

# 非可食性バイオマスの微生物 共培養系を用いたPHAの產生

---

北海道大学 大学院農学研究院  
連携研究部門 ゲノム生化学研究室  
高須賀 太一, Ph.D.

## 発表内容

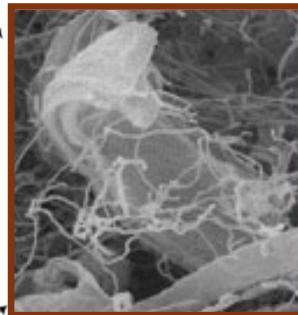
---

1. 昆虫共生細菌の植物細胞壁分解能力の解明に関するこれまでの研究成果
  - ・植物分解性 *Streptomyces* sp. SirexAA-E の機能解析
  - ・本菌が生産する多糖分解酵素の機能解析
  - ・本菌の多糖応答性転写制御因子の解析
2. 微生物共培養系の確立とPHA一気通貫生産への応用
3. 微生物共培養系PHA一気通貫生産法の向上

# 森林食害生キバチ共生細菌 *Streptomyces* sp. SirexAA-E (SirexAA-E)



*Streptomyces* sp. SirexAA-E



## 主要木質成分

- ・セルロース
- ・ヘミセルロース（キシラン、マンナン等）
- ・リグニン

細胞なし



SirexAA-E



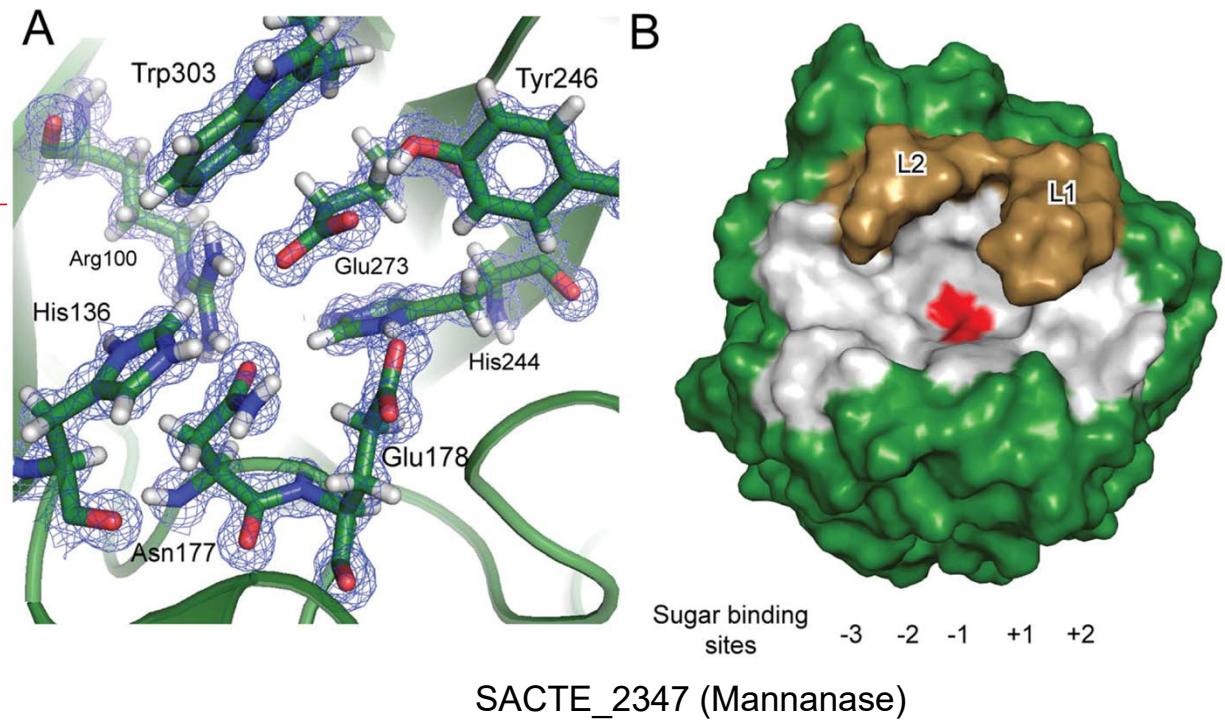
*S. griseus*



ろ紙を单一炭素源とした培養

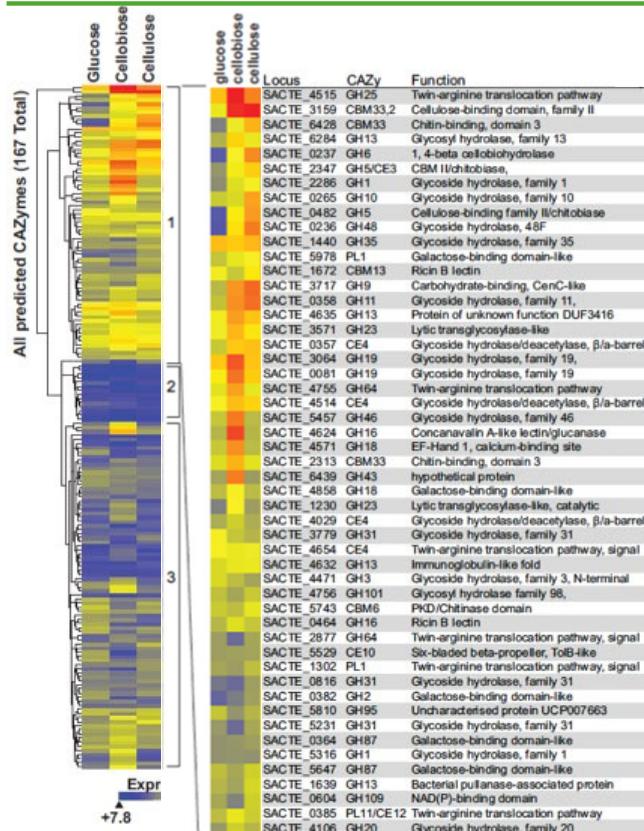
# SirexAA-Eの炭素源特異的な分泌酵素： 例：多糖分解酵素

单一炭素源			glucose	cellobiose	cellulose
Locus	GH	CBMs			
0237	GH6	CBM2	0	462	3965
0236	GH48	CBM2	0	44	1296
2347	GH5,CE3	CBM2	2	28	624
3159	CBM33	CBM2	0	4	564
0482	GH5	CBM2	0	11	156
0265	GH10	CBM2	0	13	90
0357	CE4	CBM36	0	12	87
4439			0	65	83
0562	GH74	CBM2	0	0	83
0358	GH11	CBM60	0	0	67
4343			67	298	53
1546			0	117	32
1310	PL3		0	57	26
4638			0	41	23
3717	GH9	CBM2	0	49	21
5668			29	30	21
3590			2	5	21
5978	PL1	CBM35	0	5	20
2172			19	95	20
4571	GH18	CBM2	0	9	20
6428	CBM33		0	3	20
2313	CBM33		0	11	19



Takasuka et al., 2013; Takasuka et al., 2014

# SirexAA-Eのセルロース特異的遺伝子発現と転写制御因子



Locus	Catalytic domain	CBM	Annotated function	Sequence <sup>a</sup>	Rank <sup>b</sup>	Fold change <sup>b</sup>
SACTE_0236	GH48	CBM2	1,4-beta cellobiohydrolase	TGGGAGCGCTCCCA	1	21.7
SACTE_0237	GH6	CBM2	1,4-beta cellobiohydrolase	TGGGAGCGCTCCCA	2	17.3
SACTE_3159	CBM33	CBM2	Cellulose-binding domain	TGGGAGCGCTCCCA	3	16.2
SACTE_0482	GH5	CBM2	Endo-1,4-beta-glucosidase	TGGGAGCGCTCCCA	4	15.4
SACTE_2288			Transport systems inner membrane component	TGGGAGCGCTCCCA	5	11.2
SACTE_3717	GH9	CBM2	1,4-beta cellobiohydrolase	TGGGAGCGCTCCCA	6	9.7
SACTE_6428	CBM33		Chitin-binding, domain 3	GGGAGCGCTCCCA	9	7.9
SACTE_2347	GH5	CBM2	Beta-mannosidase	TGGGAGCGCTCCCA	11	5.0
SACTE_2287			Transport systems inner membrane component	TGGGAGCGCTCCCA	15	4.3
SACTE_2289			Family 1 extracellular solute-binding protein	TGGGAGCGCTCCCA	19	3.9
SACTE_0352			GCN5-related N-acetyltransferase	TGGGAGCGCTCCCA	22	3.6
SACTE_2286	GH1		Glycoside hydrolase 1	GGGAGCGCTCCCA	27	3.4
SACTE_0483		CBM2	Cellulose-binding family protein	GGGAGCGCTCCCA	503	1.6
SACTE_0562	GH74	CBM2	Secreted cellulase (endo)	TGGGAGCGCTCCCA	5759	0.7

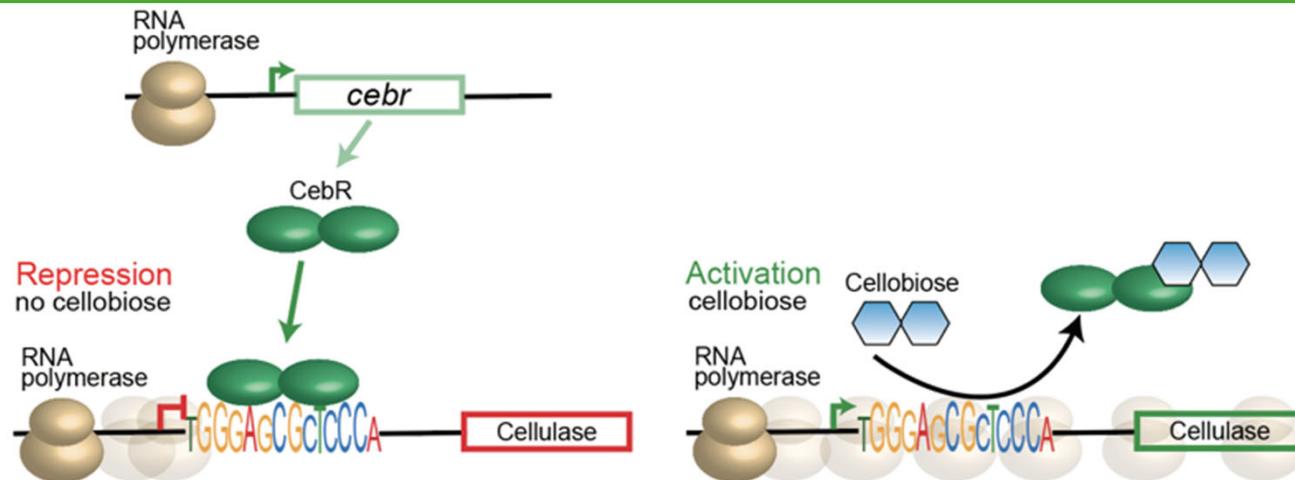
<sup>a</sup>Predicted binding sequence element found upstream from gene locus.

<sup>b</sup>Ranking and fold change in expression intensity detected by microarray for ActE genes when grown on cellulose relative to glucose.

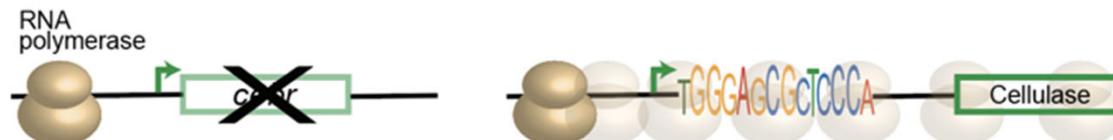


TGGGAGCGCTCCCA配列モチーフは先行研究で報告があつたため配列相同性から転写因子をつきとめた。

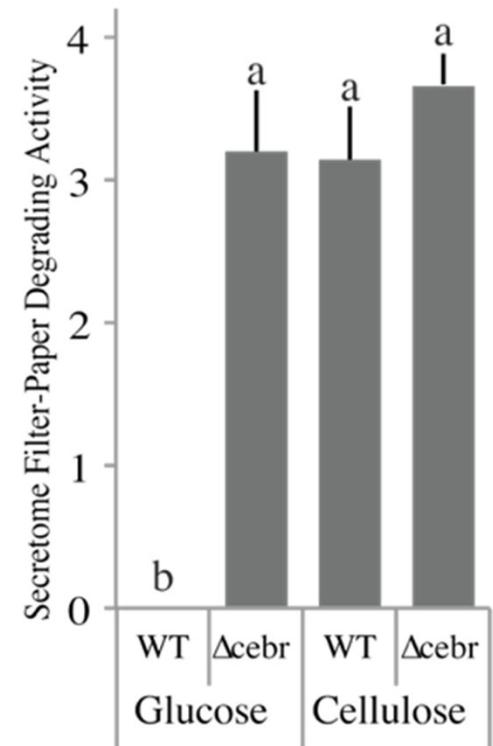
# SirexAA-Eの転写制御因子欠損によるセルロース分解向上



であれば、CebRを欠損させるとこうなる？

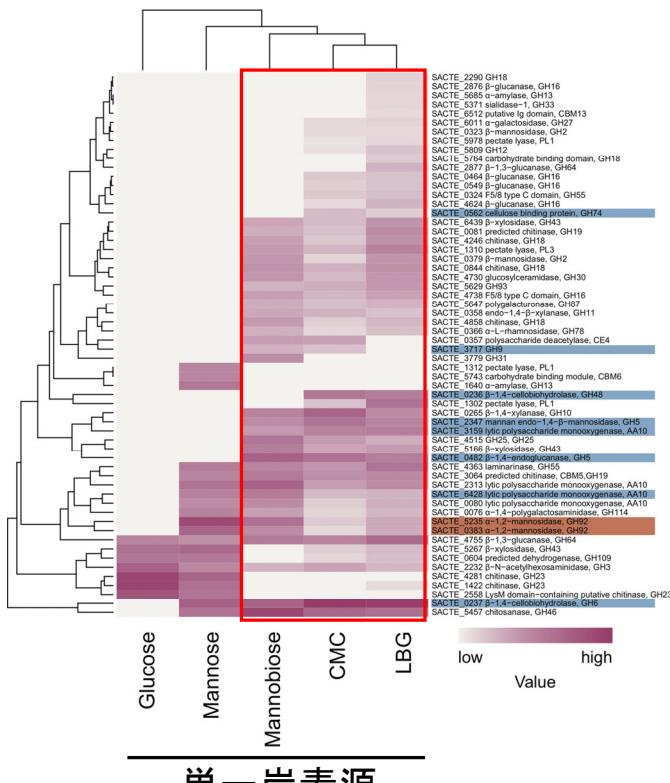


全ての配列モチーフの下流遺伝子が活性化される？

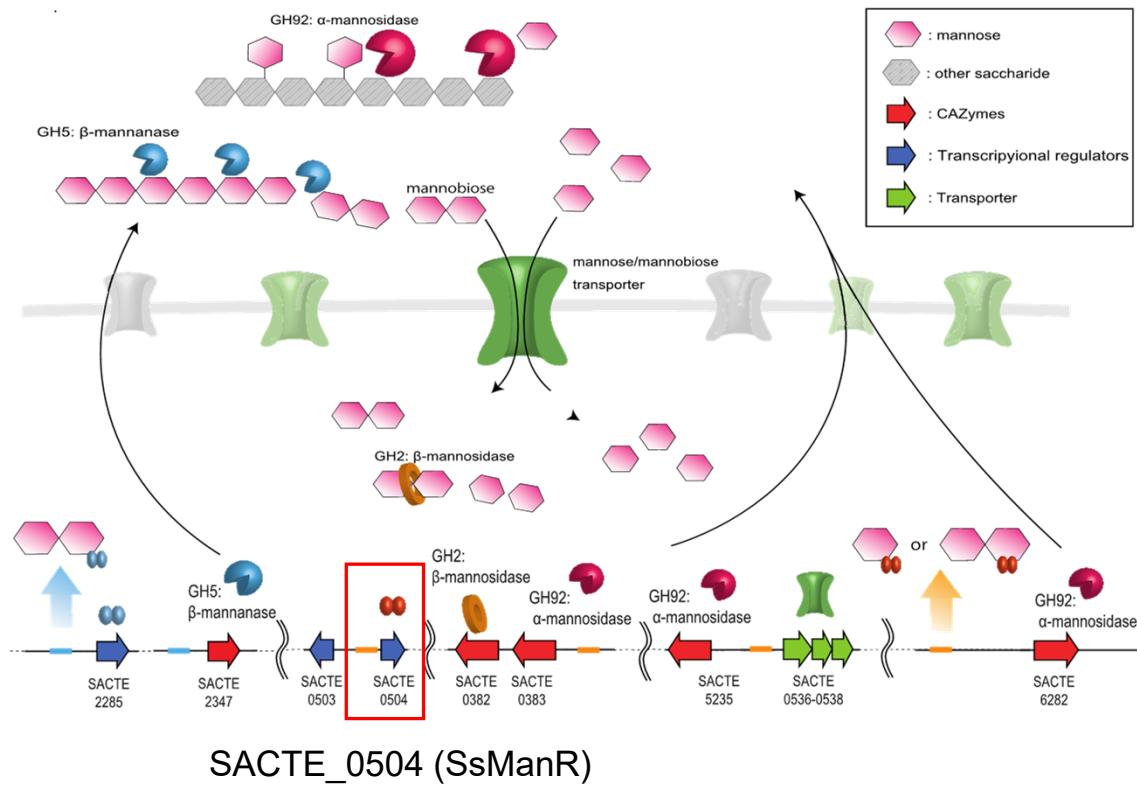


# SirexAA-Eのマンナン特異的な 転写制御因子の同定

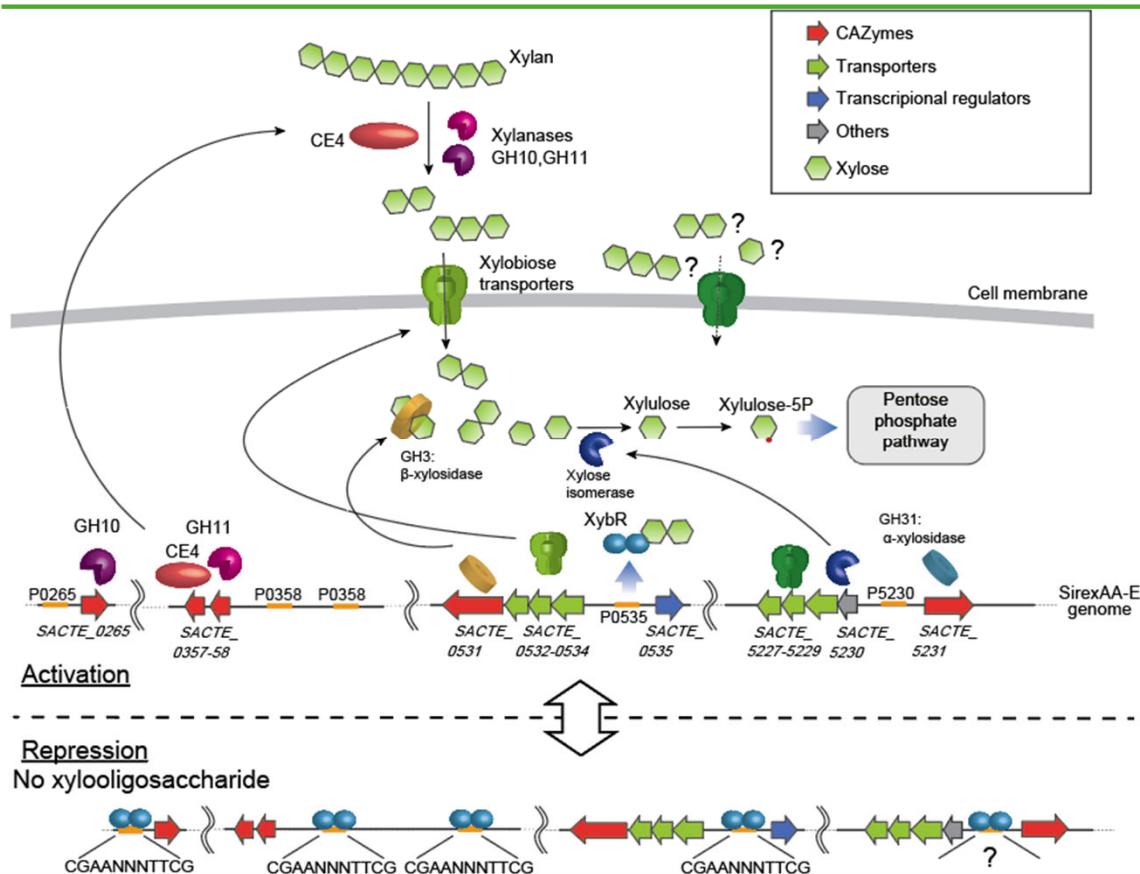
## 網羅的分泌タンパク質解析



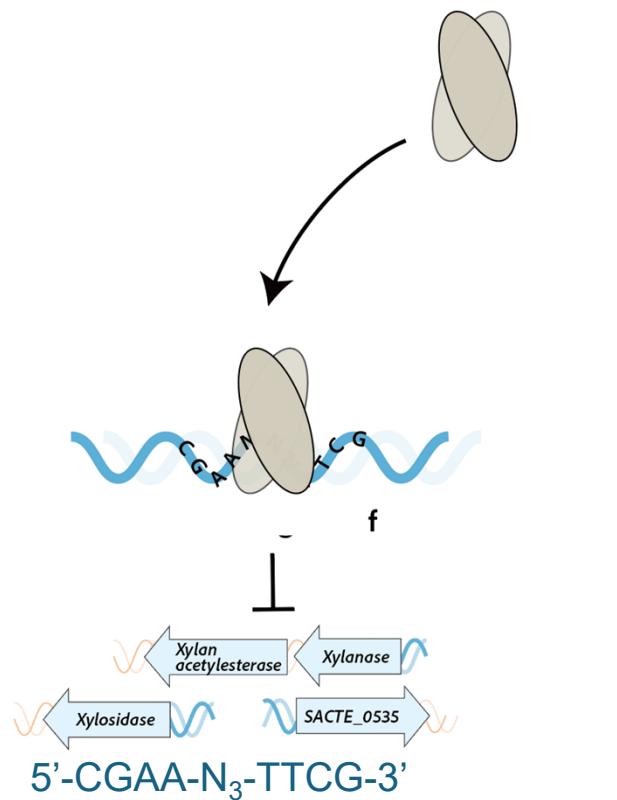
単一炭素源



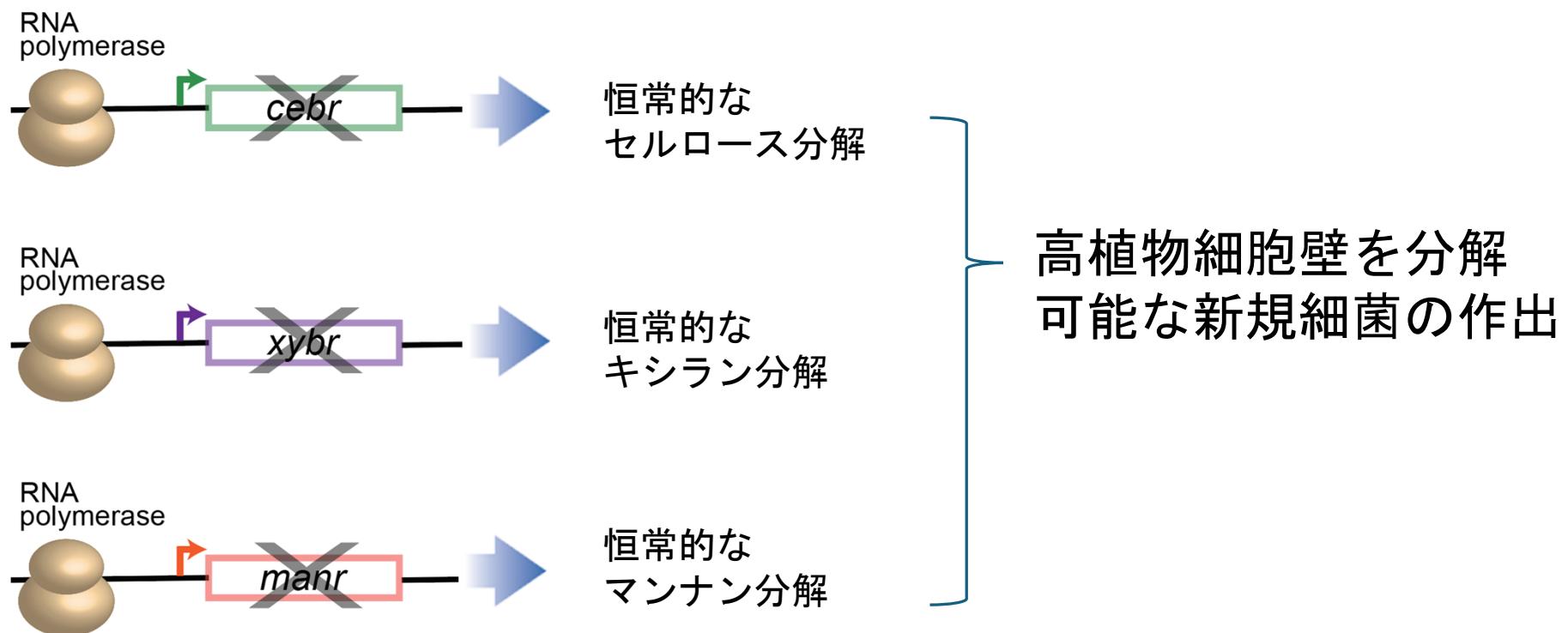
# SirexAA-Eのキシラン特異的な 転写制御因子の同定



SACTE\_0504 (SsXybR)



## SirexAA-Eのさらなる 木質成分分解向上のための方策



# 昆虫共生菌SirexAA-Eの特徴と 他細菌との共培養の可能性

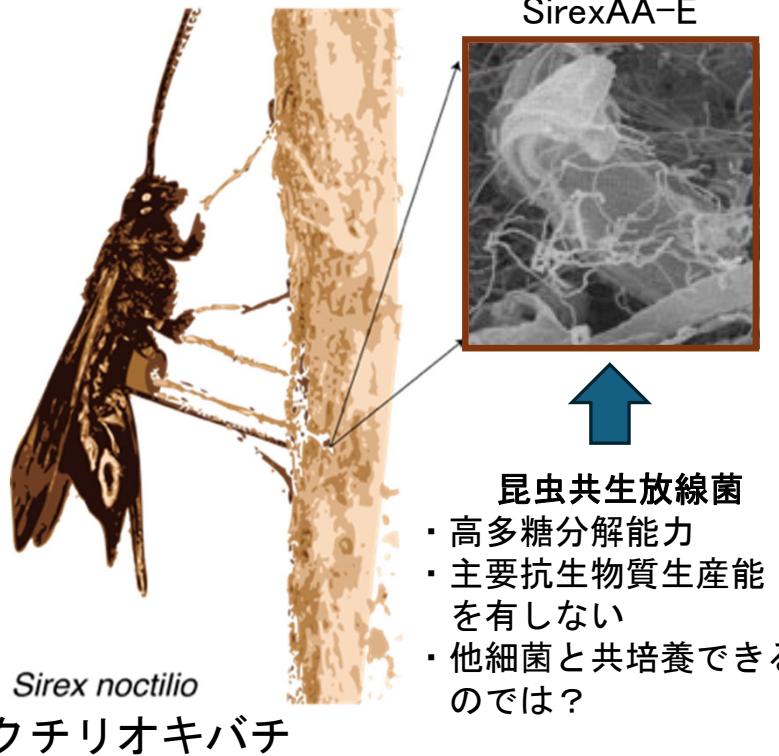


Table 1 | Comparison of genomic composition

	SirexAA-E	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. griseus</i>	<i>C. thermocellum</i>
Genome size (nt)	7414440	8667507	8545929	3843301
Proteome size	6357	8153	7136	3173
Total CAZy Proteins	167	221	132	103
% CAZy Proteins <sup>a</sup>	2.6%	2.7%	1.8%	3.2%
Total GH <sup>b</sup>	119	154	80	70
Total PL <sup>c</sup>	6	11	4	6
Total CE <sup>d</sup>	29	36	23	20
Total CBM <sup>e</sup>	85	98	68	121
antiSMASH clusters <sup>f</sup>	22	24	37	3
Genes in clusters	620	718	1139	89
% antiSMASH	9.8%	8.8%	16.0%	2.8%

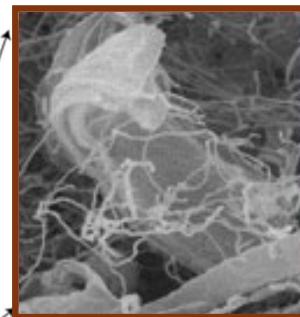
<sup>a</sup>Proteins classified as Carbohydrate Active Enzymes (CAZy).  
<sup>b</sup>GH, glycoside hydrolase.  
<sup>c</sup>PL, pectate lyase.  
<sup>d</sup>CE, carbohydrate esterase.  
<sup>e</sup>CBM, carbohydrate binding module.  
<sup>f</sup>Potential antibiotic producing gene cluster.

SirexAA-Eゲノムには22個の二次代謝産物生産クラスターがコードされているものの、網羅的遺伝子発現解析の結果、いずれのクラスターも活性化されない事が分かった。

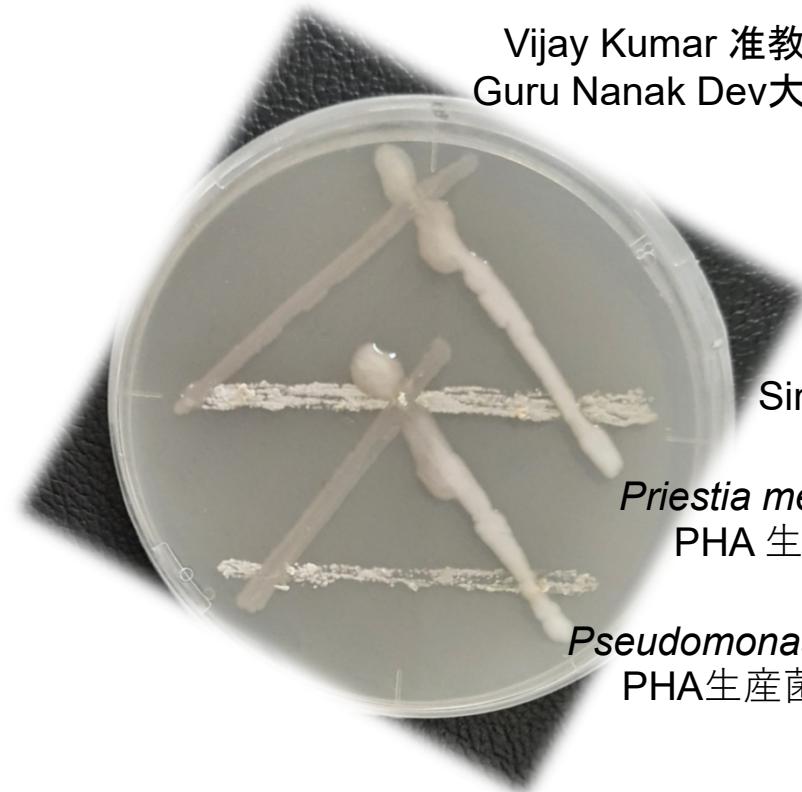
# 昆虫共生菌SirexAA-Eの特徴と 他細菌との共培養の可能性



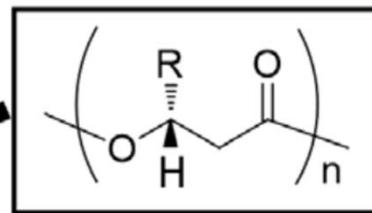
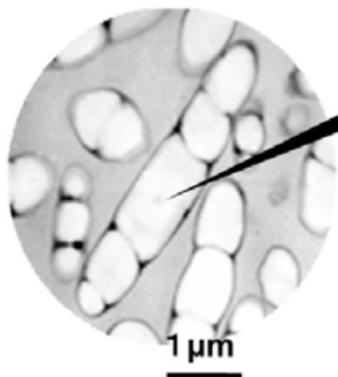
SirexAA-E



- 昆虫共生放線菌
- ・高多糖分解能力
  - ・主要抗生物質生産能を有しない
  - ・他細菌と共培養できるのでは？



# 微生物が生産する ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)に着目

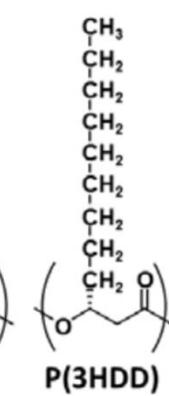
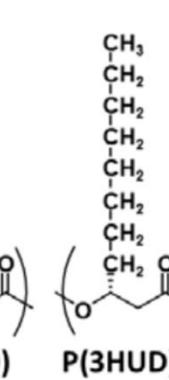
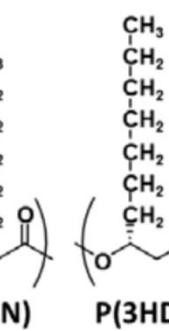
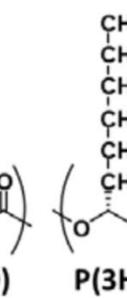
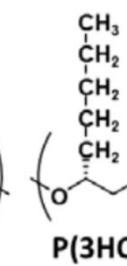
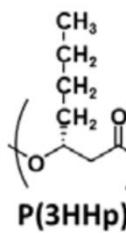
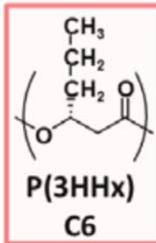
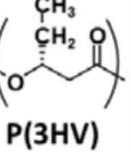
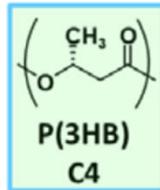


ポリヒドロキシアルカン酸  
(PHA)

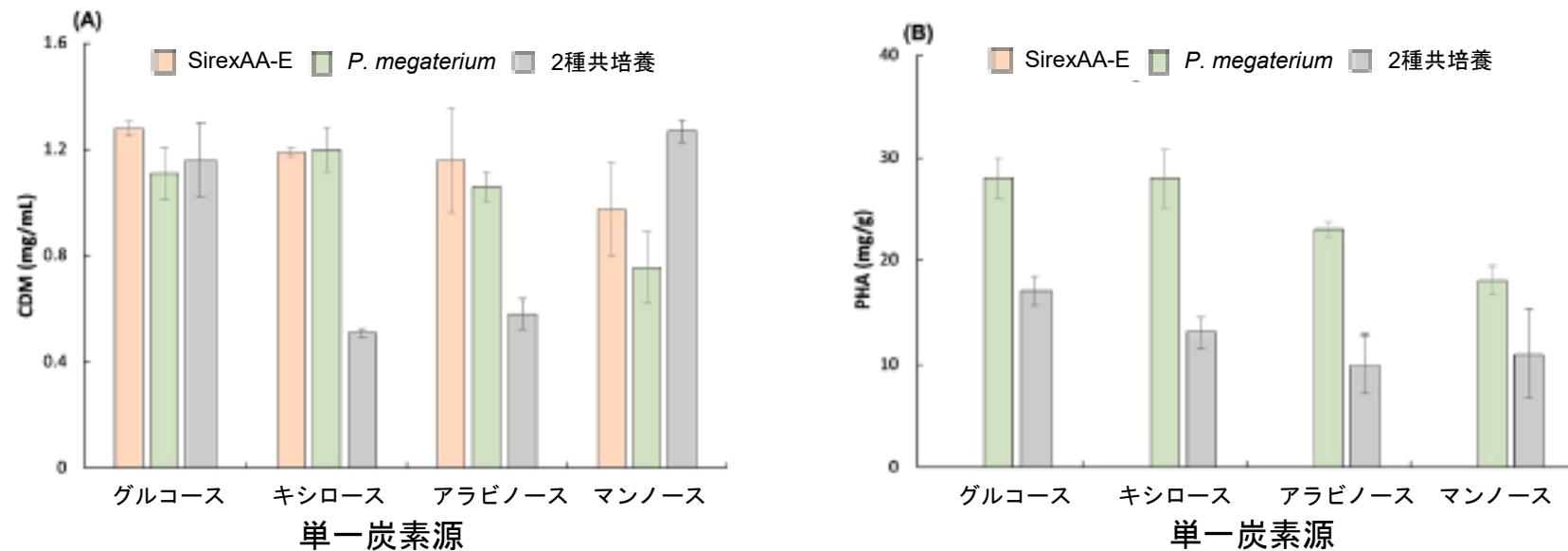
微生物が貯蔵物質として  
細胞内に蓄積するポリエステル

- 热可塑性
- 生体適合性
- 生分解性

カネカポリマー  
(PHBH)



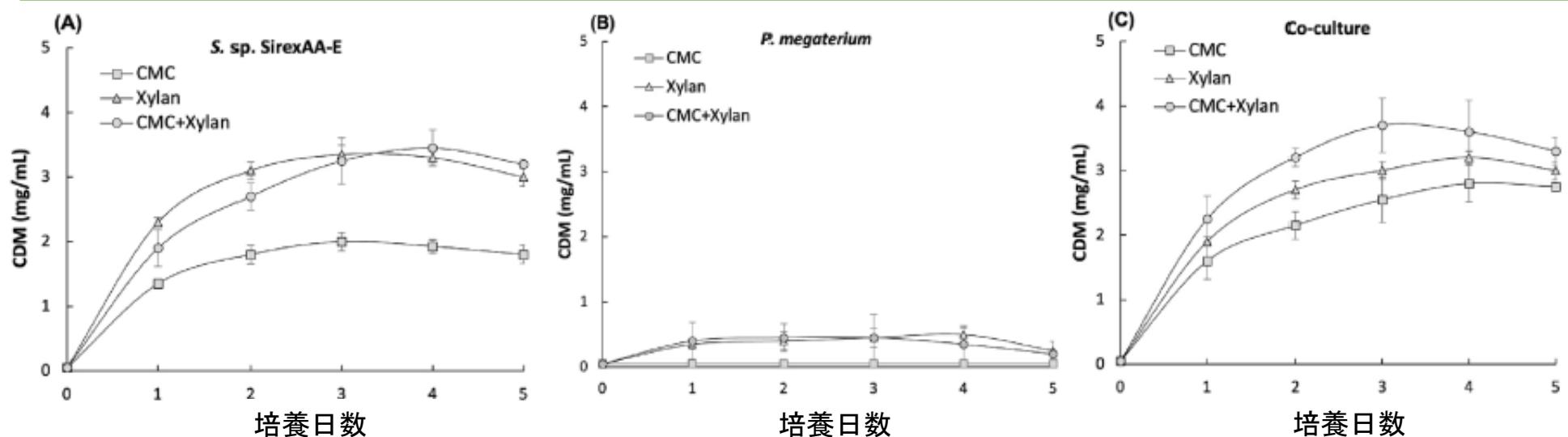
# SirexAA-Eおよび*P. megaterium*の単糖を基質とした生育試験とPHA生産試験結果



→ 主要多糖構成成分(单糖)ではいずれの細菌も生育.  
PHA生産は*P. megaterium*においてのみ確認.

CDM (mg/mL): 液体培地mLあたりの細胞乾燥重量 (mg), PHA (mg/g): 細胞乾燥重量gあたりのPHA生産量 (mg)

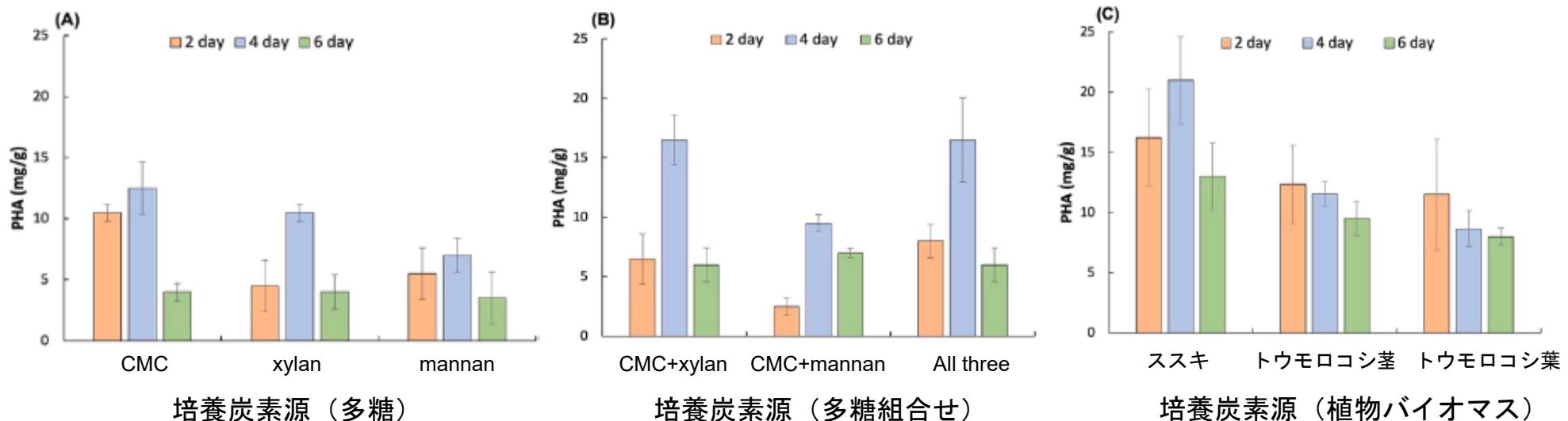
# SirexAA-Eおよび *P. megaterium*の精製多糖または組合せ 多糖を基質とした際の生育試験結果



→ SirexAA-Eのみ多糖を資化し生育可能.  
共培養(Co-culture)の結果, CMCにおいて優位な細胞増殖を確認.

CMC: カルボキシメチル化セルロース（非結晶性セルロース）, xylan: キシラン多糖: mannan: マンナン多糖

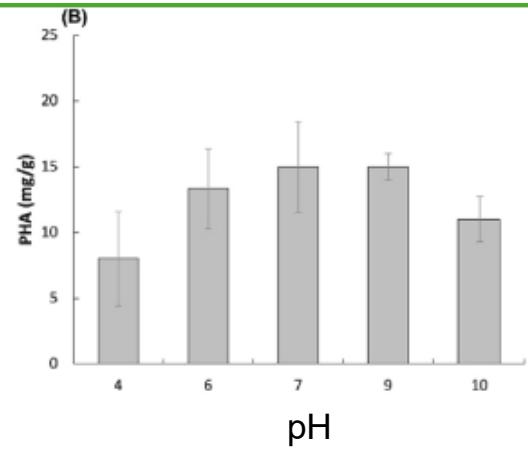
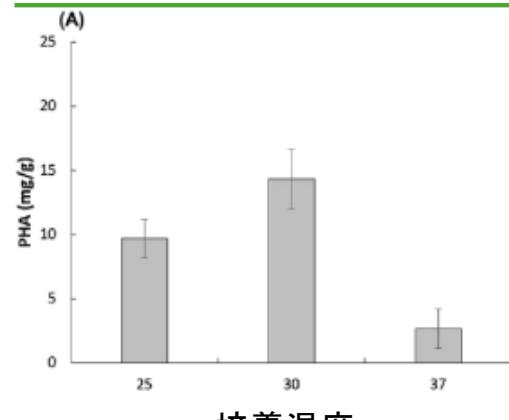
# 共培養による多糖または植物バイオマスからPHA生産結果



→ 全ての炭素源について出発原料とした結果、PHA生産を全てで確認.  
ススキを原料とした共培養4日目に最大PHA生産率を達成.

CMC: カルボキシメチル化セルロース（非結晶性セルロース）, xylan: キシラン多糖, mannan: マンナン多糖

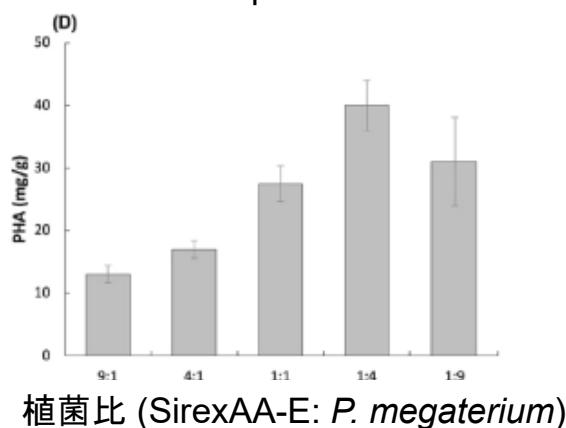
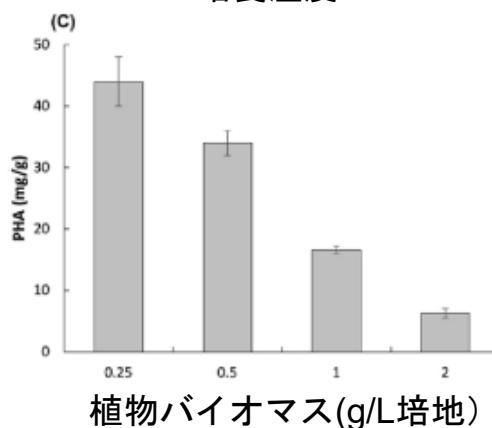
## 2種細菌共培養条件の検討



至適共培養温度: 30度

至適培地pH: 6~8

植物バイオマスローディング:  
0.25g/L



2種細菌の植菌比:  
1:4 (SirexAA-E: *P. megaterium*)

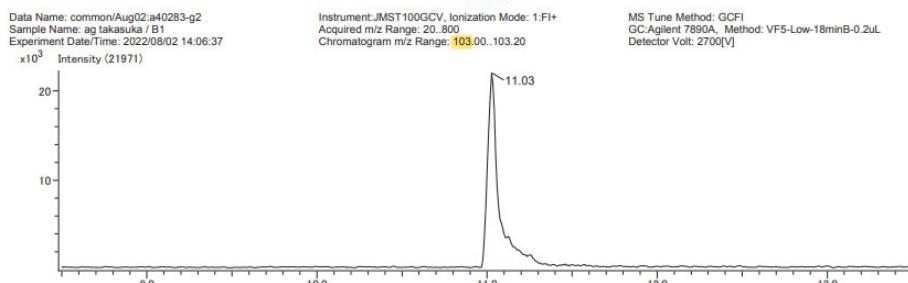
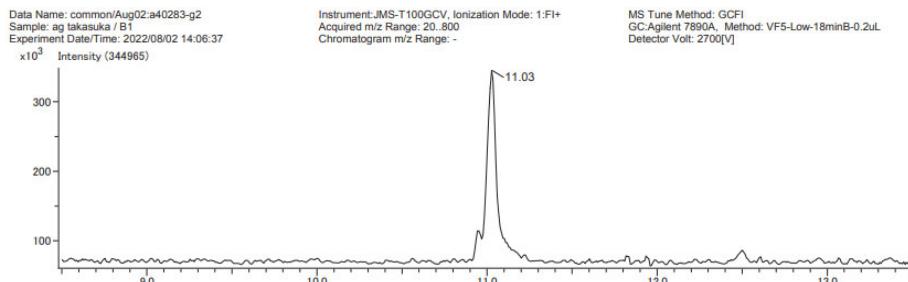
至適培養条件下PHA生産率  
( $Y_{PHA}/s = 40\text{mg/g}$ )

$Y_{PHA}/s$ : 炭素源gあたりのPHA生産量

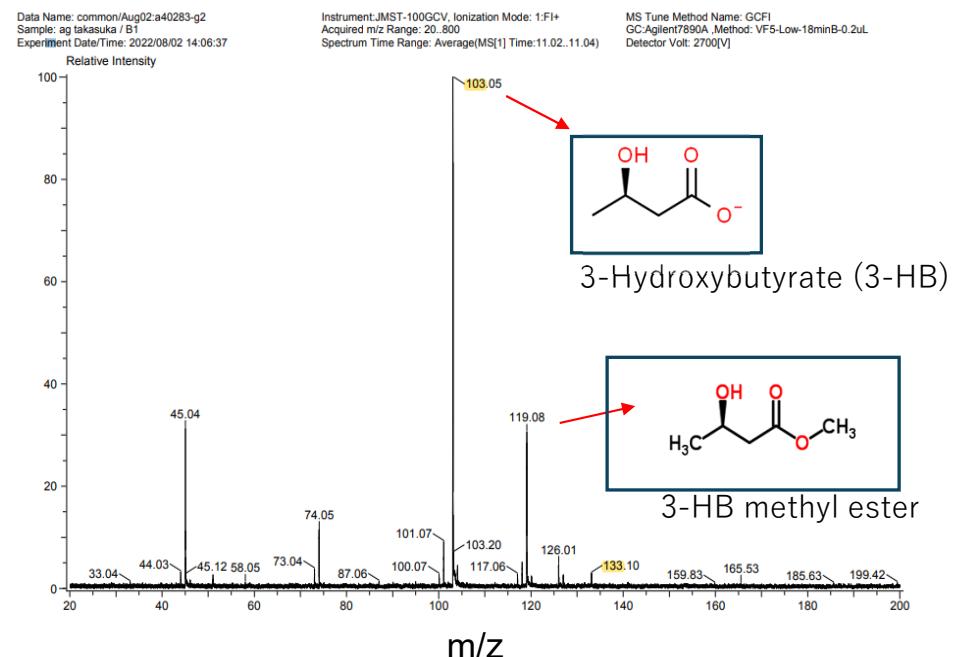
Kumar et al., 2023  
特願 2023-009430

# PHA構成ユニットの解析(GCMS)

## トータルイオンクロマトグラム

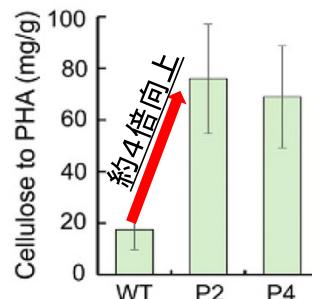
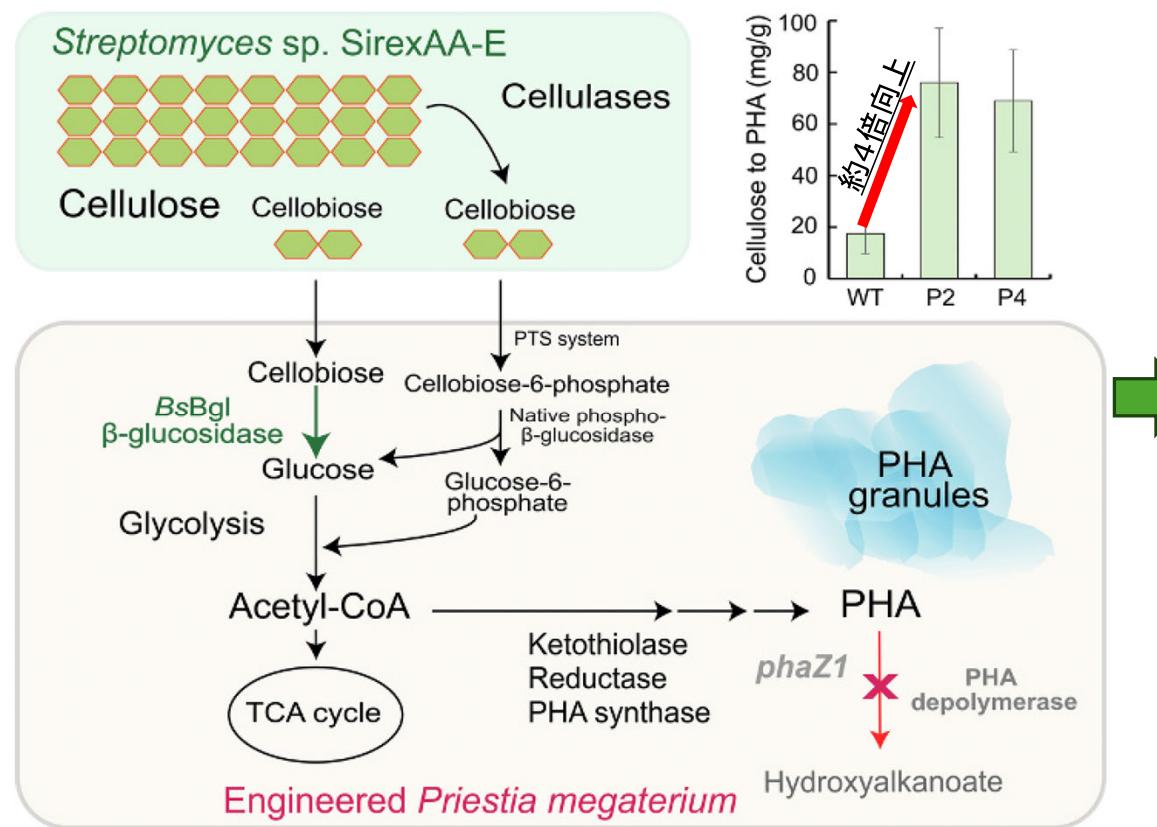


Ion Chromatogram in Mass range 103.00-103.20



メタノリシスの結果、得られたPHA構成ユニットは3-ヒドロキシ酪酸と同定。  
本2種細菌組合せ共培養によってポリヒドロキシ酪酸(PHB)生産が可能。

# ゲノム編集によるPHA生産の向上



*P. megaterium*のゲノム編集株の作出(P2およびP4株)

- P2株 ( $\Delta phaz1$   $P_{phaR}BsBgl$ )
- P4株 ( $\Delta phaz1$   $P_{citZ}BsBgl$ )

セルロースを出発原料とした際のPHA生産効率

$$Y_{PHA/s} = 70 \sim 80 \text{ mg/g}$$

*phaz1*: PHA分解酵素遺伝子, *BsBgl*: βグルコシダーゼ

*PphaR*: *phaR*遺伝子プロモーター配列, *PcitZ*: *citZ*遺伝子プロモーター配列

Kumar et al., 2025

# 非可食性植物バイオマスから PHA一貫生産技術の確立

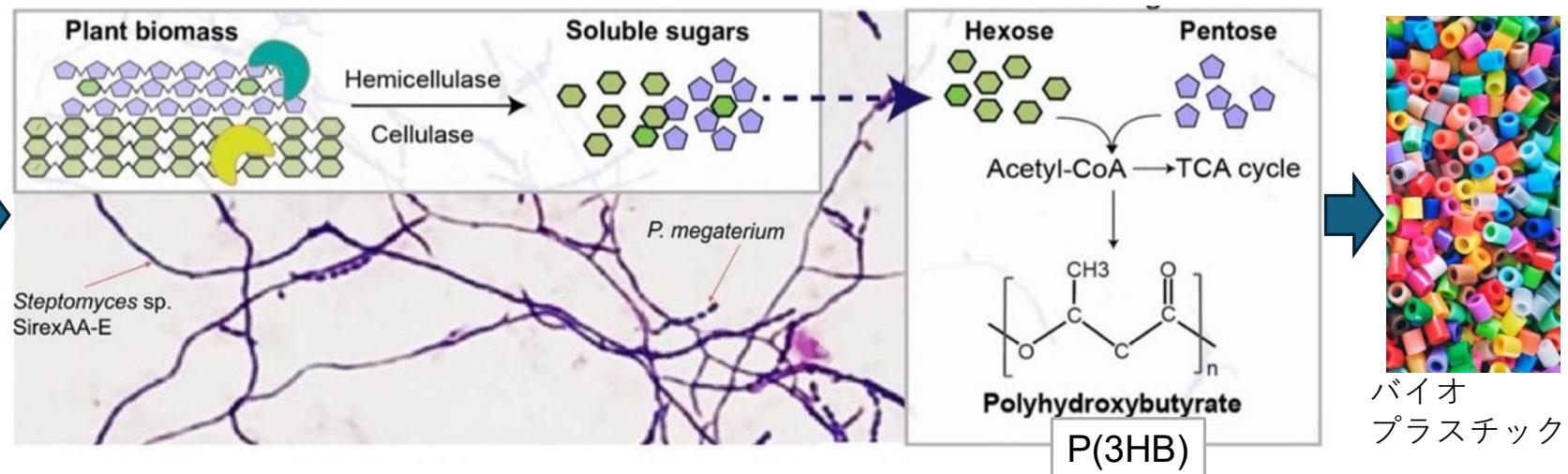


微生物共培養

- ・バイオマス分解菌 (*SirexAA-E*)
- ・PHA生産菌 (*P. megaterium*)



出発原料



## 従来技術と課題

- ・従来の植物バイオマスを出発原料としたPHAの微生物生産は多段階の工程で行われる。
- ・2段階の微生物による植物バイオマスの糖化と発酵プロセスでは、12.5 mg/gのPHA生産効率が報告されている (Martinez and Avila et al., 2021)。
- ・1段階目の植物バイオマスの糖化に商業用粗酵素抽出液を用いる事で PHA生産効率は優位に向上 (1gあたりのスキから～140mgのPHA) するが、使用する粗酵素抽出液は高価であるため費用対効果に難がある (Bhatia et al., 2019)。

## 想定される用途

- ・現在単糖を出発原料に様々なPHAを微生物発酵生産している技術に本技術を組み合わせる事で、多様なPHAポリマーの生産へ応用が容易にできる。
- ・本技術はPHA以外のバイオプロダクト生産についても、発酵菌(本技術では*P. megaterium*を使用)を組替える事で可能になる。
- ・バイオマス分解菌の分解能力の向上により、PHA生産効率の向上が可能になる。
- ・陸域のみならず、海域バイオマスも出発原料として利用できる(特願2025-123157)。

## 実用化に向けた課題

---

- ・現在単糖を出発原料に様々なPHAを微生物発酵生産している技術に本技術を組み合わせる事で、多様なPHAポリマーの生産へ拡張する必要がある。
- ・本技術をPHA以外のバイオプロダクト生産についても検証する必要がある。
- ・バイオマス分解菌の分解能力の向上により、PHA生産効率の向上が可能になる事を検証する必要がある。
- ・上記項目(用途)について、スケーラビリティ及び費用対効果の検証が必要。

## 企業や政府への期待

- ・現在単糖を出発原料に様々なPHAを微生物発酵生産している技術に本技術を組み合わせる事で、多様なPHAポリマーの生産へ拡張する必要があるため、企業が有するPHAポリマーア生産に本技術を取り入れる事に興味がある企業を募集したい。
  - ・本技術はPHA以外のバイオプロダクト生産についても、発酵菌(本技術では*P. megaterium*を使用)を組替える事で可能になるため、企業や国内・外の政府(例:南アフリカ等)と幅広い用途や技術展開を議論したい。
- また、出発原料(未利用飼料等)、やそれに伴う技術価値の付与について議論したい。

## 本技術に関する知的財産権

---

- ・発明の名称: 非可食性バイオマスの微生物共培養系を用いたPHAの產生
- ・出願番号: 特願 2023-009430
- ・出願人: 国立大学法人北海道大学
- ・発明者: 高須賀太一, クマールビジェイ

## お問合せ先

---

北海道大学 産学・地域協働推進機構  
産学・地域協働推進機構 ワンストップ窓口

<https://www.mcip.hokudai.ac.jp/about/onestop.html>