

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780062
 研究課題名 (和文) 酵母の酸素認識システムとオルガネラクロストークによる酸素代謝調節機構の解明
 研究課題名 (英文) An oxygen-recognition system through organelle crosstalk between the mitochondria and peroxisomes in yeast
 研究代表者
 中川 智行 (NAKAGAWA TOMOYUKI)
 岐阜大学・応用生物科学部・准教授
 研究者番号：70318179

研究成果の概要：

本研究ではメチロトローフ酵母の酸素認識とメタノール代謝制御について解析した。AOD は低酸素で Mod1p が支配的で、高濃度では Mod2p が支配的だった。一方、高呼吸鎖阻害で Mod1p、低阻害下で Mod2p の発現比が高くなった。これは呼吸鎖が酸素濃度を感知、それに合わせ AOD 発現を調節し、代謝を制御している、つまり、ペルオキシソームとミトコンドリア間のオルガネラクロストークの存在が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 2,100,000 | 0 | 2,100,000 |
| 2008 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 390,000 | 3,790,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：酸素、オルガネラクロストーク、アルコールオキシダーゼ、*Pichia methanolica*

1. 研究開始当初の背景

生物は進化の過程で効率よいエネルギー生産システムとして酸素を利用する呼吸を獲得した。しかし、生物は酸素により効率よくエネルギーを獲得できる反面、適切な酸素

代謝を行わなければ活性酸素が生じるとい
うリスクを負っている。つまり、生物は生命維持のために生育環境の酸素状態を的確に認識し、それに応じて酸素代謝を厳密に制御しなければならず、複数の酸素代謝系の酸素消費バランスの維持をはじめとした細胞内

の酸素を必要とする代謝系全体での代謝調節システムが重要であると思われる。

一方、メタノールを炭素源として生育できるメチロトロフ酵母は、メタノール代謝の際、少なくとも2つの酸素依存的な重要な段階を経る。一方は初段階反応アルコールオキシダーゼ (AOD) によるメタノールの酸化であり、本反応はメタノール代謝の律速段階であることから、本酵母は菌体内タンパク質の数十%を占めるほど強力で誘導されるAODの活性発現を制御することでメタノール代謝を制御している。他方は、呼吸鎖の電子伝達系であり、エネルギー獲得におけるメタノール代謝の最終段階である。つまり、メタノール代謝ではAODと呼吸鎖の間で酸素の消費が競合するため、メタノール代謝を円滑に保つためには生育環境の厳密な酸素認識とそれに合わせたAODと呼吸鎖の酸素消費バランスの制御が必要となる。また、AODと呼吸鎖活性は、それぞれペルオキシソーム(Ps)とミトコンドリア(Mt)に局在しており、メチロトロフ酵母はPs-Mt間で酸素消費バランスを調節するために、タンパク質細胞内局在制御さらにはPs-Mt間のオルガネラクロストークを行っているものと思われる。

つまり、メチロトロフ酵母のメタノール代謝には、酸素を中心とした代謝制御系が存在し、個々の代謝酵素の発現誘導の制御のみでなく、酸素認識、細胞内局在制御、さらにはオルガネラクロストークなど、生育環境下の酸素に合わせたメタノール代謝制御を行っていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではメチロトロフ酵母特に *P. methanolica* のメタノール代謝系が真核生物に普遍的な酸素代謝制御メカニズムの格好

のモデル系であると考え、本酵母のメタノール代謝における酸素認識機構および細胞内におけるオルガネラコミュニケーションを中心とした酸素代謝制御機構の解明を目指していく。

3. 研究の方法

(1) AOD アイソザイムの酸素に対する発現応答

P. methanolica は、2種の AOD 遺伝子産物 Mod1p と Mod2p のランダムな 8 量体への会合により形成される AOD アイソザイムをもつ。まず最初に、両 AOD 遺伝子の生育環境下の酸素に対する応答発現について解析することにした。

P. methanolica 酵母細胞を様々な酸素濃度下でメタノール生育 (16 時間) させ、それぞれの培養菌体中の *MOD1* および *MOD2* の発現を酵素活性レベル、活性染色、ノザン解析、さらにはプロモータアッセイで解析を行った。

(2) AOD アイソザイムの酸素に対する性質

AOD は酸素を基質として利用するオキシダーゼであるため、その酵素科学的諸性質を知ることは本酵母の酸素代謝制御の解明において重要な意味を持つものと思われる。そこで、AOD アイソザイムを構成する 2 種のサブユニットの酸素に対する親和性を観察することにした。

メタノールで生育させた *P. methanolica* *mod2Δ*株および *mod2Δ*株の培養細胞から、Mod1p および Mod2p をそれぞれ硫酸沈殿、イオン交換体、ゲル濾過カラムを用いて精製し、それぞれの酵素科学的諸性質を明らかにした。

(3) AOD アイソザイム活性発現に対する呼吸鎖の影響

AOD アイソザイムともう一つの酸素消費系である呼吸鎖との関係を解析するため、メタノール生育時（16時間）に、呼吸鎖阻害剤（アジ化ナトリウム、シクロヘキシミド）を添加することによる AOD アイソザイムの活性発現レベルを酵素活性、活性染色、ノザン解析、さらには出芽酵母の *PHO5* 遺伝子をレポーターとして用いたプロモータアッセイで解析を行った。

4. 研究成果

(1) AOD アイソザイムの酸素に対する応答

P. methanolica AOD アイソザイムの発現は酸素に対して依存的であることを見出し、低酸素下では *MOD1*、高酸素下では *MOD2* がより支配的に誘導されていた。これより *P. methanolica* は的確な酸素認識によりメタノール代謝を制御していることが明らかとなった。

(2) AOD アイソザイムの酸素に対する性質

P. methanolica Mod1p と Mod2p は酸素に対して異なる性質を示し、Mod1p は低 K_m 型、Mod2p は高 K_m 型サブユニットであることを明らかにした。また、*P. methanolica* AOD アイソザイムは酸素濃度に応じてサブユニット構成比を変化させることから、アイソザイムの組み合わせで酸素に対する V_{max} および K_m を自在に制御している。

つまり、*P. methanolica* は生育環境中の酸素濃度に応じて AOD アイソザイムの発現比を制御することで、AOD アイソザイム全体の V_{max} および K_m を調節し、過剰な AOD 活性を抑制していた。

(3) AOD アイソザイム活性発現に対する呼吸鎖の影響

呼吸鎖阻害下では *P. methanolica* AOD 発現は完全に抑制され、低阻害下では Mod1p が支配的であった。これは酸素濃度による挙動と類似しており、呼吸鎖が酸素濃度を感知し、自身の活性に合わせて AOD アイソザイムの発現を何らかの形で制御することでメタノール代謝を巧妙に制御しているものと思われる。つまり、AOD と呼吸鎖がそれぞれ局在する Ps とミトコンドリアの間でメタノール代謝を制御するための、いわゆる「オルガネラクロストーク」が何らかの形で行なわれていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

[雑誌論文] (計 2 件)

① 中川 智行. AOD アイソザイムによるメタノール代謝制御と異種遺伝子発現系への応用. バイオサイエンスとインダストリー. 65. 544-549. 2007.

査読無

② Fujimura, S., Nakagawa, T., Ito, T., Matsufuji, Y., Miyaji, T. and Tomizuka, N. 2007.

Peroxisomal metabolism is regulated by oxygen-recognition system through the organelle-crosstalk between mitochondria and peroxisomes. *Yeast*. 24: 491-498.

査読有

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 藤村 朱喜、木下 博貴、松藤 淑美、
宮地 竜郎、中川 智行、中川 純一. メ
チロトローフ酵母のメタノール代謝にお
けるシトクロム c の発現解析. 2009 年度
日本農芸化学会大会. マリンメッセ福岡.
2009 年 3 月 27 日.
- ② 伊藤 大祐、伊藤 尚志、藤村 朱喜、
小澤 正太郎、末永 優人、中川 純一、
早川 享志、中川 智行. メチロトローフ
酵母 *Pichia methanolica* のペルオキシシ
ン Pex14 の解析. 2009 年度 日本農芸化学
会大会. マリンメッセ福岡. 2009 年 3 月 27
日.
- ③ 小川 けい、蓮實 涼子、早川 享志、
中川 智行. メチロトローフ酵母 *Pichia*
methanolica のグルコース抑制解除株とそ
の関連因子の獲得. 2009 年度 日本農芸化
学会大会. マリンメッセ福岡. 2009 年 3 月
27 日.
- ④ 中川 智行、藤村 朱喜、伊藤 尚志、
宮地 竜郎、中川 純一、富塚 登、由
里本 博也、阪井康能、早川享志. *Pichia*
methanolica の 2 種のジヒドロキシアセト
ンシンターゼの機能解析. 2008 年度 日本
生物工学会大会. 東北学院大学. 2008 年 8
月 27 日.
- ⑤ 中川 智行、早川享志. メチロトローフ酵
母 *Pichia methanolica* の 2 種のアルコール
オキダーゼ遺伝子プロモーターの評価と
発現制御. 2007 年度 日本農芸化学会 中
部・関西支部大会. 中部大学. 2007 年 9 月
22 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 智行 (NAKAGAWA TOMOYUKI)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：70318179

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし