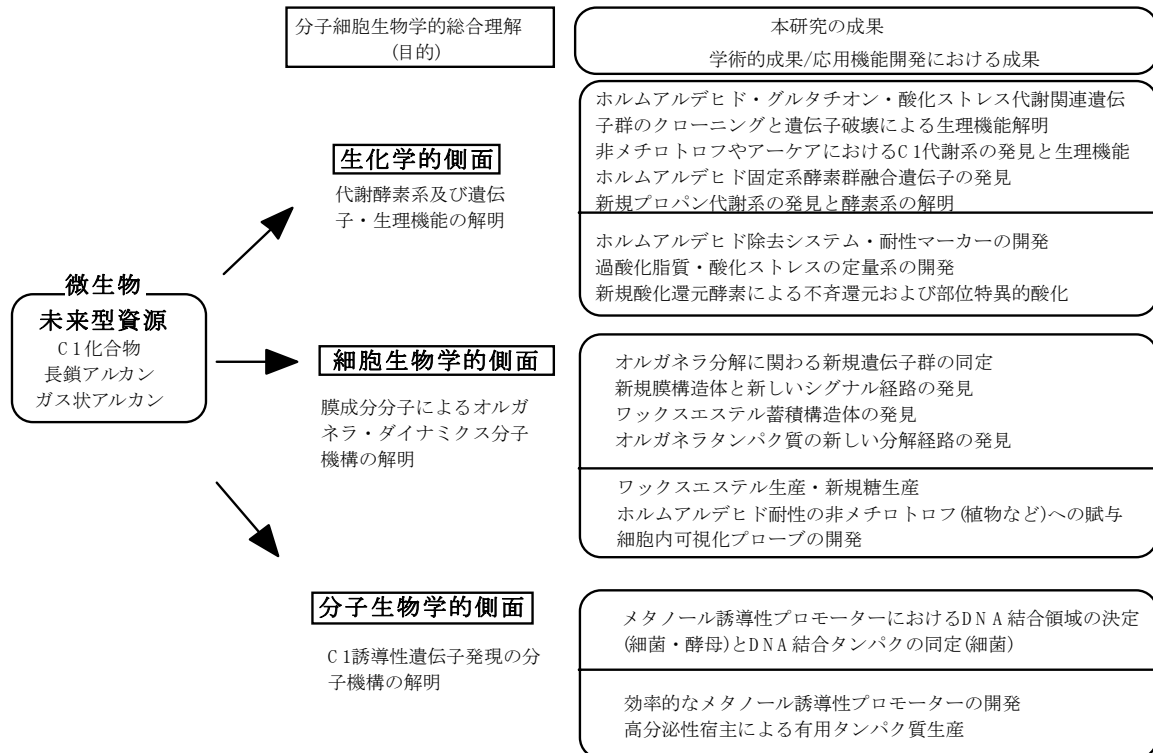


平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字	SAKAI YASUYOSHI					
①研究代表者氏名	阪井 康能			②所属研究機関・部局・職	京都大学・農学研究科・教授	
③研究課題名	和文	未来型天然資源を利用する微生物の分子細胞生物学的総合理解と応用機能開発				
	英文	Molecular and cellular biology and development of useful cellular functions of microorganisms which can utilize future-type natural resources				
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
	18,800	19,000	19,000	19,000	19,000	94,800
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
阪井 康能	京都大学・農学研究科・教授	制御発酵学・分子細胞生物学・生化学	研究の総括： タンパク質輸送・膜構造体の機能解析 未来型資源を利用する代謝経路の解明			
由里本 博也	京都大学・農学研究科・助手	応用微生物学・分子生物学・生化学	未来型資源を利用する代謝経路の解明・ 遺伝子発現制御機構の解明と異種遺伝子発現			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>今世紀の炭素・エネルギー資源は、国内外を問わず、資源の豊富さ、利便性、経済性、優れた環境特性から天然ガスが中心になるとされている。特に、メタンとメタノールは、廃棄物・木材資源などの未利用バイオマスからの循環利用が可能な未来型天然資源でもある。微生物を利用するバイオ産業も例外ではなく、これらのC1化合物を微生物培養原料とした場合には、上述の特徴に加えて、工業原料として高純度であること、培養プロセスが環境に負荷を与えないことなどの利点も有しており、いかに、これらの未来型天然資源を利用できる微生物の細胞機能を開発し、最大源に活用できるかが、今後の鍵となる技術開発であると考えられる。</p> <p>これまで、メタノールなどの還元型C1化合物を利用する微生物（メチロトローフ）の微生物機能開発の研究を、異種遺伝子発現系による有用活性型タンパク質の生産を中心に進めてきた。特にその過程において、i) メチロトローフ酵母では単膜系オルガネラが高度に発達し、そのオルガネラへのタンパク輸送機構を活用する物質生産系が構築できること、ii) メチロトローフ酵母の強力な異種遺伝子発現機構が異種タンパク生産や生体触媒系として利用できること、iii) 自然界に普遍的に存在するメチロトローフ細菌のC1化合物代謝の進化的普遍性を見出すとともに、その代謝工学的展開を可能にしたこと、などの研究成果を得ている。</p> <p>本研究では、今世紀の未来型資源をバイオテクノロジーに活用することを踏まえ、メチロトローフに加えて、未利用資源であるガス状あるいは固形アルカンなどを利用する微生物について、その分子細胞生物学的見地から、メチロトローフやアルカン資化性菌の高度利用を目的として、バイオテクノロジーとして有効な細胞機能を抽出し、機能開発するとともに、これらの有用微生物の分子細胞生物学的基盤を理解することを研究目的とする。すなわち、本研究の特徴は、未来型資源を利用する有用微生物の理解を、代謝経路のみならず、細胞構造・遺伝子発現の3つの観点から総合的に理解し、それぞれの側面からバイオテクノロジーに利用しようとする点が、先進的かつ独創的な点である。</p>						

⑦ 研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)



(I) 生化学的側面に関する新しい知見と成果

ホルムアルデヒドの生物毒性に関しては、ハウスシック症候群が知られているように、天然ガスやメタノールを原料として大量に用いる場合、避けて通れない問題の一つである。C1微生物にはホルムアルデヒドを代謝・解毒する酵素が備わっている。このような酵素系についてメタノール資化性酵母よりクローン化し、遺伝子破壊によりその生理的意義を明らかにした。一方、これまで未発表のものを含めると2種のアーケアも含めて、7種類のリブローズモノリン酸経路オペロンをクローン化した。中でもアーケアより単離した遺伝子は本来2つの読み枠から合成される2つの酵素が互いに融合遺伝子として存在することが明らかとなった。さらに遺伝子破壊の可能なアーケアである *Pyrococcus kodakaraensis* の HPS-PHI 遺伝子を破壊することにより、多くのアーケアにおける五炭糖合成がリブローズモノリン酸経路に依存しており、本経路にはホルムアルデヒド固定以外にも重要な生理機能を持っていることを明らかにした。HPS-PHI 融合遺伝子を植物・大腸菌などに導入するとホルムアルデヒド耐性を示し、植物形質転換体はホルムアルデヒド吸収能を示した。極長鎖アルカン及びガス状アルカンの代謝系に関連して、長鎖アルカン代謝系酵素を精製し、その性状を明らかにするとともに、その生物資源が枯渇しつつある有用ワックスエステルの微生物による生産系を構築した。また、プロパン代謝については、その酸化により2-プロパノール・アセトンを経て、分解される subterminal 酸化によって分解されることを初めて示し、さらにその代謝系に関わる全ての遺伝子を得た。特にアセトンの酸化が新奇酵素により触媒されていることがわかった。また、ホルムアルデヒド代謝とグルタチオン代謝・酸化ストレス代謝との関連性についても、それを司る転写因子の同定に成功し、現在、明らかになりつつあるところである。

(II) 細胞生物学的側面に関する新しい知見と成果

メタノールに生育している酵母をある環境条件化に移すと、ペルオキシソームと呼ばれる特定のオルガネラが液胞によって分解される。これが、一細胞観察により液胞のダイナミックな形態変化を伴う現象であるとともに、それに必要な30近くのATG遺伝子のクローン化と同定に成功した。またペルオキシソーム膜表面上にこれまで知られていない全く新しい膜構造体を発見し、Micropexophagic apparatus: MIPA と名付けた。複数のATG遺伝子、ならびにステロールグルコシドやPIなどの膜脂質がこのような細胞内ダイナミクスや細胞内構造の新生に関わっていることを明らかにした(次項参照)。また、ペルオキシソーム内のタンパク質分解がユビキチン系によっても分解されることが明らかとなり、現在、解析を進めている。また元来ペルオキシソームに局在するとされているタンパク質であっても、ペルオキシソーム輸送シグナルに強弱があり弱いものでは細胞質とペルオキシソームの両局在性を示すことを明らかにした、一方、n-アルカン資化性細菌がワックスエステルを著量生産する際、特徴的な構造体が時間とともに菌体内に出現することを明らかにした。以上の研究は微生物の細胞内ダイナミクスのメカニズムを明らかにするのみならず、オルガネラ内でのタンパク質生産・ワックスエステル生産に有用な知見である。

(III) 分子生物学的側面に関する新しい知見と成果

メタノール資化性細菌及び酵母を用いて、メタノールまたはホルムアルデヒド誘導性プロモーターと誘導機構について解析した。細菌についてはtrans-因子HxlRをクローン化してDNA結合領域を決定、HxlRがホルムアルデヒド誘導性に必要なことを示した。酵母についてはメタノール誘導性cis領域について特定した後、trans-因子について、様々な方法を用いて探索した結果、メタノールによって誘導される多くの蛋白の発現に関わる新しい転写因子を同定し、現在、その機能解析を進めているところである。これらの情報は高性能なメタノール誘導性プロモーターの開発のために必要な知見である。またファイターゼ・トランスグルタミナーゼなどの有用酵素の分泌タンパク質の生産を、宿主変異・発現コンストラクトの改良などにより、大幅に高めることに成功した。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

(I) オルガネラ分解に関わる *ATG* 遺伝子群の同定・新しい膜構造体 MIPA(Micropexophagic apparatus)の発見と新生膜合成・ダイナミクスの分子基盤

従来、オルガネラ分解の分子機構については、あらゆる生物を通して殆どわかっていなかった。本研究代表者らはメタノール資化性酵母を材料に、ペルオキシソームが、ペキソファジーと呼ばれるプロセスにより、液胞に選択的に取り込まれて分解することをリアルタイム観察により初めて明らかにし (J. Cell Biol. (1998)), その各過程に必要な 30 近くの *ATG* 遺伝子のクローン化と同定に成功、さらに、ペルオキシソーム膜表面上にこれまで知られていない全く新しい膜構造体があらたに出現することを発見し、Micropexophagic apparatus: MIPA と名付けた。さらにペキソファジーの膜ダイナミクスにはユビキチン様の脂質修飾システムやステロールグリコシドという希少な膜脂質成分が深く関わっていること、最近、新たに 2 種のイノシトールリン脂質 PI3P と PI4P が、ペキソファジーの過程では、全く異なる制御系を協調的に制御していることを明らかにした (J. Cell Biol. 改訂原稿投稿中)。これら一連の成果の一部は国際的学術雑誌である EMBO J. (2003) や Mol. Biol. Cell (2004, 2005)、*Genes to Cells* (2002) などに掲載、Mol. Biol. Cell と *Genes to Cells* 誌にはカバーストーリーとして取り上げられた。また関連総説の発表、国内外におけるシンポジウム (Gordon 会議や米国細胞生物学会ワークショップなど) における招待講演を行っている。今後、オルガネラ内タンパク質生産と組み合わせた応用的成果を期待している。

(II) ホルムアルデヒドを資化するリブローズモノリン酸経路オペロンの構造と機能

当初、メチロトロフ細菌に見出されていたリブローズモノリン酸(RuMP)経路の鍵酵素 HPS と PHI であるが、我々による遺伝子の構造決定以来、メチロトロフのみならず枯草菌やメタン菌・好熱菌などのアーケアなど広くそのホルムアルデヒド固定系が存在していることが明らかとなった。これまで未発表のものを含めて 7 種の微生物から RuMP オペロン遺伝子をクローン化しているが、そのうちアーケア属由来の RuMP オペロンでは、本来 2 つの読み枠から合成される HPS と PHI が互いに融合した一つの遺伝子として存在すること (J. Bacteriol. 2005)、さらに多くのアーケアでは、ホルムアルデヒド固定というより、その逆反応であるリブローズなどの五炭糖合成経路であることを、生化学および遺伝子破壊実験により明らかとした (J. Bacteriol., 改訂原稿投稿中)。また、枯草菌における HPS・PHI 遺伝子の発現が、DUF24 ファミリーに属する新しい DNA 結合タンパク質 HxIR により制御されていることを示し、その結合領域、調節領域について、生化学・分子生物学的に証明した (Mol. Microbiol. 2005)。植物細胞・大腸菌・メタノール資化性細菌などに HPS-PHI 融合遺伝子を導入することによりホルムアルデヒド耐性と吸収能の植物細胞へ賦与すること、本融合遺伝子のマーカーとして用いるための応用研究が進行中である。

(III) n- アルカン資化性細菌に見出したワックスエステルとともに生成する細胞内構造体の発見とワックスエステル生産の代謝工学的設計

これまで *Acinetobacter* sp. M-1 株における n-アルカン資化経路を生化学的に明らかにしてきた。その過程で、本菌がワックスエステルを著量蓄積できることを見出すとともに、新規なワックスエステルを蓄積している構造体が菌体内に出現していることを見出した。細胞生物学的に新たな知見を得たのみならず、応用利用上、最適な側鎖長を持つワックスエステルを自由に生産可能なことから注目を集めており、これらの成果が Appl. Environ Microbiol. (2002)に、また一連の成果をとりまとめた総説は *Curr. Opinion Microbiology* (2003) に掲載した。

一方、気体状アルカンであるプロパンやイソアルカンであるプリスタンの微生物代謝についてほとんど不明であったが、*Gordonia* sp. TY-5 株では、サブターミナル酸化により 2-propanol をへてアセトンに酸化されること、イソアルカンでの生育には、 α -メチルアシル CoA ラセマーゼが必要なことを明らかにした (J. Bacteriol. 2003, 2004)。さらにプロパン酸化により生じたアセトンは、新しいタイプの Baeyer-Villiger モノオキシゲナーゼによりメタノールと酢酸に導くことを初めて明らかにした (投稿準備中)。

(IV) メタノール酵母を用いた異種タンパク質生産系の開発

フィターゼ・トランスグルタミナーゼ・カテプシン C などの有用タンパク質の高発現法を確立した。また共同研究により、植物細胞由来脂質改変酵素の発現と脂質のバイオコンバージョンにメタノール資化性酵母発現系が有用なことを示した (Biosci. Biotechnol. Biochem., (2005) 論文賞; Appl. Microbiol. Biotechnol. (2002); Plant Cell Physiol. (2006); FEBS Lett. (2006) など)。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

【原著発表論文】

- Kosuke Kawaguchi, Yoshifumi Shinoda, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai, and Nobuo Kato. :Purification and characterization of benzoate-CoA ligase from *Magnetospirillum* sp. strain TS-6, capable of aerobic and anaerobic degradation of aromatic compounds. *FEMS Microbiol. Lett.*, **257**, 208-213 (2006).
- Masataka Kajikawa, Katsuyuki T. Yamato, Yoshito Kohzu, Shin-ichiro Shoji, Yasuyoshi Sakai, and Hideya Fukuzawa. : A front-end desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii* produces pinolenic and coniferonic acids by ω 13 desaturation in methylotrophic yeasts and tobacco. *Plant Cell Physiol.*, **47** (1), 64-73 (2006).
- Tomoyuki Nakagawa, Atsushi Inagaki, Takashi Ito, Shuki Fujimura, Tatsuro Miyaji, Hiroya Yurimoto, Nobuo Kato, Yasuyoshi Sakai, and Noboru Tomizuka. : Regulation of two distinct alcohol oxidase promoters in the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Yeast*, **23**, 15-22 (2006).
- Masataka Kajikawa, Katsuyuki T. Yamato, Yasuyoshi Sakai, Hideya Fukuzawa, Kanji Ohyama, Takayuki Kohchi. : Isolation and functional characterization of fatty acid Δ 5-elongase gene from the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *FEBS Lett.*, **580**, 149-154 (2006).
- Yoshitaka Ano, Takeshi Hattori, Nobuo Kato, and Yasuyoshi Sakai.: Intracellular ATP correlates with mode of pexophagy in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69** (8), 1527-1533 (2005).
- Yoshifumi Shinoda, Junya Akagi, Yasumitsu Uchihashi, Akira Hiraiishi, Hideaki Yukawa, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai, and Nobuo Kato. :Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: isolation and degradation genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69** (8), 1483-1491 (2005).
- Masataka Kajikawa, Katsuyuki T. Yamato, Hideya Fukuzawa, Yasuyoshi Sakai, Hidenobu Uchida, and Kanji Ohyama. :Cloning and characterization of a cDNA encoding β -amyrin synthase from petroleum plant *Euphorbia tirucalli* L. *Phytochemistry*, **66** (15), 1759-1766 (2005).
- Hiroya Yurimoto, Reiko Hirai, Norimichi Matsuno, Hisashi Yasueda, Nobuo Kato, and Yasuyoshi Sakai. : HxlR, 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** (2), 511-519 (2005).
- Izumi Orita, Hiroya Yurimoto, Reiko Hirai, Yutaka Kawarabayashi, Yasuyoshi Sakai, and Nobuo Kato. : The Archaeon *Pyrococcus horikoshii* Possess A Bifunctional Enzyme for Formaldehyde Fixation via the Ribulose Monophosphate Pathway. *J. Bacteriol.*, **187** (11), 3636-3642 (2005).
- Yoshitaka Ano, Takeshi Hattori, Masahide Oku, Hiroyuki Mukaiyama, Misuzu Baba, Yoshinori Ohsumi, Nobuo Kato, and Yasuyoshi Sakai. : A Sorting Nexin PpAtg24 Regulates Vacuolar Membrane Dynamics During Pexophagy Via Binding to Phosphatidylinositol-3- phosphate. *Mol. Biol. Cell*, **16** (2), 446-457 (2005).
- Yasuyoshi Sakai, Hironori Takahashi, Yuori Wakasa, Tetsuya Kotani, Hiroya Yurimoto, Nobuya Miyachi, Paul P. van Veldhoven, and Nobuo Kato. : Role of α -Methylacyl CoenzymeA Racemase in the Degradation of Methyl-Branched Alkanes by *Mycobacterium* sp. Strain P101. *J. Bacteriol.*, **186** (21), 7214-7220 (2004).
- Hiroya Yurimoto, Maiko Yamane, Yoshimi KikuchiI, Hiroshi Matsui, Nobuo Kato, and Yasuyoshi Sakai.: The Pro-peptide of *Streptomyces mobaraense* Transglutaminase Functions in *cis* and in *trans* to Mediate Efficient Secretion of Active Enzyme from Methylotrophic Yeasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68** (10), 2058-2069 (2004) (BBB 論文賞).
- Masataka Kajikawa, Katsuyuki T. Yamato, Yoshito Kohzu, Masutoshi Nojiri, Eiji Sakuradani, Sakayu Shimizu, Yasuyoshi Sakai, Hideya Fukuzawa, and Kanji Ohyama. : Isolation and characterization of Δ ⁶-desaturase, an ELO-like enzyme and Δ ⁵-desaturase from the liverwort *Marchantia polymorpha* and production of arachidonic and eicosapentaenoic acids in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Plant Mol. Biol.*, **54**, 335-352 (2004).

⑨研究成果の発表状況 (続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

Tomoyuki Nakagawa, Takashi Ito, Shuki Fujimura, Mika Chikui, Tasuku Mizumura, Tatsuro Miyaji, Hiroya Yurimoto, Nobuo Kato, Yasuyoshi Sakai, and Noboru Tomizuka.: Molecular characterization of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase gene *FLD1* from the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Yeast*, **21**, 445-453 (2004).

Yoshifumi Shinoda, Yasuyoshi Sakai, Hiroshi Uenishi, Yasumitsu Uchihashi, Akira Hiraishi, Hideaki Yukawa, Hiroya Yurimoto, and Nobuo Kato. : Aerobic and Anaerobic Toluene Degradation by a Newly Isolated Denitrifying Bacterium, *Thauera* sp. Strain DNT-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70** (3), 1385-1392 (2004).

Hiroya Yurimoto, Bunjun Lee, Fumi Yasuda, Yasuyoshi Sakai and Nobuo Kato.: Alcohol dehydrogenases that catalyse methyl formate synthesis participate in formaldehyde detoxification in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Yeast*, **21**, 341-350 (2004).

Hiroyuki Mukaiyama, Misuzu Baba, Masako Osumi, Yoshinori Ohsumi, Nobuo Kato, and Yasuyoshi Sakai. : Modification of a Ubiquitin-like Protein Paz2 Conduced Micropexophagy through Formation of a Novel Membrane Structure. *Mol. Biol. Cell*, **15** (1), 58-70 (2004).

Tetsuya Kotani, Tazuko Yamamoto, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai, and Nobuo Kato. : Propane Monooxygenase and NAD⁺-Dependent Secondary Alcohol Dehydrogenase in Propane Metabolism by *Gordonia* sp. Strain TY-5. *J. Bacteriol.*, **185** (24), 7120-7128 (2003).

Toshihiro Komeda, Hiroya Yurimoto, Nobuo Kato, Yasuyoshi Sakai, and Keiji Kondo. : *Cis*-acting elements sufficient for *FDH1* expression by formate in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Mol. Gen. Genet.*, **270** (3), 273-280 (2003).

Daniel J. Klionsky, James M. Cregg, William A. Dunn, Jr., Scott D. Emr, Yasuyoshi Sakai, Ignacio V. Sandoval, Andrei Sibirny, Suresh Subramani, Michael Thumm, Marten Veenhuis, and Yoshinori Ohsumi.: A Unified Nomenclature for Yeast Autophagy-Related Genes. *Dev. Cell*, **5**, 539-545 (2003).

Ryoji Mitsui, Yoko Kusano, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai, Nobuo Kato, and Mitsuo Tanaka.: Formaldehyde fixation contributes to detoxification for growth of a nonmethylotroph, *Burkholderia cepacia* TM1, on vanillic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (10), 6128-6132 (2003).

Masataka Kajikawa, Katsuyuki T. Yamato, Hiroyuki Kanamaru, Eiji Sakuradani, Sakayu Shimizu, Hideya Fukuzawa, Yasuyoshi Sakai, and Kanji Ohyama. : *MpFAE3*, β -Ketoacyl-CoA Synthase Gene in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L., Is Preferentially Involved in Elongation of Palmitic Acid to Stearic Acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67** (8), 1667-1674 (2003).

Hiroya Yurimoto, Bumjun Lee, Taisuke Yano, Yasuyoshi Sakai, and Nobuo Kato. : Physiological role of *S*-formylglutathione hydrolase in C1-metabolism of the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Microbiology*, **149** (8), 1971-1979 (2003).

○Masahide Oku, Dirk Warnecke, Takeshi Noda, Frank Müller, Ernst Heinz, Hiroyuki Mukaiyama, Nobuo Kato, and Yasuyoshi Sakai. : Peroxisome degradation requires catalytically active sterol glucosyltransferase with a GRAM domain. *EMBO J.*, **22** (13), 3231-3241 (2003).

Mikinori Kurisu, Masashi Morita, Yasunori Kashiwayama, Sadaki Yokota, Hiroshi Hayashi, Yasuyoshi Sakai, Shoji Ohkuma, Mikio Nishimura, and Tsuneo Imanaka.: Existence of Catalase-less Peroxisomes in Sf21 Insect Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**, 169-176 (2003).

Akio Tani, Takeru Ishige, Yasuyoshi Sakai and Nobuo Kato.: Two acyl-CoA dehydrogenases responsible for *n*-alkane utilization of *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J. Biotechnol. Bioeng.*, **94** (4), 326-329 (2002).

Hiroya Yurimoto, Reiko Hirai, Hisashi Yasueda, Ryoji Mitsui, Yasuyoshi Sakai, Nobuo Kato.: The ribulose monophosphate pathway operon encoding formaldehyde fixation in a thermotolerant methylotroph, *Bacillus brevis* S1. *FEMS Microbiol. Lett.*, **214**, 189-193 (2002).

Tomoyuki Nakagawa, Tasuku Mizumura, Hiroyuki Mukaiyama, Tatsuro Miyaji, Hiroya Yurimoto, Nobuo Kato, Yasuyoshi Sakai, and Noboru Tomizuka.: Physiological role of the second alcohol oxidase gene *MOD2* in the methylotrophic growth of *Pichia methanolica*. *Yeast*, **19**, 1067-1073 (2002).

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

Bumjun Lee, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai, and Nobuo Kato: Physiological role of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Microbiology*, **148** (9), 2697-2704 (2002).

Toshihiro Komeda, Kyoko Tazumi, Hiroshi Shimada, Kenjiro Kano, Takaaki Hayashi, Hiroyuki Saito, Haruhiko Tsumura, Nobuo Kato, Yasuyoshi Sakai and Keiji Kondo: Production of active bovine cathepsin C (dipeptidyl aminopeptidase D) in the Methylotrophic Yeast *Candida boidinii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 252-258 (2002).

Toshihiro Komeda, Yasuyoshi Sakai, Nobuo Kato, and Keiji Kondo. : Construction of Protease-deficient *Candida boidinii* Strains Useful for Recombinant Protein Production: Cloning and Disruption of Proteinase A gene (*PEP4*) and Proteinase B Gene (*PRB1*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66** (3), 628-631 (2002).

Takeru Ishige, Akio Tani, Keiji Takabe, Kazunori Kawasaki, Yasuyoshi Sakai, and Nobuo Kato. : Wax Ester Production from *n*-Alkanes by *Acinetobacter* sp. Strain M-1: Ultrastructure of Cellular Inclusions and Role of Acyl Coenzyme A Reductase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68** (3), 1192-1195 (2002).

Hiroyuki Mukaiyama, Masahide Oku, Misuzu Baba, Takeshi Samizo, Adam T. Hammond, Benjamin S. Glick, Nobuo Kato and Yasuyoshi Sakai. : Paz2 and 13 other *PAZ* gene products regulate vacuolar engulfment of peroxisomes during micropexophagy. *Genes to Cells*, **7** (1), 75-90 (2002). [cover story]

Hirofumi Horiguchi, Hiroya Yurimoto, Toh- Kheng Goh, Tomoyuki Nakagawa, Nobuo Kato and Yasuyoshi Sakai. : Peroxisomal Catalase in the Methylotrophic Yeast *Candida boidinii*: Transport Efficiency and Metabolic Significance. *J. Bacteriol.*, **183** (21) 6372-6383 (2001). [cover story]

Hirofumi Horiguchi, Hiroya Yurimoto, Nobuo Kato and Yasuyoshi Sakai. : Antioxidant System within Yeast Peroxisome: Biochemical and Physiological Characterization of CbPmp20 in the Methylotrophic Yeast *Candida boidinii*. *J. Biol. Chem.*, **276** (17) 14279-14288 (2001)

【原著総説論文・著書】

阪井康能: 酵母ミクロペキシファジーの細胞内ダイナミクス *顕微鏡*, 印刷中(2006).

山下俊一、阪井康能: Atg分子による膜動態の制御とペキシファジー. *蛋白質・核酸・酵素*, 印刷中(2006).

Hiroya Yurimoto, Nobuo Kato, and Yasuyoshi Sakai. :Assimilation, Detoxification, and Detoxification of Formaldehyde, A Central Metabolic Intermediate of Methylotrophic Metabolism. *The Chemical Record*, **5**, 367-375 (2005).

阪井康能 III. 微生物細胞の構造・機能. 「応用微生物学」第2版 (清水 昌、堀之内末治 編)、p.71-98、文永堂出版(東京) (2006).

由里本博也、加藤暢夫、阪井康能: 酵母、細菌、アーキアのC₁化合物代謝: *バイオサイエンスとインダストリー*, **63**(12), 773-776 (2005)

Tetsuya Kotani, Hiroya Yurimoto, Nobuo Kato, and Yasuyoshi Sakai. : Purification and characteriation of three NAD⁺-dependent secondary alcohol dehydrogenases from propane utilizing bacterium *Gordonia* sp. strain TY-5. *応用微生物学研究*, **3** (1), 135-148 (2005)

阪井康能: 未来型資源の利用を目指すC1微生物の理解. *バイオサイエンスとインダストリー*, **63**(10), 643-645 (2005).

William A. Dunn, Jr., James M. Cregg, Jan A.K.W. Kiel, Ida J. van der Klei, Masahide Oku, Yasuyoshi Sakai, Andrei A. Sibirny, Oleh V. Stasyk, and Marten Veenhuis. : Pexophagy: The Slective Autophagy Of Peroxisomes. *Autophagy*, **1** (2), 75-83 (2005).

篠田吉史、阪井康能、加藤暢夫: 脱窒性細菌による芳香族化合物の嫌気分解. *用水と排水*, **47** (3), 182-189 (2005).

米田俊浩、玉井幸夫、近藤恵二、由里本博也、加藤暢夫、阪井康能: ギ酸誘導性遺伝子発現機構の解明とメタノール資化性酵母異種タンパク質生産系の確立 *応用微生物学研究*, **2** (2), 75-81, (2004)

阪井康能: メタノール資化性酵母遺伝子発現系を用いた有用酵素生産の最適化 *生物工学会誌*, **82** (11), 520-522 (2004).

加藤暢夫、石毛たける、阪井康能: ノルマルパラフィンからのワックス生産. *科学と工業*, **78** (6), 302-309 (2004).

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

奥 公秀、加藤暢夫、阪井康能:メタノール資化性酵母*Pichia pastoris*のペキシファジーの一細胞可視化による動態解析及びPaz4/Ugt51 ステロールグルコシド合成酵素の役割 *応用微生物学研究*, 1 (2), 97-102 (2003)

向山博幸、加藤暢夫、阪井康能:メタノール資化性酵母*Pichia pastoris*のペキシファジーを支配するPAZ遺伝子群の同定とユビキチン様タンパクPaz2及びその修飾系の解析. *応用微生物学研究*, 1 (2), 90-96 (2003).

阪井康能: オルガネラ分解の分子機構: ミクロペキシファジーに必要なPAZ遺伝子群の機能と新生膜構造体 *生体の科学*, 54 (6), 540-547 (2003).

望月大資、徳田淳子、阪井康能: 新規フィターゼの特性とメチロトロフ酵母による高生産. *バイオサイエンスとインダストリー*, 61(10), 31-32 (2003).

阪井康能、奥 公秀: ステロール配糖体が果たす生物機能 *細胞工学*, 23 (9), 992-993 (2003).

阪井康能: 酵母ペルオキシソームの生成と分解の分子機構 *実験医学*, 21 (14), 1912-1916 (2003).

Takeru Ishige, Akio Tani, Yasuyoshi Sakai and Nobuo Kato. : Wax ester production by bacteria. *Curr. Opin. in Microbiol.*, 6 (3), 244-250 (2003).

阪井康能: ペキシファジーの分子機構 *生化学*, 74 (11), 1352-1356 (2002).

由里本博也、阪井康能、加藤暢夫: メチロトロフのホルムアルデヒド対策: シックハウス症候群克服のヒントが得られるか? *化学と生物*, 41 (4), 218-221 (2003).

阪井康能、向山博幸.: ミクロオートファジーの分子解剖とユビキチン様タンパク質Paz2の新しい機能 *細胞工学*, 21 (6), 618-622 (2002).

【国際学会招待講演】

招待講演 Oct 1-4 Autophagy International meeting Mishima (講演予定)

招待講演 シンポジウムオーガナイザー Sep 25-28 2006 19th Annual and International Meeting/ Japanese Association for Animal Cell Technology, Symposium "Autophagy as a novel regulatory system for various cell functions."

招待講演 April 24-29, 2005 Gordon conference "Autophagy in Stress, Development and Disease". Il Ciocco, Barga, Italy, "Membrane dynamics and molecular basis of micropexophagy in *Pichia pastoris*"

招待講演 Dec 4-8, 2004 The American Society for Cell Biology 44th Annual Meeting, Minisymposium "Autophagy and Organelle Turnover", Washington DC, USA, "Pexophagy and Its Novel Membrane Dynamics in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*"

招待講演 Aug 1-6 2004 Gordon conference "Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism". Mount Holyoke College South Hadley, MA, USA., "Intracellular homeostasis of yeast methylotrophy"

招待講演: May 13-14, 2004 International Meeting of the Microbiological Society of Korea (Sangnok Resort Convention Center, Cheonan (天安), Korea) "Symposium: Molecular and Cell Biology of the Yeast", "Pexophagy and its novel membrane dynamics in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*"

招待講演: 国際シンポジウム "Dynamic Vacuole in Plants" (Nov25-27, 2003), 岡崎コンファレンスホール "Micropexophagy requires formation of a novel membrane structure regulated by APG and non-APG gene products."

招待講演: *Hansenula polymorpha* Worldwide Network Meeting, Tenerife, Spain (Sep 27-28, 2002) "Metabolic aspects of methylotrophic yeasts: anti-oxidant system and formaldehyde oxidation pathway"

招待講演: 2002 Symposium on Peroxisome Biogenesis, San Francisco, USA (Dec 14, 2002) "Peroxisomal metabolism in the methylotrophic yeast: anti-oxidant system, formaldehyde oxidation, and the role of glutathione"

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

招待講演: III International Symposium on Autophagy: Molecular Biology and Pathophysiology of Lysosomal / Vacuolar System. Okazaki (Sep 17-20, 2002) "The function of Pdz2 in micropexophagy of *Pichia pastoris*"

招待講演: Discussion leader: Gordon conference "Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism" Connecticut, USA (July 7-12, 2002) "Session: Methylotrophic Metabolism in Yeast and Bacteria" as a Discussion leader,

招待講演, ポスター発表: XXth International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology Prague, Czech (Aug 26-31, 2001) "Pdz2 and its modification regulate vacuole engulfment of peroxisomes in micropexophagy" "Antioxidant system within yeast peroxisome: Metabolic significance and peroxisomal transport of catalase and a novel peroxiredoxin Pmp20"

招待講演, ポスター発表: 21st International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY 2001) "Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Ecology of Non-conventional Yeasts (NCY)", Lviv, Ukraine, (Aug 21-25, 2001) "New Aspects of Peroxisomal Functions: Pexophagy, Anti-oxidant activities, and their application".

【国内シンポジウム招待講演】

第17回酵母合同シンポジウム 「原点としての酵母研究：温故と知新」ベルクラシック甲府 2006年6月1-2日 "ペキソファジーにおける生体膜ダイナミクスとその制御機構"

2006年度 農芸化学学会大会 特別シンポジウム ～農芸化学を考える～ SS2 「Chemical and Molecular Biology にみる農芸化学の再発見と未来」 "農芸化学と分子細胞生物学の狭間"

(独) 中小企業基盤整備機構 平成17年度 京都地域プラットフォーム事業 産学連携プライベートセミナー 「バイオパワーによる環境問題解決」京大桂ベンチャープラザ 2006年2月25日 "微生物の有用機能を高等生物に導入する ～環境・食品・医学分野への応用～"

(独) 科学技術振興機構「生物生産研究」俯瞰ワークショップ 新大阪、JST 2005年12月7日 "微生物（酵母）を用いた有用タンパク質生産"

第28回日本分子生物学会年会ワークショップ 「タンパク質と脂質のオーケストレーションによる膜の形成」JAL リゾートシーホークホテル 2005年12月10日 "ペキソファジーにおける細胞内膜動態のイノシトールリン脂質 (PI) と PI 結合性 Atg 分子による統合的制御機構"

(独) 科学技術振興機構「生物生産研究」俯瞰ワークショップ分科会(微生物分野) 東京、JST 2005年12月7日 "微生物機能開発研究から有用物質生産へのアプローチ"

2005年度 農芸化学学会大会シンポジウム 「未来型資源としての C1 化合物 —C1 バイオ研究の現状と将来—」札幌コンベンションセンター 2005年3月29日 "未来型資源の利用を目指した C1 微生物機能の理解"

京都大学国際融合創造センター主催 「フリーディスカッション産学連携」 京大会館 2004年12月15日 "天然ガス（・石油）系炭化水素を利用する微生物機能の分子細胞生物学的総理解と利用"

京都大学国際融合創造センター主催 「フリーディスカッション産学連携」 京大会館 2004年12月15日 "天然ガス（・石油）系炭化水素を利用する微生物機能の分子細胞生物学的総理解と利用"

第27回日本分子生物学会年会ワークショップW3F 「オルガネラ膜構造のダイナミクスと形態制御」 神戸国際会議場 2004年12月8-11日 "Roles of Phosphoinositides in Peroxisome Degradation of *Pichia pastoris*" (Masahide Oku, Yoshitaka Ano, Shun-ichi Yamashita, Nobuo Kato, and Yasuyoshi Sakai)

「Carl Zeiss 顕微鏡イメージングセミナー」 2004年11月17日 京大会館 "酸化ストレスを感知する FRET プロブの開発と酵母細胞内膜ダイナミクスの可視化・動態解析"

公開シンポジウム 「蛋白質分解：新たな展開をめざして」2004年9月3-4日 北海道大学・学術交流会館 "ペルオキシソーム分解に必要な膜構造の新生機構"

第5回 酵素応用シンポジウム 2004年6月11日 名鉄ニューグランドホテル "メタノール誘導性遺伝子発現による有用酵素大量生産系とそれを支える酵母細胞機能の分子基盤"

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

第16回 酵母合同シンポジウム 「いま、酵母研究に何が求められているか」 2004年6月3-4日 大阪市立大学 学術総合センター 大ホール. "オルガネラ分解における新しい膜動態制御機構: メチロトロフ酵母のペキソファジー"

第2回 近畿産学官連携フォーラム 「「産学官」連携と共創」による近畿経済活性化に向けて」 2004年2月20日 大阪府立女性総合センター "微生物遺伝子資源の高等生物における機能発現とその利用"

公開シンポジウム「蛋白質分解のメカニズムとバイオロジー」 2003年12月19-20日 岡崎コンファレンスセンター "マイクロオートファジーに APG 遺伝子群がどうして必要なのか?"

平成15年度 日本生化学会近畿支部シンポジウム 「脂質・糖鎖 vs タンパク質相互作用により制御される細胞内品質管理のダイナミズム」 2003年11月21日 京大会館 "選択的オルガネラ分解における膜動態と脂質制御"

平成15年度 第55回 日本生物工学会大会 シンポジウム 「実用酵母研究の現状と未来: ゲノム解析による育種の可能性」 2003年9月17日 熊本大学黒髪キャンパス内 "メタノール資化性酵母のゲノム情報と遺伝子挿入破壊変異体を利用した細胞機能解析"

第55回 日本細胞生物学会大会・第35回日本発生生物学会大会 合同大会 (パシフィコ横浜) 2002年5月23日 細胞生物シンポジウム3「プロティンキネシス - オルガネラの形成と制御-」 "マイクロペキソファジーにおける液胞膜の動態制御"

藪田セミナー講演会・環境微生物研究会「微生物の物質輸送: ダイナミクスとアルゴリズム」 2002年11月15日 (倉敷市芸文館) "環境適応における酵母単膜系オルガネラの動態とその輸送系"

科学研究費重点(B) 液胞研究班班会議及び液胞研究会 (KKR 京都 くに荘) 2002年12月8-9日 "マイクロオートファジーにともなって形成される新規な膜構造体について"

第25回 日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜) 2002年12月11日 シンポジウム 17 「ユビキチン関連蛋白質分解システム」 "マイクロペキソファジーを制御する新しい膜構造体の形成と PAZ 遺伝子産物の機能"

「細胞内ネットワークダイナミズム解析技術」-ポストゲノム開発に向けた技術課題を探る-公開シンポジウム 主催 経済産業省 (METI) 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)、2001年7月4日、サンシャイン 60 ビル "細胞"を舞台にしたダイナミックバイオ技術- アレイ・セミインタクト・非侵襲性アナライザー -

第2回「生命現象のネットワークシミュレーション」シンポジウム 主催 社団法人 JBIC (Japan Biological Informatics Consortium) ホリデイ・イン (東京) 2001年9月14日 "細胞内モニタリングを利用するダイナミックバイオ技術"

第5回バイオ技術シーズ公開会 主催 近畿バイオインダストリー振興会議、千里ライフサイエンスセンター (大阪)、2001年9月10日 "未来型"天然資源を利用する微生物の分子細胞生物学的総理解と応用機能開発"

平成13年度日本生物工学会大会 シンポジウム (バイオインダストリー協会共催) 2001年9月27日 「細胞内輸送工学: バイオテクノロジーと真核細胞タンパク質輸送機能の接点を探る」(オーガナイザー) "細胞内輸送工学: そのコンセプトと応用領域"

第74回日本生化学会大会 シンポジウム「オートファジー研究の新展開: 膜動態の分子基盤」 2001年10月27日 国立京都国際会館 京都宝ヶ池プリンスホテル "マイクロペキソファジーに必須な Paz 遺伝子産物による液胞膜の動態制御"

科学研究費 重点領域(B)「液胞機能」 班会議 (2001年11月26-27日、ルブラ王山, 名古屋) "Pichia pastoris ミクロペキソファジーにおける液胞膜の動態制御"

公開シンポジウムタンパク質分解の最前線 (2001年12月20-21日、京都大学・芝蘭会館)"オルガネラ選択的分解の分子機構-Paz2 分子とその修飾系による液胞膜ダイナミクスの調節"

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

【特許】

特許第3729946（登録日：2005年10月14日）、出願番号：特願 平8- 229883（出願日：1996年8月30日）、「アルコールオキシダーゼ及びこれを用いたアルデヒド類の製造方法」発明者：宮地伸也、堀田康司、加藤暢夫、阪井康能 出願者名：（株）コスモ総合研究所、コスモ石油株式会社

出願番号：特願 2004-297260「改変フィターゼ」発明者：中山 章、谷川峰子、里沢智美、番場伸一、阪井康能、加藤 暢夫 出願者名：三井化学株式会社 中西宏幸 特許出願日：平成16年10月12日。

出願番号：特願2003- 407508「ホルムアルデヒドに対する耐性を植物に賦与する方法、環境中のホルムアルデヒドを植物に吸収させる方法」発明者：泉井 桂、陳 麗梅、加藤暢夫、阪井康能、由里本博也。出願者名：京都大学長 特許出願日：平成15年12月5日。

科出願番号：特願2001- 249771、特願2002- 56323「メタノール資化性酵母を用いたトランスグルタミナーゼの製造法」発明者：阪井康能、松井裕、加藤暢夫。 出願者名：味の素株式会社 特許出願日：平成13年8月21日、平成14年3月1日。

出願番号：特願2003- 314211、「環境の変化を検出するプローブ、タンパク質、それをコードする遺伝子DNA、mRNAおよび環境の変化の検出方法」発明者：阪井康能、加藤暢夫。 久下周佐、川井 淳、岡 正則、出願者名：東洋紡績株式会社 特許出願日：平成15年9月5日。

出願番号： 特願2003- 348668、「リン脂質の特異的検出方法および検出のための分子プローブ並びにタンパク質、それをコードする遺伝子」 発明者： 阪井康能、加藤暢夫、奥公秀、川井淳、川上文清、岡正則 出願者名：東洋紡績株式会社 特許出願日：平成15年10月7日

特許公開 特開2003- 12701「酵母由来の新規多糖体」発明者：伊藤 潔、望月 大資、徳田 淳子、安楽城 正、高橋 均、吉谷 敏、加藤 暢夫、阪井康能、坂本 正弘。 出願者名：三井化学株式会社 特許出願日：平成13年(2001)7月3日。(平成15年1月15日公開)