

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22310046

研究課題名（和文）微生物における C1 化合物代謝制御の分子基盤に立脚した環境技術開発

研究課題名（英文）Development of environmental technology based on molecular basis of microbial one-carbon metabolism

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（和文）：メタンやメタノール、ホルムアルデヒドなどの C1 化合物を利用する微生物の C1 化合物代謝制御の分子基盤に立脚した環境技術開発を目的とする研究を行った。ホルムアルデヒド固定を触媒する Hps-Phi 融合酵素をメタン資化性細菌、メタノール資化性細菌、植物で発現に成功した。また、メタノール資化性酵母のホルムアルデヒド応答性遺伝子発現に関わる因子を取得し、その機能を解明した。

研究成果の概要（英文）：In order to develop environmental technology regarding C1 compounds, such as methane, methanol and formaldehyde, we have studied molecular basis of C1 metabolism and its application. For example, we successfully expressed bacterial formaldehyde-fixing enzyme, Hps-Phi, in methanotrophs, methylotrophs, and plants. Furthermore, we revealed molecular functions of novel factors involved in yeast formaldehyde-responsive gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：メタン、メタノール、ホルムアルデヒド、C1 微生物、メタン資化性細菌、メタノール資化性酵母、メタノール資化性細菌、代謝制御

1. 研究開始当初の背景

還元型 C1 化合物であるメタン、メタノール、ホルムアルデヒドは、多様な環境中に広く存在しているが、これらの化合物は地球環境や人体に少なからず影響を及ぼすことが知られている。

メタンは CO₂ の約 20 倍の比活性、約 25% の寄与率をもつ温室効果ガスであり、過去 100 年間の大気中メタン濃度は 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。メタンは地球上の多様な環境から放出されているが、人為的な発生源（水田、牧畜など）からの放出量が 7 割近くを占める。また 2006 年には、植物から直接メタンが放出されていることも報告され、大気中メタンのモニタリングや放出機構、人為的発生源からの排出削減技術に関する研究が多面で推進されている。

メタノールは、自然環境中では植物（ペクチンのメチルエステル基が主な起源）から年

間 1 億トンほど放出されているが、工業的には、天然ガスやバイオマスから得られる合成ガス (CO, H₂) から合成されている。高純度で比較的簡便に合成でき、また輸送や取り扱いにおける利便性に加え、バイオエタノールとは異なり食料と競合しないことなどから、石油・石炭に替わるエネルギー資源、炭素資源として、さらには環境負荷の低い循環型物質生産体系の基幹物質として近年注目されている。特に欧米では、天然ガス、バイオマス、CO₂ など様々な炭素資源から化学的方法でメタノールに導き、エネルギー源の他、燃料電池、化学合成品の原料として利用し、メタノールを中心とした低環境負荷型・資源循環型の工業体系「Methanol Economy」を構築することが提唱されている。

ホルムアルデヒドは極めて毒性が高く、発癌性も指摘されている化合物である。自然環境中ではメタノールの酸化の他、植物由来のリグニン分解過程で生じる。工業的にはメタノールを酸化して合成され、接着剤、塗料、防腐剤等に含まれており、特に建築材料に広く用いられている。しかし、建材から空気中に放出されると、低濃度でも人体に悪影響を及ぼすことから、いわゆる「シックハウス症候群」の原因物質の一つとされている。このため、厚生労働省が室内のホルムアルデヒド濃度を 0.08 ppm 以下と定めたり、国土交通省が建材から放出されるホルムアルデヒドの量によって建材を分類したり、発散量を制限したりするなどの規制措置がとられている。

一方、自然界ではメタンサイクルと呼ばれる大規模な炭素循環があり、メタンと CO₂ 間の炭素循環量は CO₂ 量にして年間 15~20 億トンにも及ぶ。また自然界には還元型 C1 化合物を炭素源として生育する微生物 (C1 微生物) が広く存在する。メタンサイクルにおいてメタンから CO₂ への酸化を担うのがこの C1 微生物であり、C1 微生物は地球規模での炭素循環に大きく貢献している。

2. 研究の目的

C1 微生物における C1 化合物代謝の最大の特徴は、細胞毒性の高いホルムアルデヒドが代謝中間体となっている点である。このため C1 微生物は、細胞内にホルムアルデヒドを蓄積させない巧妙な細胞機能を持っている。メタノール資化性細菌や酵母を用いた、メタノールを培養原料とする有用物質・タンパク質生産プロセスには、既に実用化されているものもあるが、このプロセスでは、如何にしてホルムアルデヒドの毒性を最小限に留めるかが、物質生産効率を上げるための最重要課題である。また、グルコースなどの糖類を炭素源とする有用微生物の発酵生産プロセスにおいても、メタノールやホルムアルデヒド、

ギ酸などの C1 化合物を補助炭素源として利用することにより、微生物のエネルギー代謝効率が向上し、菌体収量の増加や生産性の増大が可能になることが知られている。ホルムアルデヒドを中心とする C1 化合物代謝制御の分子基盤を理解し、C1 微生物の細胞機能を利用することによって、循環型資源として有望な、メタノールをはじめとする C1 化合物を、微生物による物質生産プロセスに積極的に導入することを推進し、資源循環型物質生産体系の構築に貢献することができる。さらに、ホルムアルデヒドを中心とする C1 化合物代謝機能を利用することにより、大気中へのメタン排出削減のためにホルムアルデヒド代謝機能を強化した高機能メタン資化性細菌を開発したり、ホルムアルデヒド応答機構や代謝酵素を利用して環境中のホルムアルデヒドを検出・除去する技術を開発したりすることができる。

本研究では、ホルムアルデヒドを中心とする C1 化合物代謝制御の分子基盤を解明し、C1 微生物の細胞機能を利用して、環境中に広く存在する C1 化合物に関連した環境保全・浄化技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

研究代表者らがこれまでに行ってきた C1 化合物代謝研究によって得た知見や、微生物培養技術、分子遺伝学的・生化学的実験手法、蛍光顕微鏡観察技術を駆使し、遺伝子工学的手法による菌株や植物体の作成と、培養工学的・環境科学的な評価により、「ホルムアルデヒド代謝機能強化による高機能メタン資化性細菌の創出と利用」、「ホルムアルデヒド代謝機能強化によるメタノール資化性菌有用物質生産系の高効率化」、「C1 化合物検出セルセンサーの開発と植物によるホルムアルデヒド吸収・除去」に関する研究を行った。同時に、これらの環境技術開発に必要な「細菌のホルムアルデヒド代謝の分子基盤」と「酵母ホルムアルデヒド誘導性遺伝子発現の分子基盤」の解明に向けた研究を行った。

4. 研究成果

(1) ホルムアルデヒド代謝機能強化による高機能メタン資化性細菌の創出と利用

メタン資化性細菌 *Methylovulum miyakonense* が、*Rhizobia* に属する根粒菌との共培養により、メタン酸化活性が向上することを見出した。

メタン資化性細菌 *Methylococcus capsulatus* および *Methylovulum miyakonense* では、ホルムアルデヒド資化経路であるリブローズモノリン酸経路の鍵酵素 (Hps, Phi) をコードする遺伝子が、オペロン型と融合型の 2 種存在しており、それぞれが活性型酵素をコードし

ていることを示すとともに、それぞれの遺伝子産物の細胞内局在性を明らかにした。さらに、*Methylococcus capsulatus* Bath 株由来の Hps-Phi 融合酵素を、セリン経路を保持するメタン酸化性細菌 *Methylosinus* 属細菌に導入した株を作成した。メタン培養した Hps-Phi 発現株では、相当する酵素活性を確認できたが、生育やメタン消費に対する効果は認められず、メタンのみを炭素源とする培養では生育能低下が見られた。様々な培養条件を検討したところ、五単糖の添加によりその生育が回復したことから、Hps-Phi の高発現により基質となる糖リン酸が不足していたことが示唆された。

(2) ホルムアルデヒド代謝機能強化によるメタノール酸化性菌有用物質生産系の高効率化

メタノール酸化性酵母のホルムアルデヒド応答性遺伝子発現に関わる因子として単離した *Msn5p* の遺伝子破壊株の取得に成功し、本破壊株がメタノール培養時に若干の生育阻害を受けること、ホルムアルデヒド感受性が高くなることを見出した。*Msn5p* は、炭素源による発現制御やストレス応答に関与する核外輸送体 *Msn5p* であり、ホルムアルデヒド耐性機構には関与するが、過酸化水素耐性機構には関与しないことを明らかにした。

またメタノール酸化性酵母異種遺伝子発現系の強化に向け、メタノールおよびホルムアルデヒドに応答する遺伝子発現に関わる複数の転写因子について、個々の転写因子の機能解析とともに、転写因子間の相互作用・相互依存性に関する解析を行った。グルコース抑制に関わる転写活性化因子 *Mig1* を破壊することにより、メタノール誘導初期段階での転写活性化を早めることに成功した。

一方、メタノール酸化性細菌由来の Hps の結晶構造を明らかにするとともに、*Methylobacterium extorquens* にメタノール酸化性細菌由来の Hps-Phi 人工融合酵素を発現させ、発現レベルの最適化と様々な培養条件における生育評価を進めた。発現には、高発現プロモーターよりも中程度に発現するプロモーターを用いることにより、メタノール培養時の菌体収量が増加することを明らかにした。Hps-Phi の高発現により菌体収量が減少したが、Hps-Phi の基質やエネルギー源を補う化合物の添加効果を検討し、菌体収量減少の原因がエネルギー源の不足によるものであることを明らかにした。

(3) C1 化合物検出セルセンサーの開発と植物によるホルムアルデヒド吸収・除去

既に開発していたメタノールセンサーを利用し、植物表層のメタノール濃度が日周変動することを発見した。

Hps-Phi 人工融合酵素の観用植物（ゼラニウム）における発現に成功し、空気中のホルムアルデヒドを吸収できることを示した。

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 20 件)

- ① S. Fujimura, H. Yurimoto, S. Kurimoto, Y. Matsufuji, T. Ito, T. Hayakawa, N. Tomizuka, Y. Sakai, and T. Nakagawa. Expression level of methanol-inducible peroxisomal proteins and peroxisome morphology are affected by oxygen conditions and mitochondrial respiratory pathway function in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. FEMS Yeast Res. 13: 359-366 (2013) 査読有
doi: 10.1111/1567-1364.12040
- ② P. Nutaratat, N. Srisuk, K. Duangmal, H. Yurimoto, Y. Sakai, Y. Muramatsu, and Y. Nakagawa. *Roseomonas musae* sp. nov., a new bacterium isolated from a banana phyllosphere. Antonie van Leeuwenhoek 103: 617-624 (2013) 査読有
doi: 10.1007/s10482-012-9845-5
- ③ Z. Zhai, H. Yurimoto, and Y. Sakai. Molecular characterization of the *Candida boidinii* *MIG1* and its role in regulation of methanol inducible gene expression. Yeast 29: 293-301 (2012) 査読有
doi: 10.1002/yea.2909
- ④ H. Iguchi, I. Sato, M. Sakakibara, H. Yurimoto, and Y. Sakai. Distribution of methanotrophs in the phyllosphere. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76: 1580-1583 (2012) 査読有
doi: 10.1271/bbb.120281
- ⑤ M. Mizuno, H. Yurimoto, N. Yoshida, H. Iguchi, and Y. Sakai. Distribution of pink-pigmented facultative methylotrophs on leaves of vegetables. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76: 578-580 (2012) 査読有
doi: 10.1271/bbb.110737
- ⑥ Z. Zhai, H. Yurimoto, and Y. Sakai. *Msn5p* is involved in formaldehyde resistance but not in oxidative stress response in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76: 299-304 (2012) 査読有
doi: 10.1271/bbb.110679
- ⑦ H. Iguchi, H. Yurimoto, and Y. Sakai. Stimulation of methanotrophic growth in co-cultures by cobalamin excreted by rhizobia. Appl. Environ. Microbiol. 77: 8509-8515 (2011) 査読有
doi: 10.1128/AEM.05834-11
- ⑧ K. Kawaguchi, H. Yurimoto, M. Oku, and Y.

- Sakai. Yeast methylotrophy and autophagy in a methanol-oscillating environment on growing *Arabidopsis thaliana* leaves. PLoS ONE 6: e25257 (2011) 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0025257
- ⑨ 阪井康能, 由里本博也. C1 微生物複合生物系による省エネ型炭素固定技術. 環境資源工学. 58: 59-63 (2011) 査読無
- ⑩ C. Nishizaki, M. Nishikawa, T. Yata, T. Yamada, Y. Takahashi, M. Oku, H. Yurimoto, Y. Sakai, K. Nakanishi, and Y. Takakura. Inhibition of surgical trauma-enhanced peritoneal dissemination of tumor cells by human catalase derivatives in mice. Free Radic. Biol. Med. 51: 773-779 (2011) 査読有
doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.025
- ⑪ H. Yurimoto, M. Oku, and Y. Sakai. Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation, and peroxisome homeostasis. Int. J. Microbiol. 2011: 101298 (2011) 査読有
doi: 10.1155/2011/101298
- ⑫ H. Iguchi, H. Yurimoto, and Y. Sakai. *Methylovulum miyakonense* gen. nov., sp. nov., a novel type I methanotroph from a forest soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 810-815 (2011) 査読有
doi: 10.1099/ijs.0.019604-0.
- ⑬ 由里本博也, 阪井康能. 光合成経路と相性のよいホルムアルデヒド固定反応. バイオサイエンスとインダストリー. 69: 46-48 (2011) 査読無
- ⑭ 由里本博也, 阪井康能. C1 微生物と植物の相互作用と炭素循環 -代謝生化学・分子細胞生物学からの理解-. 植物の生長調節. 45: 125-131 (2010) 査読無
- ⑮ I. Orita, A. Kita, H. Yurimoto, N. Kato, Y. Sakai, and K. Miki. Crystal structure of 3-hexulose- 6-phosphate synthase, a member of the orotidine 5'-monophosphate decarboxylase suprafamily. Proteins 78: 3488-3492 (2010) 査読有
doi: 10.1002/prot.22860.
- ⑯ H. Iguchi, H. Yurimoto, and Y. Sakai. Soluble and particulate methane monooxygenase gene clusters in the type I methanotroph *Methylovulum miyakonense* HT12. FEMS Microbiol. Lett. 312:71-76 (2010) 査読有
doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02101.x.
- ⑰ Z. Song, I. Orita, F. Yin, H. Yurimoto, N. Kato, Y. Sakai, K. Izui, K. Li, and L. Chen. Overexpression of an HPS/PHI fusion enzyme from *Mycobacterium gastri* in chloroplasts of geranium enhances its ability to assimilate and phytoremediate formaldehyde. Biotechnol. Lett. 32: 1541-1548 (2010) 査読有
doi: 10.1007/s10529-010-0324-7
- ⑱ T. Nakagawa, K. Yoshida, A. Takeuchi, T. Ito, S. Fujimura, Y. Matsufujii, N. Tomizuka, H. Yurimoto, Y. Sakai, and T. Hayakawa. Peroxisomal catalase gene in the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74: 1733-1735 (2010) 査読有
doi: 10.1271/bbb.100329
- ⑲ T. Nakagawa, S. Fujimura, T. Ito, Y. Matsufujii, S. Ozawa, T. Miyaji, J. Nakagawa, N. Tomizuka, H. Yurimoto, Y. Sakai, and T. Hayakawa. Molecular characterization of two genes with high similarity to the dihydroxyacetone synthase gene in the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74: 1491-1493 (2010) 査読有
doi: 10.1271/bbb.100153
- ⑳ Y. Sasano, H. Yurimoto, M. Kuriyama, and Y. Sakai. Trm2p-dependent derepression is essential for methanol-specific gene activation in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. FEMS Yeast Res. 10: 535-544 (2010) 査読有
doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00640.x.
- [学会発表] (計 4 件)
- ① Yurimoto, H. Development of environmental technology based on symbiotic interactions of C1-microorganisms and plants. The 6th Japan-Finland Biotechnology Symposium, Sendai, Japan, 2012/6/4-8.
- ② Yurimoto, H. Metabolic flux regulates methanol-inducible gene expression in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. The 25th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. Olsztyn, Poland, 2011/7/11-16.
- ③ Yurimoto, H. Gene organization and function of the RuMP pathway enzymes in methanotrophs. Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism. Lewiston, USA, 2010/8/1-6.
- ④ Yurimoto, H. Biotechnological application of metabolic functions in C1-microorganisms. The 5th Japan- Finland Biotechnology Symposium, Turku, Finland, 2010/6/10.
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 1 件)
- 名称: メタン酸化菌に対して用いられるメタン酸化活性向上剤、及びその利用
発明者: 阪井康能、井口博之、由里本博也
権利者: 京都大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-183287
出願年月日: 2010 年 8 月 18 日
国内外の別: 国内

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

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

(3) 研究分担者

奥 公秀 (OKU MASAHIDE)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：10511230