

様 式 C-7-1

令和元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	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

基盤研究(S)

2. 課題番号

19H05639

3. 研究課題名

真菌における一酸化窒素の統合的理解と育種・創薬への応用

4. 研究期間

令和元年度～令和5年度

5. 領域番号・区分

—

6. 研究実績の概要

1. 酵母におけるNOの分子機能の解明
酵母NOS様活性の責任分子と考えられる酸化酵素Oxyを同定する目的で、モノオキシゲナーゼ活性を有する酵母タンパク質を解析した。3種類のP450酵素の遺伝子破壊・発現抑制株を作製し、過酸化水素処理条件下におけるNO合成について、NO反応性蛍光プローブを用いたフローサイトメトリーにより評価した。その結果、ラノステロール-14α-デメチラーゼをコードするERG11の発現抑制株において、NO由来の蛍光が減少した。また、Erg11阻害剤を処理した場合も同様の現象が観察された。以上のことから、ERG11が酵母NOS様活性のOxyをコードする可能性が示唆された。酵母のNO耐性に寄与する新たな遺伝子を探索した結果、リボフラビン合成の初発酵素であるGTP cyclohydrolase II (GCH2) をコードするRIB1遺伝子の過剰発現が、NOドナー処理時の細胞内NO濃度を低下させるとともに、細胞生存率の低下を抑制することを見出し、RIB1を新規なNO耐性遺伝子として同定した。また、組換え酵素を用いた生化学的解析等の結果、GCH2の活性によって生成する代謝中間体 (DARP) がNOを消去することを明らかにした。

2. 糸状菌におけるNOの分子機能の解明
病原性糸状菌*A. fumigatus*を対象に、各種ストレス処理時におけるNO産生を解析した。その結果、植物や微生物が産生する天然抗菌物質（ファルネソール、チモール、ピオシアニン等）の処理に対して細胞内にNOが産生されることが明らかになった。麹菌*A. oryzae*の転写因子を対象に、NOドナーに対して生育が低下する株を探索した。その結果、エルゴステロール合成系の制御や低酸素応答に重要な転写因子、亜鉛ホメオスタシスやプロリン代謝への関与が予想される転写因子などが候補として見出された。

7. キーワード

一酸化窒素 酵母 糸状菌 合成制御機構 生理機能

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NOS様活性の重要因子であるOxyの候補として、ラノステロール-14α-デメチラーゼErg11を見出した。酵母のNO合成機構を明らかにすることは、本研究の重要課題であるのみならず、真菌におけるNOの生理機能の理解および新たな普遍的NO合成機構の存在という観点から、極めて重要である。また、酵母のNO耐性機構として見出したリボフラビン合成系酵素GCH2依存的な機構は学術的に極めて価値がある。また、微生物に特異的なNO耐性機構であり、抗生物質の薬剤標的として有望であることから、本研究の重要性をより高める成果である。糸状菌についても、抗菌物質処理時のNO産生について機能解析が進み、酵母で得られた知見に基づくNO合成機構に関わる各因子の解析に着手している。また、転写制御因子の網羅的探索系を確立し、NO応答に関与する転写制御因子を明らかにした。以上の理由により、おおむね順調に進展していると判断した。

4版

9. 今後の研究の推進方策

1. 酵母におけるNOの分子機能の解明
Oxy候補として同定したErg11を酵母からアフィニティータグ融合タンパク質として精製し、還元酵素として組換え精製Tah18を用いin vitroにてNO合成活性を解析する。また、Tah18、Dre2および本研究で同定するOxyの哺乳類におけるオルソログについて、精製した組換えタンパク質を用いたNOS活性測定や相互作用解析を行い、酵母に見出したNO合成制御機構について生物間保存性の有無を検証する。酵母や糸状菌ではsGCのオルソログが保存されていないため、NOの生理機能の発現にはタンパク質の翻訳後修飾が重要だと考えられる。そこで、NOの生理機能とその分子機構を解析するため、NO依存的に翻訳後修飾を受けるタンパク質をプロテオーム解析により網羅的に同定する。

2. 糸状菌におけるNOの分子機能の解明
糸状菌で見出した天然抗菌物質に応答したNO産生の分子機構およびその生理機能について、遺伝子破壊株を作製し、分子遺伝学的手法により迫るとともに、病原菌の感染実験を実施する。麹菌ライブラリーから見出したSrbAおよびAtrRの機能解析を進め、新たなNO耐性機構の解明を目指す。また、薬剤標的として有望な低酸素応答機構との関連性を重点的に検討する。

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 1件／うち国際共著論文 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akira Nishimura, Ryo Nasuno, Yuki Yoshikawa, Minkyung Jung, Tomoaki Ida, Tetsuro Matsunaga, Masanobu Morita, Hiroshi Takagi, Hozumi Motohashi, Takaaki Akaike	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

1. 著者名 榎尾俊介、高谷直樹	4. 巻 -
2. 論文標題 アスペルギルスのエピジェネティックな代謝制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 33-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 榎尾俊介、高谷直樹	4. 巻 -
2. 論文標題 カビのエピジェネティクスと環境適応	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 59-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 那須野 亮、示野誠也、吉岡奈津子、佐藤裕一、神谷紘平、高木博史
2. 発表標題 酵母における一酸化窒素合成の新しい解析法
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019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の合成制御機構とペントースリン酸回路の関与
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 示野誠也、吉川雄樹、那須野 亮、高木博史
2. 発表標題 酵母におけるS-ニトロソ化修飾を介したNOの生理機能
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩井のぞみ、吉岡奈津子、那須野 亮、高木博史
2. 発表標題 酵母細胞内の一酸化窒素濃度を制御する遺伝子の探索と機能解析
3. 学会等名 第37回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2019年

4版

1. 発表者名 治田昇吾、Supapid Eknikom、那須野 亮、高木博史
2. 発表標題 酵母におけるニトロ化タンパク質の同定・機能解析
3. 学会等名 第37回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 那須野 亮、示野誠也、吉岡奈津子、佐藤裕一、神谷紘平、高木博史
2. 発表標題 酵母におけるアルギニン依存的な一酸化窒素合成
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Supapid Eknikom, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi.
2. 発表標題 Identification and functional analysis of nitrated proteins in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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

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 吉岡奈津子、那須野 亮、高木博史
2. 発表標題 酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 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 西村 明、赤池孝章、高木博史
2. 発表標題 種横断的な活性パースルフィド産生経路とその生理的意義の解明
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

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

—