

油脂酵母の巨大脂肪滴形成を促進する新奇メカニズム

岡本 浩二

大阪大学大学院生命機能研究科

研究の目的

脂肪滴は中性脂肪を主成分とするリン脂質一重層からなる細胞小器官であり、真核生物のほとんど全ての細胞に存在している。近年、脂肪滴は余剰脂肪の単なる貯蔵庫ではなく、動的に脂質代謝を行い、細胞の恒常性維持に役割を果たしていることがわかってきた。さらに最近、国連の持続可能な開発目標に貢献する事業として、脂肪滴からのバイオ燃料生成が注目されている。とりわけ、巨大脂肪滴を形成する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* はバイオリクターでの大量培養を可能にする微生物として期待されており、脂肪滴形成の根本理解は重要な課題である。

そこで本研究では、油脂酵母をモデルとして、脂肪滴の肥大化機構の解明を目的とした。油脂酵母を窒素源飢餓下で培養すると、24 時間で単一の脂肪滴が細胞内に顕在化し、72 時間で細胞質成分の 80%以上を占めるように肥大化する。同様の生理条件下でも、パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の脂肪滴は全細胞体積の 5%未満である。私たちは最近、窒素源飢餓下のパン酵母ではオートファジーが劇的に誘導されるのに対し、油脂酵母では強く抑制されることを見出した（文献 1）。加えて、ユビキチン様タンパク質 Atg8 が油脂酵母の脂肪滴形成を促進する可能性を提起している。Atg8 は生物種を超えて保存され、リン脂質に共有結合するユニークなタンパク質であり、オートファジー・リソソーム構造機能調節・炎症反応など多様な経路で機能すると考えられる。このような背景を踏まえた上で、油脂酵母およびパン酵母の Atg8 を解析のターゲットとし、脂肪滴の形成に関わる活性を調べることにした。

方法

油脂酵母 LsAtg8 とパン酵母 ScAtg8 のアミノ酸配列をタンパク質の立体構造上で比較すると、オートファジーへの関与が知られていないタンパク質表面に 3 つの酸性アミノ酸がトライアングル状に存在することがわかる。興味深いことに、これら 3 つの酸性アミノ酸は別種の油脂酵母の Atg8 ホモログ間で完全に保存されており、脂肪滴形成との関連が想起される。そこで、これらの酸性アミノ酸の分子機能を明らかにするため、野生型 ScAtg8 および LsAtg8 に加えて、LsAtg8 のトライアングル酸性アミノ酸を ScAtg8 に導入した変異体 ScAtg8(Ls-mut)、およびその逆バージョン

LsAtg8(Sc-mut)のパン酵母発現ベクターを構築し、これらを用いてパン酵母を形質転換した（遺伝子発現は *ScATG8* プロモーターで駆動）。得られた形質転換株を窒素源飢餓下で培養し、Atg8 の脂質化やオートファジー活性を解析した。

結果

Atg8 の脂質化については、尿素を含むポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動（Urea-SDS-PAGE）で遊離型と脂質化型の二つの異なるバンドとして分離し、Atg8 抗体を用いたウェスタンブロッティングで解析した。その結果、ScAtg8 と同様に、ScAtg8(Ls-mut)、LsAtg8、LsAtg8(Sc-mut)も脂質化することがわかった。次に、オートファジー活性については、細胞質の解糖系酵素 Tdh3 に赤色蛍光タンパク質 mCherry を付加した Tdh3-mCherry マーカー発現株を作成し、mCherry 抗体を用いたウェスタンブロッティングで解析した。窒素源飢餓下において、Tdh3-mCherry はオートファジーの積み荷として液胞（酵母のリソソーム様オルガネラ）に運ばれ分解されるが、分解酵素に耐性をもつ mCherry はオートファジーの活性に相関して蓄積する。4 種の Atg8 バリエント発現株を調べた結果、ScAtg8(Ls-mut)、LsAtg8、LsAtg8(Sc-mut)の 3 種では ScAtg8 と比較して 70-80%のオートファジー活性をもつことが示唆された。

結論

上記の結果から、油脂酵母の Atg8 に特徴的なトリアングル酸性アミノ酸は Atg8 の脂質化には関与しないとともに、オートファジー活性についても顕著な影響は及ぼさないと考えられる。油脂酵母は窒素源飢餓下において、脂肪滴の肥大化が起こる一方、オートファジーはほとんど誘導されない。この際、LsAtg8 の脂質化を阻害すると、脂肪滴の肥大化が部分的に抑制されることがわかった（文献 1）。これらの知見を総合的に考察すると、LsAtg8 はオートファジー活性に加えて脂肪滴肥大化活性をもつ可能性が提起される。また、これら 2 つの活性は互いに独立しており、特定のオルガネラへの標的化や他のタンパク質との相互作用によって使い分けられているのかもしれない。今後の解析により、この作業仮説を検証する。

文献

1. Duan L, Togou A, Ohta K, Okamoto K*. Mitochondria-giant lipid droplet proximity and autophagy suppression in nitrogen-depleted oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* cells. *J Biochem.* 2025 Jan 6;177(1):15-25. doi: 10.1093/jb/mvae069.