

枯草菌胞子表層提示技術による 新規バイオマス分解製剤の開発

神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科
教授 吉田 健一

2025年10月30日

技術開発の背景(1)

現在エネルギー源や化学品の原料は化石資源に依存している。
→**非可食バイオマス**の利用が期待される。

非可食バイオマスは、多数の糖が結合したセルロースやヘミセルロース等から構成されており、分解すると多数の糖が得られるので、さらにこの糖を変換して燃料や様々な化学品へと導く事ができる。

セルロース等は結晶性が高いため分解し難く、その効率分解糖化は重要な課題である。

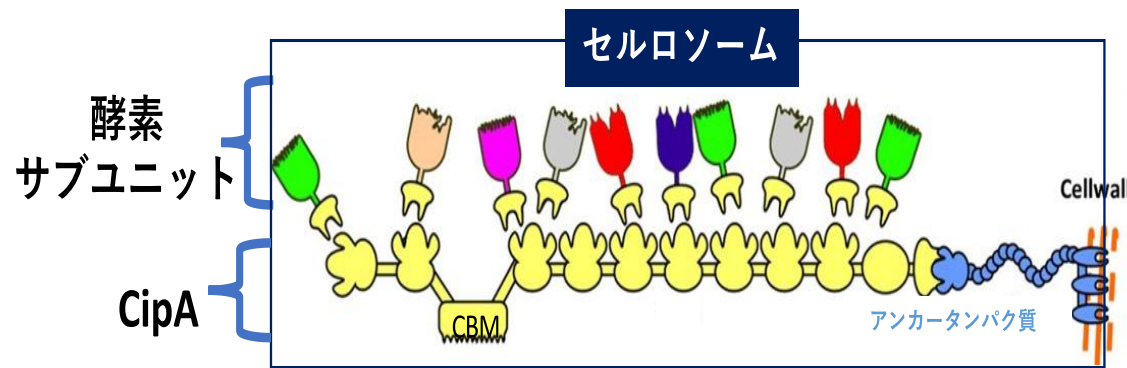
従来技術とその問題点

化学生産資源の多様化が求められる中で、食糧と競合しないバイオマス（木材廃棄物など）の利用が注目されているが、バイオマスを分解・糖化する分解酵素の性能や価格に課題がある。

- 新たなバイオマス分解技術の創出が求められている。
- 一方、従来のバイオマス分解酵素は国外企業の寡占状態にあるので、国産技術の開発が待たれる。

技術開発の背景(2)

セルロソーム



好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* が産生する巨大な酵素タンパク質複合体

細胞表面に長大なタンパク質(CipA)を提示しその上にセルロースなどを分解できる複数多種の酵素を整列結合した構造

→複数の分解酵素が集約的に作用することで、効率的なバイオマスの分解を可能となる。

しかし、*C. thermocellum*の直接的な利用は難しい。

枯草菌を使用する意義(1)

「酵素生産能力」

枯草菌は酵素分泌に優れており、組換えタンパク質を工業的に生産する主力菌である。

生産した組換えタンパク質を維持するためにタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）を8つ欠損した株が一般的用いられる（例：WB800株）。

これまでの先行研究：

- ・ WB800株によるセルロソームの分泌
- ・ WB800株の栄養細胞表面でのセルロソームの提示

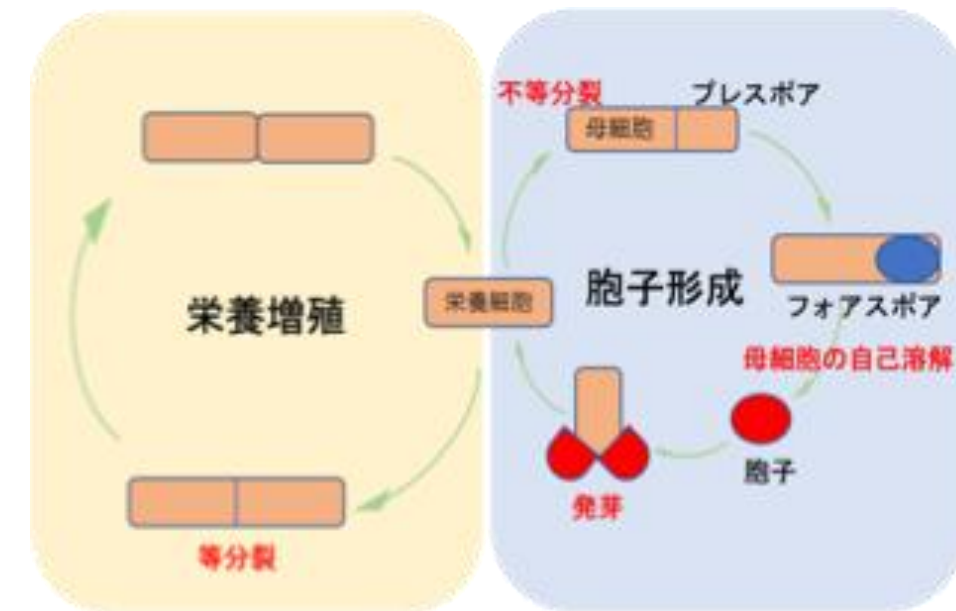
枯草菌を使用する意義(2)

通常、枯草菌は細胞分裂により増殖する。しかし栄養源の枯渇など増殖に適さない環境になると**孢子(芽胞)**を形成する。そして、増殖に適した環境下に置かれると孢子が**発芽**し、再び栄養細胞に戻り増殖する。

枯草菌の孢子は、その高い**耐熱性**、**耐紫外線性**、**耐乾燥性**などの物理的安定性に優れていることから、タンパク質ディスプレイのプラットフォームとして注目されている。

枯草菌孢子表層に*C. thermocellum*由来のセルロソームを融合し、効率的なバイオマス分解を目指す。

「枯草菌の孢子形成」



枯草菌の改良ポイント(1)

プロテアーゼ遺伝子の欠損

● WB800株

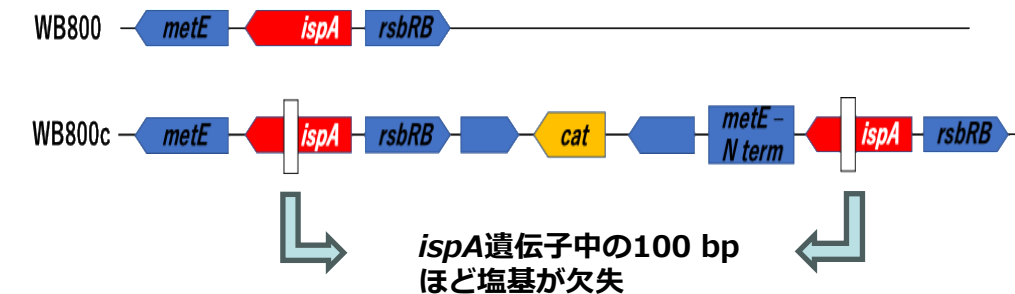
細胞外プロテアーゼを8つ欠損している。

● WB800c株

WB800株の*ispA*(細胞内プロテアーゼ)座付近に
抗生物質耐性遺伝子(*cat*)が入った株を入手した。
(*ispA*が不活性化している)

●そこで、TM01株 を作成した。

WB800c株において異種タンパク質の分解に関わる細胞内プロテアーゼをコードする*aprX*と*ispA*を欠損した10重欠損株を作成した。



枯草菌の改良ポイント(2)

胞子の発芽阻害

セルロース等を分解した後に得られる糖を枯草菌が栄養源として無駄に消費しないように胞子から発芽しない方策が必要となる。

先行研究：

- ・ germinantレセプターチャネルをコードする *gerA*, *gerB*, *gerK* を欠損することによる発芽阻害
- ・ 細胞壁加水分解酵素遺伝子 *cwlD* の欠損による発芽不全

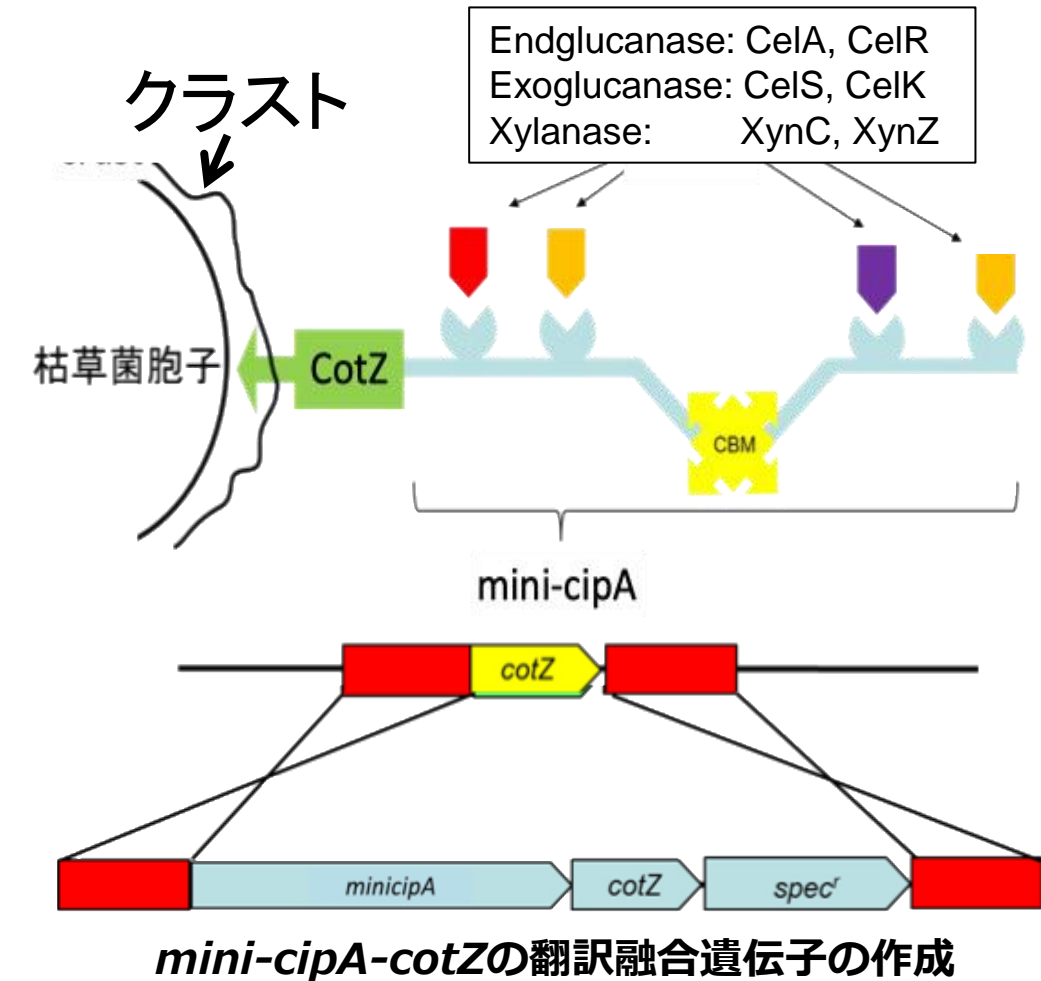
合計4つの遺伝子の欠損で発芽阻止を試みた。

孢子表層に提示する異種タンパク質(1)

mini-cipA-cotZの発現とセルロソームの孢子表面提示

枯草菌孢子の構造において、最外層部分はクラストと呼ばれる。

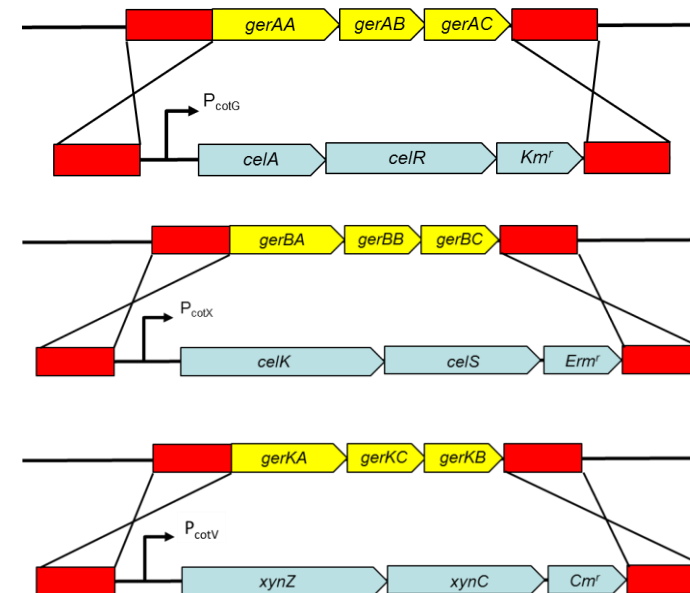
本研究ではクラストの最外層に局在する**CotZ**タンパク質に*C.thremocellum*由来の短縮型CipAタンパク質（mini-CipA）を翻訳融合することで、孢子表面へのミニセルロソームの提示を試みた。



胞子表層に提示する異種タンパク質(2)

セルロース・キシラン分解酵素の発現と*gerABK*, *cwlD*の不活性化
mini-CipA上にセルロースおよびキシロース分解酵素を集積させる。

- CelAR (エンドグルカナーゼ)
- CelKS (エキソグルカナーゼ)
- XynZC (キシラナーゼ)



上記それぞれの酵素遺伝子は、枯草菌胞子の発芽阻害のために欠損する4つの遺伝子座に置換する形で挿入した。

セルロソームmini-CipAタンパク質と発現

CipAタンパク質抗体によるWestern Blot解析を実施した。

- ・野生株(168株)、プロテアーゼ2重欠損株 (RIK1285株) の *mini-cipA-cotZ* 融合発現 (MC024およびMCR02404) は検出されなかった。
- ・WB800cの*mini-cipA-cotZ*発現 (MCW01) では分解を受けて40 kDaになった。
- ・TM01株の*mini-cipA*発現 (MCT05) で～120 kDa付近にバンドを検出し、mini-CipA全長の発現を確認した。

胞子表層での異種タンパク質発現において、*ispA*欠失のみでは不十分であり、細胞内プロテアーゼのAprX欠損が特に重要であることが示唆された。

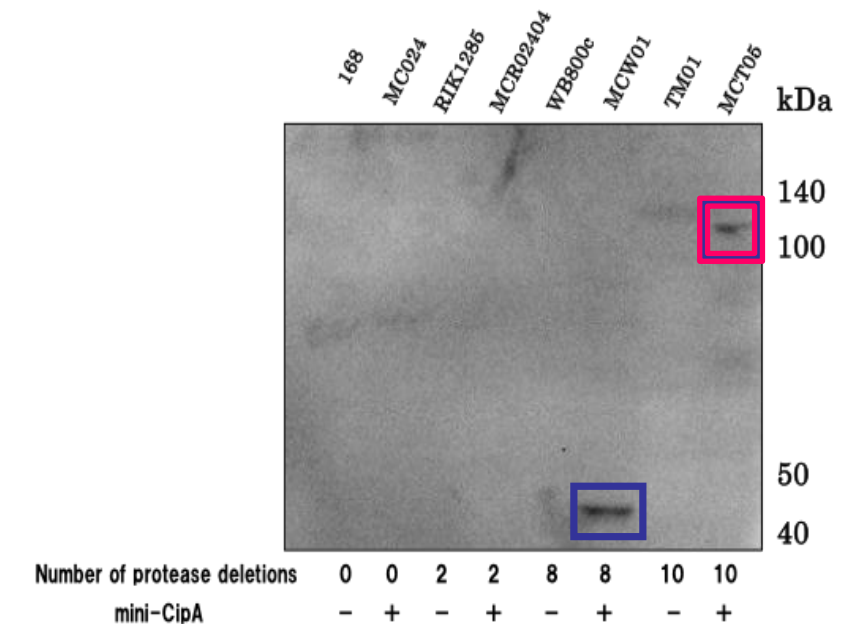


Fig. 1. Western blot analysis for mini-CipA.

枯草菌孢子の発芽阻害

枯草菌野生株(168株)と4重欠損株 ($\Delta gerABKcwID$) の一夜培養液を160,000倍に希釈し、加熱前後のサンプルをプレート培地に0.5 ml播種しCFUを計測した。

Table 1. CFU before and after heating.

Strain	Before heating	After heating
Wild-type (168)	$2.98 \pm 0.76 \times 10^8$	$2.40 \pm 0.22 \times 10^8$
$\Delta gerABKcwID$	$6.70 \pm 0.32 \times 10^7$	$1.07 \pm 1.86 \times 10^5$

・4重欠損株では、加熱後のCFUは野生株の1/1000以下であった
→この結果は発芽が有意に阻害されたことを示唆する。

胞子表層に提示した酵素活性測定

非可食バイオマスの主要な構成成分であるセルロースとキシランを基質として活性を測定（HPLC）

キシランを基質とした場合は、セルロソームを産生しない対照株と比較し、有意に活性があることを確認できた（XynZCの活性）。

→少なくとも胞子表層にCipAとキシラン分解酵素の複合体が構築維持されていることが示唆された。

セルロースを基質とした場合は活性が微弱なので、原因調査ならびに、感度の良い活性測定手法を検討中。

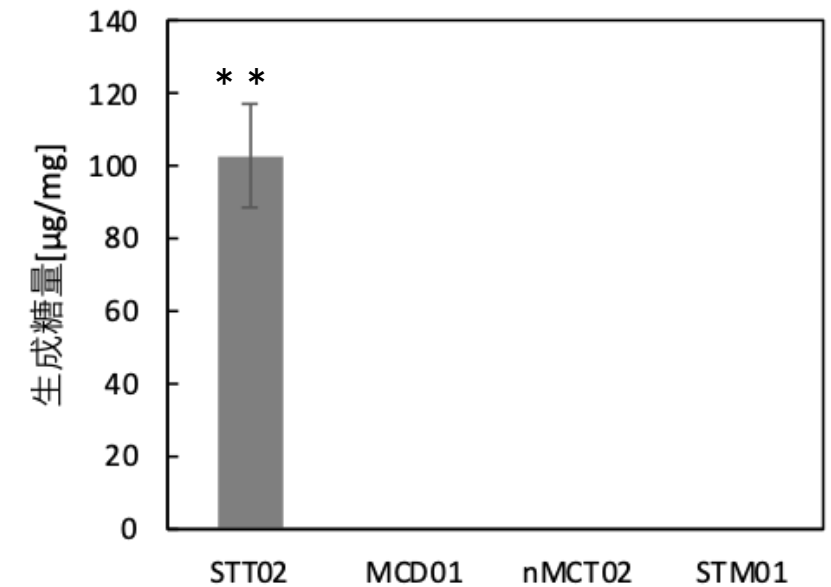


Fig.2. Xylan saccharification assay

STT02 (mini-CipA : +, 酵素 : +)

MCD01 (mini-CipA : +, 酵素 : -)

nMCT02 (mini-CipA : -, 酵素 : +)

STM01 (mini-CipA : -, 酵素 : -)

n=3, ** : p<0.01

新技術の特徴・従来技術との比較

- 元来耐熱性の胞子に耐熱性酵素をセルロソームに集約して作用させることで、**効率的なバイオマス分解高温プロセス**を可能とする点で優位性が期待される。
- 耐熱性の枯草菌胞子をそのまま酵素製剤として利用する**安価なバイオマス分解（糖化）プロセス**を提供する。
- **複数バイオマス分解酵素を同時かつ集約的に作用させるプラットフォーム**を提供する。
- 酵素製剤の**精製プロセスが不要**になる。

想定される用途

- バイオマスを分解糖化して**バイオプロダクションの原料を供給**する。
→資源の有効活用とコストダウン
- セルロソーム以外の**様々なタンパク質の胞子表層提示**が可能である。
(例えば、抗原タンパク質→経口ワクチンとしての応用)

実用化に向けた課題

- 現在、セルロソームの構成因子について、分解を押さえて幾つかの酵素活性の検出が可能のところまで開発済み。しかし、**活性の強化と完全な胞子発芽の阻止**などが未解決である。
→活性の強化と完全な胞子発芽の阻止について実験データを取得し、これらを解決する条件設定を行う。
- **胞子を高効率に大量生産する技術の開発**も必要となる。

社会実装への道筋

時期	取り組む課題や明らかにしたい原理等	社会実装へ取り組み
基礎研究	<ul style="list-style-type: none">・ 胞子表層でのセルロソーム構築の設計が完了	
現在	<ul style="list-style-type: none">・ セルロソーム酵素の発現増強と安定化に関する研究	
1年後	<ul style="list-style-type: none">・ 胞子発芽の阻止・ 発芽阻止の厳密化を実現 (例：発芽率99.9%以下を実現)	JSTのA-STEP事業等へ応募し研究資金獲得
2年後	<ul style="list-style-type: none">・ 様々な実バイオマス原料の分解検証・ セルロソーム胞子の量産化検証	セルロソーム胞子技術の汎用性を検討
4年後	<ul style="list-style-type: none">・ セルロソーム胞子の大量生産	セルソーム胞子サービスの実現

企業への期待

- **バイオマス資源の分解・糖化に関する新技術**を必要とする企業との共同研究を希望。
- 酵素活性の増強については、転写発現量の改善等により克服できると考えており、**増強強度評価**において共同研究を希望。
- 特に、**分解多少となるバイオマス資源サンプル**の提供、ならびに本技術に適した**前処理方法の開発**などを想定。
- **枯草菌胞子の大量生産**の実現も課題であり、この点でも共同研究を希望。

企業への貢献、PRポイント

【当方の役割】 本技術の科学的な裏付けを行うこと

- 本技術が提供するバイオマス分解法は**カスタマイズ可能**である（稲わら、麦わら、廃木材など、物性・組成が異なるバイオマスごとに酵素の組み合わせや割合を調整できる）。
- 菌株育種を重ねることで**顧客の希望に沿う開発ができる**と考えている。
- 木質系廃棄物や農業残渣等、**未利用資源の有効利用**を促進できる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 枯草菌変異体
- 出願番号 : 特願2025-109822
- 出願人 : 神戸大学
- 発明者 : 吉田健一

産学連携の経歴

- 2004ー2014年 食品・バイオ&ファインケミカル企業との共同研究
- 2008ー2018年 食品（ダイズ加工品・ヨーグルト）企業との共同研究
- 2010ー2011年 食品（食用油）企業との共同研究
- 2019ー2021年 酵素製造企業との共同研究
- 2019年 バイオ系スタートアップ企業への特許ライセンスアウト
- 2021年ー現在 プラスチック製品製造企業との共同研究

お問い合わせ先

神戸大学 産官学連携本部

T E L 0 7 8 - 8 0 3 - 5 9 4 5

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