

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580104

研究課題名(和文) 酵母の脂質リモデリングによる生体膜インテグリティの維持機構の解析とその応用

研究課題名(英文) Maintenance of membrane integrity by phospholipid remodeling in yeast

研究代表者

福田 良一 (Fukuda, Ryouichi)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：50323481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：リン脂質のリモデリングは、生体膜中のリン脂質分子種の多様性の獲得や生体膜の恒常性の維持に寄与するが、その機構は未解明である。本研究では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、リン脂質ホスファチジルコリン(PC)とホスファチジルエタノールアミン(PE)のリモデリングの分子機構の解析を行った。酵母のPC合成欠損株と短鎖アシル鎖を持つPCを用いて、アシル鎖のリモデリングを解析する系を構築した。さらに、PCおよびPEのsn-1位へのアシル鎖の導入を解析するためのアナログを合成してその機構の解析を行い、これらアナログのsn-1位にアシル鎖を導入するアシル転移酵素を同定した。

研究成果の概要(英文)：The remodeling of phospholipids contributes to the generation of the diversity of phospholipid species and to the maintenance of membrane homeostasis. In this study, the molecular mechanisms of the remodeling of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* were analyzed. We constructed a system to evaluate the acyl chain remodeling of PC using a yeast mutant defective in PC synthesis and PC containing short acyl chains. In addition, systems to specifically analyze the introduction of acyl residues at sn-1 positions of PC and PE using newly synthesized analogs *in vivo* and *in vitro* were constructed. Acyltransferases that introduce acyl residues at sn-1 positions of these analogs were identified.

研究分野：微生物学

キーワード：酵母 ホスファチジルコリン ホスファチジルエタノールアミン リモデリング

1. 研究開始当初の背景

真核生物の生体膜は、親水性頭部と疎水性アシル鎖の構造が異なる多様なリン脂質分子種により構成される。リン脂質アシル鎖を交換するリモデリングは、リン脂質分子種の多様性の獲得に寄与すると考えられている。また、高温、低温、酸化ストレスなどのストレス下では膜の流動性の変化やリン脂質アシル鎖の酸化など生体膜への負荷が発生するが、このような生体膜ストレスに対して生物は、脂質組成やリン脂質アシル鎖組成の改変、異常アシル鎖の除去修復などを行い、生体膜としての完全性・恒常性(生体膜インテグリティ)の維持を図ると考えられる。真核生物において、生体膜インテグリティの維持には、各脂質分子の合成の制御だけでなく、合成した脂質分子のリモデリングが重要であるとされているが、その具体的な機構や制御、実際の生理的意義は未解明である。

1950年代にWilliam Landsにより、生合成されたリン脂質のアシル鎖がホスホリパーゼによる脱アシル化とアシルトランスフェラーゼによるアシル鎖の導入という代謝回転(リモデリング)を受けることが提唱され、ランズ回路と命名された。その機構は長く不明であったが、2007年に複数のグループにより酵母のMembrane Bound O-Acyltransferase (MBOAT)ファミリーに属するアシルトランスフェラーゼ Ale1p が同定されたこと(Tamakiら *J. Biol. Chem.* **282** 34288 (2007)、他)を皮切りに、様々な真核生物でMBOATファミリー酵素が続々と同定され、リン脂質のアシル鎖のリモデリングの過程で *sn*-2位へのアシル鎖の導入に関わることが報告された。一方、*sn*-1位へのアシル鎖の導入については、線虫および酵母においてホスファチジルイノシトール(PI)のアシル鎖のリモデリングに関わる酵素が同定された(Imaeら *Mol. Biol. Cell.* **21** 3114 (2010)、他)のみで、他のリン脂質種については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、真核生物の主要かつ生育に必須のリン脂質であるホスファチジルコリン(PC)およびホスファチジルエタノールアミン(PE)のリモデリングの機構とその意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子操作

Molecular Cloning等の方法およびキット等の説明書に従った。

(2) 使用菌株

大腸菌はDH5 α 株を用いた。酵母は、W3031A株(*MATa his3 leu2 trp1 ade2 ura3*)またはMHY501株(*MAT α his3- Δ 200 leu2-3 I12 ura3-52 lys2-801 trp1-1*)を遺伝的背景とする菌株を用いた。

(3) 脂質解析

脂質抽出はBligh and Dyerの方法に従って行った。またリン脂質の質量分析には、主にエレクトロスプレーイオン化(ESI)法によるイオン源と三連四重極型の質量分析部を持つAPI3000 triple quadrupole instrument (Applied Biosystem)を用いた。リン脂質は0.4%ギ酸アンモニウムを含むアセトニトリル-メタノール-水(4:4:1)に溶解し、直接イオン源に注入した。イオンスプレーの電圧は、ポジティブスキャンの場合には5.0 kVに、ネガティブスキャンの場合には-3.8 kVに設定した。MS/MSによる測定には衝突ガスとして窒素ガスを使用し、衝突エネルギーは25~60 Vdcにした。測定は、100~200 スキャンを積算した。

4. 研究成果

(1) PCのアシル鎖のリモデリングを解析するための系の構築と解析

酵母のPC合成に関わるPEメチル化酵素をコードする遺伝子 *PEM1* および *PEM2* を破壊し、ケネディ経路でのPC合成に必須なCTP:ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ遺伝子 *PCT1* を *GAL1* プロモーター支配下においた株を、異なる遺伝的背景を持つW3031A株およびMHY501株を親株として作製した。得られたKSY02株およびPCY12G株は、ガラクトース培地で *PCT1* の発現を誘導した場合には培地にコリンを添加するとそれを利用してPCを合成して生育できたが、グルコース培地で培養することにより *PCT1* の発現を抑制すると生育できなかった。しかし、そこに炭素鎖長8の短鎖アシル鎖を持つdioctanoyl-PC (diC8PC)を添加するとその生育が支持された。安定同位体で親水性頭部を標識したdiC8PCを有機合成し、KSY02株に取り込ませて、その代謝を質量分析装置で解析したところ、*sn*-1位と*sn*-2位の両方のアシル鎖が炭素数16または18のアシル鎖に置換されたPC分子種が検出された。さらに、*in vitro* で酵母細胞抽出液を安定同位体標識したdiC8PCおよびpalmitoleoyl-CoAとインキュベートしたところ、2つのアシル鎖が16:1のアシル鎖に置換された分子種が検出された。以

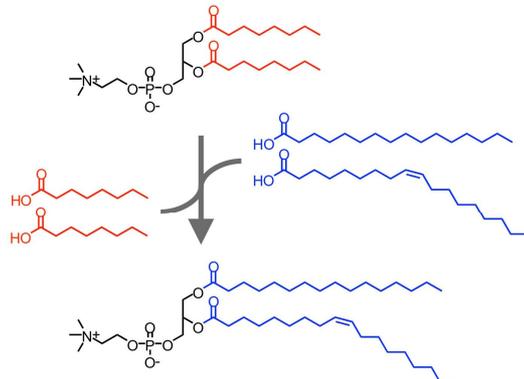


図1 短鎖アシル鎖を持つPCのリモデリング

上の結果から、短鎖アシル鎖を持つ PC は、正常な長さのアシル鎖を持つ PC にリモデリングされ利用されていることが示唆された (図 1)。

(2) PC の *sn*-1 位のアシル鎖のリモデリング

研究代表者のこれまでの diC8PC を用いたリモデリングの解析において、リモデリングの中間体として、diC8PC の *sn*-1 位のアシル鎖のみが 16 または 18 の炭素数のアシル鎖に置換された分子種と、*sn*-2 位のアシル鎖のみが置換された分子種が検出された。このことから、PC のアシル鎖のリモデリングには、*sn*-2 位のアシル鎖をリモデリングする機構だけでなく、*sn*-1 位のアシル鎖をリモデリングする機構も存在することが示唆された。

リン脂質アシル鎖のリモデリングには、ホスホリパーゼ活性によりアシル鎖を除去する過程とアシルトランスフェラーゼ活性によりアシル鎖を導入する過程が関わると考えられる。これまで、リン脂質の *sn*-1 位のアシル鎖のリモデリングの解析が遅れている理由の 1 つとして、リン脂質の *sn*-1 位のアシル鎖がホスホリパーゼ A1 活性により除去されて生成する 2-アシルリゾリン脂質は不安定であり、*sn*-2 位のアシル鎖が *sn*-1 位に分子内転移してしまうために、*sn*-1 位へのアシル鎖の導入活性を厳密に評価することが困難であることが挙げられる。

そこで、PC の *sn*-1 位へのアシル鎖の導入を評価するためのリゾ PC アナログを合成した。PCY12G において、グルコース培地で PC 合成を抑制した条件下で本リゾ PC アナログを与えたところ、その生育が支持された。また、質量分析装置を用いてその代謝を解析したところ、本リゾ PC アナログの *sn*-1 位に主に炭素鎖長 16 または 18 のアシル鎖が導入された分子種が検出された。さらに、酵母細胞抽出液と本リゾ PC アナログを *in vitro* でインキュベートしたところ、*sn*-1 位にアシル鎖が導入された分子種が検出された。以上の結果から、本リゾ PC アナログを利用することにより、PC の *sn*-1 位へのアシル鎖の導入機構を解析できると期待された。

そこで、酵母においてアシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子とアシルトランスフェラーゼをコードする可能性のある遺伝子の合計 54 の遺伝子の破壊株から細胞抽出液を調製し、*in vitro* での本リゾ PC アナログへのアシル転移活性を解析した。その結果、本リゾ PC アナログに対するアシル転移活性が低下した遺伝子破壊株を一株見出した。この遺伝子破壊株に本アシルトランスフェラーゼ遺伝子を低コピー型ベクターで導入した株の細胞抽出液では *in vitro* で本リゾ PC アナログの *sn*-1 位へのアシル転移活性が野生型株と同程度まで回復し、さらに本アシルトランスフェラーゼ遺伝子を多コピー型プラスミドで高発現した株の細胞抽出液では本 PC アナログへの *in vitro* でのアシル転移活性

が増加した。PCY12G 株において本アシルトランスフェラーゼ遺伝子を破壊した株では、PC の合成を抑制した条件下で、リゾ PC アナログ存在下での生育が低下したのに対して、低コピープラスミドで本アシルトランスフェラーゼ遺伝子を導入すると生育は回復した。また、本アシルトランスフェラーゼ遺伝子破壊株にリゾ PC アナログを取り込ませてその代謝を質量分析装置を用いて解析したところ、*sn*-1 位にアシル鎖が導入された分子種の量が低下した。以上の結果から、本アシルトランスフェラーゼがリゾ PC アナログの *sn*-1 位へのアシル転移に関わることが示唆され、本アシルトランスフェラーゼが PC の *sn*-1 位のアシル鎖のリモデリングに関わる可能性が示唆された。

(3) PE の *sn*-1 位のアシル鎖のリモデリング

PE の *sn*-1 位へのアシル鎖の導入機構を解析するためのリゾ PE アナログを、(2)と同様に合成した。

酵母において、ホスファチジルセリン (PS) の脱炭酸に関わる *PSD1* および *PSD2* を破壊し、ケネディ経路での PE 合成に必須の CTP: ホスホエタノールアミンシチジルルトランスフェラーゼをコードする *ECT1* を *GAL1* プロモーター支配下においた TKY12Ga 株は、ガラクトースを炭素源とした培地では *ECT1* の発現が発現するため培地にエタノールアミンを添加すると生育できるが、グルコース培地では PE 合成が抑制されるため生育できない (Deng ら *Biochim. Biophys. Acta.* **1801** 635 (2010))。しかし、そこに本リゾ PE アナログを添加したところ、その生育が支持された。本リゾ PE アナログを TKY12Ga 株に取り込ませ、その代謝を質量分析装置により解析したところ、本リゾ PE アナログの *sn*-1 位にアシル鎖が導入された分子種が検出された。また、本リゾ PE アナログを酵母細胞抽出液とインキュベートしたところ、*sn*-1 位にアシル鎖が導入された分子種が検出された。以上の結果から、本リゾ PE アナログを用いることにより、PE の *sn*-1 位へのアシル鎖の導入機構の解析が可能になると期待された。

本リゾ PE アナログへの *in vitro* でのアシル転移活性が低下した遺伝子破壊株を探索し、一株見出した。TKY12Ga 株において本遺伝子を破壊した株にリゾ PE アナログを取り込ませ、その代謝を質量分析装置により解析したところ、*sn*-1 位へアシル鎖が導入された分子種の量が低下した。これらの結果から、本遺伝子が PE の *sn*-1 位へのアシル鎖の導入に関わる可能性が示唆された。

(4) 小胞体における PE のメチル化による PC への変換の意義

酵母において、PE は小胞体膜上の PE メチルトランスフェラーゼ Pem1p および Pem2p により頭部がメチル化されて PC に変換される。この反応が小胞体上で行われることの意

義を探るため、*PEM1* および *PEM2* を破壊した株において、酢酸菌 *Acetobacter aceti* 由来の PE メチルトランスフェラーゼに酵母のミトコンドリアタンパク質である Pet100p のミトコンドリア移行シグナルおよび内膜貫通領域と 3xHA エピトープタグを付加した融合タンパク質 mitopmt を発現させることにより、PE メチル化反応が小胞体ではなくミトコンドリアで行われる株の作製を試みた。間接蛍光抗体法および細胞抽出液の分画により mitopmt がミトコンドリアに局在することを確認した。*PEM1*、*PEM2* の二重破壊株において mitopmt を発現させたところ、コリン非存在下でも PC が合成され、生育が回復した。さらに上記 PCY12G 株において PC 合成を完全に抑制した場合にも mitopmt を発現させることにより、PC の合成と生育の回復が観察された。これらの結果から、この株において PE はミトコンドリアで PC に変換され、それが他のオルガネラで利用されていること、酵母にはミトコンドリアから他のオルガネラへ PC を輸送する機構が存在することが示唆された。また、酵母は PC 合成の場の改変に対して対応できる頑強性を持つことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

S. Kobayashi, A. Mizuike, H. Horiuchi, R. Fukuda, and A. Ohta. Mitochondrially-targeted bacterial phosphatidylethanolamine methyltransferase sustained phosphatidylcholine synthesis of a *Saccharomyces cerevisiae* $\Delta pem1 \Delta pem2$ double mutant without exogenous choline supply. *Biochim. Biophys. Acta* **1841** 1264–1271 (2014) 査読有り

H. Kishino, H. Eguchi, K. Takagi, H. Horiuchi, R. Fukuda, and A. Ohta. Acyl-chain remodeling of dioctanoyl-phosphatidylcholine in *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in *de novo* and salvage phosphatidylcholine synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **445** 289-293 (2014) 査読有り

[学会発表](計 5 件)

水池彩、小林新吾、太田明德、福田良一、出芽酵母におけるホスファチジルエタノールアミンのオルガネラ間輸送に関する研究、酵母遺伝学フォーラム、2014 年 9 月 1 日、東京

小林新吾、水池彩、福田良一、堀内裕之、太田明德、ホスファチジルエタノールア

ミンの細胞内輸送に関する因子の出芽酵母を用いた解析、日本農芸化学会、2013 年 3 月 27 日、仙台

高城景子、岩本邦彦、小林新吾、堀内裕之、福田良一、太田明德、酵母におけるホスファチジルエタノールアミンの動態への GARP complex の関わり、日本農芸化学会、2012 年 3 月 24 日、京都

小林新吾、福田良一、太田明德、ホスファチジルエタノールアミンの細胞内輸送に関する出芽酵母を用いた解析、日本農芸化学会、2012 年 3 月 24 日、京都

小林新吾、福田良一、太田明德、ホスファチジルエタノールアミンのオルガネラ間輸送機構の解析、酵母遺伝学フォーラム、2011 年 9 月 7 日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田良一 (FUKUDA, Ryouichi)
東京大学大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：50323481