

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04326

研究課題名(和文) 低炭素循環型社会形成に資するメタノール変換バイオプロセスの新技术開発と分子基盤

研究課題名(英文) Development of the novel methanol bioconversion systems for a low-carbon and resource-recycling society and elucidation of their molecular basis

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：低炭素循環型社会形成のために、メタノールを低炭素・資源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」が提唱されている。本研究では、メタンやメタノールなどのC1化合物を利用するC1微生物を、メタノールエコノミーにおけるバイオプロセスにおいて高度活用することを目的とし、C1微生物の代謝生理機能の分子基盤を解明するとともに、様々な炭素資源からメタノールへの変換プロセスの構築に関する新技术開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタノール酵母によるメタノールからの有用タンパク質生産の根幹を担うメタノール誘導制御機構について、転写制御因子の生理機能やメタノール濃度に応答した遺伝子発現制御機構を明らかにした。また、メタンやバイオマスからのメタノール変換プロセスおよびメタノールから有用物質への変換プロセスの新技术開発に活用できる基盤的知見を得た。本研究に明らかとなった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、低炭素循環型社会におけるバイオプロセスで活用することができる。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of establishment of the low-carbon and circular society, “methanol economy”, in which methanol is used as a key compound for the production of useful compounds, is advocated. In this project, we investigated molecular basis of C1-metabolism in C1-microorganisms which can utilize methane or methanol. We elucidated physiological functions of transcriptional regulators and molecular mechanism of methanol-dependent gene regulation in methylophilic yeasts which are used for heterologous protein production. Furthermore, we developed the basic technology of methanol production from various carbon resources such as methane and biomass and production of useful compounds from methanol.

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 メタン メタノール メタノール酵母 メタノール誘導性

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、研究者個人に帰属します。

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社会・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、天然ガス、化石燃料、CO₂、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(図1)。メタノールエコノミーにおけるバイオプロセスにおいては、メタンやメタノールなどのC1化合物を利用するC1微生物の代謝生理機能が活用できる。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微生物による有用物質生産(図1中の)の技術革新に加え、C1微生物によるC1化合物の代謝生理機能と、それを支える分子基盤を解明してこれを高度活用し、温室効果ガスであるメタンの酸化・生物資源化(図1中の)、CO₂からメタノールへの還元・固定(図1中の)、バイオマスからメタノールへの変換(図1中の)などの新技術開発を進める必要がある。特にメタノールを単一炭素源・エネルギー源として

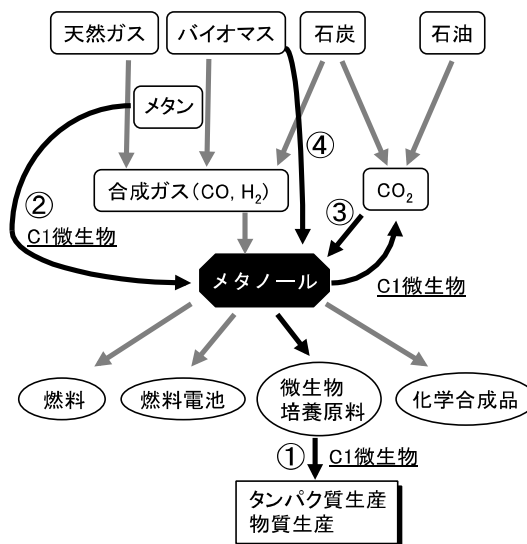


図1. メタノールを基幹物質とする工業体系
「メタノールエコノミー」

生育するメタノール資化性酵母(メタノール酵母)では、そのユニークな代謝系(強力なメタノール誘導性プロモーター)を活用した異種タンパク質生産系が構築され、本酵母は医薬品や産業用酵素などの様々な有用タンパク質を生産するための宿主として利用されている。我々はこれまでに、本酵母のメタノール代謝経路の生理的意義、メタノール誘導性遺伝子の発現制御様式ならびに関連する転写因子の機能解析など、メタノール酵母の代謝生理および分子細胞生物学的な研究を行ってきた。同時に、メタノール酵母異種タンパク質生産系を利用して、有用タンパク質生産に関する研究を行ってきた(Curr Issues Mol Biol 33:197-210, 2019)。しかしながら、強力なメタノール誘導性遺伝子発現の詳細な分子機構については、特にメタノール感知から転写制御因子に至るシグナル伝達については未解明な点が多く残されている。

一方、シェールガスやメタンハイドレートを含め将来的にも重要な天然資源となるメタンや、再生可能資源としてのバイオマス等、様々な炭素資源からのメタノールへの変換については、バイオプロセスによる変換システムは工業レベルでは確立されておらず、多大なエネルギーを投入するガス化・触媒反応による環境負荷の大きいプロセスとなっている。常温・常圧下でのメタノール生成が可能な生体触媒(酵素)としては、例えばメタン資化性細菌がもつメタンモノオキシゲナーゼがあるが、調製法や安定性などに問題があり、高度利用に向けた酵素機能開発が進んでいなかった。

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、「メタノールから有用物質への変換プロセス」と「様々な炭素資源からメタノールへの変換プロセス」に関する技術開発を行い、その開発の基盤となるC1微生物の代謝生理機能の分子基盤を解明することを目的とした。具体的には、1)「強力なメタノール誘導性遺伝子発現」という本酵母の重要形質を制御するメタノール誘導制御機構の分子基盤解明と、2)メタンやバイオマスからのメタノール変換技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酵母メタノール誘導制御機構の分子基盤解明

メタノール酵母による異種タンパク質生産の根幹を担うメタノール誘導制御機構について、各種転写因子の遺伝子破壊株を用いた作用機構解析、メタノール応答配列の解析、メタノール濃度に応答したシグナル伝達経路の解析、およびmRNAの可視化による動態制御解析を行った。

(2) メタンおよびバイオマスからのメタノール変換技術の開発

独自に開発したメタノールセンサー酵母 (Appl Microbiol Biotechnol 102:7017, 2018) を用いて高機能メタノール生成酵素の開発を行うとともに、C1 微生物における高発現や大腸菌などの異宿主細胞での新規代謝経路の構築を試みた。

4. 研究成果

(1) 酵母メタノール誘導制御機構の分子基盤解明

メタノール誘導性転写因子の生理機能解

これまでに取得した転写制御因子の遺伝子破壊株を用い、メタノール濃度に応答した遺伝子発現制御への関与を精査するための培養条件や解析条件の最適化を進め、それぞれの制御因子が関与する制御段階を明らかにした (Curr Issues Mol Biol 33:197-210, 2019)。メタノール酵母 *Candida boidinii* においてこれまでに取得した転写制御因子のうち、特にメタノール誘導の初期段階で中心的な役割を果たすと考えられる転写活性化因子について遺伝子プロモーター解析を進め、メタノールに応答する遺伝子発現に必要かつ十分な領域を2箇所同定した。さらに、この転写因子の発現制御や発現レベルを改変することにより、適切なメタノール誘導性遺伝子発現には、この転写因子が一定量以上必要であり、その発現量によってメタノール誘導性遺伝子の発現レベルが厳密に調節されることを明らかにした。

一方、*Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) において、メタノール誘導性遺伝子発現の転写活性化因子を構成的プロモーターによって強制発現するとともに、メタノール応答配列をタンデムに増幅した改変型プロモーターを構築し、メタノールに依存しない異種タンパク生産系の開発に成功した (FEMS Yeast Res 19:foz059, 2019)。

メタノール濃度に応答した遺伝子発現制御機構の解析

K. phaffii においてこれまでに取得した転写制御因子のうち、メタノール濃度に応答したシグナル伝達への関与が示唆されていた転写因子について、リン酸化動態や機能領域の解析を行った。酵母細胞をグルコース培地からメタノール培地に移すと、この転写因子のリン酸化レベルが顕著に減少し、さらにメタノール濃度に応じてリン酸化動態が変化することを明らかにした。さらにこの転写因子のドメイン欠失体やアミノ酸置換変異体を用いた解析を行い、高濃度および低濃度メタノールへの応答に重要な機能領域をそれぞれ同定した。

メタノール誘導性 mRNA の細胞内動態解析

C. boidinii においてメタノールにより強力に誘導される遺伝子のメタノール誘導性 mRNA を可視化解析する手法を確立した。この手法により、メタノール誘導時にメタノール誘導性 mRNA が一時的に顆粒構造を形成し、その細胞内動態とメタノール誘導性遺伝子の転写量およびタンパク質量の推移が連動することを明らかにした。

(2) メタンおよびバイオマスからのメタノール変換技術の開発

天然ガスやバイオマスを高効率にメタノールに変換する生体触媒(酵素)と、これを発現する微生物細胞の構築を目指し、メタノール生成酵素の高活性変異型酵素の開発や宿主細胞の構築を行った。高活性変異型酵素については、酵素遺伝子へのランダム変異や部位特異的変異を導入した変異型遺伝子ライブラリーを構築し、メタノールセンサー酵母によるスクリーニングを行った。これらを導入するメタノール酵母宿主株については、メタノール応答性や異種タンパク質生産能を向上させるための培養条件の最適化や、転写制御因子やシャペロン因子の高発現株の構築を行った。また、メタノール資化性細菌においてもメタノールセンサー細胞を構築した (J Biosci Bioeng 132:247, 2021)。

バイオマス由来の糖からのメタノール変換技術として、大腸菌にメタノール細菌のメタノール代謝酵素を導入することにより、逆行メタノール代謝経路の構築に成功した (Biosci Biotechnol Biochem 84:1062, 2020)。また、メタノールからの機能性生体高分子の生産例として、メタノール細菌の細胞壁多糖成分がイネに対する増収効果をもつことを報告した (Microb Biotechnol 14:1385-1396, 2021)。これは、メタノールを炭素源として高密度培養が可能なメタノール細菌を、メタノールバイオエコノミーで活用する具体例となった。

ガス状アルカンを原料とする有用物質生産宿主として有望なプロパン資化性細菌の C1 代謝経路についての研究を進め、本菌株は C1 炭素を資化するためのホルムアルデヒド固定系路は持たないが、メタノールから CO₂ への酸化に関わる一連の酵素群をもつことを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ohsawa Shin, Inoue Koichi, Isoda Takahiro, Oku Masahide, Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Methanol sensor Wsc1 and MAP kinase suppress degradation of methanol-induced peroxisomes in methylotrophic yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs.254714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.254714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yurimoto Hiroya, Iguchi Hiroyuki, Di Thien Do Thi, Tani Akio, Okumoto Yutaka, Ota Atsushi, Yamauchi Takahiro, Akashi Takahiro, Sakai Yasuyoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Methanol bioeconomy: promotion of rice crop yield in paddy fields with microbial cells prepared from natural gas derived C 1 compound	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbial Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1385-1396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1751-7915.13725	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Iguchi Hiroyuki, Umeda Ryohei, Taga Hiroki, Oyama Tokitaka, Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi	4. 巻 128
2. 論文標題 Community composition and methane oxidation activity of methanotrophs associated with duckweeds in a fresh water lake	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 450 ~ 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.04.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Methylotrophic Yeasts: Current Understanding of Their C1-Metabolism and its Regulation by Sensing Methanol for Survival on Plant Leaves	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 197 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21775/cimb.033.197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Shinobu, Tsutsumi Noriko, Terui Yuji, Kong XiangYu, Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Engineering the expression system for Komagataella phaffii (Pichia pastoris): an attempt to develop a methanol-free expression system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEMS Yeast Research	6. 最初と最後の頁 foz059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsyr/foz059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 由里本博也、阪井康能	4. 巻 82
2. 論文標題 メタノールバイオエコノミー：C1 微生物代謝生理の分子基盤を活用した資源循環型社会の構築	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 酵素工学ニュース	6. 最初と最後の頁 26-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeya Tomoyuki, Yamakita Miyabi, Hayashi Daisuke, Fujisawa Kento, Sakai Yasuyoshi, Yurimoto Hiroya	4. 巻 84
2. 論文標題 Methanol production by reversed methylotrophy constructed in Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1062-1068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1715202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 由里本博也、阪井康能	4. 巻 99
2. 論文標題 合成生物学によるスーパーメタン酸化生体触媒の創製	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本エネルギー学会機関誌 えねるみくす	6. 最初と最後の頁 141-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Casaroli Viviane Carnier, Orita Izumi, Katayama Shiori, Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi, Fukui Toshiaki	4. 巻 132
2. 論文標題 Methylotrophic bacterium-based molecular sensor for the detection of low concentrations of methanol	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 247 ~ 252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ma Pengli, Takashima Shigeo, Fujita Chikako, Yamada Saya, Oshima Yusuke, Cai Hao Liang, Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi, Hayakawa Takashi, Shimada Masaya, Ning Xia, Wei Baoyao, Nakagawa Tomoyuki	4. 巻 38
2. 論文標題 Fatty acid composition of the methylotrophic yeast Komagataella phaffii grown under low and high methanol conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Yeast	6. 最初と最後の頁 541 ~ 548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/yea.3655	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高木 忍、由里本 博也、阪井 康能	4. 巻 99
2. 論文標題 多様な炭素源を利用するメタノール資化性酵母の遺伝子発現系	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 516 ~ 520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.99.10_516	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohsawa Shin, Oku Masahide, Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulation of Peroxisome Homeostasis by Post-Translational Modification in the Methylotrophic Yeast Komagataella phaffii	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 887806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.887806	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 由里本博也
2. 発表標題 C1酵母で拓くメタノールバイオエコノミー
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会シンポジウム「酵母研究の産業利用への展開；いま「Non-conventional yeasts」が新しい」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 由里本博也
2. 発表標題 メタノールバイオエコノミーで活用するC1酵母のメタノール誘導機構
3. 学会等名 第198回酵母細胞研究会例会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroya Yurimoto, Koichi Inoue, and Yasuyoshi Sakai
2. 発表標題 Regulation of the Expression of a Methanol-Induced Transcription Factor Mpp1 in the Methylophilic Yeast <i>Candida boidinii</i>
3. 学会等名 The 35th International Specialized Symposium on Yeasts (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 由里本博也
2. 発表標題 C1酵母の葉面での生存戦略とメタノール感知機構
3. 学会等名 第18回新産業酵母研究会講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上紘一、岩瀬公佑、由里本博也、阪井康能
2. 発表標題 Candida boidiniiにおけるメタノール誘導性転写因子Mpp1の生理機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木田航平、岩崎光司、由里本博也、阪井康能
2. 発表標題 プロパン資化性細菌Gordonia sp. TY-5株におけるC1代謝と発現制御
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 由里本博也、阪井康能
2. 発表標題 C1微生物-植物間相互作用による炭素循環と作物増収
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会シンポジウム「微生物と植物が駆動する新しい物質循環像とバイオ分野への展開」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 由里本博也
2. 発表標題 メタノールから生産する微生物製剤の葉面散布による作物増収
3. 学会等名 バイオインダストリー協会「C1バイオエコノミー勉強会 -新たな炭素循環像を基にしたC1炭素の循環的利用-」(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 メタンからの化学品の製造方法	発明者 山本恭士、丸山悟史、 阪井康能、由里本博也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-110493	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

微生物やその細胞壁成分の葉面散布による酒米の増収に成功 https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2020-12-11-0
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	阪井 康能 (SAKAI Yasuyoshi)		
研究協力者	白石 晃将 (SHIRAIISHI Kosuke)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------