

様 式 C - 7 - 1

平成 2 8 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）

所属研究機関名称		奈良先端科学技術大学院大学
研究 代表者	部局	バイオサイエンス研究科
	職	教授
	氏名	高木 博史

1．研究種目名

基盤研究(A)(一般)

2．課題番号

16H02601

3．研究課題名

真菌における一酸化窒素の合成制御機構と生理機能の解明

4．研究期間

平成 2 8 年度～平成 3 0 年度

5．領域番号・区分

-

6．研究実績の概要

1) NOの合成機構とその制御機構：酵母*Saccharomyces cerevisiae*のジフラビンタンパク質Tah18と鉄硫黄クラスタータンパク質Dre2の相互作用について解析を行った。その結果、高濃度の過酸化水素処理によって、Tah18-Dre2複合体が解離し、酵母のメタカスパーゼMca1依存的にDre2タンパク質量が減少することが分かった。またMca1がNO合成に影響を及ぼす結果が得られ、Tah18依存的なNO合成の制御にMca1が関与する可能性が示された。高濃度の過酸化水素処理に伴うNO合成は細胞死を誘導することから、Dre2の挙動や機能がNO合成に伴う細胞死誘導に重要であることが示唆された。

2) NOおよびNO標的タンパク質の生理機能：酵母細胞内のニトロソ化タンパク質の探索、同定に必要なビオチンスイッチ法の検出感度が想定以上に低いことが判明し、実験系の確立には至らなかった。

3) 病原真菌におけるNOの合成制御機構と生理機能：カイコ幼虫のテトラサイクリン転写抑制系を用いて、NO代謝との関連が予想される*Candida glabrata*の遺伝子(*S. cerevisiae*のDRE2, YHB1, SFA1, NCP1, MET10, CYT1などのオルソログ)について、カイコ感染実験を行った。その結果、生育に必須とされる遺伝子の転写を抑制すると感染性が低下したことから、NO代謝との関連性が明確な遺伝子は見出せなかった。また、*Aspergillus fumigatus*においてNO関連遺伝子(MPR1オルソログmprA)の破壊株および過剰発現株を作製し、各種培地やストレス条件下での生育を評価した。その結果、硝酸を窒素源とした最少培地、YPD、ポテトデキストロース培地上で野生型株と変わらない生育を示し、高温や過酸化水素による酸化ストレスに対しても野生型株との違いは認められなかった。

7．キーワード

酵母 一酸化窒素 酸化ストレス シグナル伝達 病原真菌

8．現在までの進捗状況

区分	(2) おおむね順調に進展している。
理由	酵母におけるNOの合成機構とその制御機構の解析については、Dre2がTah18依存的なNO合成を阻害すること、酸化ストレスに応答して、Dre2がTah18から解離することを見出し、Dre2が酸化ストレスセンサーとして働き、NO合成を制御する機構を提唱した。また、NOは高温ストレス耐性に寄与する一方で、高濃度の過酸化水素存在下で細胞死を誘導することから、二面性（細胞保護・細胞毒性）が示唆された。一方で、酵母におけるNOおよびNO標的タンパク質の生理機能の解析については、細胞内のニトロソ化タンパク質の探索、同定に必要な実験手法（ビオチンスイッチ法）の確立が予想以上に難航している。具体的には、ニトロソ化を検出するビオチンスイッチ法の検出感度が想定以上に低いことが判明した。また、病原真菌におけるNOの合成制御機構と生理機能の解析については、 <i>Cryptococcus neoformans</i> については、アルギニン代謝系に着目し、各酵素(Mpr1, Arg7, Car1, Car2など)のオルソログ遺伝子の破壊株を用い、NO産生量、アルギニン含量、各種ストレスに対する表現型などの解析を試みている。

3 版

## 9. 今後の研究の推進方策

1) 酵母におけるNOの合成機構とその制御機構の解析: 酵母のオキシゲナーゼ様タンパク質を同定し、NO合成における分子機能を解析する。また、酵母を用いてカスパーゼ依存的な細胞死の分子機構や生理的意義に対する理解を深める。さらに、Tah18依存的なNO合成機構およびその普遍性の解明を目的に、Tah18の哺乳類ホモログNdor1、Dre2の哺乳類ホモログCiapinに着目し、Tah18-Dre2と同様にNO合成やその制御に関与しているかどうかを解析する。

2) 酵母におけるNOおよびNO標的タンパク質の生理機能の解析: ニトロソ化を検出するバイオンスイッチ法の検出感度を高める必要があることから、実験系の条件検討を詳細に行い、再現性のある実験系の確立を目指す。

3) 病原真菌におけるNOの合成制御機構と生理機能の解析: 引き続き、NO関連遺伝子の変異株や過剰発現株を用いて、細胞内NOが及ぼす影響とその制御機構を解析する。また、病原真菌のNO応答機構を明らかにするために、トランスクリプトーム解析を行う。

## 10. 研究発表(平成28年度の研究成果)

〔雑誌論文〕 計2件(うち査読付論文 2件/うち国際共著論文 1件/うちオープンアクセス 0件)

1. 著者名 Yuki Yoshikawa, Ryo Nasuno, Nobuhiro Kawahara, Akira Nishimura, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi	4. 巻 57
2. 論文標題 Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Nitric Oxide-Biology and Chemistry	6. 最初と最後の頁 85-91
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.niox.2016.04.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rika Indri Astuti, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi	4. 巻 100
2. 論文標題 Nitric oxide signaling in yeast	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 9483-9497
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-016-7827-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件(うち招待講演 5件/うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Hiroshi Takagi
2. 発表標題 Synthetic mechanism and physiological role of nitric oxide in yeast
3. 学会等名 The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ryo Nasuno, Miho Aitoku, Yuki Manago, Akira Nishimura, Yu Sasano, Hiroshi Takagi
2. 発表標題 Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism in yeast: the transcription factor Mac1-dependent activation of the superoxide dismutase Sod1
3. 学会等名 The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yuki Yoshikawa, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi
2. 発表標題 Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast
3. 学会等名 The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 吉川雄樹, 那須野 亮, 渡辺大輔, 高木博史
2. 発表標題 酵母に見出したフラボタンパク質Tah18依存的な一酸化窒素合成の制御機構
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第49回研究報告会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hiroshi Takagi
2. 発表標題 Stress tolerance mechanisms of baker's yeast mediated by proline/arginine metabolism
3. 学会等名 The 14th International Congress on Yeasts (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

3 版

1 . 発表者名 Ryo Nasuno, Miho Aitoku, Yuki Manago, Akira Nishimura, Hiroshi Takagi
2 . 発表標題 Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism in yeast through the activation of the transcription factor Mac1
3 . 学会等名 The 14th International Congress on Yeasts ( 国際学会 )
4 . 発表年 2016年

1 . 発表者名 Rika Indri Astuti, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi
2 . 発表標題 Nitric oxide signaling in oxidative stress response in the fission yeast
3 . 学会等名 The 14th International Congress on Yeasts ( 国際学会 )
4 . 発表年 2016年

1 . 発表者名 Yuki Yoshikawa, Ryo Nasuno, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi
2 . 発表標題 Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast
3 . 学会等名 The 14th International Congress on Yeasts ( 国際学会 )
4 . 発表年 2016年

1 . 発表者名 Khairul Anam, Ryo Nasuno, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi
2 . 発表標題 Molecular mechanism of nitric oxide detoxification in budding yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3 . 学会等名 The 14th International Congress on Yeasts ( 国際学会 )
4 . 発表年 2016年

1. 発表者名 Hiroshi Takagi
2. 発表標題 Novel stress-tolerant mechanisms of yeast mediated by proline-arginine metabolism and their applications to industrial yeasts
3. 学会等名 3rd International Seminar on Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 高木博史
2. 発表標題 製パン過程におけるパン酵母のストレス耐性機構：プロリン・アルギニン代謝と育種への応用
3. 学会等名 日本イースト工業会平成28年度技術懇談会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hiroshi Takagi
2. 発表標題 Synthetic Mechanism and Physiological Role of Nitric Oxide in Yeast
3. 学会等名 Gordon Research Conference “Nitric Oxide” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉川雄樹, 那須野 亮, 渡辺大輔, 高木博史
2. 発表標題 酵母に見出したフラボタンバク質Tah18依存的な一酸化窒素の合成制御機構と生理機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

【研究代表者・所属研究機関控】

日本学術振興会に紙媒体で提出する必要はありません。

3 版

〔図書〕 計0件

1 1 . 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件（うち出願0件 / うち取得0件）

1 2 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

1 3 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

-

1 4 . 備考

-