

令和元年6月5日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18740

研究課題名(和文)油糧微生物ラビリンチュラ類に備わる独自の油滴形成機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the unique lipid droplet formation mechanism in marine oleaginous microorganisms Thraustochytrids

研究代表者

石橋 洋平 (Ishibashi, Yohei)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：90572868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ燃料や機能性脂質の生産源として注目される海洋性油糧微生物であるラビリンチュラ類は、卓越した脂質蓄積能力を有することが大きな特徴である。その主要因は、脂質の貯蔵庫である油滴を大量に形成するラビリンチュラ類の特殊性にある。本研究では、ラビリンチュラ類における油滴形成制御機構を解明することを目的とし、油滴局在タンパクの機能解析、油滴を形成する脂質組成の解明、脂質代謝に関する新規酵素遺伝子の発見、従来のカテゴリーから逸脱した新奇脂質の発見など、ラビリンチュラ類を広く活用するために重要な基盤となる知見を得ることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラビリンチュラ類の油滴に含まれる脂質の合成酵素遺伝子を発見・同定したことで、その遺伝子発現量を制御することが可能となった。これにより、有用脂質の生産性を上げるために有効な分子育種標的が明確となった。また、この脂質合成酵素はこれまでに報告されたものとは全く異なる構造を有しており、学術的にも興味深い遺伝子であった。また、新規脂質分解酵素を同定し、その諸性質を検討した結果、ユニークな特性を有することも明らかとなった。この分解酵素は活性や安定性も高く、今後は油脂産業への活用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Thraustochytrids have recently received increasing attention from academic as well as industrial researchers, because they produce huge amounts of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3PUFA), such as DHA. Thraustochytrids are known as oleaginous microorganisms that accumulate n-3PUFAs as acyl chains of triacylglycerol in lipid droplets. In this study we identified the novel enzymes that are involved in lipid metabolism in this microorganisms. Moreover, we discovered novel sphingolipid that does not fit into the traditional category. We believe that our findings may provide important information not only for oil industry but also for researchers of lipids.

研究分野：脂質生化学

キーワード：高度不飽和脂肪酸 油滴 スフィンゴ脂質 脂質代謝 油糧微生物 ラビリンチュラ類

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究対象であるラビリンチュラ類は、高い脂質蓄積能力を持ち、機能性脂質として知られる DHA などの n-3 系高度不飽和脂肪酸(n-3PUFA)を生産する海洋性の油糧微生物である。バイオ燃料や機能性脂質などの有用脂質の生産源として期待される微細藻類や油糧酵母と比較して、ラビリンチュラ類の脂質含量は高く、また増殖速度も速いため、産業的な観点からも注目される。ラビリンチュラ類の高い脂質蓄積能力は、細胞内体積の大半を占めるほどに、脂質貯蔵庫「油滴」を形成する性質に起因する。なぜラビリンチュラ類は、これほどまでに多くの油滴を形成する事が出来るのだろうか。多くの真核生物に保存されるペリリピンなどの PAT ファミリー遺伝子は、油滴形成や油滴脂質の分解を制御することが知られている。我々はこれまでに、異なる 3 属のラビリンチュラ類のドラフトゲノム解析を行い、油滴の形成や脂質代謝に関与する遺伝子の探索を行ってきた。興味深いことに、既知の PAT ファミリー遺伝子に相同性を示す遺伝子は、ラビリンチュラ類のドラフトゲノム配列からは見いだされなかった。ラビリンチュラ類には独自の油滴形成制御機構が備わっていると考えられる。

2. 研究の目的

バイオ燃料や機能性脂質の生産源として注目されるラビリンチュラ類は、卓越した脂質蓄積能力を有する。その主要因は、脂質の貯蔵庫である「油滴」を大量に形成するラビリンチュラ類の特殊性にある。他生物で明らかにされた油滴形成を制御する遺伝子群の多くはラビリンチュラ類に存在せず、独自の油滴形成制御機構が備わっていることが示唆されるが、その詳細は不明である。本研究は、ラビリンチュラ類特有の油滴形成に関与するタンパク質や、油滴との関連性が示唆されたスフィンゴリン脂質の機能解析に加えて、比較ゲノム解析を行うことによって、ラビリンチュラ類が独自に獲得した油滴形成制御機構を明らかにすることを目的とする。ラビリンチュラ類の卓越した脂質蓄積力を生み出す分子基盤の解明は、有用脂質の収量を増加させる新たな戦略の構築に結びつくことが期待される。

3. 研究の方法

ラビリンチュラ類の油滴を単離し、その脂質組成を質量分析計により解析した。また、ラビリンチュラ類と近縁のストラメノパイル生物群の比較ゲノム解析を行い、ラビリンチュラ類に特有の遺伝子群を探索した。その中から脂質代謝に関連する可能性のある遺伝子を抽出し、これらの遺伝子の過剰発現および欠損株を作製した。また、大腸菌や出芽酵母を用いた異種発現により遺伝子産物の機能を評価した。油滴形成に関与する可能性のあったスフィンゴ脂質セラミドホスホエタノールアミン(CPE)の局在を調べるために、蛍光タンパクを付与した CPE 結合タンパクを細胞内に発現させ、蛍光顕微鏡でそのシグナルを解析した。本研究の過程で見いだされた未知の脂質の構造解析を行うため、ラビリンチュラ類より未知脂質を精製し、その構造解析(精密質量分析、タンデム MS、核磁気共鳴、薄層クロマトグラフ)を行った。

4. 研究成果

(1)新規リパーゼの発見

比較ゲノム解析の結果、ラビリンチュラ類に特有の新規リパーゼ遺伝子を同定した。油滴の中性脂質分解に関与する可能性を考え、本研究ではリパーゼに着目した。ラビリンチュラ類 *A. limacinum* のドラフトゲノム上にコードされた複数のリパーゼ様遺伝子のなかで、TG 分解活性が認められた Protein ID:145138 は培地中に分泌されるリパーゼであることが分かった。既存のリパーゼと配列比較を行った結果、リパーゼの活性モチーフ(GXSXG)は保存されていたが、その他の領域は全く相同性を示さない新規リパーゼであることが示された。Ni²⁺キレートカラムを用いて培地画分から本リパーゼを高純度に精製し、その基質特異性を検証した。その結果、新規リパーゼ 145138 は中性脂質である TG、ジアシルグリセロール(DG)、モノアシルグリセロール(MG)、リン脂質である PC を効率良く分解することが分かった。一方、コレステロールエステルに対する分解活性は弱く、スフィンゴ脂質に対しては全く分解活性が認められなかった事から、グリセロ型の中性脂質・リン脂質に作用するリパーゼ/ホスホリパーゼであることが示された。TG に対する位置特異性を検証した結果、本リパーゼは sn-1, 2, 3 位のどの位置にも作用するランダム型の活性を示した。本リパーゼを TG に作用させると DG、MG が順次生成し、最終的に脂肪酸とグリセロールまで分解されることが分かった。一方、本リパーゼを PC に作用させた結果、sn-1 位の脂肪酸に優先的に作用し、sn-2 位に脂肪酸が残存するリゾ PC (LPC) を産生させることが分かった。この LPC は高濃度の 145138 を作用させた場合においても残存したことから、PC の場合は TG とは異なり、sn-2 位の脂肪酸に対する活性が非常に弱いことが示された。これらの結果より、本リパーゼは TG と PC で異なる位置特異性を示すことが明らかとなった。これまでに報告のあるリパーゼ/ホスホリパーゼは TG と PC で位置特異性が一致しており、例えば TG の sn-1, 3 位に作用するリパーゼは、PC に対しては sn-1 位に作用するホスホリパーゼ A1 活性を示し、TG に対し全ての脂肪酸に作用するリパーゼは、PC に対してはホスホリパーゼ B 活性を示す。調べた限りにおいて、TG と PC で位置特異性が異なるリパーゼは、本研究で見いだされた 145138 が初めてである。本リパーゼに見出される独自かつ機能未知の配列がこのようなユニークな性質を生み出していると考えられる。今後、本リパーゼの詳細な構造解析を行うことで、その分子機構が明らかになると期待される。

(2)CPE 分解酵素の同定と CPE の局在解析

多くの真核生物に普遍的に存在するスフィンゴリン脂質は生体膜の主要な構成脂質である。先行研究により、ラビリンチュラ類の一種である *Thraustochytrium aureum* の主要スフィンゴリン脂質が、セラミドホスホエタノールアミン(CPE)であることを見出している。また、*T. aureum* の Sphingolipid synthase (SLS) 5 がホスファチジルエタノールアミンとセラミドを前駆体として、CPE を合成する活性を示すことを明らかにしている。本研究では、ラビリンチュラ類に備わる CPE の分解酵素の同定とその機能解析を行った。CPE と同じくスフィンゴリン脂質であるイノシトールホスホリルセラミド(IPC)をセラミドとイノシトールリン酸に分解する、*Saccharomyces cerevisiae* 由来の Inositol phosphosphingolipid phospholipase C (Isc1) のアミノ酸配列をクエリーとし、*T. aureum* のドラフトゲノムを用いて BLAST 検索を行った結果、CPE 分解酵素の候補遺伝子 (TauCPEase) を取得した。この遺伝子を過剰発現するコンストラクトを作製し、CPE の合成、および分解活性を持たないラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium limacinum* に導入し、TauCPEase の諸性質を検討した。その結果、TauCPEase は pH7.5 および反応温度 30°C を最適条件として、スフィンゴリン脂質であるスフィンゴミエリンと本来の基質である CPE を分解することが示された。SLS5 を過剰発現することで、高度に CPE を蓄積する能力を獲得した *A. limacinum* に、上述の TauCPEase 過剰発現コンストラクトを導入し、実際に TauCPEase が生体内で CPE を代謝するかを検証した。LC-ESI MS 解析を用いて、総脂質に含まれる CPE 量を測定した結果、CPEase 非導入株は日数の経過に伴い SLS5 の働きによって細胞内の CPE 量が増加し、対照的に CPEase 導入株では CPE 量が激減することが分かった。これらの結果は、本研究で見出した TauCPEase が、ラビリンチュラ類における CPE の分解酵素であることを強く示唆している。これまでにラビリンチュラ類以外にも様々な生物から CPE は見出されているが、その分解酵素遺伝子に関する報告例はない。本研究によって初めて明らかとなった CPE 分解酵素を手掛かりとして、CPE の代謝機構や CPE の機能に関する新しい知見が得られることが期待される。次いで、CPE 結合タンパクを用いてラビリンチュラ類の CPE の局在解析を行った。GFP を融合させた CPE 結合タンパク erylysin A (EryA) 及び pleurotolysin A2 (PlyA2) 発現コンストラクトを *T. aureum* に導入したところ、細胞膜近傍に局所的な GFP の蛍光が観察され、培養日数の経過に伴う局在の変化はなかった。Z-Stack を用いた 3D 画像構築により詳細な局在解析を行った結果、GFP の蛍光は細胞膜内膜近傍に点在している様子が観察された。一方で、CPE を合成しないラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium limacinum* を用いて同様の実験を行ったところ、GFP の蛍光は特定の場所には局在せず、細胞質全体で観察された。続いて、GFP 融合 EryA 及び PlyA2 を大腸菌で発現・精製し、ラビリンチュラ類と共にインキュベートすると、*T. aureum* の細胞膜の外側において GFP の蛍光が観察された。しかし、*A. limacinum* においては CPE 結合タンパクの蛍光は観察されなかった。以上の結果から、ラビリンチュラ類において CPE は細胞膜の内・外層に局在していることが強く示唆された。本研究当初は、CPE が油滴形成に関与すると考えていたが、油滴への局在は見られなかったこと、そして他属のラビリンチュラ類の脂質組成解析を行っていく中で、CPE を持たないものも存在することから、CPE と油滴形成には相関関係はない可能性が高いことが示された。

(3)従来のカテゴリーに属さない新奇スフィンゴ脂質の発見

A. limacinum の脂質組成を質量分析計で解析する過程で、CPE などの従来のスフィンゴ脂質とは異なる開裂パターンを示す未知脂質を発見した。本研究ではこの未知脂質を精製しその構造を決定することを目指した。*A. limacinum* から見いだされた未知脂質は d7 スフィンガニンを前駆体として合成されたことから、基本骨格としてはスフィンゴ脂質であることが確認された。*A. limacinum* における該当脂質量の経時変化を調べた結果、培養 3 日目に最大に達することが分かった。500 ml の GY 培地で 3 日間培した *A. limacinum* 藻体から固相抽出、逆相 HPLC を順次行い約 1 mg の精製標品を得た。TLC で分離後、いくつかの官能基発色試薬で調べた結果、該当脂質はアミノ基を持ち、六炭糖とリン酸基は持たないことが示された。また、精密質量分析および NMR の結果から、目的脂質はセラミド (d18:3+Me / C16:0) 骨格にアミノ基とカルボキシル基を有する親水性頭部がついた新奇スフィンゴ脂質であることが明らかになった。従来の複合スフィンゴ脂質は、セラミド骨格に糖が結合した糖脂質、またはリン酸基が結合したリン脂質に分類される。今回、ラビリンチュラ類で見出された新奇スフィンゴ脂質は、そのどちらにも属さない。その構造はエタノールアミンとセラミドがグリオキシル酸のアルデヒド基を介してアセタールを形成しているものであったことから、この新奇スフィンゴ脂質は「セラミドグリオキシルエタノールアミン」と呼称するのが妥当であると考えている。Scifider を用いて構造検索を行った結果、類似化合物は全く見いだされず、本脂質は非常に新規性の高いものであることが示された。このような新奇スフィンゴ脂質の分布を調べたところ、現時点ではラビリンチュラ類以外の生物からは見いだせていない。なお、単離した油滴にこの新奇脂質が存在するか検証した結果、油滴ではなく他の膜画分に局在する可能性が高いことが示された。また、ラビリンチュラ類には CPE をもつものと、この新奇脂質をもつもの、そして両方をもつもの、3 種類に分かれることが分かった。この結果をふまえると、ラビリンチュラ類の油滴形成と新奇脂質には特段の相関関係はない可能性が高い。今後は、この新奇脂質の分布をさらに広い生物種で調べるとともに、ラビリンチュラ類における生合成経路および生物機能を解明したいと考

えている。

(4)新規ステロールエステル合成酵素遺伝子の発見

ラビリントチュラ類の油滴に蓄積される主要な中性脂質はトリアシルグリセロール (TG) とステロールエステル (SE) である。真核生物に普遍的に存在するステロールは、細胞膜の強度や流動性の調節、脂質ラフトの構成要素など、重要な生命機能を担う脂質である。ステロールは 3 位の水酸基に脂肪酸がエステル結合したステロールエステル (SE) として生体内に蓄積される。SE はアシル CoA を前駆体とする Acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT)、またはリン脂質を前駆体とする Phospholipid sterol acyltransferase (PSAT) によって合成される。本研究により、これら従来の酵素とは全く異なる新奇 SE 合成酵素を発見した。ラビリントチュラ類は、DHA などの高度不飽和脂肪酸を合成し、トリアシルグリセロール (TG) や SE として油滴に蓄積する。ラビリントチュラ類の TG は Diacylglycerol O-acyltransferase (DGAT2) によって合成される。ラビリントチュラ類のドラフトゲノムには 3 種類の DGAT2 ホモログ (DGAT2A、B、C) が存在する。それぞれの遺伝子の欠損株を作製し、脂質組成に及ぼす影響を検証したところ、DGAT2A の欠損株では TG が大幅に減少すること、DGAT2C が DGAT2A の機能の一部を補うことが分かった。これらの結果は、DGAT2A および C がラビリントチュラ類の TG 合成に関与することを示している。一方、DGAT2B の欠損株では TG 量の変化は認められず、TG 合成酵素として機能していないことが示された。リポミクス解析によって脂質組成を網羅的に調べた結果、DGAT2B 欠損株では SE 量が顕著に減少していることが判明した。また、DGAT2B 欠損株に DGAT2B を再導入した株では、SE 量が野生株レベルまで回復することが確認された。これらの結果より、DGAT2 のホモログと考えられた DGAT2B は、生体内では SE 合成酵素として機能していることが明らかになった。これまでに DGAT2 およびそのホモログがジアシルグリセロールでなくステロールを基質とするという報告はなく、我々の知る限り本研究で見出された DGAT2B が初めての例である。系統解析の結果、興味深いことに DGAT2B はラビリントチュラ類が属するストラメノパイル生物群に特徴的に保存されることが分かった。DGAT2B は進化の過程で、ストラメノパイルが独自に獲得した SE 合成酵素遺伝子であると推測される。

(5)ラビリントチュラ類のステロール合成系の解明

全ての真核生物に普遍的に存在するステロールは、生命活動に必要な脂質の一つである。一般的に、菌類、植物、動物はそれぞれ特有のステロールを合成すると考えられてきたが、海洋微生物のラビリントチュラ類は多様なステロールを持つことが報告されている。しかし、これらの多様なステロールの合成経路、機能などは未解明のままである。油滴の主要な中性脂質である SE および油滴膜の形成機構を理解する上で、ステロール合成経路の同定・機能解析は重要である。本研究では、安定同位体と阻害剤を用いた代謝解析及びステロール合成酵素 DHCR24、SMT1、FK 欠損株、過剰発現株の作製によって、ラビリントチュラ類の多様なステロールの合成経路と生理的意義の解明を目指した。A. limacinum における推定ステロール合成経路を調べた結果、A. limacinum はステロール合成に必要な squalene monooxygenase に関して既知の遺伝子と相同性を示すものがゲノム上に存在しないことが示された。そこで、スクアレン環状化酵素の阻害剤である Ro-48-8071 と ¹³C 標識グルコースを用いた代謝解析を行った。その結果、Ro-48-8071 の添加によりエポキシスクアレンの蓄積、¹³C 標識グルコースの添加により ¹³C 標識コレステロールを検出することが出来た。これらの結果から、A. limacinum は既知の酵素とは全く異なる、新規の squalene monooxygenase によってエポキシスクアレンを合成し、ステロールを新規合成出来ることが示された。スクアレン環状化酵素によってラノステロールが合成されるか、シクロアルテノールが合成されるか、これがステロール合成における大きな分岐点となる。C14 脱メチル化酵素である CYP51 に作用する抗真菌薬であるテブコナゾールを培地中に添加した結果、動物・真菌の合成系で蓄積されるラノステロールは一切検出されず、シクロアルテノールを経由して出来る植物ステロール中間産物の蓄積が認められた。この結果から、A. limacinum はシクロアルテノールを合成することが強く示唆された。続いて、コレステロール合成に必須であると考えられる AIDHCR24、植物ステロール合成に必須であると考えられる AISMT1 を欠損させることでコレステロールもしくは植物、真菌型ステロールのどちらかしかもたない株を作成し、それぞれのステロールの機能解析を行った。その結果、AIDHCR24 欠損株、AISMT1 欠損株どちらも大幅に増殖が抑制された。このことから、コレステロール、植物ステロール、真菌型ステロールいずれも生理的に重要であり、互いに機能的相補性がないことが示された。ステロールの C14、15 二重結合を還元する還元酵素であり全てのステロールを合成するうえで必須となる酵素の一つである AIFK の欠損株を作製し、代謝物解析を行った。その結果、コレステロールなどの主要なステロールに代わり C14、15 位に二重結合をもつステロールが検出された。この結果から、FK 以降に作用するステロール合成酵素は弱い特異性を示し、それによってラビリントチュラ類のステロール合成経路は直線的ではなく複雑なネットワークのようになっていることが示された。

〔雑誌論文〕(計2件)

Regulation of Glucosylceramide Synthesis by Golgi-localized Phosphoinositide

Ishibashi Y, Ito M, Hirabayashi Y

Biochem. Biophys. Res. Commun. 499:1011-1018. (2018) 査読有

Regulation of triacylglycerol accumulation and lipid droplet morphology by the novel thraustochytrid-specific lipid droplet protein 1 (TLDP1) in *Aurantiochytrium limacinum* F26-b.

Watanabe T, Sakiyama R, Iimi Y, Sekine S, Abe E, Nomura K, Nomura K, Ishibashi Y, Okino N, Hayashi M, Ito M

J. Lipid Res. 58:2334-2347(2017) 査読有

〔学会発表〕(計11件)

1. 新規ステロールエステル合成酵素遺伝子の発見と機能解析

石橋 洋平、深堀 義朝、山元 悠樹、石丸 真由、沖野 望、林 雅弘、伊東 信

第91回 日本生化学会大会 (2018年9月24日-26日、国立京都国際会館、京都)

2. トリアシルグリセロール(TG)とホスファチジルコリン(PC)で位置特異性が異なる新規リパーゼ/ホスホリパーゼ

石橋 洋平、青木 敬祐、林 雅弘、沖野 望、伊東 信

第60回脂質生化学会 (2018年5月31日-6月1日、京王プラザホテル八王子、東京)

3. ラビリンチュラ類に特有の遺伝子の探索と機能解析

石橋 洋平、青木 敬祐、増田 栞、林 雅弘、沖野 望、伊東 信

第20回マリンバイオテクノロジー学会 (2018年5月26日-27日、フェニックス・シーガイアリゾート、宮崎)

4. 海洋性油糧微生物ラビリンチュラ類からの新規リパーゼの探索

石橋 洋平、青木 敬祐、林 雅弘、沖野 望、伊東 信

日本農芸化学会 2018年度大会 (2018年3月15日-18日、ホテルナゴヤキャッスル/名城大学、名古屋)

5. ストラメノパイル間の比較ゲノム解析により見いだされたラビリンチュラ類の新規分泌型リパーゼの機能解析

石橋 洋平、青木 敬祐、林 雅弘、沖野 望、伊東 信

2017年度 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio 2017) (2017年12月6日-9日、神戸ポートアイランド、兵庫)

6. 油糧微生物ラビリンチュラ類から見いだされた新規リパーゼの機能解析

石橋 洋平、青木 敬祐、林 雅弘、沖野 望、伊東 信

第59回 日本脂質生化学会 (2017年6月15日-16日、京都大学百周年時計台記念館、京都市)

7. 海洋微生物ラビリンチュラ類における選択マーカーリサイクル法の開発

石橋 洋平、伊東 信

日本農芸化学会 2017年度大会 (2017年3月17日-20日、ウェスティン都ホテル京都/京都女子大学、京都市)

8. Composition, localization, and metabolism of sphingolipids in thraustochytrids

Ishibashi Y, Nagatomi M, Tominaga Y, Ohara J, Morimoto M, Abe E, Yamaji-Hasegawa A, Okino N, Kobayashi T, Ito M

57th International Conference of the Bioscience of Lipids (September 4th-8th 2016, Chamonix-MontBlanc, France)

9. 海洋微生物ラビリンチュラ類の高度不飽和脂肪酸含有ステロールエステル代謝機構の解明

石橋 洋平、石丸 真由、渡辺 昂、青木 敬祐、沖野 望、伊東 信

第58回 日本脂質生化学会 (2016年6月9日-6月10日、にぎわい交流館AU、秋田市)

10. 質量分析計を用いたラビリンチュラ類の脂質代謝機構の解明

石橋 洋平

第18回マリンバイオテクノロジー学会 (2016年5月28日-5月29日、北海道大学水産学部 函館キャンパス、函館)

11. 質量分析計を用いた海洋性油糧微生物ラビリンチュラ類の脂質組成解析

石橋 洋平、青木 敬祐、伊東 信

第38回日本分子生物学会年会/第88回日本生化学会大会 合同大会 (2015年12月1日-12月4日、神戸ポートアイランド、兵庫)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：ステロールの製造法
発明者：石橋 洋平、西田 裕貴、伊東 信
権利者：国立大学法人九州大学
種類：特許
番号：特願 2017-202358
出願年：平成 29 年
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/kaishika/>

6 . 研究組織

分担者、協力者なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。