

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07360

研究課題名(和文) コエンザイムQが関与するシステイン代謝における酸化ストレス制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the regulation for oxidative stress in cysteine metabolism related to Coenzyme Q

研究代表者

戒能 智宏 (Kaino, Tomohiro)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：90541706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母(*S. pombe*)のコエンザイムQ10の欠損株の生育には、システイン(Cys)やグルタチオンなどの抗酸化物質の添加が必要であるが、CoQ欠損が遺伝子発現に及ぼす影響は明らかにはされていない。そこで、CoQ合成不能株の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて調べたところ、イオンや硫黄を含む分子種に関連するトランスポーターの遺伝子に発現の増加が見られた。また、システイン合成酵素遺伝子破壊株は、過酸化水素やパラコートに対して強い感受性を示し細胞内の活性酸素種(ROS)量が顕著に増加していた。

研究成果の概要(英文)：The growth of fission yeast (*S. pombe*) CoQ deficient mutants required the addition of cysteine (Cys) or glutathione for antioxidant to the medium, but the affect for gene expression in CoQ deficient mutants have not been elucidated. When the gene expression of the CoQ deficient mutant was analyzed by microarray, the genes of transporter for ion or sulfur compounds were upregulated. The mutant of cysteine synthase gene show the sensitive for hydrogen peroxide and paraquat and the level of reactive oxygen species (ROS) were induced.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：Coenzyme Q ubiquinone cysteine

1. 研究開始当初の背景

コエンザイム Q₁₀ (CoQ₁₀) は、ユビキノンの名称でも知られ、ミトコンドリアにおける電子伝達機能の他に、近年では脂溶性抗酸化物質として脂質の過酸化防止機能や活性酸素の消去能を有するなど細胞内での新たな機能の発見に注目が集まっている。CoQ 合成酵素遺伝子の研究は大腸菌と出芽酵母をモデルとして研究が進められ、これまでに 10 個の遺伝子が CoQ 合成に関与することが明らかにされているが (図 1) (引用文献 1)、それらの遺伝子の破壊株では呼吸欠損以外の特徴的な表現型はなく、より詳細な CoQ の機能解析には他のモデル生物を用いる必要があると考えられる。

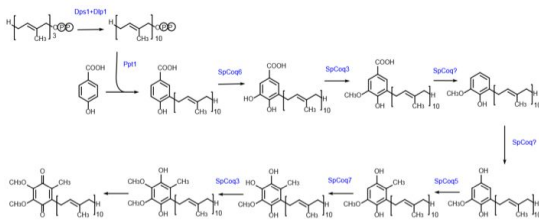


図 1 コエンザイム Q の合成経路

分裂酵母 (*S. pombe*) は、モデル生物として広く用いられている酵母であり、出芽酵母が CoQ₆ を合成するのに対して、ヒトと同じ CoQ₁₀ を合成している。*S. pombe* の CoQ 合成に関与する遺伝子の単離と破壊株の作製が進められ、その結果、CoQ 合成酵素遺伝子破壊株のほとんどが CoQ 合成不能を示し、破壊株の生育にはシステイン (Cys) やグルタチオンなどの抗酸化物質の添加が必要であることや、硫化水素を発生するという極めて特徴的な表現型を示した。さらに分裂酵母やヒトなどの高等真核生物にしか存在しない CoQ 合成に関与する遺伝子 (*dlp1*) があり (引用文献 2)、分裂酵母は、大腸菌や出芽酵母とは異なりヒトと類似の性質を示すことが多いことから、分裂酵母はヒトの CoQ₁₀ 研究のモデルとして最も適していると考えられる。

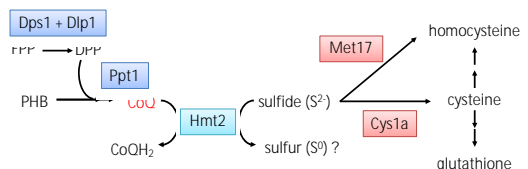


図 2 分裂酵母での sulfide 代謝のモデル図

これまでの解析から CoQ 合成酵素遺伝子破壊株の表現型の一つである硫化水素の発生は、sulfide-quinone oxidoreductase (Hmt2) の電子受容体として機能している CoQ が欠損することにより sulfide が蓄積することが原因であると考えられている (図 2)。非常に興味深いことに *hmt2* の相同遺伝子は出芽酵母には存在せずヒトやマウスなどの高等生物にのみ存在していることは、出芽酵母ではこ

の表現型が見られないことと一致しており、CoQ 研究に分裂酵母を用いる大きな利点の一つと考えられる。また、CoQ 合成酵素遺伝子破壊株は酸化ストレスに弱く、カタラーゼの遺伝子発現が上昇していることから CoQ の欠損により細胞内の酸化ストレスが昂進していることが示唆されている。

2. 研究の目的

コエンザイム Q₁₀ (CoQ₁₀) は、ミトコンドリアにおける電子伝達系において電子の授受を行っているほか、脂溶性の抗酸化物質としても機能していることが報告されている。分裂酵母は、ヒトと同じ CoQ₁₀ を合成し、CoQ 合成酵素遺伝子破壊株の生育にはシステイン (Cys) やグルタチオンなどの抗酸化物質の添加が必要であることや、CoQ が sulfide-quinone oxidoreductase (Hmt2) を介して sulfide の酸化代謝に関与していることが示唆されている。

そこで、分裂酵母の CoQ 合成酵素遺伝子破壊株を用いて、マイクロアレイ解析を行い遺伝子発現レベルでの細胞内代謝への影響を評価することを目的とした。また、CoQ がどのようにシステイン代謝を含む含硫アミノ酸代謝に影響を及ぼし、細胞内の酸化ストレスや硫化水素発生に関与しているかを細胞生物学的アプローチを用いて解明することを目的とした。あわせて、抗酸化に関与する遺伝子破壊株における細胞内 CoQ の酸化型および還元型の定量方法の検討を行った。

3. 研究の方法

野生株と CoQ 欠損株を用いて、YES 液体培地で培養した菌体から total RNA を抽出し、逆転写反応により二本鎖 cDNA を合成し、これをプローブとしてマイクロアレイ解析を行った。細胞内の活性酸素種 (ROS) の解析には、ROS を検出する蛍光プローブ (DHE、H₂DCFDA) を使い、FACS により解析を行った。細胞内 CoQ の酸化型、還元型の定量には HPLC を用いた。

4. 研究成果

分裂酵母 CoQ 欠損株の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて調べたところ、野生株に比べて分裂酵母 CoQ 合成不能株では、34 個の遺伝子の発現が 2 倍以上に増加し、29 個の遺伝子の発現が 0.5 倍以下に減少していた。Gene Ontology 解析を行ったところ、ion transmembrane transporter activity や oxidoreductase activity に分類されている遺伝子の発現が変動していることが分かった。また、電子伝達系の遺伝子の発現に減少が見られたほか、イオンや硫黄を含む分子種に関連するトランスポーターの遺伝子に発現の増加が見られた。これらの結果は、CoQ が欠損することで電子伝達系のみならず、細胞内のイオンや硫黄を含む分子種の代謝に CoQ が関与していることを示唆しており、興

味深い成果が得られたと考えている。

硫黄を含むアミノ酸であるシステインや、グルタチオンは細胞内で抗酸化物質として働いていることが知られている物質である。また、CoQ₁₀も抗酸化能を持つ物質として知られている。分裂酵母のCoQ合成酵素はミトコンドリアに局在していることが知られているが(引用文献3, 4)、システイン合成酵素の局在をGFPを用いて確認した。その結果分裂酵母システイン合成酵素はミトコンドリアに局在していることが明らかとなった。

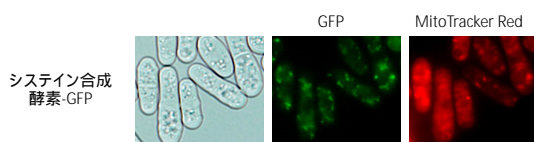


図3 システイン合成酵素の細胞内局在

次に、分裂酵母CoQ欠損株やシステイン合成酵素遺伝子の破壊株を用いて培地に酸化ストレスである過酸化水素やパラコートを追加した時の生育をスポットアッセイで、細胞内の活性酸素種(ROS)の量の測定を蛍光プローブを用いて行った。

その結果、分裂酵母システイン合成酵素遺伝子破壊株では、過酸化水素やパラコートに対して強い感受性を示し、特にパラコートで処理した時に細胞内のROSが顕著に増加していた。一方、グルタチオン合成遺伝子の破壊株では、CoQ欠損株よりも過酸化水素に対して強い感受性を示しROSの発生も確認できたが、パラコート処理では感受性を示すもののROSの増加は観察されなかった。また、*sod1*破壊株では過酸化水素、パラコートともに強い感受性を示しROSも発生していた。*sod2*破壊株においては、過酸化水素、パラコートともに強い感受性を示したが、パラコートではROSの発生はほとんど観察されなかった。分裂酵母CoQ欠損株では、過酸化水素やパラコートに対して感受性を示したが、細胞内のROS量に顕著な変化は見られなかった。以上の結果から、脂溶性の抗酸化物質であるCoQに比べて、水溶性の抗酸化物質であり代謝経路においても他の物質の合成基質としても重要なシステインやグルタチオンの合成遺伝子破壊株の方が酸化ストレスに対しては感受性を示していた。

CoQは酸化型と還元型の2つの構造をとることが出来る物質であり、そのため電子伝達系で電子の受け渡しや、抗酸化物質として機能することが知られている。今回、分裂酵母(*S. pombe*)から出来るだけ酸化を抑制した条件でCoQ₁₀を抽出して、酸化型と還元型のCoQ₁₀をそれぞれ検出し、定量を行った。その際、様々な酸化ストレス感受性株を用いて、細胞内の還元型CoQ₁₀の抽出溶媒の検討、抽出条件の検討を行ったところ、野生株と比較して還元型CoQ₁₀の比率が変動していることが示唆される株を見出した。

引用文献

1. Kawamukai, M. Biosynthesis of coenzyme Q in eukaryotes. (2016) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80(1), 23

2. Saiki R., Nagata A., Uchida N., Kainou T., Matsuda H. and Kawamukai M. Fission yeast decaprenyl diphosphate synthase consists of Dps1 and the newly characterized Dlp1 protein in a novel heterotetrameric structure. (2003) *Eur. J. Biochem.* 270, 4113

3. Uchida N., Suzuki K., Saiki R., Kainou T., Tanaka K., Matsuda H. and Kawamukai M. Phenotypes of fission yeast defective in ubiquinone production due to disruption of the gene for *p*-hydroxybenzoate polyprenyl diphosphate transferase. (2000) *J. Bacteriol.* 182(24), 6933

4. Hayashi K., Ogiyama Y., Yokomi K., Nakagawa T., Kaino T., Kawamukai M. Functional conservation of coenzyme Q biosynthetic genes among yeasts, plants, and humans. (2014) *PLoS ONE*, 9(6), e99038.

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2件)

1. Moriyama D., Kaino T., Yajima K., Yanai R., Ikenaka Y., Hasegawa J., Washida M., Nanba H., Kawamukai M. +These two authors contributed equally to this work. Cloning and characterization of decaprenyl diphosphate synthase from three different fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 査読有, 101(4), 1559-1571 (2017)

doi:10.1007/s00253-016-7963-0

2. Moriyama D., Hosono K., Fujii M., Washida M., Nanba H., Kaino T., Kawamukai M.

Production of CoQ₁₀ in fission yeast by expression of genes responsible for CoQ₁₀ biosynthesis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 79 (6), 1026-1033 (2015)

doi: 10.1080/09168451.2015.1006573

[学会発表](下記6件他、計29件)

1. 戒能智宏, 竹内佳奈, 川向 誠, 分裂酵母 *S. pombe* の CoQ 欠損株と種々の破壊株の酸化ストレス感受性、日本農芸化学会中四国支部第 50 回記念講演会(例会) 2018 年 1 月 27 日

2. 渡子 開、望月汐美、戒能智宏、川向 誠
分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* の
種々の培養条件における生育と CoQ 生合成能
への影響、第 14 回日本コエンザイム Q 協会
研究会、2017 年 2 月 7 日

3. D. Moriyama, T. Kaino, K. Hosono, M.
Fujii, R. Yanai, K. Yajima, Y. Ikenaka, J.
Hasegawa, M. Washida, H. Nanba, M.
Kawamukai, Breeding of recombinant
fission yeast for high production of
Coenzyme Q10, The Fifth International
Conference on Cofactors (ICC-05) and
Active Enzyme Molecule 2016 (AEM 2016),
2016 年 9 月

4. 森山大輔、戒能智宏、矢島麗嘉、柳井良
太、池中康裕、長谷川淳三、鷲田元久、難波
弘憲、川向 誠、酵母由来デカプレニルニリ
ン酸合成酵素の解析、日本農芸化学会 2016
年度大会、2016 年 3 月 29 日

5. 戒能智宏、竹内佳奈、古田奈々、川向 誠、
分裂酵母の CoQ 欠損が引き起こす表現型とシ
ステイン代謝の関係、BMB2015 第 38 回日本
分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大
会合同大会、2015 年 12 月 3 日

6. 戒能智宏、竹内佳奈、古田奈々、川向 誠、
CoQ 欠損が引き起こす分裂酵母の表現型とシ
ステイン代謝の関係、第 25 回イソプレノイ
ド研究会例会、2015 年 9 月 14 日

〔図書〕(計 4 件)

1. 戒能智宏、川向 誠、酵母によるコエ
ンザイム Q₁₀ の生産(第 5 章)、酵母菌・麹菌・
乳酸菌の産業応用展開(五味勝也、阿部敬悦
監修)、シーエムシー出版、40-47、2018 年

2. 戒能智宏、川向 誠、コエンザイム Q₁₀
増産技術の開発、BIO INDUSTRY、シーエムシ
ー出版、34(5)、63-71、2017 年

3. 戒能智宏、ヒトにとっても身近なコエ
ンザイム Q10、生物工学会誌(日本生物工学会)
第 93 巻、第 5 号、p295、2015 年

4. 戒能智宏、川向 誠、第 4 章生合成と欠
損症、コエンザイム Q10 の基礎と応用(日本
コエンザイム Q 協会編)丸善プラネット、
41-64、2015 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戒能 智宏(KAINO, Tomohiro)
島根大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：90541706

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()