

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06034

研究課題名（和文）ステロールの構造的違いがもたらす生命機能の解明

研究課題名（英文）Biological Functions of Structural Differences in Sterols

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）：ラビリンチュラ類はコレステロールと植物ステロール、どちらも合成する稀有な性質をもつ。その分子基盤と意義を解明する過程で、特定のステロールの欠失により細胞死や細胞分裂異常が起こることから、その機序の解明を目指した。細胞死の原因として、鉄依存的に過酸化脂質が生成することに起因するフェロトーシス様の現象が起こることを見出した。また、ステロールの構造に依存した細胞骨格の制御機構の存在も示唆された。ステロールに関連する新規酵素として、既知遺伝子とは進化的起源の異なるステロールエステル合成酵素を同定し、その構造基盤を解き明かす過程で、ステロールの生産性を向上する新技術を見出すに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロトーシス細胞死はヒトの各種疾患と関連し、世界的に注目される研究分野の一つであるが、これまで得られた成果は哺乳類に由来するものが大半である。本研究により、微生物において類似の細胞死とその制御機構が示唆され、フェロトーシスの進化的な起源や普遍性に迫るという点で学術的に重要である。さらに、新規酵素の発見とその構造改変によりステロールの生産性を高める新技術を構築したという点で、様々な用途に利用される有用脂質であるステロールの、持続可能な微生物生産への道を開拓した点でも社会的に重要な成果と考える。

研究成果の概要（英文）：Thraustochytrids can synthesize both cholesterol and phytosterols. In the process of elucidating the molecular mechanism and significance of this property, we aimed to elucidate the mechanism of cell death and abnormal cell division caused by the deletion of certain sterols. We found that cell death is caused by a ferroptosis-like phenomenon resulting from iron-dependent generation of lipid peroxide. The existence of a regulatory mechanism of the cytoskeleton dependent on sterol structure was also suggested. As a novel enzyme related to sterols, we identified a sterol ester synthase that differs in evolutionary origin from the known genes, and in the process of unraveling its structural basis, we have discovered a new technology to improve sterol productivity.

研究分野：脂質微生物学

キーワード：ステロール 細胞死 ステロールエステル

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全ての真核生物に普遍的に存在するステロールは、ステロイド骨格の C3 に OH 基をもつ脂質であり、細胞膜の流動性や透過性の調節、脂質ラフトの形成、ビタミン D や

ステロイドホルモンの前駆体等、数多くの生命活動に参与する。脊椎動物はコレステロール、植物はカンペステロールやスティグマステロールなどのいわゆる植物ステロール、酵母を含む真菌類はエルゴステロールを主なステロールとして保有する (図 1)。ステロールの構造的な違い・多様性が、どのような機能的意味を持ち、個々の生物種の生命機能にどのように関与しているのか、という観点から実施された研究は申請者が知る限りほとんどない。

生物種によって、それぞれが固有のステロールを持つと考えられてきたが、そのような常識が通用しない生物が本研究の対象生物であるラビリンチュラ類である。この真核微生物はコレステロール、植物ステロール、エルゴステロールなどの多様なステロールを合成することが可能である (図 1)。DHCR24 と SMT1 はステロール合成の分岐点となる重要な代謝酵素であるが、マウス、シロイヌナズナ、出芽酵母などのモデル生物はどちらかの遺伝子を欠損しており、代謝の分岐点がなく一本道となるためステロール組成が単純化・固定化される (図 2)。

一方、ラビリンチュラ類は両者を兼ね備えており、これがステロール構造の多様性を生み出す分子基盤となっていることを見出し (図 2)、DHCR24 遺伝子破壊によりコレステロールを、SMT1 遺伝子破壊によりエルゴステロールと植物ステロールを、それぞれ選択的に欠損させた変異株を取得した。興味深いことに、コレステロール欠損株は細胞質分裂に顕著な異常が見られ、エルゴステロール/植物ステロール欠損株は破裂を伴う自発的な細胞死が引き起こされることが分かった。この結果は、特定のステロールには、構造が異なる他種のステロールでは補完できない独自の生命機能が備わっていることを強く示唆する。では、その「ステロールの構造に依存した独自の生命機能」とは一体何か？これが本研究の核心をなす学術的問いである。

2. 研究の目的

目的：特定のステロールを欠損することで引き起こされる、細胞質分裂の異常や細胞死の分子機構の解明を通じて、ステロールの構造的な違いがもたらす生命機能に迫ることが本研究の目的である。研究対象生物としてラビリンチュラ類に着目した点が最大の独自性であるが、その利点を述べたい。哺乳類細胞や出芽酵母のステロール合成経路には分岐点がなく、経路の遮断は必然的に前駆体の蓄積を招く。つまり、目的ステロールを消失させたとしても、前駆体の蓄積の影響を無視できず、機能追究の妨げとなる。一

ラビリンチュラ類は全ての種類のステロールを合成することが可能

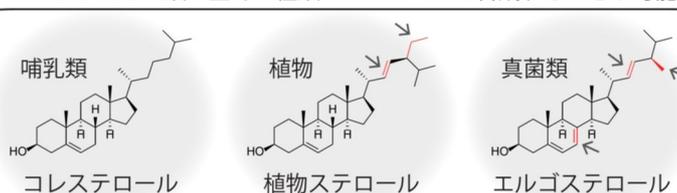


図 1. ステロールの構造多様性 (矢印はコレステロールとの相違点)

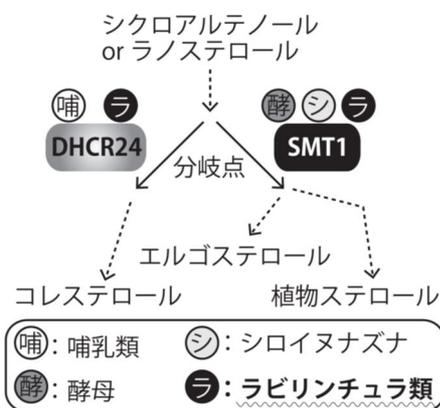


図 2. ステロールの合成経路

方、ラビリンチュラ類のステロール合成経路には分岐点があり(図 2)、一方を遮断しても別経路へとバイパスされるため、前駆体の蓄積が回避されると同時に、特定のステロールを選択的に欠損することが可能である。また、多様なステロールを合成する基盤を備えるラビリンチュラ類だからこそ、経路改変によりステロール組成が異なる変異株を作出し、それぞれの株で得られるデータを比較解析することができる。これにより、ステロールの構造と機能の関連性を浮き彫りにすることが可能となる。

目的 : ステロールは構造に応じて化成品やサプリメント、RNA ワクチンなどの脂質ナノパーティクルの原料、養殖飼料など、広範囲に利用される有用脂質でもある。本研究に至るまでに、生存・増殖への影響はあるものの、ステロール構造を規定する分岐点と同定できていたことから、特定のステロールを選択的に生産する方法への応用も視野に入れていた。真核生物において、ステロールはステロールエステル(SE)という脂肪酸と結合した状態で油滴に蓄積される。つまり、ラビリンチュラ類でステロールを高生産するためには、この生物においてステロールをSEに変換する酵素の同定とその機能向上によるSEの増加、ステロール生産ポテンシャルの向上が求められる。しかし、ここで一つの問題があった。哺乳類や酵母で報告される既知のSE合成酵素はラビリンチュラ類のゲノム上には保存されておらず、この生物のSE合成経路は全く不明であった。そこで、本研究ではステロールをSEにする未知酵素の同定とその機能解析、ステロール高生産への機能改変も試みることも並行した。

3. 研究の方法

ラビリンチュラ類としてはその代表株である *Aurantiochytrium limacinum* を用い、各種遺伝子改変を行った。細胞質分裂異常の原因を明らかにするため、アクチン結合ペプチドである Lifeact を付与した GFP と、ステロールのプローブである D4H を付与した mCherry を DHCR24 欠損株に発現させ、分裂期に特異的な局在を示すアクチンとステロールが正常な局在を示すかを観察した。SMT1 欠損株に特異的な現象である細胞死の原因を探索するため、RNA-seq 解析を行った。脂質ラジカルのプローブである LipiRADICAL Green を用いて細胞内脂質酸化ストレスを測定し、その局在を観察した。細胞内の遊離二価鉄と特異的に結合し赤色蛍光を発する試薬 FerroOrange を用いて、SMT1 欠損株における遊離二価鉄の検出を行った。これらの蛍光試薬への感受性は、フローサイトメトリーで解析した。また、SE合成酵素の候補として、従来はジアシルグリセロール(DG)からトリアシルグリセロール(TG)を合成する酵素である DGAT の4つのホモログを見出し、その欠損株を作製した。また、その候補遺伝子を出芽酵母に異種発現させ、遺伝子産物の機能解析を行った。候補遺伝子産物の局在解析を行い、反応の場を探った。SE合成酵素として機能するための構造を明らかにするために、N末端側から膜貫通領域を指標として段階的に削除した変異酵素発現コンストラクトを作製し、その局在とSE合成活性を評価した。

4. 研究成果

動物型のコレステロールを欠損した DHCR24 欠損株は、野生株と比べて増殖能が低下し、細胞の肥大化が起こる。タイムラプス解析において細胞分裂に異常が生じており、分裂の頻度も減少していることが明らかになった。細胞分裂の異常に伴い、核相も複数になっている様子が観察されたことから、核分裂は正常であり、細胞質の分裂が正常に行われていないことが示唆された。分裂期の細胞では、F-アクチンやミオシンII、その他タンパク質で構成さ

れる収縮環が、アクチン収縮により進入する。Lifeact を付与した GFP を野生株と DHCR24 欠損株に発現させ、細胞分裂中における F-アクチンの局在を観察した結果、野生株では分裂期に分裂面に Lifeact-GFP が集まっている様子が観察されたが、DHCR24 欠損株では細胞質に全体的に広がるような像が得られ、分裂面に局在している様子は観察されなかった。分裂期ではない細胞でも DHCR24 欠損株では F-アクチンの明確な局在が観察されなかった。一方、細胞質分裂の異常が高頻度で生じる DHCR24 欠損株では、F-アクチンが野生株のように分裂溝に局在する様子は見られなかったが、分裂溝は形成されていた。このことから、コレステロールを欠損した DHCR24 欠損株では F-アクチンと微小管の再編成から娘細胞が分離するフェーズに問題が生じていることが予想される。一方、D4H-mCherry を用いて標識した細胞膜内葉のステロールの局在は、DHCR24 欠損株と野生株で違いがみられなかったことから、DHCR24 欠損株でみられる F-アクチンの局在異常は細胞膜上のステロールの量的な影響よりも、質的变化に起因することが示唆される。特定構造のステロールがアクチン局在を制御する機構の解明には至っておらず、今後の課題である。

植物型の $\Delta 7$ -スティグマステロールと真菌型のエルゴステロールを欠損した SMT1 欠損株では増殖能が著しく低下する。タイムラプス解析により、SMT1 欠損株においてのみ破裂を伴う細胞死が観察された。RNA-seq 解析の結果、SMT1 欠損株においてフェロトシス抑制タンパク質 1 (FSP1) の mRNA 発現量の増加が認められた。フェロトシスは、鉄依存的な過酸化脂質の蓄積により引き起こされる制御された細胞死のひとつであり、FSP1 は還元型ユビキノンを生成することにより脂質過酸化およびフェロトシスを抑制するタンパク質である。このことから、SMT1 欠損株の細胞死は過酸化脂質の蓄積が原因で生じることが示唆された。実際に検証すると、SMT1 欠損株において、脂質ラジカルに結合する蛍光試薬である LipiRADICAL Green の添加により脂質ラジカルの増加が観察され、鉄イオンを検出する試薬である FerroOrange の添加によって二価の鉄イオンの増加が観察された。野生株や DHCR24 欠損株では脂質ラジカルや二価の鉄イオンはほとんど検出されなかった。これらのことから、SMT1 欠損株では、植物型・真菌型のステロールの欠損により、膜上の鉄輸送タンパク質が活性化される等の変化が起こり、過剰な鉄の流入が起こることで脂質ラジカルの生成およびラジカル連鎖反応が発生していることが示唆された。

フェロトシスの抑制には主要な 2 つの経路がある。一つは FSP1 による還元型ユビキノンを介した抗酸化システムであり、もう一つは GPx4 による還元型グルタチオンを介した抗酸化システムである。SMT1 欠損株で FSP1 の発現の上昇が見られ、*A. limacinum* の抗酸化システムにおける FSP1 の重要性が示唆されたが、もう一つの主要抗酸化システムの働きについてはよくわかっていなかった。そこで、*A. limacinum* に存在する GPx4 のひとつである Protein ID : 47702 の遺伝子を KO し、増殖能の低下や酸化ストレスの増加が見られるか調べた。結果、増殖特性に変化はなかったが、LipiRADICAL Green による脂質ラジカル由来の緑色蛍光が顕微鏡で観察された。観察された緑色蛍光は SMT1 欠損株で観察されたものと比較して弱かった。このことから、*A. limacinum* の GPx4 は確かに細胞内の酸化ストレス制御に関与しているが、GPx4 の欠損により発生した脂質酸化ストレスを抑制できる抗酸化機構が存在することが示された。一方で、SMT1 欠損株には GPx4 と FSP1 の両方が存在するが、脂質ラジカルが多量に検出される。*A. limacinum* における $\Delta 7$ -スティグマステロール・エルゴステロールの欠損と、酸化脂質や細胞内の抗酸化機構との関係について、最終年度にその答えとなりえる、第 3 の過酸化脂質対抗機構についての重要な論文が Nature とその姉妹誌に立て続けに掲載された(Freitas. *Nature* 2024, Li. *Nature* 2024, Yamada. *Nat Commun*

2024)。SMT1 欠損株で欠失する Δ 7-スティグマステロール・エルゴステロールにはその B 環構造に 2 つの 2 重結合をもつ (図 1 のエルゴステロール参照)。哺乳類において、コレステロールは 7-デヒドロコレステロール(7-DHC)が DHCR7 により還元されることで生成する。フェロトーシスの耐性を指標とした CRISPR スクリーニングにより、DHCR7 を欠損する細胞、すなわち 7-DHC をもつ細胞はフェロトーシスを抑制することが示された。その機序として、7-DHC がラジカルを捕捉することで、リン脂質の過酸化を抑制する、ということが報告された。ここで重要なのが 7-DHC の構造である。7-DHC も Δ 7-スティグマステロール・エルゴステロールと同様の B 環構造をもち、それこそがラジカル捕捉に重要であった。つまり、SMT1 欠損株で細胞死が起こる理由として、ラジカル捕捉能をもつステロールが欠失することが何よりの要因であると考えられる。自らの手でこのような発見、論文発表をできれば良かったと悔いが残るが、本研究目的である機序の理解、そして脂質過酸化に対する防御機構の進化的な関係性を知れたという意味では 7-DHC に関する報告は大変参考になった。

A. *limacinum* のドラフトゲノムより、TG 合成酵素である Diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) と相同性を示す 4 つのホモログ遺伝子 (DGAT2A, B, C, D) を見出し、それらの機能解析を行う過程で、DGAT2C が DG ではなくステロールを基質とし、ステロールエステル (SE) を合成する機能をもつことを明らかにした。一方、DGAT2D は DGAT2 の本来の反応産物である TG を合成する活性を有していた。これらの酵素遺伝子に蛍光タンパク質を融合させ、その局在を解析した結果、DGAT2D は油滴に、DGAT2C は ER と思われるオルガネラに局在することが分かった。DGAT2D と DGAT2C は反応産物も局在も異なることが示されたことから、これらの違いを生み出す分子基盤の解明を試みた。両者の一次構造を比較すると、DGAT2C の N 末端には DGAT2D にはみられない 13 回の推定膜貫通領域を含む配列が存在することが分かった。トポロジーを考慮し、推定膜貫通領域を 2 か所ずつ削除したコンストラクトを作製し、DGAT2C 欠損株に導入することで DGAT2C の N 末端の構造が SE 合成活性や局在に及ぼす影響を評価した。その結果、N 末端の推定膜貫通領域の 1 番目から 8 番目までを大幅に削除した DGAT2C (TM1-8 DGAT2C) においても SE 合成活性を有すること、また完全長の DGAT2C と同様に ER に局在することを見出した。一方、9 番目と 10 番目の推定膜貫通領域までを削除した DGAT2C (Δ TM1-10 DGAT2C) は SE 合成能を喪失し、ER に局在しなくなることが分かった。これらの結果より、DGAT2C は ER において SE 合成を行うこと、そしてその局在と酵素活性には 9 番目と 10 番目の推定膜貫通領域が必須であることが示された。また、予想外の結果として、活性が残存する TM1-8 DGAT2C を発現する変異株は、完全長の DGAT2C を発現する株と比較して SE 合成能が大幅に上昇することを見出した (Ishibashi Y (責任著者), et al, *Appl Environ Microbiol* 89, e0100123 (2023))。一方、何故この変異型酵素が高い SE 合成能をもつのか、その原因はまだよく分かっていない。一つの理由としては、安定的に高発現することが挙げられるが、必ずしも SE 合成能と発現量が一致するわけではないことから、別の要因も考えられる。ラビリンチュラはステロールの機能やフェロトーシスを研究する上で、貴重な微生物モデルとなることを本研究では明らかにした。そして何より、この微生物は有用な脂質を高生産するため、産業利用も大いに期待できる。何故 SE 量が高まるのか、この原因を解明するその先に、SE だけでなく他の有用脂質の生産性を向上させる新しい戦略構築に繋がる機構の発見が待つことを期待し、新たに研究課題を提案 (24K08702) するに至った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishibashi Yohei, Sadamitsu Shohei, Fukahori Yoshitomo, Yamamoto Yuki, Tanogashira Rin, Watanabe Takashi, Hayashi Masahiro, Ito Makoto, Okino Nozomu	4. 巻 89
2. 論文標題 Characterization of thraustochytrid-specific sterol-O-acyltransferase: modification of DGAT2-like enzyme to increase the sterol production in Aurantiochytrium limacinum mh0186	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e0100123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/aem.01001-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 舞, 石橋 洋平, 西田 裕貴, 林 雅弘, 伊東 信, 沖野 望
2. 発表標題 ラビリンチュラ類におけるステロール組成の変化に応じた細胞死および細胞分裂の制御機構の解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島 碧海, 石橋 洋平, 沖野 望
2. 発表標題 ラビリンチュラ類に特有の油滴タンパク質と相互作用する因子の探索と機能解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石橋 洋平, 定光 翔平, 深堀 義朝, 伊東 信, 沖野 望
2. 発表標題 DGATファミリーに属する新規ステロールエステル合成酵素の構造と機能の解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石橋洋平, 山口 舞, 定光翔平, 西田裕貴, 深堀義朝, 林 雅弘, 伊東 信, 沖野 望
2. 発表標題 ラビリンチュラ類におけるステロールの機能と代謝機構
3. 学会等名 第7回ラビリンチュラシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口 舞, 石橋 洋平, 西田 裕貴, 林 雅弘, 伊東 信, 沖野 望
2. 発表標題 ラビリンチュラ類におけるステロールの構造と機能に関する研究
3. 学会等名 マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋 洋平, 山口 舞, 西田 裕貴, 林 雅弘, 伊東 信, 沖野 望
2. 発表標題 ラビリンチュラ類のステロール多様性を生み出す分子基盤とその機能的意義の解明
3. 学会等名 第65回日本脂質生化学会
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------