

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19380048
 研究課題名（和文） 温暖化ガス削減をめざしたC1微生物の生存戦略と細胞機能の解明
 研究課題名（英文） Studies on cellular function of C1-microorganisms aiming at reduction of green house gas
 研究代表者
 阪井 康能（SAKAI YASUYOSHI）
 京都大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：60202082

研究成果の概要：

植物表層におけるメタンやメタノール資化性微生物の分布や生理生態を明らかにするとともに、温室効果ガス排出削減やこれらの炭素源を資源化するために必要な応用微生物学研究を行った。植物試料を分離源にメタンおよびメタノール資化性微生物のスクリーニングを行い、多くの分離源からメタン資化性細菌とメタノール資化性細菌を含む微生物コンソーシアムを取得した。また、葉上でのメタノール資化性酵母の生育にはメタノール代謝経路が重要であること、植物葉上には大量の微生物が利用可能なメタノールが存在することが明らかとなってきた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：メタン、メタノール、メタン資化性細菌、メタノール資化性細菌、メタノール資化性酵母、コンソーシアム、ホルムアルデヒド、ETBE

1. 研究開始当初の背景

メタンは CO₂ の数十倍の比活性をもつ温室効果ガスであり、その温暖化効果に対する寄与は、CO₂ の3分の1、フロンガスの約1.5倍にも達する。過去100年間に地球上のメタン濃度は、CO₂ と同様に急上昇し、近年でもその増加が危惧されている。最近、莫大な量のメタン(～2.4億t/年)が、様々な植物から、好氣的条件下、光合成とともに発生していることが報告され、植物細胞壁成分でメチルエ

ステル基をもつペクチンが、植物におけるメタン生成の基質であることが示唆された。また植物葉からはメタノールやホルムアルデヒドが放出されることも知られている。これは従来、植物による緑化を中心に行われてきた地球温暖化対策に一石を投じるとともに、植物からのメタン・メタノールなどのC1化合物の発生を最小限に抑制するための手段を開発することが急務であることも示している。

一方、メタンやメタノールは、天然ガスより得られる安価な炭素資源としても注目され、環境中へのメタン排出を削減し、CO₂へと燃焼することなく C1 化合物から有用物質を生産して資源化することも、エネルギー・資源問題を解決するために重要な課題である。

メタンやメタノールなどの還元型 C1 化合物を単一の炭素源として生育することができる C1 微生物については、我々を含む内外のグループにより、その C1 代謝経路の解明など、C1 化合物を炭素源として生育させたときの生理学研究が進められてきた。一方、地球環境には、メタンサイクルと呼ばれるメタン・CO₂間の年間数十億 t にも及ぶ炭素循環が C1 微生物により行われている。また、石油に代替する安価な炭素源を利用する微生物として、メタノール資化性細菌を用いたバイオプラスチックや CoQ 生産、メタノール資化性酵母を宿主とした異種遺伝子発現とそれを用いた医薬・有用酵素の生産などが工業化されている。メタン酸化酵素であるメタンモノオキシゲナーゼ(MMO)についても、多種多様な基質を酸化できることから、その生体触媒としての利用についても長年にわたり検討されてきた。

我々の研究室で最初に分離されたメタノール資化性酵母は、しばしば果皮などの植物体から分離されることが知られていたが、ペクチンとそのメチルエステル体を資化できること、本酵母が植物表層において植物からの免疫作用を逃れて生育することをこれまでに認めている。一方、欧米グループによりメタノール資化性細菌 *Methylobacterium exotroquens* が植物葉上で生育することが報告されている。これらの事実は、メタンやメタノールの植物葉からの放出を C1 微生物により抑制できる可能性をも示唆している。しかし、植物体上における C1 微生物の生態と生理については、何も明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、メタンやメタノールなどの C1 化合物を中心に、ガス状または揮発性有機化合物(VOC)を資化する微生物について、その自然界における生態と生理を明らかにするとともに、地球温暖化削減やこれらの炭素源を資源化するために必要な応用微生物学研究を行う。具体的には以下の 3 つの項目の研究を行った。

(1) 植物表層における C1 微生物の生態・生理

本研究項目では、様々な植物を分離源としてメタンおよびメタノール資化性微生物を広くスクリーニングし、分離・同定・MMO など代謝系遺伝子のクローン化や、塩基配列

上新規な MMO についてはその酵素学的諸性質について検討すると同時に、単離した C1 微生物の植物体での生育を追跡し C1 微生物の植物表層での生態と生理を明らかにする。

(2) 植物において発現される C1 微生物細胞機能の解明と利用

メタノール資化性微生物(酵母・細菌)については植物表層で生育できることが明らかとなってきた。我々がこれまでの C1 微生物研究で用いてきた様々な遺伝子破壊株や蛍光標識細胞を植物表層で生育させることにより、C1 微生物の植物表層での生存にとって重要な機能を特定して、将来、植物からの温暖化ガス発生が C1 微生物の生育により抑制されることを検証するための基盤的研究を行う。

(3) 揮発性有機化合物(VOC)の微生物代謝と環境保全技術への利用

本研究では C1 化合物以外の VOC として、ガソリンへの添加剤として利用されている Ethyl *t*-butyl ether (ETBE)の分解を司る微生物代謝機能の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 植物表層における C1 微生物の生態・生理

自然界、特に植物表層にどのような C1 微生物が生息しているかを知るため、植物体サンプルより、メタンまたはメタノールを単一の炭素源として含む培地を用いた集積培養によりスクリーニングした。植物表層に生息する C1 微生物コンソーシアムに、どのような C1 微生物が生息しているのかを明らかにするため、16S rRNA やメタンモノオキシゲナーゼ遺伝子(*pmoA*)を含む DNA 断片を PCR 増幅した後、DGGE 解析、シーケンス解析を行った。

(2) 植物において発現される C1 微生物細胞機能の解明と利用

メタノール資化性酵母のメタノール代謝系酵素遺伝子(*AOD1/DAS1/FLD1/FDH1*)では、それぞれ C1 化合物に対する応答が異なっていること、すなわち、*DAS1* はメタノールによってのみ、*AOD1* は炭素源制限下において、*FLD1* と *FDH1* は、それぞれ、ホルムアルデヒド・ギ酸によって誘導されることを明らかにしている。このメタノール代謝系酵素遺伝子群が、植物表層で発現しているのかどうかを調べるため、各酵素遺伝子のプロモーター支配下に蛍光タンパク質を発現させて検定した。また、これらのメタノール代謝系酵素遺伝子破壊株が、植物表層で生育可能かどうかを検討した。

(3) VOC の微生物代謝と環境保全技術への利用

土壌試料から ETBE を分解する菌株をスクリーニングした。取得した菌株における ETBE 分解経路を検証し、初発酸化に関わる酵素遺伝子をクローン化した。また実際の土壌中での ETBE 分解について検討した。

4. 研究成果

(1)植物表層における C1 微生物の生態・生理
①メタン・メタノール資化性 C1 微生物のスクリーニング

植物試料を分離源にメタンおよびメタノール資化性微生物のスクリーニングを行い、多くの分離源からメタン資化性細菌とメタノール資化性細菌を含む微生物コンソーシアムを取得した。メタンモノオキシゲナーゼ遺伝子 (*pmoA*)、メタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*mxnA*)、16S rRNA 配列の解析を行ったところ、多様な C1 微生物が植物表層に棲息していることがわかった。また多くのサンプルにメタン資化性菌とメタノール資化性細菌が共存していることがわかった。

②メタン資化性菌とメタノール資化性菌の共生関係

メタン資化性微生物コンソーシアムより単離したメタン資化性の *Methylocystis* 属性細菌 (MC) とメタノール資化性の *Methylobacterium* 属性細菌 (MB) が共生関係にあり、MB はメタンを炭素源として単独では生育できないものの、コンソーシアム中では生育できること、MC はメタノールによって生育が阻害されるが、コンソーシアム中では MB がメタノールを消費することで MC が生育できるようになることがわかった (図 1, 2)。

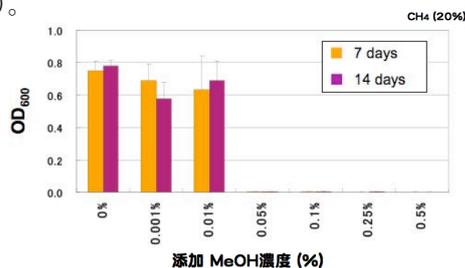


図 1. メタノールによる MC の生育阻害

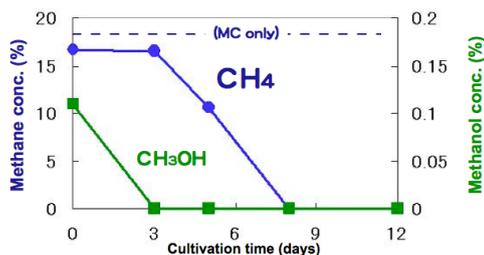


図 2. メタノール存在下での MC+MB によるメタンとメタノールの消費

③メタン資化性微生物コンソーシアム中の菌叢解析とメタン資化能の評価

いくつかのメタン資化性微生物コンソーシアムからメタン資化性菌、メタノール資化性菌、その他の細菌を単離し、それぞれを混合した培養系でメタン消費能を評価した。いくつかの組合せでは、元のコンソーシアムよりも高いメタン消費能が認められ、メタン資化性コンソーシアムを *in vitro* で再構築することに成功した。

(2) 植物において発現される C1 微生物細胞機能の解明と利用

①植物表層におけるメタノール資化性酵母 C1 代謝系酵素の発現

メタノール資化性酵母においてメタノールで誘導されるメタノール代謝経路遺伝子やペルオキシソーム形成制御関連遺伝子のプロモーター支配下に GFP を発現する株を作成し、植物 (シロイヌナズナ) 葉上に接種して、その生育および蛍光を観察した。いずれのメタノール誘導性プロモーターでも GFP の発現が見られたことから、葉上でのメタノール資化性酵母の生育時にはメタノール代謝経路酵素が誘導されていること (図 3)、また植物葉上には微生物が利用可能なメタノールが存在することが示唆された。

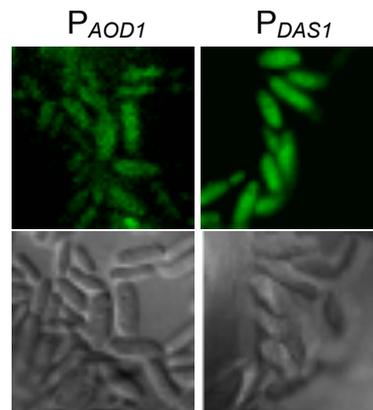


図 3. 植物表層での *AOD1*, *DAS1* プロモーター支配下の GFP 発現

② 植物表層での生育に重要なメタノール資化性酵母細胞機能

メタノール資化性酵母のメタノール代謝やペルオキシソーム形成・分解に関わるタンパク質の遺伝子破壊株を植物表層に接種した場合の生育を評価した。図 4 のように *AOD1* 破壊株では葉上での生育が明らかに弱っており、植物表層での生育にメタノール代謝が重要であることがわかった。また、メタノール代謝に加え、オートファジー経路が植物表層での生存時に機能している可能性も示唆された。

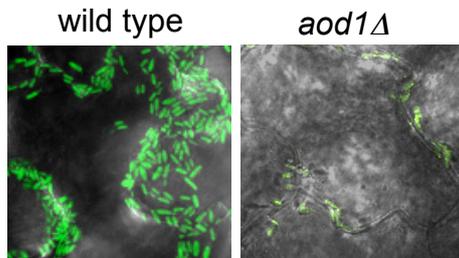


図4. *AOD1* 破壊株の植物表層での生育

③ 酵母メタノール代謝におけるストレス応答機構

メチロトロフ酵母が植物表層で生育する際には、酵母細胞は様々なストレスに曝されていると考えられる。酸化ストレス応答転写因子 *Yap1p* の酵母メタノール代謝における役割を明らかにした。メタノール代謝時には *Yap1p* は一時的に核に局在し、抗酸化酵素やグルタチオン酸化還元系の酵素遺伝子の転写を制御していることがわかった。また、メタノール代謝時に生じる過酸化水素などの活性酸素種やホルムアルデヒドの解毒において、グルタチオン酸化還元系、特にグルタチオンレダクターゼによる還元型グルタチオンの再生が極めて重要であることを明らかにした。

④ 細菌由来リブ्रोースモノリン酸経路の植物体での機能発現

メチロトロフ細菌のホルムアルデヒド固定系路（リブ्रोースモノリン酸経路）の酵素 *HPS* と *PHI* の融合酵素の創製に成功した。*HPS* と *PHI* を同時に植物内に発現させた場合に、ホルムアルデヒドを吸収し、同時に耐性が付与されることを明らかにしていたが、*HPS-PHI* 融合遺伝子を利用することにより、形質転換過程を効率化することができ、ホルムアルデヒド耐性を指標としたマーカー遺伝子としても利用可能となる。本融合酵素を植物に導入し、葉緑体あるいは細胞質で発現させたところ、細胞質で発現させるよりも葉緑体で発現させた方が、ホルムアルデヒド耐性が高いことがわかった。

(3) VOC の微生物代謝と環境保全技術への利用

ガソリンへの添加が開始された *ETBE* を分解する菌株を土壌よりスクリーニングした。2次元電気泳動により *ETBE* 添加時に誘導されるタンパク質を同定し、遺伝子をクローニングしたところ、*P450* モノオキシゲナーゼをコードしていることがわかった。このことから、*P450* モノオキシゲナーゼを初発反応とする分解経路を推定した。また取得した分解菌を実際の土壌サンプルに添加して、土壌中での *ETBE* 分解能を評価したところ、分

解菌の添加によりその分解が促進されることが確認された。

(4) その他の関連成果

植物病原性カビの植物への感染樹立に、*Atg26* が関与する選択的ペルオキシソーム分解（ペキシソファジー）が必要であることを明らかにした。これはペキシソファジーの高次機能の最初の例である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計8件）

- ① Yano, T., H. Yurimoto, and Y. Sakai. Activation of the oxidative stress regulator *PpYap1* through conserved cysteine residues during methanol metabolism in the yeast *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press (2009) 査読有
- ② Asakura, M., S. Ninomiya, M. Sugimoto, M. Oku, S. Yamashita, T. Okuno, Y. Sakai, and Y. Takano. *Atg26*-mediated pexophagy is required for host invasion by the plant pathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Cell*, 21, 1291-1304 (2009) 査読有
- ③ Yano, T., E. Takigami, H. Yurimoto, and Y. Sakai. The *Yap-1* regulated glutathione redox system curtails the accumulation of formaldehyde and reactive oxygen species in methanol metabolism of *Pichia pastoris*. *Eukaryot. Cell*, 8, 540-549 (2009) 査読有
- ④ Yurimoto H. and Y. Sakai. Methanol-inducible gene expression and heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 53, 85-92 (2009) 査読有
- ⑤ 由里本博也、折田和泉、阪井康能、アーキアにおけるホルムアルデヒド固定酵素群の生理機能、バイオサイエンスとインダストリー、66, 447-449 (2008) 査読無
- ⑥ Sasano, Y., H. Yurimoto, M. Yanaka, and Y. Sakai. *Trm1p*, a $Zn(II)_2Cys_6$ -type transcription factor, is a master regulator of methanol-specific gene activation in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Eukaryot. Cell*, 7, 527-536 (2008) 査読有
- ⑦ Orita, I., N. Sakamoto, N. Kato, H. Yurimoto, and Y. Sakai. Bifunctional

enzyme fusion of 3-hexulose-6-phosphate synthase and 6-phospho-3-hexuloisomerase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76, 439-445 (2007) 査読有

- ⑧ Sasano, Y., H. Yurimoto, and Y. Sakai. Gene-tagging mutagenesis in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *J. Biosci. Bioeng.*, 104, 86-89 (2007) 査読有

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① Yano, T., E. Takigami, H. Yurimoto, and Y. Sakai. Importance of glutathione redox system and its regulation in yeast methanol metabolism. The 12th International Congress on Yeasts. August 11-15, 2008. Kyiv, Ukraine.
- ② Sakai, Y. Syntrophic life style of C1-microorganisms on plant leaves. Gordon Research Conference on Molecular Basis Of Microbial One-Carbon Metabolism. July 20-25, 2008. Lewiston, ME, USA.
- ③ Yurimoto, H. Physiological role of RuMP pathway enzymes and their application. Gordon Research Conference on Molecular Basis Of Microbial One-Carbon Metabolism. July 20-25, 2008. Lewiston, ME, USA.

6. 研究組織

(1)研究代表者

阪井 康能 (SAKAI YASUYOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：60202082

(2)研究分担者

由里本 博也 (YURIMOTO HIROYA)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：00283648

(3)連携研究者

該当無し