

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「合成生物学によるメタン酸化触媒の
創製」

研究終了報告書

研究期間 2015年12月～2021年3月
(新型コロナウイルス感染症の影響を受け2021年9月まで延長)

研究代表者: 阪井康能
(京都大学大学院農学研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

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た。

本研究における、superMOB ならびに細胞触媒の開発にあたっては、阪井 G を軸に、嶋 G による立体構造からの提案、阪井 G での DNA 設計とセルソーター (FACS) を用いた MOB 活性断片を探索し、superMOB を阪井 G (メタノール資化性酵母) と福居 G (メタノール資化性細菌) で宿主細胞に導入して細胞触媒としての性能を評価するという体制で行った。

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 (酵母・細菌) 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高く (super folder)、天然型 MOB とは全く異なる一次構造 (unique sequence) を持つ superMOB を創製した。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 (阪井 G) およびメタノール細菌 (福居 G) 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、高感度メタノールセンサー細胞と FACS を用い、メタノール生成酵素反応により生じる μM 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 (Takeya et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018; Casaroli et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 2021)。阪井 G において、実際にメタノール生成酵素反応が検出可能かペクチンメチルエステラーゼを例に確認したところ、菌体当たりの酵素活性の強弱を評価・分別できることがわかった。このようにして確立した高感度メタノールセンサー酵母細胞と、FACS を用いたメタノール生成酵素活性評価系を用い、膜結合型メタンモノオキシゲナーゼ (pMMO) 最小触媒領域 (spmoB) の予測立体構造を基にした新規リンカー配列の挿入と、触媒部位周辺の変異体設計とその活性評価を阪井 G と嶋 G との共同で進め、メタノール生成活性が顕著に上昇した変異体を取得し、superMOB の創製に成功した (特願 2019-036229)。さらに、superMOB に部位特異的変異やランダム変異を導入した変異体ライブラリーを作成するとともに、自然界から取得した DNA 断片も利用して MOB ライブラリーの構築を進めた。

一方、可溶性メタンモノオキシゲナーゼ (sMMO) については、各構成成分やヒドロキシラーゼサブユニットの縮小化体を構築し鋭意検討したが、活性型 sMMO の異種発現には成功しなかった。しかし本研究過程で sMMO に類似した SDIMO (soluble diiron monooxygenases) をもつ非メタン資化性細菌がメタン酸化ならびにメタノール生成活性を持つことを初めて見出した。非メタン資化性細菌は、大腸菌など一般的な微生物と同じ培地で培養することができ、培養にメタンを用いることなくメタン酸化活性をもつ菌体触媒を容易に調製できる。また、非メタン資化性菌では取得不可能なメタノール脱水素酵素の遺伝子破壊株を取得できるので、メタノールを蓄積させることができ、メタノール菌と共培養することでメタンからの有用物質生産が可能となる。さらに、非メタン資化性菌において MMO 遺伝子や有用物質生産のための代謝系遺伝子を異種発現させることも可能である点など、非メタン資化性細菌はメタン酸化菌にはない利点が多く、今後のメタン酸化反応への活用が期待できる。

メタン酸化原理の解明については、阪井 G において superMOB 活性中心近傍のアミノ酸残基の部位特異的変異体を作成し、各変異体の活性を評価した。嶋 G では、好熱好酸性メタン酸化菌の pMMO 断片や superMOB 変異体を大腸菌で発現し、その活性評価と構造解析のための結晶化を行った。

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、C1 炭素固定によってメタンを生物資源化するバイリアクターを構築することを目的とし、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た開発を行った。阪井 G で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った。また、メタノール細菌およびその細胞壁多糖成分による穀物増収効果を見出し、商業圃場において酒米の収量を増大させることに成功した(特願 2018-078786; Yurimoto et al., *Microb. Biotechnol.*, 2021)。福居 G では、ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)共重合体の生合成経路を導入したメタノール細菌について、代謝改良と培養条件最適化を検討し、メタノールからの PHA 生合成能を向上させた。またメタノール細菌の効率的な物質生産を可能とする転写スイッチの開発を行った。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け6ヶ月間研究期間を延長し、MOB ライブラリーの構築を進めるとともに、MMO 遺伝子群の発現条件を検討した。また、非メタン酸化細菌におけるメタン酸化酵素候補遺伝子の解析を行った。さらに、supeMOB の結晶化条件の最適化を行い、得られた結晶を用いて X 線回折実験を行った。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. メタン酸化酵素 pMMO 触媒原理の解明

概要: FACSを用いた活性評価法により、メタン酸化活性を持つことを見出した superMOB において、結晶構造モデルを基に膜結合型メタン酸化酵素(pMMO)活性部位近傍のアミノ酸部位特異的変異体を構築し、顕著に活性が上昇する変異体、活性を失う変異体の取得に成功した。従来、変異体酵素のメタン酸化活性の測定には、大腸菌で発現させた凝集体のリフォーリング、酵素生成など、膨大な労力と時間のかかる方法しかなかったが、メタノールセンシング細胞を用いた極めて効率的なスクリーニングであることが実証された。これは、選抜した superMOB 候補変異体の生化学的検討と変異体立体構造の解析により、メタン酸化触媒原理の解明に進むための大きな前進である。

2. SDIMO をもつ非メタン酸化性細菌によるメタン酸化能の発見

概要: 従来、メタン酸化菌以外に、一部の細菌が sMMO に類似した SDIMO をもつことが知られてはいたものの、メタン酸化活性を持たないとされてきた。我々はある非メタン酸化性細菌の SDIMO がメタン酸化活性(ならびにメタノール生成活性)を持つことを初めて見出した。今後、メタン酸化活性を持つ SDIMO 遺伝子の同定、育種系の確立と変異体導入による触媒部位の特定などにより飛躍的に触媒能を向上させれば、菌体触媒反応によるメタノール生産、あるいは、メタノール菌との共培養によるメタンから有用物質生産が実現できる。

3. メタノールセンサー細胞開発の分子基盤となるメタノール感知因子の同定

概要: FACS を用いた高活性 superMOB のスクリーニングに用いるメタノールセンサー細胞のメタノールセンシングの作動原理、ならびに感度向上に向けた改良を行うための分子基盤を解明し、細胞表層タンパク質 Wsc ファミリータンパク質が、メタノール誘導性遺伝子発現制御に関わる重要なメタノールセンシング因子であることを世界で初めて明らかにした。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. superMOB の創製

概要: pMMO の可溶性最小触媒領域(spmoB)遺伝子内に pmoA 由来の断片をもつ自然界にはない一次配列(unique sequence)を有する遺伝子を合成し、メタノールセンサー酵母内で発現させたところ、活性型におりたまれて(superfolder)、メタン酸化活性を持つことを見出した。さらにある1アミノ酸変異体が、発現タンパク質量が変わらないにもかかわらず、野生型より高比活性を示すことを見出した。これは計画当初に設定した superMOB の3条件を満たしており、メタン酸化菌とは異なる宿主でメタン酸化活性を発現した最初の成功例で、superMOB の創製に成功した。今後、さらなる高活性触媒の開発と、細胞触媒創製への展開が期待できる。

2. メタノール生成を触媒する酵素工学スクリーニング系の構築と実証

概要： セルソーターを用いた1細胞解析により、 μM オーダーのメタノール濃度を検出できる高感度メタノールセンサー酵母細胞を新規に開発し、ペクチンメチルエステラーゼを例にして、メタノール生成酵素活性の検出に適用できることを実証した。本研究成果は、細胞あたりのメタノール生成酵素活性の強弱を本センサー細胞により可視化、分別できることを示すものであり、superMOB 取得のためのスクリーニングに活用できるだけでなく、バイオマスからのメタノール生産などに有用なメタノール生成酵素の高機能化のための酵素工学スクリーニング系に利用可能である。

3. メタノール細菌の細胞外多糖成分による穀物増収効果

概要： メタノール細菌を出穂後のイネにスプレー散布することにより、イネ収量を増大させる技術の開発に成功した。メタノール細菌の生菌体だけでなく、死菌体や細胞壁多糖成分によっても増収効果が認められた。superMOB を導入したメタノール細菌が構築できれば、メタンを原料として生産した菌体や化学合成できない細胞壁多糖成分を生産することが可能となることから、本研究成果は、天然ガス資源をバイオマスに転換して食糧生産を増強するという新しい循環型社会の構築を提言するものである。

<代表的な論文>

1. Tomoyuki Takeya, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai.

A *Pichia pastoris* single-cell biosensor for detection of enzymatically-produced methanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102, 7017-7027 (2018).

概要： セルソーターを用いた1細胞解析により、 μM オーダーのメタノール濃度を検出できる高感度メタノールセンサー酵母細胞を新規に開発し、ペクチンメチルエステラーゼを例にして、メタノール生成酵素活性の検出に適用できることを実証した。本研究成果は、細胞あたりのメタノール生成酵素活性の強弱を本センサー細胞により可視化、分別できることを示すものであり、superMOB 取得のためのスクリーニングに活用できるだけでなく、バイオマスからのメタノール生産などに有用なメタノール生成酵素の高機能化のための酵素工学スクリーニング系に利用可能である。

2. 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).

概要：酵母において高温や低浸透圧のセンサータンパク質として知られていた Wsc ファミリータンパク質が、メタノール酵母ではメタノール誘導性遺伝子発現制御に関わる細胞表層のメタノール感知因子であることを世界で初めて明らかにした。本研究成果は、superMOB のスクリーニングに用いるメタノールセンサー細胞の分子基盤を明らかにしたものであり、センサーの改良やメタノール誘導性異種遺伝子高発現にも重要な知見を与えるものである。

3. Hiroya Yurimoto, Hiroyuki Iguchi, Do Thi Di Thien, Akio Tani, Yutaka Okumoto, Atsushi Ota, Takahiro Yamauchi, Takahiro Akashi, and Yasuyoshi Sakai.

Methanol bioeconomy: Promotion of rice crop yield in paddy fields with microbial cells prepared from natural-gas derived C_1 -compound.

Microb. Biotechnol., 14, 1385-1396 (2021) doi: 10.1111/1751-7915.13725.

概要： メタノール細菌を出穂後のイネにスプレー散布することでイネの収量を増加させることに成功した。様々なメタノール細菌とイネ品種の組合せで実験室レベルから圃場レベルまでの栽培試験を行い、商業圃場での 5 年間に渡る栽培試験において使用菌株や、約半年間、種子から登熟期にわたるスプレー散布の時期を最適化した結果、メタノール細菌の生菌体だけでなく、死菌体や細胞壁多糖成分の散布によっても増収効果があることを明らかにした。本研

究成果は、メタノール細菌における superMOB 発現が可能になれば、メタンを生物資源化して食糧増産、温暖化ガス削減につながる新技術となることを示すものである。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「阪井」グループ

研究代表者: 阪井 康能 (京都大学大学院農学研究科 教授)

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
- ・メタノール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

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)

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

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)

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) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について 該当なし