非可食糖由来の安価タンパク質を求めるメーカー（素材の原料として納入）
- 非可食由来ケミカルスの利用を考えるメーカー（素材として納入）
- 自社の化学品製造部門、コンシューマープロダクト部門

【顧客への価値】

- 非可食由来の糖または非可食由来素材を原料に用いることで、製品のブランド価値向上
- 生分解性及び特異な機能を有する素材の利用による製品の機能性向上

【キーパートナー】

- 現在タンパク質を素材に変換する機能を持たないため、素材として利用可能な形に加工成形する企業との協業、または技術ライセンスの購入

【チャンネル】

- 糖化酵素、非可食糖製造を通して業界への営業活動を図る
- タンパク質素材サンプル提供などを通して評価を実施いただく
- 自社製品の包装容器などに利用することで認知を図る

【顧客との関係】

- 素材の原料として納入する場合、花王でその素材を使用する際は買い取り手となる
- 素材として納入する場合、サプライヤーとして安定供給・品質保証・新規素材開発を担う

【社会へのインパクト】

- 循環型社会に貢献する生分解性素材に新たな選択肢を与える
- 食料と競合しない都市廃棄物を有用素材に変換可能となる
- 古紙などの余剰資源の安定供給先となり、リサイクル業界の安定化に繋がる
- 日本におけるバイオリファイナリーの新拠点となる
- 非可食糖由来のケミカルスが普及する例となり、可食原料から非可食原料へと転換していく流れを推し進めることに繋がる

7-3 事業環境分析と競争優位性

本事業の環境分析と競争優位性について整理した。

7-3-1 事業環境と PEST 分析

国内の古紙パルプを原料とした非可食糖製造を考えるにあたり、製紙業界の動きは注視する必要がある。2023年02月03日、日本製紙株式会社、住友商事株式会社および Green Earth Institute (GEI) 株式会社は、「木質バイオマスを原料とする国内初のセルロース系バイオエタノール商用生産およびバイオケミカル製品への展開」に向けた3社による共同検討を開始することに合意したと発表した¹。3社が相互に強みを発揮し、国産材を活用した、国内初の純国産セルロース系バイオエタノール商業プラントを実現し、低炭素バイオ燃料の早期社会実装や、我が国のエネルギー安全保障に寄与することを目指すとのことである。持続可能な航空燃料(SAF)への利用を前提としたプロジェクトであり、植物を原料とする SAF は今後、環境負荷の低い燃料として需要が高まるとみられている。

昨今 SAF が高値で取引される背景もあり、原料となるバイオマスの確保は非常に重要な要素である。現在は廃棄物である非可食バイオマスも、原料としての価値が高まることで安価に調達することが難しくなる懸念がある。したがってセルロース系バイオマスの確保のためにも、花王糖化酵素のプレゼンスを高める活動は重要であると考えられた。また、国内の古紙などの都市ごみに限らず、どのようなバイオマスを対象として原料を確保すべきなのかはよく見定める必要があると考えられた(第10章で後述)。

花王としては、前述のように脱炭素社会の実現に向けた環境宣言²を発表し、原材料調達から生産、物流、販売、使用、廃棄までの製品に関わるライフサイクル全体を通して、ステークホルダーと協働で環境負荷低減を目指していくことを掲げている。2019年には持続可能な暮らしを「Kirei Lifestyle」と定義し、それを実現するための ESG 戦略「Kirei Lifestyle Plan」を策定・発表した³。この中で、脱炭素、ごみゼロ、サステナブルなライフスタイルの推進、責任ある原材料調達などのアクションが掲げられ、2021年5月には花王が取り組む新たな「脱炭素」の目標を発表し、事業活動に伴い排出される CO₂ を 2040 年までにカーボンゼロ、2050 年までにカーボンネガティブを目指すことを掲げた⁴。具体的には「使用電力を 2030 年までに 100%再生可能電力化」、「製品ライフサイクル CO₂ 排出量の削減」、「花王の製品・サービスを利用することを通じた CO₂ の削減」などを進めることとなっている。これらの達成には上記非可食バイオマスを使いこなし、CO₂ 排出を抑えた製品開発は社内外の需要が高いと考えられた。

また、中長期視点での CO₂ 削減に向けても新たな取り組みをスタートし、原材料調達においては、パーム油の代替原料を市場に供給することを目的として米国に設立されるベンチャー企業へ、パーム油由来の原料に代わる植物由来原料の商業化をめざすサステナブル素材のリーディングカンパニーである Genomatica (Geno) および Unilever と共に、創立メンバーとして参画することを発表した⁵。Geno と Unilever がすでに発表している 1 億 2 千万米ドル(約 170 億円)の投資に加え、花王が追加出資をする形での合弁事業である。このベン

チャーは、持続可能な方法で調達されたパーム油への需要が世界的に高まる中、グローバルで6,520億ドル規模のホームケア、パーソナルケア市場におけるサプライチェーンの安定、強化を図るとともに、社会と環境に配慮し、責任をもって調達されたパーム油代替原料を市場へ供給することを目指すものである。花王は、2040年までにカーボンゼロ、2050年までにカーボンネガティブという目標を掲げており、今回の取り組みは、その目標達成のための重要な戦略的決断であると述べている。持続可能なパーム油とその誘導体が花王にとって今後も非常に重要な原料であり続ける中、このベンチャーはよりサステナブルなパーム油代替原料を製造し、花王はそれらをホームケアやパーソナルケア自社製品に使用すると共に、またその誘導体をケミカル事業顧客へ供給すること、さらにはトレーサブルで透明性の高い新たなサプライチェーンを確立することで、責任ある原材料調達をさらに推進することをプレスリリースで述べている。

以上のように、近年は花王としてもカーボンゼロ、カーボンネガティブに向けて投資を開始している状況にある。このような脱炭素に向かう大きな流れによって、社内としても循環可能な原料調達及びその派生ケミカルスを自社でも作り出していく機運が高まっており、本戦略は花王としての流れにも合致していると考えられた。実際に、自社内でも糖からの発酵による物質変換技術を構築しており、例えば芳香族化合物である没食子酸及び4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸を、トウモロコシやサトウキビ由来のグルコースから微生物を用いて製造する発酵生産技術を開発したと発表した⁶。このように、社内としても糖からの発酵による物質生産は検討が進められており、その一つとして糖からのタンパク質素材もラインナップとして開発すべきだと考えられた。まずは可食糖を利用した発酵による物質生産が主流であると考えられるが、非可食糖の利用は、可食糖ベースでのバイオリファイナリーからもう1段階社会的価値を高めるものであり、こういったサステナブルな素材や原料を開発する企業にとっても魅力的なものであると考えられた。

また、持続可能な素材に関しては、その社会的価値やサステナビリティをいかに客観的に測定し評価し、示していくか、という点は非常に重要であり、近年様々な認証制度が整いつつある。例えば森林においてはFSC (Forest Stewardship Council) 認証、漁業においてはMSC (Marine Stewardship Council) 認証、バイオマスにおいてはISCC (International Sustainability & Carbon Certification) 認証、再生材においてはRMS (Recycled Material Standard) 認証などである。

ISCC 認証は、国際持続可能性カーボン認証で、世界初のバイオマス、バイオエネルギーの認証制度である。ISCC EU の場合は、欧州再生可能エネルギー指令 (RED) に基づく、EU 域内のバイオ燃料を対象とした認証スキームであるが、ISCC PLUS は EU 域外を含む全世界の製品が対象であり、バイオマス原料や製品だけではなく、リサイクル原料、製品でも取得可能である。こういった認証を得ることで、サプライチェーンの透明性が確保され、原材料が持続可能であることを証明し、製品価値を高める(買い手が高値で受け入れやすくなる)効果が期待される。

したがって、非可食糖は販売ビジネスとしても需要が高く、さらにその糖を自家消費して製造した製品においても付加価値が付く可能性は十分にあり、認証制度を利用しながら、価値の見せる化も重要であると考えられた。

上記の状況を踏まえ、循環型素材に関わる事業環境の PEST 分析としてまとめる。

政治 (Politics)

- + 化学物質に対する政府の環境規制が厳しくなり、素材の入手や製造に制限が加わる可能性がある
- + 環境保護政策の強化により、再生可能原料の需要が増加している
- + 政府のサポートにより、バイオマス資源の利用が促進され、様々な認証制度が生まれている
- 政治的不安定により、ビジネス環境が不安定になる可能性がある

経済 (Economy)

- + 再生可能エネルギーや素材への需要が高まり、循環型素材の市場は拡大するとみられている
- 燃料価格の上昇により、生産コストが上昇する可能性がある
- 大規模な事業として実施しないと成立しにくく、投資リスクが高い可能性がある
- 原料バイオマスの取り合いが起こる可能性がある

社会 (Society)

- + 環境問題に対する意識が高まっており、エコフレンドリーな製品の需要が増加している
- + 自社としても循環型の原料及び素材を活用することを迫られている
- 国によって環境意識と規制に温度差があり、国内はバイオマス由来に転換することによるコスト増加を許容されない可能性がある

技術 (Technology)

- + バイオマス資源の利活用について積極的な技術開発が（自社/世界的に）なされている
- + 新規な安価タンパク質生産技術が構築されつつある
- デジタル技術の発展により、生産プラットフォーム構築に関しても急速に追従される可能性がある

7-3-2 ファイブフォース分析

次に非可食糖からのタンパク質素材事業に関するファイブフォース分析を実施した結果を図 7-3 に示した。

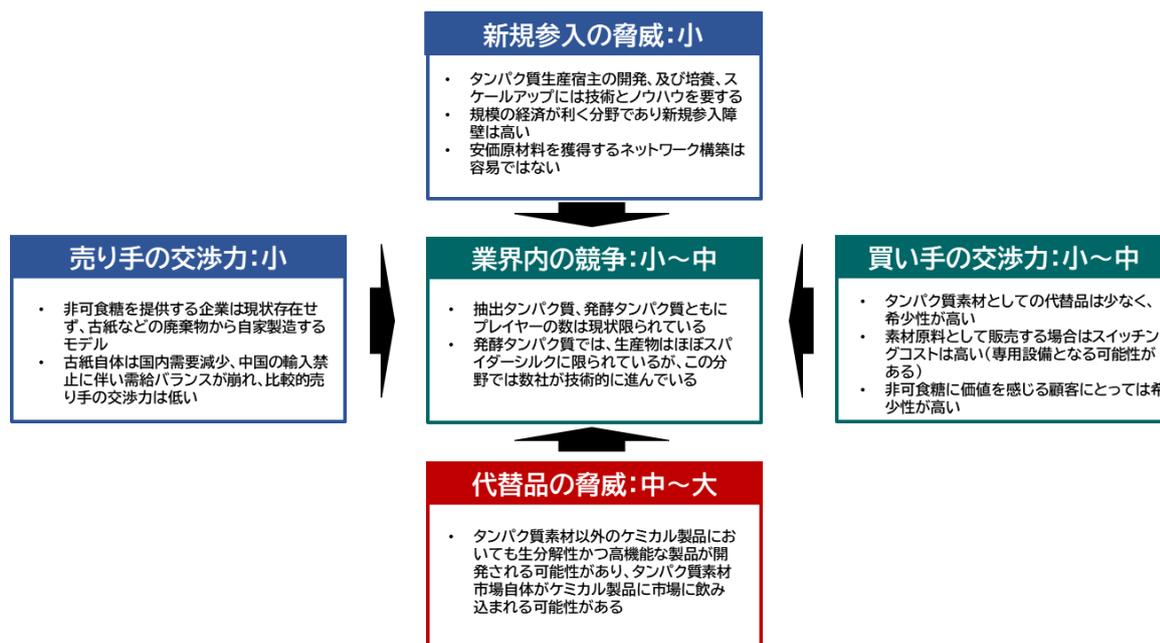


図 7-3 非可食糖からのタンパク質素材事業に関するファイブフォース分析

<売り手の交渉力>

現状非可食糖を提供する企業は存在しないため原料としての非可食糖の希少価値は高く、その原料を自家製造するモデルであるためサプライヤーからの交渉力は低いと考えられる。また、古紙自体も国内需要減少し、さらに中国の輸入禁止に伴い需給バランスが崩れ、非可食糖の原料古紙としてもサプライヤーからの交渉力は低いと考えられる。

<新規参入の脅威>

タンパク質素材の生産に関して、生産宿主の開発、及び培養・スケールアップには技術とノウハウを要するため、新規参入は容易ではない。特に、素材市場レベルで事業化可能なレベルの生産系構築は容易ではないと考えられる。また、安価原材料を獲得するネットワーク構築は容易ではなく、規模の経済が利く分野であり新規参入障壁は高いと考えられる。

<業界内の競争>

業界内の競争環境に関して、抽出タンパク質、発酵タンパク質ともにプレイヤーの数は現状限られている。発酵タンパク質では、生産物はほぼスパイダーシルクに限られているが、この分野では数社が技術的に進んでいる状況になる。スパイダーシルクに限れば競争環境は比較的高いと考えられるが、その他のタンパク質素材まで枠を広げれば現状では競争環境としては比較的低いと考えられる。

<買い手の交渉力>

タンパク質素材のプレイヤーが少ないこともあり、タンパク質素材としての代替品は少なく、希少性が高い。非可食糖に価値を感じる顧客にとってはさらに希少性が高く、顧客の交渉力を下

げるものになると考えられる。また、もし素材原料として販売する場合は、成形などの設備も専用のものを設ける可能性もあり、スイッチングコストは比較的高いと推定される。

<代替品の脅威>

最も脅威と考えられるのが代替品である。タンパク質素材以外のケミカル製品においても生分解性かつ高機能な製品が開発される可能性があり、タンパク質素材市場自体がケミカル製品に市場に飲み込まれる可能性がある。また、素材原料に関しても、CO₂からの直接変換で化学品の基幹原料を製造する取り組みもあり、業界としてのコンペティターであると考えられる。

以上のことから、4-2 で分析を行ってきたような一般的な受託生産ビジネスや、酵素外販ビジネスと比較し、業界構造としては競争が激しくないと考えられた。一方で、「素材」自体のケミカル代替品が脅威として考えられ、タンパク質素材ならではの「特異性」が今後重要になると考えられた。すなわち、既存樹脂代替なども 1st Step としてはターゲットであると思われるが、将来的に長期目線ではどのような特性でケミカル製品と差別化していくかは考えていく必要があり、タンパク質素材ならではの強みを強化することで安定して優位性を確保できる事業となる可能性があることが分かった。

7-3-3 バリューチェーン・VRIO 分析

非可食糖からのタンパク質素材事業の主活動に関するバリューチェーン、及び VRIO 分析を実施し、競争優位性について評価した。さらに、そこから見えた強み・弱み・今後の方針について検討したが、詳細はイノベーション・ストラテジー研究成果書に記載した。

7-3-4 3つの基本戦略に照らした分析

マイケル・E・ポーターの3つの基本戦略に照らし合わせ、本事業の競争戦略について考察した。詳細はイノベーション・ストラテジー研究成果書に記載した。

7-4 事業戦略のまとめ

本章では非可食糖由来のタンパク質素材のビジネスモデル整理とその競争優位性の評価を行った。

調査した限りでは、可食糖の利用であっても発酵タンパク質を利用したタンパク質素材はいまだ大規模なレベルでは事業化されておらず、参入の余地はあると考えられた。さらに、非可食糖の製造販売は現在なされておらず、非可食糖を自製して利用可能なことは大きな優位性となり、非可食糖を利用して規模の経済性を利用しながら展開できた際にはこれからの社会需要とも適合しつつ希少性があり模倣困難性の高い素材提供プラットフォームとなる可能性が十分にあると考えられた。また、本事業モデルは、一気通貫でのすべての技術要素（バイオマス原料確保、糖化、タンパク質製造、素材化）を保有しないと成立しない。バイオマス糖化酵素をオフサイト購入してもその後発酵用タンパク質を製造することが困難であり、タンパク質を製造できても非可食バイオマスの確保と糖化技術も必要となり、さらにその後ケミカル製品としての販路も必要で

ある。今後現状有していない技術ポートフォリオを補完することで、他社が参入困難なモデルとして事業展開可能であると考えられた。

7-5 参考文献

1. 日本製紙ニュースリリース, 木質バイオマス为原料とする国内初のセルロース系バイオエタノール商用生産およびバイオケミカル製品への展開に向けた協業に関する基本合意書の締結, ウェブサイト (閲覧日: 2023年4月12日),
<https://www.nipponpapergroup.com/news/year/2023/news230203005394.html>
2. Kao Corporation, CSRレポート2009, ウェブサイト (閲覧日: 2022年10月1日),
https://www.kao.com/content/dam/sites/kao/www-kao-com/jp/ja/corporate/sustainability/pdf/pdf_reports_01_05_01_001.pdf
3. Kao Corporation, 花王, ESG戦略「Kirei Lifestyle Plan」を発表, ウェブサイト (閲覧日: 2022年10月1日),
<https://www.kao.com/jp/corporate/news/sustainability/2019/20190422-001/>
4. Kao Corporation, 2040年カーボンゼロ、2050年カーボンネガティブ実現に向けた活動を加速, ウェブサイト (閲覧日: 2022年10月1日),
<https://www.kao.com/jp/corporate/news/sustainability/2022/20220426-002/>
5. 花王 プレスリリース, 花王が創立メンバーとして1億2千万米ドル*1超のベンチャー企業へ参画 Genomaticaと共に、パーム油代替原料の供給をめざす, ウェブサイト (閲覧日: 2023年4月12日),
6. 花王 プレスリリース, バイオマスからの化学原料製造を可能にする発酵生産技術, ウェブサイト (閲覧日: 2023年4月12日),
<https://www.kao.com/jp/newsroom/news/release/2023/20230331-001/>

8. 財務戦略

第 8 章でのモデルに基づき財務・収益性の分析を行った。さらに、財務計画をもとにした事業価値の評価を行った。なお、本章に関する詳細についてはイノベーション・ストラテジー研究成果書に記載した。

8-1 非可食糖及びタンパク質樹脂製造のコスト試算

古紙の調達及び非可食糖の製造に関しては過去のイノベーション・ストラテジー¹にて検討されており、約 5 万 トン/年の非可食糖が得られる試算となっている。この約 5 万トン/年の非可食糖から古紙の糖化に必要な糖化酵素を差し引いた非可食糖としての販売想定分を、一部タンパク質素材に変換して外部販売または自家消費する想定の実シミュレーションを実施した。生産規模ごとのタンパク質素材の想定製造原価の算出と、非可食糖として販売した方が利益が出る臨界点(タンパク質素材に変換した方が損をする価格設定)の算出を、非可食糖販売とタンパク質樹脂販売の比率を 99.9:0.1、99:1、90:10、50:50、0:100 と変更しながら、タンパク質樹脂売価を各種設定した際について検討を行った。

結果として、既存のモデルターゲット樹脂よりも安価にタンパク質樹脂を製造できる可能性があり、トリコデルマを利用したタンパク質素材の可能性が見出された。一方で、タンパク質樹脂の製造量が増加するほど原価が下がり、大規模に展開した際には非可食糖販売事業単独よりも多くの利益を上げられる可能性が考えられたが、事業立ち上げ初期から大規模に展開することは難しく、タンパク質樹脂製造量が少なく規模の経済性が有効でない製造量では、非可食糖として販売する方が高い収益性を得られる可能性が考えられた。そこで投資抑制をしながらまずは販売を開始するための戦略について検討を行った。詳細はイノベーション・ストラテジー研究成果書に記載した。

8-2 事業ロードマップとモデルケースにおける収益シミュレーション

上記を加味した事業ロードマップについて、第 6 章、第 8 章においても述べたが、非可食糖の製造事業は立ち上げが 2030 年、開始は 2033 年が想定されており、非可食糖はそれ以降に製造されてくると仮定している。それまでの期間に、発酵タンパク質素材の開発を行い、まずは 2033 年以降に投資抑制を行いながら小規模で製造を開始しつつも原価を低価格に抑えながらタンパク質素材事業をスタートし、軌道に乗せる。並行して、さらに売価を上げるために、新規高付加価値材としての開発を行い、売上を伸ばす。また、素材自体の開発だけでなく、糖化酵素のオンサイト外販事業を通じた国内に限らない海外での非可食バイオマスの確保を行う。これにより、さらなる規模拡大と低コスト、汎用化に向けて 2036 年以降には数千～数万トン/y まで生産規模を拡大し、大規模に展開する長期プランを想定した。

そのプランのうち、オンサイト酵素外販、非可食糖販売事業、タンパク質樹脂販売事業を統合した事業計画とし、モデルケースで示した国内の古紙からタンパク質樹脂素材を展開する場合(第 8 章の③までであり、海外展開は含まない)に絞り、具体的に収益シミュレーションを実施し

財務諸表を作成した。詳細についてはイノベーション・ストラテジー研究成果書に記載した。

非可食糖の半量をタンパク質樹脂に変換し、モデルケースでのタンパク質素材販売事業が成立すると仮定した場合には、2046年までに非可食糖販売事業¹と比較して約2.2倍にまでそのキャッシュを増大させる可能性が見込まれた。さらに、売価を約1.3倍に設定できた場合は約3.6倍、売価を約1.7倍に設定できた場合は約5.0倍にまでキャッシュを増大させる可能性があった。

8-3 事業価値算出と今後の課題

9-2の算出結果を用い、DCF法による事業価値の算出を行った。DCF法による事業価値算出に用いる加重平均資本コスト（WACC）などの条件に関しては、イノベーション・ストラテジー研究成果書に記載した。また、2022年より以前から糖化酵素開発を実施しており研究開発費が発生しているため、2020年末をDCF法における評価時点とした。オンサイト酵素ライセンス事業+非可食糖販売事業、さらにタンパク質樹脂販売事業を統合した場合について、事業価値計算を行った。

詳細はイノベーション・ストラテジー研究成果書に記載したが、モデルケースの場合、その事業価値は約73億円であり、非可食糖販売単独の場合の約38億円よりも約1.9倍の価値を創出できると考えられた。ただし、生産効率が0.67倍となった場合は非可食糖販売単独よりも事業価値が低く、実施すべきではないと考えられた。また、生産効率が1.33倍となった場合には、約123億円の事業価値と算出され、さらに事業価値を引き上げることが出来ると考えられた。一方で、生産効率は同一であるが、売価を約1.3倍とした場合にはその事業価値はさらに高く、約149億円と算出された。さらに売価を約1.7倍とした場合には、224億円と算出された。本事業は2度の大きな投資を必要とするものであり、1度目の投資回収には8年、2度目の投資回収には3-5年を要する。これにより事業価値が増加しにくいと考えられる。そこで考えられる改善方針についても検討し、詳細はイノベーション・ストラテジー研究成果書に記載したが、長期プランで原価を下げる取り組みを実施しつつも、売価を高く設定できるような価値づくりが非常に重要であると考えられた。

8-4 財務戦略のまとめ

財務分析で明らかとなったことをまとめる。

- タンパク質樹脂製造時のコスト試算を行い、素材として展開する際の目安となる価格以下の原価で展開可能である可能性があった。
- 非可食糖販売事業単独よりも大幅に利益を拡大させることが可能であると考えられたが、詳細はイノベーション・ストラテジー研究成果書に記載した。

8-5 参考文献

1. 柴田望, バイオマス糖化酵素製造技術を基にした都市型バイオリファイナリーの実現, イノベーション・ストラテジー研究成果書 (2021)

9.将来的なイノベーション・アイデア

中長期的に事業を展開していく上で、原料バイオマスの拡張、素材タンパク質の開発はともに極めて重要な要素である。本セクションにおいては、その展望について述べる。

9-1 原料バイオマスの拡張

上記イノベーション・ストラテジーについては、都市型のセルロース系バイオマスである古紙をベースに事業計画を記した。一方で、古紙の賦存量は日本では比較的多いものの、それでも数十万トン/年程度に限られるものである。そこから得られる糖を全て変換して樹脂などを製造する場合も、現在の日本におけるバイオマスプラスチック（セルロース系、バイオ PE、バイオ PET、コンポジット系、バイオ PA、PLA）の合算である 4.7 万トン/年の数分の 1 の量である。さらにこれらのバイオプラスチックはプラスチック全体生産量の 1%にも満たず¹、既存樹脂からさらに大規模に代替し、かつ規模の経済性を利用して低コスト化するためには、多量の安価バイオマスを獲得していく必要がある。

現在第 2 世代のバイオリファイナリーを行っている企業の最終目的生産物の多くは SAF 向けをはじめとする非可食エタノールであるが、セルロース系バイオマスを原料とした第 2 世代のバイオエタノールは第 1 世代のバイオエタノールよりも高コストとなることが足かせとなり、2020 年においてもその製造量は 60 万トン程度に留まっている。バイオエタノールは（昨今では LCA 視点や第 2 世代のプレミアムはあるものの）極めて低価格帯のケミカル（低分子化合物）であり、その採算性はシビアである。そこで、第 2 世代の糖から比較的中～高価格帯のケミカルも併産することでそのコスト構造を緩和する動きがあり、本ストラテジーのような非可食糖から変換し、付加価値をつけて産業化することもその一環でもある。

農業系残渣の利用に関しては、東レ（株）と DM 三井製糖（株）は、タイにおいて製糖工場で発生するサトウキビバガスなどを原料として、各種バイオ化学品の共通原料となる非可食糖を製造するシステムの実証に成功したと発表した²。NEDO は 2016 年より「余剰バガス原料からの省エネ型セルロース糖製造システム実証事業」を実施し、本事業において、東レ三井製糖は 2017 年に Cellulosic Biomass Technology Co. Ltd.（本社：タイ王国バンコク市）の事業所に非可食糖製造技術の実証プラントを建設し、2018 年 8 月から 2022 年 12 月まで運転、2023 年 3 月までに製造工程における省エネ効果や生産物の性能、システムの経済性などの検証や評価を実施していた。その結果、非可食糖を従来よりも 50%以上省エネで製造するシステムの実証に成功し、精製した非可食糖がエタノールやコハク酸製造の発酵原料として利用できることも確認している。今後、海外で大規模に実施することを視野に入れる場合、農業系残渣のバイオマス確保に向けた活動は必須となることが予想される。

一方で、農業系残渣特有の課題も存在する可能性がある。例えば、糖の品質である。古紙などの高度に精製・成形されたセルロース由来の糖は比較的不純物が少ないが、前処理方法に依るもののバガスの糖化液は一般にリグニン、窒素分をはじめとする不純物が多い。エタノール発酵に糖化液を用い蒸留精製する場合は大きな問題とはならないが、その糖を用いてタンパク質の発酵生産を行った場合は、培養液及び生産物の着色などが問題となり得る。したがって、糖の収

率とコストだけでなく、東レをはじめとする精製膜メーカーとの協業などを通し、タンパク質素材用に適した非可食糖の品質管理と技術開発についても中長期的な開発が必要であると考えられる。

9-2 新規タンパク質素材の可能性

5-3-1 でプロトタイピングを実施したが、さらに追加で検討を行い、タンパク質素材ならではの特殊機能を持たせることが可能であるか検討を実施した。新規機能性を有する酵素樹脂のプロトタイピング、及び想定用途とアイデアについて検討し、詳細についてはイノベーション・ストラテジー研究成果書に記載した。

9-3 将来的なイノベーション・アイデアのまとめと今後

既存樹脂からさらに大規模に代替し、かつ規模の経済性を利用して低コスト化するためには、多量の安価バイオマスを獲得していく必要があり、そのためには古紙由来の非可食糖だけでなく、農業系残渣などのさらに賦存量の多いバイオマスの利用へと展開していく必要性を述べた。古紙などの都市型廃棄物の利用は収集インフラも整う日本国内での事業展開を想定したものであるが、農業系残渣は花王としての事業ともシナジーを生みながらの海外での展開を主軸として考えていく必要性も考えられた。

また、原料の確保と併せ、タンパク質素材自体の開発は極めて重要であり、タンパク質は単純な既存品の代替だけでなく、新たな循環型素材の可能性を秘めると考えられた。

9-4 参考文献

1. 環境省, バイオプラスチックを取り巻く 国内外の状況,
https://www.env.go.jp/recycle/ref2101193_1.pdf
2. NEDO ニュースリリース, 従来よりも 50%以上省エネでサトウキビの搾りかすから糖を製造する実証に成功—非可食植物由来の化学品製造が可能に— ウェブサイト (閲覧日:2023 年 4 月17 日),
https://www.nedo.go.jp/news/press/AA5_101636.html

10. 結論

本研究における問い、「極めて高いタンパク質生産性を示すトリコデルマの生産系を今後どのように事業展開するべきか」、に対し、糖化酵素を基盤として得られた非可食バイオマス由来の糖、及び安価大量のタンパク質生産技術を用いて、「発酵生産タンパク質そのものを素材として活用する」という新たな循環型素材を提供するプラットフォームの提案に行き着いた。

この提案に対し、技術・知財・事業・財務の4つの視点から戦略分析を実施した結果、トリコデルマを用いた生産系の確固たる優位性である「高いタンパク質生産能」と「タンパク質の製造ノウハウ」を活かすだけでなく、その背後にある糖化酵素の製造に基づく非可食糖を獲得可能であるという希少性及び将来性を組み込みながら素材へと繋げていくことで、高い競争力を維持した事業展開の可能性が見えてきた。一方で、現在は花王ではタンパク質素材に関する技術的・知財的ポートフォリオを有していないため、タンパク質素材の価値出しとプラットフォームの提供を通じた社外との技術的パートナーシップも重要ではないかと考えられた。

技術戦略、知財戦略、事業戦略、ならびに財務戦略の分析を通じたイノベーション・ストラテジーについて総括する。

タンパク質を素材に展開する、という試みは成長段階の市場にあり、①残渣タンパク質（乳清、大豆粕など）由来の素材は安価であるものの、特定素材から抽出を経て製造するため、将来的に更に優れた機能性を有するものを創り出すなどの拡張性には限界があると考えられた。②スパイダーシルクをはじめとする発酵生産タンパク質においては、機能性自体は優れているものの、コストが課題となり大規模展開が阻まれている現状がある。

そこで、今回のイノベーション・ストラテジーでは、タンパク質生産系として微生物で最大クラスのトリコデルマを利用して、任意の組換えタンパク質を発酵生産しつつ、素材利用としてのコスト障壁を破るプラットフォームの提案である。さらに、既存の素材と比較した際の大きな社会的価値が、化石原料由来からバイオ原料由来に転換した持続可能かつ生分解を有する素材だけでなく、バイオ原料のうちでも今後食料との競合が危惧される可食バイオ由来原料（コーンスターチなど）ではなく、食料と競合しない非可食バイオマス由来（特に古紙、農業系残渣など）の素材であるという点である。このような、低コスト、非可食由来原料、生分解性、機能性を有する素材を提供するプラットフォームは現在存在せず、今後の持続可能な社会構築に向けて有意義なものとなると考えられる。

このようなプラットフォームの根幹技術として、「バイオマス糖化酵素の製造技術」「糖化技術」「タンパク質製造技術」があり、技術面、知財面でも優位性を保つことが出来る。特に、今回開発された「誘導物質フリーでのタンパク質生産技術」は、安価に糖化酵素を生産すること、安価に任意のタンパク質を生産すること、そしてその原料を非可食バイオマス由来の糖のみで実施することを可能とする基幹技術である。この部分の技術をおさえることは、非可食糖から素材製造へ繋げる（循環させる）上で根幹となり、他社への優位性を保つ上で重要である。

ビジネス戦略構築と、ロードマップ及び採算性について分析を行い、非可食糖販売事業単独よりも大幅に利益を拡大させることが可能であると考えられた。

一方で、ファイブフォース分析でも記載したように、タンパク質素材以外のケミカル製品にお

いても生分解性かつ高機能な製品が開発される可能性があり、原料バイオマスの拡張による規模拡大と低コスト化、及び「タンパク質ならではの特殊機能」の開発は残渣抽出タンパク質ではなく、設計可能な発酵タンパク質としての強みが発揮される部分でもあり、長期目線で極めて重要だと考えられた。

本事業の社会的価値について、大きく分けて 3 つあると考えている。

1 つ目は国内における新規バイオ化学コンビナートの発展である。今回の事業（酵素オンサイト販売＋非可食糖製造販売＋タンパク質素材販売）が仮に事業計画通りに実施できた場合、年間数万トンクラスで日本国内での非可食バイオマスベースのケミカルが普及していくこととなる。この量は日本におけるバイオエタノールの製造量が年間 1 万トン程度に留まっていること、バイオマスプラスチックとしてみても 5 万トン未満であることを考えると国内としては決して少ない量ではなく、日本におけるバイオリファイナリーの推進加速という点では重要な転換点となり得ると考えられる。

2 つ目は古紙や一般廃棄物の利用価値向上と環境調和型社会への変容である。これまで古紙は古紙にしかリサイクルされないにも関わらず古紙やパルプ自体が余剰となり価格の下落が生じ、さらに古紙価格の下落は古紙回収システムの維持も困難とさせることから、負のスパイラルとなりかねない課題を抱えている。古紙の循環に対しバイオリファイナリーという新たな出口を作ることは、パルプ・古紙業界の安定化にも繋がると考えられる。そしてその古紙を新たな環境調和型のケミカルスに変換し、使用することで、循環型社会の 1 つのモデルケースを創り出すことになると考えられる。花王は様々なコンシューマープロダクトやケミカル製品を抱え、トイレタリーにおいては日本で一番の売り上げを誇る。そこで使用されている化石由来の原料や可食原料由来の界面活性剤や基材、包装材を非可食糖由来のバイオベースケミカルスに変えていくだけでも、日本におけるトイレタリー製品の脱石化、脱可食原料化を推進できると考えられる。花王が先駆者となり、SDGs に配慮した環境調和型製品が一般的となるような社会へ変容させるための潮流を生み出す起爆剤となるような事業であると考えている。

3 つ目は、再生可能樹脂の選択肢を増やすことである。生分解性プラスチックの開発は進んでいるものの、石化由来のプラスチックに対し生分解性のバイオプラスチックの普及は遅れており、その種類も PBAT、PBS、PLA、PHA などに限られており、選択肢が非常に少ない。今後、汎用樹脂だけでなく、高機能なエンブラなどもバイオ由来、非可食由来に転換していくためには用途や求められる機能に応じて選択できることが重要であると考ええる。今回日本国内での事業モデルでは最大でも数万トンと規模は小さいものの、それを農業系残渣まで拡張し世界的に展開することで、このようなプラスチック問題の解決に向けた一助になると考えている。

以上のように、セルロース系バイオマス糖化酵素の技術、非可食糖の製造技術、トリコデルマを利用した安価大量なタンパク質生産技術、さらには素材用に加工する技術を一気通貫で活用することで、これまでにない新たな循環型社会への一步を踏み出し、環境調和型素材がデファクトスタンダードとなる社会を構築していきたい。

謝辞

理系研究の遂行にあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました、神戸大学 石井純 准教授に厚く御礼申し上げます。日々多くのご助言いただき、論文としてまとめることが出来て心より感謝申し上げます。学位審査にあたり、お忙しいところご協力、ご助言賜りました、神戸大学 近藤昭彦 教授、吉田健一 教授に心より御礼申し上げます。

アントレ研究の遂行にあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました、神戸大学 山本一彦 教授、蔭山広明 教授に厚く御礼申し上げます。また、幸田徹 客員教授のご助言より素材分野への展開アイデアが広がり、一つの大きな方向性となりました。重ねて感謝申し上げます。イノベーション・ストラテジー研究の審査、オフィスアワー等ご協力、ご助言賜りました、尾崎弘之 教授、福家信洋 教授に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、日頃より有益なご議論、ご助言いただきました、花王株式会社 小山伸吾氏、五十嵐一暁氏、掛下大視氏、児玉裕司氏、高橋史員氏、柴田望氏、論文執筆にあたりデータ取得にご協力いただきました、花王株式会社 一瀬桜子氏、和田真由美氏、西口大貴氏に心より感謝申し上げます。

本課程への進学にあたり、企業派遣としての学びの機会を与えてくださいました、花王株式会社 大内敦氏、瀧村靖氏に感謝申し上げます。

最後に、夢だった博士課程への進学を応援し、支えてくれた家族の真由美、陽菜、由依彩に心から感謝いたします。

神戸大学博士論文

非可食バイオマス由来糖と糸状菌による糖化酵素製造技術を基盤とした循環型タンパク質生産プラットフォームの展開 全 149 頁

提出日 2023 年 7 月 26 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。

© 新井 俊陽

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。