

学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏名	梅田 知晴
学位の種類	博士（バイオサイエンス）
授与年月日	2024年（令和6年）3月16日
学位授与の要件	本学学位規程第18条第1項該当者（学位規則第4条第1項）
学位論文の題名	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
審査委員 主査	向 由起夫 教授
副査	齊藤 修 教授
副査	中村 肇伸 教授

論文内容要旨

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有用である。出芽により増殖する特徴的な分裂様式によって、一つの細胞が死ぬまでに生む細胞の数（分裂寿命）が厳密に計数できる。野生型株の分裂寿命は平均約 25 世代である。カロリー制限による寿命延長および老化抑制は有名であり、そのカギとなるサーチュイン *SIR2* 遺伝子は酵母で初めて同定され、その後、ヒトを含む高等生物にも高度に保存されていることが示された。

所属研究室の先行研究において、環境中のリン酸濃度によって分裂寿命は制御されなかったが、リン酸飢餓応答経路（PHO 経路）で働く制御因子が分裂寿命に関与することが示された。出芽酵母では、環境中のリン酸濃度に応じた遺伝子発現制御系がよく調べられており、この PHO 経路では、Pho80p（サイクリン）-Pho85p（サイクリン依存性キナーゼ）複合体が転写活性化因子 Pho4p をリン酸化して核外に排出することによって、リン酸飢餓に応答する遺伝子（分泌型酸性ホスファターゼやリン酸トランスポーターなど）の転写を抑制する。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（10 世代）ことが見出された。この *pho80* 破壊株において下

流の転写活性化因子 *PHO4* 遺伝子をさらに破壊すると、分裂寿命が野生型株並みに回復した (23 世代) ことから、Pho4p 標的遺伝子の中に寿命制御因子が含まれると考えられた。その標的遺伝子の中から VTC (Vacuolar Transporter Chaperone) 複合体を構成する遺伝子を *pho80* 破壊株で破壊すると、分裂寿命が部分的に回復する (16-17 世代) ことがみつけられた。VTC 複合体の構成因子は *VTC1/VTC2/VTC3/VTC4/VTC5* 遺伝子にコードされ、VTC 複合体は液胞膜に局在し、ポリリン酸を合成して液胞内に取り込む活性をもつポリリン酸合成酵素である。このように *pho80* 破壊株が短寿命となる原因は VTC 遺伝子の高発現により細胞内ポリリン酸が高蓄積しているからであると考えられた。本研究では、細胞寿命決定機構の研究モデルとして出芽酵母を用い、高蓄積した細胞内ポリリン酸が分裂寿命を短縮化することを検証し、ポリリン酸がどのように分裂寿命を制御するかを明らかにすることを目指した。

本博士論文は 3 章から構成されており、第 1 章では、細胞内のポリリン酸およびオルトリン酸量を調べ、ポリリン酸代謝と分裂寿命の関係について検証した。そのために、ポリリン酸およびオルトリン酸量を正確に測定する方法を確立した。*pho80* 破壊株では様々なリン酸代謝関連遺伝子の発現が上昇するので、それらの影響を排除して細胞内ポリリン酸を増加させる方法として、ポリリン酸合成酵素 VTC 遺伝子の過剰発現株を構築した。VTC 遺伝子を過剰発現すると、ポリリン酸が高度に蓄積し、分裂寿命が短くなった。出芽酵母には 3 種類のポリリン酸分解酵素があり、Ppn1p と Ppn2p は液胞に局在し、Ppx1p は細胞質に局在する。これらポリリン酸分解酵素遺伝子を破壊すると、ポリリン酸が増加し、短寿命となった。また、短寿命の *VTC5* 過剰発現株などのポリリン酸高蓄積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、分裂寿命が回復した。興味深いことに、出芽酵母のポリリン酸はほとんどが液胞に蓄積しているにもかかわらず、細胞質のポリリン酸分解酵素が分裂寿命に関与していた。本章でのポリリン酸量と分裂寿命の間には負の相関がみられた。以上の結果より、高度に蓄積したポリリン酸が分裂寿命に悪影響を及ぼすと結論した。

第 2 章では、前章において細胞質のポリリン酸分解酵素 Ppx1p が分裂寿命に関与していたことから、細胞質に存在するポリリン酸が分裂寿命に及ぼす影響を検証した。細胞質にポリリン酸を増やすために、液胞シグナルをもたない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た。この *Ecppk1* 発現株は顕著な短寿命となり、さらに増殖遅延も観察されたことから、細胞質におけるポリリン酸はより強い毒性をもつことを示唆した。また、*Ecppk1* 発現株の短寿命を多コピーで抑圧する遺伝子として、ポリリン酸ホスファターゼ *DDP1* 遺伝子を分離した。以上の結果より、細胞質でのポリリン酸の増加は分裂寿命を短縮すると結論した。

第3章では、ポリリン酸を高蓄積して短寿命となる株がどの分裂寿命関連経路に影響を与えるのかを検索した。ポリリン酸を高蓄積する *pho80* 破壊株では、ミトコンドリアでの呼吸不全、酸化ストレスと亜鉛ストレスの感受性を観察した。*VTC5* 過剰発現株では、150 コピーの繰り返しをもつ rRNA 遺伝子領域の不安定化を観察した。残念ながら、*pho80* 破壊株と *VTC5* 過剰発現株に共通の表現型を見いだせなかった。一方で、これら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では、TCA 回路およびアデニン生合成経路で働く酵素遺伝子が共通して減少していた。*pho80* 破壊株における呼吸欠損はポリリン酸高蓄積とは独立していたことは、*pho80* 破壊株の短寿命が *VTC* 遺伝子の破壊により部分的にしか寿命が回復しなかったことから説明できると考えた。

以上の知見をまとめ、ポリリン酸（特に細胞質のポリリン酸）が高蓄積することにより分裂寿命が短縮化するモデルを提案する。本研究の成果は、出芽酵母においてリン酸飢餓に備えた貯蔵形態とされる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。これらが酵母の基礎研究にとどまらず、他の生物への応用研究に対してヒントとなる情報提供になることを期待したい。

論文審査結果要旨

本研究は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を細胞寿命の研究モデルとして、その細胞内ポリリン酸が関与する分裂寿命決定機構の解明に取り組んだものである。本論文では、まず、ポリリン酸合成酵素 (*Vtc1/Vtc2/Vtc3/Vtc4/Vtc5*) およびポリリン酸分解酵素 (*Ppn1* と *Ppx1*) が分裂寿命に関与することを示し、ポリリン酸が細胞内に高蓄積すると分裂寿命が短縮することを明らかにした。*Vtc* と *Ppn1* が液胞に局在してポリリン酸を代謝するのに対して、出芽酵母のポリリン酸の大部分が液胞に存在するにもかかわらず、細胞質に局在する *Ppx1* が分裂寿命に影響を与えたことから、細胞質のポリリン酸が分裂寿命に悪影響を与えるとの新しい着想を得た。次に、細胞質でポリリン酸を増加させるために大腸菌由来のポリリン酸キナーゼを酵母で発現させると、分裂寿命が顕著に短縮し、細胞増殖が遅くなることを示した。さらに、ポリリン酸の高蓄積による短寿命化の原因が、酸化ストレスや金属ストレスに対する感受性、リボソーム RNA 遺伝子クラスターの不安定性などである可能性を示した。以上の知見に基づき、ポリリン酸による分裂寿命決定機構モデルが提案された。

本研究は、出芽酵母を用いて細胞内のポリリン酸、特に細胞質のポリリン酸が分裂寿命決定因子となることを初めて明らかにしたものである。特に、細胞質ポリリン酸が細胞寿命と細胞増殖へ悪影響を及ぼすとの知見は、ポリリン酸がなぜ液胞に隔離されているかの問題に一つの解答を与えた。また、本研究を遂行するために細胞内のポリリン酸定量法を独自に改良・確立したことは高く評価できる。すべての生物がポリリン酸をもつことから、出芽酵母を用いた本研究の成果は、他の生物におけるポリリン酸および細胞寿命の研究の発展に貢献すると期待できる。本論文の構成は論理的であり、研究における実験の組み立ても良く、実験データも豊富で、質の高い論文といえる。論文審査におけるプレゼンテーションのレベルは高く、口頭試問においても豊富な知識量と論理的思考能力の高さを確認した。国際雑誌への査読付き英語論文を筆頭著者として発表し、国際学会で1回と国内学会で12回のポスター発表を行っている。以上より、審査員は全員一致で、本論文が長浜バイオ大学の博士（バイオサイエンス）の学位論文の要件を十分に満たすものであると認める。