

酵母の経時寿命延長因子

Ecl1 family の解析

2013 年 3 月

名古屋大学大学院

生命農学研究科

生物機構・機能科学専攻

分子細胞機構学講座

応用微生物学研究室

東 剣虹

目次

序論

第 1 章 出芽酵母における分裂酵母の Ecl1 類似因子の同定と解析

第 2 章 出芽酵母の ScEcl1 による経時寿命延長はミトコンドリアに依存する

第 3 章 分裂酵母の Ecl1 と相互作用する因子の解析

総合討論

謝辞

報文、参考文献

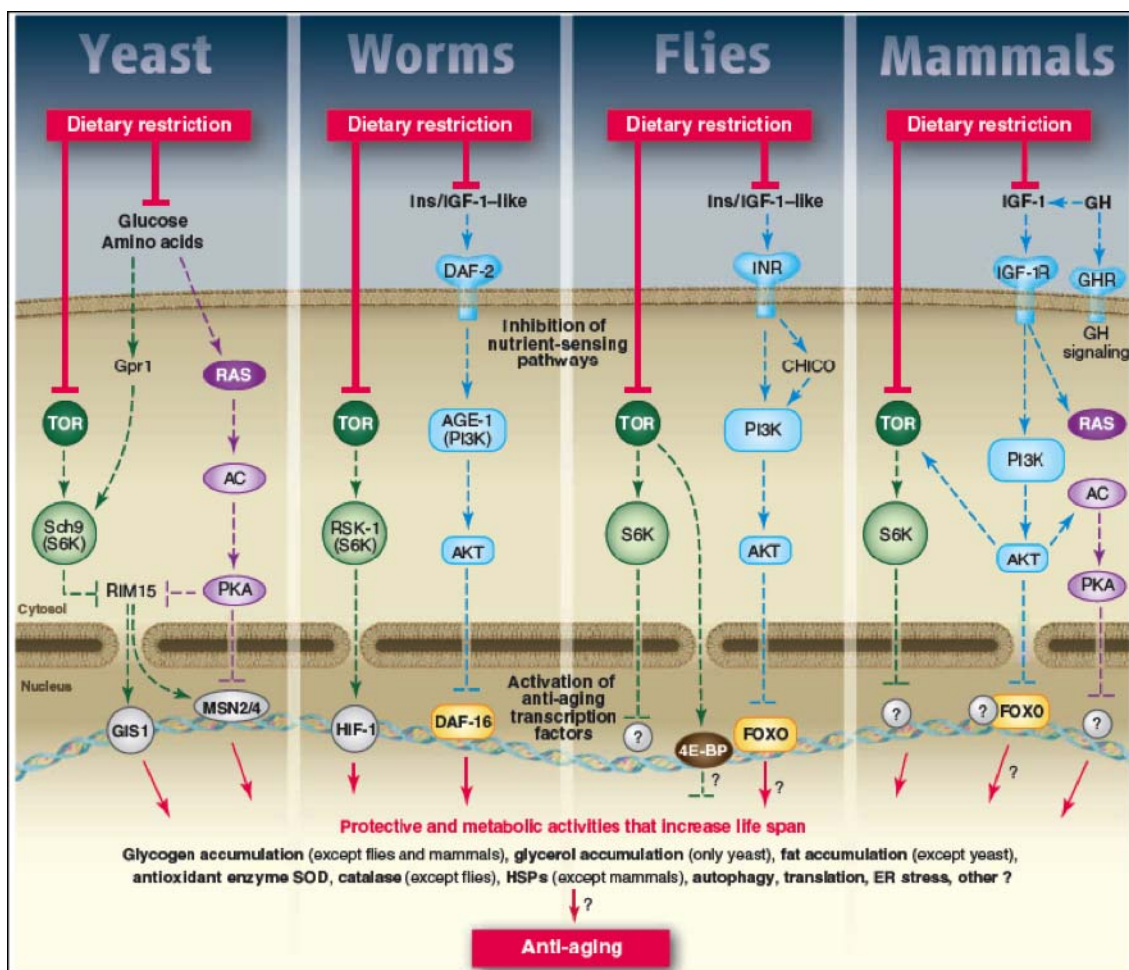
序論

本研究の目的

「健康に生きたい」、「肌年齢を若く」といった考えは、いつの時代も人にとって変わらない願いである。これらの考えの根源にあるのは、生物として避けられない「老化」というプロセスが存在しているからではないだろうか。生あるものは死を免れることはできない、また死に至る大きな要因でもある「老化」から逃れることもできない。しかし、我々はこの「老化」を遅延させることは可能ではないだろうか？私は、父方母方の双方の祖父母を皆病気で亡くしていることから、家族には健康で生きていてほしいという願望が一層強い。これらの思いを秘め、私は寿命や老化に関与した研究を行っている。

21世紀初頭に、酵母、線虫、ショウジョウバエ、マウスなどのモデル生物に共通した寿命延長要因として食餌制限が見いだされた (Longo & Fabrizio 2002)。近年の研究では、ヒトにおいて食事制限することにより癌などのリスクが低下するとの報告がある (Fontana *et al.* 2010)。栄養に応答した寿命延長に関与するシグナル伝達経路が次第に明らかになっていく中、延長メカニズムは未だに明確になっていない。しかし、少なくとも共通して保存されている経路があることから、真核微生物である酵母を用いて寿命の研究を行うことに対して意義が見いだされた。①比較的に遺伝子操作が行いやすい。②高等生物を扱うほどの倫理問題も発生しない。③近年報告されているアルツハイマー病やパーキンソン

病といった神経変性病などの原因の一つに、老化や遺伝的な要因によるミトコンドリア欠陥が引き起こす特定の細胞の機能欠陥に由来するとの報告がある (Douglas *et al.* 2010)。①～③を併せて考えて、真核生物の細胞モデルである酵母を用いた細胞レベルでの研究を行うことは、より迅速にメカニズムの解明に繋がると考えている。以上が、私が酵母を用いて寿命研究を行う動機である。



Fontana L. *et al.* 2010 *Science*より抜粋

図0: 酵母からマウスまで保存された寿命関連経路

酵母、線虫、ショウジョウバエ、マウスに共通して存在する寿命延長経路、TOR経路 (緑) とインスリン経路、RAS経路 (水色、紫) がある。ともに食餌制限と深く結びついており、負に制御されている。

酵母を用いた寿命研究

先の目的にも記述したが、酵母は真核生物の細胞モデルである。単細胞真核生物である酵母には二つの寿命概念が存在する。一つは分裂寿命で、もう一つは経時寿命である。前者は主に発芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で研究され、一つの母細胞から生涯発芽する娘細胞の数を測定することによって求められる。これは主に幹細胞などの分裂限界モデルとして用いられる。後者は発芽酵母に加え、近年分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* でも研究され始め、定常期以降の細胞集団が死滅するまでの時間を測定することで求められる。これは主に分化した細胞の細胞寿命モデルとして用いられる。

発芽酵母の研究を通して見いだされた寿命関連因子は、他の生物種においても保存されていることが示された。最も有名なのは、Tor-Sch9 経路だと思われる。栄養に応答して細胞成長に関する転写、翻訳、栄養運搬やオートファジーを制御する TORC1 の構成因子である Tor1 は、ラパマイシンの標的となるプロテインキナーゼである。これまでの研究により、Tor1 が欠損した発芽酵母では、経時寿命の延長が報告された (Fabrizio *et al.* 2001)。また、Sch9 は浸透圧ストレスや G1 期移行に関与するプロテインキナーゼであり、高等生物のリボソームプロテイン S6 キナーゼと類似する。Sch9 も欠損することで同様に発芽酵母の経時寿命の延長が報告されている (Wei *et al.* 2009)。発芽酵母の Tor1 と Sch9 に相当する因子は、例えば線虫では TOR と S6 キナーゼであり、これらの活性を抑制することで寿命が延長したとの報告がある (Johnson, 2008, Fontana *et al.* 2010)。また、ショウジョウバエの TOR をラパマイシンによって抑制することによって

も寿命の延長が見られ、マウスにおいても S6 キナーゼの欠損個体で寿命が延長したとの報告がそれぞれなされた (Partridge *et al.* 2004, Selman *et al.* 2009)。

以上のことから、栄養に関連する寿命延長経路 (因子) は酵母からマウスまで保存されていることが伺える。またこれらは酵母における先行研究によって見いだされている。よって、酵母を用いて寿命研究を行うことは、高等生物における寿命研究に大いに役立つと期待できる。

分裂酵母の経時寿命延長因子 Ecl1

本研究で扱うのは出芽酵母および分裂酵母の Ecl1 である。では、まず Ecl1 についてその基礎的な研究背景を述べる。

これは当研究室で発見した分裂酵母の新規遺伝子であり、マルチコピーのプラスミドを用いた高発現により、分裂酵母の経時寿命を延長させた。我々はこの表現型から、遺伝子を *extender of chronological lifespan* を意味する Ecl1 と命名し、発表した (Ohtsuka H *et al.* 2008)。Ecl1 は主に核に局在し、高発現することで経時寿命以外に過酸化水素ストレス耐性や、胞子形成の促進が見られた (Ohtsuka H *et al.* 2012)。上記で取り上げた食餌制限に関しては、Ecl1 高発現株にカロリー制限 (0.5 %グルコース) を施しても、それ以上の寿命延長は見られなかったことから、カロリー制限と重複して働くと考えられた。

本論文に登場する Ec11 及び Ygr146c の特殊な領域

誤解を防ぐため、本論文で登場する分裂酵母の Ec11: *SpEc11* (Ec11 に該当) と出芽酵母の Ec11: *ScEc11* (YGR146C に該当) の特殊な領域を以下に示す。

```

Ec11      1 --MDL-DFCTVCG-----ATTQDGSLYCSSECHLLDFTKLD
YGR146C   1 MSTAFNDYCTVCDRLIPTSPQKTNINTRKIQRDNETKSSLQSNKLYCSEDCKLKDSNPLN
           * ****                      ++ * **** +* * * **
Ec11      TQTTSNISVSSEYQFLVSEHLAH--FHRKSMTSADF--PTPRFSAYTKLHA-----
YGR146C   EKLLSHLHKKSKTSH--SHNLT PPLSYSKNLTASNLFEP T TSLSSSPTSS TIPFDELEKL
           +  ***  *+  * +*  + *****  **  *+
Ec11      -----
YGR146C   ESSLISPLLLPQDGIVNPKQESNPSRVDEYDENEHYLNLADSLRLDSSYQLHKAHLGYE

Ec11      ----- 80
YGR146C   NNLPRSNLIDDHLISDQIENNYNLWFRLSSS 211
    
```

青 : *SpEc11* と類似する領域の *ScEc11*-NT (1 章)

赤 : Two-hybrid で用いた *SpEc11*-CT (3 章)

参考文献

Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, Gendron CM, Longo VD, (2001) Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*, **292**, 288-90

Fontana L, Partridge L, Longo VD, (2010) Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science*, **328**, 321-6

Johnson TE, (2007) *Caenorhabditis elegans* 2007: the premier model for the study of aging. *Exp. Gerontol.*, **43**, 1-4

Longo VD, Fabrizio P, (2002) Regulation of longevity and stress resistance: a molecular strategy conserved from yeast to humans? *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 903-908

Ohtsuka H, Mita S, Ogawa Y, Azuma K, Ito H, Aiba H. (2008) A novel gene, *ecl1*⁺, extends the chronological lifespan in fission yeast. *FEMS Yeast Res.*, **8**, 520-30

Ohtsuka H, Azuma K, Kubota S, Murakami H, Giga-Hama Y, Tohda H, Aiba H. (2012) Chronological lifespan extension by Ecl1 family proteins depends on Prr1 response regulator in fission yeast. *Genes Cells*, **17**, 39-52

Partridge L, Alic N, Bjedov I, Piper MD, (2011) Ageing in *Drosophila*: the role of the

insulin/Igf and TOR signalling network. *Exp. Gerontol.*, **46**, 376-81

Selman C, Tullet JM, Wieser D, Irvine E, Lingard SJ, Choudhury AI, Claret M, Al-Qassab H, Carmignac D, Ramadani F, Woods A, Robinson IC, Schuster E, Batterham RL, Kozma SC, Thomas G, Carling D, Okkenhaug K, Thornton JM, Partridge L, Gems D, Withers DJ. (2009) Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science*, **326**, 140-4

Wallace DC, Fan W, and Procaccio V, (2010) Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, **5**, 297-348

Wei M, Fabrizio P, Madia F, Hu J, Ge H, Li LM, Longo VD, (2009) Tor1/Sch9-regulated carbon source substitution is as effective as calorie restriction in life span extension. *PLoS Genet.*, **5**, e1000467

第 1 章

出芽酵母における 分裂酵母の Ecl1 類似因子の 同定と解析

概要

分裂酵母の Ecl1 と二次配列が類似する因子の探索を行ったところ、出芽酵母の Ygr146c が最も類似性が高い因子として候補に上がった。Ecl1 が 80 アミノ酸なのに対し、Ygr146c は 211 アミノ酸とかなり大きい。また、Ygr146c は当時殆ど解析されていなかったため、表現型解析により分裂酵母の Ecl1 との類似性を議論しようと考えた。出芽酵母で Ygr146c を高発現したところ、経時寿命の延長や過酸化水素ストレスに対する耐性の上昇が見られた。これは分裂酵母内における Ecl1 高発現の表現型と一致した。また、分裂酵母の Ecl1 を出芽酵母で高発現したところ、同様に経時寿命の延長と過酸化水素ストレス耐性を示した。一方で、出芽酵母の *ygr146c* 欠損株は野生株と比較し経時寿命低下と過酸化水素ストレス感受性を示した。しかし、*ygr146c* 欠損株に分裂酵母の Ecl1 を高発現したところ、経時寿命の延長と過酸化水素ストレス耐性が回復した。さらに、分裂酵母と出芽酵母お Ecl1 はお互いによく保存された 4 つのシステインを保持しており、それぞれのシステインをセリンに置換した Ecl1 の高発現株は、いずれも経時寿命延長が低下した。

以上のことから、分裂酵母の Ecl1 は出芽酵母の Ygr146c と機能的相同性を持ち、且つ Ecl1 は少なくとも酵母間で保存されていることが示された。

緒言

当研究室で発見した分裂酵母の新規遺伝子 Ecl1 は、高発現することで経時寿命の延長、過酸化水素ストレス耐性、そして孢子形成の促進に働く。しかしながら、当時分裂酵母において、これらの表現型に関する解析されていなかったこともあり、Ecl1 が作用するメカニズムや働く経路については殆ど不明であった。そこで、他生物種で Ecl1 と類似する因子を探索することで解析の手がかりを得ようと考えた。

本章では、Ecl1 のアミノ酸配列を用いた Blast 検索により、出芽酵母で類似性が最も高い因子に着目した。その理由として、①同じ酵母の中で、比較的網羅的な解析が進んでいる、②Ecl1 が持つ 4 つのシステインの配置が一致する、などが挙げられる。解析の結果私は、出芽酵母において分裂酵母の Ecl1 と類似する因子を同定し、及び酵母間で Ecl1 が保存されていることを突き止めた。

結果

①他生物種で、出芽酵母の Ygr146c は分裂酵母の Ecl1 と最も高い類似性を持つ

Ecl1 は分裂酵母の新規遺伝子であり、且つわずか 80 アミノ酸で構成されていることから、特徴的なドメインを特定することができず、その機能類推には困難が伴った。そこで、Ecl1 のアミノ酸配列を基にわずかな相同性を頼りに Blast 検索を行うことにより、私は他生物種で類似する因子の取得し、その因子の解析情報を基に Ecl1 の機能メカニズムの解明を試みた。検索の結果、他生物種で最も Ecl1 と類似性が高い因子として出芽酵母の Ygr146c を取得した (図 1-1)。しかし、Ygr146c は当時出芽酵母において殆ど解析されていなかった。また、図 1-1 で示したように、Ygr146c は 211 アミノ酸から構成されており、Ecl1 との一致率は決して高いものとは言えなかった。しかしながら①Ecl1 が保持する 4 つのシステイン配置が保存されている (図 1-1 赤囲い)、②網羅的な解析結果がある、という 2 つのことを考慮した結果、私は Ygr146c の表現型解析を行うことにより Ecl1 との類似性を議論することにした。

```

Ec11      1 --MDL-DFCTVCG-----ATTQDGSLYCSSECHLLDFTKLD
YGR146C   1 MSTAFNDYCTVCDRLIPTSPQKTINTRKIQRDNETKSSLQSNKLYCSEDCCLKDSNPLN
          * ****                      ++ * **** +* * * *+
Ec11      TQTTSNISVSSEYQFLVSEHLAH--FHRKSMTSADF--PTPRFSAYTKLHA-----
YGR146C   EKLLSHLHKKSKTSH--SHNLTPPLSYSKNLTASNLFEP T T S L S S S P T S S T I P F D E L E K L
          + *++ *+ * +* + *++*++* ** *+
Ec11      -----
YGR146C   E S L L I S P L L L P Q D G I V N P K Q E S N P S R V D E Y D E N E H Y L N L A D S L R L D S S Y Q L H S K A H L G Y E
Ec11      ----- 80
YGR146C   N N L P R S N D L I D D H L I S D Q I I E N N Y N L W F R L S S S 211
*: 一致するアミノ酸、+: 類似するアミノ酸

```

図1-1 分裂酵母Ec11と出芽酵母Ygr146cの二次配列比較

分裂酵母のEc11 (上段) と比較し、出芽酵母のYgr146c (下段) は、アミノ酸が凡そ2.5倍も大きく、Ec11と類似する領域はYgr146cのN末側に集中していることが伺える。特に赤く囲った4つのシステインとその周辺のアミノ酸構成はほぼ一致しているのが伺える。

②Ygr146c 高発現株は経時寿命が延長し、過酸化水素ストレス耐性が上昇する

分裂酵母で Ec11 を高発現することで、経時寿命年長が確認されている (Ohtsuka H *et al.* 2008)。出芽酵母の Ygr146c が分裂酵母の Ec11 と類似する因子であれば、分裂酵母で見られた Ec11 高発現の表現型 (経時寿命の延長、過酸化水素ストレス耐性) は、出芽酵母で Ygr146c (以降 ScEc11 と表記) を高発現することによっても観察できるのではないかと考えた。Ygr146c の ORF をマルチコピープラスミドである pG1 (Schena M *et al.* 1991, Takatsume Y *et al.* 2004) に組み込み、GAPDH プロモーターによって高発現する系を構築した (以降 pScEc11 と表

記)。pScEcl1 を保持した株はベクターコントロール (以降 vc と表記) を保持した株と比較し、経時寿命の延長が見られた (図 1-2)。また、興味深いことに、本来出芽酵母にはない分裂酵母の Ecl1 を同様の系で高発現した (以降 pSpEcl1 と表記) ところ、ScEcl1 高発現と比較し、活性はやや弱いものの、同様に経時寿命を延長させた。

出芽酵母のみでなく、分裂酵母においても多くの経時寿命を延長させる変異株は同時に過酸化水素ストレスに対して耐性を示すことが報告されている (Fabrizio P and Longo VD 2003)。先行研究により、分裂酵母の Ecl1 は高発現することで過酸化水素ストレスに対し耐性を示したので (Ohtsuka H *et al.* 2009)、同様の実験を出芽酵母で行った。酵母を高濃度の過酸化水素 (200 mM) で一過的に処理した後、希釈系列を作成し YPD 培地にスポットを行った。その結果、pScEcl1 を保持した株は vc を保持した株と比較して高い過酸化水素ストレス耐性を示した (図 1-3)。また、pSpEcl1 を保持した株も pScEcl1 を保持した株と同等の過酸化水素ストレス耐性を示した。すなわち、分裂酵母、出芽酵母の Ecl1 は共に経時寿命延長と過酸化水素ストレス耐性に対し正に働くことが示された。

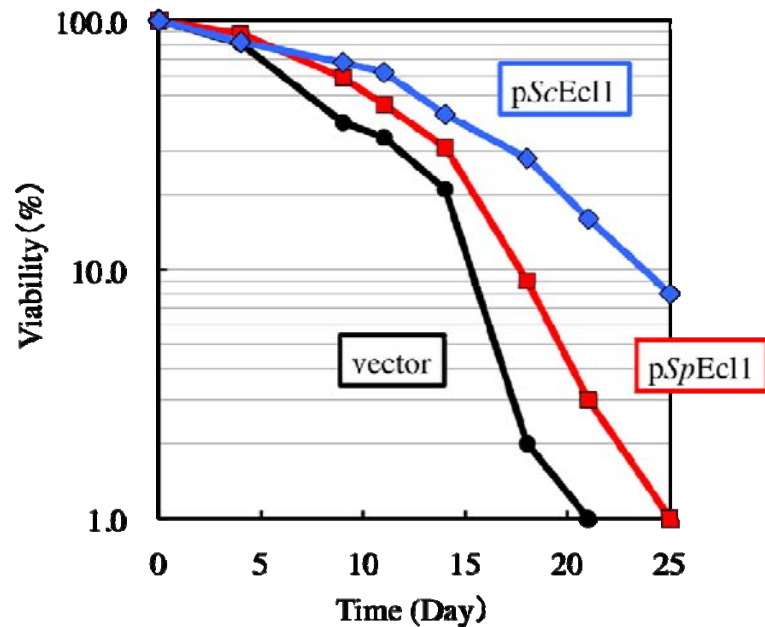


図1-2 Ecl1高発現は分裂酵母と出芽酵母の双方の経時寿命を延長させる

出芽酵母におけるEcl1高発現による経時寿命への影響を表したグラフである。ベクターコントロール株(黒)と比較し、出芽酵母のEcl1高発現株(青)は同時間における生存率が大幅に上昇していた。また、本来出芽酵母にはない分裂酵母のEcl1を高発現したところ、同様に経時寿命を延長させた(赤)。

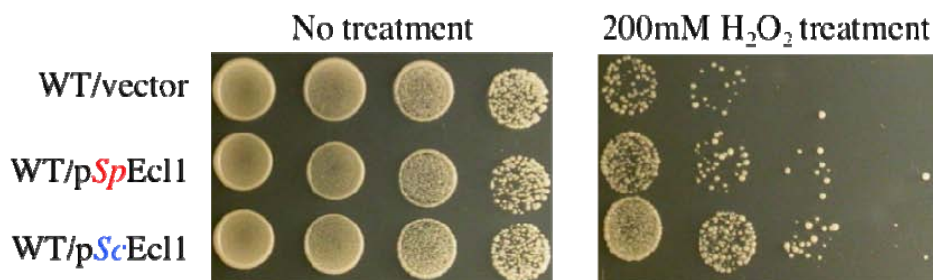


図1-3 Ecl1高発現は分裂酵母と出芽酵母の過酸化水素ストレス耐性を上昇させる

出芽酵母におけるEcl1高発現による過酸化水素ストレスへの影響を表した図である。左図が過酸化水素処理を行っていないものを、右図が200 mMの過酸化水素に1時間インキュベートしたものを通常培地にスポットしたものである。ベクターコントロール株(上段)と比較し、分裂酵母のEcl1高発現株(中段)、出芽酵母のEcl1高発現株(下段)はそれぞれ、過酸化水素ストレスに対して耐性を獲得したことが伺える。

③ *Sce11* 欠損株は経時寿命が低下し、且つ過酸化水素ストレス感受性になる

分裂酵母には *Ecl1* の他に *Ecl2*、*Ecl3* があり、それぞれ単独の欠損株では表現型を示さなかった (Ohtsuka H *et al.* 2008, Ohtsuka H *et al.* 2009)。それに対して、出芽酵母内には *ScEcl1* と類似する因子は現時点で見つかっていない。そこで、*Sce11* 欠損株を作成し、経時寿命や過酸化水素ストレスに対する影響を調べた。その結果、*Sce11* 欠損株は野生株と比較し経時寿命の低下を示し (図 1-4)、過酸化水素ストレスに対する応答では、野生株と比較し感受性を示した (図 1-5)。

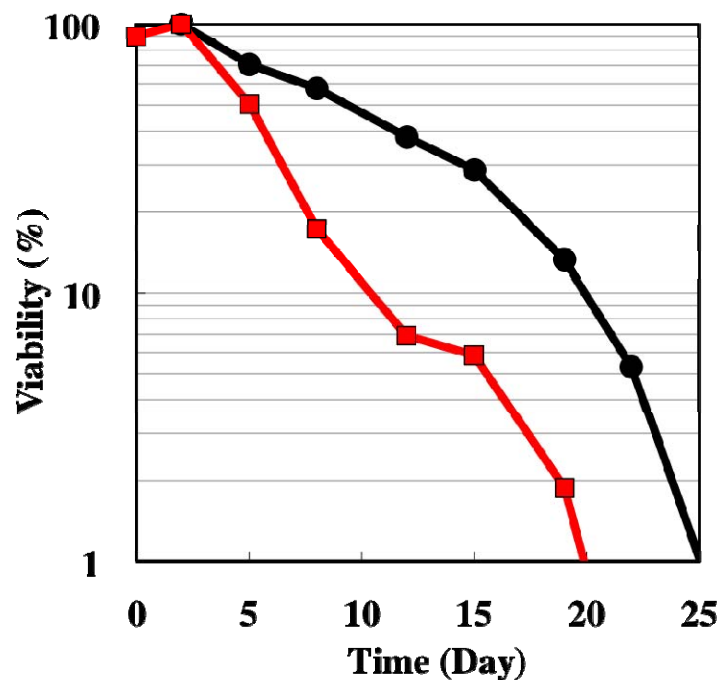


図1-4 *ygr146c*欠損株は野生株と比較し経時寿命が低下

出芽酵母の *Ecl1* が欠損することによる経時寿命への影響を表したグラフである。野生株 (黒) と比較し、*ecl1* 欠損株 (赤) は同時間における生存率が減少していることが伺える。すなわち、経時寿命が低下したことを表している。

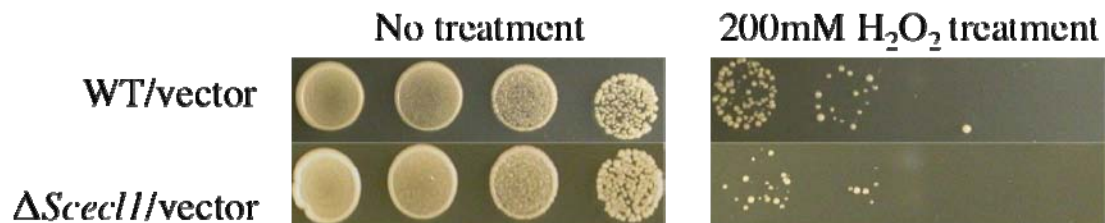


図1-5 *Scecl1*欠損株は野生株と比較し過酸化水素ストレス感受性を示す

出芽酵母における*ecl1*の欠損が過酸化水素ストレスへの影響を表した図である。左図が過酸化水素処理を行っていないものを、右図が200 mMの過酸化水素に1時間インキュベートしたものを通常培地にスポットしたものである。野生株 (上段) と比較し、*ecl1*欠損株 (下段) は過酸化水素ストレスに対し感受性を示した。

④分裂酵母の *SpEcl1* は出芽酵母の *Scecl1* 欠損を相補する

Scecl1 欠損株は野生株と比較し、上記のような著しい表現型の変化を示した。また、*SpEcl1* 高発現が分裂酵母と出芽酵母で同様の表現型を示した。この2点を踏まえ、私は *SpEcl1* が *ScEcl1* と機能的類似関係にあるのならば、*SpEcl1* 高発現は *Scecl1* 欠損の表現型を相補するのではないかと考えた。そこで、*Scecl1* 欠損株に *SpEcl1* を高発現させ、経時寿命と過酸化水素ストレスへの影響を調べた。その結果、*ScEcl1* 高発現と比較し活性はやや低いものの、*SpEcl1* 高発現は *Scecl1* 欠損による経時寿命低下と過酸化水素ストレス感受性を相補した (図 1-6, 1-7)。

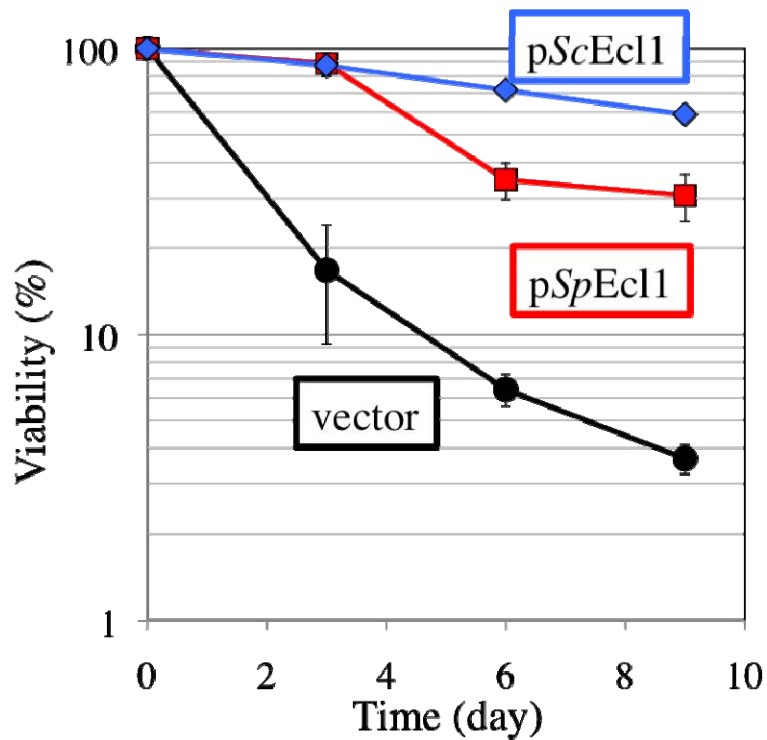


図1-6 *SpEcl1*高発現は*Scecl1*欠損による早死にを相補する

出芽酵母の*ecl1*欠損による経時寿命の低下を分裂酵母の*Ecl1*が相補するかどうかを表したグラフである。ベクターコントロール株 (黒) と比較し、分裂酵母の*Ecl1*を導入した株 (赤) は出芽酵母の*Ecl1*を導入した株 (青) と同様に経時寿命が回復した。

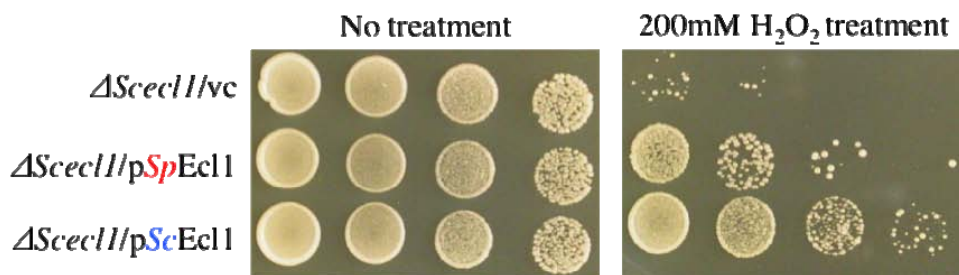


図1-7 *SpEcl1* 高発現は*Sce11*欠損による過酸化水素ストレス感受性を相補する

出芽酵母の*ec11*欠損による過酸化水素ストレス感受性を分裂酵母の*Ecl1*が相補するかどうかを表した図である。左図が過酸化水素処理を行っていないものを、右図が200 mMの過酸化水素に1時間インキュベートしたものを通常培地にスポットしたものである。ベクターコントロール株 (上段) と比較し、分裂酵母の*Ecl1*を導入した株 (中段) は出芽酵母の*Ecl1*を導入した株 (下段) と同様に耐性が回復した。

⑤ *ScEcl1* は *SpEcl1* と類似する領域で活性を持つ

SpEcl1 高発現は分裂酵母内のみでなく、出芽酵母においても経時寿命の延長、過酸化水素ストレス耐性を上昇させた。また、出芽酵母内における *SpEcl1* の類似因子である *Sce11* 欠損の表現型をも相補した。つまり、*ScEcl1* の短い領域で、*ScEcl1* と同様の活性を持つことが考えられる。そこで私は、*SpEcl1* の約 2.5 倍分子量が大きい *ScEcl1* が *SpEcl1* と類似する領域のみでも活性を持つかどうかを調べた。図 1-8 に示したような *ScEcl1* の Ser₁₂₀ の直後に終止コドンが付加した構造 (青囲い) を持つ *ScEcl1* (以降 *ScEcl1*-NT と表記) を作成し、出芽酵母内で高発現させ、*ScEcl1* 全長の高発現と経時寿命延長活性の比較を行った。その結果、*ScEcl1*-NT 高発現は *ScEcl1* 高発現と同等に出芽酵母の経時寿命を延長させた

(図 1-9)。つまり、*SpEcl1* と類似する領域の *ScEcl1* のみで十分に経時寿命延長の活性があることを示した。

```

Ecl1      1 --MDL-DFCTVCG-----ATTQDGSLYCSSECHLLDFTKLD
YGR146C  1 MSTAFNDYCTVCDRLIPTSPQKTNINTRKIQRDNETKSSLQSNKLYCSEDCKLKDSNPLN
          * ****                +- *   **** +* * *  *+
Ecl1      TQTTSNISVSSEYQFLVSEHLAH--FHRKSMTSADF--PTPRFSAYTKLHA-----
YGR146C  EKLLSHLHKKSKTSH--SHNLT PPLSYSKNLTASNLFEP T TSLSSSPTSS TIPFDELEKL
          +  ***  *+      *  +*      +  ****+  **  *+
Ecl1      -----
YGR146C  ESLLISPLLLPQDGIVNPKQESNPSRVDEYDENEHYLNLADSLRLDSSYQLHSKAHLGYE
Ecl1      ----- 80
YGR146C  NNLPRSNLIDDHLISDQIIENNYNLWFRLSSS 211

```

図1-8 *ScEcl1*-NTの構造

分裂酵母のEcl1 (上段)と出芽酵母のEcl1 (下段) の類似する領域 (青囲い) は、主に出芽酵母のEcl1のN末側であることが見受けられる。分裂酵母のEcl1高発現が出芽酵母でも経時寿命延長、過酸化水素ストレス耐性に対して正に働くことから、私はこの類似する領域に着目し、次の解析を進めた。

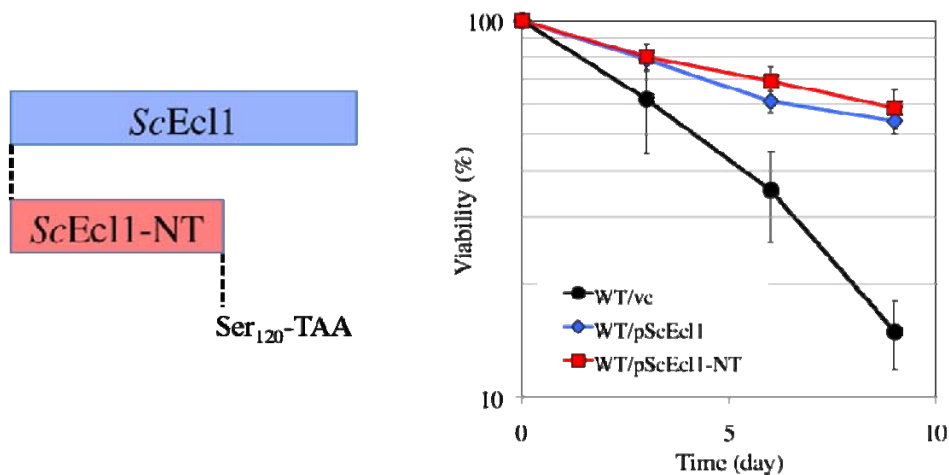


図1-9 ScEcl1-NT高発現はScEcl1と同等に出芽酵母の経時寿命を延長させる

分裂酵母Ecl1と類似する領域のみの出芽酵母Ecl1が機能するかどうかを表した図である。

左図は、分裂酵母Ecl1と類似する領域の出芽酵母Ecl1の構造 (Ser120に終止コドンが付加した構造) を表しており、ScEcl1-NTと表記する。

右図は、ScEcl1-NT高発現による経時寿命への影響を表したグラフである。ベクターコントロール株 (黒) と比較し、ScEcl1-NT高発現株 (赤) は、ScEcl1高発現株 (青) と同等に経時寿命を延長させた。

⑥ScEcl1 と SpEcl1 の保存された4つのシステイン変異は高発現による経時寿命延長活性を低下させる

SpEcl1 と ScEcl1 はお互いに4つのシステインを保持しており、図1-1でも示したように、配置と近辺のアミノ酸構成がかなり類似していることが見受けられる。その配列が酵母間で特徴的であることから、私は、これらのシステインがEcl1の機能に影響するものではないかと考え、SpEcl1 と ScEcl1 のそれぞれのシステインを1塩基置換によるセリンへの置換変異を行った (図1-10)。そして、置換型 SpEcl1 と ScEcl1 をそれぞれ分裂酵母、出芽酵母で高発現させ、野生型の

SpEcl1、*ScEcl1* 高発現との比較を行った。その結果、いずれのシステイン変異型 *SpEcl1*、*ScEcl1* 高発現も野生型の *SpEcl1*、*ScEcl1* 高発現と比較し、経時寿命延長活性の低下が見られた (図 1-11, 1-12)。

<i>SpEcl1</i>	
WT	1 MDLDFCTVCGATTQDGSLYCSSECHLLDFTKLDQTTSNISVSSEYQFLVSEHLAHFHRK 60
C ₆ S	1 MDLDFSTVCGATTQDGSLYCSSECHLLDFTKLDQTTSNISVSSEYQFLVSEHLAHFHRK 60
C ₉ S	1 MDLDFCTVSGATTQDGSLYCSSECHLLDFTKLDQTTSNISVSSEYQFLVSEHLAHFHRK 60
C ₂₀ S	1 MDLDFCTVCGATTQDGSLYSSSECHLLDFTKLDQTTSNISVSSEYQFLVSEHLAHFHRK 60
C ₂₄ S	1 MDLDFCTVCGATTQDGSLYCSSESCHLLDFTKLDQTTSNISVSSEYQFLVSEHLAHFHRK 60
<i>ScEcl1</i>	
WT	1 MSTAFNDYCTVCDRLIPTSPQKTNINTRKIQRDNETKSSLQSNKLYCEDCKLKDSNPLN 60
C ₉ S	1 MSTAFNDYSTVCDRLIPTSPQKTNINTRKIQRDNETKSSLQSNKLYCEDCKLKDSNPLN 60
C ₁₂ S	1 MSTAFNDYCTVSDRLIPTSPQKTNINTRKIQRDNETKSSLQSNKLYCEDCKLKDSNPLN 60
C ₄₇ S	1 MSTAFNDYCTVCDRLIPTSPQKTNINTRKIQRDNETKSSLQSNKLYSSEDCKLKDSNPLN 60
C ₅₁ S	1 MSTAFNDYCTVCDRLIPTSPQKTNINTRKIQRDNETKSSLQSNKLYCEDSKLKDSNPLN 60

緑: *Ecl1*が保持するシステイン 赤: セリンに置換した箇所

図1-10 置換した*SpEcl1*及び*ScEcl1*のシステイン

分裂酵母の*Ecl1* (*SpEcl1*) が保持する4つのシステインはそれぞれ6、9、20、24番目に位置しており、出芽酵母の*Ecl1* (*ScEcl1*) が保持する4つのシステインはそれぞれ9、12、47、51番目に位置している。それぞれのシステインをコードするコドンに含まれるGをCへ置換することにより、システインをセリンへ置き換えた。

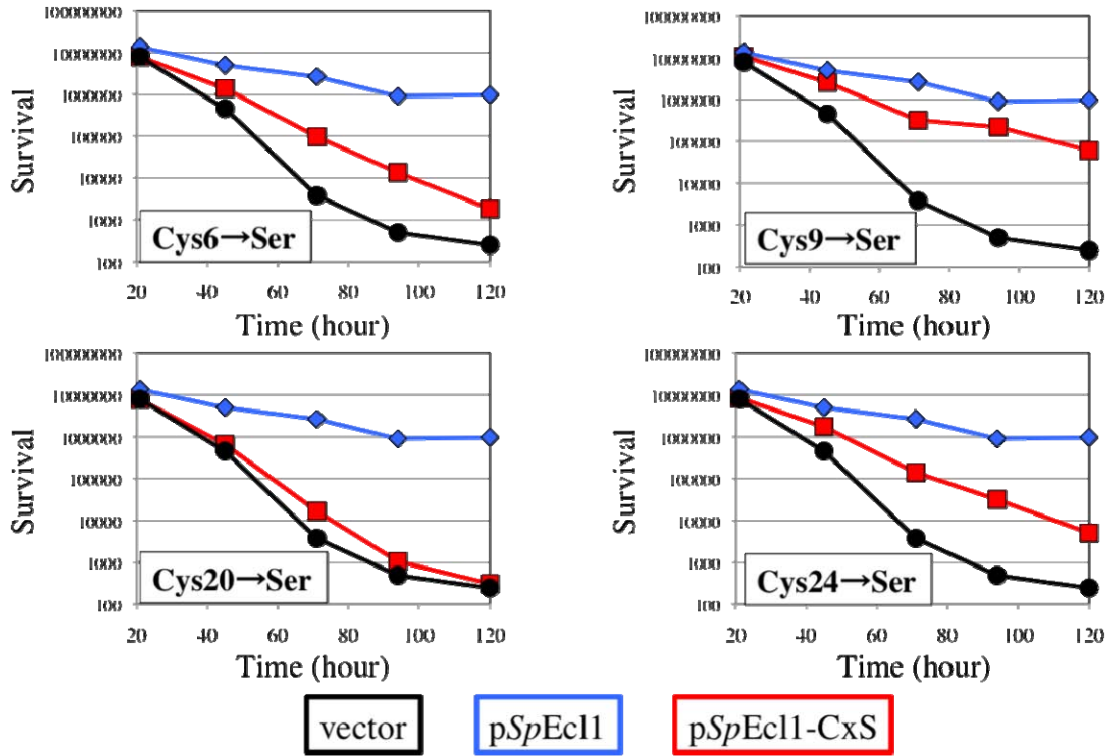


図1-11 *SpEcl1*-CxS高発現株では経時寿命延長活性が低下する

分裂酵母におけるCysX→Ser置換型Ecl1 (Ecl1-CxSと表記) 高発現による経時寿命への影響を表したグラフである。それぞれのEcl1-CxS高発現はグラフ中の赤、野生型のEcl1高発現は青、ベクターコントロールは黒で表している。どのEcl1-CxS高発現株も野生型のEcl1高発現株と比較し、経時寿命延長が低下しているのが見受けられる。

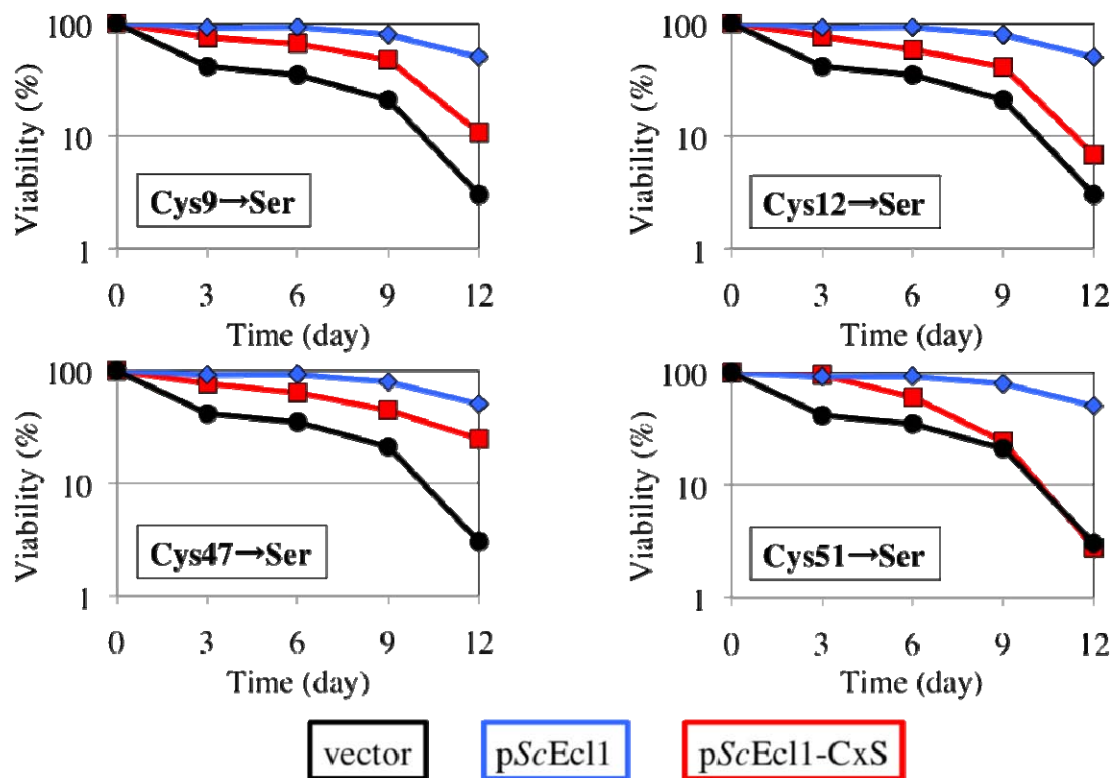


図1-12 *ScEcl1*-CxS高発現株では経時寿命延長活性が低下する

出芽酵母におけるCysX→Ser置換型Ecl1 (Ecl1-CxSと表記) 高発現による経時寿命への影響を表したグラフである。それぞれのEcl1-CxS高発現はグラフ中の赤、野生型のEcl1高発現は青、ベクターコントロールは黒で表している。どのEcl1-CxS高発現株も野生型のEcl1高発現株と比較し、経時寿命延長が低下しているのが見受けられる。

考察

これまでの *ScEcl1* に関する報告との比較

網羅的な経時寿命の解析により、約 4800 株の出芽酵母の単独の遺伝子欠損株の中で、*Scecl1* 欠損株は早死にという結果がある (Powers RW 3rd *et al.* 2006)。本研究で行った CFU の方法で測定した経時寿命の結果はそれと矛盾しない。

SpEcl1 と *ScEcl1* について

SpEcl1 は 80 アミノ酸、*ScEcl1* は 211 アミノ酸と、お互い約 2.5 倍も構成するアミノ酸の数が異なる。しかしながら、お互いに特徴的な 4 つのシステインの配置とその前後のアミノ酸構成が非常に類似することから、私は *SpEcl1* の原型が少なからず *ScEcl1* に保存されていると考えた。図 1-2、1-3 で示したように、出芽酵母における *ScEcl1* 及び *SpEcl1* 高発現は、共に経時寿命延長、過酸化水素ストレス耐性に対し、正に働きかけた。そして、図 1-6、1-7 で示したように、出芽酵母における *Scecl1* 欠損の表現型 (経時寿命低下、過酸化水素ストレス感受性) が *SpEcl1* 高発現によって相補されたことから、*Ecl1* は機能的に酵母間で保存されていると考えられる。

SpEcl1 と *ScEcl1* の機能的部位

SpEcl1 と類似する *ScEcl1* の配列は主に *ScEcl1* の N 末側に存在する。そこで私

は、80 アミノ酸しかない *SpEcl1* 高発現による経時寿命延長は *ScEcl1* の N 末側が関与しているのではないかと考えた。図 1-9 で示した *SpEcl1* と類似する領域の *ScEcl1* 高発現 (*pScEcl1-NT*) が *ScEcl1* 高発現 (*pScEcl1*) と同等に経時寿命を延長させたという結果はこの考えを支持するものである。次に私は、共に N 末側に存在する *SpEcl1* と *ScEcl1* の 4 つのシステインに着目した。互いに配列が最も類似する部分であることから、私は、このシステインが *Ecl1* の根本的な機能に関与するのではないかと考えた。*SpEcl1*、*ScEcl1* の 4 つのシステインをそれぞれセリンに置換したタンパク質の高発現は、野生型の *Ecl1* ほどの経時寿命延長を示さなかった。特に *ScEcl1* に関しては、C 末側からのアミノ酸を半分以上削った *ScEcl1-NT* 高発現では経時寿命延長には全く影響を与えなかったのに対し、N 末側のどれか 1 つのシステインをセリンに置換した *ScEcl1-CxS* の高発現はどれも経時寿命延長の活性が低下していた。システインはヘムのような金属保持や、タンパク質安定性に関するジスルフィド結合の形成に深く関与しており、タンパク質の機能等の特徴づける働きを持つ。このことから、経時寿命における直接的な機能は少なくとも *SpEcl1* 及び *ScEcl1* のシステインに依存すると考えられる。

Ecl ファミリー全体に関する考察

分裂酵母内には *Ecl* タンパク質が *Ecl1*、*Ecl2*、*Ecl3* の 3 つ存在するのに対して、出芽酵母内には *Ecl* タンパク質は *ScEcl1* の 1 つしかない。しかしながら、*ScEcl1* の表現型、アミノ酸構造や転写制御について酵母間で比較すると、*SpEcl* ファミ

リーと類似点が見られる。まず、本章の結果でも述べたようにアミノ酸構造、特にシステインの配置と周辺のアミノ酸構成については *SpEcl1* と類似するが、*SpEcl1* が定常期の進入時に一過的に発現が上昇する点などに関しては *ScEcl1* とは異なる (*ScEcl1* は生育の早い段階で発現が最も高く、生育と共に次第に減少し、定常期以降に再び上昇する data not shown)。一方で *ScEcl1* の上流には Hsf1 結合配列の存在があり、熱ショック応答時に Hsf1 による発現制御を受けると報告されている (Imazu H and Sakurai H 2005)。それに対して、分裂酵母の *SpEcl2* のみが熱ショック時に Hsf1 依存的に転写活性化される (Ohtsuka H *et al.* 2011)。この点に関しては *SpEcl2* と *ScEcl1* は類似する。*SpEcl3* については、上記のストレスシグナル等には応答せず、且つ最も発現が少ない Ecl 因子であり、現時点では最も不明な Ecl 因子である。

少なくとも *ScEcl1* と *SpEcl1*、*SpEcl2* との類似点を踏まえると、私は、分裂酵母と出芽酵母がそれぞれ独自の進化をしてきた上で、分裂酵母は様々な条件に対応する為に3つの小さな Ecl タンパク質を使い分け、出芽酵母では、それらを1つの大きな Ecl タンパク質で賄ったのではないかと考えている。

Ecl ファミリーの働きが完全に明らかになっていないので、正確な議論は難しいが、上記の考えを支持するデータとして、*SpEcl* ファミリーと類似しない *ScEcl1*-C 末側のアミノ酸配列を用いて、分裂酵母の BLAST サーチで類似する因子の検索を行うと、ミトコンドリア-リボソームタンパク質サブユニット L25、リボソーム生合成タンパク質 Nop16、そしてユビキチン-タンパク質リガーゼ E3 などが候補として挙がる。このことから、私は *ScEcl1* のアミノ酸配列がど

の *SpEcl* よりも約 2.5 倍大きいのは、単独で多くの機能を掛け持つためなのではないかと考えている。

実験材料と手法

菌株と培地

以下の菌株を用いた。

菌株名	遺伝子型
YPH250 (出芽酵母)	<i>MATa trp1-Δ1 his3-Δ200, leu2-Δ1 lys2-801 ade2-101 ura3-52</i>
JY333 (分裂酵母)	<i>h⁻ leu1 ade6-M216</i>

以下の培地を用いた。

SD 培地

(0.67 % yeast nitrogen base without amino acids and 2 % glucose)

必要に応じて以下のものを加えた。

Adenine (hemisulfate salt)	40 mg/l
L-histidine	20 mg/l
L-leucine	60 mg/l
L-tryptophan	40 mg/l
100×DropOut (-Leu,-Trp,-His,-Ade) 溶液	10 ml/l
Agar	20 g/l

100×DropOut(-Leu,-Trp,-His,-Ade)溶液

組成	溶液中濃度	培地中の最終濃度
L-arginine	2 g/l	20 mg/l
L-aspartic acid	10 g/l	100 mg/l
L-glutamic acid	10 g/l	100 mg/l
L-lysine	3 g/l	30 mg/l
L-methionine	2 g/l	20 mg/l
L-phenylalanine	5 g/l	50 mg/l
L-serine	37.5 g/l	375 mg/l
L-threonine	20 g/l	200 mg/l
L-tyrosine	3 g/l	30 mg/l
L-valine	15 g/l	150 mg/l
Uracil	2 g/l	20 mg/l

YPD 培地

(1 % yeast extract, 2 % polypeptone, 2 % glucose)

必要に応じて Agar (20 g/l) を加えた。

YES 培地

(0.5 % yeast extract, 3 % glucose)

必要に応じて以下のものを加えた。

Adenine (hemisulfate salt)	40 mg/l
G418	100 µg/ml
Agar	20 g/l

プラスミド

以下のプラスミドを用いた。

プラスミド名	マーカー
pG1	<i>TRP1</i> マーカー、出芽酵母における高発現用
pLB-Dblet	<i>LEU2</i> マーカー、分裂酵母における高発現用

ScEcl1、SpEcl1 高発現株欠損株、ScEcl1-NT 及び 1 塩基置換変異型

Ecl1 の作成

ScEcl1、SpEcl1 高発現株の作成：以下のプライマーを用いて出芽酵母染色体上の ScEcl1 及び分裂酵母染色体上の SpEcl1 を PCR で増幅させ、pG1 に組み込んだ。

pScEcl1

YGR146C-U2-BamHI : AATGGATCCATGAGCACCGCATTCAACGA

YGR146C-D-SalI : GTAGGTCGACGGCAAGTCGAAGAAGATACG

pSpEcl1

BamHI-Mws8-1 : ACTGGATCCATGGATTTGGATTTTGCACAGTG

Mws8-1-SalI : TTCTAAGTCGACTACGCATGTAGTTTTGTGTAAGC

* 下線 : 制限酵素サイト

*Sce*11 欠損株の作成 : 以下のプライマーを用いて、BY4741 欠損株ライブラリーの *Sce*11 欠損株から欠損領域を YPH250 株へ移植した。

YGR146C-U400 : TGGAGACTTGAAACGTGGTG

YGR146C-D270 : TGTATGAAGACGAAGACAGC

*ScEcl*1-NT の作成

*ScEcl*1 の 120 番目のセリンの直後に終止コドンを組み込むため、以下のプライマーを用いて *ScEcl*1-NT を PCR で増幅し、*Bam*HI、*Sal*I で制限酵素処理した後、pG1 に組み込んだ。

YGR146C-U2-*Bam*HI : AATGGATCCATGAGCACCGCATTCAACGA

*Sc_ecl*1_mid_*Sal*1 : GTGAGTCGACTT**TA**GGACTCTAGCTTCTCCAAC**T**

* 赤字 : 追加した終止コドン

1 塩基置換変異 *Ecl*1 高発現株の作成 : 以下の変異導入プライマー産物(*SpEcl*1 : M4 primer と *Ecl*1-CxMu、*ScEcl*1 : pG1-*Bam*-U370 と *Cell*-CxMu により増幅)とプラスミド上の *Ecl*1 フラグメント (*SpEcl*1 : T7 primer と Reverse primer、*ScEcl*1 : pG1-SQ-*Bam*H と pG1-SQ-*Sal*I により増幅) を用いた PCR により、4 つのシステムをコードする塩基をそれぞれ置換した *Ecl*1 を作成し、再びプラスミドに組み込んだ。

1st : ①T7 primer × Reverse primer (*SpEcl1*)、pG1-SQ-BamH × pG1-SQ-SalI (*ScEcl1*)

②M4 primer × *Ecl1-CxMu* (*SpEcl1*)、pG1-Bam-U370 × *Cell1-CxMu* (*ScEcl1*)

2nd : それぞれのフラグメント①と②と以下のプライマーを用いた PCR

M4 primer × Reverse primer (*SpEcl1*)、pG1-Bam-U370 × pG1-SQ-SalI (*ScEcl1*)

用いたプライマーの配列

SpEcl1 (赤 : 置換した塩基 C→G)

pG1-SQ-BamHI : TCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTT

pG1-SQ-SalI : AAGCACCACCACCAGTAGAG

pG1-Bam-U370 : CACCAACCATCAGTTCATAGG

Ecl1-C6Mu : CCACACACTGTGGA AAAAATCC

Ecl1-C9Mu : TGGTGGCTCCA G A C A C T G T G C A A

Ecl1-C20Mu : ATTCAGAAGAG G A G T A C A A A C T G C C

Ecl1-C24Mu : CCAAAAGATGG G A T T C A G A A G A G

ScEcl1 (赤 : 置換した塩基 C→G)

T7 primer : GTAATACGACTCACTATAGGGC

Reverse primer : GGAAACAGCTATGACCATG

M4 primer : GTTTTCCCAGTCACGAC

Cell1-C9Mu : GATCACAAACAGTGG A G T A A T C G T T G

Cell1-C12Mu : GAATGAGACGATCAG A A A C A G T G C A G

Cell1-C47Mu : CAATCTTCGGAG G A A T A T A A C

Cell1-C51Mu : CCTTCAGCTTAGAATCTTCGGAGC

生存率測定

生育を揃えるため、菌株を 30 °C の条件で 1 昼夜振とう培養した後、一部を新鮮な培地へ植菌した。出芽酵母が完全に定常期へ到達するのは凡そ 3 日かかるので、30 °C の条件で 2 昼夜振とう培養した。培養 3 日目に集菌し、滅菌水で洗った後、培地を滅菌水と入れ替えて、30 °C で振とうし続けた。サンプリングは 3 日に一度の頻度で行い、細胞の生死は CFU 法 (コロニー形成率) によって測定した。尚、水に移し替えた時点を 0 時間とした。分裂酵母の場合、1 昼夜培養後毎日サンプリングを行い、細胞の生死は CFU 法によって測定した。以上の手法は Fabrizio らのものに基づく (Fabrizio P and Longo VD 2003)。

過酸化水素ストレステスト

菌株を 30 °C で OD₆₀₀=1.0 になるまで振とう培養した後、集菌。200 mM の過酸化水素水で 30 °C 、1 時間処理した後、YPD 寒天培地に 1/10、1/10²、1/10³、1/10⁴ ずつ希釈してスポットした。菌の生育は 30 °C の孵卵器で 3~5 日インキュベートした後に観察した。

参考文献

Fabrizio P and Longo VD. (2003) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*, **2**, 73-81

Fabrizio P, Gattazzo C, Battistella L, Wei M, Cheng C, McGrew K, Longo VD. (2005) Sir2 blocks extreme life-span extension. *Cell*, **123**, 655-667

Ohtsuka H, Mita S, Ogawa Y, Azuma K, Ito H, Aiba H. (2008) A novel gene, *ecl1(+)*, extends the chronological lifespan in fission yeast. *FEMS Yeast Res.*, **8**, 520-30

Ohtsuka H, Ogawa Y, Mizuno H, Mita S, Aiba H. (2009) Identification of Ecl family genes that extend chronological lifespan in fission yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 885-89

Powers RW 3rd, Kaeberlein M, Caldwell SD, Kennedy BK, Fields S. (2006) Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev.*, **15**, 174-84

Schena M, Picard D, Yamamoto KR. (1991) Vectors for constitutive and inducible gene

expression in yeast. *Methods Enzymol.*, **194**, 389-98

Takatsume Y, Izawa S, Inoue Y. (2004) Identification of thermostable glyoxalase I in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch. Microbiol.*, **181**, 371-77

第 2 章

出芽酵母の *ScEcl1* による 経時寿命延長は ミトコンドリアに依存する







概要

多くの生物種に共通する寿命延長要因として食餌制限がある (Longo VD and Fabrizio P 2002, Kennedy BK *et al.* 2007, Fontana L *et al.* 2010, 図 2-1)。私は食餌制限に着目し、出芽酵母における Ecl1 (*ScEcl1*) の働きとの関連を調べた。その結果、*ScEcl1* 高発現による経時寿命延長は食餌制限 (以降 CR と表記) と重複することを突き止めた。さらに、*ScEcl1* はミトコンドリアにおける呼吸に関与しており、CR 時に見られる呼吸の上昇には *ScEcl1* が大きく関与していることが示唆された。呼吸が上昇するという共通の表現型から、*ScEcl1* や CR による経時寿命の延長はミトコンドリアを介していることが考えられた。ミトコンドリア DNA が欠損した ρ^0 株においては、*ScEcl1* を高発現しても、CR を施しても経時寿命の延長は全く見られなかった。

ミトコンドリアの生合成等に関与する因子との関連の解析により、呼吸関連遺伝子の発現に関与する HAP 複合体の構成因子で、*ScEcl1* と相互作用すると報告されている Hap2 (Ito T *et al.* 2001) や、Forkhead 型転写因子で、高発現によりミトコンドリアの生合成と呼吸を促進すると報告されている Hcm1 (Rodriguez-Colman MJ *et al.* 2010) の欠損株では、*ScEcl1* を高発現しても経時寿命の延長は全く見られなかった。

その傍ら、野生株において、*ScEcl1* 高発現は細胞質カタラーゼである *CTT1* の発現を上昇させた。以上のことから私は、*ScEcl1* 高発現はミトコンドリアの

呼吸活性を上昇させ、同時に ROS の類である過酸化水素ストレスに対して、細胞質カタラーゼ Ctt1 の発現を上昇させることで、細胞が様々なストレスに適応できるように働きかけているのではないかと考えた。

	Life-span increase		Beneficial health effects	
	Dietary restriction	Mutations/ drugs	Dietary restriction	Mutations/ drugs
 Yeast	3-fold	10-fold (with starvation/ DR)	Extended reproductive period	Extended reproductive period, decreased DNA damage/mutations
 Worms	2- to 3-fold	10-fold	Resistance to misexpressed toxic proteins	Extended motility Resistance to mis-expressed toxic proteins and germ-line cancer
 Flies	2-fold	60-70%	None reported	Resistance to bacterial infection, extended ability to fly
 Mice	30-50 %	30-50% (~100% in combination with DR)	Protection against cancer, diabetes, atherosclerosis, cardiomyopathy, autoimmune, kidney, and respiratory diseases; reduced neurodegeneration	Reduced tumor incidence; protection against age-dependent cognitive decline, cardiomyopathy, fatty liver and renal lesions. Extended insulin sensitivity
 Monkeys	Trend noted	Not tested	Obesity ↓ Protection against diabetes, cancer etc.	Not tested
 Humans	Not determined	Not determined (GHR-deficient subjects reach old age)	Obesity, diabetes, cancer risk etc. ↓	Possible reduction in cancer and diabetes

Fontana L *et al.* 2010 *Science*より抜粋

図2-1 多くの生物種に保存された寿命延長要因: 食餌制限

食餌制限は、酵母～マウスに至るまでの生物で寿命の延長に寄与することが報告されており(赤囲い)、サルやヒトなどの霊長類においては、肥満の回避、糖尿病や癌等の疾病のリスクを軽減させることが報告されている(緑囲い)。こうした疾病リスクの軽減は結果的に、老化に伴う疾病による死亡率の低下に繋がると考えられる。

緒言

ミトコンドリアは呼吸のみではなく、細胞構成物の生合成、ストレス応答、そして寿命に関与することが示唆されている (Tait SW and Green DR 2010, Zhou R *et al.* 2011)。欠陥を持つミトコンドリアは細胞のアポトーシスやネクローシスを引き起こすことが示されており、高等生物では、特定の細胞におけるミトコンドリアを介するこれらの細胞死が神経変性病など、様々な疾患を引き起こすと報告されている (Wallace DC *et al.* 2010)。

出芽酵母では、ミトコンドリアの機能が寿命に密接に関与していることが示唆されており、分裂寿命と経時寿命双方ともにミトコンドリアにおける呼吸の影響を受けるとの報告がある (Barros MH *et al.* 2004, Jiménez-Hidalgo M *et al.* 2009)。よって私は、ミトコンドリアと寿命の関係を明らかにすることは、老化と老化に伴う疾患のメカニズム解明に貢献すると考えた。そして、酵母におけるミトコンドリアの変異や機能維持、代謝制御を明らかにすることは、老化に伴う疾患の予防のみではなく、その根源にある細胞老化の理解に繋がると考えた。

私は分裂酵母で発見した Ecl ファミリー (Ohtsuka H *et al.* 2008, Ohtsuka H *et al.* 2009) の出芽酵母におけるホモログ *ScEcl1* の機能に興味を持った。*Ecl1* 高発現は分裂酵母、出芽酵母双方の経時寿命の延長と過酸化水素ストレス耐性を増加させた (Azuma K *et al.* 2009)。また、分裂酵母では *Ecl1* の高発現株に CR を施し

ても更なる経時寿命の延長が見られなかったことから、CR 時と同様の経路で働くことが示唆された (Ohtsuka H *et al.* 2008)。本章で私は、経時寿命延長経路の解明を目的に、CR、そしてミトコンドリアとの関係という視点から、ScEcl1 の機能について議論する。

結果

① *ScEcl1* 高発現による経時寿命延長は CR と重複する

2章の緒言で、分裂酵母の *SpEcl1* は CR と重複して経時寿命を延長させることを述べた。私は、出芽酵母における *SpEcl1* のホモログである *ScEcl1* も同様に CR と重複して経時寿命延長に働きかけているのではないかと考えた。そこで、通常培地 (2 % Glc) 及び CR 培地 (0.5 % Glc) の2種類の培地でベクターコントロール株と *ScEcl1* 高発現株を培養し、生存率測定を行うことで、*ScEcl1* 高発現による経時寿命延長と CR の関係について調べた。その結果、*ScEcl1* 高発現株に CR を施しても更なる経時寿命延長は見られなかった (図 2-2)。すなわち、*ScEcl1* は *SpEcl1* と同様に CR と重複して経時寿命を延長させることがわかった。

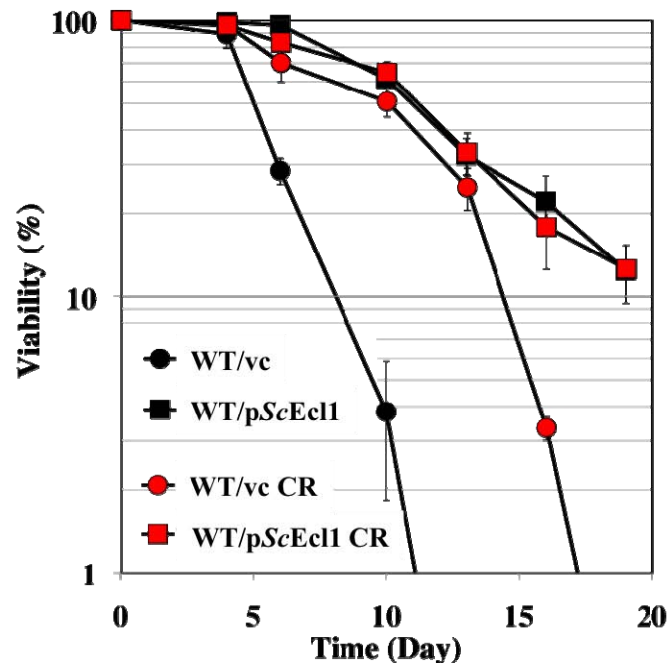


図2-2 *ScEcl1*高発現はCRと重複して出芽酵母経時寿命を延長

出芽酵母における*Ecl1*高発現及びカロリー制限 (CR) による経時寿命への影響を表したグラフである。1章の結果にも示したが、*ScEcl1*高発現株 (グラフ中の■) はベクターコントロール株 (グラフ中の●) と比較して、経時寿命の延長が見られた。また、CRを施すこと (グラフ中の●) により、酵母の経時寿命は延長した (●と●の比較)。ところが、*ScEcl1*高発現株にCRを施しても (グラフ中の■)、更なる経時寿命の延長は見られなかった (■と■の比較)。

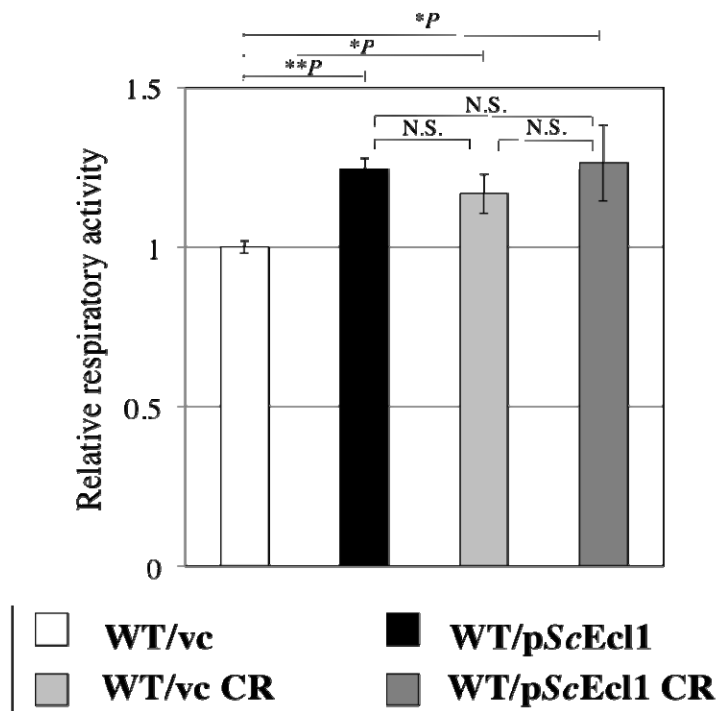
②*ScEcl1* 高発現は CR 条件下と同様に呼吸活性を上昇させる

先ほどの結果より、経時寿命において、*ScEcl1* 高発現による経時寿命延長は CR と重複して働くことが示された。飢餓あるいは CR 条件下では、真核微生物や高等生物の細胞は少ない炭素源からより多くの ATP を産出する為に発酵代謝 (増殖代謝) から呼吸代謝 (飢餓代謝) へ切り替えるとの報告がある (Vander

Heiden MG *et al.* 2009)。酵母も例外ではなく、定常期、或は CR 条件下で発酵から呼吸へ代謝シフトすることが報告されている (Lin SJ *et al.* 2002, Jiménez-Hidalgo M *et al.* 2009)。この点に着目して、私は、ScEcl1 高発現株における「代謝変化」について解析を行った。

まずは、呼吸代謝が活性化しているかどうかを調べるべく、ScEcl1 高発現株や CR 条件下での呼吸活性測定を行った。その結果、図 2-3 で示したように、対数増殖期において、ScEcl1 高発現株はベクターコントロール株と比較し、呼吸活性の上昇が見られた。また、CR 条件下ではベクターコントロール株の呼吸活性が上昇したが、通常培地における ScEcl1 高発現株と同程度の活性であった。そして ScEcl1 高発現株に CR を施しても、通常培地における ScEcl1 高発現株と同程度の呼吸活性を示した。つまり、ScEcl1 高発現による働きは CR と相乗しないことが示された。このことから、ScEcl1 高発現は CR 条件下と同様に細胞内における代謝変化を引き起こさせることが示された。

次に、呼吸活性と同様の指標となる酸素消費量について解析した。生育開始から定常期に到達するまでの培地中の溶存酸素量 (DO) を測定したところ、ベクターコントロール株と比較し、ScEcl1 高発現株は生育時により多くの酸素を消費しており、定常期付近では消費が減少していることが示された (図 2-4)。



*p < 0.05, **p < 0.01,

図2-3 ScEcl1高発現はCRと同様に細胞の呼吸活性を上昇させる

ScEcl1高発現株、及びCR条件下における呼吸活性を表したグラフである。対数増殖期において、ベクターコントロール株 (グラフ中の□) と比較し、ScEcl1高発現株 (グラフ中の■) は高い呼吸活性を示した。また、CR条件下においては、ベクターコントロール株 (グラフ中の□) も呼吸活性が上昇したが、CRとScEcl1高発現間の呼吸活性の違いは見られなかった (■と□と■の比較)。

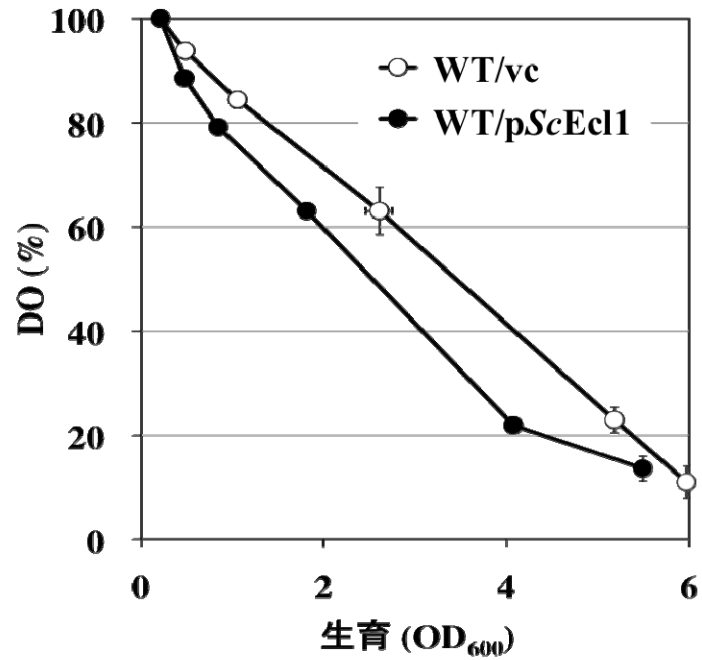


図2-4 ScEcl1高発現株は生育時により多くの酸素を消費する

生育に伴う培地中の溶存酸素量 (DO) の減少を表したグラフである。ScEcl1高発現株 (グラフ中の●) はベクターコントロール株 (グラフ中の○) と比較し、生育時により多くの酸素を消費しているのが見受けられた。しかし、定常期付近では酸素消費が減少した (OD₆₀₀ = 4→6にかけての●)。

③ScEcl1 高発現や CR による経時寿命延長はミトコンドリアに依存する

①と②の結果より、ScEcl1 高発現は CR と重複して経時寿命を延長させ、そして呼吸活性を上昇させることが分かった。細胞内の呼吸を司るのはミトコンドリアである。再度述べるが、ミトコンドリアの機能やメンテナンスはマウスにおける神経変性病等の発症において重要な部分を担っており (Green DR *et al.* 2011)、そして酵母においては、ミトコンドリアにおける代謝が寿命に多大な影響を与えるとの報告がある (Pan Y 2011)。これらの点を踏まえ、ScEcl1 高発現と CR による代謝の変化及び寿命延長はミトコンドリアに依存することが十分予想される。そこで、出芽酵母のミトコンドリア DNA 欠損変異株 (rho^0 , 図 2-5 参照) を用いて、ScEcl1 高発現や CR による経時寿命延長への影響を調べた。その結果、 rho^0 株では、ScEcl1 を高発現しても、CR を施しても全く経時寿命の延長は見られなかった (図 2-6)。そして、ScEcl1 と呼吸とミトコンドリア DNA を議論する為に、 rho^0 株における ScEcl1 高発現や CR 条件での呼吸活性や生育時の酸素消費についても調べた。その結果、ミトコンドリアの構成等に関与する因子の凡そ 99%は核 DNA でコードされているのにも関わらず、ミトコンドリア DNA がコードする 8 つのコア因子が欠損したことで、呼吸活性が全くなり、ScEcl1 高発現で見られた生育時の酸素消費の増加も全く見られなかった (図 2-7, 2-8)。

出芽酵母mtDNA (85.3kb, 8つのタンパク質と複数のRNAをコード)

電子伝達系・OXPHOSに携わるコアポリペプチド,
mtタンパク質合成関連のtRNA,
ミトコンドリアrRNA

rho⁻

mtDNAの安定性の低下によるmtDNAが減少する変異、
*hap2*や*hap3*の欠損により頻度が上昇する
(Mattoon JR *et al.* 1990 *Curr. Genet.*)

rho⁰

人為的なmtDNA欠損変異

図2-5 出芽酵母に見られるミトコンドリアDNA変異

ミトコンドリアを構成する因子の殆どは核のDNAがコードしている。しかし、ミトコンドリアの機能において中心的な役割を担う因子は全てミトコンドリアDNAがコードしている。

出芽酵母には2種類のミトコンドリアDNA変異がある。

1つは呼吸関連因子の転写を担うHAP複合体の構成因子である*hap2*、*hap3*の欠損によるミトコンドリアDNAの不安定化に伴うミトコンドリアDNAが減少する変異、rho⁻と呼ばれるものである。

もう1つは人為的に作られたミトコンドリアDNA欠損変異、rho⁰と呼ばれるものである。

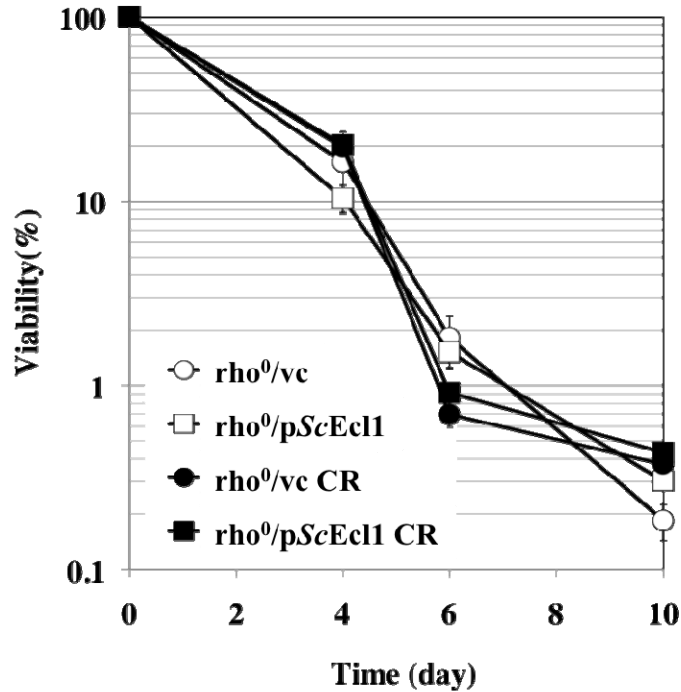


図2-6 rho⁰株においては、ScEcl1高発現もCRも経時寿命を延長させない

ミトコンドリアDNA欠損株におけるScEcl1高発現及びCRによる経時寿命への影響を表したグラフである。ミトコンドリアDNA欠損株では、ScEcl1を高発現しても、CRを施しても、経時寿命の延長は全く見られなかった。

また、このグラフで示した結果は、図2-2の結果と同時期に測定したものであり、野生株 (図2-2 WT/vc) とrho⁰株 (rho⁰/vc) の50%死滅期を調べると、野生株が約5日に対し、rho⁰株は約2日である。つまり、ミトコンドリアDNAが欠損した株では経時寿命が著しく低下するを示している。これは1章で示したScecl1欠損株の表現型と類似する。

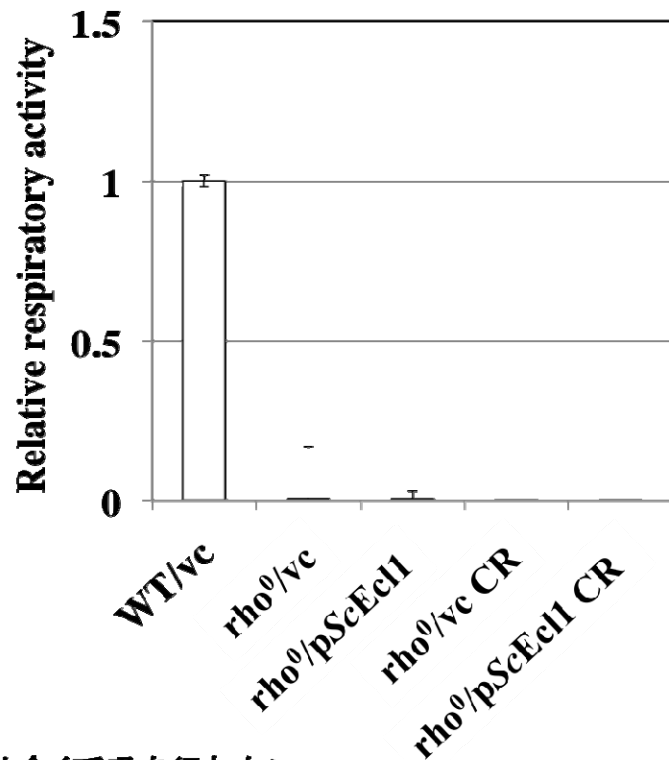


図2-7 ρ^0 株は全く呼吸を行わない

ミトコンドリアDNAが欠損した株では全く呼吸が行われなことを表したグラフである。ミトコンドリアの構成に関与する因子の凡そ99%が核のDNAにコードされているのにも関わらず、ミトコンドリアDNAがコードする8つの因子が欠損しただけで、ミトコンドリアの呼吸は全く行われなことがここで示された (グラフ中のWTと ρ^0 との比較)。

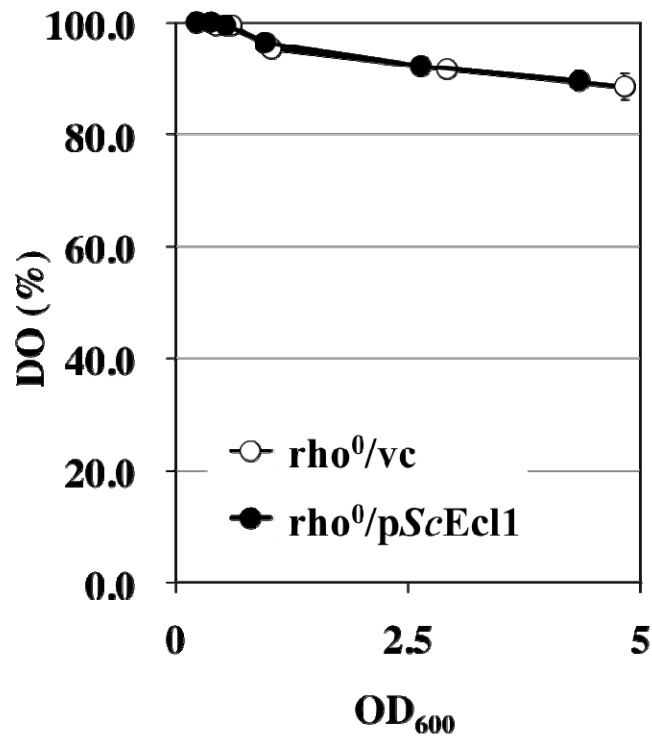


図2-8 rho⁰株では、ScEcl1を高発現しても酸素消費の増加は見られない

ミトコンドリア欠損株における生育に伴う培地中の溶存酸素量 (DO) の減少を表したグラフである。ミトコンドリア欠損株では、ScEcl1を高発現しても、生育時に見られた酸素消費の増加は見られなかった。

④ScEcl1 は CR 時の酸素消費上昇に関与する

ScEcl1 の高発現は出芽酵母の経時寿命を延長させるが、一方で、Scecl1 欠損は経時寿命の低下を示した (1 章参照)。このことから私は、Scecl1 欠損株では呼吸に関しても高発現とは逆の表現型が見られるのではないかと考えた。解析の結

果、*Scecl1* 欠損株では対数増殖期における酸素消費がわずかながらも減少した。一方で、CR 条件下における酸素消費の増加は *Scecl1* 欠損株では殆ど見られなかった (図 2-9)。すなわち、*ScEcl1* は CR 時の酸素消費の促進に深く関与していることが示唆された。

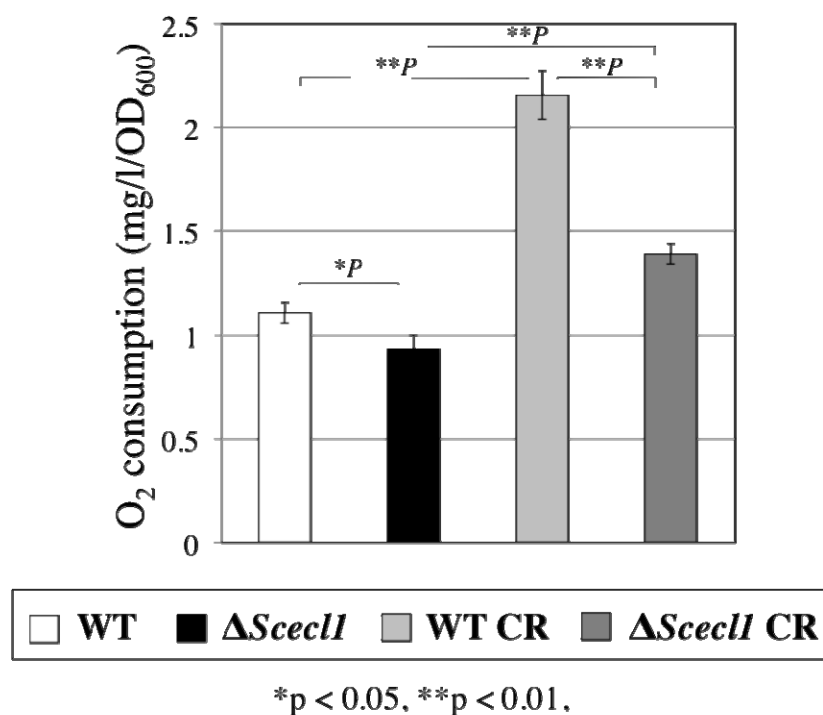


図2-9 *ScEcl1*はCR時の酸素消費増加に関与する

*Scecl1*欠損による酸素消費への影響を表したグラフである。*ScEcl1*高発現は呼吸活性及び、酸素消費の上昇に寄与したが、*Scecl1*欠損株 (グラフ中の■) は野生株 (グラフ中の□) と比較し、わずかながらも酸素消費の低下が見られた。一方で、野生株のCR時に酸素消費の増加 (グラフ中の□) が見られたが、*Scecl1*欠損株 (グラフ中の■) では上昇が大きく低下していた。

⑤ ScEcl1 による寿命延長はミトコンドリアの生合成関連因子に依存する

2章のここまでの結果より、ScEcl1 高発現はミトコンドリアの上流で働き、呼吸を促進することが示唆された。次に私は、どのような経路でミトコンドリアに働きかけているのかを調べるべく、ミトコンドリアにおける呼吸関連因子の転写やミトコンドリア生合成との関係について解析を行った。

着目した因子について、1つは HAP 複合体の構成因子で、これはミトコンドリア呼吸鎖を構成する因子の転写に必要であり (Buschlen S *et al.* 2003)、ScEcl1 と相互作用するとの報告もされている Hap2 (Ito T *et al.* 2001)。もう1つは Forkhead 型転写因子で、高発現によりミトコンドリアの生合成 (数の増加) と呼吸を促進すると報告されている Hcm1 (Rodriguez-Colman MJ *et al.* 2010) の2つである。前者の Hap2 に関しては、ScEcl1 との相互作用の他に、hap2 欠損株では、ミトコンドリア DNA の不安定化によるミトコンドリア DNA が減少する、rho⁻ 変異 (図 2-5 参照) の頻度が上昇するとの報告がある (Mattoon JR *et al.* 1990)。このことから、今回私が解析を行った rho⁰ 株と非常に近い環境を作り出すことが出来ると考えられる。後者の Hcm1 は高発現により酸素消費が上昇し、欠損により酸素消費がやや減少するという表現型を示すことが報告されており (Rodriguez-Colman MJ *et al.* 2010)、これは ScEcl1 の場合と類似する。この2つの因子の欠損株で ScEcl1 を高発現し、経時寿命への影響を調べた。その結果、hap2 及び hcm1 のどちらの欠損株においても ScEcl1 高発現は経時寿命を延長させな

かった (図 2-10)。尚、呼吸に関する制御において Hap2 の正の制御因子として Hap4 があるが、*hap4* 欠損株についても同様に *ScEcl1* を高発現させ、経時寿命測定を行ったが、*hap2* 欠損株と同様に経時寿命の延長は見られなかった。(データは省略)。

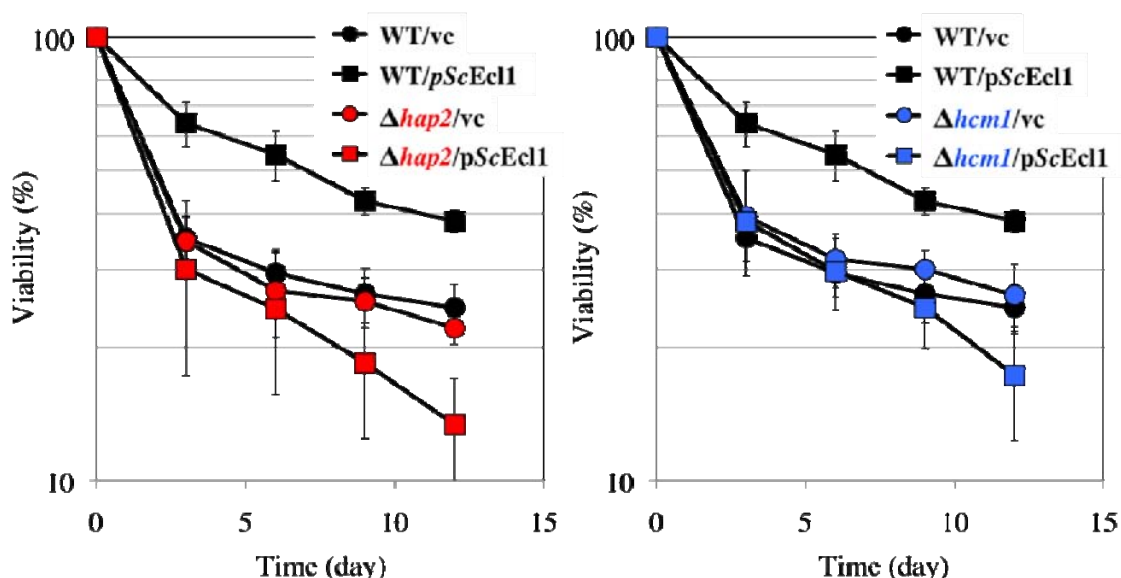


図2-10 *ScEcl1*による寿命延長はミトコンドリアの生合成関連因子に依存する

ミトコンドリア生合成やメンテナンスに関与する因子の欠損株における*ScEcl1*高発現による経時寿命への影響を表したグラフである。左のグラフはrho⁻変異に関与するHAP複合体の構成因子Hap2、右のグラフはミトコンドリアのメンテナンスに関与するForkhead型転写因子Hcm1の欠損株を用いた測定結果を示している。野生株では、*ScEcl1*を高発現すること(グラフ中の■)により経時寿命が延長した(●と■の比較)。しかし、いずれの欠損株においても、*ScEcl1*高発現による経時寿命延長は見られなかった(左グラフ:●と■の比較、右グラフ:●と■の比較)。

⑥ScEcl1 高発現はストレス応答経路を活性化させる

分裂酵母で Ecl1 を高発現することで細胞質のカタラーゼである *ctt1*⁺ の発現が上昇した (Ohtsuka H *et al.* 2012)。1 章で述べた *SpEcl1* 高発現による過酸化水素ストレス耐性の上昇は、これで説明できる。私は *ScEcl1* 高発現による過酸化水素ストレス耐性の上昇は何を介しているのかを調べた。その結果、*ScEcl1* 高発現はベクターコントロールより、分裂酵母の *Ctt1* のホモログである出芽酵母の細胞質カタラーゼ *CTT1* の発現を著しく上昇させた (図 2-11)。一方で、同じ細胞質に存在する活性酸素を分解する酵素をコードする *SOD1* の発現に変化は見られなかった。尚、ストレス応答経路と呼吸代謝の関係を議論するために Hap2 のレポーター遺伝子である *CYCI* の発現について調べたが、ベクターコントロールと *ScEcl1* 高発現の間に大きな変化は見られなかった (data not shown)。以上のことから、*ScEcl1* 高発現は *SpEcl1* 高発現と同様に *Ctt1* の発現を上昇させることにより過酸化水素ストレスに対して耐性を獲得することが示された。

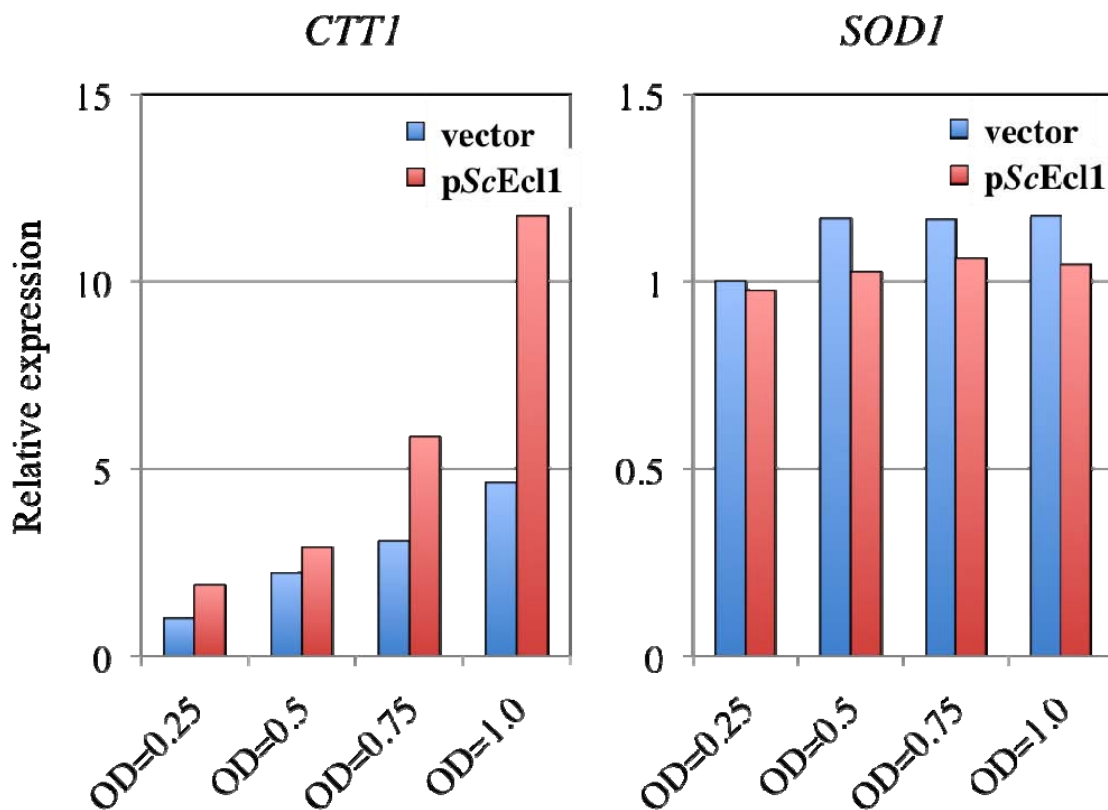


図2-11 ScEcl1高発現はCTT1の発現を上昇させる

ScEcl1高発現によるストレス応答系の因子の発現変動について表したグラフである。カタラーゼTをコードするCTT1は分裂酵母の*ctl1*⁺のホモログであり、分裂酵母ではEcl1を高発現することで、*ctl1*⁺の発現が上昇したと報告されている (Ohtsuka *et al.* 2012)。SOD1は発現が安定している抗酸化因子であり、コントロールとして用いた。どちらも細胞質で働く因子である。

ScEcl1高発現株 (左グラフの■) はベクターコントロール株 (左グラフの■) と比較し、著しいCTT1の発現上昇が見受けられた。

考察

ScEcl1 高発現が CR と重複してミトコンドリアに依存して働くことについて

経時寿命延長や呼吸活性の結果から、ScEcl1 高発現は CR と同じ表現型を示した。さらに、お互い相乗効果がないことから、ScEcl1 高発現で生じる細胞内の変化は CR と重複することが考えられる。CR による経時寿命延長のメカニズムは色々示唆されている。例えば、本論文の序論の図 0 に一部示したように、グルコース活性化経路の TOR-Sch9 経路や PKA 経路が CR によって抑制され、それらの経路で負に制御されていたミトコンドリアの生合成や呼吸代謝が活性化される。ミトコンドリアの活性化は様々な細胞構成物の生合成を活性化、代謝回転（細胞構成物の新生）を促進させる。結果的に細胞の恒常性を保つことに繋がり、それが細胞の生存を維持するというメカニズムが考えられる。いずれにせよ、生物の生死にミトコンドリアが中心的な役割を果たしている可能性が高い。実際、本章の実験結果からもそのことが伺える。野生株とミトコンドリア DNA 欠損株における ScEcl1 高発現や CR による経時寿命への影響について示した図 2-2 と図 2-6 の結果は同時にサンプリングしたもので、二つのグラフで比較すると、野生株 (WT/vc) の 50% 死滅期が 5 日に対し、ミトコンドリア DNA が欠損した rho⁰ 株 (rho0/vc) の 50% 死滅期が 2 日と、著しく早いということが見受けられる。つまり、ミトコンドリア DNA がコードする呼吸機能の中心的な因子（主

に電子伝達系や酸化的リン酸化)は酵母の寿命に密接に関与していることを示唆しており、また、この表現型は1章で示した *Scecl1* 欠損株の表現型と類似する。

生育時における呼吸活性の上昇について

図 2-4 の結果より、*ScEcl1* 高発現は対数増殖期により多くの酸素を消費していることが伺える。そして、最終的には消費の傾きが緩やかになるのが見受けられる。このことは、酵母が生育する時期により多くの酸素を消費し、定常期付近では寧ろ消費が低下することを示している。この結果と経時寿命測定の結果と合わせて考察してみた。

経時寿命の測定は定常期以降の細胞を水に移してから測定しているため、定常期以降の細胞周辺環境はすべての株において共通である。また、細胞は生育に *LEU2* 遺伝子が必要なためにプラスミドを保持しているが、水では酵母は生育しないため、長期的な生存率測定において、定常期におけるプラスミド上の *ScEcl1* の影響も大幅に減少することが考えられる。よって、本研究のように、*ScEcl1* 高発現株とベクターコントロール株間、生育時に CR を施した株と通常培地で生育した株の間で経時寿命が大きく異なるという結果は、生育時の *ScEcl1* 高発現や CR による影響に由来することを示唆するものとなる。そして、生育期の代謝変化が定常期以降の細胞の様々なストレスへの適応に寄与すると考えられる。

ScEcl1 の働きとミトコンドリアについて

ミトコンドリア DNA 欠損株は図 2-5 で示したように、呼吸（電子伝達系、酸化リン酸化）の中心的な機能を担う因子の欠損株である。図 2-7, 2-8 より、rho⁰ 株では呼吸活性と生育時の酸素消費に大きな欠陥が見られる。rho⁰ 株では ScEcl1 高発現や CR によって上昇した呼吸活性は全く見られず、ScEcl1 高発現による生育時の酸素消費増加も全く見られなかった。このことから、呼吸は勿論のこと、ScEcl1 高発現で見られた酸素消費の上昇もミトコンドリアを介した制御を受けることが示された。以上の結果を踏まえて私は、ScEcl1 はミトコンドリアの生合成や活性化に作用しているのではないかと考えた。

上記の考えを確かめる解析にあたり、私は Hap2 と Hcm1 に着目した。前者の Hap2 は結果④にも記したように、過去に ScEcl1 と相互作用することが報告されている因子であり (Ito T *et al.* 2001)、尚かつ hap2 欠損株では、ミトコンドリア DNA の不安定化を引き起こし、rho⁻変異の頻度が上昇するとの報告もある (Mattoon JR *et al.* 1990)。後者の Hcm1 は、forkhead 型転写因子として知られ、近年の解析では、高発現させることによる呼吸活性と酸化ストレス耐性の上昇、欠損することによる酸化ストレス耐性の低下が報告されている (Rodriguez-Colman MJ *et al.* 2010)。この表現型は本論文の 1 章で報告した ScEcl1 の表現型と酷似する。すなわち、ScEcl1 と同様の経路で働くことが考えられる。図 2-10 で示したように、この二つの因子の欠損株では、ScEcl1 を高発現しても経時寿命の延長が全く見られなかった。これらの結果は、上記で仮定した ScEcl1 はミトコンドリアの生合成や活性化に関与するという考えを支持するものであ

る。

ScEcl1 とストレス応答について

高い呼吸活性は ROS 生産の上昇をもたらし、細胞の早死にをもたらすとの報告がある (Balaban RS *et al.* 2005)。また図 1-11 では、ScEcl1 高発現が細胞質のカタラーゼの発現を促進する結果を示している。ところが出芽酵母において、Ctt1 の高発現は経時寿命の低下を引き起こし、欠損によって経時寿命を延長させるとの報告がある (Fabrizio P *et al.* 2003, Mesquita A *et al.* 2010)。一見これらの結果は ScEcl1 高発現による *CTT1* の発現上昇と経時寿命との関係で矛盾している。しかしながら近年、線虫を用いた研究により、酸化ストレス系統単独の活性化や抗酸化剤の添加は細胞や、組織的ストレス応答に思わぬ損傷を与える可能性があり、ミトコンドリアの呼吸活性の上昇による (或は伴う) ROS の増加 を介した酸化ストレス応答系の活性化が寿命延長に寄与するとの報告がある (Schulz TJ *et al.* 2007)。このことは、出芽酵母における *CTT1* 高発現 (酸化ストレス経路のみの活性化) による経時寿命の低下と共通点があるように思える。本考察の冒頭でも述べたが、ミトコンドリアの活性化は様々な細胞構成物の生合成を活性化、代謝回転 (細胞構成物の新生) を促進させるため、様々な経路に働きかけて、細胞の恒常性を維持しているのではないかと考えられる。よって、ScEcl1 高発現がミトコンドリアの呼吸活性とストレス応答を同時に上昇させることは、細胞の恒常性維持に働きかけており、*CTT1* の発現上昇もその一環と考えられる。

以上を踏まえ、改めて図 2-10 の生存率測定の結果を交えて考察する。*hap2* 欠

損株では、*ScEcl1* を高発現しても、ベクターコントロール欠損株よりも顕著に経時寿命が低下しているのが見受けられる。このことは以下のように考察できる。つまり、*hap2* 欠損株では呼吸関連因子の転写の欠陥により、ミトコンドリアの呼吸機能が不完全であり、*ScEcl1* を高発現しても呼吸は促進されず、*CTT1* の発現のみが促進したと考えられる。結果的に *Ctt1* 単独の高発現と類似する状況を作り出し、これまでに報告された「出芽酵母において、*Ctt1* の高発現は経時寿命を低下させる」という表現型と一致する。

本章を総合して考察した結果、私は、細胞や多細胞生物の寿命の延長はミトコンドリアとストレス応答系の厳密且つ相関的な制御が必要なのではないかと考えている。

実験材料と手法

菌株と培地

以下の菌株を用いた。

菌株名	遺伝子型
YPH250 (出芽酵母)	<i>MATa trp1-Δ1 his3-Δ200, leu2-Δ1 lys2-801 ade2-101 ura3-52</i>
DC5 (出芽酵母)	<i>MATa leu2-3, leu2-112, his3, can1</i>
DC5 rho ⁰ (出芽酵母)	<i>MATa leu2-3 leu2-112 his3 can1 ΔmtDNA</i>
BY4741 (出芽酵母)	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3-Δ0</i>
JY333 (分裂酵母)	<i>h⁻ leu1 ade6-M216</i>

以下の培地を用いた。

SD 培地

(0.67 % yeast nitrogen base without amino acids and 2 % glucose)

SDCR 培地 (CR 培地と表記)

(0.67 % yeast nitrogen base without amino acids and 0.5 % glucose)

尚、CR 培地の条件は Smith DL Jr らのプロトコルに基づく (Smith DL Jr *et al.* 2007)。

必要に応じて以下のものを加えた。

Adenine (hemisulfate salt)	40 mg/l
L-histidine	20 mg/l
L-leucine	60 mg/l
L-tryptophan	40 mg/l
100×DropOut (-Leu,-Trp,-His,-Ade) 溶液	10 ml/l
Agar	20 g/l

100×DropOut(-Leu,-Trp,-His,-Ade)溶液

組成	溶液中濃度	培地中の最終濃度
L-arginine	2 g/l	20 mg/l
L-aspartic acid	10 g/l	100 mg/l
L-glutamic acid	10 g/l	100 mg/l
L-lysine	3 g/l	30 mg/l
L-methionine	2 g/l	20 mg/l
L-phenylalanine	5 g/l	50 mg/l
L-serine	37.5 g/l	375 mg/l
L-threonine	20 g/l	200 mg/l

L-tyrosine	3 g/l	30 mg/l
L-valine	15 g/l	150 mg/l
Uracil	2 g/l	20 mg/l

YPD 培地

(1 % yeast extract, 2 % polypeptone, 2 % glucose)

必要に応じて Agar (20 g/l) を加えた。

YES 培地

(0.5 % yeast extract, 3 % glucose)

必要に応じて以下のものを加えた。

Adenine (hemisulfate salt)	40 mg/l
G418	100 µg/ml
Agar	20 g/l

プラスミド

以下のプラスミドを用いた。

プラスミド名	マーカー
pG1	<i>TRP1</i> マーカー、出芽酵母における高発現用
pG1-LEU2	<i>LEU2</i> マーカー、出芽酵母における高発現用
pLB-Dblet	<i>LEU2</i> マーカー、分裂酵母における高発現用

LEU2 マーカー-pG1 プラスミドの作成

DC5 と BY4741 株はトリプトファン非要求性であるため、pG1 ベクター (Schena *et al.* 1991) は用いることが出来ない。そこで、共通の要求性であるロイシンをマーカーにすべく、PCR を用いて以下のプライマーで、pGAD424 上の *LEU2* 遺伝子を増幅させ、pG1 と共に *Bgl*III 制限酵素処理後、プラスミド上の *TRP1* の領域に組み込んだ。

LEU2-U-*Bgl*III : TGAAGATCTAGCTAGAGTCGAGATCC

LEU2-D-*Bgl*III : CGGAGATCTCGAAATCCCCTACCCTATG

* 下線 : 制限酵素サイト

各々の株における *ScEcl*1 高発現株の作成

YPH250 は 1 章で作成した株を用いた為、省く。

DC5、BY4741 は pG1-LEU2 に、PCR を用いて以下のプライマーで染色体上の *ScEcl*1 を増幅させ、pG1-LEU2 と共に *Bam*HI、*Sal*I 制限酵素処理した後、プラスミドに組み込んだ。その産物を形質転換することで作成した。

YGR146C-U2-*Bam*HI : AATGGATCCATGAGCACCGCATTCAACGA

YGR146C-D-*Sal*I : GTAGGTCGACGGCAAGTCGAAGAAGATACG

* 下線 : 制限酵素サイト

生存率測定

基本操作は1章と変わらないため省く。CR条件については、生育を揃えるため、通常培地で菌株を30℃の条件で1昼夜振とう培養した後、一部を新鮮なCR培地へ植菌した。通常培地と同様にCR培地も3日ほどで定常期に入るので、30℃の条件で2昼夜振とう培養した。培養3日目に集菌し、滅菌水で洗った後、培地を滅菌水と入れ替えて、30℃で振とうし続けた。サンプリングは1章と同じなため省略する。よって、通常条件か、CR条件かの違いは、細胞が生育する間のみである。尚、基本操作はFabrizioらのものに基づく (Fabrizio P and Longo VD 2003)。

呼吸活性の測定

各々の株を通常培地或はCR培地で30℃、振とう培養。OD₆₀₀=0.75~1.0に到達した時点で集菌し、TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium) *¹入りの新鮮な培地へ移した。50℃、1時間振とう培養した後集菌し、lysis bufferに懸濁。Micro Smash MS-100R (Tomy) を用いて4℃、4000 rpm、4分の条件で菌を破碎。吸光度計を用いて破碎液の490nmの波長吸収を測定した。尚、呼吸活性は以下の式を用いて求めた。

$$\text{Respiratory activity} = \text{OD}_{490} / \text{OD}_{600}$$

このプロトコルはOgurらのプロトコル (Ogur M *et al.* 1954) を参考にして、本研究のため私自身が手を加え、適応させたものである。

*¹: ミトコンドリアにあるコハク酸デヒドロゲナーゼ (ユビキノン) の基質として用いられ、開環することにより赤色を呈する物質である。そのため呼吸活性

測定試薬として用いられる。培地中の TTC 量は 1 % (w/v) である。

酸素消費量の測定

各々の株を通常培地或は CR 培地に植菌し、30℃、振とう培養。OD₆₀₀ で生育を追いつながら一定間隔でサンプリングした。DO メーター (Sato Shoji Co.) を用いて培養液中の溶存酸素量を測定した。一点のみの測定の場合は、測定する OD に到達したら、その培地中の溶存酸素量を測定した。コントロールは植菌前の培地とした。酸素消費量は以下の式を用いて求めた。

$$\text{O}_2 \text{ consumption} = (\text{DO}_{(\text{before inoculation})} - \text{DO}_{(\text{sampling point})}) / \text{increased OD}_{600}$$

参考文献

- Azuma K, Ohtsuka H, Mita S, Murakami H, Aiba H. (2009) Identification and characterization of an Ecl1-family gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2787-9
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, **120**, 483-95
- Barros MH, Bandy B, Tahara, EB Kowaltowski AJ. (2004) Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bio. Chem.*, **279**, 49883-8
- Buschlen S, Amillet JM, Guiard B, Founier A, Marcireau C, Bolotin-Fukuhara M. (2003) The *S. cerevisiae* HAP complex, a key regulator of mitochondrial function, coordinates nuclear and mitochondrial gene expression. *Comp. Funct. Genomics*, **4**, 37-46
- Fabrizio P, and Longo VD. (2003) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*, **2**, 73-81

Fabrizio P, Liou LL, Moy VN, Diaspro A, Valentine JS, Gralla EB, Longo VD. (2003) SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics*, **163**, 35-46

Fontana L, Partridge L, Longo VD, (2010) Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science*, **328**, 321-6

Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. (2011) Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*, **333**, 1109-12

Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sasaki Y. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natul. Acad. Sci. USA.*, **98**, 4569-74

Jiménez-Hidalgo M, Santos-Ocaña C, Padilla S, Villalba JM, Lopez-Lluch G, Martín-Montalvo A, Minor RK, Sinclair DA, de Cabo R, Navas P. (2009) NQR1 controls lifespan by regulating the promotion of respiratory metabolism in yeast. *Aging Cell*, **8**, 140–151

Kennedy BK, Steffen KK, Kaeberlein M. (2007) Ruminations on dietary restriction and aging. *Cell. Mol Life Sci.*, **64**, 1323-1328

Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Culotta VC, Fink GE, Guarente L. (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Letters to Nature*, **418**, 344-348

Longo VD, and Fabrizio P. (2002) Regulation of longevity and stress resistance: a molecular strategy conserved from yeast to humans? *Cell Mol. Life Sci.*, **59**, 903-8

Mattoon JR, Caravajal E, Guthrie D (1990) Effects of hap mutations on heme and cytochrome formation in yeast. *Curr. Genet.*, **17**, 179-83

Mesquita A, Weinberger M, Silva A, Sampalo-Marques B, Almeida B, Leão C, Costa V, Rodrigues F, Burhans WC, Ludovico P. (2010) Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity. *Proc. Natul. Acad. Sci. USA.*, **107**, 15123-8

Ogur M, St John R, Nagai S. (1954) Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. *Science*. **125**, 928-9

Ohtsuka H, Mita S, Ogawa Y, Azuma K, Ito H, Aiba H. (2008) A novel gene, *ecl1(+)*, extends the chronological lifespan in fission yeast. *FEMS Yeast Res.*, **8**, 520-530

Ohtsuka H, Ogawa Y, Mizuno H, Mita S, Aiba H. (2009) Identification of Ecl family genes that extend chronological lifespan in fission yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 885-9

Ohtsuka H, Azuma K, Kubota S, Murakami H, Giga-Hama Y, Tohda H, Aiba H. (2012) Chronological lifespan extension by Ecl1 family proteins depends on Prr1 response regulator in fission yeast. *Genes Cells*, **17**, 39-52

Pan Y. (2011) Mitochondria, reactive oxygen species, and chronological aging: a message from yeast. *Exp. Gerontol.*, **46**, 847-52

Rodriguez-Colman MJ, Reverter-Branchat G, Sorolla MA, Tamarit J, Ros J, Cabiscol E. (2010) The forkhead transcription factor Hcm1 promotes mitochondrial biogenesis and stress resistance in yeast. *J. Biol. Chem.*, **285**, 37092-101

Schena M, Picard D, Yamamoto KR. (1991) Vectors for constitutive and inducible gene expression in yeast. *Methods Enzymol.*, **194**, 389-98

Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M. (2007) Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial

respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab.*, **6**, 280-93

Smith DL Jr, McClure JM, Matecic M, Smith JS. (2007) Calorie restriction extends the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* independently of the Sirtuins. *Aging Cell*, **6**, 649-62

Tait SW, and Green DR. (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 621-32

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, **324**, 1029-33

Wallace DC, Fan W, Procaccio V. (2010) Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu. Rev. Pathol.*, **5**, 297-348

Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, **469**, 221-5

第 3 章

分裂酵母の Ecl1 と相互作用する 因子の解析

概要

分裂酵母の Ecl1 は高発現することで、経時寿命延長、過酸化水素ストレス耐性、胞子形成の促進に寄与するが、具体的な作用メカニズムや Ecl1 自身の制御メカニズムについては分かっていない (Ohtsuka H *et al.* 2008, Ohtsuka H *et al.* 2012)。そこで私は酵母 two-hybrid 法を用いて Ecl1 と相互作用する因子の探索・解析を行い、異なった視点から Ecl1 の解析を行った。その結果、8 つの異なる相互作用因子を取得した。表現型解析の結果、相互作用因子の 1 つである *cpc2* 欠損株では、Ecl1 高発現で見られる経時寿命延長や胞子形成促進といった表現型が弱体化または消失していることを発見した。物理的相互作用ということで、タンパク質の視点から解析を進めた結果、*cpc2* 欠損株では Ecl1 の局在に変化は見られなかったが、タンパク質の量が著しく減少していることを見出した。ところが、*cpc2* 欠損株の *ecl1*⁺ mRNA 量は野生株より高かった。さらに解析を進めた結果、*cpc2* 欠損株では Ecl1 タンパク質の安定性に変化は見られなかった。よって私は、*cpc2* 欠損株では *ecl1*⁺ mRNA の翻訳に何らかの障害が起きていると考えた。また、様々な株を用いた *ecl1*⁺ mRNA の発現解析により、*cpc2* 欠損株で *ecl1*⁺ mRNA 量が高いのは、タンパク質の量の低下によるフィードバック制御なのではないかと考えた。

緒言

分裂酵母の Ecl1 は酵母の経時寿命延長因子として発見され、解析が進められてきた (Ohtsuka H *et al.* 2008, Azuma K *et al.* 2009)。分裂酵母内には Ecl1 の他に Ecl2, Ecl3 があり、各々の単独欠損では表現型を示さず、三重欠損することで、対数増殖期において早死にを示した (Ohtsuka H *et al.* 2009, Ohtsuka H *et al.* 2011)。しかしながら、2 章でも触れたが、お互いの転写制御に違いが存在することから、mRNA 発現量やタンパク質の量、強いては働きも異なる可能性が高い。そこで私は、一括りにせず、各々異なった視点から Ecl ファミリーの作用メカニズムや制御機構の解析を進めることの必要性を考えた。1 章と 2 章でも扱っていたように、私は主に Ecl1 の解析を行っていたため、Ecl1 に的を絞り、相互作用する因子の探索・解析という視点から、Ecl ファミリーの機能、制御機構の解明を試みた。

本章では、Ecl1 と相互作用する因子を取得し、その中から欠損することで Ecl1 高発現の表現型に影響を与えるものを取り上げ、解析を進めた。そして、それらの結果から Ecl1 の機能や制御機構について議論する。

結果

①酵母 two-hybrid に用いる Ecl1 の構築

私は Ecl1 を bait として用いるため、DNA binding domain (以降 DBD と表記)と Ecl1 が融合タンパク質となるように、two-hybrid 用ベクターの 1 つである pGBKT7 に Ecl1 を組み込み (以降 pEcl1-DBD と表記)、酵母に導入した。コントロールのため、pEcl1-DBD 単独保持株で two-hybrid 用の選択培地に生育出来るかどうかを調べた。その結果、本来 2 つの因子が相互作用することによって、bait 側の DBD と prey 側の activation domain (以降 AD と表記) が結合してレポーター遺伝子が転写され、選択培地での生育が可能となるが、図 3-1 で示したように、相互作用する因子がなくても pEcl1-DBD を保持する株は選択培地で生育した (赤囲い)。すなわち Ecl1 そのものに転写活性能力があり、スクリーニングには不都合であると判断した。

そこで私は Ecl1 を図 3-2 で示したように、Met1 ~ Glu52 で構成される Ecl1-N terminus (以降 Ecl1-NT と表記)と、ATG-Lys31 ~ Ala80 で構成される Ecl1-C terminus (以降 Ecl1-CT と表記) の、お互いに一部重複するような構成に Ecl1 を 2 分割し、再び pGBKT7 に組み込み、酵母に導入した。尚、Ecl1N 末側を保持したプラスミドを pEcl1-NT-DBD と表記し、Ecl1N 末側を保持したプラスミドを pEcl1-CT-DBD と表記した。そして pEcl1-NT-DBD 保持株と pEcl1-CT-DBD 保持

株の各々の選択培地における生育能を調べた。その結果、図 3-3 で示したように、pEcl1-NT-DBD 保持株は pEcl1-DBD 保持株と同様に選択培地で生育でき (赤囲い)、pEcl1-CT-DBD 保持株は生育できなかった。よって私は、pEcl1-CT-DBD を用いて two-hybrid スクリーニングを行うことにした。

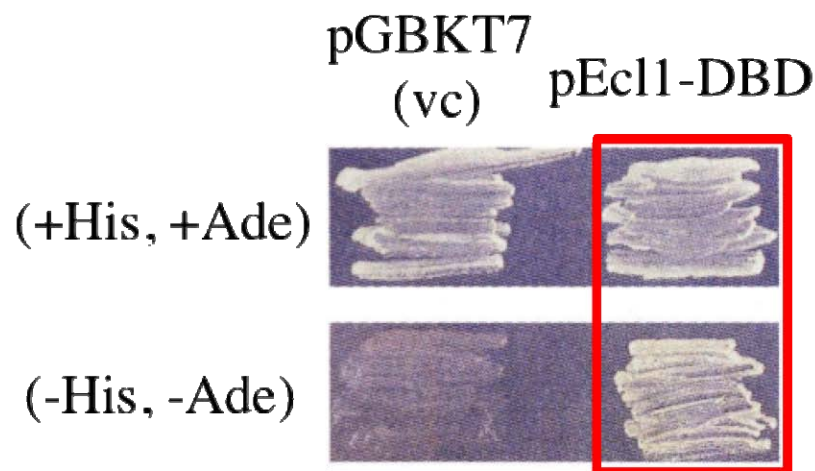


図3-1 pEcl1-DBD保持株は相互作用因子がなくても選択培地で生育可能となる

Two-hybridスクリーニングの前段階として、baitに用いる因子が単独で選択培地で生育するかどうかを確認する必要がある。図に示す2種類の培地を用いた。どちらの培地もプラスミドの保持の為にトリプトファンは含まれておらず、ヒスチジンとアデニンは相互作用依存のレポーター遺伝子産物である。

ベクターコントロール株とEcl1-DBD (DNA binding domain) 保持株をそれぞれの培地にストリークして生育を観察したところ、ベクターコントロール株は、ヒスチジンとアデニンを含む培地では生育できたが、含まない培地では生育できなかった。一方でEcl1-DBD保持株は培地中のヒスチジンとアデニンの有無に関係なく生育できた (赤囲い)。

つまり、Ecl1はレポーター遺伝子の転写活性を有する可能性があり、全長を用いたtwo-hybridスクリーニングは不可能であるということを示す。

②Ecl1 C 末と相互作用する因子の同定

Ecl1C 末を bait としてスクリーニングを行ったところ、8 つの因子を取得した (図 3-4, 3-5)。各々の因子の説明を以下に示す (主な情報は *S.pombe* GeneDB と PomBase、及び UniProt に基づく。アルファベットの割り振りは図 3-4 のものと一致する)。

a : SPAC17A5.15c (predicted as a glutamate-tRNA ligase)

この因子はクラス I アミノアシル-rRNA 合成酵素に属する因子だと考えられる。核と細胞基質に局在し (Matsuyama A *et al.* 2006)、以下の反応を触媒する。

$ATP + L\text{-glutamate} + tRNA(Glu) = AMP + diphosphate + L\text{-glutamyl-tRNA}(Glu).$

b : Apt1

この因子はプリン/ピリミジン ホスホリボシル基転移酵素ファミリーに属する。核と細胞基質に局在し (Matsuyama A *et al.* 2006)、以下に示す AMP 再利用反応を触媒する。

$AMP + diphosphate = adenine + 5\text{-phospho-}\alpha\text{-D-ribose-1-diphosphate}.$

c : Cpc2

この因子は酵母における mRACK (mammalian receptor for activated protein kinase

C) ホモログで、WD repeat G protein beta ファミリーに属する (McLeod M *et al.* 2000)。ストレスシグナル伝達において Pck2 (分裂酵母の PKC) の受容体として働く (Won M *et al.* 2001)。細胞質とリボソームに局在する (Jeong HT *et al.* 2004)。

d : Rga7

この因子は Rho-GTPase 活性化タンパク質に分類される。その中で Rga7 は MAPK である Pmk1 を負に制御する (Sato T *et al.* 2010)。細胞基質と細胞分裂部位に局在する (Matsuyama A *et al.* 2006)。

e : Rpl1201

この因子はリボソームタンパク質 L11P ファミリーに属し、26S リボソーム RNA と直接結合する。核小体と細胞基質に局在する (Matsuyama A *et al.* 2006)。

f : Tdh1

この因子はグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素ファミリーに属する。細胞基質に局在し (Matsuyama A *et al.* 2006)、以下の反応を触媒する。

D-glyceraldehyde-3-phosphate + phosphate + NAD⁺ = 3-phospho-D-glyceroyl phosphate + NADH.

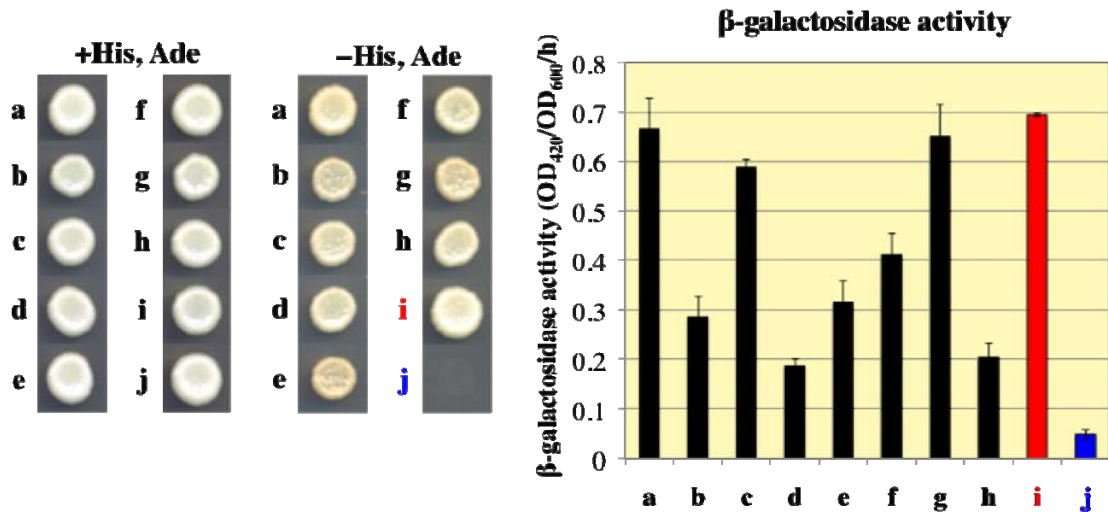
Tdh1 は Mcs4 (response regulator) -Win1 (MAPKKK) -Wis1 (MAPKK) 複合体に結合し、過酸化水素ストレスシグナル伝達を正に制御する (Morigasaki M *et al.* 2008, Morigasaki M *et al.* 2010)。

g : Eft201

この因子は GTP-binding 伸長因子ファミリー (EF-G/EF-2) に属し、翻訳伸長因子として働く (Mita K *et al.* 1997)。GTP 依存的に合成初期のタンパク質をリボソームの A-site から P-site へ移行させる。細胞基質に局在する (Matsuyama A *et al.* 2006)。

h : Dlc1

この因子はダイニン軽鎖 Tctex-type ファミリーに属し、星状体微小管や紡錘体と共存し、核、細胞基質、ダイニン複合体、細胞質表層微小管に局在する (Matsuyama A *et al.* 2006, Miki F *et al.* 2002)。



i: Ctr (+), p53 × largeT
j: Ctr (-), Ecl1-CT × null

図3-4 Ecl1C末と相互作用する因子

Ecl1-C-DBDと相互作用する因子の探索の結果、8つの独立した株を取得した。この図では各因子を保持したプラスミドを再度Ecl1-C-DBD保持株に形質転換した後に、選択培地へのスポットによる生育の観察(左図)、及びβ-ガラクトシダーゼ活性測定を行ったもの(右グラフ)を表す。尚、iがポジティブコントロール株で、jはネガティブコントロール株である。結果、選択培地における生育と、β-ガラクトシダーゼ活性の双方でポジティブな結果を示したことから、a~hのいずれの因子もEcl1C末と相互作用することを示した。

- a: **SPAC17A5.15c: Glutamate-tRNA ligase** from Met₁ 717aa/717aa
- b: **Apt1: Adenine phosphoribosyltransferase** from Met₁ 189aa/189aa
- c: **Cpc2: RACK1 ortholog, receptor of Pck2** from Ala₂₄ 291aa/315aa
- d: **Rga7: Rho-GTPase activating protein** from Ile₅₉₄ 102aa/696aa
- e: **Rpl1201: Ribosomal protein** from Thr₁₂ 154aa/166aa
- f: **Tdh1: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase** from Ala₁₀₈ 102aa/337aa
- g: **Eft201: GTP-binding elongation factor** from Gly₅₃₄ 309aa/843aa
- h: **Dlc1: Dynein light chain** from Ala₁₈ 94aa/112aa

図3-5 取得した因子の領域

取得した因子の名称を示した図である。アルファベットの割り振りは、図3-4のものと符合する。取得した因子の領域は、aとbのような全長のものや、d、f、gのようにC末側のみのものまで存在した。

③相互作用因子による Ec11 の表現型への影響

取得した相互作用因子が Ec11 とどのように関係するのかを調べる為に、私は、Ec11 が持つ最も顕著な表現型の1つである「高発現による経時寿命延長」に着目し、解析を進めた。まず各々の相互作用因子の欠損株作成を試み、8つの因子のうち、6つの因子 (Apt1, Cpc2, Dlc1, Eft2, Rga7, Tdh1) の欠損株の作成に成功した。次に作成した欠損株にプラスミドで Ec11 を高発現させ、経時寿命への影響

を調べた。その結果、図 3-6 で示したように、*cpc2* 欠損株では Ecl1 を高発現しても野生株ほどの経時寿命延長は見られなかった (赤囲い)。すなわち唯一 *cpc2* 欠損が、Ecl1 の高発現の表現型に影響を与え、Ecl1 の高発現の効果は、部分的に Cpc2 に依存していることが示された。Ecl1 と Cpc2 との間に、何らかの機能的関連があることが示唆されたため、私は Cpc2 に関して更に解析を進めた。

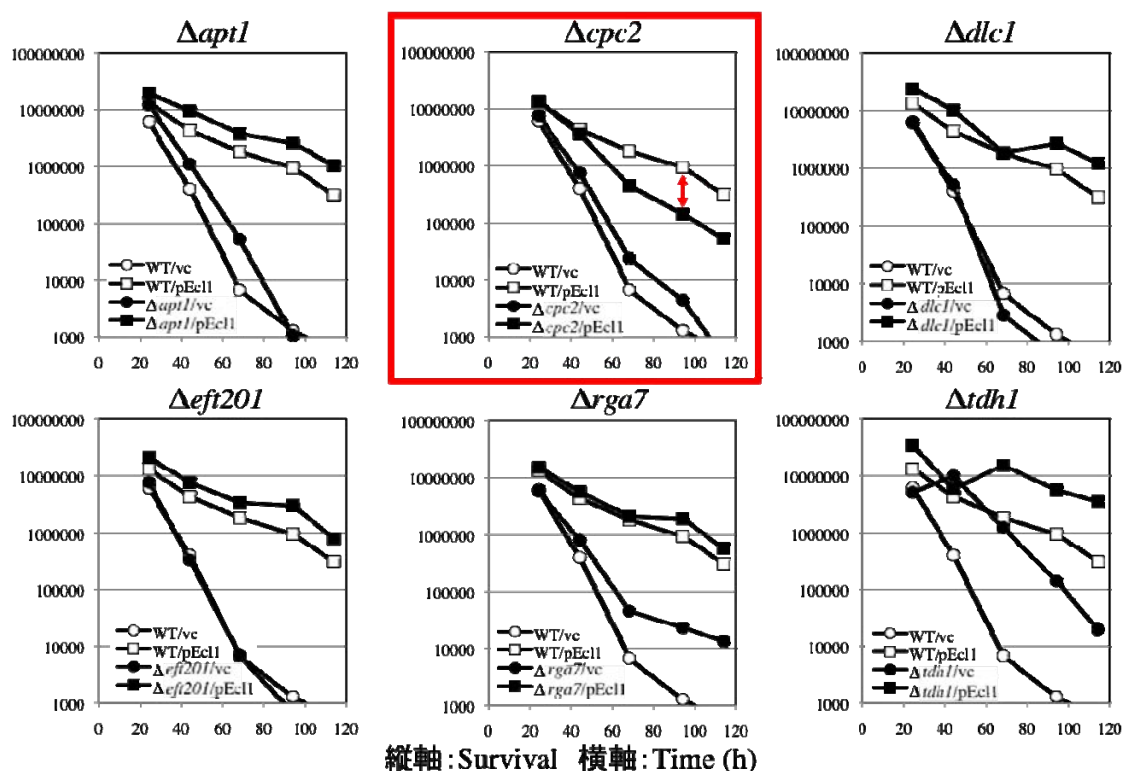


図3-6 *cpc2*欠損株ではEcl1高発現による経時寿命延長が低下する

相互作用因子の欠損株におけるEcl1高発現による経時寿命への影響を表したグラフである。取得した8つの因子のうち、6つの因子の欠損株の作成に成功し、各々の欠損株にEcl1を高発現させて、表現型解析を行った。その結果、*cpc2*欠損株では、Ecl1を高発現しても経時寿命延長が低下した (赤囲い)。

*rga7*欠損株は野生株と比較して経時寿命が延長していたが、欠損株にEcl1を高発現しても更なる延長は見られなかった (下中央グラフ)。*tdh1*欠損株は生育に異常が見られ歪なグラフとなった。これは、死細胞の栄養を利用した菌の適応再増殖によるもので、その後のグラフの傾きに差は見られなかった。その他の因子の欠損株に関しては野生株と同じであった。

よって、*cpc2*欠損のみがEcl1高発現の表現型に影響を与えた。

④Cpc2の有無はEcl1タンパク質の量に大きく影響する

(1) Cpc2はEcl1と物理的相互作用する因子として取得された。(2) *cpc2*欠損株におけるEcl1高発現の表現型が変化した。この2点を踏まえて私は、Cpc2の有無によって、Ecl1タンパク質レベルで何らかの変化が見られるのではないかと考えた。そこで、Ecl1とGFPの融合タンパク質(以降Ecl1-GFPと表記)を作成し、プラスミドに組み込んだ。そして細胞内で高発現したEcl1蛍光タンパク質の観察を試みた。

まず、Ecl1-GFPが野生型のEcl1と同様の表現型を示すかを調べるため、Ecl1-GFP高発現株の経時寿命測定を行った。その結果、図3-7で示したように、Ecl1-GFP高発現株はEcl1高発現株と同様に分裂酵母の経時寿命を延長させた。さらに、*cpc2*欠損株で見られたEcl1高発現による経時寿命延長の低下の表現型も同様に観察することができた。

次に野生株と*cpc2*欠損株におけるEcl1タンパク質の局在について調べた。その結果、図3-8で示したように、野生株と*cpc2*欠損株の間で、Ecl1-GFPの局在の違いはなく、共に核に局在するのが見受けられたが、*cpc2*欠損株では蛍光強度が著しく低かった(赤矢印での比較)。すなわち*cpc2*欠損株ではEcl1-GFPタンパク質の量が低いことが示唆された。

タンパク質の量の減少には主に3つの原因が考えられた。1つはタンパク質の安定性の低下、1つはmRNAレベルの低下、そして最後の1つはタンパク質

の翻訳障害である。Ecl1 と Cpc2 の相互作用という点から、まず私は、タンパク質の安定性に着目した。染色体上の Ecl1 に HA タグを付加し、野生株と *cpc2* 欠損株における Ecl1 タンパク質の半減期を調べた。Ecl1 タンパク質の量が最も増加する定常期付近まで株を培養し、シクロヘキシミドでタンパク質合成を阻害した後、時間を追いながら Ecl1 タンパク質の量を測定した。その結果、図 3-9 で示したように、野生株における Ecl1-HA タンパク質の半減期は約 30 分という結果を得たが (左)、*cpc2* 欠損株では、タンパク質を検出できず、半減期を議論できなかった (右)。Ecl1 タンパク質の半減期測定と平行して行った野生株と *cpc2* 欠損株での生育に伴う Ecl1 タンパク質の量の変動についても、図 3-10 で示したように、野生株では、Ecl1 タンパク質の量は定常期に入る頃に上昇したが (左)、*cpc2* 欠損株では常に Ecl1 タンパク質の量が低い上に、定常期に入る頃の上昇も見られなかった (右)。以上のことから私は、染色体上由来の Ecl1 タンパク質を用いた Cpc2 との解析は困難と判断した。

染色体上由来の Ecl1 タンパク質代替策として私は、Ecl1 の局在観察に用いた Ecl1-GFP 高発現株を用いて Ecl1 タンパク質の半減期測定を行った。その結果、図 3-11, 3-12 で示したように、プラスミド上の Ecl1 タンパク質量も *cpc2* 欠損により減少したが、検出には十分であった。そして、半減期に関しては野生株と *cpc2* 欠損株の間に大きな違いは見られないという結果を得た。このことから、Cpc2 は Ecl1 タンパク質の安定性に寄与してタンパク質量の制御を行っているわけではないことが示された。

タンパク質の安定性に変化がなかったことから、私は、*cpc2* 欠損による Ecl1

タンパク質の減少が、*ecI1*⁺の mRNA レベルで影響を受けているからではないかと考えた。半減期の測定に用いた株で、染色体上の *ecI1*-HA⁺及びプラスミド上の *ecI1*-gfp⁺の mRNA 量を調べたが、図 3-12 で示したように、染色体上の *ecI1*-HA⁺ (図 3-10 と同じサンプル由来) の発現は寧ろ *cpc2* 欠損株のほうが常に野生株よりも高く (左上)、プラスミド上の *ecI1*-gfp⁺の発現に関しては差が見られなかった (右)。このことから、Cpc2 は *ecI1*⁺の発現に働きかけることによってタンパク質の量の制御を行っているわけではないことが示された。

Ecl1-HA のタンパク質の量と *ecI1*-HA⁺ の mRNA 量が相反する結果を示したことについて、*ecI1*-HA⁺の発現が *cpc2* 欠損によって上昇したことの原因を解明する為に、私は以下の実験を行った。*ecI1*⁺の上流、下流配列がそれぞれ異なる株と *cpc2* 欠損株を用いて *ecI1*⁺ mRNA 量を測定した。その結果、興味深いことに、①プラスミド上の Ecl1 及び Ecl1-GFP (上流 573bp-*ecI1*⁺全長、下流配列なし)、②染色体上の Ecl1-HA (上流配列-*ecI1*⁺-HA-*kan*^R-下流配列)、③染色体上の Ecl1 (上流配列- *ecI1*⁺-下流配列) のそれぞれで *ecI1*⁺ mRNA 発現上昇量は異なった (図 3-14)。このことから、*ecI1*⁺の発現制御に、*ecI1*⁺の上流及び下流の配列が深く関与することが示唆された。尚、Ecl1 と相同性を持つ Ecl2, Ecl3 についても *cpc2* 欠損による影響をうけるかどうかを調べた。その結果、*ecI1*⁺のみ発現が上昇し (赤矢印)、*ecI2*⁺, *ecI3*⁺に関しては変動しなかった (図 3-15)。

これまでに、60S リボソームタンパク質 Rpl25a や性分化の制御に携わる転写因子 Ste11 などの翻訳に Cpc2 が必要との報告がある (Shor B *et al.* 2003, Paul SK *et al.* 2009)。本章の解析結果とこれまでの知見をまとめると、Cpc2 は Ecl1 の翻

訳に関与し、*cpc2* 欠損株では Ecl1 の翻訳に欠陥が生じたためにタンパク質の量が減少したと考えられる。

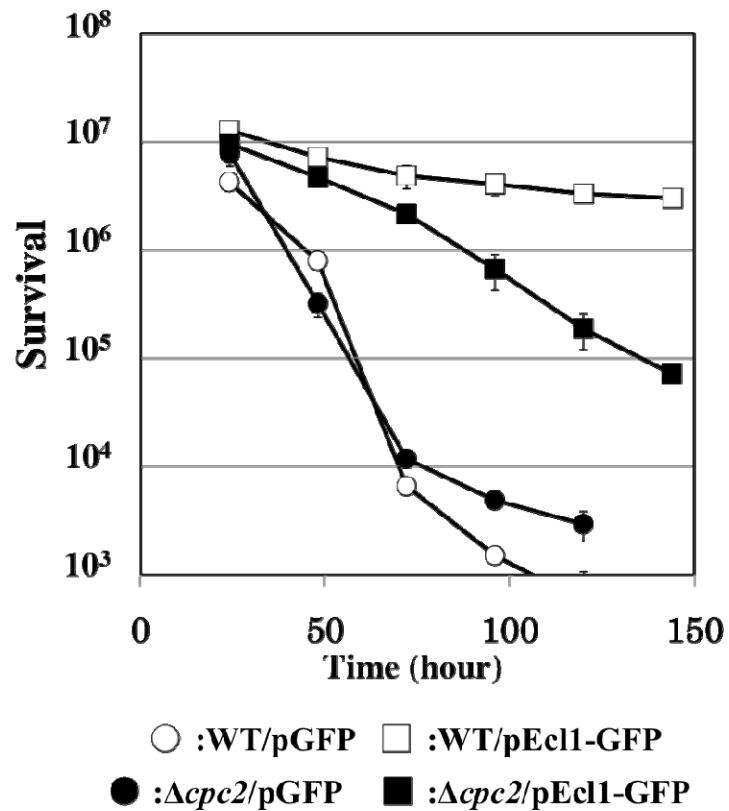


図3-7 Ecl1-GFP高発現はEcl1高発現と同様に経時寿命を延長させる

分裂酵母におけるEcl1-GFP高発現による経時寿命への影響を表したグラフである。Ecl1-GFP高発現株(グラフ中の□と■)は、ベクターコントロールのGFP高発現株(グラフ中の○と●)と比較し、経時寿命の延長を示した。また、*cpc2*欠損株で見られた経時寿命の延長も確認できた(グラフ中の□と■の比較)。

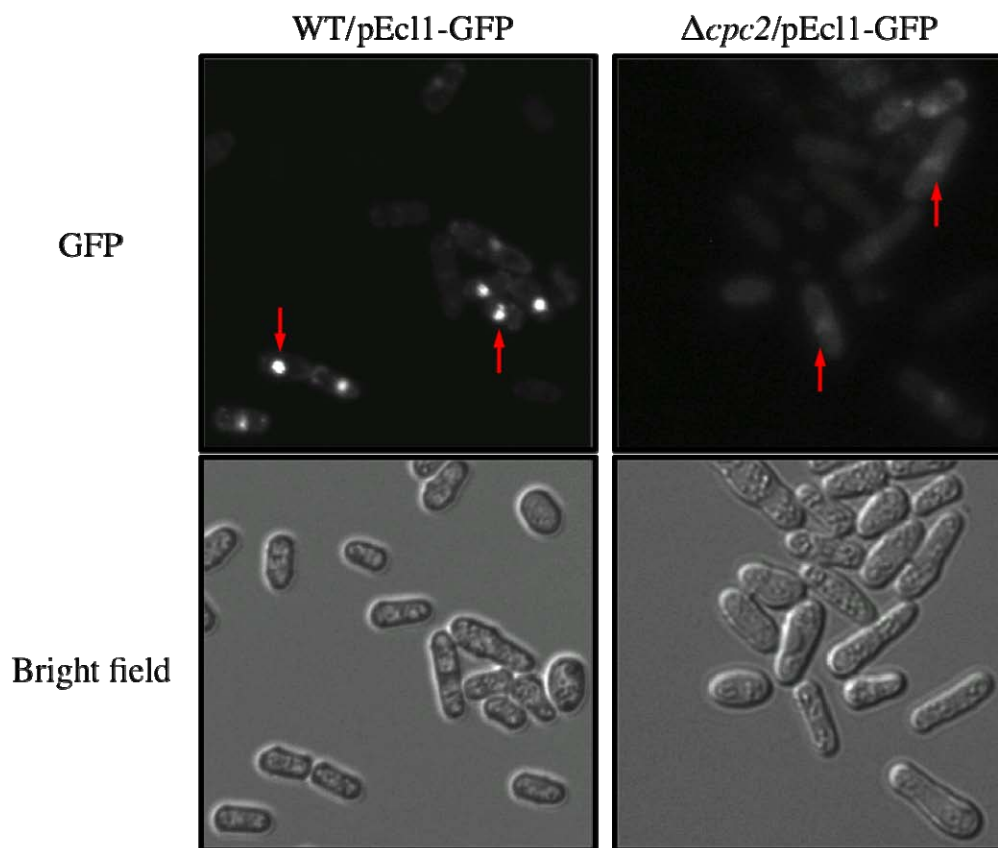
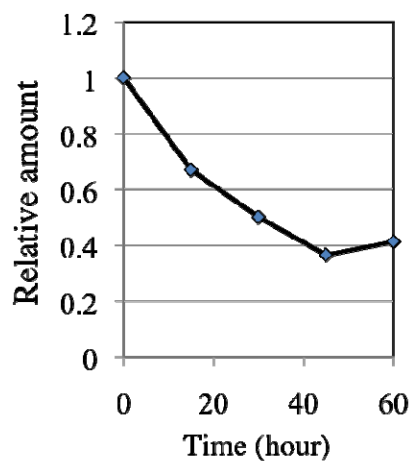
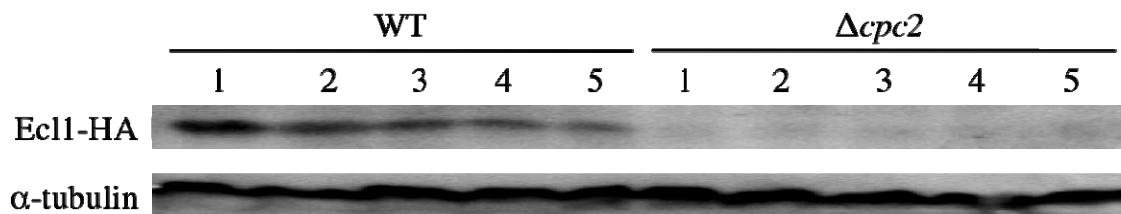


図3-8 *cpc2*欠損株ではEcl1-GFPの蛍光強度が低下する

野生株及び*cpc2*欠損株におけるEcl1-GFPの局在を表した図である。野生株において、Ecl1-GFPは主に核に局在した(左上の写真)。*cpc2*欠損株においてもEcl1は核に局在したが、蛍光度が著しく低かった(右上の写真)。



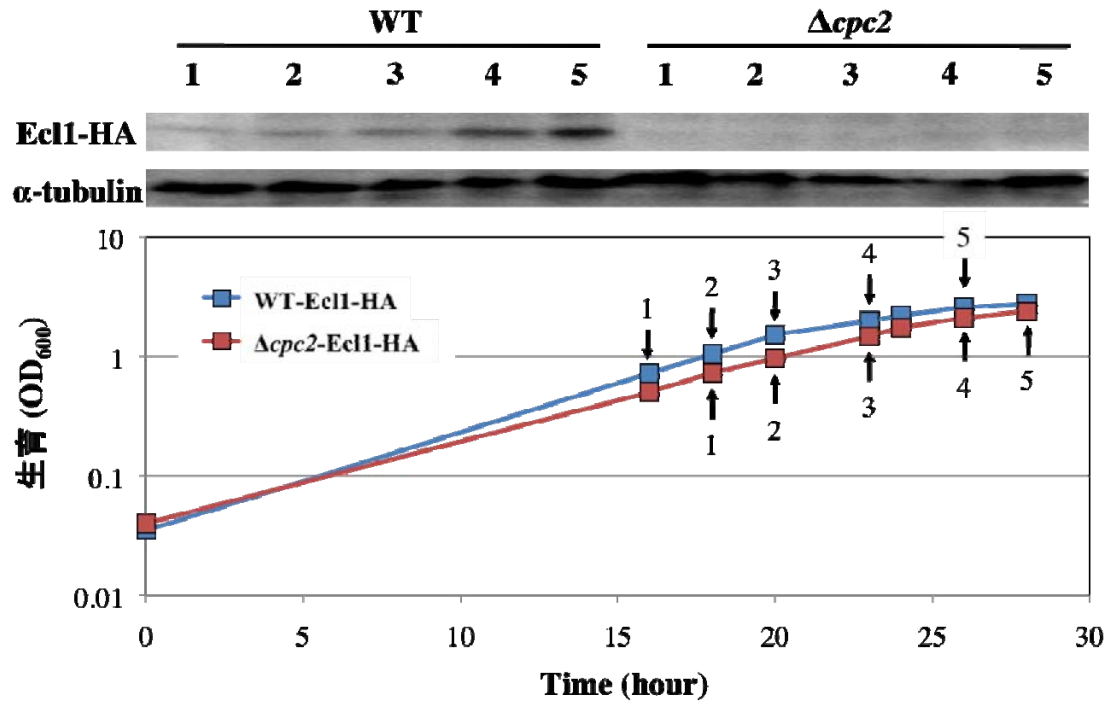
検出できず

1:0min, 2:15min 3:30min, 4:45min, 5:60min

WTにおけるEcl1-HAタンパク質の半減期
30min

図3-9 Ecl1タンパク質の半減期は約30分

染色体上のEcl1タンパク質の半減期を表した図である。野生株において、Ecl1-HAを用いたタンパク質の半減期を調べた結果、凡そ30分であることが分かった。一方で、*cpc2*欠損株ではEcl1タンパク質の量が低く、半減期を測定することは出来なかった。

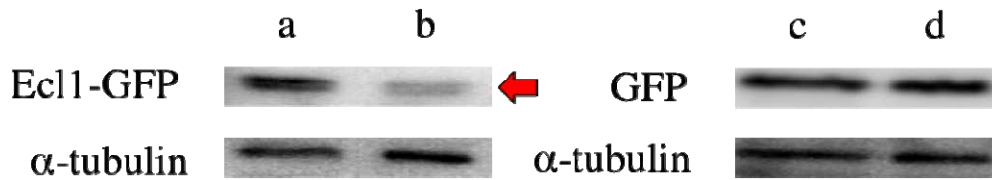


対応するOD₆₀₀ 1:0.75 2:1.0 3:1.5 4:2.0 5:2.5

図3-10 *cpc2*欠損株では生育に伴うEcl1タンパク質の増加が見られない

生育に伴うEcl1タンパク質の量的変動を表した図である。野生株では、Ecl1タンパク質の量は定常期に近づくに連れて上昇するのが見られた。一方で、*cpc2*欠損株では定常期近づいても上昇は見られなかった。

* サンプルングポイント (1~5の数字)は生育曲線 (グラフ)にあるポイントと一致する。



a: WT/pEcl1-GFP b: $\Delta cpc2$ /pEcl1-GFP
 c: WT/pGFP d: $\Delta cpc2$ /pGFP

図3-11 プラスミド上のEcl1タンパク質も*cpc2*欠損による影響を受ける

プラスミドで高発現したEcl1タンパク質の量と*cpc2*による影響を表した図である。同じODで、aの野生株におけるEcl-GFPタンパク質の量に対して、bの*cpc2*欠損株におけるEcl1-GFPタンパク質の量は著しく少なかった。この結果は、図3-8のEcl1-GFPの局在観察で観察されたEcl1-GFPの蛍光強度の低下と一致した。尚、コントロールとして、GFP単独のタンパク質の量についても調べたが、野生株と*cpc2*欠損株の間で差は見られなかった(図中のcとd)。

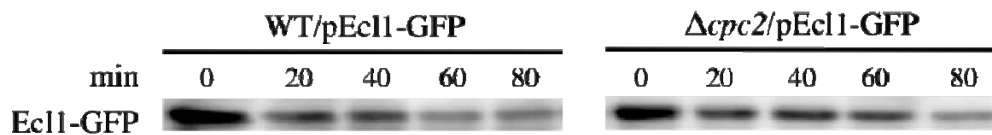


図3-12 野生株と*cpc2*欠損株間でEcl1タンパク質の安定性に大きな差はなし

プラスミド由来のEcl1-GFPタンパク質を用いた野生株と*cpc2*欠損株におけるEcl1タンパク質の半減期を表した図である。野生株と*cpc2*欠損株の間に著しい差は見られなかった。

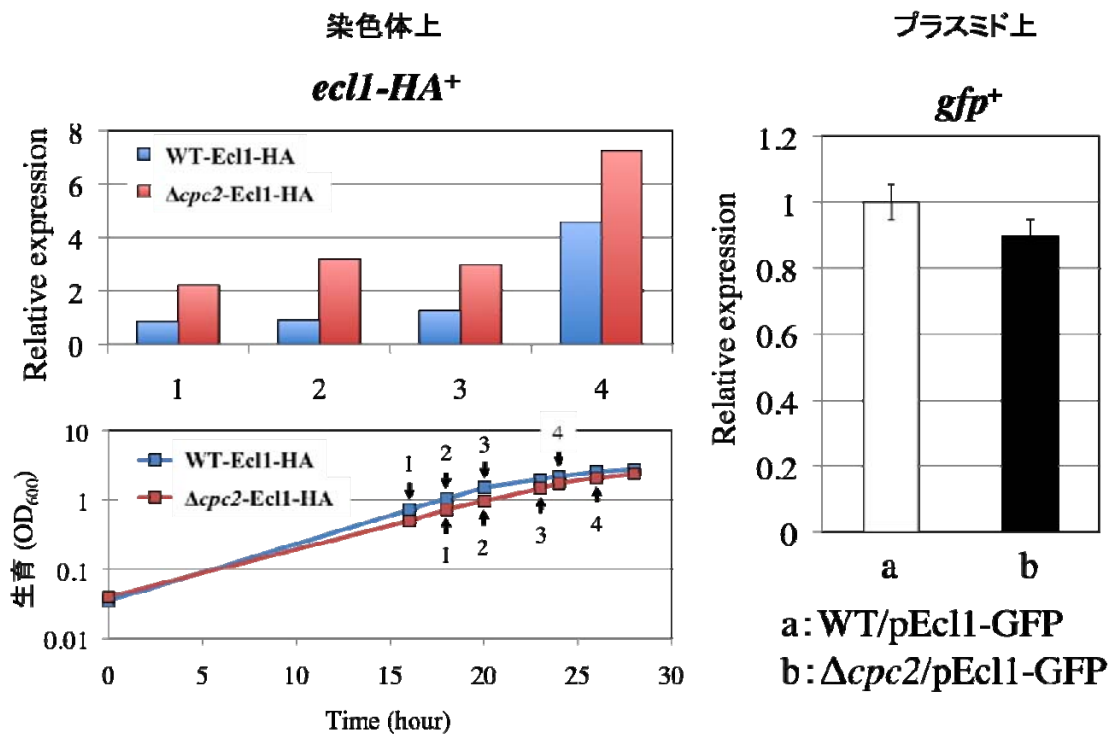


図3-13 *Cpc2*は*eclI*⁺ mRNAを介したタンパク質の量の制御に関与しない

染色体上及びプラスミド上の*eclI*⁺ mRNAに対する*cpc2*の影響を表したグラフである。左のグラフは対数増殖期 ($OD_{600}=0.75$) から定常期直前 ($OD_{600}=2.0$) にかけて染色体上由来の*eclI-HA*⁺ mRNAの変動を表している。

* 図3-10と同じサンプル由来で、サンプリングポイント(1~5の数字)は生育曲線(左下グラフ)にあるポイントと一致する。

*EclI*タンパク質量が定常期付近で上昇したように、染色体上*eclI*⁺ mRNAも定常期直前で著しく上昇した(左上グラフ中の■同士の比較)。それに対して、*cpc2*欠損株では野生株より常に*eclI*⁺ mRNA量(左上グラフ中の□)は高かった。

プラスミド由来の*eclI-gfp*⁺ mRNA量に関しては、野生株と*cpc2*欠損株の間に差は見られなかった(右グラフ)。

* プラスミド上の *eclI-gfp*⁺ の mRNA 検出に *gfp*⁺ を用いたのは、染色体上の *eclI*⁺ と区別する為である。

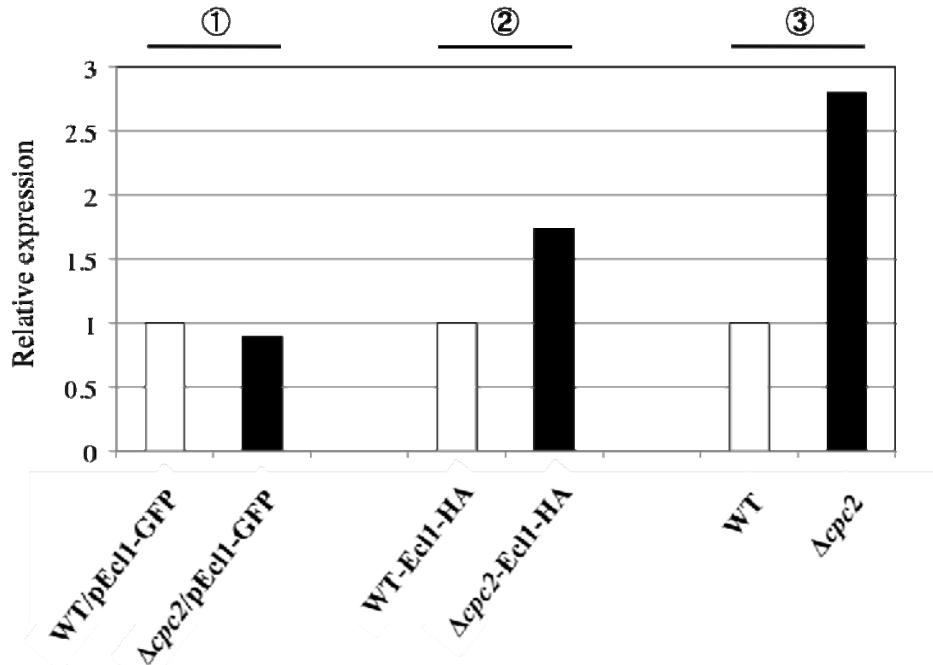


図3-14 *eclI*⁺の上流と下流配列構成が*cpc2*欠損時における*eclI*⁺の発現上昇に重要

eclI⁺の上流・下流配列と*cpc2*欠損による*eclI*⁺ mRNA量への影響を表したグラフである。

- ①: プラスミド上のEclI及びEclI-GFP、上流573 bp-*eclI*⁺全長、下流配列なし
- ②: 染色体上のEclI-HA、上流配列-*eclI*⁺-HA-*kan*^R-下流配列
- ③: 染色体上のEclI、上流配列-*eclI*⁺-下流配列

という構造となっている。グラフより、*cpc2*欠損時に見られる*eclI*⁺ mRNAの上昇には、プラスミド上の*eclI*⁺上流配列よりも更に上流、及び下流配列が必要であるということが示された。

* プラスミド上の *eclI-gfp*⁺ の mRNA 検出に *gfp*⁺ を用いたのは、染色体上の *eclI*⁺ と区別する為である。

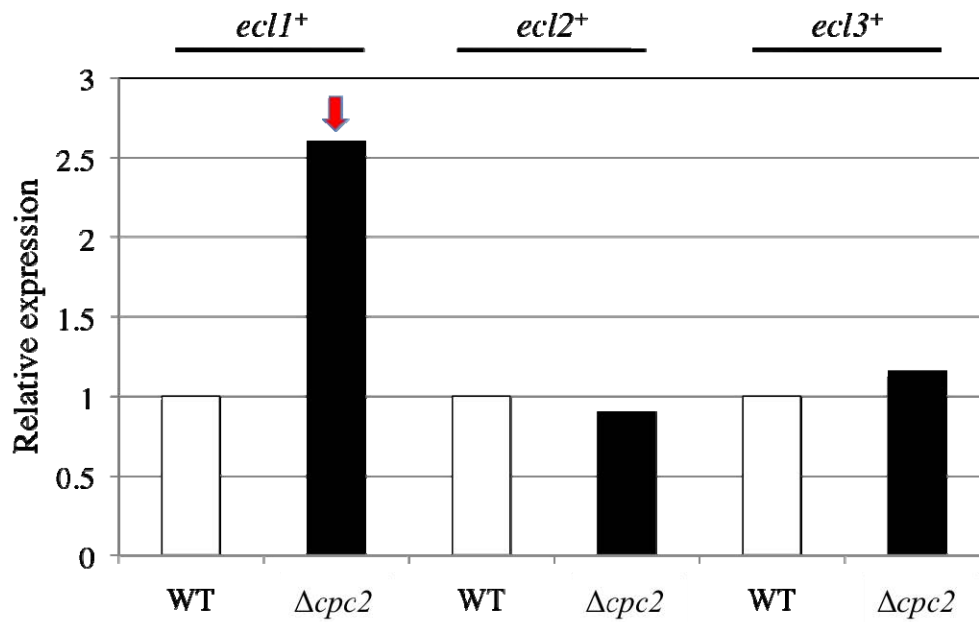


図3-15 *ecl1*⁺のみが*cpc2*欠損時に発現が上昇する

*cpc2*欠損によるEclファミリーのmRNA量の変化を表したグラフである。Ecl1と相同性を持つEcl2, Ecl3についても*cpc2*欠損による影響をうけるかどうかを調べた。その結果、*ecl1*⁺のみ発現が上昇し(グラフ中の↓)、*ecl2*⁺, *ecl3*⁺に関しては変動しなかった。

考察

Ecl1-DBD を保持する株が選択培地で生育したことについて

Two-hybrid のシステムから考察すると、本来 bait 側のプラスミドに Gal4 の DNA binding domain (DBD) が存在し、prey 側のプラスミドに Gal4 の activation domain (AD) が存在する。双方のプラスミド上にある因子同士が相互作用したときに DBD と AD が合わさって働き、Gal4 依存的に転写活性化を受けるレポーター遺伝子 (*ADE2*, *HIS3*) が転写され、酵母が選択培地で生育できるというものである。しかし、Ecl1-DBD を保持した株が選択培地で生育できたということは、あたかも Ecl1 が Gal4 の AD と同様の働きを示したと考えられる。

Ecl1 を二分割した後、Ecl1-NT-DBD 保持株は依然として Ecl1-DBD 保持株と同様に選択培地で生育でき、Ecl1-CT-DBD 保持株は生育できなかったことを考えると、Ecl1 の AD としての働きは N 末側にあると考えられる。本論文の 1 章で、Ecl1 は分裂酵母、出芽酵母の双方で働くことが示され、尚かつ N 末側にある酵母間共通の 4 つのシステインが Ecl1 の活性に重要であることが示されており、Ecl1-NT はこの 4 つのシステイン全てを保持する。また、出芽酵母の Ecl1 と相互作用する因子の 1 つとして Gal80 があり (Yu H *et al.* 2003)、Gal80 は *GAL* 遺伝子の発現制御因子で、Gal4 の活性を負に制御する (Bhat PJ and Murthy TV 2001)。以上のことをまとめて考察すると、分裂酵母の Ecl1 と出芽酵母の Ecl1 は *GAL* 遺伝子の発現制御に関与し、Gal4 と同様の転写活性を持つ Ecl1 は Gal4

の DNA binding domain と結合することで、レポーター遺伝子を転写したと考えられる。そしてこれらの結果は、Ecl1 が転写因子として働く可能性を示唆するものである。

Ecl1-CT と相互作用する因子に関する考察

Ecl1-CT を用いた相互作用因子の探索の結果、8 つの因子を取得し、表現型解析を行った。図 3-6 の経時寿命測定の結果から各々の因子について考察する。まず Rga7 について、*rga7* 欠損株が経時寿命の延長を示し、欠損株に Ecl1 を高発現させてもそれ以上の延長を示さなかった。このことから Rga7 は Ecl1 と結合することによって Ecl1 を負に制御していると考えられる。しかし、Rga7 や下流の Pmk1 が殆ど解析されていない因子という点から、Rga7 の視点からの解析を進めなかった。次に Tdh1 について、*tdh1* 欠損株の表現型は大きく変動していたが、これは *tdh1* 欠損株の生育異常に起因すると考えており、生育が異常な株は対数増殖期から多く死滅し始めるため、定常期以降では、死細胞の栄養を基に生育する能力を獲得した菌が再増殖する（適応再増殖）ことで起こる。再現性をとったところ、野生株と変化なしという結果を得た (data not shown)。また、適応再増殖後のグラフの傾きからも野生株と差が見られなかったため、Tdh1 の視点からの解析は進めなかった。*apt1* 欠損株、*dlc1* 欠損株、*eft201* 欠損株に関しては野生株と差が見られなかったため、これらの因子からの解析も一旦中断した。*cpc2* 欠損株では、経時寿命の他に、野生株の Ecl1 高発現で見られた *ste11*⁺ の発現上昇や胞子形成の促進が全く見られなくなるという興味深い現象を見出して

いるが (data not shown)、「栄養と Cpc2」という他の論点が生じて混乱を招くため、本博士論文の構成からは省いた。私は以上の考察により、Cpc2 の視点から Ecl1 の解析を進めた。

Cpc2 と Ecl1 について

図 3-8 より、Ecl1 の局在に *cpc2* の欠損は殆ど影響を与えなかったが、図 3-9 ~ 3-11 で示したように染色体上及びプラスミド上の Ecl1 のタンパク質の量が減少するという著しい表現型を示した。一方で、mRNA の量はタンパク質の量に比例しておらず、染色体上の Ecl1 に至っては、野生株よりも *cpc2* 欠損株の方が常時 *ecl1*⁺ の mRNA 量が 2 ~ 3 倍高いことが見受けられた (図 3-13)。

プラスミド上と染色体上で、*cpc2* 欠損時に見られる *ecl1*⁺ の発現量の異なることについて、図 3-14 の結果より、*cpc2* 欠損時に見られた *ecl1*⁺ mRNA の上昇は、*ecl1*⁺ の上流・下流配列の構成の違いが原因ではないかと考えられる。これは、本博士論文とは別の *ecl1*⁺ の発現制御に関する研究で、*ecl1*⁺ の上流 573bp (プラスミドが保持する *ecl1*⁺ 上流配列の長さ) よりもさらに上流及び *ecl1*⁺ の下流 (プラスミドには含まれない) に、転写因子 Atf1 の結合配列が見つかり、特定の条件における *ecl1*⁺ の発現上昇に必要であるという結果 (data not shown) を得たことに基づく考察である。つまり、少なくともプラスミド高発現系には含まれていない *ecl1*⁺ の上流と下流配列には *ecl1*⁺ の発現制御に関する他の配列が存在する。そのことを踏まえ、*cpc2* 欠損しても *ecl1-gfp*⁺ の発現に変化がなかったのは、これらの配列を含んでいないからであり、そして *cpc2* 欠損における *ecl1-HA*⁺ の発

現が *ecl1*⁺ の発現よりも低いのは、Ecl1-HA では、*ecl1*⁺ 下流に HA-kan^R 配列が付加されており、下流にある発現制御配列が距離的に *ecl1*⁺ から離れたからではないかと考えられる。

図 3-15 に示した *cpc2* 欠損による、Ecl1 と相同性をもつ Ecl2、Ecl3 をコードする *ecl2*⁺、*ecl3*⁺ の mRNA の発現に変化が見られなかった結果に関して、本論文には掲載していないが、Ecl1 と相互作用を示した 8 つの因子すべてについて、Ecl2 及び Ecl3 との相互作用を調べたが、いずれもネガティブであった。2 章の考察や本章の冒頭で述べた Ecl ファミリー間の違いを踏まえ、Ecl1 の翻訳に Cpc2 が特異的に関与し、そのため *cpc2* 欠損による発現変化も *ecl1*⁺ でのみ見られたと考えられる。

私は以上のことを踏まえ、Cpc2 は Ecl1 の翻訳に重要であり、*cpc2* 欠損で見られる染色体上の *ecl1*⁺ mRNA の上昇は、可能性の 1 つとして、*cpc2* 欠損による Ecl1 を含む Ste11 のタンパク質量減少が起き、性分化の開始やストレス応答を制御する Atf1 により *ecl1*⁺ の発現が促進されたのからではないかと考えている。そして、勿論この現象は *ecl1*⁺ の上流、下流配列に存在する *ecl1*⁺ の発現に携わる Atf1 の結合配列が必要であると考察した。そして、Ecl1 と Cpc2 の相互作用は、Ecl1 自身や Ste11 等の翻訳促進に寄与する為ではないかと考えられる。

実験材料と手法

菌株と培地

以下の菌株を用いた。

菌株名	遺伝子型
AH109 (出芽酵母)	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-20 Gal4Δ gal80Δ</i> <i>LYS2:: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,</i> <i>ura3:: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>
JY333 (分裂酵母)	<i>h⁻ leu1 ade6-M216</i>

以下の培地を用いた。

SD 培地

(0.67% yeast nitrogen base without amino acids and 2% glucose)

Adenine (hemisulfate salt)	40 mg/l
L-histidine	20 mg/l
L-leucine	60 mg/l
L-tryptophan	40 mg/l
100×DropOut (-Leu,-Trp,-His,-Ade) 溶液	10 ml/l

Agar	20 g/l
------	--------

100×DropOut(-Leu,-Trp,-His,-Ade)溶液

組成	溶液中濃度	培地中の最終濃度
L-arginine	2 g/l	20 mg/l
L-aspartic acid	10 g/l	100 mg/l
L-glutamic acid	10 g/l	100 mg/l
L-lysine	3 g/l	30 mg/l
L-methionine	2 g/l	20 mg/l
L-phenylalanine	5 g/l	50 mg/l
L-serine	37.5 g/l	375 mg/l
L-threonine	20 g/l	200 mg/l
L-tyrosine	3 g/l	30 mg/l
L-valine	15 g/l	150 mg/l
Uracil	2 g/l	20 mg/l

YPD 培地

(1 % yeast extract, 2 % polypeptone, 2 % glucose)

必要に応じて Agar (20 g/l) を加えた。

YES 培地

(0.5 % yeast extract, 3 % glucose)

必要に応じて以下のものを加えた。

Adenine (hemisulfate salt)	40 mg/l
G418	100 µg/ml
Agar	20 g/l

EMM-〈合成最小培地〉-

(0.3 % Potassium Hydrogen Phthalate, 0.22 % Na₂HPO₄, 2 % glucose,

0.5 % NH₄Cl₂, 21.32 mg/l MgCl₂ · 6H₂O, 0.294 mg/l CaCl₂ · 2H₂O, 20 mg/l KCl,

0.8 mg/l Na₂SO₄, 1.0 mg/l Pantothenic acid, 10 mg/l Nicotinic acid,

10 µg/l myo-inositol, 10 mg/l Biotin, 5.0 mg/l Boric acid, 4.0 mg/l MnSO₄,

4.0 mg/l ZnSO · 7H₂O, 2.0 mg/l FeCl₂nH₂O, 1.6 mg/l Molybdcic acid, 1.0 mg/l KI,

0.4 mg/l CuSO₄ · 5H₂O)

必要に応じて adenine 40 mg/l を加えた。

LB 培地 (大腸菌用培地)

(0.5 % yeast extract, 1 % tryptone, 0.5 % NaCl)

必要に応じて以下のものを加えた。

1N NaOH	1 ml/l
Ampicillin	50 mg/ml
Kanamycin	30 mg/ml

Agar	20 g/l
------	--------

プラスミド

以下のプラスミドを用いた。

プラスミド名	マーカー
pLB-Dblet	<i>LEU2</i> マーカー、分裂酵母における高発現用
pGBKT7	Bait プラスミド、 <i>TRP1</i> マーカー、 <i>Kan^R</i>
pGAD424	Prey プラスミド、 <i>LEU2</i> マーカー、 <i>Amp^R</i>
pGBKT7/p53	<i>p53 gene on pGBKT7 used as two-hybrid positive control</i>
pGADT7/largeT	<i>largeT gene on pGADT7 used as two-hybrid positive control</i>

プライマー

主に以下のプライマーを用いた。

プライマー名	配列
EcoRI-Mws8-1	ACTGAATTCATGGATTTGGATTTTTGCACAGTG
Mws8-1-SalI	TTCTAAGTCGACTACGCATGTAGTTTTGTGTAAGC
Hokuto1-N-SalI	GAGCGTCGACTTCTGAGACGAGAAATTGATATTCGG
Hokuto1-C-EcoRI	ATGAATTCAAGTTGGACACTCAAACCAC
Cpc2-F1	GCTAAGGACCCCATGTAAAG
Cpc2-F2	TTAATTAACCCGGGGATCCGGAGCACAAGTTGTTCTGGCA
Cpc2-R1	ACAAC TATTCAGCCACCCCA

Cpc2-R2	GTTTAAACGAGCTCGAATTCTCGTGTCTGGCAAGTTACCA
Cpc2-up	AGCCCTGACAGGAAAACTG
Cpc2-down	GTTATCTAGAACCCAGAGCC
GFP-F-inside18	CTTTTCACTGGAGTTGTCCC
GFP-R-inside180	AAGTGTTGGCCATGGAACAG
Cdc2-F-inside288	CCGAATTCAGAACTGGGG
Cdc2-R-inside500	GTATAGTTCCGCAAAGGGAC

その他の欠損株作成に用いたプライマー

apt1-F1 : GTATTCGAACAAACCCACTGC

apt1-F2 : TTAATTAACCCGGGGATCCGGGTAATTTGATTCTATCGTCGGAC

apt1-R1 : GCATGTGTATAGACTTGCGG

apt1-R2 : GTTTAAACGAGCTCGAATTCTGAAGCACCTGATGGTAGTG

apt1-up : AAAAGGGAACGGAGAGAAGG

apt1-down : CCTTCGTA CTTCCAAGGAAC

dlc1-F1 : TCGGCCCGTCTTCAAAGAAA

dlc1-F2 : TTAATTAACCCGGGGATCCGGTATTTGACGACTTACACAGCTC

dlc1-R1 : GCATCTCCTTCAGCCACAAA

dlc1-R2 : GTTTAAACGAGCTCGAATTCAAGAGAGCGGTGAGGCTATT

dlc1-up : CGCTTCCCTTCATGCTGAA

dlc1-down : TGGTTCAGGGAATTAGCGTC

eft201-F1 : GGGTACCTTAGAAGAAGCCT

eft201-F2 : TTAATTAACCCGGGGATCCGTCAGGAGTGAACGCAACCAT
eft201-R1 : ATCACTGCTTGGTTCGTGAC
eft201-R2 : GTTTAAACGAGCTCGAATTCAAGCTCGTAAGCGTAAGGGT
eft201-up : TGCCTGACAGGTTTCTTTTCG
eft201-down : TCAGCCTGCGAAGACATTGT
rga7-F1 : ATACCCTTCTTCCCCTTACC
rga7-F2 : TTAATTAACCCGGGGATCCGATTTGGAGGCGATGTTGGTG
rga7-R1 : GACTCTGGATGATTGAAGCG
rga7-R2 : GTTTAAACGAGCTCGAATTCGCCATTATTTGGGGACCTAC
rga7-up : TCCCCACTTAGAAAGGGTA
rga7-down : GGTTTGCTGAAGCTGATCGT
rpl1201-F1 : GGTTTGGCTTACCTTCATCG
rpl1201-F2 : TTAATTAACCCGGGGATCCGTGGGATCGAATTTAGGAGGC
rpl1201-R1 : CCACTTCCATTCAGTCCTCT
rpl1201-R2 : GTTTAAACGAGCTCGAATTCGCGAAATTGAGATCCCCCAA
rpl1201-up : ATTGGCTACCGTTCCCACAT
rpl1201-down : AGACCTCGGTCCTTTTCCTT
tdh1-F1 : GCTTCCTGCAGGTAACAATG
tdh1-F2 : TTAATTAACCCGGGGATCCGACGTCCAATACGACCGAAAC
tdh1-R1 : CTTAAGCTAGCGAAATGGGG
tdh1-R2 : GTTTAAACGAGCTCGAATTCCACTCCTCCATCTTCGATGC

tdh1-up : ATCACCTCCTCACCTACCAT

tdh1-down : TGAGCTAGTAGCGTACACAA

ikan-3out : CTGCCCAGATGCGAAGTTAA

ikan-5out : GGGATGTATGGGCTAAATGT

Ecl1、Ecl1-NT、Ecl1-CT を用いた two-hybrid スクリーニングの構築

以下のプライマーを用いてインサート領域を増幅させ、*EcoRI* 及び *SalI* 処理後に bait プラスミドに組み込んだ。

pGBKT7/Ecl1

EcoRI-Mws8-1 と Mws8-1-*SalI*

pGBKT7/Ecl1-NT

EcoRI-Mws8-1 と Ecl1-N-*SalI*

pGBKT7/Ecl1-CT

Ecl1-C-*EcoRI* と Mws8-1-*SalI*

尚、ポジティブコントロールとして、pGBKT7/p53 と pGADT7/largeT の双方を保持した株を作成した。

prey プラスミド

Schizosaccharomyces pombe MATCHMAKER cDNA Library (CLONTECH 社)

クローニングサイト : *EcoRI*-*XhoI*

インサートの長さ : 1.2kb~2.4kb

Two-hybrid スクリーニング

Two-hybrid のスクリーニングでは、以下のステップを踏まえ相互作用因子を取得した。

- ①2種類のプラスミドを保持しているかどうかの判断のため、形質転換直後の菌を選択培地 (-Leu, -Trp) に塗り、30 時間 孵卵器で培養。
- ②プレマスタープレートの作製
- ③マスタープレート上の菌を 30 時間 孵卵器で1昼夜~2昼夜培養し、生育した株を最終選択培地 (-Leu, -Trp, -His, -Ade) にストリーク。
- ④最終選択培地で培養し、生育してくるかどうかを観察。(第一選抜)
- ⑤最終選択培地で生育してきた菌に関しては、再びマスタープレートを作製し、これらの株に含まれている prey 側のプラスミドの回収を行った。
- ⑥上記で回収したプラスミドを pGBKT7/Ecl1 保持株に形質転換し、最終選択培地で生育してくることを確認。(第二選抜)
- ⑦第一と第二選抜をクリアした株に関して、 β -ガラクトシダーゼ活性の測定を行い、活性を示したものを相互作用因子とした。(第三選抜)
- ⑧取得した相互作用因子の領域に関してはシーケンスを読むことによって特定した。

β -ガラクトシダーゼ活性測定

以下の操作により活性測定を行った。

①酵母を 5 ml の選択培地に植菌し、110rpm, 30 シェイカーで 1 昼夜培養 (前培養)。

②前培養から 1 ml を 5 ml の新しい選択培地に植菌し、3~5 時間培養 (OD₆₀₀ が 0.5~1.0 になる)

以下 3 連で実験を行った。

③培養液 1.5 ml を 14000 rpm, 30 sec で遠心し、エッペンに集菌。

④上清を除き、沈殿を 1.5 ml の Z-Buffer に懸濁。

⑤14000 rpm, 30 sec で遠心し、沈殿を 300 μ l の Z-Buffer に再懸濁。

⑥調整液 300 μ l のうち、100 μ l を 0.9 ml の H₂O に加え、OD₆₀₀ 測定 (菌体数とした)

測定用に 100 μ l を 0.7 ml の Z-Buffer/ β -Met の入ったガラスチューブに加えた。

ブランク (2 本) は調整液の代わりに 100 μ l の Z-Buffer を用いた。

⑦0.1 % SDS を 20 μ l、クロロホルムを 30 μ l 加え、よく攪拌。

⑧15 min, 30 で保温。

⑨0.16 ml の ONPG sol を加えた。(反応開始)

⑩30 で保温。(反応液が黄色を発色するまで ただし、negative control が発色した場合は×)

⑪0.4 ml の 1 M Na₂CO₃ を加え、反応停止させた。

⑫エッペンに反応液を移し、14000 rpm, 10 min 遠心。

⑬上清を 420 nm の吸光度測定を行い、それにより活性を求めた。

相互作用因子の欠損株の作成

欠損株は「用いたプライマー」の「その他の欠損株作成に用いたプライマー」に示したプライマーを用いた。尚、各々の因子で用いたプライマーはプライマーの頭に付くものと一致する。

生存率測定

生育を揃えるため、菌株を 30 の条件で 1 昼夜振とう培養した後、一部を新鮮な培地へ植菌し、30 で振とう培養。1 昼夜培養後毎日サンプリングを行い、細胞の生死は CFU 法によって測定した。

Ecl1 の mRNA、タンパク質、局在観察について

ecl1⁺ の mRNA 量の測定

リアルタイム PCR (Illumina) を用いて測定を行った。尚、プロトコルは付属のものに基づいた。

以下のプライマーを用いて、染色体上の *ecl1*⁺ mRNA 量を測定した。

EcoRI-Mws8-1 と Mws8-1-Sal1

プラスミド上の *ecl1-gfp*⁺ mRNA 量測定は、染色体上由来のものと区別する為、*gfp*⁺ 領域のプライマーを用いて行った。

GFP-F-inside18 と GFP-R-inside180

定量コントロールとして *cdc2*⁺ を用いた。

Cdc2-F-inside288 と Cdc2-R-inside500

Ecl1 タンパク質量の測定及び局在観察

染色体上の Ecl1 タンパク質は HA、プラスミド上の Ecl1 は GFP 抗体を用いてそれぞれウエスタンブロッティングで検出した。局在に関しては、染色体上の Ecl1-GFP では十分に検出できなかったため、プラスミドで高発現した Ecl1-GFP を観察した。

タンパク質半減期の測定

以下の操作で行った。

- ①液体培地に植菌し、30 1 昼夜振とう培養 $OD_{600} \approx 1.0 \sim 1.5$ になったらシクロヘキシミドを添加。(終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$)
- ②添加後 0, 15, 30, 45, 60 分の時点で集菌し、(TE buffer 600 μl で wash $\times 2$ 回)
以降はウエスタンブロッティングと同様の操作でタンパク質を検出した。

参考文献

- Azuma K, Ohtsuka H, Mita S, Murakami H, Aiba H. (2009) Identification and characterization of an Ecl1-family gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2787-9
- Bhat PJ, Murthy TV. (2001) Transcriptional control of the GAL/MEL regulon of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of galactose-mediated signal transduction. *Mol. Microbiol.* **40**, 1059-66
- Jeong HT, Oowatari Y, Abe M, Tanaka K, Matsuda H, Kawamukai M. (2004) Interaction between a negative regulator (Msa2/Nrd1) and a positive regulator (Cpc2) of sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1621-26
- Matsuyama A, Arai R, Yashiroda Y, Shirai A, Kamata A, Sekido S, Kobayashi Y, Hashimoto A, Hamamoto M, Hiraoka Y, Horinouchi S, Yoshida M. (2006) ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.*, **24**, 841-7

McLeod M, Shor B, Caporaso A, Wang W, Chen H, Hu L. (2000) Cpc2, a fission yeast homologue of mammalian RACK1 protein, interacts with Ran1 (Pat1) kinase To regulate cell cycle progression and meiotic development. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 2117-30

Miki F, Okazaki K, Shimanuki M, Yamamoto A, Hiraoka Y, Niwa O (2002) The 14-kDa dynein light chain-family protein Dlc1 is required for regular oscillatory nuclear movement and efficient recombination during meiotic prophase in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 930-46

Mita K, Morimyo M, Ito K, Sugaya K, Ebihara K, Hongo E, Higashi T, Hirayama Y, Nakamura Y. (1997) Comprehensive cloning of *Schizosaccharomyces pombe* genes encoding translation elongation factors. *Gene.*, **187**, 259-66

Moreno S, Klar A, Nurse P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.*, **194**, 795-823

Morigasaki S, Shimada K, Ikner A, Yanagida M, Shiozaki K. (2008) Glycolytic enzyme GAPDH promotes peroxide stress signaling through multistep phosphorelay to a MAPK cascade. *Mol. Cell*, **30**, 108-13

Morigasaki S, Shiozaki K (2010) Two-component signaling to the stress MAP kinase cascade in fission yeast. *Methods Enzymol.*, **471**, 279-89

Ohtsuka H, Mita S, Ogawa Y, Azuma K, Ito H, Aiba H. (2008) A novel gene, *ec11(+)*, extends the chronological lifespan in fission yeast. *FEMS Yeast Res.*, **8**, 520-530

Ohtsuka H, Azuma K, Kubota S, Murakami H, Aiba H. (2012) Chronological lifespan extension by Ecl1 family proteins depends on Prr1 response regulator in fission yeast. *Genes to Cells*, **17**, 39-52

Paul SK, Goldar MM, Yakura M, Oowatari Y, Kawamukai M. (2009) Glutamyl tRNA synthetases and glutamic acid induce sexual differentiation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1339-47

Sato T, Villar-Tajadura MA, Madrid M, Vicente J, Gacto M, Pérez P, Cansado J. (2010) Rga4 modulates the activity of the fission yeast cell integrity MAPK pathway by acting as a Rho2 GTPase-activating protein. *J. Biol. Chem.*, **285**, 11516-25

Shor B, Calaycay J, Rushbrook J, McLeod M. (2003) Cpc2/RACK1 is a ribosome-associated protein that promotes efficient translation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.*, **49**, 49119-28

Won M, Park SK, Hoe KL, Yang YJ, Chung KS, Kim HB, Yoo HS. (2001) Rkp1/Cpc2, a fission yeast RACK1 homolog, is involved in actin cytoskeleton organization through protein kinase C, Pck2, signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 10-15

Yu H, Braun P, Yildirim MA, Lemmens I, Venkatesan K, Sahalie J, Hirozane-Kishikawa T, Gebreab F, Li N, Simonis N, Hao T, Rual JF, Dricot A, Vazquez A, Murray RR, Simon C, Tardivo L, Tam S, Svrikapa N, Fan C, de Smet AS, Motyl A, Hudson ME, Park J, Xin X, Cusick ME, Moore T, Boone C, Snyder M, Roth FP, Barabási AL, Tavernier J, Hill DE, Vidal M. (2008) High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science*, **322**, 104-10

総合討論

本研究で、私は出芽酵母及び分裂酵母の Ecl1 の機能、制御について解析を行った。

1 章における解析を通して私は、出芽酵母における分裂酵母 Ecl1 の機能的ホモログを特定した。タンパク質構造解析まで行うことは出来なかったが、遺伝的な手法により、酵母間の Ecl1 に保存された 4 つのシステインが、Ecl1 の機能・活性に重要であることを見出した。

2 章における解析を通して私は、多くの生物種で保存された食餌制限やカロリー制限による寿命延長経路と Ecl1 の寿命延長経路が重複していることを発見した。また、代謝変化とストレス応答のそれぞれの観点から、Ecl1 は代謝の変化とストレス応答の双方を制御することによって寿命延長に寄与している結果を得た。またこの現象は、線虫等で報告されている食餌制限時の寿命延長現象と同様の状況を作り出していることが分かった。線虫等の多細胞生物における Ecl1 ホモログは見つかっていないものの、以上の結果は、多細胞生物にも Ecl1 と同様の働きをする因子が存在することを示唆するものと考えている。

3 章における解析で私は、Ecl1 と相互作用する因子の取得・解析により Ecl1 の機能やタンパク質レベルでの制御の解明を試みた。その結果、Cpc2 が Ecl1 タンパク質の翻訳に重要であることを発見した。これまで当研究室では *ecl1*⁺ の発現制御に関する解析を行ってきたが、今回の結果は、発現以降の制御メカニズ

ム解明に役立つものと考えている。また、思いがけぬことに two-hybrid スクリーニングを通して、Ecl1 が転写活性能を示した結果を得ることができ、1 章の解析と総合して考察すると、Ecl1 は転写因子として働く可能性も考えられる。

以上のことから、私は異なった視点から Ecl1 の機能・制御の解析を進め、得られた結果は今後の Ecl1 の機能解析、及び細胞老化のメカニズム解明に貢献するものと考えている。

謝辞

本論文における研究は、先輩に当たる大塚のテーマを基軸に新たなテーマの設定にはじまり、研究方針、データ考察、効果的なプレゼンテーション技術を的確な指導方針のもと辛抱強くご教授くださいました分子微生物学研究室、饗場浩文教授、および大塚北斗助教に深く感謝の意を表します。実験のみでなく、一流のサイエンティストとしての心構えをお教えたことは、今後の物事の考え方にも多分な糧になると考えます。また、欠損株作り等で色々と協力していただいた古賀さん、内藤さんに感謝の意を表します。そして、知識方面や論文作成に関するアドバイス等を与えてくださった応用微生物学研究室、小林哲夫教授に感謝の意を表します。

さらに、研究室生活における苦楽をともにし、切磋琢磨しながら共に歩んできた多くの諸先輩方そして同期や後輩の仲間たちの存在は、私にとって大変な力となりました。また学会等で意見や議論を交わし、研究の視野を広げてくださった多くの他大、他研究室の先生がたにも感謝の意を表したいと思います。

そしてなにより、両親に対しては言葉にできないほどの感謝の気持ちです。その気持ちはこれからも変わりません。これら多くの人に支えられたことを胸に刻み、今後も研究に励み、生命現象の解明及び社会への貢献に寄与していきたい。

2013年2月

報文目録

Azuma K, Ohtsuka H, Mita S, Murakami H, Aiba H. (2009) Identification and Characterization of an Ecl1-Family Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 2787-9

Azuma K, Ohtsuka H, Murakami H, Aiba H. (2012) Extension of Chronological Lifespan by ScEcl1 Depends on Mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1938-42

Azuma K, Ohtsuka H, Murakami H, Aiba H. Cpc2 affects the amount of Ecl1 protein in fission yeast. (in preparation)

参考文献

Ohtsuka H, Mita A, Ogawa Y, Azuma K, Ito H, Aiba H. (2008) A novel gene, *ecl1*⁺, extends the chronological lifespan in fission yeast. *FEMS Yeast Res.* **8**, 520-30

Ohtsuka H, Azuma K, Murakami H, Aiba H. (2011) *hsf1*⁺ extends chronological lifespan through Ecl1 family gene in fission yeast. *Mol. Genet. Genomics*, **285**, 67-77

Ohtsuka H, Azuma K, Kubota S, Murakami H, Giga-Hama Y, Tohda H, Aiba H. (2012)
Chronological lifespan extension by Ecl1 family proteins depends on Prr1 response
regulator in fission yeast. *Genes Cells*, 17, 39-52

Takuma K, Ohtsuka H, Azuma K, Murakami H, Aiba H. The fission yeast *php2* mutant
displays an elongated chronological lifespan. (*Genes to Cells*, submitted)