

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05801

研究課題名（和文）油脂酵母を用いたオートファジーによる脂肪滴分解機構の解析と油脂高蓄積酵母の作出

研究課題名（英文）Roles of autophagy in the degradation of lipid droplets in the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* and the generation of strains accumulating higher amounts of triacylglycerol

研究代表者

山崎 晴丈（Yamazaki, Harutake）

新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：20456776

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：トリアシルグリセロール（TAG）を主成分とする脂肪滴の分解に関してオートファジーが関与している可能性が報告されているが、その詳細な分子機構に関しては不明な点が多い。本件研究では、TAGを高度に蓄積する酵母 *Lipomyces starkeyi* において、TAGの分解に関与するオートファジー関連遺伝子の検討を行った。その結果、マクロオートファジーに関与するAtg1、Atg2の欠失株では野生型株よりも多くのTAGを細胞内に蓄積することから、Atg1、Atg2が脂肪滴の分解に機能すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーに関する分子レベルの解析は進んでいるが、脂肪滴を標的としたオートファジーの機構の解析は不十分である。本研究は脂肪滴分解の際にどのオートファジー関連遺伝子が脂肪滴の分解に関与するかの統一見解を得ていくのに重要な知見を提供したと考えられる。また本研究は油糧酵母の油脂蓄積性向上による産業利用の促進にも寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：Autophagy is considered to play a role in the degradation of triacylglycerol (TAG) stored in lipid droplets, but the details of the molecular mechanisms remain unclear. In this study, autophagy-related genes involved in the degradation of TAG in the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* are investigated. The deletion strains of Atg1 or Atg2, key participants in macroautophagy, accumulated a larger amount of TAG per cell than the wild-type strain, suggesting that Atg1 and Atg2 function in the process of TAG degradation.

研究分野：応用微生物学

キーワード：油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 脂肪滴 トリアシルグリセロール オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

栄養飢餓状態の細胞は恒常性を維持するために、中性脂質であるトリアシルグリセロール (TAG) を分解して利用する。TAG はリン脂質一重層に覆われた脂肪滴の中に蓄積されているが、TAG が分解される際には、酵母では細胞質のリパーゼが脂肪滴に局在化して機能するとされてきた。しかし最近になり、この TAG を含む脂肪滴の分解にオートファジーの経路も関与する可能性が明らかとなりつつある。しかしながら、脂肪滴が分解される際にはマクロオートファジーとミクロオートファジーのどちらかの経路のみが使われるのか、もしくは両方の経路とも使われるかは、生物種や生育環境の条件によって異なる可能性があり、統一した見解はなかった。またどちらの経路の場合にも、他のオルガネラと区別して選択的に脂肪滴を分解している可能性があるが、その選択性を決定する分子に関する知見もなかった。

2. 研究の目的

本研究課題においては、脂肪滴を高度に蓄積する、すなわち脂肪滴の合成・分解の過程の観察がしやすい油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の脂肪滴分解機構を解明することと、その知見を元に産業利用しやすい *L. starkeyi* 株を作出することを目的とした。

3. 研究の方法

オートファジーに関与すると考えられる遺伝子を *L. starkeyi* のゲノムから探索し、その欠失株を作製した。野生型と得られた遺伝子欠失株を S5% 培地 (0.5% (NH₄)₂SO₄、0.1% KH₂PO₄、1% yeast extract (Kyokutou)、0.05% MgSO₄·7H₂O、0.01% CaCl₂·2H₂O、5% glucose)、GY 培地 (0.5% yeast extract (Kyokutou)、5% glucose)、SD 培地 (0.67% Yeast Nitrogen base w/o amino acid (Wako)、5% glucose) で培養し、TG E-test の方法に従って測定した TAG 量を指標に脂肪滴の分解が起きているかを検討した。また生菌率の測定では、野生型株とオートファジー関連遺伝子欠失株を同数スポットアッセイに供した。細胞内の活性酸素種 (ROS) の濃度は、細胞懸濁液に H₂DCEFDA を添加後の蛍光を指標に測定した。培養上清の脂肪酸の検出の際には、培養上清を TLC Silica gel にスポットし、クロロホルム/メタノール/酢酸/滅菌水 (90/15/10/3 v/v/v/v) で半分まで展開後、ヘキサノール/ジエチルエタノール/酢酸 (70/30/1 v/v/v) で展開し、TLC Silica gel をヨウ素により染色した。

4. 研究成果

Atg2 は伸長中の隔離膜と小胞体の接点に局在しているとされ、隔離膜の伸長に必要なリン脂質を小胞体から直接運搬している役割を持っていると考えられている。Atg2 の遺伝子欠失株を作製し、その油脂蓄積性を油脂の蓄積に適した S5% 培地を用いた培養で調べた。まず $\Delta atg2$ は野生型株と比べて同等の生育速度および最終細胞濃度を示した。このことから、Atg2 は少なくとも対数増殖期の細胞増殖には必要ないと考えられた。また $\Delta atg2$ は野生型株 (WT) と比べて細胞あたり最大 2.2 倍多く TAG を蓄積した。この時、顕微鏡観察では、 $\Delta atg2$ では WT に比べて細胞内一杯に脂肪滴を蓄積している細胞が多く存在した。しかしながら、 $\Delta atg2$ は 6 日目以降からグルコースが消費されなかった。 $\Delta atg2$ の生菌率をスポットアッセイにより経時的に確認したところ、培養 4 日目から $\Delta atg2$ の生菌率は WT に比べて低下し始め、培養 5、6 日目にはその差がより顕著になることを見出した。さらに細胞内の活性酸素種 (ROS) を定量したところ、 $\Delta atg2$ は WT に比べて常に ROS 濃度が高かった。さらに培養 5 日目から $\Delta atg2$ の培養上清が濁って来たことから、この上清を薄層クロマトグラフィーに供したところ、 $\Delta atg2$ の培養上清には TAG が含まれていることが明らかとなった。以上のことから、 $\Delta atg2$ は WT に比べて TAG 蓄積量が多くなり、おそらくオートファジー欠損によって窒素源枯渇に対応できずに細胞内に ROS が蓄積して細胞死が起こり、その結果として蓄積した TAG を細胞外に漏出しているのではないかと考えられた。以上のことから、 $\Delta atg2$ は油脂生産の産業への利用価値が高いと考えられたが、その際にはマクロオートファジーの欠損により窒素源等の必須栄養素のリサイクルが機能していない問題を克服する必要があると考えられた。そこで、*atg2* を S5% 培地よりも炭素/窒素比の低い SD 培地や GY 培地で培養した。その結果、 $\Delta atg2$ は S5% 培地では炭素源を消費しきらず途中で死滅してしまったものの、SD 培地や GY 培地では炭素源をすべて消費して、野生型株よりも細胞あたりの TAG 量が多いことが明らかとなった。このことから、培地組成を工夫することによって、 $\Delta atg2$ を利用して TAG をより多く蓄積できる可能性が見いだされた。

マクロオートファジーの誘導の最も上流に位置する ATG1 の欠失株 ($\Delta atg1$) を作製し、前年度までと同様に S5% 培地で培養したところ、 $\Delta atg1$ では $\Delta atg2$ より少ないものの、野生型株に比べて細胞あたりの TAG 量が多いことが明らかとなった。顕微鏡観察によっても、 $\Delta atg1$ は $\Delta atg2$ と同様に細胞内一杯に脂肪滴を蓄積している細胞が確認された。以上のことから、Atg1 も Atg2 は *L. starkeyi* において脂肪滴の分解に関与していることが考えられた。

次に、マクロオートファジーにおけるオートファジックボディの液胞内分解に必須の役割を果たしていると考えられている液胞内のリパーゼ、プロテアーゼである Atg15、Pep4 をコードする

遺伝子の破壊株 $\Delta atg15$ 、 $\Delta pep4$ を作製した。 $\Delta atg15$ 、 $\Delta pep4$ でも野生型株に比べて細胞あたりの TAG 量が増加することが予想されたが、これらの株を油脂蓄積培地である S5% 培地で培養したところ、 $\Delta atg15$ 、 $\Delta pep4$ の細胞あたりの TAG 量は野生型株と同等であった。これらのことから、単純にオートファジーを阻害すると TAG の蓄積量が増加するわけではなく、オートファゴソームが形成されて液胞に融合まですれば、オートファジックボディ内の TAG は分解される可能性も考えられた。しかしながらオートファジックボディの分解はオートファジーにおいては必須であると考えられていることから、Atg 1 や Atg 2 がオートファジー以外の未知の機能を持っており、それが TAG の分解に関与している可能性も考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------