

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05393

研究課題名(和文) 極微量しかコエンザイムQをもたない分裂酵母が示す表現型とCoQの存在意義

研究課題名(英文) The phenotypes of the fission yeast which contains trace amounts of CoQ and the significance of existence of CoQ

研究代表者

戒能 智宏 (Kaino, Tomohiro)

島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授

研究者番号：90541706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：コエンザイムQ (CoQ) は、ミトコンドリアにおける電子伝達機能の他に、脂溶性抗酸化物質としても機能することが知られている。分裂酵母*S. pombe*は、CoQ10をもち、CoQを欠損した株では、様々な表現型を示すことが知られている。同じ分裂酵母である*S. japonicus*は、CoQ10が極微量でありながら、その影響や表現型については調べられていない。そこで、*S. japonicus*の表現型を調べたところ、野生株でもCoQ欠損株でも呼吸欠損を示し、*S. pombe*のCoQ欠損株よりも強い酸化ストレス感受性を示した。一方、硫化水素はほとんど発生しておらず、最少培地での生育遅延も見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトと同じCoQ10をもつ分裂酵母*S. pombe*は、CoQ欠損により様々な表現型を示し、また、ヒトでもCoQ量の減少が病気の原因のひとつである可能性が示唆されている。*S. japonicus*は、CoQ10が極微量でありながら、硫化水素は発生しておらず、最少培地での生育遅延も見られなかった。このことから、CoQの減少による病気の原因を理解するための知見が得られることが今後期待できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Coenzyme Q (CoQ) is known to function as an electron transport in mitochondria and an lipophilic antioxidant. Fission yeast *S. pombe* produces CoQ10 and its CoQ deficient mutants show various phenotypes. Fission yeast *S. japonicus* produces low levels of CoQ10, but phenotypes are not elucidated. In this study, *S. japonicus* wild type and CoQ deficient mutant showed respiratory deficiency and the severe sensitivity of oxidative stresses, but did not show production of sulfide and the growth delay in minimal medium.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：Coenzyme Q ubiquinone 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

コエンザイム Q10 (CoQ10) は、ユビキノン 10 の名称でも知られる物質で、ミトコンドリアにおける電子伝達機能の他に、近年、脂質の過酸化防止機能を有する脂溶性抗酸化物質としての働きや、硫化物の代謝、ピリミジン合成などの新たな機能の発見に注目が集まっている(引用文献 1)。CoQ は、さまざまな生物種において自身で合成できる物質であるが、遺伝子破壊によって CoQ を欠損させると、植物では胚性致死を示し、動物では胎生致死を示すことが報告されているなど、CoQ は生きていく上で必須の成分である。また、細胞の CoQ 量が低下するヒトの CoQ 欠損症の原因として、CoQ 合成酵素遺伝子に変異がおきているという事例が最近になって多数報告されていることから(引用文献 2)、CoQ の重要性は明らかである。

分裂酵母 *Schizosaccharomyces 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 *S. cerevisiae* 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。出芽酵母 *S. cerevisiae* の CoQ 合成酵素遺伝子の破壊株では呼吸欠損以外の特徴的な表現型は見られないが、分裂酵母 *S. pombe* の CoQ 合成酵素遺伝子破壊株のほとんどが CoQ 合成不能と呼吸欠損を示すのに加えて、最少培地での生育遅延を示し、システイン (Cys) やグルタチオンなどの添加によって部分的に生育が回復すること、また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。

Schizosaccharomyces 属の分裂酵母は、モデル生物として広く基礎研究で使われている *S. pombe* 以外に、*S. japonicus*、*S. cryophilus*、*S. octosporus* の 3 種類が知られていたが(引用文献 3)、*S. japonicus* (図 1) は CoQ が検出されないと報告されていた(引用文献 4)。そこで、実際に *S. japonicus* から CoQ 抽出を行ったところ、極微量ではあるが CoQ10 が検出された。また、2011 年に報告された *S. japonicus* のゲノム配列(引用文献 3)には、これまでに知られている CoQ 合成酵素遺伝子と相同性のある遺伝子はすべて存在していた(図 2)。

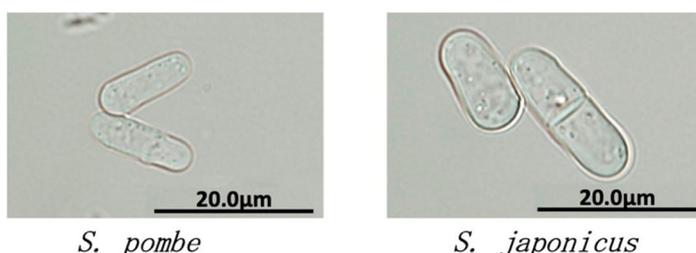


図1 分裂酵母 *S. pombe* と *S. japonicus* の顕微鏡写真

2. 研究の目的

コエンザイム Q (CoQ) は、ミトコンドリアにおける電子伝達機能の他に、脂溶性抗酸化物質としての働きや、硫化物の代謝、ピリミジン合成などにも関与していることが報告されている。分裂酵母 *S. pombe* はヒトと同じ CoQ10 を合成し、CoQ 欠損株は、呼吸欠損、最少培地での生育遅延、硫化水素の発生など多様な表現型を示すことが明らかとなってる。分裂酵母 *S. japonicus* は、CoQ が検出されないと報告されている一方で、ゲノム解析では CoQ 合成酵素遺伝子と相同性のある遺伝子が保存されているが、表現型や CoQ 欠損株の性質などは不明である。

そこで、分裂酵母 *S. japonicus* の CoQ の役割について調べることを目的として、詳細な表現型の解析と、*S. japonicus* の CoQ 欠損株の作製を行い、表現型の解析を行った。

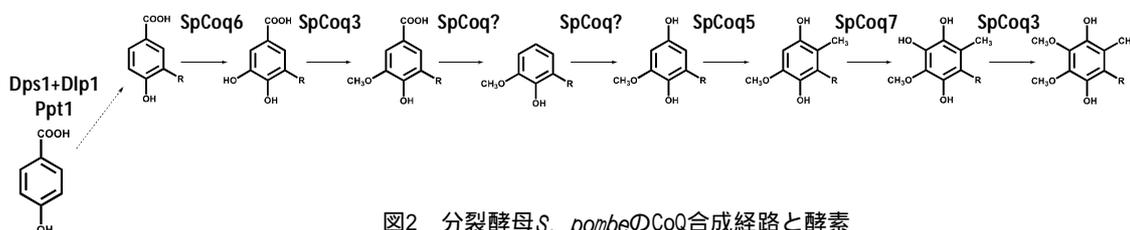


図2 分裂酵母 *S. pombe* の CoQ 合成経路と酵素

3. 研究の方法

分裂酵母 *S. pombe* の野生株と CoQ 欠損株、分裂酵母 *S. japonicus* の野生株を用いて、*S. pombe* の CoQ 欠損株が示す表現型を *S. japonicus* の野生株が示すかどうかを調べた。*S. japonicus* の

CoQ 欠損株の作製には、PCR を用いて CoQ 合成酵素遺伝子の破壊用断片を作製してエレクトロポレーション法を用いて *S. japonicus* の野生株を形質転換し、得られた株の CoQ 合成酵素遺伝子が破壊されていることを PCR で、また CoQ が欠損していることを HPLC を用いて確認した。

4. 研究成果

分裂酵母 *S. pombe* の CoQ 欠損株と CoQ 量が極微量である *S. japonicus* の野生株の表現型を解析したところ、*S. japonicus* はグリセロールを炭素源とする非発酵性培地では生育しなかった。また、酸素消費量を測定したところ、*S. pombe* の野生株は経時的に酸素が消費されているのに対して、*S. japonicus* の野生株では酸素消費量はごくわずかで *S. pombe* の CoQ 欠損株と同様の性質を示した。一方、過酸化水素やパラコートなどの酸化ストレス条件では、*S. japonicus* の野生株は、*S. pombe* の CoQ 欠損株よりも強い酸化ストレス感受性を示し（図 3）ほとんど硫化水素も発生していないことが分かった。また、嫌気条件下における生育を調べたところ、*S. cerevisiae* の CoQ 欠損株は、好気条件に比べて生育が落ちるものの野生株との生育の差は見られず、*S. pombe* の CoQ 欠損株は栄養豊富な培地でも野生株に比べて生育が悪くなるのに対して、*S. japonicus* の野生株ではその生育は好気条件とほとんど変わらなかった。

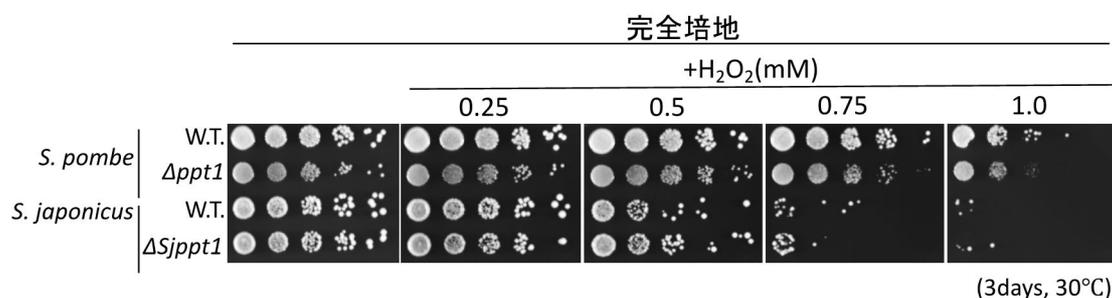


図3 野生株とCoQ欠損株の過酸化水素感受性

次に、*S. japonicus* の野生株が持つ極微量の CoQ10 の役割を調べるために、*S. japonicus* の CoQ 欠損株を作製し、表現型を調べたところ、野生型とほぼ同じ表現型を示したことから、極微量の CoQ10 による影響は明らかではないが、少なくとも *S. japonicus* の CoQ 欠損株は、*S. pombe* の CoQ 欠損株とは異なる表現型を示すことが分かった。

CoQ は、電子伝達系での電子の授受や、抗酸化物質としての機能だけでなく、酵素の機能にも関与していることが知られている。分裂酵母 *S. pombe* の *de novo* UMP 経路においては、Ura3 の機能に CoQ が関与していることが示唆されており、そのため *S. pombe* の CoQ 欠損株はウラシル要求性を示すことが報告されている（引用文献 5）。また、*S. cerevisiae* においては、プロリンが窒素源として利用でき、プロリンの分解に関与するプロリンオキシダーゼの活性に CoQ が関与していることが示唆されている（引用文献 6）。そこで、*S. japonicus* の野生株と CoQ 欠損株の培地中のウラシルの有無による生育を比較したところ、CoQ 欠損によるピリミジン合成への影響は見られなかった。また、プロリンの資化能についても野生株と CoQ 欠損株との間で差は見られなかった。以上の結果から、*S. japonicus* は CoQ10 量が極微量であるが、*S. pombe* の CoQ 欠損株とは異なる表現型を示すことが示唆された。

< 引用文献 >

1. Kawamukai M., Biosynthesis and applications of prenylquinones. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **82**, 963 (2018)
2. Laredj L. N., et al., The molecular genetics of coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochimie*, **100**, 78 (2014)
3. Rhind N., et al., Comparative functional genomics of the fission yeasts. *Science*, **332**, 930 (2011)
4. Yamada Y., et al., Coenzyme Q system in the classification of the ascosporegenous yeast genus *Schizosaccharomyces* and yeast-like genus *Endomyces*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 353 (1973)
5. Matsuo Y., et al., Polypeptone induces dramatic cell lysis in *ura4* deletion mutants of fission yeast. *PLoS One*, **8**, e59887 (2013)
6. Wanduragala S., et al., Purification and characterization of Put1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **498**, 136 (2010)

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 Nishida I., Yokomi K., Hosono K., Hayashi K., Matsuo Y., Kaino T., Kawamukai M.	4. 巻 103
2. 論文標題 CoQ10 production in Schizosaccharomyces pombe is increased by reduction of glucose levels or deletion of pka1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Appl. Microbiol. Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 4899-4915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-019-09843-7	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 Kaino T., Tonoko K., Mochizuki S., Takashima Y. and Kawamukai M.	4. 巻 82
2. 論文標題 Schizosaccharomyces japonicus has low levels of CoQ10 synthesis, respiration deficiency, and efficient ethanol production at high temperatures	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 1031-1042
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2017.1401914	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26件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 植原拓之、渡子 開、西田郁久、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母S. japonicusとS. pombeのCoQ欠損株を用いた表現型の比較
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第54回講演会（例会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishida I., Yokomi K., Hosono K., Hayashi K., Matsuo Y., Kaino T., Kawamukai M.
2. 発表標題 Coenzyme Q10 production in Schizosaccharomyces pombe is increased by reduction of glucose levels or deletion of pka1
3. 学会等名 The 10th Fission Yeast meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawamukai M., Tonoko K., Narahara T. Kaino T.
2. 発表標題 Biosynthesis of Coenzyme Q and its role in <i>S. pombe</i> and <i>S. japonicus</i>
3. 学会等名 The 10th Fission Yeast meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西原昇瑚、西田郁久、柳井良太、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母の Pos5 が CoQ 生合成に与える影響の解析
3. 学会等名 第52回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀 知葉、松本早代、柳井良太、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母のCoQ生合成におけるcoq4およびcoq11破壊株で蓄積する中間体様物質のLC-MSを用いた検出
3. 学会等名 第37回Yeast Workshop
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀 知葉、松本早代、柳井良太、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母 <i>S. pombe</i> のCoQ生合成における機能未知遺伝子coq4、coq8、coq9、coq11破壊株で蓄積する中間体様物質のLC-MSを用いた検出
3. 学会等名 第29回イソプレノイド研究会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 分裂酵母 <i>S. japonicus</i> のCoQ合成と完全CoQ欠損株の表現型の解析
2. 発表標題 戒能智宏、榎原拓之、渡子 開、西田郁久、川向 誠
3. 学会等名 第29回インプレノイド研究会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎原拓之、渡子 開、西田郁久、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母 <i>S. japonicus</i> のCoQ欠損株は、最少培地でも生育し、硫化水素を発生しない
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国支部合同大会（第55回講演会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戒能智宏、渡子 開、榎原拓之、西田郁久、川向 誠
2. 発表標題 <i>Schizosaccharomyces japonicus</i> におけるコエンザイムQ合成と役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戒能智宏、榎原拓之、渡子 開、西田郁久、川向 誠
2. 発表標題 CoQ量が極微量である分裂酵母 <i>S. japonicus</i> の完全CoQ欠損株が示す表現型の特徴
3. 学会等名 第17回日本コエンザイムQ協会研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田郁久、戒能智宏、松尾安浩、川向 誠
2. 発表標題 安息香酸は分裂酵母のCoQ生合成を顕著に阻害する
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西原昇瑚、西田郁久、柳井良太、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母Schizosaccharomyces pombeのCoQ生合成に関するPos5の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田郁久、大森夕貴、柳井良太、松尾安浩、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 コエンザイムQ10の生合成に関する新しい遺伝子の発見と機能解析
3. 学会等名 第59回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 J. Jumpathong, I. Nishida, K. Nishino, Y. Matsuo, T. Kaino, M. Kawamukai
2. 発表標題 Analysis of modified coenzyme Q10 from fungi and investigation of its responsible gene
3. 学会等名 第59回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jonkwan Jumpathong、西田郁久、松尾安浩、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 コエンザイムQのイソプレノイド鎖を修飾する酵素遺伝子の探索
3. 学会等名 第28回イソプレノイド研究会例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田郁久、横見和誠、細野耕司、林 和弘、松尾安浩、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 低グルコース及びProtein kinase Aが分裂酵母のCoQ10の生産に与える影響
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田将伍、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 CoQ10の生産性に影響を及ぼす遺伝子の探索と解析及び培養条件の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度中四国支部大会（第52回講演会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀 知葉、松本早代、柳井良太、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母S. pombeのCoQ合成遺伝子破壊株が蓄積する中間体様物質のLC-MSを用いた検出
3. 学会等名 第36回Yeast Workshop
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西原昇瑚、角 陽香、松浦啓太、柳井良太、西田郁久、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母のCoQ10生成とPos5との関連性
3. 学会等名 第36回Yeast Workshop
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植原拓之、渡子開、西田郁久、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母 <i>S. japonicus</i> の完全CoQ欠損株が示す表現型の解析
3. 学会等名 第36回Yeast Workshop
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田郁久、横見和誠、細野耕司、林 和弘、松尾安浩、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 低グルコース及びcAMP/PKA経路が分裂酵母におけるCoQ10生産性に与える影響
3. 学会等名 第36回Yeast Workshop
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田郁久、横見和誠、細野耕司、林 和弘、松尾安浩、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 低グルコース及びcAMP/PKA経路が分裂酵母のコエンザイムQ10の生産性に与える影響
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部第4回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田郁久、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母のCoQ生成に関わる新規遺伝子
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田郁久、大森夕貴、柳井良太、松尾安浩、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母のCoQ10生成に関わる新規遺伝子の解析
3. 学会等名 第16回日本コエンザイムQ協会研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田郁久、横見和誠、細野耕司、林 和弘、松尾安浩、戒能智宏、川向 誠
2. 発表標題 グルコース濃度及びcAMP/PKA経路が分裂酵母におけるコエンザイムQ10の生産性に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戒能智宏
2. 発表標題 分裂酵母を用いたコエンザイムQの合成と機能の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度中四国支部大会（第52回講演会）（招待講演）
4. 発表年 2018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
---------	---------