

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

2017

岡山理科大学大学院

理学研究科

材質理学専攻

妹尾 聖典

## 目次

研究の背景	1
引用文献	9
第1章 SOD2 の細胞寿命に果たす役割	
1. 序論	14
2. 材料と方法	16
2-1. 菌株と発現プラスミド	
2-2. 培地	
2-3. 薬剤感受性の測定	
2-4. CLS の測定	
2-5. PCR による DNA 損傷の定量	
2-5. DNA の抽出とアガロースゲル電気泳動	
2-6. タンパク質の抽出と活性染色および SDS-PAGE による分析	
2-7. RNA 抽出と RT-PCT	
2-8. ROS とカスパーゼ活性の蛍光顕微鏡による観察	
2-9. MTT アッセイ	
2-10. 突然変異率の測定	
3. 結果	21
3-1. <i>sod2Δ</i> の酸化剤に対する感受性	
3-2. SOD2 の経時寿命における役割	
3-3. <i>sod2Δ</i> における細胞内 ROS の蓄積	
3-4. 定常期における <i>sod2Δ</i> のミトコンドリア呼吸能	
3-5. 定常期における <i>sod2Δ</i> の生体高分子の損傷	
3-6. 定常期における SOD2 の活性と遺伝子発現	
3-7. カロリー制限による <i>sod2Δ</i> の CLS の伸長	
3-8. 定常期における <i>sod2Δ</i> のカスパーゼの活性化	

4. 考察	29
-------	----

5. 引用文献	32
---------	----

## 第2章 DNA 修復酵素の細胞寿命に果たす役割

1. 序論	36
-------	----

2. 材料と方法	37
----------	----

2-1. 菌株と培地および CLS の測定

2-2. DNA の断片化と突然変異率の測定

2-3. PCR によるゲノム DNA の損傷の定量

2-4. ROS とカスパーゼ活性の蛍光顕微鏡による観察

2-5. タンパク質の抽出と SDS-PAGE

3. 結果	40
-------	----

3-1. 分裂酵母 DNA 修復欠損株の CLS

3-2. 定常期における BER と NER の協調的貢献

3-3. 定常期における DNA 修復欠損株の ROS の蓄積

3-4. ゲノムおよびミトコンドリア DNA 損傷の qPCR による定量法の開発

3-5. 定常期における DNA 修復欠損株の生体高分子の損傷

3-6. カロリー制限条件下での DNA 修復欠損株の CLS 伸長

3-7. 定常期における DNA 修復欠損株のカスパーゼの活性化

4. 考察	52
-------	----

5. 引用文献	55
---------	----

総合討論	60
------	----

引用文献 . . . . . 6 2

謝辞 . . . . . 6 3

業績 . . . . . 6 4



## 略号一覧

AP…apurinic/aprimidinic

BER…base excision repair

CLS…chronological lifespan

CPD…cyclobutane pyrimidine dimer

DHE…dihydroethidium

DHR123…dihydrorhodamine123

GGR…global genome repair

NER…nucleotide excision repair

OD…optical density

PBS…phosphate buffered saline

PCR …polymerase chain reaction

qPCR …quantitative polymerase chain reaction

RLS…replicative lifespan

ROS…reactive oxygen species

SDS-PAGE…sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis

SOD…superoxide dismutase

TCR···transcription coupled repair

TOR···target of rapamycin

6, 4-PP···6, 4-photoproduct

## 研究の背景

ヒトを含めた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。これまでに、老化のメカニズムに関する種々の研究も行われ、様々な説が提唱されてきた（書籍として石井と丸山，2014）。老化のメカニズムは非常に複雑であり様々な要因があげられている。例えば、代謝で生じた活性酸素種（ROS）が生体分子を損傷させることを主原因とする「フリーラジカル説」や、DNA の損傷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、単細胞真核生物である出芽酵母、多細胞生物で遺伝学的解析が容易な線虫やハエ、および実験動物のマウスなど、多くのモデル生物を用いて寿命を決定する様々な経路が分子生物学的に解明されている。また、霊長類を用いた実験研究もなされているが、ヒト個体では疫学的に解析されている。これらの研究の結果、寿命を決定する分子レベルの基本的な仕組みは生物種間で保存されていることを支持する結果が蓄積してきている。例えば、栄養調節（カロリー制限）はほとんど全ての生物の寿命を類似の機構で延長させる。老化の「フリーラジカル説」や「DNA 傷害説」において、ROS や DNA 損傷の蓄積は脅威となるので、生物は

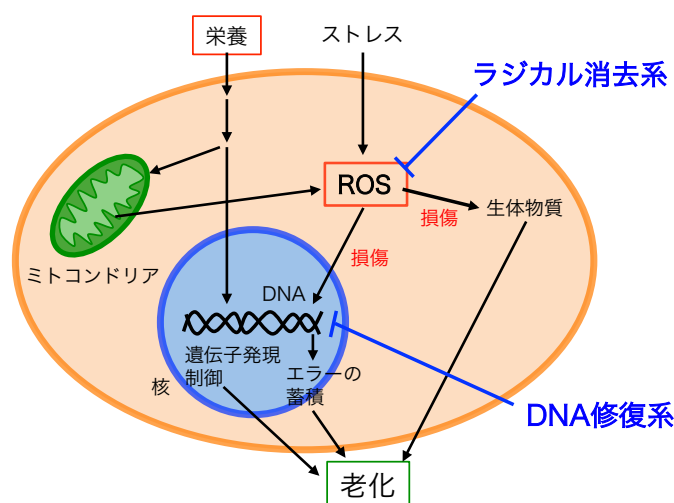


図 A1 ROS の発生とそれに対する生体防御

細胞内の代謝によりミトコンドリアから ROS が生じる。ROS は DNA などの生体高分子を損傷し、老化を促進すると考えられる。生物にはそれらに対する防御機構が存在し、ラジカル消去系が ROS を無毒化し、DNA 修復系がゲノムの維持に働いている。詳細は本文参照。

ROS に対するラジカル消去系や DNA 損傷に対する DNA 修復系など種々の防御系を持っている (図 A1)。それらの防御系の老化における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。本研究では、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) をモデル生物として、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) を消去する酵素スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) や DNA 修復酵素の欠損株における細胞老化の過程の観察や、細胞寿命へのそれら酵素の役割を分子遺伝学的に解析した。

本論文では、第 1 章に「SOD2 の細胞寿命に果たす役割」、第 2 章に「DNA 修復酵素の細胞寿命に果たす役割」を記述する。それに先立ち、これまでの研究の背景を以下に説明する。

## 1. 生物の寿命を調節する経路

これまでの研究により、寿命決定の分子メカニズムは生物種間で保存されていることが示されている (書籍として今井と吉野, 2013; 石井と丸山, 2014)。それらには、インスリン/IGF-1 経路、ラパマイシンが関わる TOR (target of rapamycin) 経路およびサーチュイン経路があげられる (図 A2) インスリン/IGF-1 シグナル経路は、インスリンやインスリン様ペプチドにより最終的に DAF-16 や FOXO を抑制させることで酸化スト

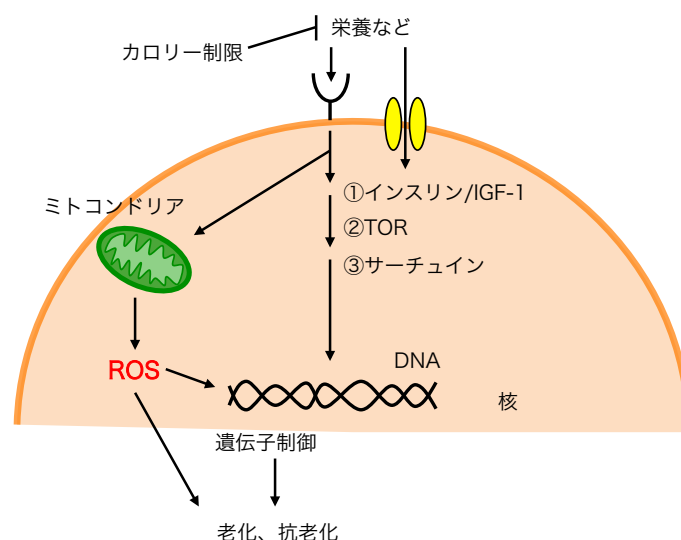


図 A2 寿命に関わる経路

生物には寿命に関わる様々な経路が知られており、生物種間で高く保存されている。詳細は本文参照。

レスに対する抑制効果を弱め寿命を負に調節している（総説として植木，2013）。線虫やハエを用いた実験ではインスリンシグナル分子のオルソログである因子の作用を低下させることで寿命が延長し、マウスでは IGF-1R 欠損により寿命が延長することが報告されている（Kenyon *et al.*, 1993; Clancy *et al.*, 2001; Holzenberger *et al.*, 2003）。ラパマイシンは細胞増殖作用をもつマクロライド系抗生物質である。ラパマイシンの結合する TOR は、細胞内で 2 つの異なる複合体 TORC1 と TORC2 を形成している。ラパマイシンは TORC1 や TORC2 を抑制し、寿命伸長に影響を与えられている（総説として Chellappa & Baur, 2013）。その他、TORC1 はオートファジー抑制やタンパク質合成調節に関わる経路に、TORC2 は細胞骨格系の組織化や細胞生存および代謝に関わる経路に影響している。線虫では TOR 欠損は寿命を 2.5 倍延長させ、また TORC1 基質の欠損でも寿命が延長することが報告された（Vellai *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2007）。出芽酵母やハエでは、TOR 欠損や TOR シグナルの低減調節により寿命が延長し、マウスでは TORC1 基質の欠損による寿命伸長が示された（Kaeberlein *et al.*, 2005; Powers *et al.*, 2006; Kapahi *et al.*, 2004; Selman *et al.*, 2009）。長寿遺伝子として知られているサーチュインは、NADH を基質とし標的タンパク質を脱アセチル化する（総説として來生，2013）。Sir2 は出芽酵母の研究により見出されたサーチュインファミリータンパク質で、Sir2 の過剰発現により寿命が伸長し、Sir2 の変異により短寿命となる（Sinclair & Guarente, 1997）。

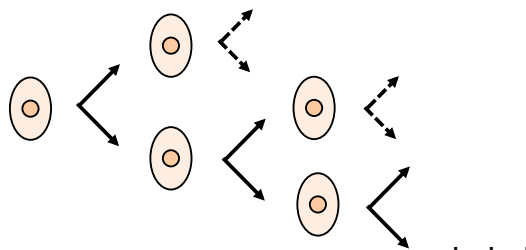
カロリー制限で出芽酵母や線虫、ハエなどでは寿命が約 2~3 倍延長し、哺乳類のマウスでは 30~50% の延長がみられた（Wei *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008; Grandison *et al.*, 2009; Anderson *et al.*, 2009）。霊長類であるサルやヒトに関する研究結果は多くはないが、老化に対する良い影響が報告されている（Colman *et al.*, 2009）。カロリー制限による寿命伸長の分子メカニズムには上記経路が相互に関係している（総説として Fontana *et al.*, 2010）。出芽酵母や線虫、哺乳類のマウスにおいてサーチュインの欠損によりカロリー制限による寿命延長効果がなくなることから（Imai & Guarente, 2010; Imai, 2009）、サーチュイン経路はカロリー制限による寿命延長の主要機構として関連していると考えられる。

## 2. 分裂酵母における寿命研究

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。さらに、ゲノム配列が全て決定していること、遺伝子発現や遺伝子産物の網羅的な解析データが利用可能であることなど、モデル生物としての重要性がさらに増加している。代表的な酵母に分裂酵母と出芽酵母があり、これらは約3~6億年前に分岐し、それぞれが独自に進化していったと考えられる (Douzery *et al.*, 2004)。そのため、分裂酵母と出芽酵母には増殖方法（分裂と出芽）や染色体数（分裂酵母 3 本、出芽酵母 16 本）などの違いがある。また、分裂酵母は出芽酵母と比べて分裂様式やテロメアの繰り返し配列、エクソン/イントロンの割合、mRNA のスプライシング、ミトコンドリアの性状など様々な生命現象においてヒトに近いとされている (Sipiczki, 2004)。

酵母の細胞寿命には、分裂寿命 (replicative lifespan : RLS) と経時寿命 (chronological lifespan : CLS) の2つの概念がある (図 A3)。RLS は細胞が何回分裂できるかの回数で示され、CLS は細胞が分裂停止後 (定常期) にどのくらい生存できるかの期間で表される。出芽酵母では両寿命を比較的容易に測定できる。一方、分裂酵

A) 分裂寿命



B) 経時寿命

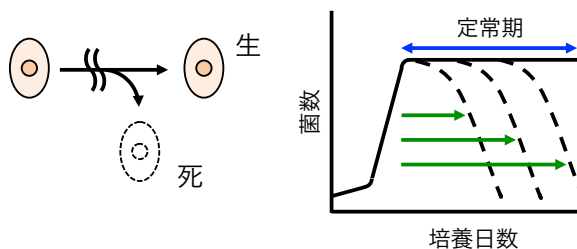


図 A3 細胞寿命の概念

細胞の寿命には、1つの細胞が何回分裂できるのかという分裂寿命 (A) と細胞分裂が停止してから細胞が死滅するまでの期間で表す経時寿命 (B) がある。

母の RLS は、細胞分裂後の母細胞と娘細胞の判別が難しいことからほとんど研究が行われていない。CLS は定常期に入って分裂を停止した細胞の生存率を調べることによって簡単に測定することができる (Roux *et al.*, 2006; Chen & Runge, 2009)。分裂酵母では、G1 期または G2 期から定常期に入ることが知られている (Costello *et al.*, 1986)。

今までの出芽酵母の寿命研究において、様々な細胞寿命の制御系が見出された (総説として Longo *et al.*, 2012)。例えば、グルコースのようなエネルギー物質のセンサーやそのシグナル経路に働くプロテインキナーゼ A (PKA) を介した経路やアミノ酸の様な栄養素に関わる TOR 経路、ミトコンドリアの活性化や ROS の生産に関わる経路、ストレス耐性に関わる経路などが知られている。これらの経路は酵母のみならず、ヒトなどの高等真核生物にも共通している。

分裂酵母における研究で欠損により CLS が伸長する遺伝子が発見されてきた。例えば、グルコースにより作動する *pka* や栄養を感知する *sck2* (Roux *et al.*, 2006; Roux *et al.*, 2009; Roux *et al.*, 2010)、P 型 H<sup>+</sup>ATPase をコードする *pma1* (Ito *et al.*, 2010) などがある。また、分裂酵母の CLS には、ストレス応答やミトコンドリア活性のような因子が関わっていると考えられる (Roux *et al.*, 2006; Roux *et al.*, 2010; Zuin *et al.*, 2010)。分裂酵母も他の生物と同様にカロリー制限 (培地中のグルコース濃度を低下させること) により CLS が伸長する (Chen & Runge, 2009)。グルコースシグナル経路に関わる Git3 グルコース受容体 (GPCR) が欠損すると CLS が延長するので、カロリー制限の効果はこの経路と関連している (Roux *et al.*, 2009)。また、*oga1* 過剰発現株は TOR 欠損株と同じような表現系を示すので *oga1* は TOR シグナル経路に関わっている (Ohtsuka *et al.*, 2013)。SOD1 とグルタチオンを欠く分裂酵母で *sir2* の欠損は寿命の低下を増加させる (Mutoh & Kitajima, 2007)。これらは分裂酵母の CLS に TOR 経路やサーチュイン経路のような寿命制御も関わっていることを示す。したがって、他の生物でも保存されている様々な寿命調節機構は、分裂酵母でも保存されていると考えられる。

### 3. 分裂酵母の DNA 修復系

細胞の DNA は内的および外的要因により損傷を受け、損傷 DNA の蓄積はヒトの老化や病気の引き金になると考えられている。生物は、その防御機構として種間で良く保存されている DNA 修復系を持っている。

塩基除去修復 (BER) 経路は、ROS により生じた塩基損傷や AP サイト、一本鎖切断のような小さな損傷の修復に重要な役割を持っている (図 A4) (総説として Bauer *et al.*, 2015)。分裂酵母の BER では、まず DNA グリコシラーゼ (アルキル化塩基を認識する *mag1/mag2* やウラシルを認識する *ung1* など) により損傷塩基が切除され AP サイトが生じる (総説として Kanamitsu & Ikeda, 2010)。AP サイトは、主に *nth1* の AP リアーゼ活性により切断され  $\alpha$ ,  $\beta$  不飽和アルデヒド (3' ブロック末端) が生じる。これを *nth1* 依存経路と呼ぶ。*nth1* は酸化損傷塩基を認識できるので、損傷塩基に直接 *nth1* が作用する場合も 3' ブロック末端が生じる。この末端は、*apn2* のもつ DNA ホスホジエステラーゼ活性により 3' -OH 末端となる。その後、DNA ポリメラーゼがギャップを埋め、DNA リガーゼにより連結される。AP サイトに AP エンドヌクレアーゼ活性を持つ *apn2* が作用したり、損傷塩基に直接 *uve1* が作用した場合には 5' -デオキシリボースリン酸 (5' ブロック末端) が生じる。この末端は DNA ポリメラーゼのもつリアーゼ活性やフラップエンドヌクレアーゼにより除去され、5' -リン酸末端が生じる。その後 DNA リガーゼによ

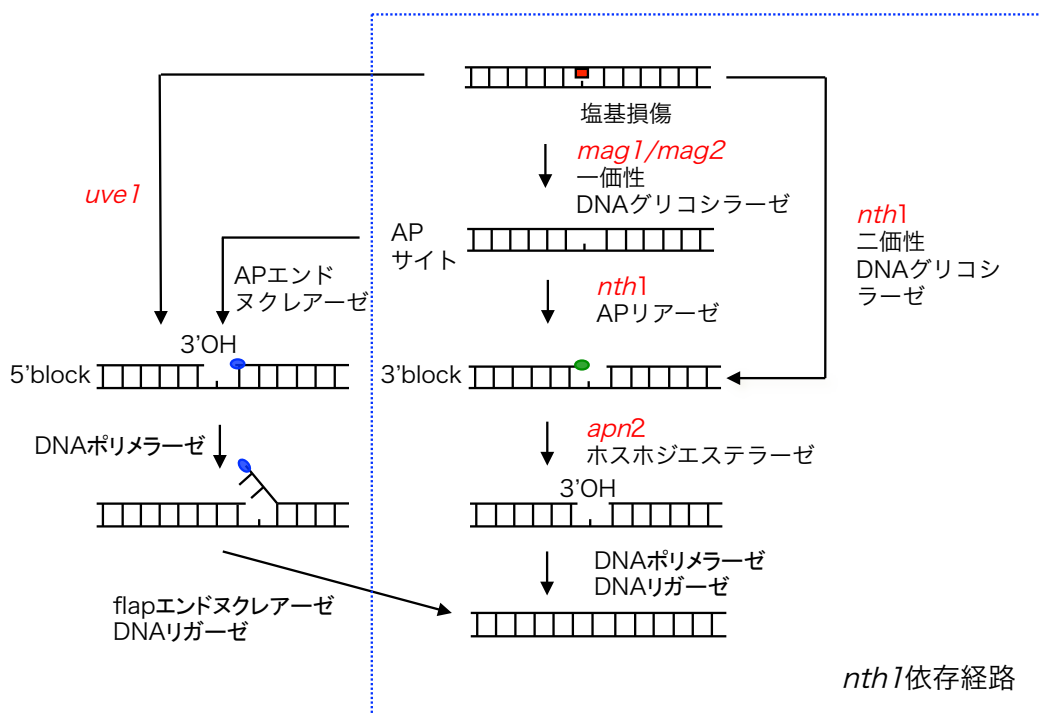


図 A4 分裂酵母の BER 経路の概要

分裂酵母の BER は塩基損傷や AP サイトに *nth1* が働く *nth1* 依存経路が主要な経路である。詳細は本文参照。



って連結される。

ヌクレオチド除去修復 (NER) 経路は、紫外線によって生じるシクロブタンピリミジン二量体 (CPD) や 6-4 光産物 (6-4PP)、および大きな付加体のような二重らせんの歪みを引き起こす損傷を取り除く働きを持つ (総説として Naegeli & Sugasawa, 2011; Melis *et al.*, 2013)。NER にはゲノム全体を対象とする修復機構 (GGR) と転写と共役した修復機構 (TCR) がある。分裂酵母の NER 機構は十分に解析されていないが、ヒトの NER 遺伝子との相同性より、主な因子の役割と修復経路は次のようであると考えられる (図 A5)。GGR には、クロマチンのリモデリングに関与すると考えられる *rhp7* (ヒトのホモログなし) や損傷部位を認識する *rhp41* (ヒトの *XPC* ホモログ) が関与している。TCR において、損傷部位は転写中の RNA ポリメラーゼ II の進行が阻害されることにより認識され、これには *rhp26* (*CSB*) が関わっている。それぞれの機構で損傷が認

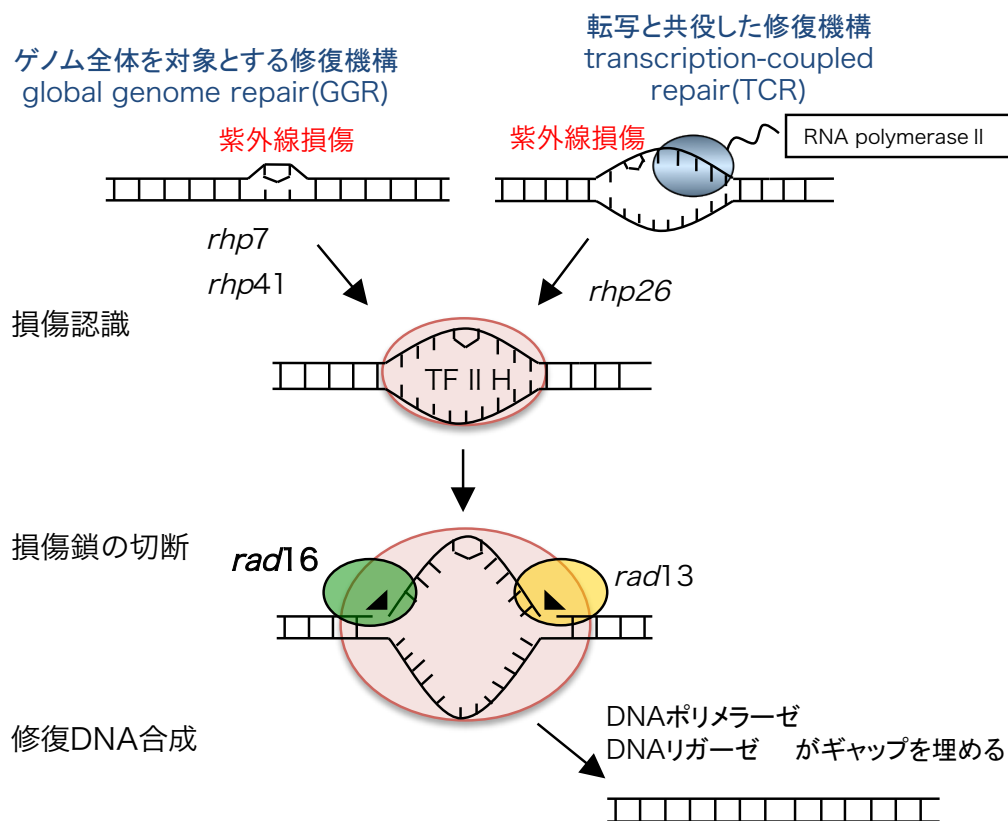


図 A5 分裂酵母の NER 経路の概要

分裂酵母の NER をヒトの NER 遺伝子との相同性をもとに図示した。図には主な因子の役割と修復経路を示した。詳細は本文参照。

識された後、損傷部位に転写因子である TFIIH が誘導される。その後、構造特異的なエンドヌクレアーゼである *rad16* (*XPF*) と *rad13* (*XPG*) がそれぞれ損傷の 5' 側と 3' 側を切断し、損傷部位が取り除かれる。その後生じた一本鎖ギャップは DNA ポリメラーゼに埋められ、DNA リガーゼにより再連結され修復が完了する。

## 引用文献

- Anderson RM, Shanmuganayagam D, Weindruch R (2009) Caloric Restriction and Aging: Studies in Mice and Monkeys. *Toxicol Pathol* 37: 47-51.
- Bauer NC, Corbett AH, Doetsch PW (2015) The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. *Nucleic Acids Res* 43: 10083-101.
- Chellappa K & Baur JA (2013) 老化における mTOR 経路 実験医学 31: 3209-16.
- Chen BR & Runge KW (2009) A new *Schizosaccharomyces pombe* chronological lifespan assay reveals that caloric restriction promotes efficient cell cycle exit and extends longevity. *Exp gerontol* 44: 493-502.
- Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leevers SJ, Partridge L (2001) Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* 292:104-6.
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325: 201-4.
- Costello G, Rodgers L, Beach D (1986) Fission yeast enters the stationary phase G0 state from either mitotic G1 or G2. *Curr Genet* 11: 119-25.
- Douzery EJP, Snell EA, Baptiste E, Delsuc F, Philippe H (2004) The timing of eukaryotic evolution: does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils? *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15386-91.
- Fontana L, Partridge L, Longo VD (2010) Dietary Restriction, Growth Factors and Aging: from yeast to humans *Science* 328: 321-6.
- Grandison RC, Piper MD, Partridge L (2009) Amino acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature* 462: 1061-4.
- Hansen M, Taubert S, Crawford D, Libina N, Lee SJ, Kenyon C (2007) Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 6: 95-110.
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, G elo en A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421:182-7.

- Imai S (2009) SIRT1 and Caloric Restriction: An Insight Into Possible Trade- Offs Between Robustness and Frailty. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12: 350-6.
- Imai S & Guarente L (2010) 10 Years of NAD-Dependent SIR2 Family Deacetylases—Implications for Metabolic Diseases. *Trends Pharmacol Sci* 31: 212-20.
- Ito H, Oshiro T, Fujita Y, Kubota S, Naito C, Ohtsuka H, Murakami H, Aiba H (2010) Pma1, a P-type proton ATPase, is a determinant of chronological life span in fission yeast. *J Biol Chem* 285: 34616-20.
- Kaeberlein M, Powers RW 3rd, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, Kerr EO, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK (2005) Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* 310:1193-6.
- Kanamitsu K & Ikeda S (2010) Early steps in the DNA base excision repair pathway of a fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Nucleic Acids* Article ID 450926: 9 pages.
- Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S (2004) Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway. *Curr Biol* 14: 885-90.
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461-4.
- Longo VD, Shadel GS, Kaeberlein M, Kennedy B (2012) Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab* 16: 18-31.
- Melis JP, van Steeg H, Luijten M (2013) Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair. *Antioxidants & Redox Signaling* 18: 2409-19.
- Mutoh N & Kitajima S (2007) Accelerated chronological aging of a mutant fission yeast deficient in both glutathione and superoxide dismutase having cu and zn as cofactors and its enhancement by sir2 deficiency. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 2841-4.
- Naegeli H & Sugasawa K (2011) The Xeroderma Pigmentosum Pathway: Decision Tree Analysis of DNA Quality. *DNA Repair* 10: 673-83.
- Ohtsuka H, Ogawa S, Kawamura H, Sakai E, Ichinose K, Murakami H, Aiba H (2013) Screening for long- lived genes identifies Oga1, a guanine-quadruplex associated protein that affects the chronological lifespan of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Genet Genomics* 288: 285-95.

- Pan KZ, Palter JE, Rogers AN, Olsen A, Chen D, Lithgow GJ, Kapahi P (2007) Inhibition of mRNA translation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 1: 111-9.
- Powers RW 3rd, Kaeberlein M, Caldwell SD, Kennedy BK, Fields S (2006) Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *GENES DEV* 20: 174-84.
- Roux AE, Quissac A, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA (2006) Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell* 5: 345-57.
- Roux AE, Leroux A, Alaamery MA, Hoffman CS, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA (2009) Pro-aging effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast. *PLoS genetics* 5: e1000408.
- Roux AE, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA (2010) Fission yeast and other yeasts as emergent models to unravel cellular aging in eukaryotes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65: 1-8.
- Selman C, Tullet JM, Wieser D, Irvine E, Lingard SJ, Choudhury AI, Claret M, Al-Qassab H, Carmignac D, Ramadani F, Woods A, Robinson IC, Schuster E, Batterham RL, Kozma SC, Thomas G, Carling D, Okkenhaug K, Thornton JM, Partridge L, Gems D, Withers DJ (2009) Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian lifespan. *Science* 326: 140-4.
- Sinclair DA & Guarente L (1997) Extrachromosomal rDNA Circles-A Cause of Aging in Yeast. *Cell* 91: 1033-42
- Sipiczki M (2004) Fission yeast phylogenesis and evolution. In Egel R (Ed.) *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe*. pp 431-43. Springer
- Smith ED, Kaeberlein TL, Lydum BT, Sager J, Welton KL, Kennedy BK, Kaeberlein M. (2008) Age- and calorie-independent life span extension from dietary restriction by bacterial deprivation in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Dev Biol* 8: 49.
- Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, Müller F (2003) Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 426: 620.

Wei M, Fabrizio P, Hu J, Ge H, Cheng C, Li L, Longo VD (2008) Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genet* 4: e13.

Zuin A, Carmona M, Morales Ivorra I, Gabrielli N, Vivancos AP, Ayte J, Hidalgo E (2010) Lifespan extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway. *EMBO J* 29: 981-91.

今井眞一郎、吉野純編 (2013) 老化・寿命のサイエンス 実験医学 増刊 31 巻 20 号

石井直明、丸山直記編 (2014) 老化の生物学-その分子メカニズムから寿命延長まで 化学同人

植木浩二郎 (2013) インスリン・IGF-1 シグナルと老化・寿命制御 実験医学 31: 3194-9.

來生 (道下) 江利子 (2013) サーチュインと老化・老化関連疾患 実験医学 31: 3217-24.

## 第 1 章

SOD2 の細胞寿命に果たす役割

## 1. 序論

好気呼吸を行う生物では、ミトコンドリアに取り込まれた酸素のうち約 2%が内的要因（エネルギー代謝など）および外的要因（紫外線照射など）により  $O_2^-$  のような ROS になる。 $O_2^-$  の生成は酸化リン酸化における複合体 III の Q サイクルで起こることが知られている（最近の総説 Chen & Zweier, 2014）。すなわち、補酵素 Q と呼ばれるユビキノンが複合体 I または II により還元されユビキノールとなり、これが酸化状態のユビキノンに戻る際に中間体としてユビセミキノンが生じる。このユビセミキノンは不安定であるため直接酸素と反応し、結果として  $O_2^-$  が生成される。 $O_2^-$  は鉄イオンによる  $\cdot OH$  への変換や一酸化窒素によるパーオキシナイトライドの生成によって酸化力の強い ROS になり、生体高分子に傷害を与える（図 B1-A）。例えば、これらの ROS はミトコンドリアの DNA やタンパク質、脂質などに損傷を与え、これが蓄積することでミトコンドリアの機能を減少させる。ヒトではミトコンドリア遺伝子病などの様々な疾患や老化が引き起こされる（図 B1-B）。生物は ROS による損傷を防ぐため、細胞内に様々な抗酸化酵素

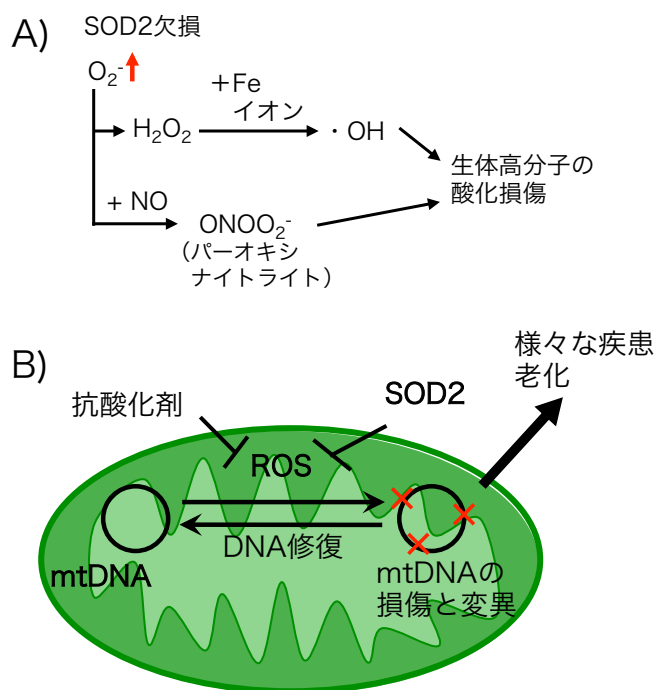


図 B1 ミトコンドリア DNA (mtDNA) の損傷と修復

A) SOD2 欠損は生体高分子の酸化損傷を引き起す。 B) ROS は mtDNA を損傷し、ヒトでは様々な疾患や老化を引き起こす原因となる。詳細は本文参照。



を持っている。さらに、還元型グルタチオン (GSH) やビタミン C などの低分子化合物も ROS を除去する働きがある。

SOD は  $O_2^-$  を過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) に不均化する。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 (Fridovich, 1995)。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。Cu, Zn を活性中心に持ち細胞質に存在する Cu, Zn-SOD (SOD1) と Mn を持ちミトコンドリアに局在する Mn-SOD (SOD2) である。SOD2 の局在がミトコンドリアに限局されていることは、本酵素がミトコンドリアで発生した  $O_2^-$  を主な標的とする酵素であることを示す。SOD2 が変異することで、ヒトでは様々な病気が引き起こされる。例えば、SOD2 の多型は 2 型糖尿病 (Nomiyama *et al.*, 2003) や心筋症 (Hiroi *et al.*, 1999) と関連する。また、神経変性疾患のパーキンソン病には SOD2 が関係していると考えられている (Belluzzi *et al.*, 2012)。しかし、ヒトの老化と SOD2 の変異との関係は十分に解明されていない。一方、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 (Wawryn *et al.*, 1999; Duttaroy *et al.*, 2003; Lebovitz *et al.*, 1996)。しかし、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) での *sod2* の欠損は寿命を延長させた (Van Raamsdonk & Hekimi, 2009)。*C. elegans* において  $O_2^-$  は単に酸化損傷を与えるのではなく、寿命を伸長させるシグナル経路への関与が示唆されている (Van Raamsdonk & Hekimi, 2012)。

最近、分裂酵母が老化や細胞死を研究するための有用なモデルとして用いられている (Roux *et al.*, 2010, Lin & Austriaco, 2014)。分裂酵母にも SOD1 と SOD2 が存在し、それぞれ核遺伝子の *sod1* と *sod2* (SPAC1486.01) にコードされている。分裂酵母の SOD1 欠損株 (*sod1* $\Delta$ ) は酸化剤に対する感受性を示した (Mutoh *et al.*, 2002)。また、私たちの今までの研究で *sod1* $\Delta$  と *sod2* $\Delta$  の比較をすると、 $O_2^-$  の発生量や酸化タンパク質量そして酸化ストレスに対する感受性のいずれも *sod1* $\Delta$  の方が *sod2* $\Delta$  よりも高くなることが分かった (Kiuchi *et al.*, 2010)。栄養成長している分裂酵母の *sod2* $\Delta$  株は、酸化剤や熱、抗浸透圧に対して中程度の感受性を示したが、SOD2 の定常期 (非分裂状態) での役割は不明である。本研究では分裂酵母をモデル生物として、*sod2* $\Delta$  の長期培養による菌株の生存率を元にして CLS の測定と老化過程の観察を行った。

表 B1. 本研究で用いた菌株

菌株名	遺伝子型	由来
ED0665	<i>h<sup>-</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	ATCC No. 96993
<i>sod2Δ</i>	<i>h<sup>-</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 sod2::kanMX6</i>	Kiuchi et al. (2010)
<i>sod2Δ+SOD2</i>	<i>h<sup>-</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 sod2::kanMX6</i> SOD2-pAUR224	本研究

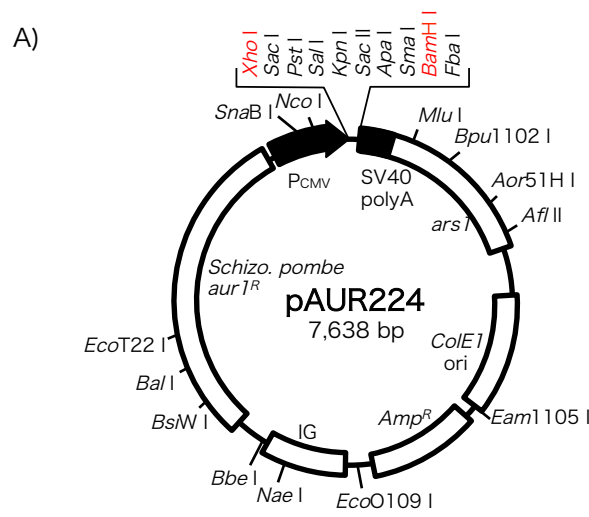
## 2. 材料と方法

### 2-1. 菌株と発現プラスミド

本研究で用いた菌株を表 B1 に示した。分裂酵母の野生株 (WT) は ED0665 株 (*h<sup>-</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18*) を使用した。*sod2Δ* は *sod2* を kan-MX6 で破壊したものを  
用いた (Kiuchi *et al.*, 2010)。また、*sod2Δ* に SOD2 発現プラスミドを導入した *sod2Δ+SOD2*  
を作製した (図 B2)。木内 (2008) の作製した SOD2 cDNA を発現プラスミド pAUR224 にク  
ローニングしたプラスミドの塩基配列解析を行ったところ、ベクターの遺伝子発現方向  
に対してインサート cDNA が逆方向に入っていた。このプラスミドをもとに、SOD2 が正  
しく発現するようなプラスミドを作製した。まず、SOD2 が正しい向きに挿入できるよ  
うに制限酵素 (*XhoI* と *BamHI*) のタグを持つ次のようなプライマーを設計した。Fw(-3) :  
5' - ATC CGC TCG AGA TGC TTC GCT TTT TGT C-3'、Rv(+822) : 5' - CGC GGA TCC AGG GTG  
TTT TCG TAA TC-3'。次に木内のプラスミドを鋳型として、KOD-Plus-Mutagenesis Kit  
(TOYOBO) を用いた PCR で SOD2 cDNA を増幅させた。制限酵素 (*XhoI* と *BamHI*) で切断  
し、インサートとした。オーレオバシジン A 耐性遺伝子をもつ pAUR224 を、制限酵素 (*XhoI*  
と *BamHI*) で切断し、ベクターとした。両者をライゲーションにより連結し、SOD2 発現  
プラスミドを作成した。塩基配列を決定し、正しい SOD2 cDNA が挿入されていることを  
確認した。ダイレクトトランスフォーメーションにより分裂酵母の *sod2Δ* 株に導入した。

### 2-2. 培地

最少培地として SD 培地 (0.67% Difco Nitrogen Base w/o Amino acids、3% グルコ  
ース、75 μg/mL のアデニン、ロイシンおよびウラシル) を用いた。完全培地として YE  
培地 (0.5% yeast extract、3% グルコース) を用いた。寒天培地には 2% の寒天を含む。  
*sod2Δ+SOD2* の培養は 0.3 μg/mL オーレオバシジン A (Takara Bio) を添加して行った。



B)

```

ATGCTTCGCTTTTTGTCTAAGAAGCTGTATGSCCGCTATTAGGAAAGCTCCTCAATTGCCAGG
M L R F L S K N S V A A I R N V S I A R
GGAGTTTCATACTAAGGCTACTCTTCCCCCTTTACCTTATGCTTACAATGCACCTTGAACCT
G V H T K A T L P P L P Y A Y N A L E P
GCTTTGTCTGGAAACGATTATGAAGTTACATCATGACAAGCATCACCAAAACATATGTTAAC
A L S E T I H K L H H D K H H Q T Y V N
AACTTGAATGCCGCTCAGGAGAAGCTGGCCGATCCCAACCTCGATTTGGAGGGAGAGGTT
N L N A A Q E K L A D P N L D L E G E V
GCCCTTCAAGCTGCTATTAATCAATGGCGGTGGTCACATCAATCATTCTCTCTTTTGG
A L Q A A I K F N G G G H I N H S L F W
AAGATTTTAGCACCTCAAAAGGAAGGTGGTGGCAAACCCGTCACCTCTGGATCTTTACAT
K I L A P Q K E G G G K P V T S G S L H
AAGGCTATAACCTCTAAATGGGGTCTTTGGAGGATTTCAGAAAGGAAATGAATGCCGCC
K A I T S K W G S L E D F Q K E M N A A
TTAGCTAGCATCCAAGGTAGTGGTTGGGCATGGCTAATCGTGGATAAAGACGGTAGTCTC
L A S I Q G S G W A W L I V D K D G S L
CGTATTACTACTGCTAACCAAGACACGATTGTCAAGTCCAAGCCATTATTGGAATT
R I T T T A N Q D T I V K S K P I I G I
GATGCTTGGGAACATGCCTACTATCCTCAATACGAGAATCGTAAGGCCGAATACTTTAAA
D A W E H A Y Y P Q Y E N R K A E Y F K
GCTATTTGGAATGTGATTAATTGGAAGAGGCCGAGTCTCGTTATTCCAACCGTTAA
A I W N V I N W K E A E S R Y S N R *

```

図 B2 SOD2 発現プラスミドの作製

A) SOD2 発現プラスミドに用いた pAUR224 ベクターの構造。プラスミド作製に使用した制限酵素切断部位を赤字で示した。B) SOD2 の cDNA の塩基配列およびアミノ酸配列を示した。

### 2-3. 薬剤感受性の測定

YE 培地 3 mL に各菌株を初期吸光度  $OD_{600}=0.1$  になるように培養液を加え、1 日培養した。培養した菌株の菌数をコールターカウンター (BECKMAN COULTER) で測定し、 $1 \times 10^7$  cells/mL の菌液を作製した。それを元に MilliQ を用いて  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^4$  cells/mL の希釈列を作製した。損傷剤を含んだ YE 寒天培地に 3  $\mu$ L ずつスポットし、28°C、3 日間培養

した後、写真撮影をした。

#### 2-4. CLS の測定

菌株を初期吸光度  $OD_{600}=0.05$  になるように YE 培地に加え培養した。各培養日数における  $OD_{600}$  の測定、コールターカウンターによる菌数測定およびコロニー形成単位 (CFU) を計測した。CFU は、菌液を MilliQ で希釈列を作製し、希釈液 100  $\mu$ L を YE 培地にガラスビーズを用いて植菌した後 28°C、3 日間培養しコロニーを数えることにより計測した。

#### 2-5. DNA の抽出とアガロースゲル電気泳動

菌株を YE 培地で培養し、各培養日数に  $1\sim 2 \times 10^8$  cells 集菌した。DNA の抽出は Gen とるくん (Takara Bio) を用い、製造会社のマニュアルに従って行った。DNA 濃度は Nano Vue Plus (GE Healthcare) または Qubit 2.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。DNA 50 ng を Gel Red を含む 0.3%アガロースゲルに乗せ、4°C、6 h 泳動した。

#### 2-6. タンパク質の抽出と活性染色および SDS-PAGE による分析

菌株を YE 培地で培養し、各培養日数に 50 mL を集菌、洗浄した。沈殿を 3 倍量の抽出バッファー (0.125 M Tris-HCl (pH 6.8)、5% glycerol、1 mM DTT、50  $\mu$ g/mL BSA) で懸濁し、半量~同量の 0.5 mm ジルコニアビーズを加えてビーズクラッシャー (TAITEC) で破碎した。12,000 rpm で遠心し、上澄みを可溶性タンパクとして使用した。タンパク質濃度はブラッドフォード法 (Bio-Rad) を用いて測定した。タンパク質を 2  $\mu$ g/ $\mu$ L になるように希釈し、native-PAGE (12% ポリアクリルアミドゲル) により分離した。活性染色法は文献を参考にして行った (Tamura *et al.*, 2010)。泳動後のゲルを 0.24 M ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 溶液に浸し、30 min 震盪した。震盪後、ゲルを MilliQ で 3 回洗浄し、0.1 M リン酸カリウム Buffer (pH 7.0) を 50 mL、26.5  $\mu$ M リボフラビン溶液を 52.6 mL、TEMED を 212  $\mu$ L を加えた溶液に浸し、30 min 震盪した。ゲルを MilliQ で洗浄した後、白色ライトをバンドが見えるまで露光させた (約 10 min)。

タンパク質溶液に対して 1/3 容の 4 x SDS-PAGE 用サンプリングバッファー [1 M スクロース、0.3 M SDS、0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.05% ブロモフェノールブルーに  $\beta$ -

メルカプトエタノールを5%になるように加えたもの]を加え、2 min 煮沸した。12.5% ポリアクリルアミドゲルに乗せ SDS-PAGE をした。CBB Stain One (nacalai tesque)により 30 min 染色し、蒸留水で一晩脱色後、写真撮影をした。

## 2-7. RNA 抽出と RT-PCT

酵母の培養液 10 mL から total RNA を ISOGEN II (ニッポンジーン) を用いて抽出した。培養液を集菌し、1 mL の TE buffer に懸濁させ、洗浄した。Buffer A (1 M ソルビトール、100 mM EDTA、14 mM 2-メルカプトエタノール) 200  $\mu$ L に懸濁させ、Zymolyase-20T (4000 U/Buffer A) を 20  $\mu$ L 加え、30  $^{\circ}$ C、30 min で処理することで細胞壁を破壊した。RNase を含まない環境下で ISOGEN II を用いて RNA を溶出し、エタノールにより沈殿させた。最終的に抽出した RNA は DEPC 処理した MilliQ 30  $\mu$ L に溶解させた。Nano Vue Plus を用い RNA の濃度を定量した。RNA 2~4  $\mu$ g を DNase I (DEOXYRIBONUCLEASE I Amplification Grade、Sigma-Aldrich) を製造元のプロトコルに従って処理した。処理した RNA の半量を 50  $\mu$ L の反応系で High-Capacity cDNA Archive Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写反応により cDNA を作製した。この cDNA を用いて目的遺伝子の発現量を調べた。コントロールである *act1* (*act1*) を増幅させたプライマーは、Fw (+385) : 5' -GCA CCT GCC TTT TAT GTT GCT ATT CAA GC-3'、Rv (+790) : 5' -GTT GGA AAA GAG CTT CAG GGG CAC G-3' である。*sod1* プライマーは、Fw (+168) : 5' -CGG TTG TAC CTC TGC TGG TCC T-3'、Rv (+346) 5' -GGC CAA TGA TGC TGT TGG CAC C-3' である。*sod2* プライマーは、Fw (+227) : 5' -GGA GGG AGA GGT TGC CCT TC-3'、Rv (+347) : 5' -GAG GTG ACG GGT TTG CCA CC-3' である。ターゲット cDNA は GoTaq Green Master Mix (Promega) を用いて増幅させた。PCR サイクルは、95 $^{\circ}$ C 2 min  $\rightarrow$  【95 $^{\circ}$ C 30 sec  $\rightarrow$  57 $^{\circ}$ C 30 sec  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 15 sec】 (x 24 cycle)  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 5 min で行った。PCR 産物は Gel Red を含む 2%アガロースゲルで電気泳動した。*act1* の発現量をデンストメトリーで定量し、全ての cDNA サンプル中の *act1* の発現量が同じになるようにノーマライズした。

## 2-8. ROS とカスパーゼ活性の蛍光顕微鏡による観察

菌株を YE 培地で培養し、培養液 1 mL に 5 mM dihydroethidium (DHE、Thermo Fisher Scientific) を 5  $\mu$ M になるように加え 28 $^{\circ}$ C、30 min ロータリーミキサーで混合しながら

らインキュベートした。遠心後、上清を捨て 1 x PBS で 3 回洗浄した。1 x PBS で再懸濁し同量の 80%グリセロールを加え、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS DP50) で 20 倍の対物レンズを用いて赤色フィルターで観察した。カスパーゼ活性の観察は、FITC-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketone (FITC-VAD-fmk、Promega)を使用した。1×10<sup>7</sup> cells の菌株を洗浄し、10 μM FITC-VAD-fmk を含んだ 1 x PBS 150 μL で再懸濁した後、28°C、20 min ロータリーミキサーで懸濁しながらインキュベートした。1 x PBS で洗浄後、1 x PBS で再懸濁し同量の 80%グリセロールを加え、蛍光顕微鏡で観察した。40 倍の対物レンズで緑色フィルターを用いた。蛍光試薬を加えていない菌液を同時に観察し、自家蛍光が無い条件で蛍光観察を行った。

#### 2-9. MTT アッセイ

MTT アッセイは Pelloquin ら (1998) の方法に従って行った。培養液を YE 培地で OD<sub>600</sub>=0.2 になるように調製した。500 μL の菌液に終濃度 0.5 mg/mL 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) と終濃度 20 μM menadione sodium bisulfite salt を加え 28°C、16 h 振盪した。同量の 0.04 M HCl を含むイソプロパノールを加えた。28°C、30 min 振盪し、遠心後の上澄みの吸光度 (OD<sub>570</sub>) を測定した。

#### 2-10. 突然変異率の測定

突然変異率の測定は L-カナバニン耐性の変異により測定した (Hida & Ikeda, 2008)。カナバニンはアルギニンの類似体であり毒性を持っている。アルギニンを取り込むことのできる細胞は、カナバニンも同時に取り込んでしまうため感受性を示す。アルギニン取り込みに関する遺伝子に変異が起こると、アルギニンを取り込めなくなるためカナバニン耐性となる。菌株を YE 培地で培養し、各培養日数に 1 x PBS で 2 回洗浄した。1 x PBS で希釈列を作製し、生菌数を測定するため、EMM 寒天培地 (2.71% EMM no Nitrogen (MP Biomedicals)、0.375% グルタミン酸、75 μg/mL のアデニン、ロイシン、ウラシル) に植菌し、28°C、3 日間培養した。変異細胞数を測定するため、75 μg/mL カナバニン (Sigma-Aldrich) を含む EMM 培地に植菌し、28°C、約 10 日間培養した。カナバニンを含む培地で生じたコロニー数を全生菌数で割って、突然変異率を算出した。

### 3. 結果

#### 3-1. *sod2*Δの酸化剤に対する感受性

SOD2 の酸化ストレスに対する防御における役割を調べるため、*sod2*Δの酸化剤の慢性損傷に対する耐性を調べた (図 B3)。酸化剤として酸化還元サイクルによって  $O_2^-$  を生成するパラコート、酸化還元サイクルにより  $H_2O_2$  や  $O_2^-$  を生じさせるメナジオンおよび還元型グルタチオンと結合し ROS の消去を阻害する CDNB を用いた。パラコートに対する感受性は WT よりも *sod2*Δの方が高くなった (図 B3-A) (Kiuchi *et al.*, 2010)。*sod2*Δ+SOD2 は、WT と同程度の感受性を示したのでパラコートに対する感受性が *sod2* 欠損によるものであることが分かった。メナジオンと CDNB に対する感受性もパラコートと同様に

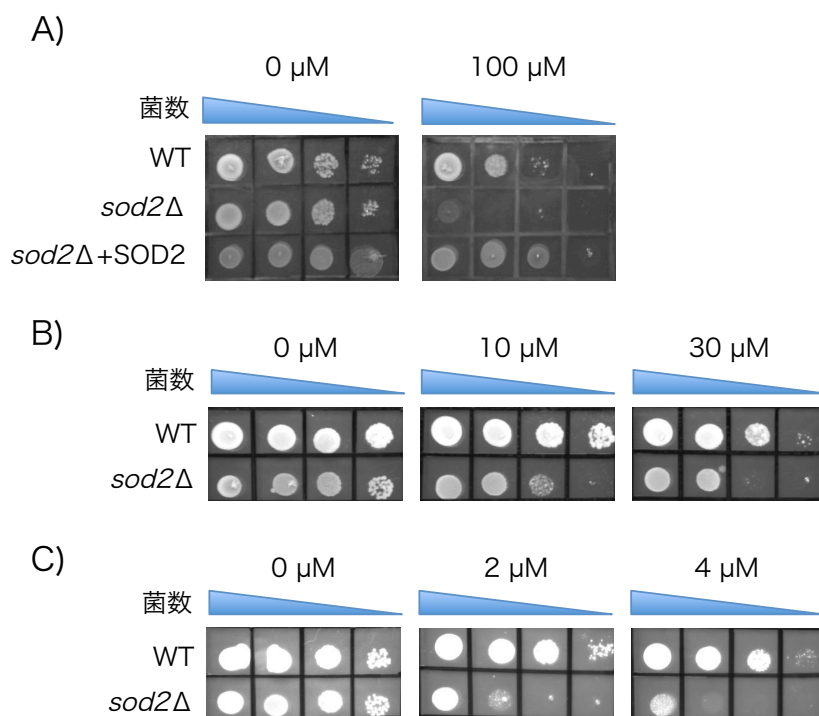


図 B3 *sod2*Δの様々な酸化剤に対する感受性

WT、*sod2*Δおよび *sod2*Δ+SOD2 のパラコート (A) に対する感受性を材料と方法に従い、スポットアッセイで測定した。WT と *sod2*Δのメナジオン (B) および 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) (C) に対する感受性を測定した。各濃度の損傷剤を含んだ YE 寒天培地に、左から  $3 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^2$ 、 $3 \times 10^1$  個の細胞を含む菌液をスポットした。28°C、3 日間培養し、写真撮影した。

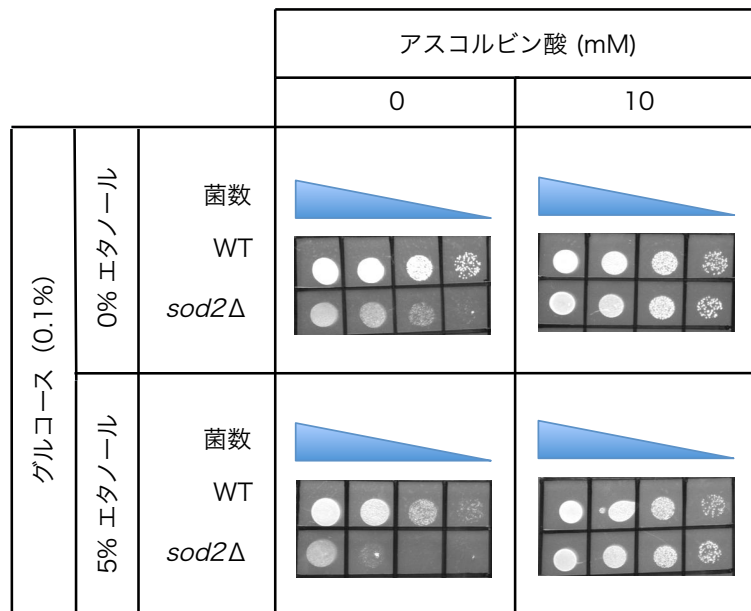


図 B4 *sod2Δ*のエタノール感受性に対する還元剤の影響

WT と *sod2Δ*を 0.5% yeast extract、0.1%グルコースおよび各濃度のエタノールとアスコルビン酸を含む寒天培地に、左から  $3 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^2$ 、 $3 \times 10^1$  個の細胞を含む菌液をスポットした。28°C、3日間培養し、写真撮影した。

*sod2Δ*の方が高い感受性を示した (図 B3-B と C)。異なる作用機序で酸化作用を示す試薬の毒性は CDNB > メナジオン > パラコート の順に強くなった。

次に *sod2Δ*の酸化剤に対する感受性が ROS の蓄積によるものかを証明するため、*sod2Δ*のエタノール感受性の還元剤による回復を調べた (図 B4)。エタノールを含む培地では、エタノールが酸化的に代謝される際に ROS が生じる。分裂酵母はエタノールを唯一の炭素源とした培地では生育できないため、0.1% グルコースを添加した。*sod2Δ*は 5% エタノールに対して感受性を示すが、還元剤であるアスコルビン酸を 10 mM 添加することにより WT と同程度まで回復した。このことは *sod2Δ*の酸化剤に対する感受性が ROS の蓄積により引き起こされたものであることを示している。

### 3-2. SOD2 の経時寿命における役割

Rouxら (2006) や Chen & Runge (2009) らの方法に従って YE 培地における WT、*sod2Δ* および *sod2Δ*+SOD2 の CLS を測定した (図 B5 および Ogata *et al.*, 2016 の Fig. 1)。各菌



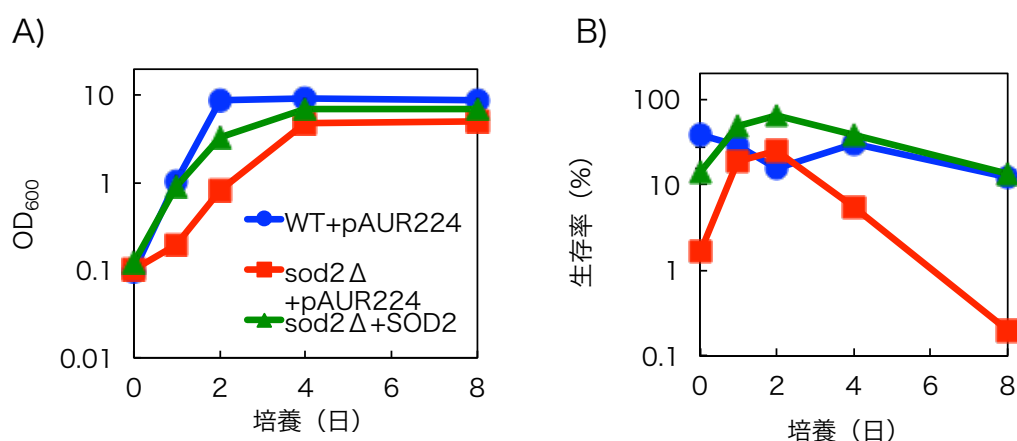


図 B5 分裂酵母 *sod2Δ* の CLS

WT、*sod2Δ* および *sod2Δ*+SOD2 をそれぞれ 1 本ずつ YE 液体培地に植菌し、材料と方法に従って CLS を測定した。A) WT、*sod2Δ* および *sod2Δ*+SOD2 の成長曲線。B) WT、*sod2Δ* および *sod2Δ*+SOD2 の生存率。各培養日数における菌液をシャーレ 3 枚に植菌し、コロニー数を計測した。生存率の平均値と標準偏差を示した (n=3)。

株の成長速度はほとんど同じで、2日目以降  $OD_{600} = \text{約}10$  で飽和点に達した。WTの生存率は緩やかに低下していき、定常期に入った直後の2日目と比べて8日目で約1桁下がった。*sod2Δ*では2日目以降著しい低下が見られ、2日目と比較して8日目で約2桁下がった。この生存率の低下はSOD2の導入によりWTと同程度まで回復した。このことから*sod2*が分裂酵母の細胞寿命の伸長に関与していることが分かった。

### 3-3. *sod2Δ*における細胞内 ROS の蓄積

*sod2Δ*の細胞内 ROS の発生を測定した (図 B6 および Ogata *et al.*, 2016 の Fig. 2)。蛍光試薬である DHE で ROS を観察した結果、WT は対数増殖期 (1 日目) でほとんど ROS の発生が見られなかったが、*sod2Δ*では DHE 陽性細胞が著しく増加した。この ROS の蓄積は SOD2 の発現により抑制された。

### 3-4. 定常期における *sod2Δ*のミトコンドリア呼吸能

次に分裂酵母の老化過程におけるミトコンドリア呼吸能の変化を MTT アッセイで調べた (図 B7 および Ogata *et al.*, 2016 の Fig. 3-D)。WT の呼吸能は定常期以降緩やかに低下していった。*sod2Δ*の呼吸能は WT よりも高い低下率を示した。ミトコンドリア呼吸

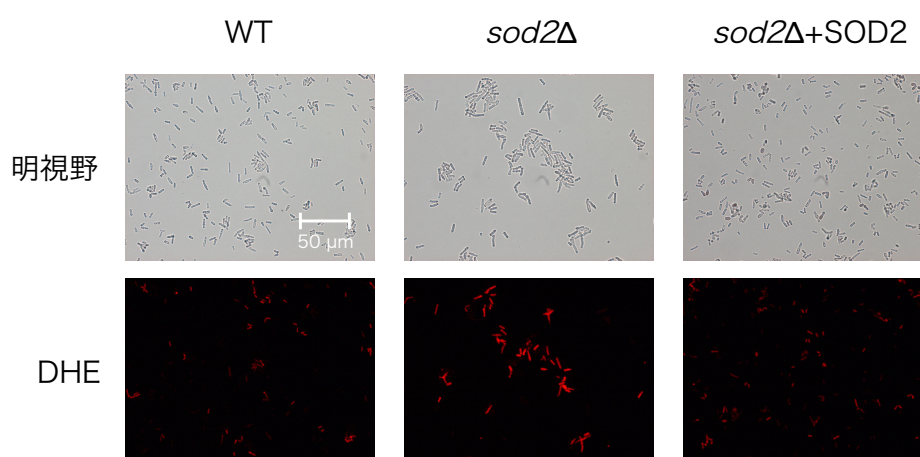


図 B6 分裂酵母細胞における ROS の発生

WT、*sod2Δ*および *sod2Δ*+SOD2 を YE 液体培地で 1 日培養した後、DHE で ROS を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。WT 明視野の右下にスケールバーを示した。

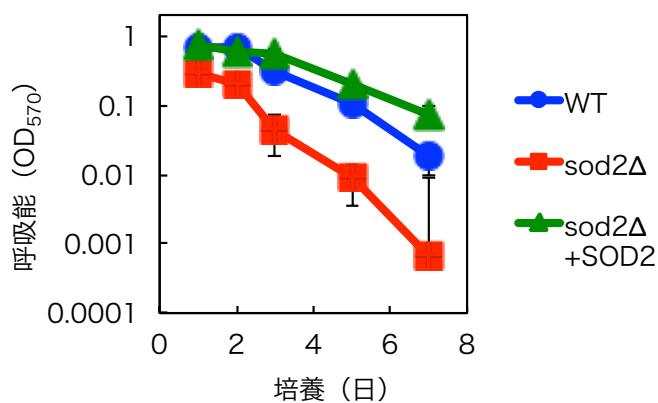


図 B7 分裂酵母 *sod2Δ* のミトコンドリア呼吸能

WT、*sod2Δ*および *sod2Δ*+SOD2 の定常期における MTT アッセイを材料と方法に従って行った。平均値と標準偏差を示した (n=3)。

能の低下も SOD2 発現プラスミドにより相補された。経時寿命過程において呼吸能を表す縦軸を対数値で示すと、生存率のグラフ (図 B5-B および Ogata *et al.*, 2016 の Fig. 1-B) とほとんど同じ形状の曲線が得られた。このことはミトコンドリア呼吸能が生存率と強い相関を持っていることが示唆される。

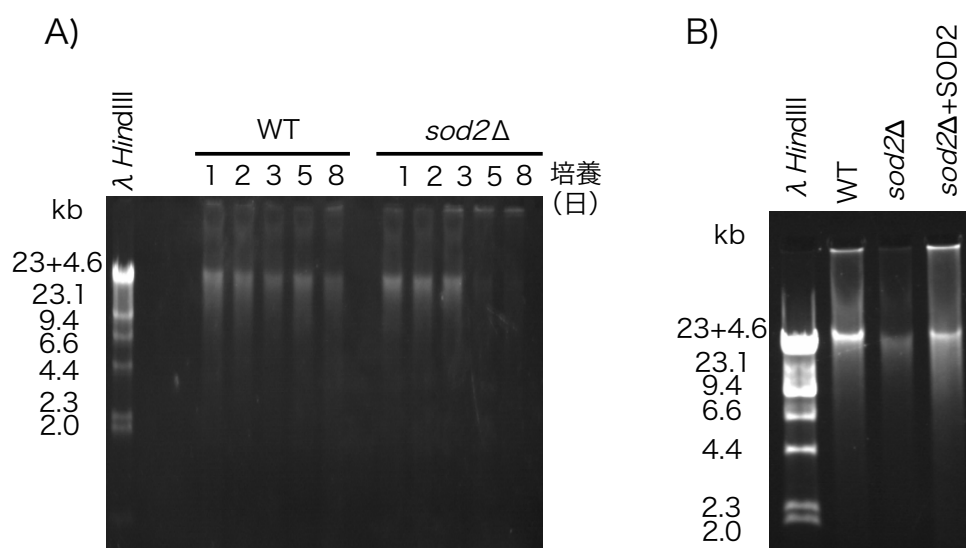


図 B8 定常期における *sod2Δ* の DNA 断片化

A) WT と *sod2Δ* の定常期細胞からゲノム DNA を抽出し、電気泳動を行った。  
 B) *sod2Δ* のゲノム DNA 断片化の相補実験。定常期（6 日目）における WT と *sod2Δ*、*sod2Δ*+SOD2 のゲノム DNA を抽出し、電気泳動を行った。

### 3-5. 定常期における *sod2Δ* の生体高分子の損傷

分裂酵母細胞の定常期に ROS が蓄積することが知られている (Roux *et al.*, 2006; Roux *et al.*, 2009)。ROS の発生は生体高分子の損傷を促進させると考えられる。DNA の損傷（二本鎖切断）を調べるため、中性条件下でアガロースゲル電気泳動を行った（図 B8 および Ogata *et al.*, 2016 の Fig. 3）。WT では経時的な変化がほとんど見られなかったが、*sod2Δ* では 5 日目以降著しい DNA の断片化が起こった。*sod2Δ*+SOD2 を用いた相補実験では、*sod2Δ* の DNA の断片化が抑制された。

次に核 DNA の突然変異率をカナバニン耐性の獲得を指標として測定した（図 B9 および Ogata *et al.*, 2016 の Fig. 3）。WT の突然変異率は、経時変化しなかった。しかし、*sod2Δ* では定常期以降著しく突然変異率が上昇した。定常期における *sod2Δ* の突然変異率の増加は SOD2 により WT と同じまで回復した。このことからミトコンドリアに局在する *sod2* の欠損が核の DNA に影響を与えていることが示された。

定常期における可溶性タンパク質を SDS-PAGE により観察した（図 B10 および Ogata *et al.*, 2016 の Fig. S3）。各菌株でゲル上部に蓄積物が経時的に増加していった。この蓄

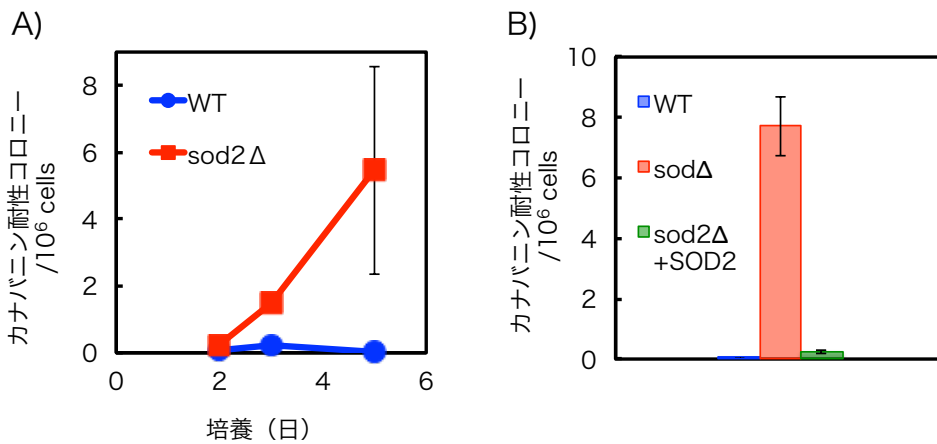


図 B9 定常期におけるゲノム DNA の突然変異率

A) WT と *sod2Δ* の経時的な突然変異率の変化を材料と方法に従って調べた。すなわち EMMG+カナバニン培地に生えたコロニー数 (突然変異菌数) を EMMG 培地に生えたコロニー数 (生菌数) で割り、生菌数 ( $10^6$  cells) 当たりの突然変異菌数を計算した。平均値と標準偏差を示した (n=3)。B) 定常期 (5 日目) における *sod2Δ* の突然変異率が SOD2 発現により相補されることを調べた。平均値と標準偏差を示した (n=3)。

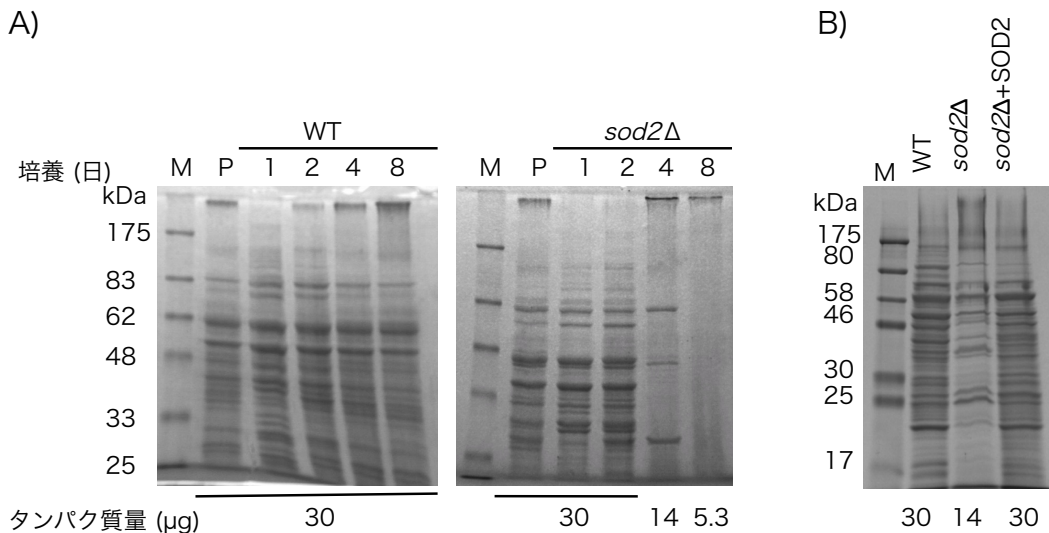


図 B10 定常期における *sod2Δ* のタンパク質分解

A) WT と *sod2Δ* の可溶性タンパク質を抽出し、12.5%ゲルで SDS-PAGE を行った。泳動したタンパク質量を写真の下に示した。プロテインマーカー (M) と 4 日目に抽出した WT のタンパク質 (P) を同時に流した。B) 定常期 (6 日目) における *sod2Δ* のタンパク質分解が SOD2 発現により相補されることを調べた。

積物はタンパク質が酸化損傷により架橋されたものであると考えられる (Berlett & Stadtman, 1997). WT では培養日数の違いによるタンパク質の分解は見られなかったが、*sod2Δ*では定常期以降著しいタンパク質の分解が起こった。4 日目では 80 kDa、55 kDa および 35 kDa のバンドのみが確認でき、8 日目にはほとんどバンドが消失した。このタンパク質の分解は SOD2 発現プラスミドの導入により抑制された。このことから定常期で蓄積した ROS によりタンパク質が損傷を受け、その後分解されたと思われる。

### 3-6. 定常期における SOD2 の活性と遺伝子発現

定常期以降 SOD2 が重要な働きをしていることが考えられるので、定常期の SOD2 活性と遺伝子発現量を測定した。活性染色により SOD2 の活性を調べた (図 B11)。その結果、SOD2 の対数増殖期での活性はほとんど見られなかったが、定常期になるにつれて活性が増加した。遺伝子発現量を RT-PCR により測定した (図 B12)。定常期における *sod2* の遺伝子発現は、対数増殖期と比べて増加した。これらのことは分裂酵母細胞が定常期に入ると何らかのシグナルにより *sod2* の転写量が増え、SOD2 が蓄積することを示す。

### 3-7. カロリー制限による *sod2Δ* の CLS の伸長

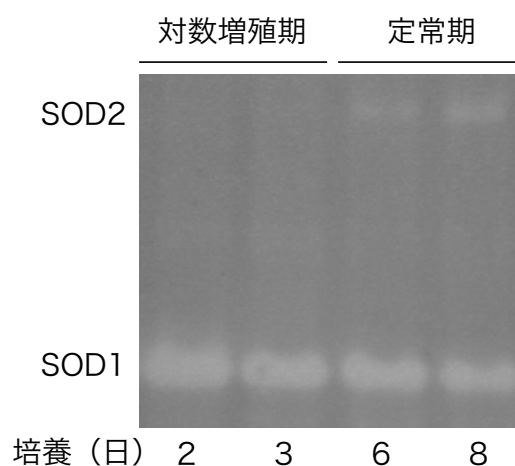


図 B11 活性染色による SOD 活性

WT のタンパク質を経時的に抽出し、材料と方法に従って活性染色により SOD1 および SOD2 の活性を測定した。泳動したタンパク質量は 50  $\mu$ g。

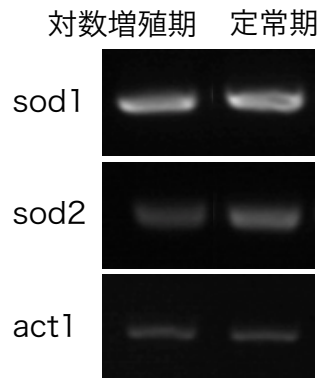


図 B12 RT-PCR による SOD の遺伝子発現

WT の RNA を経時的に抽出し、cDNA を作製した後、RT-PCR による *sod1* および *sod2* の遺伝子発現量を調べた。*act1* の発現量が同じになるように鋳型 cDNA 量を調整した。

カロリー制限は様々な生物の寿命を伸長することが知られている (Wei *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008; Colman *et al.*, 2009)。分裂酵母でもカロリー制限による CLS の延長が報告されている (Chen & Runge, 2009)。通常 3% のグルコースを含む YE 培地で培養するが、カロリー制限を行うため 0.3% のグルコースを含む YE 培地で CLS を測定した (図 B13)。3% グルコースでは *sod2Δ* の生存率は 2 日目と比較して 8 日目に約 2 桁低下した。しかしカロリー制限条件下では生存率が約 20% までしか低下しなかった。したがって *sod2* 欠損株でもカロリー制限によって寿命の伸長が起こることが分かった。

### 3-8. 定常期における *sod2Δ* のカスパーゼの活性化

ROS や DNA 損傷がミトコンドリアやチェックポイント制御を介してアポトーシスを引き起こしていることが考えられる。分裂酵母の細胞内の脂質代謝や経時老化中に引き起こされる細胞死はカスパーゼ様酵素によるアポトーシス様細胞死メカニズムが関わっていることが知られている (Roux *et al.*, 2006; Low & Yang, 2008; Lin & Austriaco, 2014)。カスパーゼ阻害剤 FITC-VAD-fmk は活性化カスパーゼと結合するので、アポトーシスの *in situ* マーカーとして用いることができる (Jayaraman, 2003)。そこで *sod2Δ* の定常期におけるアポトーシスの誘導を調べた (図 B14)。WT では 1 日目と 2 日目で活性化カスパーゼの増加は見られなかった。*sod2Δ* では 2 日目に活性化カスパーゼの増加が確認できた。このことは定常期に入ってすぐに *sod2Δ* で活性化カスパーゼによるアポ

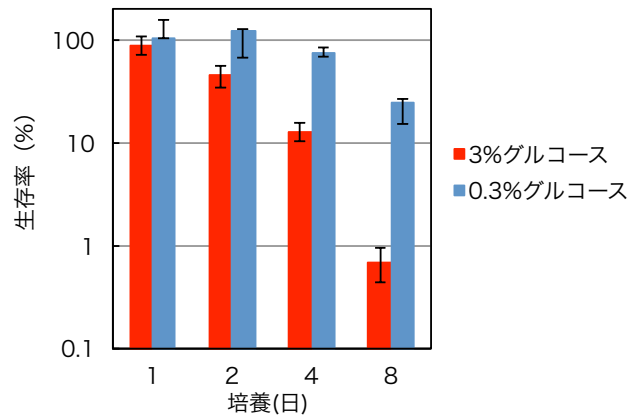


図 B13 *sod2Δ* の CLS のカロリー制限による影響

0.3%または3%グルコースを含む YE 培地で *sod2Δ* を培養し、CLS を測定した。各培養日数における菌液をシャーレ 3 枚に植菌し、コロニー数を計測した。生存率の平均値と標準偏差を示した。

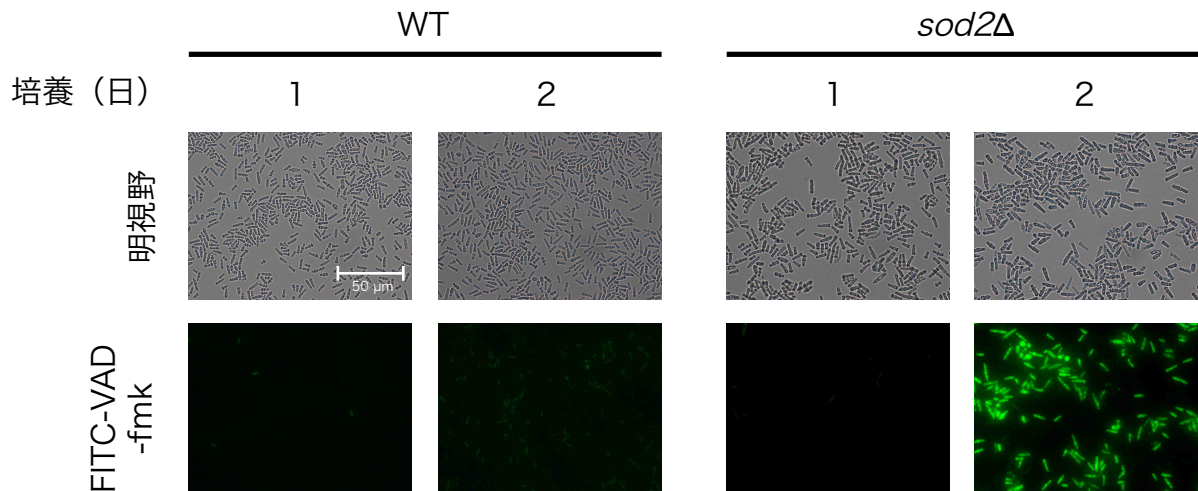


図 B14 定常期の *sod2Δ* におけるカスパーゼの活性化

WT と *sod2Δ* の対数増殖期 (1 日目) と定常期初期 (2 日目) におけるカスパーゼの活性化を FITC-VAD-fmk による蛍光顕微鏡観察で調べた。WT 明視野 1 日目の右下にスケールバーを表示した。

トーンシスが強く誘導されていることを示している。

#### 4. 考察

SOD2 は全ての真核生物のミトコンドリアに局在する ROS 消去系酵素で、多くのモデル



生物においてその酵素の欠損株は細胞の外から添加した種々の酸化剤に対して著しい感受性を示すことが知られている (Van Raamsdonk & Hekimi, 2009; Duttaroy *et al.*, 2003)。本研究でも分裂酵母の *sod2Δ* が WT に比べて大量の ROS を蓄積することを観察し、パラコートやメナジオンに対する感受性 (Kiuchi *et al.*, 2010) を再現できた。さらに GSH と結合し ROS の消去を阻害する CDNB にも感受性を示すことを見出した。アスコルビン酸は *sod2Δ* のエタノール感受性を回復させるので、SOD2 の欠損を還元剤が効果的に回復させることが出来る。これらの結果は、本研究で用いた分裂酵母の SOD2 欠損株が他の生物と同様な表現型を表すことを示している。

出芽酵母やハエ、マウスなどのモデル生物において *sod2* 欠損株はその CLS を短縮させる (Wawryn *et al.*, 1999; Duttaroy *et al.*, 2003; Lebovitz *et al.*, 1996)。分裂酵母においても WT と比べて著しく低下していた (図 B5)。この寿命の低下は SOD2 発現プラスミドの導入により回復したので、CLS の短縮は *sod2* の欠損によるものである。分裂酵母の WT では定常期になると ROS が蓄積することが知られており (Roux *et al.*, 2009)、細胞内で生じた ROS は生体高分子に損傷を与え、老化を引き起こすと考えられる。ミトコンドリアの呼吸鎖の欠損変異株において CLS の低下が見られ、その変異株では細胞内の ROS 発生量が上昇し、抗酸化剤の添加により低下した CLS が回復した (Zuin *et al.*, 2008)。また、細胞内の主な SOD 活性を担う *sod1* の欠損により CLS が低下することから (Mutoh & Kitajima, 2007)、分裂酵母の CLS は ROS の蓄積とも関連していると推察される。*sod2Δ* においても ROS が蓄積し、CLS が WT よりも短縮することが予測される。定常期において自然発生した  $O_2^-$  が蓄積したことにより生体分子 (DNA やタンパク質) が損傷を受ける。実際に *sod2Δ* の DNA や可溶性タンパク質は定常期後半に著しい損傷を受けて分解された。定常期の *sod2Δ* で核の突然変異率が上昇したので、*sod2* は核 DNA の維持にも働いていると考えられる。カスパーゼ様酵素によるアポトーシスの誘導は分裂酵母でも起こる (Roux *et al.*, 2006; Low & Yang, 2008; Lin & Austriaco, 2014)。アポトーシスの起こった細胞では核の濃縮や細胞の収縮および DNA の断片化が起きることが知られている。*sod2Δ* では対数増殖期 (1 日目) と比較して定常期直後 (2 日目) のカスパーゼの活性化が強くなった。一方、DNA の断片化は CLS の低下とともに起こる。したがって DNA の断片化はアポトーシスによって引き起こされた細胞死の結果であると推察される。



本研究において分裂酵母の定常期に *sod2* の遺伝子発現が強く誘導され、SOD2 活性が上昇することを見出した。SOD2 の発現調節に関わる経路として *sty1* 経路が考えられる (Jeong *et al.*, 2001)。*sty1* 経路では ROS による酸化ストレスから *wis1* や *sty1* を段階的に活性化することで最終的に *sod2* の遺伝子発現を調節している可能性がある (Zuin *et al.*, 2010; Toone *et al.*, 1998)。WT で *sod2* の遺伝子誘導が定常期以降強くなったのは、経時的に蓄積した ROS により *sty1* 経路が働き *sod2* の発現を調節しているからと考えられる。カロリー制限条件下において多くの生物で寿命が伸長するという報告がされている (Wei *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008; Colman *et al.*, 2009)。分裂酵母でもグルコースシグナル経路が抗老化作用を示すことが分かっている (Roux *et al.*, 2010)。経路の流れとして、まずグルコースの供給により Git3 膜受容体が G タンパク質である Gpa2 を活性化する。Gpa2 タンパク質は次に Git2/Cyr1 アデニル酸シクラーゼを活性化する。それにより生成される cAMP を介して Pka1 シグナルのスイッチが入り寿命が負に調節される。Git3/Pka1 経路はストレス耐性やミトコンドリア呼吸能の減少や経時寿命の促進の原因となる。カロリー制限条件下 (0.3% グルコース) において *sod2Δ* の CLS は回復した (図 B13 と Ogata *et al.*, 2016 の Fig. 5)。またカロリー制限により ROS の蓄積が抑制されることも知られており (Roux *et al.*, 2009)、カロリー制限は定常期における ROS の発生を抑えることで *sod2Δ* の CLS を伸長させていると推察された。

## 5. 引用文献

- Belluzzi E, Bisaglia M, Lazzarini E, Tabares LC, Beltramini M, Bubacco L. (2012) Human SOD2 modification by dopamine quinones affects enzymatic activity by promoting its aggregation: possible implications for Parkinson's disease. *PLoS One* 7: e38026.
- Berlett BS & Stadtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 20313-6.
- Chen BR & Runge KW (2009) A new *Schizosaccharomyces pombe* chronological lifespan assay reveals that caloric restriction promotes efficient cell cycle exit and extends longevity. *Exp Gerontol* 44: 493-502.
- Chen YR & Zweier JL (2014) Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res* 114: 524-37.
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325: 201-4.
- Duttaroy A, Paul A, Kundu M, Belton A (2003) A Sod2 null mutation confers severely reduced adult life span in *Drosophila*. *Genetics* 165: 2295-9.
- Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64: 97-112.
- Hida Y & Ikeda S (2008) Base excision repair of oxidative DNA damage in a catalase-deficient mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Environ* 30: 86-91.
- Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A (1999) Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 332-9.
- Jayaraman S (2003) Intracellular determination of activated caspases (IDAC) by flow cytometry using a pancaspase inhibitor labeled with FITC. *Cytometry A* 56: 104-12.
- Jeong JH, Kwon ES, Roe JH (2001) Characterization of the manganese-containing superoxide dismutase and Its gene regulation in stress response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 908-14.
- Kiuchi T, Moriuchi S, Ikeda S (2010) Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutases in protecting cells against oxidative stress. *Curr Top Genet* 4: 65-9.
- Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM (1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial

- superoxide dismutase-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 9782-7.
- Lin SJ & Austriaco N (2014) Aging and cell death in the other yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans*. FEMS Yeast Res 14: 119-35.
- Low CP & Yang H (2008) Programmed cell death in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Biochim Biophys Acta 1783: 1335-49.
- Mutoh N, Nakagawa CW, Yamada K (2002) Characterization of Cu, Zn-superoxide dismutase-deficient mutant of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Curr Genet 41: 82-8.
- Mutoh N & Kitajima S (2007) Accelerated chronological aging of a mutant fission yeast deficient in both glutathione and superoxide dismutase having cu and zn as cofactors and its enhancement by sir2 deficiency. Biosci Biotechnol Biochem 71: 2841-4
- Nomiyama T, Tanaka Y, Piao L, Nagasaka K, Sakai K, Ogihara T, Nakajima K, Watada H, Kawamori R (2003) The polymorphism of manganese superoxide dismutase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. J Hum Genet 48: 138-41.
- Ogata T, Senoo T, Kawano S, Ikeda S (2016) Mitochondrial superoxide dismutase deficiency accelerates chronological aging in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Cell Biol Int 40: 100-6.
- Pelloquin L, Belenguer P, Menon Y, Ducommun B (1998) Identification of a fission yeast dynamin-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance. Biochem Biophys Res Commun 251: 720-6.
- Van Raamsdonk JM & Hekimi S. (2009) Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet 5: e1000361
- Van Raamsdonk JM & Hekimi S (2012) Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. Proc Natl Acad Sci USA 109: 5785-90.
- Roux AE, Quissac A, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA (2006) Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. Aging Cell 5: 345-57.
- Roux AE, Leroux A, Alaamery MA, Hoffman CS, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA (2009) Pro-aging effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast. PLoS genetics 5: e1000408.
- Roux AE, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA (2010) Fission yeast and other yeasts as emergent models to unravel cellular aging in eukaryotes. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 65: 1-8.

- Smith ED, Kaeberlein TL, Lydum BT, Sager J, Welton KL, Kennedy BK, Kaeberlein M (2008) Age- and calorie-independent life span extension from dietary restriction by bacterial deprivation in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Dev Biol* 8: 49.
- Tamura S, Wada C, Hase A, Kanamitsu K, Ikeda S (2010) A simple growth test of a *Saccharomyces cerevisiae* Cu, Zn- superoxide dismutase-deficient mutant in hypertonic medium for biological evaluation of antioxidants. *Food Sci Technol Res* 16: 267-72.
- Toone WM, Kuge S, Samuels M, Morgan BA, Toda T, Jones N (1998) Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes Dev* 12: 1453-63.
- Wawryn J, Krzepiłko A, Myszka A, Biliński T (1999) Deficiency in superoxide dismutases shortens life span of yeast cells. *Acta Biochim Pol* 46: 249-53.
- Wei M, Fabrizio P, Hu J, Ge H, Cheng C, Li L, Longo VD (2008) Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genet* 4: e13.
- Zuin A, Gabrielli N, Calvo IA, Garcia-Santamarina S, Hoe KL, Kim DU, Park HO, Hayles J, Ayte J, Hidalgo E (2008) Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast. *PLoS One* 3: e2842.
- Zuin A, Carmona M, Morales Ivorra I, Gabrielli N, Vivancos AP, Ayte J, Hidalgo E (2010) Lifespan extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway. *EMBO J* 29: 981-91.
- 木内泰志 (2008) 分裂酵母のラジカル消去系酵素と DNA 修復酵素による酸化ストレス防御系の解析 岡山理科大学大学院 修士論文

## 第 2 章

### DNA 修復酵素の細胞寿命に果たす役割

## 1. 序論

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 (De Bont & van Larebeke, 2004; Swenberg *et al.*, 2011)。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。研究の背景で述べたように真核生物の主な DNA 修復経路には BER、NER、ミスマッチ修復や組換え修復などがあげられる。内的要因による DNA 損傷は、代謝により生じる ROS が原因であると考えられる。

ROS により生じた小さい塩基損傷 (AP サイトや一本鎖切断など) は BER 経路が主に修復している (Bauer *et al.*, 2015)。BER 活性は老化に伴い低下するので、老化における DNA の変異や損傷の蓄積に関わっている可能性がある (Gorbunova *et al.*, 2007; Maynard *et al.*, 2009)。NER 経路は CPD や 6-4PP のようなかさばった損傷だけでなく、ROS による小さな酸化 DNA 損傷にも働くことが示された (Pascucci *et al.*, 2011; Melis *et al.*, 2013)。NER 遺伝子の多様な変異は老化の表現型を急激に促進させると考えられる (Gorbunova *et al.*, 2007; Menck & Munford, 2014; Marteiijn *et al.*, 2014)。

真核生物であ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 (Fleck, 2004; Kanamitsu & Ikeda, 2010; Skoneczna *et al.*, 2015)。分裂酵母の BER 酵素である Nth1p と Apn2p はその修復過程において重要な役割を持っている (図 A4)。Nth1p は分裂酵母唯一の二価性 DNA グリコシラーゼであり、チミングリコールや 5-ヒドロキシシトシンのような酸化塩基を処理することができる (Karahalil *et al.*, 1998; Yonekura *et al.*, 2007)。nth1 欠損株がアルキル化損傷剤のメチルメタンスルホン酸 (MMS) に対して高感受性を示し、nth1 と他の BER 遺伝子とのエピスタシス解析において、Nth1p は自然にまたは 1 価性 DNA グリコシラーゼなどによって生じた AP サイトにも重要な働きを持っていることが示された (Alseth *et al.*, 2004; Sugimoto *et al.*, 2005; Kanamitsu *et al.*, 2007)。Nth1p はこれらの損傷を  $\beta$  脱離反応によって切断し、3' ブロック末端を生じさせる。Apn2p は主要な AP エンドヌクレアーゼであり、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和アルデヒドのような 3' -ブロック末端の修復に作用するが、AP サイトの切断には働かない (Nth1p-依存性 BER) (Alseth *et al.*, 2004; Sugimoto *et al.*, 2005)。Apn2 欠損株はブレオマイシンの類似体であるゼオシンに対して中程度の感受性を示し、また、自然突然変異率の上昇が見られた (Ribar *et al.*, 2004; Tanihigashi *et al.*, 2006;

Fraser *et al.*, 2003)。一方、分裂酵母の NER 酵素は他の生物と同様に DNA の UV 光産物の修復に重要な役割を持っている (図 A5)。しかし、*rad16* や *rad13*、*rhp14*、*rhp41*、*rhp26* などの NER 欠損株は MMS に対して中程度の感受性を示し、分裂酵母においてアルキル化損傷 DNA が通常 BER で修復されるが、NER もこの損傷の回復に貢献していることが示唆された (Memisoglu & Samson, 2000、Osman *et al.*, 2003、Kanamitsu & Ikeda, 2011)。いくつかの NER 酵素が AP サイトや 3' ブロック末端のような BER 中間体を処理することが見出され、BER と NER の間に相互作用があることが示された (Alseth *et al.*, 2005; Kanamitsu & Ikeda, 2011; Sakurai *et al.*, 2015)。分裂酵母には NER 酵素とは別の経路に属していることが知られている UV エンドヌクレアーゼ (*uve1*) が存在するが、*uve1* は UV 損傷だけでなく酸化損傷の修復にも関わっている (McCready *et al.*, 2000; Avery *et al.*, 1999; Fraser *et al.*, 2003)。

研究の背景で述べたように、出芽酵母や分裂酵母のような単細胞真核生物は寿命経路や分子機構の研究によく用いられている (Roux *et al.*, 2010; Longo *et al.*, 2012; Lin & Austriaco, 2014; Mirisola *et al.*, 2014)。分裂酵母において寿命に影響を与える遺伝子が発見されており、これらの遺伝子は栄養シグナル、ストレス応答、ミトコンドリア活性および ROS に対する防御に関わっていると考えられる (Roux *et al.*, 2010; Lin & Austriaco., 2014)。これらの遺伝子は低グルコース濃度 (カロリー制限) 条件下における CLS の延長にも深い関わりを持っていることが示唆された (Chen & Runge, 2009; Roux *et al.*, 2009; Zuin *et al.*, 2010)。分裂酵母において DNA 修復機構は経時老化におけるゲノムの維持に重要な働きを持っていると考えられるが、DNA 修復の欠損による老化への影響ははっきりと分かっていない。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。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 菌株と培地および CLS の測定

表 C1 に示した分裂酵母の各菌株を用いた。*uve1Δ/rad16Δ* は、*uve1Δ* 株に *rad16::kanMX6* 破壊カセット (Kanamitsu *et al.*, 2007) を導入して *rad16* を欠損させたものを使用した。完全培地として YE 培地 (0.5% yeast extract、3% グルコース) に 3x (225 μg/mL) のアデニン、ロイシン、ウラシルを加えた培地 (YES 3x) を用いた。最少培地として SD

表 C1. 本研究で用いた菌株

菌株名	遺伝子型	由来
FY7507	<i>h<sup>-</sup></i>	YGRC <sup>a</sup>
ED0665	<i>h<sup>-</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	ATCC No. 96993
ED0668	<i>h<sup>+</sup> ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	ATCC No. 96994
HT02	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-D18 mag1::ura4<sup>+</sup> mag2::ura4<sup>+</sup></i>	Kanamitsu et al. 2007
TS01	<i>h<sup>-</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 nth1::ura4<sup>+</sup></i>	Sugimoto et al. 2005
AY01	<i>h<sup>-</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 apn2::ura4<sup>+</sup></i>	Sugimoto et al. 2005
KK01	<i>h<sup>-</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 rad16::kanMX6</i>	Kanamitsu et al. 2007
KK04	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-D18 rad16::kanMX6 mag1::ura4<sup>+</sup> mag2::ura4<sup>+</sup></i>	Kanamitsu et al. 2007
AM01	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-D18 nth1::ura4<sup>+</sup> rad16::kanMX6</i>	Kanamitsu & Ikeda 2011
AM02	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-D18 apn2::ura4<sup>+</sup> rad16::kanMX6</i>	Kanamitsu & Ikeda 2011
AY02	<i>h<sup>-</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 uve1::ura4<sup>+</sup></i>	Tanihigashi et al. 2006
AM03	<i>h<sup>-</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 uve1::ura4<sup>+</sup> rad16::kanMX6</i>	本研究

<sup>a</sup>YGRC: Yeast Genetic Resource Center

培地 (0.67% Difco Nitrogen Base w/o Amino acids、3% グルコース) に 3x (225 µg/mL) のアデニン、ロイシンおよびウラシルを加えた培地 (SD 3x) を用いた。寒天培地には 2%の Agar を含む YES 1x (75 µg/mL のアデニン、ロイシン、ウラシル) 培地を使用した。菌株を初期吸光度 OD<sub>600</sub>=0.1 になるように YES 3x 培地に加え培養した。各培養日数における OD<sub>600</sub> の測定、コールターカウンターによる菌数測定および CFU を計測した。CFU は第 1 章で述べた方法に従って測定した。

## 2-2. DNA の断片化と突然変異率の測定

DNA の抽出と中性アガロースゲル電気泳動、および突然変異率の測定は第 1 章で述べた方法に従って行った。

## 2-3. PCR によるゲノム DNA の損傷の定量

鋳型 DNA は Gen とるくんで抽出し、Qubit dsDNA BR assay kit で DNA 濃度を定量した。標的 DNA は KOD FX Neo (TOYOBO) で増幅させた。プライマーは 5' -GCA GAC AAG AAG CAT



CGA CGT CGT G-3' と 5' -GCT GTG TCT TTA CAC AAT GCC GAG TTC C-3' を用いた。PCR 反応 (25  $\mu$ L) は 1 x PCR buffer for KOD FX Neo、0.4 mM each dNTP、0.15  $\mu$ M each Fw, Rv プライマー、1 ng 鋳型 DNA、0.5 units KOD FX Neo で行った。PCR サイクルは、98°C 2 min  $\rightarrow$  【98°C 10 sec  $\rightarrow$  63°C 30 sec  $\rightarrow$  68°C 10 min】 (x 25 cycle) で行った。PCR 産物は Qubit で定量した。相対的増幅量は、損傷サンプル ( $A_D$ ) とコントロールサンプル ( $A_C$ ) の増幅量で計算した。増幅断片当たりの損傷率は、ポアソン分布を元に計算した (損傷/増幅断片 =  $-\ln(A_D/A_C)$ ) (Furda *et al.*, 2014)。PCR によるミトコンドリア DNA (mtDNA) の損傷の定量については結果の項目に記述した。

#### 2-4. ROS とカスパーゼ活性の蛍光顕微鏡による観察

ROS の観察には蛍光試薬として DHE および dihydrorhodamine123 (DHR123、Thermo Fisher Scientific) を用いた。菌株を YES 3x 培地で培養し、各培養日数に  $1 \times 10^7$  cells の培養液に終濃度 30  $\mu$ M DHR123 または終濃度 5  $\mu$ M DHE になるように加え 28°C、30 min ロータリーミキサーで懸濁しながらインキュベートした。遠心後、上清を捨て 1 x PBS で 3 回洗浄した。1 x PBS で再懸濁し同量の 80%グリセロールを加え、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS DP50) で観察した。カスパーゼ活性の観察は、第 1 章に述べたように FITC-VAD-fmk を用いて行った。40 倍の対物レンズで DHR123 と FITC-VAD-fmk は緑色フィルターを DHE は赤色フィルターを用いた。蛍光試薬を加えていない菌液を同時に観察し、自家蛍光が無い条件で蛍光観察を行った。

#### 2-5. タンパク質の抽出と SDS-PAGE

各菌株を YES 3x 培地で培養し、 $OD_{600}$  を測定した。 $4 \div OD_{600}$  を計算し、その mL 数の菌液から集菌した。4 x SDS-PAGE 用サンプリングバッファーを 4 倍希釈し、菌体に 30  $\mu$ L 加え、3 min 煮沸した。同量のジルコニアビーズを加え、2 min ボルテックスで懸濁した。1x サンプリングバッファーを 75  $\mu$ L 加え、さらに 1 min 懸濁した。2 min 煮沸し、遠心後の上澄みをタンパク質サンプルとして使用した。タンパク質を 12.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。CBB Stain One により 30 min 染色し、蒸留水で一晩脱色後、写真撮影をした。

### 3. 結果

#### 3-1. 分裂酵母 DNA 修復欠損株の CLS

分裂酵母 DNA 修復欠損株を YES 3x 培地で培養し、定常期以降の培養期間の生存率をもとに CLS を測定した。DNA 修復欠損株は栄養要求性細胞 (*ade-*, *leu-*, *ura-*) を親株として作製したので (表 C1)、まず栄養要求性の違いによる CLS への影響を調べた。その結果、原栄養要求性株 (FY7507)、アデニン、ロイシン、ウラシルを要求する株 (ED0665) およびアデニン、ロイシンを要求する株 (FY6839) の CLS は調べた限りの期間において同じであった (図 C1 および Senoo *et al.*, 2017 の Fig. S1)。したがって、YES 3x 培地において栄養要求性の変異が定常期における寿命に影響を与えないことが示された。

分裂酵母の BER および NER 欠損株として、DNA グリコシラーゼ/AP リアーゼ活性を持つ *nth1* とヒト XPF のホモログである *rad16* の遺伝子を破壊した株を用いた。これらの単独欠損株 (*nth1Δ* と *rad16Δ*) と二重欠損株 (*nth1Δ/rad16Δ*) は好氣的環境下での YES 3x 培地において WT (ED0665) と同程度の成長を示した (図 C2-A および Senoo *et al.*, 2017 の Fig. 1-A)。培養 2 日後に WT と DNA 修復欠損株の細胞は  $OD_{600} =$  約 10、コールターカウンターによる細胞数が  $3\sim 4 \times 10^7$  cells/mL となり飽和点に達した。WT と DNA 修復欠損株の長期培養中の pH とグルコース濃度を測定した (図 C3 および Senoo *et al.*, 2017 の Fig. S2)。これらの菌株間での培地中の pH やグルコース濃度変化の大きな違いは見られなかった。したがって、DNA 修復の欠損は通常条件でのエネルギー代謝や成長に影響

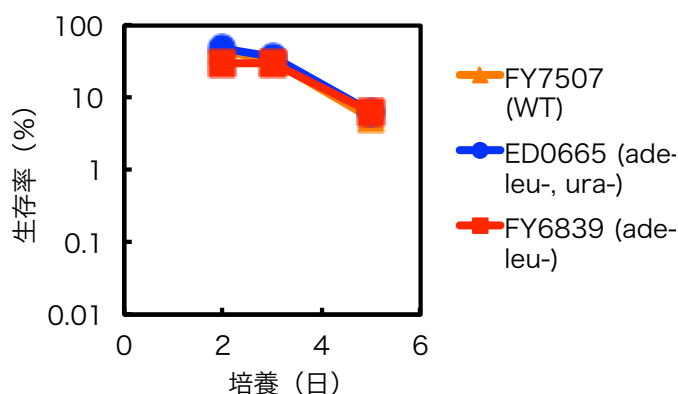


図 C1 栄養要求性による CLS への影響

栄養要求性の異なる分裂酵母菌株の YES 3x 培地における CLS を材料と方法に従って測定した。各培養日数における菌液をシャーレ 3 枚に植菌し、コロニー数を計測した。生存率の平均値と標準偏差を示した ( $n=3$ )。

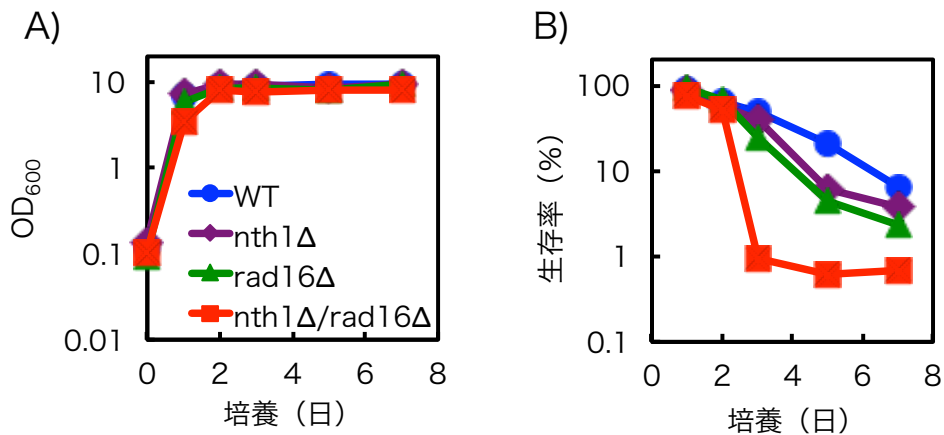


図 C2 DNA 修復酵素欠損株の CLS

WT と BER 酵素 (*nth1*) と NER 酵素 (*rad16*) の単独および二重欠損株の YES 3x 培地における CLS を測定した。A) WT、*nth1*Δ、*rad16*Δ および *nth1*Δ/*rad16*Δ の成長曲線を示した。B) WT、*nth1*Δ、*rad16*Δ および *nth1*Δ/*rad16*Δ の生存率を示した。各培養日数における菌液をシャーレ 3 枚に植菌し、コロニー数を計測した。生存率の平均値と標準偏差を示した (n=3)。

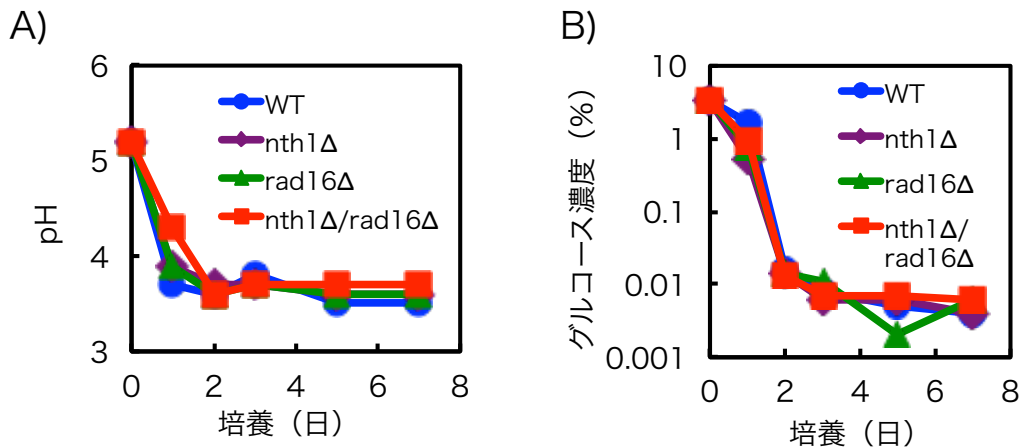


図 C3 DNA 修復酵素欠損株の培養中の pH とグルコースの変化

WT、*nth1*Δ、*rad16*Δ および *nth1*Δ/*rad16*Δ の培養液中の pH (A) とグルコース濃度 (B) を測定した。pH の測定にはコンパクト pH メーター B-712 (堀場製作所) を用いた。グルコース濃度測定にはポータブルグルコースメーター-501-H (フナコシ) にエタノール耐性センサーカートリッジ GF-501-S (AL) を装着して使用した。典型的な測定例を示した。

響を与えないと考えられる。WT と DNA 修復欠損株の MMS に対する感受性を調べた (図 C4)。WT ではほとんど感受性を示さなかったが、*nth1*Δ/*rad16*Δ では高い感受性を示した。*nth1*Δ/*rad16*Δ では単独欠損株よりもさらに強い感受性を示した。これは以前の研究と同

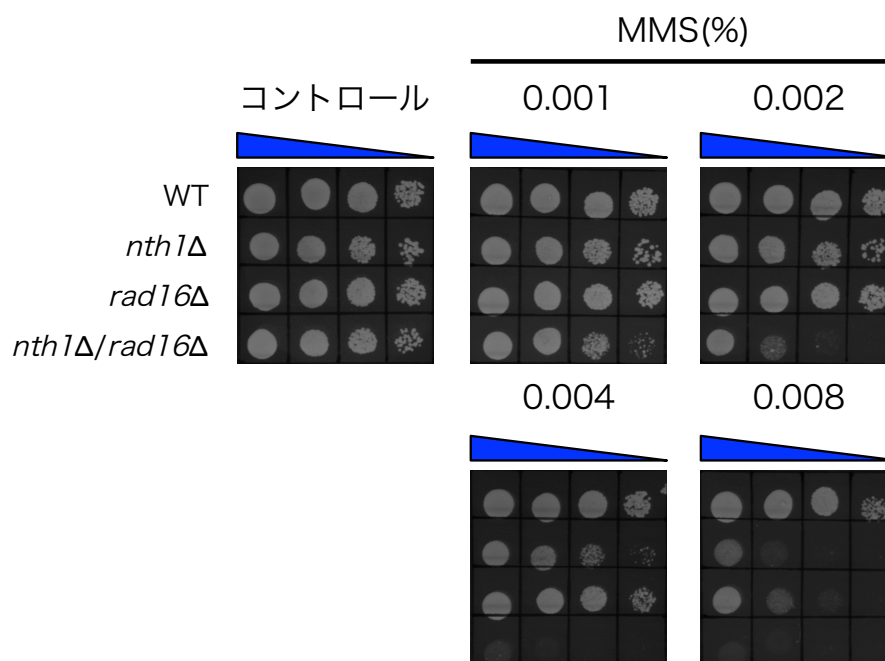


図 C4 DNA 修復欠損株のメチルメタンスルホン酸 (MMS) 感受性

WT、*nth1Δ*、*rad16Δ*および *nth1Δ/rad16Δ*を各濃度の MMS を含んだ YE 寒天培地にスポットした。左から  $3 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^2$ 、 $3 \times 10^1$  個の細胞を含む菌液をスポットした。28°C、3 日間培養し、写真撮影した。

様の結果であり (Kanamitsu *et al.*, 2007)、これらの DNA 修復欠損株を用いることで細胞老化の性状解析を行うことができると考えられる。

WT と DNA 修復欠損株を用いた CLS アッセイにおいて、WT の生存率は定常期以降緩やかに減少していった (図 C2-B および Senoo *et al.*, 2017 の Fig. 1-B)。 *nth1Δ* および *rad16Δ* の CLS は WT よりもわずかに短縮していた。しかし、*nth1Δ/rad16Δ* は定常期以降著しい生存率の減少が見られた。DNA 修復欠損株を SD 3x 培地で培養した場合でも *nth1Δ/rad16Δ* で老化が促進されることを観察した (図 C5-B および Senoo *et al.*, 2017 の Fig. S1-B)。これらの結果は、*nth1* と *rad16* が定常期の細胞の生存に協調的に働いていることを示唆している。

### 3-2. 定常期における BER と NER の協調的貢献

酵母の寿命における DNA 修復経路の役割を研究するため、いくつかの BER 欠損株およびそれらの *rad16* との二重欠損株の CLS を測定した。BER 遺伝子として 3-メチルアデニ

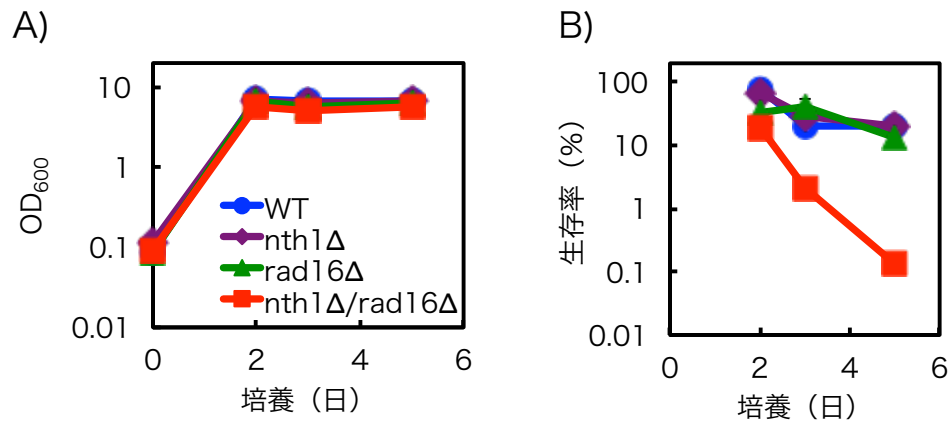


図 C5 培地の違いによる CLS への影響

WT および各欠損株の SD 3x 培地における CLS を測定した。A) WT、*nth1Δ*、*rad16Δ* および *nth1Δ/rad16Δ* の成長曲線を示した。B) WT、*nth1Δ*、*rad16Δ* および *nth1Δ/rad16Δ* の生存率を示した。各培養日数における菌液をシャーレ 3 枚に植菌し、コロニー数を計測した。生存率の平均値と標準偏差を示した (n=3)。

ングリコシラーゼをコードしている 2 つのパラログ *mag1* と *mag2* (Kanamitsu *et al.*, 2007; Dalhus *et al.*, 2013)、AP エンドヌクレアーゼ/3' -ホスホジエステラーゼ活性を持つ *apn2* (Ribar *et al.*, 2004; Alseth *et al.*, 2004; Sugimoto *et al.*, 2005) および UV エンドヌクレアーゼをコードしているが DNA の酸化損傷にも関わっている *uve1* (Avery *et al.*, 1999; Fraser *et al.*, 2003) を選んだ。全ての変異株は YES 3x 培地において WT と同程度まで成長し、OD<sub>600</sub> = 約 10 で飽和点に達した。培養 5 日目 (定常期後期) の生存率を 2 日目 (定常期初期) の生存率と比較した (図 C6 および Senoo *et al.*, 2017 の Fig. 2)。全ての BER 単独欠損株の生存率は WT と *rad16Δ* の間にあった。しかし、*apn2Δ/rad16Δ* の定常期後期の生存率は著しく減少し、*nth1Δ/rad16Δ* よりも低くなった。*mag1Δ/mag2Δ* と *uve1Δ* の *rad16* 欠損はそれらの CLS にあまり影響を与えなかった。これらの結果から、Nth1p と Apn2p は経時老化における内的 DNA 損傷の修復に重要な役割を持っていることが推察された。

### 3-3. 定常期における DNA 修復欠損株の ROS の蓄積

分裂酵母では定常期に代謝により ROS が蓄積することが知られている (Roux *et al.*, 2006; Roux *et al.*, 2009)。定常細胞の ROS の観察は蛍光試薬のジヒドロローダミン 123

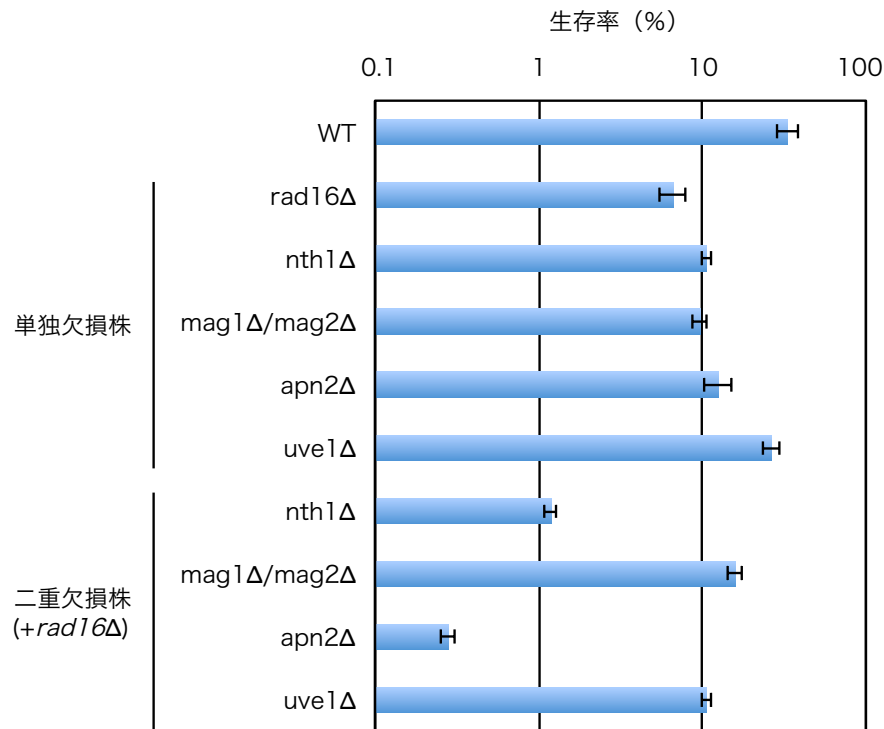


図 C6 BER と NER の欠損による CLS への影響

WT、*rad16Δ*および種々の BER 酵素欠損株の単独および *rad16Δ*との二重欠損株を YES 3x 液体培地で培養し、CLS を測定した。2 日目と 5 日目の生存率を測定し、2 日目を 100%とした時の 5 日目の生存率で表した。各培養日数における菌液をシャーレ 3 枚に植菌し、コロニー数を計測した。生存率の平均値と標準偏差を示した (n=3)。

(DHR123) とジヒドロエチジン (DHE) を用いた (図 C7 および Senoo *et al.*, 2017 の Fig. 3)。DHR123 はペルオキシダーゼ存在下でパーオキシナイトライトや過酸化水素を活性化させ、DHE 染色は  $O_2^-$  を特異的に検出する (McBride *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001)。WT では 1 日目 (対数増殖期) と比較して 3 日目 (定常期) に ROS の蓄積が見られた。DHR123 と DHE で ROS 陽性細胞数の違いはあまり見られなかった。*nth1Δ/rad16Δ* は定常期において WT よりも ROS が多く発生していた。これらのことは、分裂酵母において細胞内での ROS の蓄積と経時老化に相関関係があることを示唆している。

### 3-4. ゲノムおよびミトコンドリア DNA 損傷の qPCR による定量法の開発

分裂酵母の定常期におけるゲノム DNA および mtDNA の損傷の検出は、老化過程を理解

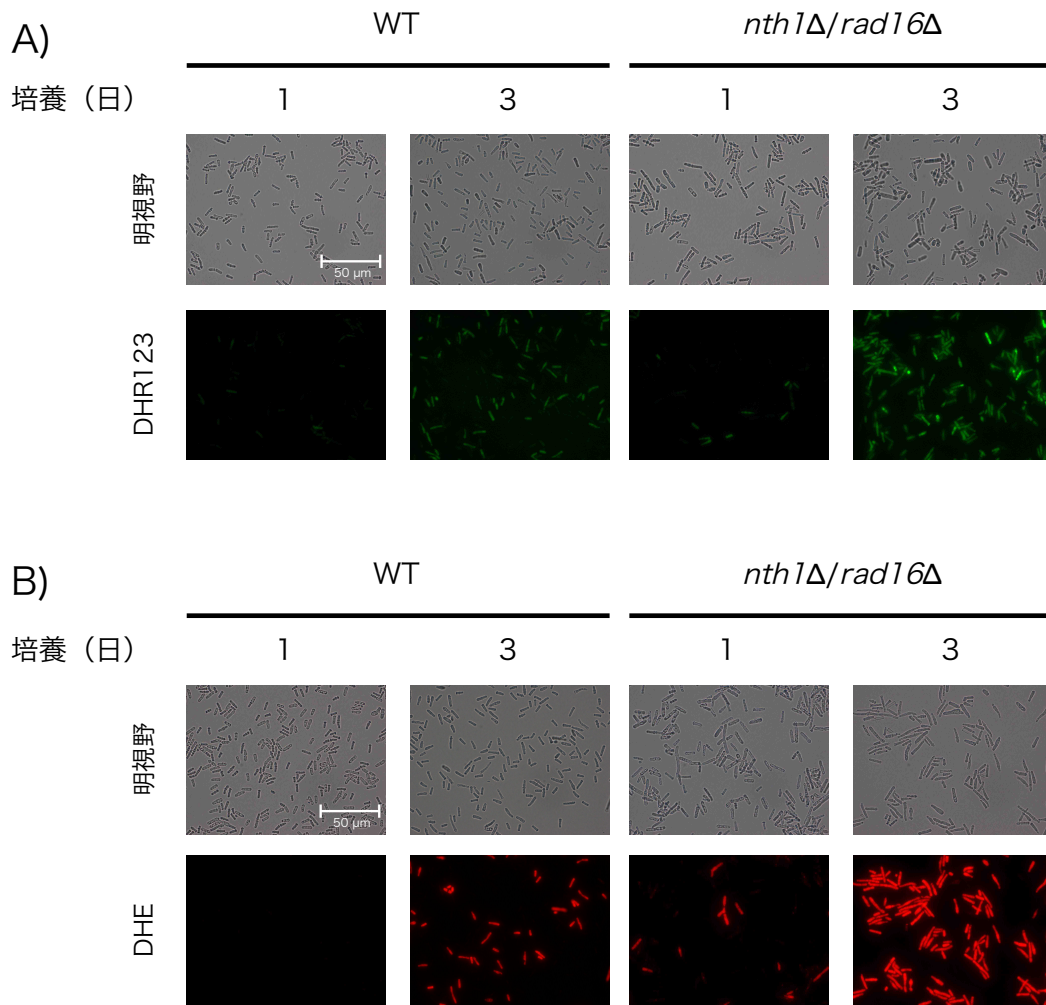


図 C7 定常期における *nth1Δ/rad16Δ* の ROS の蓄積

WT と *nth1Δ/rad16Δ* の対数増殖期（1 日目）と定常期（3 日目）における ROS の発生を観察した。蛍光試薬には、DHR123 (A) と DHE (B) を用いた。WT 1 日目の明視野の右下にスケールバーを示した。

する上で重要である。そのため、本研究ではそれら損傷を qPCR で定量する方法を開発した。qPCR では、DNA の損傷が PCR の DNA ポリメラーゼを阻害すると結果的に PCR 産物が低下することを利用して損傷を定量することができる (Furda *et al.*, 2014)。まず、mtDNA における損傷の定量法を検討した (Senoo *et al.*, 2016)。分裂酵母の mtDNA は約 19 kb の環状 DNA で、本研究において mtDNA の全遺伝子をカバーできるように 2 種類の長いサイズ (L-A と L-B : 約 10 kb) が増幅されるプライマー対を設計した (図 C8)。L-A は *cox1* (シトクロム c オキシダーゼ 1)、*cox3* および *cob* (シトクロム b) などがコードされている領域が含まれる。L-B には *cox2* や ATPase サブユニットなどのコード領域が



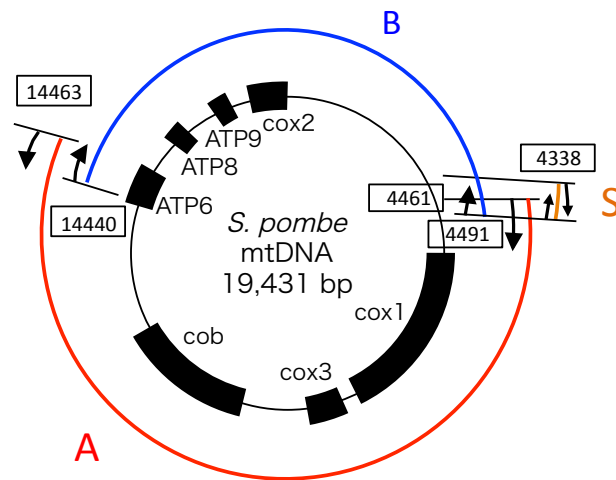


図 C8 分裂酵母 mtDNA 損傷測定用プライマー

mtDNA 損傷を qPCR により定量するために、3 種類のプライマー対を設計した。

L-A (Fw) : 5'-CCCAAGGTGTTGTGCAATTAGTGTTAAGTCG-3'

L-A (Rv) : 5'-ACTCGAACCAACACGCTCGAAAGCG-3'

L-B (Fw) : 5'-GCTTTCGAGCGTGTGTTGTTTCGAGTC-3'

L-B (Rv) : 5'-CGACTTAACACTAATTGCACAACACCTTGGG-3'

S (Fw) : 5'-GAAGGAGGAATTGCGAGTAATCAC-3'

S (Rv) : 5'-CGACTTAACACTAATTGCACAACACCTTGGG-3'

含まれている。さらに、短いサイズ (S : 154 bp) のプライマー対も設計し、qPCR の結果の標準化に使用した。これらのプライマーを用いてゲノム DNA を含む細胞全 DNA を鋳型とした PCR を行った結果、非特異的なバンドは検出されず目的位置にバンドが見られた (Senoo *et al.*, 2016 の Fig. 1)。また、PCR に用いる鋳型 DNA 量を変化 (0.01~0.1 ng) させた場合、PCR 産物が鋳型 DNA 量の変化に伴って増減した (Senoo *et al.*, 2016 Fig. 2)。したがって、これらのプライマーを用いることで定量的な PCR を行うことができる。

分裂酵母の DNA をリボフラビン存在下で UVA 照射し、mtDNA の損傷を qPCR で測定した。リボフラビンは光増感剤として働き、UVA 照射で一重項酸素や  $H_2O_2$  を生成し、DNA に酸化損傷を与える (Hiraku *et al.*, 2007; Besaratinia *et al.*, 2007; Joshi & Keane, 2010)。プライマー S で mtDNA の酸化損傷を qPCR で測定した結果、ほとんど損傷を検出できなかった。しかし、プライマー L-A と L-B で損傷を測定した結果、UVA の照射量に比例して DNA の損傷量が増加し、UVA 30 J/cm<sup>2</sup> では 10 kb 当たりの損傷量が 3~4 カ所となった



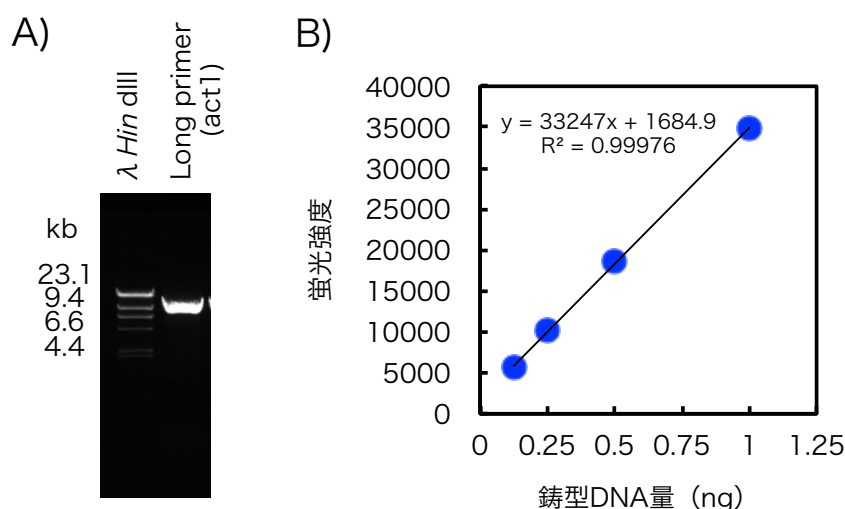


図 C9 DNA 損傷検出のための qPCR の定量性

qPCR によりゲノム DNA 損傷を測定するためのプライマー対を設計した。A) 設定したプライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物 10  $\mu$ L を 0.7% アガロースゲルで電気泳動した。B) 鋳型 DNA 量を 0.125 ng ~ 1 ng まで変化させて PCR を行い、PCR 産物 10  $\mu$ L をアガロースゲル電気泳動した。その後、ImageJ によりデンストメトリーを行い、鋳型 DNA 量と増幅された PCR 産物の関係を示した。

(Senoo *et al.*, 2016 Fig. 3)。これは UVA によって引き起こされた DNA の酸化損傷により PCR が阻害された結果であると推察される。したがって、L-A と L-B のプライマーを用いた qPCR は分裂酵母の mtDNA の酸化損傷を定量できることが示唆された。

次に、本研究では mtDNA だけでなくゲノム DNA の損傷量を qPCR で測定する条件を検討した、そのために、act1 を含む約 10 kb の領域を増幅できるプライマーを設計して PCR を行った。ゲノム DNA を鋳型とした PCR の結果、非特異的なバンドは検出されず目的位置にバンドが見られた (図 C9-A)。また、鋳型 DNA 量を変えて PCR を行ったところ、PCR 産物は鋳型 DNA を増やすにつれて直線的に増加した (図 C9-B)。このことから、本プライマーを用いることで、qPCR によりゲノム DNA の損傷を定量することができると考えられる。

### 3-5. 定常期における DNA 修復欠損株の生体高分子の損傷

・OH のような ROS はタンパク質や DNA などの生体高分子に損傷を引き起こす。DNA の酸化損傷により AP サイトや鎖切断などの多様な塩基損傷が生じる。ゲノム DNA の損傷

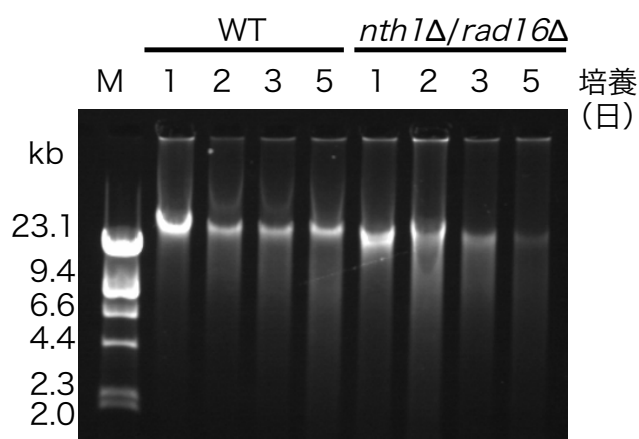


図 C10 定常期における DNA 修復欠損株の DNA 損傷

WT と *nth1Δ/rad16Δ* の DNA を経時的に抽出し、アガロースゲル電気泳動を行い、DNA の断片化を観察した。DNA マーカー (M) には  $\lambda$  *Hind* III を用いた。

をアガロースゲル電気泳動により観察すると、*nth1Δ/rad16Δ* の高分子 DNA は 5 日目以降に分解し、バンドが消滅した (図 C10 および Senoo *et al.*, 2017 の Fig. 4-C)。

次に WT と *nth1Δ/rad16Δ* のゲノムおよびミトコンドリア DNA の損傷量を定量的 PCR (qPCR) により測定した。その結果、WT のゲノム DNA 損傷量はわずかに上昇したが、*nth1Δ/rad16Δ* では DNA 損傷が定常期以降著しく蓄積した (図 C11-A および Senoo *et al.*, 2017 の Fig. 4-B)。ミトコンドリア DNA 損傷の測定でも同様の結果となった (図 C11-B)。また、可溶性タンパク質を抽出し、SDS-PAGE でタンパク質損傷の観察を行った結果、WT と DNA 修復欠損株の両方ともタンパク質の経時変化は見られなかった (図 C12)。これらの結果は、BER と NER 活性が定常期において DNA の損傷や変異を防ぐために必要であると考えられる。

カナバニン耐性変異を利用して WT と *nth1Δ/rad16Δ* の定常期における突然変異率を測定した (図 C13 および Senoo *et al.*, 2017 の Fig. 4-A)。*nth1Δ/rad16Δ* のカナバニン耐性コロニーは、全菌数に対しても生菌数に対しても定常期以降増加していった。DNA 修復欠損株の DNA 損傷や変異の蓄積は核 DNA の断片化に関連した特異的な細胞死メカニズムの活性化の可能性が考えられる。

### 3-6. カロリー制限条件下での DNA 修復欠損株の CLS 伸長

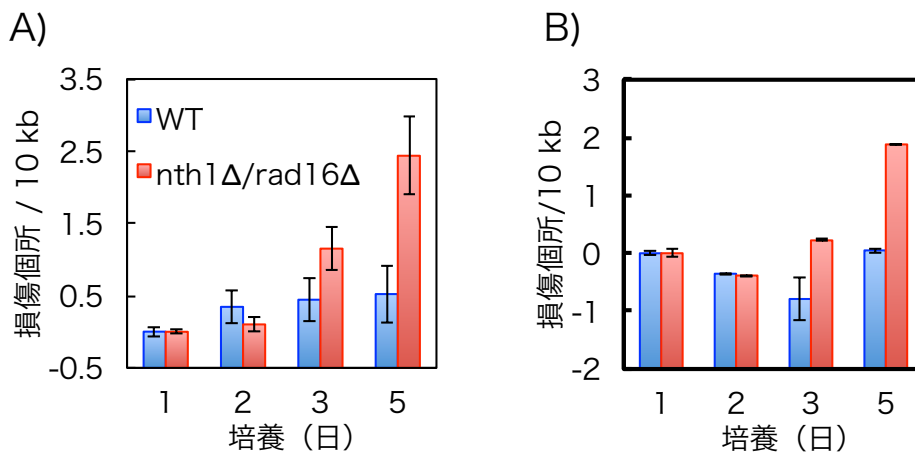


図 C11 qPCR による DNA 損傷の測定

WT と *nth1Δ/rad16Δ* のゲノム DNA (A) およびミトコンドリア DNA (B) の損傷を qPCR により測定した。各サンプルについて PCR を 3 本行った。平均値と標準偏差を示した。

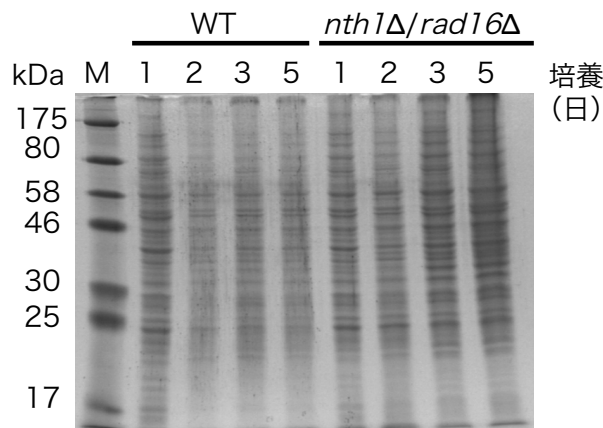


図 C12 定常期における DNA 修復欠損株のタンパク質

WT と *nth1Δ/rad16Δ* のタンパク質を材料と方法に従って経時的に抽出し、SDS-PAGE を行った。プロテインマーカー (M) を同時に泳動した。

分裂酵母を低グルコース濃度 (カロリー制限) 条件下で培養すると高濃度のものと比較して ROS の発生が抑制され、CLS の伸長が見られた (Chen & Runge, 2009; Roux *et al.*, 2009; Zuin *et al.*, 2010)。 *nth1Δ/rad16Δ* の CLS へのカロリー制限の効果を調べるため、菌株を異なるグルコース濃度 (0.3~5%) を含む YES 3x 培地で培養した。定常期における *nth1Δ/rad16Δ* の生存率の変化は、培地中のグルコース濃度と反比例していた (図

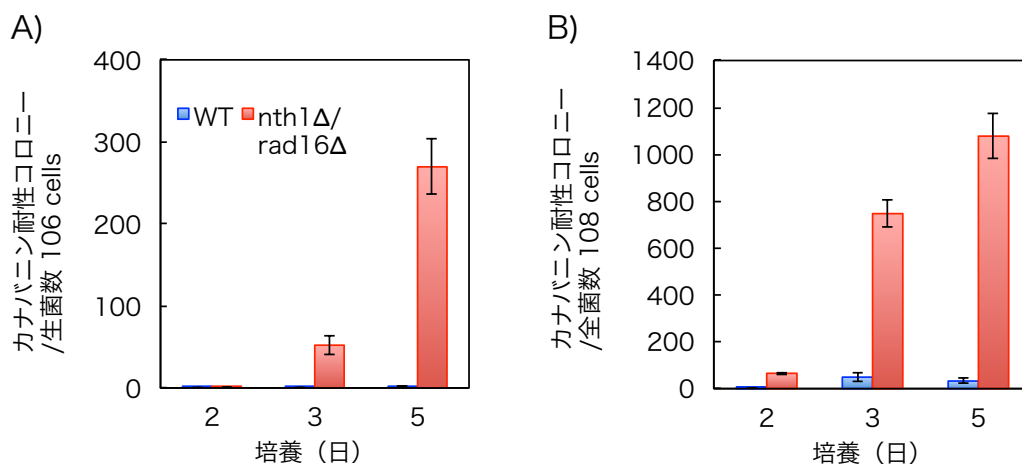


図 C13 定常期における DNA 修復欠損の突然変異率

WT と *nth1Δ/rad16Δ* の突然変異率の測定を材料と方法に従って行った。生菌数 ( $10^6$  cells) 当たりの突然変異菌数 (A) は、EMMG+カナバニン培地に生えたコロニー数 (突然変異菌数) を EMMG 培地に生えたコロニー数 (生菌数) で割って、算出した。全菌数 ( $10^8$  cells) 当たりの突然変異菌数 (B) は、突然変異菌数を植菌数で割って、算出した。平均値と標準偏差を示した ( $n=3$ )。

C14-A および Senoo *et al.*, 2017 の Fig. 5-A)。低濃度 (2%以下) での生存率は 3% グルコースの培地で培養した WT と同レベルまで回復した。さらに、*nth1Δ/rad16Δ* の定常期における ROS の測定でもグルコース濃度を低下させることで DHR123 および DHE とともに ROS 陽性細胞が減少した (図 C14-B と C および Senoo *et al.*, 2017 の Fig. 5-B)。これらの結果より、カロリー制限が ROS の発生を抑制することで *nth1Δ/rad16Δ* の CLS を延長していると推察される。

### 3-7. 定常期における DNA 修復欠損株のカスパーゼの活性化

FITC-VAD-fmk を用いてカスパーゼの活性化を調べた (図 C15 Senoo *et al.*, 2017 の Fig. 6)。これまでの観察結果と同様に (Roux *et al.*, 2006)、対数増殖期 (1日目) における WT の FITC-VAD-fmk 陽性細胞はわずかであったが、定常期の初期段階 (2日目) で急激に増加した。*nth1Δ/rad16Δ* 株は、対数増殖期と定常期初期の両方で WT よりもカスパーゼ活性化細胞数が増加していた。さらに、*nth1Δ/rad16Δ* は WT よりも蛍光を強く発していた。これらのことは、*nth1Δ/rad16Δ* が経時老化中に強いアポトーシス様細胞死を受けていることを示唆する。

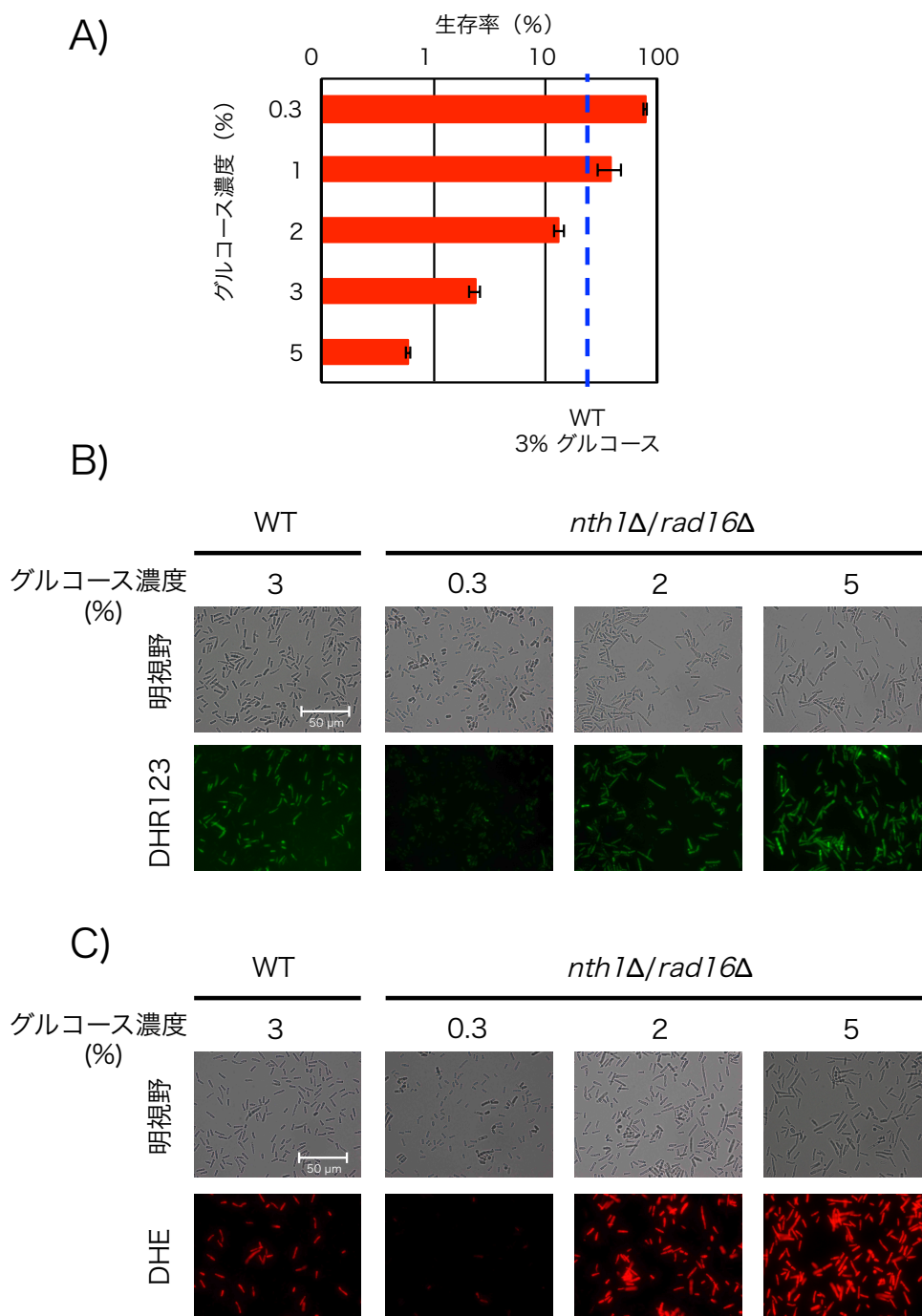


図 C14 *nth1Δ/rad16Δ* の CLS および ROS の発生のカロリー制限による影響

A) 0.3~5%までのグルコースを含む YES 3x 培地での *nth1Δ/rad16Δ* の CLS を測定した。2日目と5日目の生存率を測定し、2日目を100%とした時の5日目の生存率を示した。WTの3%グルコースを含む YES 3x 培地での生存率を破線で示した。各培養日数における菌液をシャーレ3枚に植菌し、コロニー数を計測した。生存率の平均値と標準偏差を示した。BとC) 各濃度のグルコースを含む YES 3x 培地中で3日間培養し、DHR123 および DHE により染色し、ROS の発生を蛍光観察した。比較として WT の3%グルコースを含む YES 3x 培地での場合を示した。WT 明視野の右下にスケールバーを示した。

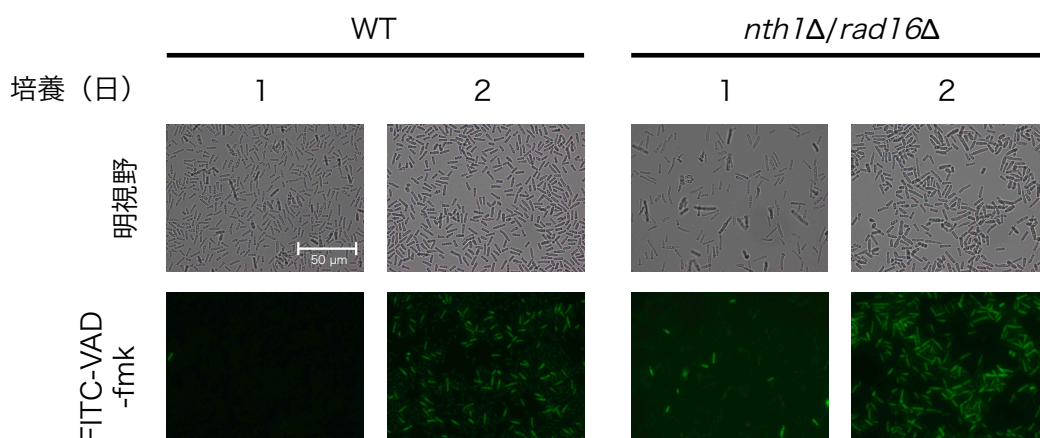


図 C15 定常期の *nth1Δ/rad16Δ*におけるカスパーゼの活性化

WT と *nth1Δ/rad16Δ*の対数増殖期 (1 日目) と定常期初期 (2 日目) におけるカスパーゼの活性化を FITC-VAD-fmk による蛍光顕微鏡観察で調べた。WT 明視野 1 日目の右下にスケールバーを表示した。

#### 4. 考察

DNA 修復欠損や DNA 損傷は、がんや神経変性疾患のようなヒトの病気や老化と強く関連している (Gorbunova *et al.*, 2007; Marteijn *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2016)。本研究では、分裂酵母において BER と NER の欠損が経時老化を加速させることを見出した。また、定常期の細胞は代謝によって生成された細胞内 ROS が蓄積した (図 C7)。これらの ROS は内因性の酸化損傷や核 DNA の変異に関与していると考えられる。分裂酵母の Apn2p や Nth1p は AP サイトや鎖切断のような小さな塩基損傷を処理し、BER 経路で重要な役割を担っている (Kanamitsu & Ikeda, 2010)。一方、分裂酵母の NER 変異は MMS に対して中程度の感受性を示し、アルキル化損傷の修復に NER が関わっていることが示唆された (図 C4 と Memisoglu & Samson, 2000; Osman *et al.*, 2003; Kanamitsu *et al.*, 2007)。nth1 や apn2 と NER 遺伝子の遺伝間相互作用は、Rhp41p と Rph26p が nth1 の作用により生じた AP サイトを重複して処理することで示された (Kanamitsu & Ikeda, 2011; Sakurai *et al.*, 2015)。Rad16p/Swi10p の構造特異的エンドヌクレアーゼは、DNA の 3' -ブロック末端を処理するバックアップ経路として働いている (Kanamitsu & Ikeda, 2011)。最近の研究で、哺乳類の NER が酸化損傷のような小さな損傷の修復に重要な働きを持っていることが示された (Pascucci *et al.*, 2011; Berra *et al.*, 2013; Melis *et al.*, 2013; Shafirovich *et al.*, 2016)。nth1Δや apn2Δからの rad16 遺伝子の欠損

は、経時老化を加速させた (図 C2 と 5 と 6)。これは、分裂酵母において NER が内因性の酸化損傷の修復する BER のバックアップ機構として働き、非分裂状態での寿命伸長に関わっていることを示唆している。

ROS の発生はアポトーシスの開始と細胞死に重要な役割を持っている (Circu & Aw, 2010)。出芽酵母と同様に、分裂酵母において細胞内の ROS が経時老化に関連していると考えられる (Fabrizio & Longo, 2003; Hlavata *et al.*, 2008; Roux *et al.*, 2009)。さらに、分裂酵母においてミトコンドリアの SOD をコードしている SOD2 遺伝子の欠損は老化を促進させ、核 DNA の断片化を引き起こした (Ogata *et al.*, 2016)。ROS は定常期に蓄積し、*nth1Δ/rad16Δ* は WT よりも ROS を発生させた (図 C7)。カロリー制限条件下では定常期の ROS の生成が著しく減少し、*nth1Δ/rad16Δ* の CLS は WT と同レベルまで回復した (図 C14)。グルコース存在下では、Git3/Pka1 経路がミトコンドリアの呼吸や酸化ストレス応答および ROS 生成を抑制する (Roux *et al.*, 2010; Zuin *et al.*, 2010)。

*nth1Δ/rad16Δ* において DNA の損傷や変異は定常期に蓄積し、DNA の断片化は細胞死とともに引き起こされた (図 C11 と 13)。*nth1Δ/rad16Δ* を *in situ* マーカーである FITC-VAD-fmk で染色すると、定常期初期でも蛍光を発していた (図 C15)。このことは、経時老化における細胞死とカスパーゼの活性化に関連があることを示唆している。核 DNA の断片化に関与しているカスパーゼの活性化が定常期初期で確認されたことから、定常期における DNA 損傷の増加は、酸化損傷によるものではなくアポトーシスによる DNA の断片化により引き起こされたものだと考えられる。出芽酵母の CLS においても、BER と NER の 2 重欠損により寿命が短縮する (Pawar *et al.*, 2009)。このとき BER と NER の欠損株は細胞内の ROS レベルが上昇し、チェックポイントキナーゼである Rad53 やリン酸化を介した酵母のチェックポイント経路を活性化する (Evert *et al.*, 2004; Pawar *et al.*, 2009)。分裂酵母においてチロシル DNA ホスホジエステラーゼ (Tdp1) の変異は、DNA 損傷を蓄積させ、G0 期 (静止期) の生存率を急激に減少させる (Ben Hassine & Arcangioli, 2009)。Tdp1 は DNA の 3' -リン酸末端とトポイソメラーゼ I のチロシル残基との間のホスホジエステル結合を切断する (Pommier *et al.*, 2014)。この酵素は Apn2 と同様に、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> やブレオマイシンなどにより生じた 3' -ホスホグリコレート末端を含む様々な 3' 損傷に働くことができる。Tdp1 が欠損すると、酸化 DNA 損傷の蓄積が 2 つの DNA 損傷チェックポイント反応の引き金となり、核 DNA の断片化を誘導する (Arcangioli

& Ben Hassine, 2009; Ben Hassine & Arcangioli, 2009)。ミトコンドリアでの ROS 生産と同様に DNA 損傷反応の活性化は、DNA 修復欠損株においてアポトーシス様細胞死の最初の段階に重要な役割を持っていると考えられる。



## 5. 引用文献

- Alseth I, Korvald H, Osman F, Seeberg E, Bjørås M (2004) A general role of the DNA glycosylase Nth1 in the abasic sites cleavage step of base excision repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 32: 5119-25.
- Alseth I, Osman F, Korvald H, Tsaneva I, Whitby MC, Seeberg E, Bjørås M (2005) Biochemical characterization and DNA repair pathway interactions of Mag1-mediated base excision repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 33: 1123-31.
- Arcangioli B & Ben Hassine S (2009) Unrepaired oxidative DNA damage induces an ATR/ATM apoptotic-like response in quiescent fission yeast. *Cell Cycle* 8: 2326-31.
- Avery AM, Kaur B, Taylor JS, Mello JA, Essigmann JM, Doetsch PW (1999) Substrate specificity of ultraviolet DNA endonuclease (UVDE/Uve1p) from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 27: 2256-64.
- Bauer NC, Corbett AH, Doetsch PW (2015) The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. *Nucleic Acids Res* 43: 10083-101.
- Ben Hassine S & Arcangioli B (2009) Tdp1 protects against oxidative DNA damage in non-dividing fission yeast. *EMBO J* 28: 632-40.
- Berra CM, de Oliveira CS, Garcia CC, Rocha CR, Lerner LK, Lima LC, Baptista Mda S, Menck CF (2013) Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue. *Free Radic Biol Med* 61: 343-56.
- Besaratinia A, Kim SI, Bates SE, Pfeifer GP (2007) Riboflavin activated by ultraviolet A1 irradiation induces oxidative DNA damage-mediated mutations inhibited by vitamin C. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5953-8.
- Chen BR & Runge KW (2009) A new *Schizosaccharomyces pombe* chronological lifespan assay reveals that caloric restriction promotes efficient cell cycle exit and extends longevity. *Exp gerontol* 44: 493-502.
- Circu ML & Aw TY (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48: 749-62.
- Dalhus B, Nilsen L, Korvald H, Huffman J, Forstrom RJ, McMurray CT, Alseth I, Tainer JA, Bjørås M (2013) Sculpting of DNA at abasic sites by DNA glycosylase homolog mag2. *Structure* 21: 154-66.
- De Bont R & van Larebeke N (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19: 169-85.

- Evert BA, Salmon TB, Song B, Jingjing L, Siede W, Doetsch PW (2004) Spontaneous DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* elicits phenotypic properties similar to cancer cells. *J Biol Chem* 279: 22585-94.
- Fabrizio P & Longo VD (2003) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2: 73-81.
- Fleck O (2004) DNA repair pathways. In: Egel R editor. *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Berlin: Springer-Verlag: pp. 101-15.
- Fraser JL, Neill E, Davey S (2003) Fission yeast Uve1 and Apn2 function in distinct oxidative damage repair pathways in vivo. *DNA Repair* 2: 1253-67.
- Furda A, Santos JH, Meyer JN, Van Houten B (2014) Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells. *Methods Mol Biol* 1105: 419-37.
- Gorbunova V, Seluanov A, Mao Z, Hine C (2007) Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Res* 35: 7466-74.
- Hiraku Y, Ito K, Hirakawa K, Kawanishi S (2007) Photosensitized DNA damage and its protection via a novel mechanism. *Photochem Photobiol* 83: 205-12.
- Hlavata L, Nachin L, Jezek P, Nystrom T (2008) Elevated Ras/protein kinase A activity in *Saccharomyces cerevisiae* reduces proliferation rate and lifespan by two different reactive oxygen species-dependent routes. *Aging Cell* 7: 148-57.
- Joshi PC & Keane TC (2010) Investigation of riboflavin sensitized degradation of purine and pyrimidine derivatives of DNA and RNA under UVA and UVB. *Biochem Biophys Res Commun* 400: 729-33.
- Kanamitsu K, Tanihigashi H, Tanita Y, Inatani S, Ikeda S (2007) Involvement of 3-methyladenine DNA glycosylases Mag1p and Mag2p in base excision repair of methyl methanesulfonate-damaged DNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Genet Syst* 82: 489-94.
- Kanamitsu K & Ikeda S (2010) Early steps in the DNA base excision repair pathway of a fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Nucleic Acids* Article ID 450926: 9 pages.
- Kanamitsu K & Ikeda S (2011) Fission yeast homologs of human XPC and CSB, rhp41 and rhp26, are involved in transcription-coupled repair of methyl methanesulfonate-induced DNA damage. *Genes Genet Syst* 86: 83-91.

- Karahalil B, Roldán Arjona T, Dizdaroglu M (1998) Substrate specificity of *Schizosaccharomyces pombe* Nth protein for products of oxidative DNA damage. *Biochemistry* 37: 590-5.
- Lin SJ & Austriaco N (2014) Aging and cell death in the other yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 14: 119-35.
- Longo VD, Shadel GS, Kaeberlein M, Kennedy B (2012) Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab* 16: 18-31.
- Low CP & Yang H (2008) Programmed cell death in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta* 1783: 1335-49.
- Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JH (2014) Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 465-81.
- Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza Pinto NC, Bohr VA (2009) Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 30: 2-10.
- McBride AG, Borutaite V, Brown GC (1999) Superoxide dismutase and hydrogen peroxide cause rapid nitric oxide breakdown, peroxynitrite production and subsequent cell death. *Biochim Biophys Acta* 1454: 275-88.
- McCready SJ, Osman F, Yasui A (2000) Repair of UV damage in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutation Res* 451: 197-210.
- Melis JP, van Steeg H, Luijten M (2013) Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antioxid Redox Signal* 18: 2409-19.
- Memisoglu A & Samson L (2000) Contribution of base excision repair, nucleotide excision repair, and DNA recombination to alkylation resistance of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* 182: 2104-12.
- Menck CF & Munford V (2014) DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? *Genet Mol Biol* 37: 220-33.
- Mirisola MG, Braun RJ, Petranovic D (2014) Approaches to study yeast cell aging and death. *FEMS Yeast Res* 14: 109-18.
- Ogata T, Senoo T, Kawano S, Ikeda S (2016) Mitochondrial superoxide dismutase deficiency accelerates chronological aging in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Biol Int* 40: 100-6.
- Osman F, Bjørås M, Alseth I, Morland I, McCready S, Seeberg E, Tsaneva I (2003) A new *Schizosaccharomyces pombe* base excision repair mutant, *nth1*, reveals overlapping pathways for repair of DNA base damage. *Mol Microbiol* 48: 465-80.

- Pan MR, Li K, Lin SY, Hung WC (2016) Connecting the dots: From DNA damage and repair to aging. *Int J Mol Sci* 17: 685.
- Pascucci B, D'Errico M, Parlanti E, Giovannini S, Dogliotti E (2011) Role of nucleotide excision repair proteins in oxidative DNA damage repair: an updating. *Biochemistry Moscow* 76: 4-15.
- Pawar V, Jingjing L, Patel N, Kaur N, Doetsch PW, Shadel GS, Zhang H, Siede W (2009) Checkpoint kinase phosphorylation in response to endogenous oxidative DNA damage in repair-deficient stationary-phase *Saccharomyces cerevisiae*. *Mech Ageing Dev* 130: 501-8.
- Pommier Y, Huang SY, Gao R, Das BB, Murai J, Marchand C (2014) Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). *DNA Repair* 19: 114-29.
- Ribar B, Izumi T, Mitra S (2004) The major role of human AP-endonuclease homolog Apn2 in repair of abasic sites in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 32: 115-26.
- Roux AE, Quissac A, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA (2006) Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell* 5: 345-57.
- Roux AE, Leroux A, Alaamery MA, Hoffman CS, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA (2009) Pro-aging effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast. *PLoS genetics* 5: e1000408.
- Roux AE, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA (2010) Fission yeast and other yeasts as emergent models to unravel cellular aging in eukaryotes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65: 1-8.
- Sakurai E, Susuki M, Kanamitsu K, Ikeda S (2015) Global genomenucleotide excision repair proteins Rhp7p and Rhp41p are involved in abasic site repair of *Schizosaccharomyces pombe*. *Adv Biosci Biotechnol* 6: 265-74.
- 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.
- Senoo T, Yamanaka M, Nakamura A, Terashita T, Kawano S, Ikeda S (2016) Quantitative PCR for detection of DNA damage in mitochondrial DNA of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Microbiol Methods* 127: 77-81.
- Shafirovich V, Kropachev K, Anderson T, Liu Z, Kolbanovskiy M, Martin BD, Sugden K, Shim Y, Chen X, Min JH, Geacintov NE (2016) Base and nucleotide excision repair of oxidatively generated guanine lesions in DNA. *J Biol Chem* 291: 5309-19.

- Skoneczna A, Kaniak A, Skoneczny M (2015) Genetic instability in budding and fission yeast-sources and mechanisms. *FEMS Microbiol Rev* 39: 917-67.
- Sugimoto T, Igawa E, Tanihigashi H, Matsubara M, Ide H, Ikeda S (2005) Roles of base excision repair enzymes Nth1p and Apn2p from *Schizosaccharomyces pombe* in processing alkylation and oxidative DNA damage. *DNA Repair* 4: 1270-80.
- Swenberg JA, Lu K, Moeller BC, Gao L, Upton PB, Nakamura J, Starr TB (2011) Endogenous versus exogenous DNA adducts: their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment. *Toxicol Sci* 120: S130-45.
- Tanihigashi H, Yamada A, Igawa E, Ikeda S (2006) The role of *Schizosaccharomyces pombe* DNA repair enzymes Apn1p and Uve1p in the base excision repair of apurinic/apyrimidinic sites. *Biochem Biophys Res Commun* 347: 889-94.
- Yonekura S, Nakamura N, Doi T, Sugiyama H, Yamamoto K, Yonei S, Zhang QM (2007) Recombinant *Schizosaccharomyces pombe* Nth1 protein exhibits DNA glycosylase activities for 8-oxo-7,8-dihydroguanine and thymine residues oxidized in the methyl group. *J Radiat Res* 48: 417-24.
- Zhang DX, Zou AP, Li PL (2001) Ceramide reduces endothelium-dependent vasodilation by increasing superoxide production in small bovine coronary arteries. *Circ Res* 88: 824-31.
- Zuin A, Carmona M, Morales Ivorra I, Gabrielli N, Vivancos AP, Ayte J, Hidalgo E (2010) Lifespan extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway. *EMBO J* 29: 981-91.

## 総合討論

分裂酵母の SOD2 欠損株（第 1 章）や DNA 修復酵素欠損株（第 2 章）を用いて CLS の測定や老化過程を観察した。本研究の結果より考えられることをまとめた（図 D1）。さらに未解決で今後の研究が必要な点についても記載する。

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。この現象は WT においても観察される（Roux *et al.*, 2006）。SOD2 が欠損している場合、ROS は WT よりもさらに増加する。ROS は DNA やタンパク質などの生体高分子の損傷、ミトコンドリア機能の低下などによりアポトーシスによる細胞死を引き起こすと考えられる。さらに、NER と BER の二重欠損株では酸化損傷 DNA が修復されないまま蓄積され、老化細胞は高い突然変異率を示す。重篤な DNA 損傷の蓄積は、ATM/ATR などによる DNA 損傷チェックポイント制御を活性化し、アポトーシスによる細胞死を誘導すると推察される（Arcangioli & Ben Hassine, 2009; Ben Hassine & Arcangioli, 2009）。このように、*sod2* や DNA 修復欠損株における老化細胞のアポトーシスには 2 つの経路が考えられる。しかし、どちらの経路が主に働いているのか、また、真のアポトーシス誘導因子は何であるのか未解決である。今回、分裂酵母のアポトーシスをカスパーゼの活性化を指標と

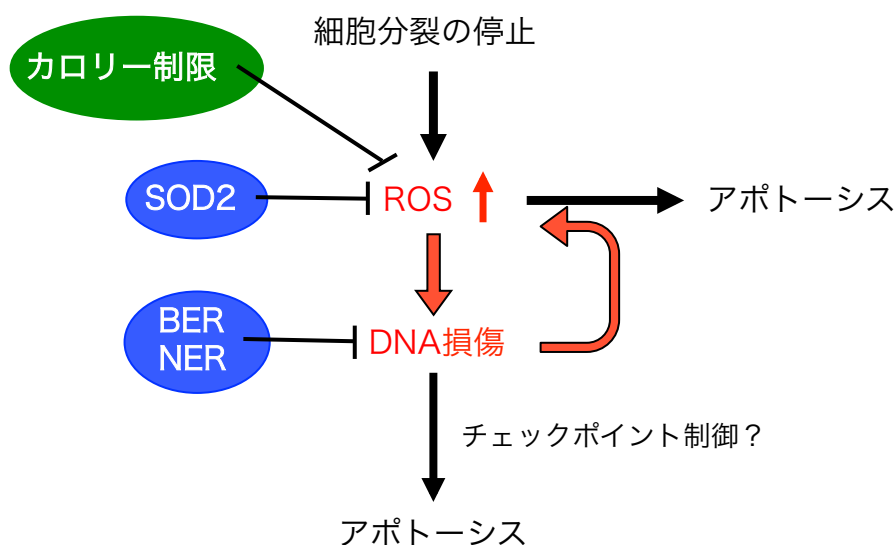


図 D1 経時寿命に果たす SOD2 と DNA 修復系の役割

本研究より考えられる分裂酵母の経時寿命における SOD2 と BER/NER 酵素の役割と細胞老化の過程をまとめた。詳細は本文参照。

して観察したが、TUNEL 法による DNA の断片化や annexin V によるホスファチジルセリンの露出の検出でも細胞死の性格付けを行う必要がある。

BER や NER で DNA 損傷が修復されないと ROS がより多く発生することを見出した。これにより、細胞寿命の短縮がさらに引き起こされる悪循環に入り込むと考えられる。この現象は、ヒト細胞においてトポイソメラーゼ阻害剤により誘発される DNA 切断が ROS の生成を増加し、アポトーシスを誘導することと類似している (Mizutani *et al.*, 2002; Kurosu *et al.*, 2003)。この場合、DNA 損傷がポリ (ADP リボース) ポリメラーゼを活性化し、結果的に NAD<sup>+</sup>を枯渇させる。それによって NAD(P)H オキシダーゼが活性化し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> レベルが O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成を介して上昇する。したがって、ROS により引き起こされた酸化損傷は ROS をより多く生成し、特定の細胞死メカニズムの活性化を誘導すると推察される。この現象が分裂酵母で起きているかどうか調べる必要がある。

定常期に SOD2 の遺伝子発現や活性が増加した。したがって、SOD2 は細胞の酸化的ストレスに応答することにより細胞寿命の伸長に重要な働きをしている。一方、BER と NER を同時に欠損した細胞株は、著しく CLS が低下したので、BER と NER は協調して経時的老化におけるゲノムの維持に働くことにより寿命の伸長に重要な働きをしている。カロリー制限は、ROS の発生を強く低下させ、抗老化に働く (Roux *et al.*, 2009; Chen & Runge, 2009)。sod2 欠損株および DNA 修復欠損株でも、カロリー制限が有効に働き、短縮した寿命を伸長させた。これには、ROS の発生量が強く関連していることを見出した。

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。これらの成果が、ヒトの老化機構の解明に役立つことを期待する。

## 引用文献

- Arcangioli B & Ben Hassine S (2009) Unrepaired oxidative DNA damage induces an ATR/ATM apoptotic-like response in quiescent fission yeast. *Cell Cycle* 8: 2326-31.
- Ben Hassine S & Arcangioli B (2009) Tdp1 protects against oxidative DNA damage in non-dividing fission yeast. *EMBO J* 28: 632-40.
- Chen BR & Runge KW (2009) A new *Schizosaccharomyces pombe* chronological lifespan assay reveals that caloric restriction promotes efficient cell cycle exit and extends longevity. *Exp gerontol* 44: 493-502.
- Kurosu T, Fukuda T, Miki T, Miura O (2003) BCL6 overexpression prevents increase in reactive oxygen species and inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic reagents in B-cell lymphoma cells. *Oncogene* 22: 4459-68.
- Mizutani H, Tada Oikawa S, Hiraku Y, Oikawa S, Kojima M, Kawanishi S (2002) Mechanism of apoptosis induced by a new topoisomerase inhibitor through the generation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 277: 30684-9.
- Roux AE, Quissac A, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA (2006) Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell* 5: 345-57.
- Roux AE, Leroux A, Alaamery MA, Hoffman CS, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA (2009) Pro-aging effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast. *PLoS genetics* 5: e1000408.



## 謝辞

本研究の遂行および論文作成にあたり、終始適切なる御指導、御校閲を賜りました池田正五教授に多大なる感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、様々な御助言を賜りました河野真二先生に深く感謝致します。

本研究に遂行にあたって、蛍光顕微鏡を提供して頂きました辻極秀次教授に深く感謝致します。

本論文の作成ならびに予備審査委員会では、多くのご助言を頂きました岡山理科大学南善子教授、汪達紘教授、辻極秀次教授、大阪教育大学 片桐昌直教授に深く感謝致します。

本研究遂行において重要な試料を頂きました木内泰志先輩、久米託矢先輩に深く感謝致します。

本研究の遂行および論文作成にあたり数多くのご協力をいただいた尾形俊哉君、山中麻友美さんに深く感謝致します。

また、本研究を行うにあたって数多くのご助言、御協力を賜りました同研究室の先輩方、そして、公私にわたって激励、および協力し合って楽しい実験生活を送らせていただいた同輩、後輩諸君の皆様に深く感謝いたします。

最後に、このような勉学の機会を与えて下さり、かつ現在に至るまで多大な援助、そして理解を頂いた両親に心より感謝し、御礼申しあげます。

## 業績

### 発表論文（査読あり）

〈博士論文に関する原著論文〉

1. Ogata T.<sup>†</sup>, **Senoo T.**<sup>†</sup>, Kawano S., Ikeda S. (<sup>†</sup>equal contribution): Mitochondrial superoxide dismutase deficiency accelerates chronological aging in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Biol Int* 40, 100-106 (2016)
2. **Senoo T.**<sup>†</sup>, Yamanaka M.<sup>†</sup>, Nakamura A., Terashita T., Kawano S., Ikeda S. (<sup>†</sup>equal 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. : 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 (2017)

〈参考論文〉

4. Ikeda S., **Senoo T.**, Kawano S., Tamura S., Shinozuka Y., Sugishita S. : Suppressing Effects of natural compounds on methionine auxotrophy of a Cu,Zn-superoxide dismutase-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Sci Technol Res* 21, 137-143 (2015)

### 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*. 14<sup>th</sup> International Congress on Yeasts Sept. 11-15 (2016) at Awaji-island

〈国内学会〉

2. **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)
3. 池田正五、河野真二、柳樂康太、田村紗矢佳、篠塚有紀、**妹尾聖典**：出芽酵母 SOD1 欠損株の酸化ストレスに起因する形質に及ぼす天然物抗酸化剤の生物学的影響、第

86 回日本生化学会、神奈川 (2013)

4. **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)
5. 尾形俊哉、**妹尾聖典**、河野真二、池田正五：分裂酵母の Mn-スーパーオキシドジスムターゼ (SOD2) 欠損株の増殖定常期における性状解析、第 87 回日本生化学会、京都 (2014)
6. **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)
7. 中村あとり、**妹尾聖典**、大山恵理子、河野真二、池田正五：定量的 PCR による分裂酵母ミトコンドリア DNA の酸化的 DNA 損傷測定法の開発とその応用、酵母遺伝学フォーラム 第 49 回研究報告会、兵庫 (2016)
8. **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)