

平成20年6月1日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18380062  
 研究課題名（和文） 酵母のアセチル化酵素 Mpr1 による抗酸化機構の解明と有用酵母の育種への応用  
 研究課題名（英文） Anti-oxidative mechanism mediated by the yeast acetyltransferase Mpr1 and its application for breeding of useful yeasts  
 研究代表者  
 高木 博史（TAKAGI HIROSHI）  
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授  
 研究者番号：50275088

研究成果の概要：酵母に見出した「アセチル化酵素 Mpr1」について、抗酸化機構の解明と高機能型酵素の創製に取り組んだ。その結果、プロリン代謝中間体が酸化ストレス下での Mpr1 の基質であること、Mpr1 を介した新規アルギニン経路が存在することなどを明らかにし、抗酸化機構の全容の解明につながる多くの重要な知見を得た。また、触媒活性や安定性を高めた変異型 Mpr1 を取得し、これらを発現する酵母では酸化ストレス耐性が大幅に向上することが示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2007年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：酵母, アセチルトランスフェラーゼ, 酸化ストレス, プロリン代謝, 活性酸素種

## 1. 研究開始当初の背景

活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) は、安定な酸素分子よりも活性化された状態にあり、反応性に富んでいる。スーパーオキシド ( $O_2^-$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル ( $HO\cdot$ ) などの ROS は、様々な原因 (放射線、紫外線、酸素呼吸、酸化剤、抗ガン剤、重金属、一酸化窒素など) により細胞内に生成する。通常の細胞には、ROS を消去する抗酸化酵素 (スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼなど)、あるいは抗酸化物質 (グ

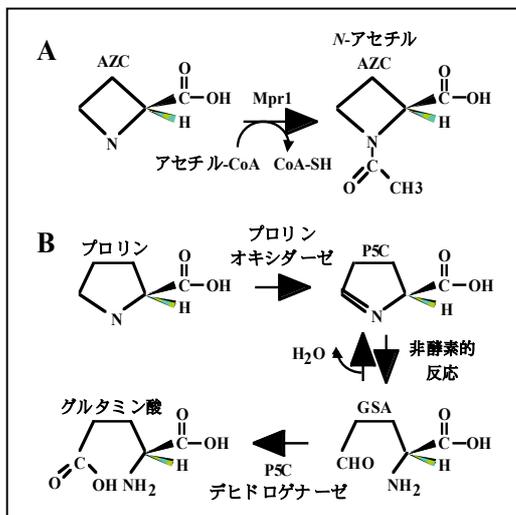
ルタチオン、チオレドキシン、ビタミン A, E など) が存在する。しかし、ROS がこれらの酵素や物質で十分処理されず、DNA、タンパク質、脂質など細胞の生命活動に重要な高分子に損傷を与え、組織障害や細胞死を引き起こす状態が「酸化ストレス」である。

研究代表者は、ヒトを含む高等真核生物のモデルとしての基礎研究、およびパンや酒類などの発酵食品や医薬品への応用研究において重要な微生物である「酵母」を用い、酸化ストレスを含む種々のストレスに対する細胞の耐性メカニズムを解析し、その成果を産業酵母 (パン酵母、清酒酵母など) の育種

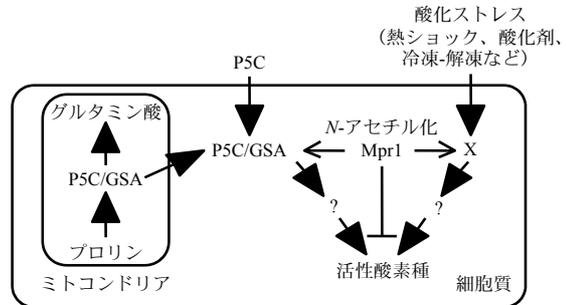
に応用することを目的に研究を進めている。本研究では、酵母に見出した「アセチル化酵素 Mpr1」による新しい抗酸化機構の解明と有用酵母の育種への応用について取り組む。

これまでに、酵母 *Saccharomyces cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b 株の染色体にプロリンの毒性アナログであるアゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) 耐性に関わる新しい遺伝子 *MPR1* (*signal278b* gene for proline-analogue resistance) を発見し、以下のことを明らかにした。

- ① *MPR1* は  $\Sigma$ 1278b 株の染色体 10 番、14 番に 2 コピー存在するが (*MPR1*, *MPR2*)、*S. cerevisiae* のゲノム解析株 (S288C 株) には *MPR1* は存在しない (*J. Bacteriol.*, 182, 4249-4256, 2000)。
- ② *MPR1* は *N*-アセチルトランスフェラーゼのスーパーファミリーに属しており、AZC を *N*-アセチル化により解毒する新規酵素 Mpr1 をコードしている (*J. Biol. Chem.*, 276, 41998-42002, 2001) (下図 A)。
- ③ *S. cerevisiae* 同胞種や分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* などにも *MPR1* のホモログ遺伝子が存在し、AZC アセチル化活性を示すため、*MPR1* は酵母に広く分布し、何らかの生理機能を有していると考えられる (*Yeast*, 19, 1437-1445, 2002; *J. Biochem.*, 133, 67-74, 2003)。
- ④ Mpr1 は熱ショックや過酸化水素処理で細胞内に生成する ROS レベルを下げ、酵母を酸化ストレスから保護している。また、Mpr1 は酸化ストレスを引き起こすプロリン代謝中間体  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸 (P5C) をアセチル化し (下図 B)、ROS を減少させる (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 12616-12621, 2004)。
- ⑤ 冷凍ストレス (冷凍-解凍処理) においても、酵母の細胞内には ROS が増加するが、Mpr1 は ROS レベルを下げ、生存率の低下を抑える (*J. Biochem.*, 138, 391-397, 2005)。



以上の結果から、Mpr1 は従来の抗酸化酵素 (カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼなど) のように ROS に直接作用するのではなく、ROS の発生に関与する物質 X (AZC や P5C のような窒素含有四員環化合物?) をアセチル化し、その結果、何らかの経路や機構により ROS の生成を抑え、酸化ストレスから酵母の細胞を防御するという新しい抗酸化機構を考えている (下図)。



## 2. 研究の目的

本研究では、酵母に見いだしたアセチル化酵素 Mpr1 について、酸化ストレス下における生理機能の解明と有用酵母の育種への応用を目的として、以下の項目に取り組む。

- ① ポストゲノム解析技術 (メタボロミクスなど) を駆使し、酸化ストレスにおける Mpr1 の細胞内基質を同定するとともに、本酵素による新しい抗酸化機構を解明する。
- ② X 線結晶構造解析により Mpr1 の立体構造を決定し、触媒反応機構や機能部位を解明するとともに、本遺伝子への変異導入実験も組み合わせ、抗酸化活性向上などの高機能型 Mpr1 を創製する。
- ③ 以上の研究で得られた知見を活用し、高度な酸化ストレス (冷凍、エタノールなど) 耐性を有する実用酵母 (パン酵母、清酒酵母など) の分子育種を行う。

## 3. 研究の方法

組換え Mpr1 の精製は以下の手順で行った。Mpr1 発現プラスミド pQE-MPR を保持した大腸菌 JM109 株を 2% カザミノ酸、アンピシリン含有 M9 液体培地に植菌し、対数増殖期まで 37°C で振とう培養後、同様の M9 液体培地に 1% 植菌し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、IPTG を終濃度 0.1 mM になるように添加、18°C で 20 時間振とう培養し、Mpr1 の発現を誘導した。大腸菌の培養液を遠心分離により集菌し、結合バッファーにて洗浄し、再度集菌した。同バッファーに再懸濁し、超音波破碎機を用い、Out Put Control 4、30 秒 ON、1 分 OFF、10 サイクルの超音波処理により破碎した。得られたライセートを 8,000 rpm, 60 min

で遠心分離し、上清を回収、0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過した。His-Trap ニッケルカラムを結合バッファーにて平衡化し、得られた無細胞抽出液を添加した。その後、同バッファーにて洗浄、溶出バッファーにて溶出画分を回収し、精製酵素とした。

Mpr1 のキネティクスは以下の手順で解析した。His-Trap により精製された His タグ付加組換え Mpr1 を用い、活性測定は 1 mM の DTNB [5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)] 溶液、滅菌水、0.025-0.15 mM アセチル CoA、酵素溶液、0.5-5 mM AZC を混合し、吸光光度計により 412 nm での 1 分間の吸光度変化を測定した。得られた吸光度変化 (初速度) を  $v$ 、基質濃度を  $[S]$  として、ミカエリス-メンテン式の変換式  $[S] / v - [S]$  プロットで表し、 $K_m$  値、 $V_{max}$  値を算出した。なお、1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の TNB (412 nm 極大吸収) を生成する酵素量を 1U とした。

細胞内の ROS レベルは以下の手順で測定した。酸化プローブとして 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) を使用した。 $\text{H}_2\text{DCFDA}$  は細胞内エステラーゼによって酵素的に脱アセチル化され、DCFH に変換される。その後、ROS によって酸化され、高度の蛍光物質 DCF を生じるため、その蛍光強度を蛍光分光光度計により測定する。50ml の SC-Leu 培地で対数増殖期まで培養した菌体を滅菌水で遠心洗浄後、100 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.4) に  $\text{OD}_{600}=1.0$  になるように懸濁した。この懸濁液 40 ml に 5 mM  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  を 80  $\mu\text{l}$  添加して (最終濃度 0.01 mM)、30°C で 15 min インキュベート後、300 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  を 400  $\mu\text{l}$  添加し (最終濃度 3 mM)、30°C で振とうさせた。 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理開始 0, 30, 60 分後に遠心分離により回収した菌体を滅菌水で洗浄し、500  $\mu\text{l}$  の滅菌水に懸濁した。次に、ガラスビーズ (0.5 mm) を加え、マルチビーズショッカーを用いて、菌体を破碎し (1 min on, 1 min off, 5 cycles, 0°C)、遠心分離後の上清を回収した。この上清 50  $\mu\text{l}$  と滅菌水 450  $\mu\text{l}$  の混合液に 504 nm の励起波長を照射し、放出された蛍光波長 (524 nm) を蛍光分光光度計で測定した。なお、菌体破碎液の上清のタンパク質濃度を定量し、細胞内 ROS レベルをタンパク質 mg あたりの蛍光強度として表した。

また、Mpr1 の抗酸化能を高め、細胞の酸化ストレス耐性を向上させる目的で、MPRI 遺伝子にランダム変異を導入し、高機能型の変異酵素 (触媒活性・安定性の向上、基質特異性の改変など) の取得を試みた。プラスミド上に組み込んだ MPRI 遺伝子をエラープロン PCR によって増幅後、酵母と大腸菌で複製可能なマルチコピーベクター pYES2 (*GAL1* プロモーターによりガラクトース培地で目的遺伝子を発現させる) に組み込み、大腸菌 DH5a

株を形質転換した。アンピシリン耐性を示す形質転換体 (約 6 万コロニー) を掻き集めて、ランダム変異ライブラリーとした。次に、変異ライブラリーからプラスミドを調製し、*S. cerevisiae* CKY8 株 (MPRI 非保持株) を形質転換後、AZC (20 mg/ml) を含む最少寒天培地に塗布し、30°C で培養することにより野生型 MPRI 導入株よりも早く出現するコロニーを選抜した。その結果、プラスミド依存的に AZC 耐性度の向上したクローンを分離し、変異型 Mpr1 を取得した。また、変異ライブラリーを導入後、3 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  を含む最少寒天培地に塗布し、30°C 培養により野生型 MPRI 導入株より早く出現するコロニーを選抜した。その結果、プラスミド依存的に  $\text{H}_2\text{O}_2$  耐性度の向上したクローンを分離した。

Mpr1 の立体構造モデリングについては Mpr1 の一次構造と立体構造が既知で MPRI と相同性の高い *1VHS* (*Bacillus subtilis*) を用いて、立体構造モデリングシステムの Phyre によりブラウザ上で行った。また、得られた構造については Ramachandran Plot プログラムにより、エネルギー最小化を行い、最終的なモデリング図を構築した。

組換え Mpr1 の結晶化と立体構造解析は以下の方法で行なった。大腸菌 MG15 株と SG13009 株にレアコドン対応の tRNA を供給する pRARE ベクター、および野生型 MPRI 遺伝子を組み込んだ発現プラスミド pQE-2MPRI を導入した。得られた形質転換体を M9 カザミノ酸培地で前培養後、30°C で本培養を行ない、660 nm での吸光度 ( $\text{OD}_{660}$ ) が 0.17~0.23 に達した時に IPTG を添加し (終濃度 0.1mM)、18°C で 18 時間、振とう培養を行なった。2 リットルの M9 カザミノ酸培地で培養して得られた菌体を超音波破碎し、His trap FF アフィニティーカラム (GE ヘルスケアバイオサイエンス社) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより粗精製標品を得た。この粗精製標品を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。カラムには DEAE toyopearl (東ソー社) を用いた。精製後のフラクションについては、SDS-PAGE および酵素活性測定によって精製度の検討を行った。酵素の濃縮には、Amicon Ultra-15 (ミリポア社) による遠心限外ろ過を用いた。

結晶化にはシッティングドロップ蒸気拡散法を用いた。結晶化のプレートは、予め aquasil による撥水処理をした Cryschem plate (Hampton Research 社) を使用した。リザーバー溶液は 1 ml、ドロップ溶液 4 ml (リザーバー溶液 2 ml, 酵素溶液 2 ml) とし、5°C, 10°C, 15°C, 20°C で約 1-3 週間静置させた。スパースマトリックス法による溶液条件のランダムスクリーニングについては Crystal screen HT (Hampton Research 社) を使用した全 576 条件について結晶化を実施

した。予備的なX線回折強度データの収集は、Rigaku micromax 007/ RAXIS- IV++ (リガク社)を用いて行った。測定条件は、使用X線CuK $\alpha$ 線1.5418Å、カメラ長200mm、照射時間1min/flameとした。さらに、シンクロトロン放射光を利用したX線回折強度データの収集は、高エネルギー加速器研究機構の放射光科学研究施設フォトンファクトリーのビームラインを利用した。

#### 4. 研究成果

##### 1) Mpr1の抗酸化機構の解明(論文①②③)

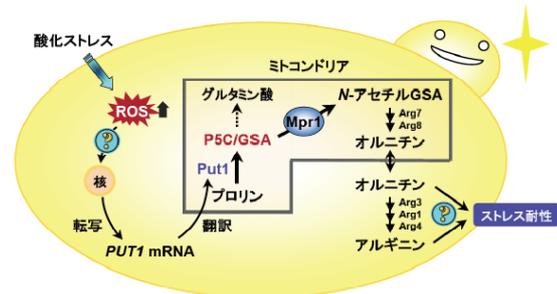
スーパーオキシドジスムターゼの遺伝子を破壊するとエタノール感受性を示すという報告から、エタノールにより細胞が酸化ストレスを受ける可能性が考えられた。そこで、 $\Sigma$ 1278b株の野生株とMPR1破壊株について、9%エタノール添加後の生存率を測定した。その結果、野生株では添加5時間後の生存率は70%を超え、24時間経っても50%前後であった。一方、MPR1破壊株では添加後2時間で生存率は約50%に低下し、24時間後には20%以下にまで低下した。また、元々MPR1を保持しないS288C株に多コピーでMPR1を導入し、15%エタノールストレスに対する影響を調べたところ、エタノール添加後の生存率は野生株と比較して約10-20倍に向上した。また、 $\Sigma$ 1278b株に9%エタノールを添加すると、時間とともにROSレベルが増加したが、MPR1を破壊するとより多くのROSが生成した。一方、S288C株にMPR1を導入すると、ROSレベルの増加が有意に抑えられた。

次に、Mpr1の機能発現に重要な残基を同定した。基質との結合や触媒機能に関与すると考えられるアミノ酸残基を置換したMpr1遺伝子を大腸菌で発現させ、AZC感受性を示す変異型Mpr1を取得した。組換え酵素を用いたキネティクス解析により、NATスーパーファミリー内で保存性の高いArg145をAla, Gly, Trp, Asp, Gluにそれぞれ置換すると、AZC、アセチルCoAに対する親和性が顕著に減少したことから、R145が基質との結合に関与することが示された。また、Mpr1ホモログ内で保存性の高いTyrをAlaに置換した結果、ほとんどの変異型酵素で触媒効率が低下し、同時に温度安定性が低下したものもあった。さらに、各TyrをPheに置換すると、Y166F変異型酵素のみ機能が低下したことから、Y166の側鎖のOH基が触媒活性に重要であることが示された。

これまでの結果から、大腸菌から調製した組換え酵素を用いた*in vitro*の実験から、Mpr1の細胞内基質としてPro代謝中間体であるP5C/GSAが考えられた。そこで、実際に細胞内でP5C/GSAからアルギニン(Arg)合成経路の中間体であるN-アセチルGSAへの反応が起こっているかどうかを検証した。まず、

PUT2とMPR1の二重破壊株をバックグラウンドにArg合成経路の各遺伝子(N-アセチルグルタミン酸シンターゼをコードするARG2、アセチルオルニチントランスアミナーゼをコードするARG8)を破壊した株を作製した。次に、各破壊株においてプラスミドでMpr1を発現させ、Proと尿素を窒素源とする液体培地での生育を比較した。その結果、ARG2破壊株ではArg要求性が部分的に相補できたのに対して、ARG8破壊株では相補されなかった。以上の結果から、酵母においてMpr1を介してP5C/GSAからN-アセチルGSAへと至る新規なArg合成経路の存在が強く示唆された。

Mpr1の細胞内基質がP5C/GSAである可能性が高いが、酸化ストレスとP5C/GSAとの関係は不明である。そこで、酸化ストレス条件下(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、高温、エタノール、冷凍)でのP5C/GSA量を測定したところ、MPR1破壊株では野生株と比較して約3倍程度増加していた。この酸化ストレス条件下でのP5C/GSA量の増加の原因を調べるため、Pro代謝関連遺伝子の転写量を定量的RT-PCRにより解析したところ、PUT1遺伝子のみ酸化ストレス依存的に転写量が2-3倍程度増加していた。また、P5C/GSA量の増加はPUT1破壊株では見られなくなった。そこで、P5C/GSAがROS発生の原因物質ではないかと考え、P5C/GSAを酵母細胞に添加したところ、MPR1破壊株において細胞生存率が著しく低下し、細胞内にROSの蓄積が観察された。また、Mpr1のC末端にGFPを融合したMpr1-GFPの細胞内局在を蛍光顕微鏡により観察したところ、主にミトコンドリアと細胞質に局在が観察された。以上の結果から、 $\Sigma$ 1278b株は高温などの酸化ストレスに応答し、PUT1の誘導によりProの分解を行い、生じたP5C/GSAをMpr1がアセチル化することで、Arg合成系を亢進し、酸化ストレス耐性を獲得するモデルが考えられた(下図)。



##### 2) 高機能型 Mpr1 の創製(論文⑥)

次に、Mpr1の抗酸化能を高め、細胞の酸化ストレス耐性を向上させる目的で、MPR1遺伝子にランダム変異を導入し、高機能型の変異酵素(触媒活性・安定性の向上、基質特異性の改変など)の取得を試みた。その結果、野

生型酵素導入株よりも過酸化水素添加後の ROS レベルを低く抑え、高い生存率を示す 3 種類の変異型 Mpr1 (K63R, F65L, L117V) 発現株を取得した。過酸化水素処理下での細胞生存率を測定したところ、ベクターのみ導入株は過酸化水素処理時間に伴い生存率は著しく低下するが、野生型 Mpr1 発現株では生存率の低下が抑制された。興味深いことに、3 種類の変異型 Mpr1 は、野生型酵素発現株よりもさらに高い生存率を示し、特に K63R-Mpr1 では著しい生存率の向上が見られた。また、各菌株における細胞内 ROS レベルの測定を行った。野生型 Mpr1 発現株はベクターのみ導入株に比べて、ROS レベルが低く抑えられていた。一方、3 種類の変異型 Mpr1 発現株では、野生型酵素発現株よりもさらに ROS レベルが低く維持されていた。したがって、今回取得した変異型 Mpr1 は酸化ストレス条件下で野生型酵素よりも細胞内 ROS レベルを低く抑え、細胞を保護していることから、抗酸化能が向上したと考えられる。

次に、大腸菌で組換え酵素を調製し、酵素特性を詳細に解析した。酸化ストレス下における細胞内基質はまだ同定されていないため、アセチル化が確認されている AZC とアセチル CoA の両基質を用いて、基質との親和性 ( $K_m$  値) および反応速度定数 ( $k_{cat}$  値) を算出し、触媒効率の指標である  $k_{cat}/K_m$  値を比較した。各変異型酵素は触媒活性が向上しており、F65L-Mpr1 は AZC に、K63R-Mpr1 はアセチル CoA に、L117V-Mpr1 は両基質に対する触媒効率が向上していた。しかし、二重変異の導入により触媒効率は野生型酵素のレベルにまで低くなる傾向が見られ、三重変異型酵素においては著しく低下していた。各変異型酵素の安定性についても解析した。各酵素を 50°C でインキュベート後の残存活性を 30°C で測定し、活性半減期を算出した。その結果、興味深いことに F65L-Mpr1 は 50°C における活性半減期が野生型酵素よりも数倍長く、熱安定性が著しく向上していることが判明し、F65L 置換は温度に対する酵素の安定化に寄与していると考えられた。三重変異型 Mpr1 については触媒活性および安定性が大きく低下しており、立体構造や酵素機能が著しく損なわれている可能性がある。

### 3) Mpr1 の立体構造解析 (論文⑤)

初期条件として 0.57 mg/ml, 1.1 mg/ml の Mpr1 溶液を用い、Crystal screen-HT を用いた 96 溶液条件についてシッピングドロップ蒸気拡散法による結晶化条件の探索を行った。その結果、MgCl<sub>2</sub> 存在下で得られた結晶について X 線回折実験を行ったところ、到達分解能 2.5Å でデータを収集でき、本結晶が空間群 P3<sub>1</sub>12 ( $a=b=84.1\text{\AA}$ ,  $c=192.3\text{\AA}$ ) に属することが判明した。本結晶を基質 AZC を含む

溶液に浸漬して X 線回折実験を行った結果、到達分解能 1.9Å でデータを収集できた。

また、P1 結晶について、重原子を結晶内に導入した重原子誘導体結晶のスクリーニングを行い、臭素 Br、タングステン W の誘導体結晶が得られた。そこで筑波フotonファクトリーのビームライン NW-12 で測定を行い、到達分解能 3.5-4.5Å のデータを収集した。多重同型置換法と異常散乱測定を組合せた方法で解析を試みたところ、Br について 1 カ所、W について 2 カ所の重原子結合部位が求められたが、同型性が低いため位相決定力が低く、初期モデルの精密化はできなかった。

次に、P3<sub>1</sub>12 結晶を用いて位相決定を試みた。本結晶についてはセレノメチオニン (SeMet) 変異体による結晶が得られており、フotonファクトリーのビームライン BL5A で位相決定のための X 線回折測定を実施し、到達分解能 2.5Å のデータセットを取得した。しかしながら、異常散乱による強度変化が極めて小さいため、構造決定に至る十分な位相決定力がないことが判明した。本酵素は、一次構造中に 4 個の Met 残基を含んでいるが、3 個は N 末端の His タグの近傍、残り 1 個が C 末端に存在することから、立体構造の決定には寄与しないフレキシブルな領域に位置しているのではないかと推定された。

以上の状況を踏まえ、構造解析に必要な位相決定を行うため、本酵素に 7 個含まれる Trp 残基を Met に置換した変異体 Mpr1 を作製し、その SeMet 変異体の結晶化スクリーニングを行なった。その結果、Trp90 と Trp185 が置換された 2 種の変異体 (W90M, W185M) で結晶を得ることができた。その後、フotonファクトリーのビームライン BL17A で X 線回折測定を実施し、W90M 変異体については空間群 P3<sub>1</sub>12 であり、これまで得られた結晶と同型であったが、完全な双晶であったため位相決定に用いることができなかった。一方、W185M 変異体については、空間群 C2 の結晶が得られたため、新たな凍結方法を再検討し、到達分解能 2.8Å のデータを収集した。このデータを用いて初期位相を求めたところ、部分的に解釈可能な電子密度図が得られ、現在初期モデルの構築を行なっている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Xiaoyi Du, Hiroshi Takagi, N-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen

species, Applied Microbiology and Biotechnology, 75, 1343-1351, 2007, 査読有

- ② 高木博史, エタノールから酵母を守る新しいアセチル化酵素 Mpr1, バイオサイエンスとインダストリー, 66, 75-77, 2008, 査読無
- ③ Tetsuya Kotani, Hiroshi Takagi, Identification of amino acid residues essential for the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1 activity by site-directed mutagenesis, FEMS Yeast Research, 8, 607-614, 2008, 査読有
- ④ 高木博史, 遺伝子組換え技術を利用した酵母の改良, 食品と技術, 449, 19-28, 2008, 査読無
- ⑤ Takao Hibi, Hiromi Yamamoto, Genichi Nakamura, Hiroshi Takagi, Crystallization and preliminary crystallographic analysis on *N*-acetyltransferase Mpr1 from *Saccharomyces cerevisiae*, Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications, F65, 169-172, 2009, 査読有
- ⑥ Kaoru Iinoya, Tetsuya Kotani, Yu Sasano, Hiroshi Takagi, Engineering of the yeast antioxidant enzyme Mpr1 for enhanced activity and stability, Biotechnology and Bioengineering, 103, 341-352, 2009, 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 小谷哲也, 高木博史, 酵母アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の活性に重要なアミノ酸残基の同定, 2007 年度日本生物工学会大会, 2007. 9. 26, 東広島
- ② 日井隆雄, 五十嵐弘子, 山本弘美, 高木博史, 酵母由来アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の X 線結晶構造解析, 日本農芸化学会 2008 年度大会, 2008. 3. 28, 名古屋
- ③ Kaoru Iinoya, Tetsuya Kotani, Hiroshi Takagi, Enhancement of antioxidant activity of *N*-acetyltransferase Mpr1 by random mutagenesis, 2008 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting, 2008. 7. 23, トロント
- ④ 小谷哲也, 西村 明, 笹野 佑, 高木博史, 酵母アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 が触媒する新規なアルギニン合成経路, 酵母遺伝学フォーラム第 41 回研究報告会, 2008. 9. 10, 札幌
- ⑤ 西村 明, 笹野 佑, 小谷哲也, 大津厳生, 高木博史, 出芽酵母 *N*-アセチルトランス

フェラーゼ Mpr1 による新しい抗酸化機構の解析, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008. 12. 11, 神戸

- ⑥ 山本弘美, 日井隆雄, 高木博史, 酵母由来 *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の基質特異性, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009. 3. 38, 福岡

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

産業財産権の名称: 変異型アセチルトランスフェラーゼ Mpr1  
発明者: 高木博史  
権利者: 奈良先端科学技術大学院大学  
産業財産権の種類、番号: 特許、特願 2006-194365、PCT/JP2007/053667  
出願年月日: 2006 年 7 月 14 日, 2007 年 2 月 27 日  
国内・国外の別: 国内、国外

産業財産権の名称: ドライイースト製造用組成物  
発明者: 高木博史、笹野 佑  
権利者: 奈良先端科学技術大学院大学  
産業財産権の種類、番号: 特許、特願 2009-31277  
出願年月日: 2009 年 2 月 13 日  
国内・国外の別: 国内

[その他]

ホームページアドレス

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 博史 (TAKAGI HIROSHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号: 50275088

(2) 研究分担者

日井 隆雄 (HIBI TAKAO)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号: 00285181