

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510202

研究課題名（和文）細胞性粘菌の網羅的遺伝子破壊株作製により明らかになった新規寿命遺伝子の解析

研究課題名（英文）Analysis of a novel life-duration related gene which was discovered by high-throughput generation of deletion mutants.

研究代表者

桑山 秀一（KUWAYAMA HIDEKAZU）

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：40397659

研究成果の概要（和文）：本研究は、細胞性粘菌において新規寿命遺伝子の制御遺伝子と被制御遺伝子を同定し、その寿命制御機構を明らかにすることを目的とした。共免疫沈降法による相互作用検出系により、この遺伝子産物が $G\alpha 2$ と相互作用することを確認し、さらに $G\alpha 9$ とも相互作用することを見出した。当該遺伝子産物は cAMP の分解ではなく cAMP の合成に直接的に関わるという知見を生化学的な解析から得ることができた。さらに cAMP 合成に関わる関連遺伝子として、新規にアラキドン酸合成酵素遺伝子を同定した。また、RabGAP が取り込んだ栄養物のリソソームへの輸送にかかわり、rabGAP が機能を失うとリソソームへ栄養が過剰に供給され細胞の増殖シグナルが活性化されることも示唆した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to identify the regulatory pathway a novel life-duration related gene, *rabgap*. We clarified that the product interacts with $G\alpha 2$ and $G\alpha 9$ in a GTP-dependent manner by pull-down assay. Biochemical analysis revealed that the RabGAP gene product regulates cAMP synthesis which is a driving force for *Dictyostelium discoideum* development. Furthermore, it was found that arachidonic acid synthesis pathway also contributes the cAMP synthesis. We also suggested that RabGAP participates in Lysosomal pathway and regulates cell proliferation probably via $G\alpha 9$.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成24年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学、ゲノム生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：微生物ゲノム、遺伝子の機能解析

1. 研究開始当初の背景

申請者は、ゲノムワイドな遺伝子機能解析を目的とし土壌微生物である細胞性粘菌の網羅的遺伝子破壊株の作製を行ってきた。得られた遺伝子破壊株のなかに、野生株に比べ増殖が極端に早く、かつ一生が早く終わる株が見つかった。この原因遺伝子を野生株にお

いて過剰に発現させると、逆に増殖が極端に遅くかつ一生が長くなった。この相同遺伝子は線虫、ショウジョウバエ、マウス、ラット、ニワトリ、ヒトを含む多くの動物種に存在し、ヒトの相同遺伝子をこの遺伝子破壊株に発現させると増殖速度の増加や寿命の短縮が相補されることもわかった。このことは、こ

の遺伝子がヒトにおいても、同様な機能を有している可能性が非常に高いことを示唆している。

近年のバイオテクノロジーやゲノム生物学の進展により、「健康で長生きをするためにはどうしたらよいか？」という問いに、遺伝子レベルで答えることが可能となってきた。とりわけ、寿命に関わる遺伝子を見つけだし、その遺伝子がいつ、どこで、何をしているかを詳細に解析することが具体的な長寿の方策につながると期待されている。

報告者は、細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) を用いてゲノムワイドな遺伝子機能解析を行っている。細胞性粘菌は森の落ち葉の下などに生息し多細胞体形成を行う真核微生物の一種で、その一生は非常に単純である(右図を参照)。胞子から発芽した粘菌アメーバ(単細胞)は土壌中のバクテリアをエサとして増殖し、飢餓状態になると10万個程の細胞が走化性運動により集合し多細胞体となり、最終的にカビに良く似た淡黄色の子実体(胞子塊と柄細胞より成る1-2mm程の構造体)を形成する。この細胞性粘菌の一生はごく短く、わずか24時間で完了すること、ゲノムサイズが小さいにも関わらず高等動物と同じ遺伝子を有し、全ゲノム解読完了、遺伝子破壊等の分子生物学的手法の適用性や簡便性が高いことから、微生物として位置づけられながら多細胞生物のモデルとして重要な研究材料の一つになっている

(Eichinger et al., *Nature*, 2005)。さらに、粘菌細胞は通常半数体であるため遺伝子破壊株作製が極めて簡単なことや、近年全ゲノム解析(6つの染色体:約34Mbp)や所属研究室を中心としたcDNA解析などの基盤整備が進展した(Eichinger et al., *Nature*, 2005)ことも手伝って、発生学や細胞生物学のモデル生物として世界的に研究が進められ顕著な成果が蓄積している(Kessin, *Nature*, 2003; Luo et al., *Cell*, 2003; Andrew & Insall, *Nature Cell Biol.* 2007; Chen et al., *Dev Cell*, 2007.他多数)。

申請者は長年、粘菌の走化性運動やストレス応答の機構解析を通して、細胞内情報伝達機構において細胞内cGMPとその制御系が重要な役割を果たしていること等を解明してきた(Kuwayama et al. *J Cell Biol.* 1993; Kuwayama et al. *Science*, 1996; Kuwayama & van Haastert, *J Biol Chem.* 1996; BBA, 1998; Kuwayama et al. *Biochem J*, 2001. Maeda et al., *Science* 2004, Kuwayama & Kubohara, *PLoS One* 2009 他)。さらに細胞性粘菌ゲノムプロジェクトに携わり、ゲノムの視野に基づく遺伝子の網羅的機能解析に力を入れ、多数の遺伝子破壊株の作製や相同性組換え効率を従来法の数十倍にまで高める新技術開発等、遺伝子

操作関連の研究・開発も進めてきた(Kuwayama et al., *J Biotech.* 2008;特許申請:特願2005-321162;国際特願PCT/JP2006/321915)。

報告者は、細胞性粘菌全ゲノム情報を基盤とした網羅的遺伝子破壊株の中に野生株に比べ増殖が極端に早く、かつ一生が早く終わる細胞性粘菌遺伝子破壊株を見いだした。また、その遺伝子が過剰に働くようにすると、逆に増殖が極端に遅くなり、かつ一生が長くなることを発見した。遺伝子の構造を解析すると、近年線虫などで見つかった寿命遺伝子(DAF-2, age-1, Rheb, TOR, DAF-16, HSF-1等のインスリン/IGF様シグナル関連遺伝子やclk-1等のクロック遺伝子、cat, sod-3等の活性酸素分解酵素関連遺伝子;(参考文献;Cunningham and Ashrafi, *Cell Metab*, 9, 113-4, 2009; Honjo et al., *Nature*. 457, 726-30, 2009; Greer, and Brunet, *Aging Cell*, 8, 113-27, 2009; Budovskaya et al., *Cell*, 134, 291-303, 2008))とは別のrabGAP活性を持つと予想される新規遺伝子であり、その相同遺伝子は単細胞である酵母には存在しないが、線虫、ショウジョウバエ、ニワトリ、マウス、ラット、ヒトに至るまで進化的に高く保存されていることがわかった。また、この細胞性粘菌遺伝子破壊株にヒトの相同遺伝子を発現させると大幅に正常な状態に戻ることから、ヒトの細胞でこの遺伝子が同様な機能をしている可能性が高いことが示唆された。

この遺伝子は、細胞内小胞輸送に関連する低分子量Gタンパク質群(rab)の制御遺伝子、rabGAP(右上図参考)と構造が似ていることから、rab遺伝子と相互作用して細胞内の小胞輸送に関わっていることが示唆される。しかしながら、この相同遺伝子の詳細な分子制御機構(どのように活性化され、どのような遺伝子を制御し、どのような生理機構を担っているか)は不明である。(唯一、ヒトにおいてAtxn1(常染色体優性小脳性運動失調の原因遺伝子)と直接的に相互作用することが報告されており(Lim J, et al, *Cell*, 125, 801-14, 2006)、ヒトにおいては脳の機能とも深く関わりを持つことが示唆されている点で医学的にも興味深い遺伝子である。)

前述のように細胞性粘菌は24時間でその一生を終え、寒天プレート上で簡便にその全生活史を観察できるため、薬剤生理活性の簡便な検出系として優れている。そこで、これまで知られている細胞性粘菌の多細胞化に影響のある薬剤のうち破壊株の短寿命性を相補する薬剤が存在するかを検討したところ、遺伝子破壊株の短寿命性を相補するような薬剤は見つからなかったが、この遺伝子破壊株がカフェインに対して耐性を持つことを発見した(カフェインは細胞性粘菌の増殖

を阻害し多細胞体化も阻害するが、これらの効果は破壊株で観察されなかった。)。つまり、新規寿命遺伝子は、カフェイン感受性に関与しているという興味深い知見が得られた。(ヒトにおいては、カフェインはアデノシン受容体拮抗による覚醒作用や cAMP や cGMP ホスホジエステラーゼ酵素阻害による交感神経興奮様作用を有することが知られているが、最近、アルツハイマー病発症に関係が深いβアミロイドの蓄積を抑制する効果も報告されている(Cao C, et al, J. Alzheimers Dis.17, 681-97, 2009).)

2. 研究の目的

本研究では、この新規寿命遺伝子(RabGAP)の制御遺伝子と被制御遺伝子を同定し、その寿命制御機構を明らかにすることを目的とした。

具体的には

1) 新規寿命遺伝子(rabGAP)の活性化経路を解明する。

①rabGAP を活性化する遺伝子(右図上流遺伝子 X)を明らかにし、相互作用様式を解析する。

②rabGAP により制御される遺伝子(右図下流遺伝子 Y)を明らかにし、その制御様式を解析する。

2) カフェインの作用と新規寿命遺伝子との関連性を明らかにする。

遺伝子破壊株がどのようなメカニズムでカフェインに対して耐性を示すのかを明らかにする。

ことである。

3. 研究の方法

新規遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、その生化学的、細胞生物学的、発生学的解析を行うことにより、細胞性粘菌の寿命の制御機構を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 新規寿命遺伝子 (RabGAP) を活性化する遺伝子を明らかにした。

昨年度は酵母 Two-Hybrid 法により相互作用候補遺伝子は得られていた。その結果を元に、3量体型Gタンパク質のαサブユニット(Gα2およびGα9)との相互作用を確認した。さらに、rabGAPの細胞内局在の解析、免疫共沈降法による相互作用の確認も行った。Gα2は発生期のcAMP合成制御、Gα9は増殖の制御に関連していることから、RabGAPはこれらふたつの遺伝子産物からのシグナルを受け、増殖期から発生期全体の時間に関連する機能をしていることが推測された。

(2) 新規寿命遺伝子 (RabGAP) により制御される遺伝子を明らかにした。

新規寿命遺伝子の直接の標的であると推測される rab 遺伝子はそのドメイン構造から 1

2 個程に絞られている。その中から上述と同じ手法で相互作用遺伝子を選抜し、rab7A がその相互作用遺伝子であることが明らかになった。さらに Rab7A の遺伝子破壊株を作製し、その表現形において増殖の遅延が見られることを確認した。

(3) 新規寿命遺伝子 (RabGAP) の細胞内分子制御機構とカフェインの作用機構との関連性の解析

rabGAP 遺伝子破壊株はアデニル酸シクラーゼの阻害剤であるカフェイン存在下でも、cAMP の合成を行うことを発見した。これを cAMP 代謝抑制の分子機構解明の足がかりとして、新規寿命遺伝子 rabGAP の cAMP の合成への作用機序を生化学的な解析を行った。具体的には、cAMP 分解酵素活性を抑制した状態で遺伝子破壊株や過剰発現株における cAMP の代謝を生化学的に定量し rabGAP が cAMP 合成を阻害していることを明らかにした。さらに、カフェイン耐性株としてアラキドン酸合成酵素遺伝子破壊株を発見し、その生化学的解析により作用機構を解析した。

(4) 新規寿命遺伝子 (RabGAP) は栄養物のリソソームへの輸送に関与する。

rabGAP 破壊株と過剰発現株においてリソソームの細胞学的な解析を行ったところ、過剰発現株において、リソソームの異常な肥大が観察された。この成果は、RabGAP が取り込んだ栄養物のリソソームへの輸送にかかわり、rabGAP が機能を失うとリソソームへ栄養が過剰に供給され細胞の増殖シグナルが活性化されることを示唆した。

以上の成果をまとめると、新規寿命遺伝子 RabGAP は細胞外もしくは細胞内のシグナルを Gα2 および Gα9 を介して受容し、そのシグナルを、cAMP 合成系やリソソーム輸送系に伝え、細胞の発生時間と増殖時間つまり細胞性粘菌の寿命に関与することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Hidekazu Kuwayama. Arachidonic Acid Enhances Caffeine-Induced Cell Death via Caspase-Independent Cell Death. Scientific Reports 査読有, 2012, 2, Article number: 577
DOI: 10.1038/srep00577

[学会発表] (計 8 件)

①Hidekazu Kuwayama. Arachidonic cascade negatively contributes to caffein

ne tolerance via caspase-independent apoptosis. 41nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists & 64nd Annual Meeting for the Japanese Society for Cell Biology. Kobe International Conference Center, Kobe, Japan. 2012年5月30日

② 桑山秀一 Arachidonic acid cascade negatively contributes to caffeine tolerance via non-apoptotic pathway.

第6回日本ゲノム微生物学会年会

立教大学、池袋、東京 2012年3月10日

③ 桑山秀一 Arachidonic acid cascade negatively contributes to caffeine tolerance in eukaryotic cell. 第34回日本分子生物学会年会パシフィコ横浜 2011年12月16日

④ 桑山秀一 カフェイン耐性におけるアラキドン酸の機能解析 第1回日本細胞性粘菌学会年会大阪大学バイオ関連多目的研究施設、大阪 2011年11月4-5日

⑤ Hidekazu Kuwayama, Yukihiro Miyana, Hideko Urushihara, Masahiro Ueda.

A rabGAP, regulating the life-span in *Dictyostelium discoideum*. International *Dictyostelium* conference 2011. Baltimore, MD, USA. 2011年8月14-18日

⑥ 桑山秀一 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の一生の長さを調節する遺伝子の機能解析と進化的考察 第5回日本進化原生生物研究会富山大学 2011年6月11日

⑦ 桑山秀一、漆原秀子、上田昌弘 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の生活環周期を調節する新規 rabGAP の機能解析 (口頭発表) 第13回細胞性粘菌研究会富山大学 2010年11月20日

⑧ 桑山秀一、漆原秀子、上田昌弘 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* において生活環周期を調節する新規 rabGAP の機能解析 第62回日本細胞生物学会年会 大阪国際会議場 2010年5月19-21日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑山 秀一 (KUWAYAMA HIDEKAZU)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：40397659