

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：22380052

研究課題名（和文）C1 微生物を中心とした複合生物系による分子循環と炭素固定

研究課題名（英文）Molecular circulation and carbon fixation by C1-microorganism consortia

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（和文）：地球上の炭素循環における炭素固定系の増強を目指し、メタンやメタノールを資化する C1 微生物を中心とした植物-微生物複合生物系による有用機能の探索、その分子・情報の循環機構の解明に関する研究を行った。自然界、特に植物表層における C1 微生物の分布を明らかにし、植物表層での増殖に必要な C1 微生物の新しい機能を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In order to strengthen carbon fixation in global carbon cycle, we studied the useful functions of C1-microorganism consortia including methane- and methanol-utilizing microorganisms and molecular mechanism of molecular and energy circulation. We revealed distribution of C1-microorganisms and found novel functions necessary for proliferation at phyllosphere.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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、メタン酸化菌、生育促進、レドックス、オートファジー、複合生物系、メタノール資化性細菌

1. 研究開始当初の背景

地球上にある炭素資源を有効に活用した有用物質・エネルギーの生産と資源循環型社会の構築は、21 世紀における人類の喫緊の課題である。石油・石炭などの化石燃料に代わり、メタンを主成分とした天然ガスやバイオマス資源として活用する効率的な炭素資源循環系の構築が必要である。バイオマスを中心としたその利用研究は、カーボンニュートラルのコンセプトの下、非可食部分を中心とした利用研究が国内外で進められている。

しかしながら、真の循環型社会を構築するためには、CO₂をバイオマスに変換する CO₂ 固定系、非可食のバイオマスや天然ガスが完全に CO₂ に酸化されるまでの過程で、メタノールやホルムアルデヒドなどの C1 化合物をバイオマスに固定する C1 固定系の構築が最も重要な課題となる。これらの多くの反応は、エネルギーを要求する還元/合成反応であるため、真の炭素循環社会を構築するための律速段階でもある。一方、CO₂ とメタンは、地球温暖化への寄与率がそれぞれ、60%および

20%にも達する2大温室効果ガスであり、地球環境中におけるメタンとCO₂間の炭素循環である「メタンサイクル」は、C1化合物を資化するC1微生物とメタン生成菌が担っている。その炭素循環量は、C1微生物のみによって行われているものだけでも、CO₂量にして、15億トン/年 に達する。近年、ペクチンやリグニンなど、植物バイオマスに起因するC1化合物の放出とそれを利用して植物に常在するC1微生物との共生関係が明らかになりつつある。このような事実も含めると地球環境に及ぼすメタンサイクルの重要性は、はかりしれない。しかしその実態は不明であり、その調査が強く望まれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1)地球環境を支えるC1微生物を中心とした複合生物間分子の共存と循環系、2)C1微生物の細胞内分子と遺伝情報の循環系、3)細胞内エネルギーの循環系という3つの微視～巨視的な循環系について、C1微生物をその対象に、分子細胞生物学の立場と方法からこれを理解して、有用な機能の探索を行った。これを基盤に、未来型資源としてその利用が必須の天然ガスやバイオマス、特にこれらを由来とするC1化合物とCO₂の画期的な炭素固定系新技術の開発とそれによる食糧・有用物質生産系の構築を目指した。

一方、細胞内では、遺伝情報に基づいてタンパク質の合成と分解、さらにその機能発現による代謝と輸送が行われている。タンパク質の一生からアミノ酸の再生に見られるような、分子の循環系のみならず、転写因子の活性化とその分解が細胞周期を制御しているように、遺伝情報もその環境変化を受けてセントラルドグマを循環する。このように、細胞活動は細胞内の分子と遺伝情報の循環系の上にも成立しておりC1微生物もその例外ではない。特にメタノール資化性酵母は、異種タンパク質生産、代謝制御転写因子やタンパク質分解系の解析が進められている。このようなC1誘導性遺伝子発現から、タンパク質分解にいたる情報と分子の循環系を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

これまでに確立してきた、遺伝子発現・細胞内動態・レドックス環境、タンパク質分解、などの生命現象を、一細胞レベルで蛍光技術による可視化する分子細胞生物学、DDGE・定量的PCR・メタゲノム解析などを利用する分子微生物生態学、植物vs微生物間を含む、複合生物間相互作用を解析するための様々な育種培養技術、細胞内生理活性物質の同定

や代謝物、遺伝子発現を解析するためのメタボローム解析や生化学、分析化学技術など、様々な知見や技術を駆使して、微視～巨視レベルで、C1微生物を含んだ複合生物系における分子と情報の分子循環系を追跡し、炭素循環の律速となっている炭素固定の効率化に向けた機能探索を行った。

4. 研究成果

(1) 植物に常在するC1微生物の統括的な理解とメタン酸化活性・イネ生育の促進

森林土壌から新規に単離したメタン酸化菌 *Methylovulum miyakonense* について新属新種を提唱した。本菌のメタン酸化酵素の遺伝子構造を明らかにするとともに、本菌との共培養によりメタン酸化能促進効果を与える *Sinorhizobium* 属細菌が生産する低分子化合物としてコバラミンを同定し、他のメタン資化性細菌にも同様の効果を与えることを見出した。

植物葉圏に棲息するメタン資化性細菌の分布を調べ、*Methylomonas* 属、*Methylosinus* 属、*Methylocystis* 属に属するメタン資化性細菌が、メタノール資化性細菌（メチロトロフ）と共に、根圏のみならず葉圏にも分布、棲息していることが明らかとなった。

一方、蔬菜葉に棲息するメタノール資化性細菌の分布を調べたところ、シソ葉に特に多く存在し、*Methylobacterium fujisawaense* の近縁種が優先的であることを明らかにした。特に、アカシソとの高い特異性が認められたメタノール資化性細菌 *Methylobacterium* sp. OR01 株が、アカシソの成長とともに種子から垂直伝播して葉上で優占化することを確認し、他の *Methylobacterium* 属細菌より強いアカシソへの定着能を有することを明らかにした。

(2) C1化合物誘導発現・タンパク質合成・分解と植物表層におけるC1微生物の生存戦略

シロイヌナズナ葉上でのメタノール資化性酵母遺伝子発現解析や細胞数定量手法、生化学的解析手法を確立し、メタノール濃度が日周変動すること、メタノールが日周変動する植物葉上での生存と増殖には、酵母メタノール代謝の中でも資化経路が必須であること、ペキシファジーを含むオートファジーが必須であることを明らかにした。

メタノール資化性酵母が植物表層に生存する際に必要な細胞機能について、特に窒素代謝に関わる遺伝子に着目し、関与する遺伝子をクローン化し、遺伝子破壊株を構築した。当該遺伝子について、これまでに確立した生化学的実験手法と蛍光観察技術を用い、葉上での遺伝子発現動態を解析するとともに、葉上での増殖への影響を調べ、その重要性を明

らかにした。

(3) 酵母グルタチオン合成・分解系を中心とした細胞内レドックス・転写制御

細胞内レドックスを *in vivo* で可視化できるレドックスフローを用いることにより、メタノール資化性酵母細胞を窒素飢餓に置いた際に細胞質が還元的になることを見出した。さらに、レドックスフローを、酵母グルタチオン合成・再生系遺伝子破壊株に導入し、様々な炭素源培養時の細胞内レドックス状態を解析し、グルタチオン制御系の重要性を明らかにした。

栄養源センサーとして知られる TOR キナーゼの細胞内レドックス制御における役割を、出芽酵母における活性亢進株を用いて解析し、TORC1 活性の亢進により、細胞内のシステインを始めとするアミノ酸プールが減少し、グルタチオン量が減少している事が示唆された。

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 25 件)

- ① M. Oku, Y. Ichiki, A. Shiraiishi, T. Takahara, T. Maeda, and Y. Sakai. Hyper-activation of target of rapamycin (TOR) kinase 1 decreases intracellular glutathione content in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by LC-MS/MS analysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press (2013) 査読有
- ② M. Mizuno, H. Yurimoto, H. Iguchi, A. Tani, and Y. Sakai. Dominant colonization and inheritance of *Methylobacterium* sp. strain OR01 on perilla plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press (2013) 査読有
- ③ M. Oku, J. Hoseki, Y. Ichiki, and Y. Sakai. A fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based redox sensor reveals physiological role of thioredoxin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 587: 793-798 (2013) 査読有
doi: 10.1016/j.febslet.2013.02.003
- ④ M. Asakura, K. Yoshino, A.M. Hill, Y. Kubo, Y. Sakai, and Y. Takano. Primary and secondary metabolism regulates lipolysis in appressoria of *Colletotrichum orbiculare*. *Fungal Genet. Biol.* 49: 967-975 (2012) 査読有
doi: 10.1016/j.fgb.2012.08.009
- ⑤ 異常を回復する化合物レドックスモジュレーターの新薬: Redoxfluorの創薬への利用. 遺伝子医学MOOK. 22: 158-163 (2012) 査読無
- ⑥ 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
- ⑦ 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
- ⑧ 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
- ⑨ 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
- ⑩ M. Oku and Y. Sakai. Assessment of physiological redox state with FRET protein probes. *Antioxid. Redox Signal.* 16: 698-704 (2012) 査読有
doi: 10.1089/ars.2011.4251
- ⑪ 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
- ⑫ 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
- ⑬ 奥 公秀、阪井康能. 細胞内の酸化還元状態を検知するタンパク質 FRET プローブ、レドックスフロー 酵母の酸化ストレス応答から学び、それを利用する新戦略. *化学と生物*. 49: 516-517 (2011) 査読無
- ⑭ 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
- ⑮ 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

- ⑩ 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
- ⑪ 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.
- ⑫ 奥 公秀、阪井康能. Redoxfluor を用いた細胞内酸化還元状態の可視化. *実験医学.* 29: 945-950 (2011) 査読無
- ⑬ 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
- ⑭ N. Tamura, M. Oku, and Y. Sakai. Atg8 regulates vacuolar membrane dynamics in a lipidation-independent manner in *Pichia pastoris*. *J. Cell Sci.* 123: 4107-4116 (2010) 査読有
doi: 10.1242/jcs.070045.
- 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 Oku, M. and Sakai, Y. Peroxisomes as dynamic organelles: autophagic degradation. *FEBS J.* 277: 3289-3294 (2010) 査読有
doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07741.x.
- ⑱ T. Yano, M. Oku, N. Akeyama, A. Itoyama, H. Yurimoto, S. Kuge, Y. Fujiki, and Y. Sakai. A novel fluorescent sensor protein for visualization of redox states in the cytoplasm and in peroxisomes. *Mol. Cell. Biol.* 30: 3758-3766 (2010) 査読有
doi: 10.1128/MCB.00121-10.
- ⑲ 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 8 件)

- ① Sakai, Y. PpAtg18 mediates switch of vacuolar dynamics between micro- and macropexophagy. Gordon Research Conference on Autophagy in Stress, Development and Disease. Ventura, USA, 2012/3/11-16.
- ② Sakai, Y. Methylotrophy and autophagy: from genome and molecules to yeast life style in nature. International Symposium on Microbial Genomic Research. Seoul, Korea, 2011/12/2.
- ③ Sakai, Y. Regulation and physiological role of autophagy in methylotrophic yeast. The 2nd Sino-Japan Autophagy Symposium. Kanagawa, Japan, 2011/10/5-7.
- ④ Sakai, Y. C1-metabolism coupled gene expression and molecular ecology at phyllosphere. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, Japan, 2011/9/6-10.
- ⑤ Sakai, Y. Regulation and molecular basis for membrane dynamics of micropexophagy. The 1st Sino-Japan Autophagy Symposium. Xi'an, China, 2010/10/14-17.
- ⑥ Sakai, Y. Regulation and molecular basis for membrane dynamics of micropexophagy. Swiss Yeast Meeting. Fribourg, Switzerland, 2010/9/6-7.
- ⑦ Sakai, Y. Methane-utilizing microbial consortium established from a forest soil including *Methylovulum miyakonense* gen. nov., sp. nov., a novel type I methanotroph. Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism. Lewiston, USA, 2010/8/1-6.
- ⑧ Sakai, Y. Recruitment of PI4-kinase from the Golgi apparatus to PAS. Gordon Research Conference on Autophagy in Stress, Development and Disease. Lucca, Italy, 2010/4/25-30.

[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

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) 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