

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07710

研究課題名(和文) 酵母におけるリン脂質の細胞内輸送と生体膜口バストネス維持機構の解明

研究課題名(英文) Intracellular phospholipid transport and robustness of biological membrane in yeast

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(農学部)・准教授

研究者番号：50323481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：リン脂質の細胞内輸送は生体膜の脂質分子種の多様性の獲得や生体膜の恒常性維持に寄与するがその機構は未解明である。本研究の結果から、モデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、細胞内のリン脂質輸送に脂質輸送タンパク質の一種が関わることが示唆された。また、石油成分である n-アルカンの資化能を持つ二形性酵母 *Yarrowia lipolytica* において、脂質輸送タンパク質が n-アルカンに応答した菌糸型生長に関わるものが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物におけるオルガネラ間の脂質輸送は細胞生物学的に重要な課題であるにもかかわらず解析の遅れた分野である。本研究において得られた酵母におけるリン脂質輸送に関する知見は、真核細胞内の脂質の動態と生体膜の形成機構の理解に大きく貢献するものである。また、本研究で得られた知見は、酵母を用いた有用脂質生産系の構築に寄与するだけでなく、様々な菌類を用いた脂質生産に拡張できる基盤を提供すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The intracellular transport of phospholipids contributes to the generation of the diversity of phospholipid species and to the maintenance of membrane homeostasis. Our results suggest that the lipid transfer protein is involved in inter-organelle phospholipid transport in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In addition, lipid transfer proteins were found to be involved in hyphal growth in response to n-alkanes in the n-alkane-assimilating dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*.

研究分野：微生物学

キーワード： *Saccharomyces cerevisiae* *Yarrowia lipolytica* リン脂質 輸送 脂質輸送タンパク質 Sec14ファミリータンパク質 膜コンタクトサイト

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の生体膜の必須かつ基本的構成因子であるリン脂質には、親水性頭部および疎水性のアシル鎖の構造から多様な分子種が存在する。生物は、環境変化などの生体膜に対するストレスに対して、膜を構成する脂質の組成を変化させることにより膜としての完全性(インテグリティ)を維持する頑強性(ロバストネス)を持つと考えられる。

真核細胞の生体膜を構成するリン脂質にはホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)などが存在する。これらリン脂質は全てのオルガネラ膜に含まれるが、その脂質組成はオルガネラごとに異なっており、そのことがオルガネラおよび膜の構造と機能に重要であると考えられている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のリン脂質の合成経路では、まず小胞体で CDP-ジアシルグリセロールから PS 合成酵素 Pss1 により PS が、PI 合成酵素 Pis1 により PI が合成される。PS はミトコンドリアあるいは小胞体の PS 脱炭酸酵素 Psd1 あるいはエンドソームの Psd2 により PE に変換される。さらに PE は小胞体に輸送され PE メチル化酵素 Pem1、Pem2 により PC に変換される(図 1)。またエタノールアミン、コリンから PE、PC を合成する Kennedy 経路も存在する。このようにリン脂質は特定のオルガネラでのみ行われることから、オルガネラごとの脂質組成を調節し生体膜ロバストネスを獲得するには、脂質の合成だけでなくオルガネラ間の脂質輸送が重要であると考えられる。さらに、リン脂質が合成される過程ではオルガネラ間を移動する必要があることから、リン脂質合成が正常に行われるためにも脂質輸送は重要であると考えられる。しかし、リン脂質のオルガネラ間の輸送とその制御の機構には未解明な点が多く残されていた。

細胞内のリン脂質輸送には、小胞輸送に依存しない輸送機構が存在する。その機構として脂質輸送タンパク質 (lipid transfer protein, LTP) が脂質をドナー膜から引き抜きターゲット膜へ輸送する機構と、異なるオルガネラが接触する膜コンタクトサイト (membrane contact sites, MCS) を介して脂質を輸送する機構が推定されていた。リン脂質を輸送する LTP の候補として、Sec14 ファミリータンパク質が挙げられる。*S. cerevisiae* には Sec14 に加え Sfh1~Sfh5 の 6 種の Sec14 ファミリータンパク質が存在する。Sec14 は PI および PC を膜間で輸送する機能を持つタンパク質として見いだされたが、その機能としては PI を PI キナーゼに提示することによりホスホイノシチドの合成を制御することであるという仮説も提唱されており (Tripathi et al. *Biochem. Soc. Trans.*, **42** 1383 (2014))、Sec14 ファミリータンパク質の機能には未解明な点が多く残されていた。このような背景のもと、筆者らはミトコンドリアへの PE の供給機構に関わるタンパク質を明らかにすることを目的として解析を行った。PSD1 破壊株ではミトコンドリアの PE 量が低下し、呼吸能に欠損を示す。そこで高発現した場合に PSD1 破壊株の呼吸機能欠損を抑圧する遺伝子を探索し、SFH1 を見出した。Sfh1 は酵母細胞内で PI や PC だけでなく PE や PS とも結合していたことから、Sfh1 がこれらリン脂質を輸送する機能を持つ可能性が考えられた。

Yarrowia lipolytica は *n*-アルカンや油脂などの疎水性化合物の強力な資化能を持つ二形性酵母である。さらに *Y. lipolytica* は脂質を高度に生産し蓄積する能力も持つことから、有用脂質生産系や脂質変換系への応用が期待されている酵母である。酵母などを用いて脂質を高生産させる場合、生体膜に対するストレスが発生すると考えられることから、効率的な脂質生産系を構築するには細胞内の脂質輸送機構と生体膜ロバストネスを理解し、それを制御する必要がある。しかしながら、*Y. lipolytica* における細胞内の脂質輸送機構は未解明であった。*Y. lipolytica* の Sec14 ファミリータンパク質の機能としては、Sec14 がグルコースを炭素源とした培地での菌糸型生長に関与することが報告されていたが (Lopez et al., *J. Cell Biol.*, **125** 113 (1994))、それ以外の Sec14 ファミリータンパク質の機能は全く不明であった。

2. 研究の目的

真核細胞は、環境の変化や特定の脂質の増減などの膜ストレスに対して、脂質の合成だけでなく、細胞内の脂質輸送を精巧に制御することにより生体膜の完全性(インテグリティ)を維持する頑強性(生体膜ロバストネス)を持つと考えられるが、生体膜の主要成分であるリン脂質の輸送と生体膜ロバストネス獲得の機構は未解明である。菌類などを用いて脂質を生産させる場合、生体膜に対するストレスが発生すると考えられるが、脂質生産と生体膜ロバストネスの関係は不明である。本研究では、モデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と脂質生産に利用されている油糧酵母 *Yarrowia lipolytica* において、リン脂質の細胞内輸送機構を解明するとともに、生体膜ロバストネスの獲得機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

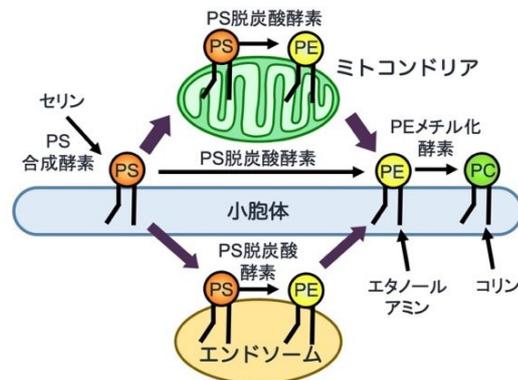


図1. 酵母のリン脂質合成経路と細胞内輸送
PS, ホスファチジルコリン; PE, ホスファチジルエタノールアミン;
PC, ホスファチジルコリン

S. cerevisiae の野生型株としては W3031A 株 (*MATa his3 leu2 trp1 ade2 ura3*) または BY4741 株 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) を、*Y. lipolytica* の野生型株としては CXAU1 株 (*MATA ade1 ura3*) を使用し、これらの株において遺伝子を破壊した株を使用した。酵母の培養には YPD 培地、YNB 培地に各種炭素源を添加した培地あるいは semi-synthetic 乳酸培地を使用した。

(2) 脂質の抽出と分析

脂質抽出は Bligh and Dyer の方法 (*Can. J. Biochem. Physiol.*, **37** 911 (1959)) に従って行った。リン脂質組成の解析では、二次元薄層クロマトグラフィーにより分離後シリカゲルをかき取り、リン定量に供して脂質を定量した。リン脂質の質量分析には、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。

(3) オルガネラの分画

酵母からの各オルガネラの分画は、既報の方法を参考に一部改変して行った (Zinser and Daum, *Yeast*, **11** 493 (1995))。

(4) リン脂質合成酵素活性測定

PS 合成酵素活性は Bae-Lee と Carman の方法 (*J. Biol. Chem.*, **259** 10857 (1984)) および Kiyono らの方法 (*J. Biochem.*, **102** 1089 (1987)) を参考に解析した。また PS 脱炭酸酵素活性は Trotter と Voelker の方法 (*J. Biol. Chem.*, **270** 6062 (1995)) を参考に解析した。

(5) *in vitro* でのリン脂質輸送解析

NBD 標識リン脂質を使用した *in vitro* でのリポソーム間輸送解析は、Miyata らの方法 (*J. Cell Biol.*, **214** 77 (2016)) を参考に一部改変して行った。

(6) 顕微鏡観察

顕微鏡観察は、生物顕微鏡 BX-52 (オリンパス) とデジタル CCD カメラ ORCA-ER 95-4742-ER (浜松ホトニクス) および多機能画像解析ソフトウェア AQUACOSMOS (浜松ホトニクス) または顕微鏡用デジタルカメラ DP80 (オリンパス) および顕微鏡用イメージングソフトウェア cellSens Standard (オリンパス)、あるいは共焦点顕微鏡 FV1200 (オリンパス) を使用した。

4. 研究成果

(1) *S. cerevisiae* におけるリン脂質の輸送機構の解析

NBD で蛍光標識したリン脂質を用いた *in vitro* でのリポソーム間の脂質輸送解析から、Sfh1 が NBD-PS を輸送できることが示された。また、これまでの解析から PC および PE との結合に欠損を持ち、高発現した場合に PSD1 破壊株の呼吸能欠損を抑圧できない Sfh1 の変異体では NBD-PS の輸送能が低下していることも示された。これらの結果から、Sfh1 が PS を輸送できること、*SFH1* の高発現による *PSD1* 破壊株の呼吸能欠損の抑圧には Sfh1 のリン脂質輸送能が重要であることが示唆された。

Sfh1 と EGFP の融合タンパク質である Sfh1-EGFP を発現させた細胞の蛍光顕微鏡解析から、Sfh1 が細胞質と核に局在することが示唆された。さらに細胞抽出液のショ糖密度勾配遠心解析により、Sfh1 が細胞質だけでなく、エンドソーム、ゴルジ体、あるいは液泡に局在することが示唆された。以上の結果から、Sfh1 が小胞体からエンドソームへの PS の輸送に関わることが示唆された (図 2)。

PSD1 の破壊株において *SFH1* を破壊した株では、資化にミトコンドリア機能を必要とする乳酸を炭素源とした培地での生育が悪化することが示され、*SFH1* とミトコンドリア機能および PE との関わりが示唆された。さらに、*SFH1* の高発現による *PSD1* 破壊株の乳酸培地での生育欠損の抑圧に、ミトコンドリアと小胞体のコンタクトサイト形成に関わる ERMES 複合体が重要であることが示され、ERMES 複合体が PE の輸送に関わる可能性が示唆された。以上の結果から、*PSD1* 破壊株で *SFH1* を高発現した場合、小胞体からエンドソームへの PS 輸送レベルが上昇して Psd2 により合成される PE 量が増加し、ミトコンドリアへ輸送される PE 量が増加することにより、呼吸機能欠損が抑圧する可能性が考えられた。

これまで未解明な点が多い *SFH2*~*SFH5* の機能を明らかにするため、*SEC14* 温度感受性株において *SFH1*~*SFH5* を破壊した *sfh1-5Δsec14-1* 株において各 *SEC14* ファミリータンパク質遺伝子を自身のプロモーター下で発現させるための低コピー型プラスミドを導入し、生育を観察した。その結果、*SEC14* を発現させた場合に生育の回復が見られたが、それ以外では *SFH2* と *SFH3* を発現させた株で生育が部分的に回復していたことから、*SFH2* と *SFH3* が *SEC14* と一部重複した機能を有すること

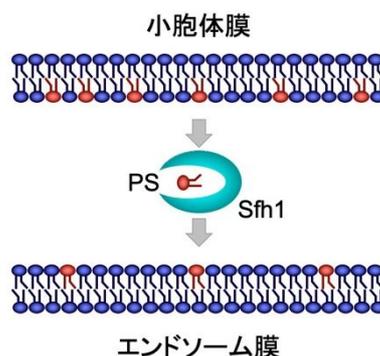


図2. Sfh1による小胞体からエンドソームへのリン脂質輸送

が示唆された。

さらに、各 Sec14 ファミリータンパク質が細胞内でリン脂質輸送を行う可能性を検証した。PSD1 および PSD2 の二重破壊株はミトコンドリアの PE 量が低下して呼吸能に欠損を示し乳酸を資化できない。この株で各 SFH 遺伝子を高発現させたところ、エタノールアミンを添加した乳酸培地では SFH2~SFH5 の高発現により生育の回復がみられた。また、SFH1 の高発現でも生育の部分的な回復が見られた。これらの結果から、Sfh1~Sfh5 が小胞体からミトコンドリアへの PE の供給に関わる可能性が考えられた。

(2) *S. cerevisiae* における生体膜口バストネスの解析

特定のオルガネラにおいて特定のリン脂質の含量を低下させることができれば、それに対する応答を解析することによって生体膜口バストネスの獲得機構に関する知見が得られると期待される。そこで、*S. cerevisiae* において細胞膜の PE 量を人為的に低下させる系を構築することを試みた。酢酸菌において PE を PC に変換する PE メチル化酵素 pmt に細胞膜への移行シグナルおよび EGFP を連結した融合タンパク質、PM-Pmt を *S. cerevisiae* で発現させた。蛍光顕微鏡観察により PM-Pmt の局在を観察したところ、細胞膜に蛍光が観察されたことから、PM-Pmt が *S. cerevisiae* の細胞膜に局在することが示唆された。また、PEM1、PEM2 の二重破壊株は PE から PC を合成できず、生育は Kennedy 経路でのコリンからの PC 合成に依存するためコリン要求性を示すが、PM-Pmt を PEM1、PEM2 二重破壊株で発現させたところ、コリン非存在下でも生育が可能になったことから、PM-Pmt が細胞内で PE をメチル化し PC を合成する機能を持つことが示唆された。以上の結果から、PM-Pmt が *S. cerevisiae* の細胞膜で PE メチル化酵素として機能していること、さらに *S. cerevisiae* では PC は小胞体で合成されるが、PC 合成の場を細胞膜に改変した株も生育できる頑強性を持つことが示唆された。この結果と一致して、PM-Pmt を発現させた細胞から細胞膜画分を単離し、リン脂質組成を解析したところ、PM-Pmt を発現させていない細胞と比較して、PE および PC の量に大きな影響は見られなかった。

PM-Pmt を発現させた細胞における PE の細胞膜への供給経路を明らかにするため、リン脂質輸送に関わる遺伝子や、小胞体と細胞膜の間の MCS 形成に関わる遺伝子の欠損株で発現させて生育を観察した。その結果、これらの株で PM-Pmt を発現させた場合にも生育に大きな影響は見られなかったことから、細胞膜への PE の供給には未知の機構に関わる可能性が考えられた。

(3) *Y. lipolytica* におけるリン脂質の輸送機構の解析

Y. lipolytica のゲノム配列から、本酵母には Sec14 ファミリー遺伝子として *S. cerevisiae* の SEC14 オルソログである SEC14、SFH2 オルソログである SFH21、SFH22、SFH23、SFH24、SFH3 オルソログである SFH3、SFH5 オルソログである SFH51、SFH51 の 8 種が存在することが明らかになった。さらに *Y. lipolytica* における網羅的転写解析から、*n*-アルカンを炭素源として培養した場合に SFH21、SFH22、SFH23 の転写産物量が増加することが示唆されていた。そこで real-time PCR 解析あるいはノーザン解析により転写産物量を解析したところ、*n*-アルカンを炭素源として培養した場合に SFH21 および SFH23 の転写産物が増加することが示唆された。一方で SFH22 の転写産物についてはこれらの方法では検出されなかった。さらに、SFH21~SFH24 の単独、多重破壊株を作製して生育を観察したところ、SFH21 破壊株は *n*-アルカン培地で菌糸状の生育に欠損を示すこと、3 つの SFH2 オルソログ、SFH21~SFH23 を破壊した 3 重破壊株では菌糸生長の欠損が悪化することが明らかになった。SFH21~SFH24 の 4 重破壊株は SFH21~SFH23 の 3 重破壊株と同様の生育を示した。また、SFH22、SFH23、SFH24 の単独破壊株では生育の異常は見られなかった。これらの結果から、*Y. lipolytica* において Sfh2 オルソログが *n*-アルカン培地での菌糸成長に関わることを示唆された。さらに SFH21 破壊株の菌糸生長の欠損が SFH22 および SFH24 の高発現により抑圧することが示され、SFH22 および SFH24 が SFH21 と重複する機能を持つことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Shiho Morisada, Ikuhisa Nishida, Makoto Kawamukai, Hiroyuki Horiuchi, Ryouichi Fukuda	4. 巻 82
2. 論文標題 Suppression of respiratory growth defect of mutant deficient in mitochondrial phospholipase A1 by overexpression of genes involved in coenzyme Q synthesis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1633 ~ 1639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1476124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuike Aya, Kobayashi Shingo, Rikukawa Takashi, Ohta Akinori, Horiuchi Hiroyuki, Fukuda Ryouichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Suppression of respiratory growth defect of mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase deficient mutant by overproduction of Sfh1, a Sec14 homolog, in yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0215009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0215009	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 林透真、古尾谷南沙、水池彩、堀内裕之、福田良一
2. 発表標題 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の細胞膜における生体膜構成リン脂質の分布と機能の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林透真、古尾谷南沙、水池彩、堀内裕之、福田良一
2. 発表標題 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の細胞膜におけるリン脂質の局在と機能の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aya Mizuike, Shingo Kobayashi, Hiroyuki Horiuchi, Akinori Ohta, Ryouichi Fukuda
2. 発表標題 Interorganellar Phosphatidylserine Transfer by Sec14 Family Protein Sfh1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 2018 American Society for Biochemistry and Molecular Biology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田良一
2. 発表標題 酵母におけるオルガネラ間のステロール輸送機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 直熙、石丸千晶、岩間亮、渡邊夏仁、志波優、兼崎友、堀内裕之、福田良一
2. 発表標題 酵母 <i>Yarrowia lipolytica</i> における n-アルカンへの吸着と細胞形態に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水池彩、小林新吾、堀内裕之、太田明德、福田 良一
2. 発表標題 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> における Sec14 ファミリータンパク質 Sfh1 による ホスファチジルセリンのオルガネラ間輸送機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊夏仁、水池彩、堀内裕之、福田良一
2. 発表標題 n-アルカン資化性酵母 <i>Yarrowia lipolytica</i> のSec14ファミリータンパク質の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水池彩、小林新吾、太田明德、堀内裕之、福田良一
2. 発表標題 出芽酵母におけるSec14ファミリータンパク質による細胞内リン脂質輸送の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第50回研究報告会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊夏仁、水池彩、堀内裕之、福田良一
2. 発表標題 n-アルカン資化酵母 <i>Yarrowia lipolytica</i> のSec14ファミリータンパク質の機能解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第50回研究報告会
4. 発表年 2017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