

論文内容の要旨

申請者氏名 Khairul Anam

一酸化窒素 (NO) は、様々な生物において多様な生命現象に関わるシグナル分子である。一方、過剰な NO 産生は nitrosative stress による細胞毒性を示すため、細胞は種々の方法で細胞内 NO 濃度を厳密に制御するとともに、nitrosative stress 耐性機構を備えている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、NO は高温ストレス耐性や細胞死誘導に関与することが明らかになっている。本研究では、酵母における新たな NO 耐性遺伝子を探索・同定し、その特性や NO 耐性機構を解析することを目的とした。

まず、細胞膜透過型 NO 特異的蛍光プローブ (DAF-FM DA) で処理した酵母細胞を、酸性の亜硝酸含有 (酸性亜硝酸) 培地で培養したところ、細胞内蛍光レベルが上昇した。また、NO 分解酵素をコードする *YHB1* の破壊株は、酸性亜硝酸培地において顕著な生育阻害を示したことから、酸性亜硝酸条件下で生成する NO が細胞毒性を示すことが明らかとなった。次に、酵母のゲノム DNA ライブラリーの多コピープラスミドを野生型株に導入し、酸性亜硝酸培地で生育が早いコロニーを取得した。各コロニー由来のプラスミドのシーケンス解析を行った結果、リボフラビン合成の初発酵素である GTP cyclohydrolase II (GTPCH2/Rib1p) をコードする *RIB1* 遺伝子を NO 耐性遺伝子候補として取得した。*RIB1* の過剰発現株および破壊株は、酸性亜硝酸に対してそれぞれ耐性と感受性を示した。また、*RIB1* 過剰発現株を NO ドナー (NOC-5) で処理した結果、野生型株に比べて細胞生存率が上昇し、細胞内 NO レベルは低下した。以上のことから、*RIB1* は細胞内 NO レベルを低下させて NO 耐性に寄与することが示唆された。

RIB1 依存的な NO 耐性機構を解析するため、既知の NO 耐性遺伝子破壊株で *RIB1* を過剰発現したところ、野生型株と同様に酸性亜硝酸耐性が上昇したことから、*RIB1* 依存的 NO 耐性機構には既知の NO 耐性遺伝子は関与しないと考えられた。また、活性中心変異型 Rib1p (Cys148Ser, Cys159Ser, Cys161Ser) を過剰発現させたところ、酸性亜硝酸に耐性を示さなかったため、*RIB1* 依存的 NO 耐性機構には Rib1p の活性が重要であることが明らかとなった。続いて、Rib1p の NO 分解活性を検証するため、DAF-FM と NOC-5 を組換え精製 Rib1p 存在下で反応させ、蛍光強度を測定した。その結果、精製 Rib1p による NO レベルの減少は観察されなかった。一方、精製 Rib1p を GTP と反応させた GTPCH2 反応液を同様の系に添加すると、NOC-5 添加による蛍光強度の上昇が阻害された。さらに、GTPCH2 反応の生成物である 2,5-diamino-6-(1-D-ribosylamino)pyrimidin-4(3H)-one 5'-phosphate (DARP) のピリミジン部位に相当する 2,4,5-triamino-6-hydroxy-pyrimidinine (DARPM) の添加により、蛍光強度の上昇が抑制された。以上のことから、Rib1p が生成する DARP が NO と反応して分解することで、NO 耐性に寄与することが示唆された。

やむを得ない事由 [図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Khairul Anam

一酸化窒素 (NO) は多様な生物において種々の生命現象に関わるシグナル分子であるが、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における NO 耐性機構については不明な点が多い。申請者は、遺伝学的スクリーニングにより NO 耐性に関与する新規遺伝子として *RIB1* を同定し、その特性を解析することで、以下に示す新たな知見や重要な結果を得た。

- 1) リボフラビン合成の初発酵素である GTP cyclohydrolase II (GTPCH2/Rib1p) をコードする *RIB1* 遺伝子の過剰発現が、NO ドナー処理時の酵母細胞内 NO 濃度を低下させるとともに、細胞生存率の低下を抑制することを見出した。
- 2) *RIB1* 遺伝子の破壊株は、NO を発生する酸性亜硝酸に対して感受性を示した。
- 3) 活性中心変異型 Rib1p (Cys148Ser, Cys159Ser, Cys161Ser) を過剰発現した株は、野生型 *RIB1* の過剰発現株と異なり、酸性亜硝酸に対する耐性を示さなかった。
- 4) 精製した組換え Rib1p は、NO ドナーによる NO 濃度の上昇を抑制しなかった。
- 5) 組換え Rib1p を GTP と反応させた GTPCH2 反応液が、NO ドナーによる NO 濃度の上昇を抑制することを見出した。
- 6) GTPCH2 の反応生成物である 2,5-diamino-6-(1-D-ribosylamino)pyrimidin-4(3H)-one 5'-phosphate (DARP) のピリミジン部位である 2,4,5-triamino-6-hydroxy-pyrimidinine (DARPM) の添加が、NO ドナーによる NO 濃度の上昇を阻害した。

これらの結果から、*RIB1* 遺伝子がコードする GTPCH2/Rib1p が GTP を DARP に変化し、DARP が NO を消去していると考えられた。*RIB1* 遺伝子が NO 耐性に関与するという報告はなく、DARP やその類縁化合物が NO と反応することも新たな知見である。従って、*RIB1* 遺伝子が NO 耐性に関与することを見出し、その機構を解析した申請者の研究は極めて意義深い。一方、酵母 *S. cerevisiae* は病原真菌のモデル生物として重要であるが、病原真菌は感染時に宿主由来の NO や関連活性分子により攻撃を受ける。*RIB1* 遺伝子は哺乳類には保存されていないことから、申請者が見出した酵母における新規な NO 耐性機構の重要分子である Rib1p は、新たな抗真菌薬の標的となり得る。さらに、申請者の結果から、DARP やそのピリミジン部位である DARPM が NO と直接反応することが強く示唆されたが、これは新たな NO 特異的なスカベンジャーや蛍光プローブを開発する端緒となる。今後、DARP や DARPM と NO との反応機構および反応生成物を明らかにすることで、これらの応用研究への貢献が期待される。

以上のように、本論文は酵母における新規な NO 耐性遺伝子 *RIB1* を見出し、その NO 耐性機構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。

やむを得ない事由 [図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()] により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】