

《農芸化学奨励賞》

微生物による C₁ 化合物代謝とその生理機能に関する分子細胞生物学的研究

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 助教授

由里本博也

メタンやメタノールなどの還元型 C₁ 化合物は、自然界に大量かつ広範に存在する。これらの C₁ 化合物を唯一の炭素源、エネルギー源として利用する微生物（メチロトローフ）は、原核生物から真核生物まで多岐にわたり、その代謝の様式も多様である。メタンやメタノールに加え、自然界にはリグニンやペクチンなどのメチル基あるいはメトキシ基を有する多様な化合物が存在し、炭素循環の過程ではこれらの C₁ ユニットが遊離した後にメチロトローフによって利用される。一方、メタノールは天然ガスの主成分であるメタンや未利用バイオマスから合成可能な循環型炭素資源であるとともに、食糧と競合しない微生物培養原料である。したがって、メチロトローフによる C₁ 化合物代謝を詳細に理解することは、自然界の物質循環過程を知るうえでも、微生物による循環型資源利用の観点からも重要である。

本研究では、微生物による C₁ 化合物代謝の中心に細胞毒性が高いホルムアルデヒド (HCHO) が位置することに着目し、HCHO 代謝に関連する酵素の生理機能や関連遺伝子群の発現制御機構を解析した。メチロトローフ酵母の C₁ 化合物代謝については、メタノール誘導性プロモーターの定量的評価から、代謝の流れにより制御される新しい遺伝子発現調節機構を見いだした。また HCHO 代謝にかかわる酵素の生理的重要性を解明し、HCHO 解毒にとどまらない新しい生理機能を明らかにした。さらに、メチロトローフ酵母の異種遺伝子発現系を用い、分子細胞生物学的知見に立脚した活性型有用酵素生産法を開発

した。一方、細菌とアーキアでは、HCHO 変換にかかる酵素がメチロトローフだけでなく非メチロトローフにも広く存在することを見いだし、それぞれの代謝の意義を分子遺伝学的、生化学的に立証した。以下にその概要を述べる。

1. メチロトローフ酵母の C₁ 化合物代謝とその利用

メタノールを唯一の炭素源、エネルギー源として生育できるメチロトローフ酵母は、安価なメタノールを利用する物質生産や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大量発現の宿主として、またメタノール培養時に発達するペルオキシソームの形成・分解研究のモデル生物として広く利用されている。本酵母のメタノール代謝はペルオキシソーム酵素であるアルコールオキシダーゼ (AOD) によるメタノールの HCHO への酸化により始まる（図 1）。HCHO はペルオキシソーム酵素であるジヒドロキシアセトンシンターゼ (DAS) により固定されて資化経路に導かれる一方で、細胞質でグルタチオン (GSH) 依存性の酸化経路によって CO₂ にまで酸化される。筆者らは主に *Candida boidinii* を用い、ペルオキシソーム酵素の発現制御機構、HCHO 代謝の意義を明らかにし、さらに本酵母における活性型有用酵素生産法を開発した。

1.1 ペルオキシソーム酵素の発現制御

C. boidinii はメタノールだけでなく、オレイン酸や D-アラニンを単一炭素源としたときにもペルオキシソームが発達する。筆者らは、種々の炭素源、窒素源で培養したときにペルオキシソームの主要な酵素および膜タンパク質の発現制御様式を主に

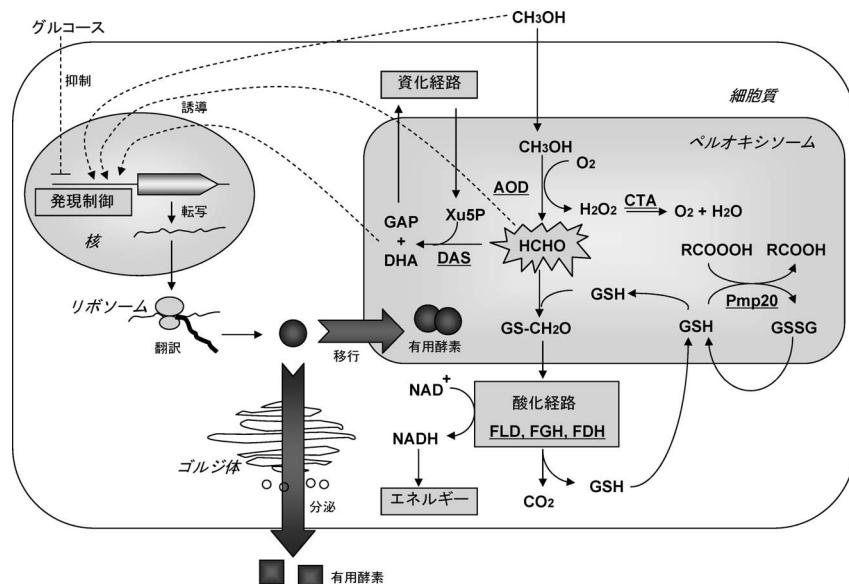
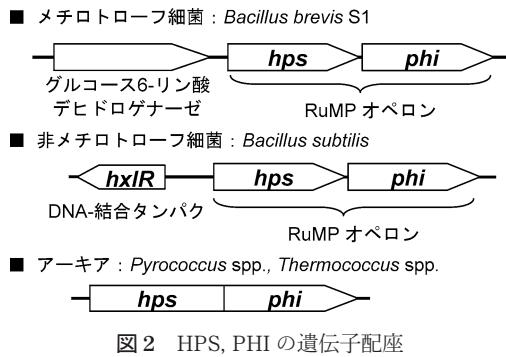


図 1 メチロトローフ酵母のメタノール代謝の概要と有用酵素生産

酵素名の略号: AOD, alcohol oxidase; DAS, dihydroxyacetone synthase; CTA, catalase; FLD, formaldehyde dehydrogenase; FGH, S-formylglutathione hydrolase; FDH, formate dehydrogenase; Pmp20, glutathione peroxidase.

物質名の略号: Xu5P, xylulose 5-phosphate; DHA, dihydroxyacetone; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; GSH, glutathione.



転写レベルで解析した。特にメタノール代謝にかかる複数の酵素遺伝子については、その発現制御様式とともに各遺伝子プロモーターにおけるメタノール誘導性の強さを定量的に評価した。その過程で、DAS 遺伝子プロモーターが AOD 遺伝子プロモーターに先行して強力に発現すること、AOD 遺伝子プロモーターが DAS による HCHO の同化代謝産物で誘導されることを発見した。これは C₁ 代謝の流れにより制御される新しい協調的な遺伝子発現調節機構の存在を示すものであり、HCHO の過剰蓄積を防ぐための巧妙な生理機能であると考えられる。

1.2 HCHO 代謝の生理的意義

GSH 依存性 HCHO 酸化経路は細菌から高等真核生物まで保存された HCHO 解毒機構である。メチロトローフ酵母では、メタノール酸化で生じた HCHO の一部は本経路によって CO₂ にまで酸化され、その過程で得られる NADH はエネルギー源として利用される。本経路の酵素（ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ : FLD, S-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼ : FGH, ギ酸デヒドロゲナーゼ : FDH）のうち、筆者らは FLD と FGH の酵素遺伝子破壊株をメチロトローフ酵母で初めて取得した。その増殖特性の解析から、HCHO 酸化はエネルギー獲得だけでなく、HCHO の解毒にも必須であること、さらに HCHO を捕捉する GSH の再生にも関与するという新知見を得た。また GSH がペルオキシソーム内に著量存在し、HCHO の捕捉だけでなく GSH ペルオキシダーゼ (Pmp20) による過酸化脂質の還元に重要であることを見いだした。さらにアルコールデヒドロゲナーゼが触媒するギ酸メチル生成反応も HCHO 解毒に重要な役割を担うことを明らかにした。

1.3 活性型有用酵素生産法の開発

C. boidinii のメタノール誘導性プロモーターを利用する異種遺伝子発現系を用い、食品産業に有用な放線菌由来のトランスクルタルミナーゼ (TG) の高分泌生産や D-アミノ酸オキシダーゼなどの有用オキシダーゼのペルオキシソーム内大量生産に成功した。TG は従来異種生産が困難であったが、TG のプロ配列と成熟型配列を独立して trans に共発現させたり、糖鎖付加部位を変異させることにより、活性型酵素の高発現に成功した。これはプロ配列がシャベロン様活性をもっており、分子内だけでなく分子間でも活性発現に寄与しうることを示している。これらはタンパク質の局在化や折りたたみなど、分子細胞生物学的知見に立脚した新しい活性型酵素生産法を構築したものである。

2. 原核微生物の HCHO 代謝

2.1 細菌のリブロースモノリン酸経路

メチロトローフ細菌の C₁ 化合物代謝においても HCHO は

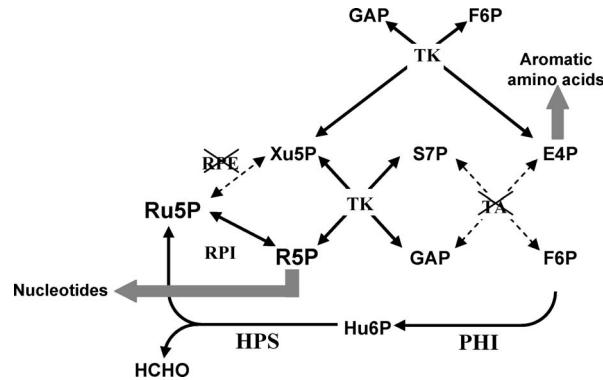


図 3 *T. kodakaraensis* におけるペントースリン酸合成経路

酵素名の略号: RPE, ribulose-5-phosphate 3-epimerase; RPI, ribose-5-phosphate isomerase; TK, transketolase; TA, transaldolase; HPS, 3-hexulose-6-phosphate synthase; PHI, 6-phospho-3-hexuloisomerase.

物質名の略号: Ru5P, ribulose 5-phosphate; Xu5P, xylulose 5-phosphate; R5P, ribose 5-phosphate; S7P, sedoheptulose 7-phosphate; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; E4P, erythrose 4-phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; Hu6P, hexulose 6-phosphate.

重要な代謝中間体である。細菌の HCHO 固定経路の一つであるリブロースモノリン酸 (RuMP) 経路の鍵酵素 3-ヘキスロース-6-リン酸シンターゼ (HPS) と 6-ホスホ-3-ヘキスロイソメラーゼ (PHI) はメチロトローフ細菌だけでなく、非メチロトローフ細菌やアーキアに広く存在している（図 2）。細菌では HPS および PHI をコードする遺伝子はオペロンを形成しており、HCHO の存在によってその発現が誘導され、HCHO の解毒に働くことを明らかにした。本オペロンのホルムアルデヒド依存的な転写活性化の分子機構は全くわかつていなかったが、非メチロトローフ細菌である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の HPS / PHI オペロン上流に存在する遺伝子産物 (HxIR) が、本オペロン上流領域に結合する新規 DNA 結合性転写活性化因子であることを明らかにした。

2.2 アーキアの HPS/PHI の生理機能

超好熱性アーキア *Pyrococcus horikoshii* や *Thermococcus kodakaraensis* では、HPS と PHI は一つの読み枠にコードされる二機能性酵素となっている。アーキアの HPS, PHI に関する知見は皆無であったが、筆者らはこれらの二機能性酵素を大腸菌内で発現させ、相当する酵素活性をもつことを示した。またその生理的意義に関して、ペントースリン酸経路を欠いたアーキアの一群に HPS と PHI が存在することに着目した。ペントースリン酸経路が不完全なアーキアでは、核酸合成の前駆体となるリボース 5-リン酸の供給経路が不明であったが、*T. kodakaraensis* で当該遺伝子を破壊してその生育特性を調べることにより、HPS-PHI のホルムアルデヒド固定の逆反応がペントースリン酸の供給に必須であることを酵素化学的・遺伝学的に実証した（図 3）。これはアーキアの糖代謝に明確な新知見を与えただけでなく、RuMP 経路が C₁ 化合物代謝以外に重要な生理的機能をもつことを示した最初の例であり、同一酵素が細菌とアーキアでは正逆異なる方向の反応にその生理的意義をもつことを初めて明らかにしたものである。

おわりに

本研究により、微生物の C₁ 化合物代謝に関連する酵素の生

理機能や遺伝子の発現制御機構にいくつかの新しい知見を与えることができた。しかし特に遺伝子発現制御機構については、C₁化合物による誘導のシグナル伝達経路や転写制御機構の分子メカニズムに未解明な点が多く残されている。現在この解明のための研究を進めているところであるが、これが解明されれば、異種遺伝子発現系の強化につながるだけでなく、C₁化合物誘導性を異種生物に導入してC₁化合物利用の幅を広げるなど新たな展開が期待できる。

本研究は京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻制御发酵学分野で行われたものです。本研究を行う機会を与えていた

だき、学部生の頃から今まで終始ご指導、ご助言を賜りました京都大学名誉教授 加藤暢夫先生（現 京都学園大）、京都大学大学院農学研究科教授 阪井康能先生に深甚なる感謝の意を表します。本研究成果は制御発酵学分野で研究を行われた多く皆様の多大なる努力の賜物であり、すべての卒業生、在学生の皆様に厚く御礼申し上げます。またここですべての方のお名前を挙げることができませんが、国内外の大学・企業の共同研究者の皆様に深く感謝申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦いただきました日本農芸化学会関西支部長 清水昌先生ならびに諸先生方に厚く御礼申し上げます。