

学位論文

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

松井滉太郎

名古屋大学大学院

創薬科学研究科 基盤創薬学専攻

分子微生物学分野

目次

第1章	序論	3
第1節	寿命研究の概要	3
第2節	モデル生物としての分裂酵母	4
参考文献 (第1章)	13
第2章	経時寿命が延長する長寿命変異株の大規模スクリーニング	19
第1節	序.....	19
第2節	実験材料と実験方法	24
第3節	長寿命変異株のスクリーニング	28
第1項	序.....	28
第2項	スクリーニング結果	28
第4節	寿命関連因子の同定	43
第1項	序.....	43
第2項	全ゲノムシーケンス解析結果	43
第3項	四分子解析	45
第4項	本研究で同定した寿命関連因子.....	55
第5節	考察.....	71
参考文献 (第2章)	73
第3章	新規寿命関連因子 Ksg1 の解析.....	81
第1節	序.....	81
第2節	実験材料と実験方法	83
第3節	新規寿命関連因子 Ksg1 の同定	93
第4節	<i>ksg1-3</i> 変異による Ksg1 の細胞膜局在及びタンパク質量の減少	96
第5節	Ksg1 タンパク質量の減少が寿命延長の主たる要因	98
第6節	Ksg1 による寿命制御機構の検討	104
第1項	序.....	104

第2項	Ksg1 とカロリー制限による寿命延長との関係の検討	104
第3項	Ksg1 と TORC1 経路との関連性の検討	108
第4項	Ksg1 の標的基質の検討.....	111
第7節	考察	116
参考文献 (第3章)	123
Supplemental Table	130
Supplemental Figure.....	131
論文目録.....	138
謝辞	139

第1章 序論

第1節 寿命研究の概要

2015年、国連総会において「持続可能な開発目標(SDGs)」が採択された。貧困、紛争、環境問題、感染症などといった地球規模の諸問題を解決し、普遍的な平和を実現することが希求されている(United Nations, 2015)。研究者にとってもこれらの解決は喫緊の課題である。様々な問題が山積している状況下で、健康寿命の延伸は重要な課題の一つであり、この問題の解決は健康の増進、並びに質の高い医療の提供にも繋がること期待される。

これまで、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、線虫 (*Caenorhabditis elegans*)、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、マウス (*Mus musculus*)、アカゲザル (*Macaca mulatta*) などをモデル生物とした寿命研究が展開されている(Fontana *et al.*, 2010; Kenyon, 2010; Santos *et al.*, 2016; Ohtsuka *et al.*, 2021; Mattison *et al.*, 2017)。複雑化した寿命制御メカニズムの解明には、前提として細胞レベルでの寿命の理解が不可欠であると考え、本研究では分裂酵母を用いた寿命研究を展開した。

分裂酵母は、ヒト細胞と同じ真核細胞からなる微生物であり、遺伝学操作が容易であるため、優れたモデル生物として使用される(Roux *et al.*, 2010)。過去の研究から、細胞レベルでも老化現象が存在することが報告されており(Minois *et al.*, 2006)、分裂酵母の寿命研究がヒトなどの高等生物の寿命や老化現象についての知見をもたらすことが期待される。

酵母の寿命には分裂寿命と経時寿命の二種類の概念が存在する。分裂寿命(Replicative lifespan)は一つの細胞が死ぬまでに生み出す娘細胞の数と定義されている。マイクロ流体デバイスによる一細胞レベルでの解析から、分裂酵母の分裂寿命は老化に影響しないことが報告されている(Spivey *et al.*, 2017; Nakaoka *et al.*, 2017)。一方、経時寿命(Chronological lifespan)は分裂停止した細胞の生存期間と定義されている。当研究室では後者の経時寿命に焦点を当てて研究を行っている。

第2節 モデル生物としての分裂酵母

【経時寿命の測定方法】

経時寿命の測定方法として「スポットテスト」と「コロニー形成率 (Colony forming unit: CFU)」の二種類が存在する。

スポットテストでは、寿命測定する酵母を長時間培養した後に適宜希釈して、固体培地に一定量スポットして、生えてくるコロニーの密度により生存率を評価する。この寿命測定の利点は、操作の簡便性にある。操作が容易であるが故に、コロニー形成率による寿命測定よりも一度に多くの菌株の寿命測定が可能となる。

コロニー形成率 (CFU) では、寿命測定する酵母を培養し、定常期移行後に経時的に培養液をサンプリングし、適宜希釈した後に固体培地に塗布して、生えてくるコロニー数により培養液 1 mL あたりの生存菌数を算出する。そして、その菌数を OD (Optical density) 値で除することで、サンプリング時の生存率を求める(Figure 1-2-1)。この寿命測定の利点は生存率の経時変化を正確に定量できることにある。

本研究では、以上の二種類の方法により経時寿命を測定した。

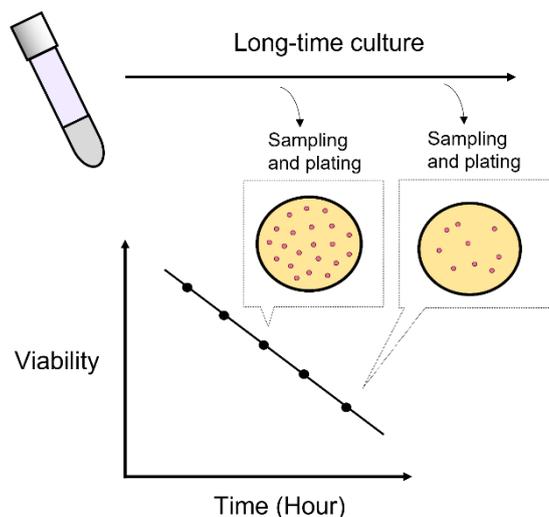


Figure 1-2-1. コロニー形成率による分裂酵母の寿命測定

分裂酵母の生存率(Viability)の定量に至るまでの流れを図示した。経時寿命を測定したい菌株を試験管で培養し続ける過程で、経時的にサンプリングし、その菌液(適宜希釈する)をプレート上に塗布する。希釈率を考慮し、生えてくるコロニー数から培養液 1 mL あたりの生存菌数を算出し、それを OD 値で除することで、サンプリング時における生存率を求める。そして、図のように生存率の変化を正確にグラフ化することができる。

【分裂酵母の細胞周期制御と生活環】

分裂酵母は栄養状態に応じて、細胞分裂や分化といった生存戦略を決定している。栄養が十分に存在する対数増殖期では、細胞分裂を続けている。つまり、M 期（有糸分裂と細胞質分裂）、G1 期、S 期（DNA 複製）、比較的長い G2 期から構成される細胞周期サイクルを繰り返すことで増殖を続けている。

一方、窒素源や炭素源などの栄養源が枯渇した状態では、細胞は G1 arrest を引き起こす。そして、異なる接合型同士（h⁺と h⁻）での接合を開始する。接合シグナルが開始されると、相手細胞の方向に偏った shmoo と呼ばれる形態形成、細胞間融合、核融合（Karyogamy）が続けて起こる（Merlini *et al.*, 2013）。

次に、核融合から孢子形成に至るまでの染色体の挙動を見ていく（Figure1-2-2）。核融合した後は、染色体重複（pre-meiotic S phase）、二回にわたる染色体の分配を経て、四つの半数体の孢子が形成される（Ohtsuka *et al.*, 2022）。ここで注目すべき時期は減数第一分裂の前期である。この段階では、相同な染色体の対合が促進され、交差組み換えが行われる（Ding *et al.*, 2019; Hiraoka, 2020; Kleckner, 2006）。この交差は、親ゲノムをシャッフルし、遺伝的多様性を生み出すという重要な役割を担っている（Samsam & Pezza, 2015）。

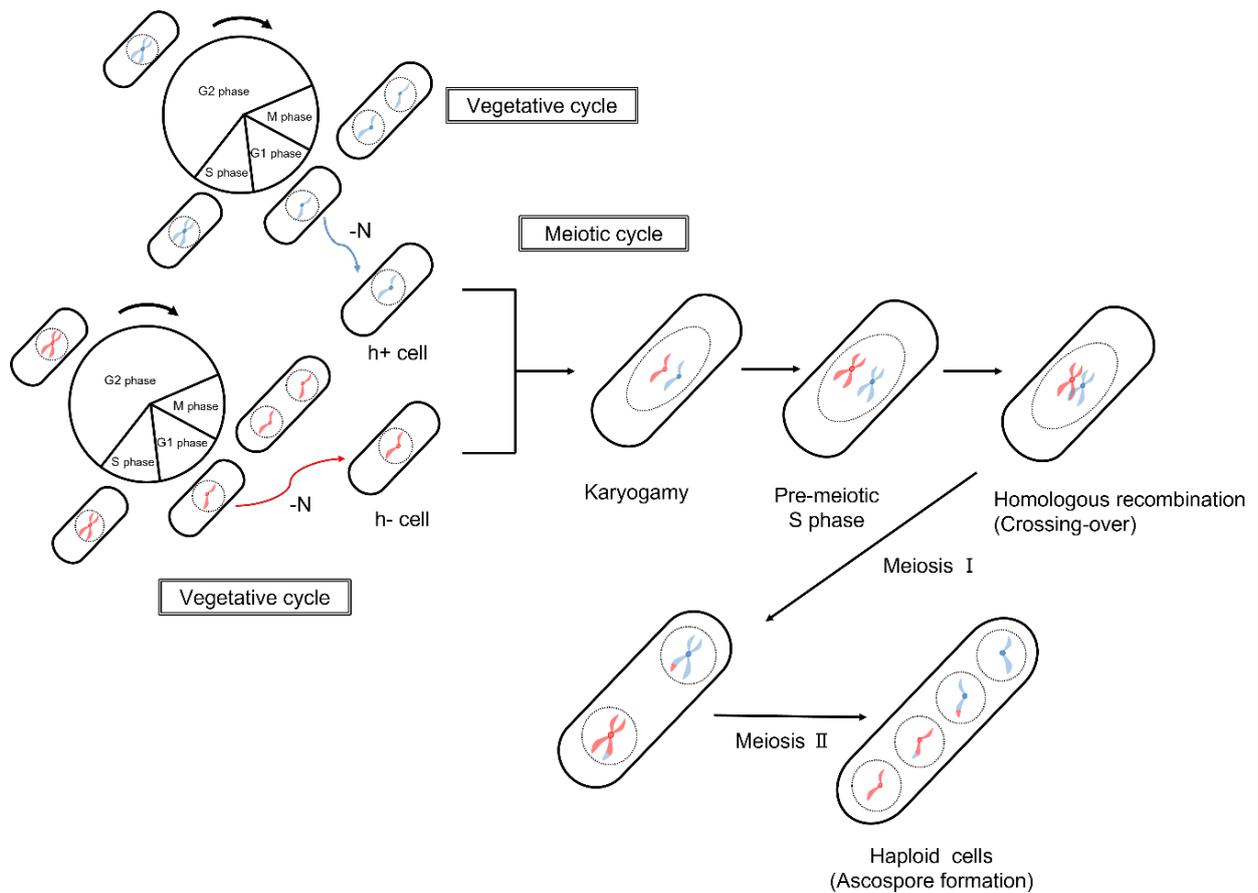


Figure 1-2-2. 分裂酵母の生活環

簡単のため、相同染色体(赤色と青色)の一对のみを示した。栄養が十分ある条件では、分裂酵母は M 期、G1 期、S 期、G2 期からなる細胞周期を進行させる(Vegetative cycle)。一方、窒素源などの栄養枯渇により、分裂酵母は G1 arrest を引き起こす。異なる接合型の酵母同士が接合すると、減数分裂が進行する(Meiotic cycle)。接合シグナルが誘導されると、核融合(Karyogamy)が促進され、核内に h と h⁺由来の染色体が共存する。次に、DNA 複製が進行し、相同染色体が近接し、相同組み換え(Homologous recombination)が行われる。これが契機となり、その後の二回にわたる分裂を通して親ゲノムとは異なる一倍体細胞の子嚢胞子(Ascospore)が形成され、遺伝的多様性が生み出される。

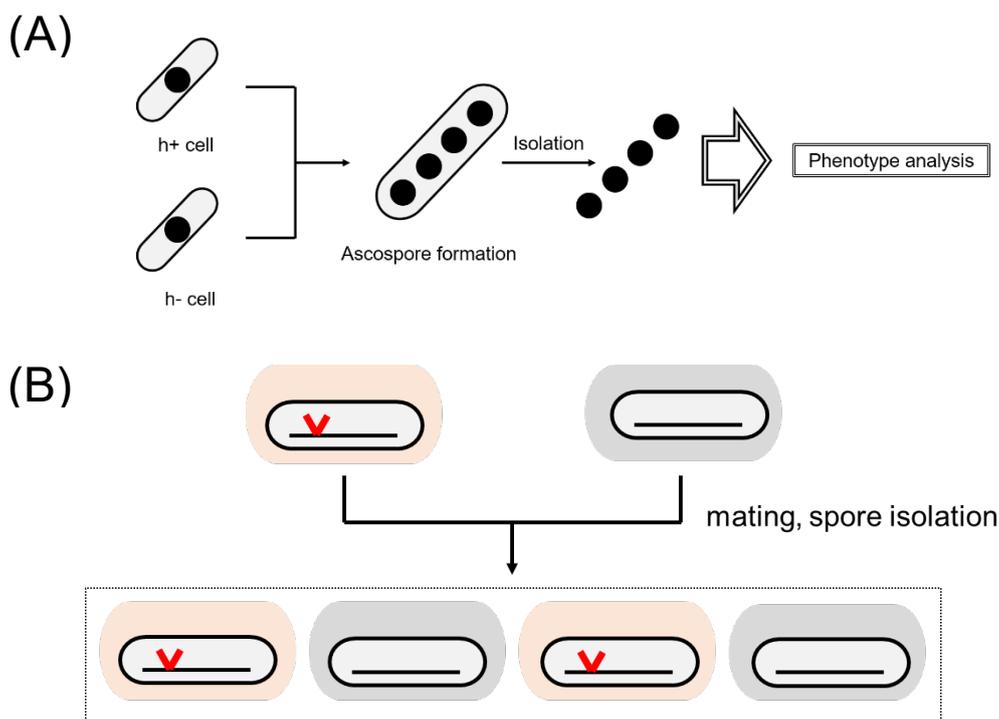
【四分子解析による遺伝学的分析】

四分子解析は、酵母の遺伝学において、単一の子嚢に含まれる子嚢胞子(Ascospore)を解析することができる強力な遺伝学手法である(Escorcia & Forsburg, 2018)(Figure 1-2-3-A)。単離した子嚢胞子の表現型を解析することで、ある特有の表現型を示す原因となる遺伝子変異の個数や遺伝子連鎖(genetic linkage)の有無が明らかになる。以下では、遺伝子変異による寿命延長を例に挙げて説明する。

まず、一つの遺伝子変異が原因で長寿命の表現型を示す場合を考える。この長寿命変異株と普通寿命の野生株との交配により、長寿命化を引き起こす遺伝子変異は、四つの子嚢胞子の内二つに遺伝し、長寿命：野生株並の普通寿命=2：2 に子嚢胞子の表現型が分離する(Figure 1-2-3-B)。

次に、異なる染色体上の二つの遺伝子変異が原因で長寿命の表現型を示す場合を考える。ただし、この場合ではどちらか片方の変異が生じていれば寿命延長するものとする。この長寿命変異株と普通寿命の野生株との交配により、長寿命化を引き起こす二つの変異の遺伝様式は Figure 1-2-3-C に示した①-③のタイプのいずれかとなる。①のパターンは、二つの遺伝子変異が同じ子嚢胞子に遺伝し、長寿命：野生株並の普通寿命=2：2 に胞子の表現型が分離する **parental ditype (PD)** である。②のパターンは、すべての子嚢胞子にそれぞれ遺伝し、全ての子嚢胞子で長寿命の表現型を示す **non-parental ditype (NPD)** である。③のパターンは①や②と異なる遺伝様式を示す **tetratype (TT)** であり、長寿命：普通寿命=3：1 に胞子の表現型が分離する。

本論文の第 2 章では、以上に示した遺伝学の知見から、当研究で扱っている長寿命変異株の寿命延長効果がいくつの遺伝子変異に起因しているのかを解析した。



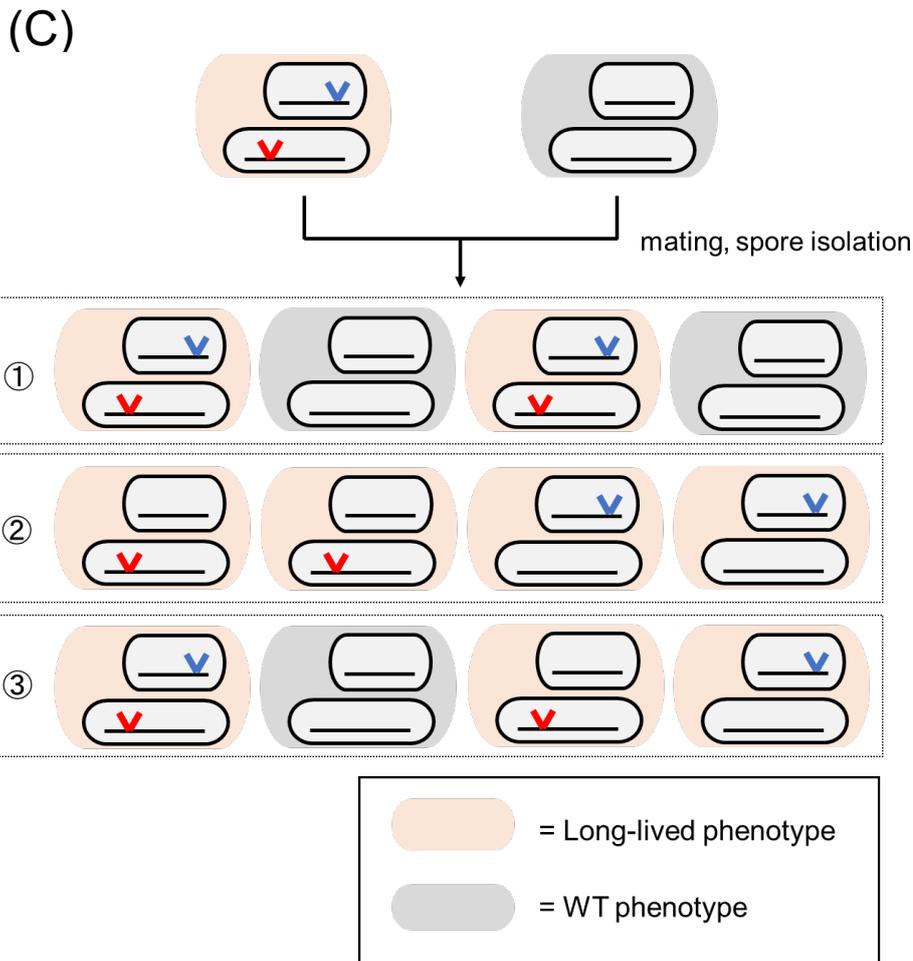


Figure 1-2-3. 分裂酵母を用いた四分子解析による遺伝学的分析。

- (A) 四分子解析に至るまでの簡略な流れ図。異なる接合型の分裂酵母株を接合すると、子嚢胞子が形成される。四分子解析用の顕微鏡でこれらの子嚢胞子を単離し、それらの表現型を解析することで、目的の表現型が生じる遺伝子変異数や遺伝子連鎖などを評価することが可能となる。
- (B) 長寿命の表現型が一遺伝子変異(赤い V 字形)に由来する場合、長寿命変異株と野生株(普通寿命)を交配させて得られる胞子の表現型は長寿命:普通寿命=2:2 に分離する。
- (C) 長寿命の表現型がそれぞれ独立した二遺伝子変異(赤い V 字形と青い V 字形)に由来する場合、長寿命変異株と野生株を交配させて得られる子嚢胞子の表現型は三つのタイプに分かれる。それぞれのタイプについて、①は parental ditype (PD)、②は non-parental ditype (NPD)、③は tetratype (TT)と呼ばれる。

【PH (Pleckstrin homology) domain】

PH domain は、細胞骨格、膜輸送、リン脂質の修飾といった細胞シグナル経路に関わるタンパク質に見られる、凡そ 120 アミノ酸から成る共通のタンパクモジュールである(Jong *et al.*, 2004)。また、PH domain はホスホイノシチド(phosphoinositide)に結合し、宿主タンパク質の膜局在を可能にする(Jong *et al.*, 2004)。分裂酵母には PH domain を有するタンパク質が 21 個存在しており(Wood *et al.*, 2002)、本論文で登場する Rgf1 や Ksg1 もそれに含まれる。

次に、PH domain に結合するホスホイノシチドの代謝について述べる。ホスホイノシチドはホスファチジルイノシトール(PI)のリン酸化誘導体であり、D-myo-inositol 環の 3,4,5 位がリン酸化あるいは脱リン酸化されることで、様々な種類のホスホイノシチドが合成される(Nakada-Tsukui *et al.*, 2019)(Figure 1-2-4)。

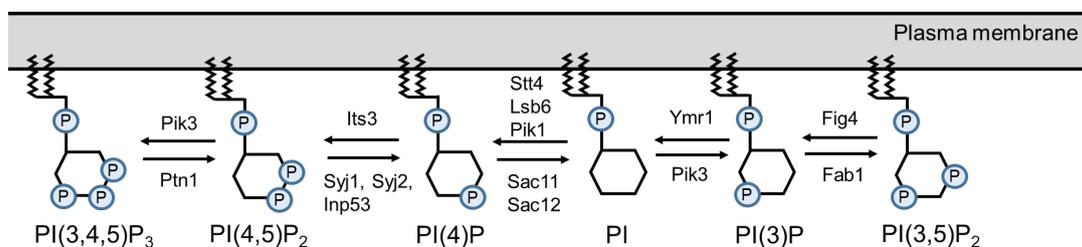


Figure 1-2-4. 分裂酵母におけるホスホイノシチドの合成経路の簡略図。ホスホイノシチドの代謝及びそれに必要なリン酸化酵素と脱リン酸化酵素を示した。各酵素の Binding partner は省略した。図は Snider *et al.*, 2018 を参考に作成した。

【TOR (Target of rapamycin)】

Target of rapamycin (TOR)シグナル経路は細胞内の栄養状態に応じて細胞増殖や代謝を制御する重要な制御因子であり、種を超えてその機能は保存されている(Otsubo *et al.*, 2017; Jacinto & Lorberg, 2008; Fontana *et al.*, 2010)。分裂酵母のTORはTORC1とTORC2の二種類の異なる複合体を介して機能している。分裂酵母のTORC1は触媒サブユニットであるTor2に加えて、Mip1, Wat1, Toc1, Tco89により構成される(Morozumi *et al.*, 2021)。一方、TORC2は触媒サブユニットであるTor1に加えて、Ste20, Sin1, Pop3, Bit61により構成される(Otsubo & Yamamoto, 2008; Cybulski & Hall, 2009)。

分裂酵母においてTORC1の不活性化には主に、TSC-Rheb, GATOR1, GAAC(General amino acid control)の経路が関与している(Fukuda *et al.*, 2021)(Figure 1-2-5)。また、窒素源不足による窒素ストレス状態ではAMP活性化キナーゼ(AMPK)がTORC1を負に制御することが知られている(Davie *et al.*, 2015)(Figure 1-2-4)。次に、これらの経路及びAMPKに関する知見について述べる。

TSC-Rhebシグナル経路は細胞増殖、細胞周期の制御、栄養の取り込みを制御する(Nakase *et al.*, 2013)。分裂酵母ではTSC複合体のTsc1-Tsc2が、TORC1の活性化因子であるRheb GTPase オルソログのRhb1を負に制御する(Matsumoto *et al.*, 2002; van Slegtenhorst *et al.*, 2004)。

GATOR1はIml1, Npr2, Npr3より構成され、Gtr1のGAP(GTPase-activating protein)として機能する(Chia *et al.*, 2017)。アミノ酸枯渇により、GATOR1はRag GTPaseのGtr1^{GTP}-Gtr2をGtr1^{GDP}-Gtr2へと変換することで、TORC1を負に制御する(Chia *et al.*, 2017)。

GAAC経路は栄養源の状態を感知し、それに適応するために重要な経路である(Tarumoto *et al.*, 2013)。アミノ酸枯渇時に、主要なeIF2キナーゼであるGcn2は、ヒスチジル tRNA 合成酵素に相同性のあるドメインを介してアミノアシル化されていないtRNAと結合することで活性化され(Dong *et al.*, 2000; Wek *et al.*, 1995)、eIF2 α をリン酸化する。eIF2 α がリン酸化された後に、転写因子Fil1が活性化され、転写応答が誘導される(Duncan *et al.*, 2018; Rubio *et al.*, 2021)。

分裂酵母AMPKは α サブユニット(Ssp2), β サブユニット(Amk2), γ サブユニット(Cbs2)のヘテロ三量体より構成される(Townley & Shapiro, 2007)。窒素ストレス条件でAMPKは活性化され、TORC1が抑制される(Forte *et al.*, 2019)。AMPKの活性化にはSsp1とPpk34によるSsp2.T189残基のリン酸化が重要であり、Amk2とCbs2に依存しないことが報告されている(Davie *et al.*, 2015)。

不活性化されたTORC1はオートファジーの亢進や経時寿命の延長といった細胞内において多様な変化をもたらす(Figure 1-2-5)。

オートファジーは酵母からヒトにまで保存性のある細胞内分解システムであり、損傷

した細胞内小器官や長寿命のタンパク質の動的平衡において重要な役割を担っている (Mukaiyama *et al.*, 2010; Xu & Du, 2022)。窒素源などの栄養源枯渇により TORC1 が不活性化されると、TORC1 基質の Atg13 が脱リン酸化され、オートファジー関連因子がプレオートファゴソーム構造体(pre-autophagosomal structure)に集合し、オートファゴソームが形成される(Otsubo *et al.*, 2017; Suzuki *et al.*, 2007)。オートファゴソームが分解対象を膜で包み、液胞と融合することで、分解を受ける。出芽酵母では、Atg13 の脱リン酸化により Atg13-Atg17 の架橋結合の形成に起因した液-液相分離が起こる (Fujioka *et al.*, 2020)。さらに、Atg1-Atg13, Atg17-Atg29-Atg31 が相互作用することで、オートファジー関連因子が濃縮された PAS が形成される (Fujioka *et al.*, 2020; Fujioka *et al.*, 2014; Yamamoto *et al.*, 2016; Suzuki *et al.*, 2007; Ragusa *et al.*, 2012)。このように、オートファジーは細胞内環境の変化に対する迅速な応答を可能にしている。

次に、TOR と経時寿命の関係についての知見を述べる。TORC1 や TORC2 の活性低下は経時寿命を延長させることが報告されている (Rodríguez-López *et al.*, 2020; Rallis *et al.*, 2013; Ohtsuka *et al.*, 2013)。また、TORC1 の下流因子である Gaf1 が経時寿命の制御に関与している (Rodríguez-López *et al.*, 2020)。Gaf1 は GATA family に属する転写因子である。Gaf1 は TORC1 の活性状態に応じて、その活性と局在を変化させる。TORC1 が不活性化すると、Gaf1 は Ppe1 により脱リン酸化され、局在が細胞質から核へ移行する (Laor *et al.*, 2015; Rodríguez-López *et al.*, 2020)。そして、タンパク質をコードする遺伝子や tRNA 遺伝子といったタンパク質の翻訳に関わる遺伝子発現を阻害することで、経時寿命を延長させる (Rodríguez-López *et al.*, 2020)。

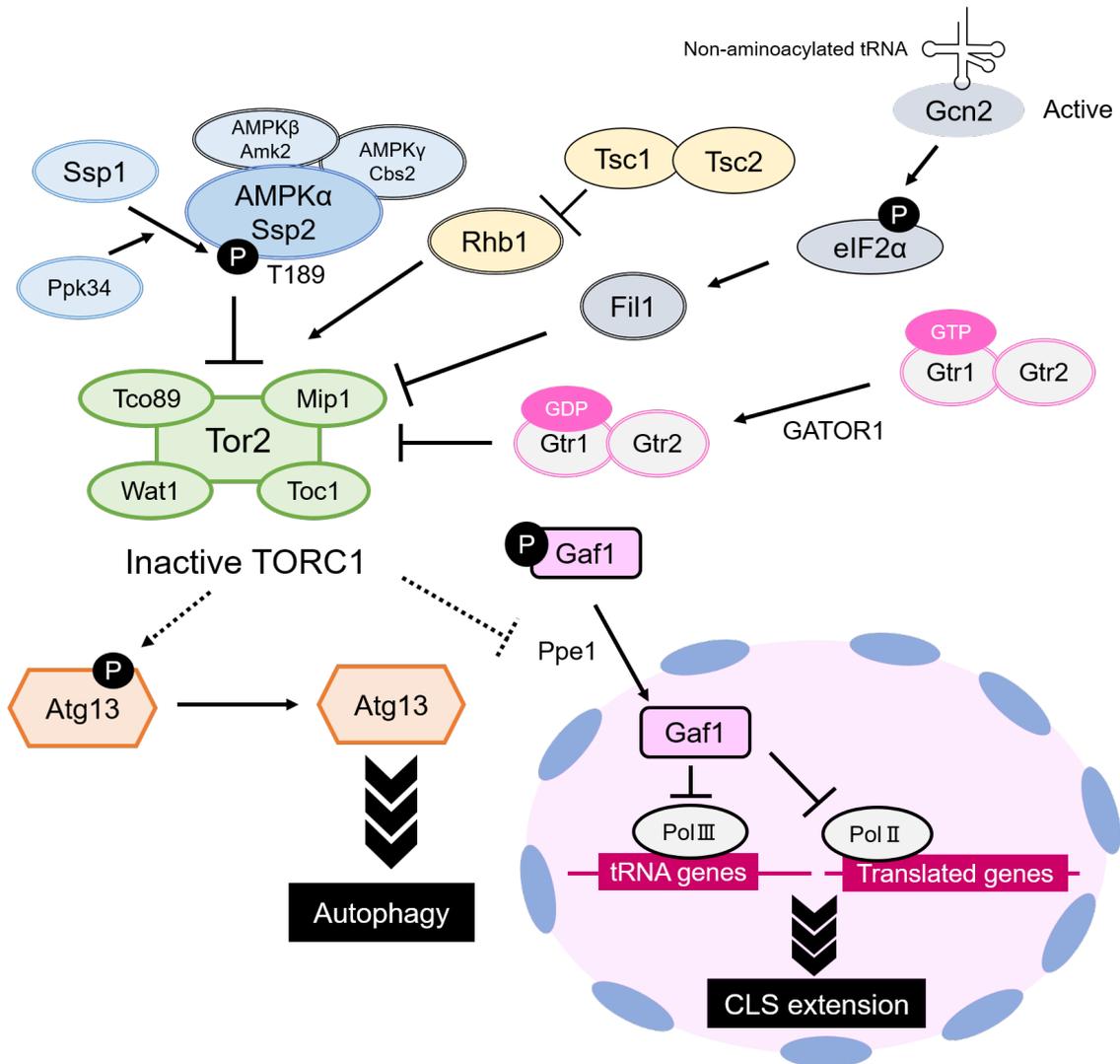


Figure 1-2-5. 分裂酵母 TORC1 を中心とした細胞内模式図。TORC1 の制御モデル並びにその下流因子を図示した。TSC, Gcn2, GATOR1 が関与する経路により TORC1 が負に制御される。さらに、窒素ストレス条件で AMPK が活性化され、TORC1 を負に制御することも明らかにされている。TORC1 が不活性化されると、Atg13 の脱リン酸化によりオートファジーが亢進される。また、Ppe1 の抑制解除に伴い Gaf1 が脱リン酸化される。それにより、Gaf1 が核移行し、RNA pol II を仲介とした翻訳遺伝子だけでなく RNA pol III を仲介とした tRNA 発現を負に制御することで経時寿命の延長を引き起こす。

参考文献 (第 1 章)

- Cybulski, N., & Hall, M. N. (2009). TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends in biochemical sciences*, *34*(12), 620-627.
- Ding, D. Q., Okamasa, K., Katou, Y., Oya, E., Nakayama, J. I., Chikashige, Y., ... & Hiraoka, Y. (2019). Chromosome-associated RNA-protein complexes promote pairing of homologous chromosomes during meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature communications*, *10*(1), 1-12.
- Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J., & Hinnebusch, A. G. (2000). Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Molecular cell*, *6*(2), 269-279.
- Duncan, C. D., Rodríguez-López, M., Ruis, P., Bähler, J., & Mata, J. (2018). General amino acid control in fission yeast is regulated by a nonconserved transcription factor, with functions analogous to Gen4/Atf4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(8), E1829-E1838.
- Escorcía, W., & Forsburg, S. L. (2018). Tetrad dissection in fission yeast. *Schizosaccharomyces pombe*, 179-187.
- Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010). Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science*, *328*(5976), 321-326.
- Forte, G. M., Davie, E., Lie, S., Franz-Wachtel, M., Ovens, A. J., Wang, T., ... & Petersen, J. (2019). Import of extracellular ATP in yeast and man modulates AMPK and TORC1 signalling. *Journal of cell science*, *132*(7), jcs223925.
- Fujioka, Y., Alam, J. M., Noshiro, D., Mouri, K., Ando, T., Okada, Y., ... & Noda, N. N. (2020). Phase separation organizes the site of autophagosome formation. *Nature*, *578*(7794), 301-305.
- Fujioka, Y., Suzuki, S. W., Yamamoto, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., ... & Noda, N. N. (2014). Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nature structural & molecular biology*, *21*(6), 513-521.

- Hiraoka, Y. (2019). Chromosome-associated RNA–protein complexes promote pairing of homologous chromosomes during meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature communications*, *10*(1), 1-12.
- Hiraoka, Y. (2020). Phase separation drives pairing of homologous chromosomes. *Current Genetics*, *66*(5), 881-887.
- Jacinto, E., & Lorberg, A. (2008). TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochemical Journal*, *410*(1), 19-37.
- Jong, W. Y., Mendrola, J. M., Audhya, A., Singh, S., Keleti, D., DeWald, D. B., ... & Lemmon, M. A. (2004). Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Molecular cell*, *13*(5), 677-688.
- Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, *464*(7288), 504-512.
- Laor, D., Cohen, A., Kupiec, M., & Weisman, R. (2015). TORC1 regulates developmental responses to nitrogen stress via regulation of the GATA transcription factor Gaf1. *MBio*, *6*(4), e00959-15.
- Kleckner, N. (2006). Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role (s) of the synaptonemal complex. *Chromosoma*, *115*(3), 175-194.
- Matsumoto, S., Bandyopadhyay, A., Kwiatkowski, D. J., Maitra, U., & Matsumoto, T. (2002). Role of the Tsc1-Tsc2 complex in signaling and transport across the cell membrane in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, *161*(3), 1053-1063.
- Mattison, J. A., Colman, R. J., Beasley, T. M., Allison, D. B., Kemnitz, J. W., Roth, G. S., ... & Anderson, R. M. (2017). Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nature communications*, *8*(1), 1-12.
- Merlini, L., Dudin, O., & Martin, S. G. (2013). Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open biology*, *3*(3), 130008.

Minois, N., Frajnt, M., Dölling, M., Lagona, F., Schmid, M., Küchenhoff, H., ... & Vaupel, J. W. (2006). Symmetrically dividing cells of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* do age. *Biogerontology*, 7(4), 261-267.

Morozumi, Y., & Shiozaki, K. (2021). Conserved and divergent mechanisms that control TORC1 in yeasts and mammals. *Genes*, 12(1), 88.

Mukaiyama, H., Nakase, M., Nakamura, T., Kakinuma, Y., & Takegawa, K. (2010). Autophagy in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS letters*, 584(7), 1327-1334.

Nakada-Tsukui, K., Watanabe, N., Maehama, T., & Nozaki, T. (2019). Phosphatidylinositol kinases and phosphatases in *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 150.

Nakaoka, H., & Wakamoto, Y. (2017). Aging, mortality, and the fast growth trade-off of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS biology*, 15(6), e2001109.

Nakase, Y., Nakase, M., Kashiwazaki, J., Murai, T., Otsubo, Y., Mabuchi, I., ... & Matsumoto, T. (2013). The fission yeast β -arrestin-like protein Any1 is involved in TSC-Rheb signaling and the regulation of amino acid transporters. *Journal of cell science*, 126(17), 3972-3981.

Ohtsuka, H., Ogawa, S., Kawamura, H., Sakai, E., Ichinose, K., Murakami, H., & Aiba, H. (2013). Screening for long-lived genes identifies Oga1, a guanine-quadruplex associated protein that affects the chronological lifespan of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular genetics and genomics*, 288(5), 285-295.

Ohtsuka, H., Shimasaki, T., & Aiba, H. (2021). Genes affecting the extension of chronological lifespan in *Schizosaccharomyces pombe* (fission yeast). *Molecular microbiology*, 115(4), 623-642.

Ohtsuka, H., Imada, K., Shimasaki, T., & Aiba, H. (2022). Sporulation: A response to starvation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *MicrobiologyOpen*, 11(3), e1303.

Otsubo, Y., Nakashima, A., Yamamoto, M., & Yamashita, A. (2017). TORC1-dependent phosphorylation targets in fission yeast. *Biomolecules*, *7*(3), 50.

Otsubo, Y., & Yamamoto, M. (2008). TOR signaling in fission yeast. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *43*(4), 277-283.

Ragusa, M. J., Stanley, R. E., & Hurley, J. H. (2012). Architecture of the Atg17 complex as a scaffold for autophagosome biogenesis. *Cell*, *151*(7), 1501-1512.

Rallis, C., Codlin, S., & Bähler, J. (2013). TORC 1 signaling inhibition by rapamycin and caffeine affect lifespan, global gene expression, and cell proliferation of fission yeast. *Aging cell*, *12*(4), 563-573.

Rodríguez-López, M., Gonzalez, S., Hillson, O., Tunnacliffe, E., Codlin, S., Tallada, V. A., ... & Rallis, C. (2020). The GATA transcription factor Gaf1 represses tRNAs, inhibits growth, and extends chronological lifespan downstream of fission yeast TORC1. *Cell reports*, *30*(10), 3240-3249.

Roux, A. E., Chartrand, P., Ferbeyre, G., & Rokeach, L. A. (2010). Fission yeast and other yeasts as emergent models to unravel cellular aging in eukaryotes. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, *65*(1), 1-8.

Rubio, A., Ghosh, S., Müllerer, M., Ralser, M., & Mata, J. (2021). Ribosome profiling reveals ribosome stalling on tryptophan codons and ribosome queuing upon oxidative stress in fission yeast. *Nucleic acids research*, *49*(1), 383-399.

Sansam, C. L., & Pezza, R. J. (2015). Connecting by breaking and repairing: mechanisms of DNA strand exchange in meiotic recombination. *The FEBS journal*, *282*(13), 2444-2457.

Santos, J., Leitão-Correia, F., Sousa, M. J., & Leão, C. (2016). Dietary restriction and nutrient balance in aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*.

Shetty, M., Noguchi, C., Wilson, S., Martinez, E., Shiozaki, K., Sell, C., ... & Noguchi, E. (2020). Maf1 - dependent transcriptional regulation of tRNAs prevents genomic

instability and is associated with extended lifespan. *Aging Cell*, 19(2), e13068.

Snider, C. E., Willet, A. H., Brown, H. T., & Gould, K. L. (2018). Analysis of the contribution of phosphoinositides to medial septation in fission yeast highlights the importance of PI (4, 5) P2 for medial contractile ring anchoring. *Molecular biology of the cell*, 29(18), 2148-2155.

Spivey, E. C., Jones Jr, S. K., Rybarski, J. R., Saifuddin, F. A., & Finkelstein, I. J. (2017). An aging-independent replicative lifespan in a symmetrically dividing eukaryote. *Elife*, 6, e20340.

Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2007). Hierarchy of Atg proteins in pre - autophagosomal structure organization. *Genes to Cells*, 12(2), 209-218.

Tarumoto, Y., Kanoh, J., & Ishikawa, F. (2013). Receptor for activated C-kinase (RACK1) homolog Cpc2 facilitates the general amino acid control response through Gen2 kinase in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), 19260-19268.

Townley, R., & Shapiro, L. (2007). Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. *Science*, 315(5819), 1726-1729.

United Nations. (2015) Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development

(外務省訳「我々の世界を変革する：持続可能な開発のための 2030 アジェンダ」)

https://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E

<https://www.mofa.go.jp/mofaj/files/000101402.pdf> (2022年8月21日閲覧)

Van Slegtenhorst, M., Carr, E., Stoyanova, R., Kruger, W. D., & Henske, E. P. (2004). Tsc1+ and tsc2+ regulate arginine uptake and metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12706-12713.

Wek, S. A., Zhu, S., & Wek, R. C. (1995). The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Molecular and cellular biology*, 15(8), 4497-4506.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., ... & Nurse, P. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, *415*(6874), 871-880.

Xu, D. D., & Du, L. L. (2022). Fission Yeast Autophagy Machinery. *Cells*, *11*(7), 1086.

Yamamoto, H., Fujioka, Y., Suzuki, S. W., Noshiro, D., Suzuki, H., Kondo-Kakuta, C., ... & Ohsumi, Y. (2016). The intrinsically disordered protein Atg13 mediates supramolecular assembly of autophagy initiation complexes. *Developmental cell*, *38*(1), 86-99.

第2章 経時寿命が延長する長寿命変異株の大規模スクリーニング

第1節 序

寿命に関連する因子の発見及びその機能解析は、寿命制御の全体像の解明への手掛かりを与え、さらには新規の創薬ターゲットの同定に貢献する可能性を秘めている。

この着想の下、過去に経時寿命が延長する変異株をスクリーニングし、長寿命の原因遺伝子を特定することで、寿命関連因子が同定されてきた。これまで、 H^+ を細胞外に排出する P-type ATPase の Pma1, serine/threonine protein kinase である Nnk1, 細胞壁構成成分の β -1,3-グルカンの glucanoyltransferase(糖転移酵素)である Gas1, スフィンゴ脂質 C4-hydroxylase(水酸化酵素)である Sur2 などの寿命関連因子が当研究室で特定されており、当該因子による寿命制御機構の解析が進められてきた(Naito *et al.*, 2014; Ito *et al.*, 2010; Imai *et al.*, 2020; Kurauchi *et al.*, 2017; Kurauchi *et al.*, 2021)(Figure 2-1-1)。ここでは、Sur2 の解析状況について説明する。

過去に当研究室では、経時寿命が延長する変異株 L1 を取得し、L1 には *sur2* 遺伝子内に、一塩基変異による 196 番目のアミノ酸変異(Ala→Val)が生じていることが分かった(Figure 2-1-2-A,B)。次に、L1 の寿命延長が *sur2* 変異に起因することを証明するため、この変異を野生株に導入した *sur2-L1::kan^R* 株を作製し寿命測定したところ、取得した L1 変異株と同様に寿命延長しており、L1 の寿命延長の原因が *sur2* 変異であることが明らかになった(Figure 2-1-2-C1, C2)。

また、*sur2* 変異が機能欠失変異であるかどうかを調べるため、*sur2* 欠損株を寿命測定した。すると、*sur2* 欠損により経時寿命が延長することが分かった(Figure 2-1-2-D)。次に、*sur2-L1::kan^R* 株と *sur2* Δ 株を用いて寿命以外の表現型を解析したところ、*sur2* Δ は KCL (1M)と caffeine(10 mM)に感受性を示し、*sur2-L1::kan^R* は *sur2* Δ よりも弱い感受性を示した(Figure 2-1-2-E)。この結果から、Sur2 機能は完全とはいかないまでも *sur2* 変異(196 Ala→Val)で喪失していることが考えられる。

また、*sur2* 欠損株では、分裂酵母の寿命延長シグナルの一つであるカロリー制限(CR)により相加的な寿命延長を引き起こさなかった(Figure 2-1-2-F)。このことから、CR に依存した寿命延長には *sur2*⁺遺伝子が必要であることが考えられた。

以上のように、一つの寿命関連因子で精力的な解析が進められてきた。しかしながら、当研究室のこれまでのスクリーニングは単発的であった。また、他の研究では非必須遺伝子の欠失変異株のセットを用いて寿命関連遺伝子が同定されている (Romila *et al.*, 2021)。しかしながら、このような解析は必須遺伝子の変異を解析できないことから、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。

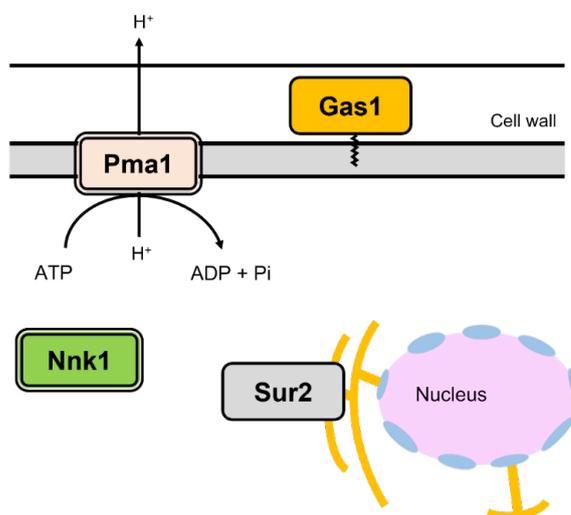
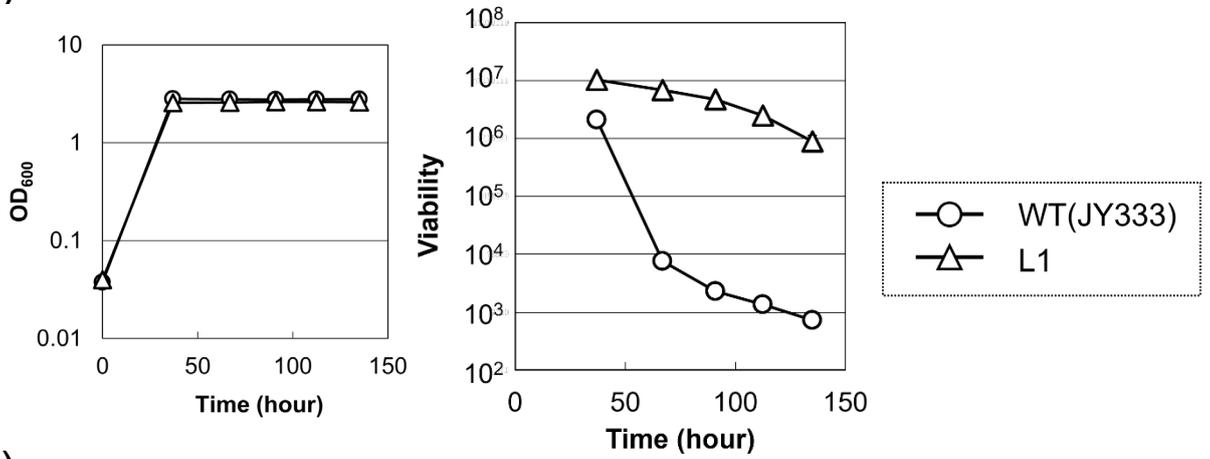


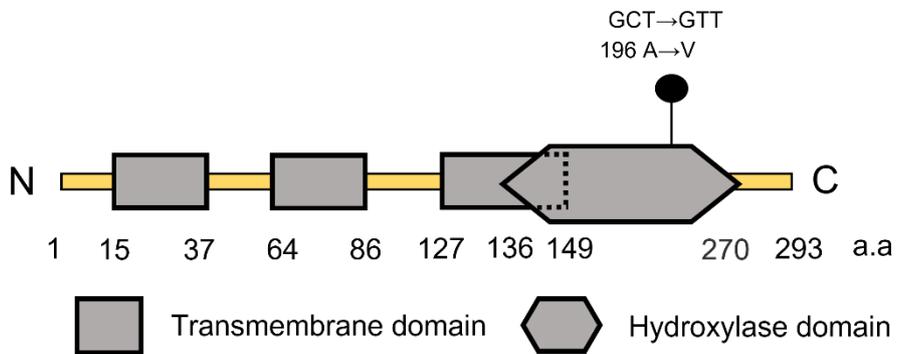
Figure 2-1-1. これまで当研究室で同定された寿命関連因子の関連図

これまで Pma1, Gas1, Nnk1, Sur2 などの因子を寿命関連因子として同定した。その内、Pma1 と Nnk1 は必須因子(二重線で囲んだ)である。

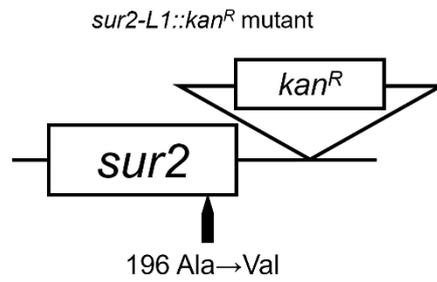
(A)



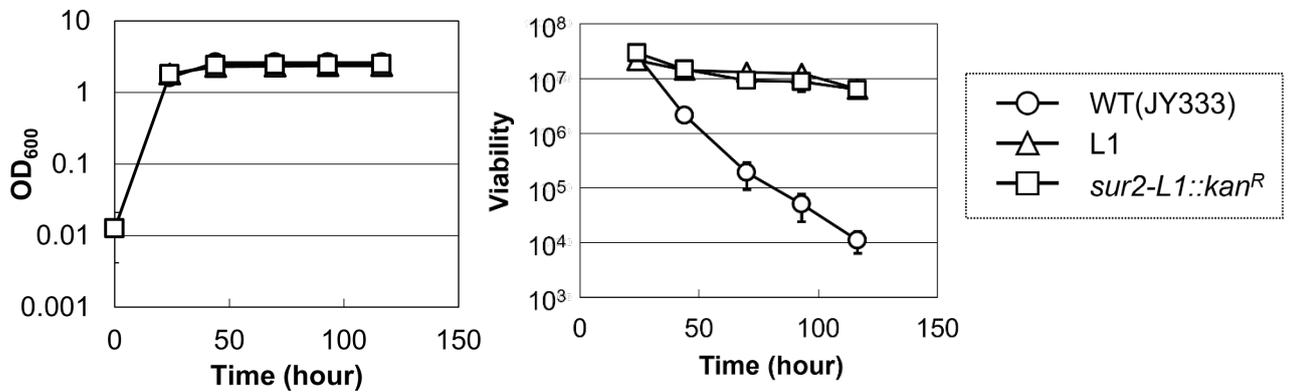
(B)



(C1)



(C2)



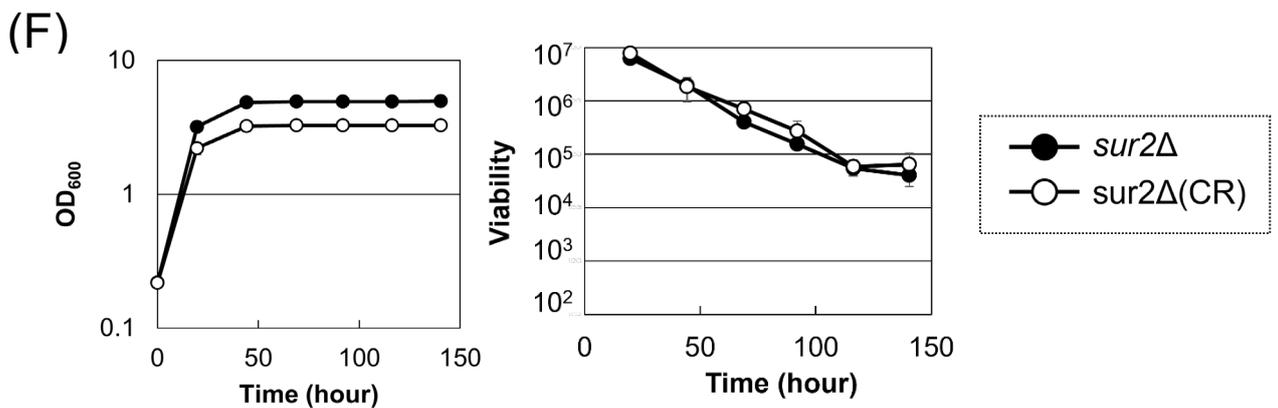
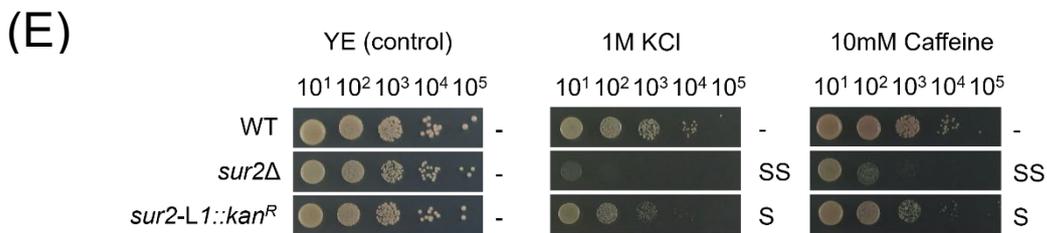
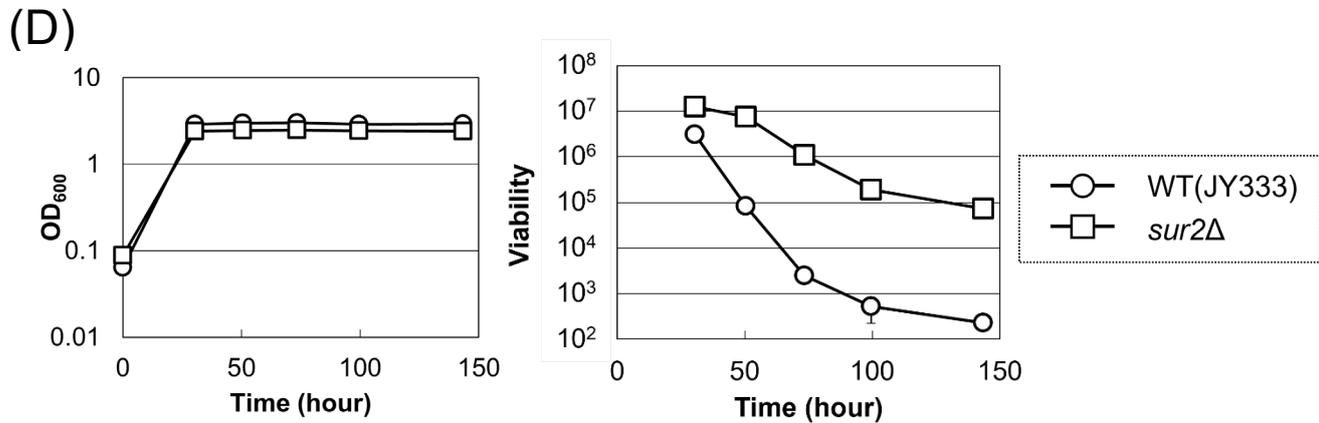


Figure 2-1-2. 寿命関連因子 Sur2 の解析状況。(A),(C),(D),(E)の測定結果は倉内の修士論文(2017)から抜粋した。

(A) L1変異は経時寿命を延長させる。WT(JY333)とL1(Sur2長寿変異株)の細胞増殖(OD₆₀₀: 左グラフ)と生存率(右グラフ)の経時変化を示した。3回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。

(B) Sur2 の模式図。Sur2 は三つの Transmembrane domain(15-37, 64-86, 127-149 amino acid)と一つの Hydroxylase domain(136-270 amino acid)を有している。

Hydroxylase domain 内の 196 番目のアミノ酸が変異(Ala→Val)している。

- (C) *sur2-L1::kan^R* は経時寿命を延長させる。(C1)形質転換により、野生株に *sur2* 変異を導入した株(*sur2-L1::kan^R*)を作製した。(C2)*sur2-L1::kan^R* は L1 と同様に経時寿命が延長する。3 回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。
- (D) *sur2Δ* は経時寿命を延長させる。WT(JY333)と*sur2Δ*の細胞増殖 (OD₆₀₀: 左グラフ) と生存率(右グラフ)の経時的変化を示した。3回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。
- (E) *sur2-L1::kan^R* と *sur2Δ* の表現型解析。野生株、*sur2-L1::kan^R*、*sur2Δ* を 10⁻¹⁰ 倍に希釈し、YE、YE+1M KCL、YE+10 mM caffeine を含む固体培地にスポットした。固体培地は 30°Cに数日間静置培養し、その後写真撮影した。-, SS, S は YE(Control) と比較して、それぞれ生育に変化なし、顕著に感受性、やや感受性であることを意味する。
- (F) CR条件における*sur2Δ*の寿命測定結果。*sur2Δ*(通常状態:2% Glucose)と*sur2Δ*(CR状態:0.5% Glucose)の細胞増殖 (OD₆₀₀: 左グラフ)と生存率(右グラフ)の経時的変化を示した。*Sur2Δ*では、CR状態にしても相加的な寿命延長が見られないことから、*Sur2* はCRに依存した寿命延長に必要であることが考えられる。3回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。

第2節 実験材料と実験方法

【使用菌株】

第2章で使用した分裂酵母の菌株とその Genotype を Table 2-2-1 に示す。

Table 2-2-1 Strains used in chapter 2

Strain	Genotype	Source
JY333	<i>h⁻ ade6-M216 leu1-32</i>	Our laboratory stock
L18	<i>h⁻ ade6-M216 leu1-32 pma1mutant</i>	Our laboratory stock (Ito <i>et al.</i> , 2010)
HM3802	<i>h⁺ ade6-M210 leu1-32</i>	Our laboratory stock

【使用した培地】

・SD 培地

組成	終濃度
Nitrogen base without amino acids	6.7 g/L
Glucose	20 g/L
Adenine	40 mg/L
Leucine	60 mg/L
*Phloxine B	10 µg/mL
*Agar	20 g/L

必要に応じて*印を付した Phloxine B（死細胞を赤く染色する試薬）や Agar（固体培地の作製時に使用）を添加した。

・YE 培地

組成	終濃度
Yeast Extract	5 g/L
Glucose	30 g/L
Adenine	40 mg/L
*Agar	20 g/L

必要に応じて*印を付した Agar を添加した。

・ EMM 胞子形成培地（固体培地）

胞子形成培地の作製では、性分化を誘導するために窒素源の NH_4Cl を除去し、グルコース濃度を通常の半分にした。

組成	終濃度
Potassium Hydrogen Phthalate	3.0 g/L
Na_2HPO_4	2.2 g/L
Glucose	10 g/L
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15 mg/L
KCl	1.0 g/L
Na_2SO_4	40 mg/L
Pantothenic acid	1.0 mg/L
Nicotinic acid	10 mg/L
Myo-inositol	10 mg/L
Biotin	10 $\mu\text{g/L}$
Boric acid	0.5 mg/L
MnSO_4	0.638 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 mg/L
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 mg/L
Molybdic acid	13 $\mu\text{g/L}$
KI	0.1 mg/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	40 $\mu\text{g/L}$
Citric acid	1.0 mg/L
Adenine	40 mg/L
Leucine	60 mg/L
Agar	20 g/L

【全ゲノムシーケンス解析】

全ゲノムシーケンス解析する分裂酵母を YE 培地で培養した後、Wizard® Genomic DNA Purification kit により、染色体 DNA を抽出した。全ゲノムシーケンス解析は名古屋大学・遺伝子実験施設に委託して行った。

【使用プライマー】

得られた長寿命変異株で目的の変異の有無を確認するために、遺伝子実験施設のシーケンス解析を行った。以下の Fw と Rv のプライマーを用いて目的の DNA 産物を精製した。

Table 2-2-2 Primers used in chapter 2

Primer name	Gene target (Mutant number)	Primer sequence (5'→3')
No.3 mutation check Fw	<i>ksg1</i> (No.3)	CTTACAAATTTTGGTCGATACC
No.3 mutation check Rv	<i>ksg1</i> (No.3)	GCTCGTGAGCTTAAGATTCC
No.7 mutation check Fw	<i>scw1</i> (No.7)	CGAATGTAGTATCCGTCGAG
No.7 mutation check Rv	<i>scw1</i> (No.7)	CAGCACTTCAAAACAGCCGC
No.11 mutation check Fw	<i>cmr2</i> (No.11)	GCCCTGCAGCGAACATACCA
No.11 mutation check Rv	<i>cmr2</i> (No.11)	TTGTTTCCTTTGTTCTTTTTCCC
No.13 mutation check Fw	<i>bgs1</i> (No.13)	CCGGTTTGTAGATACCGCCA
No.13 mutation check Rv	<i>bgs1</i> (No.13)	ACCAACCTTCCAATAGCCC
No.36 mutation check Fw-1	<i>aly2</i> (No.36)	ACCACACAATCGGTTTTAGC
No.36 mutation check Rv-1	<i>aly2</i> (No.36)	AACCAAAGGCTGGCCAACCC
No.36 mutation check Fw-2	<i>sec1</i> intron (No.36)	GTGCACTGAAATGTTTACTGGG
No.36 mutation check Rv-2	<i>sec1</i> intron (No.36)	TCCGGAAAAGGAATCATGTACTTG
No.37 mutation check Fw	<i>scw1</i> (No.37)	CGAATGTAGTATCCGTCGAG
No.37 mutation check Rv	<i>scw1</i> (No.37)	*TTAATTAACCCGGGGATCCG GAATCAATATGCAAACCTC
No.48 mutation check Fw	<i>rer2</i> (No.48)	CATGAAATTGCTACTTCTGTGC
No.48 mutation check Rv	<i>rer2</i> (No.48)	GTTGTGTGGCTGCAGTGCAG
No.51 mutation check Fw	<i>scw1</i> (No.51)	CGAATGTAGTATCCGTCGAG
No.51 mutation check Fw	<i>scw1</i> (No.51)	*TTAATTAACCCGGGGATCCG GAATCAATATGCAAACCTC
No.58 mutation check Fw	<i>rgf1</i> (No.58)	TGCGGATACTACTCAAGCCC
No.58 mutation check Rv	<i>rgf1</i> (No.58)	ACCATGTAGGACGAGAACGC
No.64 mutation check Fw	<i>rho1</i> (No.64)	CGACCGTCTACGTCCCTTGTC
No.64 mutation check Rv	<i>rho1</i> (No.64)	GTTGAATGTGCTTCGACTGAAGAG
No.92 mutation check Fw-1	<i>gaf1</i> (No.92)	CCCAGACACTTTCTCTGATC
No.92 mutation check Rv-1	<i>gaf1</i> (No.92)	TTAGCGGGAATGGAAGGGG
No.92 mutation check Fw-2	<i>tpp1</i> (No.92)	GCAGTGACGCGTTTAGATTC
No.92 mutation check Rv-2	<i>tpp1</i> (No.92)	AACCAATAAAGTCGGCTCCC
No.98 mutation check Fw	<i>plb1</i> (No.98)	AGAGGGACCCAGTTACGCTCC
No.98 mutation check Rv	<i>plb1</i> (No.98)	ACACGTCCCCAGTAATCGG

*: Italic sequence does not bind to the *scw1*⁺ gene.

【OD 測定】

日照電気（株）製の BACTOMONITOR BACT-550 を使用した。測定に用いた照射光の波長は 600 nm である。

【スポットテストによる寿命測定】

寿命測定する菌株を SD 培地 5 mL に植菌し、30℃で一晩培養して前培養を行った。前培養液を新しい SD 培地 5 mL に初期 OD₆₀₀ = 0.05 となるように植え継ぎ、本培養を開始した。本培養開始から 8 日後に、培養液を 50 倍希釈して 5 μL を YE 固体培地にスポットした。30℃で 3 日間静置培養した後、写真撮影した。

【四分子解析による遺伝学的分析方法】

掛け合わせに用いる二種の菌株を滅菌水に懸濁して十分に混合させ、EMM 孢子形成培地に塗布した。その後、四分子解析用マイクロマニピュレーションシステム MSM400 (SINGER) を用いて、子嚢から子嚢胞子を単離した。単一の子嚢から単離した四つの子嚢胞子をスポットテストし、長寿変異株の寿命延長効果がいくつの遺伝子変異に由来するのかを調べた。

【ランダムスポア処理による胞子の取得】

掛け合わせに用いる二種の菌株を滅菌水に懸濁して十分に混合させ、EMM 孢子形成培地に塗布した。培地上で生育した細胞を掬い取り、Glusulase 入りの滅菌水に十分懸濁させ、子嚢壁を溶解させた。その後、30%エタノール処理により、胞子以外の酵母細胞を除去し、YE 固体培地に塗布することで胞子を得た。

第3節 長寿命変異株のスクリーニング

第1項 序

第3節では、全ゲノムシーケンス解析した長寿命変異株の選抜過程について述べる。

野生株(JY333)のシングルコロニーを独立に100個(それぞれNo.1-100とする)取得し、5 mLのSD培地で培養した。SD培地での培養を1週間行い、その後新しい5 mLのSD培地に培養液200 μ Lを植え継ぎ、1週間培養した。この植え継ぎ操作を5回行い、自然突然変異を発生させた。

自然突然変異の発生は時間経過と共に増加する不可避の現象である。増殖段階では主にDNA複製エラーが原因で自然突然変異が蓄積される(Gangloff *et al.*, 2017; Farlow *et al.*, 2015)。一方、休止期(quiescence)の間もまた、自然突然変異はDNA複製に依存しない方法で蓄積される(Gangloff *et al.*, 2017; Gangloff & Arcangioli, 2017; Makarenko *et al.*, 2020)。

以上の理由から、今回取得した長寿命変異株(F_0)には、長寿命原因遺伝子以外にも複数の変異が生じていることが予想される。そこで、長寿命変異株(F_0)と普通寿命の野生株を掛け合わせて(純化)、長寿命原因遺伝子以外の変異を少なくした長寿命株 F_1 を取得した。 F_0 と長寿命の F_1 を全ゲノムシーケンス解析することで、各No.に共通して見られる変異を長寿命化の原因変異候補として特定することにした。以下では、長寿命変異株 F_0 と F_1 の取得について順序立てて述べる。

第2項 スクリーニング結果

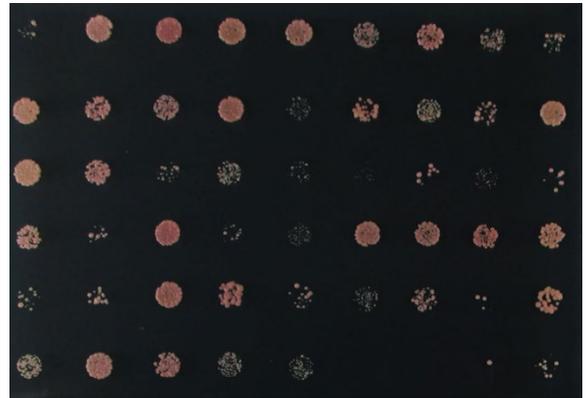
【経時寿命が延長する変異株 (F_0) の取得】

自然突然変異が蓄積した変異株を、phloxine B含有SD培地に塗布した。phloxine Bは死細胞を赤色に染色する試薬であるため、生きた細胞は比較的白色を呈する。これを指標として、各No.につき白いコロニーを1つ取得し、スポットテストによる寿命測定を行った。過去のスクリーニングで取得したL18を長生きコントロールとして使用し、L18よりもコロニー数が多いものを長寿命変異株として今後の解析に用いることにした。便宜上、この寿命測定を1stスクリーニングと呼ぶことにする。1stスクリーニングの結果として、培養して4日後と8日後のスポットテスト結果を掲載した(Figure 2-3-1)。培養8日後のスポットテストの結果を重視して長寿命変異株として選抜した。

(A1)



(A2)



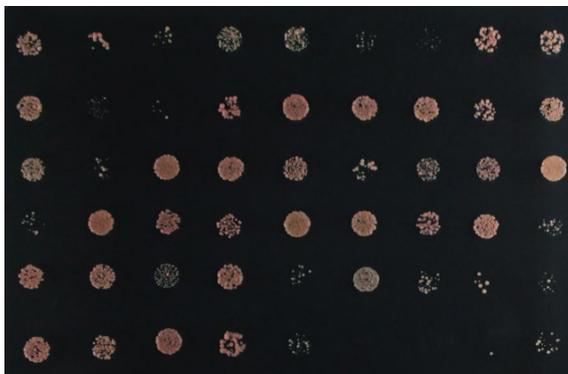
(A3)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41	42	43	44	45
46	47	48	49	50				WT L18

(B1)



(B2)



(B3)

51	52	53	54	55	56	57	58	59
60	61	62	63	64	65	66	67	68
69	70	71	72	73	74	75	76	77
78	79	80	81	82	83	84	85	86
87	88	89	90	91	92	93	94	95
96	97	98	99	100				WT L18

Figure 2-3-1. スポットテストによる寿命測定結果(1st スクリーニング)

SD 培地で培養して 4,8 日後に、50 倍希釈して 5 μ L を YE 培地にスポットした。

WT(JY333)を普通寿命のコントロール、L18 を長生きコントロールとして使用した

(A1-3) No.1-50 の寿命測定結果。A1 が培養 4 日後、A2 が培養 8 日後のスポットテストによる寿命測定結果。取得した長寿命変異株を A3 に示した(黄色で囲んだ)。

(B1-3) No.51-100 の寿命測定結果。B1 が培養 4 日後、B2 が培養 8 日後のスポットテストによる寿命測定結果。取得した長寿命変異株を B3 に示した(黄色で囲んだ)。

1st スクリーニングの結果から、合計 68 株の長寿命変異株の取得に成功した。残り 32 本の試験管に由来する株では、1st スクリーニングにより長寿命変異株の取得が出来なかったため、phloxine B 含有 SD 培地で比較的白色を呈するコロニーを各試験管につき独立に 3 個取得し、再度スポットテストによる寿命測定を行った。便宜上、このスクリーニングを 2nd スクリーニングと呼ぶことにする。2nd スクリーニングの結果を Figure 2-3-2 に掲載した。

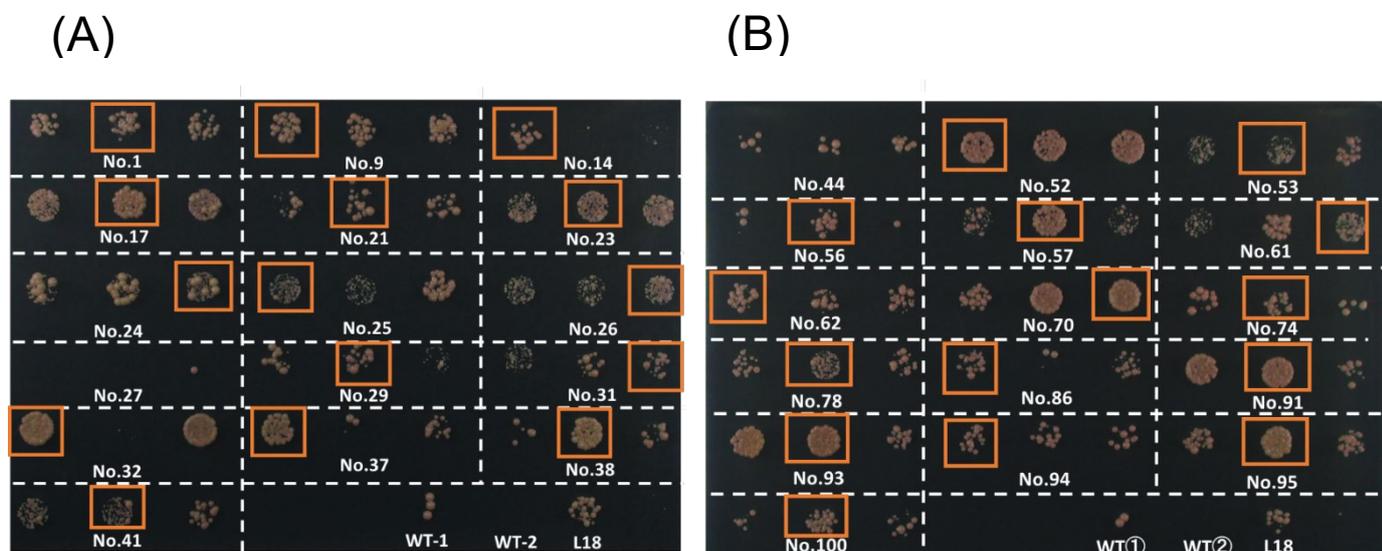


Figure 2-3-2. スポットテストによる寿命測定結果(2nd スクリーニング)

SD 培地で 8 日間培養した後、50 倍希釈して 5 μ L を YE 培地にスポットした。

WT-1 (JY333)と WT-2 (HM3802)を普通寿命のコントロール、L18 を長生きコントロールとして使用した。取得した長寿命変異株を橙色の枠線で囲んだ。

(A) No.1-41 の寿命測定結果。

(B) No.44-100 の寿命測定結果。

2nd スクリーニングの結果から、No.27 と No.44 を除いた合計 30 株の長寿命変異株の取得に成功した。

本研究で行ったスクリーニングにより、L18 よりもコロニー数が多かった合計 98 株を長寿命変異株として取得することに成功した (Table 2-3-1)。

Table 2-3-1. List of long-lived mutants (1st screening and 2nd screening)

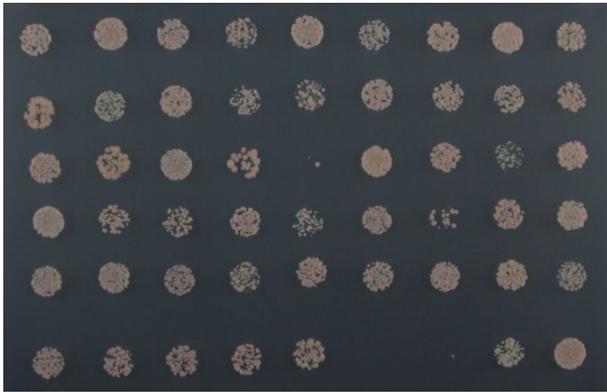
1st screening								2nd screening			
No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.10	No.1	No.9	No.14	No.17
No.11	No.12	No.13	No.15	No.16	No.18	No.19		No.21	No.23	No.24	No.25
No.20	No.22	No.28	No.30	No.33	No.34	No.35		No.26	No.29	No.31	No.32
No.36	No.39	No.40	No.42	No.43	No.45	No.46		No.37	No.38	No.41	No.52
No.47	No.48	No.49	No.50	No.51	No.54	No.55		No.53	No.56	No.57	No.61
No.58	No.59	No.60	No.63	No.64	No.65	No.66		No.62	No.70	No.74	No.78
No.67	No.68	No.69	No.71	No.72	No.73	No.75		No.86	No.91	No.93	No.94
No.76	No.77	No.79	No.80	No.81	No.82	No.83		No.95	No.100		
No.84	No.85	No.87	No.88	No.89	No.90	No.92					
	No.96	No.97	No.98	No.99							

【長寿命変異株(F₀)を、先行解析する株及び 1 群-3 群に分類した】

取得した 98 株の長寿命変異株を同時に全て解析するのは非常に困難であるため、先行解析する 3 株 (No.3,13,30) を選択することにした。1st スクリーニングの寿命測定でコロニー数が多かったもの(Figure 2-3-1)を主観的に選択し、CFU(Colony Forming Unit)による寿命測定(data not shown)で寿命延長効果が見られた No.3,13,30 を今後の先行解析に用いることにした。その後の解析で、No.30 については孢子形成率が悪く、解析を続けることが困難であったため、解析を中断することにした。

残りの 95 株については、長寿命であることの再現性を示すために再度スポットテストによる寿命測定を行った (Figure 2-3-3)。その結果、80 株で長寿命の再現性が確認できた。今後の解析を円滑に進めていくために、コロニー数を指標にして 80 株を 3 つのグループ(1 群-3 群)に分類した(Table 2-3-2)。

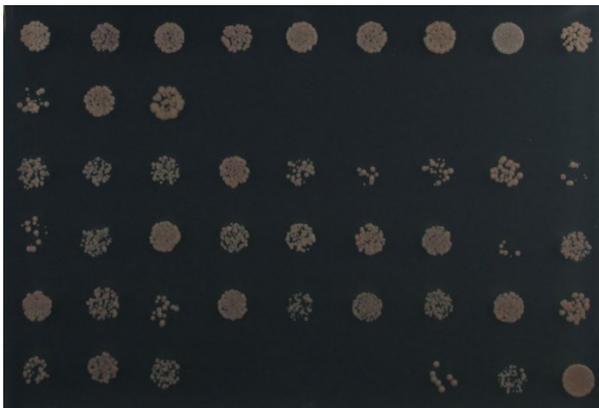
(A1)



(A2)

2	4	5	6	7	8	10	11	12
15	16	18	20	22	28	33	34	35
36	40	43	45	46	47	48	49	50
51	54	55	58	59	60	63	64	65
66	67	68	69	71	72	73	75	76
77	79	80	81	82	WT L18 No.3			

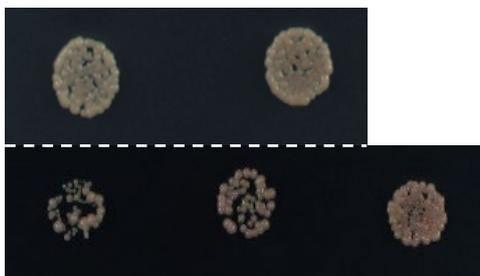
(B1)



(B2)

83	84	85	87	88	89	90	92	96	
97	98	99							
1	9	14	17	21	23	24	25	26	
29	31	32	37	38	41	52	53	56	
57	61	62	70	74	78	86	91	93	
94	95	100	WT L18 No.3						

(C1)



(C2)

19	39		
42	WT	No.3	

Figure 2-3-3. 95株のスポットテストによる寿命測定結果。SD培地で8日間培養した後、50倍希釈して5 μ LをYE培地にスポットした。WT(JY333)を普通寿命のコントロール、L18とNo.3(本研究で取得した長寿変異株)を長生きコントロールとして使用した。解析することにした長寿変異株を1群(黄色)、2群(青色)、3群(緑色)に分類し、A2,B2,C2に示した。コロニー数がL18よりも少ない株は今後解析しないことにした。

(A1) No.2-82(1stスクリーニング)の寿命測定結果。

(B1) No.83-99(1stスクリーニング)とNo.1-100(2ndスクリーニング)の寿命測定結果。

(C1) No.19,39,42(1stスクリーニング)の寿命測定結果。

Table 2-3-2. Classification of 1st - 3rd group

	1st screening	2nd screening
1群 No.3とコロニー数が 同程度である株	No.4 No.7 No.11 No.18 No.19 No.36 No.39 No.43 No.47 No.50 No.51 No.65 No.66 No.67 No.73 No.75 No.77 No.83 No.85 No.88 No.89 No.90 No.92 No.98	No.32 No.57 No.70 No.91
2群 L18よりもコロニー 数が多い株	No.2 No.5 No.10 No.12 No.28 No.33 No.48 No.58 No.60 No.64 No.68 No.71 No.72 No.84 No.87 No.96 No.99	No.17 No.38 No.41 No.52 No.56 No.78 No.95
3群 L18とコロニー数が 同程度である株	No.6 No.8 No.15 No.16 No.20 No.22 No.34 No.35 No.40 No.49 No.54 No.55 No.59 No.69 No.76 No.79 No.80 No.81 No.82	No.1 No.9 No.14 No.31 No.37 No.61 No.86 No.93 No.100

【戻し交配による長寿命変異株の純化 (F₁の取得)】

第3節-第1項で述べた理由から、長寿命変異株(F₀)には長寿命の変異以外の変異発生が予想される。そこで、大元の長寿命変異株 (F₀) と普通寿命の野生株を掛け合わせ、長寿命の原因遺伝子変異以外の変異を少なくした長寿命 F₁を取得した。ここでは、No.4の純化を例に挙げて説明する(Figure 2-3-4)。No.4では、純化により5つの F₁を独立に取得し、スポットテストによる寿命測定を行った。黄色で囲んだように長寿命の表現型を示すものと、野生株と同様にコロニーがあまり見られないものの二種類の表現型を示す F₁が得られた。長寿命の表現型を示す F₁には長寿命変異株(F₀)と同じ長寿命変異が保持されていると考えられる。そこで、長寿命変異株(F₀)と共通した長寿命原因変異を保持した長寿命の子孫株を取得し、これらを全ゲノムシーケンス解析することで、共通して含まれる変異を長寿命原因変異として特定できると判断した。

先行解析した2株(No.3とNo.13)については、四分子解析により F₁を取得し、寿命測定により長寿命の F₁を特定した。残りの95株については、ランダムスポア処理により子孫 F₁株を複数取得し、寿命測定により長寿命の F₁を特定した。次頁では、これらの詳細について述べる。

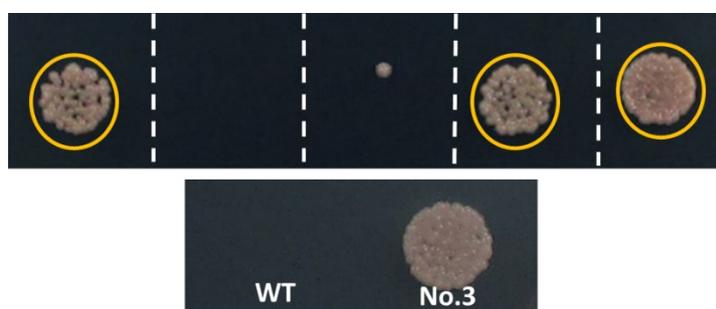


Figure 2-3-4. 戻し交配による長寿命 F₁ 株の取得を目的としたスポットテスト(培養 8 日後)
(上段)No.4(F₁)の寿命測定結果。
(下段)コントロールとして使用した WT(JY333)と本研究で取得した No.3 変異株

【先行解析した 2 株 (No.3,13) の全ゲノムシーケンス解析に至る過程】

これらの 2 株については、長寿命の表現型がいくつかの遺伝子変異に起因するのかを調べるために四分子解析を行った。長寿命変異株 (F_0 : h⁻) と普通寿命の野生株 (HM3802: h⁺) を掛け合わせ、単一の子嚢から 4 つの孢子(F_1) を単離し、スポットテストによる寿命測定を行った。その結果、野生株並みの寿命:長寿命=2:2 の表現型に分かれた (Figure2-3-5)。このことから、No.3 と No.13 の長寿命の表現型は一遺伝子変異に由来するものであることがわかった。

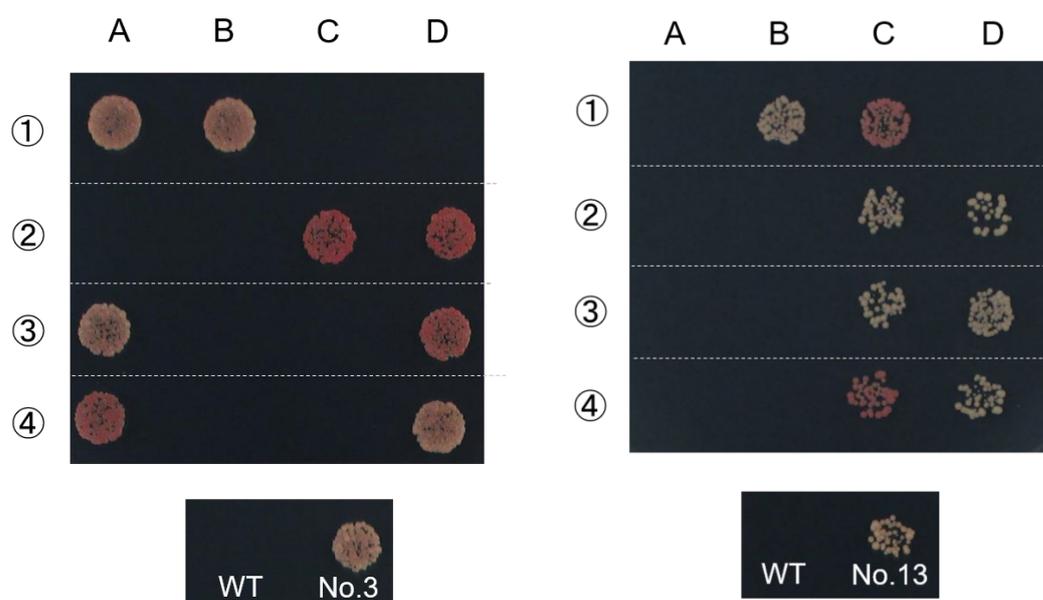


Figure 2-3-5. No.3,13 の四分子解析結果。(左側が No.3 で右側が No.13)

WT(HM3802)を普通寿命のコントロール、No.3,13(F_0)を長生きコントロールとして使用した。4 つの子嚢(①-④)から孢子(F_1)を 1 つずつ単離し(A-D)、寿命測定した。培養 8 日後、スポットテストを行ったところ、野生株並みの寿命:長寿命=2:2 の表現型に分かれた。

No.3 変異株では、純化を合計 3 回行い、長寿命の原因変異以外の変異を少なくした長寿 F_3 株を独立に 2 株取得し、 F_0 : 1 株と F_3 : 2 株の合計 3 株を全ゲノムシーケンス解析することにした。

No.13 変異株では、純化を合計 2 回行い、長寿命の原因変異以外の変異を少なくした長寿 F_2 株を独立に 3 株取得し、 F_0 : 1 株と F_2 : 3 株の合計 4 株を全ゲノムシーケンス解析することにした。全ゲノムシーケンス解析の結果は第 4 節で説明する。

No.32



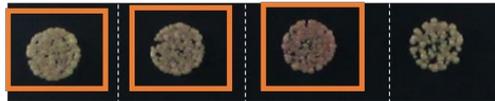
No.36

No.39

No.43

No.47

No.50



No.51



No.57

No.65

No.66

No.67

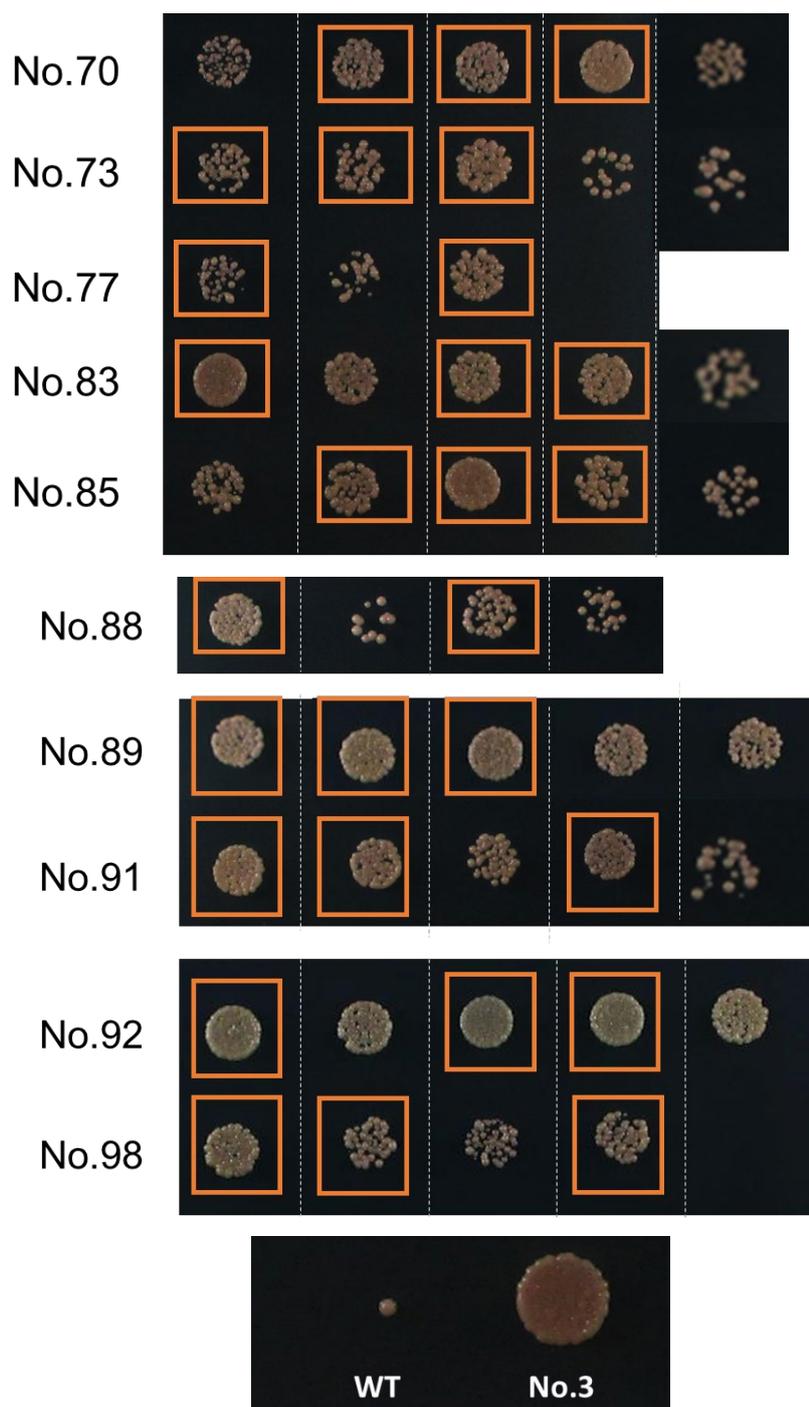
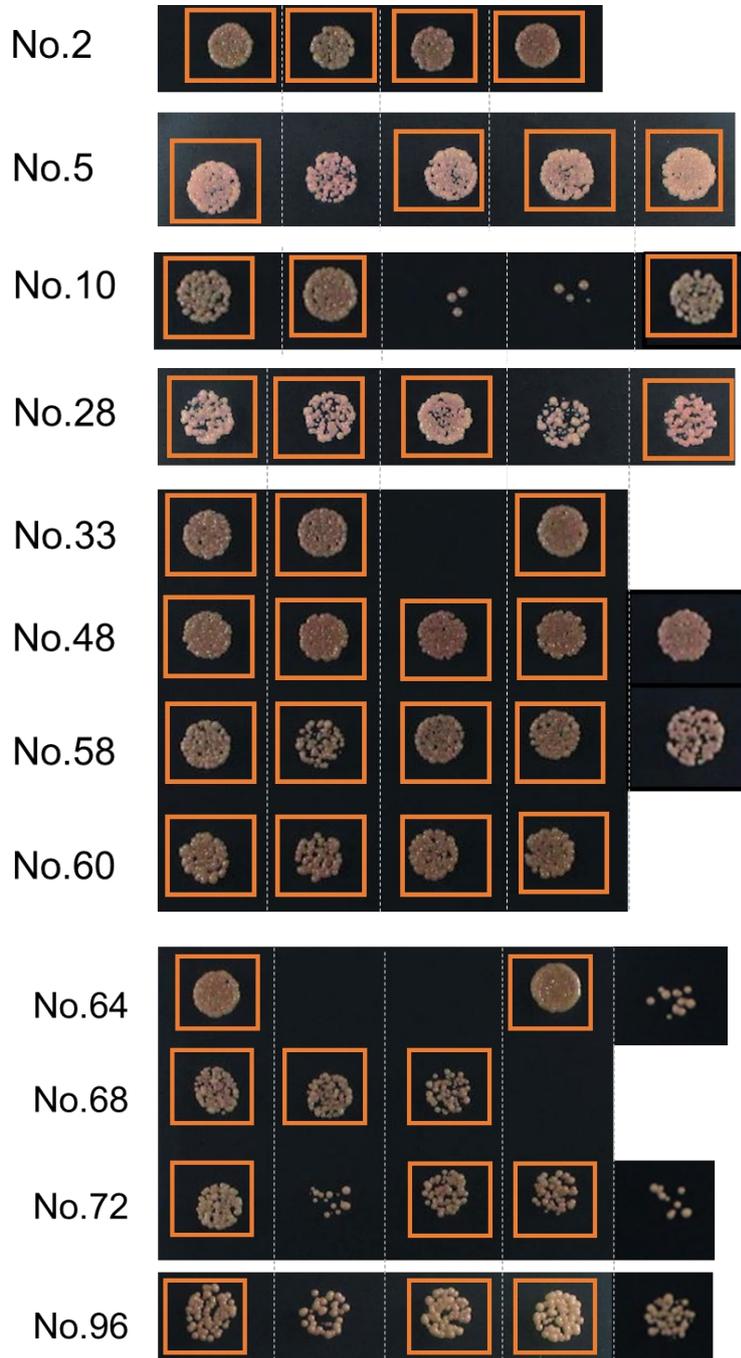


Figure 2-3-6. 1 群の長寿 F₁ のスポットテスト結果(培養 8 日後)。橙色の枠線で囲んだ菌株を全ゲノムシーケンス解析することにした。No.75 は再度のスポットテストで F₀ が寿命延長効果を示さなかったことから、この株については全ゲノムシーケンス解析を行わないことにした。

(A)



(B)

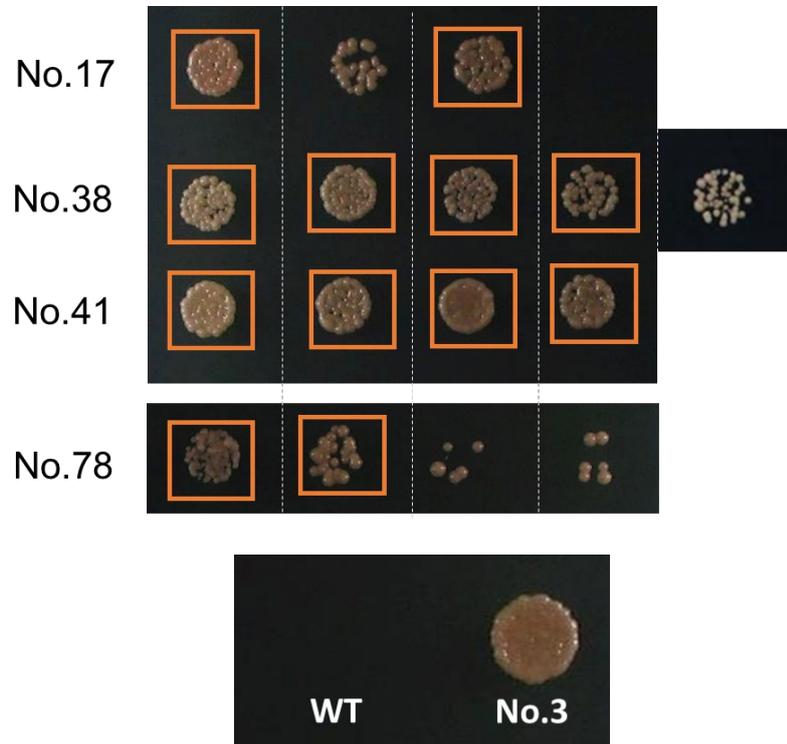


Figure 2-3-7. 2 群の長寿 F₁ のスポットテスト結果(培養 8 日後)。橙色の枠線で囲んだ菌株を全ゲノムシーケンス解析することにした。ただし、No.12,56 については長寿 F₁ の生育が悪く解析が困難であり、No.71,84,87,95,99 については長寿 F₁ が 2 個以上取得できなかったため、以上 6 株については全ゲノムシーケンス解析を行わないことにした。

(A) 1st スクリーニングで得た長寿命変異株(F₁)の寿命測定結果。

(B) 2nd スクリーニングで得た長寿命変異株(F₁)の寿命測定結果。

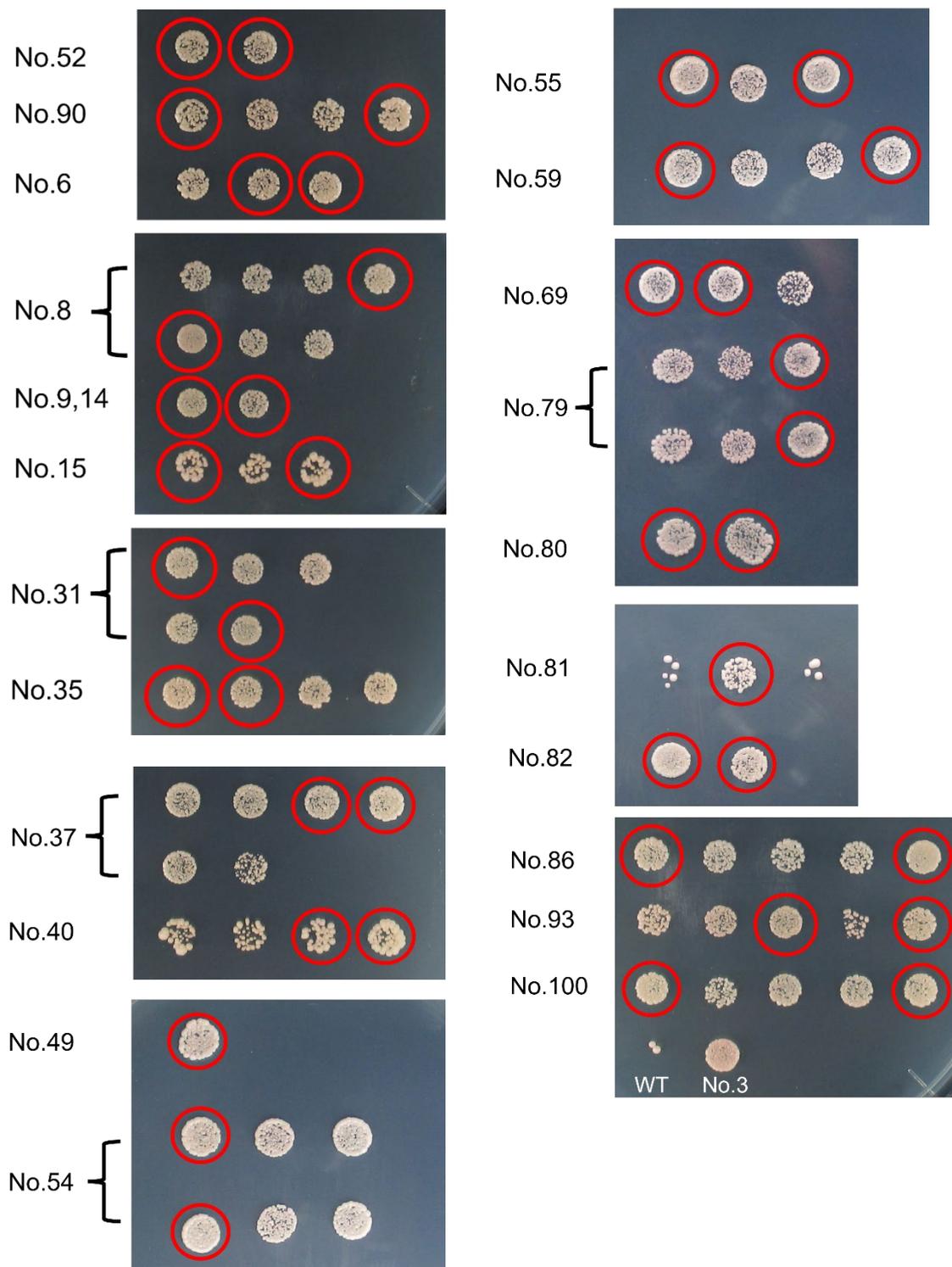


Figure 2-3-8. 3群, No. 52, 90 の長寿 F₁ のスポットテスト結果 (培養 4 日後)。赤色で囲んだ菌株を全ゲノムシーケンス解析することにした。

大規模スクリーニングで取得した長寿命変異株(全 98 株)の内、1 回目の全ゲノムシーケンス解析では 42 株を対象とすることにした(Table 2-3-3)。内訳は、1 群の 26 株と 2 群の 16 株である。2 回目の全ゲノムシーケンス解析では 3 群の 21 株、No.52(2 群)、No.90(1 群)の合計 23 株を対象とすることにした(Table 2-3-4)。尚、先行解析した No.3 変異株と No.13 変異株はこれらの 2 回にわたる解析よりも先に全ゲノムシーケンス解析した。

長寿命変異株の F_0 と F_1 を全ゲノムシーケンス解析し、これらの変異株に共通して見られる遺伝子変異を特定することにした。

Table 2-3-3. The list of long-lived mutants for the 1st whole genome sequencing

	1st screening	2nd screening
1 軍	No.4 No.7 No.11 No.18 No.19 No.36 No.39 No.43 No.47 No.50 No.51 No.65 No.66 No.67 No.73 No.77 No.83 No.85 No.88 No.89 No.92 No.98	No.32 No.57 No.70 No.91
2 軍	No.2 No.5 No.10 No.28 No.33 No.48 No.58 No.60 No.64 No.68 No.72 No.96	No.17 No.38 No.41 No.78

Table 2-3-4. The list of long-lived mutants for the 2nd whole genome sequencing

	1st screening	2nd screening
1 群と2群	No.52 No.90	
3 群	No.6 No.8 No.15 No.35 No.40 No.49 No.54 No.55 No.59 No.69 No.79 No.80 No.81 No.82	No.9 No.14 No.31 No.37 No.86 No.93 No.100

第4節 寿命関連因子の同定

第1項 序

第4節では、寿命関連因子の同定の詳細について説明する。具体的には、全ゲノムシーケンス解析(第2項)と四分子解析(第3項)の結果を総合して、寿命関連因子を同定した。さらに、第4項では、長寿命変異株の解析結果並びに同定した寿命関連因子群について述べた。

第2項 全ゲノムシーケンス解析結果

野生株(JY333 と HM3802)及び 1-3 群の長寿命変異株を全ゲノムシーケンス解析し、野生株には含まれず、各 No.株で共通して含まれる変異を長寿命の原因変異候補として特定した。野生株の全ゲノムシーケンス解析の結果は Supplemental Table 1,2 に、1-3 群の変異株の全ゲノムシーケンス解析から明らかになった coverage 数や発生した変異の個数の分布を示した図を Supplemental Figure S1 に掲載した。尚、発生した変異は SNPs(点変異)、Indel(塩基の挿入変異、あるいは欠失変異)、Large Deletion(大部分のゲノム配列の欠失変異)、Large Insertion(大部分のゲノム配列の挿入変異)、Large Substitution(大部分のゲノム配列が別のゲノム配列に置換される変異)に分類した。

全ゲノムシーケンス解析から、長寿命化を引き起こす原因遺伝子候補を Table 2-4-1 にまとめた(*印を付した株を今後着目した)。さらに、同定したこれらの原因変異候補を Figure 2-4-1 にまとめた。

Table 2-4-1. Each long-lived mutants and its candidates for longevity

Strain	Candidate genes for longevity	Description
*No.3	<i>ksg1</i>	serine/threonine protein kinase Ksg1
No.4	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
No.5	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
*No.7	<i>scw1</i>	RNA-binding protein Scw1
No.8	<i>tpp1</i>	trehalose-6-phosphate phosphatase Tpp1
No.9	<i>tpp1</i>	trehalose-6-phosphate phosphatase Tpp1
No.10	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
*No.11	<i>cmr2</i>	acetyl-CoA biosynthesis protein Cmr2
*No.13	<i>bgs1</i>	primary septum and spore wall linear 1,3-beta-glucan synthase catalytic subunit Bgs1

No.14	<i>tpp1</i>	trehalose-6-phosphate phosphatase Tpp1
No.17	<i>sdh1</i>	succinate dehydrogenase Sdh1
No.19	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
No.28	<i>tps3</i>	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase
No.31	<i>tpp1</i>	trehalose-6-phosphate phosphatase Tpp1
No.32	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
No.33	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
*No.36	<i>aly2</i> <i>sec1 (in intron)</i>	*arrestin-related endocytic ubiquitin ligase substrate adaptor Aly2 SNARE binding protein Sec1
No.37	<i>scw1</i>	RNA-binding protein Scw1
No.38	<i>scw1</i>	RNA-binding protein Scw1
No.40	<i>myo1</i>	myosin type I Myo1
No.41	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
No.43	<i>tpp1</i>	trehalose-6-phosphate phosphatase Tpp1
No.47	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
*No.48	<i>rer2</i>	cis-prenyltransferase Rer2
No.51	<i>scw1</i>	RNA-binding protein Scw1
No.52	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
No.54	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
*No.58	<i>rgf1</i>	RhoGEF for Rho1, Rgf1
*No.64	<i>rho1</i>	Rho family GTPase Rho1
No.66	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
No.67	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
No.70	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
No.80	<i>sdh1</i>	succinate dehydrogenase Sdh1
No.81	<i>bgs3</i>	cell wall 1,3-beta-glucan synthase catalytic subunit Bgs3
No.86	<i>tpp1</i>	trehalose-6-phosphate phosphatase Tpp1
No.89	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
No.91	<i>bst1</i>	GPI inositol deacylase Bst1
*No.92	<i>gaf1</i> <i>tpp1</i>	*DNA-binding transcription factor Gaf1 trehalose-6-phosphate phosphatase Tpp1
No.93	<i>pmc1</i>	vacuolar calcium transporting P-type ATPase P2 type, Pmc1

No.96	<i>rot1</i>	ER chaperone Rot1
*No.98	<i>plb1</i>	phospholipase B homolog Plb1

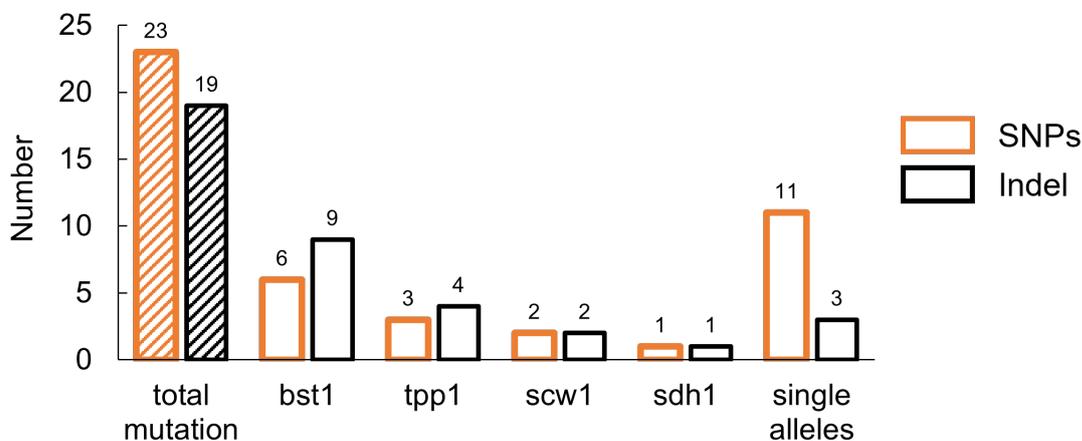


Figure 2-4-1. 全ゲノムシーケンス解析結果から明らかになった合計 42 個の長寿の原因変異候補を SNPs と Indel に分類した。*bst1* 遺伝子変異、*tpp1* 遺伝子変異、*scw1* 遺伝子変異、*sdh1* 遺伝子変異、そして単一遺伝子に一つの変異が同定されたもの(single alleles)に分類した。例えば、合計 15 株において *bst1* 遺伝子に変異が発生しており、内訳として 6 株に SNPs の変異が、9 株に Indel の変異が発生していた。

第3項 四分子解析

全ゲノムシーケンス解析結果から、長寿の原因遺伝子候補を特定することは可能だが、その変異が長寿の原因であると絞り込むには証拠として不十分である。そこで、四分子解析による遺伝学的解析から、各変異株の寿命延長効果がいくつの遺伝子変異に由来するのかを特定することにした。各長寿変異株(h-)と野生株 HM3802(h+)を接合させ、形成された単一の子囊から子囊胞子を単離し、スポットテストによる寿命測定を行った。一連の結果を Figure 2-4-2 に掲載した。

No.7,11,36,48,58,64 変異株では、野生株並の寿命：長寿命の表現型=2：2 に子囊胞子の表現型が分離した(Figure 2-4-2-A,B,C,D,E,F)。この結果は、これらの変異株の寿命延長効果が一遺伝子変異に由来することを支持するものである(Figure 1-2-3-B)。さらに、子囊胞子のセットを対象として、長寿の原因変異箇所を含む DNA フラグメントを PCR 増幅・精製しシーケンス解析を行ったところ、子囊胞子の寿命表現型と長寿の原因変異の有無が一对一に対応することが明らかとなった。

その一方で、No.92 変異株では他の変異株とは異なる結果を示した。子囊から子囊胞

子を単離し、スポットテストによる寿命測定を行ったところ、野生株並の寿命の表現型：長寿命の表現型=2:2あるいは1:3に子嚢胞子の表現型が分離した(Figure 2-4-2-G)。この結果から、No.92 変異株の寿命延長効果が複数の遺伝子変異に由来することが予想された。この仮説を検証するべく、子嚢胞子に長寿の原因変異の有無と寿命の表現型に相関関係が見られるのかをシーケンス解析により明らかにすることにした。No.92 変異株では F₀ を 1 株、長寿 F₁ を 3 株の合計 4 株を全ゲノムシーケンス解析した(Figure 2-3-6)。全ゲノムシーケンス解析結果した 4 株の内、*gaf1* 遺伝子変異(+ATTTTC の 5 塩基挿入変異)をもつ株が 1 株、*gaf1* 遺伝子変異(上記の 5 塩基挿入変異)と *tpp1* 遺伝子変異(+GAGTACG の 7 塩基挿入変異)を両方もつ株が 3 株あったため、長寿命の候補遺伝子として *gaf1*⁺と *tpp1*⁺が挙げられた(Table 2-4-1)(Figure 2-4-3-I,J)。尚、四分子解析では、*gaf1* 変異と *tpp1* 変異をもつ No.92 変異株を使用しており、*gaf1* 変異及び *tpp1* 変異により、これらの遺伝子の翻訳途中で終止コドンが発生する。

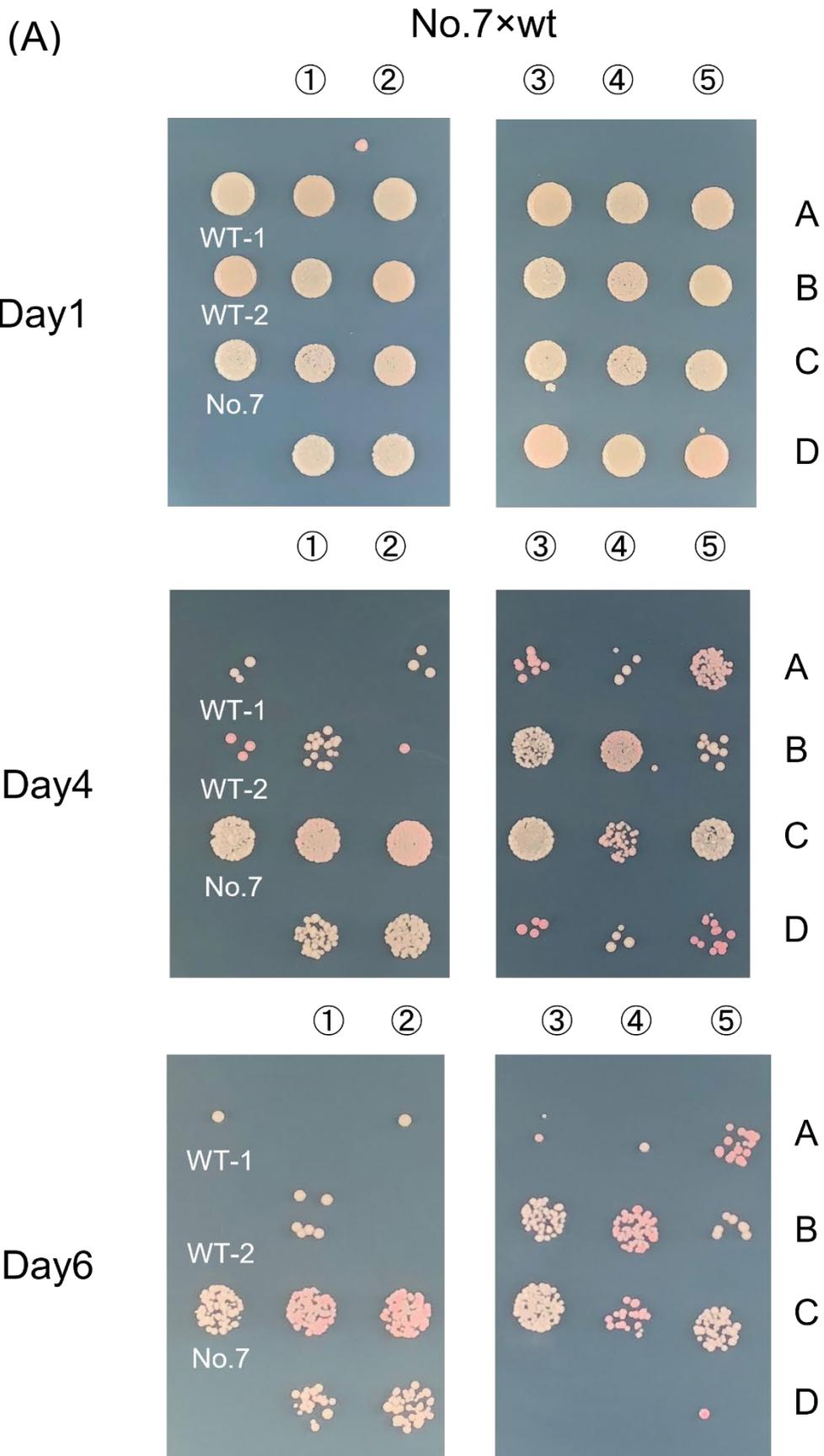
これらの遺伝子変異が寿命に影響を与えるのかを解析するため、子嚢①,②,⑧セットをシーケンス解析し、さらに単離した子嚢胞子についてコロニー形成率による寿命測定を行った。解析結果を Supplemental Figure S2-A,B に掲載した。

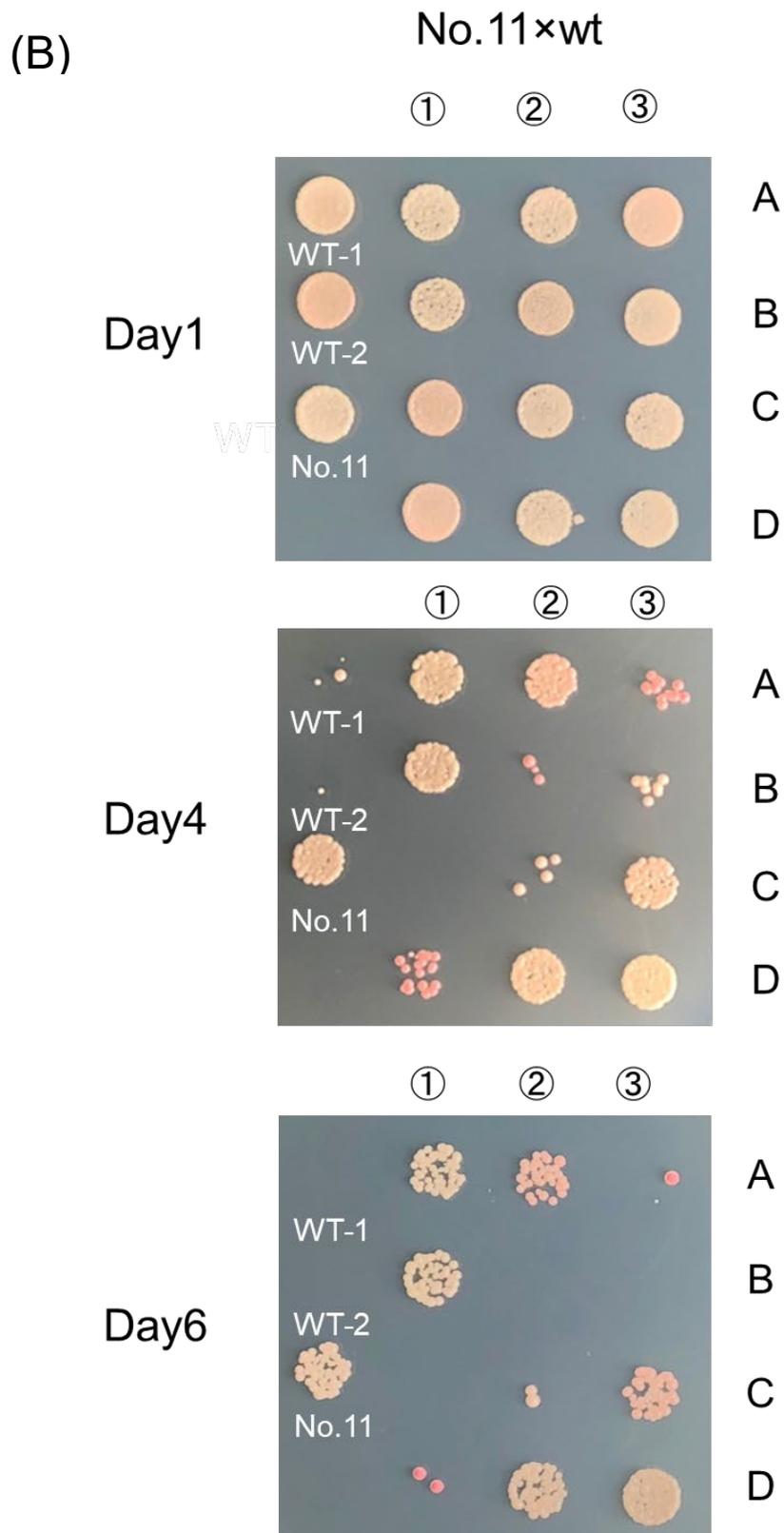
子嚢①では、子嚢胞子 C,D に *gaf1* 変異があり、子嚢胞子 B,D に *tpp1* 変異が見られた。これは、tetraptype(TT)の特徴である(Figure 1-2-3-C)。*gaf1* 変異 *tpp1* 変異の二重変異株(①-D)、*gaf1* 単独変異株(①-C)、*tpp1* 単独変異株(①-B)で寿命延長した、

子嚢②では、子嚢胞子 A,D に *gaf1* 変異があり、子嚢胞子 B,D には *tpp1* 変異が見られた。ところが、この子嚢胞子 B,D には、全ゲノムシーケンス解析した No.92 変異株に見られた *tpp1* の 7 塩基挿入変異が 3 つ連続した 21 塩基挿入変異が見られた。尚、塩基挿入箇所は全ゲノムシーケンス解析した No.92 変異株と同じであった。また、この 21 塩基挿入の *tpp1* 変異株(子嚢②-B)は野生株並みの寿命であった。*gaf1* 変異が含まれた変異株(②-A,D)において寿命延長効果が見られた。

子嚢⑧では、子嚢胞子 A,D に *gaf1* 変異と *tpp1* 変異の両方が見られ、子嚢胞子 B,C にはこれらの変異は見られなかった。これは parental ditype (PD)の特徴である(Figure 1-2-3-C)。*gaf1* 変異と *tpp1* 変異の両方が含まれた株(⑧-A,D)において寿命延長効果が見られた。

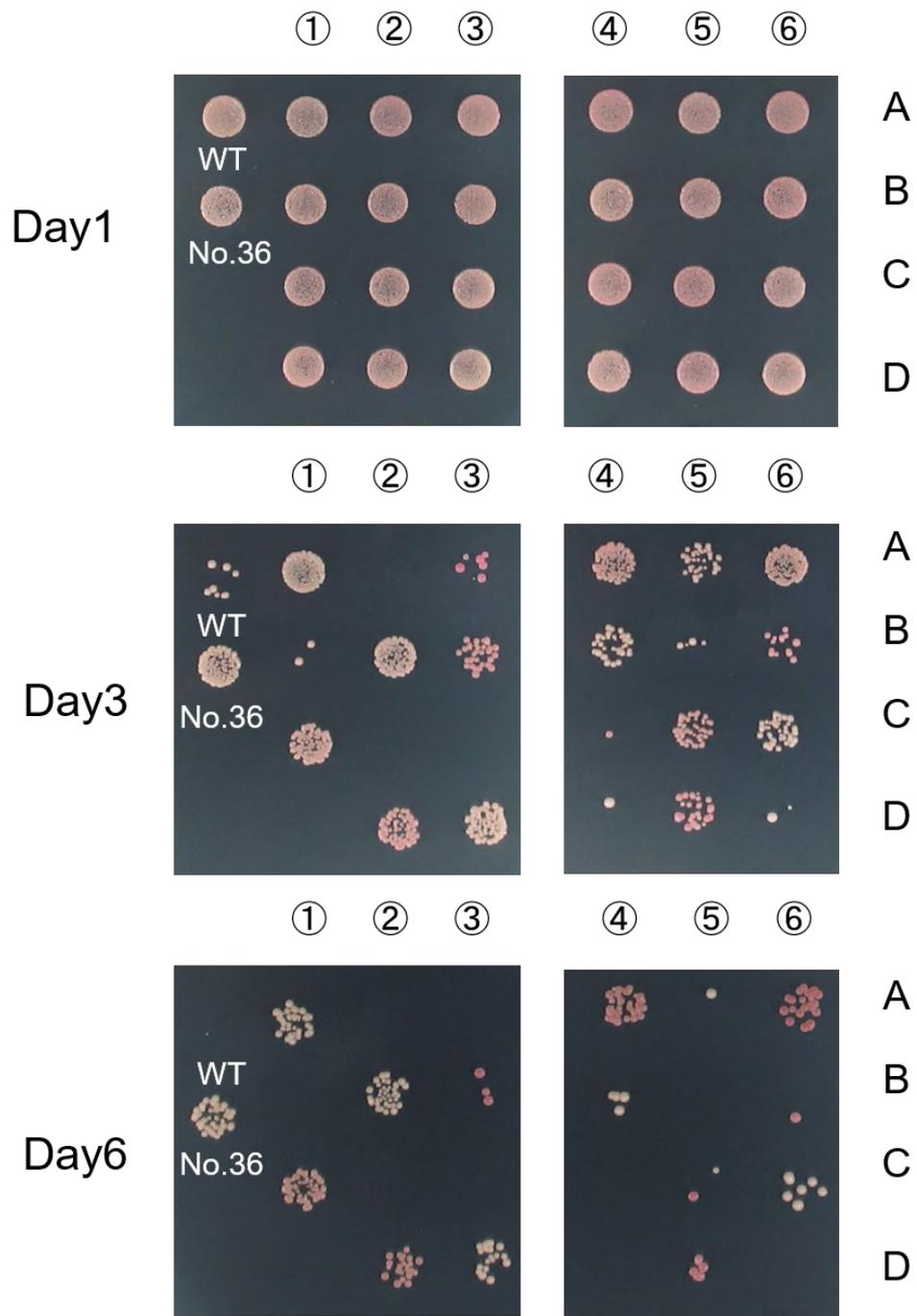
以上の寿命測定とシーケンス解析の結果を総合すると、*gaf1* 単独変異株(5 塩基挿入変異)で寿命延長すること(子嚢①-C, ②-A)が分かった。また、*tpp1* 単独変異株(7 塩基挿入変異)は寿命延長すること(子嚢①-B)が分かったが、現時点でこの 1 株しか取得されていないため、再現性は確認できていない。





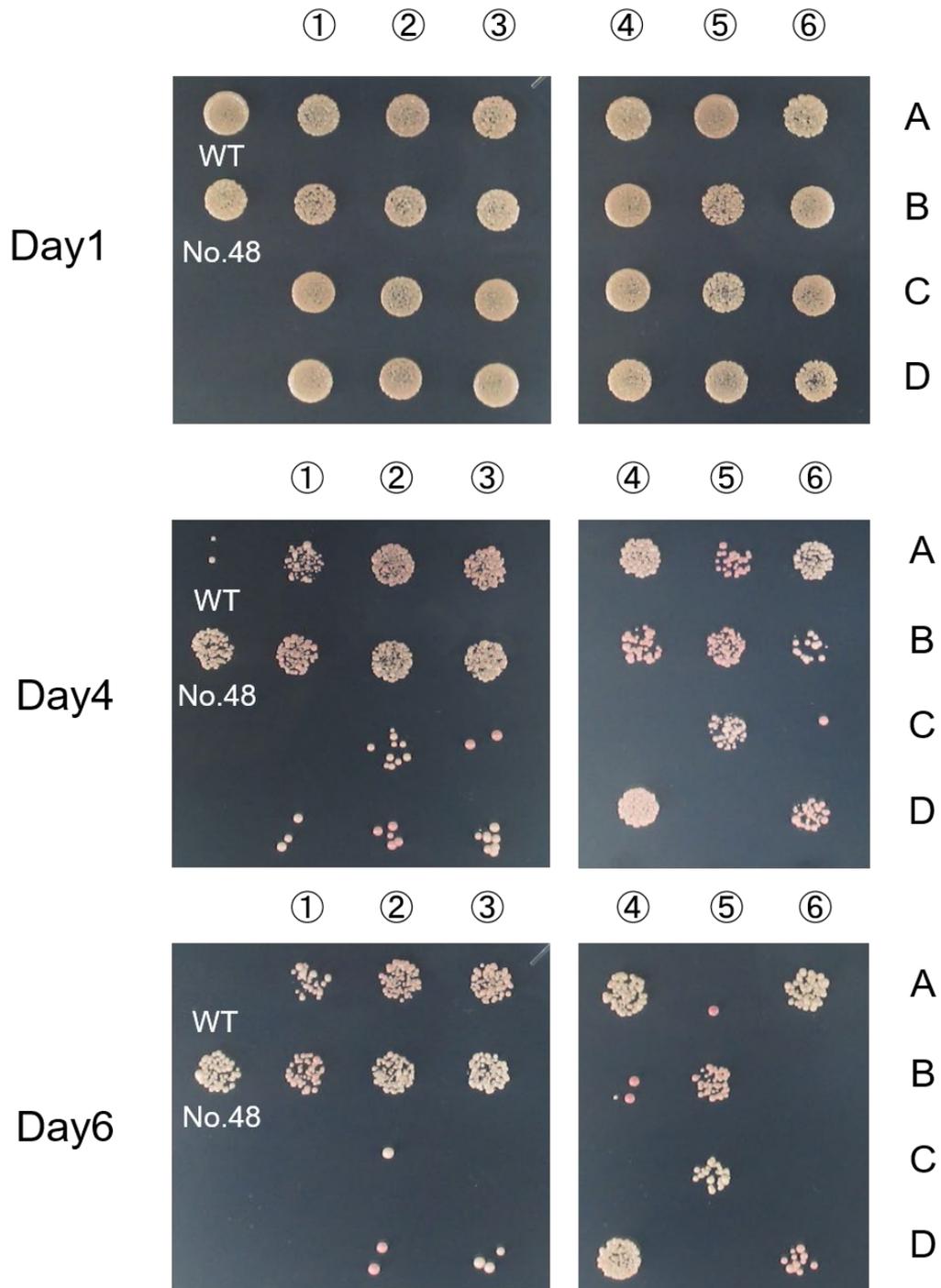
(C)

No.36 x wt



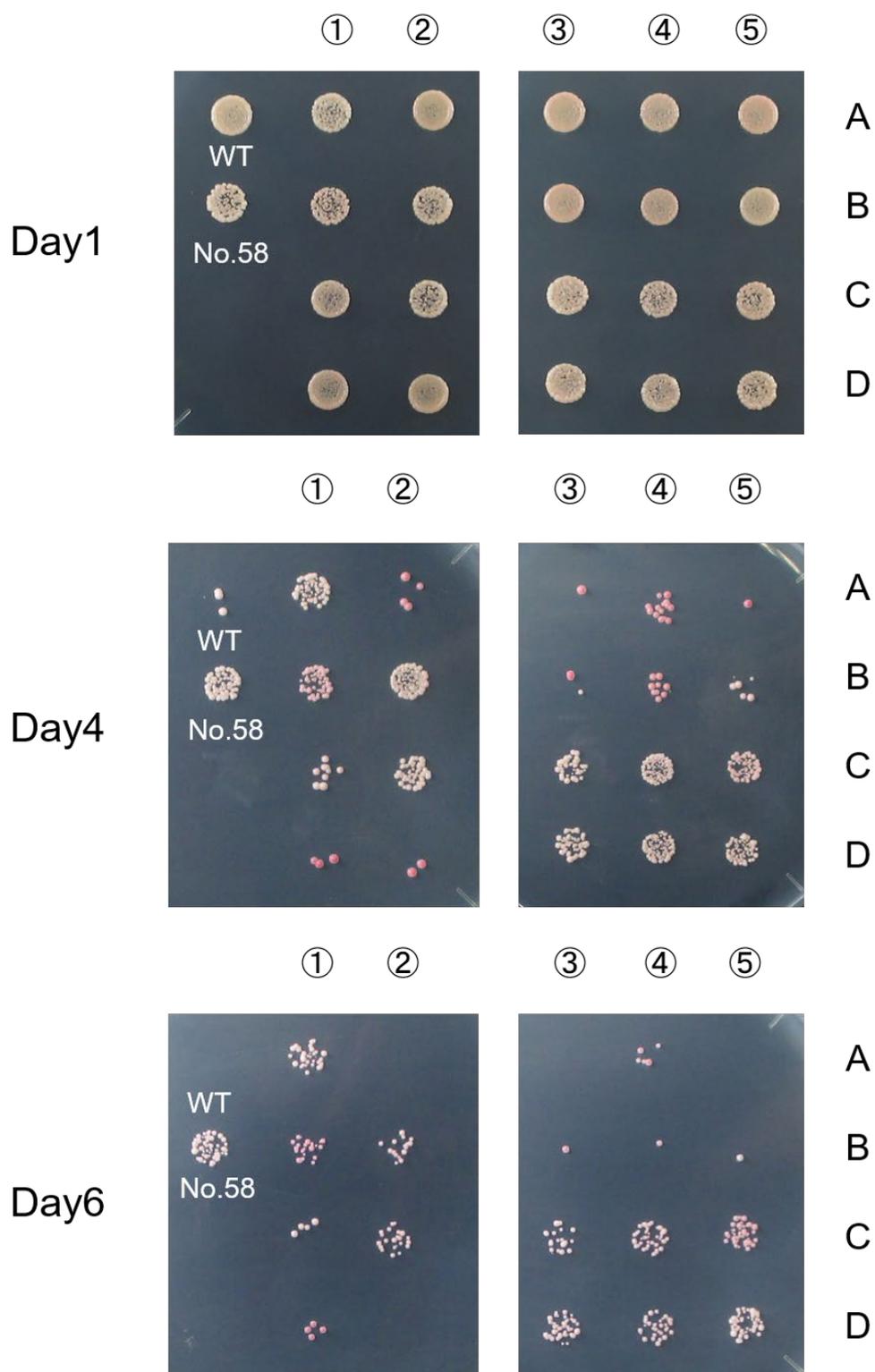
(D)

No.48 x wt



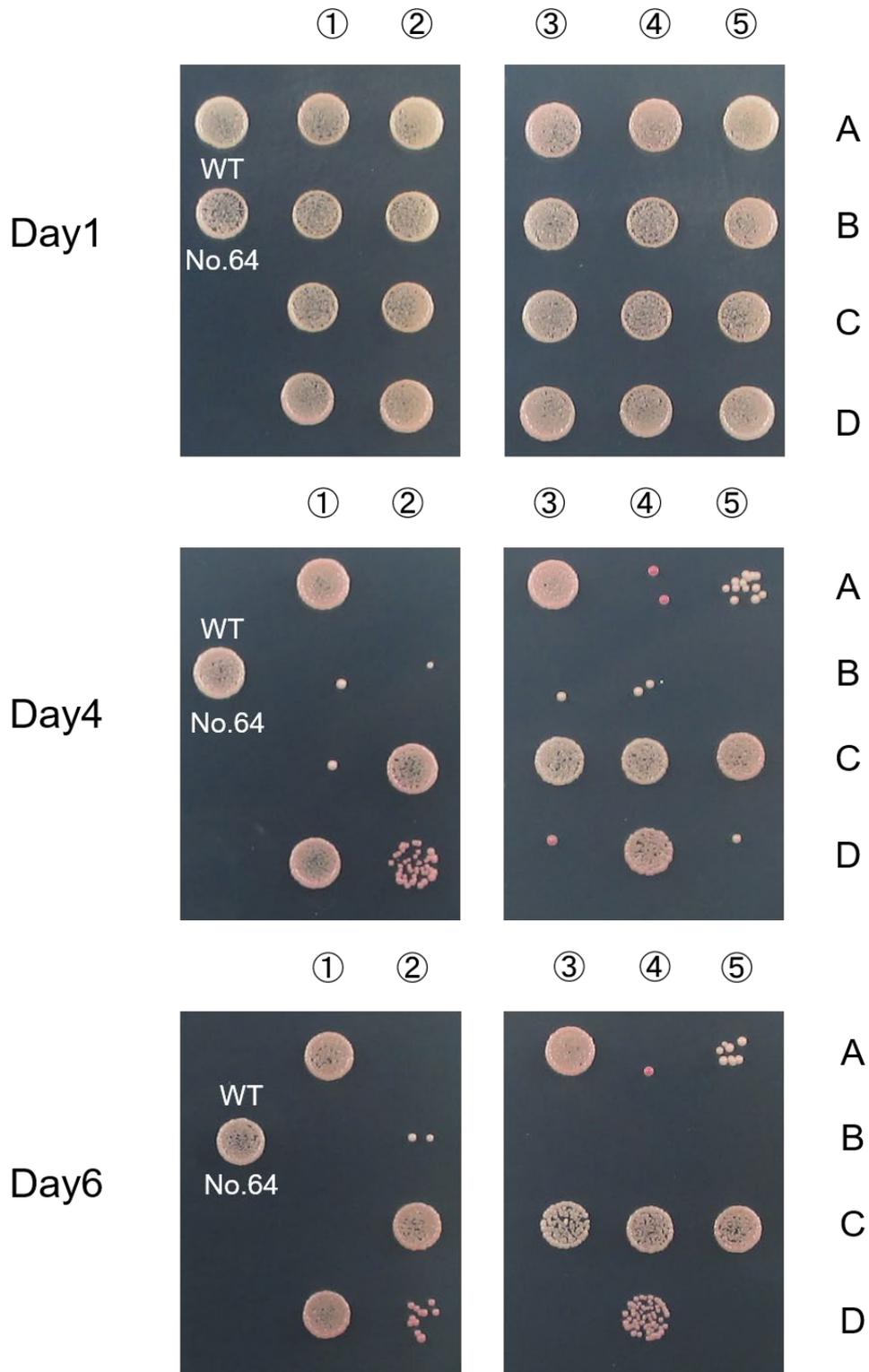
(E)

No.58 x wt



(F)

No.64 x wt



(G)

No.92 x wt

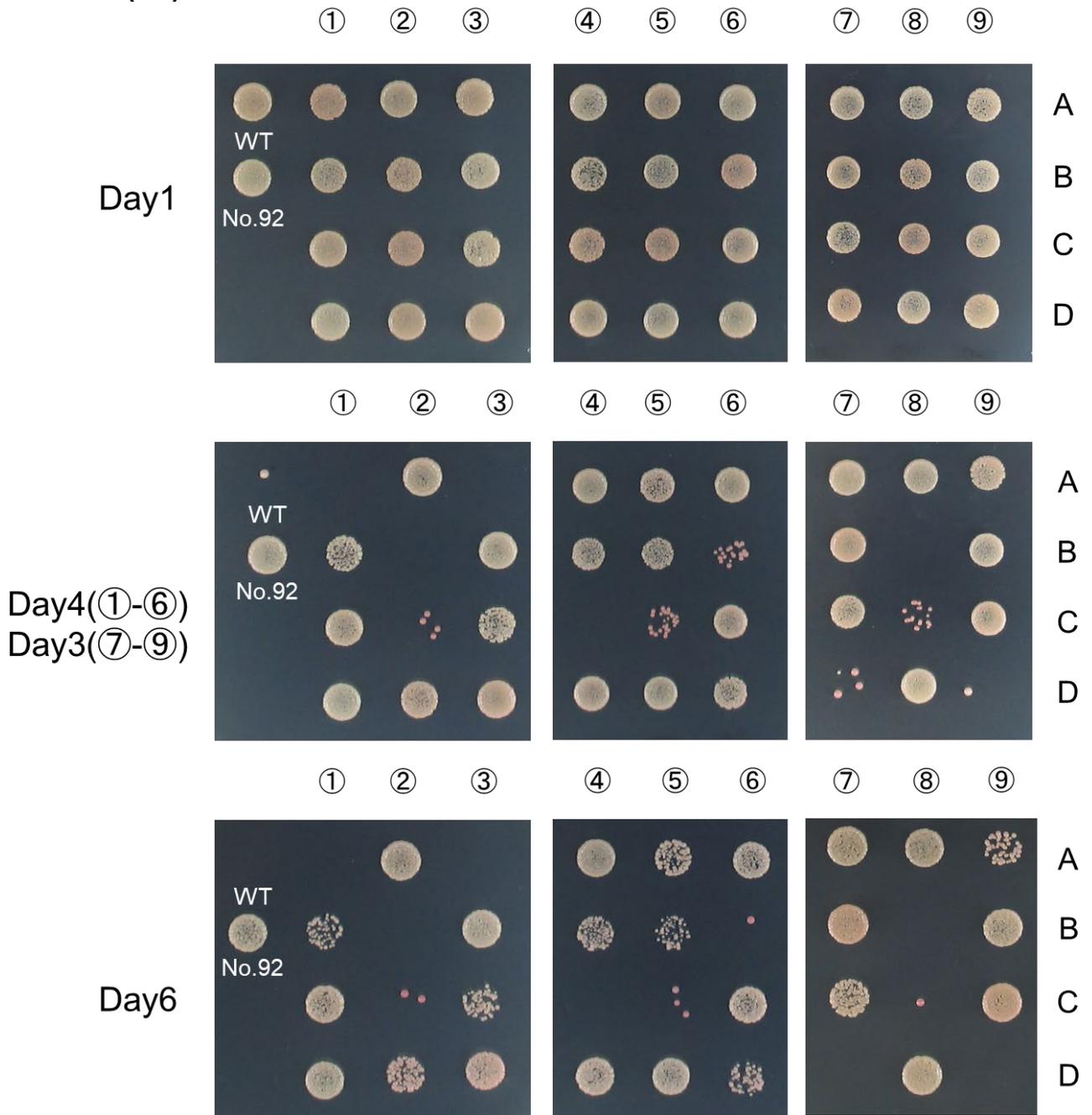


Figure 2-4-2. 各長寿命変異株における四分子解析のスポットテスト結果。

各 No.の長寿命変異株と野生株(HM3802)を掛け合わせ、形成された単一の子嚢(①-⑨)から子嚢胞子(A-D)を単離し、スポットテストによる寿命測定を行った。培養を開始して、1-6日後(写真の左側に記した日数)にサンプリングして、スポットテストを行った。図 A, B では WT-1(JY333), WT-2(HM3802)を普通寿命のコントロールとし、図 C-G では WT(JY333)を普通寿命のコントロールとした。

No.7,11,36,48,58,64 株では普通寿命と長寿命の表現型が 2:2 に分離するのに対し、No.92 株(図 G)では、②,⑧を除く子嚢 7 セットで普通寿命と長寿命の表現型が 1:3 に分離し、子嚢②,⑧では、2:2 に分離した。

- (A) No.7 の四分子解析結果。子嚢②と③のセットをシーケンス解析したところ、子嚢胞子②-C, D 及び③-B, C で *scw1* 遺伝子変異が見られた。これより、*scw1* 遺伝子変異と長寿命の表現型が1対1に対応することが明らかとなった。
- (B) No.11 の四分子解析結果。子嚢①のセットをシーケンス解析したところ、子嚢胞子①-A, B で *cmr2* 遺伝子変異が見られた。これより、*cmr2* 遺伝子変異と長寿命の表現型が1対1に対応することが明らかとなった。
- (C) No.36 の四分子解析結果。子嚢①と②のセットをシーケンス解析した。子嚢①セットでは、子嚢胞子①-A, C で *aly2* 遺伝子変異が見られ、①-B, D で *sec1* 遺伝子(イントロン)変異が見られた。一方、子嚢②セットでは、子嚢胞子②-B, D で *aly2* 遺伝子変異が見られ、②-C, D で *sec1* 遺伝子変異が見られた。これより、*aly2* 遺伝子変異と長寿命の表現型が1対1に対応し、*sec1* 遺伝子変異の有無は長寿命の表現型に影響を及ぼさないことが明らかとなった。
- (D) No.48 の四分子解析結果。子嚢②と④のセットをシーケンス解析した。子嚢胞子②-A, B 及び④-A, D で *rer2* 遺伝子変異が見られた。これより、*rer2* 遺伝子変異と長寿命の表現型が1対1に対応することが明らかとなった。
- (E) No.58 の四分子解析結果。子嚢②と③のセットをシーケンス解析した。子嚢胞子②-B, C 及び③-C, D で *rgf1* 遺伝子変異が見られた。これより、*rgf1* 遺伝子変異と長寿命の表現型が1対1に対応することが明らかとなった。
- (F) No.64 の四分子解析結果。子嚢①のセットをシーケンス解析した。子嚢胞子①-A, D で *rho1* 遺伝子変異が見られた。これより、*rho1* 遺伝子変異と長寿命の表現型が1対1に対応することが明らかとなった。
- (G) No.92 の四分子解析結果。*gaf1* 変異と *tpp1* 変異の両方をもつ No.92 変異株と HM3802 を掛け合わせ、四分子解析(スポットテスト)を行った。A-F とは異なり、普通寿命と長寿命の表現型が 1:3 あるいは 2:2 に分離した。

第4項 本研究で同定した寿命関連因子

変異株 No.1-100 の合計 100 株の解析結果を Table 2-4-2 に掲載した。橙色で塗られた No.株はスポットテストによる長寿の再現性が取れなかった、あるいは長寿 F₁ が十分に取得できなかったため、解析を中断した。「Samples for whole genome sequencing」の欄には、全ゲノムシーケンス解析した各 No.株のサンプル情報を記載した。括弧内の数字は独立に全ゲノムシーケンス解析した菌株数を意味する。例えば、No.2 変異株では長寿 F₁ 株を独立に 4 株全ゲノムシーケンス解析した。さらに、長寿命の原因遺伝子を各 No.株毎に示した。ただし、四分子解析などの詳細な解析がされていない遺伝子については括弧を付けた。

次に、これらの変異株の長寿命化の原因である変異箇所を遺伝子毎に図示し(Figure 2-4-3)、各寿命関連因子に関する知見を述べた。そして、過去の知見を踏まえて、これら各寿命関連因子群の関係図を Figure 2-4-4 に示した。

Table 2-4-2. The list of long-lived mutants

Strain number	Group	Samples for whole genome sequencing	gene
1	3 群		
2	2 群	F ₁ (4)	
3	先行解析	F ₀ (1) and F ₃ (2)	<i>ksg1</i>
4	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>bst1</i>
5	2 群	F ₁ (4)	<i>bst1</i>
6	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	
7	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>scw1</i>
8	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	
9	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (1)	
10	2 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>bst1</i>
11	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>cmr2</i>
12	2 群		
13	先行解析	F ₀ (1) and F ₂ (3)	<i>bgs1</i>
14	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (1)	
15	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	
16	3 群		
17	2 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	(<i>sdh1</i>)
18	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	

19	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>bst1</i>
20	3 群		
21			
22	3 群		
23			
24			
25			
26			
27			
28	2 群	F ₁ (4)	(<i>tps3</i>)
29			
30	先行解析		
31	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	(<i>tpp1</i>)
32	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>bst1</i>
33	2 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>bst1</i>
34	3 群		
35	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	
36	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>aly2</i>
37	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	(<i>scw1</i>)
38	2 群	F ₁ (4)	(<i>scw1</i>)
39	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	
40	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	(<i>myo1</i>)
41	2 群	F ₁ (4)	<i>bst1</i>
42			
43	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	(<i>tpp1</i>)
44			
45			
46			
47	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>bst1</i>
48	2 群	F ₁ (4)	<i>rer2</i>
49	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (1)	
50	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	
51	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	(<i>scw1</i>)
52	2 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	<i>bst1</i>

53			
54	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	
55	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	
56			
57	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	
58	2 群	F ₁ (4)	<i>rgf1</i>
59			
60	2 群	F ₁ (4)	
61	3 群		
62			
63			
64	2 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	<i>rho1</i>
65	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	
66	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>bst1</i>
67	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>bst1</i>
68	2 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	
69	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	
70	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>bst1</i>
71	2 群		
72	2 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	
73	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	
74			
75	1 群		
76			
77	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	
78	2 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	
79	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	
80	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	
81	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (1)	<i>(bgs3)</i>
82	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	
83	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	
84			
85	1 群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	
86	3 群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	

87	2群		
88	1群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	
89	1群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>bst1</i>
90	1群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	
91	1群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>bst1</i>
92	1群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>gaf1</i> <i>tpp1</i>
93	3群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	(<i>pmc1</i>)
94			
95	2群		
96	2群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	(<i>rot1</i>)
97			
98	1群	F ₀ (1) and F ₁ (3)	<i>plb1</i>
99	2群		
100	3群	F ₀ (1) and F ₁ (2)	

【寿命関連因子に関する知見】

今後着目することにした寿命関連因子に関する知見を述べる。

【Ksg1(No.3)】

Ksg1 は N 末端側に serine/threonine kinase domain、C 末端側に PH domain をもつ生育に必須のリン酸化酵素である(Figure 2-4-3-A)。本研究のスクリーニングで取得した Ksg1 長寿変異株(No.3 mutant)では、細胞膜局在に重要な PH domain 内に、一塩基変異に起因するナンセンス変異(540 W→STOP)が生じていた。Ksg1 は Gad8, Psk1, Pck1, Pck2, Pka1 などといった複数の AGC kinase をリン酸化する(Matsuo *et al.*, 2003; Nakashima *et al.*, 2012; Madrid *et al.*, 2015; Madrid *et al.*, 2017; Tang and McLeod, 2004)。また、Ksg1 は PH domain を有しており、PI(ホスファチジルイノシトール)との相互作用が Ksg1 の細胞膜局在を可能にしている(Mitra *et al.*, 2004; Madrid *et al.*, 2006)(Figure 2-4-4)。

Ksg1 についてのより詳細な知見は第 3 章で述べる。

【Sew1(No.7,37, 38, 51)】

全ゲノムシーケンス解析及び四分子解析結果より、No.7 変異株の長寿命化の原因遺伝子が *sew1*⁺であることが明らかとなった。本研究では解析対象とはしなかったが、

No.37,38,51 変異株においても、変異箇所は異なるが *scwI* 遺伝子に変異が見られた (Table 2-4-2)(Figure 2-4-3-C)。

Scw1 は RNA 結合タンパク質であり、細胞壁の構築や隔壁形成に必要である (Karagiannis *et al.*, 2002)。また、ヒトの RNA 結合タンパク質である RBPMS と RMPMS2 のオルソログである。以下では、RNA 結合タンパク質並びに細胞壁や隔壁合成における Scw1 の知見について述べる。

メッセンジャーRNA(mRNA)はゲノム DNA からタンパク質が翻訳されるための仲介役として働き、定常状態での mRNA 量は転写と分解の相反する生物学的プロセスにおいて決定される (Pérez-Ortín, 2007)。RNA 結合タンパク質は、標的転写産物の UTR 上の *cis* 領域に結合し、RNA 分解の誘導、さらに翻訳抑制に関与する (Mazumder *et al.*, 2003)。ここでは RNA 結合タンパク質は、mRNA 分解の中核を担う要素と mRNA の相互作用を調節する役割を果たしている (Pérez-Ortín *et al.*, 2013)。また、先行研究から、RNA 結合タンパクが結合することで、不安定化する mRNA だけでなく、より安定化 (分解遅延) する mRNA も存在することが明らかとなっている (Hasan *et al.*, 2014)。

Scw1 は 3' UTR にあるモチーフに結合することが示唆されている (Hasan *et al.*, 2014)。*scwI* 遺伝子の欠損により、発現変動する遺伝子を網羅的に解析した。すると、発現量の増加が見られた遺伝子には、細胞周期特異的に変動する遺伝子や細胞壁の合成や細胞質分裂に必要な遺伝子が多く含まれていることが分かった (Hasan *et al.*, 2014)。これらの結果から、Scw1 は細胞質分裂に関わる SIN 経路 (Septation initiation network) を負に制御しており (Simanis *et al.*, 2015; Karagiannis *et al.*, 2002)、また Scw1 が細胞周期に関わることを示唆された (Jin *et al.*, 2003; Hasan *et al.*, 2014)。

Scw1 の標的 mRNA の 3'UTR 上への結合はゲノムの安定性にも影響する。まずは、ゲノムの安定性に関連する R-loop の形成について説明する。RNA は転写の前後でゲノム DNA とアニーリングして、RNA-DNA ハイブリッド鎖を形成し、一本鎖 DNA が解離することがある (Costantino & Koshland, 2015)。このような核酸構造は R-loop と呼ばれる。この構造は、RNA の修飾、スプライシング、核外輸送、RNA 分解といった RNA プロセシングの機能不全により増加する傾向にある (Costantino & Koshland, 2015)。老化細胞では Scw1 のタンパク質量は減少し、 $\Delta scwI$ では R-loop が増加することが分かっている (Ellis *et al.*, 2021)。それにより、老化細胞で Scw1 の機能が低下すると、新生標的 mRNA の 3'末端が露出し、鋳型 DNA 中の相補的な配列と再び結合できるようになり、結果として R-loop が形成され、ゲノムの不安定性を引き起こす可能性がある (Ellis *et al.*, 2021)。

【細胞壁合成関連因子：Bgs1(No.13), Rgf1(No.58), Rho1(No.64)】

全ゲノムシーケンス解析及び四分子解析の結果から、本研究のスクリーニングで取得した No.13, 58, 64 変異株の長寿命化の原因はそれぞれ *bgs1*, *rgf1*, *rho1* の一塩基変異であることが分かった(Table 2-4-2)(Figure 2-4-3-B, G, H)。次に、これらの因子についての知見について述べる。

細胞壁は細胞膜の外側に位置しており、物理的ストレスを感知し、防御する役割を果たしている(Neeli-Venkata *et al.*, 2021)。細胞壁の主要な構成成分は β (1,3)-D-グルカンと α (1,3)-D-グルカンであり、細胞壁多糖類の内、前者は 50-54%を、後者は 28-32%を占めている(Durán & Pérez, 2004)。分裂酵母において、 β (1,3)-D-グルカンの触媒サブユニットをコードする遺伝子は *bgs1* から *bgs4* の四種類があり、*bgs1*, *bgs3*, *bgs4* は増殖時に、*bgs2* は孢子形成時における細胞壁合成に必須の遺伝子である(Cortés *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2003; Cortés *et al.*, 2005)。生化学的解析から、GTP 結合型の Rho1 が調節サブユニットとして機能し、細胞壁合成が活性化されることが明らかにされている(Mazur & Baginsky, 1996; Arellano *et al.*, 1997)。次に、Rho1 の活性調節について述べる。

Rho1 GTPase は細胞壁 β (1,3)-D-グルカン合成及び形態形成の制御のために必要な生存に必須のタンパク質である(Arellano *et al.*, 1996)。GTPase はグアニンヌクレオチド交換因子(GEFs)により、GDP 結合型から GTP 結合型に変換されることで活性化され、逆に GTPase 活性化タンパク質(GAPs)により GTP 結合型から GDP 結合型に変換されることで不活性化される。Rho1 は GEFs である Rgf1, Rgf2, Rgf3 により活性化され(García *et al.*, 2006; Tajadura *et al.*, 2004; Morrell-Falvey *et al.*, 2005; Mutoh *et al.*, 2005)、GAPs である Rga1, Rga5, Rga8 により不活性化される(Nakano *et al.*, 2001; Calonge *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003)。

また、Rho1 は cell integrity MAPK 経路(CIP)の上流活性化因子としての機能を有している(Cruz *et al.*, 2013)。GTP 結合型の Rho1 と Rho2 は Protein kinase C のホモログである Pck1 と Pck2 と結合することで、Pck1 と Pck2 を安定化させる(Arellano *et al.*, 1999; Villar-Tajadura *et al.*, 2008)。さらに、Rho1 を仲介とした安定化は Pck2 の T842 残基のリン酸化の増加を促進させる(Sayers *et al.*, 2000)。

以上のように、細胞壁合成に関連した因子 Bgs1, Rgf, Rho1 を新規の寿命関連因子として同定することに成功した。

【 α -arrestin protein family Aly2(No.36)】

No.36 変異株の長寿命の原因遺伝子が *aly2⁺*であることが分かった。ここでは、新規寿命関連因子 Aly2 及び α -arrestin family の知見について述べる。

細胞は周囲の環境に応じて栄養の取り込みを厳密に制御している。栄養の取り込みが不要である状況下では、それらの取り込みに関与する膜タンパク質は分解される。近年、酵母を用いた解析から、グルコース、アミノ酸、グリセロリン脂質などの輸送体が α -arrestin protein family を仲介としたエンドサイトーシスによる分解を受けることが明らかとなっている(Toyoda *et al.*, 2021; Nakase *et al.*, 2013; Robinson *et al.*, 2022; Kahlhofer *et al.*, 2021)。また、 α -arrestin は proline-rich な PY motif(PPxY, LPxY)を C 末端側に有しており、ユビキチンリガーゼである Nedd4 family の WW domain と相互作用することを可能にしている(Hatstat *et al.*, 2021)。これより、 α -arrestin はエンドサイトーシスの主要な因子であるユビキチンリガーゼのアダプターとして機能している(Kahlhofer *et al.*, 2021; Becuwe *et al.*, 2012)。

分裂酵母では、arrestin 様ドメインを含むタンパク質をコードする遺伝子として 11 種類もの遺伝子が同定されている(Toyoda *et al.*, 2021)。本研究で新規寿命関連因子として同定された Aly2 は arrestin 様の N-terminal ドメイン、C-terminal ドメインそして PY motif を有している(Toyoda *et al.*, 2021)(Figure 2-4-1-E)。No.36 変異株では開始コドンから数えて 1758 番目の塩基 G が欠失しており、これは二つの PY motif の間に位置する(Figure 2-4-3-E)。この変異により、(欠失) 変異箇所の約 60 塩基後に終止コドンが発生する。

【Cis-prenyltransferase Rer2(No.48)】

No.48 変異株の長寿命化の原因遺伝子は *rer2⁺*遺伝子であることが明らかになった。*rer2⁺*遺伝子は Cis-prenyltransferase である Rer2 をコードする遺伝子である。次に、この酵素に関する知見を述べる。

タンパク質のアスパラギンの NH₂ 基にオリゴ糖が付加する N 型糖鎖修飾は、真核細胞における主要な翻訳後修飾の一つである。そのオリゴ糖は dolichol と呼ばれるイソプレノイド脂質に付加しており、dolichol は複数のステップを経て形成される。Dolichol の合成過程において、イソペンテニルピロリン酸 (IPP) とファルネシルピロリン酸 (FPP) の縮合反応により、特定の鎖長を持つ直鎖状のポリプレニルピロリン酸が合成される。この反応を触媒しているのが *cis*-prenyltransferase (Rer2)である(Park *et al.*, 2014)(Figure 2-4-4)。Cis-prenyl 鎖の伸長は真核生物の糖タンパク質の生合成にとって不可欠であり(Fujihashi *et al.*, 2001)、この生合成が欠損すると、出芽酵母において ER 膜とゴルジ膜が異常に蓄積されることが報告されている(Sato *et al.*, 1999)。

【Transcription factor Gaf1 (No.92)】

No.92 変異株の長寿命化の原因遺伝子は *gaf1⁺* 遺伝子であることが明らかになった。転写因子 Gaf1 による寿命制御機構は第 1 章(TOR についての説明)に掲載した(Figure 1-2-5)。

【Phospholipase B Plb1(No.98)】

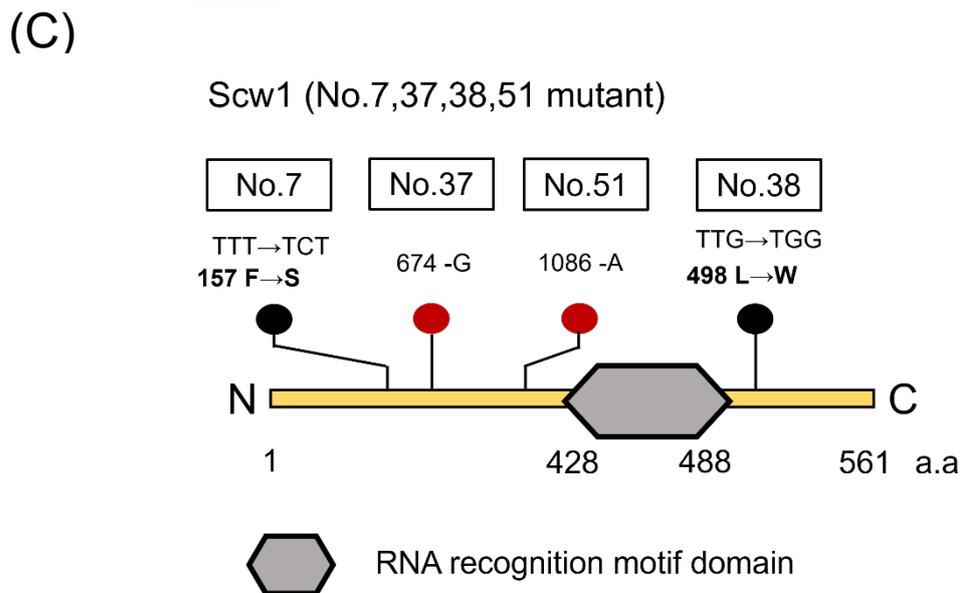
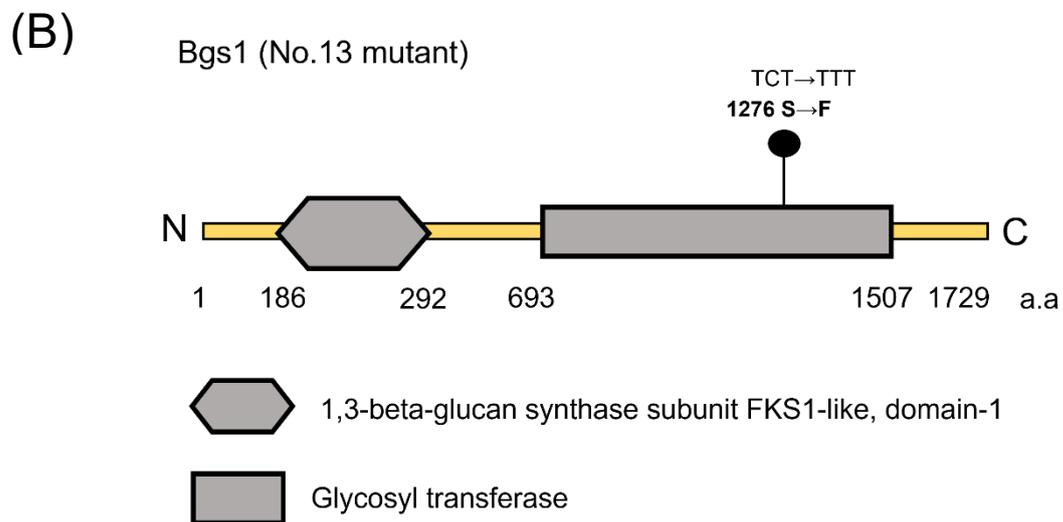
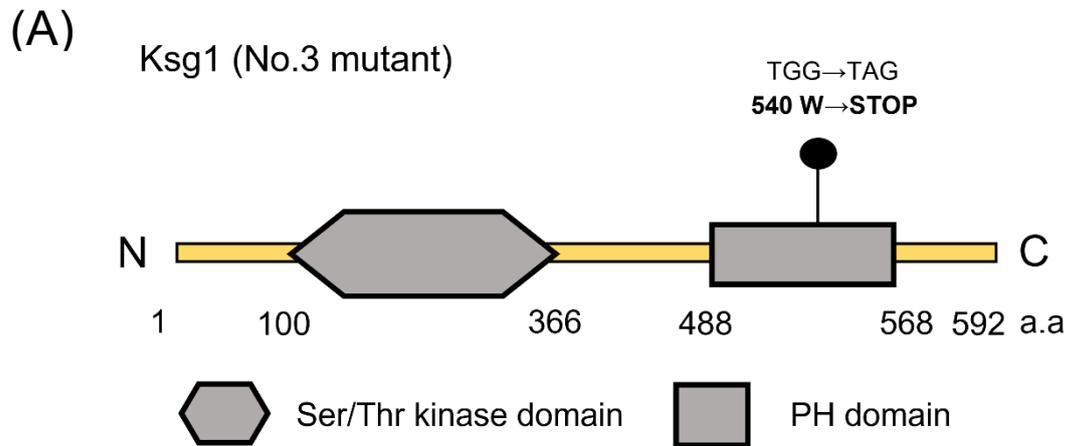
ホスホリパーゼ B(PLB)は菌類から哺乳類にまで保存された酵素である(Djordjevic *et al.*, 2010; Gassama-Diagne *et al.*, 1989; Masuda *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1994; Takemori *et al.*, 1998)。分裂酵母 Plb1 は通常の生育条件では必須ではないが、高浸透圧条件下では必須である(Yang *et al.*, 2003)。分裂酵母には、ホスホリパーゼ B をコードする遺伝子が *plb1⁺* を含めて 5 つあることが予想されている(Yang *et al.*, 2003)。出芽酵母では、細胞外でホスホリパーゼ B(PLB1, PLB2, PLB3) が phosphatidylinositol (PI) を glycerophosphoinositol(GroPIIns)に加水分解し、GIT1 により GroPIIns は細胞内に輸送される(Almaguer *et al.*, 2004; Patton-Vogt & Henry, 1998)。

分裂酵母では、Plb1 の生化学的機能は明らかにされていないが、出芽酵母 *GIT1* と相同性のある遺伝子については解析が進められている。分裂酵母では、出芽酵母 *GIT1* に相同性のある遺伝子として *tgp1⁺* (encoding glycerophosphodiester transmembrane transporter)が存在する。*tgp1⁺* は、long non-coding RNA(*nc-tgp1* RNA)により発現が厳密に制御されている(Ard *et al.*, 2014)。リン酸塩が十分ある条件では *tgp1⁺* 発現が抑制され、リン酸塩枯渇条件では *tgp1⁺* 発現抑制が解除されており、これは出芽酵母 *GIT1* の機能と類似性がある(Fisher *et al.*, 2005)。このことから、分裂酵母 *Tgp1* は出芽酵母 *GIT1* と同様の機能を保持していることが予想される(Figure 2-4-4)。

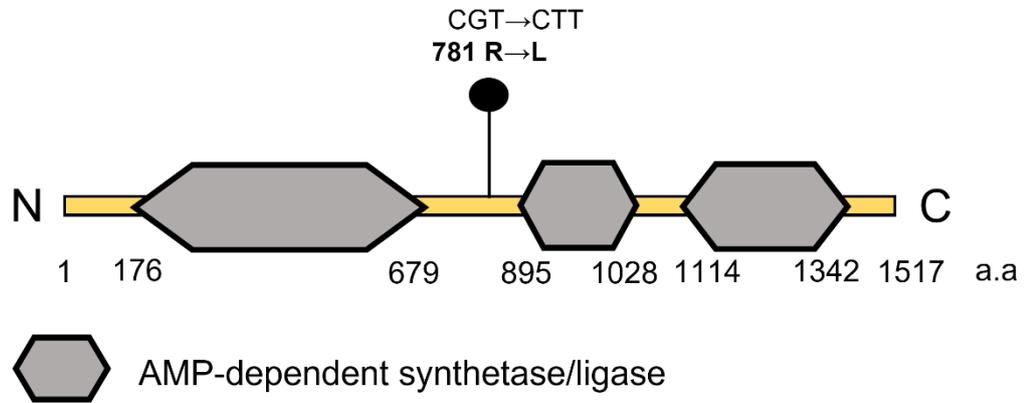
分裂酵母 Plb1 の生化学的機能は未解明のままであるが、本研究のスクリーニングで得た長寿命変異株 No.98 (Plb1)の解析がホスホリパーゼ B と経時寿命との関係、最終的にはホスホリパーゼ B の保存された機能解明につながることを期待される。

【GPI inositol deacylase Bst1(No.4,5,10,19,32,33,41,47,52,54,66,67,70,89,91)】

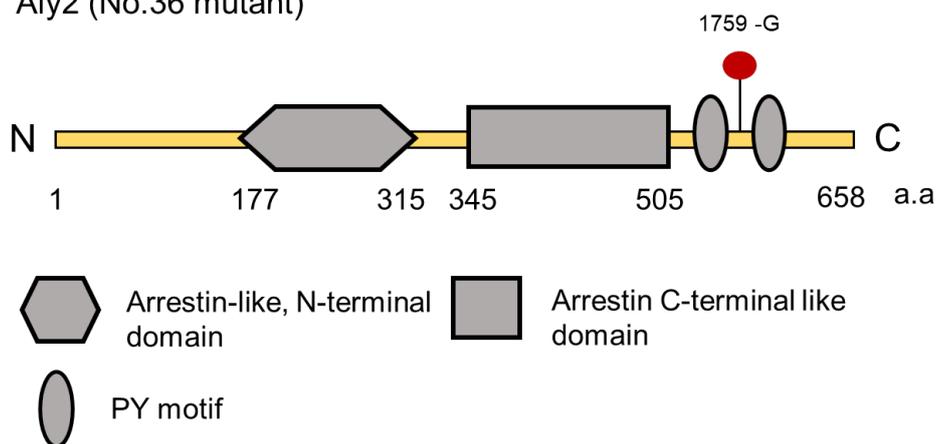
本研究の大規模スクリーニングでは、GPI inositol deacylase (GPI イノシトールの脱アシル化) をコードする *bst1⁺* 遺伝子が長寿命の原因遺伝子である変異株が 15 株取得された(Figure 2-4-3-L)。分裂酵母 Bst1 はヒト PGAP1、出芽酵母 Bst1 のオルソログである。出芽酵母や哺乳類細胞を用いた解析から、GPI イノシトール脱アシル化は GPI アンカー型タンパク質の小胞体(ER)からゴルジ体への細胞内輸送に重要であることが報告されている(Tanaka *et al.*, 2004)。しかし、分裂酵母 Bst1 の知見は少なく、その生化学的機能については明らかにされていない。



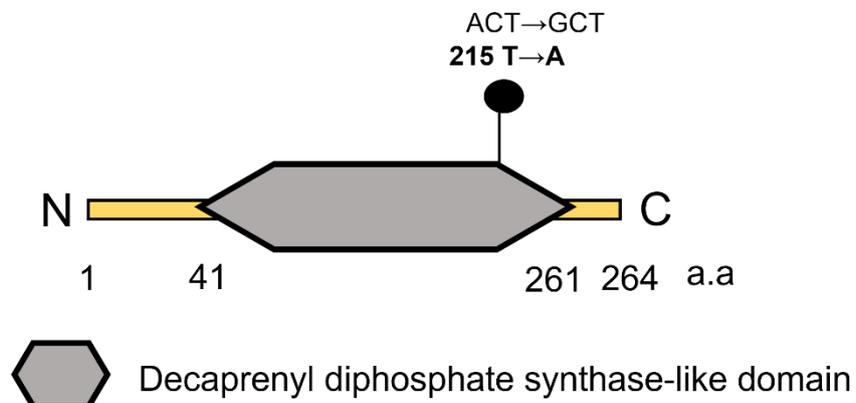
(D) Cmr2 (No.11 mutant)



(E) Aly2 (No.36 mutant)

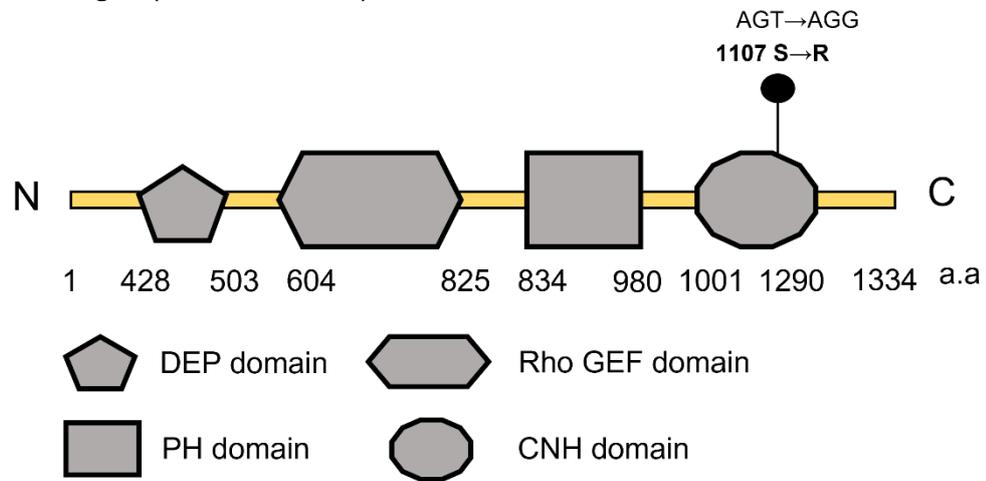


(F) Rer2 (No.48 mutant)



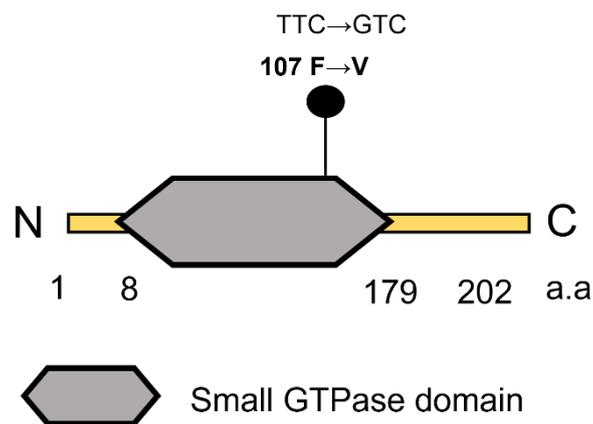
(G)

Rgf1 (No.58 mutant)



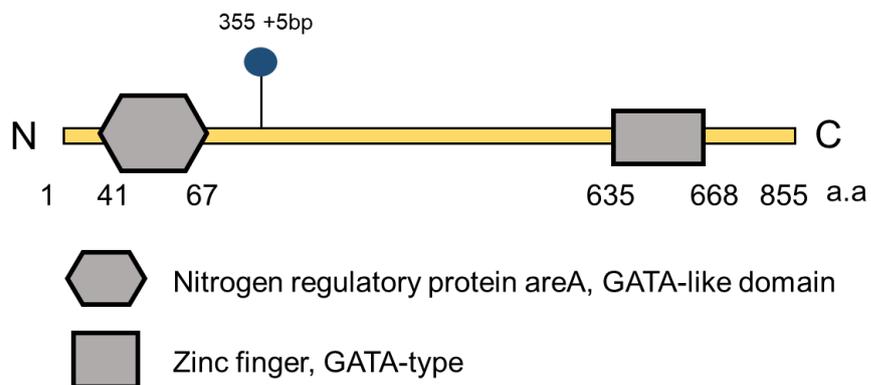
(H)

Rho1 (No.64 mutant)



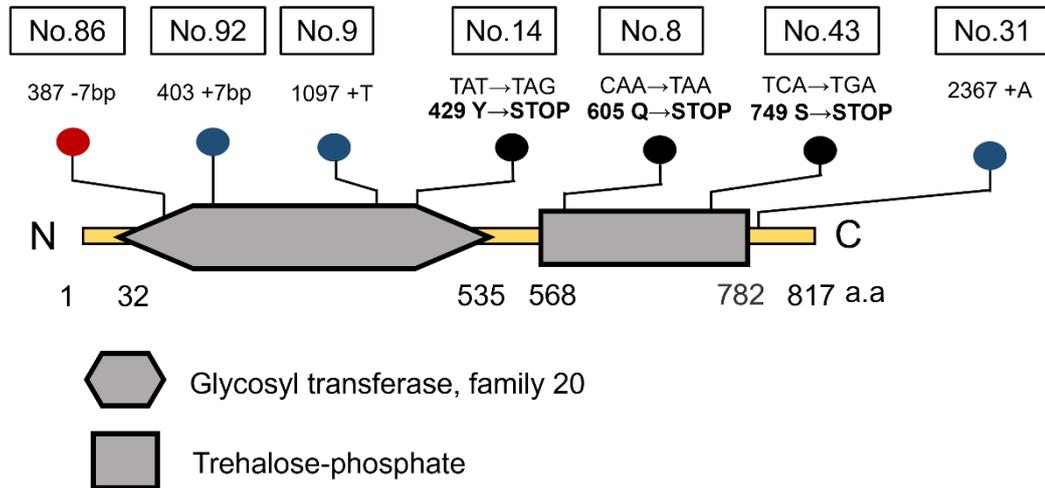
(I)

Gaf1 (No.92 mutant)



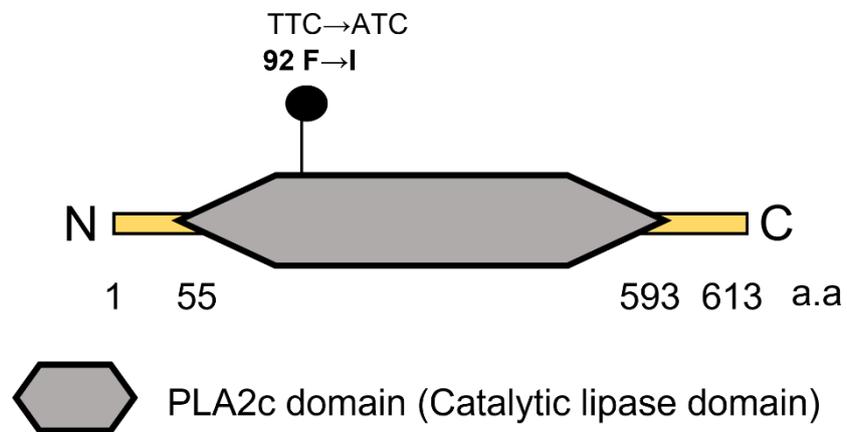
(J)

Tpp1 (No.8,9,14,31,43,86,92 mutant)



(K)

Plb1 (No.98 mutant)



(L)

Bst1 (No.4,5,10,19,32,33,41,47,52,54,66,67,70,89,91 mutant)

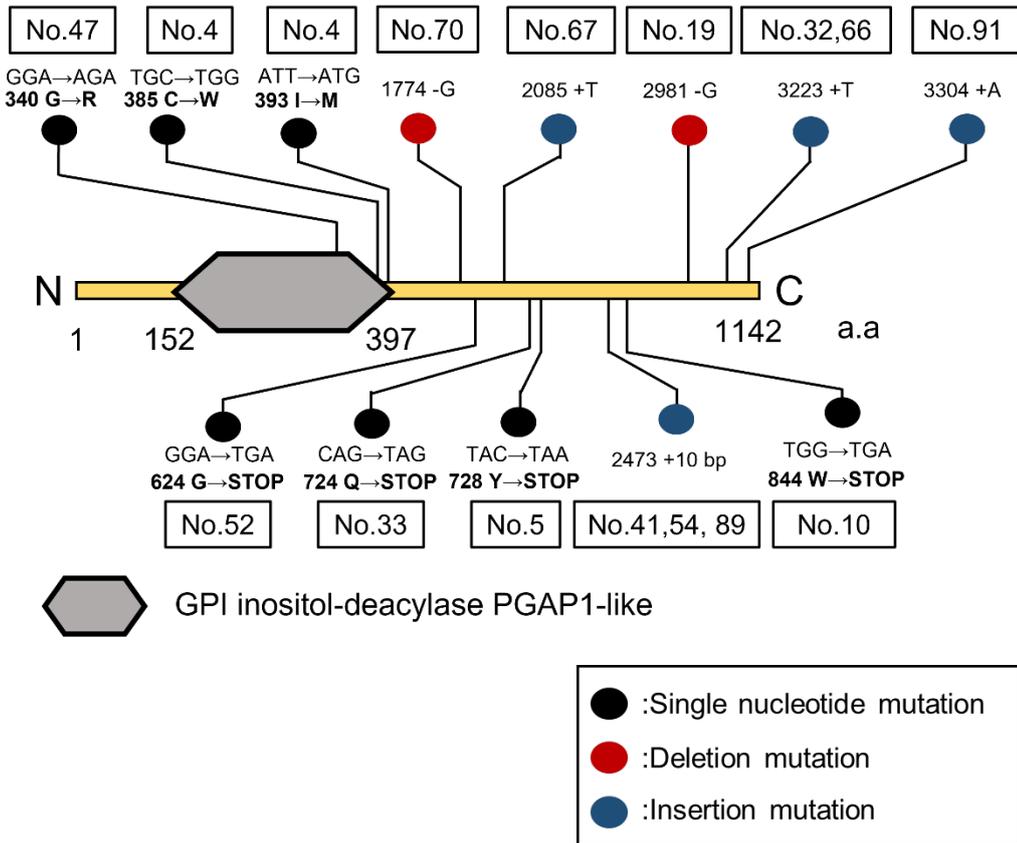


Figure 2-4-3. 長寿命変異株の長寿命化を引き起こす原因遺伝子の変異箇所を示した模式図。遺伝子模式図は Pombase; Uniprot; Toyoda *et al.*, (2021); Muñoz *et al.*, (2014)を参考に作成した。スクリーニングの過程で発生した長寿原因変異は主に一塩基変異、欠失変異、挿入変異の3種類に大別される。

- (A) Ksg1 の模式図。No.3 変異株は PH domain 内に一塩基変異が生じていた。
- (B) Bgs1 の模式図。No.13 変異株では、Glycosyl transferase domain 内に一塩基変異が生じていた。
- (C) Scw1 の模式図。No.7,37,38,51 変異株では、それぞれ異なる箇所に一塩基変異 (No.7,38)あるいは一塩基欠失変異 (No.37,51)が生じていた。
- (D) Cmr2 の模式図。No.11 変異株では、1 つ目と 2 つ目の AMP-dependent synthetase/ligase domain の間に、1 塩基変異が生じていた。
- (E) Aly2 の模式図。No.36 変異株では、二つの PY motif の間に 1 塩基欠失変異が生じていた。

- (F) Rer2 の模式図。No.48 変異株では、Decaprenyl diphosphate synthase-like domain 内に1塩基変異が生じていた。
- (G) Rgf1 の模式図。Rgf1 は、Rgf1 の核局在に影響を与える DEP (Dishevelled, Egl-10, and Pleckstrin) domain, Rho GEF domain, そして Rgf1 の細胞頂端での機能に影響を与える PH domain, CNH domain を有している。No.58 変異株では CNH domain 内に1塩基変異が生じていた。
- (H) Rho1 の模式図。No.64 変異株では、Small GTPase domain 内に1塩基変異が生じていた。
- (I) Gaf1 の模式図。No.92 変異株では、355 番目の塩基の後に、+ATTTTC の5塩基挿入変異が生じていた。
- (J) Tpp1 の模式図。N 末端側に Glycosyl transferase, family 20 domain, C 末端側に Trehalose-phosphate domain を有している。取得した長寿命変異株の内、7株に *tpp1* 遺伝子変異が生じていた。1塩基変異、欠失変異、挿入変異が生じていた。四分子解析で解析した No.92 変異株では Glycosyl transferase 内の403番目の塩基の後に +GAGTACG の7塩基挿入変異が生じていた。
- (K) Plb1 の模式図。No.98 変異株では、PLA2c domain 内に1塩基変異が生じていた。
- (L) Bst1 の模式図。Bst1 は GPI inositol-deacylase PGAP1-like domain を有している。取得した長寿命変異株の内、15株に *bst1* 遺伝子に変異が生じていた。1塩基変異、欠失変異、挿入変異が生じていた。No.41 と No.54 と No.89 変異株、あるいは No.32 と No.66 変異株ではそれぞれ同じ箇所に10塩基挿入変異または1塩基挿入変異が生じていた。

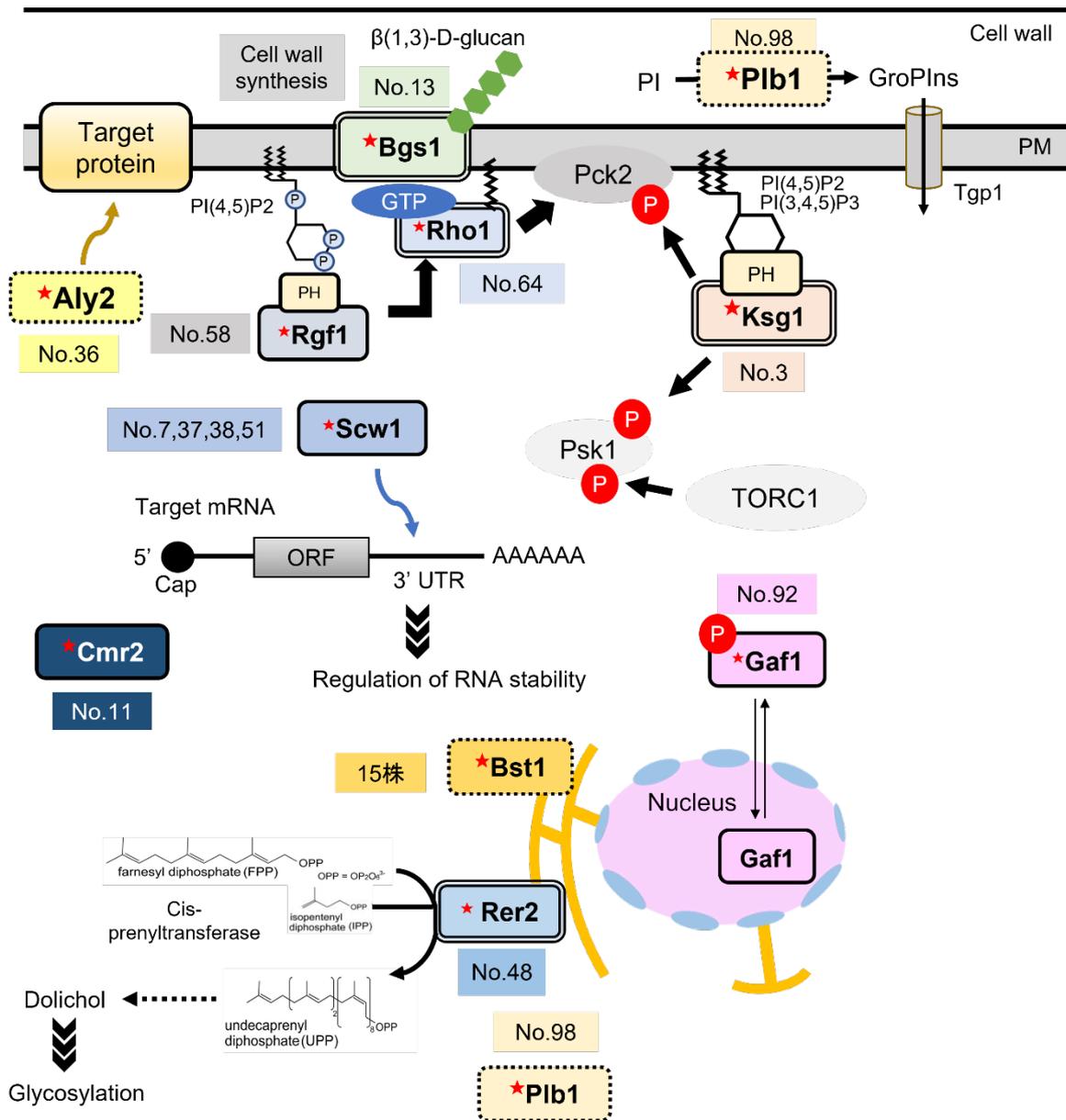


Figure 2-4-4. 本研究で同定した分裂酵母の寿命関連因子群

本研究で同定した寿命関連因子の局在とそれら因子群の関連を示した。星印を付した寿命関連因子の内、必須因子は二重線で、分裂酵母で機能未知(予想を含む)の因子は破線で囲んだ。

PH domainを介して細胞膜局在する Ksg1(No.3)は種々の AGC kinaseをリン酸化する。図ではその一部として Psk1(S6 kinase)と Pck2(Protein kinase C ortholog)を示した。Psk1 と Pck2 は、本研究で特定した Ksg1 以外の寿命関連因子との関わりが報告されている。

Psk1 は Ksg1 と TORC1 によりリン酸化される。栄養源の枯渇により、TORC1 が不活性化すると、TORC1 による Psk1 のリン酸化が減少する。また、TORC1 が不活性化すると、転写因子 Gaf1(No.92)は脱リン酸化され、局在が細胞質から核へと移行する。

一方、Pck2 の安定化には Ksg1 のリン酸化及び GTP 結合型 Rho1 の結合が必要である。Rho1(No.64)は、C 末端のシステイン残基がイソプレニル化されることで膜に局在し(Arellano *et al.*, 1998)、Rho GEF(Rgf1, Rgf2, Rgf3)により GDP 結合型から GTP 結合型へと変換される。Rgf1(No.58)の標的は Rho1 のみである。また、GTP 結合型 Rho1 は Bgs1 による細胞壁合成の調節に関わっている。

RNA 結合タンパク質の Scw1(No.7, 37,38, 51)は細胞質に局在しており(Jin *et al.*, 2003)、複数の標的 mRNA に結合し、mRNA の安定性を制御していると考えられる。

次に、小胞体に局在する Bst1 と Rer2(No.48)に着目する。Rer2(No.48)は FPP(Farnesyl diphosphate) と IPP(Isopentenyl diphosphate) を基質とする UPP(Undecaprenyl diphosphate)の合成を触媒する。図に示した構造式は Fujihashi *et al.*, 2001 から引用した。結果的に、糖鎖の担体である Dolichol が合成され、タンパク質への糖鎖修飾(翻訳後修飾)に至る。出芽酵母の Rer2 は小胞体に偏在しており、これは Rer2 が複合体を形成し、dolichol 合成効率を高めることを示唆するものである(Sato *et al.*, 1999)。Bst1(GPI inositol deacylase)は他のモデル生物による解析から、GPI イノシトールタンパク質の小胞体からゴルジ体への細胞内輸送に関与することが予想される。

分裂酵母 Plb1(Phospholipase B)について、生化学的機能については明らかにされていないが、出芽酵母での知見から細胞壁や細胞質に局在することが予想される。

分裂酵母 Aly2(α -arrestin protein family)は、膜タンパクの分解に関与することが予想されているが、そのエンドサイトーシスの対象となる標的タンパク質は不明である。

分裂酵母 Cmr2 は acetyl-CoA の生合成のタンパク質であるが、その寿命制御機構については不明である。

第5節 考察

本章では、寿命に関連する未知因子の網羅的同定を目的として、経時寿命の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行った。過去に当研究室では、同様のスクリーニング方法で *Pma1*, *Nnk1*, *Gas1*, *Sur2* などの因子が寿命関連因子として同定され、解析が進められてきたが、そのスクリーニングは単発的であった。また、過去には、定常期における寿命に関連する非必須遺伝子が広範に特定されたが(Sideri *et al.*, 2015; Romila *et al.*, 2021)、必須遺伝子に関する情報は乏しかった。以上の理由から、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た。

今回の研究では、取得した 67 株の長寿命変異株(F_0)について、長寿命変異株の戻し交配を行い、長寿命の表現型を示す F_1 を独立に 2-4 株取得し、 F_0 と F_1 を全ゲノムシーケンス解析し、これらの株に共通して発生したゲノム変異を特定した。そして、その全ゲノムシーケンス解析結果と四分子解析による遺伝学的解析を総合して、長寿命の原因変異を特定した(Table 2-4-1)(Figure 2-4-1)。特に、No.36 変異株では F_0 と F_1 に共通して *aly2⁺* と *sec1⁺* (イントロン内の変異) 遺伝子に変異が生じていた。四分子解析により、No.36 変異株の寿命延長効果は *aly2* 変異の一遺伝子変異に起因し、*sec1* 変異は長寿命化とは無関係であることが結論付けられた。このことから四分子解析による遺伝学的解析は寿命関連因子の特定に有効な手段であったと考えられる。その結果、長寿命の原因遺伝子として *ksg1⁺*, *bgs1⁺*, *scw1⁺*, *rgf1⁺*, *rho1⁺*, *gaf1⁺*, *cmr2⁺*, *rer2⁺*, *aly2⁺*, *plb1⁺*, *bst1⁺* を特定した(Table 2-4-1, Table 2-4-2)(Figure 2-4-3)。本研究により複数の因子を新規寿命関連因子として同定することに成功した。

また、*sdh1⁺* 遺伝子(No.17,80)、*tpp1⁺* 遺伝子(7 株)、*rot1⁺* 遺伝子(No.96)に関しては四分子解析などの詳細な解析を行っていない。その内、*tpp1⁺* 遺伝子に関しては、7 株に独立して変異が発生していたため、変異箇所をまとめるに留めた(Table 2-4-1)(Figure 2-4-3-J)。次に、本研究のスクリーニング結果の特徴について主に以下の三点が挙げられる。

一点目は、本研究の大規模スクリーニングにより、必須因子を寿命関連因子として同定できた点である。これは、非必須遺伝子の欠損変異株を用いた網羅的解析では不可能なことであり、*ksg1⁺*, *bgs1⁺*, *rho1⁺*, *rer2⁺* が今回取得された分裂酵母の必須遺伝子に該当する(Figure 2-4-4)。

二点目は、本研究では独立に 67 株の変異株を全ゲノムシーケンス解析し、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ことである。先述のように、*tpp1⁺* 遺伝子には 7 株(No.8,9,14,31,43,86,92)に一塩基変異、欠失変異、挿入変異などの変異が発生していた(Figure 2-4-3-J)。また、*scw1⁺* 遺伝子には、No.7, 37,38, 51 変

異株でそれぞれ異なる箇所に変異が生じていた(Table 2-4-1, Table 2-4-2)(Figure 2-4-2-C)。また、*bstI⁺*遺伝子においては、本研究で取得した長寿命変異株 67 株の内 15 株 (No.4, 5, 10, 19, 32, 33, 41, 47, 52, 54, 66, 67, 70, 89, 91)に一塩基変異、欠失変異、挿入変異などの変異が発生していたことは特筆すべき点である(Table 2-4-1, Table 2-4-2)(Figure 2-4-3-L)。変異箇所は様々であり、中には No.41 と No.54 と No.89、No.32 と No.66 変異株のようにそれぞれ同じ箇所に 10 塩基挿入変異または一塩基変異が生じているものも存在した。以上のように、本研究の大規模スクリーニングにより、*tppI⁺*、*scwI⁺*、*bstI⁺*の遺伝子において、独立に取得された変異株で同一遺伝子内の異なる箇所に変異発生していた。このことから、スクリーニングはある程度飽和しているということが考えられる。

三点目は、本研究で同定された寿命関連因子はリン酸化酵素(Ksg1)、細胞壁合成酵素(Bgs1)、RNA 結合タンパク質(Scw1)などといった様々な機能をもつ因子が多く存在するという点である。さらに、過去の知見をもとに、寿命関連因子群の関連図を作成すると、GTP 結合型の Rho1 が Bgs1 の細胞壁合成を調節しているように、寿命関連因子同士で相互作用が報告されているものもあり(Figure 2-4-4)、これらの因子は同一の寿命制御に関与する可能性があると考えられる。以上のように、バイアスなしに数多くの因子を取得可能であるのは本研究のスクリーニングの利点として挙げられる。

本研究のスクリーニングを基盤として、Bgs1(No.13)、Scw1(No.7)、Cmr2(No.11)、Rer2(No.48)、Plb1(No.98)、Bst1(15 株)による寿命制御における機能について、他の研究員と共に解析を進めており、新規の知見獲得が期待される。

同定した複数の寿命関連因子の内、本研究では高等生物にまで保存性のある Ksg1(No.3)による寿命制御機構を集中的に解析することにした。その解析結果は次章に掲載した。

参考文献 (第 2 章)

Ard, R., Tong, P., & Allshire, R. C. (2014). Long non-coding RNA-mediated transcriptional interference of a permease gene confers drug tolerance in fission yeast. *Nature communications*, 5(1), 1-9.

Arellano, M., Coll, P. M., Yang, W., Duran, A., Tamanoi, F., & Perez, P. (1998). Characterization of the geranylgeranyl transferase type I from *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular microbiology*, 29(6), 1357-1367.

Arellano, M., Duran, A., & Perez, P. (1996). Rho 1 GTPase activates the (1-3) beta - D - glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *The EMBO journal*, 15(17), 4584-4591.

Arellano, M., Duran, A., & Perez, P. (1997). Localisation of the *Schizosaccharomyces pombe* Rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. *Journal of cell science*, 110(20), 2547-2555.

Becuwe, M., Herrador, A., Haguenaer-Tsapis, R., Vincent, O., & Léon, S. (2012). Ubiquitin-mediated regulation of endocytosis by proteins of the arrestin family. *Biochemistry research international*, 2012.

Calonge, T. M., Arellano, M., Coll, P. M., & Perez, P. (2003). Rga5p is a specific Rho1p GTPase - activating protein that regulates cell integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular microbiology*, 47(2), 507-518.

Cortés, J. C. G., Carnero, E., Ishiguro, J., Sánchez, Y., Durán, A., & Ribas, J. C. (2005). The novel fission yeast (1, 3) β -D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. *Journal of cell science*, 118(1), 157-174.

Cortés, J. C. G., Konomi, M., Martins, I. M., Muñoz, J., Moreno, M. B., Osumi, M., ... & Ribas, J. C. (2007). The (1, 3) β - d - glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Molecular microbiology*, 65(1), 201-217.

Costantino, L., & Koshland, D. (2015). The Yin and Yang of R-loop biology. *Current opinion in cell biology*, 34, 39-45.

Cruz, S., Muñoz, S., Manjón, E., García, P., & Sanchez, Y. (2013). The fission yeast cell wall stress sensor - like proteins Mtl2 and Wsc1 act by turning on the GTPase Rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *Microbiologyopen*, 2(5), 778-794.

Djordjevic, J. T. (2010). Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development—lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in microbiology*, 1, 125.

Durán, A., & Pérez, P. (2004). Cell wall synthesis. *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe*, 269-279.

Ellis, D. A., Reyes-Martín, F., Rodríguez-López, M., Cotobal, C., Sun, X. M., Saintain, Q., ... & Bähler, J. (2021). R-loops and regulatory changes in chronologically ageing fission yeast cells drive non-random patterns of genome rearrangements. *PLoS genetics*, 17(8), e1009784.

Farlow, A., Long, H., Arnoux, S., Sung, W., Doak, T. G., Nordborg, M., & Lynch, M. (2015). The spontaneous mutation rate in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 201(2), 737-744.

Fisher, E., Almaguer, C., Holic, R., Griac, P., & Patton-Vogt, J. (2005). Glycerophosphocholine-dependent growth requires Gde1p (YPL110c) and Git1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43), 36110-36117.

Fujihashi, M., Zhang, Y. W., Higuchi, Y., Li, X. Y., Koyama, T., & Miki, K. (2001). Crystal structure of cis-prenyl chain elongating enzyme, undecaprenyl diphosphate synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4337-4342.

Gangloff, S., Achaz, G., Francesconi, S., Villain, A., Miled, S., Denis, C., & Arcangioli, B. (2017). Quiescence unveils a novel mutational force in fission yeast. *Elife*, 6, e27469.

- García, P., Tajadura, V., García, I., & Sánchez, Y. (2006). Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Molecular biology of the cell*, *17*(4), 1620-1631.
- Gassama-Diagne, A., Fauvel, J., & Chap, H. (1989). Purification of a new, calcium-independent, high molecular weight phospholipase A2/lysophospholipase (phospholipase B) from guinea pig intestinal brush-border membrane. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(16), 9470-9475.
- Hasan, A., Cotobal, C., Duncan, C. D., & Mata, J. (2014). Systematic analysis of the role of RNA-binding proteins in the regulation of RNA stability. *PLoS genetics*, *10*(11), e1004684.
- Hatstat, A. K., Pupi, M. D., & McCafferty, D. G. (2021). Predicting PY motif-mediated protein-protein interactions in the Nedd4 family of ubiquitin ligases. *PloS one*, *16*(10), e0258315.
- Imai, Y., Shimasaki, T., Enokimura, C., Ohtsuka, H., Tsubouchi, S., Ihara, K., & Aiba, H. (2020). *gas1* mutation extends chronological lifespan via Pmk1 and Sty1 MAPKs in *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *84*(2), 330-337.
- Ito, H., Oshiro, T., Fujita, Y., Kubota, S., Naito, C., Ohtsuka, H., ... & Aiba, H. (2010). Pma1, a P-type proton ATPase, is a determinant of chronological life span in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(45), 34616-34620.
- Jin, Q. W., & McCollum, D. (2003). Scw1p antagonizes the septation initiation network to regulate septum formation and cell separation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell*, *2*(3), 510-520.
- Kahlhofer, J., Leon, S., Teis, D., & Schmidt, O. (2021). The α - arrestin family of ubiquitin ligase adaptors links metabolism with selective endocytosis. *Biology of the Cell*, *113*(4), 183-219.
- Karagiannis, J., Oulton, R., & Young, P. G. (2002). The Scw1 RNA-binding domain protein regulates septation and cell-wall structure in fission yeast. *Genetics*, *162*(1),

45-58.

Kurauchi, T., Hashizume, A., Imai, Y., Hayashi, K., Tsubouchi, S., Ihara, K., ... & Aiba, H. (2017). Identification of a novel protein kinase that affects the chronological lifespan in fission yeast. *Microbiology letters*, *364*(2), fnw257.

Kurauchi, T., Matsui, K., Shimasaki, T., Ohtsuka, H., Tsubouchi, S., Ihara, K., ... & Aiba, H. (2021). Identification of *sur2* mutation affecting the lifespan of fission yeast. *FEMS microbiology letters*, *368*(12), fnab070.

Lee, K. S., Patton, J. L., Fido, M., Hines, L. K., Kohlwein, S. D., Paltauf, F., ... & Levin, D. E. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* PLB1 gene encodes a protein required for lysophospholipase and phospholipase B activity. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(31), 19725-19730.

Madrid, M., Jiménez, R., Sánchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Vicente-Soler, J., ... & Cansado, J. (2015). Multiple layers of regulation influence cell integrity control by the PKC ortholog Pck2 in fission yeast. *Journal of cell science*, *128*(2), 266-280.

Madrid, M., Vázquez-Marín, B., Franco, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M., & Cansado, J. (2016). Multiple crosstalk between TOR and the cell integrity MAPK signaling pathway in fission yeast. *Scientific reports*, *6*(1), 1-17.

Madrid, M., Vázquez-Marín, B., Soto, T., Franco, A., Gómez-Gil, E., Vicente-Soler, J., ... & Cansado, J. (2017). Differential functional regulation of protein kinase C (PKC) orthologs in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(27), 11374-11387.

Makarenko, R., Denis, C., Francesconi, S., Gangloff, S., & Arcangioli, B. (2020). Nitrogen starvation reveals the mitotic potential of mutants in the S/MAPK pathways. *Nature communications*, *11*(1), 1-13.

Martín, V., García, B., Carnero, E., Durán, A., & Sánchez, Y. (2003). Bgs3p, a putative 1, 3- β -glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell*, *2*(1), 159-169.

- Martín, V., Ribas, J. C., Carnero, E., Durán, A., & Sánchez, Y. (2000). bgs2+, a sporulation - specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Molecular microbiology*, *38*(2), 308-321.
- Masuda, N., KITAMURA, N., & SAITO, K. (1991). Primary structure of protein moiety of *Penicillium notatum* phospholipase B deduced from the cDNA. *European journal of biochemistry*, *202*(3), 783-787.
- Matsuo, T., Kubo, Y., Watanabe, Y., & Yamamoto, M. (2003). *Schizosaccharomyces pombe* AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *The EMBO journal*, *22*(12), 3073-3083.
- Mazumder, B., Seshadri, V., & Fox, P. L. (2003). Translational control by the 3' - UTR: the ends specify the means. *Trends in biochemical sciences*, *28*(2), 91-98.
- Mazur, P., & Baginsky, W. (1996). In vitro activity of 1, 3-β-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(24), 14604-14609.
- Mitra, P., Zhang, Y., Rameh, L. E., Ivshina, M. P., McCollum, D., Nunnari, J. J., ... & Ross, A. H. (2004). A novel phosphatidylinositol (3, 4, 5) P3 pathway in fission yeast. *The Journal of cell biology*, *166*(2), 205-211.
- Morrell-Falvey, J. L., Ren, L., Feoktistova, A., Haese, G. D., & Gould, K. L. (2005). Cell wall remodeling at the fission yeast cell division site requires the Rho-GEF Rgf3p. *Journal of cell science*, *118*(23), 5563-5573.
- Muñoz, S., Manjón, E., García, P., Sunnerhagen, P., & Sánchez, Y. (2014). The checkpoint-dependent nuclear accumulation of Rho1p exchange factor Rgf1p is important for tolerance to chronic replication stress. *Molecular biology of the cell*, *25*(7), 1137-1150.
- Mutoh, T., Nakano, K., & Mabuchi, I. (2005). Rho1 - GEFs Rgf1 and Rgf2 are involved in formation of cell wall and septum, while Rgf3 is involved in cytokinesis in fission yeast. *Genes to Cells*, *10*(12), 1189-1202.

- Nakano, K., Mutoh, T., & Mabuchi, I. (2001). Characterization of GTPase - activating proteins for the function of the Rho - family small GTPases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes to Cells*, *6*(12), 1031-1042.
- Nakase, Y., Nakase, M., Kashiwazaki, J., Murai, T., Otsubo, Y., Mabuchi, I., ... & Matsumoto, T. (2013). The fission yeast β -arrestin-like protein Any1 is involved in TSC-Rheb signaling and the regulation of amino acid transporters. *Journal of cell science*, *126*(17), 3972-3981.
- Nakashima, A., Otsubo, Y., Yamashita, A., Sato, T., Yamamoto, M., & Tamanoi, F. (2012). Psk1, an AGC kinase family member in fission yeast, is directly phosphorylated and controlled by TORC1 and functions as S6 kinase. *Journal of cell science*, *125*(23), 5840-5849.
- Neeli-Venkata, R., Diaz, C. M., Celador, R., Sanchez, Y., & Minc, N. (2021). Detection of surface forces by the cell-wall mechanosensor Wsc1 in yeast. *Developmental Cell*, *56*(20), 2856-2870.
- Park, E. J., Grabińska, K. A., Guan, Z., Stránecký, V., Hartmannová, H., Hodaňová, K., ... & Sessa, W. C. (2014). Mutation of Nogo-B receptor, a subunit of cis-prenyltransferase, causes a congenital disorder of glycosylation. *Cell metabolism*, *20*(3), 448-457.
- Patton-Vogt, J. L., & Henry, S. A. (1998). GIT1, a gene encoding a novel transporter for glycerophosphoinositol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *149*(4), 1707-1715.
- Pérez-Ortín, J. E. (2007). Genomics of mRNA turnover. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, *6*(4), 282-291.
- Pérez-Ortín, J. E., Alepuz, P., Chávez, S., & Choder, M. (2013). Eukaryotic mRNA decay: methodologies, pathways, and links to other stages of gene expression. *Journal of molecular biology*, *425*(20), 3750-3775.
- Robinson, B. P., Hawbaker, S., Chiang, A., Jordahl, E. M., Anaokar, S., Nikiforov, A., ... & O'Donnell, A. F. (2022). Alpha - arrestins Aly1/Art6 and Aly2/Art3 regulate trafficking of the glycerophosphoinositol transporter Git1 and impact phospholipid

homeostasis. *Biology of the Cell*, 114(1), 3-31.

Romila, C. A., Townsend, S., Malecki, M., Kamrad, S., Rodríguez-López, M., Hillson, O., ... & Bähler, J. (2021). Barcode sequencing and a high-throughput assay for chronological lifespan uncover ageing-associated genes in fission yeast. *Microbial Cell*, 8(7), 146.

Sato, M., Sato, K., Nishikawa, S. I., Hirata, A., Kato, J. I., & Nakano, A. (1999). The yeast RER2 gene, identified by endoplasmic reticulum protein localization mutations, encodes cis-prenyltransferase, a key enzyme in dolichol synthesis. *Molecular and cellular biology*, 19(1), 471-483.

Sayers, L. G., Katayama, S., Nakano, K., Mellor, H., Mabuchi, I., Toda, T., & Parker, P. J. (2000). Rho - dependence of *Schizosaccharomyces pombe* Pck2. *Genes to Cells*, 5(1), 17-27.

Sideri, T., Rallis, C., Bitton, D. A., Lages, B. M., Suo, F., Rodríguez-López, M., ... & Bähler, J. (2015). Parallel profiling of fission yeast deletion mutants for proliferation and for lifespan during long-term quiescence. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 5(1), 145-155.

Takemori, H., Zolotaryov, F. N., Ting, L., Urbain, T., Komatsubara, T., Hatano, O., ... & Tojo, H. (1998). Identification of functional domains of rat intestinal phospholipase B/lipase: its cDNA cloning, expression, and tissue distribution. *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2222-2231.

Tajadura, V., García, B., García, I., García, P., & Sánchez, Y. (2004). *Schizosaccharomyces pombe* Rgf3p is a specific Rho1 GEF that regulates cell wall β -glucan biosynthesis through the GTPase Rho1p. *Journal of cell science*, 117(25), 6163-6174.

Tanaka, S., Maeda, Y., Tashima, Y., & Kinoshita, T. (2004). Inositol deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14256-14263.

Tang, Y., & McLeod, M. (2004). In vivo activation of protein kinase A in

Schizosaccharomyces pombe requires threonine phosphorylation at its activation loop and is dependent on PDK1. *Genetics*, 168(4), 1843-1853.

Toyoda, Y., Soejima, S., Masuda, F., & Saitoh, S. (2021). TORC2 inhibition of α -arrestin Aly3 mediates cell surface persistence of *S. pombe* Ght5 glucose transporter in low glucose. *Journal of cell Science*, 134(10), jcs257485.

Yang, P., Du, H., Hoffman, C. S., & Marcus, S. (2003). The phospholipase B homolog Plb1 is a mediator of osmotic stress response and of nutrient-dependent repression of sexual differentiation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Genetics and Genomics*, 269(1), 116-125.

Yang, P., Qyang, Y., Bartholomeusz, G., Zhou, X., & Marcus, S. (2003). The novel Rho GTPase-activating protein family protein, Rga8, provides a potential link between Cdc42/p21-activated kinase and Rho signaling pathways in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 48821-48830.

第3章 新規寿命関連因子 Ksg1 の解析

第1節 序

【高等生物 PDK1 と分裂酵母 Ksg1 の類似性】

PDK1 は PKA、S6-kinase、AKT などの AGC family をリン酸化し、細胞シグナルにおいて中心的な役割を果たしている(Tang & McLeod, 2004)。これらの AGC family は細胞の増殖や生存、タンパク質の合成に関与している(Cantley, 2002)。また、PDK1 は PH domain を有しており、PI(3,4,5)P₃ を介して細胞膜に局在する。PDK1 だけでなくその基質である AKT も PI(3,4,5)P₃ を介して細胞膜に局在しており、PDK1 による AKT のリン酸化には、細胞膜局在が重要であることが報告されている(Lawlor & Alessi, 2001)。PDK1 のリン酸化により AKT は活性化し、細胞の増殖や生存、細胞周期の進行などに関わるタンパク質のリン酸化が進行する(Cantley, 2002)。このことから、PDK1 の細胞膜局在は、PDK1 の基質のリン酸化だけでなく細胞シグナル全体に影響を及ぼすことが予想される。

PDK1 は高等生物だけでなく、線虫や出芽酵母や分裂酵母にまで保存されており、分裂酵母では Ksg1 (Kinase responsible for sporulation and growth) と Ppk21(Putative protein kinase 21, 別名 Pdk1)の二種類のタンパク質が PDK1 オルソログとして存在する(Niederberger & Schweingruber, 1999, Bimbo *et al.*, 2005)。Ksg1 は N 末端側に Ser/Thr protein kinase domain、C 末端側に PH domain を有しており(Figure 3-1-1-A)、また、AKT オルソログである Gad8、PKA オルソログである Pka1、S6-kinase である Psk1、そして Protein kinase C オルソログである Pck1 と Pck2 をリン酸化する(Matsuo *et al.*, 2003; Tang and McLeod, 2004; Nakashima *et al.*, 2012; Madrid *et al.*, 2015; Madrid *et al.*, 2017)。このことから、Ksg1 は PDK1 と類似した機能を有していることが考えられる。一方、Ppk21 は PH domain を有しておらず、N 末端側に Ser/Thr kinase domain を有しており(Figure 3-1-1-B)、その標的となる基質は明らかにされていない(Bimbo *et al.*, 2005)。

【Ksg1 活性低下変異株 *ts208* について】

先行研究により、孢子形成率が低下する変異株の解析が行われた(Niederberger & Schweingruber, 1999)。その結果、*ksg1*⁺の一塩基変異(base 476 G→A; amino acid 159 G→E)が原因で孢子形成率が低下することが分かった(Figure 3-1-3)。本論文では、この点変異を *ksg1-208*、この変異株を *ts208* と呼ぶことにする。この *ts208* は孢子形成率の低下だけでなく、Ksg1 リン酸化活性の低下、高温感受性という表現型を有している(Matsuo *et al.*, 2003; Tang & McLeod, 2004; Madrid *et al.*, 2015)。

近年、*ts208* の高温感受性を相補する multicopy suppressor がスクリーニングされ、

*ppk21⁺*の高発現が *ts208*の高温感受性を回復することが分かった(Liu *et al.*, 2022)。この *ppk21⁺*の高発現が、*ts208* の G2 アレストに起因する高温感受性を相補するという結果及び種々の遺伝学的解析から、細胞周期の制御において Ksg1 と Ppk21 は機能的に重複していることが考えられている(Liu *et al.*, 2022)。

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、本研究では *ksg1* 長寿変異株を用いて、Ksg1 による寿命制御機構について、多角的に解析した。これらの解析により、高等生物にまで保存された寿命制御への知見を得ることが期待される。

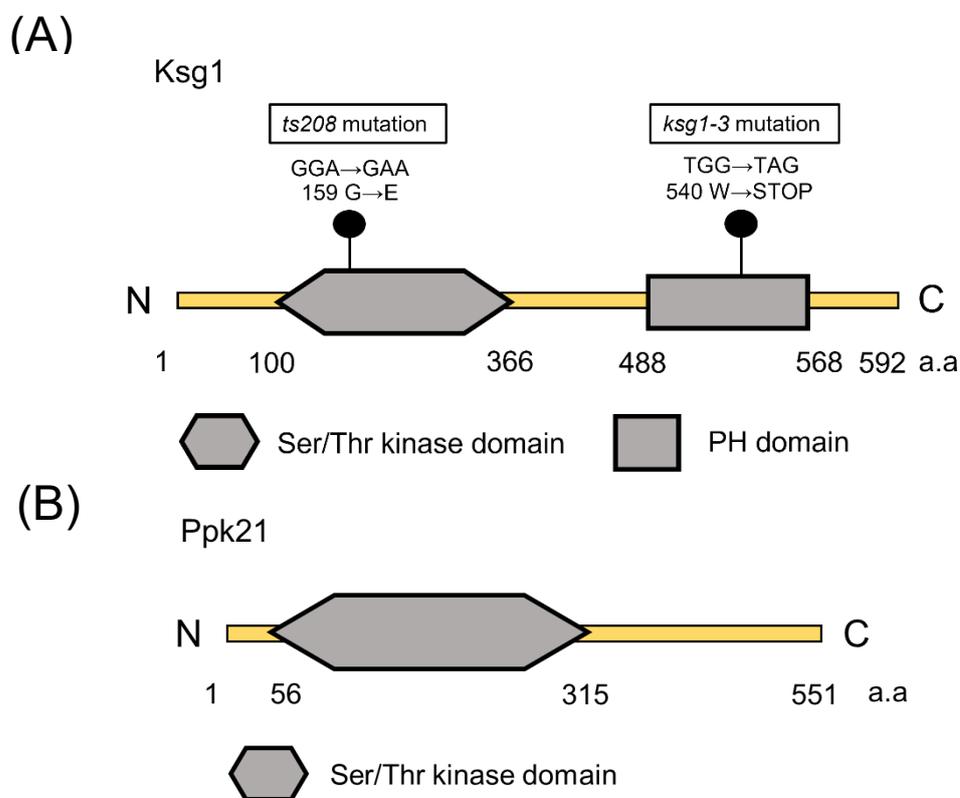


Figure3-1-1. PDK1 オルソログである分裂酵母 Ksg1 と Ppk21 の模式図。

(A) *ts208* は Ser/Thr protein kinase domain 内に一塩基変異(base G→A, amino acid G→E)が見られる。一方、本研究のスクリーニングで得た No.3 変異株は PH domain 内に一塩基変異(base G→A, amino acid W→STOP)が見られた。

(B) Ppk21 の模式図。Protein kinase domain の位置を記した。

第2節 実験材料と実験方法

【使用菌株】

Table 3-2-1 Strain list used in this chapter.

Strain	Genotype	Source
JY333	<i>h-leu1-32 ade6-M216</i>	Our laboratory stock
No.3	<i>h-leu1-32 ade6-M216 ksg1-3</i>	This study (No.3 long-lived mutant)
KM45	<i>h-ade6-M216 / pREP1</i>	This study
KM48	<i>h-ade6-M216 / pREP1-ksg1</i>	This study
KM51	<i>h-ade6-M216 ksg1-3 / pREP1</i>	This study
KM54	<i>h-ade6-M216 ksg1-3 /pREP1-ksg1</i>	This study
KM58	<i>h-ade6-M216 leu1-32 ksg1-3:kanMX6</i>	This study
KM304	<i>h-ade6-M216 leu1-32 ksg1-3xmNG:kanMX6</i>	This study
KM306	<i>h-ade6-M216 leu1-32 ksg1(1-539)-3xmNG:kanMX6</i>	This study
KM329	<i>h-leu1-32 ade6-M216 ksg1-3xmNG:kanMX6 z::adh11-HA-mNG:natMX6</i>	This study
KM348	<i>h-leu1-32 ade6-M216 ksg1-3xmNG:kanMX6 z::adh11-ksg1-HA-mNG:natMX6</i>	This study
KM337	<i>h-leu1-32 ade6-M216 ksg1-3xmNG:kanMX6 z::adh11-ksg1(1-539)-HA-mNG:natMX6</i>	This study
KM331	<i>h-leu1-32 ade6-M216 ksg1(1-539)-3xmNG:kanMX6 z::adh11-HA-mNG:natMX6</i>	This study
KM336	<i>h-leu1-32 ade6-M216 ksg1(1-539)-3xmNG:kanMX6 z::adh11-ksg1-HA-mNG:natMX6</i>	This study
KM346	<i>h-leu1-32 ade6-M216 ksg1(1-539)-3xmNG:kanMX6 z::adh11-ksg1(1-539)-HA-mNG:natMX6</i>	This study
KM327	<i>h-leu1-32 ade6-M216 ksg1-208 z::adh11-HA-mNG:natMX6</i>	This study
KM317	<i>h-leu1-32 ade6-M216 ksg1-208 z::adh11-ksg1-HA-mNG:natMX6</i>	This study
KM349	<i>h-leu1-32 ade6-M216 ksg1-208 z::adh11-ksg1(1-539)-HA-mNG:natMX6</i>	This study
KM303	<i>h-ade6-M216 leu1-32 ksg1-mNG:kanMX6</i>	This study
KM305	<i>h-ade6-M216 leu1-32 ksg1(1-539)-mNG:kanMX6</i>	This study

KM343	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ksg1-mNG-Ras1CT:bsdMX6</i>	This study
KM344	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ksg1(1-539)-mNG-Ras1CT:bsdMX6</i>	This study
TH258	<i>h+ ade- pck2::kanMX6 pck2-HA:leu1+</i>	from M. Madrid and This study
TH225	<i>h+ ade6-M216 pck2::kanMX6 pck2-HA:leu1+ ksg1-3:kanMX6</i>	from M. Madrid and This study
TH260	<i>h+ ade6-M216 pck2::kanMX6 pck2.T842A-HA:leu1+</i>	from M. Madrid and This study
TH242	<i>h+ ade6-M216 pck2::kanMX6 pck2.T842A-HA:leu1+ ksg1-3:kanMX6</i>	from M. Madrid and This study
TH261	<i>h+ ade6-M216 pck2::kanMX6 pck2.T842D-HA:leu1+</i>	from M. Madrid and This study
TH267	<i>h+ ade6-M216 pck2::kanMX6 pck2.T842D-HA:leu1+ ksg1-3:kanMX6</i>	from M. Madrid and This study
KM152	<i>h+ ade6-M216 leu1-32 ght5-GFP:kanMX6</i>	This study
KM131	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ksg1-3:kanMX6 ght5-GFP:kanMX6</i>	This study
KM709	<i>h- ade6-M216 leu1-32 psk1-13myc<<hphMX6</i>	Our laboratory stock (Ohtsuka et al., 2022)
KM737	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ksg1-3 psk1-13myc<<hphMX6</i>	This study
KM809	<i>h- ade6-M216 leu1-32 psk1-13myc<<hphMX6 z::adh11-HA-mNG</i>	This study
KM812	<i>h- ade6-M216 leu1-32 psk1-13myc<<hphMX6 z::adh11-ksg1mut-HA-mNG</i>	This study
KM813	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ksg1mutation psk1-13myc<<hphMX6 z::adh11-HA-mNG</i>	This study
KM815	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ksg1mutation psk1-13myc<<hphMX6 z::adh11-ksg1mut-HA-mNG</i>	This study
TH70	<i>h- leu1-32 ade6-M216 pck2::kanMX6</i>	This study
TH93	<i>h- leu1-32 ade6-M216 ksg1-3:kanMX6 pck2::kanMX6</i>	This study
TH64	<i>h- ade6-M216 leu1-32 pck1::kanMX6</i>	This study
TH87	<i>h- ade6-M216 leu1-32 pck1::kanMX6 ksg1-3:kanMX6</i>	This study
TH75	<i>h- ade6-M216 leu1-32 psk1::kanMX6</i>	This study
TH84	<i>h- ade6-M216 leu1-32 psk1::kanMX6 ksg1-3:kanMX6</i>	This study

TH279	<i>h+ ade6-M216 leu1-32 ksg1::kanMX6 gad8::ura4</i>	This study
TH280	<i>h- ade6-M216 leu1-32 gad8::ura4 ksg1-3::kanMX6</i>	This study
KM126	<i>h- ade6-M216 leu1-32 pka1::kanMX6</i>	This study
KM626	<i>h- ade6-M216 leu1-32 pka1::kanMX6 ksg1-3::kanMX6</i>	This study
No.64	<i>h- ade6-M216 leu1-32 rho1-64</i>	This study (No.64 long-lived mutant)
KM636	<i>h- ade6-M216 leu1-32 rho1-64 pck2::kanMX6</i>	This study
TH176	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ksg1::kanMX6 pmk1-3HA::kanMX6</i>	This study
TH178	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ksg1-3::kanMX6 pmk1-3HA::kanMX6</i>	This study
TH95	<i>h- ade6-M216 leu1-32 pmk1::kanMX6</i>	This study
KM897	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ppk21::kanMX6</i>	This study
KM900	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ksg1-3 ppk21::kanMX6</i>	This study
KM796	<i>h- ade6-M216 leu1-32 gaf1-3HA::kanMX6</i>	This study
KM798	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ksg1-3 gaf1-3HA::kanMX6</i>	This study

【使用した培地】

・SD 培地

組成	終濃度
Nitrogen base without amino acids	6.7 g/L
Glucose	20 g/L
*Adenine	40 mg/L
*Leucine	60 mg/L

必要に応じて*印を付した栄養素を添加した。

・YE 培地

組成	終濃度
Yeast Extract	5 g/L
Glucose	30 g/L
Adenine	40 (225 [†]) mg/L
*Agar	20 g/L

†: Ksg1 の局在観察時には 225mg/L の Adenine を液体培地及び固体培地に添加した。

*: 固体培地の作製時には、Agar を添加した。

【OD 測定】

日照電気 (株) 製の BACTOMONITOR BACT-550 を使用した。測定に用いた照射光の波長は 600 nm である。

【CFU(コロニー形成率)による寿命測定方法】

CFU による寿命測定は以前報告された方法と同様に行った(Hibi *et al.*, 2018; Ohtsuka *et al.*, 2008)。寿命測定する菌株を SD 液体培地 5 mL に植菌した後、経時的に培養液をサンプリングし、適宜希釈して YE 固体培地に塗布した。静置培養して生えてきたコロニー数をカウントし、それを OD 値で除した値を生存率とした。

【ランダムスポア処理による胞子の取得】

掛け合わせに用いる二種の菌株を滅菌水に懸濁して十分に混合させ、EMM 胞子形成培地に塗布した。培地上で生育した細胞を掬い取り、Glusulase 入りの滅菌水に十分懸濁させ、子嚢壁を溶解させた。その後、30%エタノール処理により、胞子以外の酵母細胞を除去し、YE 固体培地に塗布することで胞子を得た。

【分裂酵母の形質転換】

分裂酵母の形質転換は、エレクトロポレーション法あるいはリチウムアセテート法により行った。

エレクトロポレーション法では、形質転換させる株を YE 液体培地で一晩培養させ、細胞を 1 M ソルビトールで wash した。ペレット状になった細胞に 1 M ソルビトール、DNA fragment (or plasmid DNA)を入れて細胞を懸濁させ、懸濁液をキュベットに入れて電気パルスをかけた。DNA fragment の形質転換では、この懸濁液をファルコンチューブに回収し、そこに YEA 培地を添加し、室温で一晩静置させた。翌日、遠心集菌した細胞を選択培地に塗布し、目的の菌株を得た。Plasmid DNA の形質転換では、この懸濁液を SD (-Leu)固体培地に塗布し、目的の菌株を得た。

リチウムアセテート法は以前に報告されていたもの(Suga & Hatakeyama, 2005)を改変して行った。形質転換させる株を YE 液体培地で一晩培養させ、遠心集菌した細胞を 50 µl LiOAc/TE with 30% Glycerol、5 µL salmon sperm DNA(10 mg/mL)、5-10 µL DNA fragment に懸濁させた。懸濁液に 145 µl 50% PEG in LiOAc/TE を加え、42°C でヒートショックを与えた。その後、遠心集菌した細胞を滅菌水に懸濁させ、YE 固体培地に塗布した。一晩の静置培養の後、選択培地にレプリカして 2-3 日間培養させ

た。選択培地には、抗生物質として G418 (Invitrogen; 終濃度 100 µg/mL)、Hygromycin B (Wako; 終濃度 100 µg/mL)、Nourseothricin [Cat. No.AB-102L] (Jena BioScience)、Blastcidin S (Invitrogen; 終濃度 50 µg/mL) を薬剤マーカーに応じて添加した。

【使用したプラスミド】

大腸菌と分裂酵母の両方で導入可能な以下のシャトルベクターを使用した。

○pREP1

大腸菌マーカーとして Amp^R (アンピシリン耐性遺伝子)、分裂酵母マーカーとして LEU2 (ロイシン合成遺伝子) をもつ。また、pREP1 には *nmt1* プロモーターが含まれており、この下流に目的の遺伝子を挿入するためのマルチクロニングサイトが存在する。*nmt1* プロモーターはチアミン存在化で不活性化され、チアミン非存在化で活性化されるため、チアミンの有無によって目的の遺伝子の発現量を調節することが可能となる。

○pFA6a series

大腸菌マーカーとして Amp^R (アンピシリン耐性遺伝子)、分裂酵母マーカーとして薬剤耐性遺伝子をもつ。本論文では pFA6a series の薬剤耐性遺伝子として、カナマイシン耐性遺伝子(*kan*^R)、ハイグロマイシン耐性遺伝子(*hyg*^R)、ブラストサイジン耐性遺伝子(*bsd*^R)の三種類を使用した。

○PNATZA11

大腸菌マーカーとして Amp^R (アンピシリン耐性遺伝子)、分裂酵母マーカーとして clonNAT 耐性遺伝子(*nat*^R)をもつ。プラスミドである PNATZA11 には、恒常的に遺伝子発現を誘導させる *adh11* promoter の下流にマルチクロニングサイトが存在する。尚、分裂酵母 *adh1*⁺ 遺伝子の CDS(coding sequence)の開始コドンの 101-108 塩基上流に位置するプロモーター領域の TATA-box(TATAAATA)に変異を導入し、TATAAA にすることで、*adh1* プロモーターより発現の弱い *adh11* プロモーターが作製された (Chen *et al.*, 2017; Sakai *et al.*, 2021)。このプラスミドには、分裂酵母 *zfs1*⁺ 遺伝子の近傍のゲノム配列(gene-free region, z locus)が挿入されている。そのため、*Apa*I で切断し、分裂酵母に形質転換することで、この gene-free region にプラスミドを挿入し、目的の遺伝子を *adh11* promoter により高発現することが可能となる (Uda *et al.*, 2017)。詳細は【遺伝子改変による分裂酵母株の作製方法】に掲載した。

【遺伝子改変による分裂酵母株の作製方法】

標的遺伝子の近傍への薬剤耐性遺伝子の挿入、遺伝子欠損株の作製、遺伝子の C 末端側へのタグ付け(mNeonGreen, 13myc)は two-step PCR 法に従って作製した(Bähler *et al.*, 1998)。Primer F1-F2, R1-R2 を用いてそれぞれ F 片と R 片を作製(1st PCR)し、F 片,R 片,pFA6a series のプラスミドを鋳型として 2nd PCR を行った。得た DNA fragment を形質転換することで目的の菌株を作製した。

野生株に *ksg1-3* 変異を導入した株の作製

Two-step PCR 法により、以下の primer F1,F2,R1,R2, plasmid pFA6a-kanMX6 を用いてエレクトロポレーション法による野生株(JY333)への形質転換を行った。また、染色体上への形質転換の成功を確認するために、check primer Fw と check primer Rv によるコロニーPCR を行った。

F1: CTGGTACGGCTTCCGATATT

F2: TTAATTAACCCGGGGATCCGCATACTTGGAGAAGTAATTC

R1: GCTCGTGAGCTTAAGATTCC

R2: GTTTAAACGAGCTCGAATTCTCGTGAACATCTCTACCGAC

Check primer Fw: CTCTTCACATGGCAGTCATG

Check primer Rv: AGCTACCACTCATGCTGATC

Δ *ppk21* 株の作製

Two-step PCR 法により、以下の primer F1,F2,R1,R2, plasmid pFA6a-kanMX6 を用いてリチウムアセテート法による野生株(JY333)及び *ksg1-3* (No.3)への形質転換を行った。また、形質転換の成功を確認するために、check primer Fw と check primer Rv によるコロニーPCR を行った。

F1: GCCATGGATAGCTTAGCGTGA

F2: TTAATTAACCCGGGGATCCGTTATAAAAGAGGTTTTTCATGAAAAATGAAG

R1: GCCCTGCTTGCTAGAATTCAATTATTTTG

R2: GTTTAAACGAGCTCGAATTCCCCATACCTTGTTTTATTTGATTTTTTC

Check primer Fw: CAAGCAATTTATTGCTTTTTAGAGCG

Check primer Rv: GCAAGCTCTGTCAGGTGTTATTCC

Ksg1 (野生型と変異型) に 3x mNeonGreen(mNG)を融合した株の作製

変異型 Ksg1 は翻訳途中にナンセンス変異(540 W→STOP)が生じているため、539 番目の Gly 残基の直後に 3xmNG を融合させた。野生型と変異型 Ksg1 の C 末端側に 3xmNG を融合させた株を本章ではそれぞれ Ksg1-3xmNG, Ksg1(1-539)-3xmNG と命

名した。尚、mNG の塩基配列は分裂酵母のコドン使用頻度に応じて最適化されている (Sakai *et al.*, 2021)。

Two-step PCR 法により、以下の primer F1,F2,R1,R2, plasmid pFA6a-3xmNG-kanMX6 を用いてリチウムアセテート法による野生株(JY333)への形質転換を行った。また、形質転換の成功を確認するために、check primer Fw と check primer Rv によるコロニーPCR を行った。

F1: GGTACGGCTTCCGATATTTGGGCGTTTGGTTG

F2(野生型): TTAATTAACCCGGGGATCCGGACAGCACTTCTAGCAATGCTTC
TTGAAAAGCTGG

F2(変異型):TTAATTAACCCGGGGATCCGGCCATGTTCATTGTTTTTTACCA
TCCGACAACG

R1: CGCAGTCAATCTCGAGAACTTTGATCGTGTCGC

R2: GTTTAAACGAGCTCGAATTCATCCGTGATCCTTCAGTGTG

Check primer Fw: ATGCGAAGTTAAGTGCGCAG

Check primer Rv: GTTCTCGTCGGTAGAGATGTTACG

Gaf1 に 3HA を融合した株の作製

Two-step PCR 法により、以下の primer F1,F2,R1,R2, plasmid pFA6a-3HA-kanMX6 を用いてリチウムアセテート法による野生株(JY333)及び *ksg1-3* (No.3)への形質転換を行った。また、形質転換の成功を確認するために、check primer Fw と check primer Rv によるコロニーPCR を行った。

F1: TGGCGTCGCAGTCCCGATGG

F2: TTAATTAACCCGGGGATCCGCATAACGCTATAACCAATCCCAG

R1: TCCAGAACGAACGCCAAGGATTGAG

R2: GTTTAAACGAGCTCGAATTCGGCTTACGTGTGCATGATGG

Check primer Fw: CCACTAACCCCACTCCTACC

Check primer Rv: ACTACGGTATAAACATGGTCAC

Ksg1(野生型と変異型)-HA-mNG を高発現した株の作製

これらの高発現には、【使用したプライマー】に掲載した PNATZA11 プラスミドを使用した。PNATZA11 のマルチクローニングサイトの下流に HA-mNG の塩基配列が挿入されたプラスミド PNATZA11-HA-mNG が過去に作製された。これに、目的の遺伝子をクローニングして、先述のように分裂酵母内に形質転換することで目的の遺伝子に HA-mNG がタグ付けされたタンパクを高発現することが可能になる。

そこで、*ksg1+*(野生型と変異型)を以下のプライマーFw と Rv を用いて増幅し、PNATZA11-HA-mNG にクローニングした。ただし、変異型 Ksg1 は翻訳途中にナンセ

ンス変異(540 W→STOP)が生じているため、539 番目の Gly 残基までを増幅させ、その産物をクローニングした。精製したプラスミドを *ApaI* で切断し、エタノール沈殿し、リチウムアセテート法により KM304(WT)または KM306(Mutant)に形質転換した。Gene-free region への形質転換の成功を確認するため、以下の check primer Fw と Rv を用いてコロニーPCR した。Fw は薬剤耐性遺伝子の 3'末端に位置する T-TEF 領域に結合し、Rv は *zfsI⁺* 近傍のゲノム配列に結合する。

Fw- TATGTCGACTATGCGAAATACGCACAATCCGAATG,

Rv (野生型)- GTACGGATCCCCGACAGCACTTCTAGCAATGCTTCTT,

Rv (変異型)- GTACGGATCCCCGCCATGTTTCATTGTTTTTTA,

Check primer Fw (binds to T-TEF)- ATGCGAAGTTAAGTGCGCAG,

Check primer Rv (binds near the *zfsI⁺* gene)- CTCAATAAAAATGTAAGGAAG.

Ksg1(野生型と変異型)に mNG-Ras1CT を融合した株の作製

(Ras1 CT: STKCCVIC)

まずは、plasmid pFA6a-mNeonGreen-Ras1CT (Ras1CT: STKCCVIC)-bsdMX6 を作製した。以下の primer F と R を用いて、mNG の ORF の C 末端に Ras1CT 配列を付加した全長配列を増幅した。Ras1 の C 末端の 8 アミノ酸をコードする 24 ヌクレオチド(underlined)が mNG の C 末端側に続くように R primer を設計している。

F: CGGATC CCCGGGTTAATTAACATGGTATCAAAAGGCGAAGAAGATAAC

(*XmaI* site を含む)

R: AGAAGT GGCGCGCCCTAACATATAACACAACATTTAGTTGAACTACC

(*AscI* site を含む)

得られた PCR 産物を *XmaI* と *AscI* で制限酵素処理し、plasmid pFA6a-mNeonGreen-bsdMX6 にクローニングして、pFA6a-mNeonGreen-Ras1CT-bsdMX6 を作製した。ksg1-mNeonGreen の作製で得た F 片(野生型と変異型)、R 片、pFA6a-mNeonGreen-Ras1CT-bsdMX6 を鋳型として 2nd PCR を行った。得られた DNA fragment をリチウムアセテート法により野生株(JY333)に形質転換した。

【共焦点顕微鏡による mNG 融合タンパクの局在観察】

Ksg1-3xmNG の蛍光を観察するために使用した共焦点顕微鏡の情報と撮影条件を以下に示す。

共焦点顕微鏡 は、Leica SP8 TCS STED 3X FALCON equipped with HC PL APO ×100/1.40 NA oil objective lens を使用した。励起に用いたレーザー波長は 500 nm (mNG)であり、蛍光強度の定量には Fiji ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012)を使用した。

【分裂酵母のタンパク抽出とウェスタンブロッティング】

分裂酵母のタンパク抽出は以前報告された方法(Koch *et al.*, 2012)を参考にして行った。遠心集菌した細胞を 20% TCA に懸濁し、氷上で 20 分間放置した。その後、1M Tris で TCA を洗浄し、SDS sample buffer で懸濁し、95°Cで 10 分間煮沸した。煮沸後、懸濁液をガラスビーズ入りのチューブに移し、Micro Smash MS-100R (TOMY)で細胞を破碎し、注射針でチューブの底に穴を開け、新しいチューブを下に重ねて遠心し、新しいチューブに破碎液を全量回収した。その後、再度 95°Cで 10 分間煮沸し、遠心して上清を回収し、サンプルとした。

取得したタンパク抽出液を SDS-PAGE により分離し、セルロースメンブレンに転写した。5% スキムミルクあるいは Ez-block Chemi(ATTO)でブロッキング後、一次抗体反応と二次抗体反応を行った。発光検出には、Ez-West Lumi plus を使用し、Ez-capture で画像解析した。一次抗体は以下の濃度で使用した。

anti-mNeonGreen monoclonal antibody [32F6] (Chromotek) 1:10000、anti-phospho p70 S6 kinase monoclonal antibody(Thr389) (Cell Signaling Technology) 1:5000、anti- α -tubulin monoclonal antibody (Sigma Cat#T6074) 0.7:10000、anti-phospho p44/42 MAPK antibody(Erk1/2)(Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology) 1:10000、anti-HA[12CA5](Roche)1:10000、anti-phospho-eIF2 α (Ser52) polyclonal antibody (Thermo Fisher Cat#44-72) 1:5000、anti-eIF2 α polyclonal antibody (Invitrogen Cat#PA5-41916) 1:5000、anti-Atg13 antibody (Otsubo *et al.*, 2017) 1:10000

【リアルタイム PCR による遺伝子発現量の解析】

目的の菌株をOD₆₀₀≒1.0 (SD培地)まで培養し、『FavorPrep™ Tissue Total RNA Mini Kit』(FAVORGEN)を用いてRNAを抽出した。次に『ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover』(TOYOBO)を用いてcDNAを得た。このサンプルに対して『Eco™ real-time PCR system』(Illumina)と『THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix』(TOYOBO)を用いてリアルタイムPCR解析を行った。解析の際には*cdc2⁺*をコントロールとし、調べたい遺伝子の発現量を*cdc2⁺*の発現量に対する相対値のデータとして表した。

使用したプライマーを以下に示す。

Fw (*ksg1⁺* mRNA): ATCCTGGTCGTTTGAAGACC
 Rv (*ksg1⁺* mRNA): AGCACTTCTAGCAATGCTTC
 Fw (*ght5⁺* mRNA): TGTCGTGGTTCGTTGATTCC
 Rv (*ght5⁺* mRNA): CCAAATGCAGCGAGTGAGAC
 Fw (*cdc2⁺* mRNA): CCGAATTTTCAGAACTGGGG
 Rv (*cdc2⁺* mRNA): GTATAGTTCCGCAAAGGGAC

【グルコース取り込み量の解析】

分裂酵母の細胞内グルコース取り込み量の定量は、以前報告された方法(Maruyama *et al.*, 2022)で行った。概略図を Figure 3-2-1 に掲載した。

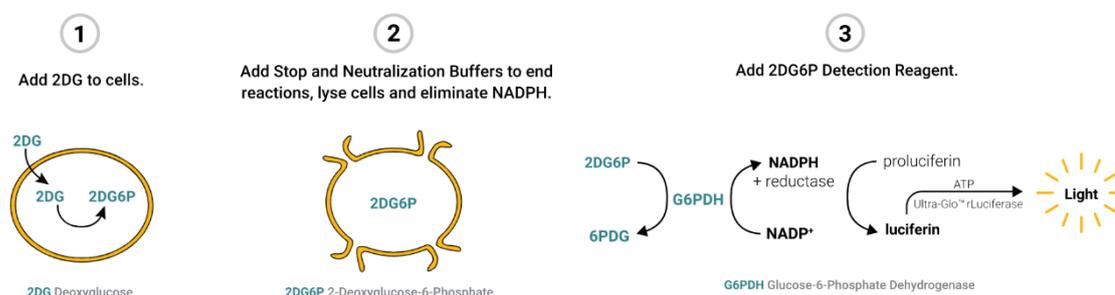


Figure 3-2-1. グルコース取り込み量の測定。

図は https://www.promega.jp/products/energy-metabolism/metabolite-detection-assays/glucose-uptake_glo-assay/?catNum=J1341 より引用した。2DG(2-deoxyglucose)を細胞に添加すると、迅速にリン酸化され 2DG6P(2-deoxyglucose-6-phosphate)に変換される(Step1)。Stop buffer を添加すると、2DG の輸送が停止され、細胞が溶解される(Step2)。迅速に G6PDH を添加すると、2DG6P は酸化され 6PDG を生じ、NADP+は還元され、NADPH を生じる。試薬に含まれる reductase は NADPH により、ルシフェリン前駆体からルシフェリン(発光酵素ルシフェラーゼの基質)へと変換させる(Step3)。

第3節 新規寿命関連因子 Ksg1 の同定

【No.3 変異株は長寿命の表現型を示す】

本研究のスクリーニングにより、経時寿命が延長する変異株を取得した。本研究では、No.3 変異株に焦点を当てて解析することにした。最初に、No.3 変異株の生存率を定量した。その結果、CFU(コロニー形成率)とスポットテストの両方の寿命測定から、No.3 変異株は長寿命の表現型を示すことが明らかになった(Figure 3-3-1)。

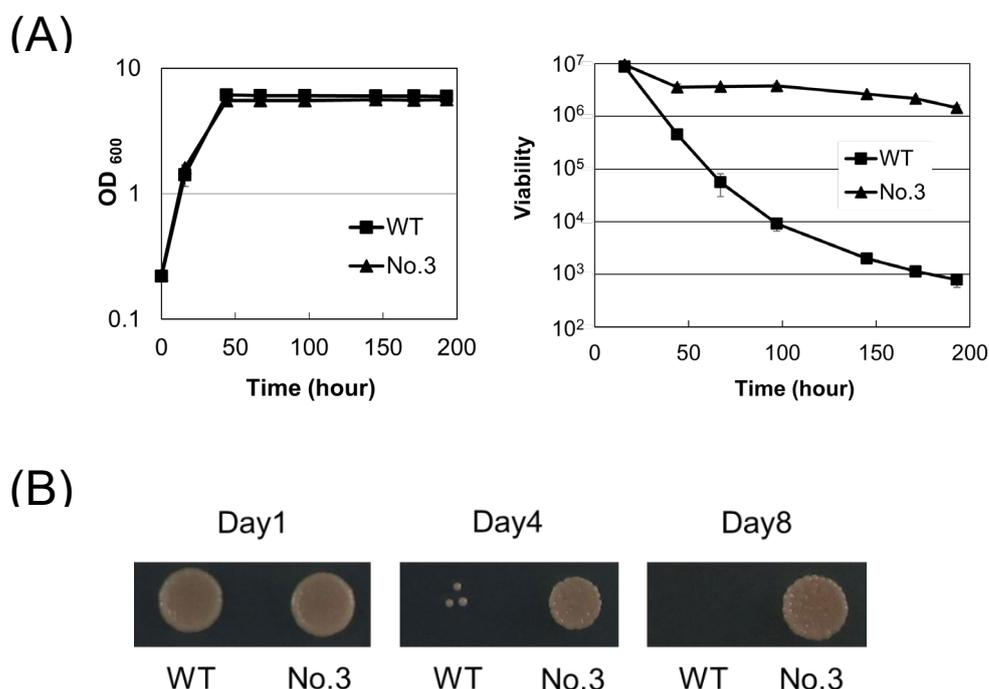


Figure3-3-1. No.3 変異株は長寿命の表現型を示す。

- (A) CFUによる寿命測定結果。No.3は長寿命の表現型を示す。WT(JY333)とNo.3の細胞増殖 (OD₆₀₀: 左グラフ)と生存率(右グラフ)の経時的変化を示した。3回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。
- (B) スポットテストによる寿命測定結果。SD培地で培養を開始してから、1,4,8日後にサンプリング及び希釈した後にYE固体培地にスポットした。

【新規寿命関連因子 Ksg1 の特定】

第2章で示した全ゲノムシーケンス解析結果より、No.3 変異株における経時寿命の延長が *ksg1* 遺伝子変異(540 W→STOP)によるものであることが示唆された。本論文では、この変異を *ksg1-3* と命名する。しかしながら、No.3 変異株には *ksg1-3* 以外の変異が含まれており、*ksg1⁺* 以外の遺伝子変異による経時寿命の延長という可能性が排除できていない。そこで、*ksg1-3* 変異が経時寿命延長の原因であるということを証明するために、次の二つの実験を行った。

一つ目は、No.3 変異株に野生型 *ksg1⁺* のプラスミドを高発現させ、寿命測定を行った。No.3 変異株の寿命延長が *ksg1-3* 変異に依存している場合、野生型 *ksg1⁺* を含むプラスミドを No.3 に導入することで長寿命の表現型が抑制されると考えられる。そこで、pREP1 vector に野生型 *ksg1⁺* を挿入したプラスミドを No.3 に導入し、寿命測定を行った。すると、No.3 に vector plasmid を導入した株(KM51)では長寿命の表現型を示すのに対し、plasmid *ksg1⁺* を導入した株(KM54)では、野生株並みの寿命に戻ることが分かった(Figure 3-3-2-A)。

二つ目は、野生株に *ksg1-3* 変異を導入し、寿命測定を行った。Two-step PCR 法により、野生株(JY333)に *ksg1-3* を導入した株を作製した(作製方法は第2節に記載)。作製株を本論文では *ksg1-3:kan^R* と命名した。この two-step PCR 法により *ksg1⁺* 遺伝子の近傍に挿入されるカナマイシン耐性遺伝子(*kan^R*)は *ksg1⁺* の終止コドンから 574-638 bp 下流に位置している(Figure 3-3-2-B)。変異導入した *ksg1-3:kan^R* 株で寿命測定を行ったところ、No.3 変異株並みの寿命延長効果が見られた(Figure 3-3-2-C)。

以上の二つの実験から、No.3 変異株の寿命延長が *ksg1-3* 変異に起因することが分かった。

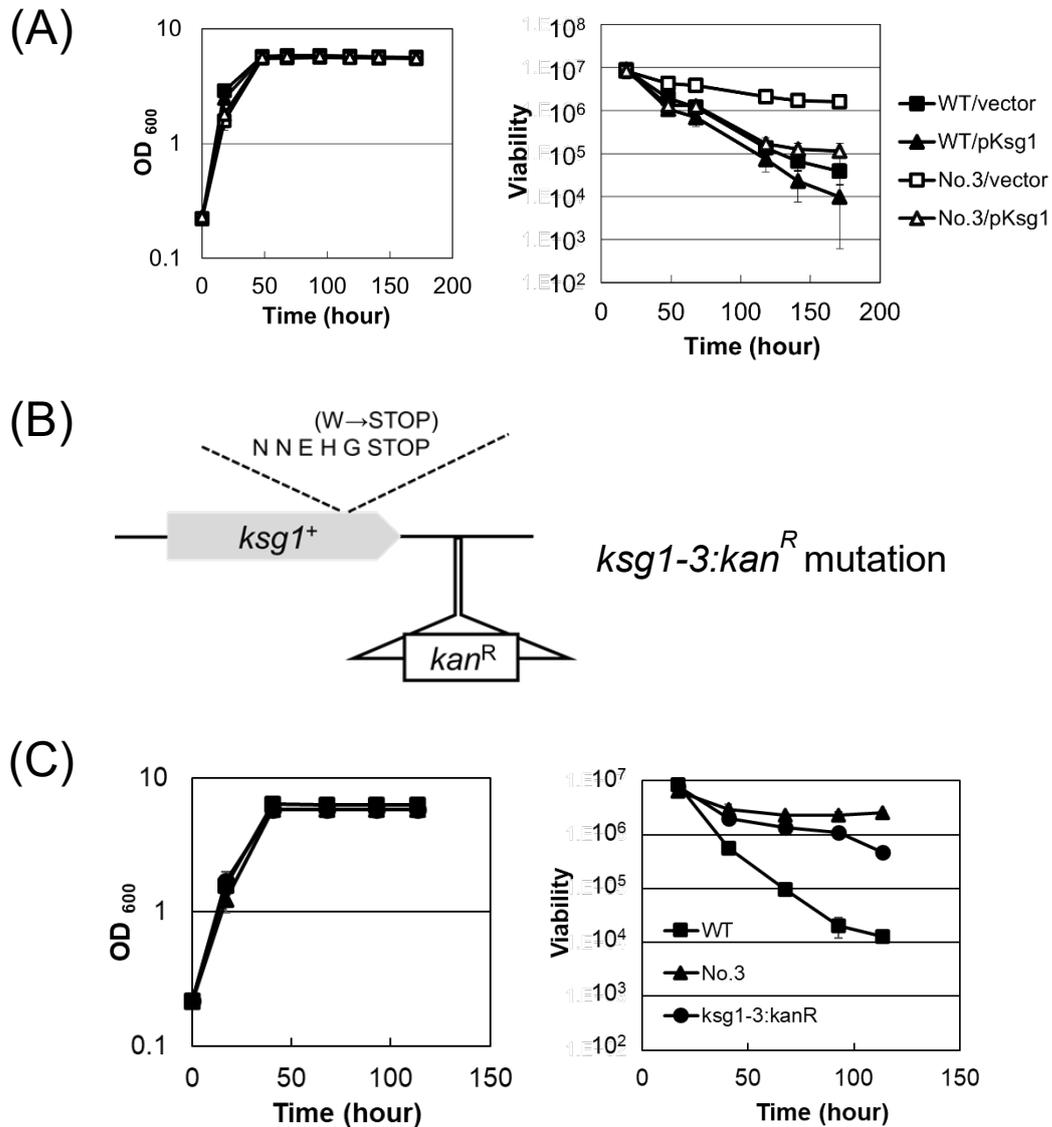


Figure3-3-2. *ksg1* 遺伝子変異は経時寿命を延長させる。

(A) *ksg1⁺* の高発現は *ksg1* 遺伝子変異による長寿命を抑制する。WT/vector(KM45), WT/pKsg1(KM48), No.3/vector(KM51), No.3/pKsg1(KM54) の細胞増殖 (OD₆₀₀: 左グラフ) と生存率 (右グラフ) の経時的変化を示した。3回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。

(B) KM58 (*ksg1::ksg1mutation kan^R*) の株設計の構造を示す。Two-step PCR 法により、*ksg1⁺* 遺伝子の終止コドンから 574-638 bp 下流にカナマイシン耐性遺伝子を挿入し、野生株 (JY333) に *ksg1-3* 変異 (540 W→STOP) を導入した KM58 を作製した。

(C) KM58 は長寿命の表現型を示す。WT (JY333), No.3, *ksg1-3:kan^R* (KM58) の細胞増殖 (OD₆₀₀: 左グラフ) と生存率 (右グラフ) の経時的変化を示した。3回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。

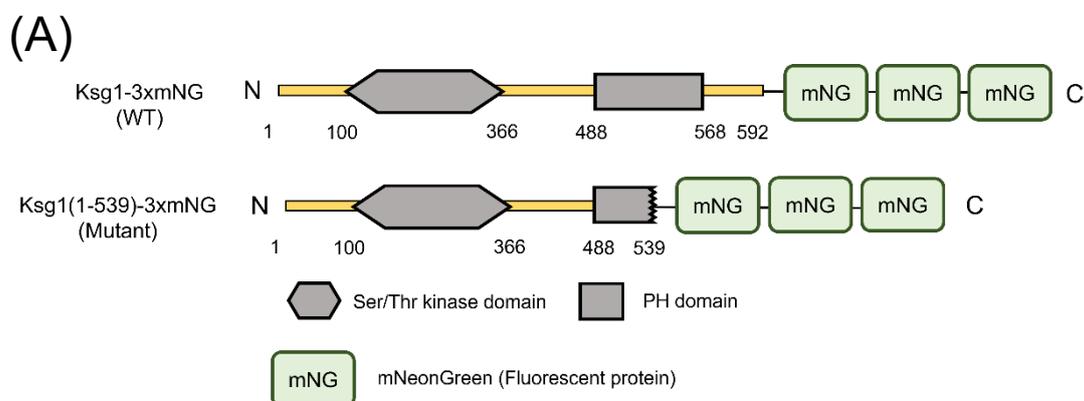
第4節 *ksg1-3*変異による Ksg1 の細胞膜局在及びタンパク質量の減少

本節では、変異型 Ksg1 の特徴についてまとめた。まず、*ksg1⁺* mRNA 発現量を調べた。WT と *ksg1-3* の間で発現量に有意差は見られなかった(Supplemental Figure S3-A)。次に、Ksg1 タンパクについて解析することにした。

上述の通り、取得した No.3 変異株には細胞膜局在に重要な PH domain 内にナンセンス変異(540 W→STOP)が生じていた(Figure 3-1-1-A)。

そこで、変異型 Ksg1 が細胞膜に局在しているのかどうかを調べた。Ksg1 の分布を定量的に解析するために、Ksg1(野生型と変異型)の C 末端側に三つの mNeonGreen(3xmNG)を融合させた株を作製した。ただし、変異型 Ksg1 に 3xmNG を融合したタンパクは、*ksg1-3* 変異により翻訳途中にナンセンス変異(540 W→STOP)が生じていることを考慮し、539 番目の Gly 残基の直後に 3xmNG を融合させ、Ksg1(1-539)-3xmNG と命名した。Ksg1-3xmNG 及び Ksg1(1-539)-3xmNG の模式図を Figure 3-4-1-A に示した。

Ksg1-3xmNG と Ksg1(1-539)-3xmNG を局在観察し、細胞幅に沿った line-scan により蛍光強度を定量した(Figure 3-4-1-B)。すると、Ksg1-3xmNG は細胞膜に集中して局在しているのに対し、Ksg1(1-539)-3xmNG は細胞膜に集中しておらず、細胞質に拡散していた。この結果は、*ksg1-3* により Ksg1 の細胞膜局在は急激に減少することを示している。次に、mNG 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより Ksg1 タンパク質量を解析した。すると、Ksg1(1-539)-3xmNG のタンパク質量は減少することが分かった(Figure 3-4-1-B)。この結果から、変異型 Ksg1 は不安定化により分解を受けることが考えられる。尚、Ksg1(1-539)-3xmNG (Strain KM306)は Ksg1-3xmNG (Strain KM304)よりも長寿命の表現型を示していることは確認済みである(Supplemental Figure S3-B)。



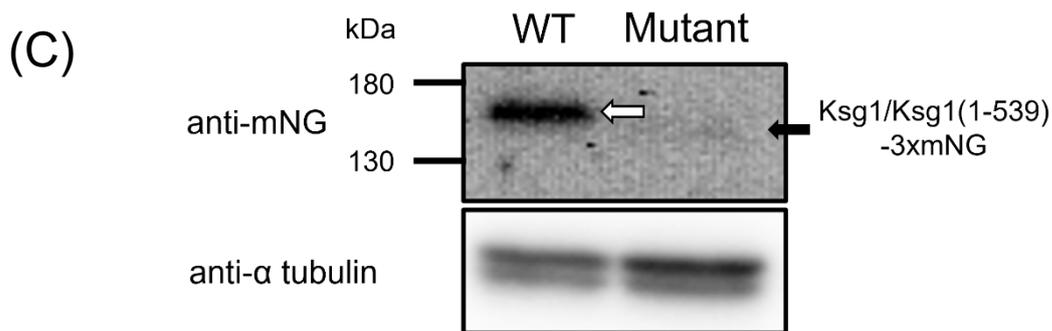
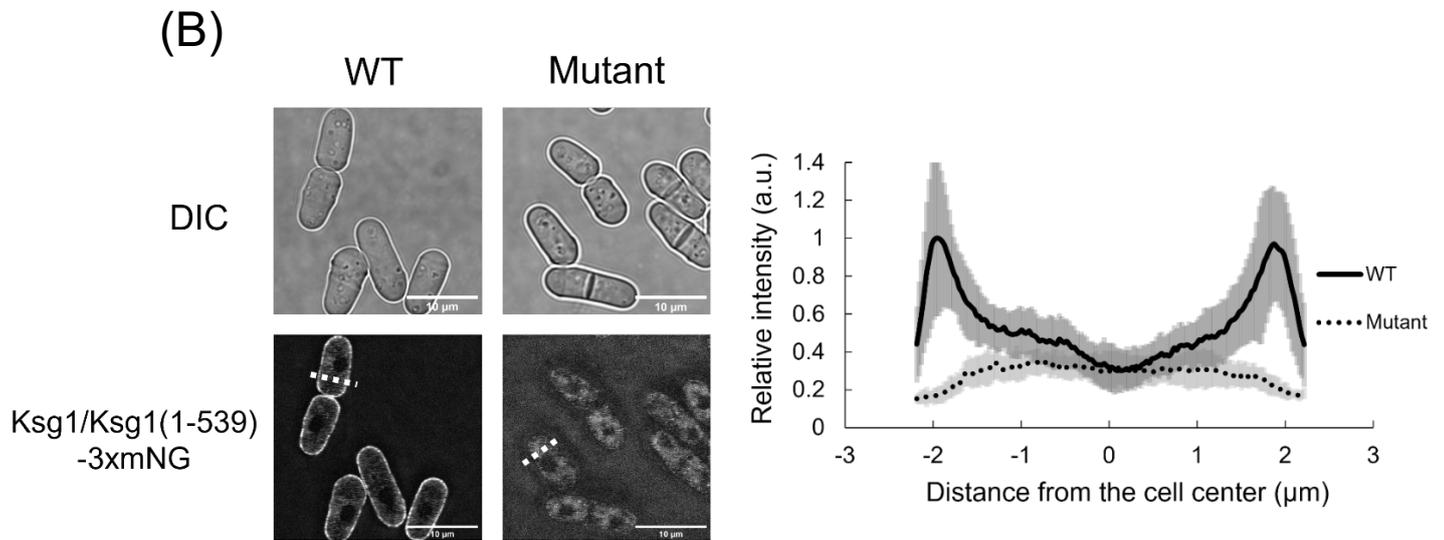


Figure 3-4-1. 変異型 Ksg1 は細胞膜局在並びにタンパク質量が減少する。

- (A) Ksg1-3xmNG または Ksg1(1-539)-3xmNG の模式図。2 step PCR 法(第 2 節に詳細を記した)により、WT(JY333)の *ksg1+* 遺伝子の C 末端側に 3xmNG をタグ付けした株を Ksg1-3xmNG(Strain: KM304)と呼び、*ksg1-3* 変異(540 W→STOP)の直前の 539 番目の Gly 残基の直後に 3xmNG をタグ付けした株を Ksg1(1-539)-3xmNG(Strain: KM306)と呼ぶことにした。
- (B) (左側)YE 培地で培養したときの、Ksg1-3xmNG (WT: KM304)と Ksg1(1-539)-3xmNG (Mutant: KM306)の局在を示した。(右側)10 個の細胞について、細胞幅(白色の点線)に沿って line scan し、蛍光強度を定量した。全データの最大値を 1 とした相対的な Relative intensity のグラフを作製した。縦の薄い色の線は標準偏差を示している。
- (C) ウェスタンブロッティングによる、mNG 抗体を使用した Ksg1 タンパク質量の定量結果。Ksg1-3xmNG (KM304)、Ksg1(1-539)-3xmNG (KM306)を OD=1.0(SD 培地)で集菌した。Ksg1-3xmNG と Ksg1(1-539)-3xmNG の位置はそれぞれ白矢印と黒矢印で示しており、分子量の位置は異なる。Loading control として α -tubulin を使用した。

第5節 Ksg1 タンパク質量の減少が寿命延長の主たる要因

*ksg1-3*変異により、Ksg1 の細胞膜局在及びタンパク質量が減少することが前節の結果より明らかとなった。そこで、*ksg1-3* 変異による寿命延長が細胞膜局在の減少あるいはタンパク質量の減少の内どちらに起因しているのかを調べた。

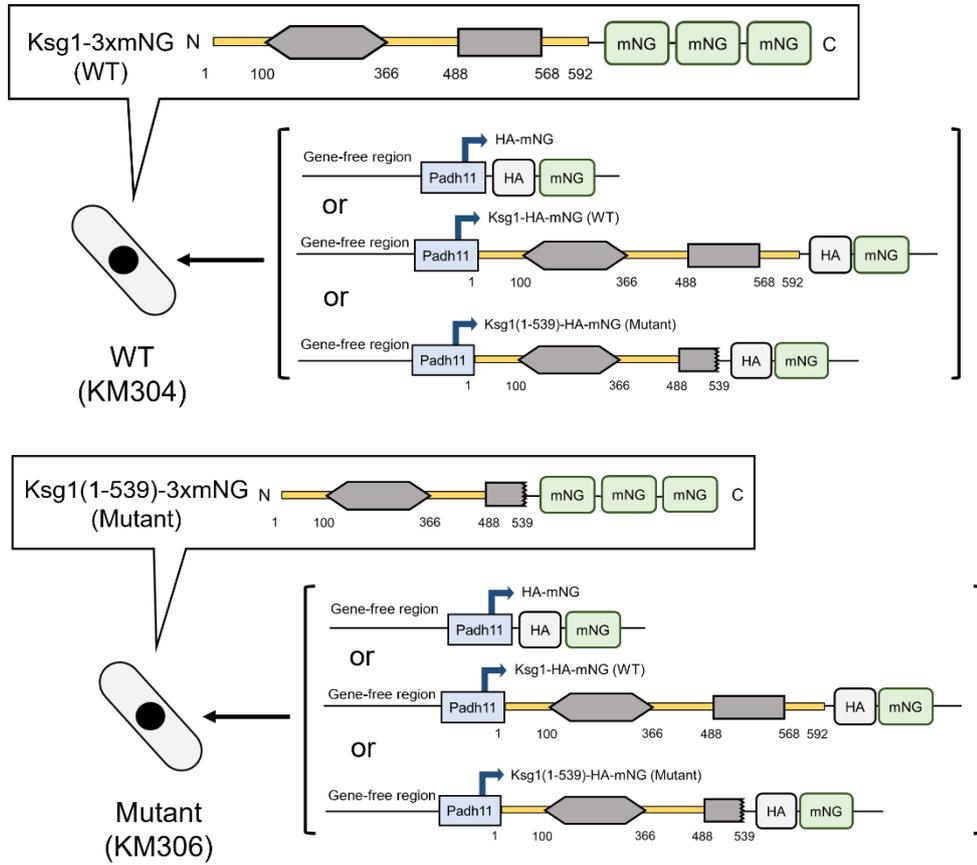
【タンパク質量の観点】

まず、タンパク質量の観点から述べる。タンパク質量の減少が Ksg1 変異による寿命延長に寄与しているのかを証明するため、元々の染色体上に野生型 Ksg1(Ksg1-3xmNG, KM304)と変異型 Ksg1(Ksg1(1-539)-3xmNG, KM306)にそれぞれ HA-mNG(control)、Ksg1-HA-mNG、Ksg1(1-539)-HA-mNG を高発現させた株を作製した(作製方法は第2節を参照)(Figure 3-5-1-A)。今後の解析でこれらのタンパク質量を測定するために、タグ付きの Ksg1 を高発現することにした。そのため、Figure 3-3-2-A の寿命測定で用いた *ksg1+*を高発現させるプラスミドは、以降の実験で使用していない。

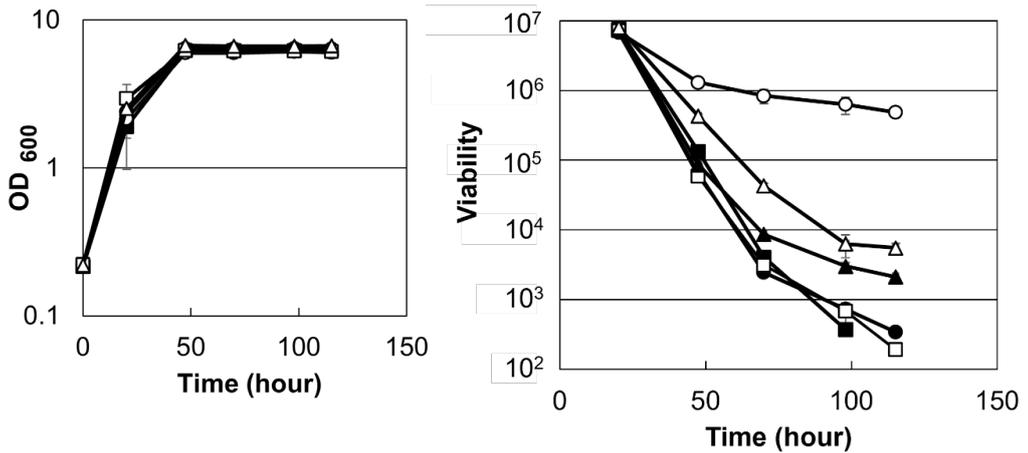
最初に、これらの株で経時寿命を調べた。すると、Ksg1-HA-mNG の高発現だけでなく Ksg1(1-539)-HA-mNG の高発現においても Ksg1 変異による寿命延長が抑制されることが分かった(Figure 3-5-1-B)。

次に、ウエスタンブロッティングにより、高発現した Ksg1-HA-mNG と Ksg1(1-539)-HA-mNG のタンパク質量を解析した。Figure 3-5-1-C に示したように、Ksg1(1-539)-HA-mNG のタンパク質量は Ksg1-HA-mNG のタンパク質量よりも少なく、不安定化されていることが考えられる。発現量の低かった Ksg1(1-539)-HA-mNG が Ksg1 としての機能を有しているのかを調べるために、*ts208*変異株を使用した(Figure 3-1-1-A)。第1節で述べたように、先行解析された *ts208*は高温感受性を示すため、これらのタンパク質の高発現で *ts208*の高温感受性が相補されるのかを調べた。すると、Ksg1-HA-mNG の高発現だけでなく、Ksg1(1-539)-HA-mNG の高発現でも高温感受性が回復することが分かった(Figure 3-5-1-D)。この結果から、発現レベルが低かった Ksg1(1-539)-HA-mNG は Ksg1-HA-mNG と同程度であるかどうかは不明だが、Ksg1 としての機能を有していることが予想される。

(A)



(B)



- WT control
- WT + ksg1-HA-mNG
- ▲ WT + ksg1(1-539)-HA-mNG
- Mutant control
- Mutant + ksg1-HA-mNG
- △ Mutant + ksg1(1-539)-HA-mNG

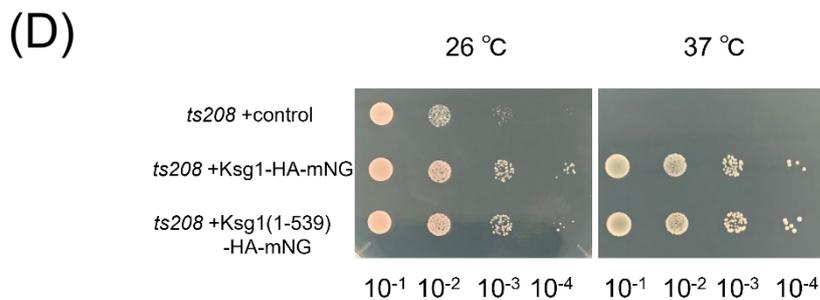
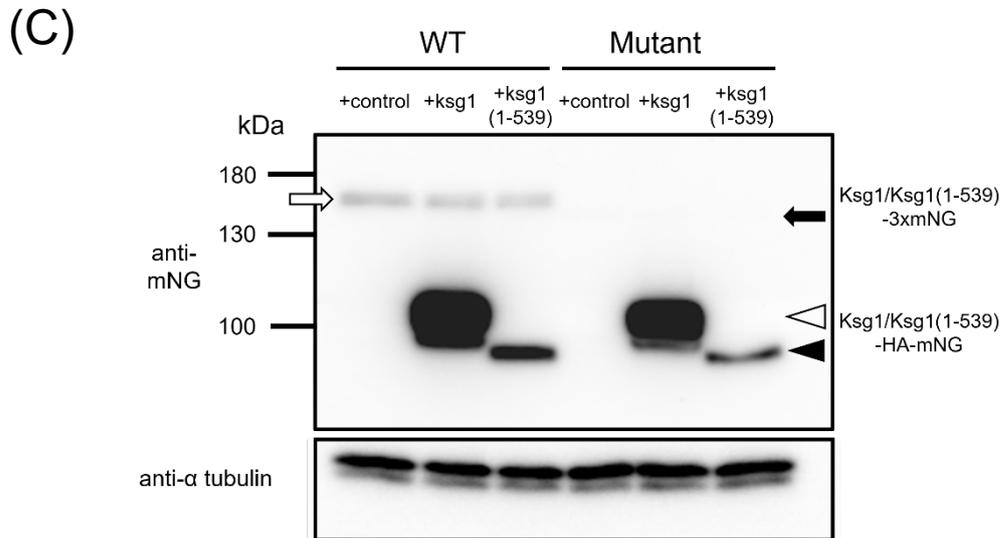


Figure 3-5-1. Ksg1-HA-mNG(野生型)と Ksg1(1-539)-HA-mNG(変異型)を高発現したときの解析結果。

- (A) 野生型(Ksg1-3xmNG, KM304)と変異型(Ksg1(1-539)-3xmNG, KM306)の gene-free region(z locus)にそれぞれ HA-mNG(control)、Ksg1-HA-mNG(野生型)、Ksg1(1-539)-HA-mNG(変異型)を高発現させた株の作製の模式図。株作製の詳細は第2節に掲載した。
- (B) Ksg1-HA-mNG と Ksg1(1-539)-HA-mNG の高発現は *ksg1-3* の寿命延長を抑制する。WT+control(KM329), WT+Ksg1-HA-mNG(KM348), WT+Ksg1(1-539)-HA-mNG(KM337), Mutant+control(KM331), Mutant +Ksg1-HA-mNG(KM336), Mutant +Ksg1(1-539)-HA-mNG (KM346)、以上の6つの株を寿命測定した。それぞれ Ksg1-HA-mNG と Ksg1(1-539)-HA-mNG を高発現した KM336 株と KM346 株では *ksg1-3* による長寿命化が抑制された。細胞増殖 (OD₆₀₀: 左グラフ)と生存率(右グラフ)の経時的変化を示した。3回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。
- (C) ウェスタンブロッティングによる、mNG抗体を使用した Ksg1タンパク質量の定量結果。

WT +control(KM329), WT +Ksg1-HA-mNG(KM348), WT +Ksg1(1-539)-HA-mNG(KM337), Mutant +control(KM331), Mutant +Ksg1-HA-mNG(KM336), Mutant +Ksg1(1-539)-HA-mNG(KM346)、以上の6つの株においてOD=1.0(SD培地)で集菌した。Ksg1(1-539)-HA-mNGのタンパク質量(黒矢尻)はKsg1-HA-mNGのそれ(白矢尻)よりも少なかった。KM304とKM306由来のKsg1-3xmNGとKsg1(1-539)-3xmNGのバンドはそれぞれ白矢印と黒矢印で示した。Ksg1(1-539)-3xmNG由来のバンドはこの画像では見えない。

(D) Ksg1-HA-mNG及びKsg1(1-539)-HA-mNGの高発現は*ts208*の温度感受性を相補する。Control(KM327)、Ksg1-HA-mNG高発現株(KM317)、Ksg1(1-539)-HA-mNG高発現株(KM349)をYE培地(26°C)で培養し、指定の希釈率でYE培地にスポットした。YE培地は記載の温度で3日間静置培養し、その後写真撮影した。

【細胞膜局在の観点】

次に、細胞膜局在の観点から述べる。Ksg1の細胞膜局在が経時寿命に与える影響を解析するため、野生型Ksg1と変異型Ksg1のC末端側に細胞膜局在シグナル配列を付加し、経時寿命を調べることにした。

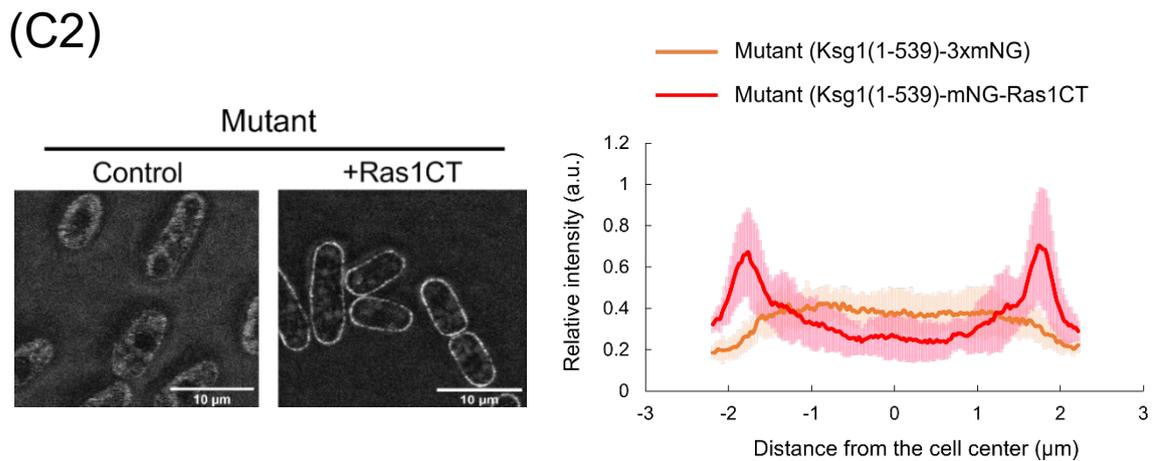
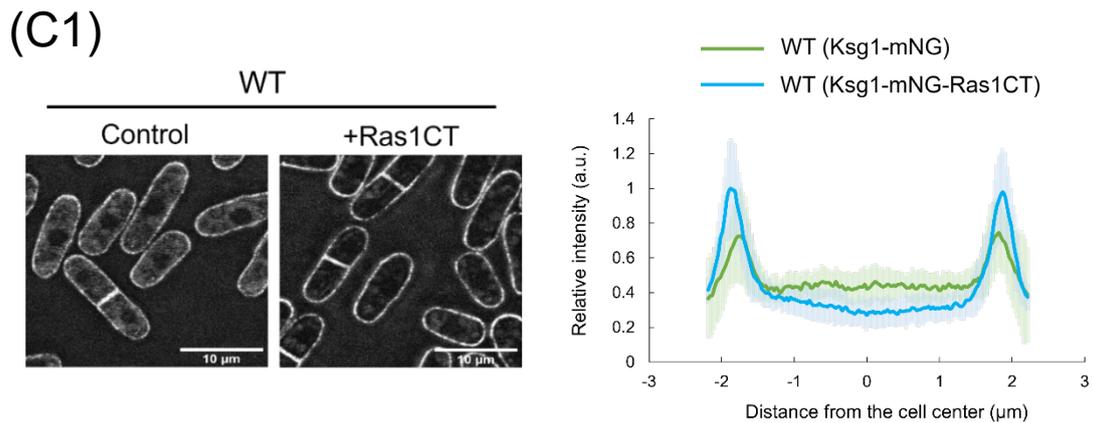
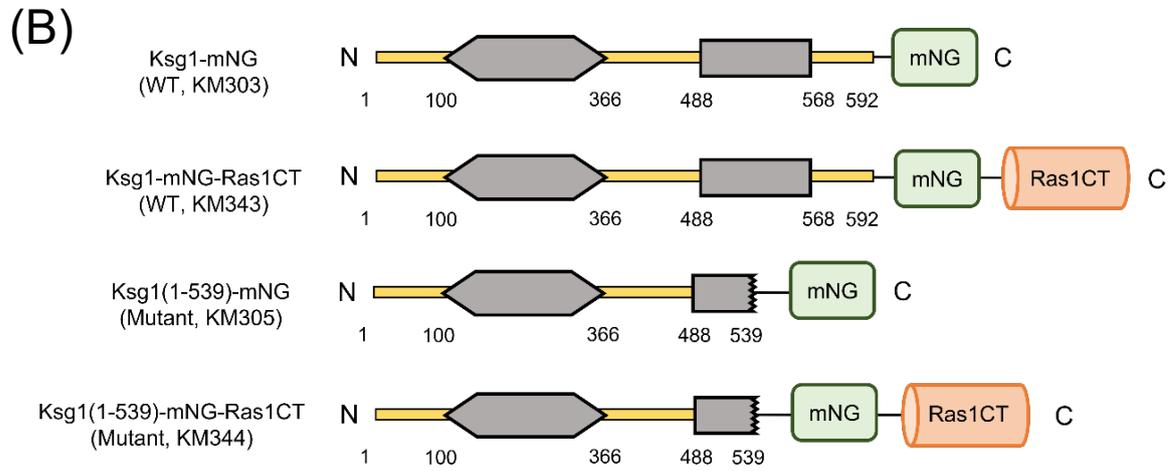
Figure 3-5-2-Aに分裂酵母Ras1のC末端配列を掲載した。赤色と青色で塗られたアミノ酸残基がそれぞれパルミトイル化(Palmitoylation)、プレニル化(Prenylation)されることでRas1は細胞膜局在を可能にする(Sánchez-Mir *et al.*, 2014)。Ras1のC末端アミノ酸配列(STKCCVIC, 以降Ras1CTと呼ぶ)を目的のタンパク質のC末端側に付加することで、そのタンパク質を細胞膜に局在させることが可能になる(Franco *et al.*, 2017)。その点に着目し、野生型と変異型Ksg1のC末端側にmNGとRas1CTをタグ付けした株を作製した(Figure 3-5-2-B)。

まずは、これらのタンパク質について局在観察した。局在観察結果と細胞幅に沿ったline-scanによる蛍光強度の定量結果をFigure 3-5-2-Cに掲載した。Ras1CT配列の付加により、変異型Ksg1(1-539)-mNG-Ras1CTは細胞膜局在した(Figure 3-5-2-C2)。

次に、経時寿命への影響を調べた。Ras1CT配列を付加しても野生株並みに寿命延長は抑制されなかった(Figure 3-6-5-D)。また、Ksg1(1-539)-mNG-Ras1CTのタンパク質量はKsg1(1-539)-mNGのタンパク質量と比較しても変化は見られなかった(data not shown)。

以上の結果より、*ksg1-3*変異による寿命延長は寧ろKsg1タンパク質量の減少に起因し、膜局在の減少の影響は比較的低いことが示唆された。ただし、Ksg1-mNGとKsg1(1-539)-mNGにRas1CTを付加することで、生存率に変化が見られたため、局在の影響を完全に排除することはできない。

(A) Ras1- DEENDKSSTKCCVIC



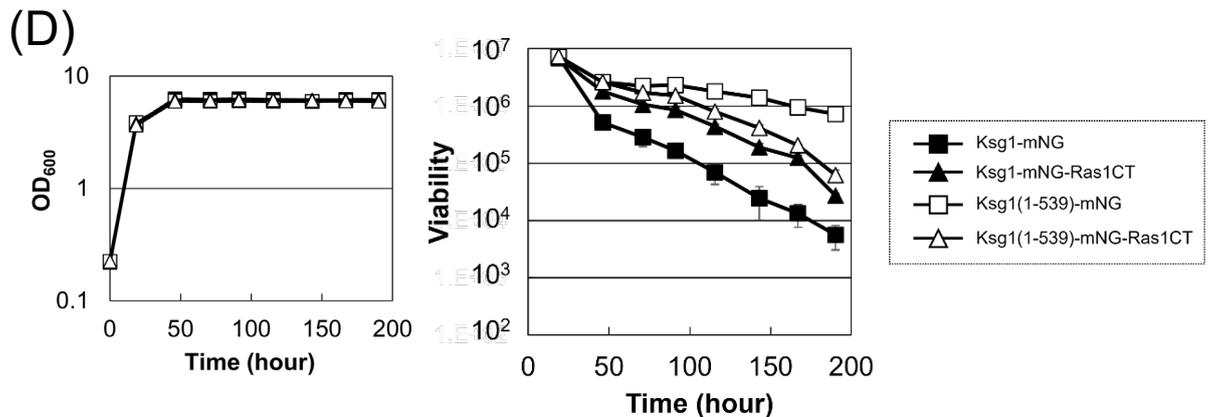


Figure3-5-2. Ksg1-mNG に細胞膜局在配列(Ras1CT)を付加したときの膜局在及び経時寿命への影響。

- (A) 分裂酵母 Ras1 の C 末端配列。パルミトイル化、プレニル化されるアミノ酸残基をそれぞれ赤色、青色で示した。下線を付けた 8 アミノ酸が細胞膜局在配列の Ras1CT に相当する。
- (B) KM303(Ksg1-mNG), KM343(WT-mNG-Ras1CT), KM305(Ksg1(1-539)-mNG), KM344(Ksg1(1-539)-mNG-Ras1CT)の株の構築。ksg1⁺の染色体上へ形質転換することでこれらの株を作製した。KM343 と KM344 の株作製の詳細は第 2 節に掲載した。
- (C) YE 培地で培養したときの、mNG 融合タンパク質の局在を示した。10 個の細胞について、細胞幅に沿って line scan し、蛍光強度を定量した。それぞれのグラフにおいて、全データの最大値を 1 とした相対的な Relative intensity のグラフを作製した。縦の薄い線は標準偏差を示している。(C1)Ksg1-mNG(KM303) と Ksg1-mNG-Ras1CT(KM343)の局在を示した。野生型 Ksg1 に Ras1CT 配列を付加することで、細胞膜局在の量が定性的に増加することが line-scan の結果より明らかになった。(C2)Ksg1(1-539)-3xmNG(KM306)と Ksg1(1-539)-mNG-Ras1CT(KM344)の局在を示した。ただし、Ksg1(1-539)-mNG はタンパク質量が少なかったため、観察には Ksg1(1-539)-3xmNG(Strain KM306)を使用した。
- (D) 寿命測定結果。Ksg1-mNG(KM303), Ksg1-mNG-Ras1CT(KM343), Ksg1(1-539)-mNG(KM305), Ksg1(1-539)-mNG-Ras1CT(KM344)の細胞増殖 (OD₆₀₀: 左グラフ) と生存率(右グラフ)の経時変化を示した。3 回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。

第6節 Ksg1による寿命制御機構の検討

第1項 序

これまで、*ksg1-3* 変異による寿命延長機構について多角的に解析した。本節では、「カロリー制限による寿命延長との関係の検討(第2項)」、「TORC1経路との関係の検討(第3項)」、「Ksg1の標的基質の検討(第4項)」についての解析結果について報告する。

第2項 Ksg1とカロリー制限による寿命延長との関係の検討

分裂酵母では、培地中のグルコース濃度を制限することで経時寿命が延長し、この現象はカロリー制限(CR)による寿命延長として知られている(Chen & Runge, 2009; Ito *et al.*, 2010)。本研究では、*ksg1-3*変異による寿命延長がCRの寿命延長に依存するのかを調べた。

分裂酵母には、8つのヘキソーストランスポーター(Ght1-8)が存在する(Heiland *et al.*, 2000; Lock *et al.*, 2019)。その内、Ght1, Ght2, Ght5, Ght8がグルコース取り込みに関与しており、その中でもGht5が主要なグルコーストランスポーターと考えられている(Saitoh *et al.*, 2015)。先行解析より、これらのヘキソーストランスポーターの各欠損株のグルコース取り込み量を調べたところ、 $\Delta ght5$ と $\Delta ght2$ でグルコース取り込み量が減少した(Maruyama *et al.*, 2022)。また、低グルコース培地ではGht5タンパク質量は増加し、Ght2タンパク質量は減少する(Saitoh *et al.*, 2015)。

さらに、CR(Glucose 0.5%)条件でグルコース取り込み量を測定したところ、通常条件(Glucose 2%)と比較してグルコース取り込み量は、野生株では増加する一方、 $\Delta ght5$ では変化が見られなかった。このことは、低グルコース状態でのグルコース取り込みには、主にGht5が関与することが考えられる(Maruyama *et al.*, 2022)。

また、当研究室で解析されているNnk1長寿変異株では、*ght5⁺* mRNA発現量が低下し(Kurauchi *et al.*, 2017)、また $\Delta ght5$ は他のヘキソーストランスポーター欠損株とは異なり、経時寿命が延長する(Maruyama *et al.*, 2022)。

以上のことから、 $\Delta ght5$ ではグルコース取り込みが制限され、CR様の寿命延長を示すことが考えられる(Maruyama *et al.*, 2022)。

また、Ght5を取り巻く細胞環境をFigure 3-6-1-Aに示した。低グルコース状態では、Ght5は細胞膜に局在しており、Ght5の局在はGad8やTORC2(Tor1)により厳密に制御される(Saitoh *et al.*, 2015; Toyoda *et al.*, 2021a)。Gad8はKsg1とTORC2によりリン酸化され(Matsuo *et al.*, 2003)、*gad8*や*tor1*(TORC2)の変異株では、Ght5は低グ

ルコース状態でも膜局在できない(Saitoh *et al.*, 2015)。また、窒素枯渇条件では、 α -arrestin Aly3 に依存する形で Ght5 はエンドサイトーシスによる分解を受ける(Toyoda *et al.*, 2021a)。一方で、低グルコース状態では、Ght5 はユビキチン化されず、膜局在を維持し、グルコースを細胞内に取り込む(Toyoda *et al.*, 2021a)(Figure 3-6-1-A)。

哺乳類筋細胞では、インスリンに応答して細胞内へのグルコース取り込みが誘導される(Ojuka *et al.*, 2012; Watson & Pessin, 2006)。

Ksg1 オルソログである PDK1 が関与するグルコース取り込み機構の簡略な流れ図を Figure 3-6-1-B に示した。インスリンが受容体に結合すると、PI(3,4,5)P₃ が産生され、PH domain をもつ PDK1 と Akt(Gad8 オルソログ)が PI(3,4,5)P₃ を介して細胞膜に膜局在する。さらに、atypical protein kinase C isoforms (aPKCs)が PDK1 によりリン酸化され、グルコース取り込みに関与する(Farese, 2002; Farese *et al.*, 2005)。そして、GLUT4 小胞の細胞膜への輸送が促進され、GLUT4 によりグルコースが細胞内に取り込まれる(Bryant *et al.*, 2002)。

以上のことから、*ksg1-3* 変異で *ght5*⁺mRNA の発現量の低下や Ght5 の局在異常、そして細胞内へのグルコース取り込み量が低下した場合、*ksg1-3* 変異による寿命延長は CR による寿命延長と同じ機構を介していることが予想されたため、これらについての解析を行った。

Figure 3-6-2-A に示したように、野生株と *ksg1-3* 変異株において、*ght5*⁺ mRNA 量に有意な差は見られなかった。また、先述のように Ksg1 の基質である Gad8 は Ght5 を制御しているため、*ksg1-3* 変異により Ght5 の膜局在に影響を与えるかどうかを調べた。Ght5 は低グルコース状態でタンパク質量が増加し、膜局在する。*ksg1-3* 変異が Ght5 の膜局在の制御に関与するのかを調べるため、*ght5*⁺ 発現が誘導される低グルコース条件で Ght5 の局在を観察した。培養条件と Ght5 観察結果を Figure 3-6-2-B に掲載した。*ksg1-3* 変異でも、低グルコース状態では Ght5 は膜局在していることが分かった。また、*ksg1-3* 変異によるグルコース取り込み量の変化は見られなかった(Figure 3-6-2-C)。

以上の結果から、*ksg1-3* 変異による寿命延長に CR の寿命延長は関与していないことが示唆された。

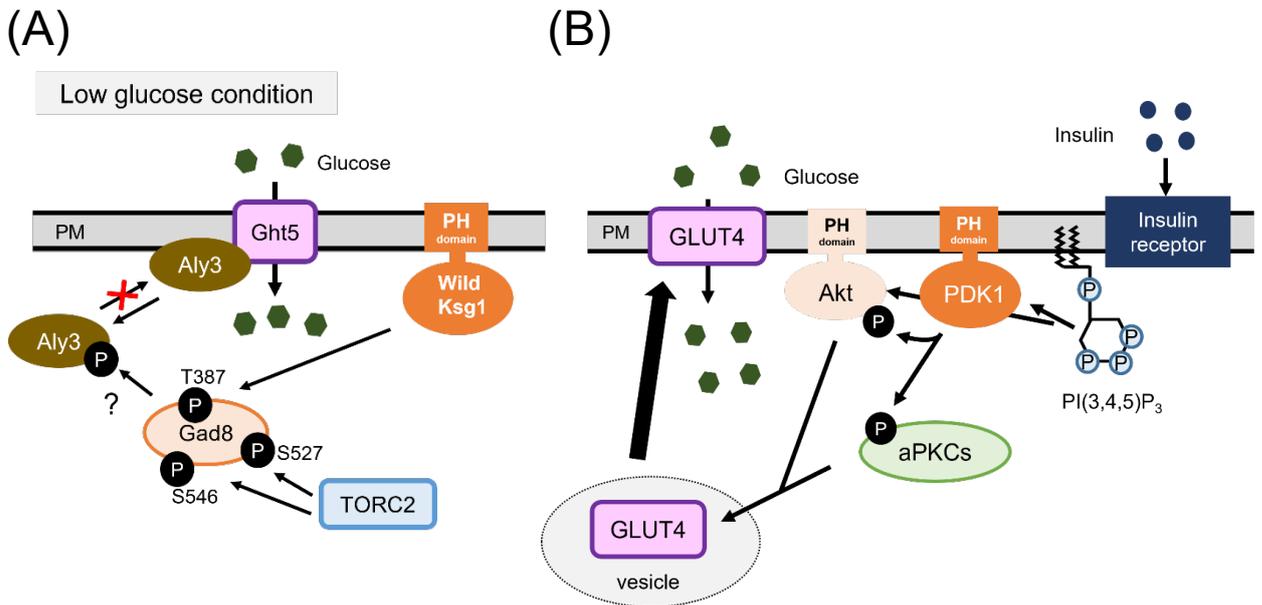


Figure 3-6-1. 分裂酵母と哺乳類筋細胞におけるグルコース取り込みの模式図。

- (A) 低グルコース状態での分裂酵母のグルコース取り込みの簡略図。Ksg1, Gad8, TORC2 が Ght5 の細胞膜局在の制御に関与している。Gad8 は Ksg1 により Thr378 残基を、TORC2(Tor1)により Ser527, Ser546 残基をリン酸化される。図のように低グルコース条件では、Ght5 は細胞膜に局在しており、Aly3 に依存したユビキチン化を受けない。これは、Gad8 により Aly3 がリン酸化されるためであると予想されている(Manning & Cantley, 2007; Toyoda & Saitoh, 2021b)。一方、窒素枯渇条件では、Ght5 は、 α -arrestin Aly3 に依存してユビキチン化され、エンドサイトーシスにより分解される。図は Toyoda & Saitoh, 2021b を参考に作製した。
- (B) 哺乳類筋細胞による GLUT4 を介したグルコース取り込みの簡略図。グルコース取り込み機構はインスリンに依存するものと依存しないものがあり、この図は PDK1 によるインスリンに依存したグルコース取り込みの過程を示している。インスリンが受容体に結合すると、PI(3,4,5)P₃ が産生され、PDK1 と Akt が細胞膜局在する。そして、PDK1 が下流因子である Akt と aPKC を活性化し、GLUT4 が細胞膜表面に輸送される。

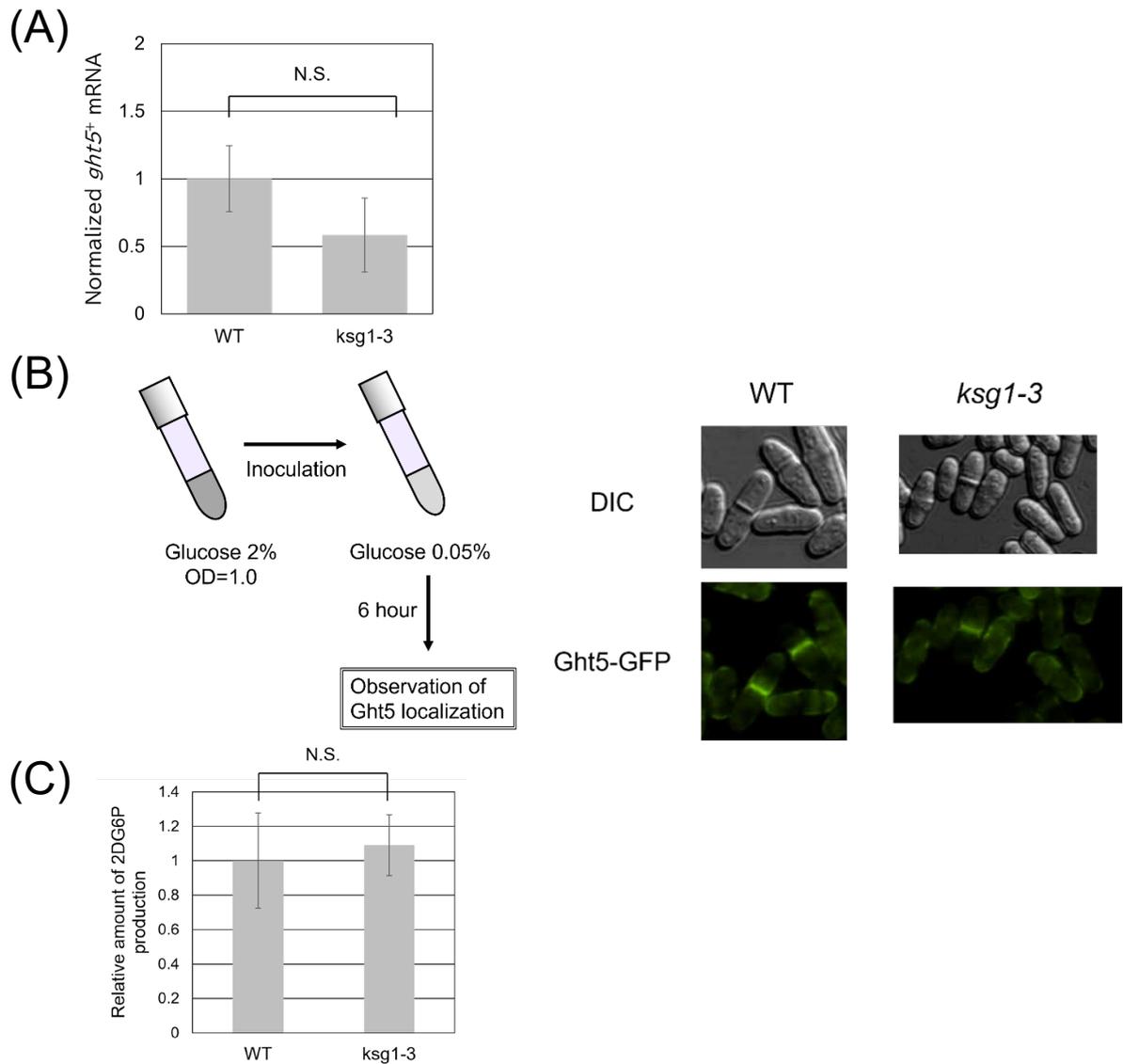


Figure 3-6-2. *ksg1-3* 変異株は CR による寿命延長に関与せず、グルコース取り込みに影響を与えない。

- (A) WT(JY333)と *ksg1-3*(No.3)の間で、*ght5⁺* mRNA の発現量に有意な差は見られない。WT(JY333)と *ksg1-3*(No.3)を OD=1.0(SD 培地)で集菌し、RT-PCR で発現量を解析した。Loading control として *cde2⁺* mRNA を解析した。
- (B) Ght5 の局在観察結果。(左図)Ght5 局在観察のための培養条件。2% Glucose を含む EMM 培地(OD=1.0)で培養し、その後 0.05% Glucose の低グルコースの EMM 培地で 6 時間培養し、Ght5 局在を調べた。(右図)Ght5 の局在。低グルコース状態では、Ght5 は隔壁あるいは細胞頂端に局在するが、*ksg1-3* 変異の有無による顕著な局在変化は見られなかった。Nikon ECLIPSE TI を用いて明視野及び GFP 蛍光を観察した。
- (C) WT(JY333)と *ksg1-3* 変異株の 2DG6P の生成量。OD=1.0(SD 培地)で集菌した。生成した 2DG6P 量をもとにグルコース取り込み量を評価している。

第3項 Ksg1 と TORC1 経路との関連性の検討

Target of rapamycin (TOR)は高度に保存された Ser/Thr kinase であり、分裂酵母では、TORC1 と TORC2 の二種類の異なる複合体として機能し、生育や代謝を制御する (Figure 1-2-5)。分裂酵母を含め、線虫やマウスにおいて TOR の活性低下により寿命延長することが報告されている (Rodríguez-López *et al.*, 2020; Kapahi *et al.*, 2004; Polak & Hall, 2009)。そこで、本研究では *ksg1-3* 変異の寿命延長が TORC1 経路に関与するのかを調べた。

分裂酵母 TORC1 は、触媒サブユニットとして Tor2 が機能しており、S6 キナーゼである Psk1 をリン酸化する (Nakashima *et al.*, 2012)。Psk1 は本研究の解析対象である Ksg1 と TORC1 (Tor2) によりリン酸化され、Ksg1 は kinase domain 内の activation loop の Ser-248 残基をリン酸化し、Tor2 は turn motif(TM)内の Thr-392 残基と hydrophobic motif(HM)内の Thr-415 残基をリン酸化する (Figure 3-6-3-A)。TORC1 に依存した HM 内の Thr-415 残基のリン酸化レベルは、哺乳類 S6K1 (S6 kinase) のリン酸化を検出する抗体を用いることで測定可能であることが既に報告されている (Morozumi *et al.*, 2021; Chia *et al.*, 2017; Nakashima *et al.*, 2012) (Figure 3-6-3-A)。

まずは、この抗体を用いて *ksg1-3* 変異で Psk1 (Thr-415) の TORC1 によるリン酸化レベルが変化するのかを調べた。すると、*ksg1-3* 変異により、Psk1 Thr-415 のリン酸化レベルが減少することが明らかとなった (Figure 3-6-3-B)。この結果から *ksg1-3* 変異により、TORC1 活性が減少することが予想された。

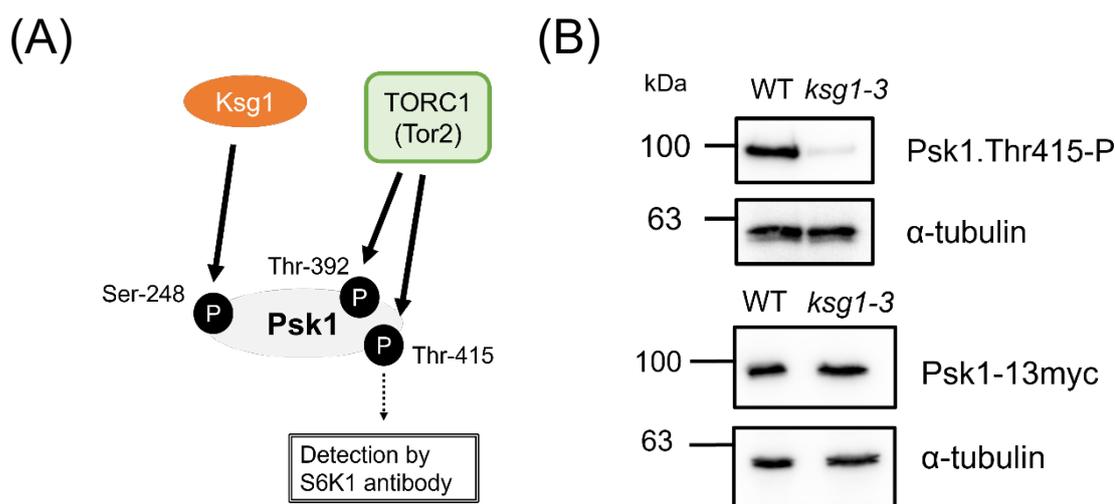


Figure 3-6-3. *ksg1-3* 変異により TORC1 による Psk1 のリン酸化レベルが減少する。

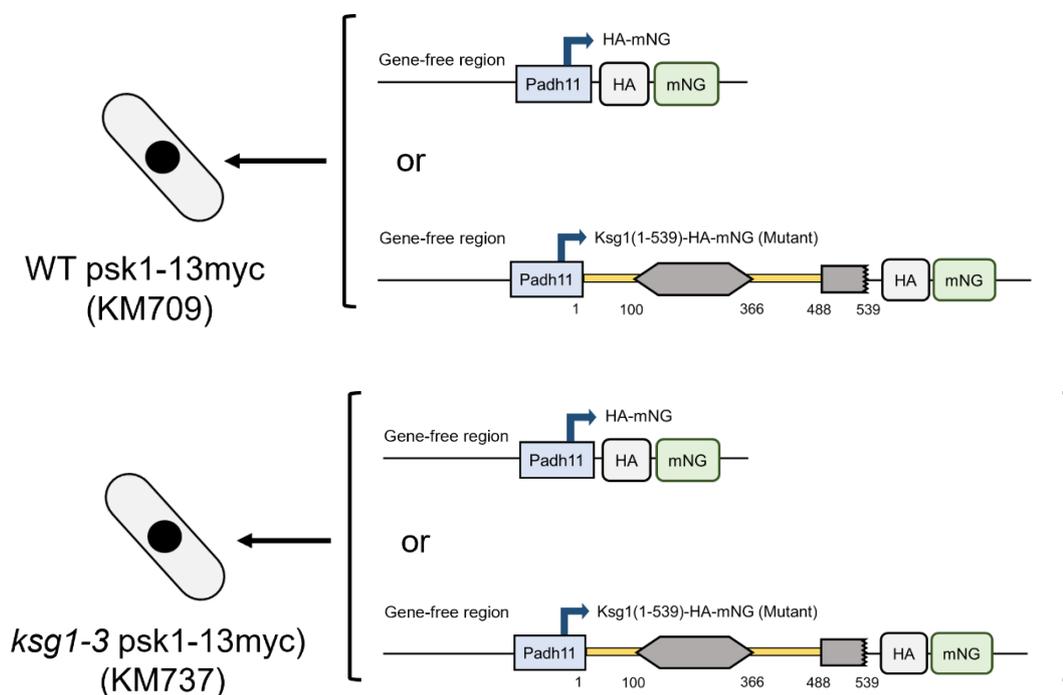
(A) Psk1 は Ksg1 と TORC1 (Tor2) によりリン酸化される。Ksg1 は kinase domain 内の T-loop の Ser-248 残基をリン酸化し、TORC1 は TM (turn motif) の Thr-392 残基と

HM(hydrophobic motif)の Thr-415 をリン酸化する。S6K1 のリン酸化を検出する抗体を用いることで、Thr-415 のリン酸化を検出することができる。

(B) *ksg1-3* 変異により TORC1 による Psk1 のリン酸化レベルが減少する。WT(KM709), *ksg1-3* (KM737)を OD=1.0(SD 培地)で集菌した。

次に、*ksg1-3* 変異による寿命延長と TORC1 活性の低下に相関関係がみられるのかを調べた。そのため、変異型 Ksg1(Ksg1(1-539)-HA-mNG)の高発現が *ksg1-3* 変異による寿命延長が抑制されたという結果(Figure 3-5-1)を踏まえて、WT *psk1-13myc* 株(KM709)と *ksg1-3 psk1-13myc* 株(KM737)に HA-mNG(control)と Ksg1(1-539)-HA-mNG をそれぞれ高発現し、Psk1.Thr-415 のリン酸化と経時寿命に変化が見られるのかを調べた。すると、Ksg1(1-539)-HA-mNG の高発現により、*ksg1-3* による経時寿命の延長が抑制されただけでなく、Psk1.Thr-415 のリン酸化が回復することが分かった(Figure 3-6-4)。以上の結果から、*ksg1-3* による寿命延長と TORC1 による Psk1 のリン酸化に相関関係が見られることが明らかになった。

(A)



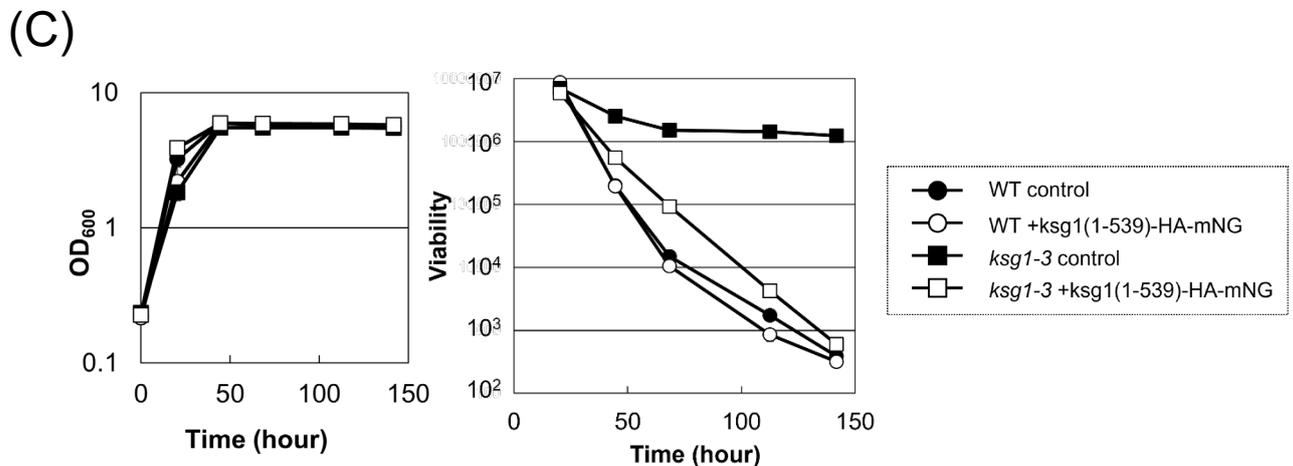
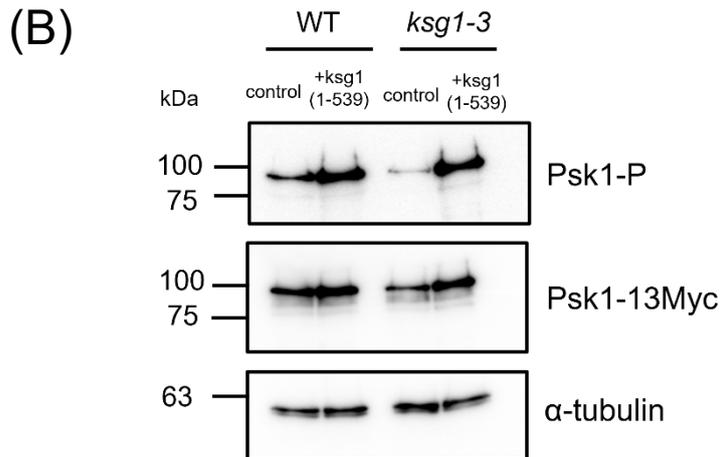


Figure 3-6-4. 変異型 Ksg1 の高発現は、*ksg1-3* 変異による、Psk1 の TORC1 によるリン酸化レベルの低下を回復し、経時寿命の延長を抑制する。

- (A) Figure 3-5-1-A と同じ方法で、HA-mNG(control)と Ksg1(1-539)-HA-mNG(変異型)をそれぞれ高発現させた株を作製した。形質転換した分裂酵母株は、野生株(WT *psk1-13myc*, KM709)と *ksg1-3* 株(*ksg1-3 psk1-13myc*, KM737)である。
- (B) Ksg1(1-539)-HA-mNG の高発現は *ksg1-3* による Psk1.Thr-415 のリン酸化レベルの低下を相補する。左から順番に WT control(KM809), WT +ksg1(1-539)-HA-mNG (KM812), *ksg1-3* control(KM813), *ksg1-3* +ksg1(1-539)-HA-mNG(KM815) を OD=1.0(SD 培地)で集菌した。
- (C) *ksg1-3* 変異による寿命延長は Ksg1(1-539)-HA-mNG の高発現で抑制される。WT control(KM809), WT +ksg1(1-539)-HA-mNG (KM812), *ksg1-3* control(KM813), *ksg1-3* +ksg1(1-539)-HA-mNG(KM815) の細胞増殖 (OD₆₀₀: 左グラフ)と生存率 (右グラフ)の経時的变化を示した。3 回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。

第4項 Ksg1 の標的基質の検討

【Ksg1 の標的基質】

Ksg1 は Gad8, Psk1, Pka1, Pck1, Pck2 などといった複数の AGC kinase をリン酸化する(Matsuo *et al.*, 2003; Nakashima *et al.*, 2012; Tang and McLeod, 2004; Madrid *et al.*, 2015; Madrid *et al.*, 2017)。Gad8 は哺乳類 Akt のオルソログであり、窒素枯渇条件での G1 アレストや、高温や高浸透圧条件での生育に必要である(Matsuo *et al.*, 2003)。Psk1 はヒト p70 S6K1 のオルソログであり、リボソームタンパク S6 をリン酸化する(Nakashima *et al.*, 2012)。Pka1(catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase)は、減数分裂(接合及び胞子形成)に必要であり、経時寿命を制御に関与している(Tang and McLeod, 2004)。Pck1 と Pck2 は Protein kinase C のオルソログであり、細胞壁の合成や cell integrity の制御に関わる(Arellano *et al.*, 1999; Madrid *et al.*, 2015; Madrid *et al.*, 2017)。このように、Ksg1 は複数の基質をリン酸化するが故に、下流の多くの細胞内応答に関わっている。そこで、*ksg1-3* による寿命延長に関わる基質を特定するため、*ksg1-3* 変異株と各基質の単独欠損株を掛け合わせ、その二重変異株を作製し、寿命測定した。すると、*pck2⁺* 遺伝子の欠損により *ksg1-3* 変異の寿命延長効果が打ち消され、その一方で *pck1⁺*、*psk1⁺*、*gad8⁺*、*pka1⁺* の遺伝子欠損は *ksg1-3* 変異による寿命効果を打ち消さないことが分かった(Figure 3-6-5-A)(Supplemental Figure S5)。この結果から、Ksg1 による寿命制御の下流に Pck2 が機能していることが考えられる。そこで、本研究では Pck2 について解析することにした。

Ksg1 は Pck2 の activation loop 内の T842 残基をリン酸化する(Madrid *et al.*, 2015)(Supplemental Figure S7)。Pck2 のリン酸化が寿命に与える影響を調べるために Pck2 の T842 残基をアラニン(A)またはアスパラギン酸(D)に置換した株を作製し寿命を調べた。Figure 3-6-5-B に示したように、T842 残基を置換しても経時寿命はコントロールと同様の傾向を示した。この結果から、Ksg1 による Pck2(T842)のリン酸化は寿命に影響を与えないことが考えられる。

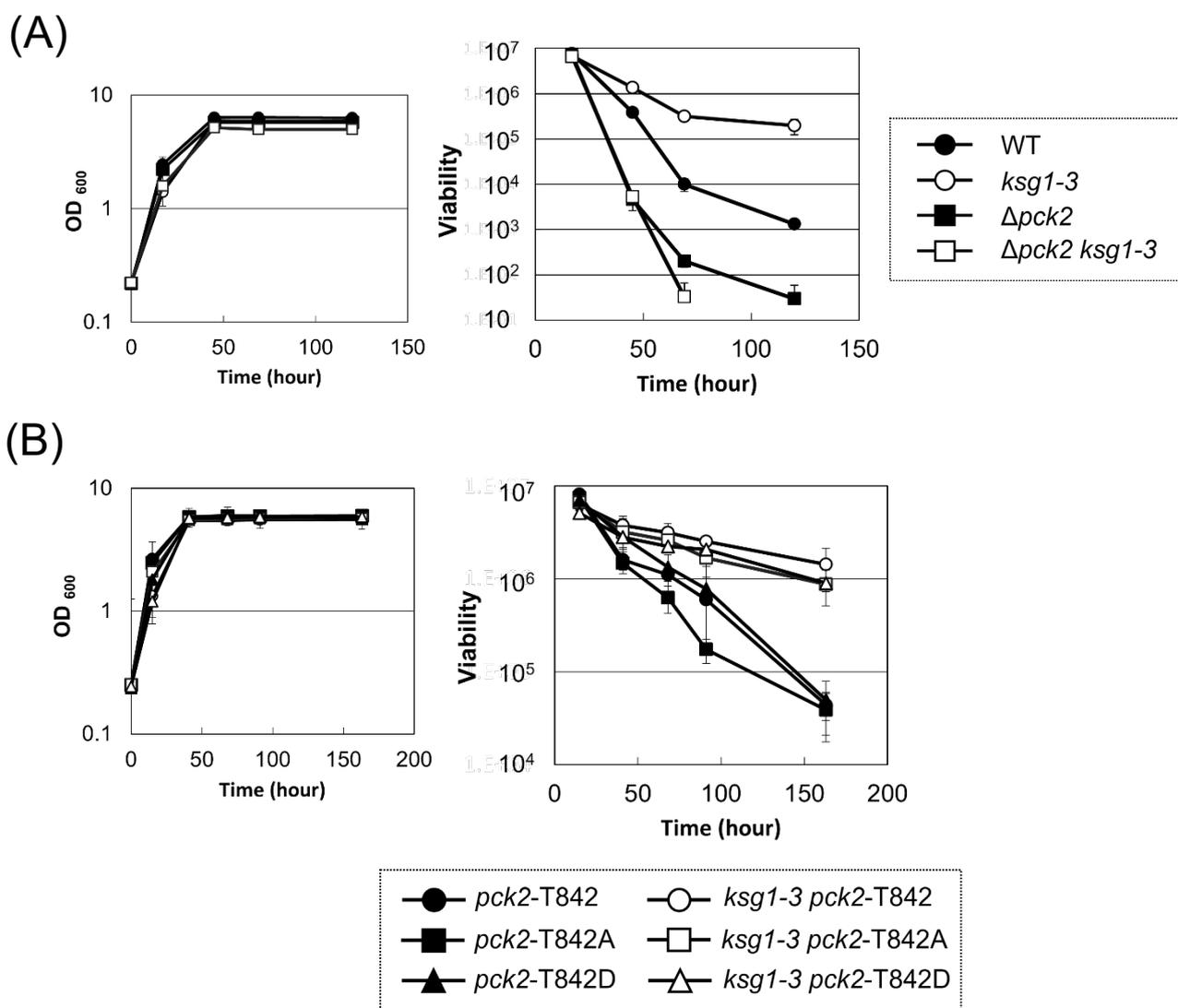
【Rho1 と Ksg1 は Pck2 と相互作用する】

2章で述べた内容と重複するが、Pck2 は cell integrity MAPK 経路(CIP)の上流活性化因子である。さらに、その上流因子として Rho1 と Rho2 が機能している(Cruz *et al.*, 2013)。GTP 結合型(活性型)の Rho1 と Rho2 は、Protein kinase C のホモログである Pck1 と Pck2 と結合することで、Pck1 と Pck2 を安定化させる(Arellano *et al.*, 1999; Villar-Tajadura *et al.*, 2008)。

rho1⁺ は、本研究の長寿命変異株のスクリーニングで得られた No.64 変異株の長寿の原因遺伝子である(Figure 2-4-3-H, 2-4-4)。No.64 変異株では *rho1⁺* 遺伝子内に一アミノ酸変異(107 F→V)が発生しており、本論文ではこれを *rho1-64* 変異と呼ぶ。また、

Rho1 を GDP 結合型(不活性型)から GTP 結合型(活性型)に変換する Rgf1(*rgf1+*)も本研究の長寿命変異株のスクリーニングで得られた No.58 変異株の原因遺伝子である (Figure 2-4-3-G, 2-4-4)。

Pck2 は Ksg1 と Rho1 と相互作用しており (Sayers *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2015)(Figure 2-4-4)、これらの因子が新規寿命関連因子として同定されたことを踏まえ、*rho1+*と *pck2+*の遺伝学解析を行った。つまり、*rho1-64*変異による寿命延長に Pck2 が必要であるのかを調べるため、 $\Delta pck2$ と *rho1-64* の二重変異株を作製し、寿命を調べた。すると、 $\Delta pck2 rho1-64$ 株において、部分的に *rho1-64*による寿命延長が抑制された (Figure 3-6-5-C)。この結果から *rho1-64* 変異による寿命延長には Pck2 に一部依存する可能性がある。



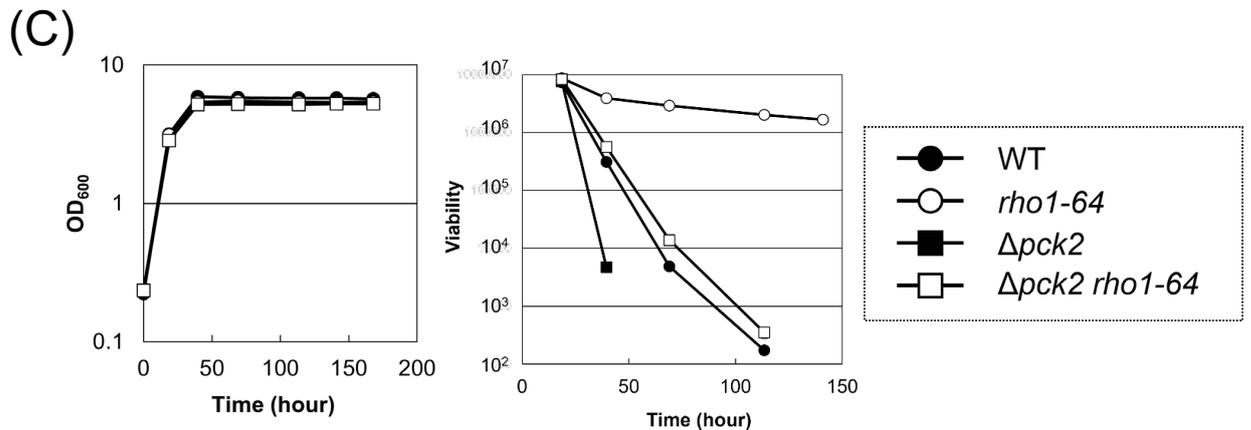


Figure 3-6-5. *ksg1*, *rho1* と *pck2* の遺伝学的解析。

- (A) *ksg1-3* による寿命延長は *pck2* 欠損により抑制される。WT(JY333), *ksg1-3* (KM58), $\Delta pck2$ (TH70), $\Delta pck2$ *ksg1-3* (TH93) の細胞増殖 (OD₆₀₀: 左グラフ) と生存率 (右グラフ) の経時的変化を示した。3 回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。
- (B) *Pck2*-T842 のリン酸化は寿命に影響を与えない。WT *pck2*-T842 (TH), WT *pck2*-T842A (TH260), WT *pck2*-T842D (TH261), *ksg1-3* *pck2*-T842 (TH225), *ksg1-3* *pck2*-T842A (TH242), *ksg1-3* *pck2*-T842D (TH267), 以上 6 つの株を寿命測定した。細胞増殖 (OD₆₀₀: 左グラフ) と生存率 (右グラフ) の経時的変化を示した。3 回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。
- (C) *rho1-64* の寿命延長は *pck2* 欠損により部分的に抑制される。WT(JY333), *rho1-64* (No.64), $\Delta pck2$ (TH70), $\Delta pck2$ *rho1-64* (KM636) の細胞増殖 (OD₆₀₀: 左グラフ) と生存率 (右グラフ) の経時的変化を示した。3 回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。

【Ksg1 と Pmk1(MAP kinase)】

先述のように、Pck2 は cell integrity MAPK 経路(CIP)の上流活性化因子である。CIPの中心的な役割を果たしているのは Pmk1(MAP kinase)である。Pmk1 は浸透圧ストレス、細胞壁ストレスなどの種々のストレス応答時において活性化される(Madrid *et al.*, 2006)。Pmk1 は CIP の中核を担っており、 $\Delta pmk1$ は細胞壁 $\beta(1,3)$ -D-glucan の合成を阻害する Micafungin に感受性を示す(Zhou *et al.*, 2013)。*ksg1-3*変異株では、 $\Delta pck2$ や $\Delta pmk1$ で感受性が見られる濃度(0.5 $\mu\text{g/mL}$)では野生株と比較して変化は見られなかった。しかし、より強い濃度(0.8 $\mu\text{g/mL}$)では *ksg1-3*変異株において感受性が見られた(Figure 3-6-6-A)。この結果から、*ksg1-3*変異により Pmk1 の活性化能が低下している可能性がある。

次に、Pck2 の下流で機能する Pmk1 のリン酸化レベルを測定した。Figure 3-6-6-B に示すように、Pmk1 のリン酸化レベルは *ksg1-3*変異の有無で変化しなかった。

以上の結果から、Pck2-Pmk1 経路が *ksg1-3* 変異による寿命延長に与える影響は小さいことが予想された。

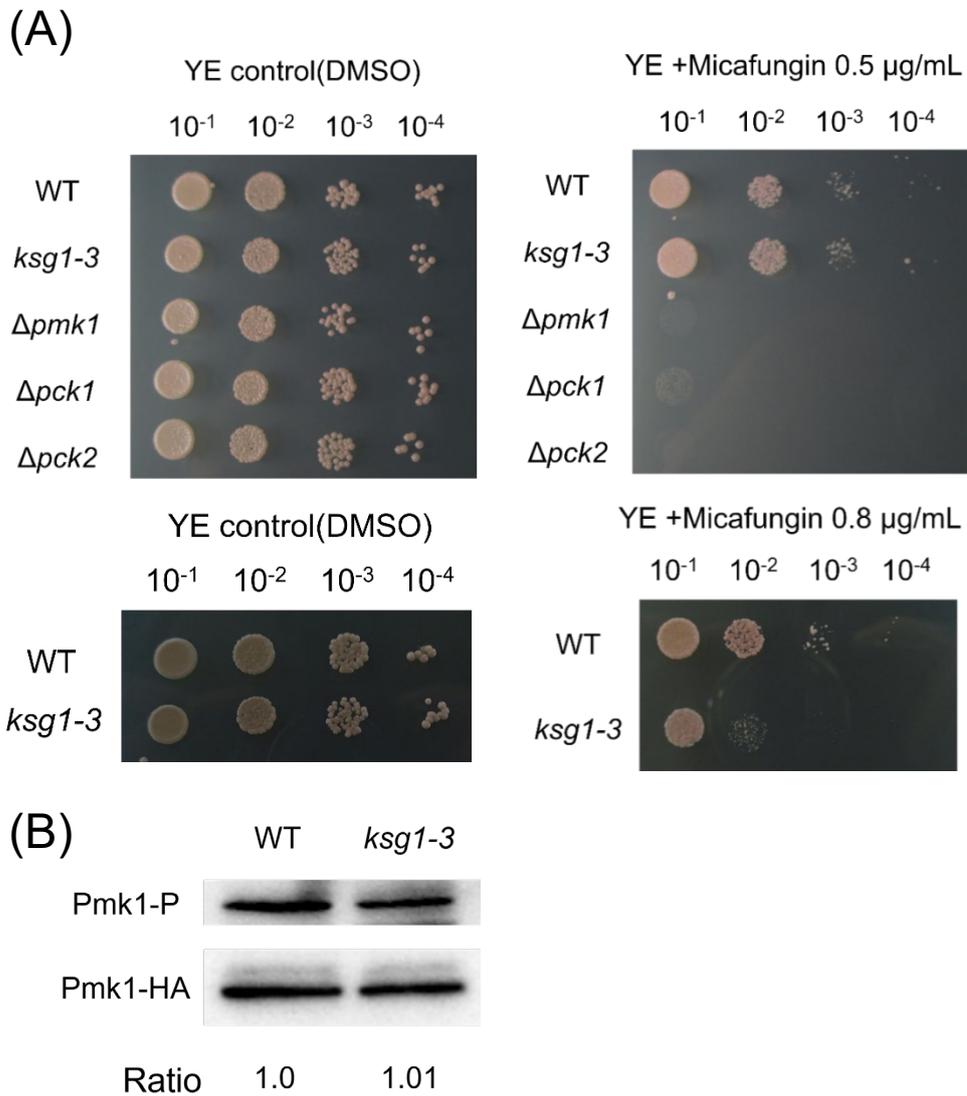


Figure 3-6-6. Pck2 の下流の解析結果。

(A) *ksg1-3* 変異は Micafungin に弱い感受性を示す。WT(JY333)、*ksg1-3* (No.3)、 Δpmk1 (TH95)、 Δpck1 (TH64)、 Δpck2 (TH70)を SD(OD=1.0)まで培養し、図に示した希釈率でスポットした。

(B) *ksg1-3* 変異では、Pmk1 のリン酸化レベルに大きな変化はない。WT(TH176)と *ksg1-3* (TH178)を SD(OD=1.0)で集菌し、Pmk1 のリン酸化レベルとタンパク質量を解析した。リン酸化の割合(ratio, P-Pmk1/Pmk1-HA)を示した。

【*ksg1-3*変異による寿命延長】

本研究では、第2章の大規模スクリーニングで取得した No.3 変異株を解析し、*ksg1-3*変異により長寿命の表現型を示すことを明らかにした。分裂酵母では、PDK1 オルソログとして Ksg1 と Ppk21 があるが、*ppk21* の欠損は経時寿命に影響を及ぼさないことが分かった(Supplemental Figure S4)。また、*ksg1-3*変異株に *ppk21⁺*を高発現しても寿命延長は抑制されなかった(data not shown)。細胞周期の制御の観点では、Ksg1 と Ppk21 が機能重複していることが予想されているが(Liu *et al.*, 2022)、寿命制御の観点では、Ksg1 による経時寿命の制御に Ppk21 は関与していないことが以上の結果から示唆された。

Ksg1 における寿命制御を解析するにあたり、まずは変異型 Ksg1 の特徴について調べることにした。

野生型 *ksg1⁺*の高発現により、*ksg1-3*変異による寿命延長を抑制したため(Figure 3-2-A)、*ksg1-3*変異により Ksg1 は活性低下していることが予想される。

*ksg1-3*変異は、*ksg1*mRNA 発現量に変化を与えない一方で、Ksg1 タンパク質量を減少させることが分かった(Figure 3-4-1)(Supplemental Figure S3-A)。*ksg1-3*変異により、PH domain 内にナンセンス変異(540 W→STOP)が発生し、Ksg1 の細胞膜局在が減少しただけでなく、タンパク質量も減少した(Figure 3-4-1)。PH domain の変異により、膜への targeting が低下すること(Jong *et al.*, 2004)、さらにはそのタンパク質の機能や安定性が低下することが報告されており(Won *et al.*, 2001; Rincon *et al.*, 2009)、Ksg1 も PH domain を介してタンパク質の安定性が保持されている可能性がある。

次に、*ksg1-3* 変異の寿命延長効果がタンパク質量の減少と細胞膜局在の減少のどちらに起因するのかを調べた。タンパク質量の解析については、膜に局在していない変異型 Ksg1(Ksg1(1-539)-HA-mNG を高発現することで寿命延長が抑制されたことが分かった(Figure 3-5-1-B)。哺乳類 PDK1 では、PH domain の欠損により標的基質のリン酸化が低下することが報告されている(Bayascas *et al.*, 2008)。そのため、PDK1 の膜局在はその機能保持に重要である。しかし、膜に局在しない Ksg1(1-539)-HA-mNG の高発現で長寿命化が抑制された結果を踏まえると、*ksg1-3* 変異による寿命延長は、タンパク質量の減少が主な要因であることが示唆された。

【Ksg1 による寿命制御機構の解析】

Ksg1 を取り巻く全体図を Figure 3-7-1 に掲載した。本研究では、Ksg1 による寿命制御を解明するため、カロリー制限(CR)や TORC1 経路といった既知の寿命延長経路、Ksg1 の標的基質の解析など多角的に解析を進めてきた。

【Ksg1 と CR について】

ksg1-3 変異による寿命延長と CR の寿命延長に関連が見られるのかを調べた。先行解析から、CR(グルコース濃度 0.5 %)状態で寿命延長するということが報告されている(Maruyama *et al.*, 2022)。そこで、*ksg1-3*による寿命延長と CR による寿命延長に関連があるかどうかを検証するため、グルコース取り込みと Ght5 に焦点を当てて解析した。

その結果、グルコース取り込み量は *ksg1-3* 変異により低下しないということ、さらに通常培地(グルコース濃度 2 %)での *ght5⁺* の発現量、及び Ght5 の膜局在に変化が見られなかったということから、*ksg1-3* 変異による寿命延長機構を CR の観点から説明することができなかった(Figure 3-6-2)。

【Ksg1 と TORC1 経路について】

ksg1-3 変異による寿命延長に、既知の寿命延長経路である TORC1 経路が関係するのかを調べた。そこで、TORC1(Tor2)による Psk1 のリン酸化レベルを解析したところ、*ksg1-3* 変異により TORC1 による Psk1 のリン酸化レベルが減少することが分かった(Figure 3-6-3-B)。この結果から Ksg1 が TORC1 を直接あるいは間接的に制御していることが予想された。本研究では、TORC1 の上流因子について解析することにした。

【TORC1 の不活性化経路の解析:GAAC 経路に着目した】

先述の通り、分裂酵母 TORC1 の不活性化には主に、TSC-Rheb, GATOR1, GAAC(General amino acid control)の三つの経路が関与している(Fukuda *et al.*, 2021)(Figure 1-2-5)。本研究では、以下の二点の理由から GAAC 経路に着目することにした。

一点目は、過去に GAAC 経路の活性化で寿命延長することが報告されているためである(Ohtsuka *et al.*, 2021)。栄養素の一つであるマグネシウム(Mg²⁺)の枯渇により、GAAC 経路が活性化(Gcn2 依存的な eIF2 α のリン酸化の促進)され、寿命延長することが報告されている(Ohtsuka *et al.*, 2021)。

二点目は、*ksg1-3* 変異による寿命延長が *pck2* 欠損で抑制された結果に基づいている(Figure 3-6-5-A)。この結果から、*ksg1-3* 変異による寿命延長に Pck2 が必要であるこ

とが考えられる。Pck2 は Cpc2 の相互作用因子としても知られている(Won *et al.*, 2001)。Cpc2 は、RACK1(Receptor of activated C kinase)のオルソログであり、また 40S リボソームのサブユニットの構成因子である(Núñez *et al.*, 2009)。Δ *cpc2* では、アミノ酸枯渇時に誘導される Gcn2 の下流である eIF2α のリン酸化レベルが上昇しないことから、Cpc2 は GAAC 経路の応答に重要であることが報告されている(Tarumoto *et al.*, 2013)。

以上の知見と本研究の結果を踏まえて、Pck2、Cpc2、さらには Gcn2 を介した eIF2α のリン酸化レベルの上昇に起因する GAAC 経路の活性化、それによる TORC1 の不活性化という一連のシグナル経路が *ksg1-3* 変異による寿命延長に関与するのかを検証した。結果を Supplemental Figure [S6-A](#) に掲載した。eIF2α のリン酸化レベルの上昇は *ksg1-3* 変異で見られなかったため、GAAC 経路は *ksg1-3* 変異により影響しないことが考えられる。現時点で、Psk1 の TORC1 によるリン酸化レベルの減少の直接的な原因は不明である。

【TORC1 の下流に着目した】

ksg1-3 変異により TORC1 活性の低下が予想されたため、TORC1 の下流に着目し、さらなる解析を進めることにした。

第 1 章【TOR】でも記載したように、TORC1 が不活性化されると、オートファジーの亢進や経時寿命の延長を引き起こす(Figure [1-2-5](#))。本研究ではこの二点に関して解析を進めた。

分裂酵母 TORC1 の基質である Atg13 は、TORC1 の活性状態に応じてリン酸化レベルが変化する。不活性化された TORC1 は Atg13 をリン酸化できないため、オートファジー関連因子が複合体を形成し、オートファジーが亢進される(Fujioka *et al.*, 2020)。そこで、*ksg1-3* 変異で Atg13 のリン酸化レベルが減少するのかを調べた。解析には Atg13 の抗体を使用し、Atg13 のリン酸化レベルの変化をバンドシフトで調べた。Supplemental Figure [S6-B](#) に示したように、WT と *ksg1-3* で Atg13 のバンドシフトは見られなかった。しかし、当研究室で実験系を構築するにあたり、positive control となるデータが上手くとれなかったため、Atg13 のリン酸化レベルの変化について結論づけることができなかった。

次に、*ksg1-3* 変異による寿命延長に Gaf1 が関与するのかを調べた。TORC1 が不活性化すると、Gaf1 は脱リン酸化され核局在し、遺伝子発現を負に制御することで寿命延長に関わる(Rodríguez-López *et al.*, 2020; Laor *et al.*, 2015)(Figure [1-2-5](#))。 *ksg1-3* 変異による寿命延長に Gaf1 が関与するのかを調べる指標として、Gaf1 のリン酸化レベルの変化をウェスタンブロッティングにより検出することにした。Supplemental Figure [S6-C](#) に示したように、WT と *ksg1-3* でリン酸化レベルのバンド位置に変化は見られなかった。しかし、こちらの解析も positive control が上手くとれなかったため、

ksg1-3 変異が Gaf1 のリン酸化に与える影響について結論づけることができなかった。

【Ksg1 と Pck2】

先述のように、Ksg1 は複数の基質をリン酸化し、多様な細胞応答に関わる (Figure 3-7-1)。 *ksg1-3* 変異による寿命延長に関わる基質を特定するため、それぞれの基質の単独欠損変異株と *ksg1-3* 変異株を掛け合わせ、二重変異株を作製し寿命を調べることにした。

すると、*pck2* 欠損で *ksg1-3* 変異による寿命延長が抑制された (Figure 3-6-5-A)。その結果を踏まえ、本研究では Pck2 について解析することにした。Ksg1 は Pck2 の T842 残基をリン酸化することから、Pck2 の T842 のリン酸化が寿命に与える影響について調べた。T842 を A(アラニン)あるいは D(アスパラギン酸)に置換しても寿命に変化は見られなかった (Figure 3-6-5-B)。この結果から、Pck2 の寿命制御について二つの可能性が考えられる。

一つ目の可能性は、Pck2 自体が必要であり、Pck2 のキナーゼ活性は必要ではないということである。Pck2 の触媒活性を失った *pck2-K712W* (catalytically dead version) の変異株はストレス応答時における T842 残基のリン酸化レベルの増加が誘導されないが、*pck2* 欠損株と比較してストレス応答時における Pmk1 のリン酸化活性を示している。この結果から、*pck2-K712W* では、Pck2 としての機能のある程度保持していることが示唆される (Madrid *et al.*, 2015)。

二つ目の可能性は、Pck2-T842 以外のリン酸化残基が寿命制御に関与するということである。Pck2 は T842 以外にも複数のリン酸化サイトがある (Madrid *et al.*, 2015) (Supplemental Figure S7)。まず、T842 残基に近い T846 残基があり、この Threonine 残基は保存性があり、ヒトではこの残基がリン酸化されることが報告されている (Oppermann *et al.*, 2009; Phanstiel *et al.*, 2011)。次に、Turn motif である T984 のリン酸化である。*pck2-T842A T846A* 変異株では T984 のリン酸化が減少することから、T984 のリン酸化がこれらのリン酸化の後に続いて起こる可能性がある (Madrid *et al.*, 2015)。*ksg1-3* 変異で T842 のリン酸化が減少し、T984 のリン酸化に支障をきたす可能性は十分考えられる。

【Rho1 と Pck2】

先述の通り、Pck2 は Rho1/2 タンパク質と HR-domain を介して相互作用し、安定化する (Arellano *et al.*, 1999; Villar-Tajadura *et al.*, 2008) (Supplemental Figure S7)。本研究のスクリーニングで同定された新規寿命関連因子の内、Pck2 に関係する因子が Ksg1 (No.3 mutant)、Rgf1 (No.58 mutant)、Rho1 (No.64 mutant) の 3 つ存在するというのも、本研究のスクリーニングにおいて注目すべき点である (Figure 2-4-4)。そのため、Ksg1 だけでなく、Rgf1 や Rho1 といったこれらの因子による寿命制御が Pck2 に

関わっているのではないかと予想した。そこで、本研究では Rho1 と Pck2 の遺伝学的解析を行った。具体的には、*rho1-64* 変異と *pck2* 欠損の二重変異株を作製し、寿命測定した。*ksg1-3Δ pck2* の二重変異株は $\Delta pck2$ 並みに寿命が低下したのに対し、*rho1-64Δ pck2* は $\Delta pck2$ 並みの寿命低下が見られなかった(Figure 3-6-5-C)。そのため、*rho1-64* 変異による寿命延長が Pck2 に依存しているのかを現時点では断定することができなかった。No.64 変異株についてはこれ以上の解析は行っていないため、No.64 変異株 (Rho1)を含めた他の変異株の解析は今後の課題として挙げられる。

【Ksg1 による寿命制御経路:Pck2-Pmk1 と TOR 経路】

本研究では、Pck2 の下流で機能する Pmk1 のリン酸化レベルについて調べた。通常培地(SD 培地)において野生株と *ksg1-3* 変異株で Pmk1 リン酸化レベルに大きな変化は見られなかった(Figure 3-6-6-B)。

しかしながら、*ksg1-3* 変異株は、Pmk1 が応答に関与する細胞壁ストレスを引き起こす薬剤である Micafungin に対して弱い感受性を示した(Figure 3-6-6-A)。分裂酵母では、Pmk1 の活性低下で寿命延長することが報告されており、さらに *ksg1-3* 変異で Micafungin 感受性を示すという結果から、*ksg1-3* 変異で Pmk1 活性の適度な低下が誘導され、それが寿命延長に部分的に寄与する可能性が考えられる(Imai *et al.*, 2020)。

また、Pck2 と TOR 経路の関係については既に報告されている。先述の通り、分裂酵母には TORC1(Tor2)と TORC2(Tor1)の二種類の異なる複合体が TOR として機能している。TORC1 の *ts* 活性低下変異株(*tor2-51*)は通常状態及び細胞壁ストレス状態において Pck2 タンパク質量に変化を及ぼさないということ、さらに TORC1 の基質である Psk1 の欠損株でも上記の条件で解析したところ、Pck2 タンパク質量に変化を与えなかった(Madrid *et al.*, 2016)。一方、Tor1 欠損株及びそのリン酸化基質である Gad8 の欠損株はストレス条件下において Pck2 のタンパク質量並びに Pmk1 の活性化が減少する(Madrid *et al.*, 2016)。以上のように、種々のストレス条件下において TORC2(Tor1)-Gad8 が Pck2 や MAPK(Pmk1)の活性を主に制御しており、TORC1(Tor2)-Psk1 経路におけるその活性制御の寄与度は比較的小さいことが報告されている(Madrid *et al.*, 2016)。

現時点において、*ksg1-3* 変異で TORC1(Tor2)による Psk1 のリン酸化が低下した結果(Figure 3-6-3-B)と *ksg1-3* 変異による寿命延長に Pck2 を必要とする(Figure 3-6-5-A)というこれらのデータの関連性については明らかにすることができなかった。

tor1 欠損株は寿命延長することが報告されており、TORC2(Tor1)が寿命制御に関与することが示唆されている(Ohtsuka *et al.*, 2013)。しかし、Ksg1 と Tor1(TORC2)の関係については、Tor1 の基質である Gad8 欠損株と *ksg1-3* 変異の二重変異株が長寿命の

表現型を示したため(Supplemental Figure S5-C)、これ以上の解析を行っていない。

ksg1-3 変異株を用いた解析により、Ksg1 による寿命制御に TORC1 経路と Pck2-Pmk1 経路が関わることを示唆するデータが得られた。また、それら以外の経路もまた Ksg1 による寿命制御に関与することも考慮に入れる必要があることから、Ksg1 による寿命制御は非常に複雑化していることが予想される。これらの情報を一元化し、Ksg1 による寿命制御の全体像を解明することが今後の課題として挙げられる。

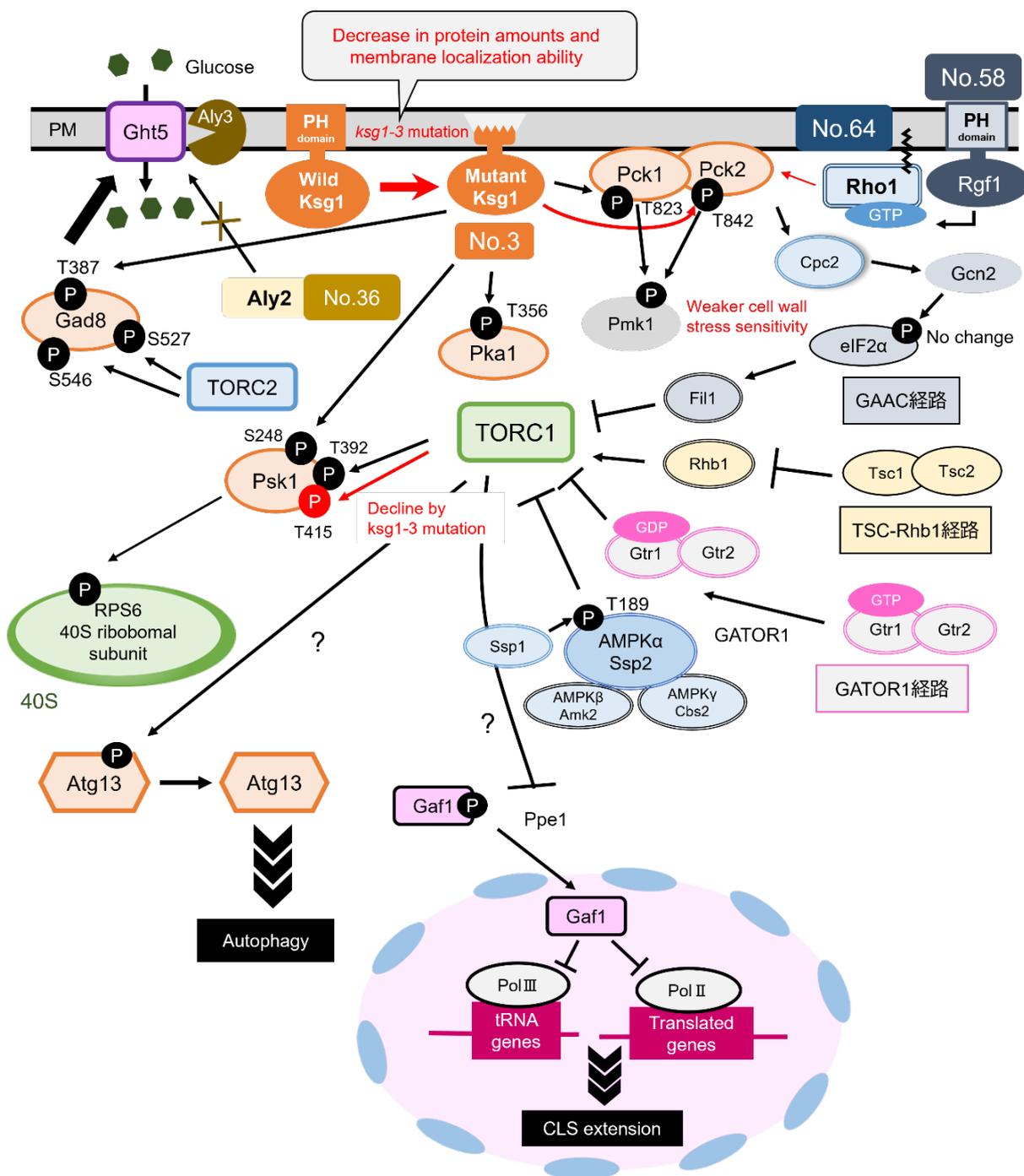


Figure 3-7-1. Ksg1 を取り巻く全体図。

本研究では、*ksg1-3* 変異による寿命延長機構を詳細に解析した。*ksg1-3* 変異で有意に変化が見られた結果については、赤線を付した。

ksg1-3 変異(540 W→STOP)により Ksg1 の細胞膜局在並びにタンパク質量が減少することが分かった。

そして、Ksg1 による寿命制御機構を解明するため、*ksg1-3* 変異による寿命延長と CR の寿命延長(第 4 節第 2 項)あるいは TORC1 経路の寿命制御(第 4 節 3 項)との関係、さらには Ksg1 の標的基質(第 4 節 4 項)について解析した。

CR との関係を知るため、グルコース取り込み量の測定、Ght5 の発現量と局在について調べた。*ksg1-3* 変異の有無で、これらに変化は見られなかった。尚、Ght5 のエンドサイトーシスによる分解は α -arrestin Aly3 に依存するが、本研究のスクリーニングで新規寿命関連因子として同定された α -arrestin Aly2(No.36 mutant)は Ght5 のエンドサイトーシスには関与しない(Toyoda *et al.*, 2021a)。

TORC1 経路との関連を知るため、まずは TORC1 による Psk1 のリン酸化レベル(Psk1-T415)を測定した。*ksg1-3* 変異でこのリン酸化レベルが劇的に減少することが分かった。Figure [1-2-5](#) に示したように、分裂酵母 TORC1 の不活性化経路は既に報告されている。本研究では、GAAC 経路に着目し、eIF2 α のリン酸化を調べたが、*ksg1-3* 変異の有無で変化は見られなかった(図中に No change と記載)。Autophagy や Gaf1 による寿命制御といった TORC1 の下流については前述の通り positive control がとれなかったため、明確な結論が得られていない。

Ksg1 と標的基質(図中の橙色の円で囲んだ)について遺伝学的解析を行った。*pck2* 欠損により、*ksg1-3* 変異による寿命延長が完全に抑制された。Pck2 の相互作用因子は Ksg1 以外にも Rho1,2 が存在する。Rho1 は本研究のスクリーニングで同定した新規寿命関連因子(No.64)である。*rho1-64* による寿命延長は *pck2* 欠損により部分的に抑制されたことから、*rho1-64* 変異による寿命延長が Pck2 依存しているかどうかは断定できない。また、Pck2 の下流で機能する Pmk1 経路に着目した。*ksg1-3* 変異による Pmk1 のリン酸化レベルに大きな変化は見られず、また細胞壁合成阻害剤である Micafungin の添加により *ksg1-3* 変異で弱い感受性が見られた。

参考文献 (第 3 章)

- Arellano, M., Valdivieso, M. H., Calonge, T. M., Coll, P. M., Duran, A., & Perez, P. (1999). *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, pck1p and pck2p, are targets of rho1p and rho2p and differentially regulate cell integrity. *Journal of cell science*, *112*(20), 3569-3578.
- Bayascas, J. R., Wullschleger, S., Sakamoto, K., Garcia-Martinez, J. M., Clacher, C., Komander, D., ... & Alessi, D. R. (2008). Mutation of the PDK1 PH domain inhibits protein kinase B/Akt, leading to small size and insulin resistance. *Molecular and cellular biology*, *28*(10), 3258-3272.
- Bähler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., Mckenzie III, A., Steever, A. B., ... & Pringle, J. R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR - based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, *14*(10), 943-951.
- Bimbo, A., Liu, J., & Balasubramanian, M. K. (2005). Roles of Pdk1p, a fission yeast protein related to phosphoinositide-dependent protein kinase, in the regulation of mitosis and cytokinesis. *Molecular biology of the cell*, *16*(7), 3162-3175.
- Bryant, N. J., Govers, R., & James, D. E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature reviews Molecular cell biology*, *3*(4), 267-277.
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, *296*(5573), 1655-1657.
- Chen, B. R., & Runge, K. W. (2009). A new *Schizosaccharomyces pombe* chronological lifespan assay reveals that caloric restriction promotes efficient cell cycle exit and extends longevity. *Experimental gerontology*, *44*(8), 493-502.
- Chen, Y. H., Wang, G. Y., Hao, H. C., Chao, C. J., Wang, Y., & Jin, Q. W. (2017). Facile manipulation of protein localization in fission yeast through binding of GFP-binding protein to GFP. *Journal of cell Science*, *130*(5), 1003-1015.
- Chia, K. H., Fukuda, T., Sofyantoro, F., Matsuda, T., Amai, T., & Shiozaki, K. (2017). Ragulator and GATOR1 complexes promote fission yeast growth by attenuating TOR complex 1 through Rag GTPases. *Elife*, *6*, e30880.

Cruz, S., Muñoz, S., Manjón, E., García, P., & Sanchez, Y. (2013). The fission yeast cell wall stress sensor - like proteins Mtl2 and Wsc1 act by turning on the GTPase Rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *Microbiologyopen*, 2(5), 778-794.

Farese, R. V. (2002). Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283(1), E1-E11.

Farese, R. V., Sajjan, M. P., & Standaert, M. L. (2005). Atypical protein kinase C in insulin action and insulin resistance. *Biochemical Society Transactions*, 33(2), 350-353.

Franco, A., Soto, T., Martín-García, R., Madrid, M., Vázquez-Marín, B., Vicente-Soler, J., ... & Cansado, J. (2017). Distinct functional relevance of dynamic GTPase cysteine methylation in fission yeast. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.

Fujioka, Y., Alam, J. M., Noshiro, D., Mouri, K., Ando, T., Okada, Y., ... & Noda, N. (2020). Phase separation organizes the site of autophagosome formation. *Nature*, 578(7794), 301-305.

Fukuda, T., Sofyantoro, F., Tai, Y. T., Chia, K. H., Matsuda, T., Murase, T., ... & Shiozaki, K. (2021). Tripartite suppression of fission yeast TORC1 signaling by the GATOR1-Sea3 complex, the TSC complex, and Gcn2 kinase. *Elife*, 10, e60969.

Heiland, S., Radovanovic, N., Hofer, M., Winderickx, J., & Lichtenberg, H. (2000). Multiple hexose transporters of *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of bacteriology*, 182(8), 2153-2162.

Hibi, T., Ohtsuka, H., Shimasaki, T., Inui, S., Shibuya, M., Tatsukawa, H., ... & Aiba, H. (2018). Tschimganine and its derivatives extend the chronological life span of yeast via activation of the Sty1 pathway. *Genes to Cells*, 23(8), 620-637.

Imai, Y., Shimasaki, T., Enokimura, C., Ohtsuka, H., Tsubouchi, S., Ihara, K., & Aiba, H. (2020). *gas1* mutation extends chronological lifespan via Pmk1 and Sty1 MAPKs

in *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *84*(2), 330-337.

Ito, H., Oshiro, T., Fujita, Y., Kubota, S., Naito, C., Ohtsuka, H., ... & Aiba, H. (2010). Pma1, a P-type proton ATPase, is a determinant of chronological life span in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(45), 34616-34620.

Jong, W. Y., Mendrola, J. M., Audhya, A., Singh, S., Keleti, D., DeWald, D. B., ... & Lemmon, M. A. (2004). Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Molecular cell*, *13*(5), 677-688.

Kapahi, P., Zid, B. M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., & Benzer, S. (2004). Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Current Biology*, *14*(10), 885-890.

Koch, A., Rode, H. B., Richters, A., Rauh, D., & Hauf, S. (2012). A chemical genetic approach for covalent inhibition of analogue-sensitive aurora kinase. *ACS chemical biology*, *7*(4), 723-731.

Kurauchi, T., Hashizume, A., Imai, Y., Hayashi, K., Tsubouchi, S., Ihara, K., ... & Aiba, H. (2017). Identification of a novel protein kinase that affects the chronological lifespan in fission yeast. *Microbiology Letters*, *364*(2), fnw257.

Lawlor, M. A., & Alessi, D. R. (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?. *Journal of cell science*, *114*(16), 2903-2910.

Liu, K., Liu, Q., Sun, Y., Fan, J., Zhang, Y., Sakamoto, N., ... & Fang, Y. (2022). Phosphoinositide-Dependent Protein Kinases Regulate Cell Cycle Progression Through the SAD Kinase Cdr2 in Fission Yeast. *Frontiers in microbiology*, *12*, 4196.

Lock, A., Rutherford, K., Harris, M. A., Hayles, J., Oliver, S. G., Bähler, J., & Wood, V. (2019). PomBase 2018: user-driven reimplementations of the fission yeast database provides rapid and intuitive access to diverse, interconnected information. *Nucleic acids research*, *47*(D1), D821-D827.

Madrid, M., Jiménez, R., Sánchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Vicente-Soler, J., ... &

Cansado, J. (2015). Multiple layers of regulation influence cell integrity control by the PKC ortholog Pck2 in fission yeast. *Journal of cell science*, *128*(2), 266-280.

Madrid, M., Soto, T., Khong, H. K., Franco, A., Vicente, J., Pérez, P., ... & Cansado, J. (2006). Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(4), 2033-2043.

Madrid, M., Vázquez-Marín, B., Franco, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M., & Cansado, J. (2016). Multiple crosstalk between TOR and the cell integrity MAPK signaling pathway in fission yeast. *Scientific reports*, *6*(1), 1-17.

Madrid, M., Vázquez-Marín, B., Soto, T., Franco, A., Gómez-Gil, E., Vicente-Soler, J., ... & Cansado, J. (2017). Differential functional regulation of protein kinase C (PKC) orthologs in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(27), 11374-11387.

Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, *129*(7), 1261-1274.

Matsuo, T., Kubo, Y., Watanabe, Y., & Yamamoto, M. (2003). *Schizosaccharomyces pombe* AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *The EMBO journal*, *22*(12), 3073-3083.

Morozumi, Y., Hishinuma, A., Furusawa, S., Sofyantoro, F., Tatebe, H., & Shiozaki, K. (2021). Fission yeast TOR complex 1 phosphorylates Psk1 through an evolutionarily conserved interaction mediated by the TOS motif. *Journal of cell science*, *134*(19), jcs258865.

Nakashima, A., Otsubo, Y., Yamashita, A., Sato, T., Yamamoto, M., & Tamanoi, F. (2012). Psk1, an AGC kinase family member in fission yeast, is directly phosphorylated and controlled by TORC1 and functions as S6 kinase. *Journal of cell science*, *125*(23), 5840-5849.

Núñez, A., Franco, A., Madrid, M., Soto, T., Vicente, J., Gacto, M., & Cansado, J. (2009). Role for RACK1 orthologue Cpc2 in the modulation of stress response in

fission yeast. *Molecular biology of the cell*, 20(18), 3996-4009.

Ohtsuka, H., Hatta, Y., Hayashi, K., Shimasaki, T., Otsubo, Y., Ito, Y., ... & Aiba, H. (2022). Cdc13 (cyclin B) is degraded by autophagy under sulfur depletion in fission yeast. *Autophagy Reports*, 1(1), 51-64.

Ohtsuka, H., Kobayashi, M., Shimasaki, T., Sato, T., Akanuma, G., Kitaura, Y., ... & Aiba, H. (2021). Magnesium depletion extends fission yeast lifespan via general amino acid control activation. *Microbiologyopen*, 10(2), e1176.

Ohtsuka, H., Mita, S., Ogawa, Y., Azuma, K., Ito, H., & Aiba, H. (2008). A novel gene, *ecI1⁺*, extends the chronological lifespan in fission yeast. *FEMS yeast research*, 8(4), 520-530.

Ohtsuka, H., Ogawa, S., Kawamura, H., Sakai, E., Ichinose, K., Murakami, H., & Aiba, H. (2013). Screening for long-lived genes identifies Oga1, a guanine-quadruplex associated protein that affects the chronological lifespan of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular genetics and genomics*, 288(5), 285-295.

Ojuka, E. O., Goyaram, V., & Smith, J. A. (2012). The role of CaMKII in regulating GLUT4 expression in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 303(3), E322-E331.

Oppermann, F. S., Gnad, F., Olsen, J. V., Hornberger, R., Greff, Z., Kéri, G., ... & Daub, H. (2009). Large-scale proteomics analysis of the human kinome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(7), 1751-1764.

Otsubo, Y., Nakashima, A., Yamamoto, M., & Yamashita, A. (2017). TORC1-dependent phosphorylation targets in fission yeast. *Biomolecules*, 7(3), 50.

Phanstiel, D. H., Brumbaugh, J., Wenger, C. D., Tian, S., Probasco, M. D., Bailey, D. J., ... & Coon, J. J. (2011). Proteomic and phosphoproteomic comparison of human ES and iPS cells. *Nature methods*, 8(10), 821-827.

Polak, P., & Hall, M. N. (2009). mTOR and the control of whole body

metabolism. *Current opinion in cell biology*, 21(2), 209-218.

Rincon, S. A., Ye, Y., Villar-Tajadura, M. A., Santos, B., Martin, S. G., & Pérez, P. (2009). Pob1 participates in the Cdc42 regulation of fission yeast actin cytoskeleton. *Molecular biology of the cell*, 20(20), 4390-4399.

Rodríguez-López, M., Gonzalez, S., Hillson, O., Tunnacliffe, E., Codlin, S., Tallada, V. A., ... & Rallis, C. (2020). The GATA transcription factor Gaf1 represses tRNAs, inhibits growth, and extends chronological lifespan downstream of fission yeast TORC1. *Cell reports*, 30(10), 3240-3249.

Saitoh, S., Mori, A., Uehara, L., Masuda, F., Soejima, S., & Yanagida, M. (2015). Mechanisms of expression and translocation of major fission yeast glucose transporters regulated by CaMKK/phosphatases, nuclear shuttling, and TOR. *Molecular biology of the cell*, 26(2), 373-386.

Sakai, K., Kondo, Y., Fujioka, H., Kamiya, M., Aoki, K., & Goto, Y. (2021). Near-infrared imaging in fission yeast by genetically encoded biosynthesis of phycocyanobilin. *Journal of cell Science*.

Sayers, L. G., Katayama, S., Nakano, K., Mellor, H., Mabuchi, I., Toda, T., & Parker, P. J. (2000). Rho - dependence of *Schizosaccharomyces pombe* Pck2. *Genes to Cells*, 5(1), 17-27.

Sánchez-Mir, L., Franco, A., Martín-García, R., Madrid, M., Vicente-Soler, J., Soto, T., ... & Cansado, J. (2014). Rho2 palmitoylation is required for plasma membrane localization and proper signaling to the fission yeast cell integrity mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and cellular biology*, 34(14), 2745-2759.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.

Suga, M., & Hatakeyama, T. (2005). A rapid and simple procedure for high - efficiency lithium acetate transformation of cryopreserved *Schizosaccharomyces pombe* cells. *Yeast*, 22(10), 799-804.

- Tang, Y., & McLeod, M. (2004). In vivo activation of protein kinase A in *Schizosaccharomyces pombe* requires threonine phosphorylation at its activation loop and is dependent on PDK1. *Genetics*, *168*(4), 1843-1853.
- Tarumoto, Y., Kanoh, J., & Ishikawa, F. (2013). Receptor for activated C-kinase (RACK1) homolog Cpc2 facilitates the general amino acid control response through Gen2 kinase in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(26), 19260-19268.
- Toyoda, Y., Soejima, S., Masuda, F., & Saitoh, S. (2021a). TORC2 inhibition of α -arrestin Aly3 mediates cell surface persistence of *S. pombe* Ght5 glucose transporter in low glucose. *Journal of cell Science*, *134*(10), jcs257485.
- Toyoda, Y., & Saitoh, S. (2021b). Fission Yeast TORC2 Signaling Pathway Ensures Cell Proliferation under Glucose-Limited, Nitrogen-Replete Conditions. *Biomolecules*, *11*(10), 1465.
- Uda, Y., Goto, Y., Oda, S., Kohchi, T., Matsuda, M., & Aoki, K. (2017). Efficient synthesis of phycocyanobilin in mammalian cells for optogenetic control of cell signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(45), 11962-11967.
- Villar - Tajadura, M. A., Coll, P. M., Madrid, M., Cansado, J., Santos, B., & Pérez, P. (2008). Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Molecular microbiology*, *70*(4), 867-881.
- Watson, R. T., & Pessin, J. E. (2006). Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation. *Trends in biochemical sciences*, *31*(4), 215-222.
- Won, M., Jang, Y. J., Chung, K. S., Kim, D. U., Hoe, K. L., Han, M. Y., ... & Yoo, H. S. (2001). Pleckstrin homology domain interacts with Rkp1/Cpc2, a RACK1 homolog, to modulate Pck2-mediated signaling process in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical and biophysical research communications*, *289*(5), 987-992.
- Zhou, X., Ma, Y., Fang, Y., Gerile, W., Jaiseng, W., Yamada, Y., & Kuno, T. (2013). A genome-wide screening of potential target genes to enhance the antifungal activity of micafungin in *Schizosaccharomyces pombe*. *PloS one*, *8*(5), e65904.

Supplemental Table

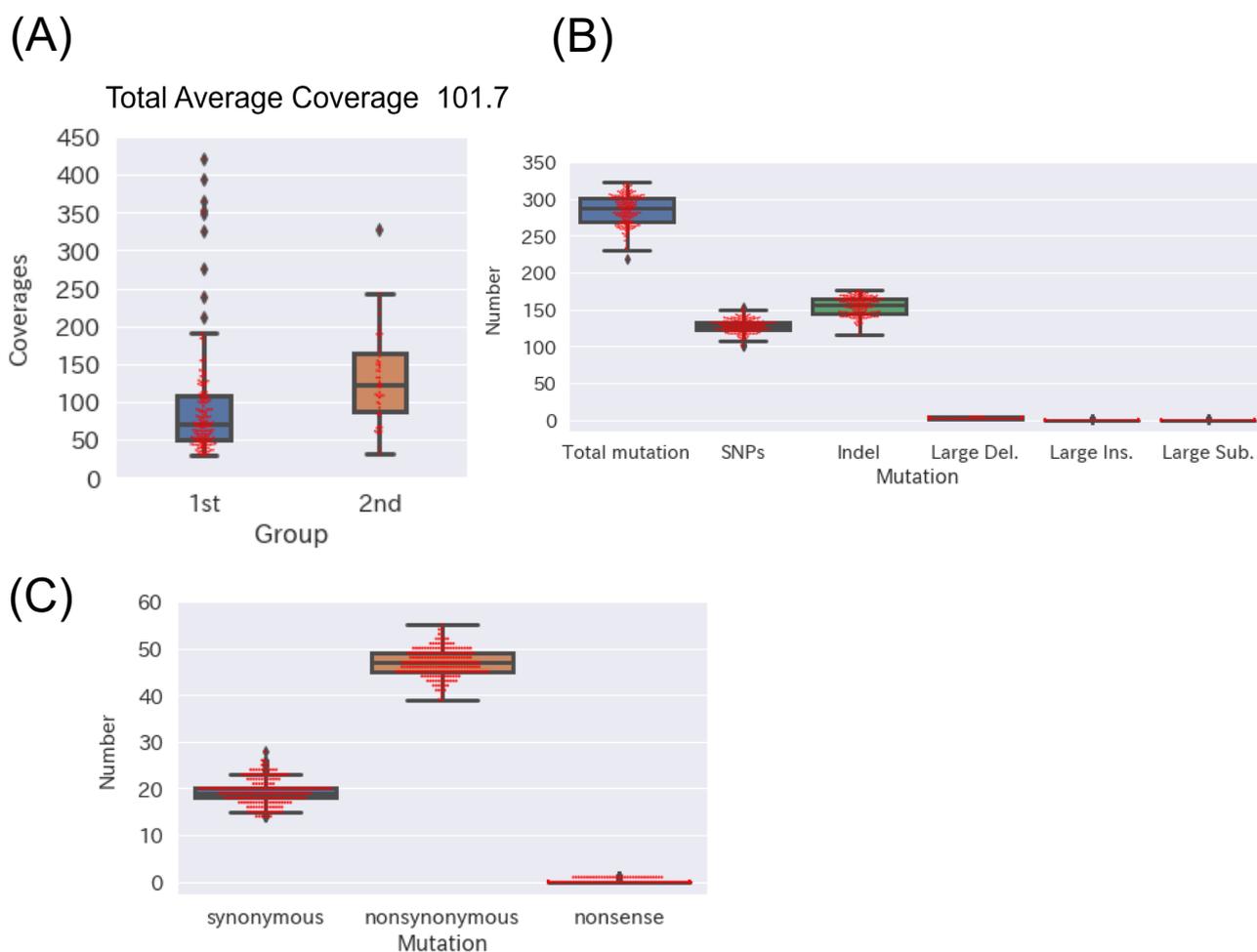
Supplemental Table 1. Type and number of mutations in wild type strains identified by the whole genome sequencing analysis.

	Total mutation	SNPs	Indel	Large deletion	Large insertion	Large substitution
JY333 (h-)	297	133	160	4	0	0
HM3802 (h+)	286	121	163	2	0	0

Supplemental Table 2. The table which classifies SNPs in wild type strains into three types (except for intergenic mutation): Synonymous mutation, Nonsynonymous mutation, and Nonsense mutation.

	Synonymous mutation	Nonsynonymous mutation	Nonsense mutation
JY333 (h-)	20	49	0
HM3802 (h+)	18	47	0

Supplemental Figure

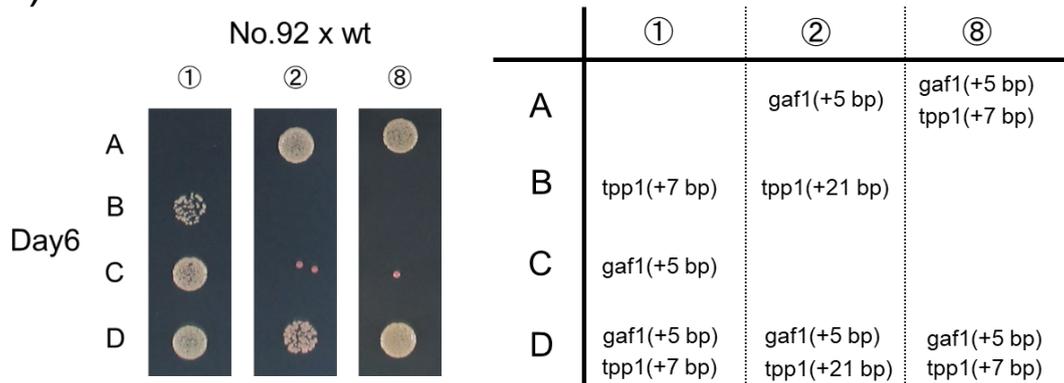


Supplemental Figure S1. 全ゲノムシーケンス解析より明らかにされた長寿命変異株 1-3 群の coverage と変異 spectrum。

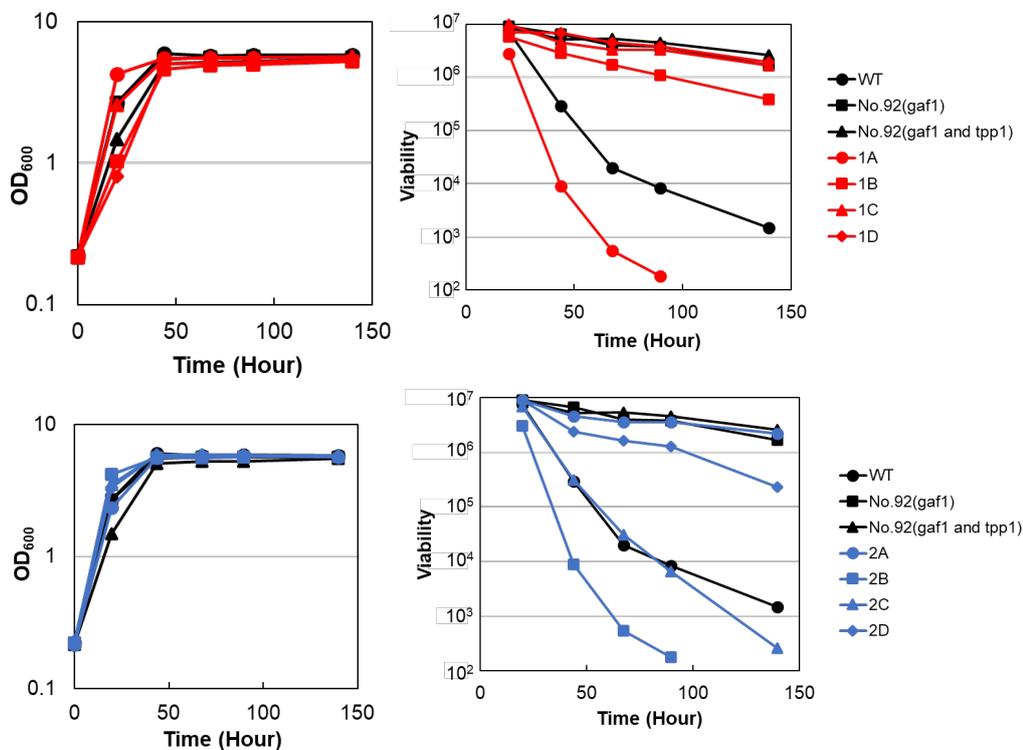
- (A) 全ゲノムシーケンス解析したサンプルの平均 coverage の分布。ただし、coverage が 30 以下のサンプルは除外した。長寿変異株 1,2 群と親株(JY333 と HM3802)の coverage を 1st group(合計 164 サンプル)に、長寿変異株 3 群、No.52(2 群)、No.90(1 群)の coverage を 2nd group(合計 50 サンプル)に示した。全体の coverage の平均値を図中に示し、1st, 2nd Group の平均 coverage はそれぞれ 92.7 と 131.3 である。尚、親株の JY333 と HM3802 の coverage はそれぞれ 190.1 と 159.2 である。
- (B) 発生した変異(Total mutation)は SNPs, Indel, Large Deletion (Large Del.), Large Insertion (Large Ins.), Large Substitution(Large Sub.)に分類される。各変異株(サンプル数:213)におけるその変異の数の分布を示した。各変異株における Large Del., Large Ins., Large Sub.の変異数はそれぞれ 5 以下、1 以下、2 以下である。ただし、これらの変異は親株の JY333 と HM3802 と重複する部分がある。

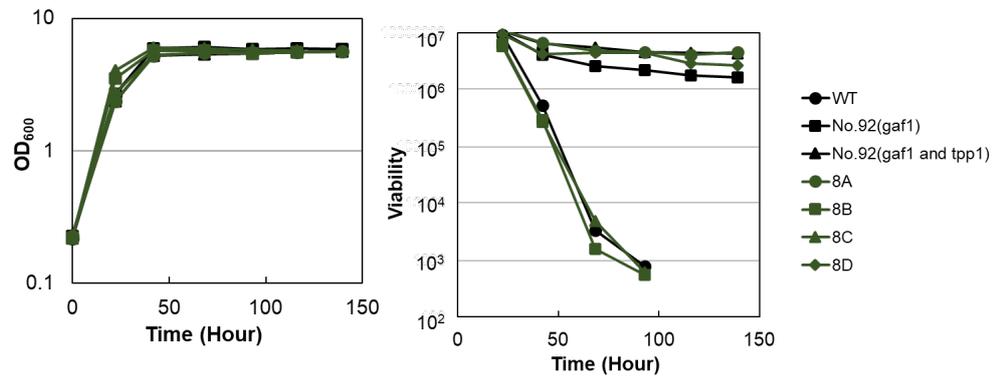
(C) 発生した SNPs 変異は、遺伝子間領域の変異である Intergenic 変異を除いて Synonymous mutation(同義変異)、Nonsynonymous mutation(非同義置換)、Nonsense mutation(ナンセンス変異)の 3 種類に分類される。各変異株(サンプル数:213)におけるその変異の数の分布を示した。各変異株における Nonsense mutation の変異数は 1 以下である。ただし、ただし、これらの変異は親株の JY333 と HM3802 と重複する部分がある。

(A)



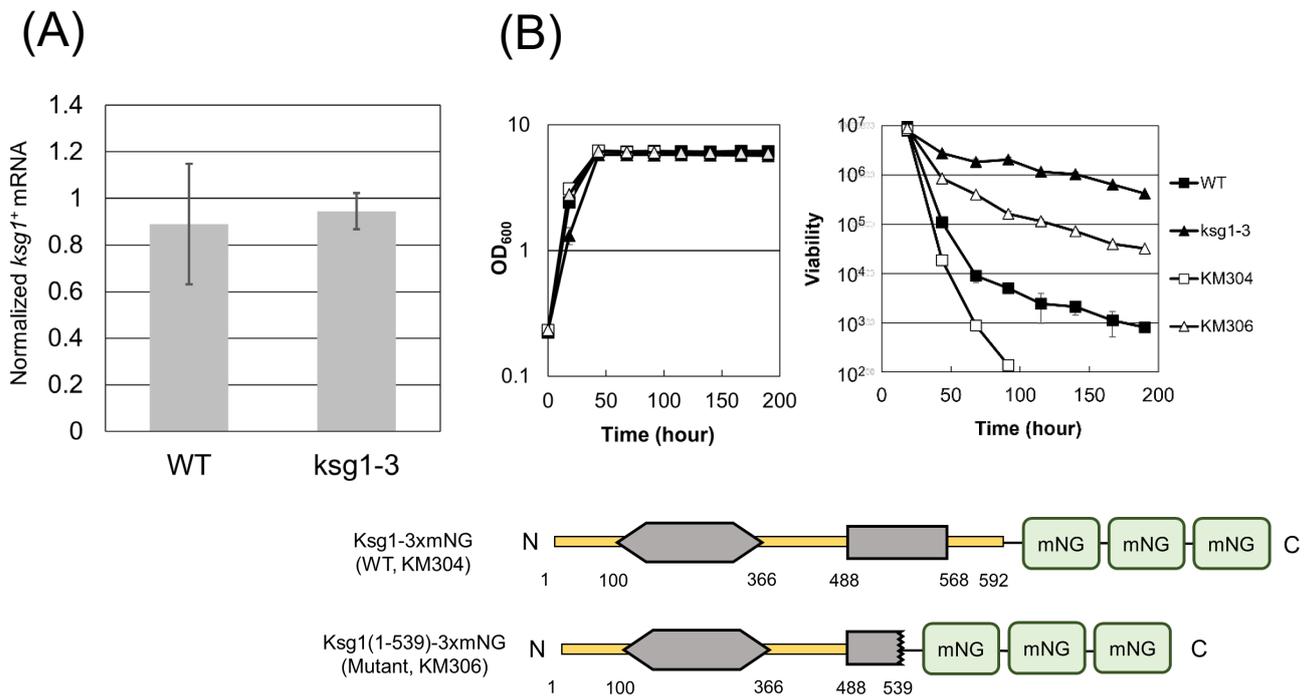
(B)





Supplemental Figure S2. No.92 変異株(*gaf1* 変異 and *tpp1* 変異)と WT(HM3802)を掛け合わせて得られた四分子の寿命測定結果。コントロールとして、WT(JY333), No.92(*gaf1* 変異 and *tpp1* 変異), No.92(*gaf1* 変異)を用いた。*gaf1* 変異(5 塩基挿入変異)あるいは *tpp1* 変異(7 塩基挿入変異)のいずれか片方の変異があることで経時寿命が延長する。ただし、*tpp1* 単独変異(7 塩基挿入変異)株は①-B の 1 株しか取得されていないため、*tpp1* 単独変異で寿命延長することの再現性は確認されていない。

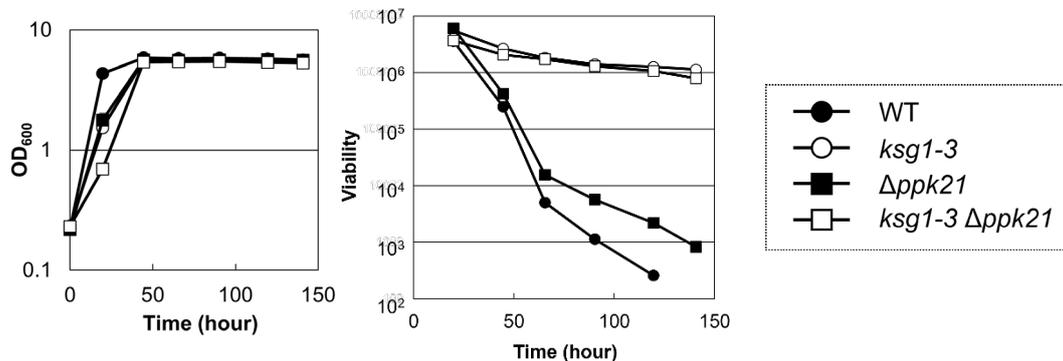
- (A) 子囊セット①,②,⑧の四分子の培養 6 日後のスポットテスト結果(再掲載)及びシーケンス解析結果。*gaf1* 変異及び *tpp1* 変異の有無を一覧にした。子囊②-B,D では、全ゲノムシーケンス解析した No.92 変異株に見られた 7 塩基挿入変異が 3 つ連続した 21 塩基挿入変異が生じていた。
- (B) ①(上段)、②(中段)、⑧(下段)の四分子の寿命測定結果。①では、長寿命の表現型と野生株並の表現型が 3:1 に分離した。*gaf1* 変異あるいは *tpp1* 変異の少なくとも一方があるだけで寿命延長することから、①は tetradype(TT)であることが分かった。②では、*gaf1* 変異をもつ 2A,2D が長寿命であり、21 変異の挿入が見られた *tpp1* 変異単独(2B)では長寿命にならなかった。⑧では、長寿命の表現型と野生株並の表現型が 2:2 に分離した。*gaf1* 変異と *tpp1* 変異が共に 8A,8D に見られたため、⑧は parental ditype (PD)であることが分かった。



Supplemental Figure S3. 変異型 Ksg1 の特徴。

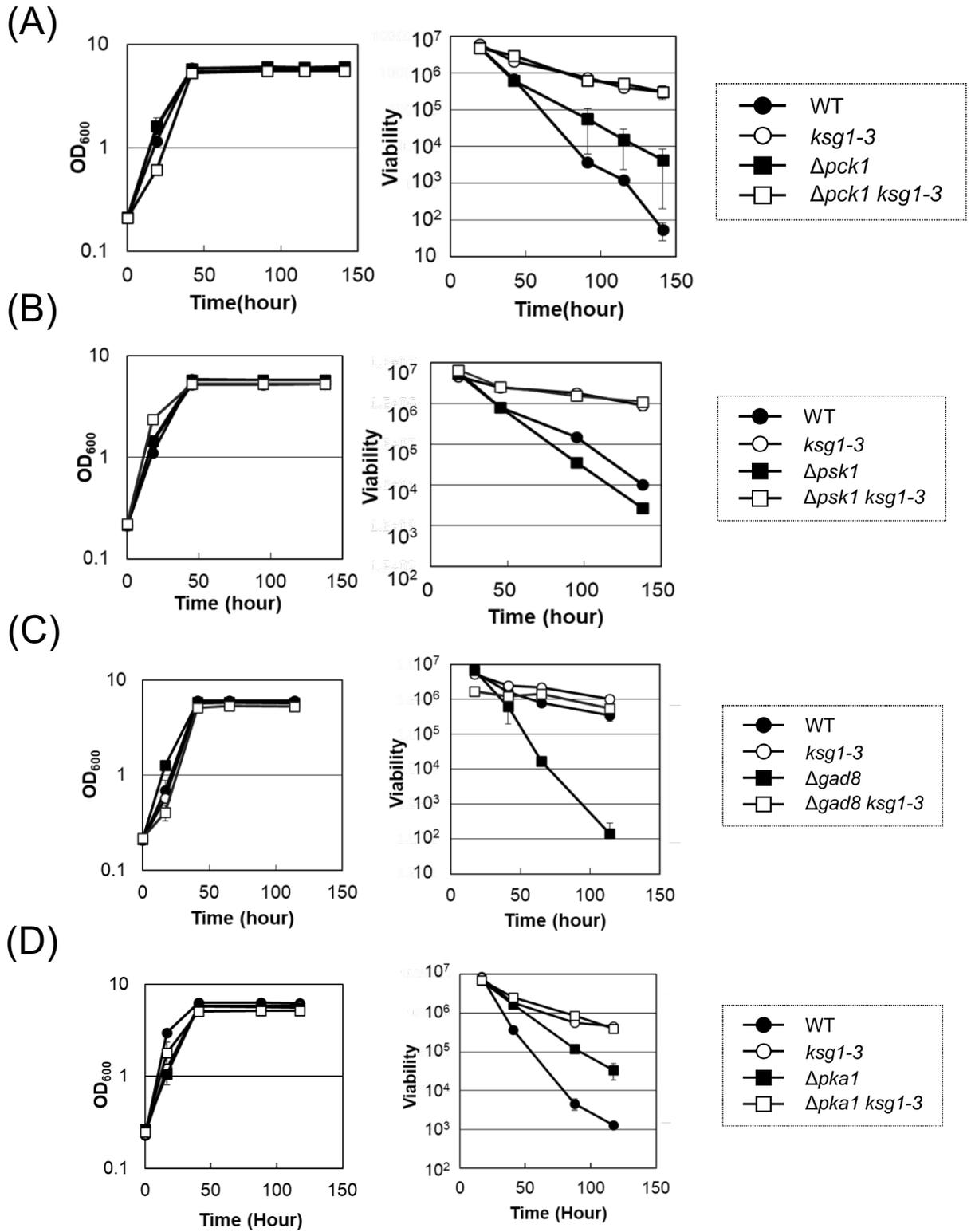
(A) WT(JY333)と *ksg1-3* (No.3)の間で、*ksg1+* mRNA の発現量に有意な差は見られない。WT(JY333)と *ksg1-3* (No.3)を OD=1.0(SD 培地)で集菌し、RT-PCR で発現量を解析した。Loading control として *cde2+* mRNA を解析した。

(B) KM306 は長寿命の表現型を示す。WT(JY333), *ksg1-3* (No.3), KM304(Ksg1-3xmNG), KM306(Ksg1(1-539)-3xmNG)の細胞増殖 (OD₆₀₀: 左グラフ)と生存率(右グラフ)の経時的変化を示した。3 回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。KM304 と KM306 株における Ksg1 へのタグ付けの模式図を再度掲載した。



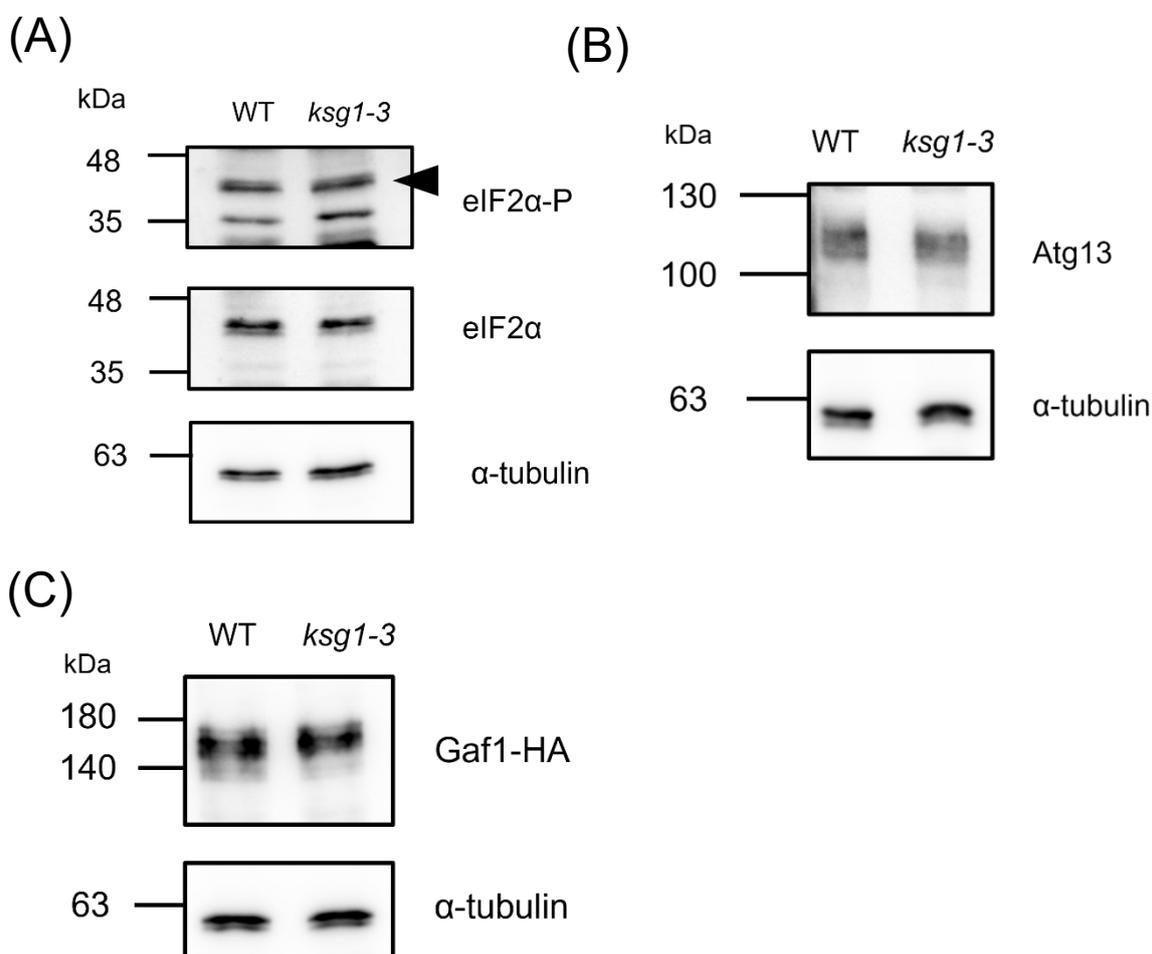
Supplemental Figure S4. Ppk21 欠損は経時寿命に影響を与えない。

WT(JY333), *ksg1-3* (No.3), $\Delta ppk21$ (KM897), *ksg1-3* $\Delta ppk21$ (KM900)の細胞増殖 (OD₆₀₀: 左グラフ)と生存率(右グラフ)の経時的変化を示した。3 回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。



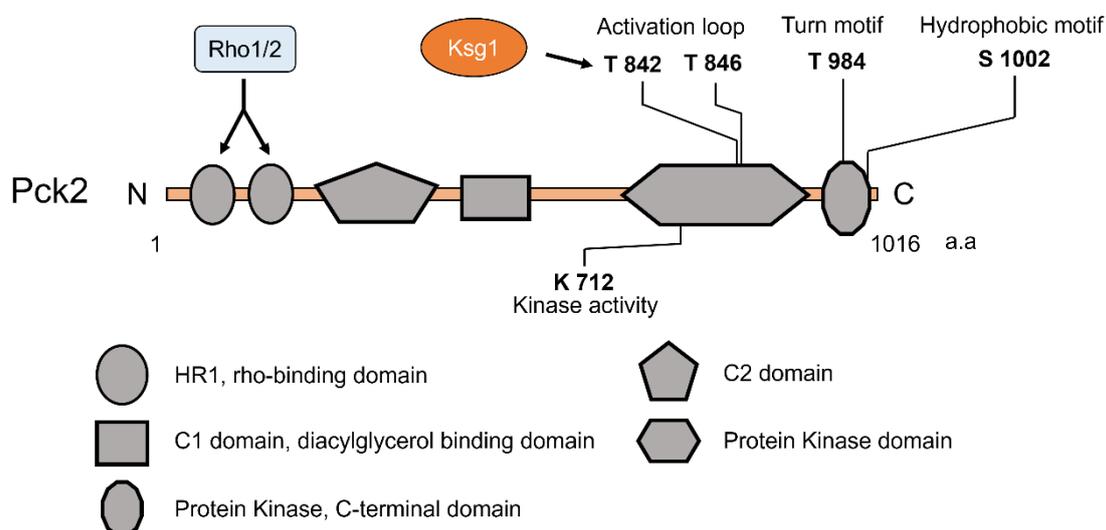
Supplemental Figure S5. *ksg1-3* 変異株とその基質の遺伝子欠損の二重変異株の寿命測定。細胞増殖 (OD_{600} : 左グラフ)と生存率(右グラフ)の経時的変化を示した。3回の独立した実験の平均値を、標準偏差を考慮してグラフ化した。

- (A) WT(JY333), *ksg1-3*(KM58), $\Delta pck1$ (TH64), $\Delta pck1 ksg1-3$ (TH87)の寿命測定。
 (B) WT(JY333), *ksg1-3*(KM58), $\Delta psk1$ (TH75), $\Delta psk1 ksg1-3$ (TH84)の寿命測定。
 (C) WT(JY333), *ksg1-3*(KM58), $\Delta gad8$ (TH279), $\Delta psk1 ksg1-3$ (TH280)の寿命測定。
 (D) WT(JY333), *ksg1-3*(KM58), $\Delta pka1$ (KM126), $\Delta psk1 ksg1-3$ (KM626)の寿命測定。



Supplemental Figure S6. *ksg1-3*とTORC1 関連の解析結果。

- (A) eIF2 α のリン酸化を検出したウエスタンブロッティングの結果。WT(JY333)と *ksg1-3* (No.3)を SD(OD=1.0)で培養して集菌した。
- (B) Atg13 のリン酸化を検出したウエスタンブロッティングの結果。Atg13 抗体を用いて、Atg13 のリン酸化レベルの変化をバンドシフトにより検出した。WT(KM709)と *ksg1-3* (KM737)を SD(OD=1.0)で培養して集菌した。
- (C) Gaf1-HA を検出したウエスタンブロッティングの結果。Gaf1-HA のバンドシフトにより、Gaf1 のリン酸化レベルの差の検出を試みた。WT(KM)と *ksg1-3*(KM)を SD(OD=1.0)で培養して集菌した。



Supplemental Figure S7. 分裂酵母 Pck2 の模式図。

Pck2 は、N 末端側から順番に Rho-binding domain、C2 domain(Ca²⁺ binding motif)、C1 domain(diacylglycerol binding domain)、Protein kinase domain、Protein kinase domain、C-terminal domain を有している。Pck2 の kinase としての触媒活性に必要なアミノ酸残基(K712)及び Pck2 の活性化と機能的関連が報告されているアミノ酸残基(T842, T846, T984, S1002)の位置を記した。図は Madrid *et al.*, 2017; Madrid *et al.*, 2015; Pombase を参考に作製した。

論文目録

報文

1. **Matsui, K.**, Okamoto, K., Hasegawa, T., Ohtsuka, H., Shimasaki, T., Ihara, K., Goto, Y., Aoki, K., and Aiba, H.
“Identification of *ksg1* mutation showing long-lived phenotype in fission yeast”, *Genes to Cells*, 2021, 26, 967-978.

参考論文

1. Kurauchi, T.*, **Matsui, K.***, Shimasaki, T., Ohtsuka, H., Tsubouchi, S., Ihara, K., Tani, M., and Aiba, H.
“Identification of *sur2* mutation affecting the lifespan of fission yeast”, *FEMS microbiology letters*, 2021, 368, fnab070. *: equally contributed
2. Maruyama, T., Hayashi, K., **Matsui, K.**, Maekawa, Y., Shimasaki, T., Ohtsuka, H., Saitoh, S., and Aiba, H.
“Characterization of hexose transporter genes in the views of the chronological life span and glucose uptake in fission yeast”, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2022, DOI <https://doi.org/10.2323/jgam.2022.05.006>

謝辞

本研究は名古屋大学分子微生物学研究室（創薬科学研究科）で行われました。6年間にわたり実験全般についてご教示いただきました饗場浩文教授に心より感謝いたします。

また、島崎嵩史助教・大塚北斗助教には実験指導や学位論文の添削など、自身の研究にご協力いただきましたことを心より感謝いたします。

本研究の全ゲノムシーケンス解析にご尽力いただき、適切なお助言をいただいた名古屋大学・遺伝子実験施設の井原邦夫准教授に感謝申し上げます。

私は、約3ヶ月間にわたり定量生物学研究部門（基礎生物学研究所）で共同利用研究をさせていただきました。当研究部門の青木一洋教授、後藤祐平助教にはご指導いただき大変お世話になりました。ここに感謝の意を表します。

御多忙の中、学位論文の審査を引き受けてくださった先生方に感謝いたします。

研究活動を共にした分子微生物学研究室の方々に感謝いたします。最後に、家族や友人など平素よりお世話になった方々に感謝申し上げます。

松井滉太郎