

審査の結果の要旨

氏名 趙 憲

本論文は、真核生物の多様な細胞機能制御に必須の役割を果たすタンパク質分解酵素複合体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ものである。特に出芽酵母の分裂寿命に注目し、プロテアソームの変異の中でも最も分裂寿命の短縮が顕著であった *Rpn10* 欠損株の寿命を回復させるような復帰変異を網羅的に探索した結果、11 個の候補遺伝子を寿命延長に効果ある遺伝子として同定するに至った。

ユビキチン・プロテアソームシステム (ubiquitin-proteasome system, UPS) は、ユビキチン修飾を受けたタンパク質の分解を通じて、真核生物の多様な細胞機能を制御することにより、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。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主要な原因である可能性が指摘されている。多くの生物種において、プロテアソームの活性は加齢とともに低下していくことから、プロテアソームは寿命と密接な関連があることが推測される。プロテアソームが寿命に影響を与えるメカニズムに関して現時点で分かっていることは、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の経路とは独立して寿命に影響を与えているということである。これはプロテアソームが *sirtuin* や TOR と並ぶ重要な寿命決定因子であることを示唆している。しかしながら、プロテアソームの活性変化がどのようにして寿命に影響を与えるかに関しては殆ど分かっていない。そこで本研究では、出芽酵母の分裂寿命に注目した。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。1つの母細胞が一生の間に分裂できる回数には 20-25 回の限度があり、最終的には娘細胞を産むことができなくなる。つまり、出芽酵母の分裂寿命は、出芽する娘細胞の数として定義される。また、寿命制御に関与する遺伝子は、酵母からヒトまで高度に保存されている。このことから、出芽酵母は老化研究モデルとして非常に有用であると考えられる。

本研究では、まず出芽酵母の分裂寿命を簡単に測定できる 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。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。

続いて構築した BY-K6001 株を用い、分裂寿命の測定が可能かどうかを調べた。短寿命な *Sir2* 欠損株と長寿命な *Fob1* 欠損株を液体培地で培養し、培地の濁度を継時的に測定した結果、短寿命な *Sir2* 欠損株の濁度上昇が培養期間の早い時期に止まるのと比べ、長寿命な *Fob1* 欠損株においては濁度上昇が長時間継続した。このことから、BY-K6001 株を用いることによって分裂寿命の長短は液体培地の濁度測定によって簡単に測定できることを確認した。

次に、プロテアソーム遺伝子の変異により短寿命となった株の寿命を正常に戻す変異のスクリーニングを行う準備として、まず利用可能なプロテアソーム遺伝子変異のうち、どの変異がスクリーニングに最も適しているのかを検討した。まず、欠損させても致死とはならない 10 種のプロテアソーム関連遺伝子アレルを BY-K6001 株に四分子解析によって導入した。導入された変異によって短寿命になった BY-K6001 株は、グルコース培地で一定時間培養するとその培養中に母細胞の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。一方、導入された変異によって短寿命にならなかった株は、グルコース培地での一定時間培

養中には分裂回数の限界に達さず、再びガラクトース培地で培養すると娘細胞の増殖が回復する。この現象を利用した回復実験を行った結果、Ump1 と Rpn10 の二つの欠損株において、グルコース培地での培養後、再びガラクトース培地で培養した際に増殖の回復が認められず、短時間内で分裂回数の限界に達したことが示された。このことから、Ump1 欠損株と Rpn10 欠損株をスクリーニングに用いる変異株候補として選択した。

さらに Ump1 欠損株と Rpn10 欠損株の分裂寿命を詳細に調べた結果、Ump1 と Rpn10 の欠損株は共に野生型株に比べて分裂寿命が確かに短くなっていること、また Rpn10 欠損株の方が Ump1 欠損株よりも分裂寿命が短くなっていることがわかった。次に、Rpn10 欠損株において観察された分裂寿命の短縮が本当に *RPN10* 遺伝子の欠損に由来するものかどうか遺伝子の相補実験により確認した。Rpn10 欠損株に *RPN10* 遺伝子をプラスミドで入れ戻し、濁度測定を行った。その結果、導入された *RPN10* 遺伝子によってグルコース培地における分裂回数の減少が相補された。Rpn10 欠損株で観察された分裂寿命の減少は確かに Rpn10 の欠損によることが確認された。これらの結果から、Ump1 欠損株と Rpn10 欠損株のうち、寿命を延長させる変異のスクリーニング用株として Rpn10 欠損株がより適切な株と判断した。

続いて Rpn10 欠損によって短くなった寿命を回復させる変異を網羅的に探索するために非必須遺伝子については出芽酵母ノックアウト (Yeast Knock Out: YKO) ライブラリー、また必須遺伝子については遺伝子の発現を低下させた DAmP (Decreased Abundance by mRNA Perturbation) ライブラリー、の二つの変異ライブラリーを用いることにした。Rpn10 欠損株にこの二つのライブラリー変異のいずれかを synthetic genetic array (SGA) 法で導入し、二重変異株ライブラリーを作製した。

しかしながら、数千の二重変異株に対して一つずつ濁度を測定するのは現実的ではない。そこで母細胞の出芽痕に存在するキチン量測定を利用した分裂寿命の測定法である High-Life (high-throughput replicative lifespan measurement)法を用いて長寿命株をライブラリーから選択することにした。High-Life 法は最初にフルオレセイン (緑色) を結合させた N-hydroxysuccinimide-ester (NHS-ester) で細胞壁を標識し、標識されたもののみを母細胞として選択できるようにして、さらに赤色の propidium iodide (PI) 染色で死細胞を除去したのち、生きている母細胞のキチン量を CF405M-WGA の染色により測定する、という方法である。実際に、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時的に測定した結果、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。このことから、母細胞の出芽痕に存在するキチン量測定を利用した High-Life 法が分裂寿命の測定法として使用可能であることを確認した。

以上を踏まえ、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を実施した。構築した二重変異株ライブラリーを NHS-ester、PI、CF405M-WGA で三重染色し、Rpn10 欠損株と比べ、キチン量が増加している株をセルソーターで回収した。非必須遺伝子については回収された YKO 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。また必須遺伝子に関しては、回収された DAmP 細胞をシングルコロニー化し、Inverse PCR を用いて 3 つの候補遺伝子を同定した。

以上の結果から、趙憲は以下の成果を示した。出芽酵母の分裂寿命を簡単に測定できる BY-K6001 株を構築し、プロテアソームサブユニット Rpn10 の欠損で分裂寿命が短縮することを明らかにした。また独自に構築した網羅的スクリーニングによって Rpn10 欠損株の短縮した分裂寿命を回復させる変異を 11 個同定した。今後得られた変異によって分裂寿命が回復する機構を解析することで、プロテアソーム機能と寿命との関連性の詳細が明らかになると考えられる。

よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。