

# 栄養飢餓応答におけるスフィンゴ脂質の機能に関する研究

小原 圭介

(北海道大学大学院 薬学研究院)

## 研究の目的

外界の栄養源の枯渇は、生物が常に直面してきた問題である。出芽酵母においても、糖源や窒素源の枯渇は、発酵から好気呼吸へのシフトや生活環の転換などの劇的な変化をもたらす。細胞内に目を向けると、栄養源リサイクル機構であるオートファジーという膜現象の発動や、栄養源を取り込むトランスポーター類の輸送の変化など、飢餓応答の一環として細胞内膜動態の大きな変化が起こる。私達は、そのような膜動態の主役である脂質分子の中でも、特に「スフィンゴ脂質」に注目して飢餓応答の研究を行ってきた。本研究を開始する時点で、1) 特定のスフィンゴ脂質分子種の合成がオートファジーに必要である事<sup>1)</sup>、および2) 窒素源が枯渇した条件下でスフィンゴ脂質の正常な合成・代謝が滞ると細胞が急速に死滅する事を見出していた。そこで、本研究では特に2)の発見を深く掘り下げ、窒素飢餓応答におけるスフィンゴ脂質の正常な合成・代謝の重要性を明らかにしようとした。

## 方法

出芽酵母のスフィンゴ脂質合成 (図 1 A) を各段階で停止させ、窒素飢餓条件下での細胞生存率を調べた。生存率は、死細胞を phloxine B で染色し、顕微鏡下で死細胞を計数して算出した。液胞内腔の可視化には、酸性条件下で蛍光を発する DCFDA を用いた。酵母の培養や遺伝子操作などは常法に従って行った。

## 結果

### スフィンゴ脂質の代謝不全は窒素飢餓条件下で急速な細胞の死を引き起こす

スフィンゴ脂質の一種であるマンノシルイノシトールホスホリルセラミド (MIPC) を合成出来ない *csg1Δ csh1Δ* 株は、窒素飢餓条件下で急速に死滅した (図 1B)。窒素源に加えて炭素源も枯渇した窒素炭素飢餓条件下では、そのような細胞の死滅は起こらなかった。このことから、窒素飢餓条件下ではエネルギーを用いた初期応答が起こり、スフィンゴ脂質が正常に合成・代謝できないと、その過程で死に至ると考えられる。次に、スフィンゴ脂質合成の初発段階を阻害するミリオンを含む窒素飢餓培地で MIPC 合成不全株を培養したところ、急速な細胞の死滅が抑制された。つまり、MIPC 合成不全株の死は MIPC の不足ではなく、その前駆体の IPC の過剰な蓄積が原因であった。スフィンゴ脂質は、長鎖塩基と脂肪酸がアミド結合した脂質であり、長鎖塩基部分と脂肪酸部分に付加される水酸基の数や部位によって 5 種類のサブタイプに分類できる。それぞれの部位の水酸化に必須な酵素を MIPC 合成不全株で欠損したところ、長鎖塩基部分の水酸化を行えない株 (*csg1Δ csh1Δ sur2Δ*) では細胞の死が抑制された (図 1C)。このことから、長鎖塩基部分が水酸化された IPC が窒素飢餓時に蓄積すると細胞が生存できなくな

る事が明らかになった。

### 細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ と液胞が MIPC 合成不全株の急速な死滅に関わる

長鎖塩基部分が水酸化された IPC は、 $\text{Ca}^{2+}$  との結合や水酸基同志の水素結合を介してクラスター化し、膜を不安定化させる可能性が指摘されている<sup>2)</sup>。そこで、 $\text{Ca}^{2+}$  を含まない培地で MIPC 合成不全株を予め培養した後に窒素飢餓培地に移したところ、細胞の死滅が抑制された。この事から、窒素飢餓に曝される前に細胞内に蓄えられた  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞の死に関わっている事が明らかになった。酵母細胞内で  $\text{Ca}^{2+}$  を最も豊富に蓄積しているのは液胞である。そこで、MIPC 合成不全株の液胞を可視化し、窒素飢餓条件下で連続観察したところ、死にゆく細胞の約半数で、細胞が死んで縮む前に液胞内容物が細胞内全体に漏出する様子が観察された (図 1D)。したがって、少なくとも半数の死細胞では、液胞膜の崩壊に伴う液胞内容物の漏出が細胞の死を引き起こしている事が強く示唆された。IPC は、脂質二重層のうちオルガネラ内腔側 (細胞膜では細胞外側) の層に存在し、液胞内腔に豊富に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  と結合できる。窒素飢餓時には、膜動態の流れが変化し、多くのタンパク質や脂質が液胞に向かう様になると言われている<sup>3)</sup>。IPC から MIPC への変換が滞ると、このような膜動態の変化に伴って IPC が液胞膜に過剰に蓄積し、

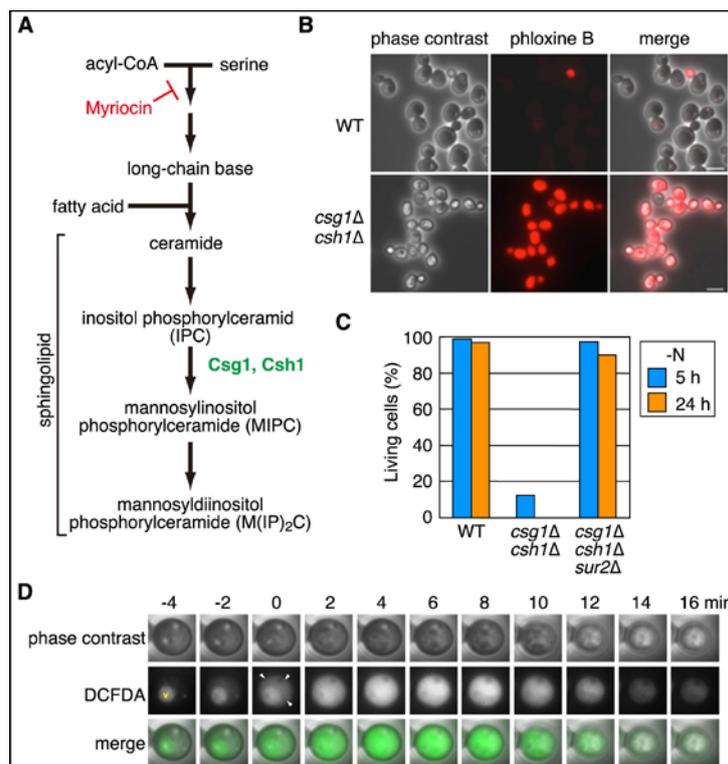


図1 窒素飢餓時の IPC の蓄積は、液胞内容物の漏出を通じた細胞の死をもたらす。A, 出芽酵母のスフィンゴ脂質合成経路。B, 野生型 (WT) および MIPC 合成不全株 (*csg1Δ csh1Δ*) を窒素飢餓条件下に置き、4 時間後に死細胞を phloxine B で染色した。バーは 5  $\mu\text{m}$ 。C, B の 2 株に加えて、長鎖塩基部分の水酸化の不全株 (*csg1Δ csh1Δ sur2Δ*) を窒素飢餓に曝し、生存率を算出した。D, MIPC 合成不全株の液胞内腔 (v) を DCFDA で可視化し、窒素飢餓 2 時間後に連続観察した。死に行く細胞の約半数で、細胞が死んで縮小するより前に、液胞内容物が細胞全体に漏出していた (矢じり)。液胞内容物が細胞全体に漏出し始めた時点を 0 分とした。

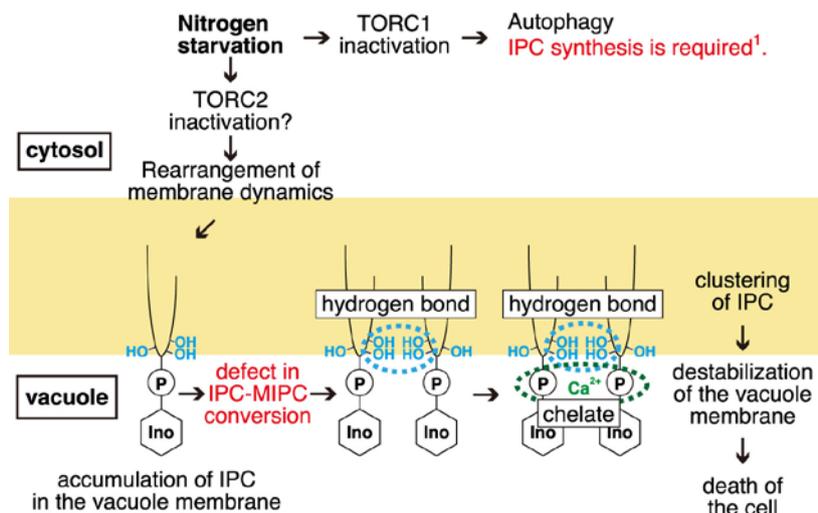


図2 作業仮説。窒素源が枯渇すると TOR 複合体の不活性化を通して、細胞飢餓応答が起こる。そのうち、TORC2 の不活性化を通して起こる初期応答では、IPC から MIPC の代謝がスムーズに行われる事が細胞の生存にとって必須である。IPC から MIPC への変換が滞ると、長鎖塩基部分が水酸化された IPC が液胞膜に蓄積し、水酸基同士の水素結合や液胞内腔の Ca<sup>2+</sup> との結合を通してクラスター化し、液胞膜の破断をもたらす。その一方で、IPC の合成は、TORC1 の不活性化を通して起こるオートファジーに必要である<sup>1)</sup>。つまり IPC の合成と MIPC への代謝の両方が正常に行われる事が、TOR 複合体を介した飢餓応答に極めて重要である。

Ca<sup>2+</sup> との結合や長鎖塩基側に付加された水酸基を介した水素結合を通してクラスター化し、液胞膜の破断をもたらすのではないかと予想している<sup>2)</sup> (図2)。

### MIPC 合成不全株の細胞の死は TOR 複合体 2 の不活性化を通して起こる

TOR 複合体は、栄養状態に応じたタンパク質合成や飢餓応答を司っている。そこで、窒素飢餓条件下での MIPC 合成不全株の死滅が TOR 複合体の不活性化を通して引き起こされるか否かを検証した。TOR 複合体には 2 種類の複合体 (TORC1, TORC2) が存在するが、TORC2 を特異的に不活性化した際に、窒素源を十分に含む培地でも MIPC 合成不全株は急速に死滅した。この結果から、窒素飢餓時に起こる MIPC 合成不全株の死滅は TORC2 の不活化を通して引き起こされる可能性が浮上した。

### 結論

窒素源が枯渇した条件下では、IPC から MIPC への変換が細胞の生死に直結する重要事項である<sup>2)</sup>。一方で、IPC の合成は飢餓応答の一種であるオートファジーの進行に必要である<sup>1)</sup>。即ち、スフィンゴ脂質の合成と代謝の正常な流れが、細胞の飢餓応答の初期に於いては極めて重要である。また、スフィンゴ脂質の正常な合成・代謝を必要とする過程は、TORC2 の不活化によって引き起こされると予想される。IPC が過剰に蓄積すると、その初期過程の途中で、細胞内の Ca<sup>2+</sup> が関わるプロセスを経て液胞膜の破断などの致命的な影響をもたらされると考えられる。

## 文献

- 1) Yamagata, M., Obara, K., and Kihara, A. (2011) Sphingolipid synthesis is involved in autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**: 786-791.
- 2) Yamagata, M., Obara, K., and Kihara, A. (2013) Unperverted synthesis of complex sphingolipids is essential for cell survival under nitrogen starvation. *Genes Cells* **18**: 650-659.
- 3) Hamasaki, M., Noda, T., Baba, M., and Ohsumi, Y. (2005) Starvation triggers the delivery of the endoplasmic reticulum to the vacuole *via* autophagy in yeast. *Traffic* **6**: 56-65.