

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660079

研究課題名(和文) C1化合物とその代謝制御システムを利用した新規代謝工学技術の開発

研究課題名(英文) Development of novel metabolic engineering technology using one-carbon compounds and their metabolic regulatory systems

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) 3,100,000円

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化合物を炭素源・エネルギー源として利用する微生物(C1微生物)が持つ、C1化合物代謝系酵素遺伝子や、C1化合物あるいはその代謝に応答する遺伝子発現制御機構・代謝制御システムを活用した新規代謝工学技術の開発を目的とした。ホルムアルデヒド固定酵素をメタノール資化性細菌やその他の有用微生物に導入した株について、代謝フローの変動をメタボローム解析により評価した。また、メタノール資化性酵母において、メタノール誘導性遺伝子発現制御に関わる転写因子の機能解析に加えて、シグナル伝達に関与する新規因子として見出した細胞膜センサータンパク質の機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：In order to develop novel metabolic engineering technology using one-carbon (C1) compounds and their metabolic regulatory systems, we investigated the metabolic flow of gene-engineered strains harboring the artificial bifunctional formaldehyde-fixation enzyme and molecular function of transcriptional regulators involved in regulation of C1 metabolism. Furthermore, we found that the sensor proteins localized in plasma membrane were involved in regulation of methanol-inducible gene expression in the methylotrophic yeast.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ホルムアルデヒド メタノール 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

微生物や植物において、遺伝子操作により細胞内の代謝経路を合目的的に改変する代謝工学は、有用物質生産やバイオレメディエーションの技術開発のための強力なツールの一つであり、対象とする宿主生物が元来持っていない酵素遺伝子を導入することによって、新しい代謝経路(反応)を構築することができる。また、宿主生物に新たな遺伝子発現制御システムを導入することにより、人工的に遺伝子発現を制御することが可能である。申請者らはこれまでに、メタンやメタノールなどの C1 化合物を利用する微生物(C1 微生物)について、C1 化合物の代謝生理機能、遺伝子発現制御機構、異種タンパク質生産や環境技術開発などの応用機能開発に関する研究を行ってきた。その過程で、異種生物に C1 化合物応答性や C1 化合物資化性を付与するための人工遺伝子回路の開発に活用可能な研究成果(枯草菌におけるホルムアルデヒド応答機構、ホルムアルデヒド固定系路の異種生物への導入、メタノール資化性酵母のメタノール誘導機構)を得た。

2. 研究の目的

本研究では、メタンやメタノール、ホルムアルデヒドなどの C1 化合物を炭素源・エネルギー源として利用する微生物(C1 微生物)が持つ、C1 化合物代謝系酵素遺伝子や、C1 化合物あるいはその代謝に応答する遺伝子発現制御機構・代謝制御システムを「遺伝子発現制御ユニット」として宿主生物に導入し、C1 化合物応答性や C1 化合物資化性を付与する人工遺伝子回路を構築することを目的とした。「ホルムアルデヒド応答スイッチ」、「人工ホルムアルデヒド固定酵素」、「メタノール誘導性遺伝子発現制御ユニット」を人工遺伝子回路開発のための3つの要素技術とし、メタノールやホルムアルデヒドを有用物質生産のための培養原料だけでなく制御物質としても利用する新しい代謝工学技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 枯草菌のホルムアルデヒド応答性遺伝子発現システムの大腸菌への導入

枯草菌の *hxlAB* オペロンは、上流に存在する DNA 結合タンパク質 HxlR 依存的に、ホルムアルデヒド特異的な転写活性化を受ける(図1)。大腸菌に HxlR の結合配列を含む *hxlAB* プロモーター支配下に GFP を発現させる遺伝子と *hxlR* を同時に導入し、ホルムアルデヒド応答スイッチとして機能するかどうかを調べた。

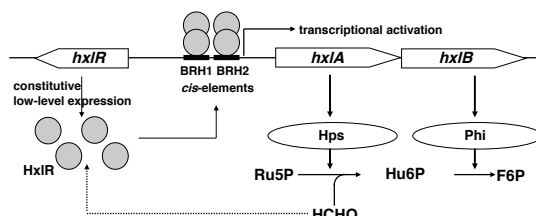


図1 枯草菌のホルムアルデヒド応答性遺伝子発現システム

(2) 人工ホルムアルデヒド固定酵素の異種生物への導入

これまでに、メタノール資化性細菌においてホルムアルデヒド固定反応を触媒するヘキサロース 6-リン酸シンターゼ(Hps)とホスホヘキサロイソメラーゼ(Phi)を人工的に融合した Hps-Phi を開発し、大腸菌と植物での発現に成功している(図2)。本研究では、メタノール資化性細菌やその他の有用微生物に導入した株について、プロモーターや培養条件の違いによる代謝フローの変動を、メタボローム解析により評価した。

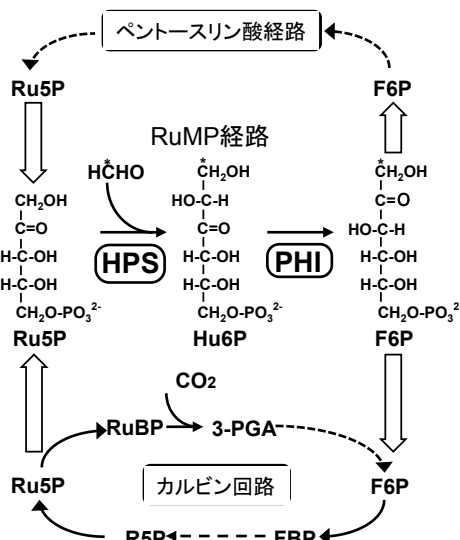


図2 HPS, PHI の異種生物への導入

(3) メタノール誘導性遺伝子発現制御ユニットの分子機構解明

メタノール資化性酵母において、メタノール誘導性プロモーターとその制御因子、シグナル伝達因子、またその発現制御を支配する代謝フローを「メタノール誘導性遺伝子発現制御ユニット」と捉え、その分子機構を解明するため、転写制御因子やシグナル伝達因子の遺伝子の破壊株や各種発現株を構築して、機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 枯草菌のホルムアルデヒド応答性遺伝子発現システムの大腸菌への導入

枯草菌の *hxlAB* プロモーター中の HxlR 結合配列 BRH1, BRH2 配列を保持した人工

ロモーターの支配下に GFP をレポータータンパク質として発現するようなプラスミドと HxlR を構成的に発現するようなプラスミドの構築を進めたが、最終的にホルムアルデヒド応答スイッチとして機能するかどうかを確認することができなかった。配列の最適化やプラスミド構築を改善する必要がある。

## (2) 人工ホルムアルデヒド固定酵素の異種生物への導入

メチロトロフ細菌のホルムアルデヒド固定代謝経路の有用微生物への導入に関して、Hps-Phi 人工融合酵素のメタノール資化性細菌、大腸菌での発現株について、培地に添加する化合物の検討とメタボローム解析を行った。

*Methylobacterium extorquens* AM1 に *hps-phi* 遺伝子を導入した株については、高発現プロモーター支配下に発現する株と中程度に発現するプロモーター支配下に発現する株を先行研究において構築していた。メタノール培養時には、高発現株では野生株に比べて菌体収量が低下しており、これは、*hps-phi* の高発現により、宿主内の代謝物およびエネルギーバランスに変化が生じ、炭素固定方向に代謝が進まなくなったためではないかと推測されていた。そこで、この生育低下を補うことを目的として、*hps-phi* 高発現により供給が不足することが予想されるリボース 5-リン酸およびエネルギー源であるギ酸を培養液中に添加により菌体収量が回復したが、本研究ではこの時の主要代謝産物の細胞内存在量をメタボローム解析により定量した。得られた結果は、細胞内のエネルギーレベル・代謝状態によって、Hps-Phi が炭素固定方向でなく、その逆方向（五単糖リン酸合成方向）に代謝が進むことを示唆する結果であった。以上の結果より、*hps-phi* 発現に用いるプロモーターの強弱により、代謝フローが大きく変動することがわかった（図 3）。

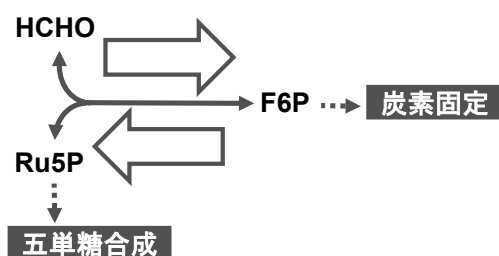


図 3 Hps-Phi 発現による代謝フローの変化

一方、大腸菌導入株については、他の C1 代謝系も同時に導入した株を構築し、連続反応による新規代謝系の構築に成功した。また、他のいくつかの有用生物（原核および真核）への導入を行い、今後その発現の確認を確認し、発現株の評価を行っていく。

## (3) メタノール誘導性遺伝子発現制御ユニットの分子機構解明

メタノール資化性酵母のメタノール誘導性遺伝子発現制御ユニットを異種生物へ導入する際に必要な基盤的知見を得るために、発現制御に関わる転写因子の機能解析に加えて、メタノール誘導性遺伝子発現におけるシグナル伝達に関与する新規因子として見出した細胞膜センサータンパク質 (Wsc ファミリータンパク質) の機能解析を行った。

当該タンパク質をコードする遺伝子破壊株では、メタノール培養時に顕著な生育遅延が観察され、メタノール誘導性遺伝子の転写レベルが低下していた。さらに、メタノール培養時の遺伝子破壊株ではホルムアルデヒドが蓄積していたことから、当該タンパク質は培地中のメタノール濃度に応じてメタノール代謝系酵素の遺伝子発現を制御し、メタノール代謝の中でも特にホルムアルデヒド代謝に重要な役割を持つことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① H. Iguchi, H. Yurimoto, and Y. Sakai, Interactions of methylotrophs with plants and other heterotrophic bacteria. *Microorganisms.*, 3, 137-151, 2015. 査読有  
DOI: 10.3390/microorganisms3020137
- ② S. Oda, H. Yurimoto, N. Nitta, Y. Sasano, and Y. Sakai, Molecular characterization of Hap complex components responsible for methanol-inducible gene expression in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Eukaryot. Cell*, 14, 278-285, 2015. 査読有  
DOI: 10.1128/EC.00285-14
- ③ 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>
- ④ 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>
- ⑤ 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>

- ⑥ 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)

[学会発表] (計7件)

- ① 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)
- ② 大澤 晋、由里本博也、阪井康能、メタノール誘導性遺伝子発現に関わる PpWsc1 と PpWsc2 の機能、酵母遺伝学フォーラム第 47 回研究報告会、2014 年 9 月 1-3 日、東京大学 (東京都・文京区)
- ③ S. Osawa, H. Yurimoto, and Y. Sakai, Functional analysis of the Wsc family proteins related to methanol-inducible gene expression in methylotrophic yeasts, Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism, 2014 年 8 月 10-15 日, South Hadley, MA (米国)
- ④ H. Yurimoto, D. Kajihara, and Y. Sakai, 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)
- ⑤ 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)
- ⑥ 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)
- ⑦ H. Yurimoto, D. Kajihara, and Y. Sakai, 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