

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22580079

研究課題名（和文） 酵母由来の新規な経時寿命延長因子 Ecl1 ファミリーの解析

研究課題名（英文） Characterization of Ecl1 family genes involved in the chronological lifespan in fission yeast.

## 研究代表者

饗場 浩文 (AIBA HIROFUMI)

名古屋大学・創薬科学研究科・教授

研究者番号：60211687

研究成果の概要（和文）：細胞の寿命がどのようにして決まるのかを理解することは現代生物学が取り組むべき課題の一つである。本研究では分裂酵母において、高発現することで経時寿命を延長する因子 Ecl1 ファミリーを発見したことを契機として、その機能解明を中心に研究を遂行した。加えて、経時寿命制御の全体像を理解することを目的に、経時寿命延長変異株ならびに延長遺伝子群のスクリーニングを行い、取得した因子の機能解析を進めた。これらの研究成果によって、分裂酵母における経時寿命の制御機構とそれに関わる新規因子群の理解が進んだ。

研究成果の概要（英文）：Understanding of lifespan is one of the important theme in current biology. In this study I analyzed the function of Ecl1 family proteins that extend chronological lifespan of fission yeast when overproduced. I also carried out genetical screening to identify novel factors involved in the regulation of chronological lifespan in fission yeast. As a consequence, I have succeeded to reveal mechanisms of Ecl1 functioning and identified novel factors that are involved in the regulation of chronological lifespan in fission yeast. These results should contribute to better understanding of lifespan in higher eukaryote.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：酵母、寿命、老化

## 1. 研究開始当初の背景

モデル生物を用いた経時寿命あるいは個体寿命に関する研究から、種を超えた共通の寿命制御因子の存在が明らかになりつつあり、栄養（カロリー）情報の受容伝達システムならびにストレス応答システムなどが、寿命制

御に重要な役割を果たすと考えられる。

申請者は、分裂酵母の定常期ストレスへの適応機構を解析する目的で、定常期における生存率が変化する変異株や、高発現すると定常期生存率が上昇する遺伝子の解析を進めてきた。これらの解析の過程で、高発現する

と顕著な経時寿命延長効果を示す新規因子 Ecl1 を見出した。さらに Ecl1 と構造・機能が類似した遺伝子を分裂酵母からあと 2 つ、出芽酵母からも 1 つ見出し、これら Ecl1 ファミリー因子が、酵母に共通の経時寿命制御因子であることを示した。しかしながら、Ecl1 ファミリーの経時寿命延長における作動メカニズムは不明であった。

## 2. 研究の目的

細胞の寿命がどのようにして決まるのかを理解することは現代生物学が取り組むべき挑戦的課題の一つであり、本研究では、分裂酵母をモデルとして細胞の経時寿命（増殖定常期における細胞の生存期間）の決定メカニズムの解明を試みる。高発現すると酵母の経時寿命を延ばす新規な因子として見出した Ecl1 ファミリータンパク質の機能解明を中心に、経時寿命に影響する因子の探索と機能解析も併せて行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 「Ecl1 ファミリーによる経時寿命延長メカニズムの解析」

・ Ecl1 を高発現した際に生じる細胞内変化をトランスクリプトーム解析等で明らかにする。

・ Ecl1 の機能発現に必要な因子を遺伝学的解析や相互作用因子の解析から明らかにする。これらにより、Ecl1 に作用する未知シグナルの実態や、Ecl1 が機能発揮をする際のエフェクター因子などに関する知見を得る。

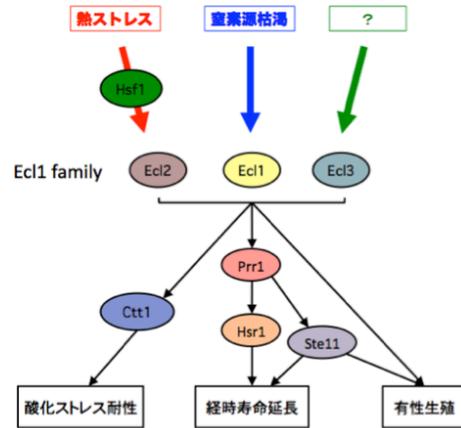
### (2) 「新規な経時寿命変異株ならびに経時寿命延長遺伝子の解析」について

・ 新規に長生き変異株や寿命延長遺伝子を探索し、それらの機能解析を進める。

## 4. 研究成果

研究目的ならびに方法欄に示した方針に従い、分裂酵母をモデルとして細胞の経時寿命を規定する因子の解析を進め、以下の成果を得た。

- 高発現すると分裂酵母の経時寿命を延長する因子として同定した Ecl1 ならびにそのパラログ Ecl2, Ecl3 の作用機構を解明する目的で、これら Ecl1 ファミリーの高発現株のマイクロアレイ解析を行った。その結果、経時寿命延長時に共通して発現が上昇する遺伝子群を同定した。これらの中には、ストレス応答、性的分化（減数分裂・胞子形成）に関与する遺伝子が多く認められた。さらに、転写因子 Prr1 が Ecl1 ファミリーによる寿命延長を仲介する中心的因子であることを明らかにした（下図）。



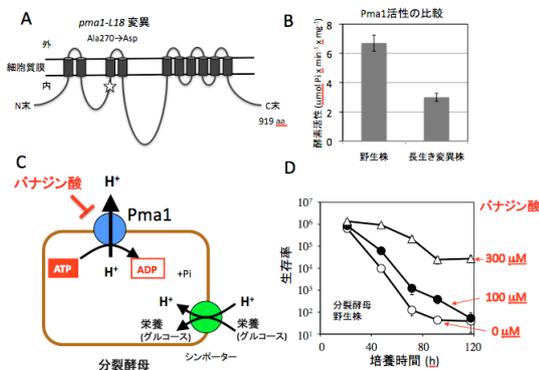
分裂酵母 Ecl1 ファミリーの作用機構

- 上記マイクロアレイ解析から高発現すると経時寿命を延長する新たな遺伝子群を同定した。

- Ecl1 の作用機構に関する知見を得るため、酵母 Two-hybrid 法を用いて、Ecl1 と相互作用する因子をスクリーニングした。その結果、8 種類の相互作用因子を同定した。

- Ecl1 がどのようなシグナルに応答して発現制御されるのかを調べる目的で、細胞周期による制御と各種栄養源の枯渇による制御を解析した。その結果、Ecl1 の発現量は細胞周期を通して一定であること、窒素源が枯渇した際に、顕著に発現が誘導されることを見いだした。

- 経時寿命延長に関わる因子を広範に探索することを目的として、経時寿命が延長する変異株をスクリーニングした。取得した経時寿命延長変異株の一つが、P-type ATPase をコードする Pma1 の活性低下型変異であることを見出した（下図）。



Pma1 の活性が低下すると分裂酵母の経時寿命が延長する

- (6) 熱ストレス転写因子Hsf1は線虫において細胞寿命に関わることが知られている。分裂酵母のHsf1についても高発現すると分裂酵母の経時寿命が延長することを見出した。さらに、Hsf1は*ec12*プロモーター上流領域に結合し熱ショックに応答した*ec12*の発現制御に関わること、Hsf1の高発現による経時寿命延長効果はEc12を含むEc11ファミリー因子に依存することを示した。
- (7) 高発現することで分裂酵母の経時寿命を延長する遺伝子を同定する目的で、分裂酵母のゲノムライブラリーを用いて新たに大規模なスクリーニングを行った。その結果、経時寿命延長遺伝子候補として複数の遺伝子を見出した。この中からSPBC16A3.08cに注目し解析を行い、SPBC16A3.08cが、出芽酵母のTOR経路に関わると予想されるStm1遺伝子の機能的オルソログであることを示した。16A3.08cの過剰発現と $\Delta$ tor1株の表現型が似ていることから16A3.08cがTOR経路に関わっていると想定し、研究を遂行中である。
- (8) 自然突然変異によって、経時寿命が延長する分裂酵母変異株を大規模にスクリーニングし、候補株を複数取得した。これらについて各種ストレスに対する表現型を解析し、そのうちの一株は、同時にKClに対する感受性を示すことを見出した。この表現型を利用して原因遺伝子の同定を開始している。
- (9) 細胞寿命の維持には正確なチェックポイント機構の発動が重要であると予想される。そこで、複製チェックポイントキナーゼCds1に着目し、下流因子の同定を進めた。
- (10) 出芽酵母のEc11がHap2と相互作用することをヒントに、分裂酵母のPhp2 (Hap2に相当) を解析した。その結果、分裂酵母のCCAAT結合転写因子複合体 (Php複合体) のサブユニットをコードするphp2遺伝子が欠損することにより分裂酵母の経時寿命が長くなることを発見した。また、 $\Delta$ php2株では、ミトコンドリアの呼吸関連遺伝子の発現が低下すると共に、当該遺伝子の上流にPhp2タンパク質が結合することを見出した。
- (11) 出芽酵母に見出したEc11ファミリーScEc11の高発現による寿命延長機構を解析し、ScEc11高発現による経時寿命延長はカロリー制限と重複すること、ならびにScEc11はカロリー制限と同様に呼吸と酸素消費を増加させることを見出した。詳細な解析の結果、ScEc11はカロリー制限状態を模倣し、ミトコンドリアに依存して経時寿命を延長させることを示した。

上記の研究成果により、分裂酵母の経時寿命延長に関わる因子群に関して知見が蓄積した。特にEc11ファミリーは、発見当初は未知の因子であったが、その作用機構の理解が進んだ。

#### 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8件)

- ① 饗場浩文、大塚北斗 分裂酵母を用いた経時寿命制御因子の探索と機能解析 化学と生物 査読有 50. No.5 337-344. (2012)
- ② Azuma, K., Ohtsuka, H., Murakami, H. and Aiba, H. Extension of chronological lifespan by ScEc11 depends on mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotech. Biochem. 査読有 76(10), 1938-1942 (2012)
- ③ Hiroshi Murakami, Hirofumi Aiba Another way to induce synchronous meiosis. Cell Cycle 査読有 11(10), 1874-1875 (2012)
- ④ Ohtsuka, H., Azuma, K., Kubota, S., Murakami, H., Giga-Hama, Y., Tohda, H. and Aiba, H. Chronological lifespan extension by Ec11 family proteins depends on Prp1 response regulator in fission yeast. Genes to Cells. 査読有 17. 39-52 (2012)
- ⑤ Miwa, Y., Ohtsuka, H., Naito, C., Murakami, H. and Aiba, H. Ec11, a regulator of the chronological lifespan of *Schizosaccharomyces pombe*, is induced upon nitrogen starvation. Biosci. Biotech. Biochem. 査読有 75. 279-283 (2011)
- ⑥ Ohtsuka, H., Azuma, K., Murakami, H., and Aiba, H. *hsf1<sup>+</sup>* extends chronological lifespan through Ec11 family genes in fission yeast. Mol. Genet. Genomics 査読有285. 67-77 (2011)
- ⑦ Hiroshi Murakami, Hirofumi Aiba, Makoto Nakanishi and Yuko Murakami-Tonami Regulation of yeast forkhead transcription factors and FoxM1 by cyclin-dependent and Polo-like kinases. Cell Cycle 査読有 9 (16), 3233-3242 (2010)
- ⑧ Ito, H., Oshiro, T., Fujita, Y., Kubota, S., Naito, C., Ohtsuka, H., Murakami, H., and Aiba, H. Pma1, a P-type proton ATPase, is a determinant of

chronological lifespan in fission yeast. J. Biol. Chem. 査読有 285. 34616-34620 (2010)

〔学会発表〕(計 33 件)

- ①Hirokazu Ito, Tomoko Oshiro, Hokuto Ohtsuka, and Hirofumi Aiba. Pma1, a P-type proton ATPase, is a determinant of chronological lifespan in fission yeast. Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology 2013. 1. 22-24(Nagoya)
- ②Hokuto Ohtsuka, Kenko Azuma, and Hirofumi Aiba. Identification of novel genes, *ec11<sup>+</sup>*, *ec12<sup>+</sup>*, and *ec13<sup>+</sup>*, which extend chronological lifespan in fission yeast. Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology 2013. 1. 22-24(Nagoya)
- ③Kenko Azuma, Hokuto Ohtsuka, Yurie Koga, Chikako Naito, Hiroshi Murakami, and Hirofumi Aiba. Functional characterization of lifespan elongation factor Ec11 in *Saccharomyces cerevisiae*. Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology 2013. 1. 22-24(Nagoya)
- ④Kazuaki Takuma, Hokuto Ohtsuka, Kenko Azuma, Hiroshi Murakami and Hirofumi Aiba. Php2 mutant extends the chronological lifespan of fission yeast. Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology 2013. 1. 22-24(Nagoya)
- ⑤Shingo Ogawa, Hokuto Ohtsuka, Erika Sakai, Hideaki Kawamura, Hiroshi Murakami, and Hirofumi Aiba. A novel gene *SPBC16A3.08c* which extends chronological lifespan in fission yeast functions downstream of TOR pathway. Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology 2013. 1. 22-24(Nagoya)
- ⑥饗場浩文 分裂酵母を用いた経時寿命延長因子の解析 日本農芸化学会2012年度大会シンポジウム「健康と長寿に貢献する酵母研究」 2012. 3. 25 (京都)
- ⑦饗場浩文 健康長寿社会をめざす酵母を用いた寿命研究の試み 日本薬学会東海支部特別講演会 2012. 12. 17 (金城学院大学)
- ⑧大塚北斗、琢磨和晃、東劍虹、村上浩士、饗場浩文 *php2*変異株は分裂酵母の経時寿命を延長させる 酵母遺伝学フォーラム第45回研究報告会 2012. 9. 4-6 (京都)
- ⑨島崎嵩史、大塚北斗、内藤知佳子、村上浩士、饗場浩文 分裂酵母における経時寿命延長因子 Ec11 の解析 日本農芸化学会中部支部第 165 回例会 2012. 10. 27 (名古屋)
- ⑩東劍虹、大塚北斗、古賀由梨枝、内藤知佳子、村上浩士、饗場浩文 分裂酵母における RACK1ホモログCpc2についての研究 日本農芸化学会中部支部第165回例会 2012. 10. 27(名古屋)
- ⑪琢磨和晃、大塚北斗、東劍虹、村上浩士、饗場浩文 分裂酵母php2+が経時寿命に与える影響に関する研究 日本農芸化学会中部支部第165回例会 2012. 10. 27(名古屋)
- ⑫小川真悟、大塚北斗、酒井枝里香、川村英彰、村上浩士、饗場浩文 分裂酵母の新規経時寿命延長因子に関する研究 日本農芸化学会中部支部第165回例会 2012. 10. 27(名古屋)
- ⑬東劍虹、大塚北斗、古賀由梨枝、内藤知佳子、村上浩士、饗場浩文 ロイシンは分裂酵母のCpc2欠損における胞子形成欠陥を相補する 第35回日本分子生物学会年会 2012. 12. 14 (福岡)
- ⑭琢磨和晃、大塚北斗、東劍虹、村上浩士、饗場浩文 分裂酵母Php2の変異によって経時寿命が長くなる 第35回日本分子生物学会年会 2012. 12. 14 (福岡)
- ⑮小川真悟、大塚北斗、酒井枝里香、川村英彰、村上浩士、饗場浩文 分裂酵母の新規経時寿命延長遺伝子SPBC16A3.08cはTOR経路の下流で働く 第35回日本分子生物学会年会 2012. 12. 14 (福岡)
- ⑯Hirokazu Ito, Tomoko Oshiro, Yasuyuki Fujita, Sachiko Kubota, Chikako Naito, Hokuto Ohtsuka, Hiroshi Murakami, and Hirofumi Aiba. Pma1, a P-type proton ATPase, is a determinant of chronological lifespan in fission yeast. The 6 th international fission yeast meeting (Boston, USA) 2011. 6. 25-30
- ⑰Hokuto Ohtsuka, Kenko Azuma, Sachiko Kubota, Hiroshi Murakami, Yuko -Giga-Hama, Hideki Tohda, and Hirofumi Aiba. Chronological lifespan extension by Ec11 family genes depends on *prp1+* in fission yeast. The 6 th international fission yeast meeting (Boston, USA) 2011. 6. 25-30
- ⑱Yuko Murakami-Tonami, Hokuto Ohtsuka, Makoto Nakanishi, Hirofumi Aiba and Hiroshi Murakami. Regulation of *wee1<sup>+</sup>* expression during meiosis in fission yeast. The 6 th international fission yeast meeting (Boston, USA) 2011. 6. 25-30
- ⑲饗場浩文: 酵母に学ぶ寿命研究が拓く未来 名古屋大学 創薬を目指した融合領域セミナー2011~最先端メディシナル

サイエンスの未来～（名古屋大学）  
2011.9.3

⑳Hirofumi Aiba. Identification and  
characterization of determinants of  
chronological lifespan in fission yeast.  
The 5<sup>th</sup> International Workshop on Cell  
Regulations in Division and Arrest  
(Okinawa, OIST Seaside House)  
2011.10.23-26

（他 13 件）

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

饗場 浩文（ AIBA HIROFUMI ）  
名古屋大学・大学院創薬科学研究科・教授  
研究者番号：60211687

(2) 研究分担者 なし  
（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし  
（ ）

研究者番号：