

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450127

研究課題名(和文) 出芽酵母を用いたスフィンゴ脂質の代謝制御メカニズムと構造機能相関の解明

研究課題名(英文) Study on mechanisms of metabolic regulation and structure-function relationship of sphingolipids in budding yeast

研究代表者

谷 元洋 (Tani, Motohiro)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：20452740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、出芽酵母における複合スフィンゴ脂質の構造多様性と多彩な生物機能の関連性を明らかにすることを目指した。その結果、複合スフィンゴ脂質のサブタイプの一つであるMIPCが細胞壁機能維持に重要であること、スフィンゴ脂質の総量の制御をすることで植物病原菌毒素やエンドサイトーシス機能不全に対する抵抗性を付与できること、複合スフィンゴ脂質の組成パターンが変化することで細胞内pHホメオスタシス崩壊下における細胞機能不全を補填できること、等を明らかにした。これらの成果は、複合スフィンゴ脂質の適正な量と質(構造多様性)が多彩な細胞機能維持に重要である、という理解に繋がった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to understand the relationship between structural diversity and biological function of complex sphingolipids in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Results of the research was the followings: (1) it was found that MIPC, one of the subtypes of complex sphingolipid in yeast, is important for maintenance of functions of cell wall, (2) change in activity of serine palmitoyltransferase affects sensitivity to Syringomycin E, a toxin produced by the plant pathogenic bacterium, (3) downregulation of de novo sphingolipid biosynthesis rescues functional defects caused by deletion of RVS167 and RVS161 encoding the amphiphysin family proteins, (4) deletion of vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) causes dramatic alteration of complex sphingolipid composition, and it was suggested that the alteration is an adaptation mechanism for defect of intracellular pH homeostasis.

研究分野：脂質生化学

キーワード：スフィンゴ脂質 複合スフィンゴ脂質 セラミド 出芽酵母 ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

生体膜の一構成成分であるスフィンゴ脂質は真核生物の生育に必須である。スフィンゴ脂質は、長鎖塩基と脂肪酸で構成されたセラミドを骨格とし、親水性頭部を持つ構造を複合スフィンゴ脂質と呼ぶ。複合スフィンゴ脂質は主に形質膜の表層に分布し、マイクロドメインという領域を形成して膜タンパク質の活性や局在を制御し、ストレス応答、物質輸送等において重要な役割を担う。複合スフィンゴ脂質は、例えば哺乳動物だと千種類以上の様々な構造バリエーションが存在する。また、複合スフィンゴ脂質の組成パターンは、細胞単位あるいはオルガネラ単位で厳密に調節維持されている。このような構造多様性と組成パターンの調節維持機構(代謝制御)は、複合スフィンゴ脂質が多彩な生物機能を発揮するための重要な分子基盤であると考えられている。そのため複合スフィンゴ脂質の構造機能相関及び代謝制御機構の解明は、非常に重要な課題である。

2. 研究の目的

出芽酵母の複合スフィンゴ脂質の構造は15種類に分類され、哺乳動物と比較すると非常にシンプルである。また分子遺伝学的アプローチが容易であり、複合スフィンゴ脂質の構造と機能の相関を調べる上で、多くの利点がある。そこで本研究では、出芽酵母をモデル生物として用いて、複合スフィンゴ脂質の代謝制御機構及び構造機能相関を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MIPC 生合成酵素遺伝子との多重欠損で合成致死となる遺伝子の探索

複合スフィンゴ脂質サブタイプMIPCの生合成の消失下において生育できなくなる遺伝子変異を探索するために、Synthetic Genetic Array (Tong, A.H., and Boone, C. (2006)

Methods Mol Biol. 313: 171-192.) の手法を用いて、酵母遺伝子ノックアウトライブラリーの全株とMIPC生合成欠損株の変異の網羅的なかけあわせをおこない、生育評価をおこなった。

(2) テトラサイクリン誘導発現抑制株の作製と解析

染色体上の標的遺伝子上流にテトラサイクリン調節プロモーターを組み込み、ドキシサイクリン処理で標的遺伝子の転写抑制を誘導可能な変異株を作製し、解析に用いた。それぞれの遺伝子の発現抑制は、10 μ g/ml のドキシサイクリンを含む培地で行った。

4. 研究成果

(1) 植物病原菌毒素 Syringomycin E に対する抵抗性を付与する新たな遺伝子変異

植物病原菌毒素 Syringomycin E は、酵母の細胞表面の複合スフィンゴ脂質を認識し、細

胞膜にイオンチャネルを形成することで毒性を発揮する。本研究では、Syringomycin E に対して抵抗性を付与する新たな遺伝子変異の探索をおこなった。その結果、スフィンゴ脂質生合成の最初の段階を触媒するセリンパルミトイル転移酵素の負の調節因子をコードする遺伝子 *ORM1*, *ORM2* の欠損によって、Syringomycin E 抵抗性となることを新たに見出した。*ORM1* 及び *ORM2* が欠損すると、スフィンゴ脂質の総量が増大し、逆に *ORM2* を過剰発現すると、スフィンゴ脂質総量が増大する。*ORM2* 過剰発現株では、欠損の場合とは逆に Syringomycin E に高感受性となることも確認された。さらに、セリンパルミトイル転移酵素遺伝子 (*LCB1*, *LCB2*) の過剰発現によって Syringomycin E に抵抗性となり、*LCB1* の発現抑制によって高感受性となることも確認された。以上の結果より、セリンパルミトイル転移酵素の活性の変化が Syringomycin E に対する毒性に大きく影響を与えることが示された (*FEMS Microbiol Lett.* 2014 ;358(1): 64-71)。

(2) 複合スフィンゴ脂質 MIPC による細胞壁機能維持

複合スフィンゴ脂質のサブタイプの一つである MIPC の生合成酵素遺伝子 (*CSG1*, *CSH1*) との多重欠損によって致死(合成致死)となる遺伝子を酵母遺伝子ノックアウトライブラリーから探索した。その結果、合計16個の合成致死遺伝子を見出した。この中には、主に細胞壁に存在するマンナン型糖鎖の生合成に関与する糖転移酵素遺伝子 (*MNN1*, *KTR6*) が含まれていた。そこでマンナン型糖鎖の糖転移酵素と MIPC 生合成酵素の遺伝学的相互作用を詳細に調べた結果、 α -1,2 結合のマンノース付加 (Mnn2 によって触媒) によって形成されるマンナン型糖鎖の枝分かれ構造が MIPC 生合成酵素欠損下において必須であることが示された。そこで、*MNN2* と *CSG1*, *CSH1* の遺伝学的相互作用をより詳しく解析するために、*MNN2* をドキシサイクリンで発現抑制可能な変異株を作製した (*tet-MNN2* 株)。*tet-MNN2 csg1 Δ csh1 Δ* 株は、細胞壁溶解酵素であるザイモリエースや SDS, カフェインに対して高感受性となり、細胞壁の機能低下が起きていることが示唆された。さらに、細胞壁機能不全により活性化されるストレス応答シグナル伝達系 (cell wall integrity pathway) が、*tet-MNN2 csg1 Δ csh1 Δ* 株において顕著に活性化されていることも確認された。これらの異常表現型は、MIPC 生合成欠損株 (*csg1 Δ csh1 Δ* 株) においても、程度は弱いものの、はっきりと観察された。以上の結果より、MIPC 生合成の欠損によって細胞壁の機能不全が引き起こされ、このような異常表現型はマンナン型糖鎖の合成不全が加わることで促進されることが示された (*Mol Microbiol.* 2015 ;95(4): 706-722)。

(3)液胞プロトン ATPase 欠損株における複合スフィンゴ脂質の組成変化とその生理学的意義

セラミドにイノシトールリン酸を付加して複合スフィンゴ脂質 IPC を合成する酵素 (Aur1) の阻害剤である Aureobasidin A (AbA) で酵母を処理すると強力な生育阻害が誘導される。我々はこれまでに低濃度の AbA に対して高感受性を示す酵母変異株のスクリーニングをおこない、そのなかで液胞プロトン ATPase (V-ATPase) の欠損株を見出していた。V-ATPase はサイトゾルから液胞にプロトンを輸送することで、細胞内の pH の調節において必須な役割を持ち、様々な生物機能の調節に関わる。本研究では、V-ATPase 欠損株のスフィンゴ脂質の組成パターンを詳細に解析した結果、複合スフィンゴ脂質の組成にダイナミックな変化が生じていることを見出した。具体的には、① IPC の減少と MIPC, M(IP)₂C の増大、② セラミドの長鎖塩基と脂肪酸部分の水酸化の減少、が観察された。特に MIPC の増大は V-ATPase 欠損株を中性条件 (pH 7.2) で培養することでより顕著に観察されるようになった。このような組成変化の生理的意義を調べるために、V-ATPase 欠損株において MIPC 及び M(IP)₂C 生合成を欠損、あるいはスフィンゴ脂質水酸化酵素を過剰発現させた。その結果、これらの変異株では V-ATPase の単独欠損株と比較して pH 7.2 における生育が著しく低下することが判明した。さらに、スフィンゴ脂質水酸化酵素を欠損させることで V-ATPase 欠損株の pH 7.2, 7.6 における生育速度が上昇することも確認された。以上の結果より、V-ATPase 欠損株において生じる複合スフィンゴ脂質の組成変化は、細胞内 pH ホメオスタシスの崩壊下における細胞の保護機構の一つであることが強く示唆された (*Microbiology* 2015 ;161: 2369-2383)。

(4)Amphiphysin ファミリータンパク質, Rvs167, Rvs161 欠損下におけるスフィンゴ脂質生合成のダウンレギュレーション

酵母 amphiphysin タンパク質 Rvs167, Rvs161 の欠損株は、エンドサイトーシス機能不全やアクチン細胞骨格形成における異常を示し、高温感受性、NaCl 高感受性を示す。過去の研究において、RVS167, RVS161 欠損株の異常表現型はスフィンゴ脂質代謝酵素の部分的な欠損によってレスキューされることが示されており、amphiphysin タンパク質とスフィンゴ脂質との間に機能的な相互関係があることが示唆されていた。本研究では、RVS167 及び RVS161 欠損株において、スフィンゴ脂質の総量が減少していることを新たに見出した。この減少は、Orm2 のカルシニューリン依存的な発現レベルの上昇に起因していることがわかった。RVS167 欠損株において、ORM1, ORM2 を発現抑制してスフィンゴ脂質量を強制的に増大させると、生育

が顕著に悪化した。一方で、セリンパルミトイル転移酵素の発現を抑制し、スフィンゴ脂質量をさらに低下させると、RVS167 欠損株の異常表現型が回復することもわかった。このようなスフィンゴ脂質量の調節による表現型の変化は、Rvs167, Rvs161 と協調的にエンドサイトーシスの制御をおこなうダイナミン様 GTPase, Vps1, の欠損株においても同様に観察された。以上の結果より RVS167, RVS161 欠損株における Orm2 によるスフィンゴ脂質量の低下は、エンドサイトーシス機能不全下における細胞の保護機構の一つであることが強く示唆された (*FEBS J.* 2016 ;283: 2911-2928)。

(5) 複合スフィンゴ脂質生合成破綻による生育阻害をレスキューする遺伝子変異の同定

複合スフィンゴ脂質は、細胞の生育に必須であり、その生合成系が破壊されると生育を維持できなくなる。本研究では、IPC 合成酵素 Aur1 のテトラサイクリン誘導発現抑制株 (*tet-AUR1* 株) の、ドキシサイクリン添加による生育阻害をレスキューできる遺伝子変異 (サプレッサー変異) を、トランスポゾンミュータジェネシスを用いてスクリーニングした。その結果、合計 9 個の遺伝子変異を同定した。この中には、ストレス応答シグナル伝達系のリプレッサー因子が含まれており、特定のストレス応答シグナル伝達系の活性化が、複合スフィンゴ脂質枯渇による細胞機能障害を補填していることが示唆された。

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 10 件)

1. *Tani M. Structure-function relationship of complex sphingolipids in yeast. *Trends Glycosci GlycTech.* 2016 ;28:E109-E116. 査読有 (*は corresponding author)
2. Toume M, and *Tani M. Yeast lacking the amphiphysin family protein Rvs167 is sensitive to disruptions in sphingolipid levels. *FEBS J.* 2016 ;283: 2911-2928. 査読有
3. Miyata N, Miyoshi T, Yamaguchi T, Nakazono T, Tani M., and *Kuge O. VID22 is required for transcriptional activation of the PSD2 gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae.* *Biochem J.* 2015 ; 472(3): 319-328. 査読有
4. *Tani M., and Toume M. Alteration of complex sphingolipid composition and its physiological significance in yeast *Saccharomyces cerevisiae* lacking vacuolar ATPase. *Microbiology* 2015 ;161: 2369-2383. 査読有
5. Sakakibara K, Eiyama A, Suzuki SW, Sakoh-Nakatogawa M, Okumura N, Tani M. Hashimoto A, Nagumo S, Kondo-Okamoto

- N, Kondo-Kakuta C, Asai E, Kirisako H, Nakatogawa H, Kuge O, Takao T, Ohsumi Y, and *Okamoto K. Functional link between Atg32-mediated mitophagy and phospholipid methylation. *EMBO J.* 2015 ;34(21): 2703-2719. 査読有
6. Ban-Ishihara R, Tomohiro-Takamiya S, Tani M, Baudier J, *Ishihara N, and *Kuge O. COX assembly factor ccde56 regulates mitochondrial morphology by affecting mitochondrial recruitment of Drp1. *FEBS Lett.* 2015 ;589(20): 3126-3132. 査読有
 7. Watanabe T, Tani M, Ishibashi Y, Endo I, Okino N, and *Ito M. Ergosteryl- β -glucosidase (Egh1) involved in sterylglucoside catabolism and vacuole formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology.* 2015 ;25(10):1079-1089. 査読有
 8. Morimoto Y, and *Tani M. Synthesis of mannosylinositol phosphorylceramides is involved in maintenance of cell integrity of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 2015 ;95(4): 706-722. 査読有
 9. *Uemura S, Shishido F, Tani M, Mochizuki T, Abe F, and Inokuchi J. Loss of hydroxyl groups from the ceramide moiety can modify the lateral diffusion of membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Lipid Res.* 2014 ;55: 1343-1356. 査読有
 10. Toume M, and Tani M. Change in activity of serine palmitoyltransferase affects sensitivity to syringomycin E in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* 2014 ;358(1): 64-71. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. 谷 元洋, 山口 雄太郎, 甲木 佑佳, 川口 諒太郎, スフィンゴ脂質生合成破綻下での生育維持に必要な酵母シグナル伝達系の解析, 第 8 9 回日本生化学会大会, 仙台、2016 年 9 月 27 日
2. 田中 聖也, 谷 元洋, 複合スフィンゴ脂質 MIPC とエルゴステロールの協調的作用による細胞壁機能維持, 酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会, 2016 年 9 月 10 日
3. 谷 元洋, 山口 雄太郎, 甲木 佑佳, 川口 諒太郎, スフィンゴ脂質生合成破綻による生育阻害を補完するストレス応答シグナルの解析, 酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会, 神戸 2016 年 9 月 10 日
4. 田中 聖也, 森元 雄士, 谷 元洋, 出芽酵母の複合スフィンゴ脂質 MIPC の cell integrity 維持における機能, 平成 28 年度 日本生化学会九州支部例会, 鹿児島、2016 年 5 月 15 日
5. Tani M, Morimoto Y, Tanaka S, Toume M, Physiological significance of biosynthesis of

mannosylinositol phosphorylceramide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, 2016 1st Korea-Japan Bioactive Lipid Joint Symposium, Korea, 2016.05.12.

6. Tani M, Multifunctional role of mannose-containing glycosphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. , Progress 100:Second International Symposium. Protein Trafficking and Intracellular Signaling of Plant and Fungal Cells, Fukuoka, 2016.02.09.
7. 山口 雄太郎, 谷 元洋, セラミド代謝異常が誘導する出芽酵母の生育阻害は、RH05 欠損によって抑制される, 第 88 回日本生化学会大会, 神戸、2015 年 12 月 1 日
8. 當銘 萌子, 谷 元洋, 出芽酵母の Amphiphysin 変異株におけるスフィンゴ脂質代謝変動の生理的意義, 第 88 回日本生化学会大会, 神戸、2015 年 12 月 1 日
9. 山口 雄太郎, 谷 元洋, セラミド代謝異常が誘導する生育阻害に対する抵抗性変異株の同定, 酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会, 広島、2015 年 8 月 31 日
10. 當銘 萌子, 谷 元洋, スフィンゴ脂質代謝変動による RVS167 欠損株の表現型の促進と抑制, 酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会, 広島、2015 年 8 月 31 日
11. 谷 元洋, 當銘 萌子, 出芽酵母の細胞内 pH ホメオスタシス崩壊下における複合スフィンゴ脂質の代謝変動, 東京、第 57 回日本脂質生化学会, 2015 年 5 月 29 日
12. 山口 雄太郎, 川口 諒太郎, 甲木 佑佳, 谷 元洋, 複合スフィンゴ脂質 IPC 合成酵素の発現抑制に対して抵抗性を示す出芽酵母トランスポン挿入変異株の探索と解析, 第 32 回 YEAST WORKSHOP, 広島、2014 年 11 月 14 日
13. 當銘 萌子, 谷 元洋, セリンパルミトイルトランスフェラーゼ活性が Syringomycin E 感受性に与える影響及び同酵素の翻訳後修飾に関する解析, 第 32 回 YEAST WORKSHOP, 広島 2014 年 11 月 14 日
14. 谷 元洋, 酵母液胞 ATPase 欠損下における複合スフィンゴ脂質の代謝変動とその生理的意義, 第 86 回日本生化学会大会, 京都、2014 年 10 月 16 日
15. 森元 雄士, 谷 元洋, 複合スフィンゴ脂質、MIPC の生合成は出芽酵母の細胞壁機能維持に関与する, 酵母遺伝学フォーラム第 47 回研究報告会, 東京、2014 年 9 月 1 日

[図書] (計 1 件)

1. *Tani M, and Ito M. Neutral ceramidase.

Encyclopedia of Signaling Molecules,
2nd Edition., in press.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 元洋 (TANI, Motohiro)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：20452740