

地球環境負荷低減のための 有用微生物スクリーニングプラットフォームの構築

官民研究開発投資拡大プログラム（PRISM）

「バイオ技術領域」

令和3年度成果

令和4年3月

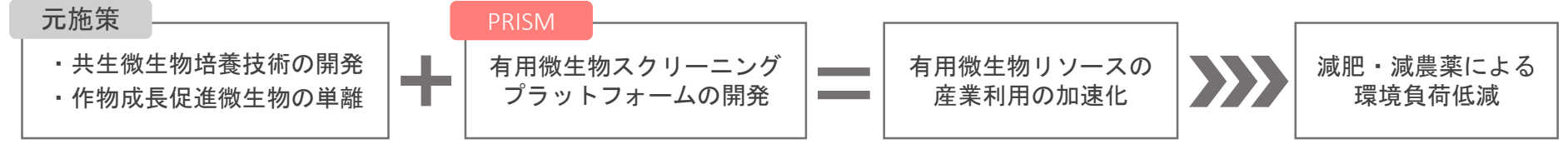
文部科学省

課題と目標

- （課題）SDGsに基づき、地球環境に負荷を与える化学肥料や化学農薬の使用を制限した農業革新が喫緊の課題であり、その解決策として農業における**微生物利用**に着目。2025年までに世界の**農業微生物市場は121億米ドル**に達するとされ、植物-微生物研究に関する論文発表は直近10年間で**年間論文発表件数が2.5倍以上**の伸びており、いち早く本件に取り掛かる事で国際競争力を強化することが不可欠。
- （目標）膨大な未知環境微生物から病原菌の拮抗微生物を分離培養し、リソース化する技術基盤「**マイクロドロップレット大規模スクリーニングプラットフォーム**」を新規に整備する。

「地球環境負荷低減のための有用微生物スクリーニングプラットフォームの構築」の概要

- 元施策：「マイクロドロップレット技術を用いた新規共生微生物培養技術の開発（R3年度：10,000千円）」・「作物と微生物叢を同時改良するホロゲノム選抜法の開発（R3年度：2,500千円）」にて、植物有用微生物の探索を実施。
- PRISMで実施する理由：**国産技術であるマイクロドロップレット技術**を使った大規模スクリーニングプラットフォームは、農業に革新をもたらす**技術基盤**であり、**生物農薬市場が拡大するなか、日本が生物農薬開発において先進国になる余地がある**。現時点ではシーズ研究の段階であり、初期投資により研究が爆発的に加速し大きな効果が期待できるため、PRISMで実施する。
- テーマの全体像：マイクロドロップレット技術を利用して、従来技術の1,000倍以上の高効率で、膨大な未知環境微生物から病原菌の拮抗微生物を分離培養し、リソース化する**技術基盤**を構築する。これにより、シーケンス技術・ゲノム編集に次いで、スクリーニング技術にイノベーションを起こし、微生物によるものづくりを加速化させる。



出口戦略

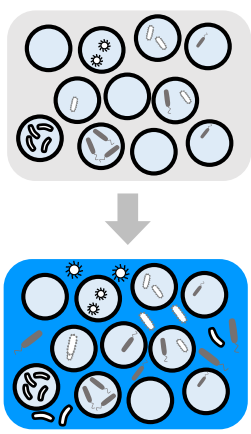
有用微生物である拮抗微生物リソースの産業利用の実績を出し、民間企業との共同研究によりマイクロドロップレット大規模スクリーニングプラットフォームによる微生物農薬の開発効率の向上を図り、さらに本プラットフォームの技術移転による拡大を介して、微生物活用によるバイオスティミュラント開発によりSDGsの課題解決に貢献する。

民間研究開発投資誘発効果等

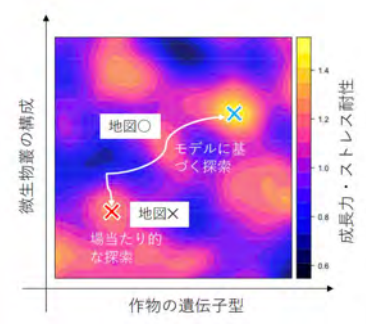
- 民間投資誘発効果として、微生物農薬に加えて医薬品、酵素生産、食品、環境浄化等の研究開発投資（440億円以上）が期待。
- 民間からの貢献額：5年で5億円相当
- （内訳：5年間総計額） 参画民間企業から人員・機器・資材等の提供（25百万円）；農薬開発企業との共同研究費（140百万円）；共同研究先企業での自社内研究（90百万円）；農薬開発企業における本プラットフォームの導入（180百万円）；農薬開発以外の微生物探索（65百万円）

アドオン（文部科学省）：80,360千円
 元施策名：（マイクロドロップレット技術を用いた新規共生微生物培養技術の開発）10,000千円；（作物と微生物叢を同時改良するホログenom選抜法の開発）2,500千円

（元施策）マイクロドロップレット技術を用いた新規共生微生物の単離、データ解析により植物有用微生物の選抜を実施している。



FACSによるソーティングは、溶媒が水相でなければならぬ
 アガロースゲルでマイクロドロップレットを作成し、ドロップレット周辺液を油相から水相に置換
 菌が水相に漏れて、混ざりあってしまう



データ解析で予測した微生物の単離が必要

分注装置が油相に対応した装置が必要

スクリーニング技術にイノベーションが必要

【PRISM】
 マイクロドロップレット大規模スクリーニングプラットフォーム構築

1. 土壤微生物のドロップレット培養条件の確立
2. 病原菌と土壤微生物の共存培養条件の確立
3. 拮抗微生物の選別および分注条件の確立

【開発のイメージ】

1) 土壤微生物のマイクロドロップレット培養条件の確立

2) 病原菌と土壤微生物の共存培養条件の確立

3) 拮抗微生物の選別および分注条件の確立

有用微生物リソースの産業利用の加速化



減肥・減農薬による環境負荷低減

資料3 「地球環境負荷低減のための微生物スクリーニングプラットフォームの構築」 目標達成状況

○施策全体の目標

膨大な未知環境微生物から病原菌の拮抗微生物を分離培養し、リソース化する技術基盤「マイクロドロップレット大規模スクリーニングプラットフォーム」を新規に整備する。

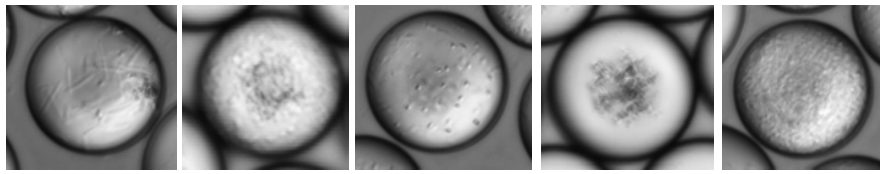
事業名等（※個別に目標を設定している場合）	当年度目標	目標の達成状況
地球環境負荷低減のための微生物スクリーニングプラットフォームの構築	<ul style="list-style-type: none"> ・ 土壌微生物のマイクロドロップレット培養条件の確立 土壌微生物をマイクロドロップレットに封入して、菌濃度、培地組成、培養温度、培養時間等の培養条件を探索して、より多様な土壌微生物を培養できる条件を確定する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 菌濃度：5点、培地組成：30点、培養温度：2点、培養時間：4点を様々に組み合わせ、合計100点以上の条件で土壌微生物の培養を行った。その結果、様々な形態および運動性の菌が培養できた。 ・ 土壌についても、採取地点の異なる5点を供試した結果、土壌ごとに形態および運動性の異なる菌やそれらが共通する菌などが多数同時に培養できた。
	<ul style="list-style-type: none"> ・ 病原菌と土壌微生物の共存培養条件の確立 植物病原菌と土壌微生物を同時に封入し、菌濃度の比率、封入方法、選抜指標等の共培養条件を探索して、拮抗微生物により病原菌の生育が抑制されるマイクロドロップレットが得られる条件を確定する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ まず、青枯病菌が安定して培養できるドロップレットの作成条件を確立した。 ・ 青枯病菌GFP株と拮抗微生物を共培養した時に、拮抗微生物によって青枯病菌の生育が抑制されてGFP蛍光がないドロップレットになることを確認するために、土壌から対峙培養法により<i>in vitro</i>において青枯病菌に拮抗作用をもつ株（P株）を単離した。 ・ 青枯病菌GFP株とP株をドロップレット内で共培養すると、P株の濃度依存的にGFP蛍光が消失し、理論通りにスクリーニング系が成立することもわかった。 ・ 青枯病菌GFP株と土壌微生物を共存培養して、拮抗微生物候補株（蛍光のないドロップレット）が安定して得られる条件も確立した。
	<ul style="list-style-type: none"> ・ 拮抗微生物の選別および分注条件の確立 拮抗微生物のマイクロドロップレットをDroplet Selectorで選抜して、1マイクロドロップレットずつプレートにソーティングして培養する条件を確定して、自動観察システムにより拮抗微生物を選抜する系を確立する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 拮抗微生物モデル株であるP株を用いて、青枯病菌GFP株と選別できるソーティングの条件を、Onchip-Sortで決定した。Onchip-Sortのソーティング条件はDroplet Selectorでも利用できるため、Droplet Selectorが設置され次第、土壌からの拮抗微生物単離が行える状態となった。

1) 土壌微生物のマイクロドロプレット培養条件の確立

菌濃度：5点
培地組成：30点
培養温度：2点
培養時間：4点

様々に組み合わせて、合計100点以上の条件を検討

様々な形態および運動性の菌が培養できた



3) ドロプレットの選別および分注条件の確立

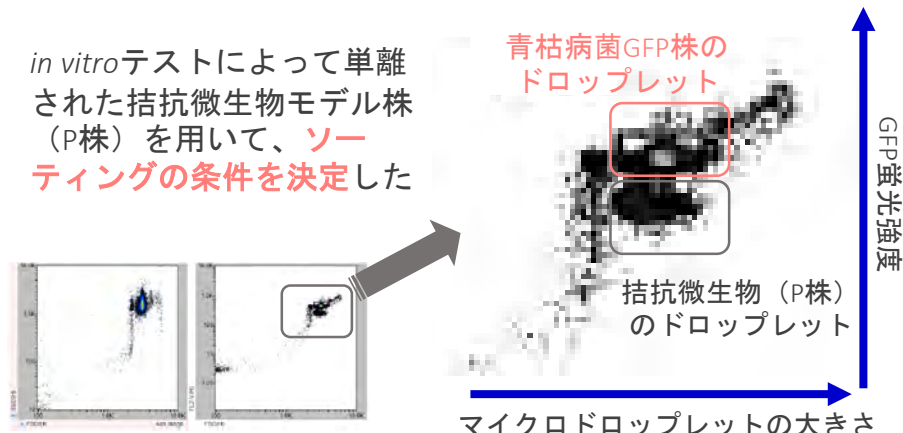
*in vitro*テストによって単離された拮抗微生物モデル株(P株)を用いて、ソーティングの条件を決定した

青枯病菌GFP株のドロプレット

拮抗微生物(P株)のドロプレット

GFP蛍光強度


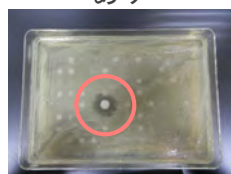
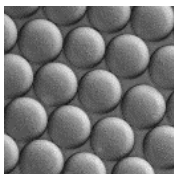
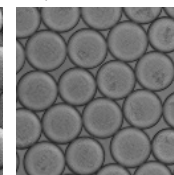
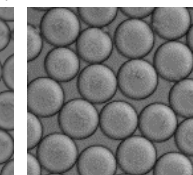
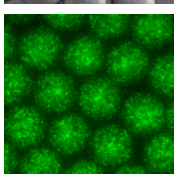
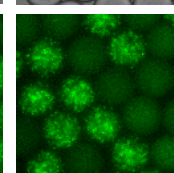
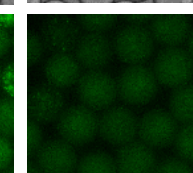
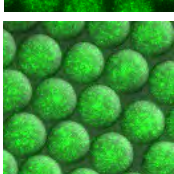
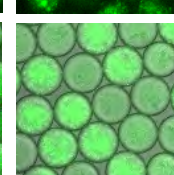
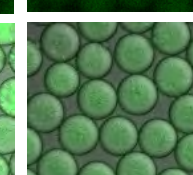
マイクロドロプレットの大きさ



2) 病原菌と土壌微生物の共存培養条件の確立

① 拮抗微生物モデル株の単離と共存培養条件の検討

青枯病菌塗布

なし	あり	青枯病菌GFP株 P株	100% 0%	100% 50%	100% 100%
		DIC			
		Fluorescence			
		Merge			

土壌から、対峙培養法により *in vitro* において青枯病菌に拮抗作用をもつ株(P株)を単離した

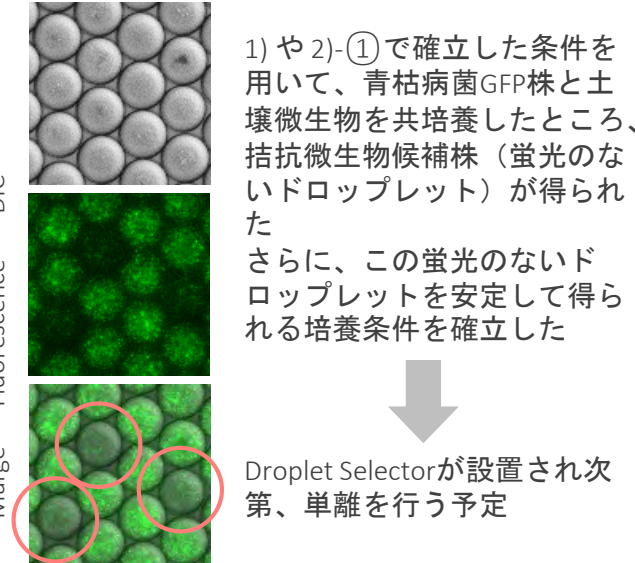
さらに青枯病菌GFP株とP株をドロプレット内で共存培養すると、P株の濃度依存的にGFP蛍光が消失し、理論通りにスクリーニング系が成立することもわかった

② 土壌微生物からの拮抗微生物共存培養条件の確立

1) や 2)-① で確立した条件を用いて、青枯病菌GFP株と土壌微生物を共存培養したところ、拮抗微生物候補株(蛍光のないドロプレット)が得られた

さらに、この蛍光のないドロプレットを安定して得られる培養条件を確立した

Droplet Selectorが設置され次第、単離を行う予定



資料5 「地球環境負荷低減のための微生物スクリーニングプラットフォームの構築」の民間からの貢献及び出口の実績

○民間からの貢献額：5年で5億円相当

(2021年度の内訳) 参画民間企業からプラットフォーム整備への貢献 (5,000千円)

当年度当初見込み		当年度実績	
参画民間企業 ＞ 人員、機器、資材等	5,000千円相当	参画民間企業 ＞ 人件費	4,000千円 ＞ 機器・資材費 1,000千円

○出口戦略

有用微生物である拮抗微生物リソースの産業利用の実績を出し、民間企業との共同研究によりマイクロドロップレット大規模スクリーニングプラットフォームによる微生物農薬の開発効率の向上を図り、さらに本プラットフォームの技術移転による拡大を介して、微生物活用によるバイオスティミュラント開発によりSDGsの課題解決に貢献する。

当年度当初見込み	当年度実績
<ul style="list-style-type: none"> スクリーニングプラットフォームの動作確認として、世界で多大な被害を示す青枯病の拮抗微生物リソース探索をケーススタディとして進める。 マイクロドロップレット大規模スクリーニングプラットフォームによる微生物農薬の開発等に関する民間企業との共同研究を進める。 	<ul style="list-style-type: none"> スクリーニング手法について、特許出願中 プラットフォームが確立すれば1000株以上の単離が見込まれており、企業1社と単離された拮抗微生物の産業利用について意見交換を進めている。 プラットフォームを利用した共同研究について、企業2社と意見交換を進めており、1社とは具体的な契約内容の協議に入っている。