

京都大学	博士（農学）	氏名	大 舘 巧
論文題目	Stress response of Gpx1 and its physiological role in assimilation of oleic acid in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母Gpx1のストレス応答機構とオレイン酸資化における生理的役割)		
(論文内容の要旨)			
グルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）はグルタチオンを電子供与体として過酸化物を還元する抗酸化酵素である。本研究では、出芽酵母が持つ三つのGPx（Gpx1、Gpx2、Gpx3）のうち、解析が十分に進んでいないGpx1に焦点を当て、遺伝子発現制御機構、酵素化学的性質、ならびに細胞内機能について解析を行った。本論文の内容は以下のように要約できる。 1. Gpx1の細胞内機能に関する手がかりを得ることを目的として、GPX1遺伝子が発現する条件を探索した。その結果、GPX1遺伝子がグルコースの枯渇、ならびにカルシウム処理によって発現誘導されることを見いだした。それらの条件下におけるGPX1遺伝子の発現は、GPX1遺伝子プロモーター上のSTRE（stress response element）配列と、そこに結合するストレス応答性転写因子Msn2ならびにMsn4に依存していた。さらに、それらの上流で機能する因子について遺伝学的、ならびに生化学的に解析を行った結果、グルコースの枯渇によるGPX1遺伝子の発現には、グルコースシグナリングに関わるプロテインキナーゼAとSnf1キナーゼという2種類のタンパク質リン酸化酵素が関わることを明らかにした。さらに、カルシウム処理によるGPX1遺伝子の発現にもプロテインキナーゼAとSnf1キナーゼが関与していることを見いだし、カルシウムにより、プロテインキナーゼAが不活性化されること、ならびにSnf1キナーゼが活性化されることを初めて明らかにした。 2. GPX1遺伝子の発現制御機構の解析の過程で、正の制御因子であるMsn2がカルシウム処理によって分解されることを見いだした。カルシウム存在下であっても、カルシニューリンの阻害剤であるFK506の添加によりMsn2の分解は抑制された。さらに、カルシニューリンの欠損株や、カルシニューリンにより活性化される転写因子Crz1を欠損させた株では、カルシウム処理によるMsn2の分解は認められなかった。解析の結果、Crz1とMsn2が同時に核に局在する時にのみ、Msn2が核内で分解されることを見いだした。同様の現象はMsn4においても認められた。このカルシウム依存的なMsn2/Msn4の分解機構をCDMD（Crz1-dependent Msn2/4 degradation）と命名した。カルシウム処理によるGPX1遺伝子の発現誘導は、Msn2とMsn4依存的に起こることから、カルシウム存在下でFK506を添加することにより発現レベルがさらに上昇することが期待された。しかしながら、カルシウム処理によるGPX1遺伝子の発現レベルは、FK506を添加してもさらに上昇することはなかった。一方、いくつかの遺伝子（GLO1、CTT1など）のカルシウム処理による発現レベルは、FK506の添加、			

あるいはカルシニューリンやCrz1の欠損によりさらに上昇した。その分子機構の詳細について検討した結果、カルシウムによる発現誘導が浸透圧ストレス応答に関わるMAPキナーゼであるHog1、ならびにMsn2/Msn4、STREの三者に依存した遺伝子において特異的に観察される現象であることを明らかにした。

3. 出芽酵母のGpx1は哺乳類GPxの構造的ホモログである。哺乳類GPxの活性中心はセレノシステインであるが、出芽酵母GPxではセレノシステインに相当する部位がシステインに置換されており、出芽酵母GPxは哺乳類GPxとは異なる反応機構を有すると考えられた。Gpx1の酵素化学的な解析は、その精製の困難さからこれまで行われてこなかったが、本論文では、Gpx1を大腸菌で発現させ、精製することに成功した。精製Gpx1は、グルタチオンならびにチオレドキシンのいずれを電子供与体として用いた場合でもペルオキシダーゼ活性を示した。一方、細胞内では、Gpx1は主にチオレドキシンのによるレドックス制御を受けており、Gpx1が持つ6個のシステイン残基のセリン置換体を用いた解析から、Gpx1はペルオキシダーゼ反応に伴い、主としてCys36とCys82間で分子内ジスルフィド結合を形成するatypical 2-Cysペルオキシレドキシニンであることを明らかにした。
4. GPX1遺伝子の発現がオレイン酸により誘導されることを見いだすとともに、その発現誘導はオレイン酸により活性化することが報告されている転写因子群によるものではなく、Msn2ならびにMsn4に依存することを明らかにした。Gpx1がオレイン酸により誘導されたことから、オレイン酸培地での生育におけるGpx1の重要性についてgpx1Δ株を用いて検討したところ、gpx1Δ株は野生株に比べて生育が低下した。gpx1Δgpx2Δgpx3Δ株ではさらなる生育の低下が認められた。次に、Gpx1の細胞内局在性についてNycodenz密度勾配遠心法により検討した結果、Gpx1がペルオキシソームマトリックスに局在することを明らかにした。さらに、ペルオキシソームマトリックスに局在するGpx1がH₂O₂を基質としてペルオキシダーゼ活性を有することを明らかにした。しかしながら、ペルオキシソームに局在し、β-酸化の初発段階で生じるH₂O₂を分解するカタラーゼCta1の過剰発現は、gpx1Δ株のオレイン酸培地での生育低下を回復させることはできなかった。一方、オレイン酸培地で培養した野生株とgpx1Δgpx2Δgpx3Δ株のペルオキシソーム形態に違いが見られたことから、ペルオキシソームの形態形成にGPxが関与すること、さらにペルオキシソームの形態変化がオレイン酸培地での生育に影響を与えている可能性を示唆した。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、出芽酵母Gpx1について、遺伝子発現制御機構、酵素化学的性質、ならびにオレイン酸資化における役割とペルオキシソーム形態に与える影響について解析したものである。評価される点は以下のとおりである。

1. *GPX1*遺伝子がグルコースの枯渇、ならびにカルシウム処理によって発現誘導されることを見だし、その詳細な機構について解析を行った。*GPX1*遺伝子が転写因子Msn2とMsn4依存的に発現誘導されること、それらの上流で機能する因子としてプロテインキナーゼAとSnf1キナーゼが関与することを見いだした。特に、カルシウム処理により、プロテインキナーゼAが不活性化されること、ならびにSnf1キナーゼが活性化されることを初めて明らかにした。
2. カルシウムで処理した酵母細胞内において、カルシニューリン/Crz1依存的なMsn2ならびにMsn4の核内分解機構が存在することを明らかにし、転写因子の核内分解による遺伝子発現制御機構について明らかにした。
3. Gpx1がグルタチオンならびにチオレドキシンを電子供与体としてペルオキシダーゼ活性を示すことを明らかにした。Gpx1の6個のシステイン残基のセリン置換体を用いた解析から、Gpx1がペルオキシダーゼ反応に伴いCys36とCys82で分子内ジスルフィド結合を形成するatypical 2-Cysペルオキシレドキシニンであることを明らかにした。
4. Gpx1がオレイン酸により誘導され、ペルオキシソームマトリックスに局在することを明らかにした。さらに、ペルオキシソームマトリックスに局在するGpx1がペルオキシダーゼ活性を示すことも明らかにした。*gpx1Δ*株はオレイン酸培地での生育が低下し、*gpx1Δgpx2Δgpx3Δ*株ではさらに生育が低下することを明らかにした。一方、*gpx1Δgpx2Δgpx3Δ*株の生育低下は、ペルオキシソームに局在し、β-酸化の初発段階で生じるH₂O₂を分解するカタラーゼCta1の過剰発現では回復しなかった。さらに、GPxがペルオキシソームの形態形成に関与することを見いだした。

以上のように本論文は、出芽酵母Gpx1の発現制御機構、酵素化学的性質と細胞内レドックス制御機構、ならびにオレイン酸資化における役割とペルオキシソーム形態に与える影響について明らかにしたものであり、微生物分子生物学、分子細胞生物学、ならびに細胞生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22年7月22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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降