

酵母のグルタチオンペルオキシダーゼの遺伝学的解析

三木 健夫

2000年

目次

緒言	1
第一章	
酵母のグルタチオン代謝関連酵素の精製	
第一節	
<i>Hansenula mrakii</i> のグルコース-6-リン酸脱水素酵素の精製 と諸性質	4
第二節	
<i>Hansenula mrakii</i> のグルタチオン還元酵素の精製と諸性質	16
第三節	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> のグルタチオン酸化酵素の精製と 機能解析	26
第二章	
<i>Hansenula mrakii</i> のグルタチオンペルオキシダーゼ遺伝子の解析	35
第三章	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> のグルタチオンペルオキシダーゼの機能解析	
第一節	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> のグルタチオンペルオキシダーゼ 遺伝子の酸化的ストレスによる発現誘導	47
第二節	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> のグルタチオンペルオキシダーゼ の酸化的ストレス応答における機能	54
要約	
謝辞	

緒言

好氣的生物は進化の過程で酸素呼吸により効率的にエネルギーを生産する機構を獲得した。酸素呼吸により、分子状酸素は4電子を受け取り水にまで還元される。しかし、一部の酸素分子は不完全な還元状態で留まり、活性酸素 ($O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 OH^{\cdot}) として細胞内に放出される。これらの分子の一部は生体膜脂質にも作用し、不飽和脂肪酸のアリル水素を引き抜くことによって連鎖的に脂質過酸化反応を進行させることが知られている (1,2)。さらに微量の遷移金属の存在下では、過酸化脂質は分解されヒドロキシルラジカル (LO^{\cdot}) や脂質ペルオキシラジカル (LOO^{\cdot}) を生じる (3,4)。これら活性酸素分子種は細胞内の重要な構成成分であるDNA、タンパク質と反応し細胞に酸化障害を与える (5,6)。

このような活性酸素分子種に対して、生物は抗酸化系酵素を中心とした防御機構を同時に獲得してきた。原核生物である大腸菌 *Escherichia coli* などでは過酸化水素 (H_2O_2) やスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) に起因する酸化的ストレスを感知すると、転写因子 OxyR および SoxRS の支配下にある Mn-スーパーオキシドジスムターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、カタラーゼおよびグルタチオン還元酵素の発現が活性化される (7-10)。これらの酵素群は細胞内の酸化還元反応に関わっており、結果的に大腸菌はこれらの遺伝子群の総合した表現型を反映し酸化的ストレス耐性を示す様になる。一方、真核生物である *Saccharomyces cerevisiae* においても過酸化水素に起因する酸化的ストレスを受けると数十種類のタンパク質の合成が同時に誘導されることが報告されている (11)。これら誘導されるタンパク質の多くはストレスに対して細胞を守る為に機能するものであり、共通の転写因子によって転写が制御されているものも存在する (12,13)。

しかし、微生物の酸化的ストレスに関する研究の多くは過酸化水素を用いて行われており過酸化脂質を用いたものは少なく、その防御機構の詳細については不明な点が多い。過酸化物を基質に用いるペルオキシダーゼは、過酸化脂質に起因する酸化的ストレスに対して重要であると予想される。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用いるものが存在する (14-16)。酵母細胞において、シトクローム *c* はミトコンドリア膜間腔に局在し細胞全体を保護するのに十分ではなく、またアスコルビン酸は細胞内でほとんど見いだされない (17)。これに対して、グルタチオンは細胞内に数 mM 濃度で存在していることから、グルタチオンを電子供与体とするグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) が機能している可能性が高い (18)。事実、酵母 *Hansenula mrakii* では膜結合型 GPx が存在していることが明らかにされ、酵母 *S. cerevisiae* のゲノム DNA 中にはヒトの GPx と高い相同

性を示す3つのGPxホモログ遺伝子が存在することが報告された (19-21)。

そこで本研究では、酵母におけるGPxの酸化ストレスに対する機能について検証する事を目的とし、第一章では*H. mrakii*からGPxの基質として重要なグルタチオンの代謝に関連する酵素について調べた。第二章では酵母のGPxについて遺伝学的側面から検討するために*H. mrakii*のGPx遺伝子の取得を試みた。第三章では*S. cerevisiae*で見い出された3つのGPxホモログ遺伝子 (GPX1、GPX2、GPX3) 産物について解析を行い、酵母のもつGPxの機能について検討した。

【引用文献】

- 1)Steels, E.L., Learmonth, R.P. and Watson, K. (1994) Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*, **140**, 569-576
- 2)Vladimirov, Y.A., Olenov, V.I., Suslova, T.B. and Cheremisina, Z.P. (1980) Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv. Lipid Res.*, **17**, 173-249
- 3)Howlett, N.G. and Avery, S.V. (1997) Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2971-2976
- 4)Aikens, J. and Dix, T.A. (1991) Peroxyl radical (HOO) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J. Biol. Chem.*, **266**, 15091-15098
- 5)Berlett, B.S. and Stadtman, E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **272**, 20313-20316
- 6)Girard, P.M. and Boiteux, S. (1997) Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie*, **79**, 559-566
- 7)Christman, M.F., Storz, G. and Ames, B.N. (1989) *OxyR*, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **86**, 3484-3488
- 8)Christman, M.F., Morgan, R.W., Jacobson, F.S. and Ames, B.N. (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell*, **41**, 753-762
- 9)Greenberg, J.T., Monach, P., Chou, J.H., Josephy, P.D. and Dimple, B. (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **87**, 6181-6185

10)Tsaneva, I.R. and Weiss, B. (1990) SoxR, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **172**, 4197-4205

11)Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M.B. and Labarre, J. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 22480-22489

12)Kullik, I. and Storz, G. (1994) Transcriptional regulators of the oxidative stress response in prokaryotes and eukaryotes. *Redox Report*, **1**, 23-29

13)DeRisi, J.L., Iyer, V.R. and Brown, P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, **278**, 680-686

14)Kubo, A., Saji, H., Tanaka, K., Tanaka, K. and Kondo, N. (1992) Cloning and sequencing of a cDNA encoding ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **18**, 691-701

15)Goltz, S., Kaput, J. and Blobel, G. (1982) Isolation of the yeast nuclear gene encoding the mitochondrial protein, cytochrome *c* peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **257**, 11186-11190

16)Brigelius-Flohe, R., Aumann, K.D., Blocker, H., Gross, G., Kiess, M., Kloppel, K.D., Maiorino, M., Roveri, A., Schuckelt, R. and Usani, F. (1994) Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *J. Biol. Chem.*, **269**, 7342-7348

17)Jamieson, D.J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 1511-1527

18)Kistler, M., Summer, K. and Eckardt, F. (1986) Isolation of glutathione-deficient mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.*, **173**, 117-120

19)Tran, L.T., Inoue, Y. and Kimura, A. (1993) Oxidative stress response in yeast: purification and some properties of a membrane-bound glutathione peroxidase from *Hansenula mrakii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1164**, 166-72

20)Cherry, J.M., Adler, C., Ball, C., Chervitz, S.A., Dwight, S.S., Hester, E.T., Jia, Y., Juvik, G., Roe, T., Schroeder, M., Weng, S. and Botstein, D. (1998) SGD: *Saccharomyces* Genome Database. *Nucleic. Acids Res.*, **26**, 73-79

21)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

第一章

酵母のグルタチオン代謝関連酵素の精製

*Hansenula mrakii*のグルコース-6-リン酸脱水素酵素の精製と諸性質

【目的】

生物が酸素を利用する過程で発生する活性酸素(O_2 、 OH 、 H_2O_2)は、細胞内の脂質成分と反応し過酸化脂質(LOOH)を発生させる原因となる(1,2)。過酸化脂質は、膜脂質成分の過酸化や細胞内成分の非特異的な修飾などを引き起こし細胞にとって有害である(3,4)。過酸化脂質を除去する酵素としてグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)が存在する。GPxは還元型グルタチオン(GSH)を用いて、過酸化物を安定な水もしくはアルコールへと還元する反応を触媒する(5)。酵母 *Hansenula mrakii* が示す過酸化脂質に対する高い耐性の獲得には、過酸化脂質誘導型のグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) が必須であることが変異株の解析から明らかにされている(6,7)。

一方、GPxによって過酸化脂質が安定なアルコールに還元される際、GSHは酸化型グルタチオン(GSSG)に酸化される。このGSSGはNADPH存在下でグルタチオン還元酵素(GR)によりGSHへと再還元され、GPxの基質として再利用される(8)。また、GRの基質であるNADPHの生成源としては、グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)によるNADP⁺の還元が重要である。事実、G6PDH遺伝子を欠損した酵母は細胞内GSH/GSSG比が低下することから、GRへのNADPHの供給は主にG6PDHによって行われると考えられる(9)。この2つの酵素(GR、G6PDH)を介したGSSGならびにNADP⁺の再還元がうまく進まない場合、GPxは基質となるGSHが供給されなくなり、結果的に過酸化物の還元は円滑に進まないと考えられる。また、過酸化脂質による酸化的ストレスによって、*H. mrakii* のG6PDH活性は上昇することが明らかにされている(10)。これは、GPx反応により不足したNADPHを補う為の活性上昇であり、*H. mrakii* の持つ高い酸化的ストレス耐性に関係していると考えられている。しかし、G6PDHの活性上昇は過酸化脂質によるタンパク質の修飾によるものなのか、G6PDHの *de novo* 合成による量的な増大によるものか明らかではない。本節では、過酸化脂質によってG6PDHの活性が変化するのかどうか明らかにすることを目的とし、*H. mrakii* からG6PDHを精製し、その諸性質について検討した。

【材料と方法】

使用菌株と培養方法

Hansenula mrakii IFO 0895株は財団法人発酵研究所(Institute for Fermentation, Osaka, Japan)より入手した。菌体を2mM *tert*-ブチルヒドロペルオキシド(*t*-BHP)を含むSD最少培地(2% グルコース、0.67% Yeast Nitrogen Base、pH5.5)に植菌し、28℃で30時間の振盪培養を行った。6リットルの培養液を遠心分離(3000 x *g*、10分間)し、湿重量で71.3 gの菌体を取得した。

粗酵素液抽出方法

得られた菌体を、0.85%生理的食塩水で洗菌し、4℃に冷却した10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に50 μ Mのフェニルメチルスルフォニルフルオリド(PMSF)を含む緩衝液[Buffer A]に懸濁した。この菌体懸濁液に対し、半容量のガラスビーズを加えDyno-millを用いて氷冷下で10分間、細胞を破碎した。細胞破碎溶液を25000 x g、30分間遠心分離し、上清(340ml)を得た。これを粗酵素液とし以下の酵素精製に供した。精製操作は全て4℃以下で行った。

DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー

細胞抽出液(340ml、総タンパク質量4270 mg)を、Buffer Aで平衡化したDEAE-celluloseカラム(4.5 x 25cm)に供しタンパク質を吸着させた後、Buffer Aでカラムを洗浄した。カラムに吸着したタンパク質を0.1MのKClの濃度勾配により溶出させ、試験管に10mlずつ分取した。これらのうち活性を示した画分(0.65-2.9mmho:286ml)を集め、この酵素溶液に硫酸アンモニウム(50.3g)を加え、30%硫酸アンモニウム飽和とし、タンパク質の塩析を行った。

Butyl-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィー

酵素溶液を0℃で2時間放置した後、20000 x g、30分間の遠心分離を行い、上清277mlを得た。これを、30%硫酸アンモニウムを含むBuffer A[Buffer B]で平衡化したButyl-Toyopearl 650Mカラム(2.5 x 23cm)に導通しタンパク質を吸着させた後、Buffer Bでカラムを洗浄した。カラムに吸着したタンパク質を30-0%の硫酸アンモニウムの濃度勾配により溶出させ、試験管に4mlずつ分取した。これらのうち活性を示した画分(10.2-9.6mmho:35.2ml)を集め、Amicon PM10による限外ろ過により、酵素溶液を2.4mlにまで濃縮した。

Sephadex G-150 カラムクロマトグラフィー

濃縮された酵素溶液を、Buffer Aで平衡化したSephadex G-150カラム(1.8 x 92cm)に導通し、Buffer Aを流速0.5ml/minで流すことによりタンパク質を溶出させ、試験管に1.5mlずつ分取した。これらのうち、活性を示した画分($V_e/V_o=1.21-1.38$:6ml)を集めた。

Blue-Sepharose CL-4B カラムクロマトグラフィー

Sephadex G-150カラム後のサンプルを、Buffer Aで平衡化したBlue-Sepharose CL-4Bカラム(1.3 x 7cm)に導通し、50mlのBuffer Aおよび100mM KClを含む25mlのBuffer Aで洗浄した。さらに0.3mM NADP⁺および5.0mM グルコース-6-リン酸を含むBuffer Aでタンパク質を溶出させ、2.5mlずつ試験管に分取した。活性を示す画分(28.5ml)を集め、Amicon PM10による限外ろ過により、酵素溶液を1.7mlまで濃縮した。濃縮した酵素溶液を、Sephadex G-25カラム(1.3 x 7cm)に導通し、NADP⁺およびグルコース-6-リン酸などを除去した。活性を示した画分(3.6ml)を精製酵素とし、以下の実験に供した。

表1 各種カラムクロマトグラフィーによるG6PDHの精製過程

Step	Total protein (mg)	Total activity(U)	Specific activity (U/mgprotein)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell extracts	4270	1120	0.262	1.00	100
DEAE-cellulose	827	614	0.742	283	54.8
Butyl Toyopearl 650M	51.0	497	9.75	37.2	44.4
Sephadex G-150	0.858	20.6	24.0	91.6	1.84
Blue-Sepharose CL-6B	0.204	19.9	97.5	372	1.78

G6PDH 活性測定方法

グルコース-6-リン酸脱水素酵素の活性は、本酵素反応により還元されるNADPHの増加量を吸光度340nmで測定することにより求めた。終濃度で20mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)、5mM グルコース-6-リン酸、0.3mM NADP⁺、20mM MgCl₂を含む反応液中で、340nmにおける吸光度の増加量を25℃で1分間測定した。NADPHのミリモル吸光係数を6.22とし、一分間に1.0 μ molのNADPHを生成する酵素量を1unitとした。また、酵素溶液のタンパク質濃度はLowryら(11)の方法に従い測定した。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

SDS-PAGEはLaemmliの方法(12)に基づき行った。分子量マーカーとしてミオシンH鎖(200KDa)、フォスホリラーゼb(97.4KDa)、ウシ血清アルブミン(68KDa)、オボアルブミン(43KDa)、カルボニックアンヒドラーゼ(29KDa)を用いた。電気泳動後のゲルに対し、クーマシーブリリアントブルーG250による染色を行いバンドを検出した。

ゲルろ過による分子量測定

精製酵素の分子量の測定は、Andrewsの方法(13)を用いた。ブルーデキストランを用いてvoid volumeを測定し、Sephadex G150カラムの分子量標準化には、*S. cerevisiae*のグルコース-6-リン酸脱水素酵素(128KDa)、ウシ血清アルブミン(68KDa)、オボアルブミン(43KDa)およびリソザイム(14KDa)を用いた。

試薬

グルコース-6-リン酸およびNADP⁺は、(株)ナカライテスクより購入した。Blue-Sepharose CL-4BはPharmaciaより購入した。*tert*-ブチルヒドロペルオキシドは片山化学より購入した。

【結果】

G6PDHの精製

各種クロマトグラフィーの結果を表1に示した。各カラムクロマトグラフィーを用いることに

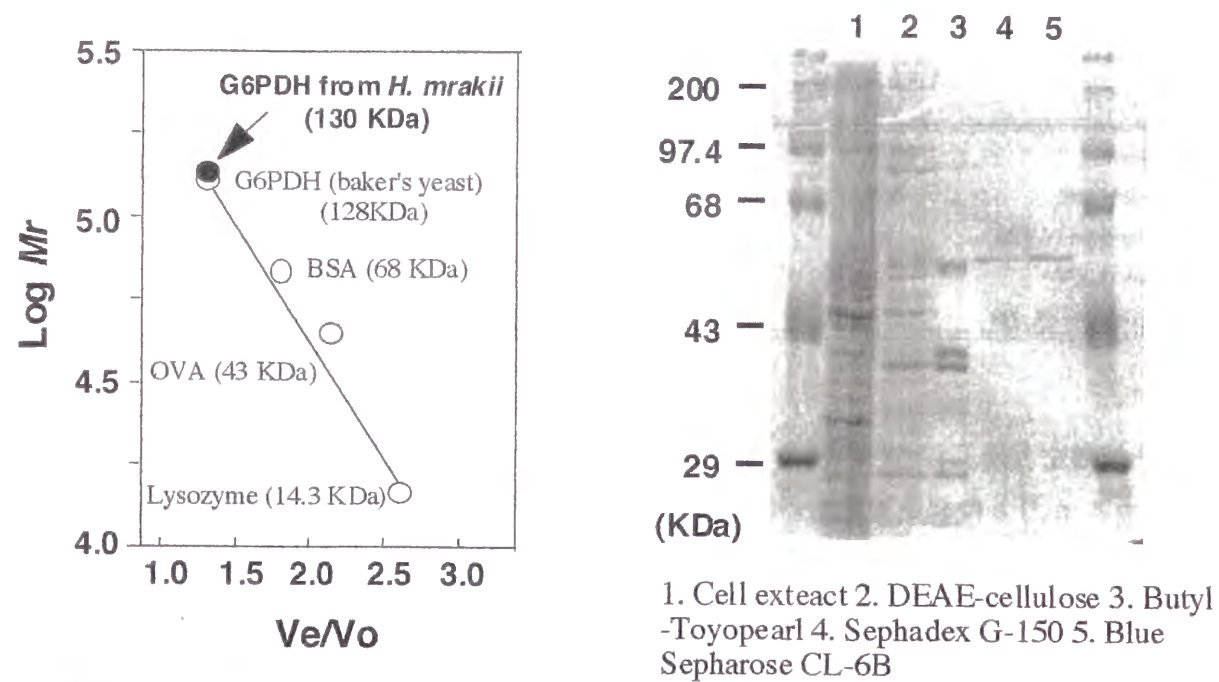


図1 ゲルろ過カラムおよびSDS-PAGEによるG6PDH分子量の測定
A) Sephadex G-150カラムクロマトグラフィーによる分子量測定の結果、*H. mrakii*のG6PDHは約130KDaを示した。B) SDS-PAGE(ゲル濃度:12%)の結果、Blue Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィー後のサンプルは、単一バンドを示し、その分子量は約52KDaを示した。

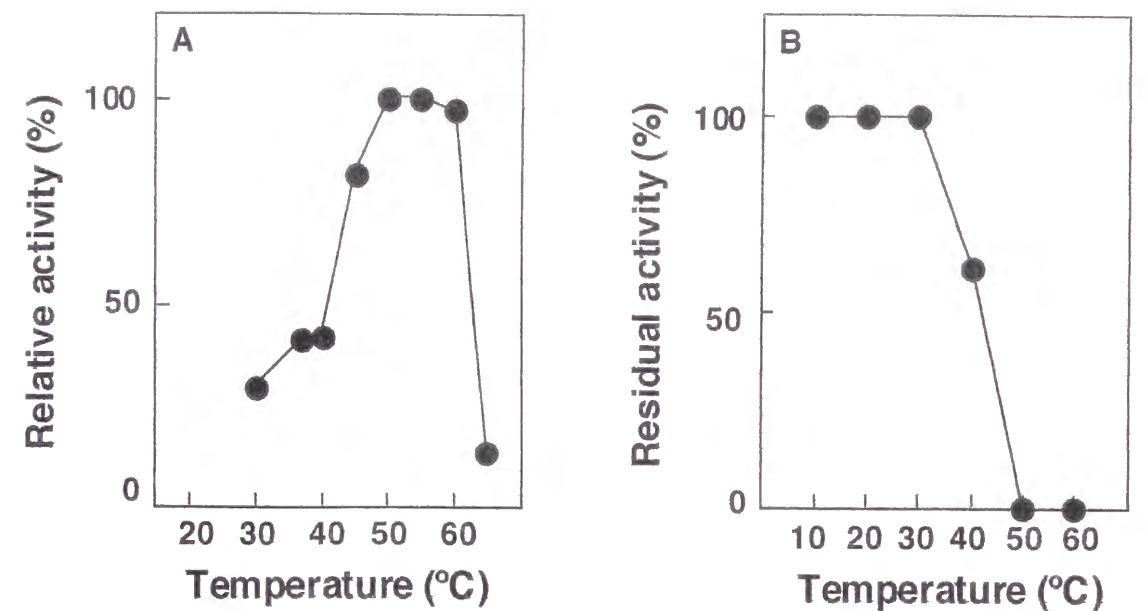


図3 温度がG6PDH活性に及ぼす影響
A) 50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 中での活性を、温度を変化させて調べた。その結果、50~55°Cで活性は最大となった。B) 温度がG6PDHの安定性に及ぼす影響を調べた。G6PDHを50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 中に入れ、それぞれの温度で処理した後、残存活性を調べた。その結果、30°Cを越えると活性は急激に低下した。

よってG6PDHを活性は372倍にまで精製でき、活性の収率は1.78%であった。Sephadex G-150カラムクロマトグラフィーによる分子量測定の結果、*H. mrakii*のG6PDHの分子量は約130KDaと算出された(図1A)。一方、SDS-PAGEの結果、Sephadex G-150カラムクロマトグラフィー後のサンプルには、数本のバンドが見られたが、Blue-Sepharose CL-4Bによる精製後のサンプルには単一バンドが見られ、その分子量は約52KDaであった(図1B)。また、本カラムクロマトグラフィーにおいてG6PDHを溶出する為には、基質であるグルコース-6-リン酸およびNADP⁺が必要であったことから、Blue-Sepharose CL-4BカラムはG6PDHとつよい親和性を示し、*H. mrakii*のG6PDHの精製に有効であることがわかった。

G6PDH活性に及ぼすpHおよび温度の影響

pHがG6PDH活性におよぼす影響を調べた結果、最大活性を示すpHはトリス-塩酸緩衝液中の9.0であることがわかった(図2A)。また、pH7以下あるいはpH10以上で活性が50%にまで減少したことから、本酵素は比較的狭い範囲で活性を示すことがわかった。精製酵素溶液のpHを変化させ、0°Cで24時間処理し安定性を調べた結果、pH7.5~8の間で活性は低下は見られず安定であった。しかし、pH4.5以下あるいはpH9以上では活性が50%以下に減少した(図2B)。

G6PDH活性におよぼす温度の影響を調べた結果、55°Cで精製酵素は最大活性を示した(図3A)。しかし、温度が65°Cを越えると活性は速やかに低下した。また、精製酵素溶液の温度を変化させ、pH7.0(リン酸緩衝液)で30分間処理し安定性を調べた結果、30°Cでほぼ活性は残存していたものの40°Cでは60%にまで活性が低下し、それ以上の温度では活性を失った(図3B)。

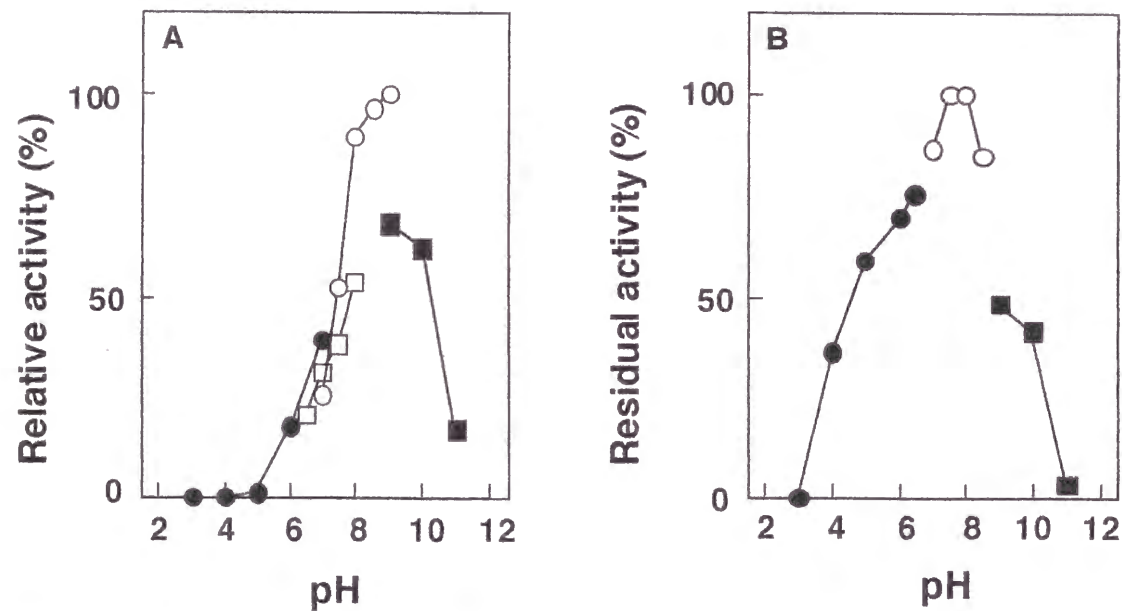


図2 pHがG6PDH活性に及ぼす影響
A) それぞれのpHに対応する緩衝液(●:クエン酸-リン酸緩衝液、○:トリス-塩酸緩衝液、□:リン酸緩衝液、■:炭酸ナトリウム緩衝液)を用いて活性を測定した。その結果、最適pHは9.0であることがわかった。B) pHがG6PDHの安定性に及ぼす影響を調べた。それぞれのpHに対応する緩衝液中で精製酵素を処理した後、残存活性を調べた。その結果、pH8.0付近で安定であることがわかった。

表2 種々の薬剤のG6PDH活性に及ぼす影響
G6PDH活性測定反応溶液中に種々の薬剤を加えて活性を測定した。
薬剤を含まないものをコントロール(100%)とし残存活性を%で表した。

Chemicals	Conc.	Relative activity (%)
Control	—	100
<i>p</i> -Chloromercuri benzoate	1mM	89.0
<i>N</i> -Ethylmaleimide	1mM	89.9
HgCl ₂	1mM	88.7
Iodoacetamido	1mM	93.9
2,4,6-Trinitrobenzene sulfonate	0.2mM	24.8
Diethylpyrocarbonate	1mM	1.53
DTT	1mM	85.3
2-ME	1mM	95.3
GSH	1mM	94.4
GSSG	1mM	96.9
EDTA	1mM	91.9
CDTA	1mM	68.9
8-Hydroxyquinoline	1mM	89.9
Lubrol PX	0.01%	148
Triton X-100	0.01%	130
Tween 20	0.01%	120
Span 20	0.01%	118
<i>tert</i> -Butyl hydroperoxide	0.1mM	123
	1mM	127
	5mM	115

CDTA, 1,2-cyclohexanediaminetetraacetic acid.

表3 金属イオンのG6PDH活性に及ぼす影響
G6PDH活性測定反応溶液中に金属イオンを存在させ活性を測定した。
金属イオンを含まないものをコントロール(100%)とし残存活性を%で表した。

Metal ions	Conc. (mM)	Relative activity (%)	
		(+Mg ²⁺)	(-Mg ²⁺)
Control	—	100	100
Zn ²⁺	0.1	29.8	5.50
	0.5	8.80	0.00
	1.0	7.50	0.00
Co ²⁺	0.1	90.4	98.4
Mn ²⁺	0.1	97.8	131
Cu ²⁺	0.1	47.8	98.5
	0.5	48.2	56.5
	1.0	20.8	24.6
Fe ²⁺	0.1	99.9	143
Ni ²⁺	0.1	98.8	72.3
Cd ²⁺	0.1	68.3	41.7
	0.5	22.8	32.9
	1.0	0.00	30.4
Al ³⁺	0.1	87.4	83.5
	0.5	0.30	0.00
	1.0	0.00	0.00
Mg ²⁺	0.1	—	118
	10	—	120
	20	—	119

基質特異性

Blue-Sepharose CL-4Bによるアフィニティーカラムクロマトグラフィーの結果から、*H. mrakii*のG6PDHは基質であるグルコース-6-リン酸およびNADP⁺に対して高い特異性を示すことがわかった。しかし、*Leuconostoc mesenteroides*および*Zymomonas mobilis*のG6PDHはNADP⁺ならびにNAD⁺の両方を基質として用いることが報告されている(14,15)。*H. mrakii*のG6PDHの基質特異性について調べた結果、グルコース-6-リン酸およびNADP⁺に対するK_m値は、それぞれ、293μMおよび24.1μMであった。他属酵母から精製されたG6PDHのグルコース-6-リン酸およびNADP⁺に対するK_m値は、*S. cerevisiae*では51μMおよび7.5μM(16)、*Candida utilis*では15μMおよび2.5μM(17)、*Pichia duponti*では160μMおよび43μM(18)であり、*H. mrakii*が示す各基質に対するK_m値との間に大きな差はみられなかった。

種々の薬剤が活性に及ぼす影響

精製酵素に対する薬剤の影響を調べた結果、システイン残基の修飾剤であるp-クロロマーキュリー安息香酸、N-エチルマレイミドおよびHgCl₂は、本酵素活性を約10%低下させた。アルギニン残基の修飾剤である2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸およびヒスチジン残基の修飾剤であるジエチルピロカーボネートは、本酵素活性を著しく阻害した。SH基の還元剤であるジチオスレイトール、2-メルカプトエタノールおよびグルタチオン(GSH)は本酵素活性に影響を与えず、酸化型グルタチオン(GSSG)についても同様であった。金属キレーターであるCDTAは、1mMで本酵素の活性を約30%低下させた。また、8-ヒドロキシキノリンおよびEDTAは、約10%活性を低下させた。界面活性剤であるLubrol PX、Triton X-100、Tween 20、Span 20は、本酵素活性を約20%上昇させた。さらに、過酸化脂質であるt-BHPも本酵素活性をやや上昇させたが、t-BHPによるストレス処理を行った酵母で見られるG6PDH活性の上昇に比べると低い値であった。

金属が活性に及ぼす影響

精製酵素に対する金属の影響を調べた。3mMのEDTAを含む20mMのトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に対して酵素標品を透析し、酵素標品と混在する金属を取り除いた。さらに、酵素標品を100倍量の20mMのトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に対して3回透析しEDTAを完全に除いた。この酵素溶液を用いて各種金属を酵素活性測定反応液に加え、G6PDH活性を測定しその影響を調べた。Zn²⁺、Cd²⁺、Cu²⁺およびAl³⁺は本酵素活性を阻害し、Cd²⁺およびAl³⁺は1mM濃度で活性を完全に阻害した。また、反応溶液からMg²⁺を除いて活性を比較したところ、G6PDH活性は、Mg²⁺を加えることにより活性が約18%上昇した。さらに、Mn²⁺、Fe²⁺は反応液中にMg²⁺が含まれていない状態では活性を約30%上昇させたが、Zn²⁺、Ni²⁺、Cd²⁺、Al³⁺はMg²⁺を含む反応液と同様に活性を阻害した。

【考察】

*H. mrakii*は過酸化脂質に対して強い耐性を示し、この耐性には過酸化脂質によって誘導されるGPxが重要な役割を果たしている(6)。GPxは過酸化脂質を安定なアルコールに変換する際、還元型のグルタチオン(GSH)を消費し酸化型のグルタチオン(GSSG)を生成する。すなわち、GPx反応が円滑に進行するためには、GSHが常に供給される必要がある。GSHはグルタチオン合成酵素IおよびIIによって*de novo*合成される他に(19)、GSSGをグルタチオン還元酵素が還元することによっても生成する(8)。細胞内グルタチオンの濃度はミリモラーオーダーであり、そのGSH/GSSGの比率は極めて高い(20)。この細胞内での高いグルタチオン還元率を実現するためには、GSSGを還元するグルタチオン還元酵素(GR)が重要である。さらに、グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)は、このGR反応で消費されるNADPHを供給する機能を持つ。*H. mrakii*を過酸化脂質を含む培地で培養すると、G6PDH活性は約2.3倍に上昇する(10)。同様に過酸化脂質によってGPxが誘導されることを併せると、G6PDHはGPxに還元力、すなわちNADPHを供給するために活性が上昇しているのではないかと考えられた。本節では、過酸化脂質によってG6PDHの活性がタンパク質レベルで変化するのかどうかを明らかにすることを目的とし、*H. mrakii*からG6PDHを精製し、その諸性質について検討した。

多くの生物種から精製されているG6PDHの分子量は50~60kDaの間にあり、特にホ乳類のG6PDHは58~67kDaを示し、比較的狭い範囲に集中していた(21)。*H. mrakii*のG6PDHの分子量は、Sephadex G150ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの結果、分子量は約130kDaと算出され、約52kDaのサブユニットからなる2量体と考えられた。このサブユニット構造と分子量は種々の微生物で報告されているG6PDHとほぼ同じであった。また、ReillyとAllredは*S. cerevisiae*のG6PDHは糖タンパク質である報告している(22)。一般に、糖鎖を持つ分子をゲルろ過クロマトグラフィーに供した場合、見かけ上の分子量は大きくなることが知られている。*H. mrakii*のG6PDHがサブユニットから考えられる分子量よりもゲルろ過による分子量が若干大きい原因として、本酵素が糖鎖を持つためではないかと考えられた。

精製G6PDHを用いてt-BHP存在下での活性の変化を調べたところ、著しい活性の上昇は見られなかった。このことから、t-BHPで処理した細胞で見られるG6PDH活性の上昇(約2.3倍)は、t-BHPのG6PDHに対する直接的な影響によるものではなく、過酸化脂質によって増大するG6PDH活性は、G6PDHが*de novo*合成された結果であると考えられた。酵母の酸化的ストレスに対する適応は、新たなタンパク質を合成を伴うことが知られている(23)。*H. mrakii*のG6PDHは過酸化脂質によって誘導されることから、本酵素は酸化的ストレス防御に重要であると考えられた。

次に、*H. mrakii*のG6PDHが*in vitro*でどのような物質に影響をうけるのか化学修飾剤および金属イオンを用いて調べた。リジン残基の化学修飾剤である2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)によって活性は約25%にまで低下した。同様に*S. cerevisiae*およびヒト赤血球から精製されたG6PDHもTNBSによって活性が阻害されることが報告されている(23)。また、*L. mesenteroides*のG6PDHについては既に遺伝子が取得されており、塩基配列より推定されるアミ

ノ酸配列から、活性部位にはリジン残基が存在していることが報告されている (15)。これら知見から、他の生物種と同様に *H. mrakii* の G6PDH についても活性部位にリジン残基が存在していると考えられた。

また、ヒスチジン残基の修飾剤であるジエチルピロカーボネートによって *H. mrakii* の G6PDH 活性は、ほぼ完全に消失した。酵母 *Candida utilis* および *S. cerevisiae* の G6PDH は、その活性発現にヒスチジン残基が重要であることが報告されている (17)。これらのことから *H. mrakii* の G6PDH は活性発現にヒスチジン残基が重要である事がわかった。

Mg²⁺ を含まない反応液中での G6PDH 活性は、Mg²⁺ を含む場合に比べて約 15% 活性が減少した。本酵素活性の発現には Mg²⁺ が重要であり、金属が本酵素の活性に関与することが示唆された。そこで、本酵素に対する各種金属の影響を調べた。Zn²⁺、Cd²⁺、Cu²⁺ および Al³⁺ は本酵素活性を阻害し、Cd²⁺ および Al³⁺ は 1mM 濃度で完全に活性を阻害した。

Mn²⁺ および Fe²⁺ を含む反応液は、Mg²⁺ を含まない反応液でも本酵素活性を上昇させることから、これらの金属は Mg²⁺ と共に G6PDH 活性発現の補因子として機能すると考えられた。*S. cerevisiae* の G6PDH は Zn²⁺ によっては影響を受けず Cd²⁺ によって阻害を受けることが報告されている (24)。また、Al³⁺ による阻害は、*S. cerevisiae* およびホ乳類で報告されている。*S. cerevisiae* では、Al³⁺ による阻害を受けた G6PDH を NaF 処理することにより阻害が消失することが報告されているが (25)、*H. mrakii* ではこのような現象は見られなかった。

本節では、t-BHP による酸化ストレスにより活性が上昇する *H. mrakii* の G6PDH について検討した。本酵素は、*in vitro* で過酸化脂質による影響をほとんど受けなかったことから、酸化ストレス条件下で見られる G6PDH の活性上昇は *de novo* 合成により酵素量が増大した結果であることが明らかとなった。また、活性部位にリジンおよびヒスチジン残基が存在していることがわかった。さらに、本酵素活性に対する各種金属の影響を調べたところ *S. cerevisiae* の G6PDH に対して阻害を示す Zn²⁺、Cd²⁺、Cu²⁺ および Al³⁺ は本酵素活性を阻害する事が明らかになり、両者はよく似た酵素化学的性質を持つと考えられた。

【引用文献】

- 1) Ames, B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, **221**, 1256-1264
- 2) Aikens, J. and Dix, T.A. (1991) Peroxyl radical (HOO·) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J. Biol. Chem.*, **266**, 15091-15098
- 3) Cerutti, P.A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, **227**, 375-381
- 4) Gutteridge, J.M. (1984) Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals

using complexed iron and hydrogen peroxide. *FEBS Lett.*, **172**, 245-249

- 5) Mannervik, B. (1985) Glutathione peroxidase. In *Methods in Enzymology* (A. Mesiter, Ed), vol.113, pp.490-495, Academic Press, New York.
- 6) Tran, L.T., Inoue, Y. and Kimura, A. (1993) Oxidative stress response in yeast: purification and some properties of a membrane-bound glutathione peroxidase from *Hansenula mrakii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1164**, 166-172
- 7) Tran, L.T., Inoue, Y. and Kimura, A. (1993) Role of glutathione peroxidase against oxidative stress in yeast: phenotypic character of lipid hydroperoxide-sensitive mutants derived from *Hansenula mrakii*. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 229-231
- 8) Flohe, H. (1988) "Glutathione reductase" Coenzyme and cofactors, (Dolphin, D., Ed) vol. 3 Glutathione Part A, pp 644-710, Academic Press, New York.
- 9) Izawa, S., Maeda, K., Miki, T., Mano, J., Inoue, Y. and Kimura, A. (1998) Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, **330**, 811-817
- 10) Tran, L.T., Kamakura, M., Izawa, S., Miki, T., Tsujimoto, Y., Inoue, Y. and Kimura, A. (1995) Oxidative stress response in yeast: induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipid peroxide in *Hansenula mrakii*. *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 606-609
- 11) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275
- 12) Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
- 13) Andrews, P. (1965) The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.*, **96**, 595-606
- 14) Scopes, R.K., Testolin, V., Stoter, A., Griffiths-Smith, K. and Algar, E.M. (1985) Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Biochem. J.*, **228**, 627-634
- 15) Bhadbhade, M.M., Adams, M.J., Flynn, T.G. and Levy, H.R. (1987) Sequence identity between a lysine-containing peptide from *Leuconostoc mesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase and an active site peptide from human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett.*,

16)Jeffery, J., Hobbs, L. and Jornvall, H. (1985) Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of a reactive lysine residue labeled with acetylsalicylic acid. *Biochemistry*, **24**, 666-671

17)Domschke, W., Engel, H.J. and Domagk, G.F. (1969) Protein structure and enzyme activity. IV. Demonstration of essential histidine residues in the glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Candida utilis*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 1117-1120

18)Kim, Y.S., Kim, Y.I. and Byun, H.S. (1988) Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glucose-6-phosphate dehydrogenase by diethylpyrocarbonate. *Biochem. Int.*, **17**, 1099-1106

19)Ohtake, Y. and Yabuuchi, S. (1991) Molecular cloning of the γ -glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **7**, 953-961

20)Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I.W. and Grant, C.M. (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell.*, **9**, 1081-1091

21)Levy, H.R. (1979) Glucose-6-phosphate dehydrogenase In *Advances in Biochemistry* (Mesiter, A., Ed), vol. 48, pp.97-192, Academic Press, New York.

22)Reilly, K.E. and Allred, J.B. (1995) Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* is a glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **216**, 993-998

23)Collinson, L.P. and Dawes, I.W. (1992) Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 329-335

24)Serafini, M.T., Romeu, A. and Arola, L. (1989) Zn(II), Cd(II) and Cu(II) interactions on glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Int.*, **18**, 793-802

25)Cho, S.W. and Joshi, J.G. (1989) Inactivation of baker's yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase by aluminum. *Biochemistry*, **28**, 3613-3618

第二節

Hansenula mrakii のグルタチオン還元酵素の精製と諸性質

【目的】

グルタチオンは細胞内に豊富に存在するトリペプチドである。*Saccharomyces cerevisiae*において γ -グルタミルシステイン合成酵素をコードする *GSH1* 遺伝子を欠損した株は酸化的ストレスに対する耐性が低下する(1)。このことは酸化的ストレスに対してグルタチオンが重要な機能を果たしていることを示している。酸化的ストレスにより発生した過酸化物質に対してのグルタチオンを介した還元反応は、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)によって行われる。しかし、GPxが抗酸化酵素として機能を発揮するためには還元型グルタチオン(GSH)の存在が必要である。酸化型グルタチオン(GSSG)を還元する酵素としてグルタチオン還元酵素(GR)が存在する。本酵素は、細胞質に存在するグルコース-6-リン酸脱水素酵素反応によって供給されるNADPHを還元力として、GSSGを還元すると考えられている。*S. cerevisiae*を用いた研究から、本酵素は細胞内のグルタチオン還元酸化比率(GSH/GSSG)を高く保つのに必要であることが報告された(2)。また、*Salmonella typhimurium*では、微弱な酸化的ストレス(H_2O_2)を与えると、GRを含む30種のタンパク質の合成が誘導され耐性が強化される(3)。一方、変異型 *oxyR1* を持つ株では、GRを含む5つ以上のタンパク質が過剰に発現し、過酸化水素に耐性を示すことから、GRの酸化的ストレス防御系における重要性は酵母のみならず細菌類でも見られる(4)。一方、酵母 *Hansenula mrakii* は過酸化脂質に起因する酸化的ストレスに対して高い耐性を示し、この耐性獲得には誘導性のGPxが必須であることが明らかにされている(5,6)。そこで、本節ではGPxにGSHを供給する機能を持つGRを各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製し、その諸性質について検討した。

【材料と方法】

使用菌株と培養方法

Hansenula mrakii IFO 0895 株は財団法人発酵研究所 (Institute for Fermentation, Osaka, Japan) より入手した。2mM *tert*-ブチルヒドロペルオキシド (t-BHP) を含むSD最少培地 (2% グルコース、0.67% Yeast Nitrogen Base、pH5.5) に、610nmでの濁度 (OD_{610}) が0.05になるよう接種し、28℃で30時間の振盪培養を行った。合計6リットルの培養液を遠心分離 (3000 x g、10分間) し、湿重量で36.8 gの菌体を取得した。

粗酵素液抽出方法

得られた菌体を、0.85%生理的食塩水で洗菌し、4℃に冷却した10mMリン酸緩衝液

(pH7.0) に50 μ Mのフェニルメチルスルフォニルフルオリド(PMSF)を含む緩衝液[Buffer A]に懸濁した。この菌体懸濁液に対し、半量のガラスビーズを加えDyna-millを用いて氷冷下で10分間、細胞を破碎した。細胞破碎溶液を25000 x g、30分間遠心分離し上清(275ml)を得た。これを粗酵素液とし以下の酵素精製に供した。精製操作は全て4 $^{\circ}$ C以下で行った。

DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー

細胞抽出液(275ml、総タンパク質量1940mg)を、Buffer Aで平衡化したDEAE-celluloseカラム(4.5 x 25cm)に導通しタンパク質を吸着させた後、Buffer Aでカラムを洗浄した。カラムに吸着したタンパク質を合計1リットルの0.1MのKClの濃度勾配により溶出させ、試験管に5mlずつ分取した。これらのうち活性を示した画分(0.65-2.9mmho:286ml)を集め、この酵素溶液に硫酸アンモニウム(60.7g)を加え30%硫酸アンモニウム飽和とし、2時間タンパク質の塩析を行った。

Butyl-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィー

30%硫酸アンモニウムを含むBuffer A[Buffer B]で平衡化したButyl-Toyopearl 650Mカラム(2.5 x 23cm)に導通しタンパク質を吸着させた後、Buffer Bでカラムを洗浄した。カラムに吸着したタンパク質を合計600mlの30-0%の硫酸アンモニウムの濃度勾配により溶出させ、試験管に4mlずつ分取した。これらのうち活性を示した画分(9.4-8.2mmho:55ml)を集め、Amicon PM10による限外ろ過により、酵素溶液を1.9mlまで濃縮した。

Sephadex G-150 カラムクロマトグラフィー

濃縮した酵素溶液を、Buffer Aで平衡化したSephadex G-150カラム(1.8 x 92cm)に導通し、Buffer Aを流速0.5ml/minで流通させることによりタンパク質を溶出させ、試験管に1.5mlずつ分取した。これらのうち、活性を示した画分($V_e/V_o=1.38-1.45:3.58$ ml)を集め、酵素溶液とした。

Blue-Sepharose CL-4B カラムクロマトグラフィー

酵素溶液を、Buffer Aで平衡化したBlue-Sepharose CL-4Bカラム(1.3 x 7cm)に導通しタン

表1 各種カラムクロマトグラフィーによるGRの精製過程

Step	Total protein (mg)	Total activity(U)	Specific activity (U/mgprotein)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell extracts	1944	48	0.025	1.00	100
DEAE-cellulose	363.8	39.3	0.108	12.4	80.8
Butyl Toyopearl 650M	62.2	36.2	0.538	21.5	74.6
Sephadex G-150	1.57	32.8	21.0	838.0	67.5
Blue-Sepharose CL-6B	0.33	28.7	88.4	3536	59.1

パク質を吸着させた後、Buffer Bでカラムを洗浄した。カラムに吸着したタンパク質を10-300mMのKClの濃度勾配により溶出させ、試験管に3.0mlずつ分取した。これらのうち、活性を示した画分(2.9-3.2mmho)を集め、20倍量のBuffer Aに対して透析したものを以下の実験に供した。

グルタチオン還元酵素活性測定方法

グルタチオン還元酵素の活性は、本酵素反応により消費されるNADPHの減少量を測定することにより測定した。すなわち、終濃度で50mMリン酸緩衝液(pH7.5)、3mM酸化型グルタチオン、0.3mM NADPHを含む反応液中で、340nmにおける吸光度の減少量を25 $^{\circ}$ Cで1分間測定した。NADPHのミリモル吸光係数を6.22とし、1分間に1.0 μ molのNADPHを消費する酵素量を1unitとした。また、酵素溶液のタンパク質濃度はBradfordの方法(7)によりを測定した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)およびタンパク質の分子量測定

第一節と同様の方法を用いた。

試薬

GSSGおよびNADPHはSigma Chemicalより購入した。Blue-Sepharose CL-4BはPharmacia

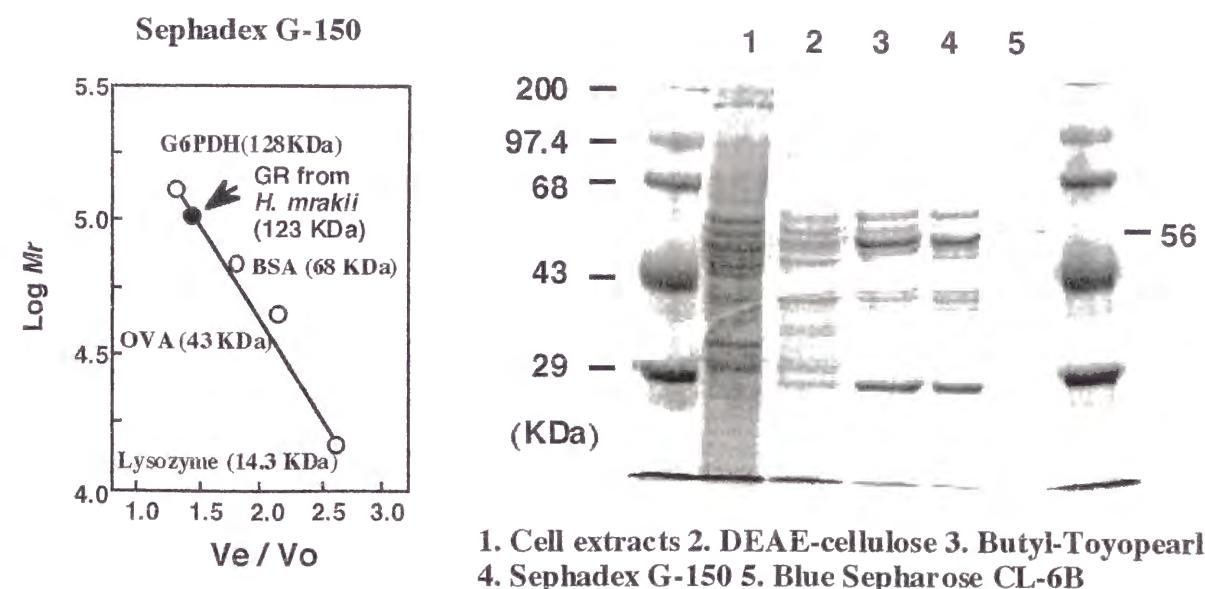


図1 ゲルろ過カラムおよびSDS-PAGEによる分子量の測定
A)Sephadex G-150カラムクロマトグラフィーによる分子量測定の結果、*H. mrakii*のGRは約123KDaを示した。B) SDS-PAGE(ゲル濃度:12%)の結果、Blue Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィー後のサンプルは単一のバンドを示し、その分子量は約56KDaを示した。

より購入した。

【結果】

GRの精製

各種カラムクロマトグラフィーによるGRの精製の結果を表1に示した。各カラムクロマトグラフィーによる酵素精製の結果、最終酵素標品の比活性は3500倍、活性収率は59.1%であった。Sephadex G-150カラムクロマトグラフィーによる分子量測定の結果、*H. mrakii*のGRの分子量は約123KDaと算出された(図1)。また、SDS-PAGEの結果、Sephadex G-150カラムクロマトグラフィー後のサンプルには、数本のバンドが見られたが、Blue-Sepharose CL-4Bによる精製後のサンプルには単一のバンドが見られ、その分子量は56KDaであった。これらのことから、*H. mrakii*のGRは56KDaの同一サブユニットから成る2量体と考えられた。

精製酵素を用いてGRの基質であるGSSGとNADPHに対する K_m 値を調べた結果、それぞれ21.3 μ Mおよび14.3 μ Mであった。また、NADHは本酵素の基質とはならなかった。

pHおよび温度の影響

pHがGR活性に及ぼす影響を調べた結果、精製酵素が最大活性を示したpHは9.0(トリス-

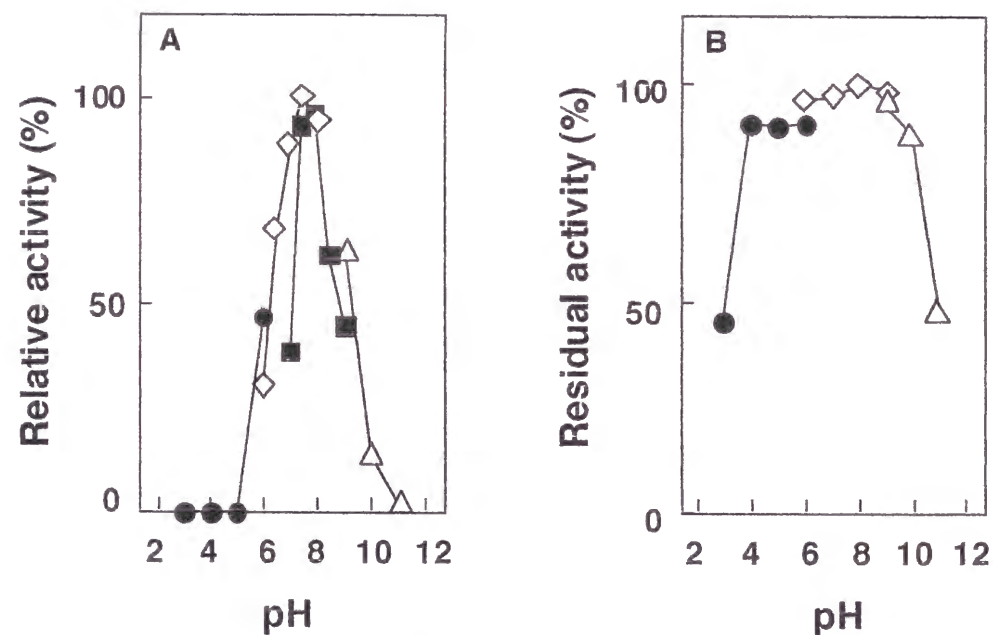


図2 pHのGR活性に及ぼす影響

A)それぞれのpHに対応する緩衝液(●:クエン酸-リン酸緩衝液、◇:トリス-塩酸緩衝液、■:リン酸緩衝液、△:炭酸ナトリウム緩衝液)を用いて活性を測定した。その結果、最適pHは8.0付近であることがわかった。B) pHがGRの安定性に及ぼす影響を調べた。それぞれのpHに対応する緩衝液中で、精製酵素を処理した後、残存活性を調べた。その結果、pH4.0~8.0付近で安定であることがわかった。

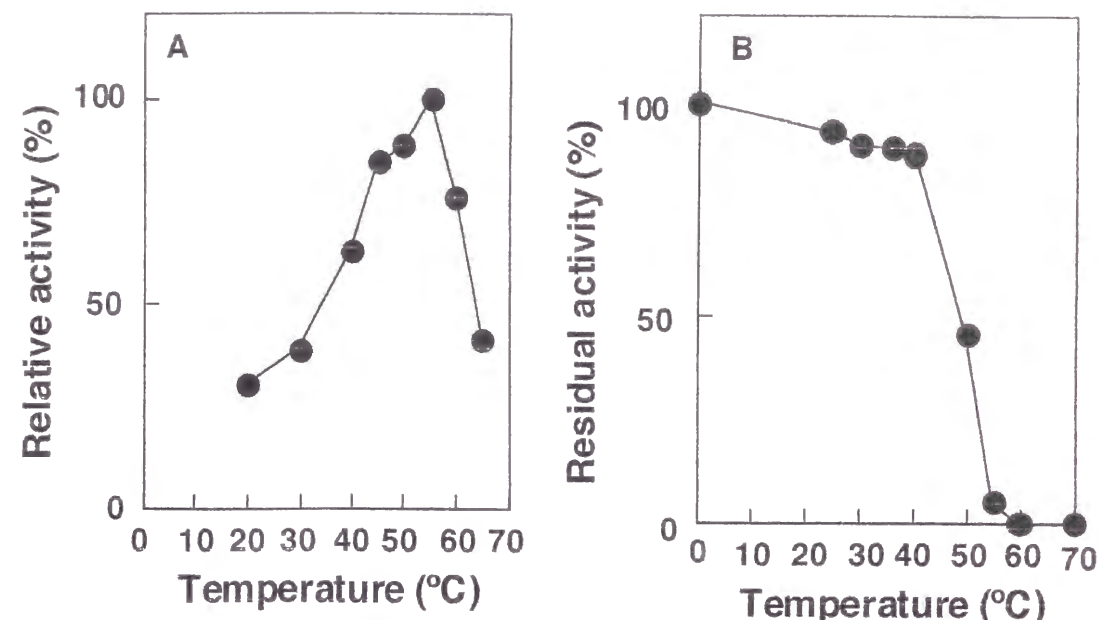


図3 温度のGR活性に及ぼす影響

A)50mM リン酸緩衝液(pH7.0)中での活性を、温度を変化させて調べた。その結果、55°C付近でGR活性は最大となった。B) 温度がGRの安定性に及ぼす影響を調べた。精製酵素を50mM リン酸緩衝液(pH7.0)中で図に示した温度で処理した後、残存活性を調べた。その結果、40°Cを越えると、活性は急激に低下した。

塩酸緩衝液中)であることがわかった(図2A)。また、pH6以下あるいはpH8.5以上では最大活性の約50%にまで活性が減少したことから、本酵素は比較的狭い範囲で活性を示すことがわかった。図に示したpHで精製酵素を0°Cで24時間放置し安定性を調べた結果、pH4.0~9.0の間で安定であることがわかった。また、pH3.5以下あるいはpH11以上で活性が50%以下に減少したことから、比較的広範囲のpHで安定であることがわかった。

温度がGR活性におよぼす影響を調べた結果、精製酵素が最大活性を示す温度は55°Cであることがわかった。また、55°Cを越えるとGR活性は速やかに減少し、65°Cで活性は約50%まで低下した(図3A)。次に、精製酵素の温度安定性を検討した。図3Bに示した各温度で30分間インキュベートした後の残存活性を測定した。氷中でインキュベートした場合の残存活性を100%として比較した。50°Cでの処理によりGR活性は約50%にまで低下し、それ以上の温度では活性がほとんど見られなくなった。

種々の薬剤が活性に及ぼす影響

精製酵素に対する種々の薬剤の影響を調べた(表2)。システイン残基の修飾剤であるN-エチルマレイミドは、本酵素活性を約10%低下させた。また、p-クロロマーキュリー安息香酸は本酵素活性を著しく阻害した。ヒスチジン残基の修飾剤であるジエチルピロカーボネートは、本酵素活性にほとんど影響を及ぼさなかった。SH基の還元剤であるジチオスレイトール(DTT)、2-メルカプトエタノール(2-ME)、及びGSHは本酵素活性に影響を与えず、GSSGについても同様であった。CDTA、8-ヒドロキシキノリンおよびEDTAなどの金属キレーターや、Lubrol PX、Triton X-100、Tween 20、Span 20などの界面活性剤は本酵素活性に影響を与え

表2 種々の薬剤のGR活性に及ぼす影響
G6PDH活性測定反応溶液中に薬剤を加えて活性を測定した。薬剤を含まないものをコントロール(100%)とし残存活性を%で表した。

Chemicals	Conc	Relative activity (%)
Control	—	100
<i>p</i> -Cloromercurobenzoate	1mM	0
<i>N</i> -Ethylmaleimide	1mM	92.3
Iodoacetamide	1mM	106.9
Diethylpyrocarbonate	1mM	105
DTT	1mM	104.2
2-ME	1mM	105.8
EDTA	1mM	110.5
CDTA	1mM	117.1
8-Hydroxyquinoline	1mM	102.9
Lubrol PX	0.01%	100.7
Triton X-100	0.01%	101.7
Span 20	0.01%	103
Tween 80	0.01%	101.8
Tween 20	0.01%	107.3
Chaps	0.01%	111.7
<i>tert</i> -Butyl hydroperoxide	0.1mM	101
	1mM	107.8
	10mM	92.5

CDTA, 1,2-cyclohexanediaminetetraacetic acid.

なかった。さらに、過酸化脂質である *tert*-ブチルヒドロペルオキシド(*t*-BHP)は、1mM濃度においても本酵素活性に影響を与えなかった。

金属が活性に及ぼす影響

精製酵素に対する金属の影響を調べた(表3)。Fe³⁺およびCd²⁺は本酵素活性を阻害し、0.001mM濃度で約20%にまで活性を低下させ、0.01mM濃度ではほぼ完全に活性が消失した。Zn²⁺およびCu²⁺は0.01mM濃度で約30%にまで活性が低下した。Mn²⁺、Al³⁺およびCo²⁺は0.1mM濃度で本酵素活性をほぼ完全に阻害した。逆に、Mg²⁺およびMn²⁺は、0.001mM濃度で本酵素活性を10%程度上昇させ、Fe²⁺は0.01mM濃度で約1.7倍にまで活性が上昇した。

表3 金属イオンのGR活性に及ぼす影響
GR活性測定反応溶液中に金属イオンを存在させ活性を測定した。金属イオンを含まないものをコントロール(100%)とし残存活性を%で表した。

Metal ion	Conc(mM)	Relative activity (%)
Fe ²⁺	0.1	N.D.
	0.01	169.5
	0.001	108.0
Fe ³⁺	0.1	N.D.
	0.01	0.9
	0.001	18.6
Cd ²⁺	0.1	0.0
	0.01	6.7
	0.001	17.7
Ni ²⁺	0.1	2.2
	0.01	96.8
	0.001	100.5
Co ²⁺	0.1	0.0
	0.01	84.8
	0.001	94.9
Cu ²⁺	0.1	6.1
	0.01	38.4
	0.001	87.1
Zn ²⁺	0.1	0.0
	0.01	39.1
	0.001	75.7
Mn ²⁺	0.1	0.0
	0.01	120.1
	0.001	114.4
Al ³⁺	0.1	0.0
	0.01	100.3
	0.001	106.7
Mg ²⁺	0.1	89.1
	0.01	111.9
	0.001	115.3

N.D., Not done

【考察】

*Saccharomyces cerevisiae*のGRをコードする *GLR1* 遺伝子破壊株では過酸化脂質、及びスーパーオキシドに対する感受性が上昇し、細胞内にGSSGの蓄積が見られることが報告されている(2)。この事は、*S. cerevisiae*のGRは酸化ストレスに対して重要であり、細胞内のGSH/GSSG比率に影響すること意味している。しかし、*H. mrakii*のGRについてはほとんど検討されていない。そこで*H. mrakii*から各種カラムクロマトグラフィーを用いてGRの精製を試み、諸性質について調べた。

*H. mrakii*のGRはSephadex G-150ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分子量測定で約123KDa、SDS-PAGEでは約56KDaを示した。高等真核生物や原核生物から精製されているGRの多くは、分子量が100KDa付近であり、2量体構造を持つことが知られている(8)。これらのことから*H. mrakii*のGRは56KDaのサブユニットから成る2量体と考えられた。

GRの基質特異性について調べた結果、NADPHは本酵素の基質であったが、NADHは基質とはならなかった。ホ乳類及びカビから精製されたGRはNADHとNADPHの両方を基質として用いることができる(9-11)。これに対して、高等植物およびシアノバクテリアのGRはNADPHのみを基質として用いる(12,13)。*H. mrakii*のGRは植物から精製されたGRと同様にNADHを基質として用いることはできなかつたが、NADPHとGSSGに対する K_m 値はそれぞれ21.3 μ Mおよび14.3 μ Mであり、*S. cerevisiae*のGRのそれとほぼ同じ値を示した(8)。通常、酵母細胞中の総グルタチオン濃度は1~2mMであり、そのうちの約5%(50 μ M)程度が酸化型(GSSG)で存在していることが報告されている(14)。これは、酵母GRのGSSGに対する K_m 値を上回っており、GSSGは細胞内でGRにより速やかに還元されると考えられる。

精製GRに対するpHの影響を調べた結果、pH7.5で最大活性を示した。また、pHを変化させ4℃で48時間処理し安定性を調べたところ、pH4~10の間で活性は安定であった。しかし、pH3以下あるいはpH11以上では約50%まで活性が低下し不安定であることがわかった。精製GRに対する温度の影響を調べた結果、55℃で最大活性を示した。また、温度を変化させpH7.0で15分間処理し安定性を調べたところ、40℃までは比較的安定であったが50℃では約50%まで活性が低下し、それ以上の温度では失活した。*H. mrakii*のグルコース-6-リン酸脱水素酵素に比べて、比較的広いpHで安定であったのに対して、最大活性を示すpHは8.0付近の狭い範囲であった(15)。

ヒト赤血球GRのX線構造解析の結果から、この活性部位に2つのシステイン残基が存在していることが明らかにされている(16)。また、*S. cerevisiae*のGRにも活性中心にシステインが存在している。そこで、*H. mrakii*のGRに対する種々の薬剤の影響を調べた。その結果、システイン残基の修飾剤である*N*-エチルマレイミドは本酵素活性を約10%しか低下させなかったが、*p*-クロロマーキュリー安息香酸は1.0mMで本酵素活性をほぼ完全に阻害した。このことから、*H. mrakii*のGRも活性部位にシステイン残基が存在していることが強く示唆された。

精製GRに対する金属イオンの影響を調べた結果、 Fe^{3+} および Cd^{2+} は著しく本酵素活性を阻

害し、 Cu^{2+} および Zn^{2+} は約40%にまで活性を低下させた。一方、*S. cerevisiae*では Fe^{3+} による阻害はみられないが Cd^{2+} については著しい活性の阻害がみられることが報告されており、同一の金属により強く阻害を受けることが明らかになった(17)。

【引用文献】

- 1) Izawa, S., Inoue, Y. and Kimura, A. (1995) Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS. Lett.*, **368**, 73-76
- 2) Muller, E.G. (1996) A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol. Biol. Cell*, **7**, 1805-1813
- 3) Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S. and Ames, B. N. (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell*, **41**, 753-762
- 4) Christman, M.F., Storz, G. and Ames, B.N. (1989) OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **86**, 3484-3488
- 5) Tran, L.T., Inoue, Y. and Kimura, A. (1993) Oxidative stress response in yeast: purification and some properties of a membrane-bound glutathione peroxidase from *Hansenula mrakii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1164**, 166-172
- 6) Inoue, Y., Tran, L.T. and Kimura, A. (1993) Role of glutathione peroxidase against oxidative stress in yeast: phenotypic character of lipid hydroperoxide-sensitive mutants derived from *Hansenula mrakii*. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 229-231
- 7) Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254
- 8) Schirmer R.H., Krauth-Siegel R.L. and Schulz G.E. (1988) "Glutathione reductase" Coenzyme and cofactors, (Dolphin, D., Ed) vol. 3 Glutathione Part A, pp554-596, Academic Press, New York.
- 9) Lopez-Barea, J. and Lee, C.Y. (1979) Mouse-liver glutathione reductase. Purification, kinetics, and regulation. *Eur. J. Biochem.*, **98**, 487-499
- 10) Worthington, D.J. and Rosemeyer, M.A. (1975) Glutathione reductase from human erythrocytes. Molecular weight, subunit composition and aggregation properties. *Eur. J. Biochem.*, **60**, 459-466

11)Woodin, T.S. and Segel, I.H. (1968) Isolation and characterization of glutathione reductase from *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **167**, 64-77

12)Vanoni, M.A., Wong, K.K., Ballou, D.P. and Blanchard, J.S. (1990) Glutathione reductase: comparison of steady-state and rapid reaction primary kinetic isotope effects exhibited by the yeast, spinach, and *Escherichia coli* enzymes. *Biochemistry*, **29**, 5790-5796

13)Serrano, A., Rivas, J. and Losada, M. (1984) Purification and properties of glutathione reductase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 7119J. *Bacteriol.*, **158**, 317-324

14)Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I.W. and Grant, C.M. (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1081-1091

15)Miki, T., Tsujimoto, Y., Miyabe, S., Sugiyama, K., Izawa, S., Inoue, Y. and Kimura, A. (1996) Oxidative stress response in yeast: Purification and some properties of oxidative stress-inducible glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Hansenula mrakii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 966-970

16)Karplus, P.A. and Schulz, G.E. (1987) Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **195**, 701-729

17)Peinado, J., Florindo, J., Garcia-Alfonso, C., Martinez-Galisteo, E., Llobell, A. and Lopez-Barea, J. (1991) Metals are directly involved in the redox interconversion of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase. *Mol. Cell. Biochem.*, **101**, 175-187

第三節

Saccharomyces cerevisiae のグルタチオン酸化酵素の精製と機能解析

【目的】

Hansenula mrakii のグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) を精製する過程で、還元型グルタチオン(GSH)をグルタチオンジスルフィド (GSSG) に酸化する活性を示す画分を偶然みいだした。精製の結果、この活性は細胞膜画分に存在する単一のタンパク質によって触媒されていた。この様な活性を示す酵素は、既にホ乳類で見られ、グルタチオン酸化酵素(GOD)として報告されていた (1-3)。一方、酵母細胞のグルタチオン酸化還元比 (GSH/GSSG) は、GRにより常に高く保たれている (4)。 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた研究から、GR欠損株は酸化的ストレスに対し感受性を示すことが報告されており、細胞内のGSH/GSSG比は酸化的ストレス防御に深く関係している (5)。酸化的ストレス防御系酵素であるGPxは過酸化脂質をアルコールへと還元する際、基質としてGSHを用いるためGSH/GSSG比の影響を大きく受けるのではないかと予想される。GODは酸素を用いてGSHを酸化することから、本酵素によって細胞内GSH/GSSG比が変化しGPx活性に影響が生じる可能性が考えられた。そこで本節では、GODのGPxに及ぼす影響を調べることを目的として、酵母 *S. cerevisiae* を用いてGODの精製と遺伝子の取得を試みた。

【材料と方法】

使用菌株と培養方法

Saccharomyces cerevisiae YPH250 (*MATa trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 ade2-101 ura3-52*)はYeast Genetic Stock Center (アメリカ カリフォルニア州立大学パークレー校) より入手した。YPD 栄養培地 (2% グルコース、2% ペプトン、1% 酵母エキス、pH5.5) にて28℃で24時間の種培養を行い、この培養液の一部をSD培地 (2% グルコース、0.67% Yeast Nitrogen Base、pH5.5) を含む試験管に移し、28℃で振盪培養を行い610nmにおける濁度(OD₆₁₀)を測定することにより生育を調べた。また、酵素精製には市販の酵母菌体 (*S. cerevisiae*; オリエンタル酵母社製) 1kgを用いた。

粗酵素液抽出方法

菌体を0.85%生理的食塩水で洗菌し、10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) に50μMのフェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF) を含む緩衝液[Buffer A]に懸濁した。この菌体懸濁液に対し、半量のガラスビーズを加えDyno-millを用いて氷冷下で10分間、細胞を破碎した。得られた溶液を100,000 x g、30分間の超遠心を行い、細胞膜を含む沈殿を得た。沈殿を

240mlの1.0% Triton X100を含むBuffer A(Buffer B)に再懸濁した後、4℃で3時間、穏やかに攪拌し膜タンパク質を可溶化した。再び4℃で100,000 x g、30分間の超遠心を行い212mlの細胞膜抽出液を得た。

カラムクロマトグラフィーによる精製

細胞膜抽出液(212ml、総タンパク質量6261.5mg)を、Buffer Bで平衡化したDEAE Toyopearl 650Mカラムに導通しタンパク質を吸着させた後、Buffer Bでカラムを洗浄した。カラムに吸着したタンパク質を0-1MのKClの濃度勾配により溶出させ、試験管に10mlずつ分取した。活性を示した画分を集め、6リッターのBuffer Bに対して4℃で12時間、透析により脱塩処理を行った。脱塩後の酵素溶液を、Q-Toyopearl 550カラムに導通しタンパク質を吸着させた後、Buffer Bでカラムを洗浄した。吸着したタンパク質を0-1MのKClの濃度勾配により溶出させ、試験管に4mlずつ分取した。活性を示した画分を集め、4リッターのBuffer Bに対して4℃で12時間、透析を行った。脱塩後の酵素溶液を、Glutathione Sepharose CL-4Bカラムに導通しタンパク質を吸着させた後、Buffer Bでカラムを洗浄した。吸着したタンパク質を0-1MのKClの濃度勾配により溶出させ、試験管に1mlずつ分取した。活性を示した画分を集め、1リッターのBuffer Bに対して4℃で12時間、透析を行った。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

第一章一節と同様の方法を用いた。分子量マーカーとしてNew England Bio.Lab.社製のMolecular weight markers:7701Sを用いた。

アミノ酸シーケンス

精製酵素をPfu アミノペプチダーゼ(タカラバイオインダストリー)を用いてN末端側のアミノ酸残基を消化しデブロックキングを行った。デブロック後のサンプルをSDS-PAGEで分離精製後、PVDF膜にブロッティングした。ボンソーSによる染色後、目的のバンドを切り出し、アミノ酸シーケンサー(Applied Biosystems, model 470A)によりアミノ酸配列を決定した。

酵素活性測定方法および細胞内酸化度の測定方法

酸素電極を用いたGOD活性の測定は、Hooperらの方法(6)に従った。また、グルタチオン還元酵素を用いたGOD活性の測定は、LashとJonesの方法(7)を用いた。GPx活性の測定は、GPx反応液(終濃度:100mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)、50mM EDTA、2mM GSH、200mM NADPH、10U/ml GR)を用意し、これに酵素溶液を約1mg/mlになるよう加え25℃で1分間反応させた。この溶液にtert-ブチルヒドロペルオキシド(t-BHP)を終濃度で1.5mMになるよう加え、340nmにおける吸光度の減少を測定した。NADPHのミリモル吸光係数を6.22として、1分間に1μmolのGSHを消費する酵素量を1unitとした。

GSH、GSSG濃度はAndersonの方法(8)に従い測定した。細胞内酸化度は蛍光プローブ

(DCFH-DA:2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)を用い、Davidsonらの方法(9)に従い測定した。酵素溶液のタンパク質濃度は、Bradfordの方法(10)に従い測定した。

各種薬剤によるGOD活性の誘導

*S. cerevisiae*を100mlのYPD液体培地中で対数増殖期(OD₆₁₀=1.0)まで振盪培養した後、各種薬剤(1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン,25μM;エタクリル酸,1mM;ジアミド,2mM;ジチオスレイトール,1mM;H₂O₂,0.4mM;t-BHP,0.6mM;パラコート,1mM;NaCl,0.5M;CaCl₂,200mM;ソルビトール,0.5M)で1時間処理した。10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で洗菌後、細胞膜抽出液を調製した。PD-10ゲルろ過カラムに導通することによりストレス剤を取り除いた後、GOD活性を測定した。

遺伝子クローニング

精製酵素のN末端付近の配列(10アミノ酸)をYeast Protein Database (YPD, <http://www.proteome.com/databases/index.html>)を用いて検索した結果、第7番染色体に存在する1113bpからなる読み枠(YGR079w)から推定されるアミノ酸配列と高い相同性を示した。そこで、このYGR079wをGOL1(Glutathione oxidase like 1)と命名した。GOL1を*S. cerevisiae* S288C株のゲノムをテンプレートとし、オリゴヌクレオチドプライマーGOL-F(SaIサイトを付加し開始コドンより763bp上流に結合する。[5'-TTATGGCCTCGTCGACGGGATATTC-3'])およびGOL-R(SphIサイトを付加し開始コドンより590bp下流に結合する。[5'-TTATTCTGGCATGCAGGACGGGCAC-3'])を用いて、PCRによる増幅を行った。2466bpの増幅断片を低融点アガロース電気泳動により精製し、T₄リガーゼを用いてベクターpUC19に連結した(PC19GOL)。

遺伝子破壊株の構築

制限酵素StyIでPC19GOLを切断し、GOL1遺伝子の621bpを欠失させたものをKlenow断片で処理し、マーカーであるHIS3(1652bp)を連結した。これを制限酵素HpaIおよびPvuIIで切断して得られる2037bpを、エレクトロポレーション法を用いて酵母細胞に導入し、相同組み換えによる遺伝子破壊を行った。遺伝子破壊の確認はPCRにより行った。

表1 各種カラムクロマトグラフィーによるGODの精製過程

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (U)	Specific activity (U/mg)	Fold Purification	Yield (%)
Total Membrane Fraction	6261.45	10.27	0.0016	1.0	100.0
DEAE-Toyopearl 650M	699.00	4.82	0.0069	4.2	46.9
Q-Sepharose	178.39	2.88	0.0161	9.8	28.0
GSH-Sepharose CL-4B	0.36	0.22	0.6166	376.1	2.1

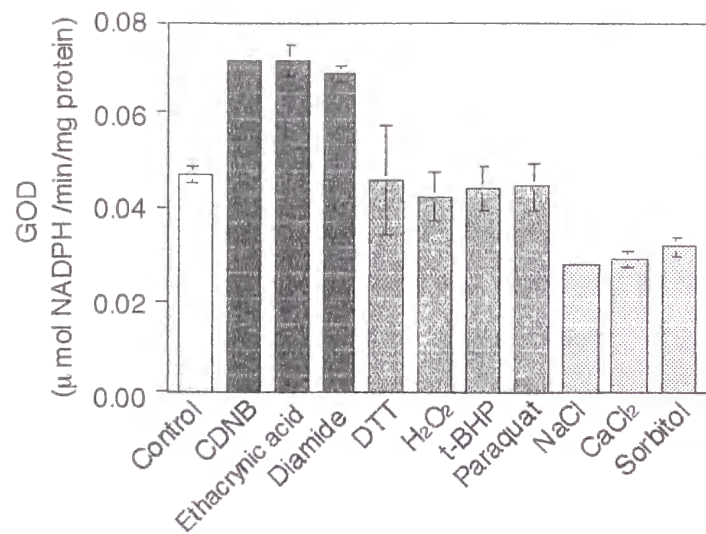


図1 各種薬剤処理によるGOD活性の変化
YPD栄養培地 (100ml) で対数生育期OD₆₁₀=1.0まで培養し、GOD活性を測定した。

【結果】

各種薬剤による GOD の誘導

各種薬剤によるグルタチオンオキシダーゼの誘導を調べた結果、スルフヒドル基(SH基)枯渇剤である1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン、エタクリル酸、ジアミドなどはGOD活性を上昇させることがわかった(図1)。一方、酸化ストレスを与える薬剤(H₂O₂、t-BHP、パラコート)はGOD活性に影響を及ぼさなかったものの、浸透圧ストレス剤(NaCl、CaCl₂、ソルビトール)はGOD活性を低下させた。また、SH基枯渇剤によるGODの誘導は濃度依存的な傾向にあった(図2)。

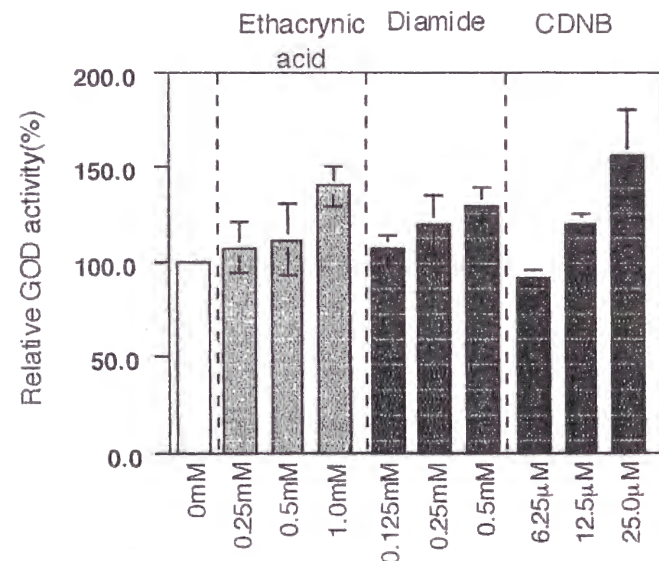
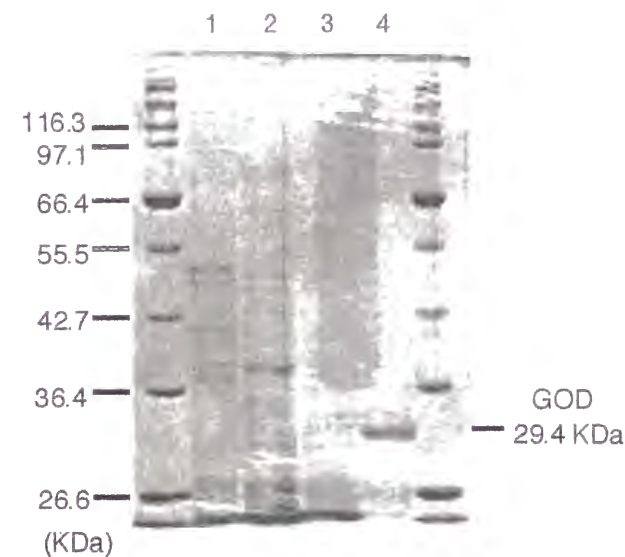


図2 SH基枯渇剤濃度によるGOD活性の変化
YPD培地 (100ml) で対数生育期 (OD₆₁₀=1.0) まで培養し、各グルタチオン枯渇剤を添加し1時間培養を続けた。集菌後、GOD活性を測定した。



1. Cell membrane exteact 2. DEAE-Toyopearl
3. QAE-Toyopearl 4. Glutathione Sepharose CL-4B

図3 SDS-PAGEによるGOD分子量の測定
SDS-PAGE(ゲル濃度:15%)の結果、Glutathione Sepharose CL-4Bカラムクロマトグラフィー後のサンプルは、単一のバンドを示し、その分子量は約29KDaを示した。

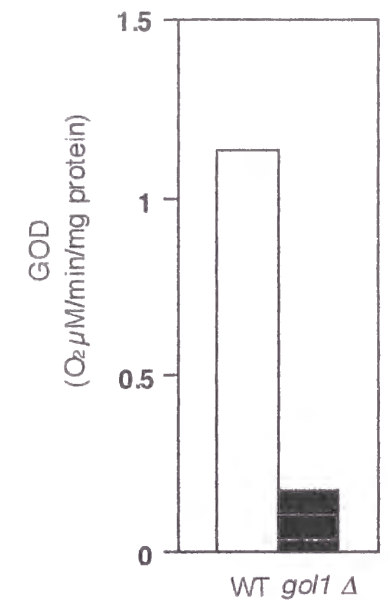


図4 *gol1Δ*株におけるGOD活性
YPD培地 (100ml) で対数生育期 (OD₆₁₀=1.0) まで培養したものを集菌し、GOD活性を測定した。

グルタチオンオキシダーゼの精製

各種クロマトグラフィーを用いてGODの精製を試みた。精製の概略を表1に示した。最終精製酵素標品の活性収率は2.1%であり、376倍に精製した。Glutathione Sepharose CL-4B アフィニティークロマトグラフィー後のサンプルは、SDS-PAGE上で単一のバンドが見られた(図3)。精製GODの分子量は約29KDa (SDS-PAGE)を示した。精製酵素のグルタチオンに対するKm値は約4.8mMであった。

GODのアミノ酸配列の決定

精製酵素のN末端付近のアミノ酸配列を決定を試みたが修飾されており決定することができなかった。そこで、Pfuアミノペプチダーゼを用いN末端側から消化した。本ペプチダーゼはプロリン残基の手前で消化反応が停止する。得られた消化物のN末端アミノ酸を9残基決定した結果、?NKVWTKEDDであった。この配列を基にYeast Protein Databaseに対して検索を行った結果、機能不明の読み枠YGR079wから推定されるタンパク質のアミノ酸配列の一部(PNKVITKEDI)と6アミノ酸配列が一致していた。

GOL1破壊株におけるGODおよびGPx活性

GOL1遺伝子破壊株(*gol1Δ*)におけるGOD活性は、野生株の約10%にまで低下した。(図4)

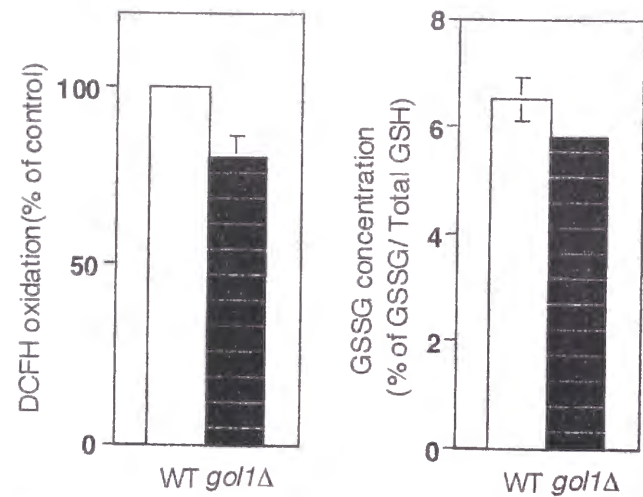


図5 *gol1Δ*株における細胞内酸化度とGSSG比率
SD栄養培地（100ml）で対数生育期(OD₆₁₀=1.0)まで培養したものを集菌し、細胞内酸化度、及び細胞内GSSG濃度を測定した。

さらに、細胞内で発生するH₂O₂の量的指標である細胞内酸化度も20%程度低下していた。また、GOD反応によって生成するGSSGの総グルタチオンに対する割合も約2%低下していた(図5)。しかし、*GOL1*破壊株のGPx活性は親株との間に差は見られなかった。0.4mMの*t*-BHPを含む培地で培養した場合においても同様の結果が得られた(図6)。

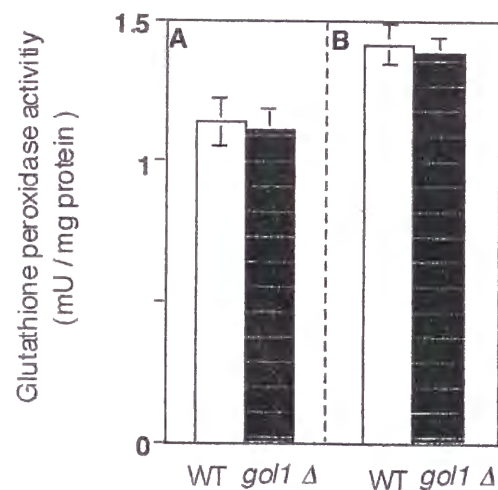


図6 *gol1Δ*株におけるGPx活性
A) SD栄養培地（200ml）で対数生育期(OD₆₁₀=1.0)まで培養したものを集菌し、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)活性を測定した。B) 0.4mM *tert*-ブチルヒドロペルオキシドを含むSD培地で培養したものを、Aと同様にGPx活性を測定した。

【考察】

グルタチオンは細胞内に多く存在する低分子チオールであり、細胞内の酸化還元状態の維持に関与している(11)。還元型グルタチオン(GSH)は、グルタチオン還元酵素による酸化型グルタチオン(GSSG)の再還元や、グルタチオン合成系酵素(γ-グルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素)などによって生成される(12,13)。しかし、GSSGの生成については、GPx反応によるGSHの酸化、あるいはグルタチオンと酸素が直接反応することにより生じるものが大部分であると考えられてきた。*H. mrakii*で見られたGODは、GSSGを積極的に生成することから、グルタチオンの酸化還元比をコントロールし、細胞内の酸化還元状態を酸化側へ導く機能を持つと考えられた。GPxはGSHを用いるため、グルタチオンの酸化還元比率に大きく影響を受けるのではないかと考えた。そこで本節では、GODのGPx活性に及ぼす影響を調べるために、遺伝学的解析が容易な*S. cerevisiae*を用いて、GODをコードすると思われる遺伝子を同定し、遺伝子破壊株の構築を試みた。

細胞を様々な薬剤で処理し、GODの誘導条件について検討した。その結果、SH基枯渇剤(1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン、エタクリル酸、ジアミド)によってGOD活性が増大したが、酸化的ストレス誘導剤(H₂O₂、*t*-BHP、パラコート)では変化が見られず、浸透圧ストレス剤(NaCl、CaCl₂、ソルビトール)では逆に低下した。酸化的ストレスによって細胞内グルタチオンの酸化還元比は低下する事が報告されている(14)。これに対して、SH基枯渇剤は細胞内の還元型グルタチオンと結合し還元物質としての機能を失わせることが報告されている(15)。GOD活性はSH基枯渇剤処理により増大することから、*S. cerevisiae*のグルタチオンオキシダーゼはSH基が減少するようなストレスで活性が増大すると考えられた。

酵素精製の結果、*S. cerevisiae*のGOD活性は超遠心を行った細胞破碎液の可溶性画分からは検出されず、沈殿から活性が検出され、*H. mrakii*と同様に細胞膜に結合して存在していた。また、GODの分子量は約29.4kDa(SDS-PAGE)であり、還元型グルタチオン(GSH)に対するKm値は4.8mMであった。ホ乳類で報告されているGOD(Rat kidney:42kDa、Bovine milk:45kDa、Rat semirenal visicle:33kDa)と比べ、分子量はやや低かった(1-3)。本酵素の部分アミノ酸配列の解析から、Yeast Protein Databaseに登録されていたYGR079wが部分的に一致する配列を含んでいた。本遺伝子産物の推定分子量は、約41kDaでありC末端側に疎水性の強い領域が存在しており、YGR079wは膜に結合して存在していると考えられた。

YGR079wの機能について検討するためYGR079wの遺伝子破壊を行い表現型を調べた。*ygr079w*破壊株におけるGOD活性は野生株の約10%程度にまで低下することがわかった。また、*ygr079w*破壊株では野生株に比べ、細胞内の過酸化水素量の指標である細胞内酸化度が20%程度低下し、全グルタチオン含量に対する酸化型グルタチオンの割合も約2%低下していた。これらの事からYGR079wはGODをコードしていると考えられ、遺伝子破壊によりグルタチオンの酸化還元比率は変化することがわかった。そこで、GODを欠損する事によりGPx活性は影響を受けるかどうか調べたが、野生株と*gol1Δ*の間にGPx活性の差はみられなかった。

【引用文献】

- 1)Ormstad, K., Lastbom, T. and Orrenius, S. (1981) Characteristics of renal glutathione oxidase activity. *FEBS Lett.*, **130**, 239-243
- 2)Janolino, V.G. and Swaisgood, H.E. (1975) Isolation and characterization of sulfhydryl oxidase from bovine milk. *J. Biol. Chem.*, **250**, 2532-2538
- 3)Ostrowski, M.C. and Kistler, W.S. (1980) Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. *Biochemistry*, **19**, 2639-2645
- 4)Grant, C.M., Collinson, L.P., Roe, J.H., Dawes, I.W. (1996) Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.*, **21**, 171-179
- 5)Izawa, S., Maeda, K., Miki, T., Mano, J., Inoue, Y. and Kimura, A.(1998)Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptiveresponse to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, **330**, 811-817
- 6)Hooper, K.L., Joneja, B., White, H.B. and Thorpe, C. (1996) A sulfhydryl oxidase from chicken egg white. *J. Biol. Chem.*, **271**, 30510-30516
- 7)Lash, L.H. and Jones, D.P. (1986) Purification and properties of the membranal thiol oxidase from porcine kidney. *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, 120-130
- 8)Anderson M.E. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. In *Methods in Enzymology* (A.Mesiter, Ed.), vol.113, pp548-553, Academic Press, New York
- 9)Davidson J.F., Whyte B., Bissinger P.H. and Schiestl R.H. (1996) Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**, 5116-5121
- 10)Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254
- 11)Lash, L.H., Jones, D.P. and Orrenius, S. (1984) The renal thiol (glutathione) oxidase. Sub-cellular localization and properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **779**, 191-200

- 12)Ohtake, Y. and Yabuuchi, S. (1991) Molecular cloning of the γ -glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **7**, 953-961
- 13)Inoue, Y., Sugiyama, K., Izawa, S. and Kimura, A. (1998) Molecular identification of glutathione synthetase (*GSH2*) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1395**, 315-320
- 14)Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I.W. and Grant, C.M. (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1081-91
- 15)Fortuniak, A., Zadzinski, R., Bilinski, T. and Bartosz, G. (1996) Glutathione depletion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **38**, 901-910

第二章

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

【目的】

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によって起こる脂質膜の過酸化は、鉄あるいは銅などの金属が存在した場合、連鎖的に進む事が報告されている (1,2)。さらに、過酸化の進んだ生体膜において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 (3,4)。このような障害をもたらす過酸化物の除去を行う酵素として、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存在し、それらは生物によって特徴的であると考えられてきた (5,6,7)。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 (8)、酵母における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。ところが、数種類の酵母ではGPx活性が動物のGPxに比べて低いため、過酸化脂質除去にはグルタチオンではない電子供与体を基質とするペルオキシダーゼが機能しているのではないかと考えられてきた。

しかし、当研究室で取得された酵母 *Hansenula mrakii* は他の酵母に比べ高い過酸化脂質耐性を示し、過酸化脂質を含む培地中で本菌を生育させるとGPxの誘導が観察される (9)。また、本菌よりGPxが精製され生化学的にグルタチオンペルオキシダーゼが存在することが証明された (10)。筆者は、GPxと共役しグルタチオン還元サイクルを形成する酵素 (グルタチオン還元酵素、及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素) の諸性質を明らかにした (第1章)。そこで、本章では酵母におけるGPxの存在をより明らかにする目的で、*H. mrakii* よりGPx遺伝子のクローニングを試みた。

【方法】

使用菌株と培養方法

使用した菌株のうち *Hansenula mrakii* IFO 0895 株は財団法人発酵研究所 (Institute for Fermentation, Osaka, Japan) より入手した。*Saccharomyces cerevisiae* YPH250 (*MATa trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 ade2-101 ura3-52*) はYeast Genetic Stock Center (アメリカカリフォルニア州立大学バークレー校) より入手した。*H. mrakii* および *S. cerevisiae* は、それぞれHm培地 (1% グルコース、0.5% ペプトン、0.2% 酵母エキス、0.03% K_2HPO_4 、0.03% KH_2PO_4 、0.01% $MgCl_2$ 、pH5.5) およびYPD培地 (2% グルコース、2% ペプトン、1% 酵母エキス、pH5.5) にて28℃で24時間振盪培養を行った。この培養液の一部を5mlのSD培地 (2% グルコース、0.67% Yeast Nitrogen Base、pH5.5) を含む試験管に移し、28℃で振盪培養を行い610nmにおける濁度(OD₆₁₀)を測定することにより生育を調べた。

DNA抽出および操作方法

ゲノム抽出はCryer らの方法に準じて行った(11)。得られたゲノムDNAを制限酵素Hind IIIで処理した後、単コピーベクター pYE-Ura3 にT₄-Ligaseを用いて連結した。大腸菌JM109 (*rec A1 end A1 gyrA96 hsdR17 sup E44 relA1 thiD(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ ΔM15]*) に形質転換した。

サザンハイブリダイゼーション

ホ乳類で報告されているGPxのcDNAから推定されるアミノ酸配列を比較し、コンピュータープログラム (DNASIS Mac,HITACHI Co.) を用いてアラインメントを構成した (12-16)。

		10	20	30	40	50
Rat	1	MSRILRASCL	LSLLLAFVFP	PGRGQEKSKT	DCHGGMSGTI	YEYGALITDG
Mouse1	1	MVTELRFVYL	VPLLLASYVO	TTPRPEKMKM	DCYKDVKGTI	YDYEALSLNG
Mouse2	1	MARILRASCL	LSLLLAFVFP	PGRGQEKSKT	DCHGGMSGTI	YEYGALITDG
Bovin	1	MARLFRASCL	LSLLLAFVFP	PSQGQEKSKT	DCHAGVGGTI	YEYGALITDG
Human	1	MARLLQASCL	LSLLLAFVFS	QSRGQEKSKM	DCHGGISGTI	YEYGALITDG
		60	70	80	90	100
	51	EEYIPFKQYA	GKYILFVNVA	SYCGLTDQYL	ELNALQEELG	PFGLVILGFP
	51	KEDIPFKQYR	GKHLFVNVA	TYCGLTIQYP	ELNALQEDLK	PFGLVILGFP
	51	EEYIPFKQYA	GKYILFVNVA	SYCGLTDQYL	ELNALQEELG	PFGLVILGFP
	51	EEYIPFKQYA	GKYILFVNVA	SYCGLTGOYV	ELNALQEELE	PFGLVILGFP
	51	EEYIPFKQYA	GKYVLFVNVA	SYCGLTGOYI	ELNALQEELA	PFGLVILGFP
		110	120	130	140	150
	101	CNQFGKQEPG	ENSEILPSLK	YVRPGGGFVP	NFQLFEKGDV	NGEKEQKFYT
	101	CNQFGKQEPG	DNLEILPGLK	YVRPGKGLP	NFQLFAKGDV	NGENEQKIFT
	101	SNQFGKQEPG	ENSEILPSLK	YVRPGGGFVP	NFQLFEKGDV	NGEKEQKFYT
	101	CNQFGKQEPG	ENSEILATLK	YVRPGGGFTP	NFQLFEKGDV	NGEKEQKFYT
	101	CNQFGKQEPG	ENSEILPTLK	YVRPGGGFVP	NFQLFEKGDV	NGEKEQKFYT
		160	170	180	190	200
	151	FLKNSCPPTA	ELLGSPGRLF	WEPMKIHDR	WNFEKFLVGP	DGIPIMRWYH
	151	FLKRSCPHPS	ETVVMKHTS	WEPKIVHDR	WNFEKFLVGP	DGVPVMRWFH
	151	FLKNSCPPTA	ELLGSPGRLF	WEPMKIHDR	WNFEKFLVGP	DGIPIMRWYH
	151	FLKNSCPPTS	ELLGSPDRLF	WEPMKVHDR	WNFEKFLVGP	DGIPIMRWYH
	151	FLKNSCPPTS	ELLGTSDFLF	WEPMKVHDR	WNFEKFLVGP	DGIPIMRWHH
		210	220	230		
	201	RTTVSNVKMD	ILSYMRRQAA	LGARGK....	230	
	201	OAPVSTVKSD	IMAYLSHFKT	I.....	230	
	201	RTTVSNVKMD	ILSYMRRQAA	LSARGK....	230	
	201	RTTVSNVKMD	ILTYMRRRAV	WEAKGK....	230	
	201	RTTVSNVKMD	ILSYMRRQAA	LGVKRK....	230	

図1 ホ乳類で取得されたGPxアミノ酸配列のアラインメント
ラット、マウス (血漿、精細胞)、ウシ、ヒトのGPxのアミノ酸配列を比較した。シャドーは、2種類以上のGPxでのアミノ酸が一致した部分を示す。矢印で示した部分に対応するオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、PCR法を用いて増幅を行った。得られた増幅断片をプローブとし *H. mrakii* のGPx遺伝子クローニングに用いた。

これらの配列の内、比較的、相同性の高い領域（アミノ酸残基：番号40～180）を増幅するオリゴヌクレオチドプライマーをRatのGPx-cDNAの塩基配列に基づき設計した。プライマーの配列は以下の通りである。HGP-F(5'-GCCAAGCTTAAGGTGCTGCTCATTGAGAAT-3')およびHGP-R(5'-GCCAAGCTTGTGTATCTGCGCACTGAACTA-3')。これらのプライマーを用いてPCRを行い、得られた増幅断片(280bp)をECL Direct Labelling and Detection System(アマシャム社)を用いてラベルしGPxプローブとして用いた。アガロースゲル電気泳動後のプラスミドおよびゲノム断片をナイロンメンブレンにプロテイングし、GPxプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。

GPx 活性測定方法

菌体を50mlのSD培地で28℃で振盪培養を行い、OD_{610nm}が1.0に到達した時点で集菌した。Braun homogenizerを用いたガラスビーズ破碎を3分間行い菌体破碎溶液を得た。4℃で6000rpm、10minの遠心分離を行い、得られた上清を粗酵素溶液とした。GPx活性はFloheとGunzlerら(17)の方法を用いて測定した。GPx反応により酸化されるGSHをグルタチオン還元酵素で還元し、吸光度340nmにおけるNADPHの減少を25℃で1分間測定した。NADPHのミリモル吸光係数を6.22として、1分あたり1μmolのGSHを消費する酵素量を1unitとした。粗酵素溶液のタンパク質濃度はBradfordの方法(18)により測定した。

塩基配列の決定

*H. mrakii*のゲノムDNA断片をM13mp19ファージプラスミドに移し、Takara DNA deletion Kitを用いてデレーションミュータントを作製した。Dye Terminator Cycle Sequencing キット (Applied Biosystems社)を用いてDNA塩基配列のシーケンスを行った。

遺伝子破壊株の構築

*H. mrakii*の遺伝子破壊には抗生物質であるオーレオバシジンA (Aureobasidin A) に耐性を賦与するAUR1-C遺伝子(4759bp)をマーカーとして用いた。AUR1-C遺伝子はプラスミドpAUR112(タカラバイオケミカル)をSalIとSmaIで切り出したものをKlenow処理し、アガロースゲル電気泳動により精製したものをを用いた。

pGPx8をBamHIとSalIで処理して得られる断片(R1)をpUC19に連結したものをpUR1とした。pUR1をEco65Iで切断しKlenow処理したものに、AUR1-C遺伝子を導入したプラスミド(pAUR1)を構築した。このプラスミドをSalIとApaIで消化し、R1断片の一部とAUR1-C遺伝子を含むフラグメント(5325bp)を得た。このDNA断片をエレクトロポレーション法で*H. mrakii*へ導入し、オーレオバシジンA(0.1 μg/ml)を含むSD最少培地へ塗布し、オーレオバシジン耐性株を選択した。オーレオバシジン耐性株より染色体DNA調製し、GPL1遺伝子の読み枠を増幅するプライマー(GPL-F、5'-TTACCTATACAGATGGATAACAACCATGGAT-3'; GPL-R、5'-CAAGGTACGTTCTAACCCAGACAGACATG-3')を用いて遺伝子破壊

を確認した。

一方、PCRを用いてGPL1遺伝子の読み枠の一部を以下のプライマー(5'-ACTCCCTTTGGCTCTAGATTTGAAGGTGAG-3'; 5'-GCTCTGTTAGCAGCATGCCATTATTCTCA-3')を用いて増幅させた。増幅断片をXbaIとSphIで消化し、AUR1-C遺伝子をもつ染色体組込型ベクターpAUR101のXbaI-SphIサイトに組み込み、pAUR2を構築した。pAUR2をNdeIで切断したものをエレクトロポレーション法を用いて*H. mrakii*に導入し、オーレオバシジンA耐性株を選択した。オーレオバシジンA耐性株の染色体DNAをHindIIIで消化し、GPL1遺伝子の終止コドンから341bp上流部分を含む断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、遺伝子破壊を確認した。

pGPx8をHindIIIとSalIで処理して得られる断片(R2)を、pUC19に連結したものをpUR2とした。pUR2をNheIとClaIで切断し、Klenow処理したものにAUR1-C遺伝子を導入したプラスミド(pAUR3)を構築した。このプラスミドをMunIとNdeIで消化し、R2断片の一部とAUR1-C遺伝子を含むフラグメント(6027bp)を得た。このDNA断片を先ほどと同様に*H. mrakii*へ導入し、オーレオバシジンA耐性株を選択した。オーレオバシジン耐性株より染色体DNA調製し、LPR1遺伝子の読み枠を増幅するプライマー(LPR-F、5'-CTCAGCTTCGAAACCATGGTTGTGAAACTC-3'; LPR-R、5'-ACAATCTTTTTTTTTTTATTAGCAGTTCTCC-3')を用いて遺伝子破壊を確認した。

一方、PCRを用いてLPR1遺伝子の読み枠の一部を以下のプライマー(5'-CAGAATATTTGTGCACAGTGAATCTAAACG-3'; 5'-AATCCACTGGTCGACACAATTCTCACCGTC-3')を用いて増幅させた。増幅断片をSalIで消化し、pAUR101のSalIサイトに組み込み、得られたプラスミド(pAUR4)をClaIで切断したものをエレクトロポレーション法を用いて*H. mrakii*に導入し、オーレオバシジンA耐性株を選択した。オーレオバシジンA耐性株の染色体DNAをHindIIIで消化し、LPR1遺伝子の終止コドンから439bp上流部分を含む断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、遺伝子破壊を確認した。

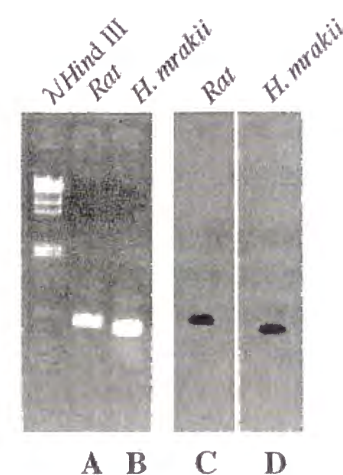


図2 PCR増幅産物のサザンハイブリダイゼーション
A:Rat cDNAライブラリーに対しPCRを行い増幅されたGPx cDNA B:*H. mrakii*のゲノムDNAに対してPCRを行い増幅されたバンド。C:Rat-GPx cDNAに対して、*H. mrakii*の増幅断片をプローブとしてサザン解析を行った。D:*H. mrakii*の増幅断片に対してRat-GPx cDNAをプローブとしてサザン解析を行った。

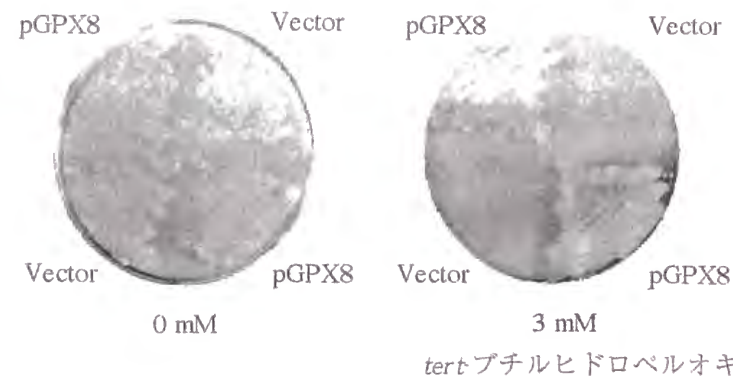


図3 pGPx8を導入した*S. cerevisiae*のt-BHP含有寒天培地での生育ベクターのみを形質転換した株は、3mMのtert-ブチルヒドロペルオキシドを含む培地では生育不能であった。しかし、pGPx8を形質転換した株は生育可能であった。

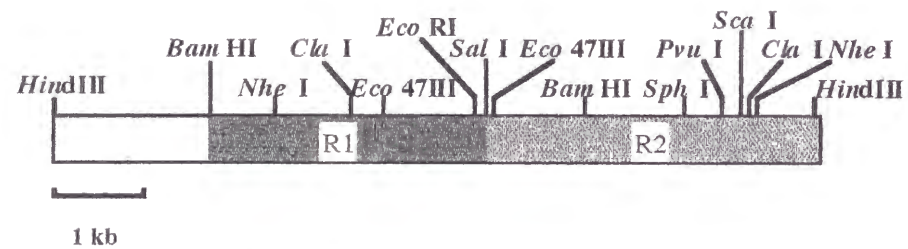


図4 pGPx8の制限酵素地図
pGPx8を制限酵素BamHI、及びSalIで消化し得られる断片をR1とした。また、SalI、及びHindIIIで消化し得られる断片をR2とした。この2つの断片をYEp24に連結したものを、それぞれpR1、及びpR2とした。

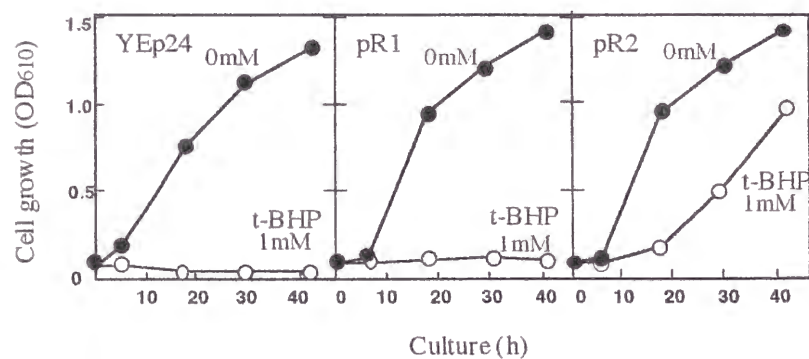


図5 pR1およびpR2導入株のt-BHP含有培地での生育
YEp24のみを含む株では、1mMのtert-ブチルヒドロペルオキシド(t-BHP)を含む培地では生育不能であった。pR1を含む株はt-BHP含有培地でやや生育し、pR2を含む株は生育可能であった。

試薬

tert-ブチルヒドロペルオキシド(t-BHP)は片山化学より購入した。GSHは興人化学より購入した。制限酵素類、T₄-DNA ligase、及びTaq polymeraseはNew England Bio. labより購入した。ECL™ラベリングキット、及びナイロン膜(Hybond-N)はAmersham社より購入した。Taq dye deoxy terminator cycle sequencingキットはApplied Biosystem社より購入した。

【結果】

Hansenula mrakii IFO 0895株のGPx遺伝子のクローニングの為に、ホ乳類で報告されているGPx(12-16)のアミノ酸配列を基にプローブを作製した。各種ホ乳類のGPxアミノ酸配列は約42%の相同性を示し、その中でも相同性の高い領域に対応する部分を増幅した(図1)。Rat-GPxcDNAを鋳型としたPCR増幅断片と(R-GPXP:約300bp)、*H. mrakii*ゲノムDNAを鋳型としたPCR増幅断片(H-GPXP:約350bp)についてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、相互に強くハイブリダイズしたことから、2つの増幅断片は強い相同性を示すことがわかった(図2)。

H-GPXPをGPxプローブに用いて*H. mrakii*のゲノムライブラリーに対して、一次スクリーニングを行い、得られたプラスミドを*S. cerevisiae*に導入し過酸化脂質耐性を指標に2次スクリーニングを行った結果、一株の陽性クローン(GPx8)を得た。本クローンより単離したプラスミドpGPx8を制限酵素HindIIIにより消化したところ、pGPx8は約8.3kbの染色体DNAを含んでいることがわかった。pGPx8を*S. cerevisiae*に形質転換し、過酸化脂質に対する耐性を調べた。その結果、ベクターのみを導入した形質転換体は、3mMのt-BHPを含む寒天培地では生育できなかったのに対し、pGPx8保有株は3mM t-BHP含有寒天培地でも生育可能であった(図3)。このことから、pGPx8の挿入断片中には酵母に対して過酸化脂質耐性を付与する遺伝子が存在していることがわかった。

さらに、過酸化脂質耐性を示す領域について検討するために、pGPx8のサブクローニングを行った。まず、pGPx8の挿入断片の制限酵素地図を作製した(図4)。pGPx8を大まかに切断するBamHIとSalIで処理して得られる断片をR1、SalIとHindIIIで処理して得られる断片をR2とした。この2つの断片を多コピーベクターYEp24に連結したものを、それぞれpR1およびpR2とした。これらを*S. cerevisiae*に形質転換し過酸化脂質に対する感受性を検討した結果、pR2を保持した株は1mM 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(図5)。また、pR1保持株は1mM 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pR2保持株に比べ弱いt-BHP耐性を示すことが明らかになった。

そこで、比較的強い耐性を与えるR2領域の塩基配列を決定したところ、783bpから成る読み枠が存在した(図6)。この遺伝子から推定されるタンパク質の分子量は29,032であり、N末端側には強い疎水性を示す領域が存在した。そこで、pR2領域中に存在する過酸化脂質耐性遺伝子をGPL1(glutathione peroxidase-like)遺伝子と命名した。

CAGTGGGATCAAGTGATAGGTATCAGTGGGAGTACAGCAGGC

TCATTCATCTATAAAATACTTCCTTTTCTTTGGGTGACGAGTCTGATTCTGGCGTCTTCTGCAGCGATCTTGGTGAAGATACCG
 ATTTTCGTCAAACACTAGCGGTATCGCGGAAAGTGAAAGTCATCATCAGTGGTGTCTTGATAAAAAAATTTCTCAGCTTCGAAACC
 ATG GTT GTG AAA CTC GTG GGA TTG ACG CTG GCT GTC AGT TCC AAT ATG TGG GCT GGT AAA GAA
 M V V K L V G L T L A V S S N M W A G K E
 GGT CCA TTA GTT CAT ATC TCG TGT TGC TGT GCA AAC ATC TTG ATG GAA TCA TTC AGA ATA TTT
 G P L V H I S C C A N I L M E S F R I F
 GAT GGC AGT GAA TCT AAA CGT CGT GAA TTG TTA CTA GCT GCC AGC GCT GCT GGT ATA TCT GTT
 D G S E S K R R E L L A A S A A G I S V
 GCA TTT AAT GCC CCC ATC AGT GGT GTC ATC TTC ACA CTC GAA CAA TTG ACC TCT TAC TTC TAC
 A F N A P I S G V I F T L E Q L T S Y F Y
 GCA TCC AGT AAG ATG TGG CCT TCT TTT GTC TGT GCA ATG GCT GCC ACT GTG GTG TTG AAC TCA
 A S S K M W P S F V C A M A A T V V L N S
 TTC AAG GAA GGT ATT GAC GTC TAT GTC ACT ATG AAT AAT CAA TGG CTA GGA TTT GAA CTG TTT
 F K E G I D V Y V T M N N Q W L G F E L F
 GGT TTC ATG ATG CTT GGA GTT GCC GGT GGT GTA TTT GGT GCA TTT TTC AAT AGG CTC AAT ATG
 G F M M L G V A G G V F G A F F N R L N M
 AAG TTT GCC AAT TTA CGC CGT GCA TTC ATA AGT TCC AGA GGA GCA AGA TAC GAA GTA TTG GAA
 K F A N L R R A F I S S R G A R Y E V L E
 GTT GTG GCA TTA TCC CTT GTC ACA TCT GTT GTG ACA TTT CCG TTG GTC TTC CCA AGG TTA TCG
 V V A L S L V T S V V T F P L V F P R L S
 CTG AAC GCG TTG ATT TCA CGA TTA TAT AAA GAT TGT GAA AAC ATC GAT GAG AAC ATC ATG GGT
 L N A L I S R L Y K D C E N I D E N I M G
 GGG CTA TGC TCT GAG CAC TCT GGA TAT ACC TTA CTG TTA CTC CTC TGT ACC GGT GTC ACA GTG
 G L C S E H S G Y T L L L L C T G V T V
 TCG GTG ATT ACA GCT TAT ACA TTC GGT ACT ATC GTA CCA GCG GGT GTT CTC ACT CCG GCA CTG
 S V I T A Y T F G T I V P A G V L T P A L
 GCC ATT GGC GCA ATA TTT GGA CGT ATC CTA GGT ATA ATT GTT GAA AAC GTT CAA ACT TCT TCG
 A I G A I F G R I L G I I V E N V Q T S S
 CCA TTG CTA TCG TCG GTA TGT FCC AAC TCT TCG AAT CTC TGT GTT TCA CCT GCT GCT TAT GCC
 P L L S S V C S N S S N L C V S P A A Y A
 GTT GTT GGA TCT GCC TTT TTA GCT GGT GTT ACC AAG ATG ACT GTA TGG GTT GTG GTC ACC
 V V G S A A F L A G V T K M T V W V V V T
 GTT TTT GAA TTA ACA GGC GCC TTG ACT TAT GTA TTG CCT ATT ATG ATC ACG GTA TTG ATC GCG
 V F E L T G A L T Y V L P I M I T V L I A
 AGA TGG ACA AGC GAT CAG CTC GAC GGT GAG AAT TGT TAC GAT CAG TGG ATT AAA TTC TTC GGA
 R W F S D Q L D G E N C Y D Q W I K F F G
 TAT CCF TAC CTG ACA GAA GTC AAG AGA CCT CTG CCT TTG ACA AAG AGT CGA GAT TTC TTA AAA
 Y P Y L T E V K R P L P L T K S R D F L K
 CCA CTG GAC GAA ATT AAG GCG ATA TAT CTG GAA GAT GTG GCT ACT TTA GAA TCA TTG GAG TCG
 P L D E I K A I Y L E D V A T L E S L E S
 CTG ACG CAG TTG AAA TAC CAA GGG GTG CCG ATA TTG AAG AGT CGT ATT GAA CCA AGA CTA TTT
 L F Q L K Y Q G V P I L K S R I E P R L F
 GGA TGG CTA TCG CTA GCC GAC TTG GAA GAC AAG TTG TTA CAA ATA CAC GCT GCT TCA GAG CCT
 G W L S L A D L E D K L L Q I H A A S E P
 GCT GAT TCA CAA AGG AGA GTT GTG TTC ACC AAT AGT GAT CGC GAT GAG GGT AAT GAT AAT GAT
 A D S Q R R V V F T N S D R D E G N D N D
 AAT GCG CAC AAT TTA TCG GAT ATT GTG GAA AAT GGT TAT ATA ACT CTC AGC CCG GAA CTG CCA
 N A H N L S D I V E N G Y I T L S P E L P
 CTA CCC TCA CTG GTT GAC GTC TTC TTC AAT ATG AAG CCT CGG TAT GTT TTG TTC TGT GAG GAT
 L F S L V D V F F N M K P R Y V L F C E D
 GGG CTG TTC TGT AGC CTG CTA ACC TTG AGA GAT GTG TCC GGG ATT GTG GAG AAC TGC TAA TAA
 G L F C S L L F L R D V S G I V E N C *
 AAAAAAAAAAGATTGTCAGCACTGCGGTTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGCCCTACGTACCTGAAGCCTTCTG
 TTTGTAGTTTTTTTGGCTCCATGAAAAATCCGCATTGTTTTGACCAAAGTCGGTGTTCGCGTGGAAAGTTTCCGATGTGGAAAAACT

図7 R1領域に存在するLPR1遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列
 約3.0kbpの大きさを示すpR2領域のデレーションミュータントを作製し塩基配列を決定した。1572bpからなる
 読み枠が一つ存在した。この読み枠をLPR1と命名した。

TCAAAATTGACTGTAGCGCGGTTTCCATCGGAATTTTCCGGTCAATAGCCCCCTTATATCTGGCTTTCTGTG

-103 GCTCATTCCTCCAGCGGTGGCGCCCGGAGAGCGAAATTTTGAACCTCTCGACACCAACCAAAAAAGGAAACAACAAAAAGTATATTTGGCCTTTTACCTATACAG

1 ATG GAT ACA ACC ATG GAT CAA AAC AAG ATG GTT GCT ACT CCC TTT GGC TCT CAG TTT GAA GGT GAG TCA TTT ATT TTG
 Met Asp Thr Thr Met Asp Gln Asn Lys Met Val Ala Thr Pro Phe Gly Ser Gln Phe Glu Gly Glu Ser Phe Ile Leu
 26

79 GTG ACC TCC CCC ACC TTTG CGG GTT TCA CCT TTA ATC ATA TAC AAG AAT ACT AAC AAA GAC ACC GCA GAG ATT GAT
 Val Thr Ser Pro Pro Thr Leu Arg Val Ser Pro Leu Ile Tyr Lys Asn Thr Asn Lys Asp Thr Ala Glu Ile Asp
 52

157 AAA GCA TTG TTC GAA TAT CAT TAC AAG ATG CAG AAC CAA TCA AAC CTG AAC AAG ATG TCC CAA GGT CGC CAT GTT CAT
 Lys Ala Leu Phe Glu Tyr His Tyr Lys Met Gln Asn Gln Ser Asn Leu Asn Lys Met Ser Gln Gly Arg His Val His
 78

235 GGT CAT CGC AAA GCT CAG AAT GGT TTG APT GGT GGA GGC TAT ATG AAT CAT AAG TCT CAA GGT CAA CGT GTG CAA AAG
 Gly His Arg Lys Ala Gln Asn Gly Leu Ile Gly Gly Tyr Met Asn His Lys Ser Gln Gly Gln Arg Val Gln Lys
 104

313 GCT CCC TGT CAT APT CAA CAA CCT CAA CAG TCT ATG TAT CCA CAG GCT CAG CAA CTT GTT CAT CAA CAA GCT CAA CAA
 Ala Pro Cys His Ile Gln Gln Pro Gln Gln Ser Met Tyr Pro Gln Ala Gln Gln Leu Val His Gln Gln Ala Gln Gln
 130

391 CAA APT TGC CAA GGT CAA GGA TAT GGC GCT CAG TTC CAC GTG AAC AAC CCA CAG GTC CCA TAT TCT TTC CAT CCT TCC
 Gln Ile Cys Gln Gln Gly Tyr GGC GCT CAG TTC CAC GTG AAC AAC CCA CAG GTC CCA TAT TCT TTC CAT CCT TCC
 156

469 ACT TCG AAT GTT TTG GCA CAG TCT CCT GAC FCC CTC GTT GAG GGT ATG GTT ACC TCA ACT GTC TAT GAC GGG TTC TCT
 Thr Ser Asn Val Leu Ala Gln Ser Pro Asp Ser Leu Val Glu Gly Met Val Thr Ser Thr Val Tyr Asp Gly phe Ser
 182

547 TTG AAT TTG TCA TCT TCT TCA TCC GGT TCG GGT TCT ATG TCG TCC TTA TCT TCT GAA CAC GAT TCT TAC TTC AAA
 Leu Asn Leu Ser Ser Ile Ser Ser Gly Ser Gly Ser Met Ser Leu Ser Ser Glu His Asp Ser Tyr phe Lys
 208

625 TCC CCA TGG GAT AAC AAT TTG GAC AAG AAC AAG ATG ATG ACA ACT CAC GGT AAT GAG TTT AAT GAG AAT
 Ser Pro Trp Asp Asn Asn Leu Asp Lys Asn Lys Met Met Thr Thr His Gly Asn Glu phe Asn Ala phe Asn Glu Asn
 234

703 AAT GGG TTT GCT GCT AAC AGA GCA GAA AAG AAT TTT GGT TGG TTA AAC ATC TGG GGT AAT GAC ATG TCT GTG TGG GGT
 Asn Gly Phe Ala Ala Asn Arg Ala Glu Lys Asn phe Gly Trp Leu Asn Ile Trp Gly Asn Asp Met Ser Val Trp Gly
 260

781 TAG AACGTACCTTGCAAGTTTCATGAAACGTTATAGGTTCTTTTATTTATCAATGTTTTTTGGTTAGGTGAGATTATTCAGGTATGTTGATTTCTGATTT

 TTAATAGGTTTTCAGTCAATGGGATGTGATTTTGGACCACTTTAATACGGTGATACATGTTTATGATATGTGAAAAAGAGAAAGGTTGTTGACGTTTATTT
 883
 CATTTGATTTATCGGTATATTTGTAACATACCTTTTAAACAAAAGATTTTGGATTTTGGACATCGTAGTCCGCTTACAGTTTATGGAACCAAGTCGTTGATTTGGCTTAA
 986

図6 R2領域に存在するGPL1遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列
 約3.7kbpの大きさを示すR2領域のデレーションミュータントを作製し塩基配列を決定した。783bpからなる読み枠が一つ存在した。こ
 の読み枠をGPL1と命名した。

一方、*S. cerevisiae* に対し弱い耐性を与える R1 には、1,572 bp から成る読み枠 (523 アミノ酸、分子量 57,340) が存在していた (図 7)。ホモロジー検索の結果、*S. cerevisiae* の *GEF1* 遺伝子 (鉄イオンの取り込みに関与)、*MDL2* 遺伝子 (多剤耐性様タンパク質)、及びホ乳類の *CLC1* 遺伝子 (クロライドイオンチャネル) などの膜タンパク質が高いスコアを示した。(19-21)。本遺伝子産物中には疎水性に富む領域が存在することから、細胞膜に結合していることが示唆された。そこで R1 領域に存在する弱い過酸化脂質耐性を示す遺伝子を *LPR1* (lipid hydroperoxide resistance) 遺伝子と命名した。

これらの結果から、*GPL1*、及び *LPR1* 遺伝子はともに過酸化脂質耐性に機能することが明らかとなり、特に *GPL1* が *H. mrakii* の GPx 遺伝子をコードしている可能性が強く示唆された。そこで、*GPL1* 遺伝子が本菌における GPx をコードしているかどうかを検討するため、本遺伝子の破壊株の構築を試みた。抗真菌性物質であるオーレオバシジン耐性遺伝子 (*AUR1-C*) をマーカー遺伝子として種々の破壊用プラスミドを構築した。*GPL1* および *LPR1* 遺伝子破壊を試み、約 121 株のオーレオバシジン耐性株を調べたが、遺伝子破壊が確認できた株は得られなかった。

【考察】

LPR1 遺伝子産物は、酵母 *S. cerevisiae* の Gef1p やホ乳類のクロライドチャンネルタンパク質である Clc3p と高い相同性 (約 31 ~ 42%) を示した (19-21)。*GEF1* 遺伝子産物は C 末端側にゴルジ体保留シグナルを持つことから、ゴルジ体のイオンの取り込みに機能すると考えられている。さらに、*GEF1* 遺伝子を破壊した株では、鉄の取り込みに重要な Fet3 の活性が消失することから、*GEF1* 遺伝子産物は鉄イオンの取り込みに関与していることが示唆されている (22)。*LPR1* 遺伝子の推定アミノ酸配列から、PSORT Program(23)により細胞内存在部位を予想した結果、Lpr1p は確率 43.5% でゴルジ体膜上に存在すると予想された。*GEF1* 遺伝子産物と相同性を示す *LPR1* 遺伝子産物が t-BHP 耐性を示すメカニズムについては不明である。

一方、強い過酸化脂質耐性を示す R2 領域には 783bp から成る読み枠を持つ *GPL1* 遺伝子が存在していた。本遺伝子を導入した株では GPx 活性が観察された。*GPL1* 遺伝子産物の推定分子量は約 28kDa であり、*H. mrakii* から精製されている GPx とほぼ同じ値を示した。また、N 末端側には一部疎水性の強い領域が存在しており、本菌の GPx が膜結合型である事実とよく一致していた。これらの結果から、*GPL1* 遺伝子は *H. mrakii* の GPx をコードしている可能性が高いと考えられた。しかしながら、そのアミノ酸配列はホ乳類の GPx のアミノ酸配列と 13.5% 程度の相同性しか示さないことから、Gpl1p はこれまでに報告されたものとは異なる分子構造をもつ可能性も考えられる。

そこで、*GPL1* が *H. mrakii* の GPx をコードしているか否かについて明らかにするため、本株における *GPL1* 遺伝子破壊株の構築を試みた。*H. mrakii* では適当なマーカー遺伝子が取得されていないことから、マーカーとしてオーレオバシジン耐性遺伝子 (*AUR1-C*) を用いた。

GPL1 遺伝子を *AUR1-C* 遺伝子を用いて置換破壊、あるいは挿入破壊を試みた。約 1000 株

のオーレオバシジン耐性株が得られ、そのうちの約 121 株について PCR、及びサザンブロットリングにより *GPL1* 遺伝子の破壊を検証した。しかしながら、調べた株についてはいずれも *GPL1* 遺伝子は破壊されていなかった。これは、*LPR1* 遺伝子についても同様であった。その原因については不明であるが、考えられる可能性の一つとして、*AUR1-C* 遺伝子が *H. mrakii* の *AUR1-C* 遺伝子ホモログ部分で組み変わっていることが考えられる。オーレオバシジンはスフィンゴ脂質の生合成に必須な酵素イノシトールリン酸-セラミド合成酵素 (IPCS) を特異的に阻害する (24)。*AUR1-C* は *S. cerevisiae* の野生型 *AUR1* 遺伝子に置換変異が導入されており、オーレオバシジンに対し脱感作型の IPCS をコードしている。*AUR1* 遺伝子ホモログは *S. cerevisiae* 以外の酵母やカビ、植物のゲノム上にも存在することから (25)、*H. mrakii* にも *AUR1-C* 遺伝子ホモログが存在すると考えられる。従って、今回作製した破壊用プラスミドでは *AUR1-C* 遺伝子は *H. mrakii* の *AUR1* 相同遺伝子座位で組み変わってしまっている可能性が考えられた。いずれにしても、*GPL1* 遺伝子が *H. mrakii* の GPx 構造遺伝子をコードしているか否か同定を行うことはできなかった。

【引用文献】

- 1) Steels, E.L., Learmonth, R.P. and Watson, K. (1994) Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*, **140**, 569-576
- 2) Howlett, N.G. and Avery, S.V. (1997) Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2971-2976
- 3) Vercesi, A.E., Kowaltowski, A.J., Grijaiba, M.T., Meinicke, A.R. and Castiho, R.F. (1997) The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosc. Rep.*, **17**, 43-52
- 4) Aoshima, H., Kadoya, K., Taniguchi, H., Satoh, T. and Hatanaka, H. (1999) Generation of free radicals during the death of *Saccharomyces cerevisiae* caused by lipid hydroperoxide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1025-1031
- 5) Kubo, A., Saji H., Tanaka, K., Tanaka, K. and Kondo, N. (1992) Cloning and sequencing of a cDNA encoding ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **18**, 691-701
- 6) Goltz, S., Kaput, J. and Blobel, G. (1982) Isolation of the yeast nuclear gene encoding the mitochondrial protein, cytochrome *c* peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **257**, 11186-11190
- 7) Brigelius-Flohe, R., Aumann, K.D., Blocker, H., Gross, G., Kiess, M., Kloppel, K.D., Maiorino M., Roveri, A., Schuckelt, R. and Usani, F. (1994) Phospholipid-hydroperoxide glutathione per-

oxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *J. Biol. Chem.*, **269**, 7342-7348.

8)Kistler, M., Summer, K. and Eckardt, F. (1986) Isolation of glutathione-deficient mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.*, **173**, 117-120

9)Inoue, Y., Ichiryu, T., Yoshikawa, K., Tran, L.T., Murata, K. and Kimura, A. (1990) Induction of glutathione peroxidase by linolenic acid hydroperoxide in *Hansenula mrakii*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3289-3293

10)Tran, L.T., Inoue, Y. and Kimura, A. (1993) Oxidative stress response in yeast: purification and some properties of a membrane-bound glutathione peroxidase from *Hansenula mrakii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1164**, 166-172

11)Cryer, D.R., Eccleshall, R. and Marmur, J. (1975) Isolation of yeast DNA. *Methods Cell Biol.*, **12**, 39-44.

12)Yoshimura, S., Watanabe, K., Suemizu, H., Onozawa, T., Mizoguchi, J., Tsuda, K., Hatta, H. and Moriuchi, T. (1991) Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *J. Biochem.*, **109**, 918-923

13)Maser, R.L., Magenheimer, B.S. and Calvet, J.P. (1994) Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion. *J. Biol. Chem.*, **269**, 27066-27073

14)Ghyselinck, N.B., Rigaudiere, N. and Dufaure, J.P. (1991) Androgen-dependent protein secreted by mouse caput epididymis shows high homologies with different glutathione peroxidases. *C. R. Acad. Sci. III*, **313**, 1-6 [in French]

15)Martin-Alonso, J.M., Ghosh, S. and Coca-Prados, M. (1993) Cloning of the bovine plasma selenium-dependent glutathione peroxidase (GP) cDNA from the ocular ciliary epithelium: expression of the plasma and cellular forms within the mammalian eye. *J. Biochem.*, **114**, 284-291

16)Takahashi, K., Akasaka, M., Yamamoto, Y., Kobayashi, C., Mizoguchi, J. and Koyama, J. (1990) Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. *J. Biochem.*, **108**, 145-148

17)Flohe, L. and Gunzler, W.A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. In *Methods in Enzymology* (A.Mesiter, Ed.), vol.105, pp114-121, Academic Press, New York

18)Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254

19)Greene, J. R., Brown, N. H., Di Domenico, B. J., Kaplan, J. and Eide, D. J. (1993) The *GEF1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an integral membrane protein: mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth. *Mol. Gen. Genet.*, **241**, 542-553

20)Dean, M., Allikmets, R., Gerrard, B., Stewart, C., Kistler, A., Shafer, B., Michaelis, S. and Strathern, J. (1994) Mapping and sequencing of two yeast genes belonging to the ATP-binding cassette superfamily. *Yeast*, **10**, 377-383

21)Borsani, G., Rugarli, E.I., Tagliatela, M., Wong, C. and Ballabio, A. (1995) Characterization of a human and murine gene (CLC3) sharing similarities to voltage-gated chloride channels and to a yeast integral membrane protein. *Genomics*, **27**, 131-141

22)Schwappach, B., Stobrawa, S., Hechenberger, M., Steinmeyer, K. and Jentsch, T. J. (1998) Golgi localization and functionally important domains in the NH₂ and COOH terminus of the Yeast CLC putative chloride channel Gef1p. *J. Biol. Chem.*, **273**, 15110-15118

23)<http://psort.nibb.ac.jp:8800/>

24)Nagiec, M.M., Nagiec, E.E., Baltisberger, J.A., Wells, G.B., Lester, R.L. and Dickson, R.C. (1997) Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the *AUR1* gene. *J. Biol. Chem.*, **272**, 9809-9817

25)Nagiec, M.M., Wells, G.B., Lester, R.L. and Dickson, R.C. (1993) A suppressor gene that enables *Saccharomyces cerevisiae* to grow without making sphingolipids encodes a protein that resembles an *Escherichia coli* fatty acyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 22156-22163

第三章

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

Saccharomyces cerevisiae のグルタチオンペルオキシダーゼ遺伝子の酸化的ストレスによる発現誘導

【目的】

すべての生物は常に変化する環境に適応することによって生存している。この適応機構には、多くの場合、生命維持活動を守る方向に働く酵素の合成あるいは活性の上昇が含まれる。このような細胞内の変化は、おそらく環境の変化を感知する因子によって行われると考えられる。大腸菌では過酸化水素およびスーパーオキシドに起因する酸化的ストレスを感知すると、転写因子 OxyR および SoxRS の支配下にある Mn²⁺ スーパーオキシドジスムターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、カタラーゼ、グルタチオン還元酵素、及びアルキルヒドロペルオキシド還元酵素遺伝子の発現が活性化される (1-5)。これらの酵素群は細胞内の活性酸素の消去に関わっており、結果的に大腸菌は、これらの遺伝子群の総合した表現型として酸化的ストレスに対して耐性を示す様になる。真核生物である *Saccharomyces cerevisiae* においても過酸化水素に起因する酸化的ストレスを受けると、十数種類のタンパク質が誘導されることが報告されている (6)。誘導されるタンパク質の多くはストレスに対して細胞を守る為に機能するものであり、これらは共通の転写因子によって転写が制御されているものもある (7)。

酵母 *Hansenula mrakii* のグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) は過酸化脂質に起因する酸化的ストレスによって誘導され、本菌の過酸化脂質耐性獲得にこの誘導が欠かせない (8)。そこで本節では、*S. cerevisiae* の3つの GPX 遺伝子のストレスによる誘導性について検討した (9)。

【方法】

使用菌株

S. cerevisiae YPH250 (*MATa trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 ade2-101 ura3-52*) は Yeast Genetic Stock Center (アメリカ カリフォルニア州立大学バークレー校) より入手した。*S. cerevisiae* の Yap1 欠損株 (*yap1 Δ*) は Wu らによって構築されたプラスミド pSM27 を用いて作製した (10)。また、YAP1 過剰発現株 (YEp13-YAP1) は、Inoue らによって構築されたものを用いた (11)。

GPX 遺伝子のクローニング

GPX1 (YKL026C)、GPX2 (YBR244W)、GPX3 (YIR037W) の各遺伝子を以下のプライマーを用いて PCR によりクローニングした。

GPX1 遺伝子の ATG コドンより 493 ~ 473bp 上流に結合し、制限酵素サイト *Bam*HI と *Sma*I

を含むプライマー GPX1-F (5'-AGTTAATGTTGGATCCGCCCGGGAGTTAA-3') と GPX1 遺伝子の TAA コドンより 964 ~ 944bp 下流に結合し制限酵素サイト *SaII* を含むプライマー GPX1-R (5'-CGCCCTGAAGGTCGACCGTGTAGAATCCT-3') によって増幅される断片の大きさは 1905bp である。

GPX2 遺伝子の ATG コドンより 720 ~ 700bp 上流に結合し、制限酵素サイト *SmaI* と *SaII* を含むプライマー GPX2-F (5'-GTTACCGTCCCCGGGTGGTTCGACTTGAT-3') と GPX2 遺伝子の TGA コドンより 1951 ~ 1931bp 下流に結合し、制限酵素サイト *SaII* サイトを含むプライマー GPX2-R (5'-GATCAAGCGTGTGACATGCAACAAGAGGC-3') によって増幅される断片の大きさは 3720bp である。

GPX3 遺伝子の ATG コドンより 853 ~ 833bp 上流に結合し制限酵素サイト *SamI* *SaII* を含むプライマー GPX3-F (5'-ATCTTTCTGCACCCGGGTGTCGACGACGCC-3') と GPX3 遺伝子の TAG コドンより 1045 ~ 1025bp 下流に結合し、制限酵素サイト *SphI* を含むプライマー GPX3-R (5'-CCTCGTACCCGCATGCTCCAGTATGGTGAA-3') によって増幅される断片の大きさは 2390bp である。

GPX1、GPX2、GPX3 の各遺伝子断片は、プラスミドベクター pUC19 のマルチクローニングサイトに、それぞれ連結した。

ノーザンブロット解析

菌体を 50ml の YPD 液体培地 (2% グルコース、1% 酵母エキス、2% ペプトン, pH5.5) で対数増殖期 ($OD_{610}=1.0$) まで振盪培養した後、各種ストレス (H_2O_2 , 0.4mM; *tert*-ブチルヒドロペルオキシド (t-BHP), 0.6mM; クメンヒドロペルオキシド (CHP), 0.2mM; パラコート (PQ),

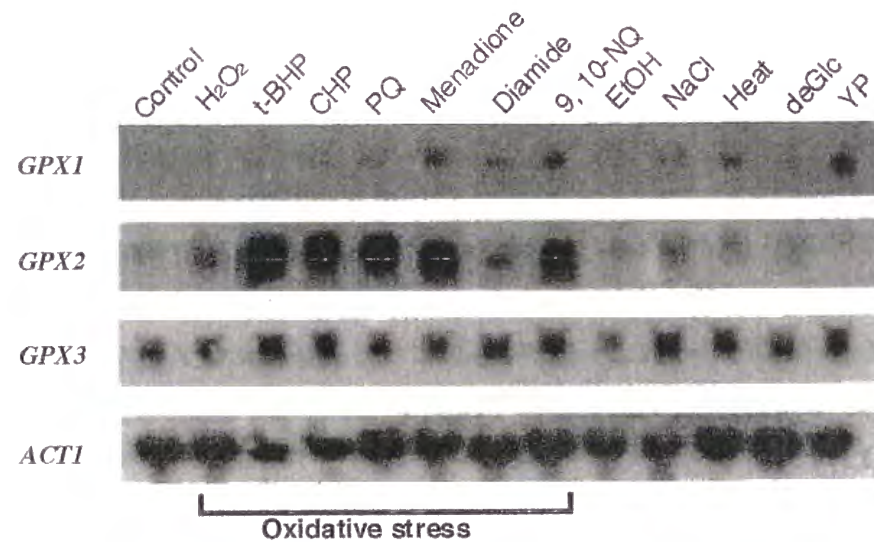


図1 各 GPX 遺伝子ホモログのノーザンブロット解析
GPX3 遺伝子はストレスの有無に関わらず高いレベルで転写されているのに対して、GPX2 遺伝子は酸化ストレスによって誘導された。

1.0mM; メナジオン, 10mM; ジアミド, 2.0mM; 9,10-ナフトキノン (9,10-NQ), 50 μ M; エタノール (EtOH), 7.5%; NaCl, 0.5M; 熱ショック (42 $^{\circ}$ C, 一時間); 2-デオキシグルコース (deGlc), 0.1%; グルコース飢餓 (YP)] で 1 時間処理した。生理的食塩水で洗菌後、全 RNA 画分を Schmitt ら (12) の方法により調製した。また Yap1 の各 GPX 遺伝子の発現に及ぼす影響を調べるため、SD 最少培地 (2% グルコース、0.67% Yeast Nitrogen Base, pH5.5) に適当なアミノ酸を添加した培地で野生株、*yap1* Δ 株、YEp-YAP1 保持株をそれぞれ対数生育期まで培養し、全 RNA 画分を調製した。全 RNA をアガロースゲル電気泳動後、ナイロンメンブレンに転写し 80 $^{\circ}$ C で 1 時間乾燥させ固定した。GPX1、GPX2、GPX3 の各遺伝子に対応するプローブを $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Amersham 社製) を用いてアイソトープラベルし、ノーザンブロット解析を行った。

【結果】

S. cerevisiae の GPX 遺伝子ホモログのストレス応答 (誘導) 性について検討した。3 つの GPX 遺伝子うち、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

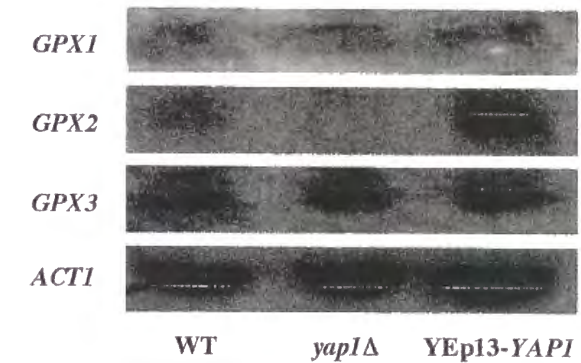


図2 YAP1 欠損株と過剰発現株における各 GPX 遺伝子の発現
GPX2 遺伝子は *yap1* Δ で転写が見られなくなり、逆に YEp13-YAP1 では転写レベルが増大した。
(WT、野生株; *yap1* Δ 、YAP1 遺伝子破壊株; YEp13-YAP1、YAP1 遺伝子過剰発現株)

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。

S. cerevisiae では酸化的ストレスに重要な転写因子として Yap1 が知られている。(13,14)。Yap1 は、YRE (Yap1 response element) と呼ばれる配列 (5'-TTA(C/G)TAA-3') に結合し、標的遺伝子の転写を活性化する (15)。酸化的ストレスに対して誘導性を示す GPX2 遺伝子の 5' 上流域を調べたところ、Yap1 の認識配列が 3 カ所 (TTAGTAA、620bp 上流; TTAATAA、410bp 上流; TTAGTAA、253bp 上流) 存在していた。

そこで、GPX2遺伝子の転写がYap1に依存しているのかどうか明らかにするために、YAP1遺伝子破壊株と、過剰発現株における各GPX遺伝子の発現量を解析した(図2)。GPX1、GPX3遺伝子の発現には変化が観察されなかったものの、GPX2遺伝子はYap1が欠損した株では転写はほとんど見られず、逆にYAP1遺伝子を大量に発現させた株では発現量が増大することがわかった。また、Yap1が欠損した株に酸化ストレスを与えても、GPX2遺伝子の発現誘導は観察されなかった。

【考察】

酸化ストレスによる *S. cerevisiae* の GPx の誘導性について検討した。 *S. cerevisiae* の 3 つの GPX 遺伝子のうち、GPX2 遺伝子は酸化ストレスにตอบสนองすること、GPX3 遺伝子はストレスとは関係なく常に高いレベルで転写されていること、GPX1 遺伝子は炭素源飢餓ストレスでやや誘導されることが明らかとなった。これらのことから、 *S. cerevisiae* の各 GPX 遺伝子は、それぞれ異なる転写制御を受けることが明らかとなった。

同じ反応を触媒する酵素の遺伝子が異なる転写制御を受ける例として、酵母のカタラーゼが挙げられる。過酸化水素を水と酸素に分解するカタラーゼは、CTT1 遺伝子と CTA1 遺伝子にコードされている。前者の発現は酸化ストレスにตอบสนองし、その遺伝子産物の細胞内局在部位は細胞質である(16,17)。後者の発現は脂肪酸(オレイン酸)の存在下で誘導され、その遺伝子産物はペルオキシソームに局在化することが報告されている(18,19)。これらの事実から、 *S. cerevisiae* の GPX 遺伝子が異なる転写制御を受ける理由の一つとして、GPX 遺伝子産物の細胞内での機能部位が異なる可能性が考えられる。

GPX2 遺伝子の誘導機構について調べたところ、GPX2 遺伝子の 5' 上流域には酸化ストレス応答に重要な転写因子 Yap1 の認識配列が 3 カ所存在していた。Yap1 はロイシンジッパー構造を持つホ乳類の転写因子 AP-1 の機能的ホモログである(20,21)。また、Yap1 は、

酸化ストレスを受けると核に局在し、その標的遺伝子の転写を活性化する(22)(図3)。そこで、YAP1 遺伝子破壊株と過剰発現株を用いて、GPX2 遺伝子の転写量の変化を調べたところ、YAP1 遺伝子破壊株では GPX2 遺伝子の転写はほとんど観察されず、逆に YAP1 過剰発現株では発現量の増大が観察された。これらの結果から、 *S. cerevisiae* の GPX2 遺伝子は Yap1 によって制御されていることが明らかとなった。酵母 *Kluyveromyces lactis* および *Candida albicans* においても Yap1 のホモログである Kap1 および Cap1 がそれぞれ同定されており、酸化ストレスに対して重要であることが報告されている(23,24)。Yap1 標的遺伝子として、

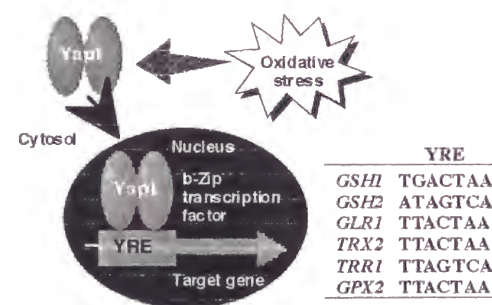


図3 酸化ストレスにตอบสนองするYap1の機能とその標的遺伝子：酸化ストレスを感知したYap1は核に局在化し、標的遺伝子の転写を活性化する。YRE、Yap1認識配列

細胞内抗酸化物質であるグルタチオンの合成系酵素(GSH1、GSH2)、グルタチオン還元酵素(GLR1)、グルタチオンと並ぶ細胞内還元物質であるチオレドキシシン(TRX2)とチオレドキシシン還元酵素(TRR1)などが同定されている(25-29)。これらは、いずれも酸化ストレスに対して重要な機能を持つことから、Yap1によって転写が制御されるGPX2遺伝子産物は酸化ストレス耐性に重要であると考えられた。

【引用文献】

1)Christman, M.F., Storz, G. and Ames, B.N. (1989) OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **86**, 3484-3488

2)Greenberg, J.T., Monach, P., Chou, J.H., Josephy, P.D. and Dimple, B. (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **87**, 6181-6185

3)Tsaneva, I.R. and Weiss, B. (1990) SoxR, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **172**, 4197-4205

4)Amabile-Cuevas, C.F. and Dimple, B. (1991) Molecular characterization of the soxRS genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon. *Nuc. Acids Res.*, **19**, 4479-4484

5)Wu, J. and Weiss, B. (1991) Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **173**, 2864-2871

6)Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M.B. and Labarre, J. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 22480-22489

7)DeRisi, J.L., Iyer, V.R. and Brown, P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, **278**, 680-686

8)Tran, L.T., Inoue, Y. and Kimura, A. (1993) Role of glutathione peroxidase against oxidative stress in yeast: phenotypic character of lipid hydroperoxide-sensitive mutants derived from *Hansenula mrakii*. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 229-231

9)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

- 10)Wu, A., Wemmie, J.A., Edgington, N.P., Goebel, M., Guevara, J.L. and Moye-Rowley, W.S. (1993) Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J. Biol. Chem.*, **268**, 18850-18858
- 11)Inoue, Y., Tsujimoto, Y. and Kimura, A. (1998) Expression of the glyoxalase I gene of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by high osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in osmotic stress response. *J. Biol. Chem.*, **273**, 2977-2983
- 12)Schmitt, M.E., Brown, T.A. and Trumpower, B.L. (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nuc. Acids Res.*, **18**, 3091-3092
- 13)Harshman, K.D., Moye-Rowley, W.S. and Parker, C.S. (1988) Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4. *Cell*, **53**, 321-330
- 14)Moye-Rowley, W.S., Harshman, K.D. and Parker, C.S. (1989) Yeast *YAP1* encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes. Dev.*, **3**, 283-292
- 15)Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C. and Struhl, K. (1997) Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6982-6993
- 16)Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J. and Toledano, M.B. (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.*, **274**, 16040-16046
- 17)Schuller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C. and Ruis, H. (1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *EMBO J.*, **13**, 4382-4389
- 18)Karpichev, I.V. and Small, G.M. (1998) Global regulatory functions of Oaf1p and Pip2p (Oaf2p), transcription factors that regulate genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 6560-6570
- 19)Rottensteiner, H., Kal, A.J., Filipits, M., Binder, M., Hamilton, B., Tabak, H.F. and Ruis, H. (1996) Pip2p; a transcriptional regulator of peroxisome proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **15**, 2924-2934
- 20)Gounalaki, N. and Thireos, G. (1994) Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response. *EMBO J.*, **13**, 4036-4041
- 21)Wemmie, J.A., Wu, A.L., Harshman, K.D., Parker, C.S. and Moye-Rowley, W.S. (1994) Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14690-14697
- 22)Kuge, S., Jones, N. and Nomoto, A. (1997) Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.*, **16**, 1710-1720
- 23)Billard, P., Dumond, H. and Bolotin-Fukuhara, M. (1997) Characterization of an AP-1-like transcription factor that mediates an oxidative stress response in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.*, **257**, 62-70
- 24)Alarco, A.M. and Raymond, M. (1999) The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, **181**, 700-708
- 25)Wu, A.L. and Moye-Rowley, W.S. (1994) *GSH1*, which encodes γ -glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 5832-5839
- 26)Inoue, Y., Sugiyama, K., Izawa, S. and Kimura, A. (1998) Molecular identification of glutathione synthetase (*GSH2*) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1395**, 315-320
- 27)Grant, C.M., Collinson, L.P., Roe, J.H. and Dawes, I.W. (1996) Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.*, **21**, 171-179
- 28)Kuge, S. and Jones, N. (1994) YAP1 dependent activation of *TRX2* is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.*, **13**, 655-664
- 29)Morgan, B.A., Banks, G.R., Toone, W.M., Raitt, D., Kuge, S. and Johnston, L.H. (1997) The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **16**, 1035-1044

第二節

Saccharomyces cerevisiae のグルタチオンペルオキシダーゼの 酸化ストレス応答における機能

【目的】

グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) は、グルタチオンを基質として過酸化水素や過酸化脂質を安定な水やアルコールに還元する反応を触媒する。原核生物ではGPxを生化学的に証明した報告はないものの、酵母 *Hansenula mrakii* においては膜結合型の GPx が報告されている (1, 2)。また、ヒトではGPX遺伝子が6種類同定されており、組織間による発現の違いが報告されている (3-8)。しかし、GPxを完全に欠損したホ乳類生物を作り出すことは技術的に容易ではないことから、酸化ストレスに対するGPxの重要性について遺伝学的に検討することは困難であった。これに対して、遺伝子破壊が容易な酵母では、GPxを欠損した株を作製でき、その機能について表現型を解析することによって、検討することが可能である。そこで、本節では *Saccharomyces cerevisiae* の持つ、3つのGPXホモログ遺伝子破壊株を構築し、酸化ストレスに対する防御系としての役割について検討した (9)。

【方法】

使用菌株

Saccharomyces cerevisiae YPH250 (*MATa trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 ade2-101 ura3-52*) は Yeast Genetic Stock Center (アメリカ カリフォルニア州立大学バークレー校) より入手し、各遺伝子破壊株は YPH250 株を基に作製した。

遺伝子破壊株の構築

pUC19 に *GPX1* 遺伝子を連結したプラスミド (第三章一節) を *EcoRI*、及び *SphI* で切断し、Klenow断片で末端を平滑化した後、栄養要求性マーカー遺伝子である *HIS3* 遺伝子を導入した。このプラスミドを *SmaI* および *XbaI* で切断し、*gpx1Δ::HIS3* を含むフラグメントをアガロースゲル電気泳動により精製した後、酵母に導入し遺伝子破壊を行った。また、*GPX1* 遺伝子破壊株は *gpx1Δ* で示した。

pUC19 に *GPX2* 遺伝子を連結したプラスミド (第三章一節) を *XbaI*、及び *StyI* で切断し、Klenow断片で末端を平滑化した後、栄養要求性マーカー遺伝子である *URA3* 遺伝子を導入した。このプラスミドを *BamHI* および *SphI* で切断し、*gpx2Δ::URA3* を含むフラグメントをアガロースゲル電気泳動により精製した後、酵母に導入し遺伝子破壊を行った。また、*GPX2* 遺伝子破壊株は *gpx2Δ* で示した。

pUC19にGPX3遺伝子を連結したプラスミド(第三章一節)をNheI、及びStuIで切断し、Klenow断片で末端を平滑化した後、栄養要求性マーカー遺伝子であるLEU2遺伝子を導入した。このプラスミドをBamHIで切断し、*gpx3Δ::LEU2*を含むフラグメントをアガロースゲル電気泳動により精製した後、酵母に導入し遺伝子破壊を行った。また、GPX3遺伝子破壊株は*gpx3Δ*で示した。

これら3種のGPX遺伝子について2重、3重の遺伝子破壊を行い、合計7種類のGPX遺伝子破壊株(*gpx1Δ*、*gpx2Δ*、*gpx3Δ*、*gpx1Δ/gpx2Δ*、*gpx1Δ/gpx3Δ*、*gpx2Δ/gpx3Δ*、*gpx1Δ/gpx2Δ/gpx3Δ*)を構築した。

スポットアッセイ

YPD液体培地(2%グルコース、2%ペプトン、1%酵母エキス、pH5.5)に菌株を接種し610nmにおける濁度(OD_{610})が0.5に達したものを、生理的食塩水で100倍、及び1000倍に希釈した。これを4.0mM過酸化水素、及び1.5mM *tert*-ブチルヒドロペルオキシド(t-BHP)を含むYPD寒天培地に10μlずつスポットし28℃で3日間培養した。

GPx活性測定方法

1リッターのYPD液体培地を含む2リッター容の坂口フラスコに菌株を接種し、28℃で振盪培養を行い、 $OD_{610}=1.0$ で集菌した。生理的食塩水による洗菌後、4℃に冷却した10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に菌を懸濁し、ガラスビーズを加えブラウンホモジナイザーを用いて10分間、細胞を破碎した。得られた溶液を4℃で14000rpm、10分間の遠心分離を行い無細胞抽出液を得た。GPX活性測定反応液[50mMリン酸緩衝液(pH7.0)、1mM GSH、0.16mM NADPH、1.0mM NaN_3 、0.24unit/ml グルタチオン還元酵素(オリエンタル酵母社製)]を準備した。活性測定反応液にt-BHPを終濃度で1mMになるよう加え、340nmにおける吸光度(A_{340})の減少を3分間測定しブランク1(B1)とした。t-BHPの溶剤として用いたジメチルスルホキシドを反応液に加え、 A_{340} の減少を3分間測定しブランク2(B2)とした。無細胞抽出液を反応液に加え、 A_{340} の減少を3分間測定しブランク3(B3)とした。これら、非酵素的なGSHの酸化を予め測定した。無細胞抽出液を含む反応液にt-BHPを加え、 A_{340} の減少を3分間測定し粗活性(A)とした。AからB1、B2、B3の値を差し引いた値をGPx活性とした。NADPHのミリモル吸光係数を6.22として、1分あたり1μmolのGSHを酸化する酵素量を1unitとした。タンパク質濃度はBradfordの方法(10)を用いて測定した。

【結果】

GPX遺伝子破壊株の表現型

GPxの基質である過酸化脂質や過酸化水素に起因する酸化ストレスに対する感受性を、スポットアッセイにより検討した。GPX1遺伝子、あるいはGPX2遺伝子の単独破壊株(*gpx1Δ*、*gpx2Δ*)、あるいは二重破壊株(*gpx1Δ/gpx2Δ*)では4.0mM過酸化水素、ならびに1.5mM t-BHP

に対して感受性を示さなかったのに対し、GPX3遺伝子の単独破壊株は強い感受性を示した。さらに、*gpx1Δ/gpx3Δ*、*gpx2Δ/gpx3Δ*および*gpx1Δ/gpx2Δ/gpx3Δ*株についても同様に感受性が見られた(図1)。

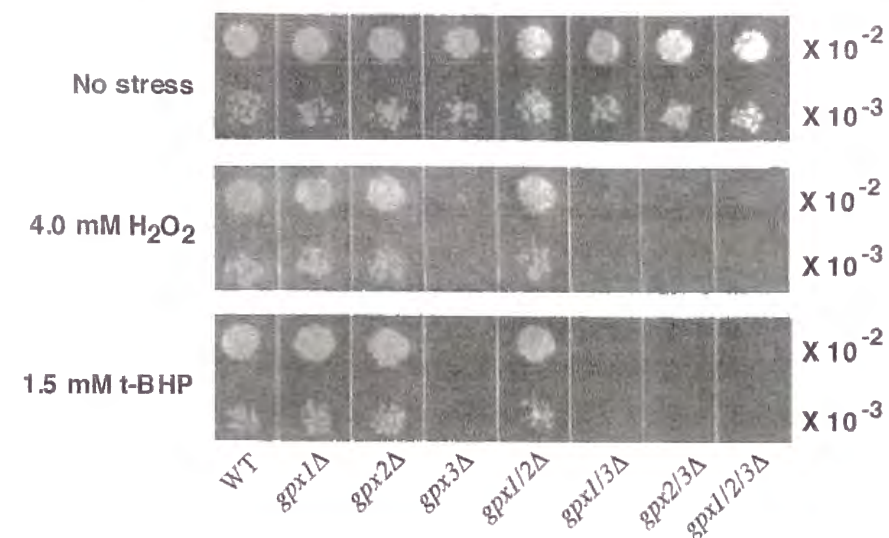


図1 GPX遺伝子破壊株の酸化ストレスに対する感受性
各GPX遺伝子破壊株を対数増殖期($OD_{610}=0.5$)まで培養し、 10^2 および 10^3 倍に希釈したものを4.0mMの H_2O_2 ならびに1.5mMの*tert*-ブチルヒドロペルオキシド(t-BHP)を含むYPD寒天培地にスポットした。菌体は28℃で3日間培養を行った。

遺伝子破壊株のGPx活性

*gpx1Δ*および*gpx2Δ*株におけるGPx活性は、野生株と比べ差は見られなかったが、*gpx3Δ*株におけるGPx活性は、野生株に比べ約30%にまで低下した。さらに、*gpx1Δ/gpx2Δ/gpx3Δ*三重破壊株では、ほとんど活性は見られなかった。(図2)

【考察】

*S. cerevisiae*の3つのGPXホモログ遺伝子が酸化ストレスに対して機能しているか否かを検討するために、各GPX遺伝子破壊株を構築し、それらの表現型を調べた。いずれの遺伝子破壊株も致死性は示さないことから、これらのGPXホモログは必須遺伝子ではないことがわかった。スポットアッセイの結果、GPX3遺伝子を欠損した株(*gpx3Δ*、*gpx1/3Δ*、*gpx2/3Δ*)は酸化ストレスに高い感受性を示すことがわかった。また、各GPX遺伝子破壊株のGPx活性を測定した結果、GPX3遺伝子破壊株では野生株に比べて30%まで活性が低下した。ノーザンブロット解析の結果(第三章一節)でも、GPX3遺伝子は構成的に発現していた(9)。これらの結果から、*S. cerevisiae*の3つのGPXホモログ遺伝子のうち、特にGPX3遺伝子産物が主要なグルタチオンペルオキシダーゼであることが明らかになった(9)。

酵母*Hansenula mrakii*の過酸化脂質に対する温度感受性変異株の表現型の解析結果から、制

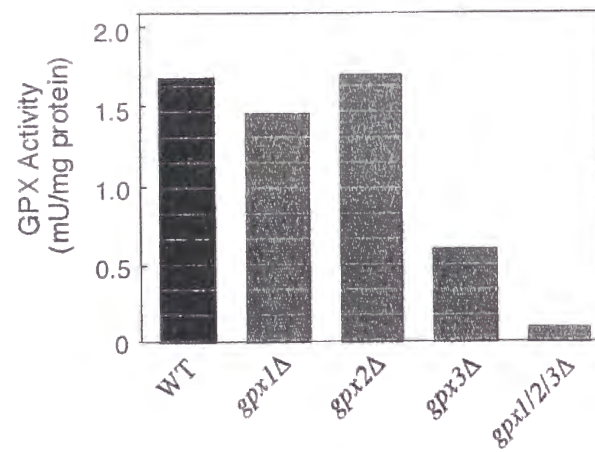


図2 各GPX遺伝子破壊株のグルタチオンペルオキシダーゼ活性

限温度下にある変異株では、過酸化脂質によるGPxの誘導が見られなくなることが報告されている(11)。このことは、*H. mrakii*の過酸化脂質耐性には、GPxの誘導による活性上昇が必須であることを示している。同様に*S. cerevisiae*のGPX2遺伝子も酸化ストレスによって誘導される。また、GPX2遺伝子の発現には酸化ストレス応答に重要な転写因子Yap1が関係している(9)。しかし、GPX2遺伝子破壊株(*gpx2*Δ)では酸化ストレスに対する感受性の増大は観察されなかった。

【引用文献】

- 1)Tran, L.T., Inoue, Y. and Kimura, A. (1993) Oxidative stress response in yeast: purification and some properties of a membrane-bound glutathione peroxidase from *Hansenula mrakii*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1164**, 166-172
- 2)Inoue, Y., Tran, L.T., Kamakura, M., Izawa, S., Miki, T., Tsujimoto, Y. and Kimura, A. (1995) Oxidative stress response in yeast: glutathione peroxidase of *Hansenula mrakii* is bound to the membrane of both mitochondria and cytoplasm. *Biochim. Biophys. Acta*, **1245**, 325-330
- 3)Mullenbach, G.T., Tabrizi, A., Irvine, B.D., Bell, G.I. and Hallewell, R.A. (1987) Sequence of a cDNA coding for human glutathione peroxidase confirms TGA encodes active site selenocysteine. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 5484
- 4)Hall, L., Williams, K., Perry, A.C.F., Frayne, J. and Jury, J.A. (1998) The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem. J.*, **333**, 5-9

5)Akasaka, M., Mizoguchi, J. and Takahashi, K. (1990) A human cDNA sequence of a novel glutathione peroxidase-related protein. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 4619

6)Dunn, D.K., Howells, D.D., Richardson, J.P. and Goldfarb, P.S. (1989) A human cDNA sequence for a novel glutathione peroxidase-related selenopeptide, GPRP. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 6390

7)Esworthy, R.S., Doan, K., Doroshov, J.H. and Chu, F.F. (1994) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a human testis phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Gene*, **144**, 317-318

8)Takahashi, K., Akasaka, M., Yamamoto, Y., Kobayashi, C., Mizoguchi, J. and Koyama, J. (1990) Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. *J. Biochem.*, **108**, 145-148

9)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

10)Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254

11)Inoue, Y., Tran, L.T. and Kimura, A. (1993) Role of glutathione peroxidase against oxidative stress in yeast: phenotypic character of lipid hydroperoxide-sensitive mutants derived from *Hansenula mrakii*. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 229-231

要約

1. 酵母 *Hansenula mrakii* IF0 0895株からグルコース-6-リン酸脱水素酵素ならびにグルタチオン還元酵素を精製し、その諸性質を明らかにした。また、酸化ストレスによるグルコース-6-リン酸脱水素酵素の活性上昇は、*de novo*合成によることを明らかにした。また、*Saccharomyces cerevisiae*のグルタチオンオキシダーゼの有無は、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 活性に影響を及ぼさないことを明らかにした。
2. *H. mrakii* IF0 0895株のゲノムから *S. cerevisiae*に対して過酸化脂質耐性を付与するDNA断片をクローニングした。得られた断片には、2つの読み枠 (*GPL1*遺伝子、*LPR1*遺伝子)が存在した。*GPL1*遺伝子を導入した *S. cerevisiae*ではGPx活性の上昇が確認された。
3. *S. cerevisiae*の3つのGPX遺伝子のうち、*GPX3*遺伝子は構成的に発現しているのに対し、*GPX2*遺伝子は酸化ストレスによって発現レベルが増大した。さらに、その発現は転写因子Yap1に依存していることを明らかにした。*GPX1*遺伝子の発現はグルコース飢餓によって若干誘導された。
4. *S. cerevisiae*のGPX遺伝子破壊株の表現型の解析から、*GPX3*遺伝子が主要なGPxとして機能していることを明らかにした。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻を頂いた京都大学食糧科学研究所
木村 光教授に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導ご鞭撻を頂いた京都大学食糧科学研究所
井上 善晴助教授に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、ご指導、励ましを頂いた京都大学食糧科学研究所
真野 純一助手に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、ご指導、励ましを頂いた京都大学食糧科学研究所
井沢 真吾助手に感謝いたします。

また、本研究を行うにあたり、助力、助言を頂いた京都大学食糧科学研究所
微生物分子育種分野の皆様、特に鎌倉 昌樹氏と松田 俊文氏に心から感謝
いたします。