

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840080

研究課題名(和文)細胞老化を引き起こす老化タンパク質の不均衡分配メカニズムの解明

研究課題名(英文)The molecular mechanism of asymmetric inheritance of damaged proteins.

## 研究代表者

鈴木 元治郎(Suzuki, Genjiro)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：60466034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：種々の疾患の原因となると考えられる細胞老化のメカニズムを解明するため、本研究では、Mlpタンパク質に着目して老化タンパク質の蓄積と不均衡分配に関する研究を行った。mlp変異株では老化タンパク質の不均衡分配ができなくなり、寿命が低下することを明らかにした。また、Mlpタンパク質は老化タンパク質凝集体と共局在することも明らかとした。以上より、Mlpタンパク質は老化タンパク質を母細胞に保持することによって娘細胞を新鮮に保つのに必要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism of cellular aging, I focused on Mlp proteins and investigated the molecular mechanism of asymmetric inheritance of damaged protein aggregates. I found the mlp mutant strain of budding yeast showed defects in asymmetric inheritance of damaged protein aggregates and prion propagons and shorter life span. I also found Mlp proteins co-localized with damaged protein aggregates. Thus, Mlp proteins must be scaffolds of aggregated proteins in mother cells and retain these aggregates in mother cells to keep the daughter cells fresh.

研究分野：遺伝学

キーワード：細胞老化 プリオン

## 1. 研究開始当初の背景

出芽酵母は真核生物のモデル生物として多くの生命現象の解明に寄与しており、単細胞生物ながらも老化現象を示すことや、Sir などの老化に關与する遺伝子の保存性などから老化研究にも広く利用されてきた。出芽酵母は、不均等分裂によって母細胞が娘細胞を作り出し増殖するが、一つの母細胞は約 30 回娘細胞を作り出し分裂を停止する。一方、娘細胞は母細胞の老化状態に關係なく、新たに 30 回程度分裂することができる。これは分裂する際に娘細胞に若返り現象が起き、母細胞の老化程度に關係なく娘細胞は老化する前の状態になるためであると考えられる。つまり、母細胞に老化を促進するような物質が蓄積することによって、娘細胞がフレッシュな状態に保たれると考えられる。近年、老化タンパク質の母細胞への蓄積が細胞老化を促進する主要な要因である可能性が指摘されている。酸化などによってダメージを受けたタンパク質は、プロテアソームなどにより分解されるが、分解されずに蓄積した老化タンパク質が細胞内には残在する。それらの老化タンパク質は母細胞へと保持されることにより、母細胞に不均等に蓄積し、ゲノムの不安定化などの老化現象が引き起こされ、母細胞でのみ細胞老化が促進されると考えられる。

## 2. 研究の目的

細胞老化の主要な原因の一つとして「老化タンパク質の蓄積」が考えられている。本研究では、老化タンパク質の古い細胞への不均等分配に着目して、細胞老化の原因である老化タンパク質の蓄積のメカニズムを解明し、細胞が細胞老化を阻害するメカニズムを解明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

本研究では、核膜孔複合体の構成タンパク質である Mlp タンパク質に着目して老化タンパ

ク質の蓄積と不均等分配に関するメカニズムの解明を試みた。まず、Hsp104 などの老化タンパク質凝集体マーカーと Mlp タンパク質が相互作用・共局在しているかを調べた。また、*mlp* 変異株を作成し、老化タンパク質の分配、寿命などを調べた。老化タンパク質の母細胞への保持と不均等分配に関しては、酵母プリオンの系を利用して定量化することも試みた。また、プロテアソームの活性を比較することによって、Mlp タンパク質が細胞内タンパク質恒常性の維持に關与しているかを調べた。

## 4. 研究成果

老化タンパク質と同様にタンパク質の凝集体からなるプリオンに着目し、プリオン化酵母を利用してプリオン凝集体に結合しているタンパク質の同定を試みた。プリオン化した酵母において、GFP タグをつけたプリオン原因タンパク質を過剰発現し、凝集体を FACS によって集め、集めた凝集体に含まれるタンパク質を質量分析によって同定したところ、複数のプリオン化酵母において核膜孔の構成因子である Mlp タンパク質(Mlp1 と Mlp2)が同定された。タンパク質の凝集体のマーカーである Hsp104 シャペロンおよび Sis1 シャペロンと Mlp タンパク質の細胞内局在を調べたところ、Hsp104 の凝集体は Mlp タンパク質とおそらく核の内側で共局在していることがわかりました。また、Mlp タンパク質はこれらのタンパク質凝集体マーカーと結合していることも免疫沈降によってわかりました。これらの結果から Mlp タンパク質が老化タンパク質凝集体形成の足場となっている可能性が示唆されました。つぎに Mlp の変異株を作成し、解析しました。Mlp1 と Mlp2 は相同な機能をもっているため、*mlp1mlp2* 二重破壊株を作成し解析を行った。二重破壊株において Hsp104 凝集体の母細胞と娘細胞における局在を調べました。Hsp104

凝集体は野生株ではほとんどが母細胞に局在するのに対し、mlp1mlp2 二重変異株では娘細胞での局在がみられた。それぞれの局在を定量したところ野生株では 90%以上が母細胞に局在するのに対し、mlp1mlp2 二重変異株では 50%程度に低下し、凝集体がランダムに局在するようになったと考えられる。二重破壊株に MLP1 を相補すると局在は回復しました。このことから Mlp タンパク質はタンパク質凝集体の不均等分配に必要であると考えられる。次に、酵母プリオン[PSI+]を利用して、プリオン凝集体の分配をしらべた。野生株ではプリオン凝集体は母細胞へ不均等に分配されるが、二重破壊株では母細胞への不均等な分配が失われることを明らかにした。このことから Mlp タンパク質はプリオン凝集体の不均等分配にも必要であることが明らかとなった。次にタンパク質凝集体の酵母細胞内での挙動を FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) および FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching) で調べた。[PSI+]プリオン化酵母において、原因タンパク質である Sup35 は凝集体を形成している。そこで Sup35 凝集体の娘細胞への流れ込みを FRAP によって調べたところ、野生株に比べて二重変異株では娘細胞への凝集体の流入が増加していることが明らかになった。また、細胞内の凝集体の挙動を FLIP によって調べたところ、二重変異株では細胞内のタンパク質凝集体の運動性が増加していることが明らかとなった。また、G76V 変異ユビキチンを発現することによってプロテアソームの活性を検討したところ、二重変異株ではプロテアソームの活性が著しく低下していることが示唆された。これらのことから、二重変異株では細胞内の凝集体の挙動が変化しており、娘細胞に流入しやすくなっていると考えられる。次に二重変異株における細胞寿命をマイクロマニピュレーション法および MEP(Mother Enrichment Program)酵母株

を利用した方法によって調べたところ、どちらの場合でも二重変異株では著しく細胞寿命が低下することが明らかとなった。また、細胞寿命の低下は Hsp104 シャペロンの過剰発現によって相補されることが明らかとなった。以上のことから、二重変異株では細胞内のタンパク質恒常性が異常となっており、細胞寿命の低下や娘細胞へのタンパク質凝集体の異常な流入が起こっていると考えられる。

本研究によって老化タンパク質の母細胞への不均等な分配に核膜孔タンパク質が重要であることが示唆された。Mlp タンパク質の哺乳類ホモログである Tpr のノックダウンによって老化現象が誘導されるという報告もあり、核膜孔複合体が細胞内タンパク質の恒常性の維持に関与し、老化を抑制している可能性があると考えられる。細胞老化のメカニズムを解明することは、老化と共に発症リスクが増加する種々の病気の発症メカニズムの解明や治療法の開発にも応用できると考えられ、本研究成果は学術的な面だけでなく医学的な面にも発展する可能性がある。

## 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 3 件 )

(1) Suzuki G, Tanaka M.

Expanding the yeast prion world:

Active prion conversion of non-glutamine/asparagine-rich Mod5 for cell survival. Prion.

査読有 7(2): 109-13. (2013)

(2) Suzuki G, Tanaka M.

Active prion conversion as a molecular switch for cellular adaptation to environmental stress.

Bioessays. 査読有 35 (1): 12-6. (2013)

(3) 鈴木元治郎・田中元雅

新規な酵母プリオンタンパク質 Mod5 の凝集  
が生存に有利に働くことを発見

化学と生物 査読有 Vol51, No.4,(2013)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 鈴木元治郎, 田中元雅

プリオン現象を利用した酵母の新たな抗ウ  
イルス作用機構

日本生化学会大会 シンポジウム 2014 年  
10 月 17 日 「国立京都国際会館 (京都府・  
京都市)」

(2) Genjiro Suzuki, Motomasa Tanaka

The mechanism of asymmetric distribution of  
prion protein in the yeast cell.

Asian Pacific Prion Symposium 2013 (アジア  
太平洋プリオンシンポジウム 2013) 2013  
年 7 月 22 日 「ハウステンボス (長崎県・佐  
世保市)」

(3) 鈴木元治郎, 田中元雅

酵母における老化タンパク質凝集体の不  
均等分配のメカニズム

日本細胞生物学会年会 シンポジウム 2013  
年 6 月 21 日 「ウインクあいち (愛知県・  
名古屋市)」

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 元治郎 ( Suzuki Genjiro )

独立行政法人理化学研究所 脳科学総合  
研究センター 研究員

研究者番号 : 60466034