

# 論文内容の要旨

申請者氏名 Eknikom Supapid

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り、タンパク質チロシン残基のニトロ化 (PTN) を含む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。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 応答機構について PTN 修飾とアミノ酸代謝という観点から解析を行った。

まず、酸性の亜硝酸塩含有 (酸性亜硝酸) 培地を用いて nitrosative stress を誘導することにより、酵母細胞内の PTN 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。同様の条件でプロテオーム解析を行ったところ、酸性亜硝酸処理によりピルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) Pdc1 を含む多くの解糖系酵素が PTN 修飾を受けることが示された。Pdc1 に関連する代謝物量を測定したところ、酸性亜硝酸処理により、Pdc1 の基質であるピルビン酸が増加し、Pdc1 の反応生成物から合成されるエタノールが減少することが明らかになった。また、PDC 活性およびエタノール合成を触媒するアルコール脱水素酵素 (ADH) 活性を測定したところ、酸性亜硝酸処理により、PDC 活性は低下したが、ADH 活性は変化しなかった。続いて、酸性亜硝酸処理を行った酵母から単離した Pdc1 を質量分析に供した結果、157 番目および 344 番目のチロシン残基 (Tyr157 および Tyr344) が PTN 修飾を受けることが判明した。また、精製した組換え Pdc1 を用い、NO ドナーによる PTN の誘導または部位特異的な PTN 修飾の導入を行うと、PDC 活性が Tyr157 および Tyr344 の PTN 修飾により抑制された。さらに、Tyr157 および Tyr344 のフェニルアラニンへの置換により PTN 修飾を受けない Pdc1 変異体を発現する酵母では、酸性亜硝酸処理に伴うエタノール合成の低下が抑制された。以上のことから、nitrosative stress 条件下では PDC 活性が Pdc1 の Tyr157 および Tyr344 の PTN 修飾により抑制され、その結果エタノール合成が阻害されることが示唆された。

一方、酸性亜硝酸処理条件下において細胞内アミノ酸含量を測定したところ、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 含量が顕著に増加した。さらに、酸性亜硝酸処理に伴う細胞生存率の低下は、GABA 添加により抑制された。GABA によるストレス耐性機構として GABA shunt 経路の関与が知られているが、GABA shunt 経路に必須の *UGA1* 遺伝子の破壊は酸性亜硝酸条件下での細胞生存率に影響しなかったのに対し、GABA 合成酵素をコードする *GAD1* 遺伝子の破壊は細胞生存率を低下させた。さらに、GABA の添加は nitrosative stress 耐性に寄与する既知の抗酸化系酵素遺伝子の発現量に影響を及ぼさなかった。以上のことから、酵母は nitrosative stress に応答して GABA 合成を活性化させ、未知の機構により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 Eknikom Supapid

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タンパク質チロシン残基ニトロ化 (PTN) 修飾を受けるタンパク質を網羅的に解析し、以下に示す新たな知見を得た。また、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 依存的な NO 耐性機構について、以下のような重要な結果を示した。

- 1) Nitrosative stress 条件下では、ピルビン酸脱炭酸酵素 Pdc1 をはじめ、解糖系酵素を含む多くのタンパク質が PTN 修飾を受けることを見出した。
- 2) Nitrosative stress 条件下では、Pdc1 の基質であるピルビン酸が増加し、Pdc1 の反応生成物から合成されるエタノールが減少することを明らかにした。
- 3) Nitrosative stress 条件下で PTN 修飾を受ける Pdc1 のアミノ酸残基として、157 番目および 344 番目のチロシン残基 (Tyr157 および Tyr344) を同定し、これらの PTN 修飾により Pdc1 活性が抑制されることを明らかにした。
- 4) Tyr157 および Tyr344 のフェニルアラニンへの置換により PTN 修飾を受けない Pdc1 変異体を発現する酵母は、nitrosative stress 条件下の野生型酵母で見られたエタノール生産性の低下が抑制されることを示した。
- 5) Nitrosative stress 条件下では、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) が酵母細胞内に蓄積すること、また GABA の添加が酵母の NO 耐性を向上させることを見出した。
- 6) 既知の GABA 依存的ストレス耐性機構に関与する GABA shunt に必須の *UGA1* 遺伝子を破壊しても酵母の NO 耐性には影響しないが、GABA 合成に必須の *GAD1* 遺伝子の破壊は NO 耐性を低下させることを明らかにした。

以上の結果から、PDC 活性が Pdc1 の PTN 修飾により阻害されることにより、酵母のエタノール合成が抑制されることが明らかになった。酵母の発酵生産過程においては、培養に伴う培地の酸性化と廃糖蜜 (モラセス) のような培地成分に含まれる亜硝酸イオンから、NO が発生することが知られている。そのため、本研究の成果は、実際の発酵生産過程において酵母の発酵力が制限される現象の分子機構を解明する端緒となる結果である。また、GABA shunt とは異なる GABA 依存的な NO ストレス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・応用の両面で極めて意義深い。

以上のように、本論文は、PTN 修飾および GABA 合成という観点から酵母における新規な NO 応答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】