

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06228

研究課題名(和文)細胞老化におけるタンパク質不均等分配の網羅的解析とその役割の解明

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of asymmetric inheritance of older proteins to understand the role in cellular aging

研究代表者

紀藤 圭治(Kito, Keiji)

明治大学・農学部・専任准教授

研究者番号：40345632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：老化研究のモデルとして広く活用されている出芽酵母では、母細胞と娘細胞に非対称に分裂するとき、母細胞は分裂回数に伴い老化していく。細胞の老化には、両細胞間での様々な細胞内成分の不均等性が関連していることが知られている。なかでも、様々なタンパク質の質的な不均等性の蓄積も、老化に深く影響していることが分かってきた。本研究では、分裂回数とともに老化していく母細胞に、どのような分子が古いタンパク質として蓄積していくのかを調べた。とくに、寿命が異なる細胞同士では不均等に蓄積する古いタンパク質が異なることが明らかとなり、そうした古いタンパク質の不均等性は細胞老化へ関連することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化に関わる分子メカニズムの包括的な解析では、老化の進行に伴うタンパク質発現量の変化が主な解析対象とされてきた。一方で、タンパク質の質的变化に焦点を当てた研究は例が少なく、本研究課題での古いタンパク質の不均等性は特色がある。また、高等生物における個体レベルでの老化でも、その基礎になっているのは細胞老化そのものであり、今後ますます高齢化が進む社会において、老化の根本的な要因に迫る研究は将来的な社会的波及効果も大きい。

研究成果の概要(英文)：In the budding yeast, which is widely used as a model of the research for aging, mother and daughter cells are asymmetrically divided and mother cells become aging in the progress of cell division. It has been known that asymmetry of cellular components between mother and daughter cells is related to aging process. Recent studies indicate that accumulation of asymmetry of difference in protein quality can affect the cellular aging. In this research, older proteins asymmetrically accumulated in mother cells in the progress of aging are analyzed with proteomic approach. It was shown that profile of accumulated older proteins is different among yeast strains having different life-span, indicating association of such type of asymmetry with cellular aging.

研究分野：細胞生物学、ゲノム生物学

キーワード：細胞老化 プロテオミクス 出芽酵母 不均等分配

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 酵母の細胞老化：

細胞老化の過程では、細胞内小器官の機能低下や酸化タンパク質およびその凝集体など様々な変化が蓄積していく。老化研究のモデルとして広く用いられている出芽酵母では、母細胞は細胞分裂に伴い細胞老化が進み、20~30個ほどの娘細胞を産生した後に分裂寿命を迎える。出芽酵母の老化には、脱アセチル化酵素やDNA複製に関与する遺伝子および抗酸化酵素など多くの老因子の関連が知られている。液胞やミトコンドリアの機能低下や酸化・凝集したタンパク質の蓄積などが、老化に深く関与していると考えられている。これらの老化関連因子や老化に伴う細胞内変化は多くの研究で報告されているが、一方で、細胞老化の進行に伴いどのようなタンパク質の質的变化が蓄積していくのか、さらには分裂回数とともに古いタンパク質として母細胞に不均等分配される分子にはどのようなタンパク質があるのかについては、これまであまり解析されていなかった。

(2) タンパク質の不均等分配：

これまでに母細胞と娘細胞のタンパク質不均等分配、すなわち細胞分裂時に新規合成されたタンパク質の分配率が母細胞と娘細胞で異なるタンパク質も、いくつか知られている。形質膜に局在するトランスポーターなどの膜タンパク質は、分裂時に新規合成された分子が娘細胞に優先的に分配される。一方で、紡錘極体や核膜孔複合体を構成するタンパク質は母細胞にもともと存在していたタンパク質分子が娘細胞に移行する。このように母細胞に分裂前から存在していた古いタンパク質が分裂時に母細胞にそのまま不均等に分配されるかは、タンパク質の種類によって異なっている。

2. 研究の目的

(1) 不均等分配の細胞老化との関連性：

本研究では、出芽酵母の細胞老化に関わるタンパク質の質的变化を包括的に理解することを目的とした。具体的には、分裂時に母細胞に優先的に不均等分配され古いタンパク質として蓄積する分子群について、その細胞老化との関連性を明らかにする。すでに、出芽酵母を用いて不均等分配される古いタンパク質を網羅的に同定する実験手法を確立しており（引用文献①）、本手法を活用する。

(2) 具体的な解析目的：

本研究課題の当初の目的では、1) 分裂寿命に影響しうるストレス存在下や寿命変異株での古いタンパク質の不均等分配を解析し、通常の培養条件での野生型と比較して不均等分配に違いのあるタンパク質を見出すことで、細胞老化との関連性を調べることと、2) 10回ほど分裂した初期老化段階の母細胞に対して、古くなったタンパク質を新規合成されたものに人工的に置換することで、その後の分裂余命が延長するかを調べることの、2点を具体的な解析目的とした。しかしながら、2)については実験手法の確立がその難易度の高さから実現できなかったため、本研究成果報告書では、1)についてその成果を報告する。

3. 研究の方法

(1) 寿命変異株の作製：

寿命変異株を用いたタンパク質不均等分配の解析を行うために、出芽酵母での代表的な短寿命変異株として *SIR2* 遺伝子（ヒストンアセチル化酵素をコード）の欠損変異株（*sir2* 欠損株）と、長寿命変異株として *FOB1* 遺伝子（DNA複製フォーク結合タンパク質をコード）の欠損変異株（*fob1* 欠損株）を作製した。二倍体株である BY4743 株の当該遺伝子座に、loxP で挟まれたカナマイシン耐性遺伝子を導入後、胞子形成後に四分子を分離することでそれぞれの遺伝子を欠損した一倍体株を取得した。次に、Cre 組換え酵素を発現させることで、薬剤耐性遺伝子を除去した。

(2) 不均等分配タンパク質の定量解析：

出芽酵母の G1 期の細胞を濃縮後、安定同位体標識したアミノ酸を培地に添加した。同時に母細胞の細胞壁をビオチン化した。約 2 時間後にストレプトアビジン磁気カラムにより、ビオチン化された母細胞とビオチンフリーの娘細胞を分離した。それぞれの細胞から抽出したタンパク質を、定法にしたがってトリプシンによりペプチドに断片化し、各タンパク質に由来するペプチドの同位体標識率を質量分析により計測した。非標識分子種を培養開始時にすでに母細胞に存在していたタンパク質の存在量とし、母細胞にもともと存在していた古いタンパク質と新規合成タンパク質（安定同位体標識タンパク質）の存在比率を、母細胞と娘細胞間で比較した。

4. 研究成果

(1) 寿命変異株の作製：

酵母二倍体株で *SIR2* 遺伝子または *FOB1* 遺伝子を欠損させるために、カナマイシン耐性遺伝

子 (KanMX) の両端に対象遺伝子領域との相同配列を付加した DNA 断片を PCR で取得した。これを二倍体酵母に形質転換し、対象遺伝子が欠損されているヘテロ接合体のクローンを PCR により選別した。その後、胞子形成と四分子分離により得られた一倍体クローンのなかから、対象遺伝子が欠損しているクローンを同様に PCR により選別した。いずれの欠損株においても、メンデルの遺伝法則にしたがった割合で目的の遺伝子欠損一倍体を取得することができた。以上より、各遺伝子欠損は酵母の生存やその増殖能に基本的には影響しないことも、あわせて確認できた。

(2) 質量分析によるタンパク質不均等分配の解析:

短寿命変異株である *sir2* 欠損株について、母細胞と娘細胞から抽出したタンパク質試料について LC-MS/MS を用いて同位体標識率を定量した。計 2 回の解析を行い、それぞれ 650 種類または 800 種類のタンパク質について、母細胞と娘細胞間での同位体標識率の差異を定量することができた (図 1)。両細胞間での標識率の差が 2 倍より大きいものを、母細胞で標識率が高いまたは低いタンパク質とした。その結果、母細胞で標識率が高いタンパク質は、それぞれの解析データで 10 種類または 13 種類、母細胞で標識率が低いタンパク質は 15 種類または 19 種類見出された。最終的に、母細胞で標識率が低いタンパク質、すなわち母細胞に優先的に分配される古いタンパク質として、2 つの解析データの少なくともいずれか一方で同定されたもの 14 種類を、母細胞に優先的に不均等分配されるタンパク質とした (図 2)。

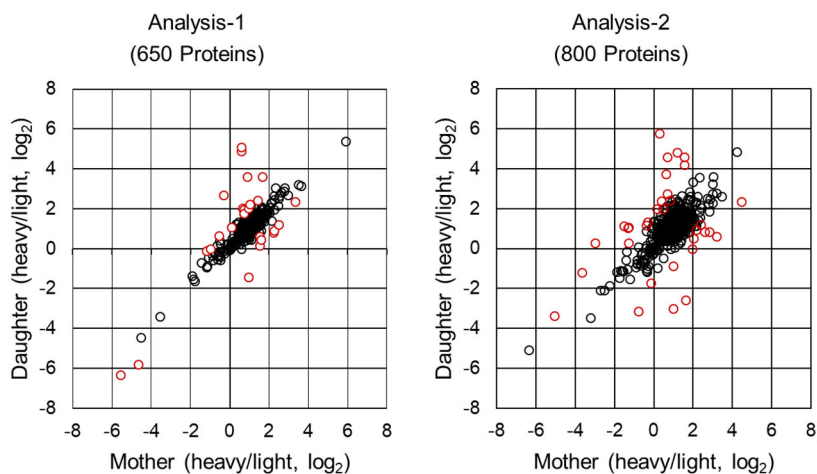


図1 母細胞と娘細胞間の同位体標識率の比較
図中の赤丸は両細胞間で標識率に差のあったタンパク質を示す。



図2 野生株 (WT) と短寿命株 (*sir2* 欠損株) での不均等分配タンパク質の比較

(3) 短寿命変異株と野生株での不均等分配の差異: 野生株と今回同定された *sir2* 欠損株それぞれにおける母細胞と娘細胞間での標識率の差異を算出した。その際、異なる解析データでの平均値を求めた。野生株と短寿命変異株でその標識率の差を比較したところ、株間における両細胞間の標識率の差が 2 倍より大きいタンパク質は、定量比較のできた全 889 タンパク質のうち 51 種類であった (図 3)。そのなかで、これまでに野生株で同定された不均等分配される古いタンパク質 21 種類と (引用文献①)、今回同定された短寿命変異株 (*sir2* 欠損株) でのそれを比較すると、6 種類が共通していた (図 2)。一方で、15 種類または 8 種類のタンパク質はいずれかの株でのみ見出された分子群であり、寿命が異なる株間で母細胞に不均等分配される古いタンパク質が異なることが示された。

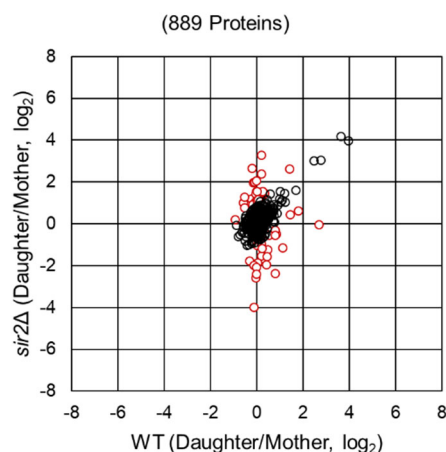


図3 母細胞と娘細胞間の標識率の差異の野生株 (WT) と短寿命株 (*sir2* 欠損株) 間の比較
図中の赤丸は株間で標識率に差異に違いがあったタンパク質を示す。

いずれか一方の株のみで不均等分配されるタンパク質として、その例を図 4 に示す。RNA ヘリカーゼである *Ski2* は短寿命変異株では母細胞へ優先的に古いタンパク質が分配されるのに対し、野生株では母細胞と娘細胞間で大きな違いはなかった。一方で、野生株のみで同定された不均等分配タンパク質のうち、スレオニン合成に関わる *Thr1* は短寿命変異株では古いタンパク質の含有率は約 30% で母細胞と娘細胞間でほとんど違いはなかった。

(4) 細胞老化とタンパク質の不均衡分配：

本研究課題では、短寿命株を用いたタンパク質不均衡分配の解析を行い、それを野生株と比較することでその差異を解析した。寿命の異なる株間で不均衡分配に少なからず差があったことから、母細胞に古いタンパク質として不均衡分配される分子群が細胞寿命と関わっている可能性が示唆された。長寿命株での不均衡分配の解析も現在進めており、寿命に影響する他のストレス存在下での解析も含め、データの充実とそれによる分裂寿命におけるタンパク質不均衡分配の関連性を検証していきたい。また、当初の研究計画にあった初期老化段階の母細胞での古いタンパク質を新規生合成分子への置換と、その分裂余命への影響についても、実験系の構築を目指す。出酵母を用いた老化研究で得られた知見は、高等生物も含め多くの生物種で共通することが多いことから、本研究でのアプローチによるタンパク質不均衡分配の解析が、細胞レベルでの老化のメカニズムや細胞内プロテオームの変化と老化との関わりを明らかにする重要なアプローチになることが期待される。

<引用文献>

- ① Okada, M., Kusunoki, S., Ishibashi, Y., Kito, K. Proteomics analysis for asymmetric inheritance of preexisting proteins between mother and daughter cells in budding yeast. *Genes Cells*. 22(6);591-601 (2017). doi: 10.1111/gtc.12497.

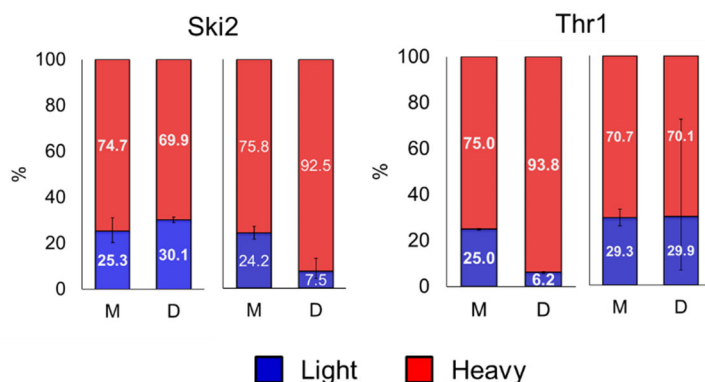


図4 野生株(WT)と短寿命株(*sir2*欠損株)のみで同定された不均衡分配タンパク質の例
M: 母細胞、D: 娘細胞、Light: 同位体非標識、Heavy: 同位体標識。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kintaka Reiko, Makanae Koji, Namba Shotaro, Kato Hisaaki, Kito Keiji, Ohnuki Shinsuke, Ohya Yoshikazu, Andrews Brenda J, Boone Charles, Moriya Hisao	4. 巻 9
2. 論文標題 Genetic profiling of protein burden and nuclear export overload	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e54080
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.54080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishikawa Akito, Shimizu Keisuke, Isowa Yukinobu, Takeuchi Takeshi, Zhao Ran, Kito Keiji, Fujie Manabu, Satoh Noriyuki, Endo Kazuyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Functional shell matrix proteins tentatively identified by asymmetric snail shell morphology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9768
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66021-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsukada Takehiro, Isowa Yukinobu, Kito Keiji, Yoshida Saishu, Toneri Seina, Horiguchi Kotaro, Fujiwara Ken, Yashiro Takashi, Kato Takako, Kato Yukio	4. 巻 376
2. 論文標題 Identification of TGF β -induced proteins in non-endocrine mouse pituitary cell line TtT/GF by SILAC-assisted quantitative mass spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 281 ~ 293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-018-02989-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimizu Keisuke, Kimura Kazuki, Isowa Yukinobu, Oshima Kenshiro, Ishikawa Makiko, Kagi Hiroyuki, Kito Keiji, Hattori Masahira, Chiba Satoshi, Endo Kazuyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Insights into the Evolution of Shells and Love Darts of Land Snails Revealed from Their Matrix Proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 380 ~ 397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/gbe/evy242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Eguchi Yuichi, Makanae Koji, Hasunuma Tomohisa, Ishibashi Yuko, Kito Keiji, Moriya Hisao	4. 巻 7
2. 論文標題 Estimating the protein burden limit of yeast cells by measuring the expression limits of glycolytic proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e34595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.34595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 紀藤圭治
2. 発表標題 バーコードペプチドタグの高感度プロテオーム解析への活用
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 紀藤圭治
2. 発表標題 プロテオームバランスの比較とその数値化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiji Kito
2. 発表標題 The use of unique peptide-tags for sensitive detection of yeast proteome
3. 学会等名 18th Human Proteome Organization World Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 紀藤圭治
2. 発表標題 代謝嗜好性やゲノム構造の異なる多様な酵母種間の比較プロテオーム解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野谷大樹、岡田充弘、紀藤圭治
2. 発表標題 出芽酵母におけるタンパク質不均等分配の包括的解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野谷大樹、岡田充弘、紀藤圭治
2. 発表標題 出芽酵母のsir2欠損株と野生株におけるタンパク質不均等分配の比較解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiji Kito
2. 発表標題 A genetic approach toward mass spectrometry-based comprehensive and sensitive quantification of yeast proteome.
3. 学会等名 17th Human Proteome Organization World Congress（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野谷大樹、岡田充弘、紀藤圭治
2. 発表標題 出芽酵母の短寿命株と野生株におけるタンパク質不均等分配の比較解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2018年大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 紀藤圭治
2. 発表標題 様々な技術融合によるプロテオームの量的および質的解析手法
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2018年大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関