

図2 HPS, PHI の遺伝子配座

転写レベルで解析した。特にメタノール代謝にかかわ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も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グルタミナーゼ (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ペ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てい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 細菌のリブローズモノリン酸経路

メチロトロフ細菌の C₁ 化合物代謝においても HCHO は

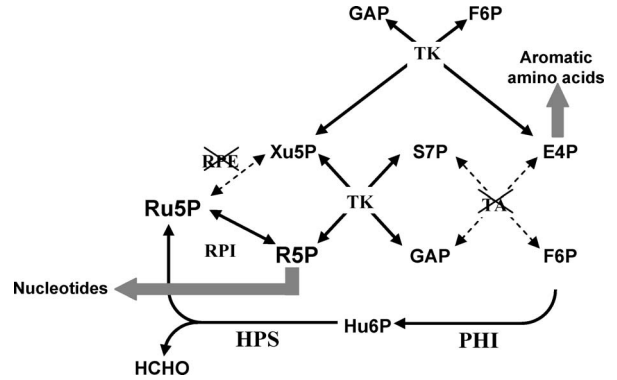


図3 T. kodakaraensis におけるペントースリン酸合成経路
酵素名の略号: RPE, ribulose-5-phosphate 3-epimerase; RPI, ribose-5-phosphate isomerase; TK, transketolase; TA, transaldolase; HPS, 3-hexulose-6-phosphate synthase; PHI, 6-phospho-3-hexuloisomerase.
物質名の略号: Ru5P, ribulose 5-phosphate; Xu5P, xylulose 5-phosphate; R5P, ribose 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ズモノリン酸 (RuMP) 経路の鍵酵素 3-ヘキソース-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) はメチロトロフ細菌だけでなく、非メチロトロ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っていなかったが、非メチロトロ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 (HxlR) 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部に 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、 C_1 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、 C_1 化合物誘導性を異種生物に導入して C_1 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発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、学部生の頃から現在まで終始ご指導、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はできませんが、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。