

# 異種タンパク生産酵母におけるメタノール濃度応答性遺伝子発現制御機構の解明

由里本 博也  
京都大学大学院 農学研究科

## 研究の目的

メタノール資化性酵母（メタノール酵母）は、強力なメタノール誘導性プロモーターを利用した異種タンパク質生産宿主として広く利用されている。我々はこれまでに、本酵母のメタノール誘導性遺伝子の発現レベルがメタノール濃度に応答して変動し、単純な濃度依存性ではなく、メタノール酵母の自然界での棲息環境の一つである植物葉面のメタノール濃度範囲（約 0.05~0.2%）においてはメタノール濃度依存的に高くなり、一般的な異種タンパク質生産培養時のメタノール濃度 0.5%以上では逆に低下することを見出した<sup>1)</sup>。この現象を「濃度応答性メタノール誘導 (concentration-regulated methanol induction; CRMI)」と定義し、その分子機構解明を進めている。これまでに、メタノール酵母 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) においてメタノール感知機構に働く細胞表層センサーとして Wsc ファミリータンパク質 (KpWsc1/KpWsc3) を同定し、両遺伝子の欠損により CRMI が損なわれることを報告したが<sup>1)</sup>、メタノール濃度情報がどのように転写制御因子に伝達されるかは不明であった。本研究では、メタノール酵母が持つポテンシャルを最大限に引き出した異種タンパク質生産宿主を開発するため、メタノール濃度に応答した遺伝子発現制御機構とそのシグナル伝達機構の解明を目的とした。

## 方法

メタノール誘導性遺伝子発現に関与する転写活性化因子のうち、KpMxr1 は *Saccharomyces cerevisiae* Adr1 のホモログであり、リン酸化制御を受けることが示唆されたため、様々なメタノール濃度条件における KpMxr1 のリン酸化動態を解析した。これまでに KpMxr1 のセリン残基がメタノール濃度非依存的に脱リン酸化され、スレオニン残基がメタノール濃度依存的にリン酸化されることを見出していたが、リン酸化部位を同定するため、グルコース培養およびメタノール培養した細胞から精製した KpMxr1 について LC-MS/MS 解析を行った。リン酸化されることが推定されたセリンまたスレオニン残基のアラニン置換変異体を作製し、各種メタノール濃度でのリン酸化状態と *AOX1* 発現レベルを解析した。

一方、KpMxr1 へのシグナル伝達経路を明らかにするために、Wsc ファミリータンパク質下流のキナーゼ KpPkc1, KpMpk1 の恒常的活性型変異体を、Cu<sup>2+</sup>で誘導できる *CUPI* プロモーター支配下で強制発現し、各種メタノール濃度条件での *AOX1* 発現レベルと KpMxr1 のリン酸化状態を調べた。

## 結果

CRMI への機能に十分である KpMxr1 の N 末端側 525 アミノ酸発現株を用いて LC-MS/MS 解析を行い、多数のリン酸化部位を同定した。リン酸化されていたアミノ酸残基は N 末端側の 1-230 アミノ酸領域に多かったことから、KpMxr1<sup>1-230</sup>-FLAG 発現株を用いて Phos-tag SDS-PAGE を用いた解析を行ったところ、グルコース培養条件で KpMxr1 が高度にリン酸化され、メタノール培養条件では脱リン酸化されることがわかった。

さらに、KpMxr1 のリン酸化状態はメタノール濃度によっても変化することを明らかにした (図 1)。次に、LC-MS/MS 解析の結果を基に、リン酸化部位のアラニン置換体発現株である SA 変異体 (S110A/S111A) 発現株および TA 変異体 (T121A/T124A/T125A/T128A/T131A) 発現株を構築した。これらの株では、低濃度メタノールに対する応答が低下し、TA 株ではメタノール濃度に対する *AOX1* の転写産物量のピークが 0.03% から 0.1% にシフトし、適切な CRMI が損なわれた。これらの結果から、*K. phaffii* における CRMI には KpMxr1 のセリン残基・スレオニン残基の厳密なリン酸化制御が重要であることがわかった。

KpWsc1/KpWsc3 タンパク質からのシグナル伝達経路 (CWI 経路) のキナーゼのうち、KpPkc1 の恒常的活性型変異体である KpPkc1<sup>R390P</sup> の過剰発現によって *AOX1* の転写産物量は減少したものの、KpMkk1 の恒常的活性型変異体 KpMkk1<sup>S313P</sup> の過剰発現では *AOX1* の転写産物量は影響を受けなかった。また、KpPkc1<sup>R390P</sup> の誘導レベルの違いにより、KpMxr1<sup>1-230</sup>-FLAG のリン酸化レベルと *AOX1* の発現レベルが変化した (図 2)。

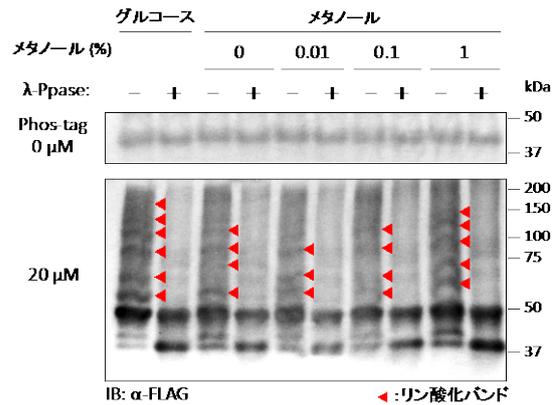


図 1. KpMxr1<sup>1-230</sup> のリン酸化状態の解析

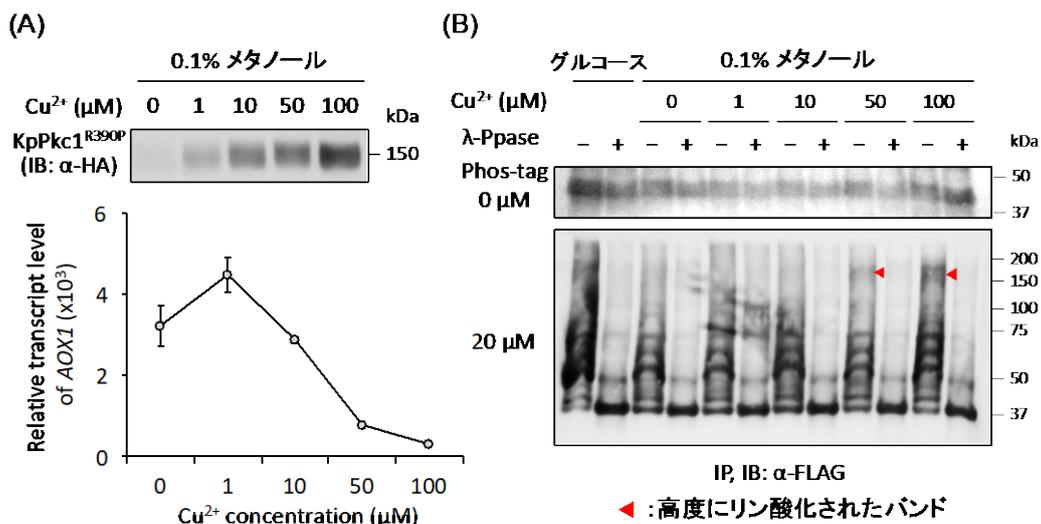


図 2. KpPkc1<sup>R390P</sup> 発現株における *AOX1* 転写産物量 (A) と KpMxr1<sup>1-230</sup> のリン酸化状態 (B)

## 結論

以上の結果から、KpWsc1/KpWac3 からのメタノール濃度情報は、KpRom2, KpRho1 を経て KpPkc1 から分岐する MAP キナーゼカスケードに依存しない未知の経路を通して伝達され、KpPkc1 の活性化レベルに応じて KpMxr1 のリン酸化状態を制御する、CRMI 経路を明らかにした (図 3)<sup>2)</sup>。

## 文献

- 1) Ohsawa, S., Yurimoto, H., and Sakai, Y. (2017) Novel function of Wsc proteins as a methanol-sensing machinery in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Microbiol.* **104**: 349-363.
- 2) Inoue, K., Ohsawa, S., Ito, S., Yurimoto, H., and Sakai, Y. (2022) Phosphoregulation of the transcription factor Mxr1 plays a crucial role in the concentration-regulated methanol induction in *Komagataella phaffii*. *Mol. Microbiol.* **118**: 683-697.

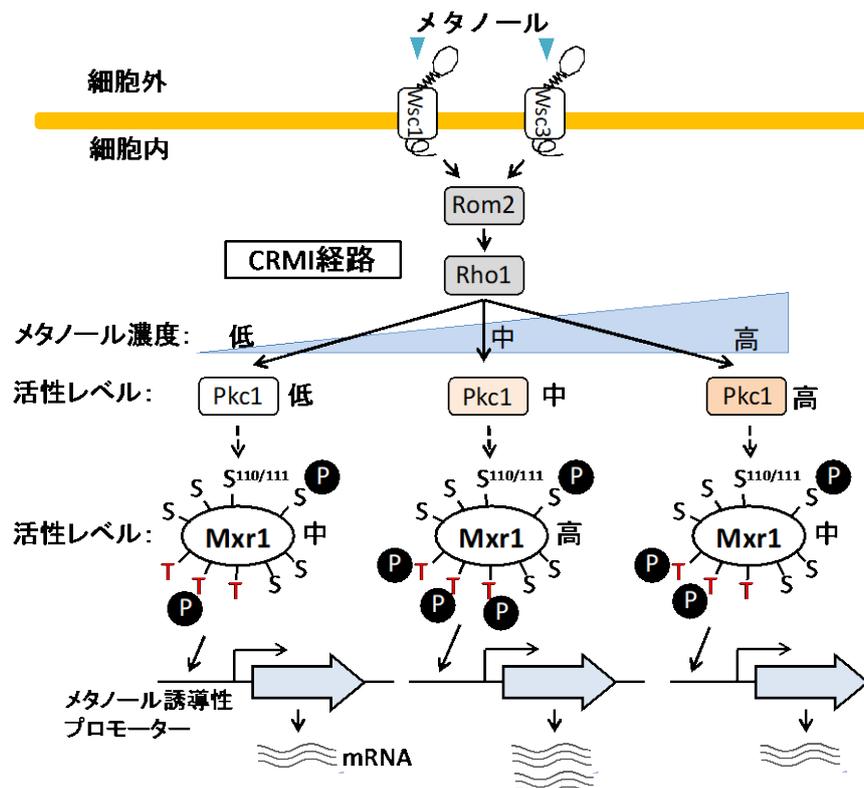


図 3. CRMI 経路による KpMxr1 のリン酸化制御