

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570180

研究課題名(和文) 出芽酵母における新規細胞内レドックス制御機構の解明

研究課題名(英文) Analyses of the intracellular redox regulation in *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

中村 敏英 (Nakamura, Toshihide)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・応用微生物研究領域・主任研究員

研究者番号：60391588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母の酸化ストレス耐性に重要な遺伝子EOS1について、機能解析を行った。Eos1タンパク質の部分的欠失試験により、Eos1タンパク質の活性に重要な領域を見出した。また、EOS1遺伝子欠損変異株の遺伝子発現解析の結果、活性酸素種除去に関わる多くの遺伝子の発現量が増加している一方で、細胞内小器官に局在する活性酸素種を分解する酵素遺伝子の発現量が低下していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：EOS1, whose function is important for oxidative stress tolerance in budding yeasts, was subjected to functional analyses. Based on phenotypic analyses using the partial deletion mutants of EOS1, I found the important region for enzymatic activity in Eos1 protein. As the results of gene expression analyses in EOS1 deletion variant, expression levels of many genes involved in elimination of reactive oxygen species (ROS) were increased. However, the expression levels of ROS degrading enzymes localized in intracellular organelles were reduced.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：酸化ストレス 遺伝子発現 Eos1

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 醸造・食品製造等においては、酵母は浸透圧や温度等の様々なストレスに曝される。このようなストレス環境下では、細胞内で酸化ストレスが生じることが示唆されている。酵母の実用的ストレス耐性には、酸化ストレス耐性が重要であると考えられる。酸化ストレスに対する応答や耐性のメカニズムについては、レドックス制御系に関連した研究を中心に様々な研究がなされているが、未だ不明な点が多く残されている。

(2) 酵母の酸化ストレス耐性に関連して、欠損により酸化ストレス感受性になる機能未知遺伝子 *EOS1* の解析を行い、Eos1 タンパク質が小胞体に局在することや、N 型糖鎖付加や亜鉛恒常性維持に関わっていることが明らかとなっている。さらに細胞内スーパーオキシドの制御に関わっている可能性も示唆されているが、その機能は不明である。この Eos1 タンパク質の機能を詳細に解析することにより、不明な点の多い細胞内レドックス制御機構の一つが明らかになると期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の酸化ストレス耐性に重要な Eos1 タンパク質の機能解明を目的として、*EOS1* 遺伝子欠損株等を用いて解析を行う。Eos1 タンパク質の役割を推測するために、Eos1 タンパク質の局在する小胞体など細胞内酸化レベルを解析する。また Eos1 タンパク質の機能に重要なアミノ酸配列を特定するために遺伝子部分領域欠失による酸化ストレス耐性の変化を解析する。酸化ストレス条件での Eos1 タンパク質の機能を調べるために DNA マイクロアレイ等による遺伝子発現解析を実施する。

### 3. 研究の方法

(1) 小胞体内のレドックス状態の測定は、酸化還元レベルに応じて色の变化する小胞体局在型緑色蛍光タンパク質 (eroGFP) を用いる。eroGFP 遺伝子を野生型株と *EOS1* 遺伝子欠損株に導入し、小胞体内レドックス状態の違いについて解析を行う。また活性酸素種の分解に関わる酵素遺伝子の発現については、リアルタイム逆転写 PCR により遺伝子発現量を定量した。

(2) Eos1 タンパク質は 4 つの膜貫通領域をもつ膜タンパク質であり、細胞質側に N 端領域と C 端領域を持ち、さらに小胞体内ループを持つ構造であると推定される。それぞれの領域を欠損した変異型 Eos1 タンパク質を発現させた場合の酸化ストレス感受性等の表現型を調べることにより、どの領域が Eos1 タンパク質の機能に重要であるか決定する。

(3) 酸化ストレス条件での遺伝子発現変化について DNA マイクロアレイを用いて解析し、詳細な遺伝子発現プロファイルを取得する。具体的には酸化ストレスとして過酸化水素処理を行う。

### 4. 研究成果

(1) 出芽酵母 *EOS1* 遺伝子欠損株が酸化ストレスに感受性を示すのは、細胞内のスーパーオキシドや過酸化水素が増加していることに起因することが明らかとなった (図 1)。細胞内でスーパーオキシド量が増加している原因について検証するために、Eos1 タンパク質の細胞内局在部位である小胞体内のレドックス状態について小胞体局在型緑色蛍光タンパク質を用いて解析を行った。その結果、*EOS1* を欠損していても小胞体内の酸化レベルに大きな変化がないことが明らかとなった。*EOS1* 遺伝子欠損株細胞内で増加しているスーパーオキシドは小胞体に由来するものではないことが示唆された。

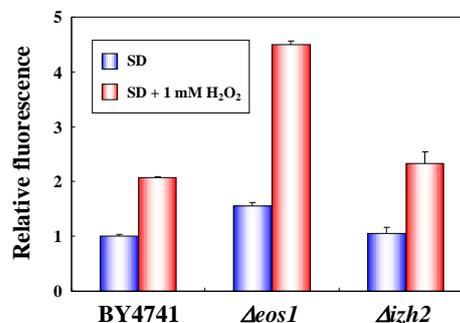


図 1. 細胞内スーパーオキシド量の比較  
BY4741 (野生型株)、 $\Delta eos1$  (*EOS1* 遺伝子欠損株)、 $\Delta izh2$  (*IZH2* 遺伝子欠損株) について、細胞内スーパーオキシドをジドロエチジウムで検出した。

(2) 細胞内でスーパーオキシドや過酸化水素等の活性酸素種が増加している原因について検証するために、活性酸素種の分解酵素をコードする遺伝子の発現量をリアルタイム逆転写 PCR で解析した。スーパーオキシドジスムターゼ 2 種 (*SOD1*, *SOD2*) およびカタラーゼ 2 種 (*CTT1*, *CTA1*) について解析を行った結果、*SOD2* および *CTA1* の遺伝子発現が大きく低下していることが明らかとなった (図 2)。Sod2 タンパク質はミトコンドリアに、Cta1 タンパク質はペルオキシゾームにそれぞれ局在していることから、*EOS1* 欠損株細胞内では、ミトコンドリアやペルオキシゾームにおける活性酸素種の分解機能が低下している可能性がある。

(3) ミトコンドリアやペルオキシゾームにおける活性酸素種の分解機能が低下している可能性について検証するために、スーパーオキシド分解活性 (SOD 活性) について詳細に解析を行った。その結果、細胞中の SOD 活性は *EOS1* 遺伝子欠損株では野生型株に比べ

約 1.4 倍に増加していることが明らかとなった (図 3)。この結果から活性酸素が多く生成されるミトコンドリアで局所的にスーパーオキシド濃度が上昇している可能性が考えられた。また、これまでの DNA マイクロアレイ解析の結果から、*EOS1* 遺伝子欠損株では鉄イオン輸送に関わる遺伝子の発現が低下していることが明らかとなっており、ヘムの減少による活性酸素種分解酵素遺伝子の発現抑制が生じている可能性も考えられる。

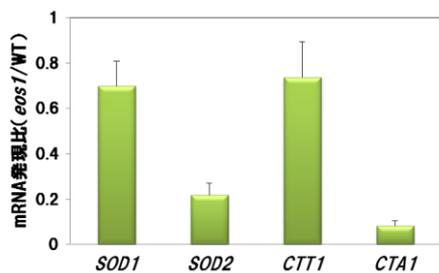


図 2, 活性酸素種分解酵素の遺伝子発現量の比較

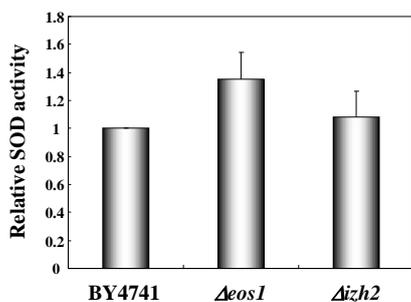


図 3, スーパーオキシドジスムターゼ活性の比較

(4) Eos1 タンパク質は 4 つの膜貫通領域をもつ膜タンパク質であり、細胞質側に N 端領域と C 端領域を持ち、さらに小胞体内ループを持つ構造であると推定される。それぞれの領域を欠損した変異型 Eos1 タンパク質を発現させた場合の酸化ストレス感受性について解析を行った結果、非膜貫通領域を欠損しても酸化ストレスに感受性を示さなかった。しかし、膜貫通領域を欠損させると酸化ストレスに感受性を示したことから、膜貫通領域が Eos1 タンパク質の機能に必須であると考えられる。Eos1 タンパク質と同一性のあるタンパク質が *Candida glabrata*、*Candida albicans*、*Schizosaccharomyces pombe* から見出されているが、特に膜貫通領域の同一性が高いことから Eos1 タンパク質の活性に膜貫通領域が重要であることが示唆された。

(5) *EOS1* 遺伝子欠損株の酸化ストレス条件下における遺伝子発現変化について DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析を行った結

果、活性酸素種消去に関わる遺伝子群の発現が野生株よりも上昇していることが明らかとなった (表 1)。通常よりも厳しい酸化ストレスを受けているため、酸化ストレスで発現誘導される遺伝子の発現量も大きく上昇していることが推測された。

表 1. *EOS1* 遺伝子欠損株において酸化ストレスにより遺伝子発現が野生型株よりも大幅に増加する遺伝子

Gene	Fold change	Descriptions of gene products
<i>SRX1</i>	4.91	Sulfiredoxin, contributes to oxidative stress resistance by reducing cysteine-sulfinic acid groups in the peroxiredoxins Tsa1p and Ahp1p that are formed upon exposure to oxidants; conserved in higher eukaryotes
<i>AZR1</i>	2.41	Plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily, involved in resistance to azole drugs such as ketoconazole and fluconazole
<i>OYE3</i>	5.29	Widely conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mononucleotide (FMN), homologous to Oye2p with slight differences in ligand binding and catalytic properties; may be involved in sterol metabolism
<i>AAD4</i>	4.82	Putative aryl-alcohol dehydrogenase with similarity to <i>P. chrysosporium</i> aryl-alcohol dehydrogenase, involved in the oxidative stress response
<i>GTT2</i>	3.51	Glutathione S-transferase capable of homodimerization; functional overlap with Gtt2p, Grx1p, and Grx2p
<i>TSA2</i>	2.06	Stress inducible cytoplasmic thioredoxin peroxidase; cooperates with Tsa1p in the removal of reactive oxygen, nitrogen and sulfur species using thioredoxin as hydrogen donor; deletion enhances the mutator phenotype of tsa1 mutants

(6) 酸化ストレス耐性とトレハロース蓄積が関連しているという報告があることから、*EOS1* 遺伝子欠損株における各種ストレス下でのトレハロース蓄積量を解析した。その結果、*EOS1* 遺伝子欠損株は定常期や低温ストレス下でのトレハロース蓄積量が野生型株よりも増加し、逆に高温ストレス下では減少していることが明らかとなった。Eos1 タンパク質がトレハロース合成に関与していることが示唆され、Eos1 タンパク質の重要な機能の 1 つである可能性があり、今後の研究課題である。

表 2. *EOS1* 遺伝子欠損株におけるトレハロース蓄積量

Strain	Log phase	Trehalose content mg/g celi DW				
		30°C Stationary	30°C 1hr	45°C 4hr	10°C 4hr	0°C 16hr
BY4741	<0.1	77.9 ± 16.9	263.0 ± 26.0	0.7 ± 1.3	25.2 ± 11.0	
$\Delta eos1$	<0.1	114.4 ± 7.9	238.6 ± 28.9	2.9 ± 2.6	42.4 ± 9.4	

以上を総括すると、本研究実績は、出芽酵母の酸化ストレス耐性における Eos1 タンパク質機能の重要性を示したものであり、機能の完全な解明には至らなかったが、酸化ストレス耐性の分子メカニズム解明に貢献するものであると考えられる。Eos1 タンパク質は亜鉛や鉄などの金属イオンの恒常性を維持することで細胞内の酸化レベルを維持することに重要なタンパク質であることが示唆された。今後は Eos1 タンパク質の機能解析をさらに進めることによって、酸化ストレス耐性の分子メカニズム解明の基盤となる新たな知見が得られるものと期待される。

## 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1件)

- ①Haitani, Y., Tanaka, K., Yamamoto, M., Nakamura, T., Ando, A., Ogawa, J. and Shima, J. Identification of an acetate-tolerant strain of *Saccharomyces cerevisiae* and characterization by gene expression analysis. Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, Vol.114, No.6, 2012, 648-651  
doi:10.1016/j.jbiosc.2012.07.002

[学会発表] (計4件)

- ①岡田奈津実、中村敏英、小川順、島純：  
RNA-seqによる *Saccharomyces cerevisiae*  
高温耐性株のトランスクリプトーム解析、  
日本生物工学会、2013年9月19日、広島
- ②田中晃一、灰谷豊、吉山洋子、山本まみ、中村敏英、安藤聡、小川順、島純：産業プロセスに有用な酢酸ストレス耐性酵母の同定と耐性メカニズムの解析、日本農芸化学会、2013年3月26日、仙台
- ③灰谷豊、中村敏英、安藤聡、小川順、島純：  
遺伝子発現解析とエタノール発酵能に基づく酸耐性酵母の特性評価、日本農芸化学会  
2012年3月23日、京都
- ④中村敏英、山本まみ、安藤聡、渡邊樹、島純：出芽酵母の高温耐性能に関する遺伝子の探索、日本農芸化学会、2012年3月23日、京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 敏英 (NAKAMURA, Toshihide)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・応用微生物研究領域・主任研究員

研究者番号：60391588