

《農芸化学奨励賞》

酵母における脂質の代謝と膜輸送に関する研究



東京大学大学院農学生命科学研究科 助教 福田 良一

1. はじめに

脂質は、エネルギー源としてだけでなく、生体膜の構成成分、調節物質、情報伝達物質として重要な役割を果たす細胞にとって必須の成分である。脂質の代謝と膜輸送は、真核細胞のオルガネラ形成、活動、ホメオスタシスの維持に深くかかわっているが、その具体的なメカニズムや制御には未解明の部分が多い。また、脂質には食品、医薬品、生物素材などとして利用価値の高いものも多く、このような有用脂質の効率的な生産系の構築には、脂質の代謝と輸送のメカニズムを理解する必要がある。本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* およびアルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* を用い、脂質の代謝と膜輸送に関する研究を行った。

2. 出芽酵母における脂質の代謝と膜輸送

(1) 小胞輸送における膜融合の機構

真核細胞において、オルガネラ間のタンパク質や一部の脂質の輸送は小胞輸送により行われる。さまざまなオルガネラが存在した細胞内で、小胞は目的となるオルガネラ膜へ正確に輸送され膜融合しなければならないが、そのような輸送の特異性を決定する機構は不明であった。一方、真核細胞内の小胞やオルガネラ膜にはそれらに特異的な SNARE タンパク質と呼ばれる一群の膜タンパク質が存在しており、小胞輸送の特異性にかかわることが推定されていた。また、神経細胞由来の SNARE タンパク質を用いた解析から、SNARE タンパク質は輸送小胞とターゲットとなるオルガネラの膜を融合させることができることが示唆されていた。

そのような背景のもと、本研究では出芽酵母由来の精製 SNARE タンパク質を組み込んだリボソームを用い、液胞間、小胞体由来の小胞とゴルジ体、ゴルジ体由来の小胞と細胞膜の3種類の細胞内小胞輸送の膜融合過程を *in vitro* で再構成した。その結果、それらの膜融合にかかわる v-SNARE と t-SNARE 複合体の構成が明らかとなり、これら SNARE タンパク質が膜を融合させる機能をもつことが示された (図1)。これらの結果から、v-SNARE 由来の一つの helix と、t-SNARE 複合体由来の三つの helix がそれらの膜貫通領域の近傍でコイルドコイル構造を形成することにより二つの膜が引き寄せられて融合するという、細胞内膜融合に関する規則性も見いだされた。さらに、これら3種の t-SNARE 複合体と酵母内のすべての v-SNARE となりうる SNARE タンパク質を組み込んだリボソームを用いて膜融合を調べ、一部の例外を除いて、SNARE タンパク質の組み合わせが正しい場合には膜融合が起こるのに対して、正しくない場合には膜融合しないことを明らかにし、v-SNARE と t-SNARE の組み合わせにより膜融合の特異性が決定されることを示した。

(2) リン脂質の輸送と代謝

生体膜は極めて多様な脂質から構成されており、個々の脂質

の合成、輸送、分解と再構成 (リモデリング) が厳密に調節されることにより、生体膜の恒常性が維持されている。このうち、脂質の合成とその制御に関しては比較的解析が進んでいるのに対して、脂質の輸送や分解やリモデリングについては未解明の部分が多く残されている。この原因としては、特定の脂質を可視化するプローブが少ないことや、個々の脂質分子の代謝をモニターすることが困難であることが挙げられる。本研究では、遺伝学的解析の容易な出芽酵母を用いてこれらの問題点に取り組み、生体膜の主要構成成分の一つであるリン脂質の輸送と代謝に関する研究を行った。

脂質は生体膜上で不均一に分布しており、脂質二重層の内外層間でも非対称に存在している。ホスファチジルエタノールアミン (PE) は、真核細胞の主要リン脂質の一つであり、出芽酵母においては生育に必要な脂質である。古くからさまざまな生物種において PE は細胞膜の内層側に偏って分布することが示唆されており、特に動物細胞において細胞膜上での PE の動態の観察が行われてきたが、PE の非対称分布の形成・維持にかかわる内外層間の脂質輸送機構は不明であった。そこで、筆者らは PE に特異的に結合する抗生物質 Ro09-90198 (Ro) を標識して、出芽酵母および分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の細胞膜外層に存在する PE を観察し、細胞膜において通常内層側に多いとされる PE が細胞周期の特定の時期に、極性部位近傍で外層へ露出することを示した (図2)。さらに、遺伝子破壊株を用いた解析から、P 型 ATPase である Dnf1 および Dnf2 と細胞膜タンパク質である Ros3 が、細胞膜において外層側に露出した PE の内層への輸送にかかわることを示唆した。また、酵母遺伝子破壊株コレクションから Ro 感受性株を多数得ており、これらの解析により細胞膜上での PE の非対称分布にかかわるタンパク質が明らかになるものと期待してい

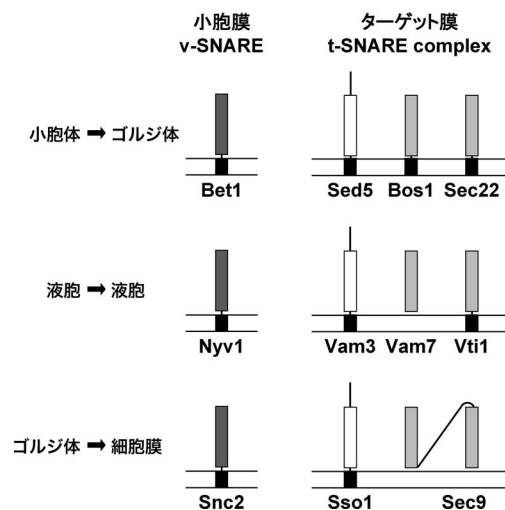


図1 v-SNARE と t-SNARE 複合体の構成

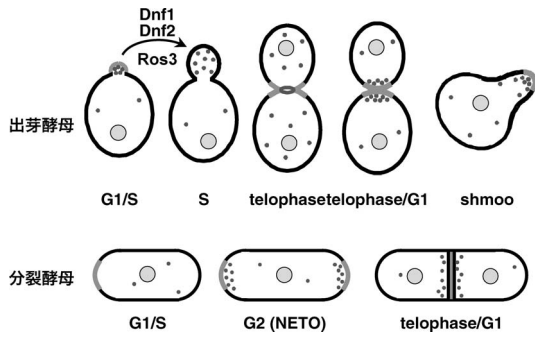


図2 酵母における細胞膜外層へのPEの露出と細胞周期
細胞膜上の薄いグレーで示した部分は外層側にPEが露出している部位を、薄いグレーの円は核を、また濃いグレーのドットはアクチンパッチを示す。

る。

一方、リン脂質のアシル鎖のリモデリングの分子メカニズムとその意義を明らかにすることを目的として、出芽酵母においてPEおよびホスファチジルコリン(PC)のリモデリングについて解析を行った。生体膜中に存在する本来のリン脂質よりも短いアシル鎖を有するPEやPCを酵母の脂質合成欠損株に取り込ませ、その代謝変換を質量分析装置を用いて調べる系を確立し、酵母においてPEやPCのアシル鎖を交換するリモデリングの機構が存在することを明らかにするとともに、その反応様式を詳細に解析した。これにより、これまで困難であったアシル鎖のリモデリングの解析に新たな道が拓かれた。

3. アルカン資化性酵母における脂質代謝の制御

Y. lipolytica はアルカンや脂肪酸等の様々な脂溶性物質を資化する高い能力をもち、脂溶性炭素源を材料とした有用化合物生産への応用が期待される酵母である。*Y. lipolytica* をアルカンを炭素源とした培地で培養すると、アルカンの末端酸化にかかわるチトクロム P450 (P450ALK) の転写が誘導される。このような現象は、さまざまなアルカン資化性酵母においても以前から観察されていたが、アルカンのような高度に疎水的な化合物によって真核細胞の遺伝子発現が制御される機構は不明であった。

筆者らは、*Y. lipolytica* においてアルカン培養時に高度に転写誘導される P450ALK をコードする *ALK1* の発現制御について解析を行い、そのプロモーター上の配列 ARE1 に結合する bHLH 型転写活性化因子 Yas1 と Yas2 を見いだした。

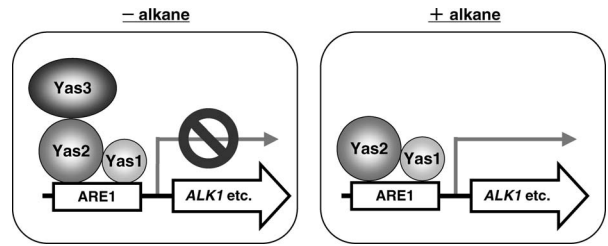


図3 Yas1, Yas2, Yas3 によるアルカン依存的転写制御

Yas1 と Yas2 は複合体を形成し、ARE1 に結合して ALK1 の転写を活性化することが明らかとなった(図3)。さらに最近、Yas2 と結合して Yas1-Yas2 による転写活性化を負に調節する因子 Yas3 も同定した。これらの因子の出芽酵母におけるオルソログは、リン脂質合成酵素遺伝子の転写制御にかかわる正の転写因子である Ino4 および Ino2、転写抑制因子である Opi1 であることから、両酵母における脂質の合成と代謝の興味深い関連が明らかとなった。

本研究は、主に東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻細胞遺伝学研究室で行われたものであり、研究を進めるに当たり終始暖かなご指導、ご助言を賜りました東京大学教授・太田明徳先生に心より感謝申し上げます。研究者としての基礎をご指導いただきました元東京大学教授・高木正道先生に厚く御礼申し上げます。本研究を進めるうえで多大なご助言と励ましをいただきました東京大学准教授・堀内裕之先生に深く感謝申し上げます。また、ご指導いただきました東北大学准教授・永田裕二先生、細胞遺伝学研究室の諸先輩方に心より御礼申し上げます。本研究は、細胞遺伝学研究室の大学院生、学生の多大なる努力のたまものであり、卒業生、在校生に深く感謝いたします。本研究の一部は米国 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center で行われたものであり、ご指導、ご鞭撻を賜りました現 Columbia 大学教授 James E. Rothman 先生ならびに現 Heidelberg 大学教授 Thomas H. Söllner 先生に御礼申し上げます。また、共同研究をさせていただきました学内外の先生方に感謝申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関東支部長の久保田紀久枝先生ならびにご支援を賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。