

論文の内容の要旨

論文題目 出芽酵母を用いたプロテアソームによる分裂寿命制御機構の解明

氏名 趙 憲

【序論】

ユビキチン・プロテアソームシステム (UPS) は真核生物において酵母からヒトまで広く保存された細胞内タンパク質分解機構であり、タンパク質の分解を通じて様々な生命現象を制御し、細胞及び個体の恒常性の維持に重要な役割を担っている。従って、プロテアソームの活性制御に異常が生じると、ユビキチン化された基質が分解されずに蓄積し、タンパク質の品質管理が正常に行われなくなる。近年、老化に伴う異常タンパク質の蓄積が細胞老化を促進する可能性が指摘されている。実際に、ハエ、線虫、及び出芽酵母等においてプロテアソームの活性を遺伝学的手法により低下させると寿命が短くなることが報告されている。これらの事実は、正常なプロテアソーム活性が寿命を全うするために必要であることを示唆している。一方、プロテアソームは sirtuin や TOR (target of rapamycin) といった代表的な寿命決定経路とは独立して寿命に影響を与えているという報告があり、プロテアソーム活性がどのように寿命に影響を与えるかについてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、出芽酵母の分裂寿命に注目し、寿命が短くなったプロテアソーム変異株の寿命を回復させるような復帰変異を網羅的に探索することで、プロテアソームの活性が寿命を変化させる分子メカニズムの解明を目指した。

【方法・結果】

1. 出芽酵母の分裂寿命を簡単に測定できる BY-K6001 株の構築

出芽酵母は名前の通り母細胞から娘細胞が出芽して分裂するが、母細胞は分裂できる回数に制限があり、この回数を分裂寿命と言う。出芽酵母における最も確実な分裂寿命の測定方法は、顕微鏡下で母細胞から娘細胞を取り除きながら母細胞が幾つの娘細胞を生み出すことが出来るかを継時的に数えるというものである。しかしながら、この方法で数千の変異体を網羅的に解析するのは難しい。この問題を解決するため、本研究

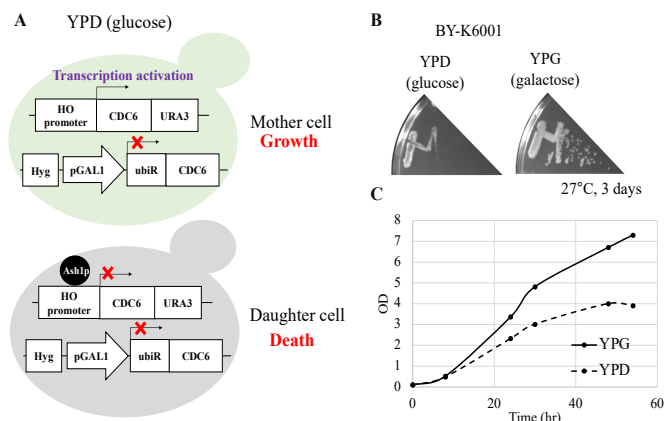


図1. BY-K6001株を構築した

A. BY-K6001株のモデル図。URA3: ウラシル遺伝子マーカー、Hyg: ハイグロマイシン耐性遺伝子、pGAL: ガラクトース誘導性プロモーター、ubiR: ユビキチン、Ash1p: 娘細胞へのみ局在し、HO遺伝子発現を制御するリプレッサー
B. BY-K6001株をYPDおよびYPGプレート上で27°C、3日間培養した。
C. BY-K6001株を濁度(OD₆₀₀)が0.1になるようにYPDおよびYPGに希釈し、継時的に濁度を測定した。

では遺伝子操作によって娘細胞の増殖を抑制し、母細胞だけを培養可能とすることで分裂寿命の簡単な測定を可能とする網羅的スクリーニング用 BY-K6001 株を構築した。この株では、必須遺伝子 *CDC6* が、ガラクトースにより誘導される *GAL1* プロモーターと母細胞特異的に発現する *HO* 遺伝子のプロモーターの両者により発現する (図 1A)。構築した BY-K6001 株は、ガラクトース存在下では正常に成長した一方で、グルコース存在下では、コロニーが形成されず、娘細胞は *CDC6* 遺伝子の発現停止により、増殖が抑制されていることが確認できた (図 1B, C)。

2. 利用可能なプロテアソーム変異株から Rpn10 欠損株を最も短寿命な株として同定した

次に BY-K6001 株を用いて、利用可能なプロテアソーム変異のうち最も寿命を短縮させ、寿命を復帰させる復帰変異のスクリーニングに適する変異を探索した。短寿命になった株は、グルコース培地での短時間培養でも母細胞は分裂回数の限界に達し、ガラクトース培地に戻して培養しても娘細胞の増殖が不可能となる。この現象を利用して BY-K6001 株に導入した各プロテアソーム変異から、グルコース培地での培養後ガラクトース培地に戻した際に最も増殖を悪くする変異として $\Delta rpn10$ 変異を選別した (図 2A)。次に、Rpn10 欠損株のグルコース培地での増殖を継続的に測定し、Rpn10 欠損株が野生型株に比べて分裂寿命が短くなっていることを確認した (図 2B)。

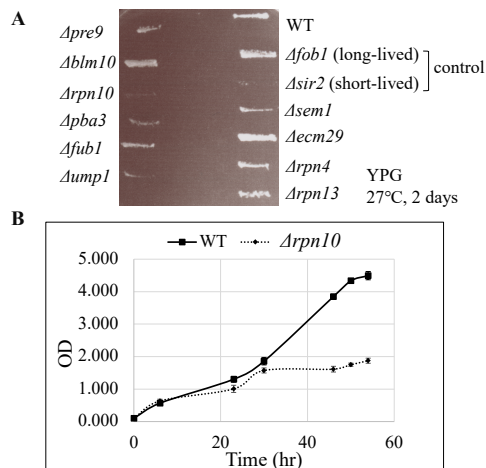


図2.最も短寿命なRpn10欠損株を同定した

A. 構築したBY-K6001にプロテアソーム変異を導入し、回復実験を行った。
B. WTとRpn10欠損株を濁度(OD₆₀₀)が0.1になるようにYPDに希釈し、継続的に濁度を測定した。

3. High-Life 法で Rpn10 欠損株における分裂寿命減少を確認した

娘細胞を出芽した後、母細胞の細胞壁に形成される出芽痕にはキチンが多く含まれている。このことからキチン量は母細胞の分裂寿命の指標となる。High-Life 法では母細胞を選択するために培養の最初に NHS-ester で、その後、死細胞を除外するために Propidium iodide (PI)、及びキチン量を測定するために CF405M-WGA で三重染色する。野生型株と Rpn10 欠損株のキチン量と生存率との関係をフローサイトメトリーで継続的に測定した結果、Rpn10 欠損株は野生型株に比べ、キチン量が増加する前に生存率が下がった。この結果より Rpn10 欠損株は短寿命であることがキチン量

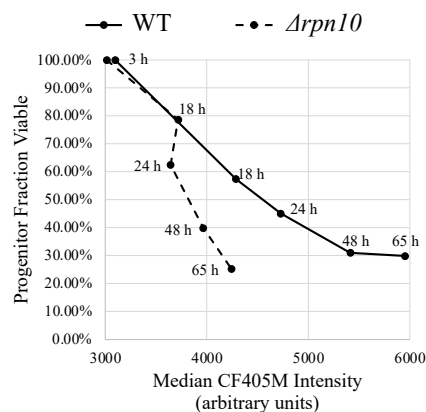


図3.Rpn10欠損株は野生型株に比べ、低いキチン量で高い致死率を示した。

と生存率の関係からも確認された (図 3)。

4. Rpn10 欠損株の寿命を延長させる遺伝子変異の網羅的スクリーニング

Rpn10 欠損株の寿命を延長させるような復帰変異を網羅的にスクリーニングするため、まず、Rpn10 欠損株に非必須遺伝子欠損 (YKO) のアレルを synthetic genetic array (SGA) 法で導入し、異なる接合型 (MATa もしくは MAT α) をもつ 2 つのライブラリーから合計 1,916 の二重変異株を作製した。次に、Rpn10 単独欠損株に比べ寿命が延長した株を出芽痕のキチン量を指標としてセルソーターで回収した (図 4)。回収された細胞を用いた Barcode-sequencing (Bar-seq) 解析から、細胞数が 4 倍以上増加した遺伝子として 197 遺伝子を取得した。さらに MATa 細胞と MAT α 細胞の解析結果の重ね合わせにより、8 遺伝子を候補として絞り込んだ。この中の 4 個にはヒトにもホモログが存在する (図 5)。

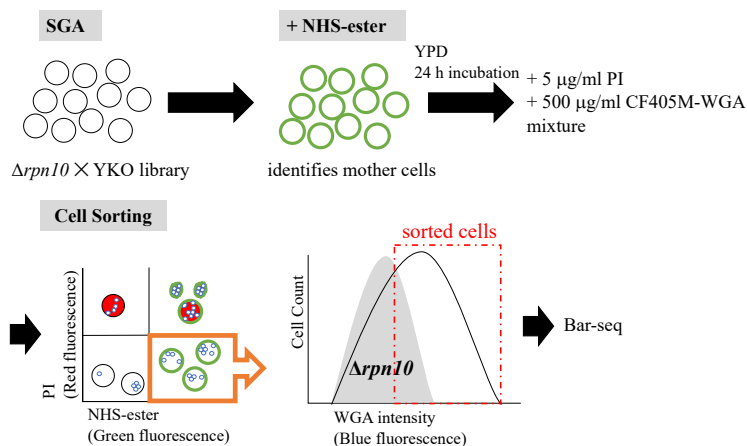


図4. Rpn10欠損株の寿命を回復させる変異のスクリーニング方法
培養最初にNHS-esterで標識されたものを母細胞とし、24時間培養後PIとCF405M-WGAで染色する。PIで染まったものは死細胞として除外し、NHS-esterで標識された細胞の中からCF405M-WGAの蛍光が強いものをセルソーターで回収した。

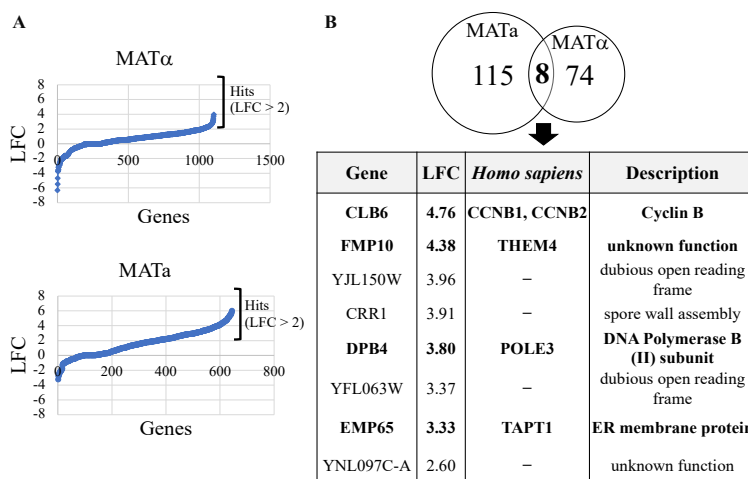


図5. スクリーニングでRpn10欠損株の寿命を回復させる8遺伝子を選抜した。
A. スクリーニングにおける各遺伝子のLFCを昇順に並べた。LFC: log₂-fold change
B. 最終候補遺伝子のリスト。太字は出芽酵母とヒトの共通遺伝子を表す。

【総括】

本研究で構築した BY-K6001 株を用いて出芽酵母プロテアソーム変異株の中から Rpn10 欠損株の分裂寿命が最も短いことを明らかにした。そして、プロテアソームに関わる寿命関連因子を同定するべく、BY-K6001 株と High-Life 法を組み合わせ出芽痕のキチン量を指標としたスクリーニング系を構築した。Rpn10 欠損株の分裂寿命を延長させる遺伝子欠損変異を接合型の異なる 2 つのライブラリーから単離し、共通して得られたものを寿命延長に効果ある変異として同定した。今後、得られた 8 遺伝子の個別解析によりプロテアソームが寿命に影響を及ぼす現象の分子メカニズムを解明し、健康寿命の延伸に大きく貢献する結果が得られると期待される。