

(論文内容の要旨)

微生物から動植物に至る全ての細胞は、細胞内レドックスの恒常性を維持するための調節機構を備えている。メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* において、メタノールはペルオキシソーム内のアルコールオキシダーゼにより酸化され、ホルムアルデヒドと H_2O_2 に代謝される。細胞内における高レベルの活性酸素種 (ROS) の発生は、本酵母による異種タンパク質生産にも大きな影響を与え得る。このような ROS を消去する抗酸化酵素系が知られているが、メタノール代謝時に本酵母細胞が受けるストレスとその応答機構については不明であった。本論文では、*P. pastoris* のメタノール生育時におけるストレスとその応答機構を支配する因子の一つとして PpYap1 を同定し、その分子応答機構を明らかにした。また、細胞内レドックスを可視化する新奇な蛍光プローブ "Redoxfluor" を創生し、これを用いてペルオキシソーム欠損病と細胞内レドックスの強い関連性を示すとともに、本疾患を対象とした創薬スクリーニング系を構築した。その主な内容は以下の通りである。

- 1) 出芽酵母のストレス応答性転写因子 ScYap1 の *P. pastoris* におけるホモログである PpYap1 を同定した。PpYap1 は、他の酵母の Yap1 ホモログと同様、分子内に2つの cysteine-rich domain (CRD)、N 末端側の n-CRD と C 末端側の c-CRD を持つ。CRD 上の 234、240、392、414、423 番目に位置する Cys 残基は酵母 Yap1 間で高度に保存されており、これら 4 つの Cys 残基が、ホルムアルデヒドならびに H_2O_2 の両ストレス応答に重要な役割を果たしていた。
- 2) *PpYAP1* 遺伝子破壊株 (*Ppyap1Δ* 株) は様々な酸化剤に感受性を示し、抗酸化酵素をコードする遺伝子の発現が大幅に抑制されていた。*Ppyap1Δ* 株に赤色蛍光タンパク質と PpYap1 との融合タンパク質 mRed-PpYap1 を発現させた株において、mRed-PpYap1 が、様々な酸化剤により核へ局在化し薬剤感受性を相補したことから、PpYap1 が *P. pastoris* におけるレドックス制御の調節因子であることを示した。
- 3) *Ppyap1Δ* 株はメタノール培養において生育阻害を示した。この結果は、外部からの薬剤添加などの非生理的な条件ではなく、通常の代謝に伴うストレス応答に、酵母 Yap1 が重要な役割を担うこと示す初めての例である。
- 4) *Ppyap1Δ* 株の他、グルタチオンレドックス系に関わる遺伝子の破壊株について、野

生株とメタノール培地での生育を比較した。その結果、グルタチオンレダクターゼを欠損した *Ppglr1Δ* 株が顕著な生育阻害を示し、その細胞内の還元型グルタチオン (GSH) 量は極めて少なかった。*Ppglr1Δ* 株は、GSH の添加によりメタノール培地での生育阻害が部分的に回復すること、ホルムアルデヒド感受性を示したことから、グルタチオンレダクターゼにより再生される GSH が ROS のみならずホルムアルデヒドの解毒にも重要な働きをすることを明らかにした。

- 5) メタノール誘導開始後、細胞質に拡散していた mRed-PpYap1 が核局在して、*Ppyap1Δ* 株ではメタノール代謝時におけるグルタチオンレドックス系遺伝子の転写活性化が、野生株の 0.2 - 0.7 倍に抑制されていた。このことから、メタノール誘導時には、mRed-PpYap1 が核に局在して、グルタチオンレドックス系遺伝子の転写を活性化することを示した。
- 6) ROS の除去に関係なく生育阻害を示す GSH 依存的ホルムアルデヒド酸化経路の欠損株を用いた解析から、ホルムアルデヒドの毒性を消去するための細胞内 GSH の消費が Yap1 の核局在化を引き起こすことを示した。
- 7) Yap1 の CRD 領域とその改変体、および 2 種の蛍光タンパク質 (Cerulean・Citrine) との融合タンパク質を多数作成し、Yap1 CRD の構造変化を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の変化により検出する、新奇のレドックス応答性蛍光プローブ "Redoxfluor" を創生した。本プローブ (C-probe) は、酸化状態では FRET が解除された。さらに、そのレドックス状態に対する応答は可逆的、かつ、CRD 上の Cys 残基に依存していた。
- 8) C-probe を酵母・哺乳類培養細胞 (CHO) の細胞質に発現させ、可視化解析することにより、C-probe が、生理的レベルのレドックス変化を可視化できる初めての遺伝子導入型プローブであることを示した。
- 9) C-probe にペルオキシソーム移行シグナル 1 (PTS1) を付加したペルオキシソーム局在型プローブを作成し、*P. pastoris* および哺乳類培養細胞に導入して解析した結果、ROS を産生するペルオキシソーム内のレドックス状態は、予想に反して細胞質よりも還元状態にあった。
- 10) C-probe を用いて、細胞内レドックスとペルオキシソーム欠損病との関連性について調べたところ、予想外なことにペルオキシソーム欠損細胞の細胞質レドックスが正常細胞よりも還元的であることを見出した。また、野生株のレドックスには変化を

引き起こさず、ペルオキシソーム欠損 CHO 細胞における異常なレドックス状態を正常に回復する薬剤を "Redox modulator" として位置づけ、C-probe を用いて探索した結果、Trichostatin A を見出し、創薬に Redoxfluor が適用できることを示した。

	氏 名	矢野 泰介
(論文審査の結果の要旨) 微生物から動植物に至る全ての細胞は、細胞内レドックスの恒常性を維持するための調節機構を備えている。メタノール資化性酵母 <i>Pichia pastoris</i> は、メタノールを単一の炭素・エネルギー源として生育し、メタノール代謝の過程でメタノールはペルオキシソーム内のアルコールオキシダーゼにより酸化され、ホルムアルデヒドと H_2O_2 を生じる。この細胞内で発生する高レベルの活性酸素種 (ROS) は、本酵母を用いた異種タンパク質生産にも大きな影響を与え得る。ROS を消去するペルオキシソーム内の抗酸化酵素群、カタラーゼ (Cta1) や グルタチオンペルオキシダーゼ活性を持つ Pmp20 が知られているものの、メタノール代謝時に細胞が受けるストレスとその応答機構は不明であった。メタノール代謝におけるストレスやその防御機構は、細胞内レドックスの恒常性維持機構やグルタチオン関連代謝の生理的役割を解明するための良いシステムでもある。本論文は、<i>P. pastoris</i> のメタノール代謝時におけるレドックス制御機構についてストレス応答性転写因子 PpYap1 とグルタチオンレドックス系を対象とした解析により、メタノール代謝時におけるストレスとその分子応答機構を明らかにしたものである。さらにレドックス応答の分子基盤が最も明らかにされている出芽酵母 ScYap1 を利用し、細胞内レドックスを可視化する新奇な蛍光プローブ "Redoxfluor" を創生した。ペルオキシソーム内あるいはペルオキシソーム欠損細胞 (酵母及び CHO 細胞) に Redoxfluor を導入することにより、ペルオキシソーム欠損病とレドックスの強い関連性を明らかにし、本疾患を対象とした創薬スクリーニング系を構築した。評価すべき点は以下の5点である。 1) 出芽酵母のストレス応答性転写因子 ScYap1 のメタノール酵母 <i>P. pastoris</i> におけるホモログである PpYap1 を同定し、本酵母内でレドックス調節因子として機能することを示した。 2) メタノール代謝時に生じるホルムアルデヒドや ROS の解毒において、グルタチオンレドックス系、特にグルタチオンレダクターゼ PpGlr1 による 酸化型グルタチオンから還元型グルタチオンへの再生が極めて重要であり、その制御を PpYap1 が行う		

ていることを明らかにした。本論文は、外部からの薬剤添加などの人為的なストレス応答でなく、生理的な代謝の過程で PpYap1 が活性化されることを示した初めてのものである。

- 3) Yap1 の分子内領域を利用した新奇のレドックス応答性蛍光プローブ "Redoxfluor" を開発した。本プローブは、*in vitro*、*in vivo* において、生理的なレベルの細胞内レドックス変化に可逆的に応答した。
- 4) ペルオキシソーム移行シグナルを Redoxfluor に付加し、ペルオキシソーム内に発現させた。その結果より、酵母及び CHO 細胞の両者において、ROS を産生するペルオキシソームの内部が、細胞質より還元的であることを示した。
- 5) Redoxfluor を用いて、細胞内レドックスとペルオキシソーム欠損病との関連性について調べたところ、予想外なことにペルオキシソーム欠損細胞の細胞質レドックスが正常細胞よりも還元的であることを見出した。この異常なレドックス状態を正常に回復する薬剤 "Redox modulator" について、Redoxfluor を用いたスクリーニングを行った結果、Trichostatin A を見出した。

以上のように、本論文は、酵母 *P. pastoris* のメタノール代謝時におけるレドックス制御機構という観点から、その代謝によって生じるストレスとそれに応答する分子機構を初めて明らかにしたものである。また、Yap1 のレドックスセンシング機能を利用して細胞内レドックスを可視化する新奇な蛍光プローブ "Redoxfluor" を創生し、ペルオキシソーム欠損病とレドックスの関連性を明らかにし、本遺伝病を対象とした新たな創薬スクリーニング系を構築した。以上の研究から得られた知見は、制御発酵学、応用微生物学、分子細胞生物学、創薬科学などの分野に大きく寄与するものである。

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 21 年 6 月 11 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。