

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18531

研究課題名(和文) 老化関連因子のイメージングによる細胞分裂寿命リセット機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of resetting replicative life span by imaging aging-associated factors

研究代表者

岡田 悟 (Okada, Satoshi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：30734488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母において、細胞分裂寿命に関わると考えられる種々のオルガネラそれぞれについて、特異的に局在するタンパク質のC末端を緑色または赤色の蛍光タンパク質でタグ付けすることにより、その挙動を追跡できる出芽酵母株を作出し、撮影条件の最適化を行った。長時間の経時生細胞イメージングを実施するため、マイクロ流路を用いた顕微鏡ステージトップ培養装置を導入し、装置上での孢子形成誘導条件を検討し、高効率かつ短時間で孢子形成を誘導できる条件を確立した。高輝度の新規蛍光タンパク質のBiFC化を行い、Sir2(出芽酵母の分裂寿命に強く関与していることが既知のタンパク質)を含むRENT複合体の可視化を実現した。

研究成果の概要(英文)：Budding yeast strains in which ageing-related organelles are visualized by C-terminal tagging with green or red fluorescent protein were constructed. Live cell imaging conditions for these strains were optimized. To achieve long-term time-lapse live cell imaging, a microfluidics-based stage top cell culture device was introduced on a microscope. On the device, cell culture conditions for high efficiency sporulation induction were optimized. By development of BiFC system of novel bright fluorescent protein, RENT complexes containing an ageing-related factor, Sir2, were successfully visualized in living yeast cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：出芽酵母 細胞老化 オルガネラ イメージング 孢子形成

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の老化は多くの生物で見られる普遍的現象である。多細胞生物個体のみならず、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をはじめとする単細胞生物も例外ではない。これら単細胞生物は細胞群として

は無限の増殖能を持つと考えられるが、個々の細胞に注目すれば、その分裂回数には限界がある(細胞分裂寿命)。この細胞分裂寿命を規定しているのはどのような因子であるのかについては未だ研究の途上にあるものの、細胞分裂を繰り返していく中で細胞に何らかのダメージ因子が蓄積し、最終的に細胞分裂ができなくなるといふ仮説が有力である。このようなダメージ因子の実体としては、ERCs (Extrachromosomal Ribosomal DNA Circles)、タンパク質凝集体、膜電位の低下したミトコンドリア、pH の上昇した液胞が候補として考えられている。

個々の細胞が老化していく中で、細胞群としての永続性を担保するためには、何らかの方法でこれらのダメージ因子を消去・排除する仕組み、つまり細胞の若返り機構が必要である。このような機構のひとつのあり方が、細胞分裂時のダメージ因子の非対称分配である。出芽酵母の場合、上述のダメージ因子は母細胞に偏って分配され、娘細胞には受け継がれないという現象が報告されている。すなわち、細胞分裂のたびにダメージ因子は母細胞のみに蓄積し、娘細胞は細胞分裂寿命がリセットされた状態で生まれてくる。ダメージ因子の非対称分配のメカニズム、およびこのメカニズムが機能しなくなった時の細胞分裂寿命への影響について知見が蓄積しつつある。

出芽酵母の生活環において、上記の非対称分配が成り立たないプロセスが存在する。配偶子形成(胞子形成)である。2倍体の出芽酵母は栄養源飢餓にさらされると減数分裂を経て4つの1倍体胞子を形成する。出芽酵母の胞子形成は、母細胞の内側に新規に4つの膜構造が作られるというものであり、栄養増殖時のような母細胞-娘細胞間の単純な極性関係は成立しない。この時、母細胞の細胞分裂寿命は胞子に受け継がれるのだろうか? Unal らによって、多数回の細胞分裂を経た母細胞に由来する胞子であっても、完全な細胞分裂寿命を持つことが報告されている (Science 332, 1554, 2011)。これはすなわち、胞子形成過程において、胞子(娘細胞)の細胞分裂寿命をリセットする機構が働いていることを意味する。また、Unal らは、老化した母細胞に蓄積していたタンパク質凝集体や ERCs といったダメージ因子が、胞子形成を経た娘細胞には受け継がれていないことも報告している。

胞子形成を経ることで ERCs やタンパク質凝集体が消失することは分かっているものの、そのメカニズムの詳細は不明である。また、膜電位の低下したミトコンドリアや pH

上昇を生じた液胞の胞子形成期の動態についてはそもそも観測がなされていない。老化関連因子のうち、液胞を除く3つについては、オートファジーによる分解・排除のメカニズムがあり得るが、オートファジーそのものが胞子形成にとって必要不可欠であるため、オートファジーの中核的因子の遺伝子破壊株を利用した解析は実現できない。

### 2. 研究の目的

本研究では、各老化関連因子を出芽酵母生細胞において可視化し、胞子形成期における時空間動態を定量的に観測することを第一の目的とする。これに加えて、老化関連因子の排除・消去に密接に関連していると考えられるオートファジー関連タンパク質も同時に可視化することで、老化関連因子とオートファジーの時空間的関連性を明らかにする。さらには、オートファジー中核因子の変異体ではなく、それぞれの老化関連因子の分解・排除に特異的に作用すると予想される変異体を利用することで、それぞれの因子の分解・排除経路を切り分けて解析することを試みる。将来的には、従来知見と本研究で得られた情報を統合し、栄養増殖期と胞子形成期の両方を包含した、老化関連因子の蓄積と消去によって説明・予測される細胞分裂寿命決定の定量的時空間モデルを構築することを目指したい。

### 3. 研究の方法

#### [細胞老化関連因子の可視化]

細胞の老化と関連した因子として、本研究においては、ERCs (Extrachromosomal Ribosomal DNA Circles)、タンパク質凝集体、ミトコンドリア膜電位、液胞内腔の pH の4つに注目する。

ERCs を可視化するにあたっては、lacO アレイと lacI-GFP の組み合わせを用いる。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、rDNA は第12番染色体上に約150コピーがタンデムリピートとして存在する。Miyazaki らの方法を用いることで、リピートに含まれるすべてのユニットに lacO アレイが含まれた細胞株を作出することができる<sup>1</sup>。この細胞株において lacI-GFP を発現させることによって、ゲノム上の rDNA およびそこから生じる ERCs を可視化することができると考えられる。この条件下において、ゲノム上の rDNA リピートと ERCs を空間的に区別することが困難な場合には、代替案として、rDNA リピートユニットと lacO アレイを含むプラスミドを用いる。プラスミドに leu2d 遺伝子を搭載しておけば、培地からロイシンを抜くことでプラスミドのコピー数を人為的に増加させ、細胞老化による ERCs の蓄積をミミックすることができるのに加えて、lacI-GFP によってこのプラスミドのみ(=人工的に作りだした染色体外の rDNA 配列)のみを可視化することが可能である。

熱ショックやタンパク質の折り畳み障害を始めとするストレスによってタンパク質凝集体が生じることが既知であり、このタンパク質凝集体は細胞の老化によっても蓄積を生じることが分かっている。タンパク質凝集体を可視化するには、タンパク質凝集体に局在することが既知であるシャペロンタンパク質 Hsp104 に GFP タグを付けたものを利用する。

ミトコンドリアについては、その分布のみならず、膜電位の高低についても情報を得る必要がある。このため、緑色蛍光/赤色蛍光の比を取ることで膜電位の高低を定量的に評価することのできるミトコンドリア染色色素 JC-1 を用いる。JC-1 の分光学的特性が他因子との同時イメージングと適合しない場合には、ミトコンドリアの膜電位に応じて緑色蛍光輝度が変化する色素 DiOC6 と、膜電位によらずミトコンドリア全体を可視化することのできる Tom70-RFP (ミトコンドリア外膜タンパク質 Tom70 に RFP タグを付けたもの) の組み合わせを用いる。

液胞についても、ミトコンドリア同様、その分布だけではなく、液胞内腔の pH の変動を調べる必要がある。この要求を満たすため、Pho8-SEP と Pho8-RFP の組み合わせを用いる。Pho8-SEP は液胞局在性アルカリフォスファターゼ Pho8 に pH 依存的に蛍光輝度が変化する改変緑色蛍光タンパク質 pHluorin を連結した分子であり、Pho8-RFP に由来する赤色蛍光の輝度との比を取ることで、生細胞内で液胞内の pH の変動を追跡することができる。

#### [オートファジー関連因子の可視化]

胞子形成の過程において、いつ・どこでオートファジーが生じ、どのような因子がどれだけ分解されるのかを観測するために、上記の老化関連因子と同時に、オートファジー関連タンパク質も可視化し、これらの間の関連性を調べる。Ape1-RFP を用いることによって PAS (Pre-Autophagosomal Structure) を可視化する。また、液胞膜に局在する Vph1-RFP によって液胞膜を可視化し、オートファジーの結果、各老化関連因子が液胞に取り込まれたどうかを確認することも試みる。

また、使用する蛍光タンパク質タグを適切に選択することによって (BFP, GFP, RFP の組み合わせまたは CFP, YFP, RFP の組み合わせ)、最大で 3 つの因子のシグナルの変化を同時に定量し、それらの間の時空間的関連性を明らかにすることを試みる。

#### [それぞれの老化関連因子に対する特異的な変異の導入]

ERCs がオートファジーによって排除されると想定した場合、これはヌクレオファジーによると考えるのがもっともシンプルな仮説である。ヌクレオファジーには核膜上の Nvj1 タンパク質と液胞膜上の Vac8 タンパ

ク質が必要であることが既知である。本研究では、Nvj1 欠失株を使用することでヌクレオファジーを抑制することを試みる。

タンパク質凝集体はプロテアソーム系およびシャペロンを介したオートファジーによって排除されることが既知である。本研究ではそれぞれの経路を特異的に阻害するために、プロテアソームサブユニット欠失株 (*rpn13*)、シャペロンタンパク質欠失株 (*ydj1*) を利用する。

ミトコンドリアについては、胞子形成の前期にはマイトファジーによる分解、後期には胞子膜外への残存という 2 段階の排除過程があることを示す予備的結果を得ている。それぞれの経路を特異的に阻害するために、マイトファジーに必須なミトコンドリア膜タンパク質 Atg32 の欠失株、ミトコンドリアを細胞膜にアンカーする機構に関わるタンパク質 Mmr1, Num1 の欠失株を利用する。液胞については、栄養増殖期の出芽酵母では、液胞膜 ATPase である Vma1 を過剰発現することによってその pH の上昇が抑制されることが既知である。本研究でも同様に Vma1 を過剰発現し、pH の上昇を抑制した時、胞子形成期の液胞の動態がどのように変化するかを観測する。

#### 4. 研究成果

平成 27 年度は、当初計画にしたがって、核小体、ミトコンドリア、液胞について、各オルガネラ特異的に局在するタンパク質を蛍光タンパク質でタグ付けすることで可視化した出芽酵母細胞株を作成した。具体的には下記のタンパク質の C 末端に緑色蛍光タンパク質 GFP または赤色蛍光タンパク質 RFP (類縁体を含む) を融合したものを作成した。Nop1 (核小体)、Tom70 (ミトコンドリア外膜)、Vph1 (液胞膜)、Sec63 (核膜を含む小胞体)、Nup49 (核膜孔)、Nup57 (核膜孔)、Spc42 (中心小体)、Cse4 (セントロメア)。波長の異なる 2 種類の蛍光タンパク質を使用することにより、ミトコンドリアと液胞の組み合わせについて同時に可視化した菌株も作成した。これらの出芽酵母細胞株について、栄養増殖条件において、アガロース包埋法を利用したタイムラプスライブセルイメージングを実施し、長時間の撮影が可能な実験条件を検討した。さらに長時間のタイムラプスライブセルイメージングを実施するため、マイクロ流路を用いた顕微鏡ステージトップ灌流培養装置の使用条件についても検討を実施した。

平成 28 年度は、長時間のタイムラプスライブセルイメージングを実施するためにマイクロ流路を用いた顕微鏡ステージトップ灌流培養装置上での胞子形成誘導条件を検討し、胞子形成誘導開始から 24 時間以内に約 70% の細胞で減数第二分裂が完了する、高効率な条件を確立した。具体的には、胞子形成効率が高いことが確認されている SK1 株を利用することに加えて、胞子形成誘導前の培

養時に酢酸を炭素源とした富栄養培地を利用することで高い胞子形成効率を得ることができた。ここで確立した胞子形成誘導法を用いて、出芽酵母の胞子形成過程の全過程をモニターする長時間タイムラプスライブセルイメージングを実施した。特に、胞子形成期の核膜、核小体のふるまいについては、野生型株および核膜のオートファジーに関連する変異株の比較を試みた。

加えて、出芽酵母の分裂寿命に強く関与していることが知られるタンパク質サーチュイン Sir2 および Sir2 が含まれる RENT 複合体の挙動について注目した。RENT 複合体に含まれている Sir2 分子集団のみを可視化するため、RENT 複合体のコンポーネントのひとつである Net1 と Sir2 との間で生じる BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation, 二分子蛍光相補) を利用することを試みた。具体的には、Net1 の C 末端に蛍光タンパク質の N 末端側フラグメントを融合させ、Sir2 の C 末端には蛍光タンパク質の C 末端側フラグメントを融合させて利用した。従来広く BiFC に利用されてきた黄色蛍光タンパク質 Venus については、既報通り Sir2-Net1 間での BiFC シグナルが観察されたものの、光安定性が低いため、長時間のタイムラプスライブセルイメージングの実施は困難であった。そこで、近年発表された高輝度・高光安定性緑色蛍光タンパク質 mNeonGreen および赤色蛍光タンパク質 mRuby2/mRuby3 についての BiFC 化を試みた。mNeonGreen については、11 本のシートを 8 本+3 本に分けるパターン、mRuby2/mRuby3 については、11 本のシートを 7 本+4 本または 8 本+3 本に分ける 2 パターンで BiFC 化することができた。ここで確立した高輝度・高光安定性蛍光タンパク質の BiFC を用いることによって、核小体内の RENT 複合体に含まれる Sir2-Net1 ペアのふるまいを長時間に渡ってタイムラプスライブセルイメージングによって追跡することが可能になったと考えられる。

#### 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)

— Satoshi Okada, Mid Eum Lee, Erfei Bi, and Hay Oak Park (2017) Probing Cdc42 Polarization Dynamics in Budding Yeast Using a Biosensor. *Methods in Enzymology* 589, 171-190.  
doi: 10.1016/bs.mie.2017.01.011  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007668791730037X>

— Satoshi Okada, Carsten Wloka, and Erfei Bi (2017) Analysis of protein dynamics during cytokinesis in budding

yeast. *Methods in Cell Biology*, 137, 25-45.

doi: 10.1016/bs.mcb.2016.04.002

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X1630036X>

— Keiji Kito, Mitsuhiro Okada, Yuko Ishibashi, Satoshi Okada, and Takashi Ito (2016) A strategy for absolute proteome quantification with mass spectrometry by hierarchical use of peptide concatenated standards. *Proteomics* 16, 1457-73.  
doi: 10.1002/pmic.201500414  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.201500414/full>

[学会発表](計 2 件)

岡田 悟

「高輝度・高光安定性蛍光タンパク質の BiFC 化とその利用について」  
酵母研究若手の会第 3 回研究会 2017 年 3 月 16 日~2017 年 3 月 17 日 京都大学宇治キャンパス

岡田 悟

「遺伝子座特異的にヒストン修飾の変化を検出するライブセルイメージング手法を開発する試み」  
酵母研究若手の会第 2 回研究会 2016 年 3 月 17 日~2016 年 3 月 18 日 理化学研究所 和光研究所 大河内記念ホール

[図書](計 0 件)

[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：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

九州大学 大学院 医学研究院 医化学分野  
<https://biochem1.wp.med.kyushu-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡田 悟 (OKADA, Satoshi)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：30734488