

氏名	三木健夫
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1112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	農学研究科食品工学専攻
学位論文題目	酵母のグルタチオンペルオキシダーゼの遺伝学的解析

論文調査委員 (主査) 教授 木村 光 教授 柴原正章 教授 江崎信芳

### 論文内容の要旨

細胞と外界、細胞内器官と細胞質を隔てる生体膜はリン脂質の二重膜で構成されている。呼吸により生じる活性酸素種は生体膜脂質の過酸化を引き起こし反応性の高い過酸化脂質を発生させる原因となる。過酸化脂質を多く含む生体膜では正常な物質輸送が見られず、最終的には細胞死を引き起こすことが知られている。このような過酸化脂質を消去する酵素として、ペルオキシダーゼが存在する。このペルオキシダーゼには、電子供与体としてシトクローム c、アスコルビン酸、グルタチオンなどを基質に用いるものがある。真核細胞である酵母において、シトクローム c はミトコンドリア膜間腔に局在しており細胞全体を保護するのに十分でないことや、アスコルビン酸は細胞内でほとんど見いだされないのに対して、グルタチオンは数 mM 濃度で存在していることから、酵母の主要なペルオキシダーゼはグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) ではないかと考えられる。そこで、本研究では酸化的ストレスに対する酵母の GPx の機能について以下の観点から検討した。

#### 1. 酵母のグルタチオン代謝関連酵素の精製

GPx の基質となるグルタチオンは、グルタチオン還元酵素 (GR) により還元される。また、グルコース 6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) の還元力の供給が重要である。そこで *Hansenula mrakii* における両酵素の存在を生化学的に証明することを目的として、両酵素の精製を試みた。さらに、*H. mrakii* の GR と G6PH の存在ならびに諸性質を明らかにした。また、酵素精製の過程で見いだされたグルタチオン酸化酵素 (GOX) についても精製を行い、そのアミノ酸配列から GOX をコードすると思われる遺伝子を取得した。また、本遺伝子を破壊した株ではグルタチオンの還元比率が低下することを明らかにした。

#### 2. *Hansenula mrakii* のグルタチオンペルオキシダーゼ遺伝子の解析

*Hansenula mrakii* は過酸化脂質に対して高い耐性を示す酵母として取得された。本菌では過酸化脂質によって誘導される GPx 活性が観察される。そこで、本菌より GPx 遺伝子の取得を試みた結果、*GRL1*、*LPR1* 遺伝子を得た。これらの過酸化脂質に対する耐性能を検討した結果、*GRL1* 遺伝子を保持した株は 1 mM tert-ブチルヒドロペルオキシド (t-BHP) 含有液体培地でも生育が可能であり、強い t-BHP 耐性を示すことが明らかになった。また、*LPR1* 遺伝子保持株は 1 mM t-BHP 含有液体培地では生育できなかったものの、対照株が生育できない t-BHP 含有寒天培地で生育可能であったことから *GPL1* 遺伝子に比べ弱い t-BHP 耐性を示すことが明らかになった。しかし、*GPL1* 遺伝子が本菌の GPx をコードしているか確認することはできなかった。

#### 3. *Saccharomyces cerevisiae* のグルタチオンペルオキシダーゼの機能解析

ほ乳類の GPx 遺伝子と相同性を示す 3 つの遺伝子ホモログ (*GPX1*、*GPX2*、*GPX3*) が *S. cerevisiae* ゲノムデータベースに存在していた。そこで、GPx 遺伝子ホモログのストレスに対する機能を調べた。まず、異なるストレスによる 3 つの GPx ホモログ遺伝子の発現誘導を調べた結果、*GPX2* はエタノール、熱ストレス、浸透圧ストレス、グルコース飢餓などによっては誘導されないものの、過酸化脂質、過酸化水素、メナジオンなどの酸化的ストレスにより顕著に誘導されることが明らかになった。これに対して、様々なストレス剤の有無に関係なく *GPX3* 遺伝子は常に高いレベルで転写されている

ことがわかった。また、*GPX1* 遺伝子はグルコース飢餓ストレスでやや誘導されることがわかった。*GPX* 遺伝子をすべて破壊した株は致死性を示さなかったものの、GPx 活性はほとんど観察されず、t-BHP ならびに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対して高い感受性を示したことから、*GPX* 遺伝子ホモログは酸化ストレスに対して機能していることを明らかにした。また、*GPX3* 遺伝子破壊株は野生株に比べ GPx 活性が 30% にまで低下したことから、*S. cerevisiae* における主要な GPx 活性は *GRX3* によ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、酵母のグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) について遺伝学的解析を行い、酸化ストレスに対して GPx が機能していることを明らかにした。また、GPx の基質であるグルタチオンの酸化および還元に関わる酵素についても検討し、酵素化学的諸性質を明らかにした。評価すべき点は以下の通りである。

1. *Hansenula mrakii* のグルタチオン還元酵素およびグルコース 6-リン酸脱水素酵素の精製を行い、生化学的に存在を明らかにした。また、両酵素の酵素化学的諸性質から、細胞内酸化型グルタチオンを還元する機能を十分持つと考えられ、本菌にもグルタチオン還元サイクルが存在していることを明らかにした。過酸化脂質によって誘導されるグルコース 6-リン酸脱水素酵素の活性上昇は、*de novo* 合成によって起こることを明らかにした。

2. *Saccharomyces cerevisiae* のグルタチオン酸化酵素の精製を行い、部分アミノ酸配列を決定した結果、*S. cerevisiae* ゲノムデータベースに登録されている YGR 079 w と相同性を示した。本遺伝子破壊株では、グルタチオンの還元比率が低下することを明らかにした。このことから、YGR 079 w はグルタチオン酸化酵素をコードしていることが示唆された。

3. *H. mrakii* の GPx 遺伝子の取得を試み、*GPL1* および *LPR1* 遺伝子を得た。前者は *S. cerevisiae* に強い過酸化脂質耐性を与え、後者は弱い耐性を与えることを明らかにした。*GPL1* 遺伝子が *H. mrakii* の GPx をコードしているかどうか調べるために、本遺伝子破壊株の構築を試みたが、これを得ることはできなかった。一方、*LRR1* 遺伝子産物はほ乳類のイオンチャンネルタンパク質と高い相同性を示すことを明らかにし、酵母の過酸化脂質耐性にはイオンチャンネルタンパク質が関係していることを明らかにした。

4. *S. arevisiae* の染色体上に存在する 3 つの *GPX* 遺伝子ホモログについて、遺伝学的解析を行った。*GPX* 遺伝子ホモログのストレスに対する転写応答を調べ、*GPX2* 遺伝子が酸化ストレスに応答することを明らかにした。また、この転写応答は酸化ストレス応答に重要な転写因子、Yap1 依存的に起こることを明らかにした。

5. *GPX* 遺伝子を欠損した株では GPx 活性がほとんど観察されないことから、*GPX* 遺伝子は *S. cerevisiae* の GPx をコードしていることを明らかにした。酸化ストレスに対する *GPX* 遺伝子産物の機能を調べ、本遺伝子産物は過酸化脂質耐性に重要であることを明らかにした。また、3 つの *GPX* 遺伝子ホモログのうち *GPX3* が主要な GPx であることを明らかにした。

以上のように本論文では、これまで明らかにされていなかった酵母のグルタチオンペルオキシダーゼについて遺伝学的側面から解析し、酵母における過酸化脂質耐性機構にグルタチオンペルオキシダーゼが重要な役割を果たすことを示したもので、分子生物学、微生物学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 2 月 10 日、論文なら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。