

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15245

研究課題名(和文)オートファジーの炭素代謝制御への寄与とその生理的意義の酵母種横断的な解明

研究課題名(英文) Contribution of autophagy to the regulation of carbon metabolism and its physiological significance across yeast species

研究代表者

岩間 亮 (Iwama, Ryo)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：90793042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは真核生物に広く保存された細胞内分解システムである。本研究では、酵母におけるエネルギー代謝で主要な役割を担う炭素代謝に着目し、オートファジーの生理的意義を明らかにすることを目指した。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* ではエタノールで増殖時、またエタノールが枯渇時にオートファジーが生じていることが示され、細胞質、小胞体、ミトコンドリアが分解されていた。特に、エタノール枯渇時にはミトコンドリアがさらに良く分解されていた。さらに、エタノール増殖時、エタノール枯渇時において、細胞質や脂肪滴がマイクロオートファジーが生じていることも示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、低濃度のグルコース培地を使用することで、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、オートファジーが様々な飢餓やストレスのみならず、エタノール増殖という通常の生育条件でも様々な種類のオートファジーが生じていることが示され、オートファジーの生理的意義の一端を明らかにできた。細胞の生理的意義を検討するにあたり、様々な培地条件を精緻に検討することの重要性が再認識された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is an intracellular degradation system that is widely conserved in eukaryotes. In this study, we focused on carbon metabolism, which plays a major role in energy metabolism, and aimed to elucidate the physiological significance of autophagy in yeast. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, autophagy occurred during ethanol-utilizing phase and ethanol-depletion phase. In the process, the cytosol, endoplasmic reticulum, and mitochondria were degraded. In particular, mitochondria were even better degraded during ethanol-depletion phase. Furthermore, it is also shown that micro-autophagy of the cytoplasm and lipid droplets during ethanol-utilizing phase and ethanol-depletion phase occurs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー 炭素源 グルコース エタノール 酵母 液胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内に備わっている分解システムであり、真核生物で広く保存されている。オートファジーとは、細胞質の一部や細胞小器官が選択的あるいは非選択的にオートファゴソームに取り込まれて液胞に輸送され、取り囲まれた物質が液胞内で分解される過程を指す。一般にオートファジーは窒素源飢餓時にタンパク質分解を大きく促進しアミノ酸を細胞内に供給する機構と理解されているが、オートファジーは一度に多様な標的を大量に分解できるため、その役割はアミノ酸供給にとどまらず、細胞内のタンパク質や細胞小器官を大規模に再編し、細胞内代謝経路を制御する機能もあると考えられる。しかしながら、オートファジーが細胞内代謝に与える影響についてはほとんど理解されていなかった。

炭素源は解糖系でもエネルギーを得られる発酵性炭素源と好気呼吸が必要な非発酵性炭素源に大別される。解糖系は比較的少ない種類の酵素により細胞質で行われるが、グルコースを炭素源として生育する際には、全タンパク質中における解糖系酵素群の占める割合は20-30%に及ぶこともある。一方、非発酵性炭素源を炭素源とする場合には、ミトコンドリアにおけるTCA回路および電子伝達系が適切に機能する必要があり、多くのタンパク質が関与する。炭素源に合わせてこれらのタンパク質を適切な量に調整することは重要な応答であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、酵母群を研究対象とし、細胞内エネルギー代謝に対して主要な役割を果たす炭素代謝に着目し、オートファジーの生理的意義を探ることであり、特に、炭素源の変動を起因とするオートファジーを整理すること、それらオートファジーがどのような生理的意義を持つのかを調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) GFP-Atg8を発現する細胞では、オートファジーの進行に伴いGFP-Atg8が液胞内に取り込まれる。その後、Atg8は液胞内で分解されるが、比較的強固なGFPは分解されず、ウェスタン解析により検出できるため、オートファジーの程度を解析できる(GFP-Atg8 cleavage assay)。GFP-Atg8 cleavage assayを用いて、炭素源変動時のオートファジーの進行を調べた。

(2) オートファジーの基質であるかどうかを検証するために、標的タンパク質にGFPを融合したタンパク質を発現させることで、GFP-Atg8と同様な手法により検討する。それぞれのオルガネラマーカーとして、Pgl1(細胞質)、Sec63(小胞体)、Oma45(ミトコンドリア)、Pex11(ペロキシソーム)、Osw5(脂肪滴)を選択した。

(3) オートファジー欠損株の生育の変化を精緻に観察するため、酵母を培地に植菌した後、OD自動測定器を用いて10分ごとにODを測定した。

### 4. 研究成果

(1) まず、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のダイオキシックシフトに着目した。*S. cerevisiae* をグルコース培地で培養すると、*S. cerevisiae* はグルコースが尽きるまでグルコースを使用してエタノールを産生しながら生育するが、グルコース枯渇後ではエタノールを利用するようになり、使用する炭素源の遷移が見られることとなる(この現象をダイオキシックシフトと呼ぶ)。通常、酵母の培養では2%グルコースの培地を使うことが多いが、合成培地ではグルコース枯渇後の生育は良好ではないことが多数示されていた。今回、0.2%グルコースの合成培地で培養したところ、グルコース枯渇後のエタノール増殖でも十分な生育を示した(図1)。このことから、2%グルコース培地におけるグルコース枯渇後の増殖は、炭素源遷移の影響のみならず他の栄養素の影響を強く受けることが示唆され、実際に、増殖が停止したように見える段階においても、エタノールは枯渇していなかった(図1)。0.2%グルコース培地は炭素源遷移を解析するためのモデル培地系であると考えられ、この培地では酵母の生育はグルコース増殖期、エタノール増殖期、エタノール枯渇期の3段階に明確に区別された。

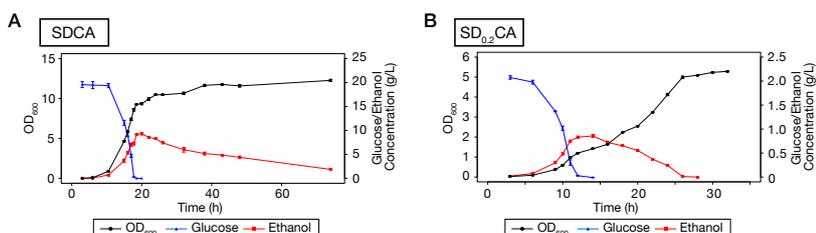


図1: グルコース濃度と酵母の増殖曲線の違い

(A) 2%グルコースでの生育 (B) 0.2%グルコースでの生育

(2) この培地を用いて、オートファジーの誘導を検討したところ、エタノール増殖期からオート

ファジーが生じていることが示された。オートファジーの程度は、エタノール枯渇期に向けてさらに増加している可能性が示唆された。エタノール増殖期には、細胞質、小胞体、ミトコンドリアが分解されており、一方で、ペルオキシソームや脂肪滴は分解されていなかった。エタノール枯渇期には、特にミトコンドリアの分解が活性化していることも示された。これら小胞体、ミトコンドリアの分解はそれぞれ、ER ファジー、マイトファジーにより分解されることも明らかとなった。

(3) エタノール増殖期、エタノール枯渇期には、液胞膜が液胞内腔へと陥入して周辺の物質を取り込むマイクロオートファジーが生じていることも示された。このマイクロオートファジーは、マクロオートファジーに必要な遺伝子群は必須ではなかった。また、電子顕微鏡や蛍光顕微鏡での観察から、マイクロオートファジーにより細胞質や脂肪滴が取り込まれていることが示された (図 2)。

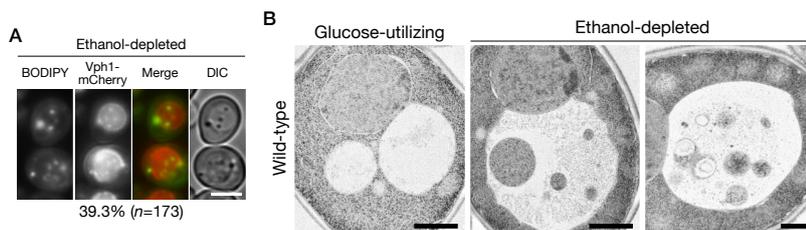


図 2: ミクロオートファジーで取り込まれる基質

(A) 脂肪滴を染色できる BODIPY と液胞膜タンパク質 Vph1-mCherry の蛍光像 (B) 電子顕微鏡像

(4) オートファジー欠損株は、エタノール増殖期にわずかに生育が遅延することが示された。また、エタノール枯渇期のオートファジーの意義を調べるため、エタノール枯渇期で長時間培養した後、新たな培地に再度植菌する実験を行った。その結果、オートファジー欠損株は、野生型株と比較して再増殖までのラグ時間が長くなることが示された。

以上の結果から、*S. cerevisiae*においては、エタノールで増殖しているとき、エタノールが枯渇するときにマイクロオートファジーを含めた様々な種類のオートファジーが生じていることが示された。これらはオートファジーの誘導には、炭素源の変遷も重要な要因となることが示唆された。

(5) 上記研究を遂行する中で、エタノール増殖期に液胞形態が極めて複雑になることが示唆された。当初予定していない結果であったが、マイクロオートファジーとの関連も深いため、液胞形態のダイナミクスの研究を展開した。液胞膜タンパク質 Vph1 に GFP を融合した Vph1-GFP を液胞形態の指標として使用して蛍光顕微鏡観察をしたところ、エタノール増殖期に確かに複雑な形態の液胞が現れることが示された。また、GFP 等を付加しない野生型株の細胞でも、電子顕微鏡観察により複雑な形態の液胞が観察された (図 3)。しかしながら、エタノール培地で 10 回程度分裂した酵母では、複雑な形態の液胞は見られず、細かい球形の液胞が複数見られるのみであった。時間経過による液胞形態の変化を観察したところ、ダイオキシシフト後 2 時間で全細胞の 4 割程度が複雑な形態の液胞を有するようになることが見出された。複雑な形態の液胞はグルコース増殖からエタノール増殖へと代謝が切り替わる際に、一過的に生じる現象であることが示唆された。

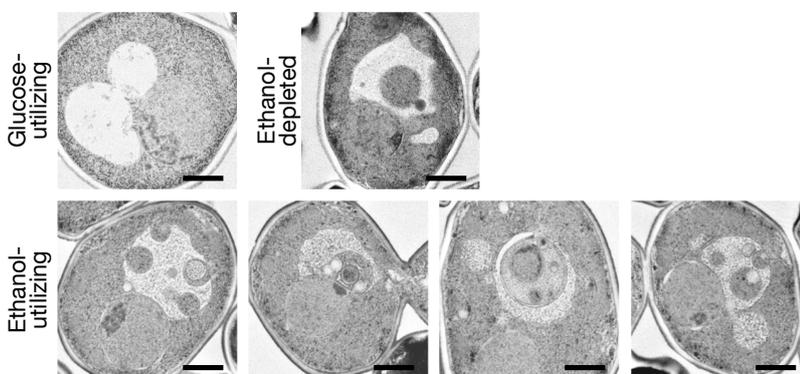


図 3: エタノール増殖時に見られる複雑な形態の液胞

(6) 複雑な形態の液胞が見られる段階において、細胞に低浸透圧ストレス (蒸留水に移す処理)、高浸透圧ストレス (1 M ソルビトールを添加する処理) を加えたところ、複雑な形態の液胞の膨潤化や細分化などの大きな変化は見られなかった。一方で、複雑な形態の液胞は、ジギトニン+1,6-ヘキサンジオール処理により、その複雑さが解消される。1,6-ヘキサンジオールを系から除いたところ、一定数の細胞内では、複雑な形態の液胞が再び見られるようになった。細胞質の液滴、液胞膜上のドメインが液胞形態に影響を与えている可能性が示唆された。

(7) 液胞の体積や表面積を測定したところ、複雑な形態の液胞の液胞体積はグルコース増殖の時と大きく変わらないが、見かけ上の液胞表面積が大きく増加していることがわかった。表面積体積比はグルコース増殖→遷移中→エタノール増殖で徐々に増加していくことも示された。

以上の結果から、培地の炭素源がグルコースからエタノールに遷移した直後から、液胞膜が上昇するが、体積は十分に増加しないため、複雑な形態の液胞が生じる可能性がある。また、エタノールでの生育が長くなると、体積の減少が見られ、小さな球形の液胞が生じるようになると考えられる。

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 0件）

1. 著者名 Iwama Ryo, Ohsumi Yoshinori	4. 巻 294
2. 論文標題 Analysis of autophagy activated during changes in carbon source availability in yeast cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 5590 ~ 5603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.005698	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩間亮、森下聖月、大隅良典
2. 発表標題 細胞内代謝変動時に変化する液胞形態の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩間亮、大隅良典
2. 発表標題 炭素源変動により誘導されるオートファジーの解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩間亮、大隅良典
2. 発表標題 炭素源の変化や枯渇により誘導されるオートファジーの機能
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----