

## 出芽酵母の老化に伴う遺伝子発現の非対称な分配

—DNA Microarray を用いた発現プロファイリングからの解析

非対称変異体グループ研究員

檜原 理史

### 1. はじめに

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は細胞分裂の際、出芽という非対称分裂を行い母細胞から形態的により小さな娘細胞を生じる。個々の母細胞を観察していくと何回かの分裂のあと、分裂限界に達し細胞死が起こる。すなわち個々の母細胞の分裂回数は有限であり、出芽酵母には寿命が存在する<sup>1)</sup>。さらに出芽酵母の平均分裂回数は、各々の細胞株に特有の値を示す。これは出芽酵母の老化現象が、遺伝的因子により支配されている可能性を示唆している。このような特徴から、出芽酵母は単細胞生物とはいえ、1950年代より細胞老化の研究対象として着目されてきた。

我々は、出芽酵母の細胞老化に伴う現象を「分裂に伴う母細胞内に起こる遺伝子発現量の非対称な分配による複合的な連鎖の結果」であると考え、数回しか分裂をしていない「若い」細胞集団と、分裂限界に近づいている「老化」した細胞集団との間で遺伝子の発現プロファイリングを全ゲノムレベルで行った。その結果、分裂限界に近づくに従い引き起こされる生体内の現象が、様々な遺伝子の発現レベルの変化より推察された。

### 2 実験方法

本研究では、分裂回数すなわち世代の揃った細胞集団を回収することが必須である。我々は、シヨ糖密度勾配法により単離した virgin 細胞を分裂させ目的とする分裂世代の細胞を、30%以上の回収率で、かつ非常に均一な集団として単離する方法を確立した。回収した細胞の分裂回数の確認は、娘細胞が母細胞から分離する際、細胞壁に残す出芽痕を蛍光色素 Calcafluor で染色後、セクショニング光学顕微鏡 Delta Vision により3次元構築した画像をもとにその数を数えることにより行った。これにより  $19.1 \pm 6.6$  回の平均寿命を示す細胞株 CG379 から、数回しか分裂をしていない「若い」細胞集団(平均分裂回数  $2.9 \pm 0.9$ ,  $n=97$ )と、分裂限界に近づいている「老化」した細胞集団(平均分裂回数  $17.6 \pm 2.4$ ,  $n=100$ )を回収した。

この細胞集団から RNA を回収後、発現量に差のある稀少転写物を検出するのに適した、サブトラクション法の変法である suppression subtractive hybridization PCR 法<sup>2, 3)</sup>により、若い細胞あるいは老化細胞により高い発現を示す cDNA の濃縮、及び PCR による増幅を行った。この PCR 断片からプローブを作製し、Research Genetics 社の作成した Microarray (出芽酵母で現在同定されている 6340 個の遺伝子のうち、6144 個が高密度に Blotting されているメンブレン) に対しハイブリダイゼーションを行った。

遺伝子発現の解析に際しては、理論構築グループ、上村研究員により開発された、マイクロアレイ解析用ソフトウェア、SpotEditor とデータベース化システム、SpotDB により行った。なお

SpotEditor、SpotDB の詳細については理論構築グループ、上村研究員の講演要旨を参照していただきたい。

### 3 解析結果と考察

まず発現量が減少、あるいは増大している遺伝子の抽出を行った。その条件としては、シグナル強度比が2以上で、かつ強い方のシグナル強度が一定値以上のものとした。この値は、6144 個のシグナル強度の分布からみて有意水準 99.5%とされる値を算出することにより求めた。これはプローブの鋳型となる cDNA 断片を PCR により増幅させていく過程で、一方の細胞で発現量が多い遺伝子の cDNA 断片が濃縮かつ均一化されている事を考慮に入れたためである。

今回の解析においては、シグナル強度比が2以上かつシグナル強度が650以上のものを抽出した。その結果、若い細胞により多く発現しているとして抽出された遺伝子は検索した総数に対して3.9%に当たる239個（うち機能不明なものが70個）、また老化細胞により多く発現していると抽出されたものは1.3%に当たる78個（うち機能不明なものが21個）であった。

そのうち発現量が低下している遺伝子群には、1)リボゾームタンパク質をコードする遺伝子群、2)rRNA、tRNA のプロセッシングに関わる遺伝子群、3)RNA ポリメラーゼ I, II, III のサブユニット、4)DNA 修復系の遺伝子群が含まれていた。1),2)は老化細胞における著しいタンパク質合成能の低下を、3)は転写活性の低下を、また4)はDNA複製における突然変異率の上昇を示唆している。

また、細胞周期の進行を制御するサイクリン遺伝子 CLB6、PCL2 の発現量低下は、分裂限界に近づくにつれ、細胞周期の進行が遅くなるという知見と一致している<sup>1)</sup>。さらにクロマチン構造を形成するコアヒストンの一つである HTB1、体細胞分裂期の染色体の分離、凝集に関与する MCD1、動原体に結合し染色体分離に関与する CBF1 の発現量の低下は老化に伴うクロマチン構造の弛緩や不均等な染色体分離を示唆するものである。

### 4 おわりに

以上述べてきたように、分裂初期の細胞と分裂限界に近づいた細胞との二者間で発現プロファイリングを行うことにより、老化細胞内における様々な現象を遺伝子機能の視点から推定することが出来た。今後は、分裂初期から分裂限界までの過程をさらに多段階に分けての発現プロファイルリングにより、分裂軸に対する発現変動の階層構造を明らかにすることが更なる老化現象の分子レベルでの機構の解明に繋がると考えている。

### 参考文献

- 1) Mortimer, R. K. and Johnston, J. R. (1959) *Nature* 183, 1751-1752
- 2) Diatchenko, L. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6025-6030
- 3) Gurskaya, N. G. *et al.* (1996) *Anal. Biochem.* 240, 90-97