



ピキア酵母を宿主とした芳香族化合物群高生産プロセスの開発およびその事業展開

雲北, 涼太

(Degree)

博士 (科学技術イノベーション)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Date of Publication)

2025-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8964号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490189>

※ 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

ピキア酵母を宿主とした芳香族化合物群
高生産プロセスの開発およびその事業展開

2024 年 1 月

神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科

雲北 涼太

目次

第1章 序論

1.1 バイオエコノミー時代の到来	5
1.2 各国のバイオエコノミーへの対応	7
1.3 本研究の目的	8
1.4 業績一覧	9
1.5 本論文の構成	10
1.6 参考資料および引用文献	12

第2章 ピキア酵母を宿主とした芳香族化合物群の発酵生産

2.1 緒言	
2.1.1 チロシン由来芳香族化合物群	14
2.1.2 酵母 <i>Pichia pastoris</i> (ピキア酵母)	14
2.1.3 研究戦略	15
2.2 結果および考察	
2.2.1 チロシン生産量の簡便な評価系の構築	17
2.2.2 チロシン高生産に有効な代謝改変の探索	18
2.2.3 ピキア酵母による芳香族化合物群の発酵生産	20
2.2.4 細胞内代謝物蓄積量の測定	21
2.2.5 流加培養	23
2.3 小括	24
2.4 実験手法	25
2.5 参考資料および引用文献	33

第3章 炭素源の違いによる芳香族化合物群生産への影響

3.1 緒言	
3.1.1 課題設定	43
3.1.2 研究戦略	45
3.2 結果および考察	
3.2.1 アミノ酸を炭素源とした芳香族化合物群生産	45
3.2.2 培養上清および細胞内に含まれる代謝物の経時測定	48
3.2.3 単一アミノ酸添加条件での培養試験	50
3.3 小括	52
3.4 実験手法	53

3.5 参考資料および引用文献	55
-----------------	----

第4章 微生物培養系と膜抽出システムの組み合わせによるバイオフェノール生産性の向上

4.1 緒言	
4.1.1 現状のバイオものづくりの限界	57
4.1.2 二相培養	58
4.1.3 膜抽出システム「Pertraction システム」	58
4.1.4 研究戦略	59
4.2 結果および考察	
4.2.1 ピキア酵母に対するフェノールの毒性	59
4.2.2 フェノール抽出に適した有機溶媒の検討および二相培養	60
4.2.3 膜抽出技術「Pertraction システム」の開発	62
4.2.4 微生物培養系と膜抽出システムのカップリング	64
4.3 小括	66
4.4 実験手法	66
4.5 参考資料および引用文献	69

第5章 イノベーション・アイデア

5.1 イノベーション・アイデアの概要	
5.1.1 先端研究を通して得られたブレイクスルー	71
5.1.2 価値提案	71
5.2 着想に至った背景	
5.2.1 現代社会とエネルギー	72
5.2.2 エネルギー業界における脱炭素化の重要性	72
5.2.3 脱炭素燃料の使用によるカーボンニュートラル	73
5.2.4 日本国内の SAF 市場および需要見通し	74
5.2.5 SAF 製造法	75
5.3 イノベーション・アイデアの独自性および優位性	
5.3.1 提案する新規バイオものづくり	78
5.3.2 本アイデアの優位性	79
5.3.3 本事業におけるターゲット化合物	80
5.4 小括	83
5.5 参考資料および引用文献	83

第6章 事業戦略

6.1	ビジネスモデルの立案	
6.1.1	日本における SAF 製造	87
6.1.2	SAF 製造サプライチェーン	88
6.1.3	民間企業による取り組み	89
6.1.4	5-Forces 分析	90
6.1.5	ターゲティング	94
6.2	成長戦略	
6.2.1	シード期	95
6.2.2	アーリー期	97
6.2.3	ミドル期	99
6.3	本事業を行う上でのリスク	100
6.4	小括	101
6.5	参考資料および引用文献	102

第7章 技術戦略

7.1	予備検討	104
7.2	研究開発項目	106
7.3	参考資料および引用文献	110

第8章 知財戦略

8.1	登録特許調査（海外）	112
8.2	登録特許調査（国内）	113
8.3	研究成果の権利化	115
8.4	参考資料および引用文献	116

第9章 財務戦略

9.1	各成長段階における財務戦略	120
9.2	財務諸表	122
9.3	参考資料および引用文献	124

第10章 結言

謝辞

第 1 章 序論

1.1 バイオエコノミー時代の到来

生物の機能を利用した技術（バイオテクノロジー）が生み出す価値によって作り出される経済「バイオエコノミー」は、昨今、世界の大きな潮流となっている。バイオテクノロジーが活躍する分野は、健康・医療（新治療法や診断法など）、農業（食料、飼料、繊維など）、工業（酵素、バイオ燃料、バイオプラスチックなど）と非常に広範であり、公衆衛生の向上、省エネルギー、地域社会の発展など、幅広い社会課題の解決にも貢献が期待されている。2009 年の OECD のレポート「The Bioeconomy to 2030 : Designing a Policy Agenda」[1]によると、バイオエコノミー市場は 2030 年には OECD 諸国の GDP の 2.7%（約 1.6 兆ドル、約 200 兆円）に成長し、その比率は健康・医療が 25%、農業が 36%、工業が 39% であると予測されている（図 1-1）。また、最近、アメリカの大手コンサルティング会社マッキンゼー・アンド・カンパニーが予想し直したところ、2030 年の世界市場規模は最大 400 兆円と約 2 倍に上振れしていた [2]。更には SDGs や ESG 経営など「脱化石資源」と言わないと、経営的にも投資的にも非常に厳しいことから、バイオテクノロジーが大きなソリューションの一つになりつつあると言える [3]。以下に様々な領域におけるバイオテクノロジーの役割を列挙する。

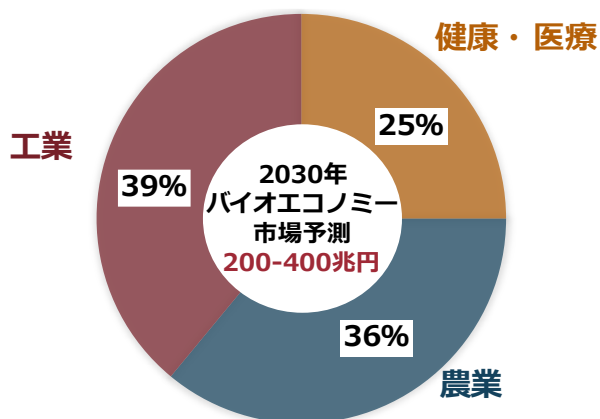


図 1-1 バイオエコノミー市場の予測

「Focus NEDO、バイオ×デジタルで切り拓く未来 スマートセルインダストリー」[4]をもとに筆者が作成

・医療・ヘルスケア分野

医療・ヘルスケア分野では、抗体医薬などのバイオ医薬品、再生医療、遺伝子治療、細胞医療が大きな市場に成長しつつある。実際、世界の売り上げトップ 10 の医薬品の大半は、抗体医薬品をはじめとしたバイオ医薬品である [5]。更には世界的な大流行を引き起こした COVID-19 に対して、モデルナ社やファイザー社の mRNA を使った新しいタイプのワクチンも実用化された。このように、バイオテクノロジーは世界の医薬品開発の中核となっ

ている。従来、治療手段（モダリティ）は低分子化合物とされてきたが、モダリティが低分子化合物からペプチド（中分子）薬、抗体医薬を含むタンパク質医薬、核酸医薬、細胞医薬、再生医療など多種多様なバイオ製品に拡大しており、医薬品の概念が大きく変わりつつある。特に遺伝子治療薬や細胞治療薬が開発・承認ラッシュを迎えており、次いで抗体医薬、再生医療などへと広がっている [3]。

・エネルギー分野

エネルギー分野では、持続可能・環境適応型エネルギー供給の実現を目指して、バイオ燃料の開発が強く求められている。代表的なバイオ燃料としてはバイオエタノール・バイオディーゼル燃料（Biodiesel fuel; BDF）・持続可能な航空燃料（Sustainable aviation fuel; SAF）・バイオメタンガスなどが挙げられるが、中でも、昨今、ジェット燃料のバイオ化（SAFの開発）が強く望まれている。

ブラジルのハイゼン社によるセルロース系バイオマスからのエタノール生産などの成功例はあるものの、ごく一部での実用化にとどまっており、未だ開発段階である。

・工業（ものづくり）分野

工業（ものづくり）分野においては、化石資源を利用した従来の化学工業プロセスからの抜本的な改革が期待されている。現在、私たちの身の回りの製品のほとんどは、石油・石炭などの化石資源を原料にしており、バイオ由来製品への転換が必須である。特に、バイオマスや CO₂ などの再生可能資源を原料とした、持続可能で環境に適応したバイオものづくりへの転換が不可欠である。このように、バイオエコノミーにおけるものづくり分野では、製造プロセスの抜本的な脱化石資源化により、持続可能で環境に適応した素材供給の実現を目指している。

・食料分野

食料分野においても、世界は非常に危機的な状況にある [6]。また、世界で起こる紛争も食料供給の安全保障を脅かしている。更には、地球温暖化が進む中、収量を維持・向上させるためには耐環境性を高める必要があり、バイオテクノロジーを駆使した食料安全保障の確保は極めて重要である [3]。従来のゲノム育種に加えて、最近ではゲノム編集食品という言葉を目にすることが多くなってきた。例えば、2022 年 1 月時点で届け出が受理されているゲノム編集食品には、GABA（トマトやカカオなどに多く含まれるアミノ酸の一種）含有量を増やしたトマト、可食部（身）を増量したマダイ、短期間で成長するトラフグがある [7]。また、最近の大きな傾向として、温暖化ガス排出量の少ない未来型食品を生産するために、代替肉や代替タンパク質、代替ミルクなどを効率よく生産する動きもある。

1.2 各国のバイオエコノミーへの対応

2022 年 6 月、日本政府は「骨太の方針」と成長戦略を閣議決定し、“バイオものづくり分野”や“再生・細胞医療・遺伝子治療等のバイオテクノロジー・医療分野”を国益に直結する重要科学技術分野と位置付けた [8]。同戦略でバイオものづくりは、海洋汚染、食糧・資源不足など地球規模での社会的課題の解決と、経済成長との両立を可能とする、“二兎を追える研究分野”と認識されている。また、グリーントランスフォーメーション (GX) を通じた脱炭素、エネルギー安定供給、経済成長の実現も重点分野であるが、GX の実現に向けてもバイオテクノロジーは重要な役割を果たしている [8]。

米国では、2012 年に「National Bioeconomy Blueprint」、2016 年に「Federal Activities Report on the Bioeconomy」を発表し、2030 年には 10 億トンのバイオマスを用い、化石由来燃料の 25% を代替、約 2,300 万トンのバイオ由来製品と 850 kWh の電力供給を目指す目標を示している [9, 10]。また、2022 年 9 月には、バイデン大統領が大統領令「Extensive Order on Advancing Biotechnology and Biomanufacturing Innovation for a Sustainable, Safe, and Secure American Bioeconomy」に署名した [11]。同大統領令では、「2030 年までに、世界の製造業における生産高の 3 分の 1 以上、約 30 兆ドル (約 4300 兆円) 相当がバイオベースのものづくりに置き換わる」との見通しが示されている。

英国では、2015 年にバイオエコノミー指針である「Building a high value bioeconomy」を発表し、合成生物学の実用化を加速してバイオエコノミーを推進する戦略を明確化している [12]。その翌年 2016 年には、バイオエコノミー戦略として「Biodesign for the Bioeconomy UK Synthetic Biology Strategic Plan」を発表し、同戦略では「合成生物学は設計・構築・試験・分析のサイクルを加速させて生物をデザインする手法に進化し、経済的、社会的ベネフィットを与える」と記載している。また、バイオエコノミーを達成するツールとして合成生物学を位置付け、社会実装の段階に入りつつあると宣言している [13]。

EU では、2012 年にバイオエコノミー戦略である「Innovating for Sustainable Growth: A Bioeconomy for Europe」を発表し、7 年間で約 5,180 億円を投資し、2030 年までに石油由来製品の 30%、輸送燃料の 25% を生物由来に置換すると宣言した [14]。また、2014 年には、バイオを情報通信技術 (Information and Communication Technology; ICT) 等とともに重要課題に位置付け、社会的な課題解決に向けて「食糧安全保障」、「持続可能な農業及びバイオエコノミー」、「安全かつクリーンで、効率的なエネルギー」、「気候への対処、資源効率及び原材料」等を取り上げた [15]。

他にも、バイオエコノミーに関する様々な取り組み・政策は世界各国で発表されている。また、日本を含む世界各国でバイオテクノロジー関連研究への投資も進められており、現在、

世界はバイオ大競争時代に突入していると言えるだろう。

1.3 本研究の目的

本研究では、バイオエコノミー市場における「工業」分野である「バイオものづくり」に着目した。バイオものづくりのサプライチェーンを図 1-2 に示すが、バイオものづくりでは、

① 「前処理」

原料となる資源（主に、トウモロコシやサトウキビ）を調達し、前処理を施すことで微生物を培養するための原料（従来は、主にグルコース）を得る。

② 「培養」

微生物の特性や代謝反応を利用して、原料から目的化合物を生産させる。

③ 「分離・精製」

生産された目的化合物は、分離・精製などの工程を経て純度が高められる。

④ 「加工」

分離・精製などの工程で純度が高められた化合物は加工され、最終的に⑤「製品」として販売される。

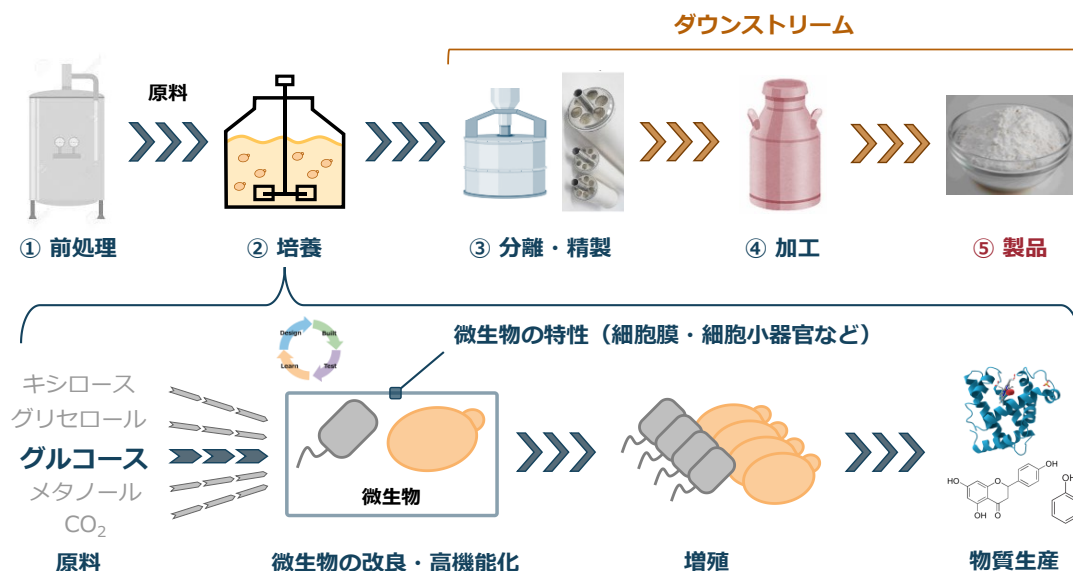


図 1-2 バイオものづくりのサプライチェーン

バイオものづくりは、微生物の発酵能力を利用して様々な化合物を生産できることから大きな注目を集めているが、現状、化学プロセスでは数時間で生産できるものが、バイオプロセスでは数日かかることも珍しくなく、製品に関しても「化学プロセスは速くて濃い、バイオプロセスは遅くて薄い」のが現状である。特に、合成生物学などの微生物育種開発に関

わる技術は未だ発展途上であり、低コストで製造されている現代の化学プロセスをバイオプロセスにそのまま置き換えることは難しい。このように、従来のバイオものづくりの課題は【微生物宿主の生産性の低さ】にあると言える。今後、バイオものづくりを実用化していくためには、微生物宿主の物質生産能を高めることが不可欠である。

本研究では、「**ピキア酵母を宿主とする芳香族化合物生産**」をケーススタディーとして、ピキア酵母の芳香族化合物生産性を向上させる技術開発に取り組み、バイオものづくりを実用化する上での研究開発プラットフォームの確立を目指した。具体的には、ピキア酵母による芳香族化合物の大量生産に適した代謝改変の探索、培養条件・培養手法の確立に取り組んだ。更には、研究を通して得られたブレイクスルーを活用したイノベーション・アイデアを立案し、その実現に向けてビジネスモデル、事業、技術、知財、財務の観点からの戦略を策定した。

1.4 業績一覧

筆者は在学中に筆頭著者として3本の研究論文（査読済）、共著者として2報の研究論文（査読済）を投稿し、1件の特許出願も行った。筆者の在学中の先端研究に関わる業績を以下に列挙する。

研究論文（筆頭著者）

Kumokita, R. et al., Construction of an L-Tyrosine chassis in *Pichia pastoris* enhances aromatic secondary metabolites production from glycerol. *ACS Synthetic Biology*, 2022, **11**, 2098-2107 [16]

Kumokita, R. et al., Aromatic secondary metabolite production from glycerol was enhanced by amino acid addition in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, **107**, 7391-7401 [17]

Kumokita, R. et al., High-level phenol bioproduction by engineered *Pichia pastoris* in glycerol fed-batch fermentation using an efficient pertraction system. *Bioresource Technology*, 2024, **393**, 130144 [18]

研究論文（共著者）

Ito, Y., Terai, G., Ishigami M., Hashiba N., Nakamura Y., Bamba T., Kumokita, R. et al., Exchange of endogenous and heterogeneous yeast terminators in *Pichia pastoris* to tune mRNA stability and gene expression, *Nucleic Acids Research*, 2020, **48**, 13000-13012 [19]

Inokuma, K., Miyamoto, S., Morinaga, K., Kobayashi Y., Kumokita, R. et al., Direct production of 4-hydroxybenzoic acid from cellulose using cellulase-displaying *Pichia pastoris*, *Biotechnology and Bioengineering*, 2023, **120**, 1097-1107 [20]

特許出願

【発明の名称：フェノール類の製造方法、 出願番号：特願 2023-142382】

国際学会発表

Kumokita, R. et al., Construction of an L-Tyrosine chassis in *Pichia pastoris* enhances aromatic secondary metabolites production from glycerol, Metabolic Engineering 15 (ME15), 11-15, June, 2023

Kumokita, R. et al., High-level phenol bioproduction by engineered *Pichia pastoris* in glycerol fed-batch fermentation using an efficient pertraction system, Asian Synthetic Biology Association 2023 (ASBA 2023), 12-16, December, 2023

1.5 本論文の構成

本論文は全 10 章で構成されている。

第 1 章では、前述の通り、本研究の根幹である「バイオものづくり」に関する学術的および社会的背景を序論としてまとめた。

第 2 章から第 4 章は、以下の 3 つの論文の内容で構成されている。

Kumokita, R. et al., Construction of an L-Tyrosine chassis in *Pichia pastoris* enhances aromatic secondary metabolites production from glycerol. *ACS Synthetic Biology*, 2022, **11**, 2098-2107 [16]

Kumokita, R. et al., Aromatic secondary metabolite production from glycerol was enhanced by amino acid addition in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, **107**, 7391-7401 [17]

Kumokita, R. et al., High-level phenol bioproduction by engineered *Pichia pastoris* in glycerol fed-batch fermentation using an efficient pertraction system. *Bioresource Technology*, 2024, **393**, 130144 [18]

第 2 章では、ピキア酵母を宿主として初となる芳香族化合物群（レスベラトロール、ナリゲニン、フェノール、ノルコクラウリン）の発酵生産に取り組んだ。具体的には、まず、芳香族化合物群生産における共通前駆体「チロシン」への代謝の強弱を簡便に評価できる評

価系を構築し、この評価系を用いて、チロシン高生産株、すなわちチロシンシャーシ株を作出した。更には、開発したチロシンシャーシ株に各種芳香族化合物群の生合成経路を導入し、ピキア酵母の芳香族化合物群生産性を調査した。

第 3 章では、ピキア酵母を用いた芳香族化合物群の発酵生産において、グリセロールを炭素源として使用すると、グルコースを使用した場合と比較して生産量が大幅に向上することに注目し、ピキア酵母がグリセロールから芳香族化合物群を高生産できるメカニズムの解明に取り組んだ。

第 4 章では、ピキア酵母が生産した芳香族化合物が培養液中に一定量以上蓄積すると、ピキア酵母に対して毒性を示し、生育阻害や物質生産性の低下を引き起こすことに焦点を当て、ピキア酵母を宿主としたフェノール生産を例に、発酵培養液中のフェノール濃度を低減させ、ピキア酵母への毒性を軽減させるアプローチの開発に取り組んだ。具体的には、培養液からフェノールを抽出するための中空糸膜を用いたフェノール膜抽出システム「Pertraction システム」を構築し、「Pertraction システム」と「ピキア酵母でのフェノール発酵生産系」を組み合わせることで、連続的なバイオフェノール発酵生産システムの確立を目指した。

第 5 章では、第 2 章から第 4 章で取り組んだ先端研究で得られたブレイクスルーと、日本国内のエネルギー産業における脱炭素化の重要性を考慮し、イノベーション・アイデアとして、「**バイオ燃料 (BDF/SAF) の普及拡大を視野に入れた、ピキア酵母による新規バイオものづくり事業**」を提案した。

第 6 章では、提案したイノベーション・アイデアを実現するための事業戦略について述べた。具体的には、環境分析や競合分析を通じてビジネスモデルを立案した。更には、事業をシード期、アーリー期、ミドル期に分け、それぞれの成長フェーズにおける事業ロードマップと達成目標を策定した。

第 7 章では、これまでの先端研究を通して得られた技術プラットフォームを整理し、イノベーション・アイデアを実現するための技術的な課題を明確化した。更には、課題解決に向けた研究開発項目を具体的に策定した。

第 8 章では、知財戦略に焦点を当て、提案する事業に関連するコア技術や関連技術について、他社の特許を参考に特許性を分析した。また、先端研究を通して得られた研究成果の権利化や、今後開発する技術のノウハウとしての秘匿方針についても検討した。

第 9 章では、財務戦略に焦点を当て、シード期、アーリー期、ミドル期の各成長フェーズにおける主要イベントやマイルストーンを列挙し、大学発ベンチャー設立から事業開始、安定した営業キャッシュフローが得られるまでの財務状況を想定した。更には、必要な資金調達計画および財務諸表を作成した。

第 10 章では、本研究の成果を簡潔にまとめ、また本研究の波及効果について議論し、本

稿の結言とした。

1.6 参考資料および引用文献

- [1] 「The Bioeconomy to 2030」, OECD, 2009,
<https://doi.org/10.1287/9789264056886-en>
- [2] McKinsey & Company:
<https://www.mckinsey.com/industries/life-sciences/our-insights/the-bio-revolution-innovations-transforming-economies-societies-and-our-lives>
- [3] 日本生物工学会誌、第 101 巻、第 1 号、2-14、「バイオ物質生産に資するスマートセル創出に向けた革新的アプローチ」、2023
- [4] Focus NEDO、No.70「バイオ×デジタルで切り拓く未来 スマートセルインダストリー」、2018、<https://www.nedo.go.jp/content/100884792.pdf>
- [5] 日経バイオテク、「速報、世界の医薬品売上高トップ 10_2022 年度」、2023 年 4 月
- [6] THE STATE OF FOOD SECURITY AND NUTRITION IN THE WORLD 2022, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2023,
<https://www.fao.org/3/cc0639en/online/cc0639en.html>
- [7] 季刊『社会運動』【446 号】特集：農業危機、生産する消費者運動、販売が始まったゲノム編集食品、2022 年 4 月
- [8] 「経済財政運営と改革の基本方針 2022 新しい資本主義へ ～課題解決を成長のエンジンに変え、持続可能な経済を実現～」2022 年 6 月、https://www5.cao.go.jp/keizai-shimon/kaigi/cabinet/2022/2022_basicpolicies_ja.pdf
- [9] NATIONAL BIOECONOMY BLUEPRINT, 2012,
<https://obamawhitehouse.archives.gov/administration/eop/ostp/library/bioeconomy>
- [10] FEDERAL ACTIVITIES REPORT ON THE BIOECONOMY, 2016,
<https://www.energy.gov/eere/bioenergy/articles/federal-activities-report-bioeconomy>
- [11] Executive Order on Advancing Biotechnology and Biomanufacturing Innovation for a Sustainable, Safe, and Secure American Bioeconomy, 2022

- [12] Building a high value bioeconomy, HM Government, 2015,
https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/408940/BIS-15-146_Bioeconomy_report_-_opportunities_from_waste.pdf
- [13] Biodesign for the Bioeconomy - UK Strategic Plan for Synthetic Biology, 2016,
<https://iuk.ktn-uk.org/perspectives/biodesign-for-the-bioeconomy-uk-strategic-plan-for-synthetic-biology/>
- [14] Innovating for Sustainable Growth: A Bioeconomy for Europe, 2012,
https://www.ecsite.eu/sites/default/files/201202_innovating_sustainable_growth_en.pdf
- [15] Horizon 2020 – Research and innovation, 2014,
https://research-and-innovation.ec.europa.eu/funding/funding-opportunities/funding-programmes-and-open-calls/horizon-2020_en
- [16] Kumokita, R. *et al.*, Construction of an L-Tyrosine chassis in *Pichia pastoris* enhances aromatic secondary metabolites production from glycerol. *ACS Synth. Biol.*, 2022, **11**, 2098-2107
- [17] Kumokita, R. *et al.*, Aromatic secondary metabolite production from glycerol was enhanced by amino acid addition in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2023, **107**, 7391-7401
- [18] Kumokita, R. *et al.*, High-level phenol bioproduction by engineered *Pichia pastoris* in glycerol fed-batch fermentation using an efficient pertraction system. *Bioresour. Tech.*, 2024, **393**, 130144
- [19] Ito, Y. *et al.*, Exchange of endogenous and heterogeneous yeast terminators in *Pichia pastoris* to tune mRNA stability and gene expression, *Nucleic Acids Research*, 2020, 48, 13000-13012
- [20] Inokuma, K. *et al.*, Direct production of 4-hydroxybenzoic acid from cellulose using cellulase-displaying *Pichia pastoris*, *Biotechnology and Bioengineering*, 2023, 120, 1097-1107

第2章 ピキア酵母を宿主とした芳香族化合物群の発酵生産

2.1 緒言

2.1.1 チロシン由来芳香族化合物群

芳香族アミノ酸「チロシン」から変換できる芳香族化合物には、高付加価値化合物が多く、主にポリマー原料、栄養機能食品、医薬品原料、農薬原料などに使用されている（図 2-1）[21, 22]。現行の製造法では石油からの精製および植物からの直接抽出に依存しているが、石油からの精製による製造法では、製造工程で多量の CO₂ を排出するため、地球温暖化の一因となる。植物からの抽出による製造法では植物中に含まれる量が少なく、また、天候・気温により植物の収穫量は大きく変動するため、安定的な供給が困難である [23, 24]。化学合成では、プロセスが複雑で反応条件も厳しく、また、選択性にも乏しいため、低コストでの製造は難しい [25, 26]。付加価値の高い芳香族化合物群を低コストで安定供給するためには、増殖が速く高密度培養が可能な微生物に芳香族化合物群の合成経路を導入し、微生物の物質生産能力を活用して高収率で発酵生産させるプロセスの開発が急務である。

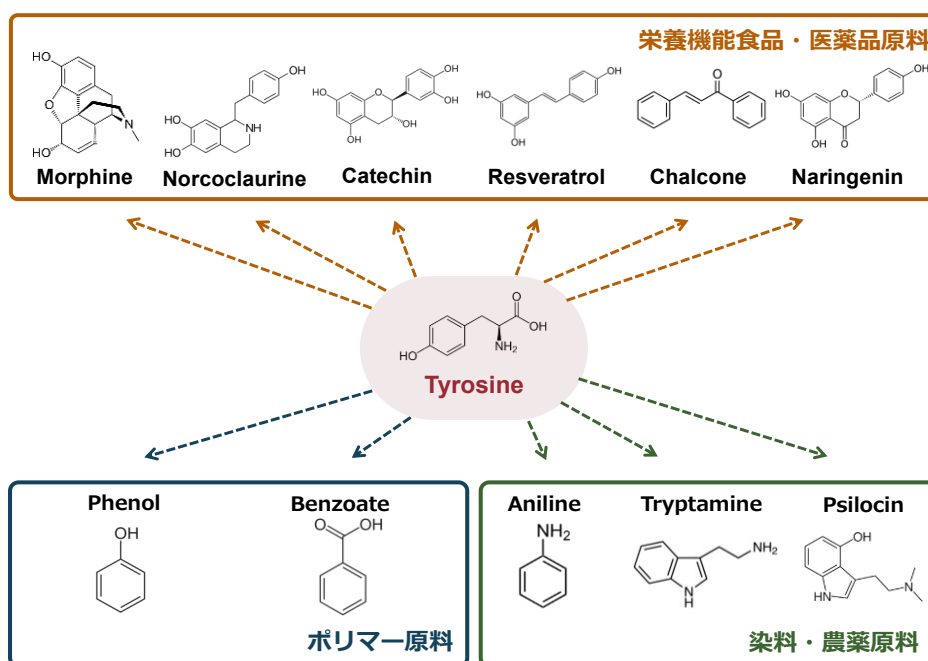


図 2-1 芳香族アミノ酸「チロシン」から合成できる芳香族化合物群

2.1.2 酵母 *Pichia pastoris* (ピキア酵母)

微生物の中でも酵母は、ファージ感染に対する影響を受けにくく、かつ高濃度の代謝産物に対する耐性も高いことから、物質生産の宿主として大いに期待されている [27, 28]。しかしながら、チロシン由来の芳香族化合物群の生産については未だ実績が乏しく、そのポテ

ンシャルは明らかになっていない。

本研究では微生物宿主として、酵母 *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) (ピキア酵母) に着目し、ピキア酵母を宿主とした芳香族化合物群高生産プロセスの開発に取り組むこととした。ピキア酵母はメチロトロフ酵母の一種であり、メタノールを唯一の炭素源、エネルギー源として生育できるという特徴を持ち、自然界では栗の木などの樹木に生息している。メタノールの他には、グルコースやグリセロールなど複数の炭素源を利用して生育できる。長年の研究の末、ピキア酵母は「好気条件下で増殖が速い」・「エタノールを生産しない」・「タンパク質生産のための発現系として非常に優れている」ことが明らかとなり、現在では、生物学的研究やバイオテクノロジー産業で広く使用されている [29, 30, 31]。また、培養上の細胞密度が極めて高い状態、いわゆる「高密度状態」でも増殖可能であり、この特徴は異種タンパク質の発現に適合し、より高い生産収量の達成に寄与している [32]。その一方で、ゲノムへの遺伝子組換え効率が低い、遺伝子組換えツールが少ない等が原因で、ピキア酵母に異種生物や植物の代謝経路を実装し、有用物質を生産する研究は極めて少なかった。

2.1.3 研究戦略

本研究では、スチルベノイドの一種であり、アンチエイジング作用やがん予防効果を有する抗酸化物質である「Resveratrol (レスベラトロール)」、フラボノイドの一種であり、酸化作用、抗炎症作用を含む多様な生理活性を有する「Naringenin (ナリンゲニン)」、ベンジルイソキノリンアルカロイドの一種であり、医薬品原料である「Norcoclaurine (ノルコクラウリン)」、樹脂、合成香料など、多数の工業製品を製造する際の原料となる「Phenol (フェノール)」の4つの芳香族化合物をターゲットとし、ピキア酵母を宿主とした発酵生産に取り組んだ。

ピキア酵母において、取り込まれた炭素源 (グルコース、グリセロール) は、多くの生物が共通してもつ代謝経路である解糖系 (Glycolysis) → ペントースリン酸経路 (Pentose phosphate pathway) → シキミ酸経路 (Shikimate pathway) → チロシンを経て、芳香族化合物群生産に用いられる (図 2-2)。そこで筆者は、芳香族化合物群生産における共通前駆体であるチロシンへの代謝フラックスをいかに強化するかが、芳香族化合物群高生産の鍵となると考えた。しかしながら、これまでピキア酵母へ代謝工学を応用して、解糖系やペントースリン酸経路、シキミ酸経路の代謝を改変・強化してチロシンや芳香族化合物群の生産性を向上させた報告がなく、ピキア酵母に合わせたチロシン高生産に有効な代謝改変もわかっていなかった。更には、チロシンへの代謝の強弱を評価するためには、複雑な分析手法でチロシン生産量を測定する必要があった。そこで、本研究では、①チロシン生産量の簡便な評価系の立ち上げ、②チロシン生産性向上酵素の探索およびチロシン高生産株 (チロ

シンシャーシ株)の作出、③各種生合成経路を導入することによるピキア酵母を用いた芳香族化合物群の発酵生産、に取り組むこととした。本書の冒頭で述べたバイオものづくりのサプライチェーンに当てはめると、「微生物の改良・高機能化」に該当する(図2-3)。

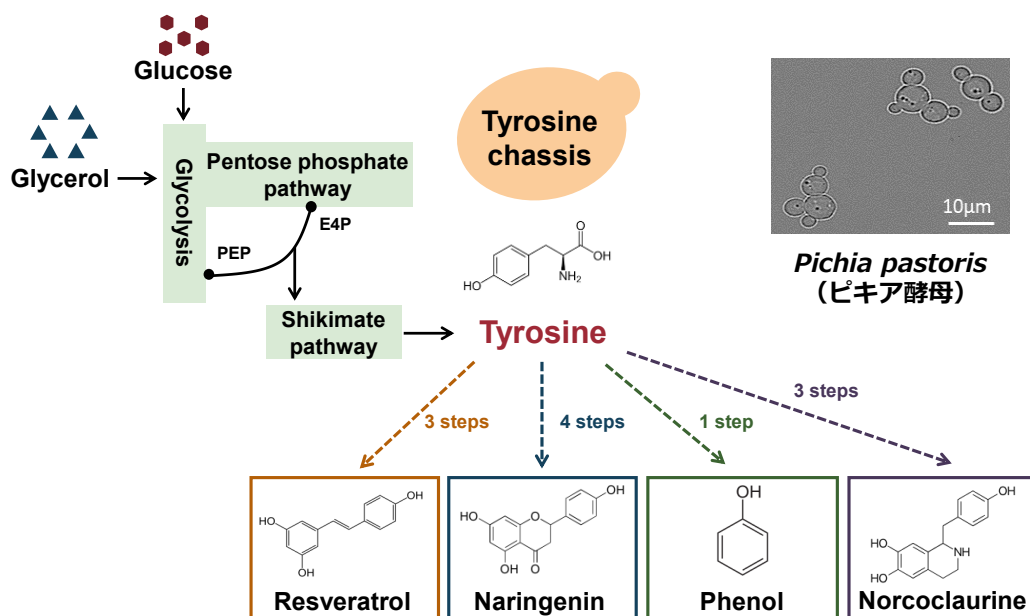


図 2-2 ピキア酵母における芳香族化合物群生合成経路

E4P: erythrose-4-phosphate; PEP: phosphoenolpyruvate

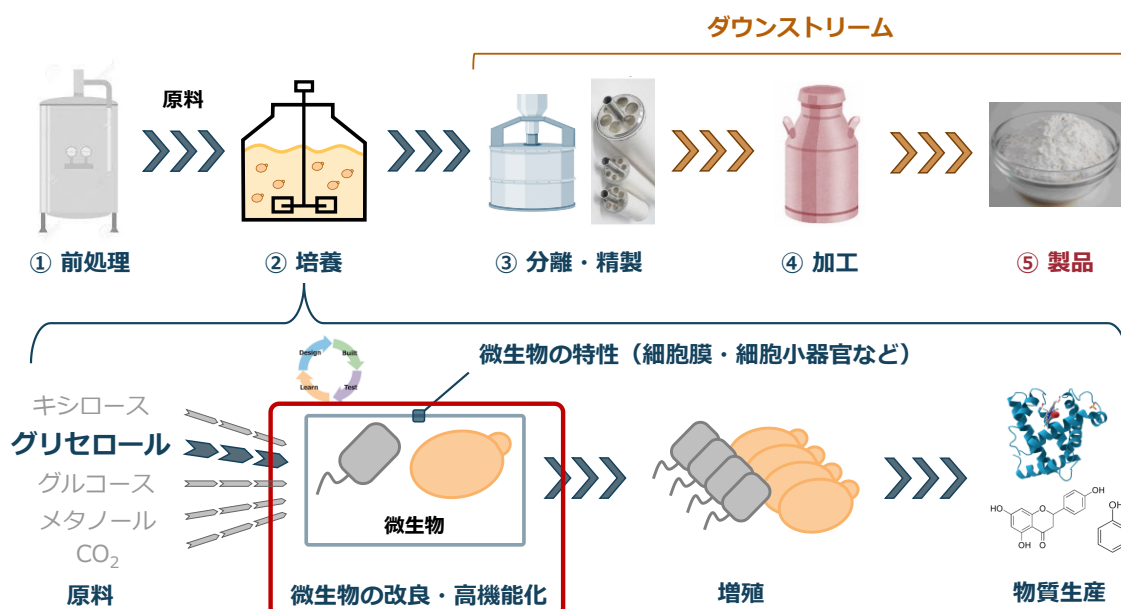


図 2-3 バイオものづくりのサプライチェーン

バイオものづくりのサプライチェーンにおいて、第2章の研究内容が該当する箇所を赤枠で囲っている。

2.2 結果および考察

2.2.1 チロシン生産量の簡便な評価系の構築

チロシン生産量の簡便な評価系としてチロシンから 2 段階の酵素反応で生産できる Betaxanthin (ベタキサンチン) に着目した (図 2-4)。ベタキサンチンは緑色の蛍光を発する黄色の色素であるため、コロニーの色の違いや蛍光顕微鏡、プレートリーダーにより、菌体のベタキサンチン生産量を簡便に定量できる。ベタキサンチン生産量を指標にチロシンまでの代謝レベルを簡便に評価できるのではと考えたのである。

ピキア酵母は、グルコースやグリセロールを代謝し、チロシンまでを生合成することは可能であるが、チロシンをベタキサンチンに変換する酵素はもっていない。そのため、ピキア酵母を宿主にベタキサンチンを生産するためには、チロシンから L-DOPA への反応を触媒する酵素 tyrosine hydroxylase (CYP) および L-DOPA からベタキサンチンへの反応を触媒する酵素 DOPA dioxygenase (DOD) を共発現させる必要がある。しかしながら、CYP はチロシンから L-DOPA の反応だけでなく、L-DOPA から L-Dopaquinone への反応も触媒する (図 2-4)。そこで本研究では、L-DOPA から L-Dopaquinone への反応の活性を低減させるために、CYP のアミノ酸配列の 13 番目の W (トリプトファン) を L (ロイシン) に、309 番目の F (フェニルアラニン) を L (ロイシン) に変更した変異型 CYP (CYP^{W13L, F309L}) を導入した [33]。

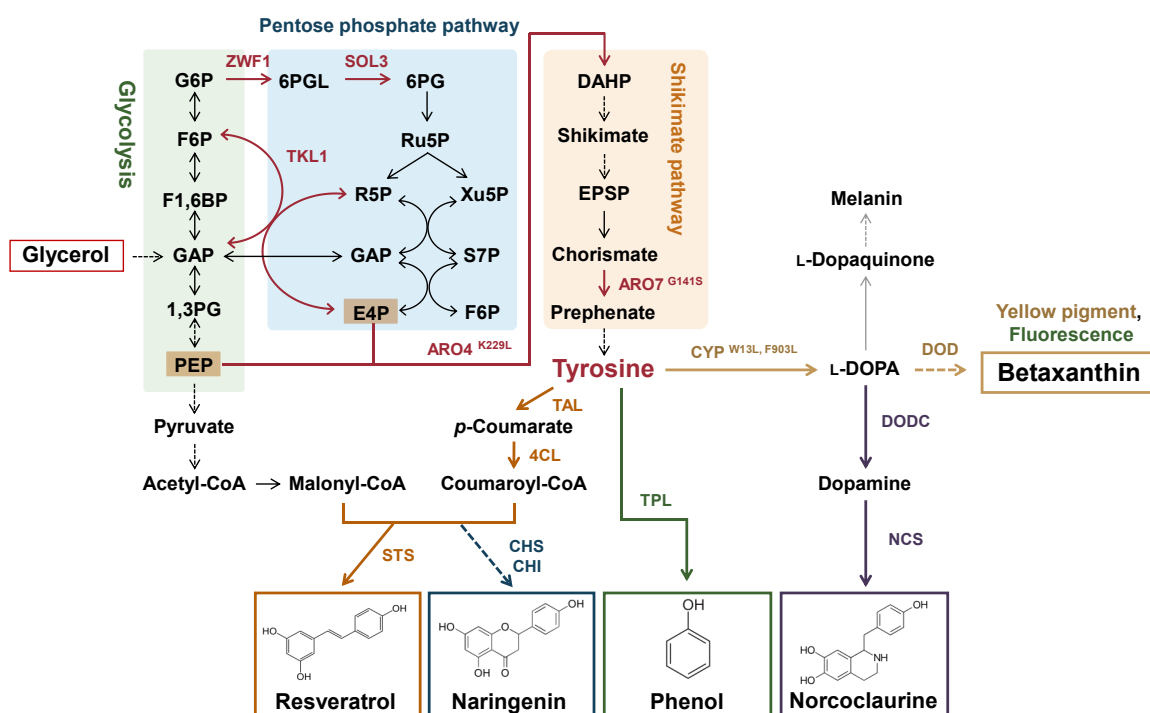


図 2-4 芳香族化合物群生合成経路の詳細図

ピキア酵母に内在する代謝経路を黒と赤の矢印で示す。赤矢印は本研究で過剰発現した酵素を示す。ベタ

キサンチン、レスベラトロール、ナリンゲニン、フェノール、ノルコクラウリン、メラニンの生合成経路を、それぞれ黄色、オレンジ色、青色、緑色、紫色、灰色で示す。破線は複数の酵素反応を示す。

ベタキサンチン生合成経路の酵素(変異型 CYP および DOD)を導入していない株(control 株)(図 2-5_a)と比較して、ベタキサンチン生合成経路の酵素を導入した株(CD 株)(図 2-5_b)ではコロニーが黄色を呈した。また、蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、コントロール株(図 2-5_c)では、緑色蛍光を確認できなかったが、CD 株(図 2-5_d)では、緑色蛍光が観察された。以上の結果から、ピキア酵母を宿主にベタキサンチンを生産することに成功した。

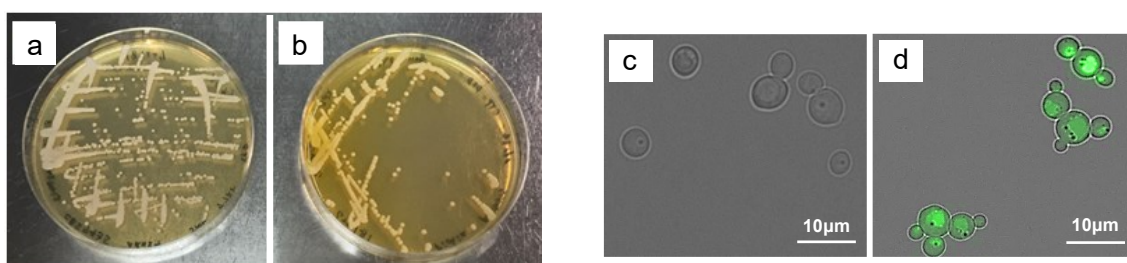


図 2-5 コントロール株およびベタキサンチン生産株の観察結果

(a,b: 明視野、c,d: 蛍光顕微鏡)

(a, c) : ベタキサンチン生合成経路の酵素(変異型 CYP および DOD)を導入していない株(control 株)、(b, d) : ベタキサンチン生合成経路の酵素を導入した株(CD 株)

2.2.2 チロシン高生産に有効な代謝改変の探索

ベタキサンチン生産株(CD 株)をベースに代謝改変を行い、チロシン生産性の向上に寄与する酵素を探索した。具体的には、チロシンを生合成する上での上流経路となるペントースリン酸経路やシキミ酸経路の酵素に着目した。

ピキア酵母では、ペントースリン酸経路の glucose-6-phosphate dehydrogenase (ZWF1) の過剰発現と 6-gluconolactonase (SOL3) の過剰発現を組み合わせることで、ペントースリン酸経路への代謝フラックスを強化できることが報告されている [34]。S. cerevisiae では、ペントースリン酸経路の transketolase (TKL1) や、シキミ酸経路の DAHP synthase (ARO4) および chorismate mutase (ARO7) のチロシンによるフィードバック非感受性型 (ARO4^{K229L}、ARO7^{G141S}) を過剰発現させることで、シキミ酸経路から合成できる代謝産物の生産量を増加できることが報告されている [26, 35]。

本研究では、ベタキサンチン生産株(CD 株)をベースに、ピキア酵母由来の SOL3、ZWF1、TKL1、S. cerevisiae 由来の変異型 ARO4 (ARO4^{K229L})、変異型 ARO7 (ARO7^{G141S}) を単独もしくは組み合わせて過剰発現させた株をそれぞれ作出し、菌体の黄色呈色度合いおよ

び培養上清の緑色蛍光強度から、ベタキサンチン高生産に有効な代謝改変を探索した（作成した酵母株のリストは、表 2-2 に示す）。それぞれの菌株を培養し、培養上清のベタキサンチン由来の緑色蛍光強度を測定した結果を図 2-6 に示す。ピキア酵母では、ペントースリン酸経路の酵素（SOL3、ZWF1、TKL1）を過剰発現させてもベタキサンチン由来の緑色蛍光強度に有意な差は見られなかったが（ $p > 0.05$ ）、シキミ酸経路の酵素（*S. cerevisiae* 由来の変異型 ARO4、変異型 ARO7）を過剰発現させるとベタキサンチン由来の緑色蛍光強度が増加し、特に、変異型 ARO4 と変異型 ARO7 を共発現した株（CD47m 株）では、CD 株に比べて緑色蛍光強度が 191%増加した（図 2-6）。また、CD47m 株は CD 株に比べ、目視で確認できるレベルで菌体が黄色に呈色していた（図 2-6）。一方、ペントースリン酸経路の酵素（SOL3、ZWF1、TKL1）の過剰発現とシキミ酸経路の酵素（変異型 ARO4、変異型 ARO7）の過剰発現を組み合わせても、CD47m 株と比較してベタキサンチン由来の緑色蛍光強度は増加しなかった。このことから、ピキア酵母では、SOL3、ZWF1、TKL1 の過剰発現はベタキサンチン生産量を増加させる上で有効な代謝改変ではないことが示唆された。

ピキア酵母では、変異型 ARO4（ARO4^{K229L}）および変異型 ARO7（ARO7^{G141S}）を過剰発現し、チロシンによるフィードバック阻害を解除することでベタキサンチン生産量が増加することが明らかとなった。

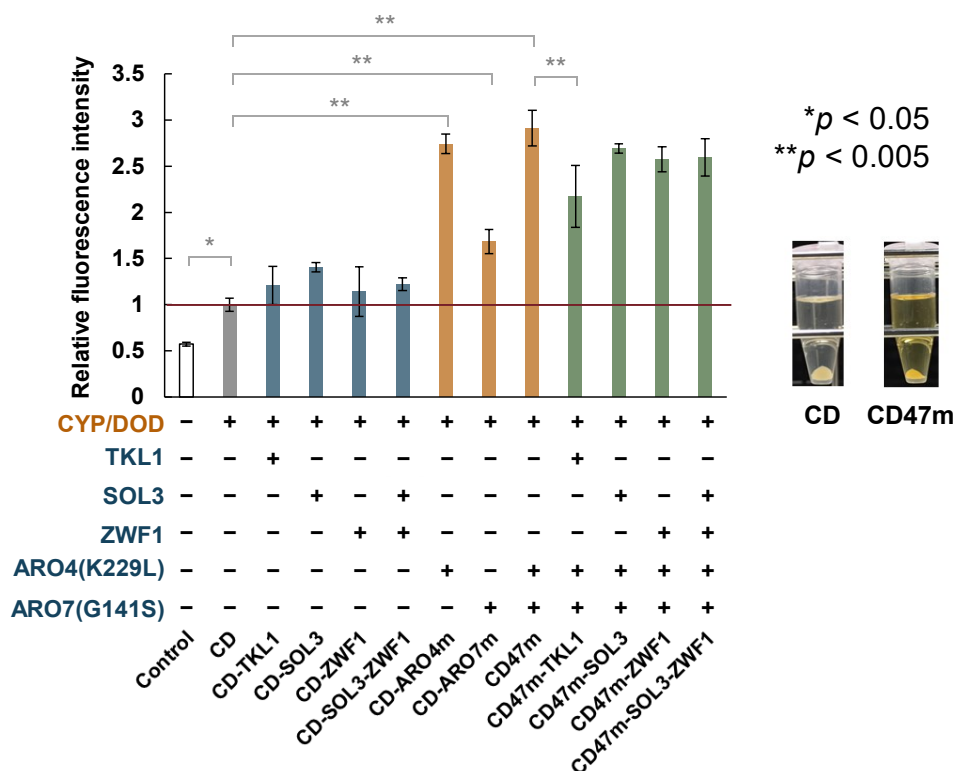


図 2-6 ベタキサンチン高生産に有効な代謝改変のスクリーニング

それぞれの酵母株を、20 mL の YPG 培地を含む 100 mL の三角フラスコを用いて、30℃、150 rpm の条

件で培養し、培養 24 時間後の培養上清に含まれるベタキサンチン由来の緑色蛍光を、プレートリーダーを用いて励起波長 485 nm、蛍光波長 510 nm で測定した。蛍光強度は CD 株のベタキサンチン由来の蛍光強度を 1 とした際の相対蛍光強度を示す。ペントースリン酸経路の酵素を過剰発現した株を青色、シキミ酸経路の酵素を過剰発現した株をオレンジ色、ペントースリン酸経路とシキミ酸経路の両方の酵素を過剰発現した株を緑色で示す。使用した酵母株の詳細は、表 2-2 にまとめている。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。統計的有意性は、Student の t 検定で判定した ($*p < 0.05$, $**p < 0.005$)。

2.2.3 ピキア酵母による芳香族化合物群の発酵生産

続いて、ベタキサンチン由来の蛍光強度を利用した評価系の有効性を検証することにした。具体的には、ターゲット化合物であるレスベラトロール、ナリングニン、フェノール、ノルコクラウリンの生合成に必要な酵素をピキア酵母に導入した株（それぞれ T4S 株、T4CC 株、TPL 株、CDN 株）と、ベタキサンチン高生産に有効な代謝改変である ARO4^{K229L}と ARO7^{G141S}を共発現させた株（47m 株）に、更に、各種芳香族化合物の生合成経路の酵素を導入した株（それぞれ 47m-T4S 株、47m-T4CC 株、47m-TPL 株、47m-CDN 株）を作成し、これらの菌株の培養試験を行い、芳香族化合物の生産量を測定した。その結果、47m 株に芳香族化合物生合成経路を導入した株全てで、芳香族化合物の生産量が大きく向上し、451 mg/L (9.10 mmol/mol-glycerol) のレスベラトロール、306 mg/L (5.18 mmol/mol-glycerol) のナリングニン、625 mg/L (30.6 mmol/mol-glycerol) のフェノール、10.6 mg/L (0.18 mmol/mol-glycerol) のノルコクラウリンを生産することに成功した（図 2-7）。これらの生産量は、これまでに報告された先行研究と比べても高い生産量（特に、真核生物を宿主にグリセロールを炭素源とした際の最大生産量）であり（表 S2-1）、ピキア酵母がグリセロールを炭素源に芳香族化合物群を高生産できることが明らかとなった。

これらの結果は、「ベタキサンチンの蛍光強度を利用した評価系は、チロシンへの代謝強弱を評価する上で有効な手法であること」「チロシンを高生産できる菌株（47m 株）、すなわちチロシンシャーシ株の作出は、様々な芳香族化合物群を高生産する上で有効な戦略であること」を示唆している。

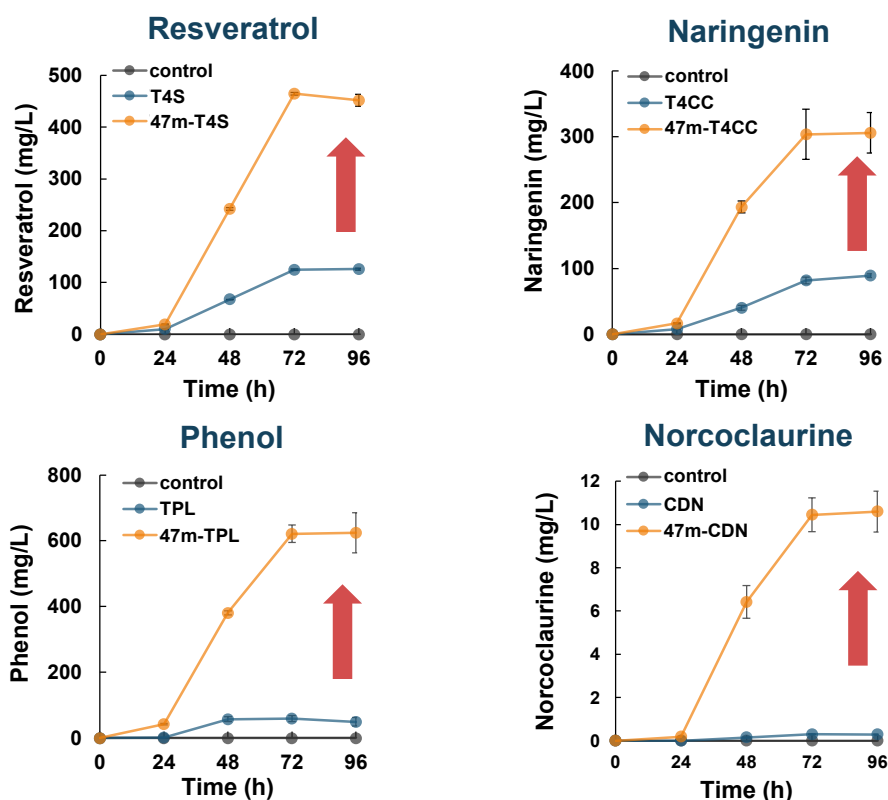


図 2-7 ピキア酵母による芳香族化合物群の発酵生産

20 mL の YPG 培地を含む 100 mL の三角フラスコを用いて、30℃、150 rpm の条件で培養試験を行った。芳香族化合物生合成経路の酵素を導入していない株（コントロール株）の培養結果を灰色、コントロール株に芳香族化合物の生合成経路の酵素を導入した株の培養結果を青色、47m 株（チロシンシャーシ株）に芳香族化合物の生合成経路の酵素を導入した株の培養結果をオレンジ色で示す。使用した酵母株の詳細は、表 2-2 にまとめている。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均値 ± 標準偏差で示した。

2.2.4 細胞内代謝物蓄積量の測定

次に、チロシン高生産に有効な代謝改変である ARO4^{K229L} と ARO7^{G141S} の過剰発現によるピキア酵母の代謝応答の変化を調べるため、レスベラトロール生産株である T4S 株、47m-T4S 株、ならびにそれらの親株（コントロール株）の細胞内代謝物を抽出し、レスベラトロール生産経路に関与する代謝物を定量した。その結果、ARO4^{K229L} と ARO7^{G141S} を過剰発現した 47m-T4S 株では、シキミ酸経路の代謝物である 3-デヒドロキナ酸 (DHQ)、3-デヒドロシキミ酸 (DHS)、シキミ酸、シキミ酸 3-リン酸 (S3P)、コリスミ酸が、有意に蓄積していた (図 2-8)。更には、芳香族アミノ酸であるチロシン、フェニルアラニン、トリプトファンも有意に蓄積していた (図 2-8)。これらの結果は、ARO4^{K229L} と ARO7^{G141S} の過剰発現が、シキミ産経路への代謝フラックスを増強することを裏付けている。

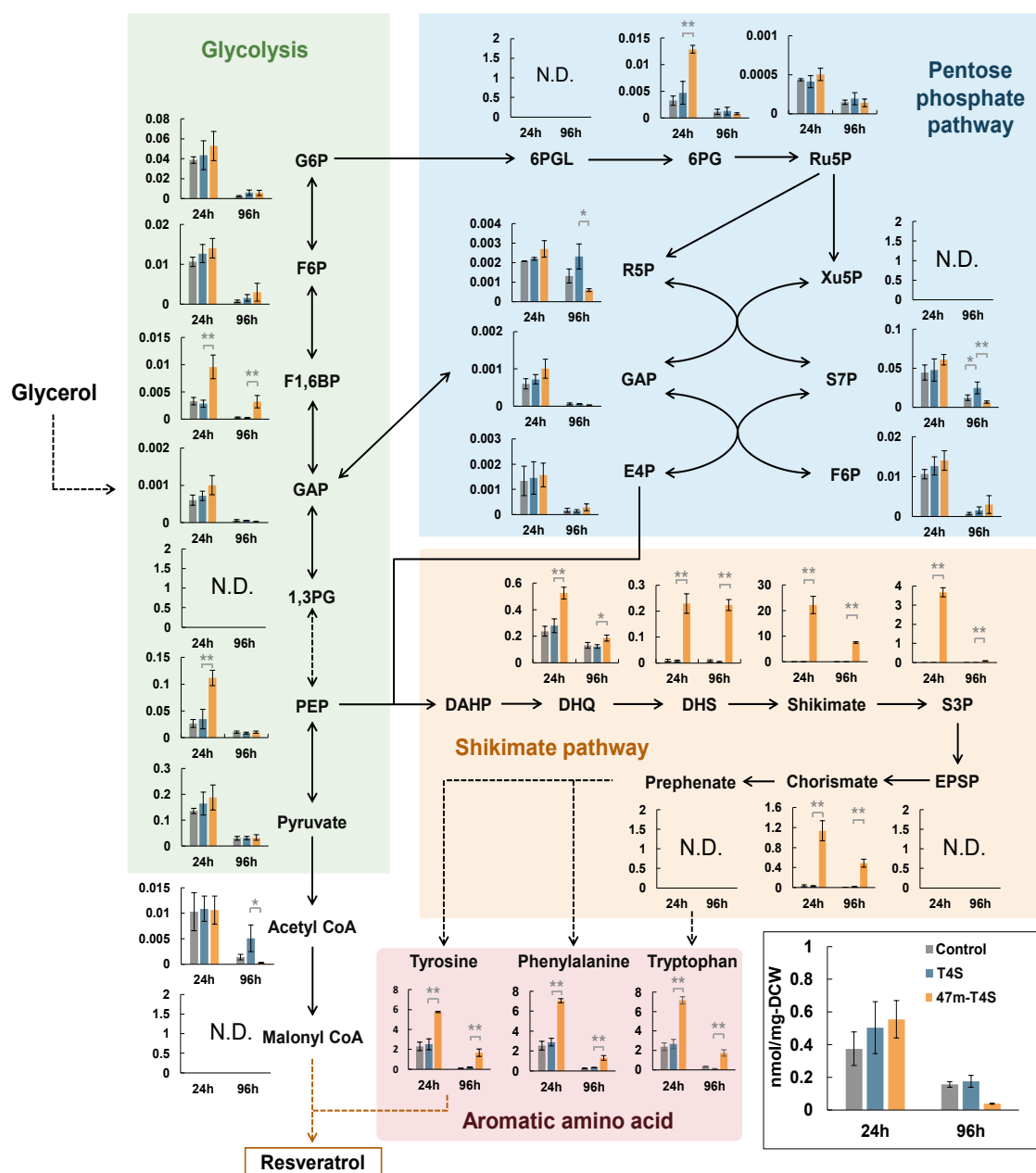


図 2-8 細胞内代謝物蓄積量の比較

レスベラトロール生産株である T4S 株、47m-T4S 株、ならびにそれらの親株（コントロール株）を 20 mL の YPG 培地を含む 100 mL の三角フラスコを用いて、30℃、150 rpm の条件で培養し、培養 24 時間後および培養 96 時間後に細胞内代謝物を抽出し、レスベラトロール生産経路に関わる代謝物を LC-MS/MS で定量した。y 軸の単位は n-mol/mg-dry cell weight (DCW) である。破線は複数の酵素反応を示す。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均値 ± 標準偏差で示した。統計的有意性は、Student の *t* 検定で判定した (**p* < 0.05, ***p* < 0.005)。G6P: glucose-6-phosphate; F6P: fructose-6-phosphate; F1,6BP: fructose-1,6-bisphosphate; GAP: glyceraldehyde-3-phosphate; 1,3PG: 1,3-bisphosphoglycerate; PEP: phosphoenolpyruvate; 6PGL: 6-phosphogluconolactone; 6PG: 6-phosphogluconate; Ru5P: ribulose-5-phosphate; R5P: ribose-5-phosphate; Xu5P: xylulose-5-

phosphate; S7P: sedoheptulose-7-phosphate; E4P: erythrose-4-phosphate; DAHP: 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate; DHQ: 3-dehydroquinate; DHS: 3-dehydroshikimate; S3P: shikimate 3-phosphate; EPSP: 5-O-(1-carboxyvinyl)-3-phosphoshikimate; N.D.: not detected.

2.2.5 流加培養

最後に、培養途中でグリセロール等の栄養素を添加する流加培養を検討した。その結果、グリセロールを炭素源に 1825 mg/L (6.70 mmol/mol-glycerol) のレスベラトロール、1067 mg/L (3.28 mmol/mol-glycerol) のナリングニン、1052 mg/L (27.1 mmol/mol-glycerol) のフェノール、9.7 mg/L (0.03 mmol/mol-glycerol) のノルコクラウリンを生産することに成功した (図 2-9)。しかしながら、これらの生産量は理論収率の 5%~10% に過ぎず、更なる生産量の増加には菌株の改良が不可欠である。例えば、図 2-8 に示したレスベラトロール生産株 (47m-T4S 株) の細胞内代謝物蓄積量の測定結果から、シキミ産経路の中間代謝物である「シキミ酸」は他の代謝物よりも多く蓄積していることがわかる。したがって、シキミ酸からシキミ酸 3-リン酸 (S3P) への反応を触媒する酵素の過剰発現は有効なアプローチの一つであろう。

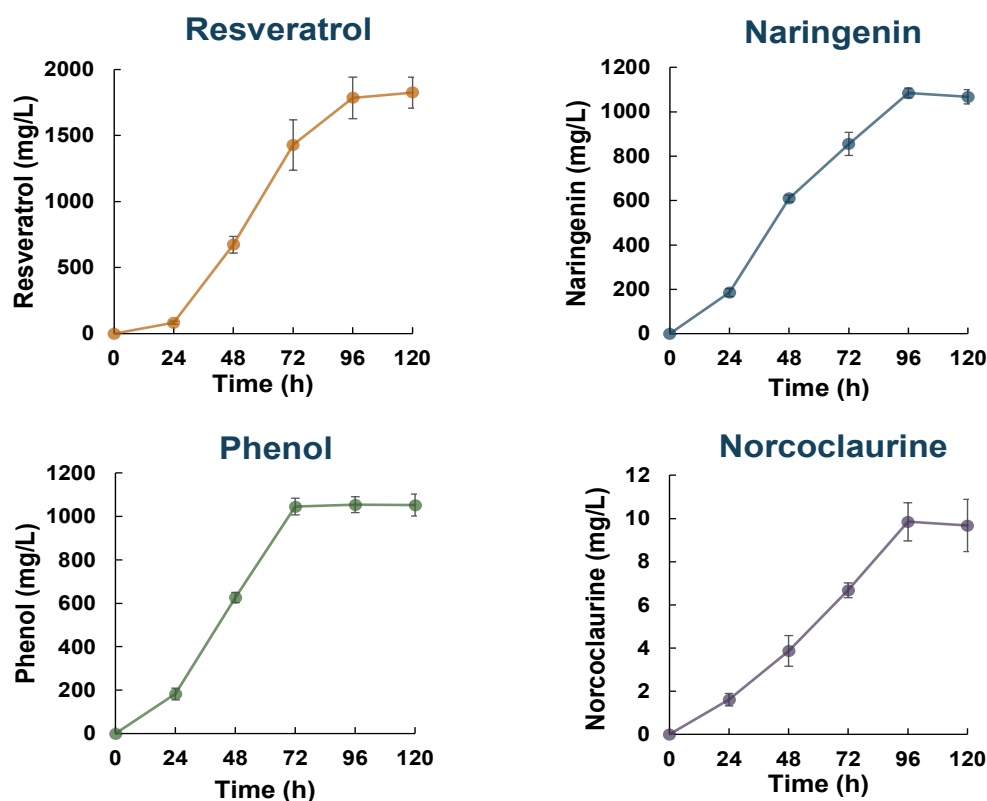


図 2-9 流加培養結果

100 mL の YPG 培地を含む 250 mL Jar fermentor を用いて、30℃、pH = 6.0 の条件で流加培養をおこなった。攪拌速度を 300 rpm~600 rpm の間で変化させ、培養液中の溶存酸素 (Dissolved oxygen; DO)

濃度を 20%に維持した。菌株は 47m-T4S (レスベラトロール生産)、47m-T4CC (ナリングニン生産)、47m-TPL (フェノール生産)、47m-CDN (ノルコクラウリン生産) を使用した。また、培養 30 時間から 96 時間の間、フィード液 (50 g/L Yeast extract、100 g/L Peptone、200 g/L Glycerol) を 625 μ L/h の流量で添加した。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

図 2-7 に示したフラスコでの回分培養と比較し、流加培養ではレスベラトロール、ナリングニン、フェノールの生産量が向上した。しかしながら、ノルコクラウリン生産量は回分培養と流加培養の間でほとんど差がなかった (図 2-7, 2-9)。ドーパミンからノルコクラウリンへの反応を触媒する酵素 norcoclaurine synthase (NCS) を酵母の細胞質で発現させると、*S. cerevisiae* では毒性を示すことが報告されている [36]。本研究でも、NCS はピキア酵母の細胞質で発現させており、NCS の発現をペルオキシソーム等の細胞小器官に局在化させることで、ノルコクラウリン生産量を向上できる可能性がある。

2.3 小括

本研究は、ピキア酵母を宿主に芳香族化合物群の発酵生産を試みた初の報告である。また、芳香族化合物群生産における共通前駆体「チロシン」への代謝の強弱を簡便に評価できる評価系を構築し、この評価系を用いることにより、チロシン高生産株、すなわちチロシンシャーシ株の作出に成功した。

チロシン生産量の簡便な評価系として、チロシンから 2 段階の酵素反応で生産できるベタキサンチンに着目した。ベタキサンチンは緑色の蛍光を発する黄色色素であるため、コロニーの色の違いや蛍光顕微鏡により、菌体のベタキサンチン生産量を簡便に定量できる。ベタキサンチンの蛍光強度を指標に、チロシンへの代謝の強弱を評価したところ、ピキア酵母では、変異型 ARO4 (ARO4^{K229L}) と変異型 ARO7 (ARO7^{G141S}) の過剰発現が、チロシンへの代謝フラックスの増強に有効であることが明らかとなった。

実際、ARO4^{K229L} と ARO7^{G141S} を過剰発現させた株 (チロシンシャーシ株) に、レスベラトロール、ナリングニン、フェノール、ノルコクラウリンの生合成経路を導入すると、それぞれの化合物の生産量が大幅に増加し、真核生物を宿主にグリセロールを炭素源とした際の最大生産量に達した。これらの結果から、「ベタキサンチンの蛍光強度を利用した評価系は、チロシンへの代謝の強弱を評価する有効な手法であること」「チロシンを高生産できる菌株、すなわちチロシンシャーシ株を作出することは、様々な芳香族化合物を高生産するための有効な戦略であること」「ピキア酵母はグリセロールを炭素源に芳香族化合物群を高生産できること」が示唆された。

本研究で得られた結果は、ピキア酵母を宿主に芳香族化合物群の発酵生産を行う上で重要な知見の一つとなるだろう。

2.4 実験手法

・使用菌体および培地組成

全てのプラスミドの増幅には、*Escherichia coli* NovaBlue (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いた。NovaBlue は LB+Amp 培地で培養し、培養は 37℃、200 rpm で行った。*Pichia pastoris* (ピキア酵母) は遺伝子の非相同組換え活性が高いという特徴がある。そこで本研究では、非相同組換え活性を低減させた *P. pastoris* CBS7435 Δ dnl4 Δ his4 株 [37] を親株 (コントロール株) として用いた。ピキア酵母の培養には、20 g/L のグルコースを含む YPD 培地、または、20 g/L のグリセロールを含む YPG 培地を用いて、必要に応じて抗生物質を加えた。培養は特記がない限り 30℃、150 rpm で行った。本研究で用いた培地組成の詳細は 2.5 参考資料に示す。

・プラスミドの構築

本研究で作製したプラスミドは全て、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio USA, Mountain View, CA) を用いて作製した。簡単に説明すると、制限酵素処理したベクターの末端 15 塩基の相同配列を、クローニングしたい塩基配列の両端に PCR で付加し、ベクターとクローニング配列、In-Fusion 酵素を混合し、50℃で 15 分間インキュベートした。本研究で使用した酵素のうち、*Beta vulgaris* 由来の tyrosine hydroxylase (CYP)、*Mirabilis jalapa* 由来の DOPA deoxygenase (DOD)、*Hypericum androsaemum* 由来の chalcone synthase (CHS)、*Hyperiza serrata* 由来の chalcone isomerase (CHI)、*Citrobacter freundii* 由来の tyrosine phenol-lyase (TPL)、*Pseudomonas putida* 由来の DOPA decarboxylase (DODC)、*Coptis japonica* 由来の norcoclaurine synthase (NCS) はピキア酵母のコドン使用頻度に最適化し、GeneArt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で人工合成した。また、*Herpetosiphon aurantiacus* 由来の tyrosine ammonia-lyase (TAL)、*Arabidopsis thaliana* 由来の 4-coumarate CoA ligase (4CL)、*Vitis vinifera* 由来の stilbene synthase (STS) は先行研究 [38] を参考に、*Scheffersomyces stipitis* のコドン使用頻度に酵素配列を最適化したものを使用した。本研究で使用した全てのプラスミドを表 2-1 に示す。また、本研究で使用した DNA プライマーの配列は表 S2-2 にまとめている。

表 2-1 本研究で使用したプラスミド

Plasmids	Description	Source
pPGP-EGFP	P_{gap} -EGFP- T_{aox1} , G418 marker	[37]
pPGP-CYP	P_{gap} -BvCYP ^{W13L, F309L} - T_{aox1} , G418 marker	[19]

pPGPH-DOD	P_{gap} -MjDOD- T_{aox1} , Hyg marker	[19]
pPGPZ-EGFP	P_{gap} -EGFP- T_{aox1} , Zeo marker	[16]
pPGP-CYP-DOD	P_{gap} -BvCYP ^{W13L, F309L} - T_{aox1} , P_{gap} -MjDOD- T_{aox1} , G418 marker	[16]
pPGPZ-TKL1	P_{gap} -TKL1- T_{aox1} , Zeo marker	[16]
pPGPZ-SOL3	P_{gap} -SOL3- T_{aox1} , Zeo marker	[16]
pPGPZ-ZWF1	P_{gap} -ZWF1- T_{aox1} , Zeo marker	[16]
pPGPZ-SOL3-ZWF1	P_{gap} -SOL3- T_{aox1} , P_{gap} -ZWF1- T_{aox1} , Zeo marker	[16]
pPGPH-ARO4 ^{K229L}	P_{gap} -ARO4 ^{K229L} - T_{aox1} , Hyg marker	[16]
pPGPZ-ARO7 ^{G141S}	P_{gap} -ARO7 ^{G141S} - T_{aox1} , Zeo marker	[16]
pPGPH-ARO4 ^{K229L} -ARO7 ^{G141S}	P_{gap} -ARO4 ^{K229L} - T_{aox1} , P_{gap} -ARO7 ^{G141S} - T_{aox1} , Hyg marker	[16]
pPGP-TAL	P_{gap} -HaTAL- T_{aox1} , G418 marker	[16]
pPGP-4CL	P_{gap} -At4CL- T_{aox1} , G418 marker	[16]
pPGPZ-STs	P_{gap} -VvSTs- T_{aox1} , Zeo marker	[16]
pPGP-TAL-4CL	P_{gap} -HaTAL- T_{aox1} , P_{gap} -At4CL- T_{aox1} , G418 marker	[16]
pPGP-TAL-STs	P_{gap} -HaTAL- T_{aox1} , P_{gap} -VvSTs- T_{aox1} , G418 marker	[16]
pPGP-TAL-4CL-STs	P_{gap} -HaTAL- T_{aox1} , P_{gap} -At4CL- T_{aox1} , P_{gap} -VvSTs- T_{aox1} , G418 marker	[16]
pPGPZ-CHS	P_{gap} -HaCHS- T_{aox1} , Zeo marker	[16]
pPGPZ-CHI	P_{gap} -MsCHI- T_{aox1} , Zeo marker	[16]
pPGPZ-CHS-CHI	P_{gap} -HaCHS- T_{aox1} , P_{gap} -MsCHI- T_{aox1} , Zeo marker	[16]
pPGPZ-TPL	P_{gap} -CfTPL- T_{aox1} , Zeo marker	[18]
pPGPZ-DODC	P_{gap} -PpDODC- T_{aox1} , Zeo marker	[16]
pPGP-CYP-DODC	P_{gap} -BvCYP ^{W13L, F309L} - T_{aox1} , P_{gap} -PpDODC- T_{aox1} , G418 marker	[16]
pPGPZ-NCS	P_{gap} - ΔN_{50} -CjNCS- T_{aox1} , Zeo marker	[16]

pPGPZ-EGFP の構築

Zeocin 耐性遺伝子マーカーを含むプラスミドは以下のように構築した。Zeocin 耐性遺伝子をコードするカセット、AOX1 プロモーター領域、EGFP 発現カセット (P_{gap} -EGFP- T_{aox1}) の DNA フラグメントを、pUC19_HpPgap_HpPgap_HpTmox_Zeo [39]、*P. pastoris*

CBS7435 ゲノム DNA、pPGP_EGFP からそれぞれ、プライマーInt-Zeo_pUC19_F/R、Int-Aox1p_pUC19_F/R、Int-EGFP_pUC19_F/R を用いて PCR で増幅した。得られた断片を pUC19 ベクターの *Eco*RI、*Hind*III/*Pst*I、*Bam*HI 部位にそれぞれクローニングした。

pPGP-CYP-DOD の構築

DOD 発現カセット (P_{gap} -DOD- T_{aox1}) の DNA フラグメントを、pPGPH-DOD [19]からプライマーInt-DOD_pPGP-CYP_F/R を用いて PCR で増幅した。得られた断片を *Bgl*II で制限酵素処理した pPGP-CYP ベクターにクローニングした。

pPGPZ-TKL1、pPGPZ-SOL3、ZWF1 の構築

Transketolase (TKL1)、6-gluconolactonase (SOL3)、glucose-6-phosphate dehydrogenase (ZWF1) は、*P. pastoris* CBS7435 ゲノム DNA からそれぞれ、プライマーInt-TKL1_pPGPZ_F/R、Int-SOL3_pPGPZ_F/R、Int-ZWF1_pPGPZ_F/R を用いて PCR で増幅した。得られた断片を *Spe*I/*Xho*I で制限酵素処理した pPGPZ-EGFP ベクターにそれぞれクローニングした。

pPGPZ-SOL3-ZWF1 の構築

ZWF1 発現カセット (P_{gap} -ZWF1- T_{aox1}) の DNA フラグメントを、pPGPZ-ZWF1 からプライマーInt-ZWF1_pPGPZ-SOL3_F/R を用いて PCR で増幅した。得られた断片を *Ssp*I で制限酵素処理した pPGPZ-SOL3 ベクターにクローニングした。

pPGPH-ARO4^{K229L} の構築

S. cerevisiae 由来 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (ARO4) のアミノ酸配列の 1~228 および 230~371 をコードする 2 つの DNA フラグメントを *S. cerevisiae* YPH499 ゲノム DNA からプライマーInt-ARO4^{K229L}_pPGPH_up_F/R および Int-ARO4^{K229L}_pPGPH_down_F/R を用いて PCR で増幅した。得られた 2 断片を Int-ARO4^{K229L}_pPGPH_up_F および Int-ARO4^{K229L}_pPGPH_down_R プライマーを用いたオーバーラップ PCR により結合させ、ARO4 に変異を導入した (ARO4^{K229L})。この ARO4^{K229L} 断片と、pPGPH-DOD [19]からプライマーInv-pPGPH_F/R を用いてインバース PCR で増幅したベクター断片をクローニングした。

pPGPZ-ARO7^{G141S} の構築

S. cerevisiae 由来 chorismate mutase (ARO7) のアミノ酸配列の 1~140 および 142~257 をコードする 2 つの DNA フラグメントを *S. cerevisiae* YPH499 ゲノム DNA から

プライマー-Int-ARO7^{G141S}_pPGPZ_up_F/R および Int-ARO7^{G141S}_pPGPZ_down_F/R を用いて PCR で増幅した。得られた 2 断片を Int-ARO7^{G141S}_pPGPZ_up_F および Int-ARO7^{G141S}_pPGPZ_down_R プライマーを用いたオーバーラップ PCR により結合させ、ARO7 に変異を導入した (ARO7^{G141S})。この ARO7^{G141S} 断片を *SpeI/XhoI* で制限酵素処理した pPGPZ-EGFP ベクターにクローニングした。

pPGPH-ARO4^{K229L}-ARO7^{G141S} の構築

ARO7^{G141S} 発現カセット (*P_{gap}-ARO7^{G141S}-T_{aox1}*) の DNA フラグメントを、pPGPZ-ARO7^{G141S} からプライマー-Int-ARO7^{G141S}_pPGPH-ARO4^{K229L}_F/R を用いて PCR で増幅した。得られた断片を *KasI* で制限酵素処理した pPGPH-ARO4^{K229L} ベクターにクローニングした。

pPGP-TAL、pPGP-4CL、pPGPZ-STS の構築

TAL、4CL、STS の断片は、pInA2-T4V [38]からそれぞれ、プライマー-Int-TAL_pPGP_F/R、Int-4CL_pPGP_F/R、Int-STS_pPGPZ_F/R を用いて PCR で増幅した。得られた断片を *SpeI/XhoI* で制限酵素処理した pPGP-EGFP、pPGP-EGFP、pPGPZ-EGFP ベクターにそれぞれクローニングした。

pPGP-TAL-4CL の構築

4CL 発現カセット (*P_{gap}-4CL-T_{aox1}*) の DNA フラグメントを、pPGP-4CL からプライマー-Int-4CL_pPGP-TAL_F/R を用いて PCR で増幅した。得られた断片を *BstAPI* で制限酵素処理した pPGP-TAL ベクターにクローニングした。

pPGP-TAL-STS の構築

STS 発現カセット (*P_{gap}-STS-T_{aox1}*) の DNA フラグメントを、pPGPZ-STS からプライマー-Int-STS_pPGP-TAL_F/R を用いて PCR で増幅した。得られた断片を *AatII* で制限酵素処理した pPGP-TAL ベクターにクローニングした。

pPGP-TAL-4CL-STS の構築

4CL 発現カセット (*P_{gap}-4CL-T_{aox1}*) の DNA フラグメントを、pPGP-4CL からプライマー-Int-4CL_pPGP-TAL-VST_F/R を用いて PCR で増幅した。得られた断片を *BstAPI* で制限酵素処理した pPGP-TAL-STS ベクターにクローニングした。

pPGPZ-CHS、pPGPZ-CHI、pPGPZ-TPL、pPGPZ-DODC、pPGPZ-NCS の構築

人工合成した CHS、CHI、TPL、DODC、NCS の断片は、それぞれプライマー Int-CHS_pPGPZ_F/R、Int-CHI_pPGPZ_F/R、Int-TPL_pPGPZ_F/R、Int-DODC_pPGPZ_F/R、Int-NCS_pPGPZ_F/R を用いて PCR で増幅した。得られた断片を *SpeI/XhoI* で制限酵素処理した pPGPZ-EGFP ベクターにそれぞれクローニングした。

pPGPZ-CHS-CHI の構築

CHI 発現カセット (P_{gap} -CHI- T_{aox1}) の DNA フラグメントを、pPGPZ-CHI からプライマー Int-CHI_pPGPZ-CHS_F/R を用いて PCR で増幅した。得られた断片を *AatII* で制限酵素処理した pPGPZ-CHS ベクターにクローニングした。

pPGP-CYP-DODC の構築

DODC 発現カセット (P_{gap} -DODC- T_{aox1}) の DNA フラグメントを、pPGPZ-DODC からプライマー Int-DODC_pPGP-CYP_F/R を用いて PCR で増幅した。得られた断片を *AatII* で制限酵素処理した pPGP-CYP ベクターにクローニングした。

・組換えピキア酵母株の作出

本研究で作成した全てのピキア酵母株を表 2-2 に示す。ピキア酵母の形質転換は、先行文献 [40]で報告されている酢酸リチウムを用いた One-step transformation 法に修正を加えて行なった。具体的には、抗生物質を含む 5 mL の YPD 培地で菌体を一晚培養し、 $OD_{600} = 10 \times 1$ mL 分を集菌した後、12000 rpm で 1 分間遠心した。次に、500 μ L の滅菌水で 2 回、菌体を洗浄した。上清を取り除き、形質転換に用いる DNA を 10 μ L (500-1000 ng) 加え、続いて Carrier DNA 10 μ L、2 M 酢酸リチウム 8 μ L、60% (w/v) PEG3350 100 μ L、1 M DTT 8 μ L を順番に加えて混合した。42℃で 30 分間インキュベートし、12000 rpm で 1 分間遠心後、上清を取り除き、500 μ L の YPD 培地に再懸濁して 30℃、200 rpm で 2 時間回復培養を行った。2 時間後、抗生物質を含む YPD プレートに 150 μ L ずつ播種した。

表 2-2 本研究で使用したピキア酵母株

Strains	Description	Source
CBS7435 $\Delta dnl4$	$\Delta dnl4 \Delta his4 :: ADE1$	[37]
$\Delta his4$ (Control)		
CD	CBS7435 $\Delta dnl4 \Delta his4$ / pPGP-CYP-DOD [G418 marker]	[16]
CD-TKL1	CD / pPGPZ-TKL1 [G418, Zeo marker]	[16]
CD-SOL3	CD / pPGPZ-SOL3 [G418, Zeo marker]	[16]

CD-ZWF1	CD / pPGPZ-ZWF1 [<i>G418</i> , <i>Zeo</i> marker]	[16]
CD-SOL3-ZWF1	CD / pPGPZ-SOL3-ZWF1 [<i>G418</i> , <i>Zeo</i> marker]	[16]
CD-ARO4m	CD / pPGPH-ARO4 ^{K229L} [<i>G418</i> , <i>Hyg</i> marker]	[16]
CD-ARO7m	CD / pPGPZ-ARO7 ^{G141S} [<i>G418</i> , <i>Zeo</i> marker]	[16]
CD47m	CD / pPGPH-ARO4 ^{K229L} -ARO7 ^{G141S} [<i>G418</i> , <i>Hyg</i> marker]	[16]
CD47m-TKL1	CD47m / pPGPZ-TKL1 [<i>G418</i> , <i>Hyg</i> , <i>Zeo</i> marker]	[16]
CD47m-SOL3	CD47m / pPGPZ-SOL3 [<i>G418</i> , <i>Hyg</i> , <i>Zeo</i> marker]	[16]
CD47m-ZWF1	CD47m / pPGPZ-ZWF1 [<i>G418</i> , <i>Hyg</i> , <i>Zeo</i> marker]	[16]
CD47m-SOL3-ZWF1	CD47m / pPGPZ-SOL3-ZWF1 [<i>G418</i> , <i>Hyg</i> , <i>Zeo</i> marker]	[16]
47m	CBS7435 $\Delta dnl4 \Delta his4$ / pPGPH-ARO4 ^{K229L} -ARO7 ^{G141S} [<i>Hyg</i> marker]	[17]
T4S	CBS7435 $\Delta dnl4 \Delta his4$ / pPGP-TAL-4CL-STS [<i>G418</i> marker]	[16]
47m-T4S	47m / pPGP-TAL-4CL-STS [<i>G418</i> , <i>Hyg</i> marker]	[16]
T4CC	CBS7435 $\Delta dnl4 \Delta his4$ / pPGP-TAL-4CL, pPGPZ-CHS-CHI [<i>G418</i> , <i>Zeo</i> marker]	[16]
47m-T4CC	47m / pPGP-TAL-4CL, pPGPZ-CHS-CHI [<i>G418</i> , <i>Hyg</i> , <i>Zeo</i> marker]	[16]
TPL	CBS7435 $\Delta dnl4 \Delta his4$ / pPGPZ-TPL [<i>Zeo</i> marker]	[18]
47m-TPL	47m / pPGPZ-TPL [<i>Hyg</i> , <i>Zeo</i> marker]	[18]
CDN	CBS7435 $\Delta dnl4 \Delta his4$ / pPGP-CYP-DODC, pPGPZ-NCS [<i>G418</i> , <i>Zeo</i> marker]	[16]
47m-CDN	47m / pPGP-CYP-DODC, pPGPZ-NCS [<i>G418</i> , <i>Hyg</i> , <i>Zeo</i> marker]	[16]

ベタキサンチン生産株の構築

EcoRV で制限酵素処理した pPGP-CYP-DOD プラスミドを、*P. pastoris* CBS7435 $\Delta dnl4 \Delta his4$ 株の CCA38743 遺伝子部位 (Chromosome II 1,466,549-1,467,148) へ導入し、CD 株を得た。次に、*NsiI* で制限酵素処理した pPGPZ-TKL1、pPGPZ-SOL3、pPGPZ-ZWF1、pPGPZ-SOL3-ZWF1、pPGPZ-ARO7^{G141S} プラスミドを CD 株の AOX1 プロモーター部位 (Chromosome IV 238,032-238,957) へそれぞれ導入し、CD-TKL1 株、CD-SOL3 株、CD-ZWF1 株、CD-SOL3-ZWF1 株、CD-ARO7m 株を得た。また、pPGPH-ARO4^{K229L} および pPGPH-ARO4^{K229L}-ARO7^{G141S} プラスミドを *BsrGI* で制限酵素処理した

後、CD 株の *Arg4* 遺伝子部位 (Chromosome I 1,279,382-1,281,027) へ導入し、ARO4m 株および CD47m 株を得た。最後に、*Nsi*I で制限酵素処理した pPGPZ-TKL1、pPGPZ-SOL3、pPGPZ-ZWF1、pPGPZ-SOL3-ZWF1 プラスミドを CD47m 株の *AOX1* プロモーター部位へそれぞれ導入し、CD47m-TKL1、CD47m-SOL3、CD47m-ZWF1 および CD47m-SOL3-ZWF1 株を得た。

チロシン高生産株（チロシンシャーシ株）の構築

*Bsr*GI で制限酵素処理した pPGPH-ARO4^{K229L}-ARO7^{G141S} プラスミドを、*P. pastoris* CBS7435 Δ *dnl4* Δ *his4* 株の *Arg4* 遺伝子部位へ導入し、47m 株（チロシンシャーシ株）を得た。

レスバトロール生産株の構築

*Eco*RV で制限酵素処理した pPGP-TAL-4CL-VST プラスミドを、*P. pastoris* CBS7435 Δ *dnl4* Δ *his4* 株および 47m 株の CCA38743 遺伝子部位へそれぞれ導入し、T4S 株および 47m-T4S 株を得た。

ナリングニン生産株の構築

*Eco*RV で制限酵素処理した pPGP-TAL-4CL プラスミドと *Nsi*I で制限酵素処理した pPGPZ-CHS-CHI プラスミドを、それぞれ *P. pastoris* CBS7435 Δ *dnl4* Δ *his4* 株および 47m 株の CCA38743 遺伝子部位と *AOX1* プロモーター部位へ導入し、T4CC 株および 47m-T4CC 株を得た。

フェノール生産株の構築

*Nsi*I で制限酵素処理した pPGPZ-TPL プラスミドを、*P. pastoris* CBS7435 Δ *dnl4* Δ *his4* 株および 47m 株の *AOX1* プロモーター部位へ導入し、TPL 株および 47m-TPL 株を得た。

ノルコクラウリン生産株の構築

*Eco*RV で制限酵素処理した pPGP-CYP-DODC プラスミドと *Nsi*I で制限酵素処理した pPGPZ-NCS プラスミドを、それぞれ *P. pastoris* CBS7435 Δ *dnl4* Δ *his4* 株および 47m 株の CCA38743 遺伝子部位と *AOX1* プロモーター部位へ導入し、CDN 株および 47m-CDN 株を得た。

・フラスコでの培養試験（回分培養）

培養試験に用いる菌体を、必要に応じて抗生物質を添加した YPG 培地 5 mL を含む試験

管に播種し、30℃、150 rpm の条件で 24 時間前培養した。前培養後の菌体を滅菌水で 2 回洗浄した後、20 mL の YPG 培地を含む 100 mL のバツフルなし三角フラスコに、初期 $OD_{600} = 0.05$ となるように植菌し、30℃、150 rpm の条件で培養試験を行った。サンプリングは 24 時間ごとに行った。

・ベタキサンチン由来の緑色蛍光測定

前述のフラスコでの培養試験と同様に、菌体を YPG 培地で 24 時間培養した後、培養液 1 mL をサンプリングし、14000 rpm で 2 分間遠心した。培養上清 250 μ L を 96 ウェル黒色プレート (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) に移し、プレートリーダー (EnVision 2104 Multilabel Reader, PerkinElmer) を用いて励起波長 485 nm、蛍光波長 510 nm で、培養上清に含まれるベタキサンチン由来の緑色蛍光強度を測定した。

・Jar fermentor での流加培養

培養試験に用いる菌体を、必要に応じて抗生物質を添加した YPG 培地 20 mL を含む三角フラスコに播種し、30℃、150 rpm の条件で 48 時間前培養した。前培養後の菌体を滅菌水で 2 回洗浄した後、100 mL の YPG 培地を含む 50 mL の Jar fermentor (Bio Jr. 8; ABLE Biott, Tokyo, Japan) に初期 $OD_{600} = 5$ となるように植菌した。培養は 30℃で行い、通気量は 100 mL/min に維持した。培養液の pH は、5 N アンモニウム水溶液を自動添加することで 6.0 に維持し、必要に応じて消泡剤 (antifoam SI; FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を添加した。攪拌速度を 300 rpm~600 rpm の間で変化させ、培養液中の溶存酸素 (DO) 濃度を 20% に維持した。フィード液 (50 g/L yeast extract、100 g/L peptone、200 g/L glycerol) は、培養開始 30 時間~96 時間の間、625 μ L/h の流量で Jar fermentor に添加した。

・代謝物の分析

培養上清中のグリセロール濃度の定量には、Aminex HPX-87H カラム ($7.8 \times 300 \text{ mm}^2$, 9 μ m particle size; Bio-Rad, Hercules, CA) と RID-10A 検出器を装備した高速液体クロマトグラフィー (HPLC; high-performance liquid chromatography) を使用した。カラムオーブンは 65℃に維持し、移動相には 5 mM H_2SO_4 を使用し、0.6 mL/min の流速で稼働した。

培養液中のレスベラトロール、ナリンゲニン濃度を測定するため、サンプリングした培養液を等量の 99.5%エタノールと混合し、10 秒間ボルテックスした後、4℃、13000 rpm の条件で 5 分間遠心分離した。得られた培養上清を Luna Omega PSC18 カラム ($4.6 \times 150 \text{ mm}^2$, 3 μ m particle size; Phenomenex, CA) と SPD-20A UV/VIS 検出器を装備した

HPLC で分析した。レスベラトロール、ナリングニン は 280 nm の吸光度で検出した。カラムオーブンは 40℃ に維持し、移動相には 0.1% (v/v) ギ酸水溶液とアセトニトリルを使用し、1.0 mL/min の流速で稼働した。測定方法の詳細は、先行研究 [38] を参照されたい。

培養上清中のフェノール濃度の定量には、COSMOSIL 5C18-AR-II カラム (4.6 × 250 mm², 5 μm particle size; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) と SPD-20A UV/VIS 検出器を装備した HPLC を使用した。フェノールは 275 nm の吸光度で検出した。カラムオーブンは 30℃ に維持し、移動相には 0.1% (v/v) ギ酸水溶液とアセトニトリル (30:70; v/v) を使用し、1.0 mL/min の流速で稼働した。

培養上清中のノルコクラウリン濃度の定量には、Discovery HS F5-3 カラム (2.1 × 150 mm², 3 μm, Sigma-Aldrich, MO) を装着した LCMS-8060 トリプル四重極質量分析計 (Shimadzu, Kyoto, Japan) を使用した。全てのサンプルには内部標準物質として、終濃度 1 μM となるように (+)-10-カンファースルホン酸を加えた。測定方法の詳細は、先行研究 [41] を参照されたい。

細胞内代謝産物の抽出は既報の方法 [42] に従った。アミノ酸およびシキミ酸経路の代謝物は、前述のノルコクラウリン濃度の定量と同様の手法で LCMS-8060 トリプル四重極質量分析計を使用して分析した。解糖系およびペントースリン酸経路の代謝物は、Mastro C18 カラム (2.1 × 150 mm², 3 μm, Shimadzu) を装備した 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, CA) を用いて、既報の方法 [41, 43] に従って分析した。

・統計検定

数値は全て平均値 ± 標準偏差で示した。系統間の有意差を評価するために、Tukey の範囲検定と組み合わせた一元配置分散分析を統計検定として用いた。統計解析は、生物統計学で頻繁に使用される統計関数を追加するために設計された R コマンダーの修正版である EZR [44] を用いて行った (2 標本の不等分散 ; 両側検定、**p* < 0.05, ***p* < 0.005)。

2.5 参考資料および引用文献

表 S2-1 微生物を宿主とした芳香族化合物生産報告 (先行研究との比較)

Product	Host	Substrate	Titer/yield/cultivation	Reference
Resveratrol	<i>E. coli</i>	Glucose	Titer: 305 mg/L Yield: 0.79 mmol/mol-glucose (Batch culture)	[45]
Resveratrol	<i>E. coli</i>	Glycerol	Titer: 80 mg/L Yield: 0.40 mmol/mol-glycerol (Batch culture)	[46]

Resveratrol	<i>C. glutamicum</i>	Glucose	Titer: 30 mg/L Yield: 0.32 mmol/mol-glucose (Batch culture)	[47]
Resveratrol	<i>S. cerevisiae</i>	Glucose	Titer: 273 mg/L Yield: 10.7 mmol/mol-glucose (Batch culture)	[48]
		Glucose	Titer: 812 mg/L Yield: 7.02 mmol/mol-glucose (Fed-batch culture)	
Resveratrol	<i>Y. lipolytica</i>	Glucose	Titer: 525 mg/L Yield: 15.8 mmol/mol-glucose (Batch culture)	[49]
		Glucose	Titer: 12.4 g/L Yield: 42.9 mmol/mol-glucose (Fed-batch culture)	
Resveratrol	<i>Y. lipolytica</i>	Glycerol	Titer: 430 mg/L Yield: 1.87 mmol/mol-glycerol (Batch culture)	[50]
Resveratrol	<i>S. stipitis</i>	Glucose	Titer: 238 mg/L Yield: 4.25 mmol/mol-glucose (Batch culture)	[38]
		Sucrose	Titer: 669 mg/L Yield: 20.1 mmol/mol-sucrose (Batch culture)	
Resveratrol	<i>P. pastoris</i>	Glycerol	Titer: 451 mg/L Yield: 9.10 mmol/mol-glycerol (Batch culture)	This study [16]
		Glycerol	Titer: 1825 mg/L Yield: 6.70 mmol/mol-glycerol (Fed-Batch culture)	

Naringenin	<i>E. coli</i>	Glucose	Titer: 588 mg/L Yield: 14.4 mmol/mol-glucose (Fed-batch culture)	[26]
Naringenin	<i>S. cerevisiae</i>	Glucose	Titer: 113 mg/L Yield: 3.74 mmol/mol-glucose (Batch culture)	[51]
Naringenin	<i>Y. lipolytica</i>	Glucose	Titer: 124 mg/L Yield: 6.2 mmol/mol-glucose (Batch culture)	[52]
		Glucose	Titer: 898 mg/L Yield: 2.45 mmol/mol-glucose (Fed-batch culture)	
Naringenin	<i>P. pastoris</i>	Glycerol	Titer: 306 mg/L Yield: 5.18 mmol/mol-glycerol (Batch culture)	This study [16]
		Glycerol	Titer: 1067 mg/L Yield: 3.28 mmol/mol-glycerol (Fed-Batch culture)	
Phenol	<i>P. putida</i>	Glucose	Titer: 141 mg/L Yield: 54.0 mmol/mol-glucose (Batch culture)	[53]
Phenol	<i>P. taiwanensis</i>	Glucose	Titer: 294 mg/L Yield: 156 mmol/mol-glucose (Batch culture)	[54]
		Glycerol	Titer: 341 mg/L Yield: 90.5 mmol/mol-glycerol (Batch culture)	
Phenol	<i>E. coli</i>	Glucose	Titer: 250 mg/L Yield: 23.9 mmol/mol-glucose (Batch culture)	[55]

Phenol	<i>E. coli</i>	Glucose	Titer: 376 mg/L Yield: 36.0 mmol/mol-glucose (Batch culture)	[56]
Phenol	<i>P. pastoris</i>	Glycerol	Titer: 625 mg/L Yield: 30.6 mmol/mol-glycerol (Batch culture)	This study [18]
		Glycerol	Titer: 1052 mg/L Yield: 27.1 mmol/mol-glycerol (Fed-Batch culture)	
Norocclaurine	<i>S. cerevisiae</i>	Sucrose	Titer: about 250 mg/L (Batch culture)	[25]
Norocclaurine	<i>P. pastoris</i>	Glycerol	Titer: 10.6 mg/L Yield: 0.18 mmol/mol-glycerol (Batch culture)	This study [16]
		Glycerol	Titer: 9.7 mg/L Yield: 0.03 mmol/mol-glycerol (Fed-Batch culture)	

表 S2-2 本研究で使したプライマー

Primers	Description
Int-Zeo_pUC19_F	tccccgggtaccgagctcgaattcgatccccacacaccatag
Int-Zeo_pUC19_R	tgtaaacgacggccagtgaattctcagtcctgctcctcgccac
Int-Aox1p_pUC19_F	ctagagtcgacctgcagatctaacaaccaaagacgaaaggt
Int-Aox1p_pUC19_R	catgattacgccaagcttttagttgtttttgatcttctcaagttg
Int-EGFP_pUC19_F	tctgcaggctgactctagaggatcctttttgtagaaatg
Int-EGFP_pUC19_R	agctcggtagccgggatctaagcttgacaaacgaac
Int-DOD_pPGP-CYP_F	tgtgcaagcttagatcgaattcgagctcggtagccggggatc
Int-DOD_pPGP-CYP_R	tgtctctagaagatctttttgtagaaatgtcttggtgtcc
Int-TKL1_pPGPZ_F	tcaaaacacaactagatgtctgatctcttagctatcaac
Int-TKL1_pPGPZ_R	atgtctaaggctcgactacgcatgaacagactcaaaagc
Int-SOL3_pPGPZ_F	tcaaaacacaactagtaggtacaaatctattctatg

Int-SOL3_pPGPZ_R	atgtctaaggctcgagtcagtatattcgaagtagaaac
Int-ZWF1_pPGPZ_F	tcaaaacacaactagtatgaccgatacgaaagccg
Int-ZWF1_pPGPZ_R	atgtctaaggctcgagttacatcttgtgcagcacatcg
Int-ZWF1_pPGPZ-SOL3_F	aaatgcttcaataatattaagcttgacaaacgaacttc
Int-ZWF1_pPGPZ-SOL3_R	tcttccttttcaatatttttttagaaatgtcttg
Int-ARO4 ^{K229L} _pPGPH_up_F	tcaaaacacaactagatgagtgaaatctccaatgttcgctg
Int-ARO4 ^{K229L} _pPGPH_up_R	agcaacacatgcaaagtaacacccatgaaatggtgag
Int-ARO4 ^{K229L} _pPGPH_down_F	ttgcatgggtgtgctgctatcaccac
Int-ARO4 ^{K229L} _pPGPH_down_R	atgtctaaggctcgactatttctgttaacttctcttc
Inv-pPGPH_F	ttggagattcactcatctagttgtgtttgatagttgttc
Inv-pPGPH_R	agttaacaagaaatagtcgagccttagacatgactgttcc
Int-ARO7 ^{G141S} _pPGPZ_up_F	tcaaaacacaactagatggatttcacaaaaccagaaactg
Int-ARO7 ^{G141S} _pPGPZ_up_R	agtggcaacagaagagaagttattcttatcatcaccatc
Int-ARO7 ^{G141S} _pPGPZ_down_F	tcttctgttgccactagagatatagaatg
Int-ARO7 ^{G141S} _pPGPZ_down_R	atgtctaaggctcgattactctccaaccttcttagcaag
Int-ARO7 ^{G141S} _pPGPH-ARO4 ^{K229L} _F	aatggcgaatggcgcgatctaagcttgacaaacgaac
Int-ARO7 ^{G141S} _pPGPH-ARO4 ^{K229L} _R	taccgcatcaggcgcttttttagaaatgtcttggtgtcc
Int-TAL_pPGP_F	atcaaaacacaactagatgtccaccaccttgatcttg
Int-TAL_pPGP_R	tcatgtctaaggctcgactatctgaacaagatgatgg
Int-4CL_pPGP_F	atcaaaacacaactagatgactactcaggacgtcatcg
Int-4CL_pPGP_R	tcatgtctaaggctcgactagttcatcaagccgttg
Int-STs_pPGPZ_F	atcaaaacacaactagatggcctctgtcgaagaattcag
Int-STs_pPGPZ_R	tcatgtctaaggctcgactagttggtgacagttgggac
Int-4CL_pPGP-TAL_F	tcacaccgcatatggtgcaagcttgacaaacgaacttctcac
Int-4CL_pPGP-TAL_R	tgagagtgcaccatagcttttttagaaatgtcttg
Int-STs_pPGP-TAL_F	ataatggtttcttagacgtcaagcttgacaaacgaacttc
Int-STs_pPGP-TAL_R	aaaagtgccacctgacgtcttttttagaaatgtcttggtg
Int-4CL_pPGP-TAL-VST_F	tttcacaccgcatatggtgcttttttagaaatgtcttg
Int-4CL_pPGP-TAL-VST_R	tactgagagtgcaccatagcaagcttgacaaacgaac
Int-CHS_pPGPZ_F	atcaaaacacaactagatggtcaccgtcgaagaggttag
Int-CHS_pPGPZ_R	tcatgtctaaggctcgattagttgatggcaacggagtg

Int-CHI_pPGPZ_F	atcaaaacacaactagatggctgcttccatcactgc
Int-CHI_pPGPZ_R	tcatgtctaaggctcgattagttaccgatcttgaaagc
Int-TPL_pPGPZ_F	atcaaaacacaactagatgaactaccccgccgagc
Int-TPL_pPGPZ_R	tcatgtctaaggctcgattagatgtagtcgaatctgg
Int-DODC_pPGPZ_F	tcaaaacacaactagtagtactccagagcagttcagac
Int-DODC_pPGPZ_R	atgtctaaggctcgagttaacccttgatgacgtcctgc
Int-NCS_pPGPZ_F	atcaaaacacaactagatggaagagactgtcatgtgtacc
Int-NCS_pPGPZ_R	tcatgtctaaggctcgattactcgaggacttgtgtctg
Int-CHI_pPGPZ-CHS_F	tttcacaccgcatatgggatctaagcttgcaaaacgaac
Int-CHI_pPGPZ-CHS_R	tgagagtgcacatatgtttttgtagaaatgtcttg
Int-DODC_pPGP-CYP_F	atttcacaccgcatggatctaagcttgcaaaacgaac
Int-DODC_pPGP-CYP_R	tgtactgagagtgcactttttgtagaaatgtcttggtgtcc

培地組成

<YPD 培地>

10 g/L	Yeast extract
20 g/L	Bacto peptone
20 g/L	D-Glucose

<YPG 培地>

10 g/L	Yeast extract
20 g/L	Bacto peptone
20 g/L	Glycerol

プレート作成用には Agar Powder を 2.0% (w/v) 加えた。また、株の薬剤耐性に合わせて、G418 を 0.5% (w/v)、Hygromycin B を 0.3% (w/v)、Zeocin を 0.1% (w/v) の濃度で加えた。

<LB 培地>

5 g/L	Yeast extract
10 g/L	Bacto peptone
10 g/L	NaCl

プレート作成用には Agar Powder を 2.0% (w/v) 加えた。また、Ampicillin を 0.01% (w/v) の濃度で加えた。

参考文献

- [21] Newman, D. J. *et al.*, Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 2016, **79**, 629–661
- [22] Kim, G. B. *et al.*, Metabolic engineering for sustainability and health. *Trends Biotechnol.* 2023, **41**, 425–451
- [23] Pyne, M. E. *et al.*, Engineering plant secondary metabolism in microbial systems. *Plant Physiol.* 2019, **179**, 844–861
- [24] Facchini, P. J. *et al.*, Synthetic biosystems for the production of high-value plant metabolites. *Trends Biotechnol.* 2012, **30**, 127–131
- [25] Pyne, M. E. *et al.*, A yeast platform for high-level synthesis of tetrahydro-isoquinoline alkaloids. *Nat. Commun.* 2020, **11**, 1–10
- [26] Zhou, S. *et al.*, A fermentation and metabolic pathway optimization to *de novo* synthesize (2S)-naringenin in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2020, **30**, 1574–1582
- [27] Krivoruchko, A. *et al.*, Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015, **35**, 7–15
- [28] Patra, P. *et al.*, A recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts. *Biotechnol. Adv.* 2021, **47**, 107695
- [29] Heisteringer, L. *et al.*, Microbe Profile: *Komagataella phaffii*: a methanol devouring biotech yeast formerly known as *Pichia pastoris*. *Microbiology.* 2020, **166**, 614–616
- [30] Yang, Z. *et al.*, Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol. Adv.* 2018, **36**, 182–195
- [31] Peña, D. A. *et al.*, Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015, **35**, 7–15

- [32] Zhou, X. *et al.*, Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metab. Eng.* 2018, **50**, 2–15
- [33] Trenchard, I. J. *et al.*, *De novo* production of the key branch point benzylisoquinoline alkaloid reticuline in yeast. *Metab. Eng.* 2015, **31**, 74–83
- [34] Nocon, J. *et al.*, Increasing pentose phosphate pathway flux enhances recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, **100**, 5955–5963
- [35] Suástegui, M. *et al.*, Yeast factories for the production of aromatic compounds: from building blocks to plant secondary metabolites. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2016, **43**, 1611–1624
- [36] Grewal, P. S. *et al.*, Peroxisome compartmentalization of a toxic enzyme improves alkaloid production. *Nat. Chem. Biol.* 2021, **17**, 96–103
- [37] Ito, Y. *et al.*, Deletion of DNA ligase IV homolog confers higher gene targeting efficiency on homologous recombination in *Komagataella phaffii*. *FEMS Yeast Res.* 2018, **18**, foy074
- [38] Kobayashi, Y. *et al.*, Resveratrol production from several types of saccharide sources by a recombinant *Scheffersomyces stipitis* strain. *Metab. Eng. Commun.* 2021, **13**, e00188
- [39] Nakamura, Y. *et al.*, A stable, autonomously replicating plasmid vector containing *Pichia pastoris* centromeric DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018, **84**, 15
- [40] Chen, D. *et al.*, Short communications One-step transformation of yeast in stationary phase. 1992, 83–84
- [41] Vavricka, C. J. *et al.*, Mechanism-based tuning of insect 3,4-dihydroxyphenyl-acetaldehyde synthase for synthetic bioproduction of benzylisoquinoline alkaloids. *Nat. Commun.* 2019, **10**, 2015
- [42] Kato, H. *et al.*, Widely targeted metabolic profiling analysis of yeast central metabolites. *J. Biosci. Bioeng.* 2012, **113**, 665–673
- [43] Hsu, H. H. *et al.*, A systematic approach to time-series metabolite profiling and RNA-seq analysis of chinese hamster ovary cell culture. *Sci. Rep.* 2017, **7**, 43518

- [44] Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 2013, **48**, 452–458
- [45] Wu, J. *et al.*, Efficient *de novo* synthesis of resveratrol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 44 (7)
- [46] Park, J. Y. *et al.*, Biosynthesis of resveratrol using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Biol. Chem.* 2021, 64 (1)
- [47] Braga, A. *et al.*, Impact of the cultivation strategy on resveratrol production from glucose in engineered *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 2018, **265**, 70–75
- [48] Li, M. *et al.*, Engineering yeast for high-Level production of stilbenoid antioxidants. *Sci. Rep.* 2016, **6**, 1–8
- [49] Sáez-Sáez, J. *et al.*, Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for high-level resveratrol production. *Metab. Eng.* 2020, **62**, 51–61
- [50] He, Q. *et al.*, *De novo* production of resveratrol from glycerol by engineering different metabolic pathways in *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng. Commun.* 2020, **11**, 0–5
- [51] Koopman, F. *et al.*, *De novo* production of the flavonoid naringenin in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 2012, **11**, 1–15
- [52] Palmer, C. M. *et al.*, Engineering 4-coumaroyl-coA derived polyketide production in *Yarrowia lipolytica* through a β -oxidation mediated strategy. *Metab. Eng.* 2020, **57**, 174–181
- [53] Wierckx, N. J. P. *et al.*, Engineering of solvent-tolerant *pseudomonas putida* S12 for bioproduction of phenol from glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, **71**, 8221–8227
- [54] Wynands, B. *et al.*, Metabolic engineering of *Pseudomonas taiwanensis* VLB120 with minimal genomic modifications for high-yield phenol production. *Metab. Eng.* 2018, **47**, 121–133
- [55] Miao, L. *et al.*, Construction of a novel phenol synthetic pathway in *Escherichia coli* through 4-hydroxybenzoate decarboxylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015,

99, 5163–5173

[56] Thompson, B. *et al.*, Engineering and comparison of non-natural pathways for microbial phenol production. *Biotechnol. Bioeng.* 2016, **113**, 1745–1754

第3章 炭素源の違いによる芳香族化合物群生産への影響

3.1 緒言

3.1.1 課題設定

これまでに、ピキア酵母を宿主として、①芳香族化合物群生産における中間前駆体「チロシン」を高生産できるチロシンシャーシ株の作出、②芳香族化合物群（レスベラトロール、ナリンゲニン、フェノール、ノルコクラウリン）の発酵生産、に成功した。しかしながら、ピキア酵母での芳香族化合物群生産に適した炭素源や培地組成を含む培養条件については、検討されていなかった。ピキア酵母は、グルコースとグリセロールの両方を炭素源として使用できる。そこで、レスベラトロール、ナリンゲニン、およびこれらの化合物の共通前駆体である *p*-クマル酸の3つの芳香族化合物をターゲットに、炭素源の違いによる生産性の違いを調査することにした（図 3-1）。

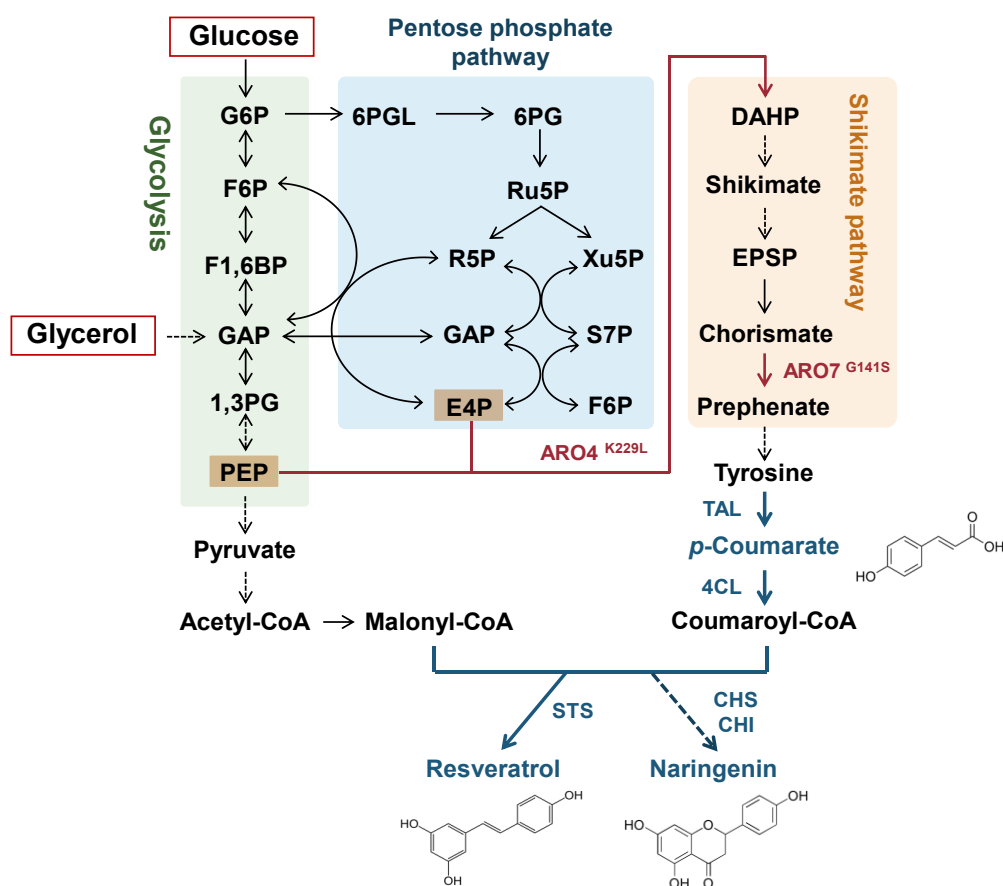


図 3-1 ピキア酵母における芳香族化合物群生合成経路

ピキア酵母に内在する代謝経路を黒と赤の矢印で示す。赤矢印は過剰発現した酵素を示す。*p*-クマル酸、レスベラトロール、ナリンゲニンの生合成経路を、青色で示す。破線は複数の酵素反応を示す。

G6P: glucose-6-phosphate; F6P: fructose-6-phosphate; F1,6BP: fructose-1,6-bisphosphate;

GAP: glyceraldehyde 3-phosphate; 1,3PG: 1,3-bisphosphoglycerate; PEP: phosphoenolpyruvate; 6PGL: 6-phosphogluconolactone; 6PG: 6-phosphogluconate; Ru5P: ribulose-5-phosphate; R5P: ribose-5-phosphate; Xu5P: xylulose-5-phosphate; S7P: sedoheptulose-7-phosphate; E4P: erythrose-4-phosphate; DAHP: 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate; ARO4^{K229L}: DAHP synthase (K229L); ARO7^{G141S}: chorismate mutase (G141S); TAL: tyrosine ammonia-lyase; 4CL: 4-coumarate CoA ligase; STS: stilbene synthase; CHS: chalcone synthase; CHI: chalcone isomerase

p-クマル酸生産株 (47m-TAL) では、培養 96 時間で 20 g/L のグルコースから 45 mg/L の *p*-クマル酸を生産した一方、20 g/L のグリセロールから 92 mg/L の *p*-クマル酸を生産した (図 3-2_a)。レスベラトロール生産株 (47m-T4S) では、培養 96 時間で 20 g/L のグルコースから 176 mg/L のレスベラトロールを生産した一方、20 g/L のグリセロールから 452 mg/L のレスベラトロールを生産した (図 3-2_b)。ナリンゲニン生産株 (47m-T4CC) では、培養 96 時間で 20 g/L のグルコースから 136 mg/L のナリンゲニンを生産した一方、20 g/L のグリセロールから 297 mg/L のナリンゲニンを生産した (図 3-2_c)。このように、いずれの芳香族化合物においても、炭素源としてグリセロールを用いた場合、グルコースを用いた場合よりも生産量が向上した (図 3-2)。しかしながら、グリセロールを炭素源として使用することで、なぜピキア酵母の芳香族化合物生産性が向上するかは不明なままであった。

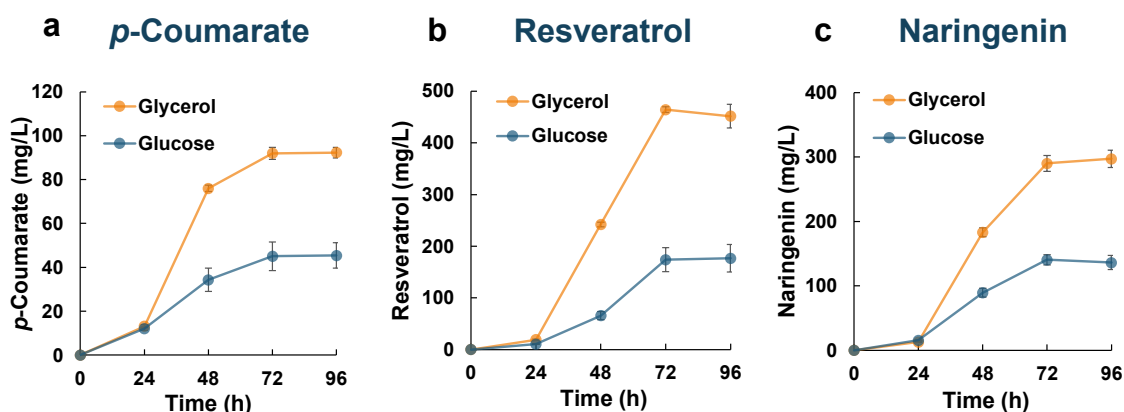


図 3-2 グルコースおよびグリセロールを炭素源とした芳香族化合物生産

p-クマル酸生産株 (47m-TAL)、レスベラトロール生産株 (47m-T4S)、ナリンゲニン生産株 (47m-T4CC) を、20 mL の YPD (グルコース) または YPG (グリセロール) 培地を含む 100 mL の三角フラスコを用いて、30℃、150 rpm で培養した。青線は YPD 培地、オレンジ線は YPG 培地での芳香族化合物生産量を示す。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均値 ± 標準偏差で示した。

3.1.2 研究戦略

本研究の目的は、グルコースと比較してグリセロールを炭素源として用いた場合に、ピキア酵母の芳香族化合物生産性が向上する原因を明らかにすることである。そこでまず、グルコースまたはグリセロールに加えてアミノ酸を炭素源とした場合としなかった場合の *p*-クマル酸、レスベラトロール、ナリングニンの生産量を測定した。また、グルコースまたはグリセロールを炭素源とした培養において、発酵中の培養上清の代謝物濃度および細胞内の代謝物量を網羅的かつ経時的に調査した。さらに、代謝解析結果に基づき、ピキア酵母で芳香族化合物を高生産できる培養条件の確立を目指した。冒頭で述べたバイオものづくりのサプライチェーンに当てはめると、培養における「原料」「増殖」「物質生産」部分に該当し、原料の違いによる物質生産性の違いを調べた（図 3-3）。

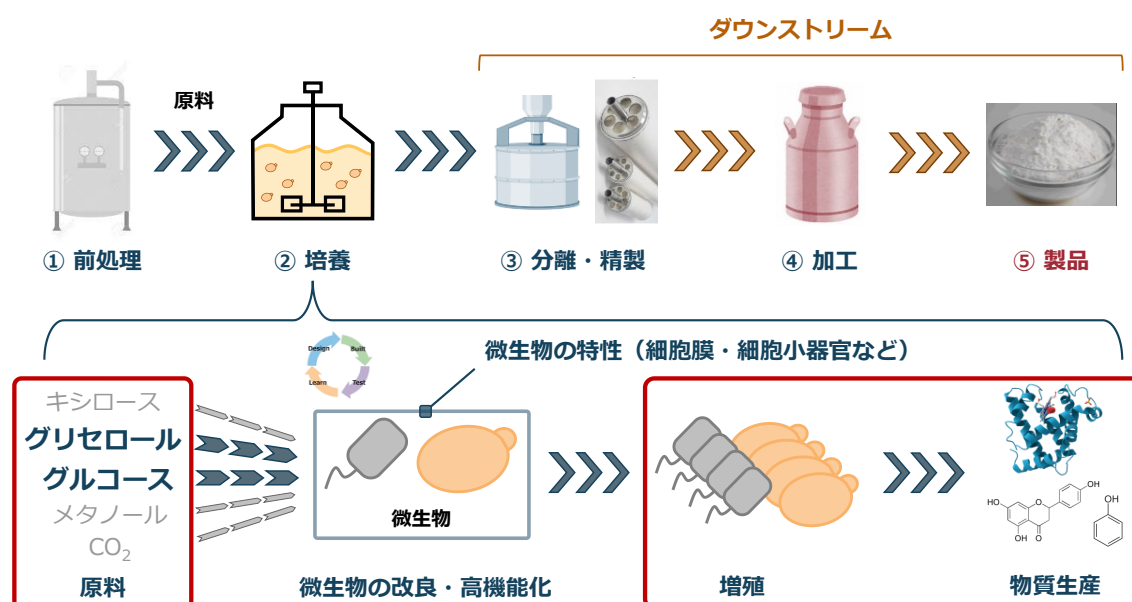


図 3-3 バイオものづくりのサプライチェーン

バイオものづくりのサプライチェーンにおいて、第 3 章の研究内容が該当する箇所を赤枠で囲っている。

3.2 結果および考察

3.2.1 アミノ酸を炭素源とした芳香族化合物群生産

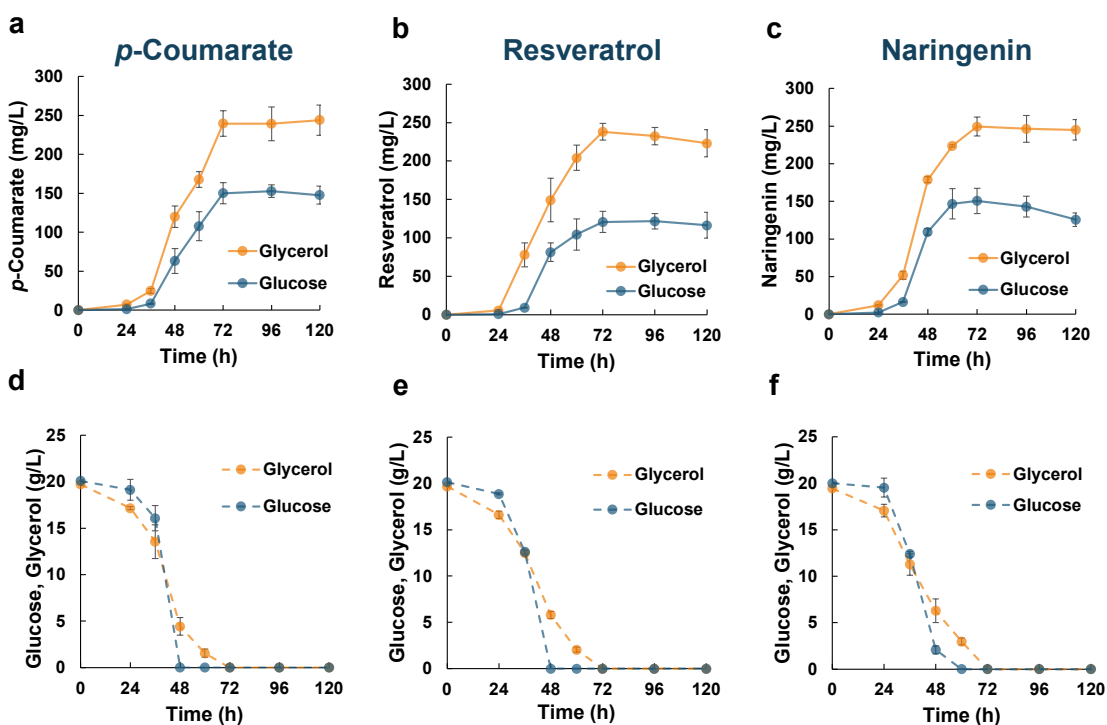
まず、グルコースまたはグリセロールに加え、アミノ酸を炭素源とした場合としなかった場合の芳香族化合物生産量を調査することにした。具体的には、グルコースまたはグリセロールの炭素源に加え、アミノ酸を含む合成培地（SCD および SCG 培地）、アミノ酸を含まない合成培地（SD および SG 培地）のそれぞれで培養試験を行い、*p*-クマル酸、レスベラトロール、ナリングニン生産量を測定した。各培地の組成は、3.5 参考資料に示す。これらの合成培地には窒素源として硫酸アンモニウムが含まれており、微生物が窒素源としてア

ンモニアを消費すると硫酸イオンが生成し、培養液中の pH が低下し、微生物細胞の増殖に有害となる [57, 58]。したがって、発酵培養液の pH を調整できる Jar fermentor で培養試験を行った。

アミノ酸を含む SCD（グルコース）および SCG（グリセロール）培地での培養では、炭素源としてグリセロールを用いた場合に、芳香族化合物生産量が向上した（図 3-4_a-c）。一方、アミノ酸を含まない SD（グルコース）および SG（グリセロール）培地での培養では、炭素源としてグルコースを用いた方が、芳香族化合物生産量が多かった（図 3-4_g-i）。興味深いことに、グルコースを炭素源とした場合、アミノ酸の有無にかかわらず、*p*-クマル酸、レスベラトロール、ナリンゲニン生産量はほとんど同じであった（図 3-4_a-c, g-i）。一方、グリセロールを炭素源とした場合、アミノ酸を含まない SG 培地と比較して、アミノ酸を含む SCG 培地では培養 120 時間後の *p*-クマル酸、レスベラトロール、ナリンゲニン生産量がそれぞれ 153%、275%、298%向上した（図 3-4_a-c, g-i）。これらの結果は、ピキア酵母が培養液中にアミノ酸を含む条件下でグリセロールから芳香族化合物群を高生産できることを示唆している。

また、培養液中のグルコースおよびグリセロールの消費については、いずれの芳香族化合物生産においても、20 g/L のグルコースは培養 48 時間で消費されていたのに対し、20 g/L のグリセロールは 72 時間～96 時間かけて消費されていた（図 3-4_d-f, j-l）。

SCD（グルコース）およびSCG（グリセロール）培地での培養試験



SD（グルコース）およびSG（グリセロール）培地での培養試験

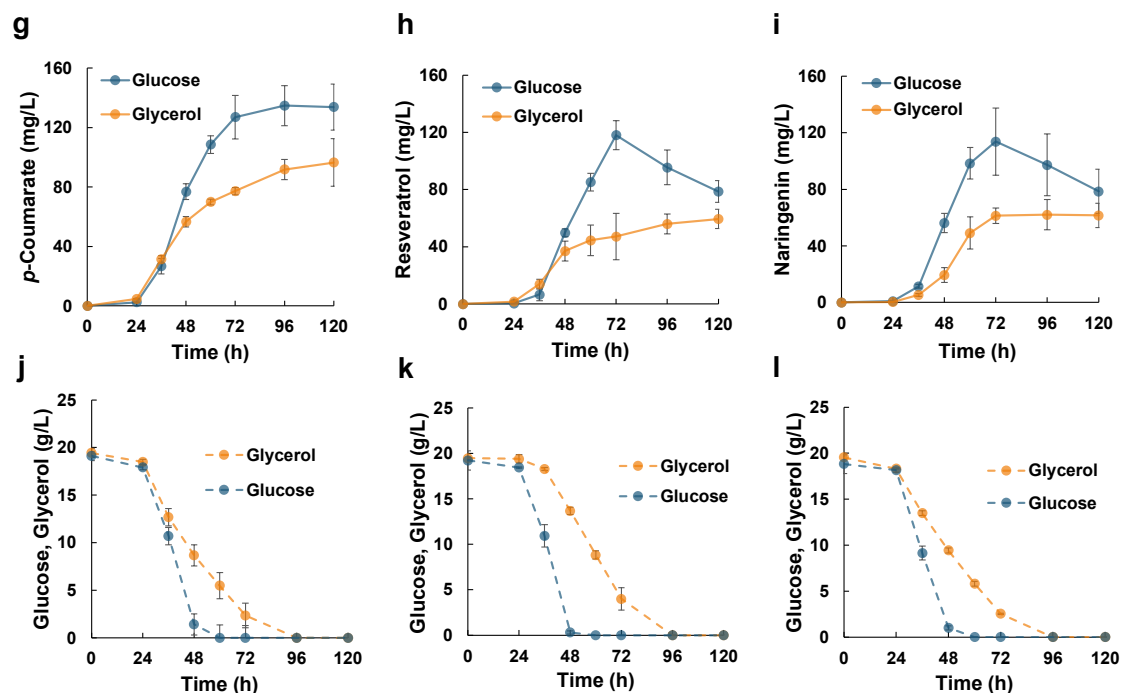


図 3-4 アミノ酸を炭素源とした芳香族化合物群生産および炭素源の消費

p-クマル酸生産株 (47m-TAL)、レスベラトロール生産株 (47m-T4S)、ナリンゲニン生産株 (47m-T4CC) を、100 mL の SCD（グルコース）および SCG（グリセロール）培地、SD（グルコース）および SG（グリセロール）培地を含む 250 mL Jar fermentor を用いて、30℃、400 rpm、pH = 6.0 の条件で培養した。(a-c) SCD および SCG 培地での培養結果を示す。青線は SCD、オレンジ線は SCG 培地での芳香族化合物生産量を示す。(d-f) SCD および SCG 培地で培養した際の培養液中のグルコースおよびグリセロール濃度を示す。青線は SCD 培地、オレンジ線は SCG 培地での培養結果である。(g-i) SD および SG 培地での培養結果を示す。青線は SD、オレンジ線は SG 培地での芳香族化合物生産量を示す。(j-l) SD および SG 培地で培養した際の培養液中のグルコースおよびグリセロール濃度を示す。青線は SD 培地、オレンジ線は SG 培地での培養試験結果である。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均値 ± 標準偏差で示した。

アミノ酸を含まない SD（グルコース）培地での培養では、培養 72 時間後以降、培養液中のレスベラトロールおよびナリンゲニン量が減少していた（図 3-4_h, i）。この現象は、*Corynebacterium glutamicum* を宿主にグルコースを炭素源としたレスベラトロール生産、*S. stipitis* を宿主に廃糖蜜（モラセス）を炭素源としたレスベラトロール生産でも報告されている [47, 38]。Braga らは、培養液中の炭素源が枯渇した後に溶存酸素（DO）濃度が上昇することにより、抗酸化物質であるレスベラトロールが酸化またはオリゴマー化する可能性を示唆している [47]。ナリンゲニンもレスベラトロールと同様に抗酸化物質であるた

め、同様の現象が起こった可能性がある。しかしながら、アミノ酸を含む SCD（グルコース）や SCG（グリセロール）培地、アミノ酸を含まない SG（グリセロール）培地での培養では、培養液中のレスベラトロールやナリンゲニン量は減少しなかった（図 3-4_a-c, g-i）。グリセロールの消費に要する時間は、グルコースの消費に要する時間よりも長く（図 3-4_d-f, j-l）、また、アミノ酸を含む培養条件では、グルコースやグリセロールが枯渇した後もアミノ酸が代替炭素源として存在する。したがって、細胞はアミノ酸を炭素源として利用することができ、細胞の呼吸によって酸素を消費することができたため、芳香族化合物の酸化やオリゴマー化を防ぐことができたと考えられる。

3.2.2 培養上清および細胞内に含まれる代謝物の経時測定

グルコースおよびグリセロールを炭素源とする培養において、ピキア酵母の芳香族化合物生産性と代謝動態の関係性を調べるため、レスベラトロール生産株（47m-T4S）を SCD（グルコース）培地および SCG（グリセロール）培地で培養し、30、36、42、48、60、72 時間培養後の培養上清および細胞内の代謝物を網羅的に分析した。

培養上清の代謝物濃度および細胞内の代謝物量の経時変化を、それぞれ図 3-5 および図 3-6 に示す。メチオニン（Met）、ヒスチジン（His）、リジン（Lys）、アルギニン（Arg）は、SCD、SCG 培地での培養ともに培養 30 時間後には培養上清で枯渇していた（図 3-5）。また、SCG 培地での培養と比較し、SCD 培地で培養した場合、多くのアミノ酸 [バリン（Val）、ロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）、アスパラギン酸（Asp）、アスパラギン（Asn）、グルタミン酸（Glu）、フェニルアラニン（Phe）、チロシン（Tyr）、トリプトファン（Trp）] の培養上清中の濃度が高かった（図 3-5）。一方、SCD（グルコース）培地での培養と比較し、SCG（グリセロール）培地で培養した場合、シキミ産経路の代謝物 [3-デヒドロキナ酸（DHQ）、3-デヒドロシキミ酸（DHS）、シキミ酸] の培養上清中の濃度が高く、これらの代謝物は細胞内にも多く蓄積していた（図 3-5, 3-6）。これらの結果は、ピキア酵母がグリセロールを炭素源として利用する場合、培養液中のアミノ酸代謝を促進し、芳香族化合物生産に向けた代謝フラックスを増強させることを示唆している。

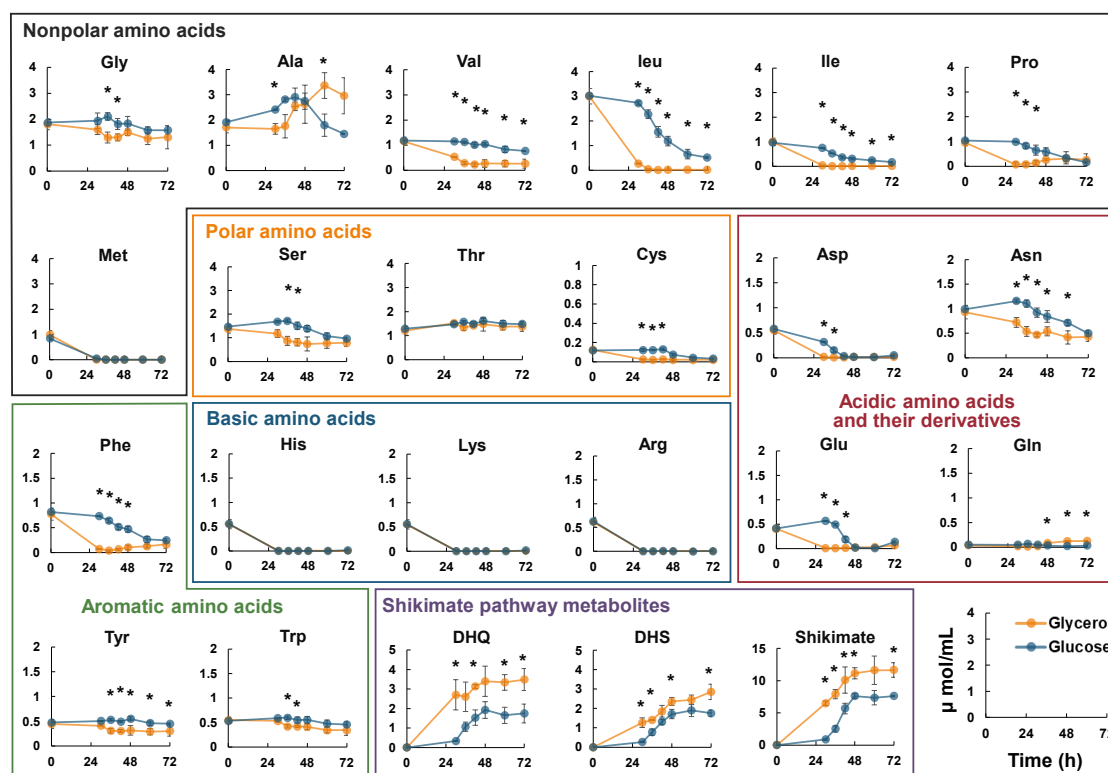


図 3-5 培養上清に含まれる代謝物の経時変化

レスバトロール生産株 (47m-T4S) を、100 mL の SCD (グルコース) または SCG (グリセロール) 培地を含む 250 mL Jar fermentor で、30℃、400 rpm、pH = 6.0 の条件で培養した。培養上清に含まれる代謝物の濃度を経時的に LC-MS/MS で測定した。青線は SCD (グルコース) 培地、オレンジ線は SCG (グリセロール) 培地で培養した際の培養上清に含まれる代謝物の濃度を示す。y 軸の単位は $\mu\text{mol/mL}$ である。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。統計的有意性は、Student の t 検定で判定した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$)。

Gly: glycine; Ala: alanine; Val: valine; Leu: leucine; Ile: isoleucine; Pro: proline; Met: methionine; Ser: serine; Thr: threonine; Cys: cysteine; His: histidine; Lys: lysine; Arg: arginine; Asp: aspartate; Asn: asparagine; Glu: glutamate; Gln: glutamine; Phe: phenylalanine; Tyr: tyrosine; Trp: tryptophan; DHQ: 3-dehydroquininate; DHS: 3-dehydroshikimate

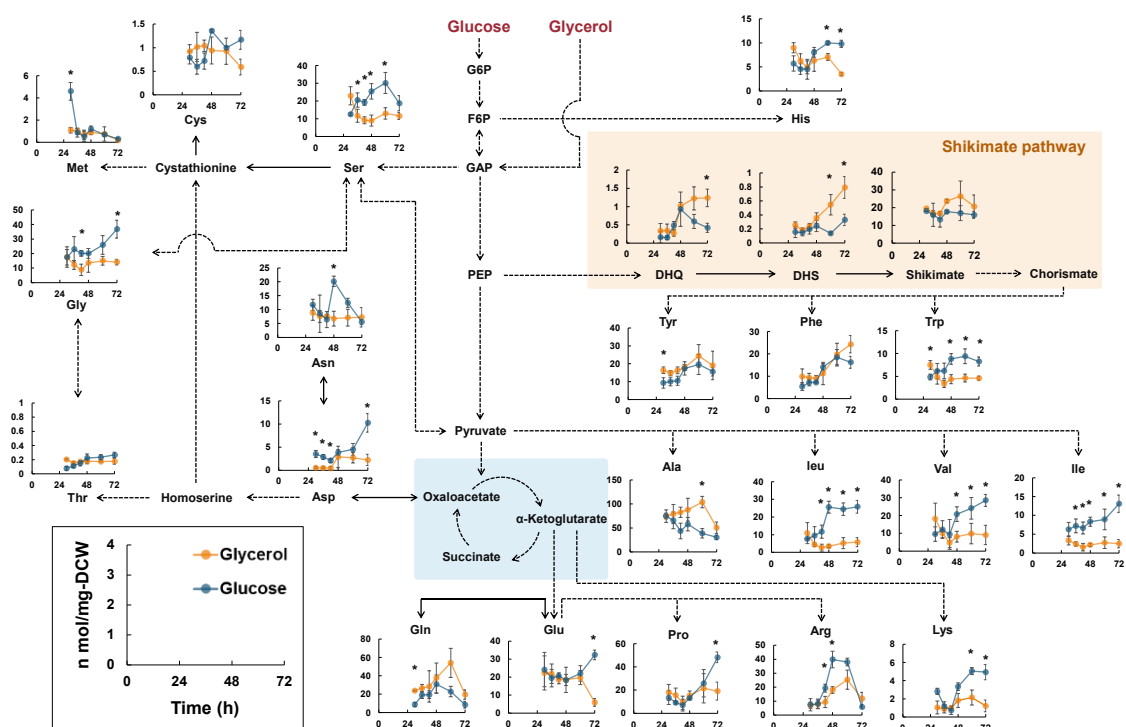


図 3-6 細胞内代謝物の経時変化

レスベラトロール生産株 (47m-T4S) を、SCD (グルコース) または SCG (グリセロール) 培地 100 mL を含む 250 mL Jar fermentor で、30℃、400 rpm、pH = 6.0 の条件で培養した。細胞内の代謝物量を経時的に LC-MS/MS で測定した。青線は SCD (グルコース) 培地、オレンジ線は SCG (グリセロール) 培地で培養した際の細胞内の代謝物濃度を示す。y 軸の単位は n-mol/mg-dry cell weight (DCW) である。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均値 ± 標準偏差で示した。統計的有意性は、Student の t 検定で判定した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$)。

3.2.3 単一アミノ酸添加条件での培養試験

次に、どのアミノ酸の代謝がピキア酵母の芳香族化合物生産性の向上に寄与しているかを調査することにした。図 3-5 に示した培養上清中の代謝物濃度を参考に、SCD 培地での培養と比較して、SCG 培地で培養した際に濃度が減少または枯渇していた 14 種類のアミノ酸 (Tyr、Phe、Trp、His、Met、Asn、Asp、Leu、Val、Ile、Gln、Glu、Arg、Lys) を選択し、それぞれのアミノ酸のみを培養液に添加した条件で、レスベラトロール生産試験を行った。その結果、添加するアミノ酸によってレスベラトロール生産量が大きく異なることが明らかとなった (図 3-5)。例えば、Arg または Lys を添加した条件での培養では、アミノ酸添加なしの SG 培地で培養した際のレスベラトロール生産量と比べて半分以下であった。Crépin らは、*S. cerevisiae* のアミノ酸消費速度はアミノ酸ごとに異なり、複数の転写因子によって密接に制御されていると報告している [59]。ピキア酵母を培養する際に、培養液中に Arg または Lys のみが高濃度で存在すると、これらのアミノ酸消費に関与する転

写因子が芳香族化合物の生産に関与する酵素の発現を制御したのかもしれない。この仮説を検証するためにはさらなる研究が必要であるが、芳香族化合物生産に関与する酵素の発現レベルを測定することは一つのアプローチであろう。

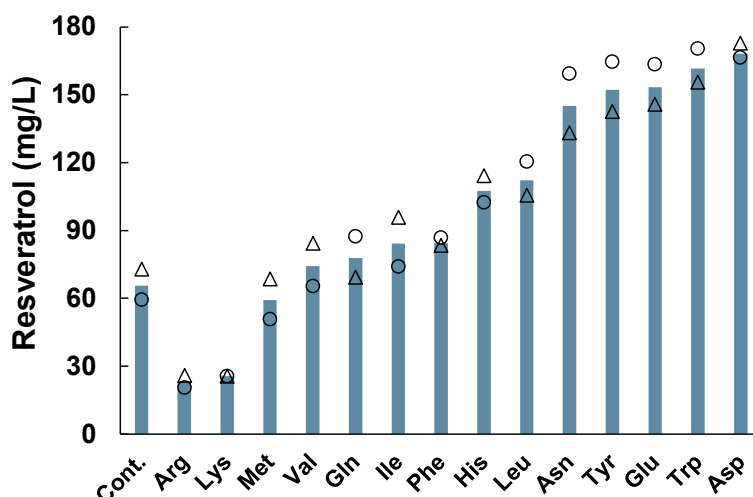


図 3-7 単一アミノ酸添加条件におけるレスベラトロール生産試験

レスベラトロール生産株 (47m-T4S) を、単一のアミノ酸のみを添加した 100 mL の SG 培地を含む 250 mL Jar fermentor で、30℃、400 rpm、pH = 6.0 の条件で培養した。○および△は 120 時間培養後のレスベラトロール生産量 (n=2) を示し、棒グラフの値は 2 サンプルの平均値である。Cont. はアミノ酸添加なしの培地 (SG 培地) での培養結果である。

一方、Asn、Tyr、Glu、Trp、Asp を添加すると、アミノ酸を添加しない SG 培地での培養と比較して、レスベラトロール生産量はそれぞれ 121%、132%、134%、146%、156% 増加した (図 3-7)。炭素源の消費については、アミノ酸添加の影響はなく、どの条件でも培養 96 時間後には 20 g/L のグリセロールが消費されていた。そこで、レスベラトロール生産量を最も増加させたアミノ酸である Asp または Trp を添加した条件で培養し、図 3-5、3-6 と同様に培養上清中の代謝物濃度および細胞内の代謝物量を網羅的かつ経時的に分析した。

その結果、アミノ酸添加なしの SG 培地での培養と比べて、Asp または Trp を添加した培地で培養した場合、培養上清中の多くのアミノ酸 (Asn、Glu、Ala、Val、Tyr、Phe) 濃度が低いことが明らかとなった (図 3-6)。対照的に、シキミ酸経路の代謝物 (DHQ、DHS、シキミ酸) や Tyr の細胞内蓄積量は、Asp または Trp を添加した培地での培養で有意に高かった。これらの結果から、ピキア酵母はグリセロールを炭素源に培養すると、特定のアミノ酸の代謝を促進し、シキミ酸経路への代謝フラックスを増強させることが明らかとなった。

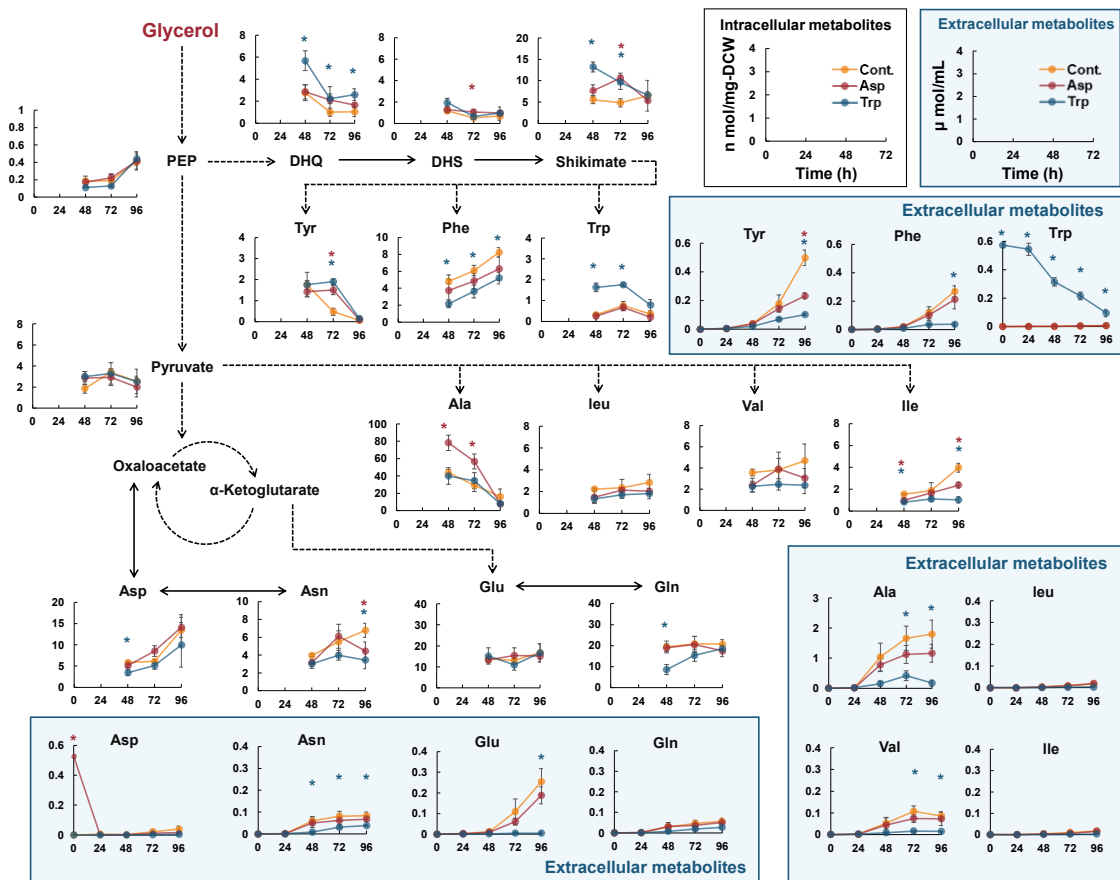


図 3-8 Asp または Trp 添加条件での培養上清および細胞内代謝物蓄積量の経時変化
 レスバトロール生産株 (47m-T4S) を、Asp または Trp を添加した 100 mL の SG 培地を含む 250 mL Jar fermentor で、30℃、400 rpm、pH = 6.0 の条件で培養した。培養上清の代謝物濃度および細胞内の代謝物量を経時的に LC-MS/MS で測定した。オレンジ線は SG 培地 (コントロール)、赤線は SG + Asp 培地、青線は SG + Trp 培地での培養を示す。細胞内の代謝物量を示すグラフの y 軸の単位は n-mol/mg-dry cell weight (DCW)、培養上清中の代謝物濃度を示すグラフの y 軸の単位は μmol/mL である。培養上清の代謝物濃度を示すグラフは青枠で囲っている。複数の酵素ステップは破線の矢印で示す。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均値 ± 標準偏差で示した。統計的有意性は、Student の *t* 検定で判定した (**p* < 0.05, ***p* < 0.005)。赤と青のアスタリスクは、それぞれ Asp または Trp 添加条件での培養と SG 培地 (コントロール) での培養との統計的有意差を示す。

3.3 小括

本研究では、グルコースと比較してグリセロールを炭素源として用いた場合に、ピキア酵母の芳香族化合物生産性が向上することに着目し、ピキア酵母がグリセロールから芳香族化合物を高生産できるメカニズムの解明に取り組んだ。

アミノ酸の添加を含む培養条件を検討し、ピキア酵母発酵中の培養上清中の代謝物濃度

および細胞内の代謝物量を網羅的かつ経時的に調査することで、ピキア酵母はグリセロールを炭素源として培養すると、特定のアミノ酸代謝を促進し、芳香族化合物生産への代謝フラックスを増加させることが明らかとなった。ピキア酵母における *p*-クマル酸、レスベラトロール、ナリングニンの生産挙動が酷似していることから、他の芳香族化合物の生産についても同様の結果が期待できる。将来的には、培養液中に添加するアミノ酸の組み合わせや濃度を最適化することで、ピキア酵母を宿主にグリセロールを原料とした芳香族化合物生産性を更に向上できる可能性がある。

3.4 実験手法

・使用菌体、培地、プラスミド

ピキア酵母の培養は、20 g/L のグルコースを含む YPD、SCD、SD 培地または、20 g/L のグリセロールを含む YPG、SCG、SG 培地を使用し、必要に応じて抗生物質を加えた。培養は特記がない限り 30℃、150 rpm で行った。本研究で用いた培地組成の詳細は 3.5「参考資料」に示す。本研究で使用したプラスミドの構築方法は全て、第 2 章に記載している。

・組換えピキア酵母株の作出

本研究で使用した全てのピキア酵母株を表 3-1 に示す。ピキア酵母の形質転換法については、第 2 章を参照されたい。

p-クマル酸生産株の構築

EcoRV で制限酵素処理した pPGP-TAL プラスミドを、*P. pastoris* CBS7435 $\Delta dnl4 \Delta his4$ 株および 47m 株の CCA38743 遺伝子部位へそれぞれ導入し、TAL 株および 47m-TAL 株を得た。

表 3-1 本研究で使したピキア酵母株

Strains	Description	Source
CBS7435 $\Delta dnl4$	$\Delta dnl4 \Delta his4$:: ADE1	[37]
$\Delta his4$ (Control)		
47m	CBS7435 $\Delta dnl4 \Delta his4$ / pPGPH-ARO4 ^{K229L} -ARO7 ^{G141S} [Hyg marker]	[17]
TAL	CBS7435 $\Delta dnl4 \Delta his4$ / pPGP-TAL [G418 marker]	[17]
47m-TAL	47m / pPGP-TAL [G418, Hyg marker]	[17]
T4CC	CBS7435 $\Delta dnl4 \Delta his4$ / pPGP-TAL-4CL, pPGPZ-CHS-	[16]

	CHI [G418, Zeo marker]	
47m-T4CC	47m / pPGP-TAL-4CL, pPGPZ-CHS-CHI [G418, Hyg, Zeo marker]	[16]
T4S	CBS7435 $\Delta dnl4 \Delta his4$ / pPGP-TAL-4CL-STS [G418 marker]	[16]
47m-T4S	47m / pPGP-TAL-4CL-STS [G418, Hyg marker]	[16]

・フラスコでの培養試験（回分培養）

培養試験に用いる菌体を、必要に応じて抗生物質を添加した YPD または YPG 培地 5 mL を含む試験管に播種し、30℃、150 rpm の条件で 24 時間前培養した。前培養後の菌体を滅菌水で 2 回洗浄した後、20 mL の YPD または YPG 培地を含む 100 mL のバッフルなし三角フラスコに、初期 OD₆₀₀ = 0.05 となるように植菌し、30℃、150 rpm の条件で培養試験を行った。サンプリングは 24 時間ごとに行った。

・Jar fermentor での回分培養

培養試験に用いる菌体を、必要に応じて抗生物質を添加した SCD、SCG、SD、または SG 培地 20 mL を含む三角フラスコに播種し、30℃、150 rpm の条件で 48 時間前培養した。前培養後の菌体を滅菌水で 2 回洗浄した後、100 mL の SCD、SCG、SD、または SG 培地を含む 250 mL の Jar fermentor (Bio Jr. 8) に初期 OD₆₀₀ = 0.05 となるように植菌した。培養は 30℃、400 rpm で行い、通気量は 100 mL/min に維持した。培養液の pH は、5 N アンモニウム水溶液を自動添加することで 6.0 に維持し、必要に応じて消泡剤を添加した。

単一アミノ酸を添加した条件での培養試験の際は、Leu (400 mg/L)、Ile (80 mg/L)、Val (80 mg/L)、Met (80 mg/L)、Asp (80 mg/L)、Asn (80 mg/L)、Arg (80 mg/L)、Lys (80 mg/L)、Glu (80 mg/L)、Gln (80 mg/L)、His (80 mg/L)、Phe (80 mg/L)、Tyr (80 mg/L)、Trp (80 mg/L) をそれぞれ添加した SG 培地 100 mL を含む 250 mL の Jar fermentor (Bio Jr. 8) で培養した。これらの添加するアミノ酸の濃度は、合成培地である SCD および SCG 培地に含まれているアミノ酸濃度と等しくなるように調整した。その他の培養条件は前述の条件と同様の手法で行った。

・代謝物の分析

培養上清中のグルコースおよびグリセロール濃度の定量には、Aminex HPX-87H カラムと RID-10A 検出器を装備した HPLC を使用した。カラムオーブンは 65℃に維持し、移動相には 5 mM H₂SO₄ を使用し、0.6 mL/min の流速で稼働した。培養液中の *p*-クマル酸、

レスベラトロール、ナリングニン濃度の測定は、第2章でレスベラトロールおよびナリングニン濃度を測定した際と同様の手法で行った。

細胞内代謝産物の抽出および測定も第2章に記載の方法で行なった。培養上清に含まれる代謝物を測定する際は、培養上清と同量のクロロホルムを加え、培養液から代謝物を抽出した。ボルテックスした後、13000 rpm、4℃で5分間遠心し、得られた上清を分析に供した。サンプルには内部標準物質として、終濃度1 μMとなるように(+)-10-カンファースルホン酸を加えた。

・統計検定

数値は全て平均値 ± 標準偏差で示した。系統間の有意差を評価するために、Tukeyの範囲検定と組み合わせた一元配置分散分析を統計検定として用いた。統計解析は、生物統計学で頻繁に使用される統計関数を追加するために設計されたRコマンドーの修正版であるEZR [44]を用いて行った（2標本の不等分散；両側検定、* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ ）。

3.5 参考資料および引用文献

培地組成

<SCD 培地>

6.7 g/L	Yeast nitrogen base without amino acids (YNB)
1.92 g/L	Yeast synthetic drop-out medium supplemented without uracil
80 mg/L	Uracil
20 g/L	D-Glucose

<SCG 培地>

6.7 g/L	Yeast nitrogen base without amino acids (YNB)
1.92 g/L	Yeast synthetic drop-out medium supplemented without uracil
80 mg/L	Uracil
20 g/L	Glycerol

<SD 培地>

6.7 g/L	Yeast nitrogen base without amino acids (YNB)
80 mg/L	Histidine
20 g/L	D-Glucose

<SG 培地>

6.7 g/L	Yeast nitrogen base without amino acids (YNB)
80 mg/L	Histidine
20 g/L	Glycerol

プレート作成用には Agar Powder を 2.0% (w/v) 加えた。また、株の薬剤耐性に合わせて、G418 を 0.5% (w/v)、Hygromycin B を 0.3% (w/v)、Zeocin を 0.1% (w/v) の濃度で加えた。

YPD 培地、YPG 培地の組成は、第 2 章 2.5「参考資料」に記載している。

参考文献

- [57] Libkind, D. *et al.*, *Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high-altitude Lake. *Folia Microbiol.* 2004, **49**, 19–25.
- [58] Libkind, D. *et al.*, Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018, **22**, 687–692.
- [59] Crépin, L. *et al.*, Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: A model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, **78**, 8102–8111.

第 4 章 微生物培養系と膜抽出システムの組み合わせによるバイオフェノール生産性の向上

4.1 緒言

4.1.1 現状のバイオものづくりの限界

冒頭で述べたように、微生物を宿主とするバイオものづくり技術の開発において、目的物質の生産性向上および生産効率の最適化は不可欠である。しかしながら、芳香族化合物のような疎水性化合物を微生物で生産させる場合、生産した疎水性化合物が培養液中に一定量以上蓄積すると、微生物に対して毒性を示し、これが微生物の生育阻害や物質生産性の低下を引き起こす。例えば、第 2 章でピキア酵母を宿主に生産させたフェノールは、ほとんど全ての微生物に対して毒性があり、培養液中に 0.05% (w/v) 以上の濃度で存在すると微生物の増殖を阻害することが報告されている [60, 61]。フェノール生産ピキア酵母の流加培養結果を図 4-1 に示すが、フェノール生産量 (図 4-1_青線) は培養 72 時間以降増加せず、また、培養液中で微生物の原料となるグリセロール (図 4-1_オレンジ線) は、培養 72 時間以降消費されていなかった。これらの結果から、培養液中のフェノール濃度が高くなると、ピキア酵母へ毒性が生じ、グリセロール消費が抑制され、フェノール生産が停止したと推察される。したがって、ピキア酵母を宿主にフェノール生産量を更に増加させるためには、培養液中のフェノール濃度を低減できるアプローチを開発する必要がある。

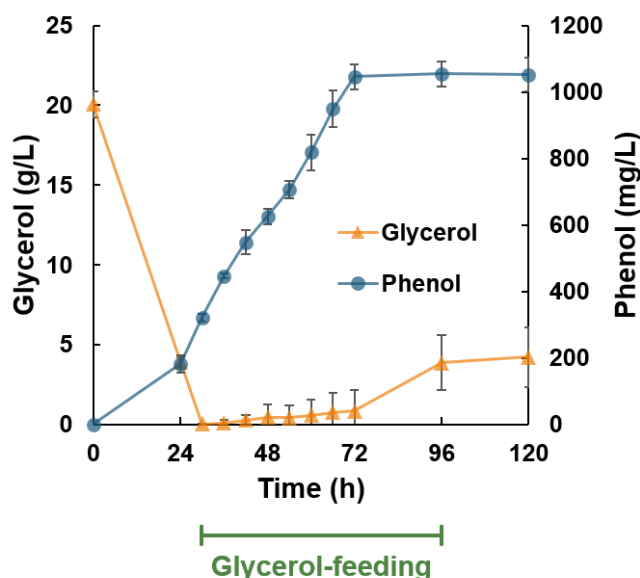


図 4-1 フェノール生産ピキア酵母株の流加培養結果

47m-TPL 株 (フェノール生産株) を、1 L の YPG 培地を含む 2 L Jar fermentor を用いて、30℃、pH = 6.0 の条件で流加培養をおこなった。攪拌速度を 300 rpm~600 rpm の間で変化させ、培養液中の溶存酸素 (DO) 濃度を 20% に維持した。また、培養 30 時間から 96 時間の間、フィード液 (50 g/L Yeast extract、

100 g/L Peptone、200 g/L Glycerol) を 5 mL/h の流量で添加した。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

4.1.2 二相培養

疎水性化合物の微生物に対する毒性を緩和するアプローチの一つに二相培養がある。二相培養とは、疎水性化合物が発酵培養液よりも有機溶媒への溶解度が高いことを利用して、発酵培養液に有機溶媒を添加することで疎水性化合物を培養液から抽出（液-液抽出）する手法である [62, 63]。例えば、Kim らは有機溶媒に polypropylene glycol 1200 を用いた二相培養を行い、*S. cerevisiae* を宿主とした 2-phenylethanol 生産量を約 9 倍増加させることに成功した [63]。しかしながら、従来の二相培養システムでは、培養液に酸素を供給するための通気と溶液の攪拌により二相がエマルジョン化してしまうことが課題であり、これは、微生物の生育・代謝に悪影響を及ぼすだけでなく、代謝産物の連続的な抽出を不可能にしていた [64, 65]。

4.1.3 膜抽出システム「Pertraction システム」

液-液抽出の界面に膜を使用するシステム「Pertraction システム」を開発できれば、微生物の発酵プロセスを妨げることなく疎水性化合物を連続かつ効率よく抽出できる可能性がある [66, 67, 68]。Pertraction システムには主に 3 つの利点がある。第一に、二相がエマルジョン化しない。水相と有機相の界面は膜の多孔質構造によって維持されるため、両相が直接接触することはない。第二に、連続抽出が可能である。複数の工程を必要とする従来の抽出法に比べ、膜抽出システムでは水相と有機相が最初から分離しており、各相をフレッシュな状態に維持することで連続処理が可能である。第三に、スケールアップが容易である。膜抽出では膜表面が水相と有機相の界面であり、特に中空糸膜は体積当たりの膜面積が非常に大きいので、中空糸膜を膜抽出に使用することで省スペースかつコンパクトなスケールアップが可能となる。

例えば、Combes らは、oleyl alcohol（オレイルアルコール）を有機溶媒として用い、疎水性ポリプロピレン製の中空糸膜を使用した Pertraction システムと微生物のバッチ培養を組み合わせ、*S. cerevisiae* が生産した *p*-クマル酸を、膜界面を介して培養液から抽出することに成功した [69]。しかしながら、最終的な *p*-クマル酸生産量は Pertraction システムを用いない培養の 89%に過ぎなかった。疎水性化合物の生産性を高めるには、より効率的な Pertraction システムの開発が不可欠である。具体的には、使用する菌株や抽出する化合物に適した抽出溶媒や膜の選択、また、それらを組み込んだ Pertraction システムを開発する必要がある。

4.1.4 研究戦略

本研究では、ピキア酵母でのフェノール生産を例に、まず、培養液からのフェノール抽出に適した有機溶媒の探索および二相培養を検討した。次に、培養液から効率的にフェノールを抽出するための中空糸膜を利用したフェノール膜抽出システム「Pertraction システム」の開発に取り組んだ。最後に、「ピキア酵母によるフェノール生産系」と「フェノール膜抽出システム」を組み合わせ、連続的なバイオフェノール発酵生産システムの確立を目指した。冒頭で述べたバイオものづくりのサプライチェーンに当てはめると、「培養」および「分離・精製」部分に該当し、ピキア酵母に生産させたフェノールを連続的に分離し、さらにはフェノールの生産量を増加させる技術の確立を目指した研究である（図 4-2）。



図 4-2 バイオものづくりのサプライチェーン

バイオものづくりのサプライチェーンにおいて、第 4 章の研究内容が該当する箇所を赤枠で囲っている。

4.2 結果および考察

4.2.1 ピキア酵母に対するフェノールの毒性

まず、ピキア酵母に対するフェノールの毒性を評価するために、コントロール株（CBS7435 $\Delta dnl4 \Delta his4$ ）を、100、250、500、1000、2000 mg/L の濃度でフェノールを添加した培地で培養試験を行った。その結果、培養液中のフェノール濃度が高くなるにつれてピキア酵母の増殖は低下し、特に、フェノール濃度が 1000 mg/L 以上になるとピキア酵母の増殖はほとんど停止した（図 4-3）。この結果から、図 4-1 で示した流加培養において、フェノール生産量が 1000 mg/L 付近で停止し、培養液中のグリセロールが培養 72

時間以降消費されなかったのは、培養液中のフェノール濃度が高くなりピキア酵母へ毒性が生じたためと考えられる。

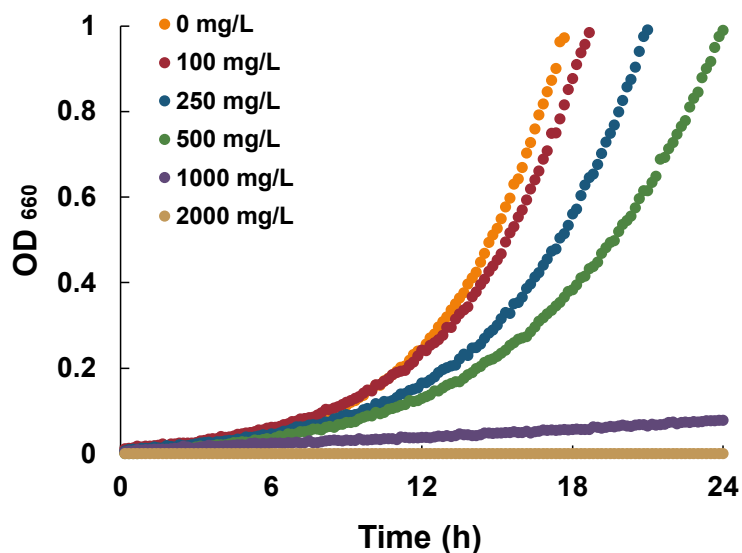


図 4-3 培養液中のフェノールによるピキア酵母の増殖阻害

P. pastoris CBS7435 $\Delta dnI4$ $\Delta his4$ (コントロール株) を、0、100、250、500、1000、2000 mg/L の濃度でフェノールを添加した YPG 培地で培養し、バイオフィトレコーダーを用いて OD₆₆₀ を 20 分間隔で自動測定した。

4.2.2 フェノール抽出に適した有機溶媒の検討および二相培養

大腸菌や *P. putida* を宿主とするフェノール生産においては、トリブチリンおよび 1-オクタノールを有機溶媒として用いた二相培養を行うことでフェノール生産量が増加することが報告されている [55, 70]。本研究では、まず培養液からのフェノール抽出に適した有機溶媒を探索した。具体的には、1 g/L のフェノールを含む YPG 培地に有機溶媒（1-ペンタノール、1-ヘキサノール、1-オクタノール、テトラデカン、シクロヘキサノン、トリブチリン）を添加し、それぞれ混合した後、水相および有機相のフェノール濃度を測定した（図 4-4_a）。その結果、1-ペンタノール、1-ヘキサノール、1-オクタノール、トリブチリンは高いフェノール抽出能を示し、それぞれ 89%、89%、87%、88% のフェノールが有機相に抽出された。一方で、テトラデカンおよびシクロヘキサノンを添加した場合は、それぞれフェノールの 98% および 97% が培地（水相）に残ったままであった（図 4-4_b）。

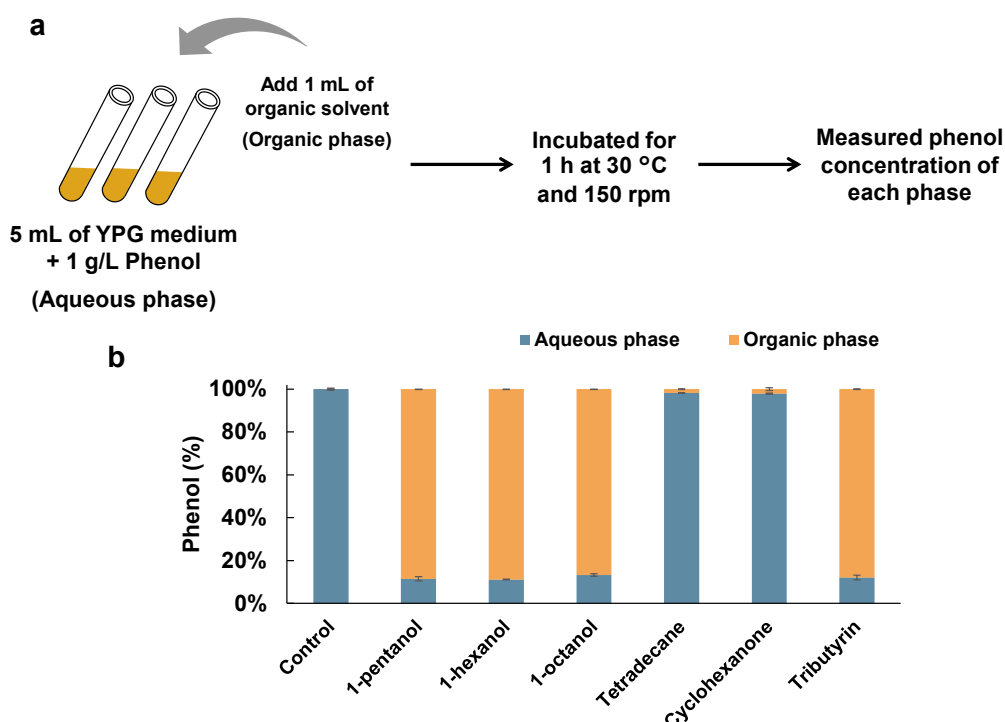


図 4-4 フェノール抽出に適した有機溶媒の検討

(a) 各有機溶媒のフェノール抽出効率を調べる実験手順を示している。(b) それぞれの有機溶媒のフェノール抽出効率の比較。グラフ中の青とオレンジは、それぞれ培養液（水相）と有機溶媒（有機相）のフェノール分配比を示す。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均値 ± 標準偏差で示した。

フェノール抽出効率が高い有機溶媒の中でも、トリブチリンは人体や環境への影響が少なく、かつ疎水性化合物の抽出によく用いられる有機溶媒である [55]。本研究ではフェノールの抽出溶媒としてトリブチリンを使用することにした。フェノール生産試験における培養 48 時間時点で培養液中にトリブチリンを添加し二相培養を行ったところ、培養 72 時間後には、生産されたフェノールの 88%が培養液（水相）からトリブチリン（有機相）に抽出された（図 4-5_a）。しかしながら、トリブチリンを添加しない培養と比べ、トリブチリンを添加した二相培養では培養 48 時間以降、フェノール生産量は増加せず、培養液中でピキア酵母の増殖およびフェノール生産の原料となるグリセロールの消費も停止した（図 4-5）。これらの結果から、二相培養系において有機溶媒がピキア酵母に直接接触すると、ピキア酵母の代謝活性に悪影響を及ぼすことが示唆された。なお、先行研究では、大腸菌や *P. putida* を宿主としたフェノール生産において、二相培養での細胞増殖およびフェノール生産は阻害されていなかった [53, 55]。これは、原核生物と真核生物の細胞膜の化学構造の違いによるものと考えられ、その理由を解明するためにはさらなる研究が必要だろう。

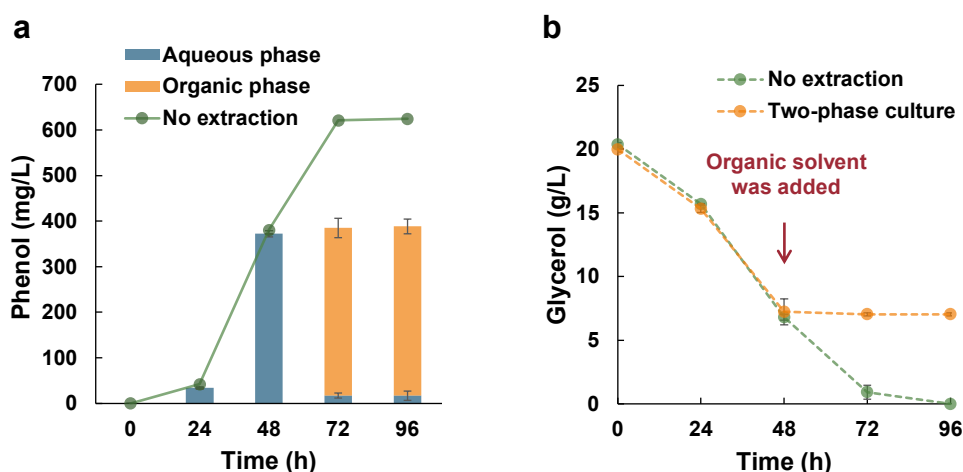


図 4-5 二相培養の検討

フェノール産生ピキア酵母株（47m-TPL）を、20 mL の YPG 培地を含む 100 mL の三角フラスコを用いて、30℃、150 rpm で培養した。培養開始から 48 時間後時点に、フェノールの抽出溶媒としてトリブチリンを培養液に添加した。**(a)** 青およびオレンジの棒グラフは、水相（培養液）および有機相（トリブチリン）のフェノール濃度を示す。数値は、培養液（水相）あたりの濃度に換算している。緑色の線は、トリブチリンを添加せずに培養した場合のフェノール生産量を示す。**(b)** 47m-TPL 株のグリセロール消費を示す。オレンジの破線は二相培養におけるグリセロール消費量を示し、緑の破線は有機溶媒を添加しない培養でのグリセロール消費を示す。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均値 ± 標準偏差で示した。

4.2.3 膜抽出技術「Pertraction システム」の開発

液-液抽出の界面に膜を使用するシステム「Pertraction システム」を開発できれば、微生物の発酵プロセスを妨げることなく、また微生物に対する有機溶媒の毒性を考慮することなく、疎水性化合物を抽出できる [67, 68]。本研究では、培養液からフェノールを抽出するために、中空糸膜を用いたフェノール膜抽出システムの開発に取り組んだ。中空糸膜には、宿主であるピキア酵母（径：約 6 μm ）自体は通さず、ピキア酵母が生産したフェノールのみを抽出できるよう、膜表面の孔径が 0.04 μm ~0.06 μm の限外ろ過膜を使用した。通常、中空糸膜の素材には物理的強度や耐薬品性の観点から PP（ポリプロピレン）、PTFE（ポリテトラフルオロエチレン）、PVDF（ポリフッ化ビニリデン）などの疎水性物質が使用されるが [67, 68, 71]、疎水性素材の膜を使用した場合、中空糸膜内側を流れる溶媒が漏れ出す恐れがある。そこで本研究では、PVDF 膜の表面を PVP（ポリビニルピロリドン；膜の親水化剤としてよく使用される [72]）で修飾した PVDF/PVP 膜を用いた中空糸膜モジュールを開発した。開発した中空糸膜コンタクターの写真および中空糸膜断面の SEM 画像を図 4-6 に示す。

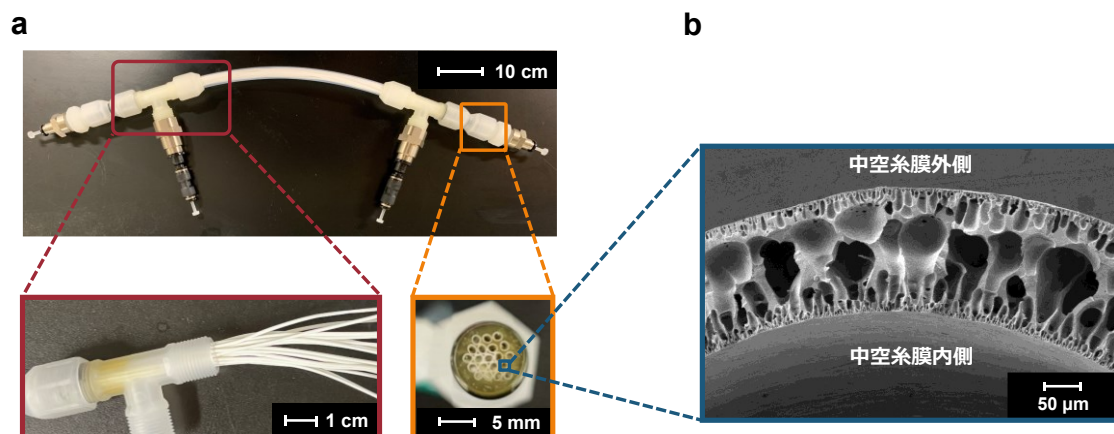


図 4-6 開発した中空糸膜コンタクターの写真および膜断面の SEM 画像

(a) 本研究で開発した中空糸膜コンタクターの写真。20 本の中空糸膜チューブがコンタクター内に設置されている。(b) 作成した中空糸膜の細孔構造を電界放出型走査電子顕微鏡 (Field Emission-Scanning Electron Microscopy; FE-SEM) で撮影した写真。写真は中空糸膜の断面を示している。

まず、フェノールを含む YPG 培地 (水相) とトリブチリン (有機相) の系で、水相のフェノールが有機相に抽出されるかを調査した。図 4-7_a に Pertraction システムの模式図を示すが、水相を中空糸膜コンタクターのシェル側に、有機相 (トリブチリン) を中空糸膜の内側に送液し、中空糸膜界面を介してフェノールを抽出できるように設計した。また、水相と有機相の流れは対向流となるように設計し、YPG 培地 (水相) およびトリブチリン (有機相) の流速はそれぞれ 210 mL/min と 250 mL/min とした。この系では、Pertraction システム開始から 90 分で 41% のフェノールが水相から有機相に抽出された (図 4-7_b)。また、水相と有機相の間で溶媒の漏れは観察されなかった。

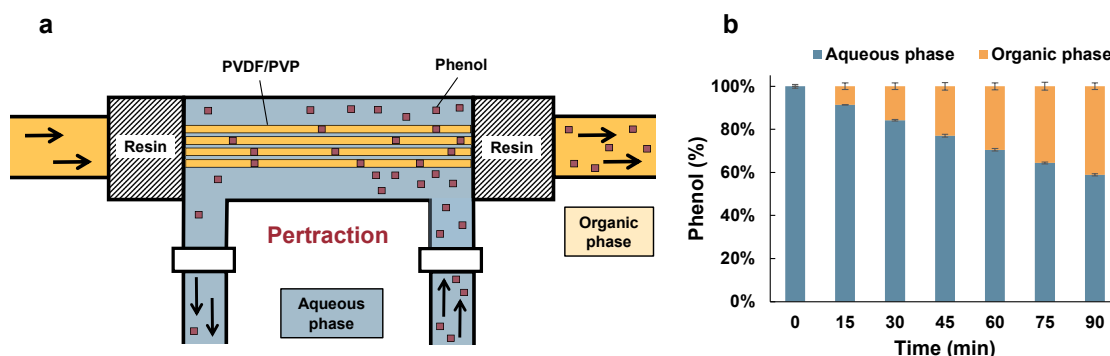


図 4-7 Pertraction システムの模式図および培地からのフェノール抽出

(a) 中空糸膜コンタクターによるフェノール抽出の模式図。矢印は水相および有機相の流れを示す。(b) フェノールを添加した YPG 培地 (水相) とトリブチリン (有機相) の系でのフェノール膜抽出試験の結果

を示す。水相の初期フェノール濃度を 500 mg/L として膜抽出を開始した。水相の流速は 210 mL/min、有機相の流速は 250 mL/min とした。水相および有機相のフェノール濃度を 15 分ごとに測定し、各相のフェノール分配比を算出した。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

4.2.4 微生物培養系と膜抽出技術のカップリング

最後に、「ピキア酵母を用いたフェノール生産系」と「中空糸膜を用いたフェノール膜抽出システム」を組み合わせ、連続的なバイオフェノール発酵生産システムの確立を目指した（図 4-8）。酵母が培養液（水相）で生産したフェノールは、中空糸膜コンタクター内の中空糸膜界面を介して抽出溶媒（有機相）に抽出され、培養液中のフェノール濃度が低下し、酵母自体は再び発酵槽に戻されフェノールを生産し続けることを目指した（図 4-8）。

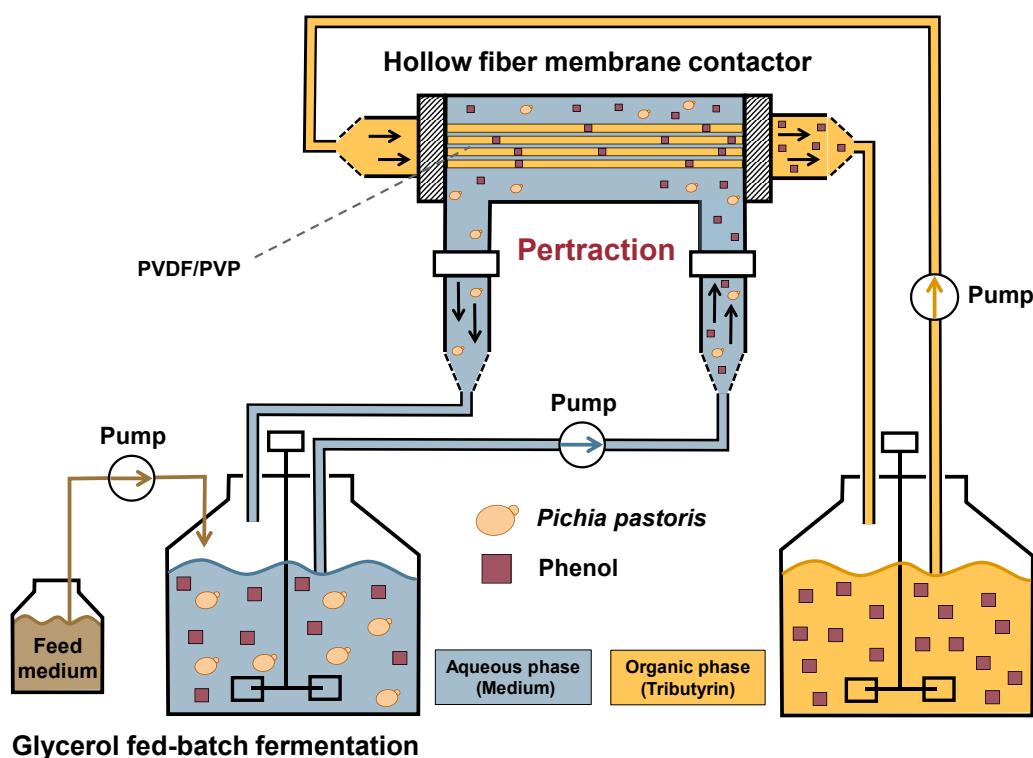


図 4-8 微生物培養系と膜抽出システムの組み合わせ（概要図）

青色は微生物培養液（水相）の流れ、黄色はフェノール抽出用有機溶媒（有機相；トリブチリン）の流れを示す。矢印は水相、有機相のそれぞれの流れを示す。

膜抽出モジュールを用いて、培養開始から 30-48 時間、54-72 時間、78-96 時間の 3 回に分けて培養液からフェノールを抽出したところ、培養 144 時間後の総フェノール生産量は 3304 mg/L に達し、膜抽出システムを導入していない流加培養でのフェノール生産量と比較して 214%向上した（図 4-9_a）。また、膜抽出中は培養液中のフェノール濃度は

500 mg/L 以下に保たれていた。更に、膜抽出終了後も培養液中のフェノール濃度は向上し続け、培養 120 時間までに培養液中のグリセロールはすべて消費されていた(図 4-9_b)。

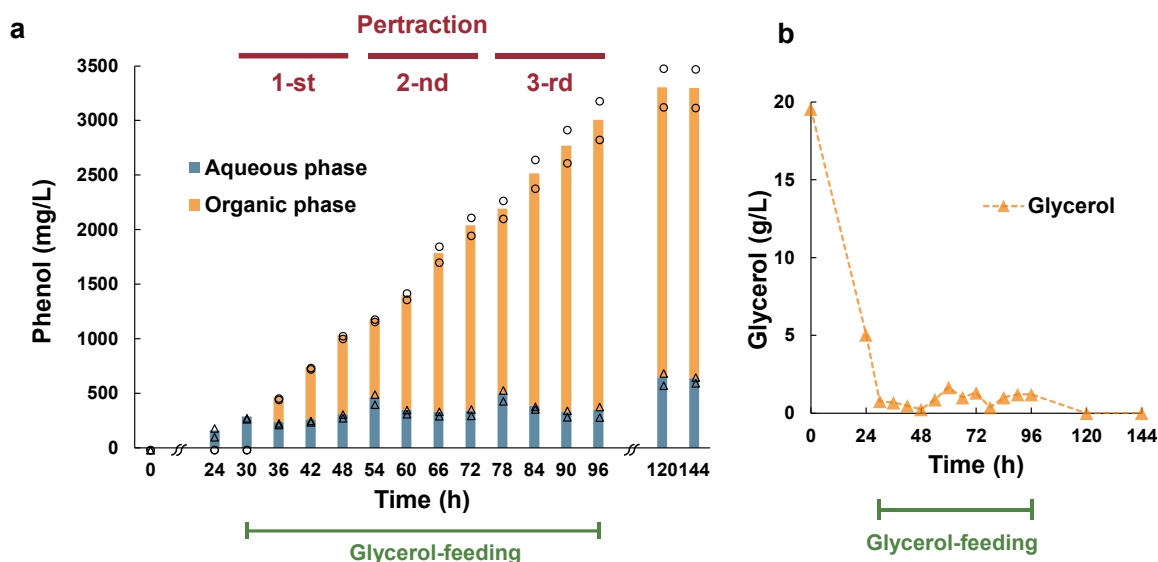


図 4-9 膜抽出技術を組み合わせたバイオフィェノール生産

47m-TPL 株（フェノール生産株）を、1 L の YPG 培地を含む 2 L Jar fermentor を用いて、30℃、pH = 6.0 の条件で流加培養をおこなった。攪拌速度を 300 rpm~600 rpm の間で変化させ、培養液中の溶存酸素(DO)濃度を 20%に維持した。また、培養 30 時間から 96 時間の間、フィード液(50 g/L Yeast extract、100 g/L Peptone、200 g/L Glycerol) を 5 mL/h の流量で添加した（緑線で示す）。**(a)** 培養液からのフェノール抽出は、赤線で示すように、培養 30-48 時間、54-72 時間、78-96 時間の 3 回行った。青およびオレンジの棒グラフは、水相（培養液）および有機相（トリブチリン）のフェノール濃度を示す。数値は、培養液（水相）あたりの濃度に換算している。データは 2 回の独立した実験として取得し、棒グラフの値はその平均を示す。また、○と△は 2 回の実験の実測値を示す。**(b)** 膜抽出技術を組み合わせたバイオフィェノール生産試験における 47m-TPL 株のグリセロール消費を示す。データは 2 回の独立した実験として取得し、グラフは 2 回の実験の平均値を示している。

これらの結果から、培養液から疎水性化合物であるフェノールを抽出することで、ピキア酵母への毒性を軽減させ、ピキア酵母にフェノールを生産させ続けることに成功した。本研究成果は、中空糸膜コンタクターと流加培養を組み合わせ、微生物への毒性低減に成功した初めての報告である。今後、膜素材の検討や使用する中空糸膜の本数を増やすことで、より効率的にフェノールの抽出を行うことができると考えられる。本研究で開発した手法は、微生物に対して毒性の高い化合物を発酵生産する際のアプローチの一つとして応用できるだろう。

4.3 小括

本研究では、芳香族化合物のような疎水性化合物を微生物で生産させる場合、生産した疎水性化合物が培養液中に一定量以上蓄積すると、微生物に対して毒性を示し、微生物の生育阻害や物質生産性の低下を引き起こすことに着目し、ピキア酵母を宿主とするフェノール生産を例に、「酵母を用いたバイオフェノール生産系」と「中空糸膜を用いたフェノール膜抽出システム」を組み合わせることで、酵母に対して毒性の大きいフェノールの生産量を大きく向上させることに成功した。

中空糸膜モジュールの最適化（膜素材や中空糸膜の本数の検討など）によって、微生物培養液からより効率的にフェノールを抽出できる可能性がある。本研究で開発した技術は、微生物にとって毒性の高い様々な疎水性化合物の発酵生産や発酵生産物の分離にも応用できるだろう。

4.4 実験手法

・使用菌体、培地、プラスミド

本研究では、フェノール生産株（47m-TPL 株）を用いて実験を行った。ピキア酵母の培養は、20 g/L のグリセロールを含む YPG 培地を使用し、必要に応じて抗生物質を加えた。培養は特記がない限り 30℃、150 rpm で行った。本研究で使用した菌体、培地組成、プラスミド等の詳細は全て、第 2 章に記載している。

・二相培養

47m-TPL 株を、YPG 培地 5 mL を含む試験管に播種し、30℃、150 rpm の条件で 24 時間前培養した。前培養後の菌体を滅菌水で 2 回洗浄した後、20 mL の YPG 培地を含む 100 mL のバツフルなし三角フラスコに、初期 $OD_{600} = 0.05$ となるように植菌し、30℃、150 rpm の条件で培養試験を行った。培養 48 時間時点で 5 mL の有機溶媒（トリブチリン）を水相：有機相が 4：1（v/v）となるように添加した。サンプルは 24 時間ごとに採取し、水相および有機相中のグリセロールまたはフェノール濃度をそれぞれ測定した。

・Jar fermentor での流加培養

47m-TPL 株を、20 mL の YPG 培地を含む 100 mL 三角フラスコに播種し、30℃、150 rpm の条件で 48 時間前培養した。前培養後の菌体を滅菌水で 2 回洗浄した後、1 L の YPG 培地を含む 2 L の Jar fermentor に初期 $OD_{600} = 5$ となるように植菌した。培養は 30℃で行い、通気量は 100 mL/min に維持した。培養液の pH は、5 N アンモニウム水溶液の自動添加により 6.0 に維持し、必要に応じて消泡剤を添加した。攪拌速度を 300 rpm～600 rpm の間で変化させ、培養液中の溶存酸素（DO）濃度を 20%に維持した。フィード液（50

g/L yeast extract、100 g/L peptone、200 g/L glycerol) は、培養開始 30 時間～96 時間の間、平均 5 mL/h の速度で Jar fermentor に添加した。

・フェノール耐性試験

P. pastoris CBS7435 $\Delta dnI4$ $\Delta his4$ 株 (コントロール株) を用いて、フェノール耐性試験を行った。前培養は、YPG 培地 5 mL を入れた試験管に菌体を播種し、30℃、150 rpm の条件で 24 時間前培養した。前培養後の菌体を滅菌水で 2 回洗浄した後、5 mL の YPG 培地を含む L 型試験管に、初期 $OD_{600} = 0.05$ となるように植菌し、30℃、40 rpm の条件で培養試験を行った。細胞の増殖は、バイオフィトレコーダー (TVS062CA, Advantec, Tokyo, Japan) を用いて OD_{660} を 20 分間隔で自動測定した。

・代謝物の分析

培養上清中のグリセロール濃度の定量には、Aminex HPX-87H カラムと RID-10A 検出器を装備した HPLC を使用した。カラムオーブンは 65℃ に維持し、移動相には 5 mM H_2SO_4 を使用し、0.6 mL/min の流速で稼働した。

フェノール濃度の定量には、COSMOSIL 5C18-AR-II カラム ($4.6 \times 250 \text{ mm}^2$, 5 μm particle size; Nacalai Tesque) と SPD-20A UV/VIS 検出器を装備した HPLC を使用した。フェノールは 275 nm の吸光度で検出した。カラムオーブンは 30℃ に維持し、移動相には 0.1% (v/v) ギ酸水溶液とアセトニトリル (30:70; v/v) を使用し、1.0 mL/min の流速で稼働した。

・中空糸膜の作製

ポリフッ化ビニリデン (PVDF)、ジメチルアセトアミド (DMAc)、ポリビニルピロリドン (PVP, K90) を、ARKEMA K.K. (Tokyo, Japan)、Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan)、FUJIFILM Wako Pure Chemical からそれぞれ購入した。PVDF/PVP 素材の中空糸膜の作製には、Non-solvent Induced Phase Separation (NIPS)法を用いた [73]。具体的な操作を以下に示し、製膜に用いた装置の概要図を図 4-10 に示す。

- ① 18% (w/v) PVDF、2% (w/v) PVP、80% (w/v) DMAc のポリマー溶液を調整し、ドープタンク内で一晩攪拌した。
- ② 凝固浴槽を 70 L の水道水で満たし水温を 40℃ に保った。また、凝固液タンク (Coagulating liq. tank) に脱気した Milli-Q 水 1 L を準備した。
- ③ 二重管ノズルの外側にポリマー溶液を、内側に凝固液である Milli-Q 水を吐出し、凝固浴槽に浸漬することで中空糸膜を製膜した。この時ギャップ長は 15 cm、中空糸膜の巻き取り速度は 5.5 m/min とした。

- ④ 製膜した中空糸膜を水道水に 2 日間浸漬して洗浄した。
- ⑤ 作製した中空糸膜を 50% (w/v) のグリセロール溶液に 3 日間浸漬し、50℃で乾燥させた。

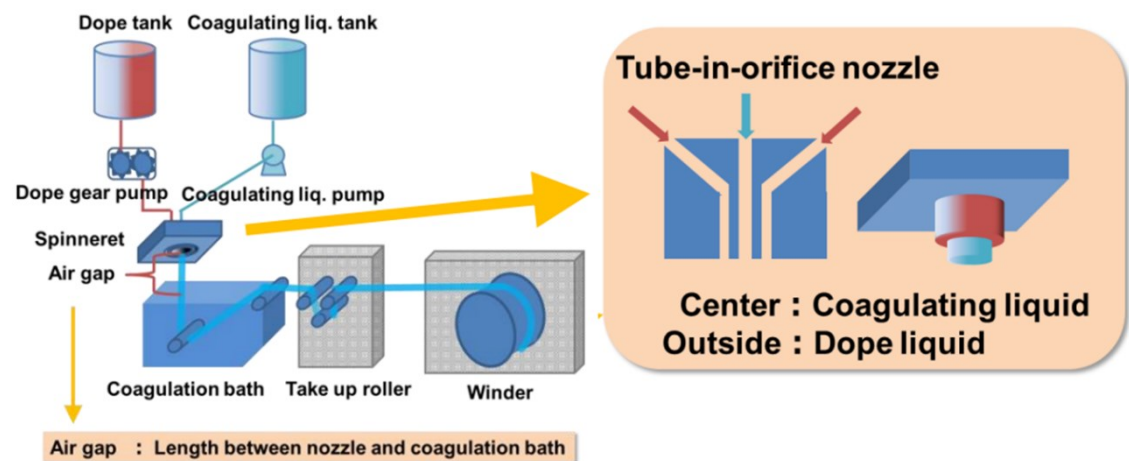


図 4-10 NIPS 法による中空糸膜紡績プロセス

中空糸膜コンタクター（モジュール）の作製

開発した中空糸膜コンタクターの写真および特性を、それぞれ図 4-6 と表 4-1 に示す。乾燥させた PVDF/PVP 中空糸膜の束を、長さ 31 cm、内径 1 cm の perfluoroalkoxy-alkane (PFA) チューブに 20 本充填した。このとき、充填密度 (PDF : packing density of the hollow fiber) は 44%、膜の外表面積は 213 cm²であった。チューブの端はポリウレタン樹脂でポッティングした。PFA チューブの両端にはポリプロピレン製のチーズユニオンを取り付けた。チーズユニオンのシェル側接続部とボア側接続部には、それぞれチューブ継手を取り付けた。

表 4-1 開発した中空糸膜コンタクターの特徴

Characteristic	Data
Membrane/Hydrophilic additive	Polyvinylidene difluoride (PVDF) / Polyvinylpyrrolidone (PVP)
Number of hollow fiber membrane	20 fibers
Fiber length	31 cm
Packing density	44%
Porosity	87.3%
Fiber internal diameter	1080 μm

Fiber external diameter	1470 μm
Membrane inner surface pore size	0.063 μm
Membrane outer surface pore size	0.037 μm

・中空糸膜コンタクターを用いた培養液からのフェノール抽出

中空糸膜コンタクターを用いたフェノール膜抽出（Pertraction）は対向流で行い、水相（水またはフェノールを含む培養液）は中空糸膜コンタクターのシェル側に、有機相（トリブチリン）は中空糸膜の内側に送液した（図 4-7_a）。水相と有機相の流速はそれぞれ 210 mL/min と 250 mL/min とした。特記がない限り、Pertraction に使用する水相および有機相の溶媒はそれぞれ 500 g および 300 g とした。各サンプル中のフェノール量は、前述の代謝物分析法で測定した。

「ピキア酵母を用いた流加培養」と「中空糸膜を用いた Pertraction システム」を組み合わせる場合、流加培養は前述の「Jar fermentor での流加培養」と同様の条件で行った。中空糸膜コンタクターは、Pertraction に使用する前に、99.5%エタノールをモジュールのシェル側と中空糸膜の内側にそれぞれ 20 分間送液して滅菌した。水相（培養液）の流速は 210 mL/min、有機相（トリブチリン）の流速は 250 mL/min とした。培養液からのフェノール抽出は、培養 30 時間～48 時間、54 時間～72 時間、78 時間～96 時間の 3 回行った。中空糸膜コンタクターは毎回新しいものを使用した。抽出開始から 6 時間ごとに培養液（水相）とトリブチリン（有機相）を回収し、OD₆₀₀、培養液中のグリセロール濃度、両相中のフェノール濃度を測定した。

4.5 参考資料および引用文献

[60] Kahru, A. *et al.*, The toxicity and fate of phenolic pollutants in the contaminated soils associated with the oil-shale industry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2002, **9**, 27–33

[61] Krastanov, A. *et al.*, Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Eng. Life Sci.*, 2013, **13**, 76–87

[62] Prpich, G. P. *et al.*, A novel solid-liquid two-phase partitioning bioreactor for the enhanced bioproduction of 3-methylcatechol. *Biotechnol. Bioeng.* 2007, **98**, 1008–1016

[63] Kim, B. *et al.*, Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway. *Biotechnol. Bioeng.* 2014, **111**,

- [64] Malik, S. *et al.*, Living between two worlds: Two-phase culture systems for producing plant secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2013, **33**, 1–22
- [65] Kleinegris, D. M. M. *et al.*, Two-phase systems: Potential for in situ extraction of microalgal products. *Biotechnol. Adv.* 2011, **29**, 502–507
- [66] Červeňanský, I. *et al.*, Pertraction-adsorption in situ product removal system: design and mathematical modeling. *Chem. Eng. Process.* 2019, **143**, 107604
- [67] Khalid, A. *et al.*, Membrane separation processes for dehydration of bioethanol from fermentation broths: Recent developments, challenges, and prospects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2019, **105**, 427–443
- [68] Gössi, A. *et al.*, In-situ recovery of carboxylic acids from fermentation broths through membrane supported reactive extraction using membrane modules with improved stability. *Sep. Purif. Technol.* 2020, **241**, 116694
- [69] Combes, J. *et al.*, In-stream product recovery of *p*-coumaric acid heterologously produced: Implementation of a continuous liquid-liquid extraction assisted by hollow fiber membrane contactor. *Sep. Purif. Technol.* 2022, **293**, 121083
- [70] Kim, B. *et al.*, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of phenol from glucose. *Biotechnol. J.* 2013, **9**, 621–629
- [71] Burge, G. *et al.*, Towards an extractive bioconversion of 3-hydroxypropionic acid: study of inhibition phenomena. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2017, **92**, 2425–2432
- [72] Yabuno, Y. *et al.*, Preparation of polyamide–PVDF composite hollow fiber membranes with well-developed interconnected bicontinuous structure using high-temperature rapid NIPS for forward osmosis. *J. Memb. Sci.* 2020, **612**, 118468
- [73] Hashino, M. *et al.*, Effect of kinds of membrane materials on membrane fouling with BSA. *J. Memb. Sci.* 2011, **384**, 157–165

第5章 イノベーション・アイデア

5.1 イノベーション・アイデアの概要

5.1.1 先端研究を通して得られたブレイクスルー

筆者は先端研究を通して、以下の3つのブレイクスルーを得た。

- ① ピキア酵母は芳香族化合物群の発酵生産に優れた宿主である [16]
- ② ピキア酵母はグリセロールを効率良く芳香族化合物群に変換可能である [17]
- ③ 微生物培養系と膜抽出技術とを組み合わせることで、微生物にとって毒性の高い化合物でも発酵法により高生産できる [18]

以下では、これらの先端研究で得られたブレイクスルーを活かしたイノベーション・アイデア、およびその実現に向けたビジネスモデルについて述べる。

5.1.2 価値提案

筆者は、先端研究で得られたブレイクスルー「ピキア酵母がグリセロールを原料に芳香族化合物群を高生産できる」を踏まえ、イノベーション・アイデアとして【バイオ燃料（BDF/SAF）製造過程で生じるプロセス残渣「グリセロール」を原料とした芳香族化合物生産】を提案する（図5-1）。提案する価値は2つあり、1つ目は、バイオ燃料製造コストの低減、2つ目は、プロセス残渣であるグリセロール残渣を原料とした高付加価値化合物の生産である。

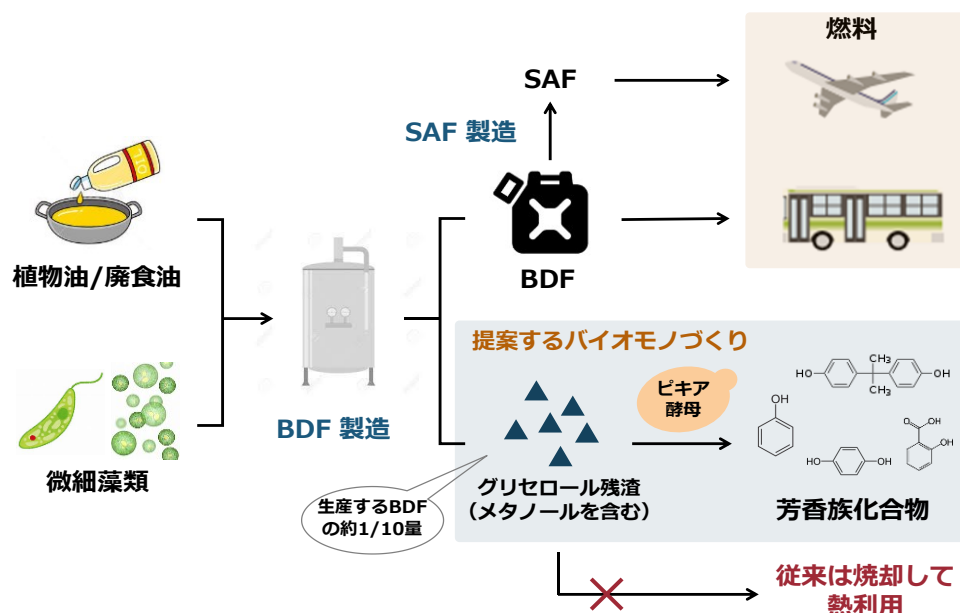


図5-1 提案するバイオものづくり

BDF: biodiesel fuel; SAF: sustainable aviation fuel

5.2 着想に至った背景

5.2.1 現代社会とエネルギー

エネルギーは、衣・食・住・労働・移動・娯楽など現代社会のあらゆる分野で利用されており、日常生活や社会活動を維持していくために不可欠である [74]。しかしながら、経済成長や大幅な人口増加に伴い、世界のエネルギー消費量は増加の一途をたどっており、1980年に約 68 億トンであった世界のエネルギー消費量は、2020 年には約 2 倍の 133 億トンに達した（図 5-2_左）。特に、2000 年代以降、アジア太平洋地域の新興国における工業化やモータリゼーションの進展により、エネルギー消費量の伸びは大きくなっており、世界のエネルギー消費量は 2030 年には約 160 億トンに達すると予測されるなど、今後も増加傾向にある。2020 年のエネルギー源別の消費量内訳は、石炭：27.2%、石油：31.2%、天然ガス：24.7%、原子力：4.3%、水力：6.9%、再生エネルギー：5.7%であり、世界のエネルギー消費に占める化石資源（石炭・石油・天然ガス）への依存度は 83.1%と極めて高い（図 5-2_左）。

日本国内の化石資源への依存度は、世界のエネルギー消費における化石資源への依存度よりも高く、2020 年時点で化石資源への依存度は約 85%であり、非化石資源の導入率はわずか 15%にとどまる（図 5-2 右）。

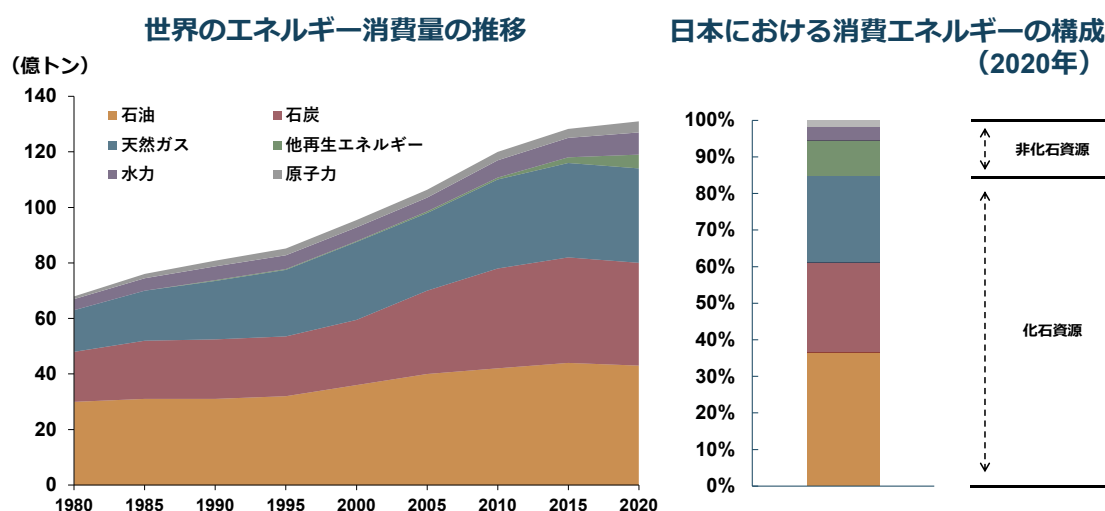


図 5-2 世界のエネルギー消費量の推移

「経済産業省_資源エネルギー庁、エネルギー白書 2022」[75] をもとに筆者が作成

5.2.2 エネルギー業界における脱炭素化の重要性

化石資源の燃焼による CO₂ の排出は、地球温暖化進行の直接原因の一つである温室効果ガスの排出に直結する。2020 年度の日本国内の温室効果ガス排出量は 11.5 億トンと推計

され、そのうち 91%の 10.4 億トン は CO₂ の排出によるものとされている [76]。化石資源の使用による CO₂ 排出量を部門別に見ると、エネルギー転換部門から 3.9 億トン（40.4%）、産業部門から 2.4 億トン（24.3%）、運輸部門から 1.7 億トン（17.0%）が排出されており、これらの部門で CO₂ 総排出量の 81.7%を占めている（図 5-3_左）。

中でも筆者は、運輸部門における CO₂ 排出に注目した。運輸部門における CO₂ 排出の大部分は、発電源と輸送用燃料の使用によるものであるが、2020 年の運輸部門における再生可能エネルギー導入率はわずか 4.1%にすぎない（図 5-3_右）。化石資源利用の代替として、発電源では発電時に CO₂ を排出しない太陽光発電や風力発電、バイオマス発電、人工光合成への移行、輸送用燃料では、自動車分野では電気自動車（Electric Vehicle; EV）や燃料電池自動車（Fuel Cell Vehicle; FCV）への移行、航空分野では持続可能な航空燃料（SAF）の導入が注目されており、今後、いかに導入率を高めていくかが課題となっている。特に、燃烧しても大気中の CO₂ 排出量を増やさず、化石燃料の代替となる「脱炭素燃料」の導入がカギと言えるだろう。

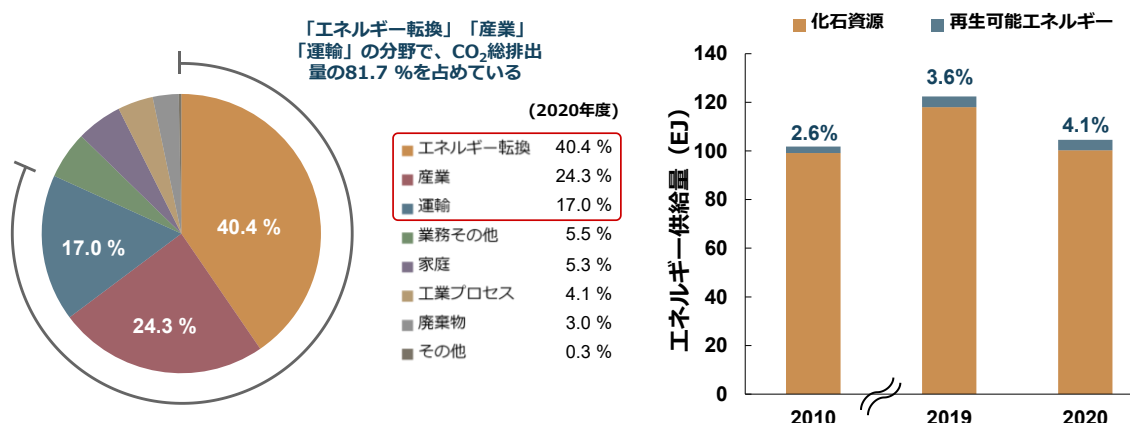


図 5-3 日本の CO₂ 排出内訳（左）と運輸部門の再生可能エネルギー導入率（右）

「令和 4 年版、環境・循環型社会・生物多様性白書」[77]をもとに筆者が作成

5.2.3 脱炭素燃料の使用によるカーボンニュートラル

近年、CO₂ の人為的な排出を実質ゼロ（ニュートラル）にする「カーボンニュートラル」という概念が注目されており、2015 年に国連が定めた「持続可能な開発目標（Sustainable Development Goals; SDGs）」の達成に向け、カーボンニュートラルへの取り組みは欠かせないテーマとなっている。例えば、バイオ燃料を例にすると、エネルギーを得るためにバイオ燃料を燃焼すると CO₂ が排出されるが、発生した CO₂ は原料となるバイオマスの光合成によって吸収（炭素固定）されるため、バイオ燃料を使用しても大気中の CO₂ の増減は実質的にゼロと考えることができる（図 5-4）。

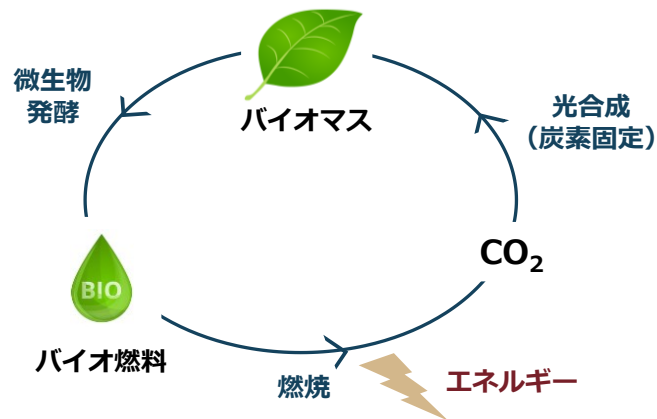


図 5-4 バイオ燃料の使用によるカーボンニュートラル

バイオ燃料（バイオエタノール・バイオディーゼル燃料（BDF）・持続可能な航空燃料（SAF）・バイオメタンガスなど）に加え、水素燃料、合成燃料なども脱炭素燃料として挙げられ [78]、従来の化石資源を利用する燃料製造法に代替する次世代の燃料製造法として大きな注目を集めている。特に SAF 製造は、市場拡大の余地が大きい急成長産業であり、現在、SAF 製造に関する研究・開発が世界中で進められている。

5.2.4 日本国内の SAF 市場および需要見通し

SAF（サフ）とは「Sustainable Aviation Fuel」の略で、エネルギー源として実質、永続的に使える航空機用燃料、特にジェット燃料の代替となるカーボンニュートラルな燃料を指す。従来からジェット燃料は化石資源由来の燃料に依存しており、CO₂ 排出量は人類の活動によって排出される CO₂ 総排出量のうちの 2%～3%（363 億トン）と言われている。CO₂ 排出量軽減の取り組みの中で、より排出量を削減するための手段として登場したのが SAF である。持続可能な原料から製造される SAF は、従来使用されてきた化石資源由来の燃料の使用と比較して、CO₂ 排出量を約 80%削減することができる。

2022 年 10 月に開催された第 41 回国際民間航空機関（International Civil Aviation Organization; ICAO）総会では、2024 年以降、国際線航空機が排出する CO₂ 排出量を 2019 年比で 15%削減する目標が掲げられた [79]。航空業界の各社はこの目標に沿った脱炭素化を求められており、SAF はこの目標を達成するために不可欠の要素と考えられている。

環境意識が特に高い北欧諸国（デンマーク、ノルウェー、スウェーデン、フィンランド）をはじめ、イギリス、フランス、ドイツ、オランダ、スペインでは、SAF の義務化や導入目標の設定を検討するなど、規制強化の動きが著しく、世界では、CO₂ 排出量の多い飛行機に乗るのは恥ずかしい「飛び恥（Flight Shame）」という言葉まで生まれている。今後、SAF を給油できない空港への飛行機の発着が敬遠される可能性も考えられ、日本国内で SAF 供

給体制を整備することは極めて重要である。

日本国内では、2030 年までにジェット燃料の 10%（約 200 万 kL）を SAF へ移行する目標が決められ、2050 年には約 2300 万 kL の SAF が必要になると予測されている（図 5-5）。しかしながら、現状では SAF の国産化は欧米に大きく遅れを取っており、海外調達も進んでいない。2023 年 5 月には、コスモ石油社や JGC 社、レボインターナショナル社の共同出資会社が国内初となる SAF 量産プラントの建設に着工すると発表した。しかしながら、プラントが稼働するのは 2025 年以降であり、SAF 生産量も年間約 3 万 kL（推測）にすぎず、2030 年の生産目標 200 万 kL には到底及ばない [80]。このように、急増する SAF 需要に供給が全く追いついていないのが現状である。日本が世界から取り残されないためには、SAF の生産・調達に本腰を入れて取り組む必要がある。

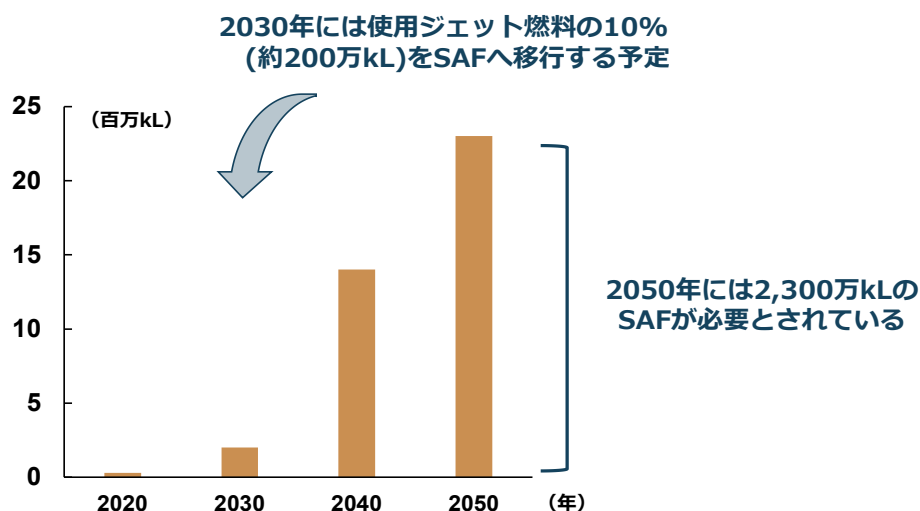


図 5-5 日本国内における SAF 需要見通し

「持続可能な航空燃料（SAF）国産化に向けた取組と事業機会_三井住友銀行」[81]をもとに筆者が作成

5.2.5 SAF 製造法

SAF の原料は、植物などのバイオマス、飲食店や日常生活で排出される廃棄物・廃食油などであるが、決定的な製造技術はなく、現在世界中で開発競争が行われている。世界的な SAF 需要の増加に供給が追いついていないため、様々な原料や燃料化プロセスの組み合わせも検討されている。SAF 製造プロセスを原料ごとに分けると、(1) セルロース系バイオマスを原料とした SAF 製造、(2) 都市ごみ・廃ガスを原料とした SAF 製造、(3) 微細藻類を原料とした SAF 製造、(4) 油脂（廃食油・植物油）を原料とした SAF 製造の 4 つに大別できる（図 5-6）。以下でそれぞれの製造法について説明する。

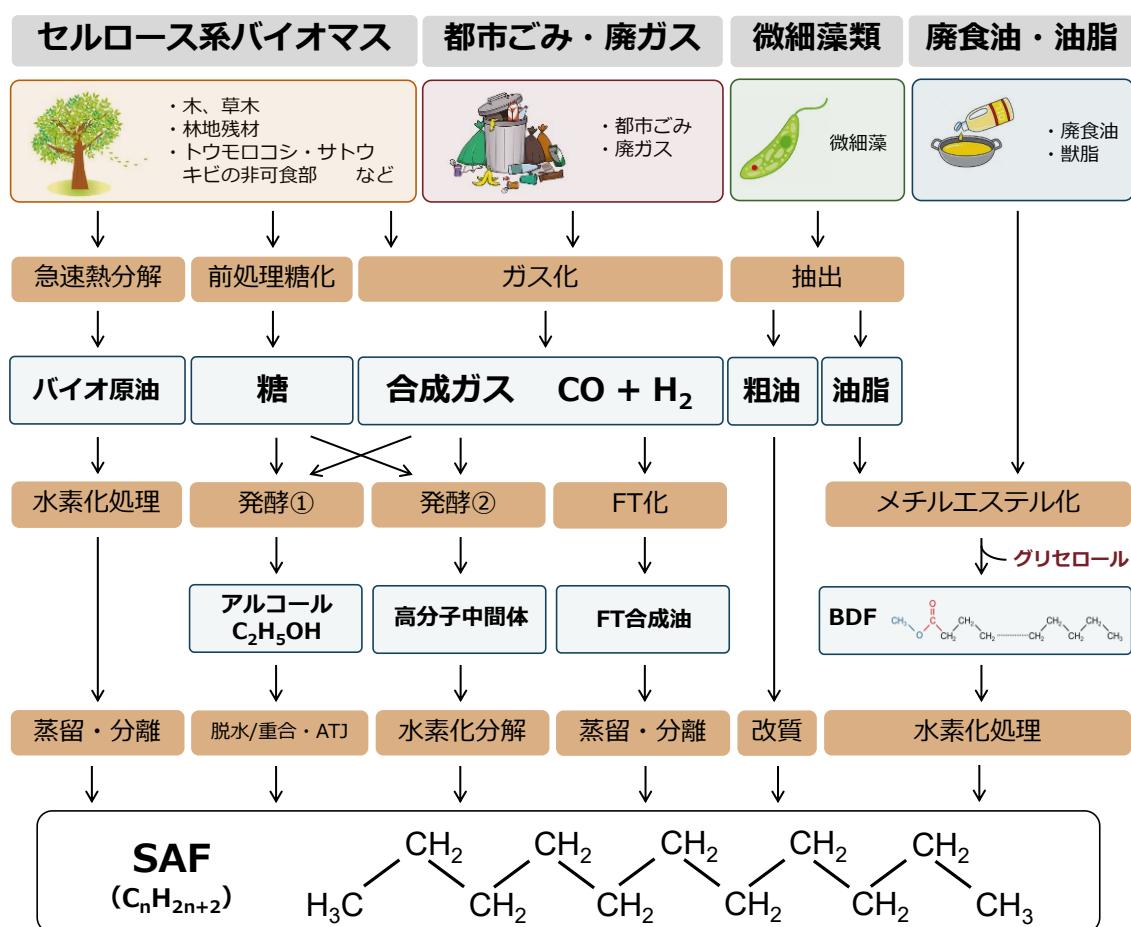


図 5-6 様々な原料からの SAF 製造法

「NEDO、次世代バイオ燃料（バイオジェット燃料）分野の技術戦略策定に向けて」[82]をもとに筆者が作成

① セルロース系バイオマスを原料とした SAF 製造法

セルロース系バイオマス（木質系、草本系など）を原料とする SAF 製造プロセスには、急速熱分解等によりバイオ原油に変換後、精製するプロセス、糖化・発酵を経由するプロセス、合成ガス（水素、一酸化炭素）を経由するプロセスの3種類がある（図 5-6）。糖化・発酵を経由するプロセスは、アルコールを経由するプロセスと高分子中間体（ファルネセンなど）を経由するプロセスに分けられ、合成ガスを経由するプロセスは、主に FT（Fischer-Tropsch）合成（熱化学的変換技術）を利用する。最も一般的な製造プロセスはアルコール経由のプロセスであるが、このプロセスではアルコールを SAF に変換するために、重合など多くの工程が必要となる。バイオジェット燃料を低コストで製造するためには、原料となるアルコールの低コストでの製造技術や、アルコールから炭化水素燃料への変換技術の低コスト化が必要である。米国のバイオベンチャー Amyris は高分子中間体（ファルネセン）を経由するプロセスでのバイオジェット燃料の生産に成功しているが、ファルネセンは化粧品などの高付加価値製品製造における原料でもあるため、コストの観点から、燃料製造よ

りも高付加価値製品製造に主眼が置かれている。

② 都市ごみ・廃ガスを原料とした SAF 製造法

都市ごみ・廃ガスを原料とする製造プロセスは、セルロース系バイオマスから合成ガスを経て SAF を製造するプロセスと類似しているが、合成ガスが都市ごみ・廃ガスから得られるため、組成と原料が異なる。この製造プロセスにおける大きな課題は、原料（都市ごみ・廃ガス）の選別と前処理技術の開発である。都市ごみ・廃ガスには多くの不純物が含まれており、夏場と冬場では成分も異なる。特に、都市ごみをそのままガス化すると、製造工程に関わる触媒の有害成分であるタール、硫黄、汚染物質などの不純物が発生することが多く、クリーンなガスを得るためには、これらの成分を除去する必要がある。また、製造規模を拡大し経済的なメリットを得るためには、必要な量の都市ごみを大量に収集することも重要である。

③ 微細藻類を原料とした SAF 製造法

微細藻類を原料とする製造プロセスには、微細藻類の代謝により生産された油脂を抽出し、メチルエステル化および水素化処理を施し製造するプロセス、②微細藻類に粗油（炭化水素）を生産させ、抽出した後、改質して製造するプロセスがある（図 5-6）。微細藻類を使用する利点は、単位面積当たりの油脂生産量が他の産油植物（例えば、大豆）に比べて多いことである [82]。この高い生産性が注目され、各国で微細藻類を原料とした SAF 製造プロセスの開発が進められている。しかしながら、現行の微細藻類を原料とした SAF 製造プロセスは栽培・収穫・脱水時に多くの労力とエネルギーを消費しており、今後のプロセス改善が不可欠である。また、エネルギー収支の観点だけでなく、経済性の観点からも、栽培・収穫・脱水のコスト削減、生産性や収率の向上が必要である。また、微生物代謝により炭化水素を直接生産させるには、*Botryococcus braunii* のような特定の菌株を使用する必要がある。しかしながら、これらの菌株についてはまだ不明な点が多く、この製造法に関しても今後のさらなる研究が不可欠である。

微細藻類を利用した生産プロセスはパイロットスケールまで開発されているが、実用化された例はまだない。

④ 油脂（廃食油・植物油）を原料とした SAF 製造法

油脂を原料とする製造プロセスでは、油脂をメチルエステル化して BDF を製造し、これを改質（水素化処理）するプロセスである（図 5-6）。メチルエステル化処理は、BDF 製造のための要素技術として商用段階の技術であり、水素化処理技術は一般的な石油精製技術であるため、この製造プロセスは技術的には成熟した変換技術である。しかしながら、原料

となる廃食油の入手ルートが少ないこと、植物油を原料とする場合には食料との競合の問題があることなどから、将来的な量的拡大が可能かどうかは不透明である。

5.3 イノベーション・アイデアの独自性および優位性

5.3.1 提案する新規バイオものづくり

これまで、エネルギー業界における脱炭素化の重要性（特に、SAF 普及拡大の重要性）について述べてきたが、現在のところ決定的な SAF 製造技術は存在せず、SAF に対する世界的な需要の急増に供給が全く追いついていない。SAF 製造プロセスには、前述したように 4 種類の製造プロセスがあるが、それぞれのサプライチェーンの規模は石油からのジェット燃料製造に比べて小さい。SAF 需要の増大に対応するためには、単一原料由来の SAF 製造サプライチェーンの構築だけでは限界があり、多様な原料を活用した複合的な SAF 製造サプライチェーンの構築が不可欠である。

筆者は、微細藻類および油脂（廃食油・植物油）を原料とした SAF 製造の普及・拡大を考えた場合、製造工程でプロセス残渣「グリセロール」が大量に発生することに着目した（図 5-6）。

そこで、先端研究で得られたブレイクスルー「ピキア酵母がグリセロールを原料に芳香族化合物群を高生産できる」をもとに、イノベーション・アイデアとして【**バイオ燃料（BDF/SAF）製造過程で生じるプロセス残渣「グリセロール」を原料とした芳香族化合物生産**】を提案する（図 5-7）。提案する価値は 2 つあり、1 つ目はバイオ燃料製造コストの低減、2 つ目はグリセロール残渣からの高付加価値化合物の生産である。

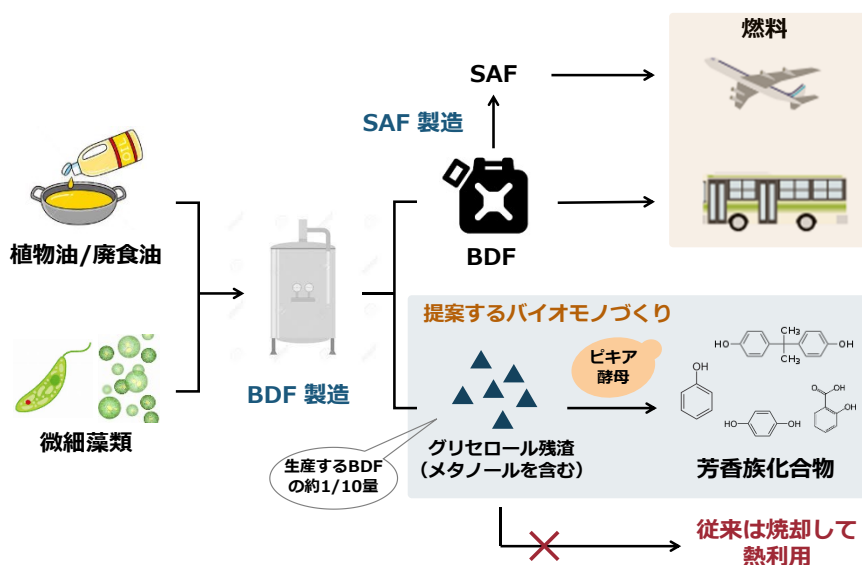


図 5-7 提案するバイオものづくり（図 5-1 の再掲）

BDF: biodiesel fuel; SAF: sustainable aviation fuel

5.3.2 本アイデアの優位性

本書で提案するイノベーション・アイデアの優位性は2つあり、「プロセス残渣であるグリセロール残渣を微生物の発酵原料として使用する点」「グリセロール残渣に含まれるグリセロールおよびメタノールの両方を微生物の発酵原料として使用する点」である。冒頭で述べたバイオものづくりのサプライチェーンに当てはめると、原料の観点で「安価で使われていない基質を原料とすること」、微生物の特性の観点で「ピキア酵母の特性を生かした効率的なバイオものづくり」が競争優位性となる（図5-8）。

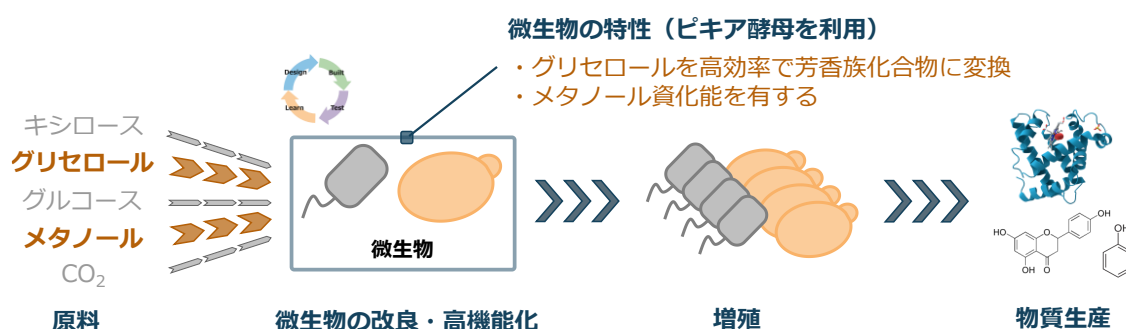


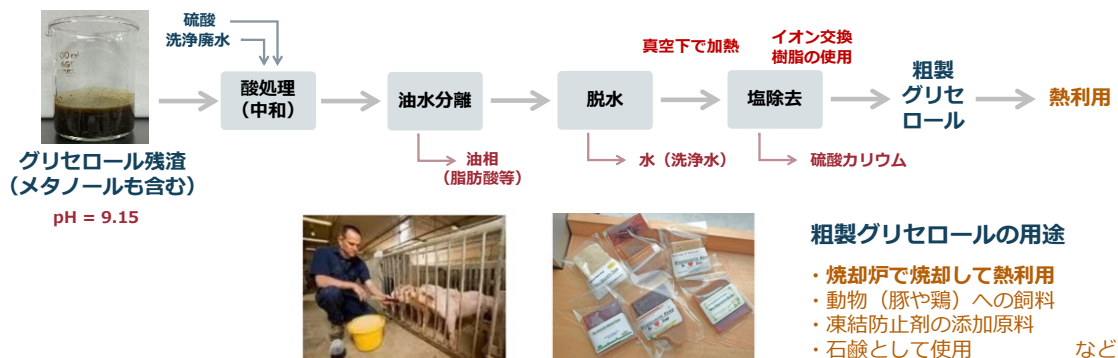
図 5-8 提案する新規バイオものづくりのサプライチェーン

BDF や SAF 製造時に生じるグリセロール残渣には、グリセロールの他に、未反応のメタノールや遊離脂肪酸、触媒として使用したカリウムやナトリウムなどの塩類が含まれる。これらの成分を含んだまま焼却すると、焼却炉の炉壁を傷める恐れがあるため、グリセロール残渣をそのまま焼却処分することはできない。そのため、グリセロール残渣は図 5-9_a に示すプロセスで粗精製された後、熱利用、家畜飼料、凍結防止剤の添加物、石鹼などに使用されている [83]。しかしながら、このグリセロール残渣の粗精製プロセスには「真空下で加熱」「イオン交換樹脂の使用」などのコストがかかる工程が含まれており、より低コストでグリセロール残渣を処理できるプロセスの開発が望まれる。本書で提案する微生物発酵法を応用したプロセスは、脱水、塩除去の工程を得ないため、より低コストにグリセロール残渣を処理できる（図 5-9_b）。更には、既存のグリセロール残渣の用途よりも付加価値の高い化合物を生産することが可能となる。また、ピキア酵母は元来、メタノール資化能を有しており、高濃度のメタノール存在下でも生育可能である（ほとんどの微生物は高濃度メタノール存在下では生育できない）。ピキア酵母を宿主とすることで、グリセロール残渣に含まれるグリセロールとメタノールの両方を原料に、高付加価値化合物を生産することが可能となる。

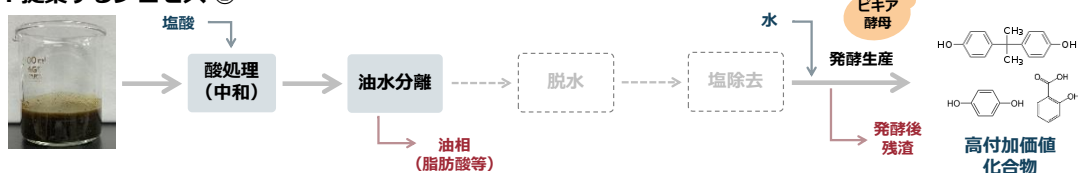
将来的には、酸処理（中和）、油水分離の工程も含まず、グリセロール残渣から直接、芳

香族化合物を発酵生産するプロセスも開発する（図 5-9_c）。

a : グリセロール残渣の粗精製フロー



b : 提案するプロセス ①



c : 提案するプロセス ②



図 5-9 イノベーション・アイデアの独自性および優位性

5.3.3 本事業におけるターゲット化合物

大学で得られた研究成果を社会に実装するためには、まず小さなビジネスを立ち上げ成功させることが重要であり、本書では、日本での事業を想定した戦略立案を試みる。そこで、まず初めに日本国内におけるバイオテクノロジー利用製品およびバイオ関連の製品・サービスの市場を調査した。2019 年に約 5 兆円であった市場規模は 2021 年には約 5.6 兆円に達し、更には 2023 年には 6.1 兆円まで拡大すると予測されており、今後も市場の拡大が期待される（表 5-1）。ここでは、市場が拡大しているバイオ製品およびサービスについてのみ言及するが、バイオテクノロジー利用製品に関しては、抗体医薬や核酸医薬などのバイオ医薬品の市場が大きく拡大している。伝統的な発酵産業の市場は堅調で、産業用酵素やバイオプラスチックの市場も拡大している。更には、ロシア・ウクライナ戦争による影響で GM 作物の輸入価格が急騰したことに関連し、遺伝子組換え作物の市場も大きく拡大している。バイオ関連の製品・サービスの市場では、生分解性プラスチックをはじめとするバイオベースの化成品、機能性表示食品の市場が拡大している（詳細は、参考資料_表 S5-1、S5-

2 をご覧いただきたい)。

表 5-1 日本のバイオ製品・サービスの市場

(単位：億円)

	2019 年度	2020 年度	2021 年度	2022 年度	2023 年度
A バイオテクノロジー利用製品					
《医薬品》					
抗体医薬	11890	12502	14839	16022	16654
抗体薬物複合体 (ADC)	0	287	524	756	928
核酸医薬	147	197	211	245	285
再生医療等製品	60	121	212	267	301
					など
《化成品・試薬・農薬》					
組換え産業用酵素	570	600	630	700	760
組換え生分解性プラスチック	10	20	30	35	40
					など
《農業・水産・畜産》					
組換えナタネ (輸入額)	1181	1069	1670	2462	2400
組換えダイズ (輸入額)	1242	1221	1662	2236	2192
組換えトウモロコシ (輸入額)	3536	3649	4785	6633	6449
					など
A バイオテクノロジー利用製品 (合計)	32386	327634	37882	42932	43648
B バイオ関連の製品・サービス					
《化成品》					
生分解性プラスチック	20	30	32	35	38
バイオマスプラスチック	120	140	151	164	176
					など
《食品》					
機能性表示食品	2500	3000	3278	3600	3960
					など
B バイオ関連の製品・サービス (合計)	17566	19014	17833	17564	17496
日本のバイオ製品・サービス市場 (A+B)	49952	51777	55715	60496	61144

(2019 年～2021 年は実測値、2022、2023 年は予測値)「日経バイオ年鑑 2021～2023」[84]を基に筆者が作成

(詳細につきましては、参考資料_表 S5-1、S5-2 をご覧ください)

2×2 分析

次に、本事業で生産すべきターゲット化合物を探索するため、これまでの日本におけるバイオテクノロジー利用製品・サービスを参考に 2×2 分析を行った。また、筆者は先端研究を通して、微生物にとって毒性の高い化合物であるフェノールを発酵生産させ、さらに膜抽出技術と組み合わせることで、微生物のフェノール生産性を大幅に向上させることに成功した。そこで、今回の 2×2 分析では、横軸に生産する製品のコスト、縦軸に生産する製品(化合物)の微生物への毒性の程度を基準とした(図 5-10)。

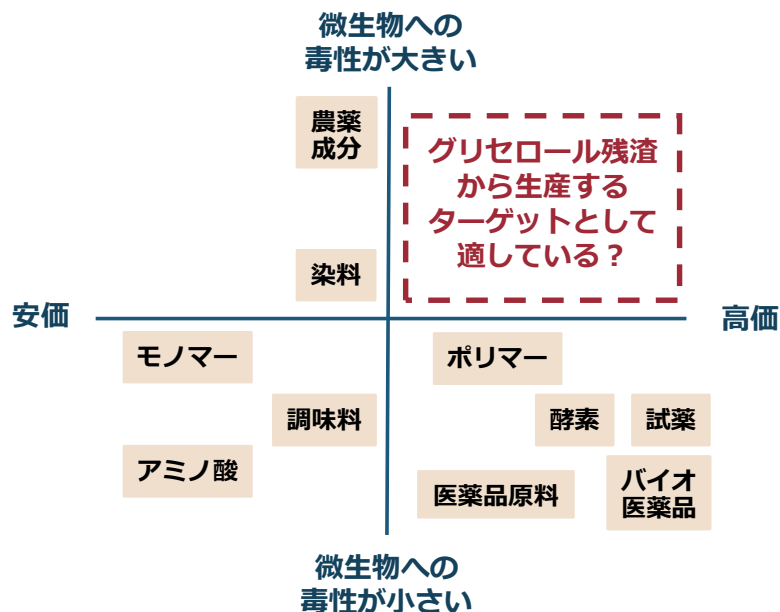


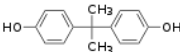
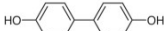
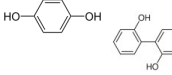
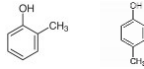
図 5-10 本事業におけるターゲット化合物に関する 2×2

第 2 象限に分類された農薬成分や染料を除き、バイオテクノロジーを利用した製品の多くは第 3 象限および第 4 象限に分類されており、いずれの製品においても微生物への毒性が小さいことが伺える。当然のことながら、微生物への毒性が大きい化合物をバイオテクノロジーで高生産するのは困難であるため、現在のバイオプロセスでは生産されていない。逆に言えば、これらの化合物をバイオテクノロジーで生産できれば、既存のバイオ関連事業と競合することなく事業を展開することが可能となる。

先端研究で開発した技術「微生物培養系と膜抽出技術との組み合わせによる微生物毒性の高い化合物の発酵生産技術」を応用すれば、微生物内に生合成経路さえ確立できれば、理論的にはどのような化合物でも微生物発酵で生産することが可能である。そこで本事業では、図 5-10 に示す 2×2 分析の第 1 象限に分類される高価かつ微生物への毒性が大きい化合物に着目した。具体的には、先端研究で生産したフェノールやフェノールから得られる誘導体（ビスフェノール A、ビフェノールなど）、ハイドロキノン等をターゲットとした（表 5-2）。これらの化合物の既存の製造方法は石油などの化石燃料からの精製に依存しており、バイオプロセスによる製造方法は未だ報告されていない。

表 5-2 本事業でのターゲット化合物、既存の製造法など

「2022 年版 17322 の化学商品 化学工業日報社」[85]を基に筆者が作成

化合物	既存の製造法	用途	価格・製造量	推定市場規模 (日本国内)	製造業者
フェノール 	クメン法、 コールタール（石炭酸油） を苛性ソーダで処理し、そ の後、蒸留・精製	消毒剤、各種樹 脂の原料、合成 香料、農薬	230～240 yen/kg 生産量：551,689 t 輸出量：39,421 t 輸入量：104,070 t	1450 億円	三菱ケミカルHD、 三井化学、 エア・ウォーター
ビスフェノールA 	アセトンとフェノールを強 酸触媒の存在下で脱水縮合	ポリカーボネー ト樹脂、エポキ シ樹脂の原料、 エンブラの原料	460 yen/kg 生産量：416,535 t 輸出量：181,200 t 輸入量：36,157 t	1250 億円	三菱ケミカルHD、 三井化学、日鉄ケ ミカル&マテリア ル、出光興産
ハイドロキノン 	①クメン法によるフェノ ール合成時に得られる副産物 (2,4-ジイソプロピルベ ンゼン)を酸化、②フェ ノールを過酸化水素で酸化	写真現像薬、ゴ ム薬品、染料中 間体、有機化合 物の重合防止剤	1600～1700 yen/kg 生産量：10,000 t 輸出量：不明 輸入量：448 t	172 億円	宇部興産、 三井化学
サリチル酸 	石炭酸ナトリウムの熱溶液 と炭酸ガスを反応 (Kolbe-Schmitt反応)	アゾ染料、防腐 剤、香料、角質 溶剤	550～650 yen/kg 生産量：2,600 t 輸出量：13 t 輸入量：805 t	20 億円	エービーアイコー ポレーション、
ビフェノール 	①ビフェニルをスルホン化 した後、アルカリ融解、② 2,6-ジ-tert-ブチルフェノ ールを高温酸化カップリング し、その後、脱ブチル化	液晶ポリマー、 ポリイミドの原 料、合成樹脂の 改質剤	市場価格不明 生産量：不明 輸出量：不明 輸入量：不明	不明	三菱ケミカルHD、 本州化学工業
クレゾール 	コールタールを蒸留・精製	消毒剤、合成樹 脂、ワニス、薬 品原料、農薬、	市場価格不明 生産量：不明 輸出量：1,261 t 輸入量：6,464 t	不明	JFEケミカル、 三井化学、 河野薬品

5.4 小括

筆者は、将来的なバイオ燃料の普及拡大を考えた場合、BDF/SAF 製造プロセスにおけるプロセス残渣「グリセロール」が大量に発生することに着目し、筆者が先端研究で得られた技術的ブレイクスルー「ピキア酵母がグリセロールを炭素源に芳香族化合物群を高生産できる」を踏まえ、【バイオ燃料（BDF/SAF）製造過程で生じるプロセス残渣「グリセロール」を原料とした芳香族化合物生産】をイノベーション・アイデアとして提案した。提案する価値は2つあり、1つ目はバイオ燃料製造コストの低減、2つ目はプロセス残渣であるグリセロール残渣を原料とした高付加価値化合物の製造である。

以降の章では、本イノベーション・アイデアを実現するための各種戦略を示す。

5.5 参考資料および引用文献

表 S5-1 日本におけるバイオテクノロジー利用製品の市場

バイオテクノロジー利用製品	2019 年度	2020 年度	2021 年度	2022 年度	2023 年度
<医薬品>					
酵素製剤	516	562	610	603	622
血液凝固線溶系因子製剤	983	748	827	806	782
ホルモン	2785	2706	2873	2985	3022
インターフェロン類	70	59	52	43	40

エリスロポエチン類	1004	614	509	425	366
サイトカイン類	417	401	415	424	426
抗体医薬	11890	12502	14839	16022	16654
抗体薬物複合体（ADC）	0	287	524	756	928
融合蛋白質製剤	1621	1648	1692	1828	1897
核酸医薬	147	197	211	245	285
再生医療等製品	60	121	212	267	301
動物用組換え医薬品（IFN、抗体、EGF など）	20	20	20	20	20
動物用ワクチン（非組換え含む）	510	520	530	540	550
《化成品・試薬・農薬》					
組換えニトトリヒドラーゼ生産物	100	100	100	100	100
洗剤（組換え酵素配合）	2000	2000	2000	2000	2000
組換え研究用試薬類	480	500	520	540	560
組換え産業用酵素	570	600	630	700	760
組換え BT 剤	12	12	12	12	12
組換えアミノ酸・調味料	3000	3000	3000	3000	3000
組換え生分解性プラスチック	10	20	30	35	40
《農業・水産・畜産》					
組換えナタネ（輸入額）	1181	1069	1670	2462	2400
組換えダイズ（輸入額）	1242	1221	1662	2236	2192
組換えトウモロコシ（輸入額）	3536	3649	4785	6633	6449
組換えワタ（輸入額）	200	174	124	214	203
組換えカーネーション	8	8	8	8	8
組換えバラ	1	1	1	1	1
遺伝子組換え実験動物	23	24	25	26	27
ゲノム編集トマト	0	0	0.5	1	2
ゲノム編集マダイ	0	0	0.03	0.1	1
A バイオテクノロジー利用製品	32386	32763	37882	42932	43648

表 S5-2 日本におけるバイオ関連の製品・サービスの市場

バイオ関連の製品・サービス	2019 年度	2020 年度	2021 年度	2022 年度	2023 年度
《機器・試薬》					
液体クロマトグラフ（HPLC）	500	500	499	509	519
液体クロマトグラフ質量分析装置（LC/MS）	200	200	220	250	280
ガスクロマトグラフ（GC）	82	94	107	108	110
ガスクロマトグラフ（GC/MS）	90	81	91	96	100
遺伝子導入装置（エレクトロポレーション法）	4	4	4	4	3
トランスフェクション用試薬	12	11	10	10	10
ゲノム編集用試薬（ノックイン・アウト・ダウン）	11	12	13	13	14
PCR 装置	9	9	10	11	12
リアルタイム定量 PCR 装置	24	53	49	40	32
PCR/リアルタイム PCR 関連試薬	8	8	8	10	12
電気泳動装置・消耗品（スラブゲル）	39	38	40	42	44
マイクロチップ/キャピラリー電気泳動装置	19	13	16	18	22
DNA シーケンサー（NGS 含む）	48	46	51	59	65
シーケンス関連品（試薬・消耗品・前処理装置）	111	119	135	153	171
核酸抽出・精製用試薬	59	74	74	74	74
DNA マイクロアレイと関連製品	23	20	19	20	20
生体分子間相互作用解析装置	9	10	9	15	16
イメージングアナライザー	14	10	9	15	16
<i>in vivo</i> イメージング装置	5	16	21	31	40
シングルセル解析装置	7	5	6	7	7

フローサイトメーター/セルソーター	58	63	69	78	86
フローサイトメーター用試薬	32	32	34	36	38
細胞形態解析装置	14	15	16	17	19
自動細胞破壊装置	14	11	14	16	17
分光光度計（ライフサイエンス用途）	8	8	8	9	10
マイクロプレートリーダー	25	28	28	28	29
ピペット	35	38	40	41	42
ピペット消耗品（チップなど）	46	52	72	66	80
分注ロボット	34	30	52	55	58
その他ライフサイエンス向け製品	40	50	60	70	75
《サービス》					
DNA 受託合成サービス	24	25	24	25	24
ペプチド受託合成サービス	38	40	40	50	50
遺伝子解析サービス	140	150	155	160	165
DTC 遺伝子検査サービス	30	30	30	30	30
組換え食品検査サービス	12	12	12	12	12
蛋白質受託生産（微生物、動物細胞、カイコ、タバコ等）	100	105	107	110	115
薬物動態試験受託サービス	100	100	98	95	93
《医薬原料、診断薬》					
ヒアルロン酸 医薬品	500	500	500	500	500
DNA プローブ診断薬	170	175	180	185	190
医療用バイオセンサー（試験紙、装置類含む）	620	630	640	650	660
クリニカルシーケンス	15	30	45	50	55
《化成品》					
生分解性プラスチック	20	30	32	35	38
バイオマスプラスチック	120	140	151	164	176
セルロースナノファイバー	60	60	60	100	120
《食品》					
酵母製品	200	200	200	200	200
異性化糖	1500	1500	1500	1500	1500
チーズ	2000	2100	2200	2250	2300
プロバイオティクス	1800	2000	2000	2100	2200
機能性表示食品	2500	3000	3278	3600	3960
特定保健用食品（トクホ）	6000	6500	4760	3810	3050
《農業・水産・畜産》					
生物農薬・フェロモン	37	37	37	37	37
B バイオ関連の製品・サービス	17566	19014	17833	17564	17496
日本のバイオ製品・サービス市場（A+B）	49952	51777	55715	60496	61144

注） 2021/2019 比で市場が 10%以上拡大しているものを赤文字で示す（単位：億円）

（2019 年～2021 年は実測値、2022、2023 年は予測値）「日経バイオ年鑑 2021～2023」[84]を基に筆者が作成

参考文献

[74] 経済産業省_資源エネルギー庁、エネルギー白書 2013

[75] 経済産業省_資源エネルギー庁、エネルギー白書 2022、
<https://www.enecho.meti.go.jp/about/whitepaper/2022/pdf/>

[76] United Nations Environment Program, Annual Report, 2022,

<https://www.unep.org/annualreport/2022/>

[77] 環境省、令和 4 年版、環境・循環型社会・生物多様性白書、2022、

<https://www.env.go.jp/policy/hakusyo/r04/pdf.html>

[78] The Asahi Shimbun SDGs Action、「脱炭素化に向けて注目のバイオ燃料 原料や問題点、作り方などを解説」、2022、<https://www.asahi.com/sdgs/article/14661874>

[79] 日本経済新聞、「国際線「50 年 CO₂ ゼロ」目標を採択 国際民間航空機関」、2022 年 10 月

[80] 日本経済新聞、「コスモ石油など、再生航空燃料を量産へ 国内初」、2023 年 5 月

[81] 持続可能な航空燃料（SAF）国産化に向けた取組と事業機会、三井住友銀行、コーポレート・アドバイザリー本部、企業調査部、

https://www.smbc.co.jp/hojin/report/investigationlecture/resources/pdf/3_00_C_RSDReport124.pdf

[82] NEDO_TSC Foresight、vol. 37、「次世代バイオ燃料（バイオジェット燃料）分野の技術戦略策定に向けて」、2020、<https://www.nedo.go.jp/content/100920836.pdf>

[83] 日本マリンエンジニアリング学会誌、第 47 巻、第 1 号、2012、https://www.jstage.jst.go.jp/article/jime/47/1/47_51/_pdf/-char/ja

[84] 日経バイオテクオンライン_日経バイオ年鑑 2021～2023、<https://bio.nikkeibp.co.jp/db/yb2023/>

[85] 2022 年版 17322 の化学商品、化学工業日報社、2022 年 1 月

第 6 章 事業戦略

6.1 ビジネスモデルの立案

6.1.1 日本における SAF 製造

2022 年 3 月には、国産 SAF の商用化および普及・拡大を通じてカーボンニュートラルな空の実現を目指すオールジャパンの有志団体「ACT FOR SKY」が設立された。ACT FOR SKY は、ACT メンバー「事業として国産 SAF 製造に直接関与し、サプライチェーン構築の主体となる企業」と SKY メンバー「国産 SAF のサプライチェーン構築に必要となる企業や自治体」で構成されている。設立当初の 2022 年 3 月には 16 社で構成されていたが（図 6-1_左）、2022 年 9 月に 6 社、2022 年 11 月に 2 社、2023 年 4 月に 5 社が新たに加わり、現在は、計 29 社で構成されている（図 6-1_右）。ACT FOR SKY 参画企業の取り組み内容および方針の詳細は（参考資料_表 S6-1）をご覧ください。

2022年3月（設立時）



2023年4月



図 6-1 ACT FOR SKY への加盟企業

「Act for Sky_ホームページ [86]」を基に筆者が作成

ACT FOR SKY の活動内容は、以下の 6 つである。

- ① 国産 SAF を通じた脱炭素化社会、資源循環型社会の実現に向けた各メンバーのアクションの発信
- ② 脱炭素化社会、資源循環型社会の実現に必要な増加コストに関する議論
- ③ 自治体、教育の場を通じたカーボンニュートラルに関する啓蒙活動
- ④ 各メンバー同士での情報共有、新たなアクションへの意見交換
- ⑤ SAF に関する各国動向の共有

⑥ 国産 SAF における共通課題の抽出、関係機関との情報共有

2023 年 5 月には ACT FOR SKY のメンバーであるレボインターナショナル社が国産 SAF のサプライチェーン構築に向けた「廃食用油の供給および利用に関する基本同意書」を締結し、JGC 社、コスモ石油社と共同で、国内初となる国産 SAF の大規模生産実証設備の起工式が行われた [80, 86]。このように、日本における SAF 製造事業はまだ始まったばかりである。

6.1.2 SAF 製造サプライチェーン

日本では、2030 年までにジェット燃料の 10%（約 200 万 kL）を SAF に転換する目標が決定されており、商業レベルでの SAF 製造プロセスの早急な開発が望まれる。

油脂（植物油、廃食油）および微細藻類を原料とする SAF 製造サプライチェーンを図 6-2 に示すが、菜種、オリーブ、パーム等から抽出される植物油や、外食産業やホテル、工場から排出される廃食油を原料として収集し、アルカリ触媒下でメタノールと反応させ、BDF を製造する。この際、副産物としてグリセロール残渣が生じる。SAF は BDF に水素化処理を施すことで製造される。

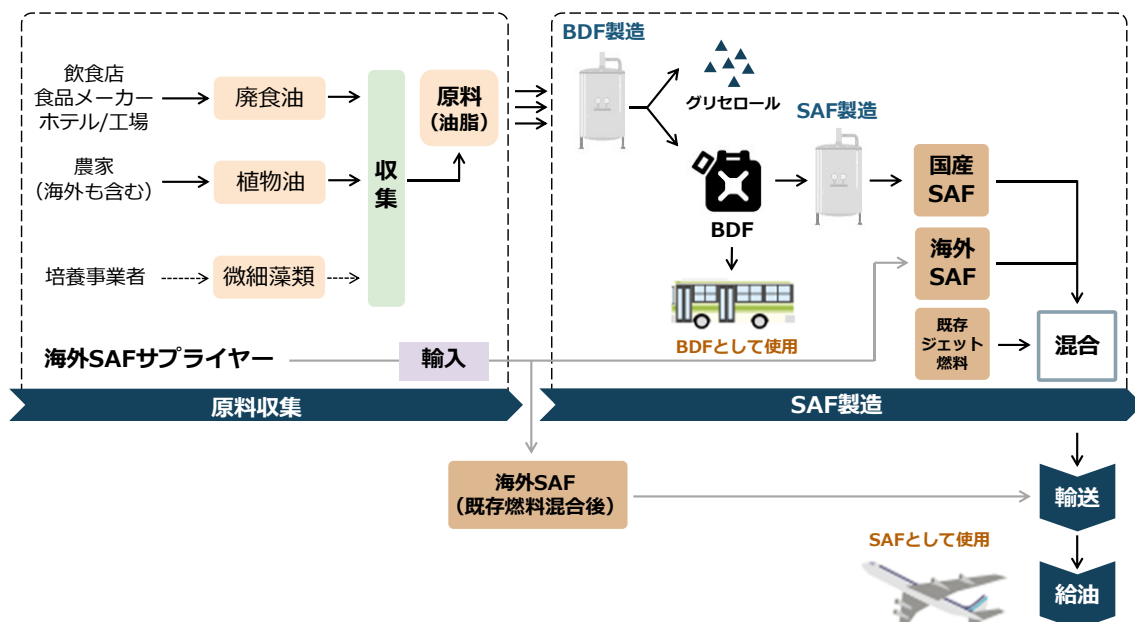


図 6-2 油脂および微細藻類を原料とした SAF 製造サプライチェーン

「持続可能な航空燃料（SAF）国産化に向けた取組と事業機会_三井住友銀行」[81]を基に筆者が作成

将来的には、SAF 混合比率 100%の燃料が期待されているが、現在のプロセスで製造される SAF は既存の化石資源由来のジェット燃料と混合して使用される。現在、油脂由来の

SAF の最大混合比率は 50%である。したがって、製造された SAF は既存のジェット燃料と混合され、船で空港まで輸送された後、航空燃料として給油される。国内製造の SAF だけで供給量を賄えない場合は、海外の SAF サプライヤーから購入することになる(図 6-2)。

6.1.3. 民間企業による取り組み

ここで、民間企業における SAF 製造に関する取り組みを調べるため、ACT FOR SKY の幹部企業であり、BDF の製造・販売で国内シェアトップを誇る「レボインターナショナル」社および、微細藻類由来の油脂からの SAF 製造プロセス開発に取り組む「ユグレナ」社をベンチマーク企業として選定し、SAF 製造への取り組みを調査した。

「株式会社レボインターナショナル」

株式会社レボインターナショナルは 1999 年に設立され、廃油の回収および BDF のリサイクルを専門とする企業として主に日本国内で事業展開している。具体的な事業内容は、以下の 6 つである。

- ① 「バイオディーゼル燃料研究開発・製造・販売・輸出事業」
- ② 「使用済み食用油引取事業」
- ③ 「バイオディーゼル燃料製造プラント販売・エンジニアリング事業」
- ④ 「市民活動支援事業」
- ⑤ 「原料植物及び油脂の研究開発・東南アジアにおけるプランテーション事業」
- ⑥ 「洗剤・エコロジー関連商品販売事業」



レボインターナショナル社の BDF 生産能力は 30,000 L/Day と国内最大であり、使用済み廃食油のリサイクル率は 98.5%である [87]。また、同社のホームページや事業内容を見ると、BDF/SAF 製造サプライチェーンのすべての項目に携わっているように見えるが、同社が特に力を入れているのは、廃食油の収集および BDF/SAF 製造法の開発である。プラントレベルでの BDF/SAF 製造および製造された燃料の輸送は JGC 社やコスモ石油社等に依頼するか、もしくは共同で行っていると考えられる。実際、レボインターナショナル社設立から現在までに申請した特許の 8 割以上が BDF/SAF の製造法に関する特許であり、残りの特許は生産設備に関する特許であった。また、会社設立から 23 年間で申請された特許はわずか 13 件で、そのほとんどが 2008 年～2014 年の間に申請されたものである。これらは、廃食油を原料とした BDF/SAF 生産に関する技術は成熟し、特許が申請され尽くしたか、もしくはレボインターナショナル社がクローズ戦略を取っていることを示唆している。

「株式会社ユーグレナ」

株式会社ユーグレナは 2005 年に設立されたバイオテクノロジー企業であり、微細藻類であるユーグレナ (*Euglena gracilis*) の屋外大量培養技術を基に機能性食品・化粧品・飼料・燃料など様々な用途開拓を行う企業である。具体的な事業内容は、以下の 4 つに大別できる。



- ① 石垣島ユーグレナやヤエヤマクロレラ、カラハリスイカ、ミドリ麴などを使用した食品、化粧品の製造および販売を行う「ヘルスケア事業」
- ② バイオ燃料「サステオ」の開発、製造、販売に取り組む「バイオ燃料事業」
- ③ バングラデシュの子どもたちや難民、農家への支援を行う「ソーシャルビジネス」
- ④ 遺伝子解析サービスを提供する「バイオインフォマティクス事業」

同社の主力事業は機能性食品や化粧品の製造・販売を中心としたヘルスケア事業だが、中期的には BDF/SAF などのバイオ燃料事業での実用化を目指している。バイオ燃料事業については、BDF/SAF 製造の実証プラントは稼働しているものの、未だ商業化前の段階であるため、売上高の大半はヘルスケア事業が占めており、ヘルスケア事業で得たキャッシュフローをバイオ燃料事業に投資している。

バイオ燃料事業では、使用済み廃食油や微細藻類「ユーグレナ」が生産するバイオマス油脂から製造した BDF/SAF を販売する事業である。2018 年には神奈川県横浜市に生産能力が 125 kL/年の SAF 製造プラントが完成し、2025 年にはマレーシアに生産能力が 72.5 kL/年の SAF 製造プラントが建設される予定である [88]。

2021 年 3 月 15 日、同社は微細藻「ユーグレナ」由来 SAF の完成を発表し、同社の株価は一時、前日終値を 30% 近く上回った [89, 90]。しかしながら、ユーグレナ社が製造する SAF の主原料は微細藻類ではなく廃食油であり微細藻「ユーグレナ」の含有量はわずかであった。同社広報部は、主原料が廃食油であることは認めたが、微細藻「ユーグレナ」がどれほど含まれているかについては、「開示していないが、ゼロではない」と明かさなかった。微細藻類を原料とする SAF が商業ベースで使用されるまでには、製造コストの大幅な引き下げなど越えるべきハードルがまだ幾つもあるだろう。

6.1.4 5-Forces 分析

続いて、【BDF/SAF 製造過程に生じるプロセス残渣「グリセロール」を原料とした芳香族化合物生産】事業を行う上での外部環境を分析するために、「SAF 製造」「グリセロール残渣からのバイオものづくり」のそれぞれの観点で 5-Forces 分析を行った (図 6-3)。

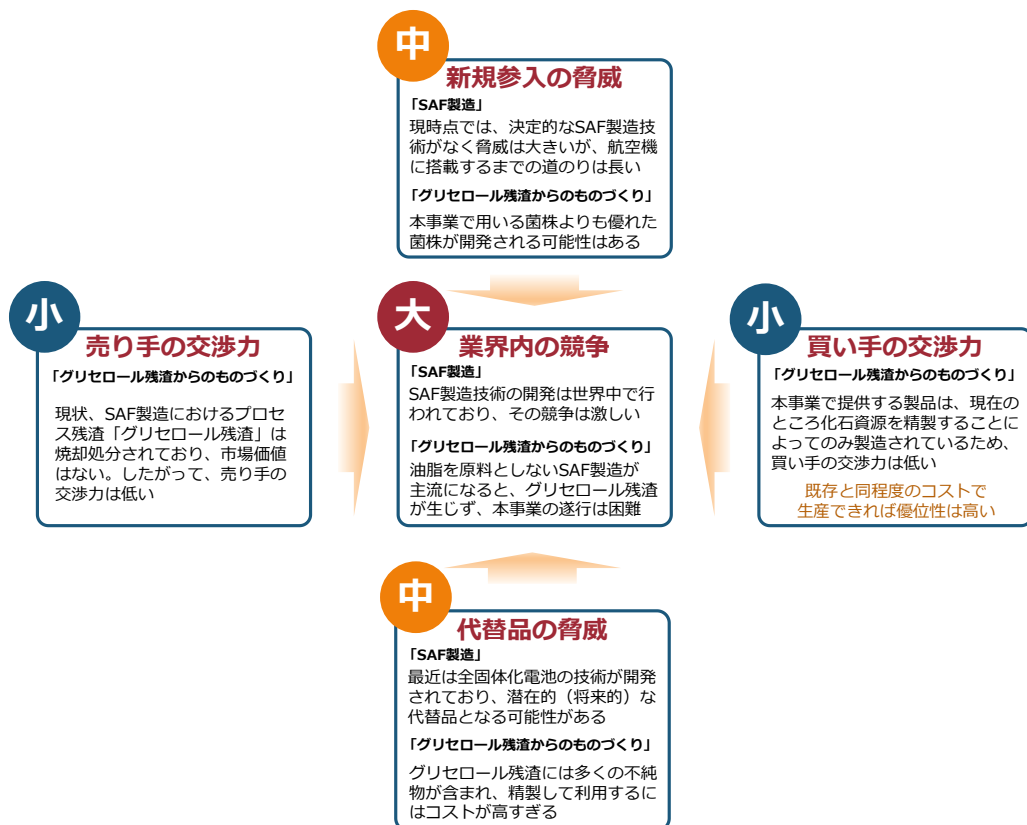


図 6-3 5-Forces 分析

① 業界内の競争 ・ ・ ・ ・『大』

「SAF 製造」

SAF 製造の取り組みおよび SAF 製造技術の開発は、日本国内外の多くの企業によって進められており、その競争は熾烈を極めていているといえる。

「グリセロール残渣からのバイオものづくり」

廃食油や植物油などの油脂および微細藻類を原料としない SAF 製造法（例えば、トウモロコシなどのバイオマスや都市ガスを原料とした SAF 製造法など）が主流になると、グリセロール残渣が生じず、本事業を遂行することが困難となる。現在の研究開発動向を見る限り、油脂由来の製造法がもっとも成熟した技術であり、先に上市されることが予測されるが、潜在的な脅威は非常に大きい。

② 新規参入の脅威 ・ ・ ・ ・『中』

「SAF 製造」

SAF 製造に関する研究開発は、現在世界中で進められているが、現時点で決定的な生産技術はなく、脅威となりうる。しかしながら、製造した SAF が航空機に搭載されるには、

代替航空燃料の認証制度である ASTM International D7566 の認証を受けた変換プロセスに該当する必要がある。現在、ASTM International D7566 で認証されたプロセスは7プロセスのみであり（参考資料_表 S6-2）、認証されるまでのハードルは高い。

「グリセロール残渣からのバイオものづくり」

決定的な SAF 製造法がなく、SAF 生産量も限られている現状では、グリセロール残渣の処理は問題視されていない。しかしながら、今後、SAF 生産量が向上するにつれてグリセロール残渣の量も増加することが予想され、その際には、新たなグリセロール残渣処理技術が開発される可能性がある（例えば、「本事業で使用する菌株よりも優れたグリセロール残渣資化能力を有する菌株の開発」、「独自のグリセロール残渣処理技術の開発」など）。

グリセロール残渣の量が増加するまでに、グリセロール残渣から高付加価値化合物を生産できる技術を確立できれば、本書で提案する事業が優位に立てるだろう。

③ 代替品の脅威 『中』

「SAF 製造」

重量が重いことは航空機にとって致命的であり、電気や水素燃料の使用は適さない（電気はバッテリーに蓄える必要があり、水素は蓄える用の高圧ボンベが必須）。最近では全固体化電池の技術が開発されており、この開発が進めば将来的に SAF の代替となる可能性がある。しかしながら、商業レベルでの製造プロセスの迅速な開発が望まれている現状を踏まえると、まずは SAF 供給量を増やすことが先決であり、全固体化電池は潜在的（将来的）な代替品と言える。

「グリセロール残渣からのバイオものづくり」

グリセロールの用途には、化粧品や食品添加物、甘味料、保存料、保湿剤などがあるが、SAF 製造工程で生じるグリセロール残渣には多くの不純物が含まれ、精製して高純度グリセロールとして販売するにはコストがかかりすぎる。

また、微生物を用いて木質系バイオマス（グルコースやキシロース）等から本事業でターゲットとする芳香族化合物を生産することも考えられるが、本事業でターゲットとする化合物は微生物にとって毒性がある化合物群であるため、高収率での生産は難しく、商業化へのハードルは高い。

④ 売り手の交渉力 『小』

「グリセロール残渣からのバイオものづくり」

SAF 製造工程で得られたグリセロール残渣は、図 5-9_a に示すプロセスで粗精製された

後、主に焼却処分されており、市場価値はないと言える。本書で提案するプロセスは、グリセロール残渣をより低コストで処理でき、かつ高付加価値化合物を生産できるため、現行のグリセロール残渣処理プロセスと比較し、優位性が高い。一方で、本アイデアでは SAF 製造企業からのグリセロール残渣の調達が必須であるため、SAF 製造企業に対し、既存のプロセスに対する優位性を示し、グリセロール残渣を譲渡いただく、もしくは購入することが鍵となる。グリセロール残渣の処理が SAF 製造サプライチェーンに密接に関連している場合、グリセロール残渣の調達が困難な場合もある。

⑤ 買い手の交渉力 ・ ・ ・ ・『小』

「グリセロール残渣からのバイオものづくり」

本事業でターゲットとする化合物は、高価かつ人体に有毒である化合物であり、例として先端研究で生産したフェノールやフェノールから得られる誘導体（ビスフェノール A、ビフェノール）、ハイドロキノンを挙げた。これらの化合物の既存の製造法は、石油などの化石資源からの精製に依存している。脱炭素化、カーボンニュートラルへの移行が強く求められる昨今、化石資源に依存しない代替製造法の開発は急務である。しかしながら、これらの化合物は人体や微生物に対して有毒であることが多く、パイオプロセスを応用した製造法はこれまで報告されていない。今後、化石資源に依存しない製造法への移行が不可欠であることを考えると、提案するアイデアによって生産される化合物が優位性を獲得し、市場に参入できる可能性は高い。一方で、現状のバイオプロセスではまだコストが高く、技術開発の障壁は高い。バイオプロセスを活用し、既存と同程度のコストで生産できれば、本アイデアの優位性は高くなるだろう。

5-Forces 分析によって得られたインサイト

5-Forces 分析の結果、SAF 製造に関する競争は非常に激しいが、グリセロール残渣の処理については、現在のところ大きく問題視されていない。本事業の鍵は SAF 製造企業からのグリセロール残渣の調達であり、SAF 製造企業に対し、既存のプロセスに対する優位性を示し、グリセロール残渣を譲渡または購入する戦略を立てる必要がある。

本事業で生産するターゲット化合物の生産は、現状では化石資源からの精製に依存しており、パイオプロセスでは生産されていない。今後、化石資源に依存しない製造法への移行が不可欠であることを考えると、本書で提案する事業によって生産される化合物が優位性を獲得し、市場に参入できる可能性は十分に考えられる。しかしながら、コスト面では既存プロセスに大きく劣るため、現行プロセスよりも低コストかつ高効率で生産できる技術の開発が望まれる。また、油脂や微細藻類以外の SAF 製造法の開発が拡大すると、グリセロール残渣が生じず、本事業を遂行することが困難になるため、世の中の SAF 製造に関する

開発動向は常に注視する必要がある。

6.1.5 ターゲティング

図 6-2 で示したように、油脂および微細藻類を原料とした SAF 製造では、「収集 → 製造 → 輸送 → 利用」というサプライチェーンが確立されているが、新設する会社で最初からこれらすべてのサプライチェーンに取り組むのは技術的にも体力的にも困難である。

筆者が提案するイノベーション・アイデアは、SAF 製造におけるプロセス残渣「グリセロール」を原料に高付加価値化合物を生産することであり、5-Forces 分析で得られたインサイトからも SAF 製造におけるプロセス残渣「グリセロール」の調達は不可欠である。そこで、SAF 製造におけるプロセス残渣「グリセロール」を調達する過程として、前述の有志団体「ACT FOR SKY」への加盟を予定している。この団体に加盟することで、SAF 製造会社とのコネクションを構築し、グリセロール残渣調達のきっかけとする。ACT FOR SKY 設立に際し、幹事企業である JGC 社の佐藤雅之会長は「企業にはこだわりはありません。それぞれの役割を担っていただける気持ちの強い企業であれば、どんな企業にも参加して頂きたい」と記者会見で語っており、加盟に際しての障壁は特にないだろう。具体的には、表 6-1 に示す油脂および微細藻類を原料とする SAF 製造企業をターゲットにグリセロール残渣を調達する。

表 6-1 本事業でターゲットとする SAF 製造企業

企業名	主な取り組み内容・方針
出光興産	SAF製造・供給サプライチェーンの構築
ENEOS	廃棄物・廃食油を原料とするSAF製造開発
コスモ石油	廃棄物・廃食油を原料とするSAF製造開発
日揮HD（JGC）	廃食油を原料とするSAF製造開発
レボインターナショナル	廃食油を原料とするSAF製造開発
ユーグレナ	微細藻類由来の油脂を原料としたSAF製造法の開発
IHI	微細藻類由来の油脂を原料としたSAF製造法の開発

6.2 成長戦略

これまで、イノベーション・アイデアの概要、日本における SAF 製造の現状、SAF 製造サプライチェーンについて述べてきた。また、5-Forces 分析を通じて、本事業アイデアの優位性および課題を明らかにした。ここでは、現在から事業開始、収益化に至るまでの道筋を示すロードマップを作成する。

具体的には、事業をシード期、アーリー期、ミドル期に分け、各成長段階に応じたビジネスモデル、達成目標を策定した。

6.2.1 シード期

シード期は、ベンチャー企業における技術開発やコンセプト検証の段階であり、実際の事業はまだ稼働していない。シード期のメイン活動は研究開発であり、特に本事業のコンセプトである「SAF 製造プロセスで生じるグリセロール残渣を有効活用できる菌株の開発」および「グリセロールを原料としたバイオ製品の創出」に重点を置く。その他の活動としては、法人の設立、共同研究パートナーの探索、グリセロール残渣の調達コネクションの確立、そしてこれらの活動を行うための資金調達などがある。図 6-4 は、シード期の事業ロードマップを示したものであり、以下でそれぞれの項目についてのビジネスの流れを説明する。

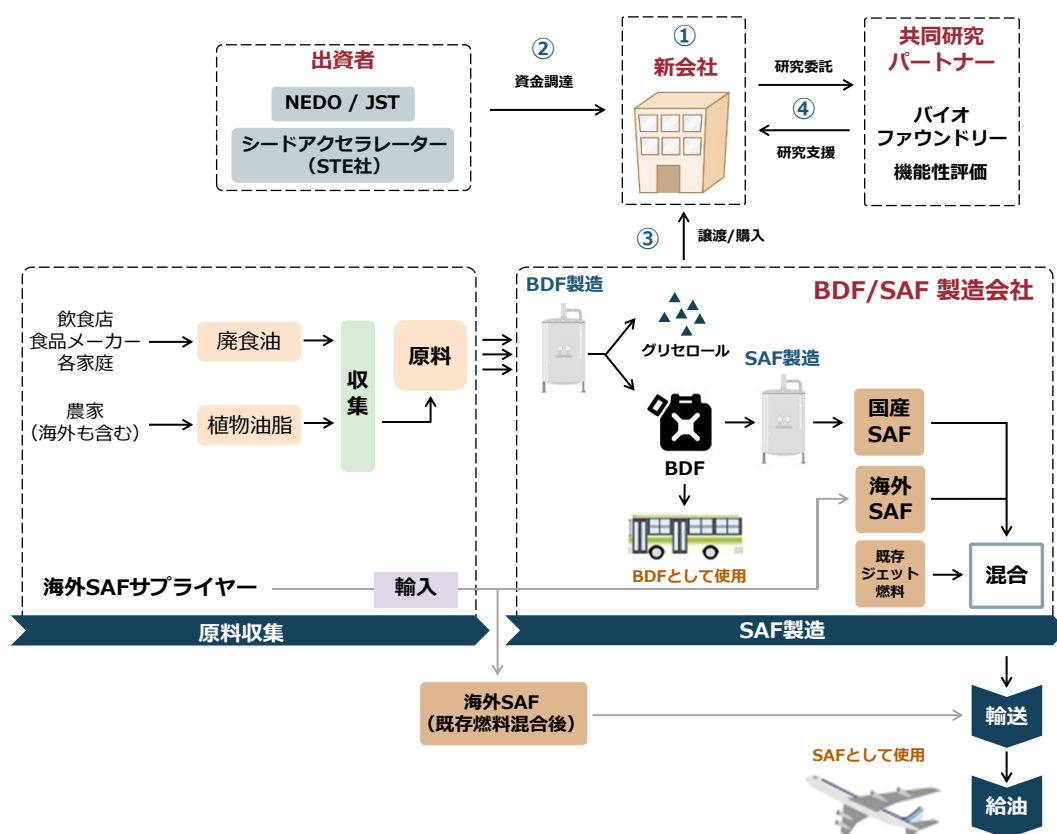


図 6-4 シード期の事業ロードマップ

① 法人（新会社）の設立/研究開発

本事業【バイオ燃料（BDF/SAF）製造工程で生じるプロセス残渣「グリセロール」を原料としたバイオものづくり】を実現するためのコア技術である「グリセロール残渣を有効活用できる菌株の開発」および「グリセロール残渣を原料としたバイオ製品の創出」は、

シード期以前の神戸大学在学中から研究開発を進めておく。

シード期のまず初めに法人（新会社）を設立する。法人を設立して初めて出資者からの資金調達が可能となる。神戸大学発ベンチャーとして新会社を設立した後は、神戸大学との共同研究の形で研究開発を進める。

② 資金調達

シード期は、技術開発やコンセプト検証の段階であり、事業で提供する製品のプロトタイプはまだない。そのため、一般のベンチャーキャピタルやシードアクセラレーターなどの投資会社からの資金調達は難しい。そこで、神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科発バイオベンチャーの創業支援・投資育成に特化したシードアクセラレーターである株式会社科学技術アントレプレナーシップ（STE）社や、NEDO や JST が運用する起業を前提とした研究開発促進を目的とした研究助成金に応募し、資金調達を行う。シード期に獲得する資金は、知的財産権の申請や維持に使用できる資金を獲得することが望ましい。

③ グリセロール残渣の調達に関するコネクションの確立

法人を設立するとともに、前述した ACT FOR SKY に加盟し、BDF/SAF 製造企業とのコネクションを構築し、グリセロール残渣を調達する。また、グリセロール残渣の輸送にはコストがかかるため、新会社は BDF/SAF 製造会社の近くに設立することが望ましい。

④ 共同研究および研究委託の交渉

シード期の研究開発を迅速化するため、例えば、バックス・バイオイノベーション社などのバイオファウンドリーを共同研究パートナーとし、迅速に研究開発を進める。また、生産した芳香族化合物の機能性評価も外部企業に委託する。これらの場合、共同研究パートナーとは秘密保持契約（Non-Disclosure Agreement; NDA）を締結し、共同研究費用を負担することで、取得した化合物情報の機密性を保持する予定である。一方、用途開発や特許取得につながる可能性のあるデータについては、共同研究パートナーと共同出願を行い、その実施権を購入する。なお、知的財産に関わる全ての業務を自社で行うことは困難であるため、神戸大学の産学連携本部や STE 社の支援を活用する。

【達成目標】

シード期の達成目標は、「法人を設立し、BDF/SAF 製造企業とのコネクションを確立し、本事業のコア技術を開発・知財化すること」である。特に、本事業のように新規にベンチャー企業を設立する場合は、このステップは速やかに行うべきである。ベンチャービジネスの成功には、シード期に少ない資金で PoC としてコンセプトを実証することが極めて重要で

ある。したがって、シード期には、グリセロール残渣を有効利用できる菌株を獲得し、ターゲットとする「芳香族化合物」を生産し、得られた製品の機能性評価まで行うことを目指す。このシード期の達成目標に複数年を要する場合は、事業化ルートからの撤退も検討しなければならない。

6.2.2 アーリー期

アーリー期は、立ち上げた事業が軌道に乗るまでの期間であり、量産化に向けた技術開発に着手し始める。アーリー期までは、事業認知や事業拡大のために様々なコストがかかるため、赤字になることが多い。図 6-5 は、アーリー期の事業ロードマップを示したものであり、以下でそれぞれの項目についてのビジネスの流れを説明する。

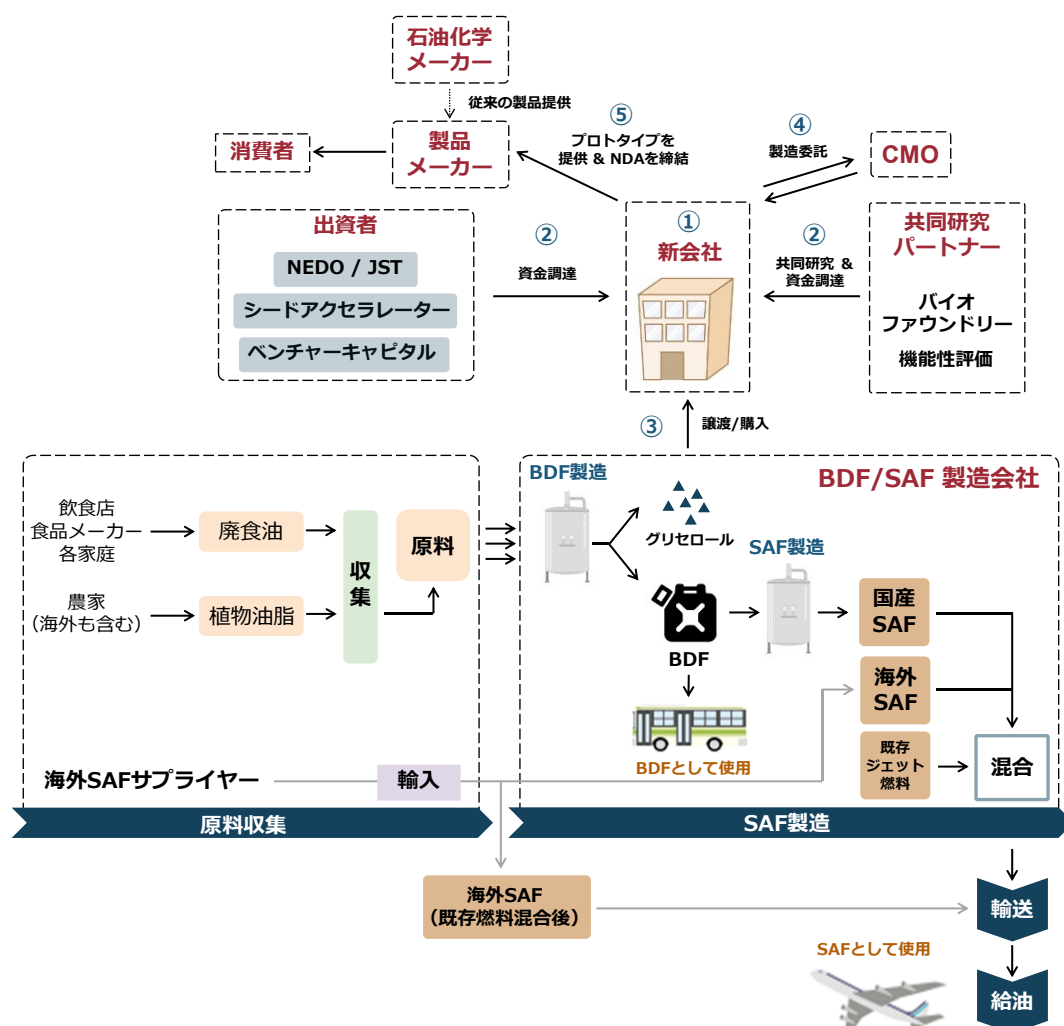


図 6-5 アーリー期の事業ロードマップ

① 研究開発

シード期に実施したコンセプト検証の規模を拡大し、量産化に向けた技術開発に着手する。微生物の生産性を向上させるための培養条件の検討や培地組成の最適化もこの期間に行う。アーリー期の後半には、様々な芳香族化合物製造技術の開発など、ターゲットの拡充にも着手する。

② 資金調達

事業拡大には多額の資金が必要となるため、STE 社や NEDO、JST が運用する研究助成金には引き続き応募し、資金調達する。一方、これらの資金は使途に制約が多く、過度に依存すると事業資金が不足する恐れがある。アーリー期には事業のプロトタイプは完成しているため、本事業に将来性を見出したベンチャーキャピタルや企業からも資金を調達する。

③ グリセロール残渣の調達

BDF/SAF 製造会社とのコネクションを活用して、引き続きグリセロール残渣を調達する。調達可能なグリセロール残渣の量によっては、複数の BDF/SAF 製造会社からの調達も検討する。

④ 製品の製造委託

パイロットスケールでの芳香族化合物製造は、Green Earth Institute 社などのバイオ製造プラントを有する CMO 企業に委託し、安定したサプライチェーンの確立を目指す。自社では、CMO 企業と製造委託契約を締結し、芳香族化合物を生産するピキア酵母株や自社で粗精製したグリセロール残渣を含む発酵原料を CMO 企業に提供し、製造委託料を支払う。

⑤ 製品メーカーへの提供

発酵生産した芳香族化合物を製品メーカーに提供し、製品メーカーが加工・商品化して、消費者に販売する。その製品の売上に基づいて、自社は製品メーカーから収益を得る。その際、製品メーカーと NDA を締結し、既存サプライヤー（主に石油化学メーカーを想定）への技術流出を防ぐ。製品メーカー側にとっては、化石資源に依存しない製造法への転換が可能となり、Win-Win の関係性を築くことができる。

【達成目標】

アーリー期の達成目標は、「実際の事業を開始し、また量産化に向けた技術開発やパイロットスケールでの製造法を開発すること」である。本事業の場合、グリセロール残渣を原料としたパイロットスケールでの「芳香族化合物」製造プロセスを開発し、生産した化合物を

製品として製品メーカーに提供して収益を得る。また、生産するターゲット化合物の拡充も図る。

6.2.3 ミドル期

ミドル期は、製品やサービスが市場で認知され、事業が軌道に乗り始める時期であり、これまでの投資資金の回収や、製品販売による経常的な売り上げが期待できる。また、提供する芳香族化合物の種類拡充や自社内での発酵プラントの建設も行い、事業拡大を目指す。図6-6は、ミドル期の事業ロードマップを示したものであり、以下でそれぞれの項目についてのビジネスの流れを説明する。

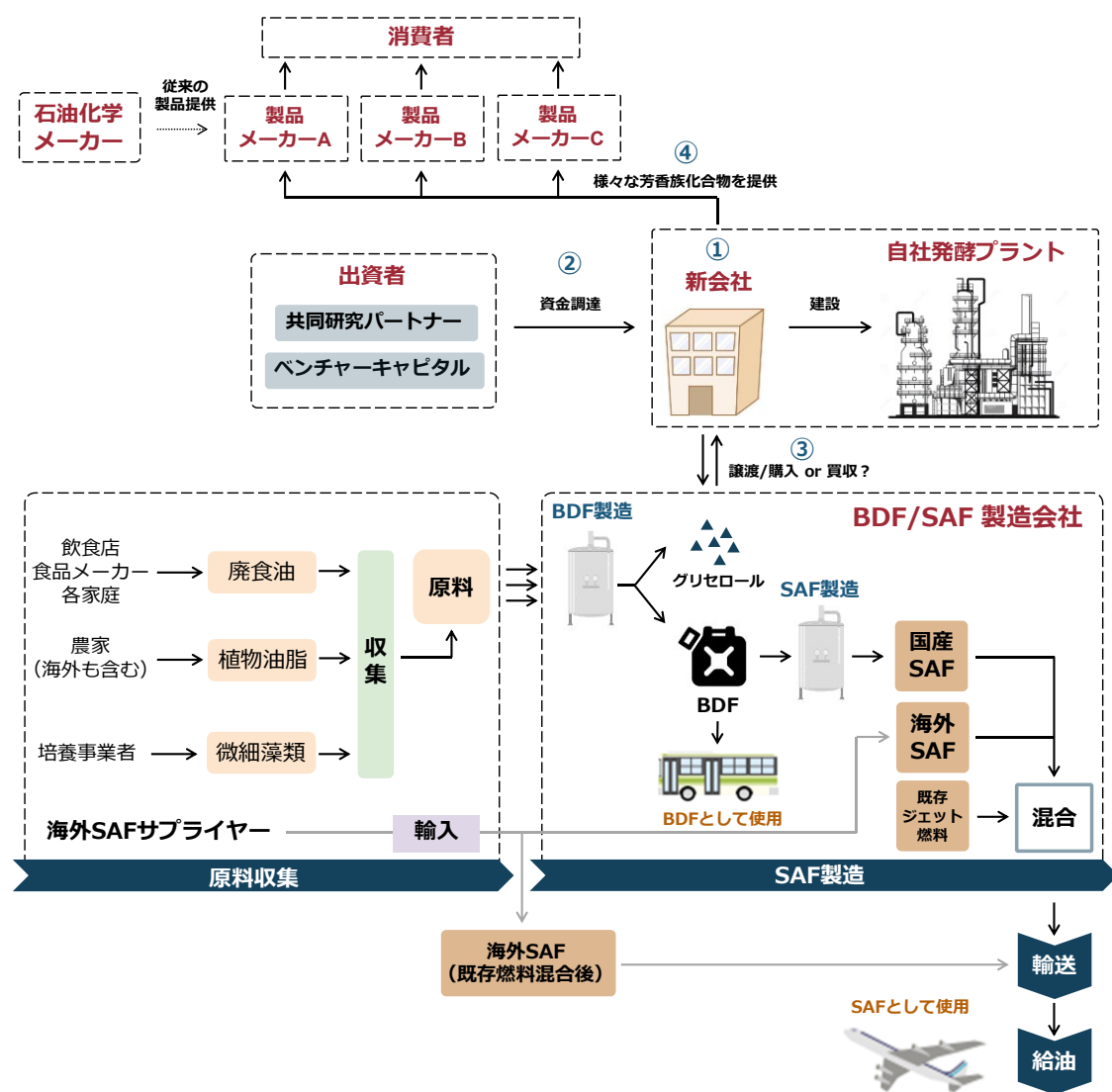


図 6-6 ミドル期の事業ロードマップ

① 研究開発

ミドル期には、多種多様な芳香族化合物のパイロットスケールでの生産を行う。アーリー期では、パイロットスケールでの製造はバイオ製造プラントを有する CMO 企業に委託していたが、ミドル期では、自社内に発酵プラントを建設し、発酵生産を行う。また、図 5-9_c に示したように、グリセロール残渣から直接、芳香族化合物を発酵生産するプロセスの開発もこの時期に行う。

② 資金調達

発酵プラントの建設には多額の資金が必要であるため、ミドル期首記の時点での社内のキャッシュフロー残高に応じて、資金調達を行う。ミドル期には、製品やサービスは既に市場で認知されているため、ベンチャーキャピタルや共同研究パートナーとなる企業から資金を調達する。

③ グリセロール残渣の調達

本事業がミドル期に入る頃には、微細藻類を原料とする BDF/SAF 製造法が確立されている可能性がある。そのため、グリセロール残渣は、本事業での必要量に応じて、油脂（廃食油や植物油）および微細藻類由来の油脂を原料に BDF/SAF 製造を行った際のプロセス残渣を調達する。また、「自社内での廃食油の回収および SAF 製造」、「BDF/SAF 製造会社の買収」など、自社のバリューチェーンの拡大も検討する。

④ 製品メーカーへの提供

発酵生産した芳香族化合物の製品メーカーへの提供は、基本的にはアーリー期と同じであるが、生産する化合物に応じて異なる製品メーカーに提供する。あるいは、特定の企業とのみ NDA を結び、集中的に製品を提供することも戦略の一つである。従来から製品メーカーに原料を提供してきた石油化学メーカーに、自社を買収させるのも一つの戦略である。

【達成目標】

ミドル期の達成目標は、「自社内で発酵プラントを建設、また、多種多様な芳香族化合物の生産を展開すること」である。これまでに投資してきた資金を回収し、キャッシュフローを黒字化させることも目標の 1 つである。

6.3 本事業を行う上でのリスク

前述したように、現在の SAF 製造における原料は、①木材や草などのバイオマス、②都市ごみや廃ガス、③植物油や廃食油などの油脂、④微細藻類由来の油脂、の 4 つに大別で

きる。本書で提案するアイデアは、油脂（廃食油や植物油）および微細藻類を原料とした SAF 製造が拡大することを前提としており、廃食油等の供給が減少して廃食油からの SAF 製造が困難になった場合、あるいは油脂や微細藻類を原料としない SAF 製造法（例えば、木材や草などのバイオマス、都市ガスや廃ガスを原料とした SAF 製造法など）が主流となった場合には、グリセロール残渣が発生しないため、本事業の実施は困難となる。

グリセロール残渣が得られない場合のアプローチとしては、精製グリセロールを原料とした芳香族化合物群の生産が挙げられる。グリセロールは現在、大豆油や獣脂などに含まれるトリアシルグリセロール（トリグリセリド）の加水分解によって得られている。また、石油由来のプロピレン（ $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_3$ ）から化学合成することも可能である。精製グリセロールのコストは 2020 年時点で 1 kg あたり 150 円～200 円であるが、国内のグリセロール生産量が 35,221 トンであるのに対し、輸入量は 76,230 トンで、国内市場の 68%を輸入に依存している [85]。したがって、精製グリセロールを原料としたバイオものづくりを行うには、グリセロールの輸送などを考慮すると、国内よりも海外での事業展開が望ましいだろう。

6.4 小括

本章では、提案したイノベーション・アイデア【バイオ燃料（BDF/SAF）製造過程に生じるプロセス残渣「グリセロール」を原料とした芳香族化合物生産】を事業化する上でのビジネスモデルを立案した。

SAF 製造に関する競争は非常に激しいが、グリセロール残渣の処理については、現在のところ大きく問題視されていない。BDF/SAF 製造企業に既存のプロセスに対する優位性を示すことができれば、グリセロール残渣は調達できるだろう。また、本事業で生産するターゲット化合物は、現状では化石資源からの精製による製法に依存しており、パイオプロセスでは生産されていない。今後、化石資源に依存しない製造法への移行が不可欠であることを考えると、本事業で生産する化合物が優位性を獲得し、市場に参入できる可能性は十分にある。一方で、油脂や微細藻類以外の SAF 製造法の開発が拡大すると、グリセロール残渣が生じず、本事業を遂行することが困難になるため、世の中の SAF 製造に関する開発動向は常に注視する必要がある。

次章では、提案したイノベーション・アイデアを事業化する上での技術戦略を簡潔に説明する。

6.5 参考資料および引用文献

表 S6-1 ACT FOR SKY 参画企業の取り組み内容および方針

(太文字は幹事企業)

	企業名	主な取り組み内容・方針
ACT メンバー (19社)	出光興産	SAF製造・供給全般
	IHI	SAF製造・認証・利用による貢献
	伊藤忠商事	SAFサプライチェーン構築・国産SAF生産案件検討
	ENEOS	廃棄物等を原料とするSAF製造
	コスモ石油	廃棄物等を原料とするSAF製造
	全日本航空 (ANA)	SAFの調達および使用
	太陽石油	木質バイオマス・CO ₂ を原料とするSAF製造検討
	東洋エンジニアリング	FT合成によるSAF製造
	日揮HD (JGC)	廃食油を原料とするSAF製造
	日本航空 (JAL)	SAFの調達および使用
	丸紅	廃棄物等を原料とするSAF製造販売事業
	三井物産	エタノールを原料とするSAF製造
	三菱重工	バイオ由来のSAF製造用噴流床ガス化設備製造
	レポインターナショナル	廃食油を原料とするSAF製造
	大栄環境	廃棄物を原料とするSAF製造
	電源開発	SAFの原料(微細藻類)供給への貢献
	東芝エネルギーシステムズ	CO ₂ からSAFの原料となるCOを還元するCO ₂ 電解装置の開発
	Boeing Japan	SAFに係る研究開発、認証、および利用促進等によるカーボンニュートラル達成への貢献
	凸版印刷	古紙を原料とするバイオエタノールの製造
SKY メンバー (10社)	小田急電鉄	資源、廃棄物収集スマート化、地域資源循環の向上
	日清食品HD	SAFの原料(油脂)供給
	ニチレイ	廃食用油の提供
	大和リゾート	SAF原料となる廃食用油の供給および、本活動の普及活動
	関西エアポート	空港関連施設や地元地域へSAF原料となる廃食用油の提供呼びかけ、本活動の普及推進
	Green Earth Institute	木質バイオマス由来SAF用エタノールの生産技術の事業化
	トリドールHD	SAFへの廃食用油提供
	みずほ銀行	国産SAFの商用化と普及・拡大に向けた情報収集・発信、及び業界横断連携の支援
	三菱UFJ銀行	国産SAFの商用化と普及・拡大に向けた情報収集・発信、及び業界横断連携の支援
	三井住友銀行	国産SAFの商用化と普及・拡大に向けた情報収集・発信、及び業界横断連携の支援

「Act for Sky_ホームページ [86]」を基に筆者が作成

表 S6-2 ASTM International D7566 の認証を受けた変換プロセス

認証済No.	変換プロセス	概要
ANNEX 1	Fischer-Tropsch (FT) 法 【合成ガスを経由するガス化FT合成プロセス】	2009年9月 GTL (Gas to liquid) 50%混合が承認
ANNEX2	Hydroprocessed esters fatty acids (HEFA) 【バイオディーゼルを水素化処理するプロセス】	2011年7月 Bio-SPK (Bio Synthetic Paraffin Kerosene) 50%混合が承認
ANNEX3	Synthetic Iso-paraffin (direct sugar) (SIP) 【糖化・発酵を経由するプロセスのうち、高分子中間体を経由するプロセス】	2014年6月 10%混合が承認
ANNEX4	Synthesized paraffinic kerosine plus aromatics (SPK/A) 【ガス化FT合成によるプロセスのうち、芳香族が含まれる製造プロセス】	2015年11月 非化石資源由来の芳香族をアルキル化した合成ケロシンを承認
ANNEX5	Alcohol to JET (ATJ) 【糖化・発酵を経由するプロセスのうち、アルコールを経由するプロセス】	2016年1月 ブタノール to JET 30%混合が承認 2018年4月 エタノール to JET 50%混合が承認
ANNEX6	Catalytic hydrothermolysis jet (CHJ) 【微細藻由来の油脂から製造するプロセス①】	2020年1月 50%混合が承認
ANNEX7	Hydrocarbon-Hydroprocessed Esters Fatty Acids (HC-HEFA-SPK) 【微細藻由来の油脂から製造するプロセス②】	2020年5月 微細藻類由来炭化水素の水素化処理により精製される合成パラフィンケロシン 10%混合が承認

「NEDO、次世代バイオ燃料（バイオジェット燃料）分野の技術戦略策定に向けて」[82]を基に筆者が作成

[86] <https://actforsky.jp> 2023 年 9 月 1 日閲覧

[87] 株式会社レボインターナショナル_ホームページ、2023 年 9 月 9 日閲覧、
<https://www.e-revo.jp/>

[88] 株式会社ユーグレナ_ホームページ、2023 年 9 月 9 日閲覧、
<https://www.euglena.jp/>

[89] ニュースリリース、「ユーグレナバイオジェット燃料が完成、年内の供給開始・フライト実現へ」、2021 年 3 月、<https://www.euglena.jp/news/20210315/>

[90] 会社四季報オンライン、「ユーグレナが急騰、バイオジェット燃料完成し年内にも販売開始」、2021 年 3 月、<https://shikiho.toyokeizai.net/news/0/417300>

第7章 技術戦略

7.1 予備検討

これまでに、イノベーション・アイデアとして【BDF/SAF 製造過程に生じるプロセス残渣「グリセロール」を原料としたバイオものづくり】を提案し、その事業化戦略を示してきた。本章では、このイノベーション・アイデアを実現するための技術戦略をまとめた。

本事業を行う上での予備検討として、岐阜県の地方自治体「三の倉センター」からご提供いただいたグリセロール残渣を原料に、ピキア酵母を宿主とする芳香族化合物群の発酵生産に取り組んだ。BDF/SAF 製造過程ではアルカリ触媒として水酸化ナトリウム（NaOH）や水酸化カリウム（KOH）を使用し、油脂成分とメタノールをエステル反応させ、脂肪酸メチルエステル（BDF）を合成する。そのため、BDF 製造工程で生じる副産物であるグリセロール残渣もアルカリ溶液である。実際に、「三の倉センター」からご提供いただいたグリセロール残渣の pH を測定したところ pH = 9.15 であり、グリセロールの他には、遊離脂肪酸、メタノール、塩分等も含まれていた（図 7-1）。このグリセロール残渣を原料に高付加価値化合物（芳香族化合物）を直接発酵生産できれば、SAF 製造コストを大幅に削減できる。しかしながら、現状、ピキア酵母を含む多数の微生物（一部のアルカリ耐性菌を除く）はアルカリ条件下では増殖することができない。実際、ピキア酵母をグリセロール残渣に直接播種してみたが、増殖できなかった。

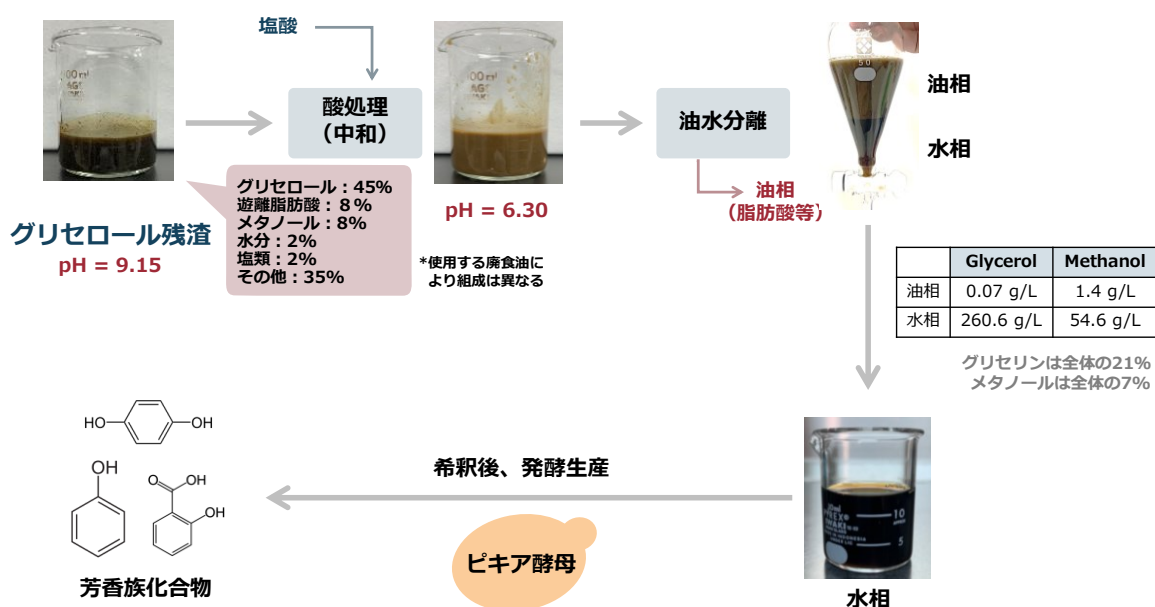
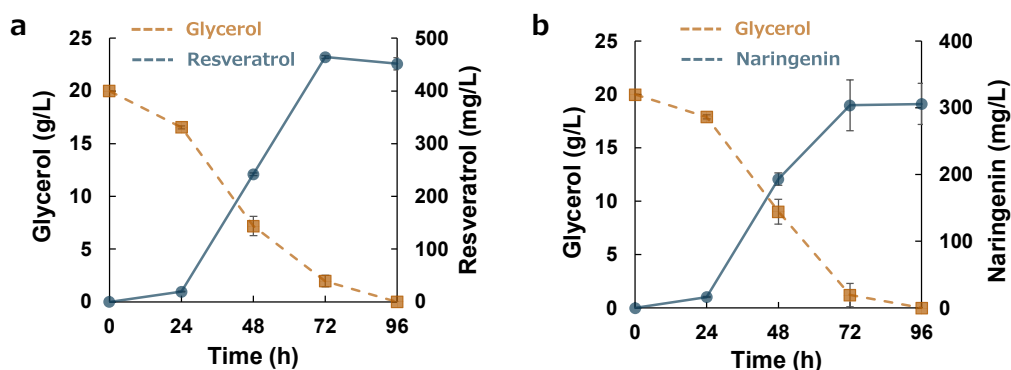


図 7-1 グリセロール残渣の粗精製フロー

そこで、塩酸を加えてグリセロール残渣を中和し（pH = 6.3）、一晩静置することで、遊離脂肪酸などを含む油相とグリセロールおよびメタノールを含む水相に分離させた（図 7-

1)。油水分離後の水相中に含まれるグリセロール濃度は 260.6 g/L、メタノール濃度は 54.5 g/L であった（図 7-1）。この粗精製後グリセロール液（初期グリセロール濃度を 20 g/L に希釈）を炭素源として、ピキア酵母で芳香族化合物（レスベラトロールおよびナリンゲニン）を発酵生産させた結果を図 7-2 に示す。その結果、精製グリセロールを原料とした場合（図 7-2_a, b）と同程度の芳香族化合物を発酵生産することに成功し、ピキア酵母は精製グリセロールのみならず、グリセロール残渣からも芳香族化合物を発酵生産できることが明らかとなった（図 7-2_c, d）。

精製グリセロールを原料とした培養試験結果



グリセロール残渣を原料とした培養試験結果

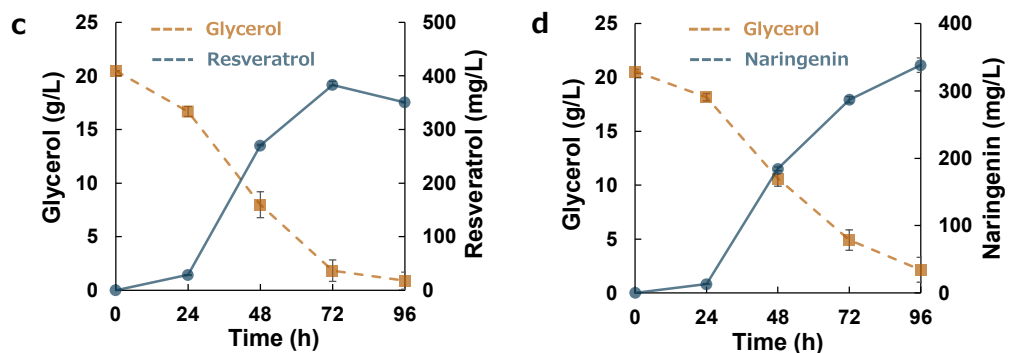


図 7-2 グリセロール残渣を原料とした芳香族化合物群の発酵生産

レスベラトロール生産株（47m-T4S）、ナリンゲニン生産株（47m-T4CC）を、20 mL の培地を含む 100 mL の三角フラスコで培養した。（a, b）精製グリセロールを原料とした培養試験結果を示す。（c, d）グリセロール残渣を原料とした培養試験結果を示す。青線は芳香族化合物生産量、オレンジ線は YPG 培地で培養した際の培養液中のグリセロール濃度を示す。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均値 ± 標準偏差で示した。

一方で、培養液中の粗精製後グリセロール液の濃度が 100 g/L を超えると、ピキア酵母が増殖できなくなることとも明らかとなった。これは、グリセロール残渣に含まれる Na^+ イオンや K^+ イオンなどの無機塩や脂肪酸などの不純物がピキア酵母の生育を阻害している

ためと推察される（課題①）。また、ピキア酵母はメタノール資化能を有しているにもかかわらず、グリセロール残渣に含まれるメタノールを炭素源として使用できないことも明らかとなった（課題②）。この現象は、ピキア酵母はグリセロールを優先的に代謝していることを意味しており、このメカニズムを解明できればピキア酵母における芳香族化合物群の発酵生産収率を更に向上できると考えられる。すなわち、高濃度のグリセロール残渣を含む環境下でも増殖でき、かつグリセロールとメタノールを同時に代謝できるピキア酵母の開発は、グリセロール残渣を原料とするバイオプロセスの開発におけるコア技術になると考えた。

7.2 研究開発項目

予備検討の結果も踏まえ、先述した事業計画を遂行するには、2つの大きな研究開発が不可欠である。1つ目は「SAF 製造プロセスで生じるグリセロール残渣を有効活用できる菌株の開発」、2つ目は「グリセロールを原料としたバイオ製品の創出」である。

「SAF 製造プロセスで生じるグリセロール残渣を有効活用できる菌株の開発」では、進化工学を応用したストレス耐性型ピキア酵母株の開発（研究開発項目①）と、トランスポーター工学によるグリセロール/メタノール同時資化型ピキア酵母の開発（研究開発項目②）を行い、最終的にこれらを組み合わせる。

研究開発項目①

「進化工学を応用したストレス耐性型ピキア酵母株の開発」

前述のように、グリセロール残渣を原料に芳香族化合物を直接発酵生産できれば、BDF/SAF 製造コストを大幅に削減することができる。

バクテリアでは、グリセロール残渣での繰り返し培養による適応進化でバクテリアの生育が大幅に向上することが報告されている [91]。しかしながら、より高等な真核生物である酵母では環境応答機構がバクテリアとは根本的に異なるため、独自の開発手法が必要となる。また、菌体の生育のみを指標に適応進化を行った株では、菌体の生育上の負荷となる芳香族化合物生産に関連するゲノム部位に変異が入る可能性が高く、芳香族化合物生産量の低下が予見される。そのため、ピキア酵母に適した進化工学手法を開発するとともに、芳香族化合物の生産性を簡便にモニターすることが必須となる。そこで、これまでの先端研究で開発してきた「チロシン生産性を菌体の呈色度合いや蛍光強度を指標に選定できる技術」[16, 19]を応用する。チロシンから2段階の酵素反応で得られる蛍光色素ベタキサンチンをスクリーニング手段として用いることで、菌体の生育だけでなく、芳香族化合物生産における中間体「チロシン」までの代謝レベルを簡便に評価でき、グリセロール残渣を効率よく

芳香族化合物に変換できるピキア酵母株の獲得が期待される。具体的には、まず、ピキア酵母にベタキサンチン生合成経路の酵素をプラスミド保持の形で導入したベタキサンチン生産株を作成し、その菌株を精製グリセロール培地で前培養する。次に、増殖した菌体を、グリセロール残渣を低濃度で含む培地へ植菌する。3日～4日培養した菌体を回収し、菌体濁度に応じて希釈した後、再度、グリセロール残渣を低濃度で含む培地へ播種する。この工程をグリセロール残渣の濃度を徐々に上げながら繰り返すことで、グリセロール残渣を高濃度で含む環境下でも生育でき、かつチロシン生産性が高い進化型ピキア酵母株を、菌体の生育およびベタキサンチンの呈色度合いを指標に獲得する（図 7-3）。続いて、獲得した進化株の全ゲノム配列解析を行い、グリセロール残渣での生育に寄与する酵母ゲノム DNA 上の変異を同定する。更に、同定した変異を進化前の菌株へ導入し、グリセロール残渣での培養試験を行い、その有効性を検証する。

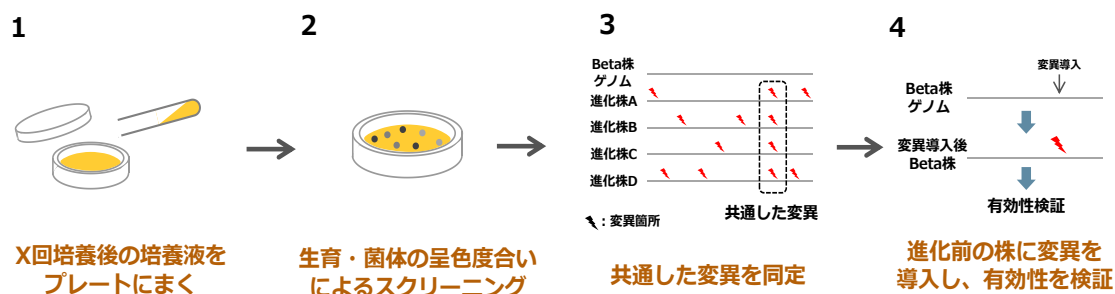


図 7-3 繰り返し培養による進化型酵母株の獲得および変異箇所の同定

研究開発項目②

「トランスポーター工学によるグリセロール/メタノール同時資化型ピキア酵母の開発」

グリセロール残渣を原料とした高効率なバイオプロセスを開発するには、グリセロールが存在する場合においてもメタノールを代謝するための工学が必要である。ピキア酵母では膜貫通タンパク質である Glycerol Transporter 1 (GT1) を欠損させることで、培地中にグリセロールが存在する場合においてもメタノールを代謝できることが報告されており、これは、GT1 を経てグリセロールが細胞内に取り込まれるとメタノール代謝に関連する酵素の発現が抑制されるためと考察されている [92]。しかしながら、この手法ではグリセロール取り込み能力が著しく低下し生育が悪化するため、本研究開発には適さない。そこで、本研究開発では、ピキア酵母の GT1 を欠損させた株に、他生物種由来のグリセロール取り込みを担う酵素を導入し、グリセロール/メタノール同時資化型ピキア酵母の獲得を目指す（図 7-4）。まず、様々な生物種のグリセロール取り込みを担う酵素について系統樹解析を行い、異なるグループに属する酵素を選抜する。次に、前述の研究開発項目①で獲得したグ

グリセロール残渣で生産可能なピキア酵母からベタキサンチン生産に關与するプラスミドを抜き、さらに GT1 を欠損させた上で、選抜した酵素をそれぞれ発現させる。そして、グリセロールとメタノールの混合培地で培養しグリセロールとメタノールの取り込み能力を調べる。

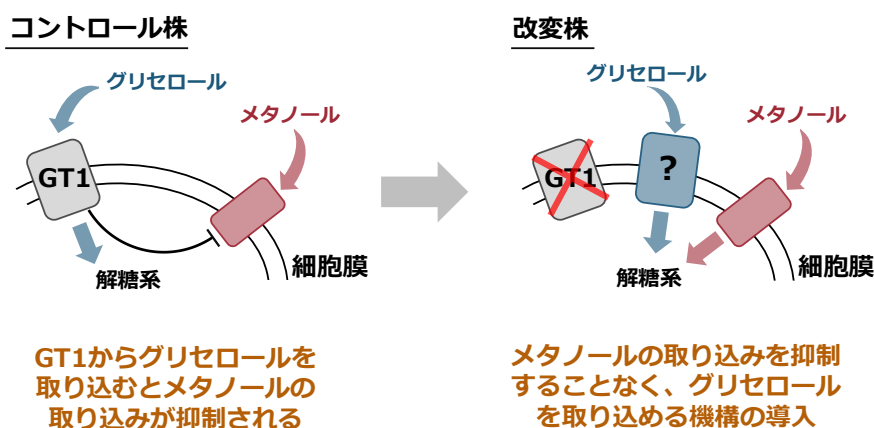


図 7-4 グリセロールとメタノールを同時に代謝できる新規酵母株の開発

本研究開発「SAF 製造プロセスで生じるグリセロール残渣を有効活用できる菌株の開発」の独創的な点は、グリセロール残渣を直接微生物発酵の原料として使用する点、また、グリセロール残渣に含まれるグリセロールとメタノールの両方を炭素源として使用できる酵母株を開発する点である。また、チロシンから合成できる色素ベタキサンチンをスクリーニング手段として用いることで、生育とチロシン生産性の両面から微生物の適応進化を行うことが可能である。予備実験の結果、これまでバイオものづくりに一般的に使用されてきた大腸菌やサッカロ酵母、ヤロウィア酵母はメタノールを代謝できなかった。更には、4% (w/v) 以上のメタノールを含む培地では生育阻害、または生育不可が見られた。一方で、ピキア酵母はメタノールを代謝できることに加え、4% (w/v) 以上のメタノールを含む培地でも生育可能である。本研究開発は、ピキア酵母のメタノール資化性に着目し、グリセロールとメタノールを含むグリセロール残渣から効率的なバイオものづくりを試みる研究開発である。

「グリセロールを原料としたバイオ製品の創出」では、図 5-10 に示した 2×2 の結果も参考に、ピキア酵母で発酵生産させる化合物を選定し、それぞれの生合成経路を導入することでグリセロール残渣を原料とした芳香族化合物の発酵生産に取り組む。ここでは、例として、「ハイドロキノン」、「フェノール」、「ビフェノール」、「サリチル酸」の 4 つの化合物の発酵生産戦略について述べる。それぞれの代謝物の生合成経路を図 7-5 に示す。

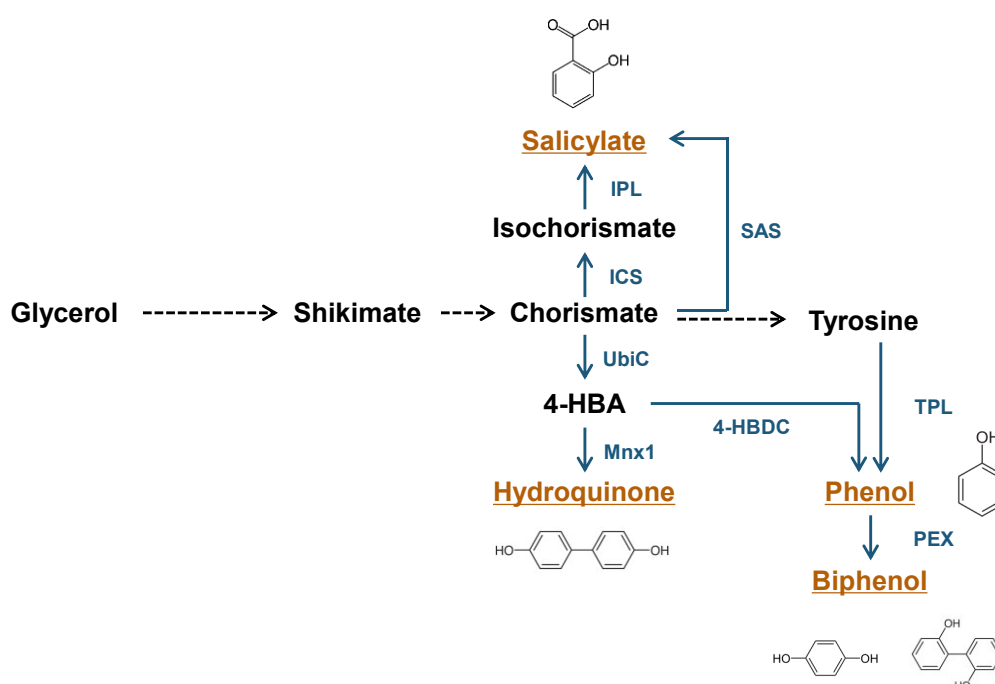


図 7-5 各種ターゲット化合物の生合成経路

ICS: isochorismate synthase; IPL: isochorismate pyruvate lyase; SAS: salicylate synthase; UbiC: chorismate pyruvate-lyase; Mnx1: 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase; 4-HBDC: 4-hydroxybenzoate decarboxylase; TPL: tyrosine phenol-lyase; PEX: peroxidase;

「ハイドロキノン」

ハイドロキノン (Hydroquinone) の生合成については、コリスミ酸から得られる 4-ヒドロキシ安息香酸 (4-hydroxybenzoic acid; 4-HBA) を経て合成する代謝経路が存在するが、筆者の知る限り、微生物を用いたハイドロキノン生産の報告はない。ハイドロキノンを生合成するには、コリスミ酸から 4-HBA を合成する酵素 chorismate pyruvate-lyase (UbiC) および 4-HBA からハイドロキノン合成する酵素 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase (Mnx1) を導入する必要がある。

「フェノール」

フェノール (Phenol) の生合成には、第 2 章で述べたように tyrosine phenol-lyase (tpl) を導入してチロシンから 1 段階の反応で合成する経路と 4-hydroxybenzoate decarboxylase (4-HBDC) の導入により、4-HBA から 1 段階の反応で合成する経路がある (図 7-5)。RITE と住友ベークライトの合併会社である Green Chemicals 社は、微生物を用いたフェノール開発技術に関する特許を保有しており、フェノール生産に関して競合となる。Green chemicals 社は RITE で開発された技術のライセンス先企業である。RITE はコリネ菌を 2 段階の高密度・非増殖型プロセスで培養し、第 1 段階で炭素源である

グルコースを 4-HBA に変換し、第 2 段階で 4-HBA をフェノールに変換する。しかしながら、この培養技術に特許性はない。文献や特許情報を参照すると、コリスミ酸を 4-HBA に変換する酵素である 4-HBDC について、様々な生物種由来の酵素の中から活性の高い酵素を同定しており、これが特許取得の主要因であった [93]。

「ビフェノール」

ビフェノール (Biphenol) は、酵素 peroxidase (PEX) を導入することにより、フェノールから 1 段階の反応で合成できる。筆者の知る限り、微生物を用いたビフェノールの生産報告はない。

「サリチル酸」

サリチル酸 (Salicylate) は、酵素 salicylate synthase (SAS) を導入することで、シキミ酸経路の中間体であるコリスミ酸 (Chorismate) から 1 段階の反応で合成できる [94]。また、コリスミ酸をイソコリスミ酸 (Isochorismate) に変換する酵素 isochorismate synthase (ICS) およびイソコリスミ酸をサリチル酸に変換する酵素 isochorismate pyruvate lyase (IPL) を導入することで 2 段階の反応で合成することも可能である [95]。

これらの化合物のほとんどは、まだ微生物を用いた生産報告がないか、または生産量がごくわずかである。その理由の一つは、これらの化合物が微生物に対して強い毒性を持つことである。そこで、先端研究を通して開発した「微生物培養系と膜抽出技術とのカップリングにより微生物への毒性を低減させる技術」を応用する。それぞれの目的化合物の抽出に適した有機溶剤を検討することで、膜抽出技術を用いて目的化合物を効率的に発酵生産させることが可能となる。

7.3 参考資料および引用文献

[91] Wang, Z. *et al.*, Activation of glycerol metabolism in *Xanthomonas campestris* by adaptive evolution to produce a high-transparency and low-viscosity xanthan gum from glycerol, *Bioresour. Tech.*, 2016, **211**, 390-397.

[92] Li, X. *et al.*, Transcriptional analysis of impacts of glycerol transporter 1 on methanol and glycerol metabolism in *Pichia pastoris*, *FEMS Yeast Resear.*, 2018, 18, 1.

[93] Kitade, Y. *et al.*, Production of 4-hydroxybenzoic acid by an aerobic growth-arrested bioprocess using metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*.

Applied and Environmental Microbiology, 2018, **84** (6), e02587-17.

[94] Mishra, A. K. *et al.*, Salicylic acid biosynthesis and metabolism: A divergent pathway for plants and bacteria. *Biomolecules*, 2021, **11**, 705.

[95] Zhang, M. *et al.*, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level production of salicin. *ACS Omega*, 2022, **7** (37), 33147-33155.

第 8 章 知財戦略

8.1 登録特許調査（海外）

提案したイノベーション・アイデア【バイオ燃料（BDF/SAF）製造過程に生じるプロセス残渣「グリセロール」を原料としたバイオものづくり】を実現するための知財戦略を立案する前段階として、「SAF 製造」および「グリセロール残渣の処理」の両観点で、取得されている特許の外観を調査した。具体的には、Web サイト「The Lens」[96]で「Sustainable Aviation Fuel」「Crude Glycerol」のワードを含む知財をそれぞれリストアップした。

「Sustainable Aviation Fuels」

検索項目を「**Sustainable and Aviation and Fuel**」とし、「Sustainable」「Aviation」「Fuel」の 3 語を含む特許を検索したところ、合計 4750 件の特許がヒットした。年代別の特許出願件数をグラフ化したものを図 8-1 に示すが、特許出願件数は右肩上がり増加しており、今後も増加していくことが予測できる。特許の内容としては、SAF の製造技術（様々な原料からの SAF 製造法など）に関する特許が大多数を占めていた。

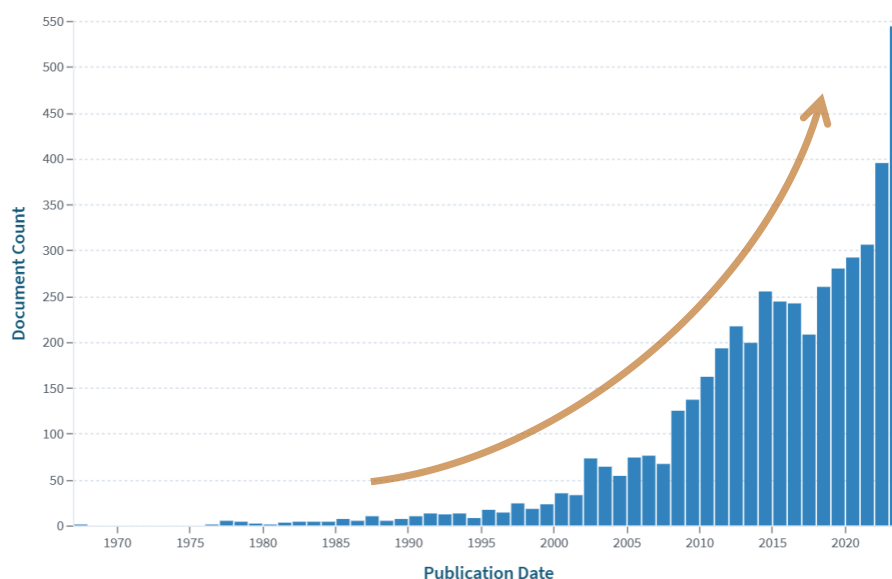


図 8-1 SAF 製造に関連する出願特許一覧（世界）

「The Lens – Free & Open Patent and Scholarly Search」[96]で 2023/10/3 に筆者が調査

「Crude Glycerol」

一方、検索項目を「**Crude and Glycerol**」とし、「Crude」「Glycerol」の 2 語を含む特許を検索したところ、合計 271,466 件の特許がヒットした。年代別の特許出願件数をグラフ化したものを図 8-2 に示すが、特許出願件数は 2015 年頃まで右肩上がり増加し、そ

の後は横ばいであった。これは、BDF 生産量の増加に伴いグリセロール残渣に関連する特許出願数は増加してきたが、現在は BDF 生産に関する技術開発が成熟期に入ってきたことを示しているのかもしれない。また、特許の大半はグリセロール残渣の精製に関するものであったが、一部、グリセロール残渣の有効利用に関する特許も含まれており、これらの特許は本書で提案する事業を行う上での競合となる可能性がある。

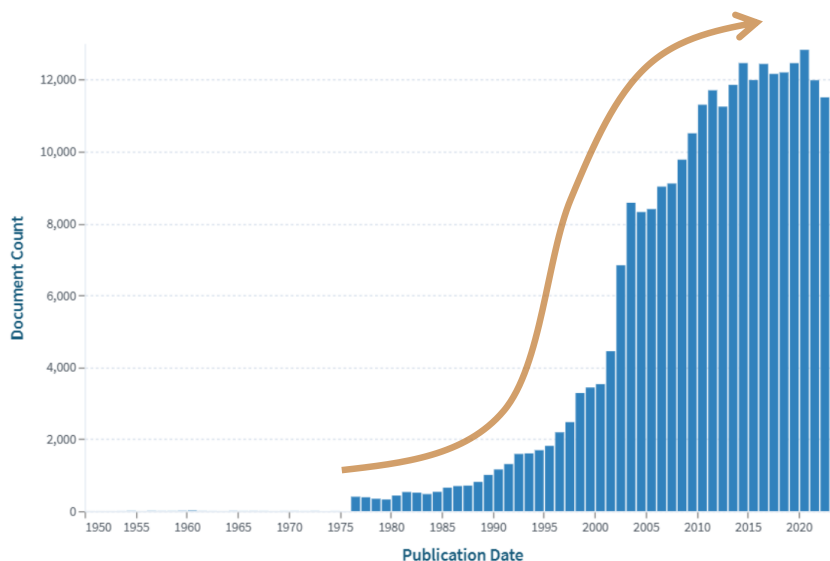


図 8-2 グリセロール残渣に関連する出願特許一覧（世界）

「The Lens – Free & Open Patent and Scholarly Search」[96]で 2023/10/3 に筆者が調査

8.2 登録特許調査（国内）

本書では、日本でのビジネスを想定した戦略を立案してきた。そこで、本書で提案するビジネスの実施に関連する特許を調査するために、特許情報プラットフォーム「J-PlatPat」[97] を利用して、日本国内の登録特許を調査した。検索対象は「和文テキスト」「国内文献」で、検索項目は「請求の範囲」とした。「請求の範囲」に『ディーゼル』『燃料』『Sustainable Aviation Fuel』『SAF』のいずれかの単語を含み、かつ『グリセロール』または『グリセリン』の単語を少なくとも 1 つ含む国内特許および新案公報を検索したところ、863 件の公開特許公報が抽出された。対象を 2003 年以降に出願された特許に限定し、また、要約を見る限り、本書で提案する事業アイデアと関連性のない特許を除外したところ、本書で提案する事業アイデアと関連性のある特許は 170 件であった（関連特許の一覧は参考資料_表 S8-1 をご覧ください）。

この 170 件の特許の大部分は、「BDF/SAF の製造法」および「グリセロール残渣の処理」に関するものであった。一方、グリセロール残渣の有効利用に関する特許もいくつか出願されており、特に、表 8-1 に示すように、微生物を用いたグリセロール残渣からの有用化合

物生産に関連する特許として、「グリセリン高含有培養培地上での発酵による 1,3-プロパンジオールの改良された生産を行うための微生物および方法」、「グリセロール廃液からのエタノール生産方法」などが挙げられる。

表 8-1 微生物を用いたグリセロール残渣からの物質生産_関連特許（国内）

公開番号	出願年	発明の名称	出願人/権利者	FIサブクラス
特表2020-529849	2018	グリセリン高含有培養培地上での発酵による1,3-プロパンジオールの改良された生産を行うための微生物および方法	METabolic Explorer	C12P
特表2018-512135	2016	粗製グリセリンを用いたバイオマス及び油分の高密度生産	MARA Renewables Corporation	C12N
特開2014-158438	2013	グリセロール廃液からのエタノール生産方法	電力中央研究所	C12N
特開2013-118828	2011	グリセリン分解能力に優れた新規な光合成細菌株、及びかかる細菌株を使用したグリセリン分解方法	関西電力	C12N
特表2011-529339	2009	酵母ピキア・パストリスの発酵によるキチン、その誘導体及びグルコース、マンノース及び／又はガラクトースを含有するポリマーの共生産のための方法	73100-SETENTA E TRES MIL E CEM,LTD	C12P
特開2008-007509	2007	グリセロールからジクロロプロパノールを製造するための方法であって、該グリセロールが最終的にバイオディーゼルの製造における動物性脂肪の転化から生じる方法	SOLVAY	C07B

特許情報プラットフォーム「J-PlatPat」[97]で 2023/10/4 に筆者が調査

特に、2009 年にポルトガルのバイオテクノロジー企業【73100-SETENTA E TRES MIL E CEM, LTD】によって出願された特許「特許 2011-529339_酵母ピキア・パストリスの発酵によるキチン、その誘導体及びグルコース、マンノース及び／又はガラクトースを含有するポリマーの共生産のための方法」[98]は、本書で提案する事業と同じ宿主「ピキア酵母」を用いたグリセロール残渣からの物質生産に関する特許であるため、より詳細に調査した。

特許 2011-529339

「特許 2011-529339」の要約を図 8-3 に示す。この特許は、ピキア酵母を用いた BDF 製造におけるプロセス残渣「グリセロール」からのグルコサミンポリマー（キチン-グルカン複合体）およびその誘導体の製造に関するものである。特許請求の範囲には、原料としてグリセロールの他に、メタノールおよびグリセロールとメタノールの混合物の使用も含まれている。

(57)【要約】

本発明は、好気性条件下でバイオリクター中で酵母ピキア・パストリスの高細胞密度発酵により、好ましくは、バイオディーゼル産業からのグリセロールの副産物を炭素源として用いて、グルコサミンポリマー（キチン、キトサン、又はそのあらゆる誘導体）とグルコース、マンノース及び／又はガラクトースを含むポリマーの共生産のための方法に関する。純粋なグリセロール、純粋なメタノール、グリセロールリッチ又はメタノールリッチな混合物もまた炭素源として使われうる。本発明はまた、グルコース、マンノース及び／又はガラクトースを含むポリマーとともに、高い細胞密度と高い細胞壁キチン含量を得るために十分に最適化された P. パストリス発酵プロセスに関する。

図 8-3 特許 2011-529339【要約】

本書で提案するアイデアは、上記特許と同様、ピキア酵母を宿主とし、グリセロール残渣を原料としたバイオものづくり事業であり、この点では競合となり得る可能性が大きい。し

かしながら、上記特許では、BDF 生産における副生成物「グリセロール残渣」を完全に精製した後、そのグリセロールを原料にピキア酵母を増殖させた例が記載されているだけであり、グリセロール/メタノールの両方を原料にピキア酵母を増殖させた実施例もなかった。本事業の技術戦略では、「高濃度のグリセロール残渣を直接原料にし、増殖可能なピキア酵母の開発」と「グリセロール/メタノールを同時に資化できるピキア酵母の開発」について記載した。技術戦略に記載した通りの技術開発が成功すれば、新たな知的財産権を取得できる可能性は高い。

8.3 研究成果の権利化

提案したイノベーション・アイデア【SAF 製造過程に生じるプロセス残渣「グリセロール」を原料としたバイオものづくり】を実現するには、「グリセロール残渣を有効活用できる菌株の開発」、「グリセロール残渣を原料としたバイオ製品の創出」の 2 つの研究開発が必要である。また、本事業で生産する化合物は微生物に対して毒性のある芳香族化合物であるため、「微生物培養系と膜抽出技術とのカップリングにより微生物への毒性を低減させる技術」も必須である。そこで、これらの技術に関する権利取得を含めた戦略、ライセンス戦略等についてまとめた。

グリセロール残渣を有効活用できる菌株の開発

8.2「登録特許調査（国内）」で日本国内の「BDF/SAF の製造法」および「グリセロール残渣の処理」に関連する登録特許を調査したところ、本書で提案する事業アイデアに関連する特許は 170 件あったが、「高濃度のグリセロール残渣を含む環境下でも増殖できる菌株の開発」「グリセロール/メタノールを同時に代謝できる菌株の開発」に関する特許は未だ取得されていない。したがって、7.2「研究開発項目」に記載した研究開発が成功すれば、特許出願を行い、知的財産権の獲得を試みる。

グリセロールを原料としたバイオ製品の創出

本事業におけるグリセロールから様々な芳香族化合物までの生合成経路に関して、目新しさはない。実際に微生物を宿主に生産を試みた論文などで公知となっている合成経路や酵素をピキア酵母に導入することで、各種芳香族化合物の生産を試みる。一方で、これまで微生物での生産が報告されていない芳香族化合物の生産や、生合成経路の酵素の高活性化に成功すれば、知財化できる可能性は十分にあるだろう。

微生物培養系と膜抽出技術とのカップリングにより微生物への毒性を低減させる技術

先端研究②で紹介した「中空糸膜モジュールを利用したフェノール膜抽出システムの開

発および培養系とのカップリングによる連続的なフェノール生産」の研究開発に関しては、現在、特許出願中である（発明の名称：【フェノール類の製造方法】、出願番号：【特願 2023-142382】）。なお、本特許出願は企業との共同出願であるため、本書で提案した事業を実施するためには企業とのライセンス契約の締結が必須である。

また、菌株の開発方法、菌株の遺伝子組換え等によるターゲット化合物の生産性の向上、培養条件の検討、スケールアップ技術等についてはノウハウとして自社内で開発プラットフォームを構築する。

8.4 参考資料および引用文献

表 S8-1 バイオ燃料製造およびグリセロール残渣に関連する国内特許一覧

公開番号	出願年	発明の名称	出願人/権利者	FIサブクラス
特開2023-096319	2021	バイオディーゼル燃料の精製方法	RITA、水光技研	B01D
特開2023-073638	2021	グリセリンを含む原料液と水素とを原料とするプロピレンの製造方法	旭化成	C07C
特開2022-143758	2021	グリセリン脂肪酸エステル組成物及び、該グリセリン脂肪酸エステル組成物を含有する潤滑油組成物又は燃料油組成物	ADEKA	C10M
特開2022-002522	2021	粗製グリセリンを用いたバイオマス及び油分の高密度生産	MARA Renewables Corporation	C12N
WO2021/193887	2021	バイオディーゼル燃料の製造方法	バイオ燃料技研工業、丸紅	C10G
特開2021-121200	2021	植物脂質から工業製品を製造する工程	CSIRO	C12N
特開2022-045854	2020	バイオディーゼル燃料の二段製造方法	アトラスコア	C10L
特表2023-504849	2020	バイオベースの材料をアップグレードするための方法およびアップグレードされた材料	NESTE	C10G
特表2022-544550	2020	バイオ燃料を生産するための高温及び高圧での脂肪の加水分解による供給材料の前処理プロセス	NextChem	C10L
WO2020/213701	2020	メタン発酵方法、メタン発酵システム、廃棄物再利用方法および廃棄物再利用システム	クボタ環境サービス、バイオ燃料技研工業	C12P
WO2020/059885	2019	グリセリンの精製方法および精製システム、剥離剤の製造方法および剥離方法	バイオ燃料技研工業、丸紅	C07C
特開2020-005537	2018	再生可能エネルギー利用システム	倉橋 みどり	C12M
特表2021-506754	2018	燃料およびオイル適用のためのケトンを製造する方法	NESTE	C07C
特開2019-088285	2018	脂質製造のための工程	CSIRO	C12N
特表2020-529849	2018	グリセリン高含有培養培地上での発酵による1,3-プロパンジオールの改良された生産を行うための微生物および方法	METabolic Explorer	C12P
特表2020-524197	2018	再生可能なベースオイル、ディーゼルおよびナフサを製造するための方法	NESTE	C10G
特表2020-524196	2018	脂肪酸の前分画法による再生可能なベースオイルおよびディーゼルの製造	NESTE	C10G
特開2019-037916	2017	水処理方法、水処理システム、脱窒剤の製造方法及び脱窒剤の製造装置	クボタ環境サービス、バイオ燃料技研工業	C02F
特開2018-131540	2017	燃料改質システム	ダイセル、本田技研工業	C10L
特表2019-518088	2017	改善されたグリセロール吸着のための吸着剤設計	アメリカ合衆国	C10L
特表2019-502013	2016	バイオ燃料	Bio-bean	C10L
特開2016-179989	2016	天然油供給原料から燃料を精製および製造する方法	Elevance Renewable Sciences	C07C
特表2018-512135	2016	粗製グリセリンを用いたバイオマス及び油分の高密度生産	MARA Renewables Corporation	C12N
特開2017-088779	2015	バイオディーゼル燃料の製造方法およびバイオディーゼル燃料の製造装置	JFE環境サービス	C10L
特開2017-014319	2015	バイオディーゼルの製造方法及びバイオディーゼル製造装置	熊本大学	C10L
特開2017-002261	2015	燃料油用潤滑性向上剤および燃料油組成物	日油	C10L
特表2017-529060	2015	植物脂質から工業製品を製造する工程	CSIRO	C12P
特表2017-509780	2015	添加剤組成物、およびそのような組成物を含む高機能燃料	TotalEnergies	C10L
特表2017-509325	2015	光再生可能バイオ燃料の製造方法	VERDANT BIOPRODUCTS Ltd.	C12P
特開2016-037523	2014	洗剤	鈴木 正誉	C11D
特開2016-036760	2014	グリセリン含有廃液の処理方法及び処理装置	栗田工業、宮崎大学	C02F
特開2016-017094	2014	バイオディーゼル燃料の製造方法	JFEスチール	C10L
特開2015-154754	2014	バエニパチルス（Paenibacillus）属細菌のグリセロール代謝促進方法	電力中央研究所	C12N
特表2017-501269	2014	オレフィン化合物及び炭化水素燃料又はその留分の製造方法	Varsalis	C10G
特開2015-203067	2014	バイオディーゼル油の製造システム	立花マテリアル、戸田建設	C10L
特表2017-502113	2014	トリアシルグリセロールが豊富な原料を変換するための並流断熱反応システム	Lummas Technology	C10G
特開2015-002743	2014	生物油ならびにその生産および使用	DSM	C10L
特表2016-523093	2014	バイオ燃料生産のための改変された珪藻	Selectis	C12N
特開2015-040268	2013	燃料油の製造方法	富士エコ研究開発	C10L

公開番号	出願年	発明の名称	出願人/権利者	FIサバクラス
特開2023-096319	2021	バイオディーゼル燃料の精製方法	RITA、水光技研	B01D
特開2023-073638	2021	グリセリンを含む原料液と水素とを原料とするプロピレンの製造方法	旭化成	C07C
特開2022-143758	2021	グリセリン脂肪酸エステル組成物及び、該グリセリン脂肪酸エステル組成物を含有する潤滑油組成物又は燃料油組成物	ADEKA	C10M
特開2022-002522	2021	粗製グリセリンを用いたバイオマス及び油分の高密度生産	MARA Renewables Corporation	C12N
WO2021/193887	2021	バイオディーゼル燃料の製造方法	バイオ燃料技研工業、丸紅	C10G
特開2021-121200	2021	植物脂質から工業製品を製造する工程	CSIRO	C12N
特開2022-045854	2020	バイオディーゼル燃料の二段製造方法	アトラスコア	C10L
特表2023-504849	2020	バイオベースの材料をアップグレードするための方法およびアップグレードされた材料	NESTE	C10G
特表2022-544550	2020	バイオ燃料を生産するための高温及び高圧での脂肪の加水分解による供給材料の前処理プロセス	NextChem	C10L
WO2020/213701	2020	メタン発酵方法、メタン発酵システム、廃棄物再利用方法および廃棄物再利用システム	クボタ環境サービス、バイオ燃料技研工業	C12P
WO2020/059885	2019	グリセリンの精製方法および精製システム、剥離剤の製造方法および剥離方法	バイオ燃料技研工業、丸紅	C07C
特開2020-005537	2018	再生可能エネルギー利用システム	倉橋 みどり	C12M
特表2021-506754	2018	燃料およびオイル適用のためのケトンを製造する方法	NESTE	C07C
特開2019-088285	2018	脂質製造のための工程	CSIRO	C12N
特表2020-529849	2018	グリセリン高含有培養培地上での発酵による1,3-プロパンジオールの改良された生産を行うための微生物および方法	MEtabolic Explorer	C12P
特表2020-524197	2018	再生可能なベースオイル、ディーゼルおよびナフサを製造するための方法	NESTE	C10G
特表2020-524196	2018	脂肪酸の前分画法による再生可能なベースオイルおよびディーゼルの製造	NESTE	C10G
特開2019-037916	2017	水処理方法、水処理システム、脱窒剤の製造方法及び脱窒剤の製造装置	クボタ環境サービス、バイオ燃料技研工業	C02F
特開2018-131540	2017	燃料改質システム	ダイセル、本田技研工業	C10L
特表2019-518088	2017	改善されたグリセロール吸着のための吸着剤設計	アメリカ合衆国	C10L
特表2019-502013	2016	バイオ燃料	Bio-bean	C10L
特開2016-179989	2016	天然油供給原料から燃料を精製および製造する方法	Elevance Renewable Sciences	C07C
特表2018-512135	2016	粗製グリセリンを用いたバイオマス及び油分の高密度生産	MARA Renewables Corporation	C12N
特開2017-088779	2015	バイオディーゼル燃料の製造方法およびバイオディーゼル燃料の製造装置	JFE環境サービス	C10L
特開2017-014319	2015	バイオディーゼルの製造方法及びバイオディーゼル製造装置	熊本大学	C10L
特開2017-002261	2015	燃料油用潤滑性向上剤および燃料油組成物	日油	C10L
特表2017-529060	2015	植物脂質から工業製品を製造する工程	CSIRO	C12P
特表2017-509780	2015	添加剤組成物、およびそのような組成物を含む高機能燃料	TotalEnergies	C10L
特表2017-509325	2015	光再生可能バイオ燃料の製造方法	VERDANT BIOPRODUCTS Ltd.	C12P
特開2016-037523	2014	洗剤	鈴木 正誉	C11D
特開2016-036760	2014	グリセリン含有廃液の処理方法及び処理装置	栗田工業、宮崎大学	C02F
特開2016-017094	2014	バイオディーゼル燃料の製造方法	JFEスチール	C10L
特開2015-154754	2014	パエニバチルス（Paenibacillus）属細菌のグリセロール代謝促進方法	電力中央研究所	C12N
特表2017-501269	2014	オレフィン化合物及び炭化水素燃料又はその留分の製造方法	Varsalis	C10G
特開2015-203067	2014	バイオディーゼルの製造システム	立花マテリアル、戸田建設	C10L
特表2017-502113	2014	トリアシルグリセロールが豊富な原料を変換するための並流断熱反応システム	Lummus Technology	C10G
特開2015-002743	2014	生物油ならびにその生産および使用	DSM	C10L
特表2016-523093	2014	バイオ燃料生産のための改変された珪藻	Selectis	C12N
特開2015-040268	2013	燃料油の製造方法	富士エコ研究開発	C10L
特開2015-039348	2013	微生物変異株、当該微生物変異株を用いた廃水処理方法及び廃水処理装置	筑波大学	C02F
特開2014-158438	2013	グリセロール廃液からのエタノール生産方法	電力中央研究所	C12N
特開2014-139283	2013	バイオマス液化物の製造方法及びバイオマス液化物製造システム	新日鉄住金化学	C09K
特開2014-135906	2013	形質転換微生物類及びその培養方法	東京農工大学	C12N
特表2015-519918	2013	組み換え微生物およびそれにより作製されるバイオディーゼル	Lanzatech	C12N
特開2013-199654	2013	燃焼装置に用いる燃料及びその製造方法	アイ・シー・ティ化成	C10L
特開2014-074147	2012	バイオ燃料油組成物	アイエーグループ	C10L
特開2013-224811	2012	廃グリセリン燃焼装置	小池 正志	F23C
特開2013-194110	2012	固体燃料の製造方法並びに固体燃料及びその使用方法	太平洋セメント	B09B
特開2013-183687	2012	油脂生産方法及び油脂生産装置	住友重機械工業	C12M
特開2013-173826	2012	廃グリセリン再生燃料製造装置および方法	山下 博	C10L
特開2013-144267	2012	最終処分場の早期安定化方法	大成建設、福岡大学	B09B
特表2015-511118	2012	脂質製造のための工程	CSIRO	C12P
特開2013-249325	2012	バイオディーゼル燃料の製造方法	前田道路	B01J
特表2014-525490	2012	バイオディーゼルの製造方法	RIST (Research Institute of Industrial Science & Technology)	C07B
特開2013-245238	2012	バイオディーゼル燃料の製造方法、当該方法に使用する残留アルコール除去装置及びバイオディーゼル燃料の製造装置	太田油脂	C10L
特開2013-118828	2011	グリセリン分解能力に優れる新規な光合成細菌株、及びかかる細菌株を使用したグリセリン分解方法	関西電力	C12N
特開2013-095865	2011	混合燃料の製造方法、及び鉱物油の使用方法	前田建設工業、神奈川大学	C10L
特開2013-087126	2011	液体燃料の製造方法、その製造方法により製造された液体燃料およびその液体燃料を含んでなるA重油代替燃料組成物	バイオ燃料技研工業	C10L
特開2013-079309	2011	廃油系固体燃料の製造方法	太平洋セメント	B09B
特表2014-520918	2011	バイオディーゼル教育訓練設備及び産業シミュレーション	Biominas Engenharia de Energias	C10L
特開2013-010699	2011	グリセリン系固形物からグリセリン原料を製造する方法および製造装置	Oneworld	C07C
特開2012-184366	2011	乳化燃料	ライオン	C10L
特開2012-179003	2011	バイオディーゼル燃料の製造方法	国立高等専門学校機構	A23K
特開2012-161733	2011	バイオディーゼル燃料製造用触媒組成物、当該触媒組成物の製造方法、当該触媒組成物を用いたバイオディーゼル燃料の製造方法及び当該方法に使用されるバイオディーゼル燃料製造用装置	同志社大学	B01J

特開2012-139216	2011	新規微生物、当該新規微生物を用いた廃水処理方法及び廃水処理装置	筑波大学	C02F
特表2013-543910	2011	脂質材料を精製するための方法	NESTE	C11B
特表2013-545461	2011	高グリセリン濃度を用いる1,3-プロパンジオール生産用微生物	MEtabolic Explorer	C12N
特開2012-067299	2011	高遊離脂肪酸原料からのバイオディーゼル及びグリセリンの生成	Renewable Energy Group	C10L
特開2012-012401	2011	脂肪酸エステル及びそれらの使用	Arizona Chemical Company	C07C
特表2013-534827	2011	脂質を生成する方法	CSIRO	A01H
特表2013-529906	2011	脂質の製造のための方法および微生物	NESTE	C10L
WO2011/132511	2011	新規微生物並びにそれを用いた水素製造方法、1,3-プロパンジオール製造方法及びバイオディーゼル廃液の処理方法	サッポロビール	C12N
特表2013-523160	2011	バイオ燃料を生成する方法およびシステム	Heliae	C12N
特開2012-062430	2010	バイオディーゼル燃料の製造方法	エムエムシーセンター	C10L
特開2012-039975	2010	グリセリンの処理方法	大阪府立大学	C12P
特開2012-039912	2010	グリセリンの処理方法および下水余剰汚泥の処理方法	大阪府立大学	C02F
特開2011-256265	2010	非水式バイオディーゼル燃料油の製造方法及びその製造装置	グリーンテックソリューション	C10L
特開2011-236390	2010	廃油の精製方法	活水プラント	C10G
特開2011-214734	2010	廃グリセリンの燃料処理装置および方法	前田道路、	C10L
特表2013-507441	2010	天然油供給原料から燃料を精製および製造する方法	Elevance Renewable Sciences	C07B
特表2013-503920	2010	バイオディーゼルの生産のためのシステムおよび過程	Albemarle	B01J
WO2011/024989	2010	グリセリン系固形物から液化物を製造する方法	Oneworld	C10L
特表2012-532591	2010	組み換え酵母株を用いたグルコース、ガラクトース、およびアラビノースからのエタノールの発酵生産	DSM	C12N
特表2012-525827	2010	高グリセリン濃度を用いる1,3-プロパンジオール生産のための連続培養	MEtabolic Explorer	C08G
特表2012-525473	2010	バイオディーゼル原料中のモノグリセリド、ジグリセリドおよびトリグリセリドをモデル化するシステムならびにその方法	Aspen Technology	C10L
特開2011-116675	2009	グリセリン精製装置及び精製方法並びにグリセリン改質装置及び改質方法	IHI	B01D
特開2011-105543	2009	グリセリン改質装置及びグリセリン改質方法	IHI	C01B
特開2011-093991	2009	低引火点廃油の処理方法および固体燃料	太平洋セメント	C10L
特開2011-068741	2009	イカダモ属藻類から油脂類を抽出する方法並びに油脂類及び脱油脂残渣の用途	日本触媒	A23K
特開2011-068738	2009	イカダモから油脂類を搾油する方法並びに油脂類及び脱油脂残渣の用途	日本触媒	A23K
特開2011-026394	2009	バイオディーゼル燃料の製造方法、およびバイオディーゼル燃料の製造装置	JOHNAN、同志社大学	C10L
特開2011-006298	2009	グリセリン改質装置および改質方法	IHI	C01B
特開2010-265335	2009	脂肪酸アルキルエステル燃料油の製造方法及び製造装置	錦エンジニアリング、ボーラズ研究所	C10L
特開2010-260960	2009	バイオディーゼル燃料の製造方法及びシステム	中国電力	C10L
特開2010-209166	2009	燃料用混合物及びその使用方法	グリーンテックソリューション	C10L
特開2010-193767	2009	グリセリンの処理方法	大阪府立大学	C10L
特開2010-095714	2009	燃焼装置に用いる燃料の製造方法	アイ・シー・ティ化成	C10L
特表2011-529339	2009	酵母ピキア・パストリスの発酵によるキチン、その誘導体及びグルコース、マンノース及びノ又はガラクトースを含有するポリマーの共生産のための方法	73100-SETENTA E TRES MIL E CEM,LTD	C12P
特表2011-521669	2009	バイオ燃料、バイオディーゼルおよび他の有用化学物質用の脂肪酸を生成する方法	Dacres Wood	C10L
特表2011-520949	2009	粗製グリセロールの精製方法	RHODIA POLIAMIDA E ESPECIALIDADES S.A.	C07C
特表2011-515097	2009	バイオディーゼル燃料を生成するための改良された方法	NEURON BIO	C10L
WO2009/107783	2009	バイオディーゼル燃料油の製造方法、製造装置及びそれに使用する吸着剤充填コラム	グリーンテックソリューション	C10L
特表2011-511122	2009	植物油のエステル交換方法	Qs Biodiesel	C10L
特開2010-139184	2008	グリセリン燃焼暖房装置	さががけ	F23G
特開2010-079346	2008	廃グリセリン含有の木質バイオマス無償貸与サービスシステム	シーバランス	G06F
特開2010-037422	2008	脂肪酸エステルとグリセリンの製造方法および脂肪酸エステルを含むバイオディーゼル並びに使用する固体触媒	クラリアント触媒	B01J
特開2010-001329	2008	ディーゼル燃料の製造方法、及びディーゼル燃料	万作の花	C10G
特開2009-299000	2008	脂肪酸メチルエステルの製造方法および副生グリセリンの使用法	北海道立総合研究機構	C08K
特開2009-298982	2008	粗バイオディーゼル燃料とグリセリンの液-液分離槽およびその液-液分離方法	日立造船	B01D
特開2009-298616	2008	グリセリン改質装置および改質方法	IHI	C01B
特開2009-297669	2008	バイオディーゼル燃料製造用固体塩基触媒、当該触媒の製造方法、当該触媒を用いたバイオディーゼル燃料製造用装置及び当該装置を用いたバイオディーゼル燃料の製造方法	同志社大学、JOHNAN	B01J
特開2009-280761	2008	廃グリセリン添加エマルジョン燃料及びその製造方法	神奈川大学、前田建設工業、月島機械	C10L
特開2009-275127	2008	グリセリンで洗浄を行うバイオディーゼル燃料製造方法	秋田県立大学	C10L
特開2009-262075	2008	グリセリン副産物のリサイクル方法	大林組	B09B
特表2010-528627	2008	微生物による油の生産	Solazyme	C12M
特表2010-523789	2008	ガラクトースに富む多糖、その製造方法及びその応用	73100-SETENTA E TRES MIL E CEM,LTD	C08B
特開2009-144128	2007	バイオディーゼル生成方法及び生成装置	ヘルスクリーン	C10L
特開2009-040979	2007	液化ジメチルエーテルによるメタノール抽出型バイオディーゼル燃料高速製造方法	国立環境研究所	C10L
特開2009-013041	2007	バイオディーゼル燃料（BDF）製造時の副生物グリセリンからの水素製造	エプシロン	C01B
特開2008-291116	2007	バイオディーゼル燃料用添加剤及びその添加剤を含んでる燃料	日本触媒	C10L
特開2008-266476	2007	軽油代替燃料の製造装置	本多電子	C10L
特開2008-231345	2007	バイオディーゼル燃料の製造方法	バイオエナジーズジャパン	B01J
特開2008-212772	2007	バイオディーゼル油製造用固体触媒及び当該固体触媒の製造方法	同志社大学	B01J
特開2008-192423	2007	グリセリンの処理方法及びグリセリンの処理装置	タクマ	C01B
特開2008-111098	2007	高遊離脂肪酸原料からのバイオディーゼル及びグリセリンの生成	Renewable Energy Group	C10L
WO2008/053837	2007	燃料	宇部興産	C10L
特開2008-239938	2007	バイオディーゼル燃料の製造方法	バイオエナジーズジャパン	C10L
特表2009-544810	2007	植物油及び石油バイオディーゼルを含む代替有機燃料配合物	Alternative Fuels Group Inc	C10L
特開2008-007509	2007	グリセロールからジクロロプロパノールを製造するための方法であって、該グリセロールが最終的にバイオディーゼルの製造における動物性脂肪の転化から生じる方法	SOLVAY	C07B
特表2009-536970	2007	バイオディーゼル燃料を製造するための吸着剤粒子を用いる物理的精製方法	GRACE	B01D
特表2009-523880	2007	バイオディーゼル燃料を製造する方法および当該方法によって得られたバイオディーゼル燃料	Biodiesel de Andalucia 2004	C10L

特開2008-143983	2006	油脂を原料とする脂肪酸アルキルエステルの製造方法	宇部マテリアルズ	C07B
特開2008-081559	2006	バイオディーゼル燃料組成物およびその製造方法	日本触媒	C10L
特開2008-045056	2006	バイオディーゼル燃料油製造装置	MHIソリューションテクノロジーズ	C10L
特開2008-031257	2006	ディーゼルエンジン用燃料を製造する方法	旭化成	C10L
特開2008-024841	2006	バイオディーゼル燃料の製造方法	鹿児島大学	C10L
特開2008-023426	2006	粗製グリセリンの処理方法	千葉三港運輸	B09B
特開2008-001856	2006	バイオディーゼル油の製造方法	同志社大学	C07B
特開2007-332250	2006	ディーゼルエンジン用燃料の製法	旭化成	C07B
特開2007-332199	2006	植物油を原料とする自動車用燃料（BDF）の製造方法及び製造装置	阿部 俱己	B01D
特開2007-211139	2006	脂肪酸エステルとグリセリンの製造方法及び製造装置並びに燃料	染谷商店	C10L
特表2009-523866	2006	植物性及び動物性脂肪廃棄物からの燃料取得方法及びその方法を実行するためのプラント	Wulfenia Beteiligungs GmbH	C10L
特開2007-254672	2006	廃食用油の処理装置	寺尾 義典	C11B
WO2006/134845	2006	バイオディーゼル油製造用固体塩基触媒及びその製造方法、バイオディーゼル油製造用反応器及び装置、並びに該装置を用いたバイオディーゼル油の製造方法	同志社大学	B01J
特表2008-541738	2006	バイオディーゼル生産からの副産物である粗製グリセロールを用いた1,3-プロパンジオールの生産方法	精華大学	C12P
特表2008-539308	2006	トリグリセリド処理副生成物を用いる環境調和型の凍結防止又は除氷流体	MRI Research Associates	C09K
WO2006/088123	2006	バイオディーゼル燃料の精製方法	鹿児島大学	C10L
特開2007-099882	2005	バイオディーゼル燃料の製造装置及びバイオディーゼル燃料の製造方法	BSS	C10L
特開2006-274043	2005	軽油代替燃料の製造方法とその装置	コマツ三重	C10L
特開2006-252798	2005	燃料電池用酸素極触媒、直接メタノール型燃料電池及び触媒の製造方法	日立マクセル	B82Y
特表2008-530318	2005	液体バイオ燃料混合物並びにそれを製造するための方法及び装置	Homepage Fraunhofer-Gesellschaft	C10L
特開2006-193497	2005	脂肪酸アルキルエステルの製造方法	グリーンテックソリューション	C07C
特表2008-502780	2005	バイオディーゼルを生産する方法	カーネギーメロン大学	C10L
特開2006-036817	2004	脂肪酸エステルの製造方法および製造装置	木村化工機	C07C
特開2006-028146	2004	油脂類を原料とする脂肪酸エステルの製造方法	アイシーエス	C07B
特開2005-350632	2004	バイオディーゼル燃料の製造方法	CDMコンサルティング	C10L
特開2005-350631	2004	酸性油脂類および変性油脂類からのバイオディーゼル燃料製造方法	CDMコンサルティング	B01J
特開2005-350630	2004	低排出型バイオディーゼル燃料製造技術	CDMコンサルティング	C10L
特開2005-206770	2004	脂肪酸エステルの製造方法及び脂肪酸エステルを含む燃料	アイシーエス	B01J
特表2007-508922	2004	廃水処理プラント汚泥からのバイオディーゼル燃料及び他の有用な化学物質の生成	ミシシッピ大学	A23K
特表2007-509189	2004	燃料内において、特にディーゼル燃料、ガソリン燃料およびナタネ油メチルエステル内において、添加物として使用される酸素含有物の製造方法	コーセー	C10L
特開2005-154647	2003	油脂からのディーゼル燃料油製造プロセス	レポインターナショナル	C10L
特開2005-060591	2003	副産物を生成しないバイオディーゼル燃料の無触媒製造法	農業・食品産業技術総合研究機構	C10L
特開2005-029715	2003	バイオディーゼル燃料の製造方法	産業技術総合研究所	C10L
特開2004-307663	2003	改質燃料製造方法および廃植物油改質装置	明電舎	C10L
特開2004-307608	2003	廃油脂からのディーゼル燃料油の製造方法	日立造船	C10L
特開2004-285312	2003	植物性廃油を固化した燃料及びその製造方法	藤田 東一	C10L
特開2004-217776	2003	バイオディーゼル精製器	吉田 進	C10L
特開2004-182966	2003	脂肪酸エステルの製造装置	木村化工機	B01D
WO2003/070859	2003	ディーゼル燃料用脂肪酸アルキルエステルの製造方法	レポインターナショナル	C10L

特許情報プラットフォーム「J-Plat Pat」[97]で調査（2023/10/4）

[96] 「The Lens – Free & Open Patent and Scholarly Search」、2023/10/3 に調査、
<https://www.lens.org/>

[97] 特許情報プラットフォーム「J-Plat Pat」、2023/10/4 に調査
<https://www.j-platpat.inpit.go.jp/>

[98] 日本国特許庁、特許出願公表番号「特表 2011-529339」、
https://www.j-platpat.inpit.go.jp/gazette_work3/domestic/A/423529000/423529300/423529330/423529339/AB21C92CEDC76E96855D77F87B00BF09BC4F454D731741993DBD6387721A6635/JPA%202011529339-000000.pdf

第9章 財務戦略

9.1 各成長段階における財務戦略

6.2.「成長戦略」の項では、シード期、アーリー期、ミドル期の各成長フェーズにおける事業ロードマップを示した。本章では、それぞれの事業成長フェーズにおける財務状況および資金調達について説明する。

財務諸表作成のための前提条件

表 9-1 に創業以降に起こる社内の主要イベントおよびマイルストーンを示す。

表 9-1 各成長フェーズにおける主要イベントおよびマイルストーン

成長フェーズ	年次	主要イベント	マイルストーン
シード期	2025年	自己資本金500万円を開業資金とする	法人を設立、BDF/SAF製造企業とのコネクション
	2026年	神戸大学発ベンチャーとして会社設立	を確立、本事業のコア技術を開発、知財化
		2000万円の資金調達 コア技術の開発に成功、知財化	
アーリー期	2027年	事業「グリセロール残渣を原料としたバイオ製品の創出」を開始	実際の事業をスタート、また、量産化に向けた技術やパイロットスケールでの製造法を開発
		8000万円の資金調達	
		量産化に向けた技術開発に着手	
	2029年	1億5000万円の資金調達	
ミドル期	2030年	パイロットスケールでの製造プロセスを開発	自社内で発酵プラントを建設、多種多様な芳香族化合物を生産
	2031年	生産するターゲット化合物を拡充	
	2034年	自社内に発酵プラントを建設（完了）	
	2036年～	以降、経営状況が変化せず、継続的に利益が得られると仮定	

財務諸表の作成に当たっての前提条件は以下の通りである。

まず、取締役員数については、ミドル期期首に常勤の取締役として代表取締役社長（CEO）、最高財務責任者（CFO）の2名、非常勤の社外取締役として1名、非常勤の監査役として1名の計4名が在籍することを想定している。

会社の設立時はCEO、CFOの2名で創業し、アーリー期期首の資金調達時に監査役を1名配置する。社外取締役（非常勤）は、アーリー期半ばに、共同研究として資金提供されている企業から受け入れる。監査役の報酬は月額20万円、社外取締役は、資金提供企業からオプションとして勧誘するため、給与は支払わない。常勤取締役（CEO、CFO）の報酬はアーリー期後半に月額25万円、ミドル期には月額40万円とした。

研究開発者は会社設立時に1名、半年後にもう1名雇用する。アーリー期期首に更に1名雇用し、アーリー期の研究開発者は合計3名になる。ミドル期期首には更に1名の研究

開発者を雇用する。報酬は、シード期は月額 35 万円、アーリー期以降は月額 45 万円とした。

売上原価（研究開発費）には、研究開発に必要な人工合成遺伝子（DNA）、試薬、実験器具などの材料・消耗品費が含まれ、シード期には研究者 1 人当たり月額 20 万円（年間 240 万円）、アーリー期/ミドル期には月額 30 万円（年間 360 万円）を計上した。製造する製品の精製費および製造委託費は、合わせて売上高の 30%とした。諸経費には、水道光熱費、通信費、従業員の旅費/交通費等として従業員 1 人当たり月額 2 万円（年間 24 万円）を計上した。大学や企業との共同研究に必要な費用（共同研究費）や特許取得に必要な費用・特許維持費（知財経費）は、その都度計上した。また、今回は売掛金、買掛金、棚卸資産は考慮していない。アーリー期期首に購入する培養装置等の実験機器、ミドル期期首に自社内で設立する発酵プラントは、それぞれ 10 年で減価償却すると仮定した。

また、国税庁 HP [99]および兵庫県庁 HP [100]によると、法人税（国税）額は利益の 15%、法人事業税（地方税）額は利益の 5.1%、法人住民税【均等割+法人税割】（地方税）額は 22,000 円+法人税額の 1.0%であった（これらの税率は所得に応じて変動する）。今回の財務諸表の作成に当たっては、簡略化し、所得が赤字の際は法人住民税 30,000 円のみを法人税等として計上し、所得が黒字になると、法人税・法人事業税・法人住民税の 3 つを合算し、所得の 25%を法人税等として計上した。

以下で各成長フェーズにおける財務状況の詳細について述べる。

シード期

シード期のマイルストーンは、「法人を設立し、BDF/SAF 製造企業とのコネクションを確立し、本事業のコア技術を開発・知財化すること」である（表 9-1）。

まず、2025 年の会社設立に向け、自己資金 500 万円を開業資金とする。また、本事業【BDF/SAF 製造過程に生じるプロセス残渣「グリセロール」を原料としたバイオものづくり】を実現するためのコア技術である「グリセロール残渣を有効活用できる菌株の開発」と「グリセロールを原料としたバイオ製品の創出」は、神戸大学在学中から研究開発を進めておく。2025 年に神戸大学発ベンチャーとして会社を設立した後は、神戸大学との共同研究の形で研究開発を進める（シード期の研究開発で使用する培養装置等は、神戸大学が所有する装置を使用させていただく）。シード期は、技術開発やコンセプト検証の段階であるため、事業で提供する製品のプロトタイプはまだない。そのため、一般のベンチャーキャピタルやシードアクセラレーターなどの投資会社からの資金調達は難しい。そこで、神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科発バイオベンチャーの創業支援・投資育成に特化したシードアクセラレーターである STE 社や、NEDO や JST が運用する起業を前提とした研究開発

促進を目的とした研究助成金等に応募し、資金調達を行う。調達額は 2000 万円を予定しており、その一部は神戸大学との共同研究にかかる研究開発費に充当する。シード期後半には、開発したコア技術の特許出願を行うため、シード期に獲得する資金は、知的財産権の申請や維持に使用できる資金であることが望ましい。

シード期の後期には、8.3.「研究成果の権利化」で記載した特許が成立することを前提に、特許出願に掛かる費用として計 200 万円を計上した。

アーリー期

アーリー期のマイルストーンは、「実際の事業を開始し、また量産化に向けた技術開発やパイロットスケールでの製造法を開発すること」である（表 9-1）。

アーリー期の初年度（2027 年）には、本事業【グリセロール残渣を原料とした芳香族化合物生産】を開始する。資金調達は 2027 年と 2029 年にそれぞれ予定しており、この頃には、事業のプロトタイプが完成しているため、本事業に将来性を見出したベンチャーキャピタルや企業から資金を調達する計画である。資金調達額は 2027 年に 8000 万円、2029 年に 1 億 5000 万円を予定しており、これらの資金はターゲット化合物である芳香族化合物の量産化に向けた技術開発費、培養装置等の実験機器の購入、大学や企業との共同研究費、シード期に出願した特許の登録維持費などに充当する。アーリー期初期の培養装置等の購入のために 2400 万円を計上し、10 年で償却した。

アーリー期の後半では、パイロットスケールでの芳香族化合物製造プロセスの開発や、多様な芳香族化合物の製造技術の開発など、ターゲットの拡充にも着手する。パイロットスケールでの製造プロセスの開発が完了するアーリー期後半には売上高が向上し、営業キャッシュフローも黒字化すると推定される。

ミドル期

ミドル期のマイルストーンは、「自社内で発酵プラントを建設、また、多種多様な芳香族化合物の生産を展開すること」である（表 9-1）。

アーリー期の芳香族化合物製造は、バイオ生産プラントを持つ CMO 企業に委託していたが、ミドル期では、自社内で発酵プラントを建設する。発酵プラントの建設費として 1 億円を計上し、10 年で償却した。また、ミドル期中期の 2036 年以降は経営状況が変化せず、継続的に利益が得られると仮定した。

9.2 財務諸表

上述の前提条件を反映して作成した財務諸表（損益計算書; Profit and Loss Statement およびキャッシュフロー計算書; Cash Flow Statement）を参考資料_表 S9-1 に示す。ま

た、主要な財務指標である営業キャッシュフロー（営業 CF）および現預金残高の推移を図 9-1 に示す。営業 CF は会社設立からアーリー期までは赤字が続くが、研究開発が進み、量産が可能となるアーリー期最終年度（2033 年）以降は黒字に転じる見込みである。

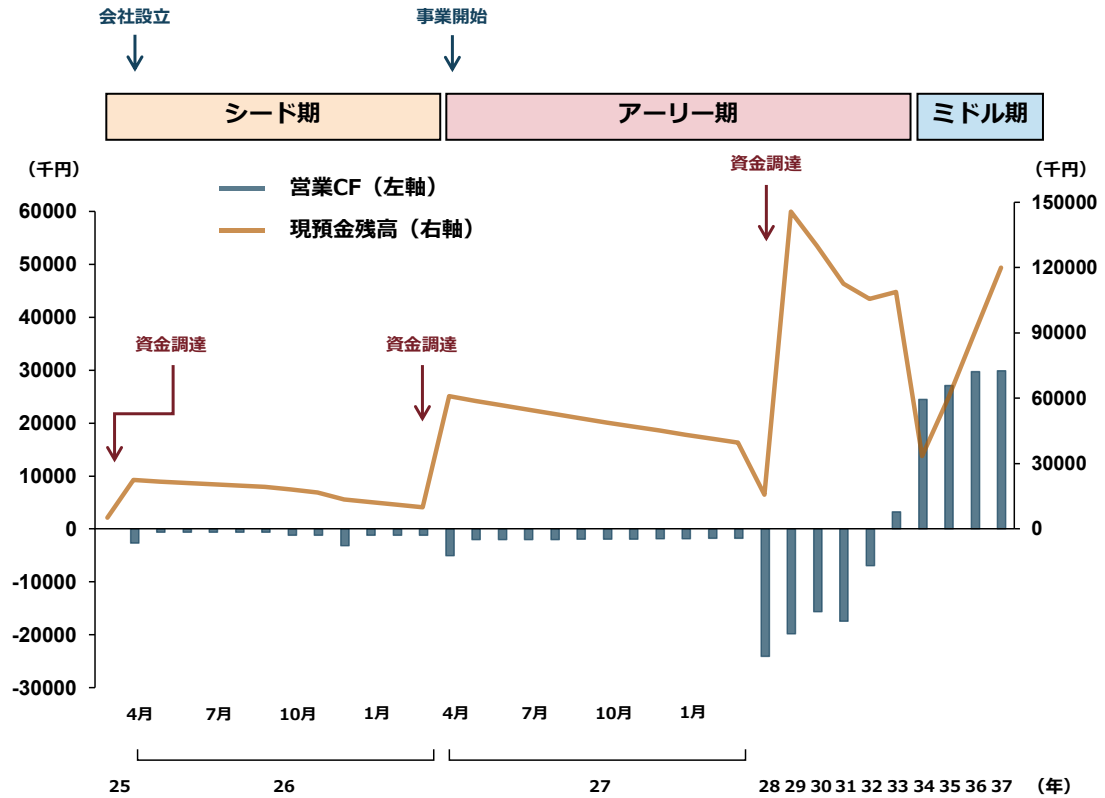


図 9-1 営業キャッシュフローおよび現預金残高の推移

9.3 参考資料および引用文献

表 S9-1 損益計算書およびキャッシュフロー計算書

損益計算書										
会社設立										
財務指標（千円）	シード期									
	2025年	2026年								
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月		
売上高	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
売上原価（研究開発費）	0	200	200	200	200	200	200	400	400	
精製費/製造委託費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
売上総利益	0	▲200	▲200	▲200	▲200	▲200	▲200	▲400	▲400	
販管費	0	2,410	410	410	410	410	410	780	780	
人件費	0	350	350	350	350	350	350	700	700	
諸経費	0	60	60	60	60	60	60	80	80	
共同研究費	0	2,000	0	0	0	0	0	0	0	0
知財経費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
営業利益	0	▲2,610	▲610	▲610	▲610	▲610	▲610	▲1,180	▲1,180	
税引前利益	0	▲2,610	▲610	▲610	▲610	▲610	▲610	▲1,180	▲1,180	
法人税等	0	30	30	30	30	30	30	30	30	30
当期純利益	0	▲2,640	▲640	▲640	▲640	▲640	▲640	▲1,210	▲1,210	
キャッシュフロー計算書										
当期純利益	0	▲2,640	▲640	▲640	▲640	▲640	▲640	▲1,210	▲1,210	
減価償却費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
売掛金/買掛金/棚卸資産	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
営業キャッシュフロー	0	▲2,640	▲640	▲640	▲640	▲640	▲640	▲1,210	▲1,210	
土地の取得	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
培養装置等の設備	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
建物、備品の取得	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
投資キャッシュフロー	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
自己資本の増減	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NEDO/JSTなどからの助成金	0	20,000	0	0	0	0	0	0	0	0
VC投資/企業との共同研究	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
財務キャッシュフロー	5,000	20,000	0	0	0	0	0	0	0	0
現預金の増減	5,000	17,360	▲640	▲640	▲640	▲640	▲640	▲1,210	▲1,210	
期末現預金残高	5,000	22,360	21,720	21,080	20,440	19,800	19,160	17,950	16,740	
損益計算書										
財務指標（千円）	シード期					事業開始				
						アーリー期				
	12月	1月	2月	3月	2027年	4月	5月	6月	7月	8月
売上高	0	0	0	0	0	500	520	540	560	580
売上原価（研究開発費）	400	400	400	400	400	900	900	900	900	900
精製費/製造委託費	0	0	0	0	0	150	156	162	168	174
売上総利益	▲400	▲400	▲400	▲400	▲400	▲550	▲536	▲522	▲508	▲494
販管費	2,780	780	780	780	780	4,670	1,670	1,670	1,670	1,670
人件費	700	700	700	700	700	1,550	1,550	1,550	1,550	1,550
諸経費	80	80	80	80	80	120	120	120	120	120
共同研究費	0	0	0	0	0	2,000	0	0	0	0
知財経費	2,000	0	0	0	0	1,000	0	0	0	0
営業利益	▲3,180	▲1,180	▲1,180	▲1,180	▲1,180	▲5,220	▲2,206	▲2,192	▲2,178	▲2,164
税引前利益	▲3,180	▲1,180	▲1,180	▲1,180	▲1,180	▲5,220	▲2,206	▲2,192	▲2,178	▲2,164
法人税等	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
当期純利益	▲3,210	▲1,210	▲1,210	▲1,210	▲1,210	▲5,250	▲2,236	▲2,222	▲2,208	▲2,194
キャッシュフロー計算書										
当期純利益	▲3,210	▲1,210	▲1,210	▲1,210	▲1,210	▲5,250	▲2,236	▲2,222	▲2,208	▲2,194
減価償却費	0	0	0	0	0	200	200	200	200	200
売掛金/買掛金/棚卸資産	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
営業キャッシュフロー	▲3,210	▲1,210	▲1,210	▲1,210	▲1,210	▲5,050	▲2,036	▲2,022	▲2,008	▲1,994
土地の取得	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
培養装置等の設備	0	0	0	0	0	▲24,000	0	0	0	0
建物、備品の取得	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
投資キャッシュフロー	0	0	0	0	0	▲24,000	0	0	0	0
自己資本の増減	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NEDO/JSTなどからの助成金	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VC投資/企業との共同研究	0	0	0	0	0	80,000	0	0	0	0
財務キャッシュフロー	0	0	0	0	0	80,000	0	0	0	0
現預金の増減	▲3,210	▲1,210	▲1,210	▲1,210	▲1,210	50,950	▲2,036	▲2,022	▲2,008	▲1,994
期末現預金残高	13,530	12,320	11,110	9,900	60,850	58,814	56,792	54,784	52,790	

損益計算書

財務指標（千円）	アーリー期							2028年	2029年
	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月		
売上高	600	650	700	750	800	850	900	12,000	18,000
売上原価（研究開発費）	900	900	900	900	900	900	900	10,800	10,800
精製費/製造委託費	180	195	210	225	240	255	270	3,600	5,400
売上総利益	▲ 480	▲ 445	▲ 410	▲ 375	▲ 340	▲ 305	▲ 270	▲ 2,400	1,800
販管費	1,670	1,670	1,670	1,670	1,670	1,670	1,670	24,040	24,040
人件費	1,550	1,550	1,550	1,550	1,550	1,550	1,550	18,600	18,600
諸経費	120	120	120	120	120	120	120	1,440	1,440
共同研究費	0	0	0	0	0	0	0	2,000	2,000
知財経費	0	0	0	0	0	0	0	2,000	2,000
営業利益	▲ 2,150	▲ 2,115	▲ 2,080	▲ 2,045	▲ 2,010	▲ 1,975	▲ 1,940	▲ 26,440	▲ 22,240
税引前利益	▲ 2,150	▲ 2,115	▲ 2,080	▲ 2,045	▲ 2,010	▲ 1,975	▲ 1,940	▲ 26,440	▲ 22,240
法人税等	30	30	30	30	30	30	30	30	30
当期純利益	▲ 2,180	▲ 2,145	▲ 2,110	▲ 2,075	▲ 2,040	▲ 2,005	▲ 1,970	▲ 26,470	▲ 22,270

キャッシュフロー計算書

当期純利益	▲ 2,180	▲ 2,145	▲ 2,110	▲ 2,075	▲ 2,040	▲ 2,005	▲ 1,970	▲ 26,470	▲ 22,270
減価償却費	200	200	200	200	200	200	200	2,400	2,400
売掛金/買掛金/棚卸資産	0	0	0	0	0	0	0	0	0
営業キャッシュフロー	▲ 1,980	▲ 1,945	▲ 1,910	▲ 1,875	▲ 1,840	▲ 1,805	▲ 1,770	▲ 24,070	▲ 19,870
土地の取得	0	0	0	0	0	0	0	0	0
培養装置等の設備	0	0	0	0	0	0	0	0	0
建物、備品の取得	0	0	0	0	0	0	0	0	0
投資キャッシュフロー	0	0	0	0	0	0	0	0	0
自己資本の増減	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NEDO/JSTなどからの助成金	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VC投資/企業との共同研究	0	0	0	0	0	0	0	0	150,000
財務キャッシュフロー	0	0	0	0	0	0	0	0	150,000
現預金の増減	▲ 1,980	▲ 1,945	▲ 1,910	▲ 1,875	▲ 1,840	▲ 1,805	▲ 1,770	▲ 24,070	130,130
期末現預金残高	50,810	48,865	46,955	45,080	43,240	41,435	39,665	15,595	145,725

損益計算書

財務指標（千円）	アーリー期				ミドル期			
	2030年	2031年	2032年	2033年	2034年	2035年	2036年	2037年
売上高	24,000	30,000	45,000	60,000	100,000	105,000	110,000	115,000
売上原価（研究開発費）	10,800	10,800	10,800	10,800	14,400	14,400	14,400	14,400
精製費/製造委託費	7,200	9,000	13,500	18,000	30,000	31,500	33,000	34,500
売上総利益	6,000	10,200	20,700	31,200	55,600	59,100	62,600	66,100
販管費	24,040	30,040	30,040	30,040	38,320	38,320	38,320	38,320
人件費	18,600	24,600	24,600	24,600	32,400	32,400	32,400	32,400
諸経費	1,440	1,440	1,440	1,440	1,920	1,920	1,920	1,920
共同研究費	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
知財経費	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
営業利益	▲ 18,040	▲ 19,840	▲ 9,340	1,160	17,280	20,780	24,280	27,780
税引前利益	▲ 18,040	▲ 19,840	▲ 9,340	1,160	17,280	20,780	24,280	27,780
法人税等	30	30	30	290	4,320	5,195	6,070	6,945
当期純利益	▲ 18,070	▲ 19,870	▲ 9,370	870	12,960	15,585	18,210	20,835

キャッシュフロー計算書

当期純利益	▲ 18,070	▲ 19,870	▲ 9,370	870	12,960	15,585	18,210	20,835
減価償却費	2,400	2,400	2,400	2,400	12,400	12,400	12,400	10,000
売掛金/買掛金/棚卸資産	0	0	0	0	0	0	0	0
営業キャッシュフロー	▲ 15,670	▲ 17,470	▲ 6,970	3,270	25,360	27,985	30,610	30,835
土地の取得	0	0	0	0	0	0	0	0
培養装置等の設備	0	0	0	0	0	0	0	0
建物、備品の取得	0	0	0	0	▲ 100,000	0	0	0
投資キャッシュフロー	0	0	0	0	▲ 100,000	0	0	0
自己資本の増減	0	0	0	0	0	0	0	0
NEDO/JSTなどからの助成金	0	0	0	0	0	0	0	0
VC投資/企業との共同研究	0	0	0	0	0	0	0	0
財務キャッシュフロー	0	0	0	0	0	0	0	0
現預金の増減	▲ 15,670	▲ 17,470	▲ 6,970	3,270	▲ 74,640	27,985	30,610	30,835
期末現預金残高	130,055	112,585	105,615	108,885	34,245	62,230	92,840	123,675

「超入門企業価値経営_実践コーポレート・ファイナンス_第3刷、中央経済社」[101]を参考に作成

[99] 国税庁 HP 「法人税の税率」

<https://www.nta.go.jp/taxes/shiraberu/taxanswer/hojin/5759.htm>

[100] 兵庫県庁 HP 「法人県民税・事業税」

https://web.pref.hyogo.lg.jp/kk22/pa04_000000008.html

[101] 山本一彦、超入門企業価値経営__実践コーポレート・ファイナンス_第3刷、中央経済社、2016

第 10 章 結言

バイオテクノロジーが生み出す価値によって作り出される経済「バイオエコノミー」は、現在、世界中で注目されている。本書では、バイオエコノミー市場の工業分野である「バイオものづくり」に焦点を当て、ケーススタディーとして「ピキア酵母を宿主とする芳香族化合物生産」に取り組み、バイオものづくりを実用化する上での研究開発プラットフォームの確立を目指した。

筆者は、先端研究を通して以下の 3 つのブレイクスルーを得た。①「ピキア酵母は芳香族化合物群の発酵生産に優れた宿主である」、②「ピキア酵母はグリセロールを効率良く芳香族化合物群に変換できる」、③「微生物培養システムと膜抽出技術とを組み合わせることで、微生物にとって毒性の高い化合物でも発酵法により高生産が可能である」。また、これらのブレイクスルーを活かしたイノベーション・アイデアとして、【バイオ燃料 (BDF/SAF) 製造過程に生じるプロセス残渣「グリセロール」を原料とした新規バイオものづくり事業】を提案した。筆者が提案したアイデアは、従来は主に焼却処分されており、市場価値のないグリセロール残渣を付加価値の高い芳香族化合物に変換するものである。また、芳香族化合物の中でも、微生物にとって毒性の高い芳香族化合物を生産ターゲットとしている。これらの芳香族化合物の生産は、現状では化石資源からの精製に依存しており、パイオプロセスでは生産されていない。今後、化石資源に依存しない製造法への移行が不可欠であることを考えると、本書で提案する事業で生産された化合物が優位性を獲得し、市場に参入できる可能性は十分に考えられる。しかしながら、現状のバイオプロセスでは、やはりコスト面で既存プロセスに大きく劣るため、現行プロセスよりも低コストかつ高効率で生産できる技術の開発が望まれる。

また、本書で提案したアイデアは、油脂（廃食油や植物油）および微細藻類を原料とした SAF 製造が拡大することを前提としており、油脂や微細藻類を原料としない SAF 製造法（例えば、木材や草などのバイオマス、都市ガスや廃ガスを原料とした SAF 製造法など）が広まると、グリセロール残渣が生じず、本事業を遂行することが困難になる。そのため、世の中の SAF 製造に関する開発動向は常に注視する必要がある。

最後に、本書で遂行した先端研究の発展および提案したイノベーション・アイデアの実現が、バイオものづくりによる持続可能な社会の構築につながり、社会的・経済的価値創造の一助となることを期待する。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多岐にわたるご指導とご協力を賜りました先端バイオ工学研究センターセンター長および神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科の蓮沼誠久教授に深く御礼申し上げます。蓮沼誠久教授には、研究計画や研究に対する取り組み方、心構えについて綿密なご指導をいただきました。また、他大学や他学部との共同研究や学会参加など、私が成長できるような機会を常に与えてくださったことに心より感謝しております。今後も学んだことを存分に発揮していきたいと考えております。

イノベーション・アイデアの創出および事業戦略・ビジネスモデルの構築に関しまして、ご指導とご鞭撻を賜りました神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科の尾崎弘之教授、山本一彦教授、蔭山広明教授、福家信洋准教授、並びに関係者の皆様方に深甚なる感謝の意を表します。特に、尾崎弘之教授には、私の事業計画の不十分な点に対して、常に的確なアドバイスを賜りましたことに心より感謝しております。

本研究のみならず、様々な場でご指導、ご鞭撻頂きました神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科の吉田健一教授、安枝寿特命教授、石井純准教授、白井智量客員准教授、吉田崇伸特命助手、先端バイオ工学研究センターの秀瀬涼太特命准教授、伊藤洋一郎特命准教授、番場崇弘特命助教、松田真実特命助手、堀良美特命助手に深く御礼申し上げます。特に、研究室に配属された日からお世話になっている番場崇弘特命助教には、日々の研究の進め方や実験計画の構築方法など密なご指導を頂きました。この場を借りて深く御礼申し上げます。また、日々ご助言と励ましを頂きましたバイオ生産工学研究室の皆様にも深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究の共同研究者としてご指導、ご助言、ご協力いただきました、神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科の吉岡朋久教授、新谷卓司客員教授、北河享客員教授、中川敬三准教授、月田彪斗氏、神戸大学大学院工学研究科の松山秀人教授、三菱ケミカル株式会社の山本恭士氏、林隆宏氏、丸山悟史氏に深く感謝申し上げます。

最後に、日々励ましの言葉を頂き、様々な場でご指導、ご鞭撻頂きました神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科および先端バイオ工学研究センターの近藤昭彦教授に深く御礼申し上げます。

神戸大学博士論文

「ピキア酵母を宿主とした芳香族化合物群高生産プロセスの開発およびその事業展開」
全 129 頁

提出日 2024 年 1 月 24 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。

© 雲北涼太

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。