

# AOD アイソザムによるメタノール代謝制御と異種発現系への応用

中川智行



メチロトロフ酵母は、メタノール代謝の際、アルコールオキシダーゼ (AOD) により毒性の高いホルムアルデヒド (FA) を代謝中間体として生産する。よって、メチロトロフ酵母は円滑なメタノール代謝を行うため、FA の細胞毒性を最小限に抑える努力をあの手この手で行っている。本稿では、メチロトロフ酵母の「FA 対策」の1つとして *Pichia methanolica* の持つ AOD アイソザムを例にとり、その「活性発現制御機構」から本酵母の「FA レベル調節システム」について解説し、メチロトロフ酵母のメタノール代謝制御について考察する。また、後半はこの一風変わった AOD アイソザムの遺伝子発現制御機構を利用した異種遺伝子発現系についても紹介する。

**キーワード** メチロトロフ酵母、AOD アイソザム、ホルムアルデヒド (FA)、異種遺伝子発現系

## はじめに

メタノールは、天然ガスから容易にかつ安価に大量生産でき、さらには燃焼の際に  $\text{CO}_2$  と水にまで完全に酸化することから、次世代のクリーンエネルギーの1つに数えられている。このメタノールを唯一の炭素源として生育できる生物はメチロトロフと呼ばれ、その特異な細胞機能を活かして、現在まで様々な分野で多様な研究が行われてきた。特に、真核生物で唯一報告されているメチロトロフ、メタノール資化性酵母(メチロトロフ酵母)は強力なメタノール誘導性遺伝子プロモーターを持ち、それを利用した異種遺伝子発現系が *Pichia pastoris*、*Hansenula polymorpha*、*Candida boidinii*、*P. methanolica* において開発されている。また、メチロトロフ酵母は脂肪酸合成やバイオセンサーの開発・研究に用いられているのみならず、メタノール誘導性オルガネラ・ペルオキシソーム (Ps) をはじめとしたオルガネラダイナミクスの解析、また、*P. pastoris*、*H. polymorpha* はすでにゲノ

ム解説されるなど、細胞生物学の基礎的研究におけるモデル生物としても広く用いられている。

メチロトロフ酵母のメタノール代謝は、アルコールオキシダーゼ(AOD)によるメタノールのホルムアルデヒド(FA)への酸化により開始される(図1)。AODは強力に誘導されるメタノール誘導性酵素の1つで、その欠損株はメタノールに生育できないことから、メチロトロフ酵母の鍵酵素である。一方、FAはメタノール資化における重要な代謝中間体であり、代謝効率という観点からは細胞内FA濃度を高レベルに保つことが有利であると考えられる。しかし、FAはタンパク質や核酸と非特異的に反応するため、すべての生物に対して高い細胞毒性を示す揮発性化学物質で、シックハウス症候群の原因物質としても知られる。つまり、FAの毒性の観点からは、メチロトロフ酵母は細胞内FA濃度を低レベルに抑える必要がある。実際、メチロトロフ酵母がFAを直接炭素源として生育できないことから、本酵母がメタノール代謝において「FA対策」に細心の注意を払っていることが伺え、こ

筆者紹介：なかがわ・ともゆき (NAKAGAWA, Tomoyuki) 岐阜大学応用生物科学部 (Faculty of Appl. Biological Sciences, Gifu Univ.) 准教授 1999 年京都大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士後期課程修了 博士(農学) 専門：応用微生物学  
連絡先：〒501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1-1 E-mail t\_nakaga@gifu-u.ac.jp (勤務先)



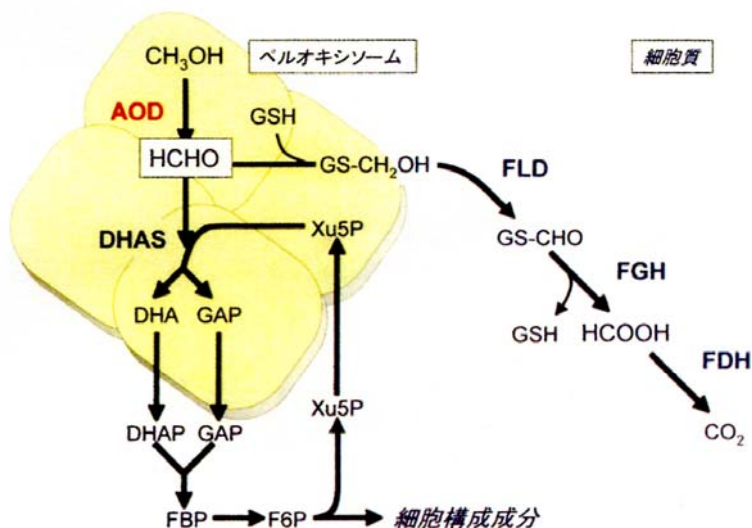


図1 メチロトロフ酵母のメタノール代謝経路

AOD: アルコールオキシダーゼ

DHAS: ジヒドロキシアセトンシンターゼ

FLD: グルタチオン依存型ホルムアルデヒド脱水素酵素

FGH: S-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼ

FDH: キ酸脱水素酵素、DHA: ジヒドロキシアセトン

GAP: グリセルアルデヒド3-リン酸

DHAP: ジヒドロキシアセトンリン酸

FBP: フルクトース 1,6-ビスリン酸

F6P: フルクトース 6-リン酸

Xu5P: キシルロース 5-リン酸

GS-CH<sub>2</sub>OH: S-ヒドロキシメチルグルタチオン

GS-CHO: S-ホルミルグルタチオン

のことからもメチロトロフ酵母のメタノール代謝における最重要課題が「細胞内FAレベルの厳密な制御」であることは明白である。

筆者らは、このメチロトロフ酵母のいわゆる「FAレベル調節システム」の1つとして *Pichia methanolica* のAODアイソザイムの活性発現制御に着目し、そのメタノール代謝における役割について解析してきた。本稿では、AODアイソザイムの「活性発現制御機構」と「FA対策」を中心としたメチロトロフ酵母のメタノール代謝の制御機構について解説し、後半はAODアイソザイムを利用した新たな *P. methanolica* 異種遺伝子発現系の可能性についても紹介する。

## 1. AODアイソザイムの活性発現とメタノール代謝の制御

AODは、メチロトロフ酵母のメタノール代謝の初段階酵素であり、いくつかの担糸菌を除いて本酵母群にのみ分布するいわゆるメチロトロフ酵母特有の鍵酵素である。現在まで主に解析されてきたメチロトロフ酵母 *P. pastoris*、*H. polymorpha*、*C. boidinii* は単一のAODサブユニットでメタノール代謝を行っているが、筆者らは *P. methanolica* をはじめとするいくつかのメチロトロフ酵母がAODを9種のアイ

ソザイムとして持つことを見だし<sup>1)</sup>、その活性発現機構およびその生理的役割について解析を行ってきた。

ここでは *P. methanolica* のAODアイソザイムの活性発現と細胞内FAレベルの調節機構を中心にメチロトロフ酵母のメタノール代謝制御の現在までの知見を解説する。

### (1) AODアイソザイムの形成システムと酵素科学的諸性質

AODアイソザイムの形成機構は、かの有名な乳酸脱水素酵素と同じハイブリッド型アイソザイムである。*P. methanolica* はAOD遺伝子として *MOD1* と *MOD2* の2コピーを持ち<sup>2),3)</sup>、メタノール生育時には2種のAODサブユニット *Mod1p* および *Mod2p* を同時に発現させる。AODは単量体では活性を示さず、8量体(オクタマー)を形成することで活性型として機能するが、*P. methanolica* では細胞内で *Mod1p* と *Mod2p* がランダムにオクタマーへ会合することによりハイブリッド型AODアイソザイムを形成する。つまり、*Mod1p* と *Mod2p* のホモ8量体のほか、両サブユニットを含むハイブリッド分子もそれぞれ形成され、合計9種のAODアイソザイムを形成するという仕組み



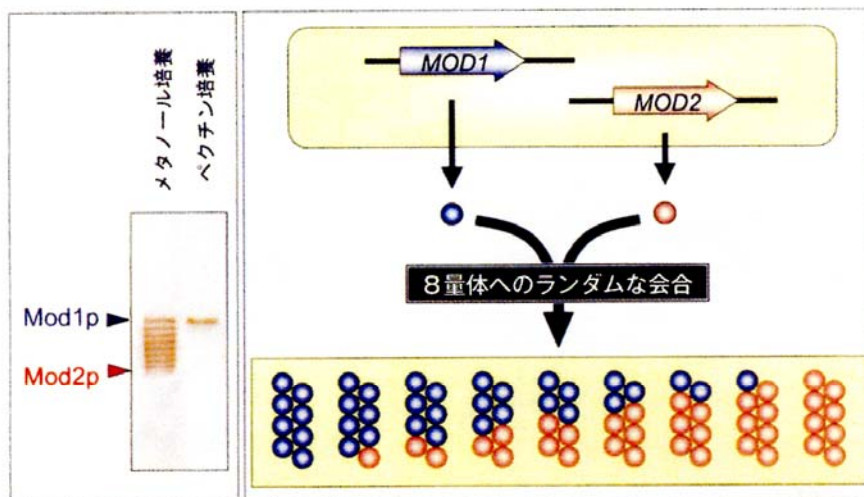


図2 AOD アイソザイムの電気泳動パターンと形成概念図

である (図2)。

では、*P. methanolica* はどうしてこのようなAODアイソザイムを形成する必要があるのでしょうか？その謎を解く鍵は、両サブユニットの酵素科学的性質の違いにあった。Mod1pとMod2pはアミノ酸配列レベルで約85%の相同性を持つが、それぞれ異なる性質を兼ね備えていた。例えば、Mod1pは他のメチロトロフ酵母由来AODと同様の性質を示すのに対し、Mod2pはメタノールに対する $K_m$ 値がMod1pの約10倍で、 $V_{max}$ が約1/10とAODとしての新規な性質を持ち合せていた<sup>4),5)</sup>。このことはMod1pとMod2pが機能し得るメタノール濃度がそれぞれ異なることを意味し、Mod1pは低メタノール濃度下におけるメタノール酸化に適しており、Mod2pは高メタノール環境下でのみ機能することを示している。

一方、Mod1pとMod2pから形成されるハイブリッドAOD分子は、それぞれ両サブユニットの中間的な性質を持つ。Gruzmanらは9種のAODアイソザイムを個々に精製し、それぞれのメタノールに対する $K_m$ 値を解析しているが、Mod2pの含有割合が多くなるにつれてAODハイブリッド分子種のメタノールに対する $K_m$ が増加することを報告している<sup>5)</sup>。つまり、*P. methanolica*は様々なメタノール濃度下に最適反応条件を持つ9種類のAOD分子種を2種のAODサブユニットからつくり出すことができるのである。

## (2) AOD アイソザイムの活性発現調節と細胞内FA濃度の制御

では、*P. methanolica*はAODアイソザイムの活性

発現をどのように制御し、それぞれのアイソザイムをどう使い分けているのだろうか？

前述した通り、AODアイソザイム分子の性質はMod1pとMod2pのサブユニット含有比率に依存しており、また、9種のAODアイソザイム分子の形成比もサブユニットの存在比により決定される<sup>3)</sup>。つまり、MOD1とMOD2の発現比率が細胞内におけるAODハイブリッド分子種の存在比を支配しており、AODアイソザイムの酵素科学的性質を決定する大きな要因であることが容易に考えられる。実際、*P. methanolica*は生育環境下のメタノール濃度を的確に認識する能力を持ち、MOD1とMOD2の発現比率をそのメタノール濃度に応じて変化させ、それに応じた機能を持つAODアイソザイムを構成する能力を持っていた<sup>6)</sup>。例えば、メタノール濃度が低い生育環境下では高 $V_{max}$ 低 $K_m$ を持つMod1pを支配的に発現させ、メタノール濃度の上昇に合わせて*P. methanolica*は低 $V_{max}$ 高 $K_m$ を持つMod2pの発現量を増加させている (図3)。つまり、*P. methanolica*はメタノールに対する $V_{max}$ および $K_m$ が異なる2種のAODサブユニットMod1pとMod2pの構成比を外環境のメタノール濃度に合せて8:0から0:8まで9通りに変化させ、2種類のAODがそれぞれホモ8量体で機能する場合に比べて生育環境に見合った性質を持つAOD分子種を合成している。これにより低メタノール環境では高 $V_{max}$ 低 $K_m$ のMod1pをメインに使うことで効率よくFAを生産するが、高メタノール環境下では低 $V_{max}$ 高 $K_m$ のMod2pを支配的に発現させることでAOD活性を意図的に抑え、メタノールの過剰酸化によるFAの過剰生



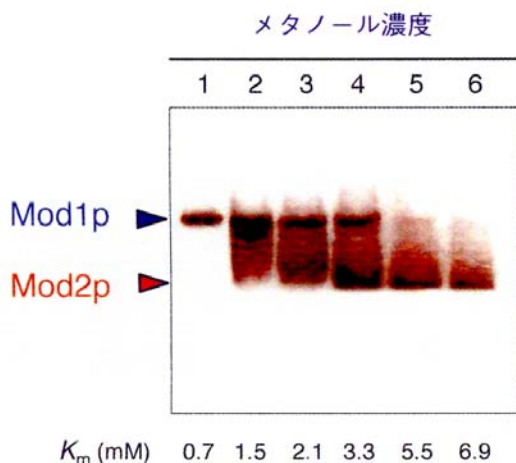


図3 メタノール濃度に対するAODアイソザイムの発現パターンの変化

$K_m$ は各メタノール濃度下で誘導されたAODアイソザイム全体でのメタノールに対する値。

レーン1:0%      レーン2:0.1%      レーン3:0.25%  
レーン4:0.5%      レーン5:1%      レーン6:2%

産を抑制することができる。言い換えれば、AODアイソザイムはFAの合成量を外環境のメタノール濃度に合わせて調節できる非常に優れた「FAレベル調節システム」の1つであると言えよう。

### (3) AODの細胞内局在とAODアイソザイムの活性発現調節

AODはメタノール誘導性のオルガネラ・Psに局在するマトリックス酵素である。AODがPsに局在することには大きな意味がある。AODはメタノールを酸化し、毒性の高いFAおよび $H_2O_2$ を反応生産物として生産する。AODを単膜のオルガネラ・Psに閉じ込めることで、これら毒性の高い反応生産物を一カ所に封じることができ、これら毒性物質の細胞全体への影響を最小限に抑える効果がある。また、AODはサブ

ユニットのままPsに運ばれ、Psに局在後、初めてオクタマーを形成し、活性型に移行する<sup>7)</sup>。AODをPs内でのみ活性型に移行させることで、AODによるFAおよび $H_2O_2$ の生産をPs内に限定させることができ、生体内におけるこれら毒性代謝中間体の制御を行うことができる。つまり、Psへの輸送過程はAODの活性発現調節において非常に重要なステップの1つであり、本過程の制御はメチロトロフ酵母の重要な「FAレベル調節システム」の一環であると言える。

AODアイソザイムもちろんPsへの輸送過程が活性発現の重要な関門の1つであり、Ps輸送シグナル1(PTS1)レセプターであるPex5pの欠損株ではほとんど活性型に移行しない<sup>8)</sup>。しかし、AODアイソザイムのPs輸送と活性型への移行システムの詳細はほとんどブラックボックスであり、今後、AODアイソザイムによるメタノール代謝制御を明らかにする上で解明しなければいけない重要な課題の1つである。

### (4) 酸素によるAODアイソザイムの活性発現調節

一方、AODアイソザイムはメタノールのみならず、もう一方の基質、酸素によってもその活性発現が厳密に制御されている<sup>9)</sup>。*P. methanolica*は低酸素下では酸素に対して低 $K_m$ を示すMod1pを、高酸素下では高 $K_m$ のMod2pを支配的に誘導する(図4A)。つまり、*P. methanolica*はメタノールと同様に生育環境下の酸素濃度を的確に認識し、生育環境に合せたAODアイソザイムを構築している。

このAODアイソザイムの酸素に対する発現制御も非常に重要な意味を持つ。メチロトロフ酵母のメタノール代謝では、少なくとも2つの重要な酸素依存的段階を経なければならない。一方はAODによるメタノール酸化であり、他方はメタノール代謝の最終段階

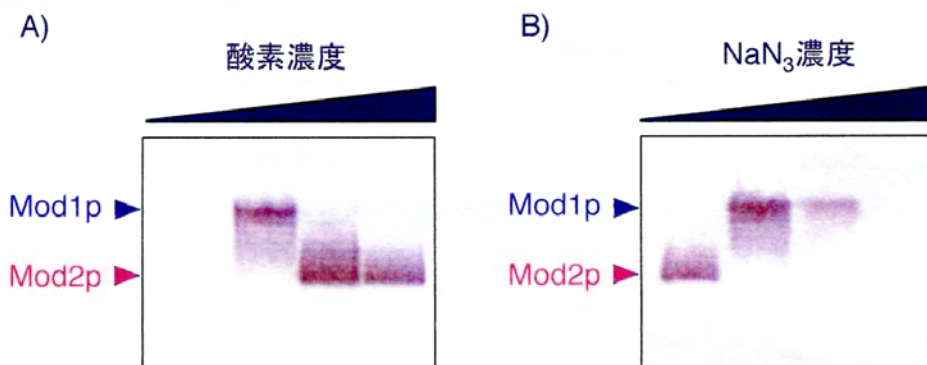


図4 酸素(A)およびアジ化ナトリウム(B)に対するAODアイソザイムの発現パターン



である呼吸鎖である。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AODと呼吸鎖の酸素消費バランスの制御が必要となる。実際、呼吸鎖を完全阻害することで両者の活性バランスを崩すとAODアイソザイムの発現は見られなくなる。さらには、呼吸鎖の高阻害下ではMod1pが支配的に誘導され、その阻害率を下げるにつれてMod2pの発現比が高くなる(図4B)。本発現パターンはAODアイソザイムの酸素濃度に対する挙動と非常に類似しており、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」が何らかの形で行われていることが考えられる。

## 2. AOD アイソザイムを利用した新規異種遺伝子発現系の開発

ここまでAODアイソザイムの生理的役割「メタノール代謝制御」についての現在までの知見を紹介してきたが、ここからはAODアイソザイムの応用について述べたい。

*P. methanolicus*はMOD1プロモーター( $P_{MOD1}$ )を利用した異種遺伝子発現系がすでに開発され<sup>2)</sup>、インビトロジェン社からすでに発現キットとして発売されている。一方、筆者らは*P. methanolicus*のAODアイソザイムの研究の過程で、MOD2がMOD1同様にメタノールにより強力に発現することを見だし、両遺伝子の発現形式が炭素源、メタノールおよび酸素濃度により異なることを明らかにしてきた<sup>10)</sup>。このことは、 $P_{MOD1}$ とMOD2プロモーター( $P_{MOD2}$ )を組み合わせることで2種の有用タンパク質を同一細胞内で大量生産させることが可能であり、さらには個々の発現時期および発現量を炭素源、メタノールの添加時期および添加量で簡単にコントロールできることが考えられる。実際、 $P_{MOD1}$ および $P_{MOD2}$ の詳細な発現制御機構を出芽酵母*PHO5*(*ScPHO5*)をレポーター遺伝子として評価したところ、 $P_{MOD1}$ はグリセロールを炭素源とした時、メタノールと同レベルの強力な発現を示した<sup>10)</sup>。一方、 $P_{MOD2}$ はグリセロールではその発現が見られないが、そこにメタノールを添加することで強力

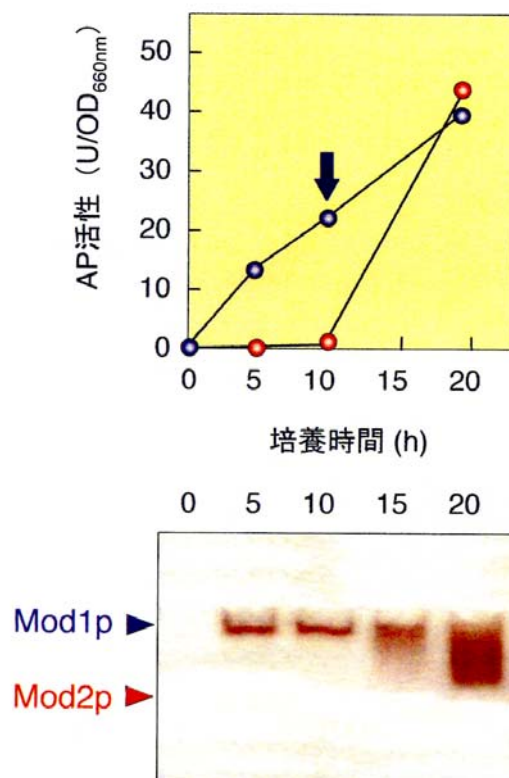


図5  $P_{MOD1}$  (●) と  $P_{MOD2}$  (●) の発現パターンの比較  
グリセロール誘導10時間後、メタノール添加による  $P_{MOD2}$  の発現誘導。矢印は1%メタノール添加時間。  
AP: 酸性ホスファターゼ

な発現が認められた。まず、細胞をグリセロールで培養した場合、 $P_{MOD1}$ -*PHO5*では培養とともにすぐに*ScPHO5*の発現が観察されるが、 $P_{MOD2}$ -*PHO5*ではその発現が全く見られない。しかし、10時間後にメタノールを添加すると  $P_{MOD2}$ -*PHO5*からも *ScPHO5*が発現しはじめ、20時間後には両者の発現レベルはほぼ同じになった(図5)。つまり、グリセロールで  $P_{MOD1}$ のみを発現させ、のちにメタノールを添加するだけで  $P_{MOD2}$ の発現をONにできることから、 $P_{MOD1}$ と  $P_{MOD2}$ の共発現させるステージを簡単に制御できる。また、誘導炭素源の種類だけでなく、メタノール濃度や酸素供給量によって  $P_{MOD1}$ 、 $P_{MOD2}$ の発現量を細かく制御でき、2種の目的タンパク質の生産量と発現時期を最適条件にコントロールできると考えられる。

筆者らは実際に前述のシステムを用いて異なる2種の異種タンパク質を同一細胞内で共発現させ、誘導条件によってそれぞれのプロモーターによる異種タンパク質の誘導をコントロールすることが可能であった(未発表データ)。このような同一細胞内での2種の発



現タンパク質の生産管理は、これまで困難であった様々なタンパク質の生産に応用できると考えられる。例えば、2種のタンパク質からなるヘテロマーの生産、活性型への移行に他の因子による修飾が必要なタンパク質生産など、同一細胞内で共発現させなければならない有用タンパク質生産への利用が考えられ、さらには細胞毒性を示すタンパク質の生産においては活性発現を修飾因子の発現時期により制御できるなど、AODアイソザイムを用いた異種発現系は新たな異種タンパク質発現系のツールとして幅広い応用が期待できる。

## おわりに

本稿では、メチロトロフ酵母のメタノール代謝制御について *P. methanolica* のAODアイソザイムの役割を中心に解説した。しかし、メチロトロフ酵母のいわゆる「FA対策」はAODによるFAの生産管理のみならず、もっと多様な仕組みで行われている。例えば、メチロトロフ酵母のグルタチオン依存型FA脱水素酵素(FLD)はメタノール濃度の上昇に応じて発現量が増加し<sup>11)</sup>、FLDを欠損させるとメタノール生育能を完全に失う<sup>12)</sup>。FLDはメタノール資化には関与しない酸化経路の酵素であることから、本酵母のメタノール代謝において「FAの毒性回避」がどれだけ重要かを示している。さらに、メチロトロフ酵母がAODよりもFA代謝酵素群を優先的に発現させ、「FA対策」を完成させたのちにAODを発現させることで、細胞内のFAの蓄積を防いでいると報告されている<sup>13)</sup>。

このように、メチロトロフ酵母はあの手この手でFAの毒性を最小限に抑えることで、より良いメタノール代謝を実現している。筆者はメチロトロフ酵母のこれらメタノール代謝制御機構を解明し、強化することで、高濃度のメタノールを処理でき、さらにはFAをも資化できる「スーパー・メチロトロフ酵母」を育種できるのではと考えている。「スーパー・メチロトロフ酵母」はメタノール・FAを対象とした排水処理、空気浄化さらにはバイオセンサーの開発などに応用できると考えており、AODアイソザイムを用いた *P. methanolica* 異種遺伝子発現系とともにさらなる発展を目指したい。

## 参考文献

1) Ito, T. *et al.* : Distribution, diversity and regulation

of alcohol oxidase isozymes, and phylogenetic relationships of methylotrophic yeasts, *Yeast*, 24, 523 ~ 532 (2007)

- 2) Raymond, C. K. *et al.* : Development of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica* for the expression of the 65 kDa isoform of human glutamate decarboxylase, *ibid.*, 14, 11 ~ 23 (1998)
- 3) Nakagawa, T. *et al.* : Alcohol oxidase hybrid oligomers formed *in vivo* and *in vitro*, *ibid.*, 15, 1223 ~ 1230 (1999)
- 4) Nakagawa, T. *et al.* : Isozymes of methanol oxidase in a methanol-utilizing yeast, *Pichia methanolica* IAM 12901, *J. Ferment. Bioeng.*, 81, 498 ~ 503 (1996)
- 5) Gruzman, M. B. *et al.* : Multiple molecular forms of alcohol oxidase from the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*, *Biochemistry (Moscow)*, 61, 1537 ~ 1544 (1996)
- 6) Nakagawa, T. *et al.* : Physiological role of the second alcohol oxidase gene *MOD2* in the methylotrophic growth of *Pichia methanolica*, *Yeast*, 19, 1067 ~ 1073 (2002)
- 7) Stewart, M. Q. *et al.* : Alcohol oxidase and dihydroxyacetone synthase, the abundant peroxisomal proteins of methylotrophic yeasts, assemble in different cellular compartments, *J. Cell Sci.*, 114, 2863 ~ 2868 (2001)
- 8) Ito, T. *et al.* : Molecular characterization of the *PEX5* gene encoding peroxisomal targeting signal 1 receptor from the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*, *Yeast*, 24, 589 ~ 597 (2007)
- 9) Fujimura, S. *et al.* : Peroxisomal metabolism is regulated by oxygen-recognition system through the organelle-crosstalk between mitochondria and peroxisomes, *ibid.*, 24, 491 ~ 498 (2007)
- 10) Nakagawa, T. *et al.* : Regulation of two distinct alcohol oxidase promoters in the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*, *ibid.*, 23, 15 ~ 22 (2006)
- 11) Nakagawa, T. *et al.* : Molecular characterization of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase gene *FLD1* from methylotrophic yeast *Pichia methanolica*, *ibid.*, 21, 445 ~ 453 (2004)
- 12) Lee, B. *et al.* : Physiological role of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in the methylotrophic yeast, *Candida boidinii*, *Microbiology*, 148, 2697 ~ 2704 (2002)
- 13) Yurimoto H. *et al.* : Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism, *Chem. Rec.*, 5, 367 ~ 375 (2005)