

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850064

研究課題名(和文) 脂質動態のオルガネラレベルでの調節機構解明とその応用

研究課題名(英文) Elucidation and application of regulation mechanism of lipid dynamics at the organelle level

研究代表者

奥 公秀 (Masahide, Oku)

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：微生物を利用した油脂生産能の向上や、真核生物における脂質代謝の新たな知見獲得を目指し、酵母の中性脂質を中心とする脂質代謝、および中性脂質集積の場となる細胞内小器官である脂肪滴の動態を、特にオートファジー関連タンパク質(Atgタンパク質)の関与に着目して解析した。結果、脂肪滴の量維持に機能する2つのAtgタンパク質を見出し、それらが脂肪滴に局在するリパーゼによる中性脂質の加水分解反応、すなわちリポリシスをどのように制御するかという分子機構についても解明することに成功した。

研究成果の概要(英文)：This research project, aiming at gaining insights with regard to improvement in oil production by microorganisms, and new aspects of lipid metabolism in eukaryotic cells, focused on the involvements of autophagy-related (Atg) proteins in dynamics of neutral lipids, and that of lipid droplets, the organelle for the accumulation of the lipids in yeasts. This project succeeded in the identification of two Atg proteins acting on the maintenance of lipid droplet amounts, and also in the elucidation of molecular mechanism as to how these proteins regulate lipolysis (hydrolysis of neutral lipids inside the lipid droplets by lipases associated to the organelle).

研究分野：応用微生物学

キーワード：オートファジー 脂肪滴 中性脂質 リポリシス

### 1. 研究開始当初の背景

バイオマス資源を利用した微生物による有用物質生産系の中で、油脂生産系は特にエネルギー・環境問題の観点から注目されている。特に、微細藻類や酵母を用いた油脂の生産は実用化へ様々な試みがなされている。これらの生物種において、油脂生産のための中性脂質合成・分解酵素群の同定や改良は盛んに行われている一方、細胞内の実質的な油脂蓄積の場である脂肪滴の細胞内小器官としての動態については不明な部分が多く残されたままであった。具体的には、脂肪滴の生成に関しては小胞体から切り離されて生成するモデルが有力であるが、切り離されてから脂肪滴がどのようにしてその大きさを変えるのか、またどのようなメカニズムで脂肪滴全体の分解が起こるのか、といった点に多くの謎が残っている。

### 2. 研究の目的

本研究課題においては、脂肪滴の増大および分解に機能する、新たなタンパク質因子群の同定を通じて、真核微生物における油脂生産効率の向上の基盤となる知見を得ることを主たる目的とした。特に、オートファジーと呼ばれる、細胞内物質の分解機構に着目して研究を遂行した。オートファジーは細胞内小器官分解のための主要経路であり、脂肪滴もその分解標的として想定されたことから、オートファジーに機能するタンパク質群の量調節・機能改変を通じて細胞内脂肪滴量の増大、またそれに伴う油脂生産能の向上を目指した。さらに、これまでは主にアミノ酸リサイクリングの機能について注目されてきたオートファジーが、細胞内の脂質代謝・動態に及ぼす影響について調べることも、本研究課題の目的に設定した。

### 3. 研究の方法

(1) 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を対象に、オートファジー機能タンパク質としてこれまでに同定された主要 18 タンパク質 (Atg1~Atg18 と名付けられている) の各欠損株について、グルコース合成培地で定常期まで培養した後、脂質を抽出し、中性脂質 (トリアシルグリセロール量) を測定して野生株と比較した。

(2) オートファジー誘導時に標的を包み込む膜構造体に局在するオートファジー機能タンパク質のひとつである Atg8 について、その脂肪滴動態への関与を調べた。具体的には、出芽酵母の Atg8 タンパク質の発現量を当該遺伝子破壊、および細胞内コピー数の異なるベクターを介した発現により増減させた後に、脂質抽出、中性脂質量測定を行うと同時に、蛍光色素染色による脂肪滴の蛍光顕微鏡観察により細胞内の脂肪滴の蓄積状態を比較した。また Atg8 の持つ膜半融合活性の鍵となるアミノ酸残基を変異させた場合

の脂肪滴蓄積量も比較した。さらに、脂肪滴上に局在し、中性脂質の加水分解に寄与する 2 つのリパーゼ (Tgl3, Tgl4) の欠損株において Atg8 をコードする遺伝子を破壊し、その脂肪滴の蓄積量に与える効果を調べた。また、大腸菌を用いて発現、精製されたりコンビナント Atg8 と、ATG8 遺伝子破壊株から単離し蛍光色素染色された脂肪滴とを混合し、その形態の変化を経時的に蛍光顕微鏡により追跡観察した。

(3) オートファジーにおける最後の過程、すなわち液胞 (リソソーム) 内での加水分解の引き金となるリパーゼ、Atg15 についてもその脂肪滴動態への関与を調べた。具体的には、Atg15 のさまざまな変異体発現株における脂肪滴、中性脂質量の観察、測定を行った。また Atg15 と同時に、他のオートファジー機能タンパク質も欠損した株や、上記リパーゼ (Tgl3, Tgl4) を欠損させた株を作成し、その脂肪滴、中性脂質量の観察、測定を行った。Tgl3, Tgl4 のカルボキシル末端に、赤色蛍光タンパク質 mCherry を融合させたものを野生株、Atg15 欠損株において発現させ、その細胞内局在を蛍光顕微鏡により解析した。また、Atg15 の欠損株における中性脂質関連代謝産物の量を野生株と比較した。

### 4. 研究成果

(1) 各種変異 Atg タンパク質欠損株におけるトリアシルグリセロール量を野生株と比較すると、野生株より本脂質量の増大した株、および減少した株の両方が見いだされた。具体的には、Atg2、Atg6、Atg14 の各欠損株でトリアシルグリセロールの細胞内蓄積量が野生株より増大していた。このうち、Atg6、Atg14 はイノシトールリン脂質の一種であるフォスファチジルイノシトール 3-リン酸の合成酵素複合体の因子であることから、この脂質合成複合体が細胞内中性脂質の蓄積を抑制する働きをもつことが強く示唆された。反対に Atg8 の欠損株、また Atg15 の欠損株においては、当該中性脂質量が野生株と比較して減少することが分かった。

(2) 上記 (1) の研究結果を受けて、Atg8 の欠損株における中性脂質量の減少を引き起こす分子機構を調べた。まず、定常期まで培養された出芽酵母においては、細胞内 Atg8 量と中性脂質 (トリアシルグリセロール) 量に正の相関があることを見いだした。マルチコピープラスミドを用いて Atg8 を多く発現させた際に、トリアシルグリセロールの量は通常株より約 20% 増加していた。次に、Atg8 タンパク質の持つ生化学的な性質である、膜半融合 (hemifusion) 活性に着目した。本活性を失った変異タンパク質を発現させて脂肪滴・中性脂質量を測定すると、Atg8 欠損株と同様に、野生株と比較して有意な量減少が見られたことから、膜半融合活性が脂肪滴量

の量維持に重要な働きを持つことを見出した。この結果と一致して、単離・精製された脂肪滴と Atg8 を混合すると脂肪滴の集合塊（クラスター）形成が誘導されたが、膜半融合活性を失った Atg8 と混合した場合の脂肪滴のクラスター形成は顕著に抑制されていた。さらに Atg8 欠損による脂肪滴・中性脂質量の減少が、Tgl3, Tgl4 の両方を欠損する酵母株においては見られなかったことから、Atg8 の脂肪滴動態への関与は、Tgl3, Tgl4 による脂肪滴中性脂質に対する加水分解作用（リポリシス）に依存することが強く示唆された。以上の結果をまとめることで、Atg8 の持つ膜半融合活性が脂肪滴同士のクラスター形成、肥大化を誘導し、結果として脂肪滴表面のリパーゼ（Tgl3, Tgl4）によるリポリシスを抑制するというモデルを提唱した。（図 1。）

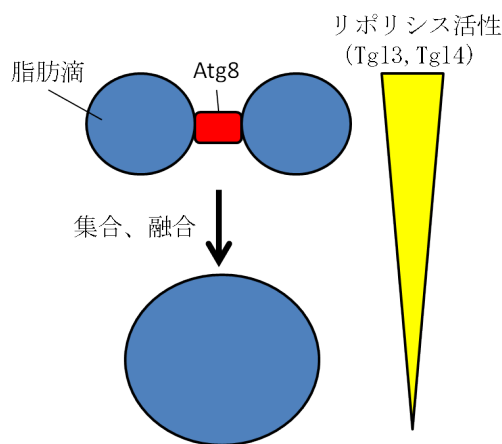


図 1 Atg8 が脂肪滴の動態に及ぼす分子機構のモデル図

(3) 上記(1)の研究結果を受けて、Atg15 欠損株における中性脂質量の減少を引き起こす分子機構も調べた。Atg15 はリパーゼに特徴的なアミノ酸配列を持つが、本配列に点変異を導入したものを発現させても脂肪滴量は回復しなかったことから、本タンパク質のリパーゼ活性が脂肪滴量の維持に必須であることを確認した。Atg15 の欠損株に対し飢餓誘導性のマクロオートファジーに機能する他の Atg タンパク質をさらに欠損させたところ、Atg15 単独欠損株において見られたような脂肪滴量の減少が見られなくなった。このことは、マクロオートファジーにより液胞内に輸送された物質の分解が Atg15 欠損により滞ったことで脂肪滴量の減少につながったことを強く示唆している。また、Atg8 欠損の場合と同様に、Atg15 欠損株においてもリポリシスに機能するリパーゼ（Tgl3, Tgl4）の欠損により脂肪滴量減少が

解消されたことから、Atg15 欠損がリポリシスを介し脂肪滴量を減少させたことが分かった。この結果と相応して、Atg15 欠損株では Tgl3, Tgl4 の局在、量が野生株と異なり、よりリポリシスが起りやすい状態にあることが分かった。さらに中性脂質由来の代謝物群の細胞内量を比較したところ、Atg15 の欠損株では野生株よりも、ジアシルグリセロール・遊離脂肪酸といったトリアシルグリセロールの分解産物量が増加していることを見いだした。以上の結果を総合すると、飢餓誘導性マクロオートファジーにより液胞内に輸送された物質が Atg15 のリパーゼ活性に依存した分解を受けられない場合には、何らかのシグナル伝達によりリポリシスに関与するリパーゼ群（Tgl3, Tgl4）の局在や量が増加（増加）することでリポリシスが亢進して脂肪滴量が減少し、その代償に、ジアシルグリセロールや遊離脂肪酸量が増加するというモデルを提唱した（図 2）。このことは、や中性脂質量の制御を行うという新たな代謝制御のメカニズムを示しており、微生物における油脂生産の向上や、真核生物における脂質のホメオスタシス維持機構解明にとって重要な知見をもたらしている。

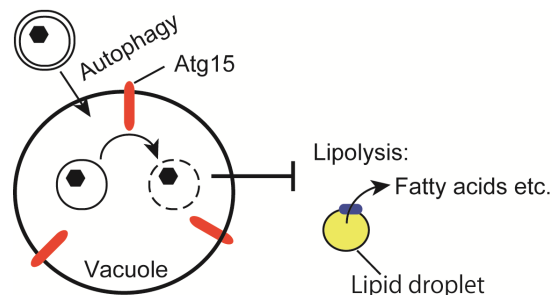


図 2 Atg15 活性による液胞内膜構造体分解が脂肪滴動態へ関与する作用機序のモデル図

## 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 4 件)

Masamune Aihara, Xiulian Jin, Yusuke Kurihara, Yutaka Yoshida, Yuichi Matsushima, Masahide Oku, Yuko Hirota, Tetsu Saigusa, Yoshimasa Aoki, Takeshi Uchiumi, Tadashi Yamamoto, Yasuyoshi Sakai, Dongchon Kang, and Tomotake Kanki. The Tor and Sin3-Rpd3 complex regulate expression of the mitophagy receptor protein Atg32. *Journal of Cell Science*, **127**, 2014, 3184-3196  
DOI: 10.1242/jcs.153254

奥 公秀、田村 直輝、阪井 康能、メチロトロフ酵母における多様なオートファジー経路とその生理機能、*化学と生物* **52** 巻、2014、825-829  
[https://katosei.jsbba.or.jp/back\\_issue.php?bn\\_vol=53&bn\\_no=12](https://katosei.jsbba.or.jp/back_issue.php?bn_vol=53&bn_no=12)

Yuichiro Maeda, Masahide Oku, Yasuyoshi Sakai. A defect of the vacuolar putative lipase Atg15 accelerates degradation of lipid droplets through lipolysis. *Autophagy*, **11**, 2015, 1247-1258  
DOI: 10.1080/15548627.2015.1056969

Masahide Oku, Yasuyoshi Sakai. Pexophagy in yeasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. **1863**, 2016, 992-998  
DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.023

〔学会発表〕(計 3 件)

奥 公秀、前田 佑一郎、阪井 康能、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における脂肪滴の動態制御、日本農芸化学会創立 90 周年・関西支部創立 80 周年記念大会、2014 年 9 月 20 日、奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県・生駒市)

Masahide Oku, Yasuyoshi Sakai, Induction of microautophagy during diauxic shift, 27<sup>th</sup> International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Workshop 4: Growth control and Metabolism, 2015 年 9 月 8 日、Levico Terme, Trent, Italy

奥 公秀、酵母液胞と脂肪滴との機能関連、酵母研究会 第 81 回講演会、2016 年 3 月 14 日、月桂冠株式会社 (京都府・京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔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 (OKU, Masahide)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 10511230

### (2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者  
なし