

|             |                                                                                                                                                       |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | イ 李 俊<br>ボム 範                                                                                                                                         |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (農 学)                                                                                                                                             |
| 学 位 記 番 号   | 農 博 第 1288 号                                                                                                                                          |
| 学位授与の日付     | 平 成 14 年 5 月 23 日                                                                                                                                     |
| 学位授与の要件     | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                                                                               |
| 研究科・専攻      | 農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻                                                                                                                             |
| 学 位 論 文 題 目 | Functional analysis of the genes involved in the formaldehyde oxidation pathway in the methylophilic yeast<br>(メタノール酸化性酵母におけるホルムアルデヒド酸化経路関連遺伝子群の機能解析) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 加 藤 暢 夫    教 授 清 水    昌    教 授 熊 谷 英 彦                                                                                                   |

### 論 文 内 容 の 要 旨

酵母がメタノールを炭素源として利用する際、ホルムアルデヒドは酸化経路と資化経路の分岐点に位置する代謝中間体である。一方、ホルムアルデヒドは生体にとって毒性の高い化合物であり、その毒性を最小限にとどめるための細胞機能は、細胞生理学の領域だけでなく当該酵母の工業的利用の観点からも重要な問題を含んでいる。従来、ホルムアルデヒドの酸化に関与するさまざまな酵素反応が知られているが、それぞれがエネルギー獲得と解毒の両面にどのように関与するかについては、明らかにされていない。

本研究は、ホルムアルデヒドの酸化に関与する各酵素遺伝子をクローニングし、遺伝子破壊株の生育特性からそれぞれの酵素の機能を明確にし、ホルムアルデヒド酸化の役割の全体像を明らかにしたものであり、得られた成果は以下のように要約できる。

1) メタノール酸化性酵母 *Candida boidinii* よりホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ (FLD) を精製し、そのアミノ酸配列を基に相当する遺伝子 (*FLD1*) をクローニングし、132bp のイントロンを含む全塩基配列を決定した。Northern 解析の結果、*FLD1* の mRNA はメタノールおよびホルムアルデヒドで誘導され、グルコース抑制を受けないことを明らかにした。構築した *FLD1* 遺伝子破壊株をさまざまな炭素源を制限基質とするケモスタット培養を行い、その生育特性を解析した結果、当該酵素は、メタノールに生育する際のエネルギー生成に必須であると同時にホルムアルデヒドの解毒にも寄与していることを明らかにした。

2) ホルムアルデヒドの酸化経路において、FLD 反応の次の反応を触媒する S-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼ (FGH) に相当する遺伝子 (*FGH1*) を *C. boidinii* より、メタノール酸化性酵母で初めてクローニングした。その推定アミノ酸配列は、パン酵母に対して約60%の相同性を示した。*C. boidinii* の酵素は、その C-末端にペルオキシソーム移行シグナルを有する点の特徴であった。FGH と緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質を構築し、その細胞内局在性を検討した結果、当該酵素はペルオキシソーム移行シグナルをもつにも拘わらず、細胞質においても機能することを見出した。*FGH1* は、*FLD1* と同様にメタノールおよびホルムアルデヒドによって誘導され、その発現は、mRNA レベルで調節されていることを明らかにした。*FGH1* 破壊株は、メタノールを制限基質とするケモスタット培養で、微弱ながら生育することができ、代謝の過程でホルムアルデヒドを生じるメチルアミンやコリンを炭素源とした場合には、生育に若干の遅延があるだけであったことから、この酵素はメタノールの酸化に必須ではないが、ホルムアルデヒドの解毒に寄与していると判断された。

3) 酵母がメタノールに生育する際に、著量のギ酸メチルが培地中に蓄積する。これは、メタノールとホルムアルデヒドの非酵素的付加物であるヘミアセタールが、NAD<sup>+</sup> 関与の脱水素酵素 (ギ酸メチルシンターゼ, MFS) によって酸化されて生じるものとされている。本研究では、*C. boidinii* に MFS をコードする遺伝子が 3 種 (*MFS1*, *MFS2*, *MSF3*) 存在することを認めた。それぞれを大腸菌で発現させて触媒機能を精査した結果、いずれもがアルコール脱水素酵素及び MFS の

活性を有することを明らかにした。また、その推定一次構造より、MFS1p は細胞質に、MFS2p と MFS3p はミトコンドリアに局在すると推定した。おのおのの単独の遺伝子破壊株および複数の組み合わせの遺伝子破壊株を構築し、生育特性を調べたところ、いずれの破壊株もメタノール培地に生育できるが、MFS1 破壊株では、メタノールでの生育が著しく遅延することから、MFS1p は、メタノール生育の初期段階に細胞内に蓄積するホルムアルデヒドの除去に関与すると結論した。

以上の結果より、メタノール資化性酵母には、ホルムアルデヒドの酸化に関与する多種類の酵素が存在し、いずれもメタノール培地での正常な生育に必要であり、ホルムアルデヒドからのエネルギー生成とその解毒に、それぞれが異なる役割を果たしていることを明確にした。

## 論文審査の結果の要旨

メタノール資化性酵母を工業的に利用する場合、炭素基質として用いるメタノールから生じるホルムアルデヒドの代謝を正確に把握し、その細胞内蓄積を制御することは安定な培養条件を得るために重要である。ホルムアルデヒドの酸化に関しては、関与する各酵素の触媒機能に関する知見はあるものの、おのおのの酵素反応と細胞機能との関係は明らかではなかった。特に、ホルムアルデヒドは細胞毒性が強く、その解毒機構は、細胞生理学の観点からも興味ある問題を含んでいる。本研究は、酵母におけるホルムアルデヒドの酸化に関与するそれぞれの酵素の誘導と機能を遺伝子のレベルで検討し、エネルギー生産およびホルムアルデヒドの解毒への寄与を明らかにしたもので、評価すべき点は以下の3点である。

1) *C. boidinii* よりホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ (FLD) を精製してその酵素化学的性質を明らかにするとともに、相当する遺伝子 (*FLD1*) をクローニングした。Northern 解析および当該遺伝子破壊株の生育特性から、FLD はメタノールやホルムアルデヒドによって誘導され、エネルギー生産とホルムアルデヒドの解毒の両方に必須の役割をもつことを明らかにした。

2) *C. boidinii* より S-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼ遺伝子 (*FGH1*) を、メタノール資化性酵母で初めてクローニングし、その遺伝子産物 (FGH) の C-末端にペルオキシソーム移行シグナル (PTS1) が存在することを見出した。さらに緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現させることによって、当該酵素が PTS1 の存在にも拘わらず、細胞質で機能することを見出した。*FGH1* はメタノールおよびホルムアルデヒドに対応してその mRNA レベルで発現調節されていること、FGH の触媒機能はメタノール酸化系に必須ではないが、ホルムアルデヒドの解毒に寄与していることを明確にした。

3) *C. boidinii* に3種のギ酸メチルシンターゼ遺伝子を見出し、それぞれの遺伝子を形質転換した大腸菌より当該酵素を精製して性質を明らかにした。その結果、これらの遺伝子産物は全てアルコールデヒドロゲナーゼに相当することを見出した。各遺伝子産物の推定一次構造より、MFS1p は細胞質にあり、MFS2p および MFS3p はミトコンドリアに局在すると推定した。それぞれの遺伝子破壊株の増殖特性から、MFS1 がメタノール生育の初期段階に蓄積するホルムアルデヒドの除去に関与していることを明確にした。これらは、アルコールデヒドロゲナーゼのギ酸メチルを生成する触媒機能が、ホルムアルデヒドの解毒作用を通じて、メタノール代謝に重要な役割を果たしていることを初めて明らかにしたものである。

以上のように本論文は、酵素と遺伝子のレベルでの検討を通じて、メタノール資化性酵母におけるホルムアルデヒド酸化の生理的意義を総合的に理解することを可能にしたものであり、制御発酵学、応用微生物学、細胞生理学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年4月11日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。