

微生物による有用物質の 大量生産を光でコントロールできる技術

日本大学 生物資源科学部 応用生物科学科
准教授 高野 英晃

2022年12月20日

従来技術とその問題点

〈一般的な微生物タンパク生産系〉

大腸菌(メルク)、バチルス属細菌(ドイツMoBiTec)、ロドコッカス(産総研/北海道システムサイエンス)、ブレビバチルス(ヒゲタ醤油)、コリネバクテリウム(味の素)などをホストとする生産系が市販・受託解析に利用されている。

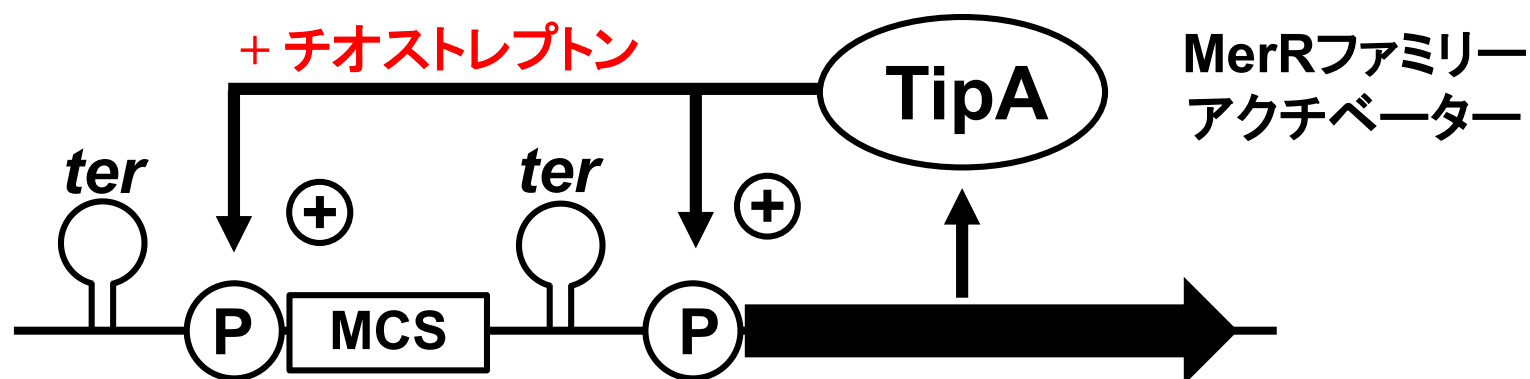
高いタンパク質生産性が報告され、国内外の研究者によって汎用されているが、いずれも低分子インデューサーを必要とする、もしくは増殖阻害を引き起こす構成的発現系である。

大腸菌において青色光をインデューサーとする組換えタンパク質生産に成功した例(*J Mol Biol.* 416:534(2012))はあるが、バクテリアで広く利用されているタンパク生産系は見つからない。

従来型の放線菌の誘導型発現システム

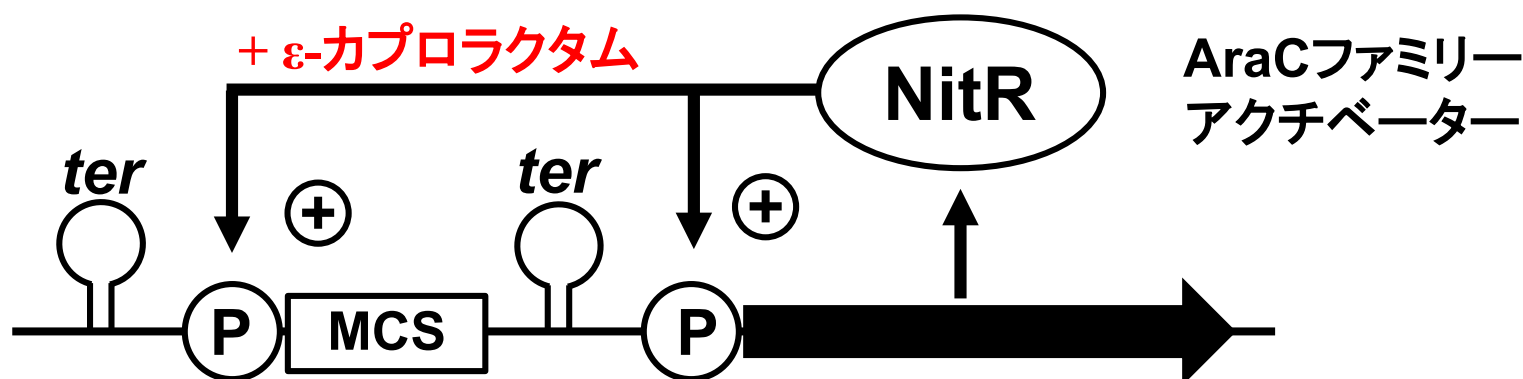
1. tipASシステム (抗生物質チオストレプトン)

1990年代に英国で開発



2. nitRシステム (アミド化合物ε-カプロラクタム)

2004年～筑波大小林ら



高いタンパク質生産性が報告され、国内外の研究者によって汎用されているが、いずれも低分子インデューサーを必要とする。

オプトジェネティクス、光遺伝学とは？

～光によって細胞機能を制御する技術～

光に応答して何らかの細胞状態や細胞機能を変化させるような生体分子をコードする遺伝子を，特定の細胞に選択的に導入，もしくは発現させ，光操作を行う実験技術．

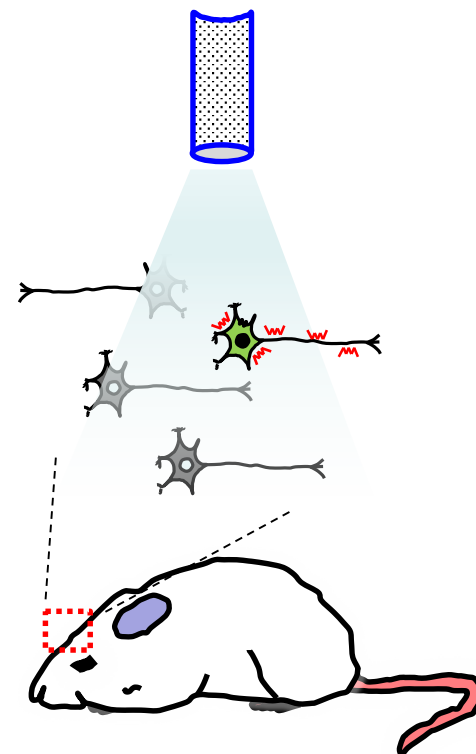
非侵襲性（物理的接触なし）

可逆的 （リバーシブル）

迅速的 （すぐにオン）

局所的 （ピンポイント）

安価 （光は安い）



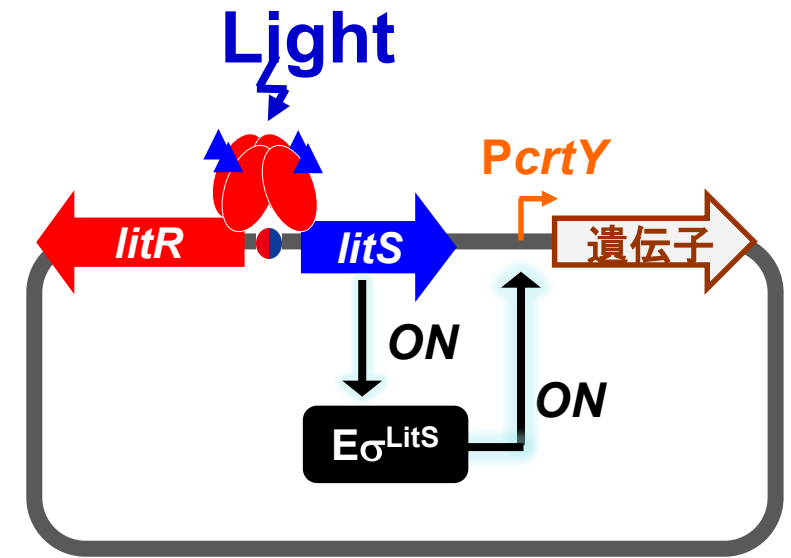
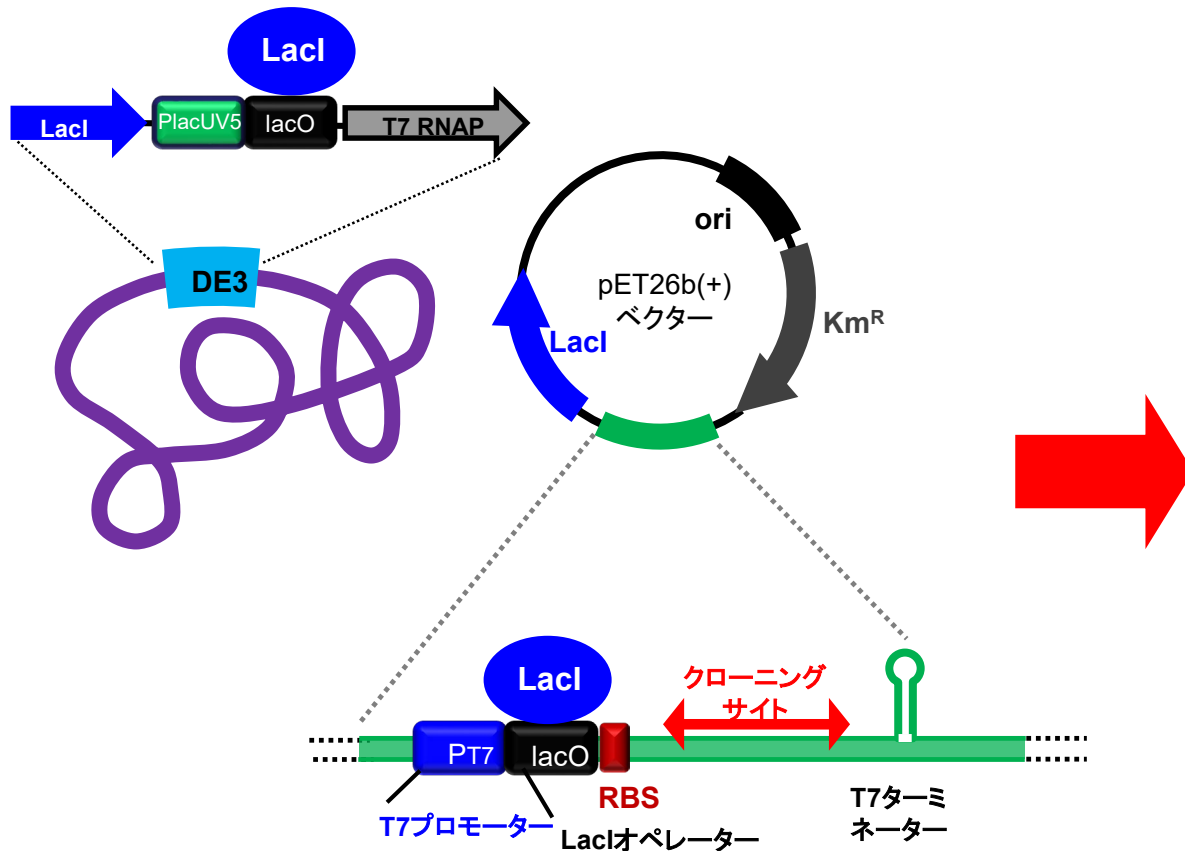
光制御システムの特徴

・ 高価・再利用できない・培地組成を変えてしまう低分子インデューサー（IPTGは生産コストの最大40%を占める）を必要としない**安価・非侵襲性**に加えて、光遮断によってスイッチオフにもできる可逆性という従来タイプのもたない**自由自在にオン・オフ制御**できる。

・ インデューサーの合成プロセスにおけるCO₂排出・環境破壊を抑制でき、循環型社会構築の一端にも貢献する。

したがって、光誘導システムは既存システムにとって代わる**環境にやさしい低コスト生産システム**となりうる。

組換えタンパク質生産の光制御技術開発

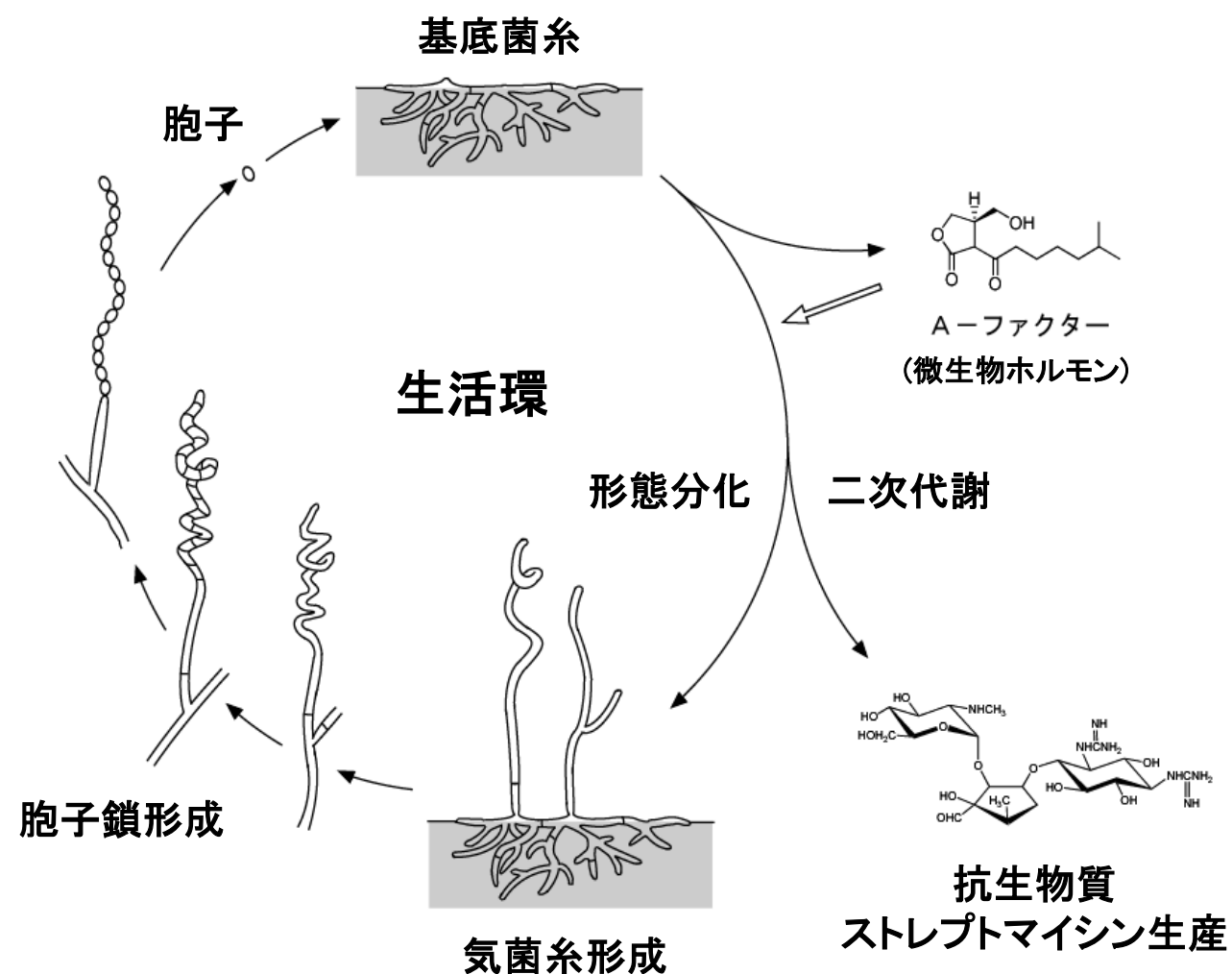


低分子化合物型

光スイッチ型

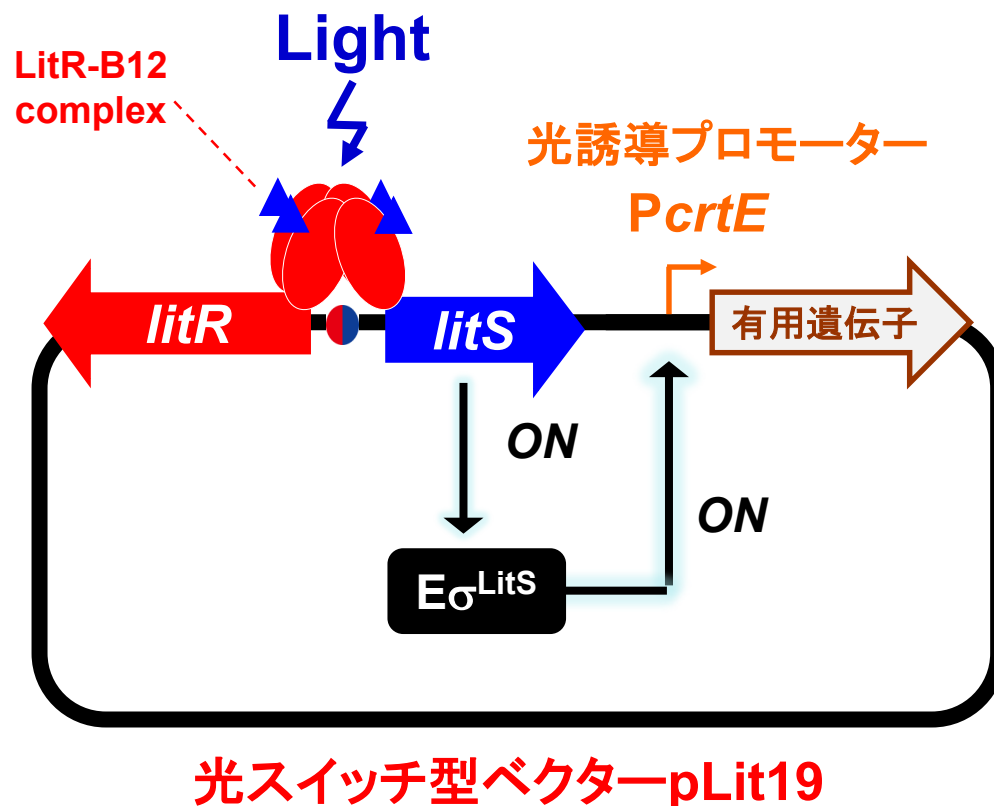


ストレプトマイシン生産菌 放線菌 *Streptomyces griseus*



- 基礎研究で長年使用されてきたため、形態分化と二次代謝制御の主要経路が解明されている
- ゲノム解読完了株
- 容易・安価なDNA導入・遺伝子破壊系が確立されている
- プラスミドなどのツールが整備されている
- A-ファクターによる形態分化と二次代謝の一括制御
- 放線菌の中では増殖が速い

微生物工場“放線菌”の エコクリーンな有用物質生産系の開発



ホスト

Streptomyces griseus NBRC13350

ベクター

放線菌で広く使用されているpIJ702

LitR

ビタミンB12をクロモフォアに利用する
光センサー型DNA結合タンパク質

LitS

RNAポリメラーゼのシグマ因子

PprtE

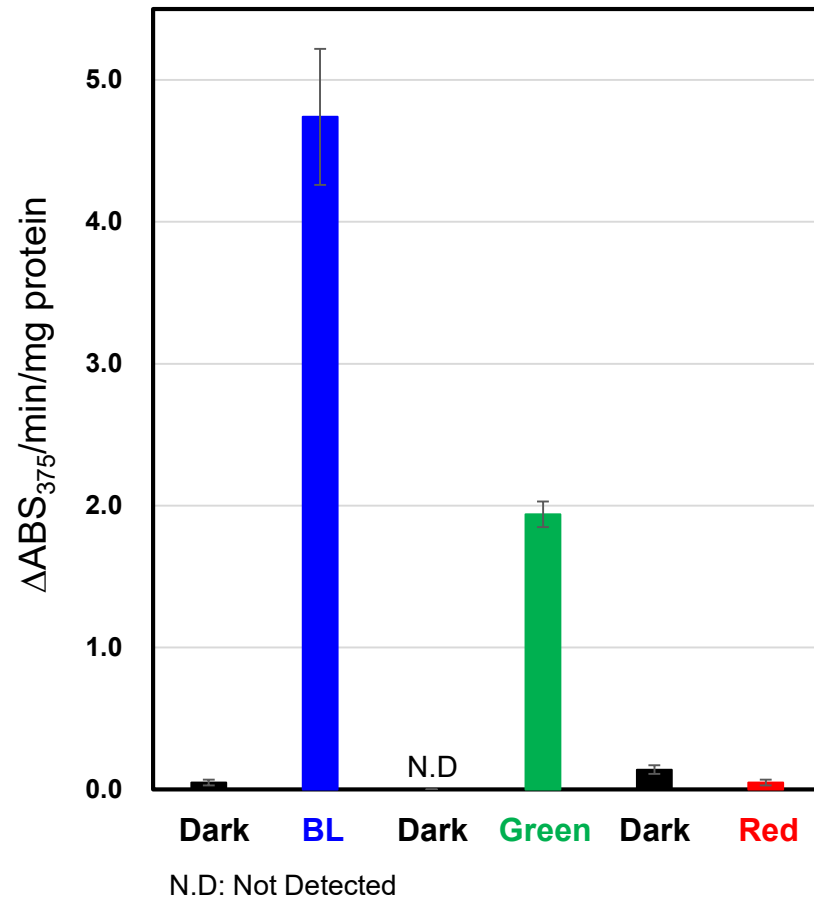
LitSによって認識される光刺激誘導型
プロモーター

暗条件におけるLitR-B12複合タンパク質はLitSからの転写開始を抑制しているが、光照射されるとB12の光分解にともなってLitRは不活性化する。その結果、発現したLitSタンパク質がRNAポリメラーゼとともに、*crtE*プロモーター(*PprtE*)からの転写を誘導する。

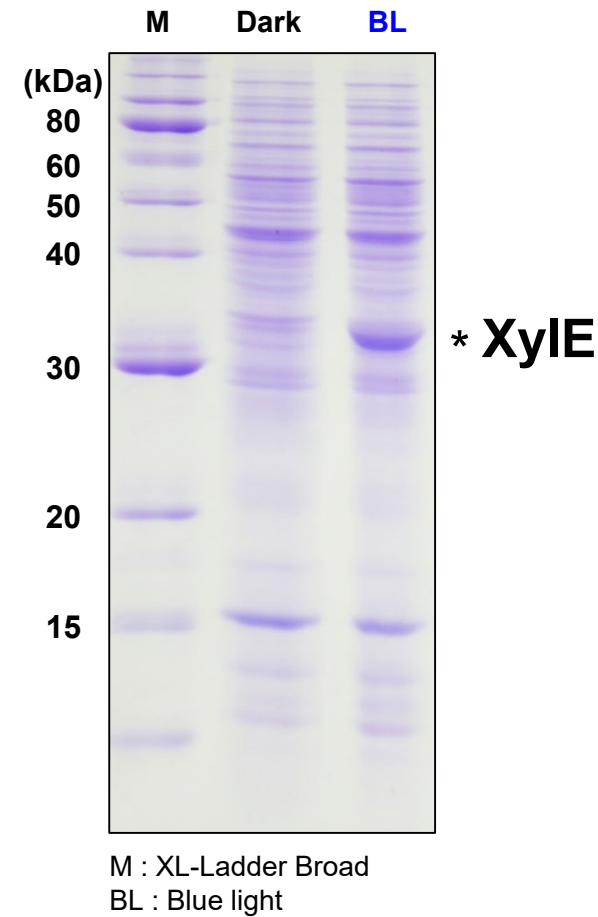
青～緑色光によって発現誘導できる



(A) XylE活性



(B) 発現蛋白質の検出



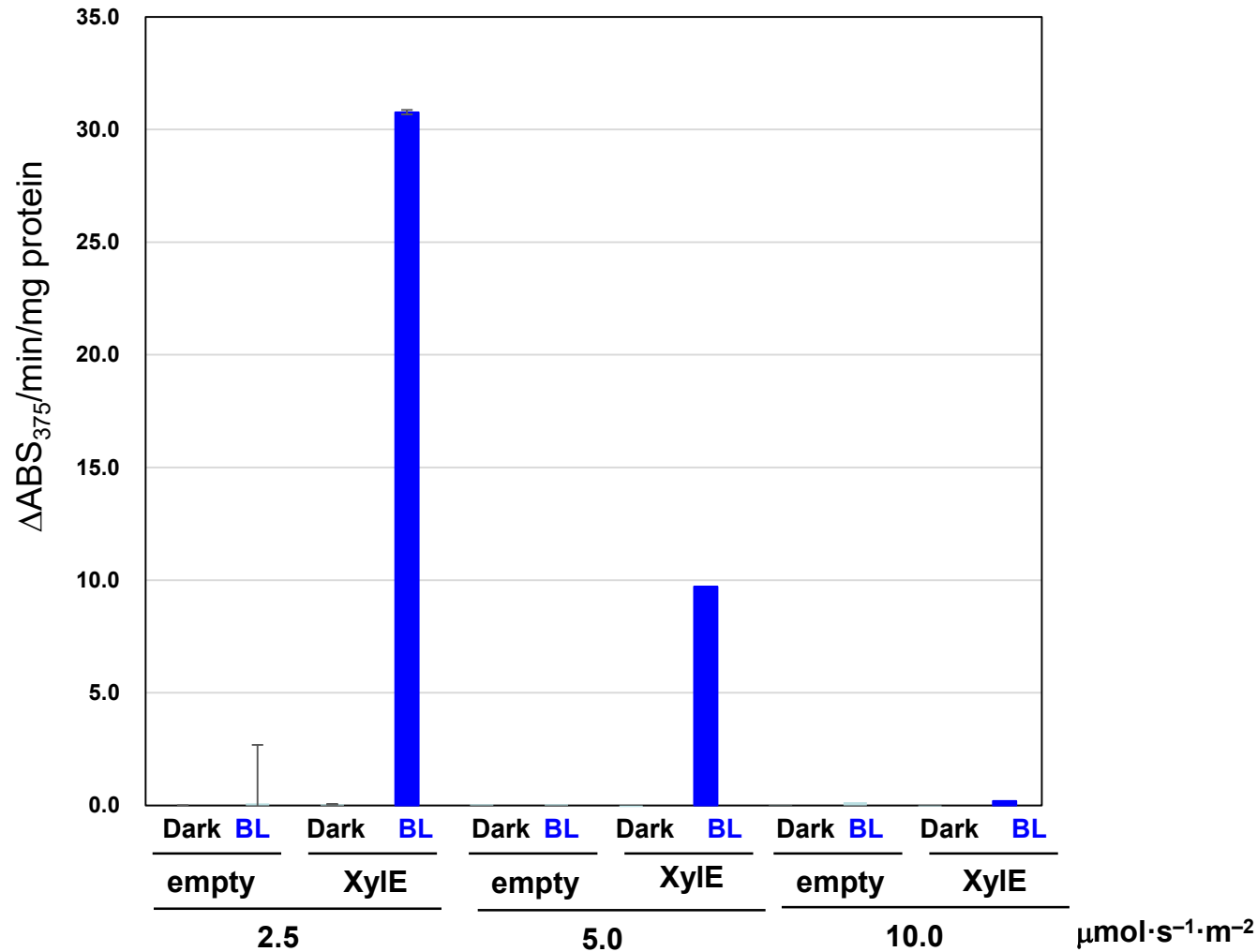
<Culture conditions>

S. griseus NBRC 13350/pLit19-XylE

YMPD medium, 2days, shaking culture, BL • Red light: $3 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$

Green Light: $1 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$

非常に弱い光によって誘導できる (細胞のストレスにならない光強度)

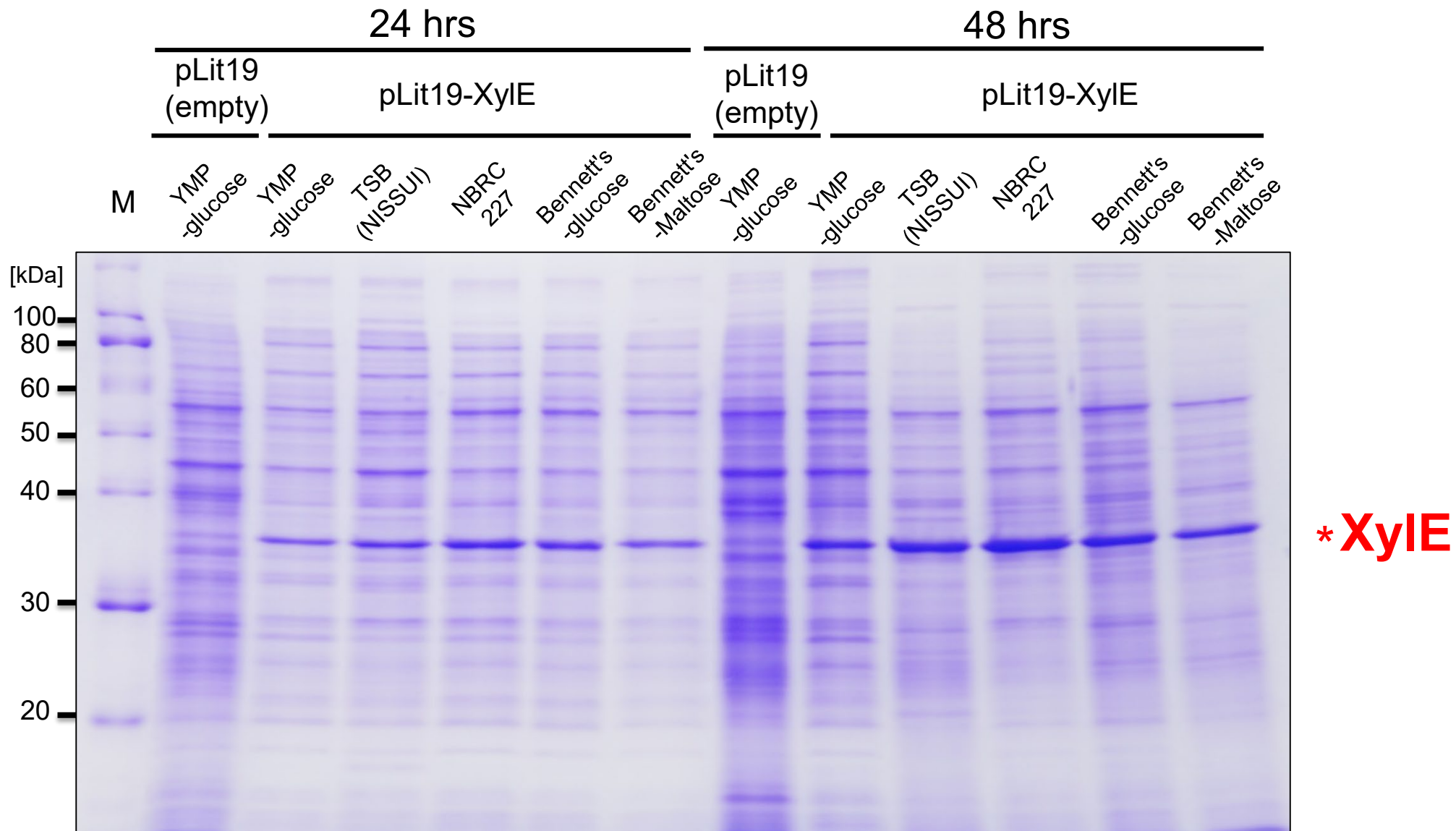


<Culture conditions>

S. griseus NBRC 13350/pLit19, pLit19-XylE

YMPD medium, 2 days, shaking culture

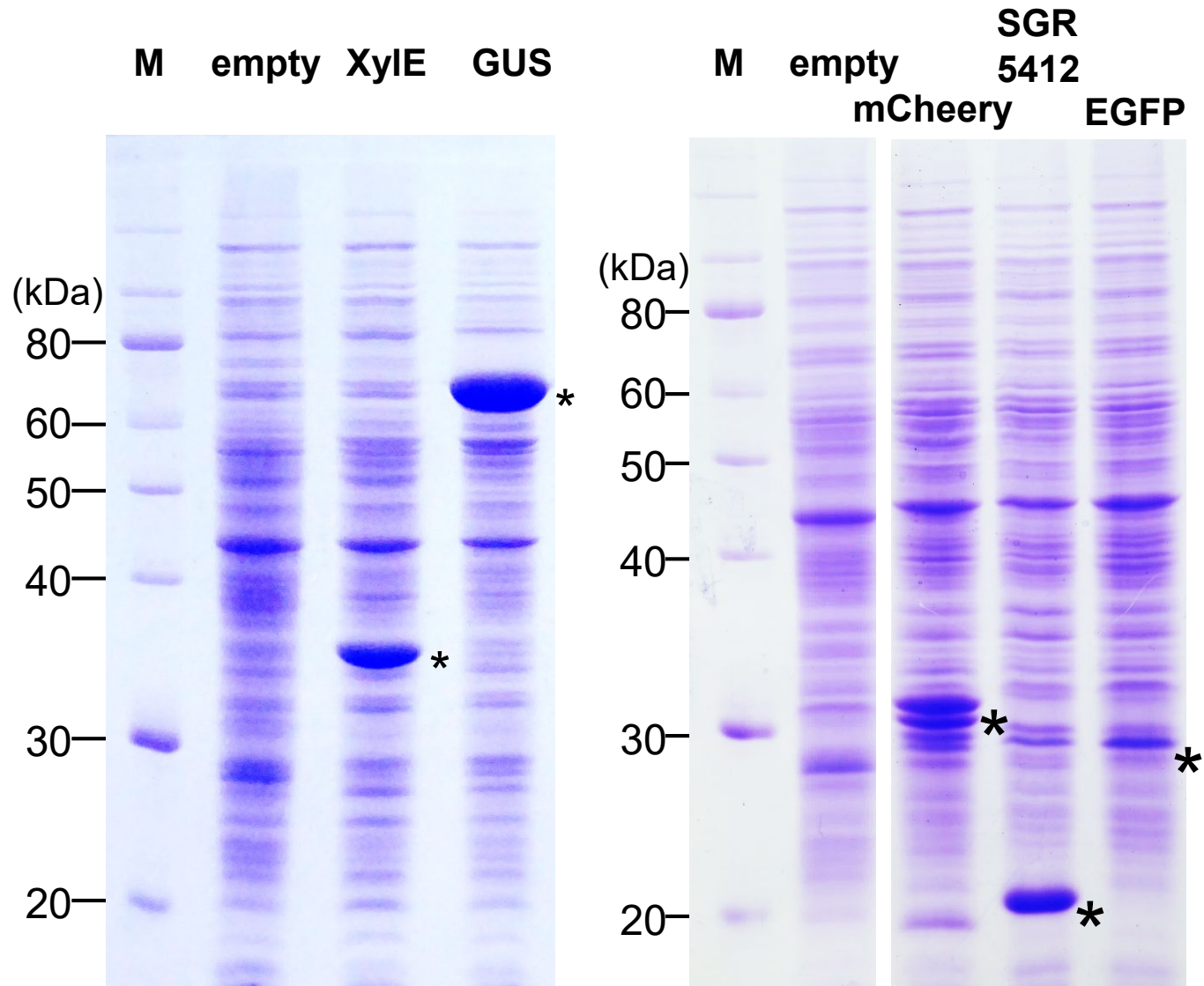
培養培地の種類に依存しない高いタンパク生産性



M : XL-Ladder Broad

Shaking culture (135rpm), Blue light : $3 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$

各種細胞内タンパク質の大量生産



M : XL-Ladder Broad

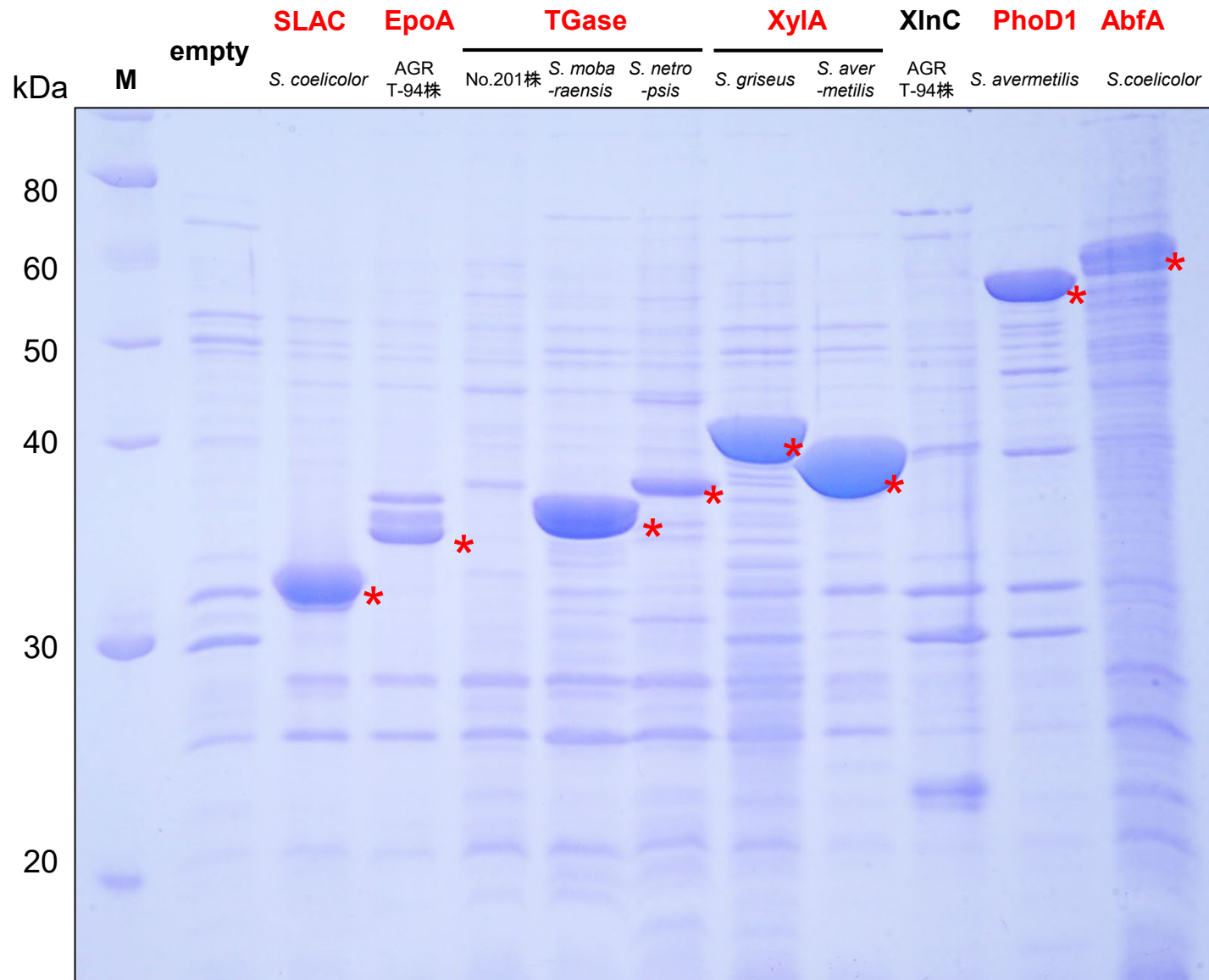
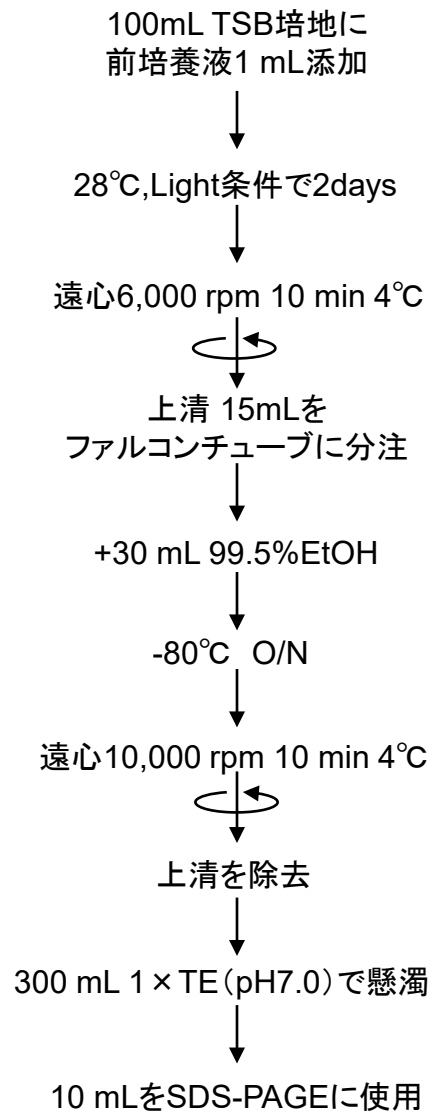
<Culture conditions>

S. griseus NBRC 13350/pLit19-GOI

YMPD medium, 2days, shaking culture, BL:3 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$

各種細胞外酵素の大量発現 (50倍濃縮)

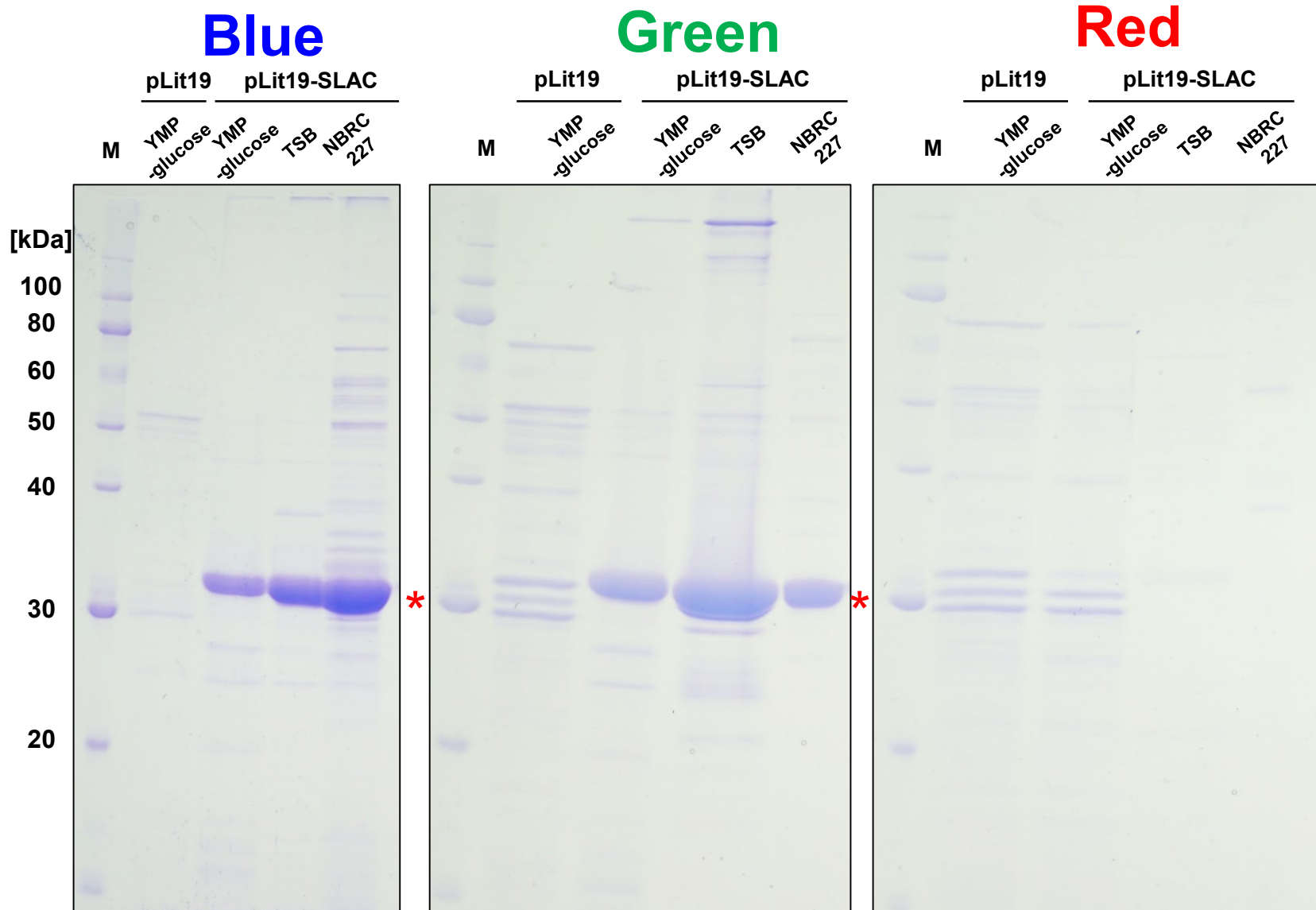
実験方法



M:XL-Ladder Broad
(5μLアプライ)

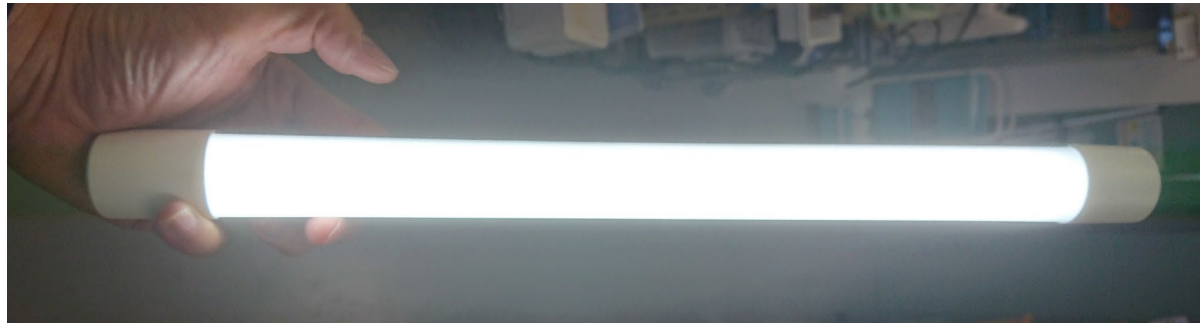
光強度: 3 μmol/m² sec

青～緑色光によるラッカーゼSLCAの発現誘導(50倍濃縮)

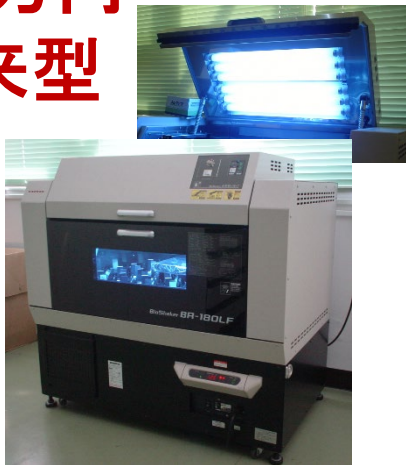


24時間培養, Blue light : 3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{sec}$
SDS-PAGE濃縮ゲル : 12.5%

市販簡易LEDライトの利用 (販売価格2000円程度)

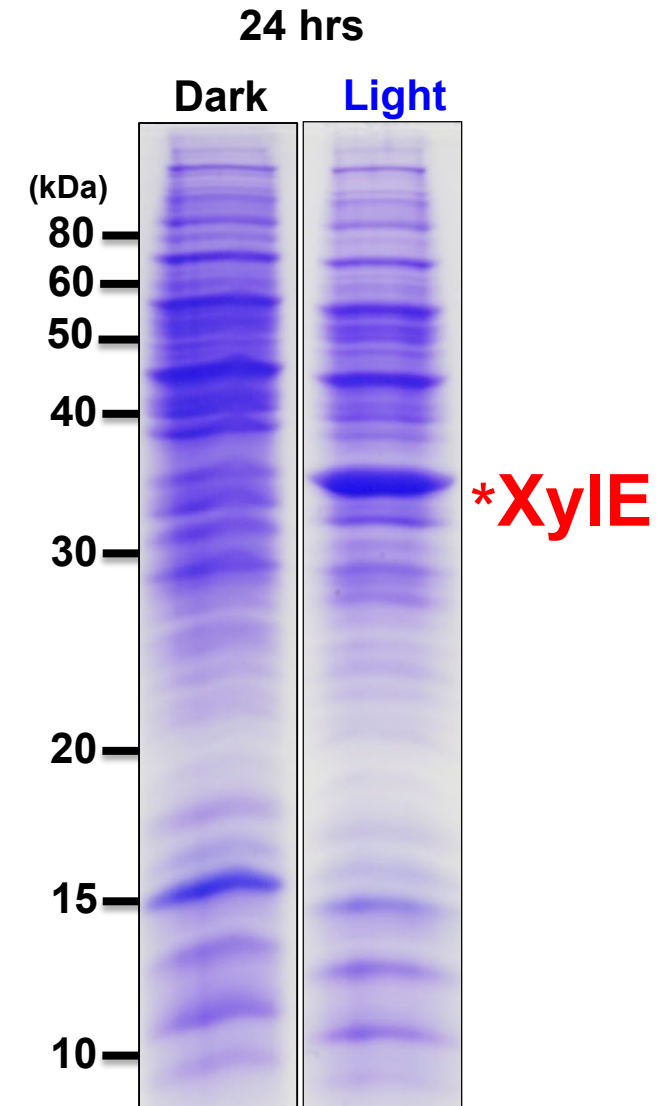


200万円
従来型



タイッテク BR-180LF

液体振とう培養



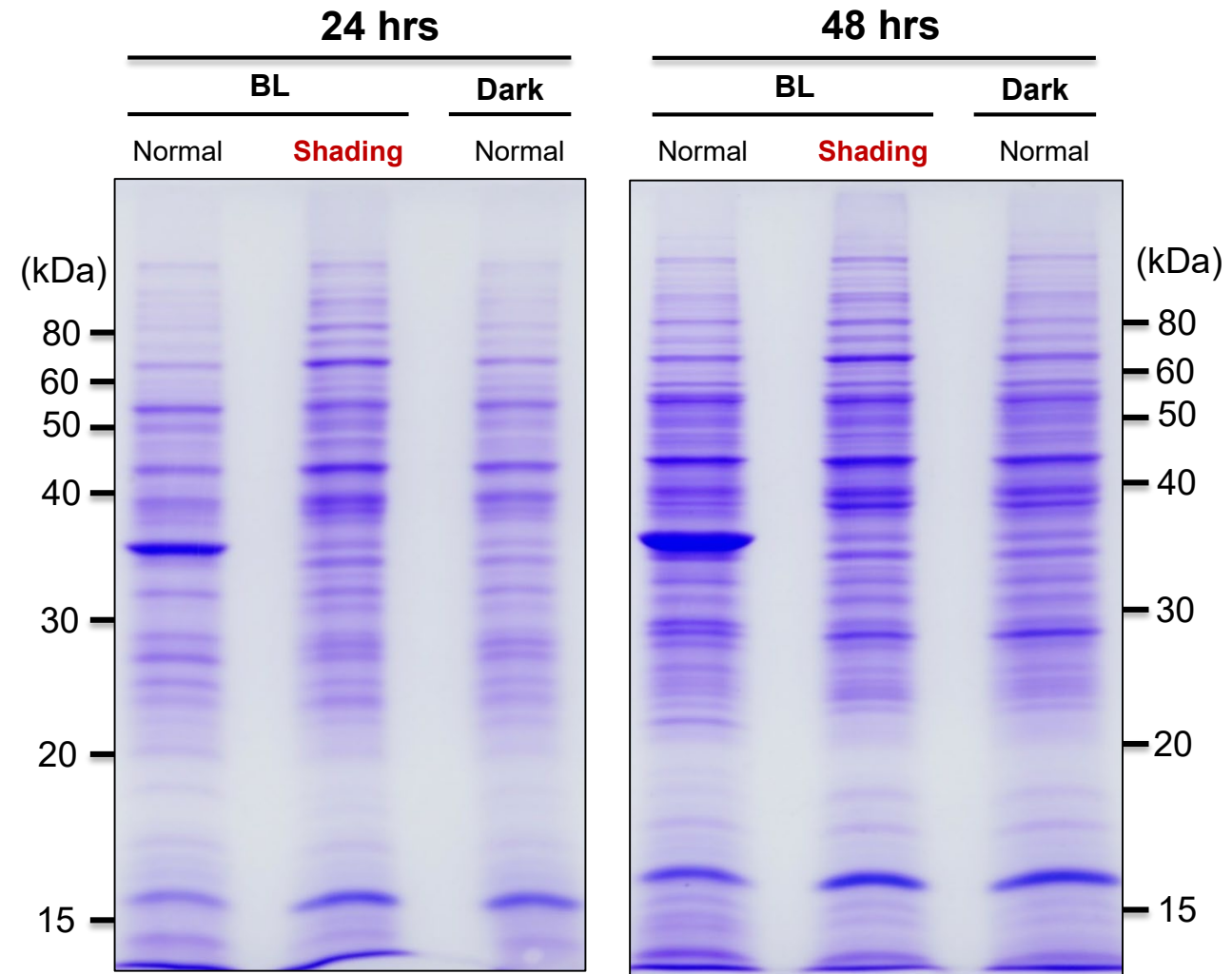
YMP-glucose + 20 μ g tsr
1日間連続白色+電球色光照射
(8.2 mmol $\cdot$ s $^{-1}$ $\cdot$ m $^{-2}$)

遮光性バツフル付フラスコの利用

Normal



Shading



pLit19-XylE

YMP-glucose + 20 γ tsr, 1~2日間連続青色光照射 ($2.75 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術では、低分子化合物を誘導剤に用いるため、遺伝子発現をオフにすることは困難であった。本技術ではオフ制御も可能である可能性が高い。
- 従来技術では、低分子化合物を誘導剤に用いるため、環境負荷が高い、その低分子化合物の販売が終了する可能性などの問題点があった。
- LED光源を用いるため、長年繰り返し使用でき、環境負荷が低く、安価である。

想定される用途

- 本技術では、オンオフ制御が光によってできるため、複雑な発酵制御が可能である。
- 放線菌を用いるため二次代謝産物の生産に適している。
- 放線菌を用いるため組換え(食品)酵素生産も可能である。
- 弱い光で制御可能であるため、細胞のストレスにならない。

実用化に向けた課題

- 組換え(食品)酵素で実績のある放線菌 *Streptomyces lividans*では本系は機能しないため、プラスミド型から染色体組込み型に変更して、現在検討中である。
- 放線菌の組換えタンパク質系のキット化に向けて、DNA導入系・培養培地を検討して、簡便・安価にする。

企業への期待

- 微生物による有用物質生産の技術を持つ、また新規参入を検討している企業との共同研究・ライセンス移転を希望。
- 環境にやさしい・複雑・厳密な微生物生産制御系を開発中の企業には本技術の導入が有効と思われる。
- 現在求められている低環境負荷な生産系であり、企業ブランドイメージアップに貢献できる。
- 放線菌 *Streptomyces* の組換えタンパク質発現キットは市販されていない。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : プラスミドベクター、組換え放線菌、及び標的タンパク質の生産方法
- 出願番号 : 特願2022-031597
- 出願人 : 学校法人日本大学
- 発明者 : 高野 英晃

お問い合わせ先

日本大学産官学連携知財センター

TEL 03-5275-8139

FAX 03-5275-8328

e-mail nubic@nihon-u.ac.jp