

## 出芽酵母の母細胞と娘細胞のトランスクリプトーム比較

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 情報生命科学専攻

宮 和樹 (47116912) 2013年3月修了

指導教員：伊藤隆司 教授

出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)は以前から細胞老化のモデル生物として広く用いられてきた。これまでの研究により、replicative aging と呼ばれる老化の進行とともに、ヒストン脱アセチル化酵素である Sir2 の活性が下がり、ヒストンアセチル化酵素の Sas2 によって特にサブテロメア領域におけるヒストン H4K16 のアセチル化が亢進することや、老化にともなってヒストンの量は減少していき、ヒストンタンパク質の発現を亢進させることで寿命が伸びることなどが明らかになっている。

我々は酵母細胞が replicative aging の進行にともなって大きくなる性質に注目し、粒子をその大きさにそって分画する装置であるエルトリエーターという遠心分画装置を用いて老化した細胞を集めて、RNA-seq および ChIP-seq による網羅的解析をおこなうことを計画した。ただし、通常の培養環境では、出芽のたびに生まれて指数関数的に増加する娘細胞よりも、出芽を繰り返して老化した母細胞の方が先に死ぬため、十分な数の老化細胞を集めることは難しい。

そのため、我々は“Mother Enrichment Program (MEP)”と呼ばれる手法の併用を計画した。MEP は、娘細胞特異的なプロモーターによって発現するエストラジオール結合ドメイン融合型 Cre リコンビネース (EBD-Cre) 遺伝子と、エクソンの1つが loxP サイトで挟まれた2種類の必須遺伝子を持った株を用いる。この株では娘細胞にのみ EBD-Cre が発現するが、通常は核外に存在している。しかし、エストラジオールを培養液に添加すると、EBD-Cre が核内に移行して必須遺伝子のエクソンを欠失させるので娘細胞は死ぬ。その一方で母細胞は出芽を繰り返すので、培養時間を延ばすにつれて replicative aging の進んだ細胞集団が娘細胞に希釈されることなく得られる。これを用いて老化細胞が大半を占める細胞集団を得た上で、そこからエルトリエーターによって老化細胞を更に精製することを試みた。

しかしながら、実際に実験系を立ちあげて MEP 株の培養をおこなった結果、出芽途中で分裂が止まったようなダンベル状の細胞が細胞集団の大半を占めることが分かった。このダンベル状の細胞のサイズは正常な細胞よりも大きく、エルトリエーターを用いても正常に老化した母細胞と分けることができなかつたため、MEP の採用を断念した。

そこで、酵母の野生株を非常に低い細胞密度 (replicative aging が進み老化した細胞が死にくい環境) で培養した細胞集団をエルトリエーターで分画し、老化した細胞を集めることにした。この手法では老化が非常に進んだ細胞を集めることは難しく、bud scar の平均個数が約2個の母細胞の集団しか得られない。そのため、対数増殖期の細胞集団をエルトリエーターで分画してほとんど出芽を経験していない非常に若い細胞 (娘細胞) を得て、それを対照とする RNA-seq および ChIP-seq 解析をおこない、母細胞と娘細胞におけるトランスクリプトームおよびエピゲノムの差異を検討することで、老化の初期の変化の検出を目指すことに方針を変更した。

まず、娘細胞 (bud scar 数平均 0.32) と母細胞 (bud scar 数平均 1.88) から RNA を抽出し、RNA-seq をおこなった。その結果、娘細胞と母細胞で発現量が変化した遺伝子が 20 個見つかった。これらの遺伝子のうち、娘細胞で発現量が多かった 16 個の遺伝子群からは、娘細胞がグルコースと窒素源の飢餓状態にあることが示唆された。例えば、*CTA1*, *POT1*, *IDP2*, *ADY2*, *ACSI*, *SFC1*, *YAT1*, *RGI2* は転写因子 Adr1 または Cat8 に制御されている遺伝子群であるが、これらの遺伝子が娘細胞で誘導されていることは、ペルオキシソームと細胞質においてアセチル CoA の合成が促進されて呼吸によるエネルギー産生がおこなわれていること、すなわち娘細胞がグルコース枯渇時の diauxic shift 様の応答を示していることを示唆している。また、*MEP2*, *CAR2*, *PUT1* は窒素源の分解と利用に関わっており、娘細胞が窒素源の不足状態にあることを示唆している。さらに、アミノ酸飢餓全般に応答する転写因子 Gcn4 の標的である *LYSI*, *LYS9*, *RTC2* の発現も上昇していた。このことから、母細胞から分裂したばかりの娘細胞では、母細胞とは異なる代謝システムを持っている可能性があると考えられ、メタボローム解析による確認が望まれる。

次に、娘細胞と母細胞からタンパク質を抽出し、ヒストン H4K16ac 抗体とヒストン H3 抗体によるウェスタンブロット解析をおこなった。ヒストン H4K16 のアセチル化は、replicative aging に伴って亢進するという報告がある修飾である。実際に、若い細胞よりもやや老化した細胞の方がアセチル化されたヒストン H4K16 が多いという結果が得られた。興味深いことに、アセチル化の亢進は既報よりも若い段階から始まっていることが示唆された。一方、ヒストン H3 は細胞の老化とは関係なく一定量存在すると言われているが、我々のおこなった実験では娘細胞よりも母細胞で強いシグナルが得られた。以上の結果は、一般に細胞分裂を経ても安定に伝わると思われるエピジェネティック変化が、母細胞と娘細胞の間では非対称に継承されることも示唆している。

今回我々がおこなった研究は、酵母の娘細胞と母細胞のトランスクリプトーム比較を実施した初めての例である。この比較の結果、娘細胞でグルコースおよび窒素源の飢餓状態様の応答が見られた。酵母は一般に、豊富な栄養源の存在を感知した上で分裂を始めるが、我々のおこなった解析からは、母細胞が豊富な栄養源のもとで分裂をおこなっている一方、娘細胞がその栄養源の存在を感知できていないという非対称性が存在する可能性が示唆された(下図)。さらに、ウェスタンブロット解析の結果、娘細胞と母細胞においてヒストン H3 およびアセチル化ヒストン H4K16 の量が変化していることが明らかになり、エピジェネティック修飾の違いも示唆された。

我々の研究は、娘細胞と母細胞でエピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームが異なっていることを示唆しており、今後、これらの変化を各階層間の因果関係を考慮しながら解明していくことが、非対称分裂細胞の老化を理解するためには重要であると考えられる。

