

糖の使い分け技術・代謝制御添加剤を 駆使した微生物発酵生産

神戸大学 大学院工学研究科 応用化学専攻
准教授 田中 勉

2021年5月28日

低炭素社会の構築に向けて

第二百三回国会における菅内閣総理大臣所信表明演説（R2.10.26.）

三 グリーン社会の実現

菅政権では、成長戦略の柱に経済と環境の好循環を掲げて、グリーン社会の実現に最大限注力してまいります。

我が国は、二〇五〇年までに、温室効果ガスの排出を全体としてゼロにする、すなわち二〇五〇年カーボンニュートラル、脱炭素社会の実現を目指すことを、ここに宣言いたします。

もはや、温暖化への対応は経済成長の制約ではありません。積極的に温暖化対策を行うことが、産業構造や経済社会の変革をもたらし、大きな成長につながるという発想の転換が必要です。

鍵となるのは、次世代型太陽電池、カーボンリサイクルをはじめとした、革新的なイノベーションです。実用化を見据えた研究開発を加速度的に促進します。規制改革などの政策を総動員し、グリーン投資の更なる普及を進めるとともに、脱炭素社会の実現に向けて、国と地方で検討を行う新たな場を創設するなど、総力を挙げて取り組みます。環境関連分野のデジタル化により、効率的、効果的にグリーン化を進めていきます。世界のグリーン産業をけん引し、経済と環境の好循環をつくり出してまいります。

省エネルギーを徹底し、再生可能エネルギーを最大限導入するとともに、安全最優先で原子力政策を進めることで、安定的なエネルギー供給を確立します。長年続けてきた石炭火力発電に対する政策を抜本的に転換します。

2050年までに
温室効果ガスの排出をゼロに

[環境省HPより](#)

2050年カーボンニュートラルの実現に向けて

様々な取り組み

- ・パリ協定に基づく基本戦略
- ・エネルギー基本計画
- ・地球温暖化計画 など

2050年カーボンニュートラルについて

2020年10月26日、第203回臨時国会の所信表明演説において、菅義偉内閣総理大臣は「2050年までに、温室効果ガスの排出を全体としてゼロにする(※)、すなわち2050年カーボンニュートラル、脱炭素社会の実現を目指す」ことを宣言しました。

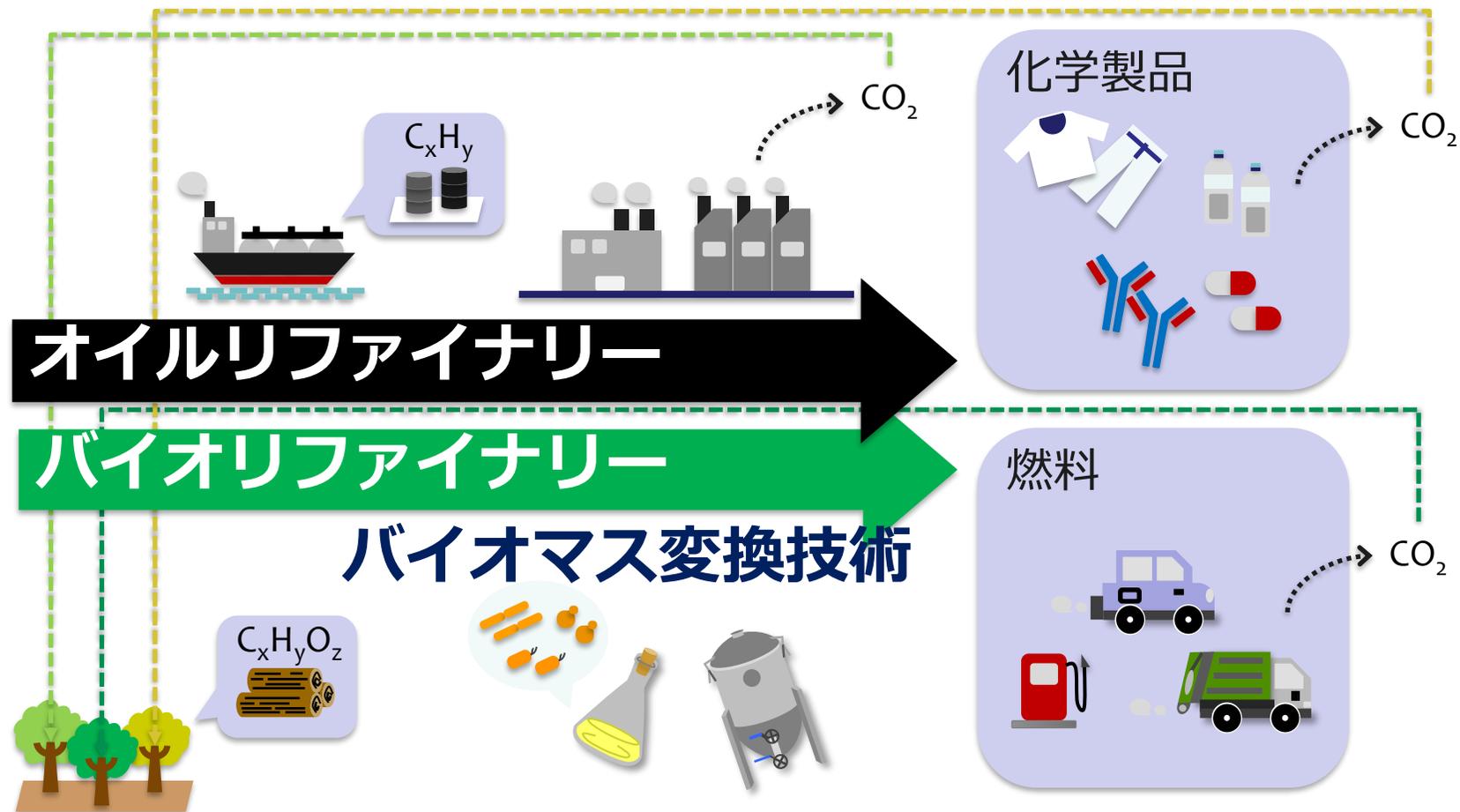
本ページでは、2050年カーボンニュートラルの実現に関連した情報を掲載します。

※「排出を全体としてゼロ」とは、二酸化炭素をはじめとする温室効果ガスの排出量から、森林などによる吸収量を差し引いてゼロを達成することを意味しています。

(菅総理の所信表明演説は、[こちら\(首相官邸HP\)](#) からご覧ください。)

バイオテクノロジーによる脱炭素社会への寄与

- 再生可能資源であるバイオマスを利用したものづくり
(カーボンニュートラルの実現)



- バイオリファイナリーの大きな課題
生産速度・収率が低い→既存プロセスと比較して高コスト

従来技術とその問題点

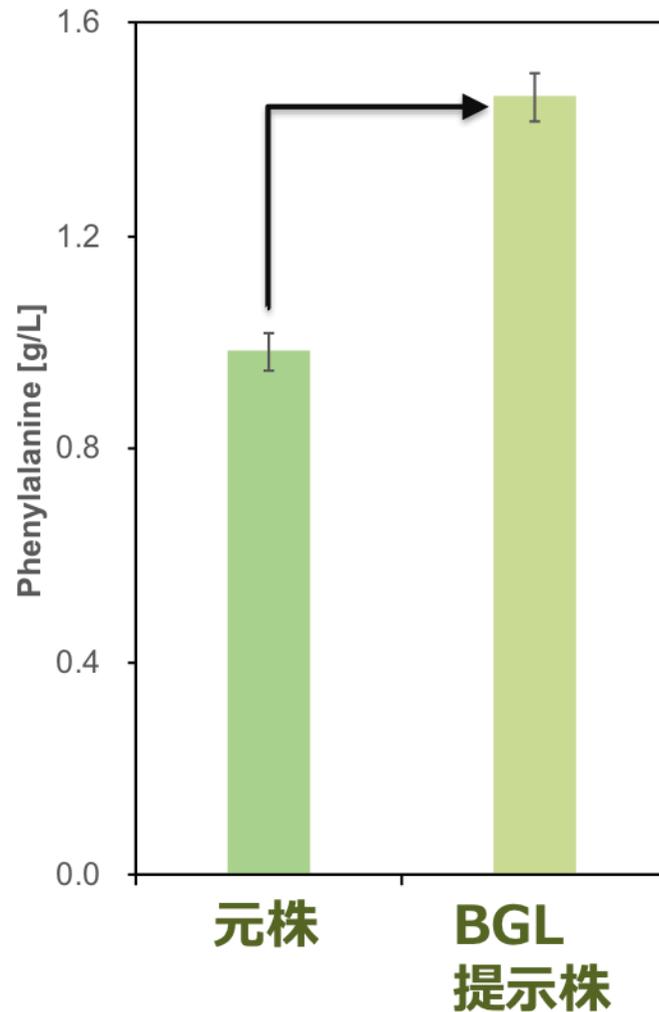
微生物を用いた有用化合物生産において

- 遺伝子組換えが必要
- 遺伝子組換え後は
増殖ばかりで目的生産物の収率と生産性が低い

全く新しいコンセプト:

細胞の「外」をエンジニアリングして細胞「内」の代謝を改変

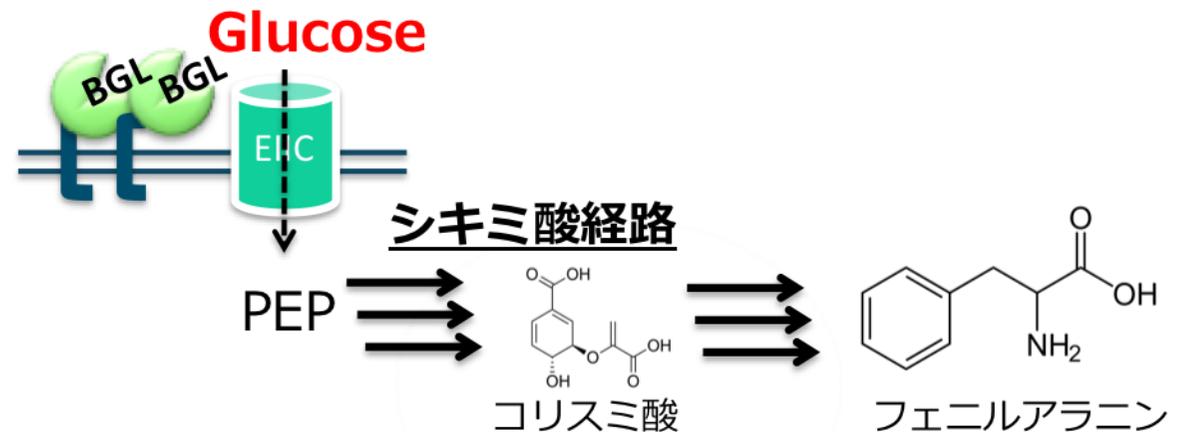
グルコース炭素源における
フェニルアラニン生産量



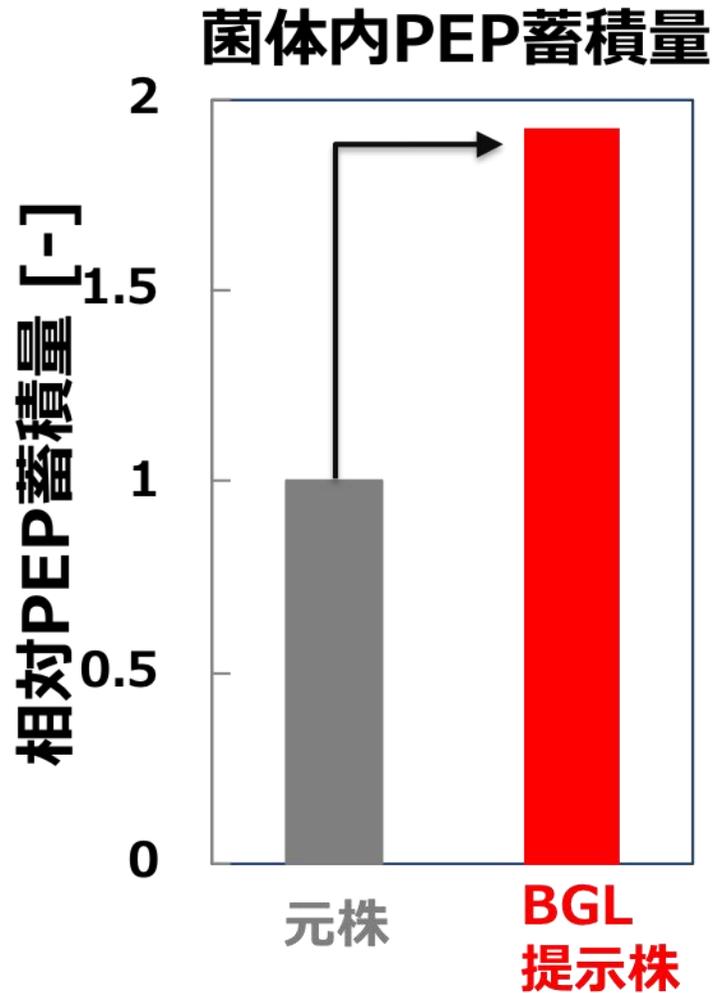
**微生物表層にBGLを発現させると
グルコースを炭素源として
フェニルアラニンの生産量上がる**

BGL:β-glucosidase
セロビオースをグルコースへと加水分解する酵素

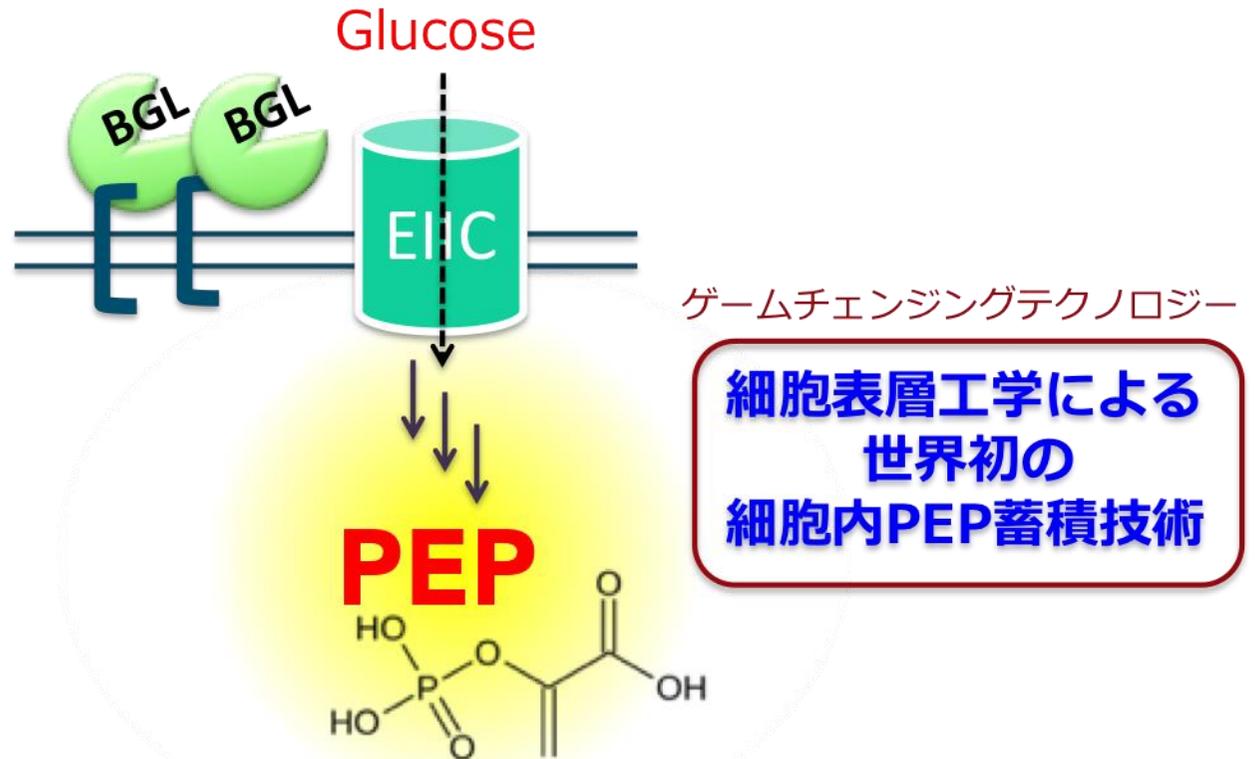
※本技術ではセロビオースも酵素活性も関係ないです



全く新しいコンセプト: BGL提示により菌体内のPEPが蓄積する

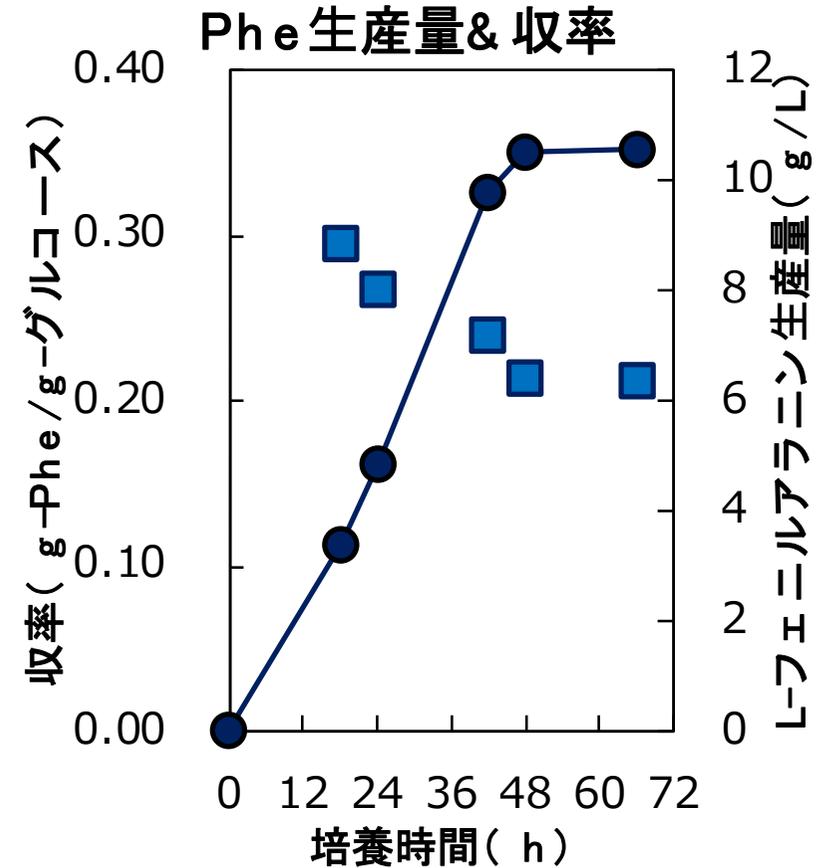
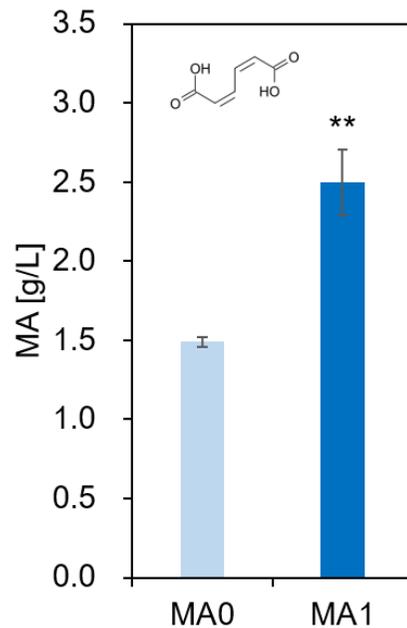
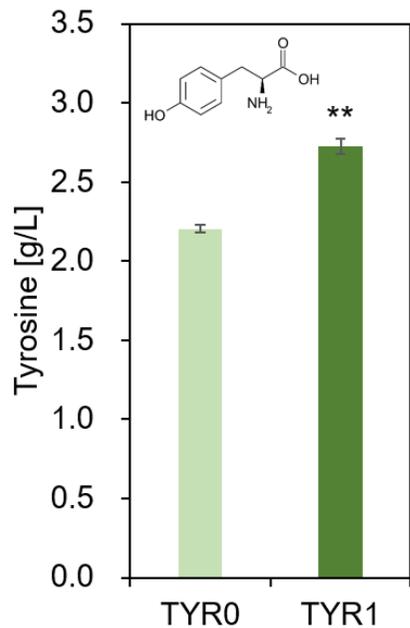
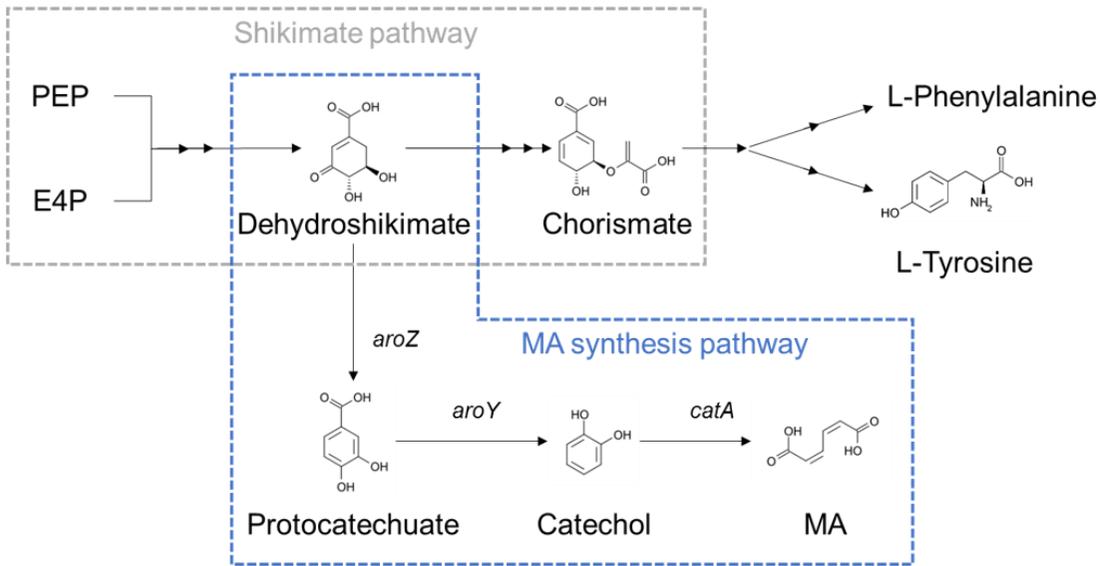


E. coli ATCC 31882
M9, 20g/L glucose



**BGL提示により
菌体内にPEPが蓄積！！**

全く新しいコンセプト: BGL提示PEP蓄積技術を多様な化合物へ展開

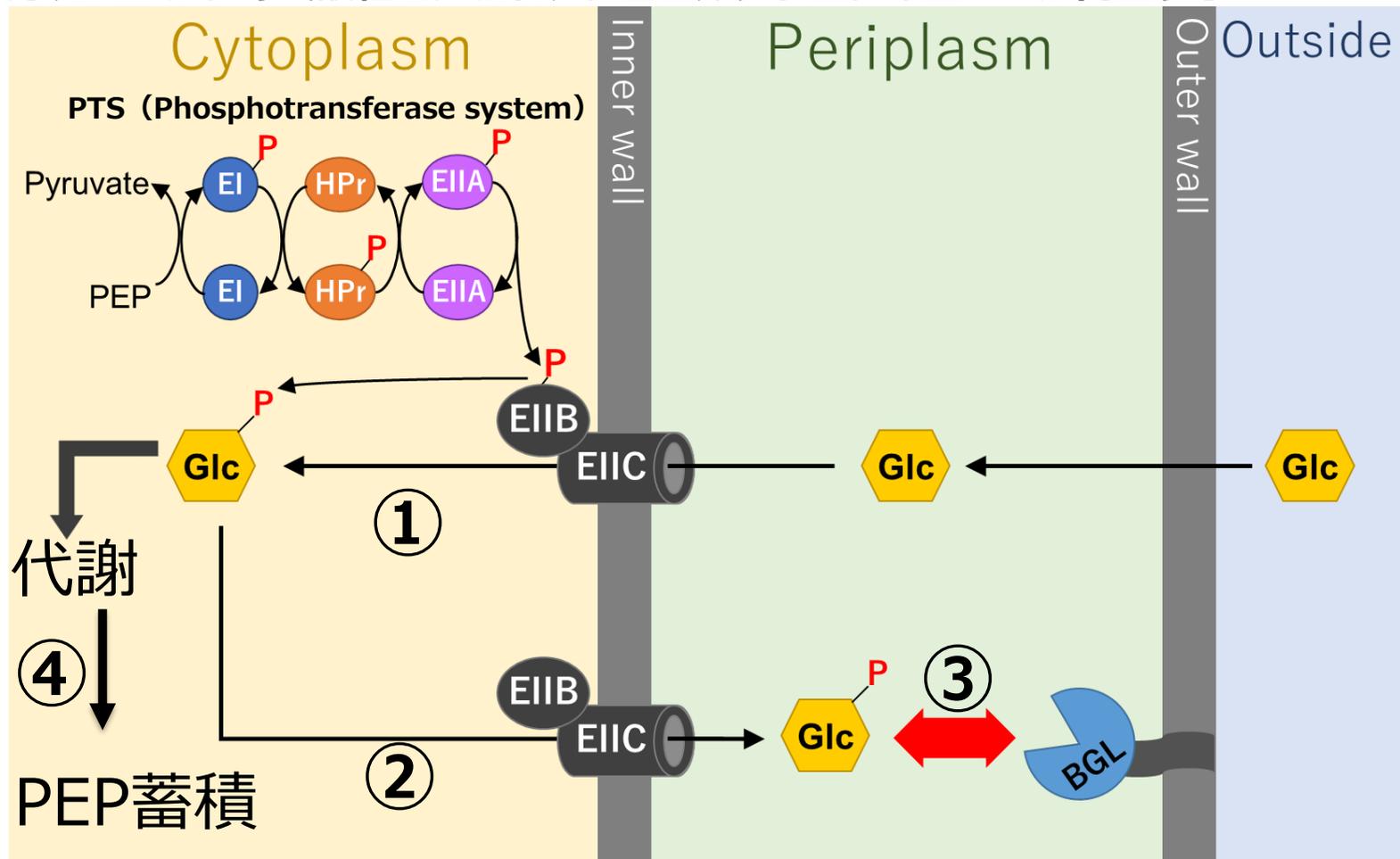


**PEP蓄積により
フェニルアラニン、チロシンおよび
ムコン酸の生産量も向上!!!**

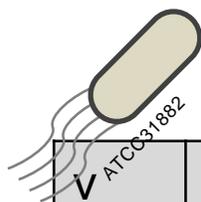
基礎研究から導かれる新しいメカニズム： BGLをペリプラズムに局在化させるとシキミ酸経路が強化される

微生物表層にBGLを提示するとグルコースを炭素源としてフェニルアラニンの生産量が上がる

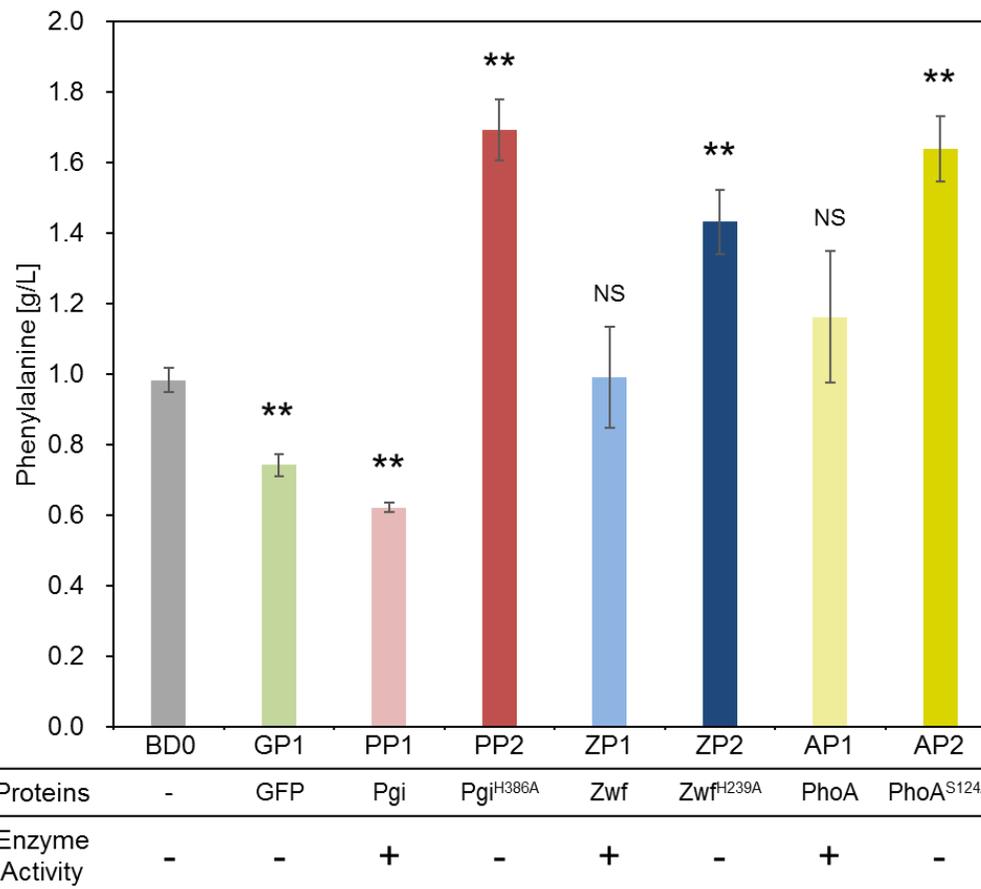
1. グルコースはPTSを介して細胞内にとりこまれてグルコース 6 リン酸 (G6P) となる
2. そのG6Pのごく一部がEIIBCを介してペリプラズムに汲み出される
3. G6PがペリプラズムでBGLと相互作用することにより細胞内の代謝が変化し、PEPが蓄積
4. 蓄積したPEPがシキミ酸経路に流れ、フェニルアラニンの生産量が向上する



メカニズムの実用化への応用: G6Pと相互作用するタンパク質でもよい



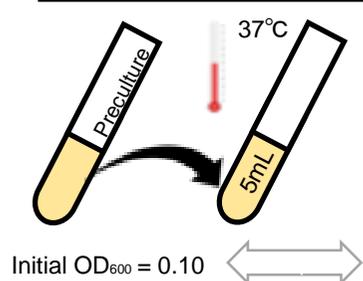
	Control	GFP (Control)	Pgi	Zwf	PhoA
Native protein (Light)	BD0	GFP GP1	Pgi PP1	Zwf ZP1	PhoA AP1
Inactivate mutant (Dark)			Pgi ^{H386A} PP2	Zwf ^{H239A} ZP2	PhoA ^{S124A} AP2



Medium

- M9YP minimal medium
- + 20 g/L **Glucose**
- + 10mM pyruvate
- + 5g/L Yeast extract
- + 40mg/L Tyrosine
- + 40mg/L Tryptophan
- + Antibiotics

Culture conditions



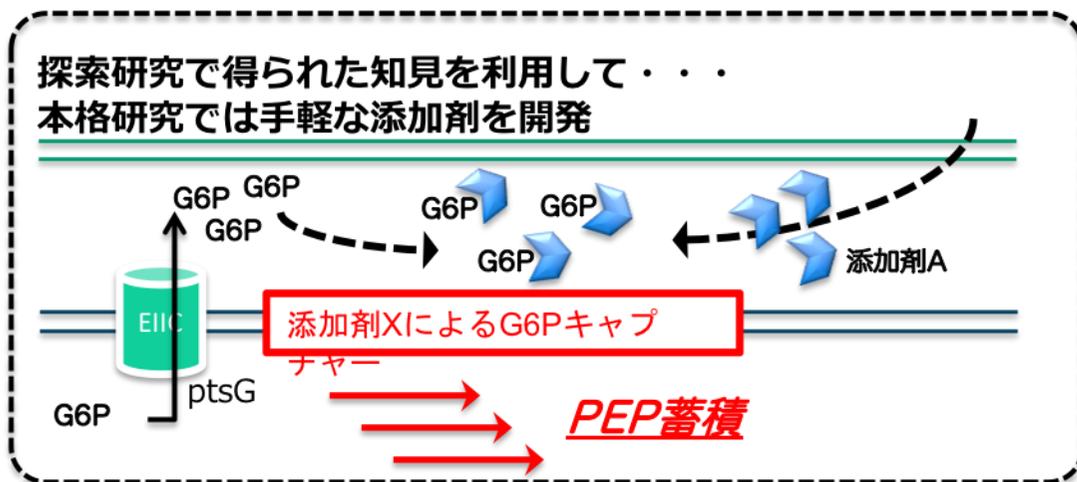
G6Pと親和性を持つタンパク質（不活性型）を局在化させてもシキミ酸経路が強化されフェニルアラニンの生産量が増加する

社会実装に向けて： 遺伝子組換えを用いない代謝制御添加剤の開発

本格研究・社会実装

添加剤を利用したシャーシ技術

- **添加剤を加えるだけで手軽に代謝を改変できる独創的新技术**
- **企業・他の研究機関が保持する微生物にそのまま適用可能**



<手頃な代謝改変をサポートする多様な添加剤の開発>



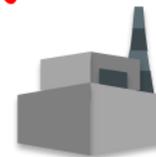
社会実装例)

利点1：

遺伝子組換え技術を利用しない

企業X

- ・ 遺伝子組換え技術を持たない (あるいは遺伝子組換え技術が利用できない環境)



non-GMOにも利用可能な添加剤によって、大幅な収率向上が見込める！

利用者を選ばない技術であり、波及効果大きい

→参入のハードルが低い

利点2：

手軽に代謝改変が可能

企業Y

- ・ すでに微生物を用いた物質生産技術を保有
- ・ **現状の培養システムに添加剤を加えるだけで生産量と収率を向上できる！**

研究機関Y

- ・ 独自の変異株を保持



添加剤を加えるだけで独自株の更なる改変を手軽に行うことができる！！

社会実装に向けて： 「外」から「中」を変えて社会を変える

~Challenges~ Why? (メカニズムの解明)

- ・ペリプラズム内でG6P→PEP蓄積
- ☞ G6P以外の物質を利用して代謝制御が可能に

- ・取り込んだG6Pを再度ペリプラズムに排出
- ☞ 代謝全体の制御が可能に

~Perspectives~ How? (社会実装)

【non-GMOを用いた物質生産】

発酵微生物の代謝変動によって発酵食品の香りや味が変化
→代謝が未解明でも「経路」を強化できる

【家畜飼料添加剤】

腸内細菌の代謝変動にるげっぶのCO2減少：温室効果ガス削減

【添加剤固定化リアクター】

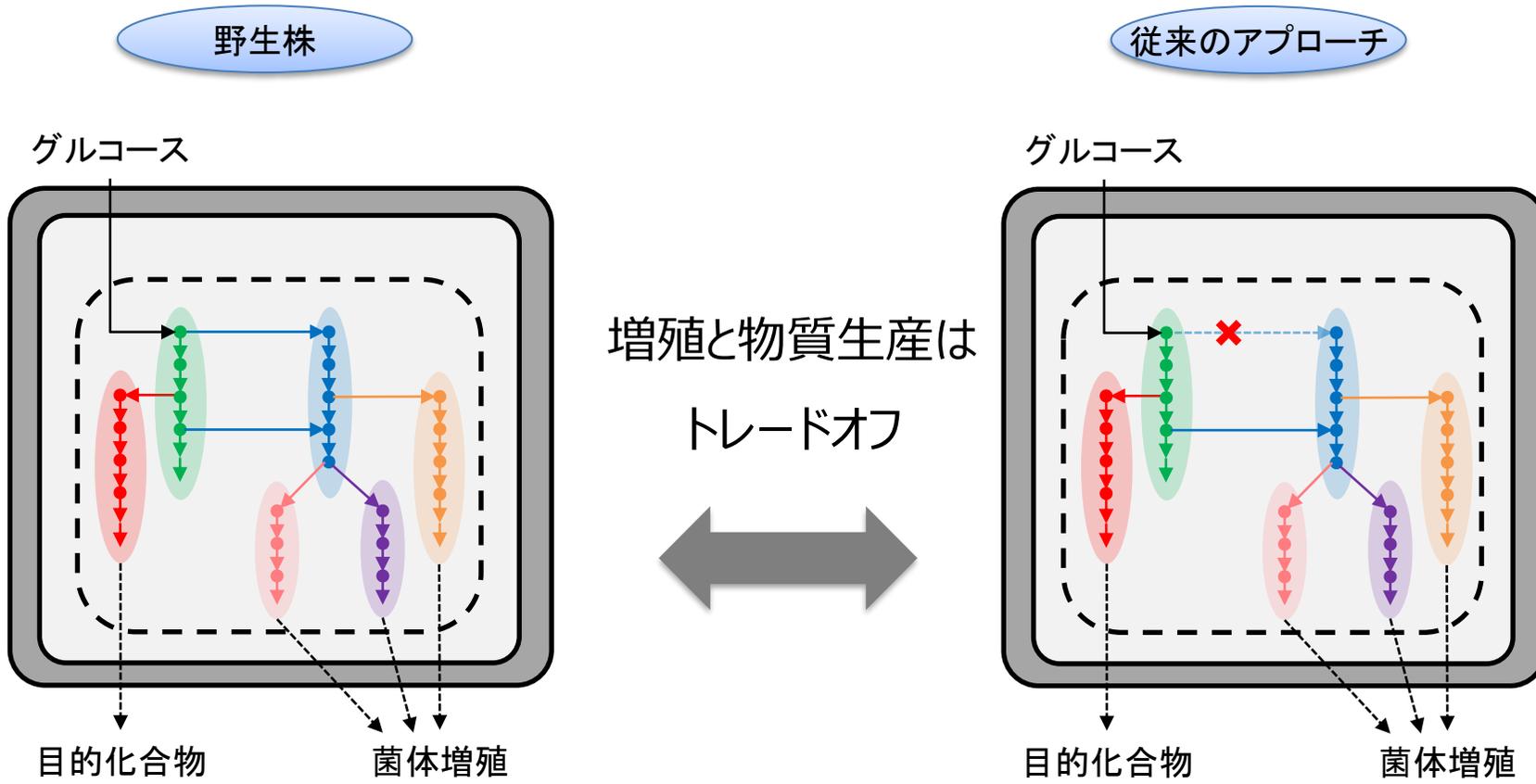
代謝改変剤を予め固定化やコーティングしたバイオリアクター
→培養するだけで代謝が変わる
→添加剤の回収も不要

「外」から
「中」を変える
×
「微生物」と
「化学」で社会
を変える

【抗菌剤】

微生物の代謝を抑制することで菌体の繁殖を阻害
→農薬など農林業への応用

これまでの代謝改変技術： 増殖と物質生産はトレードオフ



炭素源は主に微生物の増殖に使われ、
目的化合物の生産量は低い

菌体増殖が低下するためトータルの
生産量が低くなる

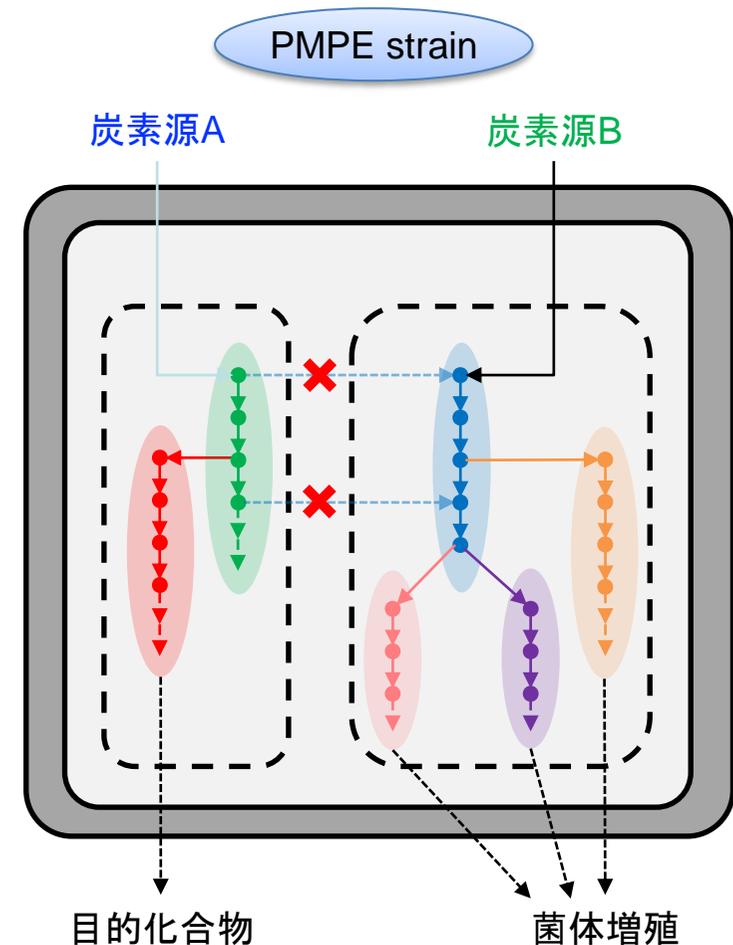
Parallel Metabolic Pathway Engineering (PMPE)

Parallel Metabolic Pathway Engineering (PMPE)

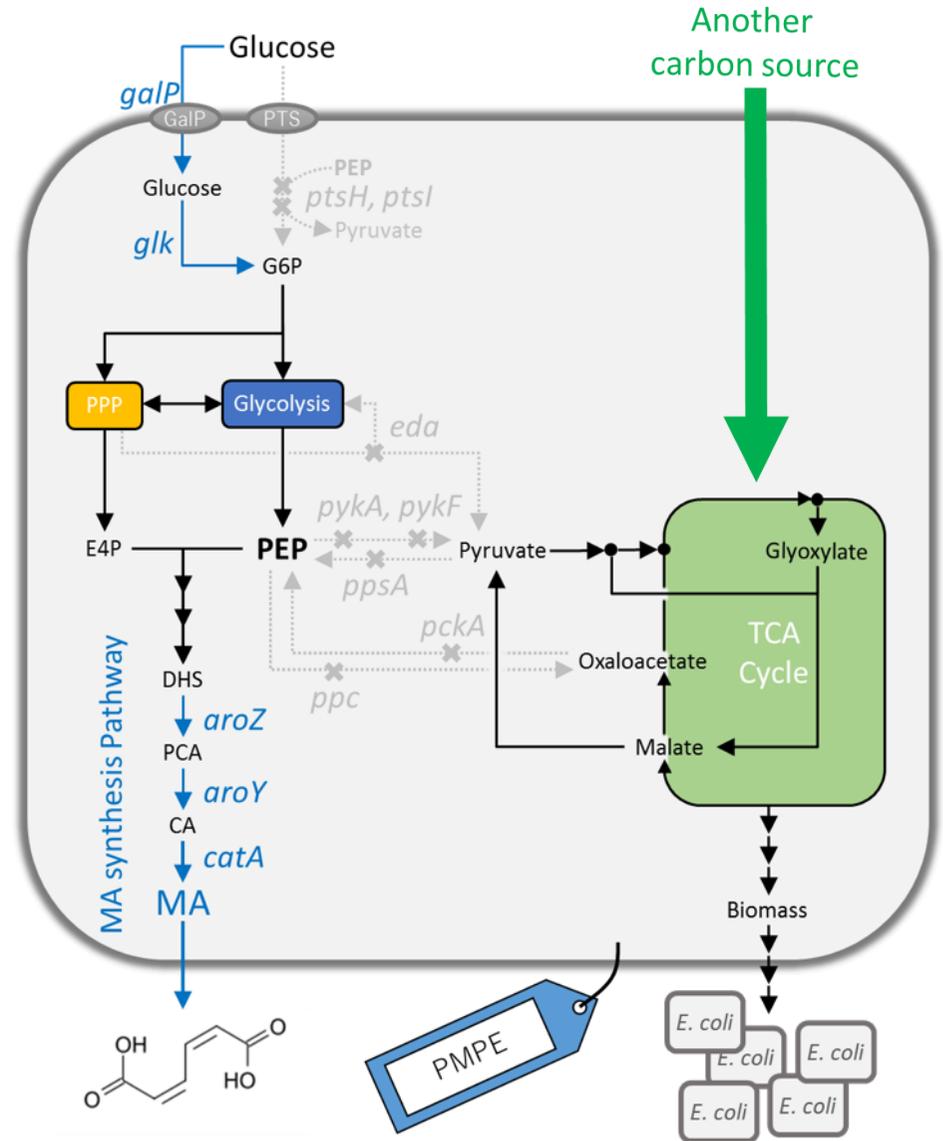
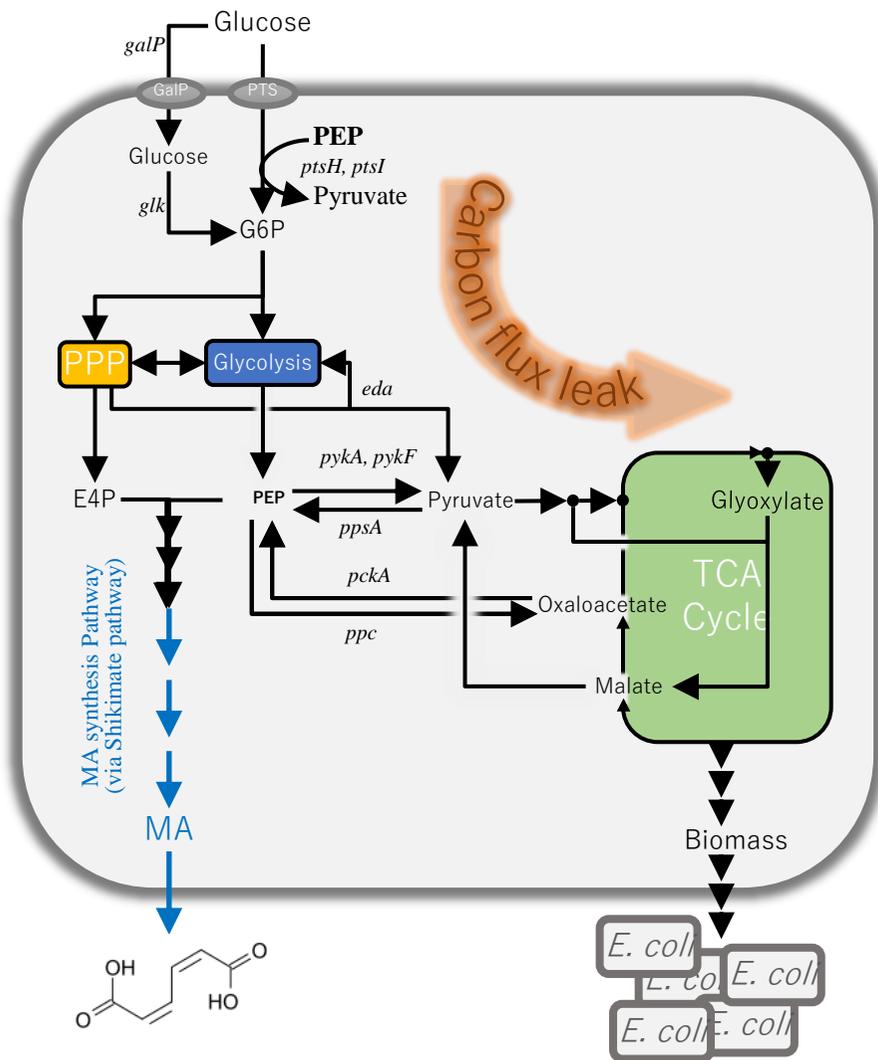
物質生産と増殖の代謝経路を完全に分離し、それぞれ独立に（Parallelに）制御する

Advantages

- 高収率：炭素源Aはほぼ全て物質生産に使われる
- 糖の有効利用:
物質生産に適した炭素源からモノを作り、
それ以外の炭素源は増殖に使う
グルコース / キシロース
グリセロール / 酢酸
グリセロール / メタノール
- ハンドリング：共培養に比較して培養しやすい



新しい代謝改変技術： PMPEのデザイン



物質生産と増殖の経路を完全に分離する

培養条件の最適化

GX1xMA strain

(PMPE株)

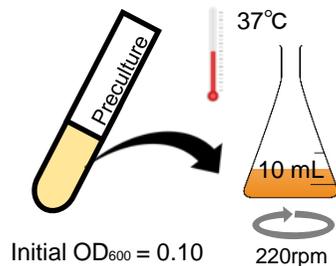


...GX1 harboring
pZE12-x and pSAK-MA

Medium

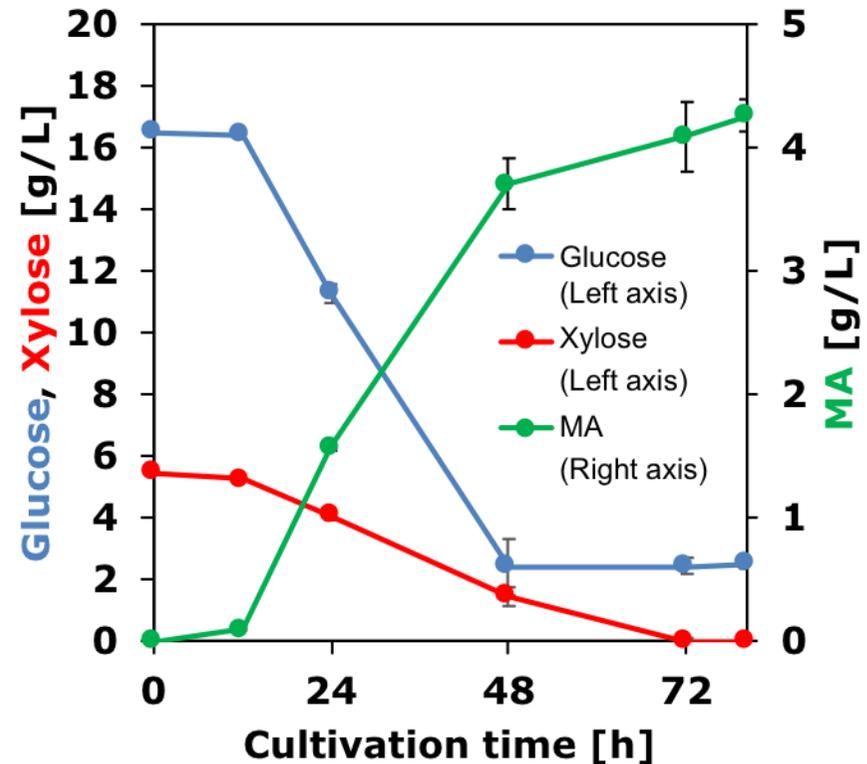
M9 minimal medium
+ 20 g/L Sugar(s)
+ 5 g/L Yeast extract
+ 40mg/L Tyrosine
+ 40mg/L Tryptophan
+ 100mg/L Phenylalanine
+ Antibiotics

Cultural condition



Medium

M9 minimal medium
+ 20 g/L Sugar(s)
+ 5 g/L Yeast extract
+ 40mg/L Tyrosine
+ 40mg/L Tryptophan
+ 100mg/L Phenylalanine
+ Antibiotics
+ CaCO₃



Titer 4.26 g/L
Yield 0.31 g/g-glucose

新技術の特徴・従来技術との比較

- 遺伝子組み換えを用いずに、培地に添加するだけで目的化合物の生産性を向上させる技術を開発
- 主要中間体とその経路を強化するため、目的生産物を明らかにしなくても使用可能
- 増殖経路と生産経路を完全に分離するため、
培養制御が不要
ワンポットでの増殖連動型の物質生産が可能
細胞と目的物質の収率の制御が容易

想定される用途

- 微生物を用いた環境に優しく低炭素なものづくり
- 培地に添加することで生産量を向上できる添加剤
- バイオマス成分の有効利用(C5糖、C6糖の混合糖)
- 廃棄物の効率的な有価物転換
(廃グリセロールなど)

実用化に向けた課題

- 現在、とある化合物で添加剤としての効果を確認済み。しかし、毒性や効果の点で改善の余地あり
- G6Pキャプチャー効果のある添加剤の探索
- 企業から要望のある微生物での適用性確認

企業への期待

- 化合物ライブラリー等を持つ企業との共同研究を希望。
特に、これまでボツになった化合物群に
本技術で使えるものがある可能性あり
- 実バイオマス処理技術を持つ企業との共同研究を希望。
本技術は実バイオマスでも適用可能なことは予備検討で
実証済み
- 微生物培養、生産の実績が無い企業でも
「添加剤」として自社化合物等の新規分野開拓の可能性
- 糖含量の高い廃棄物を持つ企業での廃棄物の有効利用

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : グルコース6リン酸を捕捉する物質を用いた芳香族化合物の製造方法
- 出願番号 : 特願2020-112989
- 出願人 : 神戸大学/理化学研究所
- 発明者 : 藤原良介、野田修平、田中勉

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 糖代謝経路が改変された微生物
- 出願番号 : 特願2020- 082823
- 出願人 : 神戸大学/理化学研究所
- 発明者 : 藤原良介、野田修平、田中勉

産学連携の経歴

- 2017年-現在 JST未来社会創造事業に採択
- 2020- A社と共同研究実施
- 2021- B社と共同研究実施

お問い合わせ先

神戸大学

産官学連携本部 産学連携・知財部門

TEL 078-803-5945

FAX 078-803-5389

e-mail: oacis-sodan@office.kobe-u.ac.jp