

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

平成 24 年度 修士論文

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

2013 年 1 月提出

指導教員 伊藤 隆司 教授

47116912 宮 和樹

1. INTRODUCTION

出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)は、細胞増殖速度が早い、遺伝学的解析が進んでいる、ゲノム改変手法が確立している、破壊株リソースが整備されている、データベースが充実しているなどの特長を持つため、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、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(Dang et al. 2009)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(Feser et al. 2010)ことなどが明らかになっている。また、rDNA の組み換えによって生じる extrachromosomal rDNA circles(ERCs) や酸化ダメージを受けたタンパク質が老化の進行とともに蓄積し、これらの量が一定量を超えると細胞は死ぬと考えられており、これらの物質の存在量は Sir2 に制御されている(Steinkraus, Kaeberlein, and Kennedy 2008)ことや、テロメアの長さは老化が進行してもほとんど変わらない(D’Mello and Jazwinski 1991)こと、転写因子 NDT80 の強制発現で細胞の老化をリプログラムできること(Unal, Kinde, and Amon 2011)なども分かっている。

酵母の老化には、replicative aging と chronological aging の 2 種類がある。酵母は母細胞から出芽という形で娘細胞が生ずる非対称分裂をおこなう。一つの母細胞が出芽できる回数は予め決まっており、出芽を経るごとに進む老化を replicative aging と呼ぶ。母細胞の細胞壁には出芽の度にその痕跡(bud scar)が残るので、この数が replicative age を示す。一方、chronological aging とは、飢餓状態などにより G0 期で増殖が止まっている細胞の生存率が時間とともに低下してゆく過程を指す。前者と後者は、それぞれ高等動物における幹細胞と終末分化細胞の老化のモデルとされている(Longo et al. 2012)。

replicative aging はプレート上で培養した酵母細胞から、マイクロマニピュレーターを用いて針の先端で細胞をつつき、娘細胞を取り除きながら観察するのが一般的である。しかし、この方法は人の手で細胞を一つずつ扱うことになるため、数十~百個程度の細胞を観察するのが限界であり、生化学的・分子生物学的解析をおこなうことはできない。そこで我々は、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。

エルトリエーターは、粒子をその大きさにそって分画する装置である。装置内のチャンバーに粒子を含んだ溶液を流しながら遠心力を加えると、チャンバー内で粒子の大きさによる勾

配ができる。その状態で遠心の回転数や溶液の流速を調節すると、小さい粒子から順に装置の外へと排出される(Diamond 1991)。酵母細胞は一般に老化するほど大きくなるので、一定期間培養した細胞をエルトリエーターに投入し、分裂したばかりの娘細胞など小さい細胞を取り除いて老化した母細胞のみを集めることが可能である。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。

そこで我々は、“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(Lindstrom and Gottschling 2009)。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。娘細胞で発現量が高かった遺伝子群には、栄養源が枯渇したときに発現が上昇す

る遺伝子が多く含まれていた。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(Dang et al. 2009)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りとさ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。

2. RESULTS

Mother Enrichment Program (MEP)

- MEP 株は小分けして培養する必要がある

Lindstrom らの使用した MEP 株のうち UCC5179 株を用いて、MEP の再現を試みた。細胞を 2×10^4 個/ml の濃度で、1L の YPD+エストラジオール培地内で培養を開始し、24 時間ごとに培地の OD600 の数値や細胞の bud scar 数を計測した。その結果、培養開始から 96 時間後の観察で、細胞が急激に増殖していた(図 1)。顕微鏡で確認したところ、娘細胞と思われる小さな細胞が大量に存在していた。これは一部の細胞が突然変異によりエストラジオール耐性を持ち、エストラジオール存在下でも分裂できる娘細胞を出芽したことが原因だと思われる。エストラジオール耐性を持つ変異体が出現することは Lindstrom らも報告しており、彼らの実験では分裂のたびに 1.4×10^{-8} の確率でエストラジオール耐性を持つ変異体が発見されたとしていた (Lindstrom and Gottschling 2009)。

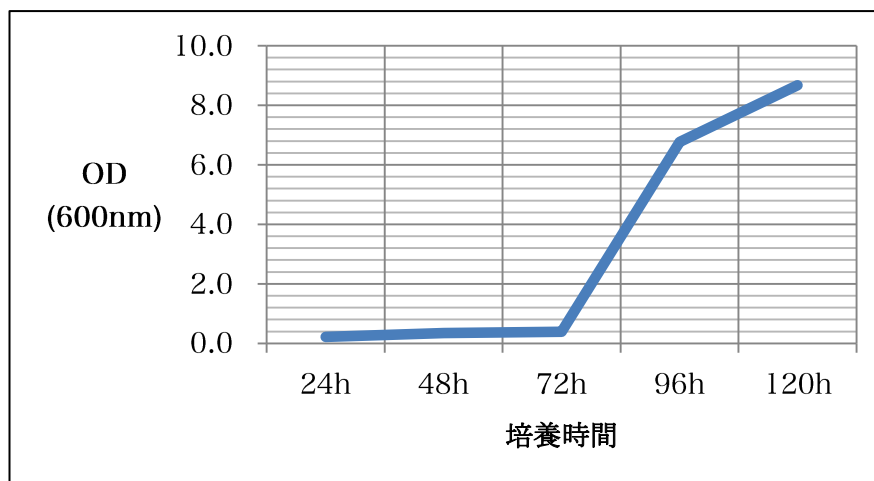


図 1 : MEP 株を 120 時間培養し、24 時間ごとに OD600 を計測した。96 時間後に OD が急上昇している。

この問題を解決するため、培地を 20ml ずつチューブに小分けし、これを 100 本培養して変異体が出現しなかったもののみ回収して使用することにした。120 時間の培養後、100 本の

うち 60 本は OD が上昇しており変異があると思われ、残りの 40 本は OD が培養開始時からほぼ変わらなかったため、変異が起きなかったと考えられる。酵母が 2 時間に 1 回分裂すると仮定して、先述した Lindstrom らによる実験(Lindstrom and Gottschling 2009)における変異体の出現確率を今回の実験に当てはめると、全体の約 30 %のチューブで変異が起きることになる。今回の我々の実験ではその 2 倍のチューブで変異が起きたが、その原因は不明である。

● 異常な形状の細胞

変異が起きなかった細胞の細胞壁を calcofluor で染色し、bud scar の数を数えようとしたところ、ほとんどの細胞に bud scar が全く見られなかった。また、この bud scar が全く見られない細胞は、ダンベル状に 2 つの細胞がつながったような形状をしていた(図 2(b))。

このダンベル状の細胞は、本来分裂できずに死ぬはずの娘細胞が、途中まで分裂した状態で生き残ったものと思われる。この細胞はサイズが大きいため、エルトリエーターによってサイズが大きい老化細胞と小さい娘細胞とを分画する際に老化細胞のフラクションに入ってしまう、老化した細胞と若い細胞を分画することができなかった。このため、MEP の採用を断念した。

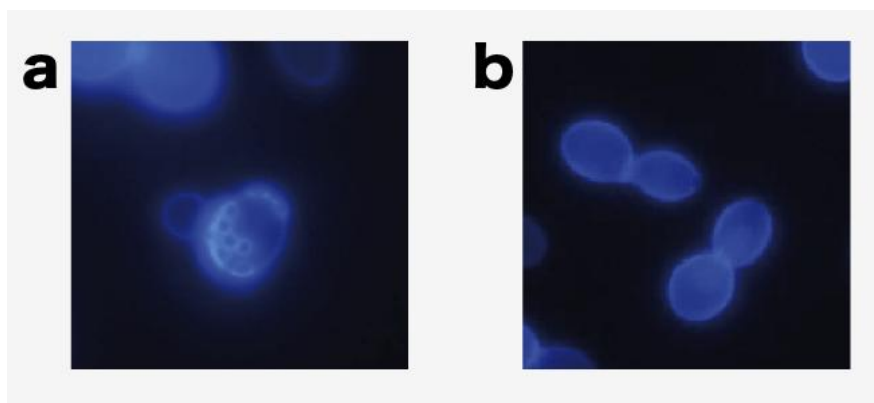


図 2 : (a) WT 株の母細胞はこのように bud scar を持ち、発芽途中の娘細胞は母細胞よりも小さい。(b) 120 時間培養した後の MEP 株の細胞。ほとんどの細胞に bud scar が見られず、ダンベル状に 2 つの細胞がつながったような形状をしている。2 つの細胞の大きさはほぼ同じで、どちらが母細胞かがわからない。

エルトリエーターによる細胞分画

エルトリエーターは、粒子をその大きさにそって分画する装置である。装置内のチャンバーに粒子を含んだ溶液を流しながら遠心力を加えると、チャンバー内で粒子の大きさによる勾配ができる。その状態で遠心の回転数や溶液の流速を調節すると、小さい粒子から順に装置の外へと排出される(図3)。酵母細胞は一般に老化するほど大きくなるので、一定期間培養した細胞をエルトリエーターに投入し、分裂したばかりの娘細胞など小さい細胞を取り除いて老化した母細胞のみを集めることが可能である。当初は MEP 株を培養した後、エルトリエーターによって老化した細胞のみを得る予定だったが、MEP の採用を断念したため、エルトリエーターのみで老化した細胞を集めることを試みた。

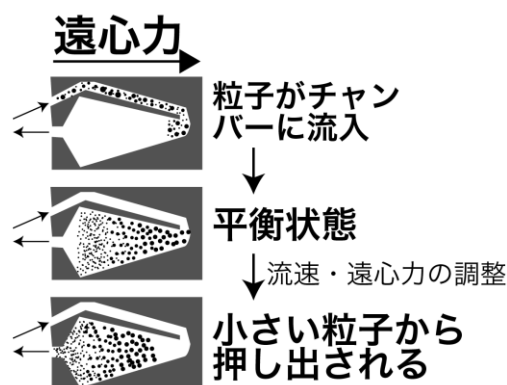


図3：エルトリエーターが粒子を大きさごとに分画する仕組み。Diamond(Diamond 1991)の図を改変。

以降の実験には BY4741 野生株を使用した。酵母の野生株は、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、対数増殖期の細胞集団をエルトリエーターで分画し、出芽を経験していない非常に若い細胞（娘細胞）と数回細胞分裂した母細胞を得て、老化の初期に生じる変化の検出を目指すことに方針を変更した。

酵母を 100ml の YPD 内で一晚培養した後、100 分の 1 の濃度に希釈して OD600 が約 0.8 の mid-log phase になるまで 4~5 時間培養した。培養はすべて 30°C でおこなった。この培養液から 10^9 個分の細胞を取り、エルトリエーターで細胞を大きさごとに分画した。詳しい手法は Materials and Methods の項に記載した。5 つのフラクションを採取し、そのうち十分な細胞量が得られたフラクション 1.6 とフラクション 2 の bud scar 数を数えた。その結果、フラクション 1.6 は細胞の大きさが小さく、bud scar 数平均が 0.32 とほとんどの細胞が娘細胞である集団であり、その一方フラクション 2 はフラクション 1.6 よりもやや大きく、bud scar 数平均が 1.88 と 1、2 回細胞分裂した母細胞の集団であることが分かった(表 1、図 4)。

	細胞数	bud scar 数平均
フラクシオン 1.6	1.20E+08	0.32
フラクシオン 2	6.02E+08	1.88

表 1: フラクシオン 1.6 と 2 の細胞数、および bud scar 数の平均($n = 50$)。

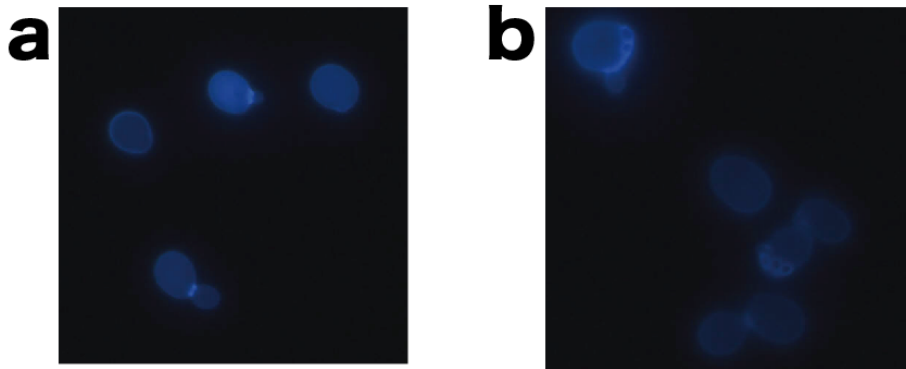


図 4: フラクシオン 1.6(a)とフラクシオン 2(b)の細胞の細胞壁を染色したもの。フラクシオン 2 の細胞の方がフラクシオン 1.6 よりもやや大きい。

RNA-seq

● シークエンスとマッピング結果

娘細胞と母細胞から RNA を抽出し、MiSeq で RNA-seq をおこなった。シークエンスはペアエンドでおこない、QC 後のリード数の合計はフラクシオン 1.6 が 3,626,600 リード、フラクシオン 2 が 4,423,480 リードだった。このリードを TopHat(Trapnell et al. 2012)によってマッピングした結果、フラクシオン 1.6 が 3,041,972 リード、フラクシオン 2 が 3,592,608 リードマップされた(表 2)。

	シークエンス	マッピング結果	マッピング率(%)
フラクシオン 1.6	3,626,600	3,041,972	83.9
フラクシオン 2	4,423,480	3,592,608	81.2

表 2: 各フラクシオンのリード数およびマッピング結果。

次に、2つのフラクシヨンのマッピング結果を Cufflinks パッケージに含まれる Cuffdiff (Trapnell et al. 2012)で処理し、発現量の差をとった。この結果を R パッケージの CummeRbund で解析した。

- 発現量に差がある 20 個の遺伝子

CummeRbund によって発現量の差が有意水準 0.05 で有意と判定された遺伝子が 20 個あった (図 5)。そのうち 4 個は母細胞で発現量が増加し(表 3)、16 個は減少した(表 4)。

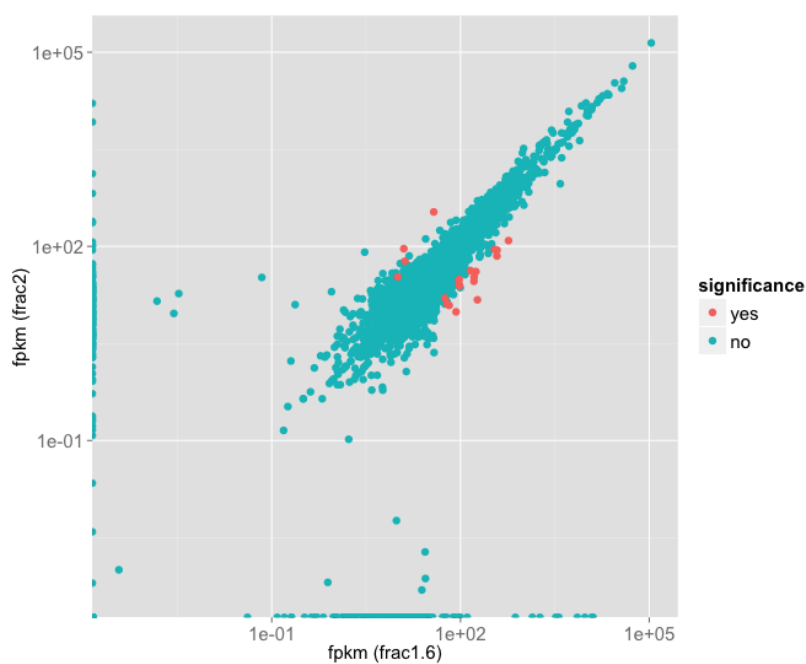


図 5：各遺伝子をフラクシヨ 1.6 とフラクシヨ 2 の Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments の値 (fPKM 値) でプロットした。CummeRbund によって有意水準 0.05 で有意と判定された遺伝子はマゼンタ色、それ以外の遺伝子はシアン色で示している。

遺伝子	fPKM (frac1.6)	fPKM (frac2)	変動量(倍)
<i>PIR1</i>	37.5	340.7	9.08
<i>EGT2</i>	12.6	92.1	7.32
<i>ASH1</i>	13.1	59.1	4.50
<i>CHS2</i>	10.1	33.9	3.36

表 3：母細胞で発現が増加した遺伝子。

遺伝子	fpm (frac1.6)	fpm (frac2)	変動量(倍)
<i>SFC1</i>	185.9	14.9	0.08
<i>TIS11</i>	85.1	9.7	0.11
<i>RTC2</i>	163.6	28.9	0.18
<i>CTP1</i>	65.9	12.3	0.19
<i>ADY2</i>	379.7	71.0	0.19
<i>LYS1</i>	164.7	33.7	0.20
<i>MEP2</i>	61.2	12.9	0.21
<i>CAR1</i>	579.2	122.8	0.21
<i>PUT1</i>	380.7	87.8	0.23
<i>RGI2</i>	175.7	40.8	0.23
<i>IDP2</i>	96.3	24.5	0.25
<i>LYS9</i>	347.2	90.0	0.26
<i>ACS1</i>	94.9	26.2	0.26
<i>POT1</i>	56.4	15.9	0.28
<i>YAT1</i>	144.0	42.3	0.29
<i>CTA1</i>	95.3	30.9	0.32

表4：母細胞で発現が減少した遺伝子。

次に、Funspec (<http://funspec.med.utoronto.ca/>) でこれらの遺伝子の GO 解析をおこなった(表5、表6)。その結果、アンモニア輸送やリジン、グルタミン酸の生合成など窒素に関わるプロセスや、酸化還元プロセスに関わるプロセスに多くの遺伝子が含まれていた(表5)。また、ペルオキシソームの膜や細胞分裂時の芽(bud)にタンパク質や mRNA が局在する遺伝子も含まれていたことがわかった(表6)。

生物学的プロセス	p-value	このカテゴリに含まれる遺伝子	遺伝子数/全遺伝子数
アンモニア輸送	1.30E-04	<i>ADY2 MEP2</i>	2/6
リジン生合成プロセス	2.41E-04	<i>LYS1 LYS9</i>	2/8
窒素の利用	3.10E-04	<i>ADY2 MEP2</i>	2/9
グルタミン酸生合成プロセス	6.66E-04	<i>PUT1 IDP2</i>	2/13
酸化還元プロセス	1.06E-03	<i>CTA1 LYS1 PUT1 IDP2 LYS9</i>	5/272

表5：生物学的プロセスでクラスタリングした GO 解析結果。2個以上の遺伝子が含まれたクラスタを記載した。

細胞の構成要素	p-value	このカテゴリに含まれる遺伝子	遺伝子数/全遺伝子数
ペルオキシソームの膜	4.72E-04	<i>CTAI POT1</i>	2/11
細胞分裂時の芽(bud)	8.68E-03	<i>ASH1 EGT2</i>	2/47

表 6：細胞の構成要素でクラスタリングした GO 解析結果。2 個以上の遺伝子が含まれたクラスタを記載した。

● 細胞周期によって発現が変動する遺伝子

20 個の遺伝子を Cyclebase (<http://cyclebase.org/>) で検索し、細胞周期による発現変動があるかどうかを調べた。その結果、母細胞で発現が減少した 16 遺伝子は、いずれも細胞周期によって発現量に変化はない遺伝子だった(図 6)。その一方、母細胞で発現が上昇した 4 遺伝子(*PIR1*, *EGT2*, *ASH1*, *CHS2*)は G2 期の終盤から G1 期の初期に発現が上昇していた(図 7)。つまり、これらの遺伝子は M 期を中心にピークを迎え、その後発現が減少する遺伝子である。

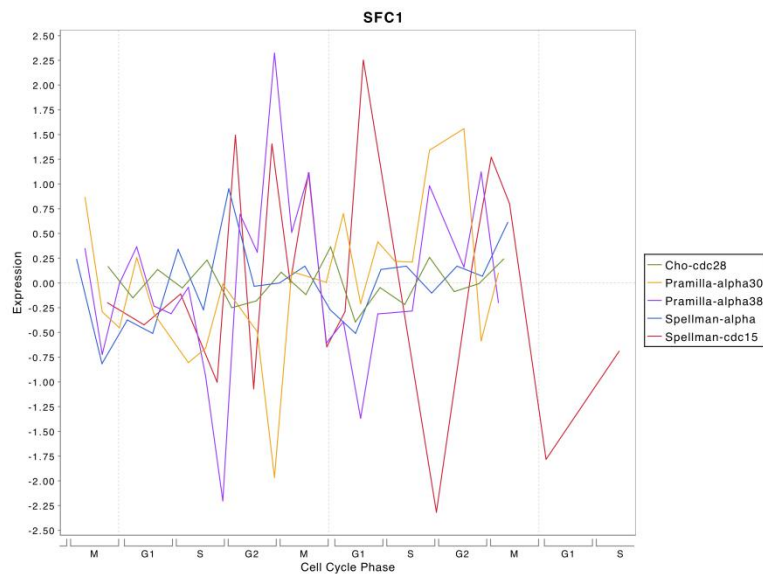


図 6：SFC1 の細胞周期による遺伝子発現量の変動。細胞周期による発現量の変動は見られない。母細胞で発現量が減少した他の遺伝子でも同様だった。Cyclebase より抜粋。

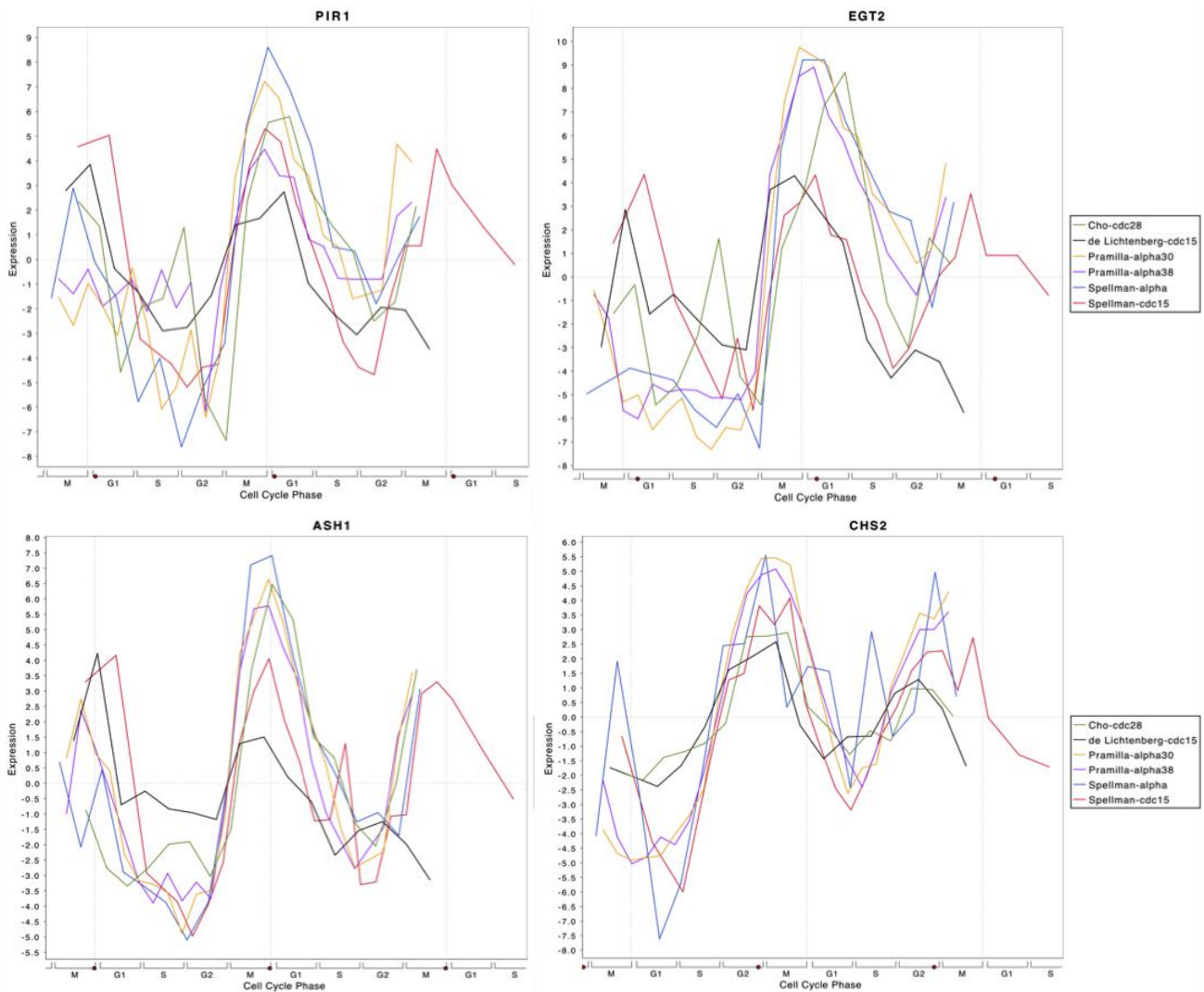


図7： *PIR1*, *EGT2*, *ASH1*, *CHS2*の細胞周期による遺伝子発現量の変動。縦軸が発現量、横軸が細胞周期を表している。いずれの遺伝子もM期周辺で発現が上昇している。Cyclebaseより抜粋。各実験の詳細は http://cyclebase.org/displayexperiments.action#organism_1 に記載されている。

これらの遺伝子を、当研究室とインテック社で開発した Annotation Rating Tool (ART)を用いて解析した。その結果、*PIR1*, *ASH1*, *EGT2*の3遺伝子のmRNAには、M/G1期からG1期に発現する遺伝子を制御する転写因子Swi5が結合するという結果が、Harbisonら (Harbison et al. 2004)による Chip-on-chip 実験から得られていることが分かった。以上の結果から、母細胞の集団はM期周辺の細胞が多かった可能性がある。

● 栄養枯渇時に発現する遺伝子

母細胞で発現が減少した遺伝子には、栄養が枯渇しているときに発現する遺伝子が複数含まれていた。これらの遺伝子とその機能を表7に示す。これらの遺伝子が母細胞で発現が減少

している、すなわち娘細胞での発現量が母細胞よりも高いということは、発芽したばかりの娘細胞の代謝メカニズムは、通常の酵母細胞とは異なっている可能性があることを示唆している。実際、母細胞で発現が減少した遺伝子のうち *SFC1*, *ADY2*, *RGI2*, *IDP2*, *ACS1*, *POT1*, *YAT1*, *CTA1* は、グルコース枯渇時に転写因子 Adr1 や Cat8 の制御によって発現が上昇する遺伝子である。これらの遺伝子は、酵母の代謝システムを、細胞外のグルコースを消費する発酵から体内に蓄積したトレハロースやグルコース代謝によって産生されたエタノールを消費する好気呼吸へと変更する diauxic shift に関わっている。以上のことから、娘細胞は若い母細胞とは異なった代謝システムを持っている可能性が考えられる。

遺伝子名	変動量(倍)	機能
<i>SFC1</i>	0.08	コハク酸をミトコンドリアへ輸送する。エタノールと酢酸の代謝に必要。
<i>TIS11</i>	0.11	鉄が枯渇している環境で発現する。Tis11 は DNA の複製ストレスがかかっている時に多く存在する。
<i>ADY2</i>	0.19	胞子形成時に酢酸を輸送する。ミトコンドリア内でリン酸化される。
<i>CAR1</i>	0.21	窒素源が他にないときにアルギニンを窒素源として使うための Arginase。
<i>PUT1</i>	0.23	窒素源が他にないときにプロリンを窒素源として使うためのプロリン脱炭化酵素。
<i>IDP2</i>	0.25	NADP 依存性のイソクエン酸脱水素酵素。グルコース存在下での成長時は発現が低下する。
<i>ACS1</i>	0.28	酢酸からアセチル CoA の産生。発酵できない炭素源での成長や、好気呼吸時に発現する。

表 7: 娘細胞で発現量が高く、母細胞で発現が減少した遺伝子のうち、栄養が枯渇した環境で発現する遺伝子。

ウェスタンブロット解析

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。その結果、ヒストン H3、ヒストン H4K16 のアセチル化はともに、フラクション 2 の方が亢進していることが分かった(図 8)。ヒストン H3 の量は一定でコントロールに使われることが多いが、今回はそれに反する結果が得られた。ヒストン H4K16 のアセチル化は、bud scar 数平均が 7~9 個の細胞で亢進していることは既報である (Dang et al. 2009) が、今回のように老化の初期段階からアセチル化が亢進し始めていることは報告されていない。

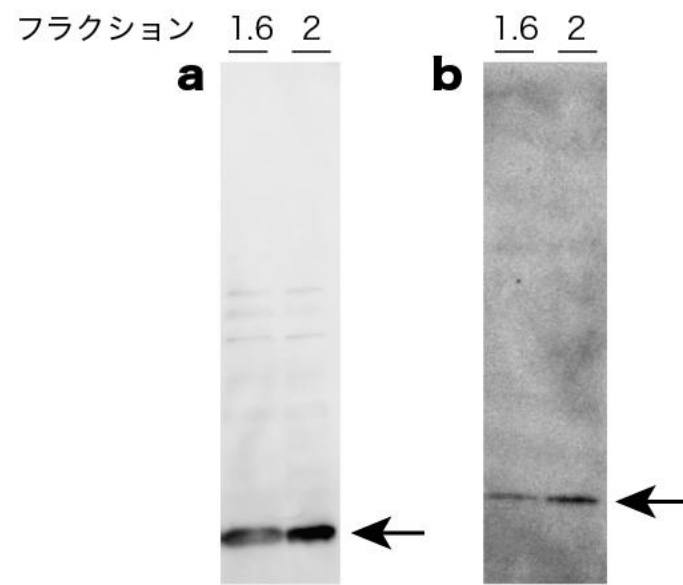


図8：ヒストン H3 抗体(a)、およびヒストン H4K16 アセチル化抗体(b)によるウェスタンブロット解析結果。

3. DISCUSSION

エルトリエーターによる細胞分画

エルトリエーターを用いた娘細胞と母細胞の分画は、まだ安定した技術ではない。別に培養した細胞を同じ条件で分画したが、フラクション 1.6 までにはほとんど細胞が取れず、フラクション 2 以降に集中してしまっただけであった。そのため、今後同様の実験をおこなう場合は、フラクション 2 以降も細かく分画条件を設定し、それぞれのフラクションの平均 bud scar 数を都度計測した上で、その後の実験に用いるフラクションを決定する必要があるだろう。

RNA-seq のリード量

我々のおこなった RNA-seq は、マッピングに使ったリード数がフラクション 1.6 と 2 でそれぞれ約 360 万リードと 440 万リードだった。一方、Nookaew ら(Nookaew et al. 2012) による RNA-seq のマッピング及び発現解析手法の比較実験では、約 1200 万リードをマッピングに用いていた。このことから、追加でシーケンスをおこない、我々のおこなった RNA-seq の結果と合わせることで十分なリード量が得られ、新たに発現量の差が有意と判定される遺伝子が現れる可能性がある。

ASH1 mRNA の存在量

ASH1 mRNA は酵母の分裂の際に母細胞から娘細胞へと mRNA を輸送する機構で働いており、娘細胞に局在すると言われている(図 9)(Fundakowski, Hermesh, and Jansen 2012)。しかし、我々の RNA-seq の結果では、ASH1 mRNA は母細胞に多く存在していた。Cyclebase で ASH1 の細胞周期による発現変動をみると、M 期で高く発現し、その前後では発現が低くなっている。娘細胞の集団は母細胞から分裂したあと G1 期や S 期にいるものが大半を占めていると考えられる。その一方、母細胞の集団は M 期のものも多く含まれていたなどの原因により、このような結果になった可能性がある。ただし、母細胞の集団の細胞周期の傾向は、今回の実験では直接確認できていない。このことを確認するためには、 α ファクターなどの薬品で細胞周期を揃えた上で、エルトリエーターによって細胞を分画する実験をおこなうなどの方法が考えられる。

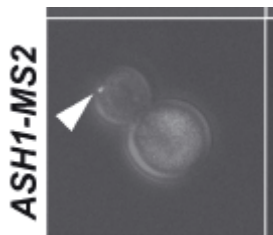


図 9: MS2 タグに結合した ASH1 mRNA を蛍光染色したもの。白い矢印の先端、娘細胞側に ASH1-MS2 mRNA が局在している。Fundakowski ら(Fundakowski, Hermesh, and Jansen 2012)の論文より抜粋。

遺伝子発現から推測される娘細胞の代謝変化

● グルコースの枯渇とアセチル CoA の合成

母細胞で発現が減少した、すなわち娘細胞で発現量が多かった遺伝子のうち、*CTA1*, *POT1*, *IDP2*, *ADY2*, *SFC1*, *RGI2*, *ACS1*, *YAT1* 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(Tachibana et al. 2005)。

Cta1 と *Pot1* はいずれもペルオキシソームに局在し、脂肪酸の β 酸化に関わっている。*Idp2* は細胞質でイソクエン酸から α ケトグルタル酸を生成するが、その際に生じる NADPH はペルオキシソームにおける β 酸化の副産物である過酸化水素の除去をおこなうチオール酵素に必要であることが知られている(Contreras-Shannon et al. 2005)。

Ady2 は酢酸のトランスポーターであり、また *Acs1* は核や細胞質において酢酸と CoA からアセチル CoA を合成する酵素である。この反応の進行には、コハク酸をミトコンドリアに取り込み、代わりにフマル酸を細胞質に放出する *Sfc1* が必要とされている(Fernández, Fernández, and Rodicio 1994)。

また、*Yat1* はカルニチンアセチル化酵素であり、ミトコンドリアへの活性アセチル基の輸送、すなわちミトコンドリアへのアセチル CoA の供給を司っている。

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意味する。また、*Rgi2* も機能不明ではあるが、グルコース非存在下での呼吸によるエネルギー産生に必要であることが知られている(Domitrovic et al. 2010)。

Tis11 は鉄の取り込みに関わり、上記の遺伝子群と同様に diauxic shift 時にタンパク質リン酸化酵素 *Snf1* の下流で誘導されるが、転写因子 *Aft1* によって制御されることが知られている(Haurie, Boucherie, and Sagliocco 2003)。

なお、細胞質におけるアセチル CoA 合成には、上記の酢酸に由来する経路の他に、ミトコンドリアから排出されたクエン酸と ATP-クエン酸リアーゼの作用による経路も知られている(Hynes and Murray 2010)。興味深いことに、娘細胞で誘導された遺伝子には細胞質にクエン酸を輸送する *CTPI* が含まれていた。しかし、出芽酵母には ATP-クエン酸リアーゼが見出されておらず(Hynes and Murray 2010)、*CTPI* の誘導は別の意義を持つ可能性がある。

● 窒素源の枯渇とそれに対する応答

酵母が資化しやすい窒素源はグルタミン、アルギニン、アンモニアである。娘細胞で誘導された遺伝子群に含まれていた *Mep2* はアンモニアのトランスポーターであり、*Car2* はアルギニンの分解と利用に関わっている。また、*Put1* は良質な窒素源がない時に誘導され、質の悪い窒素源であるプロリンの分解と利用に関わる酵素である。これらが誘導されていることは、娘細胞が窒素源の不足状態にあることを示唆している。

また、娘細胞では *LYS1*、*LYS9* および *RTC2* の発現も上昇しているが、これらはいずれもアミノ酸飢餓全般に応答する転写因子 Gcn4 の標的である。Lys1 と Lys9 はリジン合成系の酵素である。一方、Rtc2 は液胞から陽イオン性アミノ酸を細胞質に輸送するトランスポーターであり、リジン合成系を特異的に制御する転写因子 Lys14 の支配下にあることから、主にリジンを輸送すると考えられている。これらの応答は、細胞質におけるリジンに対する要求が高まっていることを示している。

これと関連して興味深いのは、*CTP1* と *IDP2* の誘導である。Ctp1 はクエン酸をミトコンドリアから細胞質に輸送するトランスポーターであり、Idp2 は先述したように細胞質でイソクエン酸を酸化して α ケトグルタル酸を生成する酵素である。 α ケトグルタル酸はアンモニアと反応し、グルタミン酸を経て様々な分子の生合成に利用しやすい窒素源であるグルタミンへと変換されるので、この応答は窒素源飢餓への応答にも関与している可能性がある。

以上の遺伝子発現変動の結果は、娘細胞がグルコースと窒素源の飢餓状態にあることを示唆しており、メタボローム解析による確認が望まれる。豊栄養培地中の実験であるにも関わらず、娘細胞が特異的に飢餓様状態に陥る理由は何であろうか。ひとつの可能性としては、細胞サイズを増大させるためにグルコースやアミノ酸に対する需要が高いにもかかわらず、それらの供給、つまり培地からの取り込みが不十分であることが考えられる。非対称分裂を行う酵母では、細胞膜タンパク質が非対称に継承される結果、出芽直後の娘細胞において量が極端に少なくなるトランスポーターの例が知られている(Eldakak et al. 2010)。グルコースやアミノ酸のトランスポーターについてもこのような不均等が生じると、娘細胞特異的な飢餓様状態が一過性に引き起こされる可能性がある。これらのトランスポーターの分布を GFP 標識等を利用して精査することで、この仮説は検証可能であろう。

また、RNA-seq の結果から示唆されるアセチル CoA や α ケトグルタル酸の量の変動は、エピジェネティック修飾にも影響を与える可能性がある。アセチル CoA はヒストンアセチル化酵素 (Gcn5, Sas2, Sas3, Esa1, Rtt109) の基質であり、特に今回娘細胞で誘導されていた *ACSI* はヒストンアセチル化に関わることが知られている。また、 α ケトグルタル酸は JmjC ドメインを持つヒストン脱メチル化酵素 (Jhd1, Jhd2, Rph1, Ecm5, Gis1) の基質であり、ヒストンのメチル化レベルへの影響も考えられる。このことから、娘細胞と母細胞におけるヒストン修飾の違いを ChIP-seq などで調べることで、興味深い事実が明らかになる可能性がある。

ヒストン修飾との関係

我々の研究では、ヒストン H3 の量は娘細胞のほうが母細胞よりも少ないという結果が得られた。フラクション 1.6 のウェスタンブロット結果のバンドの濃さが一定でなく、これだけで結論付けることはできないが、老化した細胞でヒストンが少なくなる (Feser et al. 2010) ように、娘細胞でもヒストンの量が少なくなっている可能性が考えられる。また、ヒストン H4K16 のアセチル化は娘細胞で低く、母細胞で高くなっており、これも老化した細胞でヒストン H4K16 のアセチル化が亢進する (Dang et al. 2009) ことと類似している。今後、これらの現

象がゲノム中のどの位置で起こっているかを ChIP-seq など調べること、今回おこなったトランスクリプトーム解析との関連を明らかにする必要があるだろう。またその際はプロモーター領域の活性化状態をよく反映する H3K4 トリメチル化なども同時に観測することで、遺伝子の転写量の変化があるかどうかを明らかにするべきであろう。現在、 10^7 個オーダーの細胞からの ChIP を試みており、ヒストン H3 とヒストン H3K4 トリメチル化に関してはその後のシーケンスなどが可能なだけの DNA が IP されてきている一方、ヒストン H4K16 アセチル化に関しては IP された DNA 量が極めて少なく、シーケンスがおこなえない可能性が大きい。そのため、ヒストン H3 とヒストン H3K4 トリメチル化に関する ChIP-seq を先行して実施し、トランスクリプトーム解析結果との比較をおこないたい。

結論と今後の展望

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、娘細胞において母細胞とは異なる独特の代謝が起こっている可能性が強く示唆された。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 の量が増加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。

MATERIALS AND METHODS

酵母株と培地

MEP を除くすべての実験で BY4741 株を使用した。MEP の実験では UCC5179 株を使用した。これらの株の遺伝子型を

株	遺伝子型
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
UCC5179	<i>MATa ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3Δ0 trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP- LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX</i>

表 8 に記載した。培地は YPD 液体培地 (1% 酵母エキス、2% グルコース、2% ペプトン) を使用した。

株	遺伝子型
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
UCC5179	<i>MATa ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3Δ0 trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP- LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX</i>

表 8: 今回の実験に用いた酵母株の遺伝子型。

Mother Enrichment Program (MEP)

MEP の実験は Lindstrom ら (Lindstrom and Gottschling 2009) の記述に沿っておこなった。以下に概要を示す。

UCC5179 株を YPD 液体培地中で一晩培養した後、細胞の濃度が 2×10^4 個/ml になるように 1L の YPD で希釈した。30°C で 2 時間培養した後、エストラジオールを 1μM 加え、30°C で培養を続けた。24 時間ごとに 50ml 程度の培養液を取り、細胞壁を染色して OD 600 と bud scar 数を計測した。

エルトリエーターによる細胞分画

酵母細胞を 100ml の YPD 内で一晩培養した後、100 分の 1 の濃度に希釈して OD600 が約 0.8 の mid-log phase になるまで 4~5 時間培養した。培養はすべて 30°C でおこなった。この培養液から 10^9 個分の細胞を取り、3200 rpm で遠心して上清を捨て、PBS 2 ml に懸濁した。

エルトリエーターは Beckman Coulter 社の JE-6B を用いた。3600rpm、4°C で遠心を開始し、ポンプを起動してチャンバーとチューブを PBS で満たした。ポンプの流速を 10ml/分 に設定し、細胞懸濁液を注入した。細胞が全てチャンバーに入った時点で回転数を 3200 rpm に

下げ、フラクションの採取を開始した。回転数と流速は(Laun et al. 2001)を参考にし、フラクション数を増やした。各フラクションの流速と回転数を表9に示す。

フラクション	流速 (ml/分)	rpm
1	10	3200
1.3	10	3000
1.6	10	2800
2	15	2700
3	15	2400

表9：各フラクション採取時の流速と回転数。

各フラクションにつき約500mlの溶液を回収した。それぞれ3200rpmで8分間遠心して上清を捨て、沈殿した細胞をPBS 1mlに懸濁した。細胞数を数え、 2×10^7 個ずつ分注し、遠心して上清を除いてから -80°C で凍結保存した。

細胞染色と bud scar 数カウント

10^7 個の細胞を遠心し、上清を除いた。Fluorescent Brightener 28(SIGMA)を1mg/mlの濃度でPBSに溶かし、遠心したものの上清30ulで細胞を懸濁し、遮光して5分間室温でインキュベートした。PBS 500ulを加え、ボルテックスしてよく混合したのちに遠心し、上清をすべて捨てた。これをPBS 20ulで懸濁したものをプレパラートに置いて蛍光顕微鏡で観察し、50個の細胞の bud scar 数を数え、その平均を計算した。

ウェスタンブロット

2×10^7 個の細胞をPBS 50ulに懸濁し、さらに2x SDS sample buffer(0.11M Tris-HCl (pH 6.8), 4.5% SDS, 22.7% グリセロール, 0.1mg/ml ブロモフェノールブルー)を加えた。これを 95°C で10分間加熱し、1.5ml相当のジルコニアビーズとともに2mlチューブに入れ、MULTI-BEADS SHOCKER (安井器械)で2500rpm、120秒(55秒 on, 5秒 offを2回)破碎をおこなった。その後2mlチューブの底に注射器の針で穴を開け、新しい2mlチューブに上からはめ込み、3200rpmで1分間遠心して細胞破碎液とビーズを分離した。

このようにして得た細胞破碎液のうち、10ulを16% ポリアクリルアミドゲルのウェルにロードし、230V、35mAで50分 SDS-PAGE をおこなった。次に濾紙4枚を blotting buffer(0.30% Tris, 1.44% グリシン, 0.01% SDS)に、Immobilon P PVDF メンブレン (Millipore)1枚をメタノールに浸した。セミドライ式ブロッティング装置に、下から順に濾紙2枚、泳動を終えたゲル、メンブレン、濾紙2枚の順に重ね、10V、400mAで80分ウェスタンブロットをおこなった。メンブレンを取り出して Ponceau S に浸し、数十秒振盪した後蒸留

水で数回洗浄することで、タンパク質が正常に泳動、転写されたことを確認した。次にメンブレンをブロッキングバッファ(3% スキムミルク, PBS)に浸し、30 分間室温で振盪することでブロッキングをおこなった。

ブロッキングバッファ 2ml に対して 1 次抗体を 2ul 加えたものをパラフィルム上に置き、その上にメンブレンをタンパク質が転写された面を下にして重ねた。さらにその上にセロファンを置いて蒸発を防ぎながら 10 分間室温で反応させた。メンブレンを取り出し、T-PBS 100ml に浸して 10 分間振盪させて洗浄した。これを 2 回繰り返した。次に T-PBS 2ml に 2 次抗体を 2ul 加えたものをパラフィルム上に置き、その上にメンブレンをタンパク質が転写された面を下にして重ねた。さらにその上にセロファンを置いて蒸発を防ぎながら 10 分間室温で反応させた。メンブレンを取り出し、T-PBS 100ml に浸して 10 分間振盪させて洗浄した。

その後メンブレンに ImmunoStar Zeta (Wako) 600ul をかけ、5 分間反応させた後に CCD イメージャーで検出、撮影した。

RNA 抽出

-80°Cで凍結保存された酵母細胞を PBS 400ul に懸濁して融解した。これに水飽和フェノール 500ul、及び 5x RNA lysis buffer (50mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM EDTA, 2.5% SDS) 100ul を加えてよく混合した。これを 1.5ml 相当のジルコニアビーズとともに 2ml チューブに入れ、アダプター付きボルテックスで 10 分間ボルテックスして細胞を破碎した。

2ml チューブを 15000rpm で 1 分間遠心し、水相を新しい 1.5ml チューブに回収した。2ml チューブにクロロホルム 500ul を加え、15000rpm で 1 分間遠心することで、ビーズの下にあった水相を浮き上がらせた。この水相も同様に回収した。

水飽和フェノールを等量加え、よくボルテックスしてから 15000rpm で 1 分間遠心し、水相を新しい 1.5ml チューブに回収した。これを白い中間層が見えなくなるまで 2~3 回繰り返した。

水飽和フェノール/クロロホルムを等量加え、よくボルテックスしてから 15000rpm で 1 分間遠心し、水相を新しい 1.5ml チューブに回収した。これを白い中間層が見えなくなるまで 2~3 回繰り返した。

イソプロパノールを等量加え、よく混合してから 15000rpm で 10 分間遠心し、上清をすべて捨てた。95%エタノールを 500ul 加えて洗浄し、15000rpm で 10 分間遠心し、上清をすべて捨てた。沈殿を風乾させた後、DEPC 水 100ul に溶解した。OD260 を測定して濃度を決定し、-80°Cで凍結保存した。

RNA-seq

RNA-seq の鋳型調製は、前述の方法で抽出した Total RNA 1ug を用いて、strand-specific なシーケンスが可能な TruSeq Standard Total RNA Sample Prep Kit (Illumina) の少数サンプル用プロトコルに従っておこなった。以下に概要を示す。キットに同梱されていた Ribo-Zero rRNA Removal kit を用いて rRNA を除去し、68°Cで 5 分間加熱して RNA を断片

化した。続いて第一鎖 cDNA 合成、第二鎖 cDNA 合成をおこない、3'端をアデニル化した。次にアダプターライゲーションをおこなった。このとき、サンプルごとに異なるインデックスを持つアダプターを用いた(表 10)。アダプターが結合した DNA 断片を PCR 増幅し、一部を電気泳動してサイズ分布を確認したのち、シーケンスをおこなった。MiSeq (Illumina)を使い、ペアエンドで左から 34 ヌクレオチド、右から 33 ヌクレオチドシーケンスした。

サンプル	アダプターのインデックス
frac1.6	AGTTCCG
frac2	ATGTCAG

表 10 : RNA-seq 鋳型調製時に用いたアダプターのインデックス。

MiSeq によって得られたペアエンドのシーケンスデータを TopHat でマッピングした。その後 Cufflinks で発現量解析をおこなった。TopHat の実行時にはアダプター間の長さを指定する r を 300、最大のイントロン長を指定する $\text{--max-segment-intron}$ を 10000 に設定した。Cufflinks の実行時には、トランスクリプトームのリファレンスファイルとして Illumina iGenomes (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/igenomes.html>)で配布されている Ensembl EF4 に同梱されている genes.gtf を使用した。

4. ACKNOWLEDGEMENTS

本研究を進めるにあたり、ご指導を賜りました東京大学 伊藤隆司教授に厚く御礼申し上げます。また、研究の方針や実際の実験におけるご指導、ご助言を賜りました東京大学 太田一寿助教、三浦 史仁助教に心より感謝の意を表します。さらに、諸事に渡りご指導、ご協力をいただきました本研究室 梅山 大地氏、横山 貴央氏、並びに当研究室の同期、後輩諸氏、スタッフの皆様にも心より感謝いたします。ありがとうございました。

5. REFERENCES

- Contreras-Shannon, Veronica, An-Ping Lin, Mark T McCammon, and Lee McAlister-Henn. 2005. "Kinetic properties and metabolic contributions of yeast mitochondrial and cytosolic NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases." *The Journal of biological chemistry* 280 (6) (February 11): 4469–75. doi:10.1074/jbc.M410140200.
- Dang, Weiwei, Kristan K Steffen, Rocco Perry, Jean a Dorsey, F Brad Johnson, Ali Shilatifard, Matt Kaeberlein, Brian K Kennedy, and Shelley L Berger. 2009. "Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan." *Nature* 459 (7248) (June 11): 802–7. doi:10.1038/nature08085.
- Diamond, Rochelle a. 1991. "Separation and enrichment of cell populations by centrifugal elutriation." *Methods* 2 (3) (June): 173–182. doi:10.1016/S1046-2023(05)80059-3.
- Domitrovic, Tatiana, Guennadi Kozlov, João Claudio Gonçalves Freire, Claudio Akio Masuda, Marcius da Silva Almeida, Mónica Montero-Lomeli, Georgia Correa Atella, Edna Matta-Camacho, Kalle Gehring, and Eleonora Kurtenbach. 2010. "Structural and functional study of YER067W, a new protein involved in yeast metabolism control and drug resistance." *PloS one* 5 (6) (January): e11163. doi:10.1371/journal.pone.0011163.
- D'Mello, N P, and S M Jazwinski. 1991. "Telomere length constancy during aging of *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of bacteriology* 173 (21) (November): 6709–13.
- Eldakak, Amr, Giulia Rancati, Boris Rubinstein, Parama Paul, Veronica Conaway, and Rong Li. 2010. "Asymmetrically inherited multidrug resistance transporters are recessive determinants in cellular replicative ageing." *Nature cell biology* 12 (8) (August): 799–805. doi:10.1038/ncb2085.
- Fernández, M, E Fernández, and R Rodicio. 1994. "ACR1, a gene encoding a protein related to mitochondrial carriers, is essential for acetyl-CoA synthetase activity in *Saccharomyces cerevisiae*." *Molecular & general genetics: MGG* 242 (6) (March): 727–35.
- Feser, Jason, David Truong, Chandrima Das, Joshua J Carson, Jeffrey Kieft, Troy Harkness, and Jessica K Tyler. 2010. "Elevated histone expression promotes life span extension." *Molecular cell* 39 (5) (September 10): 724–35. doi:10.1016/j.molcel.2010.08.015.
- Fundakowski, Julia, Orit Hermesh, and Ralf-Peter Jansen. 2012. "Localization of a Subset of Yeast mRNAs Depends on Inheritance of Endoplasmic Reticulum." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 13 (12) (September 20): 1642–1652. doi:10.1111/tra.12011.
- Harbison, Christopher T, D Benjamin Gordon, Tong Ihn Lee, Nicola J Rinaldi, Kenzie D Macisaac, Timothy W Danford, Nancy M Hannett, et al. 2004. "Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome." *Nature* 431 (7004) (September): 99–104. doi:10.1038/nature02800.

- Haurie, Valérie, Helian Boucherie, and Francis Sagliocco. 2003. "The Snf1 protein kinase controls the induction of genes of the iron uptake pathway at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*." *The Journal of biological chemistry* 278 (46) (November 14): 45391–6. doi:10.1074/jbc.M307447200.
- Hynes, Michael J, and Sandra L Murray. 2010. "ATP-citrate lyase is required for production of cytosolic acetyl coenzyme A and development in *Aspergillus nidulans*." *Eukaryotic cell* 9 (7) (July): 1039–48. doi:10.1128/EC.00080-10.
- Laun, P, A Pichova, F Madeo, J Fuchs, A Ellinger, S Kohlwein, I Dawes, K U Fröhlich, and M Breitenbach. 2001. "Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis." *Molecular microbiology* 39 (5) (March): 1166–73.
- Lindstrom, Derek L, and Daniel E Gottschling. 2009. "The mother enrichment program: a genetic system for facile replicative life span analysis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 183 (2) (October): 413–22, 1SI–13SI. doi:10.1534/genetics.109.106229.
- Longo, Valter D, Gerald S Shadel, Matt Kaeberlein, and Brian Kennedy. 2012. "Replicative and Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*." *Cell metabolism* 16 (1) (July 3): 18–31. doi:10.1016/j.cmet.2012.06.002.
- Nookaew, Intawat, Marta Papini, Natapol Pornputtpong, Gionata Scalcinati, Linn Fagerberg, Matthias Uhlén, and Jens Nielsen. 2012. "A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucleic acids research* 40 (20) (September 10): 10084–10097. doi:10.1093/nar/gks804.
- Steinkraus, K a, M Kaeberlein, and B K Kennedy. 2008. "Replicative aging in yeast: the means to the end." *Annual review of cell and developmental biology* 24 (January): 29–54. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123509.
- Tachibana, Christine, Jane Y Yoo, Jean-basco Tagne, Nataly Kacherovsky, Tong I Lee, and Elton T Young. 2005. "Combined global localization analysis and transcriptome data identify genes that are directly coregulated by Adr1 and Cat8." *Molecular and cellular biology* 25 (6) (March): 2138–46. doi:10.1128/MCB.25.6.2138-2146.2005.
- Trapnell, Cole, Adam Roberts, Loyal Goff, Geo Pertea, Daehwan Kim, David R Kelley, Harold Pimentel, Steven L Salzberg, John L Rinn, and Lior Pachter. 2012. "Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks." *Nature protocols* 7 (3) (March): 562–78. doi:10.1038/nprot.2012.016.
- Unal, Elçin, Benyam Kinde, and Angelika Amon. 2011. "Gametogenesis eliminates age-induced cellular damage and resets life span in yeast." *Science* 332 (6037) (June 24): 1554–7. doi:10.1126/science.1204349.