

平成 22 年 6 月 13 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780061

研究課題名 (和文) メチトロフ酵母の酸素応答システムとエピジェネティクス制御

研究課題名 (英文) The regulatory system of methanol metabolism by oxygen in methylotrophic yeast *Pichia methanolica*.

## 研究代表者

藤村 朱喜 (FUJIMURA SHUKI)

東京農業大学・生物産業学部・助教

研究者番号：00453803

## 研究成果の概要 (和文)：

ヒトを含む生物にとって酸素はエネルギー獲得のためにはなくてはならないものであるが、反応性が高く活性酸素種を生み出す要因である。そのため生物には酸素を認識、応答するシステムが存在すると推測される。申請者が着目したメチロトロフ酵母におけるメタノール代謝は、初段階酵素アルコールオキシダーゼ (AOD) の酵素反応と呼吸鎖の二カ所で酸素を必要とする。AOD 発現は呼吸鎖活性により制御されていることを示されたことから、呼吸鎖構成因子シトクロム *c* の発現について解析し AOD 発現制御との関係を考察した。*P. methanolica* はメタノールおよび酸素濃度に応じて *CYCI* 発現を制御し、代謝を調節していることが推測された。ヒストンアセチル化賦活剤により、AOD の誘導量の増加が見られ、エピジェネティクス制御の存在の可能性が示唆された。

## 研究成果の概要 (英文)：

Methanol metabolic pathway is a good model for oxygen response system as it requires and consumes oxygen. Methanol metabolism in methylotrophic yeast, *Pichia methanolica* a large amount of oxygen are used for methanol oxidation and for synthesis of ATP in respiratory chain. In this study the author investigated that *Pichia methanolica* *CYCI* expression patterns. The level of *PmCYCI* expression changed with methanol concentration, and *CYCI* expression was induced strongly at high oxygen concentration when grown on methanol. These results showed that, this expression pattern change of *PmCYCI* is specific to methanol metabolizing activity. In eukaryotes chromatin remodeling system is important in transcriptional regulation. To find out whether histone acetylation plays a role in the regulation of AOD we tested the effect of histone deacetylases (HDACs) activator. As a result the expression of AOD induced by Resveratrol which is a potent activator of HDAC.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：環境応答、酸素認識、エピジェネティクス、メチロトロフ酵母

## 1. 研究開始当初の背景

生物は、生育環境に適応する能力を持ち、ダイナミックな細胞内制御を行うことで自身の生命活動を維持している。生物を取り巻く環境因子は様々に存在するが、それらの中でも酸素は、地球上に大多数存在する好気性生物の必須因子であり、生命活動を大きく左右すると考えられる。これより、生物の持つ環境適応能力の中でも、特に、酸素応答系について、その普遍性やユニークな応答機構を見出すべく、最重要課題の一つとして取り挙げた。

申請者は、真核単細胞生物であるメチロトロフ酵母に着目した。本酵母のメタノール代謝系では初段階酵素アルコールオキシダーゼ (AOD) と呼吸鎖の二カ所で酸素を共有する必要性が生じる。また、AOD によるメタノール酸化はメタノール代謝の律速段階であり、菌体内タンパク質の数十%を占めるほど強力に誘導することで代謝バランスを保っている。そのためメタノール代謝には AOD の発現と呼吸鎖の活性の間に酸素の共有を支えるための厳密な酸素認識とそれによる代謝制御が存在すると推測される。また、酸素を共有する AOD と呼吸鎖の細胞内局在はそれぞれペルオキシソーム (Ps) とミトコンドリア (Mt) であることから、Ps と Mt との間で酸素消費バランスを保つために、細胞は厳密な制御系を備えていると推測し、これらをモデルとし解析を行った。

## 2. 研究の目的

ヒトを含む生物にとって酸素はエネルギー獲得のためにはなくてはならないものであるが、一方で非常に反応性が高く活性酸素種を生み出す要因である。そのため生物には酸素を適切に認識、応答するシステムが存在すると推測される。申請者は酸素認識機構について明らかにするためメチロトロフ酵母におけるメタノール代謝に着目した。本代謝では初段階酵素アルコールオキシダーゼ (AOD) の酵素反応と呼吸鎖の二カ所で酸素を必要とする。そこでメタノール代謝では両者間の酸素利用バランスの制御が特に重要であると考え、現在までに AOD の発現が呼吸鎖活性により制御されていることを示している。この酸素認識機構において、代謝制

御に対しその重要性が示唆された呼吸鎖について解析を進め、特に構成因子であるシトクロム *c* の発現について解析し AOD 発現制御との関係を考察した。さらにエピジェネティクスによる制御との関連を解析するためヒストンアセチル化阻害剤および賦活剤を用いて検討し、メタノール代謝における酸素認識制御とクロマチンリモデリングによる制御との関連性について明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

酸素認識による AOD 発現について、ミトコンドリアを上位とした制御に関し詳細な解析を行った。メチロトロフ酵母 *Pichia methanolica* の Cyt *c* をコードする *Pm CYCI* をクローニングし、様々な条件での発現応答を解析し、メタノール代謝における Cyt *c* の挙動を明らかにした。

また、メタノール代謝に対するエピジェネティクス制御の関与の解析についてヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤である Ky-2 および賦活剤である Resveratrol を用い解析を行った。

## 4. 研究成果

### ○ *Pichia methanolica* CYCI 遺伝子のクローニング

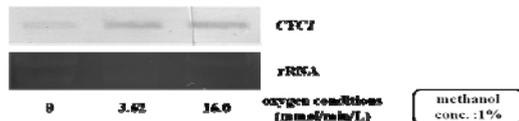
ミトコンドリア呼吸鎖構成因子の一つであるシトクロム *c* をコードする遺伝子について一次構造の決定を行った。その結果、*Pm CYCI* は 110 アミノ酸残基からなり *Pichia pastoris* Cyc1p と 95%、*Candida albicans* Cyc1p と 89% の相同性が示された。また、cytochrome *c*, class I が保存されていた。

### ○ *Pichia methanolica* におけるシトクロム *c* の発現挙動

#### 1. 酸素濃度による *PmCYCI* 発現への影響

*P. methanolica* CYCI の嫌気下での発現を観察したところ、発現されないことが明らかになった。そこで、この酸素依存的な発現に関し、AOD と同じく濃度の違いについても差異が見られるかどうか検討した。メタノール誘導を行った *P. methanolica* では酸素供給量 3.62 mmol/min/l (50 rpm) から 16.0 mmol/min/l (150 rpm) への酸素供給量の増

加に伴って *CYC1* 発現量は増加していることが明らかになった。メタノール生育時、*P. methanolica* では AOD アイソザイムが酸素濃度変化により変化していることが報告されている。これより、酸素濃度別に観察される *CYC1* 発現量の変化は AOD 制御と何らかの関係があると示唆された。



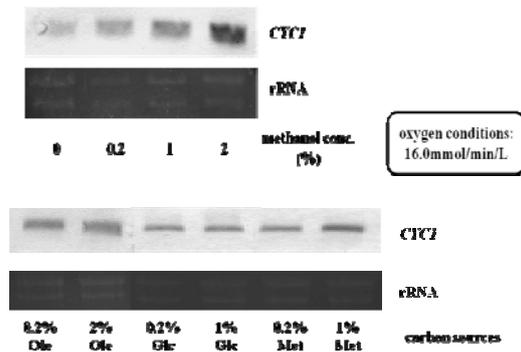
## 2. 炭素源による *CYC1* 発現への影響

*P. methanolica* *CYC1* の呼吸鎖における代謝基質の供給元である炭素源の濃度による発現量の変化は現在まで解析されていない。シトクロム *c* のメタノール代謝への影響を考える上で、炭素源の違いがシトクロム *c* の発現量にどのように影響を及ぼすか解析することが必要であると考えられる。そこで、メタノールを含む様々な炭素源について濃度別の *CYC1* 転写量の解析を行った。

メタノール誘導に対する *CYC1* の発現挙動を解析したところ、メタノール濃度上昇に従って *CYC1* 発現量は増加していた。また、グルコース濃度の変化による *CYC1* 発現量は変化がなかった。メタノールと同様にペルオキシソーム内にて代謝が進行するオレイン酸においても濃度による *CYC1* の発現量に変化は見られなかった。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、*CYC1* はグルコースによりリプレッションを受けており (Zitomer, *et al.*, 1978)、メタノールではこのような抑制を受けないことが明らかになった。また、代謝に酸素を用いるオレイン酸について *P. methanolica* は、酸素濃度変化によりオレイン酸代謝初段階酵素アシル-CoA オキシダーゼの発現量が増加することを明らかにしている (unpublished data)。しかし、オレイン酸濃度による *CYC1* 発現量に変化は見られなかった。よって、オレイン酸代謝にシトクロム *c* は関わっていないことが考えられる。

これらのことからメタノール代謝においてのみ特有の *CYC1* 発現調節が存在することが明らかになった。



## 3. *P. methanolica* AOD 欠損株における *CYC1* の挙動

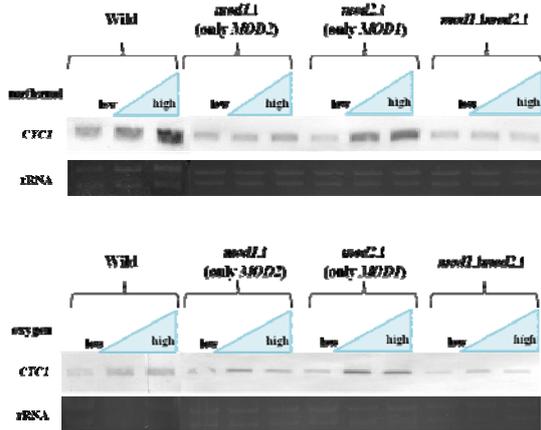
AOD アイソザイム形成と同様にシトクロム *c* の発現においても酸素、メタノール両方の制御を受けていることが明らかとなり、AOD 制御に対しシトクロム *c* が何らかの関わりを持つことが推察された。

*P. methanolica* においてシトクロム *c* が AOD 発現制御に関与すると仮定すれば、酸素及びメタノール濃度依存的に発現比率を変化する AOD アイソザイムを構成する Mod1p、Mod2p に着目し、*CYC1* の発現挙動との関連を解析してみることは興味深いと考えられる。そこで、両遺伝子欠損株におけるメタノール、酸素濃度別 *CYC1* 発現を解析した。

*P. methanolica* AOD を構成する Mod1p、Mod2p の欠損株を用い、メタノール濃度別 *CYC1* 発現挙動を解析したところ *mod1*  $\Delta$  株、すなわち Mod2p のみ細胞内に存在する株は発現量に変化は見られなかった。*mod2*  $\Delta$  株すなわち Mod1p のみが細胞内に存在する株ではメタノール濃度増加により *CYC1* 発現量は増加し、野生株と同じ挙動を示していた。また、両方を欠損した *mod1*  $\Delta$  *mod2*  $\Delta$  株ではメタノール濃度上昇による発現量の変化は見られなかった。

同じように欠損株での酸素濃度別 *CYC1* 発現挙動を解析したところ、*mod1*  $\Delta$  株では発現量に変化は見られず、*mod2*  $\Delta$  株では野生株と同じように酸素濃度上昇に従って *CYC1* の発現量は増加していた。

これらの結果からメタノール代謝における *CYC1* 発現量の増加の誘導に Mod1p の存在が必須であり、*CYC1* の AOD 発現への関与が強く示唆される結果となった。



○ *P. methanolica* のメタノール代謝に対するヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤および賦活剤が与える影響

1. HDAC 阻害剤の影響解析

エピジェネティクス制御に関わる HDAC の阻害剤 Ky-2 を用い、メタノール生育に与える影響を観察した。その結果、生育においては顕著な差異は見られなかった。また、メタノール代謝酵素群の誘導について解析を行った結果、阻害剤の添加による誘導量の変化は観察されなかった。

2. HDAC 賦活剤の影響解析

エピジェネティクス制御に関わる HDAC の賦活剤 Resveratrol を用い、メタノール生育に与える影響を解析した。その結果、生育に対しては影響は観察されなかったが、メタノール代謝酵素群のうち AOD においてのみ誘導量の増加が観察された。この結果より、メタノール代謝に対し、クロマチンリモデリングによる制御が存在する可能性が示唆された。

本研究では *P. methanolica* のメタノール代謝について酸素認識の制御に関わる因子としてミトコンドリア呼吸鎖の中でもシトクロム *c* の重要性を明らかにした。また、この AOD の制御に対し HDAC 賦活剤が誘導量の変化をもたらすことを見出し、エピジェネティクス制御とメタノール代謝調節との関連性が示唆された。

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 1 件)

- ① Matsufuji, Y., Fujimura, S., Ito, T., Nishizawa, M., Miyaji, T., Nakagawa, J., Ohya, T., Tomizuka, N. and Nakagawa, T. 2008. Acetaldehyde tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* involves the pentose phosphate pathway and oleic acid biosynthesis. 査読有り *Yeast* **11**, 2008, 825-833.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 木下博貴, 藤村朱喜, 松藤淑美, 宮地竜郎, 中川智行, 中川純一. メチロトロフ酵母のメタノール代謝におけるシトクロム *c* の発現挙動. 日本農芸化学会北海道支部大会平成 20 年度第二回合同学術講演会. 2008 年 11 月, 帯広
- ② 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. 日本農芸化学会 2009 年度大会. 2009 年 3 月, 福岡
- ③ Fujimura S, Nakagawa T, Matsufuji Y, Miyaji T, Tomizuka N, Nakagawa J. 2009. The regulatory system of methanol metabolism by oxygen in methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Yeast*. 26: S154
- ④ 藤村朱喜, 木下博貴, 松藤淑美, 宮地竜郎, 中川智行, 中川純一. メチロトロフ酵母のメタノール代謝におけるシトクロム *c* の発現. 日本農芸化学会 2010 年度大会, 東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioindustry.nodai.ac.jp/~1microb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 朱喜 (FUJIMURA SHUKI)

東京農業大学・生物産業学部・助教

研究者番号： 00453803

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無