

Title	オイル生産微細藻におけるオートファジーによる分解物とその利用
Sub Title	The degradation products by autophagy and its metabolic utilization in oil-rich algae
Author	田中, 美穂(Tanaka, Miho) 富田, 勝(Tomita, Masaru)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2014-02
Jtitle	優秀修士論文
JaLC DOI	
Abstract	<p>単細胞緑藻類の中には窒素栄養欠乏(-N)下においてトリアシルグリセロール(TAG)を蓄積するオイル生産微細藻が存在する。また同条件では、オートファジーを誘導することが知られている。オートファジーは飢餓時に細胞質のオルガネラやタンパク質を液胞で低分子へとバルク分解する真核生物で広く保存された機構であり、細胞は分解されたアミノ酸をタンパク質合成に再利用することで飢餓に応答している。しかし、それ以外の利用先に関する知見は乏しい。近年、微細藻類が生産するTAGは、二酸化炭素から新規に固定された炭素分子以外に、細胞内の炭素分子を炭素源として再利用している事が示唆されており、再利用機構として知られるオートファジーがTAG蓄積にも関与しているのではないかと考えた。本研究では、-N下でTAGを蓄積する緑藻類を対象に、オートファジーによる分解物とその代謝を明らかにするために2つの実験を行った。一つ目は、TAG蓄積におけるオートファジーの役割を明らかにするために、栄養状態とは独立に薬剤添加によりオートファジーを誘導または阻害した時のTAG量の変化を調査した。その結果、TAG量が増加したことから、オートファジーを制御するTarget of rapamycin (TOR)の下流にTAG蓄積機構があることが示唆された。しかし、オートファジーの分解を阻害剤で制御できなかったため、TAG蓄積へのオートファジーの関与については考察できなかった。二つ目は、オートファジーによって分解されたアミノ酸の代謝を明らかにするために、タンパク質を窒素安定同位体標識した細胞を用いて-N下でタンパク質からアミノ酸への同位体の移動を確認した。アミノ酸以外の代謝物質について調査したところ、ArgやLysの分解経路上の物質からも標識が検出された。このことから、窒素がない状態においていくつかのアミノ酸は、アンモニアとして窒素源を排出するかアミノ基転移をすることで、炭素骨格へ分解されると推測された。</p> <p>Some of unicellular green algae accumulate a large amount of triacylglycerol (TAG) under nitrogen deficient (-N) conditions. Under the same conditions, autophagy is also induced in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>. Autophagy is widely conserved catabolic process in eukaryotes, whereby cytosolic organelles and protein complexes are degraded to monomeric units in vacuole during starvation. These degradation products of protein are recycled to protein synthesis adapting to starvation. However, degradation products and its metabolic utilization are almost unknown. Recently, some reports have suggested that TAG is synthesized by not only photosynthetically fixed compounds but also intracellular compounds. Therefore, I speculated that autophagy relates to TAG accumulation as recycling pathway of carbon source under -N conditions in green alga. In this study, I focus on the degradation products by autophagy and its metabolic utilization in oil-rich alga, and planned two experiments. Firstly, to clear the role of autophagy in TAG accumulation, I examined TAG accumulation during pharmacological autophagy induction or inhibition, which independent to nutritional conditions. As the results, TAG was accumulated by autophagy induction, therefore TAG accumulation is probably regulated downstream of Target of rapamycin (TOR), a regulator of autophagy. However, it was not demonstrated the involvement of autophagy in TAG accumulation, because autophagy inhibitors did not work for an autophagic degradation in <i>C. reinhardtii</i>. Secondly, to find metabolic utilizations of degradation products by autophagy, all amino acids in proteins were labeled by stable nitrogen isotope (¹⁵N) and free amino acids were unlabeled using modified a method of long-lived protein degradation assay. Labeling ratio of free amino acids increased under -N conditions, and intermediate metabolites on Arg and Lys degradation pathway were also labeled by ¹⁵N. Therefore, some of amino acids are supposed to be degraded to carbon skeleton and ammonia under -N conditions.</p>
Notes	2012年度先端生命科学プロジェクト
Genre	Thesis or Dissertation
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001003-2013-002-0001

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

優秀
修士論文

オ

イル生産微細藻における
オートファジーによる分解物とその利用
2012年度

Keio SFC Academic Society

田中 美穂 政策・メディア研究科 修士課程

先端生命科学プロジェクト

慶應義塾大学湘南藤沢学会

推薦のことば

窒素栄養欠乏により脂質を蓄積するオイル生産微細藻は、次世代バイオ燃料の原料として期待されている。本論文では、窒素栄養欠乏時におこるオートファジーと呼ばれる細胞内の物質再利用機構に着目したことで、オートファジーと脂質蓄積が同調的に引き起される事を初めて明らかにし、新たな脂質蓄積の制御機構の可能性を示した。また、慶應義塾大学先端生命科学研究所のメタボローム解析技術を駆使することで、これまでに明らかになっていない、オートファジーによる分解物から生産された代謝物を検出することに成功した。オイル生産微細藻におけるオートファジーの役割の重要性を示した研究であり、優秀修士論文として強く推薦する。

慶應義塾大学
環境情報学部教授
富田 勝

修士論文 2012 年度 (平成 24 年度)

オイル生産微細藻における
オートファジーによる分解物とその利用

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科

田中美穂

修士論文 2012 年度（平成 24 年度）

オイル生産微細藻における オートファジーによる分解物とその利用

論文要旨

単細胞緑藻類の中には窒素栄養欠乏（-N）下においてトリアシルグリセロール（TAG）を蓄積するオイル生産微細藻が存在する。また同条件では、オートファジーを誘導することが知られている。オートファジーは飢餓時に細胞質のオルガネラやタンパク質を液胞で低分子へとバルク分解する真核生物で広く保存された機構であり、細胞は分解されたアミノ酸をタンパク質合成に再利用することで飢餓に応答している。しかし、それ以外の利用先に関する知見は乏しい。近年、微細藻類が生産する TAG は、二酸化炭素から新規に固定された炭素分子以外に、細胞内の炭素分子を炭素源として再利用している事が示唆されており、再利用機構として知られるオートファジーが TAG 蓄積にも関与しているのではないかと考えた。

本研究では、-N 下で TAG を蓄積する緑藻類を対象に、オートファジーによる分解物とその代謝を明らかにするために 2 つの実験を行った。一つ目は、TAG 蓄積におけるオートファジーの役割を明らかにするために、栄養状態とは独立に薬剤添加によりオートファジーを誘導または阻害した時の TAG 量の変化を調査した。その結果、TAG 量が増加したことから、オートファジーを制御する Target of rapamycin (TOR) の下流に TAG 蓄積機構があることが示唆された。しかし、オートファジーの分解を阻害剤で制御できなかったため、TAG 蓄積へのオートファジーの関与については考察できなかった。二つ目は、オートファジーによって分解されたアミノ酸の代謝を明らかにするために、タンパク質を窒素安定同位体標識した細胞を用いて -N 下でタンパク質からアミノ酸への同位体の移動を確認した。アミノ酸以外の代謝物質について調査したところ、Arg や Lys の分解経路上の物質からも標識が検出された。このことから、窒素がない状態においていくつかのアミノ酸は、アンモニアとして窒素源を排出するかアミノ基転移をすることで、炭素骨格へ分解されると推測された。

キーワード

1. オイル生産微細藻, 2. 窒素栄養欠乏, 3. オートファジー, 4. 再利用, 5. メタボローム解析

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科

田中美穂

Master's Thesis Academic Year 2012

The degradation products by autophagy and its metabolic utilization in oil-rich algae

Summary

Some of unicellular green algae accumulate a large amount of triacylglycerol (TAG) under nitrogen deficient (-N) conditions. Under the same conditions, autophagy is also induced in *Chlamydomonas reinhardtii*. Autophagy is widely conserved catabolic process in eukaryotes, whereby cytosolic organelles and protein complexes are degraded to monomeric units in vacuole during starvation. These degradation products of protein are recycled to protein synthesis adapting to starvation. However, degradation products and its metabolic utilization are almost unknown. Recently, some reports have suggested that TAG is synthesized by not only photosynthetically fixed compounds but also intracellular compounds. Therefore, I speculated that autophagy relates to TAG accumulation as recycling pathway of carbon source under -N conditions in green alga.

In this study, I focus on the degradation products by autophagy and its metabolic utilization in oil-rich alga, and planned two experiments. Firstly, to clear the role of autophagy in TAG accumulation, I examined TAG accumulation during pharmacological autophagy induction or inhibition, which independent to nutritional conditions. As the results, TAG was accumulated by autophagy induction, therefore TAG accumulation is probably regulated downstream of Target of rapamycin (TOR), a regulator of autophagy. However, it was not demonstrated the involvement of autophagy in TAG accumulation, because autophagy inhibitors did not work for an autophagic degradation in *C. reinhardtii*. Secondly, to find metabolic utilizations of degradation products by autophagy, all amino acids in proteins were labeled by stable nitrogen isotope (^{15}N) and free amino acids were unlabeled using modified a method of long-lived protein degradation assay. Labeling ratio of free amino acids increased under -N conditions, and intermediate metabolites on Arg and Lys degradation pathway were also labeled by ^{15}N . Therefore, some of amino acids are supposed to be degraded to carbon skeleton and ammonia under -N conditions.

Keywords

1. Oil-rich algae, 2. Nitrogen deficiency, 3. Autophagy, 4. Recycle, 5. Metabolome analysis

Graduate School of Media and Governance, Keio University

Miho Tanaka

略語

2-OG : α -ケトグルタル酸、Ac-CoA : アセチルCoA、Ala : アラニン、Arg : アルギニン、Asp : アスパラギン酸、Asn : アスパラギン、Cys : システイン、DAG : ジアシルグリセロール、DGDG : ジガラクトシルジアシルグリセロール、Gln : グルタミン、Glu : グルタミン酸、Gly : グリシン、His : ヒスチジン、Ile : イソロイシン、Leu : ロイシン、Lys : リジン、Met : メチオニン、MGDG : モノガラクトシルジアシルグリセロール、Ox : オキサロ酢酸、PE : ホスファチジルエタノールアミン、Phe : フェニルアラニン、PI : ホスファチジルイノシトール、Pro : プロリン、Ser : セリン、Su : コハク酸、Su-CoA : スクシニルCoA、Thr : スレオニン、Trp : トリプトファン、Tyr : チロシン、Val : バリン

目次

第 1 章 序論.....	7
1.1 飢餓時におけるオートファジーの役割	7
1.2 窒素栄養欠乏と TAG 蓄積.....	8
1.3 オイル生産微細藻類の意義.....	9
1.4 本研究の目的と意義.....	10
第 2 章 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> においてオートファジーが TAG 蓄積に及ぼす影響.....	11
2.1 背景と目的.....	11
2.2 材料と手法.....	12
2.2.1 株と培養条件.....	12
2.2.2 細胞密度測定.....	13
2.2.3 オルガネラの観察.....	13
2.2.4 代謝物の抽出.....	13
2.2.5 代謝物の測定.....	13
2.2.6 タンパク質抽出と定量.....	14
2.2.7 ウェスタンブロット.....	14
2.3 結果.....	15
2.3.1 <i>A. thaliana</i> の抗体と <i>C. reinhardtii</i> のタンパク質の結合	15
2.3.2 オートファジー誘導剤と阻害剤の濃度検討.....	16
2.3.3 Rapamycin と Torin1 添加による増殖, 細胞体積と ATG8 の変化.....	16
2.3.4 Rapamycin と Torin1 添加による TAG 量の変化.....	17
2.3.5 オートファジーに関わる物質の調査	18
2.4 議論.....	28

第 3 章 窒素安定同位体を用いた “ <i>Pseudochoricystis ellipsoidea</i> ” の窒素栄養欠乏下 における細胞内分解物とその利用	32
3.1 背景と目的.....	32
3.2 材料と手法.....	34
3.2.1 株と培養条件	34
3.2.2 細胞内窒素が ^{15}N に置き換わる時間の検討	34
3.2.3 アミノ酸とタンパク質の同位体標識交換比率の検討.....	34
3.2.4 同位体標識方法とサンプリング	34
3.2.5 代謝物質の抽出.....	35
3.2.6 タンパク質抽出と加水分解.....	35
3.2.7 代謝物質とタンパク質アミノ酸の定量	35
3.2.8 同位体標識交換比率 (ILR) の計算	36
3.2.9 ATG8 のウェスタンブロット	36
3.3 結果	39
3.3.1 ^{14}N 培地と ^{15}N 培地を用いた同位体標識交換比率の検討	39
3.3.2 タンパク質分解の検証	39
3.3.3 タンパク質分解機構の調査	40
3.3.4 各アミノ酸におけるプールサイズの変化.....	40
3.3.5 ^{15}N 標識された他の代謝物	40
3.4 考察	50
 第 4 章 総括.....	 53
謝辞	54
参考文献	55
付録	61

第 1 章 序論

1.1 飢餓時におけるオートファジーの役割

細胞内のタンパク質、脂質、核酸や糖類などは、合成と分解により常に代謝回転されている。タンパク質の分解機構にはユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー-リソソーム系があり、どちらの機構も真核生物で広く保存されている。ユビキチン-プロテアソーム系は目的タンパク質にユビキチン等の分解シグナルとなる分子を標識し、プロテアソームによって分解する機構である。その役割は、不要となったり、ミスフォールディングや凝集などの異常をきたしたりしたタンパク質を選択的に分解して、細胞から除去することである。それに対し、オートファジー-リソソーム系は主に飢餓時に誘導され、タンパク質やオルガネラをバルク分解するシステムであり、これにより新規タンパク質の合成材料となるアミノ酸を供給して生命を維持する役割を担っているとされる。この様に、ユビキチン-プロテアソーム系は主に単一のタンパク質をターゲットとして常に活性化しているのに対し、オートファジー-リソソーム系によって分解されるターゲットは多様であると考えられており、細胞の生存に必要な物質が枯渇する飢餓下において、多様な分解産物を大量に供給する点で飢餓応答に重要な役割を果たしていると考えられる (Mizushima, 2007)。実際にオートファジー能を欠いた酵母では、栄養欠乏下で生存率が減少するため (Scott *et al.*, 1996)、オートファジーは飢餓時の生存に必須と言える。しかし、オートファジーによって分解される物質や分解産物、またその分解産物の利用については、知見が乏しい。

オートファジーが誘導されると、オートファゴソーム膜と呼ばれる隔離膜が細胞質のタンパク質、ミトコンドリアや小胞体などを包み込み、動物の場合はリソソームへ、植物の場合は液胞へと輸送される。リソソームや液胞にはタンパク質分解酵素、脂肪分解酵素、グリコシダーゼ、ヌクレアーゼなど数十種類の分解酵素が存在することから、オートファゴソーム内の物質はアミノ酸や脂肪酸、グルコース、核酸などの低分子へと分解され、細胞質へと放出されると予想されている (Kuma and Mizushima, 2010)。オートファジー欠損株では遊離アミノ酸プールが野生株に比べて少ないことが酵母 (Onodera and Ohsumi, 2005) とマウス (Komatsu *et al.*, 2005; Sou *et al.*, 2008) で報告されている。また、酵母のオートファジー欠損株では窒素栄養欠乏でタンパク質合成が誘導されないことから、オートファジーによって分解されたアミノ酸はタンパク質合成に再利用されていると考えられている (Onodera and Ohsumi, 2005)。Atg5 欠損マウスの新生仔は、出生 10 時間後の組織において AMP-activated protein kinase が活性化してしており、細胞内エネルギーレベルの低下が示唆されたことから、分解されたアミノ酸はエネルギーの維持にも利用されていると考えられる (Kuma *et al.*, 2004)。さらに、ATG7 欠損マウスでは絶食時の血糖値が野生型よりも低いことから、糖新生にも利用されているとされている (Ezaki *et al.*,

2011) . 以上に述べたオートファジー能を失った個体の研究から、ほ乳類では、オートファジーによって分解されたアミノ酸は新規タンパク質合成やエネルギー生産、糖新生に使われ、飢餓に適応していると考えられている (Kuma and Mizushima, 2010) .

1.2 窒素栄養欠乏と TAG 蓄積

藻類とは、「酸素発生型光合成をおこなう陸上植物以外の生物」の総称で、互いに異なる 10 前後の系統群が含まれる。ほとんどの藻類は、高等植物同様、無機栄養があれば、光を受けて光合成することにより二酸化炭素を唯一の炭素源として生育可能である。生育環境が至適条件から大きく変化した際には、環境に応じて代謝を積極的に変化させて、ストレスに応答し生命を維持する。多くの藻類は、細胞内にエネルギー貯蔵物質としてデンプンなどの多糖やトリアシルグリセロール (TAG) などの中性脂質を蓄積するが (Klyachko-Gurvich, 1974; Opute, 1974; Suen *et al.*, 1987; Tonon *et al.*, 2002) , ストレス条件下において乾燥重量比で 20~50%と高度に TAG を蓄積するオイル生産微細藻が数十株報告されている (Chisti, 2007) . TAG 蓄積が誘導されるストレスとしては、光量、温度、水量などの物理的要因、藻類自身の増殖に起因する pH, 栄養源、毒素、二酸化炭素濃度などの化学的要因 (Liu *et al.*, 2008; Lynn *et al.*, 2000; Reitan *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 2007; Guschina and Harwood, 2006) , 共生、バクテリアなどによる生物的要因 (Lebsky *et al.*, 2001; de-Bashan *et al.*, 2002) などが様々な生物種で報告されている。その中でも特に、窒素栄養欠乏 (-N) ストレスは、素早く、そして広範囲な種において TAG 蓄積が誘導され、TAG の含有量は誘導前の 1.5~15 倍に増加することが知られている (Hu *et al.*, 2008; Illman *et al.*, 2000, Shfrin and Chisholm, 1981) . しかし、-N ストレスに対する分子応答メカニズムと TAG 蓄積の生理的關係は明らかになっていない。

実験室での藻類の培養には、二酸化炭素から光合成で炭素固定して唯一の炭素源とする光独立栄養と、炭素固定に加えて培地中に添加した炭素源も利用する混合栄養が用いられている。緑藻のモデル生物である *Chlamydomonas reinhardtii* は、どちらの培養方法においても -N 下で TAG 量が増加する事から、TAG の炭素源は外部から取り込んだ二酸化炭素や酢酸に由来すると考えられてきた (Li *et al.*, 2012) . しかし、*C. reinhardtii* の独立栄養環境下において、-N 下 24 時間後に、炭素固定反応を行う酵素 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) のラージサブユニットや、光合成の光受容体となる Chlorophyll が減少する (Msanne *et al.*, 2012) . 混合栄養環境下においても、-N 下 48 時間後のトランスクリプトームを行った研究で、脂質合成関連の遺伝子は発現量が増加し、光合成関連遺伝子の発現量は減少する (Miller *et al.*, 2010) . これらのことから、-N 下では光合成による炭素固定能が低下していることが推測される。そのため、TAG 合成に必要な炭素源は二酸化炭素からの新規固定以外に細胞内の物質を TAG の炭素源として利用していることが予測されている (Wang *et al.*, 2009; Msanne *et al.*, 2012) . また、窒素栄養が

供給されない-N 下においても生存に必要なタンパク質を作る必要があり、光合成能が低下する中で細胞内の物質を再利用している可能性がある。 *C. reinhardtii* は-N 下において TAG を蓄積すると共に (Weers and Gulati, 1997) , オートファジーを誘導する (Pérez-Pérez *et al.*, 2010) 。 オートファジーが真核生物で広く保存されていることから、様々なオイル生産微細藻において TAG 蓄積とオートファジーが同調的に引き起されていると考えられる。 そのため、-N 下においてオートファジーが TAG 蓄積や生存に重要な役割を担っていると推測した。

1.3 オイル生産微細藻類の意義

オイル生産微細藻が蓄積する TAG はグリセロール骨格に 3 つのアシル基が結合した中性脂質であり、加水分解により脂肪酸を遊離してメチルエステル化することによりバイオディーゼル燃料として利用可能である。

近年、地球温暖化の一因とされる「大気中の二酸化炭素濃度上昇の抑制」と限りある「地下資源の有効利用」という 2 つの観点から、化石燃料に変わる持続的に利用可能な燃料の開発が望まれている。特に注目されているのは、植物の利用拡大である。なぜなら、植物は光合成により大気中の二酸化炭素を吸収して成長するため、植物を燃焼して二酸化炭素が発生しても大気中の二酸化炭素量は増加しないとみなされる、カーボンニュートラルな資源だからである。すでに植物を原料とするバイオ燃料としては、サトウキビやトウモロコシなどから作られるバイオエタノールがガソリンの、ナタネやアブラヤシなどから作られるバイオディーゼルが軽油の代替燃料として実用化されている。しかし、これらは食用作物を原料としているため、バイオ燃料の増産にともない、食糧価格の高騰を招いていることや、新たな耕作地を得るために森林伐採が行われていること、栽培時に使用する肥料が強い温室効果ガスである窒素酸化物を発生させることなど、弊害や非持続性などの問題が指摘されており、現在の作物由来バイオ燃料の評価方法を見直す提案がなされている (Melillo *et al.*, 2009) 。 それに対して微細藻類は、工業的に培養できるため荒野など未開拓地を利用できる、陸上植物に比べて単位面積あたりの二酸化炭素吸収量、および、オイル産生量が格段に多いなどの理由から、次世代バイオ燃料の原料として期待されている (Schenk *et al.*, 2008) 。 現在、アメリカを中心に世界中の企業や研究機関が、商用規模で連続的に培養可能な装置の開発、低コストで培養するための条件検討、効率的な細胞回収法の開発など、微細藻に特化した多くのプロセス開発に力を注いでいる。しかし、微細藻類は、これまで産業的にほとんど利用されてこなかったために依然として製造コストが高く、バイオ燃料としての実用化には、設備の効率化のみならず、微細藻による脂質の産生効率を高める事が必要である (Ratledge and Cohen, 2008) 。

1.4 本研究の目的と意義

本研究では、-N ストレスによって TAG を蓄積するオイル生産微細藻を対象に、-N 下におけるオートファジーの役割を解明することを目的とした。第 2 章では *C. reinhardtii* の TAG 蓄積におけるオートファジーの役割を明らかにするために、栄養状態とは独立に薬剤によりオートファジーを誘導、阻害させた際の TAG 量、およびその他の物質の変化を調査する。オイル生産微細藻におけるオートファジーと TAG 蓄積の生理学的関係を明確にすることにより、-N 下でのオートファジーの新たな役割を推測できると期待している。第 3 章では、-N 下の“*Pseudochoxicystis ellipsoidea*”において、限りある細胞内窒素の利用を明らかにするために、窒素安定同位体を用いてオートファジーによって分解されたタンパク質由来アミノ酸の分配先を追跡する。オートファジーによるタンパク質分解の意義は、新規タンパク質を合成するためのアミノ酸の供給であると言われてきたが、本研究の解析方法により、これまでどの真核生物でも知られてこなかった、オートファジーによって供給された物質の代謝を明らかにすることを目指した。

第 2 章

Chlamydomonas reinhardtii においてオートファジーが TAG 蓄積に及ぼす影響

2.1 背景と目的

単細胞緑藻のモデル生物である *Chlamydomonas reinhardtii* は, -N 下で TAG を蓄積し (Weers and Gulati, 1997), オートファジーを誘導する (Pérez-Pérez *et al.*, 2010). 近年, -N 下で TAG を蓄積する緑藻類において, 二酸化炭素からの新規固定以外に細胞内の物質を TAG の炭素源として再利用していると考えられ, 細胞内物質の TAG への再利用機構としてオートファジーとの関係性が示唆されている (Wang *et al.*, 2009; Msanne *et al.*, 2012). *Arabidopsis thaliana* の老化時には葉緑体タンパク質である Rubisco がオートファジーによって分解されることから (Ono *et al.*, 2012), Rubisco を含む葉緑体がオートファジーによって分解されていると考えられている (Wada *et al.*, 2009). オイル生産微細藻類である "*Pseudochoricystis ellipsoidea*" の -N 下では, 葉緑体の減少や, 葉緑体膜である MGDG の減少が見られることから, オートファジーによって葉緑体膜や, 細胞膜脂質などに含まれるグリセロ脂質が分解され, TAG 合成の炭素源となっているとの仮説を立てた.

セリン・スレオニンキナーゼである Target of rapamycin (TOR) は, 細胞増殖やタンパク質合成を促進し, オートファジーを負に制御する (Zhang *et al.*, 2000; Oldham *et al.*, 2005; Wullschleger *et al.*, 2006). 一方で, 飢餓下では様々な真核生物において TOR が不活性化され, 細胞増殖やタンパク質合成を制御すると同時に, オートファジーを促進する (Diaz-Troya *et al.*, 2008). Rapamycin や Torin1 は TOR の阻害剤として知られており, いくつかの真核生物で, Rapamycin 添加により増殖が抑制され, オートファジーが誘導することが知られている (Noda *et al.*, 1998). Rapamycin と Torin1 は TOR を不活性化させる作用機序はそれぞれ異なる. TOR は TOR complex 1 (TORC1) と TOR complex 2 (TORC2) の 2 つの異なる複合体を形成する (Helliwell *et al.*, 1994). Rapamycin は FKBP-12 と結合しやすく, そのタンパク質複合体は TOR 上の FRB (FKBP12-rapamycin binding) ドメインに結合し, TORC1 にしかない TOR と Raptor の結合が不安定になり TOR を不活性化化する. そのため, Rapamycin は TORC1 特定的な阻害剤である. 一方, ATP 競合的な Torin1 は TORC1 と TORC2 の両方を阻害する (Guertin and Sabatini, 2009). オートファジーは TORC1 の不活性化により誘導されるが, ほ乳類においては Rapamycin よりも Torin1

の方が強くオートファジーを誘導するという報告がある (Thoreen and Sabatini, 2009; Guertin and Sabatini, 2009). その理由として, Torin1 は Rapamycin よりも多くの TORC1 リン酸化サイトをリン酸化することが一部で分かっていた (Thoreen *et al.*, 2009). 高等植物は, Rapamycin 耐性があり TOR へ効果はないが, *C. reinhardtii* においては Rapamycin 添加により TOR が不活性化され (Crespo *et al.*, 2005), オートファジーが誘導される (Pérez-Pérez *et al.*, 2010) ことが報告されている.

オートファジーが誘導されると, オートファゴソーム膜の形成に必須である ATG8 は, ホスファチジルエタノールアミン (PE) が結合した ATG8-PE となるため (Ichimura *et al.*, 2000), ATG8 の脂質修飾をウェスタンブロットにより検出することで, オートファジーの活性を観測することができる (Kabuya *et al.*, 2004). ATG8-PE はオートファゴソーム膜に局在し, ATG8-PE 自身も液胞と融合した後は, 液胞内の酵素によって分解される. そのため, 一般的にはオートファジーを誘導すると ATG8 と ATG8-PE が増加し, 液胞分解阻害剤によりオートファジーの分解を阻害した際には ATG8-PE のみの増加が観察される. このような液胞におけるオートファジーの分解阻害剤としては, 液胞型 ATP アーゼ特異的阻害剤である Chloroquine (Suzuki *et al.*, 2002) や bafilomycin A1 (Drose *et al.*, 1993) が知られている.

本研究では, TAP 培地に Rapamycin または Torin1 添加によりオートファジーを誘導させた際と, TAP 培地から窒素源を除いた TAP-N 培地に Chloroquine または Bafilomycin 添加によりオートファジーによる分解を阻害させた際の TAG 蓄積を液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-TOFMS) を用いて調査することで, TAG 蓄積とオートファジーの関係性を明らかにすること目的とした. またオートファジー誘導時に増加, 阻害時に減少した物質はオートファジーによる分解産物である可能性があるため, キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-TOMS) を用いてメタボローム解析を行った.

2.2 材料と手法

2.2.1 株と培養条件

Chlamydomonas reinhardtii CC-503 株は Chlamydomonas resource center から分譲された. 培地を 500 mL 入れた扁平プラスチックに, CO₂ を 1% 添加した大気を 100 mL/min 通気し, 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の蛍光灯を 24 時間照射して 25°C で培養した.

培地は, TAP 液体培地 (Gorman and Levine, 1965) に, Rapamycin (LC laboratories, USA) と Torin1 (TOCRIS, USA) を加えた培地と, TAP 培地からアンモニウムイオンを除いた TAP-N 培地に Chloroquine (Sigma-Aldrich, USA), Bafilomycin A1 (Santa Cruz Biotechnology, USA) を加えた培地を用いた. Rapamycin は, 90% ethanol-10% Tween 20 で溶解した 1mg/mL のストックを終濃度が 25 nM, 50 nM, 100 nM になる様に加え, 溶媒だけを加えたものをネガティブコントロールとした. Torin1 は, DMSO で溶解した 5 mM

のストックを終濃度が 20 nM, 100 nM, 500 nM になる様に加え、溶媒だけを加えたものをネガティブコントロールとした。Chloroquine は DMSO で溶解した 1 mM のストックを終濃度が 10, 50, 250 μ M になる様に加え、溶媒だけを加えたものをネガティブコントロールとした。Bafilomycin A1 は DMSO で溶解した 1 mg/mL のストックを終濃度が 0.1, 1.0 μ M になる様に加え、溶媒だけを加えたものをネガティブコントロールとした。

2.2.2 細胞密度測定

培養中の細胞密度は、培養瓶から分取した培養液を必要に応じてセルパック (Sysmex, Japan) で希釈し、細胞粒子計測器 CDA-1000 (Sysmex, Japan) を用いて測定した。この測定により、細胞密度と細胞体積が測定される。細胞体積は、細胞直径を用いて換算された。

2.2.3 オルガネラの観察

脂質染色には、親油性の色素である Nile Red (Sigma-Aldrich, USA; Greenspan *et al.*, 1985) を用いた。Nile Red は DMSO で 33 μ g/mL に溶解し、染色液とした。培養液に最終濃度 6.6 μ g/mL の染色液を加え、3 分室温でインキュベート後観察した。微分干渉および蛍光観察には、Leica DM2500 (Leica, Germany) の顕微鏡を用いた。Nile Red の観察には、励起波長 540-552 nm, 吸収波長 580-620nm のフィルターセットと蛍光ランプ EL6000 (Leica, Germany) で観察し、顕微鏡デジタルカメラ DP51 (Olympus, Japan) で撮影した。

2.2.4 代謝物の抽出

培養液から約 1.0×10^7 細胞を回収し、遠心分離により培地を除去した後、500 μ L のメタノールで酵素反応を停止した。回収した細胞に直径 0.5 mm のジルコニアビーズを加えて Micro Smash (Tommy Seiko, Japan) を用いて破碎した。その後、超純水 450 μ L と内部標準物質として 10 μ M の 1,2-dihexanoyl (d22)-sn-glycero-3-phosphocholine (Avanti Polar Lipids, USA) を含んだクロロホルムを 500 μ L 加え、2,000 g で 15 分遠心することで 2 層に分けた。その後、有機層をガラスバイアルに分注して脂質の測定に用い、水層は 800 μ L を限外濾過し、真空乾燥後 40 μ L の Milli-Q 水で溶解して脂質以外の代謝物の測定に用いた。

2.2.5 代謝物の測定

脂質は液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-TOFMS) で先端生命科学研究所の藤倉純子技術員に、その他の代謝物はキャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-TOFMS) の陽イオンモードと陰イオンモードで先端生命科学研究所の斎藤佳苗技術員にそれぞれ測定していただいた (Hirayama *et al.*, 2009; Soga *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2012)。

データの解析には、MasterHands (Sugimoto *et al*, 2010) のバージョン 2.13.0.8 を用いた。ピーク面積を内部標準物質の面積値で補正し、各物質は回収した細胞数で正規化を行った。物質の同定には Ito ら (2012) が用いた物質リストを参考に、精密質量 (質量精度 20 ppm) 泳動時間 (誤差 0.2 分) から同定した。

2.2.6 タンパク質抽出と定量

培養液から 1.2×10^7 細胞を回収し、遠心分離により培地を除去した後、すばやく液体窒素に浸して酵素反応を停止した。*C. reinhardtii* のタンパク質の抽出には、トリクロロ酢酸 (TCA) 沈殿とビーズ破碎による抽出方法の 2 種類を用いた。TCA 沈殿による抽出では、0.1 M Dithiothreitol 入り 0.2 M NaOH を 100 μ L で細胞を破碎し、20% トリクロロ酢酸を 100 μ L 加えることでタンパク質を沈殿させ、13,000 $\times g$ で 4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心した。上清を除いた後、pH を酸性から塩基性にするために 1 mL のアセトンを加え、ソニケーターでペレットをはがした。13,000 $\times g$ で 4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心し、10 分間室温でペレットを乾かした後、SDS-PAGE sample buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 2% SDS, 10% glycerol, 20 mM DTT, a trace amount of bromophenol blue) を 40 μ L 加えて 65 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートすることでタンパク質を溶出させた。95 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートすることでタンパク質を変性させた後、13,000 $\times g$ で 4 $^{\circ}$ C、1 分間遠心して上清を定量し、ウェスタンブロットに用いた。ビーズ破碎による抽出では、0.5% Triton X-100 を含んだ pH7.5 の 50 mM Tris-HCl を 200 μ L でペレットを再溶解させた後、直径 0.5 mm のジルコニアビーズを加えて Micro Smash (Tommy Seiko, Japan) を用いて破碎した。その後、13,000 $\times g$ で 4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心して上清を定量に用いた。定量後、SDS-PAGE sample buffer を加えて 95 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートすることでタンパク質を変性させ、ウェスタンブロットに用いた。

A. thaliana のタンパク質は同慶應義塾大学大学院、政策・メディア研究科の海老敬行氏よりいただいた。

タンパク質の定量は Quant-iT protein assay kits と Qubit fluorometer (Life Technologies, USA) を用い、125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 μ g/mL の BSA を用いた検量線により定量した。

2.2.7 ウェスタンブロット

ATG8 のウェスタンブロットには、TCA 沈殿により抽出したタンパク質を用いた。セパレーションゲルに 6 M urea を含んだ 12.5% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) によりタンパク質を分離した (Kirisako *et al*, 2000)。分離したゲルから PVDF メンブレン (Millipore, USA) にタンパク質をセミドライで転写後、2% milk (明治, Japan) で 30 分ブロッキングした。一次抗体には、*A. thaliana* の ATG8 全長の抗体、 α -ATG8 (abcam, Japan; Chung *et al*, 2009) を 1:1,000 の濃度で用い、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。二次抗体には、Horseradish peroxidase (HRP) 標識された anti-rabbit (GE Healthcare, UK) を 1:10,000

の濃度で1時間インキュベートした。免疫反応については、ルミノール化学発光 (Millipore, USA) で反応後, ImageQuant LAS4000 mini (GE Healthcare, Sweden) で撮影した。各サンプルの測定に用いたタンパク質量は Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色により可視化された。

β -Actin のウェスタンブロットには, TCA 沈殿とビーズ破碎により抽出したタンパク質を用いた。SDS-PAGE と転写は上記と同様の方法を行った後, 一次抗体には, *A. thaliana* の β -Actin 全長の抗体, Actin-11 (Agrisera, Sweden) を 1:3000 の濃度で用い, 常温で1時間インキュベートした。その後, 5% milk (明治, Japan) を用いて室温で1時間ブロッキングした。二次抗体には, Horseradish peroxidase (HRP) 標識された anti-mouse (GE Healthcare, UK) を 1:50,000 の濃度で用い, 室温で1時間インキュベートした。免疫反応については, ルミノール化学発光 (Millipore, USA) で反応後, ImageQuant LAS4000 mini (GE Healthcare, Sweden) で撮影した。

2.3 結果

2.3.1 *A. thaliana* の抗体と *C. reinhardtii* のタンパク質の結合

C. reinhardtii の ATG8 と β -Actin の検出には, それぞれの *A. thaliana* 抗体を用いた。*A. thaliana* 抗体の結合を確認するために, *C. reinhardtii* と *A. thaliana* のタンパク質を用いて, 12.5% SDS-PAGE でウェスタンブロットを行った。ATG8 抗体は *A. thaliana* と *C. reinhardtii* の両方で 15 kD 付近にバンドが検出され, 結合が認められた (図 1 (A))。ATG8 は, システインプロテアーゼである ATG4 によって C 末端の Gly 残基の直後を切断され, その後 PE が結合して ATG8-PE となる。*C. reinhardtii* の ATG8 は 134 アミノ酸であり, その後 ATG4 により 120 番目の Glycin で切断されて PE が結合するため, ATG8-PE は 120 アミノ酸となる (付図 1)。*A. thaliana* の ATG8 は 127 アミノ酸であり, その後 ATG4 により 132 番目の Glycin で切断されて PE が結合するため, ATG8-PE は 132 アミノ酸となる (付図 1)。そのため, *A. thaliana* と *C. reinhardtii* の ATG8 と ATG8-PE の泳動距離に差が見られた (図 1 (A))。

一方, *A. thaliana* の Actin-11 抗体については *A. thaliana* では目的の 42kD 付近にバンドが検出されたのに対して, *C. reinhardtii* の定常期, -N 下では β -Actin のバンドが検出されなかった (図 1 (B))。Actin-11 抗体は, *A. thaliana* の全長タンパク質に対する抗体で, *Nicotiana tabacum* や *Oryza sativa* には結合し, *C. reinhardtii* にも結合することが予想されていた。 β -Actin はストレス下においてもタンパク質量に変化が見られないため様々な生物でコントロールとされているタンパク質である。本研究では *C. reinhardtii* の定常期, -N 下の細胞において, TCA 沈殿とビーズ破碎どちらの方法を用いてタンパク質を抽出しても, β -Actin のバンドが検出されなかったことから (図 1 (B)), *C. reinhardtii* には結合しない抗体であることが推測された。*C. reinhardtii* のウェスタンブロットを用いた

他の研究では、*C. reinhardtii*のアクチン抗体を作製するか、CBBを用いており (Barnes *et al.*, 2005), 本研究ではタンパク質量の可視化にCBBを用いることとした。

2.3.2 オートファジー誘導剤と阻害剤の濃度検討

オートファジーの誘導剤である Rapamycin と Torin1 は、TOR を不活性化することで増殖を抑制する。効果のある薬剤濃度を決定するために、25 nM, 50 nM, 100 nM の Rapamycin と、20 nM, 100 nM, 500 nM の Torin1 について、増殖の変化を調査した。Rapamycin は溶媒のみの 0 nM に比べてどの濃度でも増殖が阻害されたが、25 nM よりも 50 nM と 100 nM の方が増殖を阻害する期間が長かった (図 2 (A))。50 nM と 100 nM は大きな差が見られなかったため (図 2 (A)), Rapamycin は十分な効果を期待できる 50 nM で以降の実験を行った。Torin1 は溶媒のみの 0 nM と 50 nM, 100 nM において大きな差が見られなかったが、500 nM で増殖が抑制されたため (図 2 (B)), 以降の実験には 500 nM の Torin1 を用いた。また、いずれの薬剤を添加した際も時間の経過に伴い増殖が回復したため (図 2 (A) (B)), 増殖が抑制されている期間に試験を行った。

オートファジーの阻害剤である Chloroquine と Bafilomycin A1 は、液胞内の分解を阻害するため、細胞の生存率が下がり、ATG8-PE が蓄積する事が期待される (Shacka *et al.*, 2006)。効果のある薬剤濃度を決定するために、10, 50, 250 μ M の Chloroquine と 0.1, 1.0 μ M の Bafilomycin A1 について、細胞密度と ATG8 の脂質修飾をウェスタンブロットで調査した。どちらの処理についても、溶媒のみを加えた 0 μ M は -N 下であるため細胞密度に大きな変化が見られなかった (図 3 (A) (C))。Chloroquine 10 μ M, 50 μ M は、0 μ M と大きな差が見られなかったが、250 μ M では細胞密度が減少し、細胞の生存率が下がっていると考えられた (図 3 (A))。ウェスタンブロットによる ATG8-PE の蓄積については、Chloroquine 10 μ M, 50 μ M は、0 μ M と大きな差が見られなかったが、250 μ M の Chloroquine 添加 24 時間後に ATG8-PE の増加が見られた (図 3 (B))。しかし、同時に ATG8 の増加も見られた (図 3 (B))。別の日に行った繰り返し実験においても、250 μ M と 1000 μ M の Chloroquine 添加で細胞密度が減少し、ATG8 と ATG8-PE の増加が確かめられた (date not shown)。液胞阻害時には、ATG8 は変わらず ATG8-PE の蓄積が見られる事が知られている (Shacka *et al.*, 2006)。そのため、Chloroquine 250 μ M については細胞生存率が下がっているが、それは液胞阻害による影響ではないと考えた。Bafilomycin A1 についても、0.1, 1.0 μ M で細胞密度が減少し (図 3 (C)), 生存率が下がっているが、ATG8-PE の蓄積が見られなかった (図 3 (D))。これらの結果から、オートファジー阻害剤である Chloroquine と Bafilomycin A1 は *C. reinhardtii* の細胞生存率に影響を与えるが、液胞を阻害しないと考えられた。

2.3.3 Rapamycin と Torin1 添加による増殖、細胞体積と ATG8 の変化

50 nM Rapamycin と 500 nM Torin1 添加による細胞への影響と、オートファジーの誘導

を調べるために、処理前と添加 1, 3, 6, 15, 28 時間後の細胞をサンプリングし、細胞粒子計測器による細胞密度と細胞体積の測定、顕微鏡観察、ATG8 のウェスタンブロットを行った。条件検討時と同様に、Rapamycin 添加により増殖が抑制され、1 時間後に細胞の増殖が見られなくなった (図 4 (A))。また、細胞体積測定において添加 1 時間の間に細胞体積が増加した (図 4 (B))。顕微鏡観察から葉緑体やピレノイドの形状には、大きな変化は見られなかった (図 4 (C))。ATG8 と ATG8-PE は Rapamycin 添加 15 時間と 28 時間後に増加が見られたことから、15 時間後にはオートファジーが誘導されたと考えられる (図 4 (D))。Torin1 添加時についても、条件検討同様、増殖が抑制され、1 時間後に細胞の増殖が見られなくなった (図 5 (A))。また、添加 3 時間後に細胞体積の増加が認められた (図 5 (B))。顕微鏡観察から葉緑体やピレノイドの形状には、大きな変化は見られなかった (図 5 (C))。ATG8 と ATG8-PE は Rapamycin 添加 15 時間と 28 時間後に増加が見られたことから、15 時間後からオートファジーが誘導されていることが分かった (図 5 (D))。

2.3.4 Rapamycin と Torin1 添加による TAG 量の変化

50 nM Rapamycin と 500 nM Torin1 添加により、ATG8-PE が増加した 15, 28 時間をオートファジー誘導条件として (図 4 (D), 図 5 (D)), TAG 量を LC-TOFMS で測定した。Rapamycin 添加時には 30 分子種の TAG が同定された (図 6 (A))。オートファジーの誘導が確かめられた 15, 28 時間のいずれか、または、双方において、全ての分子種が有意に増え (図 6 (A)), また Nile Red 染色した蛍光顕微鏡観察においても 26 時間後に TAG とみられる油滴が観察され (図 6 (E)), オートファジー誘導下では TAG 量が増加することが分かった。変化率が最も大きかった分子種は、Rapamycin 添加 15 時間後に TAG46:1 が約 5.9 倍に増加した。また、全ての分子種について Rapamycin 添加 1, 3, 6 時間後にも有意に増減が見られた。これらの 28 時間までの変化は、階層的クラスタリングにより 3 つの異なる変化に分類され (図 6 (A)), 3 つの各クラスター内で最も存在量が多かった分子種を代表として図 15 の B-D に示した。TAG44:0 を主要な分子種とするクラスターは、Rapamycin 添加 1 時間後に増加し、徐々に減少した (図 6 (B))。TAG50:3 を主要な分子種とするクラスターと、TAG50:7 を主要な分子種とするクラスターは、Rapamycin 添加 1 時間後に減少後、徐々に増加した点で共通であるが、TAG50:3 を主要な分子種とするクラスターは 15 時間が最も増加した点であったのに対して (図 6 (C)), TAG50:7 を主要な分子種とするクラスターは 28 時間が最も増加した点であった (図 6 (D))。不飽和度が高い分子種の多くが TAG50:7 を主要な分子種とするクラスターに含まれた。

Torin1 添加時には、17 分子種が同定され、コントロールに対する比の変化を図 7 (A) に示した。オートファジーの誘導が確かめられた 15, 28 時間のいずれか、または、双方において、全ての分子種において有意に増え、また Nile Red 染色した蛍光顕微鏡観察の結果からも 28 時間後に TAG が観察され (図 7 (E)), Torin1 添加によるオートファジー誘導下でも TAG 量が増加することが分かった。変化率が最も大きかった分子種は、Torin1 添加

15 時間後に TAG52:2 が 7.3 倍に増加した。Torin1 添加時でも Rapamycin 添加時同様、1, 3, 6 時間後にも有意に増減が見られ、その変化は 2 つの異なるクラスターに分類され (図 7 (A)), 各クラスター内で最も存在量が多かった分子種を代表として図 15 の B と C に示した。TAG52:4 を主要な分子種とするクラスターは、15 時間が最も増加した点であったのに対して (図 7 (B)), TAG52:6 (rt: 37.12) を主要な分子種とするクラスターは 28 時間が最も増加した点であった (図 7 (C))。不飽和度が 6 以上の分子種の多くが TAG52:6 (rt: 37.12) を主要な分子種とするクラスターに含まれ、Rapamycin 同様不飽和度が高い分子種ほど遅れて TAG が蓄積することが分かった。

Rapamycin では炭素数が 44 から 52 の分子種が検出されたのに対して、Torin1 では 50 から 54 の分子種が検出され (図 6 (A), 図 7 (A)), Torin1 よりも Rapamycin の方がやや短い脂肪酸鎖が結合した TAG を多く合成する傾向がみられた。また、変化率についても違いが見られた。共通して検出された TAG の全ての分子種について、Torin1 の方が Rapamycin よりも 1.4 倍から 3.9 倍変化率が高かった。

2.3.5 オートファジーに関わる物質の調査

50 nM Rapamycin と 500 nM Torin1 で TAG が増加した理由を調査するために、オートファジー誘導時に増減する代謝物を CE-TOFMS と LC-TOFMS を用いて調べた。Rapamycin と Troin1 添加それぞれについて、オートファジーの誘導下である 15, 28 時間の双方においてコントロールに対して *t*-test で $p < 0.05$ で顕著に差のあった物質をオートファジーに関わる物質とした。Rapamycin と Troin1 共通して増加した 24 物質, Rapamycin のみで増加した 5 物質, Torin1 のみで増加した 48 物質を表 1 に示した。Rapamycin と Troin1 共通して減少した 3 物質, Rapamycin のみで減少した 29 物質, Torin1 のみで減少した 10 物質を表 2 に示した。

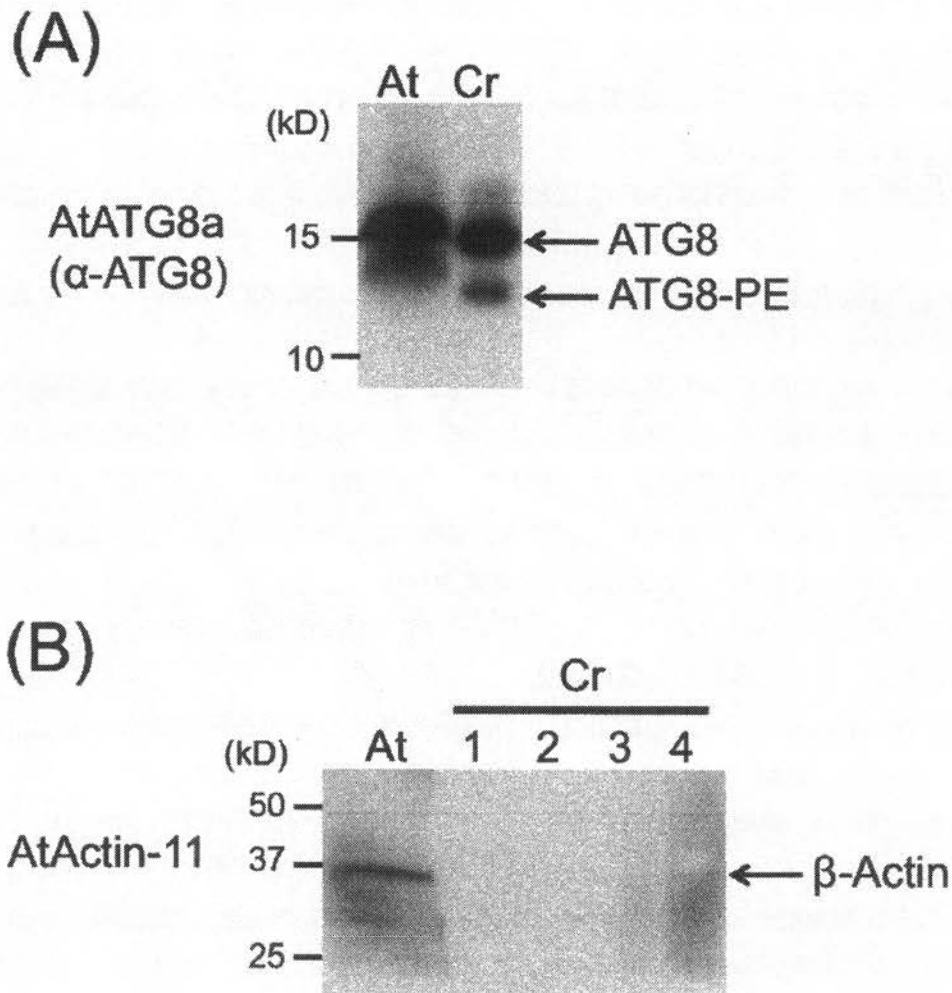


図 1

***Chlamydomonas reinhardtii* に対する *Arabidopsis thaliana* の ATG8 抗体と β -Actin 抗体のウェスタンブロット**

(A) *A. thaliana* (At) と *C. reinhardtii* (Cr) の総タンパク質に、*A. thaliana* の ATG8a 抗体 (α -ATG8) を用いてウェスタンブロットを行った。ATG8 とフォスファチジルエタノールアミン (PE) で修飾された ATG8-PE のバンドを矢印で示した。分子量マーカー (kD) の位置を左に示した。(B) *A. thaliana* の Actin-11 抗体 (AtActin-11) を用いてウェスタンブロットを行った。*A. thaliana* (At) のタンパク質を 30 μ g ロードした。1: 定常期 (1.2×10^7 cell/mL) の細胞からビーズ破砕により抽出したタンパク質を 30 μ g ロードした。2: 1 と同様のタンパク質を 20 μ g ロードした。3: 定常期 (1.2×10^7 cell/mL) の細胞から TCA 沈殿で抽出したタンパク質を 20 μ g ロードした。4: 窒素栄養欠乏 24 時間後の細胞から TCA 沈殿で抽出したタンパク質を 20 μ g ロードした。 β -Actin のバンドを矢印で示した。分子量マーカー (kD) の位置を左に示した。

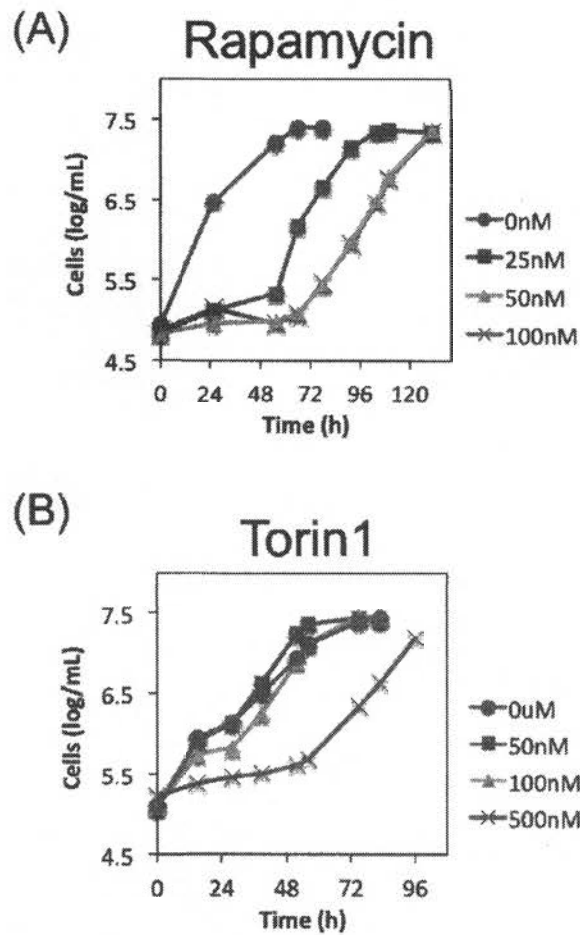


図2 Rapamycin と Torin1 添加時の増殖変化

(A) 溶媒のみ (0 nM), Rapamycin 25, 50, 100 nM を TAP 培地に添加した時の細胞密度を経時的に測定した。それぞれ 1 回ずつ実験した。(B) 溶媒のみ (0 nM), Torin1 50, 100, 500 nM を TAP 培地に添加した際の細胞密度を測定した。それぞれ 1 回ずつ実験した。

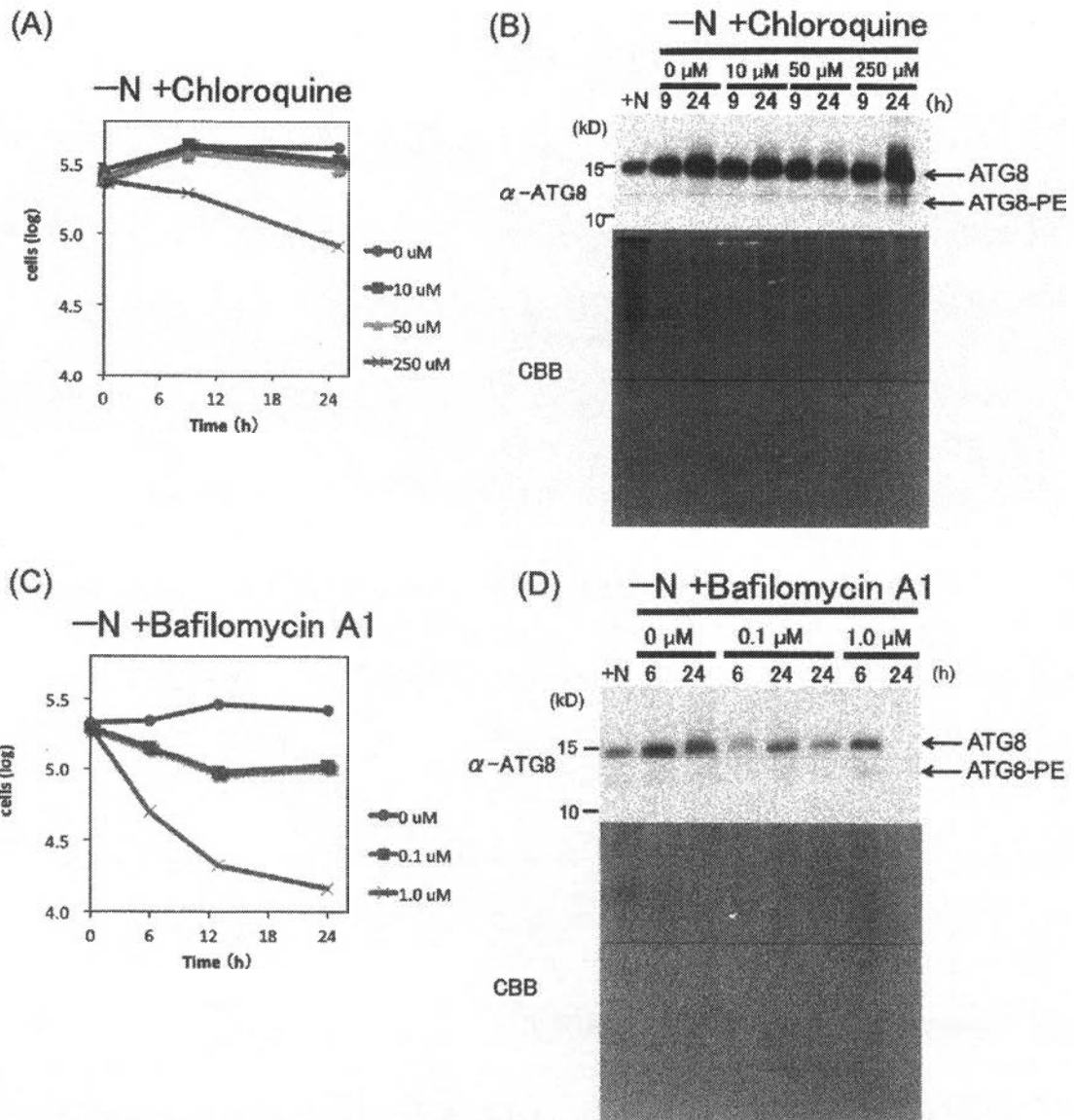


図3 Chloroquine と Bafilomycin A1 添加時の増殖と ATG8 の脂質修飾

(A) 溶媒のみ (0 μ M), Chloroquine 10, 50, 250 μ M を TAP-N 培地に添加した際 (-N +Chloroquine) の細胞密度を測定した。それぞれ 1 回の実験である。(B) 溶媒のみ (0 μ M), Chloroquine 10, 50, 250 μ M を TAP-N 培地に添加 (-N +Chloroquine), 9, 24 時間後の細胞から TCA 沈殿によりタンパク質を抽出した。30 μ g のタンパク質を 12.5% SDS-PAGE で分離後, ATG8 とその脂質修飾 (ATG8-PE) を, ATG8 抗体 (α -ATG8) を用いてウェスタンブロットで検出した。分子量マーカー (kD) の位置を左に示した。タンパク質量は CBB で可視化した。(C) 溶媒のみ (0 μ M), Bafilomycin A1 0.1, 1.0 μ M を TAP-N 培地に添加した際 (-N +Bafilomycin A1) の細胞密度を測定した。それぞれ 1 回の実験である。(D) 溶媒のみ (0 μ M), Bafilomycin A1 0.1, 1.0 μ M を TAP-N 培地に添加 (-N +Bafilomycin A1), 6, 24 時間後の細胞から TCA 沈殿によりタンパク質を抽出した。30 μ g のタンパク質を 12.5% SDS-PAGE で分離後, ATG8 とその脂質修飾 (ATG8-PE) を, ATG8 抗体 (α -ATG8) を用いてウェスタンブロットで検出した。分子量マーカー (kD) の位置を左に示した。タンパク質量は CBB で可視化した。

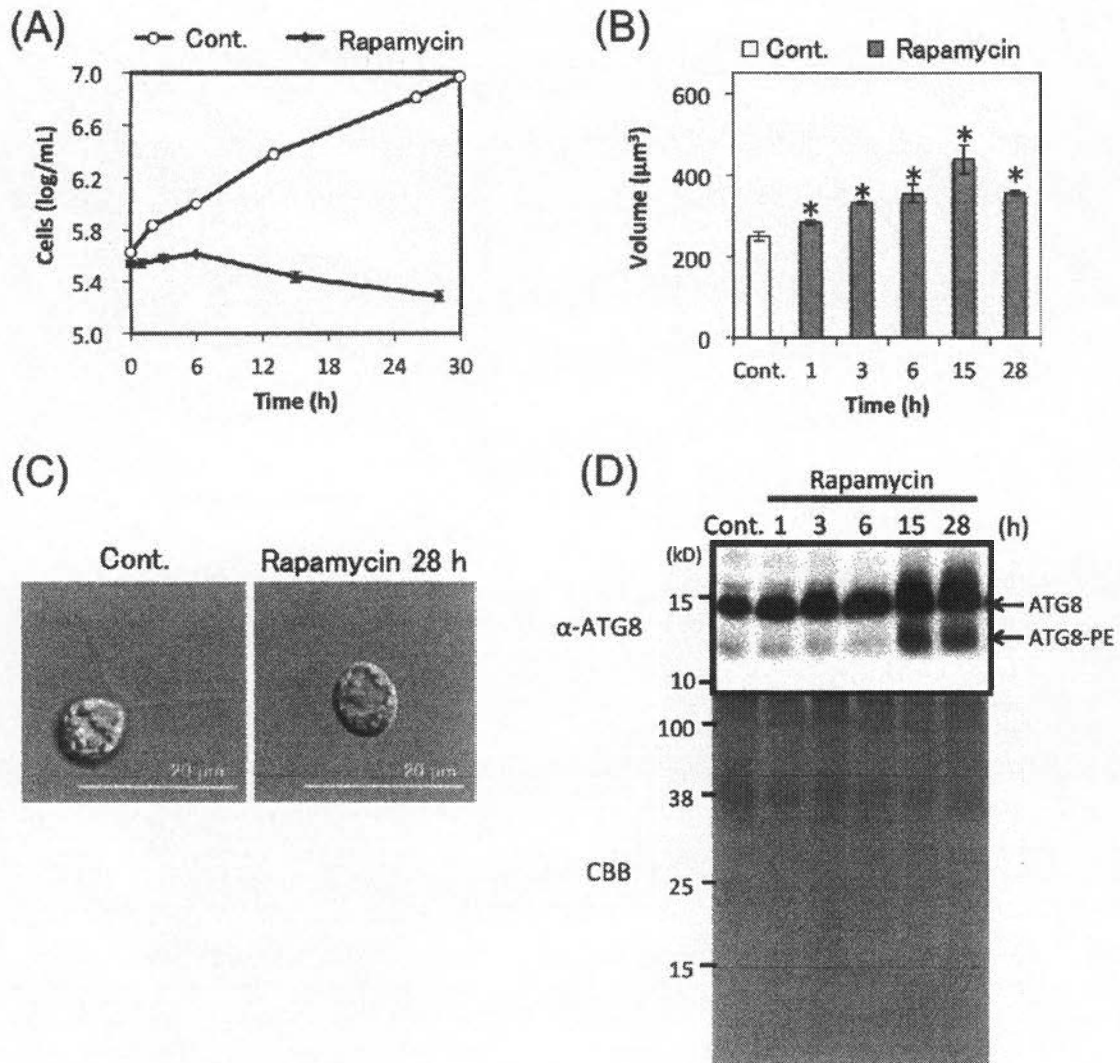


図4 Rapamycin 添加による増殖、細胞体積と ATG8 の変化

(A) 溶媒のみを添加 (Cont.) と、50 nM Rapamycin 添加 (Rapamycin) 1, 3, 6, 15, 28 時間後の増殖変化. Cont. は 1 回, Rapamycin は 4 回の実験である. (B) 溶媒のみを添加 (Cont.) と、50 nM Rapamycin 添加 (Rapamycin) 1, 3, 6, 15, 28 時間後の細胞体積の変化. *は、Cont. と比較して t test で $p < 0.05$ と有為差が認められた. どちらも 4 回の実験である. (C) 溶媒のみを添加 (Cont.) と、50 nM Rapamycin 添加 28 時間後の微分干渉顕微鏡を用いた細胞の形態変化. (D) 溶媒のみを添加 (Cont.) と、50 nM Rapamycin 添加 (Rapamycin) 1, 3, 6, 15, 28 時間後の細胞から TCA 沈殿によりタンパク質を抽出した. 30 μg のタンパク質を 12.5% SDS-PAGE で分離後、ATG8 とその脂質修飾 (ATG8-PE) を、ATG8 抗体 (α -ATG8) を用いてウェスタンブロットで検出した. 分子量マーカー (kD) の位置を左に示した. タンパク質量は CBB で可視化した.

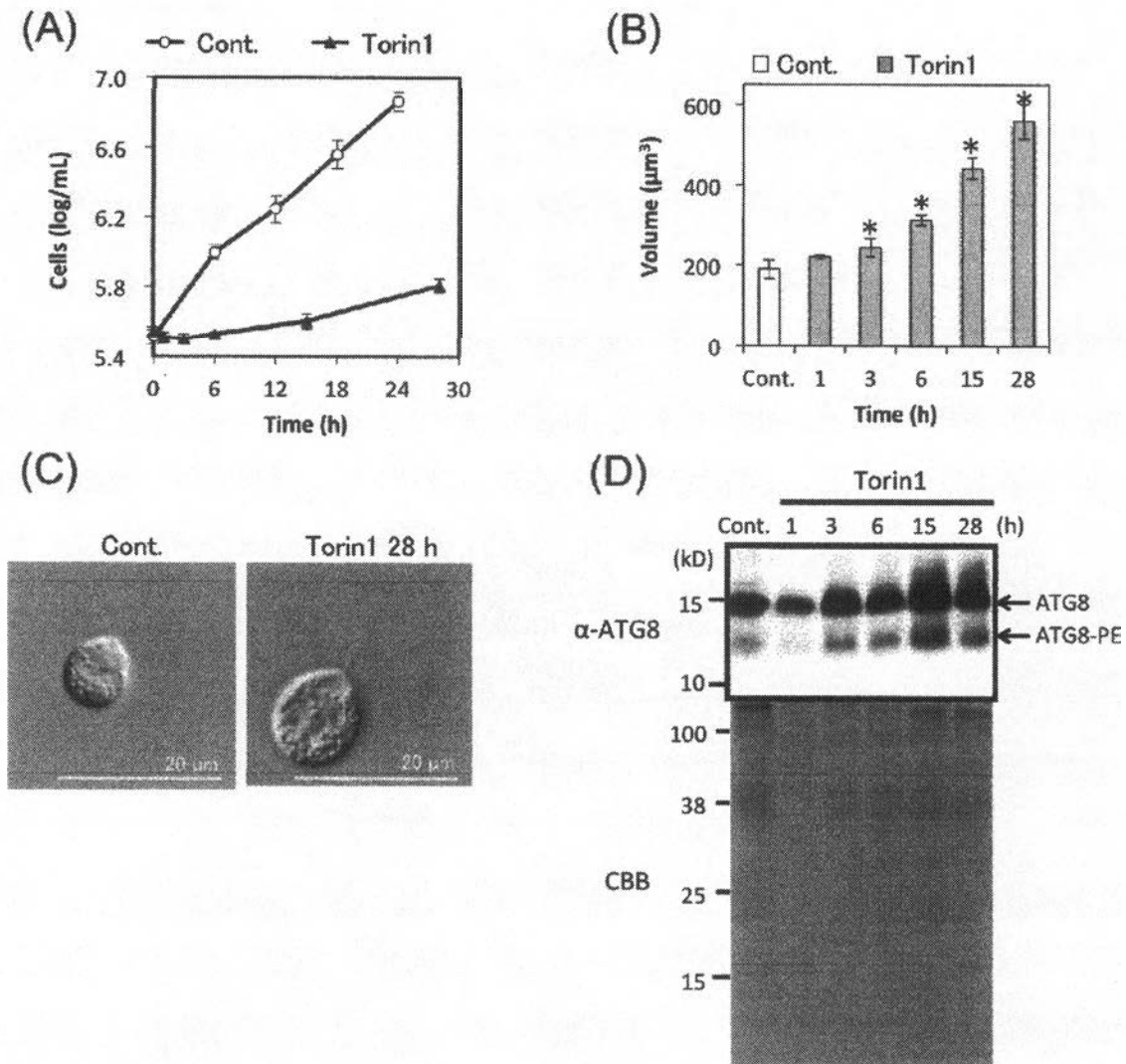


図5 500 nM Torin1 添加による増殖，細胞体積と ATG8 の変化

(A) 溶媒のみを添加 (Cont.) と，500 nM Torin1 添加 (Torin1) 1, 3, 6, 15, 28 時間後の増殖変化. どちらも 4 回の実験である. (B) 溶媒のみを添加 (Cont.) と，500 nM Torin1 添加 (Torin1) 1, 3, 6, 15, 28 時間後の細胞体積の変化.*は，Cont. と比較して *t* test で $p < 0.05$ と有為差が認められた. どちらも 4 回の実験である. (C) 溶媒のみを添加 (Cont.) と，500 nM Torin1 添加 28 時間後の微分干渉顕微鏡を用いた細胞の形態変化. (D) 溶媒のみを添加 (Cont.) と，500 nM Torin1 添加 (Torin1) 1, 3, 6, 15, 28 時間後の細胞から TCA 沈殿によりタンパク質を抽出した. 30 μg のタンパク質を 12.5% SDS-PAGE で分離後，ATG8 とその脂質修飾 (ATG8-PE) を，ATG8 抗体 (α -ATG8) を用いてウェスタンブロットで検出した. 分子量マーカー (kD) の位置を左に示した. タンパク質量は CBB で可視化した.

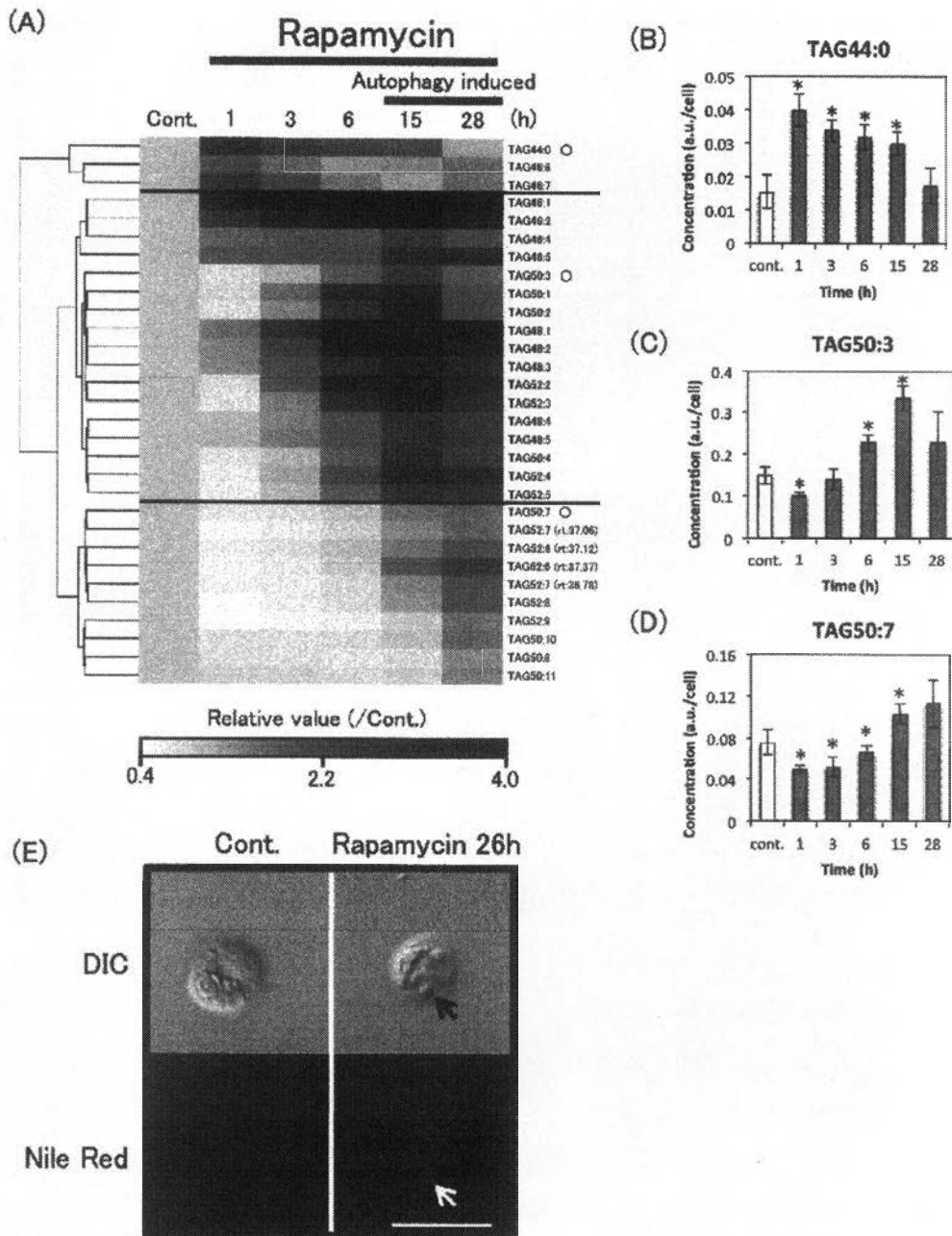


図 6 Rapamycin 添加時の TAG 量の変化

(A) 溶媒のみを添加 (Cont.) と、50 nM Rapamycin 添加 (Rapamycin) 1, 3, 6, 15, 28 時間後に LC-TOFMS で同定した TAG の各分子種の変化. 同定できた 30 分子種の Cont. に対する割合をヒートマップにして示した. 階層的クラスタリングにより 3 つの異なる変化に分類され, 各クラスターの中で存在量が最も多い分子種を○で示し, 濃度の変化を B-D に示した. (B, C, D) 溶媒のみを添加 (Cont.) と、50 nM Rapamycin 添加 (Rapamycin) 1, 3, 6, 15, 28 時間後の各分子種における濃度変化. *は, Cont. と比較して *t*-test で $p < 0.05$ と有意差が認められた. それぞれ 4 回の実験結果である. (E) 溶媒のみを添加 (Cont.) と、50 nM Rapamycin 添加 (Rapamycin) 26 時間後の Nile Red で染色をした細胞. 赤く光った油滴が TAG であり, 矢印で示した. 右下のバーは 10 μm である.

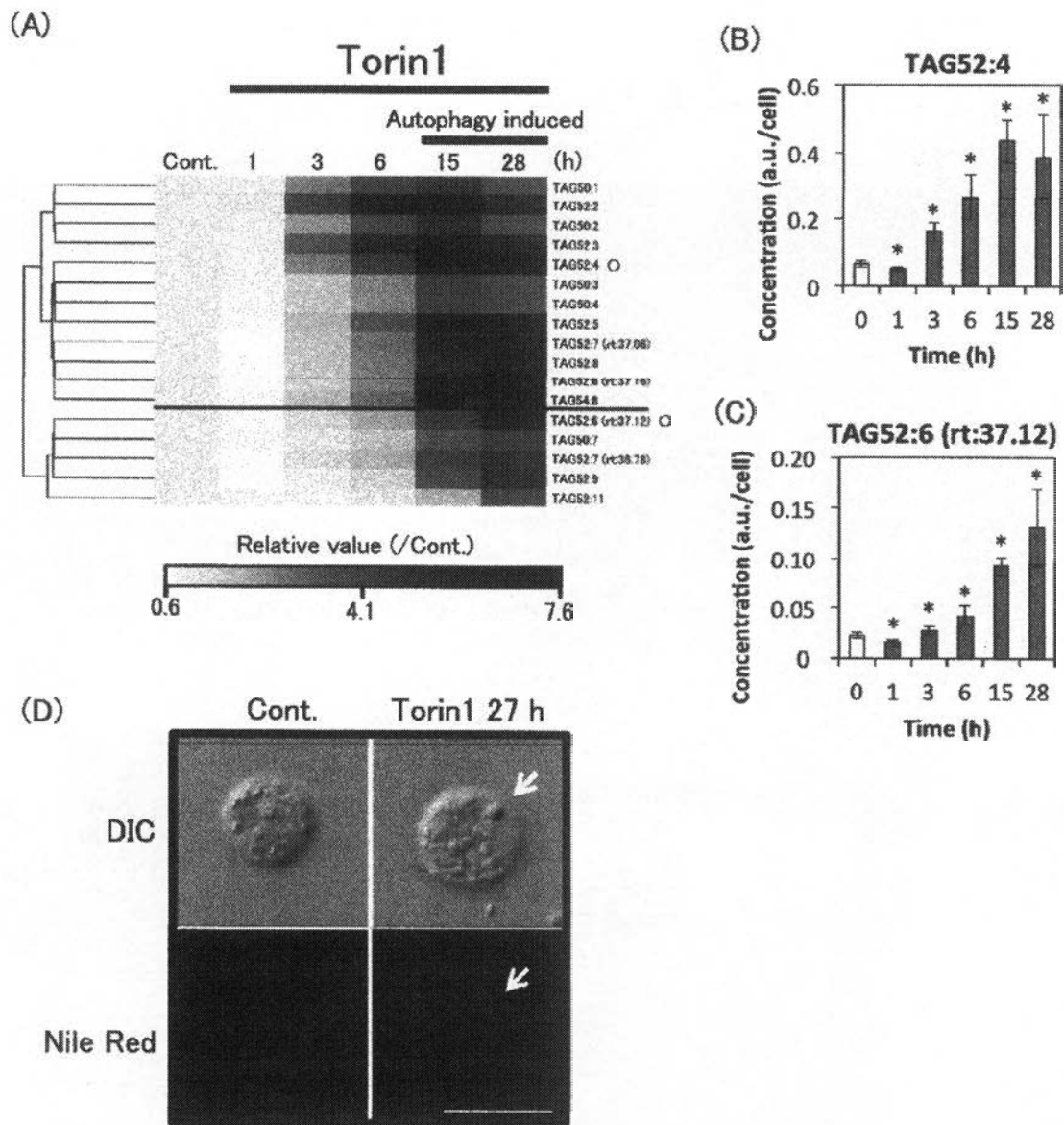


図7 Torin1 添加時の TAG 量の変化

(A) 溶媒のみを添加 (Cont.) と、500 nM Torin1 添加 (Torin1) 1, 3, 6, 15, 28 時間後に LC-TOFMS で同定した TAG の各分子種の変化。同定できた 30 分子種の Cont. に対する割合をヒートマップにして示した。階層的クラスタリングにより 3 つの異なる変化に分類され、各クラスターの中で存在量が最も多い分子種を○で示し、B, C に濃度の変化を示した。(B, C) 溶媒のみを添加 (Cont.) と、500 nM Torin1 添加 (Torin1) 1, 3, 6, 15, 28 時間後の各 TAG 分子種の濃度変化。*は、Cont. と比較して t -test で $p < 0.05$ と有為差が認められた。それぞれ 4 回の実験結果である。(D) 溶媒のみを添加 (Cont.) と、500 nM Torin1 添加 (Torin1) 26 時間後の Nile Red で染色をした細胞。赤く光った油滴が TAG であり、矢印で示した。右下のバーは 10 μm である。

表 1 Rapamycin または Torin1 添加により増加した物質

DAG: ジアシルグリセロール, DGDG: ジガラクトシルジアシルグリセロール, MGDG: モノガラクトシルジアシルグリセロール, PI: ホスホチジリンイノシトール, PE: ホスホチジリンエタノールアミン、TAG: トリアシルグリセロール

Rapamycin and Torin1		Rapamycin		Torin1	
脂質	低分子	脂質	低分子	脂質	低分子
DAG34:1	Ala		2'-Deoxyguanosine	Anthraxanthin	3-Hydroxy-3-methylglutarate
DAG34:2	Arg		Adenosine	Chlorophyll b	ATP
TAG52:2	Asn		Met	DGDG34:6	beta-Ala
TAG52:4	Asp		N-Acetylaspartate	MGDG34:1	Citrate
TAG52:5	Citrulline		trans-Cinnamate	MGDG34:6	Cysteine: glutathione disulphide ·divalent
TAG52:6 (rt:37.37)	Cytidine			PE36:3	Ethanolamine phosphate
TAG52:7 (rt:36.78)	gamma-Guanidinobutyrate			PE36:5	Fumarate
TAG52:8	Gln			PI28:1	gamma-Aminobutyric acid
	Glu			PI28:1	Glutathione (oxidized form)
	Guanosine			TAG50:1	Gly
	Ile			TAG50:2	His
	N-Acetylputrescine			TAG50:3	Leu
	N-gamma-Ethylglutamine			TAG50:4	Lys
	Ser			TAG50:7	N-Acetyl-beta-alanine
	Thr			TAG52:11	N6,N6,N6-Trimethyllysine
	Val			TAG52:3	NAD+
				TAG52:6 (rt:37.12)	Ornithine
				TAG52:7 (rt:37.06)	Pantothenate
				TAG52:9	Phe
				TAG54:8	Pimelate
					Pro
					Propionate
					Ribulose 5-phosphate
					S-Adenosylhomocysteine
					Succinate
					Tfp
					Tyr
					Uridine

表 2 Rapamycin または Torin1 添加により減少した物質

FA : 脂肪酸, PI : ホスファテチジルイノシトール, PE : ホスファテチジルエタノールアミン

Rapamycin and Torin1		Rapamycin		Torin1	
脂質	低分子	脂質	低分子	脂質	低分子
	Adenine CMP-N-acetylneuraminate UDP-glucose	Chlorophyll b PE36:5 PI28:1	Alantoin Glycerol-3-phosphate 5-Methylthioadenosine ADP AMP ATP beta-Ala-Lys CDP Citramalate CMP Fructose-1,6-bisphosphate GDP Glutathione (oxidized form) Glycerophosphate GTP IDP ITP Malate NAD+ Pantothenate Phosphoenolpyruvate Pyruvate Ribulose 5-phosphate 5-Methylthioadenosine UDP UMP	FA13:2 PI28:0	2-Hydroxypentanoate 3-Phenylpropionate 5-Oxoproline Butanoate Glutarate N-Acetylaspartate Putrescine(1,4-Butanediamine) Trimesate

2.4 議論

ATG8 の脂質修飾をウェスタンブロットで検出することでオートファジーをモニターする方法は真核生物で広く使われている (Mizushima, 2004). 本研究では, *A. thaliana* の ATG8 抗体が *C. reinhardtii* に結合することを確かめた. その逆で, *C. reinhardtii* の全長の ATG8 抗体もまた *A. thaliana* に結合する (Pérez-Pérez *et al.*, 2010). また, *A. thaliana* の ATG8 抗体は *Zea mays* のタンパク質にも結合する (Chung *et al.*, 2009). 酵母の ATG8 ペプチド抗体では, N 末端配列よりも C 末端の配列の方がより ATG8-PE への結合が強かったことから (Kabaya *et al.*, 2004), AtATG8 抗体は C 末端を認識すると考えられる. *C. reinhardtii* と *A. thaliana* のアミノ酸配列は特に C 末端配列の相同性が高いため (付図 1), 相互に結合可能だと考えられる. 緑藻から高等植物に至るまで C 末端配列の保存性が高いため, 他の緑藻類においても *A. thaliana* の ATG8 抗体を利用できると期待される.

50 nM Rapamycin, または, 500 nM Torin1 の添加により, 細胞増殖が抑制され (図 4 (A), 図 5 (A)), TOR の不活性化を確認した. 50 nM Rapamycin では約 70 時間後に, 500 nM の Torin1 では約 60 時間後に増殖の抑制が阻害され, 増殖の抑制が見られなくなった (図 2 (A), (B)). 長時間の TOR の不活性化は TOR の上流である PI3K-Akt 経路の活性化により, 再度 TOR を活性化させる報告があり (Wan *et al.*, 2007), 増殖が抑制されている間が, TOR が不活性化している間と考えられる. さらに, TOR の不活性化によりオートファジーの誘導を確認した (図 4 (D), 図 5 (D)). 表現系としては, 体積の増加 (図 4 (B), 図 5 (B)), TAG の蓄積が見られたが (図 4 (E), 図 5 (D)), その他の細胞形態には大きな変化は見られなかった (図 4 (C), 図 5 (C)). *Drosophila* においては TOR を阻害すると増殖が停止し, 細胞サイズが小さくなる (Zhang *et al.*, 2000). 本研究と共通してみられた増殖の抑制は TORC1 が細胞周期の G1 期や G2 期を停止するためだろうが (Wang and Proud, 2009), 体積への制御関係やその機構は未解明である.

Rapamycin または Torin1 どちらによるオートファジー誘導下においても TAG の蓄積が認められ (図 6, 図 7), -N 下でなくともオートファジーと TAG 蓄積は同調的に起こる事が分かった. 本研究の仮説通り, オートファジーによって TAG が増加したのであれば, TAG 合成の供与体となった脂質がオートファジー誘導下で顕著に減少すると期待できる. しかし, Rapamycin と Torin1 添加時に共通して減少した脂質は一つも検出されなかった. Rapamycin のみ減少したものに PI28:1 (コントロールに対する 15 時間後の変化率が 0.76 倍) と PE36:5 (コントロールに対する 15 時間後の変化率が 0.61 倍), Torin1 のみ減少したものに PI28:0 (コントロールに対する 15 時間後の変化率が 0.72 倍) などの細胞膜脂質があり, オートファジー誘導下では異なる分子種を分解している可能性は考えられる. しかし, Rapamycin 添加時に TAG の中で最も増加率が高かった TAG46:1 では, コントロールに対する 15 時間後の変化率が 5.9 倍, Torin1 添加時には TAG52:2 が 15 時間後に 7.3 倍

であり、TAGの増加率に比べると膜脂質の減少率は非常に少なかった。その他にTAGが蓄積した理由については、TORがオートファジー以外の機構を經由して脂質代謝に関与していることも考えられる。マウスの線維芽細胞ではTORC1がlipin1タンパク質を制御することが示唆されている(Laplante and Sabatini, 2009)。複数の異なる局在と働きをもつlipin1は、ほ乳類ではPhosphatidic acid (PA)からDAG合成を促進するホスファチジン酸ホスファターゼ活性をもつ(Han et al., 2006; Donkor et al., 2007)。C. reinhardtiiでもlipin1のホモログとして、ホスファチジン酸ホスファターゼPAH1が存在する(Merchant et al., 2011)。TORC1と細胞質に局在するlipin1の制御関係は未解明であるが、TORC1不活性化によりlipin1が活性化し、TAGの前駆体であるジアシルグリセロール(DAG)及びTAG合成を促進させることが予想されている(Laplante and Sabatini, 2009)。C. reinhardtiiにおいてもTOR不活性化時にDAGの増加が見られた(表1)。マウスの脂肪細胞においてはRapamycinによるTORC1の不活性化によりTAG分解が促進し、脂肪滴が減少する(Chakrabarti et al., 2010)。またマウスの肝細胞においてオートファジーによって脂肪滴が分解することも示唆されている(Singh et al., 2009)。一方で、DrosophilaにおいてはTORの不活性化により増殖が抑制し、脂肪滴の蓄積が見られたという本結果と類似した報告がある(Oldham et al., 2000; Zhang et al., 2000)。本研究により、C. reinhardtiiのTOR不活性化と同調的にTAGが蓄積することが分かったが、TORの不活性化による貯蔵脂質への影響は生物種により大きく異なった。また本研究により、TORの阻害に作用機構の異なるRapamycinとTorin1を用いることで、蓄積するTAG組成が変化する事が明らかとなった。Torin1添加時には検出されなかった44, 46, 48といった短い炭素鎖のTAGがRapamycin添加時には検出された事から、RapamycinとTorin1では脂肪酸伸長反応の制御において違いがある可能性がある。また、Torin1の方がRapamycinに比べてTAG増加の変化率が高いのは、Torin1の方がRapamycinよりも強くオートファジーを誘導する(Thoreen and Sabatini, 2009; Guertin and Sabatini, 2009)ためかもしれない。また、どちらの薬剤添加でも、TAGの不飽和度が高いものは遅れて増加したことから(図6(B)(C), 図7(B)(C)), TAG合成時には不飽和度の低い分子種が先に合成され、その後不飽和化されると考えられた。

また本研究では、LC-TOFMSとCE-TOFMSを用いてオートファジー誘導下で変化する物質を同定することで、オートファジーにより分解される物質、生産される物質を予測しようとした。増加した物質はオートファジーによる分解産物、もしくは分解産物から代謝物されたと考えられる。一方で、オートファジー誘導時に減少した物質は、オートファジーによって低分子へと分解された物質と考えられる。オートファジー誘導時にはタンパク質がアミノ酸へと分解されるため、アミノ酸の増加が期待される。RapamycinとTorin1両方で増加した16物質のうち、タンパク質を構成するアミノ酸が10物質含まれており、また9つのアミノ酸はTorin1で増加したことから(表1)、タンパク質分解による遊離アミノ酸への供給はオートファジーの最も貢献度が大きい役割であることが考えられた。同様

に Rapamycin と Torin1 共通して増加がみられた Citrulline, gamma-Guanidinobutyrate, N-Acetylputrescine は Arginine and protein metabolism 上の代謝物であり, N-gamma-Ethylglutamine は Glu から 2 反応で合成される物質であるため, これらは分解産物であるアミノ酸から合成されたと考えられる. また, Guanosine と Cytidine はリボースと糖が結合したヌクレオシドであり, RNA の分解物であると考えられる. また, Rapamycin と Torin1 添加してオートファジーを誘導した際に, 共通の変化をする物質数よりも, それぞれの薬剤のみで変化する物質数が多かった (表 1, 2). これらの違いは, rapamycin よりも Torin1 の方がリン酸化を阻害する範囲が広いといった作用機構の差にあると考えられる.

TAG を含め, 同定できた物質については, ATG8-PE 検出以前の 1, 3, 6 時間においても物質量の変化が確認されたが (date not shown), TOR によるオートファジー以外の機構を経由した変化であるか, ATG8-PE がウェスタンブロットでは検出できない程度のオートファジーによる変化であるかは不明である.

本章では, Torin1 または rapamycin を添加して TOR とは独立に TOR を不活性化しオートファジーを誘導することにより, TAG 蓄積がおこることが明らかになった. このことから TAG 蓄積機構は TOR の下流にあることが強く示唆された. TOR を不活性化したことにより TAG が蓄積した理由は, (i) 本研究の仮説通り, オートファジーによって細胞膜脂質が分解され, DAG と TAG 合成へと利用された, (ii) オートファジーとは異なる TOR からの機構 (DAG 合成を促進するホスファチジン酸ホスファターゼの活性化など) により TAG が蓄積したということが予測される (図 8). 一方で, 液胞阻害剤である Chloroquine と Bafilomycin A1 を用いてオートファジーによる分解の阻害を試みたが, 高等植物やほ乳類で見られる ATG8 の検出パターンとは異なり (図 3), オートファジーを阻害できなかったと考えられる. そのため, オートファジーによって TAG 蓄積がおこったのか, TOR の不活性化により TAG 蓄積がおこったのかは考察できなかった. しかし, 本研究により初めて, *C. reinhardtii* において TOR の不活性化により TAG 蓄積がおこる事を示した.

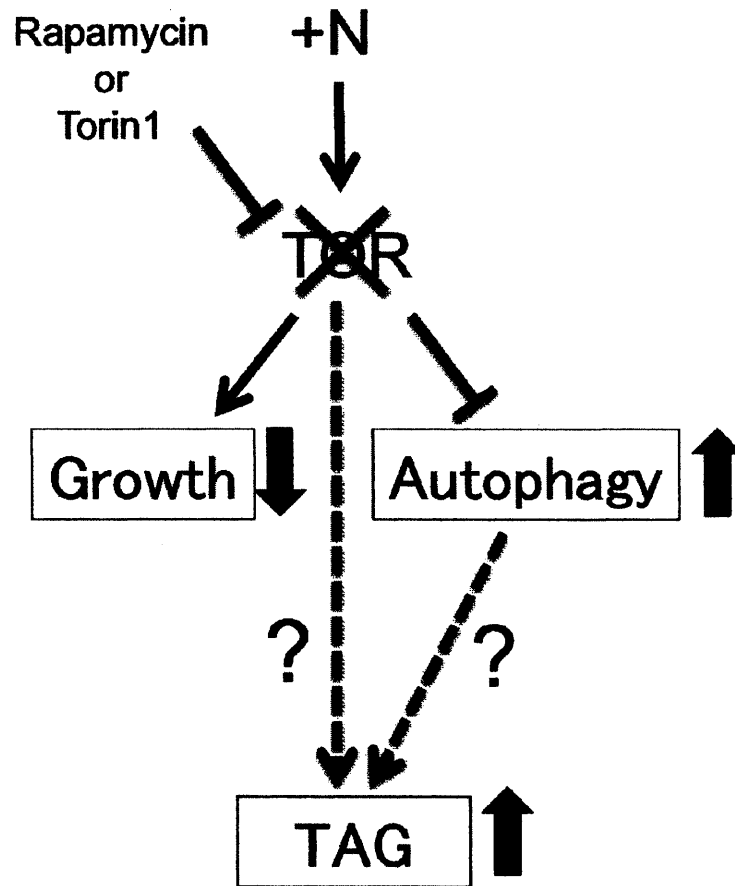


図 8 Rapamycin または Torin1 を添加した際にみられた変化

50nM Rapamycin と 500nM Torin1 を添加して Target of rapamycin (TOR) を不活性化した時には、増殖 (Growth) の抑制、オートファジー (Autophagy) の誘導、トリアシルグリセロール (TAG) の増加がみられた。TOR の不活性化により、TAG が増加した理由は 2 つ考えられた。(i) 本研究の仮説通り、オートファジーによって他の脂質が分解され TAG 合成へと供給された。(ii) オートファジーとは異なる TOR からの機構 (DAG 合成を促進するホスファチジン酸ホスファターゼの活性化など) により TAG が蓄積した。どちらの機構にしる、*C. reinhardtii* において TOR の下流に TAG 蓄積機構があることを本研究で明らかにした。

第 3 章

窒素安定同位体を用いた

“*Pseudochoricystis ellipsoidea*” の窒素栄養欠乏下における細胞内分解物とその利用

3.1 背景と目的

緑藻 “*Pseudochoricystis ellipsoidea*” MBIC11204 株は, -N 下で C18:1 と C16:0 を主成分とする軽油クラスの TAG を蓄積すること, 倍加時間は 8.8 時間であり他のオイル生産微細藻に比べて増殖が速いことから, ディーゼル燃料の代替としての実用化が期待されている有用なオイル生産微細藻類である (Sato *et al.*, 2010). しかし, 他のオイル生産微細藻類と同様に, -N 下でのストレス応答や TAG 蓄積の代謝制御機構は不明である.

-N 下では窒素同化や新規のアミノ酸合成の低下が示唆されており, またアミノ酸プールやタンパク質量は減少することがいくつかのオイル生産微細藻で調べられている. 緑藻綱・オオヒゲマワリ目に属するモデル生物の *C. reinhardtii* においては, Trp 合成遺酵素量の低下が示されている (Msanne *et al.*, 2012). トレボウクシア藻綱に属する “*P. ellipsoidea*” は, -N 下で総タンパク質量, および, Trp と His を除くタンパク質を構成するアミノ酸の量が顕著に減少する (Ito *et al.*, 2012). *C. reinhardtii* における -N 下での一次代謝物質を中心としたメタボローム解析においても, Trp と Ile を除くアミノ酸が減少した (Bölling and Fiehn, 2005). また不等毛植物門・真正眼点藻綱の *Nannochloropsis* 属 PP 983 株では, 培地中唯一の窒素栄養である硝酸ナトリウム量を 3 mM から 150 μ M に減らすと, 脂質量が大幅に増加し, タンパク質量が減少することが報告されている (Hu and Gao, 2006). しかし一方で, -N 下でも生命維持のための一次代謝物質や, タンパク質合成のためのアミノ酸は必要であると考えられる.

第一章で既述した通り, オートファジーは, 飢餓時にタンパク質を分解してアミノ酸を供給する機構であり, *C. reinhardtii* の -N 下ではオートファジーが誘導される (Pérez-Pérez *et al.*, 2010). オートファジーは真核生物で広く保存されている機構であることから, “*P. ellipsoidea*” の -N 下でもオートファジーが誘導され, タンパク質分解によりアミノ酸を供給していると予想される. 酵母では -N 下でタンパク質分解によりアミノ酸プールが一時的に増加するとタンパク質合成が促進したことから, 分解されたアミノ酸がタンパク質合成に再利用されることが示されている (Onodera and Ohsumi, 2005). このこ

とから、飢餓時に誘導されるオートファジーは、タンパク質合成のアミノ酸を供給することで、飢餓に適応する役割があると考えられている。一方で、タンパク質量とアミノ酸プールが顕著に減少したことから (Ito *et al.*, 2012), タンパク質分解により供給されたアミノ酸はタンパク質合成以外にも代謝されることが考えられる。しかし、分解されたアミノ酸の利用先については、タンパク質合成以外に調べられていない。

オートファジーのモニター方法には、オートファジー関連タンパク質を検出する方法が多く利用されているが (Mizushima, 2004), 物質分解を物質レベルで直接的にモニターする長寿命タンパク質分解アッセイ法もある (Klionsky *et al.* 2007; Ueno *et al.* 2008). 例えば, [¹⁴C] Val の放射性同位体で長時間培養することで細胞内のタンパク質を標識した後, 非標識の Val で短時間培養することで, 置換に時間のかかるタンパク質は標識されたまま, 遊離の Val は非標識された細胞ができる。これに飢餓や薬剤添加といった処理を施し, その後, 細胞質や培地中に放出された物質の放射線量を測定することで, タンパク質分解率を定量することができる。この手法はほ乳類や酵母で古くから利用されているが, 単一のアミノ酸でタンパク質を標識しているため, タンパク質から分解された全てのアミノ酸の代謝を追跡することができない。

本章では "*P. ellipsoidea*" の-N 下におけるタンパク質分解の仮説を検証し, さらに分解物がどの代謝物へ再利用されているのか明らかにすることを目的とした。そのために, 長寿命タンパク質分解アッセイ法を参考に安定同位体により標識された化合物を細胞内に取り込ませてメタボローム解析を行う。本手法では, 唯一の硝酸源である ¹⁵NO₃ を用いてタンパク質を窒素安定同位体 (¹⁵N), 遊離アミノ酸 (A.A.) を ¹⁴N となるように標識させた細胞を作り出し, その後-N 下で培養した細胞におけるタンパク質と遊離アミノ酸の ¹⁴N と ¹⁵N の割合を測定することでタンパク質分解を検証する。また, 分解されたアミノ酸は同位体標識されており, 同位体が検出された窒素代謝物を網羅的に解析することにより, 同時に-N 下における窒素代謝物の分配を明らかにすることができると考えている。

3.2 材料と手法

3.2.1 株と培養条件

"*P. ellipsoidea*" MBIC11204 株は株式会社デンソー (Aichi, Japan) より供与された。培地を 600 mL 入れた扁平フラスコに, CO₂ を 1% 添加した大気を 300 mL/min 通気し, 180 μmol/m²/s の蛍光灯を 24 時間照射して 25°C で培養した。培地は A5 (¹⁴NO₃; 付表 1) 培地を基本とし, 窒素安定同位体 (¹⁵N) 標識された NaNO₃ (SHOKO, Japan) を用いた A5 (¹⁵NO₃) 培地と A5 培地から NaNO₃ を除いた (-N) 培地を用いた。培地交換は, 細胞を遠心により収集後, 新しい培地で 1 度共洗いしたのち, 新しい培地で再懸濁して培養した。

3.2.2 細胞内窒素が ¹⁵N に置き換わる時間の検討

¹⁴NO₃ 培地で培養した細胞を処理前としてサンプリング後, ¹⁵NO₃ 培地へ培地交換し 6 時間, 1, 2, 4, 7 日後に, サンプリングを行った。各サンプリングポイントでは OD₇₂₀ が 0.32 ~ 0.74 の細胞を約 95 mL ~ 219 mL 遠心分離により約 OD₇₂₀ 70 相当の細胞を回収した。細胞における全窒素と, ¹⁵N の濃度測定は, それぞれ日立 RMI-2 質量分析計と Elemental analyzer EA1110 を用いて燃焼法により測定された。測定は SI サイエンス株式会社に依頼し, 細胞内の前窒素に対する ¹⁵N の比率を換算した。

3.2.3 アミノ酸とタンパク質の同位体標識交換比率の検討

¹⁵NO₃ 培地で 5 日間培養することで, 細胞内の窒素を ¹⁵N に置換し, 処理前としてサンプリングを行った。¹⁴NO₃ 培地で培養し, 3, 6, 9 時間後にサンプリングを行った。各サンプリングポイントでは OD₇₂₀ 0.18 ~ 0.52 の細胞を約 116 ~ 327 mL 遠心分離により約 OD₇₂₀ 60 相当の細胞を回収した。回収した細胞から代謝物を抽出 (3.2.5 参照) し, 3.2.6 で述べる方法でタンパク質を抽出後加水分解し, 3.2.7 で述べる方法でそれぞれのアイソトポマーを測定後, 3.2.8 で述べる方法で同位体標識交換比率 (ILR) を求めた。

3.2.4 同位体標識方法とサンプリング

¹⁵NO₃ 培地で 5 日間培養することで, 細胞内の窒素を ¹⁵N に置換した。次に ¹⁴NO₃ 培地で 6 時間培養することで, 遊離アミノ酸は ¹⁴N, タンパク質は ¹⁵N が主成分となるように調整し, 処理前 (0h) のサンプリングを行った。その後, 処理前の細胞を -N に培地交換し 3, 6, 12, 24, 72 時間後にサンプリングを行った。以上に述べた手法の簡略図を図 9 に示した。それぞれのサンプリングポイントでは OD₇₂₀ 0.17 ~ 0.66 の細胞を約 48 mL ~ 176 mL 遠心分離により約 OD₇₂₀ 30 相当回収した。

3.2.5 代謝物質の抽出

回収した細胞は $3,310 \times g$ で 3 分遠心後, 1 mL の Milli-Q で一度洗った. その後, 直径 0.5 mm のジルコニアビーズ約 500 μL と, 内部標準物質として L-Methionine sulfone (Wako, Japan), MES (Dojindo, Japan), CSA (Wako, Japan) を 20 μM 含んだメタノール 1050 μL を加えて Micro Smash (Tomy, Japan) で物理的に破碎した. 細胞破碎液のうち 50 μL を DNA の定量に用いて, 同定した代謝物濃度について単位細胞あたりの代謝物濃度に換算した. ゲノム DNA は, FastPure DNA Kit (Takara Bio, Japan) で抽出し, Quant-iT dsDNA HS assay kit と Qubit fluorometer (Life Technologies, USA) で定量した. 細胞破碎後のメタノール溶液 600 μL に, 超純水 600 μL とクロロホルム 240 μL を入れることで水層と有機層に液-液分配し, 水層部分を限外濾過した. ろ液は真空乾燥後, 50 μL の Milli-Q 水で溶解し, 代謝物の測定に用いた.

3.2.6 タンパク質抽出と加水分解

細胞破碎後のメタノール溶液 200 μL に, 8 M urea と 0.1 M Tris-HCl (pH 8) を加え, タンパク質を溶解した. 溶解したタンパク質の精製には, ゲル濾過 (PD-10 Desalting Columns (General Electric Company, Germany)) と, 限外濾過 (Amicon Ultra-4 10,000 MWCO Centrifugal Filter Devices (Millipore corporation, America)) を用いた. その後, ガラスバイアルに移して 6 N の塩酸で 105°C、16 時間インキュベートすることでタンパク質をアミノ酸へ加水分解した (Hama *et al.*, 1987). 加水分解されたアミノ酸は, ドラフト内で 60°C で 2 日間インキュベートし, 塩酸を完全に揮発させた. その後, 内部標準物質として L-Methionine sulfone (Wako, Japan), MES (Dojindo, Japan), CSA (Wako, Japan) を 200 μM 含んだ Milli-Q 250 μL に溶解し, 全量を限外濾過後, アミノ酸の測定に用いた.

3.2.7 代謝物質とタンパク質アミノ酸の定量

キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-TOFMS) (Aligent Technologies, Waldbronn, Germany) を用いて代謝物質を定量した (Soga *et al.*, 2003; Soga *et al.*, 2009). データ解析には, MasterHands (Sugimoto *et al.*, 2010) -2.0.0.1.4 を用いた. 代謝物質については, 付表 2 に示した窒素元素を含む代謝物質を対象にそれぞれの質量アイソトポマーを質量電荷比 (質量精度 50 ppm) と泳動時間 (誤差 5 分) から同定した. タンパク質アミノ酸については, タンパク質を構成する 20 アミノ酸を対象にそれぞれの質量アイソトポマーを同様に同定した. 同定できた物質は, 20 μM , または 50 μL の標品の測定値を基準に, 濃度に換算した.

3.2.8 同位体標識交換比率 (ILR) の計算

遊離アミノ酸とタンパク質アミノ酸, その他の代謝物のデータの総窒素に対する ^{15}N の比率は, Hasumuna ら (2009) が行った ^{13}C fraction (%) の式を参考に, 代謝物質あたりの同位体標識交換比率 (Isotope Labeled Ratio; ILR) として計算した (式 1; (例) 窒素原子を 2 つ含む Gln の $\text{ILR} = (\text{Gln}_0 \times 0 + \text{Gln}_1 \times 1 + \text{Gln}_2 \times 2) / 2 \times (\text{Gln}_0 + \text{Gln}_1 + \text{Gln}_2)$). また, 各物質のプールサイズはアイソトポマーの総和として計算した.

$$\text{Isotope Labeled Ratio (ILR)} = \frac{\sum_{i=0}^n (M_i \times i)}{n \times \sum_{i=0}^n M_i} \quad (\text{式 1})$$

n : 代謝物中の窒素の数

i : ^{15}N 標識された窒素の数

M_i : i 個の窒素が ^{15}N 標識された質量アイソトポマーの濃度

3.2.9 ATG8 のウェスタンブロット

+N で培養した処理前 (0 時間) と, -N 1, 3, 6 時間後の培養液からそれぞれ 1.0×10^8 cells の細胞を回収した. $4,000 \times g$ で 24°C , 5 分間遠心して培地を除去した後, 液体窒素で酵素反応を停止した. その後, 0.1 M Dithiothreitol 入り 0.2 M NaOH を $100 \mu\text{L}$ で細胞を破碎し, 20% トリクロロ酢酸を $100 \mu\text{L}$ 加えることでタンパク質を沈殿させ, $13,000 \times g$ で 4°C , 5 分間遠心した. 上清を除いた後, pH を酸性から塩基性にするために 1 mL アセトンを加え, ソニケーターでペレットをはがした. $13,000 \times g$ で 4°C , 5 分間遠心し, 10 分間室温でペレットを乾かした後, SDS-PAGE sample buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 2% SDS, 10% glycerol, 20 mM DTT, a trace amount of bromophenol blue) を加えて 65°C で 10 分間インキュベートすることでタンパク質を溶出させた.

抽出したタンパク質を 95°C で 5 分インキュベートすることでタンパク質を変性させた後, $13,000 \times g$ で 4°C , 1 分間遠心した. タンパク質の定量は Quant-iT protein assay kits と Qubit fluorometer (Life Technologies, USA) で行い, スタンダードには 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g/mL}$ の BSA を用いた. 全てのサンプルは 30 mg 分のタンパク質を用いて, セパレーションゲルに 6 M urea を含んだ 12.5% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) によりタンパク質を分離した (Kirisako *et al.*, 2000). 分離したゲルから PVDF メンブレン (Millipore, USA) にタンパク質を転写後, 2% milk (明治, Japan) で 30 分ブロッキングした. 一次抗体には, *Arabidopsis thaliana* の ATG8 全長の抗体, α -ATG8 (abcam, Japan; Chung *et al.*, 2009) を 1:1,000 の濃度で用い, 4°C で一晩インキュベートした. 二次抗体には, Horseradish peroxidase (HRP) 標識された anti-rabbit (GE Healthcare, UK) を 1:10,000 の濃度で 1 時間インキュベートした. 免疫反応については, ルミノール化学発

光 (Millipore, USA) で反応後, ImageQuant LAS4000 mini (GE Healthcare, Sweden) で撮影した.

各サンプルの測定に用いたタンパク質量は Coomassie Brilliant Blued (CBB) 染色により可視化された.

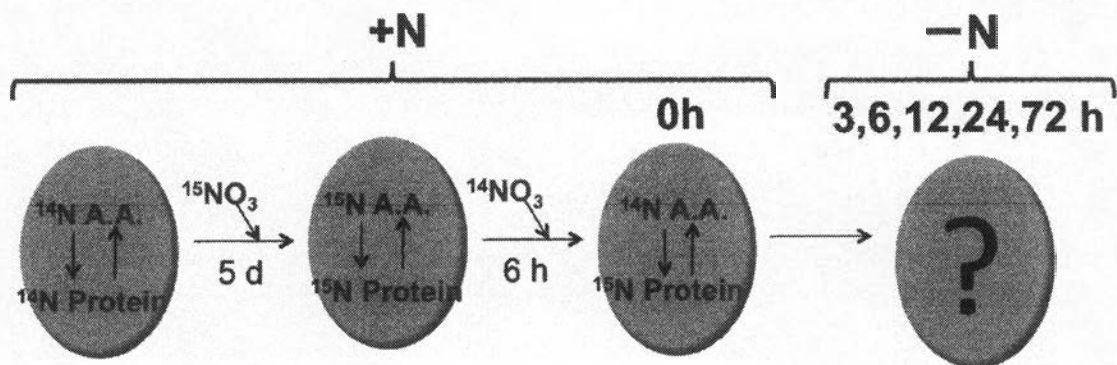


図9 同位体標識方法の簡略図

培地は A5 (+N; ^{14}N) 培地, 窒素安定同位体標識された $^{15}\text{NaNO}_3$ を用いた A5 (^{15}N) 培地と A5 培地から NaNO_3 を除いた (-N) 培地を用いた. 通常 ^{14}N で構成されている細胞を ^{15}N で 5 日間培養することで, 細胞内の全窒素を ^{15}N に置換した. その後, 6 時間 ^{14}N 培地で培養することで, タンパク質 (Protein) は ^{15}N , アミノ酸 (A. A.) は ^{14}N が主成分となるような細胞を構成して処理前 (0h) とした. -N 培地で 3, 6, 12, 24, 72 時間後の A. A. における ^{15}N の比率を ILR として求めた. 0, 72 時間後では Protein における ^{15}N の比率を ILR として求めた.

3.3 結果

3.3.1 ^{14}N 培地と ^{15}N 培地を用いた同位体標識交換比率の検討

大気中の窒素は 99.634%が ^{14}N , 0.366%が ^{15}N で構成されており, 細胞内窒素の同位体比率はこれに準じている. 細胞内窒素を十分に ^{15}N に置換されるのに必要な培養時間を調査するために処理前と -N 0.5, 1, 2, 4, 7 日後の同位体比を測定した結果, 4 日後に 99.9%の置換率となり, 4 日以上培養すれば十分に ^{15}N 置換されることが分かった (図 10).

また, 細胞内窒素が ^{15}N で構成されている細胞を ^{14}N で培養し, 遊離アミノ酸を ^{14}N , タンパク質を ^{15}N が主成分となるように区別するのに最適な培養時間を調査するために, 処理前と -N 3, 6, 9 時間後にサンプリングを行いタンパク質と遊離アミノ酸における ILR を測定した. タンパク質の ^{15}N 標識率が高く, 遊離アミノ酸とタンパク質の分離度が大きくなる時間を, 最適条件とした. 遊離アミノ酸の 0, 3, 6, 9 時間における各アミノ酸の ILR の平均は 0.98, 0.25, 0.17, 0.12 であり, タンパク質の 0, 3, 6, 9 時間における ILR は 0.99, 0.86, 0.75, 0.61 であった (図 11). また, 遊離アミノ酸に対するタンパク質の比は 0.99, 3.48, 4.35, 5.13 だった. 遊離アミノ酸とタンパク質を完全に分離することはできなかったが, ^{15}N の割合についてアミノ酸が 2 割以下, タンパク質が 7 割以上に標識された 6 時間を培養時間とした. (図 11).

3.3.2 タンパク質分解の検証

タンパク質は ^{15}N , 遊離アミノ酸は ^{14}N が主成分となるような状態 (0h) と -N 72 時間後 (-N 72 h) における, 遊離アミノ酸とタンパク質アミノ酸の ILR を求めた結果をそれぞれ図 12 (A) と (B) に示した.

タンパク質を構成する 20 のアミノ酸のうち, Cys は検出されなかった. 検出された 19 アミノ酸の処理前では, 遊離アミノ酸の ILR の平均値が 0.30 で, タンパク質アミノ酸の ILR の平均値は 0.72 であり, 標識率に勾配をつけることができた (図 12 (A) (B)). しかし, Arg の遊離アミノ酸とタンパク質アミノ酸の ILR はそれぞれ 0.52 と 0.75 で, Asn の遊離アミノ酸とタンパク質アミノ酸の ILR はそれぞれ 0.70 と 0.70 であり, 遊離アミノ酸の ILR が高い値を示し, 勾配をつける事ができなかった (図 12 (A)). 2 回行った実験どちらにおいても, -N 72 時間後のタンパク質アミノ酸は全て減少したのに対して (図 12 (B); 付図 2 (B)), Arg と Asn を除く全てのアミノ酸について, 遊離アミノ酸は 1.5 倍以上増加した (図 12 (A); 付図 2 (A)). -N 下で遊離アミノ酸における ILR が増加したことは, 高度に ^{15}N 標識されたタンパク質がアミノ酸へ分解されたためであり, タンパク質分解が促進していることが明らかになった.

3.3.3 タンパク質分解機構の調査

"*P. ellipsoidea*"の-N下におけるタンパク質分解がオートファジーに起因するかを明らかにするため、経過時間に伴う ILR の変化と、オートファジーのモニター方法の一つである ATG8 の脂質修飾の変化を調査した。遊離アミノ酸の 0, 3, 6, 12, 24, 72 時間における ILR の変化では、2 回の実験において、ILR は-N 3 時間には増加が見られ、-N から 3 時間でタンパク質分解がおこなっていることが分かった (図 13 (A) ; 付図 3)。一方で、ウェスタンプロットで ATG8 の 0, 1, 3, 6 時間後における変化をみたところ、1, 3, 6 時間後には 0 時間に比べて ATG8 の量が増加し、ATG8-PE も検出されたことから (図 13 (B))、-N 1 時間後にオートファジーがおこなっていることが分かった。これらの結果から、ILR の増加によって明らかとなったタンパク質分解は、オートファジーが起因していることが明らかになった。

3.3.4 各アミノ酸におけるプールサイズの変化

飢餓時におけるオートファジーの意義は、タンパク質を分解することでアミノ酸プールへ供給することであると言われている。そこで、-N 下における各アミノ酸のプールサイズの変化を調べた (図 14)。Arg, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr, Val においては、2 反復の実験で共通して 3 時間以降で一時的に増加したポイントがあり、タンパク質由来のアミノ酸がプールの維持に関与していることが分かった (図 14)。一方で、Ala, Asn, Gln, Glu, Gly, Thr は ILR が増加しているが、プールサイズが一時的に減少した (図 14)。このように、検出できた全てのアミノ酸の ILR は増加した一方で、His と Trp 以外のアミノ酸は一時的にプールサイズが増加したとしても、その後は減少しており、供給されたアミノ酸を代謝していることが分かった。

タンパク質を構成するアミノ酸は分解すると、クエン酸回路上の物質もしくはその前駆体の物質となる (図 14)。各アミノ酸のプールサイズと ILR の変化をアミノ酸分解経路にマッピングし、2 回の実験で共通して-N 72 時間後に 0 時間に対して 6 倍以上に減少したアミノ酸を減少率の高かったアミノ酸として水色の背景で示した (図 14)。減少率が高かったアミノ酸は炭素骨格までの異化反応が 4 反応以内で行われるアミノ酸であった (図 14)。それらの反応式は、脱アンモニア反応と、Glu にアミノ基を転移する反応であった。また、Pyruvate, Citrate, Iso citrate, 2-OG, Malate は-N 72 時間後に顕著に増加、Fumarate, Su は顕著に減少することが分かっている (Ito *et al.*, 2012; 図 14)。

3.3.5 ¹⁵N 標識された他の代謝物

タンパク質から分解されたアミノ酸の代謝を追跡するために、¹⁵N 標識された窒素代謝物を抽出したところ、ILR が 0.33 以上の窒素代謝物が 28 物質同定された。それらの物質について KEGG (Kanehisa *et al.*, 2008) から Pathway を調べたところ、Arg and pro metabolism, Glutathion metabolism, Lys degradation, Cys and met metabolism, Gly,

ser and thr metabolism といったアミノ酸代謝上と, Purine metabolism, Pyrimidine metabolism といった核酸代謝上に多く検出された (表 3). アミノ酸代謝のうち, Arg and pro metabolism と Lysine degradation 上で検出された代謝物の ILR とプールサイズの変化を図 15, 16 に示した. Arg and pro metabolism 上に存在する物質については, タンパク質アミノ酸の ILR が増加した 6 時間の間で, Citrullin, Ornithine の ILR の増加が見られ, N-acetyl-glu は 0 時間で ILR が 0.54 と高かったために ^{15}N が入ってきたのかは不明である (図 15). また, Lysine degradation 上に存在する物質は全て Lys から Acetyl-CoA までの分解経路上の物質であった (図 16). alpha-Aminoadipate と N-epsilon-Acetyllysine は ILR の増加がみられたが, Pipecolate は 0 時間で ILR が 0.74 と高かったために ^{15}N が入ってきたのかは不明である (図 16).

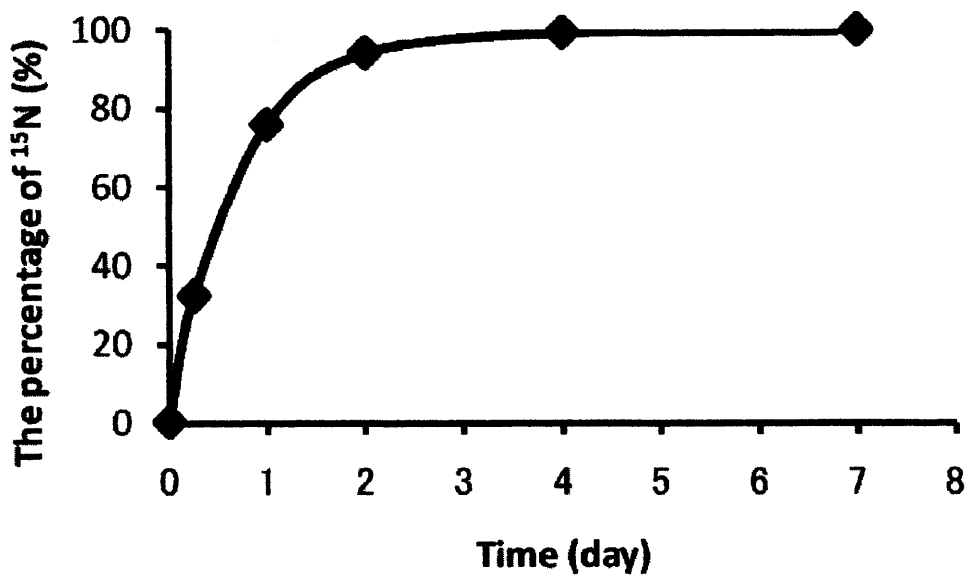


図 10 細胞が ¹⁵N に置換されるのに必要な培養時間の検討

横軸に時間(日), 縦軸に細胞全体における ¹⁵N の比率を示した. 通常の細胞を ¹⁵NO₃ 培地で培養して 0, 0.5, 1, 2, 4, 7 日後の ¹⁵N の比率を燃焼法により測定したところ, 細胞内の窒素が 99.9% ¹⁵N に置換されるためには 4 日以上培養が必要であることが分かった.

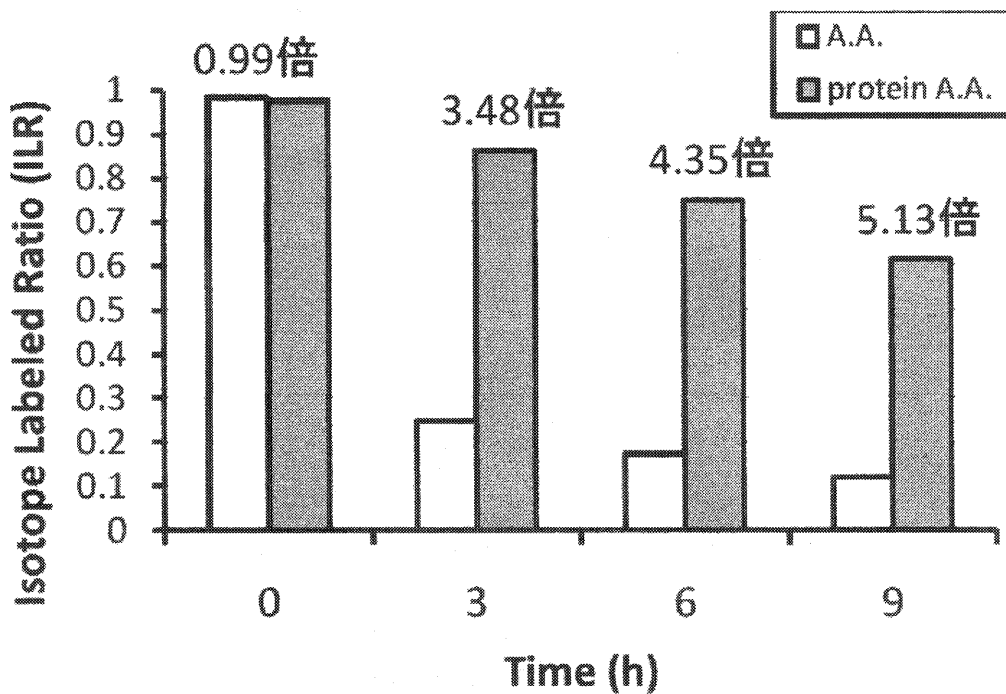


図 11 A.A.は ^{14}N , Protein は ^{15}N が主成分となるのに最適な培養時間の検討

横軸に時間 (h), 縦軸に標識率 (ILR) を示した. 白いバーは遊離アミノ酸 (A.A.), グレーのバーはタンパク質アミノ酸 (Protein A.A.) である. A.A.の 0, 3, 6, 9 時間における ILR は 0.98, 0.25, 0.17, 0.12 であり, Protein の 0, 3, 6, 9 時間における ILR は 0.99, 0.86, 0.75, 0.61 であった. また, バーの上を示した数値は A.A.に対する Protein の比であり 0.99, 3.48, 4.35, 5.13 倍であった. Protein の ILR が高く高く, A.A.と Protein の分離度が大きくなる時間を最適条件とし, ^{15}N の割合について A.A.が 2 割以下, Protein が 7 割以上に標識された 6 時間を培養時間とした.

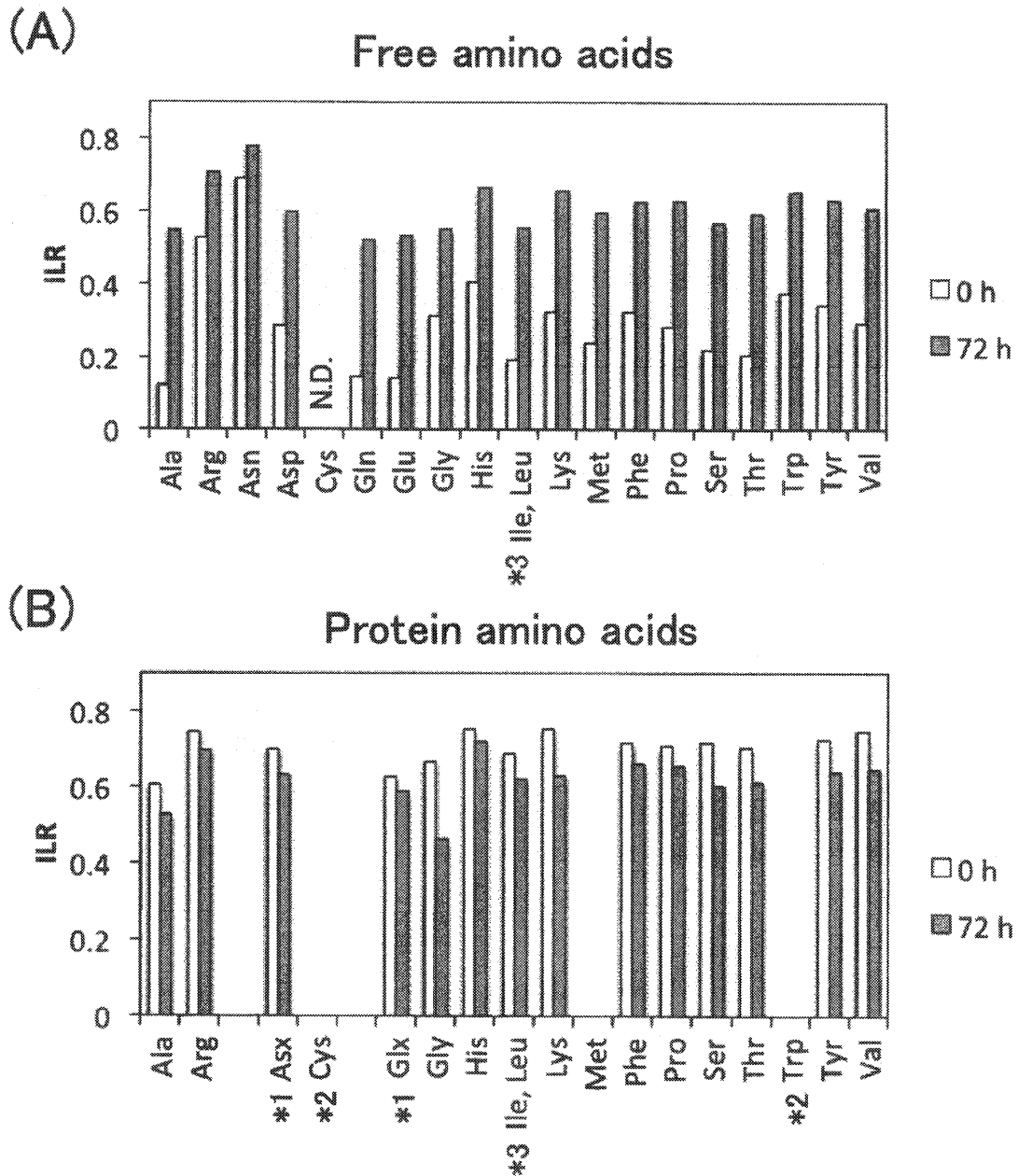


図 12 -N 72 時間後における遊離アミノ酸とタンパク質アミノ酸の ILR の変化

(A) 処理前 (0 h; 白) と -N 72 時間後 (72 h; グレー) における遊離アミノ酸 (Free amino acids) の ILR の変化. (B) 処理前 (0 h; 白) と -N 72 時間 (72 h; グレー) におけるタンパク質アミノ酸 (Protein amino acids) の ILR の変化.

N.D.: 検出されなかった.

*1: Gln と Asn は HCl により, Glu と Asp へそれぞれ加水分解された.

*2: Cys, Trp, Met は HCl により分解された.

*3: Ile と Leu はピークを分解することができなかった.

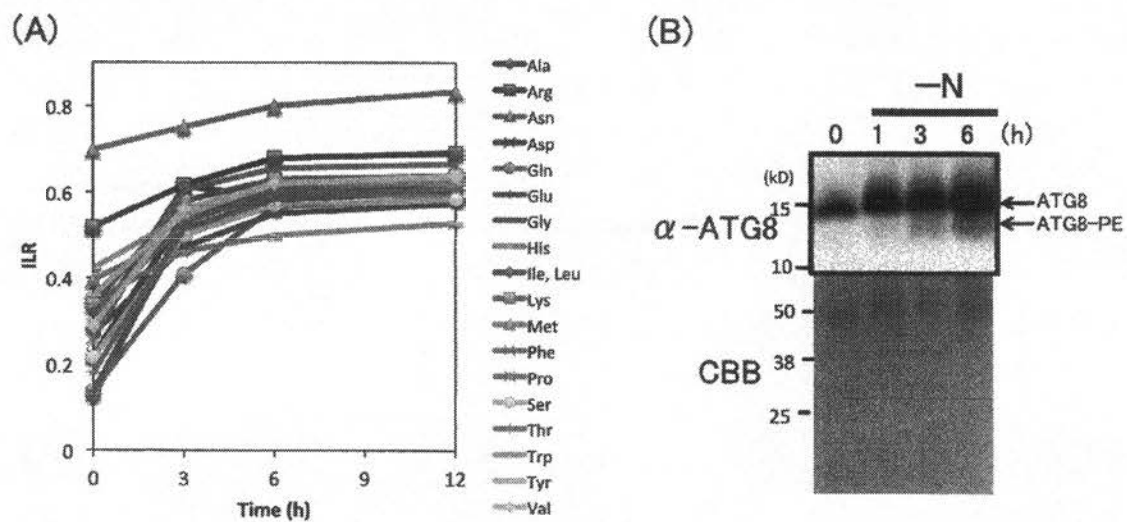


図 13 オートファジーによるタンパク質分解の検証

(A) -N 0, 3, 6 12 時間後における遊離アミノ酸の ILR の変化. 横軸に時間 (h), 縦軸に標識率 (ILR) を示した. Cys は検出されなかった. (B) -N 0, 1, 3, 6 時間後の細胞から TCA 沈殿によりタンパク質を抽出した. 30 μ g の総タンパク質を 12.5% SDS-PAGE で分離後, *A. thaliana* の ATG8a 抗体 (α -ATG8) を用いてウェスタンブロットを行った. ATG8 とフォスファチジルエタノールアミン (PE) で修飾された ATG8-PE のバンドを矢印で示した. 分子量マーカー (kD) の位置を左に示した. タンパク質量は CBB で可視化した.

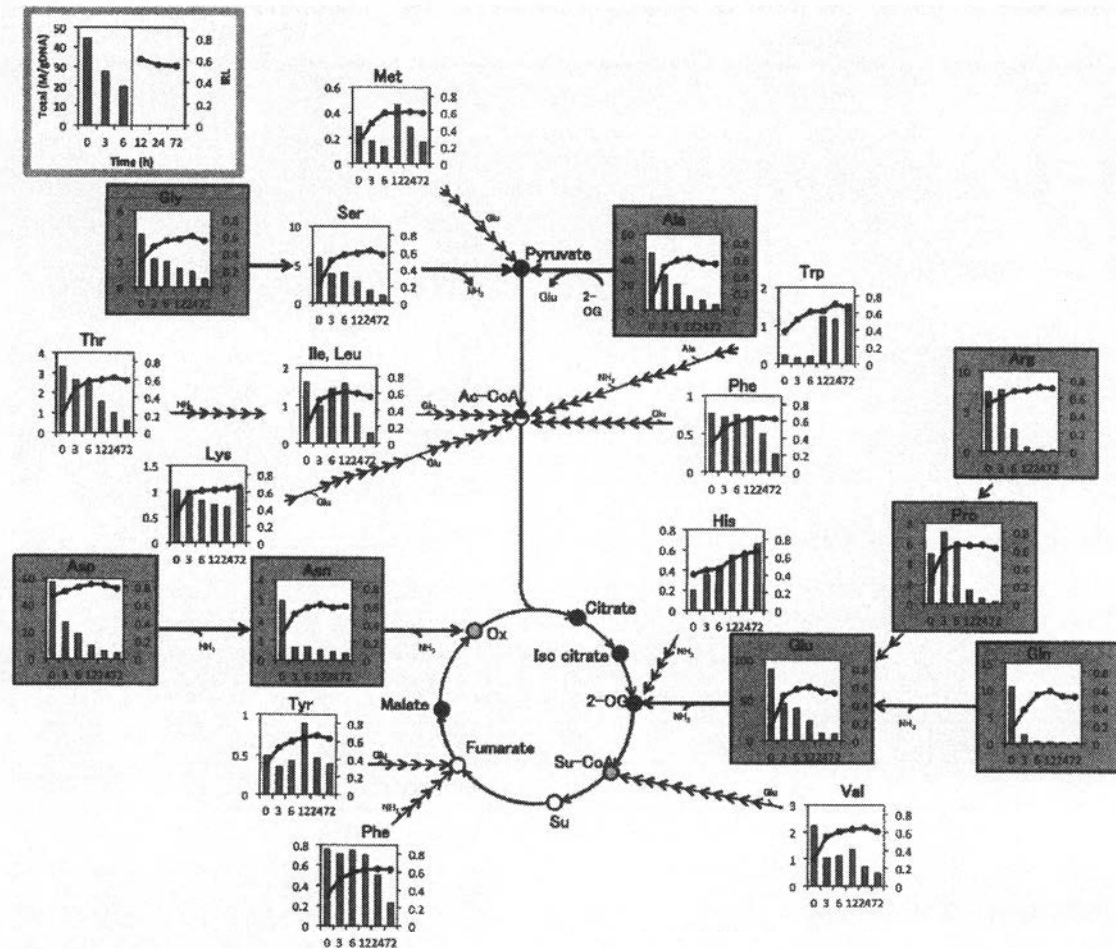


図 14 タンパク質を構成するアミノ酸の分解経路

-N 0, 3, 6 12 時間後におけるタンパク質を構成するアミノ酸の ILR の変化を折れ線グラフに、プールサイズの変化を棒グラフに示した。横軸に時間 (h)、縦軸左はプールサイズ変化、縦軸右は標識率 (ILR) である。灰色が背景のアミノ酸は 2 回の実験で共通して、-N 72 時間後に 0 時間に対して 6 倍以上に減少した、減少率の高いアミノ酸である。アミノ酸に応じてピルビン酸 (Pyruvate)、アセチル CoA (Ac-CoA)、クエン酸 (Citrate)、イソクエン酸 (Iso citrate)、 α -ケトグルタル酸 (2-OG)、スクシニル CoA (Su-CoA)、コハク酸 (Su)、フマル酸 (Fumarate)、リンゴ酸 (Malate)、オキサロ酢酸 (Ox) へと分解され、高等植物の分解経路を示した。また、これらの中心代謝物についてはプールサイズが *t*-test の $p < 0.05$ で有意に増加した物質を黒丸、有意に減少した物質を白丸、 $p > 0.05$ で有意な差がみられなかった物質を白と黒の丸、CE-TOFMS で測定できない物質を灰色の丸で示した。矢印の数は反応の数を示す。

表 3 高度に ¹⁵N 標識された窒素代謝物とその代謝経路

代謝経路	代謝物質
Purine metabolism	Adenine
	Adenosine
	ADP
	AMP
	ATP
	GMP
	Guanosine
Pyrimidine metabolism	IMP
	CDP
	CMP
Arg and pro metabolism	Cytidine
	Citrulline
	GABA
	N-Acetyl-glutamate
Glutathione metabolism	Ornithine
	5-Oxoproline
	gamma-Glu-cys
	Glutathione (oxidized form)
Lys degradation	Glutathione (reduced form)
	alpha-Aminoadipate
	N-epsilon-Acetyl-lysine
Cys and met metabolism	Pipecolate
	O-Acetylserine
Gly, ser and thr metabolism	S-Adenosylhomocysteine
	Betaine
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	N-Acetylglucosamine 6-phosphate
Taurine and hypotaurine metabolism	Hypotaurine
Vitamin B6 metabolism	Pyridoxal

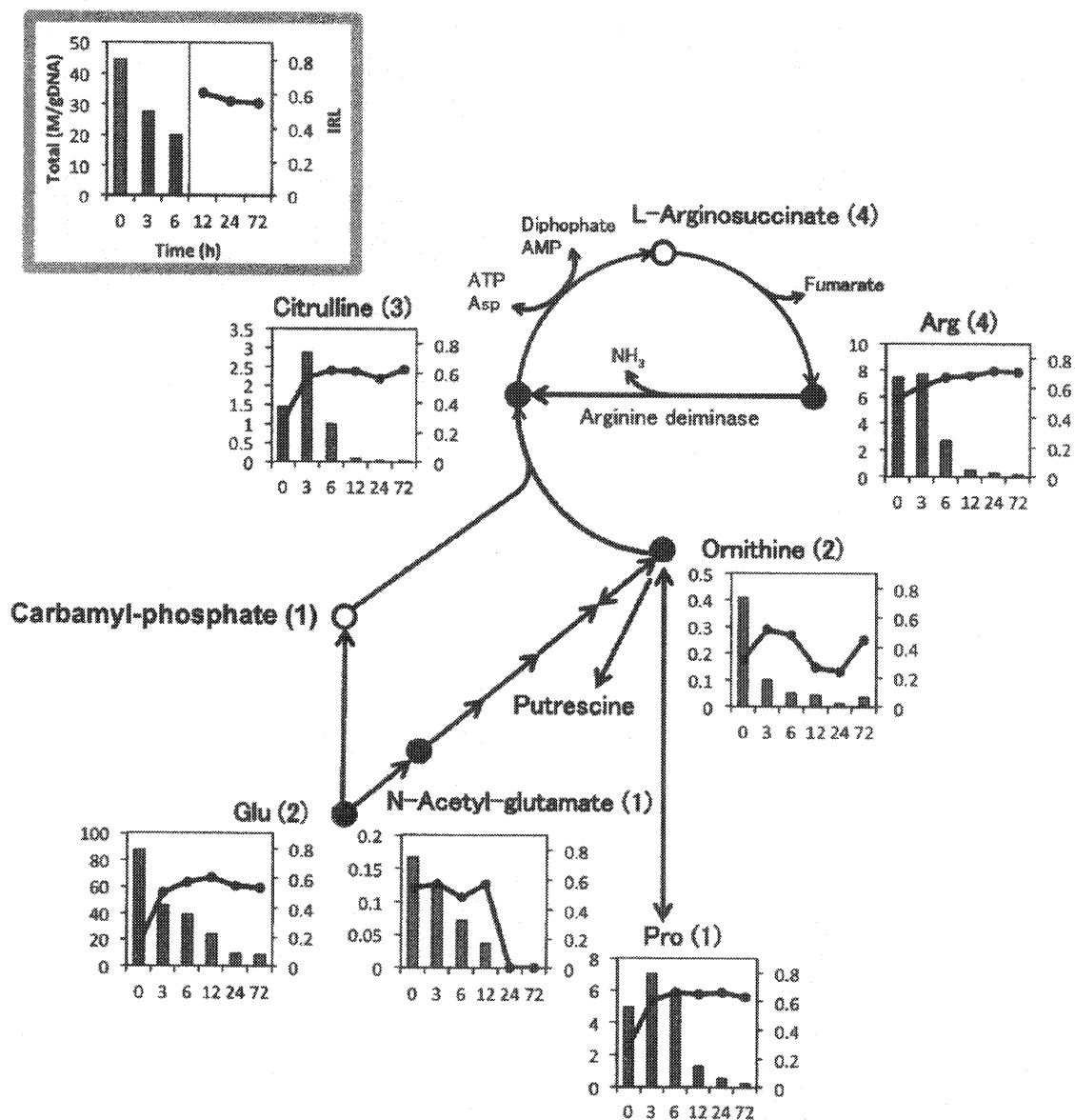


図 15 Arg pro 代謝経路上で ¹⁵N が検出された窒素代謝物

黒丸は ¹⁵N が検出された窒素代謝物を表し、窒素原子の個数を括弧内に示した。-N 0, 3, 6, 12 時間後におけるタンパク質を構成するアミノ酸の ILR の変化を折れ線グラフに、プールサイズの変化を棒グラフに示した。横軸に時間 (h), 縦軸左はプールサイズ変化, 縦軸右は標識率 (ILR) である。矢印の数は *C. reinhardtii* で推測されている代謝反応の数を示した。

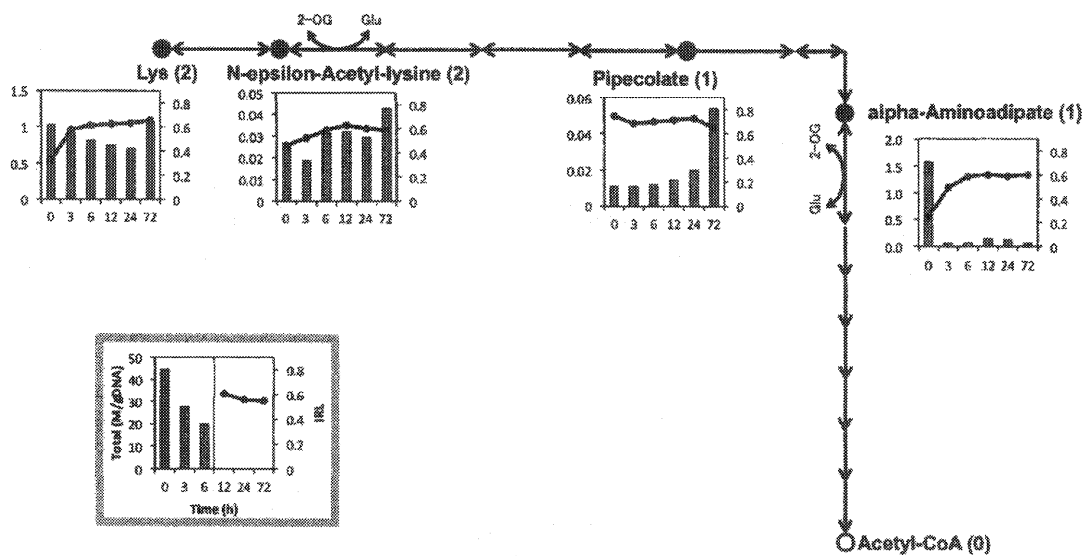


図 16 Lys 分解経路上で ¹⁵N が検出された窒素代謝物

黒丸は ¹⁵N が検出された窒素代謝物を表し、窒素原子の個数を括弧内に示した。-N 0, 3, 6 12 時間後に
けるタンパク質を構成するアミノ酸の ILR の変化を折れ線グラフに、プールサイズの変化を棒グラフに示
した。横軸に時間 (h), 縦軸左はプールサイズ変化, 縦軸右は標識率 (ILR) である。矢印の数は *C. reinhardtii*
で推測されている代謝反応の数を示した。

3.4 考察

タンパク質分解をモニターするために、唯一の硝酸源である $^{15}\text{NO}_3$ を用いてアミノ酸は ^{14}N 、タンパク質は ^{15}N となる様に標識したのち、-N 下で経時的に ILR を調査したところ、遊離アミノ酸の ILR が増加しタンパク質分解がおこっていることが明らかとなった(図 12). 放射性同位体 Val を用いた長寿命タンパク質分解アッセイ法によりタンパク質分解を検証した酵母の-N 下の研究では、処理前のタンパク質内の放射線量は $150\text{-}200\ \mu\text{g}$ であり、-N 6 時間後の細胞質内の放射活性は $10\ \mu\text{g}$ であった (Onodera and Ohsumi, 2005; Supplemental Table SI). そのため Gronostajski and Pardee (1984) の計算方法に従ったタンパク質分解率 (処理前のタンパク質内の放射性活性に対する-N 6 時間後の細胞質内の放射性活性) で計算すると 6 時間で $5.0\text{-}6.7\%$ であり、これまでのオートファジーに関する異なる手法から導いた分解率とほぼ同じであるため、主な長寿命タンパク質分解はオートファジーによるものであると議論している. 同様にマウスの肝細胞でも絶食時に長寿命タンパク質分解アッセイを用いており、4 時間で 15.2% であった (Ueno *et al.*, 2008). 本研究では ^{15}N 標識された 0 時間のタンパク質濃度は $64.4\ \text{M/g DNA}$ であり、遊離アミノ酸の濃度は-N 6 時間後に $3.52\ \text{M/g DNA}$ だったため、タンパク質分解率 (0 時間のタンパク質内の ^{15}N 濃度に対する-N 6 時間後の細胞質内の ^{15}N 濃度) は 5.4% と計算された. 繰り返し実験においても 6 時間のタンパク質分解率は 5.2% であった. 酵母の-N 時の分解率と近い結果が得られたことから、真核単細胞生物の-N 下におけるタンパク質分解率は約 5% であることが示唆された. マウスの絶食時の分解率はより高く、多細胞生物は単細胞生物よりも飢餓時におけるタンパク質分解率が高いか、栄養飢餓の種類によって異なることが考えられた. また、"*P. ellipsoidea*" の-N 下においてオートファジーが誘導されたことから (図 13), 長寿命タンパク質分解はユビキチン・プロテアソームによる分解も関わっていると思われるが、分解率から主にオートファジーによるものであると考えられた.

アミノ酸プールは His と Trp 以外は減少したことから、タンパク質分解により供給された以上の量を利用していると考えられる. 本研究の長寿命タンパク質分解アッセイ法では分解された全てのアミノ酸が ^{15}N 標識されており、分解されたアミノ酸の代謝を追跡することができる. 実際に高濃度に ^{15}N 標識された窒素代謝物質はタンパク質アミノ酸以外に 28 物質検出され、分解物は他の窒素代謝物へと供給していることが明らかとなった.

Purin metabolism 上と Pyrimidine metabolism 上で ^{15}N が供給された物質には、AMP, CMP, GMP, IMP などのヌクレオチドと、Adenosine, Guanosine, Cytidine といったヌクレオチドが検出された. オートファジーによって RNA が分解されるとの報告がある (Balavoine *et al.* 1990; Lardeux *et al.* 1987). 今回の実験では RNA の標識率を測定していないが、RNA も ^{15}N 標識されている可能性があり、ヌクレオチドの ILR の増加は RNA からの分解物が供給されたためであることが考えられた. 一方で、核酸新規合成経路でしか生産されない IMP が検出された. 核酸に含まれる窒素を供給しているのは、プリン環の

新規合成で付加される Asp, Gln, Gly と、ピリミジン環の新規合成で付加される Asp, Gln であり、核酸代謝の ILR が増加した理由には、RNA の分解以外にアミノ酸からの核酸代謝への新規合成も考えられた。また DNA のオートファジーによる分解の報告はないが、Adenosine, Guanosine, Cytidine や Adenine の ILR が増加したことや、第 2 章ではオートファジー誘導時にも Guanosine, Cytidine が増加したことから (表 1), オートファジーによる DNA の分解が示唆された。ADP, ATP, CDP はヌクレオチドからの代謝であると考えられる。

また、Arg and pro metabolism 上の尿素サイクル周辺でいくつかの物質に ^{15}N が供給されていた。Arg は窒素原子を 4 つもっており、標準アミノ酸のうちで最も窒素含有量が高い。高等植物で知られている Arg 分解経路は 3 つある。Arginase による Ornithine と Urea への分解、Agmatinase による Putrescine と Urea への分解、Arginine deiminase による Citrulline と NH_3 への分解である。“*P. ellipsoidea*” と同じ緑藻類のモデル生物 *C. reinhardtii* では、高等植物や珪藻とは異なり Arginase が機能していないという報告 (Armbrust *et al.*, 2004) や、Agmatinase はコードされていない報告がある。唯一 *C. reinhardtii* における Arg の分解経路に、Arginine deiminase が報告されており (Sussenbach and Strijkert, 1969), これは Arg が Citrulline と NH_3 へ分解し、窒素を NH_4^+ として細胞外へと排出する反応である。実際に Arg のプールサイズが減少し、Citrulline の ILR が増加したことから (図 15), Arginine deiminase による Arg の分解が考えられた。Citrulline の生産はその他に、Ornithin と Carbamyl-phosphate が合成する経路も存在するが、-N 3, 6, 12, 24, 72 時間後における Citrulline の ILR は Ornithine よりも高かった。ILR が低い物質から高い物質へ合成されることは考えられないため、Ornithin と Carbamyl-phosphate による Citrulline の合成は活発ではないと考えられる。これらのことから、Arg は Citrulline と NH_3 へ分解され、-N 下では窒素を NH_4^+ として細胞外へと排出する反応を行っていることが推測された。その他に検出された N-Acetyl-glu は 0 時間の ILR が高かったために、Glu から合成されたかは不明であるが、プールサイズが減少したことから Ornithine へと代謝した可能性が高い。Ornithine についても ILR が 6 時間までは増加したことから、N-Acetyl-glu から代謝された可能性が高い。またプールサイズが減少したことから、Citrulline へと代謝したことも考えられるが、Ornithine は Putrescine, N-Acetyl-ornithine, Pro にも代謝経路が繋がっており (図 15), それらへ少量ずつ分散して代謝していることが考えられた。Lys degradation 上で ^{15}N が供給された物質については、Lys から Acetyl-CoA への分解経路上の物質であり (図 16), Lys の Acetyl-CoA への異化反応が促進していると考えられた。

このように、Arg と Lys についてはアミノ酸の分解反応が促進していることが分かった。今回の実験で分解が推測されたのは Arg と Lys のみだったが、Arg と Lys 同様、他のアミノ酸についても -N 72 時間後でプールサイズが減少することから、他に利用されているもしくは分解されている可能性が高い。中でも減少率が高かった、Gly, Ala, Asp, Asn, Arg, Pro,

Glu, Gln は、アミノ酸を積極的に分解していることが予想された。これらのアミノ酸は 4 反応以内で炭素骨格へと分解されるアミノ酸であり (図 14), 炭素骨格へ供給しやすく、窒素を取り出しやすい性質があるといえる。逆に、炭素骨格までの反応数が多かったアミノ酸の多くは、減少率も少なく積極的に分解しないことが考えられた。さらに、Gly, Ala の分解産物である Pyruvate や Arg, Pro, Glu, Gln の分解産物である 2-OG についてはプールサイズの増加が見られ、アミノ酸から供給されたために増加したと考えられる。これらの結果から -N 下においては、アミノ酸は分解反応を促進させていることが示唆された。これまでの研究では、-N 下の酵母において、タンパク質から分解されたアミノ酸の大部分がタンパク質合成へ再利用されると推測している (Onodera and Ohsumi, 2005)。本研究ではタンパク質合成の再利用は確認していないが、オートファジーによって供給されたアミノ酸はタンパク質合成に利用されるだけでなく、分解して窒素源を排出していることが推測された。-N 下ではタンパク質量が約 2/5 へと減少し、His と Trp 以外のアミノ酸は 4/5~1/100 へと減少したことからも (Ito *et al.*, 2012), 細胞内の窒素源は大幅に減少しており、アミノ酸が分解されていると考えるのは妥当である。窒素栄養が枯渇する中で、タンパク質をアミノ酸へ分解し、アミノ酸も分解することで、アミノ酸プールを減らしてタンパク質合成が活発におこらない様に調整しているのかもしれない。また必要な炭素は光合成による炭素同化から得るのではなく、窒素源同様に細胞内の炭素源を再利用しているのかもしれない。今後アミノ酸を構成する炭素骨格と窒素の利用先についてタンパク質合成以外の代謝の観点でより詳しく調べる必要がある。

本章では、 $^{15}\text{NO}_3$ を用いて、タンパク質が ^{15}N 、遊離アミノ酸が ^{14}N となるように標識し、-N 後の標識率の変化を測定することで、タンパク質由来とみなされる高度に ^{15}N 標識された遊離アミノ酸が検出され、"*P. ellipsoidea*" の -N 下においてオートファジーによるタンパク質分解が起こる事を検証した。タンパク質由来のアミノ酸から代謝されたと考えられる高度に ^{15}N 標識された代謝物が 28 物質検出された。その中には、Arg や Lys の分解経路上の物質が検出され、窒素がない状態において一部のアミノ酸は分解されていることが分かった。またタンパク質分解によるアミノ酸供給があるにも関わらず遊離アミノ酸とタンパク質の量が顕著に減少したことからも、他のアミノ酸も積極的に分解していると考えられる。これまでは他の真核生物において、オートファジーにより分解されたアミノ酸はタンパク質合成に再利用されていると言われてきたが、本研究により、その他にアミノ酸を積極的に分解していることが示唆された。これにより生産された炭素骨格は TAG の炭素源となっている可能性がある。

第 4 章 総括

オートファジーは細胞質にあるオルガネラやタンパク質をバルク分解する機構であるが、タンパク質以外の分解物は未解明である。さらに、タンパク質から供給されたアミノ酸を含め分解物の利用先も不明である。本研究では、オイル生産微細藻においてオイル生産微細藻においてオートファジーと TAG 蓄積が同調的に起こることを明らかにした。また、タンパク質由来のアミノ酸はアンモニアとして窒素源を排出するかアミノ基転移をすることで、炭素骨格へ分解していることを示唆するデータを得た。本研究の第 3 章で述べた手法は、タンパク質分解を証明する際に一般的に用いられるプロテアーゼ活性測定法やオートファジー検出方法とは異なり、タンパク質分解の検証だけでなく、分解物から生産された代謝物も検出することに成功した。本研究により、オートファジーの生理的役割を解明するための基礎を築いたと考える。今後は、本手法を用いることで分解物のリサイクルとその意義の解明が進むと期待している。

謝辞

学部1年の秋から修士2年まで5年半、富田研究会の多くの方々にお世話になり、お陰様で本稿を執筆することが出来ました。特にアドバイザーの慶應義塾大学先端生命科学研究所の伊藤卓朗博士には研究の方向性から実験まで昼夜問わず御指導と御助言をいただきました。仲田崇志博士は、藻類だけでなく、生物学の様々な分野における知識を語って下さり、研究することの厳しさと面白さについて考えさせられました。また、多くの実りある議論を下さった中東憲治博士、CE-TOFMSの測定を下さった技術員の斎藤佳苗氏、鈴木麻子氏、畑山陽子氏、LC-TOFMSの測定と指導を下さった藤倉純子氏、ウェスタンブロットの実験指導を下さった北川光洋博士、曾我朝子氏、東京工業大学の中戸川仁博士、"*P. ellipsoidea*"の株を提供して下さったデンソー基礎研究所の阿野嘉孝氏と蔵野憲秀氏、*A. thaliana*のタンパク質を提供して下さった海老敬行氏、タンパク質定量や同位体実験を御指導して下さった今見考志博士と戸谷吉博博士、研究について事細かに情報交換を行い日々の研究を共にした新川はるか氏は、本研究の成果には必要不可欠であり、多忙な中でも親身になってお力添えいただいた事に感謝致します。本研究は山形県及び鶴岡市から多方面にわたる援助を受けました。また、2011年度と2012年度には森基金からも援助を受けました。関係各位に、厚く御礼申し上げます。最後に、このような研究活動を行える環境と機会を設けて下さった富田勝教授には、懇切なる御指導、御鞭撻を賜り、この場をお借りして深く感謝申し上げます。

参考文献

- Armbrust, E.V. *et al.* (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science*, **306**, 79-86.
- Balavoine, S. *et al.* (1990) Rates of RNA degradation in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.*, **189**, 617-623.
- Barnes, D. *et al.* (2005) Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes. *Mol. Genet. Genomics.*, **274**, 625-636.
- Bölling, C. and Fiehn, O. (2005) Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation. *Plant Physiol.*, **139**, 1995-2005.
- Chakrabarti, P. *et al.* (2010) Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes*, **59**, 775-781.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, **25**, 294-306.
- Chung, T. *et al.* (2009) The ATG autophagic conjugation system in maize: ATG transcripts and abundance of the ATG8-lipid adduct are regulated by development and nutrient availability. *Plant Physiol.*, **149**, 220-234.
- Crespo, J. *et al.* (2005) Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, **139**, 1736-1749.
- de-Bashan, L.E. *et al.* (2002) Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.*, **48**, 514-521.
- Diaz-Troya, S. *et al.* (2008) The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy*, **4**, 851-865.
- Donkor, J. *et al.* (2007) Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J. Biol. Chem.*, **282**, 3450-3457.
- Drose, S. *et al.* (1993) Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases. *Biochemistry*, **32**, 3902-3906.
- Ezaki, J. *et al.* (2011) Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy*, **7**, 727-736.
- Gorman, D.S. and Lecine, R.P. (1965) Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 1665-1669.
- Greenspan, P. *et al.* (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.*, **100**, 965-973.

- Guertin,D.A. and Sabatini,D.M. (2009) The pharmacology of mTOR inhibition, *Sci. Signal.*, **2**, pe24
- Guschina,I.A. and Harwood,J.L. (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.*, **45**, 160-186.
- Hama, T. *et al.* (1987) Determination of amino acid production rate of a marine phytoplankton population with ¹³C and gas chromatography-mass spectrometry. *Limnol. Oceanogr.*, **32**, 1144-1153.
- Han,G.S. *et al.* (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* lipin homolog is a Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J. Biol. Chem.*, **281**, 9210-9218.
- Hasunuma,T. *et al.* (2010) Metabolic turnover analysis by a combination of in vivo ¹³C-labelling from ¹³CO₂ and metabolic profiling with CE-MS/MS reveals rate-limiting steps of the C₃ photosynthetic pathway in *Nicotiana tabacum* leaves. *J. Exp. Bot.*, **61**, 1041-1051.
- Helliwell,S.B. *et al.* (1994) TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol. Biol. Cell*, **5**, 105-118.
- Hirayama,A. *et al.* (2009) Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res.*, **69**, 4918-4925.
- Hu,H. and Gao,K. (2006) Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO₂ concentration. *Biotechnol. Lett.*, **28**, 987-992.
- Hu,Q. *et al.* (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.*, **54**, 621-639.
- Ichimura,Y. *et al.* (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, **408**, 488-492.
- Illman,A.M. *et al.* (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb. Technol.*, **27**, 631-635.
- Ito,T. *et al.* (2012) Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxiophycean alga in nitrogen-deficient conditions. *Metabolomics*, 10.1007/s11306-012-0463-z
- Kabeya,Y., *et al.*, (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.*, **19**, 5720-5728.
- Kabeya,Y. *et al.* (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.*, **117**, 2805-2812.
- Kanehisa,M. *et al.* (2008) KEGG for linking genomes to life and the environment.

- Nucleic Acids Res.*, **36**, 480-484.
- Kirisako, T. *et al.* (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.*, **151**, 263–276.
- Klionsky, D.J. *et al.* (2007) Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy*, **3**, 181-206.
- Klyachko-Gurvich, G.L. (1974) Changes in the content and composition of triacylglyceride fatty acids during restoration of *Chlorella pyrenoidosa* cells after nitrogen starvation. *Soviet Plant Physiol.*, **21**, 611-618.
- Kuma, A. *et al.* (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, **432**, 1032-1036.
- Kuma, A. and Mizushima, N. (2010) Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: With an emphasis on nutrient metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **21**, 683–690.
- Laemmli, U.K. (1970) Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laplante, M. and Sabatini, D.M. (2009) An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr. Biol.*, **19**, 1046-1052.
- Lardeux, B.R. *et al.* (1987) RNA degradation in perfused rat liver as determined from the release of [¹⁴C]cytidine. *J. Biol. Chem.*, **262**, 14507-14513.
- Lebsky, V.K. *et al.* (2001) Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.*, **47**, 1-8.
- Li, X. *et al.* (2012) A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*, **24**, 4670-4686.
- Liu, Z.Y. *et al.* (2008) Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.*, **99**, 4717-4722.
- Lynn, S.G. *et al.* (2000) Effect of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry in freshwater diatom *Stephanodiscus minutulus* acillariophyceae. *J. Phycol.*, **36**, 510-522.
- Masanne, J. *et al.* (2012) Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochemistry*, **75**, 50–59.
- Melillo, J.M. *et al.* (2009) Indirect emissions from biofuels: how important? *Science*, **326**,

- 1397-1399.
- Merchant, S.S. *et al.* (2011) TAG, you're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **23**, 352-363.
- Miller, R. *et al.* (2010) Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. *Plant Physiol.*, **154**, 1737-1752.
- Mizushima, N. (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev.*, **21**, 2861-2873.
- Mizushima, N. (2004) Methods for monitoring autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 2491-2502.
- Noda, T. and Ohsumi, Y. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.*, **273**, 3963-3966.
- Oldham, S., *et al.* (2000) Genetic and biochemical characterization of *dTOR*, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev.*, **14**, 2689-2694.
- Ono, Y. *et al.* (2012) Evidence for contribution of autophagy to Rubisco degradation during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell & Environment*, 10.1111/pce.12049
- Onodera, J. and Ohsumi, Y. (2005) Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 31582-31586.
- Opute, F.I. (1974) Lipid and Fatty-acid Composition of Diatoms. *J. Exp. Bot.*, **25**, 823-35.
- Pérez-Pérez, M.E. *et al.* (2010) Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiol.*, **152**, 1874-1888.
- Reitan, *et al.* (1994) Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.*, **30**, 972-979.
- Rao, A.R. *et al.* (2007) Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresour. Technol.*, **98**, 560-564.
- Ratledge, C. and Cohen, Z. (2008) Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technol.*, **20**, 155-160.
- Satoh, A. *et al.* (2010) Characterization of the lipid accumulation in a new microalgal species, *Pseudochorocystis ellipsoidea* (Trebouxiophyceae). *J. Jpn. Inst. Energy*, **89**, 909-913.
- Schenk, P.M. *et al.* (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.*, **1**, 20-43.
- Scott, S.V. *et al.* (1996) Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**,

12304-12308.

- Shacka, J.J. *et al.* (2006) Bafilomycin A1 inhibits chloroquine-induced death of cerebellar granule neurons. *Mol. Pharmacol.*, **69**, 1125–1136.
- Shifrin, N.S. and Chisholm, S.W. (1981) Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J. Phycol.*, **17**, 374-384.
- Singh, R. *et al.* (2009) Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, **458**, 1131-1135.
- Soga, T. *et al.* (2003) Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Proteome Res.*, **2**, 488-494.
- Soga, T. *et al.* (2009) Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **81**, 6165-6174.
- Sou, Y.S. *et al.* (2008) The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 4762–4775.
- Suen, Y. *et al.* (1987) Total lipid production of the green alga *nannochloopsis* sp. under different nitrogen regimes. *J. Phycol.*, **23**, 289-297.
- Sugimoto, M. *et al.* (2010) Correlation between sensory evaluation scores of Japanese sake and metabolome profiles. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 374-383.
- Sussenbach, J.S. and Strijkert, P.J. (1969) Arginine metabolism in *chlamydomonas reinhardi* Arginine deiminase: The first enzyme of the catabolic pathway. *FEBS Lett.*, **3**, 166-168.
- Suzuki, T. *et al.* (2002) The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy. *J. Biochem.*, **131**, 647-651.
- Thoreen, C.C. and Sabatini, D.M. (2009) Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely. *Autophagy*, **5**, 725-726.
- Tonon, T. *et al.* (2002) Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*, **61**, 15-24.
- Ueno, T. *et al.* (2008) Loss of Pten, a tumor suppressor, causes the strong inhibition of autophagy without affecting LC3 lipidation. *Autophagy*, **4**, 692-700.
- Wada, S. *et al.* (2009) Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol.*, **149**, 885-893.
- Wang, X. and Proud, C.G. (2009) Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator. *Trends Cell Biol.*, **19**, 260–267.
- Wang, Z.T. *et al.* (2009) Algal lipid bodies: Stress induction, purification, and Biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell*, **8**, 1856-1868.
- Weers, M.M. *et al.* (1997) Growth and reproduction of *Daphnia galeata* in response to

changes in fatty acids, phosphorus, and nitrogen in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Limnol. Oceanogr.*, **72**, 1584-1589.

Wullschleger, S. *et al.* (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, **124**, 471-484.

Zhang, H. *et al.* (2000) Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin *dTOR*. *Genes Dev.*, **14**, 2712-2724.

付録

```

Cr ATG8 -----MVGSRPPTFKQEHSLDKRKAEEARIKEKYPDRIPVIVEKAERSDIPDI 48
At ATG8a MIFACLKFAETNRIAMAKSSPKISNPLEARMSESSRIREKYPDRIPVIVEKAGQSDVPDI 60
          !. .!* .!.*! * !*!***;*****;*****;***;***

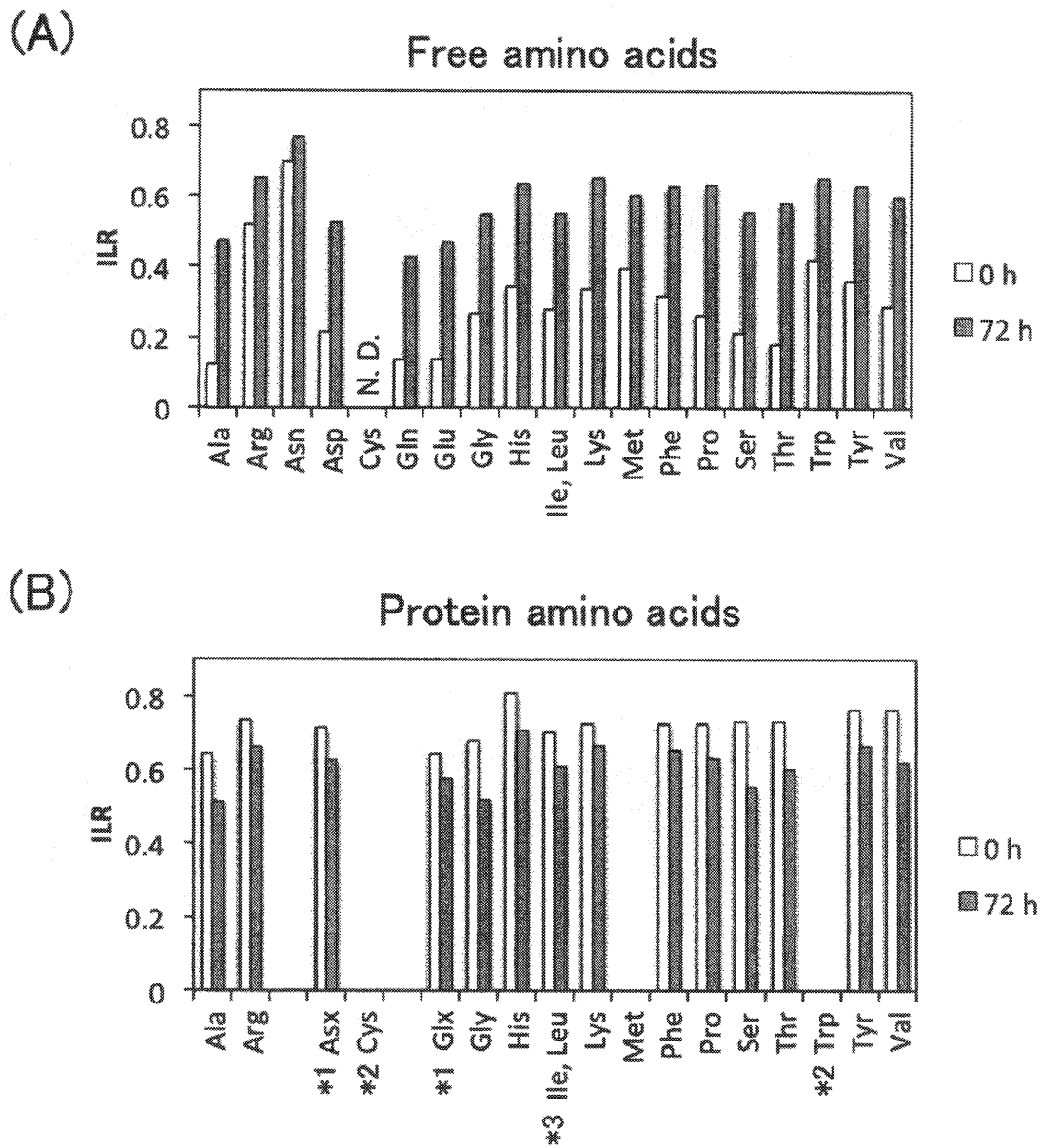
Cr ATG8 DKKKYLVPSDLTVGQFVYVIRKRIKLSPEKAIPIFVKVLPPTAALMSSSIYEDHKDEGDF 108
At ATG8a DKKKYLVPADLTVGQFVYVVRKRIKLGAEKAIPIFVKVNTLPPTAALMSAIYEEHKDEGDF 120
          *****;*****;*****..*****;*****.*****;***;*****

Cr ATG8 LYITYSGENTFGAGEQLQLFVEELAL 134
At ATG8a LYMTYSGENTFGS-----LTVA----- 137
          ***;*****; *.*
          ↑

```

付図 1 *C. reinhardtii* と *A. thaliana* におけるアミノ酸配列の相同性

Chlamydomonas reinhardtii の ATG8 (Cr ATG8) と, *Arabidopsis thaliana* の ATG8a (At ATG8a) のアミノ酸配列を ClustalW2 によりアライメントを行った。ATG8 は、システインプロテアーゼである ATG4 によって C 末端の Gly 残基 (矢印) の直後を切断され, その後 PE が結合して ATG8-PE となる。



付図 2 -N 72 時間後における遊離アミノ酸とタンパク質アミノ酸の ILR の変化

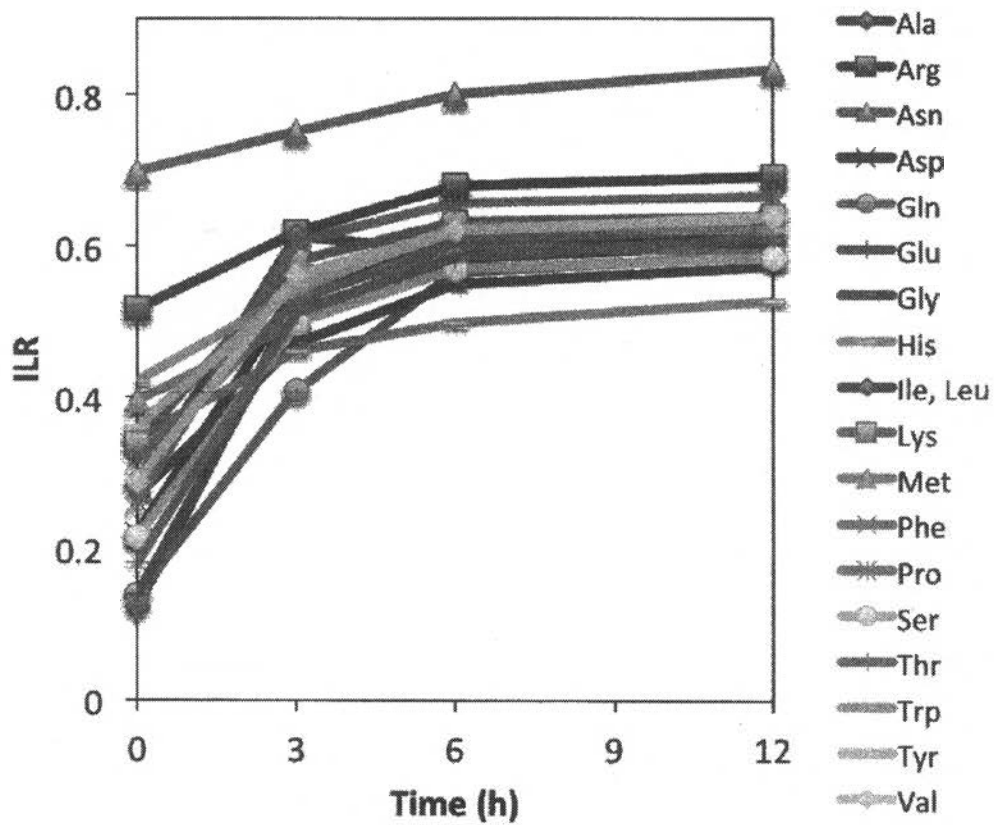
(A) 処理前 (0 h; 白) と-N 72 時間後 (72 h; グレー) における遊離アミノ酸 (Free amino acids) の ILR の変化. (B) 処理前 (0 h; 白) と-N 72 時間後 (72 h; グレー) におけるタンパク質アミノ酸 (Protein amino acids) の ILR の変化.

N.D.: 検出されなかった.

*1: Gln と Asn は HCl により, Glu と Asp へそれぞれ加水分解された.

*2: Cys, Trp, Met は HCl により分解された.

*3: Ile と Leu はピークを分解することができなかった.



付図3 遊離アミノ酸のILRの変化

-N 0, 3, 6 12 時間後における遊離アミノ酸のILRの変化。横軸に時間 (h), 縦軸に標識率 (ILR) を示した。Cysは検出されなかった。

付表 1 A5 培地の組成

NaNO ₃	150	mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10	mg
KH ₂ PO ₄	3.5	mg
K ₂ HPO ₄	4.5	mg
Fe-EDTA	1.2	mg
CaCl ₂	0.68	mg
H ₃ BO ₃	0.007	mg
MnSO ₄ · 5 H ₂ O	0.013	mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.03	mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.03	mg
Na ₂ MO ₄ · 2H ₂ O	0.0035	mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.013	mg
Milli-Q up to	100	mL

付表 2 各アイソトポマーの同定に用いた物質リスト

m/z : 質量電荷比、*mt* : 泳動時間

物質名	<i>m/z</i>	<i>mt</i>
5-Aminolevulinate	132.0655	10.33
5-Aminolevulinate+1	133.0626	10.33
5-Oxoproline	130.0499	24.35
5-Oxoproline+1	131.0469	24.35
Adenine	136.0618	9.89
Adenine+1	137.0588	9.89
Adenine+2	138.0558	9.89
Adenine+3	139.0529	9.89
Adenine+4	140.0499	9.89
Adenine+5	141.0469	9.89
Adenosine	268.1040	12.37
Adenosine+1	269.1011	12.37
Adenosine+2	270.0981	12.37
Adenosine+3	271.0951	12.37
Adenosine+4	272.0922	12.37
Adenosine+5	273.0892	12.37
ADP	426.0225	14.11
ADP+1	427.0192	14.11
ADP+2	428.0162	14.11
ADP+3	429.0133	14.11
ADP+4	430.0103	14.11
ADP+5	431.0073	14.11
Ala	90.0550	11.49
Ala+1	91.0520	11.49
alpha-Aminoadipate	162.0761	13.53
alpha-Aminoadipate+1	163.0731	13.53
AMP	346.0562	15.88
AMP+1	347.0528	15.88
AMP+2	348.0499	15.88
AMP+3	349.0469	15.88
AMP+4	350.0440	15.88
AMP+5	351.0410	15.88
Arg	175.1190	9.33
Arg+1	176.1160	9.33
Arg+2	177.1130	9.33
Arg+3	178.1101	9.33
Arg+4	179.1071	9.33
Asn	133.0608	13.03
Asn+1	134.0578	13.03
Asn+2	135.0548	13.03
Asp	134.0448	14.11
Asp+1	135.0418	14.11

物質名	m/z	mt
ATP	505.9886	13.49
ATP+1	506.9855	13.49
ATP+2	507.9825	13.49
ATP+3	508.9796	13.49
ATP+4	509.9766	13.49
ATP+5	510.9737	13.49
beta-Ala	90.0550	9.57
beta-Ala+1	91.0520	9.57
Betaine	118.0863	13.85
Betaine+1	119.0833	13.85
CDP	402.0108	13.65
CDP+1	403.0079	13.65
CDP+2	404.0050	13.65
CDP+3	405.0020	13.65
Citrulline	176.1030	13.62
Citrulline+1	177.1000	13.62
Citrulline+2	178.0970	13.62
Citrulline+3	179.0941	13.62
CMP	322.0453	15.39
CMP+1	323.0416	15.39
CMP+2	324.0386	15.39
CMP+3	325.0357	15.39
Cys	122.0270	13.87
Cys+1	123.0240	13.87
Cytidine	244.0928	12.16
Cytidine+1	245.0898	12.16
Cytidine+2	246.0869	12.16
Cytidine+3	247.0839	12.16
GABA	104.0706	9.98
GABA+1	105.0676	9.98
gamma-Glu-cys	251.0696	15.34
gamma-Glu-cys+1	252.0667	15.34
gamma-Glu-cys+2	253.0637	15.34
GDP	442.0172	14.32
GDP+1	443.0141	14.32
GDP+2	444.0111	14.32
GDP+3	445.0082	14.32
GDP+4	446.0052	14.32
GDP+5	447.0022	14.32
Gln	147.0764	13.30
Gln+1	148.0735	13.30
Gln+2	149.0705	13.30
Glu	148.0604	13.50
Glu+1	149.0575	13.50
Glutathione(oxidized form)	307.0833	14.74

物質名	m/z	mt
Glutathione(oxidized form)+1	308.0803	14.74
Glutathione(oxidized form)+2	309.0774	14.74
Glutathione(oxidized form)+3	310.0744	14.74
Glutathione(oxidized form)+4	311.0714	14.74
Glutathione(oxidized form)+5	312.0685	14.74
Glutathione(oxidized form)+6	313.0655	14.74
Glutathione(reduced form)	308.0911	15.74
Glutathione(reduced form)+1	309.0881	15.74
Glutathione(reduced form)+2	310.0852	15.74
Glutathione(reduced form)+3	311.0822	15.74
Gly	76.0393	10.69
Gly+1	77.0363	10.69
GMP	362.0510	16.08
GMP+1	363.0478	16.08
GMP+2	364.0448	16.08
GMP+3	365.0418	16.08
GMP+4	366.0389	16.08
GMP+5	367.0359	16.08
Guanosine	284.0989	15.04
Guanosine+1	285.0960	15.04
Guanosine+2	286.0930	15.04
Guanosine+3	287.0901	15.04
Guanosine+4	288.0871	15.04
Guanosine+5	289.0841	15.04
His	156.0768	9.54
His+1	157.0738	9.54
His+2	158.0708	9.54
His+3	159.0679	9.54
Hypotaurine	110.0270	20.10
Hypotaurine+1	111.0241	20.10
Ile	132.1019	12.77
Ile+1	133.0989	12.77
IMP	347.0404	15.54
IMP+1	348.0369	15.54
IMP+2	349.0339	15.54
IMP+3	350.0309	15.54
IMP+4	351.0280	15.54
Leu	132.1019	12.87
Leu+1	133.0989	12.87
Lys	147.1128	9.06
Lys+1	148.1098	9.06
Lys+2	149.1069	9.06
Met	150.0583	13.28
Met+1	151.0554	13.28
N-Acetylglucosamine	222.0972	23.09

物質名	m/z	mt
N-Acetylglucosamine+1	223.0943	23.09
N-Acetylglucosamine 6-phosphate	300.0490	15.08
N-Acetylglucosamine 6-phosphate+1	301.0460	15.08
N-Acetylglutamate	188.0564	12.07
N-Acetylglutamate+1	189.0535	12.07
N-epsilon-Acetyllysine	189.1234	14.01
N-epsilon-Acetyllysine+1	190.1204	14.01
N-epsilon-Acetyllysine+2	191.1174	14.01
O-Acetylserine	148.0604	15.17
O-Acetylserine+1	149.0575	15.17
Ornithine	133.0972	8.99
Ornithine+1	134.0942	8.99
Ornithine+2	135.0912	8.99
Pantothenate	218.1034	18.39
Pantothenate+1	219.1004	18.39
Phe	166.0863	13.66
Phe+1	167.0833	13.66
Pipecolate	130.0863	12.84
Pipecolate+1	131.0833	12.84
Pro	116.0706	13.38
Pro+1	117.0676	13.38
Pyridoxal	168.0655	11.19
Pyridoxal+1	169.0626	11.19
S-Adenosylhomocysteine	193.0681	11.17
S-Adenosylhomocysteine+1	194.0651	11.17
S-Adenosylhomocysteine+2	195.0622	11.17
S-Adenosylhomocysteine+3	196.0592	11.17
S-Adenosylhomocysteine+4	197.0562	11.17
S-Adenosylhomocysteine+5	198.0533	11.17
S-Adenosylhomocysteine+6	199.0503	11.17
5-Methythioadenosine	200.0762	9.33
5-Methythioadenosine+1	201.7590	9.33
5-Methythioadenosine+2	202.7561	9.33
5-Methythioadenosine+3	203.7531	9.33
5-Methythioadenosine+4	204.7501	9.33
5-Methythioadenosine+5	205.7472	9.33
Ser	106.0499	12.50
Ser+1	107.0469	12.50
Thr	120.0655	13.07
Thr+1	121.0626	13.07
Trp	205.0972	13.58
Trp+1	206.0942	13.58
Trp+2	207.0912	13.58
Tyr	182.0812	13.92
Tyr+1	183.0782	13.92

物質名	<i>m/z</i>	mt
Val	118.0863	12.56
Val+1	119.0833	12.56

オイル生産微細藻におけるオートファジーによる分解物とその利用

2014年2月5日 初版発行

著者 田中美穂

監修 富田勝

発行 慶應義塾大学 湘南藤沢学会

〒252-0816 神奈川県藤沢市遠藤5322

TEL:0466-49-3437

Printed in Japan 印刷・製本 ワキプリントピア

ISBN 978-4-87762-270-1
SFC-MT 2013-002

■ 本論文は修士論文において優秀と認められ、出版されたものです。