

「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

H28 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(研究機関別)

- ① 研究代表者: 阪井 康能 (国立大学法人 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(研究機関別)

- ① 主たる共同研究者: 嶋 盛吾 (国立大学法人 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(研究機関別)

- ① 主たる共同研究者: 福居 俊昭 (国立大学法人 東京工業大学 生命理工学院 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28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28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、メタノール酵母およびメタノール細菌を宿主細胞とするメタノールセンサー細胞の構築を進めた。高感度センサー開発の基盤となるメタノールセンシング機構の解析も行った。また、メタン酸化菌のメタンモノオキシゲナーゼ(pMMOおよびsMMO)の触媒部位や各サブユニットを発現する菌株を構築し、その発現産物の性状解析を行った。

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28年度は、MMO生合成過程を追跡するための生化学的実験手法およびその材料を整備した。さらにMOB活性をもつ酵素断片ライブラリーの基になる新規メタン資化性微生物の分離を行った。また酵素精製に必要な菌体を生産する培養法も確立した。

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28年度も前年度に引き続き、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メタノール細菌に導入した。

代表的な原著論文

1. Shin Ohsawa, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. Novel function of Wsc proteins as a methanol-sensing machinery in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Microbiol.*, 104: 349-363 (2017).
2. Tristan Wagner, Jörg Kahnt, Ulrich Ermler and Seigo Shima. Didehydroaspartate modification in methyl-coenzyme M reductase catalyzing methane formation. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55: 10630-10633 (2016).