

## 学位論文の要旨

論文題目 Studies on the molecular mechanisms that regulate lifespan in budding yeast  
(出芽酵母の寿命を制御する分子機構の研究)

広島大学大学院統合生命科学研究科

生物工学プログラム

学生番号 D203324

氏名 益村 晃司

## 序論

老化・寿命制御機構の解明は、ヒトの健康寿命・寿命延長を理解するための重要な課題の一つである。老化・寿命研究は、生物学的老化の理解だけでなく、老化に伴うがんや心臓病、神経疾患などの各種疾患の発症機構や治療への応用が期待される。これまでに、酵母、線虫、ハエ、マウスなどヒトのモデルとなる生物を用いて、寿命制御に関わる共通の分子やそのメカニズムが明らかになってきた。例えば、カロリー制限やメチオニン制限(MetR)などの食事制限、mTORC1(mechanistic Target of rapamycin complex I)経路の不活性化、AMPK(AMP 活性化プロテインキナーゼ)の活性化は多くのモデル生物で寿命延長が報告されている。しかし、その詳細な分子メカニズムや、寿命とシグナル伝達経路との関係は未だ不明な点も多い。

著者の所属研究室ではこれまでに、出芽酵母のカルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )依存性プロテインホスファターゼであるカルシニューリン(CN)を世界に先駆けて発見し、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが CN と Mpk1(MAP キナーゼ)を活性化し、Swe1 キナーゼ(細胞周期の負の調節因子)の活性調節を介して、細胞周期進行を阻害することを明らかにしてきた。 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルによる細胞周期のさらなる制御機構を解明するため、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルに応答できなくなった変異株の取得が行われた。その結果、*scz1~14* 変異株および *sgh1~6* 変異株が取得された。興味深いことに、*scz14* は寿命との関連が深い遺伝子サイレンシングに関わる *SIR3* における変異であった。これにより、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが新たに寿命制御にも関与することが示唆された。そこで、本研究では寿命制御への関与が予想される *scz7* 変異株および *sgh5* 変異株を用いた解析の関連から、出芽酵母の新規寿命制御メカニズムを解明することを目的とした。

第一章では、ストレス応答性シグナル経路と寿命制御との関係について解析した。High Osmolarity Glycerol(HOG)経路は、高浸透圧に応答し活性化されるストレス応答性 MAPK 経路である。その下流因子 Hog1 は高浸透圧や酸化ストレス、細胞周期進行など様々な生存応答を制御する。著者の所属研究室では、Hog1 の破壊株が示す  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性および高浸透圧感受性の抑圧因子として、*sko1-18/sgh5* 変異を取得した。Sko1 は Tup1-Cyc8 と複合体を形成し高浸透圧や酸化ストレス誘導性遺伝子の転写を阻害するが、ストレス応答時には Sko1-Tup1-Cyc8 複合体が Hog1 によってリン酸化されることで転写を活性化する。これまでに、Sko1 の変異体は酸化ストレス耐性を示し、*hog1Δ*破壊株が示す酸化ストレス感受性は Sko1 の機能欠損によって抑圧されることが知られている。また、*hog1Δ*破壊株は経時寿命(分裂停止細胞の生存期間)において短命を示すことから、細胞の生存には HOG 経路が重要であることが示唆された。そこで本研究では、*hog1Δ*破壊株のストレス感受性を抑圧する因子として取得された Sko1 の寿命制御における役割を解析した。

第二章では、栄養・代謝シグナルに関わる寿命制御機構について解析を行った。*sah1/scz7*変異は S-アデノシルホモシステイン(SAH)水解酵素 *SAH1* における変異であり、これまでに *sah1* 変異株は増殖遅延と経時寿命および複製寿命(一つの母細胞の分裂回数)において短命を示すことを見出した。こ

れにより、メチオニン代謝と寿命との関連が示唆された。そこで、新規寿命制御因子の取得のため、*sah1* 変異株の増殖遅延を抑圧するスクリーニングが行われた。その結果、生体の主要なメチル基供与体 S-アデノシルメチオニン(SAM)を高蓄積し寿命を延長する *SSG1* 変異株が取得された。さらに、*SSG1* 変異株の解析から、SAM 合成の促進が ATP の減少から AMPK を活性化し寿命を延長することが明らかとなった。興味深いことに、SAH を添加するだけでも SAM を高蓄積し、寿命を延長することが明らかとなった。しかし、SAH が寿命を延長する分子メカニズムは不明であった。そこで本研究では、SAH による寿命延長メカニズムの解明を目指し解析を行った。

### 第一章 *sko1Δ*破壊株はグリセロール合成系を介して酸化ストレス耐性と寿命延長を示す(参考論文 1)

寿命延長は酸化ストレスなど様々なストレス耐性と関連することが多い。そこで、*hog1Δ*破壊株の酸化ストレス感受性を抑圧した *sko1-18* 変異株において、経時寿命を測定した。その結果、*sko1-18* 変異株は *hog1Δ*破壊株の短命を抑圧し、さらに *sko1Δ*破壊株は野生株より寿命を延長した。このことから、Sko1 の破壊による Sko1 標的遺伝子の転写抑制解除が寿命延長に関わることが予想された。寿命制御に関わる Sko1 の標的遺伝子を探すため、高浸透圧ストレスが HOG 経路を活性化し、グリセロール合成の促進により寿命を延長することに着目した。*sko1Δ*破壊株においてグリセロール合成に重要な *GPD1/2* 遺伝子を破壊したところ、*sko1Δ*破壊株の寿命延長と酸化ストレス耐性が消失した。また、*sko1Δ*破壊株における *GPD1/2* 遺伝子の転写量を測定したところ、*GPD1* は約 1.8 倍増加していた。これにより、グリセロール合成系が寿命制御と酸化ストレス応答における Sko1 の重要な下流因子であることが明らかとなった。

### 第二章 SAH はメチオニン制限を模倣して寿命を延長する (参考論文 2)

SAH による寿命延長メカニズムを解明するため、まず野生株に SAH を添加した際のメタボロミクス解析を行った。その結果、SAH だけでなく SAM の高蓄積も観察され、SAH は SAM 合成を促進していると予想した。SAM の合成にはメチオニン(Met)が必要であるため、SAM 合成の活性化は Met を消費する。メタボロミクスの結果から、SAH 添加時、アミノ酸の中で Met のみ有意に減少していた。そこで、SAH 添加時の Met の減少が SAM 合成の促進によるのか、[methyl-<sup>13</sup>C]Met を用いて解析した。その結果、SAH は細胞内の[methyl-<sup>13</sup>C]Met 量を有意に減少させ、[methyl-<sup>13</sup>C]SAM を増加させた。これにより、SAH が SAM 合成を促進した結果、細胞内の Met 量を低下させることが示唆された。以上の結果より、SAH の添加が MetR の健康効果を模倣すると予想した。MetR はオートファジー依存的に寿命を延長することが知られている。そこで、オートファジー活性を測定したところ SAH はオートファジーの誘導を促進した。さらに Tor1 経路はオートファジーを負に制御するため、SAH が Tor1 活性を阻害するか解析した。その結果、Tor1 の下流因子 Rps6 のリン酸化レベルが減少したことから、SAH が Tor1 活性を低下させることが示唆された。さらに、Tor1 とオートファジーの必須構成要素 Atg7 を破壊すると、SAH による寿命延長効果が消失した。以上のことから、SAH は MetR の健康効果を模倣して寿命を延長することが明らかになった。

### 総括

本研究では、出芽酵母の寿命制御に関わる分子機構を解明するため、ストレス応答性経路と生体内の代謝産物が寿命を延長するメカニズムを解析した。第一章では、HOG 経路の制御因子 Sko1 の機能抑制が、*hog1Δ*破壊株の酸化ストレス感受性と短命を抑圧し、グリセロール合成系依存的に酸化ストレス耐性と寿命延長を示すことを明らかにした。第二章では、[methyl-<sup>13</sup>C]Met を用いて、SAH が SAM の合成を促進し Met を消費することで、細胞内の Met レベルを減少させることを明らかにした。さらに、SAH は Tor1 を阻害しオートファジーを活性化したため、MetR の健康効果を模倣していることが予想された。ストレス応答性経路は高等生物にまで高度に保存されており、SAH の健康効果は多細胞モデル生物の線虫でも確認されたことから、本研究の成果はヒトの健康への寄与、また加齢性疾患の理解への応用が期待される。

参考論文（学位要件論文）

[1] **Koji Masumura**, Sachi Matsukami, Kumiko Yonekita, Muneyoshi Kanai, Kazunori Kume, Dai Hirata, Masaki Mizunuma, *SKO1* deficiency extends chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(8), 1473-1476 (2019).

[2] #Takafumi Ogawa, #**Koji Masumura**, Yuki Kohara, Muneyoshi Kanai, Tomoyoshi Soga, Yoshikazu Ohya, T. Keith Blackwell, Masaki Mizunuma, *S*-adenosyl-L-homocysteine extends lifespan through methionine restriction effects, *Aging Cell*, 21(5), e13604 (2022).

#Takafumi Ogawa and Koji Masumura contributed equally to this work.

関連論文

[1] **益村 晃司**, 水沼 正樹, 酵母のメチオニン代謝系による寿命制御機構, 月刊「細胞」, 52 巻, 11 号, 58-61, 2020.