

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780058
 研究課題名 (和文) 微生物の C1 化合物代謝の分子基盤と遺伝子発現制御機構の解明
 研究課題名 (英文) Molecular basis of one-carbon metabolism of microorganisms and the regulatory mechanism of the gene expression
 研究代表者
 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

研究成果の概要：

酵母メタノール誘導性遺伝子発現に関わる転写因子を新たに取得し、Trm1 がメタノール特異的誘導、Trm2 がグルコース脱抑制に関わる転写因子として機能していることを明らかにした。枯草菌のホルムアルデヒド応答性遺伝子発現制御機構を利用し、ホルムアルデヒドを検出できるセンサー細胞を開発した。メタノール資化性細菌のホルムアルデヒド固定経路の酵素 (HPS, PHI) を人工的に融合した二機能性酵素を創製し、ホルムアルデヒド資化性や耐性を異種生物に付与することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

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：メタノール、ホルムアルデヒド、*Candida boidinii*、プロモーター、リブローズモノリン酸経路、*Mycobacterium gastris*、HPS、PHI

1. 研究開始当初の背景

ホルムアルデヒドは、メタンやメタノール、メチルアミンなどの C1 化合物を利用する微生物 (メチロトロフ) の多様な代謝経路において、エネルギーを得るための酸化経路と細胞構成成分合成のための資化経路の分岐点に位置する重要な化合物である。このようにメチロトロフの C1 化合物代謝は、細胞毒性の高いホルムアルデヒドが中心に位置していることが特徴であり、メチロトロフ

がホルムアルデヒドの細胞内蓄積をいかにして最小限にとどめているかを知ることは、微生物の C1 化合物代謝を理解する上で重要である。

一方、自然界では CO₂ にして約 15～20 億トン/年に及ぶ炭素資源がメタンと CO₂ の間で循環しており (メタンサイクル)、メタンから CO₂ への酸化を担っているのがメチロトロフである。自然界にはメタンやメタノールに加え、ペクチンやリグニンなどのメチ

ル基やメトキシ基を持つ様々な化合物が広く大量に存在しており、これらの利用には原核微生物から真核微生物までの多様なメチロトロフが関わっている。メタンやバイオマスから取り出せるメタノールは循環型炭素資源であるとともに、食糧と競合しない微生物培養原料としても非常に有望であり、メチロトロフの工業利用の観点からも、ホルムアルデヒドを中心とする C1 化合物代謝の分子基盤は解明すべき重要課題である。

我々は、メチロトロフ酵母では主に *Candida boidinii* を用い、メタノール代謝系の酵素化学的解析や遺伝子破壊株を用いた解析により、メタノール代謝、特にホルムアルデヒド酸化経路の生理的意義を明らかにしてきた。さらに本酵母による異種遺伝子発現やこれに用いるメタノール誘導性プロモーターの解析を行ってきた。しかし他のメチロトロフ酵母を含めてもメタノールやホルムアルデヒド誘導性遺伝子発現の分子機構に関する研究は未だ未発展であり、本研究はその先駆的なものであると言える。

我々はさらに、メタノール誘導性遺伝子プロモーターの発現制御様式を詳細に調べ、メタノール代謝関連酵素の遺伝子発現が急激なホルムアルデヒドの蓄積を起ささないように巧みに調節されていること、特にホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ (FLD) 遺伝子の発現は他のメタノール代謝の酵素と異なり、グルコースによるカタボライト抑制を受けず、ホルムアルデヒドによって誘導されることを明らかにした。

一方、細菌のホルムアルデヒド固定経路のひとつであるリブローズモノリン酸経路の2つの鍵酵素 (3-ヘキシユロース-6-リン酸シンターゼ: HPS, 6-ホスホ-3-ヘキシユロイソメラーゼ: PHI) についても、酵素化学的諸性質や遺伝子構造と発現制御について解析を行い、HPS/PHI がメチロトロフ細菌だけでなく、非メチロトロフ細菌やアーキアにも存在すること、細菌では HPS と PHI がオペロンを形成していることを見出した。さらに非メチロトロフ性の枯草菌では *hps*, *phi* オペロンに隣接する新規 DNA 結合タンパク質 (HxlR) が本オペロンの転写活性化因子であることを明らかにした。またアーキアにおける HPS/PHI の機能に着目し、超好熱性アーキア *Pyrococcus horikoshii* で HPS と PHI が融合酵素として存在し、二機能性の活性型酵素であることを明らかにした。ペントースリン酸経路が不完全なアーキアにおいては、リブローズモノリン酸経路の逆反応が核酸の前駆体となるリボース 5-リン酸の生合成に寄与していることを酵素の触媒機能と遺伝子破壊株の解析により、初めて明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、C1 化合物に応答して発現する遺伝子発現制御機構について、酵母と細菌を用いてその機構を分子レベルで明らかにし、得られた知見を有用酵素生産や C1 化合物検出細胞の構築に展開した。併せて、細菌およびアーキアに分布するホルムアルデヒド固定酵素の構造学的解析と応用機能開発を行った。具体的には以下の3項目の研究を行った。

(1) 酵母の C1 化合物応答性遺伝子プロモーターの解析と転写因子の探索

メチロトロフ酵母のメタノール誘導性遺伝子発現に関わる転写因子として既已取得していた *Trm1* に加え、本研究で新規に取得した *Trm2* について、転写因子としての特性やメタノール誘導性遺伝子発現における機能や重要性、*Trm1* との関連性について解析した。また、いくつかのメタノール誘導性プロモーターについてこれまで決定した *cis-element* を様々な組合せや個数で融合した新奇人工プロモーターを作成し、メタノール誘導性の強さや早さを比較した。

(2) 細菌のホルムアルデヒド応答性遺伝子発現制御機構の解明とその利用

ホルムアルデヒドに応答して *hps*, *phi* オペロンが誘導される非メチロトロフの枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を対象とし、遺伝子破壊株ライブラリーやトランスポゾン変異を用い、ホルムアルデヒドによって *hps*, *phi* オペロンが誘導されない株を網羅的にスクリーニングし、ホルムアルデヒド応答性遺伝子発現の制御因子を探索した。また *hps* オペロン上流のホルムアルデヒド応答領域の支配下に蛍光タンパク質を発現する株を構築し、ホルムアルデヒドセンサー細胞を開発した。

(3) HPS/PHI 融合酵素の触媒機能と3次元構造解析

一部の超好熱性アーキアでは HPS と PHI は融合酵素として存在しており、触媒活性も融合型の方が高くなっている。アーキア由来の融合酵素は常温では機能しないため、本酵素の応用利用を考えた場合、常温で機能する融合酵素を開発する必要がある。そこで常温で機能する HPS-PHI 人工融合酵素を作成し、その触媒機能の評価と異種生物への導入を行った。

一方、HPS はその1次構造から OMPDC (orotidine monophosphate decarboxylase) suprafamily に属するとされるが、HPS についてのみ立体構造が明らかにされていない。本研究では、メチロトロフ細菌の HPS 立体構造を解析した。

3. 研究の方法

(1) 酵母の C1 化合物応答性遺伝子プロモーターの解析と転写因子の探索

主にメチロトロフ酵母 *Candida boidinii* を用い、gene-tagging 変異法により、メタノール誘導性遺伝子発現に関わる因子をスクリーニングした。メタノールやホルムアルデヒドによって誘導される遺伝子 (*AOD1*, *DAS1*, *FLD1*, *FDH1*) のプロモーター支配下にレポーター遺伝子として出芽酵母の酸性ホスファターゼ遺伝子を発現する株を用い、レポーター活性が低下した変異株を多数取得した。

既に取得していた転写因子 *Trm1* に加え、本研究で新たに取得した *Trm2* について、GFP 融合タンパク質による細胞内局在解析、クロマチン免疫沈降解析、さらに遺伝子破壊株を用いた解析を行った。

複数のメタノール誘導性遺伝子プロモーターの *cis*-element を組み合わせた人工プロモーターを作成した。

(2) 細菌のホルムアルデヒド応答性遺伝子発現制御機構の解明とその利用

枯草菌を対象とし、遺伝子破壊株ライブラリーのなかから、ホルムアルデヒドによって HPS 活性が誘導されない株をスクリーニングした。これと並行して、*hps* オペロンのプロモーター領域に *lacZ* をレポーター遺伝子として連結した株を用い、トランスポゾン変異法により転写活性の低下した株をスクリーニングした。

枯草菌の *hps* オペロンのプロモーター領域 (ホルムアルデヒド応答領域) の支配下に GFP を発現する株を構築し、様々なホルムアルデヒド濃度の培地上での蛍光輝度をもとに、ホルムアルデヒドの検出・定量を試みた。

(3) HPS/PHI 融合酵素の触媒機能と 3 次元構造解析

メチロトロフ細菌 *Mycobacterium gastri* MB19 株由来の HPS, PHI の人工融合酵素遺伝子を大腸菌内で発現させ、触媒機能を解析した。さらに本融合酵素をセリン経路をもつメタノール資化性菌 *Methylobacterium extorquens* AM1 株に導入し、ホルムアルデヒド耐性や資化能が付与できるか、生育促進効果がみられるかなどについて検討した。

M. gastri MB19 株由来の HPS の結晶構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) 酵母の C1 化合物応答性遺伝子プロモーターの解析と転写因子の探索

①メタノール誘導性遺伝子発現変異株のスクリーニング

C. boidinii における変異株取得法である gene-tagging 変異法を最適化し、メタノール誘導性プロモーター活性が低下した変異株を多数取得した。

②酵母のメタノール誘導性遺伝子発現に関わる転写因子の解析

また既に取得していたメタノール誘導性転写活性化因子 *Trm1p* のメタノール誘導性遺伝子発現における機能を明らかにした。メタノール誘導はグルコース脱抑制とメタノール特異的誘導の 2 種類の制御を受けると考えられるが、*Trm1p* はこのうちメタノール特異的誘導に関わる転写活性化因子であることを明らかにした。

Gene-tagging 変異から得られた変異株の解析の結果、新奇転写因子 *Trm2* を取得した。様々な培地での細胞内局在解析や遺伝子破壊株の解析から、*Trm2p* がグルコース脱抑制に関わる転写活性化因子であることを明らかにした。*trm1* Δ *trm2* Δ 二重遺伝子破壊株を用いた解析から、*Trm2* によるグルコース脱抑制が起こった上で *Trm1p* によるメタノール特異的な誘導が引き起こされるモデルが考えられた (図 1)。

さらに、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。

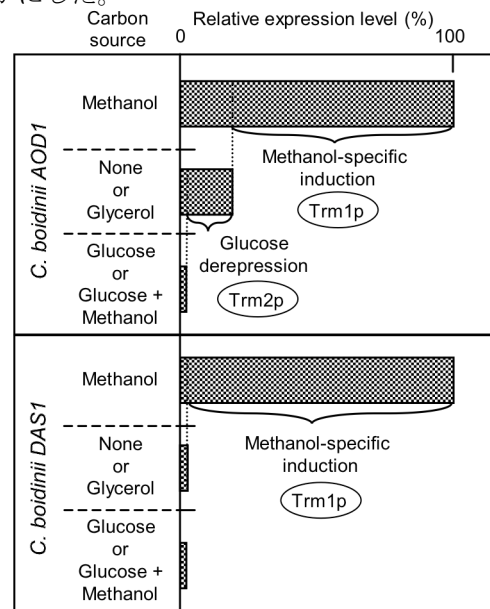


図 1. メタノール誘導性遺伝子発現におけるグルコース脱抑制とメタノール特異的誘導

③新奇人工プロモーターの開発

いくつかのメタノール誘導性プロモーターについてこれまで決定した *cis*-element を様々な組合せや個数で融合した人工プロモーターを作成し、従来よりも強力なメタノール誘導性を持つプロモーターを取得し、サイズの縮小化にも成功した。

(2) 細菌のホルムアルデヒド応答性遺伝子発現制御機構の解明とその利用

① 枯草菌のホルムアルデヒド応答性遺伝子発現に関わる因子の探索

ホルムアルデヒドに応答して発現する枯草菌の *hps*, *phi* オペロンの発現を指標に、遺伝子破壊株ライブラリーやトランスポゾン変異を利用して、ホルムアルデヒド応答性遺伝子発現に関わる因子を探索した。候補遺伝子は複数取得できたが、該当遺伝子単独破壊では表現型が認められなかった。

② ホルムアルデヒドセンサー細胞の開発

枯草菌の *hps*, *phi* オペロンのホルムアルデヒド応答領域の支配下に GFP を発現する株を構築した。発現カセットやホルムアルデヒド誘導方法、培養条件を最適化することにより、平板培地中のホルムアルデヒドの検出・定量が可能になったことがわかった。ホルムアルデヒドセンサー細胞を構築した。今後、環境中のホルムアルデヒドの検出・定量への利用が期待できる。

(3) HPS/PHI 融合酵素の触媒機能と 3 次元構造解析

① HPS-PHI 人工融合酵素の創製

M. gastris MB19 株由来の HPS と PHI の人工融合酵素を作成しこれを大腸菌で発現させたところ、両酵素活性を示すとともに、触媒効率が向上し、さらにホルムアルデヒド耐性が向上することがわかった。

さらに本融合酵素を、ホルムアルデヒド固定系路としてセリン経路をもつメタノール資化性菌 *M. extorquens* AM1 株に導入したところ、メタノール資化能とホルムアルデヒド耐性が高まった。

② HPS/PHI 融合酵素の 3 次元構造解析

M. gastris MB19 株の HPS の結晶化を行い、X 線構造解析を行った。OMPDC supra family と類似の立体構造を持つことがわかった。

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 9 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 Yurimoto H. and Y. Sakai. Methanol-inducible gene expression and heterologous protein production in the

methylophilic yeast *Candida boidinii*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 53, 85-92 (2009) 査読有

③ Yurimoto, H. Molecular basis of methanol-inducible gene expression and its application in the methylophilic yeast *Candida boidinii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 793-800 (2009) 査読有

④ 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

⑤ Egawa, K., H. Shibata, S. Yamashita, H. Yurimoto, Y. Sakai, and H. Kato. Overexpression and purification of rat peroxisomal membrane protein 22, PMP22, in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, 64, 47-54 (2009) 査読有

⑥ 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

⑦ Sasano, Y., H. Yurimoto, M. Yanaka, and Y. Sakai. Trm1p, a Zn(II)₂Cys₆-type transcription factor, is a master regulator of methanol-specific gene activation in the methylophilic yeast *Candida boidinii*. *Eukaryot. Cell.*, 7, 527-536 (2008) 査読有

⑧ 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

⑨ Sasano, Y., H. Yurimoto, and Y. Sakai. Gene-tagging mutagenesis in the methylophilic yeast *Candida boidinii*. *J. Biosci. Bioeng.*, 104, 86-89 (2007) 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し