

|           |                                                                                                                                                                                                           |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | ほり ぐち ひろ ふみ<br>堀 口 博 文                                                                                                                                                                                    |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (農 学)                                                                                                                                                                                                 |
| 学 位 記 番 号 | 農 博 第 1204 号                                                                                                                                                                                              |
| 学位授与の日付   | 平成 13 年 5 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    | Physiological significance and application of a novel intraperoxisomal antioxidant system in the yeast established via protein-traffic engineering<br>(新しく見出されたペルオキシソーム内抗酸化機構のタンパク質輸送工学を用いた生理的意義の解明と応用開発) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 加 藤 暢 夫      教 授 清 水      昌      教 授 熊 谷 英 彦                                                                                                                                                 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

真核生物では、酸化ストレスに対処する手段のひとつとして、さまざまな酸化反応をペルオキシソーム膜内に隔離し、反応によって生じる過酸化水素をこのオルガネラ内のカタラーゼによって分解して酸化ストレスが細胞全体に拡散しないようにしている。また、ほ乳類のペルオキシソーム膜には、抗酸化タンパク質ファミリーの一つであるペルオキシレドキシニンに属する Pmp20 がある。

本研究は、さまざまな炭素源によってペルオキシソームが顕著に発達するメタノール資化性酵母 *Candida boidinii* を用いて、カタラーゼのペルオキシソームへの局在化機構を明らかにするとともに、Pmp20 による抗酸化機構を生化学的に初めて明らかにしたものである。また、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いて細胞内タンパク質輸送を可視化する手法を適用して輸送シグナルと受容体との相互作用と輸送効率との関連に基づくタンパク質輸送工学の手法を一段と進展させた。得られた結果は以下のように要約できる。

- 1) *C. boidinii* よりペルオキシソーム型カタラーゼ遺伝子 (*CbCTA1*) をクローニングするとともに *CbCTA1* 破壊株 (*cta1Δ* 株) を取得し、その生育特性から、その遺伝子産物がペルオキシソーム内の酸化反応によって生じる過酸化水素を分解し、酸化ストレス防御に関与することを明らかにした。
- 2) *CbCTA1* の塩基配列から推定した一次構造のカルボキシル末端は -NKF であり、この配列を欠失した *CbCTA1Δnkf* を *cta1Δ* 株に発現させた場合、細胞質に活性型のカタラーゼが存在するにも拘わらず、*cta1Δ* 株のメタノールでの生育を相補できないことから、この配列がペルオキシソーム移行シグナル PTS1 として機能すること、およびカタラーゼがペルオキシソームに局在することが本酵母のメタノール生育に必須の生理的要件であることを実証した。
- 3) GFP とカタラーゼの融合タンパク質 (GFP-Ctalp) を構築して目的タンパク質の細胞内局在性を蛍光顕微鏡下で可視化して調べ、PTS1 のシグナル配列がそのレセプターである Pex5p との相互作用の強さを規定し、ペルオキシソームへの輸送効率を決定する要因であることを明らかにした。
- 4) PTS1 シグナル配列を欠失した GFP-Ctalp と全長のカタラーゼを同時に発現させることによって、カタラーゼ活性を示し、かつ蛍光を発するハイブリッドオリゴマーを作らせ、その輸送過程を蛍光顕微鏡下で追跡する方法を適用して、カタラーゼがサブユニットのオリゴマーを形成した後にペルオキシソームへ運ばれることを初めて明らかにした。
- 5) カタラーゼの細胞生理的な役割とは別に、これを大量生産させる場合には、むしろ PTS1 配列を欠失した遺伝子を発現させて細胞質に蓄積させた方がよいこと、およびヘムの前駆体である 5-アミノレブリン酸の添加がカタラーゼ生産を顕著に増強することを見出して、この形質転換株が過酸化水素を高濃度に含有する排水処理に有効であることを示した。
- 6) *C. boidinii* ペルオキシソーム膜に結合した 20kDa のタンパク質は PTS1 配列をもち、ほ乳類の Pmp20 ファミリーと高い相同性を示し、メタノールに生育した場合にのみ誘導発現する。*C. boidinii* Pmp20 遺伝子が大腸菌で発現させること

によって、そのアルキル過酸化物に対する耐性が上昇することを見出すとともに、この発現株より精製した Pmp20 がその Cys53 を介してアルキル過酸化物を基質としてグルタチオンペルオキシダーゼ活性を示し、酸化された当該チオール基はグルタチオンによって還元されることを見出した。さらに、PTS1 を欠失した Pmp20 遺伝子を *pmp20* 破壊株に形質転換し、そのメタノールに対する生育を野生株や *cta1Δ* 株などと比較した結果、Pmp20 はペルオキシソーム内膜に存在することが生理的に必須で、ペルオキシソーム膜で生じる脂質ペルオキシドの分解に関与することを見出した。また、メタノール生育時のペルオキシソームには、生理的濃度のグルタチオンが存在し、Pmp20 のグルタチオンペルオキシダーゼ活性がメタノール生育時に実際に機能することを示した。以上の結果は、Pmp20 ファミリーの生理的な役割を生化学的に初めて明らかにしたものであり、これまで困難であった食品中の過酸化脂質の定量法を開発するための基盤的知見でもある。

## 論文審査の結果の要旨

好気性生物は絶えず様々な活性酸素種に起因する酸化ストレスにさらされており、これを防除するための多様な抗酸化機構を有している。これまで、可溶性の過酸化物に対する防除機構はよく研究されているが、老化や生活習慣病などの原因とされる生体膜に蓄積する過酸化物の除去機能については十分な知見が得られていない。特に、全ての真核生物において多様な酸化反応を担うオルガネラであるペルオキシソームには、何らかの酸化ストレス防除機構が存在すると考えられているが、その分子レベルでの機構解明は進展していなかった。本論文では、メタノールなど様々な炭素源によってペルオキシソームが顕著に発達する酵母 *Candida boidinii* を用いて、そのペルオキシソームでの過酸化物の分解機構の詳細を明らかにしたもので、評価すべき点は以下の6点である。

- 1) *C. boidinii* のペルオキシソーム型カタラーゼ遺伝子 (*CbCTA1*) 破壊株を取得し、このカタラーゼがペルオキシソーム内で生じる過酸化水素の分解に必須であることを明らかにした。
- 2) *CbCTA1* の塩基配列から推定した一次構造のカルボキシル末端は -NKF であり、この配列がペルオキシソーム移行シグナル PTS1 として必要十分であること、およびカタラーゼのペルオキシソームへの局在が、本酵母がメタノールに生育するために必須であることを明確にした。
- 3) 緑色蛍光タンパク質 (GFP) とカタラーゼの融合タンパク質を構築して目的タンパク質を蛍光顕微鏡下で可視化し、PTS1 をもつタンパク質とそのレセプターとの相互作用から、ペルオキシソームへの輸送効率を評価できる新しい系を構築した。
- 4) 上記の手法を適用して、カタラーゼが細胞質で活性型のサブユニットオリゴマーを形成した後にペルオキシソームへ輸送されることを実証した。これはカタラーゼの輸送過程を、細胞内で可視化することにより検証した初めての例である。
- 5) 工業的に有用なカタラーゼを大量生産するために、PTS1 配列を欠失したカタラーゼ遺伝子を形質転換した *C. boidinii* を、メタノールを炭素源とし、ヘムの前駆体である 5-アミノレブリン酸を添加した培地で培養することによって、カタラーゼを細胞質に高度に蓄積する菌体の調製法を開発した。さらに、得られた菌体が過酸化水素を高濃度に含有する排水処理に有効であることを示した。
- 6) *C. boidinii* のペルオキシソーム膜に存在する Pmp20 遺伝子が大腸菌で発現させ、その形質転換体より精製した Pmp20 を用いて、Pmp20 の過酸化物に対する抗酸化活性が、Cys53 を介するグルタチオンペルオキシダーゼ活性によるものであり、酸化された当該チオール基がグルタチオンによって還元されることを生化学的に初めて明らかにした。さらに、*C. boidinii* の Pmp20 遺伝子破壊株を宿主とし、これにさまざまな Pmp20 変異遺伝子を導入した株の生育特性の比較から、当該酵母がメタノールに生育するときに、Pmp20 はペルオキシソーム内膜に存在することが必須であり、ペルオキシソーム内膜で生じる脂質ペルオキシドの分解に関与することを実証した。

以上のように本論文は、メタノール資化性酵母のペルオキシソームで起こる酸化ストレス防除機構を分子レベルで明らかにして過酸化脂質の定量法の開発に基盤的な知見を与えるとともに、目的タンパク質の可視化によるタンパク質輸送工学の手法を酵素生産に活用したもので、制御発酵学、応用微生物学、細胞生理学に貢献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13年4月12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。