

(別紙1)

論文内容の要旨

申請者氏名 吉川 雄樹

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、アルギニンを基質として一酸化窒素 (NO) を合成する NO 合成酵素 (NOS) 様活性を有し、過酸化水素に応答して NOS 様活性依存的に NO を合成する。しかし、酵母のゲノム上にはヒトなどで発見され、よく解析されている哺乳類型 NOS のオルソログがないため、酵母における NOS 様活性の制御機構や生理的意義については不明であった。一方、当研究室では近年、高温処理条件下において、酵母の細胞内でフラボタンパク質 Tah18 依存的な NOS 様活性により NO が合成され、細胞の高温ストレス耐性に寄与することを見出した。そこで本研究では、酵母における Tah18 依存的な NO 合成制御機構とその生理的意義について解析を行った。

まず、過酸化水素処理条件下での細胞内 NO レベルを評価したところ、哺乳類 NOS の阻害剤 (NAME) 処理や、Tah18 の発現抑制によって有意に低下したことから、過酸化水素処理においても Tah18 依存的な NOS 様活性が誘導されることが示された。続いて、Tah18 と相互作用する鉄硫黄クラスタータンパク質 Dre2 の発現を抑制した株で、継時的に NO レベルを測定したところ、Dre2 タンパク質量の低下に伴って、有意な上昇が観察された。また、Tah18 と Dre2 の過剰発現株を用いて Tah18-Dre2 複合体の挙動を生化学的に解析したところ、Tah18 は過酸化水素処理後、速やかに Dre2 と解離することが明らかになった。さらに、遊離型の Tah18 を減少させることを目的に、細胞内で Dre2 を過剰発現させると、過酸化水素処理条件下での NO レベルが有意に低下した。

一方、酵母は過酸化水素処理により細胞死が誘導されるため、Tah18 発現抑制株の細胞生存率を測定したところ、NAME 処理した場合と同様に、野生型株と比べて細胞生存率が有意に上昇した。以上の結果から、通常の条件下では Tah18 と Dre2 が相互作用することで NOS 様活性は抑制されているが、酸化ストレスに応答して Tah18 が Dre2 から解離することで NOS 様活性が発現し、合成された NO が細胞死を引き起こすと結論付けた。また、哺乳類型 NOS はレダクターゼドメインからオキシゲナーゼドメインに電子が伝達されて反応が進行するが、一次構造上レダクターゼドメインの配列しか有していない Tah18 は未知のオキシゲナーゼ様タンパク質に電子を伝達することで、NOS 様活性を発現していると考えられた。

最近、哺乳類における Dre2 のホモログである Ciapin 1 は Caspase 3 によって分解されることが報告された。そこで、過酸化水素処理条件下での Dre2 タンパク質量を解析したところ、酵母のメタカスパーゼ Mca1 の遺伝子破壊株では、野生型株で観察される Dre2 の分解が抑制された。また、過酸化水素存在下で Mca1 は Dre2 と相互作用することが示された。さらに、Mca1 遺伝子破壊株は野生型株に比べて、過酸化水素処理後の細胞内 NO レベルが低く、細胞生存率は高かった。以上の結果から、Mca1 が NO 合成の亢進を介して、過酸化水素処理による細胞死を促進する可能性が考えられた。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 吉川 雄樹

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のゲノム上には、ヒトでよく解析されている一酸化窒素合成酵素 (NOS) のオルソログがないため、NO の合成制御機構や生理的意義については不明であった。申請者は、酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 と複合体を形成する鉄硫黄クラスタータンパク質 Dre2 に着目し、Tah18 依存的な NOS 様活性の制御機構と生理的意義に関する解析を行い、以下に示す新たな知見や重要な結果を得た。

- 1) 高温処理と同様に、過酸化水素処理条件下において、Tah18 依存的な NOS 様活性が誘導され、NO が合成されることを見出した。
- 2) Dre2 は酵母における Tah18 依存的な NOS 様活性の抑制因子であり、過酸化水素処理後、速やかに Tah18 から解離することを明らかにした。
- 3) 遊離型の Tah18 を減少させることを目的に、細胞内で Dre2 を過剰発現させると、Tah18 依存的な NOS 様活性による NO 合成が抑制されることを示した。
- 4) Tah18 依存的な NOS 様活性を抑制することで、過酸化水素処理により誘導される細胞死が阻害されることを明らかにした。
- 5) 過酸化水素処理条件下において、メタカスパーゼ Mca1 が Dre2 と結合し、Dre2 の分解に関与すること、および NO 合成を亢進し、細胞死を誘導することを示した。

これらの結果から、申請者は通常の条件下では Tah18 に依存的な NOS 様活性は Dre2 との結合により抑制されているが、酸化的環境においては Dre2 から遊離した Tah18 が未知のオキシゲナーゼタンパク質に電子を伝達し、NOS 様活性が発現するという新規の NO 合成制御機構を提唱した。また、過酸化水素処理に伴って Tah18 依存的に合成される NO が細胞死を誘導することを明らかにした。一方、Mca1 が何らかの機構で過酸化水素処理条件下における NO 合成に関与することを見出した。これまで酵母などの真菌類では、NOS は同定されておらず、哺乳類型 NOS のオルソログも保存されていないため、NOS 様活性の制御機構についてはほとんど不明であった。本研究は、酵母における NO 合成制御機構の一端を明らかにしたものであり、真菌における NO 研究を進める上で重要な知見となり得る。また、Tah18 や Dre2 のホモログは哺乳類などの高等生物でも保存されており、多くの生物種において同様の機構が存在する可能性を示した点で、学術的に興味深い。さらに、酵母において Mca1 による細胞死誘導機構に NO が関与する可能性を初めて示した。カスパーゼ依存的な細胞死は多くの真核生物で見られる現象であり、酵母を用いてその分子機構や生理的意義に対する理解を深めることが期待される。

本論文は酵母に見出した NO 合成の制御機構と生理的役割を解析したものであり、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。