

平成30年6月18日現在

機関番号：83903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07322

研究課題名(和文) ビタミンB6による細胞寿命制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of lifespan regulation by vitamin B6 in yeast

研究代表者

亀井 優香 (KAMEI, Yuka)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・老化機構研究部・流動研究員

研究者番号：90772153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、酵母細胞内のビタミンB6(VB6)が減少すると細胞の寿命が短くなることが分かった。本研究の目的はVB6による細胞寿命制御機構を解明することである。

VB6合成酵素遺伝子は老化細胞で転写誘導される。VB6合成酵素遺伝子の転写因子であると推定された2つの転写因子はそれぞれアミノ酸とグルコース飢餓時に標的遺伝子を活性化するため、老化細胞では栄養飢餓時のシグナル伝達系が刺激されていることが示唆された。一方、出芽酵母の全VB6依存性酵素の中から、寿命決定に関わる酵素を同定した。またメタボローム解析から、VB6の欠乏による短寿命の原因はさまざまな代謝経路の異常であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that vitamin B6 (VB6) sustain replicative lifespan in yeast. However, how VB6 regulates cellular lifespan is unclear. VB6 synthase was found to be upregulated in early senescent cells. Two nutrient-regulated transcription factors were independently required for the VB6 synthase upregulation and longevity. We observed a VB6-dependent metabolic difference and characteristic amino acid changes. A lot of deletion mutants of VB6-dependent enzyme gene exhibited short lifespan. These results indicate that VB6 deficiency accelerates cellular ageing due to a combination of metabolic defects and provide valuable information for understanding cellular anti-ageing by VB6 in higher eukaryotes.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：ビタミンB6 細胞寿命 分裂寿命 アミノ酸 出芽酵母

### 1. 研究開始当初の背景

生物の寿命は遺伝的要因と環境的要因により決定され、これらの要因は個体レベルと細胞レベルの研究でかなり解明されてきた。マウスや線虫を用いた研究から、寿命を制御する遺伝子が数多く同定され、栄養飢餓や酸化ストレスなどの環境的要因が寿命に影響する研究も多く報告されている。主要栄養素である糖質などの制限により寿命が延長し、それに長寿遺伝子として有名なサーチュイン(酵母では *SIR2*) が深く関わることはよく知られているが、ビタミンなどの微量栄養素が寿命を制御する報告は数少ない。出芽酵母は真核細胞の重要な老化・寿命研究モデルであり、その分裂寿命は一つの母細胞が死ぬまでに生む娘細胞の数として定義される(図1)。近年、出芽酵母の全非必須遺伝子破壊株の網羅的な寿命解析が行われ、長寿命変異株の情報が報告された(*Cell Metabolism*, 2015, 22: 895)。

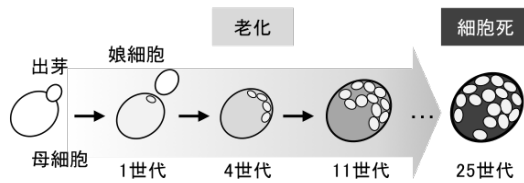


図1 出芽酵母の老化と寿命

### 2. 研究の目的

今まで主要栄養素による寿命制御については調べられてきたが、ビタミンなどの微量栄養素については知見がほとんどなかった。研究代表者は、酵母細胞内のビタミン  $B_6$  が細胞老化に伴って増加し、欠乏すると細胞寿命が短くなることを見いだした。本研究の目的は、ビタミン  $B_6$  による細胞寿命制御機構を解明することである。ビタミン  $B_6$  合成酵素遺伝子が老化細胞で転写誘導されることから、その転写誘導の仕組みを解明することにより、細胞老化の引き金となるシグナルや制御因子を明らかにする。また、活性型ビタミン  $B_6$  (PLP) はアミノ酸代謝酵素などの補酵素として働くため、どの細胞内代謝がビタミン  $B_6$  による寿命制御に関与するのも明らかにする。本研究で得られる知見は微量栄養素による細胞寿命制御研究のさきがけとなるものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 老化に伴う PLP 合成酵素遺伝子の転写誘導メカニズムの解明

PLP 合成酵素遺伝子 (*SNZ1*) を老化細胞特異的に転写誘導する因子を、出芽酵母の転写因子遺伝子破壊株コレクションを用いた発現解析により探索した。同様に、この転写因子が働くシグナル伝達系を構成する制御因子も老化細胞特異的な転写誘導に関与することを確かめた。これらの遺伝子が分裂寿命に関与することを検証して、細胞老化の引き金

となるシグナルを明らかにすることを試みた。

#### (2) ビタミン $B_6$ 欠乏による短寿命の原因解明

出芽酵母の全 PLP 依存性酵素の中から、分裂寿命制御に関与する酵素を遺伝学的に同定した。また、これら酵素遺伝子破壊株のメタボローム解析および細胞アミノ酸量を測定し、ビタミン  $B_6$  の欠乏による短寿命の原因となる細胞内代謝物および代謝経路を明らかにすることを試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) 老化に伴う PLP 合成酵素遺伝子の転写誘導メカニズムの解明

PLP 合成酵素 *SNZ1* 遺伝子を老化細胞特異的に転写誘導する因子を、出芽酵母の転写因子遺伝子破壊株コレクションを用いた発現解析により探索した。

まず、*SNZ1* 遺伝子プロモーターに  $\beta$ -ガラクトシダーゼ *lacZ* 遺伝子を連結したレポーターを利用し、*SNZ1* 発現誘導に必要な転写因子を絞り込むことを試みた(図2)。しかし、このレポーター遺伝子を導入した菌株のコロニーは、老化が進行していると考えられる中心部だけでなく、全体が X-gal を加えた培地で青く呈色し、スクリーニング系として機能しなかった。

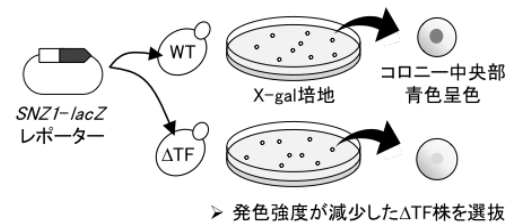


図2 老化細胞特異的な転写因子 (TF) の選抜

そこで、一般的な培養条件 (YPD 完全培地、対数増殖期) で *SNZ1* の発現に必要な転写因子を探索することにした。出芽酵母の生育に必須でない転写因子の遺伝子破壊株 (全 175 株) から全 RNA を抽出し、RT-qPCR 法により *SNZ1* 遺伝子の転写量が野生型と比べて減少する株を目的の候補株とした。次に、ピオチン標識法により候補遺伝子破壊株の老化細胞を回収し、RT-qPCR 法で *SNZ1* 遺伝子の転写量を調べることにより、その転写因子が老化細胞における *SNZ1* 遺伝子の転写誘導に必要なことを確認した。

老化細胞特異的に *SNZ1* 遺伝子を誘導する転写因子であると推定された 2 つの転写因子は、それぞれアミノ酸とグルコース飢餓時に標的遺伝子を活性化することが知られていた。これらの転写因子遺伝子破壊株では、野生型株において見られたアミノ酸やグルコースの欠乏による *SNZ1* 遺伝子の転写誘導が見られなかった。また、これらの転写因子遺

伝子破壊株の老化細胞では PLP 合成酵素遺伝子の転写誘導が抑えられた。これらのことから老化細胞ではアミノ酸やグルコース飢餓時のシグナル伝達系が刺激されていることが示唆された。

## (2) ビタミン B<sub>6</sub> 欠乏による短寿命の原因解明

プロトン核磁気共鳴 (<sup>1</sup>H-NMR) 法による細胞内メタボローム解析によって、ビタミン B<sub>6</sub> 取り込み酵素遺伝子破壊株の代謝パターンは野生型株と大きく異なっていることが示された。出芽酵母の全 PLP 依存性酵素遺伝子 50 個のうち、破壊すると分裂寿命が短縮する遺伝子は約半数であった。これらのうちほとんどはアミノ酸の代謝酵素遺伝子であるが、ピオチンやグリセロールの代謝酵素遺伝子も含まれていた。細胞内アミノ酸量の測定により、ビタミン B<sub>6</sub> 取り込み酵素遺伝子破壊株では、セリンやスレオニンなどのアミノ酸が増加するが、培地中にビタミン B<sub>6</sub> を過剰に添加するとそれらの量が野生型株と同程度まで減少することを見つけた。このような細胞内アミノ酸の変化が、ビタミン B<sub>6</sub> 取り込み酵素遺伝子破壊株の短寿命の原因であることを証明することを試みた。野生型株の寿命測定培地に特定のアミノ酸を過剰に添加することで、ビタミン B<sub>6</sub> 取り込み酵素遺伝子破壊株の細胞内アミノ酸量の変化を模倣した。しかし、野生型株の寿命はビタミン B<sub>6</sub> 取り込み酵素遺伝子破壊株のように短くならなかった。<sup>1</sup>H-NMR によるメタボローム解析からも、細胞内アミノ酸量を変化させた野生型株とビタミン B<sub>6</sub> 取り込み酵素遺伝子破壊株の代謝は依然として大きく異なっていることが示された。これらのことから、ビタミン B<sub>6</sub> 欠乏による短寿命の原因は、アミノ酸代謝だけではなく、さまざまな代謝経路の異常であることが示唆された。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

山本聡一郎、亀井優香、向由起夫

「出芽酵母ビタミン B6 合成酵素 *SNZ1* 遺伝子の老化依存的転写誘導に必要な転写因子の同定」、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年

十一智教、山本聡一郎、亀井優香、向由起夫

「出芽酵母の分裂寿命を制御するビタミン B6 依存性酵素遺伝子の同定」、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年

亀井優香、十一智教、山本聡一郎、向由起夫

「ビタミン B6 合成酵素および取り込み酵素による分裂寿命制御機構」、酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究報告会、2017 年

亀井優香、山本聡一郎、松永光平、福崎英一郎、向由起夫

「ビタミン B6 による出芽酵母の分裂寿命制御」、第 39 回日本分子生物学会、2016 年

亀井優香、山本聡一郎、向由起夫

「酵母のトランスクリプトームとメタボロームから見た細胞老化」、第 89 回日本生化学会(招待講演)、2016 年

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

亀井 優香 (KAMEI, Yuka)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・老化機構研究部・流動研究員

研究者番号: 90772153

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

向 由起夫 (MUKAI, Yukio)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・  
准教授

研究者番号：60252615