

微生物におけるホルムアルデヒド対策の分子機構の解明とその利用

由里本 博也

(京都大学大学院農学研究科)

研究の目的

メタン、メタノール、ホルムアルデヒドなどのC1化合物を資化するメチロトロフは、その代謝の初期段階で細胞毒性の高いホルムアルデヒドを生じる。メタンやバイオマスから取り出せるメタノールは微生物培養原料としても非常に有望であるため、微生物がホルムアルデヒドの細胞内蓄積をいかにして最小限にとどめているかを知ることは、代謝生理学上重要であるだけでなく、C1化合物あるいはこれを利用する微生物の産業利用の観点からも重要な課題である^{1,2)}。本研究ではC1化合物代謝の分子機構を明らかにするため、メチロトロフ細菌だけでなく非メチロトロフ細菌やアーキアにも広く存在するホルムアルデヒド固定経路(リブローズモノリン酸経路)の2つの酵素のアーキアにおける生理的意義、および枯草菌における本酵素の遺伝子発現調節機構を明らかにした。さらにメチロトロフ酵母においてC1化合物に応答して発現する遺伝子の転写調節機構を分子レベルで解析した。

方法と結果

1) アーキアにおけるリブローズモノリン酸経路の生理的意義の解明

様々な微生物種のゲノム解析により、これまでメチロトロフ細菌にのみ存在すると考えられてきたホルムアルデヒド固定経路の一つであるリブローズモノリン酸経路(RuMP経路)が、細菌やアーキアに広く保存されていることが明らかになってきた。一方アーキアでは、通常のペントースリン酸経路が不完全である場合が多く、これらのアーキアがどのようにして核酸の前駆体となるリボース 5-リン酸やリブローズ 5-リン酸を合成しているかは謎であった。最近、リブローズモノリン酸経路の鍵酵素 3-ヘキスロース-6-リン酸シンターゼ(HPS)と 6-ホスホ-3-ヘキスロイソメラーゼ(PHI)によるホルムアルデヒド固定の逆反応がフルクトース 6-リン酸からリボース 5-リン酸の生合成を担うことが提唱された。そこで、ひとつの ORF (TK0475) に両遺伝子がコードされており、且つ遺伝子破壊が可能な超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 を用い、当該遺伝子破壊株を作製して、破壊株の生育特性および TK0475 発現産物の性質を明らかにすることにより、上記の提唱を証明した。

TK0475 遺伝子破壊株は、アミノ酸を炭素源とする最少培地に生育不能となり、培地にヌクレオシドを添加することにより生育が回復した。さらに、*T. kodakaraensis* KOD1 および、TK0475 大腸菌発現株の無細胞抽出液の HPS、PHI 活性測定、精製した TK0475 発現産物の酵素反応速度論的解析の結果から、TK0475 遺伝子産物は HPS、PHI 両活性をもつ二機能性酵素であり、ホルムアルデヒド固定の逆反応であるフルクトース 6-リン酸からリブローズ 5-リン酸とホルムアルデヒドを生じる活性を示すこと、さらにペントースリン酸経路が不完全なアーキアにおいては HPS と PHI が核酸の前駆体となるリボース 5-リン酸生合成に必須の役割を果たしていることが明らかとなった³⁾。

2) 枯草菌における RuMP オペロンの転写調節に関わる新規 DNA 結合タンパク質の解析

枯草菌は非メチロトロフ細菌であるが、RuMP 経路の鍵酵素 HPS, PHI に相当する遺伝子オペロン (*hxlAB*) を有している。本オペロンはホルムアルデヒドによって発現誘導される。*hxlAB* オペロン上流には逆向きの機能未知 ORF *hxlR* が存在する。HxlR はその推定アミノ酸配列から、DUF24 という機能未知タンパク質ファミリーに属するとされ、ヘリックス-ターン-ヘリックス型の DNA 結合モチーフを持つ。*hxlR* の破壊によりホルムアルデヒド依存的な *hxlAB* オペロンの転写が抑制されることから、*hxlR* が本オペロンの発現調節に関与することが示唆されているが、その分子機構の詳細は不明であった。

大腸菌発現株より精製した HxlR タンパク質と *hxlAB* オペロン上流領域との結合を、ゲルシフトアッセイや DNase I フットプリントアッセイ、表面プラズモン共鳴解析などにより検証した。その結果、HxlR 二量体がオペロン上流の 2 つの領域に結合することが明らかとなった。さらにレポーター遺伝子 *lacZ* を用いた解析により、この領域がオペロンの転写活性化に必要な領域であることが明らかとなった。以上の結果から、HxlR タンパク質は *hxlAB* オペロンのホルムアルデヒド依存的な転写活性化を正に調節する DNA 結合性転写活性化因子であることが分かった⁴⁾。現在機能未知タンパク質ファミリー DUF24 は「helix-turn-helix, HxlR type」と名付けられている。

3) 酵母の C1 化合物誘導性遺伝子発現を調節する転写因子の解析

メタノールを生育・誘導基質とする異種遺伝子発現系が開発されているメチロトロフ酵母 *Candida boidinii* において、メタノールやホルムアルデヒドなどの C1 化合物による遺伝子発現誘導の分子機構はほとんど明らかにされていない。我々はいくつかの C1 化合物誘導性プロモーターを取得しており、本酵母の C1 化合物誘導性遺伝子発現の分子機構を明らかにしようとしている⁵⁾。これまでレポーター遺伝子として出芽酵母の酸性ホスファターゼを用い、gene-tagging 法によりプロモーター活性が低下した株をスクリーニングしてきたが、本研究では、変異株ライブラリーから取得したひとつの遺伝子 *TRM1* に着目した。

Trm1p は真核微生物に特有な Zn(II)₂Cys₆ タイプの Zinc finger protein family に属していた。*TRM1* 遺伝子破壊株は、メタノール培地では全く生育できなかったが、グルコースやグリセロールなどのメタノール以外の炭素源では野生株と同様に生育した。*TRM1* 遺伝子破壊株株において、複数のメタノール誘導性プロモーターの転写活性を測定したところ、メタノール及びホルムアルデヒドを誘導基質としたときのみ、著しい転写活性の低下がみられた。また Trm1p は核に局在していた。以上の結果から、Trm1p が C1 化合物誘導性遺伝子発現の主要な転写因子である可能性が示唆された。

結論

本研究では、微生物のホルムアルデヒド代謝の分子機構に関する研究をおこなった。アーキアでは細菌にみられる HPS, PHI によるホルムアルデヒド固定反応の逆反応により、核酸合成に必要なペントースリン酸を供給していることを明らかにした。一連の酵素反応が細菌とアーキアで異なる生理的役割を果たしている珍しい事例であり、代謝経路の進化の観点からも非常に興味深い。メタノールやホルムアルデヒドなどの C1 化合物による遺伝子発現誘導の分子機

構に関して、枯草菌とメチロトロフ酵母の DNA 結合性の転写活性化因子を取得して、その性質を解析した。今回解析した転写因子を足がかりに、C1 化合物の認識に関わる因子や情報伝達経路についての解析を今後も進めていく。

文献

- 1) Kato, N., Yurimoto, H., and Thauer, R. K., The physiological role of the ribulose monophosphate pathway in bacteria and archaea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70: 10-21 (2006).
- 2) Yurimoto, H., Kato, N., and Sakai, Y., Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism. *Chem. Rec.*, 5: 367-375 (2005).
- 3) Orita, I., Sato, T., Yurimoto, H., Kato, N., Atomi, H., Imanaka, T., and Sakai, Y., The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Bacteriol.*, 188: 4698-4704 (2006).
- 4) Yurimoto, H., Hirai, R., Matsuno, N., Yasueda, H., Kato, N., and Sakai, Y., HxIR, a member of the DUF24 protein family, is a DNA-binding protein that acts as a positive regulator of the formaldehyde-inducible *hxlAB* operon in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 57: 511-519 (2005).
- 5) Yurimoto, H., Komeda, T., Lim, C. R., Nakagawa, T., Kondo, K., Kato, N., and Sakai, Y., Regulation and evaluation of five methanol-inducible promoters in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1493: 56-63 (2000).