

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	西本 琢登
学位授与の日付	平成27年8月31日	
論文名	酵母の放射線曝露による細胞内酸化応答に対する抗酸化因子の機能	
論文審査委員	主査	片岡 道彦
	副査	山地 亮一
	副査	阪本 龍司
	副査	岸田 正夫
	副査	古田 雅一

論文要旨

【序章】

近年、放射線は医療・食品分野において殺滅菌に用いられていることから、放射線の細胞へのストレス作用および致死機構の解明は重要な課題である。放射線照射が細胞に与える影響には、放射線のエネルギーがDNA分子に直接吸収されて生じる励起・電離によるDNA鎖の切断損傷（直接作用）と細胞質内の水分子に放射線のエネルギーが吸収されて励起分解し、生成する活性酸素種（ROS）による生体分子の酸化損傷（間接作用）の2つの異なる作用が存在する。そのために放射線の作用機序については両作用の違いを考慮した詳細な解析が必要である。真核生物のモデル生物として研究されてきたパン酵母、*Saccharomyces cerevisiae*についてはこれまでに酸化や熱など様々なストレスに対する細胞応答解析が行われており、多くの関連報告が存在する。本研究では、放射線曝露の間接作用で発生するROSに対して*S. cerevisiae*では抗酸化機構が機能すると予想した。そして、その代表的な因子として抗

酸化酵素カタラーゼ及び抗酸化物質トレハロースに着目し、*S. cerevisiae*に⁶⁰Coガンマ線を照射した時の細胞内のカタラーゼ活性とトレハロース蓄積の動態を解析し、放射線曝露時のカタラーゼとトレハロースの機能を解明することを目的とした。

【1】放射線曝露に対する細胞応答におけるカタラーゼの重要性

*S. cerevisiae*に対する放射線照射に抗酸化酵素カタラーゼがどのような影響を及ぼすのか、カタラーゼ欠損株を用いて解析した。カタラーゼはROSの1つである過酸化水素を分解、無毒化する酵素で、*S. cerevisiae*には2種類の細胞内カタラーゼ（ペルオキシソームカタラーゼ：CTAと細胞質カタラーゼ：CTT）が存在する。これらのカタラーゼ遺伝子をそれぞれ1種欠いた欠損株 $\Delta acta$ および Δctt に加えて、CTT遺伝子を Δctt に組み込みCTTを恒常的に生産する $\Delta T+T$ を用いて、放射線に対する細胞応答を野生株と比較・解析した。まず、対数増殖後期まで培養したそれぞれの菌体中のカタラーゼ活性を測定したところ、野生株と比較して Δctt のみが著しく低い値を示した。一方、 $\Delta acta$ と $\Delta T+T$ は野生株の2倍以上の値を示した。また、放射線曝露に対する生残率は野生株と比較して Δctt のみ著しく低下が認められ、 $\Delta acta$ と野生株は同程度の値を示した。 $\Delta T+T$ の生残率は2 kGy以上では野生株と同程度であったが、0.5-1 kGyでは Δctt と同程度であった。カタラーゼ活性と放射線曝露後の生残率の相関からカタラーゼが放射線に対する防護機能に関係していることが示唆された。しかし、 $\Delta T+T$ においてはカタラーゼ活性が野生株よりも高いにもかかわらず、低線量曝露の際の生残率が低かったことからカタラーゼ以外の要因も放射線に対する防護機能に影響を与えていることが考えられた。また、カタラーゼが放射線に対する防護機能に関係しているならば、放射線曝露によってカタラーゼが誘導される可能性があると考え、放射線曝露後のカタラーゼ活性の誘導の有無を調べた。その結果、 $\Delta acta$ 以外の株は0.5-1 kGyの低線量でのカタラーゼ活性の誘導が認められた。また、野生株と各カタラーゼ欠損株を対数増殖後期まで培養し、抽出した粗酵素に放射線を照射した後のカタラーゼ活性を測定したところ、すべての株でカタラーゼ活性の低下が認められた。加えて、カタラーゼ遺伝子発現量の解析でもCTA1は放射線曝露によって増加傾向にあるが、CTT1は減少傾向にあり、これらのことから放射線曝露においてCTAが誘導される可能性が示唆された。また、放射線曝露によるカタラーゼ活性の増

減は、放射線によるカタラーゼの失活と遺伝子発現の誘導によるカタラーゼの増加のバランスによって決定されることが示唆された。しかし、放射線照射によるカタラーゼ活性の上昇と放射線曝露後の生残率には相関が認められない。以上のことから、放射線曝露に対する細胞防護にはCTTが重要であることが示唆された。

【2】放射線曝露に対するカタラーゼとトレハロースの細胞防護における関係性について

前章でカタラーゼが放射線曝露に対する防護機能と関係することが示されたが、カタラーゼ以外にも放射線曝露に対する*S. cerevisiae*の生残率に影響を及ぼす要因が存在することが示唆された。そこでカタラーゼ以外の抗酸化物質としてトレハロースに注目した。トレハロースの細胞内への蓄積はHeat Shock (HS)で誘導されることが知られており、酸化ストレスの防護に寄与することが知られている。トレハロース合成酵素（トレハロース-6-リン酸シンターゼ）欠損株 $\Delta tps1$ を用いて放射線曝露に対するトレハロースの影響を解析した。また、これまでにカタラーゼが抗酸化物質であるグルタチオンと協調してROSからの細胞防護を行うという報告があるため、同様の関係性がカタラーゼとトレハロースについても認められるかについても検証した。まず、前章で使用した変異株に加えて両カタラーゼ欠損株 $\Delta acta-ctt$ と $\Delta tps1$ についてもカタラーゼ活性の測定を行った。その結果、予想通り $\Delta acta-ctt$ にはカタラーゼ活性が認められなかったが、 $\Delta tps1$ では野生株の約2倍の活性が認められた。次にこれら全ての株でトレハロース含量を測定すると、カタラーゼの遺伝子を1つあるいは両方欠損した $\Delta acta$ 、 Δctt および $\Delta acta-ctt$ は、野生株の約2倍のトレハロースの蓄積を示した。トレハロース蓄積量の増加が野生株よりもカタラーゼ活性が高い $\Delta acta$ にも認められたため、カタラーゼ活性の低下よりもカタラーゼ遺伝子の欠失そのものがトレハロースの蓄積を誘導することが示唆された。前章で使用した変異株に加えて $\Delta tps1$ と両カタラーゼ欠損株 $\Delta acta-ctt$ についても放射線曝露後の生残率の測定を行った。その結果、 $\Delta tps1$ は4 kGyを除いて野生株と同程度の生残率を示したが、4 kGyでは Δctt と同程度であった。また、 $\Delta acta-ctt$ は最も低い生残率を示した。このことから放射線曝露からの細胞の防護にはトレハロースよりもカタラーゼの方が重要であることが示唆される。しかし、 $\Delta tps1$ はカタラーゼ活性が高いにもかかわらず、4 kGyでの生残率が野生株よりも著

しく低く、 Δctt と同程度だった。これまでに一定以上のトレハロースを蓄積していないと強い酸化ストレスに対する抵抗性が低下するという報告があるため、トレハロースも高線量の放射線曝露に対する防護に寄与していると考えられる。これらの株のROSに対する耐性を確認するため過酸化水素曝露後の生残率を測定したところ、 Δctt および $\Delta\text{cta-ctt}$ では著しく低く、 Δcta は野生株と同程度、 Δtps1 は野生株よりわずかに低い値となった。 Δctt と $\Delta\text{cta-ctt}$ の過酸化水素曝露後の生残率に差が認められなかったことから、細胞外部からの過酸化水素ストレスに対しては細胞質内カタラーゼであるCTTが主な防御を担うことが示された。また、 Δcta は野生株と比較してカタラーゼ活性とトレハロース蓄積量ともに高い値を示しているが、放射線曝露後も両株の生残率に差は認められなかったことから、一定量以上のカタラーゼ活性やトレハロースの蓄積があったとしても生残率が向上することは無いことが示された。また、 Δtps1 の生残率は、過酸化水素曝露後で野生株より低くなり、4 kGyの放射線曝露後では Δctt と同程度まで減少することから、放射線曝露や酸化ストレスに対して抵抗性を示すためには十分量のトレハロースの蓄積が必要であると考えられる。以上の結果から、放射線曝露に対する細胞防御を主に担うのはCTTであるが、細胞内に必要量のトレハロースが蓄積していないと生残率に影響を与えることが示唆された。

【まとめ】

本研究により放射線曝露に対して Δctt のみ生残率が低く、放射線照射によって誘導されるCTAは生残率に影響を与えないことから、*S. cerevisiae*において放射線曝露に対する防護的役割を主に担うのはCTTであることが明らかになった。これは過酸化水素処理による強い酸化ストレスを与えた場合にも認められた。また、十分量のトレハロースが蓄積していないと4 kGyという高線量の放射線曝露や過酸化水素曝露に対する生残率が減少することから一定程度以上の酸化ストレスに対する防護にはトレハロースもまた影響を及ぼすことが示唆された。また、トレハロースを蓄積出来ないTPSI遺伝子欠失株ではカタラーゼ活性が上昇し、カタラーゼ遺伝子を欠損した株では逆にトレハロースの蓄積量が増加することから、カタラーゼの活性化とトレハロースの蓄積が互いに影響し合っているという現象が酵母で初めて認められた。

審査結果の要旨

近年、放射線は医療・食品分野等においてその重要性を増していることから、放射線が細胞に及ぼす影響を解明することは非常に重要な課題となっている。放射線照射が細胞に与える影響としては、放射線がDNA鎖等の生体分子に直接損傷を与える作用（直接作用）と、細胞内の水分子に放射線のエネルギーが吸収され生じる活性酸素種（ROS）による生体分子に対する酸化損傷作用（間接作用）の2つの異なる作用が存在する。両作用ともに最終的に生体分子の損傷に至るが、間接作用に関しては発生したROSに対する防御機構が働く可能性がある。したがって、放射線が細胞に及ぼす影響を解明する上で、放射線照射時の間接作用による細胞内酸化に対する抗酸化因子の機能を明らかにすることは意義深いと考えられる。パン酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）は真核生物のモデル生物としてこれまで数多くの研究がなされており、酸化や熱といった様々なストレスに対する細胞内応答解析が行われてきた。本研究は、*S. cerevisiae*への放射線（⁶⁰Coガンマ線）曝露によって生じる細胞内ROSに対する防御機構を、細胞内での抗酸化酵素カタラーゼ及び抗酸化物質トレハロースの動態を中心に解析することで明らかにした。

第1章では、放射線曝露に対する細胞内応答でのカタラーゼの重要性について検証した。カタラーゼはROSの1つである過酸化水素を分解・無毒化する酵素であるが、*S. cerevisiae*には2種類の細胞内カタラーゼ（ペルオキシソームカタラーゼA（Cta）および細胞質カタラーゼT（Ctt））が存在する。各カタラーゼ遺伝子の欠損株等を用いた検討により、放射線曝露に対してCtt遺伝子欠損株の生残率が著しく低下することが明らかとなった。一方、Ctaに関しては、放射線曝露によって遺伝子発現量の増加が認められたが、Cta遺伝子欠損による放射線曝露後の生残率への影響は認められなかった。これらの結果から、放射線曝露時のROS除去において2種のカタラーゼのうちCttが重要な役割を担っていることが示唆された。

第2章では、放射線曝露後の生残率に影響を及ぼすカタラーゼ以外の因子として、トレハロースの細胞内蓄積の影響について解析した。トレハロースは、*S. cerevisiae*において熱ショックにより細胞内蓄積が誘導される物質で、抗酸化物質の1つとしても知られている。そこで、熱ショックによりトレハロース蓄積を誘導した細胞やトレハロース合成酵素遺伝子*TPS1*の欠損株を用いて、放射線曝露後の影響を解析した。その結果、トレハロースの蓄積は放射線曝露後の生残率を著しく上昇させ、細胞内酸化度やDNA二重鎖切断頻度を大幅に低減することが確認

できた。放射線曝露によるトレハロース蓄積の誘導効果は認められなかったが、トレハロースの蓄積が放射線曝露によって生じる損傷から細胞を防護する作用があることが示された。

これまでに、*S. cerevisiae*においてカタラーゼと抗酸化物質であるグルタチオンがROSからの細胞防護を協調的に行うことが報告されていた。そこで第3章では、*S. cerevisiae*の放射線曝露に対する細胞防護に効果が認められたカタラーゼおよびトレハロースについて、細胞防護における関係性がどのようになっているかを検証した。その結果、トレハロースを蓄積できない*TPS1*欠損株でカタラーゼ活性が上昇することが確認されるとともに、2種のカタラーゼ遺伝子のうち1つあるいは両方を欠損した株においてはカタラーゼ活性の強弱に関わらず、著しく高いトレハロースの蓄積が認められた。これらの結果から、カタラーゼとトレハロースは協調して放射線曝露による細胞損傷からの防護を行っていることが示された。また、これらの遺伝子欠損株に対する放射線や過酸化水素曝露後の生残率を比較した結果、Cttの欠損が最も致命的な影響を与えることが示された。

本研究では、*S. cerevisiae*に対する放射線曝露の間接作用による細胞損傷からの防護において、2種の細胞内カタラーゼのうちCttが重要な役割を果たしていることが初めて明らかにされた。さらに、カタラーゼはトレハロースと協調的に働くことで、放射線曝露で生じる細胞損傷からの防護を行っていることも明らかにされた。これらの成果は、真核生物細胞に対する放射線曝露の直接的・間接的な影響を解析していく上で、新たな知見を与えるものであり、微生物生理学、放射線生物学の分野に大きく貢献するものである。よって、最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。