

平成23年度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

新学術領域研究

4. 研究期間

平成23年度～平成24年度

5. 課題番号

2

3

1

1

7

7

1

1

6. 研究課題名

酵母に見出した酸化ストレス下に生成する一酸化窒素の生理機能の解明

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	タカギ ヒロシ 高木 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

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。

研究代表者は、実験室酵母において高温培養や過酸化水素処理等の酸化ストレス下で、プロリンからアルギニン合成が亢進されること、増加したアルギニンからNOが生成し、細胞にストレス耐性を付与することを見出した。また、酵母のNO合成酵素（NOS）として、鉄硫黄クラスターへの電子の転移活性が報告されているTah18タンパク質を同定した。今年度は、NO合成に関与するTah18の特性を解析するとともに、NOの下流シグナル経路の解析を行った。また、実用パン酵母におけるNOの合成系およびその生理機能についても解析した。

まず、組換え酵素を用いて、Tah18のNOS活性に関するキネティクスを測定したところ、Tah18単独で哺乳類のNOSと同程度の値が得られた。次に、Tah18と相互作用するDre2タンパク質がNOS活性に及ぼす影響を調べたところ、Dre2の条件の破壊株では、細胞内のDre2発現量の減少に伴い、NOS活性が上昇することを見出した。これらの結果から、Dre2がTah18のNOS活性を負に制御している可能性が考えられた。

次に、非酵素的NOドナーで処理した細胞を用いてDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、銅代謝（還元、取込み、輸送）に関与する転写因子Mac1の制御下にある遺伝子群（CTR1, FRE1, FRE7等）の転写量が増加していた。また、NO処理後の細胞では、細胞内の銅含量や銅依存的superoxide dismutase（SOD）活性が有意に上昇していた。以上の結果から、NOがMac1の活性を制御し（ニトロソ化?）、銅依存的なSODの活性上昇を介して、酵母に酸化ストレス耐性を付与することが明らかになった。

さらに、プロリン・アルギニン代謝の鍵酵素（Pro1, Mpr1）の高機能型変異酵素を発現させることで、NO合成系を強化した実用パン酵母を作製し、製パンストレス下での発酵能を評価した。その結果、製パンストレス（乾燥、冷凍など）に応答して生成したNOが、ROSレベルの上昇を抑えることで、発酵力を向上させることが判明した。

10. キーワード

(1) 酵母	(2) 一酸化窒素	(3) 酸化ストレス	(4) 活性酸素種
(5) ニトロソ化	(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、酵母における NO の生理機能と下流シグナル経路の解明を目的に、1) ニトロソ化タンパク質の同定と抗酸化能との関連性解析 2) cGMP の検出とグアニル酸シクラーゼの探索 3) NO 応答性の未知のシグナル伝達系や代謝系の解析を行なう。3) 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。1) 2) については、実験系の確立にメドが立ち始めており、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。

1) については、高温処理下におけるニトロソ化タンパク質の網羅的解析を行なう。具体的には、ビオチン・スィッチ法を用いてビオチン化したニトロソ化タンパク質を LC/MS/MS で同定し、ニトロソ化部位を決定する。
 2) については、高温または NO 処理下における細胞内 cGMP 含量や GC 活性を ELISA 法で測定する。次に、多くの細菌ではアデニル酸シクラーゼが GC 活性も有しているため、酵母の同遺伝子欠損株を用いて GC 活性を検討する。

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				
Yu Sasano, Yutaka Haitani, Keisuke Hashida, Iwao Ohtsu, Jun Shima and Hiroshi Takagi	Enhancement of the proline and nitric oxide synthetic pathway improves fermentation ability under multiple baking-associated stress conditions in industrial baker's yeast				
雑 誌 名	査読の有無	巻	発 行 年		最初と最後の頁
Microbial Cell Factories	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（ 8 ）件 うち招待講演 計（ 2 ）件

発 表 者 名	発 表 標 題	
西村 明, 真砂裕紀, 高木博史	酵母における酸化ストレスで誘導される一酸化窒素生成とその生理的役割	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第11回日本NO学会学術集会	2011年5月13日	昭和薬科大学（町田市）

発 表 者 名	発 表 標 題	
Yu Sasano and Hiroshi Takagi	Improvement of the fermentation ability of industrial baker's yeasts with engineered proline/arginine metabolism under baking-associated stress conditions	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
29 th International Specialized Symposium on Yeasts	2011年8月30日	Hotel Camino Real Guadalajara (Guadalajara, Mexico)

発 表 者 名	発 表 標 題	
真砂裕紀, 西村 明, 高木博史	酵母における一酸化窒素の生理学的役割の解析	
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		
高木博史, 西村 明	酵母における酸化ストレスで誘導される一酸化窒素生成とその生理的役割		
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所	
日本遺伝学会第83回大会ワークショップ「細胞ストレスと多様なゲノム応答」(招待講演)	2011年9月20日	京都大学農学部 (京都市)	

発 表 者 名	発 表 標 題		
西村 明, 高木博史	Oxidative stress-induced NO synthesis and its physiological role in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所	
第34回日本分子生物学会年会	2011年12月16日	パシフィコ横浜 (横浜市)	

発 表 者 名	発 表 標 題		
川原寛弘, 西村 明, 高木博史	酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> に見出した一酸化窒素合成酵素の機能解析		
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所	
日本農芸化学会2012年度大会	2012年3月23日	京都女子大学 (京都市)	

発 表 者 名	発 表 標 題		
真砂裕紀, 西村 明, 高木博史	酵母における一酸化窒素の下流経路の解析		
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所	
日本農芸化学会2012年度大会	2012年3月24日	京都女子大学 (京都市)	

発 表 者 名	発 表 標 題		
高木博史, 西村 明, 笹野 佑	The physiological role of nitric oxide found in yeast and its application		
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所	
日本農芸化学会2012年度大会シンポジウム「特殊環境下における微生物の潜在能力とその応用」(招待講演)	2012年3月25日	京都女子大学 (京都市)	

【図 書】 計 (0) 件

著 者 名		出 版 社			
書 名		発 行 年			総ページ数

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w e b ページがある場合は、U R Lを記載すること。

--