

様式 F-7-1

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（令和元年度）

所属研究機関名称	奈良先端科学技術大学院大学		機関番号	14603
研究代表者	部局	先端科学技術研究科		
	職	教授		
	氏名	高木 博史		

1. 研究種目名 挑戦的研究（萌芽）

2. 課題番号 19K22282

3. 研究課題名 酵母に見出したプロリン代謝酵素の多機能性の解明と細胞機能の向上への挑戦

4. 補助事業期間 令和元年度～令和3年度

## 5. 研究実績の概要

プロリンはワインの原料であるブドウ中に最も豊富に含まれるアミノ酸であるが、発酵中の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はプロリンをほとんど資化することができず、発酵後も多量に残存することが知られている。残存したプロリンは苦味の増加や酸味の減少を引き起こし、最終製品であるワインの酒質を低下させると考えられている。これまでの研究から、ブドウ中に含まれる資化効率の良い窒素源が nitrogen catabolite repression (NCR) を介して、資化効率の悪いプロリンの資化を抑制することが示唆されている。しかし、プロリン資化の抑制機構については未だ不明な点が多い。そこで、発酵環境下においてプロリンを効率良く資化できる菌株の創製を目的とし、プロリン資化抑制に関わる因子の同定とその作用機序の解析を行った。

まず、プロリンの細胞内取り込みを酵母の生育によって評価するために、プロリン要求性株を構築した。酵母のプロリン生合成経路はグルタミン酸とアルギニンからの二つの経路が存在するため、それぞれの経路に関与するグルタミルキナーゼ (Pro1) とオルニチンアミノトランスフェラーゼ (Car2) をコードする遺伝子を破壊した二重欠損株を作製した。このプロリン要求株を用いて、様々な窒素源を含む培地において生育試験を行ったところ、一般的なNCRの因子であるアンモニウムイオンとグルタミン酸はプロリンの資化をほとんど抑制せず、過去に報告のないアルギニンがプロリンの資化を完全に抑制することを見出した。また、プロリンの取り込みに関与するトランスポーター群 (Gap1, Gnp1, Put4) およびプロリンの分解に関与する酵素 (Put1, Put2) をコードする遺伝子の発現がアルギニンによって抑制されることが判明した。

## 6. キーワード

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 窒素源 プロリン資化 プロリントランスポーター アルギニン

## 7. 現までの進捗状況

区分 (1) 当初の計画以上に進展している。

理由 当初の計画に記載したプロリン代謝による細胞寿命の制御については、これまでの結果を中心に纏めた原著論文が *Microbial Cell* 誌に掲載された。

また、プロリン代謝の新しい生理機能に着目し、プロリン資化抑制に関わる因子の同定とその作用機序の解析を行ったところ、プロリンの取り込みに関与するトランスポーター群 (Gap1, Gnp1, Put4) およびプロリンの分解に関与する酵素 (Put1, Put2) をコードする遺伝子の発現がアルギニンによって抑制されることを新たに見出し、原著論文の投稿と特許出願を行うことができたため、当初の計画以上に進展していると判断した。

## 8. 今後の研究の推進方策

- 1) アルギニンによるプロリン資化抑制機構を解明するために、アルギニン存在下でもプロリン資化が可能な自然突然変異株を取得する。取得した変異株については、全ゲノム解析を通して、プロリン資化抑制機構に関与する遺伝子の同定を試みる。また、同定した遺伝子を解析することで、プロリン資化抑制の詳細な機構を明らかにする予定である。
- 2) Pro代謝酵素による分裂寿命の制御機構を解析するために、プロリン分解に関与する「プロリンオキシダーゼPut1」の分裂寿命に及ぼす影響を解析する。
- 3) 新規なアルギニン合成を介して細胞の抗酸化に関与する「N-アセチルトランスフェラーゼMpr1」が酵母の分裂寿命に及ぼす影響について、Mpr1をコードする遺伝子の過剰発現株、破壊株を用いて解析する。

## 9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

当初の計画で使用する消耗品費については、既存の試薬や実験器具を使用することで抑制できたため。また、当初口頭発表を予定していた日本農芸化学会がキャンセル（実際は誌上開催）になったため、旅費・学会参加費が発生しなかったため。次年度については、新たな研究を含めて研究全体を加速する目的でおもに消耗品費に使用する予定。

## 10. 研究発表（令和元年度の研究成果）

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

1. 著者名	Yukio Mukai, Yuka Kamei, Xu Liu, Shan Jiang, Yukiko Sugimoto, Noreen Suliani binti Mat Nanyan, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi	4. 卷	6
2. 論文標題	Proline metabolism regulates replicative lifespan in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年	2019年
3. 雑誌名	Microbial Cell	6. 最初と最後の頁	482-490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	10.15698/mic2019.10.694	査読の有無	有
オープンアクセス	オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著	-

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名	谷川 翼, 西村 明, 高木博史
2. 発表標題	酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> におけるアルギニンによるプロリン資化抑制機構の解析
3. 学会等名	日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年	2020年

〔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

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アルコール飲食品製造用組成物	発明者 西村 明, 谷川 翼, 高木博史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-041757	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計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

-