

博士論文

出芽酵母の分泌型酸性ホスファターゼによる
分裂寿命維持機構に関する研究

2022年3月

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科
バイオサイエンス専攻
バイオ科学技術領域

中島 俊雄

目次

序論	4
第1章 分泌型酸性ホスファターゼは分裂寿命の維持に必要である	
第1節 緒言	9
第2節 材料と方法	13
第3節 結果	
第1項 出芽酵母の APase 遺伝子四重破壊株は短寿命である	23
第2項 APase 破壊株の短寿命は環境中のリン酸濃度に依存しない	27
第3項 4つの APase は分裂寿命制御に関して重複した役割をもつ	30
第4節 考察	34
第2章 イノシトール六リン酸合成酵素遺伝子 <i>IPK1</i> の破壊により APase 破壊株の短寿命は回復する	
第1節 緒言	35
第2節 材料と方法	35
第3節 結果	
第1項 APase 破壊株における短寿命に関連する表現型の解析	41
第2項 ホスファチジルイノシトールリン酸を介した寿命制御の検討	50
第3項 イノシトールポリリン酸代謝を介した寿命制御の検討	52
第4節 考察	61
第3章 チアミンの過剰供給により APase 破壊株の短寿命は回復する	
第1節 緒言	63

第2節 材料と方法	65
第3節 結果	
第1項 チアミンを過剰添加すると APase 破壊株の寿命は回復する	68
第2項 <i>THI80</i> 遺伝子を過剰発現すると APase 破壊株の寿命は回復する	75
第3項 <i>PDA1</i> あるいは <i>PDB1</i> 遺伝子を過剰発現すると APase 破壊株の寿命は回復する	77
第4節 考察	81
結論	82
総合考察	83
謝辞	84
論文目録	85
引用文献	86

序論

過去数百年の間に、世界的に人類の平均寿命は2倍程に延長している。これは医学医術の進歩、公衆衛生活動の拡大、食生活の改善や社会保障の充実など様々な社会的な発展に起因した恩恵であるが、一方で社会的な高齢化によって労働力となる人口比率の減少や医療費の増大など多くの問題も抱えている。現在では、単に平均寿命を延ばすことではなく、元気よく自立して過ごせる期間を示す健康寿命を延長することが重要であると考えられており、老化や寿命に関する研究の重要性は高い。寿命の決定に関与する遺伝子や化合物などの因子を同定し、その寿命制御機構を明らかにすることで、新たな抗老化薬の発見やより良い生活習慣の提案などを介して、健康寿命の延長、老年疾病の予防など社会への貢献が期待できる。

ヒトを含むほとんどの生物の寿命は、様々な環境要因や遺伝要因の影響を受け、複合的に決定される (Guarente, 2000)。寿命を制御する代表的な環境要因としては摂取カロリーが挙げられる。線虫において摂取カロリーを制限すると寿命が延長し、逆に増大させると短縮する (Schlotterer, 2009)。カロリー制限は、出芽酵母、線虫、ショウジョウバエ、マウスなど様々な生物の寿命を延長し (Guarente and Kenyon, 2000)、ヒトの健康寿命に対しても有益な効果を示すことが知られている (Redman, 2018)。寿命を制御する最も有名な遺伝要因としては出芽酵母からヒトに至るまで保存されたサーチュイン遺伝子が挙げられる。これは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた研究で NAD⁺依存性脱アセチル化酵素遺伝子 (*SIR2* 遺伝子) として初めてつけられた (Imai, 2000)。出芽酵母の *SIR2* 遺伝子を破壊すると寿命は短くなり、過剰発現すると寿命は長くなる (Kaeberlein et al, 1999)。サーチュインはカロリー制限による寿命延長に必要であり (Guarente, 2005)、環境要因と遺伝要因は必ずしも独立ではない。出芽酵母などのモデル生物を用いた研究によって多くの寿命関連因子が明らかにされており、これまでに報告された寿命に関与する経路や機構としては、インスリン経路、酸化ストレス、DNA 修復、ミトコンドリア機能およびオートファジーなどが挙げられる (Carter, 2007; Kenyon, 2010)。

これまでの研究で、老化した細胞の蓄積が個体の老年疾病や寿命に悪影響を及ぼすことがわかっており (McHugh, 2018)、個体レベルでの寿命と同様に細胞レベルでの寿命に関する制御機構の解明もまた重要である。出芽酵母は、細胞レベルでの研究に

有用な真核モデル生物であり、世代時間の短さや遺伝子操作の簡便性などの利点から、様々な寿命関連遺伝子の発見に貢献してきた。出芽酵母の寿命には2つの定義があり、経時寿命および分裂寿命と呼ばれている。経時寿命は、細胞が増殖しない状態で生存することができる時間（生存期間）と定義され、神経細胞のような非分裂細胞における寿命モデルと考えられている（Maclean, 2001）。分裂寿命は、1つの母細胞が死ぬまでに生む娘細胞の数（分裂回数）と定義され、分裂の活発な細胞の寿命モデルとなる（Guarente, 2000）。この細胞の分裂回数の限界は、ヒト細胞ではヘイフリック限界と呼ばれる。出芽酵母では、多くの遺伝子が真核生物でよく保存されている（Kaeberlein, 2001）。加えて、出芽酵母はヒトなどの培養細胞とは異なり非対称に分裂するため、母細胞と娘細胞の違いが明瞭であり、寿命の測定が簡便かつ正確に行える利点がある。そのため、出芽酵母はヒトなどの真核生物のモデルとして、特に分裂寿命研究において有用なモデル生物である。

生物において、栄養状態、pH および浸透圧などの環境の変化への対応は生存に不可欠である。リン酸の一価または二価のアニオンである無機リン酸は、DNA および脂質膜合成、高エネルギーリン酸エステルの生成およびタンパク質のリン酸化や脱リン酸化による細胞内シグナル伝達のような細胞機能に必須である。血中のリン酸濃度の上昇などは、マウスやショウジョウバエの寿命を短縮し（Bergwitz, 2012; Kuro-o, 2010）、ヒトにおいてもリン酸の恒常性の破綻（リン酸の過多や過少）は、疾病や寿命短縮の原因となる可能性がある（Bergwitz, 2013）。しかし、リン酸がどのように寿命に関与するのか未だ明らかとなっていない。

出芽酵母も非常に高い環境への適応性をもち、十分なリンを維持するため、酵母はPHO システムと呼ばれるリン酸飢餓に応答する遺伝的な調節回路を有している（Lenburg, 1996; Oshima, 1997; Persson, 2003）。低リン酸条件下では、転写因子Pho4pによってリン酸飢餓応答遺伝子（*PHO* 遺伝子）が発現し、リン酸飢餓に対応する（図0-1）。Pho4pはDNA結合ドメインとタンパク質相互作用に働くHLHモチーフを有する転写因子であり（Berben, 1990）、ホメオドメインタンパク質であるPho2pと共にリン酸飢餓応答遺伝子の転写を活性化する（Vogel, 1989）。高リン酸条件下では、Pho80p（サイクリン）とPho85p（サイクリン依存性キナーゼ）の複合体がPho4pをリン酸化し、Pho4pはリン酸化されることでPho2pとの結合が弱まり、DNAへの結合活性が低下する。また、リン酸化されたPho4pは核外輸送因子Msn5p

との親和性が高まり核から細胞質へ移行するのでリン酸飢餓応答遺伝子の転写は抑えられる (Komeili, 1999)。低リン酸条件では、Pho80p-Pho85p 複合体は Pho81p によって不活性化されている。よって、Pho4p はリン酸化されず核内輸送因子である Pse1p によって核内に移行し、リン酸飢餓応答遺伝子の発現が誘導される (Vogel, 1989; Kaffman, 1994)。

PHO 遺伝子には、分泌型酸性ホスファターゼ (APase) 遺伝子 (*PHO5*、*PHO11*、*PHO12*) や高親和性リン酸トランスポーター遺伝子 (*PHO84*、*PHO89*) などが含まれ (Pettersson, 1999; Wykoff, 2001; Serra-Cardona, 2014)、それらの発現によってリン酸飢餓に対応している (Lenburg, 1996; Oshima, 1997)。リン酸トランスポーターのうち、高親和性の Pho84p および Pho89p が主に低リン酸条件下での無機リン酸の取り込みを担う (Bun-ya, 1991; Serra-Cardona, 2014)。低親和性リン酸トランスポーターである Pho87p、Pho90p、および Pho91p は、細胞外無機リン酸濃度に関わらず、構成的に発現している (Tamai, 1985)。Pho84p は低親和性リン酸トランスポーターよりも細胞外無機リン酸に対して約 10~100 倍低い K_m 値を有する (Martinez, 1998; Serrano, 2002)。培地中の無機リン酸濃度が低下すると、*PHO84* と *PHO89* 遺伝子が発現される (Pettersson, 1999; Lagerstedt, 2002)。細胞外のリン酸濃度が上昇すると高親和性リン酸トランスポーター Pho84p の分解が起こることが知られている (Pratt et al, 2004)。Pho84p は細胞膜から取り除かれ、その後、液胞で分解されると言われているが詳しい機構は分かっていない (Lagerstedt, 2002; Persson, 2003)。リン酸トランスポーターによって取り込まれた無機リン酸の一部は、VTC (Vacuolar Transporter Chaperone) 複合体によってポリリン酸となり、液胞に貯蔵される。それにより、液胞のポリリン酸がリン酸飢餓条件下でのリン酸の蓄えとして働く (Kulaev, 1979; Kulaev, 1983; Kulaev, 2000)。実際に、低リン酸条件下に細胞を移すと、液胞のポリリン酸含量の急速な減少がみられる (Kulaev, 1999)。この貯蔵されたポリリン酸は、ポリリン酸ホスファターゼ (Ppn1p、Ppn2p と Ppx1p) によって分解され、無機リン酸に変換される (Oshima, 1997; Lichko, 2000; Lichko, 2008; Gerasimaité, 2017)。

本研究室の先行研究によって、出芽酵母を用いてリン酸による寿命制御が検討された (丸橋翼修士論文, 2017; Nakajima, 2020)。高リン酸条件 (無機リン酸濃度: 11 mM) と低リン酸条件 (無機リン酸濃度: 0.22 mM) の合成培地における野生型株の分

分裂寿命に差はみられず、環境中のリン酸濃度は酵母の分裂寿命に影響しなかった。しかし、リン酸飢餓応答を負に制御する *PHO80* と *PHO85* 遺伝子をそれぞれ破壊すると短寿命となった。これらの遺伝子破壊株では、高リン酸条件においてもリン酸飢餓遺伝子の転写因子 Pho4p がリン酸化されず、リン酸飢餓応答遺伝子が過剰に発現している。そのため、リン酸飢餓応答遺伝子の過剰な発現が短寿命を引き起こすと考えられ、短寿命の *pho80* 破壊株において、破壊することで寿命を回復させるリン酸飢餓応答遺伝子が探索された。*pho80* 破壊株においてすべての APase 遺伝子 (*PHO3*、*PHO5*、*PHO11*、*PHO12*) を破壊しても分裂寿命は回復せず、APase の過剰発現が *pho80* 破壊株の短寿命原因ではなかった。しかし、興味深いことに、野生型株において 4 つの APase 遺伝子をすべて破壊した APase 四重破壊株は、野生型株に対して約 70% の短寿命となることを見出した。本博士論文研究では、APase がどのように酵母の分裂寿命を制御するのかを解明することを目指した。

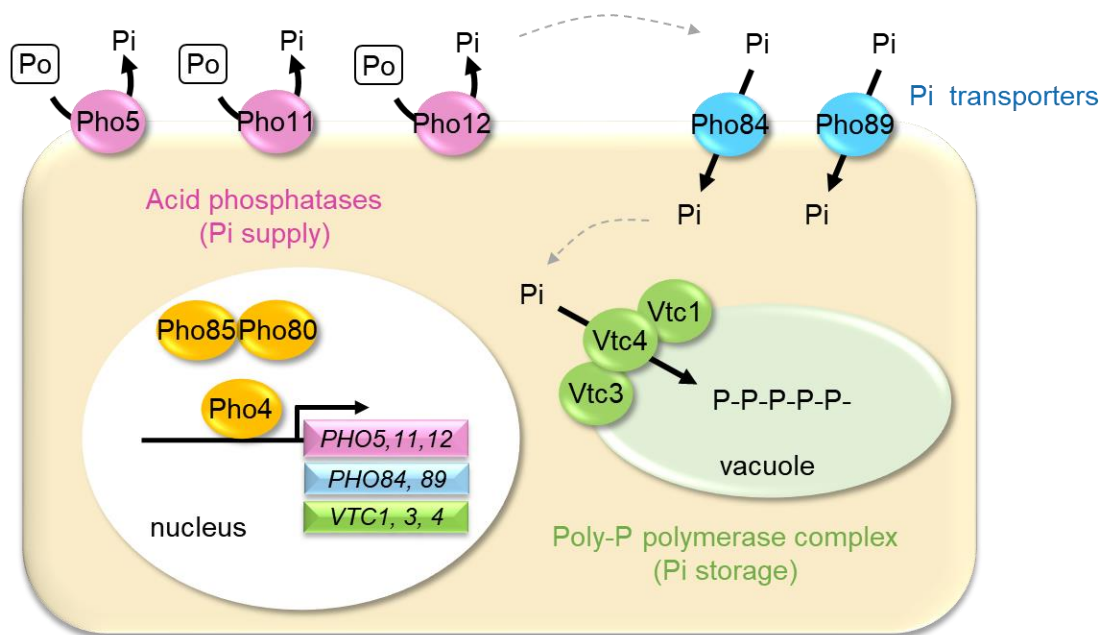


図 0-1. 出芽酵母のリン酸飢餓応答

酸性ホスファターゼが細胞外の有機リン酸を脱リン酸化し、無機リン酸を生成する。リン酸トランスポーターが無機リン酸を細胞内に取り込む。ポリリン酸ポリメラーゼ複合体、細胞質の無機リン酸からポリリン酸を生成し液胞に貯蔵する。

第1章 分泌型酸性ホスファターゼは分裂寿命の維持に必要である

第1節 緒言

本研究室の先行研究によって、出芽酵母を用いてリン酸による寿命制御が検討された（丸橋翼修士論文, 2017; Nakajima, 2020）。高リン酸条件（無機リン酸濃度: 11 mM）と低リン酸条件（無機リン酸濃度: 0.22 mM）の合成培地における野生型株の分裂寿命に差はなく、環境中のリン酸は酵母の寿命に影響しなかった。しかし、リン酸飢餓応答を負に制御する *PHO80* および *PHO85* 遺伝子をそれぞれ破壊すると短寿命となることを見出された。これらの遺伝子破壊株では高リン酸条件においてもリン酸飢餓遺伝子の転写因子 Pho4p がリン酸化されないため、核内に留まる。それによって、高リン酸条件にも関わらず、リン酸飢餓応答遺伝子が過剰に発現している。そのため、リン酸飢餓応答遺伝子の過剰な発現が短寿命を引き起こすと考え、*pho80* 破壊株および *pho85* 破壊株の短寿命の原因遺伝子が探索された。*pho80* 破壊株において、出芽酵母がもつ4つすべての酸性ホスファターゼ（APase）遺伝子を破壊しても寿命の回復は見られなかった。従って、APase の過剰発現が *pho80* 破壊株の短寿命原因ではないことが示されたが、興味深いことに、これら4つの APase 遺伝子をすべて破壊した APase 四重破壊株は、野生型株に対して約70%の短寿命となった。

APase は全分子量の約半分が糖鎖によって構成される糖タンパク質であり（Kozulic, 1984）、細胞壁と細胞内膜の間のペリプラズムに局在する他、細胞外にも分泌される（Oshima, 1984; Semenova, 1986）（図 1-1）。APase には、リン酸飢餓によって発現が誘導される *PHO5*、*PHO11*、*PHO12* 遺伝子と、チアミン（ビタミン B₁）飢餓によって発現が誘導される *PHO3* 遺伝子がある（Oshima, 1997; Lemire, 1985; Nosaka, 1989）。出芽酵母がもつ4つすべての APase はアミノ酸配列レベルで約80%の相同性を有している（図 1-2）。また、APase は基質特異性が広く、リン酸抑制性 APase 活性の約90%を占める Pho5p（Svaren, 1997）は、グルコース 6 リン酸、ヌクレオチド、ATP など幅広い低分子化合物を脱リン酸化する（Andreeva, 2019; Kennedy, 2005）。Pho3p はチアミンリン酸に高い親和性を持ち、オルトリン酸（orthoP）およびチアミンを生成する（Nosaka, 1990）。従って、APase の生物学的機能は、細胞外の有機リン酸（Po）化合物を脱リン酸化して、細胞に無機リン酸（Pi）を供給することであると考えられている。

酵母の分泌型 APase は、細胞外の Po 化合物の脱リン酸化を介して Pi を細胞に供給するため、APase の欠損によって細胞外からの供給される Pi 量が減少し、分裂寿命が短くなると予想した。また、APase 四重破壊株が短寿命であることをみつけたものの、どの APase が寿命に関与するのかわかっていない。本章では、細胞外の Po 化合物の有無や Pi 濃度が APase 破壊株の寿命に影響を及ぼすかを調べた。加えて、4 つの APase のうちどの APase が分裂寿命に関与しているのかを調べた。

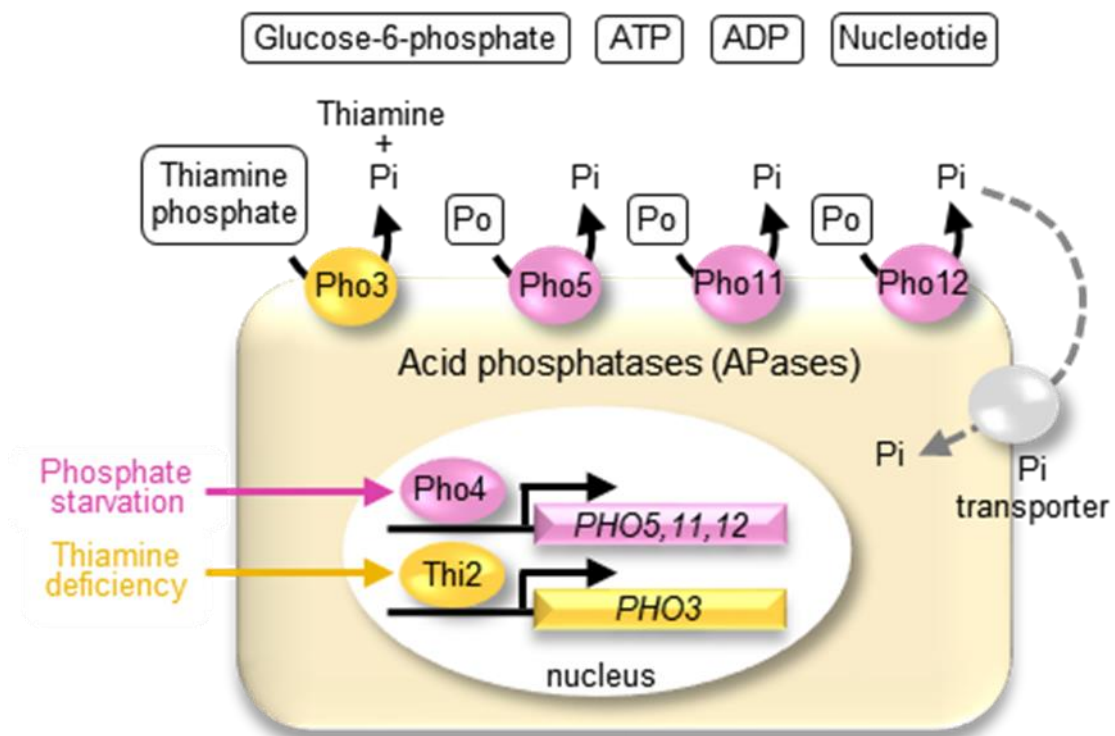


図 1-1. 出芽酵母の酸性ホスファターゼ

リン酸飢餓によって、Pho4p を介して *PHO5*、*PHO11*、*PHO12* は発現が誘導される。チアミン欠乏によって、Thi2p を介して *PHO3* は発現が誘導される。

Pho3p	MFKSVVYSLAALVNAGT I PLGELADVAK I GTQED I FPFLGGAGPYSFPGDYG I SRDLPEGCEMKQLQMLARHGERTYTSKGATIMK	1-90
Pho5p	MFKSVVYSILAASLANAGT I PLGKLADVDK I GTQKD I FPFLGGAGPYSFPGDYG I SRDLPEGCEMKQLQMVGRHGERTYTVSLAKTIKS	1-90
Pho11p	MLKSAVYSILAASLVNAGT I PLGKLSIDK I GTQTE I FPFLGGSGPYSFPGDYG I SRDLPECEMKQVQVGRHGERTYTSKAKS I MT	1-90
Pho12p	MLKSAVYSILAASLVNAGT I PLGKLSIDK I GTQTE I FPFLGGSGPYSFPGDYG I SRDLPECEMKQVQVGRHGERTYTVSKAKS I MT	1-90
	:	
Pho3p	TWYKLSNYTRQFNGSLNDDYEFF I RDDDDLEMETTFANSDVNLNPTYGEMDAKRHAREFLAQYGYMFENQTSFPIFAASSERVHDTA	91-180
Pho5p	TWYKLSNYTRQFNGSLNDDYEFF I RDDDDLEMETTFANSDVNLNPTYGEMNAKRHARDFLAQYGYMVENQTSFAVFTSNKRCHDTA	91-180
Pho11p	TWYKLSNYTGQFSGALSFLNDDYEFF I RDTKNLEMETTLANSVNLNPTYGEMNAKRHARDFLAQYGYMVENQTSFAVFTSNRNCHDTA	91-180
Pho12p	TWYKLSNYTGQFSGALSFLNDDYEFF I RDTKNLEMETTLANSVNLNPTYGEMNAKRHARDFLAQYGYMVENQTSFAVFTSNRNCHDTA	91-180
	***** *:*	
Pho3p	QYF I DGLGDKFN I SLQTVSEASAGANTLSAGNACPGWDEDANDD I LDKYDTTYLDD I AKRLNKENKGLNLTSSDANTFFAWCAYELNAR	181-270
Pho5p	QYF I DGLGDKFN I TLQTVSEASAGANTLSACNSCPAWDYDANDD I VNEYDTTYLDD I AKRLNKENKGLNLTSTADSTLFSWCAFEVNAK	181-270
Pho11p	QYF I DGLGDKFN I SLQTVSEASAGANTLSAHSHPAWDDVND D I LKDYDTTYLDD I AKRLNKENKGLNLTSSDANTFFAWCAYE I NAR	181-270
Pho12p	QYF I DGLGDKFN I SLQTVSEASAGANTLSAHSHPAWDDVND D I LKDYDTTYLDD I AKRLNKENKGLNLTSSDANTFFAWCAYE I NAR	181-270
	***** *:	
Pho3p	GYSVDC I FTDELVRYSYGQDLVSFYQDGPYDM I RSVGANLFNATLKLKQSEI QDQKQVLSFHTD I LNLTTAG I I DDKNNLTAE	271-360
Pho5p	GYSVDC I FTDELVRYSYGQDLVHYHGGPYDI I KSVGNLNFNASVKLLKQSEI QDQKQVLSFHTD I LNLTTAG I I DDKNNLTAE	271-360
Pho11p	GYSDC I N I FTKDELVRFSYGQDLETYQTGPYD VRSVGNLFNASVKLLKQSEI QDQKQVLSFHTD I LNLTTAG I I DDKNNLTAE	271-360
Pho12p	GYSDC I N I FTKDELVRFSYGQDLETYQTGPYD VRSVGNLFNASVKLLKQSEI QDQKQVLSFHTD I LNLTTAG I I DDKNNLTAE	271-360
	***** *:	
Pho3p	YVPFMGNTFHRSWYVPGARVYTEKFQCSNDTYVRYV I NDAVVP I ETCSTGPGFSCE I NDFYDYAEKRVAGTDFLKVGNVSSVSNSTELT	361-450
Pho5p	YVPFMGNTFHRSWYVPGARVYTEKFQCSNDTYVRYV I NDAVVP I ETCSTGPGFSCE I NDFYDYAEKRVAGTDFLKVGNVSSVSNSTELT	361-450
Pho11p	HVPFMGNTFHRSWYVPGARVYTEKFQCSNDTYVRYV I NDAVVP I ETCSTGPGFSCE I NDFYDYAEKRVAGTDFLKVGNVSSVSNSTELT	361-450
Pho12p	HVPFMGNTFHRSWYVPGARVYTEKFQCSNDTYVRYV I NDAVVP I ETCSTGPGFSCE I NDFYDYAEKRVAGTDFLKVGNVSSVSNSTELT	361-450
	:**** *:	
Pho3p	FYWDWNTTHYNDTLLKQ	451-467
Pho5p	FYWDWNTTHYNASLLRQ	451-467
Pho11p	FFWDWNTKHYNDTLLKQ	451-467
Pho12p	FFWDWNTKHYNDTLLKQ	451-467
	:	

図 1-2. 出芽酵母の 4 つの酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の比較

* :すべての酸性ホスファターゼでアミノ酸が保存されていることを示す。

: :アミノ酸の性質が同じであることを示す。

. :アミノ酸の性質が似ていることを示す。

無印 :アミノ酸が保存されておらず、性質も類似していないことを示す。

ホスファターゼに典型的な RHGXRP モチーフと HD モチーフは黄色で示した。

第2節 材料と方法

使用菌株とプライマー

本章において用いた出芽酵母菌株を表1-1に示した。遺伝子の破壊には、PCRにより増幅した薬剤耐性 (*KanMX*) および栄養選択 (*Candida glabrata HIS3* [*CgHIS3*], *CgLEU2*, *CgURA3*) マーカー遺伝子を用いた相同組み換え法 (Wach, 1994) により作製した。また、本章において使用したプライマーを表1-2に示した。

表 1-1 第1章で使用した菌株

Strain	Genotype
BY4742	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-pho3	<i>MATa pho3Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-pho5	<i>MATa pho5Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-pho11	<i>MATa pho11Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-pho12	<i>MATa pho12Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-pho3-5	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-pho3-5-11	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho11Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-pho3-5-12	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho12Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-pho3-11-12	<i>MATa pho3Δ::kanMX pho11Δ::CgHIS3 pho12Δ::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-pho5-11-12	<i>MATa pho5Δ::kanMX pho11Δ::kanMX pho12Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-APΔQ	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho11Δ::CgHIS3 pho12Δ::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-APΔQ-TpPHO5	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho11Δ::CgHIS3 pho12Δ::CgLEU2 ura3Δ0::[URA3, TDH3p-PHO5-3HA] leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>

表 1-2 第 1 章で使用したプライマー

Name of primers	Sequence	Gene
For construction of gene knockout and overexpression strain		
PHO3- PHO5KOf	GGTATTTATTTATATTTGCAATATTATTTATTTAT ACAATCACAGGAAACAGCTATGACC	<i>PHO3</i>
PHO3KOf	AAAAATACTACAGTAAAGAAAGGGCCATTCCAA ATTACCTGTTGTAAAACGACGGCCAGT	<i>PHO3</i>
PHO3- PHO5KOr	AGAACAACAACAATAGAGCAAGCAAATTCGA GATTACCAGTTGTAAAACGACGGCCAGT	<i>PHO5</i>
PHO11KOf	AACAACAGCAAAGAGAGCAAGAACATCATCAG AAATACCACACAGGAAACAGCTATGACC	<i>PHO11</i>
PHO11KOr	TCATAATTAGTTTCTAAAATTACATAATCATATT ATCTATGTTGTAAAACGACGGCCAGT	<i>PHO11</i>
PHO12KOf	AACAACAGCAAAGAGAGCAAGAACATCATCAG AAATACCACACAGGAAACAGCTATGACC	<i>PHO12</i>
PHO12KOr	TATTTAGTTTCTAAAATTACATAAATCATATTAG GTCTATGTTGTAAAACGACGGCCAGT	<i>PHO12</i>
TDH3p- PHO5f	ACATAAACAAACAAAATGTTTAAATCTGTTGTTT ATTCAATTTTA	<i>PHO5</i>
TDH3p- PHO5r	AACAGATTTAAACATTTTGTGTTTATGTGTGT TTATTCG	<i>TDH3</i>
PHO5-3HAf	CTATTGAGACAATAGTACCCATACGATGTTCCCTG A	<i>3HA</i>
PHO5-3HAr	AACATCGTATGGGTAATTTGTCTCAATAGACTG GCG	<i>PHO5</i>
For confirmation of gene knockout and overexpression strain		
PHO3Cr	TTATACGGGAGCTCCGATATCTATTTTCAGC	<i>PHO3</i>
PHO5pf	GGAATCCCCGAAAGTTGTATTCAACAA	<i>PHO5</i>
PHO11Cr	ATAGAGTAATCACATACTGCGCCTTTGTGC	<i>PHO11</i>
PHO12Cr	CTGTGTTTGTGTTCCAACCTTGGTACTTCTC	<i>PHO12</i>
PHO5RTf	TCGTGGTGTGCATTTGAAGTGAACG	<i>PHO5</i>
PHO5RTTr	CTGGACCCTCATGGTAATAAGTGTG	<i>PHO5</i>
APaseRTf	TGGTACGTTCCACAAGGTGCTC	<i>PHO3/5/11/12</i>
APaseRTTr	CTGCTGACGTTACAGACCTTTAGG	<i>PHO3/5/11/12</i>

使用培地

YPD 培地は酵母を培養するための完全培地として用い、50 g の YPD Broth

(Difco) を加えて作製した。寿命測定用に用いる際は、成分の偏りを防ぐため、脱イオン水 1 L あたり Yeast extract (Difco) を 10 g、Peptone (Difco) を 20 g、Dextrose (和光純薬) を 20 g 加えて作成した。

YPD-Pi 培地は、低無機リン酸の完全培地として用い、脱イオン水 500 mL ほどに Yeast extract (Difco) を 10 g、Peptone (Difco) を 20 g、1M 硫酸マグネシウム (和光純薬) 水溶液を 10 mL、28%アンモニア水 (和光純薬) を 10 mL を加え、1 時間放置後、濃塩酸 (和光純薬) で pH5.8 に合わせ、脱イオン水で 1 L にメスアップした。リン酸イオンは硫酸マグネシウムイオンとアンモニアイオンと反応して、リン酸マグネシウムアンモニウムが沈殿として生じる。この反応を利用して YPD 培地から無機リン酸を取り除いた後、塩酸で pH を調整した。

高リン酸合成培地は、有機リン酸化合物を含まない高無機リン酸培地として用い、脱イオン水 1 L あたり Dextrose を 20 g、L-アスパラギン (和光純薬) を 2.0 g、4× high Pi stock soln. を 250 mL 加えて、そこに栄養要求性に応じたアミノ酸や核酸を添加し、オートクレーブした。オートクレーブ後に ×1000 vitamin mix を 1 mL 加えた。合成培地には、YPD 培地と異なり組成が明白であること、リン酸濃度を自由に調整できるなどの利点がある。

4× high Pi stock soln. は脱イオン水 1 L あたりにリン酸二水素カリウム (和光純薬) を 6 g、硫酸マグネシウム七水和物 (和光純薬) を 2 g、塩化カルシウム二水和物 (和光純薬) を 1.32 g、KI 溶液 (10 mg/mL) を 0.1 mL、×1000 trace metal を 4.0 mL 加えた。

×1000 vitamin mix は脱イオン水 1 L あたりにニコチン酸 (ナカライテスク) を 0.2 g、ピリドキシン (ナカライテスク) を 0.2 g、チアミン (ナカライテスク) を 0.2 g、パントテン酸 (ナカライテスク) を 0.2 g、イノシトール (ナカライテスク) を 10 g、ビオチン (ナカライテスク) を 0.02 g 加えてフィルター濾過滅菌した。

×1000 trace metal は脱イオン水 1 L あたりにホウ酸 (ナカライテスク) を 0.6 g、硫酸マグネシウム七水和物 (和光純薬) を 0.3 g、硫酸亜鉛 (ナカライテスク) を 3.0 g、硫酸銅 (II) (ナカライテスク) を 0.4g、塩化鉄 (III) (ナカライテスク) を 2.5 g、モリブデン酸ナトリウム (ナカライテスク) を 0.25 g 加えてオートクレーブした。

KI 溶液 (10 mg/mL) は脱イオン水 10 mL あたりにヨウ化カリウム (和光純薬)

を 100 mg 加えた。

低リン酸合成培地は、有機リン酸化合物を含まない低無機リン酸培地として用い、脱イオン水 1 L あたり Dextrose を 20 g、L-Asparagine を 2.0 g、4×high Pi stock soln. を 5 mL、4×low Pi stock soln. を 250 mL 加えて、そこに栄養要求性に応じたアミノ酸や核酸を添加し、オートクレーブした。オートクレーブ後に×1000 vitamin mix を 1 mL 加えた。

4×low Pi stock soln. は脱イオン水 1L あたりに塩化カリウム（和光純薬）を 6.0 g、硫酸マグネシウム七水和物を 2.0 g、塩化カルシウムを 1.32 g、を分けて溶かした。いずれかの溶液に KI 溶液（10 mg/ml）を 0.1 mL 加え、オートクレーブした。オートクレーブ後にすべての溶液を混ぜ、×1000 trace metal を 4.0 mL 加えた。

G418（ジェネティシン）耐性株選択培地（YPD 培地+G418）は、YPD をオートクレーブ後、65°C 以下になったら G418（50 mg/mL）を終濃度 200 µg/mL になるように加えた。*kanMX* で形質転換した株は G418 耐性をもつ。

最少培地（SD 培地）は、脱イオン水 1 L あたり、Dextrose を 20 g、Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids（Difco）を 6.7 g 加え、栄養要求性に応じたアミノ酸や核酸を添加した。

添加する場合のアミノ酸や核酸の量(脱イオン水 1 L あたり)を下記に示した。

L-Arginine（ナカライテスク）0.02 g、L-Methionine（ナカライテスク）0.02 g、L-Tyrosine（ナカライテスク）0.03 g、L-Isoleucine（ナカライテスク）0.03 g、L-Lysine（ナカライテスク）0.03 g、L-Phenylalanine（和光純薬）0.06 g、L-Valine（ナカライテスク）0.15 g、L-Threonine（和光純薬）0.2 g、L-Tryptophan（ナカライテスク）0.04 g、Uracil（ナカライテスク）0.02 g、L-Leucine（和光純薬）0.04 g、L-Histidine（ナカライテスク）0.02 g、Adenine（和光純薬）0.04 g

胞子形成誘導培地（Spo 培地）は、脱イオン水 1 L あたり、酢酸カリウム（ナカライテスク）を 5.0 g 加えた。

培地はすべて 121°C にて 20 分間のオートクレーブ（BS-325, TOMY）により滅菌した。寒天平板培地の場合は 1 L あたり 20 g の Agar（Difco）を加えた。

ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) 法による DNA 断片の増幅

PCR チューブに PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (1.25 U/ μ L) を 0.5 μ L、5 \times PrimeSTAR GXL Buffer を 5 μ L、forward primer (10 μ M) を 0.75 μ L、reverse primer (10 μ M) を 0.75 μ L、2 mM dNTPs を 2 μ L、鋳型 DNA (10-50 ng/mL) を 1 μ L 加え、滅菌水を反応液量が合計 25 μ L になるよう加えた。この反応液をサーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler Dice, TaKaRa) にセットし、98 $^{\circ}$ C 10 秒と 68 $^{\circ}$ C 1 分/kbp の反応を 30~40 回繰り返した。DNA 断片の両端には、酵母のゲノムと相同な配列を 40bp もつように作成した。この DNA 断片を用いて、相同組み換えにより酵母のゲノム遺伝子の破壊やゲノムへの遺伝子の導入を行った。

アガロース電気泳動

Agarose S (ニッポンジーン) を 1 \times TAE 溶液 (ニッポンジーンの 50 \times TAE を希釈) で加熱溶解させて固めたアガロースゲルを使用した。アガロースは検出するバンドの大きさに応じて 1%(<1kbp)もしくは 2%(>1kbp)になるように加えた。アガロースゲルは十分に固まった後、冷蔵庫で 5 分以上冷却した。DNA 試料に対して 6 \times Loding buffer (ナカライテスク) を混合してアプライした。電気泳動後はエチジウムブロマイド(ナカライテスク)水溶液で 10 分以上染色してトランスイルミネーター(AE-6911CX 型プリントグラフ CX、ATTO)で DNA のバンドを確認した。DNA 断片の分子量の推定には予想される DNA 断片の大きさに応じて Gene Ladder 100 (2、1.5、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 kbp、和光純薬) または 1 kbp DNA ladder (10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 kbp、ナカライテスク) をサイズマーカーとして使用した。

形質転換法による酵母遺伝子破壊および過剰発現株の構築

出芽酵母の形質転換は酢酸リチウム法により実施した。2 mL の YPD 液体培地に酵

母を植菌し、30℃で一晩振盪培養した。その培養液を 5 mL の YPD 液体培地に 2% 植菌し、OD₆₀₀ が 1.0±0.2 になるまで 30℃で振盪培養した。丸底チューブに移し、室温で 2,000 rpm、5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。5 mL の滅菌水に懸濁し、再度室温で 2,000 rpm、5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。100 mM 酢酸リチウム (SIGMA) を 500 μL 加え、1.5 mL エッペンドルチューブに移して 14,000 rpm、10 秒間遠心分離した。上清を取り除き、50 % ポリエチレングリコール (SIGMA) 240 μL、1.0 M 酢酸リチウム 36 μL、2.0 mg/mL キャリア DNA (Deoxyribonucleic Acid Sodium Salt from Salmon Sperm, 和光純薬) 25 μL、DNA 溶液またはプラスミド DNA 23 μL、滅菌水 47 μL を順番に加えてボルテックスでよく混合した。30℃で 30 分保温し、その後 42 °C で 20 分間ヒートショックした。懸濁液を 14,000 rpm、10 秒間遠心分離し、上清を取り除いた。薬剤耐性マーカー (*kanMX* など) をマーカーとして使用する場合、沈殿に YPD を 1 mL 加えて懸濁後、丸底チューブに移して 1 時間、30℃で浸とう培養した。栄養要求性マーカー (*Candida glabrata* の *HIS3* [*CgHIS3*]、*CgLEU2*、*CgURA*) を使用した場合は、培養を挟まず細胞を集菌し、滅菌水 100 μL に懸濁した。懸濁液を適切な選択培地にプレーティングビーズ (Bac'n' Roll Beads, ニッポンジーン) を用いて塗布し、30℃で培養した。

四分子解析による多重変異株の構築

二倍体のコロニーを孢子形成誘導培地に塗り、3~7 日 25℃で静置した。孢子形成を確認後、1.5 mL エッペンドルチューブに分注した 10 μL の Zymolyase (酵母の細胞壁を溶解する) 酵素溶液 (0.3 mg/mL) に細胞を懸濁し、30℃で 5 分間反応させた。反応液を YPD 寒天培地に 5 μL 滴下し、マイクロマニピュレーター (光学顕微鏡: OLYMPUS BX51、マニピュレーター (粗動用) : ナリシゲ MMN-1、三次元ジョイスティック油圧マイクロマニピュレーター (懸架式) : ナリシゲ MMO-202ND、針: シンガー) を用いて孢子嚢を解剖し、四分子を 1 つずつ分けた。孢子細胞を 30℃で 3 日間生育させ、コロニーを形成させた。得られたコロニーを YPD 寒天培地に並べて、

30℃で一晩培養した。

コロニーPCRによる遺伝子型解析

PCR チューブに Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 U / μ L) を 0.2 μ L、2 \times Gflex PCR Buffer を 5 μ L、forward primer (10 μ M) を 0.25 μ L、reverse primer (10 μ M) を 0.25 μ L、滅菌水を反応液量が合計 10 μ L になるよう加えた。PCR 反応液に直接コロニーを少量懸濁し、この反応液をサーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler Dice, TaKaRa) にセットし、94℃で1分の変性後、98℃ 10秒と 68℃ 30秒/kbp の反応を 30~40 回繰り返した。

DNA 塩基配列の決定

ゲノムへの遺伝子導入時など必要に応じて、シーケンシングによって DNA 配列を決定した。PCR 産物 4.5 μ L に Exonuclease I (GE Healthcare) 0.25 μ L と Alkaline phosphatase (GE Healthcare) 0.25 μ L 加えた。PCR 産物中の過剰なプライマーを消化し、未反応の dNTP を脱リン酸化するために、37℃で 30 分反応させて、Exonuclease I と Alkaline phosphatase を失活させるために 80℃で 15 分反応させてから氷冷した。これを鋳型 DNA とし、直接塩基配列の決定に用いた。シーケンスサンプルの調整には Big Dye Terminator (Applied Biosystems ver.3.1) を使用した。Big Dye Premix 1.0 μ L、5 \times buffer (Applied Biosystems) 3.5 μ L、1 μ M プライマー 3.2 μ L、鋳型 DNA 2 μ L に、全量が 20 μ L なるよう滅菌水を加えた。サーマルサイクラーを用い、96℃で1分間の変性後、96℃ 10秒、50℃ 5秒、60℃ 4分の反応を 30 回繰り返した。DNA クリーナー (和光純薬) もしくは一般的なプロトコールのエタノール沈殿によって蛍光ターミネーターを除去した。使用方法は説明書に従った。反応液と等量の DNA クリーナーを加えて懸濁し、10 分間静置した。12,000 rpm で 10 分間遠心分離し、ピペッティングにより上清を取り除いた。70%エタノールを反応液の 2 倍量加えて 10 秒間ボルテックスを用いて懸濁した。12,000 rpm で 10 分間遠心分離

を行い、ピペッティングにより上清を取り除き、風乾させた。沈殿を 20 μ L の Hi-Di ホルムアミド (Applied Biosystems) に溶解し、94°C で 2 分間の熱処理後、すばやく氷冷した。この溶液を 8 連 PCR チューブに移し、シーケンサー (ABI PRISM 3100 ジェネティックアナライザー、 Applied Biosystems) を用いて DNA 塩基配列を決定した。

酸性ホスファターゼ活性染色

酸性ホスファターゼ活性を検出する酵母株を高リン酸培地に並べて 30°C で保温し生育させておいた。0.2 g の Bacto Agar (Difco) を 10 mL の滅菌水で加熱融解したものに、10 mg の α -ナフチルリン酸二ナトリウム *n* 水和物 (和光純薬) と 0.1 g の Fast blue salt B (SIGMA) を含む 10 mL の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH4.0) を加え、軽くかき混ぜた。これを染色液とし、形質転換体コロニーの上に重層した。 α -ナフチルリン酸がホスファターゼによって脱リン酸化されることでナフトールが生成し、ナフトールが Fast Blue Salt B とジアゾカップリング反応を起こし、赤く発色する。そのため、酢酸によって酸性となった条件では酸性ホスファターゼを産生しているコロニーのみ赤色に染まる。

分裂寿命測定

-80°C で保存していたグリセロールストックを YPD 培地に画線して 30°C で 2 日間培養し、シングルコロニーを形成させた。*kanMX* 遺伝子を用いた遺伝子破壊株の場合は YPD+G418 培地に画線した。このシングルコロニーを YPD 培地に塗り拡げ、30°C で 1 日培養した。測定開始日の前日の午後 5 時に、少量の細胞を爪楊枝でかきとって、測定に使用する培地の隅に塗り拡げ、30°C で一晩培養した。翌朝、マイクロマニピュレーター (光学顕微鏡:OLYMPUS BX51、マニピュレーター (粗動用):ナリシゲ MMN-1、三次元ジョイスティック油圧マイクロマニピュレーター (懸架式):ナリシゲ MMO-202ND、針:シンガー) を用いて、ステージの目盛りを目安にして 5 目盛間隔で 6 行 8 列の 48 箇所、出芽しかかっている酵母細胞を 3 細胞ずつ配置した。

30℃で2時間培養した後、出芽した娘細胞を残して、母細胞を取り除いた。この娘細胞を母細胞として分裂寿命を測定した。酵母細胞は30℃で培養し、世代時間に合わせ約2時間ごとに母細胞から出芽した娘細胞を取り除いてその細胞数を数えた。培地の乾燥を防ぐために、滅菌水で濡らしたガーゼをプレートのかぶりの内側に置き、プレートにパラフィルムを巻いて封をした。1日の測定は培養時間と作業時間を合わせて9時間ほど行い、1日の測定終了後は娘細胞の出芽を防ぐために4℃で保存した。翌日の測定は30℃で30分以上培養してから開始した。母細胞が3日以上出芽しなければ死んだと判断した。死んだ母細胞から娘細胞が出芽していた場合、マイクロマニピュレーターで取り除くことができなくても数を数え、出芽回数に加えた。48細胞の分裂寿命測定を2回行い、合計96細胞の平均の出芽回数を分裂寿命とした。得られた結果に対してWilcoxonの順位和検定を行い、*p*値が0.01未満のときに有意差があると判断した。

細胞内全ポリリン酸とオルトリン酸定量

OD₆₀₀=1に達した溶液10 mLを集菌し、1.5 mL エッペンドルフチューブに移した。500 μLの0.1% TritonX-100を加え、500 μLのジルコニアビーズを加えたスクリーキャップ付き2 mLチューブ (TOMY、TM-625S)に移した。ビーズ破砕機 (Micro SmashTM MS-100R)にて細胞破砕 (3,000 rpm、5分、4℃、1回)した。細胞が破砕されたことを顕微鏡で確認し、細胞懸濁液から50 μLをオルトリン酸定量用に1.5 mLチューブに分注した。分注した細胞懸濁液50 μL (1 OD分)を遠心分離 (13,000 rpm、5分、4℃)し、水層画分 (上清)を新しい1.5 mL エッペンドルフチューブに移し、オルトリン酸抽出液とした。残り450 μLの細胞懸濁液に5 μLの1 M Tris-HCl (pH 8.0)、10 μLの0.5 M EDTA、10 μLの5 M LiCl、25 μLの10% SDSと500 μLのacid phenolを加え、再度、Micro SmashTM MS-100R (3,000 rpm、5分、4℃)にかけた。遠心分離 (14,000 rpm、5分、4℃)の後、水層画分 (上層)を新しい1.5 mL エッペンドルフチューブに移した。500 μLのクロロホルムを加えてvortexで30秒間混合し、遠心分離 (14,000 rpm、5分、4℃)の後、水層画分 (上層 約200 μL)を新しい1.5 mL エッペンドルフチューブに移した。2.5

倍量の 99.5%冷エタノールを加え、 -20°C にて 3 時間以上静置した後、遠心分離（14,000 rpm、10 分、 4°C ）にて、沈殿を回収した。0.5 mL の 70%冷エタノールを加えてリンスした後、遠心分離（14,000 rpm、5 分、 4°C ）して溶液をできるだけ取り除き、沈殿を風乾（約 30 分）させる。沈殿に 50 μL の TE/SDS buffer（10 mM Tris-HCl [pH7.4]）、1 mM EDTA、0.1% SDS を加えて vortex で懸濁し、Nano Drop TM Light（Thermo Fisher Scientific）で RNA 濃度を測定した。15 μL の 2 M 過塩素酸水溶液に、5 μg RNA 相当の抽出液を加え、TE/SDS buffer を追加し 30 μL に調製した。そして、ヒートブロック（Cool Thermo Unit CTU-N: TAITEC）で加水分解（30 分、 90°C ）した。その後、70 μL の滅菌水を加えて全量 100 μL のポリリン酸抽出液とした。標準リン酸水溶液（800 μM ）を適当な buffer（ポリリン酸：0.3M 過塩素酸水溶液 / オルトリン酸；0.1% TrironX-100）で 10 倍希釈して 80 μM のリン酸水溶液を作製した。その溶液を希釈し、80 μM 、40 μM 、20 μM および 0 μM のリン酸標準液の希釈系列を調製した。BIOMOL green（リン酸定量試薬：Enzo）を 200 μL ずつ分注しておいた 1.5 mL エッペンドルフチューブに、20 μL の希釈した標準リン酸溶液および試料を加えて軽く転倒混和し、室温にて 20 分間反応させた。20 分後、 A_{620} 値を測定し、リン酸濃度を決定した。

第3節 結果

第1項 出芽酵母の APase 遺伝子四重破壊株は短寿命である

まず初めに、APase 四重破壊株が APase 活性をもたないことを確認するため、4つの APase 遺伝子の破壊をすべて組み合わせた株を作製し、それらの株の APase 活性を評価した (図 1-3)。APase 活性の確認には、培地中のリン酸量を厳密に制御でき、リン酸飢餓応答系による寿命制御に関する先行研究で使用していた合成培地を使用した。APase 活性染色を行ったところ、以前の報告 (Nosaka, 1990; Toh-e, 1973) と同様に、高リン酸 (11 mM) 条件下では野生型 *PHO3* 遺伝子をもつ株のコロニーは赤く染色された。低リン酸 (0.22 mM) 条件下では野生型 *PHO5* 遺伝子をもつ株のコロニーは真っ赤に染色され、APase 遺伝子の破壊を重ねる毎に、染色の程度は低下していった。APase 四重破壊株はリン酸濃度に関わらず正常に生育したが、いずれの培地でも全く染色されなかった。これらの結果から、APase 四重破壊株が APase 活性をもたないこと、また APase をコードする遺伝子がこれら 4 つのみであることを確認した。

次に、APase が分裂寿命に及ぼす影響を知るため、すべての APase を破壊した APase 四重破壊株の分裂寿命を測定した。表現型が表れるとしたら、低リン酸条件でより顕著であると予想した。しかし、APase 四重破壊株は、低リン酸および高リン酸合成培地の両方で、同程度の短寿命を示した (図 1-4、表 1-3)。これらの結果は、APase 遺伝子が分裂寿命の維持に必要であること、そして、細胞外の Pi 濃度が APase 破壊株の寿命に影響しないことを示した。

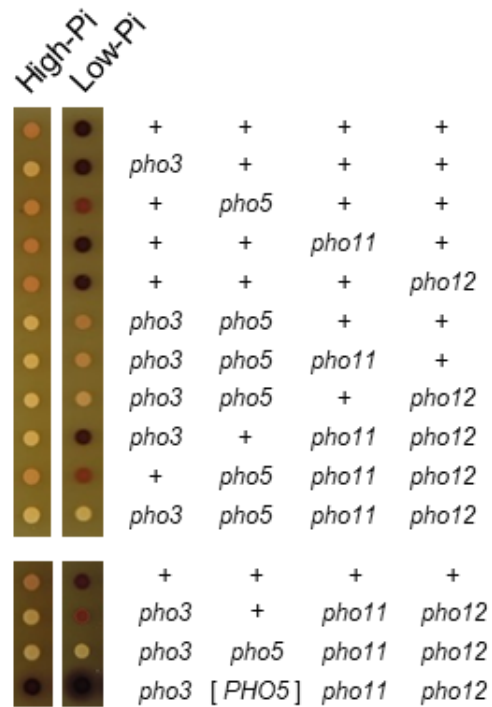


図 1-3. 高リン酸および低リン酸合成培地における APase 遺伝子破壊株の APase 活性染色

野生型株および APase 遺伝子の破壊を組み合わせた株を、高リン酸（無機リン酸濃度: 11 mM）および低リン酸（無機リン酸濃度: 0.22 mM）培地にそれぞれ植菌し 30°C で培養した。翌日、それらを同様の培地に再度植菌した。翌日、APase 活性染色した。酸性ホスファターゼを産出しているコロニーは、その程度に応じて赤色に染まる。

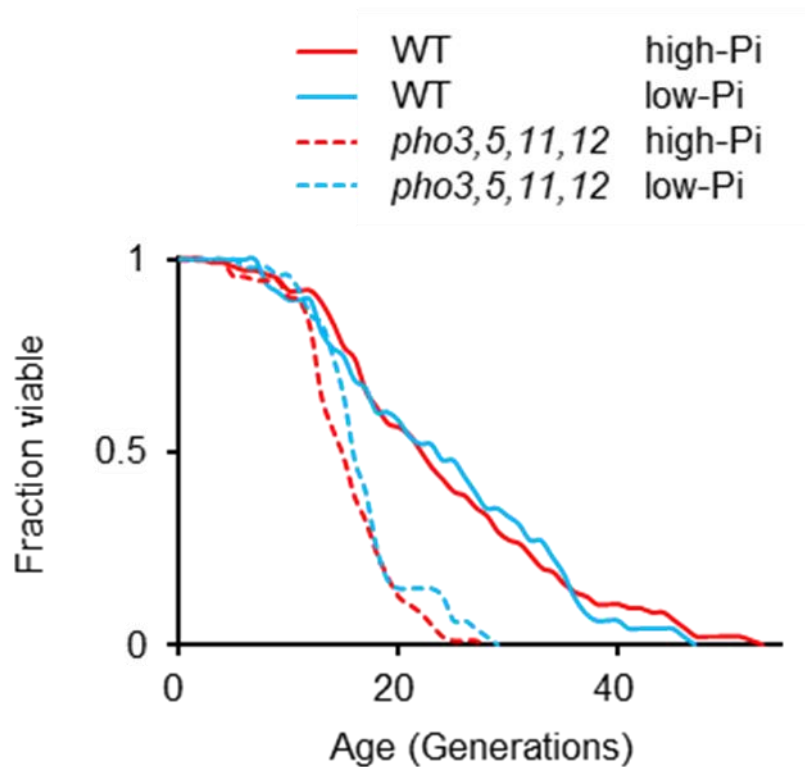


図 1-4. 合成培地における APase 四重破壊株の寿命曲線

高リン酸合成培地（無機リン酸濃度 11 mM）および低リン酸（無機リン酸濃度：0.22 mM）合成培地において、野生型株と APase 四重破壊株の分裂寿命を測定した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT、High Pi（—、平均寿命 24.3 ± 11.0 ）、WT、Low Pi（—、平均寿命 24.3 ± 10.5 ）、*pho3,5,11,12*、High Pi（—破線、平均寿命 15.6 ± 4.4 ）、*pho3,5,11,12*、Low Pi（—破線、平均寿命 17.0 ± 4.7 ） Piは無機リン酸を表す。

表 1-3 第 1 章における分裂寿命測定結果

Relevant genotype	Averaged lifespan (Generations)	±	SD	Maximum lifespan (Generations)	<i>P</i> value ^{a)}
Synthetic high-Pi medium					
Wild type	24.3	±	11.0	53	-
<i>pho3</i>	24.9	±	6.9	37	2.9E-01
<i>pho5</i>	26.7	±	9.4	52	1.1E-01
<i>pho11</i>	22.6	±	8.7	43	5.0E-01
<i>pho12</i>	23.0	±	8.1	42	8.4E-01
<i>pho3 pho5</i>	21.6	±	9.3	41	2.6E-01
<i>pho3 pho5 pho11</i>	20.6	±	7.4	34	1.1E-01
<i>pho3 pho5 pho12</i>	20.6	±	7.2	39	1.0E-01
<i>pho3 pho11 pho12</i>	21.8	±	5.2	34	4.8E-01
<i>pho5 pho11 pho12</i>	20.4	±	8.0	45	6.0E-02
<i>pho3 pho5 pho11 pho12</i>	15.6	±	4.4	28	7.3E-10
<i>pho3 pho5 pho11 pho12</i> [TDH3p- <i>PHO5</i>]	19.9	±	7.0	37	2.0E-02
Synthetic low-Pi medium					
Wild type	24.3	±	10.5	47	-
<i>pho3 pho5 pho11 pho12</i>	17.0	±	4.7	29	1.2E-03
YPD medium					
Wild type	25.0	±	9.1	40	-
<i>pho3 pho5 pho11 pho12</i>	16.9	±	4.7	32	1.2E-07
Pi-depleted YPD medium					
Wild type	25.2	±	6.7	41	-
<i>pho3 pho5 pho11 pho12</i>	15.8	±	4.1	24	8.9E-12

^{a)} Wilcoxon rank-sum 検定を用いて、野生型株 BY4742 に対する *p* 値を算出した。TDH3p-は過剰発現 (OE) を示す。

第2項 APase 破壊株の短寿命は環境中のリン酸濃度に依存しない

上記の分裂寿命測定に用いた合成培地は、APase の基質となる Po 化合物を一切含まない。そのため、APase 破壊株の短寿命が、合成培地に特有な現象ではないことを確かめるために、酵母の培養において最も一般的であり、APase の基質となる Po 化合物を含む YPD 完全培地と YPD-Pi 培地（ほとんどの Pi を除去した YPD 培地）においても APase 破壊株の寿命を測定したところ、合成培地での結果と同様に有意な短寿命を示した（図 1-5、表 1-3）。以前に報告したように、野生型株の寿命は、環境中の Pi 濃度に関わらず正常であった（Nakajima, 2020）。これらの結果から、APase 四重破壊株の短寿命は、細胞外の Po 化合物の脱リン酸化および Pi の生成の欠陥によるものではなく、環境中の Po 化合物および Pi の濃度に依存しないことが示された。

APase の破壊による細胞内のリン酸量の変動を調べたところ、高リン酸および低リン酸合成培地において、細胞内のオルトリン酸およびポリリン酸量は APase 四重破壊株と野生型株で同程度であった（図 1-6）。このように、APase は細胞内のリン酸レベルの維持には寄与しておらず、細胞外の有機リン酸化合物の脱リン酸化や細胞内の無機リン酸レベルの制御ではなく、新規の機構を介して寿命に関与すると予想した。

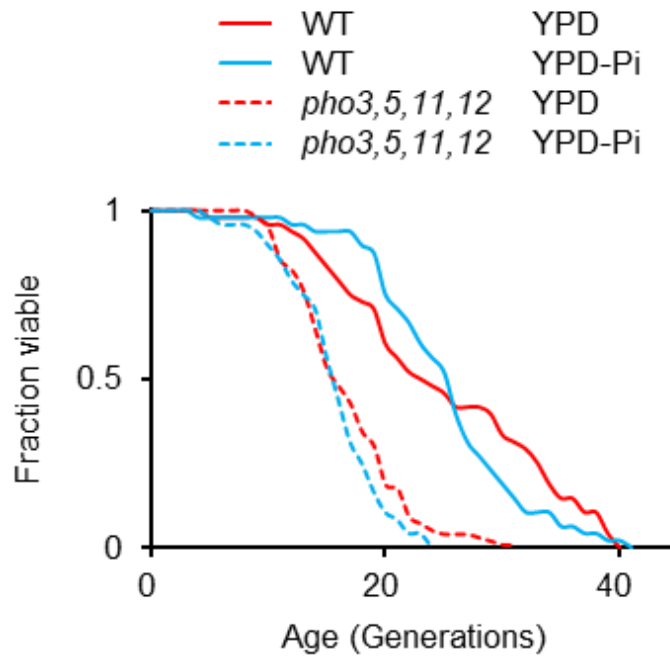


図 1-5. YPD および YPD-Pi 培地における APase 四重破壊株の寿命曲線

YPD および YPD-Pi 培地において、野生型株と APase 四重破壊株の分裂寿命を測定した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT、YPD(—、平均寿命 26.1 ± 9.3)、WT、YPD-Pi (—、平均寿命 28.6 ± 11.1)、*pho3,5,11,12*、YPD (—破線、平均寿命 16.9 ± 4.7)、*pho3,5,11,12*、YPD-Pi (—破線、平均寿命 15.8 ± 4.1) Piは無機リン酸を表す。

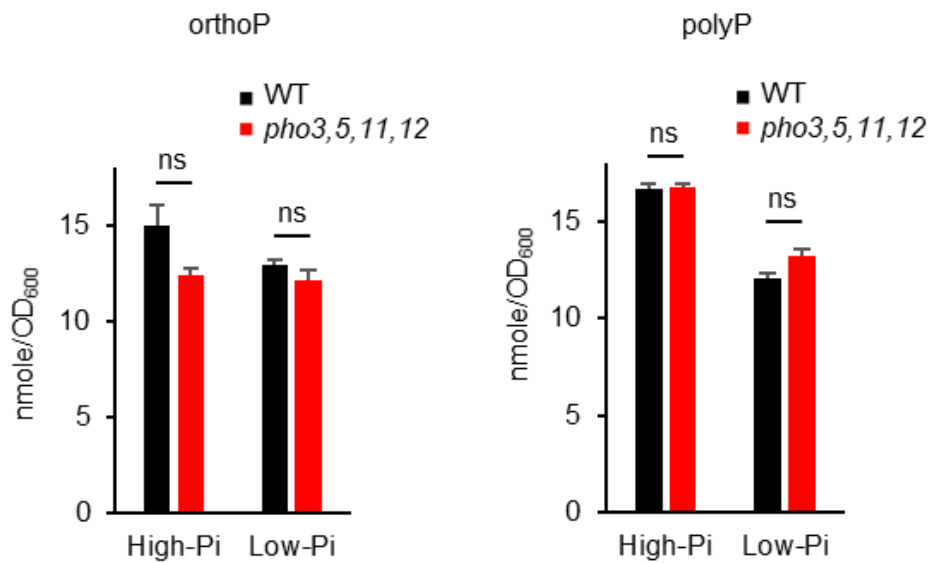


図 1-6. APase 四重破壊株の細胞内オルトリン酸およびポリリン酸量

高リン酸（無機リン酸濃度: 11 mM）および低リン酸（無機リン酸濃度: 0.22 mM）合成培地において、野生型株と APase 四重破壊株の細胞内オルトリン酸（無機リン酸）およびポリリン酸をリン酸定量キット（BIOMOL Green）によって測定した。1 つの菌株について 3 回測定し、その平均と、標準誤差を示した。Student-T 検定から野生型株に対する有意差を求めた。高リン酸培地における野生型株と APase 四重破壊株の細胞内オルトリン酸量の p 値は、 1.2×10^{-1} であった。 ns=有差なし

第3項 4つのAPaseは分裂寿命制御に関して重複した役割をもつ

出芽酵母のすべてのAPaseはアミノ酸配列レベルで約80%の相同性を有しており、基質特異性は広い(Andreeva, 2019; Kennedy, 2005)。一方で、Pho3pはチアミンリン酸に高い親和性をもつなど特異性の違いも報告されている(Nosaka, 1990)。従って、寿命制御に特異的なAPaseが存在する可能性を考えた。そこで、4つのAPase遺伝子のうち、どのAPaseが分裂寿命の維持に貢献するかを検討した。高リン酸合成培地では、単一遺伝子破壊株は野生型株と同等の正常な寿命を示し(図1-7、表1-3)、様々な組み合わせの二重および三重破壊株も、野生型株との有意な差は認められなかった(図1-8、表1-3)。したがって、すべてのAPaseを破壊したときのみ、短寿命となることが明らかとなった。

本研究で作成したAPase四重破壊株の寿命短縮が他の遺伝子変異によるものではないことを確認するために、構成的かつ強い転写活性をもつ*TDH3*(グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ)プロモーターの制御下に連結した*PHO5*遺伝子を4重破壊株の*ura3*遺伝子座に組み込んだ。この*PHO5*相補株は、高リン酸培地でもAPase活性を有し、低リン酸培地での野生型と同程度の活性を示した(図1-3)。この*PHO5*相補株は、*pho3 pho11 pho12*の3重破壊株と同程度にまで分裂寿命が回復した(図1-9、表1-3)。従って、APase四重破壊株の短寿命は、APase遺伝子の欠損が原因であり、4つの分泌型APaseは分裂寿命の維持において共通の機能をもつことが示された。

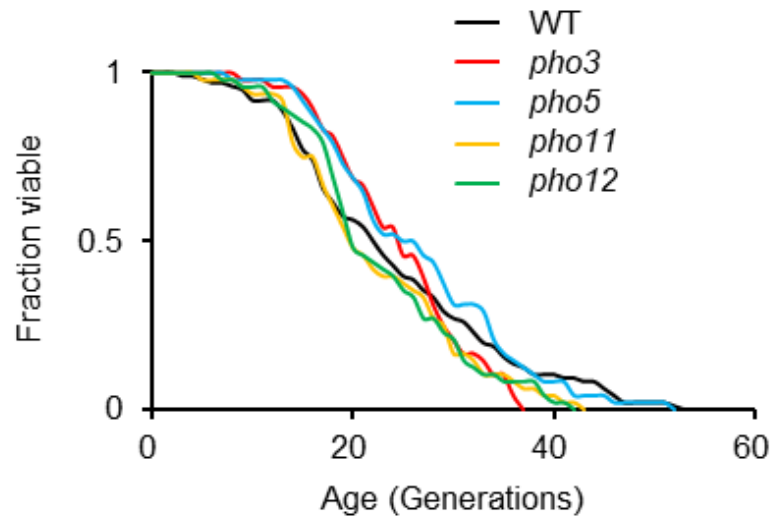


図 1-7. 高リン酸合成培地における APase 遺伝子単独破壊株の分裂寿命曲線

高リン酸合成培地（無機リン酸濃度: 11 mM）において、野生型株、*pho3* 遺伝子破壊株、*pho5* 遺伝子破壊株、*pho11* 遺伝子破壊株と *pho12* 遺伝子破壊株の分裂寿命を測定した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT（—、平均寿命 24.3 ± 11.0 ）、*pho3*（—、平均寿命 21.5 ± 8.1 ）、*pho5*（—、平均寿命 26.7 ± 9.4 ）、*pho11*（—、平均寿命 22.6 ± 8.7 ）、*pho12*（—、平均寿命 21.3 ± 8.2 ）

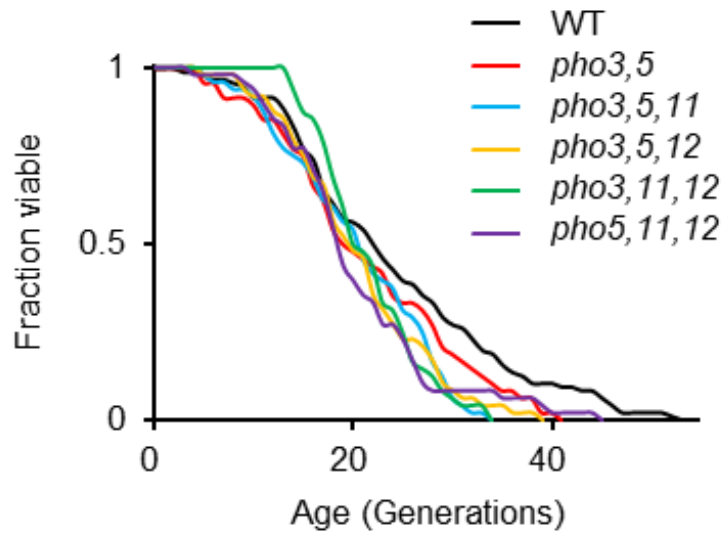


図 1-8. 高リン酸合成培地における APase 遺伝子二重および三重破壊株の分列寿命曲線

高リン酸合成培地（無機リン酸濃度: 11 mM）において、*pho3,5* 遺伝子破壊株、*pho3,5,11* 遺伝子破壊株、*pho3,5,12* 遺伝子破壊株、*pho3,11,12* 遺伝子破壊株と *pho5,11,12* 遺伝子破壊株の分裂寿命を測定した。野生型株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT（—、平均寿命 24.3 ± 11.0）、*pho3,5*（—、平均寿命 21.6 ± 9.3）、*pho3,5,11*（—、平均寿命 21.0 ± 7.5）、*pho3,5,12*（—、平均寿命 20.6 ± 7.2）、*pho3,11,12*（—、平均寿命 21.8 ± 5.2）、*pho5,11,12*（—、平均寿命 19.9 ± 7.0）

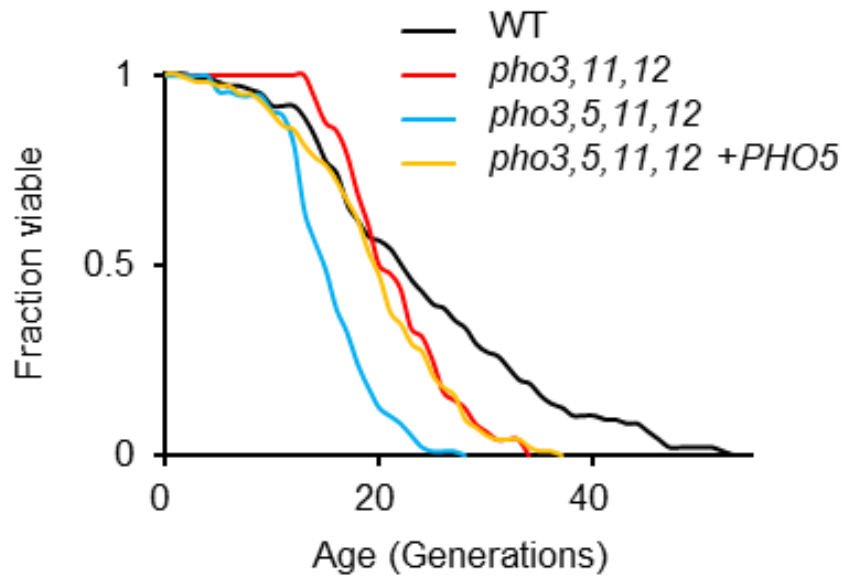


図 1-9. 高リン酸合成培地における APase 遺伝子四重破壊株および *PHO5* 相補株の分裂寿命曲線

高リン酸合成培地（無機リン酸濃度: 11 mM）において、APase 四重破壊株に *PHO5* 遺伝子を導入した株の分裂寿命を測定した。野生型株および *pho3,11,12* 遺伝子破壊株と APase 四重破壊株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT (—、平均寿命 24.3 ± 11.0)、*pho3,11,12* (—、平均寿命 21.8 ± 5.2)、*pho3,5,11,12* (—、平均寿命 15.6 ± 4.4)、*pho3,5,11,12 +PHO5* (—、平均寿命 19.9 ± 7.0)

第3節 考察

APase 四重破壊株は細胞外のリン酸濃度に関わらず短寿命であり、細胞内のリン酸量は野生型株程度であった。APase が細胞外の Po 化合物の脱リン酸化による Pi の生成以外の役割を介して分裂寿命に関与することが示された。つまり、APase は細胞外だけでなく、細胞内でも機能している可能性がある。APase は細胞外に分泌されるだけでなく、ペリプラズム空間にも存在することが知られているため (Oshima, 1997)、APase はペリプラズム空間もしくはその近傍の細胞表層において、おそらく内因性の細胞内基質の脱リン酸化を介して分裂寿命の維持に関与している可能性がある。

高リン酸合成培地において、リン酸抑制性 APase (Pho5p, Pho11p, Pho12p) の発現は抑えられるため、APase 活性はチアミン抑制性 APase (Pho3p) に由来する。*pho3*破壊株が高リン酸合成培地にて APase 活性をほとんど示さなかったにも関わらず、APase 四重破壊株だけが顕著な短寿命であった。これは、APase 活性染色法では検出できない程、ごく少量の APase が寿命に関与している可能性がある。今回の実験において APase 活性染色では、 α -ナフチルリン酸を APase の基質として用いた。APase は一般に基質特異性が広いとされているが、 α -ナフチルリン酸と実際の寿命に関与している基質に対する APase の特異性も異なる可能性がある。そのため、高リン酸培地において、正常な寿命を有する *pho3* 破壊株の APase 活性がほとんど検出されなかったのかもしれない。

第2章 イノシトール六リン酸合成酵素遺伝子 *IPK1* の破壊により APase 破壊株の短寿命は回復する

第1節 緒言

これまで、APase は細胞外の Po 化合物を脱リン酸化することで Pi を供給すると考えられていた。しかし、第1章の結果より、APase は細胞外の Po 化合物の脱リン酸化による Pi の供給を介さずに細胞の分裂寿命を維持することが明らかとなり、APase が細胞内において分裂寿命を制御する可能性が示唆された。本章では、APase 破壊株の短寿命の原因を知るために、短寿命の原因として知られる、ストレス感受性の増加、呼吸能の欠損、ゲノムの不安定化や代謝の変動などの表現型を検討した。また、APase は細胞外に分泌される他に、ペリプラズム空間に局在している。従って、APase の寿命に関与する基質がペリプラズム空間に存在する可能性を考え、ペリプラズムに存在する低分子化合物のキナーゼに着目し、寿命への関与について調査した。さらに、APase のオルソログの基質に着目し、寿命への関与について検討した。

第2節 材料と方法

第1章で記述したものについては省略する。

使用菌株とプライマー

本章において用いた出芽酵母菌株を表2-1に示した。本章において使用したプライマーは表2-2に示した。

表 2-1 第2章で使用した菌株

Strain	Genotype
BY4742	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-APΔQ	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho11Δ::CgHIS3 pho12Δ::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2- fob1	<i>MATa fob1Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-APΔQ-fob1	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho11Δ::CgHIS3 pho12Δ::CgLEU2 fob1Δ::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-ldb19	<i>MATa ldb19Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-yap1	<i>MATa yap1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>

BY2-hog1	<i>MATa hog1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-rnr1	<i>MATa rnr1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY4742-ρ ⁰	<i>MATa rho⁰ ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-TpLSB6	<i>MATa TDH3p-LSB6::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-TpSTT4	<i>MATa TDH3p-STT4::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-TpMSS4	<i>MATa TDH3p-MSS4::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-ipk1	<i>MATa ipk1Δ::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-APΔQ-ipk1	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho11Δ::CgHIS3 pho12Δ::CgLEU2 ipk1Δ::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-TpIPK1	<i>MATa TDH3p-IPK1::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-APΔQ-TpIPK1	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho11Δ::CgHIS3 pho12Δ::CgLEU2 TDH3p-IPK1::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-arg82	<i>MATa arg82Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-kcs1	<i>MATa kcs1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-vip1	<i>MATa vip1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-TpKCS1	<i>MATa TDH3p-KCS1::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-APΔQ-TpKCS1	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho11Δ::CgHIS3 pho12Δ::CgLEU2 TDH3p-KCS1::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-TpVIP1	<i>MATa TDH3p-VIP1::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-APΔQ-TpVIP1	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho11Δ::CgHIS3 pho12Δ::CgLEU2 TDH3p-VIP1::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>

表 2-2 第 2 章で使用したプライマー

Name of primers	Sequence	Gene
For construction of gene knockout and overexpression strain		
IPK1KOf	AATTGTCAGAGATAAGTTCCTTTTTTTGAAAAGA AAGATCGCACAGGAAACAGCTATGACC	<i>IPK1</i>
IPK1KOr	GCATCTGCCAGTACCAAAGGTGGAAAGAAAAGT ATACAGTGTGTGTAACACGACGGCCAGT	<i>IPK1</i>
TDH3p- IPK1r	CAATCAGTATATTTGCCCCACCACGTCCGATGA CTTGCATTTTGTTTGTATGTGTGTT	<i>IPK1</i>
KCS1KOf	TTTTTATTTTTTGTATATATAAACTAAAGCTAAA AGACTCACAGGAAACAGCTATGACC	<i>KCS1</i>
TDH3p- KCS1r	TATCGGGTATTTTATCATGAATTTTCGTGAGAGGT ATCCATTTTGTGTTTATGTGTGTT	<i>KCS1</i>
VIP1KOf	CAAAAGCATCTCGTAGCATATTAATATATTGCAG AAGGTCCACAGGAAACAGCTATGACC	<i>VIP1</i>
TDH3p- VIP1r	CCTCATCAGATTCAATCGGTTCTTCTTTATCCC ACTCATTTTGTGTTTATGTGTGTT	<i>VIP1</i>
KO-TDH3pf	GTTTTACAACAACCTTTATTTAGTCAAAAAATTAG C	<i>TDH3</i>
KO- TDH3pr	TGACTAAATAAAGTTGTTGTAAAACGACGGCCA GT	-
FOB1KOf	TTAACGATTGTGTGAGTGTGAATTTGTGCTGAG GATAACACACAGGAAACAGCTATGACC	<i>FOB1</i>
FOB1KOr	ACCTATGGTGA CTCTCCTTTCATTCTATCCTAC ATATTAGTTGTAAAACGACGGCCAGT	<i>FOB1</i>
LSB6KOf	CATAAAGTGA ACTAGACACTTTCAAGAAGCCAA CCAAAGCCACAGGAAACAGCTATGACC	<i>LSB6</i>
TDH3p- LSB6r	GATTTACGGTATGATCATGCTGGTAAGCTTCGT TACTCATTTTGTGTTTATGTGTGTT	<i>LSB6</i>
STT4KOf	GATAACTACAGCAATCGAAAACGCCACTCGTTT AAGGCAGCACAGGAAACAGCTATGACC	<i>STT4</i>
TDH3p- STT4r	TTAAAGATGAAGAGGCTTTCAATCCTCTGGTAA ATCTCATTTTGTGTTTATGTGTGTT	<i>STT4</i>
MSS4KOf	TTGCCCTATATCGCTTTTCCCTATCAATAGTTTC TAACTCCACAGGAAACAGCTATGACC	<i>MSS4</i>
TDH3p- MSS4r	GCGGTACA ACTGAAGGAGGTTGTGATCGCAAG ACTGACATTTTGTGTTTATGTGTGTT	<i>MSS4</i>

For confirmation of gene knockout and overexpression strain

IPK1Cf	AATGTGATGTAAGGACGACGTAGGAAAGCG	<i>IPK1</i>
IPK1RTf	TTGGCCCGATCTGTTATCATC	<i>IPK1</i>
IPK1RTr	CACTGAGAATTGGCCTTATAGCTTC	<i>IPK1</i>
ARG82Cf	TCTCAGAAGTAGGCTGGGTAAGTATC	<i>ARG82</i>
KCS1Cf	TCCAACAAAAGGGAAAATCCCAGTTTGACC	<i>KCS1</i>
KCS1RTf	GCAACTCTTTATCACCCATTCTCAC	<i>KCS1</i>
KCS1RTr	TTCGTTTCCCGTATCTTCATCC	<i>KCS1</i>
VIP1Cr	TTAATGTGCTCTGACGCATATCCTTATGGC	<i>VIP1</i>
VIP1KOf	CAAAAGCATCTCGTAGCATATTAATATATTGCAG AAGGTCCACAGGAAACAGCTATGACC	<i>VIP1</i>
VIP1RTf	GGATCGCCCCATTTACCTC	<i>VIP1</i>
VIP1RTr	CACATACCCCAATCTTCCCTACC	<i>VIP1</i>
LDB19Cr	TAACAAAGCTATGTACCTACGACG	<i>LDB19</i>
YAP1Cf	CGTTTACCGATTAAGCACAGTACCTTTACG	<i>YAP1</i>
HOG1Cr	CATAAGTGACGGTTCTTGGAGTC	<i>HOG1</i>
RNR1Cr	ATAGGTACCTTTTAGCTTGGCATTAGAATGGAA AC	<i>RNR1</i>
FOB1Cf	CCAGAGTATCTTTACCCCCACATTCAATA	<i>FOB1</i>
LSB6Cr	CATGAATCCGCTAAGATCTGTTTGG	<i>LSB6</i>
LSB6RTf	AAGTGGGTCGTACTTTGTGTATGG	<i>LSB6</i>
LSB6RTr	GTTCCCTCATCCTTGGGCTTG	<i>LSB6</i>
STT4Cr	AAATGGCTTGGCACAATCGAGAATC	<i>STT4</i>
STT4RTf	ACGACAAAGCAGGTATCAACAGAG	<i>STT4</i>
STT4RTr	AAATAGTGTGCCCTCGAAATGG	<i>STT4</i>
MSS4Cr	TATTAGCTAGCGTGGCTTATGCAAG	<i>MSS4</i>
MSS4RTf	TTCCACCACACTTAGACATTAC	<i>MSS4</i>
MSS4RTr	TTCGCCAACCTTTCTTTATCC	<i>MSS4</i>

ストレス感受性試験

様々なストレスに対する感受性はスポットアッセイによって観察した。1 mL の YPD 液体培地に酵母を植菌し、30°Cで一晩振盪培養した。その培養液全量を 1.5 mL エッペンドルチューブに移し、13,000 rpm、1 分間遠心分離した。1 mL の滅菌水で洗浄後、1 ml の滅菌水に懸濁し、OD₆₀₀ を測定した。その後、OD₆₀₀ が 5 になるように希釈した。

OD₆₀₀=5 から 5 倍希釈を 5 回行い、6 段階の希釈系列を作製した。スタンプピンを用いて全段階 (OD₆₀₀=5,1,0.2,0.04,0.008,0.0016) を各条件 (4 mM H₂O₂ [酸化ストレス]、1 M ソルビトール [浸透圧ストレス]、100 mM ヒドロキシウレア [DNA 複製ストレス]) の YPD 培地 (プレート) において 30°C で培養し、熱ストレス条件は、YPD 培地において、40°C で培養した。

呼吸能の確認

YPD 培地と、グリセロールを炭素源とした YPGly 培地に酵母を塗り広げ、30°C で培養し、生育を確認した。

グリセロールは非発酵性の炭素源であるため、発酵しかできない呼吸欠損株は YPGly 培地においてエネルギー (ATP) を生成できず生育することができない。そのため、YPGly 培地での生育によって呼吸能を有するかを判断した。

¹H-核磁気共鳴(¹H-NMR)法を用いたメタボローム解析

1 mM TSP を含む重水 (D₂O) で作製した 600 μL の 0.1 M リン酸カリウムバッファ (pH 7.0) を集菌した酵母細胞に加え懸濁し、200 μL のジルコニアビーズが入った 2 mL スクリューキャップ付きチューブに移した。ビーズスマッシャー (Micro Smash MS-100R、TOMY) を用いて 3,000rpm、4°C、5 分間の条件で細胞を十分に破砕した。細胞破砕溶液を 13,000 rpm、5 分間遠心し上清を 560 μL 回収後、NMR 試料管 (PS-001-7、SHIGEMD) に移し、NMR 解析 (JNM-ECS400、JEOL) に用いた。¹H-NMR のスペクトルは、90 度パルス幅、データ採取時間 0.8 秒、5 kHz の観測範囲で、共鳴周波数 500 MHz で 65,536 データポイントを得た。パルスの繰り返し時間は 5 秒とし、積算回数は 64 回とした。測定の間は 25 °C を保持した。ケミカルシフト値は内部標準物質である TSP のシグナルを基準とし 0.0 ppm に設定した。このとき、TSP のピークを見て測定の精度を判断した。明らかに形の崩れているデータやピークの先が割れているデータは再測定した。¹H-NMR 法により得られたデータは ALICE for Metabolome (日本電子株式会社) を用いてデータ処理した。それぞれのスペクトルを 0.04 ppm 幅に分割し、領域内のすべてのシグナルを積分して絶対値表

示で数値化した。4.40~5.50 ppm の領域は軽水 (H₂O) のシグナルを含んでいるためデータから取り除いた。スペクトルデータ全体の積分値の合計を 100 とした。同様に 1.18~1.22 ppm と 3.58~3.70 ppm はエタノールの領域シグナルを含んでいるためデータから取り除いた。その結果、スペクトルから 217 個の変量が得られた。0.04 ppm 幅に分割した各変量をスペクトルデータ全体の積分値を足した合計で割り標準化し、得られた結果を菌株ごとに平均値を出した。¹H-NMR 法により得られたスペクトルデータを SIMCA-P+12.0.1 (Umetrics) を用いて主成分分析と判別分析によって解析をした。主成分分析では、まず多変量のなかで分散が一番大きい軸を第一主成分という合成変量とし、次に第一主成分軸の位置から 90 度の直交座標のなかで分散の最も大きい軸を第二主成分とする。さらに第二主成分軸の位置から 90 度の直交座標のなかでも最も分散の大きい軸を第三主成分軸とする。この作業を繰り返し、合成変量をできる限り高くする。そして、最も高い組み合わせの二つの合成変量でグラフ (スコアプロット) を作成した。

ゲノムの安定性試験

ADE2 遺伝子を破壊した株に pASZ11 プラスミドを形質転換する。形質転換体を YPD 液体培地 10 mL で 24 時間培養し、それを 3 回繰り返す。YPD 寒天培地に塗布し、プラスミドの欠失した赤色のコロニーとプラスミドの欠失していない白色のコロニーの比率を計算する。ゲノムが不安定になっている場合、プラスミドの欠失頻度が高くなる。

リボソーム DNA 領域の安定性試験

東京大学定量生命科学研究所 (小林武彦先生、細山田舜研究員) との共同研究により行った。リボソーム DNA (rDNA) リピートの安定性は、パルスフィールド電気泳動によって、rDNA リピートを含む XII 染色体の長さの均質性を決定することによって推定した (Kobayashi, 2017)。

第3節 結果

第1項 APase 破壊株における短寿命に関連する表現型の解析

APase 四重破壊株の短寿命の原因を知るため、分裂寿命との関連が知られているいくつかの表現型を調べた。まず、APase 破壊株は、熱ストレス (40°C)、酸化ストレス (4 mM H₂O₂)、浸透圧ストレス (1 M ソルビトール)、DNA 複製ストレス (100 mM ヒドロキシウレア) などに対し感受性がないか調べた。ストレス感受性株は分裂寿命が短くなる例があるため (Kruegel, 2011)、APase 破壊株のストレス条件における生育を評価した。それぞれのストレスに対して感受性をもつコントロール株として、*lbd19* (熱ストレス)、*yap1* (酸化ストレス)、*hog1* (浸透圧ストレス)、*rnr1* (DNA 複製ストレス) 破壊株を使用した。しかし、いずれのストレス条件においても、APase 破壊株は、野生型株と同程度の生育を示した (図 2-1)。従って、APase 破壊株は上記のストレスに対して感受性ではないと結論した。

第2に、APase 破壊株におけるミトコンドリア機能を確認した。ミトコンドリアの機能不全は短寿命を引き起こすことが知られているため (Yi, 2018)、呼吸能を指標にミトコンドリア機能の評価した。炭素源としてグルコースの代わりに好氣的呼吸でのみ利用可能なグリセロールを使用すると、ミトコンドリアをもたない株 (ρ^0) は生育できない (図 2-2)。このグリセロール培地において、APase 破壊株は野生型株と同様に生育したため、ミトコンドリア機能は正常であると判断した。

第3に、APase 破壊株のゲノムの安定性を確認した。ゲノムが不安定になると短寿命となるだけでなく、プラスミドの欠失率が増加することが報告されている (Bru, 2016)。そのため、プラスミドの欠失率からゲノムの安定性を評価した。APase 破壊株のプラスミド欠失率は野生型と同程度であり (図 2-3)、ゲノムは安定的に維持されていることが示唆された。

第4に、リボソーム DNA (rDNA) 領域の安定性についても調査した。酵母において、XII 染色体に位置する rDNA クラスターのコピー数が不安定であると短寿命となる (Kobayashi, 2013)。複製フォークのブロックに必要な *FOB1* 遺伝子を欠損させると、rDNA のコピー数は安定化する。APase 破壊株において、*FOB1* 遺伝子を破壊すると、分裂寿命は回復した (図 2-4、表 2-3)。従って、APase 破壊株では rDNA 領域のコピー数が不安定性であると予想した。しかし、rDNA のコピー数を、XII 染色体

の長さから実際に確認すると、APase 破壊株の rDNA 領域は野生型株と同程度に安定であった (図 2-5)。従って、*FOBI* の破壊による APase 破壊株の寿命回復は、APase の欠損による短寿命の原因とは独立した効果によるものであると考えた。

最後に、APase 破壊株の代謝変動について検討した。短寿命株は代謝変化を伴うことがある。そのため、¹H-NMR メタボローム解析によって、APase 破壊株の代謝プロファイルを調べたが、野生型との違いはなく、この解析では寿命に関連した代謝の変動はみられなかった (図 2-6)。

以上の結果から、ストレス感受性の増加、呼吸能の欠損、ゲノムおよび rDNA 領域の不安定化や代謝変動が APase 破壊株の短寿命の原因ではないと結論した。

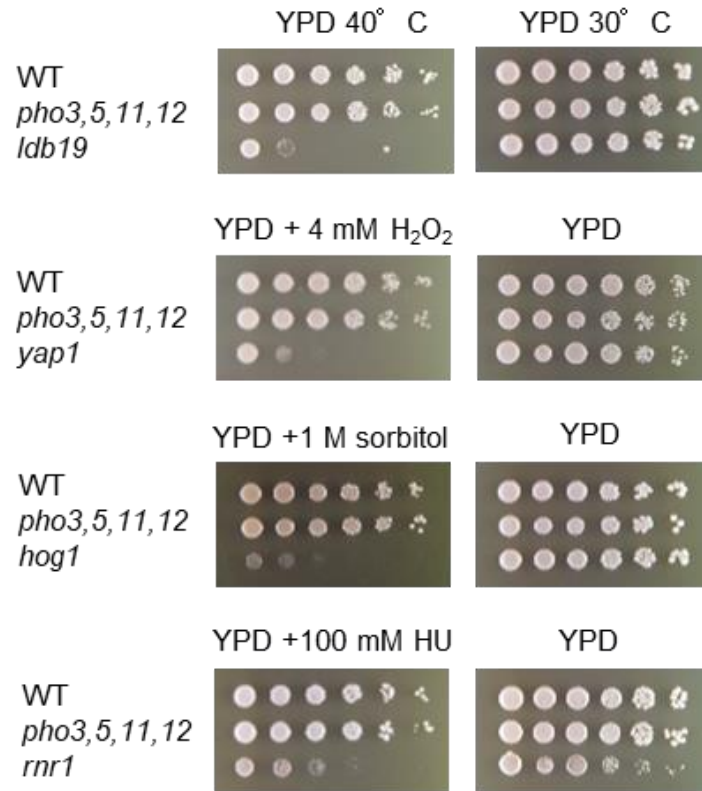


図 2-1. APase 四重破壊株のストレス感受性試験

様々なストレス条件下における野生型株と APase 四重破壊株の生育観察によって、ストレスの感受性を試験した。1 M のソルビトール(浸透圧ストレス)、4 mM の過酸化水素(酸化ストレス)、100 mM のヒドロキシウレア (HU) (DNA 複製ストレス) を含む YPD 培地プレートに酵母細胞懸濁液をスポットし、その後、熱ストレスとして 30°C および 40°C でインキュベートした。熱ストレス、酸化ストレス、浸透圧ストレス、DNA 複製ストレスについては、それぞれ *ldb19*、*yap1*、*hog1*、*rnr1* 破壊株をコントロールとして用いた。それぞれ、培地に植菌後 3 日目の生育を比較した。



図 2-2. グリセロール合成培地での生育観察による呼吸能の確認

非発酵性の炭素源であるグリセロールを唯一の炭素源とする高リン酸合成培地で APase 四重破壊株を培養し、培養 3 日目の生育を比較した。ミトコンドリア DNA をもたない *rho*⁰ 変異株は呼吸能を欠損した株は生育することができない。

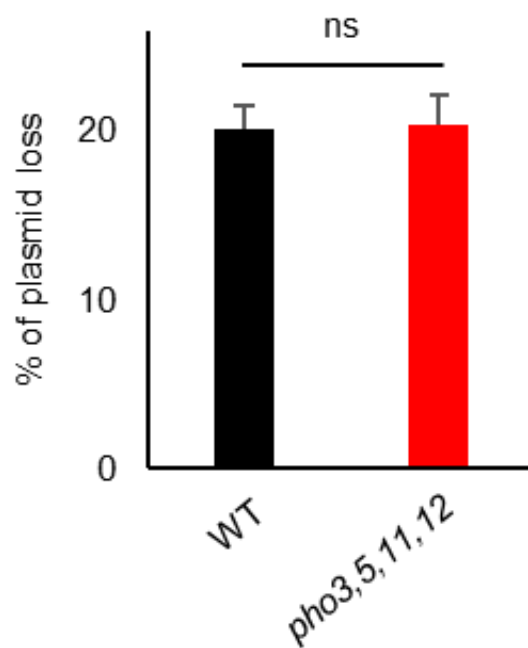


図 2-3. プラスミド欠失率を指標にしたゲノム安定性試験

ゲノムが不安定にあると、プラスミドの保持能が低下することが知られている (Bru, 2016)。従って、野生型株および APase 四重破壊株において、プラスミドの欠失率からゲノムの安定性を評価した。両菌株において、*ADE2* 遺伝子を破壊した。*ade2*破壊株は、赤色コロニーを形成する。その後、*ADE2* 遺伝子をもつ pASZ11 プラスミドを用いて形質転換した。形質転換体を 24 時間増殖させ、プラスミド欠失を可能にするために YPD 液体培地で 3 回リフレッシュした。YPD 寒天培地にプレーティングし、赤色コロニー (*ade2*: プラスミドの欠損) を計数した。1 つの菌株について 3 回計測し、その平均と、標準誤差を示した。Student-T 検定から野生型株に対する有意差を求めた。ns=有意差なし

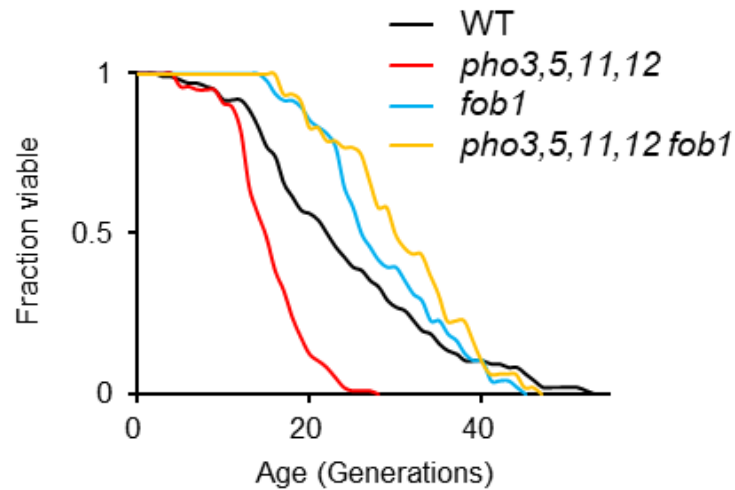


図 2-4. 合成培地における *FOB1* を破壊した APase 四重破壊株の分裂寿命曲線

高リン酸合成培地（無機リン酸濃度: 11 mM）において、*FOB1* 遺伝子を破壊した株および APase 四重破壊株において *FOB1* を破壊した株の分裂寿命を測定した。*FOB1* を破壊すると、rDNA 領域が安定化することが知られている（Kobayashi, 1998; Defossez, 1999）。野生型株と APase 四重破壊株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT (—、平均寿命 24.3 ± 11.0)、*pho3,5,11,12* (—、平均寿命 15.6 ± 4.4)、*fob1* (—、平均寿命 28.6 ± 7.7)、*pho3,5,11,12 fob1* (—、平均寿命 30.9 ± 7.9)

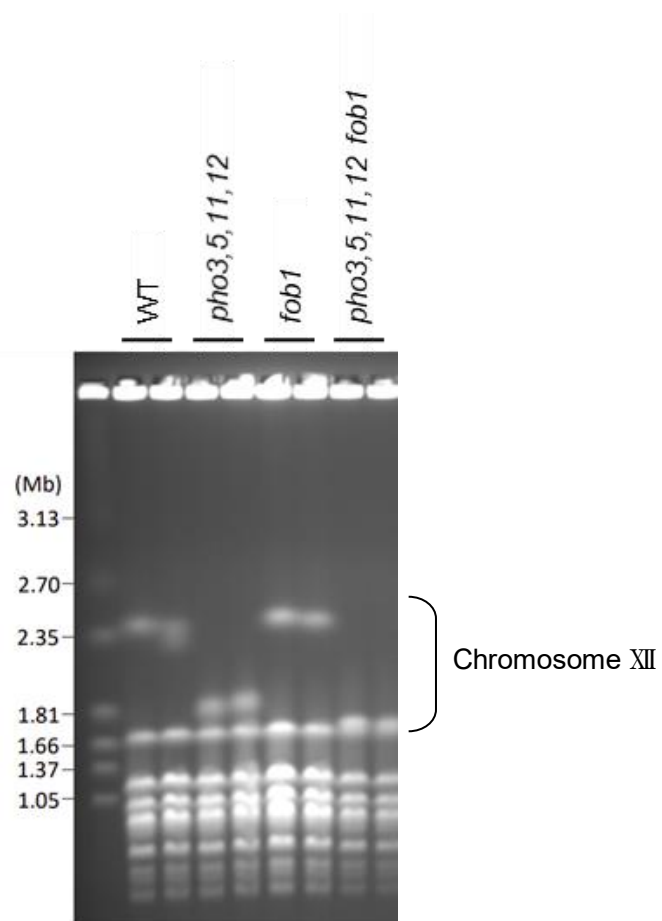


図 2-5. rDNA 領域の不安定性試験

rDNA リピートを含む XII 染色体の長さの均一性から rDNA 領域の安定性を推定した。

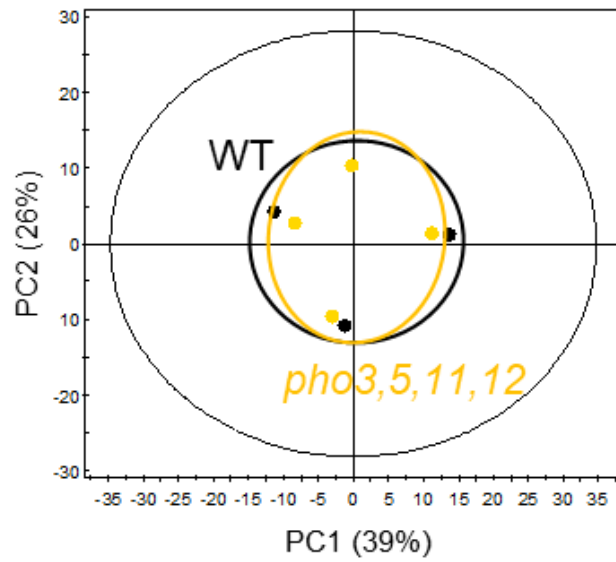


図 2-6. 野生型株および APase 四重破壊株の代謝プロファイル

高リン酸合成培地で培養した酵母を用いた $^1\text{H-NMR}$ メタボロームデータの主成分分析から野生型株と APase 四重破壊株の代謝プロファイルを比較した。

表 2-3 第 2 章における分裂寿命測定結果

Relevant genotype	Averaged lifespan (Generations)	±	SD	Maximum lifespan (Generations)	<i>P</i> value ^{a)}
Synthetic high-Pi medium					
Wild type	24.3	±	11.0	53	-
<i>pho3 pho5 pho11 pho12</i>	15.6	±	4.4	28	7.3E-10
<i>fob1</i>	28.6	±	7.7	45	4.3E-03
<i>pho3 pho5 pho11 pho12 fob1</i>	30.9	±	7.9	47	7.5E-05
<i>TDH3p-LSB6</i>	25.0	±	5.8	42	2.0E-01
<i>TDH3p-STT4</i>	22.2	±	7.2	45	4.2E-01
<i>TDH3p-MSS4</i>	22.6	±	7.1	41	6.1E-01
<i>ipk1</i>	23.0	±	9.1	46	6.0E-01
<i>pho3 pho5 pho11 pho12 ipk1</i>	20.8	±	6.7	42	4.8E-02
<i>TDH3p-IPK1</i>	14.2	±	3.5	21	2.4E-09
<i>pho3 pho5 pho11 pho12 TDH3p-IPK1</i>	12.6	±	3.6	22	2.3E-12
<i>arg82</i>	22.0	±	6.9	39	6.0E-01
<i>kcs1</i>	6.7	±	3.2	16	2.3E-19
<i>vip1</i>	23.0	±	7.7	42	7.7E-01
<i>TDH3p-KCS1</i>	22.6	±	6.2	39	8.0E-01
<i>pho3 pho5 pho11 pho12 TDH3p-KCS1</i>	22.0	±	6.9	38	3.8E-01
<i>TDH3p-VIP1</i>	23.0	±	6.1	37	9.6E-01
<i>pho3 pho5 pho11 pho12 TDH3p-VIP1</i>	20.9	±	7.2	39	1.2E-01

^{a)} Wilcoxon rank-sum 検定を用いて、野生型株 BY4742 に対する *p* 値を算出した。TDH3p-は過剰発現 (OE) である。

第2項 ホスファチジルイノシトールリン酸を介した寿命制御の検討

APase は細胞外に分泌されるだけでなく、ペリプラズム空間に局在する (Oshima, 1997)。細胞外の有機リン酸化合物は APase の寿命に関与する基質ではなかったの
で、寿命を制御する APase の基質がペリプラズム空間に存在する可能性を考えた。細
胞膜およびその近傍に存在する低分子化合物のキナーゼを探索したところ、ホスファ
チジルイノシトール (PI) やそのリン酸塩であるホスファチジルイノシトール 4-リン
酸 (PIP) のキナーゼである Lsb6p、Stt4p と Mss4p がみつかった。そのため、
APase が PIP やホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PIP₂) の脱リン酸化に
関与していると予想した。APase 破壊株の PIP や PIP₂ の増加が短寿命の原因であれ
ば、PI や PIP キナーゼを過剰に発現させれば、寿命が短くなると考えた。出芽酵母
は、2つの PI キナーゼ (Lsb6p と Stt4p) と 1つの PIP キナーゼ (Mss4p) をもって
いる (図 2-7A) (Strahl, 2007)。そのため、野生型株において、*LSB6*, *STT4* ある
いは *MSS4* を過剰発現させた株を構築し、分裂寿命を測定した。いずれの過剰発現株
(OE-*LSB6*, OE-*STT4*, OE-*MSS4*) も、野生型株と同程度の寿命を示し、寿命が
短くなることはなかった (図 2-7B、表 2-3)。これらの結果は、PIP と PIP₂ が寿命決
定に関係する APase の基質ではないことを示している。

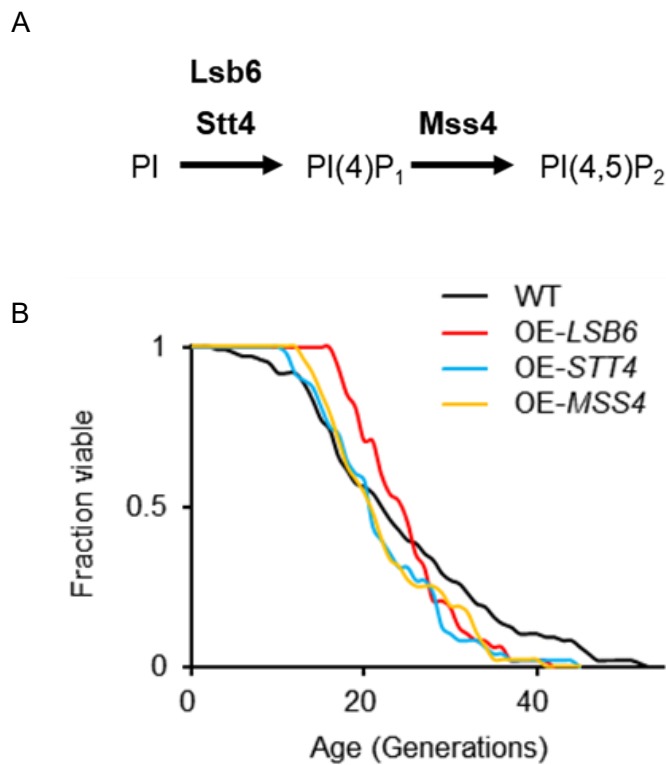


図 2-7. 酵母の PI 代謝経路の模式図と *LSB6*、*STT4* および *MSS4* を過剰発現させた株の分裂寿命曲線

(A) PI はホスファチジルイノシトール、PI(4)P₁ はホスファチジルイノシトール 4 リン酸、PI(4,5)P₂ はホスファチジルイノシトール 4,5-ニリン酸) を示す。(B) PI のキナーゼをコードする *LSB6* および *STT4* 遺伝子、PIP のキナーゼをコードする *MSS4* 遺伝子をそれぞれ過剰発現させた株の分裂寿命を測定した。野生型株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT (—、平均寿命 24.3 ± 11.0)、OE-*LSB6* (—、平均寿命 25.0 ± 5.8)、OE-*STT4* (—、平均寿命 22.2 ± 7.2)、OE-*MSS4* (—、平均寿命 22.6 ± 7.1)

第3項 イノシトールポリリン酸代謝を介した寿命制御の検討

酵母の APase はヒスチジン酸性ホスファターゼに典型的な RHGX_RXP モチーフ (基質の結合と触媒作用に関与)と HD モチーフ (プロトン供与に関与)をもち (図 1-2)、multiple inositol polyphosphate (polyP) phosphatase 1 (MINPP1) ファミリーに属している。ヒトやマウスの MINPP タンパク質はイノシトールポリリン酸を基質としており (Chi, 1999)、酵母の Pho5p は細胞外のイノシトール 1,2,3,4,5,6-ヘキサキスリン酸 (IP₆、フィチン酸) を脱リン酸化する (Andlid, 2004)。そのため、APase 破壊株は、内因性の IP₆ レベルが上昇し、その結果、寿命が短くなるのではないかと考えた。

IP₆ は、酵母のイノシトールポリリン酸代謝経路で合成される (図 2-8)。この経路では、Arg82p が IP₃ (イノシトール三リン酸) から IP₄ (イノシトール四リン酸)、IP₄ から IP₅ (イノシトール五リン酸) を生成し、Ipk1p が、IP₅ から IP₆ を生成する。IP₆ は、Ksc1p および Vip1p によって、さらにリン酸化され、IP₇ (イノシトール七リン酸)、IP₈ (イノシトール八リン酸) となる。酵母では、IP₆ は核から細胞質への mRNA の輸送に関与する (York, 1999) 他、金属イオンに対して強いキレート作用をもつことが知られている。

イノシトール 1,3,4,5,6-ペンタキスリン酸 (IP₅) をイノシトール 1,2,3,4,5,6-ヘキサキスリン酸 (IP₆) にリン酸化するイノシトール 2 キナーゼをコードする *IPK1* 遺伝子を破壊すると、IP₆ が減少すると考えた。そこで、細胞内 IP₆ の増加が短寿命の原因であると仮定した APase 破壊株において *IPK1* を破壊したところ、分裂寿命が回復した (野生型株との有意差: 4.8×10^{-2}) (図 2-9、表 2-3)。この寿命の回復が独立した寿命延長効果ではないことを確かめるため、野生型株においても *IPK1* を破壊した。*ipk1* 破壊株は野生型株程度の寿命であり、寿命は延長されなかった (図 2-9、表 2-3)。さらに、細胞内 IP₆ の増加が期待される *IPK1* の過剰発現株では、野生型の寿命を APase 破壊株の寿命まで有意に短縮した (図 2-10、表 2-3)。*IPK1* を過剰発現させても、APase 破壊株の寿命に対する加算的な影響はみられなかった。一方、イノシトール 1,4,5 三リン酸 (IP₃) をリン酸化し、イノシトール 1,3,4,5-テトラキスリン酸 (IP₄) を経由して IP₅ を形成するイノシトールポリリン酸マルチキナーゼをコードする *ARG82* 遺伝子を破壊しても、野生型の寿命には影響を与えなかった (図 2-11、表 2-3)。従って、IP₄ や IP₅ の減少が短寿命の原因ではないことがわかった。IP₆ の合成

を強化すると野生型株の寿命が短縮されるだけでなく、IP₆の合成を止めると APase 破壊株の寿命は回復することから、細胞内 IP₆の増加が寿命を短縮し、APase 破壊株では細胞内 IP₆が増加していることが示唆された。

IP₆は、キナーゼ Kcs1p および Vip1p によって、イノシトールピロリン酸塩、ジホスホイノシトールペンタキスリン酸塩 (IP₇または PP-IP₅) およびビスジホスホイノシトールテトラキスリン酸塩 (IP₈または[PP]₂-IP₄) にリン酸化される (図 2-8)

(Mulugu, 2007; Shah, 2017; Steidle, 2016; Ye, 2013)。KCS1 または VIP1 を過剰発現させると、APase 破壊株の分裂寿命が回復した (野生型株との有意差: 3.8×10^{-1} , 1.2×10^{-1}) (図 2-12,13、表 2-3)。野生型株において、KSC1 遺伝子を破壊すると寿命が劇的に短くなったが、VIP1 遺伝子を破壊しても寿命は変わらなかった (図 2-14、表 2-3)。これまでの結果に加え、IP₆から IP₇および IP₈の合成の強化によっても、APase 破壊株の短寿命が回復したことから、細胞内 IP₆の増加が短寿命の原因であり、APase が細胞内 IP₆を脱リン酸化することで分裂寿命を維持すること遺伝学的に強く支持された。

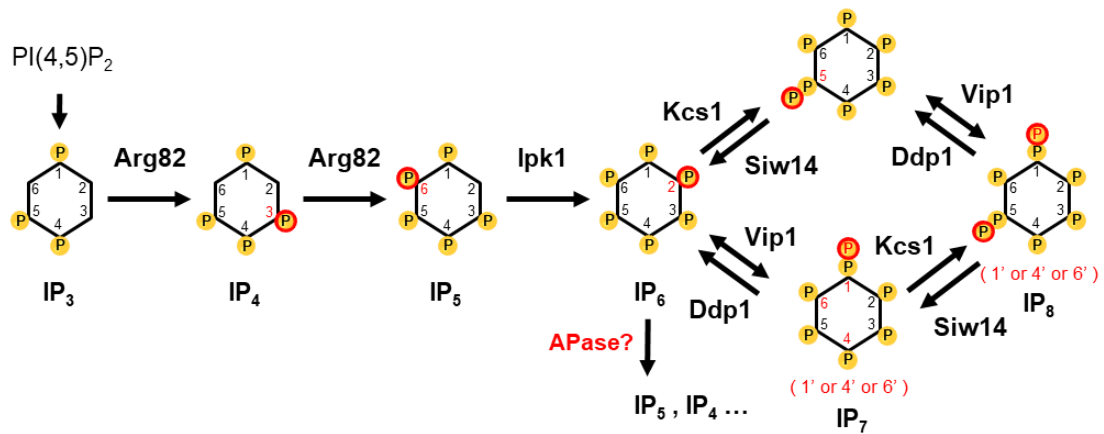


図 2-8. 酵母のイノシトールポリリン酸代謝経路

PI(4,5)P₂はホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸、IP_n はイノシトールポリリン酸を示す。

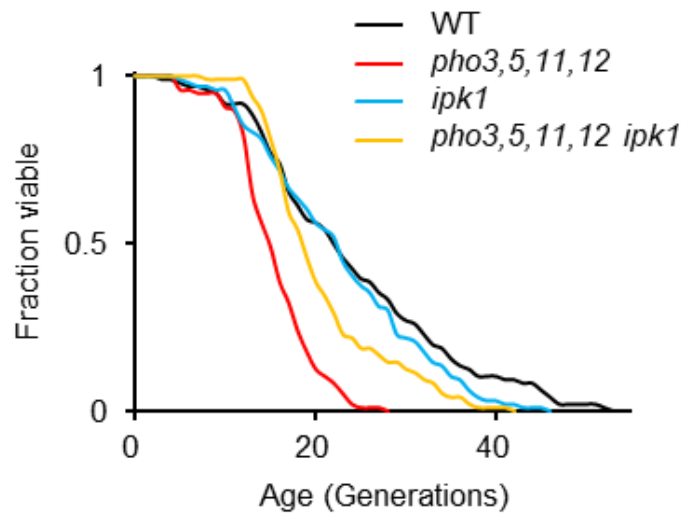


図 2-9. *IPK1* を破壊した 野生型株および APase 四重破壊株の分裂寿命曲線

高リン酸合成培地（無機リン酸濃度: 11 mM）において、 IP_5 から IP_6 への変換を担うキナーゼをコードする *IPK1* 遺伝子を破壊した株および APase 四重破壊株において *IPK1* を破壊した株の分裂寿命を測定した。野生型株と APase 四重破壊株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT（—、平均寿命 24.3 ± 11.0 ）、*pho3,5,11,12*（—、平均寿命 15.6 ± 4.4 ）、*ipk1*（—、平均寿命 23.0 ± 9.1 ）、*pho3,5,11,12 ipk1*（—、平均寿命 20.8 ± 6.7 ）

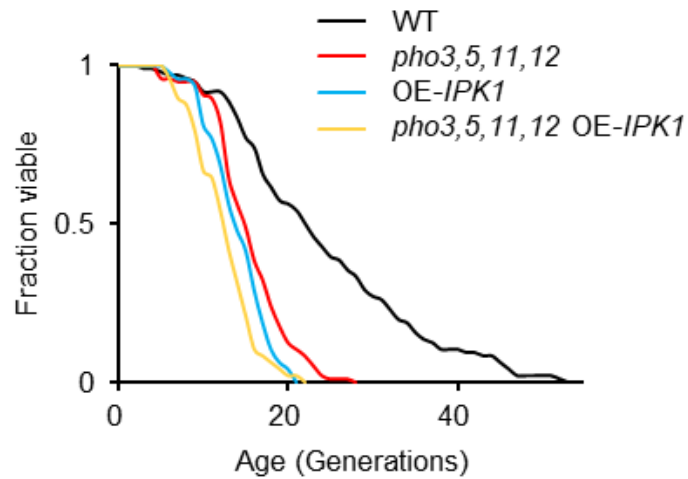


図 2-10. *IPK1* を過剰発現した野生型株および APase 四重破壊株の分裂寿命曲線

高リン酸合成培地（無機リン酸濃度: 11 mM）において、*IPK1* 遺伝子を過剰発現した株および APase 四重破壊株において *IPK1* を過剰発現した株の分裂寿命を測定した。野生型株と APase 四重破壊株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT（—、平均寿命 24.3 ± 11.0）、*pho3,5,11,12*（—、平均寿命 15.6 ± 4.4）、OE-*IPK1*（—、平均寿命 14.2 ± 3.5）、*pho3,5,11,12* OE-*IPK1*（—、平均寿命 12.6 ± 3.6）

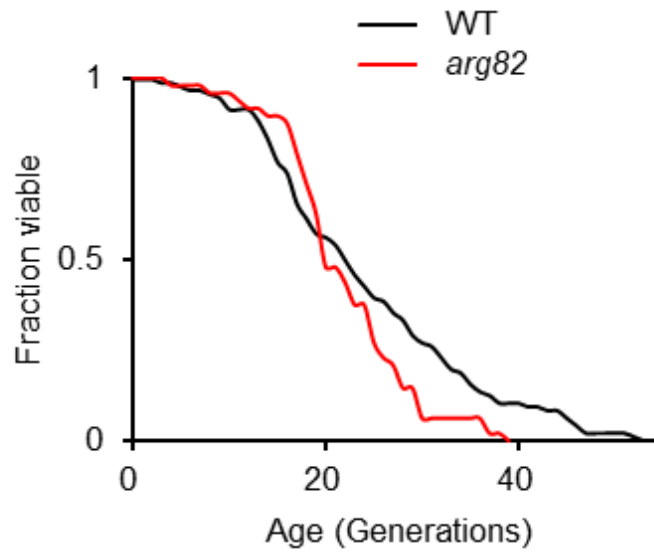


図 2-11. *ARG82* を破壊した株の分裂寿命曲線

高リン酸合成培地（無機リン酸濃度: 11 mM）において、 IP_3 から IP_4 、 IP_4 から IP_5 への変換を担うキナーゼをコードする *ARG82* 遺伝子を破壊した株の分裂寿命を測定した。野生型株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT（—、平均寿命 24.3 ± 11.0 ）、*arg82*（—、平均寿命 22.0 ± 6.9 ）

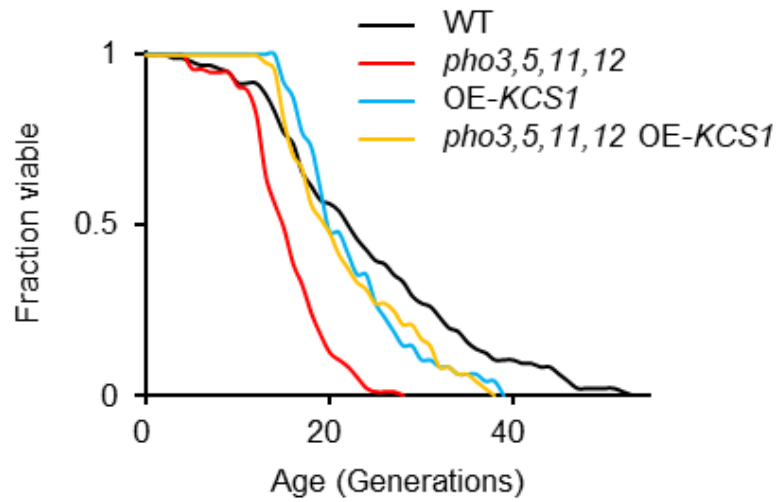


図 2-12. *KCS1* を過剰発現した野生型株および APase 四重破壊株の分裂寿命曲線

高リン酸合成培地（無機リン酸濃度: 11 mM）において、*KCS1* 遺伝子を過剰発現した株および APase 四重破壊株において *KCS1* を過剰発現した株の分裂寿命を測定した。野生型株と APase 四重破壊株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT (—、平均寿命 24.3 ± 11.0)、*pho3,5,11,12* (—、平均寿命 15.6 ± 4.4)、OE-*KCS1* (—、平均寿命 22.6 ± 6.2)、*pho3,5,11,12* OE-*KCS1* (—、平均寿命 22.0 ± 6.9)

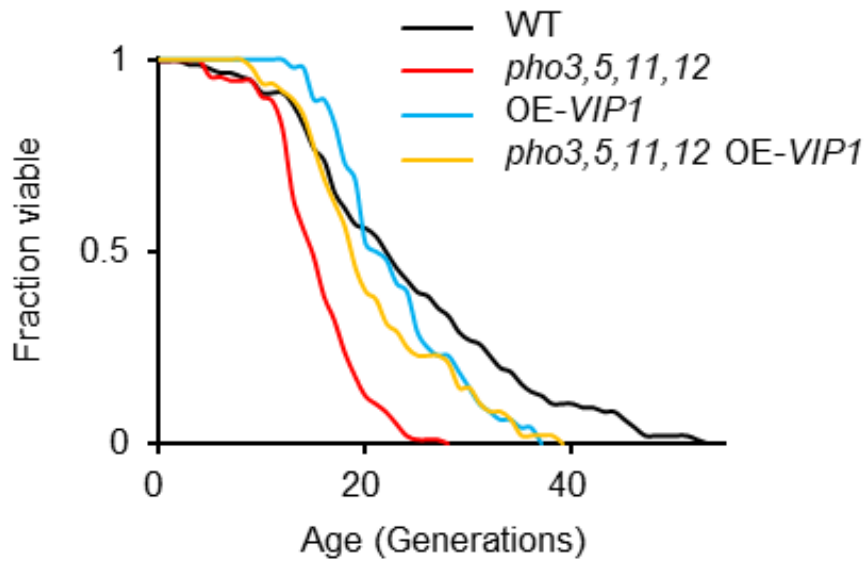


図 2-13. *VIP1* を過剰発現した野生型株および APase 四重破壊株の分裂寿命曲線

高リン酸合成培地（無機リン酸濃度: 11 mM）において、*VIP1* 遺伝子を過剰発現した株および APase 四重破壊株において *VIP1* を過剰発現した株の分裂寿命を測定した。野生型株と APase 四重破壊株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT（—、平均寿命 24.3 ± 11.0）、*pho3,5,11,12*（—、平均寿命 15.6 ± 4.4）、OE-*VIP1*（—、平均寿命 23.0 ± 6.1）、*pho3,5,11,12* OE-*VIP1*（—、平均寿命 20.9 ± 7.2）

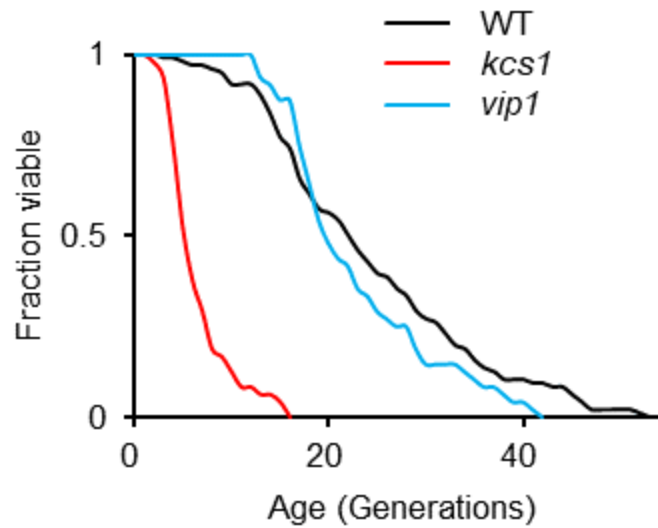


図 2-14. *KCS1* および *VIP1* を破壊した株の分裂寿命曲線

高リン酸合成培地（無機リン酸濃度: 11 mM）において、IP₆から IP₇、IP₇から IP₈ への変換を担うキナーゼをコードする *KCS1* および *VIP1* 遺伝子をそれぞれ破壊した株の分裂寿命を測定した。野生型株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT（—、平均寿命 24.3 ± 11.0）、*kcs1*（—、平均寿命 6.7 ± 3.2）、*vip1*（—、平均寿命 23.0 ± 7.7）

第4節 考察

APase 破壊株において、IP₆の合成キナーゼをコードする *IPK1* 遺伝子を破壊すると分裂寿命が回復し、野生型株において、*IPK1* を過剰発現すると分裂寿命が短縮された。これらの結果は、IP₆が分裂寿命の維持に関連する APase の新たな細胞内基質である可能性を遺伝学的に強く示唆している。しかし、*IPK1* を欠損させると、IP₅から作られる 5-ジホスホイノシトール 1,3,4,6-テトラキスホスフェートが増加することから (Saiardi, 2000)、イノシトールポリリン酸合成遺伝子の欠損による影響は、単一のイノシトールポリリン酸に限定されない可能性もある。従って、APase 破壊株の細胞内 IP₆および他の IP 量の確認が必要である。また、APase がどのようにして細胞内の代謝物にアクセスするかは明らかではないが、おそらく、ペリプラズム空間やその近傍で IP₆を脱リン酸化している可能性がある。

酵母では、IP₆は核から細胞質への mRNA の輸送に関与している (York, 1999)。哺乳類では、IP₆は DNA 依存性プロテインキナーゼ複合体に結合して DNA の二本鎖切断の修復を促進し (Hanakahi, 2000)、クラスリンアセンブリープロテイン 3 に結合してクラスリンケージの組み立てを阻害する (Norris, 1995)。従って、細胞内の IP₆は、タンパク質に結合し、その活性を制御することで寿命決定に関与している可能性がある。また、IP₆は、負電荷を帯びた 6 つのリン酸ラジカルをもつことから、カルシウムや亜鉛などの微量金属イオンに対して強いキレート作用をもつ。細胞内の 2 価の陽イオンをキレートすることで、IP₆は分裂寿命を維持する酵素や制御タンパク質の機能を阻害する可能性がある。Pho5p が IP₆から生成する主な生成物は、1,2,4,5,6-ペンタキスリン酸と 1,2,5,6-テトラキスリン酸である (Andlid, 2004)。これらのイノシトールポリリン酸は、イノシトールポリリン酸代謝経路で合成される中間体の 1,3,4,5,6-ペンタキスリン酸や 1,3,4,5-テトラキスリン酸とは異なる。従って、酵母の APase は、イノシトールポリリン酸合成の逆反応を触媒していないようである。注目すべきは、*kcs1* 破壊株では寿命が極端に短くなったのに対し、*vip1* 破壊株では通常の寿命を保っていたことである。この違いは、Kcs1p が C5 位で IP₆をリン酸化するのに対し、Vip1p は C1, C4, C6 位で IP₆をリン酸化すること (Mulugu, 2007; Shah, 2017; Steidle, 2016; Ye, 2013)、あるいは、Vip1p が Kcs1p とは異なり、IP₇に対するホスファターゼ活性を有することに起因するかもしれない (Dollins, 2020)。また、以前の研究で、私はリン酸飢餓応答遺伝子の過剰な発現が分裂寿命を短くすることを報告し

た (Nakajima, 2020)。Vip1p 由来の IP₇は、リン酸飢餓応答を活性化 (負の制御を抑制) することが知られており (Lee, 2007)、*kcs1* 破壊株では IP₇の生成は Vip1p に依存している。そのため、*kcs1* 破壊株では、IP₆の増加に加え、リン酸飢餓応答遺伝子の過剰な発現が起こり、加算的に寿命が短縮された可能性がある。

PI(4)P₁を産生する PI キナーゼ (Lsb6p, Stt4p) の過剰発現や、PI(4,5)P₂を産生する PIP キナーゼ (Mss4p) の過剰発現は、酵母の寿命に影響を与えなかった。したがって、PI(4)P₁と PI(4,5)P₂は、寿命の決定には関与しておらず、APase の基質ではないことが示唆された。一方、PI(4,5)P₂のリン酸化酵素 (Inp51p, Inp52p, Inp53p) は分裂寿命の決定に関与することが知られており、*inp51*と *inp53* 破壊株は長寿命であり、*inp52*破壊株は短寿命であった (Ives, 2000; Hacıoglu, 2010)。これらの結果は、PI リン酸化経路が分裂寿命の調節に関連していることを示している。*inp* 破壊株の寿命の違いは、他の PIP、おそらく PI(3)P₁または PI(3,5)P₂の脱リン酸化に起因すると考えられるが、これらの Inp ホスファターゼは、PI(4,5)P₂の 5 位のリン酸を優先的に加水分解する (Strahl, 2007)。現在までのところ、酵母の APase (またはそのオルソログ) の細胞内での役割については、まだ解明されていない。したがって、本研究は、ヒトやマウスの MINPP1 タンパク質のような高等真核生物の APase に関する研究を後押しする可能性がある。さらに、イノシトールポリリン酸と分裂寿命の関係を、特に APase 破壊株の細胞内 IP₆や関連する IP を定量化することで明らかにし、APase による分裂寿命維持の機構を解明する必要がある。

第3章 チアミンの過剰供給により酸性ホスファターゼ破壊株の短寿命は回復する

第1節 緒言

出芽酵母のもつ4つのAPase遺伝子のうち、*PHO5*、*PHO11*、*PHO12*遺伝子はリン酸飢餓によって発現誘導されるが、*PHO3*遺伝子はチアミン飢餓によって発現が誘導される (Toh-e, 1975; Lemire, 1985; Nosaka, 1989)。また、Pho3pは、細胞外のチアミンリン酸を脱リン酸化することにより細胞にチアミンと無機リン酸を供給すると考えられている (Nosaka, 1990)。

出芽酵母はチアミンを細胞外から取り込むだけでなく、生体内で新たに合成することができる (図 3-1)。チアミンの取り込みは、*Thi7p*、*Thi71p*、*Thi72p* の3つのチアミントランスポーターが担っている (Singleton, 1997; Enjo, 1997; Belenky, 2008)。チアミンの生合成では、まずヒドロキシエチルチアゾールおよびヒドロキシメチルピリミジンがそれぞれ作られる (Wightman, 2003; Rodríguez-Navarro, 2002; Praekelt, 1994; Nosaka, 1994; Llorente, 1999)。それらは *Thi6p* によって結合されてチアミン-リン酸 (TMP: Thiamine monophosphate) となり、脱リン酸化を経てチアミンとなる。その後、*Thi80p* によって活性型のチアミン二リン酸 (TDP: Thiamine diphosphate) となり、補酵素としてアルコール発酵や糖代謝に関与している (Hohmann, 1998)。

本章では、チアミンがAPaseによる分裂寿命制御に関与するかを検討した。まず、環境中のチアミン量がAPase破壊株の寿命に及ぼす影響について調べた。次に、補酵素であるチアミン二リン酸 (TDP) を生成するキナーゼ *THI80* 遺伝子を過剰発現し、APase破壊株の寿命への影響を調べた。最後に、チアミン依存性酵素をコードする遺伝子を過剰発現させ、APase破壊株の寿命への影響を検討した。

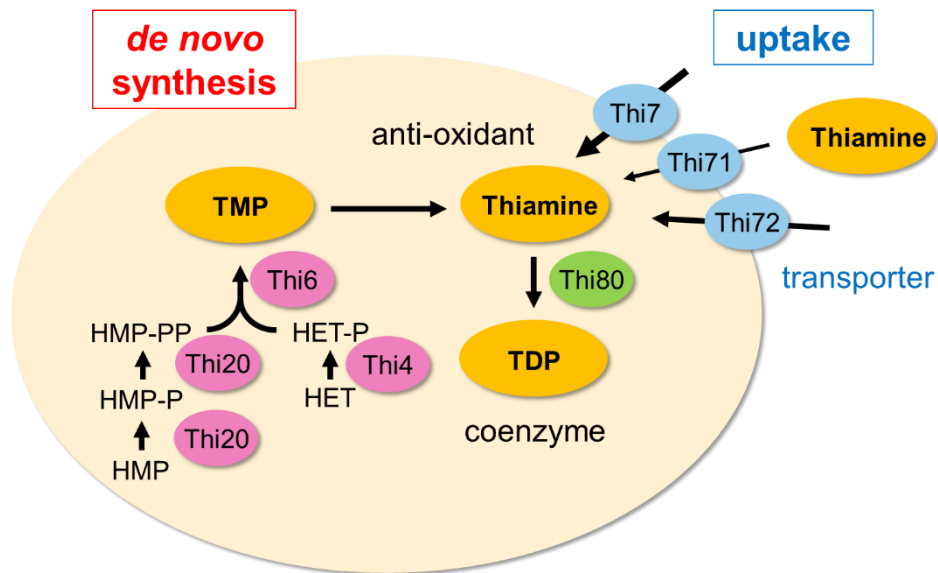


図 3-1. 出芽酵母におけるチアミンの合成と取り込み

チアミン生合成経路では、まずピリミジン部 (HMP-PP) とチアゾール部 (HET-P) がつくられ、Thi6p によって TMP が合成される。TMP は脱リン酸化されてチアミンとなり、Thi80p によって TDP がつくられる。また、チアミンは Thi7p、Thi71p、Thi72p によって細胞外から取り込まれる。活性型の TDP は糖・アミノ酸代謝の補酵素として働き、チアミンは抗酸化作用を有する。**HET**: 5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazole, **HMP**: 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine.

第2節 材料と方法

第1章および第2章で記述したものについては省略する。

使用菌株とプライマー

本章において用いた出芽酵母菌株を表3-1に示した。本章において使用したプライマーは表3-2に示した。

表 3-1 第3章で使用した菌株

Strain	Genotype
BY4742	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-APΔQ	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho11Δ::CgHIS3 pho12Δ::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-thi6	<i>MATa thi6Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-thi7H-71-72L	<i>MATa thi7Δ::CgHIS3 thi71Δ::kanMX thi72Δ::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-TpTHI80	<i>MATa TDH3p-THI80::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-APΔQ-TpTHI80	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho11Δ::CgHIS3 pho12Δ::CgLEU2 TDH3p-THI80::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-thi3	<i>MATa thi3Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-APΔQ-thi3U	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho11Δ::CgHIS3 pho12Δ::CgLEU2 thi3Δ::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-TpPDA1	<i>MATa TDH3p-PDA1::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-APΔQ-TpPDA1	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho11Δ::CgHIS3 pho12Δ::CgLEU2 TDH3p-PDA1::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-TpPDB1	<i>MATa TDH3p-PDB1::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>
BY2-APΔQ-TpPDB1	<i>MATa pho3-pho5Δ::kanMX pho11Δ::CgHIS3 pho12Δ::CgLEU2 TDH3p-PDB1::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>

表 3-2 第 3 章で使用したプライマー

Name of primers	Sequence	Gene
For construction of gene knockout and overexpression strain		
THI80KOf	ATTGGTCACAAAGAACAATAAAAAGCTGAATAT CACTGCTCACAGGAAACAGCTATGACC	<i>THI80</i>
TDH3p- THI80r	TTTAAATACGTTTCAGGATTTTCAATACACTCCTCG CTCATTTTGTGGTTTATGTGTGTT	<i>THI80</i>
THI7KOf	ATCATTTAAAGGACTGTAGAGCCAATTGCATTATA TCAATCACAGGAAACAGCTATGACC	<i>THI7</i>
THI7KOr	AAATTTTATTCTTAATTATTTTGGCAATTTTATTTTC CCAGTTGTAAAACGACGGCCAGT	<i>THI7</i>
THI72KOf	ATATACTATCAAGCAAAAAAACTCTAGCATTAC ACCATTACAGGAAACAGCTATGACC	<i>THI72</i>
THI72KOr	TGAACACTAAGTATGATCATTTTATTAGGTTTTTT GCTCAGTTGTAAAACGACGGCCAGT	<i>THI72</i>
THI3KOf	AAGAACATAACTACTAAAACGCACCGTCGTCATT CTGAAGCACAGGAAACAGCTATGACC	<i>THI3</i>
THI3KOr	TAATCATGAGGGTCCCTGGTAGTAGGGCGGAGA GATCAGAGTTGTAAAACGACGGCCAGT	<i>THI3</i>
PDA1KOf	GTTGGATACAGCAATAAGAAAGGAAACCACATTT GTGCCACACAGGAAACAGCTATGACC	<i>PDA1</i>
TDH3p- PDA1r	CCAATTGTGATGGTTGGCGTTTGAATGAAGCAGC AAGCATTTTGTGGTTTATGTGTGTT	<i>PDA1</i>
PDB1KOf	TTTAGTAAGTTCTTTTACTTTTGCAATAATTTTGTT CAACCACAGGAAACAGCTATGACC	<i>PDB1</i>
TDH3p- PDB1r	CAACATTTCTGGCCAATGATGTTGGCAGTCTGGA AAACATTTTGTGGTTTATGTGTGTT	<i>PDB1</i>
KO-TDH3pf	GTTTTACAACAACCTTATTTAGTCAAAAAATTAG C	<i>TDH3</i>
KO-TDH3pr	TGACTAAATAAAGTTGTTGTAAAACGACGGCCA GT	-
For confirmation of gene knockout and overexpression strain		
THI6Cr	TCGAAAAACTGACACCAAAGCAAGAGGAAG	<i>THI6</i>
THI7Cr	AGGACTAGTTAGACGCTGGCAATAAGATTG	<i>THI7</i>
THI71Cr	CAGTAAAGTATTTGCAGCTGAGGATCGATC	<i>THI71</i>
THI72Cr	CCAACAAGCTTAATAGTAGTGTTTCCTGGG	<i>THI72</i>
THI80RTf	TCAAGCTTTGTTACATGACTCCAAC	<i>THI80</i>
THI80RTr	TCCAATAGGCAACAACCCAC	<i>THI80</i>

THI3Cr	GATATGTAGCAGACATAGATGAGGCTACAG	<i>THI3</i>
PDA1RTf	TCCAGGCTTCTATGGTGGTAATG	<i>PDA1</i>
PDA1RTTr	GCGTCCTCGTTCTTGTATTGG	<i>PDA1</i>
PDB1RTf	GACCGTGATGATGATGTCTTCC	<i>PDB1</i>
PDB1RTTr	CACCGAACCTGTCCAATAAACC	<i>PDB1</i>

HPLC による細胞内チアミンの定量

2 mL の液体培地に酵母を植菌し、30°C で一晚振盪培養した。その培養液を 100 mL の液体培地に初期 OD₆₀₀=0.05 となるように植菌し、OD₆₀₀=1.0±0.2 になるまで 30°C で振盪培養した。1 本の 50 mL ファルコンチューブで 2 回に分けて遠心分離 (3,500 rpm、5min) し、集菌した。その後、25 mL の PBS(-) で、3 回洗浄した。そして、細胞に 500 μL の PBS(-) に懸濁した。その細胞懸濁液を 500 μL のジルコニアビーズを加えたスクリーキャップ付き 2 mL ビーズ破碎装置用サンプルチューブ (TOMY) に移し、Micro smash MS-100R にて細胞破碎 (3,000 rpm、300 sec、4°C を 2 回) 繰り返した。細胞破碎後、遠心分離 (14,000 rpm、5 min、4°C) して上清を回収し、細胞抽出液とした。細胞抽出液 100 μL をコスモナイスフィルター W (ナカライテスク) に通し、サンプルを調整した。

高速液体クロマトグラフィーシステム (Valve / Event LC-Net II / ADC、Pump PU-4185-Binary、Column Oven CO 4060、Photo Diode Array Detector ND-4015、UV Detector UV-4075; 日本分光) を用いた。固定相には、ポリアミノ充填 HPLC カラム (Asahipack、NH2P-50-4E 内径 4.6 mm×250 mm; Shodex) を用い、移動相には、pH 8.6 リン酸カリウム緩衝液 (90 mM) - アセトニトリル混合物 (40:60、v/v) を使用した。流速 1.2 mL/min で無勾配溶出し、248 nm の波長を検出した。チアミン標品、および、細胞抽出液+チアミン標品の測定によって、チアミンのピークを同定した。チアミン標品で検量線を作成し、細胞抽出液におけるチアミン量を測定した。

第3節 結果

第1項 チアミンを過剰添加すると APase 破壊株の寿命は回復する

出芽酵母のもつ4つの APase 遺伝子のうち、*PHO3* 遺伝子はチアミン飢餓によって発現が誘導される (Nosaka, 1990)。そこで、まず初めに、細胞外のチアミンが APase 破壊株の分裂寿命に影響するか調べた。高リン酸合成培地には、通常 $0.6 \mu\text{M}$ のチアミンが含まれている。そこで、チアミンを一切含まない ($0 \mu\text{M}$) 高リン酸合成培地および、過剰にチアミンを添加した ($6 \mu\text{M}$ [通常の 10 倍]) 高リン酸合成培地において、APase 破壊株の分裂寿命を測定した。チアミンを含まない培地では、APase 破壊株の寿命は通常のチアミン濃度の培地での寿命と同程度の短寿命であり、野生型株の寿命にも影響しなかった (図 3-2、表 3-3)。チアミンを過剰に加えると、APase 破壊株の寿命は野生型株程度にまで回復したが、野生型株の分裂寿命は延長されなかった (図 3-2、表 3-3)。従って、過剰なチアミンは APase 破壊株の短寿命を抑圧することが明らかとなった。

APase 破壊株は、過剰なチアミン添加により寿命が回復したため、細胞内チアミン量が減少していると予想した。そのため、まず初めに、細胞内チアミンの減少が分裂寿命に関与するかを検討した。チアミンは合成および取り込みによって獲得されるため、遺伝子破壊によりそれぞれの経路を断つことで、細胞内チアミン量を低下させた株の作製を試みた。チアミン合成の要である *THI6* 遺伝子を破壊しても、細胞内チアミン量は減少せず、分裂寿命は野生株程度であった (図 3-3,4、表 3-3)。チアミントランスポーターをコードする *THI7*、*THI71*、*THI72* 遺伝子の三重破壊株は細胞内チアミン量が減少し、分裂寿命が短くなった (図 3-3,4、表 3-3)。さらに、培地にチアミンを過剰に添加することで、*thi7 thi71 thi72* 三重破壊株の寿命は野生型株程度にまで回復した (図 3-5、表 3-3)。これらの結果から、細胞内チアミン量が減少すると短寿命となると結論した。

次に、APase 破壊株における細胞内チアミン量の減少を予想したが、APase 破壊株の細胞内チアミン量は、細胞外チアミン量に関わらず、野生型と同程度であった (図 3-6)。細胞外のチアミンが過剰になると、APase 破壊株でも野生型でも、細胞内のチアミン濃度が劇的に増加していた。これらの結果は、チアミンが APase の欠損による寿命短縮に対して、おそらく間接的に有益な効果をもたらすことを示している。

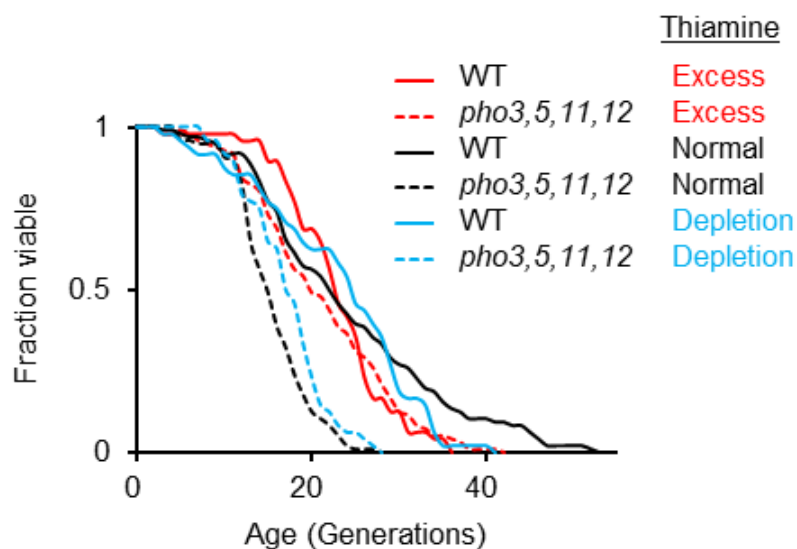


図 3-2. 高チアミンおよび低チアミン培地における APase 四重破壊株の分裂寿命曲線

高リン酸合成培地にチアミンを過剰（10 倍）に添加した培地（チアミン濃度: 6 μM ）および、高リン酸合成培地からチアミンを除いた培地（チアミン濃度: 0 μM ）において、野生型株と APase 四重破壊株の分裂寿命を測定した。通常の高リン酸合成培地（Thiamin: 0.6 μM ）での野生型株、APase 四重破壊株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT、Excess Thiamine (—、平均寿命 23.0 \pm 6.1)、WT、Normal Thiamine (—、平均寿命 24.3 \pm 11.0)、WT、Depleted Thiamine (—、平均寿命 23.0 \pm 9.1)、*pho3,5,11,12*、Excess Thiamine (—破線、平均寿命 21.2 \pm 8.1)、*pho3,5,11,12*、Normal Thiamine (—破線、平均寿命 15.6 \pm 4.4)、*pho3,5,11,12*、Depleted Thiamine (—破線、平均寿命 17.4 \pm 4.4)

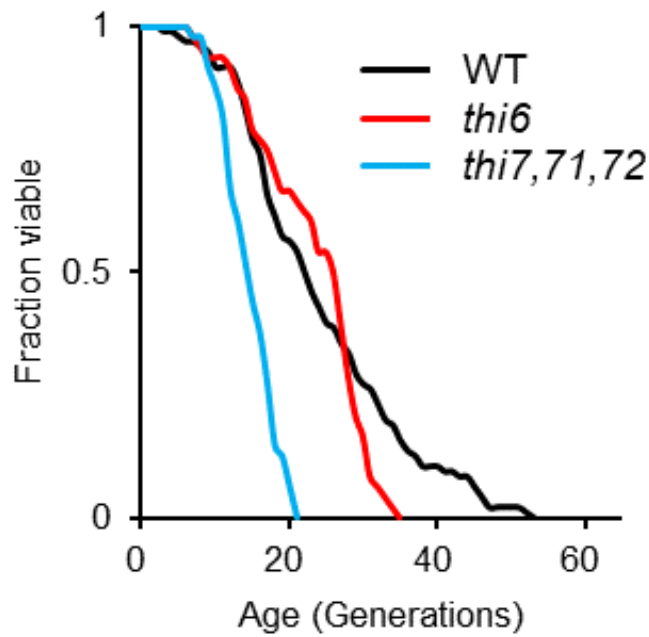


図 3-3. 高リン酸合成培地における *thi6* 遺伝子破壊株および *thi7, 71, 72* 遺伝子三重破壊株の寿命曲線

高リン酸合成培地（無機リン酸濃度: 11 mM）において、*thi6* 遺伝子破壊株と *thi7, 71, 72* 遺伝子破壊株の分裂寿命を測定した。野生型株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT（—、平均寿命 24.3 ± 11.0）、*thi6*（—、平均寿命 23.5 ± 7.5）、*thi7, 71, 72*（—、平均寿命 14.8 ± 3.6）

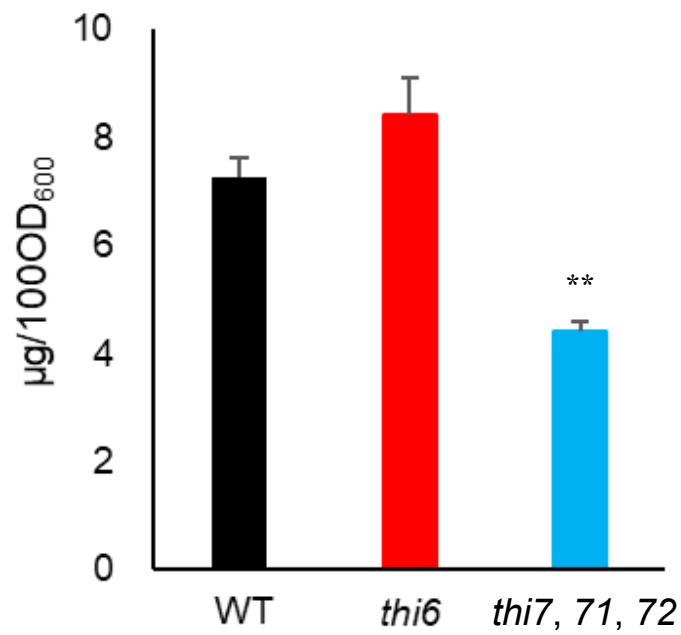


図 3-4. 高リン酸合成培地における *thi6* 遺伝子破壊株および *thi7, 71, 72* 遺伝子三重破壊株の細胞内チアミン量

高リン酸合成培地において培養した酵母細胞の細胞内チアミン量を HPLC によって定量した。1 つの菌株について 3 回測定し、その平均と、標準誤差を示した。

Student-T 検定から野生型株に対する有意差を求めた。(**: $p < 0.01$)

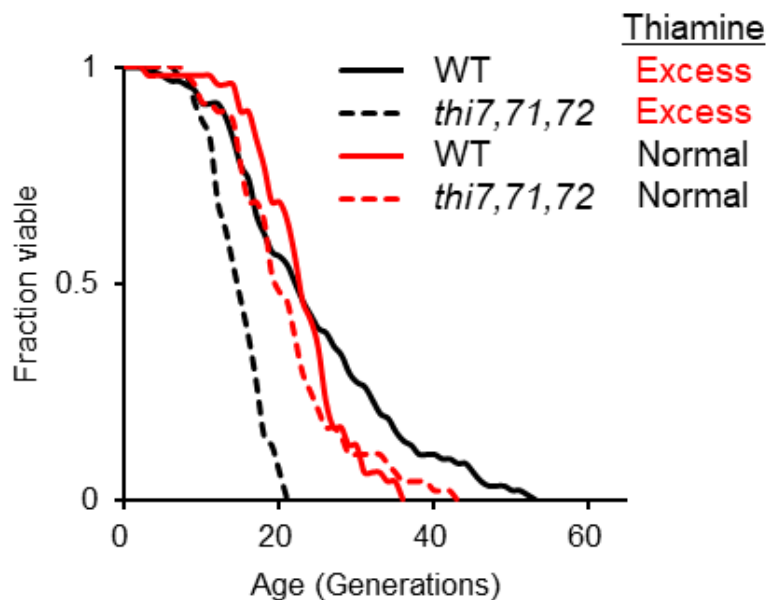


図 3-5. 高チアミン培地におけるチアミントランスポーター破壊株の分裂寿命曲線

高リン酸合成培地にチアミンを過剰（10 倍）に添加した培地（チアミン濃度: 6 μM ）および高リン酸合成培地（チアミン濃度: 0.6 μM ）において、チアミントランスポーター三重破壊株の分裂寿命を測定した。野生型株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT、Excess Thiamine (—、平均寿命 23.0 ± 6.1)、WT、Normal Thiamine (—、平均寿命 24.3 ± 11.0)、*thi7,71,72*、Excess Thiamine (—破線、平均寿命 21.2 ± 7.6)、*thi7,71,72*、Normal Thiamine (—破線、平均寿命 14.8 ± 3.6)

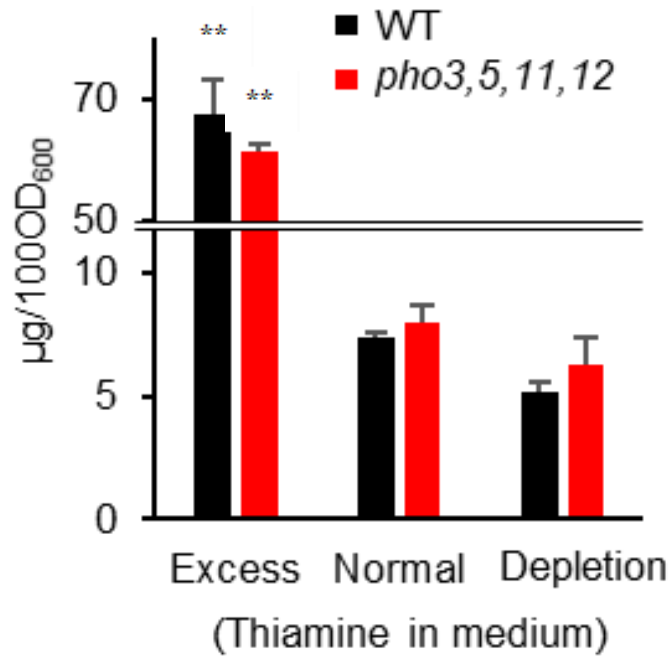


図 3-6. APase 四重破壊株の細胞内チアミン量

高リン酸合成培地にチアミンを過剰（10 倍）に添加した培地（チアミン濃度: 6 μM ）、高リン酸合成培地（チアミン濃度: 0.6 μM ）、高リン酸合成培地からチアミンを除いた培地（チアミン濃度: 0 μM ）において、野生型株と APase 四重破壊株の細胞内チアミン量を HPLC によって定量した。1 つの菌株について 3 回測定し、その平均と、標準誤差を示した。Student-T 検定によって通常のチアミン濃度で培養した野生型株に対する有意差を求めた。（**: $p < 0.01$ ）

表 3-3 第 3 章における分裂寿命測定結果

Relevant genotype	Averaged lifespan (Generations)	±	SD	Maximum lifespan (Generations)	<i>P</i> value ^{a)}
Synthetic high-Pi medium (Normal thiamine: 0.6 μM)					
Wild type	24.3	±	11.0	53	-
<i>pho3 pho5 pho11 pho12</i>	15.6	±	4.4	28	7.3E-10
<i>thi6</i>	23.5	±	7.4	35	9.1E-01
<i>thi7 thi71 thi72</i>	14.8	±	3.6	21	2.3E-08
<i>TDH3p-THI80</i>	23.2	±	9.0	41	7.0E-01
<i>pho3 pho5 pho11 pho12 TDH3p-THI80</i>	21.6	±	7.4	41	3.0E-01
<i>thi3</i>	23.4	±	8.1	42	9.8E-01
<i>pho3 pho5 pho11 pho12 thi3</i>	17.5	±	5.2	31	1.3E-04
<i>pho3 pho5 pho11 pho12 TDH3p-PDA1</i>	21.7	±	7.3	41	3.1E-01
<i>pho3 pho5 pho11 pho12 TDH3p-PDB1</i>	19.8	±	7.8	39	2.5E-02
Synthetic high-Pi medium (Excess thiamine: 6 μM)					
Wild type	23.0	±	6.1	36	9.2E-01
<i>pho3 pho5 pho11 pho12</i>	21.2	±	8.1	42	1.1E-01
<i>thi7 thi71 thi72</i>	21.2	±	7.6	43	1.8E-01
Synthetic high-Pi medium (Depleted thiamine: 0 μM)					
Wild type	23.2	±	9.1	41	9.8E-01
<i>pho3 pho5 pho11 pho12</i>	17.4	±	4.7	28	2.9E-04

a) Wilcoxon rank-sum 検定を用いて、野生型株 BY4742 に対する *p* 値を算出した。TDH3p-は過剰発現 (OE) である。

第2項 *THI80* 遺伝子を過剰発現すると APase 破壊株の寿命は回復する

細胞外からのチアミンの過剰供給が APase 破壊株の分裂寿命を回復させたため、細胞内における活性型チアミン二リン酸 (TDP) の増強によっても APase 破壊株の分裂寿命が回復するか検討した。チアミンは、細胞内でチアミンピロホスホキナーゼ Thi80p によって補酵素である TDP に変換される (Nosaka, 1993)。*THI80* 遺伝子を過剰発現させると、通常チアミン培地において APase 破壊株の寿命が野生型程度にまで回復した (図 3-7、表 3-3)。野生型株における *THI80* 遺伝子の過剰発現は寿命を延長することはなかった。このことから、細胞内の TDP の増加が APase 破壊株の短寿命の抑圧に関与することが示された。

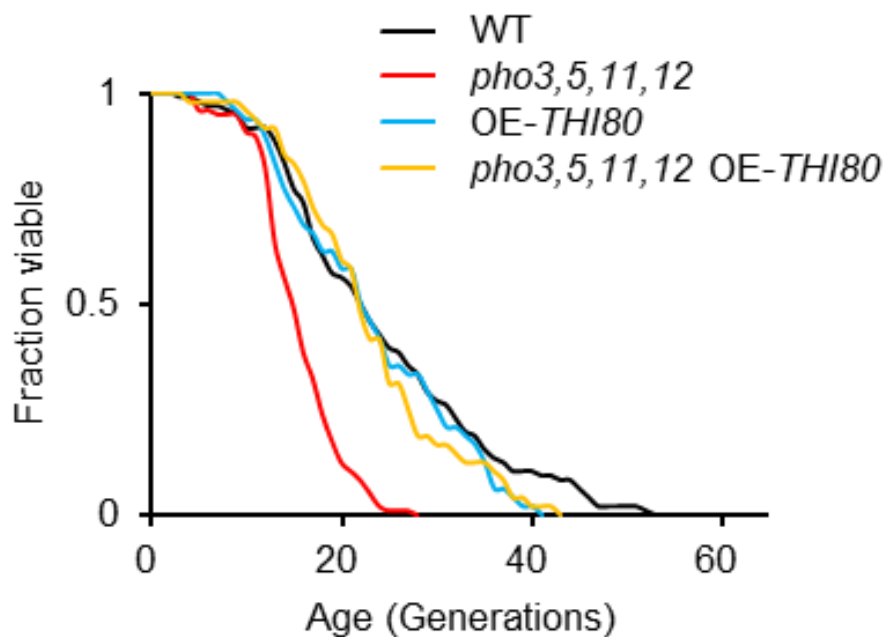


図 3-7. 合成培地における *THI80* 遺伝子過剰発現株の分裂寿命曲線

高リン酸合成培地において、チアミンからチアミンニリン酸に変換するキナーゼをコードする *THI80* 遺伝子を過剰発現した株および APase 破壊株において *THI80* を過剰発現した株の分裂寿命を測定した。野生型株および APase 四重破壊株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT (—、平均寿命 24.3 ± 11.0)、*pho3,5,11,12* (—、平均寿命 15.6 ± 4.4)、OE-*THI80* (—、平均寿命 23.2 ± 9.0)、*pho3,5,11,12* OE-*THI80* (—、平均寿命 21.6 ± 7.4)

第3項 *PDA1*あるいは*PDB1* 遺伝子を過剰発現すると APase 破壊株の寿命は回復する

TDP は補酵素として糖やアミノ酸の代謝やアルコール発酵に関与する。また、TDP は転写活性化因子である Thi3p と結合して不活性化し、チアミン代謝関連の *THI* 遺伝子群の転写を抑制する (Nosaka, 2005; Nishimura, 1992)。まず初めに、培地へのチアミンの過剰添加や *THI80* 遺伝子の過剰発現により増加した TDP が *THI* 遺伝子群の発現抑制を介して APase 破壊株の寿命を回復させる可能性を考えた。この場合、*THI3* 遺伝子の破壊は、過剰なチアミン補給による寿命への影響を模倣すると予想された。しかし、*THI3* 遺伝子を欠失させても、APase 破壊株の短命は回復しなかった (図 3-8、表 3-3)。次に、TDP が TDP 依存性の代謝酵素の活性化を介して、APase 破壊株の寿命を回復させている可能性について検討した。まず、APase 破壊株と野生型株を通常および過剰なチアミン条件下で培養し、¹H-NMR メタボローム解析を行った。主成分分析のスコアプロットでは、チアミン過剰培地で培養した APase 破壊株のクラスターのみが他のクラスターと明確に分離した (図 3-9)。このことは、過剰なチアミンの添加が APase 破壊株の代謝を変化させていることを示しており、細胞内 TDP の増加による TDP 依存性酵素の活性化が APase 破壊株の短寿命を抑制している可能性が示された。

11 個ある TDP 依存性酵素遺伝子のうち、寿命決定に関与するものを探索したところ、ピルビンデヒドロゲナーゼの構成サブユニットをコードする *PDA1* あるいは *PDB1* 遺伝子を破壊すると分裂寿命が短くなることが報告されていた (Schleit, 2013)。そのため、*PDA1* もしくは *PDB1* を過剰発現したところ、APase 破壊株の分裂寿命が回復した (図 3-10、表 3-3)。これらの結果から、チアミンはおそらく糖代謝酵素の活性を通じて、分裂寿命の維持に貢献することが示された。

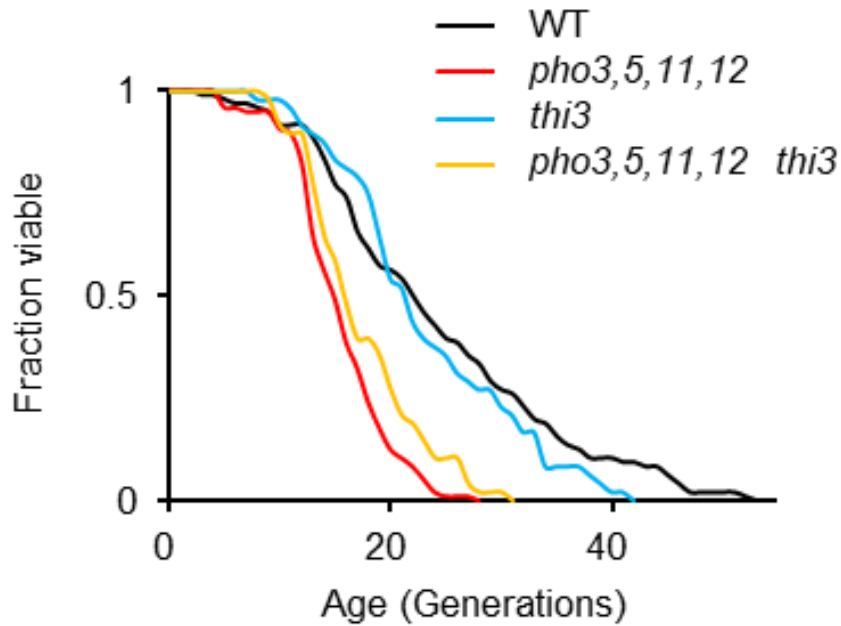


図 3-8.合成培地における *thi3* 遺伝子破壊株の分裂寿命曲線

高リン酸合成培地において、野生型株の *THI3* を破壊した株および APase 四重破壊株の *THI3* を破壊した株の分裂寿命を測定した。野生型株および APase 四重破壊株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT (—、平均寿命 24.3 ± 11.0)、*pho3,5,11,12* (—、平均寿命 15.6 ± 4.4)、*thi3* (—、平均寿命 23.4 ± 8.1)、*pho3,5,11,12 thi3* (—、平均寿命 15.3 ± 6.2)

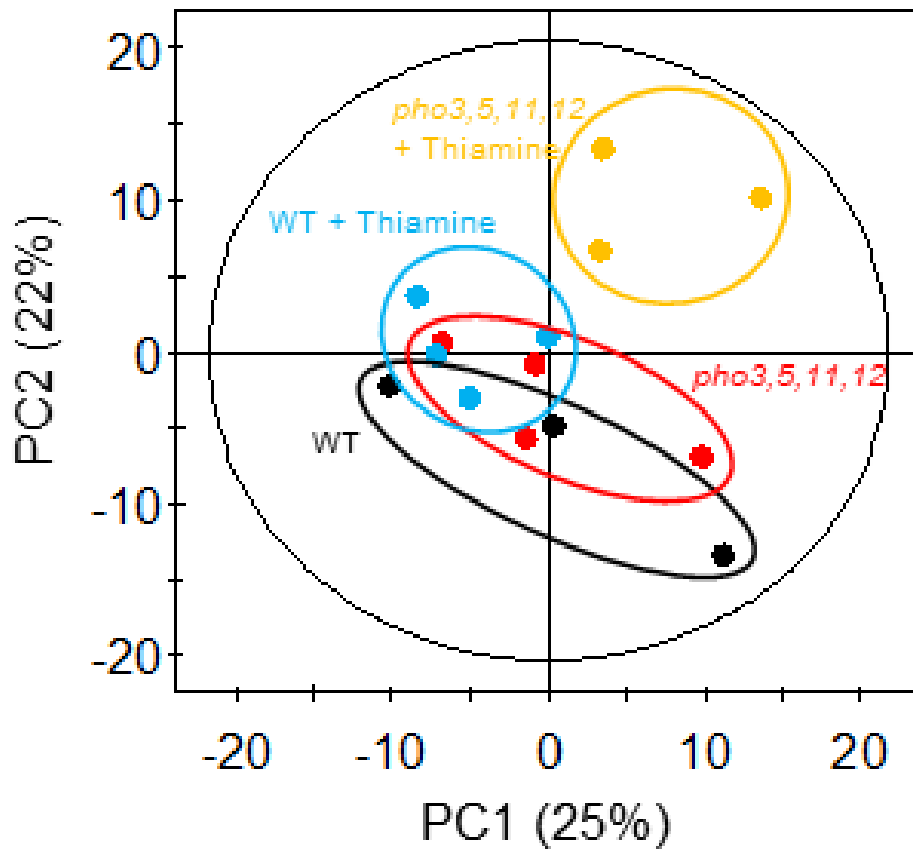


図 3-9. チアミンの過剰添加時の野生型株および APase 四重破壊株の代謝プロファイル

高リン酸合成培地にチアミンを過剰（10 倍）に添加した培地（チアミン濃度: 6 μM ）および高リン酸合成培地（チアミン濃度: 0.6 μM ）において培養した酵母を用いた $^1\text{H-NMR}$ メタボロームデータの主成分分析から野生型株と APase 四重破壊株の代謝プロファイルを比較した。

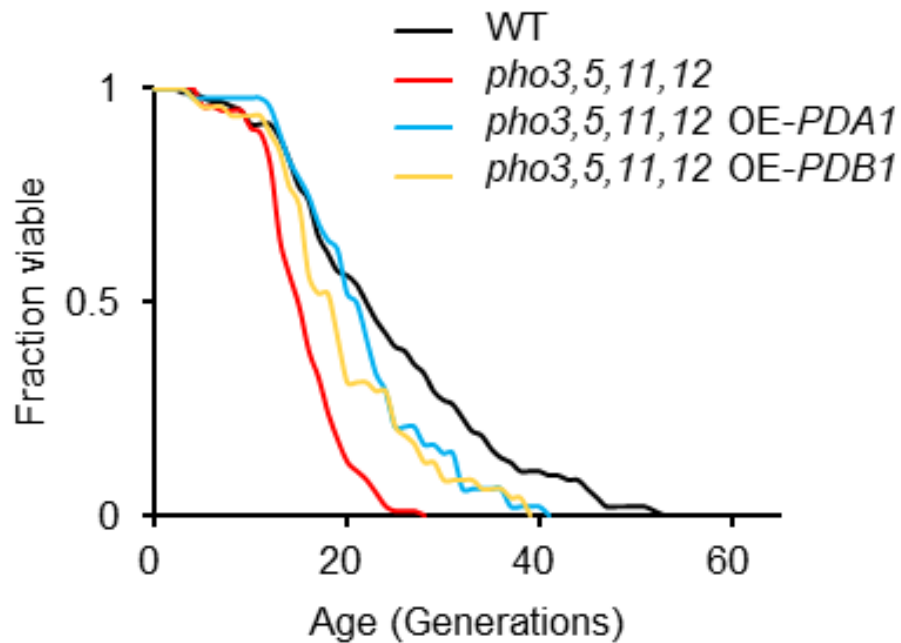


図 3-10. 合成培地における *PDA1* あるいは *PDB1* 遺伝子過剰発現株の分裂寿命曲線

高リン酸合成培地において、ピルビンデヒドロゲナーゼの構成サブユニットをコードする *PDA1* あるいは *PDB1* 遺伝子を過剰発現した APase 破壊株の分裂寿命を測定した。野生型株および APase 四重破壊株は以前測定したものを使用した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットしたグラフを示した。WT (—、平均寿命 24.3 ± 11.0)、*pho3,5,11,12* (—、平均寿命 15.6 ± 4.4)、*pho3,5,11,12* OE-*PDA1* (—、平均寿命 21.7 ± 7.3)、*pho3,5,11,12* OE-*PDB1* (—、平均寿命 19.8 ± 7.8)

第4節 考察

チアミンの過剰供給は細胞内チアミンを増加させ、APase 四重破壊株の短寿命を抑制した。さらに、TDP 合成酵素遺伝子 *THI80* の過剰発現によっても APase 破壊株の寿命は回復したため、細胞内の TDP の増加が APase 破壊株の寿命回復に重要であると考えた。さらに、TDP 依存性酵素のうち、ピルビンデヒドロゲナーゼ複合体の構成因子をコードする *PDA1* もしくは *PDB1* 遺伝子の過剰発現が APase 破壊株の寿命を回復させることを見出した。TDP 依存性酵素の過剰発現によっても、TDP 合成酵素の過剰発現と同様に寿命が回復したため、細胞内 TDP 量の増加が APase 破壊株の寿命回復に重要であることは強く支持されている。加えて、本研究では APase 破壊株における短寿命の回復に貢献する TDP 依存性酵素として、ピルビンデヒドロゲナーゼを同定した。

ショウジョウバエにおいて、ピルビンデヒドロゲナーゼを活性化させると好氣的な解糖から酸化的なリン酸化へと代謝が変化し、敗血症モデルの寿命が改善することが報告されている (Bakalov, 2020)。従って、チアミンはピルビン酸代謝の運命決定を介して、分裂寿命の回復に貢献しているかもしれない。また、APase 破壊株ではピルビン酸がうまく代謝できていない可能性がある。取得できる老化細胞には限界があるため、本研究では、対数増殖期の野生型株と APase 破壊株の代謝プロファイルを比較した。そのため、老化した APase 欠損細胞では代謝変化が確認できるかもしれない。

チアミントランスポーターの破壊は細胞内のチアミン量を減少させ、寿命を短縮した。これまで、チアミンの減少が寿命を短縮させる報告はない。従って、本研究によってチアミンが寿命決定に重要な因子であることが明らかとなった。今後は、チアミンによる APase 破壊株の寿命抑制機構の解析によって、チアミンが寿命にもたらす有益な効果について解析する他、チアミン依存性酵素の破壊や過剰発現によって、寿命の維持や延長につなげられる可能性がある。

結論

1. 酸性ホスファターゼは分裂寿命の維持に必要である。
2. イノシトール六リン酸の合成酵素遺伝子 *IPK1* を破壊すると酸性ホスファターゼ破壊株の短寿命は回復する。
3. チアミンは分裂寿命の維持に貢献する。

総合考察

これまで、出芽酵母の分泌型ホスファターゼ (APase) は、細胞外の有機リン酸化化合物を脱リン酸化し、細胞に無機リン酸を供給すると考えられていた。しかし、本研究の第 1 章では、APase の細胞内における新たな役割として、分裂寿命の維持に必要であることを明らかにした。第 2 章において、APase が細胞内イノシトール六リン酸 (IP₆) の脱リン酸化を介して分裂寿命の維持に貢献する可能性が強く示された。第 3 章では、過剰なチアミンがチアミン二リン酸 (TDP) 依存性酵素の活性化を介して、APase 破壊株の短寿命に対し有益な効果をもつこと、そして、細胞内チアミンの減少が分裂寿命を短縮することを見出した。現在のところ、IP₆ とチアミンの関連については明らかになっていない。しかし、これまでの結果から、おそらく細胞内 IP₆ の増加が APase 破壊株の短寿命の原因であり、チアミンは短寿 APase 破壊株の短寿命を代謝調節によって間接的に抑圧していると考えた。本研究において、細胞内の IP₆ および TDP 量の定量には至っていない。そのため、今後は、細胞内の IP₆ および関連 IP や、TDP を定量し、APase を介した分裂寿命の維持機構についてより理解する必要がある。また、IP₆ やチアミンがどのように分裂寿命に関与するのか、また、IP₆ とチアミンの関連について調査することで、APase による寿命制御だけでなく、未知の寿命の決定要因の解明に繋がることが期待される。

謝辞

本研究の遂行と博士論文の作製にあたり、多くの方々にご協力いただきましたことを心よりお礼申し上げます。直接のご指導ならびにご教示を賜りました長浜バイオ大学大学院 向 由起夫 教授には深く感謝いたしております。研究の議論に貴重な時間を割いてくださり、数多くのご助言や暖かい激励をいただきましたことに、重ねてお礼申し上げます。

長浜バイオ大学大学院 蔡 晃植 教授、中村 肇伸 教授には多くのご助言を承りましたことに深く感謝いたします。

長浜バイオ大学大学院 環境微生物学研究室に在籍する皆様には大変お世話になりました。貴重なご助言をいただき、様々な議論をしてくださいましたことに感謝しております。

最後に、4年間の大学生活に加えて博士課程前期課程の2年間、そして後期課程の3年間と、長い研究生活を暖かく見守り支援して下さった両親に心から感謝の意を表して謝辞といたします。

論文目録

Secreted acid phosphatases maintain replicative lifespan via inositol polyphosphate metabolism in budding yeast

Toshio Nakajima, Shun Hosoyamada, Takehiko Kobayashi and Yukio Mukai
FEBS Letters. 2022. 596(2):189-198

参考文献

Cyclin-dependent kinase Pho85p and its cyclins are involved in replicative lifespan through multiple pathways in yeast

Toshio Nakajima, Tsubasa Maruhashi, Takaaki Morimatsu and Yukio Mukai
FEBS Letters. 2020. 594(7):1166-1175

引用文献

Andlid, T.A., Veide, J. and Sandberg, A.S. (2004). Metabolism of extracellular inositol hexaphosphate (phytate) by *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* **97**, 157-69.

Andreeva, N., Ledova, L., Ryasanova, L., Kulakovskaya, T. and Eldarov, M. (2019). The acid phosphatase Pho5 of *Saccharomyces cerevisiae* is not involved in polyphosphate breakdown. *Folia Microbiol (Praha)* **64**, 867-873.

Bakalov, V. et al. (2020). Dichloroacetate-induced metabolic reprogramming improves lifespan in a *Drosophila* model of surviving sepsis. *PLoS One* **15**, e0241122.

Belenky, P.A., Moga, T.G. and Brenner, C. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* YOR071C encodes the high affinity nicotinamide riboside transporter Nrt1. *J Biol Chem* **283**, 8075-9.

Bergwitz, C. (2012). Dietary phosphate modifies lifespan in *Drosophila*. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 3399-406.

Bergwitz, C. et al. (2013). Genetic determinants of phosphate response in *Drosophila*. *PLoS One* **8**, e56753.

Bru, S. et al. (2016). Polyphosphate is involved in cell cycle progression and genomic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **101**, 367-80.

Bun-Ya, M., Nishimura, M., Harashima, S. and Oshima, Y. (1991). The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol Cell Biol* **11**, 3229-38.

Carter, D.O., Yellowlees, D. and Tibbett, M. (2007). Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. *Naturwissenschaften* **94**, 12-24.

Chi, H. et al. (1999). Multiple inositol polyphosphate phosphatase: evolution as a distinct group within the histidine phosphatase family and chromosomal localization of the human and mouse genes to chromosomes 10q23 and 19. *Genomics* **56**, 324-36.

Dae-Gwan Yi, Sujin Hong, Won-Ki Huh. (2018). Mitochondrial dysfunction reduces yeast replicative lifespan by elevating RAS dependent ROS production by the ER localized NADPH oxidase Yno1. *PLoS One* **18**, 13

Defossez, P.A., Prusty, R., Kaeberlein, M., Lin, S.J., Ferrigno, P., Silver, P.A., Keil, R.L. and Guarente, L. (1999). Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells. *Mol Cell* **3**, 447-55.

Dollins, D.E., Bai, W., Fridy, P.C., Otto, J.C., Neubauer, J.L., Gattis, S.G., Mehta, K.P.M. and York, J.D. (2020). Vip1 is a kinase and pyrophosphatase switch that regulates inositol diphosphate signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 9356-9364.

Enjo, F., Nosaka, K., Ogata, M., Iwashima, A. and Nishimura, H. (1997). Isolation and characterization of a thiamin transport gene, *THI10*, from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**, 19165-70.

Gerasimaite, R., Pavlovic, I., Capolicchio, S., Hofer, A., Schmidt, A., Jessen, H.J. and Mayer, A. (2017). Inositol Pyrophosphate Specificity of the SPX-Dependent Polyphosphate Polymerase VTC. *ACS Chem Biol* **12**, 648-653.

Guarente, L. and Kenyon, C. (2000). Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* **408**, 255-62.

Guarente, L. and Picard, F. (2005). Calorie restriction-the *SIR2* connection. *Cell* **120**, 473-82.

Hacioglu, E., Esmer, I., Fomenko, D.E., Gladyshev, V.N. and Koc, A. (2010). The roles of thiol oxidoreductases in yeast replicative aging. *Mechanisms of Ageing and Development* **131**, 692-699.

Hanakahi, L.A., Bartlet-Jones, M., Chappell, C., Pappin, D. and West, S.C. (2000). Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-strand break repair. *Cell* **102**, 721-9.

Hohmann, S. and Meacock, P.A. (1998). Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochim Biophys Acta* **1385**, 201-19.

Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M. and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795-800.

Ives, E.B., Nichols, J., Wenthe, S.R. and York, J.D. (2000). Biochemical and functional characterization of inositol 1,3,4,5, 6-pentakisphosphate 2-kinases. *J Biol Chem* **275**, 36575-83.

Kaeberlein, M., McVey, M. and Guarente, L. (1999). The *SIR2 / 3 / 4* complex and *SIR2* alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* **13**, 2570-80.

Kaeberlein, M., McVey, M. and Guarente, L. (2001). Using yeast to discover the fountain of youth. *Sci Aging Knowledge Environ* **2001**, pe1.

- Kaffman, A., Herskowitz, I., Tjian, R. and O'Shea, E.K. (1994). Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85. *Science* **263**, 1153-6.
- Kennedy, E.J., Pillus, L. and Ghosh, G. (2005). Pho5p and newly identified nucleotide pyrophosphatases / phosphodiesterases regulate extracellular nucleotide phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**, 1892-901.
- Kenyon, C.J. (2010). The genetics of ageing. *Nature* **464**, 504-12.
- Kobayashi, T., Heck, D.J., Nomura, M. and Horiuchi, T. (1998). Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev* **12**, 3821-30.
- Kobayashi, T. and Sasaki, M. (2017). Ribosomal DNA stability is supported by many 'buffer genes'-introduction to the Yeast rDNA Stability Database. *FEMS Yeast Res* **17**
- Komeili, A. and O'Shea, E.K. (1999). Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science* **284**, 977-80.
- Kozulić, B., Barbarić, S., Ries, B. and Mildner, P. (1984). Study of the carbohydrate part of yeast acid phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* **122**, 1083-90.
- Kruegel, U. et al. (2011). Elevated proteasome capacity extends replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS genetics* **7**, e1002253.
- Kulaev, I. and Kulakovskaya, T. (2000). Polyphosphate and phosphate pump. *Annu Rev Microbiol* **54**, 709-34.

- Kulaev, I.S., Kulakovskaya, T.V., Andreeva, N.A. and Lichko, L.P. (1999). Metabolism and function of polyphosphates in bacteria and yeast. *Prog Mol Subcell Biol* **23**, 27-43.
- Kulaev, I.S. and Vagabov, V.M. (1983). Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Adv Microb Physiol* **24**, 83-171.
- Kuro-o, M. (2010). A potential link between phosphate and aging-lessons from Klotho-deficient mice. *Mech Ageing Dev* **131**, 270-5.
- Lagerstedt, J.O., Zvyagilskaya, R., Pratt, J.R., Pattison-Granberg, J., Kruckeberg, A.L., Berden, J.A. and Persson, B.L. (2002). Mutagenic and functional analysis of the C-terminus of *Saccharomyces cerevisiae* Pho84 phosphate transporter. *FEBS Lett* **526**, 31-7.
- Lee, Y.S., Mulugu, S., York, J.D. and O'Shea, E.K. (2007). Regulation of a cyclin-CDK-CDK inhibitor complex by inositol pyrophosphates. *Science* **316**, 109-12.
- Lemire, J.M., Willcocks, T., Halvorson, H.O. and Bostian, K.A. (1985). Regulation of repressible acid phosphatase gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **5**, 2131-41.
- Lenburg, M.E. and O'Shea, E.K. (1996). Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem Sci* **21**, 383-7.
- Lichko, L.P., Kulakovskaya, T.V. and Kulaev, I.S. (2000). Purification and characterization of a soluble polyphosphatase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Mosc)* **65**, 355-60.

Lichko, L.P., Kulakovskaya, T.V., Kulakovskaya, E.V. and Kulaev, I.S. (2008). Inactivation of *PPX1* and *PPN1* genes encoding exopolyphosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* does not prevent utilization of polyphosphates as phosphate reserve. *Biochemistry (Moscow)* **73**, 985-989.

Llorente, B., Fairhead, C. and Dujon, B. (1999). Genetic redundancy and gene fusion in the genome of the Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*: functional characterization of a three-member gene family involved in the thiamine biosynthetic pathway. *Mol Microbiol* **32**, 1140-52.

MacLean, M., Harris, N. and Piper, P.W. (2001). Chronological lifespan of stationary phase yeast cells; a model for investigating the factors that might influence the ageing of postmitotic tissues in higher organisms. *Yeast* **18**, 499-509.

Martinez, P. and Persson, B.L. (1998). Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **258**, 628-38.

McHugh, D. and Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol* **217**, 65-77.

Mulugu, S. et al. (2007). A conserved family of enzymes that phosphorylate inositol hexakisphosphate. *Science* **316**, 106-9.

Nakajima, T., Maruhashi, T., Morimatsu, T. and Mukai, Y. (2020). Cyclin-dependent kinase Pho85p and its cyclins are involved in replicative lifespan through multiple pathways in yeast. *FEBS Lett* **594**, 1166-1175.

Nishimura, H., Kawasaki, Y., Kaneko, Y., Nosaka, K. and Iwashima, A. (1992). A positive regulatory gene, *THI3*, is required for thiamine metabolism in

Saccharomyces cerevisiae. *J Bacteriol* **174**, 4701-6.

Norris, F.A., Ungewickell, E. and Majerus, P.W. (1995). Inositol hexakisphosphate binds to clathrin assembly protein 3 (AP-3/AP180) and inhibits clathrin cage assembly in vitro. *J Biol Chem* **270**, 214-7.

Nosaka, K. (1990). High affinity of acid phosphatase encoded by *PHO3* gene in *Saccharomyces cerevisiae* for thiamin phosphates. *Biochim Biophys Acta* **1037**, 147-54.

Nosaka, K., Kaneko, Y., Nishimura, H. and Iwashima, A. (1989). A possible role for acid phosphatase with thiamin-binding activity encoded by *PHO3* in yeast. *FEMS Microbiol Lett* **51**, 55-9.

Nosaka, K., Kaneko, Y., Nishimura, H. and Iwashima, A. (1993). Isolation and characterization of a thiamin pyrophosphokinase gene, *THI80*, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 17440-17447.

Nosaka, K., Nishimura, H., Kawasaki, Y., Tsujihara, T. and Iwashima, A. (1994). Isolation and characterization of the *THI6* gene encoding a bifunctional thiamin-phosphate pyrophosphorylase / hydroxyethylthiazole kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 30510-6.

Nosaka, K., Onozuka, M., Konno, H., Kawasaki, Y., Nishimura, H., Sano, M. and Akaji, K. (2005). Genetic regulation mediated by thiamin pyrophosphate-binding motif in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **58**, 467-79.

Oshima, Y. (1997). The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet Syst* **72**, 323-34.

Persson, B.L., Lagerstedt, J.O., Pratt, J.R., Pattison-Granberg, J., Lundh, K., Shokrollahzadeh, S. and Lundh, F. (2003). Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **43**, 225-44.

Petersson, J., Pattison, J., Kruckeberg, A.L., Berden, J.A. and Persson, B.L. (1999). Intracellular localization of an active green fluorescent protein-tagged Pho84 phosphate permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **462**, 37-42.

Praekelt, U.M., Byrne, K.L. and Meacock, P.A. (1994). Regulation of *THI4 (MOL1)*, a thiamine-biosynthetic gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 481-90.

Pratt, J.R., Mouillon, J.M., Lagerstedt, J.O., Pattison-Granberg, J., Lundh, K.I. and Persson, B.L. (2004). Effects of methylphosphonate, a phosphate analogue, on the expression and degradation of the high-affinity phosphate transporter Pho84, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **43**, 14444-53.

Redman, L.M., Smith, S.R., Burton, J.H., Martin, C.K., Il'yasova, D. and Ravussin, E. (2018). Metabolic Slowing and Reduced Oxidative Damage with Sustained Caloric Restriction Support the Rate of Living and Oxidative Damage Theories of Aging. *Cell Metab* **27**, 805-815.e4.

Rodríguez-Navarro, S. et al. (2002). Functional analysis of yeast gene families involved in metabolism of vitamins B₁ and B₆. *Yeast* **19**, 1261-76.

Saiardi, A., Caffrey, J.J., Snyder, S.H. and Shears, S.B. (2000). The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis. *J Biol Chem* **275**, 24686-92.

Saka, K., Ide, S., Ganley, A.R. and Kobayashi, T. (2013). Cellular senescence in yeast is regulated by rDNA noncoding transcription. *Curr Biol* **23**, 1794-8.

Schleit, J. et al. (2013). Molecular mechanisms underlying genotype-dependent responses to dietary restriction. *Aging Cell* **12**, 1050-61.

Schlotterer, A. et al. (2009). *C. elegans* as model for the study of high glucose-mediated life span reduction. *Diabetes* **58**, 2450-6.

Serra-Cardona, A., Petrezselyova, S., Canadell, D., Ramos, J. and Arino, J. (2014). Coregulated expression of the Na⁺/phosphate Pho89 transporter and Ena1 Na⁺-ATPase allows their functional coupling under high-pH stress. *Mol Cell Biol* **34**, 4420-35.

Shah, A., Ganguli, S., Sen, J. and Bhandari, R. (2017). Inositol Pyrophosphates: Energetic, Omnipresent and Versatile Signalling Molecules. *J Indian Inst Sci* **97**, 23-40.

Singleton, C.K. (1997). Identification and characterization of the thiamine transporter gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **199**, 111-21.

Steidle, E.A., Chong, L.S., Wu, M., Crooke, E., Fiedler, D., Resnick, A.C. and Rolfes, R.J. (2016). A Novel Inositol Pyrophosphate Phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*: Siw14 PROTEIN SELECTIVELY CLEAVES THE beta-PHOSPHATE FROM 5-DIPHOSPHOINOSITOL PENTAKISPHOSPHATE (5PP-IP5). *J Biol Chem* **291**, 6772-83.

Strahl, T. and Thorner, J. (2007). Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 353-404.

Svaren, J. and Hörz, W. (1997). Transcription factors vs nucleosomes: regulation of

the *PHO5* promoter in yeast. *Trends Biochem Sci* **22**, 93-7.

Toh-e, A., Ueda, Y., Kakimoto, S.I. and Oshima, Y. (1973). Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **113**, 727-38.

Vogel, K., Hörz, W. and Hinnen, A. (1989). The two positively acting regulatory proteins *PHO2* and *PHO4* physically interact with *PHO5* upstream activation regions. *Mol Cell Biol* **9**, 2050-7.

Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R. and Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1793-808.

Wightman, R. and Meacock, P.A. (2003). The *THI5* gene family of *Saccharomyces cerevisiae*: distribution of homologues among the hemiascomycetes and functional redundancy in the aerobic biosynthesis of thiamin from pyridoxine. *Microbiology (Reading)* **149**, 1447-1460.

Wykoff, D.D. and O'Shea, E.K. (2001). Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **159**, 1491-9.

Ye, C., Bandara, W.M. and Greenberg, M.L. (2013). Regulation of inositol metabolism is fine-tuned by inositol pyrophosphates in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **288**, 24898-908.

York, J.D., Odom, A.R., Murphy, R., Ives, E.B. and Wentz, S.R. (1999). A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* **285**, 96-100.

丸橋翼修士論文. (2017). 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* でのリン酸飢餓応答因子による分裂寿命制御機構.