

Synthetic biological studies on production of methanol from natural resource-derived carbon compounds
(天然資源由来炭素化合物を基質としたメタノール生成反応に関する合成生物学研究)

応用生命科学専攻 制御発酵学分野 竹谷 友之

メタノールは、化学原料や微生物培養の炭素源として広く用いられており、現在主に、メタンを主成分とする天然ガスから合成ガス化を経て製造されている。一方、自然界には、メタン酸化を常温常圧条件で触媒するメタンモノオキシゲナーゼ (MMO) や、植物細胞壁成分であるペクチンのメチルエステル基を加水分解するペクチンメチルエステラーゼ (PME) などのメタノール生成活性をもつ酵素が存在する。また、細菌のメタノール資化に関わる酵素の中には、逆反応、すなわちバイオマス成分からメタノールを生成する方向の反応の触媒活性を示すものが知られている。本論文では、これらの酵素群を利用した各種天然資源由来炭素化合物からのメタノール生産のための合成生物学的研究を行った。

第一章では、メタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* を用いて、メタノール生成酵素活性を評価したり、高活性菌株を選抜したりするためのバイオセンシング技術として『メタノールセンサー酵母』(以下『センサー酵母』)を開発した。*K. phaffii* がもつメタノール誘導性遺伝子プロモーターがメタノール濃度に応じた強さで転写誘導されることを利用し、その支配下に蛍光タンパク質を発現させることで、細胞の蛍光強度からメタノール濃度を可視化するシステムを構築した。用いるプロモーターの種類やその制御に影響を与える培養条件を蛍光顕微鏡観察により最適化、さらに、FACSによる一細胞解析に供した結果、メタノール濃度に応じて蛍光強度の分布がシフトし、 μM レベル(検出下限 $2.5 \mu\text{M}$)のメタノールを検出・定量できる高感度センサー酵母の開発に成功した。

第二章では、開発したセンサー酵母を用いて、メタノール生成酵素活性の可視化に取り組んだ。第一節では、真菌 *Aspergillus niger* 由来 PME をセンサー酵母に異種発現させ、ペクチン含有培地でのメタノール生成活性を FACS で解析した。その結果、PME 非発現細胞と比較して蛍光強度が高まり、さらに PME の導入コピー数に比例して細胞の蛍光強度の増大が見られた。これらの結果から、細胞あたりの PME 発現量の違いによる活性の強弱をセンサー酵母により可視化できることを示し、細胞あたりのメタノール生成活性が高い菌株の選抜が可能であることを示した。第二節では、メタン酸化活性の可視化について検討するため、メタン酸化活性を有する細菌とセンサー酵母を共培養した。その結果、メタンの存在下でセンサー酵母の蛍光強度が有意に増大した。これにより、メタン酸化活性もセンサー酵母により可視化できることを示すとともに、メタンを用いてワンポットで異種タンパク質合成を行う新たな手段を提示した。次に、MMO 遺伝子およびこれに由来する人工メタン酸化生体触媒遺伝子のセンサー酵母における異種発現を試みたが、確たる活性は検出できなかった。しかし、活性可視化の際に添加した還元型キノン化合物や過酸化水素によって生理的条件下でもメタンが非酵素的に酸化されることを見出し、これが酵素活性の適切な可視化を妨げていた可能性を示した。

第三章では、細菌のメタノール資化経路を大腸菌内で逆行させ、糖化合物からのメタノール生産技術の開発を試みた。メタノール資化性細菌においてメタノールからフルクトース 6-リン酸 (F6P) への炭素固定に関わる酵素、すなわち *Bacillus methanolicus* S1 株由来の NAD^+ 依存型メタノール脱水素酵素 (MDH) および *Mycobacterium gastri* MB19 株由来の 3-ヘキサロース-6-リン酸シンターゼと 6-ホスホ-3-ヘキサロイソメラーゼの人工融合酵素 (HPS-PHI) の遺伝子を大腸菌で異種発現させたところ、メタノール酸化およびホルムアルデヒド固定の逆反応の触媒活性をそれぞれ確認した。次に MDH と HPS-PHI を同時発現させた大腸菌を用いた菌体反応を行い、F6P およびグルコースからメタノールが生成することを示し、大腸菌における逆行 C1 代謝経路の構築に成功した。本技術は、バイオマスも糖化を経て原料化できる点で、多様な天然資源からのメタノール生産につながるものである。