

Discovery and Analysis of a Major Lipid Droplet Protein in a Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*

著者	YONEDA Kohei
著者別名	米田 広平
発行年	2017
その他のタイトル	海産珪藻 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> における主要油滴タンパク質の発見と解析
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2017
報告番号	12102甲第8365号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00149944

氏名	米田 広平		
学位の種類	博士（理学）		
学位記番号	博 甲 第 8365 号		
学位授与年月日	平成 29年 9月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Discovery and Analysis of a Major Lipid Droplet Protein in a Marine Diatom <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (海産珪藻 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> における主要油滴タンパク質の発見と解析)		
主査	筑波大学教授	博士（農学）	鈴木 石根
副査	筑波大学教授	博士（理学）	石田 健一郎
副査	筑波大学教授（連携大学院）	農学博士	中嶋 信美
副査	筑波大学助教	博士（理学）	吉田 昌樹

論 文 の 要 旨

生物が蓄積する油脂を石油代替物質として活用する試みが注目を集めている。特に微細藻類は、光合成により光エネルギーを用いてCO₂を炭素源として油脂を生産でき、また陸上植物に比べ油脂生産効率が高いため注目を集めている。生物の細胞内で油脂は、油滴と呼ばれる細胞内の小胞に蓄積される。油滴は、一般的に小胞体膜の膜中に中性脂肪が蓄積し、油滴表面に特別なタンパク質が表在することで形成する。陸上植物や動物では、油滴表面のタンパク質は、油滴の構造の安定化、油脂の代謝や細胞内膜輸送などの機能に関わっている。しかしながら、微細藻類の油滴表面に局在するタンパク質については、様々な藻類種から異なる起源の油滴表在タンパク質が報告され、統一的な解釈が困難な状況であった。

著者は、本論文の第1章で、油脂高蓄積性の海産性羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* に着目し、油滴の主要タンパク質の同定の結果を記述している。細胞を6日間、窒素源を欠乏させた培養条件で培養し、油滴を十分発達させ、独自に条件を検討したショ糖密度勾配遠心法により、他のオルガネラの混入のない油滴を精製することに成功したことを報告している。精製した油滴画分のプロテオーム解析により、5種の油滴タンパク質を同定し、そのうちの最も多量に存在するタンパク質を Stramenopile-type lipid droplet protein (StLDP) と命名した。StLDP は、既知の油滴局在タンパク質と比べて大きなタンパク質であり、一次配列の相同性も見られなかったため、既知のものとは由来の異なる油滴タンパク質であることを主張している。しかしながら、StLDP には、陸上植物の油滴局在タンパク質オレオシンに見られる様な、配列の中央付近に疎水性領域が存在すること、Proline knot と呼ばれる特徴的なプロリン残基が疎水性領域に見られ

ることを見出し、立体構造上は類似の機能を有することを予測した。StLDP に相同なタンパク質は、珪藻や卵菌類が含まれる Stramenopile のゲノムにのみ見出されることから、Stramenopile に特徴的なタンパク質であることを主張している。また、著者は、StLDP の遺伝子発現を、油脂産生を誘導する窒素欠乏条件で解析し、StLDP 遺伝子の転写産物の蓄積が顕著に誘導され、油滴の大きさの変化と高い相関があることを明らかにし、これらのことから StLDP が油滴形成に重要な役割を有していることを考察している。

本論文の第2章で、著者は、StLDP を光合成色素タンパク質であるフコキサンチンクロフィル結合タンパク質の遺伝子 *fcpA* のプロモーターから発現する *P. tricornutum* 細胞を作製し、StLDP の機能解析を試みた結果をまとめている。この改変体では、StLDP の転写産物量は、窒素源を充足している培養条件で最も高く、窒素欠乏条件では低下した。この変化は *fcpA* の発現様式と同様の傾向であった。培養条件にかかわらず、その生育は野生株と同様であった。窒素充足条件では、StLDP の発現が高いにもかかわらず、油滴の形成は認められず、脂質の組成も野生株と同様であった。窒素欠乏条件で6日間培養すると、野生株に比べて改変体では、油滴の大きさが増大し、中性脂質の蓄積量が著しく増加し、反対に主に膜脂質が含まれる極性脂質の含量は低下した。しかしながら、脂質の総量は変化しなかった。これらの結果から、筆者は、StLDP は油脂の生産そのものには関わらないが、中性脂質の油滴への取り込みを促す機能があると考察している。窒素欠乏の2日目において、野生株ではほとんど全ての細胞(97%)が、1つまたは2つの油滴を保持していたが、改変体では1つまたは2つの油滴を持つ細胞は全体の約8割に減少し、3つあるいは4つの油滴を持つ細胞がそれぞれ15%、6%存在することが見出された。すなわち、StLDP は油滴形成の初期においてトリアシルグリセロールなどの中性脂質を油滴中に隔離することで、中性脂質の蓄積量を高めているのに機能していると考察している。

審 査 の 要 旨

本論文を通して著者は、油脂産生珪藻の油滴局在タンパク質を生化学的に初めて同定し、その過剰発現体を作成して、その油滴局在タンパク質の機能を生理的に解析した。藻類の油滴はこれまで高純度で単離することができず、その構成分子について十分な研究が行われてこなかった。本論文の著者は、細胞を破壊する方法や油滴の分離方法について試行錯誤しながら、非常に純度の高い状態で単離することに成功した。これにより油滴の構成分子を研究する突破口を開いた。これらの結果により、珪藻類およびラビリンチュラ類を用いた油脂生産に、新たな知見を提供することが期待できる。この論文でも示された、多くの生物種に見られる油脂蓄積に関わる主要なタンパク質が、非常に多様な起源を有するであろうことは、その進化が複数の異なる機構で起こったことを示唆し、蓄積される脂質の種類や、蓄積を促す環境条件の違いなどにより、油滴局在タンパク質が使い分けられてきた可能性を示すものである。このように脂質の蓄積には、生物間でこれまで考えられていた以上に大きな違いがあり、また複雑な機構が潜んでいる可能性を示したことは、当該分野の今後の研究の発展に大きく貢献したと評価できる。

平成29年8月3日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認められる。