

オートファジーが微細藻の生存・デンプンの蓄積・脂質の分解に必要であることを解明

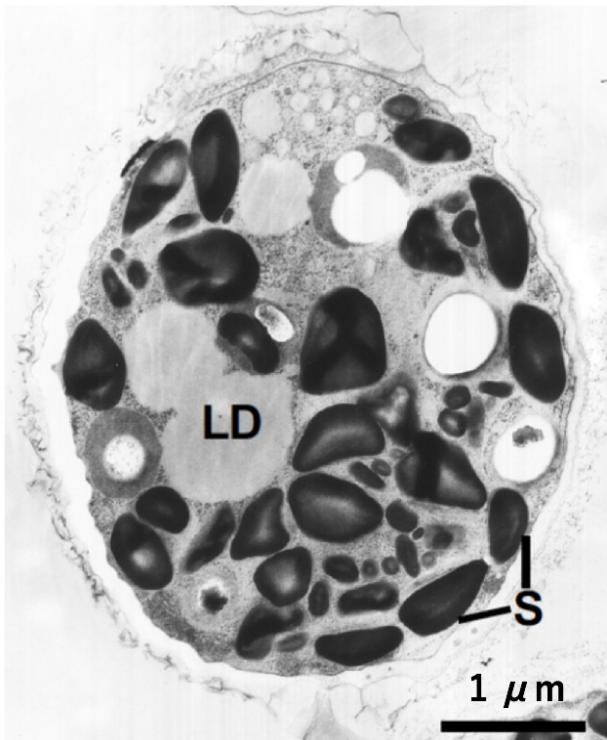
—藻類によるバイオ燃料生産の安全性確保への貢献も期待—

概要

京都大学大学院生命科学研究科 福澤秀哉 教授、梶川昌孝 同助教、新川はるか 同研究員の研究グループは、お茶の水女子大学 加藤美砂子 教授、京都大学大学院理学研究科 西村芳樹 助教、同人間・環境学研究科 幡野恭子 助教らの協力を得て、微細藻におけるオートファジーの重要性を明らかにしました。オートファジーは生体成分のリサイクルなどさまざまな生命現象に関わっています。本研究では、オートファジー不全の変異体を微細藻で初めて作り出し、これを調べることで、バイオ燃料源として注目される藻類のデンプンの蓄積や脂質の分解にオートファジーが重要な役割を果たすことを示しました。さらにオートファジー不全株は貧栄養な自然環境では生存が困難であることから、組換え微細藻を閉鎖系で培養する場合に、生物学的封じ込めによる安全性確保のツールとなる事が期待できます。

本研究成果は、2018年10月6日に日本植物生理学会の国際学術誌「Plant & Cell Physiology」でオンライン掲載されました。

野生株



オートファジー不全株

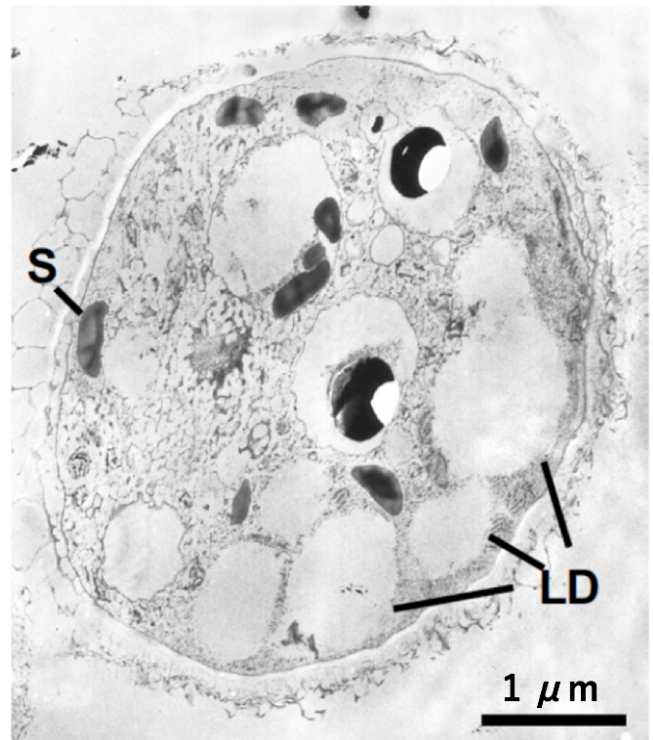


図1. 窒素欠乏条件6日目の野生株（左）とオートファジー不全株（右、*atg8*）

LD：中性脂質を含む油滴、S：デンプン顆粒。右の *atg8* で油滴がデンプン顆粒より多い。

＜本研究成果のポイント＞

- 動物、植物、菌類など広く真核生物に保存されるオートファジーは、生体成分のリサイクルなどさまざまな生命現象に関わっている。藻類にもオートファジー関連遺伝子（ATG 遺伝子）が存在することから、オートファジーの存在が示唆されてきたが、その機能についてオートファジー不全変異体を用いた検証は行われていなかった。オートファジーの必須因子である ATG8 および ATG3 の遺伝子は、モデル緑藻クラミドモナス（コナミドリムシ）のゲノム中に 1 コピーずつ存在することから、これらの遺伝子を破壊すれば、オートファジー不全になることが予想された。本研究では、オートファジー不全変異株（*atg8* および *atg3*）を緑藻で初めて単離し、微細藻におけるオートファジーの重要性を示す事に成功した。
- 窒素、硫黄、リン酸といった栄養源の欠乏で、緑藻はデンプンと中性脂質（トリアシルグリセロール：TAG）を蓄積する。一方、*atg8* 変異体では一旦蓄積したデンプンが分解されてしまい、代わりに中性脂質が蓄積することから、オートファジーが細胞に蓄積したデンプンの維持に必要であることが示唆された（顕微鏡写真の図 1 を参照）。
- 窒素欠乏にさらされた緑藻クラミドモナスに再び窒素源を与えると、一旦蓄積したデンプンと脂質が速やかに分解される。これに対して、*atg8* 変異体では窒素を再添加した直後にデンプンは分解されるが、中性脂質の分解が野生型よりも遅れることから、オートファジーは細胞内で蓄積した脂質の分解にも必要であることが判明した。
- 葉緑体やミトコンドリアは独自のゲノムを持ち、雌雄の接合時に片方の親由来のオルガネラゲノムのみが受け継がれる（片親遺伝）。マウスや線虫では、ミトコンドリアの母性遺伝にオートファジーが関わるかどうか議論が続いている。そこで、緑藻でオルガネラゲノムの母性遺伝にオートファジーが関与するかどうかについて、*atg8* 変異体を用いて調べたところ、葉緑体ゲノムもミトコンドリアゲノムも共に接合時の母性遺伝は正常であり、緑藻ではオートファジーは母性遺伝に関与しないことが判明した。

1. 背景

藻類を供給源としたバイオ燃料生産については社会的な要請もあり、高脂質・高デンプン蓄積性の藻類の探索や、脂質やデンプン蓄積機構の研究が国内外において取り組まれています。多くの藻類は、栄養欠乏に曝された時にこれらの物質を細胞内に蓄積します。藻類は栄養欠乏状態に置かれると増殖は停止しますが、直ちに死滅することはなく、一定期間細胞生存性を維持します。現在、オートファジーの生理的な意義は、酵母をはじめ動植物や菌類においてオートファジー不全変異体を用いて示されていますが、一方、藻類では不全変異株がこれまでなかったので、微細藻におけるオートファジーの重要性は明確ではありませんでした。我々は、栄養欠乏条件での藻類の生存性にオートファジーが重要な役割を果たすと推測しました。

2. 研究手法・成果

遺伝子操作が可能なモデル緑藻クラミドモナス（学名は *Chlamydomonas reinhardtii*：和名はコナミドリムシ）は、窒素・リン酸・硫黄といった栄養源が枯渇すると中性脂質とデンプンを高蓄積します。また、クラミドモナスのゲノムにはオートファジーに関連する ATG 遺伝子が保存されています。そこで本研究では、オートファジーの初期のプロセスであるオートファゴソーム膜の形成に必要な遺伝子 *ATG8* および *ATG3* を欠損した変異体の単離を試みました。どちらの遺伝子もクラミドモナスゲノム中には 1 コピーのみ存在し、これらが欠損することでオートファジー不全になると予測しました。約 4,600 系統の変異株ライブラリーから各遺伝子の DNA タグ挿入変異株を 1 株ずつ選別しました。*atg8* および *atg3* 変異株は野生株と異なり、窒素欠

乏条件での細胞生存性が急激に低下し、2週間後には野生株細胞が80%以上生存していたのに対して、両変異株ともに生存率が5%以下に低下したことから、細胞の生存にオートファジーが必要であることが判明しました。そこで、栄養欠乏条件での中性脂質 (TAG) とデンプンの蓄積量について *atg8* 変異株を代表として調べることで、これらの代謝制御にオートファジーが果たす役割を検証しました。

窒素および硫黄欠乏条件において *atg8* 変異株は、デンプンを欠乏ストレスを受けた当初は野生株と同様に蓄積しましたが、ストレス下2日目以降に一旦蓄積したデンプンが分解されてしまったことから、オートファジーは蓄積したデンプンの維持に必要でした。また窒素欠乏条件に移して2日目に培地置換により窒素十分条件に戻すと (窒素再添加条件)、野生株では速やかに TAG およびデンプンが分解されますが、*atg8* 変異体ではデンプンは正常に分解される一方、TAG とそれを含む油滴の分解が野生株よりも約6時間遅れて進行したことから、オートファジーは速やかな TAG 分解に必要でした。

リン酸欠乏条件において、緑藻は窒素および硫黄欠乏の時と同様に、デンプンと TAG を蓄積します。*atg8* 変異体は TAG を野生型と同様に蓄積する一方、欠乏ストレスの当初からデンプン蓄積が起らなかったことから、オートファジーはリン酸欠乏に応答したデンプン蓄積に必要でした。

3. 波及効果、今後の予定

今回我々は、緑藻のオートファジー不全変異株を用いることで、オートファジーがどのような栄養条件で中性脂質やデンプンの蓄積および分解に関与するかを明らかにしました。これまで藻類の脂質やデンプンの代謝へのオートファジーの関与については、オートファジー阻害剤の添加や野生株の ATG8 タンパク質の発現レベルを調べるといった間接的に検証にとどまっていた。今後は今回単離したオートファジー不全株を用いて、さらに種々の異なる生理的条件でのオートファジーの役割を明らかにできると期待されます。

藻類をバイオ燃料生産に利用する場合には大量培養が必要となります。培養対象となる藻類はその地域に本来生育しない外来種である場合や、組換え体である場合が想定されるので、生物学的封じ込め対策が必要です。今回報告したオートファジー不全株は窒素、硫黄、リン酸といった様々な栄養欠乏条件において生存性が大幅に低下しました。このことから貧栄養の外部自然環境に微細藻が飛散しても、オートファジー不全株であれば生育が制限されるという「生物学的封じ込め」が可能になると考えられます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の「戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業」(コード番号:P10010)、文部科学省科学研究費補助金 (16H04805)、科学技術振興機構 ALCA (JPMJAL1105) のサポートを受けた研究成果です。

<論文タイトルと著者>

タイトル: Isolation and characterization of *Chlamydomonas* autophagy-related mutants in nutrient-deficient conditions.

著者: Masataka Kajikawa, Marika Yamauchi, Haruka Shinkawa, Manabu Tanaka, Kyoko Hatano, Yoshiki Nishimura, Misako Kato, and Hideya Fukuzawa

掲載誌: Plant and Cell Physiology DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy193>

<お問い合わせ先> 京都大学大学院生命科学研究科 微生物細胞機構学分野

URL: <http://www.molecule.lif.kyoto-u.ac.jp/>