

論文内容の要旨

申請者氏名 示野 誠也

一酸化窒素 (NO) は、種々の生物の多様な生命現象に関わるシグナル分子であり、タンパク質システイン (Cys) 残基の翻訳後修飾などにより、その生理機能を発揮している。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 NO 耐性機構を有している。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、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 耐性機構について、Cys 残基の翻訳後修飾という観点から解析を行った。

まず、酵母の細胞抽出液を NO ドナーで処理し、プロテオーム解析を行ったところ、解糖系の酵素を含めた多くのタンパク質の S-ニトロソ (SNO) 化レベルが上昇した。一方、酸性の亜硝酸塩含有 (酸性亜硝酸) 培地を用いたニトロソ化ストレス (nitrosative stress) で酵母を処理したところ、細胞内の SNO 化レベルは変化しなかったが、S-グルタチオン (SGT) 化レベルが上昇することを免疫化学的手法により見出した。同様の条件で解糖系の酵素を解析したところ、酸性亜硝酸処理依存的に fructose-1,6-bisphosphate aldolase Fba1 が SGT 化修飾されることを明らかにした。また、Cys をセリン (Ser) で置換した Fba1 変異体を発現する酵母の解析により、Cys112 が SGT 化部位であることが示された。続いて、組換え Fba1 の酵素活性を測定したところ、酸化剤とグルタチオンを用いた SGT 化修飾処理により、野生型 Fba1 の酵素活性が低下した一方、Cys112 を Ser で置換した Fba1 (Cys112Ser-Fba1) の活性は低下しなかった。さらに、Fba1 の酵素活性は NO ドナーを用いた SNO 化修飾処理では変化しなかった。また、グルタレドキシシン Grx1 と SGT 化処理を行った組換え Fba1 を反応させたところ、Fba1 が脱 SGT 化され、酵素活性が回復することが明らかとなった。以上のことから、ニトロソ化ストレス条件下では、Fba1 の酵素活性が Cys112 の SGT 化修飾により可逆的に抑制されることが示された。

続いて、酵母細胞内の解糖系とペントースリン酸回路 (PPP) の代謝物量を測定したところ、酸性亜硝酸処理に依存して、Fba1 の基質 fructose-1,6-bisphosphate、PPP の代謝中間物 6-phosphogluconate、PPP で主に合成される NADPH が、野生型株において増加した。一方、Cys112Ser-Fba1 発現株ではこれらの代謝物量は変化しなかった。このことから、ニトロソ化ストレス条件下で PPP が亢進されることが示唆された。続いて、酸性亜硝酸処理条件下における細胞の生存率を測定したところ、Cys112Ser-Fba1 発現株は野生型株よりも低い生存率を示した。以上の結果から、また NADPH は NO 解毒酵素の電子供与体としても用いられることから、酵母はニトロソ化ストレスに応答して、Cys112 の SGT 化修飾を介して解糖系を阻害し、PPP を亢進することにより NADPH を合成し、NO ストレス耐性を獲得している可能性が示された。

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 示野 誠也

一酸化窒素 (NO) は種々の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が、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における NO 応答機構については不明な点が多い。申請者は、プロテオーム解析によりシステイン (Cys) 残基が翻訳後修飾を受けるタンパク質を網羅的に解析し、以下のような新たな知見を得た。

- 1) ニトロソ化ストレス (nitrosative stress) 条件下で、解糖系酵素である fructose-1,6-bisphosphate aldolase Fba1 が、112 番目のシステイン残基 (Cys112) において S-グルタチオン (SGT) 化修飾を受けることを見出した。
- 2) Cys112 の SGT 化修飾により、Fba1 の酵素活性が抑制されることを明らかにした。
- 3) グルタレドキシシン Grx1 は、SGT 化 Fba1 を脱 SGT 化し、SGT 化により低下した Fba1 の酵素活性を回復させることが分かった。
- 4) ニトロソ化ストレス条件下では、酵母の野生型株において Fba1 の基質 fructose-1,6-bisphosphate (FBP)、ペントースリン酸回路 (PPP) の代謝中間物 6-phosphogluconate (6PG)、PPP で主に合成される NADPH の細胞内含量がそれぞれ増加したが、Cys112 をセリン (Ser) に置換した Fba1 変異体 (Cys112Ser-Fba1) を発現する酵母では、これらの代謝物の増加が抑制されることが示された。
- 5) Fba1 変異体 (Cys112Ser-Fba1) を発現する酵母は、野生型株に比べて酸性亜硝酸処理後の細胞生存率が有意に低下することを明らかにした。

以上の結果から、ニトロソ化ストレス条件下では、Fba1 の酵素活性が SGT 化を介して低下することで解糖系が抑制されるとともに、PPP の亢進に伴って増加した NADPH が酵母の NO 耐性に寄与する可能性が示された。酵母の発酵生産過程においては、培地成分に用いる廃糖蜜に含まれる高濃度の亜硝酸イオンが、培養に伴う培地の酸性化によって NO に変換されることが知られている。また、酵母の近縁種である *Candida* 属などの病原性真菌は、感染時に宿主の免疫系に由来するニトロソ化ストレスに曝されるため、病原性真菌の NO 耐性は感染や病原性に重要である。本研究の成果は、産業酵母や病原性真菌の NO 耐性機構を解明する端緒となり、有用酵母の育種や抗真菌薬の探索に資することができる。また、SGT 化修飾依存的な代謝制御による NO 耐性機構はこれまで報告がなく、申請者が見出した知見は基礎・応用の両面で意義深い。

以上のように、本論文は SGT 化修飾という観点から酵母における新規な代謝制御による NO ストレス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】