

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510274

研究課題名(和文) 老化マーカーの開発と老化制御因子の網羅的スクリーニング

研究課題名(英文) Development of aging markers for screening for genes regulating chronological aging

## 研究代表者

松山 晃久 (Matsuyama, Akihisa)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：90399444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の寿命の1つに、分裂を止めた状態でどれだけの期間生存できるかという「経時寿命」がある。経時老化は我々の臓器など分裂を停止した細胞の寿命制御機構を研究する良いモデルだが、細胞の寿命をその場で測定する方法がないために研究が遅れている。そこで本研究では即時に細胞の老化度を測定できるシステムを開発することを目指した。老化に伴って量が変動するタンパク質を分裂酵母の全5,000種類のタンパク質から探し出した。それらに蛍光タンパク質を融合することにより、目的タンパク質の量を可視化し、老化度と蛍光強度が相関するものを見出した。その結果、細胞の蛍光輝度を測定するだけで老化度が測定できるようになった。

研究成果の概要(英文)：Chronological lifespan (CLS) is defined as the length of time a cell can survive without cell division, which may serve as a good model for studying the mechanisms regulating life span of differentiated cells that are generally non-dividing. Chronological age of cells has been estimated by measuring colony forming units of cells in stationary phase. However, this method is a very time-consuming and daunting task. To address this issue, we tried to develop molecular markers that can provide an indirect measure of chronological age of a cell using fission yeast. Using the strain collection, a set of strains that can express each of the fission yeast ORFs with small epitope tags, we identified proteins whose expression levels were altered according to the time in stationary phase. Tagging of these candidates with fluorescent proteins allows immediate measuring of cell age from the fluorescence intensity. These aging markers will help identify factors regulating CLS.

研究分野：分子生物学

キーワード：経時老化 リバースプロテオミクス

### 1. 研究開始当初の背景

我々は老化がどのようなことを意味しているのかを直感的には理解しているが、近年ようやく酵母や線虫、ショウジョウバエなどのモデル生物でその制御因子が少しずつ見え始めたに過ぎず、老化のメカニズムの大部分はまだ謎に包まれている。哺乳類に限らず、多くの生物で老化を遅らせ、寿命を延長させる唯一の確実な方法はカロリー制限であるが、この一見普遍的な現象の裏に潜む分子メカニズムについてもまだ諸説混沌としており、現在においても普遍的に説明できる仮説はない。

細胞の寿命には、一つの細胞が何回分裂するかで規定される「複製寿命」と、分裂を止めた状態でどれだけの期間生存できるかという「経時寿命」がある。複製寿命は幹細胞など生涯を通じて分裂を続ける細胞の寿命についての良いモデルである。一方で我々の皮膚や臓器など分化した細胞は通常もう分裂しない。経時寿命はこれら分裂しない細胞の寿命制御機構を研究する良いモデルであるが、その研究は複製寿命に比べて遅れている。経時寿命は増殖を停止させた細胞集団を増殖可能な条件に戻した時に再び増殖できる細胞の割合(コロニー形成率)で測定するため、その場ですぐに老化度を知ることができず、いちいち細胞をプレートに蒔いてコロニー数を測るために操作が面倒で時間を要する。これが経時老化研究を遅らせている主要な原因と考えられる。

### 2. 研究の目的

細胞の経時老化の度合いが即時に測定可能になれば、例えば全遺伝子破壊株を用いて経時老化に影響を及ぼす遺伝子を探索するなど、大規模なスクリーニングも可能になると期待される。そこで本研究では、経時老化に伴ってレベルの変化するタンパク質を蛍光タンパク質で標識することにより、コロニー形成率を測定しなくても、蛍光強度を測定するだけで細胞の経時老化の度合いを即時に測定できる方法を確立する。

### 3. 研究の方法

以前に研究代表者らが構築した約5,000株からなる分裂酵母のタグ融合遺伝子発現株のセットを個々に飽和状態になるまで培養して分裂を停止させた後、そのまま培養して経時老化を進行させる。一定期間ごとに細胞を回収し、全細胞抽出液を調製した後、それらをメンブレンにスポットしたプロテインアレイを作製し、抗タグ抗体により各タンパク質の発現レベルを測定する。各時点のデータを比較し、有意な量的変化を示すタンパク質を見出す。これらの候補タンパク質について、遺伝子にGFP等を融合して可視化し、コロニー形成率で測定した細胞の老化度と、マーカーが発する蛍光強度が相関しているものを選び出す。老化に伴って量の増加・減少

するものそれぞれをGFPとRFP等、異なる色の蛍光タンパク質で標識し、1つの細胞で発現させ、2色の蛍光強度比を測定することで、他の内部標準を用いなくても老化の度合いを測定できるようにする。

### 4. 研究成果

分裂酵母の全ORFライブラリーを活かし、約5,000種類的全遺伝子産物を定常期において過剰発現させ、その後の経時老化に伴う発現レベルの変化をプロテインアレイを用いて測定した。このスクリーニングの結果、コロニー形成率が1割以下に低下する時点で発現レベルが顕著に変化したタンパク質として、増加・減少それぞれについて50種類以上のタンパク質を同定した。続いて、これらの中からさらに経時老化マーカーに適した動態を示すタンパク質を選択するため、各候補タンパク質をコードする遺伝子の3'末端に蛍光タンパク質をコードする遺伝子を融合させて発現させ、経時老化に伴う細胞の蛍光強度の変化を観察した他、ウェスタンブロットによって細胞内タンパク質レベルの変化も調べた。その結果、定常期にタンパク質レベルが増加していくタンパク質として2種類、減少していくタンパク質として5種類のタンパク質を最終候補として選択した。

一方で、定常期の培養時間に応じてmRNAの発現レベルが変化する遺伝子についてもDNAマイクロアレイを用いてスクリーニングした。その結果、細胞が飽和して増殖が停止した後、培養時間と共に発現レベルが増加・減少する遺伝子をそれぞれ多数見出した。これらの遺伝子のいくつかについてプロモーター領域をクローニングし、蛍光タンパク質のORFにつないで経時老化時の蛍光強度を調べたが、どれも経時老化との相関が見られなかったことから、転写レベルに基づいたマーカーは経時老化の場合は適さないことがわかった。

以上の結果を元に、タンパク質レベルに基づいて得られたマーカーの候補について、経時老化に伴いレベルが上昇するタンパク質の遺伝子にGFPを、低下するタンパク質をコードする遺伝子にRFPを融合させ、1つの株で発現させることにより、2つの蛍光タンパク質の蛍光強度比が細胞の老化の度合いに応じて変化する老化マーカーを作製した。これにより、細胞の発する蛍光強度を測定するだけで即時に細胞の老化度がわかるようになった。現在、この株を元に経時老化に影響を与える遺伝子のスクリーニングを行っている。

### 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 2 件)

1. SUMOylation regulates telomere length by targeting the shelterin subunit Tpz1/Tpp1 to modulate shelterin-Stn1 interaction in fission yeast.

Miyagawa K, Low RS, Santosa V, Tsuji H, Moser BA, Fujisawa S, Harland JL, Raguimova ON, Go A, Ueno M, Matsuyama A, Yoshida M, Nakamura TM, Tanaka K.

**Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A.**, 2014; 111(16): 5950-5.

doi: 10.1073/pnas.1401359111.( 査読有 )

2. Cross-species protein interactome mapping reveals species-specific wiring of stress response pathways.

Das J, Vo TV, Wei X, Mellor JC, Tong V, Degatano AG, Wang X, Wang L, Cordero NA, Kruer-Zerhusen N, Matsuyama A, Pleiss JA, Lipkin SM, Yoshida M, Roth FP, Yu H.

**Science Signaling**, 2013; 6(276): ra38.

doi: 10.1126/scisignal.2003350.( 査読有 )

[学会発表](計 9 件)

1. 岡本 真也、松山 晃久、吉田 稔  
「 Extracellular Acetate Extends Chronological Lifespan of Fission Yeast 」  
2015 年 1 月 7 日 The 1st CSRS-ITbM Joint Workshop  
名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所、名古屋
2. 福島 玲奈、松山 晃久、吉田 稔  
「 分裂酵母における新規経時寿命測定法の開発 」  
2014 年 11 月 26 日 第 37 回日本分子生物学会年会  
パシフィコ横浜、横浜

3. 松山 晃久  
「 全タンパク質の電気泳動度データベース : Mobilitome 」

2014 年 10 月 25 日 第 65 回 日本電気泳動学会総会 シンポジウム  
横浜情報文化センター、横浜

4. 福島 玲奈、松山 晃久、吉田 稔  
「 分裂酵母の新規経時寿命測定法の開発 」

2014 年 9 月 2 日 酵母遺伝学フォーラム第 47 回研究報告会  
東京大学弥生講堂、東京

5. Fukushima R, Matsuyama A  
「 Development of protein markers for chronological aging 」

2014 年 4 月 21 日 The 3rd RIKEN-SNU Workshop on Chemical Biology for Health and Resource Sciences  
ホテルメトロポリタン、東京

6. 近藤 直子、白井 温子、夏目 徹、浜本 牧子、松山 晃久、吉田 稔  
「 eIF5A による発現制御を受けるタンパク質の網羅的探索 」

2014 年 3 月 30 日 日本農芸化学会 2014 年度大会  
明治大学、川崎

7. 福島 玲奈、松山 晃久、吉田 稔  
「 分裂酵母における経時老化マーカーの開発 」

2013 年 3 月 27 日 日本農芸化学会 2013 年度大会  
東北大学、仙台

8. 近藤 直子、白井 温子、夏目 徹、浜本 牧子、松山 晃久、吉田 稔

「リバースプロテオミクスを用いた  
eIF5A におけるハイブシン化の機能解  
析」

2013年3月27日 日本農芸化学会2013  
年度大会  
東北大学、仙台

9. Akihisa Matsuyama, Minoru Yoshida  
「Reverse proteomics in fission yeast」  
2012年9月28日 The Second Annual  
Meeting for Whole-Organism Science  
Society  
RIKEN Spring-8, Sayo-cho, Sayo-gun,  
Hyogo

〔図書〕(計 2 件)

1. 松山 晃久、白井 温子、吉田 稔  
「全タンパク質の電気泳動度データベ  
ース：Mobilitome」  
生物物理化学 電気泳動, 58(2): 89-91,  
2014.
2. 松山 晃久  
「トラポキシン B：全合成からエピジ  
ェネティクスまで」  
ケミカルバイオロジー 成功事例から  
学ぶ研究戦略, pp.153-163, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

1. 「How yeast responds to change」  
2013, Research Highlight: Biology,  
RIKEN RESEARCH.  
<http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/research/7169.html>
2. 「長寿遺伝子を網羅的に探し出す」  
2012, 理研ニュース 2月号 SPOT  
NEWS.
3. 「老化に関わる遺伝子を網羅的に探し  
出す」  
2012, 独立行政法人理化学研究所 基幹研  
究所リーフレット No.3  
<http://www.asi.riken.jp/jp/publications/leaflet/number3/matsuyama/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松山 晃久 (独立行政法人理化学研究  
所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員)

研究者番号：90399444

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：