平成23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(B) 4. 研究期間 平成22年度～平成24年度
5. 課題番号

2	2	3	8	0	0	6	1
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 酵母のプロリン代謝中間体アセチル化酵素 Mpr1 による抗酸化機構の解明とその応用
7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
50275088	<small>タカギ</small> 高木 <small>ヒロシ</small> 博史	バイオサイエンス研究科	教授

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名
10273848	<small>ヨシダ</small> 吉田 <small>ノブユキ</small> 信行	バイオサイエンス研究科	助教
60395655	<small>オオツ</small> 大津 <small>イワオ</small> 厳生	バイオサイエンス研究科	助教

9. 研究実績の概要

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

Mpr1は高温や過酸化水素処理などの酸化ストレスで誘導され、プロリン代謝中間体（P5C/GSA）をN-アセチル化し、アルギニンおよび一酸化窒素の合成を促進することで、酵母に酸化ストレス耐性を付与すると考えられている。今年度は、Mpr1を介した抗酸化機構、特にP5C/GSAの毒性機序とMpr1による解毒機構の解明を目的に研究を実施した。

まず、P5C/GSA代謝に関与している遺伝子の各破壊株（*PUT1*, *PUT2*, *PRO3*, *CAR2*）を作製し、P5C/GSAの毒性を検討した。また、細胞内のROSの主たる発生源である呼吸鎖が関与している可能性を考慮し、呼吸欠損株（ ρ^0 株）も作製した。その結果、*PUT1*, *PUT2*, *PRO3*, *CAR2*を破壊してもP5C/GSAに対する感受性は変わらなかったが、 ρ^0 株はP5C/GSAに耐性を示すことが判明した。また、ROSレベルも ρ^0 株では上昇していないことが判明し、P5C/GSAが呼吸鎖の機能に依存して毒性を発揮することが示された。次に、ミトコンドリアからのROS発生と呼吸鎖阻害に対するP5C/GSAの直接的な影響を検討した。野生株から精製したミトコンドリアにP5Cを添加すると、無添加に比べてsuperoxide anionが著しく増加した。一方、反応液から呼吸基質（コハク酸）やミトコンドリアを除くと、superoxide anionは発生しなかった。さらに、コハク酸で呼吸鎖を活性化した後の酸素消費量がP5Cの濃度依存的に阻害された。

以上の結果から、P5C/GSAは直接的にミトコンドリア呼吸鎖を阻害し、ROSを発生させることが明らかになった。また、Mpr1はP5C/GSAをN-アセチル化し、アルギニン合成経路を亢進することで、一酸化窒素の生成に寄与するだけでなく、有毒なP5C/GSAが細胞内に蓄積しないようにして抗酸化能を発揮していると考えられた。

10. キーワード

(1) 酵母	(2) アセチル化酵素	(3) 酸化ストレス	(4) 活性酸素種
(5) アミノ酸代謝	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

下欄には、交付申請書に記載した「研究の目的」の達成度について、以下の区分により自己点検による評価を行い、その理由を簡潔に記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。
 <区分>①当初の計画以上に進展している。 ②おおむね順調に進展している。 ③やや遅れている。 ④遅れている。

(区分) ②おおむね順調に進展している
(理由) 本研究では、Mpr1 について生理機能の解明とその応用を目的に、1) Mpr1 を介した抗酸化機構の解明、2) 高機能型 Mpr1 の創製と酵母のストレス耐性への応用、3) 高等生物における Mpr1 の機能解析とその応用、に取り組んでいる。1) については、当初の計画をほぼ達成しており、科学的に価値の高い知見が数多く得られた。2) 3) については、Mpr1 の立体構造解析に必要な結晶が生成し始めているため、今後の進展が期待できる。

12. 今後の研究の推進方策

本研究課題の今後の推進方策について簡潔に記述すること。研究計画の変更あるいは研究を遂行する上での問題点があれば、その対応策なども記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

本研究では、Mpr1 について生理機能の解明とその応用を目的に、1) Mpr1 を介した抗酸化機構の解明 (ROS 制御の分子機構、NO による抗酸化機構など)、2) 高機能型 Mpr1 の創製と酵母のストレス耐性への応用、3) 高等生物における Mpr1 の機能解析とその応用、に取り組んでいる。1) については、概ね当初の計画を達成しており、今後、原著論文として成果の公表を行う。今後は、2) および3) の研究に特化する、特に Mpr1 の結晶構造解析を急ぎ、Mpr1 の触媒反応機構の解明、および分子設計に基づく高機能型 Mpr1 の創製と抗酸化能向上に取り組む。
--

13. 研究発表 (平成 23 年度の研究成果)

※ 「13. 研究発表」欄及び「14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況」欄において記入欄が不足する場合には、適宜記入欄を挿入し、それによりページ数が増加した場合は、左端を糊付けすること。

〔雑誌論文〕 計 (1) 件 うち査読付論文 計 (1) 件

著者名	論文標題						
Bach Thi Mai Hoa, Takao Hibi, Ryo Nasuno, Goh Matsuo, Yu Sasano and Hiroshi Takagi	Production of <i>N</i> -acetyl <i>cis</i> -4-hydroxy-L-proline by the yeast <i>N</i> -acetyltransferase Mpr1						
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁		
Journal of Bioscience and Bioengineering	有	印刷中	2	0	1	2	印刷中
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)							
印刷中							

〔学会発表〕 計 (7) 件 うち招待講演 計 (3) 件

発表者名	発表標題		
Hiroshi Takagi	Engineering of proline metabolic enzymes and its application to baker's yeast		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日独科学協力シンポジウム「有用化合物開発のためのバイオ触媒」(招待講演)	2011年4月26日	奈良先端科学技術大学院大学 (生駒市)	

発表者名	発表標題		
那須野 亮, 高木博史	酵母の酸化ストレス耐性に関与する <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼMpr1の構造機能解析		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第11回日本蛋白質科学会	2011年6月9日	ホテル阪急エキスポパーク (吹田市)	

発表者名	発表標題		
西村 明, 高木博史	出芽酵母における一酸化窒素合成とその生理的意義		
学会等名	発表年月日	発表場所	
酵母遺伝学フォーラム第44回研究報告会	2011年9月5日	九州大学医学部 (福岡市)	

発表者名	発表標題		
Hiroshi Takagi	A novel antioxidative mechanism mediated by proline/arginine in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
学会等名	発表年月日	発表場所	
The International Union of Microbiological Societies 2011 Congress: symposium 「Yeast, a front runner of applied microbiology and biotechnology」 (招待講演)	2011年9月7日	札幌コンベンションセンター (札幌市)	

発表者名	発表標題		
高木博史	酵母に見出した酸化ストレスで誘導される一酸化窒素生成に関与する新規酵素		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第84回日本生化学会大会シンポジウム「特殊環境下における微生物の潜在能力：酵素研究の新展開」(招待講演)	2011年9月24日	国立京都国際会館 (京都市)	

発表者名	発表標題		
那須野 亮, 高木博史	酵母の酸化ストレス耐性に関するN-アセチルトランスフェラーゼMpr1の構造機能解析		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第84回日本生化学会大会	2011年9月22日	国立京都国際会館 (京都市)	

発表者名	発表標題		
Bach Thi Mai Hoa, Takao Hibi, Kunita Kino and Hiroshi Takagi	Microbial production N-acetyl cis-4-hydroxy-L-proline		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第63回日本生物工学会大会	2011年9月27日	東京農工大学 (小金井市)	

【図書】計(1)件

著者名	出版社			
高木博史	シーエムシー出版			
	書名	発行年	総ページ数	
	酵母の発酵環境ストレス耐性機構の解析と実用酵母の育種への応用. 「発酵・醸造食品の最新技術と機能性II」	2011	10	

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

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

--