

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25281063

研究課題名(和文)メタノールエコノミーでの活用を目指すC1微生物代謝生理の分子基盤解明と新技術開発

研究課題名(英文)Molecular basis of metabolic physiology of C1-microorganisms and its application in methanol economy

研究代表者

由里本 博也 (YURIMOTO, Hiroya)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00283648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：メタンやメタノールなどのC1化合物やこれを利用するC1微生物を、低炭素社会の実現のための社会構想の一つである「メタノールエコノミー」で最大限活用するために、C1微生物代謝生理機能の分子基盤解明とメタノールエコノミーにおけるバイオプロセス新技術の開発を行った。特に、メタノール資化性酵母がもつ「強力なメタノール誘導性遺伝子発現」と「植物表層での生育能」という「二大有用形質」に関して、メタノール誘導性転写因子複合体の機能を解明するとともに、植物表層における窒素源利用とその代謝制御機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of development of novel biotechnology that can be applied in low carbon society “methanol economy”, we have studied molecular basis of metabolic physiology of C1-microorganisms that can utilize C1 compounds, such as methane and methanol, and its application. We focused on two major useful traits of methylotrophic yeasts, “strong methanol-inducible gene expression” and “ability to proliferate at the phyllosphere”. For example, molecular function of the transcriptional factor complex responsible for methanol-inducible gene expression was elucidated. Furthermore, we revealed nitrogen utilization and its regulation of the methylotrophic yeast at the phyllosphere.

研究分野：応用微生物学

キーワード：メタノール資化性酵母 転写因子 C1化合物代謝 メタン メタノール ホルムアルデヒド 硝酸 メチルアミン

### 1. 研究開始当初の背景

低炭素社会の実現のための社会構想の一つに、「メタノールエコノミー」がある。これは、ノーベル化学賞受賞者の Olah 博士らが提唱したもので、天然ガス、石炭、CO<sub>2</sub>、バイオマスなど様々な炭素資源を化学的方法でメタノールに導き、これを中心とする資源循環型工業体系を構築しようというものである。メタノールは、天然ガスやバイオマスから得られる合成ガス (CO, H<sub>2</sub>) から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、さらには低環境負荷型・循環型物質生産体系の基幹物質として注目されている。

ケミカルプロセスによるメタノールへの変換技術や、メタノールを燃料や化成品原料として利用する技術に関しては、「C1 ケミストリー」として主に化学系研究機関・企業で研究開発が進められている。一方、バイオプロセスには、メタンやメタノールなどの C1 化合物を炭素源・エネルギー源として利用する微生物 (C1 微生物) による有用物質・タンパク質生産があり、1970 年代のメタノールからのシングルセルプロテイン (SCP) 生産に端を発し、化学・医薬・食品分野での研究開発が行われてきた。中でもメタノール資化性酵母 (メタノール酵母) では、非常に強力なメタノール誘導性プロモーターを利用した異種遺伝子発現系が開発されており、特にワクチンや抗体など高等真核生物由来の異種タンパク質の高生産宿主として利用されている。研究代表者はこれまでに、本酵母における異種タンパク質高生産系の開発や、それを支える本酵母のメタノール代謝生理、メタノール誘導性遺伝子発現制御機構、オルガネラ形態制御機構に関する顕著な業績を挙げてきた。しかし、強力なメタノール誘導性遺伝子発現の分子メカニズム、メタノール応答性転写活性化機構については、発現制御様式に関する知見や転写活性化因子に関する断片的な知見があるだけで、詳細な分子機構は未解明であった。

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 CO<sub>2</sub> 間の炭素循環量は CO<sub>2</sub> 量にして年間 15~20 億トンにも及ぶ。メタンサイクルにおいてメタンから CO<sub>2</sub> への酸化を担うのが 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。メタノールエコノミーでのバイオプロセスを高機能化・高度利用するためには、C1 微生物による C1 化合物の巨視的・微視的な代謝と、それを支える分子基盤を活用し、温室効果ガスであるメタンの酸化・生物資源化、CO<sub>2</sub> からメタノールへの還元・固定、バイオマスからメタノールへの変換などの技術開発を進める必要があった。

### 2. 研究の目的

本研究では、メタンやメタノールなどの C1 化合物やこれらを利用する C1 微生物を、メタノールエコノミーで最大限活用するために明らかにすべき C1 微生物の代謝生理機能の分子基盤を解明し、バイオプロセスによる CO<sub>2</sub> やバイオマスからメタノールへの変換と有用タンパク質生産に関する新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、微生物の C1 化合物代謝研究によって得た知見や、独自に開発した解析技術を駆使し、C1 微生物代謝生理機能の分子基盤解明とメタノールエコノミーにおけるバイオプロセス新技術開発を行った。

(1) メタノール酵母の有用形質を制御する遺伝子機能の解明

メタノール酵母が持つ、「強力なメタノール誘導性遺伝子発現」と「植物表層での生育能」という形質を本酵母の「二大有用形質」と捉え、これらを制御する転写活性化因子の機能解析と新奇遺伝子の探索・機能解析を行った。

(2) C1 化合物代謝反応を高度利用した新規メタノール変換反応の構築

CO<sub>2</sub> やバイオマスからメタノールへの変換バイオプロセスを構築するために、個々の反応に関与する酵素の選抜・最適化・高機能化を行った。

(3) 植物表層での有用タンパク質直接生産法の開発

植物から放出されるメタノールを利用した植物表層での異種タンパク質生産を試みた。

### 4. 研究成果

(1) メタノール酵母の有用形質を制御する遺伝子機能の解明

強力なメタノール誘導性プロモーターの転写活性化に関与する転写因子と情報伝達関連因子の機能解析を行った。Hap 複合体構成因子 (Hap2/3/5) については、各遺伝子破壊株におけるメタノール誘導性遺伝子の発現レベル、各構成因子の細胞内局在、プロモーターへの結合能、構成因子間での相互作用を調べ、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。また、核内への輸送の相互依存性を示すとともに、免疫沈降法によってそれぞれの構成因子が直接相互作用することを見出し、メタノール酵母においても複合体を形成することを明らかにした (論文⑧)。さらに、Hap3 が持つメタノール酵母に特有の C 末端領域が、メタノール誘導性遺伝子の転写活性化に重要であること、他の真核生物でも高度に保存されている N 末端領域は核局在や DNA 結合に重要であることを

明らかにした (論文①)。

一方、植物表層でのメタノール資化性酵母の生育に重要な遺伝子の同定については、複数の候補遺伝子の遺伝子破壊株と蛍光タンパク質レポーター発現株を作成し、*in vitro*での生理機能および当該遺伝子産物の細胞内局在を調べた。特に葉上での窒素源利用に関する新知見を得た。すなわち、メタノール酵母は若葉上では硝酸を主に利用し、老化した葉ではメチルアミンを主に利用すること、特に硝酸レダクターゼが葉上での増殖に重要な役割を果たすことを明らかにした (論文⑥)。さらに、硝酸レダクターゼ (YNR) およびアミノキシダーゼ (AMO) について、各種窒素源を含む培養条件での発現制御を解析し、YNR 遺伝子の発現が硝酸により誘導されること、他の窒素源が存在しても抑制されないことを明らかにした。また YNR は硝酸以外の窒素源存在下では選択的オートファジーによって液胞に輸送され分解制御を受けることを明らかにした。一方、AMO 遺伝子の発現は、メチルアミンで誘導されるが、アンモニアで抑制された (論文③)。

(2) C1 化合物代謝反応を高度利用した新規メタノール変換反応の構築

メタノール資化性細菌やメタノール資化性酵母がもつ C1 化合物代謝酵素について、大腸菌での発現株を構築し、無細胞抽出液および休止菌体を用いた反応系での活性評価と培養条件の最適化を行った。さらに、シアノバクテリアにおいてホルムアルデヒド固定系路遺伝子発現株の構築も試み、ホルムアルデヒド耐性の付与に成功した。

また、水生植物表層に見出していた高いメタン酸化活性を示すメタン資化性微生物コンソーシアムについて、メタン資化性細菌の分布特性を明らかにした (論文⑬)。

(3) 植物表層での有用タンパク質直接生産法の開発

糸状菌由来ペクチンメチルエステラーゼの発現株を作成した。当該発現株はペクチンを炭素源とする培養では顕著な増殖能増強を確認できたが、シロイヌナズナ葉上では正の効果は認められなかった (論文⑩)。さらに、植物の生長制御機能をもつ生理活性ペプチドについても、メタノール酵母での高発現株を取得してその生産性を評価した。

## 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 18 件)

- ① Oda, S., Yurimoto, H., Nitta, N., and Sakai, Y. The unique C-terminal region of Hap3 is required for methanol-regulated gene expression in the methylotrophic yeast

*Candida boidinii*. Microbiology, in press. 査読有

DOI: 10.1099/mic.0.000275.

- ② 由里本博也, 阪井康能. C1 微生物の巧妙なストレス適応機構と多様な生育環境での生存戦略. 極限環境生物学会誌, 14, 54-62 (2015). 査読有

- ③ Shiraishi, K., Oku, M., Uchida, D., Yurimoto, H., and Sakai, Y. Regulation of nitrate and methylamine metabolism by multiple nitrogen sources in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. FEMS Yeast Res., 15, fov084. 査読有

DOI: 10.1093/femsyr/fov084

- ④ 由里本博也, 阪井康能. C1 微生物-植物共生系による C1 炭素固定と植物生長促進. 光合成研究, 25, 92-99 (2015). 査読有  
<http://photosyn.jp/journal.html#73>

- ⑤ Hamilton, R., Dimitri Kits, K., Ramonovskaya, V.A., Rozova, O.N., Yurimoto, H., Iguchi, H., Khmelenina, V.N., Sakai, Y., 他 13 名. Draft genomes of gammaproteobacterial methanotrophs isolated from terrestrial ecosystems. Genome Announc., 3, e00515-15 (2015). 査読有  
DOI: 10.1128/genomeA.00515-15

- ⑥ Shiraishi, K., Oku, M., Kawaguchi, K., Uchida, D., Yurimoto, H., and Sakai, Y. Yeast nitrogen utilization in the phyllosphere during plant lifespan under regulation of autophagy. Sci. Rep., 5, 9719 (2015). 査読有  
DOI: 10.1038/srep09719

- ⑦ Iguchi, H., Yurimoto, H., and Sakai, Y. Interactions of methylotrophs with plants and other heterotrophic bacteria. Microorganisms, 3, 137-151 (2015). 査読有

DOI: 10.3390/microorganisms3020137

- ⑧ Oda, S., Yurimoto, H., Nitta, N., Sasano, Y., and Sakai, Y. Molecular characterization of Hap complex components responsible for methanol-inducible gene expression in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. Eukaryot. Cell, 2015, 14, 278-285 (2015). 査読有

DOI: 10.1128/EC.00285-14

- ⑨ Boontham, W., Srisuk, N., Kokaew, K., Treeyoung, P., Limtong, S., Thamchaipenet A., and Yurimoto, H. Xylitol production by thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea siamensis* and its xylose reductase gene (*XYLI*) cloning. Chiang Mai J. Sci., 41, 491-502 (2014). 査読有

[http://it.science.cmu.ac.th/ejournal/journalDetail.php?journal\\_id=5044](http://it.science.cmu.ac.th/ejournal/journalDetail.php?journal_id=5044)

- ⑩ Hoefman, S., van der Ha, D., Iguchi, H., Yurimoto, H., Sakai, Y., Boon, N., Vandamme, P., Heylen, K., and de Vos P. *Methyloparacoccus murrellii* gen. nov., sp. nov., a novel methanotroph isolated from pond water in South Africa and Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 2100-2107 (2014). 査読有  
DOI: 10.1099/ijms.0.057760-0
- ⑪ Kawaguchi, K., Yurimoto, H., and Sakai, Y. Expression of a codon-optimized *Aspergillus niger* pectin methylesterase gene in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78, 718-721 (2014). 査読有  
DOI: 10.1080/09168451.2014.891936
- ⑫ 由里本博也、阪井康能. 植物から放出される C1 化合物と微生物-植物間相互作用による炭素循環. *AROMA RESEARCH*, 15, 80-84 (2014). 査読無  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020001200>
- ⑬ Yoshida, N., Iguchi, H., Yurimoto, H., Murakami, A., and Sakai, Y. Aquatic plant surface as a niche for methanotrophs. *Front. Microbiol.*, 5, 30 (2014). 査読有  
DOI: 10.3389/fmicb.2014.00030
- ⑭ 阪井康能、由里本博也. 葉面に棲息する C1 微生物：共生系による炭素循環と環境バイオへの利用. *環境バイオテクノロジー学会誌*, 13, 79-84 (2013). 査読無  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020320655>
- ⑮ Iguchi, H., Sato, I., Yurimoto, H., and Sakai, Y. Stress resistance and C1 metabolism involved in plant colonization of a methanotroph *Methylosinus* sp. B4S. *Arch. Microbiol.*, 195, 717-726 (2013). 査読有  
DOI: 10.1007/s00203-013-0922-6
- ⑯ 由里本博也、井口博之、阪井康能. C1 微生物複合生物系が駆動する炭素循環(メタンサイクル). *生物の科学 遺伝*, 67, 591-595 (2013). 査読無  
<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201302281987522910>
- ⑰ 由里本博也、阪井康能. C1 微生物代謝経路の省エネ型炭素固定系としての利用とその問題点. *生物工学会誌*, 91, 384-387 (2013). 査読無  
[http://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9107/9107\\_tokushu\\_4\(1\).pdf](http://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9107/9107_tokushu_4(1).pdf)
- ⑱ Mizuno, M., Yurimoto, H., Iguchi, H., Tani, A., and Sakai, Y. Dominant colonization and inheritance of *Methylobacterium* sp. strain OR01 on perilla plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 1533-1538 (2013). 査読有  
DOI: 10.1271/bbb.130207
- [学会発表] (計 10 件)
- ① Yurimoto, H. Studies on C1-microorganisms and their applications in biotechnology, The 1st KU-KUGSA Bilateral Symposium on "Food, Environment and Life for the Next Generation", 2015 年 12 月 16 日, バンコク (タイ)
- ② Yurimoto, H. Symbiotic interaction between C1-microorganisms and plants and its applications, International Symposium on Microbial Research and Biotechnology for Biomass Utilization, 2015 年 11 月 12-13 日, JR 博多シティ (福岡県・福岡市)
- ③ Yurimoto, H. Transcription factors involved in regulation of methanol-inducible gene expression in the methylotrophic yeast, 32nd International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY32) -Yeasts Biodiversity and Biotechnology in the Twenty-First Century-. 2015 年 9 月 13-17 日, ペルージャ (イタリア)
- ④ 由里本博也、C1 微生物の巧妙なストレス適応機構と多様な生育環境での生存戦略、極限環境生物学会第 16 回シンポジウム「極限環境生物が秘めるストレス適応能力」、2015 年 6 月 6 日, 京都大学(京都府・京都市)
- ⑤ 由里本博也、阪井康能、植物から放出される C1 化合物と葉面微生物-植物間相互作用による C1 炭素循環、第 4 回生物起源微量ガスワークショップ、2014 年 11 月 20-21 日, 文部科学省研究交流センター (茨城県・つくば市)
- ⑥ Yurimoto, H., Kajihara, D., and Sakai, Y. Metabolic alteration by introducing bifunctional formaldehyde-fixing enzyme into the methylotrophic bacteria. Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism, 2014 年 8 月 10-15 日, South Hadley, MA (米国)
- ⑦ Oda, S., Yurimoto, H., and Sakai, Y. Molecular characterization of Hap complex components responsible for methanol-inducible gene expression in the methylotrophic yeast *Candia boidinii*, Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism, 2014 年 8

月 10-15 日, South Hadley, MA (米国)

- ⑧ 由里本博也、阪井康能、微生物ホルムアルデヒド代謝の戦略的活用、日本農芸化学会 2014 年度大会シンポジウム「アルデヒドのバイオサイエンス —生物の多様なアルデヒド代謝系とその戦略的活用—」、2014 年 3 月 30 日, 明治大学 (神奈川県・川崎市)
- ⑨ 由里本博也、阪井康能、植物から放出される C1 化合物と微生物—植物間相互作用による炭素循環、第 252 回生存圏シンポジウム「植物アロマのメタ代謝科学 ~生態学、大気科学、植物科学の融合~」、2014 年 2 月 28 日, 京都大学 (京都府・宇治市)
- ⑩ Yurimoto, H., Kajihara, D., and Sakai, Y.  
Metabolic alteration by introducing bifunctional formaldehyde-fixing enzyme into the methylotrophic bacterium, V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 2013 年 10 月 2-4 日, マドリッド (スペイン)

## 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) 連携研究者

阪井 康能 (SAKAI, Yashuyoshi)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：60202082

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