

メタノールからのバイオものづくり

由里本博也^{1*}・阪井 康能²

はじめに

微生物による有用物質生産（バイオものづくり）に関する技術開発は、低炭素社会での活用に向けてその重要性が益々高まっている。微生物培養炭素源としては主に糖質が利用されるが、その原料はデンプンなどの可食性バイオマスに過度に依存しているのが現状である。デンプンを原料とする場合には食糧やバイオエタノール生産との競合という問題があり、非可食性バイオマスの場合でも前処理や糖化のコストや投入エネルギーの問題がある。そのため、将来の低炭素社会においては、その合成にエネルギー消費が少なく、カーボンニュートラルにも生産が可能な炭素資源を利用したバイオものづくりプロセスの確立が望まれる。

糖質に代わる培養原料として、CO₂を含めたさまざまな化合物の利用が検討されてきたが、中でも有望な化合物の一つがメタノールである。メタノールは、天然ガスや石炭などの化石資源の他、CO₂やバイオマスからも生産することができ、食糧と競合しない炭素資源である。燃料としての用途だけでなく、さまざまな化成品の原料にもなることから、天然ガス、石炭、CO₂、バイオマスなど、多様な炭素資源を化学的方法でメタノールに導き、これを中心とする資源循環型工業体系「メタノールエコノミー」を構築することが提唱され、資源循環型社会の基幹物質として注目されている¹⁾。

一方、自然界では、メタノールを炭素源・エネルギー源として利用するメタノール資化性微生物（メタノール酵母やメタノール細菌）がさまざまな環境中に棲息している。特にメタノール細菌は、地球表面積の2倍にも相当する植物葉面に、植物細胞壁構成成分のペクチンに含まれるメチルエステルに由来するメタノールを炭素源として棲息する²⁾。一方、微生物に利用されなかったメタノールは植物から年間約1億トン放出されており、葉面のメタノールは未利用な炭素資源でもある。そのユニークな代謝系やメタノールへの旺盛な増殖能を基盤として、メタノール資化性微生物はさまざまな有用物質生産や有用酵素・タンパク質生産に利用されている（図1）。その

C1炭素固定反応は光合成と異なり、エネルギーを必要としない点で物質生産にも有利である。本稿では、バイオマスからも合成可能なメタノールからのバイオものづくりについて、メタノール酵母やメタノール細菌による有用タンパク質・物質生産の概要とともに、メタノール細菌による植物生長促進（バイオマス増産）についても紹介する。

工業原料・微生物培養原料としてのメタノール

メタノールは、天然ガス（メタン）や石炭を主な原料として得られる合成ガス（CO、H₂）を経由して、高温・高圧下での触媒化学反応により合成され、世界全体で年間約8000万トンが製造されている。メタノールが工業原料として優れている点は、常温で液体であるため貯蔵や運搬が容易であること、比較的安価に高純度で得られること、食糧と競合しないこと、さまざまな炭化水素を経て多くの化成品へと変換できることなどが挙げられ、その需要は年々伸びており、今後さらに市場規模、生産量とも増大することが見込まれる。一方、合成ガスはバイオマスのガス化によっても得られ、国内外で草本や木質バイオマスからのバイオメタノール合成プラントが実用

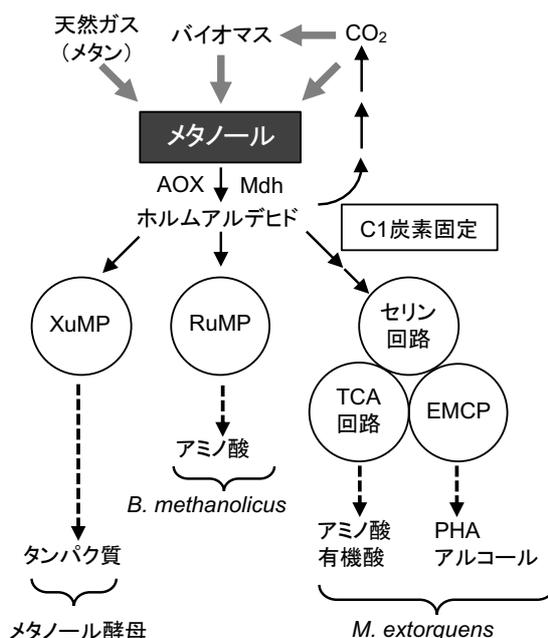


図1. メタノールからの有用物質生産代謝の概要

著者紹介 ¹ 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻（准教授）

E-mail: yurimoto.hiroya.5m@kyoto-u.ac.jp

² 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻（教授）

化されている。さらに、再生可能クリーンエネルギーを利用したCO₂の水素化還元によるメタノール合成についての技術開発も進められ、将来の低炭素社会においては、化石資源を利用せず、カーボンニュートラルにメタノールを生産することが期待されている。

メタノールからの各種化成品合成については、「C1 ケミストリー」として研究開発が進められてきたが、メタノールエコノミーにおいては、メタノール合成プロセスも含めたケミカルプロセスだけでなく、バイオプロセスによる物質生産、すなわち「メタノールバイオエコノミー」も重要である。1970年代のメタノールからのシングルセルプロテイン（SCP）生産に端を発し、化学・医薬・食品分野でメタノール資化性微生物を利用した有用物質・タンパク質生産の研究開発が行われてきた。英国・ICI社はタンパク質含量の高いメタノール細菌（*Methylophilus methylotrophus*）を使用して大規模プラントでのSCP商業生産を開始したが³⁾、大豆や魚粉との価格競争に対抗できず、短期間の内に生産中止となった。しかしながら、メタノール代謝経路の解明や高密度培養技術の開発など、その後のメタノール資化性微生物の利用価値を高める基盤が築かれた。SCPに関しては、将来の世界的な人口増加に伴うタンパク質不足「プロテインクライシス」への危機感から、近年再び注目を集めている。

培養炭素源としてのメタノールは、水溶性であるため培地に添加しやすく、他の微生物によるコンタミのリスクも少ない。グルコースのような発酵性炭素源ではエタノールによる生育阻害が起こるが、メタノールではそのような阻害が起こらず、メタノール資化性細菌では乾燥菌体重量で200 g/L、メタノール酵母では100 g/Lを超える高密度培養が可能である⁴⁾。後述するように、メタノール細菌では、アミノ酸や生分解性プラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）を50 g/L以上生産することが可能である。これらを年間1万トン生産しようとする場合、5000 Lのファーメンター40回分培養すればよいことになり、5000 Lファーメンターが4基あれば、月1回の培養で十分に足りることになる。

メタノール酵母による異種タンパク質生産

産業用酵素や医薬品タンパク質などの有用タンパク質の多くが、遺伝子組換え技術を用いた異種遺伝子発現系によって生産されている。中でも、もっとも強力な異種タンパク質生産宿主として広く利用されているのがメタ

ノール酵母である。メタノール酵母の最初の報告は、1969年のOgataらにより京都市の土壌から分離された*Candida boidinii*（当時は*Kloeckera* sp.）である⁵⁾。1970年代には、メタノールを原料として飼料添加物としてのSCPを生産する研究開発が行われ、米国Phillips Petroleum社で*Pichia pastoris*（分類学上の正式名称は*Komagataella phaffii*）を用いた商業生産も行われたが、オイルショックによる価格高騰のために頓挫した⁶⁾。しかし1980年代には、*P. pastoris*において強力なメタノール誘導性プロモーターを利用した異種タンパク質生産系が確立され、その後*Hansenula polymorpha*（*Ogataea polymorpha*）、*C. boidinii*、*Ogataea minuta*なども利用されるようになった⁷⁾。*P. pastoris*発現系では1500種以上の生産例が報告されており、現在もその数は飛躍的に増加している⁸⁾。メタノール酵母で生産された有用タンパク質の中には、実用化されているものも多数あり、たとえば、植物油精製時の脱ガムに利用されるホスホリパーゼCなど、米国食品医薬品局（FDA）のGRAS（generally recognized as safe）物質として認証されているものもある⁹⁾。メタノール酵母の異種タンパク質生産系の特徴の一つに、分泌生産能力に優れている点があり、生産するタンパク質によってはg/Lオーダーでの高分泌生産が可能である。

メタノール酵母では、メタノールをホルムアルデヒドに酸化するアルコールオキシダーゼ（AOX）やC1炭素固定経路であるキシロコースモノリン酸経路（XuMP）のジヒドロキシアセトンシンターゼ（DAS）などの酵素が細胞内タンパク質の数十%に達するほどに誘導され、そのメタノール誘導性遺伝子プロモーターが異種遺伝子の発現に利用される。メタノール誘導性遺伝子の発現制御は、培地中の炭素源による影響を大きく受け、*P. pastoris*では、メタノール誘導性遺伝子の発現は、グルコースとエタノールの他、グリセロールによっても抑制される。このため、*P. pastoris*でタンパク質生産のための高密度培養を行うために、グリセロールバッチ培養フェーズ、グリセロールフェドバッチ培養フェーズ、メタノールフェドバッチ培養フェーズの3段階で培養することが多い。メタノールのみでの培養では菌体増殖とタンパク質生産を同時に行うと高密度培養が達成できないため、グリセロールを炭素源として高密度培養を達成してから、菌体増殖を伴わずにメタノール誘導によりタンパク質生産を行う。このとき、メタノールの添加量および速度がきわめて重要であり、培地中メタノール濃度が高すぎると、代謝中間体であるホルムアルデヒドが蓄積して生育

阻害を引き起こすため、培地中メタノール濃度をモニタリングしたり、溶存酸素濃度 (DO) を指標にして、メタノール濃度をなるべく低く維持したりすることが重要である。また、AOX 反応には O₂ を必要とするため、培地への十分な通気も重要である。

近年では、AOX 遺伝子以外の強力なメタノール誘導性プロモーターを利用した発現系やメタノール以外の炭素源による発現系の開発、高効率分泌タンパク質生産のための宿主開発が進められている^{10,11)}。メタノールバイオエコノミーにおける基幹技術として、メタノール酵母による異種タンパク質生産を活用していくためには、本酵母の代謝生理機能や遺伝子発現制御機構の詳細を解明し、異種タンパク質生産系のさらなる強化に応用展開する必要がある。

濃度応答性メタノール誘導とその利用

メタノール酵母におけるメタノール誘導性遺伝子の転写レベルは、メタノール濃度によって調節されるが、単純な濃度依存性ではない。*P. pastoris* AOX1 の転写レベルは、0.001–0.1 % の間で直線的に増加する一方で、0.1 % 以上の濃度では減少する (図 2A)¹²⁾。これは、過剰なホルムアルデヒド蓄積を回避するために細胞がもつ機能と考えられるが、高濃度メタノール条件での転写レベルの低下は、効率の良い異種タンパク質生産の妨げとなる。筆者らは、メタノール濃度に応答した誘導性遺伝子発現を「濃度応答性メタノール誘導 (concentration-regulated methanol induction; CRMI)」と定義し、その分子機構を明らかにしつつある。

筆者らは、メタノール酵母のメタノール誘導性遺伝子発現を制御する転写制御因子の機能解析を進めるとともに¹²⁾、細胞表面においてメタノール濃度の感知に寄与する Wsc ファミリータンパク質 (Wsc1, Wsc3) が、*P.*

pastoris において CRMI に関与することを明らかにした (図 2A)¹³⁾。一般的な酵母の細胞表面ストレス応答では、Wsc タンパク質からのシグナルは、cell wall integrity (CWI) 経路を経て下流の遺伝子発現を制御する。一方、メタノール濃度情報は、MAP キナーゼカスケードに依存せずに Pkc1 から分岐する未知の経路を経て、メタノール誘導性遺伝子発現に必須な転写因子 Mxr1 へと伝達され、そのリン酸化状態に応じてメタノール誘導性遺伝子発現レベルを制御する CRMI 経路を明らかにした (図 2B)¹⁴⁾。

また筆者らは、メタノール酵母の CRMI を利用し、メタノール誘導性 DAS 遺伝子プロモーター支配下に蛍光タンパク質を発現するメタノールセンサー酵母細胞を開発し、自然界におけるメタノール酵母やメタノール細菌の棲息環境の一つである植物葉面では、メタノール濃度が約 0.05–0.2 % の範囲内で日周変動することを明らかにした¹⁵⁾。CRMI はこのような環境に適応するための生存戦略として重要な生理機能である。さらに、メタノールセンサー細胞を用いたメタノール生成酵素活性評価系を確立した¹⁶⁾。メタンやバイオマスからメタノールへと変換するバイオプロセスは、メタノールエコノミーにおいて重要な技術である。メタノール生成酵素のモデルとして糸状菌由来のペクチンメチルエステラーゼ (PME) を用いたところ、メタノールセンサー酵母への PME 遺伝子の導入コピー数に応じてフローサイトメトリーで測定した蛍光強度が増加した。このように、メタノールセンサー酵母を宿主とすることにより、メタノール生成酵素活性の評価と高活性酵素のハイスループットスクリーニングが可能であることがわかった。

メタノール細菌による有用物質生産

上述の通り、メタノール細菌も当初は SCP としての利用開発が進められたが、その代謝特性の理解が進むと、さまざまな有用物質を生産する能力を持つことがわかってきた。中でもメタノール細菌のモデル菌株である *Methyloburbum extorquens* (旧名: *Methylobacterium extorquens*) AM1 株では、50 年以上前からの代謝生理学的な研究に加えて、遺伝子工学ツールの開発やオミックス解析、代謝フラックス解析が進められた¹⁷⁾。本菌のメタノール代謝は PQQ 依存性メタノール脱水素酵素 (Mdh) により始まり、C1 炭素固定はセリン回路で行われるが、代謝の進行に必要なグリオキシル酸の再生は一般的なグリオキシル酸回路ではなく、ethylmalonyl-CoA 経路 (EMCP) で行われる (図 1)。TCA 回路を含むこれ

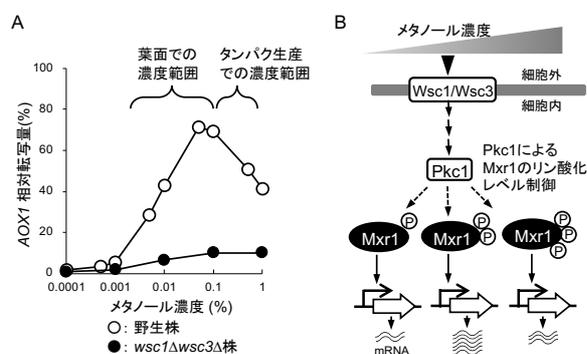


図 2. メタノール酵母における濃度応答性メタノール誘導 (A) とメタノール濃度 Mxr1 のリン酸化レベルの制御 (B)

らの代謝経路中間体からは、さまざまな有機酸、アミノ酸、アルコール、PHAを生産することができる。L-セリンやPHAは50 g/Lを越える生産例が報告されており、本菌のメタノールからの物質生産能力の高さを示している¹⁷⁾。

PHAは、生分解性プラスチック原料として、さまざまな原料からの生産系が開発されている。メタノール細菌では、EMCP中間体から導かれる(R)-3-hydroxybutyrate (C₄モノマー)のホモポリマーとしてポリヒドロキシブタン酸(PHB)が合成される。培養条件を整えた高密度培養によって、149 g/L(乾燥菌体重量の64%)もの生産例が報告された¹⁸⁾。しかしPHBホモポリマーの物性は実用化には適していなかったため、代謝工学によって(R)-3-hydroxyvalerate (C₅モノマー)や(R)-3-hydroxyhexanoate (C₆モノマー)を含む共重合ポリマーを生産する菌株が代謝工学的に構築されている^{19,20)}。

耐熱性メタノール細菌 *Bacillus methanolicus* においても、各種アミノ酸をはじめとする物質生産例が報告されており、その生産量はL-グルタミン酸では55–70 g/L、L-リシンでは11 g/Lに達する²¹⁾。*B. methanolicus*は、*M. extorquens*とは異なるメタノール代謝経路を持ち、NAD⁺依存性Mdhと、C1固定経路としてリブローズモノリン酸経路(RuMP)を持つ(図1)。至適生育温度は50℃で、37–60℃で良好に生育するため、培養槽の冷却コストを低減できるという利点がある。

メタノール細菌によるバイオマス増産

最後に、メタノール細菌を利用した食糧増産について紹介する。上述の通り、メタノール資化性微生物は、ペクチンに由来するメタノールを炭素源として葉面に棲息している。中でも *Methylobacterium* 属細菌は、葉面微生物の10–20%をも占める優占種であり、メタノールを葉面での生存のための主要な炭素源としながら、植物ホルモンやその他の化合物を合成して植物生長促進効果をもたらすことが知られている²²⁾。これまでにメタノール細菌の種子への接種や葉面散布により、野菜類への生長促進効果は報告されてきたが、イネなどの穀類については顕著な増収効果は認められていなかった。筆者らは、実際の商業圃場においてメタノール細菌の接種方法や接種時期の最適化を行い、メタノール細菌の死菌体を出穂後のイネ葉面にスプレー散布することで、イネの穀物収量を増加させることに成功した²³⁾。これは、バイオマスからも合成可能なメタノールを原料として、安価に大量に

生産できるメタノール細菌菌体を生長促進剤(バイオステイミュラント)として利用し、植物のCO₂固定を増強してバイオマス増産を達成するという、資源循環型「メタノールバイオエコノミー」を具現化したものである。

おわりに

本稿では、メタノールからのバイオものづくりについて、メタノール酵母とメタノール細菌による有用タンパク質・物質生産について概説したが、微生物によるバイオものづくりの炭素源にメタノールを利用することは、メタノール資化性微生物以外でも可能である。誌面の都合上詳しく紹介できなかったが、さまざまな有用物質の生産菌として利用されている *Escherichia coli* や *Corynebacterium glutamicum* に、NAD⁺依存性MdhやRuMPの酵素遺伝子を導入し、メタノール資化能(synthetic methylotrophy)を合成生物学的に付与することも可能となってきているが、まだメタノールでの生育能や物質生産能はメタノール資化性微生物には遠く及ばない²⁴⁾。メタンやバイオマス、さらにはCO₂からも変換可能なメタノールを利用したバイオものづくりは、低炭素循環型社会の構築やSDGs達成の観点からもさらなる技術革新が期待される。

文 献

- 1) Olah, G. A.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 2636 (2005).
- 2) Nemecek-Marshall, M. et al.: *Plant Physiol.*, **108**, 1359 (1995).
- 3) Windass, J. D. et al.: *Nature*, **287**, 396 (1980).
- 4) Riesenberger, D. Guthke, R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 422 (1999).
- 5) Ogata, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1519 (1969).
- 6) Duman-Özdamar, Z. E. and Binay, B.: *Protein J.*, **40**, 367 (2021).
- 7) Yan, C. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **106**, 3449 (2022).
- 8) Ergün, B. G. et al.: *FEMS Yeast Res.*, **21**, foab057 (2021).
- 9) Ciofalo, V. et al.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **45**, 1 (2006).
- 10) 高木 忍ら: *生物工学会誌*, **99**, 516 (2021).
- 11) Zahrl, R. J. et al.: *Methods Mol. Biol.*, **1923**, 75 (2019).
- 12) Yurimoto, H. and Sakai, Y.: *Curr. Issues Mol. Biol.*, **33**, 197 (2019).
- 13) Ohsawa, S. et al.: *Mol. Microbiol.*, **104**, 349 (2017).
- 14) Inoue, K. et al.: *Mol. Microbiol.*, **118**, 683 (2022).
- 15) Kawaguchi, K. et al.: *PLoS ONE*, **6**, e25257 (2011).
- 16) Takeya, T. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 7017 (2018).
- 17) Ochsner, A. M. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 517 (2015).
- 18) Suzuki, T. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 322 (1986).
- 19) Orita, I. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 3715 (2014).
- 20) Orita, I. et al.: *Microorganisms*, **10**, 184 (2022).
- 21) Pfeifenschneider, J. et al.: *Biofuels Bioprod. Biorefin.*, **11**, 719 (2017).
- 22) Vorholt, J. A.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 828 (2012).
- 23) Yurimoto, H. et al.: *Microb. Biotechnol.*, **14**, 1385 (2021).
- 24) Antoniewicz, M. R.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **59**, 165 (2019).