

学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏名	亀井 優香
学位の種類	博士（バイオサイエンス）
授与年月日	2015年（平成27年）3月21日
学位授与の要件	本学学位規程第18条第1項該当者（学位規則第4条第1項）
学位論文の題名	Mechanisms of Cellular Senescence and Longevity in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
審査委員	主査 教授 蔡 晃植 副査 教授 山本 章嗣 副査 教授 山本 博章

論文内容要旨

生物は成長・成熟した後に老化が始まり最終的に死に至るが、それらは環境要因と遺伝的要因に影響される。個体レベルの老化の進行あるいは寿命を決定する機構を明らかにすることに加えて、細胞レベルの老化・寿命を研究することも重要である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は細胞寿命の研究モデルとして有用であり、これまでに酵母を用いて遺伝学的に多くの寿命関連遺伝子がみつげられた。出芽酵母の分裂寿命は一つの細胞が死ぬまでに生む細胞の数と定義され、上皮細胞のように活発に分裂する細胞の寿命モデルである。本研究では、細胞老化の制御と寿命を決定する因子をメタボロミクスおよびトランスクリプトミクスの手法を用いて明らかにすることを目指した。

以前の研究において、GABA 代謝酵素遺伝子の転写活性化因子をコードする *UGA3* 遺伝子を破壊すると分裂寿命が延長することが示された。そこで、この長寿命の原因を Uga3p 標的遺伝子の中から同定することを試みた。Uga3p 標的遺伝子である *UGA1* 遺伝子（GABA アミノ基転移酵素）を破壊すると分裂寿命は延長したが、*UGA2*（コハク酸セミアルデヒド脱水素酵素）と *UGA4* 遺伝子（GABA 透過酵素）を破壊しても分裂寿命は延長しなかった。また、GABA の合成に関わる *GAD1* 遺伝子（グルタミン酸脱炭酸酵

素)の破壊株は長寿命であった。¹H核磁気共鳴分光法によって得られた細胞内代謝物プロファイルの判別分析では、長寿命株 ($\Delta uga1$ と $\Delta gad1$) が通常寿命株 ($\Delta uga2$, $\Delta uga4$ と野生型) と異なる代謝パターンをもつことが示され、ガスクロマトグラフィー質量分析により、コハク酸やフマル酸などの TCA 回路の中間代謝物が長寿命株で増加傾向にあった。このことから、長寿命株では好気呼吸が亢進していると推測したが、呼吸は上昇していなかった。一方、サーチュイン *SIR2* 遺伝子は $\Delta uga1$ と $\Delta gad1$ 株の長寿命に必要であった。従って、GABA 代謝遺伝子は *SIR2* 遺伝子に依存し、呼吸とは独立した機構によって寿命を決定していると結論した。

老化細胞を調べることにより寿命に関係する細胞内の変化がみつかることを期待して、老化の初期段階 (4, 7 および 11 世代) の細胞におけるトランスクリプトームとメタボロームを解析した。11 世代の細胞では糖代謝や TCA 回路の代謝酵素遺伝子やアミノ酸分解に関わる遺伝子の転写量が増加しており、アミノ酸合成酵素遺伝子の転写量が減少していた。このトランスクリプトームの結果は、ピルビン酸と TCA 回路中間代謝物 (オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸およびリンゴ酸) が老化の進行にともない増加し、分岐鎖アミノ酸やグルタミン酸などの多くのアミノ酸が 4 世代から次第に減少したことを示すメタボローム解析の結果と一致した。7 世代から 11 世代にかけて転写量が大きく増加した遺伝子に着目すると、定常期に転写が誘導される遺伝子が多く含まれていた。老化細胞回収時には定常期のように細胞濁度は高くなく、培地中の栄養源が減少していなかったため、11 世代で起こる老化現象の一つとして栄養センサーやシグナル伝達因子の劣化を考えた。

11 世代の細胞において、ビタミン B6 合成経路におけるピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) シンターゼをコードする *SNZ1* 遺伝子の転写量が劇的に増加していた。PLP はビタミン B6 (ピリドキシン、ピリドキサル、およびピリドキサミン) の活性型であり、アミノ酸や脂質代謝酵素の補酵素として働く。酵母細胞は培地のビタミン B6 を取り込むとともに細胞内で合成する経路を有している。Snz1p と複合体を形成して PLP 合成に関与するグルタミンアミド基転移酵素をコードする *SNO1* 遺伝子は *SNZ1* とプロモーター領域を共有するが、細胞老化にともなう転写誘導はみられなかった。*SNZ1* 遺伝子を破壊した株の分裂寿命は平均 17.5 世代と短かったが、 $\Delta sno1$ 遺伝子破壊株の分裂寿命は野生型株と同じであった。 $\Delta snz1$ 株はピリドキシンを含まない培地で増殖が極めて遅くなるが、 $\Delta sno1$ 株の生育は $\Delta snz1$ 株ほど遅くはなかった。ビタミン B6 トランスポーターをコードする *TPN1* 遺伝子の破壊株は $\Delta snz1$ 株と同様に短寿命であった。分裂寿命測定培地に過剰量のピリドキシンを添加すると、 $\Delta snz1$ と $\Delta tpn1$ 株の寿命は野生型株の寿命と同程度までに回復した。これらのことから、出芽酵母の分

裂寿命にはビタミン B6 が必要であると結論した。

本研究では、代謝物や代謝関連遺伝子が寿命を決定する新たな例を見いだした。GABA 代謝酵素遺伝子による寿命決定機構として、GABA 代謝関連化合物量の変化ではなくサーチュインによる寿命制御を明らかにした。また、細胞老化の起こる時期および現象を明らかにした。さらに、これまでに寿命を制御する代謝として解糖系などの中央代謝に関わるものが多く報告されていたが、ビタミン代謝も寿命に関連することを明らかにした。今後、すべての代謝関連遺伝子破壊株のメタボローム解析を行うことにより新たな寿命制御機構を明らかにできる可能性がある。

論文審査結果要旨

本論文では、出芽酵母の寿命決定のメカニズムの一端を明らかにした結果と、寿命と様々な代謝産物とが密接に関係することを明確な実験で証明した結果が記されている。本論文では、まず、寿命因子として同定した GABA 代謝酵素遺伝子の転写活性化因子をコードする *UGA3* 遺伝子の標的因子について研究を行い、GABA 代謝遺伝子はサーチュイン遺伝子に依存し、呼吸とは独立した機構によって寿命を決定していると結論づけた。また、老化細胞を調べることにより寿命に関係する細胞内の変化が見つかることを期待して、老化の初期段階の細胞におけるトランスクリプトームとメタボロームを解析した。その結果、11 世代の細胞では糖代謝や TCA 回路の代謝酵素遺伝子やアミノ酸分解に関わる遺伝子の転写量が増加しており、アミノ酸合成酵素遺伝子の転写量が減少していた。また、ビタミン B6 合成経路におけるピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) シンターゼをコードする *SNZ1* 遺伝子の転写量が劇的に増加していた。さらに、様々な欠損株などを用いて、出芽酵母の分裂寿命にはビタミン B6 が必要であると結論した。

本研究は、出芽酵母における寿命が GABA の代謝系ではなく、サーチュイン経路によって制御されることを初めて明らかにするとともに、酵母の寿命決定にビタミン B6 が関与することを明確に証明したものであり、その研究結果は高く評価できる。また、研究も論理的に構成されており、研究における実験の組み立ても良く、研究データも豊富で、質の高い論文といえる。英語論文としては、筆頭著者で 2 報、学会発表も国際学会での

英語発表が2回、国内学会での発表も数十回行っている。論文審査におけるプレゼンテーションもレベルが高く、口頭試問においても豊富な知識量と論理的思考能力の高さが確認された。以上のことから審査員は、本論文が長浜バイオ大学の博士（バイオサイエンス）の学位論文として相応しいものと結論づけた。