

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580072

研究課題名 (和文) 酵母におけるステロールホメオスタシスの分子メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of the maintenance of sterol homeostasis 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・助教

研究者番号：50323481

研究成果の概要 (和文)：

オルガネラ間のステロールの輸送機構は未解明である。本研究では、出芽酵母を用い、形質膜から小胞体へのステロールの輸送を *in vitro* で解析する系を構築し解析を行った。その結果、形質膜から小胞体へのステロールの輸送にオキシステロール結合タンパク質が関与することが示唆された。また、これまで解析が困難であった小胞体から液胞および小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送機構を解析する系を構築した。

研究成果の概要 (英文)：

We constructed a system, in which the transport of sterol from the plasma membrane to the ER is evaluated *in vitro* using budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and analyzed its mechanism. We also construct systems to assay the sterol transport from the ER to the vacuole or mitochondria in yeast.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：酵母、ステロール、脂質、輸送

## 1. 研究開始当初の背景

ステロールは動物、植物、真菌類の生体膜に含まれる必須の脂質であり、動物ではコレステロールが、真菌類ではエルゴステロールが主要ステロールとなっている。真核細胞の

生体膜中では、ステロール含量はオルガネラごとに特定の割合にコントロールされており、このことがオルガネラの形成、活動、恒常性の維持に大きく関わっていると考えられている。ステロールは、多くのオルガネラ

膜の構成成分となっているが、一方でその合成は小胞体でのみ行われる。またステロールの一部は小胞体でステリルエステルに変換され、脂質顆粒に貯蔵される。従って、オルガネラ膜のステロール含量の維持（ステロールホメオスタシスの維持）には、ステロールの合成だけでなく、小胞体と各オルガネラ間のステロール輸送の厳密な制御が重要であると考えられる。しかしながら、ステロールの細胞内輸送のメカニズムとその制御、さらにこれらの具体的な意義については未解明である。

細胞内のステロール輸送については、酵母変異株や薬剤を用いた解析およびリポソームを用いた *in vitro* の解析等から、小胞輸送に依存しない輸送機構が存在すること、オキシステロール結合タンパク質のホモログ（酵母では Osh タンパク質）がステロールの輸送を担うタンパク質として機能することが示唆されているが、その具体的なメカニズムは未解明であった。酵母ゲノムには、*OSHI* ~7 の 7 種のオキシステロール結合タンパク質がコードされており、これら Osh タンパク質の役割については、*OSHI* ~7 の全ての遺伝子を破壊すると致死となることは報告されたが、個々の機能や役割分担に関しては不明な点が多い。

細胞内のステロール輸送機構の解析には、ステロールの移動を観察、追跡する系が必要である。形質膜-小胞体間など一部のオルガネラの間では、ステロール輸送をモニターする系が報告されているが、他の多くのオルガネラについては、そのような系がない。従って、細胞内オルガネラ間のステロール輸送を解明するためには、それらのオルガネラについても、ステロール輸送をモニターするための系を構築する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、オルガネラ間のステロール輸送を測定・評価する系を構築し解析を行うことにより、その分子機構と制御を明らかに

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、遺伝子操作には **DH5 $\alpha$**  株を、タンパク質生産には **BL21(DE3)** 株を用いた。酵母は、主に **W3031A** 株を遺伝的背景とする菌株を用いた。

### (3) オルガネラ膜の単離

酵母からのオルガネラの単離は、Zinser と Daum の報文 (Yeast, 11, 493-536 (1995)) あるいは **Current Protocols in Cell Biology** に従って行った。

### (4) 脂質解析

脂質抽出は **Bligh and Dyer** の方法に従って行った。また薄層クロマトグラフィー (TLC) には TLC プレート (Merck, Silica gel 60) を用い、ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸 (80:20:10, v/v/v) を展開溶媒とした。

## 4. 研究成果

### (1) 形質膜から小胞体へのステロール輸送

酵母に外からステロールを取り込ませると、その一部は小胞体へ輸送され、エステル化される。このことは、形質膜から小胞体へステロールを輸送する機構が存在することを示唆する。そこで本研究では、形質膜から小胞体へのステロール輸送を *in vitro* で測定する系を構築し、その機構を解析した。酵母から単離した小胞体膜画分をアクセプター膜に、ステロールを <sup>14</sup>C で標識した酵母から単離した形質膜画分をドナー膜にし、標識ステロールが小胞体上でエステル化されることを指標にステロール輸送を測定する系を用いて、形質膜から小胞体へのステロールの輸送機構の解析を行った。細胞質画分の添加により標識ステロールのエステル化が促進したことから、ステロール輸送に細胞質が必要であることが示唆された。さらにオキシス

テロール結合タンパク質の欠損株から単離した細胞質画分では標識ステロールのエステル化が低下したこと、大腸菌で合成させ精製した酵母オキシステロール結合タンパク質を細胞質画分の代わりに添加してもステロールのエステル化が観察されたことから、オキシステロール結合タンパク質が形質膜から小胞体へのステロールの輸送に関わることが示唆された。

#### (2) 小胞体から液胞へのステロール輸送

酵母の液胞膜には細胞内のステロールの約30%が存在することが報告されている。ステロールは液胞の機能に重要であると考えられており、実際にステロールが液胞膜同士の融合に関与するということが示唆されている。しかしながら、小胞体で合成されたステロールの液胞膜への輸送の機構は未解明である。

酵母のステロールアシルトランスフェラーゼ欠損株において、ステロールアシルトランスフェラーゼと液胞膜タンパク質の融合タンパク質を発現させることにより液胞にステロールアシルトランスフェラーゼを局在させた株を作製し、小胞体膜から液胞膜へのステロール輸送をエステル化により解析する系の構築を行った。蛍光顕微鏡観察の結果から、融合タンパク質が実際に液胞に輸送されていることが示唆された。また融合タンパク質の発現に依存してステロールのエステル化が見られたことから、融合タンパク質が細胞内でステロールアシルトランスフェラーゼ活性を持つことが確認された。さらに融合タンパク質を発現させた株から単離した液胞画分と標識ステロールを含む膜画分を細胞質存在下インキュベートしたところ、ステロールのエステル化が観察されたことから、これら2つの膜の間でステロールが輸送されたことが示唆された。これらの結果から、この系は、液胞へのステロール輸送の解析に利用できることが期待された。

#### (3) 小胞体からミトコンドリアへのステロ

ール輸送

ステロールはミトコンドリア膜の主要構成成分の1つであり、その合成欠損株ではミトコンドリアの形態に異常が生じることから、ミトコンドリアでも重要な役割を果たすと考えられる。しかし、酵母において、小胞体で合成されたステロールのミトコンドリアへの輸送機構は不明である。

小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送を解析する系の構築を行った。(2)と同様にステロールアシルトランスフェラーゼ遺伝子破壊株において、ステロールアシルトランスフェラーゼにミトコンドリア輸送シグナルを付加した融合タンパク質を発現させた。蛍光顕微鏡観察の結果から、発現させたステロールアシルトランスフェラーゼはミトコンドリアに局在することが示唆された。また、融合タンパク質の発現に依存してステロールエステルの生産が見られたことから、融合タンパク質が細胞内でステロールアシルトランスフェラーゼ活性を持つことが示され、実際に小胞体で合成されたステロールがミトコンドリアへ輸送され、エステル化されることが示唆された。今後、本系を用いることにより、ミトコンドリアへのステロール輸送の解析が可能となると期待された。

#### 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3件)

- ① L. Deng, R. Fukuda, T. Kakihara, K. Narita, and A. Ohta. Incorporation and remodeling of phosphatidylethanolamine containing short acyl residues in yeast. **Biochim. Biophys. Acta** 1801: 635–645 (2010)
- ② Y. Ono, R. Fukuda, and A. Ohta. Involvement of *LEM3/ROS3* in the uptake of phosphatidylcholine with short acyl chains in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 73: 750-752 (2009)

- ③ L. Deng, J. Nagasawa, Y. Ono, Y. Ishikawa, T. Kakiyama, R. Fukuda, and A. Ohta. Manipulation of major membrane lipid synthesis and its effects on sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 査読有、Vol.72、2008、2362-2368

[学会発表] (計 3 件)

- ① 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、2010 年 9 月 9 日、奈良
- ② 小林新吾、福田良一、太田明德、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機構の解析、日本農芸化学会大会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京
- ③ Lan Deng、長澤順平、福田良一、太田明德、出芽酵母の胞子形成における脂質の役割、日本農芸化学会関東支部 2008 年度大会、2008 年 10 月 11 日、甲府

## 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