

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 6 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660058

研究課題名(和文) 酵母のアセチル化酵素Mpr1による細胞内抗酸化系の新しい制御機構

研究課題名(英文) New regulatory mechanism of intracellular antioxidative system by the yeast acetyltransferase Mpr1

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：最近明らかにしたMpr1の立体構造に基づいて理論的な分子設計を行い、分子内相互作用の強化によって野生型酵素に比べて熱安定性が著しく向上したMpr1変異体(Asn203Lys-Mpr1)を取得した。また、同変異体を発現する酵母ではMpr1を介したアルギニン合成能が亢進し、同変異体の有用性が認められた。次に、Mpr1の細胞内における基質と生成物の同定、および触媒反応を含め、Mpr1依存的なアルギニン合成経路の解明を試みた。その結果、Mpr1依存的に合成されたN-アセチルプロリンがアルギニン合成の中間代謝物質として、またはアルギニン代謝酵素の制御分子として機能する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We constructed stable Mpr1 variants by a rational design based on its crystal structure. Substitution of Asn203 to a Lys was suggested to stabilize α -helix 2, which is important for the whole structure of Mpr1, probably by neutralizing its dipole moment, leading to an increase in the thermostability of Mpr1. Expression of the Mpr1 variant enhanced the arginine biosynthesis in yeast. This finding will lead to the construction of new yeast strains with increased arginine synthetic activity and fermentation rate. We also attempted to clarify the Mpr1-dependent arginine synthetic pathway in yeast including identification of the cellular substrate of Mpr1 and its catalytic reaction. As a result, N-acetyl proline, which is converted from proline catalyzed by Mpr1, was suggested to function as the intermediate for Mpr1-dependent arginine synthesis or the regulator for the arginine metabolic enzyme.

研究分野：応用微生物学

キーワード：N-アセチルトランスフェラーゼMpr1 酵母 アルギニン合成 プロリン代謝 酸化ストレス耐性

1. 研究開始当初の背景

酵母においては、発酵生産時に高温や高濃度エタノールに曝されることにより、ミトコンドリア膜の損傷などにより活性酸素種 (ROS) が生成し、生体高分子が酸化障害を受ける。また、ROS が高温応答と酸化ストレス応答を連結している可能性も報告されている (Moraitis *et al.*, *Yeast*, **21**, 313, 2004)。一方、植物では ROS によって光合成や生育の阻害が見られ (Miller *et al.*, *Plant Cell Environ.*, **33**, 453, 2010)、ヒトにおいても酸化ストレスと疾病・老化との関連が注目されている (Lu *et al.*, *Exp Cell Res.*, **314**, 1918, 2008; Avery., *Biochem J.*, **434**, 201, 2011)。従って、細胞の酸化ストレスに対する応答機構を理解することは基礎・応用の両面で非常に重要である。

Mpr1 は当初プロリン (Pro) アナログ (アゼチジン-2-カルボン酸: AZC) を解毒する *N*-アセチルトランスフェラーゼとして同定したが (Shichiri *et al.*, *JBC*, **276**, 41998, 2001)、その後 Pro 代謝中間体 (Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸: P5C) を *N*-アセチル化し (Nomura and Takagi, *PNAS*, **101**, 12616, 2004)、アルギニン (Arg) と NO の合成を亢進することで細胞に酸化ストレス耐性を付与することが判明した (Nishimura *et al.*, *FEMS Yeast Res.*, **10**, 687, 2010)。また、P5C 自身も ROS 発生を誘導するため (Nishimura *et al.*, *FEBS Lett.*, **586**, 2411, 2012)、Mpr1 は P5C のアセチル化によっても ROS 発生を防いでいると考えられる。最近 *in vitro* の実験から、Mpr1 によるアセチル化反応がグルタチオン (GSH) の代謝産物であるピログルタミン酸 (pGlu) によって阻害されることが明らかになった (未発表)。GSH は細胞内のレドックス制御に關与する重要な抗酸化物質であるため、Mpr1 依存的な抗酸化機構と GSH 依存的な抗酸化機構が Mpr1 の活性発現によって統合的に制御されている可能性がある (図 1)。

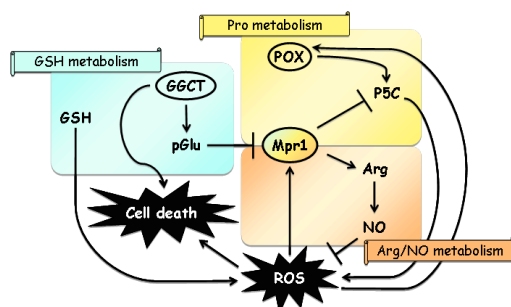


図1 Mpr1によるROS応答・細胞死誘導の統合的制御モデル

2. 研究の目的

以上の背景から、Mpr1 依存的および GSH 依存的な 2 つの抗酸化機構 (ROS 応答機構) について、GSH・pGlu 量と Mpr1 活性・Arg/NO 量の関連性、ROS 発生や生体分子の酸化状態、生育や細胞死などの表現型を解析し、両機構が統合的に制御されていることを証明する。また、Mpr1 のミトコンドリアへの輸送機構とその生理的意義、細胞内の Mpr1 活性化因

子について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各生理的条件下における細胞内 pGlu の定量と Mpr1 依存的抗酸化機構の関連性解析
まず、2,4-dinitrophenylhydrazine と *N*-[3-(Dimethylamino)propyl]-*N'*-ethylcarbodiimide を用いた pGlu の可視化と HPLC を組み合わせ、pGlu の定量系の構築を試みた。また、pGlu 分解酵素 (oxoprolinase Oxp1) の過剰発現株と破壊株を構築し、Mpr1 のモデル基質である毒性物質 AZC に対する耐性を指標として、*in vivo* での Mpr1 の活性を評価した。

(2) Mpr1 のミトコンドリアへの輸送の生理的意義の解明

ヒスチジンタグを融合した Mpr1 を酵母細胞内で発現させ、Ni カラムによるプルダウンアッセイを行った。また、GFP を融合させた Mpr1 を用いて、各種条件による Mpr1 の局在を蛍光顕微鏡にて観察した。

(3) 立体構造に基づく Mpr1 の高機能化

大腸菌を用いた組換え酵素として Mpr1 を発現・精製した後、モデル基質である AZC を用いて *in vitro* で酵素活性を測定した。また、高温 (50°C) 処理後の残存活性により安定性を評価した。

(4) Mpr1 依存的な新規アルギニン合成系の解析

Mpr1 が Arg 代謝にどのように關与しているか検討するため、Arg 合成系遺伝子の破壊株を用いて Arg 要求性の検討を行った。また、Arg 代謝に關連するアミノ酸や、既知の基質である AZC と構造の類似するアミノ酸を用いて基質のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) 各生理的条件下における細胞内 pGlu の定量と Mpr1 依存的抗酸化機構の関連性解析

pGlu の定量系の構築を試みたところ、標準試料の pGlu の定量は可能であったものの、細胞内 pGlu を定量することはできなかった。これは、細胞内 pGlu 量が非常に少なく、本検出系の感度では検出できなかったと考えられる。また、細胞内で Mpr1 の活性が内在性 pGlu によって制御されているかを検証するために、pGlu 分解酵素 (oxoprolinase Oxp1) の過剰発現株と破壊株を構築し、Mpr1 のモデル基質である毒性物質 AZC に対する耐性を指標として、*in vivo* における Mpr1 の活性を評価した。しかし、Oxp1 過剰発現株は野生株と同等の AZC 耐性を示し、また、Oxp1 破壊株は予想に反して AZC 耐性が向上した。これらのことは、細胞内 pGlu 濃度は非常に低く、Mpr1 の活性を阻害するほどではないことを示唆している。

今回我々は遺伝学的な解析を用いて、Mpr1 の細胞内基質がこれまで考えられてきた

P5C/glutamate- γ -semialdehyde (GSA)ではなく、glutamate-5-phosphate (Glu-P)であることを示す結果を得た。Glu-Pは非常に不安定であり、また *in vitro* の反応系では Mpr1 は活性を示さないことから、この反応には何らかのタンパク質との相互作用等が必要であると考えられた。細胞内濃度の pGlu では Mpr1 の活性を制御していないことを示唆する上記の結果は、モデル基質の AZC を用いて得られた結果であり、今後は生理的機能（酸化ストレス耐性）とそれに寄与する Mpr1 の酵素反応に関連付けた解析により、Mpr1 の生理機能が内在性 pGlu によって制御されるかどうかをさらに検証する必要がある。

(2) Mpr1 のミトコンドリアへの輸送の生理的意義の解明

Mpr1 がミトコンドリアへ輸送される場合、何らかのタンパク質との相互作用は必須であるとの着想から、ヒスチジンタグを融合した Mpr1 を酵母細胞内で発現させ、Ni カラムによるプルダウンアッセイを行い、Mpr1 と相互作用するタンパク質を探索した。しかし、今回の試みでは、相互作用タンパク質を見出すことはできなかった。また、各種クロスリンカーを用いて Mpr1 と相互作用タンパク質を共有結合にて結合させ同定するという試みもしたが、同様に、相互作用タンパク質の発見には至らなかった。

一方、培養条件やストレス条件と Mpr1 の局在との関連性を評価するために、GFP を融合させた Mpr1 を用いて、各種条件による Mpr1 の局在を蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、ストレス等の刺激では Mpr1 の局在変化は観察されなかったが、炭素源をグリセロールにして培養した時のみ、Mpr1 とミトコンドリアのシグナルが重なることが観察された。しかしこれは、単純に非発酵性炭素源であるグリセロールによりミトコンドリアの量が増え、結果的にミトコンドリアと重なる Mpr1 が増えたことが原因と考えられた。

以上の結果から、研究期間内に当初の研究目的を達成することは困難であると判断し、研究の方針・目的を、立体構造に基づく Mpr1 の高機能化、および Mpr1 依存的な新規 Arg 合成系の解析に変更した。

(3) 立体構造に基づく Mpr1 の高機能化

最近明らかにした Mpr1 の立体構造 (Nasuno *et al.*, *PNAS*, **110**, 11821, 2013) に基づいて理論的な分子設計を行い、活性や安定性の向上した変異型 Mpr1 を取得するとともに、それらの構造機能相関を解析した。大腸菌を用いた組換え酵素として Mpr1 を発現・精製した後、モデル基質である AZC を用いて *in vitro* で酵素活性を測定した。また、高温 (50°C) 処理後の残存活性により安定性を評価した。まず、CoA チオレート安定化により反応を触媒する Asn178 とその近傍にある Ser181 をアニオン安定化能の高い残基に置

換した変異型 Mpr1、および基質のカルボキシレート認識・結合する Asn135 をアニオン結合能の高い塩基性残基などに置換した変異型 Mpr1 を作製した。これらの活性を測定したところ、野生型酵素に比べて著しく低下した。これは側鎖サイズの変化により正常な触媒反応が阻害されたためと考えられた。

一方、N-アセチルトランスフェラーゼには二量体形成が活性に重要である酵素も存在することが報告されている。Mpr1 は溶液中で二量体を形成することから、二量体形成が活性や安定性に関与すると考えた。また、一般的に分子内相互作用はタンパク質の安定性を上昇させる。そこで、二量体の分子間表面かつ分子内ドメイン間に位置する Asn203 にアミノ酸置換を導入し、分子間または分子内相互作用の強化を試みた (図2)。

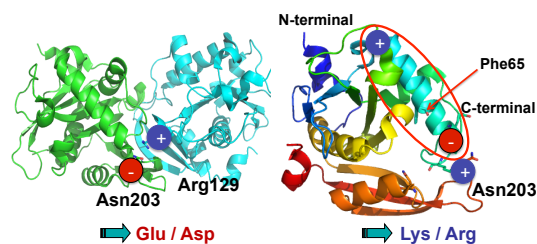


図2 Mpr1の分子内構造の安定化

その結果、Asn203 を塩基性残基 (Lys, Arg) に置換すると熱安定性が向上し、特に Asn203Lys-Mpr1 は 50°Cにおける活性半減期が野生型酵素の最大約 3.7 倍に延長し、著しい安定性の向上が認められた (図3)。

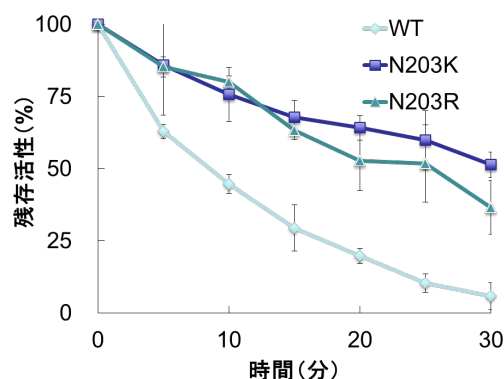


図3 Mpr1変異体の50°Cにおける安定性

また、ネイティブゲルを用いた電気泳動の結果から、この熱安定性の向上は二量体形成の促進ではなく、分子内相互作用の強化に起因するものと考えられた。さらに、過去に取得した安定化型変異体 (Phe65Leu) との二重変異体では、安定性が単独変異体よりも有意に向上した。また、各変異型酵素を酵母で発現させた結果、細胞内での Mpr1 を介した Arg 合成能の亢進が認められた (図4)。

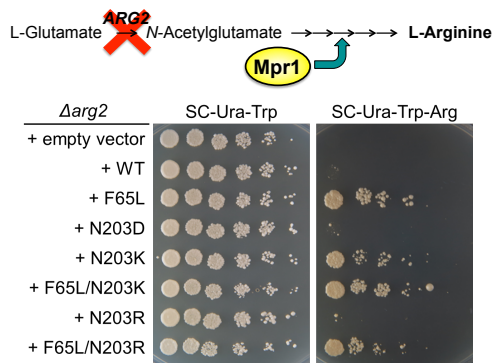


図4 各Mpr1変異体を発現する酵母 $\Delta arg2$ 株の生育

(4) Mpr1 依存的な新規アルギニン合成系の解析

酵母では、グルタミン酸を出発物質として Arg2,6,5 により、*N*-アセチルグルタミン酸 (*N*-AcGlu)、*N*-アセチルグルタミルリン酸 (*N*-AcGluP)、*N*-アセチルグルタミル- γ -セミアルデヒドへとそれぞれ変換され、その後数段階の反応を経てアルギニン (Arg) が合成される。Mpr1 が Arg 代謝にどのように関与しているか詳細に検討するため、Arg 合成系遺伝子の破壊株を用いて Arg 要求性の検討を行った。その結果、Arg2 遺伝子破壊株は Arg 要求性にはならなかったが、Arg2 の下流である Arg5/6 (同一遺伝子上にコードされる) の遺伝子破壊株は Arg 要求性を示すことが確認できた。このことより、Mpr1 は *N*-AcGlu、もしくは *N*-AcGluP の生成反応を触媒していることが示唆された。また、Arg 合成に Mpr1 の酵素活性が重要であるかを検証するために、Arg2 遺伝子破壊株で野生型 Mpr1 および活性残基の Asn178 を Asp に置換した変異型 Mpr1 (Asn178Asp) を過剰発現させ、Arg 無添加の培地での生育を評価した。その結果、野生型 Mpr1 の過剰発現により Arg2 遺伝子破壊株は良好に生育するようになったが、変異型 Mpr1 の過剰発現では生育は改善されなかったことから、Mpr1 依存的な Arg 合成にはその酵素活性が必要であることが示された。

次に、Mpr1 の Arg 合成経路における生成物が *N*-Ac Glu もしくは *N*-Ac GluP のどちらであるかを明らかにするため、Arg6 活性が野生型株の 1/1,000 に低下した *arg6* 株に、Mpr1 の過剰発現プラスミドを導入し、Arg 非含有培地における生育を評価した。その結果、*arg6* 株は Arg 非含有培地において著しく生育が悪化したが、Mpr1 を過剰発現させてもこの生育悪化は改善されなかった。Mpr1 が Arg6 の生成物である *N*-Ac GluP を供給する場合、Mpr1 の過剰発現によって *arg6* 株の生育悪化は改善されると考えられる。従って、Mpr1 は *N*-Ac Glu の供給により Arg 合成に寄与することが示唆された (図 5)。しかし、Mpr1 の Glu に対する *N*-アセチル化活性の測定を行ったところ、活性は検出できなかった。

そこで、Arg 代謝に関連するアミノ酸や、既知の基質である AZC と構造の類似するア

ミノ酸を用いて基質のスクリーニングを行った。その結果、興味深いことに pH8.0-9.0 の条件において Mpr1 の Pro に対する *N*-アセチル化活性を検出した (図 6)。また、LC-MS を用いた解析により、Mpr1 は *in vitro* において Pro を *N*-アセチル化することにより *N*-アセチルプロリン (*N*-Ac Pro) を合成することが明らかになった。以上の結果から、Mpr1 依存的に合成された *N*-Ac Pro が Arg 合成の中間代謝物質となる可能性、Arg 代謝酵素の制御分子として機能する可能性が考えられることから (図 7)、現在、*N*-Ac Pro の Arg 代謝経路における機能の解析を含め、Mpr1 依存的な Arg 合成経路の全容解明に取り組んでいる。

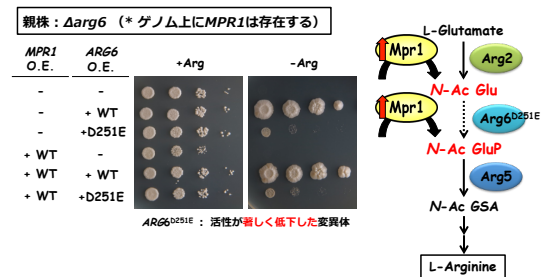


図5 Mpr1を発現する酵母 $\Delta arg6$ 株の生育

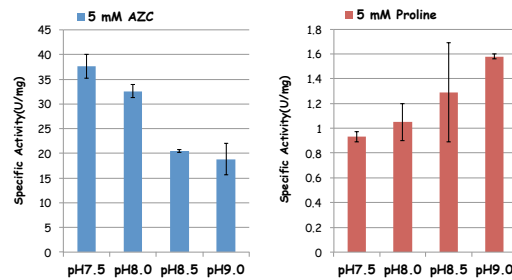


図6 Mpr1のAZC, プロリンに対するアセチル化活性

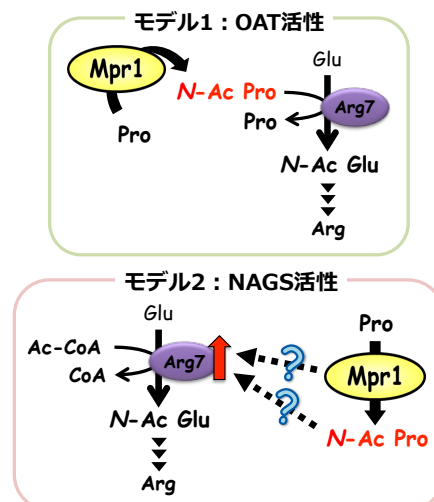


図7 Mpr1依存的な新規アルギニン合成経路モデル

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 4 件)

- ① Ryo Nasuno, Saeka Hirase, Saki Norifune, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi: Structure-based molecular design for thermostabilization of *N*-acetyltransferase Mpr1 involved in a novel pathway of L-arginine synthesis in yeast. *Journal of Biochemistry*, **159**, 271-277 (2016). 査読有
- ② 高木博史, 那須野 亮: 酵母に見出した新規な抗酸化酵素「*N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1」. *化学と生物*, **53**, 148-155 (2015). 査読有
- ③ 高木博史: 製パンプロセスにおけるパン酵母のストレス耐性: プロリン・アルギニン代謝と育種への応用. *日本食品微生物学会雑誌*, **31**, 185-193 (2014). 査読有
- ④ Hiroshi Kitagaki, Hiroshi Takagi: Mitochondrial metabolism and stress response of yeast: Applications in fermentation technologies. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **117**, 383-393 (2014). 査読有

〔学会発表〕 (計 10 件)

- ① 乗船沙紀, 関口春菜, 那須野 亮, 高木博史: 酵母における *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 のアルギニン代謝経路における分子機構の解明. 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016.3.27-30, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) .
- ② 高木博史: 酵母におけるプロリン・アルギニン代謝を介した新しい酸化ストレス耐性機構. 第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会ワークショップ「多様性・特異性を基盤にした新しい微生物機能とその応用」, 2015.12.1-4, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) .
- ③ 乗船沙紀, 関口春菜, 那須野 亮, 高木博史: 酵母における *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 依存的な新規アルギニン合成機構の解明. 酵母遺伝学フォーラム 第 48 回研究報告会, 2015.8.31-9.2, 広島大学 (広島県東広島市) .
- ④ 高木博史, 那須野 亮: 酵母に見出した抗酸化酵素「*N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1」の構造機能解析. 第 15 回日本蛋白質科学会年会公募型シンポジウム. 2015.6.24-26, あわぎんホール (徳島県徳島市) .
- ⑤ 乗船沙紀, 関口春菜, 那須野 亮, 高木博史: 酵母における *N*-アセチル基転移酵素 Mpr1 依存的な新規アルギニン合成機構の解明. 日本農芸化学会関西支部例会 (第 489 回講演会), 2015.5.23, 京都府立大学 (京都府京都市) .
- ⑥ 平瀬冴華, 那須野 亮, 渡辺大輔, 高木博史: 酵母の抗酸化酵素 *N*-acetyltransferase Mpr1 の立体構造に基づいた機能向上. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015.3.27, 岡山大学 (岡山県岡山市) .

- ⑦ 平瀬冴華, 那須野 亮, 渡辺大輔, 高木博史: 酵母の酸化ストレス耐性に関わる *N*-acetyltransferase Mpr1 の立体構造に基づいた分子設計と構造機能相関. 2014 年度日本農芸化学会関西支部大会 (第 486 回講演会), 2014.9.20, 奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県生駒市) .
- ⑧ 乗船沙紀, 関口春菜, 那須野 亮, 高木博史: 酵母における *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 依存的な新規アルギニン合成機構の解明. 酵母遺伝学フォーラム 第 47 回研究報告会, 2014.9.1-3, 東京大学 (東京都文京区) .
- ⑨ 関口春菜, 那須野 亮, 西村 明, 高木博史: 酵母における *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 依存的な新規アルギニン合成系の分子機構の解析. 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014.3.27-30, 明治大学 (神奈川県川崎市) .
- ⑩ 関口春菜, 西村 明, 那須野 亮, 高木博史: 酵母に見出した抗酸化酵素 *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の機能解析. 日本農芸化学会関西支部例会 (第 482 回講演会), 2013.12.7, 神戸大学 (兵庫県神戸市) .

〔図書〕 (計 2 件)

- ① Hiroshi Takagi, Jun Shima: Stress tolerance of baker's yeast during bread-making processes. "Stress Biology of Yeasts and Fungi: Application for Industrial Brewing and Fermentation" Hiroshi Takagi, Hiroshi Kitagaki (eds.) pp. 23-42 (2015).
- ② 高木博史: アミノ酸の代謝制御機構と産業酵母の育種への応用. 「酵母の生命科学と生物工学 一産業応用から基礎科学へ」 (原島 俊, 高木博史 編), pp. 225-243 (2013).

〔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) 連携研究者

大津 巖生 (OHTSU, Iwao)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号: 60395655

(3) 研究協力者

那須野 亮 (NASUNO, Ryo)