

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                  |    |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|----|-------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 博士（生命科学）                         | 氏名 | 三河 拓己 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 分裂酵母Vps1とAtg8の酸化ストレス抵抗性における機能の解析 |    |       |
| <p>（論文内容の要旨）</p> <p>好氣的な環境下で活動する生物は、常に活性酸素に曝されている。ミトコンドリアでは電子伝達系によってATP合成が行われており、生物の活動に必要なエネルギーの大部分を生み出している。その一方で、電子伝達系の副産物として有害な活性酸素が発生し、細胞損傷を引き起こす。生物はミトコンドリアと共存する中で、活性酸素に対する様々な防御機構を発展させてきたことが予想される。そして、それらの機構の全容はまだ明らかではない。paraquatはミトコンドリアから活性酸素を発生させ細胞に酸化ストレスを与える薬剤である。本研究では、まず、分裂酵母の新規酸化ストレス耐性経路の同定を目的として、paraquat感受性変異株のスクリーニングを行った。paraquatへの抵抗性に必要な遺伝子は、呼吸によって発生する酸化ストレスへの抵抗性にも必要であることが予想された。スクリーニングによって得られたparaquat感受性株の中から、ダイナミン関連タンパク質(DRP)ファミリーの一員である <i>vps1<sup>+</sup></i> 遺伝子を同定した。<i>vps1Δ</i>株ではミトコンドリアの断片化が観察され、特にparaquat存在下ではミトコンドリアの断片化が著しく亢進した。また、<i>vps1Δ</i>株では液胞タンパク質輸送に異常があり、液胞プロテアーゼのIsp6が細胞表面に誤輸送された。さらに液胞機能と関連して <i>vps1Δ</i>株ではparaquat存在下における液胞形態に異常が観察された。また、<i>vps1Δ</i>株では高浸透圧ストレスや高濃度のカルシウム、高濃度の鉄に対して感受性を示した。これより、Vps1が液胞機能に関与することが推測された。そこで、次にparaquat抵抗性と液胞機能の関係に注目した。様々な液胞機能の欠損株を作製し、paraquat感受性を調べたところ、オートファジー関連因子の <i>atg<sup>+</sup></i> 遺伝子や液胞酸性化に機能する <i>vma3<sup>+</sup></i> 遺伝子の破壊株がparaquatに対し感受性を示した。これより、液胞がparaquat抵抗性に寄与することが示唆された。興味深いことに、今回調べた <i>atg<sup>+</sup></i> 遺伝子の中で <i>atg8<sup>+</sup></i> 遺伝子のみが <i>vps1<sup>+</sup></i> 遺伝子との二重遺伝子破壊株において、様々なストレスに対し強い感受性を示した。また、<i>atg8Δ</i>株では異常な液胞形態が観察された。オートファジー機能を失った <i>atg8-G116A</i>株や <i>atg1Δ</i>株では液胞形態の異常は観察されないことから、Atg8はオートファジーとは独立した液胞機能を持つことが示唆された。さらに、Vps1とAtg8は内因性の酸化ストレスへの抵抗性に必要であった。以上の結果より、Vps1とAtg8は酸化ストレス抵抗性に必要であることが明らかになり、そのストレス耐性には液胞機能が関与することが示唆された。</p> |                                  |    |       |

(論文審査の結果の要旨)

活性酸素はタンパク質、核酸、脂質など様々な細胞構成物に損傷を与える。これらの損傷の蓄積はやがて細胞機能の低下を引き起こし、老化や疾病の原因となると考えられている。ミトコンドリアでは日常的に大量の活性酸素が産出されており、細胞は恒常性を維持するため、これら有害な活性酸素に対し、直接的に活性酸素を除去する機構や、酸化損傷に対する修復機構を備えている。

本研究は新規抗酸化機構の解明を目的とし、ダイナミン関連タンパク質(DRP)ファミリーの一員であるVps1の酸化ストレス抵抗性について研究を行ったものである。DRPファミリーは酵母からヒトまで広い生物種間で保存されており、オルガネラの形態制御に関与することが知られている。特にVps1は出芽酵母において詳細な解析がなされており、液胞タンパク質輸送や液胞形態の制御、ペルオキシソーム形態の制御、アクチン局在の制御など多面的な機能が知られている。しかし、これまでVps1のストレス抵抗性への関与はほとんど知られていなかった。申請者は分裂酵母を用い、ミトコンドリアより活性酸素を発生させる薬剤paraquatに対する感受性株のスクリーニングを行った。得られたparaquat感受性株の中から*vps1<sup>+</sup>*遺伝子を同定し、Vps1が酸化ストレス抵抗性に重要な機能をもつことを明らかにした。*vps1Δ*破壊株では酸化ストレス環境下における液胞の異常な肥大化が観察され、正常な液胞形態の制御が酸化ストレスへの抵抗性に必要であることが示唆された。さらに*vps1Δ*破壊株では高浸透圧ストレスや高濃度のカルシウム、鉄に対して感受性を示し、Vps1が正常な液胞機能に必要であることが示唆された。この結果は、液胞機能に異常を持つ*vma3Δ*破壊株や*vps34Δ*破壊株がparaquat感受性を示す結果とも一致する。また、本研究ではオートファジー因子Atg8が液胞形態制御に機能することが明らかにされた。申請者はオートファジー機能を欠失した*atg8-G116A*変異株を作製し、Atg8による液胞形態の制御がオートファジーとは独立した機能であることを示した。また、*vps1Δ atg8Δ*二重破壊株の解析より、液胞形態の制御や酸化ストレス抵抗性において、両者の間に強い遺伝学的相互作用が存在することを明らかにした。

本研究はVps1がオートファジー因子Atg8と協調して酸化ストレスへの抵抗性や液胞形態の制御に機能することを示した初めての報告であり、液胞機能を介した抗酸化ストレス機構の解明をはじめとする、当該分野における今後の研究の発展に寄与すると考えられる。

本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。尚、平成22年1月26日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日