

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）

			機関番号	1 4 6 0 3
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	先端科学技術研究科		
	職	助教		
	氏名	那須野 亮		

1．研究種目名 若手研究

2．課題番号 19K16129

3．研究課題名 新規な網羅的定量解析系を用いた酵母の活性窒素種シグナルの総合的理解

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

タンパク質ニトロ化の網羅的定量解析系を構築するため、酵母を酸性条件下で亜硝酸処理したところ、酵母の全タンパク質のニトロ化レベルが顕著に亢進した。続いて、Fluorinated Carbon-tag (FCT) 法 (Proteomics, 15, 580-590, 2015) による解析を試みたが、ニトロ化タンパク質は同定できなかった。そこで、ニトロ化条件で処理したタンパク質抽出液をトリプシン消化し、直接LC-MS/MSに供したところ、複数のニトロ化タンパク質とニトロ化部位を同定した。また、同条件で処理した酵母の代謝物を解析したところ、多くの代謝物の細胞内含量が亜硝酸処理により変化したことから、タンパク質ニトロ化が代謝酵素の活性制御等に関与する可能性が示唆された。一方、タンパク質S-ニトロソ化を網羅的に解析するため、酵母タンパク質抽出液をNOドナーで処理し(in vitro)、ビオチンスイッチ法とLC-MS/MSに供したところ、数多くの代謝酵素がS-ニトロソ化されることが示唆された。続いて、既知および改良型のビオチンスイッチ法により、NOドナー処理した酵母から得たタンパク質抽出液 (in vivo) を解析したが、タンパク質S-ニトロソ化は検出されなかった一方、システイン残基に別の酸化的修飾が起こっていることが示唆された。このことから、酵母細胞内ではNOによってS-ニトロソ化とは異なる酸化的修飾が起きる可能性が示された。修飾タンパク質の定量方法については、解析プログラムの問題から15N-硫酸アンモニウムを用いた系では解析が難しいことが判明したため、アルギニン・リジン要求性株を構築し、安定同位体ラベルしたアルギニン・リジン含有培地で培養し、SILAC法により定量解析を行った。

6．キーワード

翻訳後修飾 ニトロ化 S-ニトロソ化

7．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	当初予定していた方法は機能しなかったものの、代替案として試みた手法により、ニトロ化タンパク質、S-ニトロソ化タンパク質の網羅的解析方法が確立できた。また、定量解析についても、代替案であるSILACにより可能となった。一方、複数のニトロ化タンパク質を同定し、その一部についてはすでに個別解析で再現性が取れている。

1 版

8. 今後の研究の推進方策

現状では、ニトロ化タンパク質の網羅的解析には成功したものの、網羅的かつ定量的な解析には至っていない。SILAC法により定量方法には問題ないが、全タンパク質中のニトロ化タンパク質量が少ないことが問題と考えられる。これは、これまでの解析では、ニトロ化タンパク質の濃縮を行わずに解析したためと考えられる。計画当初の解析方法であるFCT法では、ニトロ化タンパク質の濃縮も工程に含まれていたが、代替案ではこれが無い。したがって、ニトロチロシン抗体を用いた免疫沈降を組み合わせることで、ニトロ化タンパク質の濃縮を行い、網羅的定量解析を行う。また、既に同定されたニトロ化タンパク質については、in vitroでニトロ化タンパク質を調製して機能解析するとともに、変異型タンパク質の発現株の表現型評価から生理機能を解析する。S-ニトロ化タンパク質については、in vitroでのS-ニトロ化タンパク質の同定には成功したものの、in vivoではS-ニトロ化とはことなる酸化修飾が亢進することが示唆された。今後は、この酸化修飾が何かを明らかにするとともに、その生理機能や制御の作用機構を明らかにする。上記以外の部分については計画通りに遂行する予定である。

9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

次年度使用額が無いため、記入しない。

10. 研究発表（令和元年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Anam Khairul, Nasuno Ryo, Takagi Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 A Novel Mechanism for Nitrosative Stress Tolerance Dependent on GTP Cyclohydrolase II Activity Involved in Riboflavin Synthesis of Yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-62890-3	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 該当する

1. 著者名 Nasuno Ryo, Shino Seiya, Yoshikawa Yuki, Yoshioka Natsuko, Sato Yuichi, Kamiya Kohei, Takagi Hiroshi	4. 巻 598
2. 論文標題 Detection system of the intracellular nitric oxide in yeast by HPLC with a fluorescence detector	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 113707 ~ 113707
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2020.113707	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 Nishimura Akira, Nasuno Ryo, Yoshikawa Yuki, Jung Minkyung, Ida Tomoaki, Matsunaga Tetsuro, Morita Masanobu, Takagi Hiroshi, Motohashi Hozumi, Akaike Takaaki	4. 巻 294
2. 論文標題 Mitochondrial cysteinyl-tRNA synthetase is expressed via alternative transcriptional initiation regulated by energy metabolism in yeast cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13781 ~ 13788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.009203	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉岡奈津子, 那須野 亮, 高木博史
2. 発表標題 酵母Saccharomyces cerevisiaeにおける転写因子Fzf1による細胞内NOレベルの調節機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 那須野 亮, Anam Khairul, 高木博史
2. 発表標題 酵母におけるリボフラビン合成系酵素依存的な新しい一酸化窒素耐性機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川雄樹, 那須野 亮, 高木博史
2. 発表標題 酵母に見出した一酸化窒素合成に必要な補酵素の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

【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。

1 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

-