

令和元年6月3日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02997

研究課題名(和文) C1微生物で拓くメタノールエコノミー：低炭素・循環型社会で活用する基盤技術開発

研究課題名(英文) Methanol economy pioneered by C1-microorganisms: development of basic technologies utilized in low-carbon and sustainable society

研究代表者

由里本 博也 (YURIMOTO, Hiroya)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：00283648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：メタノールを低環境負荷型・循環型物質生産体系の基幹物質として利用する工業体系「メタノールエコノミー」におけるバイオプロセスに活用できるC1微生物について、その代謝生理機能の分子基盤解明と活用技術の開発を行った。異種タンパク質生産宿主として有用なメタノール酵母におけるメタノール誘導性遺伝子発現制御に関わる転写活性化因子やシグナル伝達関連タンパク質の分子機能を解明した。また、バイオマス由来の糖類からのメタノール変換技術の開発を行うとともに、植物共生C1微生物の細胞機能を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

詳細な分子機構が不明であった強力なメタノール誘導性遺伝子発現の分子基盤およびメタノール応答性転写活性化機構に関して、メタノール感知に関わるセンサータンパク質を初めて同定するとともに、発現制御の新規な機構を明らかにすることができた。本研究で解明したC1微生物代謝生理機能の分子基盤や有用物質生産のための基盤技術は、持続可能システムとしての低炭素・循環型物質生産プロセスに活用することができる。

研究成果の概要(英文)：C1-microorganisms that can utilize C1 compounds, such as methane and methanol, can be used for the bioprocess in the low carbon society "methanol economy". In this project, we investigated molecular basis of C1-metabolism in C1-microorganisms and its application. We elucidated novel molecular functions of transcriptional regulators and signal transducers responsible for methanol-induced gene expression in methylotrophic yeasts which are used for heterologous protein production. Furthermore, we developed the basic technology of methanol production from biomass-derived sugar compounds and elucidated cellular functions relating to plant colonization of methylotrophic bacteria.

研究分野：応用微生物学

キーワード：遺伝子発現制御 転写因子 シグナル伝達 異種タンパク質生産 メタノール メタノール資化性酵母  
Methylobacterium

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

持続可能システムとしての低炭素・資源循環型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（1994年）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、これを中心とする工業体系を構築しようとするものである。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。さらに近年では米国でのシェールガス革命により、メタンからメタノールへの変換反応を含め、メタン・メタノールからの有用物質生産技術の開発が、米国エネルギー省（DOE）などの政府機関、大手企業やベンチャー企業を巻き込んで注目されている。

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きた。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。研究代表者らはこれまでに、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研究を行ってきた。メタノール酵母によるタンパク質高生産技術は、メタノールエコノミーにおけるバイオプロセスの基幹技術であるが、強力なメタノール誘導性遺伝子発現の分子基盤、メタノール応答性転写活性化機構については、発現制御様式や関与する転写活性化因子の個々の機能解析は、研究代表者らを始めとする国内外の研究により明らかにされてきているものの、詳細な分子機構は未解明な点が多く残されている。

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 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り、研究代表者らはその基盤となる先駆的な知見を得てきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、C1 化合物や 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、バイオマスからのメタノールへの変換と有用タンパク質生産に関する基盤技術を確立することを目的とした。具体的には、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、2) メタノール変換技術の開発を行った。また、植物表層微生物の優占種であるメタノール資化性 *Methylobacterium* 属細菌は、植物から放出されるメタノールを利用し、植物生長促進効果をもたらすことが知られていることから、本属細菌のメタノールエコノミーでの活用を視野に入れ、メタノール代謝特性や植物上での定着・生存に必要な、3) 植物共生メタノール資化性細菌の細胞機能を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (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とその活用

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「タンパク質高生育能」という形質を本酵母の「二大有用形質」と捉え、メタノール誘導性遺伝子発現に関わる転写活性化因子やシグナル伝達関連タンパク質の機能解析を行うとともに、異種タンパク質生産能向上に関わる因子を共発現する宿主株を構築してその培養条件を検討した。

#### (2) バイオマスからのメタノール変換技術の開発

バイオマス由来の糖類からのメタノールへの変換バイオプロセスを構築するために、C1 微生物代謝酵素遺伝子を導入した大腸菌を用い、反応条件の最適化を行った。また、細胞内でのメタノール生成酵素の活性を評価できるメタノールセンサー細胞を構築し、モデル酵素を用いた活性評価を行った。

#### (3) 植物共生メタノール資化性細菌の細胞機能解明

*Methylobacterium* 属細菌の植物上での定着・生存に関わる細胞機能に関して、本属細菌のビタミン要求性の解析と、本属細菌がもつ概日遺伝子ホモログの機能解析を行った。

#### 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とその活用

メタノール酵母において強力なメタノール誘導性遺伝子発現に特化された転写制御機構を明らかにするため、転写制御因子とシグナル伝達関連因子の機能解析を行った。

メタノール誘導に関わる Hap 複合体については、メタノール酵母特異的な Hap3 の領域を特定するとともに (論文①)、*Candida boidinii* Hap 複合体の各構成因子の核移行シグナルを決定した (学会発表⑤)。また、自身もメタノール誘導される転写因子 CbMpp1 について、遺伝子プロモーターの欠失解析を行い、転写調節に重要な領域を特定した (学会発表②)。

メタノール誘導性遺伝子の発現レベルがメタノール濃度に応じて変動することを見出し、このメタノール濃度の感知機構に、細胞膜センサータンパク質である Wsc ファミリータンパク質が関与することを初めて見出した (論文⑦)。Wsc タンパク質が細胞表層ストレスを感知すると、下流のシグナル伝達経路 (CWI 経路) が活性化されるが、メタノール感知では、CWI 経路の途中から分岐する新規経路があり、シグナル伝達因子や転写因子の変異体を用いた解析の結果、メタノール誘導性遺伝子発現に関わる転写因子のリン酸化動態が制御されることが示唆された。また、メタノール培養時などにストレス応答に働く情報伝達因子 CbHog1 の新奇機能を明らかにした (論文⑥)。

一方、メタノール誘導性遺伝子発現はエタノールの共存によって抑制されるが、このエタノール抑制は、エタノール分子そのものではなく、エタノールからアセチル CoA への代謝が関与する抑制機構であり、アセチル CoA 合成酵素のエタノール抑制に必要な機能領域や活性制御を明らかにした (論文②)。

メタノール酵母における異種タンパク質生産では、複数の有用タンパク質の生産についての研究を進めるとともに、分泌効率を向上させるための培養法や宿主株の改良を進めた。

##### (2) バイオマスからのメタノール変換技術の開発

メタノール資化性細菌がもつ C1 微生物代謝系酵素遺伝子を導入した大腸菌株について、メタノール代謝の逆反応を利用し、バイオマス由来の糖類からのメタノール生成のモデル基質としてフルクトース 6-リン酸やグルコースを用い、休止菌体反応に用いる菌体の培養条件や反応条件を検討した結果、従前よりも短時間の反応時間でメタノール生成を確認できた。また、反応中間体定量解析により、細胞内代謝系が想定した方向に進んでいることを確認した。

バイオプロセスにより生じたメタノールを検出するために、メタノール酵母 *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) のメタノール誘導性遺伝子発現機構を利用し、メタノール誘導性プロモーター支配下に蛍光タンパク質を発現するメタノールセンサー細胞を構築し、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターを用いた検出条件の最適化を行った。さらにメタノールセンサー酵母を宿主としてメタノール生成活性をもつ酵素や代謝系を導入した際に、その活性評価や高活性菌株の選抜が可能かどうかをモデル酵素を用いて検討した。バイオマス由来のペクチンを基質とし、メタノール生成反応を触媒する酵素であるペクチンメチルエステラーゼをモデル酵素として利用したところ、その活性の強弱を評価することに成功した (論文③)。

##### (3) 植物共生メタノール資化性細菌の細胞機能解明

植物から分離した *Methylobacterium* 属細菌の多くがビタミン B 群要求性を示し、特にパントテン酸 (ビタミン B<sub>5</sub>) 要求性を示す株が多いことを見出した。アカシソから単離した *Methylobacterium* sp. OR01 株を用い、OR01 株がパントテン酸合成前駆体のうち β-アラニン合成できないこと、β-アラニンおよびいくつかの前駆体化合物が本株の最少培地での生育を回復させることを明らかにした。さらに、シロイヌナズナ葉上にはパントテン酸、β-アラニン、およびいくつかの前駆体が存在し、OR01 株が葉上でこれらの化合物を獲得して定着できることを明らかにした (論文①)。

また、シアノバクテリアの概日遺伝子として知られている *kaiC* のホモログ遺伝子が、モデル菌株である *M. extorquens* AM1 株の葉面定着に重要な役割を果たすことを明らかにするとともに、KaiC タンパク質のリン酸化や発現量が生育温度により調節され、環境適応を制御していることを示した (論文④)。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Yusuke Yoshida, Hiroyuki Iguchi, Yasuyoshi Sakai, and Hiroya Yurimoto. Pantothenate auxotrophy of *Methylobacterium* spp. isolated from living plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 83, 569-577 (2019) 査読有  
DOI: 10.1080/09168451.2018.1549935
- ② Shin Ohsawa, Susumu Nishida, Masahide Oku, Yasuyoshi Sakai, and Hiroya Yurimoto. Ethanol represses the expression of methanol-inducible genes via acetyl-CoA synthesis in the yeast *Komagataella phaffii*. *Sci. Rep.*, 8, 18051 (2018) 査読有  
DOI: 10.1038/s41598-018-36732-2
- ③ Tomoyuki Takeya, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai. A *Pichia pastoris* single-cell

- biosensor for detection of enzymatically produced methanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102, 7017-7027 (2018) 査読有  
DOI: 10.1007/s00253-018-9144-9
- ④ Hiroyuki Iguchi, Yusuke Yoshida, Kento Fujisawa, Hiroki Taga, Hiroya Yurimoto, Tokitaka Oyama, and Yasuyoshi Sakai. KaiC family proteins integratively control temperature-dependent UV resistance in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Environ. Microbiol. Rep.*, 10, 634-643 (2018) 査読有  
DOI: 10.1111/1758-2229.12662.
  - ⑤ 由里本博也、大澤晋、阪井康能. 異種タンパク質生産に有用な C1 酵母のメタノールセンシング機構. *バイオサイエンスとインダストリー*, 76, 30-34 (2018) 査読有
  - ⑥ Kosuke Shiraishi, Takahiro Hioki, Akari Habata, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. Yeast Hog1 proteins are sequestered in stress granules during high-temperature stress. *J. Cell Sci.*, 131, jcs209114 (2018) 査読有  
DOI: 10.1242/jcs.209114
  - ⑦ Shin Ohsawa, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. Novel function of Wsc proteins as a methanol-sensing machinery in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Microbiol.*, 104, 349-363 (2017) 査読有  
DOI: 10.1111/mmi.13631
  - ⑧ Takayuki Ikezoe, Jing Yang, Chie Nishioka, Bin Pan, Kailin Xu, Mutsuo Furihata, Keigo Nakamura, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai, Goichi Honda, and Akihito Yokoyama. The fifth epidermal growth factor-like region of thrombomodulin exerts cytoprotective function and prevents SOS in a murine model. *Bone Marrow Transplant.*, 52, 73-79 (2017) 査読有  
DOI: 10.1038/bmt.2016.195
  - ⑨ 由里本博也. メタノール酵母による異種タンパク質生産：高生産のための技術戦略. *SUNATEC e-Magazine*, 126, <http://www.mac.or.jp/mail/160901/02.shtml> (2016) 査読無
  - ⑩ Hiroyuki Iguchi, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. *Methylovulum* Iguchi, Yurimoto and Sakai 2011, 813VP. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-4 (2016) 査読有  
DOI: 10.1002/9781118960608.gbm01416
  - ⑪ Saori Oda, Hiroya Yurimoto, Nobuhisa Nitta, and Yasuyoshi Sakai. The unique C-terminal region of Hap3 is required for methanol-regulated gene expression in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Microbiology*, 162, 898-907 (2016) 査読有  
DOI: 10.1099/mic.0.000275

[学会発表] (計 15 件)

- ① 由里本博也、阪井康能. はじめに～葉面 C1 微生物の生存戦略とその利用. 日本農芸化学会 2019 年度大会シンポジウム「植物生長促進微生物研究の新潮流」(2019)
- ② Hiroya Yurimoto, Koichi Inoue, and Yasuyoshi Sakai. Regulation of the expression of a methanol-induced transcription factor Mpp1 in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism (2018)
- ③ Yusuke Yoshida, Hiroyuki Iguchi, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. Analysis of B vitamins auxotrophy of *Methylobacterium* sp. living in the phyllosphere. Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism (2018)
- ④ Hiroya Yurimoto. Methanol-sensing machinery and signaling pathway in the methylotrophic yeast. *Non-conventional Yeasts: From Basic Research to Application* (2018)
- ⑤ Hiroya Yurimoto, Ryouta Ikeda, Saori Oda, and Yasuyoshi Sakai. Nuclear translocation of Hap complex components required for methanol-regulated gene expression in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. 28th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (2017)
- ⑥ Shin Ohsawa, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. Function of Wsc family proteins as a methanol-sensing machinery in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. 28th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (2017)
- ⑦ 由里本博也. メタノールを食べる酵母のユニークな代謝生理機能とその利用. 第 3 回バイオ応用工学特別セミナー「ビールと酵母について考えてみよう」(2017)
- ⑧ 由里本博也. 基礎研究を知ろう～意外に身近に棲む微生物の凄い能力を通じて～. 第 97 回農芸化学会サイエンスカフェ (2016)
- ⑨ Hiroya Yurimoto. Symbiotic interaction between microbes and plants at phyllosphere. The 2nd Joint Seminar of New Core to Core Program A: Advanced Research Networks on Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas. (2016)

- ⑩ Hiroya Yurimoto. Transcriptional regulation of methanol-regulated genes in the methylotrophic yeast. 14th International Congress on Yeasts (2016)
- ⑪ Kosuke Shiraishi, Takahiro Hioki, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. Intracellular dynamics of Hog1 in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. 14th International Congress on Yeasts (2016)
- ⑫ Shin Ohsawa, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. Regulation of methanol-inducible gene expression by Wsc family proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. 14th International Congress on Yeasts (2016)
- ⑬ Hiroya Yurimoto. Methanol sensing and signaling pathway in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism (2016)
- ⑭ Kosuke Shiraishi, Takahiro Hioki, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. Formation and function of mRNP granules in the methylotrophic yeast growing on methanol utilizing environment. Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism (2016)
- ⑮ Shin Ohsawa, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. Molecular machinery of methanol sensing in methylotrophic yeast. Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism (2016)

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：阪井 康能

ローマ字氏名：(SAKAI, Yasuyoshi)

研究協力者氏名：奥 公秀

ローマ字氏名：(OKU, Masahide)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。