

微生物のストレス応答における情報伝達の解明とその利用 —酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の酸化ストレスに対する ALD5 遺伝子の役割—

栗田 修*

Role of *ALD5* gene for oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*

by Osamu KURITA

Mitochondrial aldehyde dehydrogenase ALD5 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the biosynthesis of mitochondrial electron transport chain and the *ald5* mutant is incompetent for respiration. With of the mutant, we examined the detoxication of H₂O₂ generating by fatty acid β -oxidation in peroxisome. The *ald5* mutant (AKD321), as well as 746 ρ^0 mutant, was more resistant to H₂O₂ stress than the wild type. However, overexpression of *MDH3* gene that was involved in the reoxidation of NADH during fatty acid β -oxidation caused a decrease in cell viability of AKD321 to H₂O₂ stress, while 746 ρ^0 mutant had no such effect. Intracellular H₂O₂ concentration increased approximately 4-fold in *MDH3* overexpressing *ald5* strain (MD3-AKD321), compared with AKD321. The peroxisomal catalase activity of MD3-AKD321 decreased by 83% to that of AKD321. And also, the overexpression of *MDH3* had only a weak effect in *MDH3* overexpressing 746 ρ^0 strain, decreasing by 14% to that of 746 ρ^0 mutant. The increased palmitoyl CoA oxidation by overexpression of *MDH3* gene was the same in both strains. Under conditions of *MDH3* overexpression, peroxisomal catalase (CTA1) appears to be a limiting factor to oxidative stress. These observations point to an important, as yet unidentified, role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALD5) to endogenous oxidative stress in peroxisome.

Key words: oxidative stress, aldehyde dehydrogenase, malate dehydrogenase, yeast

1. はじめに

好氣的に生育する細胞にとって、フリーラジカルや過酸化水素などの活性酸素種の除去は、細胞の構成成分を保護する上で重要である^{1), 2)}. 活性酸素種は、呼吸中のミトコンドリアにある電子伝達系における分子状酸素の不完全な還元による産物として生じる^{3), 4), 5)}. また、過酸化水素はペルオキシソームにおける脂肪酸の β 酸化の際にも生じる. この反応は補酵素 FAD が関与し、ミトコンドリアでの電子が直接酸素に転移する反応とは異なる. 生細胞は酸化障害を回避するために、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、及びグ

ルタチオンペルオキシダーゼなどの酵素を含むタンパク質の生合成を行っている^{6), 7)}. これまで、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の酸化ストレスに対する多くの研究は、ミトコンドリアに集中して行われてきたが、ペルオキシソームに対してはほとんど行われていなかった. 本研究では、ペルオキシソームでの脂肪酸の β 酸化を促進したときに、酵母細胞が如何に応答するかについて検討した.

酵母 *S. cerevisiae* において、ミトコンドリア局在のアルデヒド脱水素酵素 ALD5 はマイナーな酵素であり、ミトコンドリアの電子伝達系の生合成に関与する^{8), 9)}. *ald5* 変異株は、プチット変

* 生物食品グループ

異株とはミトコンドリア DNA が正常な点で異なるが、呼吸する能力が欠けている。本研究では、両株のペルオキシソームにおける酸化ストレスの応答の差異について検討した。ペルオキシソーム局在のリンゴ酸脱水素酵素 (MDH3) は Steffann らにより同定され¹⁰⁾、脂肪酸の β 酸化中に生じる NADH の再酸化に関与することが報告された¹¹⁾。このことから、ペルオキシソームでの酸化ストレスの影響を調べる方法として、MDH3 遺伝子の過剰発現を試みた。

酵母 *S. cerevisiae* には、二つのカタラーゼ；ペルオキシソーム局在のカタラーゼ A (CTA1) と、細胞質局在のカタラーゼ T (CTT1) がある¹²⁾。そのカタラーゼの二重変異株は、野生株及び単一変異株に比べて H_2O_2 に対して感受性を示した¹³⁾。しかしながら、CTA1 の発現は CTT1 とは対照的に、 H_2O_2 に対して影響を示さないことが報告されている¹⁴⁾。

本研究では、ペルオキシソーム局在の MDH3 遺伝子の過剰発現が、ペルオキシソーム由来のカタラーゼの活性に影響を与え、またその活性はミトコンドリア局在の ALD5 の存在に依存したことを報告する。

2. 実験方法

2. 1 酵母菌株及びプラスミド

本研究に使用した酵母菌株は The Yeast Genetic Stock Center から分譲された DBY 746 (MAT α *his3 leu2-3, 112 trp1-289 ura3-52*) を親株として用い、AKD321 株は前報で記述した DBY 746 株の ALD5 の遺伝子破壊によって作出した株である⁸⁾。プチット変異株 (ρ^0) はエチジウムブロマイド処理により分離した¹⁵⁾。AKD321 株及びプチット変異株は MDH3 遺伝子過剰発現プラスミド pRS426-MDH3 により形質転換した。プラスミド pRS426-MDH3 は、多コピー型ベクター pRS426 の *XhoI/SalI* 部位に MDH3 遺伝子をクローニングすることにより構築した。また、MDH3 遺伝子は DBY746 のゲノムを鋳型 DNA として PCR 法により、フォワードプライマーとして 5' -TTAGATTAGAGGGAAATAAAT TGCA-3' を、またリバースプライマーとして、5' -TCTCATGATTTTTTCGGT-3' を用いて増幅した。その PCR 増幅産物 3.8kb の断片を *XhoI* と *SalI* の制限酵素で処理し、pRS426 の *XhoI/SalI* 部位にク

ローニングした。酵母の形質転換は、酢酸リチウム法により行った¹⁶⁾。

2. 2 培地及び培養条件

酵母菌株は YPD 培地 (1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% glucose) 或いは適当なアミノ酸及び核酸を添加した YNB 培地 (0.67% yeast Nitrogen Base, 2% glucose) で培養した。固体培地は 2% の寒天の添加により作成した。生育度は 600nm の濁度をモニターすることにより測定した。

2. 3 過酸化水素処理

酵母細胞は 10^5 cells/ml の菌体密度で、YNB 培地に摂取し、約 10^7 cells/ml になるまで培養した後、集菌し、0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) に $OD_{600}=0.1$ となるように懸濁した。酵母細胞の死滅率の測定は、細胞懸濁液に対して最終濃度が 2 mM H_2O_2 となるように調製し、30°C、1 時間浸透しながら保持した。生菌数は適宜希釈した試料液を YPD 培地に塗布し、30°C 2 日間培養後のコロニー数より求めた。

2. 4 ペルオキシソーム画分の調製

ペルオキシソーム画分は Kapperli らの変法により調製した¹⁷⁾。対数後期まで培養した細胞を集菌し、1 mM DTT, 1 mM EDTA, 及び 1 M ソルビトールを含む 0.1 M トリシュー塩酸緩衝液 (pH8.0) (緩衝液 A) で洗浄した。細胞壁は緩衝液 A 中に 1mg/ml の濃度の Zymolyase100-T を加えて、30°C 1 時間酵素処理した。得られたスフェロプラストは 2 回緩衝液 A で洗浄し、1 mM DTT, 1 mM EDTA, 及び 0.25 M スクロースを含む 0.1 M トリシュー塩酸緩衝液 (pH8.0) に懸濁した後、超音波処理して破壊した。その懸濁液を 4000g, 10 分間遠心し、得られた上清液を細胞フリーの抽出液とした。細胞フリーの抽出液は 12,000g 15 分間遠心してミトコンドリア画分を取り除き、その上清液を 25,000g, 15 分間遠心して得られた上清液に対して、16 mM の $CaCl_2$ 濃度となるように固形 $CaCl_2$ を添加した。ペルオキシソーム画分は、15,000g, 15 分間遠心して集めた。沈殿物は 0.15 M KCl を含む 0.1 M トリシュー塩酸緩衝液 (pH8.0) で洗浄し、25,000g, 15 分間遠心した。その沈殿物 (ペルオキシソーム) は 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 及び 0.25 M スクロースを含む 0.1 M トリシュー塩酸緩衝液 (pH8.0) に懸濁し、酵素活性測定に用いた。

2. 5 過酸化水素の測定

粗酵素液中の過酸化水素濃度の決定に対し、酵母細胞は対数後期まで培養・集菌し、MSK 細胞ホモジナイザーを用いてガラスビーズにより細胞破碎した。そのホモジネートを 12,000g, 15 分間遠心し、その上清液を過酸化水素の測定に用いた。過酸化水素の定量は Rapoport らの方法により行った¹⁸⁾。粗酵素液の 10 μ l を 1ml の 0.1M KCl, 6% メタノール, 10U/ml スーパーオキシドジスムターゼ, 200U/ml カタラーゼを含む 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.2) に加えた。その反応物は 37°C, 20 分間インキュベートし、2 倍容の Nash 試薬を加えて反応を停止した。その反応混合物は分光蛍光光度計 FP-770 (日本分光製) により、励起波長 412 nm 及び蛍光波長 505 nm で蛍光強度を測定した。コントロールは、試料の蛍光強度より酵素スーパーオキシドジスムターゼとカタラーゼを除いたときの試料の蛍光強度を差し引いたときの値とした。

2. 6 酵素活性測定法

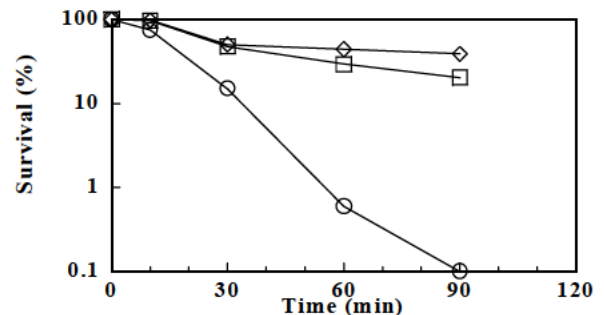
リンゴ酸脱水素酵素活性は、0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4), 0.12mM NADH, 及び 0.33 mM オキサロ酢酸を含む反応混合物の NADH 酸化の速度として測定した¹⁹⁾。酵素活性の 1U は、1 分間当たり 1 μ mol の NAD⁺を生ずる酵素量とした。カタラーゼ活性は、240nm での過酸化水素の分解度を測定することにより求めた¹⁹⁾。その酵素活性の 1U は、タンパク質 1mg 当たり 1 μ mol の過酸化水素が分解される量とした。脂肪酸 β 酸化活性は、0.175mM トリブスルホン酸 (pH8.5), 50 μ M パルミトイル-CoA 及び 50 μ M FAD を含む緩衝液にペルオキシソーム溶出液を添加して測定した。酸素消費量はクラーク型の酸素電極より測定し、時間に対する酸素濃度の傾きより、脂肪酸 β 酸化の活性を求めた。タンパク質の濃度は Lowry らの方法より、牛血清アルブミンを標準物質として決定した²⁰⁾。

3. 結果

図 1 (A) に示すように、ald5 変異株 (AKD321) は ρ^0 変異株と同様に、野生株よりも過酸化水素に対して抵抗性を示した。ald5 変異株は呼吸欠損であることから、これらの結果は以前報告された脂質過酸化物を用いての実験結果²¹⁾と同様に、呼吸機能の欠如が過酸化水素に対する抵抗性を増加さ

せたことを示唆する。生細胞に対する酸化ストレスの機構の解明には、外因性の適応・応答のみならず、細胞内に生ずる酸化ストレスの応答を明らかにすることが重要と考える。そこで、MDH3 遺伝子の過剰発現を用いて、ペルオキシソーム内で発生する過酸化水素に対する酵母の適応・応答について調べることにした。

(A)



(B)

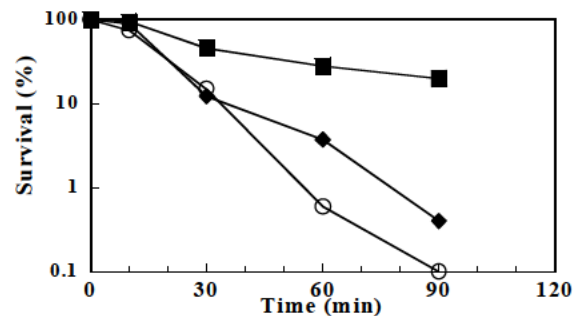


図 1 過酸化水素に対する感受性

(A) DBY746 (○), DBY746 ρ^0 (□), AKD321 (◇), (B) strains DBY746 (○), MD3-746 ρ^0 (■), 及び MD3-AKD321 (◆) の酵母菌株は YNB 培地で対数期まで増殖した後、2mM H₂O₂ で 30°C 一定時間処理をした。生存率は未処理の菌体に対する百分率で求めた。

MDH3 遺伝子の過剰発現は、746 ρ^0 変異株において過酸化水素に対する感受性に影響を与えなかった。一方、AKD321 株では生存率は著しく低下した (図 1 (B))。これらの結果は、MDH3 遺伝子を過剰発現した場合に、ミトコンドリアの呼吸機能とは別の調節が、過酸化水素の解毒作用に関与したことを意味する。

過酸化水素の細胞内の濃度が、MDH3 遺伝子の過剰発現により変化するかを検討した。746 ρ^0 及び

AKD321 株において、MDH3 遺伝子の過剰発現により、粗抽出液中の過酸化水素の濃度は約 1.4 倍及び 4 倍それぞれ上昇した (図 2)。この観察は、MDH3 遺伝子の過剰発現による脂肪酸の β 酸化が促進した結果と推定した。しかしながら、増加した過酸化水素の濃度は MD3-746 ρ^0 (14.2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ タンパク質) と MD3-AKD321 (44.3 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ タンパク質) で大きく異なっていた。その差は両株における過酸化水素の酸化ストレスに対する細胞の生存率の差に反映されたものと推定した。

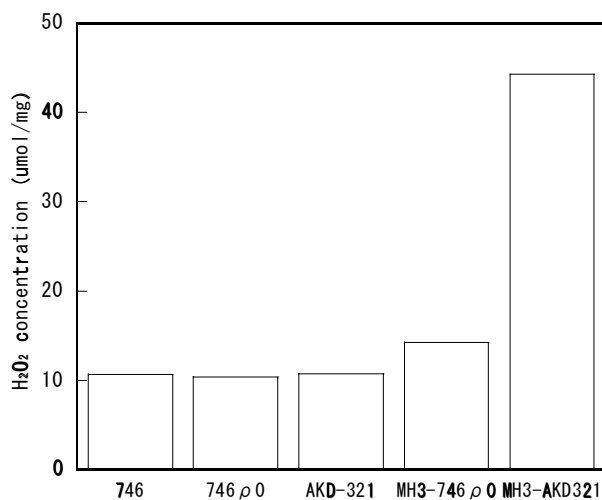


図 2 各酵母菌株における粗抽出液中の過酸化水素濃度

MD3-AKD321 において、細胞内の過酸化水素濃度が MDH3 遺伝子の発現により何故著しく増加したかを確かめるために、ペルオキシソーム中でのパルミトイル CoA の酸化とカタラーゼ活性を調べた。表 1 に示すように、MD3-AKD321 と MD3-746 ρ^0 の両株とも、それぞれに対する対照株に対して約 1.4 倍のパルミトイル CoA の酸化が上昇していた。一方、MD3-AKD321 のカタラーゼ活性は AKD321 の

それに対して 83%まで減少し、MD3-746 ρ^0 のその活性は 746 ρ^0 に対して 14%減少していた。この様に、MD3-AKD321 における過酸化水素に対する極度の感受性は、ペルオキシソーム局在のカタラーゼ活性の減少が寄与していると推定される。

酵母のペルオキシソームのカタラーゼ A はヘム含有の酵素である。ヘムはそれを含む酵素において、可逆的に酸素を保持することができる。それゆえ、MD3-AKD321 の過酸化水素ストレスに対する感受性増加がヘムの欠乏による結果としてのカタラーゼ活性の低下が起因しているかを検討した。図 3 に示すように、MD3-AKD321 は培地中のヘミンの存在により過酸化水素に対する抵抗性が増加した。一方、AKD321 ではヘミンの添加による影響は認められなかった。これらの結果は、MDH3 遺伝子の過剰発現によって引き起こされたペルオキシソーム局在のカタラーゼ活性の低下は、部分的ではあるが、ヘムの欠乏が寄与していると推定される。

4. 考察

前報の中で、ミトコンドリア局在のアルデヒド脱水素酵素 (ALD5) を欠損した酵母の変異株では、呼吸能がなく、シトクローム含量が少なくなっていることを明らかにした⁸⁾。ald5 変異株は野生株と同様の正常なシトクローム c を含むプチット変異株とは異なるが、外因性の過酸化水素に対してはその変異株と同様に抵抗性を示した。しかしながら、MDH3 遺伝子の過剰発現は ald5 変異株のその酸化ストレスに対する感受性を増加させた。プチット変異株では、MDH3 遺伝子の過剰発現による酸化ストレスの影響がなかったことから、MDH3 の過剰生産によって誘導された内因性の酸化ストレスに対しては、シトクローム c の含量がその適応に重要であると思われる。確かに、MDH3 遺伝子の

表 1. 各酵母菌株のペルオキシソーム抽出液中のリンゴ酸脱水素酵素、パルミトイル-CoA 酸化及びカタラーゼの酵素活性

| 菌株 | Malate dehydrogenase (mU/mg-p) | Palmitoyl-CoA oxidation ($\mu\text{M O}_2/\text{min}/\text{mg-p}$) | Catalase (mU/mg-p) |
|------------------|-----------------------------------|---|-----------------------|
| DBY746 | 30.2 | 0.81 | 2.58 |
| DBY746 ρ^0 | 28.1 | 0.73 | 3.47 |
| AKD321 | 26.0 | 0.80 | 2.95 |
| MD3-746 ρ^0 | 31.7 | 1.03 | 2.99 |
| MD3-AKD321 | 35.3 | 1.15 | 0.50 |

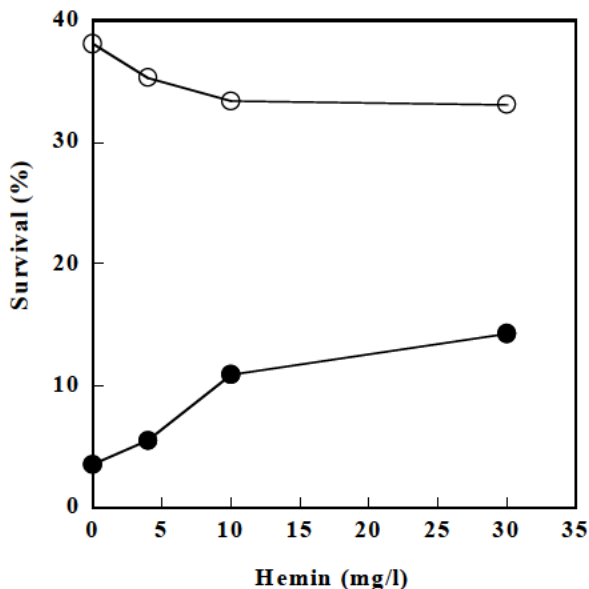


図3 AKD321(○)及びMD3-AKD321(●)における過酸化水素に対する感受性へのヘミンの効果

過剰発現は、ペルオキシソームにおける脂肪酸の β 酸化を誘導し、結果として、細胞内の過酸化水素濃度は上昇した。シトクロームcは電子伝達可能なタンパク質であり²²⁾, *ald5*変異株でのシトクロームc含量の減少は、電子伝達系を乱し、MDH3遺伝子の過剰発現といった内因性の酸化ストレスに対して、細胞死を誘導したものと推定される。

本研究では、内因性の酸化傷害に関して、酵母細胞の応答の機能を幾つか報告した。その機能の一つは、ペルオキシソーム局在のカタラーゼ(CTA1)がMDH3遺伝子の過剰発現によって引き起こされることである。MDH3遺伝子の過剰発現は、NAD/NADHに関するペルオキシソーム内の酸化還元バランスに重大な影響を及ぼした可能性がある。なぜなら、MDH3は脂肪酸の β 酸化で生ずるNADHの再酸化に関与しており、またペルオキシソーム膜は生体内でNAD(H)を透過することができないためである¹¹⁾。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae*において、細胞質局在のカタラーゼCTT1は外因性の過酸化水素に対して活性の増加が起こるのに対して、ペルオキシソーム局在のカタラーゼCTA1はその現象は認められない。CTA1遺伝子の誘導は定常期で起こり¹⁴⁾, CTA1及びCTT1を欠損した二重変異株は、野生株よりも定常期において過酸化水素に対して

感受性を示す¹³⁾。また、その二重変異株は高濃度の酸素存在下において寿命が短くなることが知られている²³⁾。本研究のMH3-AKD321株における顕著な寿命の短縮は、ペルオキシソーム局在のカタラーゼ活性の低下が関与していると推定した(データ提示なし)。このことから、酵母のCTA1は正常な一生を送るのに必要な酵素であるように思われる。

Grantらは、*S. cerevisiae*における過酸化水素のストレスに対してグルタチオンとカタラーゼの双方がその抵抗性に関与していると報告した²⁴⁾。グルタチオンジスルフィドはNADPHの存在下で、グルタチオンレダクターゼの作用により、グルタチオンから形成される。興味ある知見として、ミトコンドリア局在のALD5はその活性に対して、補酵素の利用上、NADよりむしろNADPを優先する⁹⁾。加えて、ペルオキシソーム局在のCTA1は、その活性に対してNADPHとヘムの結合を必要とする²⁵⁾。これらのことから、ALD5はシトクロームの構成成分であるヘムの生合成のみならず、CTA1の効果的な作用を実行するためのNADPHの供給に関与していると思われる。本研究での*ald5*変異株が、MDH3遺伝子の過剰発現によりカタラーゼ活性が低下した原因の一つには、ヘムの欠乏が考えられる。CTA1の発現はヘムの欠乏下で著しく低下する²⁶⁾。事実、MD3-AKD321において、ヘミンの存在下で過酸化水素に対する感受性は低下した。このことを考慮すると、NADPHは過酸化水素のストレス応答に対しての必須な成分であるように思われる。

Minardらは、NADPH依存の細胞内代謝は重要な抗酸化作用であると提唱した²⁷⁾。このことに関して、ミトコンドリアALD5によるNADPHの生成の意義を検討することは興味あることである。本研究では、MDH3とCTA1の関連性は明らかにできなかった。しかしながら、ペルオキシソーム内での内因性の酸化ストレスの評価が可能となり、今後ペルオキシソームとミトコンドリアの細胞内器官での酸化ストレスの制御経路の解明が期待されることである。最後に、さらなる酵母細胞における外因性及び内因性の酸化ストレスの研究が、活性酸素種の酸化傷害の機能的な反応経路の解明に対して期待される。

5. まとめ

酵母 *S. cerevisiae* の ALD5 遺伝子破壊株を用いて、ペルオキシソームにおける脂肪酸 β 酸化より生じる過酸化水素の解毒機構について検討した。

ald5 変異株は呼吸欠損株と同様に過酸化水素に対して抵抗性を示した。しかしながら、MDH3 遺伝子の増幅効果により、ald5 変異株ではその抵抗性は減少した。その原因としては、細胞内の過酸化水素濃度の上昇が確認された。また、ペルオキシソームにおけるカタラーゼ活性が低下していることも確認した。ALD5 は、呼吸鎖のシトクローム c の生合成に関与しており、また MDH3 遺伝子の過剰発現の際に、細胞内に蓄積する過酸化水素の分解を担うカタラーゼ活性の保持に要するヘムの生合成に対しても、ヘミン添加効果による MDH3 遺伝子過剰発現した ald5 変異株の過酸化水素に対する感受性が低下した実験結果より、関与していることが明らかとなった。

参考文献

- 1) Moradas-Ferreira P. et al.: "The molecular defences against reactive oxygen species in yeast." *Mol. Microbiol.* **19**, 651-658 (1996)
- 2) Ruis H. et al.: "(1995) Stress signaling in yeast." *Bioessays* **17**, 959-965 (1995)
- 3) Ames B. M. et al.: "Mitochondrial decay in aging." *Biochim. Biophys. Acta* **1271**, 165-170 (1995)
- 4) Nohl H. "Generation of superoxide radicals as byproducts of cellular respiration." *Ann. Biol. Clin.* **52**, 199-204 (1994)
- 5) Turrens J. F. "Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain." *Biosci. Rep.* **17**, 3-8 (1997)
- 6) Jamieson D.J. "Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **14**, 1511-1527(1998)
- 7) Yu B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* **74**, 139-162 (1994)
- 8) Kurita O. et al.: "Involvement of mitochondrial aldehyde dehydrogenase ALD5 in maintenance of the mitochondrial electron transport chain in *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Microbiol.Lett.* **181**, 281-287(1999)
- 9) Wang X. et al.: "Molecular cloning, characterization, and potential roles of cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase in ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Bacteriol.* **180**, 822-830 (1998)
- 10) Steffan J. S. et al.: "Isolation and characterization of the yeast gene encoding the MDH3 isozyme of malate dehydrogenase." *J. Biol. Chem.* **267**, 24708-24715 (1992)
- 11) Van Roermnd C. W.T. et al.: "The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under *in vivo* conditions." *EMBO J.* **14**, 3480-3486 (1995)
- 12) Klei I.J. et al.: "Growth of catalase A and catalase T deficient mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*." *Arch. Microbiol.* **153**, 513-517 (1990)
- 13) Izawa S. et al.: "Importance of catalase in the adaptative response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochem. J.* **320**, 61-67 (1996)
- 14) Gasch A. P. et al.: "Genomic expression programs in response of yeast cells to environmental changes." *Mol. Biol. Cell* **11**, 4241-4257 (2000)
- 15) Rickwood D. et al.: "Yeast mitochondria. In *Yeast, a Practical Approach*" (Campbell I and Duffus JH, eds), pp.185-254, IRL Press, Oxford (1988)
- 16) Gietz R. D. et al.: "Studies on the transformed of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure." *Yeast* **11**, 355-360 (1995)
- 17) Kappeli O. et al.: "Convenient procedure for the isolation of highly enriched cytochrome P-450 containing microsomal fraction from *Candida tropicalis*." *Anal. Biochem.* **126**, 179-182(1982)
- 18) Rapoport R. et al.: "A fluorimetric assay for hydrogen peroxide, suitable for

- NAD(P)H-dependent superoxide generating redox systems. ” *Anal. Biochem.* 218, 309-313 (1994)
- 19) Arnao M. B. et al.: “ Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reducing agent. ” *Biochim. Biophys. Acta* 1038, 85-89 (1990)
- 20) Lowry O.H. et al.: “Protein measurement with the Folin phenol reagent. ” *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
- 21) Evans M. V. et al.: “ Toxicity of linoleic acid hydroperoxide to *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of a respiration-related process for maximal sensitivity and adaptive response. ” *J. Bacteriol.* 180, 483-490 (1998)
- 22) Liu X. et al.: “Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. ” *Cell* 86, 147-157(1996)
- 23) Nestelbacher R. et al.: “The influence of oxygen toxicity on yeast mother cell-specific aging. ” *Exper. Gerontol.* 35, 63-70 (2000)
- 24) Grant C. M. et al.: “ (1998) Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. ” *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 253, 893-898 (1998)
- 25) Maté M. J. et al.: “ Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. ” *J. Mol. Biol.* 268,135-149(1999)
- 26) Skoneczny M. et al.: “ Oxygen and haem regulate the synthesis of peroxisomal proteins: catalase A, acyl-CoA oxidase and Pex1p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; the regulation of these proteins by oxygen is not mediated by haem. ” *Biochem. J.* 350, 313-319 (2000)
- 27) Minard K.I. et al.: “Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast. ” *Free Rad. Biol. & Med.* 31, 832-843 (2001)