

氏 名	まえ た かず ひろ 前 田 和 宏
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1484 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Cellular response to methylglyoxal in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> におけるメチルグリオキサル応答機構)
論文調査委員	(主 査) 教 授 喜 多 恵 子 教 授 廣 瀬 正 明 教 授 西 岡 孝 明

論 文 内 容 の 要 旨

メチルグリオキサル (MG) は解糖系から派生する代謝物であるにもかかわらず細胞の生育を阻害し、ある種の細胞に対してはアポトーシスを誘導する。さらに MG は、*in vitro* でタンパク質中のリシン残基やアルギニン残基、あるいは DNA や RNA 分子中のグアニン残基を修飾することも報告されている。また近年、MG と疾病との関連が示唆されており、MG が大腸ガンや肺ガン、糖尿病を引き起こす可能性が指摘されている。しかしながら、MG が細胞内で生成する生物学的意義は明らかにされておらず、MG の細胞内での真の役割については不明な点が多い。本論文は、細胞レベルでの MG に対する応答機構を解明するため、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて行った研究をまとめたものである。主な内容は次に示す通りである。

(1) 細胞内の MG レベルの変動を精査したところ、細胞の生育フェーズに応じて MG 含量が変動し、エネルギー獲得系が解糖系から酸素呼吸へと遷移するジオキシシフト時に最大となった。また、MG 代謝酵素グリオキサラーゼ I を欠損させた株 (*glo1Δ* 株) では、MG 含量が構成的に増加していた。MG の細胞内機能を探索することを目的として、野生株と *glo1Δ* 株の遺伝子発現パターンの違いを DNA マイクロアレイ解析により比較した。その結果、*glo1Δ* 株では *S. cerevisiae* のゲノム中の約10%の遺伝子で発現レベルが上昇しており、糖代謝やストレス応答などに関連する遺伝子の発現に変動が見られた。さらに *glo1Δ* 株では転写因子 Yap1 が構成的に活性化され、その標的遺伝子群の発現も上昇していた。次に、Yap1 活性化の機構について検討した。*glo1Δ* 株では MG が構成的に増加していることや、細胞外からの MG 添加によっても Yap1 が可逆的に活性化されることから、*glo1Δ* 株における Yap1 の活性化は MG の増加に起因している。このことは Yap1 活性化の生理的意義として、グルタチオン生合成系を活性化し、グルタチオンによって増加した MG を代謝していることを示唆している。従来 Yap1 は酸化的ストレスに応答して活性化され、その活性化機構は分子内ジスルフィド結合の形成によることが知られているが、MG による Yap1 の活性化には活性酸素の発生を伴わず、また、ジスルフィド結合の形成を介さない新規な機構であることを明らかにした。

(2) 細胞外 MG に対する応答を検討したところ、あらかじめ低濃度 MG で処理した細胞は、高濃度 MG に対して耐性を獲得した。そこで MG に対する適応機構について検討を行ったところ、MG は転写因子 Msn2 や Crz1、転写因子をプロモーター領域にリクルートする機能を持つ Hog1 の活性化を引き起こすこと、また MG 代謝酵素であるグリオキサラーゼ I 遺伝子 (*GLO1*) の発現を誘導することを見出した。このことは、MG が遺伝子発現を引き起こすためのシグナル伝達経路を活性化させることを示しており、MG がシグナル分子として機能している可能性が考えられた。また、グリオキサラーゼ I は MG 代謝酵素であることから、この細胞応答は合目的的であると考えられた。

(3) MG が引き起こす増殖阻害、ならびに細胞死について検討を行った。これまでに MG が細胞死を引き起こすことは報告されており、実際 *S. cerevisiae* においても過剰量の MG 投与によってネクロシス様の細胞死が引き起こされた。一方、低濃度の MG 処理は細胞増殖の可逆的な阻害を引き起こすことを見出した。その機構について検討したところ、

MG は細胞の極性を制御するアクチンを脱極性化させることによって細胞増殖を停止させることを明らかにした。このとき、細胞増殖に関わるシグナル伝達経路の Mpk1 MAP キナーゼ経路が活性化され、さらに、本経路の破壊株は MG 感受性を示すことを見出した。また、Mpk1 MAP キナーゼ経路を構成的に活性化させる低分子量 G タンパク質 Rho1 の活性化変異を導入した株は、MG によるアクチンの脱極性化の抑制と MG 耐性を示した。これらのことから、MG 存在条件下での生育に Mpk1 MAP キナーゼ経路が必要であることが明らかとなった。

以上のように、*S. cerevisiae* をモデル生物として MG に対する応答機構を細胞レベルで解析し、MG がシグナルイニシエーターとして情報伝達系を活性化することや、Yap1 を始めとする種々の転写因子の活性化を引き起こすことを明らかにするとともに、MG は単なる代謝中間体ではなく細胞の生理機能に積極的に関与していることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

MG は様々な生物種で普遍的に見られる化合物であり、真核生物における主な生成源は解糖系である。一方で MG は通常の代謝過程で生じるにもかかわらず、糖尿病や大腸ガン、肺ガンとの関連、あるいはアポトーシスへの関与などが指摘されている。しかしながら MG によるこれらの現象の分子機序については未解明な点が多い。その理由の一つは、MG がどのような細胞応答を惹起するかについての詳細な知見が得られていないことに起因する。本論文では、細胞内での MG の役割、細胞外 MG に対する細胞応答について、*S. cerevisiae* をモデル生物として検討した研究結果がまとめられている。以下に示す点が成果として評価できる。

- (1) 細胞の生育に応じた細胞内 MG 量の変化についてはこれまでに報告がなく、MG 含量がエネルギー獲得系が解糖系から酸素呼吸へと遷移するジオキシシフト時に最大となることの発見は、MG の細胞内での役割を知る上で重要な知見となりうる。また、MG 代謝酵素グリオキサラーゼ I の欠損株 (*glo1Δ* 株) における MG 含量が野生株に比べ構成的に高いことを見出し、DNA マイクロアレイ解析により野生株と *glo1Δ* 株で遺伝子発現パターンが異なることを示した。細胞内 MG レベルの増減は、上記のように生育のフェーズ、あるいは利用可能な炭素源の違いによって細胞内で実際に起こりうる状況を反映しており、細胞内で生成する MG が遺伝子発現に影響を及ぼすことを示した興味深い結果である。さらに、発現パターンに変動のみられる遺伝子のプロファイリングから、それらを制御する転写因子が MG のターゲットとなりうる可能性を示唆し、実際、そのうちの一つである Yap1 について以下に示すように活性化の詳細なメカニズムを明らかにしている。
- (2) 著者は MG のターゲットの一つとして転写因子 Yap1 を同定し、その活性化機構について検討を行っている。これまでの研究で、Yap1 の活性化機構として過酸化水素が引き起こす分子内ジスルフィド結合の形成による活性化が報告されていたが、今回著者は、Yap1 の C 末端側のシステインクラスターのうち、一つのシステイン残基を残した Yap1 分子でも MG による活性化が起こること、また、そのシステイン残基にジスルフィド結合を介して結合するタンパク質がないことを生化学的に証明し、従来知られていた機構とは異なる新規な Yap1 の活性化機構の存在を示した。またこのことは、酵母細胞において MG がタンパク質の生理的な機能に影響を与えることを示した初めての例でもある。さらに、これまで MG はタンパク質分子中のリシン残基やアルギニン残基を不可逆的に修飾することが示されてきたが、本研究は、MG のタンパク質分子中のシステイン残基に対する可逆的な修飾を示唆した初めての報告である。
- (3) 細胞内のみならず、細胞外の MG に対する細胞応答について検討を行い、MG が HOG-MAP キナーゼ経路や、カルシウム／カルシニューリン経路を活性化させることを発見し、MG がシグナル伝達経路のイニシエーターとして機能することを明らかにした。このことは、これらのシグナル伝達系によって制御される細胞応答機構とその意義を明らかにする上で重要な知見を提供している。
- (4) MG が引き起こす細胞死の機構について検討を行った結果、過剰量の MG が *S. cerevisiae* に対しネクローシス様の細胞死を引き起こすことを明らかにしている。また、亜致死量の MG は可逆的な細胞増殖の阻害を引き起こすことを見出し、その機構がアクチンの極性の破壊に依存していることを報告している。アクチンの極性は細胞増殖、細胞形態、細胞内物質輸送など、さまざまな局面において重要な役割を果たしていることから、MG の多面的な機能を裏付ける根拠の一つであると考えられる。

以上のように、本論文は細胞内で生成する代謝中間体が、単なる代謝中間体としての機能を超えて細胞の生理に影響を与えうることを示したものであり、代謝物によるシグナル伝達という新しい概念の構築へ向けての重要な知見を提供しており、生化学、細胞生物学、分子生物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17年2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。