

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21780095

研究課題名（和文） カルシウムシグナルによる酵母の寿命制御機構

研究課題名（英文） Role of the Ca<sup>2+</sup> signaling pathway in the regulation of the life span in yeast

研究代表者

水沼 正樹 (MIZUNUMA MASAKI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：10343295

研究成果の概要（和文）：

我々は、酵母の“カルシニューリン”とよばれる Ca<sup>2+</sup>依存性脱リン酸化酵素に注目し、解析を行っている。今回はカルシニューリンの寿命への関与について注目した。Ca<sup>2+</sup>の添加によって野生株の寿命が短くなることがわかった。また、Ca<sup>2+</sup>感受性を示す *Δzds1* 株では、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇し、さらに寿命が短いことが明らかとなった。次にカルシニューリンに注目し、解析を行った。恒常的にカルシニューリンを活性化させた株でも寿命の短縮が観察された。以上の結果から、カルシニューリンは寿命を短くする機能を持つことがわかった。また、通常の増殖条件においてもカルシニューリン単独欠損株は寿命が短いことが分かった。以上の結果から、適切なカルシニューリン活性が寿命制御に極めて重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We are focus on the roles of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin in budding yeast. Especially, here, we investigated a relationship between Ca<sup>2+</sup>-signaling and lifespan. We found that Ca<sup>2+</sup> affected the replicative lifespan (RLS) of yeast. The increase in calcineurin activity by either the *zds1* deletion or the constitutively activated calcineurin reduced RLS. Further, the calcineurin deletion per se promoted ageing without impairing the gene silencing typically observed in short-lived sir mutants, indicating that calcineurin plays an important role in a regulation of RLS even under normal growth condition. Thus, our results indicate that Ca<sup>2+</sup> homeostasis/Ca<sup>2+</sup>-signaling is required to regulate longevity in budding yeast.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：カルシウム、老化、寿命、酵母

## 1. 研究開始当初の背景

カルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )はシグナルの担い手として、ヒトなど高等生物では受精、記憶精神活動、免疫、分泌を始め、高次な生命現象に極めて重要な役割を果たしている。 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達においては、“カルシニューリン”とよばれる $\text{Ca}^{2+}$ 依存性脱リン酸化酵素の働きがとりわけ重要である。

酵母は、ヒトの生命のメカニズムを明らかにする生命科学研究において格好のモデル生物であるため、酵母を利用して解析を行っている。これまでに、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達に関わる細胞周期・細胞増殖制御を発見した。さらに、本制御機構に携わる機能分子を同定するため、 $\text{Ca}^{2+}$ 耐性を指標に変異株を網羅的にスクリーニングを実施し、約500株の変異株を取得して遺伝学的に分類した。変異(変異株名を*scz*と呼んでいる)は、14遺伝子座に分類され、順次解析した。特に、*scz14*はテロメアサイレンサーSir3における変異であることが明らかになり、NAD依存性脱アセチル化酵素をコードするSir2も $\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達に関わることが示唆された。Sir2は酵母からマウスなどの高等生物にまで高度に保存され、老化・寿命に関わることが報告されていることから、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達は細胞増殖のみならず老化・寿命など極めて重要な生命現象に関与していることが予想された。実際、予備的な実験から $\text{Ca}^{2+}$ は酵母の寿命を短くすることや*scz*変異株の殆どは野生株と比較して寿命が短いことがわかった。

## 2. 研究の目的

$\text{Ca}^{2+}$ シグナルは、細胞増殖と連動して老化・寿命やアポトーシスなど重要な生命現象に関与していることが示唆された。このことから、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルは環境適応、生存に至る広範な基本的生命現象に関わることが予想された。 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルと老化・寿命の分子機構は未解明な部分が多い分野なので、まず、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルによる老化・寿命への影響を詳細に調べ、これ

に関わる因子を同定し、制御メカニズムを明らかにする。特に本研究では、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル(ホメオスタシス)による老化・寿命制御の解明を行う。

## 3. 研究の方法

(1) $\text{Ca}^{2+}$ シグナル(ホメオスタシス)の寿命への影響、(2)*SCZ*(カルシニューリン)が老化・寿命制御にどのように関わるのかその分子機構を明らかにし、さらに(3)新規老化・寿命関連因子をスクリーニングする。以下、具体的な研究計画・方法を記す。

### (1) $\text{Ca}^{2+}$ シグナル(ホメオスタシス)の寿命への影響

#### ① $\text{Ca}^{2+}$ の野生株の寿命に対する影響

野生酵母細胞の分裂回数を計測することにより寿命を計測することにより、 $\text{Ca}^{2+}$ (最終濃度100 mM)の有無による寿命に対する影響について調べる。細胞の生死判定には、フロキシシンBを用い、死んだ細胞は赤く染まる。

#### ②細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の寿命への影響

酵母には細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度調節に関わる $\text{Ca}^{2+}$ トランスポーターとして、Pmc1(液胞に局在する $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase)とPmr1(小胞体に局在する $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase)が知られているので、それぞれを高発現し、細胞質内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を減少された際の野生株の寿命への影響を調べる。

### (2) *SCZ*(カルシニューリン)の寿命制御への関与

カルシニューリン欠損株について老化・寿命への関与を調べるため、寿命の測定や老化の指標となる現象を調べる。

#### ①野生株に $\text{Ca}^{2+}$ を加えて寿命を測定する。

#### ②カルシニューリン破壊株の寿命測定

#### ③カルシニューリン高発現株の寿命測定

#### ④カルシニューリン破壊株の遺伝子発現(rDNA, テロメア, *MAT*座)への影響

### (3) 老化・寿命に関わる変異株のスクリーニ

## ング

① *scz6*/Cキナーゼ *PKC1* 変異株を用いた長寿変異株のスクリーニング

*scz6* 変異は、C キナーゼ *PKC1* における変異であった (以後 *pkc1-1* 変異と呼ぶ)。興味深いことに、*pkc1-1* 変異株は、37 度で緩慢な増殖を示す。そこで、*pkc1-1* 変異株を培地にスプレッドし、37 度で培養し、生育できたつまりこの増殖停止を解除した変異株を取得する。次に変異が一遺伝子変異に由来するものかどうか調べる。さらに変異の優・劣判定を行う。

## 4. 研究成果

### (1) Ca<sup>2+</sup>シグナル(ホメオスタシス)の寿命への影響

まず、Ca<sup>2+</sup>の複製的寿命に対する影響を調べた。その結果、Ca<sup>2+</sup>の添加によって野生株の寿命が短くなることがわかった。また、Ca<sup>2+</sup>感受性を示す *Δzds1* 株では、CDRE (calcineurin-dependent reporter element)-レポーターアッセイを用いた解析から、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が示唆され、さらに寿命が短いことが明らかとなった。これらの結果より、細胞内外の高濃度の Ca<sup>2+</sup>は寿命を短縮することがわかった。さらに、細胞内 Ca<sup>2+</sup>ホメオスタシスの維持に重要な機能をもつ ER-Golgi に局在することが知られる Ca<sup>2+</sup>イオンポンプの *Pmr1* を用いて解析した。*pmr1* 破壊株でもレポーターアッセイを行った結果、細胞内 Ca<sup>2+</sup>レベルが高く、寿命が短縮することが明らかとなった。以上の結果から、細胞内 Ca<sup>2+</sup>ホメオスタシスの維持が寿命延長に重要であることが分かった。

### (2) SCZ (カルシニューリン)の寿命制御への関与

さらに、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性ホスファターゼであるカルシニューリンに注目し、解析を行った。興味深いことに、先述した寿命の短い *Δzds1* 株においては、*CNBI* (カルシニューリンの調節サブユニット) 遺伝子を同時に破壊すると寿命が野生株と同程度にまで

回復した。さらに、恒常的にカルシニューリンを活性化させた株でも寿命の短縮が観察された。以上の結果から、カルシニューリンは寿命を短くする機能を持つことがわかった。さらに、通常の増殖条件で、カルシニューリン単独欠損株は寿命が短いことが分かった。以上の結果から、適切なカルシニューリン活性が寿命制御に極めて重要であることが示唆された。

### (3) 老化・寿命に関わる変異株のスクリーニング

*scz6* 変異は、C キナーゼ *PKC1* における変異であった (以後 *pkc1-1* 変異と呼ぶ)。*pkc1-1* 変異は、37 度で緩慢な増殖を示す。そこで、*pkc1-1* 変異株を培地にスプレッドし、37 度で培養し、生育できたつまりこの増殖停止を解除した変異株を取得した。スクリーニングの結果、変異株を 86 株選抜した。そのうち *PKC1* 遺伝子内における変異株が 4 株で、同遺伝子以外における変異は 82 株であった。82 株について変異の優・劣判定は現在進行中である。

## 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 2 件)

1. Ryohei Tsubakiyama, Masaki Mizunuma\*, Anri Gengyo, Josuke Yamamoto, Kazunori Kume, Tokichi Miyakawa, and Dai Hirata  
Implication of Ca<sup>2+</sup> in the regulation of replicative lifespan of budding yeast.  
J. Biol. Chem. 286, 28681-28687 (2011)  
査読有
2. Siriluck Attrapadung, Jun Yoshida, Ken-ichi Kimura, Masaki Mizunuma, Tokichi Miyakawa, and Benjamas Wongsatayanont  
Thanomsub  
Identification of ricinoleic acid as an Inhibitor of Ca<sup>2+</sup> signal-mediated

cell-cycle regulation in yeast.

**FEMS Yeast Research**, 10, 38-43 (2010)

査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 水沼 正樹、椿山 諒平、久米 一規、宮川 都吉、平田 大、出芽酵母の  $Ca^{2+}$  シグナルによる寿命制御日本農芸化学会 2012 年度京都大会(招待講演) 2012 年 3 月 25 日京都女子大学

2. 古家野 孝行、久米 一規、水沼 正樹、平田 大、分裂酵母における DNA 複製と細胞極性をつなぐ経路：癌細胞の異常な形を理解するヒント！、日本農芸化学会 2012 年度京都大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学

3. 橋本 智代、久米 一規、水沼 正樹、平田 大、DNA 複製チェックポイント経路による成長極性制御に関与する遺伝子の探索、日本農芸化学会 2012 年度京都大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学

4. 畠山 千央、久米 一規、高田 純平、福留 美穂、水沼 正樹、平田 大、出芽酵母におけるカルシニューリン機能関連遺伝子の探索、日本農芸化学会 2012 年度京都大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学

5. 椿山 諒平、水沼 正樹、久米 一規、平田 大、出芽酵母における新規寿命制御因子の同定と機能解析、日本農芸化学会 2012 年度京都大会、2012 年 3 月 23 日、京都女子大学

6. 長尾 悠広、椿山 諒平、水沼 正樹、平田 大、 $Ca^{2+}$  シグナルによる出芽酵母の複製的寿命制御機構の解析、日本農芸化学会 2012 年度京都大会、2012 年 3 月 23 日、京都女子大学

7. 椿山 諒平、水沼 正樹、平田 大、出芽酵母の複製的寿命制御における  $Ca^{2+}$  の役割、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14

日、パシフィコ横浜

8. 椿山 諒平、水沼 正樹、平田 大、 $Ca^{2+}$  が関与する出芽酵母の複製的寿命制御酵母遺伝学フォーラム第 44 回研究報告会、2011 年 9 月 6 日、九州大学医学部百年講堂

9. 椿山 諒平、水沼 正樹、久米 一規、宮川 都吉、平田 大、出芽酵母を用いた新規寿命制御因子の探索と機能解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 26-28 日、京都女子大学

10. 椿山 諒平、水沼 正樹、久米 一規、宮川 都吉、平田 大、出芽酵母を用いた新規寿命制御因子の探索と機能解析、BMB2010(第 33 回分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会)、2010 年 12 月 7-10 日、神戸ポートアイランド

11. R. Tsubakiyama, M. Mizunuma, K. Kume, T. Miyakawa, D. Hirata, The  $Ca^{2+}$ -signaling pathways is involved in the replicative lifespan in budding yeast (2010), CSHL Meeting on Molecular Genetics of Aging, September 28-October 2, 2010 Cold Spring Harbor Laboratory, NY

12. 椿山 諒平、水沼 正樹、久米 一規、宮川 都吉、平田 大、出芽酵母における新規寿命制御因子の探索と機能解析、酵母遺伝学フォーラム第 43 回研究報告会、2010 年 9 月 9-11 日、奈良市ならまちセンター

13. 椿山 諒平、水沼 正樹、久米 一規、宮川 都吉、平田 大、 $Ca^{2+}$  シグナルによる出芽酵母の複製的寿命制御機構の解明、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 27 日-30 日、東京都

14. 天野 雄一、久米 一規、水沼 正樹、平田 大、SEARCH FOR PROTEIN KINASES REGULATING CELL CYCLE AND CELL POLARITY IN

CALCIUM-SIGNALING PATHWAYS IN BUDDING YEAST、日本分子生物学会第 32 回年会、2009 年 12 月 11 日、横浜市

15. 佐々 佑太郎、小原 由廉、板倉 哲、久米 一規、水沼 正樹、宮原 浩二、平田 大、線虫の寿命決定機構におけるPKC-1の役割、日本分子生物学会第32回年会、2009年12月09日、横浜市

16. R. Tsubakiyama, M. Mizunuma, K. Kume, T. Miyakawa, D. Hirata, Analysis of yeast lifespan mediated by the Ca<sup>2+</sup>-signaling pathways, ASCB 49th Annual Meeting 2009, December 5-9, 2009, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA

17. 椿山 諒平、水沼 正樹、玄行 杏里、久米 一規、宮川 都吉、平田 大、出芽酵母における Ca<sup>2+</sup>シグナルと複製的寿命との関係、酵母遺伝学フォーラム第 4 2 回研究報告会、2009 年 7 月 28-30 日、つくば市

[図書] (計 2 件)

1. 水沼 正樹、平田 大  
出芽酵母の寿命研究の現状と展望  
日本醸造協会誌、106 巻 12 号 794-800 ページ(2011)  
査読なし
2. 椿山 諒平、水沼 正樹  
パン酵母でアンチエイジング  
生物工学会誌、89 巻 8 号 501 ページ (2011)  
査読なし

[その他]

研究室 HP :

<http://www.hiroshima-u.ac.jp/adsm/bio/saibou/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水沼 正樹 (MIZUNUMA MASAKI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・  
准教授

研究者番号 : 10343295

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :