

学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕実績報告書

令和7年5月14日 提出

関連する持続可能な開発目標（SDGs）

	1 貧困		2 飢餓		3 保健		4 教育
	5 ジェンダー	●	6 水・衛生	●	7 エネルギー		8 経済成長と雇用
●	9 インフラ、産業化、イノベーション				10 不平等		11 持続可能な都市
	12 持続可能な消費と生産				13 気候変動		14 海洋資源
●	15 陸上資源		16 平和		17 実施手段		

1 課題番号： 24 独先 11

2 研究者（研究代表者）

①所属部科校：生物資源科学部（生命科学研究所）

②資格・氏名：教授・高野英晃

3 研究課題

①和文表記：光で制御できる未来型バイオ生産系を用いたフラボノイド工場の創生

②英文表記：Construction of a flavonoid factory using a light-controllable futuristic bioproduction system

4 研究期間：令和6年度～令和7年度

5 現在までの達成度

※当初の研究目的に対する達成度について、自己評価を行ってください

①区分 A：当初の計画以上に進展している，B：概ね順調に進展している，C：やや遅れている

②達成度 研究期間全体（2年間）を100%とした場合に、現在の進捗状況を〇〇%で評価してください

①区分：B：概ね順調に進展している

②達成度： 40%

6 研究組織

①研究代表者

資 格・氏 名 (研究者番号)	所属部科教 実施研究所	役 割 分 担
教授・高野 英晃 (50385994)	生物資源科学部 生命科学研究所	光制御型微生物工場の構築

②研究分担者

[illegible]

7 研究目的

1. 光制御型微生物工場の構築 高野らの研究では、光によって制御できる微生物大量生産系を開発する。従来法の微生物発現系では、大腸菌 pET システムに代表されるように人工化合物 IPTG や抗生物質を用いるケミカル誘導系が利用されてきた。しかしながら、これら化合物の利用は、合成時の高環境負荷・高価・再利用不可・多剤耐性菌の出現という大きな問題点がある。本問題を解決するために、本研究では、「LED 光源」を用いた光によって制御できる微生物生産系 LiEX を高度化する。LiEX システムは、光の特性により細胞機能スイッチングを「外部から非接触で」自由自在に制御できるメリットをもち、雑菌混入リスク“ゼロ”であり、繰り返し使用できる LED 光源を用いるため環境にやさしく、低コストといった従来型にない特徴を有し、いわば究極に理想的な「未来型バイオ生産系」である。本研究では特許出願したプロトタイプをさらに改良し、世界のバイオ生産を「光誘導タイプ」に変革させるゲームチェンジャー技術に成長させ、地球環境に配慮した次世代型のバイオプロダクション系を完成し、世界のバイオものづくりを本技術によって新しい時代に導くことを目標とする。

2. 組換え微生物によるフラボノイド生産 明石らの研究では、植物由来の高付加価値な希少天然物の微生物生産を検討する。これは最近「新しい資本主義実現会議」で提案された、重点的に研究開発を促す5分野の1つの「バイオものづくり」に関わる研究でもある。従来の有機合成による手法では、多大な労力とコスト、さらに環境への負荷が問題となっている。これまで生合成系の再構築による物質生産には、大腸菌や酵母が主に用いられてきたが、生産量が少ない・酵素タンパク質が発現しないなどイレギュラーな問題も多い。抗生物質など多様な代謝産物をつくる放線菌は、物質生産マシナリーとして最適であると期待される。植物・微生物を問わず生合成研究の到達点の1つは、スマートセルを用いた有用物質のバイオプロダクションといえる。本研究の「学術的問い」は、「高野が開発した革新的なシステムを利用して、汎用性の高いスマートセルをつくれるか」である。ホストでは本来生産しない植物代謝物を放線菌で生産できれば、他の代謝物にも利用できることが期待され、科学技術イノベーション創出に寄与できる。

8 研究概要

微生物と植物の機能を活用した「バイオものづくり」による持続可能な成長社会の実現に貢献するため、高野(代表者)は、環境負荷の低い「光制御型」微生物バイオ生産系「LiEX」を活用して産業上有用な物質を生産する未来型システムを開発する。一方、明石(分担者)は長年研究してきた植物由来の希少有用物質合成を担う遺伝子を人工合成し、高野らの LiEX システムを生産プラットフォームに利用することによって、従来の大腸菌・酵母では合成が困難であった植物物質の合成を実現する。これにより本学独自の次世代型バイオプロダクション工場「N.Biofactory」を創生し、フラボノイド類をはじめとする付加価値の高い物質生産系を構築し、連携企業との共同研究によって社会実装を目指す。

9 研究結果

1. 放線菌を宿主とする光誘導型ハイパー高生産系 “プラスミド型 LiEX 系” の完成

LitR/CarH ファミリーは、アデノシル B12 をベースとする光感受性の転写制御因子であり、非光合成細菌におけるカロテノイドの光応答生産を制御する。本研究では、ストレプトマイシン生産菌 *Streptomyces griseus* NBRC 13350 において、LitR とそのパートナーである ECF 型シグマ因子 LitS を用いた青緑色光誘導性過剰発現系を構築し、pLiEX(plasmid-based Light inducible Expression)システムと命名した(図1)。

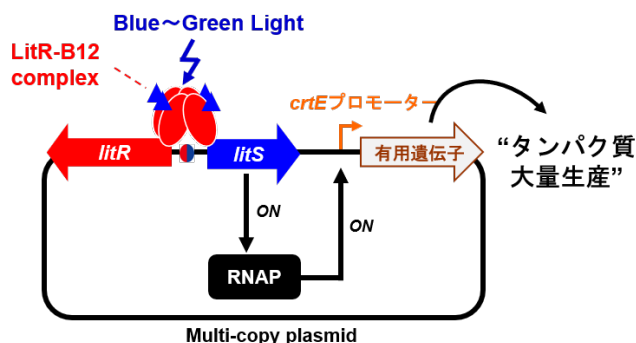


図1. プラスミド型光誘導発現システム” pLiEX”

構築したマルチコピープラスミド型 pLiEX は、放線菌組換え体による工業生産に長年利用されているマルチコピープラスミド pIJ101rep、チオストレプトン耐性遺伝子、*litR*、*litS*、および LitS 認識光誘導性 *crtE* プロモーターの 5 つの遺伝エレメントから構成される。pLiEX を導入した *S. griseus* 形質転換体は、カテコール-2, 3-ジオキシゲナーゼや β -グルクロニダーゼなどの細胞内レポーター酵素、ラッカーゼやトランスグルタミナーゼなどの細胞外分泌酵素、メラニン、フラビオリン、インジゴイジンなどの二次代謝産物を光依存的に大量生産した。さらに、色素性抗生物質であり、多数の生合成遺伝子によって合成されるアクチノロージン遺伝子クラスター全体を持つセファマイシン産生 *Streptomyces* sp. NBRC 13304 は、経路特異的アクチベーター *actII-ORF4* を持つ pLit19 シャトル型プラスミド導入後、光依存的アクチノロージン産生を示した。pLit19 に *S. phaeochromogenes* 由来 pJV1 プラスミドのコピー数増加に寄与する *sti* フラグメント(第2複製開始点)を挿入すると光感受性が向上し、弱い光照射下でも遺伝子発現が可能になった。さらに、構築した2種類の大腸菌-放線菌シャトル型プラスミドは、pLiEX と同様の能力を持つことがわかった。以上より、我々は、*S. griseus* NBRC 13350 および *Streptomyces* sp. NBRC 13304 の光遺伝学的に制御されたハイパー生産系の確立に成功し、研究成果を発表した。

[研究成果発表]

1. *Scientific Reports* (2024) Vol. 14, Article number: 25852
2. プレスリリース : <https://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~NUBScommon/release/20241108.pdf>

2. プラスミド型 LiEX システムの汎用性向上

これまでの解析において、プラスミドタイプ pLiEX システムが機能するモデル放線菌株は *S. griseus* NBRC 13350 株のみであり、その宿主域の狭さが問題であった。*Streptomyces* 属放線菌はおよそ 1,200 種が系統分類学的に正式同定されており、個々の種がユニークな生理活性物質を生産することが予想されている。宿主域の改善は必須であることから、光誘導性マルチコピープラスミドが安定して機能する *Streptomyces* 属放線菌株を探索した。KEGG データベースに完全ゲノム配列が公開されている *Streptomyces* 属放線菌 50 種を取り寄せ、接合伝達法を用いて、pGMLit19(pLit19 の大腸菌-放線菌シャトルプラスミドタイプ)にレポーター酵素 β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子をクローニングした pGMLit19-*gus* を各種放線菌に導入した結果、9 種で形質

転換体が得られた。それら形質転換体を明・暗条件で培養し、GUS 酵素生産を指標として LitR-LitS 系の機能を評価した。その結果、モデル株 *S. albus* J1074、セファマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. NBRC 13304、プラシノマイシン生産菌 *S. prasinus* NBRC 13479、ダプトマイシン生産菌 *S. roseosporus* NRRL 11379 の4株において GUS 生産の光誘導が認められた。とくに *S. albus* J1074 と *S. prasinus* NBRC 13479 の形質転換体においては極めて高い酵素生産が認められ、暗条件と比較して明条件ではそれぞれ約 11.5 倍、23.4 倍と高発現していることが確認された。この4株の細胞質タンパク質を SDS-PAGE/CBB 染色法によって検出したところ、GUS の推定分子量と一致するタンパク質バンドが検出された。以上より、*S. griseus* NBRC 13350 株に加えて、*S. albus* J1074 と *S. prasinus* NBRC 13479 においてプラスミドタイプ pLiEX システムが機能することが判明した

我々はゲノム情報をもとに小型高コピープラスミドを保有する 34 種の *Streptomyces* 属細菌株を見出し、放線菌-大腸菌シャトルプラスミドを構築した。これらのプラスミドを *S. albus* J1074、*S. griseus* NBRC 13350、*Streptomyces* sp. NBRC 13304 に導入し、形質転換効率を調べた。その結果、3 種類の放線菌宿主株のうち *Streptomyces* sp. NBRC 13304 と *S. albus* J1074 が特に高い形質転換効率を示した。また、我々が構築した 34 種類のプラスミドのうち 30 種類は安定的な複製を示した。菌体外分泌酵素ロイシンアミノペプチダーゼ（LAP）遺伝子をクローニングしたプラスミド群を構築し、

LAP 酵素生産を指標としてプラスミドのコピー数を解析した。その結果、18 種のプラスミド導入株において LAP の光依存的な高い菌体外生産が確認された（図 2）。また、LAP 酵素活性はプラスミドコピー数を反映していることが示唆された。

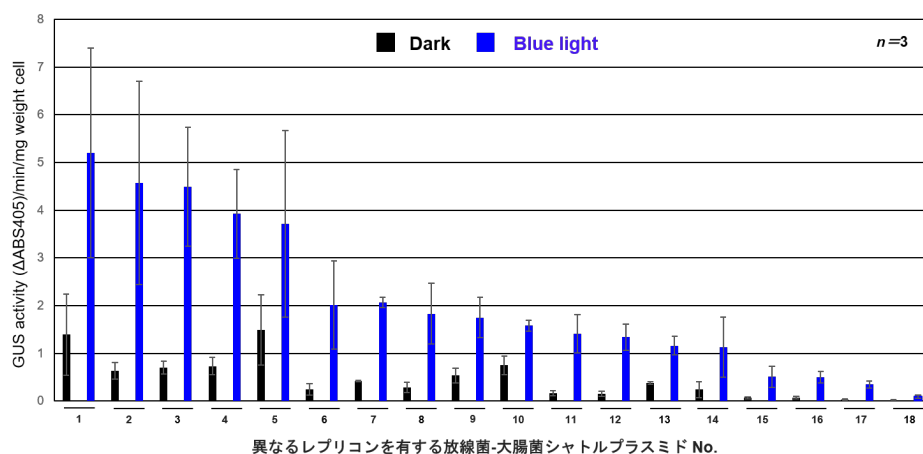


図2. 異なるレプリコンを有するプラスミドを用いたLAP酵素の光誘導発現

Streptomyces 属細菌の遺伝子組換え実験で使用される放線菌のプラスミドには、ローリングサークル型複製を行う高コピープラスミドとシータ型複製を行う低コピープラスミドが知られている。同一の複製制御システムを持っているプラスミドは、一般的に細胞内で安定的に共存することができない不和合性現象が知られている。そこで、異なる薬剤耐性マーカー遺伝子を導入した pUWLit19-*aphII* (カナマイシン耐性)、pUWB3416-*tsr* (チオストレプトン耐性)、pUWD41917-*aac(3)IV* (アプラマイシン耐性)、pUWFJ103-*hph* (ハイグロマイシン耐性) の計 4 種類のプラスミドを構築した（図 3）。これら 4 種プラスミドのアライメント解析を行った結果、複製を担う *rep* 遺伝子は互いに高い相同性を有していたため、同じ複製様式になると考えられ、不和合性のため同一細胞内で共存できないと予想された。しかし、これら 4 種の各プラスミドを接合伝達法によって順次導入した結果、予想外なことに *Streptomyces* sp. NBRC 13304 株の細胞内で 4 種プラスミドを共存させることに成功した。これは放線菌において 4 種類のプラスミドを共存させることに成功した初めての例である。本研究成果を本年度中に報文として発表予定である。

3. プラスミド LiEX システムを使った植物フラボノイド「naringenin」の高生産

アントシアニンなどのフラボノイド合成経路の重要な中間体であるナリングゲニンは、*p*-クマル酸を基質として、次の経路で合成される。4-coumarate-CoA ligase(4CL)による *p*-クマロイル CoA の合成、Chalcone synthase(CHS)によるナリングゲニンカルコンの合成、Chalcone isomerase(CHI)によるナリングゲニンの合成の反応が順次行われる。組換え放線菌を用いたナリングゲニンの生産に成功した例が報告されているが、その生産量が少ないため、必ずしも広く研究されていない。我々は、ゲノム情報をもとに放線菌がナリングゲニンの分解遺伝子群を有していること強く示唆するデータを得た。つまり、優れた化学工場として知られている放線菌がナリングゲニンを効率よく合成できないのは、分解系を持ち合わせているためであると予想された。また、スターター基質である *p*-クマル酸の分解系の存在も長年示唆されているが明らかになっていない。そこで、ナリングゲニン分解系を有していない放線菌をゲノム情報より見出し、それをホストに利用した。まず、4CL、CHS、CHI を上記の 2. で構築した異なる高コピープラスミドに導入し、これら 3 種類のプラスミドを保有する放線菌形質転換体を構築した。その形質転換体を *p*-クマル酸を添加した条件で 2 日間培養し、ナリングゲニンの生産を解析したところ、その顕著な生産が確認された。今後、大量生産を可能にする培地培養条件を検討する予定である。

4. 放線菌群で広く機能する光誘導型ハイパー高生産系の完成（ゲノム組込み型）

上述したようにマルチコピープラスミドを利用した光誘導性遺伝子高発現システム pLiEX を完成させ、その成果を発表した。しかし、*S. griseus* など一部の *Streptomyces* 属細菌でしか機能せず、その宿主範囲が極めて限定的という問題は解決できていなかった。ホストの検討や高コピープラスミドの検討を行ってきたが改善されていない。そこで、マルチコピープラスミドと同等の機能を有するゲノム組込み型の光誘導性発現系

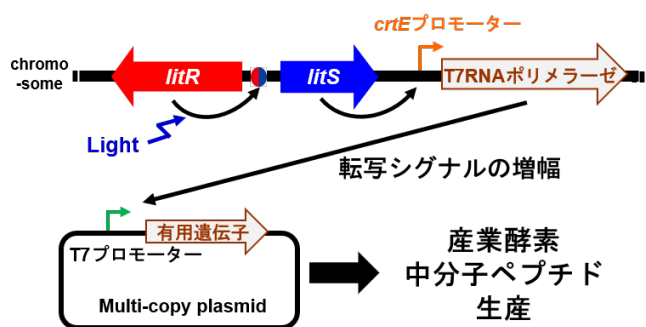


図3. ゲノム組込み型光誘導発現システム“iLiEX”

（iLiEX）の開発を進め、完成させるに至った（図 3）。この改良型 LiEX システムは、光センサー LitR、転写増幅モジュール T7 RNA ポリメラーゼ、ベクターをゲノム上に丸ごと組込むためのセリン型インテグラーゼを組み合わせで構築した。iLiEX システムは、*S. coelicolor*、*S. lividans*、*S. albus* J1074、*S. avermitilis* など多数の *Streptomyces* 属細菌でも機能し、最大の課題であった宿主域の問題を解決することができた。成功のカギは転写増幅モジュール T7 RNA ポリメラーゼを転写回路に導入したことであった。また、リボソーム結合部位の最適化により、マルチコピープラスミドタイプに匹敵する高い生産レベルが得られた。さらに、T7 RNA ポリメラーゼの機能を抑制する T7 リゾチーム遺伝子を導入することで、暗条件下での漏出發現も抑制され、厳密な制御が可能となった。さらに、iLiEX の機能を簡便に評価するために、蛍光タンパク質、色素合成酵素、発色タンパク質の光依存的な過剰発現にも成功し、寒天固体上で iLiEX の稼働を可視化することができた。また、ラッカーゼやトランスグルタミナーゼなどの有用分泌酵素の高生産にも

成功した。以上より、我々は *Streptomyces* 属細菌において広く機能するシングルコピーの光誘導性ハイパー発現系の開発に成功した。本研究成果を本年度中に報文として発表予定である。

5. 放線菌でのアントシアニン生合成系の再構築

フラボノイドの一つであるアントシアニンは、赤色から青色の色調を示す植物の代表的な色素である。アントシアニンはフェニルアラニンと酢酸から生合成されるが、一連の代謝経路と関与する酵素遺伝子は、すでに明らかにされている(図 4)。生成物を目で見えて判別できる利点があり、放線菌でのアントシアニン生産を試みた。

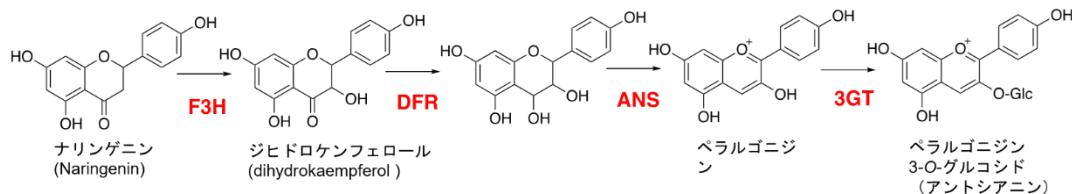


図4. アントシアニンの生合成

ANS, anthocyanidin synthase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; 3GT, anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase.

Flavanone 3-hydroxylase (F3H)は生合成の初期にはたらく酵素であり、*S*-naringenin から dihydrokaempferol の生成を触媒する。はじめにコドンの最適化の有無により、放線菌での物質の生産量に変化するかを調べた。シロイヌナズナ由来 *F3H* (*AtF3H*)と共に、大腸菌(*Ec-coF3H*)と放線菌(*Sg-coF3H*)にコドンを最適化した *F3H*を、放線菌発現ベクター(pTYM19 ΔNdeI-T7p-MCS)に導入した。それぞれストレプトマイシン生産放線菌 *Streptomyces griseus* NBRC 13350 株で発現させてラセミ体の naringenin を投与し、2 日後に dihydrokaempferol の生成物量を比較した。その結果、*Ec-coF3H* 発現株 (2.6 ± 0.5 mg/L culture)と比べ、*AtF3H*, *Sg-coF3H* 発現株 (5.4 ± 1.3 mg/L culture)では、約 2 倍高い生産量を示すことがわかった。このため *Sg-coF3H* 発現株について、経時的に培養液を回収し、生成物量を比較すると、ラセミ体の naringenin を投与後 2~3 日目に生産量は最大になり、その後減少することがわかった(図 5)。また投与した基質も培養 4 日後にはほとんど見られなかった。放線菌が基質や生成物を分解している可能性が示唆され、外来遺伝子を導入していないコントロールの放線菌に dihydrokaempferol を投与し、減少量を比較すると、培養 4 日後にはほぼ消失することがわかった(図 6)。放線菌がフラボノイドなどのポリフェノールを無作為に分解している可能性が示唆された。これは放線菌での物質生産の障害になる可能性があり、分解の原因となる酵素タンパク質のスクリーニングを現在検討している。また

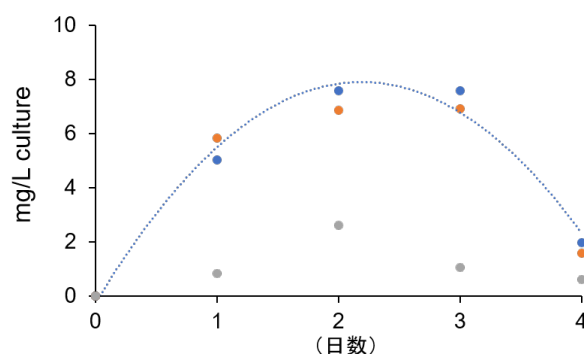


図5. *Sg-coF3H*発現株でのdihydrokaempferol生成量の経時変化

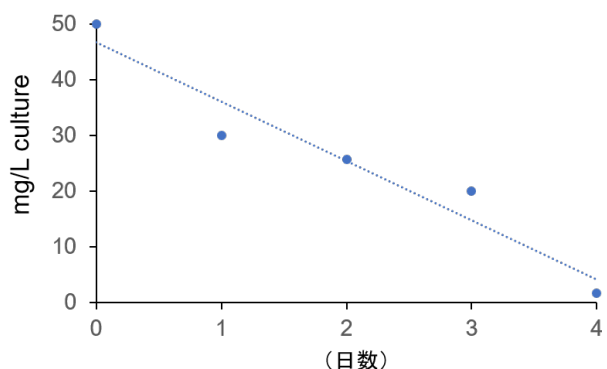


図6. 放線菌でのジヒドロケンフェロールの減少の経時変化

図 2 に示すように、培養ごとに生産量のばらつきが大きいことがわかった。これは液体培地で培養時に、放線菌が凝集して 1 mm 程度のペレット状になり、一定量の菌体を回収できないためだと考えられた。また凝集により、効率的に基質が放線菌内へ取り込まれないことも想定された。今後、凝集を防ぐために界面活性剤などを添加し、物質生産を試みる予定である。現在、放線菌でのアントシアニン生産のため、放線菌にコドン最適化した dihydroflavonol 4-reductase (DFR), anthocyanidin synthase (ANS)、anthocyanidin 3-glucosyltransferase (3GT) を組み込んだ放線菌を作成中であり、今後アントシアニン生産を試みる予定である。

6. Phenoxodiol 生産のための予備検討

イソフラブ-3-エン骨格を持つ phenoxodiol は、マメ科ハギ属 (*Lespedeza*) 植物が蓄積する化合物である。これは抗がん作用を示し、以前 phase III の臨床試験が行われていた。イソフラブ-3-エンは形式的には daidzein から IFR (isoflavone reductase)、I4R (2'-hydroxyisoflavanone 4-reductase)、isoflav-3-ene synthase (I3S) の反応によりつくられる (図 7)。しかしこれまで IFR は、2'-hydroxydaidzein から 2'-hydroxydihydrodaidzein を生成することは知られていたが、daidzein を基質とするかは知られていなかった。

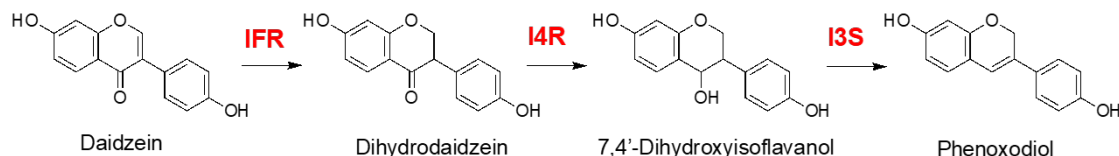


図7. Phenoxodiolの生成

I3S, isoflav-3-en synthase; I4R, 2'-hydroxyisoflavanone 4-reductase; IFR, isoflavone reductase.

微生物で新規生合成系を再構築する際には、複数の酵素遺伝子を同時に発現させ、中間代謝物を蓄積せずに、最終産物のみを効率的に生産させる必要がある。Phenoxodiol は希少な有用フラボノイドであり、次年度に放線菌での物質生産を検討するために、予備的に大腸菌での生産を試みた。はじめにダイズ IFR 発現大腸菌に基質 (daidzein) を投与し、*in vivo* での物質生産を検討すると、本来の基質の 2'-hydroxydaidzein の時と比べて 1/3 程度であったものの daidzein から dihydrodaidzein を生産 (100 ± 2.6 mg/L culture) することがわかった。次にダイズ由来 IFR、I4R、I3S を大腸菌発現ベクター (pET46) に組み込み、大腸菌 C41 株を形質転換した。この共発現株は、IPTG の添加時に基質の daidzein を加えて培養し、その後、培養液から生成物を回収して HPLC で分析した。その結果、中間の代謝物はほとんど検出されず、主要産物として phenoxodiol が確認された。LB 培地での 24 時間後の生産量は約 20 mg/L culture であった。大腸菌では一連の反応が効率的に進行することがわかり、今後 IFR、I4R、I3S 共発現放線菌を作成し、物質生産を試みる予定である。