

論文審査の結果の要旨および担当者

| | |
|------|--------|
| 報告番号 | ※甲 第 号 |
|------|--------|

氏 名 松井 滉太郎

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

論文審査担当者

| | | |
|-----|----------|-------|
| 主 査 | 名古屋大学教授 | 饗場 浩文 |
| 委 員 | 名古屋大学教授 | 廣明 秀一 |
| 委 員 | 名古屋大学教授 | 大嶋 篤典 |
| 委 員 | 名古屋大学准教授 | 井原 邦夫 |
| 委 員 | 名古屋大学助教 | 島崎 嵩史 |

論文審査の結果の要旨

松井滉太郎は細胞の寿命制御メカニズムを理解することを目的に、分裂酵母を研究対象にしてその経時寿命が野生株と比較して延長する変異株を大規模にスクリーニングし、原因変異の同定と当該遺伝子機能の解明を試みた。一連の研究成果をとりまとめ、以下に示す内容の博士学位論文を作成・提出した。

必須遺伝子や優性変異をも網羅できる長寿命変異株のスクリーニング系を確立し、大規模スクリーニングを実施した

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、大規模にスクリーニングを実施した。取得した変異株候補について、長寿命の原因遺伝子を特定するに至るまでの成果を博士論文としてまとめた。具体的な成果は以下の通りである。

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、67株の変異株について解析を完了した。ゲノムシーケンス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。本研究で同定した変異遺伝子は、*ksg1*⁺, *bgs1*⁺, *rho1*⁺, *rgf1*⁺, *gaf1*⁺, *scw1*⁺, *tpp1*⁺, *cmr2*⁺, *rer2*⁺, *aly2*⁺, *plb1*⁺, *bst1*⁺である。この内、*scw1*⁺, *tpp1*⁺, *bst1*⁺遺伝子については、複数の異なる変異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た。

Ksg1による寿命制御機構の解析を行った

「長寿命変異株の大規模スクリーニング」の成果を基に、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、かつ必須遺伝子(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、解析を進めた。まず、*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が引き起こされることを明らかにした。過去に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*変異により寿命が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

ソログであり、取得した *ksg1* 長寿変異は膜局在に必要とされる PH (Pleckstrin homology) domain 内にあった。当該変異により正常な PH domain が損なわれることが想定された。実際に解析したところ、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、取得した *ksg1* 変異株が示す長寿命の表現型を相補した。さらに、変異型 Ksg1 を高発現させることで、異なる *ksg1* 変異株が示す温度感受性も相補できた。よって、取得した *ksg1* 長寿変異によって Ksg1 のタンパク量が減少し細胞内の Ksg1 活性が低下したことが、寿命延長の主たる原因であると示唆できた。

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、松井滉太郎は、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、その一部について機能の解析を深化させた。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。これらを踏まえ審査委員会は本論文の内容が博士 (創薬科学) の学位論文として十分に価値あるものと認め、論文審査に合格と判定した。