

「多様な天然炭素資源の活用に資する革新的触媒と創出技術」  
平成27年度採択研究代表者

H27 年度  
実績報告書

阪井 康能

京都大学大学院農学研究科  
教授

合成生物学によるメタン酸化触媒の創製

## § 1. 研究実施体制

### (1) 阪井グループ

- ① 研究代表者: 阪井 康能 (京都大学農学研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・合成生物学による superMOB の創製
  - ・メタン酸化原理の解明
  - ・MeOH 菌細胞触媒の創製とリアクターによるメタンからの有用物質生産

### (2) 嶋グループ

- ① 主たる共同研究者: 嶋 盛吾 (北海道大学低温科学研究所、客員教授)
- ② 研究項目
  - ・メタン酸化系酵素の構造生化学

### (3) 福居グループ

- ① 主たる共同研究者: 福居 俊昭 (東京工業大学生命理工学研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・合成生物学による superMOB の創製
  - ・メタンを原料とした有用物質生産が可能な細胞触媒の創製

## § 2. 研究実施の概要

シェールガスの台頭により未来型資源としてメタンが注目されているが、メタンを有効利用するための夢の反応、“メタノールへのメタン酸化反応”は既存の触媒では困難である。一方、地球上には、この反応をすでに実現し、年間10億トンのメタン酸化を実現している微生物、“メタン酸化菌”が存在する。本研究では、メタン酸化菌が持つメタン酸化反応の分子機構と原理を解明し、工業生産展開可能な全く新しいメタン酸化触媒を合成生物学により創製、開発することを目的とし、「スーパーメタン酸化生体触媒(superMOB)の創製」、「メタン酸化原理の解明」、「メタンを直接基質とした有用物質生産のための細胞触媒創製」の3項目に関する研究を行っている。各項目の平成 27 年度実施概要は以下の通りである。

### 1. superMOB の創製

本研究ではメタン酸化反応以外の全てのメタン資化に必要な代謝を備えるメタノール資化性菌(MeOH 菌)を宿主細胞として用い、高活性(superactive)、細胞内で活性型への折りたたみ効率が高く(superfolder)、天然型 MOB とは全く異なる一次構造(unique sequence)、を持つ superMOB を創製する。平成 27 年度は、メタン酸化活性を指標としたスクリーニングが可能な新規 MOB 活性評価系を確立するため、宿主に用いる菌株の選抜、遺伝子操作系の整備、培養・反応諸条件の検討を行うとともに、メタン酸化菌のメタンモノオキシゲナーゼ(pMMO および sMMO) 遺伝子の発現ベクターの構築と superMOB 創製にむけてのスクリーニング系の構築に着手した。

### 2. メタン酸化原理の解明

メタン酸化菌における MMO 生合成過程における構造形成機序の解析を構造解析とともにを行い、これらの知見をふまえて新規 DNA 断片の再設計、再スクリーニングを行うことで、superMOB を開発する。活性と折りたたみに関する種々のアミノ酸変異体についても活性評価と構造解析を行い、MOB 反応機構の解析とメタン酸化原理の解明を行う。平成 27 年度は、pMMO および sMMO 遺伝子から MOB 活性をもつ酵素断片ライブラリーの設計を行った。

### 3. メタンを直接基質とした有用物質生産のための細胞触媒創製

superMOB を物質生産代謝経路で機能させることで、メタンから有用物質への多段階代謝を効率良く行う“superMOB 細胞触媒”を作製し、それを用いた高生産性バイオリクターを構築する。細胞触媒は、物質生産代謝の設計と構築、転写装置の改変による発現最適化など、合成生物学的アプローチを駆使して開発する。生産する有用物質として低環境負荷型高分子素材であるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)共重合体および化成品候補タンパク質を対象とし、平成 27 年度は、タンパク質生産のためのメタノール酵母宿主細胞の整備を行うとともに、PHA 共重合体を生合成する人工代謝経路の鍵酵素遺伝子を MeOH 菌に導入した。

代表的原著論文

1. 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).