

略 歴

1991年 3月	東京大学農学部	卒業
1993年 3月	東京大学大学院 農学生命科学研究科	修士課程終了
1996年 1月	日本学術振興会特別研究員	
1996年 3月	東京大学大学院 農学生命科学研究科	博士課程終了
1997年 11月	米国メモリアル・スローン・ ケタリング・がんセンター	博士研究員
2000年 7月	東京大学大学院 農学生命科学研究科	助手
2007年 3月	東京大学大学院 農学生命科学研究科	助教
	現在に至る	

酵母のステロールホメオスタシスの解明

ステロールは真核細胞の生体膜を構成する主要脂質の一つである。ステロールは細胞膜やオルガネラ膜に含まれているが、その割合は膜ごとに異なっており、そのことが膜の構造や機能に重要であると考えられている。一方で、ステロールの合成は小胞体でのみ行われることから、各オルガネラ膜中のステロール量の調節と生体膜としての機能の維持、すなわちステロールホメオスタシスには、小胞体から各オルガネラへのステロール輸送が重要であると考えられる。細胞内のステロール輸送は小胞輸送に依存しない機構により行われることが提唱されてきたが、詳細は未解明である。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、古くからアルコール醸造やパン作りに利用されてきたが、それら発酵条件ではアルコール、酸化、温度など膜に負荷を与えるストレスに曝される。*S. cerevisiae* において主要ステロールであるエルゴステロールはこれらのストレスに対する耐性に関わることから、膜ストレスに対する耐性を増強した優良菌株の創製には、ステロールホメオスタシス維持機構の解明が必要であると考えられる。

S. cerevisiae において、ステロールはミトコンドリアを含む様々なオルガネラに含まれているが、小胞体からそれらオルガネラへどの様にステロールが輸送されるかは未解明である。本研究では、*S. cerevisiae* から調製した膜画分を用い、小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送を *in vitro* で評価する系を構築し、その機構について解析を行った。この系では、内在性のステロールアシル化酵素の欠損株において、細菌由来のステロール化酵素にミトコンドリア移行シグナルおよび膜貫通領域と EGFP を連結した mito-SatA-EGFP を発現させてミトコンドリアに局在させ、ミトコンドリアでのステロールのエステル化を指標にステロール輸送を評価することにした。まず、放射標識したステロールを含む小胞体膜画分を mito-SatA-EGFP を発現させたミトコンドリア画分および細胞質画分と混合したところ、ステロールの

エステル化が見られたことから、小胞体からミトコンドリアへ *in vitro* でステロールが輸送されたと考えられた。

次に、*S. cerevisiae* のオキシステロール結合タンパク質ホモログである Osh タンパク質のステロール輸送への関与を解析した。7つの *OSH* 遺伝子、*OSH1* ~ *OSH7* を欠損した株から調製した膜画分および細胞質画分を用いて *in vitro* で小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送を解析したところ、ステロール輸送が低下した。さらに、細胞質画分の代わりに精製した Osh4 ~ Osh7 タンパク質やすべての *OSH* 遺伝子を破壊し *OSH1* ~ *OSH3* を単独で発現させた株から調製した細胞質画分を添加したところ、ステロール輸送が観察された。また、*OSH* 遺伝子を欠損させた株では、ミトコンドリア画分のステロール含量が低下した。これらの結果から、Osh タンパク質が小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送に関わることが明らかになり、さらに *S. cerevisiae* の Osh1 ~ Osh7 が全てステロールを輸送することができることが示唆された。

はじめに

ステロールは真核細胞の生体膜の主要構成成分の1つであり、流動性や透過性など膜の特性に大きな影響を与える脂質である。また、ステロールは膜上で脂質マイクロドメインを形成することにより、シグナル伝達や小胞輸送など様々な細胞内プロセスに関与する。生体膜を構成するステロールの主要な分子種は、動物ではコレステロールであるのに対して、酵母を含む菌類ではエルゴステロールである。ステロールは、細胞膜やオルガネラ膜などほとんどの膜に含まれているが、その含量は膜ごとに異なっており、そのことが膜の構造と機能に重要であると考えられている。ステロールは小胞体膜上で新規合成されるか、細胞外から取り込まれることから、生体膜中のステロールレベルの調節と生体膜としての機能の維持、すなわちステロールホメオスタシスの維持には、細胞内ステロール輸送が重要であると考えられる。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、エルゴステロールはミトコンドリアの形態に重要であることが知られている⁽¹⁾。また、動物ではステロールはミトコンドリアでホルモンなどの合成に利用される。しかしながら、小胞体で合成されたステロールがどのようにミトコンドリアに輸送されるかは全く不明である。

細胞内のステロール輸送の機構については、小胞輸送による機構と小胞輸送に依存しない機構が存在することが古くから知られているが、小胞輸送非依存的ステロール輸送の機構は未解明である。小胞輸送非依存的な脂質輸送の機構として、脂質分子を一方の膜から抽出し他方の膜に輸送して挿入する脂質輸送タンパク質 (Lipid Transfer Protein, LTP) による輸送と、2つの膜が近接しているが融合していない領域である膜コンタクトサイト (Membrane Contact Site, MCS) を介した輸送が提唱されている。オキシステロール結合タンパク質 (Oxysterol Binding Protein, OSBP) 関連タンパク質 (OSBP-related Protein, ORP) は、ステロールを輸送する LTP の候補の1つである。酵母には OSBP ホモログ遺伝子として、*OSH1* ~ *OSH7* が存在する (Fig. 1)。これら *OSH* 遺伝子がコードするタンパク質のうち、Osh4 は *in vitro* でステロールを輸送する活性を持ち、小胞体-細胞膜間および小胞体-ゴルジ体間のステロール輸送に関わることが示唆されているが、他の Osh タンパク質がステロール輸送に関与するかどうかは不明である⁽²⁾。また、各 *OSH* 遺伝子を破壊しても生育は可能であるが、全ての *OSH* 遺伝子を破壊すると致死となることから⁽³⁾、*OSH* 遺伝子は何らかの生育に必須な機能を共有していると考えられているが、それが何かは不明である。

S. cerevisiae は、古くからアルコール醸造やパン製造等に利用されてきたが、それら発酵条件ではエタノール、酸化、温度など膜に負荷を与えるストレスに曝される。酵母においてエルゴステロールはこれらのストレスに対する耐性に関わることが知られていることから⁽⁴⁻⁶⁾、膜ストレスに対する耐性を増強した優良菌株の創製には、ステロールホメオスタシス維持機構の解明が必要であると考えられる。

本研究では、*S. cerevisiae* のステロールホメオスタシスの維持機構を理解し、それを応用してストレス耐性酵母を創製するため、ステロールのオルガネラ間輸送機構について解析を行った。

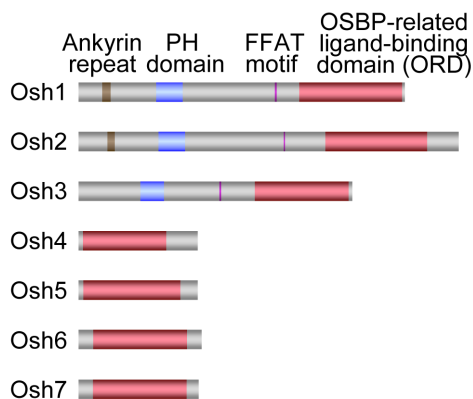


Fig. 1 *S. cerevisiae* の Osh1 ~ Osh7 の構造
ORP は全て脂質との結合に関わる OSBP-related ligand binding domain (ORD) を持つ。また、一部の ORP には小胞体膜タンパク質 VAP との結合に係る FFAT motif、ホスホイノシチドとの結合に関わる PH domain、機能不明の Ankyrin repeat が存在する。

方法

酵母の菌株と培地

酵母の菌株は、野生型株である W303-1A 株 (ATCC)、*OSH* 遺伝子を全て破壊し *OSH4* または *osh4-1* を発現する CBY924 株、CBY925 株⁽⁷⁾ およびそれらの株において *ARE1* および *ARE2* を破壊した株を使用した。酵母の培養は、YPD 培地、SD 培地、Semi-synthetic lactate 培地 (0.17% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate、0.5% 硫酸アンモニウム、4.4% 乳酸、0.8% 水酸化ナトリウム、pH5.5) を使用した。

オルガネラの単離とステロール輸送解析

酵母の小胞体画分⁽⁸⁾、ミトコンドリア画分⁽⁹⁾、細胞質画分は常法に従い調製した。ステロール輸送解析ではまず Venkateswarlu らの方法⁽¹⁰⁾に従い、L-[methyl-³H]メチオニンを使用して小胞体膜上で [³H] 標識ステロールを *in vitro* で合成した。遠心により小胞体画分を単離した後、ミトコンドリア画分および細胞質画分あるいは精製タンパク質を添加しインキュベートした。反応後脂質を抽出し、シリカゲル 60TLC プレートを用いヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸 (80:20:1) を展開溶媒とした TLC により分離した。ステロールおよびステリスエステルをかき取り、液体シンチレーションカウンターにより [³H] 標識されたステロールとステリルエステルを定量した。

結果

小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送の *in vitro* での解析系の構築

ステロールの細胞内輸送の研究が遅れている理由として、ステロールのオルガネラ間の移動を簡単に評価する系がないことがあげられる。細胞内ではステロールの一部は小胞体でステロールアシル化酵素によってステリルエステルに変換され、脂肪滴に貯蔵される。酵母において、ステロールアシル化酵素遺伝子 *ARE1* および *ARE2* を破壊した *are1 Δ are2 Δ* 株ではステリルエステルが全く検出されなくなるが、生育に影響は見られない。申請者はこれまでに、*are1 Δ are2 Δ* 株において、細菌由来のステロールアシル化酵素 SatA に酵母のミトコンドリアタンパク質である Pet100 のミトコンドリア移行シグナルおよび膜貫通領域と蛍光タンパク質 EGFP を連結した融合タンパク質 mito-SatA-EGFP を発現させることによりステロールアシル化酵素をミトコンドリアに局在させ、ステロールがミトコンドリアでエステル化されることを指標に、生細胞内での小胞体からミトコンドリアステロール輸送を評価する系を構築した (Fig. 2)⁽¹¹⁾。

そこで、本研究ではこの mito-SatA-EGFP の系を利用し、酵母から調製した精製膜画分を用いて小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送を *in vitro* で評価する系を構築し、その機構の解析を行った。まず、*are1 Δ are2 Δ* 株から精製した小胞体画分上で [³H] メチオニン存在下、[³H] 標識ステロールを合成させた。小胞体を遠心により精製した後、mito-SatA-EGFP を発現させた *are1 Δ are2 Δ* 株から精製したミトコンドリアおよび *are1 Δ are2 Δ* 株の細胞質とインキュベートしたところ、[³H] 標識ステロールが時間とともにステリルエステルに変換されたことから (Fig. 3)、*in vitro* で小胞体からミトコンドリアへ [³H] 標識ステロールが輸送されたと考えられた。

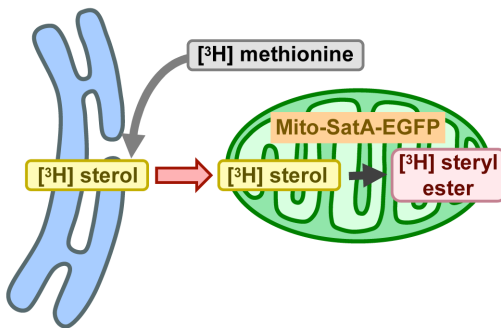


Fig. 2 小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送の解析系

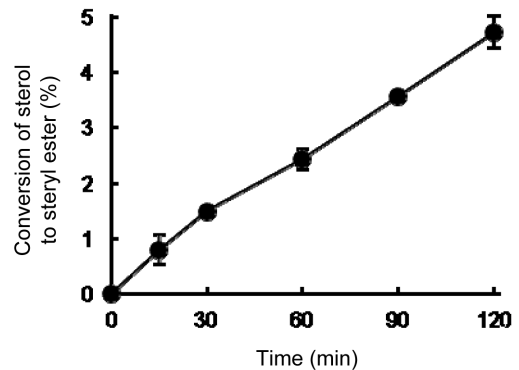


Fig. 3 野生型株由来の小胞体、ミトコンドリア、細胞質画分を用いた *in vitro* でのオルガネラ間ステロール輸送

Osh4による小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送

構築した *in vitro* のステロール輸送解析系を用いて、Oshタンパク質の関与を調べることにした。Oshタンパク質は重複した機能を持つことが予想されたこと、Oshタンパク質の一部は膜に局在することから、*OSH* 遺伝子をすべて破壊した背景で、野生型の *OSH4* を発現させた *osh Δ OSH4* 株あるいは温度感受性の *osh4-1* を発現させた *osh Δ osh4-1* 株から調製した膜画分と細胞質画分を使用することにした。まず *osh Δ osh4-1* 株から調製した小胞体画分および mito-SatA-EGFP を発現させた

osh Δ *osh4-1* 株から調製したミトコンドリア画分と *osh* Δ *OSH4* 株あるいは *osh* Δ *osh4-1* 株から調製した細胞質画分を使用してステロール輸送を解析した (Fig. 4A)。その結果、25℃ではどちらの細胞質を用いた場合にも同程度のステロール輸送が見られたのに対して、37℃では、*osh* Δ *OSH4* 株の細胞質を使用した場合と比較して *osh* Δ *osh4-1* 株の細胞質を用いた場合にはステロール輸送が低下した。更に細胞質画分の代わりに大腸菌で合成させ精製した Osh4 を添加した場合にもステロール輸送が観察された (Fig. 4B)。これらの結果から、Osh4 が *in vitro* で小胞体からミトコンドリアへステロールを輸送する機能を持つことが示唆された。

Osh4によるミトコンドリアのステロール量の維持

osh Δ *OSH4* 株および *osh* Δ *osh4-1* 株から小胞体およびミトコンドリアを精製し、ステロール含量を定量した (Fig. 5)。ステロール含量はリン脂質由来のリン量に対するエルゴステロール量で評価した。その結果、25℃で培養した場合にはこれらの株のミトコンドリア画分には同程度のステロールが含まれていたのに対して、37℃で培養した場合には *osh* Δ *OSH4* 株と比較して *osh* Δ *osh4-1* 株のミトコンドリア画分のステロール含量は低くなっていた。これらの結果から、Osh4 が細胞内でミトコンドリアのステロール量の維持に関与することが示唆された。

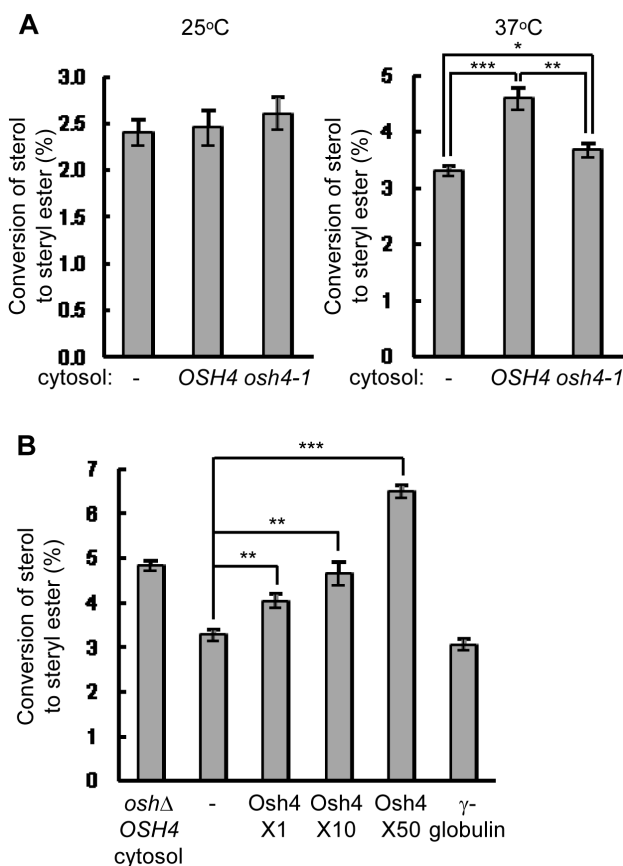


Fig. 4 Osh4によるステロール輸送

osh Δ *osh4-1* 株の膜画分と細胞質画分 (A) または精製タンパク質 (B) を用い、*in vitro* でステロール輸送を解析した。

p* < 0.05, *p* < 0.01, ****p* < 0.001。

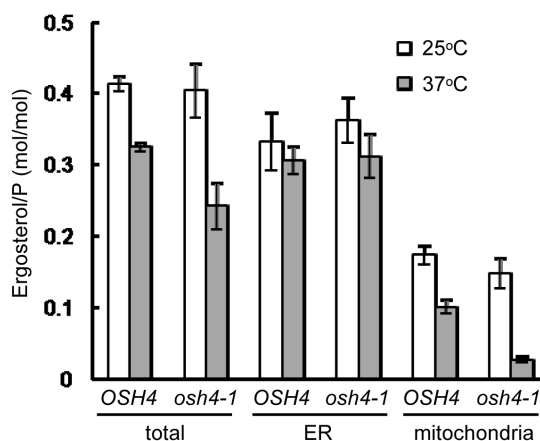


Fig. 5 *OSH* 遺伝子変異株における小胞体およびミトコンドリアのステロール含量

osh Δ *OSH4* 株 (*OSH4*) および *osh* Δ *osh4-1* 株 (*osh4*) から小胞体およびミトコンドリア画分を精製し、ステロール量を解析した。

他のOshタンパク質によるステロール輸送

Osh4以外のOshタンパク質がステロール輸送能を持つか検討した。*osh* Δ *osh4-1*株の小胞体およびミトコンドリア画分に大腸菌で合成させ精製したOsh5～Osh7を添加して37℃でステロール輸送を解析したところ、どのOshタンパク質を用いた場合にもステロール輸送が観察された (Fig. 6A)。Osh1～Osh3は大腸菌中で合成させ精製することができなかつたため、*OSH* 遺伝子をすべて破壊した背景で *OSH1*～*OSH3*を単独で発現させる酵母株を作製し、その細胞質画分を使用した。その結果、どの株の細胞質画分を用いた場合にもステロール輸送が観察された (Fig. 6B)。これらの結果から、Oshタンパク質はすべてステロールを輸送する機能を持つことが示唆された。

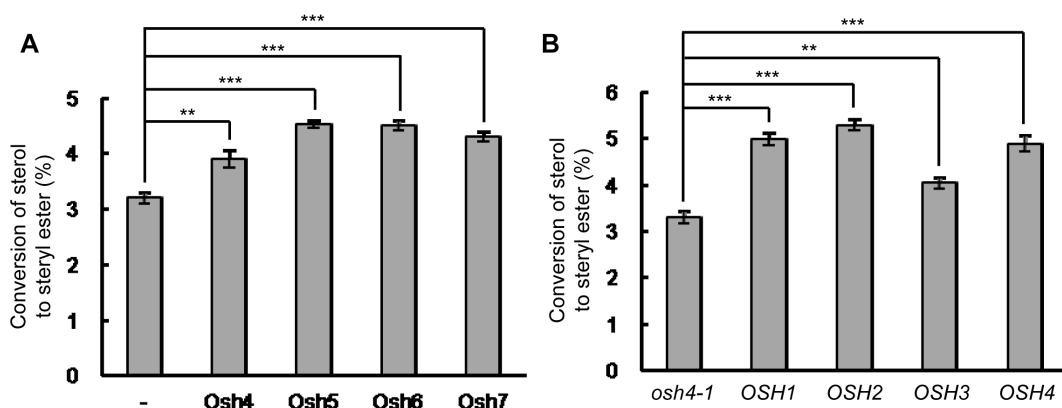


Fig. 6 Oshタンパク質によるステロール輸送

osh Δ *osh4-1*株の膜画分と精製タンパク質 (A) または細胞質画分 (B) を用い、*in vitro*でステロール輸送を解析した。
** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

考 察

本研究では、酵母から調製した膜画分を使用し、*in vitro*で小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送を評価する系を構築し、その機構を解析した。本研究により、Oshタンパク質が小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送を担うことが示された。更に酵母のOshタンパク質はすべてステロールを輸送する機能を持つことが初めて示唆された。ORPは真核生物に保存されたタンパク質であるが、多くの生物はゲノムに複数のORPパラログを有する。これまで酵母や動物のごく一部のORPについて*in vitro*でステロールを輸送することができることが示され、オルガネラ間のステロール輸送に関与することが報告されてきた⁽²⁾。一方で、ORPが膜間で脂質を輸送するLTPとしてではなく、エキソサイトーシスやホスホイノシチド代謝等様々な細胞内プロセスに脂質センサーあるいは制御因子として関与することが提唱されており⁽²⁾、ORPに共通する必須の機能は不明であった。本研究の結果から、ステロールを輸送することがORPの共通する必須の機能である可能性が示唆された。

*in vitro*でのステロール輸送解析において、*OSH*をすべて欠損した条件でもある程度のステロール輸送が観察されたことから、小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送には、他のLTPやMCSも関与する可能性が考えられる。これらの遺伝子を破壊した株から調製した膜画分や細胞質画分を使用して本研究で構築した系を用いてステロール輸送を解析することにより、小胞体からミトコンドリアへの

ステロール輸送の全貌を明らかにすることができると期待される。

さらに、ステロール輸送に関わることが明らかとなった *OSH* 遺伝子を改変した株においてストレス耐性と細胞内ステロール分布を解析することにより、ストレス応答におけるステロールの役割を明らかにし、ストレス耐性の酵母菌株の創製が可能になると期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人アサヒグループ学術振興財団より研究助成を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Altmann, K., and Westermann, B. (2005) Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5410-5417
2. Kentala, H., Weber-Boyvat, M., and Olkkonen, V. M. (2016) OSBP-Related Protein Family: Mediators of Lipid Transport and Signaling at Membrane Contact Sites. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **321**, 299-340
3. Beh, C. T., Cool, L., Phillips, J., and Rine, J. (2001) Overlapping functions of the yeast oxysterol-binding protein homologues. *Genetics* **157**, 1117-1140
4. Swan, T. M., and Watson, K. (1998) Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**, 191-197
5. Inoue, T., Iefuji, H., Fujii, T., Soga, H., and Satoh, K. (2000) Cloning and characterization of a gene complementing the mutation of an ethanol-sensitive mutant of sake yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 229-236
6. Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., and Beney, L. (2012) Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution* **66**, 2961-2968
7. Beh, C. T., and Rine, J. (2004) A role for yeast oxysterol-binding protein homologs in endocytosis and in the maintenance of intracellular sterol-lipid distribution. *J. Cell Sci.* **117**, 2983-2996
8. Wuestehube, L. J., and Schekman, R. W. (1992) Reconstitution of transport from endoplasmic reticulum to Golgi complex using endoplasmic reticulum-enriched membrane fraction from yeast. *Methods Enzymol.* **219**, 124-136
9. Zinser, E., and Daum, G. (1995) Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 493-536
10. Venkateswarlu, K., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Manning, N. J., and Kelly, S. L. (1998) The N-terminal membrane domain of yeast NADPH-cytochrome P450 (CYP) oxidoreductase is not required for catalytic activity in sterol biosynthesis or in reconstitution of CYP activity. *J. Biol. Chem.* **273**, 4492-4496

11. Tian, S., Ohta, A., Horiuchi, H., and Fukuda, R. (2015) Evaluation of sterol transport from the endoplasmic reticulum to mitochondria using mitochondrially targeted bacterial sterol acyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 1608-1614