

Epigenetic silencing mediates mitochondria stress-induced longevity

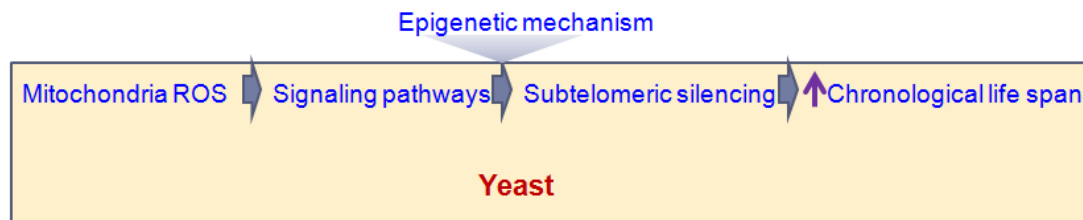
Cell Metab. 2013 June 4 ;17:954-964.

吳易謙 整理

粒線體異常是生物老化的重要特徵。傳統上認為，粒線體異常會導致自由基的產生，而自由基將造成大分子損傷，進而影響細胞的功能，甚至誘發細胞死亡。但是過去的研究指出，自由基除了會造成大分子損傷外，也可能有其他作用。例如，自由基可以對蛋白質的半胱氨酸殘基進行共價修飾，進而調節蛋白質分子的功能（例如酵素分子的活性）。自由基正逐漸地被認為，在特定訊息傳遞路徑中，扮演重要的生理角色。近年老化領域的研究甚至指出，粒線體產生的自由基，可能參與延壽的訊息傳遞路徑。作者先前的研究指出，相較於野生型酵母菌株，於生長期大量產生粒線體自由基的酵母菌株有較長的時序壽命(chronological life span)。總言之，粒線體自由基可能具有加速與延緩老化的雙重功能。顯然的，我們急需建立一個新的模型，來解釋此一矛盾現象。

學者推測，雖然高量的粒線體自由基會造成損傷，但適量的粒線體自由基，會誘發特定的壓力反應(stress responses)，使得生物體在未來面對高量的粒線體自由基時，較不易發生損傷與老化。然而目前仍不甚清楚此一激效適應(hormetic adaptation)的詳細機轉為何。染色體端粒損傷是廣知的老化機轉。近年的研究指出，附基因調控機轉(epigenetic mechanism)與伴隨的亞端粒區域基因轉錄抑制(subtelomeric transcriptional silencing)在端粒結構的維持上，扮演重要角色，能夠保護染色體端粒，使其較不易發生損傷。所以作者研究團隊做了一個假設：適量的粒線體自由基，能藉由活化特定的訊息傳遞路徑，啟動亞端粒區域附基因調控機轉，抑制亞端粒區域基因轉錄，進而延緩老化、延長酵母菌的時序壽命(圖一)。

圖一 研究假設：適量的粒線體自由基(mitochondria ROS)能藉由活化特定的訊息傳遞路徑(signaling pathways)啟動亞端粒區域(subtelomeric regions)附基因調控機轉(epigenetic mechanism)，抑制亞端粒區域基因轉錄(subtelomeric silencing)，進而延緩老化、延長酵母菌的時序壽命(chronological life span)。



本研究以酵母菌為生物模型(model organism)。為了驗證假說，研究團隊使用帶有不同基因突變的酵母菌菌株，測量及比較其於生長靜止期(stationary phase)的存活曲線與時序壽命。該研究團隊以下述兩種方法，適度地增加粒線體自由基：1. 減少 TOR complex 1 (TORC1) signaling (使用帶有 *tor1* 突變的酵母菌菌株 *tor1Δ*)；

2. 於指數性成長(exponential growth)階段，施予短暫的且未達到致死量(sublethal dose)的 menadione。

研究團隊發現，與野生菌株比較，產生適量粒線體自由基的酵母菌菌株，確實有較長的時序壽命。為了找出粒線體自由基可能誘發的訊息傳遞路徑，作者比較了兩菌株的基因表現；結果發現有 45 種基因，在兩種增加粒線體自由基的實驗中，皆會發生「表現上的改變」(or 表現量皆減少)。進一步發現這 45 種基因，絕大部分都帶有 AG5 promoter motif。能夠與 AG5 promoter motif 結合的 transcriptional regulators 包含 Gis1p、Msn2p、Msn4p 與 Rph1p。*gis1pΔ*、*msn2pΔ*、*msn4pΔ* 酵母菌菌株，在適量粒線體自由基的刺激下，依然能夠延長時序壽命；相反的，*rph1pΔ* 酵母菌菌株，則無此現象。可見，Rph1p 參與粒線體自由基所誘發的延壽訊息傳遞路徑。原則上，Rph1p 接受 Rad53p 激酶的調控，而 Rad53p 可以被 Tel1p 或 Mec1p 激酶活化。雖然 *rad53pΔ* 與 *tell1pΔ* 酵母菌菌株在適量粒線體自由基的刺激下，無法延長時序壽命；但 *mec1pΔ* 的時序壽命仍較控制組長。可見，粒線體自由基藉由 Tel1p，活化下游的 Rad53p 與 Rph1p (圖二)。但是基本上，Tel1p 只有在 nuclear DNA 發生損傷(damage)的時候，才會活化 Rad53p。所以粒線體自由基，是藉由破壞 nuclear DNA，來誘發 Tel1p-Rad53p-Rph1p 路徑嗎？作者以下列證據告訴我們，答案是否定的：1. 經 menadione 或 methylmethane sulfate (一種 DNA damaging agent) 處理後，會產生不同程度的 Rad53p 磷酸化，而且只有前者會受到 *tell1p* 基因突變的影響；2. 經 menadione 或 methylmethane sulfate 處理後，Rad53p 會在不同部位被磷酸化；3. Menadione 與 methylmethane sulfate 處理會誘發不同的基因表現；4. Menadione 處理後並無法產生 DNA 氧化損傷；5. Menadione 處理的延壽效果並不會因為無法偵測 DNA double-strand break (mediated by Mre11p) 而打折。綜合以上結果，粒線體自由基可以藉由直接活化 Tel1p，來活化下游的 Rad53p 與 Rph1p (圖二)。

釐清 Rph1p 的上游機轉後，作者繼續探討 Rph1p 的下游延壽機轉。於適量粒線體自由基的刺激下，Rph1p 會被磷酸化，且此現象不發生在 *rad53pΔ* 與 *tell1pΔ* 酵母菌菌株。所以適量粒線體自由基，藉由活化 Tel1p 與 Rad53p，磷酸化 Rph1p (圖二)。Rph1p 為一 histone demethylase，會對 histone 3 的 lysine 36(H3K36) 去甲基化。當 Rph1p 被磷酸化後，其會脫離 chromatin，進而增加該區域 histone 的甲基化。就酵母菌而言，ribosomal DNA gene cluster、mating loci、subtelomeric regions 這些染色體區域的 histone 甲基化，會促進 heterochromatin 的形成，抑制基因的轉錄，進而延長壽命。的確，染色質免疫沉澱實驗(chromatin immunoprecipitation) 結果告訴我們，於適量粒線體自由基的刺激下，Rph1p 會脫離亞端粒區域(subtelomeric regions)，並增加該區域 H3K36 的甲基化 (H3K36me3 的量)(圖二)，而在 *rad53pΔ* 與 *rph1pΔ* 酵母菌菌株，則無此現象。藉由 gene expression microarrays 的實驗，作者也進一步發現在適量粒線體自由基的刺激下，

經由上述訊息傳遞路徑，絕大部分表現被抑制的基因，確實都位於亞端粒區域。作者進一步於酵母菌的染色體亞端粒區域置入 URA3 reporter，如果亞端粒區域的基因轉錄被抑制，URA3 reporter 就不會表現，使得該菌株在 5-FOA 毒素環境中仍能存活。此 URA3 reporter 實驗結果亦顯示，粒線體自由基訊息傳遞路徑，確實抑制端粒區域基因的轉錄(圖二)。同樣的現象，亦由 RT-PCR 實驗證實。Sir3p 所主導產生的 high-order chromatin，可抑制亞端粒區域基因轉錄。的確，作者於染色質免疫沉澱實驗(chromatin immunoprecipitation)中發現，經由上述訊息傳遞路徑，適量粒線體自由基，會使結合於亞端粒區域的 Sir3p 量增加。*sir3Δ* 酵母菌菌株的不具亞端粒區域基因轉錄抑制及延壽效果，亦證實了 Sir3p 的重要性。

自由基不全然只有壞處。本篇研究首次證實，適量的粒線體自由基可以藉由 Tel1p-Rad53p 訊息傳遞路徑調控 histone demethylase Rph1p 的活性，啟動 Sir3p 主導的亞端粒區域附基因調控機轉(subtelomeric epigenetic mechanism)，抑制亞端粒區域基因轉錄(subtelomeric genes silencing)，進而延長酵母菌的壽命(圖二)。如果此機轉亦能適用在更高等的生物，那麼本研究結果，將為自由基相關的老化與病理機制，提供全然嶄新的思維。

圖二： 適量粒線體自由基藉由 mtROS signaling 啟動亞端粒區域附基因調控機轉(subtelomeric epigenetic mechanism)，抑制亞端粒區域基因轉錄(subtelomeric genes silencing)，進而延長酵母菌的時序壽命(chronological life span)。

