

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14449

研究課題名(和文) 哺乳類低容量ストレス応答の分子機構とその生物学的意義

研究課題名(英文) Identification of low-dose stress-responsive pathways

研究代表者

石川 冬木 (Ishikawa, Fuyuki)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：30184493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生物が生存する環境は常に変動している。通常、その変化は僅かなものであるため、それを意識することはないが、そのような低いレベルでのストレスが生物機能の維持、生物の生存に重要な役割を果たす可能性を明らかにすることを目的として研究を行った。分裂酵母変異株ライブラリーをスクリーニングし、強い熱ストレスには野生型同様抵抗性を示すが、弱い熱ストレスには感受性を示す変異株を得て、その責任変異遺伝子を同定した。このことは、弱いストレスに特異的に反応するストレス応答経路の存在を示唆する。

研究成果の概要(英文)：All organisms live in ever-changing environments. Subtle environmental stresses, although not recognized consciously, may alert organisms to prepare for prospective severe stress. This study is aimed for elucidating molecular pathways, if any, that recognizes low-dose stress, which causes adaptive response in organisms. We have screened fission yeast a mutant library for mutants that are resistant to severe stress, but sensitive to low-dose stress. We have identified mutants and their responsible genes. These results suggest that there is pathways that respond specifically to low-dose stresses.

研究分野：分子生物学、遺伝学、腫瘍学

キーワード：ストレス反応 分裂酵母 変異体スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

ストレスは、細胞死をもたらすような強いストレスもあれば、四季のうつろいのようにともすると意識にのぼらない弱いストレスもある。また、環境変化が緩徐あるいは急速におこるようなストレス印加速度の高低がありうる。古くより、同じ種類のストレスが、その強度が強い場合には生体に細胞死などの悪影響(負の適応度)をもたらしても、弱い場合には有益な影響(正の適応度)を与える場合があることが指摘され、そのような低容量ストレスが生体の生存に有利に作用することはホルメシス(hormesis)と呼ばれてきた。数多くの化合物、生理活性物質、電離放射線などの物理的刺激が、高容量では細胞・生体の生存を低下させるものの、低容量ではむしろ向上させることが報告されているが、その分子基盤は不明である。

ホルメシス効果から示唆されることは、生体・細胞には、表現型として変化が現れないような弱いストレスを感知する仕組みがあり、それが引き続く強いストレスに抵抗性を与えることがあるということである。しかし、ホルメシス効果の分子機構はそのほとんどが未解明のままである。その理由として、ホルメシスでいうところの「弱いストレス」が、生体・細胞に細胞死や増殖抑制のような明らかな表現型を与えるものではなく、「弱いストレスを感知する」ことを表現型から判断することが難しいためである。

2. 研究の目的

ホルメシスは、酵母、動物、植物など、さまざまな生物とストレスを用いた研究によって報告されており、それらに共通の分子機構があるのかどうかを明らかにすることは、ヒトのホルメシス効果の有無を検討する上で重要である。特に、近年、低容量放射線被曝後の発がんを含めた生体効果に閾値があるのか、閾値なしの線形関係にあるのか、あるいはホルメシス関係が認められるのかは、社会的にも大きな問題となっている。本研究は、低容量ストレスに対する生体応答を分子レベルで解明しようとするものである。そこで本研究では、以下の二点を目的とする。

①ストレスを定量的に負荷した場合の、細胞が示すストレス応答を定量的に測定する実験系を確立する。

②哺乳類生物の低容量ストレス応答機構を分子レベルで理解し、それが生物学的に重要な役割を果たしているか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

獲得耐性は、出芽酵母やヒト培養細胞において報告があるが、獲得耐性に関わる遺伝子は知られていないため、そのような遺伝子を同定するために遺伝学的実験が可能な生物種を使うこととした。出芽酵母のクロマチン制御は、ヒストン修飾など高等真核生物と異なる点が多いため、その点でよりヒトと類似し

ている分裂酵母をモデルとすることにした。既に、分裂酵母においても獲得耐性が機能することを確認している。分裂酵母に変異原であるニトロソグアニジン作用させた変異ライブラリーを作成し、獲得耐性がおこらない変異株を複数同定した。その結果、分裂酵母ヒストンシャペロン HIRA 複合体が獲得耐性に必要なことを見出した(Chujo, M. et al. *J Biol Chem.* 287: 23440-50, 2012)。そこで、本研究では、分裂酵母を用いて、ストレスを定量的に負荷した場合の細胞が示すストレス応答を定量的に測定する実験系を確立し、それを哺乳類細胞に応用する。

4. 研究成果

①新たな分裂酵母獲得耐性欠損株の取得

既に、分裂酵母を用いた獲得耐性欠損株の解析から HIRA 複合体の 1 構成成分をコードする *slm9* 遺伝子を取得している。獲得耐性をもたらす経路を同定するために、これ以外の獲得耐性に必要な遺伝子のスクリーニングを突然変異株ライブラリーを用いて実施した。その結果、一つの候補変異株 A を得た。野生型細胞との戻し交配の結果および四分子解析の結果、その変異株の責任遺伝子は単一遺伝子の劣性変異であることが分かった。しかし、詳細な解析の結果、本変異株は獲得耐性が正常であることが分かったが、興味深いことに、変異株 A は、47°C 2 時間の強いストレスには抵抗性であるが、37°C で持続培養する低容量ストレス(分裂酵母の至適培養温度は 30~32°C)には感受性であった。このことは、強いストレスと弱いストレスに対して同じストレス反応経路が強弱をもって反応するばかりでなく、弱いストレスに特異的に反応する経路があることを示唆している。

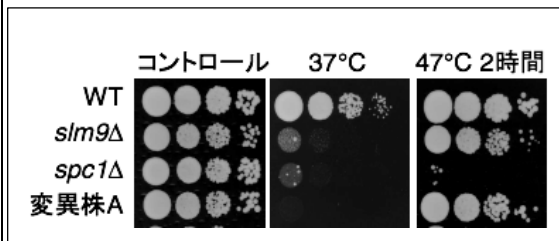


図1 低容量ストレス特異的な経路の存在
*slm9Δ*は獲得耐性変異株、*spc1Δ*は全てのストレスに対する感受性株。

②弱いストレスに対して特異的に反応する経路の解析

弱いストレスに特異的に反応する経路は従来知られていなかったため、その経路に関するさらなる知見を得る目的で、強いストレスには感受性を示さないが、弱いストレスに特異的に感受性を示す変異体を、変異体ライブラリーのスクリーニングによってさらに同定することを試みた。

ライブラリーをプレーティングしてレプリ

カをとり、第一のレプリカプレートはストレスなし、第二は37°Cで3日間、第三は47°Cで2時間培養した後、32°Cで3日間培養を続けた。47°C処理ではコロニーを形成できるが、37°C培養では形成できない株を同定し、15株の低容量ストレス感受性株を得た。それぞれ野生株と戻し交配、四分子解析を行った。その結果、15株の変異株を得ることができた。図2にその一部の表現型を示す。変異株B~Eは、47°C処理では野生株(WT)と同程度にコロニーを形成するが、37°C培養では少ない数のコロニーしか形成していない。

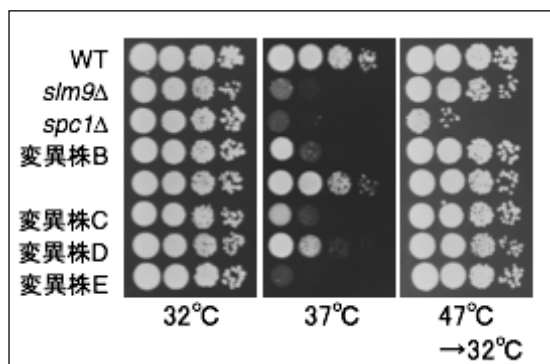


図2 低容量ストレス特異的に感受性を示す分裂酵母変異株の単離

これらの変異株を野生型細胞と戻し交配し、4分子解析によって親株と同じ表現型を示す細胞を同定した。その結果、これらは全て単一遺伝子の劣性変異による変異体であることが明らかになった。飯田哲史博士(東京大学・分子細胞生物学研究所)との共同研究により、それぞれの変異株のゲノム配列を次世代シーケンサーによって解読し、変異遺伝子と変異の詳細を同定した。

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. Hirai, Y., Tamura, M., Otani, J., and Ishikawa, F. (2016). NEK6-mediated phosphorylation of human TPP1 regulates telomere length through telomerase recruitment. *Genes Cells*, 21(8): 874-889. doi: 10.1093/nar/gkw1176
2. Takikawa, M., Tarumoto, Y., Ishikawa, F. (2017). Fission yeast Stn1 is crucial for semi-conservative replication at telomeres and subtelomeres. *Nucleic Acids Res*, 45(3): 1255-1269. doi: 10.1111/gtc.12391

[学会発表] (計 23件)

1. 石川冬木 「染色体テロメアサーベイランス」生命科学研究所入試説明会、2015年5月16日(東京都、京都大学東京オフィス)
2. 石川冬木 「Refreshing telomeres」染色体研究の最前線 - Forefront of Chromosome Study、2015年8月10日(京都市、先端科学研究棟大セミナー室)
3. Fuyuki Ishikawa 「Telomere Refreshing」第2回 IFOM-京都大学 合同シンポジウム The 2nd IFOM - KU Joint Symposium 「Perspectives in cancer biology: Genomic variations and host-tumor interactions」、2015年10月6日~7日(京都市、芝蘭会館)
4. Fuyuki Ishikawa, Yusuke Shima, Yuzo Watanabe, and Mahito Sadaie 「Telomere Surveillance/テロメア・サーベイランス」第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日~10日(名古屋市、名古屋国際会議場)
5. 石川冬木 「Mitohormesis」島根大学大学院セミナー、2015年11月17日(島根県出雲市、島根大学大学院医学系研究科)
6. 石川冬木 「ミトコンドリア・核ゲノム相関による老化制御」国際高等研究所研究プロジェクト「クロマチン・デコーディング」、2015年12月19日~20日(京都府木津川市、国際高等研究所)
7. 石川冬木 「弱いストレスが惹起するもの：細胞老化とホルミーシス」第3回先端医工学研究センターシンポジウム、2016年3月4日(京都市、同志社大学今出川キャンパス 良心館)
8. 石川冬木 「ホルミーシスと老化」第2回 Geroscience Initiative Japan、2016年3月12日(大阪市、グランフロント大阪)

- ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター)
9. Yusuke Shima, Yuzo Watanabe, and Fuyuki Ishikawa 「CST complex in the base excision repair (BER) pathway」 EMBO conference on Telomeres, Telomerase and Disease, 2016年4月26日～5月1日 (Crowne Plaza Liège, Liege, Belgium)
 10. 石川冬木 「マイトホルミーシス (Mitohormesis)」第80回日本生化学会中部支部シンポジウム「先端生命科学与生化学」2016年5月21日 (三重県津市、三重大学講堂)
 11. Fuyuki Ishikawa 「テロメア DNA 結合蛋白質 CST の DNA 塩基除去修復における役割/ Telomere CST complex is required for DNA base excision repair (BER)」第18回生命科学研究科シンポジウム、2016年7月7日～8日 (京都市、芝蘭会館稲盛ホール)
 12. Fuyuki Ishikawa 「Mitohormesis in fission yeast」Growing Edge of Radiation Biology, from principles to applications, 2016年9月1日～2日 (京都市、コープイン京都)
 13. Masahiro Takikawa, Io Yamamoto, Fuyuki Ishikawa 「Stn1 functions at non-telomeric regions in fission yeast」Cold Spring Harbor Asia Conference 「telomere and telomerase」, 2016年9月5日～9日 (Suzhou, China, Worldhotel Grand Dushulake Suzhou)
 14. Fuyuki Ishikawa 「What is hormesis/ホルミーシスとは何か」第75回日本癌学会学術総会、2016年10月6日～8日 (横浜市、パシフィコ横浜)
 15. 石川冬木 「ホルミーシスと獲得耐性」第7回 名市大頭脳循環セミナー、2016年10月14日 (名古屋市、名古屋市立大学)
 16. Shoma Ishikawa and Fuyuki Ishikawa 「Cellular senescence in post-mitotic cells」第一回日仏交流ワークショップ「CELLULAR SENESENCE and AGING IN CANCER AND DISEASES」, 2016年10月31日～11月2日 (京都市、コープイン京都)
 17. 石川冬木 「ヒストンシャペロンHIRA因子による獲得耐性」ワークショップ「染色体研究の最前線」、2017年1月16日～17日 (大阪府吹田市、大阪大学生命機能研究科の生命システム棟セミナー室)
 18. 石川冬木 「ヒトの一生を科学する」東京で学ぶ 京大の知 シリーズ24、2017年2月1日 (東京都、京都大学東京オフィス)
 19. 石川冬木 「癌細胞がライオンに出会うとき」第106回サイテックサロン、2017年3月4日 (東京都、駒場ファカルティハウス1階セミナールーム (東京大学駒場キャンパス内))
 20. Fuyuki Ishikawa 「Fission yeast telomere-binding proteins Taz1 and Rap1 are required for preventing GCR (gross chromosomal rearrangements) formation」CSH telomere meeting, 2017年5月2日～5月6日 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA)
 21. 石川冬木 「Cellular Senescence in Post-mitotic Cells」東北大学知のフォーラムテーマプログラム"ASC"、2017年5月10日～5月12日 (東北大学加齢医学研究所)
 22. 石川冬木 「テロメア維持の分子機構: テロメレースとALT (alternative lengthening of telomeres)」第35回

日本脳腫瘍病理学会、2017年5月18日
～20日（栃木県総合文化センター）

23. 石川冬木「神経細胞の細胞老化」第17
回日本抗加齢医学会総会シンポジウム
「日本初！エイジング研究最先端！」、
2017年6月2日～3日（東京国際フォー
ラム）

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.lif.kyoto-
u.ac.jp/j/?post_type=labos&p=144&doing_w
p_cron=1497284584.8937160968780517578125](https://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/?post_type=labos&p=144&doing_wp_cron=1497284584.8937160968780517578125)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 冬木 (ISHIKAWA, Fuyuki)
京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：30184493

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし