

博士論文

出芽酵母の細胞内ポリリン酸による
分裂寿命決定機構に関する研究

2024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

梅田 知晴

目次

| | |
|--|----|
| 序論 | 3 |
| 本論 | |
| 第1章 ポリリン酸代謝酵素による分裂寿命制御の検証 | |
| 第1節 緒言 | 12 |
| 第2節 材料と方法 | 16 |
| 第3節 結果 | |
| 第1項 比色定量法による細胞内ポリリン酸・オルトリン酸定量法の確立 | 40 |
| 第2項 ポリリン酸ポリメラーゼ遺伝子破壊株の細胞内リン酸の定量 | 44 |
| 第3項 ポリリン酸ポリメラーゼ遺伝子過剰発現株の細胞内リン酸量と分裂寿命の測定 | 49 |
| 第4項 ポリリン酸ホスファターゼ遺伝子破壊株の細胞内リン酸量と分裂寿命の測定 | 52 |
| 第5項 ポリリン酸ホスファターゼ遺伝子過剰発現株の細胞内リン酸量と分裂寿命の測定 | 54 |
| 第4節 考察 | 58 |
| 第2章 細胞質ポリリン酸による分裂寿命短縮化の検証 | |
| 第1節 緒言 | 63 |
| 第2節 材料と方法 | 64 |
| 第3節 結果 | |
| 第1項 大腸菌ポリリン酸キナーゼ <i>Ecppk1</i> 遺伝子発現株の構築と分裂寿命の測定 | 70 |
| 第2項 <i>Ecppk1</i> 発現株の短寿命を抑圧する多コピー抑圧遺伝子の分離 | 76 |
| 第3項 <i>Ecppk1</i> 発現株におけるトランスクリプトームとメタボローム解析 | 80 |
| 第4節 考察 | 84 |

| | | |
|------|---------------------------|-----|
| 第3章 | ポリリン酸高蓄積株における分裂寿命関連因子の検索 | |
| 第1節 | 緒言 | 87 |
| 第2節 | 材料と方法 | 89 |
| 第3節 | 結果 | |
| 第1項 | 液胞の形態と酸性度の観察 | 94 |
| 第2項 | 呼吸活性能およびストレス応答の検討 | 97 |
| 第3項 | ポリリン酸高蓄積株におけるトランスクリプトーム解析 | 105 |
| 第4節 | 考察 | 111 |
| 結論 | | 113 |
| 総合考察 | | 114 |
| 謝辞 | | 118 |
| 論文目録 | | 119 |
| 参考文献 | | 120 |

序論

生物には寿命がある。一般的な寿命とは、生物が生まれてから死ぬまでの期間のことである。世界全体のヒトの平均寿命は73.3歳である(1)。日本人の平均寿命は1947年には男女共に50歳代前半であったが、2022年には男性81歳、女性87歳となった(図0-1)(2)。日本人の最長寿命として記録されているのは119歳であり、世界最長寿記録は1997年に亡くなったフランス人女性の122歳である。このように、医療技術の発展や生活環境および食生活の改善などによりヒトの平均寿命は70余年で大幅に延長してきたが、これまでの知見から最大寿命の延長は起こらないとされている。これは100歳以上の長寿者をセンテナリアン、110歳以上の長寿者をスーパーセンテナリアンと呼称される百寿者の情報をもとにした統計により結論付けられたものである。実際、1980年には千人程度であったセンテナリアンの人数が2022年には9万人超にまで増加したが、世界的にも1990年以降に最大寿命は延長していない(3)。

一般的な個体レベルの寿命に対して、細胞レベルの寿命も重要である。Hayflickは、ヒト初代培養細胞において約50回分裂した細胞がそれ以上分裂できなくなったことから、細胞の分裂回数に限りがあることを見出した(4)。これはヘイフリック限界あるいは分裂限界とよばれる。細胞は個体を構成する基本単位であり、細胞寿命が個体寿命とよく相関していることから(5)、細胞レベルでの寿命決定機構の解明も重要である。細胞に寿命があるといえど、分裂が停止した細胞がすぐに消滅するわけではなく、個体では加齢あるいはストレスにより分裂限界を迎えた老化細胞が蓄積することで炎症を引き起こされ、動脈硬化や腎障害などの加齢関連疾患の原因となる。最近、この老化細胞を除去することで加齢関連疾患の病態が改善されることが報告されている(6)。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、細胞レベルの寿命研究モデル生物として優れている。*S. cerevisiae* は真核生物としてはいち早く全ゲノムが解読され、ゲノム関連情報や代謝物情報などが蓄積し、それらのデータベースが充実している。また、一倍体でも二倍体でも増殖が安定して維持されること、他の生物種よりも相同組み換え効率が高いために遺伝子操作が簡便であること、培養が簡便であることなどの利点が多い。個体寿命の研究モデルとして用いられている線虫の寿命は約1ヶ月、ハエは約4ヶ月、マウスは約3年、サルは約25年であり、寿命の測定に膨大な時間を要する。これらに対して、細胞寿命ではあるが、出芽酵母の世代時間の短さ(2時間)は寿命研究におい

で大きなメリットである。出芽酵母では、二通りの寿命（分裂寿命と経時寿命）が定義づけられている。「分裂寿命」の定義は、一つの細胞が死ぬまでに生む細胞の数（分裂回数）である。出芽酵母では、一つの細胞（母細胞）から出芽した細胞（娘細胞）が母細胞より小さいために母細胞と娘細胞を見分けやすく、この特徴を利用して分裂回数を厳密に計数できる（図 0-2）。分裂寿命は高等生物における分裂の活発な細胞（上皮細胞など）の寿命モデルとされる（7）。「経時寿命」の定義は、栄養分を枯渇させたときに分裂を停止した細胞が生きている時間の長さである。経時寿命は高等生物における分化して分裂を停止した細胞（神経細胞や心筋細胞など）の寿命モデルとされている（8）。本研究は分裂寿命についての研究である。個々の細胞の寿命はその老化進行の指標となり得る。細胞寿命が長い細胞はその老化進行が抑制されていて、細胞寿命が短い細胞の老化進行が促進されていると評価できる。

細胞老化の仕組みについては、これまでに以下のような説が提唱されている。1) 老化は遺伝子にプログラムされているとする「プログラム説」（4）、2) DNA、RNA、タンパク質の構造的なエラーの蓄積による機能障害が老化を引き起こすとする「エラー説」（9）、3) 細胞機能の維持に必要なものが量的あるいは質的に閾値を下回ることによってその機能が消失するとする「消耗説」（例えば、染色体末端にあるテロメアの短縮など）（10）、4) エネルギー代謝の副産物としてミトコンドリアで産生される反応性の高いフリーラジカル（不対電子をもつ高酸化性分子）がタンパク質や脂質などを酸化させることで老化を引き起こすとする「フリーラジカル説」（11, 12）などがある。これら要因は単独ではなく重なって起こり得るため、老化現象を一概に説明することは難しいが、個々の要因への対応で老化の進行を抑制できる例が報告されている。

カロリー制限は最も有名な寿命延長手段である。線虫において、食餌の制限により寿命延長効果がみられることがはじめて報告された（13）。霊長類であるアカゲザルを用いた 20 年にもわたる長期間の研究も実施されている。ウィスコンシン大学のグループの第 1 報では、食餌制限群（自由摂取群の 70%に制限）のサルは、自由摂取群のサルよりも加齢によるガンの発生率や心血管疾患に罹患するリスクおよび脳委縮や糖尿病などの加齢に伴い発症する疾患で死亡するリスクが減少し、寿命の延長効果が認められた（14）。一方、ほぼ同時期にアメリカ国立加齢研究所のグループがアカゲザルを用いた同じ内容の実験を実施しており、カロリー制限による寿命延長効果は認められないと報

告した (15)。両者の結果の不一致は、第 1 報の研究でコントロール群の設定に不備があったことやサルスの遺伝的背景の差によるものとされている (16, 17)。しかし、どちらの実験においても加齢に伴う疾病発生の抑制は観察されている。カロリー制限による寿命延長効果は酵母、ショウジョウバエやマウスでも確認されている (7)。出芽酵母を用いた研究では、培地中のグルコース濃度を 1/4 に制限することにより分裂寿命が 30% 延長することが示されており (18)、カロリー制限による寿命延長効果に NAD⁺ (ニコチンアミドジヌクレオチド) 依存性のヒストン脱アセチル化酵素をコードする *SIR2* 遺伝子が関与することが見出された (19)。*sir2* 変異株ではカロリー制限による寿命延長効果が観察されないことに加えて、*SIR2* 遺伝子を過剰発現することにより分裂寿命が延長する (20)。カロリー制限による寿命延長メカニズムは、カロリー制限により増加した NAD⁺ により Sir2p タンパク質が活性化され、遺伝子の修復、ゲノムの安定化やエネルギー代謝にとどまらず、栄養飢餓応答に関与するタンパク質リン酸化酵素 TORC (Target of rapamycin complex) 1 の制御や AMPK (AMP-activated protein kinase) の活性化などの細胞機能に影響を及ぼすことにより寿命を制御している (21)。*SIR2* 遺伝子はサーチュイン遺伝子としてヒトを含む高等生物にも保存されており (22, 23, 24)、サーチュインによる寿命延長効果は線虫、ショウジョウバエやマウスでも確認されている。

私の所属研究室の先行研究によって、カロリー制限と同じように環境中のリン酸が分裂寿命制御に影響を与えるかどうかを検討された。出芽酵母は生存に必須なリンを確保するために、環境中の無機リン酸量に反応して遺伝子発現を制御するリン酸飢餓応答経路 (PHO 経路) をもつ (図 0-3) (25)。リン酸が十分に存在する環境では、サイクリン/サイクリン依存性キナーゼ Pho80p-Pho85p 複合体が転写活性化因子 Pho4p をリン酸化し、リン酸化された Pho4p が核外に排出されるため、Pho4p により転写される遺伝子 (リン酸飢餓応答遺伝子) は発現しない。リン酸が不足した環境では、Pho80p-Pho85p 複合体の活性がサイクリン依存性キナーゼインヒビター Pho81p により阻害されるため、Pho4p がリン酸化されずに核内に残り、標的となるリン酸飢餓応答遺伝子の転写を活性化する。リン酸飢餓応答遺伝子には酸性ホスファターゼ遺伝子 *PHO5/PHO11/PHO12* やリン酸トランスポーター遺伝子 *PHO84*、ポリリン酸ポリメラーゼ遺伝子 *VTC1/VTC2/VTC3/VTC4* がある。

先述のカロリー制限のように、リン酸の制限によって出芽酵母の分裂寿命が延長する

ことが期待されたが、培地中のリン酸濃度を増減させても野生型酵母の分裂寿命は変わらなかった (26)。ところが、PHO 経路に含まれる制御因子が分裂寿命の維持に必要であることが見出された。転写活性化因子 Pho4p をリン酸化によって負に制御する *PHO80* 遺伝子を破壊すると、分裂寿命が短くなった。この *pho80* 破壊株において *PHO4* 遺伝子をさらに破壊すると、分裂寿命が野生型株レベルにまで回復した (図 0-4)。これらの結果から、*pho80* 破壊株におけるリン酸飢餓応答遺伝子の発現上昇が分裂寿命を短くする原因であると考えられた (26, 27)。*pho80* 破壊株で高発現するリン酸飢餓応答遺伝子の中から、分裂寿命に関与する遺伝子が探索され、*VTC* 遺伝子を破壊することによって *pho80* 破壊株の短寿命が部分的ではあるが回復した (図 0-5)。これらの知見から、ポリリン酸ポリメラーゼ遺伝子の高発現が出芽酵母の分裂寿命を短くすることが示唆され、細胞内にポリリン酸が高蓄積することにより分裂寿命が短縮化すると考えられた。他方、*pho80 vtc* 二重破壊株の寿命回復が部分的であったことから、*pho80* 破壊株の短寿命はポリリン酸の蓄積以外にも原因があると考えられた。

ポリリン酸とは、リン酸基が 3 個から数千個直鎖状に連なった高エネルギーリン酸化合物である。出芽酵母では、細胞内に取り込まれたリン酸が、ポリリン酸ポリメラーゼ *VTC* 複合体によりポリリン酸として液胞に貯蔵される (28, 29)。ポリリン酸はリン酸の貯蔵以外に様々な生体機能をもつことが報告されている。大腸菌では、ポリリン酸が ATP 依存性プロテアーゼの一種である Lon プロテアーゼと結合してその活性を調節する (30)。ヒトでは、ポリリン酸が血液凝固因子として働くことや骨の形成に関与することが報告されている (31, 32)。出芽酵母においてポリリン酸が細胞機能を制御する例として、細胞周期の制御に関与することが報告されているが、その分子メカニズムは明らかにされていない (33)。

以上の知見から、本研究では、ポリリン酸の高蓄積が分裂寿命の短縮化を引き起こすかどうかを明らかにすることを目的として、ポリリン酸代謝酵素遺伝子の破壊株および過剰発現株について細胞内ポリリン酸量および分裂寿命を調べた。また、*pho80* 破壊株が短寿命となるポリリン酸の高蓄積以外の原因を探索することも試みた。本研究の成果は、ほとんどの生物種がポリリン酸をもつことから、ポリリン酸と細胞寿命の関係を初めて示すものとなる。

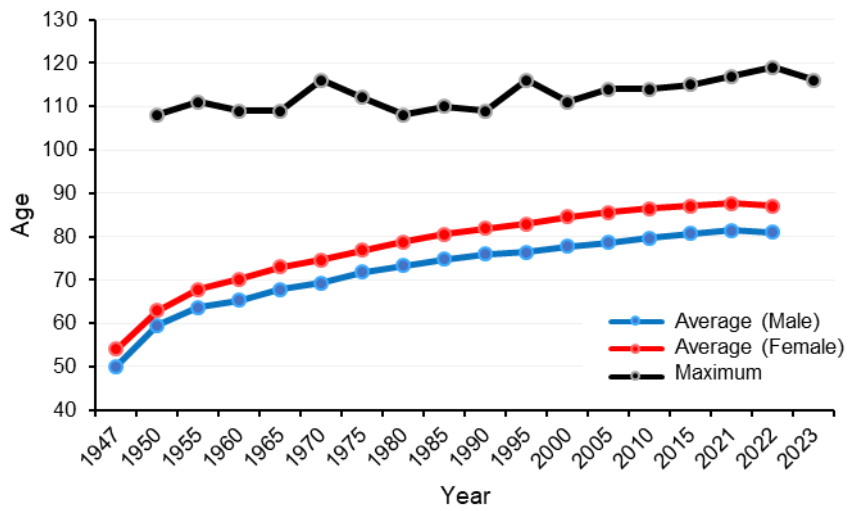
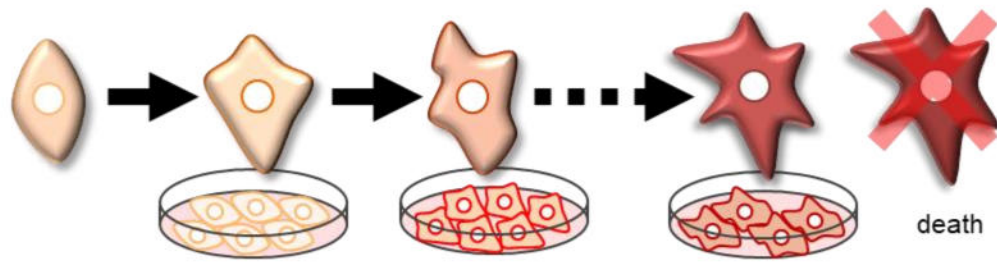


図 0-1 日本の平均寿命（男女別）と最大寿命の推移

厚生労働省が発表している簡易生命表を参考に作成した。

(● : 最大寿命、● : 男性の平均寿命、● : 女性の平均寿命)

Human primary cultured cell



Budding yeast cell

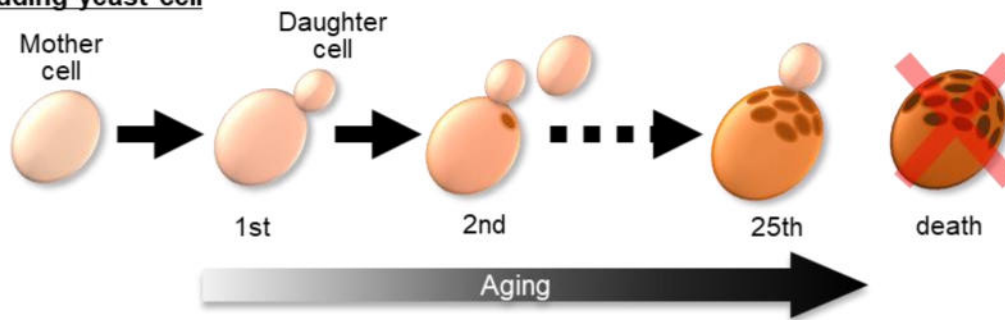


図 0-2 ヒト初代培養細胞と出芽酵母の分裂様式と細胞老化の推移

ヒト初代培養細胞と出芽酵母の老化過程を示す。ヒト初代培養細胞は 50 回ほど分裂を繰り返すと増殖が停止する。出芽酵母は 25 回ほど出芽すると分裂が停止する。

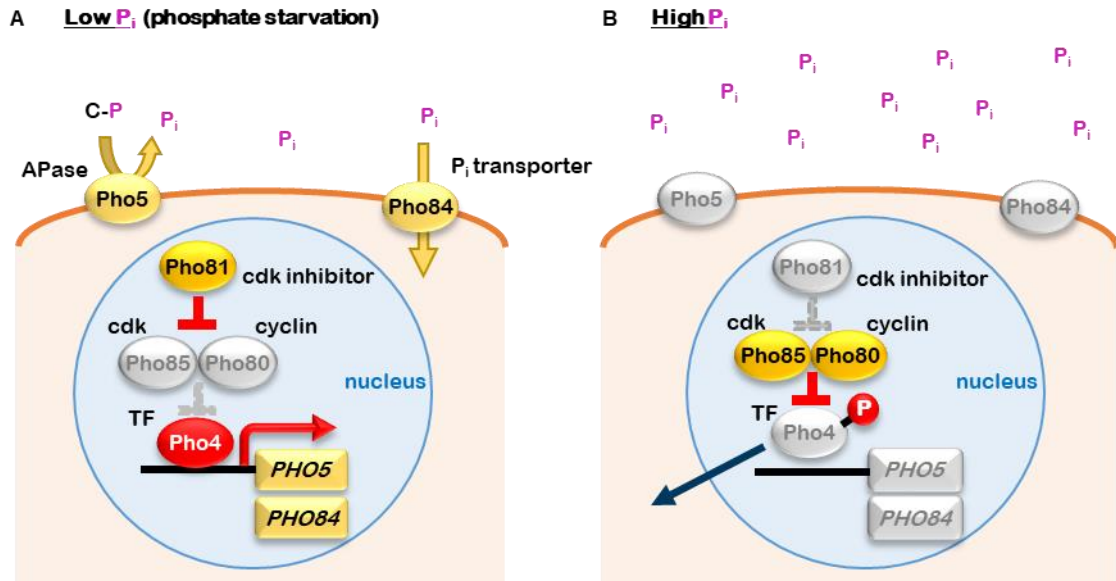


図 0-3 出芽酵母のリン酸飢餓応答経路の模式図

- (A) 低リン酸条件下での応答。Pho80p-Pho85p サイクリン依存性キナーゼ (cdk) 複合体が cdk インヒビター Pho81p により不活化されることで、転写活性化因子 Pho4p が核内に残り、分泌型酸性ホスファターゼ (APase) *PHO5* 遺伝子やリン酸トランスポーター *PHO84* 遺伝子の転写を活性化する。Pi は無機リン酸を、C-P は有機リン酸を表す。
- (B) 高リン酸条件下での応答。Pho80p-Pho85p 複合体によって、Pho4p がリン酸化されると核外へと排出され、*PHO5* 遺伝子や *PHO84* 遺伝子の転写が抑制される。

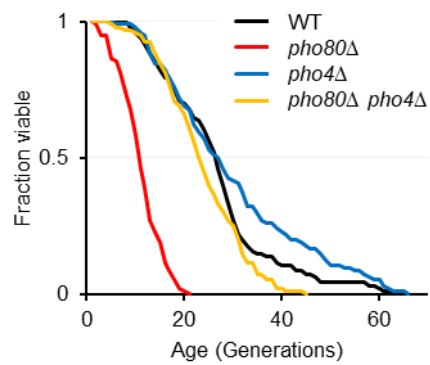


図 0-4 *pho80* 遺伝子破壊株の分裂寿命は *PHO4* 遺伝子の破壊によって完全に回復する

分裂寿命曲線。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。野生型 (WT) 株 (—、26.0 世代)、*pho80*Δ 株 (—、10.0 世代)、*pho4*Δ 株 (—、27.0 世代)、*pho80*Δ *pho4*Δ 株 (—、22.5 世代) 参考のため、先行研究 (26) のデータを示す。

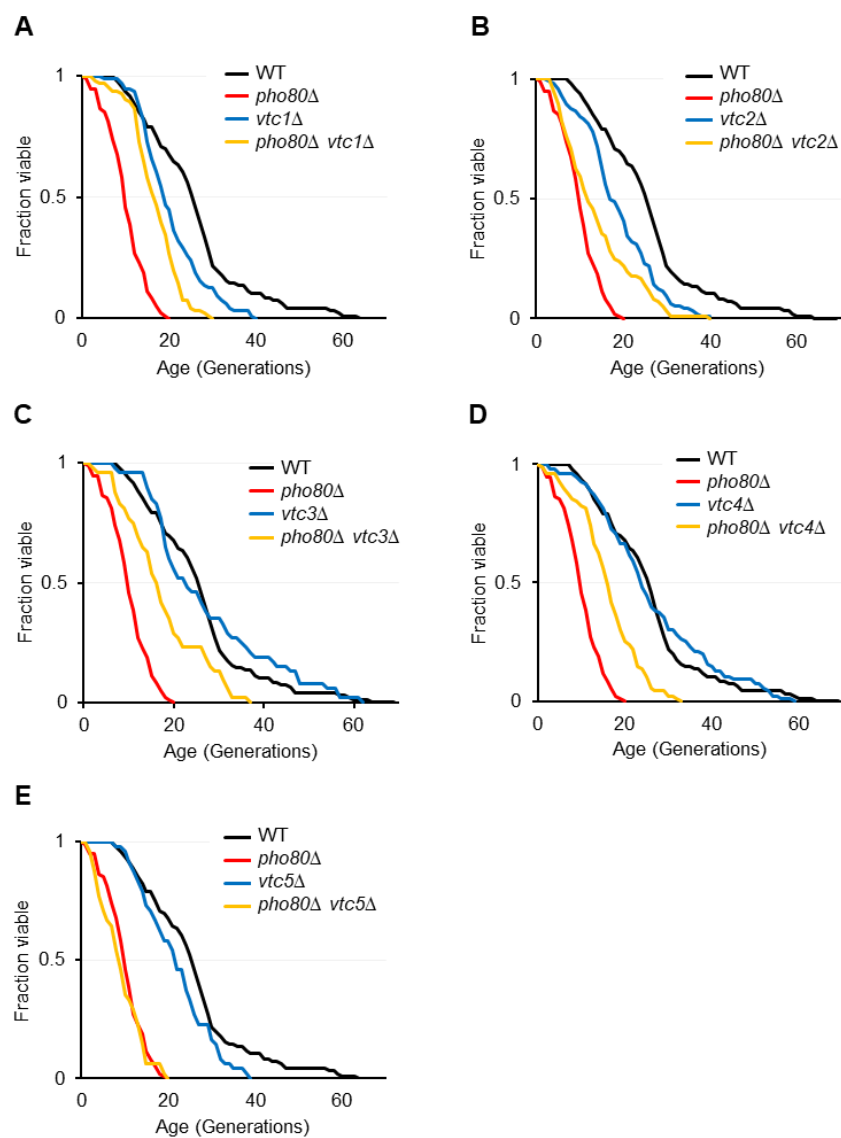


図 0-5 *pho80* 破壊株における *vtc* 遺伝子を破壊した株の分裂寿命

- (A) 分裂寿命曲線。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。野生型 (WT) 株 (—、26.0 世代)、*pho80*Δ 株 (—、10.0 世代)、*vtc1*Δ 株 (—、19.0 世代)、*pho80*Δ *vtc1*Δ 株 (—、17.0 世代) 以降、WT 株と *pho80*Δ 株のデータを繰り返し用いた。
- (B) *vtc2*Δ 株 (—、17.5 世代)、*pho80* *vtc2*Δ 株 (—、12.0 世代)
- (C) *vtc3*Δ 株 (—、23.0 世代)、*pho80*Δ *vtc3*Δ 株 (—、16.5 世代)
- (D) *vtc4*Δ 株 (—、24.0 世代)、*pho80*Δ *vtc4*Δ 株 (—、16.0 世代)
- (E) *vtc5*Δ 株 (—、22.0 世代)、*pho80*Δ *vtc5*Δ 株 (—、9.0 世代)

第 1 章

ポリリン酸代謝酵素による分裂寿命制御の検証

第 1 節 【緒言】

先行研究において、PHO 経路におけるサイクリン Pho80p をコードする *PHO80* 遺伝子を破壊すると、分裂寿命が短くなることを見出された (26)。この *pho80* 破壊株において下流の転写活性化因子 *PHO4* 遺伝子を破壊すると、分裂寿命は野生型株と同程度に回復した。*pho80* 破壊株では Pho4p 標的遺伝子の転写量が増加するため、Pho4p 標的遺伝子の高発現が分裂寿命を短くすると考えられた。そこで、*pho80* 破壊株において、Pho4p 標的遺伝子が高発現することで分裂寿命を短くするならば、その遺伝子を破壊することによって分裂寿命が回復すると考え、*pho80* 破壊株において個々の Pho4p 標的遺伝子を破壊した二重破壊株を構築し、その分裂寿命が調べられた。リン酸トランスポーターや酸性ホスファターゼ、アルカリホスファターゼをコードする遺伝子を破壊しても *pho80* 破壊株の短寿命は回復しなかったが、*VTC1*、*VTC2*、*VTC4* 遺伝子を破壊すると、*pho80* 破壊株の短寿命が回復した (Umeda *et al.*, 2023) (図 0-5、表 1-4)。

VTC 遺伝子は、Vacuolar Transporter Chaperone (VTC) 複合体の構成因子をコードする。VTC 複合体は、液胞膜 (一部は核周辺) に局在し、ATP からポリリン酸を合成し、それを液胞内に取り込むポリリン酸ポリメラーゼである。VTC 複合体は触媒サブユニットである *Vtc4p* とそのアクセサリサブユニット *Vtc1p*、*Vtc2p*、*Vtc3p*、*Vtc5p* から構成され、液胞に局在する VTC 複合体は主に *Vtc1p-Vtc3p-Vtc4-Vtc5p* で、核周辺の VTC 複合体は *Vtc1p-Vtc2p-Vtc4* で構成される (29) (図 1-1)。*pho80* 破壊株の RNA-seq 解析と RT-qPCR 解析により *VTC1/VTC2/VTC3/VTC4* 遺伝子の転写量が野生型株よりも増加していたことから、*pho80* 破壊株において VTC 複合体の活性が上昇し、ポリリン酸の合成および液胞への蓄積が促進されたと考えた。

ポリリン酸合成酵素に対して、出芽酵母では 3 種類のポリリン酸分解酵素 (*Ppn1p*、*Ppn2p*、*Ppx1p*) が同定されている。*Ppn1p* と *Ppn2p* は液胞膜に局在し、*Ppn1p* は *endo* 活性と *exo* 活性の両方をもつ dual 型ポリリン酸ホスファターゼであり、*Ppn2p* は *endo* 型ポリリン酸ホスファターゼである。*Ppx1p* は細胞質に局在する *exo* 型ポリリン酸ホスファターゼである (34, 35, 36) (図 1-2)。

本章では、*pho80* 破壊株が示す短寿命の原因が *VTC* 遺伝子の高発現であることから、

ポリリン酸合成酵素遺伝子および分解酵素遺伝子の破壊株および過剰発現株を構築することにより、細胞内ポリリン酸の高蓄積が分裂寿命に影響を及ぼすことを検証した。

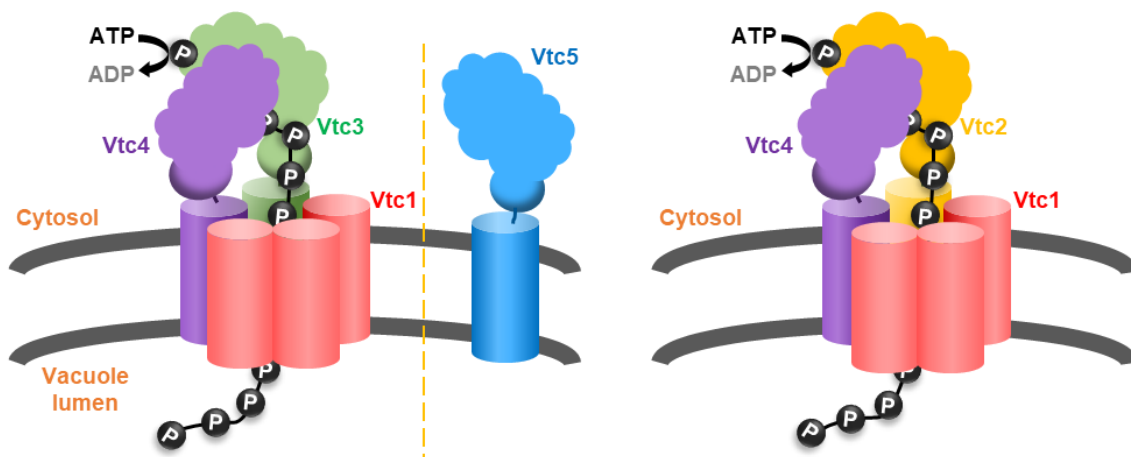


図 1-1 VTC 複合体によるポリリン酸合成および液胞輸送の模式図

VTC 複合体は Vtc1p-Vtc3p-Vtc4p-Vtc5p で構成された複合体 (左) と Vtc1p-Vtc2-Vtc4p で構成された複合体 (右) の 2 パターンが存在する。Vtc5p は液胞に局在するが、液胞膜から精製した複合体の結晶構造解析では Vtc1p-Vtc3p-Vtc4p (存在比 3:1:1) のみで解析されており (37, 38)、VTC 複合体の中でどのように存在するのか厳密にはわからない。

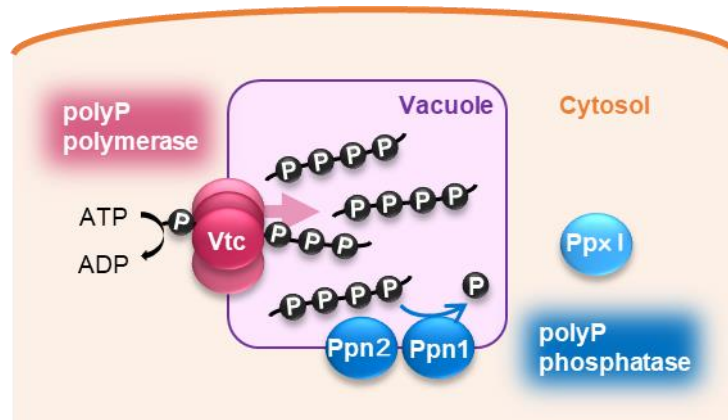


図 1-2 出芽酵母におけるポリリン酸の合成と分解

液胞膜に局在する VTC 複合体によりポリリン酸が合成され液胞内に蓄積する。ポリリン酸ホスファターゼは液胞膜に Ppn1p と Ppn2p が局在し、細胞質に Ppx1p が局在する。

第2節 【材料と方法】

使用した菌株

本章において用いた出芽酵母菌株の遺伝子型は表 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て相同組み換え法 (39) により作製した。遺伝子の過剰発現には、構成的に強発現することが知られている *TDH3* 遺伝子のプロモーターを利用した (40)。相同組み換え法により *TDH3* 遺伝子のプロモーターを目的遺伝子の本来のプロモーターと置換させる方法で上記の薬剤耐性あるいは栄養選択マーカー遺伝子を用いて作製した。

使用したオリゴヌクレオチド

使用したオリゴヌクレオチドの塩基配列は表 1-2 に示した。

使用したプラスミド

使用したプラスミドの情報は表 1-3 に示した。

【表 1-1】 第 1 章で使用した酵母菌株

| Strain Name | Genotype |
|-----------------|---|
| BY4742 | <i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i> |
| BY2-pho80H | <i>MATα pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-pho4* | <i>MATα pho4Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i> |
| BY2-pho4-pho80H | <i>MATα pho4Δ::kanMX pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-vtc1* | <i>MATα vtc1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-vtc2* | <i>MATα vtc2Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-vtc3* | <i>MATα vtc3Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-vtc4* | <i>MATα vtc4Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i> |
| BY2-vtc5* | <i>MATα vtc5Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-vtc1-pho80H | <i>MATα vtc1Δ::kanMX pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-vtc2-pho80H | <i>MATα vtc2Δ::kanMX pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-vtc3-pho80H | <i>MATα vtc3Δ::kanMX pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-vtc4-pho80H | <i>MATα vtc4Δ::kanMX pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-vtc5-pho80H | <i>MATα vtc5Δ::kanMX pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpVTC1 | <i>MATα TDH3p-VTC1::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpVTC2 | <i>MATα TDH3p-VTC2::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpVTC3 | <i>MATα TDH3p-VTC3::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpVTC4 | <i>MATα TDH3p-VTC4::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpVTC5 | <i>MATα TDH3p-VTC5::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpVTC5-vtc4 | <i>MATα TDH3p-VTC5::CgLEU2 vtc4Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpVTC4-1 | <i>MATα TDH3p-VTC4::CgLEU2 TDH3p-VTC1::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpVTC4-1-2 | <i>MATα TDH3p-VTC4::CgLEU2 TDH3p-VTC1::CgHIS3 TDH3p-VTC2::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |

【表 1-1】 第 1 章で使用した酵母菌株 (続き)

| Strain Name | Genotype |
|-------------------|--|
| BY2-TpVTC4-1-3 | <i>MATα TDH3p-VTC4::CgLEU2 TDH3p-VTC1::CgHIS3 TDH3p-VTC3::CgURA3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpVTC4-1-3-2 | <i>MATα TDH3p-VTC4::CgLEU2 TDH3p-VTC1::CgHIS3 TDH3p-VTC3::CgURA3 TDH3p-VTC2::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-ppn1* | <i>MATα ppn1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-ppn2 | <i>MATα ppn2Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-ppn1-2H | <i>MATα ppn1Δ::kanMX ppn2Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-ppx1H | <i>MATα ppx1Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-ppn1-2H-ppx1L | <i>ppn1Δ::kanMX ppn2Δ::CgHIS3 ppx1Δ::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpPPN1 | <i>MATα TDH3p-PPN1::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpPPN2 | <i>MATα TDH3p-PPN2::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpPPX1 | <i>MATα TDH3p-PPX1::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpPPN1-TpVTC5 | <i>MATα TDH3p-VTC5::CgLEU2 TDH3p-PPN1::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpPPN2-TpVTC5 | <i>MATα TDH3p-VTC5::CgLEU2 TDH3p-PPN2::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpPPX1-TpVTC5 | <i>MATα TDH3p-VTC5::CgLEU2 TDH3p-PPX1::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpPPN1-pho80H | <i>MATα TDH3p-PPN1::CgLEU2 pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpPPN2-pho80H | <i>MATα TDH3p-PPN2::CgLEU2 pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpPPX1-pho80H | <i>MATα TDH3p-PPX1::CgLEU2 pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-PPX1-GFP | <i>MATα PPX1-GFP::HIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpPPX1-GFP | <i>MATα TDH3p-PPX1::CgLEU2 CgHIS3::TDH3p-PPX1-GFP::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |

【表 1-1】 第 1 章で使用した酵母菌株 (続き)

| Strain Name | Genotype |
|-------------|---|
| BY2-TpVTC5- | <i>MATα TDH3p-VTC5::CgLEU2 CgHIS3::TDH3p-PPX1-</i> |
| TpPPX1-GFP | <i>GFP::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |

Strains marked with an asterisk (*) are obtained from the Yeast MAT α Collection YSC1054.

【表 1-2】 第 1 章で使用したオリゴヌクレオチド

| Name of oligonucleotide | Sequence (5' to 3') |
|---|---|
| For construction of gene knockout strain | |
| PHO80KOf | ATCATAAGACGAGGATATCCTTTGGAGACTCATAGAAATCC ACAGGAAACAGCTATGACC |
| PHO80KOr | CTCAATCATGATTGCTTTCATAATACCCACGAAAAATCAG TTGTAAAACGACGGCCAGT |
| VTC3KOf | GCGAACAGCAGAATTTGTCCTTGGTTTTTCAGAGTTTGAAA CACAGGAAACAGCTATGACC |
| VTC3KOr | ACTTGTGTAATATATGTGTATATAAAAAATATACATGTTTCGTT GTAAAACGACGGCCAGT |
| VTC4KOf | AAATCGGCCAATAAAAGAGCATAACAAGGCAGGAACAGC TCACAGGAAACAGCTATGACC |
| VTC4KOr | TTATTACTTAATTATACAGTAAAAAAACACGCTGTGTATG TTGTAAAACGACGGCCAGT |
| PPN2KOf | TGTAAAATGAGCCAGGCTTGAGGAGCATAGATACGCAAAA CACAGGAAACAGCTATGACC |
| PPN2KOr | TATATAAATCTGTTGCGCTTTTAAGTAGTACTTTTTGTTGT TGTAACGACGGCCAGT |
| PPX1KOf | CAAATAATCAAAAAGTTCAAAACACCGATTGTTAAGAAAG CACAGGAAACAGCTATGACC |
| PPX1KOr | GTCATATATAAACCAAATAAAGCATATATAACATCTCCCTGT TGTAACGACGGCCAGT |
| For confirmation of gene knockout | |
| PHO80Cr3 | AACGCACTTATTGGGTGCTTATAAGCTGTT |
| PHO8Cr | AAATGCGATACAGTACGTGTCATGCGG |
| VTC1Cr | TTCCCGGCTTTTACCGTAATAGTAGTCAAG |
| VTC2Cr | TGCAAAAGCAAGGACTGAAAACGAAGATTC |
| VTC3Cr | ATACTGTAGTGTGTTCCGGTGCTTATCTAC |
| VTC4Cr | CATTTTGTGATGGTGACGATGGCATGTAAG |
| VTC5Cr | ATCACAATACTATGCGTTCAAACACGGCC |
| PPN1Cr | AAATGGTACAGTTTTGCCATGCAACTGGAC |
| PPN2Cr | TATTGATGGTGTTTAGGTGCTGGATGTTGG |
| PPX1Cr | CGCATCTTCACCCATAATTCTCGAAGAAGG |
| kanMXCr | TTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTG |

【表 1-2】 第 1 章で使用したオリゴヌクレオチド (続き)

| Name of oligonucleotide | Sequence (5' to 3') |
|---|---|
| For construction of gene overexpression strain | |
| KO-TDH3pf | GTTTTACAACAACCTTTATTTAGTCAAAAAATTAGC |
| KO-TDH3pr | TGACTAAATAAAGTTGTTGTAAAACGACGGCCAGT |
| VTC1Kof | TTATCGAATACGATTA AACACTACGCCAGATTTCCACAATC ACAGGAAACAGCTATGACC |
| VTC2Kof | AAAGAACGACTACACCTCAACATAACGACACTTTTTTGAC CACAGGAAACAGCTATGACC |
| VTC3Kof | GCGAACAGCAGAATTTGTCCTTGGTTTTCAGAGTTTGAAA CACAGGAAACAGCTATGACC |
| TDH3p-VTC1r | TTTTCCCAGGTGTTCTTTGTAATAATGGTGCTGAAGACATT TTGTTTGTTTATGTGTGTTTATTC |
| TDH3p-VTC2r | GAGGATAAACCTCATTAGCCAACCTTCACTCCAAACAGCAT TTTGTGTTGTTTATGTGTGTTTATTC |
| TDH3p-VTC3r | GAGGATATACGTCGTTAGCCAGTTTAATACCAAATAGCATT TTGTTTGTTTATGTGTGTTTATTC |
| TDH3p-VTC4r | GTCTAATAAGAGACTTGCTCAAGTGCTCACCAAACCTTCATT TTGTTTGTTTATGTGTGTT |
| VTC5-CgLEU2f | TCAGCCCTAGGTAAGGATAGATACGAAGGGTGTACAATC CCCATCCTTTTTACCAATAG |
| CgLEU2-TDH3pr | TGACTAAATAAAGTTTTCGTTTCCCGATACATGCG |
| CgLEU2-TDH3pf | GGGAAACGAAAACCTTTATTTAGTCAAAAAATTAGC |
| TDH3p-VTC5r | CAGGGATTGATTTATTCAATATGCGATCTTCAAATTTCAATT TGTTTGTTTATGTGTGTT |
| PPN1Kof | TTTTCAATTGAGTAGGGGTAGAGCTAGTTAGCTGCTTTTCGC ACAGGAAACAGCTATGACC |
| TDH3p-PPN1r | TGCTTACATTGCGCACTTCACTCTTACCCACTACAACCATT TTGTTTGTTTATGTGTGTT |
| TDH3p-PPN2r | TACTAAGTGTAGCGGCTCGTCTTTTCCGCTTATCTTCCATCA TTTTGTTTGTTTATGTGTGTT |
| TDH3p-PPX1r | GTGCCAAAAATTCAGGAACCGTCTTTCTCAAAGGCGACAT TTGTTTGTTTATGTGTGTT |
| PPX1-tagF2 | CGTCCCCTATTTAGAGGAAGCGTACTCAAACCTGGAAGAG CGGATCCCCGGGTAAATTA |

【表 1-2】 第 1 章で使用したオリゴヌクレオチド (続き)

| Name of oligonucleotide | Sequence (5' to 3') |
|------------------------------------|--|
| PPX1-tagR1 | GTCATATATAAACCAAATAAAGCATATATAACATCTCCCTGA ATTCGAGCTCGTTTAAAC |
| For construction of plasmid | |
| PPX1f2 | CGGAATTCATGTCGCCTTTGAGAAAGACGG |
| PPX1r2 | GCGTCGACTCACTCTTCCAGGTTTGAGTACG |
| For RT-qPCR | |
| VTC1RTf | TTTACAGTTATGCTGGGAGGCCTTG |
| VTC1RTr | TAGTCCTGCACTGACCCTACCTATC |
| VTC2RTf | AAGCCGAATACCCCACTTTG |
| VTC2RTr | GATGTTGACCGCTTCTTTGTTG |
| VTC3RTf | GGGTACTCAAAGGAGGAACTGG |
| VTC3RTr | TGGCTGCAACTTCTCCTCAAC |
| VTC4RTf | CATAGAGAGGATTGGACTGGTGAG |
| VTC4RTr | CTTGCCTTCTTTACGCATCTTGCC |
| VTC5RTf | GGTTCTGTTGCGTCATTTGG |
| VTC5RTr | GTGAGTCCTCTATGTCTTGCTGTTG |
| PPN1RTf | GCTGTACTTATTCAAGCCAATCC |
| PPN1RTr | AACCATACTTTCATTCCCCTACTCC |
| PPN2RTf | GGAAGATAAGCGGAAAAGACGAG |
| PPN2RTr | GGCAATAAGGAAACTGGTGGAG |
| PPX1RTf | GTGGTACGTGAACTCATTGAAAGG |
| PPX1RTr | ACATCGCCACACCTCCATC |

【表 1-3】 第 1 章で使用したプラスミド

| Plasmid Name | Insert gene | Vector |
|------------------------|--------------------|---------------|
| pUC-kanMX | <i>kanMX</i> | pUC118 |
| pCgLs | <i>CgLEU2</i> | pUC118 |
| pCgH | <i>CgHIS3</i> | pUC119 |
| pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6 | <i>GFP</i> (S65T) | pFA6a-kanMX6 |
| pGEX-PPX1 | <i>ScPPX1</i> | pGEX-6P-1 |

使用した培地と試薬

以下、寒天平板培地を作製する場合には、培地 1 L あたり寒天（ナカライテスク）を 20 g 加えた。すべての培地は、121°C で 20 分間オートクレーブ滅菌した。

完全培地 (YPD 培地)

脱イオン水 1 L あたり Yeast Extract (BD Bacto) を 10 g、Peptone (BD Difco) を 20 g と Dextrose (ナカライテスク) を 20 g 加えた。

G418 耐性株選択培地 (YPD+G418 培地)

G418 二硫酸塩（ジェネティシン、ナカライテスク）を脱イオン水で 50 mg/mL に調製し、フィルターろ過滅菌した。YPD 培地をオートクレーブ滅菌後、65°C 以下になったらジェネティシン（50 mg/mL）を終濃度 200 µg/mL になるように加えた。

高リン酸合成培地 (High Pi 培地)

脱イオン水 1 L あたり 20 g の Dextrose、2.0 g の L-Asparagine (ナカライテスク)、250 mL の 4×High P_i ストック溶液(※1)を加え、栄養要求性に応じてアミノ酸や核酸を添加した。オートクレーブ滅菌後に 1 mL の Vitamin mix(※2)を加えた。

※1 4×High Pi ストック溶液

脱イオン水 1 L あたり 6 g のリン酸二水素カリウム (和光純薬) と 1.32 g の塩化カルシウム二水和物 (和光純薬)、10 mL のオートクレーブ滅菌済み 400×硫酸マグネシウム七水和物溶液、0.4 mL の 1 mg/mL KI 溶液と 0.4 mL の 1,000× Trace metal (※3) を加えた。400×硫酸マグネシウム溶液は 50 mL の脱イオン水に 10 g の硫酸マグネシウム七水和物 (和光純薬) を溶かし、オートクレーブ滅菌した。

※2 Vitamin mix

1,000×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。

※3 10,000×Trace metal

10,000× 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滅菌した。

大腸菌抗生物質耐性形質転換体選択培地 (LB-Amp-Cam 培地)

脱イオン水 1 L あたり、25 g の LB Broth Miller (ナカライテスク) を加えた。オートクレーブ滅菌後、終濃度 50 µg/mL または 100 µg/mL となるようアンピシリン (和光純薬) と終濃度 34 µg/mL となるようにクロラムフェニコール (和光純薬) を加えた。

アンピシリン耐性プラスグロウ培地 (Plus-grow-Amp 培地)

脱イオン水 1 L あたり、40 g のプラスグロウ (ナカライテスク) を加えた。オートクレーブ滅菌後、終濃度が 100 µg/mL となるようアンピシリンを加えた。

酵母の遺伝子破壊株と遺伝子過剰発現株の構築

本研究で作製した遺伝子破壊株および遺伝子過剰発現株の構築手順を以下に示す。形質転換体の選択マーカーとして、*S. cerevisiae* 由来の *URA3* 遺伝子と *HIS3* 遺伝子、*C. glabrata* 由来の *LEU2* (*CgLEU2*) 遺伝子と *HIS3* (*CgHIS3*) 遺伝子およびカナマイシン耐性を付与する *kanMX* 遺伝子を用いた。

遺伝子破壊株は、ゲノム上の目的遺伝子のオープンリーディングフレーム (ORF) を選択マーカー遺伝子と置換することにより構築した。遺伝子破壊のための DNA 断片を増幅するために、目的遺伝子の ORF から上流と下流のそれぞれ 40 塩基に続き、選択マーカーを増幅するための 20 塩基の配列をもつプライマーを設計した。この PCR プライマーと選択マーカーをもつプラスミドを鋳型とした PCR により DNA 断片を増幅した。この

PCR産物を用いて酵母株を形質転換し、選択培地で生育したコロニーについて、コロニーPCRあるいは表現型解析により目的遺伝子が破壊されていることを確認した。

遺伝子過剰発現株は、ゲノム上の目的遺伝子本来のプロモーター配列の下流（ATGを+1位としたときの-1位）に選択マーカー遺伝子と*TDH3*遺伝子プロモーター配列（構成的かつ強力なプロモーター）を挿入することにより構築した。遺伝子過剰発現のためのDNA断片を増幅するために、目的遺伝子の-40位から-1位までの配列に続き、選択マーカー遺伝子を増幅するための20塩基の配列をもつプライマーおよび選択マーカー遺伝子を逆方向から増幅するプライマーを用いてPCRによりDNA断片を増幅した。また、選択マーカー遺伝子下流の20塩基に続き、*TDH3*プロモーター配列の20塩基をもつプライマーおよび目的遺伝子の+40位から+1位までの配列に続き、*TDH3*プロモーターを逆方向から増幅するプライマーを用いてPCRによりDNA断片を増幅した。これら2つのPCR産物を精製した後、混合してPCRにより増幅し、これら2つのPCR産物を連結した。このPCR産物を用いて酵母株を形質転換し、選択培地で生育したコロニーについて、コロニーPCRにより*TDH3*プロモーターが挿入されたことを確認し、RT-qPCR法により親株よりも転写量が増加していることを確認した。

分子生物学的方法

ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR)

酵母形質転換用のDNA断片を作製するために、5×Prime Star GXL (TaKaRa)を用いた。PCRチューブ(0.2 mL)に5×Prime Star GXL bufferを5 µL、dNTP Mixtureを2 µL、2種類(forward/reverse、各10 µM)のプライマーを各0.25 µLと鋳型DNA(プラスミドであれば0.1 ng、酵母ゲノムであれば10 ng)を加え、Prime Star GXL DNA Polymeraseを1 µL加え、滅菌水で反応液量の合計が25 µLになるよう調製した。サーマルサイクラー (Thermal Cycler Dice mini TP100、TaKaRa)にチューブをセットし、94°Cで1分間の変性後、プライマーの配列に最適な温度(55°Cまたは60°C)でアニーリング15秒間、68°Cで1 kbpあたり1分間伸長させる反応を30回繰り返した。

コロニーPCR

KOD FX Neo (TOYOBO) を用いた。PCR チューブに 2×PCR Buffer for KOD FX Neo を 5 μL 、2 mM dNTPs を 2 μL 、2 種類 (forward/reverse、各 10 μM) のプライマーを各 0.3 μL 、KOD FX Neo を 0.2 μL 加え、滅菌水で反応液量が 10 μL になるよう調整した。マイクロチップの先端にコロニーをごく少量かき取り、反応液に懸濁してサーマルサイクラーに PCR チューブをセットした。94°C で 2 分間の変性後、プライマーの配列に最適な温度 (55°C または 68°C) でアニーリング 30 秒間、68°C で 1 kbp あたり 1 分間伸長させる反応を大腸菌の場合は 25 回、酵母菌の場合は 40 回繰り返した。

PCR 産物の精製

LaboPass™ PCR Purification Kit (COSMO Genetech) を用いて説明書に従って PCR 産物を精製した。PCR 産物を含む溶液に 5 倍量の Buffer PB を加えてよく混合してから、スピнкаラムを挿入した Collection Tube に全量移した。13,000 rpm で 1 分間、室温で遠心分離した後、カラム素通り液を捨て、750 μL の Buffer NW を加えた。13,000 rpm で 1 分間、室温で遠心分離した後、カラム素通り液を捨て、再度 13,000 rpm で 1 分間、室温で遠心分離した。スピнкаラムを新しい 1.5 mL チューブに挿入し、50 μL の EB Buffer を添加して、1~5 分間静置した。13,000 rpm で 1 分間遠心分離し、Nano Drop (Nano Drop Lite, Thermo Fisher Scientific) で回収した溶液の DNA 濃度を測定した。

アガロースゲル電気泳動

Agarose S (ニッポン・ジーン) を 1×TAE 溶液 (50×TAE (ニッポン・ジーン) 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% (1 kbp 以上の場合) もしくは 2% (1 kbp 以下の場合) になるように加えた。DNA 試料に 6×Loading buffer (ニッポン・ジーン) 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 15 分間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 Gene Ladder wide 1 (0.1-20 kbp、ニッポン・ジーン) をサイズマーカーとして使用した。

アガロースゲルからの DNA 断片の回収

LaboPass™ Gel Purification Kit(COSMO Genetech)を用いて、アガロースゲルから DNA 断片を回収した。使用方法は説明書に従った。アガロースゲル電気泳動後、目的のバンドをカミソリで切り取り、1.5 mL チューブに入れた。切り取ったゲルに対して3倍量の Buffer GB を加えた。50°Cに設定したヒートブロック(Cool Thermo Unit CTU-N、TAITEC)で2~3分間保温し、ゲルを完全に溶解させてからスピнкаラムを挿入した Collection Tube に全量移した。13,000 rpm で1分間、室温で遠心分離した後、カラム素通り液を捨て、750 µL の Buffer NW を加えた。13,000 rpm で1分間、室温で遠心分離した後、カラム素通り液を捨て、再度 13,000 rpm で1分間、室温で遠心分離した。スピнкаラムを新しい 1.5 mL チューブに挿入し、50 µL の EB Buffer を添加して、1~5分間静置した。13,000 rpm で1分間遠心分離し、Nano Drop で DNA 濃度を測定した。

DNA 塩基配列の決定

プラスミドベクターにクローニングした遺伝子について、DNA 塩基配列を決定した。シーケンスサンプルの調製には Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit(Applied Biosystems)を使用した。Big Dye Premix を 1 µL、Big Dye terminator 5×sequencing buffer(Applied Biosystems)を 3.5 µL、10 µM プライマーを 0.32 µL、鋳型 DNA を 200 ng 加え、全量が 20 µL になるよう滅菌水を加えた。サーマルサイクラーを用いて、96°Cで1分間の変性後、96°Cで10秒間、50°Cで5秒間、60°Cで4分間の反応を30回繰り返した。反応液 20 µL に 125 mM EDTA を 2 µL、3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を 2 µL を加えて懸濁し、99.5%エタノールを 50 µL 加えて15分間室温で静置した。12,000 rpm で10分間、室温で遠心分離し、上清を除いた。70%エタノールを 100 µL 加えてなじませてから、12,000 rpm で10分間、室温で遠心分離し、上清を除いた後、風乾させた。沈殿を 20 µL の Hi-Di ホルムアミド (Applied Biosystems)に溶解し、サーマルサイクラーを用いて 94°Cで2分間の熱処理した後、すばやく氷冷した。シーケンサー(ABI PRISM 3500 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。

酵母からの RNA 抽出

2 mL の高リン酸液体培地に酵母を植菌し、30°C で 2 日間振盪培養した。2 mL の培養液の OD₆₀₀ (細胞濁度) から、5 mL の高リン酸液体培地に初期 OD₆₀₀ が 0.05 か 0.1 になるように植菌し、OD₆₀₀ が 1.0 ± 0.2 になるまで培養した。培養液を丸底チューブに移して卓上多本架遠心機 (LC-220、TOMY) を用いて 2,000 rpm で 5 分間、室温で遠心分離して集菌した。1 mL の滅菌水に懸濁後、1.5 mL エッペンドルフチューブに移して、卓上遠心機 (マイクロ冷却遠心機 3520、KUBOTA) を用いて、13,000 rpm で 10 秒間、室温で遠心分離した。上清を除いて集菌した細胞は、液体窒素に浸し凍結させ保存した。凍結した細胞に RLT buffer を 600 μL 加えて懸濁した。細胞懸濁液と等量のジルコニアビーズ (ZB-045 (φ 0.4~0.5 mm)、アズワン) が入った 2 mL スクリューキャップチューブに懸濁液を移し、ビーズ式細胞破碎装置 (Micro Smash™ MS-100R (冷却型)、TOMY) を用いて 3,000rpm で 5 分間、4°C での破碎を 3 回繰り返した。顕微鏡で細胞が破碎したことを確認してから、上清を新しい 1.5 mL エッペンドルフチューブに移し、卓上遠心機で 13,000rpm で 2 分間、室温で遠心分離した。上清を新しい 1.5 mL エッペンドルフチューブに移し、上清と等量の 70 %エタノールを加えた。RNeasy spin column をセットした 2 mL collection tube に全量を移し、13,000 rpm で 10 秒間、室温で遠心分離した。カラム素通り液を除き、メンブレン洗浄のため、RW1 buffer を 700 μL 加えて 13,000 rpm で 10 秒間、室温で遠心分離した。カラム素通り液を除き、RNeasy spin column に RPE buffer を 500 μL 加え、13,000 rpm で 10 秒間、室温で遠心分離した。カラム素通り液を除き、RNeasy spin column に RPE buffer を 500 μL 加え、13,000 rpm で 2 分間、室温で遠心分離した。カラムに残った buffer を除くため、RNeasy spin column を新しい 2 mL collection tube にセットし 13,000 rpm で 1 分間、室温で遠心分離した。RNeasy spin column を新しい 1.5 mL チューブに移し、RNase-free water を 50 μL 加えて、1~5 分間静置した。13,000 rpm で 1 分間、室温で遠心分離して RNA を抽出し、RNA 濃度は Nano Drop を用いて測定した。

定量的逆転写 PCR (RT-qPCR)

複数の菌株で共通の遺伝子の転写量を調べる時はワンステップ RT-qPCR 法を用い、一つの菌株で複数の遺伝子の転写量を調べる時はツーステップ RT-qPCR 法を用いた。

ワンステップ RT-qPCR

one step TB Green Prime Script RT-PCR kit II (TaKaRa) を用いた。PCR チューブ (Hi-8-tube、TaKaRa) に 2×one step TB Green RT-PCR buffer 4 を 5 μ L、Prime Script 1step Enzyme Mix 2 を 0.4 μ L、2 種類(forward/reverse、各 10 μ M)のプライマーをそれぞれ 0.4 μ L、total RNA (1 ng) を 1 μ L を加え、RNase free dH₂O で反応溶液が合計 10 μ L になるよう調製した。この反応液をサーマルサイクラー (Thermal Cycler Dice Real time System Single TP850、TaKaRa) にセットし、42°Cで 5 分間、95°Cで 10 秒間の cDNA 合成反応後、95°Cで 5 秒間、60°Cで 30 秒間の反応を 40 回繰り返した。

ツーステップ RT-qPCR

Primer Script RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いた。PCR チューブ(PCR-8TNEW、BMBio)に 5×Primer Script RT Master Mix (Perfect Real Time) を 2 μ L、total RNA (200ng) を 2 μ L 加え、RNase Free dH₂O で反応溶液が 10 μ L になるように調製した。この反応液をサーマルサイクラー(Thermal Cycler Dice mini TP100、TaKaRa)にセットし、37°Cで 15 分間、85°Cで 5 秒間の逆転写反応により cDNA を合成した。次に、TB Green Premix Ex Taq II (Til RNase Plus) を用いて、PCR チューブ (Hi-8-tube、TaKaRa) に 2×TB Green Premix Ex Taq II (Til RNase Plus) を 5 μ L、2 種類(forward/reverse)のプライマー (10 μ M) を 0.4 μ L、cDNA 溶液 (0.2 ng) を 1 μ L 加え、反応溶液が合計 10 μ L になるように滅菌水で調製した。この反応液をサーマルサイクラー (Thermal Cycler Dice Real time Single TP850、TaKaRa) にセットし、95°Cで 30 秒間の変性後、95°Cで 5 秒間、60°Cで 30 秒間の反応を 45 回繰り返した。

酵母の形質転換

酵母の形質転換は酢酸リチウム法により以下の手順で行った。2 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°Cで振盪培養した。OD₆₀₀ の測定には、Smart Spec™ Plus Spectrophotometer (BIO-RAD) を用いた。16 mL 丸底チューブに移し、卓

上多本架遠心機 (LC-220, TOMY) を用いて 2,000 rpm で 5 分間、室温で遠心分離し、集菌した。100 mM 酢酸リチウム (SIGMA) を 500 μ L 加え、1.5 mL エッペンドルフチューブに移して卓上マイクロ冷却遠心機 (3520, KUBOTA) 14,000 rpm で 10 秒間、室温で遠心分離した。上清を取り除き、50% ポリエチレングリコール (SIGMA) を 240 μ L、1 M 酢酸リチウムを 36 μ L、2 mg/mL キャリア DNA (Deoxyribonucleic Acid Sodium Salt from Salmon Sperm, 和光純薬) を 25 μ L、PCR 産物溶液またはプラスミド DNA (1~10 ng) と滅菌水で 50 μ L に調製した溶液を順番に加え、ボルテックスでよく混合した。30°C で 30 分間保温し、その後 42°C で 20 分間ヒートショックを行った。懸濁液を 14,000 rpm で 10 秒間、室温で遠心分離し、上清を取り除いた。*kanMX* (薬剤耐性遺伝子) を形質転換体選択マーカーとして使用する場合は、沈殿に YPD を 1 mL 加えて懸濁後、丸底チューブに移して 30°C で 1 時間振盪培養した。細胞を集菌し、滅菌水 100 μ L 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°C で培養した。

大腸菌の形質転換

大腸菌の形質転換には、DH5 α competent Quick (TOYOBO) (プラスミド構築用) と Rosetta (Novagen) (GST 融合タンパク質発現用) を使用した。コンピテントセル 10 μ L にプラスミド DNA (1~10 ng) を混合し、氷上で 30 分間冷却した。42°C で 45 秒間のヒートショック後、LB 培地を 90 μ L 加え、37°C で 1 時間振盪培養した。細胞を集菌し、形質転換体選択 (LB-Amp あるいは LB-Amp-Cam) 培地に塗布し、37°C で保温した。

大腸菌からのプラスミド回収

大腸菌からプラスミド DNA を回収するために LaboPass™ Plasmid Mini Purification Kit (COSMO Genetech) を説明書に従って使用した。目的のプラスミドを持つ大腸菌を 2 mL の plus-grow-Amp 液体培地に植菌し、37°C で一晩振盪培養した。この培養液を 1.5 mL チューブに移し、卓上遠心機を用いて 13,000 rpm で 10 秒間、室温で遠心分離した。上清を取り除き、250 μ L の Resuspension Buffer を加えて懸濁した。そこへ 250 μ L の Lysis Buffer を加えて 4 回転倒混和した。5 分間静置した後、350 μ L の Neutralization Buffer を加えて 4 回転倒混和した。13,000 rpm で 10 分間、室温で遠心分離し、スピ

ンカラムをセットした Collection Tubes に上清を移した。13,000 rpm で1分間、室温で遠心分離し、カラム素通り液を捨てた。750 μ L の Wash buffer を加えて 13,000 rpm で1分間、室温で遠心分離した後、もう1度、遠心分離して余分な Wash buffer を取り除いた。スピカラムを新しい 1.5 mL チューブにセットし、50 μ L の Elution Buffer を加え、1~5分間静置し、13,000 rpm で1分間、室温で遠心分離した。Nano Drop を用いて溶出されたプラスミド DNA の濃度を測定した。

生化学的方法

大腸菌での酵母 Ppx1 p タンパク質の発現と精製

GST-Ppx1p 融合タンパク質を発現するプラスミドをもつ大腸菌 (Rosetta 株) を 3 mL の LB-Amp-Cam 培地で前培養した。本培養液 100 mL に対して 2% になるように植菌し、37°C で振盪培養した。OD₆₀₀=1 におよそ達したときに最終濃度が 0.1 mM となるように IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) を添加し、37°C で 4 時間培養した。卓上多本架遠心機 (LC-220, TOMY) を用いて 3,500 rpm で 5 分間、室温で遠心分離して集菌した。IPTG 添加前と IPTG 添加後の培養液を一部サンプリングしておき、IPTG 添加による GST 融合タンパク質の発現が誘導されたことを SDS-PAGE で確認した (図 1-3 A)。集菌した細胞を 5 mL の破碎用 buffer (※4) に懸濁した。懸濁液を氷上で冷やしながら超音波破碎機 (UD-201, TOMY) を用いて細胞を破碎した。超音波を OUT PUT 3、DUTY constant で 30 秒間あて、3 分間氷上で冷却することを 5 回繰り返した。13,000 rpm で 10 分間、4°C で遠心分離し、上清を回収して細胞粗抽出液とした。

精製にはグルタチオンセファロース 4B (GE Healthcare) を用いた。はじめに、PBS で平衡化した 500 μ L のグルタチオンセファロース 4B に細胞粗抽出液を 1 mL 添加してローテーターを用いて 30 分間、室温で転倒混和して、GST 融合タンパク質を担体に結合させた。グルタチオンセファロースのマニュアルでは担体の洗浄に PBS を用いるが、回収する画分にリン酸が含まれると以降の実験に影響するため、Tris-HCl (pH 8.0) バッファーに変更した。担体の 10 倍量の Tris-HCl で担体を 3 回洗浄した後、10 mM 還元型グルタチオンを含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) を担体の 4 倍量加え、室温で 15 分間静置して目的の GST 融合タンパク質を溶出させた。500 \times g で 5 分間、遠心分離し

て上清を 1.5 mL チューブに回収することを 3 回繰り返した。SDS-PAGE で目的タンパク質が精製されたことを確認した (図 1-3 B)。GST 融合タンパク質のうち、GST 部分を切断して目的タンパク質のみ溶出させる場合には、PreScission Protease を用いた。まず、PreScission Protease は担体量 1 μ L に対し 80 μ L の PreScission Protease と 920 μ L の PreScission 切断バッファーを混合した溶液を 5°C で調製した。溶出のステップに進む前の洗浄後の担体を、担体の 10 倍量の PreScission 切断バッファーで再懸濁し、500 \times g で 5 分間、遠心分離して上清を除いた後、調製した PreScission Protease 溶液を加え、穏やかに転倒混和した。5°C で 4 時間反応させ、500 \times g で 5 分間、遠心分離して上清を回収し、GST タグを切断し ScPpx1p のみを回収できたことを SDS-PAGE で確認した (図 1-3 C)。精製したタンパク質は Bradford 法によりタンパク質濃度を決定した。

※4 大腸菌細胞破碎用 buffer

大腸菌細胞破碎用 buffer の組成は、1 \times PBS、5% (v/v) TritonX-100、0.1 mM PMSF、プロテアーゼインヒビターカクテル (Thermo Fisher Scientific) である。

SDS 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

10% SDS-PAGE ゲルを用いた。分離ゲル 5 mL は、40% (w/v) アクリルアミド/ビス混合液 (ナカライテスク) を 1.3 mL、1.5 M Tris-HCl (pH8.8) を 1.3 mL、10% (w/v) SDS を 50 μ L、10% (w/v) ペルオキシ二硫酸アンモニウム (APS) を 50 μ L、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) を 2 μ L、2.3 mL の純水を加えて調製し、ゲル型に流し込んで上から純水をゆっくり注いだ。濃縮用ゲル 3 mL は、40% (w/v) アクリルアミド/ビス混合液を 380 μ L、1.0 M Tris-HCl (pH6.8) を 380 μ L、10% (w/v) SDS を 30 μ L、10% (w/v) APS を 30 μ L、TEMED を 3 μ L、純水を 2.2 mL 加えて調製した。分離ゲル上に注いだ純水を除き、濃縮用ゲルを分離ゲルの上に重層した。タンパク質サンプルは SDS-PAGE sample buffer (※5) に懸濁し、95°C で 5 分間煮沸した。泳動用 buffer には Tris-glycine buffer (※6) を用いた。定電圧 100 V、150 mA、10.0 W で 2 時間電気泳動した。タンパク質のバンドは Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色液により染色した。タンパク質の分子量の推定には WIDE VIEW™ プレステインタンパク質サイズマーカー III (和光純薬) を用いた。

※5 SDS-PAGE sample buffer

SDS-PAGE sample buffer の組成は、120mM Tris-HCl (pH6.8)、10% グリセロール、4% SDS、8% β -メルカプトエタノール、0.004% ブロモフェノールブルーである。溶液サンプルには2×SDS-PAGE sample buffer をサンプルと等量懸濁し、菌体サンプルには1×SDS-PAGE sample buffer を5 OD₆₀₀ の細胞あたり100 μ L 懸濁した。

※6 Tris-glycine buffer

Tris-glycine buffer の組成は、25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% SDS である。

タンパク質の定量

Bradford 法による Protein Assays キット (BIO RAD) を使用し、使用方法は説明書に従った。プロテインアッセイ染色液は滅菌水で5倍希釈して濾過したものを用いた。検量線はBSAの希釈系列(0.05、0.1、0.2、0.5 (mg/mL))で作成した。タンパク質溶液20 μ Lにプロテインアッセイ染色液180 μ L加えて、室温で5分間静置し、A₅₉₅での吸収極大波長を測定した。

Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色

SDS-PAGE ゲル中のタンパク質の染色にはCBB Stain One Super (Ready To Use) (ナカライテスク)を使用した。電子レンジを使用することで、染色時間が大幅に短縮できるため、推奨されている電子レンジ染色法に従った。ゲルの洗浄のため、純水にゲルを浸し、電子レンジで1分間、600 Wで加熱した。SDS-PAGE ゲルを室温で5分間振盪し、純水を除く操作を2回繰り返した。染色するため、ゲルが浸る程度のCBB Stain One Super (約50 mL)を加えて電子レンジで30秒間~1分間加熱した。SDS-PAGE ゲルを2分間室温で振盪しCBB Stain One Superを除去した。再び、ゲルが浸る程度の純水を加え、電子レンジで1分間加熱し、SDS-PAGE ゲルを室温で5分間振盪し純水を除去する操作を2回繰り返すことで、SDS-PAGE ゲルを脱染色した。

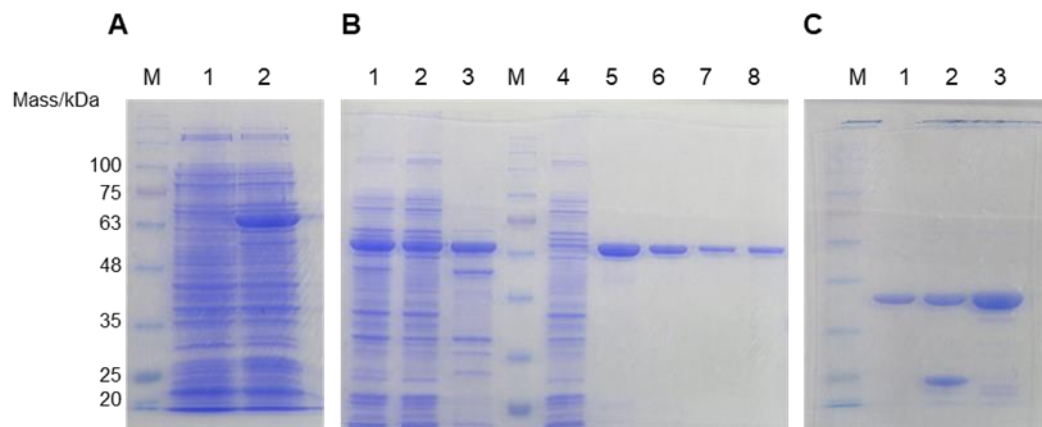


図 1-3 大腸菌での酵母 Ppx1p 発現誘導と精製

- (A) 大腸菌での酵母 Ppx1p 発現誘導。GST 融合 ScPpx1p の分子量は 71 kDa。Lane 1: IPTG 誘導前のタンパク質抽出液、Lane 2: IPTG 誘導後のタンパク質抽出液。M: タンパク質の分子量の推定には WIDE VIEW™ プレステインタンパク質サイズマーカーⅢ (和光純薬) を用いた。
- (B) 発現した酵母 Ppx1p の精製。GST 融合 Ppx1p の分子量は 71 kDa。Lane 1: タンパク質抽出液 (破碎前)、Lane 2: 破碎後の上清画分、Lane 3: 破碎後沈殿、Lane 4: 素通り画分、Lane 5-7: 溶出 1~3 回目画分、Lane 8: ビーズ。
- (C) GST 融合 Ppx1p から ScPpx1p の切り出し。GST の分子量は 26 kDa、ScPpx1p の分子量は 45 kDa。Lane 1: GST 切り出し処理後の上清 (ScPpx1p のみ)、Lane 2: GST 切り出し処理後のビーズ (ScPpx1p と GST)、Lane 3: PreScission protease (46 kDa)。

細胞内オルトリン酸およびポリリン酸の抽出

ポリリン酸とオルトリン酸は同一の細胞破碎液から調製した。高リン酸培地で2日間培養した前培養液から、10 mLの高リン酸培地に初期 $OD_{600}=0.05$ になるように植菌した。 $OD_{600}=1$ に達した培養液から細胞を集菌し、10 OD分の細胞を1.5 mL エッペンドルフチューブに回収した。500 μ LのLETS buffer (※7)を加えて懸濁し、500 μ L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。すぐに500 μ Lのacid phenol (ニッポンジーン)を加え、ビーズ式細胞破碎装置にて細胞破碎(3,000 rpm、5分間、4°C)した。14,000 rpmで5分間、4°Cで遠心分離した後、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 μ Lのクロロホルム(和光純薬)を加えてvortexで30秒間混合し、14,000 rpmで5分間、4°Cで遠心分離した後、上層を新しい1.5 mL エッペンドルフチューブに移した。ここから、オルトリン酸定量用に45 μ L(1 OD分)を1.5 mLチューブに分注し、13,000 rpmで5分間、4°Cで遠心分離して上清を新しい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。残り約400 μ Lの細胞懸濁液にDNase IとRNase Aをそれぞれ10 μ gと1M $MgCl_2$ 溶液を1 μ L加えてよく懸濁し、37°Cで1時間反応させた。その後、溶液の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、14,000 rpmで10分間、4°Cで遠心分離し、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、14,000 rpmで5分間、4°Cで遠心分離して溶液を完全に除き、沈殿を風乾(約30分間室温で静置)させた。沈殿に50 μ LのTE buffer(10 mM Tris-HCl(pH7.4)、1 mM EDTA)を加えて沈殿をよく溶解させてポリリン酸抽出液とした。

ポリリン酸抽出液は精製したポリリン酸ホスファターゼ Ppx1pによりオルトリン酸に分解させる処理が必要である。ポリリン酸抽出液をPpx1p reaction buffer (※8)に懸濁し、精製した大腸菌組み換え体 ScPpx1pを0.1 μ g加えて37°Cで1時間反応させた。

※7 LETS buffer

LET bufferの組成は、終濃度が10 mM Tris-HCl (pH8.0)、10 mM EDTA、100 mM LiCl、0.5% SDSである。

※8 Ppx1p reaction buffer

Ppx1p reaction buffer の組成は、終濃度が 40 mM Tris-HCl (pH7.5)、200 mM 酢酸アンモニウム、8 mM MgCl₂ である。

BIOMOL Green によるオルトリン酸の定量

オルトリン酸量は、マラカイトグリーンを用いたリン酸比色定量試薬「BIOMOL® Green」(Enzo Life Science) を用いて定量した。BIOMOL Green を 200 μ L 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 μ L のサンプルを加え、室温にて 20 分静置した。反応時間を一定にするために 30 秒間隔でサンプルを加え、素早く A₆₂₀ nm 値を測定した。付属の標準リン酸水溶液 (800 μ M) を 10 倍希釈 (オルトリン酸の定量の場合は SDS を除く LETS buffer、ポリリン酸の定量の場合は 1×Ppx1p reaction buffer で希釈) して 80 μ M のリン酸水溶液を作製し、以降 2 倍の段階希釈を 3 回繰り返したサンプルで検量線を作成した。

出芽酵母の分裂寿命の測定

-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高リン酸合成培地に塗り拡げ、30°C で 1 日培養した。翌日、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) (図 1-4 A) 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、出芽していない酵母細胞を配置した (図 1-4 B)。30°C 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°C で培養し、世代時間に合わせて約 2 時間毎に母細胞から出芽した娘細胞を取り除き、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ふたの内側に置き、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

細胞の出芽を抑えるために 4°C でプレートを保管した。翌日の測定は 30°C で 30 分間程度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 1 回の出芽として出芽回数に加えた。48 細胞の分裂寿命測定を 1 セットとして、48 細胞または 96 細胞 (2 セット) の出芽回数の中央値を分裂寿命とした。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 以下のときに有意差があると判断した。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットした寿命曲線で評価できる (図 1-4 C)。

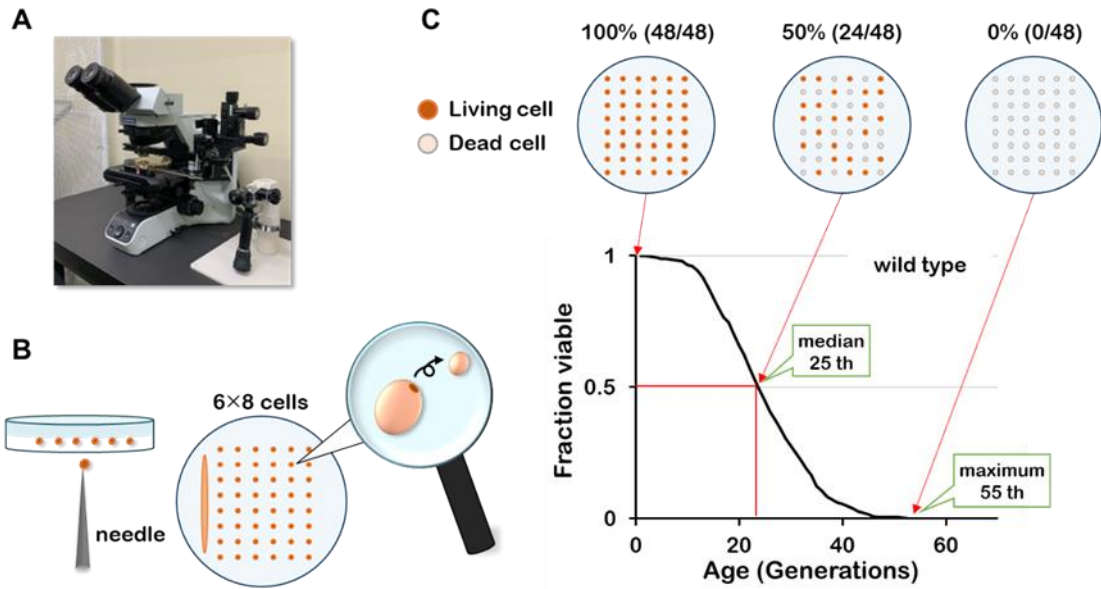


図 1-4 分裂寿命測定の概略と分裂寿命曲線

(A) マイクロマニピュレーター。

(B) 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、出芽していない酵母細胞を配置し測定する。

(C) 分裂寿命曲線。横軸に世代数、縦軸に生存率をプロットした。

第3節 【結果】

第1項 比色定量法による細胞内ポリリン酸・オルトリン酸定量法の確立

最初に、酵母細胞内のポリリン酸を定量する方法を確立させた。ポリリン酸の定量には、 ^{31}P -核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance: NMR) 分光法とマラカイトグリーンを用いたリン酸比色定量法が用いられている。 ^{31}P -NMR 分光法を用いた先行研究により、*pho80*破壊株では野生型株と比べてより多くのポリリン酸が細胞内に蓄積していることが示された (27)。 ^{31}P -NMR 分光法は、細胞培養液そのものをサンプルとして測定するため、細胞破碎などのサンプル調製の手間がかからないメリットがあるが、スペクトル中のポリリン酸のピーク面積の積分値からサンプル間での相対値は算出できるものの、定量性が十分でなく、オルトリン酸のピークがほとんどみられないことが問題であった。そこで、細胞内のポリリン酸およびオルトリン酸をより厳密に定量するために、本研究ではリン酸比色定量試薬を用いた方法を確立させた。Neef や Lonetti らが報告した、細胞破碎液から核酸サンプルとしてポリリン酸を回収し、過塩素酸で化学的に分解したオルトリン酸をマラカイトグリーン試薬で定量する方法を検討した (41, 42)。マラカイトグリーンは酸性溶液中で黄色を呈するが、オルトリン酸がモリブデン酸と結合した複合体と会合することにより緑色に変色するため、吸光度 $A_{620 \text{ nm}}$ を測定することでサンプル中のリン酸を定量できる (43)。ポリリン酸は核酸画分として抽出し、エタノール沈殿によってオルトリン酸を除いた。オルトリン酸は、エタノール沈殿前の細胞破碎液の一部をサンプルとして直接定量した。

上記の文献に基づく方法にはサンプル調製に関して二つの問題点があったので改良を加えた。まず、ポリリン酸からオルトリン酸を産出する酸加水分解の過程において、核酸由来の遊離リン酸が混入することを懸念した。そこで、酵母のポリリン酸ホスファターゼ Ppx1p を大腸菌で大量に発現・精製した組み換え体 ScPpx1p (図 1-3) を用いて、核酸抽出画分のポリリン酸をオルトリン酸に分解することにした。また、核酸由来の遊離リン酸を極力除くために、DNase と RNase により核酸を分解してからポリリン酸をエタノール沈殿により精製することで、核酸がほぼ含まれないポリリン酸抽出液を調製することができた。これらの改善を加える前の過塩素酸によりポリリン酸を分解させた場合の結果と比較すると、検出されるオルトリン酸量が減少傾向にあり、ポリリン酸由来

のオルトリン酸のみを定量することができたと判断した (図 1-5 A)。

次に、後述するポリリン酸ホスファターゼ *PPXI* 過剰発現株における結果 (第 1 章 第 3 節 第 5 項) について、³¹P-NMR 分光法での測定ではポリリン酸量は宿主株に比べて減少しなかったのに対して (Umeda *et al.*, 2023)、上記の比色定量法ではポリリン酸が大幅に減少し、かつオルトリン酸量の著しい増加がみられた (図 1-5 B, C)。この矛盾について、比色定量法では細胞破碎により抽出したサンプルを氷上で保持するときに過剰発現した Ppx1p がポリリン酸を分解していると考えた。そこで、細胞の破碎と同時にタンパク質を除去することが必須であると考え、ビーズによる細胞破碎の際にフェノールを加えて除タンパク質処理を行った。その結果、*PPXI* 過剰発現株において、抽出した核酸濃度はこれまでとほぼ変わらず、³¹P-NMR 分光法での結果と同様にポリリン酸量は減少しなかった。以上の結果より、二つの問題を解決したポリリン酸定量法を確立できた (図 1-6) と考え、この方法で本論文のすべてのサンプルについてポリリン酸およびオルトリン酸を定量した。

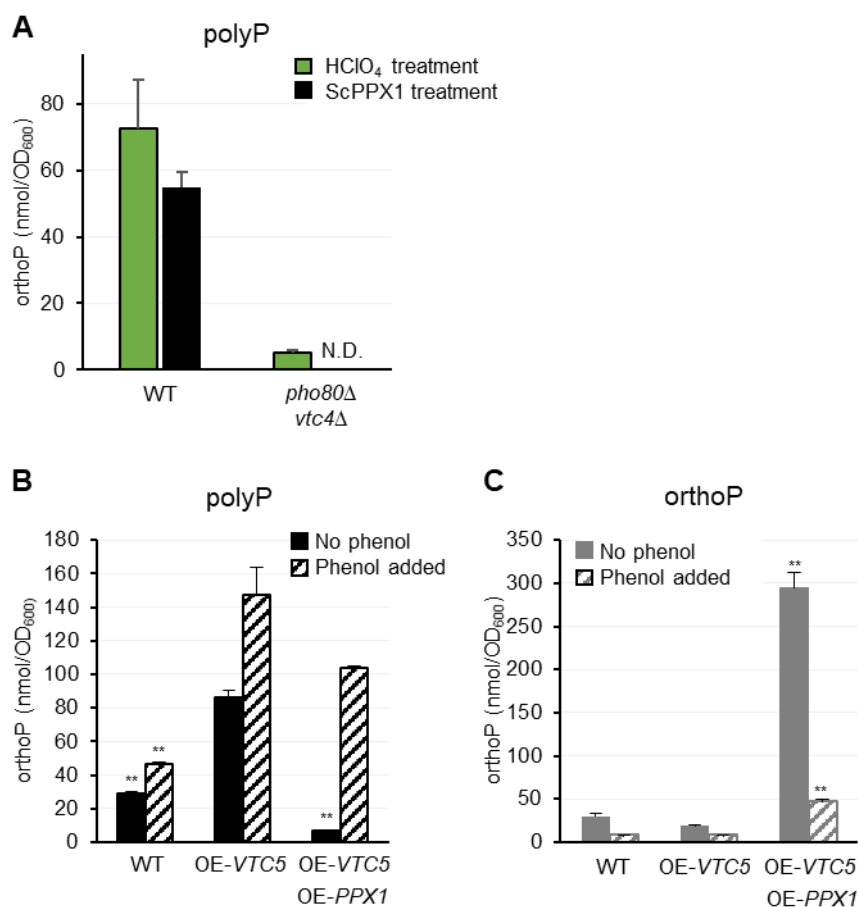


図 1-5 細胞内リン酸定量における課題の検討

- (A) ポリリン酸に対する過塩素酸 (■) による酸加水分解と組換え体 ScPpx1p による酵素的分解 (■) の比較。
- (B) 細胞内ポリリン酸量。同じ菌株由来のサンプルについて 3 回測定し、その平均と標準誤差を示した。Student's-*t* 検定から *VTC5* 過剰発現株に対する有意差を求め、有意差がある場合は (** : $p < 0.01$) で示した。
- (C) 細胞内オルトリン酸量。菌株は (A) と同じ。同じ菌株由来のサンプルについて 3 回測定し、その平均と標準誤差を示した。Student's-*t* 検定から *VTC5* 過剰発現株に対する有意差を求め、有意差がある場合は (** : $p < 0.01$) で示した。

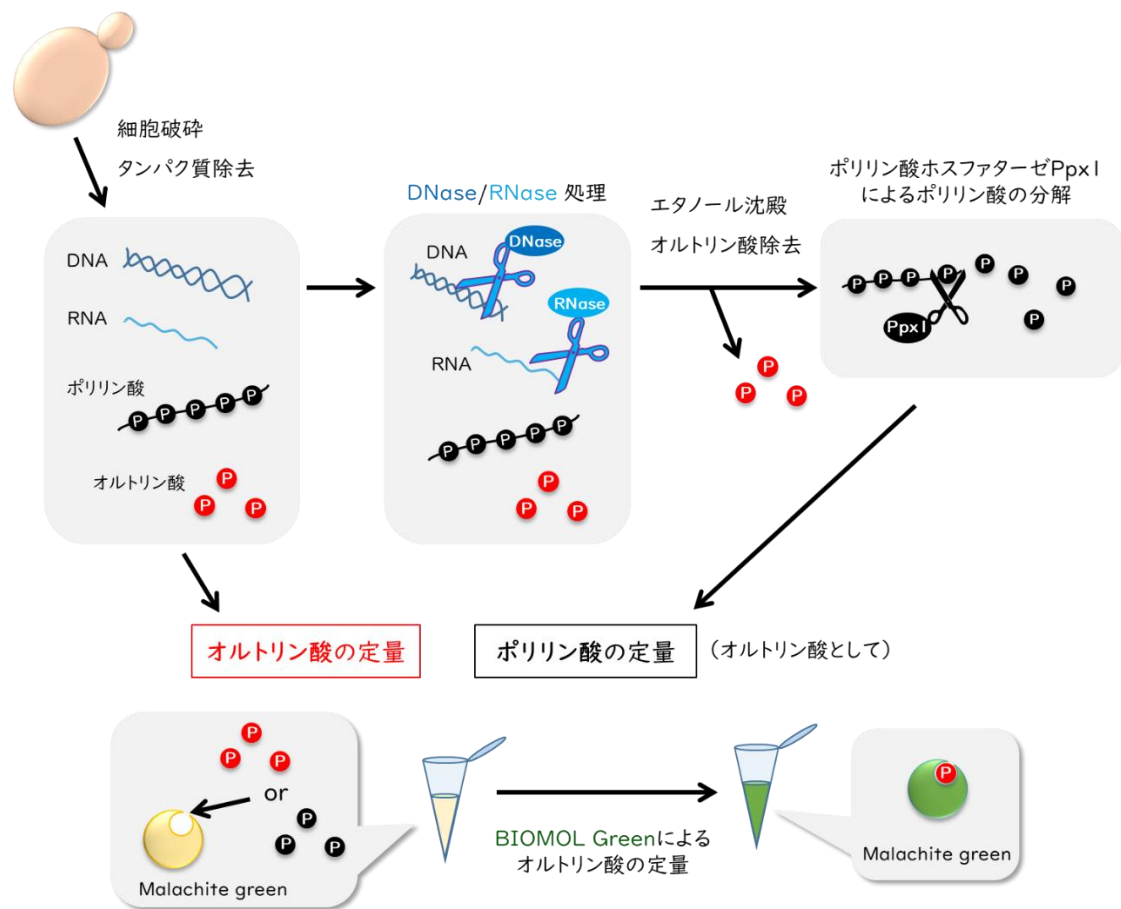


図 1-6 細胞内ポリリン酸・オルトリン酸定量法 (フロー図)

第 2 項 ポリリン酸ポリメラーゼ遺伝子破壊株の細胞内リン酸の定量

前項にて確立したリン酸定量法で、*pho80*破壊株と *pho80 vtc* 二重破壊株の細胞内ポリリン酸を定量した。細胞内ポリリン酸量について、短寿命である *pho80*破壊株 (10 世代) では、野生型株の約 6 倍に増加していた (図 1-7 A)。野生型株 (26 世代) と同程度の寿命である *pho80 pho4* 二重破壊株 (22.5 世代) では、野生型株と同程度のポリリン酸量であった。寿命が部分的に回復した *pho80 vtc1* 二重破壊株 (16 世代) と *pho80 vtc4* 二重破壊株 (17 世代) では、ポリリン酸が検出できなかった。*pho80 vtc3* 二重破壊株 (16 世代) は、寿命が部分的に回復しているものの、ポリリン酸が減少しなかった。*pho80 vtc2* 二重破壊株 (14 世代) は *pho80*破壊株の半分程度に減少した。分裂寿命が回復しなかった *pho80 vtc5* 二重破壊株 (9 世代) は、細胞内のポリリン酸量も *pho80*破壊株と同程度で減少しなかった。

次に、細胞内オルトリン酸量について、*pho80*破壊株および *pho80 vtc* 二重破壊株では野生型株と同程度であった (図 1-7 B)。このことから、細胞内オルトリン酸量は分裂寿命に影響していないことが示唆された。オルトリン酸量はポリリン酸量でみられた大幅な変動はみられず、恒常性が保たれているようであった。

*pho80*破壊株ではなく、野生型株の *VTC* 遺伝子を単独で破壊した株の分裂寿命と細胞内リン酸を定量した。*vtc1*破壊株と *vtc4*破壊株ではポリリン酸は検出できず、*vtc5*破壊株のポリリン酸は劇的に減少した (図 1-8 A)。一方、*vtc2*破壊株と *vtc3*破壊株のポリリン酸は野生型株の 6 割程度に減少した。オルトリン酸量については、*pho80 vtc* 二重破壊株と同様に、ほとんど変動がなかった (図 1-8 B)。ポリリン酸が検出されない *vtc1*破壊株と *vtc4*破壊株において、*vtc1*破壊株は野生型株と比べてやや短寿命であるが、*vtc4*破壊株の寿命は野生型株とほぼ同じであった (図 1-8 C)。このように、ポリリン酸が存在しない細胞で分裂寿命が変わらないことから、細胞内ポリリン酸は分裂寿命の維持に必須ではないことが示された。

【表 1-4】 第 1 章における酵母菌株の分裂寿命

| Relevant genotype | Median lifespan | Maximum lifespan | vs. WT | <i>p</i> -value vs. (Strain) |
|---|-----------------|------------------|---------|----------------------------------|
| Wild-type (WT) | 26.0 | 64 | — | — |
| <i>pho80</i> * ² | 10.0 | 20 | 1.2E-23 | — |
| <i>pho80 pho4</i> * ² | 22.5 | 44 | 1.6E-01 | 1.0E-23 (<i>pho80</i>) |
| <i>vtc1</i> * ² | 19.0 | 40 | 6.0E-04 | — |
| <i>pho80 vtc1</i> * ² | 17.0 | 30 | 8.5E-10 | 3.9E-16 (<i>pho80</i>) |
| <i>vtc2</i> * ² | 17.5 | 48 | 2.4E-05 | — |
| <i>pho80 vtc2</i> * ² | 12.0 | 40 | 3.2E-13 | 3.8E-03 (<i>pho80</i>) |
| <i>vtc3</i> | 23.0 | 62 | 8.3E-01 | — |
| <i>pho80 vtc3</i> | 16.5 | 37 | 4.3E-05 | 2.8E-07 (<i>pho80</i>) |
| <i>vtc4</i> * ² | 24.0 | 59 | 9.2E-01 | — |
| <i>pho80 vtc4</i> * ² | 16.0 | 33 | 6.0E-10 | 2.6E-11 (<i>pho80</i>) |
| <i>vtc5</i> * ² | 22.0 | 39 | 8.0E-02 | — |
| <i>pho80 vtc5</i> * ² | 9.0 | 20 | 5.5E-17 | 1.9E-01 (<i>pho80</i>) |
| <i>TDH3p-VTC1</i> | 17.5 | 41 | 4.4E-02 | 1.8E-08 (<i>TDH3p-VTC5</i>) |
| <i>TDH3p-VTC2</i> | 19.0 | 36 | 2.0E-02 | 6.0E-08 (<i>TDH3p-VTC5</i>) |
| <i>TDH3p-VTC3</i> | 22.5 | 42 | 7.6E-01 | 7.6E-13 (<i>TDH3p-VTC5</i>) |
| <i>TDH3p-VTC4</i> | 20.5 | 55 | 3.1E-01 | 2.6E-11 (<i>TDH3p-VTC5</i>) |
| <i>TDH3p-VTC5</i> | 13.0 | 22 | 6.4E-18 | — |
| <i>TDH3p-VTC5 vtc4</i> | 21.0 | 37 | 2.5E-03 | 1.2E-08 (<i>TDH3p-VTC5</i>) |
| <i>TDH3p-VTC4</i> <i>TDH3p-VTC1</i> | 17.5 | 43 | 9.2E-03 | 1.6E-05 (<i>TDH3p-VTC5</i>) |
| <i>TDH3p-VTC4</i> <i>TDH3p-VTC1</i> <i>TDH3p-VTC2</i> | 18.0 | 36 | 5.8E-02 | 9.2E-10 (<i>TDH3p-VTC5</i>) |
| <i>TDH3p-VTC4</i> <i>TDH3p-VTC1</i> <i>TDH3p-VTC3</i> | 18.5 | 28 | 5.8E-03 | 7.2E-08 (<i>TDH3p-VTC5</i>) |

【表 1-4】 第 1 章における酵母菌株の分裂寿命 (続き)

| Relevant genotype | Median | Maximum | <i>p</i> -value | |
|-------------------------|----------|----------|-----------------|--------------------------|
| | lifespan | lifespan | vs. WT | vs. (Strain) |
| <i>TDH3p-VTC4</i> | 15.0 | 23 | 1.7E-05 | 3.9E-03 |
| <i>TDH3p-VTC1</i> | | | | (<i>TDH3p-VTC5</i>) |
| <i>TDH3p-VTC2</i> | | | | |
| <i>TDH3p-VTC3</i> | | | | |
| <i>ppn1</i> | 15.0 | 32 | 4.1E-12 | — |
| <i>ppn2</i> | 15.5 | 35 | 7.4E-06 | — |
| <i>ppn1 ppn2</i> | 15.0 | 34 | 1.4E-04 | 1.2E-01 (<i>ppn1</i>) |
| <i>ppx1</i> | 15.5 | 47 | 3.7E-09 | — |
| <i>ppn1 ppn2 ppx1</i> | 12.5 | 47 | 9.1E-11 | 3.1E-01 (<i>ppn1</i>) |
| <i>TDH3p-PPN1</i> | 8.0 | 20 | 8.3E-26 | — |
| <i>TDH3p-PPN2</i> | 21.5 | 44 | 1.8E-01 | — |
| <i>TDH3p-PPX1</i> | 17.5 | 30 | 6.4E-09 | — |
| <i>TDH3p-PPN1</i> | 18.0 | 46 | 1.1E-06 | 4.5E-07 |
| <i>TDH3p-VTC5</i> | | | | (<i>TDH3p-VTC5</i>) |
| <i>TDH3p-PPN2</i> | 13.5 | 30 | 5.5E-10 | 1.8E-01 |
| <i>TDH3p-VTC5</i> | | | | (<i>TDH3p-VTC5</i>) |
| <i>TDH3p-PPX1</i> | 22.0 | 39 | 1.7E-02 | 8.3E-16 |
| <i>TDH3p-VTC5</i> | | | | (<i>TDH3p-VTC5</i>) |
| <i>TDH3p-PPN1 pho80</i> | 6.0 | 18 | 6.7E-20 | 4.4E-06 (<i>pho80</i>) |
| <i>TDH3p-PPN2 pho80</i> | 9.0 | 18 | 7.1E-18 | 1.1E-01 (<i>pho80</i>) |
| <i>TDH3p-PPX1 pho80</i> | 13.0 | 26 | 1.4E-11 | 2.1E-04 (<i>pho80</i>) |

*1 *p*-value は遺伝子の単独破壊あるいは単独過剰発現株については野生型株の分裂寿命と比較してウィルコクソンの順位和検定により算出した。複数遺伝子の破壊あるいは過剰発現株については比較した菌株名を括弧内に記述した。1.0E-02 未満を有意差ありと評価した。

*2 先行研究の結果を参考として示した。

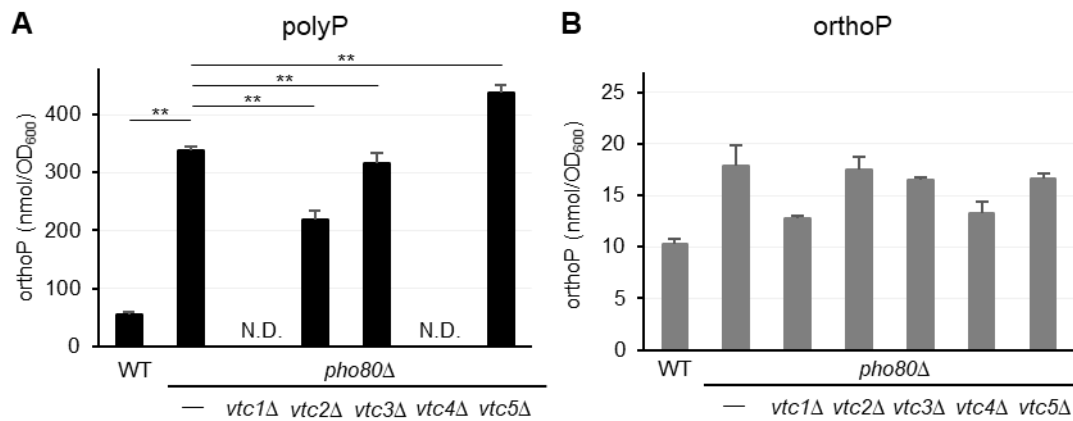


図 1-7 *pho80* 破壊株と *pho80 vtc* 二重破壊株における細胞内リン酸量

(A) 細胞内ポリリン酸量。同じ菌株のサンプルについて 3 回測定し、その平均と標準誤差を示した。Student's-*t* 検定から *pho80* 破壊株に対する有意差を求め、有意差がある場合は (** : $p < 0.01$) で示した。N.D. : 検出限界以下。

(B) 細胞内オルトリン酸量を示した。

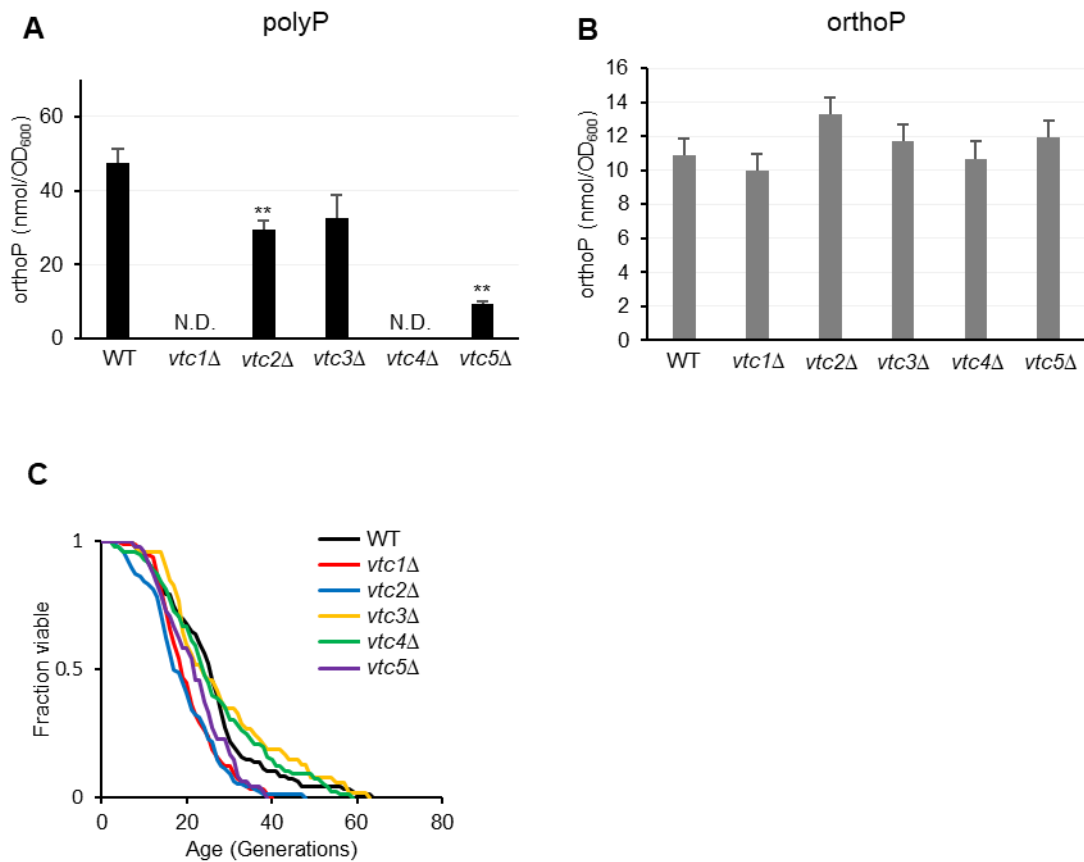


図 1-8 *VTC* 遺伝子の単独破壊株における細胞内リン酸量と分裂寿命

(A) *VTC* 遺伝子単独破壊株の細胞内ポリリン酸量。同じ菌株サンプルについて 3 回測定し、その平均と標準誤差を示した。Student's-*t* 検定から野生型株に対する有意差を求め、有意差がある場合は (**: $p < 0.01$) で示した。N.D.: 検出限界以下。

(B) 細胞内オルトリン酸量。サンプルは (A) と同じ。

(C) 分裂寿命曲線。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。野生型 (WT) 株 (—、中央値 26.0 世代)、*vtc1Δ* 株 (—、19.0 世代)、*vtc2Δ* 株 (—、19.0 世代)、*vtc3Δ* 株 (—、23.0 世代)、*vtc4Δ* 株 (—、26.5 世代)、*vtc5Δ* 株 (—、22.0 世代)

第 3 項 ポリリン酸ポリメラーゼ遺伝子過剰発現株の細胞内リン酸量と分裂寿命の測定

細胞内ポリリン酸の高蓄積が分裂寿命を短くすることを確かめるために、*VTC* 遺伝子を過剰発現させることでポリリン酸を高蓄積させることを試みた。まず初めに、*VTC* 複合体の構成遺伝子 *VTC1/VTC2/VTC3/VTC4/VTC5* 遺伝子をそれぞれ単独で過剰発現する株を構築した。酵母細胞内で構成的に強発現することが報告されている *TDH3* 遺伝子のプロモーター (40) を目的遺伝子の本来のプロモーターと置換させることで目的遺伝子を過剰発現させた。*VTC* 複合体の中で触媒活性を有する *VTC4* 遺伝子を過剰発現させても、細胞内ポリリン酸量と分裂寿命は野生型株と変わらなかった (図 1-9 A、C、D)。同様に、アクセサリ因子である *VTC1*、*VTC2*、*VTC3* 遺伝子について、それぞれ過剰発現させても細胞内のポリリン酸量はほとんど増加せず、分裂寿命もほとんど短縮しなかった。ところが、*VTC5* 遺伝子の単独過剰発現によって、ポリリン酸が高蓄積し、分裂寿命が顕著に短くなった。これは、*VTC4* 遺伝子を破壊することでポリリン酸が蓄積せず、分裂寿命が回復した。(図 1-9 A、D、表 1-4) どの *VTC* 過剰発現株においてもオルトリン酸は野生型株とほとんど変わらなかった (図 1-9 B)。

ポリリン酸の合成と液胞への取り込みには *VTC* 複合体の構成因子の存在比が重要であると考えられたため、*VTC1/VTC2/VTC3/VTC4* 遺伝子を共に過剰発現させることを試みた。液胞の *VTC* 複合体は *Vtc1p-Vtc3p-Vtc4p-Vtc5p* 複合体として存在している。*VTC1* と *VTC4* 遺伝子を共発現させた株では、細胞内ポリリン酸量は野生型株と変わらず、分裂寿命は *VTC1* 遺伝子の単独過剰発現株と変わらなかった (図 1-10 A)。この *VTC1-VTC4* 共発現株において、さらに *VTC2* 遺伝子を過剰発現させると、ポリリン酸量が増加したものの、分裂寿命の短縮はみられなかった (図 1-10 C、D)。同様に、*VTC1-VTC4* 共発現株において、さらに *VTC3* 遺伝子を過剰発現させると、ポリリン酸がより高蓄積した。*VTC1-VTC3-VTC4* の多重過剰発現の効果は、ポリリン酸の高蓄積と分裂寿命の短縮を引き起こした。*VTC1-VTC3-VTC4* の多重過剰発現株にさらに *VTC2* 過剰発現を追加すると *VTC5* 過剰発現株と同程度の短寿命となった。これらの *VTC* 多重過剰発現株では、細胞内オルトリン酸量の大きな変動はみられなかった (図 1-10 B)。

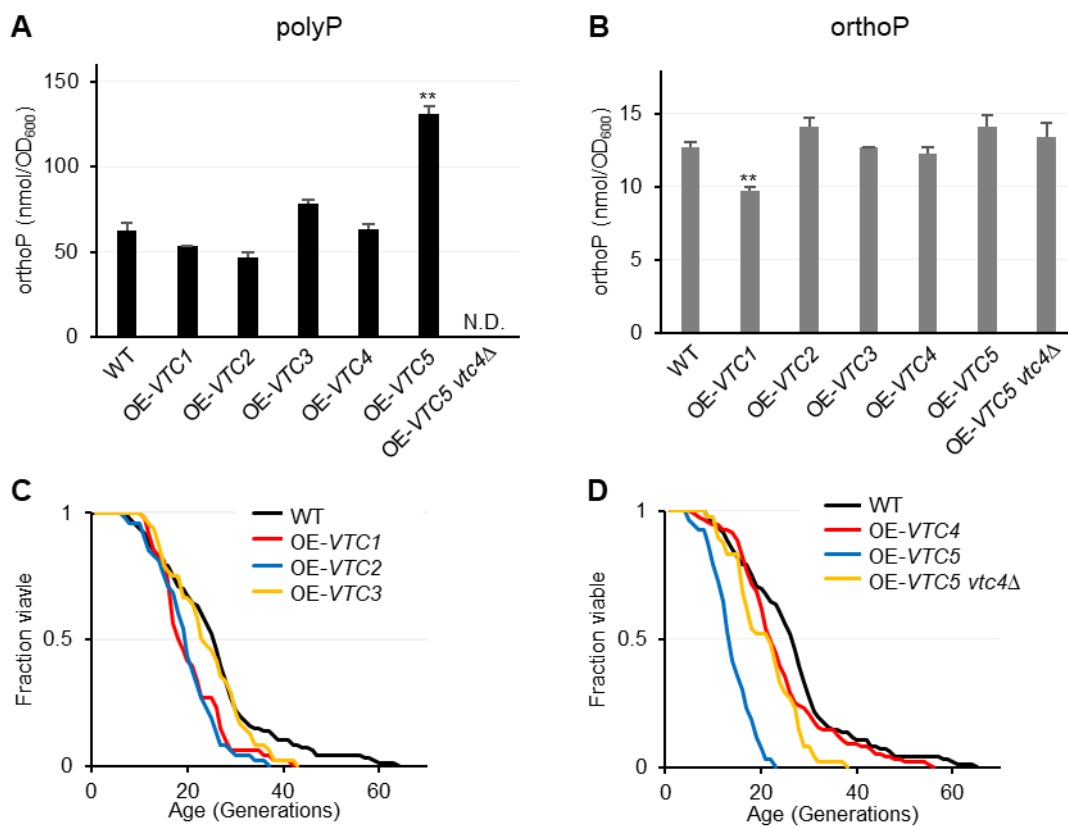


図 1-9 *VTC* 遺伝子単独過剰発現株における細胞内リン酸量と分裂寿命

- (A) *VTC* 遺伝子単独破壊株の細胞内ポリリン酸量。同じ菌株サンプルについて 3 回測定し、その平均と標準誤差を示した。Student's-*t* 検定から野生型株に対する有意差を求め、有意差がある場合は (*: $p < 0.05$) または (**: $p < 0.01$) で示した。N. D.: 検出限界以下
- (B) 細胞内オルトリン酸量を示す。
- (C) 分裂寿命曲線。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。野生型 (WT) 株 (—、26.0 世代)、OE-*VTC1* 株 (—、17.5 世代)、OE-*VTC2* 株 (—、19.0 世代)、OE-*VTC3* 株 (—、22.5 世代)
- (D) 分裂寿命曲線。野生型 (WT) 株 (—、26.0 世代)、OE-*VTC4* 株 (—、20.5 世代)、OE-*VTC5* 株 (—、13.0 世代)、OE-*VTC5 vtc4Δ* 株 (—、21.0 世代)

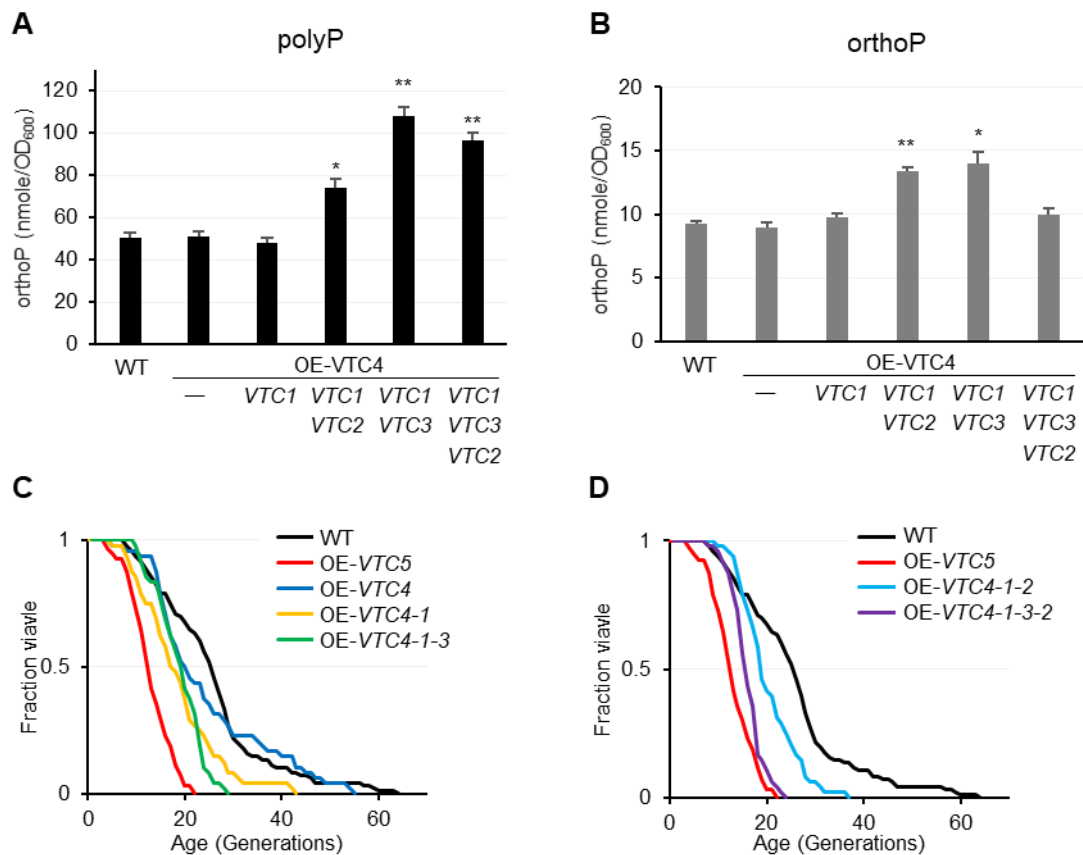


図 1-10 *VTC* 遺伝子を多重に過剰発現させた株の細胞内リン酸量と分裂寿命

- (A) *VTC* 遺伝子多重過剰発現株の細胞内ポリリン酸量。同じ菌株サンプルについて 3 回測定し、その平均と標準誤差を示した。Student's-*t* 検定から *VTC4* 過剰発現株株に対する有意差を求め、有意差がある場合は (*: $p < 0.05$) または (**: $p < 0.01$) で示した。
- (B) 細胞内オルトリン酸量。
- (C) 分裂寿命曲線。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。野生型 (WT) 株 (—、26.0 世代)、OE-*VTC5* 株 (—、13.0 世代)、OE-*VTC4* 株 (—、20.5 世代)、OE-*VTC4* OE-*VTC1* 株 (—、17.5 世代)、OE-*VTC4* OE-*VTC3* 株 (—、18.5 世代)
- (D) 分裂寿命曲線。野生型 (WT) 株 (—、26.0 世代)、OE-*VTC5* 株 (—、13.0 世代)、OE-*VTC4* OE-*VTC1* OE-*VTC2* 株 (—、18.0 世代)、OE-*VTC4* OE-*VTC1* OE-*VTC3* OE-*VTC2* 株株 (—、15.0 世代)

第 4 項 ポリリン酸ホスファターゼ遺伝子破壊株の細胞内リン酸量と分裂寿命の測定

前項では、*VTC* 遺伝子を過剰発現させてポリリン酸の合成・取り込みを促進することにより、液胞内へのポリリン酸の蓄積を試みた。ポリリン酸は *VTC* 複合体により合成される一方で、ポリリン酸ホスファターゼにより分解される。出芽酵母におけるポリリン酸ホスファターゼは、液胞膜に局在する *Ppn1p* と *Ppn2p* および細胞質に局在する *Ppx1p* が報告されている。そこで、これらのポリリン酸ホスファターゼ遺伝子を欠失させることで、細胞内にポリリン酸が増加すると考えた。*ppn1* 破壊株と *ppx1* 破壊株では、細胞内ポリリン酸量が野生型株よりも有意に増加した (図 1-11 A)。*ppn2* 破壊株のポリリン酸量は野生型株と同程度であり、*ppn1 ppn2* 二重破壊株のポリリン酸量は *ppn1* 破壊株と同程度であり、二重破壊による加算的な効果はみられなかった。どのポリリン酸ホスファターゼ遺伝子破壊株においてもオルトリン酸は野生型株とほとんど変わらなかった (図 1-11 B)。分裂寿命については、*ppn1* 破壊株は 15 世代、*ppn2* 破壊株は 15.5 世代、*ppn1 ppn2* 二重破壊株は 15 世代であり、どれも野生型株の 6 割程度の短寿命を示した (図 1-11 C、表 1-4)。*pho80* 破壊株および *VTC5* 過剰発現株ほどの劇的な増加量ではないものの、ポリリン酸分解活性の低下によるポリリン酸の増加が分裂寿命を短くすることが示唆された。

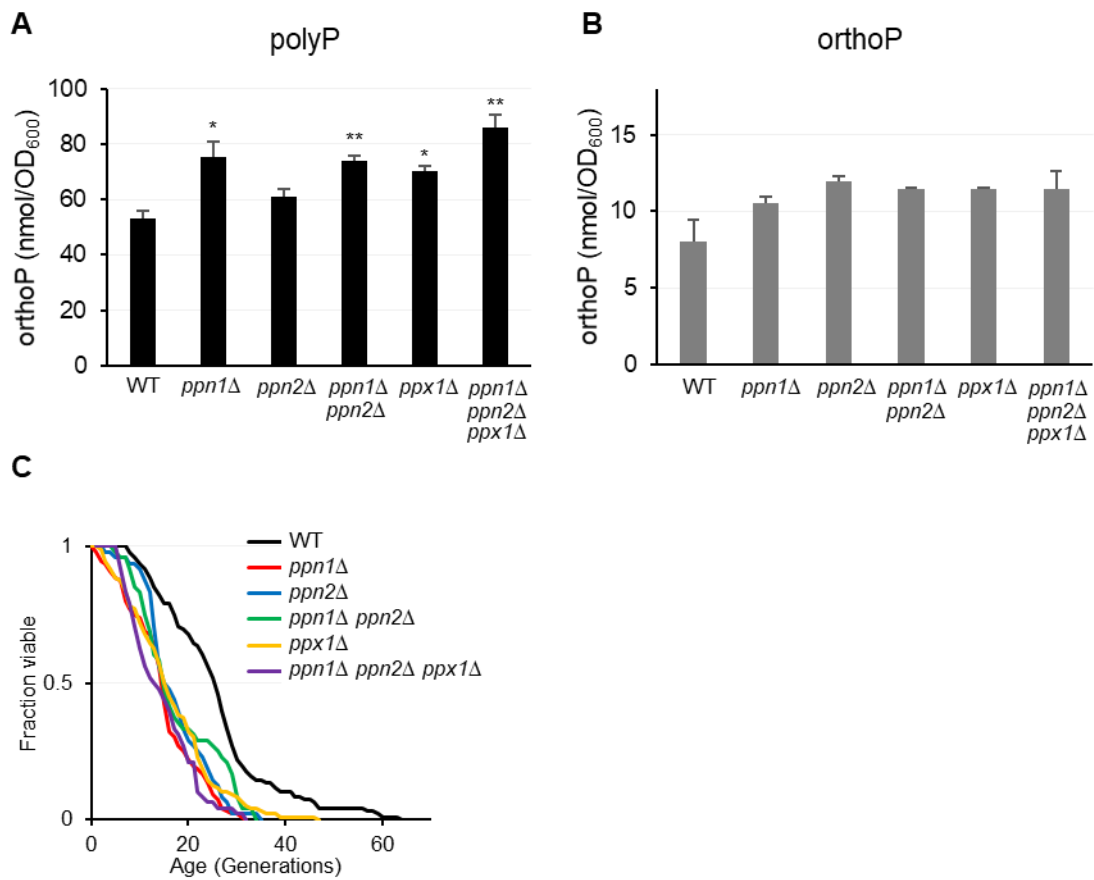


図 1-11 ポリリン酸分解酵素遺伝子破壊株における細胞内リン酸量と分裂寿命

(A) ポリリン酸ホスファターゼ遺伝子破壊株の細胞内ポリリン酸量。同じ菌株サンプルについて 3 回測定し、その平均と標準誤差を示した。Student's-*t* 検定から野生型株に対する有意差を求め、有意差がある場合は (* : $p < 0.05$) または (** : $p < 0.01$) で示した。

(B) 細胞内オルトリン酸量。

(C) 分裂寿命曲線。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。野生型 (WT) 株 (—、26.0 世代)、*ppn1Δ* 株 (—、15.0 世代)、*ppn2Δ* 株 (—、15.5 世代)、*ppn1Δ ppn2Δ* 株 (—、15.0 世代)、*ppx1Δ* 株 (—、15.5 世代)、*ppn1Δ ppn2Δ ppx1Δ* 株 (—、12.5 世代)

第 5 項 ポリリン酸ホスファターゼ遺伝子過剰発現株の細胞内リン酸量と分裂寿命の測定

細胞内ポリリン酸の高蓄積が短寿命の原因であるならば、細胞内ポリリン酸を高蓄積させた株において、ポリリン酸を減少させることにより分裂寿命が回復すると考えた。まず、*pho80*破壊株においてポリリン酸ホスファターゼ遺伝子を過剰発現させた。細胞内ポリリン酸量については、*PPN1* 遺伝子あるいは *PPN2* 遺伝子を過剰発現させたが、野生型株である *pho80*破壊株とほとんど変わらなかった (図 1-12 A)。*pho80*破壊株で *PPX1* 遺伝子を過剰発現させると、ポリリン酸量はやや減少したが、親株よりも顕著に高蓄積していた。細胞内オルトリン酸量について、*pho80*破壊株において *PPN1* 遺伝子を過剰発現させると、2 倍程度に増加した (図 1-12 B)。*PPN2* 遺伝子と *PPX1* 遺伝子の過剰発現ではオルトリン酸は有意に増加しているものの、顕著な変化量ではなかった。分裂寿命について、*pho80*破壊株においてポリリン酸ホスファターゼ遺伝子を過剰発現させると、親株である *pho80*破壊株が 10 世代であるのに対して、*PPN1* 過剰発現株では 6 世代、*PPN2* 過剰発現株では 9 世代、*PPX1* 過剰発現株では 13 世代であった (図 1-12 C、表 1-4)。このように、*pho80*遺伝子破壊株でポリリン酸ホスファターゼ遺伝子を過剰発現させても、ポリリン酸を減少させることができず、分裂寿命の回復もみられなかった。

次に、*VTC5* 過剰発現株において、各ポリリン酸ホスファターゼ遺伝子を過剰発現させた。細胞内ポリリン酸量について、*PPN1* 遺伝子を過剰発現させると、野生型株程度に減少した (図 1-13 A)。*PPN2* 遺伝子と *PPX1* 遺伝子の過剰発現は、やや減少したものの高蓄積のままであった。細胞内オルトリン酸量について、*PPN1* 遺伝子と *PPN2* 遺伝子を過剰発現させるとやや増加し、*PPX1* 遺伝子を過剰発現させると 4 倍量に増加した (図 1-13 B)。分裂寿命について、親株である *VTC5*過剰発現株 (13 世代) に対して、*PPN1* 過剰発現では 18 世代、*PPN2* 過剰発現では 13.5 世代、*PPX1* 過剰発現では 22 世代であり、*PPN1* 遺伝子と *PPX1* 遺伝子をそれぞれ過剰発現させたことにより分裂寿命の回復がみられた (表 1-4)。細胞質の *PPX1* 遺伝子の過剰発現で分裂寿命が回復したことが予想外であったため、過剰に発現された Ppx1p が液胞へ誤局在している可能性を疑った。そこで、ゲノム上の *PPX1* 遺伝子の C 末端に GFP (Green Fluorescence protein) 蛍光タンパク質を付加した株を構築した。Ppx1p-GFP は野生型株において蛍光強度は弱いものの、液

胞以外の細胞質全体に局在しており、ゲノム上の *PPX1* 遺伝子プロモーターを *TDH3* プロモーターと置換して高発現させると蛍光シグナルが増強された。さらに、*VTC5* 遺伝子を過剰発現させると、より強い蛍光強度で細胞質に蛍光が確認でき、液胞内への誤局在は生じていなかった（図 1-13 C）。以上の結果より、*VTC* 遺伝子の高発現によるポリリン酸の増加は液胞内にとどまらず、細胞質に漏出したポリリン酸が分裂寿命の短縮に作用する可能性を考えた。これについては次章で検証する。

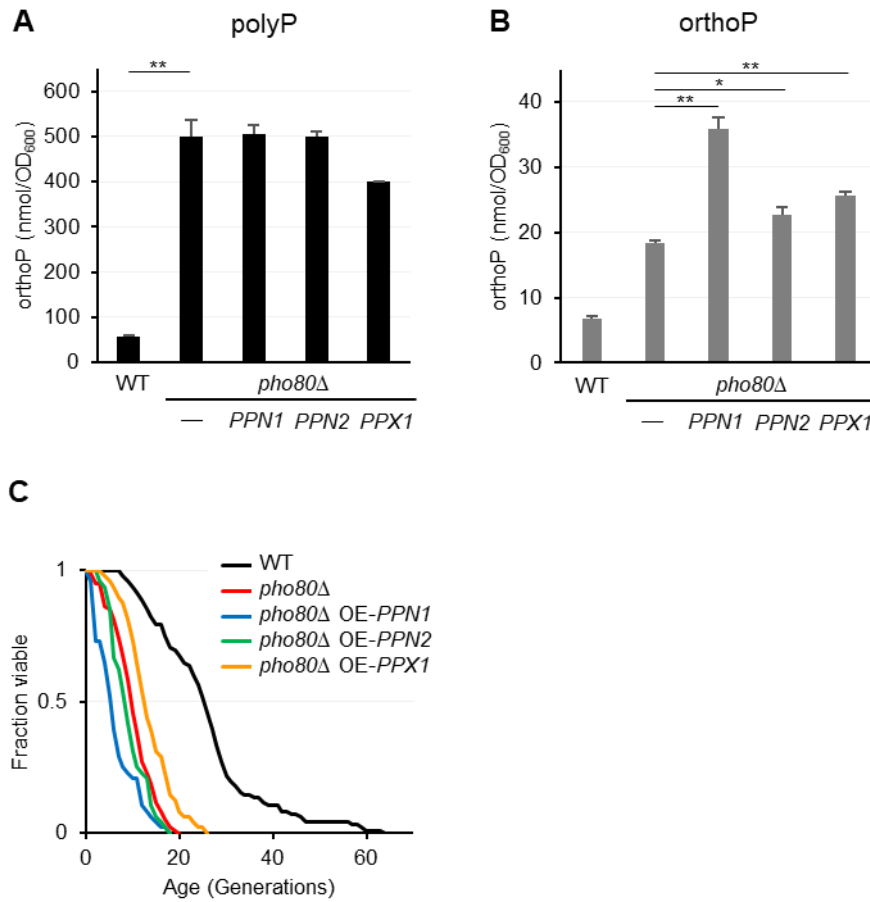


図 1-12 *pho80* 遺伝子破壊株における各ポリリン酸分解酵素遺伝子の過剰発現の効果

(A) *PHO80* 遺伝子を破壊してポリリン酸ホスファターゼ遺伝子を過剰発現させた株の細胞内ポリリン酸量。同じ菌株サンプルについて 3 回測定し、その平均と標準誤差を示した。Student's-*t* 検定から *pho80* 破壊株に対する有意差を求め、有意差がある場合は (* : $p < 0.05$) または (** : $p < 0.01$) で示した。

(B) 細胞内オルトリン酸量。

(C) 分裂寿命曲線を示す。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。野生型 (WT) 株 (—、26.0 世代)、*pho80Δ* 株 (—、10.0 世代)、*pho80Δ* OE-*PPN1* 株 (—、6.0 世代)、*pho80Δ* OE-*PPN2* 株 (—、9.0 世代)、*pho80Δ* OE-*PPX1* 株 (—、13.0 世代)

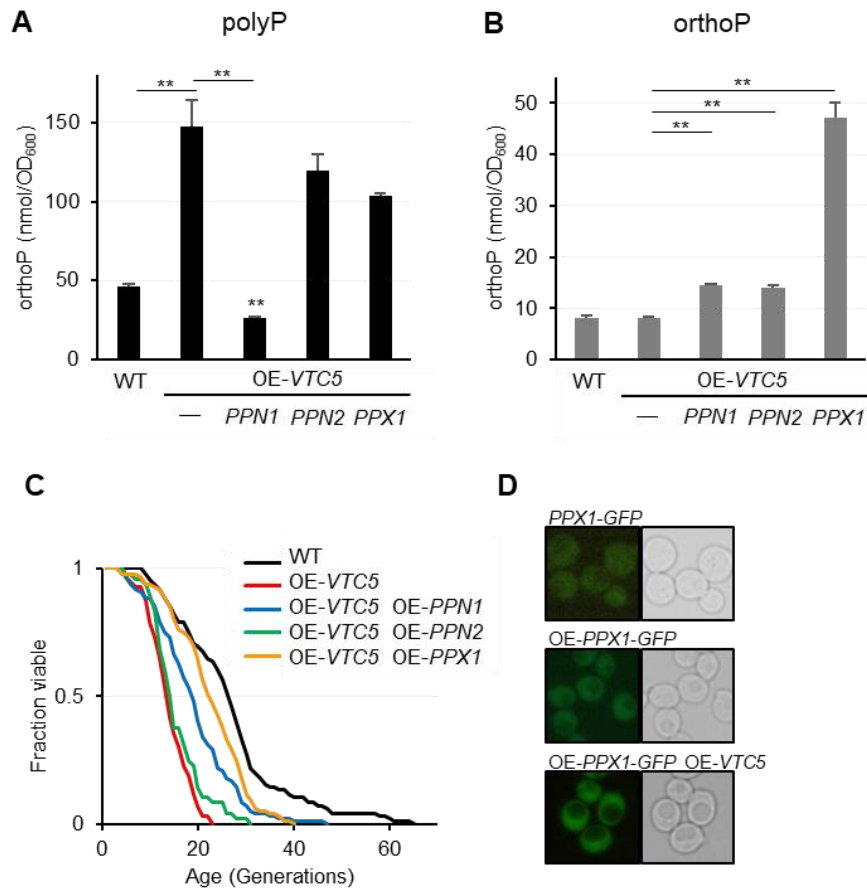


図 1-13 *VTC5* 過剰発現株における各ポリリン酸分解酵素遺伝子過剰発現の効果

- (A) *VTC5* とポリリン酸ホスファターゼの共発現株の細胞内ポリリン酸量。同じ菌株サンプルについて 3 回測定し、その平均と標準誤差を示した。Student's-*t* 検定から *VTC5* 過剰発現株に対する有意差を求め、有意差がある場合は (* : $p < 0.05$) または (** : $p < 0.01$) で示した。
- (B) 細胞内オルトリン酸量。
- (C) 分裂寿命曲線。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。野生型 (WT) 株 (—、26.0 世代)、OE-*VTC5* 株 (—、13.0 世代)、OE-*VTC5* OE-*PPN1* 株 (—、18.0 世代)、OE-*VTC5* OE-*PPN2* 株 (—、13.5 世代)、OE-*VTC5* OE-*PPX1* 株 (—、22.0 世代)
- (D) Ppx1p-GFP の細胞内局在観察。高リン酸合成培地で $OD_{600} = 1$ まで生育させた細胞を蛍光顕微鏡で観察した。上：本来の *PPX1* プロモーターをもつ PPX1-GFP 株、中：*TDH3* プロモーターに置換した TpPPX1-GFP 株、下：*VTC5* を過剰発現した TpPPX1-GFP 株。

第4節 【考察】

本章では、先行研究において示された *pho80* 破壊株が短寿命になる原因を明らかにすることを目的とした。*pho80* 破壊株で高発現していた遺伝子のうち、ポリリン酸合成酵素複合体 *VTC* 遺伝子を破壊することで分裂寿命の部分的な回復がみられたため、ポリリン酸代謝酵素が分裂寿命に関与することを検証した。複合体を構成する *VTC* 遺伝子のうち、*VTC5* 遺伝子だけが単独の過剰発現でポリリン酸の高蓄積と分裂寿命の短縮を引き起こした。他の *VTC* 遺伝子の単独過剰発現ではこれらは観察されなかったが、複合体に含まれるすべての *VTC* 遺伝子を共発現させるとポリリン酸高蓄積と短寿命がみられた。また、ポリリン酸分解酵素遺伝子の破壊はポリリン酸の増加と分裂寿命の短縮を引き起こした。ポリリン酸を高蓄積し、短寿命となる *VTC5* 過剰発現株においてポリリン酸分解酵素遺伝子を過剰発現させると、液胞型 *PPN1* 過剰発現株ではポリリン酸の減少と分裂寿命の回復がみられ、細胞質型 *PPX1* 過剰発現株ではポリリン酸の大幅な減少がみられなかったが、分裂寿命が回復した。以上より、ポリリン酸代謝酵素遺伝子は分裂寿命に関与すると結論した。細胞内のポリリン酸量の増減と分裂寿命の長短に相関がみられたことから、ポリリン酸の高蓄積により分裂寿命が短くなることが強く示唆された。

ポリリン酸とオルトリン酸の分裂寿命への関与について

本章で得られたリン酸量と分裂寿命の関係をまとめると、ポリリン酸量と分裂寿命の間に負の相関がみられた一方で、オルトリン酸量と分裂寿命の間に相関はみられなかった（図 1-14）。このように、細胞内ポリリン酸が高蓄積すると分裂寿命が短くなることが明らかとなった。一方、*vtc4* 破壊株や *vtc1* 破壊株のようにポリリン酸が一切検出されない細胞において、分裂寿命はほとんど野生型株と変わらなかった。この結果は、ポリリン酸は分裂寿命の維持には必要ないことを示している。

前述の通り、オルトリン酸は DNA や RNA の原料になり、タンパク質のリン酸化によるシグナル伝達に利用されるなど、生命活動の維持に必須である。しかし、短寿命である *pho80* 破壊株において、リン酸トランスポーターが高発現することにより、オルトリン酸が大量に取り込まれているにもかかわらず、オルトリン酸量は野生型株と変わらなかった。細胞内オルトリン酸が過剰量になった場合、ポリリン酸の合成に利用されるか、

細胞外に排出されることにより、オルトリン酸の恒常性が保たれると考えられる。短寿命である *pho80* 破壊株と *VTC5* 過剰発現株において、ポリリン酸が増加し、オルトリン酸量が野生型株と変わらないことから、オルトリン酸ではなく、高蓄積したポリリン酸が分裂寿命に悪影響を与えると考えた。これまで、ポリリン酸はリン酸の貯蔵形態として考えられてきたが、過去に報告されたように、ポリリン酸がシャペロン活性をもつこと (44) や細胞周期にも関与すること (33) など、機能的分子として分裂寿命に影響を及ぼしているのであろう。

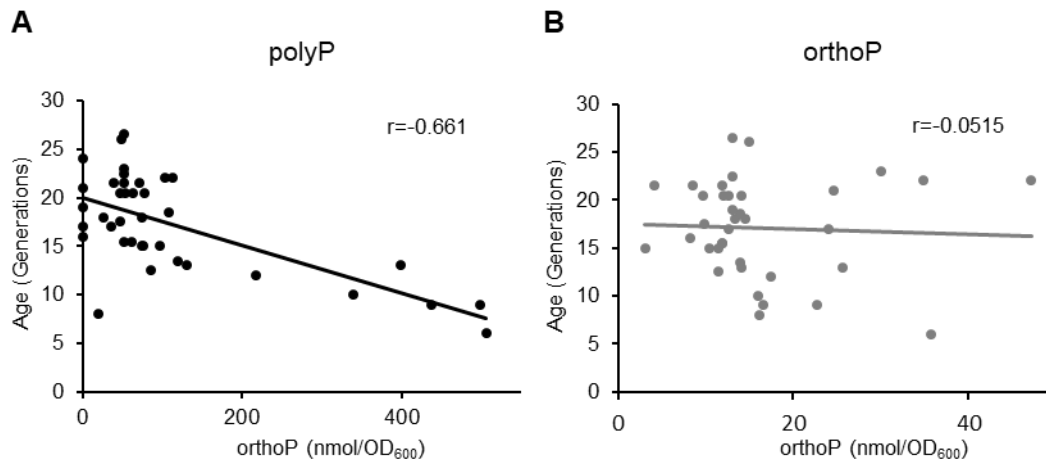


図 1-14 細胞内ポリリン酸量およびオルトリン酸量と分裂寿命との相関

- (A) 第 1 章で測定したすべての菌株について、細胞内ポリリン酸量と分裂寿命をプロットした散布図。相関係数は-0.661 であり、負の相関があるといえる。
- (B) 第 1 章で測定したすべての菌株について、細胞内オルトリン酸量と分裂寿命をプロットした散布図。相関係数は-0.0515 であり、両者の間に相関関係はない。

ポリリン酸ポリメラーゼ遺伝子のポリリン酸蓄積と分裂寿命への関与について

VTC 複合体は、Vtc1p-Vtc2p-Vtc4p あるいは Vtc1p-Vtc3p-Vtc4p 複合体として発見された (29)。Vtc1p-Vtc3p-Vtc4p 複合体の結晶構造が解明され、その存在比が 3:1:1 であることが報告されている (37)。ポリリン酸ポリメラーゼ触媒サブユニットをコードする *VTC4* 遺伝子を単独で過剰発現させてもポリリン酸量は野生型株と同程度であった。この理由は、ポリリン酸ポリメラーゼ触媒サブユニットだけを過剰発現させても VTC 複合体の化学量論比が崩れていてポリリン酸合成を促進できないためと考えられる。Vtc2p と Vtc3p はパラログであり、VTC 複合体中に同時に存在せず、主に Vtc1p-Vtc3p-Vtc4p 複合体は液胞膜に存在し、Vtc1p-Vtc2p-Vtc4p 複合体は液胞の他に核周辺と細胞膜近傍に存在する (45)。従って、*vtc2* 破壊株あるいは *vtc3* 破壊株において、*vtc1* 破壊株や *vtc4* 破壊株と異なり、ポリリン酸が減少しなかったのは、両複合体が相互に補完し合えたことによると考えられる。液胞膜以外に存在する VTC 複合体およびポリリン酸の役割についての知見はなく、それらの機能解明については今後の課題となる。

Vtc1p、Vtc2p、Vtc3p、Vtc4p に対して、Vtc5p は後に発見された VTC 複合体構成因子であり、本研究において、*VTC5* 遺伝子の転写は Pho4 転写活性化因子によって制御されない、単独過剰発現によりポリリン酸を増加させることができるなど、他の *VTC* 遺伝子とは異なる側面をもつことを示した。*VTC5* 遺伝子の破壊により *pho80* 破壊株 (*VTC5* 以外の *VTC* 遺伝子が高発現する) のポリリン酸高蓄積と短寿命を改善できなかったこと、*vtc5* 破壊株ではポリリン酸が顕著に減少したこと、および *VTC5* 遺伝子の過剰発現が *VTC1-VTC2-VTC3-VTC4* 共過剰発現と同じようにポリリン酸の高蓄積と短寿命を引き起こしたことから、Vtc5p は VTC 複合体の安定性やポリリン酸ポリメラーゼ活性の補助的な調節機能に必要であるのかもしれない (図 1-1)。

ポリリン酸ホスファターゼのポリリン酸蓄積と分裂寿命への関与について

出芽酵母のポリリン酸ホスファターゼとして、液胞に局在する Ppn1p と Ppn2p および細胞質に局在する Ppx1p が知られている。どのポリリン酸ホスファターゼ遺伝子を破壊しても分裂寿命が短くなり、*VTC5* 過剰発現株において *PPN1* と *PPX1* 遺伝子をそれぞれ過剰発現させると分裂寿命を回復させた。ほとんどのポリリン酸が液胞膜で合成されて、液胞内に蓄積するにもかかわらず、細胞質に局在する Ppx1p が、Ppn1p や Ppn2p と同様

に、分裂寿命の制御に関与することは興味深い。これらの結果は、細胞質のポリリン酸が分裂寿命に悪影響を及ぼすことを示唆する。この可能性については次章で検証する。

ppn1 破壊株と *ppx1* 破壊株では細胞内のポリリン酸が増加したのに対して、*ppn2* 破壊株のポリリン酸量は野生型株と変わらなかった。Ppn1p は *endo* および *exo* 型のポリリン酸ホスファターゼ活性をもつものに対して、Ppn2p は *endo* 型のポリリン酸ホスファターゼ活性のみをもつ (46)。つまり、Ppn2p は長鎖のポリリン酸を短鎖にするが、オルトリン酸にまでポリリン酸分解をしないため、短鎖のポリリン酸が検出されたのであろう。さらに、ポリリン酸量が野生型株と変わらない *ppn2* 破壊株が短寿命であったのは、野生型株では Ppn2p によって短鎖となるポリリン酸が、*ppn2* 破壊株では長鎖のままであることが原因であるかもしれない。つまり、鎖長が長いポリリン酸の方が分裂寿命により大きな影響を与える可能性がある。これらの可能性を検証するためには、それぞれの細胞がもつポリリン酸の鎖長を調べる必要がある。

PHO80 遺伝子の破壊と *VTC5* 遺伝子の過剰発現は、どちらもポリリン酸を高度に蓄積して分裂寿命を短くするが、その仕組みは異なると考えられる。*pho80* 破壊株と *VTC5* 過剰発現株においてポリリン酸ホスファターゼ *PPN1* と *PPX1* 遺伝子をそれぞれ過剰発現させると、*VTC5* 過剰発現株ではポリリン酸が減少し、分裂寿命が回復するのに対して、*pho80* 破壊株ではポリリン酸の蓄積も短寿命も解消されなかった。*pho80* 破壊株では *VTC5* 過剰発現株のおよそ 3 倍のポリリン酸を蓄積していた。それでも、*pho80* 破壊株において Ppn1p ホスファターゼを過剰発現してもほとんどポリリン酸が減少しない理由は不明であるが、*pho80* 破壊株においてポリリン酸ホスファターゼの発現あるいは活性を阻害する何らかの機構が働いていると考えている。

第2章 細胞質ポリリン酸による分裂寿命の短縮化の検証

第1節 【緒言】

前章において、細胞内にポリリン酸が高度に蓄積すると分裂寿命が短くなることを見出した。細胞内のポリリン酸は、出芽酵母ではほとんどが液胞に存在することが示されている (47, 48)。液胞膜に局在するポリリン酸ポリメラーゼ VTC 複合体は、ポリリン酸を合成すると同時にそれを液胞内へ取り込む。興味深いことに、出芽酵母は液胞内に局在するポリリン酸ホスファターゼ (Ppn1p と Ppn2p) に加えて、細胞質に局在する Ppx1p をもつ (34)。さらに、ポリリン酸を高蓄積して短寿命となる *VTC5* 過剰発現株を宿主として *PPX1* 遺伝子を過剰発現させると、ポリリン酸量が僅かにしか減らなかったものの、分裂寿命が野生型株レベルまで回復した。これらの結果は、細胞質のポリリン酸が分裂寿命に関与することを示唆した。

本章では、細胞質のポリリン酸による分裂寿命への影響を検証することを目指して、細胞質でポリリン酸を産生することを試みた。酵母がもつポリリン酸合成酵素は液胞膜局在の VTC 複合体のみが知られており、これは膜局在であることと、複合体で機能することから、細胞質でポリリン酸を産生するために用いるのは難しいと判断した。そこで、細胞質にポリリン酸を増加させるために、大腸菌 *Escherichia coli* 由来のポリリン酸キナーゼ *Ecppk1* 遺伝子を酵母で発現することにした。*Ecppk1* タンパク質は ATP の末端リン酸基をポリリン酸に転移し、数百個のリン酸が連なったポリリン酸を合成する酵素である。この *Ecppk1* 遺伝子を酵母で発現させることにより、酵母の細胞質でポリリン酸を産生し、それが分裂寿命に影響を及ぼすかどうかを調べた。さらに、細胞質ポリリン酸が分裂寿命に影響を与える原因を明らかにするために、*Ecppk1* 遺伝子の発現による短寿命を抑圧する遺伝子の分離および *Ecppk1* 発現株におけるトランスクリプトーム解析とメタボローム解析を試みた。

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。

使用した菌株

本章において用いた出芽酵母菌株の遺伝子型は表 2-1 に示した。

使用したオリゴヌクレオチド

使用したオリゴヌクレオチドの塩基配列は表 2-2 に示した。

使用したプラスミド

使用したプラスミドの情報は表 2-3 に示した。

【表 2-1】 第 2 章で使用した酵母菌株

| Strain Name | Genotype |
|-----------------------|--|
| BY4742 | <i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>vtc4</i> * | <i>MATα vtc4Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>ppx1</i> | <i>MATα ppx1Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpPPN1 | <i>MATα TDH3p-PPN1::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpPPN2 | <i>MATα TDH3p-PPN2::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpPPX1 | <i>MATα TDH3p-PPX1::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>ddp1</i> * | <i>MATα ddp1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpDDP1 | <i>MATα TDH3p-DDP1::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>snz1-sno1</i> | <i>MATα snz1Δ-sno1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |

【表 2-2】 第 2 章で使用したオリゴヌクレオチド

| Name of oligonucleotide | Sequence (5' to 3') |
|---|---|
| For construction of plasmid | |
| PPK1ORFf | CGGGATCCATGGGTCAGGAAAAGCTATACATC |
| PPK1ORFr | CCCTCGAGTTATTCAGGTTGTTTCGAGTGATTG |
| pBR-Bc2 | CTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCC |
| pBR-Bac2 | GAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGG |
| GFP-Ecppk1 | CGATGTATAGCTTTTCCTGACCCATTTTGTATAGTTCATCCATGCCA |
| pYES2-tagR1 | ATGATGCGGCCCTCTAGATGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC |
| For confirmation of gene knockout | |
| DDP1Cf | CTTCAAACCTTCATCATCAGAAAGG |
| For construction of gene overexpression strain | |
| KO-TDH3pf | GTTTTACAACAACCTTTATTTAGTCAAAAAATTAGC |
| TDH3p-DDP1r | CAGAACGTACTGGACCATGATTATCCGCGGTTTTGCCCATCATTTT GTTTGTTTATGTGTGTT |
| For RT-qPCR | |
| ppk1RTf | ACCCGCTGATTGAAAGGATG |
| ppk1RTTr | AATGGCGGGAATGAGAGTTG |
| DDP1RTf | CGACTGCCCAACGAGAAAC |
| DDP1RTTr | GCGGGTGCTTTGCTACTTC |
| UBC6RTf | CACGGTACTTTAACTTTCCCGTCT |
| UBC6RTTr | GAAAGGCATAATCGTGTGTTGG |

【表 2-3】 第 2 章で使用したプラスミド

| Plasmid Name | Insert gene | Vector |
|------------------------|--------------------|---------------|
| pYES2 | Empty | pYES2 |
| pYES-Ecppk1 | <i>Ecppk1</i> | pYES2 |
| pYES-GFP-Ecppk1 | <i>GFP</i> (S65T) | pYES-Ecppk1 |
| pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6 | <i>GFP</i> (S65T) | pFA6a-kanMX6 |
| YEp13 | Empty | YEp13 |

使用した培地と試薬

完全合成培地 (SC 培地)

脱イオン水 1 L あたり Dextrose を 20 g、Yeast Nitrogen Base without amino acid (BD Difco) を 6.7 g、20×Dropout Mixture(※9)を 50 mL 加えた。形質転換体の選択に用いる場合は、選択マーカーが関与するアミノ酸や核酸を除いた。ガラクトース誘導性プロモーターによる遺伝子発現系を扱う場合、Dextrose の代わりに Galactose (ナカライテスク) を加えた。

※9 20×Dropout Mixture

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) 0.4 g、L-Methionine (ナカライテスク) 0.4 g、L-Tyrosine (ナカライテスク) 0.6 g、L-Isoleucine (ナカライテスク) 0.6 g、L-Lysine (ナカライテスク) 0.6 g、L-Phenylalanine (和光純薬) 1.2 g、L-Valine (ナカライテスク) 3 g、L-Threonine (和光純薬) 4 g、L-Tryptophan (ナカライテスク) 0.8 g、Uracil (ナカライテスク) 0.4 g、L-Leucine (和光純薬) 0.8 g、L-Histidine (ナカライテスク) 0.4 g、Adenine (和光純薬) 0.8 g

トランスクリプトーム解析(RNA-seq 解析)

RNA の抽出方法は第 1 章の材料と方法に記載した。pYES-Ecppk1 と pYES2 を保持する野生型株について解析するため、5 mL の SC-Ura (グルコース) 液体培地にプラスミドを保持する酵母形質転換体を植菌し、30°C で一晚振盪培養した。その培養液を 50 mL の SC-Ura (グルコース) 液体培地に 0.05% 植菌し、OD₆₀₀ が 1.0±0.2 になるまで 30°C で振盪培養した。一度集菌してグルコース培地を除去し、*Ecppk1* の発現誘導のため、SC-Ura(ガラクトース)液体培地に移して 8 時間培養後に 5 OD 分だけ集菌し、残りはメタボローム解析に用いた。抽出 RNA からのライブラリー作製およびシーケンシング解析は株式会社 生物技研に委託した。

メタボローム解析 (キャピラリー電気泳動質量分析 (CE-MS) 解析)

pYES-Ecppk1 と pYES2 を保持する野生型株について解析した。酵母細胞の培養は上記のトランスクリプトーム解析と同じである。集菌した細胞の前処理として、培地を除去し、超純水にて 2 回洗浄を行った。そこにメタノール溶液を添加し、懸濁及び 30 秒

間の超音波処理を行った。内部標準物質 5 μ M を含んだ Milli-Q 水を加えて攪拌し、30 秒間静置した。その後、抽出液を回収し、遠心分離 (2,300 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分) を行った。遠心分離後、限外ろ過チューブ (ウルトラフリーMC PLHCC, HMT, 遠心式フィルターユニット 5 kDa) に抽出液を移し取った。これを遠心 (9,100 \times g、4 $^{\circ}$ C、120 分) し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び Milli-Q 水に溶解して測定に供した。メタボローム解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社に委託した。

第3節 【結果】

第1項 大腸菌ポリリン酸キナーゼ *Ecppk1* 遺伝子発現株の構築と分裂寿命の測定

まず初めに、大腸菌のポリリン酸キナーゼ *Ecppk1* 遺伝子を酵母で発現させるために、酵母多コピー型プラスミドベクターpYES2 上のガラクトース誘導性 *GAL1* 遺伝子プロモーター下流に *Ecppk1* 遺伝子のコード領域を組み込んだ。*GAL1* プロモーター下流の遺伝子は、培地の炭素源がガラクトースのときに高発現し、グルコースのときに発現が抑制される。この pYES-*Ecppk1* プラスミドを出芽酵母の野生型株に導入した形質転換体と、コントロールとして空ベクターpYES2 を導入した形質転換体を作製し、ガラクトース培地とグルコース培地での分裂寿命を比較した。ガラクトース培地で培養すると、pYES-*Ecppk1* プラスミドを導入した株の分裂寿命が空ベクター導入株の 64%に短くなった (図 2-1 A、表 2-4)。*EcPpk1p* が細胞質で発現していることを確認するために、GFP を *EcPpk1p* の N 末端に付加したプラスミドを作製し、その細胞内局在を観察した。この GFP-*EcPpk1p* は酵母の細胞質全体に局在していた (図 2-1 C)。*Ecppk1* 遺伝子を発現させた野生型株の細胞内ポリリン酸量は、空ベクターを導入した野生型株に対して約 1.3 倍増加していた ($p=0.019$) (図 2-1 B)。これらの結果は、細胞質のポリリン酸の増加が短寿命を引き起こすことを示すものである。

Ecppk1 遺伝子の発現による細胞質ポリリン酸の増加は *pho80* 破壊株や *VTC5* 過剰発現株ほど顕著ではなかった。野生型株における細胞内ポリリン酸のほとんどは VTC 複合体により合成された液胞内のポリリン酸であると考えられる。そこで、液胞膜に局在するポリリン酸ポリメラーゼをコードする *VTC4* 遺伝子を破壊することで液胞に蓄積しているポリリン酸を排除すれば、*Ecppk1* 遺伝子の発現による細胞質ポリリン酸の増加分を把握できると考えた。空ベクターを保持する *vtc4* 破壊株では、細胞内ポリリン酸量は検出できなかったが、*Ecppk1* 遺伝子を発現させた *vtc4* 破壊株では微量ではあるが検出することができた (図 2-1 B)。また、*vtc4* 破壊株で *Ecppk1* 遺伝子を発現させると、野生型株で *Ecppk1* 遺伝子を発現させ株と同様に分裂寿命が短くなった (図 2-1 A、表 2-4)。このように、*Ecppk1* 遺伝子の発現による細胞質ポリリン酸の増加はわずかではあるが、分裂寿命を短縮するには十分なようである。

次に、*Ecppk1* 遺伝子を発現させることによる短寿命の原因が、細胞質ポリリン酸の

増加であることを確かめた。短寿命である *Ecppk1* 発現株において、細胞質に局在するポリリン酸ホスファターゼ *PPX1* 遺伝子を過剰発現させると、分裂寿命が部分的に回復した ($p=9.2E-09$) (図 2-2 A、表 2-4)。これに対して、液胞に局在するポリリン酸ホスファターゼ *PPN1* 遺伝子を過剰発現させても、分裂寿命は回復しないどころか短くなった (図 2-3 A、表 2-4)。野生型株において *Ecppk1* 遺伝子を発現させると、ポリリン酸量は増加したが、*PPX1* 過剰発現株において *Ecppk1* 遺伝子を発現させても、ポリリン酸量は増加しなかった。*PPN1* 過剰発現株において *Ecppk1* を発現させると、野生型株よりもポリリン酸は減少するが、空ベクター導入株よりはポリリン酸は増加していた (図 2-2 B)。

ガラクトース培地上で pYES-*Ecppk1* プラスミドをもつ野生型株を培養すると、酵母の増殖が遅くなった (図 2-3 A)。pYES-*Ecppk1* プラスミドをもつ *PPX1* 過剰発現株では増殖が回復し、*PPN1* あるいは *PPN2* 過剰発現株では増殖は回復しなかった (図 2-3 B)。また、pYES-*Ecppk1* プラスミドをもつ *ppx1* 破壊株は全く増殖しなくなった。これらの増殖の違いはグルコース培地では観察されなかった。これらの結果は、*Ecppk1* 遺伝子の発現が出芽酵母の増殖に悪影響を及ぼすことを示し、その原因が細胞質のポリリン酸であることを示唆するものである。

【表 2-4】 第 2 章における分裂寿命測定結果

| Relevant Genotype | | Median lifespan | Maximum lifespan | <i>p</i> -value | |
|-------------------|---------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | | | | vs. <i>Ecppk1</i> | vs. Empty |
| Wild-type (WT) | | 21.5 | 40 | - | - |
| WT | pYES- <i>Ecppk1</i> (<i>Ecppk1</i>) | 7.0 | 15 | - | 1.5E-13 (WT w Empty) |
| <i>vtc4</i> | pYES2 (Empty) | 21.5 | 43 | - | 5.5E-01 (WT w Empty) |
| <i>vtc4</i> | pYES- <i>Ecppk1</i> | 8.5 | 22 | 1.6E-01 (WT w <i>Ecppk1</i>) | 8.7E-12 (<i>vtc4</i> w Empty) |
| <i>TDH3p-PPN1</i> | pYES- <i>Ecppk1</i> | 3.0 | 6 | 1.5E-08 (WT w <i>Ecppk1</i>) | 2.5E-16 (WT w Empty) |
| <i>TDH3p-PPX1</i> | pYES- <i>Ecppk1</i> | 15.0 | 34 | 9.2E-09 (WT w <i>Ecppk1</i>) | 7.2E-05 (WT w Empty) |
| <i>TDH3p-DDP1</i> | pYES2 | 21.5 | 42 | - | 7.7E-01 (WT w Empty) |
| <i>TDH3p-DDP1</i> | pYES- <i>Ecppk1</i> | 15.0 | 29 | 1.9E-10 (WT w <i>Ecppk1</i>) | 1.6E-05 (TpDDP1 w Empty) |

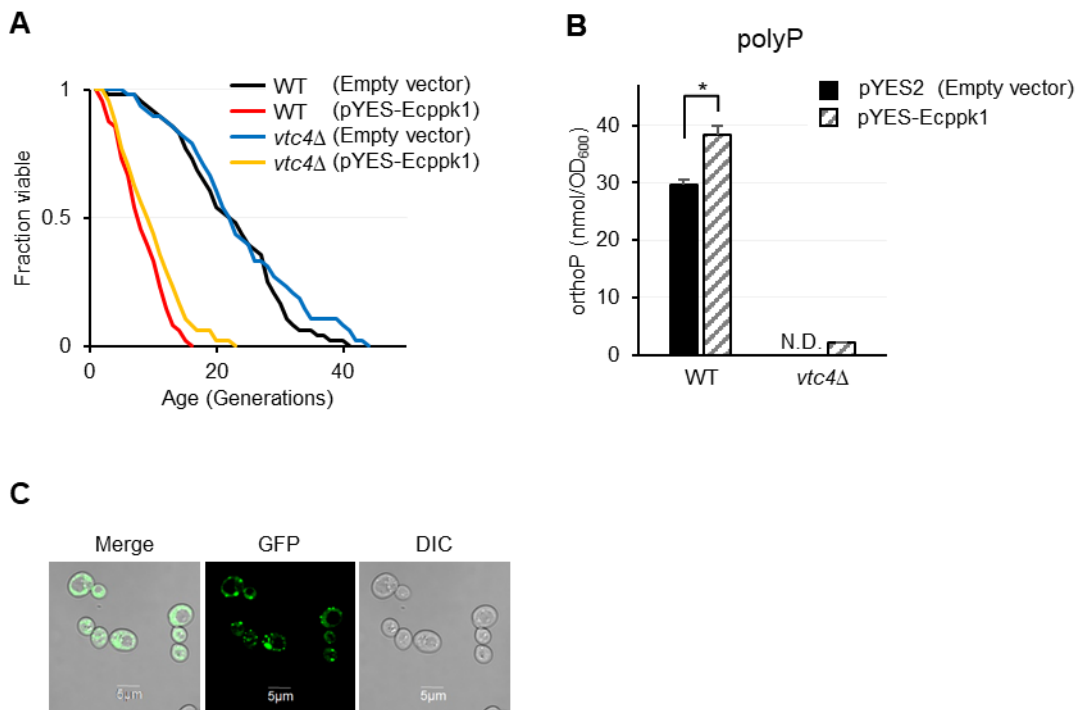


図 2-1 *Ecppk1* を発現した野生型および *vtc4* 遺伝子破壊株におけるに分裂寿命とポリリン酸量

(A) 分裂寿命曲線。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。野生型 (WT) 株 (—、21.5 世代)、pYES2 空ベクタープラスミドを保持する WT 株 (—、7.0 世代)、pYES-Ecppk1 プラスミドを保持する *vtc4* 遺伝子破壊株 (—、21.5 世代)、pYES2 空ベクタープラスミドを保持する *vtc4* 遺伝子破壊株 (—、8.5 世代)。 *Ecppk1* 遺伝子発現のために、グルコースの代わりにガラクトースを含む SC-Ura 培地で測定した。

(B) 細胞内ポリリン酸量。■: 空ベクターを導入した細胞、▨: *Ecppk1* プラスミドを導入した細胞。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's-*t* 検定から野生型株に対する有意差を求め有意差がある場合は (*: $p < 0.05$) で示した。N. D.: 検出限界以下。

(C) GFP-EcPpk1p 発現プラスミドを導入した野生型細胞の蛍光顕微鏡観察。

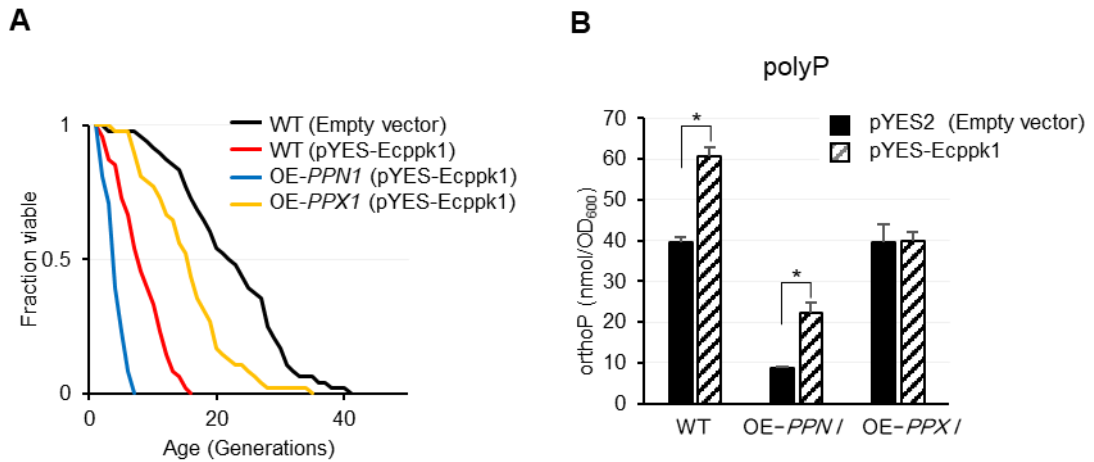


図 2-2 *Ecppk1* 遺伝子が発現したポリリン酸ホスファターゼ過剰発現株における分裂寿命とポリリン酸量

(A) 分裂寿命曲線。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。野生型 (WT) 株 (— 、21.5 世代)、pYES2 空ベクタープラスミドを保持する WT 株 (— 、7.0 世代)、pYES-Ecppk1 プラスミドを保持する *PPN1* 過剰発現株 (— 、3.0 世代)、pYES-Ecppk1 プラスミドを保持する *PPX1* 過剰発現株 (— 、15.0 世代)。

(B) 細胞内ポリリン酸量。■ : 空ベクターを導入した細胞、▨ : *Ecppk1* プラスミドを導入した細胞。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's-*t* 検定から野生型株に対する有意差を求め、有意差がある場合は (* : $p < 0.05$) で示した。

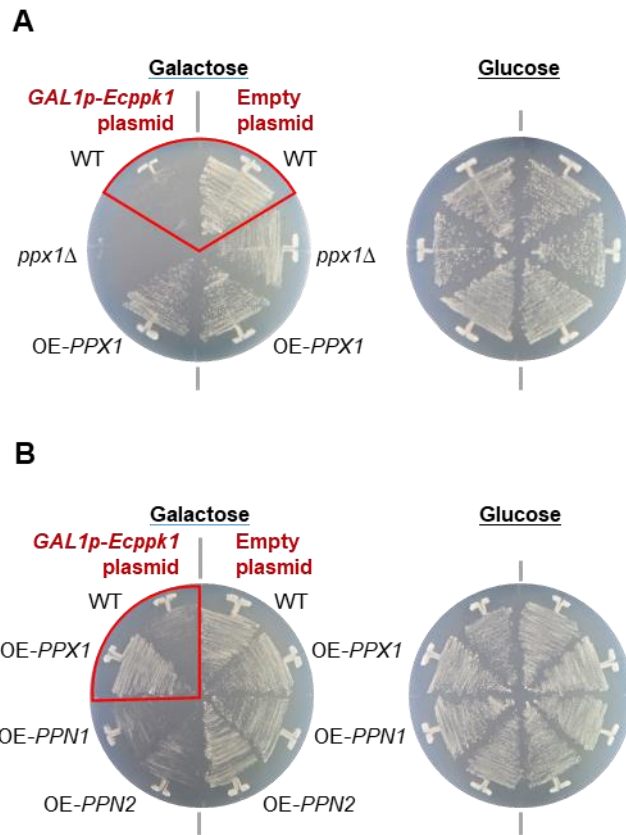


図 2-3 pYES-Ecppk1 を導入したポリリン酸ホスファターゼ破壊株と過剰発現株の生育

- (A) ガラクトース培地における形質転換体の生育比較。上から野生型株 (WT)、*ppx1* 破壊株、*PPX1* 過剰発現株 (OE-*PPX1*) の順に、左側には pYES-*ppk1* プラスミド、右側には pYES2 空ベクターを導入した形質転換体を並べた。画線して 2 日目の生育状況を示した。
- (B) ガラクトース培地における形質転換体の生育比較。上から野生型株 (WT)、*PPX1* 過剰発現株 (OE-*PPX1*)、*PPN1* 過剰発現株 (OE-*PPN1*)、*PPN2* 過剰発現株 (OE-*PPN2*) の順に、左側には pYES-*ppk1* プラスミド、右側には pYES2 空ベクターを導入した形質転換体を並べた。画線して 2 日目の生育状況を示した。

第 2 項 *Ecppk1* 発現の短寿命を抑圧する多コピー抑圧遺伝子の分離

大腸菌ポリリン酸キナーゼ *Ecppk1* 遺伝子を発現させた酵母株は分裂寿命が短くなった。この *Ecppk1* 発現株の短寿命は *VTC* 遺伝子の過剰発現株の短寿命よりも短くなった。*EcPpk1p* により合成されたポリリン酸が、どのような因子を介して分裂寿命に影響を及ぼしているのかを明らかにするために、*Ecppk1* 発現株の短寿命を多コピーで抑圧する遺伝子の探索を試みた。前項に示したように、細胞質ポリリン酸ホスファターゼ *PPX1* 遺伝子の過剰発現は、*EcPpk1p* により増加したポリリン酸を分解することで短寿命と増殖遅延を抑圧した。このように増加したポリリン酸を分解する酵素の他に、ポリリン酸により機能を制御されるタンパク質が見出されることを期待した。

分裂寿命の評価には 3 週間程度を必要とし、多数の細胞サンプルを測定しなければならないので、分裂寿命の回復をスクリーニングの指標とするのではなく、*Ecppk1* 発現株が示す増殖遅延の改善を一次スクリーニングの指標とすることにした。BY4742 株 (*leu2* と *ura3* 変異をもつ) を野生型宿主として、まず *Ecppk1* 発現プラスミド pYES-*Ecppk1* (*URA3* 選択マーカールをもつ) を導入し、次に多コピー型プラスミドベクター YEp13 (*LEU2* 選択マーカールをもつ) で構築された出芽酵母ゲノムライブラリーを導入した。ガラクトース培地で、約 10 万個の $\text{Ura}^+ \text{Leu}^+$ 形質転換体コロニーを取得し、その中から増殖が良好でコロニーサイズの大きなコロニーを 51 個選択した (図 2-4 A)。*Ecppk1* が発現しているにもかかわらず増殖が改善されていることを確認するために、ガラクトース平板培地での画線培養によりシングルコロニーの生育を比較し、明らかに生育がよい株を選抜した (図 2-4 B)。これらの株は 2 種類の pYES-*Ecppk1* プラスミド (*URA3* マーカー) とライブラリープラスミド (*LEU2* マーカー) を保持しているため、ロイシンを含まない培地でのみ生育する $\text{Ura}^- \text{Leu}^+$ 株を選別し、その株からライブラリープラスミドを 20 個回収した。このように回収したプラスミドを、pYES-*Ecppk1* を保持する野生型株に再度導入したところ、ガラクトース培地での増殖が改善されたのは 6 個のプラスミドのみであった。これらのライブラリープラスミドに挿入された DNA 断片の塩基配列を決定したところ、すべて第 XV 番染色体右腕に位置する *DDP1* 遺伝子と *GET4* 遺伝子を含むプラスミドであった (図 2-4 C)。最後に、*DDP1* 遺伝子を単独で発現するために、ゲノム上の *DDP1* 遺伝子プロモーターを *TDH3* プロモーターと置換した株を構築した。こ

の株に pYES-Ecppk1 プラスミドを導入したところ、*Ecppk1* 発現株におけるガラクトース培地での増殖遅延を抑圧することを確認した (図 2-5 A)。

DDP1 遺伝子はジアデノシンポリリン酸およびジホスホイノシトールポリリン酸を基質とするホスファターゼをコードし、その産物は細胞質と核に局在していると報告されている (49, 50)。ゲノム上の *DDP1* 遺伝子の C 末端側に GFP を融合した株を作製したが、GFP のシグナルが検出できなかった。*TDH3* プロモーターにより過剰発現させた *DDP1* 遺伝子についても C 末端側に GFP を融合したところ、Ddp1p-GFP のシグナルが液胞以外の細胞質全体に観察された (図 2-5 B)。

Ddp1p はポリリン酸ホスファターゼの仲間であることから、細胞質ポリリン酸ホスファターゼ Ppx1p と同じ機能を示すかどうかを調べた。*DDP1* 過剰発現株に pYES-Ecppk1 プラスミドを導入すると、*PPX1* 過剰発現株と同程度に分裂寿命が回復した (図 2-5 C、表 2-4)。また、細胞内ポリリン酸量についても *PPX1* 過剰発現と同様に、*DDP1* 過剰発現株で pYES-Ecppk1 を発現させると、*Ecppk1* 発現によるポリリン酸の増加がみられなかった (図 2-5 D)。また、*ddp1* 破壊株では、*ppx1* 破壊株と同様に致死となった (図 2-5 A)。このことから、Ddp1p は過剰発現によって本来の基質にとどまらず、*Ecppk1* 遺伝子の発現により増加したポリリン酸も分解していると考えた。

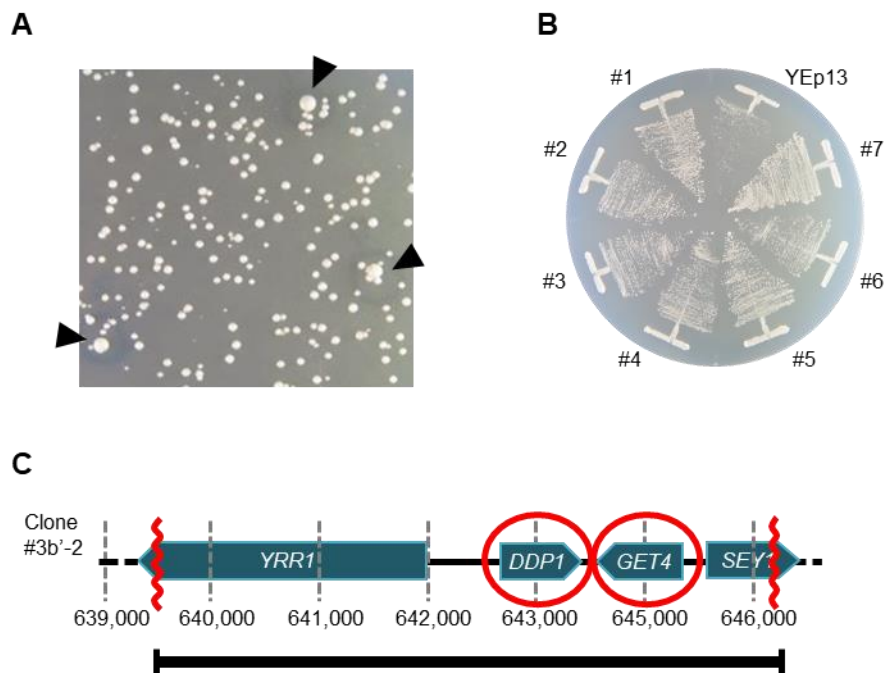


図 2-4 *Ecppk1* 発現による増殖遅延を抑圧する多コピー抑圧因子の分離

- (A) 1次スクリーニングのガラクトース培地上での形質転換体の生育
- (B) 候補株 (#1~#7) におけるシングルコロニーの生育比較。ネガティブコントロールの YEp13 は空ベクターである。
- (C) *Ecppk1* 遺伝子の発現による増殖遅延を抑圧したクローンがもつゲノム DNA 断片の染色体領域。全長が含まれていたのは *DDP1* 遺伝子と *GET4* 遺伝子のみであった。

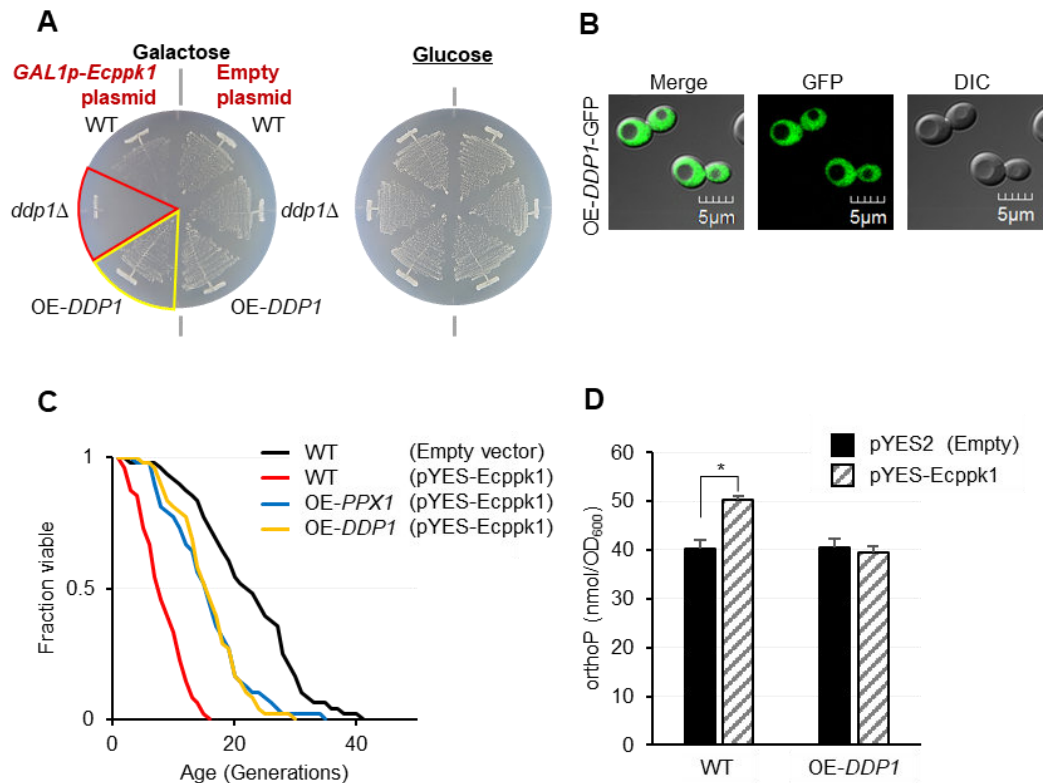


図 2-5 *DDP1* 遺伝子の過剰発現による細胞増殖、分裂寿命とポリリン酸量への影響

- (A) *Ecppk1* 遺伝子を発現する *DDP1* 過剰発現株および破壊株におけるガラクトース培地での生育。上から野生型株 (WT)、*ddp1* 破壊株、*DDP1* 過剰発現株の順に、左側には pYES-*ppk1* プラスミド、右側には pYES2 空ベクターを導入した形質転換体を並べた。画線して 2 日目の生育状況を示した。
- (B) Ddp1p-GFP タンパク質の細胞内局在。合成培地で $OD_{600} = 1$ まで生育させた細胞を蛍光顕微鏡で観察した。
- (C) 分裂寿命曲線。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。野生型 (WT) 株 (— 、21.5 世代)、pYES2 空ベクタープラスミドを保持する WT 株 (— 、7.0 世代)、pYES-*Ecppk1* プラスミドを保持する *PPX1* 遺伝子過剰発現株 (— 、15.0 世代)、pYES-*Ecppk1* プラスミドを保持する *DDP1* 遺伝子過剰発現株 (— 、15.0 世代)。
- (D) 細胞内ポリリン酸量。■: 空ベクターを導入した細胞、▨: *Ecppk1* プラスミドを導入した細胞。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's-*t* 検定から野生型株に対する有意差を求め、有意差がある場合は (*: $p < 0.05$) で示した。

第 3 項 *Ecppk1* 発現株におけるトランスクリプトームおよびメタボローム解析

Ecppk1 遺伝子の発現により増加したポリリン酸がどのような因子に影響を及ぼして分裂寿命を短縮させるのかを明らかにするために、本項では *Ecppk1* 遺伝子の発現による転写および代謝の変動を網羅的に解析することから、ポリリン酸により影響を受ける制御系あるいは代謝経路の探索を試みた。

まず、pYES-*Ecppk1* プラスミドあるいは空ベクターpYES2 をもつ野生型株をガラクトース培地で 8 時間培養した細胞から全 RNA を抽出し、RNA-seq 解析に供した。pYES-*Ecppk1* 導入株において、空ベクター導入株に対して転写量が 2 倍以上に増加している遺伝子が 31 個、減少している遺伝子は 7 個であった (表 2-5、表 2-6)。転写量が増加している遺伝子の中には、ピリドキサルリン酸合成酵素をコードし、老化細胞と定常期の細胞で転写が誘導されることが知られている *SNZ1/SNO1* 遺伝子が含まれていた (51)。*SNZ1/SNO1* 遺伝子の高発現が *Ecppk1* 遺伝子の発現による短寿命に影響しているかどうかを確認するために、*snz1 sno1* 二重破壊株において pYES-*Ecppk1* プラスミドを導入したが、その増殖遅延は抑圧されなかった (図 2-6)。その他には、塩基性アミノ酸であるアルギニンとヒスチジンの生合成経路で働く酵素遺伝子が多く含まれおり、GO エンリッチメント解析よりアミノ酸生合成経路の遺伝子が濃縮された。*Ecppk1* 発現により減少した遺伝子については、類似した機能をもつ遺伝子は見いだせなかった。

RNA-seq 解析と同一の培養液から代謝産物を抽出し、CE-MS 法によるメタボローム解析に供した。*Ecppk1* 発現により増加した代謝物はアデニンとグアノシンであり、減少したのはカルノシンと CoA であった。カルノシンはグルタミン代謝と尿素回路、CoA は TCA 代謝によるエネルギー蓄積と補酵素代謝に関わる。メタボローム解析では検出されなかった代謝物が多く、*Ecppk1* 遺伝子の発現による顕著な変動がみられなかった。また、トランスクリプトーム解析で転写が変動した酵素遺伝子が関わる代謝経路での代謝物の変動はみられなかった。

【表 2-5】 *Ecppk1* 遺伝子の発現により転写量が上昇した遺伝子 (RNA-seq 解析)

| Systematic Name | Gene Name | Name Description |
|-----------------|---------------|---|
| YLR154C-G | - | Putative protein of unknown function; |
| YMR095C | <i>SNO1</i> | SNZ proximal Open reading frame |
| YMR096W | <i>SNZ1</i> | SNooZe |
| YOR302W | - | Arginine attenuator peptide |
| YOL058W | <i>ARG1</i> | ARGinine requiring |
| YJL088W | <i>ARG3</i> | ARGinine requiring |
| YER069W | <i>ARG5,6</i> | ARGinine requiring |
| YMR062C | <i>ARG7</i> | ARGinine requiring |
| YIL116W | <i>HIS5</i> | HISTidine requiring |
| YCL030C | <i>HIS4</i> | HISTidine requiring |
| YER081W | <i>SER3</i> | SERine requiring |
| YDR035W | <i>ARO3</i> | AROMatic amino acid requiring |
| YOR292C | - | Putative protein of unknown function |
| YOR303W | <i>CPA1</i> | Carbamyl Phosphate synthetase A |
| YDR536W | <i>STL1</i> | Sugar Transporter-Like protein |
| YNM0032C | <i>RNA170</i> | RNA of unknown function transcribed by RNA polymerase III |
| YBR047W | <i>FMP23</i> | Found in Mitochondrial Proteome |
| YJL089W | <i>SIP4</i> | SNF1-Interacting Protein |
| YNG0001C | <i>RME3</i> | Regulator of Meiosis 3 |
| YOR313C | <i>SPS4</i> | SPorulation Specific transcript |
| YKL086W | <i>SRX1</i> | SulfiRedoXin |
| YJL106W | <i>IME2</i> | Inducer of MEiosis |
| YGR067C | - | Putative protein of unknown function; |
| YBR250W | <i>SPO23</i> | SPOrulation |
| YMR159C | <i>ATG16</i> | Conserved protein involved in autophagy |
| YIL164C | <i>NIT1</i> | NITrilase superfamily |
| YER175C | <i>TMT1</i> | Trans-aconitate MethylTransferase |
| YGL259W | <i>YPS5</i> | |
| YGL258W-A | - | Putative protein of unknown function |

【表 2-6】 *Ecppk1* 遺伝子の発現により転写量が減少した遺伝子 (RNA-seq 解析)

| Systematic Name | Gene Name | Name Description |
|-----------------|-------------|---|
| YJR047C | <i>ANB1</i> | Translation elongation factor eIF-5A |
| YOL101C | <i>IZH4</i> | Membrane protein involved in zinc ion homeostasis |
| YGL055W | <i>OLE1</i> | Delta(9) fatty acid desaturase |
| YJL133C-A | <i>DPI8</i> | Putative mitochondrial protein of unknown function |
| YLR413W | <i>INA1</i> | Protein of unknown function |
| YJL052W | <i>TDH1</i> | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), isozyme 1 |
| YBR067C | <i>TIP1</i> | Major cell wall mannoprotein with possible lipase activity |

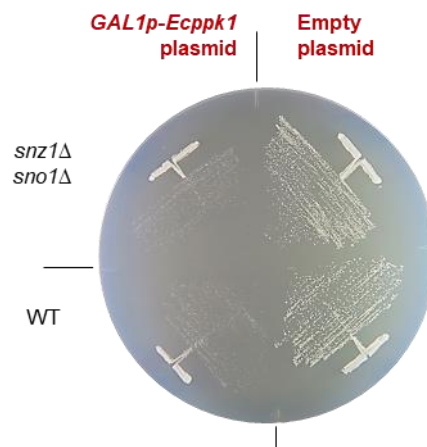


図 2-6 ピリドキサーリン酸合成酵素遺伝子破壊株における *Ecppk1* 遺伝子発現の影響

野生型株 (WT) および *snz1 sno1* 二重破壊株に pYES-Ecppk1 を導入した株をガラクトース培地で画線培養した。植菌後 2 日目に観察した。

第4節 【考察】

本章では、細胞質のポリリン酸による分裂寿命への影響を検証するために、大腸菌由来のポリリン酸キナーゼ *Ecppk1* 遺伝子を酵母で発現させ、細胞質ポリリン酸を増加させる株を構築した。*Ecppk1* 発現株では、ポリリン酸がわずかではあるが増加し、分裂寿命が顕著に短くなった。さらに、細胞質ポリリン酸の増加による短寿命の原因を知るために、*Ecppk1* 発現株の増殖遅延を遺伝子量効果で抑圧する遺伝子としてポリリン酸ホスファターゼの一種である *DDP1* 遺伝子を分離した。*DDP1* 遺伝子の破壊と過剰発現でみられる表現型は、*PPX1* 遺伝子でみられるものと同じであった。

細胞質ポリリン酸の増加について

Ecppk1 発現株の解析より、細胞質ポリリン酸の増加が分裂寿命を短くすることを確認することができた。*Ecppk1* 発現株で細胞質のポリリン酸が（わずかではあるが）増加したことは、液胞のポリリン酸を産生しない *vtc4*破壊株を宿主として *Ecppk1* 遺伝子を発現させたときにもポリリン酸が増加したこと、*Ecppk1* 発現株において細胞質ポリリン酸ホスファターゼ *PPX1* 遺伝子を過剰させるとポリリン酸の増加がみられなかったことより確からしい。但し、細胞質ポリリン酸が本当に増加していることは生化学的にも示すべきである。実際に、液胞を除く細胞分画を試みたが、出芽酵母では液胞が大きく、液胞を破壊せずに細胞質分画を取得することができなかった。また、*Ecppk1* 遺伝子の発現による短寿命化の原因が細胞質ポリリン酸の増加であることをより強く示すためには、EcPpk1p タンパク質の触媒活性が欠損した変異タンパク質の発現、および EcPpk1p を細胞質ではなく液胞内で発現させることにより短寿命化がみられなくなることも調べる必要がある。

Ecppk1 発現株における増殖遅延について

Ecppk1 遺伝子を発現させると酵母の増殖が遅くなった。これは以前の報告とも一致する (52)。液胞のポリリン酸を高蓄積する *VTC5*過剰発現株は正常に増殖し、*pho80*破壊株は野生型株と比べてわずかに増殖が遅くなるが、*Ecppk1* 発現株ほど遅くはならない。このように、細胞質ポリリン酸を増加させると増殖が悪くなることより、細胞質のポリリン酸は細胞に対して強い毒性をもつものと考えられる。特に、細胞質ポリリン酸

ホスファターゼ *PPX1* 遺伝子を破壊した株（および *DDP1* 破壊株）において *Ecppk1* 遺伝子を発現させた細胞が増殖しなかったことから、細胞が生育するために許容できる細胞質ポリリン酸量に限界があることを示している。本研究で構築した *Ecppk1* 発現株は酵母が生育可能な細胞質ポリリン酸を生産していると考えられる。

***Ecppk1* 発現株の短寿命を多コピーで抑圧する遺伝子について**

Ecppk1 遺伝子の発現による短寿命（および増殖遅延）を多コピーで抑圧する遺伝子の探索では、細胞質ポリリン酸が影響を及ぼす因子を明らかにすることが目的であったが、唯一得られた遺伝子は *DDP1* 遺伝子であった。*Ddp1p* は主にイノシトールピロリン酸 InsP_7 および InsP_8 の脱リン酸化とエンドポリホスファターゼ活性についてよく調べられている (53)。多コピーベクターで高発現させた *DDP1* 遺伝子は *EcPpk1p* により合成された細胞質ポリリン酸を分解することで増殖遅延および短寿命を抑圧したと考えられる。この抑圧効果は、細胞質ポリリン酸ホスファターゼ *PPX1* 遺伝子の過剰発現と同じである。*Ddp1p* は過剰発現により液胞以外の細胞質全体に局在することや、*Ecppk1* 発現株での短寿命が *DDP1* の過剰発現で緩和されたことは *PPX1* 遺伝子での観察と同じである。興味深いことは、*PPX1* と *DDP1* 遺伝子は重複した機能をもつのではなく、それぞれが必須な機能をもつことである。*ddp1* 破壊株では *PPX1* 遺伝子が正常で、逆に *ppx1* 破壊株では *DDP1* 遺伝子が正常であるにもかかわらず、どちらの単一破壊株も *Ecppk1* 遺伝子の発現により致死になった。

今回のスクリーニングでポリリン酸ホスファターゼ（例えば *PPX1*）が抑圧因子として得られることは想定されたが、他方、細胞質ポリリン酸による短寿命化に関する新規の遺伝子を分離することができなかった。*Ecppk1* 遺伝子の発現による細胞質ポリリン酸の増加による短寿命と増殖遅延が同じ経路を利用しているかどうかはわかっていないので、増殖遅延を1次スクリーニングの指標にしたことが問題であるかもしれない。他に、細胞質ポリリン酸が分裂寿命に影響を及ぼす経路が単一でないことが考えられる。本スクリーニングの途中で増殖遅延の抑圧の再現性がみられなくなったクローンが複数あった。このスクリーニング系を改善するとしたら、強力すぎる *GAL1* プロモーターによる *Ecppk1* 遺伝子の発現系の変更が挙げられる。また、ゲノムライブラリーをプラスミドで導入しているので、pYES-*Ecppk1* との2種類のプラスミドの保持

を避けるために、*Ecppk1* 遺伝子の発現系をゲノムに組み込んだ株を構築することで改善されるかもしれない。

***Ecppk1* 発現株におけるトランスクリプトーム解析とメタボローム解析について**

Ecppk1 発現株における細胞内の変動から細胞質ポリリン酸の増加による影響を知ろうと試みた。*Ecppk1* 発現株におけるトランスクリプトーム解析から、出芽酵母の老化細胞で誘導される遺伝子 (*SNZ1/SNO1* 遺伝子など) の発現上昇を見つけたが、その発現上昇が短寿命の原因となっているのではなく、おそらく *Ecppk1* 遺伝子の発現により細胞老化が惹起された結果によるものかもしれない。また、メタボローム解析からは顕著な変動を見つけることができなかったことより、細胞質ポリリン酸は細胞内の代謝に影響を与えないのかもしれない。

第 3 章

ポリリン酸高蓄積株における分裂寿命関連因子の検索

第 1 節 【緒言】

第 1 章において、*pho80*破壊株と *VTC*過剰発現株が共にポリリン酸を高蓄積し、分裂寿命が短縮することを明らかにした。しかし、*pho80*破壊株と *VTC5*過剰発現株の間で異なる現象もみられた。ポリリン酸ホスファターゼの過剰発現による寿命回復効果は、*VTC5*過剰発現株ではみられたが、*pho80*破壊株ではみられなかった。また、*pho80*破壊株では転写活性化因子 *PHO4* 遺伝子の破壊によってその短寿命は完全に回復するが、*VTC* 遺伝子の破壊では部分的にしか回復しなかった。これは *pho80*破壊株の短寿命の原因として、ポリリン酸蓄積とは独立した経路が存在することを示す。

これまでに様々な寿命関連因子が報告されてきた。序論で述べたように、カロリー制限（培地中のグルコース濃度を通常の 2%から 0.5%に減少させる）により酵母の分裂寿命が延長する。酵母は、グルコース存在下では酸素の有無にかかわらず、呼吸ではなく発酵によりエネルギーを獲得するが、カロリー制限により発酵から呼吸に代謝が切り替わることが寿命延長の引き金となる (54)。このカロリー制限による寿命延長にはサーチュインをコードする *SIR2* 遺伝子の機能が必要である。ゲノムの安定性も細胞寿命に重要である。リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) は第 XII 番染色体上に 100 コピー以上のリピート構造として存在するが、細胞分裂に伴い環状リボソーム DNA (Extrachromosomal rDNA circles, ERCs) として染色体から切り出され、核小体に蓄積する。この ERCs の蓄積が老化の要因でもあり、rDNA 領域からの ERCs の生成を *SIR2* 遺伝子が抑制することが示されている (55)。栄養シグナル伝達系も細胞寿命に関係する。アミノ酸センサーとして働くプロテインキナーゼ TORC1 (Target of rapamycin complex) 阻害剤ラパマイシンの添加あるいは *TOR1* 遺伝子を破壊することにより、分裂寿命が延長する (21)。これらの要因の他に、呼吸欠損株やストレス感受性株で分裂寿命が短くなることが報告されている (56)。

本章では、高蓄積したポリリン酸が分裂寿命に関係するどの環境因子や遺伝因子に影響を与えるかを検討した。そのために、*pho80*破壊株と *VTC5*過剰発現株について分裂寿命に関係することが知られている表現型を調べた。また、ポリリン酸高蓄積株の細胞

内の変動を知るために、*pho80* 破壊株と *VTC5* 過剰発現株におけるトランスクリプトーム解析を試みた。

第2節 【材料と方法】

第1章と第2章で記述したものについては省略する。

使用した菌株

本章において用いた出芽酵母菌株の遺伝子型は表 3-1 に示した。

使用したオリゴヌクレオチド

使用したオリゴヌクレオチドの塩基配列は表 3-2 に示した。

【表 3-1】 第 3 章で使用した酵母菌株

| Strain Name | Genotype |
|--------------------------|--|
| BY4742 | <i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i> |
| BY4742-p ⁰ | <i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 rho0</i> |
| BY2-pho80H | <i>MATα pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>vtc1</i> * | <i>MATα vtc1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>vtc2</i> * | <i>MATα vtc2Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>vtc3</i> * | <i>MATα vtc3Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>vtc4</i> * | <i>MATα vtc4Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>vtc5</i> * | <i>MATα vtc5Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>vtc1</i> -pho80H | <i>MATα vtc1Δ::kanMX pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>vtc2</i> -pho80H | <i>MATα vtc2Δ::kanMX pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>vtc3</i> -pho80H | <i>MATα vtc3Δ::kanMX pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>vtc4</i> -pho80H | <i>MATα vtc4Δ::kanMX pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>vtc5</i> -pho80H | <i>MATα vtc5Δ::kanMX pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>vma5</i> * | <i>MATα vma5Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpVTC5 | <i>MATα TDH3p-VTC5::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpVTC5- <i>vtc4</i> | <i>MATα TDH3p-VTC5::CgLEU2 vtc4Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TpVTC4-1-3-2 | <i>MATα TDH3p-VTC4::CgLEU2 TDH3p-VTC1::CgHIS3 TDH3p-VTC3::CgURA3 TDH3p-VTC2::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>tor1</i> | <i>MATα tor1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>tor1</i> -pho80H | <i>MATα tor1Δ::kanMX pho80Δ::CgHIS3 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2- <i>ppn1</i> | <i>MATα ppn1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TDH3p-PPN1 | <i>MATα TDH3p-PPN1::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |
| BY2-TDH3p-PPN2 | <i>MATα TDH3p-PPN2::CgLEU2 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> |

Strains marked with an asterisk (*) are obtained from the Yeast MAT α Collection YSC1054.

【表 3-2】 第 3 章で使用したオリゴヌクレオチド

| Name of oligonucleotide | Sequence (5' to 3') |
|---|--|
| For construction of gene knockout strain | |
| PHO80KOf | ATCATAAGACGAGGATATCCTTTGGAGACTCATAGAAATCCACA GGAAACAGCTATGACC |
| PHO80KOr | CTCAATCATGATTGCTTTCATAATACCCACGAAAAATCAGTTGT AAAACGACGGCCAGT |
| For confirmation of gene knockout | |
| PHO80Cr3 | AACGCACTTATTGGGTGCTTATAAGCTGTT |
| VMA5Cf | CGTAAAGAGAAGCGTCAGTCATAAACG |
| kanMXCr | TTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTG |

使用した培地

高リン酸合成グリセロール培地

脱イオン水 1 L あたり 20 g の Glycerol (和光純薬)、2.0 g の L-Asparagine (ナカライテスク)、250 mL の 4×High Pi ストック溶液を加え、栄養要求性に応じてアミノ酸や核酸を添加した。オートクレーブ後に 1 mL の Vitamin mix を加えた。

ストレス感受性試験

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 10 になるように希釈した。OD₆₀₀=10 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希釈液 (OD₆₀₀=10, 2, 0.4, 0.08, 0.0016) を各条件 (4 mM H₂O₂ [酸化ストレス]、10 mM Mn²⁺ [重金属ストレス]、10 mM Zn²⁺ [重金属ストレス]) の高リン酸培地 (プレート) にスポットし、30°C で培養した。

SynaptoRed C2 による酵母液胞膜染色

酵母の液胞膜染色には、一般的によく用いられる FM4-64 の相当品として販売されている SynaptoRed™ C2 (biotium) を用いた。高リン酸合成培地で 2 日間培養した 2 mL の前培養液から、5 mL の高リン酸合成培地に初期 OD₆₀₀=0.05 になるように植菌し、OD₆₀₀=1 まで増殖させた。1 OD 分の細胞を集菌し、40 μM の SynaptoRed C2 を加えた高リン酸合成培地に懸濁して丸底チューブに移してアルミホイルで遮光し、30°C で 1 時間培養した。細胞を集菌し、高リン酸合成培地 1 mL に懸濁して再び丸底チューブに移してアルミホイルで遮光し、30°C で 1 時間培養した。細胞を集菌し、滅菌水 25 μL に懸濁した細胞懸濁液を、蛍光顕微鏡 (BX-50、OLYMPUS) でフィルターは WIG を用い、倍率は 10 (接眼レンズ) × 100 倍 (対物レンズ) に設定して観察した。

Quinacrine 染色による液胞酸性度の観察

塩基性の膜透過物質である Quinacrine が細胞内の酸性区画に蓄積することから、その蛍光は酸性区画であることを示す。YPD 培地で一晚培養した前培養液から、5 mL の YPD 培地に植菌し、 $OD_{600}=1$ まで増殖させた。集菌した細胞を、100 mM HEPES (pH7.5) を含む培地 1 mL に懸濁し、キナクリン (和光純薬) を終濃度が 0.4 mM になるように加えた。アルミホイルで遮光し、30°C で 20 分間保温した。細胞を集菌し、2% グルコースを含む 100 mM HEPES バッファー (pH7.5) で洗浄してから、蛍光顕微鏡でフィルターは WBV を用い、倍率は、10 (接眼レンズ) × 100 倍 (対物レンズ) に設定して観察した。

TOR キナーゼ活性試験

TORC1 キナーゼの活性は、Sch9p のリン酸化状態をモニターすることで評価した (57, 58)。GST-Sch9 を発現させるプラスミドを導入した酵母の細胞溶解液を phospho-T737-Sch9 抗体と GST 抗体でウェスタンブロットした。浜松医科大学医学部医学科 前田 達哉 教授、谷川 美頼 特任助教との共同研究により行った。

リボソーム DNA 領域の安定性試験

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 (59)。東京大学定量生命科学研究所 小林 武彦 教授、細山田舜 博士との共同研究により行った。

第 3 節 【結果】

第 1 項 液胞の形態と酸性度の観察

細胞内のほとんどのポリリン酸は液胞内に貯蔵される (60, 61)。短寿命である *pho80* 破壊株および *VTC5* 過剰発現株では、ポリリン酸が液胞に高蓄積することで液胞に異常が生じている可能性を考えた。まず、SynaptoRed C2 (FM4-64 相当品) で液胞膜を染色して液胞形態を観察した。*pho80* 破壊株および *VTC5* 過剰発現株の両方で、野生型株よりも液胞が大きかった (図 3-1 A~C)。これらの中には、液胞が細胞の大部分を占めているものもあった。ポリリン酸が検出されない *vtc4* 破壊株では、断片化された小さな液胞が複数みられた (図 3-1 D~F)。

出芽酵母において、液胞は通常 pH 5 程度の酸性環境である。液胞が酸性でないとミトコンドリアの機能障害が起こり、分裂寿命が短くなる (62)。そこで、ポリリン酸高蓄積株の液胞内の酸性度を Quinacrine 染色にて観察した。Quinacrine 染色により液胞の蛍光が観察されれば、その液胞は酸性であると判断される。野生型株では Quinacrine 蛍光を確認した (図 3-2 A)。液胞型 ATPase である *VMA5* 遺伝子を破壊すると、液胞内の酸性化能が失われることが報告されており、実際に *vma5* 破壊株では Quinacrine 蛍光は観察されなかった (図 3-2 B)。*pho80* 破壊株では野生型株と同程度の強い蛍光が観察され、*VTC5* 過剰発現株でも、少し弱いですが、蛍光が観察された (図 3-2 C、D)。これらの結果から、ポリリン酸高蓄積株の液胞内の酸性度は正常に維持されていると結論した。

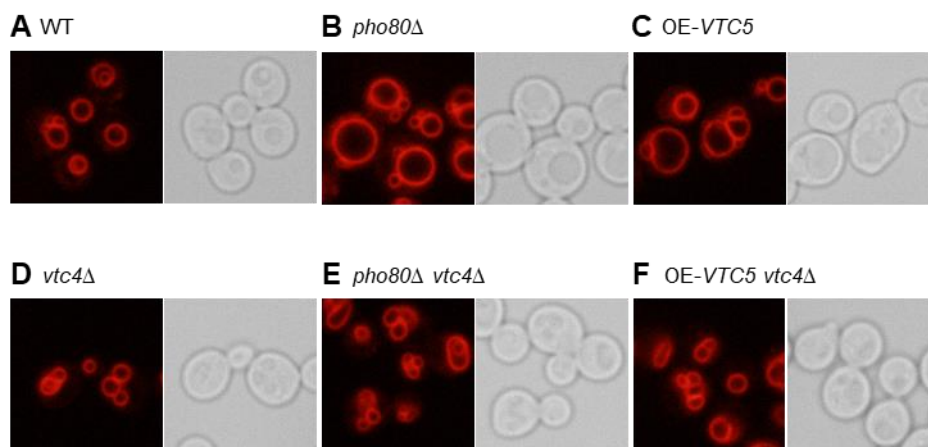


図 3-1 ポリリン酸高蓄積株における液胞の形態観察

高リン酸合成培地で $OD_{600} = 1$ まで生育させた細胞の液胞膜をSynaptoRed C2で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。(A) 野生型株、(B) *pho80* 破壊株、(C) *VTC5* 過剰発現株、(D) *vtc4* 破壊株、(E) *pho80 pho4* 二重破壊株、(F) *VTC5* 過剰発現 *vtc4* 破壊株。

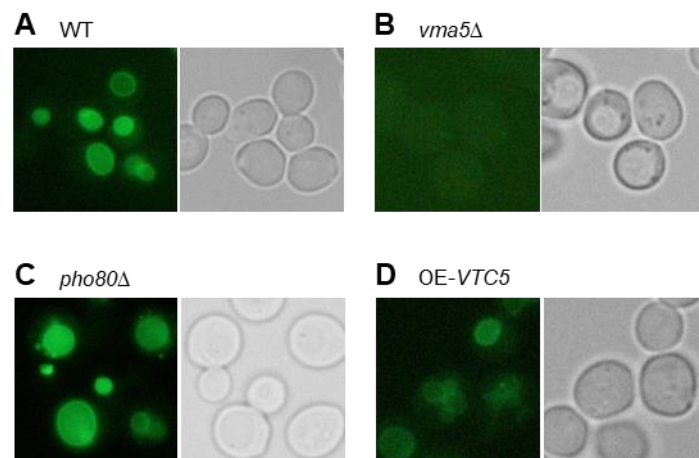


図 3-2 ポリリン酸高蓄積株における液胞内酸性度の観察

YPD 培地で $OD_{600} = 1$ まで生育させた細胞をキナクリンで染色し、蛍光顕微鏡で観察した。(A) 野生型株、(B) *vma5* 破壊株、(C) *pho80* 破壊株、(D) *VTC5* 過剰発現株。

第 2 項 呼吸能およびストレス応答の検討

出芽酵母では、ミトコンドリアの呼吸不全により分裂寿命が短くなることが報告されている (56)。また、酸化ストレスなどに対する感受性が高くなると分裂寿命が短縮することから、ポリリン酸高蓄積株において呼吸能およびストレス条件での生育を調べた。

第 1 に、ポリリン酸高蓄積と呼吸の関係性について調べた。グルコースの代わりに非発酵性の炭素源であるグリセロールを含む培地において、野生型株はグリセロールを利用して生育するが、ミトコンドリアゲノムを欠損した ρ^0 株は呼吸ができずにグリセロール培地で生育できない。ポリリン酸が高蓄積し短寿命となる *pho80* 破壊株はグリセロール培地において生育しなかった (図 3-3)。寿命が完全に回復した *pho80 pho4* 二重破壊株で野生型株並みに生育し、寿命が部分的に回復した *pho80 vtc1* 二重破壊株と *pho80 vtc4* 二重破壊株はほとんど生育しなかった。このことから *pho80* 破壊株は呼吸能が欠損しているが、それはポリリン酸の高蓄積によるものではないと考えた。

第 2 に、ポリリン酸高蓄積株について酸化ストレスとしての過酸化水素を含む培地での生育を調べた。過酸化水素の存在下で *pho80* 破壊株は生育できず、過酸化水素に感受性があった。これに対して、*pho80 pho4* 二重破壊株は野生型株と同じように生育し、*pho80 vtc1* および *pho80 vtc4* 二重破壊株も同程度の生育を示したことから、ポリリン酸の高蓄積が酸化ストレス感受性に関与することが示唆された。

第 3 に、ポリリン酸高蓄積株の金属ストレスへの感受性について調べた。マンガン添加培地において *pho80* 破壊株は生育しなかった。同様に、*VTC5* 過剰発現株と *VTC1/VTC2/VTC3/VTC4* 共過剰発現株が生育しなかった。しかし、これら *VTC* 過剰発現株の *VTC4* 遺伝子を破壊すると、野生型株と同程度に生育したことから、マンガンストレス感受性もポリリン酸高蓄積に関与することが示唆された。しかし、マンガン存在下、*vtc1* 破壊株および *vtc4* 破壊株が野生型株よりもよく生育したことから、*pho80 vtc* 二重破壊株が良好に生育したのは、マンガン感受性を抑圧したのではなく、*VTC* 遺伝子の破壊によりマンガン耐性になるからであると考えられた。(図 3-4)。亜鉛添加培地での生育について、*pho80* 破壊株は生育せず、*pho80 vtc1* 二重破壊株と *pho80 vtc4* 二重破壊株は野生型株と同程度に生育した。*vtc* 単独破壊株は野生型株と同程度の生育であったことから、*pho80* 破壊株での亜鉛感受性を *VTC* 遺伝子の破壊により抑圧したので、ポリリン酸の高蓄積が亜鉛感受性に関与すると考えられた。しかし、*pho80* 破壊株と同

様にポリリン酸を高蓄積する *VTC5* 過剰発現株と *VTC1/VTC2/VTC3/VTC4* 共過剰発現株が野生型株並みに生育したため、ポリリン酸の高蓄積が亜鉛感受性に必ずしも関与するとはいえなかった。

第4に、TOR活性がポリリン酸高蓄積株の短寿命に関与するかどうかを検討した。哺乳類細胞において、細胞内の栄養やATPのセンサーとして細胞増殖や免疫に関わるシグナル伝達に重要なキナーゼであるmTOR (mammalian TOR) に関して、ポリリン酸がmTOR活性を促進することが報告されている(63)。酵母においてTOR1複合体(TORC1)は液胞膜に局在し(64)、*tor1*破壊株では分裂寿命が延長する(21)ことから、ポリリン酸の高蓄積がTORC1を活性化させて短寿命となる可能性を考えた。本研究で用いている合成培地では、*tor1*破壊株は長寿命でなく、野生型株と同程度であり、*pho80*破壊株においてTOR1遺伝子を破壊しても短寿命は回復しなかった(6世代)(図3-5 A、表3-3)。そこで、YPD培地で分裂寿命を測定したところ、以前の報告通り、*tor1*破壊株では野生型株よりも長寿命となった(32世代)(図3-5 B、表3-3)。*pho80 tor1*二重破壊株の分裂寿命は*pho80*破壊株と同程度であった(12世代)。さらに、Tor1pキナーゼの基質であるSph9pのリン酸化について確認した。野生型株ではTor1p阻害剤であるラパマイシン添加によりリン酸化されたSph9pのバンドは検出されなかった(図3-5 C)。ポリリン酸を高蓄積する*pho80*破壊株ではリン酸化のバンドが野生型株よりも濃くなることはなく、バンドが若干薄く観察された。ポリリン酸が検出されない*vtc4*破壊株でもリン酸化バンドは野生型株と差がなかった。以上の結果より、*pho80*破壊株ではTORC1は活性化されておらず、これが短寿命の原因とはならないと結論した。

第5に、ポリリン酸高蓄積株においてrDNA領域の安定性が短寿命に関与するかどうかを検討した。出芽酵母のrDNAは第XII番染色体上に約150コピー繰り返されるが、rDNAのコピー数が不安定になると細胞老化が促進され、短寿命となる(65)。そこで、ポリリン酸高蓄積株においてrDNAのコピー数が不安定化する可能性を調べた。パルスフィールドゲル電気泳動により染色体DNAを分離し、第XII番染色体のバンドのシャープさを視覚化した。rDNAのコピー数が不安定であると第XII番染色体の長さにバラつきがでるためスミアなバンドになり、コピー数が安定していればシャープなバンドが観察できる。*pho80*破壊株は野生型株に似たシャープなバンドが検出され、*pho80 vtc4*二重破壊株とも同様であったことから、*pho80*破壊株の第XII番染色体のrDNA領域は安

定であった。一方で、*VTC5*過剰発現株のバンドはスメアになっていることから、第 XII 番染色体の rDNA 領域が不安定であることがわかった (図 3-5 D)。

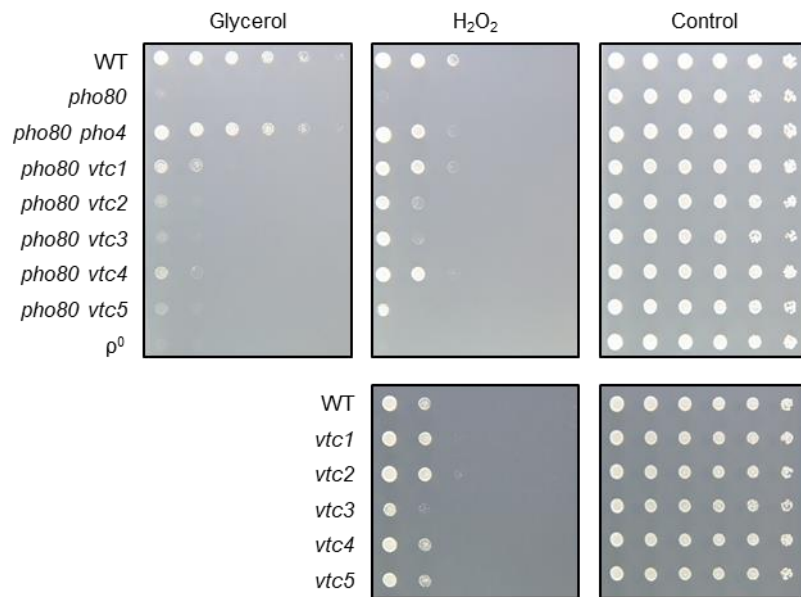


図 3-3 *pho80*破壊株における呼吸能と酸化ストレス感受性の試験

炭素源としてグリセロールを含む高リン酸合成培地と過酸化水素を添加した高リン酸合成培地での酵母の生育を示す。過酸化水素の終濃度は4 mMである。酵母を植菌してから4日目に撮影した。

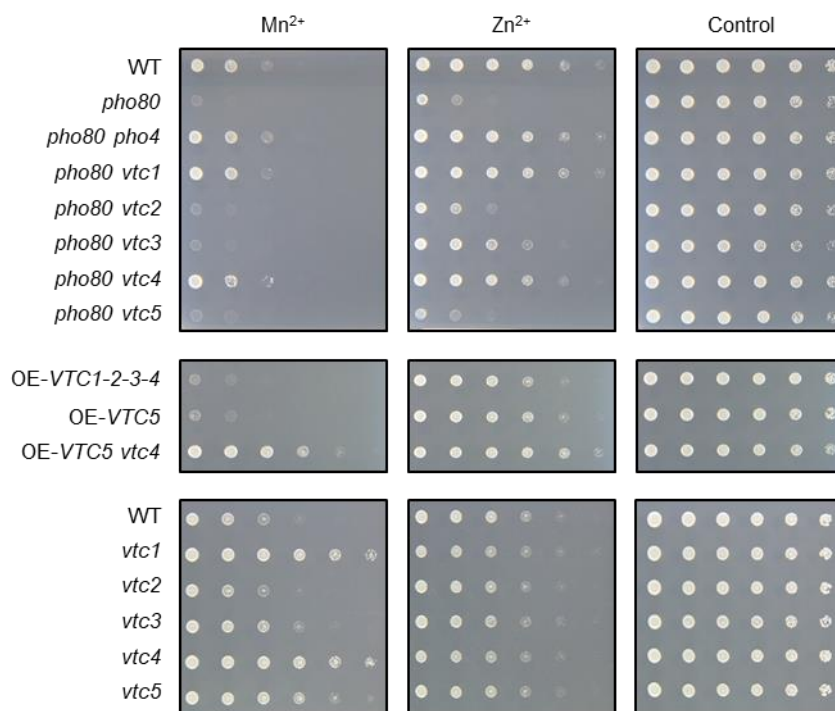


図 3-4 ポリリン酸高蓄積株における金属ストレス感受性の試験

マンガンあるいは亜鉛を添加した高リン酸合成培地での酵母の生育を示す。マンガンと亜鉛の終濃度は 10 mM である。酵母を植菌してから 4 日目に撮影した。

【表 3-3】 第 3 章における酵母菌株の分裂寿命

| Relevant genotype | Median lifespan | Maximum lifespan | vs. WT | <i>P</i> -value vs. (Host Strain) |
|--------------------------------|-----------------|------------------|---------|-----------------------------------|
| High Pi synthetic media | | | | |
| Wild-type (WT) | 26.0 | 64 | — | — |
| <i>pho80</i> | 10.0 | 20 | 1.2E-23 | — |
| <i>tor1</i> | 19.0 | 57 | 4.1E-02 | 4.0E-13 (<i>pho80</i>) |
| <i>pho80 tor1</i> | 6.0 | 20 | 4.0E-20 | 2.6E-05 (<i>pho80</i>) |
| YPD media | | | | |
| WT | 22.0 | 36 | — | — |
| <i>pho80</i> | 16.0 | 35 | 3.2E-03 | — |
| <i>tor1</i> | 32.0 | 49 | 4.7E-06 | 3.3E-09 (<i>pho80</i>) |
| <i>pho80 tor1</i> | 12.0 | 32 | 2.3E-07 | 9.2E-03 (<i>pho80</i>) |

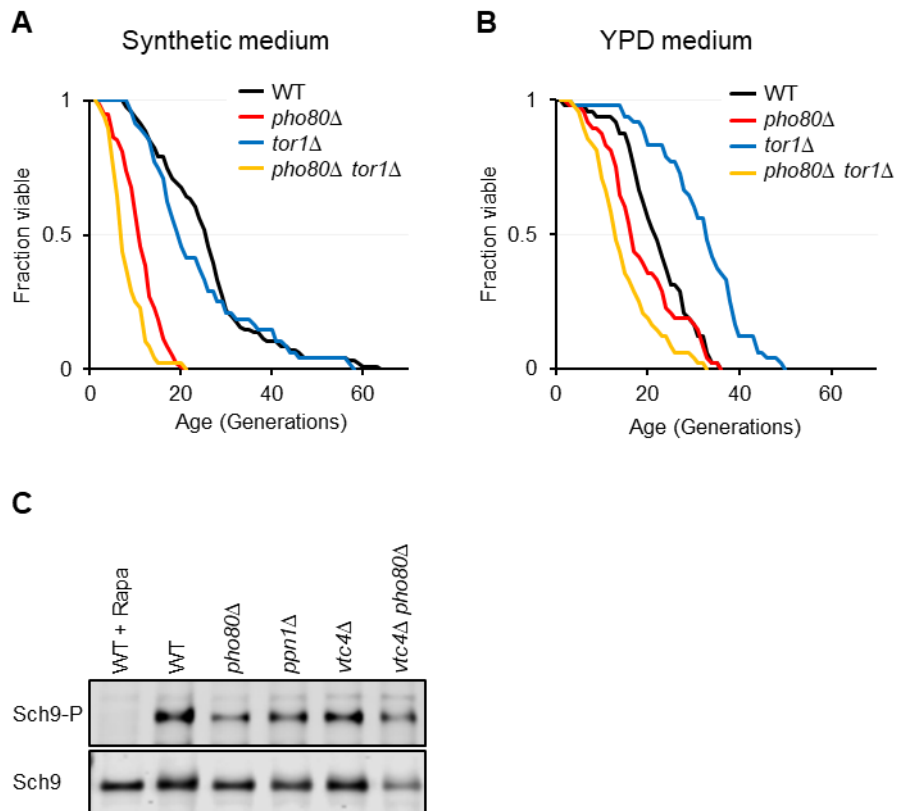


図 3-5 *tor1* 破壊株における分裂寿命とポリリン酸高蓄積株における TORC1 活性

(A) 高リン酸合成培地での分裂寿命曲線。横軸が世代数、縦軸が生存率をプロットしたグラフを示した。野生型 (WT) 株 (—、26.0 世代)、*pho80Δ* 株 (—、10.0 世代)、*tor1Δ* 株 (—、15.0 世代)、*pho80Δ tor1Δ* 株 (—、6.0 世代)。

(B) YPD 培地での分裂寿命曲線。野生型 (WT) 株 (—、22.0 世代)、*pho80Δ* 株 (—、16.0 世代)、*tor1Δ* 株 (—、32.0 世代)、*pho80Δ tor1Δ* 株 (—、12.0 世代)。

(C) Sch9p のリン酸化検出。(Rapa: ラパマイシ)

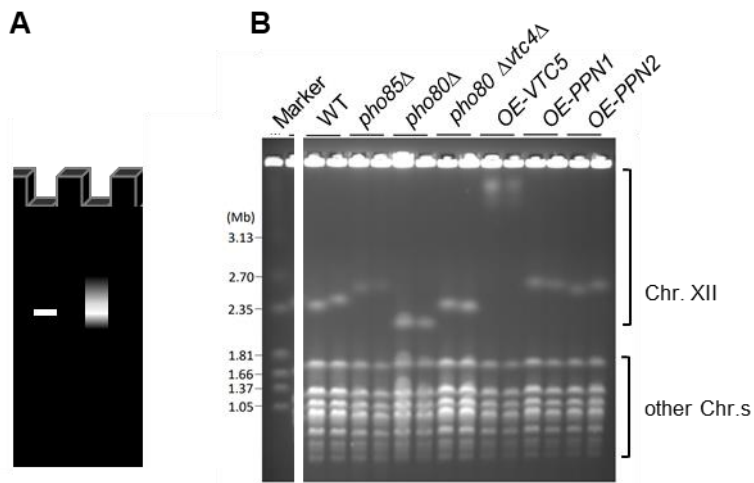


図 3-6 ポリリン酸高蓄積株における rDNA リピートの安定性試験

(A) パルスフィールドゲル電気泳動 CHEF (contour-clamped homogeneous electric field) 法による電気泳動のバンドパターンによる rDNA リピートの安定性評価。
左レーン：シャープなバンド（安定）、右レーン：スメアなバンド（不安定）。

(B) CHEF 電気泳動による第 XII 番染色体の解析。

第 3 項 ポリリン酸高蓄積株におけるトランスクリプトーム解析

ポリリン酸高蓄積株の短寿命の原因を網羅的に探索する目的で、*pho80*破壊株と *VTC5*過剰発現株について RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析を試みた。*pho80*破壊株では、野生型株に対して転写量が 2 倍以上に増加している遺伝子が 19 個、減少している遺伝子は 32 個であった（表 3-4、表 3-5）。*VTC5*過剰発現株では、野生型株に対して転写量が 2 倍以上増加している遺伝子はなく、減少している遺伝子は 37 個であった。転写量が増加している遺伝子について、*pho80*破壊株では PHO 経路に関する遺伝子の転写量が大きく上昇していた。一方、転写量が減少した遺伝子については、*pho80*破壊株では 6 割、*VTC5*過剰発現株では 5 割の遺伝子が共通していた（表 3-6）。この 2 株で共通して転写量が減少した遺伝子について、GO エンリッチメント解析をした結果、生物学的プロセスでクエン酸回路およびプリン生合成に関するタンパク質遺伝子が濃縮されていた（表 3-7）。また、細胞の構成要素としてはミトコンドリアが濃縮されていた。

【表 3-4】 *pho80*破壊株で野生型株より転写量が2倍以上減少した遺伝子 (RNA-seq 解析)

| Systematic Name | Gene Name | Name Description |
|-----------------|--------------|---|
| YDR343C | <i>HXT6</i> | High-affinity glucose transporter |
| YLR058C | <i>SHM2</i> | Cytosolic serine hydroxymethyltransferase |
| YDR342C | <i>HXT7</i> | High-affinity glucose transporter |
| YMR120C | <i>ADE17</i> | Enzyme of 'de novo' purine biosynthesis |
| YNL160W | <i>YGP1</i> | Cell wall-related secretory glycoprotein |
| YOL154W | <i>ZPS1</i> | Putative GPI-anchored protein |
| YMR096W | <i>SNZ1</i> | Protein involved in vitamin B6 biosynthesis |
| YHL040C | <i>ARN1</i> | ARN family transporter for siderophore-iron chelates |
| YLR359W | <i>ADE13</i> | Adenylosuccinate lyase |
| YAR015W | <i>ADE1</i> | N-succinyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide synthetase |
| YDR019C | <i>GCV1</i> | T subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex |
| YOR387C | — | Putative protein of unknown function |
| YHL047C | <i>ARN2</i> | Transporter; member of the ARN family of transporters |
| YNL037C | <i>IDH1</i> | Subunit of mitochondrial NAD ⁺ -dependent isocitrate dehydrogenase |
| YEL065W | <i>SIT1</i> | Ferrioxamine B transporter; member of the ARN family of transporters |
| YPL265W | <i>DIP5</i> | Dicarboxylic amino acid permease |
| YOR136W | <i>IDH2</i> | Subunit of mitochondrial NAD ⁺ -dependent isocitrate dehydrogenase |
| YDL223C | <i>HBT1</i> | Shmoo tip protein, substrate of Hub1p ubiquitin-like protein |
| YGL255W | <i>ZRT1</i> | High-affinity zinc transporter of the plasma membrane |
| YKL175W | <i>ZRT3</i> | Vacuolar membrane zinc transporter |
| YLR130C | <i>ZRT2</i> | Low-affinity zinc transporter of the plasma membrane |
| YBR117C | <i>TKL2</i> | Transketolase |
| YPR036W-A | <i>SPO24</i> | Small (67 amino acids) protein involved in sporulation |
| YEL071W | <i>DLD3</i> | 2-hydroxyglutarate transhydrogenase |
| YGR043C | <i>NQM1</i> | Transaldolase of unknown function |
| YEL060C | <i>PRB1</i> | Vacuolar proteinase B (ytcB) with H3 N-terminal endopeptidase activity |
| YLL055W | <i>YCT1</i> | High-affinity cysteine-specific transporter |
| YNL254C | <i>RTC4</i> | Protein of unknown function |
| YOR184W | <i>SER1</i> | 3-phosphoserine aminotransferase |
| YIL162W | <i>SUC2</i> | Citrate synthase |
| YOR382W | <i>FIT2</i> | Mannoprotein that is incorporated into the cell wall |
| YCR005C | <i>CIT2</i> | Citrate synthase |

【表 3-5】 *VTC5* 過剰発現株で野生型株より転写量が 2 倍以上減少した遺伝子
(RNA-seq 解析)

| Systematic Name | Gene Name | Name Description |
|-----------------|-------------------|---|
| YLR058C | <i>SHM2</i> | Cytosolic serine hydroxymethyltransferase |
| YPL187W | <i>MF(ALPHA)1</i> | Mating pheromone alpha-factor |
| YNL036W | <i>NCE103</i> | Carbonic anhydrase |
| YDR382W | <i>RPP2B</i> | Ribosomal protein P2 beta |
| YPL265W | <i>DIP5</i> | Dicarboxylic amino acid permease |
| YMR120C | <i>ADE17</i> | Enzyme of 'de novo' purine biosynthesis |
| YLR359W | <i>ADE13</i> | Adenylosuccinate lyase |
| YAR015W | <i>ADE1</i> | N-succinyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide synthetase |
| YDR019C | <i>GCV1</i> | T subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex |
| YNL037C | <i>IDH1</i> | Subunit of mitochondrial NAD ⁺ -dependent isocitrate dehydrogenase |
| YMR096W | <i>SNZ1</i> | Protein involved in vitamin B6 biosynthesis |
| YPR035W | <i>GLN1</i> | Glutamine synthetase |
| YPR080W | <i>TEF1</i> | Translation Elongation Factor |
| YBR068C | <i>BAP2</i> | Branched-chain Amino acid Permease |
| YBL043W | <i>ECM13</i> | Non-essential protein of unknown function |
| YOR063W | <i>RPL3</i> | Ribosomal 60S subunit protein L3 |
| YPL135W | <i>ISU1</i> | Conserved protein of the mitochondrial matrix |
| YHL015W | <i>RPS20</i> | Protein component of the small (40S) ribosomal subunit |
| YEL060C | <i>PRB1</i> | Vacuolar proteinase B (yvcB) with H3 N-terminal endopeptidase activity |
| YLR142W | <i>PUT1</i> | Proline oxidase |
| YBR031W | <i>RPL4A</i> | Ribosomal 60S subunit protein L4A |
| YOR136W | <i>IDH2</i> | Subunit of mitochondrial NAD ⁺ -dependent isocitrate dehydrogenase |
| YMR145C | <i>NDE1</i> | Mitochondrial external NADH dehydrogenase; |
| YPR036W-A | <i>SPO24</i> | Small (67 amino acids) protein involved in sporulation |
| YPR002W | <i>PDH1</i> | Putative 2-methylcitrate dehydratase |
| YPL131W | <i>RPL5</i> | Ribosomal 60S subunit protein L5 |
| YNL117W | <i>MLS1</i> | Malate synthase |
| YGL055W | <i>OLE1</i> | Delta(9) fatty acid desaturase |
| YDL081C | <i>RPP1A</i> | Ribosomal stalk protein P1 alpha |

【表 3-5】 *VTC5* 過剰発現株で野生型株より転写量が 2 倍以上減少した遺伝子
(RNA-seq 解析) (続き)

| | | |
|---------|--------------|---|
| YEL009C | <i>GCN4</i> | bZIP transcriptional activator of amino acid biosynthetic genes |
| YKL178C | <i>STE3</i> | Receptor for a factor pheromone |
| YEL065W | <i>SIT1</i> | Ferrioxamine B transporter |
| YLR167W | <i>RPS31</i> | Fusion protein cleaved to yield ribosomal protein S31 and ubiquitin |
| YDR225W | <i>HTA1</i> | Histone H2A |
| YER024W | <i>YAT2</i> | Carnitine acetyltransferase |
| YHL047C | <i>ARN2</i> | Transporter; member of the ARN family of transporters |
| YNR001C | <i>CIT1</i> | Citrate synthase |

【表 3-6】 *pho80* 破壊株と *VTC5* 過剰発現株で共通して野生型株より転写量が 2 倍以上減少した遺伝子 (RNA-seq 解析)

| Systematic Name | Gene Name | Name Description |
|-----------------|---------------|---|
| YLR058C | <i>SHM2</i> | Cytosolic serine hydroxymethyltransferase |
| YNL036W | <i>NCE103</i> | Carbonic anhydrase |
| YPL265W | <i>DIP5</i> | Dicarboxylic amino acid permease |
| YMR120C | <i>ADE17</i> | Enzyme of 'de novo' purine biosynthesis |
| YLR359W | <i>ADE13</i> | Adenylosuccinate lyase |
| YAR015W | <i>ADE1</i> | N-succinyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide synthetase |
| YDR019C | <i>GCV1</i> | T subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex |
| YNL037C | <i>IDH1</i> | Subunit of mitochondrial NAD ⁺ -dependent isocitrate dehydrogenase |
| YMR096W | <i>SNZ1</i> | Protein involved in vitamin B6 biosynthesis |
| YPR080W | <i>TEF1</i> | Translation Elongation Factor |
| YPL135W | <i>ISU1</i> | Conserved protein of the mitochondrial matrix |
| YEL060C | <i>PRB1</i> | Vacuolar proteinase B (<i>yscB</i>) with H3 N-terminal endopeptidase activity |
| YOR136W | <i>IDH2</i> | Subunit of mitochondrial NAD ⁺ -dependent isocitrate dehydrogenase |
| YMR145C | <i>NDE1</i> | Mitochondrial external NADH dehydrogenase; |
| YPR036W-A | <i>SPO24</i> | Small (67 amino acids) protein involved in sporulation |
| YNL117W | <i>MLS1</i> | Malate synthase |
| YEL065W | <i>SIT1</i> | Ferrioxamine B transporter |
| YER024W | <i>YAT2</i> | Carnitine acetyltransferase |
| YHL047C | <i>ARN2</i> | Transporter; member of the ARN family of transporters |
| YNR001C | <i>CIT1</i> | Citrate synthase |

【表 3-7】 *pho80* 破壊株と *VTC5* 過剰発現株で共通して野生型株より転写量が 2 倍以上減少した遺伝子の GO エンリッチメント解析

Biological Process

| Term | Count | % | <i>p</i> -Value | Benjamini |
|--|-------|------|-----------------|-----------|
| tricarboxylic acid cycle | 4 | 20.0 | 1.3E-4 | 9.3E-3 |
| 'de novo' IMP biosynthetic process | 3 | 15.0 | 3.7E-4 | 1.3E-2 |
| purine nucleotide biosynthetic process | 3 | 15.0 | 2.8E-3 | 6.5E-2 |

Cellular Component

| Term | Count | % | <i>p</i> -Value | Benjamini |
|--|-------|------|-----------------|-----------|
| mitochondrial intermembrane space | 4 | 20.0 | 2.6E-3 | 7.7E-2 |
| mitochondrial isocitrate dehydrogenase complex (NAD ⁺) | 2 | 10.0 | 6.0E-3 | 7.7E-2 |
| mitochondrial matrix | 4 | 20.0 | 7.4E-3 | 7.7E-2 |
| fungal-type vacuole | 4 | 20.0 | 5.1E-2 | 3.8E-1 |
| Mitochondrion | 8 | 40.0 | 6.0E-2 | 3.8E-1 |

Molecular Function

| Term | Count | % | <i>p</i> -Value | Benjamini |
|---|-------|------|-----------------|-----------|
| catalytic activity | 6 | 30.0 | 3.0E-3 | 1.9E-1 |
| isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺) activity | 2 | 10.0 | 1.1E-2 | 3.3E-1 |
| siderophore transmembrane transporter activity | 2 | 10.0 | 2.1E-2 | 4.4E-1 |

Pathway

| Term | Count | % | <i>p</i> -Value | Benjamini |
|---|-------|------|-----------------|-----------|
| Biosynthesis of secondary metabolites | 9 | 45.0 | 2.1E-4 | 2.9E-3 |
| Carbon metabolism | 6 | 30.0 | 2.5E-4 | 2.9E-3 |
| Glyoxylate and dicarboxylate metabolism | 4 | 20.0 | 4.9E-4 | 2.9E-3 |
| Metabolic pathways | 12 | 60.0 | 5.0E-4 | 2.9E-3 |
| One carbon pool by folate | 3 | 15.0 | 3.0E-3 | 1.4E-2 |

第 4 節 【考察】

本章では、ポリリン酸の高蓄積が分裂寿命を短縮する原因を見つけ出すことを目指し、ポリリン酸を高蓄積する *pho80* 破壊株と *VTC5* 過剰発現株について分裂寿命に関連する表現型を調べた。ポリリン酸が蓄積する液胞に関して、*pho80* 破壊株と *VTC5* 過剰発現株で共に液胞内の酸性度は正常に保たれていたが、液胞が肥大化していた。また、*pho80* 破壊株では呼吸能の低下、酸化ストレスおよび金属ストレスに対して感受性が観察された。一方、*VTC5* 過剰発現株では rDNA リピート領域の不安定化がみられた。このように、2 株のポリリン酸高蓄積株に共通した表現型は見いだせなかったが、トランスクリプトーム解析では 2 株に共通した転写変動がみられた。

ポリリン酸高蓄積株における分裂寿命関連表現型について

ポリリン酸を高蓄積し短寿命となる *pho80* 破壊株と *VTC5* 過剰発現株において分裂寿命に関係する表現型を検索した。

pho80 破壊株と *VTC5* 過剰発現株で共に液胞の肥大化がみられたことは、ポリリン酸が液胞に過剰に蓄積していることと関係していると考えられる。*S*-アデノシルメチオンが液胞内に高蓄積すると経時寿命が短くなる例が報告されている (66)。液胞はプロテアーゼを多く含み、オートファジー研究でも提案されているように細胞内の再生処理工場と考えられているが、老廃物の蓄積により液胞機能も低下するために、老化に伴い肥大化する。ポリリン酸の高蓄積の結果として液胞が肥大化したのであって、分裂寿命の短縮化が液胞の肥大化の原因になっているとは考えにくい。

液胞膜には、アミノ酸、重金属イオン、カルシウムイオンなどのトランスポーターが存在しており、例えば、塩基性アミノ酸 (リジン、アルギニン、ヒスチジン) は全体量のうち 9 割が液胞内に存在している (67)。ポリリン酸合成酵素を過剰発現することにより、これらの物質が液胞で増加した結果として液胞が肥大化するのかもしれない。ポリリン酸高蓄積株において、これらの物質の増加を調べることは興味深い。

pho80 破壊株は酸化ストレスと亜鉛ストレスに感受性となった。*PHO80* 遺伝子の破壊により酵母細胞がこれらのストレスに鋭敏になり、細胞老化の進行が早まった結果として分裂寿命が短縮されたと考えられる。一方、*VTC5* 過剰発現株では rDNA リピートが不

安定化していた。これが *VTC5* 過剰発現株の短寿命の原因である可能性がある。*pho80* 破壊株と *VTC5* 過剰発現株で共通に観察される表現型を見つけることができなかつたので、ポリリン酸の高蓄積による短寿命の原因を限定することができなかつた。*pho80* 破壊株と *VTC5* 過剰発現株の短寿命の原因は、上で示したようにそれぞれ異なるのかもしれない。あるいは、まだ見つけられていない共通の原因の存在を否定することはできない。

***pho80 vtc* 二重破壊株の分裂寿命が部分的に回復したことについて**

pho80 破壊株はポリリン酸を高蓄積し、短寿命となった。この *pho80* 破壊株の *PHO4* 遺伝子を破壊すると分裂寿命が野生型株レベルまで回復する。これは *PHO80* 遺伝子の破壊により Pho4p 転写活性化因子の標的となる遺伝子の発現が上昇したことで説明できる。一方、*pho80* 破壊株の *VTC* 遺伝子を破壊すると分裂寿命が回復するが、その回復レベルは完全ではなく部分的であった。これは *pho80* 破壊株における *VTC* 遺伝子以外の Pho4p 標的遺伝子の発現上昇が *pho80* 破壊株の短寿命に寄与していることを示唆していた。本章での表現型解析から、*pho80* 破壊株の呼吸能が欠損していること（グリセロール培地で生育しない）を見つけ、*pho80* 破壊株の *VTC4* 遺伝子を破壊してもこの欠損が改善されなかつたことから、*PHO80* 遺伝子の破壊による呼吸欠損はポリリン酸の高蓄積に依存しないことを示している。つまり、*pho80 vtc* 二重破壊株が部分的にしか寿命を回復しない理由は、*pho80* 破壊株における呼吸欠損であると考えられる。今後、*pho80* 破壊株におけるミトコンドリア数や ROS の産生量などを調べる必要がある。

ポリリン酸高蓄積株における転写変動について

pho80 破壊株および *VTC5* 過剰発現株でそれぞれ野生型株より転写量が減少した遺伝子のうち、その半数以上が重複していた。共通して変動する制御系として、TCA 回路およびアデニン生合成経路で働く酵素遺伝子が含まれていた。この解析結果に従うと、TCA 回路に属する酵素量が減少していると考えられ、呼吸能の低下による分裂寿命短縮化が考えられる。一方で、呼吸能に関する遺伝子は、*pho80* 破壊株では低下しているものの、*VTC5* 過剰発現株では正常であり、これは表現型解析の結果と一致した。アデニンの合成も減少している可能性があるため、今後、細胞内のアデニン量などを検討する必要がある。

結論

本研究では、出芽酵母を細胞寿命決定機構の研究モデルとして、遺伝学的・分子生物学的・細胞生物学的手法によりポリリン酸と分裂寿命の関係を明らかにすることを目指した。第1章では、ポリリン酸代謝酵素が分裂寿命に関与することを明らかにし、細胞内ポリリン酸が高度に蓄積すると、分裂寿命が短縮すると結論した。また、ほとんどのポリリン酸が液胞に存在するにもかかわらず、細胞質に局在するポリリン酸ホスファターゼが分裂寿命に関与することから、細胞質のポリリン酸が分裂寿命を制御する可能性を示唆した。第2章では、大腸菌由来のポリリン酸キナーゼ *Ecppk1* 遺伝子を酵母で発現して細胞質でポリリン酸を産生すると短寿命と増殖遅延が生じることを明らかにし、細胞質でポリリン酸がわずかでも増加すると分裂寿命が短縮すると結論した。また、新たに分裂寿命に関係する因子として分離したポリリン酸ホスファターゼ *DDP1* 遺伝子が細胞質ポリリン酸の低減に貢献することを示唆した。第3章では、ポリリン酸の高蓄積による短寿命化に関わる分裂寿命制御因子を検索し、ポリリン酸を高蓄積する *pho80* 破壊株は酸化ストレスと金属ストレス感受性により、*VTC5* 過剰発現株は rDNA リピートの不安定化により短寿命となることを示唆した。また、*pho80* 破壊株における短寿命の原因がポリリン酸の高蓄積以外に呼吸能の欠損であることを示唆した。以上のように、本研究は出芽酵母においてポリリン酸による細胞寿命決定機構をはじめて解明し、ポリリン酸の新たな細胞機能を発見したものである。

総合考察

本研究では、出芽酵母の PHO 経路におけるサイクリン *PHO80* 遺伝子を破壊することにより分裂寿命が短縮した先行研究の成果をきっかけとして、ポリリン酸（特に細胞質ポリリン）が高度に蓄積すると分裂寿命が短くなることを明らかにした。本研究の知見をまとめて、ポリリン酸による分裂寿命制御モデルを提案する（図 4）。*pho80* 破壊株では *VTC* 遺伝子が高発現することにより、*VTC* 過剰発現株と同じように、液胞でのポリリン酸合成が促進され、ポリリン酸が液胞に高度に蓄積する。また、大腸菌ポリリン酸キナーゼ *Ecppk1* 遺伝子を発現させると、細胞質でポリリン酸が合成される。このように細胞内で高度に蓄積したポリリン酸は、細胞老化を進行させて分裂寿命を短縮すると考える。高蓄積したポリリン酸が細胞老化を促進するメカニズムは明らかではないが、ストレス抵抗因子やゲノム安定化因子あるいは未同定の細胞老化抑制因子の機能を阻害することが考えられる。

本研究では細胞質や液胞内それぞれのポリリン酸量を測定できなかったが、*pho80* 破壊株や *VTC* 過剰発現株では液胞のポリリン酸が、*Ecppk1* 発現株では細胞質のポリリン酸が増加して分裂寿命を短縮化すると考えられる。液胞のポリリン酸を合成しない *vtc4* 破壊株で細胞質ポリリン酸を増加させると分裂寿命が短くなったことから、細胞質のポリリン酸が分裂寿命に悪影響を与えることは間違いないであろう。一方、液胞のポリリン酸が分裂寿命に関与することは否定できないが、*VTC* 複合体の過剰発現により本来、液胞内に取り込まれなければならないポリリン酸が細胞質に漏出する可能性も十分に考えられる。*VTC* 複合体は液胞膜に局在するが、ポリリン酸合成ドメインは液胞膜外に位置するので、高発現させた *VTC* 複合体がポリリン酸を合成した後、それを液胞内に取り込むことができず、細胞質に漏出するのかもしれない。*pho80* 破壊株や *VTC* 過剰発現株では液胞のポリリン酸が増加すると考えられ、その増加量は 3 倍から 6 倍であった。一方、*Ecppk1* 遺伝子の発現による細胞質のポリリン酸の増加分は 1.3 倍程度であった。このような細胞質ポリリン酸のわずかな増加で分裂寿命が顕著に短くなったことから、細胞質のポリリン酸は液胞のポリリン酸よりも分裂寿命に対してより強力に影響を与えると考えられる。これは *Ecppk1* 発現株が液胞のポリリン酸高蓄積株ではみられない増殖遅延を示すこととも矛盾しない。おそらく細胞質ポリリン酸は微量でも毒性をもつためであろう。これはポリリン酸が液胞で合成されて蓄積すること、つまりポリリン酸

が液胞に隔離されていること、および細胞質に局在するポリリン酸ホスファターゼ Ppx1p をもつことをよく説明することができる。

ポリリン酸に関する最近の研究では、ポリリン酸がタンパク質の翻訳修飾の一つとして制御することも報告された。非酵素的にポリリン酸が共有結合するポリリン酸化タンパク質として、出芽酵母のヌクレオポリン、トポイソメラーゼ (68) やヒトの DYRK1A や MafB (69) などがある。これらはすべて核で働くタンパク質で、核の中にポリリン酸が存在することを示す。しかし、これらのタンパク質へのポリリン酸化はすべてタンパク質の酵素活性を阻害すると報告されている。ポリリン酸化の意義や核へのポリリン酸化の輸送など、まだ不明な要素が多いものの、ポリリン酸が非酵素的にタンパク質に結合し得るという情報は、細胞質でのポリリン酸の挙動の一つの可能性を提示している。このように、ポリリン酸がタンパク質の機能を阻害するようなことが分裂寿命に関わるタンパク質に対して起こる可能性は否定できない。

本研究で細胞内ポリリン酸を定量する方法を確立したが、この方法では細胞内のポリリン酸の全量を対象としており、超遠心分離法により液胞と細胞質を分画して細胞質ポリリン酸を定量することを試みたが、液胞を破裂させずに細胞質画分を回収することができなかった。細胞質ポリリン酸を検出・定量する方法として、細胞破碎を経由しない方法を考えている。蛍光物質の DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) が核酸への結合時とポリリン酸への結合時において使用する励起波長・蛍光波長が異なることを利用して細胞内のポリリン酸を調べることを試みたい。また、ポリリン酸はリン酸基が 3~数千残基の広範囲で直鎖状に連なったポリマーであり、本ポリリン酸定量法では、オルトリン酸に分解したポリリン酸を定量しているため、個々のポリリン酸の鎖長については調べていなかった。ポリリン酸高蓄積株において同じポリリン酸量であっても、そこに含まれるポリリン酸が少量の長鎖ポリリン酸なのか、大量の短鎖ポリリン酸なのかを知ることは有用である。本定量法では、ポリリン酸をポリリン酸ホスファターゼ Ppx1p によって分解したが、本酵素は *in vitro* 実験系において 30 残基以下の短鎖ポリリン酸には結合しにくく、長鎖ポリリン酸をよく分解すると報告されている (48)。このように、ポリリン酸の含有量と鎖長をより厳密に測定する方法を改良し、細胞内ポリリン酸のより詳細な情報を得ることができれば、ポリリン酸による細胞機能制御機構のさらなる解明へ貢献することができるであろう。

これまでに、ポリリン酸による細胞寿命制御についての報告はないが、オルトリン酸が個体寿命に影響を与える例が知られている。カルシウム恒常性維持に関与する Klotho 遺伝子を欠失させたマウスは、血中のリン酸濃度が高く、成長が遅く、短寿命となる (70)。この Klotho 欠損マウスにおいて血中リン酸濃度を低下させると寿命が回復する (71)。出芽酵母では、環境中のオルトリン酸濃度は分裂寿命に影響を与えず (26)、細胞内のオルトリン酸も分裂寿命と関係しなかったことは、出芽酵母とマウスで細胞寿命と個体寿命の違いをみていること、あるいはリン酸による寿命制御が生物種間で異なることが原因かもしれない。

近年の細胞寿命研究のトピックとして、老化細胞を選択的に除去することが可能となったことは大きな発展である (6)。ラット腎臓やヒト皮膚における老化細胞の生存に必要な遺伝子である GLS1 (Glutaminase 1) を阻害することで老化細胞が死滅し、炎症が抑制されることで抗老化効果が発揮される。酵母をモデルとした細胞老化研究では、老化細胞の除去ではなく、カロリー制限を模倣するレスベラトロールや NMN (nicotinamide mononucleotide) の摂取によってサーチュインを活性化して細胞老化の進行を遅延するような方法を開発することが有用である。ポリリン酸はヒトを含むほぼすべての生物がもつとされるので、ポリリン酸による細胞寿命制御の可能性を他の生物種でも確認することは今後の課題である。ポリリン酸の蓄積が細胞寿命を短縮することから、細胞老化の進行を促進していると考えられ、ポリリン酸の蓄積を阻害するような方法を検討することは重要である。本研究の成果として、リン酸飢餓に備えた貯蔵形態とされるポリリン酸が細胞寿命を制御することを示したことは新しい細胞機能制御の例となり意義深い。さらに、本研究での成果が、酵母の基礎的な研究にとどまらず、他の生物への応用的な研究に対してヒントとなる情報提供になることを期待する。

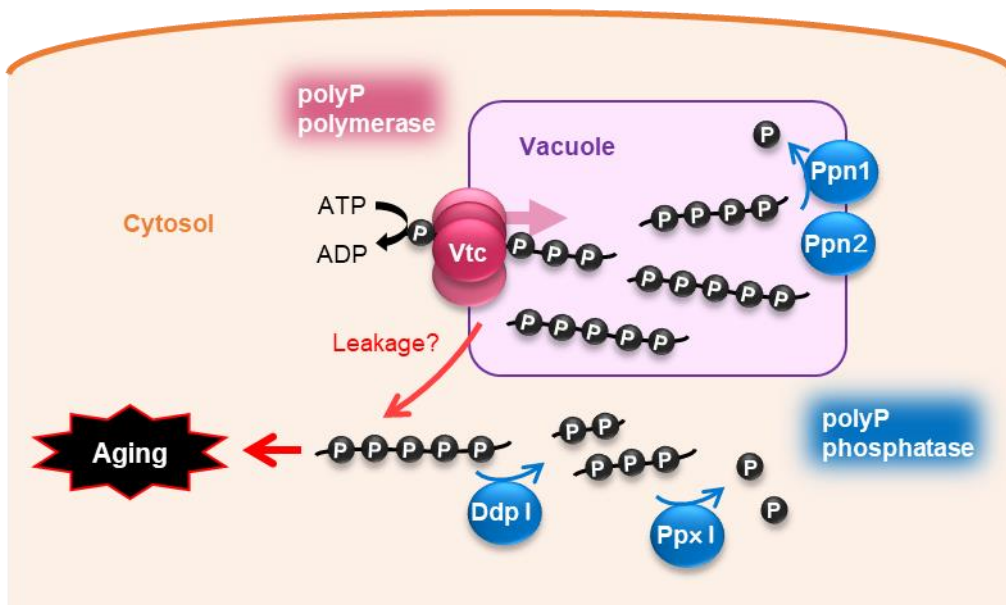


図4 本研究でのポリリン酸による分裂寿命制御モデル

謝辞

本研究の遂行にあたり、熱心なご指導を賜りました、向 由起夫 教授に心から感謝いたします。研究の議論に貴重なお時間を割いてくださり、研究のおもしろさを教えてくださいました。実験に関するだけでなく、学会発表や様々な申請書作成などでも数多くのご助言をいただき、研究を通してたくさんの方のことを学びました。6年半の研究室生活の中で、何度も、あたたかい叱咤激励をいただき支えてくださいましたことに、重ねてお礼申し上げます。

副指導教員を引き受けてくださった齋藤 修 教授、中村 肇伸 教授には、本論文の作成にあたり、ご助言とご教示を賜りました。厚くお礼申し上げます。

本研究の第1章は、丸橋 翼 氏の研究成果から展開したものであり、中島 俊雄 博士に分裂寿命測定等の実験手法をご指導いただきました。先輩方に感謝いたします。

第3章 第3節 第2項に記載した Sch9p のリン酸化の確認実験は、浜松医科大学の前田 達哉 教授と谷川 美頼 特任助教に、rDNA の不安定性試験は、東京大学の 小林 武彦 教授と細山田 舜 博士にお世話になりました。深く感謝いたします。

本研究は、日本学術振興会の特別研究員課題として、研究費の支援を受けたものであることを付記します。

最後に、4年間の大学生活に加えて修士課程の2年間、そして博士課程の3年間という長浜での長い学生生活を支えてくれた家族に感謝します。特に、大学院に進学させてもらったことは、とても大きな転機となったと思っています。いつもあたたかく見守り、帰省した時には近況を親身に聞き、激励してくれた両親、姉弟と祖父母に、深い感謝の意を表します。

論文目録

Overexpression of polyphosphate polymerases and deletion of polyphosphate phosphatases

Chiharu Umeda, Toshio Nakajima, Tsubasa Maruhashi, Mirai Tanigawa, Tatsuya Maeda and Yukio Mukai

FEBS Letters (2023) **597**, 2316-2333.

参考文献

1. WHO (2022) World health statistics 2022 : monitoring health for the SDGs, sustainable development goals
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240051157>
2. 厚生労働省 (2023) 令和 4 年簡易生命表
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/life/life22/index.html>
3. Dong, X., Milholland, B., and Vijg, J. (2016) Evidence for a limit to human lifespan. *Nature* **538**, 257-259 10.1038/nature19793
4. Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* **25**, 585-621,
5. Rohme, D. (1981) Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5009-5013 10.1073/pnas.78.8.5009
6. Johmura, Y., Yamanaka, T., Omori, S., Wang, T. W., Sugiura, Y., Matsumoto, M. *et al.* (2021) Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders. *Science* **371**, 265-270 10.1126/science.abb5916
7. Guarente, L., and Kenyon, C. (2000) Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* **408**, 255-262 10.1038/35041700
8. Longo, V. D., and Fabrizio, P. (2012) Chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Subcell Biochem* **57**, 101-121 10.1007/978-94-007-2561-4_5
9. Orgel, L. E. (1963) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **49**, 517-521 10.1073/pnas.49.4.517
10. Kruk, P. A., Rampino, N. J., and Bohr, V. A. (1995) DNA damage and repair in telomeres: relation to aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 258-262 10.1073/pnas.92.1.258

11. Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300 10.1093/geronj/11.3.298
12. Harman, D. (1993) Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs Aging* **3**, 60-80 10.2165/00002512-199303010-00006
13. Klass, M. R. (1977) Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. *Mech Ageing Dev* **6**, 413-429 10.1016/0047-6374(77)90043-4
14. Colman, R. J., Anderson, R. M., Johnson, S. C., Kastman, E. K., Kosmatka, K. J., Beasley, T. M. *et al.* (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* **325**, 201-204 10.1126/science.1173635
15. Mattison, J. A., Roth, G. S., Beasley, T. M., Tilmont, E. M., Handy, A. M., Herbert, R. L. *et al.* (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* **489**, 318-321 10.1038/nature11432
16. Colman, R. J., Beasley, T. M., Kemnitz, J. W., Johnson, S. C., Weindruch, R., and Anderson, R. M. (2014) Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun* **5**, 3557 10.1038/ncomms4557
17. Mattison, J. A., Colman, R. J., Beasley, T. M., Allison, D. B., Kemnitz, J. W., Roth, G. S. *et al.* (2017) Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat Commun* **8**, 14063 10.1038/ncomms14063
18. Lin, S. J., Defossez, P. A., and Guarente, L. (2000) Requirement of NAD and *SIR2* for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **289**, 2126-2128 10.1126/science.289.5487.2126
19. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaerberlein, M., and Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795-800 10.1038/35001622

20. Kaerberlein, 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**, 2570-2580 10.1101/gad.13.19.2570
21. Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K. *et al.* (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* **460**, 392-395 10.1038/nature08221
22. Tissenbaum, H. A., and Guarente, L. (2001) Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410**, 227-230 10.1038/35065638
23. Rogina, B., and Helfand, S. L. (2004) *Sir2* mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15998-16003 10.1073/pnas.0404184101
24. Brachmann, C. B., Sherman, J. M., Devine, S. E., Cameron, E. E., Pillus, L., and Boeke, J. D. (1995) The *SIR2* gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev* **9**, 2888-2902 10.1101/gad.9.23.2888
25. Kaffman, A., Rank, N. M., O'Neill, E. M., Huang, L. S., and O'Shea, E. K. (1998) The receptor *Msn5* exports the phosphorylated transcription factor *Pho4* out of the nucleus. *Nature* **396**, 482-486 10.1038/24898
26. 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 10.1002/1873-3468.13707
27. 丸橋翼 (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, 長浜バイオ大学大学院
28. Ogawa, N., DeRisi, J., and Brown, P. O. (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell* **11**, 4309-4321

10.1091/mbc.11.12.4309

29. Hothorn, M., Neumann, H., Lenherr, E. D., Wehner, M., Rybin, V., Hassa, P. O. *et al.* (2009) Catalytic core of a membrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase. *Science* **324**, 513-516 10.1126/science.1168120
30. Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N. *et al.* (2001) Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science* **293**, 705-708 10.1126/science.1061315
31. Smith, S. A., Mutch, N. J., Baskar, D., Rohloff, P., Docampo, R., and Morrissey, J. H. (2006) Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 903-908 10.1073/pnas.0507195103
32. Wang, Y., Li, M., Li, P., Teng, H., Fan, D., Du, W. *et al.* (2019) Progress and Applications of Polyphosphate in Bone and Cartilage Regeneration. *Biomed Res Int* **2019**, 5141204 10.1155/2019/5141204
33. Bru, S., Martinez-Lainez, J. M., Hernandez-Ortega, S., Quandt, E., Torres-Torronteras, J., Marti, R. *et al.* (2016) Polyphosphate is involved in cell cycle progression and genomic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **101**, 367-380 10.1111/mmi.13396
34. Andreeva, N., Trilisenko, L., Eldarov, M., and Kulakovskaya, T. (2015) Polyphosphatase PPN1 of *Saccharomyces cerevisiae*: switching of exopolyphosphatase and endopolyphosphatase activities. *PLoS One* **10**, e0119594 10.1371/journal.pone.0119594
35. Gerasimaite, R., and Mayer, A. (2017) Ppn2, a novel Zn²⁺-dependent polyphosphatase in the acidocalcisome-like yeast vacuole. *J Cell Sci* **130**, 1625-1636 10.1242/jcs.201061
36. Lichko, L. P., Andreeva, N. A., Kulakovskaya, T. V., and Kulaev, I. S. (2003) Exopolyphosphatases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **3**, 233-238 10.1016/S1567-1356(02)00205-2
37. Guan, Z., Chen, J., Liu, R., Chen, Y., Xing, Q., Du, Z. *et al.* (2023) The cytoplasmic

- synthesis and coupled membrane translocation of eukaryotic polyphosphate by signal-activated VTC complex. *Nat Commun* **14**, 718 10.1038/s41467-023-36466-4
38. Liu, W., Wang, J., Comte-Miserez, V., Zhang, M., Yu, X., Chen, Q. *et al.* (2023) Cryo-EM structure of the polyphosphate polymerase VTC reveals coupling of polymer synthesis to membrane transit. *EMBO J* **42**, e113320 10.15252/embj.2022113320
 39. Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1793-1808 10.1002/yea.320101310
 40. Partow, S., Siewers, V., Bjorn, S., Nielsen, J., and Maury, J. (2010) Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **27**, 955-964 10.1002/yea.1806
 41. Neef, D. W., and Kladde, M. P. (2003) Polyphosphate loss promotes SNF/SWI- and Gcn5-dependent mitotic induction of *PHO5*. *Mol Cell Biol* **23**, 3788-3797 10.1128/MCB.23.11.3788-3797.2003
 42. Lonetti, A., Sziogyarto, Z., Bosch, D., Loss, O., Azevedo, C., and Saiardi, A. (2011) Identification of an evolutionarily conserved family of inorganic polyphosphate endopolyphosphatases. *J Biol Chem* **286**, 31966-31974 10.1074/jbc.M111.266320
 43. Van Veldhoven, P. P., and Mannaerts, G. P. (1987) Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range. *Anal Biochem* **161**, 45-48 10.1016/0003-2697(87)90649-x
 44. Gray, M. J., Wholey, W. Y., Wagner, N. O., Cremers, C. M., Mueller-Schickert, A., Hock, N. T. *et al.* (2014) Polyphosphate is a primordial chaperone. *Mol Cell* **53**, 689-699 10.1016/j.molcel.2014.01.012
 45. Desfougeres, Y., Gerasimaite, R. U., Jessen, H. J., and Mayer, A. (2016) Vtc5, a Novel Subunit of the Vacuolar Transporter Chaperone Complex, Regulates Polyphosphate Synthesis and Phosphate Homeostasis in Yeast. *J Biol Chem* **291**, 22262-22275

10.1074/jbc.M116.746784

46. Andreeva, N., Ledova, L., Ryazanova, L., Tomashevsky, A., Kulakovskaya, T., and Eldarov, M. (2019) Ppn2 endopolyphosphatase overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison with Ppn1, Ppx1, and Ddp1 polyphosphatases. *Biochimie* **163**, 101-107 10.1016/j.biochi.2019.06.001
47. Kulaev, I. S., Vagabov, V. M., and Kulakovskaya, T. V. (2004) *The Biochemistry of Inorganic polyphosphates, Second Edition*, WILEY,
48. Saito, K., Ohtomo, R., Kuga-Uetake, Y., Aono, T., and Saito, M. (2005) Direct labeling of polyphosphate at the ultrastructural level in *Saccharomyces cerevisiae* by using the affinity of the polyphosphate binding domain of *Escherichia coli* exopolyphosphatase. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5692-5701 10.1128/AEM.71.10.5692-5701.2005
49. York, J. D. (2006) Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 552-559 10.1016/j.bbailip.2006.04.014
50. Cartwright, J. L., and McLennan, A. G. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* YOR163w gene encodes a diadenosine 5', 5'''-P^l,P⁶-hexaphosphate (Ap₆A) hydrolase member of the MutT motif (Nudix hydrolase) family. *J Biol Chem* **274**, 8604-8610 10.1074/jbc.274.13.8604
51. Kamei, Y., Tamada, Y., Nakayama, Y., Fukusaki, E., and Mukai, Y. (2014) Changes in transcription and metabolism during the early stage of replicative cellular senescence in budding yeast. *J Biol Chem* **289**, 32081-32093 10.1074/jbc.M114.600528
52. Gerasimaite, R., Sharma, S., Desfougeres, Y., Schmidt, A., and Mayer, A. (2014) Coupled synthesis and translocation restrains polyphosphate to acidocalcisome-like vacuoles and prevents its toxicity. *J Cell Sci* **127**, 5093-5104 10.1242/jcs.159772
53. Safrany, S. T., Ingram, S. W., Cartwright, J. L., Falck, J. R., McLennan, A. G., Barnes, L. D. *et al.* (1999) The diadenosine hexaphosphate hydrolases from *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* are homologues of the human diphosphoinositol

- polyphosphate phosphohydrolase. Overlapping substrate specificities in a MutT-type protein. *J Biol Chem* **274**, 21735-21740 10.1074/jbc.274.31.21735
54. Guarente, L., and Picard, F. (2005) Calorie restriction--the *SIR2* connection. *Cell* **120**, 473-482 10.1016/j.cell.2005.01.029
 55. Fritze, C. E., Verschueren, K., Strich, R., and Easton Esposito, R. (1997) Direct evidence for *SIR2* modulation of chromatin structure in yeast rDNA. *EMBO J* **16**, 6495-6509 10.1093/emboj/16.21.6495
 56. Yi, D. G., Hong, S., and Huh, W. K. (2018) Mitochondrial dysfunction reduces yeast replicative lifespan by elevating RAS-dependent ROS production by the ER-localized NADPH oxidase Yno1. *PLoS One* **13**, e0198619 10.1371/journal.pone.0198619
 57. Takahara, T., and Maeda, T. (2012) Transient sequestration of TORC1 into stress granules during heat stress. *Mol Cell* **47**, 242-252 10.1016/j.molcel.2012.05.019
 58. Tanigawa, M., and Maeda, T. (2017) An In Vitro TORC1 Kinase Assay That Recapitulates the Gtr-Independent Glutamine-Responsive TORC1 Activation Mechanism on Yeast Vacuoles. *Mol Cell Biol* **37**, 10.1128/MCB.00075-17
 59. 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**, 10.1093/femsyr/fox001
 60. Urech, K., Durr, M., Boller, T., Wiemken, A., and Schwencke, J. (1978) Localization of polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **116**, 275-278 10.1007/BF00417851
 61. Hurlimann, H. C., Stadler-Waibel, M., Werner, T. P., and Freimoser, F. M. (2007) Pho91 Is a vacuolar phosphate transporter that regulates phosphate and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **18**, 4438-4445 10.1091/mbc.e07-05-0457

62. Hughes, A. L., and Gottschling, D. E. (2012) An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast. *Nature* **492**, 261-265 10.1038/nature11654
63. Wang, L., Fraley, C. D., Faridi, J., Kornberg, A., and Roth, R. A. (2003) Inorganic polyphosphate stimulates mammalian TOR, a kinase involved in the proliferation of mammary cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11249-11254 10.1073/pnas.1534805100
64. Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D. *et al.* (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* **10**, 457-468 10.1016/s1097-2765(02)00636-6
65. Saka, K., Ide, S., Ganley, A. R., and Kobayashi, T. (2013) Cellular senescence in yeast is regulated by rDNA noncoding transcription. *Curr Biol* **23**, 1794-1798 10.1016/j.cub.2013.07.048
66. Ogawa, T., Tsubakiyama, R., Kanai, M., Koyama, T., Fujii, T., Iefuji, H. *et al.* (2016) Stimulating S-adenosyl-l-methionine synthesis extends lifespan via activation of AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 11913-11918 10.1073/pnas.1604047113
67. Austin, S., and Mayer, A. (2020) Phosphate Homeostasis - A Vital Metabolic Equilibrium Maintained Through the INPHORS Signaling Pathway. *Front Microbiol* **11**, 1367 10.3389/fmicb.2020.01367
68. Azevedo, C., Livermore, T., and Saiardi, A. (2015) Protein polyphosphorylation of lysine residues by inorganic polyphosphate. *Mol Cell* **58**, 71-82 10.1016/j.molcel.2015.02.010
69. Neville, N., Lehotsky, K., Yang, Z., Klupt, K. A., Denoncourt, A., Downey, M. *et al.* (2023) Modification of histidine repeat proteins by inorganic polyphosphate. *Cell Rep* **42**, 113082 10.1016/j.celrep.2023.113082
70. Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T. *et al.* (1997) Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **390**, 45-51 10.1038/36285

71. Ohnishi, M., and Razzaque, M. S. (2010) Dietary and genetic evidence for phosphate toxicity accelerating mammalian aging. *FASEB J* **24**, 3562-3571 10.1096/fj.09-152488