

脂質からみたオートファジーの膜動態

堀江-川俣 朋子

(東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター)

オートファジーは真核生物が持つ細胞内の主要な分解システムである。オートファゴソームは二重膜から構成されており、外膜は液胞/リソソームと融合する。一方、内膜やそれに含まれるタンパク質、核酸、オルガネラ等は、液胞/リソソーム内の種々の加水分解酵素（プロテアーゼ、RNase、リパーゼなど）によりまるごと分解される。これまで *ATG* 遺伝子の発見とそれに続く各 *Atg* タンパク質の構造・機能解析から、オートファゴソームの形成過程を分子レベルで理解することが可能となってきた。最近では、*Atg2* が脂質を輸送する活性を持つことや、*Atg9* が脂質スクランブラーゼ活性を持つことなど、画期的な発見が相次いで報告されている。このように *Atg* タンパク質の動作原理が次第に明確になりつつあるが、オートファゴソーム膜形成の全体像を理解するには至っていない。特に、オートファゴソーム膜の構成脂質の理解はほとんど進んでいない。さらに、液胞/リソソームでの膜脂質分解に関する研究はこれまで殆ど行われてこなかった。液胞内リパーゼである *Atg15* が必須であることはかなり前から知られていたが、その他の脂質分解酵素は存在も含めて未知であり、脂質分解の最終産物およびその代謝・輸送の素過程もわかっていない。

最近私達は、オートファジーを誘導した酵母細胞から、液胞及びオートファジックボディ（オートファゴソームと液胞との融合に伴い液胞内に遊離するオートファゴソームの内膜小胞）を生化学的に単離することに成功している。これにより、オートファゴソームに含まれるタンパク質の網羅的なプロテオーム解析が可能になっただけでなく、液胞膜やオートファジックボディ膜の脂質組成の解析も可能になった。また、液胞内リパーゼ *Atg15* に依存したオートファジックボディ膜分解過程を解析できる *in vitro* 系を構築した。本研究会では、これまで得られたオートファジー関連膜の脂質組成や液胞内での膜脂質分解に関する結果について紹介したい。

セラミドの小胞体からゴルジ体への輸送：膜接触部位の役割

船戸 耕一

(広島大学大学院統合生命科学研究科)

細胞膜に囲まれた区画を1つしか持たない原核細胞と異なり、真核生物の細胞には膜で囲まれた様々なオルガネラが存在する。これらのオルガネラは固有のタンパク質と脂質組成をもち、固有の機能を果たす。オルガネラに局在する分子の分布はそれぞれの分子の合成、輸送、分解の動的平衡の上に維持されているが、中でもオルガネラ間の輸送を伴う分子の仕分けはオルガネラの独自性の構築に重要な役割を果たす。この仕分けの分子機構、つまり選別輸送についてはタンパク質でこれまで研究が進められてきたが、最近になって、脂質の選別輸送に関する研究が進展し、タンパク質の輸送とは異なる様式で行われていることが明らかになってきた。今回の研究会では、脂質の輸送の分子機構について、スフィンゴ脂質代謝の中間代謝物質であるセラミドを例に紹介したい。

セラミドは長鎖アミノアルコールであるスフィンゴイド塩基に脂肪酸がアミド結合した化合物であり、セラミドの1位に極性基が結合することによって複合スフィンゴ脂質と呼ばれる多様な分子へ変換される。出芽酵母では、セラミドにイノシトールリン酸が付加してイノシトールリン酸セラミド (IPC) が、IPCにマンノースが付加してマンノシルイノシトールリン酸セラミド (MIPC) が、さらにイノシトールリン酸がMIPCに付加することでマンノシルジイノシトールリン酸セラミド (M(IP)₂C) が合成される。セラミド合成酵素は小胞体に、複合スフィンゴ脂質の合成酵素はゴルジ体に局在していることから、小胞体で合成されたセラミドはゴルジ体へ輸送される必要がある。このセラミドの小胞体ーゴルジ体間輸送には、輸送小胞を介した小胞輸送と輸送小胞を介さない非小胞輸送の2つの経路が存在する¹⁾。小胞輸送はタンパク質の輸送と同じCOPII小胞を用いたATP依存性の輸送であり、セラミド輸送の約6-8割を担う。一方、セラミドの非小胞輸送はATP非要求性であり、サイトゾルタンパク質とオルガネラ間で形成される接触部位が関与することが示唆されているが、その実体は長い間不明であった。

今回の研究会では、最近我々が明らかにしたセラミドの非小胞輸送に関与するtricalbins (トリカルビン) について報告する。トリカルビンは、小胞体と細胞膜間の接触部位の形成に関与する繫留因子として酵母で2012年に同定された。我々は、トリカルビンが小胞体とゴルジ体間の接触部位の形成にも関与し、セラミドの非小胞輸送を促進する能力があることを発見した²⁾。

1) Funato and Riezman, *J. Cell Biol.*, 2001, DOI: 10.1083/jcb.200105033

2) Ikeda et al., *iScience*, 2020, DOI: 10.1016/j.isci.2020.101603

ゲノム編集が変える麹菌の研究と機能開発

丸山潤一

(東京大学 大学院農学生命科学研究科)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本の伝統的醸造産業に使用されている糸状菌である。また、酵素や異種タンパク質の生産だけでなく、近年は天然物の異種生産宿主としてもその利用は広がっている。これまでの麹菌の遺伝子解析や機能改変は、最初に全ゲノム配列が解読された野生株 RIB40 を対象として、宿主・ベクター系の開発などにより集中的に行われてきた。その一方で、麹菌には日本酒・醤油・味噌、酵素生産などそれぞれの用途に適した多種多様な実用株が存在する。しかし、これら個々の麹菌実用株の機能開発を目的とした遺伝子改変を行うのは極めて困難であり現実的ではなかった。

ゲノム編集は DNA 切断酵素を用いて標的遺伝子を改変する技術であり、なかでも CRISPR/Cas9 システムは、Cas9 ヌクレアーゼと sgRNA (single-guide RNA) の 2 つの因子による簡便で効率的な遺伝子改変が可能な技術である。我々は CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術を麹菌で初めて導入し、実用株において 50 ~ 100% の高い変異導入効率を得ることに成功した。さらにドナー DNA を用いて、標的遺伝子を破壊するノックアウト、標的とする遺伝子座に DNA 断片を導入するノックインを行うこともできた。従来の遺伝子破壊・遺伝子導入の考えでは標的とする遺伝子座に形質転換マーカーを導入して選択圧を上げていたのに対し、ゲノム編集によるノックアウト・ノックインは高効率であるために形質転換マーカーの導入を必要としない。これに加え、ゲノム編集用プラスミドのリサイクリングを繰り返す技術を開発したことで、形質転換マーカーの数を気にすることなく遺伝子改変を無限に繰り返すことが可能になった。

以上のように、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術は、麹菌実用株における遺伝子改変効率を飛躍的に向上したに留まらず、多重遺伝子改変も可能にした。そして最近では、次世代シーケンサー解析によりゲノム配列情報が容易に入手できることで、麹菌実用株の多様な特性に着目した遺伝子機能解析が可能である。さらには、実用株を対象に従来のランダム変異によらない自在かつ効率的な遺伝子改変が行われ、産業利用の現場に即した麹菌育種へと展開することが期待される。

【文献】 Katayama et al. (2019) Forced recycling of an AMA1-based genome-editing plasmid allows for efficient multiple gene deletion/integration in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 85; e01896-18.

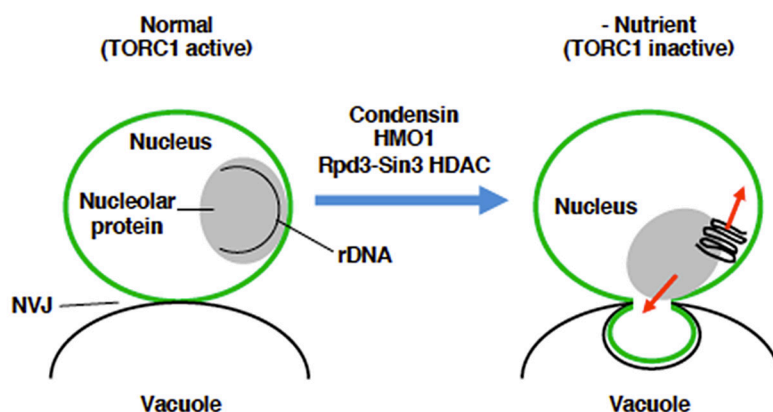
液胞による染色体動態制御とヌクレオファジー誘導

丑丸敬史

(静岡大学 大学院総合科学技術研究科)

ヌクレオファジーは分裂を停止した神経細胞等での核内浄化に重要な役割を担うと予想されるものの、その実態は不明である。モデル生物である出芽酵母は、細胞分裂時に核膜崩壊を起こさない“closed mitosis”を起こすため、神経細胞における核内浄化機構の解析のための良いモデルとなっている。酵母におけるマイクロ型のヌクレオファジー（マイクロヌクレオファジー）では、核と液胞の接続部（nucleus–vacuole junction, NVJ）において核膜が液胞内部へと陥没し、核の一部が千切り取られて液胞内で分解される。この過程で核小体が分解される。興味深いことに、核小体内部にある rDNA 領域を含め染色体（核質）は分解されず、核小体タンパク質が分解される。このようにヌクレオファジーは極めて選択的に核小体タンパク質を分解するが、その仕組みは不明であった。

我々はその機構の解明に取り組み、栄養源飢餓後のヌクレオファジーに先立ち、分解される核小体タンパク質が rDNA から分離して、ヌクレオファジーが起こる部位である NVJ に接近すること、その一方で、rDNA はコンデンシン依存的に凝縮しつつ核小体から分離し、逆に NVJ から遠ざかることを見出した。NVJ に局在する Nvj1 を欠損させると、マイクロヌクレオファジーの消失とともにこれらの核小体成分の変化も抑制された。このように、飢餓に応答して、NVJ の位置が鍵となり染色体と核小体タンパク質の核内配置がダイナミックに変化した。これら核内物質がどのようにして NVJ の位置を知り、どのような機構で移動するかの詳細は不明である。本発表では、この機構に関与する新たな因子も紹介し、それらの働きについて総合的に議論したい。



メタノールバイオエコノミーで活用する

C1酵母のメタノール誘導機構

由里本博也

(京都大学 大学院農学研究科)

天然ガスの主成分であるメタンから工業生産されるメタノールは、未利用バイオマスからの循環的生産も可能であり、様々な化成品の原料にもなることから、天然ガス、石炭、CO₂、バイオマスなど、多様な炭素資源を化学的方法でメタノールに導き、これを中心とする資源循環型工業体系「メタノールエコノミー」を構築することが提唱されている。一方、C1化合物であるメタノールを単一炭素源・エネルギー源として生育可能なメタノール資化性酵母（C1酵母）では、強力なメタノール誘導性プロモーターを利用した異種遺伝子発現系が開発され、異種タンパク質の高生産宿主として広く利用されており、C1酵母のメタノール誘導機構は、メタノールエコノミーにおけるバイオプロセス「メタノールバイオエコノミー」において高度に活用することが期待される。本講演では、C1酵母異種遺伝子発現系の基盤となるメタノール誘導性遺伝子の発現制御機構について、我々が行ってきたメタノール誘導性転写制御因子の機能解析や、メタノール感知機構とその利用に関する最近の研究成果を紹介する。

我々はこれまでに、*Candida boidinii* を用いてメタノール誘導制御に関わる複数の転写制御因子を同定し、転写因子 Trm2 が関与しメタノールの存在に依存しない転写活性化（脱抑制）と、Trm1 や Hap 複合体が関与しメタノール濃度に依存した転写活性化（メタノール誘導）の2段階でメタノール誘導性遺伝子の転写活性化が起こることを明らかにしてきた。一方、メタノール酵母が細胞外のメタノールをどのように感知し、転写制御因子にシグナル伝達しているかについては全くわかっていなかったが、*Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) においてメタノール感知機構に働く細胞表層センサーとして、Wsc ファミリータンパク質を同定した。Wsc1 は低濃度メタノールと細胞表層ストレスの両方の刺激に応答して機能する一方、細胞表層ストレスセンサーとしての機能をもたない Wsc3 は、より高濃度でのメタノール感知に重要であり、この濃度応答性の違いによって幅広いメタノール濃度を感知し、メタノール誘導性遺伝子の転写レベルを調節していると考えられる。さらに、C1酵母がもつメタノール濃度に応答する遺伝子発現制御機構を利用した「メタノールセンサー細胞」を構築し、このセンサー細胞を宿主として、高活性メタノール生成酵素のハイスループット酵素工学生産が行えることを示した。