

氏名	すぎやまけいいち 杉山圭一
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1099号
学位授与の日付	平成12年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Study of Glutathione Metabolism on Heat Shock Stress in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の熱ショックストレスにおけるグルタチオン代謝に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 木村 光 教授 清水 昌 教授 江崎信芳

### 論文内容の要旨

グルタチオン ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine) は生体内にもっとも多く存在する低分子チオール化合物である。その合成は ATP 存在下,  $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素 (*GSH1* 遺伝子産物) とグルタチオン合成酵素 (*GSH2* 遺伝子産物) の2つの酵素の連続した反応により行われる。グルタチオンの生体内における役割は多岐にわたるが、そのなかでも重要なものとして抗酸化剤としての役割があげられる。好氣的生物においては、呼吸に用いられる酸素の一部は不完全な還元状態で留まり活性酸素種となる。哺乳類では呼吸量が環境温度の急激な上昇、いわゆる熱ショックストレスにより増大することが知られている。このことは酸化的ストレスと熱ショックストレスが一部オーバーラップしている可能性を示唆している。そこで本研究では出芽酵母、*Saccharomyces cerevisiae* における熱ショックストレス時のグルタチオン代謝及びその役割について検討した。その結果、*S. cerevisiae* では熱ショックストレス時において、グルタチオンはミトコンドリア DNA の保護に必要であることを明らかにした。また熱ショックストレス時に細胞内グルタチオン含量が増大することを見出し、その増大が酸化的ストレス応答性転写因子 Yap1 を介したグルタチオン合成系酵素遺伝子群の転写誘導によることを明らかにした。本論文の主な内容は以下のとおりである。

#### 第1章 熱ショックストレス応答におけるグルタチオンの役割

*S. cerevisiae* において熱ショックストレスにより呼吸量が増大し、それに伴い細胞内酸化度が上昇することを明らかにした。また同ストレス時に細胞内グルタチオン含量も増大することを明らかにした。一方、グルタチオン合成系欠損株は、野生株と同様に熱ショックストレスに対する適応性を獲得し、また熱ショックストレス応答性遺伝子である *HSP104* 遺伝子や細胞質カタラーゼをコードする *CTT1* 遺伝子も野生株と同じように発現誘導が起きていることを確認した。しかしながら *gsh1* 欠損株では熱ショックストレスにより呼吸欠損株の出現頻度が上昇し、またその頻度は細胞外からグルタチオンを添加することにより一部抑制されることを見出した。これより熱ショックストレスにおけるグルタチオンの役割は、呼吸量の増大に伴い不可避免的に発生する活性酸素種からのミトコンドリア DNA の保護であると考察した。

#### 第2章 *S. cerevisiae* の *GSH2* 遺伝子の同定

第1章において熱ショックストレスによる細胞内グルタチオン含量の増大を示したが、その増大の機構を遺伝子レベルで解析するために、未だクローニングされていなかったグルタチオン合成酵素遺伝子 (*GSH2*) の同定を行った。その結果、*Saccharomyces Genome Database* において YOL 049 w と呼ばれる機能未同定の ORF が *S. cerevisiae* の *GSH2* 遺伝子であることを明らかにした。

#### 第3章 *GSH2* 遺伝子の発現制御

グルタチオン合成系の1段階目の反応を行う  $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素をコードする *GSH1* 遺伝子は、酸化的ストレス応答性転写因子 Yap1 により制御されていることが知られている。そこで今回同定した *GSH2* 遺伝子も Yap1 によ

り転写制御されているか検討した。その結果、*GSH2* 遺伝子も *Yap 1* により転写制御されていることを明らかにした。これより酸化的ストレスが負荷された場合、*S. cerevisiae* は *Yap 1* を介して *GSH1* 遺伝子と *GSH2* 遺伝子の両遺伝子の転写を協調的に誘導することによって、細胞内グルタチオン含量を増大させることを明らかにした。

#### 第4章 熱ショックストレスによるグルタチオン含量の増大の機構

*S. cerevisiae* における熱ショックストレスによるグルタチオン含量の増大は、*Yap 1* を介した *GSH2* 遺伝子と *GSH2* 遺伝子の転写誘導によるものであることを明らかにした。また熱ショックストレスを嫌気培養下の細胞に、またはミトコンドリアのチトクロム *c* オキシングーゼの阻害剤であるシアン化カリウムで処理した細胞に負荷する実験から、同ストレス時の *GSH1* 遺伝子と *GSH2* 遺伝子の転写誘導には、呼吸により不可避免的に発生する活性酸素種が関与していることを明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

本論文では、熱ショックストレス時に出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において細胞内グルタチオン含量が増大すること、またその際、グルタチオンはミトコンドリア DNA の保護に機能していることを明らかにした。また同ストレス時のグルタチオン含量の増大がグルタチオン合成系酵素遺伝子群の転写誘導によることを示した。評価すべき点は以下のとおりである。

1. *S. cerevisiae* に熱ショックストレスを負荷した場合、呼吸量が増大しそれに伴い細胞内酸化度も上昇していることを明らかにした。またその際、細胞内グルタチオン含量も増大していることを見出した。

2. 熱ショックストレスに対する耐性獲得にグルタチオンは必要ないことを明らかにした。またこれを支持する結果として、グルタチオン合成系欠損株においても、熱ショックストレス時に同ストレス誘導性遺伝子の発現誘導が起こることを確認した。

3. *gsh1* 欠損株の熱ショックストレスによる呼吸欠損株の出現頻度の上昇から、熱ショックストレス時にグルタチオンはミトコンドリア DNA を保護していることを明らかにした。

4. *S. cerevisiae* のグルタチオン合成酵素をコードする *GSH2* 遺伝子を同定した。本遺伝子は第 15 番染色体上に存在し、推定分子量は 55, 812 であった。本遺伝子を *gsh2* 欠損株にシングルコピーで導入すると、グルタチオン合成酵素活性は野生株と同レベルまで上昇した。またマルチコピーで導入した場合、同酵素活性は野生株の約 4 倍に上昇した。

5. *GSH2* 遺伝子が、 $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素をコードする *GSH1* 遺伝子と同様に転写因子 *Yap 1* により制御されていることを明らかにした。*Yap 1* は酸化的ストレス応答性転写因子であるが、実際に *yap1* 遺伝子破壊株では、*GSH1* 遺伝子と同様に *GSH2* 遺伝子も酸化的ストレスによる誘導が認められなくなることを確認した。これにより *S. cerevisiae* では、*Yap 1* を介してグルタチオン合成系酵素遺伝子である *GSH1* 遺伝子及び *GSH2* 遺伝子の転写を誘導することで、細胞内グルタチオン含量を増大させ、負荷されている酸化的ストレスに応答していることを明らかにした。

6. 熱ショックストレスによる細胞内グルタチオン含量の増大は、*Yap 1* を介した *GSH1* 遺伝子及び *GSH2* 遺伝子の転写の誘導によることを明らかにした。

7. 熱ショックストレス時の *GSH1* 遺伝子及び *GSH2* 遺伝子の転写の誘導は、嫌気培養した細胞に対して、またはシアン化カリウム処理をした細胞に熱ショックストレスを負荷した場合では観察されなかった。これより同ストレスによる *Yap 1* を介した *GSH1* 遺伝子及び *GSH2* 遺伝子の転写の誘導には、呼吸により発生する活性酸素種が関与していることを明らかにした。

以上のように本論文は、酸化的ストレスからの防御に重要なグルタチオンが、熱ショックストレスにおいてもミトコンドリア DNA の保護に必要であることを明らかにした。これまで酸化的ストレスからの防御に重要と考えられてきたグルタチオンが、熱ショックストレス時においても酸化的ストレス時と同様に *Yap 1* を介しその含量を増大させていることを明らかにしたことは、熱ショックストレスと酸化的ストレスが一部オーバーラップしていることを示すもので、応用微生物学、微生物生理学などの発展に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 12 年 1 月 13 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。