

セノオ タカハリ
氏名・(本籍) 妹尾 聖典 (岡山県)

学位の種類 博士(理学)

学位記番号 甲第理105号

学位授与の日付 平成29年3月20日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当(課程博士)

学位論文題目 分裂酵母の細胞寿命に果たす抗酸化酵素および
DNA修復酵素の役割

論文審査委員
主査 教授 池田 正五
副査 教授 南 善子
教授 汪 達絃
教授 辻極 秀次
教授 片桐 昌直
(大阪教育大学大学院教育学研究科)

論文内容の要旨

申請者氏名 妹尾 聖典

論文題目

分裂酵母の細胞寿命に果たす抗酸化酵素およびDNA修復酵素の役割

1. 緒言

全ての生物には寿命が存在し、昔から寿命延長や抗老化は人類の強い興味の対象である。老化のメカニズムは非常に複雑であり、これまでに様々な説が提唱されてきた。例えば、代謝で生じた活性酸素種（ROS）が生体分子を損傷し、それらが蓄積することを原因とする「フリーラジカル説」、損傷DNAや複製エラーなどの蓄積を原因とする「DNA傷害説」がある。近年では、酵母や線虫、ハエ、マウスなど多くのモデル生物を用いた分子生物学的解析が行われ、寿命を決定する基本的な仕組みは生物種間で保存されていることが示唆された。生物は、「フリーラジカル説」や「DNA傷害説」において脅威となるROSやDNA損傷に対する防御系を持っている。それらの防御系の役割やそれらが破綻した時の老化過程を詳細に解析することは重要である。酵母は単細胞真核生物で、培養や遺伝学的解析が容易なことから多くの生命現象解析のモデル生物として用いられてきた。代表的な酵母に出芽酵母と分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) があり、分裂酵母は出芽酵母と比べて様々な生命現象においてヒトに近いとされている。単細胞真核生物の寿命の概念には、一つの細胞の分裂可能回数である分裂寿命と分裂停止後の細胞の生存期間である経時寿命（CLS）が存在する。本研究では、分裂酵母をモデル生物として、スーパーオキシド (O_2^-) を消去するスーパーオキシドジスマターゼ（SOD）や損傷DNAを修復するDNA修復酵素に着目し、それら酵素の欠損株を用いてCLSの測定および老化過程の観察を行うことで、それら酵素の寿命への役割の解析を行った。

2. SOD2の細胞寿命に果たす役割

SODは O_2^- を過酸化水素 (H_2O_2) に不均化し、生じた H_2O_2 はカタラーゼやペルオキシダーゼの作用により水に分解され無毒化される。多くの真核生物は活性中心金属や細胞内局在の異なるSODを持っている。そのうち、SOD2はMnを持ち、ROSの発生源であるミトコンドリアに局在する。出芽酵母やハエ、マウスなどのモデル生物を用いた研究により、SOD2の欠損は酸化ストレスを上昇させ、寿命を低下させるということが見出されている。しかし、分裂酵母SOD2の寿命への役割は十分に解明されていない。そこで、分裂酵母の

長期培養 (YE 培地 : 0.5% 酵母エキス、3% グルコース) による生存率を元にしたCLS の測定および細胞の老化過程の観察を行った。野生株 (WT) と *sod2* 欠損株 (*sod2Δ*) はほぼ同じ速度で生育し、2 日目以降増殖が停止し、定常期に入った。WT の生存率は、定常期以降緩やかに低下していった。一方、*sod2Δ*は急激に生存率を低下させたが、SOD2 発現プラスミドの導入により WT と同程度まで回復した。これらの結果は、SOD2 が CLS の伸長に強く貢献していることを示している。細胞内の ROS の蓄積を蛍光色素で染色して観察した結果、対数増殖期においても WT よりも *sod2Δ*の方が多くの ROS の蓄積が見られた。ROS の蓄積は生体高分子に損傷を与えることが知られている。可溶性タンパク質を SDS-PAGE により分析した結果、WT ではほとんどバンドに変化はなかったが、定常期以降タンパク質が酸化的に架橋された凝集物の蓄積が見られた。一方、*sod2Δ*では定常期以降タンパク質の著しい分解が見られた。カナバニンを用いて前進突然変異率を測定すると、WT ではほとんど変化しなかったが、*sod2Δ*では 3 日目以降急激な突然変異率の上昇が起きた。また、DNA を中性ゲル電気泳動により解析した結果、*sod2Δ*では定常期以降高分子 DNA が分解し、バンドが消失した。*sod2Δ*の MTT アッセイで調べたミトコンドリア呼吸能は、WT に比べて著しく低かった。また、*sod2Δ*で見られたこれらの生体高分子の損傷は、SOD2 の導入により抑制された。ROS や DNA 損傷はアポトーシスの誘導を引き起こすことが考えられるため、活性化カスパーゼを蛍光試薬 FITC-VAD-fmk で染色した。その結果、*sod2Δ*では活性化カスパーゼが WT と比べて著しく増加しており、アポトーシス様の細胞死が引き起こされていることがわかった。SOD2 の遺伝子発現と活性をそれぞれ RT-PCR と活性染色で調べた。定常期以降に SOD2 の遺伝子発現が誘導され、酵素活性も蓄積していくことがわかった。これらのことから *sod2* は定常期に発現量や活性を増加させ、細胞寿命を伸長させていると考えられる。

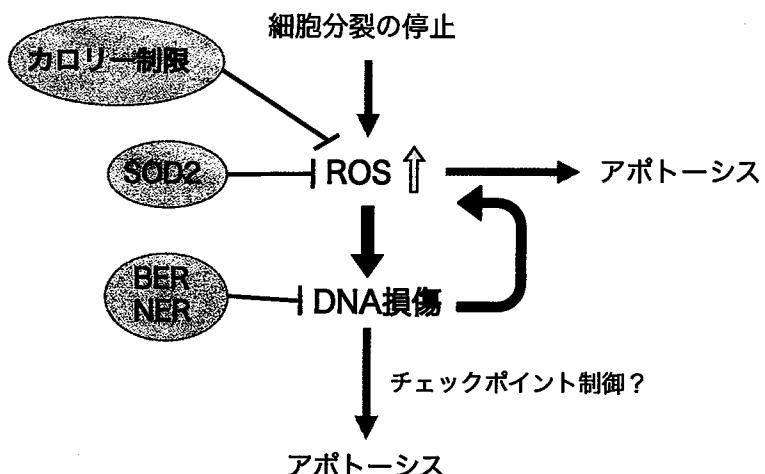
3. DNA 修復酵素の細胞寿命に果たす役割

真核生物のゲノム DNA は内的要因や外的要因により絶えず攻撃され、様々な損傷を受けている。老化はゲノム DNA 損傷の蓄積と関係し、がんの発生の増加を伴うと考えられている。生物は DNA 損傷の蓄積を防ぐため、多くの DNA 修復経路を持っている。真核生物の主な DNA 修復経路には塩基除去修復 (BER)、ヌクレオチド除去修復 (NER)、ミスマッチ修復や組換え修復などがあげられる。分裂酵母においても、BER および NER 遺伝子は他の生物と同様に高く保存されている。本研究では、分裂酵母の DNA 修復欠損株の CLS を測定し、細胞の老化過程を観察した。BER 遺伝子の *nth1* (DNA グリコシラーゼ/AP リアーゼ) および NER 遺伝子の *rad16* (ヒトの XPF ホモローグ) の単独欠損株の CLS は、WT と比べそれわずかに低下したが、*nth1* と *rad16* の二重欠損株では CLS のさらなる低下が見られた。また、BER 遺伝子 (*apn2*) と *rad16* の二重欠損でも著しい CLS の低下が見

られた。このことから BER と NER が協調して細胞寿命に働き、BER 酵素の中でも Nth1p と Apn2p は内在的な DNA 損傷修復に重要な役割を持つことがわかった。ROS の発生を蛍光観察した結果、定常期に ROS の蓄積量が上昇し、DNA 修復欠損株 (*nth1Δ/rad16Δ*) は、WT よりも陽性細胞率が増加した。したがって、ROS の蓄積は CLS の低下に影響している。ROS は DNA に損傷を与えると考えられる。*nth1Δ/rad16Δ*は、定常期以降急激に突然変異率が増加した。これは ROS による変異原性のある損傷が定常期に起きていることを示している。定常期におけるゲノム DNA と mtDNA の損傷を定量的 PCR (qPCR) で定量した。その結果、ゲノム DNA において、WT ではほとんど変化が見られなかつたのに対して、*nth1Δ/rad16Δ*では 3 日目以降 DNA の損傷が増加した。また、mtDNA でも同様の結果となった。ゲノム DNA の分解を中性ゲル電気泳動で調べた結果、*nth1Δ/rad16Δ*では 5 日目に著しいバンドの分解が見られた。3 日目以降で生存率が低下しているので、qPCR で測定した DNA の損傷は、ROS により引き起こされたものと考えるよりは、むしろ細胞死による DNA の断片化によるものかもしれない。様々なグルコース濃度で *nth1Δ/rad16Δ*を培養し、生存率を測定した。グルコース 1%以下のカロリー制限条件下において、*nth1Δ/rad16Δ*の生存率は WT と同程度かそれ以上に回復した。また、グルコース濃度に比例して ROS の発生が低下した。これらのこととは、カロリー制限が ROS の発生を抑え、*nth1Δ/rad16Δ*の CLS を伸長させていることを示唆する。*nth1Δ/rad16Δ*の細胞死を調べるために、活性化カスパーゼを蛍光観察した。その結果、対数増殖期よりも定常期初期にカスパーゼが活性化され、*nth1Δ/rad16Δ*は WT よりも陽性細胞数が多かった。このことから DNA 修復欠損株ではアポトーシス様の細胞死が引き起こされていると考えられる。以上のことから BER と NER は協調して定常期におけるゲノム維持に働き、経時的老化を抑制していると考えられる。

4. まとめ

本研究から得られた分裂酵母の細胞寿命に果たす SOD2 と DNA 修復酵素の役割および細胞老化の過程を右図にまとめた。まず定常期に入ると細胞分裂が停止し、呼吸の亢進により ROS が増加する。SOD2 が欠損している場合、増加した ROS は DNA の損傷やアポトーシスによる細胞死を引き起こす。さらに、蓄積した DNA 損傷は、BER や NER で修復されないとより多くの



ROS を発生させ、細胞寿命の短縮を引き起こす悪循環に入り込むと考えられる。また、DNA 損傷は、チェックポイント制御を介したアポトーシスによる細胞死を起こす。ミトコンドリアの SOD2 は ROS の増加を強く抑制し、BER や NER などの DNA 修復系はゲノムの損傷を修復することで細胞の老化を防いでいる。さらにカロリー制限は、ROS の発生を強く低下させ、抗老化に働くことが示された。このように、本研究で老化の「フリーラジカル説」や「DNA 傷害説」を支持する多くの分子的基盤を得ることができた。したがって、本研究で用いた SOD2 欠損株や DNA 修復酵素欠損株は、分裂酵母の細胞老化の分子メカニズムをさらに解明するためのモデルとして有用であると考えられる。

発表論文：査読有り

1. Ogata T.¹, Senoo T.¹, Kawano S., Ikeda S. (¹equal contribution): Mitochondrial superoxide dismutase deficiency accelerates chronological aging in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Biol Int* 40, 100-106 (2016)
2. Senoo T.¹, Yamanaka M.¹, Nakamura A., Terashita T., Kawano S., Ikeda S. (¹equal contribution): Quantitative PCR for detection of DNA damage in mitochondrial DNA of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Microbiol Methods* 127, 77-81 (2016)
3. Senoo T, Kawano S, Ikeda S (2017) DNA base excision repair and nucleotide excision repair synergistically contribute to survival of stationary-phase cells of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Biol Int*: in press.

学会発表：

〈国際学会〉

1. Senoo T., Kawano S., Ikeda S.: Chronological aging and cell death in DNA repair-deficient mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. 14th International Congress on Yeasts Sept. 11-15 (2016) at Awaji-island

〈国内学会（主な発表）〉

1. 妹尾聖典、河野真二、池田正五：分裂酵母の Mn-SOD(SOD2) 欠損株の酸化ストレスに対する感受性の解析、第 85 回日本生化学会大会、福岡 (2012)
2. 妹尾聖典、河野真二、池田正五：分裂酵母の増殖定常期における細胞寿命に及ぼす DNA 修復系の影響、第 39 回中国地区放射線影響研究会、広島 (2014)
3. 妹尾聖典、河野真二、池田正五：分裂酵母細胞の経時寿命における塩基除去修復の役割の解析、第 37 回日本分子生物学会年会、神奈川 (2014)
4. 妹尾聖典、河野真二、池田正五：分裂酵母の塩基除去修復とヌクレオチド除去修復の経時寿命における役割、第 39 回日本分子生物学会年会、神奈川 (2016)

審査結果の要旨

本論文は分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) をモデル生物とした細胞寿命関連遺伝子の研究であり、抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ SOD2 や DNA 修復酵素の酵母細胞の経時寿命 (CLS) に果たす役割や細胞老化の過程を分子遺伝学的に解析したものである。

研究の背景では、これまでの様々な生物で行われてきた寿命を調節する経路、分裂酵母における寿命研究、および分裂酵母の DNA 修復系について概説し、本研究の目的を明記した。

第 1 章は「SOD2 の細胞寿命に果たす役割」で、分裂酵母 SOD2 の寿命への役割を CLS の測定や老化過程の観察により調べた。CLS は酵母細胞の定常期における生存率の低下から測定できる。*sod2*欠損株 (*sod2Δ*) の CLS は、野生株と比較し著しく低下した。SOD2 発現プラスミドの導入により CLS が回復した。さらに、*sod2Δ*では細胞の内活性酸素種 (ROS) の上昇や突然変異率の増加、ミトコンドリア呼吸能の低下、著しい生体高分子の分解がおき、アポトーシス様細胞死が誘導された。また、定常期以降 *sod2*の発現が誘導され、経時寿命を伸長させていることを明らかにした。

第 2 章は「DNA 修復酵素の細胞寿命に果たす役割」で、DNA 修復酵素の寿命への役割を CLS の測定や老化過程の観察により調べた。塩基除去修復 (BER) 遺伝子の *nth1* およびヌクレオチド除去修復 (NER) 遺伝子の *rad16* の単独欠損株の CLS は、野生株と比べそれわずかに低下したが、*nth1* と *rad16* の二重欠損株 (*nth1Δ/rad16Δ*) では著しく低下した。また、他の BER 遺伝子 (*apn2*) と *rad16* の二重欠損でも著しく CLS が低下した。したがって BER と NER が協調して細胞寿命に働き、BER 酵素の中でも Nth1p と Apn2p は老化過程でおこる DNA 損傷修復に重要な役割を持つ。*nth1Δ/rad16Δ*では ROS の増加や突然変異率の上昇、DNA 損傷量の増加、アポトーシス誘導が起きた。カロリー制限により *nth1Δ/rad16Δ*の ROS 発生が抑制され、CLS が回復した。これらのことより、BER と NER が協調して定常期におけるゲノム維持に働き、経時的老化を抑制していることが明らかになった。また、本研究で分裂酵母のゲノムおよびミトコンドリアの DNA 損傷を定量的 PCR で測定する方法を新規に開発した。

このように、論文により得られた成果は学術的に価値のある新しい知見を多く含んでいる。さらに、これらの研究内容を含む論文が複数の英文学術雑誌に公表されている。審査の結果、本論文の提出者の妹尾聖典は博士(理学)の学位を受ける資格を有すると認める。