

氏名	たか つめ よし ふみ 高 詰 佳 史
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1621 号
学位授与の日付	平 成 19 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	Activation of stress signal transduction pathway by methylglyoxal in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (分裂酵母におけるメチルグリオキサールによるストレス伝達経路の活性化)
論文調査委員	(主 査) 教 授 喜 多 恵 子 教 授 江 崎 信 芳 教 授 阪 井 康 能

論 文 内 容 の 要 旨

メチルグリオキサール (MG) は、解糖系酵素の一つであるトリオースリン酸イソメラーゼの反応中間体から派生する 2-オキソアルデヒドである。ほとんどの生物がエネルギー生成に解糖系を用いることから、MG は全ての生物において認められる生体内物質である。また、ある種の細菌は MG を積極的に合成する酵素を持つことから、MG が細胞内で何らかの機能を持つことが予想されている。しかしながら、高濃度の MG は細胞の増殖を阻害し、その生理的役割については、ほとんど明らかになっていない。一方、MG と、それを代謝する酵素グリオキサラーゼ I (Glo1) が糖尿病やがんに関与することは古くから指摘されているが、MG の代謝異常がそれら疾患の原因であるのか、あるいは結果であるのかについては明確な解答は得られていない。本論文は、MG は単なる代謝物というだけにとどまらず、シグナル伝達をはじめとする細胞応答に関与しているのではないかという仮定のもと、モデル生物として分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) を用いて、MG およびその代謝酵素 Glo1 がストレスシグナル伝達系に与える影響についての研究をまとめたものである。主な内容は次に示す通りである。

(1) *S. pombe* における MG 代謝系を明らかにすることを目的として、Glo1 の構造遺伝子 (*glo1⁺*) を同定した。分裂酵母の *glo1⁺* 破壊株 (*glo1Δ*) は MG に対し感受性を示し、また、出芽酵母の *glo1Δ* 株が示す MG 感受性は当該遺伝子の導入により抑圧された。次に、*glo1⁺* 遺伝子産物の精製を行った。興味深いことに、分裂酵母の Glo1 は 59°C で 4 時間処理しても 90% 以上の活性を維持できる耐熱性の高い酵素であった。

(2) *S. pombe* における Glo1 の各種ストレスに対する応答について検討した結果、Glo1 活性は浸透圧ストレスによってのみ上昇し、その他のストレスには応答しないことを見いだした。興味深いことに、浸透圧ストレスにより Glo1 活性が上昇するにもかかわらず、*glo1⁺* 遺伝子の mRNA、および Glo1 タンパク質レベルの増加は認められなかった。タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド存在下では、浸透圧ストレスによる Glo1 の活性化は見られなかったことから、Glo1 活性の上昇は浸透圧ストレス条件下で新規に合成されるタンパク質によることが示唆された。また、抗 Glo1 抗体を用いた免疫沈降実験を行った結果、Glo1 に結合するタンパク質の存在を認めた。

(3) 細胞外 MG に対する *S. pombe* の応答を検討したところ、様々なストレス応答に関わるシグナル伝達経路である Spc1-MAP キナーゼがリン酸化されることを見いだした。MG による Spc1 のリン酸化は、Spc1 をリン酸化する上流のキナーゼである Wis1 を欠損させると見られなくなったことから、MG は Spc1-MAPK 経路を活性化していることが示唆された。

(4) Spc1-MAP キナーゼ経路の機能的に上流で働く酸化ストレスセンサーとして、二成分制御系によるシグナル伝達機構が存在する。すなわち、酸化ストレスシグナルを Phk1/Phk2/Phk3 の三つのセンサーキナーゼが受容し、リン酸基転移メディエーター (Spy1) を介してレスポンスレギュレーター (Mcs4) に収束する。MG による Spc1 のリン酸化は Mcs4 を欠損させると全く観察されなくなった。本論文では、MG シグナルは Phk1/Phk2/Phk3 に加え、それ以外のセンサーを

介して Mcs4 にいったん収束した後に, Spc1-MAP キナーゼ経路を活性化していることを明らかにした。

(5) MG が転写因子 Pap1 を可逆的に活性化することを見いだした。過酸化水素による Pap1 の活性化は Spc1 に依存するのに対し, MG による Pap1 の活性化は Spc1 非依存的に起こった。さらに, MG は Pap1 の Cys 残基に可逆的に作用することで核外輸送を阻害し, 結果的に Pap1 を活性化していることを明らかにした。

(6) 一般にシグナル伝達系の活性化は一過性であり, 必要以上にシグナルを伝えないように, 活性化されたシグナル伝達系は不活性化される。Spc1-MAP キナーゼ経路の場合, 各構成タンパク質のリン酸化による活性化は脱リン酸化によってシグナル伝達経路が OFF になる。本論文では, *glo1Δ* 株では MG ストレスによる Spc1 のリン酸化状態が野生株に比べて長く持続することを見いだした。浸透圧ストレス等の MG 以外のストレスでは, Spc1 のリン酸化ならびに脱リン酸化状態に野生株と *glo1Δ* 株で違いは見られなかった。リン酸化 Spc1 を用いた *in vitro* ホスファターゼアッセイ系を構築して解析を行った結果, MG が Spc1 を基質とするホスファターゼを阻害することを明らかにした。さらに, ヒトのチロシンホスファターゼである PTP1B を用いた *in vitro* のアッセイ系においても, MG が PTP1B を阻害することを明らかにした。以上のことから MG は, Spc1-MAP キナーゼ経路のシグナル遮断機構を阻害していることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

メチルグリオキサール (MG) は解糖系の過程で派生する 2-オキソアルデヒドである。MG は細胞内で通常の代謝で生成するにもかかわらず, その反応性の高さから, さまざまな生体成分, 例えば DNA, RNA, タンパク質などと adduct を形成することが報告されており, 結果的に MG は細胞機能に異常を引き起こす。例えば, 細胞内 MG レベルの上昇と, 糖尿病やある種のがんと関連が古くから指摘されている。しかしながら, それらの疾患の原因が MG レベルの上昇によるのか, 疾患の結果として MG レベルが上昇するののかについては明らかになっていない。本論文では分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* をモデル生物として, MG がシグナル伝達系に与える影響について検討した結果が報告されている。以下に示す点が成果として評価できる。

(1) *S. pombe* において初めてグリオキサラーゼ I (Glo1) の構造遺伝子 (*glo1⁺*) を同定し, 生化学的, ならびに遺伝学的解析から, *S. pombe* においても出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と同様に Glo1 が MG の主要な代謝酵素であることを明らかにした。精製された *S. pombe* の Glo1 は高い耐熱性を示し, これまでに精製が報告されている Glo1 に耐熱性を持つ例はないことから, 耐熱性 Glo1 の初めての報告例でもある。

(2) *S. pombe* における Glo1 のストレス応答性を検討し, 浸透圧ストレスによって特異的に活性が上昇することを明らかにしている。しかしながら, 浸透圧ストレスによって Glo1 活性が上昇するにもかかわらず, *glo1⁺* 遺伝子の mRNA, および Glo1 タンパク質レベルの増加は認められていない。シクロヘキシミドでタンパク質合成を阻害すると, 浸透圧ストレスによる Glo1 活性の上昇が観察されなくなることから, 浸透圧ストレス条件下で合成される何らかのタンパク質の関与が示唆される。さらに, Glo1 と相互作用する因子を免疫沈降実験により見だし, 翻訳後修飾による活性化の可能性を示唆している。

(3) *S. pombe* を MG で処理すると, ストレス応答性の MAP キナーゼである Spc1 がリン酸化されることを見だし, MG がシグナル伝達経路のイニシエーターとして機能することを明らかにした。

(4) Spc1-MAP キナーゼ経路へシグナルを伝達する上流のセンサーとして, 酸化ストレスセンサーを構成する二成分制御系に加え, 未知のセンサーによっても MG シグナルが受容され, 二成分制御系のレスポンスレギュレーターである Mcs4 を介して Spc1-MAP キナーゼ経路へシグナルを伝達していることを明らかにした。

(5) MG の細胞内における標的分子の一つとして, 酸化ストレス応答性の転写因子 Pap1 を同定した。MG による Pap1 の活性化は, 従来から知られているような分子内ジスルフィド結合の形成による酸化ではなく, Pap1 の C 末端側に存在する Cys 残基の可逆的な修飾によるものであることを明らかにした。

(6) MG による Spc1 のリン酸化において *glo1Δ* 株では Spc1 のリン酸化状態が野生株と比べて持続することを見だし, その原因が, MG による Spc1 を基質とするプロテインホスファターゼの阻害によることを, *in vitro* のホスファターゼアッセイ系を構築することで明らかにした。さらに, ヒトのチロシンホスファターゼである PTP1B も MG により阻害され

ることを明らかにした。PTP1Bを始めとするチロシンホスファターゼの活性中心には Cys 残基が存在し、また MG による Pap1 の活性制御も Cys 残基を標的としていたことから、Cys 残基を介した MG のシグナル伝達経路への関与を強く示唆する結果が得られている。

以上のように本論文は、分裂酵母をモデルとして、全ての生物に共通して存在する代謝物である MG がシグナル伝達のイニシエーターとして機能することを明らかにし、MG が関与する細胞内応答機構の解明に重要な知見を提供していることから、生化学、分子細胞学、応用微生物学などの分野に大きく寄与するものである。

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19年2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。