

AODアイソザイムによる巧妙なメタノール代謝制御と有用酵素大量生産系への応用

岐阜大学 応用生物科学部 食品生命科学課程 中川 智行

1. 研究の目的

安価でクリーンなエネルギーであるメタノールを唯一の炭素源として利用できるメタノール資化性酵母は、メタノール誘導性酵素アルコールオキシダーゼ (AOD) の強力な発現力を活かした異種遺伝子発現系が開発・利用されるなど、現在、最も産業利用されている有用酵母のひとつである。

本酵母のメタノール代謝は AOD によるメタノールの酸化により始まる。本反応により生じるホルムアルデヒド (FA) は細胞構成成分に導かれる重要な代謝中間体である一方、強い毒性を示す化学物質でもある。つまり、本酵母はメタノール代謝の際、細胞内 FA レベルを生育に有利でかつ毒性を回避できる濃度に制御する必要がある。我々は、種々のメタノール資化性酵母が AOD アイソザイムを持つことを見だし、本アイソザイムが FA の細胞内レベルの調節に関与することを見いだしてきた。

本シンポジウムでは、このユニークな AOD アイソザイムの機能発現メカニズムとメタノール代謝制御における役割について報告し、さらには AOD アイソザイム由来 2 種の遺伝子プロモータを応用した *Pichia methanolica* 新規異種遺伝子発現系の開発についても紹介する。

2. AOD アイソザイムの活性発現の分子機構

AOD はメタノール資化性酵母特有の鍵酵素であり、種々のメタノール資化性酵母が AOD を 9 種のアイソザイムとして持つ。AOD は 8 量体を形成することで活性型として機能するが、AOD アイソザイムでは Mod1p と Mod2p がランダムに会合することによりハイブリッド型アイソザイムを形成する¹⁾。つまり、AOD アイソザイムでは Mod1p と Mod2p のホモ 8 量体のほか、両サブユニットを様々な割合で含むハイブリッド分子も形成され、合計 9 種のアイソザイムが生産される。一方、*P. methanolica* Mod1p と Mod2p はアミノ酸配列レベルで約 85% の相同性を持つが、異なる酵素化学的性質を兼ね備えている。Mod1p は他のメタノール資化性酵母由来 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、 V_{max} が約 1/10 である²⁾。このことは、Mod1p と Mod2p が機能しうるメタノール濃度が異なることを意味し、Mod1p は低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、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³⁾。つまり、*P. methanolica* は様々なメタノール濃度に最適反応条件を持つ 9 種類の AOD 分子種を 2 種の AOD サブユニットから作り出すことができるのである。

3. AOD アイソザイムの活性発現調節と細胞内 FA 濃度の制御

AOD アイソザイムの性質は 2 種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³⁾。つまり、*MOD1* と *MOD2* の発現比率が細胞内の AOD アイソザイムの性質を決定する要因であり、実際、*P. methanolica* は生育環境下のメタノール濃度を認識し、*MOD1* と *MOD2* の発現比を制御することで、それに応じた機能を持つ AOD アイ

ソザイムを形成する³⁾。例えば、低メタノール下では高 V_{\max} 低 K_m の Mod1p を支配的に発現させ、メタノール濃度の上昇に応じて低 V_{\max} 高 K_m の Mod2p の発現量を増加させる。つまり、*P. methanolica* は Mod1p と Mod2p の構成比を外環境のメタノール濃度にあわせて変化させ、低メタノール環境では Mod1p により効率よく FA を生産し、高メタノール環境では Mod2p を支配的にすることで AOD 活性を意図的に抑え、メタノールの過剰酸化による FA の過剰生産を抑制している。言い換えれば、AOD アイソザイムは FA 合成量を外環境のメタノール濃度に合わせて調節する「メタノール代謝制御機構」の一つといえる。

4. 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

P. methanolica は *MOD1* プロモータ (P_{MOD1}) を利用した異種遺伝子発現系が開発され⁴⁾、すでに発売されている。一方、我々は *MOD2* が *MOD1* 同様メタノールにより強力に発現するが、その発現挙動が *MOD1* とは異なることを示している⁵⁾。つまり、 P_{MOD1} と *MOD2* プロモータ (P_{MOD2}) を組み合わせることで、同一細胞内で2種の有用タンパク質を大量生産させることができ、さらにその発現ステージを個々に制御できる新規異種発現系を構築できると考えている。実際、同一細胞内で両プロモータにて2種の異種タンパク質を発現させ、炭素源の組み合わせで P_{MOD1} と P_{MOD2} の共発現ステージを簡単に制御できることを示している。また、誘導炭素源だけでなく、メタノール濃度や酸素供給量によって P_{MOD1} 、 P_{MOD2} の発現量を制御できることから、両プロモータは2種の目的タンパク質の生産量と発現時期を自在にコントロールすることが可能な異種遺伝子発現系として利用できる可能性を示すことができた。

5. おわりに

AOD アイソザイムの機能発現機構の解明は、メタノール資化性酵母のメタノール代謝制御を理解し、その産業利用の幅を広げる効果が期待できる。例えば、メタノール代謝制御を理解することで、高濃度メタノールおよび FA を処理できる「スーパー・メタノール資化性酵母」の分子育種が可能になり、育種株を用いたメタノール・FA の排水処理、空気浄化、バイオセンサーなどへの応用が見込める。さらには、AOD アイソザイムを用いた異種遺伝子発現系は同一細胞内で2種の発現タンパク質の生産管理が必要な発現系に応用できることから、その特性を活かした新規有用酵素大量生産系として酵素産業に貢献できるものと考えている。また、本研究で得られたこれら成果をさらに深化させることで、メタノール資化性酵母および AOD アイソザイムのさらなる応用の可能性も広がるものと期待している。

参考文献

- 1) Nakagawa T, et al. 1999. *Yeast* **15**: 1223-1230.
- 2) Nakagawa T, et al. 1996. *J. Ferment. Bioeng.* **81**: 498-503.
- 3) Nakagawa T, et al. 2002. *Yeast* **19**: 1067-1073.
- 4) Raymond CK, et al. 1998. *Yeast* **14**: 11-23.
- 5) Nakagawa T, et al. 2006. *Yeast* **23**: 15-22.