

論文内容の要旨

申請者氏名 PHUONG THI HUONG

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質の折り畳みなどを司る細胞内小器官である。小胞体におけるタンパク質の折り畳みはシステイン残基間のジスルフィド結合を伴うことが多く、その過程は酸化的折り畳みと呼ばれる。小胞体の機能不全、すなわち小胞体ストレスは、小胞体への構造異常タンパク質蓄積を伴い、細胞にダメージを与える。小胞体ストレスに対する防衛応答が Unfolded protein response (UPR) であり、小胞体内在性分子シャペロン BiP などの発現が転写レベルで誘導される。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では、小胞体ストレスセンサータンパク質である Ire1 が、転写因子 Hac1 をコードする mRNA (HAC1 mRNA) をスプライシングにより成熟させることにより、UPR が引き起こされる。よって、HAC1 mRNA スプライシングは、出芽酵母細胞内の小胞体ストレスレベルの指標となる。

本研究では、培養時の分子状酸素の有無が、出芽酵母の小胞体ストレス状態にどのような影響を及ぼすかを検討した。出芽酵母を酸素欠乏環境にて培養するだけでは、HAC1 mRNA スプライシングは亢進されず、よって、動物細胞の場合と異なり、低酸素のみでは出芽酵母は小胞体ストレス状態にはならないと考えられる。一方、DTT や ツニカマイシンなど、小胞体におけるタンパク質の折り畳みを阻害する薬剤が惹起する HAC1 mRNA スプライシングは、低酸素状態によって増強された。他の真核生物と同様、酵母細胞においても、分子状酸素の最大の消費場所はミトコンドリアであるが (有気呼吸)、小胞体ストレス状態の酸素供給依存性は、ミトコンドリア有気呼吸が出来ない $\rho 0$ 変異株 (ミトコンドリア DNA 欠損株) においても認められた。すなわち、出芽酵母においては、ミトコンドリア有気呼吸に非依存的に、酸素供給が小胞体ストレスを緩和するのである。また、 $\rho 0$ 変異株においては、DTT によって酸素消費量が増大した。

そして、このような事象の原因の候補として、本研究では Ero1 を取り上げた。Ero1 は Protein disulfide isomerase を酸化し、小胞体内腔における多様なタンパク質の酸化的折り畳みを進めるタンパク質であるが、精製 Ero1 を用いた生化学的解析により、分子状酸素を最終電子受容体として、Ero1 は酸化カスケードを進めることが示されている。しかし、分子状酸素以外の電子受容体も知られており、*in vivo* ではどのような局面で分子状酸素が必要とされるのかについては、不明であった。本研究では Ero1 変異株などを用いた細胞レベルでの解析を進め、小胞体ストレス時には、Ero1 依存的に酸素消費が増大し (酸化的折り畳みが増大し)、それが小胞体ストレスの緩和に結びつくことを示す知見を得た。

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 PHUONG THI HUONG

出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)は通性嫌気性微生物に分類され、ミトコンドリアでの有気呼吸によってエネルギーを得る一方、グルコースが豊富な環境下では、エタノール発酵により ATP を産生することも可能である。基礎生物学系の多くの研究室では通気条件で出芽酵母を増殖させるのに対し、醸造は静置条件で行うことが多い。しかし、通気環境下と低酸素環境下で培養した場合の細胞の状態の差異については、未だに精査されておらず、本研究はそれにアプローチするものである。本研究の第一の発見は、低酸素条件下では、小胞体ストレスが増強されることである。エタノールも小胞体ストレス誘発機能を有しており、それが低酸素状態にて増強されるという知見は、エタノール発酵という出芽酵母の産業利用局面における細胞のストレス耐性に際して、重要な示唆を与えるものとなろう。なお、ミトコンドリア DNA 欠損 $\rho 0$ 変異細胞においても同様の知見は認められ、酸素供給による小胞体ストレスの緩和が、ミトコンドリアにおける有気呼吸に因るものではないことが示された。

本研究ではさらに、小胞体ストレス時の酸素の消費が、小胞体内在性タンパク質 Ero1 に因ることを、強く示唆する知見を得ている。Ero1 は Protein disulfide isomerase を酸化し、小胞体内腔におけるタンパク質システイン残基ジスルフィド結合形成カスケードの起点となる。精製タンパク質を用いた In vitro 解析では、分子状酸素が Ero1 の電子受容体になり得ることが示されていたが、細胞内でそのような反応が起きるかどうかはこれまで不明であり、よって、本研究はミトコンドリア非依存的な小胞体による酸素消費、および、それが起きる局面を明確に示したものであると評価される。

なお、動物細胞においても、低酸素状態が小胞体ストレスを引き起こす（そして、悪化させる）ことが知られている。例えば、脳虚血による神経細胞死にも小胞体ストレスが関与するという知見もあり、酸素欠乏による小胞体ストレスは、臨床的にも重要なトピックであるが、そのメカニズムについては未だに決着がついていない。本研究にて理解が深まった「小胞体における酸素消費による小胞体ストレスの緩和」は、真菌類のみならず、動物細胞の生命現象についての理解を深めることにも貢献するであろう。

以上のように、本論文は小胞体ストレスと分子状酸素との関係について新たな知見をもたらし、ミトコンドリア呼吸以外での酸素の生理的意義についての理解を深め、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】