



C1微生物の生存戦略における分子・細胞基盤の解明と機能開発

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 阪井 康 能

はじめに

筆者は1978年に京都大学農学部農芸化学科に入学し生化学・有機化学の教科書や啓蒙書、原著論文などを乱読していたが、今でも1回生のゼミで読んだWatson “Molecular Biology of the Gene (3rd ed)” の衝撃は忘れられない。高校までの教科書と異なり“〇〇についてはまだ明らかとなっていない”と記載されていて、好奇心がかき立てられた。その後、細胞のもつ様々な“制御機構”に興味を抱くようになった。オペロン説はその1つである。講義で恩師の谷吉樹先生が「我が国におけるアミノ酸・核酸の制御発酵は人類が微生物の制御機構と戦ってきた歴史でもある」と語られていたことも強く印象に残る。

C1微生物はCH₄-CO₂間の炭素循環メタンサイクルを担うメタンまたはメタノール (MeOH) 資化性微生物 (メチロトロフ) とメタン生成菌の総称である。ここではメチロトロフ (酵母・細菌) の分子細胞生物学を主軸にした制御発酵学研究、植物葉面での生存戦略と生理機能を分子レベルで理解することを目指した筆者の研究を振りかえる。異種遺伝子発現に関する応用研究の成果に関して、プロモーター・転写因子の改変や分泌性タンパク質の折りたたみ向上によるタンパク質の高生産については割愛し、ペルオキシソーム (Ps) 合成・分解の分子機構とオルガネラ内酵素生産を中心に述べる。

1. メタノール資化性酵母 (C1酵母) における分子育種法の開発と MeOH 誘導性遺伝子発現の分子機構

1969年緒方ら (京大・農) によりC1酵母 *Candida boidinii* が報告された。その後C1代謝生化学の解明と分子育種技術の開発を経て現在では *Komagataella phaffii* (旧 *Pichia pastoris*) を代表にC1酵母を宿主とした有用酵素・抗体医薬など異種有用タンパク質生産が国内外で産業化されている。しかしメタノール感知に始まるシグナル伝達と誘導性転写制御の分子基盤に関する体系的な研究は皆無であった。

筆者は、C1酵母において新奇遺伝子の同定に有効なジーンタギング変異導入法 (REMI法) と形質転換系を開発し、MeOHにより誘導されるC1代謝酵素遺伝子、MeOH誘導性の

発現制御に関わる *cis* 配列と7種の転写因子を同定した。遺伝子発現の活性化が i) MeOH非存在時におこる転写活性化 (脱抑制)、ii) MeOH濃度依存的活性化の2段階で起こるモデルを提唱している。さらにシグナル伝達系として、細胞表面分子 Wsc1/Wsc3 が MeOH濃度を感知し、MeOH誘導性遺伝子発現のみならず、MAPKカスケードを通してペキソファジーを抑制することも示した (図1)。

2. 翻訳後のタンパク質品質管理機構：オルガネラ局在・折りたたみ・レドックス制御

2-1. ペルオキシソーム膜タンパク質の機能解析と臨床診断用オキシダーゼのオルガネラ内生産

異種有用タンパク質生産の際、翻訳後のタンパク質の折りたたみ・品質管理が活性型タンパク質生産性に大きな影響を与える。C1酵母はMeOH培養時、C1代謝酵素を含む巨大なペルオキシソーム (Ps) が発達し、その細胞をMeOH非含有培地に移すと、Psは選択的オートファジー (ペキソファジー) により分解される。この特性によりC1酵母は、Psの合成・分解の分子細胞生物学におけるモデル生物として利用されている。

ヒトにも保存される3種の *C. boidinii* Ps膜タンパク質 (PMP) の未知であった機能を解明した。遺伝子破壊株の解析結果から、Pmp47はATP/ADP交換輸送体としてPsタンパク質輸送・折りたたみに関与し、Psタンパク質の折りたたみにATP要求性と非要求性のものがあることを示した。Pmp30 (後のPex11) はPs分裂装置としてPsサイズに影響する。Pmp20は抗酸化酵素ペルオキシレドキシニン型グルタチオンペルオキシダーゼとしてPs内でのROS除去に機能していた。

多くのオキシダーゼが臨床診断薬に利用される。C1酵母Psは大量のアルコールオキシダーゼ (AOD) を含んでおり、*C. boidinii aod1Δ*株を用いることで臨床診断薬オキシダーゼのPs内大量生産系を構築した。破壊株における高生産は、大量に存在するAODを持たないため、Psへの輸送・Ps内スペース・オキシダーゼの補酵素であるFAD供給のキャパシティーが増え、オキシダーゼの反応産物で毒性の高いH₂O₂がカタラーゼにより分解されるPs内に封入されたことによると考えられる。

2-2. 新センサーを用いた細胞内レドックス制御の解析

細胞内局所的レドックスを追跡するためにレドックス可視化センサー Redoxfluor (細胞質・Ps) および roGFP-iL S4 (小胞体) を開発した。C1酵母と動物培養細胞においてPs内は細胞質より還元環境であること、Ps欠損細胞では細胞質が正常細胞より還元的なことを示した。動物培養細胞において小胞体ストレス・プロテアソーム阻害条件で小胞体内は酸化になった。このような細胞内レドックス異常を緩和する化合物として、Ps欠損細胞についてはトリコスタチン、プロテアソーム阻害についてはレスベラトロールやセサミンが有効であった。本レドッ

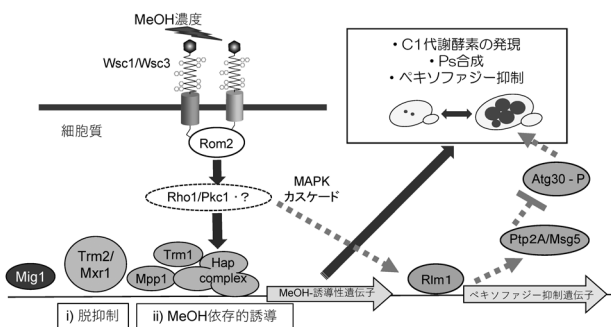


図1. MeOHによる遺伝子発現制御の分子機構

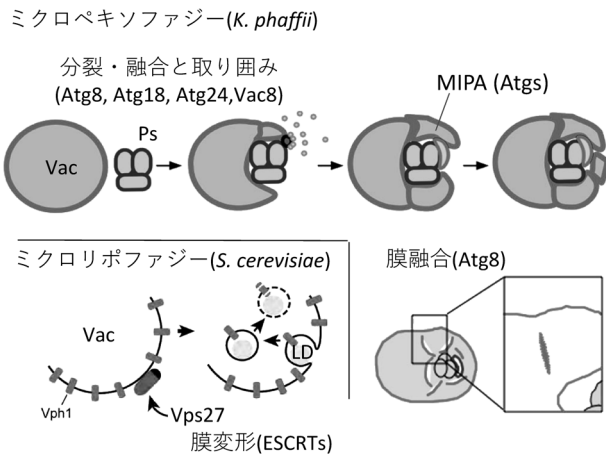


図2. 酵母マイクロオートファジーの分子機構

クス可視化技術は創薬・食品機能成分の開発にも有用である。

3. ミクロオートファジーによるオルガネラ分解の分子機構

K. phaffii の液胞膜を FM4-64, Ps を GFP-SKL で二重染色し生きたまま観察することで, Ps がマイクロオートファジーによっても分解されることを見いだした。この過程に関わる新規遺伝子 *ATG26* を含む 20 種以上の遺伝子群を同定した。予想に反してマクロオートファジーとは膜動態が全く異なるにもかかわらず, 多くの *ATG* 遺伝子がマイクロオートファジーに必要であった。これは後に液胞の閉じ込めに必要な膜構造体 MIPA (micropexophagic membrane apparatus) の発見につながった。一方, 非オートファジー機能により *Atg8*・*Atg18*・*Atg24*・*Vac8* が Ps を取り囲むための液胞の形態制御に必要なことなど, 新たな分子機構が明らかとなった。出芽酵母においては脂肪滴が ESCRT 分子群によって駆動されるマイクロリポファジーにより分解されていた (図2)。酵母においてマイクロオートファジが *Atg*・ESCRT 分子群により駆動されることを世界に先駆けて明らかにすることができた。高等生物でも同様の分子機構が報告されつつある。

4. C1 微生物の植物葉上における生存戦略と機能発現

葉面の全面積は地球表面積の 2 倍にも及ぶ。葉面環境は, 限定された栄養源, 光と温度の日周期性, 宿主の生理による環境変化にも適応しながら葉面微生物は生存する。またメタンや MeOH が植物葉から放出, 存在することも明らかとなり, 今世紀初頭には MeOH 資化性細菌が葉面に優占種として植物と相利共生することが報告された。筆者は C1 酵母が生きた植物葉上で増殖すること, メタン資化性細菌が水生植物葉上に多数棲息し, 重要なメタンシンクとなっていることを見いだした。

4-1. 植物葉面環境と C1 酵母の生存戦略

C1 酵母が何故 MeOH を炭素源とし, MeOH に応答した遺伝子発現を行い, 巨大な Ps を発達させるのかといった C1 酵母に特徴的な細胞現象の生理的意義については, 長年, 全く不明であった。筆者は MeOH センサー酵母細胞を開発し, 若いシロイヌナズナ葉上の MeOH 濃度を追跡したところ, MeOH 濃度は暗期に高く, 明期には低いという日周変動を見いだした。葉上で *C. boidini* は MeOH を炭素源, 硝酸を窒素源として利用して 10 日で 3-4 回分裂する。MeOH 濃度の日周変動に応答して C1 代謝酵素の誘導と Ps の合成・分解を繰り返し, 葉上増殖には Ps の合成のみならず分解も必要であった (図3)。

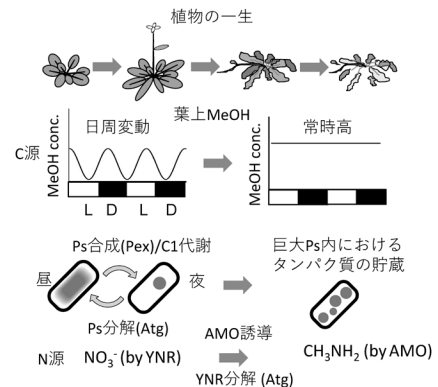


図3. C1 酵母の植物葉上における生存戦略

植物が老化して枯れると葉上 MeOH は常時高く Ps は細胞内容量の 80% を占めるほど発達する。栄養源の乏しい葉上から土に帰るまで巨大な Ps はタンパク質の貯蔵庫となるのであろう。窒素源として若葉上では nitrate reductase (YNR) により硝酸を, 老化葉上では amine oxidase (AMO) によりメチルアミンを利用する。不要になった YNR はオートファジーにより選択的に分解される。C1 酵母の葉上での生存戦略機構として, MeOH 誘導性遺伝子発現の進化的起源, 巨大ペルオキシソームとオートファジーの葉上生存のための生理的意義が明らかとなった。

4-2. C1 細菌の植物葉面における生物間相互作用

植物から単離した多くの MeOH 細菌が, パントテン酸要求性を示し, その要因は β アラニン生合成遺伝子の欠損であった。MeOH 資化性細菌が垂直伝搬によりシソで優占化していること, シアノバクテリアでは時計遺伝子として機能する KaiC が植物上での定着に重要で, KaiC は温度依存性 UV 抵抗性の制御に関わっていた。さらに民間企業と共同で 7 年の圃場葉面散布試験を行い, 酒造好適米について数%~約 16% の安定的増収技術を確立した。一方, 水生植物葉上には多数のメタン資化性細菌が棲息し, *Shinorhizobium* 属細菌の生産するコバラミンによりメタン消費が促進されていることを見いだした。

おわりに

メタン・メタノールは植物葉上に大量に存在することから, バイオマス- CO_2 炭素循環とメタンサイクルは共役する。C1 化合物を唯一の炭素・エネルギー源として増殖するメチロトロフは“究極の低炭素細胞”で“持続的な低炭素社会”を構築するためのお手本である。分子細胞生物学を軸にした制御発酵学を念頭におき C1 酵母を用いた異種遺伝子発現を起点に, 一連の研究を進めてきた。この間, 細胞内循環から地球環境の炭素循環にまで思いを馳せ, 生物種, 基礎・応用にとらわれず自由に研究を行い継続できたことは, 農芸化学という我が国独自の学問体系・文化と雰囲気, 懐の大きさによることに疑いなく, 今後も農芸化学分野の発展に貢献すべく挑戦を続けたい。

謝辞 本研究は京都大学農学研究科応用生命科学専攻制御発酵学分野で行われたもので, 直接ご指導を賜りました谷吉樹先生, 加藤暢夫先生, 研究に直接, ご協力頂いた当分野の現任教員由里本博也氏, 白石晃将氏, 奥公秀氏, 寶関淳氏, ならびに学生, 民間企業を含む共同研究者の皆様へ厚く御礼申し上げます。分子細胞生物学分野で多くのご助言を頂いた大隅良典博士, Suresh Subramani 博士に心より感謝します。