

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580142

研究課題名(和文)カルシウムシグナル伝達に関わる因子による酵母の寿命制御

研究課題名(英文)Analysis of lifespan regulation mediated by calcium signaling in yeast

研究代表者

水沼 正樹 (Mizunuma, Masaki)

広島大学・先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：10343295

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)：真核生物ではカルシウムイオン(Ca²⁺)は、生体で様々な重要な機能を担っている。我々はすでに取得しているCa²⁺耐性変異株を用いてその寿命を測定した(scz1~14)。幾つかの変異株の寿命が延長した。中でもカルシニューリン変異株(scz4)の寿命が延長したことから、この原因を調査中である。一方、sah1-1/scz7変異株は顕著に短命であった。この表現型を利用して長寿変異株のスクリーニングを実施した。取得した変異株をSSG1と命名した。SSG1変異株は野生株よりも長寿となった。このことからSSG1は長寿に関わる遺伝子と予想され、現在この原因を解析中である。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotic cells, the calcium ion (Ca²⁺) is involved in the regulation of various cellular functions as a signal molecule. We have conducted a life span analysis using all identified scz mutants of yeast. We measured the CLS (the length of time that a mother cell can survive in a non-dividing, quiescence-like state) of scz1-14 mutants. Some mutants extended CLS. One of the long-lived mutants was the cnb1/scz4 strain. The CNB1 encodes the regulatory subunit of CN. We are currently investigating how the CN affects life span. On the other hand, we found that a mutation of S-adenosylhomocysteine (SAH) hydrolase, sah1-1/scz7, affected cell growth and CLS. Thus, we have isolated the long-lived mutant by screening for the suppression of the growth defect of the sah1-1 mutant. This mutation was named SSG1. The SSG1 single mutant was shown to have a longer CLS than a wild-type yeast. Therefore, the Ssg1 protein is predicted to be a factor in longevity. We are investing this phenotype.

研究分野：分子生物学

キーワード：老化 寿命 カルシウム

1. 研究開始当初の背景

寿命研究は、生物学的老化の仕組みを明らかにするのみならず、ヒトの老化を理解し、“健康寿命”の延長を実現するうえで極めて重要な課題である。老化過程は非常に複雑なプロセスであるが、その謎が遺伝子レベルで理解されつつある。近年、酵母、線虫、ショウジョウバエ、マウスなどのいわゆる真核モデル生物を用いた老化・寿命研究が世界中で活発に行われている。実際、これらモデル生物を用いた研究によって、多くの寿命制御因子が同定され、老化の基本的な仕組みには共通点が多いことが明らかになった (Fontana *et al.*, *Science*, 328, 321-326, 2010)。

一方、ヒトの早老症モデルマウスにおいて、 Ca^{2+} 恒常性維持に異常が生じている事も報告されている。しかしながら、老化の原因(シグナル)やいつ・どこで寿命が決定されるのか(シグナルの活性化機構)などの詳細は、不明な点が多い。老化・寿命研究において、とりわけ、酵母は、ゲノム情報が整備され、分子遺伝学が駆使でき、さらに寿命が短いことから寿命研究に適している。実際、寿命研究において酵母を用いた研究がそのブレイクスルーとなっている。

これまでに、私は、出芽酵母を用いて Ca^{2+} シグナル伝達に関わる生理機能の解析を行ってきた。特に、酵母の Ca^{2+} シグナルがカルシニューリン(Ca^{2+} 依存性プロテインホスファターゼ)活性化を介し、細胞周期 G_2 期停止及び芽の極性成長を誘導することを見出し、機構の概容を明らかにした(Mizunuma *et al.*, *Nature*, 392, 303-306, 1998)。さらに、本制御機構に携わる機能分子を同定するため、 Ca^{2+} 耐性を指標に変異株を網羅的にスクリーニングし、取得された約 500 株の変異株を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 (Mizunuma *et al.*, *EMBO J.*, 20, 1074-1085, 2001 他多数)。その結果、 Ca^{2+} シグナル伝達に関与するシグナル伝達経路の同定および細胞周期・増殖制御機構はほぼ解明

できた。最近の解析から、*scz14* はストレス応答や寿命にも関与することが報告されたテロメアサイレンサー Sir3 における変異であった。また、Sir2 も Ca^{2+} シグナル伝達に関与することが示唆された。

Sir2 は酵母からマウスなど高度に保存された寿命決定因子として著名である(これに関して、最近ハエ・線虫では遺伝的バックグラウンドを揃えると Sir2 高発現による寿命延長が再現されないことから、Sir2 が長寿遺伝子かどうか議論されているところである、Burnett *et al.*, *Nature*, 477, 482-485, 2011)。まず、 Ca^{2+} の寿命に対する影響を調べた。その結果、カルシニューリン調節サブユニット *CNBI* の破壊株の寿命は短縮し、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、細胞内の Ca^{2+} ホメオスタシスの破綻が寿命の短縮を導くことを発見した。一方、興味深いことに、細胞内 Ca^{2+} 濃度が高くさらに寿命の短い $\Delta zds1$ 株においては、*CNBI* 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。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(Tsubakiyama *et al.*, *J. Biol. Chem.* 286, 28681-28687, 2011)。予備的な解析から、すべての *scz* 破壊株/変異株は野生株と比較して寿命が短かった。以上、 Ca^{2+} シグナル伝達系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。

2. 研究の目的

Ca^{2+} シグナル伝達のみならず生理機能の全体像の解明を目指す。特に本研究では、 Ca^{2+} シグナル系で機能することが予想される分子による寿命制御の解明を行う。私は、 Ca^{2+} シグナル伝達に関わる細胞増殖制御の解析を一貫して行い、その解析過程で、 Ca^{2+} シグナルは寿命制御にも関与することを見出した。 Ca^{2+} シグナルによる寿命制御の分子機構は未解明な部分が多い分野なので、酵母を用

いて寿命を制御する因子を同定し、その分子機構を細胞内シグナル伝達ネットワークの解明を通して理解することを目的とする。

3. 研究の方法

この目標達成のための研究の流れは、(1) 寿命を制御するシグナル伝達経路の同定 (SCZ による寿命制御機構の解明および *scz* 変異株を利用した新規寿命関連因子の同定)、さらに(2) これらシグナル伝達系の活性化機構の解明、である。

研究方法は、SCZ (Ca²⁺シグナル伝達変異) が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、さらに寿命制御に関わる新規因子を同定する。既知の寿命制御因子との相互作用を調べる。また、寿命制御に関わるシグナルも同定し活性化機構も解明する。

4. 研究成果

scz 変異株は 14 の遺伝子座に分類されており、全ての株について寿命を測定した結果、殆どの変異株は寿命が短いことがわかった。中でも、*sah1/scz7* は顕著に短命となった。一方、長寿となった株は 2 つ存在し、*cnb1/scz4* (カルシニューリン) および *sir3/scz14* (遺伝子のサイレンサー因子) 破壊株が長寿となった。以上のことから、SCZ 遺伝子のその殆どが寿命に何らかのかたちで関わるということが分かった。

まず、*cnb1* 破壊株の経時的寿命が延長した原因を探ることにした。これまでに Tor1 経路の欠損が長寿になることがよく知られていることから、*tor1* との二重破壊株を構築し、現在それらの寿命、ストレス耐性等、調べている。

先述した顕著に短命となった *sah1* 変異株についても解析を進めた。長寿の仕組みを明らかにするためには長寿変異株を取得することが有効と考え、*sah1* 変異株が示す緩慢な増殖を抑圧する変異株を取得することにより、長寿遺伝子の取得を試みた。その結果、

増殖が良好となった優性変異株が取得され、その寿命を測定したところ、野生株と比較して顕著に寿命が延長していたことから、目的の長寿変異株のスクリーニングに成功した(優性変異株を *SSG1* と命名、未発表)。現在、本株を用いて長寿になった原因を詳細に解析中である。

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 10 件)

以下 10 件、全て査読有

1. Tamura H, Okada H, Kume K, Koyano T, Goshima T, Nakamura R, Akao T, Shimoi H, Mizunuma M, Ohya Y, Hirata D. Isolation of a spontaneous cerulenin-resistant sake yeast with both high ethyl caproate-producing ability and normal checkpoint integrity. **Biosci Biotechnol Biochem.**, in press

2. Kume K, Koyano T, Takata J, Wakabayashi K, Mizunuma M, Miyakawa T, Hirata D. Screening for a gene deletion mutant whose temperature sensitivity is suppressed by FK506 in budding yeast and its application for a positive screening for drugs inhibiting calcineurin. **Biosci Biotechnol Biochem.**, in press

3. Mizunuma M*, Neumann-Haefelin E, Moroz N, Yujie L, T., Blackwell TK*. mTORC2-SGK-1 acts in two environmentally-responsive pathways with opposing effects on longevity. **Aging Cell**, 13, 869-878 (2014)
*Corresponding authors

4. Anzawa Y, Satoh K, Satoh Y, Ohno S, Watanabe T, Katsumata K, Kume K, Watanabe K, Mizunuma M, Dai Hirata. Late-maturing cooking rice *Sensyuraku* has excellent properties, equivalent to sake rice, for high-quality sake brewing. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 78, 1954-1962 (2014)

5. Mizunuma M*, Tsubakiyama R, Ogawa T, Shitamukai A, Kobayashi Y, Inai T, Kume K, Dai Hirata. Ras/cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulates multiple aspects of cellular events by phosphorylating the Whi3 cell cycle regulator in budding yeast.

J. Biol. Chem., 288, 10558-10566 (2013)

*Corresponding author

6. Mizunuma M*, Ogawa T, Koyama T, Shitamukai A, Tsubakiyama R, Komaruyama T, Yamaguchi T, Kume K, Hirata D. Evidence of antagonistic regulation of restart from G₁ delay in response to osmotic stress by the Hog1 and Whi3 in budding yeast.

Biosci. Biotechnol. Biochem., 77, 2002-2007 (2013)

*Corresponding author

7. Anzawa Y, Nabekura Y, Satoh K, Satoh Y, Ohno S, Watanabe T, Kaneoke M, Kume K, Mizunuma M, Watanabe K, Katsumata K, Hirata D.

Polishing properties of sake rice Koshitanrei for high-quality sake brewing.

Biosci. Biotechnol. Biochem., 77, 2160-2165 (2013)

8. Kume K, Kubota S, Koyano T, Kanai M, Mizunuma M, Toda T, Hirata D.

Fission yeast leucine-rich repeat protein Lrp1 is essential for cell morphogenesis as a component of the morphogenesis Orb6 network (MOR).

Biosci. Biotechnol. Biochem., 77, 1086-1091 (2013)

9. Aburai N, Yoshida J, Kobayashi M, Mizunuma M, Ohnishi M, Kimura K.

Pisiferdiol restores the growth of a mutant yeast suffering from hyperactivated Ca²⁺ signalling through calcineurin inhibition.

FEMS Yeast Res., 13, 16-22 (2013)

10. Robida-Stubbs S, Glover-Cutter K, Lamming DW, Mizunuma M, Narasimhan SD, Neumann-Haefelin E, Sabatini DM, Blackwell TK.

TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO.

Cell Metab., 15, 713-724 (2012)

〔学会発表〕(計6件)

1. (招待講演) 水沼 正樹 「酵母におけるS-アデノシルメチオニンによる寿命制御
日本農芸化学会 2015 年度大会(2015 年 3 月 29 日、岡山大学)」

2. (招待講演) 水沼 正樹 「線虫の mTORC2 を介した寿命制御」
第 9 回遺伝子栄養学研究会 (2014 年 9 月 19 日、札幌北広島クラッセホテル)

3. (招待講演) 水沼 正樹 「酵母の高浸透圧ストレスに対する適応戦略」
第 65 回日本生物工学会大会シンポジウム

(2013 年 9 月 20 日、広島国際会議場)

4. M. Mizunuma, E. Neumann-Haefelin, N. Moroz, K. Blackwell. TORC2 regulates SGK-1 in two opposing longevity pathways.
19th International C. elegans Meeting, 2013 年 6 月 26 日~6 月 30 日, University of California, CA (USA)

5. M. Mizunuma, R. Tsubakiyama, D. Hirata. cAMP/PKA regulates multiple aspects of cellular events by phosphorylating Whi3 in yeast.

2012 CSHL Meeting on Molecular Genetics of Aging, 2012 年 10 月 9 日~10 月 13 日, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (USA)

6. (招待講演) 水沼 正樹 「モデル生物(酵母と線虫)を用いた寿命研究」
第 20 回酵母合同シンポジウム(2012 年 9 月 7 日、京都大学)

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ

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

広島大学健康長寿研究拠点

<http://hiha.hiroshima-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

水沼 正樹 (MIZUNUMA MASAKI)

研究者番号 : 10343295