

## 論文内容の要旨

申請者氏名 西村 明

酵母 *Saccharomyces cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b 株には、プロリン代謝中間体の $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸/グルタミン酸- $\gamma$ -セミアルデヒド (P5C/GSA) を *N*-アセチル化する酵素 Mpr1 が存在しており、Mpr1 は P5C/GSA をアセチル化することでプロリン (Pro) とアルギニン (Arg) の代謝を連結している。また、Mpr1 は高温や過酸化水素などにより生じる細胞内 ROS レベルを制御し、酸化ストレスから細胞を防御していることも判明した。しかし、P5C/GSA のアセチル化と抗酸化との関連については不明な点が多く、Mpr1 による抗酸化機構は明らかになっていない。そこで本研究では、酵母の Pro/Arg 代謝を介した新規な酸化ストレス耐性機構について、分子機構と生理機能の解析を行った。

まず、酵母が高温に曝されると Pro オキシダーゼと Mpr1 の遺伝子が誘導され、Pro から Mpr1 を介した Arg 合成が亢進していることが判明した。また、Mpr1 はミトコンドリアで P5C/GSA をアセチル化し、Arg 合成の亢進に寄与していると考えられた。

次に、Arg 合成の亢進が酸化ストレス耐性に関与すると予想し、その機構を解析した。Arg の作用機序としては、哺乳類と同様に一酸化窒素 (NO) の関与が考えられるが、酵母のゲノム上には哺乳類 NO 合成酵素 (NOS) のオルソログが存在しておらず、NO の生成機構や生理機能は不明である。その結果、酵母においても Arg から NOS 活性依存的に発生する NO が酸化ストレス耐性に寄与していることが明らかになった。そこで、酵母の NOS 様タンパク質を哺乳類 NOS に存在するオキシドレダクターゼドメインを指標に生化学的手法で探索した。その結果、オキシドレダクターゼと推定される 27 個の機能未知タンパク質の中から、Tah18 に明瞭な NOS 活性を検出した。Tah18 を組換えタンパク質として調製し、解析したところ、Tah18 は基質特異性や補酵素要求性などの点で哺乳類 NOS と類似の性質を示すが、一次構造上オキシゲナーゼドメインがなく、活性化にカルモジュリンは必要ない。また、ヘムではなく鉄イオンがオキシゲナーゼ反応に重要であることが判明した。Tah18 は複合体を形成する Dre2 タンパク質の鉄硫黄クラスターに FAD と FMN を介して電子を転移するタンパク質として報告されているが、NOS としての活性は初めての知見である。Tah18 の NOS 活性と Dre2 への電子転移活性は無関係であった。さらに、生育に必須である Tah18 遺伝子の条件的破壊株を作製したところ、高温処理下でも NO 含量が増加せず、生存率も野生株に比べて著しく低下した。また、Tah18 過剰発現株では野生株より高い NOS 活性が検出された。これらの結果から、酵母の NOS 活性は Tah18 に依存していると結論づけた。

最後に、NO による抗酸化機構を解析したところ、NO が細胞内への銅の取り込みを制御し、銅依存性スーパーオキシドジスムターゼ (Sod1) の活性を増加させることを見出した。以上の結果から、高温処理により誘導される NO 合成が Tah18 の NOS 活性に依存し、銅の取り込みを介して細胞の酸化ストレス耐性に関与することが示された。

(別紙2)

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 西村 明

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は発酵生産環境において、冷凍、乾燥、高温、浸透圧、エタノールなど細胞内に活性酸素種 (ROS) が蓄積する酸化ストレスにより有用機能の発現が制限されている。申請者は、酵母のプロリン (Pro)・アルギニン (Arg) 代謝を介した酸化ストレス耐性機構を解析し、以下に示す新たな結果や重要な知見を得た。

- 1) 酵母  $\Sigma$ 1278b 株に存在する抗酸化酵素 Mpr1 の機能を解析し、Mpr1 は ROS 産生に関与する Pro 代謝中間体をミトコンドリアで *N*-アセチル化することで、細胞内 ROS レベルを制御するとともに、Pro と Arg の代謝経路を連結していることを示した。
- 2) 酵母  $\Sigma$ 1278b 株は細胞内 ROS レベルを増加させる高温処理 (39°C) に曝されることで、Pro オキシダーゼ遺伝子と Mpr1 遺伝子が誘導され、Pro からの Arg 合成が亢進し、増加した Arg が細胞の酸化ストレス耐性に関与することを明らかにした。
- 3) Arg の作用機序として、哺乳類や一部の細菌と同様に一酸化窒素 (NO) の関与を想定し、解析を行ったところ、酵母においても Arg から NO 合成酵素 (NOS) 活性依存的に NO が生成し、細胞の酸化ストレス耐性に寄与していることを見出した。
- 4) 酵母のオキシドレダクターゼと推定される 27 個の機能未知蛋白質の中から、Tah18 に明瞭な NOS 活性を検出した。組換えタンパク質を用いた酵素学的な解析から、Tah18 は哺乳類 NOS と類似の性質を示すが、ヘムではなく鉄イオンがオキシゲナーゼ反応に重要であることを示した。Tah18 は鉄硫黄クラスターの生成に関与するタンパク質であるが、NOS としての活性は初めての知見である。さらに、Tah18 遺伝子の条件的破壊株の実験から、酵母細胞内での NO 生成は Tah18 の NOS 様活性に依存しており、生成した NO がストレス耐性に関与していることを見出した。
- 5) NO の下流経路を解析し、NO が細胞内への銅の取り込みを制御することで、銅依存性スーパーオキシドジスムターゼ (Sod1) の活性を増加させることを確認した。

これらの結果から、酵母において酸化ストレス下で Pro からの Arg 合成が亢進され、増加した Arg から Tah18 の NOS 活性依存的に NO が生成すること、および NO が銅の取り込みを介して細胞の酸化ストレス耐性に関与することを初めて明らかにした。

これまで酵母、糸状菌などの真菌類では NOS が同定されておらず、NO 研究はほとんど進展していないが、本研究は真菌類における NO の生理機能を理解する上で意義深い。一方、バイオテクノロジーの面からも、酸化ストレス耐性を高めた産業用酵母の育種に有用な知見である。また、ヒトでは NO が炎症、高血圧、癌など多くの疾病に関与しており、将来的には NO と病気の関連性を調べるモデルとして期待できる。

以上のように、本論文は酵母における NO の生成機構と生理的役割の一端を明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。