

酵母TORC2-Pkc1シグナル経路を標的とした
大豆ペプチドによる寿命延伸機構の解明

京都大学大学院 農学研究科

井上 善晴

超高齢化社会に突入した日本において、健康寿命をいかに伸ばすかということは社会的関心が極めて高い課題である。「寿命」と「食」との関係は古くから指摘されている。例えば「腹八分目」というように、カロリー制限は寿命を延伸させる (Dorling et al. 2020)。また、活性酸素 (ROS) は老化を促進させると考えられており、抗酸化性ポリフェノールの一種であるレスベラトロールは長寿遺伝子サーチュイン (SIRT) を活性化させることで寿命を延伸させることが報告されている。その一方で、近年の研究では、適度な ROS は寿命を延伸させることが報告されている (Karagianni and Bazopoulou, 2024)。例えば、カロリー制限による寿命の延伸は、TORC1 というタンパク質リン酸化酵素複合体の不活性化に起因するが、その際に ROS が産生する。また、グルコース代謝の過程でメチルグリオキサール (MG) という活性アルデヒドが生成する (Inoue et al. 2011; 井上 2016)。MG は細胞毒性を示し、その代謝にはグルタチオン (GSH) が必要であるため、MG は細胞内 GSH の減少を引き起こし、ROS のレベルを上昇させると考えられている (Desai et al. 2010)。

本研究では、高等真核生物のモデル生物であり、寿命や老化研究においても広く利用されている出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いて、MG 代謝に着目した寿命と、それに関わる大豆ペプチドの影響について検討を行った。出芽酵母の寿命は 2 種類の尺度で評価される。1 つは、1 個の細胞が行える細胞分裂 (出芽) の回数を指標にして評価する「分裂寿命」である。もう 1 つは、定常期まで培養し栄養が枯渇した状態の細胞が、どれだけ生きながらえることができるかを指標として評価する「経時寿命」である。本研究では、経時寿命に及ぼす MG 代謝酵素の欠損や大豆ペプチドの影響について検討を行った。

実験方法

使用菌株

本研究で使用した酵母を表 1 に示した。

表 1 使用菌株

Strain	Genotype	Source
DL100	<i>MATa leu2-3, 112 trp1-1 ura3-52 his4 can1</i>	Siliciano and Tatchell 1984
DL376	DL100, <i>pkc1Δ::LEU2</i>	Levin and Bartlett-Heubusch 1992
DL100- <i>glo1Δ</i>	DL100, <i>glo1Δ::KanMX4</i>	This study
<i>pkc1Δglo1Δ</i>	DL100, <i>pkc1Δ::LEU2 glo1Δ::kanMX4</i>	This study
YPH250	<i>MATa trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 ura3-52 ade2-101</i>	Yeast Genetic Stock Center
<i>glo1Δ</i>	YPH250, <i>glo1Δ::LEU2</i>	Lab stock
<i>glo1Δgre2Δgre3Δsfa1Δ</i>	YPH250, <i>glo1Δ::LEU2 gre2Δ::KanMX4 gre3Δ::his5⁺ sfa1Δ::URA3</i>	This study

培地

経時寿命の計測には以下の培地を用いた。SDC 培地 (2% グルコース、0.17% yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate、0.5% ammonium sulfate、20 mg/L 各種アミノ酸および塩基 (アルギニン、ヒスチジン、メチオニン、トリプトファン、アデニン、ウラシル)、30 mg/L 各種アミノ酸 (イソロイシン、ロイシン、リジン、チロシン)、60 mg/L フェニルアラニン、150 mg/L バリン。大豆ペプチド培地 (2% グルコース、20 mg/L ウラシル、20 mg/L アデニン、0.8% ハイニュート AM-不二製油株式会社製)。また、生存率測定のためのコロニー形成には、YPD 培地 (2% グルコース、1% 酵母エキス、2% ペプトン) に 2% 寒天を加えたものを用いた。グリオキサラーゼ I 活性を測定するための培養は SD 培地 (2% グルコース、0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids、必要に応じてアミノ酸ならびに塩基を添加) を用いた。

経時寿命の測定

30 mL の SDC 培地、あるいは大豆ペプチド培地を含む 100 mL 容三角フラスコで 28°C で振とう培養した。培養 3 日で生育が停止した時点をも Day 0 として、培養液を経時的にサンプリングし、YPD 寒天培地に塗布した。2 日後に出現したコロニー数をカウントし、Day 0 の生菌数を 100% として生存率を求め、経時寿命を評価した。

プラスミド

YEpl3+*YAPI* は研究室保管のものを用いた (Inoue et al. 1999)。*GAL* プロモーターを持つ YCpLG (Bardwell et al. 1998) に野生型 *PKC1* 遺伝子、ならびに構成的活性化変異型 *PKC1*^{R398P} を導入したプラスミドを作製した。

グリオキサラーゼ I 活性の測定

グリオキサラーゼ I 活性は、MG とグルタチオンを基質とし、*S*-ラクトイルグルタチオンの生成に伴う A_{240} の上昇を測定することで行なった (Inoue and Kimura, 1996)。

結果と考察

Pkc1 が MG 代謝酵素に及ぼす影響

S. cerevisiae の *PKC1* 遺伝子は、本菌における唯一のプロテインキナーゼ C をコードする必須遺伝子である。われわれはこれまでに、MG が TOR 複合体 2 (TORC2) を活性化し、TORC2 が Pkc1 を直接リン酸化することで活性化することを明らかにしている (Nomura and Inoue 2015; Nomura et al. 2022)。そこで、MG の主要な代謝酵素であるグリオキサラーゼ I (Glo1) 活性に及ぼす Pkc1 の影響について検討を行った。*pkc1Δ* 株における Glo1 活性を野生株と比較したところ、有意な差は認められなかった (図 1A)。次に、Pkc1 の構成的活性化変異体 (Pkc1^{R398P}) をガラクトースプロモーターに連結し、ガラクトースを添加することで発現誘導させた際の Glo1 活性を測定した。その結果、ベクターコントロールや野生型 Pkc1 を発現させた場合との間で有意差は認められなかった (図 1B)。これらのことから、Glo1 活性は TORC2-Pkc1 シグナル経路の下流には位置しないことが明らかとなった。

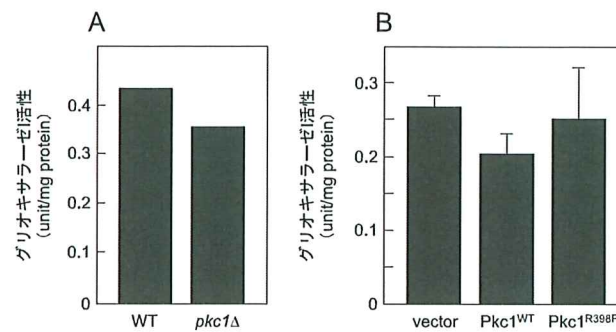


図1 Pkc1 が Glo1 活性に及ぼす影響

(A) DL100 株の野生株 (WT) ならびに *pkc1Δ* 株を 1 M ソルビトールを含む SD 培地で対数期まで培養し、Glo1 活性を測定した。(B) *GALI* プロモーター下流に野生型 *PKC1* (*Pkc1^{WT}*)、構成的活性化変異型 *PKC1* (*Pkc1^{R398P}*) を連結したプラスミドを導入した株をラフィノース培地で対数期まで培養した。2%ガラクトースを添加し、さらに 2 時間培養したのち Glo1 活性を測定した。

グリオキサラーゼ I (Glo1) 欠損が経時寿命に及ぼす影響

S. cerevisiae において MG は種々の酵素により代謝される (Inoue et al. 2011; 井上 2016)。MG の代謝酵素のうち、あらゆる生物種において普遍的な酵素は MG をグルタチオン依存的に *S*-ラクトイルグルタチオンに変換するグリオキサラーゼ I (Glo1) である。そこで、Glo1 欠損が経時寿命に及ぼす影響について検討した。その結果、*glo1Δ* 株では経時寿命の有意な延伸が認められた (図 2A)。

Pkc1 欠損株の経時寿命に及ぼす *GLO1* 遺伝子破壊の影響

これまでの研究から、*pkc1Δ* 株では経時寿命が顕著に短縮することを見いだしている (図 2B) (井上・池田 2017)。一方、Glo1 欠損株では経時寿命の延伸が認められたことから、*pkc1Δ* 株の経時寿命の短縮が *GLO1* 遺伝子の破壊により抑圧されるかどうかを検討した。その結果、*pkc1Δglo1Δ* 株の経時寿命は *pkc1Δ* 株のそれと同じであった (図 2B)。大豆ペプチドは *pkc1Δ* 株の経時寿命の短縮を回復させることができた (井上・池田 2017) ことから、大豆ペプチドによる寿命延伸効果は、Glo1 欠損によりもたらされる経時寿命延伸効果とは異なる作用機序によるものであると考えられた。

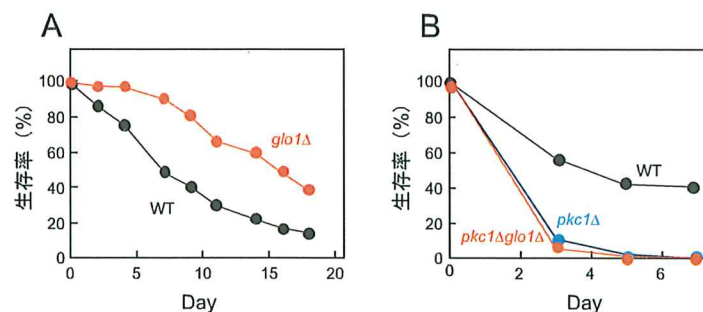


図2 Pkc1 ならびに Glo1 欠損が経時寿命に及ぼす影響

(A) YPH250 株の野生株 (WT) ならびに *glo1Δ* 株を SDC 培地で 3 日間培養した。その時点を経時的に生存率を測定した。(B) DL100 株の野生株 (WT)、*pkc1Δ* 株、ならびに *pkc1Δglo1Δ* 株を SDC 培地で 3 日間培養した。その時点を経時的に生存率を測定した。

転写因子 Yap1 の過剰発現が経時寿命に及ぼす影響

われわれはこれまでに、*glo1Δ*株では細胞内 MG 含量が増大するとともに、転写因子 Yap1 が構成的に活性化することを明らかにしている (Maeta et al. 2005)。そこで、*YAP1* 遺伝子を過剰発現させた細胞の経時寿命を測定した。その結果、ベクターコントロールと比べて、*YAP1* 遺伝子を過剰発現させても経時寿命が延伸することはなかった。このことから、*glo1Δ*株の経時寿命の延伸は、Yap1 の構成的な活性化によるものではないと考えられた (図 3)。

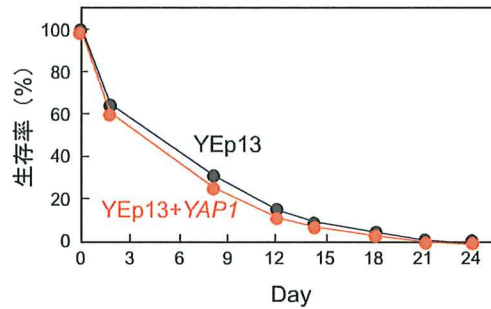


図 3 Yap1 の過剰発現が経時寿命に及ぼす影響

野生株 (YPH250) にベクター (YEp13) ならびに YEp1+*YAP1* を導入した株を SDC 培地で 3 日間培養した。その時点を目 0 とし、目 0 の生存率を 100%として、経時的に生存率を測定した。

MG 代謝酵素の欠損が経時寿命に及ぼす影響

*glo1Δ*株では細胞内 MG 含量が増大すること (Maeta et al. 2005)、また Glo1 以外の MG の代謝酵素 (Gre2, NADPH 依存性メチルグリオキサル還元酵素 ; Gre3, NADPH 依存性アルドース還元酵素) を同時に破壊した *glo1Δgre2Δgre3Δ*株では、さらに細胞内 MG 含量が増加することを既に報告している (Nomura et al. 2018)。さらに最近われわれは、本来ホルムアルデヒドをグルタチオン依存的に S-ホルミルグルタチオンに変換する Sfa1 が、MG 代謝に関与することを見いだした。そこで、*glo1Δ*株が示す経時寿命の延伸が、細胞内 MG 含量の増大に伴う MG によるホルミシス効果に起因する可能性を検討する目的で、Glo1 単独破壊株よりも細胞内 MG レベルの更なる増加が期待される *glo1Δgre2Δgre3Δsfa1Δ*四重破壊株の経時寿命を測定した。その結果、予想に反し、*glo1Δgre2Δgre3Δsfa1Δ*株の経時寿命は *glo1Δ*株のそれよりも短縮傾向を示した (図 4)。

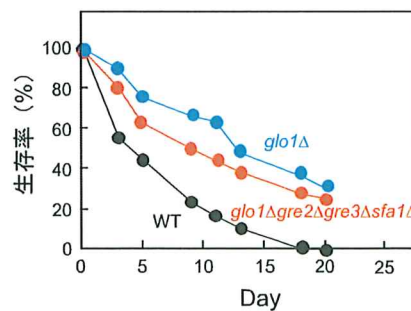


図 4 MG 代謝酵素欠損が経時寿命に及ぼす影響

YPH250 の野生株 (WT)、*glo1Δ*株、ならびに *glo1Δgre2Δgre3Δsfa1Δ*株を SDC 培地で 3 日間培養した。その時点を目 0 とし、目 0 の生存率を 100%として、経時的に生存率を測定した。

これらのことから、Glo1 欠損株における経時寿命の延伸は、単に細胞内 MG 含量の増大によるホルミシス効果によるものではない可能性、あるいは、ホルミシス効果ではあるものの、*glo1Δgre2Δgre3Δsfa1Δ*株ではホルミシス効果を発揮する以上の MG が蓄積し、毒性物質としての MG の効果が優っている可能性も考えられた。

次に、経時寿命に及ぼす大豆ペプチドの影響を検討した。その結果、野生株においては大幅な、また *glo1Δ*株や *glo1Δgre2Δgre3Δsfa1Δ*株でも大豆ペプチドにより程度の差はあれ経時寿命の延伸効果が観察された (図 5)。大豆ペプチドは *glo1Δ*株でも経時寿命を延伸した (相加性が見られた) ことから、大豆ペプチドによる経時寿命の延伸効果は Glo1 欠損による経時寿命への影響とは異なる作用機序によるものである可能性が考えられた。一方、*glo1Δgre2Δgre3Δsfa1Δ*株における大豆ペプチドの経時寿命の延伸効果は *glo1Δ*株におけるそれよりも小さかったことから、四重破壊株では毒性物質としての MG の作用が強く発揮されている可能性が考えられた。

今後は、Glo1 欠損株や大豆ペプチド培地で培養した細胞の RNA-seq 解析やメタボローム解析などにより、どのような遺伝子や代謝系が酵母の経時寿命に影響を及ぼしているかを検討していく必要がある。

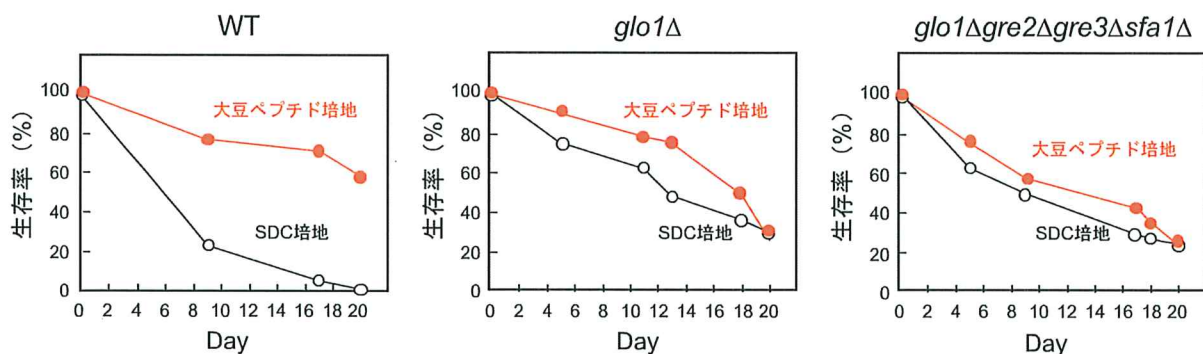


図 5 大豆ペプチドが経時寿命に及ぼす影響

YPH250 の野生株 (WT)、*glo1Δ*株、ならびに *glo1Δgre2Δgre3Δsfa1Δ*株を SDC 培地、あるいは大豆ペプチド培地で 3 日間培養した。その時点を目 0 とし、目 0 の生存率を 100%として、経時的に生存率を測定した。

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人・タカノ農芸化学研究助成財団に厚く御礼申し上げます。また、本研究にご協力いただいた京都大学大学院農学研究科・応用生命科学専攻・エネルギー変換細胞学分野の池田佳代氏に感謝いたします。

参考文献

Bardwell, L., Cook, J. G., Zhu-Shimoni, J. X., Voora, D. and Thorner, J. (1998) Differential regulation of transcription: repression by unactivated mitogen-activated protein kinase Kss1 requires the Dig1 and Dig2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15400-15405.

- Desai, K. M., Chang, T., Wang, H., Banigesh, A., Dhar, A., Liu, J., Untereiner, A. and Wu, L. (2010) Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88:273-284.
- Dorling, J. L., Martin, C. K. and Redman, L. M. (2022) Calorie restriction for enhanced longevity: The role of novel dietary strategies in the present obesogenic environment. *Ageing Res. Rev.* 64:101038.
- Inoue, Y. and Kimura, A. (1996) Identification of the structural gene for glyoxalase I from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271:25958-25965.
- Inoue, Y., Maeta, K. and Nomura, W. (2011) Glyoxalase system in yeasts: Structure, function, and physiology. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22:278-284.
- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S. and Kimura, A. (1999) Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274:27002-27009.
- Karagianni, C. and Bazopoulou, B. (2024) Redox regulation in lifespan determination, *J. Biol. Chem.* 300(3):105761.
- Levin, D. E. and Bartlett-Heubusch, E. (1992) Mutants in the *S. cerevisiae* *PKC1* gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J Cell Biol.* 116:1221-1229.
- Maeta, K., Izawa, S., Okazaki, S., Kuge, S. and Inoue, Y. (2005) Activity of the Yap1 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by methylglyoxal, a metabolite derived from glycolysis. *Mol. Cell. Biol.* 24:8753-8764.
- Nomura, W., and Inoue, Y. (2015) Methylglyoxal activates the target of rapamycin complex 2-protein kinase C signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 35:1269-1280.
- Nomura, W., Aoki, M. and Inoue, Y. (2018) Toxicity of dihydroxyacetone is exerted through formation of methylglyoxal in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on actin polarity and nuclear division. *Biochem. J.* 475:2637-2652.
- Nomura, W., Ng, S.-P., Takahara, T., Maeda, T., Kawada, T., Goto, T. and Inoue, Y. (2022) Roles of phosphatidylserine and phospholipase C in the activation of TOR complex 2 signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 135: jcs259988.
- Siliciano, P. G. and Tatchell, K. (1984). Transcription and regulatory signals at the mating type locus in yeast. *Cell* 37:969-978.
- 井上善晴 (2016) 解糖系派生物メチルグリオキサールによるメタボリックシンドローム. 実験医学増刊. 34:45-51.
- 井上善晴、池田佳代. (2017) 大豆ペプチドによる経時寿命延伸効果の分子基盤解明. 大豆たん白質研究, 20:95-101.