

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：34303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05838

研究課題名（和文）酵母生育環境に応じた脂肪滴量制御のメカニズム

研究課題名（英文）Regulation mechanism of yeast lipid droplet quantity in response to environmental changes

研究代表者

奥 公秀（Oku, Masahide）

京都先端科学大学・バイオ環境学部・准教授

研究者番号：10511230

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究結果として、まず出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 脂肪滴局在タンパク質がステロール合成を制御する分子機構が見出された。具体的には、脂肪滴に局在するタンパク質がステロール合成酵素の細胞内局在を規定すること、またそれにより細胞内ステロール量の維持に働くことを見出した。また、メタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* が脂肪滴を蓄積するグリセロール培養条件において、メタノールの添加に応じてメタノール資化能も保持する株選抜に成功した。選抜株において、2つの転写因子をコードする遺伝子への変異を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における発見により、脂肪滴の新たな生理機能が明らかになってきた、すなわち、脂肪滴に局在するタンパク質が小胞体で機能するステロール合成酵素の局在を制御し、結果としてステロール合成能に影響を及ぼすことが分かり、新たなステロール合成制御システムとして機能するという知見が得られた。本研究結果のもう1つの意義は、メタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* の新たな方向性での育種を提案したことである。これまで本酵母に関してはタンパク質生産能の向上を目的とした遺伝子改変が多く行われてきたが、本研究では、本酵母のバイオディーゼルの複数成分の同時代謝を可能とするような育種に成功した。

研究成果の概要（英文）：Through this research project, molecular mechanism to regulate sterol synthesis activity by a lipid droplet protein has been discovered in *Saccharomyces cerevisiae*. In concrete terms, a lipid-droplet resident protein was found to affect the localization of an enzyme in the sterol synthesis pathway, and to contribute to maintaining cellular sterol content. Furthermore, this project was able to select a mutant strain of the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* which holds methanol-utilizing activity even in the presence of glycerol. In this mutant strain genome, mutations were identified within two genes encoding transcription factors.

研究分野：応用生化学

キーワード：脂肪滴 オートファジー 酵母 メタノール資化性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究課題を開始する 2020 年までに、出芽酵母の脂肪滴を対象とした研究では(1)脂肪滴の中性脂質分解の様式として、脂肪滴表面でリパーゼが作用するリポリシスの他に、脂肪滴を液胞に輸送して分解するリポファジーという機構があること、が本申請者を含む複数研究者により明らかにされていた。また、(2)脂肪滴形成時には、小胞体の一部領域を囲み込み中性脂質の蓄積の場を形成する分子装置(Seipin)が重要であることも明らかになりつつあった。

一方で酵母脂肪滴の動態を支える分子機構に関しては不明な点も多く残っていた。特に上記のリポファジーにおいては、分解するべき脂肪滴がどう認識されるか、といった点に関して不明な点が残っている。また上記の Seipin に結合するタンパク質として同定されていた Ldo タンパク質がどのような生理学的役割を持つのかについても、詳細は明らかにされていなかった。

また本研究開始までに、本申請者はメタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* がグリセロールを炭素源とした培養時に脂肪滴を顕著に誘導することを見出していた。しかしグリセロールとメタノールを両方含む培養条件では、本酵母はグリセロール代謝を優先してメタノールを代謝しない。このグリセロールによるメタノール代謝抑制の分子機構についてはこれまで知見が全く得られていなかった。

2. 研究の目的

上記の背景に基づき、本申請者はリポファジーの分子機構をより詳細に明らかにすることを主要な目的として本研究を開始した。具体的には脂肪滴に局在して Seipin と相互作用し、リポファジーに機能することが示唆されていた Ldo タンパク質(スプライシングに応じて Ldo16 と Ldo45 の 2 種類のアイソフォームが存在する)について、その機能の詳細を明らかにする実験計画を構築した。

また、メタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* を用いた研究においては、グリセロール・メタノール混合炭素源での培養時に見られる、メタノール代謝系抑制の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)出芽酵母 Ldo タンパク質の機能解明

Ldo タンパク質をコードする 2 つの ORF をどちらも欠損した株(LD0delta 株)を、抗生物質耐性遺伝子カセットの当該位置導入(組み換え)により作成した。野生株と上記 2 つの LDO ORF の単独欠損株、および LD0delta 株を培養し、その脂肪滴形態を Nile Red 試薬による染色、蛍光顕微鏡観察により比較した。

野生株および LD0delta 株の有するスクアランエポキシダーゼ、Erg1 のカルボキシ末端に蛍光タンパク質 EGFP を融合させ発現させるための形質転換操作を行った。得られた株を培養し、Erg1-EGFP の蛍光シグナルを蛍光顕微鏡観察により解析した。

野生株および LD0delta 株を培養後、Folch の方法による脂質抽出に供した。抽出脂質について、サイエックス社 QTRAP® LC-MS/MS(液体クロマトグラフィー・質量分析)システム(API-3000)を用い、エルゴステロールおよびその合成中間体であるラノステロール、スクアランの量比を比較した。

(2) グリセロール存在下でもメタノール代謝活性を持つ *Komagataella phaffii* 株の創出と解析

Komagataella phaffii 野生株を、エチルメタンスルホン酸(3%)に懸濁し、室温で 60 分間処理することでランダム遺伝子変異を誘発した。この処理酵母をプレートに静置したメンブレンフィルター上で生育させた後、2%グリセロール・0.4%メタノールを含むプレートに移した。この状態で 28、24 時間静置し、メンブレンフィルターをアルコールオキシダーゼ活性により染色するアッセイに供した。

野生株および上記アッセイの結果得られた変異株について、ゲノムを単離し、ホールゲノムシーケンスに供した。

4. 研究成果

(1)出芽酵母 Ldo タンパク質の機能解明

Ldo タンパク質が脂肪滴動態に与える影響を調べるため、その欠損株における脂肪滴形態を野生株と比較した。結果、Ldo タンパク質の欠損株においては、脂肪滴同士が連なったパターンが野生株よりも高頻度に観察された。

これまでの研究から同様の脂肪滴の形態がスクアランエポキシダーゼ、Erg1 の変異株において見出されていた(Ta et al., FEBS J. 2012, 279:p.4231)。そこで Ldo タンパク質欠損株における Erg1 の局在を、EGFP を付加した融合タンパク質の局在解析により調べた。結果、Erg1-EGFP の局在は、野生株よりも Ldo タンパク質欠損株で、より脂肪滴に偏って存在することを見出した。

この Erg1 局在の脂肪滴への偏りが、細胞内のステロール合成活性に与える影響を調べるため

に、野生株と Ldo タンパク質欠損株から脂質抽出し、エルゴステロールおよびその合成中間体の量を比較したところ、欠損株では[エルゴステロール]/[スクアレン]の量比が、野生株よりも顕著に減少することを見出した。

(2) グリセロール存在下でもメタノール代謝活性を持つ *Komagataella phaffii* 株の創出と解析
Komagataella phaffii の野生株にランダム遺伝子変異導入を行い、グリセロール・メタノール混合炭素源培地において、メタノールを代謝するための酵素アルコールオキシダーゼを発現している株を選抜した。結果、1 株の変異株を取得することができた。

本変異株がグリセロール存在下でもメタノール代謝酵素を発現する分子機構を明らかにするために、その変異導入箇所をホールゲノムシーケンス解析により探索した。結果、多種酵母において呼吸生育や鉄代謝調節に関わると報告されていた 2 つの転写因子をコードする遺伝子に変異（ミスセンス変異）が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Ohsawa Shin, Inoue Koichi, Isoda Takahiro, Oku Masahide, Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi	4. 巻 134
2. 論文標題 The methanol sensor Wsc1 and MAPK Mpk1 suppress degradation of methanol-induced peroxisomes in methylotrophic yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.254714	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 -

1. 著者名 Abe Yuichi, Honsho Masanori, Kawaguchi Ryoko, Matsuzaki Takashi, Ichiki Yayoi, Fujitani Masashi, Fujiwara Kazushirou, Hirokane Masaaki, Oku Masahide, Sakai Yasuyoshi, Yamashita Toshihide, Fujiki Yukio	4. 巻 295
2. 論文標題 A peroxisome deficiency?induced reductive cytosol state up-regulates the brain-derived neurotrophic factor pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 5321 ~ 5334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.011989	査読の有無 無
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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------