

氏 名 井 沢 真 吾
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学位記番号 論 農 博 第 2254 号
 学位授与の日付 平 成 11 年 7 月 23 日
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
 学位論文題目 Study on the adaptive response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*
 (出芽酵母の酸化的ストレス適応機構に関する研究)

論文調査委員 (主 査)
 教授 木 村 光 教授 井 上 國 世 教授 江 崎 信 芳

論 文 内 容 の 容 旨

好氣的生物にとって、酸素は呼吸による効率的なエネルギー生産に必要である反面、その代謝の過程で有害な活性酸素種が発生する。過酸化水素 (H_2O_2) や $OH\cdot$ 、 O_2^- をはじめとする活性酸素種は反応性が高いため、酸化的ストレスとして DNA の損傷やタンパク質の失活、膜脂質の過酸化などを引き起こす。さらに、酸化的ストレスによる損傷が癌や循環器病、老化などに深く関与している。酸化的ストレスへの適応応答機構を解析することは、これらの病気に対する基礎研究としての重要性に加え、細胞の持つ適応能力についての理解を深める上で重要である。

著者は酸化的ストレスに対する細胞の適応応答機構について、高等真核生物と多くの共通の性質を持ち遺伝学的解析が容易な出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて解析を行った。酸化的ストレスの一つである H_2O_2 への適応応答における、細胞内チオール(グルタチオン, チオレドキシン, グルタレドキシン)と酸化的ストレス応答性の転写制御因子 Yap1 の役割を中心に検討を行った。本論文の主な内容は以下の通りである。

第一章 H_2O_2 への適応応答におけるカタラーゼの役割, 対数増殖期では、カタラーゼ欠損株は野生株と同様のストレス感受性を示した。しかし、定常期のストレス感受性や適応応答による耐性の上昇については、野生株に比べ本欠損株は高い感受性を示し、耐性の上昇も不十分であった。このことから、対数増殖期ではカタラーゼ以外の機構により細胞内で発生する H_2O_2 に対処しているが、定常期やストレス条件下での耐性獲得にはカタラーゼが必要不可欠であることが明らかとなった。

第二章 H_2O_2 への適応応答におけるグルタチオンの役割 H_2O_2 ストレス耐性に対する細胞内グルタチオン含量の影響を検討し、耐性獲得においてグルタチオンが必要不可欠であること、グルタチオン合成系を阻害した細胞や欠損した細胞が H_2O_2 に対し超感受性になることを明らかにした。また、酵母では初めて、 H_2O_2 の適応応答の際にグルタチオンの合成系と再還元系が誘導されることを明らかにした。

第三章 H_2O_2 への適応応答におけるグルタチオン再還元系の役割グルタチオン再還元系であるグルタチオン還元酵素 (GR) とグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) 欠損株の解析から、グルタチオンの再還元が十分な耐性の獲得に必要なことを明らかにした。しかしながら、GR 欠損株に比べ G6PDH 欠損株の方が H_2O_2 に対する感受性が高く、適応応答による耐性の上昇も不十分であったことから、グルタチオンの再還元以外にも G6RDH が H_2O_2 への耐性獲得に重要な働きをすることを明らかにした。また、G6PDH の機能について、大腸菌、酵母、哺乳動物の三者間での比較、特にヒトの G6PDH 欠損症との関連について考察を行った。

第四章 酸化的ストレス応答性転写因子 Yap1 の制御機構に関する解析

グルタチオンやチオレドキシンの代謝系をはじめとする、 H_2O_2 への適応応答の際に誘導される遺伝子群の転写制御因子である Yap1 の酸化還元的な制御機構について解析を行った。酸化還元調節因子であるチオレドキシンとグルタレドキシン欠損株における Yap1 活性について検討を行ったところ、チオレドキシンの欠損株では非ストレス条件下でも恒常的に Yap1 標的遺伝子の転写が活性化されることを見出した。また、Yap1 は活性化の際に核に局在化するが、チオレドキシ

欠損株では非ストレス条件下でも常に核に局在することを green fluorescent protein を用いて明らかにした。このような、チオレドキシシン欠損株における Yap 1 の恒常的な活性化は嫌気的条件下では観察されないことから、酸化還元状態を介した制御機構であることが確認された。また、システイン残基をアミノ酸置換した変異型 Yap 1 の局在性を検討したところ、核外輸送配列近傍のシステイン残基が局在性の制御に重要であり、チオレドキシシンはこれらのシステイン残基に作用することで Yap 1 の局在性の制御に関与することを見出した。また、チオレドキシシン自身もストレス応答により核内にも局在するようになることを見出し、核内におけるチオレドキシシンによる Yap 1 の不活性化についての自己調節機構モデルを提唱した。

論文審査の結果の要旨

本論文では出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、過酸化水素 (H_2O_2) に対する適応応答機構を解析し、HP 2 消去酵素であるカタラーゼとともに、グルタチオンなどの細胞内チオールが重要な役割を担うことを明らかにした。また、 H_2O_2 応答性の転写因子である Yap 1 の制御機構について解析を行い、細胞内チオールのうちのチオレドキシシンがその制御機構に関与することを明らかにした。評価すべき点は以下の通りである。

1. 対数増殖期と定常期の細胞では、 H_2O_2 に対する感受性に違いがあり、 H_2O_2 耐性に対するカタラーゼの役割について増殖時期により違いがあることを見出した。また、対数増殖期の細胞においてはカタラーゼ以外のストレス防御機構の重要性を示した。

2. グルタチオンが H_2O_2 に対する耐性獲得の上で必要不可欠であることを明らかにし、 H_2O_2 感受性が細胞内のグルタチオン含量により変化することを見出した。

3. H_2O_2 適応応答の際にはグルタチオン合成系とともにグルタチオン再還元系が誘導され、十分な耐性獲得の上で必要不可欠であることを見出した。

4. グルコース-6-リン酸脱水素酵素がグルタチオン再還元系以外の H_2O_2 耐性機構にも寄与していることを明らかにした。

5. H_2O_2 により誘導される遺伝子群の転写を制御する転写因子 Yap 1 が、チオレドキシシンの欠損株 (*trx 1 Δ/trx 2 Δ*) では恒常的に活性化され、核に局在することを見出した。また、 H_2O_2 ストレス条件下では、チオレドキシシンも核内に存在することを見出した。

6. Yap 1 の局在性及び活性が酸化還元的に制御され、その制御にチオレドキシシンが関与していることを明らかにした。

7. Yap 1 の持つ核外輸送配列近傍のシステイン残基にチオレドキシシンが作用することで、Yap 1 の細胞内局在性が制御されることを見出した。

8. Yap 1 とチオレドキシシンの三重欠損 (*yap 1 Δ/trx 1 Δ/trx 2 Δ*) が合成致死性を示すことを見出した。

9. H_2O_2 ストレスへの適応応答における Yap 1 の活性制御機構と、チオレドキシシンによる自己調節機構についてモデルを提唱した。

以上のように、本論文は酵母細胞における酸化的ストレスへの適応機構を分子生物学レベルで解析し、細胞のもつ適応能力についての研究をまとめたものであり、分子生物学、細胞生物学、酵素化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 11 年 6 月 14 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。