

栄養飢餓時の脂肪滴ダイナミクス

鈴木 邦 律

東京大学大学院新領域創成科学研究科
附属バイオイメージングセンター 准教授

緒 言

生物は栄養が不足した時に備えて過剰な栄養をできる限り細胞内に貯蔵しようとする。こうした仕組みは単細胞真核生物である出芽酵母から我々哺乳類のような高等動物にまで共通であり、炭水化物や脂質は脂肪滴というオルガネラに中性脂質として蓄えられる。脂肪滴に貯蔵された中性脂質は必要に応じて細胞に使われやすい形に代謝された後、使用される。単細胞真核生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、脂肪滴は triacylglycerol (TAG) と steryl-ester (SE) を主成分とする。TAGとSEの合成にはそれぞれ2つずつの遺伝子が関与している。これら4つの遺伝子が全て破壊された株(以下、脂肪滴形成不能株と呼ぶ)では、TAGとSEが合成できなくなり、脂肪滴が消失する。脂肪滴形成不能株は、栄養が十分に存在する培地で増殖可能であるが、栄養が不足した培養条件での生存率が低下することが報告されている。

一方、栄養が不足した際の細胞の応答機構として、真核生物に広く保存されている細胞内分解機構であるオートファジーという現象が知られている(図1)。オートファジーとは細胞質成分を細胞内分解コンパートメントである液胞/リソソームに送り込んで分解することにより遊離アミノ酸を確保し、栄養飢餓環境に適応するために必要なタンパク質合成を行うためのシステムである。細胞質成分の隔離は二重膜の閉じたオルガネラであるオートファゴソーム(以下AP)によって担われている。AP形成に必須な遺伝子として一群の autophagy-related (ATG) 遺伝子が知られており、ATG 遺伝子を欠いた細胞は、オートファジー不能となる。オートファジー不能株は富栄養条件での増殖に問題はないが、栄養飢餓培地での生存率が低下する。

脂肪滴形成不能株とオートファジー不能株の表現型が類似していることから、脂肪滴形成不能株でオートファジー活性が低下しているのではないかと考え、脂肪

滴形成とオートファジー活性との関連を調べた。

結 果

栄養飢餓時の表現型が類似していることから、脂肪滴形成不能株の供与を受け、オートファジー活性を調べた。オートファジーが引き起こされると、形成されたAPが液胞と融合することにより、オートファジックボディ(以下AB)と呼ばれる構造体として液胞内部に放出される(図1)。野生株においては、ABは液胞内の加水分解酵素の働きにより速やかに崩壊するのでその存在を確認することはできないが、液胞内加水分解酵素Pep4を欠いた株では、ABが分解されないことから、液胞内部を動き回る多数の粒子として明視野顕微鏡下に目視可能となる。Pep4を欠いた脂肪滴形成不能株を用いてABの観察を行ったところ、ABの蓄積がほとんど見られないことがわかった。この結果から、脂肪滴形成不能株はオートファジーの過程に欠損があるものと考えられた(未発表データ)。

脂肪滴形成不能株は4つの遺伝子が破壊されている株

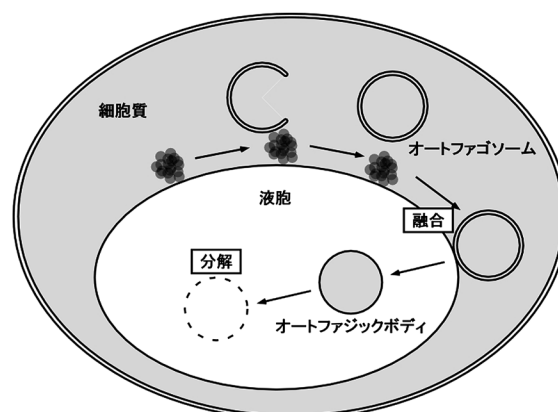


図1 オートファジーの模式図

細胞質を包み込むようにオートファゴソームが形成される。オートファゴソームは細胞内分解コンパートメントである液胞/リソソームと融合した後、内容物の細胞質成分と共に速やかに分解される。

である。その中でオートファジーの活性に重要な遺伝子を決定するために、出芽酵母の遺伝学を有効に利用して、自身の手で脂肪滴形成不能株を作製し、オートファジー活性を定量化した。出芽酵母においてはアルカリホスファターゼアッセイ法 (ALP assay) がオートファジー活性を定量化する方法として確立している。液胞酵素ALPを操作して液胞ターゲティングシグナルを欠損させることにより細胞質に局在させる。オートファジーの進行に伴い、細胞質に局在させたALPが非選択的にAPへと取り込まれ、液胞へと輸送される。ALPは液胞内で成熟することにより初めて活性化するので、細胞抽出液中のALPの活性を測定することによってオートファジーの活性を見積もることができる。脂肪滴形成に関わる4種類の遺伝子の単独破壊株を作製し、掛け合わせを行うことでそれぞれの組み合わせの二重破壊株 (6種類) と三重破壊株 (4種類)、そして四重破壊株 (1種類) を作製した。これらの株のオートファジー活性をALP assay法により定量化し、四重破壊株でオートファジー欠損の表現型が出ることを再確認した (未発表データ)。一連の実験により、オートファジー活性にとって重要な遺伝子の組み合わせを解明することができた。

考 察

脂肪滴は中性脂質の貯蔵オルガネラとして知られているが、その能動的な役割についての知見は多くない。我々の研究により、脂肪滴形成不能株はオートファジー活性が大幅に低下していることが確認された。オートファジーは二重膜オルガネラであるAP形成を介して進行する。脂肪滴は中性脂質を貯蔵しておくオルガネラであると考えられているが、AP形成の膜動態に能動的に関わっているとすれば、極めて興味深い現象だと言える。脂肪滴やAPは単細胞真核生物である出芽酵母から高等動物にまで普遍的に存在し、どちらも小胞体から形成されると考えられている。本研究の成果は小胞体を軸にしたオルガネラ間の相互作用を理解するうえでも極めて興

味深いものである。また、栄養飢餓条件で引き起こされるオートファジーという現象と、中性脂質代謝との関係を探ることは、我々真核生物の「食」とそれによる細胞内代謝制御機構を理解することにもつながるだろう。例えばカロリー制限などでオートファジーを誘導すれば、中性脂質の合成経路がオートファジーの進行に振り替えられ、細胞内への中性脂質の蓄積を減らすことができるかもしれない。こうしたことを考えると、本研究により得られる知見は、将来的には生活習慣病のリスク低減やQuality of Lifeの向上に寄与することが期待される。

要 約

脂肪滴形成不能株は、栄養が十分に存在する培地で増殖可能であるが、栄養が不足した培養条件での生存率が低下する。また、オートファジー不能株も同様に富栄養条件での増殖に問題はないが、栄養飢餓培地での生存率が低下することが知られている。このように、脂肪滴形成不能株とオートファジー不能株の表現型が類似している点に注目して研究を進めたところ、脂肪滴形成不能株ではオートファジー活性が低下していることがわかった。また、脂肪滴形成に関わる4つの遺伝子のうち、特定の組み合わせで遺伝子を破壊した場合にのみオートファジー不能の表現型が見られた。今後はこれらの遺伝子がどのようにオートファジー活性に関わっているのかを解析していく予定である。

謝 辞

本研究課題に対して助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに選考の労をとっていただいた諸先生方に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) K. Suzuki, et al.: *PLoS One*, **9**, e91651, 2014.
- 2) K. Suzuki, et al.: *J. Cell Sci.*, **126**, 2534–2544, 2013.
- 3) R. Matsumoto, et al.: *Protoplasma*, **250**, 1283–1293, 2013.