

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850048

研究課題名(和文) Ecl1 familyタンパク質の寿命延長メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of Ecl1 family proteins that extends chronological lifespan

研究代表者

大塚 北斗(Ohtsuka, Hokuto)

名古屋大学・創薬科学研究科・助教

研究者番号：10632151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母が環境中の亜鉛や鉄の量に応答して、性分化や寿命の延長を引き起こすことを明らかにした。また、これら応答にはEcl1 family遺伝子が中心的働きをすることも同時に示した。これらは以下の論文にまとめ発表した。

(1) Ohtsuka H, et al. Mol Genet Genomics. 2015 (2) Shimasaki T, Ohtsuka H, et al. Mol Genet Genomics. 2017

研究成果の概要(英文)：We identified that fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* responds to the environmental levels of zinc or iron and causes the sexual development or the chronological lifespan extension. We also showed that these responses require Ecl1 family genes. We reported these as following papers.

(1) Ohtsuka H, et al. Mol Genet Genomics. 2015 (2) Shimasaki T, Ohtsuka H, et al. Mol Genet Genomics. 2017

研究分野：分子微生物学

キーワード：Ecl1 family遺伝子 ecl1 経時寿命 亜鉛 分裂酵母 鉄 性分化

## 1. 研究開始当初の背景

老化という現象はあらゆる生物に共通して起こる。老化の分子生物学研究においては、モデル生物を用いた多くの研究により、老化に関わる因子や経路などがさまざまな生物種にわたり共通して保存されていることが証明されている (Fontana et al. Science 2010)。申請者らは分裂酵母を用い老化現象のメカニズム解明を目指した研究に取り組んできた。

酵母を用いた老化研究は、その遺伝子操作の容易さを活かし、さまざまな老化関連因子が同定され、細胞寿命・老化メカニズム解明に貢献している (Roux et al. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2010; 饗場,大塚 化学と生物 2012)。その酵母の寿命の概念として2つの寿命が定義されている。分裂寿命と経時寿命である。申請者らは分裂酵母を用い経時寿命の研究をしている。経時寿命とは、分裂しない状況下での細胞集団の生存期間を計測することで測定され、高等多細胞生物の分化した細胞の寿命モデルとして捉えられている。

酵母の老化研究においても、出芽酵母に比べ分裂酵母を用いた研究は比較的新しい。分裂酵母は細胞分裂の形態やエキソン/イントロンの割合などの観点から、出芽酵母より高等生物に近いと判断されうる。さまざまな生物に保存されている老化・寿命メカニズムの理解と、ヒトなどへの老化・寿命研究の応用の観点から、分裂酵母を用いて老化研究に取り組むことにはさまざまな利点がある。申請者らは分裂酵母の経時寿命解析を行う過程で、それまで non-coding RNA しか無いと認識されていた DNA 領域に新たにタンパク質をコードする遺伝子、*ecl1<sup>+</sup>*、*ecl2<sup>+</sup>*、*ecl3<sup>+</sup>*を見いだした (Ohtsuka et al. FEMS Yeast Res 2008; Ohtsuka et al. Biosci Biotechnol Biochem 2009)。また同様に、出芽酵母においてもそのホモログ遺伝子 *ECL1* を発見した (Azuma, Ohtsuka et al. Biosci Biotechnol Biochem 2009)。これら Ecl1 family 遺伝子群は分裂酵母、出芽酵母のどちらにおいても高発現することにより寿命を延長させ、その遺伝子群の欠損により寿命が短くなる。現在までに、これら遺伝子の発現機構や (Ohtsuka et al. Mol Genet Genomics 2011) その寿命延長に関与する因子の特定 (Ohtsuka et al. Genes Cells 2012) に関して一定の知見を得られたが、その遺伝子産物の分子レベルでの機能は未だ不明のままである。本研究計画では、後述する表1や図1の予備的研究結果、つまり Ecl1 family タンパク質の機能と金属との関わりを知見が得られたことから、Ecl1 family タンパク質群に関わる現象・反応・制御などの分子機構および寿命延長メカニズムの解析を行い、同時にこれらと金属との関連を調べる

## 2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は Ecl1 family タンパク質群に関わる現象・反応・制御などの分子機構および寿命延長メカニズムの解析を行い、同時にこれらと金属との関連を調べる

## 3. 研究の方法

(1) Ecl1 family タンパク質の金属結合の有無を調べる。Ecl1 family タンパク質は共通して保存されている4つのシステイン残基を持つ。過去にジスルフィド結合形成の有無を調べたが、これらシステイン残基のジスルフィド結合の形成は見られなかった。今回、これら4つのシステインが亜鉛などの金属との結合に関与しているかどうかを調べる。

(2) Ecl1 family 遺伝子産物のタンパク質3次元構造を決定する。

(3) Ecl1 family タンパク質の減数分裂・有性生殖に対する影響を調べる。Ecl1 family タンパク質の解析を通じて、分裂酵母が Ecl1 family タンパク質依存的に鉄や亜鉛の枯渇に応答して有性生殖・減数分裂誘導を起こすことを見いだした。分裂酵母の減数分裂・有性生殖の誘導要因は炭素源や窒素源の枯渇が知られており、生育環境にわずかに存在する金属因子の量が減数分裂・有性生殖誘導に関わることは申請者らが初めて明らかにした。これより、従来の寿命解析の視点とは異なる点から Ecl1 family タンパク質の解析を行うことができ、さらにその研究結果は分裂酵母の新たな生理応答の解明にも貢献することが期待される。

(4) 細胞外金属量の変動は Ecl1 family タンパク質群による寿命延長に影響を与えるか? 上記(3)より、Ecl1 family タンパク質が何らかのかたちで金属類に関与・応答していることが確認された。また、Ecl1 family タンパク質の高発現による寿命延長は金属類の添加により抑制されることがわかった。また、ここには示さないが、分裂酵母の寿命が生育環境中の金属量を減らすことで長生きする予備的研究結果も得られている。本研究計画では、生育環境中の金属量の低下が Ecl1 family タンパク質を介し、寿命延長を導くという仮説を立て、その仮説を検証する。現在、生物の寿命に影響を与える外的要因として、摂取カロリーの量が知られている。これを利用した寿命延長は、カロリー制限と呼ばれており、最も有名な寿命延長手段である。しかし、このカロリー制限による寿命延長は通常生活での食べる量を減らさなければならぬので、その実現には空腹という苦痛を伴う。本研究での知見は、カロリー以外の因子の摂取制限が寿命延長を引き起こす一例を示すものであり、その現象解明とメカニズムの解析により新たな寿命制御の観点もたらされることが期待される。

## 4. 研究成果

本研究では、分裂酵母の Ecl1 family タン

パク質による寿命延長メカニズムの解明を目指し、特にその金属との関連において重点的に解析を行った。本計画では、具体的に以下を目指していた。

(1) Ecl1 family タンパク質の金属結合の有無を調べる。

(2) Ecl1 family 遺伝子産物のタンパク質3次元構造を決定する。

(3) Ecl1 family タンパク質の減数分裂・有性生殖に対する影響を調べる。それぞれの成果を以下にまとめた。

(1): Ecl1 タンパク質が亜鉛と結合することを明らかにした。この亜鉛結合は Ecl1 family タンパク質の保存されたシステインが重要であり、このシステインをセリンに変換したタンパク質では、亜鉛結合は見られなくなり、Ecl1 タンパク質の高発現による表現型も見られなくなった。(2): Ecl1 family タンパク質の3次元構造を決定することは残念ながらできなかった。Ecl1 タンパク質は高濃度で存在するとき、原因不明の自己分解を起こす。精製した Ecl1 タンパク質のみでこの分解の現象が見られることから、Ecl1 タンパク質にプロテアーゼ活性があるのではないかと予想している。事実、Ecl1 family タンパク質のある領域の配列は金属プロテアーゼのドメインと類似性を示すことが分かっている。(3): 分裂酵母が亜鉛や鉄などの環境中の金属量に反応して有性生殖を起こすことを明らかにし、その反応に Ecl1 family 遺伝子が中心的な働きをすることを証明することができた。

#### 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2件)

Ecl1 is a zinc-binding protein involved in the zinc-limitation-dependent extension of chronological life span in fission yeast.

Shimasaki T, Ohtsuka H, Naito C, Azuma K, Tenno T, Hiroaki H, Murakami H, Aiba H. *Mol Genet Genomics*. 2017 Apr;292(2):475-481. doi: 10.1007/s00438-016-1285-x. Epub 2017 Feb 3.

Sexual development of *Schizosaccharomyces pombe* is induced by zinc or iron limitation through Ecl1 family genes.

Ohtsuka H, Ishida M, Naito C, Murakami H, Aiba H. *Mol Genet Genomics*. 2015 Feb;290(1):173-85. doi: 10.1007/s00438-014-0911-8. Epub 2014 Sep 10.

[学会発表](計10件)

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 Ecl1 ファミリータンパク質の機能解析 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 2015.12.1-4(1) 神戸ポートアイランド 1P112

Maiko Ishida, Hokuto Ohtsuka, Hiroshi Murakami, Hirofumi Aiba. Sexual development of *S. pombe* is induced by iron or zinc limitation. The eighth international fission yeast meeting. Kobe, Japan 21-26 June, 2015 Poster 113.

Takafumi Shimasaki, Hokuto Ohtsuka, Maiko Ishida, Chikako Naito, Hirofumi Aiba. Functional analysis of Ecl1 family proteins that extend chronological lifespan of *Schizosaccharomyces pombe*. The eighth international fission yeast meeting. Kobe, Japan 21-26 June, 2015 Poster 113.

石田麻衣子、大塚北斗、内藤知佳子、村上浩士、饗場浩文 分裂酵母は亜鉛もしくは鉄枯渇下で有性生殖を引き起こす 理系女性研究者の活躍推進シンポジウム「シーズ&ニーズ・マッチングフォーラムおよび女性研究者交流会」2015.3.10 豊橋技術科学大学

島崎嵩史、大塚北斗、石田麻衣子、内藤知佳子、饗場浩文 分裂酵母における経時寿命延長因子 Ecl1 ファミリータンパク質の解析 第37回日本分子生物学会年会 2014.11.25-27 横浜

石田麻衣子、大塚北斗、村上浩士、饗場浩文 新規な性分化シグナル・亜鉛枯渇における Ecl1 ファミリー遺伝子の機能解析 第37回日本分子生物学会年会 2014.11.25-27 横浜

島崎嵩史、大塚北斗、石田麻衣子、内藤知佳子、饗場浩文 分裂酵母における経時寿命延長因子 Ecl1 ファミリータンパク質の解析 日本農芸化学会中部支部第171回例会 2014.10.11 名古屋大学

石田麻衣子、大塚北斗、村上浩士、饗場浩文 新規な性分化シグナル・亜鉛枯渇における Ecl1 ファミリー遺伝子の機能解析 酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会 2014.9.1-3(1,2) (東京大学農学部弥生キャンパス 東京大学弥生講堂) P32

大塚北斗、島崎嵩史、石田麻衣子、内藤知佳子、饗場浩文 分裂酵母における経時寿命延長因子 Ecl1 ファミリータンパク質

の解析 酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会 2014.9.1-3(1,2) (東京大学農学部弥生キャンパス 東京大学弥生講堂) P31

石田麻衣子、大塚北斗、内藤知佳子、村上浩士、饗場浩文 分裂酵母はFe,Zn 枯渇下で有性生殖を引き起こす 名古屋大学若手女性研究者サイエンスフォーラム 2014.8.6 名古屋大学

〔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

大塚 北斗 (Ohtsuka, Hokuto)  
名古屋大学大学院 創薬科学研究科 助教  
研究者番号：10632151

##### (2)研究分担者

該当無し

##### (3)連携研究者

該当無し

##### (4)研究協力者

天野 剛志 (Tenno, Takeshi)  
島崎 嵩史 (Shimasaki, Takafumi)