

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510279

研究課題名(和文)細胞寿命研究モデルとしての出芽酵母二倍体細胞における寿命制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of lifespan regulation in diploid cells of the budding yeast  
*Saccharomyces cerevisiae* as a model for cellular lifespan study

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母は細胞レベルの老化・寿命制御の解明に重要な研究モデルであるが、遺伝学的解析に有利なことから一倍体細胞が用いられてきた。高等生物が一般的に二倍体であるので、本研究では出芽酵母の二倍体細胞について寿命制御メカニズムを解明することを目指した。野生型の二倍体株は一倍体株よりも分裂寿命(1個の細胞が死ぬまでに出芽する細胞数)が長かった。二倍体特異的に発現する遺伝子の探索過程で、新しい寿命関連遺伝子を見つけた。さらに、増殖に必要な遺伝子の中から二倍体ヘテロ遺伝子破壊株を利用することにより新しい寿命遺伝子を見つけた。

研究成果の概要(英文)：The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the most important model organisms for studying cellular senescence and lifespan. Haploid cells of the yeast is convenient for analyzing gene function. In this study, we have investigated yeast diploid cells as a better model for cellular lifespan study since higher organisms are generally diploid cells. Diploid cells of wild-type strain exhibited longer replicative lifespan, the number of cells produced from a cell before dying, than haploid cells. During searching genes that are specifically expressed in diploid cells, we found novel longevity genes. Using heterozygous diploid knockout mutants, we discovered novel longevity genes essential for cell proliferation.

研究分野：酵母の分子遺伝学

キーワード：寿命 二倍体細胞 出芽酵母 老化疾患モデル トランスクリプトーム メタボローム 必須遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は細胞レベルの老化・寿命研究モデルとして広く用いられている。出芽酵母における「分裂寿命」とは1個の母細胞が死ぬまでに生む娘細胞の数として定義され、多細胞生物における分裂が活発な細胞の寿命モデルとなっている。

(2) 出芽酵母では一倍体において突然変異の表現型を容易に調べられることから、他の生物にさきがけて多くの寿命遺伝子が同定され、そのノックアウト (KO) 株が老化疾患モデルとして研究されてきた。しかし、高等生物と同じ二倍体の出芽酵母が一倍体よりも長寿なので、出芽酵母の一倍体を高等生物のモデルとして研究することは問題であった。また、出芽酵母の二倍体が長寿である原因が理解されていなかったため、酵母細胞の倍数性と分裂寿命の関心に興味を持った。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、出芽酵母の二倍体で働く寿命遺伝子を同定し、その機能を解析することにより、一倍体を用いた従来の研究では見逃されていた二倍体に特有の寿命制御機構を明らかにすることである。

(2) 本研究で得られる成果は、これまでに一倍体だけを用いて解析されてきた寿命研究の問題を解決することに貢献する。また、一般的に二倍体である実用酵母の寿命に関しても新しい知見が得られると考える。さらに、高等生物の老化研究モデルおよび老化疾患モデルとしての出芽酵母の有用性をより高めるものである。

## 3. 研究の方法

### (1) 二倍体特異的な寿命遺伝子の同定と機能解析

① 遺伝的背景が同質の二倍体、三倍体、四倍体株を構築し、それらの分裂寿命を一倍体株と比較した。

② 二倍体で特異的に転写される遺伝子を既に報告された文献データおよび新たな DNA マイクロアレイ解析によって探索した。

③ 二倍体特異的に発現する遺伝子について、その両対立遺伝子を破壊した二倍体ホモ KO 株の分裂寿命を測定した。

### (2) 二倍体ヘテロ KO 株を用いた増殖に必須な寿命遺伝子の同定

① 増殖に必須な転写因子遺伝子について、一方の対立遺伝子のみを破壊した二倍体ヘテロ KO 株の分裂寿命を測定した。

② 増殖に必須な転写因子遺伝子を 2 コピーもつ株を構築し、その分裂寿命を測定した。

### (3) 清酒酵母における分裂寿命の検討

① 二倍体である清酒酵母の分裂寿命を測定し、実験室二倍体株と比較した。

### (4) 老化細胞で転写誘導される寿命遺伝子の同定と機能解析

① 老化段階の細胞を回収し、それらのトランスクリプトームを DNA マイクロアレイ解析によって、メタボロームをガスクロマトグラフィー質量分析によって調べた。

② 老化細胞で発現が誘導される遺伝子について、その遺伝子 KO 株の分裂寿命を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 二倍体特異的な寿命遺伝子の同定と機能解析

① これまでに二倍体出芽酵母の二倍体が一倍体よりも長寿であることは観察されていたが (文献①)、三倍体や四倍体などの高次倍数体については報告されていなかった。出芽酵母 KO コレクションの親株である BY4742 株と遺伝的背景が同質の二倍体の分裂寿命は約 30 世代で、一倍体の分裂寿命 (約 25 世代) よりも長かった。三倍体と四倍体も長寿であったが、二倍体とほぼ同じ寿命であった (図 1)。

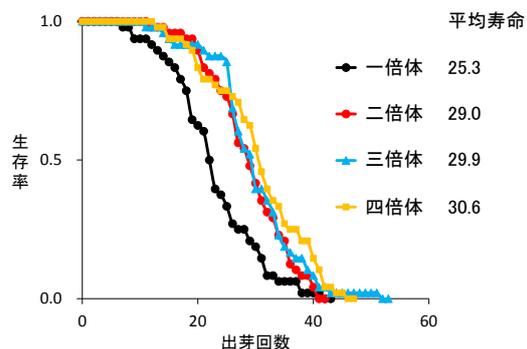


図 1 出芽酵母高次倍数体の分裂寿命

② 高次倍数体の間では <sup>1</sup>H-NMR 法による細胞内メタボロームの違いがみられなかったため、二倍体の長寿の原因は転写パターンの違いであると考えた。以前に高次倍数体の DNA マイクロアレイ解析が行われており (文献②)、その解析データから二倍体特異的に転写される遺伝子を再検討したところ、高次倍数体で転写量が 2 倍以上に増加する遺伝子を 13 個抽出した。また、分裂寿命測定に用いた二倍体と一倍体について DNA マイクロアレイ解析を独自に行い、二倍体で転写量が 2 倍以上に増加する遺伝子を 25 個見いだした。

③ 二倍体特異的に発現する遺伝子の中で、*RAD50* 遺伝子の二倍体ホモ KO 株が短寿であった。しかし、*RAD50* 遺伝子の一倍体 KO 株も同じように短寿であったため、*RAD50* 遺伝子は二倍体特異的な寿命遺伝子ではないと結論した。また、4 個の機能未知遺伝子を含む残りの二倍体特異的遺伝子について二倍

体ホモ KO 株の分裂寿命を調べたが、野生型株と同じ、あるいは野生型株よりも長寿であったので、これらは目的の寿命遺伝子ではないと判断した。アクチンをコードする *ACT1* 遺伝子の転写が二倍体で増加していた。*ACT1* 遺伝子は増殖に必須な遺伝子なので、その二倍体ヘテロ KO 株を構築すると、その分裂寿命は野生型二倍体株よりも短くなった。

## (2) 二倍体ヘテロ KO 株を用いた増殖に必須な寿命遺伝子の同定

① *ACT1* 遺伝子のように増殖に必須な遺伝子が寿命決定に関与するかどうかはこれまでに調べられていなかった。そこで、二倍体ヘテロ KO 株を利用することにより、この問題を解決できると考えた。出芽酵母の約 6,600 個の遺伝子のうち約 1,200 個が必須遺伝子である。その中の DNA 結合性の転写因子をコードする 8 個の必須遺伝子についてヘテロ KO 株の分裂寿命を測定すると、*FHL1*、*RAP1*、*REB1*、*MCM1* 遺伝子の二倍体ヘテロ KO 株が短寿となった (図 2)。これら転写因子遺伝子ヘテロ KO 株の <sup>1</sup>H-NMR メタボロームを調べると、*FHL1* 遺伝子ヘテロ KO 株だけが特徴的な代謝プロファイルを示したことから、転写因子 Fhl1p は代謝調節を介して寿命を制御すると考えた。

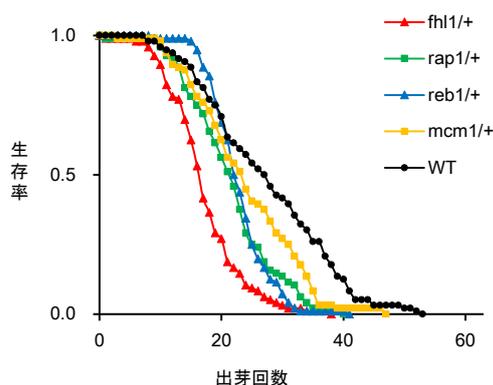


図 2 必須転写因子遺伝子 KO 株の分裂寿命

② 必須な転写因子遺伝子を 2 コピーもたせた株で、その転写因子遺伝子の発現量が 2 倍以上に増加していることを確認したが、それらの分裂寿命は野生型株とほぼ同じであった。

## (3) 清酒酵母における分裂寿命の検討

① 清酒造りに用いられる出芽酵母は二倍体であり、近年、清酒酵母が予想に反してストレスに弱いことが報告された。代表的な清酒酵母であるきょうかい酵母の分裂寿命を測定すると、実験室条件のグルコース濃度 (2%) ともろみ中のグルコース濃度 (10%) のどちらにおいても、きょうかい酵母は実験室二倍体株よりも長寿であった。

## (4) 老化細胞で転写誘導される寿命遺伝子の同定と機能解析

① 老化の進行速度が寿命を決定すると考え

られているので、二倍体における細胞老化を解析する前に予備的に一倍体における細胞老化の解析を試みた。4 世代、7 世代および 11 世代の老化細胞を回収し、DNA マイクロアレイ解析によりトランスクリプトーム情報を、ガスクロマトグラフィー質量分析よりメタボローム情報を取得した。老化の進行に伴い、多くのアミノ酸量が減少し、TCA 回路中間代謝物量が増加していた。この代謝変化はこれらの代謝物を触媒する酵素遺伝子の転写レベルの変化と一致した。また、11 世代の老化細胞で、*SNZ1* 遺伝子などの定常期に誘導される遺伝子の発現が増加していた。

② *SNZ1* 遺伝子はビタミン B<sub>6</sub> 合成酵素をコードしており、この遺伝子を破壊すると分裂寿命は短くなった。また、ビタミン B<sub>6</sub> 取込み酵素遺伝子 KO 株も短寿であった。

以上のように、二倍体特異的な発現を指標として、二倍体で特異的に働く寿命遺伝子を同定することはできなかった。しかし、二倍体ヘテロ KO 株を利用することにより、増殖に必須な寿命遺伝子を発見する方法を新しく提案することができた。また、二倍体である実用酵母の中で清酒酵母の分裂寿命が実験室酵母よりも長寿であることを示すことができた。さらに、老化細胞を調べることにより、ビタミン B<sub>6</sub> 関連遺伝子が寿命決定に重要であることを明らかにした。これらの知見は国内外ともに報告がなく、学会発表および論文発表において高く評価された。

今後は、これまで寿命が解析されなかった必須遺伝子を中心に、出芽酵母二倍体を用いる有用性を高めることを目指したい。また、長寿の清酒酵母を用いることにより、実験室酵母の解析だけでは得ることができなかった新しい寿命制御機構の発見を期待したい。老化細胞で特異的に発現する寿命遺伝子の転写制御機構の研究は細胞老化シグナルの発見に結びつく大きなチャンスであると考えられる。

## <引用文献>

- ① Kaeberlein, M. *et al.*, Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background, *Mech. Ageing Dev.*, Vol. 126, No. 4, 2005, pp. 491-504.
- ② Galitski, T. *et al.*, Ploidy regulation of gene expression, *Science*, Vol. 285, No. 5425, 1999, pp. 251-254.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kamei, Y., A. Tai, S. Dakeyama, K. Yamamoto, Y. Inoue, Y. Kishimoto, H. Ohara, Y. Mukai. Transcription factor genes essential for cell proliferation and replicative lifespan in budding yeast.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有,  
Vol. 463, Iss. 3, 2015, pp. 351-356.  
DOI:10.1016/j.bbrc.2015.05.067.

②Kamei, Y., Y. Tamada, Y. Nakayama, E. Fukusaki, Y. Mukai. Changes in transcription and metabolism during the early stage of replicative cellular senescence in budding yeast. *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 289, No. 46, 2014, pp. 32081-32093.  
DOI: 10.1074/jbc.M114.600528.

[学会発表] (計15件)

①丸橋 翼、田井 晶子、亀井 優香、向 由起夫、出芽酵母におけるビタミン B6 合成酵素遺伝子 *SNZ1* による分裂寿命制御機構、日本分子生物学会、2014年11月25日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

②北村 友貴、向 由起夫、清酒酵母における寿命遺伝子の解析、Yeast Workshop、2014年11月14日、ビューポートくれ (広島県・呉市)

③田井 晶子、向 由起夫、転写因子 Forkhead-like 1 によるリン酸飢餓応答に必要な *PHO4* 遺伝子転写制御、Yeast Workshop、2014年11月14日、ビューポートくれ (広島県・呉市)

④亀井 優香、山本 香李、嶽山 翔太、井上 大和、田井 晶子、向 由起夫、出芽酵母の分裂寿命を制御する増殖に必須な転写因子遺伝子の同定、日本遺伝学会、2014年9月19日、長浜バイオ大学 (滋賀県・長浜市)

⑤亀井 優香、向 由起夫、出芽酵母のビタミン B6 合成酵素遺伝子 *SNZ1* は分裂寿命を制御する、日本遺伝学会、2014年9月19日、長浜バイオ大学 (滋賀県・長浜市)

⑥向 由起夫、転写と代謝プロファイルから細胞老化を考える (招待講演)、酵母合同シンポジウム、2014年9月4日、東京大学伊藤国際学術研究センター (東京都・文京区)

⑦ Yukio Mukai, Yuka Kamei, Yoshihiro Tamada, Yasumune Nakayama, Eiichiro Fukusaki, Changes in transcription and metabolism during the early stage of replicative cellular senescence in budding yeast, Yeast Genetics Meeting, July 31, 2014, Univ. Washington (Seattle, USA)

⑧井上 大和、亀井 優香、向 由起夫、出芽酵母の転写因子をコードする必須遺伝子へテロノックアウト株のメタボローム解析、日本分子生物学会、2013年12月3日、神戸ポ

ートアイランド (兵庫県・神戸市)

⑨向 由起夫、嶽山 翔太、山本 香李、亀井 優香、出芽酵母の転写因子をコードする必須遺伝子 *FHL1* は長寿遺伝子である、日本分子生物学会、2013年12月3日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

⑩亀井 優香、向 由起夫、出芽酵母の老化により転写誘導される *SNZ1* 遺伝子は長寿遺伝子である、日本分子生物学会、2013年12月3日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

⑪Yuka Kamei, Yukio Mukai, Changes in transcription and metabolism during early stage of replicative cellular senescence in budding yeast, Molecular Basis of Aging & Disease, Sept. 10, 2013, Cold Spring Harbor Asis (Suzhou, China)

⑫向 由起夫、メタボロームを利用した酵母細胞の寿命・老化研究 (招待講演)、酵母研究会、2013年3月13日、白鶴酒造株式会社 (兵庫県・神戸市)

⑬亀井 優香、玉田 佳大、福崎 英一郎、向 由起夫、出芽酵母の老化進行過程におけるメタボローム解析、日本分子生物学会、2012年12月12日、福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

⑭小崎 太寅、市橋 あづみ、松田 宙大、亀井 優香、田村 隆行、堤 浩子、福崎 英一郎、向 由起夫、清酒酵母の分裂寿命と経時寿命、日本生物工学会、2012年10月25日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

⑮亀井 優香、玉田 佳大、福崎 英一郎、向 由起夫、老化進行過程における酵母細胞のメタボローム解析、酵母遺伝学フォーラム、2012年9月4日、京都大学宇治キャンパス (京都府・宇治市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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