

様 式 C - 7 - 1

## 平成 26 年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号 

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 基盤研究(A) 4. 研究期間 平成 25 年度～平成 27 年度
5. 課題番号 

2	5	2	5	2	0	6	5
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 酵母における一酸化窒素の生成機構と生理的役割の解明

## 7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
5 0 2 7 5 0 8 8	タカギ ヒロシ 高木 博史	バイオサイエンス研究科	教授

## 8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名
3 0 3 3 3 4 8 8	チバナ ヒロジ 知花 博治	千葉大学・真菌医学研究センター	准教授
8 0 1 2 5 9 2 1	カワモト ススム 川本 進	千葉大学・真菌医学研究センター	教授

## 9. 研究実績の概要

- 1) NOの生成機構の解析: Tah18とDre2それぞれにタグを融合した共過剰発現株を作製し、ブルダウン後のウェスタン解析により、高温や過酸化水素処理後のTah18-Dre2複合体の割合を非ストレス下のものと比較した。その結果、高温や過酸化水素処理後5分でTah18-Dre2複合体の割合が低下し、過酸化水素処理1時間でその割合はさらに減少した。この結果は「非ストレス下ではDre2はTah18と相互作用することでTah18依存的なNO合成酵素(NOS)活性を抑制しているが、ストレスにตอบสนองしたTah18-Dre2複合体の解離によって遊離したTah18がNOS活性に寄与する」という仮説を支持している。
- 2) NOの生理的役割の解析: 過酸化水素存在下では、Tah18タンパク質の過剰発現によって合成されるNOがアポトーシス様の細胞死を誘導していることが強く示唆された。
- 3) 病原真菌におけるNOの生成機構・生理的役割の解析と病原性への寄与の検証: *Candida glabrata*において、TAH18の発現抑制株と野生型株をマウスマクロファージに喂食させたところ、発現抑制株の方がマクロファージ内での増殖率は高かった。また、*Aspergillus fumigatus*におけるMpr1の機能解析のために、mpr1遺伝子破壊株および高発現株を作製して調べたところ、mpr1遺伝子破壊株はプロリンアナログ(AZC)に対する感受性が観察されたことから、Mpr1がAZCアセチルトランスフェラーゼとしての機能を有することが推測された。一方、これらの株は高温や酸化などのストレスに対して、野生型株と変わらない表現型を示した。

## 10. キーワード

(1) 一酸化窒素	(2) 酵母	(3) シグナル伝達	(4) 酸化ストレス耐性
(5)	(6)	(7)	(8)

## 11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、NOの生成機構について我々の仮説を支持する結果を得ることができた。ストレス下では遊離したTah18依存的に細胞保護に必要なレベルのNOが合成されるが、非ストレス下ではDre2がTah18に依存したNO合成酵素活性を抑制することで、NOが過剰に合成されないよう制御していると考えられる。また、高濃度の過酸化水素存在下ではTah18の過剰発現により合成されるNOがアポトーシス様細胞死を誘導していることが示唆され、NOのシグナル分子としての生理的役割の理解に繋がる結果が得られた。

病原真菌においても、NO合成関連遺伝子の破壊株や発現抑制株の構築と機能解析をH25年度に引き続き、更に進めることができた。H26年度には、*C. glabrata* においては、TAH18の病原性への関与が示唆される結果が得られ、また、*A. fumigatus* においては、Mpr1がアセチルトランスフェラーゼとしての機能を有することが示唆された。

## 12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

NOによるタンパク質Cys残基のS-ニトロソ化は、タンパク質機能の可逆的な制御に寄与していると考えられる。S-ニトロソ化の検出については、バイオスイッチ法がすでに確立されているが、我々はそれを応用した系でS-ニトロソ化タンパク質を探索・同定し、その生理機能を解析することで、NOシグナル伝達の解明を目指す。また、Tah18依存的な細胞死誘導機構の下流経路を明らかにすることを目的として、NOの標的タンパク質・標的遺伝子の探索を行う。また、NAME処理を用いた表現型解析から、Tah18依存的に細胞死が誘導される際、NO非依存的な細胞死も起こっている可能性が考えられる。この経路の解析も、並行して行う。

*C. glabrata* においては、TAH18の発現を抑制した株の方が、マクロファージ内での増殖は高くなった原因について検討する。また、*A. fumigatus* においては、各種遺伝子変異株におけるNO産生量の定量測定法を確立し、培地中の窒素源によるNO産生への影響検討および感受性評価を行う。更に、*Cryptococcus neoformans* においては、これまでに得られたmpr1遺伝子破壊株およびアルギニン代謝系遺伝子の破壊株について、表現型の解析およびマウスの感染モデルを用いて病原性を調べる。

## 13.研究発表(平成26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(2)件 うち査読付論文 計(2)件

著者名		論文標題			
Ryo Nasuno, Miho Aitoku, Yuki Manago, Akira Nishimura, Yu Sasano, Hiroshi Takagi		Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism in yeast through the activation of the transcription factor Mac1			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
PLoS One	有	9	2014	e113788	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1371/journal.pone.0113788					

著者名		論文標題			
高木博史, 那須野 亮		酵母に見出した新規な抗酸化酵素「N-アセチルトランスフェラーゼMpr1」			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
化学と生物	有	53	2015	148-155	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
なし					

(学会発表) 計(17)件 うち招待講演 計(3)件

発表者名		発表標題	
那須野 亮, 相徳珠帆, 高木博史		酵母における銅代謝関連転写因子Mac1を介したNOによる高温ストレス耐性機構の解析	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第14回日本NO学会学術集会	2014年05月16日～2014年05月17日	ホテルニューオータニ佐賀(佐賀県佐賀市)	

発表者名	発表標題	
吉川雄樹, 川原寛弘, 那須野 亮, 高木博史	酵母のNO合成に関するTah18の細胞死誘導メカニズムの解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
第14回日本NO学会学術集会	2014年05月16日～2014年05月17日	ホテルニューオータニ佐賀(佐賀県佐賀市)

発表者名	発表標題	
Hiroshi Takagi	The flavoprotein Tah18-dependent NO synthesis confers high-temperature stress tolerance on yeast cells	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 8th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide	2014年06月16日～2014年06月20日	Cleveland (USA)

発表者名	発表標題	
Ryo Nasuno, Miho Aitoku, Yuki Manago, Akira Nishimura, Hiroshi Takagi	Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism in yeast: the transcription factor Mac1-dependent activation of the superoxide dismutase Sod1	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 8th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide	2014年06月16日～2014年06月20日	Cleveland (USA)

発表者名	発表標題	
Rika Indri Astuti, Hiroshi Takagi	The role of nitric oxide in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe under oxidative stress conditions	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 8th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide	2014年06月16日～2014年06月20日	Cleveland (USA)

発表者名	発表標題	
高木博史	酵母に見出した一酸化窒素による抗酸化機構とその応用	
学会等名	発表年月日	発表場所
第186回酵母細胞研究会例会(招待講演)	2014年07月11日	キリンビール(株)横浜工場(神奈川県横浜市)

発表者名	発表標題	
那須野 亮, 相徳珠帆, 真砂裕紀, 西村 明, 高木博史	酵母における銅代謝関連転写因子Mac1を介したNOによる高温ストレス耐性機構の解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会	2014年09月01日～2014年09月03日	東京大学弥生講堂(東京都文京区)

発表者名	発表標題	
吉川雄樹, 那須野 亮, 川原寛弘, 高木博史	酵母に見出したTah18タンパク質依存的なNO生成と制御機構	
学会等名	発表年月日	発表場所
酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会	2014年09月01日～2014年09月03日	東京大学弥生講堂(東京都文京区)

発表者名	発表標題	
高木博史	ミトコンドリア内のアミノ酸代謝制御機構と産業酵母の育種への応用	
学会等名	発表年月日	発表場所
第66回日本生物工学会大会シンポジウム(招待講演)	2014年09月09日～2014年09月11日	札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

発表者名	発表標題	
佐藤裕士, 那須野 亮, 渡辺大輔, 高 博史	酵母を用いたフラボタンパク質Tah18依存的な細胞死誘導機構の解明	
学会等名	発表年月日	発表場所
2014年度日本農芸化学会関西支部大会(第486回講演会)	2014年09月20日	奈良先端科学技術大学院大学(奈良県生駒市)

発表者名	発表標題	
Hiroshi Takagi	Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and its application to industrial yeast	
学会等名	発表年月日	発表場所
31st International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY31)	2014年10月09日 ~ 2014年10月12日	Vipava (Slovenia)

発表者名	発表標題	
Hiroshi Takagi	Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and its application to baker's yeast	
学会等名	発表年月日	発表場所
International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies (FKMS 2014)(招待講演)	2014年10月30日 ~ 2014年10月31日	Seoul (South Korea)

発表者名	発表標題	
吉川雄樹, 那須野 亮, 渡辺大輔, 高木博史	酵母に見出したフラボタンパク質Tah18依存的なNO合成とその制御機構	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本農芸化学会関西支部例会(第487回講演会)	2014年12月06日	神戸大学(兵庫県神戸市)

発表者名		発表標題	
吉川雄樹, 那須野 亮, 渡辺大輔, 高木博史		酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18依存的なNO合成とその制御機構	
学会等名		発表年月日	発表場所
日本農芸化学会2015年度大会		2015年03月26日～2015年03月29日	岡山大学(岡山県岡山市)

発表者名		発表標題	
佐藤裕士, 那須野 亮, 渡辺大輔, 高木博史		酵母におけるフラボタンパク質Tah18依存的な細胞死誘導機構の解明	
学会等名		発表年月日	発表場所
日本農芸化学会2015年度大会		2015年03月26日～2015年03月29日	岡山大学(岡山県岡山市)

発表者名		発表標題	
Indri Astuti Rika, 渡辺大輔, 高木博史		分裂酵母における一酸化窒素シグナルとその生理的役割	
学会等名		発表年月日	発表場所
日本農芸化学会2015年度大会		2015年03月26日～2015年03月29日	岡山大学(岡山県岡山市)

発表者名		発表標題	
知花博治		病原性酵母Candida glabrataを用いた病原性解明と抗真菌薬開発に向けた取り組み	
学会等名		発表年月日	発表場所
日本マイコキシン学会第76回大会シンポジウム		2015年02月13日	千葉大学亥鼻キャンパス記念講堂(千葉県千葉市)

〔図書〕計(1)件

著者名	出版社		
Hiroshi Takagi, Hiroshi Kitagaki	Springer		
書名	発行年	総ページ数	
Stress Biology of Yeasts and Fungi: Application for Industrial Brewing and Fermentation	2   0   1   5	218 (23-42)	

## 14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

## 15. 備考

--