

「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

H29 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 (京都大学大学院農学研究科 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 29 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微生物を宿主細胞として用い、高活性 (super active)、細胞内で活性型への折りたたみ効率が良く (super folder)、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 29 年度は、高感度メタノールセンサー細胞とセルソーターを用い、メタノール生成酵素反応により生じる  $\mu\text{M}$  レベルのメタノールを検出するための基本的な諸条件 (培養条件、反応条件、解析条件など) を最適化した。これにより前年度より 1 オーダー感度が向上した。高感度化により酵素反応が検出可能か確認したところ、ペクチンメチルエステラーゼを例に、菌体当たりの酵素活性の強弱を、評価・分別できることを FACS 解析より確認した。また、前年度に引き続き、pMMO 触媒領域、および sMMO をメタノール酵母および細菌に導入し、活性発現のための諸条件 (遺伝子配列の最適化、培養条件、タンパク質の発現の追跡、シャペロンの有無など) を検討した。現在、メタノールセンサー酵母において、メタン酸化活性を示す MOB 断片が見いだされつつあり、生化学的検証を加えている。

### 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 29 年度は、好熱好酸性メタン資化性菌などの pMMO の DNA 断片、可溶化を向上させる変異体、などを構築し、MOB 活性について、その活性評価と推定構造の検証を行った。一方、メタン酸化菌において、sMMO の生合成過程を追跡する手法を確立し、sMMO 誘導時に特異的に誘導され、sMMO と相互作用するタンパク質候補を同定した。

### 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29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。