

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2006 ~ 2009
 課題番号： 18370070
 研究課題名(和文) モデル微生物に学ぶストレス応答戦略と細胞長寿命化への展開
 研究課題名(英文) Characterization of stress responses and its application to the lifespan regulation in model microorganisms.
 研究代表者
 饗場 浩文 (AIBA HIROFUMI)
 名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
 研究者番号：60211687

研究成果の概要 (和文)

モデル微生物を対象としてストレス適応機構の総合的解明を目指し、大腸菌を用いた 2 成分制御系や転写因子の機能解析、ならびに分裂酵母を用いた定常期ストレスへの適応機構の解析を行った。その結果、2 成分制御系のレスポンスレギュレーター ArcA がこれまで知られていた嫌気-好気に応答した遺伝子発現以外に、鞭毛合成系の遺伝子群の発現に関与することを見出し、そのメカニズムを解析した。また、レスポンスレギュレーター ArcA に加え、広域転写因子 H-NS ならびに Fnr を対象として、ChIP-CHIP 法を導入しゲノムワイドな結合様式と制御機構を明らかにした。他方、分裂酵母を用いて、定常期での生存率に影響する因子を広範に探索した。その結果、新規な経時寿命延長因子群 (Ecl1 ファミリー) を見出した。さらにこれらが酵母に共通する因子であることを示し、経時寿命制御機構に関して新たな知見を得た。

研究成果の概要 (英文)

To understand the strategy of stress responses of microorganisms, I characterized two model microorganisms, *E. coli* and *S. pombe*. In *E. coli*, I found that a response regulator, ArcA is involved in flagella synthesis in addition to the well known aerobic-anaerobic responses. I also identified the whole genome binding sites of transcription factors, ArcA, H-NS and Fnr of *E. coli* by using ChIP-CHIP analysis.

By using fission yeast, *S. pombe*, I started to identify and characterize factors involved in the chronological lifespan. In this project, I identified novel factors, Ecl1 family proteins that increase chronological lifespan of *S. pombe* when overexpressed. I also isolated some mutants and clones that affect chronological lifespan of *S. pombe*. Based on these results, I was able to establish the basis for the development of the future research.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2007 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2008 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2009 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：2 成分制御系、経時寿命、大腸菌、分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

2成分制御系は最初バクテリアにのみ見出されたがその後、酵母、カビ、高等植物など真核生物にも広く存在する事が知られ、普遍的な情報伝達システムとして認知されている。申請者は世界に先駆けて大腸菌における浸透圧情報の伝達と遺伝子発現制御に2成分制御系(EnvZ-OmpR系)が関わることを見出し、以来、大腸菌、シアノバクテリア、分裂酵母などに対象を広げて2成分制御系の機能解析を進めてきた。近年は、マイクロアレイ解析を出発点とした、大腸菌2成分制御系の網羅的転写解析、精製タンパク質を用いた網羅的リン酸化解析を通して2成分制御系がネットワークを形成して機能するという新たな概念を提出した。2成分制御系は環境変化を感知し適応するために発達したシステムである。従ってその作動原理を理解すれば、ストレス応答システムの有効利用が可能となり、新機能付加型生物(例えばストレス耐性能の付加や、細胞の長寿命化など)を創出できる可能性がある。そこで、2成分制御系に関する未解決の重要課題を本研究で取り上げ解析することにした。

一方、近年の老化研究から、酸化ストレスなどの環境ストレスによるダメージの蓄積が寿命の規定因子の一つであることが明らかになってきた。細胞寿命はその分裂回数(Replicative Aging:例として出芽酵母の出芽回数)で測定する場合と、分裂を伴わない細胞の生存期間(Chronological Aging:線虫の生存日数や酵母の増殖定常期での生存期間など)で測定する場合があるが、双方において、ストレス感受性と寿命との間に関連が認められている。このような背景から、ストレス適応能力の強化が細胞の長寿命化につながることを再認識するに至った。そこで、増殖定常期ストレスに着目し、定常期での生存率が変化する分裂酵母の変異株ならびに高発現することで経時寿命に影響する因子の検索と取得を行うことを計画した。細胞寿命に関しては、酵母からヒトまで共通性が指摘されていることから、本研究の成果は、高等生

物にも適用できる可能性が高い。また、その知見は応用(醗酵生産における長生き変異株の利用など)と基礎(ストレス応答、細胞寿命、老化制御など)の両面にわたる波及効果を及ぼすことが期待された。

以上のように本研究は、微生物の2成分制御系研究を出発点として、新たに細胞寿命研究への展開を確立するという意義を持って計画された。

2. 研究の目的

モデル微生物を対象にストレス適応機構を総合的に解析し新規生命現象の発見と理解を深めること、またそれを用いて新しい生物機能を創出(ストレス適応能の強化や細胞の長寿命化)することを目的とした。

そのために以下の2つの具体的テーマと目的を掲げ、これらを並行して進めることとした。

(1)「2成分制御系を中心としたストレス応答機構の包括的解析」について

微生物界で最も普遍的に見られるストレス応答システムである2成分制御系に関し、大腸菌ならびに分裂酵母を対象として全2成分制御系が関わる細胞応答(ストレスシグナルと制御される遺伝子群)を明らかにし、その生理的意義を解明する。同時に、2成分制御系研究で解析が遅れている基本的な作動原理、すなわちヒスチジinkinナーゼのシグナル受容の仕組み、レスポンスレギュレーターの転写制御の仕組み、ならびに特異性を持ったヒスチジinkinナーゼからレスポンスレギュレーターへのリン酸転移反応の仕組みを明らかにする。

一方、最近の我々の解析から2成分制御系は相互作用しながら機能ネットワークを形成して情報伝達を行うという新たな概念が浮かび上がってきた。しかしながらネットワークの形成原理や意義に関してはほとんど解明されておらず2成分制御系の総合的理解にとって重要な課題となっている。そこで主に大腸菌を対象として複数(30種類)存

在する2成分制御系がどのような原理で相互作用するのか、あるいは情報交換の特異性を維持するののかに関して膜や他の生体因子を考慮に入れて理解することを目指す。

(2)「細胞の長寿命化に向けた定常期ストレス応答機構の解析」について

近年の細胞老化研究の進展により、酸化ストレスなどの環境ストレスによるダメージの蓄積が細胞の寿命を規定する一つの要因であることが明らかとなってきた。寿命あるいは細胞老化のモデルとして用いられている出芽酵母、線虫などにおいてはストレス感受性と寿命との間に関連が認められている。従って、ストレス適応能の強化あるいは制御により、細胞寿命を延ばすことが可能であると予想される。本研究では、分裂酵母ならびに出芽酵母を用いて増殖定常期(stationary phase)に焦点を当て、定常期での生存率に異常をきたす変異株(長生き変異株、早死に変異株)や遺伝子群を広範に取得し、その原因遺伝子の特定と機能を明らかにする。出芽酵母では変異が細胞分裂寿命に与える影響も解析する。これらの知見を基に、当該遺伝子の機能を人為的に制御した場合、酵母の細胞寿命(増殖定常期の生存率あるいは細胞分裂回数)がどのように変化するかを解析する。

3. 研究の方法

(1)「2成分制御系を中心としたストレス応答機構の包括的解析」について

① *in vivo*におけるレスポンスレギュレーター結合領域のゲノム解析

多くのレスポンスレギュレーターは転写因子として働いており、それらが制御する遺伝子に関しては我々のマイクロアレイ解析などから多くの情報が蓄積している。これらの知見をもとにChIP-CHIP解析を行い、想定された遺伝子プロモーター領域へのレスポンスレギュレーターの結合を各種刺激存在下で解析する。

② 大腸菌2成分制御系タンパク質の細胞内量および動態の時間空間的解析

2成分制御系タンパク質の各種ストレスに応答した時間・空間的細胞内動態を探る

ために各種タグを付加した2成分制御系遺伝子を染色体上で構築し、これを用いて、細胞内量ならびに局在に関するデータを取得する。

③ 2成分制御系タンパク質間の相互作用ネットワークの機能解明

複数存在する2成分制御系間(ヒスチジンキナーゼ間、レスポンスレギュレーター間、ヒスチジンキナーゼ-レスポンスレギュレーター間)での相互作用ネットワーク、リン酸リレーネットワークを解明し、情報伝達における役割を明らかにする。

(2)「細胞の長寿命化に向けた定常期ストレス応答機構の解析」について

① 分裂酵母の定常期生存率の変異株の解析

増殖定常期での生存率が高く維持される「長生き変異株」、ならびに低くなる「早死に変異株」を取得解析し、原因遺伝子を同定する。

② 経時寿命の制御に関与する因子の検索と同定

各種ゲノムから、分裂酵母を宿主として経時寿命を延長させる因子のスクリーニングを行う。同様の解析を出芽酵母においても行い、細胞寿命制御に関する知見を得る。

4. 研究成果

「2成分制御系を中心としたストレス応答機構の包括的解析」について

(1)先に申請者は2成分制御系を単独で欠失させた場合、最も多くの遺伝子発現に影響するレスポンスレギュレーターとして、ArcAを同定した。既にArcAは嫌気-好気環境に応答して呼吸関連遺伝子の制御に関わることが知られていたが、新たに、鞭毛合成系の遺伝子発現に関与することを見出した。大腸菌の鞭毛合成は階層性を持って制御され、マスターレギュレーターFlhDCにより、class2遺伝子群(鞭毛特異的σ因子FlhAを含む)、class3遺伝子群が順次活性化される。本研究では、*arcA*変異株に解析を加え、ArcAはFlhAの発現に必要であるがFlhDCの発現には関与しないことを見いだした。ヒスチジンキナーゼArcBは運動性に必要ではないものの、ArcAのリン酸化部位は運動性

に必要であることも見いだした。これらの結果から、ArcA は ArcB 以外のヒスチジンキナーゼによっても制御を受け鞭毛合成に関与することが示唆された。

- (2) ArcA に代表されるレスポンスレギュレーターや広域転写因子によるゲノムワイドな転写制御機構を解明するために、ChIP-CHIP 解析法を導入した。本研究では、ArcA, H-NS, Fnr を対象として、それぞれの C-末端に 3xFLAG タグを付加し、共通の抗体でクロマチン免疫沈降を行った。これらを用いて、染色体上での各転写因子の結合配列、結合様式などに関する知見を得た。
- (3) 分裂酵母を対象にして経時寿命に影響する因子の検索を行った。その結果、*lcf1⁺* のパラログ遺伝子 *lcf2⁺* を見だし、それがミリスチン酸に特異性を持った新たな long chain fatty acyl-CoA synthetase をコードすることを明らかにした。*lcf1⁺* と *lcf2⁺* との 2 重変異株では、上記酵素活性が顕著に減少するとともに、増殖定常期における生存率も顕著に低下した。既に申請者らは分裂酵母の long chain fatty acyl-CoA synthetase をコードする *lcf1⁺* 遺伝子が、増殖定常期における生存率の維持に必要であることを見出しており、これらの結果を総合すると、脂肪酸の利用、代謝が増殖定常期における生存率、すなわち計時寿命の決定に重要な役割を果たしていることが示唆された。
- (4) 分裂酵母から高発現すると経時寿命を延長する新規因子 Ecl1 を発見した。Ecl1 は、それまで遺伝子として想定されていなかった全く新規な因子であり、核局在性を示した。また培地のグルコースのセンシングに関与する Pka1 経路に作用して経時寿命を延長する可能性が示唆された。
- (5) 分裂酵母の経時寿命延長遺伝子 *ecl1⁺* のパラログ遺伝子として *ecl2⁺* と *ecl3⁺* を見出した。*ecl2⁺* と *ecl3⁺* は、高発現すると *ecl1⁺* 同様に分裂酵母の経時寿命を延ばした。*ecl2⁺* と *ecl3⁺* は、それぞれ 84 アミノ酸、89 アミノ酸からなるタンパク質をコードするが、現在の分裂酵母の遺伝子データベースでは両方とも遺伝子として予想さ

れていない新規な遺伝子であった。Ecl2 タンパク質は Ecl1 タンパク質と同様に核に局在した。本結果によって、*ecl1⁺*, *ecl2⁺*, *ecl3⁺* 遺伝子が経時寿命制御において重複した役割を果たしている可能性が示唆された。

- (6) 先に我々は分裂酵母の経時寿命を延長する新規タンパク質 Ecl1 を見出した。経時寿命延長における Ecl1 機能の普遍性を解析する目的で、Ecl1 を出芽酵母で高発現したところ、出芽酵母の経時寿命が延長した。出芽酵母において Ecl1 と相同因子を検索したところ、一部アミノ酸配列が類似した機能未知の YGR146C を同定した。YGR146C を出芽酵母で高発現すると経時寿命が延長することに加え、その欠失株は経時寿命が短縮することを見出した。これらの結果に基づき、YGR146C が出芽酵母における Ecl1 の構造機能的ホモログであり、経時寿命の制御に関わる新規因子であると結論した。Ecl1 様のタンパク質は他の酵母などにも見出されることからこれらを含めた Ecl1 ファミリータンパク質は、酵母における新規な経時寿命制御因子であることが示唆された。
- (7) 細胞寿命に影響する因子の広範な検索を目的として、経時寿命が延長する変異株をスクリーニングした。得られた変異株のいくつかについては、原因遺伝子を特定し、細胞寿命の制御機構に関する解析を進行している。他方、高発現することで経時寿命を延長する新規遺伝子群のスクリーニングも行い、遺伝子の特定と解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Azuma, K., Ohtsuka, H., Mita, S., Murakami, H., and Aiba, H. Identification and characterization of an Ecl1-family gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 査読有り 73, 2787-2789 (2009)
- ② Ito, T., Uozumi, N., Nakamura, T., Takayama,

- S., Matsuda, N., Aiba, H., Hemmi, H., and Yoshimura, T. The implication of YggT of *Escherichia coli* in osmotic regulation. *Biosci. Biotech. Biochem.* 査読有り 73. 2698-2704 (2009)
- ③ Shimada, M., Yamamoto, A., Murakami Tonami, Y., Nakanishi, M., Yoshida, T., Aiba, H., and Murakami, H. Casein kinase II is required for the spindle assembly checkpoint by regulating Mad2p in fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 査読有り 388. 529-532. (2009)
- ④ Ohtsuka, H., Ogawa, Y., Mizuno H., Mita, S., and Aiba, H. Identification of Ecl family genes that extend chronological lifespan in fission yeast. *Biosci. Biotech. Biochem.* 査読有り 73. 885-889. (2009)
- ⑤ Ohtsuka, H., Mita, S., Ogawa, Y., Azuma, K., Ito, H., and Aiba, H. A novel gene, *ec11+*, extends chronological lifespan in fission yeast. *FEMS Yeast Research* 査読有り 8. 520-530 (2008)
- ⑥ Fujita, Y., Mita, S., Ohtsuka, H., and Aiba, H. Identification of a fatty acyl-CoA synthetase gene, *lcf2+*, which affect viability after entry into the stationary phase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 査読有り 71. 3041-3047. (2007)
- ⑦ Kato, Y., Sugiura, M., Mizuno, T., and Aiba, H. Effect of the *arcA* mutation on the expression of flagella genes in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 査読有り 71. 77-83. (2007)
- ⑧ Grainger, D., Aiba, H., Hurd, D., Browning, D., and Busby, S. Transcription factor distribution in *Escherichia coli*: studies with FNR protein. *Nucleic Acids Research.* 査読有り 35. 269-278. (2007)
- ⑨ Oshima, T., Ishikawa, S., Kurokawa, K., Aiba, H., and Ogasawara, N. *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA Research* 査読有り 13. 141-153. (2006)
- ① 饗場浩文：分裂酵母に見出した経時寿命延長因子 *Ec11* ファミリー 第 178 回酵母細胞研究会（キリンビール横浜工場）2009. 12. 4
- ② Hokuto Ohtsuka, Kenko Azuma and Hirofumi Aiba. Identification of novel genes, *ec11+*, *ec12+*, and *ec13+*, which extend chronological lifespan in fission yeast. The 5th International Fission Yeast Meeting. 2009.10.26-31 (Tokyo)
- ③ 東 剣虹、大塚北斗、古賀由梨枝、内藤知佳子、饗場浩文 分裂酵母の経時寿命延長因子 *Ec11* と相互作用する因子の解析 日本農芸化学会中部支部第 156 回例会 2009. 10. 3 (名古屋大学)
- ④ 大塚北斗、東 剣虹、三輪由紀子、浜 祐子、東田英毅、饗場浩文 分裂酵母経時寿命を延長させる新規遺伝子の解析 日本農芸化学会中部支部第 156 回例会 2009. 10. 3 (名古屋大学)
- ⑤ 饗場浩文：料理は科学だ！ in 名古屋 学士会 パン作りから学ぶ科学シリーズ（ホームメイド協会栄校）2009. 8. 23
- ⑥ 東剣虹、大塚北斗、古賀由梨枝、内藤知佳子、饗場浩文 分裂酵母の経時寿命延長因子 *Ec11* と相互作用する因子の解析 酵母遺伝学フォーラム第 42 回研究報告会 2009. 7. 28-30 (つくば)
- ⑦ 大塚北斗、東剣虹、三輪由紀子、浜祐子、東田英毅、饗場浩文 分裂酵母経時寿命を延長させる新規遺伝子の解析 酵母遺伝学フォーラム第 42 回研究報告会 2009. 7. 28-30 (つくば)
- ⑧ 饗場浩文：分裂酵母に見出した新規な経時寿命延長因子：*Ec11* ファミリー 第 68 回酵母研究会（月桂冠（株）昭和蔵ホール）2009. 3. 13
- ⑨ 大塚北斗、東剣虹、小川祐樹、水野浩之、三田知花、饗場浩文 分裂酵母経時寿命を延長させる新規遺伝子 *ec11+*, *ec12+*, *ec13+* の解析 第 31 回日本分子生物学会年会（第 81 回日本生化学会大会合同大会）2008. 12. 12 (神戸)
- ⑩ 東剣虹、大塚北斗、三田知花、小川祐樹、饗場浩文 酵母の経時寿命に関わる新規遺伝子群の解析 日本農芸化学会中部支

部第 153 回例会 2008. 11. 1 (名古屋大学)
「日本農芸化学会中部支部維持会員賞 (奨励賞)」受賞

- ⑪ 大塚北斗、東剣虹、三田知花、小川祐樹、饗場浩文 分裂酵母経時寿命を延長させる新規遺伝子 *ec11+*, *ec12+*, *ec13+* の解析 酵母遺伝学フォーラム第 41 回研究報告会 2008. 9. 10-12 (札幌)
- ⑫ 大塚北斗、三田知花、小川祐樹、東剣虹、伊藤宏和、饗場浩文 *ec11+* は分裂酵母の経時寿命を延長させる 日本農芸化学会 2008 年度大会 2008. 3. 28 (名古屋)
- ⑬ 三田知花、藤田康之、大塚北斗、饗場浩文 分裂酵母長鎖脂肪酸 Acyl-CoA 合成に関わる新規遺伝子 *Icf2+* の定常期生存率への影響 第 30 回日本分子生物学会年会 (第 80 回日本生化学会大会合同大会) 2007. 12. 14 (横浜)
- ⑭ 大塚北斗、三田知花、饗場浩文 新規遺伝子 *ec11+* は分裂酵母の経時寿命を延長させる 第 30 回日本分子生物学会年会 (第 80 回日本生化学会大会合同大会) 2007. 12. 14 (横浜)
- ⑮ 饗場浩文 微生物研究から高次生命現象に迫る: 分裂酵母による細胞寿命制御研究の展開 2007 年ゲノム微生物学会若手の会 2007. 10. 22-23 (八王子)
- ⑯ 大塚北斗、三田知花、饗場浩文 分裂酵母の経時寿命を延長させる新規遺伝子 *ec11+* 日本農芸化学会中部支部第 150 回例会 (関西支部・中部支部合同大会) 2007. 9. 22 (中部大学)
- ⑰ 大塚北斗、三田知花、饗場浩文 分裂酵母の定常期生存率を上昇させる新規遺伝子 *ec11+* 酵母遺伝学フォーラム第 40 回研究報告会 2007. 9. 13 (大阪)
- ⑱ 三田知花、藤田康之、大塚北斗、饗場浩文 *S. pombe* 脂肪酸 Acyl-CoA 合成に関わる新規遺伝子 *Icf2+* の機能解析 酵母遺伝学フォーラム第 40 回研究報告会 2007. 9 (大阪)
- ⑲ 加藤吉伸、杉浦雅仁、饗場浩文 ArcA は大腸菌鞭毛合成遺伝子群の発現に必要である 第 1 回 日本ゲノム微生物学会年会

2007. 3. 1-3 (千葉県かずさアカデミアホール)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~microbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

饗場 浩文 (AIBA HIROFUMI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・
准教授

研究者番号 : 60211687