

(別紙 1)

論文内容の要旨

申請者氏名 Rika Indri Astuti

一酸化窒素 (NO) は、高等動物などにおいて様々な生理現象に関与するシグナル分子であるが、酵母を含む微生物における NO シグナルの存在や意義についてはほとんど理解されていない。当研究室では、真核生物のモデルである出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、NO が細胞の酸化ストレス耐性に関与することを見出している。そこで本研究では、同じく代表的なモデル生物として知られる分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* における NO シグナルとその役割に関する研究を行った。

まず、*S. pombe* 細胞内の NO およびその誘導体である S-ニトロソチオール (RSNO) を定量したところ、それらの量が細胞の増殖時期で変動していたことから、*S. pombe* においても NO シグナルの存在が示唆された。実際に、NO の解毒に関与する NO ジオキシゲナーゼおよび S-ニトロソグルタチオンレダクターゼのオルソログ遺伝子である SPAC869.02c および *fmd2*⁺ の二重破壊によって細胞内の NO 含量が顕著に増加したことから、これら 2 種類の NO 解毒酵素が協調的に機能していることを明らかになった。

SPAC869.02c および Fmd2 の発現レベルを解析したところ、SPAC869.02c は生育期間を通じて恒常的な発現を示したのに対し、Fmd2 は定常期に特異的に発現が誘導された。また、哺乳類 NO 合成酵素 (NOS) 阻害剤の処理によって SPAC869.02c の発現量のみが特異的に減少した。以上の結果から、SPAC869.02c は NOS により産生される NO によって誘導されるのに対し、Fmd2 は NOS 非依存的に生成する NO のシグナルに応答することが示唆された。また、定常期と関連の深いミトコンドリアの活性に着目して解析を進めると、ミトコンドリア電子伝達系におけるシトクロム *bc*₁ (複合体 III) が新たな NO 生成源として同定された。NO の細胞内局在を調べた結果、定常期にはミトコンドリアの近傍に強いシグナルが認められたことから、このモデルが支持された。

ミトコンドリア活性の上昇は活性酸素種 (ROS) の生成につながることから、NO シグナルが酸化ストレス応答に関与する可能性について検証を行った。まず、細胞を酸化ストレスに曝す前に、予め NO ドナーで処理して細胞内に NO を発生させると、ROS レベルの上昇が抑えられ、酸化ストレスによる生育阻害が軽減されることが明らかになった。その原因を探るためにトランスクリプトーム解析を行なったところ、NO ドナーの処理が、①フェントン反応 (Fe^{2+} イオンと過酸化水素が反応して Fe^{3+} イオンと毒性の高いヒドロキシルラジカルを生成する反応) の抑制、②スルフェレドキシン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼなどの過酸化水素の解毒に関与する酵素の発現誘導、③ミトコンドリア電子伝達系の抑制を引き起こすことが示唆された。以上の研究を通して、分裂酵母における NO シグナルがミトコンドリアの活性上昇によって引き起こされ、複数の分子メカニズムを介して抗酸化作用を発揮するという全体像を初めて理解するに至り、真核生物全体における NO シグナルの重要性を示すことができた。

(別紙 2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Rika Indri Astuti

代表的なモデル生物である分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* において、一酸化窒素 (NO) を介したシグナル伝達が細胞の孢子形成に関与することは過去の報告から示唆されていたが、NO の生成および解毒に関与する因子および NO シグナルの生理的意義についてはほとんど理解されていなかった。申請者は、*S. pombe* における NO 解毒酵素の同定と機能解析を端緒として、以下に示す新たな結果や重要な知見を得た。

- 1) NO 解毒酵素として知られる NO ジオキシゲナーゼをコードする新規遺伝子 *SPAC869.02c*、および S-ニトロソグルタチオンレダクターゼと相同性の高い 3 つの *fmd⁺* 遺伝子のうち *fmd2⁺* のみが NO レベルの制御に機能していることを見出した。
- 2) Fmd2 タンパク質の発現レベルを解析した結果、Fmd2 が定常期やグルコース枯渇など、ミトコンドリアの活性が高い条件において誘導され、特にミトコンドリア電子伝達系におけるシトクロム *bc₁* (複合体 III) が Fmd2 の誘導に必要であることを明らかにした。複合体 III は硝酸レダクターゼ活性を有することが他の生物において報告されていることから、複合体 III が硝酸からの NO 合成に関与すると考えられた。
- 3) NO の細胞内局在を蛍光顕微鏡観察によって解析し、定常期において NO がミトコンドリアの近傍において産生されていることを示した。
- 4) *S. pombe* の細胞を NO ドナーで処理することにより、酸化ストレス条件下における活性酸素種 (ROS) の生成が抑えられ、生育障害が軽減されることを示した。
- 5) NO ドナーで処理した細胞の DNA マイクロアレイ解析の結果から、NO が複数の分子メカニズム (①フェントン反応 (Fe^{2+} イオンと過酸化水素が反応して Fe^{3+} イオンと毒性の高いヒドロキシルラジカルを生成する反応) の抑制、②スルフェレドキシン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼなどの過酸化水素の解毒に関与する酵素の発現誘導、③ミトコンドリア電子伝達系の抑制) を介して細胞内 ROS レベルの上昇を抑え、抗酸化作用を示すことが示唆された。

申請者は、NO シグナルの存在さえも明確に示されていなかった分裂酵母を用いて本研究課題に果敢にチャレンジし、NO の解毒酵素を新規に同定したことに加え、NO の合成メカニズムの解明に資する新規な知見を得た。さらに、酸化ストレス応答における NO シグナルの役割を見出したことは分裂酵母をはじめ微生物の NO 研究における大きな進展であり、新たなストレス応答の研究分野が申請者により開拓された。今後、本研究のさらなる発展により、ストレス環境下における微生物の生理・生態に関する理解が深まり、酵母を用いた有用物質の生産などの応用研究に繋がる知見が得られる。加えて、分裂酵母をモデルとした NO シグナル伝達経路の全体像の解明にも繋がり、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。