

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780100

研究課題名(和文)オートファジー分子を利用したC1酵母によるタンパク質・脂質生産のための基盤研究

研究課題名(英文)Basic research for protein and lipid production in C1 yeast utilizing autophagy molecules

研究代表者

奥 公秀 (Oku, Masahide)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10511230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、異種タンパク質生産に広く用いられるメタノール資化性酵母(C1酵母)を対象に、オートファジーの関連タンパク質(Atgタンパク質)のさらなる機能解明を通じて、本酵母のタンパク質・脂質生産に資する知見を得ることを目的とした。結果、1) Atg8の融合タンパク質を用いた解析から、本タンパク質が中性脂質蓄積の場となる脂肪滴の形態制御にも機能していることを見いだした。また、2) 液胞膜に局在するAtg18とAtg21の解析から、両タンパク質のペルオキシソーム分解オートファジーにおける機能を明らかにし、Atg18がリン酸化制御を介して多様な環境変化に応じた液胞形態制御を行うことを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this research project, I aimed to obtain insights useful for protein or lipid production in the methylotrophic yeast (C1 yeast), by elucidating molecular functions of autophagy-related (Atg) proteins in this yeast species. As a result, I discovered that 1) Atg8 can act on the morphological regulation of lipid droplets, a storage site of neutral lipids, as revealed by the analysis of several Atg8-fused proteins. And 2) I elucidated the role of two vacuole-localized Atg proteins (Atg18 and Atg21) in peroxisome-targeting autophagy, and also discovered that Atg18 drives the morphological changes of the vacuole in response to various environmental alternations, which is regulated by the phosphorylation status of the protein.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物学

キーワード：オートファジー 液胞 脂肪滴 ペルオキシソーム メタノール資化性酵母

## 1. 研究開始当初の背景

近年の急速な研究進展により、細胞内成分の主要な分解経路であるオートファジーの分子機構が明らかとなってきた。特に、分解対象を包み込むための新生膜の形成に機能する、オートファジー関連タンパク質 (Atg タンパク質) が多数同定され、これらタンパク質間での相互関連も解明されつつある。

このような基礎生物学的な知見を応用面で利用することを考えると、産業用酵母におけるオートファジー分子機構の理解が必要となる。私たちはこれまでに異種タンパク質生産系宿主となるメタノール資化性酵母 (C1 酵母) における、Atg タンパク質群の同定と機能解析を進めてきた。その過程において Atg タンパク質が本酵母の多様な培養条件での生育に必要なことを見いだしていた。また Atg タンパク質群のうち、Atg8 がそれまで見出されてきたオートファジー新生膜の伸長・形成のみならず、液胞形態の制御にも関与することを見いだしていた。

このような経緯から本研究開始の際には、C1 酵母の 1) 多様な培養条件適応に機能する Atg タンパク質機能の分子機構詳細と、2) 幅広いオルガネラ動態を制御する Atg タンパク質機能の分子機構を理解することにより本酵母がタンパク質・脂質生産を行う際の培養条件変化に対する適応能力を上昇させることや、オルガネラへの生産物質の蓄積能を上昇させることが期待された。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、第一の目的として C1 酵母の環境変化適応時に Atg タンパク質がどのような分子応答を示すのかを把握することを設定した。具体的には本酵母のメタノールへの炭素源変換や、浸透圧、酸化ストレスの付加時の Atg タンパク質の局在や生化学的性質の変化を検出し、その生理機能を明らかにすることを目指した。

もう一つの目的として、本酵母における様々なオルガネラの動態制御に機能する Atg タンパク質の機能解明を目的とした。特に、上記の液胞膜動態や、ペルオキシソーム及び中性脂質代謝・生産の重要な場となる脂肪滴の動態制御機構を明らかにすることに注力した。

## 3. 研究の方法

### (1) 多様な培養条件変化に応答する Atg タンパク質の分子機能解明

酵母の液胞形態は、多様な培養条件の変化に応じダイナミックに変化することが知られていた。そこで C1 酵母 *Pichia pastoris* の Atg タンパク質のうち、液胞膜に局在する 2 つのタンパク質 (Atg18 と Atg21) の局在を、それぞれに蛍光タンパク質を付加した融合タンパク質の顕微鏡解析により追跡観察した。また、上記の Atg タンパク質に別の低分子量のエピトプタグを付加した融合タン

パク質を用いて、SDS-PAGE、Western Blot による解析を行った。また、Phos-tag Acrylamide [和光純薬工業 (株) 社製] を用いて、リン酸化/非リン酸化 Atg タンパク質の分離実験も行った。さらに、Atg18、Atg21 タンパク質の GST (グルタチオン S-トランスフェラーゼ) との融合タンパク質も作成して精製し、タンパク質-脂質オーバーレイアッセイや、表面プラズモン解析により量タンパク質のイノシトールリン脂質との結合能を調べた。

### (2) 多様なオルガネラの動態に機能する Atg タンパク質の機能解明

上記 (1) に記した Atg18、Atg21 融合タンパク質発現株における液胞形態を蛍光顕微鏡観察により調べた。ペルオキシソームに対するオートファジー性分解の有無、速度を、本オルガネラに局在する膜タンパク質 Pex12 に対するイムノプロット解析や、本オルガネラ内部の酵素アルコールオキシダーゼの活性染色により調べた。

また *Pichia pastoris* のメタノール培養時における脂肪滴形態を Atg8 融合タンパク質発現株で調べた。私たちの以前の研究から、本酵母の Atg8 は液胞膜の融合に機能することが分かっていたことから、Atg8 と脂肪滴局在タンパク質 Erg6 との融合タンパク質を作成することで、この脂肪滴局在型 Atg8 融合タンパク質が脂肪滴の形態に与える影響を調べた。脂肪滴形態は染色色素 BODIPY を用いて蛍光顕微鏡により観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 多様な培養条件変化に応答する Atg タンパク質の分子機能解明

*Pichia pastoris* の Atg18 および Atg21 を GST との融合タンパク質として本酵母内で発現させたのち精製し、イノシトールリン脂質に対する結合を調べたところ、この 2 つのタンパク質は非常によく似た立体構造をとるにもかかわらず、Atg18 は主にフォスファチジルイノシトール 3, 5-2 リン酸 (PI35P2) に、Atg21 はフォスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P) に結合するという、異なる結合特性を有することを見いだした。

興味深いことに Atg18 は通常のグルコース培地での培養時にリン酸化されていることが分かった。このリン酸化部位を本タンパク質のトリプシン処理断片に対する質量分析法により同定した。また、このリン酸化は低浸透圧、酸化ストレス付加時に亢進することを見いだした。上記ストレスを除くと脱リン酸化が誘導されたことから、環境変化に応じた可逆的な Atg18 のリン酸化・脱リン酸化サイクルが見出された。

Atg18 のリン酸化と上記 PI35P2 への結合能との相関を調べると、Atg18 に対する脱リン酸化処理は本タンパク質の上記脂質結合能を上昇させることを見出した。またリン酸化を受けない Atg18 変異体 (下記詳述) では、

この脂質結合能が正常 Atg18 より高いことが分かり、本タンパク質のリン酸化が脂質結合能を負に制御していることが明らかとなった。

## (2) 多様なオルガネラの動態に機能する Atg タンパク質の機能解析

(1) で述べた *Pichia pastoris* Atg18 のリン酸化状態は液胞形態と強い相関を示した。すなわち、Atg18 がリン酸化される条件においては単一の大きな液胞が観察されるのに対し、Atg18 が脱リン酸化される条件においては、複数の小さな液胞が房状に観察された。さらにリン酸化部位をアラニン残基に置換しリン酸化を受けなくなった Atg18 を発現させたところ房状の液胞が観察される割合が増え、逆にリン酸化部位をアスパラギン酸に置換しリン酸基に類似した負電荷を導入したリン酸化模倣型の Atg18 発現株では、高浸透圧条件で単一の大きな液胞が野生株より増加することが分かった。このことは Atg18 のリン酸化状態が液胞膜形態に影響することを示している。

*Pichia pastoris* のペルオキシソーム分解のためのオートファジー経路に Atg18, Atg21 の両方が機能することを見いだしたが、その作用機序は2つのタンパク質で異なっていた。すなわち、Atg18 は液胞膜形態制御とオートファジー新生膜形成の両方に機能する一方、Atg21 は新生膜形成のみに機能していた。また、上記のリン酸化を模倣した Atg18 は液胞膜に局在しにくくなる一方で、マクロペキソファジーと呼ばれる経路が野生株より亢進することが分かった。

同じく *Pichia pastoris* の Atg8 を脂肪滴局在タンパク質 Erg6 と融合させて発現させた株をメタノール培地にて培養すると、野生株ではほとんどみられない脂肪滴 (BODIPY 染色による粒状パターンにより可視化される) が見られるようになった。このことから、Atg8 はこれまでに報告されているオートファジー新生膜や液胞膜の融合に寄与するとともに、脂肪滴の形態にも影響を与えることが示された。また、脂肪滴が細胞内の中性脂質の蓄積の場であることから、本法を利用して C1 酵母における中性脂質量を増加させる技術が可能であると考えられた。

## 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6件)

1. Masahide Oku, Yoshitaka Takano, and Yasuyoshi Sakai: The emerging role of autophagy in peroxisome dynamics and lipid metabolism of phyllosphere microorganisms. *Frontiers in Plant Sciences*, **5**, Article 81 (2014) 査読有, DOI: 10.3389/fpls.2014.00081

2. Naoki Tamura, Masahide Oku, and Yasuyoshi Sakai: Atg21 regulates pexophagy via its PI(3)P binding activity in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research*, in press, 査読有

DOI: 10.1111/1567-1364.12132.

3. Naoki Tamura, Masahide Oku, Moemi Ito, Nobuo. Noda, Fuyuhiko. Inagaki, and Yasuyoshi Sakai: Atg18 phosphoregulation controls organellar dynamics by modulating its phosphoinositide-binding activity. *Journal of Cell Biology*, **202**, 685-698 (2013), 査読有,

DOI: 10.1083/jcb.201302067

4. 寶関 淳、奥 公秀、阪井 康能: 酵母のレドックス認識機構を応用した新しいセンサータンパク質の開発、フレグランスジャーナル、41、64-69 (2013)、査読無

5. Masahide Oku, Jun Hoseki, Yayoi Ichiki, and Yasuyoshi Sakai: A fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based redox sensor reveals physiological role of thioredoxin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **587**, 793-798 (2013), 査読有,

DOI: 10.1016/j.febslet.2013.02.003

6. 阪井康能、寶関 淳、奥 公秀: レドックス異常を回復する化合物レドックスモジュレーターの新発見: Redoxfluor の創薬への利用、*遺伝子医学 MOOK*, **22**, 158-163 (2012)、査読無

[学会発表](計5件)

1. 奥 公秀、阪井 康能: 環境変動に対応するための Atg タンパク質によるオルガネラ動態制御機構、日本農芸化学会 2014 年度大会 シンポジウム「農芸化学を横断するオートファジー研究の新展開」, 2014 年 3 月 30 日、明治大学生田キャンパス

2. Masahide Oku, Yuichiro Maeda, and Yasuyoshi Sakai: Autophagy of lipid particle in *Saccharomyces cerevisiae*. The 30<sup>th</sup> International Specialized Symposium on Yeast. 2013 年 6 月 19 日, Stara Lesna, Slovakia

3. 奥 公秀、島並 祐子、阪井 康能: 出芽酵母におけるチオレドキシンの生理学的役割、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、東北大学川内北キャンパス

4. 奥 公秀、阪井 康能: レドックスフルールバイオセンサーにより明らかとなった酵母細胞質チオレドキシンの生理学的機能、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

5. Masahide Oku, Souta Yamaguchi, and Yasuyoshi Sakai: Functional relationship of autophagic scaffold proteins in micro-pexophagy. The 6th International Symposium on Autophagy, 2012 年 10 月 28 日 ~ 2012 年 11 月 01 日、沖縄県万国津梁館

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.seigyo.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6．研究組織  
(1)研究代表者  
奥 公秀（おく まさひで）  
京都大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：10511230