

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07689

研究課題名(和文)オルガネラの健全性を支えるオートファジー・脂質代謝の分子機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of autophagy and lipid metabolism supporting soundness of organelles

研究代表者

奥 公秀 (Oku, Masahide)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：10511230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、オルガネラの健全性を維持するための分子機構を明らかにすることを主たる目的とした。特に、ミトコンドリア、脂肪滴の健全性(恒常性)維持の分子機構について、脂質代謝およびオートファジーに着目した解析を進めた。ミトコンドリア特有の脂質であるカルジオリピンの脂肪酸部分の組成を決定する要因として、タファジンと呼ばれる酵素が持つ基質特異性を明らかにした。オートファジー機能タンパク質であるAtg8が中性脂質分解(リポリシス)を抑制する働きをもつことを示した。さらに、ESCRTと呼ばれるタンパク質ファミリーに依存した、液胞膜の変形を伴うオートファジー(マイクロオートファジー)を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、カルジオリピンがいかにして不飽和脂肪酸鎖を多く含むリン脂質として合成されるのか、という問いについて、タファジンという、ヒトの疾患にも関与する酵素の基質特異性から答えを得られたことが大きな意義である。また、脂肪滴の量調節は細胞内の中性脂質量も左右する重要性をもつが、オートファジーに機能するタンパク質がこの量調節に機能するという発見は、哺乳類細胞にも共通するもので普遍的重要性を持つと考えられる。さらに、リソソーム(液胞)膜が直接変形して分解対象を取り込むマイクロオートファジーの新たな分子機構を提示することができたことは、オートファジーの多様性理解に大きく貢献したと考えている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was to elucidate the molecular mechanism underlying maintenance of organelles functionality. In particular, the mitochondrion emitting reactive-oxygen species (ROS) and the lipid droplet, a major storage site of neutral lipids, were chosen as the objects of the studies on the lipid dynamics and autophagy system. Through this project, the substrate specificity of a yeast enzyme termed tafazzin was revealed as a determinant of the composition of fatty acid moiety within the mitochondrial lipid, cardiolipin. As with the lipid droplet, the role of an autophagy-related protein, Atg8, was uncovered in counteracting degradation of neutral lipids through lipolysis. In addition, a new type of autophagy (microautophagy) was discovered that is dependent on the so-called ESCRT proteins.

研究分野：応用微生物学

キーワード：オートファジー カルジオリピン 脂肪滴 ペルオキシソーム ミクロオートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私たちの体を形成する細胞には、さまざまな細胞内小器官（オルガネラ）が含まれる。このオルガネラの健全性は、細胞ひいては個体の健全性を維持する基礎を担っている。これまでの研究から、傷ついたオルガネラを除去するシステムとして、ライソゾーム（液胞）と呼ばれる加水分解酵素を多く含むオルガネラに輸送して対象オルガネラを分解する、オートファジーと呼ばれる機構が重要であることが分かってきた。オートファジーによる様々なオルガネラ分解が報告される中でも、中性脂質を貯蔵するオルガネラである脂肪滴の分解や、ライソゾーム膜タンパク質自身の分解については、不明な点が多い。

オルガネラの中でも、代謝過程で活性酸素種（ROS）が発生するミトコンドリアの健全性を維持することは特に重要である。ミトコンドリアのグリセロリン脂質であるカルジオリピンは、合成の際にその脂肪酸部分が不飽和脂肪酸を含むものに置き換わることで適切な機能を果たし、ミトコンドリア健全性を支えていると考えられてきた。この脂肪酸部分の置き換えを行う酵素はタファジンと呼ばれ、酵母からヒトまで広く存在している。タファジンの変異がパーズ症候群と呼ばれる疾患の原因であることから、本酵素の生化学的解析は重要であるにもかかわらず進んでいないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究課題においては、ROSを生じるオルガネラ（ミトコンドリア、ペルオキシソーム）と中性脂質蓄積の場である脂肪滴の健全性を維持するための分子機構に関し、(1)オートファジーと(2)タファジンの解析を中心に明らかにすることを目的とした。また、オートファジーに関しては、ライソゾーム膜自身の分解を担うオートファジーの一種、ミクロオートファジーの分子機構の解明も目指した。

研究の対象として、オートファジー研究が最も進んでいるモデル生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と、メタノールを唯一の炭素源として生育可能なメタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) を用いた。*K. phaffii* は、メタノール資化に伴いペルオキシソームを顕著に発達させ、炭素源がメタノール以外に切り替わるとオートファジーにより速やかにペルオキシソームを分解することから、その分子メカニズムを解明するモデル生物として、本研究代表者らを含め世界で用いられてきた経緯がある。

3. 研究の方法

(1) オートファジーによる脂肪滴・液胞膜動態制御の分子メカニズム解明

酵母を実験対象とする研究では、オートファジーによるオルガネラ分解のモニター法として、適当なオルガネラ局在タンパク質を緑色蛍光タンパク質（GFP）と融合した形で発現させ、GFPに対する抗体を用いたイムノプロットにより、その分子量の推移を検出する方法が頻繁に用いられる。GFPは液胞内に輸送されても比較的安定に残存するが、オルガネラタンパク質部分は液胞内で速やかに分解するため、液胞内に輸送された GFP 融合タンパク質は、GFP 単体とほぼ同じサイズで検出される。このため、全長型（オルガネラタンパク質 + GFP）と GFP 単体様型の 2 つのタンパク質の量比をイムノプロットにより検出することで、発現オルガネラタンパク質のオートファジーによる分解活性を可視化できる。本申請研究においては、液胞膜及び脂肪滴に特異的に局在するタンパク質を GFP との融合タンパク質として発現させた。

脂肪滴の量を測定する方法として、BODIPY™ 493/503 で染色された脂肪滴の蛍光顕微鏡観察のほか、その主成分であるトリアシルグリセロール（TAG）量測定も行った。TAG 量の測定は、ガラスビーズを用いて破碎した酵母菌体から脂質を Bligh-Dyer 法により抽出し、薄層クロマトグラフィーにより脂質を分離した後、硫酸銅-リン酸溶液による染色反応で検出されるスポットのデンストメトリーにより行った。

(2) タファジンの生化学的解析

酵母 *S. cerevisiae* タファジン（Taz1）を、大腸菌体内でグルタチオン S-転移酵素（GST）との融合タンパク質として IPTG 誘導性プロモーターの支配下で発現させた。発現した GST-Taz1 融合タンパク質をグルタチオンセファロースカラムにて精製した。精製タンパク質を合成モノリゾカルジオリピンとフォスファチジルコリン間でのアシル転移反応の酵素触媒として用い、カルジオリピンの生成をイオンペア高速液体クロマトグラフィーにより脂肪酸組成ごとに分離し、それらを蒸発光散乱検出によって定量して評価した。反応の基質として上記のほか、ジリゾカルジオリピンも使用した。

4. 研究成果

(1) オートファジーによる脂肪滴・液胞膜動態制御の分子メカニズム解明

酵母のこれまでの研究によりオートファジー機能タンパク質（Atg タンパク質）が多数同定されている。その中でもオートファジー特有の膜構造（オートファゴソーム）に局在する Atg8 は、Atg3, Atg4, Atg7 といった他の Atg タンパク質の酵素活性を介して膜局在する。本研究課題の前段階で *S. cerevisiae* Atg8 の欠損が脂肪滴の量を減少させることが示唆されていたので、本タンパク質の脂肪滴動態への関与を詳細に調べた。結果、上記の Atg3, Atg4, Atg7 の欠損とは異なり Atg8 欠損が特異的に脂肪滴量の減少を引き起こすこと、また Atg8 が上記 Atg タンパク質には依存せず脂肪滴に局在することを見出した。さらに精製脂肪滴と Atg8 を用いた実験から、

Atg8 が脂肪滴同士を結びつける活性を有することを見出した (業績雑誌論文)。

Atg8 の脂肪滴結びつけ活性が脂肪滴量を増加させる作用機序として、脂肪滴表面のリパーゼによる中性脂質分解、リポリシスとの関連に着目した。リポリシスを担うリパーゼ Tgl3 と Tgl4 を欠損させた酵母株では、Atg8 欠損による脂肪滴量減少が見られなかったことから、Atg8 による脂肪滴同士の結びつけがリポリシスの抑制につながっていることが強く示唆された。同様の現象は哺乳類細胞でも見られており (引用文献、) Atg8 (哺乳類では LC3 と呼ばれる) の脂肪滴における機能が真核生物において広く保存されていると考えられる。また、脂肪滴表面に Atg8 (LC3) 局在が観察された結果をもって、脂肪滴を対象とする選択的なオートファジー (リポファジー) の証拠とする過去の報告が必ずしも適当でなく、Atg8 の脂肪滴局在が脂肪滴に対するリポファジーとは異なる機能を反映している可能性も考慮すべきことが分かった。

リポファジー、および液胞膜タンパク質の分解は、酵母においてミクロオートファジーと呼ばれる過程により行われることが明らかとなりつつある。これは液胞膜が対象となるオルガネラを直接取り囲むように変形するものであるが、その分子機構については不明な点が多かった。本研究では脂肪滴に極めて忠実に局在して、リポファジー活性の検出に用いることができるタンパク質として Osw5 を見出した (右図 1)。この Osw5 および液胞膜タンパク質 Vph1 に GFP を融合させたものを用いて、そのオートファジーによる分解がどのような遺伝子に依存しているか調べると、両者とも ESCRT タンパク質と呼ばれるタンパク質に依存して分解されることが分かった (業績雑誌論文)。ESCRT タンパク質はこれまで主にエンドソーム膜の陥入による多胞体 (multivesicular body) 形成過程に機能することが知られていたものだが、本研究によりはじめて ESCRT タンパク質の 1 つ Vps27 が、ミクロオートファジー誘導時に液胞膜に移行することが分かった。また Vps27 タンパク質内に存在するクラスリン重鎖サブユニット (生体膜表面に格子状構造を形成するタンパク質) への結合領域が、ミクロオートファジーに重要であることも明らかにした。

これまでの本研究代表者らの研究から、*K. phaffii* におけるペルオキシソームの選択的分解がミクロオートファジーによりなされることが分かっていた。また、近年の *S. cerevisiae*、さらに高等植物、動物細胞を対象とした多くの研究においてミクロオートファジーが見出され、その分子メカニズムの一端が明らかとなりつつあるが、これらを俯瞰的に把握してその特徴に応じた分類法の確立がなされていなかった。そこで本研究課題で見出された分子メカニズムにも立脚した、ミクロオートファジーの新たな分類法を提唱した (業績雑誌論文)。

(2) タファジンの生化学的解析

これまでの研究では、タファジンがカルジオリピンに組み込む脂肪酸に関して基質特異性はなく、タファジンの存在するミトコンドリア内の膜ドメインを構成するリン脂質の脂肪酸組成が、そのままカルジオリピンの脂肪酸組成に反映される、という説が立てられていた。しかしながら本研究において、基質 (フォスファチジルコリン、リゾカルジオリピン) から成る合成リポソームと酵母タファジン (Taz1) を用いた実験では、フォスファチジルコリンのアシル基を構成する脂肪酸のうち、不飽和脂肪酸が優先的にカルジオリピンに組み込まれていた (業績雑誌論文)。

タファジンが持つ、反応基質 (フォスファチジルコリン) の不飽和脂肪酸への高い反応性の詳細を調べるために、脂肪酸部分の 2 重結合位置をずらした不飽和脂肪酸を反応に用いると、カルジオリピンへの脂肪酸部分の組み込みが見られなくなったことから、本酵素が基質の 2 重結合位置を厳密に認識し、カルジオリピンの脂肪酸部分の置き換えを行うことが分かった (業績雑誌論文)。これらの研究から、タファジンの持つ基質特異性が明確になった。

< 引用文献 >

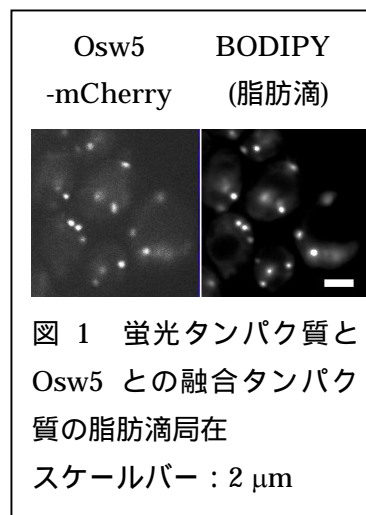
Shibata *et al.* (2010) LC3, a microtubule-associated protein1A/B light chain3, is involved in cytoplasmic lipid droplet formation. *Biochem Biophys Res Commun*, **393**:274-279.

Shibata *et al.* (2009) The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation. *Biochem Biophys Res Commun*, **382**:419-423

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Pang Y, Yamamoto H, Sakamoto H, Oku M, Mutungi JK, Sahani MH, Kurikawa Y, Kita K, Noda NN, Sakai Y, Jia H, Mizushima N. (2019) Evolution from covalent conjugation to non-covalent interaction in the ubiquitin-like ATG12 system. *Nat. Struct Mol Biol*,



26:289-296. 査読有

doi: 10.1038/s41594-019-0204-3

Fukuoka H, Kawase T, Oku M, Yurimoto H, Sakai Y, Hayakawa T, Nakagawa T. (2019) Peroxisomal Fba2p and Tal2p complementally function in the rearrangement pathway for xylulose 5-phosphate in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng*, in press. 査読有

doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.01.008

Ohsawa S, Nishida S, Oku M, Sakai Y, Yurimoto H. (2018) Ethanol represses the expression of methanol-inducible genes via acetyl-CoA synthesis in the yeast *Komagataella phaffii*. *Sci Rep*, **8**:18051. 査読有

doi: 10.1038/s41598-018-36732-2

Oku M, Sakai Y. (2018) Three distinct types of microautophagy based on membrane dynamics and molecular machineries. *BioEssays*, **40**:180008. 査読有

doi: 10.1002/bies.201800008

Abe M, Sawada Y, Uno S, Chigasaki S, Oku M, Sakai Y, Miyoshi H. (2017) Role of Acyl Chain Composition of Phosphatidylcholine in Tafazzin-Mediated Remodeling of Cardiolipin in Liposomes. *Biochemistry*, **56**:6268-6280. 査読有

doi: 10.1021/acs.biochem.7b00941

Oku M, Maeda Y, Kagohashi Y, Kondo T, Yamada M, Fujimoto T, Sakai Y. (2017) Evidence for ESCRT- and clathrin-dependent microautophagy. *J Cell Biol*, **216**:3263-3274. 査読有

doi: 10.1083/jcb.201611029

Maeda Y, Oku M, Sakai Y. (2017) Autophagy-independent function of Atg8 in lipid droplet dynamics in yeast. *J Biochem*, **161**:339-348. 査読有

doi: 10.1093/jb/mvw078

Abe M, Hasegawa Y, Oku M, Sawada Y, Tanaka E, Sakai Y, Miyoshi H. (2016) Mechanism for remodeling of the acyl chain composition of cardiolipin catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* tafazzin. *J Biol Chem*, **291**:15491-15502. 査読有

doi: 10.1074/jbc.M116.718510

[学会発表](計 7 件)

Masahide Oku, The dynamics of lipid droplets at the crossroads between autophagy and lipolysis, 第 91 回日本生化学会大会 (2018)

奥 公秀、阪井 康能、脂肪滴量制御におけるオートファジーおよび ESCRT タンパク質の機能、第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2018)

奥 公秀、阪井 康能、ミクロオートファジーの分子機構、生理機能の多様性、日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018)

奥 公秀、酵母脂肪滴のダイナミクスに関わるオートファジー、第 8 回愛媛微生物 (NAME) フォーラム (2017)

奥 公秀、籠橋 葉子、前田 佑一郎、阪井 康能、酵母脂肪滴の動態解析に有用な新たなマーカータンパク質の発見、第 50 回酵母遺伝学フォーラム (2017)

Masahide Oku, Yuichiro Maeda, Yasuyoshi Sakai, Functional involvements of Autophagy-related proteins in lipid droplet dynamics, 14th International Conference on Yeast (2016)

奥 公秀、前田 佑一郎、阪井 康能、脂肪滴恒常性維持に寄与する Atg タンパク質の機能解明、第 68 回日本細胞生物学会大会 (2016)

[図書](計 1 件)

Shun-ichi Yamashita, Masahide Oku, Yasuyoshi Sakai, Yukio Fujiki. Springer, *Methods in Molecular Biology*, Peroxisomes: Methods and Protocols (2017) p.249-255

[その他]

ホームページ等

<http://www.seigyo.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：安部 真人

ローマ字氏名：(ABE, Masato)

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。