

令和元年5月29日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21165

研究課題名（和文）タンパク質脱ニトロ化酵素の探索・同定・機能解析

研究課題名（英文）Screening, identification, and functional analyses of protein denitrase

研究代表者

那須野 亮（Nasuno, Ryo）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：90708116

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）：本課題では、タンパク質ニトロ化によるシグナル経路の消去系酵素denitraseを、酵母をモデル生物として同定することを試みた。グルタミン合成酵素（GS）をモデル基質として酵母denitrase活性の検出を試みたところ、酵母粗酵素液からニトロ化GSに対する明確なdenitrase活性を検出した。また、亜硝酸処理条件下で多数の代謝酵素がニトロ化されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、酵母から初めてdenitrase活性を検出するとともに、多数のニトロ化タンパク質を同定した。本課題の期間内では、denitraseの同定には至らなかったが、これらの成果により、denitraseの探索がより加速されると考えられる。Denitraseの同定と機能解析は、様々な病態とも関連するタンパク質ニトロ化シグナルを理解する上で必須であり、本研究成果は、重要な基礎生物学的知見であるにとどまらず、将来的な医学・薬学・農学分野への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We tried to identify Denitrase which decreases the protein tyrosine (Tyr) nitration-dependent signal. Using the yeast glutamine synthetase Gln1 as a model substrate, we detected the clear denitrase activity against the nitrated Gln1 from the yeast lysate. Our proteomic analyses showed that many metabolic enzymes are nitrated under nitrite treatment.

研究分野：生化学・細胞生物学・微生物学

キーワード：脱ニトロ化酵素 酵母 タンパク質ニトロ化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) パーオキシナイトライト (PN) によるニトロ化修飾はシグナル伝達系として機能する。
一酸化窒素 (NO) は、多くの生物種において様々な生命現象に関わるシグナル分子である。NO はタンパク質中のヘム鉄やシステイン残基に可逆的に結合し、タンパク質の機能を制御する。一方、NO は活性酸素種 (ROS) の一種であるスーパーオキシドアニオンと反応し、PN を生成する。PN はタンパク質のチロシン (Tyr) 残基の側鎖をニトロ化して 3-ニトロチロシン (3NT) へと変換し、標的タンパク質の活性を制御することが多くの生物種で報告されている。Tyr 残基のニトロ化は、Tyr のフェノール性水酸基の pKa の低下や立体障害により、タンパク質の機能を変化させる。このように、NO によるシグナルの一部は、PN によるタンパク質 Tyr 残基のニトロ化を介して細胞内で伝達されると考えられる。

(2) PN によるタンパク質ニトロ化を消去する系は明らかではない。

ニトロ化は化学的に安定であり、消去 (脱ニトロ化) には酵素による触媒反応が必要と考えられる。一方、動物細胞を用いた研究から、細胞には NO 発生刺激に応答する脱ニトロ化酵素 (denitrase) 活性があることが示されている。Denitrase 活性はいくつかの組織や細胞で見出されており、denitrase による脱ニトロ化を受けるタンパク質も複数同定されている。しかし、denitrase はいまだ同定されておらず、denitrase 分子の解析は進んでいない。ニトロ化シグナルを理解する上で、denitrase の同定は必須である。

(3) 酵母は、タンパク質ニトロ化シグナルの研究のよいモデル生物となる。

応募者は、哺乳類と同様に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* がアルギニン依存的に NO を生成し、生成された NO がストレス耐性に寄与することを見出した。また、酵母でもタンパク質のニトロ化が報告されていることから、酵母はタンパク質ニトロ化研究のモデル生物に適していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、酵母をモデル生物として用い、denitrase 分子およびそれをコードする遺伝子を探索・同定・機能解析することを目的として行った。酵母を用いた簡便なスクリーニング系により denitrase を同定した後、denitrase の酵素学的解析、細胞内基質の探索・同定、denitrase および基質タンパク質のニトロ化の生理学的機能の解析を行うことを目標とした。また、同定した酵母 denitrase のアミノ酸配列・塩基配列情報から、多種生物におけるオルソログの機能解析を行うとともに、酵母 denitrase と同様の探索系と多種生物由来の遺伝子ライブラリー等を用いて多種生物の denitrase のスクリーニングを行うことも、併せて目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酵母 Tyr 要求性株の構築と表現型の解析

相同組換えを用いた方法により、酵母 *S. cerevisiae* BY4741 株を親株に、*tyr1* 株、*aro7* 株を構築し、最少培地へ塗布することでアミノ酸要求性を確認した。酵母が遊離 3NT を Tyr へ変換する能力を持つか解析するため、野生株および *aro7* 株を最少培地、Tyr・フェニルアラニン (Phe) 含有最少培地、3NT・Phe 含有最少培地にスポットし、生育を評価した。また、酵母が 3NT を細胞内へ取り込んでいることを確認するため、3NT を単一窒素源とする最少培地に野生株を塗布し、生育を評価した。

(2) タンパク質ニトロ化レベルの解析

各種条件で培養・ストレス処理した酵母からタンパク質を抽出し、抗 3NT 抗体を用いたウェスタンブロットに供し、タンパク質ニトロ化レベルを評価した。

(3) ニトロ化 Gln1 をモデル基質として用いた denitrase 活性の評価

酵母 glutamine synthetase (GS) Gln1 を、pET53 プラスミドおよび大腸菌 BL21(DE3) 株を用いた系により His タグ融合タンパク質として発現し、Ni カラムを用いて精製した。精製 Gln1 を PN 処理した後、抗 3NT 抗体によるドットブロットにより Gln1 のニトロ化を確認した。酵母粗酵素液の denitrase 活性を測定するため、ニトロ化 Gln1 を酵母粗酵素液と混合し 37 °C で 1 時間インキュベートした後、抗 3NT 抗体および抗 His タグ抗体を用いたドットブロット法に供した。GS 活性の測定は、GS 反応の副生成物として生じる無機リン酸をマラカイトグリーン法により定量した。

(4) 定量的ニトロ化プロテオーム解析

¹⁴N または ¹⁵N ラベルした硫酸アンモニウム (硫安) を単一窒素源とする最少培地で酵母を培養し、¹⁴N-硫安で培養した細胞をコントロールとする一方、¹⁵N-硫安で培養した細胞を亜硝酸塩で処理した。集菌の後タンパク質を抽出し、等量ずつ混合して SDS-PAGE に供し、CBB にて染色した。トリプシン消化・還元アルキル化を行いゲルから抽出したペプチドを LC-MS/MS に供し、¹⁴N ラベルされたペプチドと ¹⁵N ラベルペプチドのシグナル強度の比から、タンパク質量を相対定量した。また、Tyr のニトロ化シグナルを検出し、同様に定量した。

4. 研究成果

(1) 3NT を用いた denitrase のスクリーニング

いくつかの脱リン酸化酵素は、リン酸化タンパク質に加えて相当する遊離リン酸化 Tyr を Tyr へと変換することから、同様に denitrase もタンパク質ニトロ化部位のアミノ酸残基に相当する遊離 3NT を Tyr へと変換する活性を有すると仮定した。そこで、Tyr 要求性株が Tyr 非含有・3NT 含有培地で生育可能か検証した。まず、Tyr 要求性株候補として Tyr 合成経路の遺伝子 *TYR1*, *ARO7* に着目した。 *tyr1* 株と *aro7* 株を構築し、Tyr 要求性を評価したところ、 *tyr1* 株は Tyr 要求性を示さず、 *aro7* 株は Tyr・フェニルアラニン要求性を示した。続いて、 *aro7* 株を Tyr 非含有・3NT 含有培地で培養したが生育しなかった (図 1)。亜硝酸塩の添加によりニトロ化ストレスを加えた条件でも、同様の結果であった。一方で、野生株は 3NT 単一窒素源培地で生育したことから、3NT は細胞内に取り込まれると考えられた。以上の結果から、タンパク質脱ニトロ化酵素には、遊離 3NT を Tyr へ変換する活性はない (少なくとも生育に必要な量の Tyr は合成できない) と結論付けた。

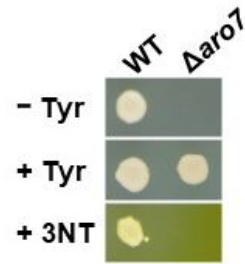


図1 Δ aro7株の3NT資化能

(2) 細胞内ニトロタンパク質レベルが上昇する条件の探索

生化学的に脱ニトロ化酵素を探索することを目的に、タンパク質ニトロ化レベルが高い条件で denitrase 活性が上昇すると仮定し、タンパク質ニトロ化レベルが高い細胞の処理・培養条件を探索した。種々の条件で培養・処理した細胞からタンパク質を抽出し、抗 3NT 抗体によるウェスタンブロット解析を行ったところ、特定のストレス条件・増殖時期に依存してタンパク質ニトロ化レベルが変化することが明らかとなった。また、細胞内タンパク質のタンパク質ニトロ化レベルをより顕著に上昇させることを試みた。まず、PN ドナーである 3-(4-Morpholinyl)sydnominine で酵母を処理したが、タンパク質ニトロ化レベルの上昇はコントロール条件と比べて軽微であった。しかし、亜硝酸塩を NO ドナーとして処理することで細胞内ニトロ化レベルが著しく上昇した (図 2)。



図2 ニトロ化レベルの解析

(3) ニトロ化 Gln1 をモデル基質として用いた denitrase 活性の測定

GS は、ニトロ化により活性が阻害されることが、哺乳類や植物で報告されている。また、哺乳類細胞由来の denitrase 活性は、GS のニトロ化修飾を除去することが報告されている。そこで、GS のニトロ化、および酵素活性を指標に、酵母 denitrase を探索した。まず、酵母 GS である Gln1 を、大腸菌を用いた組換えタンパク質として精製し PN 処理したところ、活性が顕著に低下することが分かった。さらに、PN 処理による Gln1 のニトロ化も確認された (図 3)。以上のことから、酵母 GS においても、ニトロ化により酵素活性が抑制されることが、初めて明らかとなった。

続いて、denitrase 活性の測定を試みた。まず、ニトロ化によって抑制された Gln1 活性の回復を指標に、denitrase 活性の検出を試みた。細胞内タンパク質ニトロ化レベルが上昇する条件で培養・処理した酵母細胞から得た粗酵素液をニトロ化 Gln1 と混合・インキュベートし、GS 活性を測定したが、酵母粗酵素液に含まれる Gln1 活性が非常に高く、精製 Gln1 由来の活性の変化を観察することはできなかった。続いて、抗 3NT 抗体を用いたドットプロット法により、Gln1 ニトロ化レベルの減弱を指標に denitrase 活性の検出を試みた。酵母粗酵素液とニトロ化 Gln1 を、プロテアーゼ阻害剤存在下で混合し 37 °C で 1 時間インキュベートすると、Gln1 タンパク質量を示すシグナルが減弱しなかったのに対し、ニトロ化シグナルは減弱した (図 4)。また、ボイルして失活させた酵母粗酵素液を用いた場合は、どちらのシグナルも減弱しなかった。このことにより、酵母粗酵素液から denitrase 活性を検出した。酵母細胞内から denitrase 活性を検出した例は報告が無く、これが初めての知見である。

さらに、硫酸沈殿により分画した酵母粗酵素液を用いて同様の解析を行ったが、硫酸分画前より denitrase 活性が上昇した画分は見出せなかった。粗酵素液中の見かけの denitrase 活性が低すぎるのが一因と考えられる。denitrase 活性の検出感度を上げるべく、反応させる粗酵素液量やタンパク質量を増加させたが、酵母が持つプロテアーゼ活性が極めて高く Gln1 自身

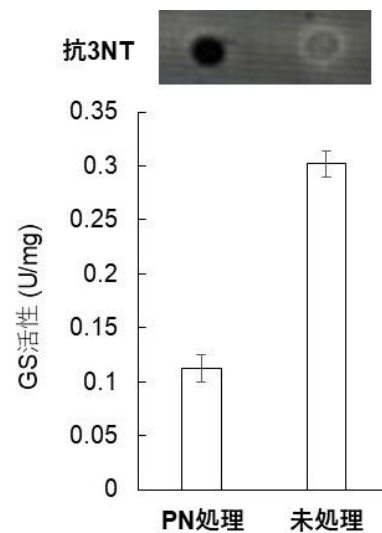


図3 ニトロ化とGln1活性

が分解されて、プロテアーゼ活性と denitrase 活性の区別が難しくなったため、denitrase 活性検出感度の向上には至らなかった。

(4) 別のモデル基質ニトロ化タンパク質の探索

前項より、ニトロ化 Gln1 をモデル基質として denitrase 活性を高感度で測定することは、困難であると分かった。そこで、Gln1 に代わる DNT 活性の基質を探索するため、酸性亜硝酸処理した細胞から抽出したタンパク質を、定量的ニトロ化プロテオーム解析に供し、ニトロ化タンパク質の同定を試みた。その結果、複数のタンパク質、特に多くの代謝酵素がニトロ化されるとともに、タンパク質量が増加することを見出した。また、これらのタンパク質のニトロ化部位に相当する Tyr 残基も同定した。亜硝酸塩処理条件下でニトロ化を受けるとタンパク質の存在量が増加するタンパク質はこれまで知られておらず、これが初めての報告である。現在、これらのタンパク質をエピトープタグ融合型タンパク質として発現する株を構築し、免疫沈降と抗 3NT 抗体を用いたウェスタンブロットにより、ニトロ化修飾の再現性を確認している。

一方、酸性亜硝酸処理した細胞から得た抽出液を、遠心分離により分画しウェスタンブロット解析を行った結果、ニトロ化タンパク質の多くは不溶性画分に存在することが分かった。このことから、ニトロ化が特に膜タンパク質において起こっている可能性が示唆された。上記スクリーニングは可溶性画分のタンパク質を対象としたものであるため、現在、膜タンパク質を対象に同様のスクリーニングを行っている。



図4 Denitrase活性測定

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Rika Indri Astuti*, [Ryo Nasuno*](#), Hiroshi Takagi: Nitric oxide signaling in yeast. *These authors contributed equally to this work. Adv. Microb. Physiol., 査読有, 72, 2018, 29-63. DOI:10.1016/bs.ampbs.2018.01.003.

那須野 亮, 吉川雄樹, 高木博史: 酵母に見出した一酸化窒素(NO)の合成制御機構と生理機能. 化学と生物, 査読有, 55, 2017, 617-623. DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.55.617.

Rika Indri Astuti*, [Ryo Nasuno*](#), Hiroshi Takagi: Nitric oxide signaling in yeast. *These authors contributed equally to this work. Appl. Microbiol. Biotech., 査読有, 100, 2016, 9483-9497.

Yuki Yoshikawa*, [Ryo Nasuno*](#), Nobuhiro Kawahara, Akira Nishimura, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi: Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. *These authors contributed equally to this work. Nitric Oxide-Biol. Chem., 査読有, 57, 2016, 85-91. DOI: 10.1016/j.niox.2016.04.003.

[学会発表](計28件)

Supapid Eknikom, [Ryo Nasuno](#), Hiroshi Takagi: Identification and functional analysis of nitrated proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The 34th International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY34), 2018年10月.

Yuki Yoshikawa, [Ryo Nasuno](#), Hiroshi Takagi: Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. The 13th International Meeting on Yeast Apoptosis, 2018年8月.

[Ryo Nasuno](#), Miho Aitoku, Yuki Manago, Akira Nishimura, Hiroshi Takagi: Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism in yeast through the activation of the transcription factor Mac1. The 14th International Congress on Yeasts "Session: Signaling, sensing and gene expression", 2016年9月.

Khairul Anam, [Ryo Nasuno](#), Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi: Molecular mechanism of nitric oxide detoxification in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The 14th International Congress on Yeasts, 2016年9月.

[Ryo Nasuno](#), Miho Aitoku, Yuki Manago, Akira Nishimura, Yu Sasano, Hiroshi Takagi: Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism in yeast: the transcription factor Mac1-dependent activation of the superoxide dismutase Sod1. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 2016年5月.

他、23件