

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主 論 文 の 要 旨

論文題目 寿命制御機構の解明に向けた分裂酵母長寿命変異株の
網羅的探索と解析

氏 名 松井滉太郎

論 文 内 容 の 要 旨

【研究背景】

「ヒトの寿命はどのようにして制御されるのか」を理解することは、現代生物学がチャレンジすべき課題の一つである。そのためには、寿命制御の基本的機構を理解する必要がある、これまで酵母、線虫、ショウジョウバエ、マウスのような真核モデル生物を用いた寿命研究が展開されてきた。寿命は遺伝学的要因のみならず環境要因等の多様な影響を受け、複雑な制御下にあることが予想されるが、その全体像は明らかとなっていない。今後、ヒトを始めとした高等生物の寿命を理解するには、その前提として細胞レベルでの寿命の理解が必要であると考え、本研究では、遺伝学操作が容易であり、細胞レベルでの寿命研究のモデルとして優れた分裂酵母を対象に、寿命研究を進めることを計画した。具体的には、非分裂細胞の生存率と定義される「経時寿命」に焦点を当てて、経時寿命が延長する変異株の取得と解析を実施した。

寿命に関連する因子の発見は、寿命制御メカニズムの解明に手掛かりを与える。その着想の下、これまで当研究室をはじめ、いくつかの研究室で寿命関連因子の同定を目指した研究が進められた。しかし、それらのスクリーニングは単発的であり、また非必須遺伝子の欠失変異株のセットを用いているため、必須遺伝子の変異を解析できないということから、網羅性の観点で十分と言えるものではなかった。複雑化された寿命現象をより理解するためには、必須遺伝子を含めたさらに多くの寿命関連因子を網羅的に同定し、当該因子の機能を解析することが必要であると考えた。そこで本研究では、経時寿命が延長する変異株を大規模にスクリーニングし、長寿命の原因遺伝子の同定と解析を通して、寿命の理解を深化させることにした。

【本論文の内容】

本論文では以下の二つの研究内容と成果を報告する。

① 経時寿命が延長する分裂酵母の長寿命変異株の大規模スクリーニング

経時寿命が延長する長寿命変異株をスクリーニングするための実験系を構築し、それに従いスクリーニングを実施した。取得した変異株について、長寿命の原因遺伝子を特定するに至るまでの成果をまとめた。以下に具体的な成果を示す。

分裂酵母の野生株から得た独立の 100 コロニーをそれぞれ回分培養し、野生株が殆ど死滅するまで培養を続けた。その培養液を用いて継代培養を繰り返すことで、自然突然変異により長寿命となった分裂酵母変異株を濃縮した。このようにして得た独立の培養液から長寿命変異株 (F₀) を取得した。取得した各長寿命変異株について、戻し交配を行い、長寿命の表現型を示す F₁ を複数株得た。その後、F₀ 株と F₁ 株 (2-3 株) について全ゲノムシーケンス解析することで、共通して生じたゲノム変異を特定した。これらの解析から、約 65 株の変異株について解析を完了した。その結果と四分子解析による遺伝学的解析結果を総合することで、複数の寿命関連遺伝子変異を同定した。これまで、本研究で同定した変異は、*ksg1*⁺, *bgs1*⁺, *rho1*⁺, *rgf1*⁺, *gaf1*⁺, *scw1*⁺, *tpp1*⁺, *cmr2*⁺, *rer2*⁺, *aly2*⁺, *plb1*⁺, *bst1*⁺ の遺伝子に生じていた。また、*scw1*⁺, *tpp1*⁺, *bst1*⁺ 遺伝子については、同一の遺伝子内の異なる箇所に変異が生じた変異株が独立に取得された。よって、スクリーニングはある程度飽和していると考えられた。以上の結果より、様々な因子を新規の寿命関連因子として同定することに成功した。さらに、過去の知見を踏まえて、これら寿命関連因子群の関係についてまとめ上げた。

上記成果を基に、同定した変異の中から、高等生物にまで保存性があること、かつ分裂酵母の生育に必須であることを指標として、Ksg1 (リン酸化酵素) を研究対象とし、さらなる解析を進めた。

② Ksg1 による寿命制御機構の解析

「長寿命変異株の大規模スクリーニング」の結果から、*ksg1*⁺ 遺伝子内にナンセンス変異が生じることで経時寿命の延長を引き起こすことが分かった。これまでに Ksg1 が細胞寿命制御に関わるという知見はなく、本研究で初めて明らかにすることができた。そこで、*ksg1* 変異により寿命延長する機構を解明するため、多角的な解析を行った。

分裂酵母 Ksg1 は哺乳類 PDK1 (Phosphoinositide-dependent protein kinase) のオルソログである。取得した *ksg1* 長寿変異は膜局在に必要とされる PH (Pleckstrin homology) domain 内にあり、変異により PH domain の合成が損なわれることが考えられた。実際に、変異型 Ksg1 は細胞膜局在が損なわれていた。同時にタンパク質の安定性も低下した。従って、Ksg1 タンパク量や活性の低下、あるいは細胞膜局在の喪失が経時寿命の延長の原因であることが想定された。そこで、膜局在が損なわれ、安定性も低下した変異型 Ksg1 を高発現させたところ、*ksg1* 変異が示す長寿命の表現型を相補した。さらに、温度感受性 *ksg1* 変異株もその変異型 Ksg1 を高発現させるこ

とで、その温度感受性の表現型を相補できた。よって、Ksg1 のタンパク量の減少が、寿命延長の主たる原因であると示唆することができた。

Ksg1 は複数の基質をリン酸化することが知られているが、*ksg1* 変異による長寿命化に関係のある基質については明らかにされていない。そこで、*ksg1* 変異と各種リン酸化基質遺伝子との遺伝学的解析を行った。その結果、*pck2⁺* 遺伝子の欠損が *ksg1* 変異による寿命延長を抑制したのに対し、それ以外の *pck1⁺*, *gad8⁺*, *psk1⁺*, *pka1⁺* の欠損は *ksg1* 変異による寿命延長を抑制しなかった。この結果から、Pck2 が *ksg1* 変異による寿命延長に関与することが強く示唆された。さらに、*ksg1* 変異による寿命延長と、カロリー制限や TOR (Target of rapamycin) 経路にも着目して解析を進め、寿命制御における Ksg1 の役割について考察した。

以上、本研究では分裂酵母を用いて経時寿命が延長する変異株の大規模スクリーニングを実施し、新規因子を含む多くの寿命関連因子の同定に成功した。加えて、その一部については機能の解析も進めた。これらの成果は、細胞寿命の制御機構の全体像を解明するための基盤を提供するものであり、当該分野の進展に大きく貢献するものと考えられる。