

ホルムアルデヒド固定酵素の発現制御機構と触媒機能の応用機能開発

京都大学大学院 農学研究科 応用生命科学専攻 由里本 博也

1. はじめに

ホルムアルデヒド (HCHO) は、メタンやメタノール、メチルアミンなどの C₁化合物を利用する微生物 (メチロトローフ) の代謝経路において、エネルギーを得るための酸化経路と細胞構成成分合成のための資化経路の分岐点に位置する重要な化合物である。HCHO は強い生物毒性を示す化合物であるため、全ての生物は何らかの HCHO 解毒機構を持っている。その一つにメチロトローフ細菌がもつ HCHO 固定経路であるリブローズモノリン酸経路 (RuMP 経路) がある。本経路では遊離の HCHO とリブローズ 5-リン酸とがアルドール縮合して 3-ヘキシュロース 6-リン酸が生成し、これが異性化されてフルクトース 6-リン酸になる (図1)。この2段階の反応は、3-ヘキシュロース-6-リン酸シンターゼ (HPS) と 6-ホスホ-3-ヘキシュロイソメラーゼ (PHI) によって触媒される。HPS と PHI の遺伝子はメチロトローフ細菌だけでなく、非メチロトローフ細菌やアーキアにも広く存在する。本シンポジウムでは、我々がこれまでに行ってきた RuMP 経路の生理機能や HPS, PHI の遺伝子構造や発現制御機構、触媒機能に関する研究結果と、そこから得られた基盤的知見を利用した応用機能開発について紹介する。

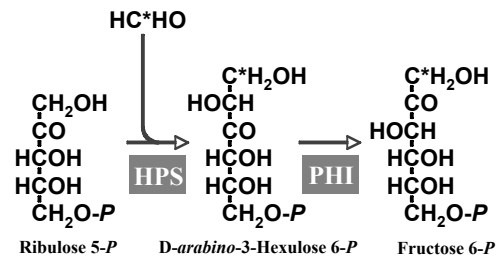


図1. HPS と PHI

2. HPS, PHI の遺伝子構造と発現制御機構

メチロトローフ細菌では、HPS と PHI の遺伝子 (*hps* および *phi*) はクラスターを形成しており、通性メチロトローフ細菌である *Mycobacterium gastri* や *Bacillus brevis* では、両遺伝子はポリシストロニックなオペロンとして HCHO に応答して発現する (図2)。非メチロトローフ性の枯草菌 *Bacillus subtilis* でも、通性メチロトローフ細菌と同様なオペロンとしてコードされており、培地に添加した HCHO によって両遺伝子が誘導発現する。細菌の *hps/phi* オペロンの HCHO 依存的な転写活性化の分子機構は全く分かっていなかったが、枯草菌の *hps/phi* オペロン上流に存在する HxlR が、本オペロン上流の HCHO 応答領域に結合する新規 DNA 結合性転写活性化因子であることを明らかにした。しかしながら、*in vitro* でのオペロン上流配列への HxlR 結合は、HCHO の有無によって影響されなかったことから、本オペロンの HCHO による転写活性化には HxlR 以外の別の因子が関与することが示唆され、現在枯草菌の遺伝子破壊株ライブラリーやトランスポゾン変異を用いて、新規遺伝子を探索している。

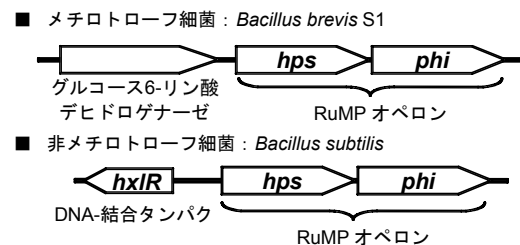


図2. *hps* と *phi* の遺伝子配座

3. アーキアの HPS/PHI の生理機能

超好熱性アーキア *Pyrococcus horikoshii* や *Thermococcus kodakaraensis* では、HPS と PHI はひとつの読み枠にコードされる二機能性酵素となっている (図2)。アーキアの HPS, PHI に関する知見は皆無であったが、我々はこれらの二機能性酵素を大腸菌内で発現させ、相当する酵素活性を持つことを明らかにした。またその生理機能に関して、ゲノム解析の結果からペントースリン酸経路を欠いたアーキアの一部に HPS と PHI が存在す

ことに着目した。ペントースリン酸経路が不完全なアーキアでは、核酸合成の前駆体となるリボース 5-リン酸の供給経路が不明であったが、遺伝子破壊が可能な *T. kodakaraensis* で当該遺伝子を破壊してその生育特性を調べることにより、HPS/PHI の HCHO 固定の逆反応がペントースリン酸の供給に必須であることを酵素化学的・遺伝学的に実証した (図 3)。これはアーキアの糖代謝に明確な新知見を与えただけでなく、RuMP 経路が C1 化合物代謝以外に重要な生理的機能を持つことを示した最初の例であり、同一酵素が細菌とアーキアでは正逆異なる方向の反応にその生理的意義をもつことを初めて明らかにした。

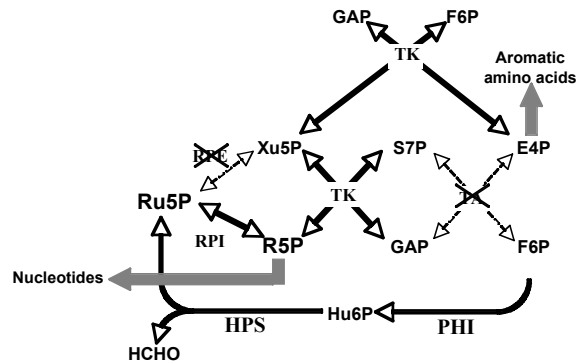


図 3. *T. kodakaraensis*におけるペントースリン酸合成経

4. 常温で機能する HPS-PHI 人工融合酵素の創製と利用

P. horikoshii の HPS-PHI 融合酵素について、HPS 部分、PHI 部分、HPS-PHI 融合酵素をそれぞれ大腸菌で発現させて活性を比較したところ、HPS-PHI 融合酵素は HPS と PHI を混合した酵素系に比べてサブユニット換算で約 50 倍の活性を示した。*P. horikoshii* 由来の酵素は常温では機能しないので、常温付近での活性型融合酵素を創製するため、メチロトロフ細菌 *M. gastri* 由来の HPS と PHI を人工的に融合させた二機能性酵素を大腸菌で発現させた。人工融合酵素では触媒効率が向上しており、大腸菌発現株では HCHO 耐性が向上した。HPS と PHI を異種生物に導入する際、融合酵素であれば 1 段階の形質転換で導入できる上に、本融合酵素は HCHO 耐性による形質転換マーカーとしての利用などが期待される。

一方、メチロトロフ細菌の HCHO 資化経路には RuMP 経路以外にセリン経路がある。HPS, PHI をセリン経路を持つメチロトロフ細菌に導入することにより、メタノール資化能の向上が期待できる。そこで、HPS-PHI 人工融合酵素をセリン経路で HCHO を資化するメチロトロフ細菌 *Methylobacterium extorquens* AM1 株に導入した。野生株およびセリン経路上の酵素遺伝子の破壊株に HPS-PHI 融合酵素を導入したところ、破壊株に導入した株はメタノール培地で生育し、導入した HPS-PHI によりセリン経路が代替できることがわかった。さらに野生株に導入した場合にはメタノール資化能が向上することがわかった。*M. extorquens* AM1 株はメタノールからの PHB (ポリヒドロキシ酪酸) 生産などにも使用される菌株であることから、HPS-PHI 融合酵素導入により、高収率化が可能になると考えられる。

5. おわりに

HCHO は「シックハウス症候群」の主要な原因物質とされており、室内空気中や環境中の HCHO を検出、除去する技術開発が求められている。我々は細菌の HPS, PHI を植物に導入し、空気中の HCHO を吸収・除去できる組換え植物の創製にも成功しており、現在 HPS-PHI 融合酵素の導入を行っている。また枯草菌遺伝子の HCHO 応答領域の支配下に蛍光タンパク質を発現することによって、環境中の HCHO を検出できるセンサー細胞の開発も行っている。以上のように、HPS, PHI の触媒機能だけでなく、HCHO に応答する遺伝子発現制御機構を利用した応用開発を進めている。またこれらの研究を通して、循環型資源としても注目されている C1 化合物の有効利用技術開発への展開も期待できる。