

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月19日現在

機関番号：14603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06869

研究課題名(和文) 酵母に見出した新規な一酸化窒素の合成制御機構および生理的役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanism of nitric oxide synthesis and physiological role found in yeast

研究代表者

吉川 雄樹 (Yoshikawa, Yuki)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・博士研究員

研究者番号：30807483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：酵母における新規なNO合成関連因子の探索を通して、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素(Gnd1)が過酸化水素処理条件下におけるNO合成に重要であることが分かった。またその後の解析から、Gnd1特異的な活性がNO合成に重要であることが示された。また、これまで研究代表者の所属する研究室で見出した酵母でのNO合成に関与する因子であるTah18とDre2の哺乳類ホモログNdor1およびCiapin1をそれぞれ置換し、発現させた酵母菌株を作製しNO合成を評価したところ、NO合成能には影響が見られず、酵母に見出したNO合成機構が哺乳類にまで保存される可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、ペントースリン酸回路はリボース合成を介した核酸合成への寄与と、それに伴いNADPHが産生され、酸化的环境下での還元力の供給に寄与することが知られていた。しかし、このとき合成されるNADPHが酸化ストレス条件下であるにも関わらず、活性窒素種である一酸化窒素の合成に必須である可能性が示された。細胞内の還元力の提供に関わる一方で、活性窒素種を生産する意義は未だ分かっていないが、非常に興味深い現象である。酸化的环境下での酵母の生存戦略を理解するうえで重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Thorough the screening for identification of novel nitric oxide (NO) synthesis-related factor, we identified some of candidate. We measured intracellular NO production under hydrogen peroxide (H2O2) treatment condition in each strain, the deletion mutant of 6-phospho gluconate dehydrogenase (Gnd1) significantly inhibited to produce NO under H2O2 treatment condition. Moreover, intracellular NO production recovered by introduction of Gnd1, but not Gnd2 is a paralog of Gnd1.

We construct the strain expressing Ndor1 and Ciapin1, which are mammalian homologous proteins of Tah18 and Dre2 in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Ndor1-Ciapin1 complex showed that identical function as Tah18-Dre2 in yeast growth, and Ndor1 complements Tah18-dependent NO synthesis in yeast cells. Moreover, Ndor1-Ciapin1 complex performed the same behavior that dissociated response to H2O2 treatment like as Tah18-Dre2 complex in yeast cells.

研究分野：微生物科学

キーワード：一酸化窒素 酵母 ペントースリン酸回路 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 NADPH 哺乳類ホモログ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (Nitric Oxide: NO) は生物種を問わず多くの生命現象に関わるシグナル伝達物質である。研究代表者の研究室では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてジフラビンオキシドレダクターゼである Tah18 が NO 合成酵素 (NOS) 様の活性に必要であることを見出した。また研究代表者の研究により、Tah18 との既知の相互作用タンパク質である鉄硫黄クラスタータンパク質である Dre2 によって Tah18 依存的な NOS 様活性が抑制されることを見出している。さらに最近、Dre2 が分解されることで、Tah18 依存的な NO 合成を促進する可能性が示された。*S. cerevisiae* に見出した Tah18 依存的な NOS 様活性および制御機構は、これまで哺乳類において見出されている NOS 活性の制御機構とは異なる新規な制御機構であると推測される。本研究では、高等生物にまで保存されているフラボタンパク質 Tah18 に見出した新規の NOS 様活性の制御機構および生理的役割の解明を目的としている。

2. 研究の目的

本研究では、1) Tah18 に依存した NO の合成に関連する因子を同定する、2) Dre2 の分解機構および NO 合成との関連性を明らかにする、3) Tah18 依存的な NO 合成制御機構の普遍性を検証することを目的としている。

3. 研究の方法

1) Tah18 と相互作用するタンパク質に NO 合成関連因子が存在すると想定し、過酸化水素処理条件下でタグを融合した Tah18 の共免疫沈降を行い、LC-MS を用いた質量分析で同定した相互作用タンパク質を候補とする。得られた候補について、NO 特異的な蛍光プローブである DAF-FM DA を処理し、細胞内蛍光強度をフローサイトメーターによって測定した。ストレス処理前の細胞内蛍光強度を基準にして、ストレス処理後の細胞内蛍光強度の相対的変化の度合いを比較することで細胞内での NO 合成への影響を評価した。

2) メタカスパーゼ Mca1 の遺伝子破壊株における Tah18-Dre2 複合体の解離への影響、および過酸化水素処理条件下での生存率に対する Dre2 タンパク質量の影響を検討した。

3) Tah18 依存的な NO 合成機構の普遍性を検証するため、酵母における Tah18 と Dre2 の哺乳類ホモログである Ndor1 および Ciapin1 を酵母で発現することで、Tah18 および Ciapin1 の機能を相補出来るか検討する。菌株を作製した後、NO 合成能を評価する。また、Tah18-Dre2 複合体と同様に、過酸化水素処理に反応して複合体の解離が起きるかどうかを検討した。

4. 研究成果

1) 研究代表者の所属する研究室において、酵母における NOS 様活性に関与する因子としてフラボタンパク質である Tah18 を同定した。既知の NOS は、NADPH から電子を伝達するレダクターゼドメインと、基質であるアルギニンの酸化を行うオキシゲナーゼドメインから構成される。Tah18 は、NOS のレダクターゼドメインと類似した一次構造を持つが、NOS 活性に必須であるオキシゲナーゼドメインに相当する配列を有しておらず、Tah18 が関与する NO 合成の詳細な機構は不明である。Tah18 は鉄硫黄クラスタータンパク質である Dre2 と複合体を形成して、NADPH から電子を伝達することで鉄硫黄クラスタータンパク質の合成に寄与することが報告されている。一方、研究代表者は過酸化水素処理条件下において Tah18 が NO 合成に関与すること、過酸化水素処理に反応して Tah18-Dre2 複合体が解離することを明らかにした。これらのことから、「Dre2 から解離した Tah18 が NOS のオキシゲナーゼに相当するタンパク質へと電子を伝達することで NO 合成に寄与する」と想定し、過酸化水素処理条件下で Tah18 と相互作用するタンパク質を探索・同定した(図 1)。

同定されたタンパク質の破壊株をそれぞれ作製し、過酸化水素処理条件下での細胞内 NO 合成量を評価したところ、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (Gnd1) の破壊株ではほとんど NO の合成に伴う細胞内蛍光強度の上昇が見られなかった (図 2)。

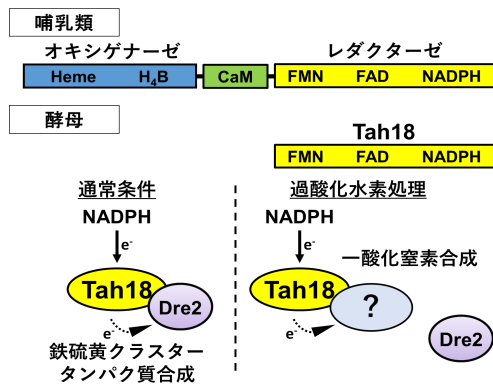


図1. Tah18依存的なNO合成制御モデル

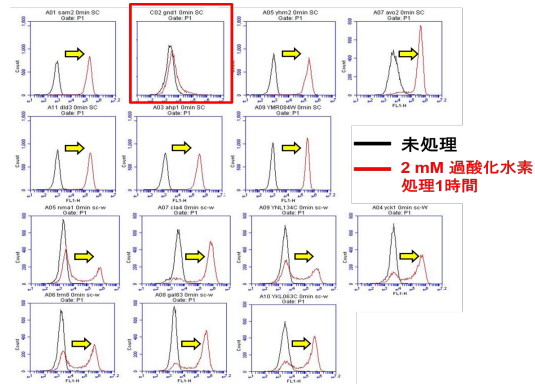


図2. 各候補遺伝子破壊株でのNO合成評価

また Gnd1 のパラログである Gnd2 の破壊株では NO 合成量に影響は見られなかったが、Gnd1 の上流に位置する代謝酵素 6-ホスホグルコノラクトナーゼ Sol3, Sol4 の二重欠損株においても NO 合成量の顕著な低下が見られた (図 3)。また、プラスミドを用いて Gnd1 を相補することによって過酸化水素処理条件下での NO 合成能が回復した (図 4)。Gnd1 とそのパラログである Gnd2 それぞれのタンパク質発現パターンについて、ウェスタンブロット法を用いて解析したところ、Gnd2 は Gnd1 と比較して全長で発現されるタンパク質量がほとんど検出できず、細胞内で不安定である可能性が示唆された (図 5)。これが要因で Gnd2 はほとんど NO 合成に影響を及ぼさないのだと考えられる。これまで、ペントースリン酸回路はリボース合成を通じた核酸合成への寄与と、それに伴う NADPH 産生により酸化的环境下での還元力供給に寄与することが知られていた。しかし、この時合成される NADPH は酸化ストレス条件下にも関わらず、活性窒素種である NO の合成にも必須である可能性が示され、酸化ストレス応答機構における非常に興味深い知見が得られた。

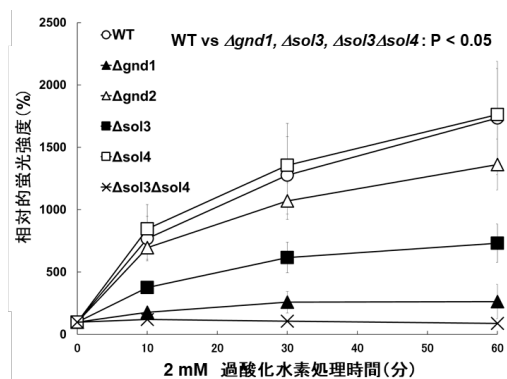


図3. PPP変異株におけるNO合成量の評価

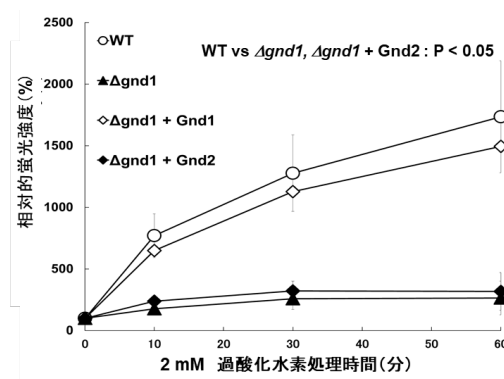


図4. プラスミド導入に伴うNO合成能の相補

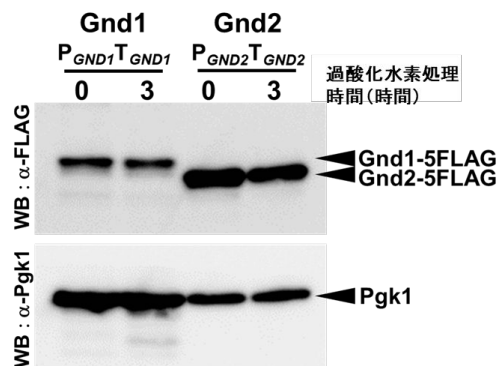


図5. Gnd1、Gnd2のタンパク質発現解析

2) これまで、Tah18 の相互作用タンパク質として報告されている Dre2 が、Tah18 から伝達される電子を優先的に受け取ることで、酵母における Tah18 が関与する NO 合成を間接的に抑制している可能性が示された。Dre2 の哺乳類ホモログである Ciapin1 は、哺乳類におけるアポトーシス抑制因子として報告されている。また最近、Ciapin1 はアポトーシス誘導時にカスパーゼ 3 によって分解されることも分かった。最近、研究代表者らは Dre2 が過酸化水素処理条件下でカスパーゼ 3 に類似したメタカスパーゼ Mca1 依存的にタンパク質量が減少することを見出し、これまでの研究代表者の研究では過酸化水素処理条件下での Tah18 依存的な NO 合成は細胞死を誘導することを報告している。そこで、Mca1 依存的な Dre2 タンパク質量の減少が Tah18 と Dre2 の複合体解離を促進し、NO 合成が促進され、細胞死を誘導するのではないかと推測した。野生型株、MCA1 遺伝子破壊株における Tah18-Dre2 複合体の相互作用について、過酸化水素処理後の経過時間ごとに解析したが、野生型株と MCA1 遺伝子破壊株において相互作用に関する変化は見られなかった。これまでの研究代表者らの解析から、Tah18 と Dre2 の解離はストレス処理後 1 時間以内の短い時間で観察できるが、過酸化水素処理後 2 時間半以降でのみ Mca1 依存的な Dre2 タンパク質量が観察されたことから、Mca1 は Tah18-Dre2 複合体の相互作用に影響を及ぼさないことが示された。哺乳類では、Ciapin1 の発現量低下に伴い細胞死が誘導されることから、Dre2 の分解に伴い細胞死が誘導されると予想していた。しかし、DRE2 過剰発現株および発現抑制株を作製し、過酸化水素処理条件下での生存率を測定したところ、DRE2 過剰発現株では過酸化水素処理に対し野生型株と比較して感受性を示し、DRE2 発現抑制株では逆に耐性を示した(図 6)。酵母においては Mca1 による Dre2 タンパク質量の低下は細胞死の誘導には直接関係しないことが考えられ、Dre2 が過剰に存在する細胞では過酸化水素処理条件下で生存率が低下するなんらかの原因が存在することが考えられた。

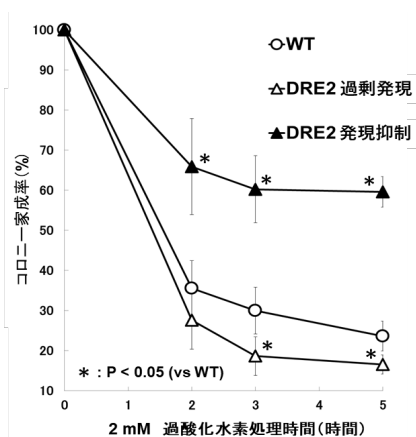


図6. 過酸化水素処理後のコロニー形成率

3) NO 合成に関与する因子として研究代表者の所属する研究室では Tah18 と Dre2 を見出したが、これらの哺乳類ホモログである Ndor1 および Ciapin1 は、哺乳類において NO 合成に関与するという報告は無い。そこで Tah18 が関与する NO 合成機構が他の生物種にまで保存されている可能性を検討するため、酵母の Tah18、Dre2 をそれぞれ Ndor1、Ciapin1 と置換した酵母菌株を作製し、過酸化水素処理条件下での NO 合成を評価した。結果として、Ndor1-Ciapin1 発現株は野生型株と同程度の NO 合成量を示した(図 7)。また、過酸化水素処理条件下での Ndor1 および Ciapin1 の相互作用を共免疫沈降により解析した結果、Tah18-Dre2 複合体と同様に過酸化水素処理応答的に解離することが分かった(図 8)。これらの結果から、Ndor1 は、Tah18 が NO 合成に関与する過程で必要となる機能を損なっており、酸化的環境下での複合体としての挙動も同様であることが示唆された。

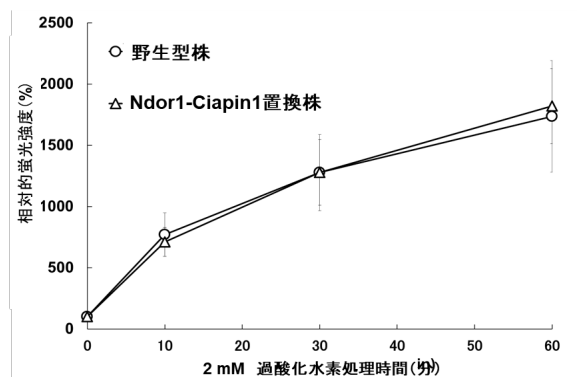


図7. 哺乳類ホモログによるNO合成能の相補

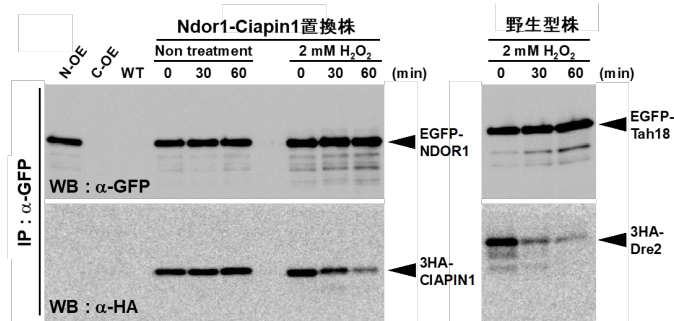


図8. 過酸化水素処理後の相互作用解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史、酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な一酸化窒素の合成制御機構、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019 年
2. 吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史、酵母に見出した新規な一酸化窒素合成の制御機構の解析、酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会、2018 年
3. Yuki Yoshikawa, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi, Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. 13TH INTERNATIONAL MEETING ON YEAST AGEING AND APOPTOSIS, 2018.
4. 吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史、酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な一酸化窒素の合成制御機構の解析、第 18 回日本 NO 学会学術集会、2018 年
5. 吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史、酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な一酸化窒素の合成制御機構、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年
6. 吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史、酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な一酸化窒素合成の制御機構と細胞死誘導機構 Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast、生命科学系学会合同年次大会、2017 年
7. 吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史、酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な一酸化窒素合成の制御機構と細胞死誘導メカニズムの解析、酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究報告会、2017 年
8. 吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史、酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な一酸化窒素の合成制御機構と細胞死誘導機構、第 17 回日本 NO 学会学術集会、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://bsw3.naist.jp/takagi/takagi-j.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者：吉川 雄樹

ローマ字氏名：YOSHIKAWA, Yuki

所属研究機関名：奈良先端科学技術大学院大学

部局名：先端科学技術研究科・バイオサイエンス領域

職名：博士研究員

研究者番号（8桁）：30807483

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。