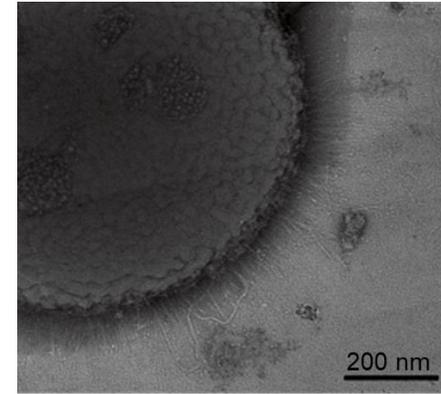
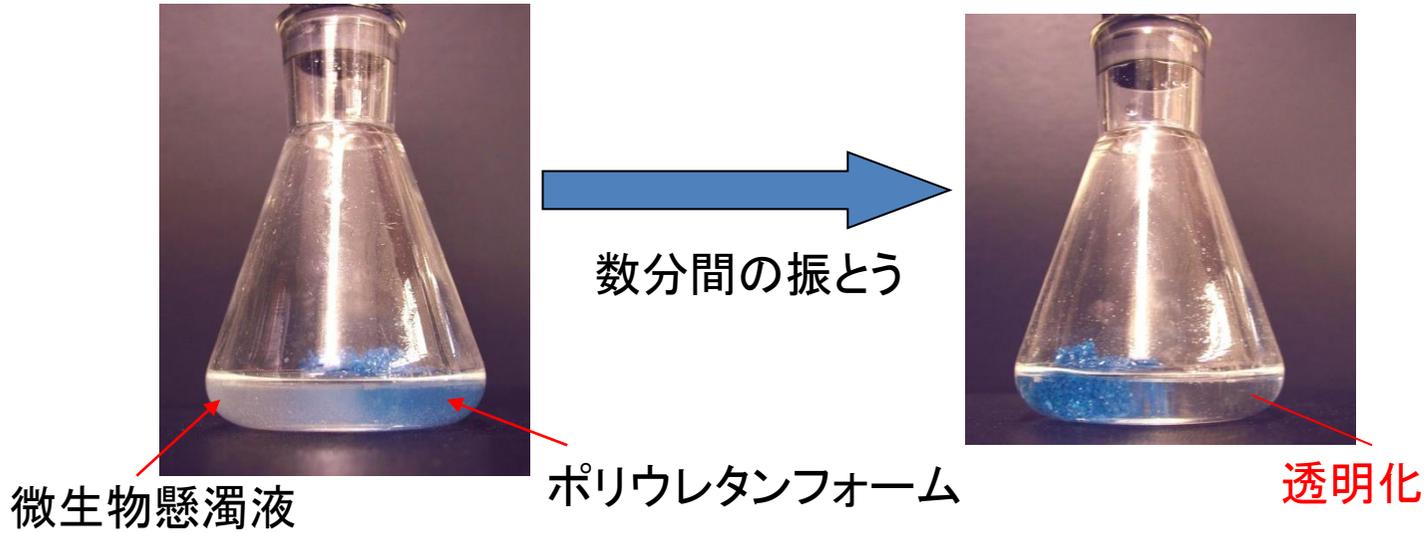


接着タンパク質による 新規微生物固定化法と気相微生物反応

名古屋大学 大学院工学研究科 生命分子工学専攻
教授 堀 克敏

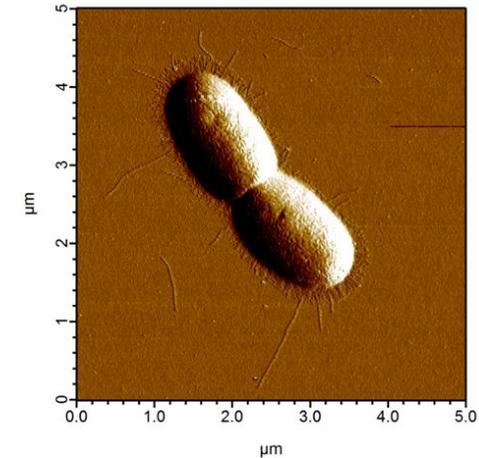
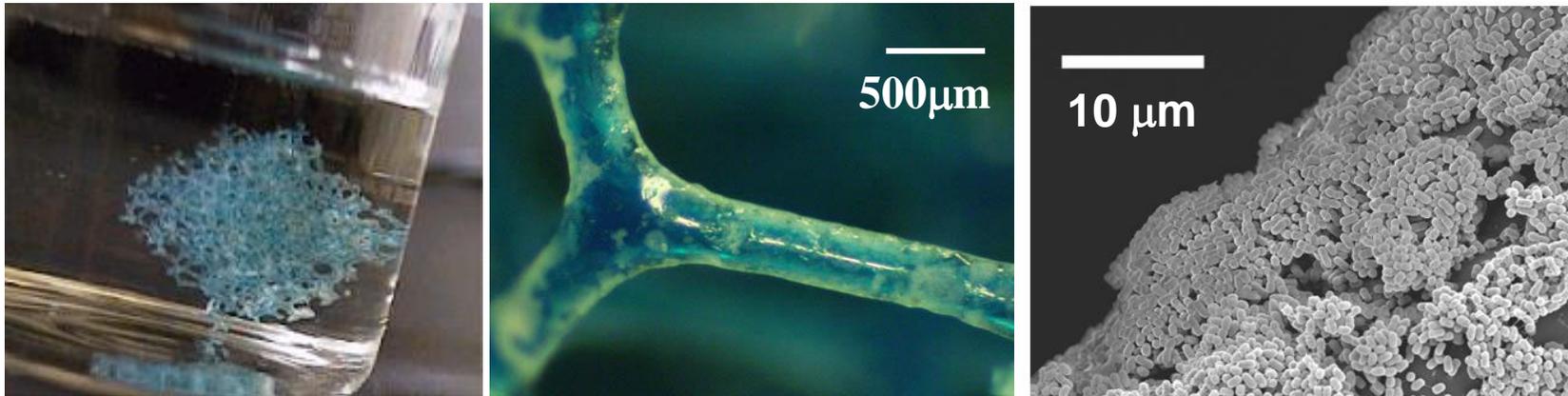
2024年3月7日

Acinetobacter sp. Tol 5: 高付着性の炭化水素分解細菌



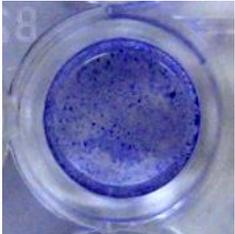
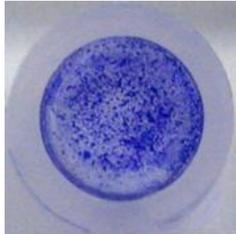
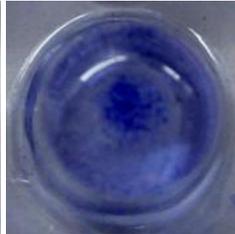
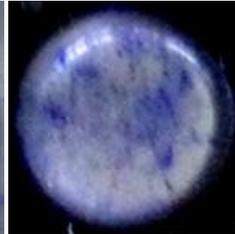
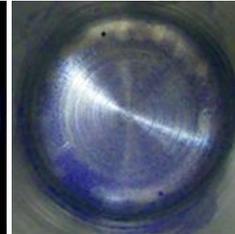
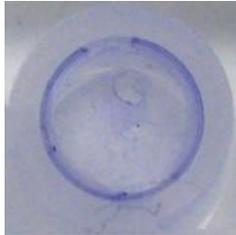
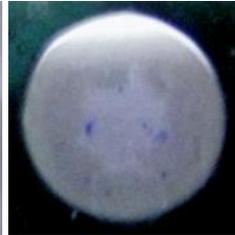
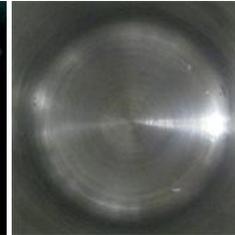
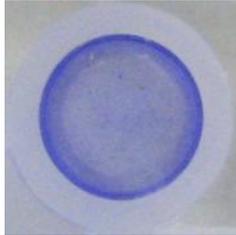
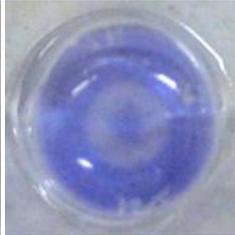
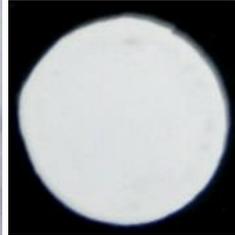
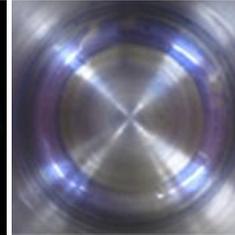
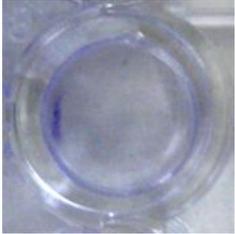
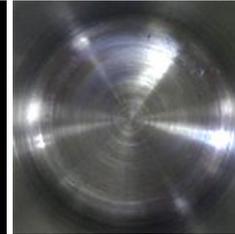
接着ナノファイバータンパク質AtaA

ポリウレタンフォームに付着するTol 5 細胞



様々な材料に非特異的に付着する *Acinetobacter* sp. Tol 5細胞

Materials

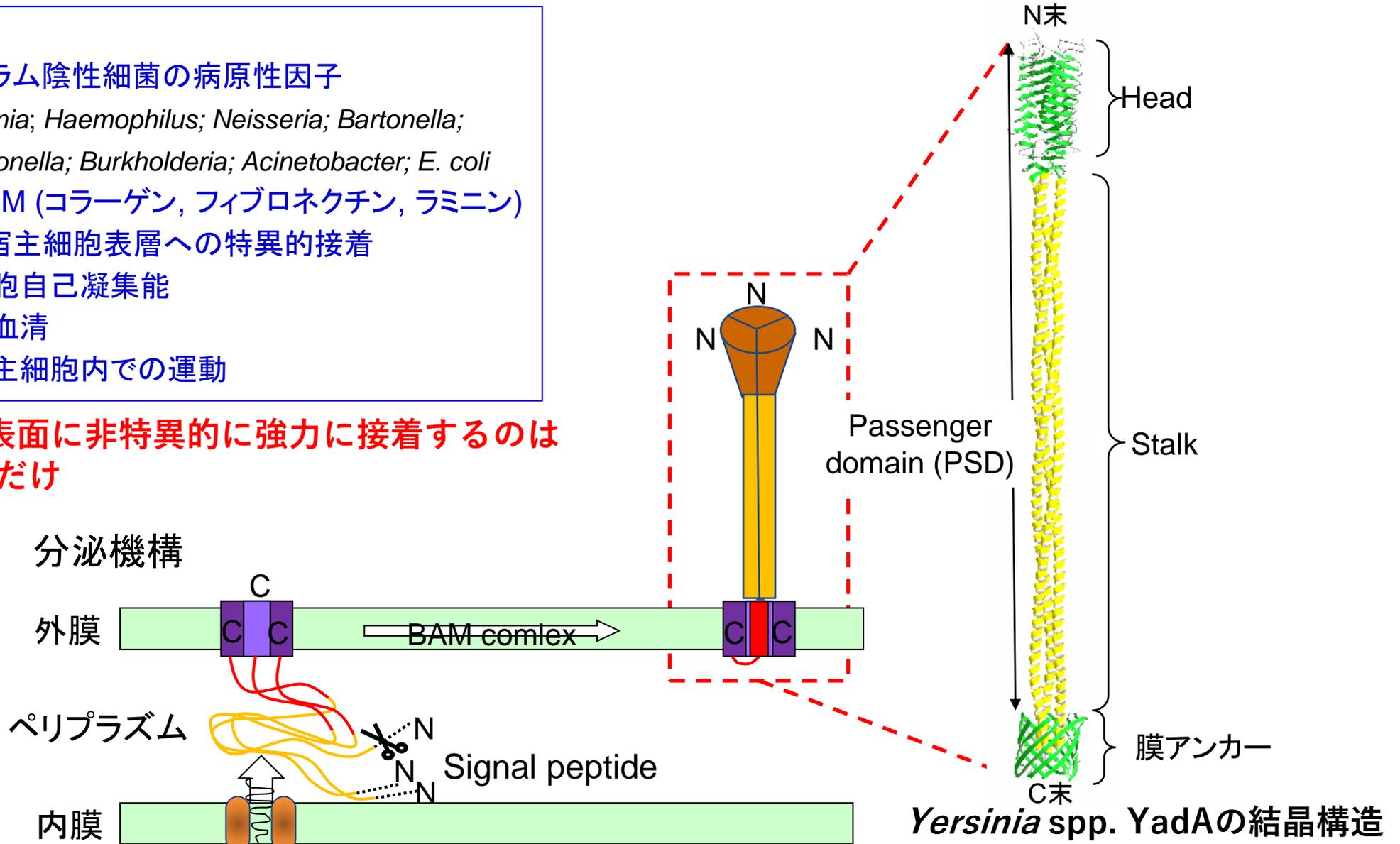
	PS	PP	PVC	Glass	SUS
<i>Acinetobacter</i> sp. Tol 5					
<i>P. aeruginosa</i> 緑膿菌 PAO1					
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1					
大腸菌 <i>E. coli</i>					

PS, ポリスチレン; PP, ポリプロピレン; PVC, ポリ塩化ビニル; SUS, ステンレススチール

AtaAは trimeric autotransporter adhesin (TAA) familyのタンパク質

- 機能**
- グラム陰性細菌の病原性因子
Yersinia; Haemophilus; Neisseria; Bartonella; Salmonella; Burkholderia; Acinetobacter; E. coli
 - ECM (コラーゲン, フィブロネクチン, ラミニン) と宿主細胞表層への特異的接着
 - 細胞自己凝集能
 - 抗血清
 - 宿主細胞内での運動

材料表面に非特異的に強力に接着するのは AtaA だけ



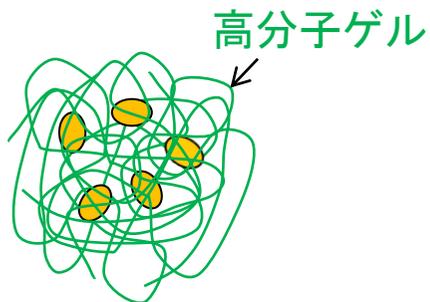
Yersinia spp. YadAの結晶構造

TAAs はホモ三量体を形成し、N末-head-stalk-C末膜アンカーの共通の構成を有する

AtaAを使った新規微生物固定化法

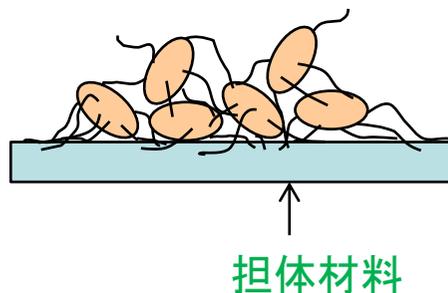
包括固定法:

微生物細胞の固定化に最も使われてきた従来法



新方法:

AtaAを介する材料表面への直接固定化

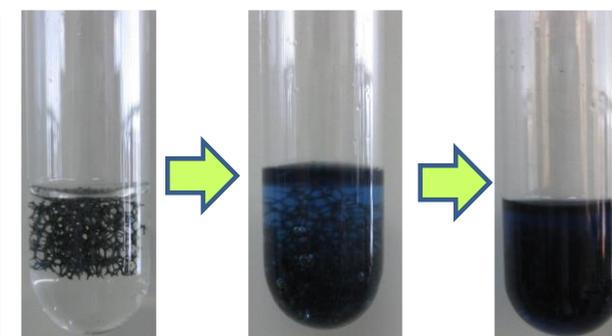
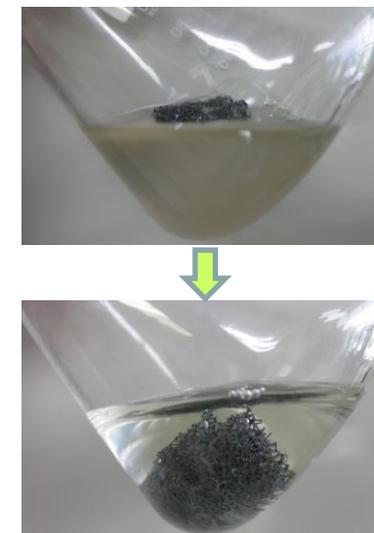


欠点

- ゲル内部での物質移動律速
- ゲルの脆弱性
- ゲルからの細胞の漏えい

優位性

- 簡便
- 物質移動律速なし
- 機械強度の高い担体選択
- 剥離細胞の再付着

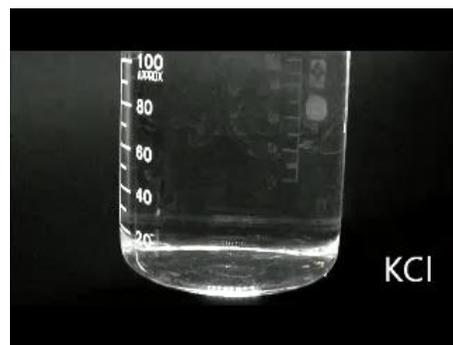
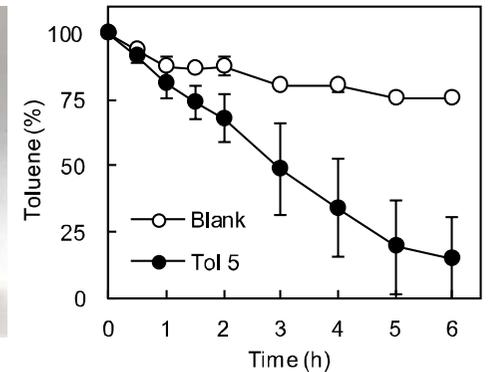
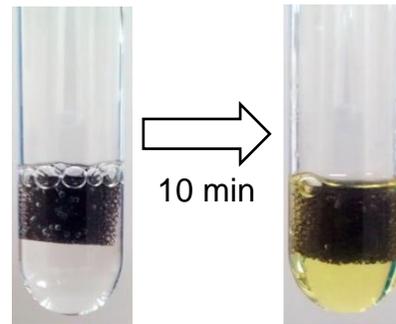
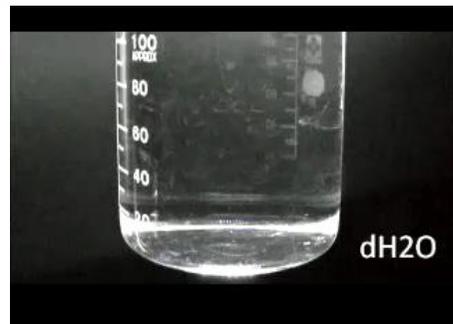
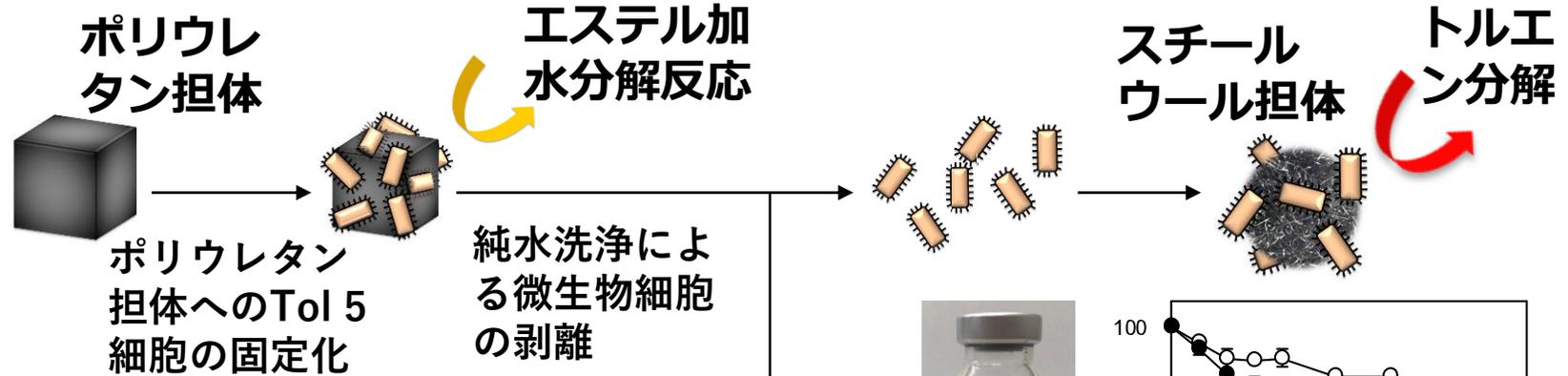
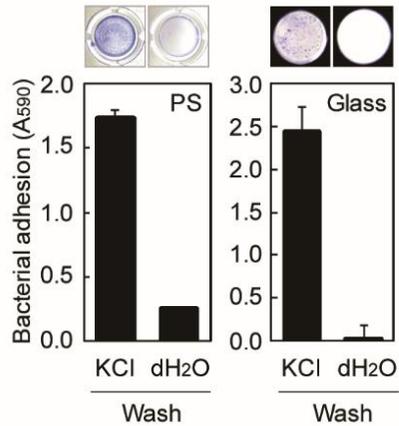


固定化微生物による青色色素インディゴの生産

Biotechnol. Bioeng. **111** (2014) 16-24.

従来法の欠点は新手法で全て解決！

AtaAを使った可逆的固定化による微生物細胞と担体の再利用

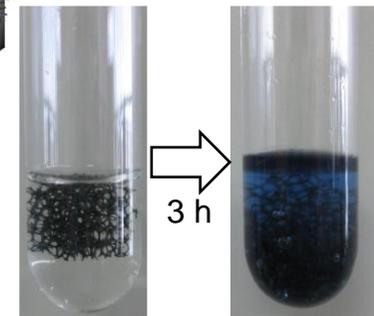


世界で唯一の微生物細胞の可逆的固定化法



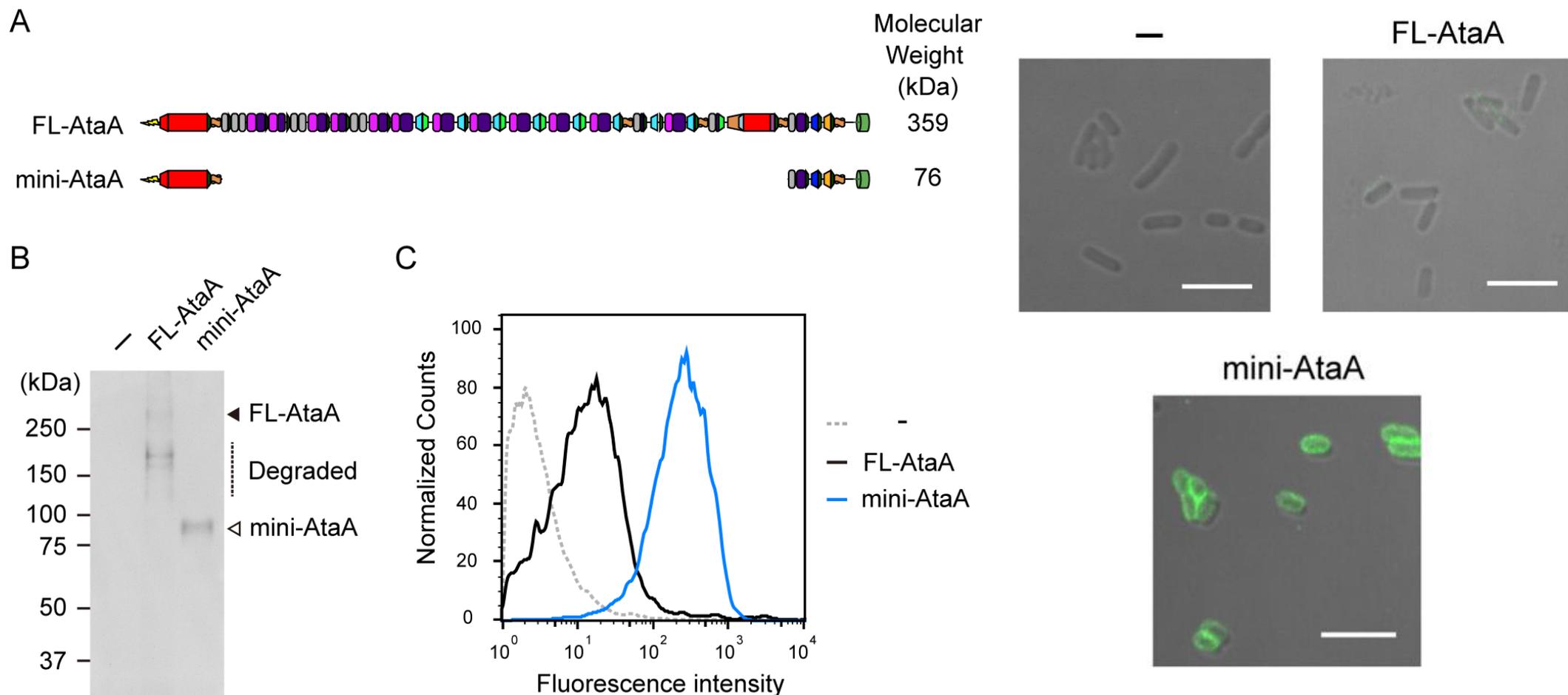
微生物細胞と担体の両方を、それぞれ別の化学反応に再利用することも可能

別の細菌種ST-550(pAtaA)細胞の固定化

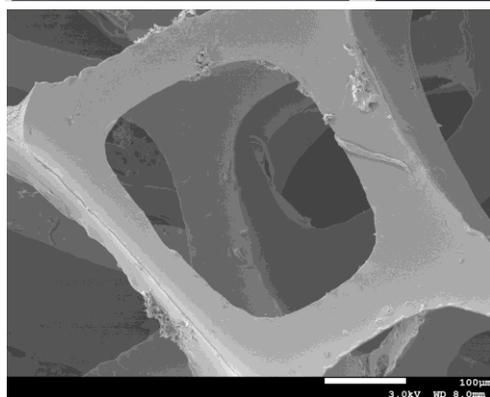
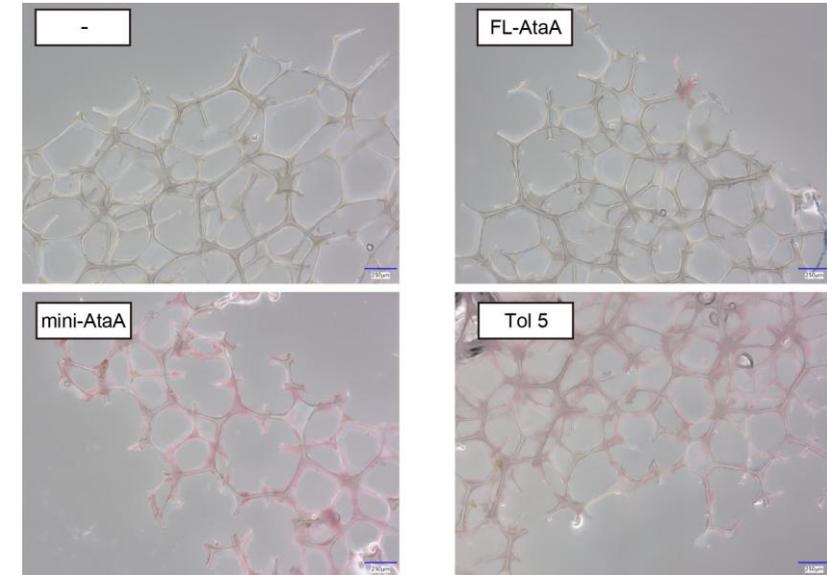
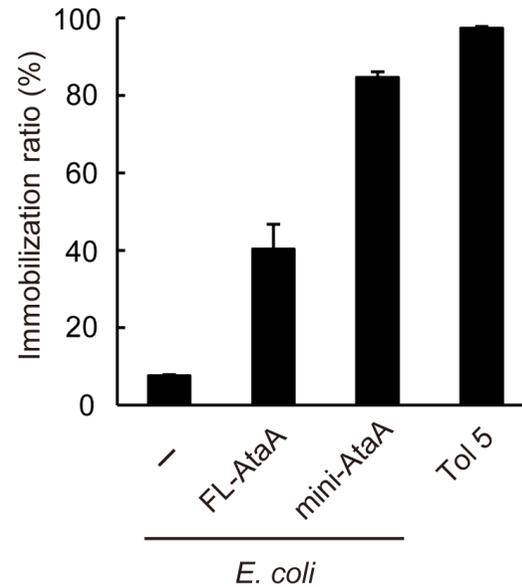
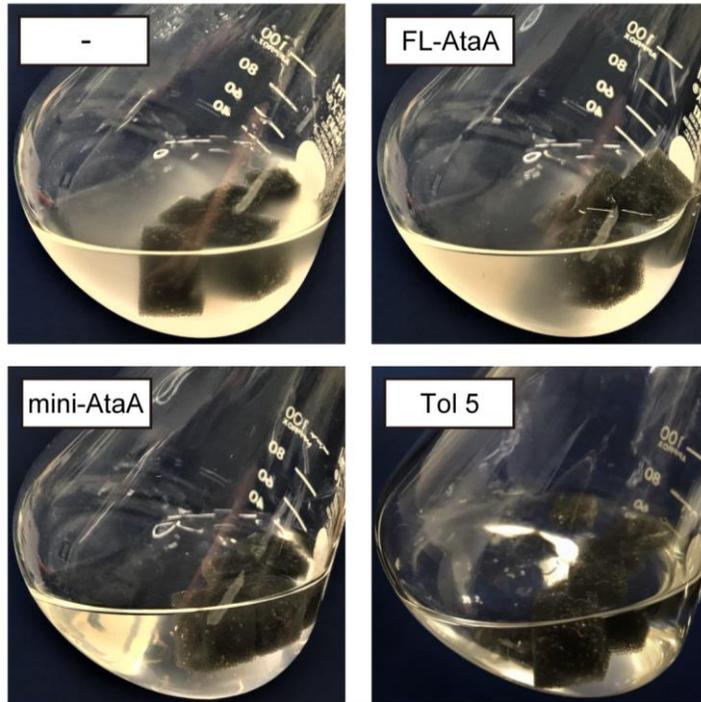


Mini-AtaAの設計と大腸菌での発現

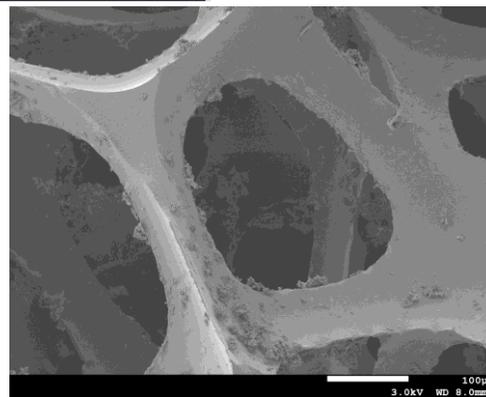
3630アミノ酸の三量体から成る巨大タンパク質AtaAを大腸菌で発現させることは困難であったが、接着部位と分泌・細胞表層提示に必須の部分を残した**Mini-AtaA**を設計・構築することで克服した。



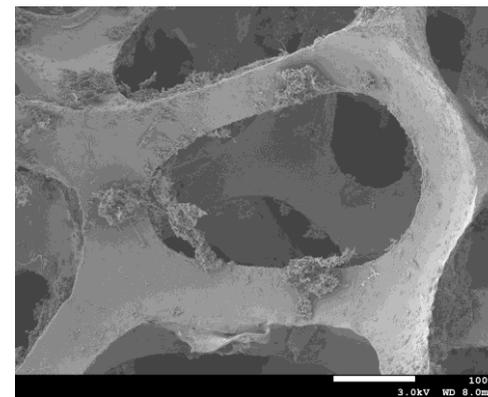
Mini-AtaAにより、ウレタン担体への大腸菌細胞の固定化に成功



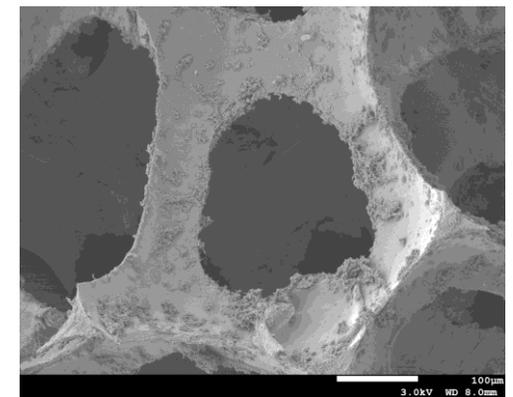
E. coli BL21 WT



E. coli (FL-AtaA)



E. coli (mini-AtaA)



Tol 5 WT

従来技術とその問題点(細菌固定化)

現在最も使われている微生物固定化法として、ゲルに微生物細胞を閉じ込める包括固定法があるが、

- ゲル内部における物質輸送律速
- 機械的攪拌などによるゲルの崩壊
- キレート剤などの混入によるゲル架橋の崩壊
- ゲルからの細胞の漏洩
- 手間とコスト

等の問題があり、実用性は低い。

新技術の特徴・従来技術との比較 (細菌固定化)

- 物質輸送律速となるゲルなどのマトリックスがない。
- 様々な担体が利用可能であり、機械的強度の強い材料や腐食しない材料も選択可能。
- 担体は形状も自由に設計でき、リアクターとの一体型も可能。
- 微生物懸濁液を担体と接触させるだけで数分以内に迅速固定。
- 純水洗浄または阻害ペプチドを入れるだけで剥離可能。
- 阻害ペプチドを除くか塩の添加で再固定可能。
- 世界で唯一の反復着脱可能な固定化法で、微生物も担体も再利用可能。

想定される用途(細菌固定化)

- 大腸菌などの産業用細菌に適用して汎用的なバイオものづくりに適用可能。
- CO₂を原料にプラスチック生産などへの利用が期待される水素細菌の固定化にも成功済み。
- バイオ水素生産菌、色素生産菌、エステル加水分解細菌への適用例も論文発表済み。
- 様々なグラム陰性細菌を固定化して連続反応または繰り返し反応が可能。
- 遠心分離やろ過などによる細胞分離が不要な微生物生産。
- 高密度培養による効率的なバイオものづくり。

実用化に向けた課題（細菌固定化）

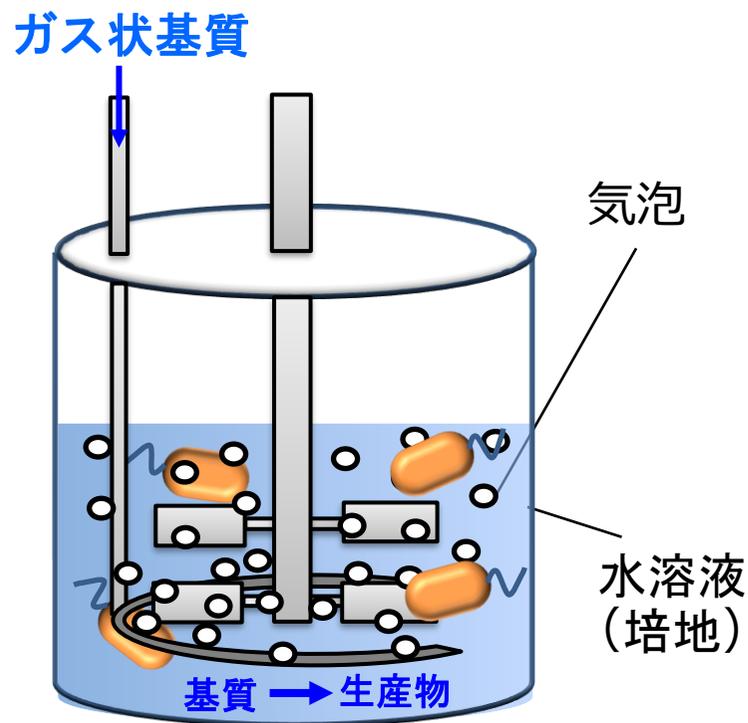
- 大腸菌などのグラム陰性細菌は、既に実用化段階。
- 現在、大腸菌などのグラム陰性細菌のみに適用可能であるが、枯草菌などのグラム陽性細菌や酵母などの真核生物には、さらなる技術革新が必要（難易度高）。
- シアノバクテリアについては、理論上は適用可能であるが、実用化には、かなりの検討が必要だろう（難易度中）。
- 現在、一か月程度の長期連続運転の経験があるが、今後、数か月の安定的な長期連続プロセスを開発予定。

企業への期待(細菌固定化)

- 本技術は、バイオものづくりの下流プロセスにあたる。よって、合成生物学等により創出する様々なバクテリアに適用可能。
- バクテリアは触媒に相当するが、どんなによい触媒を創っても、効率的なプロセスと組み合わせなければ実用化は難しい。
- オリジナリティの高い微生物触媒をもつ企業との共同研究を募集中。
- 当研究室は合成生物学による上流工程(微生物開発)も得意なので、バイオでつくりたい具体的な化学品がある企業との共同研究も募集中。
- 合成生物学・代謝工学による微生物触媒を開発中の企業が高効率な実用化プロセスを確立するには、本技術の導入が有効と思われる。

気相微生物反応

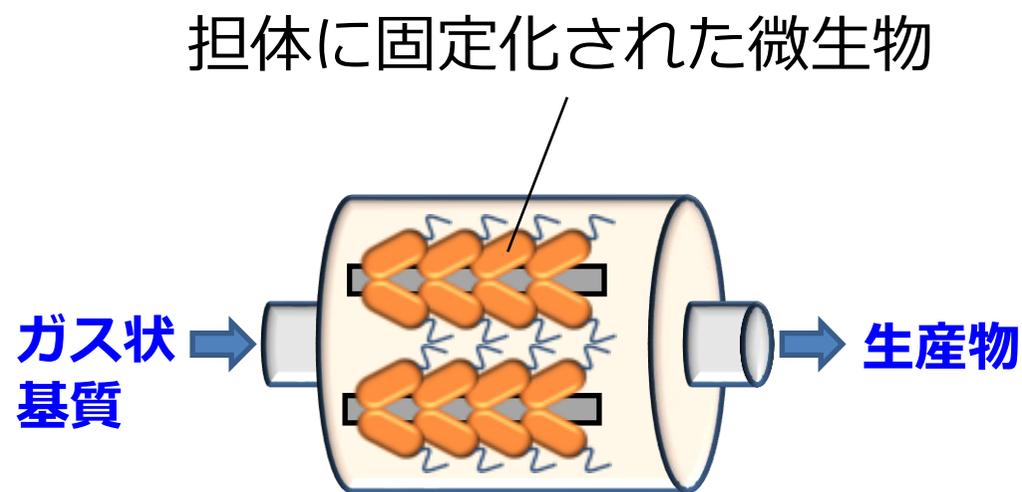
従来のバイオプロセス



反応：水相中
ばっ気/攪拌：必須

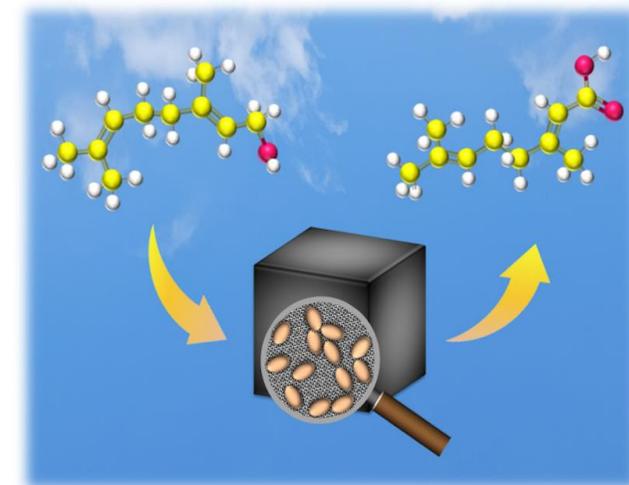
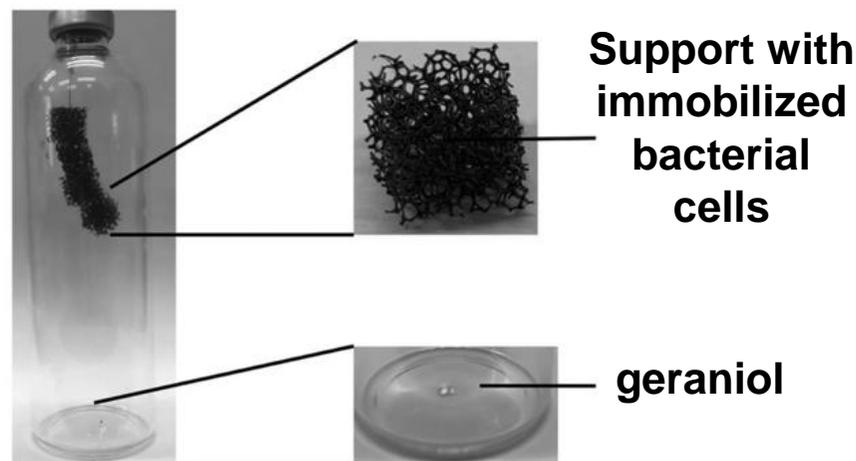
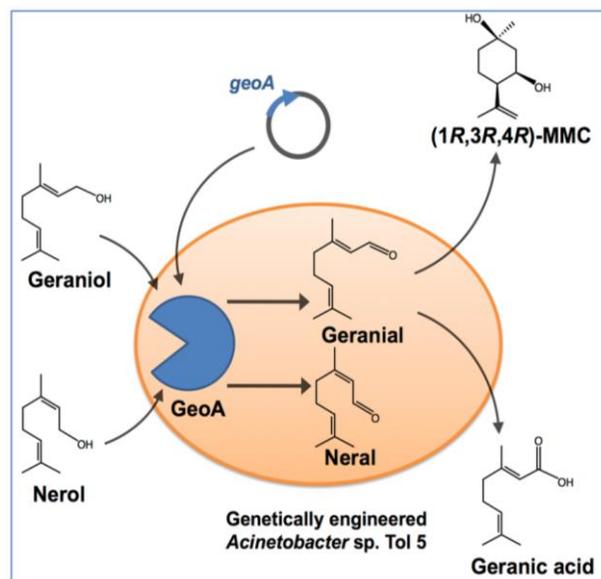
気相微生物反応プロセス

Game-changing
→

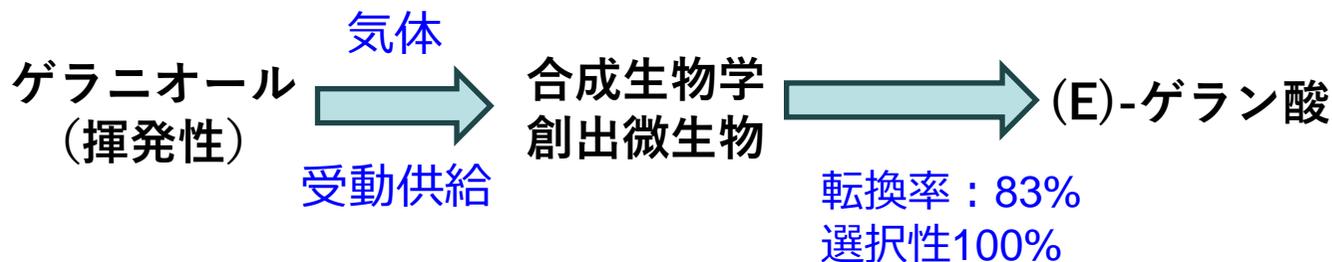


反応：気相中
ばっ気/攪拌：不要

気相微生物反応によるテルペンの生産



Usami, Ishikawa, Hori, *Biosci. Biotech. Biochem.* **82**, (2018), 2012



Green Chemistry



PAPER



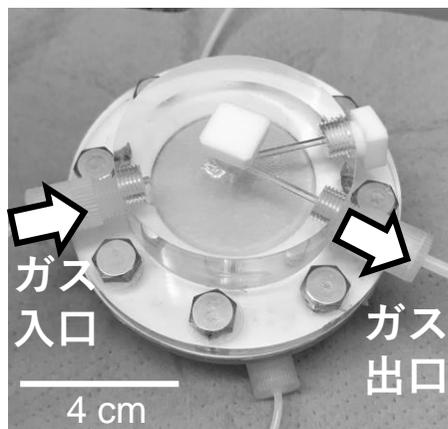
Cite this: *Green Chem.*, 2020, **22**, 1258

Gas-phase bioproduction of a high-value-added monoterpenoid (*E*)-geranic acid by metabolically engineered *Acinetobacter* sp. Tol 5†

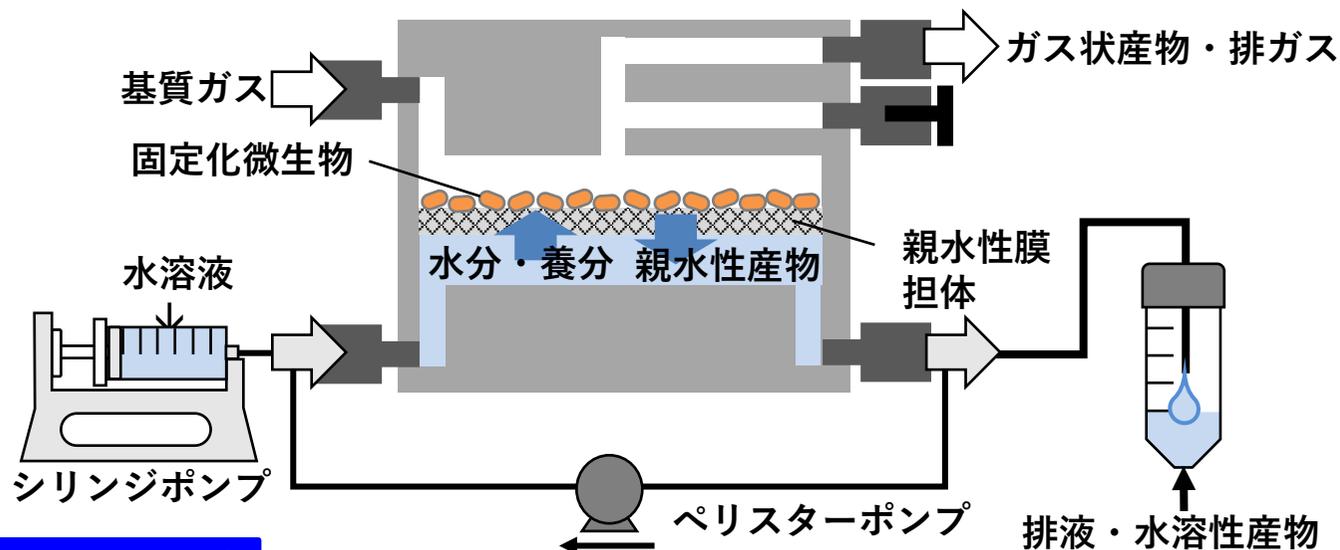
Atsushi Usami, Masahito Ishikawa and Katsutoshi Hori*

Usami, Ishikawa, Hori, *Green Chem.*, **22**, (2020), 1258.

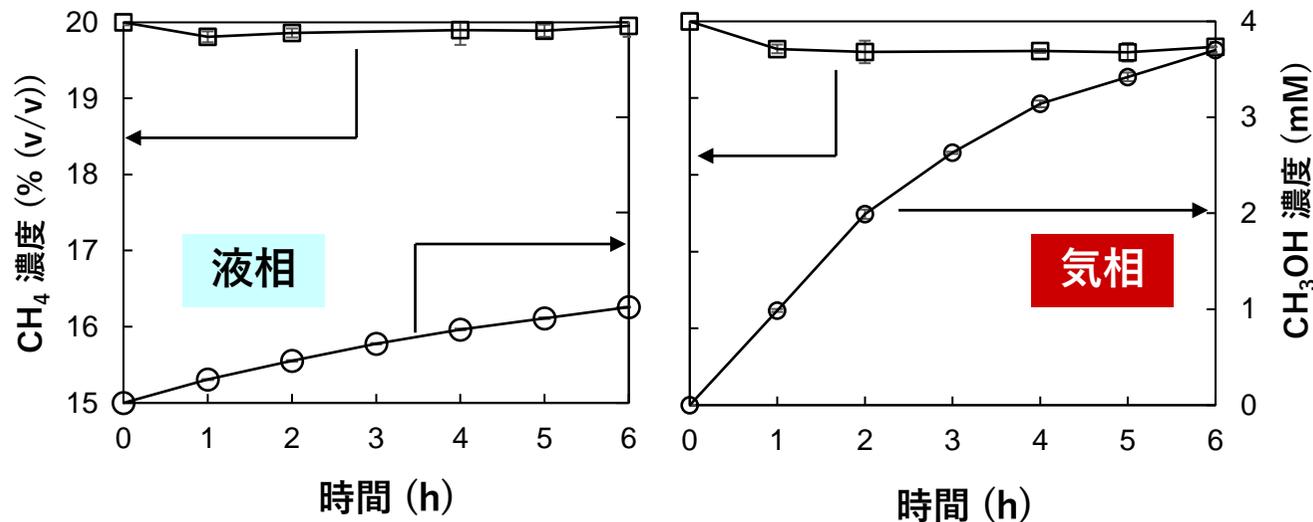
新規気相バイオリアクター：逆相型メンブレンバイオリアクター(IMBR)



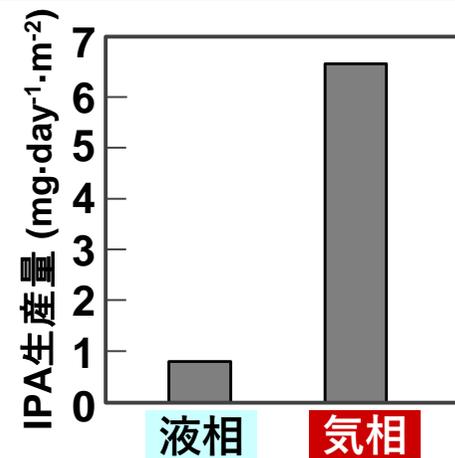
Biotechnol. Biofuels Bioproducts, 16, (2023) 16.



メタン→メタノール変換(メタン酸化細菌)

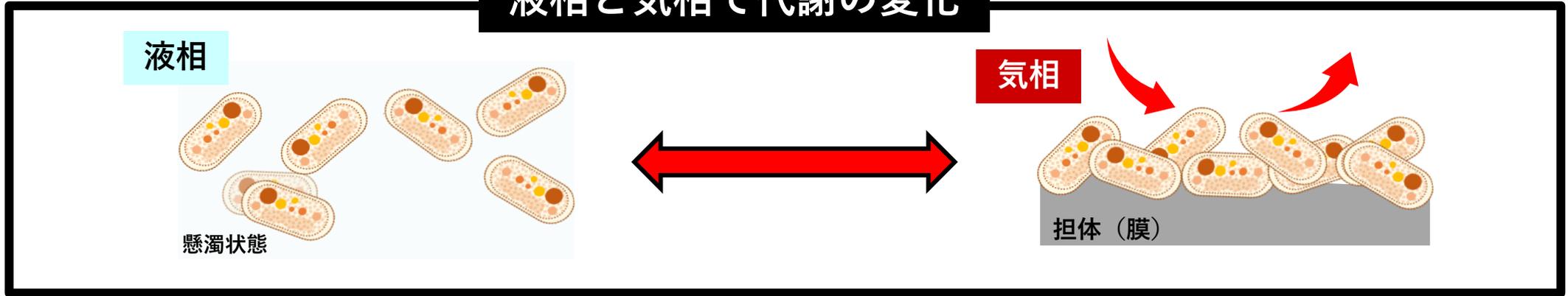


CO₂→イソプロパノール (IPA)生産(水素細菌)



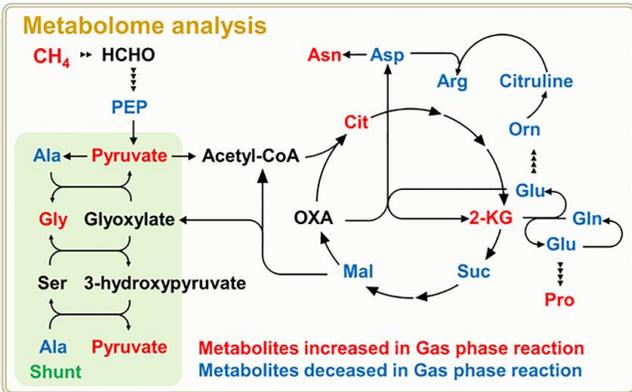
気相微生物反応における代謝変化：増殖が抑制され二次代謝が活性化の傾向

液相と気相で代謝の変化



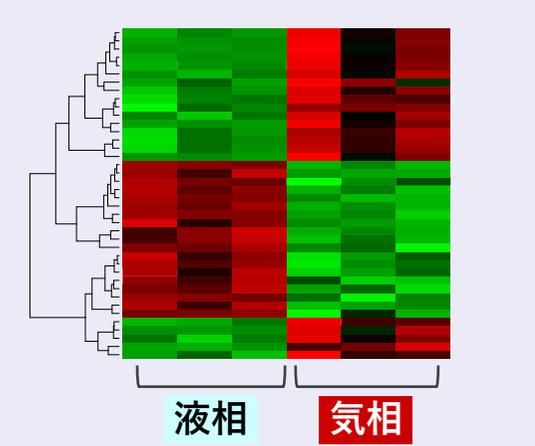
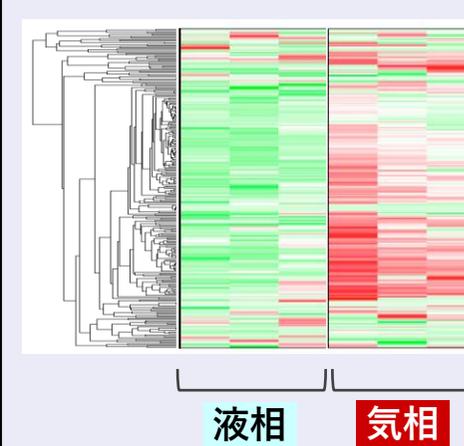
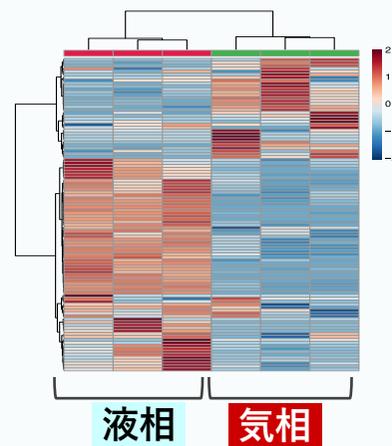
メタン酸化細菌 (*Methylococcus capsulatus* str. Bath)

Acinetobacter sp. Tol 5



メタボローム

トランスクリプトーム



Bioresour. Technol. 330, (2021) 125002.

従来技術とその問題点(気相微生物反応)

微生物反応は水溶液(培養液)中で行うのがこれまでの常識であったが、下記のような問題があった。

- 攪拌やばっ気に多大なエネルギーとコストがかかる。
- 酸素は水に溶けにくいので、好気性微生物の培養では溶存酸素の維持に注意が必要。
- 発酵熱が蓄積しやすく、しばしば冷却が必要。
- 雑菌汚染やバクテリオファージによる汚染リスクが高いため、連続反応が困難。
- 培地の滅菌も必須だが、コストがかかる。
- スケールアップが困難(酸素供給、せん断速度、表面積効果等、全てのパラメータを揃えることはできない。)
- 生産物の分離回収にコストがかかる。

新技術の特徴・従来技術との比較 (気相微生物反応)

- 分子の拡散速度は、気相中では液相中での1万倍であるため、超高速反応プロセスの構築が可能。
- ばっ気も攪拌も不要の省エネプロセス。
- スケールアップが容易。
- 雑菌やファージの増殖の媒体となるバルク水がないので、汚染リスクが低い。
- 気相または水相から産物回収が容易。
- 体積効率の低さは連続操作でカバー可能。
- 細胞内に蓄積しやすい老廃物や阻害物質は洗浄操作で排出。
- 増殖が抑制され、二次代謝が活性化。

想定される用途(気相微生物反応)

- ばっ気や攪拌が不要な省エネ型バイオプロセス
- CO₂やメタンなどの温暖化ガスを原料にしたバイオものづくり
- バイオナフサや揮発性化合物を原料にしたバイオものづくり
- ガス化バイオマス、ガス化廃棄物・廃溶剤を原料としたバイオものづくり
- アロマ等ガス状化成品やバイオガス燃料などのガス状産物のバイオ生産
- 雑菌やファージ汚染リスクの低い長期連続バイオプロセス
- 二次代謝産物の効率的な生産

実用化に向けた課題(気相微生物反応)

- 現在の生物化学工学は液相反応系に偏っており、気相反応系の学理は存在しない。
- 気相微生物反応のための化学工学を創出する必要がある。
- 気相微生物反応の学理を構築し、体系化する必要がある。
- 実施例が少なく、有用性の検証が必要。
- 効率的なバイオリアクターの設計が必要。
- 汎用性の高い気相微生物反応プロセスを創出する必要がある。

企業への期待(気相微生物反応)

次のような企業との共同研究を募集中(既に複数社と展開中であるが、新規も受付中)

- こんなガス状基質でこんな生産物を造りたいという希望のある企業
- カーボンニュートラル・リダクションのためのバイオプロセスに興味のある企業
- 廃プラスチックなどの廃棄物削減と有価物への変換に取り組みたい企業
- SDGsのためのバイオプロセスに関心のある企業
- 革新的なバイオプロセスの構築に興味のある企業
- 気相微生物反応の学理や新しい化学工学に興味のある企業
- 流体シミュレーションの得意な企業

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 微生物の固定化及び脱離方法
- 出願番号 : PCT/JP2014/056966、特願2015-508308、US14/779,717、DE14773956.9
- 出願人 : 東海国立大学機構
- 発明者 : 堀 克敏
- 公開番号 : WO2014/156736 (登録番号 : JP6353438、US9631189、DE2980211)

- 発明の名称 : 接着タンパク質
- 出願番号 : PCT/JP2020/027921、特願2021-533117、US17/628,132、EP20840533.2
- 出願人 : 東海国立大学機構
- 発明者 : 堀 克敏
- 公開番号 : WO2021/010481

- 発明の名称 : 気相微生物反応
- 出願番号 : PCT/JP2021/015227、特願2022-515385、US17/918,402、EP21787958.4
- 出願人 : 東海国立大学機構
- 発明者 : 堀 克敏
- 公開番号 : WO2021/210553

産学連携の経歴

- 1999年～現在 20社以上の企業と共同研究を実施(現在6社)
- 2014-2016年 JST A-STEP事業(起業挑戦)に採択
- 2014-2019年 JST ALCA(先端的低炭素化技術開発)事業に採択
- 2017年6月 大学発ベンチャー(株)フレンドマイクロブ設立
同社取締役会長を兼任
- 2018-2021年 JST 未来社会創造事業に採択
- 2020-2022年 NEDOムーンショット型研究開発事業に採択
- 2023年5月 (株)フレンドマイクロブ第三者割当増資にて総額
2億3000万円の資金調達を実施(豊田合成、ハウス
食品、住友商事、ジェネシア・ベンチャーズ)
- 2021年～現在 新しい産学連携体制を構築(大学・ベンチャー・大
手企業との三者間の共同・受託研究)
既に5件以上(1000万円/年/件以上)
- 2023-2025年 JST GteX(革新的GX技術創出事業)に採択

お問い合わせ先

東海国立大学機構名古屋大学

学術研究・産学官連携推進本部

知財・技術移転部門

担当コーディネーター：斎藤茂樹

T E L 052-789-5545

e-mail k-sangakukan@aip.nagoya-u.ac.jp