

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580109

研究課題名(和文) 酵母の酸素認識と細胞内酸素情報ネットワークによるメタノール代謝の制御機構の解明

研究課題名(英文) Expression level of methanol-inducible peroxisomal proteins is affected by oxygen conditions and mitochondrial respiratory pathway function in the methylotrophic yeast

研究代表者

中川 智行 (Nakagawa, Tomoyuki)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：70318179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：メチロトロフ酵母のメタノール代謝は、ペルオキシソームと呼吸鎖で酸素を大量に消費する。よって、メタノール代謝を円滑に進めるには、両オルガネラ間で酸素消費バランスを的確に調節する必要がある。私たちはこのような背景から、メチロトロフ酵母のメタノール代謝における酸素消費バランスの制御について、詳細な解析を行った。ペルオキシソーム局在型メタノール代謝酵素は、酸素依存的にその発現が制御されており、その発現は呼吸鎖が阻害されると極端に低下した。また、呼吸鎖欠損株ではメタノール代謝酵素群の発現が低酸素状態と同様に低下することから、酵母の酸素認識と代謝制御には呼吸鎖が深く関わっていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Oxygen is required by methylotrophic yeast for the AOD-catalyzed reactions within peroxisomes for methanol metabolism in addition to its role as the terminal electron acceptor for the respiratory chain in the mitochondria. Therefore, the yeast cells must have a mechanism for controlling the methanol metabolism, which responds to oxygen levels, in order to balance the oxygen needs between these two organelles. In this study we showed that methanol-inducible peroxisomal proteins were induced only under aerobic conditions, and those gene expression was repressed by inhibition of the mitochondrial respiratory chain. In the respiratory deficient mutant strains, their induction was at very low levels despite the presence of oxygen. Taken together, these facts indicate that the yeast can sense oxygen conditions, and that mitochondrial respiratory function may have a profound effect on induction of methanol-inducible gene expression of peroxisomal proteins.

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：メチロトロフ酵母 酸素認識 アルコールオキシダーゼ 呼吸鎖 ペルオキシソーム

1. 研究開始当初の背景

メタノールは、CO₂を原料にした接触水素化反応や植物バイオマスの熱分解反応により合成できる最も現実的かつ直接的な低環境負荷型炭素源の一つである。我々は、メタノールに生育可能なメチロトロフ酵母の細胞機能を最大限に活用し、メタノールを出発原料とした発酵生産を促進することが、CO₂濃度の上昇を起点とする環境諸問題解決の糸口になるものと考えている。

現在、メチロトロフ酵母の利用における最大の弱点は、低酸素環境における細胞機能の低下にある。例えば、低酸素状態ではメタノール代謝酵素群の活性発現は極端に低下し、アルコールオキシダーゼ(AOD)プロモータを利用した有用タンパク質発現系の生産効率は著しく低下する。これは単に「酸素不足」による代謝阻害ではなく、細胞が酸素濃度に応じて代謝系全体を制御し、低酸素下で細胞機能を低レベルに抑えるよう制御していることを意味する。つまり、本酵母の酸素認識と酸素代謝制御の分子機構を理解できれば、低酸素下でもメチロトロフ酵母の細胞機能を最大限に引き出すことが可能である。

2. 研究の目的

メタノールを唯一の炭素源・エネルギー源として生育できるメチロトロフ酵母の産業利用における最大の弱点である「低酸素環境下での細胞機能の低下」の詳細を理解し、その細胞内の分子メカニズムをすることを目的に、メチロトロフ酵母の酸素認識と細胞内酸素情報ネットワークによるメタノール代謝制御の分子機構を分子レベル・遺伝子レベルで明確にし、その弱点を克服したメチロトロフ酵母の分子育種を目指した基盤構築を行っていく。

また、酸素認識とそれに伴う代謝制御は全ての真核生物が持つ重要な細胞機能であることが考えられるものの、その詳細についての報告は全くなく、産業微生物、特に私たち人類が最も利用している産業微生物である出芽酵母の発酵利用においても重要な知見をもたらすものと考えている。

3. 研究の方法

(1)呼吸鎖による酸素認識と核への酸素情報伝達システムの分子メカニズムの解明

呼吸鎖欠損株の作成と解析

*Candida boidinii*をエチジウムブロマイドにより変異処理をし、生育が遅いプチコロニーを選抜することにより呼吸鎖欠損株⁰株を

作成した。

作成した⁰株の各種炭素源における生育特性を観察し、メタノール代謝酵素群の発現誘導を酵素活性、ウエスタン解析、さらには出芽酵母の*PHO5*遺伝子をレポーターとしたプロモータアッセイ等を用いて詳細に観察した。

*P. pastoris*チトクロム*c*(Cyt1)遺伝子破壊株*cycl1*株を作成と解析

呼吸鎖活性を戦略的にシャットダウンした環境下でのAOD応答を観察するため、*Pichia pastoris*を用いて呼吸鎖因子のチトクロム*c*(Cyt1)の遺伝子破壊株*cycl1*株を作成した。*cycl1*株の作成には、*Pichia pastoris*の*CYC1*遺伝子を、本酵母の薬剤マーカー遺伝子である*Zeo^r*にて相同置換することにより作成した。

作成した*cycl1*株の各種炭素源における生育特性、メタノール代謝酵素群の発現誘導を、酵素活性レベル、*LacZ*遺伝子をレポーターとしたプロモータアッセイ等を用いて詳細に観察した。

(2)酸素応答に異常をきたした変異株の獲得

AOD発現を指標に呼吸鎖によるO₂応答が異常をきたした変異株を獲得し、呼吸鎖から核への情報伝達を担う因子の同定を試みた。

AODは嫌気状態では発現が完全に抑制されるが、その発現抑制が解除された変異株の獲得を試みた。REMI法を用いて、マーカー遺伝子を*P. pastoris*ゲノムにランダムに挿入し、嫌気状態でもAOD発現が見られる変異株のスクリーニングを試みた。

4. 研究成果

私たちはこれまで、メチロトロフ酵母である*Pichia methanolica*がメタノール代謝の初段階酵素AODを9種のアイソザイムとして持つことを示しており、そのアイソザイムの発現制御が、酸素濃度およびメタノール濃度に依存して行われていることを報告してきた[Fujimura *et al.* 2007. Peroxisomal metabolism is regulated by an oxygen-recognition system through organelle crosstalk between the mitochondria and peroxisomes. *Yeast* 24: 491-498.]。

*P. methanolica*ではAODアイソザイムを構成するMod1pが低酸素で主に発現し、高酸素下ではMod2pが支配的に発現することを示し、呼吸鎖を阻害することで低酸素状態と同様の発現パターンを示すことを見いだしてきた。

しかし、*P. methanolica*は遺伝子組換えの際、特定の遺伝子との相同置換が行われにくく、

さらにはゲノム情報が公開されていないなど、酵母の酸素応答機構を解明していく上で、非常に扱いにくく、分子・遺伝子レベルでの解析においてデメリットを持つ酵母菌株である。そこで、本研究課題では、研究材料として遺伝子組み換えがより行いやすい *Candida boidinii* とゲノム情報がすでに公開されており、その情報を活用できる *Pichia pastoris* を用いて、酵母の酸素応答および認識メカニズムの分子レベルでの解析を行うことにした。

(1)呼吸鎖による酸素認識と核への酸素情報伝達システムの分子メカニズムの解明

呼吸鎖欠損株を用いた酸素認識機構の解明

メチロトロフ酵母 *C. boidinii* を用いて、メタノール代謝酵素群の酸素に対する発現誘導を観察した。その結果、AOD やジドロキシアセトンシンターゼ (DAS)、グルタチオン依存型ペルオキシダーゼ (Pmp20) など、ペルオキシソームに局在するメタノール代謝酵素群は酸素の存在下で強力に発現し、低酸素環境下ではその発現は極端に低下した。また、これらメタノール代謝酵素群の酸素誘導はアジ化ナトリウム等で呼吸鎖を阻害することで、低酸素環境と同様に発現量を極端に低下させた。一方、ペルオキシソーム膜貫通型タンパク質でペルオキシソーム ADP/ATP 輸送体ある Pmp47 は酸素の有無で発現はそれほど変化せず、その酸素応答がペルオキシソーム局在型酵素群とは全く異なる挙動を示すことが明らかとなった。

呼吸鎖を阻害することでメタノール代謝酵素群の発現誘導が低下したことから、*C. boidinii* を用いて呼吸鎖欠損株⁰株を作成した。作成した⁰株はグルコースには生育可能であったが、メタノールやグリセロール、エタノールなどの非発酵炭素源には全く生育できなかった。

また、⁰株でのペルオキシソーム局在型メタノール代謝酵素群の発現誘導を mRNA レベルおよびタンパク質発現レベルで観察したところ、これら酵素群の発現誘導は、酸素が存在する環境であるにもかかわらず、極端に低下し、低酸素状態と同様の挙動を示した。一方、ペルオキシソーム膜タンパク質である Pmp47 は⁰株においても発現はそれほど変化しなかった。

さらには、酸素の有無におけるペルオキシソームの形態変化を、ペルオキシソーム移行シグナルを付与した GFP を発現させた *C. boidinii* で観察したところ、低酸素状態ではペルオキシソームの形態は著しく小さくなった。また、酸素が存在するにもかかわらず、アジ化ナトリウムで処理をした細胞では、同

様にペルオキシソームの形態は小さいものであった。一方、AOD の欠損株においても好気条件かでも小さなペルオキシソームしか観察されず、ペルオキシソームの形態は酸素により制御されるものの、その大きさはマトリクスタンパク質の発現量が大きく関与することが推測された。

チトクロム *c* 遺伝子破壊株 *cycl* 株を作成と解析

これまで、*P. methanolica* および *C. boidinii* を用いて、呼吸鎖がペルオキシソーム局在型代謝系の発現を制御する可能性を示してきた。しかし、*P. methanolica* および *C. boidinii* は完全なゲノム配列が公開されておらず、この先、研究を進める上でゲノム配列がすでに公開され、使用が可能な *P. pastoris* を用いて遺伝子レベルで詳細に解析することを目指した。

まず、*P. pastoris* のメタノール代謝酵素群の酸素に対する発現誘導を観察した。その結果、*P. pastoris* は他のメチロトロフ酵母と同様に、AOD や DAS、カタラーゼ (CTA) など、ペルオキシソームに局在するメタノール代謝酵素群は酸素の存在下で強力に発現し、低酸素環境下ではその発現は極端に低下し、アジ化ナトリウム等で呼吸鎖を阻害することで、低酸素環境と同様に発現量を極端に低下させた。

そこで、呼吸鎖活性を戦略的にシャットダウンすることを目的とし、遺伝子レベルで確実に標的遺伝子を欠損した株を作成するため、*P. pastoris* の呼吸鎖因子であるチトクロム *c* (Cyt1) の遺伝子破壊株 *cycl* 株を作成した。*cycl* 株の作成には、*Pichia pastoris* の *CYCl* 遺伝子を、本酵母の薬剤マーカー遺伝子である *Zeo^r* にて相同置換することにより作成した。

P. pastoris の *cycl* 株の各種炭素源における生育特性を観察したところ、*C. boidinii* の⁰株と同様にグルコースには生育可能であったが、メタノールやグリセロール、エタノールなどの非発酵炭素源には全く生育できなかった。

また、メタノール代謝酵素群の発現誘導を、酵素活性レベル、*LacZ* 遺伝子をレポーターとしたプロモータアッセイ等を用いて詳細に観察したところ、*cycl* 株では AOD や CTA などのメタノール代謝酵素群の発現は低レベルに抑えられており、これら酵素群の酸素誘導における呼吸鎖の重要性を示すことができた。

(2)酸素応答に関する鍵因子の同定とその機能

ここまで、メチロトロフ酵母は外環境の

酸素濃度を的確に認識し、その状況に応じて AOD をはじめとしたメタノール代謝酵素群の発現を巧妙に制御していることを明らかにしてきた。

しかし、その酸素に対する発現制御に呼吸鎖が重要な役割を果たしていることを示しては来たものの、その核となる重要な鍵因子の同定には至っていないのが現状である。私たちは、遺伝子レベルで酸素応答・酸素認識に関与する因子を同定するため、*P. pastoris* に REMI 法を用いて、ゼオシン耐性遺伝子をマーカー遺伝子として *P. pastoris* ゲノムにランダムに挿入することで、遺伝子破壊株ライブラリーの作成を試みた。

得られたライブラリーをもとに AOD 発現を指標に呼吸鎖による O₂ 応答が異常をきたした変異株を獲得し、呼吸鎖から核への情報伝達を担う因子の同定を試みた。

具体的には、AOD は嫌気状態では発現が完全に抑制されるが、その発現抑制が解除された変異株の獲得を試みた。REMI 法にてライブラリー作成は可能であったものの、今回、有力な変異株をスクリーニングすることはできなかった。

今後、変異株ライブラリーの再構築と AOD の発現に異常をきたしている変異株のスクリーニングを行い、その変異遺伝子を解析することで、メチロトロフ酵母の酸素認識と酸素応答における分子メカニズムを解明していきたいと考えている。

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)

Fujimura S, Yurimoto H, Kurimoto S, Matsufuji Y, Ito T, Hayakawa T, Tomizuka N, Sakai Y, Nakagawa T. 2013. Expression Level of Methanol-inducible Peroxisomal Proteins and Peroxisome Morphology are Affected by Oxygen Conditions and Mitochondrial Respiratory Pathway Function in the Methylophilic Yeast *Candida boidinii*. *FEMS Yeast Res.*, 13:359-366.
DOI: 10.1111/1567-1364.12040
(査読有り)

中川智行. 2012. 酵母のメタノール代謝制御の分子メカニズムの解明とその応用. 生物工学会誌. 90: 72-77.
https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9002/9002_saito.pdf
(査読なし・総説)

[学会発表](計8件)

若山 敬嗣、早川 享志、中川 智行. メチロトロフ酵母 *Pichia methanolica* の様々な炭素源による生育特性と AOD アイソザイムの発現誘導. 日本農芸化学会 2014 年度大会. 2014.3.30. 明治大学 川崎.

岡田 一真、栗本 将太、早川 享志、中川 智行. メチロトロフ酵母 *Pichia pastoris* AOX1 の酸素応答における Cyc1p の役割. 日本農芸化学会 中部支部 168 回例会. 2013.10.12. 名古屋大学 名古屋.

若山 敬嗣、早川 享志、中川 智行. メチロトロフ酵母 *Pichia methanolica* の異種遺伝子発現系への応用を目指した新たな炭素源の探索と AOD アイソザイムの発現特性の解析. 日本農芸化学会 中部支部 168 回例会. 2013.10.12. 名古屋大学 名古屋.

Nakagawa T, Fujimura S, Yurimoto H, Sakai Y and Hayakawa T. Oxygen conditions and mitochondrial respiratory function influence expression level of methanol-inducible peroxisomal proteins and peroxisome morphology in the methylotrophic yeast. *BioMicroWorld 2013: 5th International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*. 2013.10.3. マドリード スペイン.

岡田 一真、栗本 将太、早川 享志、中川 智行. メチロトロフ酵母 *Pichia pastoris* シトクロム c の発現制御とメタノール代謝における役割. 日本農芸化学会 2013 年大会. 2013.3.26. 東北大学 仙台.

Nakagawa T. Regulation of methanol metabolism in the methylotrophic yeast. 2011 KSBF Fall Meeting & International Symposium. 2011.10.6. 仁川 大韓民国.

中川智行. 酵母のメタノール代謝制御の分子メカニズムの解明とその応用. 第 63 回 日本生物工学会 大会. 2011.9.26. 東京農工大学 東京.

栗本将太、早川享志、中川智行. メチロトロフ酵母 *Pichia pastoris* AOX1 の酸素応答におけるシトクロム c の役割. 第 63 回 日本生物工学会 大会. 2011.9.26. 東京農工大学 東京.

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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・教授
研究者番号：70318179

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：