

トランス脂肪酸による細胞内オルガネラおよび ストレス感受性に及ぼす影響の解析

井 沢 真 吾

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 准教授

緒 言

トランス脂肪酸の過剰摂取は心疾患リスクの上昇や認知機能の低下をもたらすといわれ、2003年以降、食品中のトランス脂肪酸レベル明記の義務化や使用の規制が各国で行われるようになった。トランス脂肪酸の過剰摂取による生体への影響は、疫学調査や実験動物の病理学的解析によるデータを中心に議論されてきたが、分子レベル・細胞レベルでの解析データは非常に乏しいのが現状であり、トランス脂肪酸の摂取に対する細胞の応答機構等はほとんど未解明のままである。

そこで、本研究ではトランス脂肪酸の摂取および代謝時における細胞内の応答機構について、オルガネラの機能・形態やストレスへの感受性等を中心に解析を行い、分子レベルで新しい情報の収集に取り組んだ。研究には真核細胞の優れたモデル系であり、食品製造業においても重要である出芽酵母を利用した。出芽酵母は、発酵食品の製造や酒類醸造等に広く利用され、安全性も高いことが証明されている点に加え、分子生物学・生化学・細胞生物学・遺伝学的な解析が容易であり、効率的な研究の遂行が可能である。また、脂肪酸のみを炭素源として生育することができることから、トランス脂肪酸の生体への影響を解析する上で様々な利点を有している¹⁾。

方 法

菌体および培地

実験には出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A 株を用いた。シス脂肪酸としてオレイン酸、トランス脂肪酸としてエライジン酸を用いて、これらの脂肪酸を唯一の炭素源として酵母細胞を培養した。脂肪酸培地組成は 0.67 % YNB w/o amino acid, 0.15% Tween 40, 0.15% oleic acid or elaidic acid を用い、適宜アミノ酸と塩基を添加して 28°C で培養を行った。

ストレス耐性の解析

対数増殖期まで培養した細胞をリン酸緩衝液 (50 mM

pH6.8) に懸濁し、H₂O₂、熱ショック (42°C)、冷凍解凍ストレス (-30°C で冷凍保存後、室温で解凍)、エタノール、浸透圧ストレスで処理した。経時的にサンプリングを行い、YPD plate (2% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract, 2% agar) に塗布し死滅率を計測した²⁾。

DNA マイクロアレイ解析

オレイン酸およびエライジン酸培地で培養した酵母細胞より、それぞれトータル RNA を抽出し、マイクロアレイ解析 (3D-Gene Yeast Oligo Chip 6K, Toray Industries Inc., Tokyo Japan) により転写レベルの比較を行った。

オルガネラ形態解析

オルガネラ形態は GFP-fusion タンパク質を発現させ、蛍光顕微鏡 (Leica, AF6500 system) によって観察・解析した。ペルオキシソームにおける 3-oxoacyl CoA thiolase である Pot1p の GFP-fusion プラスミドは、プライマーセット

5'-TCTCTAACTCTAGACCGACCAACTGCAAGCCAGCGGCA-3' と 5'-AAGTATTCTCGAGATTCTTTAATAAAGATGGCGGCGGC-3' により増幅した *POT1* 遺伝子を染色体組み込み型ベクター pAUR-GFP の XbaI/XhoI サイトに挿入して構築し、BsiWI による線状化後、酵母細胞に形質転換した。リピッドボディや小胞体膜上に局在するエルゴステロール合成系酵素である Erg6p の GFP-fusion プラスミドは、5'-TATAATGCGGCCGCACATTCCTACTATAACGTCGT-3' と 5'-ATCTAGTCTCGAGATTGAGTTGCTTCTTGGAAGTT-3' のプライマーセットで増幅した *ERG6* 遺伝子を染色体組み込み型ベクター pJK67 の NotI/XhoI サイトに挿入して構築し、XbaI による線状化後、酵母細胞に形質転換した。

同様の方法で、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、液胞、エンドソーム、ペルオキシソーム、核小体、P-body、ストレス顆粒、膜マイクロドメインを観察する GFP 融合タンパク質を発現するゲノム組み込み型のプラスミドをそれぞれ構築した。

結 果

1. トランス脂肪酸による P-body とストレス顆粒の形成

真核生物の細胞質における翻訳と mRNA の分解は密接に連携しており、その制御はストレス条件下において特に重要である。ストレス条件下で非翻訳状態の mRNA はポリソームから隔離され、翻訳制御因子や RNA 分解装置などとともにストレス顆粒 (stress granule, SG) やプロセシングボディ (P-body) といった構造体を細胞質に形成する。両構造体は非翻訳状態の mRNA と RNA 結合タンパク質によって細胞質に形成される構造体であり、P-body が主として mRNA 分解に関わるタンパク質と複合体を形成するのに対し、SG は翻訳開始因子や 40S リボソームサブユニット等と複合体を形成する。それぞれ、ストレス条件下における mRNA の一時的な隔離・貯蔵やストレス除去時の回復過程における速やかな翻訳再開に関わっていると考えられている。そこで、オレイン酸培地およびエライジン酸培地で培養した細胞における P-body と SG の形成状態を検討した。P-body、SG のそれぞれのマーカーとして Dcp2p-GFP と Ngr1p-GFP を用いた^{3, 4)}。解析の結果、エライジン酸で培養した細胞では P-body および SG の形成が顕著であり (Fig. 1A)、オレイン酸培地に比べ高いストレス状態に細胞が

おかれていると考えられた。実際に、マイクロアレイ解析やウェスタンブロット解析では、ヒートショックプロテイン (HSP) などのストレスタンパク質の発現量がエライジン酸培地で増加していた。

2. トランス脂肪酸によるストレス耐性の上昇

エライジン酸培地で培養した細胞内で HSP の発現量上昇が観察されたことから、ストレスに対する感受性を検討した。その結果、過酸化水素等の酸化的ストレスやエタノールストレス、浸透圧ストレスに対する感受性に大きな違いは観察されなかったが、熱ショック及び冷凍解凍ストレスに対する耐性は、オレイン酸に比べエライジン酸で培養した細胞の方が有意に高い耐性を示した (Fig. 2)。

3. オルガネラ形態の違い

P-body や SG 以外のオルガネラや構造体の形態についても検討を行った。リピッドボディやミトコンドリア形態については大きな違いは観察されなかったが、ペルオキシソームについてエライジン酸培地で培養した細胞で若干の肥大化が観察された。また、細胞膜上に局在する膜マイクロドメインについてはエライジン酸による培養時に有意な凝集が観察された (Fig. 1B)。

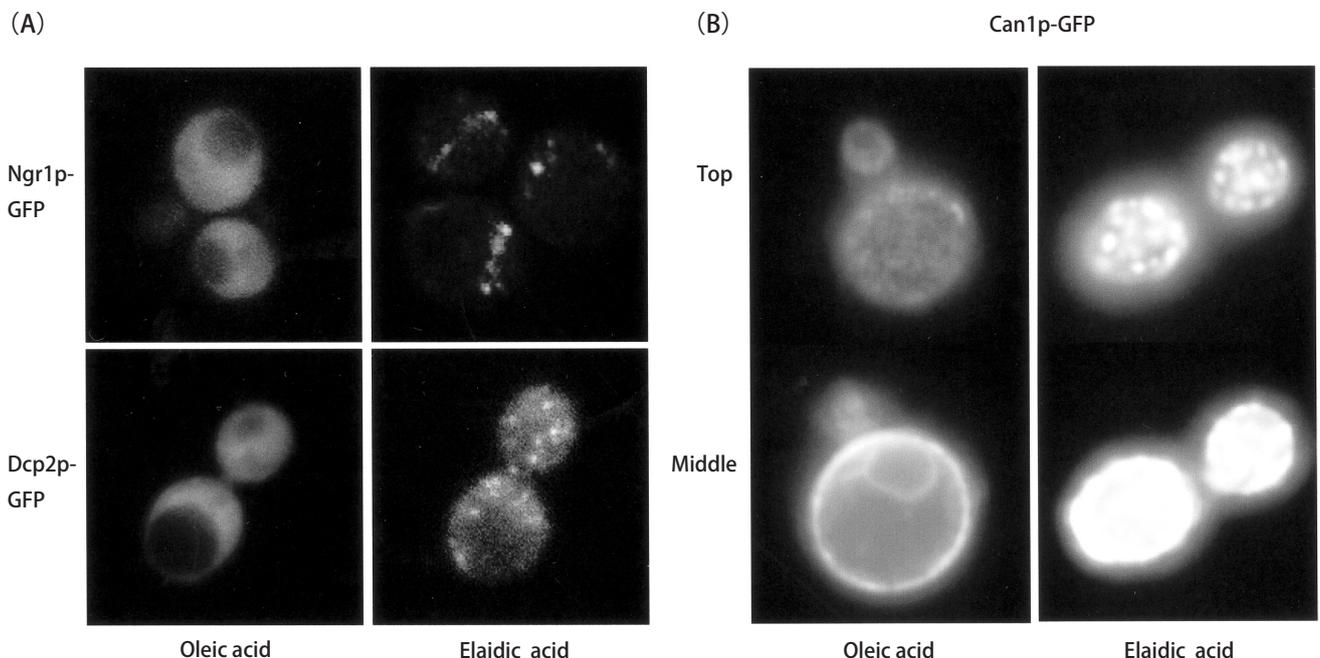


Fig. 1 Cultivation with elaidic acid induces the formation of P-bodies and SGs and the accumulation of micro domains
Yeast cells were cultured in 100 ml of each medium with shaking (120 rpm) at 28 °C. (A) The assembly of SGs and P-bodies was examined with Ngr1p-GFP (SG marker) and Dcp2p-mRFP (P-body marker). (B) Distribution of micro domains on the plasma membrane was monitored with Can1p-GFP.

考 察

マクロアレイ解析の結果から、トランス脂肪酸（エライジン酸）を培地成分として培養することにより、ストレス応答性の転写活性化因子 Msn2p/Msn4p の標的遺伝子やヒートショックプロテイン遺伝子の転写レベルが上昇したことから、トランス脂肪酸の代謝は酵母細胞にとってストレスに似た負荷がかかった状況を引き起こしていると推測された。実際に細胞質では P-body や SG の形成が誘導されたことから、翻訳抑制を含めて通常の培養条件下とは随分と異なる状態に細胞があると考えられる。一方で、これらのストレス応答がエライジン酸培養によって誘導されたことによって、ストレスに対する耐性が上昇したのではないかと考えられた。膜構造の違いもストレスに対する感受性を大きく左右することから、トランス脂肪酸の代謝を介して膜脂質組成にも影響しているのではないかと推測している。膜マイクロドメインの形態学的違いは両脂肪酸培地による膜脂質組成の違いを反映している可能性が高く、今後、より詳細な分子機構の解明に取り組む予定である。また、過酸化水素に

対する耐性がオレイン酸培地での培養時と差がなかったのは、両培地ともにペルオキシソームでの β -酸化を誘導することで各種抗酸化系酵素の発現が上昇したためだと考えられた。今回の解析では、トランス脂肪酸を唯一の炭素源として培養したため、ヒトのトランス脂肪酸摂取のケースとは必ずしも同列に比較することはできないが、動物細胞でも似たような影響が引き起こされるのか検討する予定である。

要 約

オレイン酸培地での培養に比べ、エライジン酸で培養した酵母細胞は熱ショック及び冷凍解凍ストレスに対する耐性が高く、細胞内に P-body や SG を形成していた。また、膜マイクロドメイン構造についても両培地での培養で違い確認された。DNA マイクロアレイやウェスタンブロット解析の結果、ストレスタンパク質の発現レベル上昇が確認され、エライジン酸で培養した細胞がストレス応答した状態に近いと考えられた。

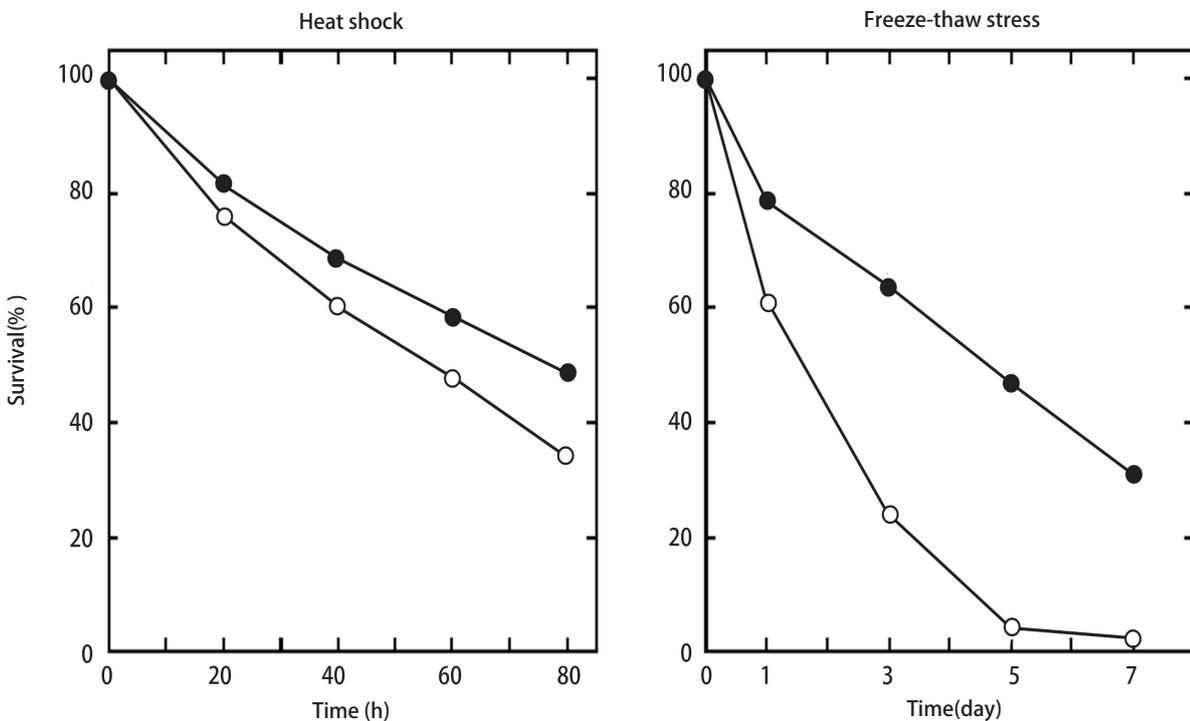


Fig. 2 Susceptibility to heat shock and freeze-thaw stress

Cells were treated with various types of stress such as heat shock (42°C) and freeze-thaw stress (-30°C), and then samples were diluted and plated on YPD plates to monitor cell viability. Percent survival was expressed relative to the initial viability prior to the treatment with ethanol. Results are representative of three independent experiments. White circles, cells grown in oleic acid medium; black circles, cells grown in elaidic acid medium.

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) A. Gurvitz, et al, : *J. Biol. Chem.*, **276**, 895-903 (2001).
- 2) S. Izawa, et al, : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 533-538 (2007).
- 3) S. Izawa, et al, : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2800-2807 (2007).
- 4) K. Kato, et al, : *submitted*.