

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15808

研究課題名（和文）真核生物に共通する新規な一酸化窒素合成機構の解明およびその生理的役割の理解

研究課題名（英文）Elucidation of a novel mechanism of nitric oxide synthesis common to eukaryotes and understanding of its physiological role.

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） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：酵母細胞内NADPH/NADP比が低下することで、非ストレス条件下であるにもかかわらず、酸化ストレス応答性転写因子であるYap1の活性化を介して酸化ストレス耐性因子の発現量が上昇し、酸化ストレスや一酸化窒素（NO）に対して高いストレス耐性を獲得することを明らかにした。PPP欠損株のイソブタノール感受性が細胞内NADPH/NADP比と相関することを示し、NADPH代謝を必要とするイソブタノール耐性機構の存在を示唆した。酵母のメタロチオネインがNO耐性に寄与していることを初めて示した。さらに、スクリーニングを通して顕著に高いNO耐性を示す菌株を取得することに成功し、新規なNO耐性因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PPP欠損株はラジカル分子に対して感受性を示すと考えられたが、酵母は細胞内NADPH/NADP比の低下に伴いストレス応答機構が活性化されることを示した。酵母において、次世代のバイオジェット燃料として期待されるイソブタノールのストレス作用機序が近年明らかにされた。本研究によってNADPHを必要とするイソブタノール耐性機構の存在が新たに示され、本成果は酵母を用いたバイオ燃料生産へ貢献することが期待される。また本研究を通じて酵母において複数の新たなNO耐性機構を明らかにできた。これらの研究成果は今後、病原性真菌における宿主感染後のNO耐性機構の解明にも貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The depleted intracellular NADPH/NADP ratio in yeast cells increases the expression of oxidative stress tolerance factors via activation of Yap1, an oxidative stress-responsive transcription factor, despite non-stress conditions, and results in high stress tolerance to oxidative stress and nitric oxide (NO). The isobutanol sensitivity of PPP-deficient strains correlated with the intracellular NADPH/NADP ratio, suggesting the existence of an isobutanol tolerance mechanism that requires NADPH metabolism. We showed for the first time that yeast metallothionein contributes to NO tolerance. Furthermore, through screening, we succeeded in obtaining strains that showed remarkably high NO resistance and identified a novel NO resistance factor.

研究分野：微生物科学

キーワード：酵母 一酸化窒素 ペントースリン酸回路 ストレス応答 NADPH イソブタノール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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物に多大な影響を与え、様々な生命現象に関わるシグナル伝達物質である。哺乳類では、主にアルギニン (Arg) を基質として、オキシゲナーゼ (Oxy) ドメインとレダクターゼ (Red) ドメインから成るNO合成酵素 (NOS) がNADPHと酸素を利用して、酸化的にNOとシトルリンを合成する。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。しかし、酵母におけるNO合成機構の詳細は依然として不明であった。最近研究代表者らの研究において、ペントースリン酸回路 (Pentose Phosphate Pathway : PPP) の欠損酵母を用いた解析結果から、酵母が哺乳類と同様にNADPHがNO合成に必須である可能性が示された。そこで本研究では、NO合成と細胞内レドックスバランスの関係性について解析し、酵母におけるNO合成制御機構を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、1) 酵母におけるNO合成制御機構とNADPHの関連性を明らかにすることを目的に、研究を遂行する過程で得られた結果から、2) 細胞内NADPHレドックスバランスがNOを含むストレス耐性に及ぼす影響を明らかにすることを目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) PPPの初発酵素グルコース6リン酸脱水素酵素 (G6PD) をコードする遺伝子*ZWF1*の欠損株 (*zwf1Δ*株) のNO合成能を解析した。NO特異的な蛍光プローブDAF-FM DAを処理した細胞を用いて、フローサイトメーターによって細胞内NO量を測定した。

(2) *zwf1Δ*株および6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (6PGD) をコードする*GND1*の欠損株 (*gnd1Δ*株) の過酸化水素およびNOドナー処理後の生存率を測定した。また細胞内のNADPH/NADP⁺比を解析し、酸化ストレス応答性転写因子であるYap1の転写活性を解析し、Yap1の局在を蛍光顕微鏡により解析した。Yap1の転写制御下の遺伝子がコードする細胞質局在型のカタラーゼCtt1のタンパク質量を解析した。

(3) PPP欠損株のイソブタノール耐性をスポットテストによって観察し、細胞内NADPH量を解析した。各菌株の細胞内アセトアルデヒド量を測定した。また各菌株の*Zwf1*、および*Gnd1*の酵素活性をそれぞれ測定した。

(4) 酵母のメタロチオネイン (MT) をコードする遺伝子*CUP1-1*およびパラログである*CUP1-2*をそれぞれ同時に欠損した*cup1-1/cup1-2*欠損株 (*cup1Δ*株) を構築した。亜硝酸は酸性条件下で自己分解が促進され、NOを含むRNSを発生させるため、亜硝酸含有寒天培地での生育を観察することでNO耐性を評価した。細胞内のMTによるNO除去能を評価した。Cup1タンパク質のNO除去能を評価するため、野生型株および*CUP1*過剰発現株の細胞抽出液からCup1タンパク質を粗精製し、NOドナーあるNOC5の反応液中にCup1粗精製溶液を添加した際のNO量を測定した。RNS暴露後の*CUP1*遺伝子発現量を解析した。

(5) RNSが非酵素的に発生する培地で酵母を培養し続け、RNS耐性を有する酵母を選別した。耐性株について次世代シーケンス解析を行った。

4. 研究成果

(1) 研究代表者のこれまでの研究結果と同様に過酸化水素処理後の細胞内 NO 量の上昇がほぼ完全に消失したが、PPP 欠損株が過酸化水素処理に対して顕著に高い耐性を示すことが分かった(研究成果 2)。そのため PPP 欠損株を用いての NO 合成能の評価は困難であると判断し、PPP 欠損株が示すストレス耐性に着目して研究を進めることとした。

(2) PPP 欠損株は、細胞内の NADPH/NADP⁺比が低下することで酸化ストレスに対して感受性を示すことが知られている。しかし、最少培地である SD 培地にて培養した際に、野生型株と比較して *zwf1Δ* 株が顕著に高い酸化および NO 耐性を示した(図 1)。

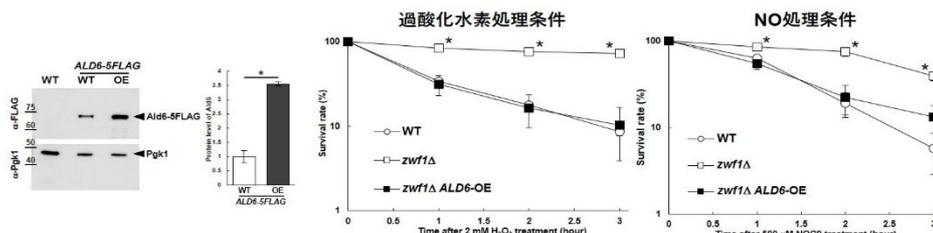


図1. 過酸化水素、およびNO処理後の細胞生存率

同様の培養条件で *zwf1Δ* 株は細胞内の NADPH/NADP⁺比が極端に低下し、代替 NADPH 産生酵素であるアセトアルデヒド脱水素酵素をコードする *ALD6* を過剰発現させることで回復した(図 2A)。また NADPH/NADP⁺比の低下に伴い Yap1 の転写活性が上昇し、*ALD6* 過剰発現によって野生型株と同程度にまで低下した(図 2B)。さらに、*zwf1Δ* 株においては、非ストレス条件下でも、Yap1 が核に局在することが示された(図 2C)。

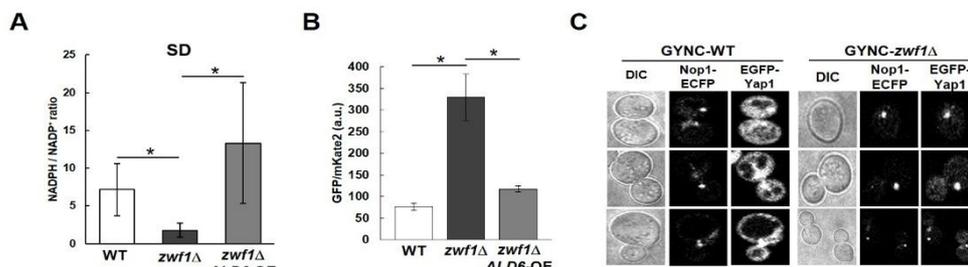


図2. 細胞内NADPH/NADP⁺比とYap1の転写活性

これらの結果から *zwf1Δ* 株の細胞内が酸化的になり、Yap1 の転写活性が上昇し、酸化ストレス応答性因子の発現量が上昇したと考えた。実際に *zwf1Δ* 株における Ctt1 量は野生型株と比較して顕著に高かった(図 3A)。さらに *zwf1Δ* 株の *CTT1* 過を欠損させたところ、生存率は野生型株と同程度にまで低下し、*CTT1* 過剰発現株は、*zwf1Δ* 株と同程度の高い生存率を示した(図 3B)。しかし、*ZWF1* および *GLR1* の二重遺伝子欠損株はストレス耐性に影響が見られなかった(図 3C)。これらの結果から、細胞内 NADPH の枯渇にตอบสนองして、Yap1 を介して NADPH を必要としない Ctt1 等の抗酸化因子を誘導することで、ストレス耐性を向上する機構が存在することが示唆され、研究代表者らがこれらの知見をまとめて報告した。

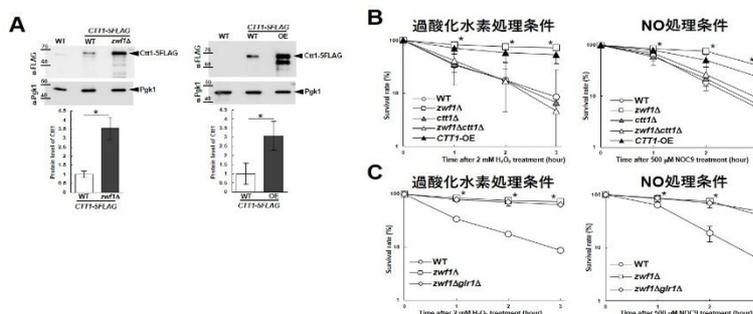


図3. Ctt1タンパク質量と過酸化水素およびNO処理後の生存率

(3) イソブタノールは、次世代のバイオジェット燃料としての利用が期待されている分岐鎖アルコールの一種である。酵母 *S. cerevisiae* はエタノールに対して強い耐性を有する一方で、イソブタノールに暴露すると、強力な生育阻害が引き起こされる。近年、酵母はイソブタノールに暴露することで、窒素飢餓応答が引き起こされることが報告された (Kuroda *et al.*, 2019)。この報告の中で、PPP 欠損株がイソブタノールに特に強い感受性を示すことも示されたが、細胞内 NADPH との関連性は明らかでなかった。研究代表者らの研究にて、*zwf1Δ* 株のイソブタノール感受性を確認し、*ALD6* を過剰発現させることで感受性が解消されることを示した。*zwf1Δ* 株は、野生型株と比較して細胞内 NADPH/NADP⁺ 比が顕著に低下し、*ALD6* 過剰発現によって回復したことから、イソブタノール耐性と細胞内の NADPH/NADP⁺ 比が相関することが示唆された (図 4AB)。一方で、*gnd1Δ* 株は *ALD6* の過剰発現によって細胞内 NADPH/NADP⁺ 比は回復せず、イソブタノールに対して感受性を示した (図 4AB)。

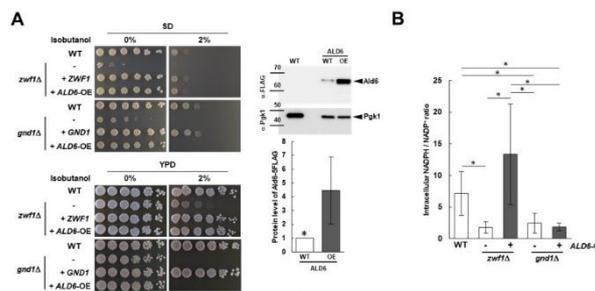


図4. *zwf1Δ* 株および *gnd1Δ* 株のイソブタノール耐性と細胞内 NADPH/NADP⁺ 比

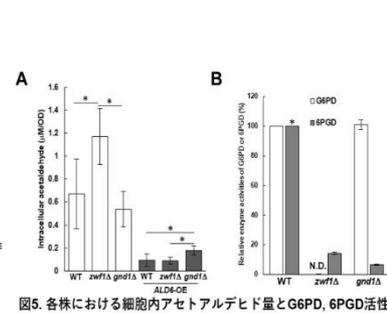


図5. 各株における細胞内アセトアルデヒド量と G6PD, 6PGD 活性

これらの結果から、酵母のイソブタノール耐性と細胞内 NADPH/NADP⁺ 比が相関することが示された。また *gnd1Δ* 株の Ald6 の機能が損なわれている可能性が考えられたため、細胞内アセトアルデヒド量を測定したところ、*gnd1Δ* 株においては *ALD6* 過剰発現に伴うアセトアルデヒドの減少量が野生型株や *zwf1Δ* 株と比較して優位に低かった。(図 5A)。これらの結果から、*gnd1Δ* 株において Ald6 の機能は損なわれていないが、活性が阻害されている可能性が示された。また *gnd1Δ* 株では 6PGD 活性は顕著に低下するが、野生型株と同程度の G6PD 活性を示した (図 5B)。*gnd1Δ* 株において G6P は 6PG へと変換され蓄積することが知られており、6PG が G6P イソメラーゼの阻害剤として機能することから (Marchand *et al.*, 1989)、グルコースから解糖系への代謝フローが減退し、*ALD6* を過剰発現しても、細胞内 NADPH/NADP⁺ 比やイソブタノール耐性を高めるには至らなかったと考えられる。研究代表者らはこれらの知見をまとめて報告した。

(4) MT はチオールに富んだ小さな (6-7 kDa) タンパク質であり、亜鉛、カドミウム、銅に結合して無毒化する金属結合タンパク質の役割を担う。また MT はヒドロキシラジカルや NO とも反応することが知られているが、酵母においては NO 耐性への関与は検証されていない。*cup1Δ* 株は野生型株と比較して RNS に対して感受性を示し、*CUP1* 過剰発現株は耐性を示した (図 6B)。この結果から、Cup1 が酵母における NO 耐性において重要であることが示唆された。

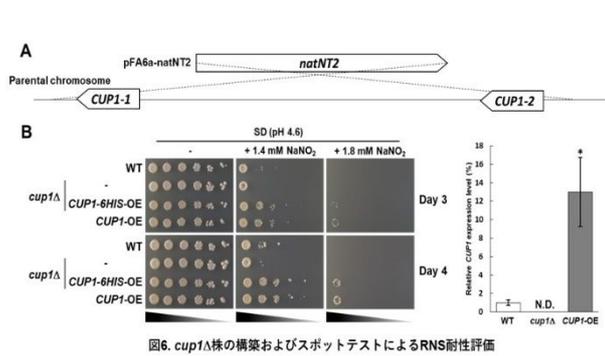


図6. *cup1Δ*株の構築およびスポットテストによるRNS耐性評価

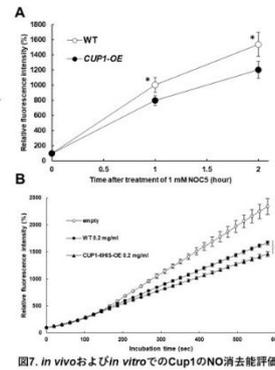


図7. *In vivo*および*in vitro*でのCup1のNO消去能評価

これまでの関連研究の報告から、研究代表者らはCup1がNOと優先的に結合してNOスカベンジャーとして働くことでNO耐性に寄与していると考えた。そこで、NO暴露後の野生型株および*CUP1*過剰発現株の細胞内NO量を評価した結果、*CUP1*を過剰発現した細胞では、細胞内NO量が有意に減少した(図7A)。また、Cup1タンパク質のNOを評価するために、Cup1のC末端側に6Hisタグを融合した*CUP1-6HIS*過剰発現株を構築し、野生型株したものそれぞれタンパク質抽出液を遠心式限外濾過フィルターにて粗精製した。野生型株と比較して*CUP1-6HIS*過剰発現株のCup1タンパク質粗精製液を用いた際にNOC5処理に伴うNO検出量が有意に低下した(図7B)。これらの結果から、Cup1が酵母細胞内でNOスカベンジャーとして働くことが示唆された。しかし、亜硝酸由来のRNSに暴露しても*CUP1*発現量に影響は見られなかった。これらの結果から、Cup1は存在量を上昇させずとも、通常細胞内に存在するCup1がRNS耐性に貢献していることが示唆された。現在、これらの知見を基に論文投稿の準備を進めている。

(5) 研究代表者らは、さらに新規なNO耐性因子を探索するために、亜硝酸由来のRNSが発生する培地にて生育可能であった酵母細胞の継代培養を繰り返し、選別前の酵母と比較して顕著に高いRNS耐性を有する酵母株の取得に成功した。また遺伝学的解析により、これまでRNS耐性に関する報告の無い新規な因子が要因であることが分かった。今後の解析により、酵母における新規なRNS耐性機構を明らかできると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuki Yoshikawa, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi	4. 巻 38(7)
2. 論文標題 An NADPH-independent mechanism enhances oxidative and nitrosative stress tolerance in yeast cells lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Yeast	6. 最初と最後の頁 414-423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/yea.3558	査読の有無 有
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 Yuki Yoshikawa, Ryo Nasuno and Hiroshi Takagi	4. 巻 85(9)
2. 論文標題 NADPH is important for isobutanol tolerance in a minimal medium of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2084-2088
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab115	査読の有無 有
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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史
2. 発表標題 酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> における新規な一酸化窒素耐性機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史
2. 発表標題 酵母におけるペントースリン酸回路とイソブタノール耐性との関連性
3. 学会等名 第67回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川 雄樹、那須野 亮、吉岡 奈津子、高木 博史
2. 発表標題 酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> における一酸化窒素応答性転写因子Fzf1の活性化機構の解析.
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会・第21回日本NO学会合同学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川雄樹、那須野亮、高木博史
2. 発表標題 酵母の過酸化水素および一酸化窒素に対する防御機構と細胞内NADPHとの関連性の解析.
3. 学会等名 第20回日本NO学会合同学術集会、誌上開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川雄樹、那須野亮、高木博史
2. 発表標題 NADPH量が制限された酵母細胞内における過酸化水素および一酸化窒素ストレス耐性機構
3. 学会等名 第53回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2020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 誌面開催
4. 発表年 2020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 吉川雄樹、那須野亮、高木博史
2. 発表標題 酵母の一酸化窒素合成において NADPHは必要なのか？
3. 学会等名 第19回日本NO学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関