

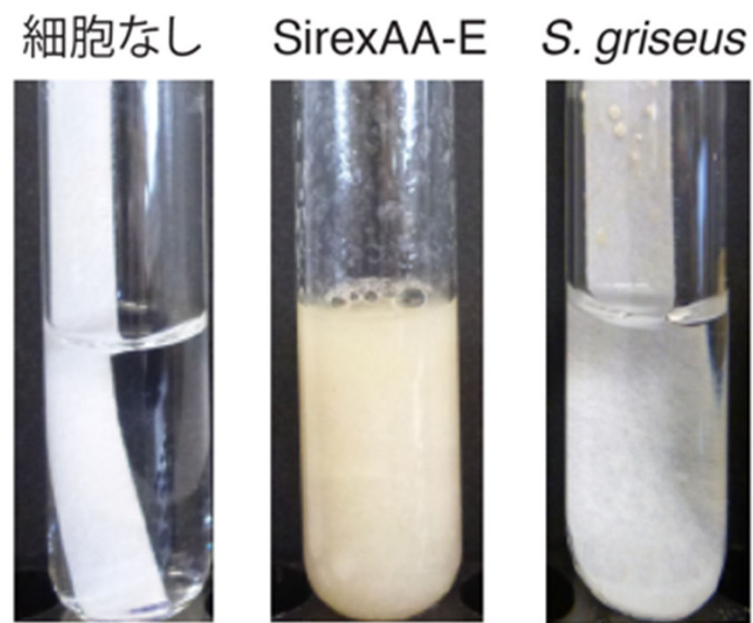
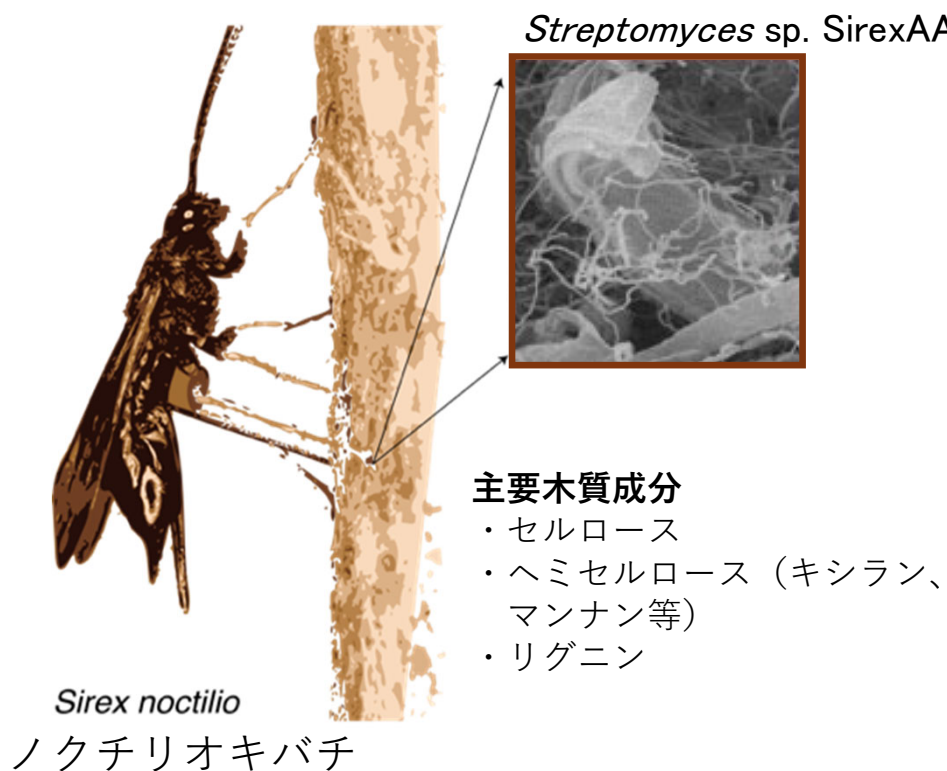
非可食性バイオマスの微生物 共培養系を用いたPHAの産生

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*)

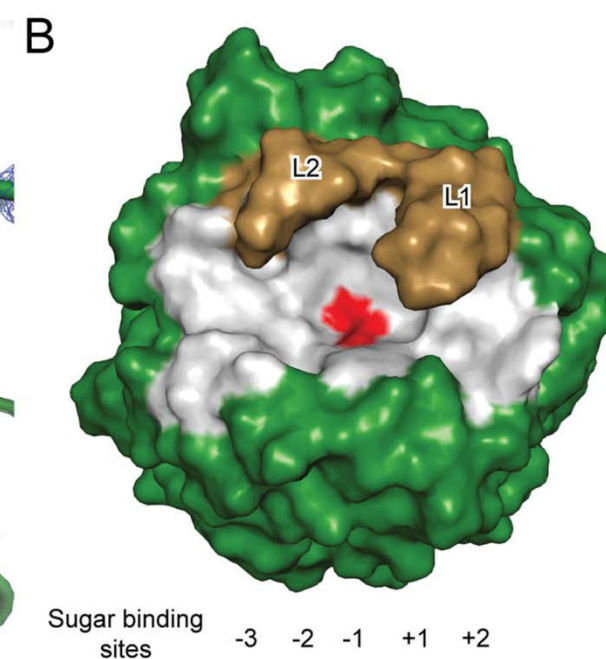
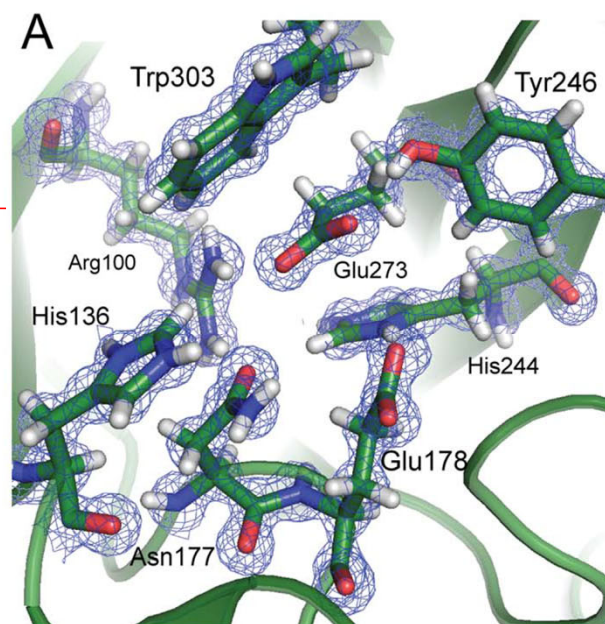


ろ紙を単一炭素源とした培養

SirexAA-Eの炭素源特異的な分泌酵素： 例：多糖分解酵素

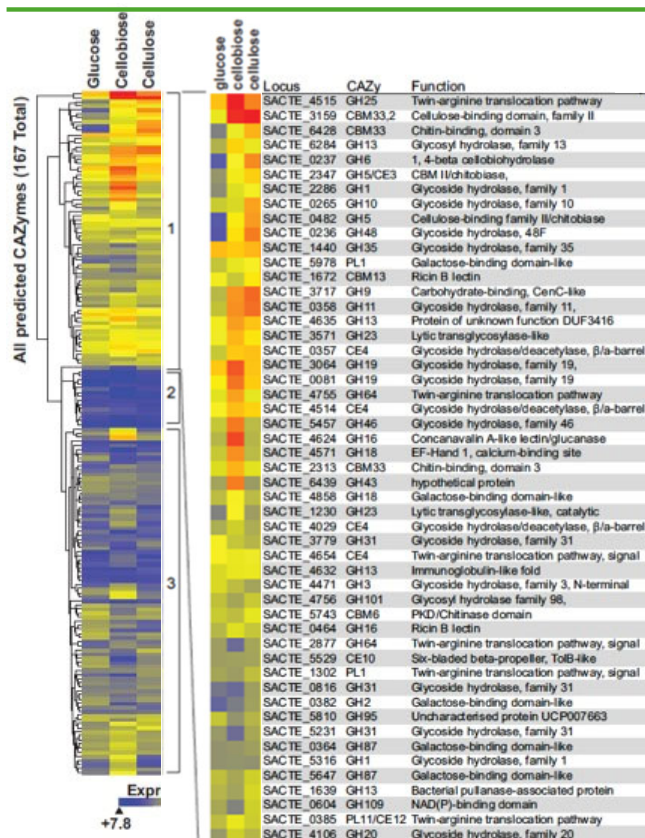
単一炭素源

Locus	GH	CBMs	glucose	cellobiose	cellulose
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



SACTE_2347 (Mannanase)

SirexAA-Eのセルロース 特異的遺伝子発現と転写制御因子



Locus	CAZy	Function	Locus	Catalytic domain	CBM	Annotated function	Sequence ^a	Rank ^b	Fold change ^b
SACTE_4515	GH25	Twin-arginine translocation pathway	SACTE_0236	GH48	CBM2	1,4-beta cellobiohydrolase	TGGGAGCGCTCCCA	1	21.7
SACTE_3159	CBM33.2	Cellulose-binding domain, family II	SACTE_0237	GH6	CBM2	1,4-beta cellobiohydrolase	TGGGAGCGCTCCCA	2	17.3
SACTE_6428	CBM33	Chitin-binding, domain 3	SACTE_3159	CBM33	CBM2	Cellulose-binding domain	TGGGAGCGCTCCCA	3	16.2
SACTE_6284	GH13	Glycosyl hydrolase, family 13	SACTE_0482	GH5	CBM2	Endo-1,4-beta-glucosidase	TGGGAGCGCTCCCA	4	15.4
SACTE_0237	GH6	1,4-beta cellobiohydrolase	SACTE_2288			Transport systems inner membrane component	TGGGAGCGCTCCCA	5	11.2
SACTE_2347	GH5/CE3	CBM lichenobiose	SACTE_3717	GH9	CBM2	1,4-beta cellobiohydrolase	TGGGAGCGCTCCCA	6	9.7
SACTE_2286	GH1	Glycoside hydrolase, family 1	SACTE_6428	CBM33		Chitin-binding, domain 3	GGGAGCGCTCCCA	9	7.9
SACTE_0265	GH10	Glycoside hydrolase, family 10	SACTE_2347	GH5	CBM2	Beta-mannosidase	TGGGAGCGCTCCCA	11	5.0
SACTE_0482	GH5	Cellulose-binding family II/chitinase	SACTE_2287			Transport systems inner membrane component	TGGGAGCGCTCCCA	15	4.3
SACTE_0236	GH48	Glycoside hydrolase, 48F	SACTE_2289			Family 1 extracellular solute-binding protein	TGGGAGCGCTCCCA	19	3.9
SACTE_1440	GH35	Glycoside hydrolase, family 35	SACTE_0352			GCN5-related N-acetyltransferase	TGGGAGCGCTCCCA	22	3.6
SACTE_5978	PL1	Galactose-binding domain-like	SACTE_2286	GH1		Glycoside hydrolase 1	GGGAGCGCTCCCA	27	3.4
SACTE_1672	CBM13	Ricin B lectin	SACTE_0483		CBM2	Cellulose-binding family protein	GGGAGCGCTCCCA	503	1.6
SACTE_3717	GH9	Carbohydrate-binding, CenC-like	SACTE_0562	GH7/4	CBM2	Secreted cellulase (endo)	TGGGAGCGCTCCCA	5759	0.7
SACTE_0358	GH11	Glycoside hydrolase, family 11							
SACTE_4635	GH13	Protein of unknown function DUF3416							
SACTE_3571	GH23	Lytic transglycosylase-like							
SACTE_0357	CE4	Glycoside hydrolase/deacetylase, beta-barrel							
SACTE_3064	GH19	Glycoside hydrolase, family 19							
SACTE_0081	GH19	Glycoside hydrolase, family 19							
SACTE_4755	GH64	Twin-arginine translocation pathway							
SACTE_4514	CE4	Glycoside hydrolase/deacetylase, beta-barrel							
SACTE_5457	GH46	Glycoside hydrolase, family 46							
SACTE_4624	GH16	Concanavalin A-like lectin/galactanase							
SACTE_4571	GH18	EF-Hand 1, calcium-binding site							
SACTE_2313	CBM33	Chitin-binding, domain 3							
SACTE_6439	GH43	hypothetical protein							
SACTE_4858	GH18	Galactose-binding domain-like							
SACTE_1230	GH23	Lytic transglycosylase-like, catalytic							
SACTE_4029	CE4	Glycoside hydrolase/deacetylase, beta-barrel							
SACTE_3779	GH31	Glycoside hydrolase, family 31							
SACTE_4654	CE4	Twin-arginine translocation pathway, signal							
SACTE_4632	GH13	Immunoglobulin-like fold							
SACTE_4471	GH3	Glycoside hydrolase, family 3, N-terminal							
SACTE_4756	GH101	Glycosyl hydrolase family 98							
SACTE_5743	CBM6	PKD/Chitinase domain							
SACTE_0464	GH16	Ricin B lectin							
SACTE_2877	GH64	Twin-arginine translocation pathway, signal							
SACTE_5529	CE10	Six-bladed beta-propeller, TolB-like							
SACTE_1302	PL1	Twin-arginine translocation pathway, signal							
SACTE_0816	GH31	Glycoside hydrolase, family 31							
SACTE_0382	GH2	Galactose-binding domain-like							
SACTE_5810	GH95	Uncharacterised protein UCP007663							
SACTE_5231	GH31	Glycoside hydrolase, family 31							
SACTE_0364	GH87	Galactose-binding domain-like							
SACTE_5316	GH1	Glycoside hydrolase, family 1							
SACTE_5647	GH87	Galactose-binding domain-like							
SACTE_1639	GH13	Bacterial pullanase-associated protein							
SACTE_0604	GH109	NAD(P)-binding domain							
SACTE_0385	PL11/CE12	Twin-arginine translocation pathway							
SACTE_4106	GH20	Glycoside hydrolase, family 20							

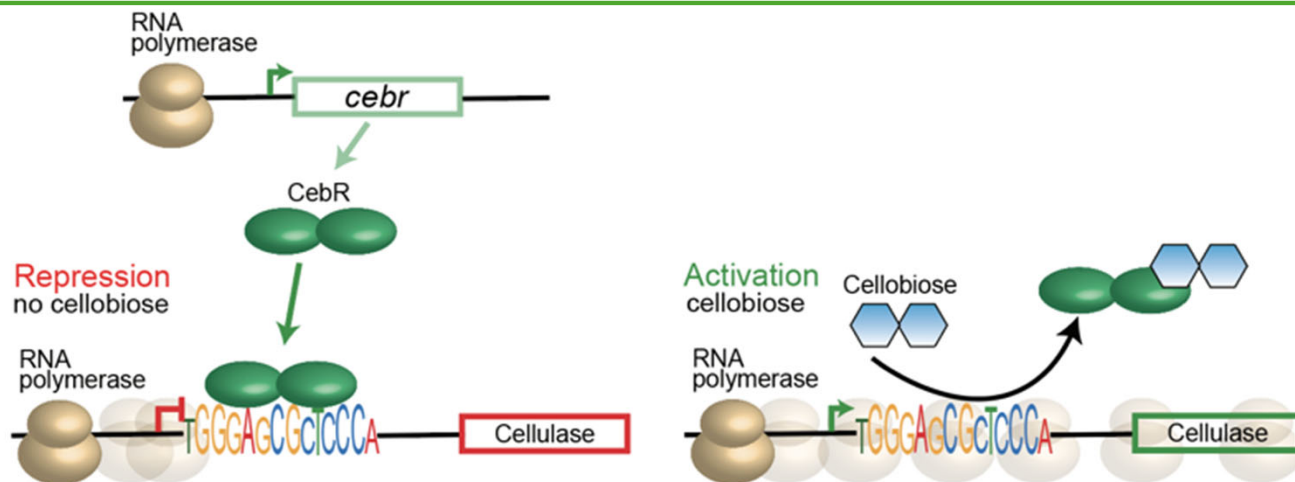
^aPredicted binding sequence element found upstream from gene locus.

^bRanking and fold change in expression intensity detected by microarray for ActE genes when grown on cellulose relative to glucose.

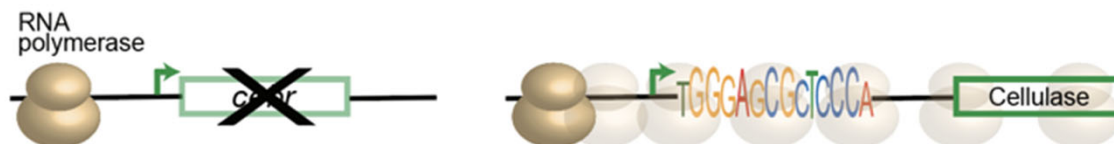


TGGGAGCGCTCCCA配列モチーフは先行研究で報告があったため配列相同性から転写因子をつきとめた。

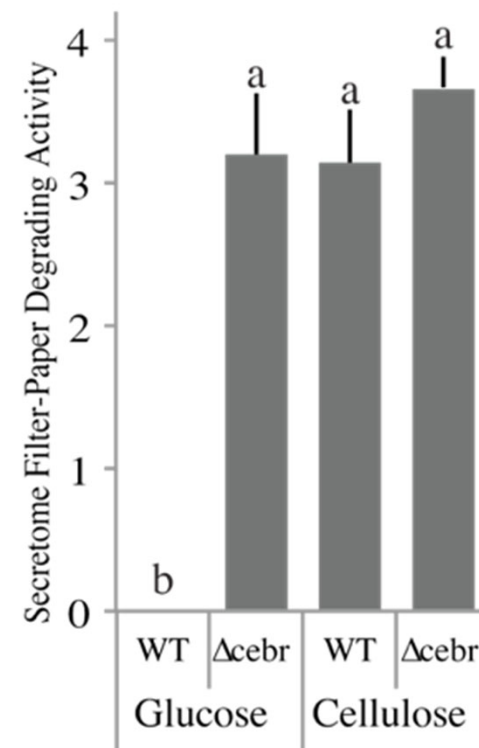
SirexAA-Eの転写制御因子欠損による セルロース分解向上



であれば、CebRを欠損させるとどうなる？

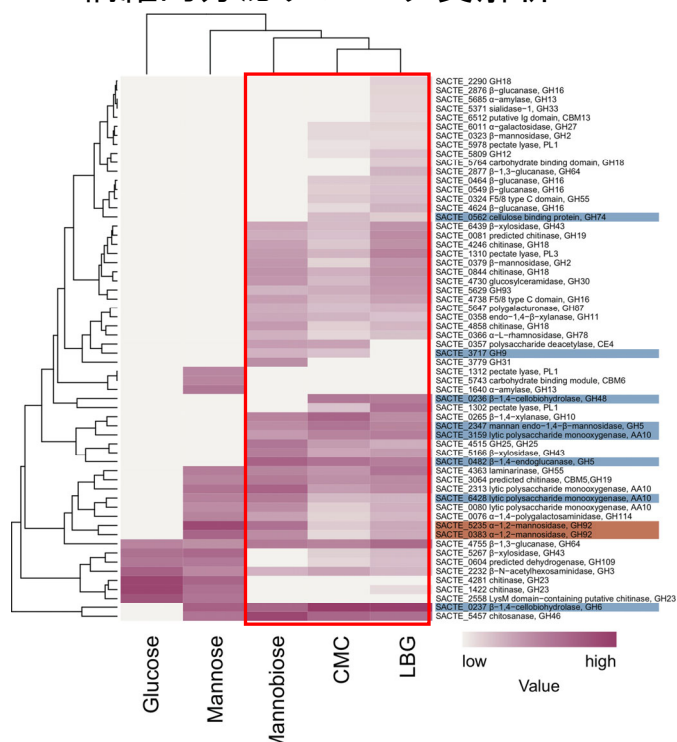


全ての配列モチーフの下流遺伝子が活性化される？

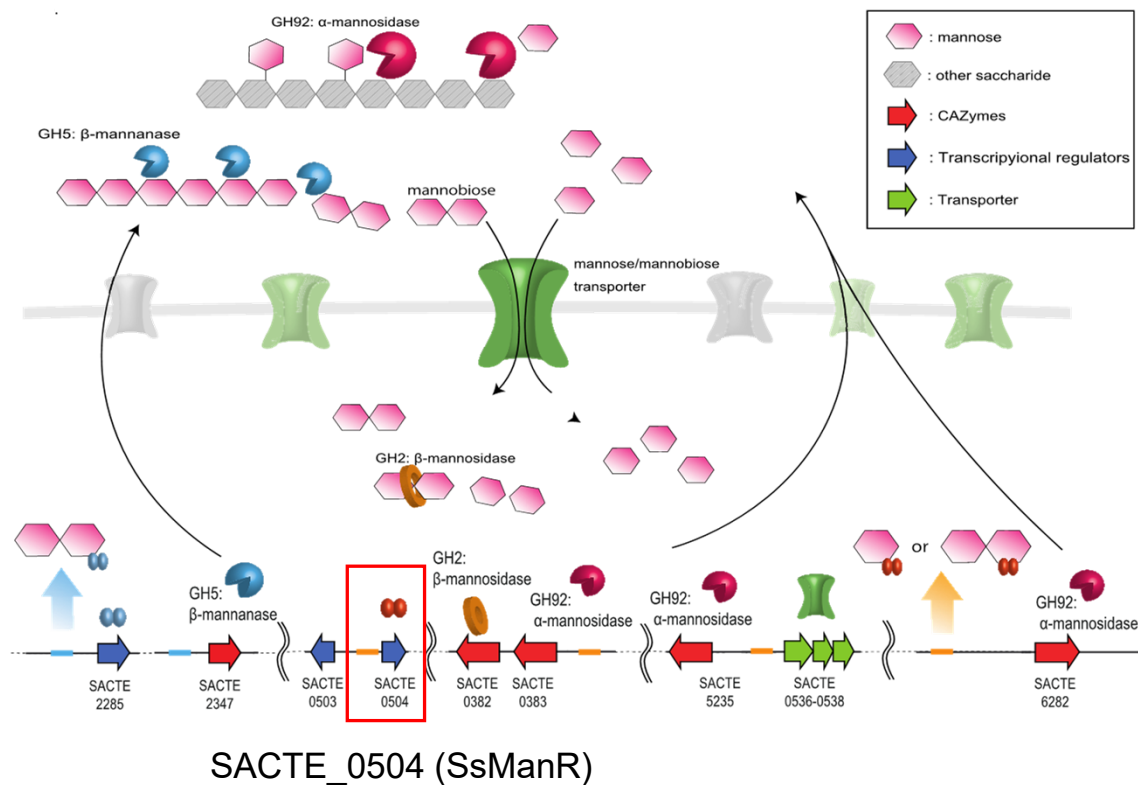


SirexAA-Eのマンナン特異的な 転写制御因子の同定

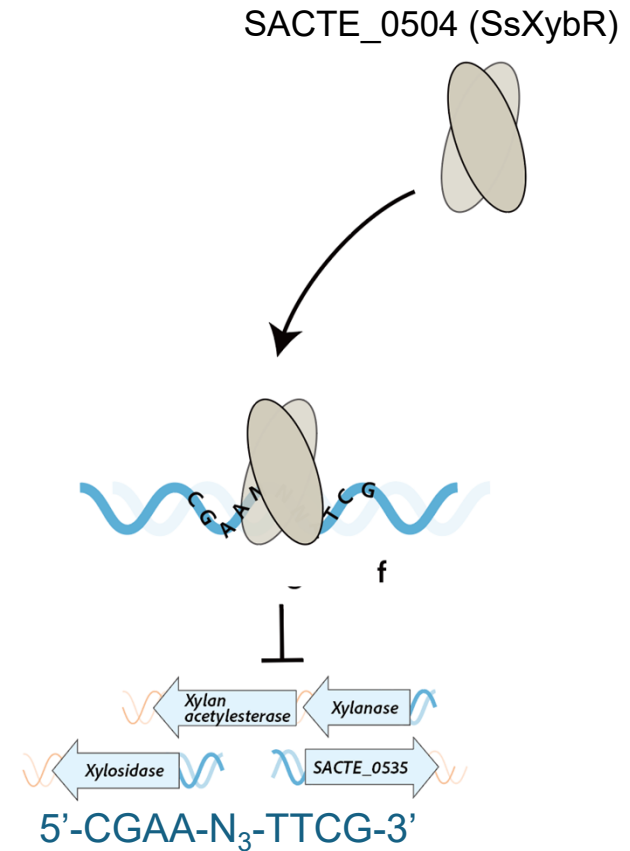
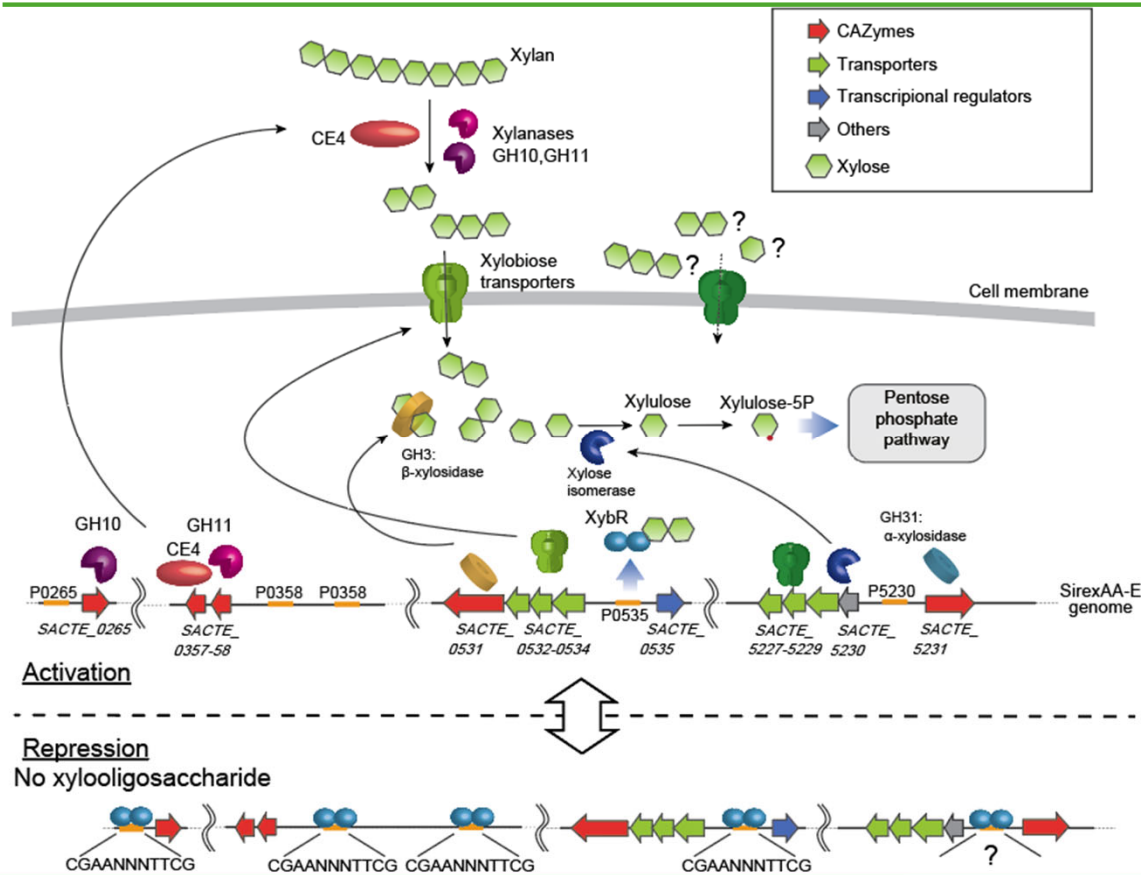
網羅的分泌タンパク質解析



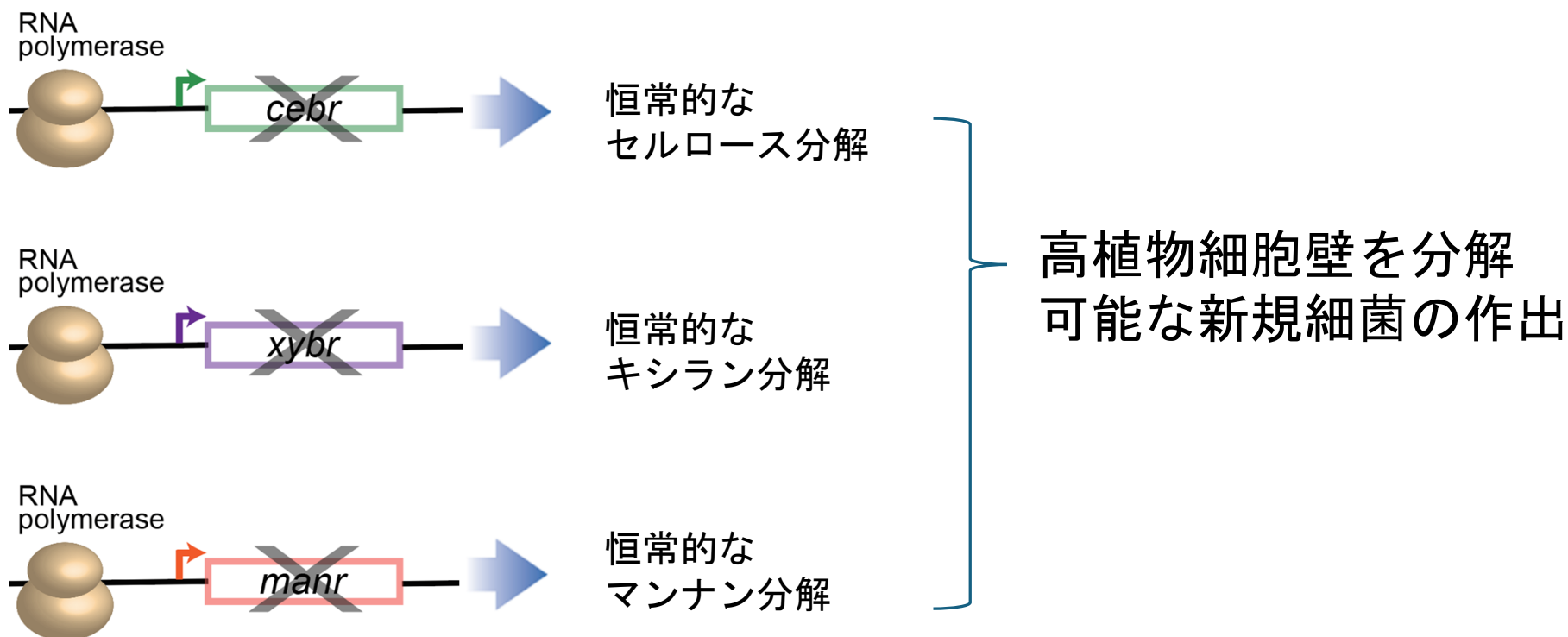
单一炭素源



SirexAA-Eのキシラン特異的な 転写制御因子の同定



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

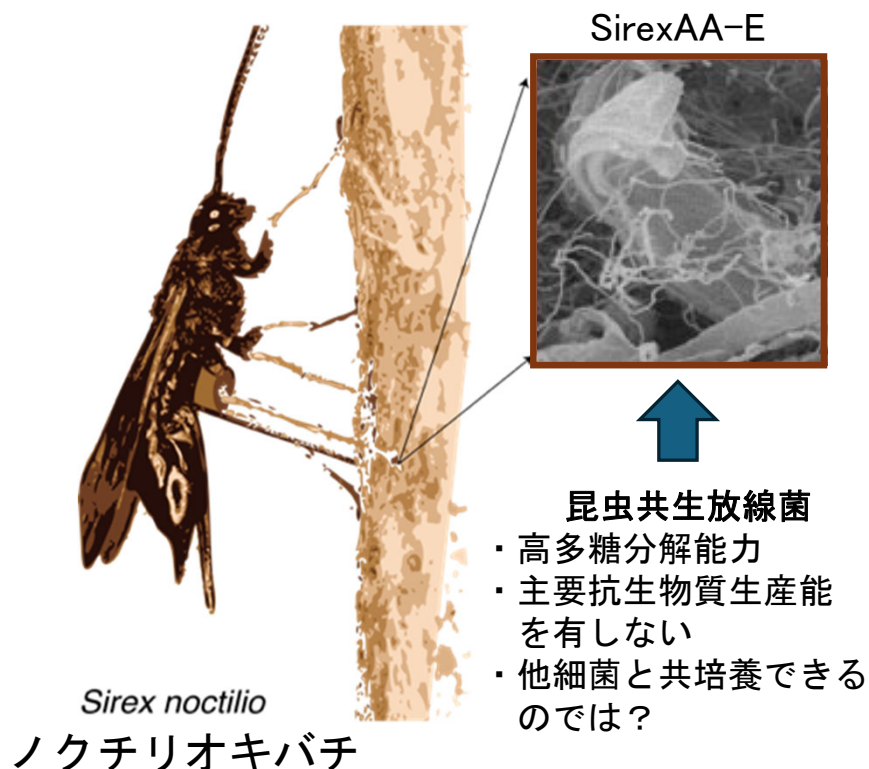


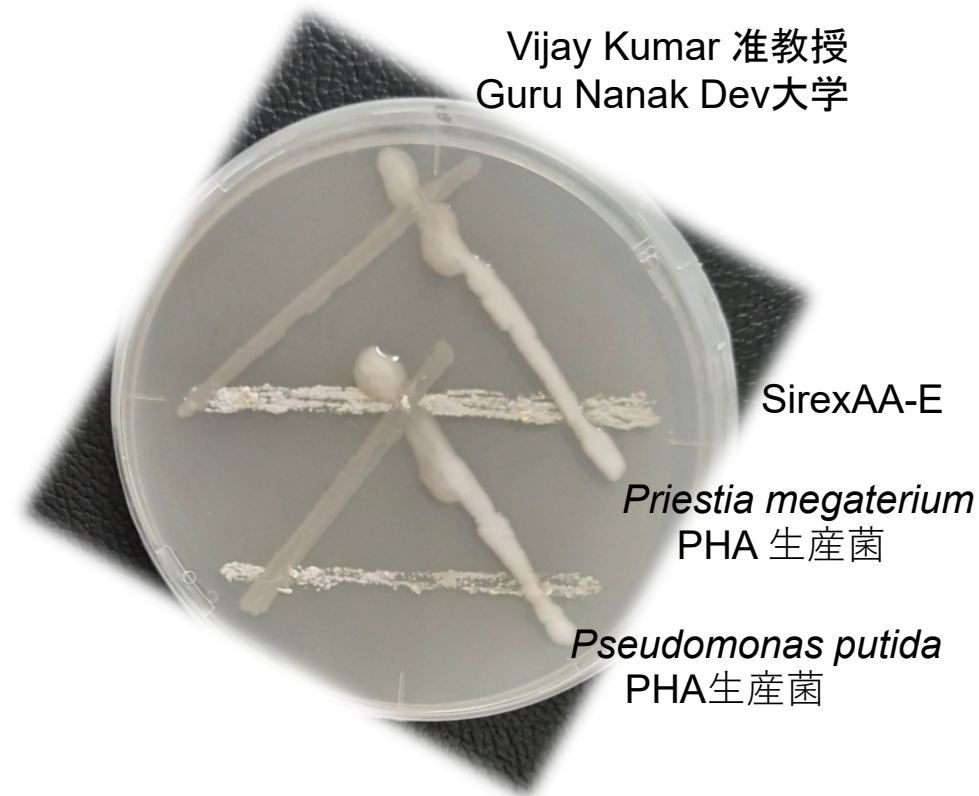
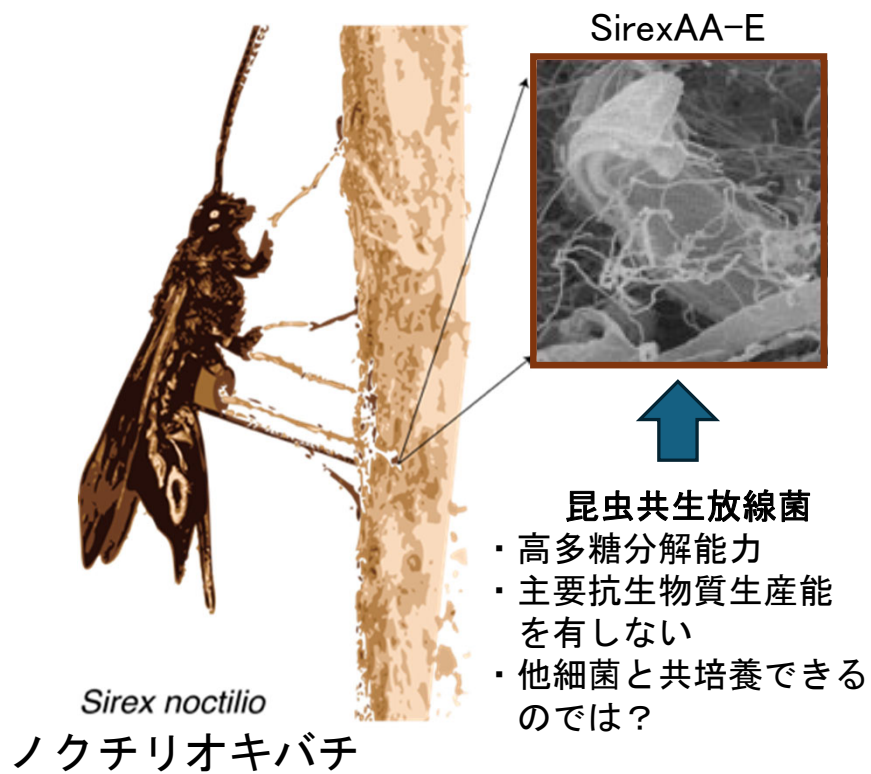
Table 1 | Comparison of genomic composition

	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 ^a	2.6%	2.7%	1.8%	3.2%
Total GH ^b	119	154	80	70
Total PL ^c	6	11	4	6
Total CE ^d	29	36	23	20
Total CBM ^e	85	98	68	121
antiSMASH clusters ^f	22	24	37	3
Genes in clusters	620	718	1139	89
% antiSMASH	9.8%	8.8%	16.0%	2.8%

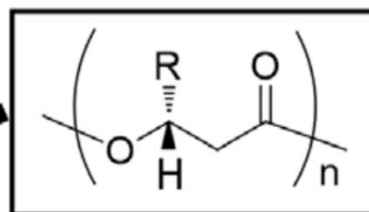
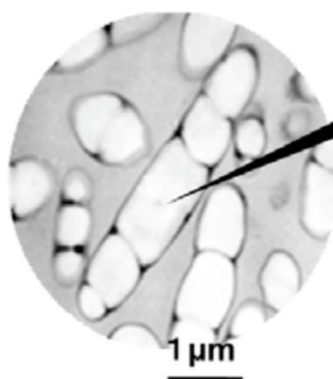
^aProteins classified as Carbohydrate Active Enzymes (CAZy).
^bGH, glycoside hydrolase.
^cPL, pectate lyase.
^dCE, carbohydrate esterase.
^eCBM, carbohydrate binding module.
^fPutative antibiotic producing gene cluster.

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



微生物が生産する ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)に着目

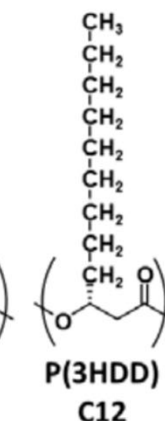
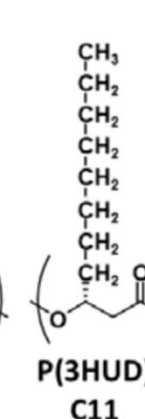
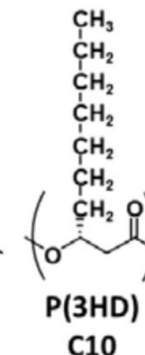
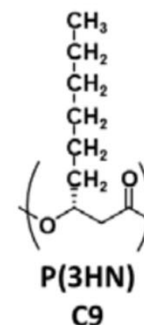
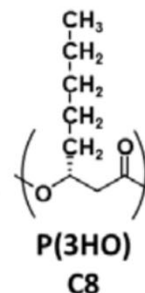
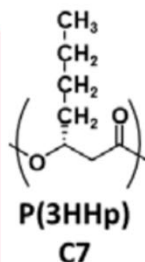
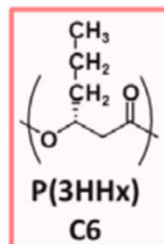
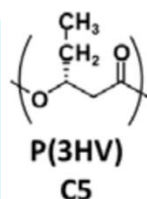
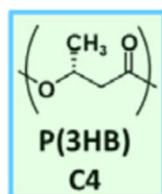


微生物が貯蔵物質として
細胞内に蓄積するポリエステル

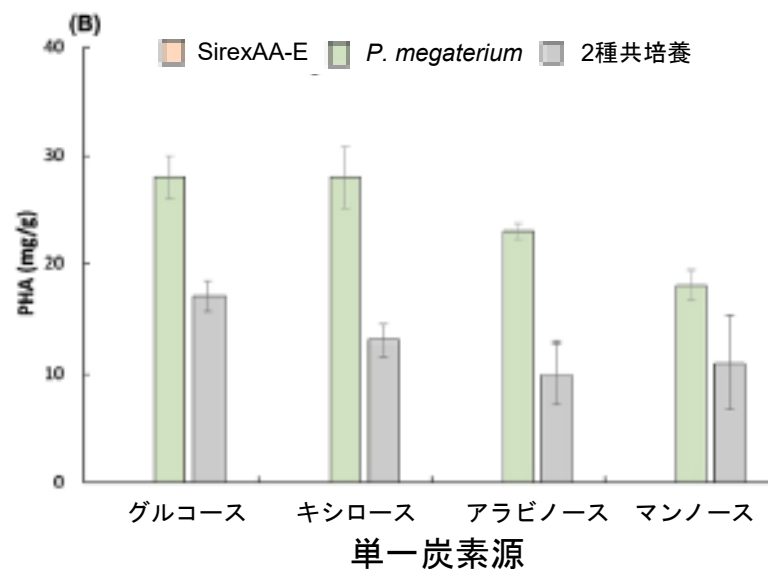
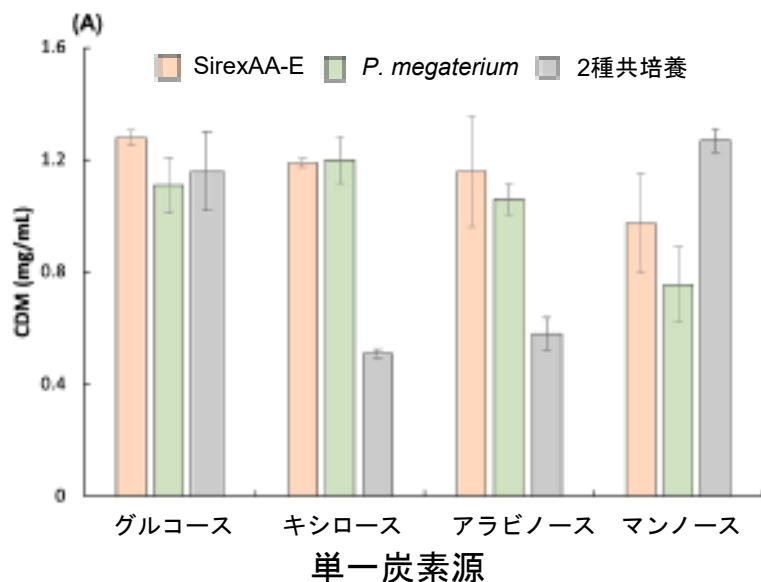
ポリヒドロキシアルカン酸
(PHA)

- 熱可塑性
- 生体適合性
- 生分解性

カネカポリマー
(PHBH)



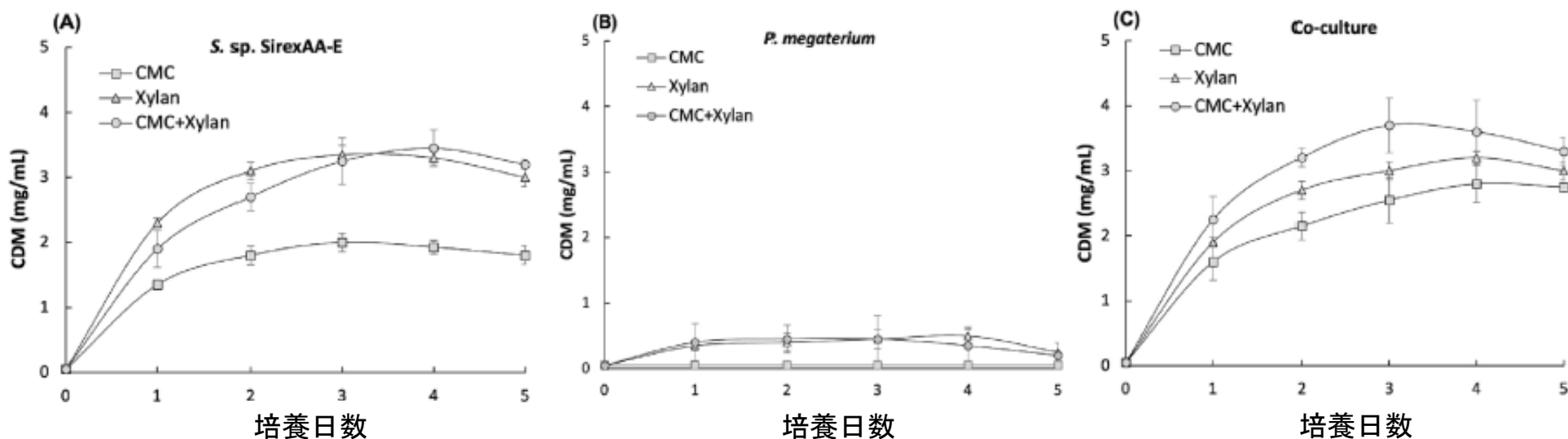
SirexAA-Eおよび*P. megaterium*の単糖を 基質とした生育試験とPHA生産試験結果



➡ 主要多糖構成成分(単糖)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

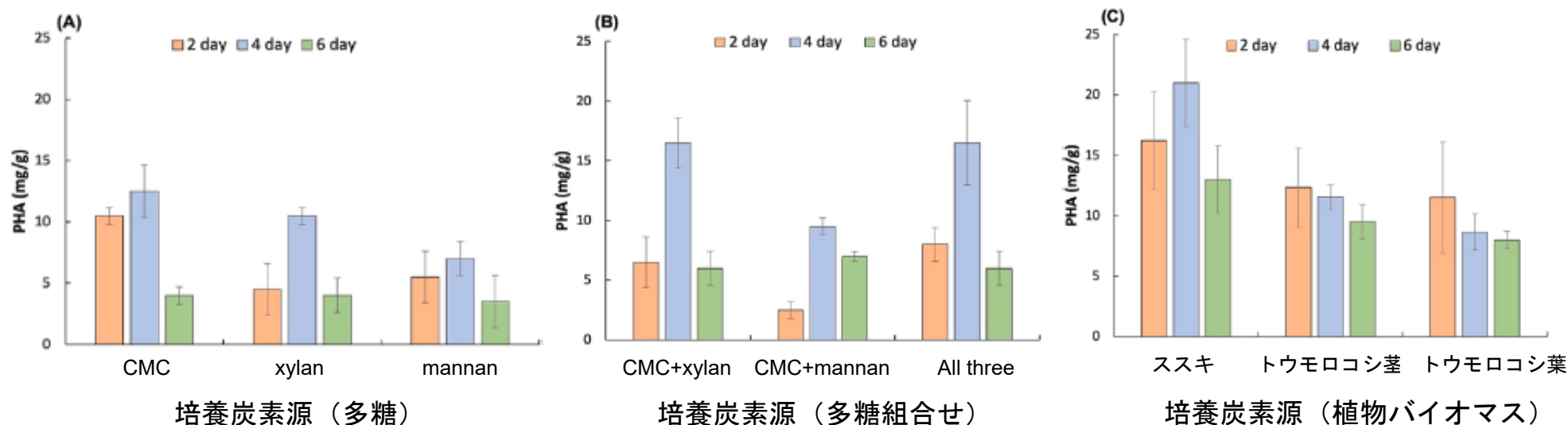


➡ SirexAA-Eのみ多糖を資化し生育可能.

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

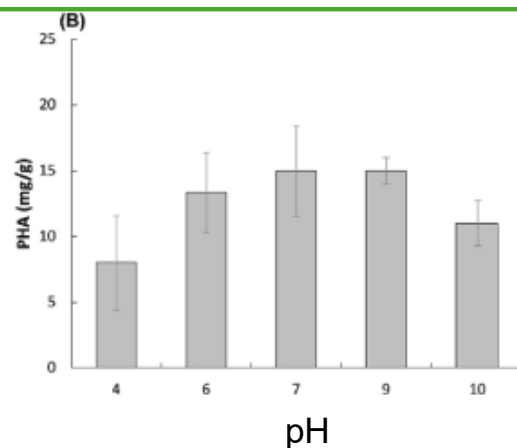
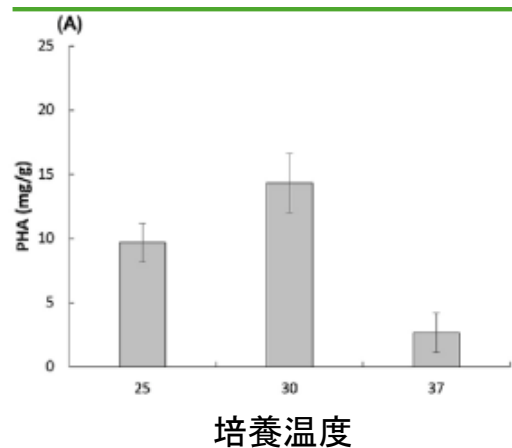
共培養による多糖または植物バイオマスからPHA生産結果



➡ 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

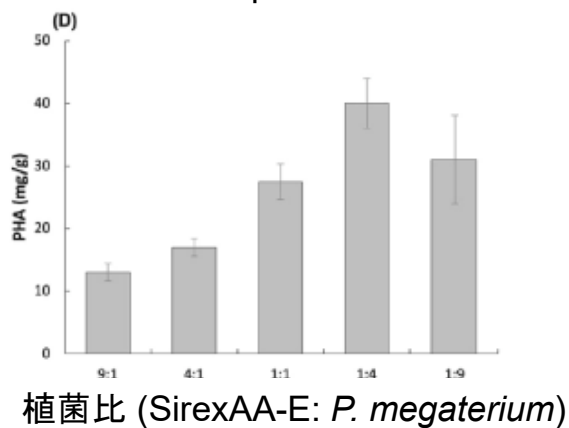
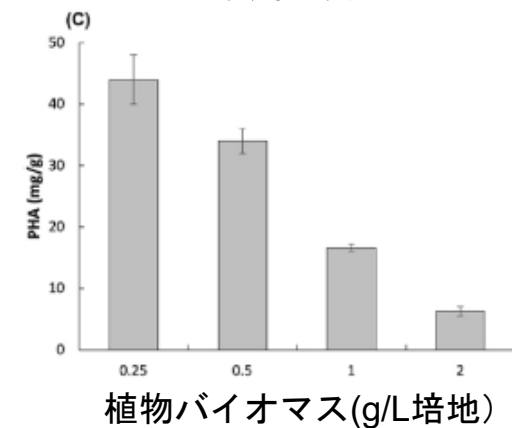
2種細菌共培養条件の検討



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



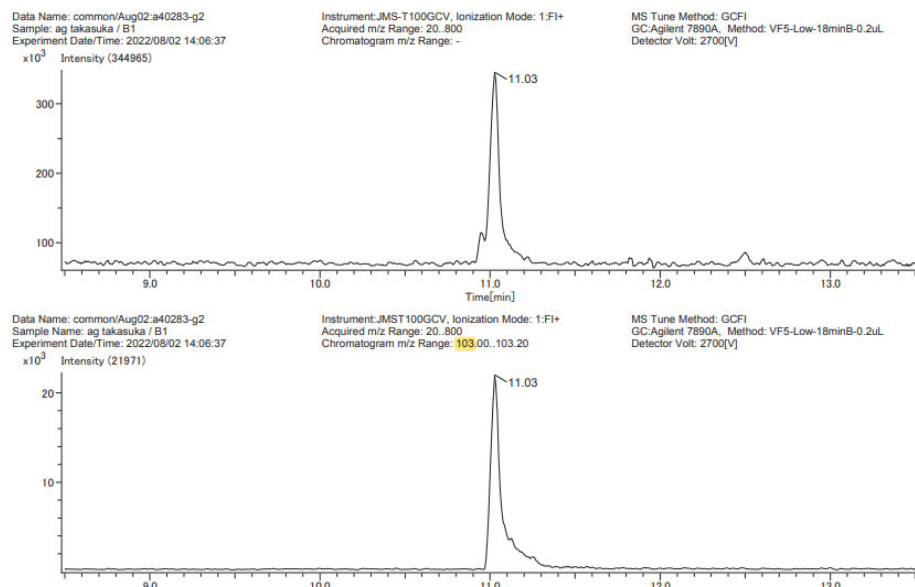
2種細菌の植菌比:
1:4 (SirexAA-E: *P. megaterium*)

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

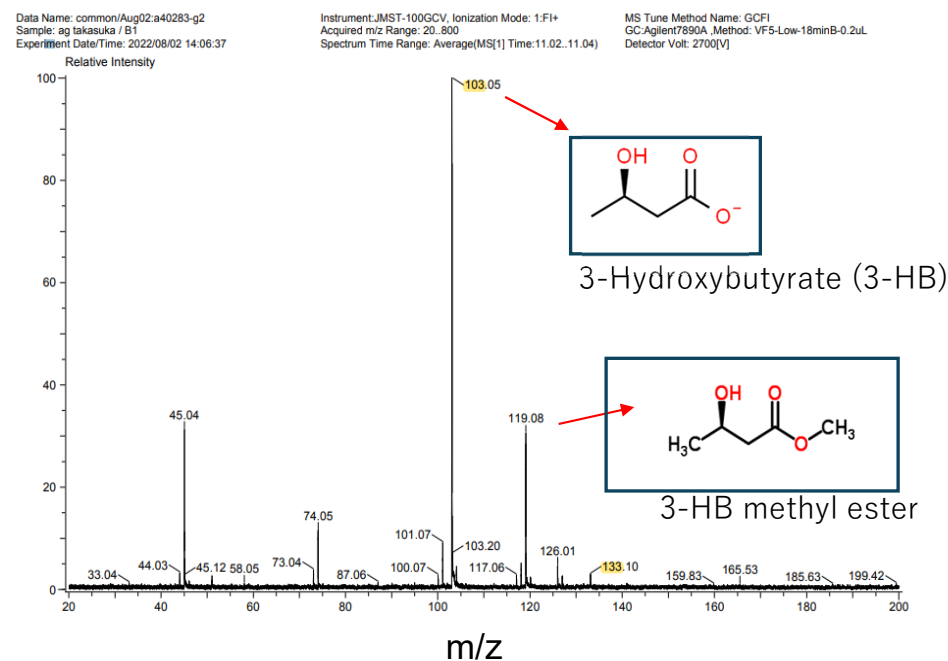
$Y_{PHA/s}$: 炭素源gあたりのPHA生産量

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

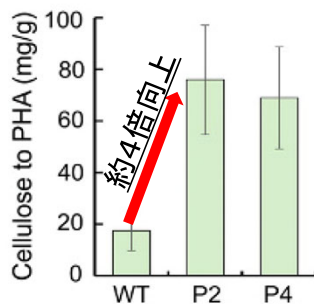
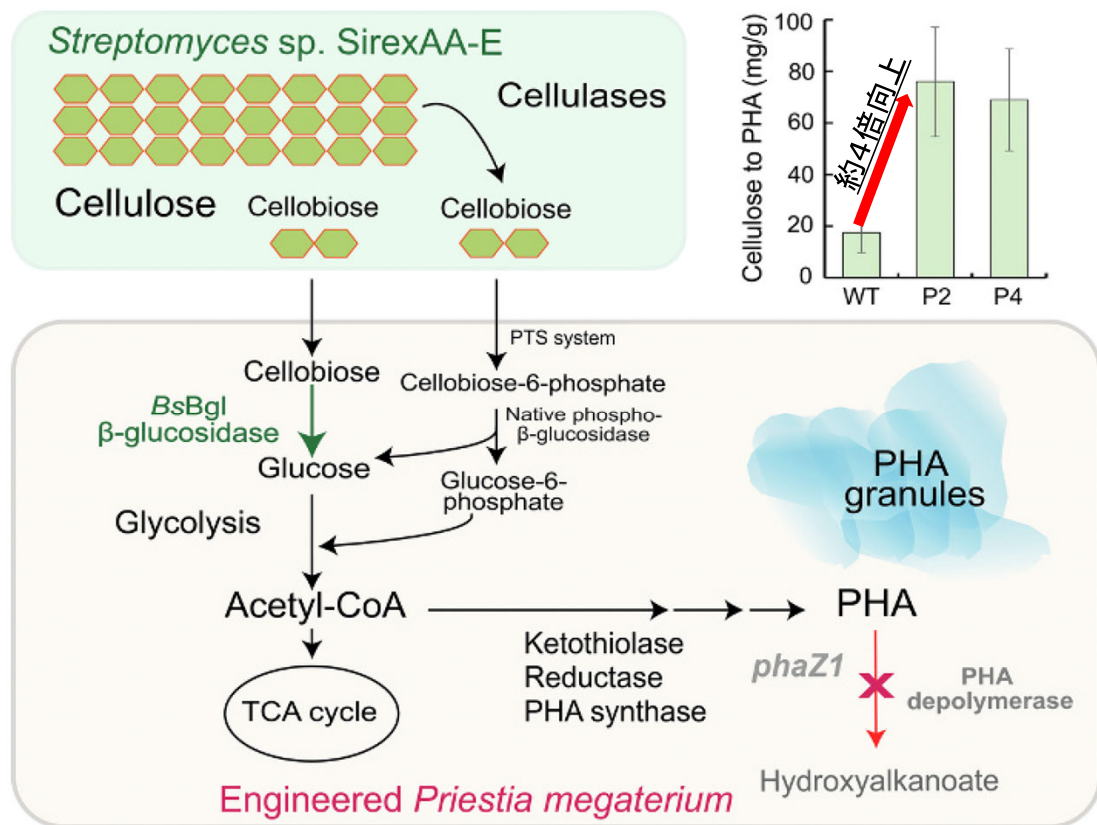


Ion Chromatogram in Mass range 103.00-103.20



➡ 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

P_{phaR}: *phaR*遺伝子プロモーター配列, *P_{citZ}*: *citZ*遺伝子プロモーター配列

非可食性植物バイオマスから PHA一貫生産技術の確立

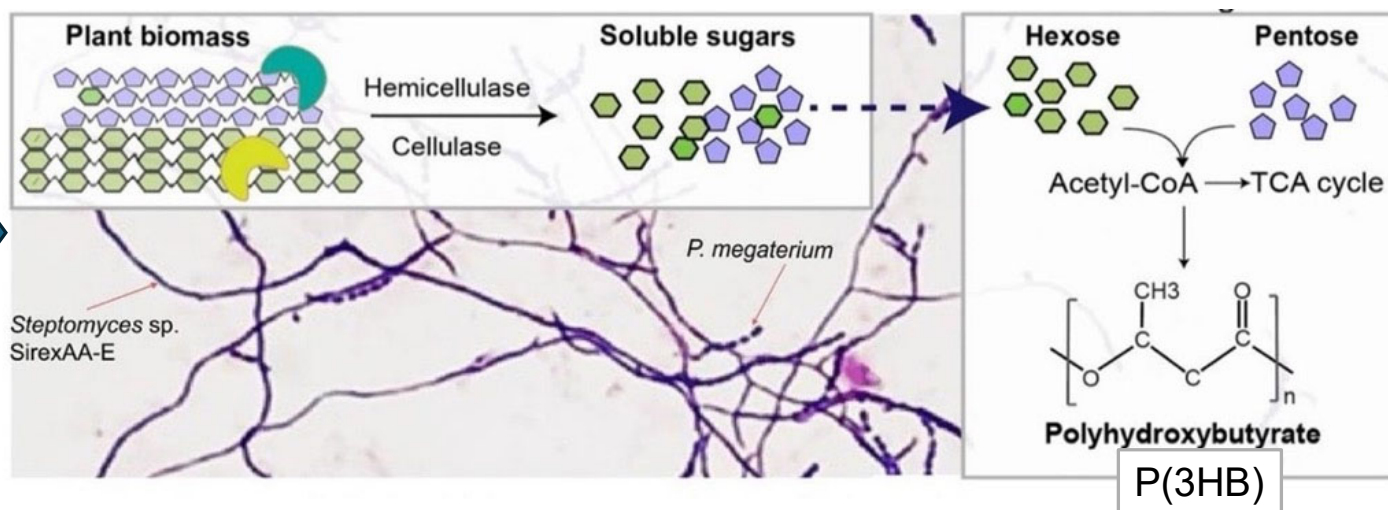


微生物共培養

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



出発原料



バイオ
プラスチック

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の産生
- ・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>

