

博士論文番号：1481022

酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な
一酸化窒素の合成制御機構と細胞死誘導機構

吉川 雄樹

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科
ストレス微生物科学研究室
(高木 博史 教授)

平成 29 年 3 月 15 日提出

目次

1. 序論.....	4
1-1. 酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1-2. 一酸化窒素 (Nitric oxide : NO)	5
1-3. NO の解毒系	7
1-4. 一酸化窒素合成酵素 (NOS)	8
1-5. 酵母における NO と NOS	9
1-6. ジフラビン酸化還元酵素 Tah18.....	10
1-7. 単細胞生物における細胞死	11
2. 材料と方法.....	14
2-1. 菌株とプラスミド	14
2-2. 培地	16
2-3. プラスミド構築	17
2-4. 酵母の形質転換	20
2-5. ゲノム上の <i>TAH18</i> 、および <i>DRE2</i> 遺伝子の欠失.....	20
2-6. プラスミドシャッフリング法による遺伝子破壊の確認およびタグ融合タンパク質の機能相補確認.....	20
2-7. 過酸化水素処理後の細胞内での NO の観察	22
2-8. 過酸化水素処理後の細胞内 NO 量の測定	22
2-9. 培地交換後の細胞内 NO 量の測定	22
2-10. 共免疫沈降およびウェスタン解析	22
2-11. タンパク質濃度の測定.....	23
2-12. 細胞生存率の測定	23
2-13. スポットテスト	24
2-14. 生育速度の測定	24
2-15. 二次元電気泳動法による Tah18 の相互作用タンパク質の探索.....	24
3. 結果.....	26
3-1. 酵母細胞内において過酸化水素ストレスに応答して Tah18 依存的な NOS 様活性により NO が合成される.....	26
3-2. Dre2 は酵母細胞内での NOS 様活性を抑制する.....	29
3-3. Tah18 と Dre2 の複合体は過酸化水素処理に伴い解離する.....	33
3-4. Dre2 の過剰発現は過酸化水素処理条件下における Tah18 依存的な NOS 様活性を抑制する.....	36
3-5. 過酸化水素処理条件における Tah18 依存的な NO 合成は細胞死を誘導する	37

3-6. Tah18 は Dre2 との解離後、相互作用するタンパク質が変わる	38
3-7. 過酸化水素処理条件下で、Dre2 は Mca1 によって分解される	42
3-8. Mca1 はエタノール、抗真菌薬添加条件においても酵母の生育に影響を及ぼす	46
4. 考察.....	47
5. 総括.....	59
6. 謝辞.....	60
7. 参考文献.....	61

1. 序論

1-1. 酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はパン類、酒類、バイオエタノールなどの発酵生産に必要な微生物である。発酵生産過程において、酵母は高温、高浸透圧、高濃度エタノールなど様々なストレスに曝されており、細胞内はミトコンドリア膜の損傷や抗酸化酵素群の変性などにより活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が蓄積する「酸化ストレス」状態に陥り有用機能 (アルコール、炭酸ガス、味・風味成分などの生成) の発現が著しく制限されている^{1,2}。

以上のことから、酵母のストレス応答機構を理解することで産業酵母の育種に貢献することが期待できる (Figure 1)。

また酵母では、ヒトをはじめとする高等生物に存在する基本的な生命現象や遺伝子がよく保存されているため、酵母を用いた基礎研究から得られた知見は、多くの高等生物に活用できる可能性を秘めている。例えば、ショウジョウバエや線虫では、酸化ストレス耐性の向上が寿命の延長に繋がると報告されているが、同様の現象は酵母でも見られている³。神経変性疾患研究に酵母をモデル生物として用いる試みも、数多くなされている^{4,5}。従って、酵母の環境刺激に対する応答や細胞内外シグナル伝達経路を理解することは、普遍的な生命現象を理解することに加え、発酵産業に新たな技術的ブレイクスルーをもたらすなど、基礎・応用の両面において非常に重要である。



Figure 1. ストレス耐性と発酵

発酵過程において、酵母は高温、高浸透圧、高エタノールなどの様々なストレスを受けている。このようなストレス条件下では、酵母の有用機能が低下している。

1-2. 一酸化窒素 (Nitric oxide : NO)

一酸化窒素 (NO) は拡散性を有するフリーラジカルであり、動植物や微生物において様々な生命現象に関与している。多細胞生物の場合、NO は拡散性の観点から細胞間のシグナル伝達物質として、大きな役割を持っており^{6,7}、例えば、哺乳類では血圧の調節、神経伝達、免疫応答に関与している^{8,9}。また植物では、種子の発芽の調節に関与し¹⁰、強光ストレスに対する応答にも寄与している¹¹。一方、単細胞である微生物でも NO の生理的機能が報告されている。例えば、放射線耐性バクテリア *Deinococcus radiodurans* において、放射線ストレス時に合成する NO が耐性に重要であることが示されている¹²。また、*Pseudomonas aeruginosa* のバイオフィーム形成と分散に NO が関与することが報告されている¹³。さらに、*Staphylococcus aureus* では宿主体内での過剰なヘムに対する防御機構として、*Bacillus subtilis*、*Bacillus anthracis* では、酸化ストレスに対する防御機構として、それぞれ nitric oxide synthase 活性が寄与し、細胞の生存および病原性の獲得に重要であることが報告されている¹⁴⁻¹⁶。このように、NO は細胞間の情報伝達物質だけでなく、細胞内の様々な機能に関与していることが示されている。

主なNOの作用機序として、以下の2つが報告されている。一点目として、NOが可溶性guanylyl cyclase (sGC) のヘムに結合してこれを活性化し、GTPからcyclic guanosine monophosphate (cGMP) 含量を増加させることが示されている¹⁷。増加したcGMPはセカンドメッセンジャーとなり、リン酸化酵素やイオンチャネル、ホスホジエステラーゼなどのタンパク質に結合して、血管機能調節、神経伝達などの様々な生理反応を調節している。二点目として、NOは直接、または間接的にタンパク質の翻訳後修飾を行うと報告されている¹⁸⁻²⁰。その一つに、NOはタンパク質のシステイン残基を直接S-ニトロソ化する。タンパク質の直接のS-ニトロソ化は酸化ストレス防御機構に関与しているという仮説が提唱されており、NOがタンパク質のシステイン残基をS-ニトロソ化することで、酸化ストレスによるタンパク質の変性を防いでいる可能性が挙げられる。ROSによるシステイン残基の酸化が非可逆的であるのに対して、NOによるシステイン残基のS-ニトロソ化は完全に可逆的である²¹。そのため、可逆的なS-ニトロソ化が非可逆的な酸化からタンパク質を保護していると考えられる。実際、*B. subtilis*は感染時にNOを発生させ、システイン残基をS-ニトロソ化し、マクロファージからの酸化ストレスに抵抗している^{15,16}。また、転写因子のS-ニトロソ化を通して抗酸化遺伝子の転写を制御していることが報告されている。例えば、動植物や微生物でascorbate peroxidase, catalase, glutathione reductase, peroxidase, superoxide dismutase (SOD) などの遺伝子の転写が制御されている^{15,22-26}。大腸菌においては、ストレス応答因子OxyRがニトロソ化によって活性化されることが

知られている²⁶。一方、哺乳類においては、小胞体膜上に存在するセンサータンパク質であるIre1 α がS-ニトロソ化修飾によってその活性が抑制され、神経細胞死が誘導される²⁷。またglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH EC 1.2.1.12) はS-ニトロソ化修飾によって核移行シグナルを持つタンパク質Siah1と複合体を形成し、核へ移行することで、細胞死を引き起こす²⁸。一方、NOとsuperoxide anionの反応生成物であるperoxynitrite (PN) は、タンパク質のチロシン残基をニトロ化する。ニトロ基の立体障害によって当該チロシン残基のリン酸化が阻害されるということが知られている²⁹。さらに、NOやPNとcGMPの反応生成物である8-nitro cGMPは、タンパク質のシステイン残基のチオール基をS-グアニル化修飾し、シグナル伝達に寄与する。酸化ストレスセンサーであるKeap1はS-グアニル化によって転写因子であるNrf2から解離し、Nrf2の転写活性が上昇し、抗酸化機構に寄与することが報告されている³⁰。

これらの報告にあるように、NOは様々なシグナル伝達機構によって数多くの生命現象に関与する。NOは、細胞保護だけでなく細胞死の誘導をも引き起こす、二面性を持ち合わせたシグナル伝達物質であるため、その合成機構は非常に厳密に制御される必要がある。NOの合成経路については、現在までに、nitric oxide synthase (NOS, EC 1.14.13.39) やnitrite reductases (NIR, EC 1.7.2.1)、非酵素的なnitriteの還元と3つの経路が主に知られている。NOSはアルギニンを2段階で酸化し、NOとシトルリンを産生する (Figure 2)。一方、NIRはnitriteを還元して、NOを発生させる。哺乳類や酵母の場合、cytochrome c oxidase (ミトコンドリア呼吸鎖の複合体IV) は低酸素条件下で酸素の代わりにnitriteを電子受容体として使用し、その結果NOを発生させる³¹。また、細菌のNIRは通常、nitriteを6電子還元してアンモニアを合成するが、副産物としてNOを産生することが知られている³²。さらに、植物のnitrate reductaseはnitrateだけでなく、nitriteも還元することができ、その結果NOが発生するとも報告されている³³。さらに、nitriteは酸性条件下ではnitrous acidとなり、非酵素的にNOに還元される³⁴。

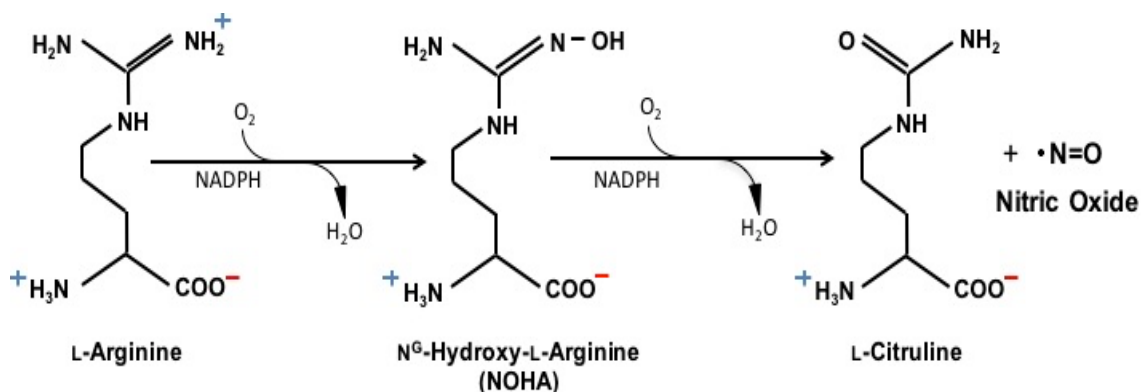


Figure 2. NOS による NO 合成反応

アルギニンから二段階の酸化反応により、代謝中間体 N^G -ヒドロキシアルギニン (NOHA) を経て、NO とシトルリンを合成する。哺乳類には、endothelial NOS (eNOS)、neuronal NOS (nNOS)、inducible NOS (iNOS) の 3 種類のアイソザイムが保存されており、それぞれ発現する組織や器官、生理機能が異なる。

1-3. NO の解毒系

上記において記述したように、NO が示す毒性の側面から、様々な生物種、特に NO に直接曝される病原菌においては、NO に対する防御機構が存在する。哺乳類の主な NO 合成系である NOS は、生体内で多くの制御を受けて局所的に NO を産生しており、arginase (EC 3.5.3.1) を活性化することで基質であるアルギニンを積極的に消費することで、過剰な NO 合成を回避する³⁵。一方、脱窒微生物がもつ NIR は脱窒という生体エネルギー獲得系と共役しており、多量に NO を産生するため、NO 消去系として NO 還元酵素 nitric oxide reductase (NOR, EC 1.7.1.15) を有している^{36,37}。また、多くの微生物に保存されている NO 解毒系として nitric oxide dioxygenase (EC 1.14.12.17) であるフラボヘモグロビン (FHb) が知られており、FHb に結合するヘム鉄が NO を優先的に補足し、硝酸へと酸化的に無毒化する³⁸。また FHb は嫌気条件下では NO を N_2O へと還元的に無毒化する³⁹。多くの病原菌は FHb の発現量を厳密に制御することで宿主細胞内での NO 耐性を獲得し^{40,41}、この FHb による NO 消去系は *S. cerevisiae* においても保存されている^{42,43}。これらのように NO を直接的に分解する解毒系に加え、や *S*-nitrosoglutathione reductase (GSNOR EC 1.2.1.46) による NO 解毒系が微生物だけでなく植物でも報告されている^{44,45}。細胞内で最も多量に存在するチオール化合物の 1 つであるグルタチオン (GSH) は NO と反応して、*S*-nitrosoglutathione (GSNO) へと変換されるが、GSNOR は GSNO を GSH とアンモニアへと還元的に分解する。さらに、近年 *Aspergillus nidulans* から発見された NO-inducible nitrosothionein (iNT) はシステイン残基を豊富に含む短いペプチドであり、NO と反応して *S*-ニトロソ化され、

thioredoxin (TRX, EC 1.8.1.8) およびthioredoxin-disulfide reductase (TRR, EC 1.8.1.9) と協調することで、NOの解毒に寄与する⁴⁶。このように、NOは様々な機構により消去され、その細胞内濃度は適切に制御される。

1-4. 一酸化窒素合成酵素 (NOS)

哺乳類 NOS は、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) と酸素を使用して、アルギニンを基質として、NO とシトルリンを合成する。この反応には、補酵素として flavin adenine dinucleotide (FAD)、flavin mononucleotide (FMN)、tetrahydrobiopterin (H₄B) が必要なことが知られている⁴⁷。哺乳類 NOS は N 末端側の oxygenase domain (Oxy) と C 末端側の reductase domain (Red) から成り、NOS 反応は 2 段階のアルギニン酸化反応を経て起こる (Figure 2, 3)。まず、NADPH 由来の電子が Red 中の FAD、FMN を介して Oxy へと渡される。続いて、Oxy のヘム鉄に結合した分子状酸素がこの電子により活性化され開裂し、Oxy に結合したアルギニンのグアニジノ基を酸化し、最終的に NO とシトルリンが合成される。酸化反応は 2 段階の酸素添加反応であり、一段階目の反応生成物 (全反応の中間体) として N^ω-ヒドロキシアルギニン (NOHA) が合成される。(Figure 2)^{48,49}。このため、NOS はアルギニンと NOHA の両者を基質として用いることが可能である。Calmodulin (CaM) は Oxy と Red を連結する役割を担っており、全ての哺乳類 NOS アイソザイムで必須である⁵⁰。一方、H₄B は NADPH からの電子がヘムに供給されるときに重要となると考えられているが、その詳細はほとんど理解されていない⁵¹。また NOS には神経型 (neuronal NOS : nNOS)、誘導型 (inducible NOS : iNOS) および血管内皮型 (endothelial NOS : eNOS) の 3 つのアイソフォームが知られる⁴⁷。これらの NO 合成活性は異なり、また異なる発現調節を受けている。現在までにアルギニンから NO を合成する NOS 活性は動物、植物、細菌、真菌類など多くの生物の細胞から検出されている。*Bacillus*, *Deinococcus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* 属細菌などで発見された細菌型の NOS は、哺乳類 NOS の Oxy に相同性を示すアミノ酸配列を有するものの、Red に相同性を有する配列が存在しない⁵²。分子状酸素の活性化に用いられる電子を NADPH から伝達する機能は、任意の Red タンパク質が担うと考えられている。また、一般的に細菌類は H₄B を生合成できないため、その構造類似体である tetrahydrofolate (H₄F) を、H₄B の代わりに要求する⁵³。高等植物の場合、NOS 活性は *Arabidopsis* や *Maize* 属の植物などで明確に認められているが、これらの生物種のゲノム上には哺乳類 NOS 遺伝子と相同な配列は見出されていない。一方、興味深いことに、真核藻類である緑藻 *Ostreococcus tauri* のゲノム解析から、哺乳類 NOS と類似したドメイン構造を持ち、NOS 活性を有する NOS 様タンパク質が発見された⁵⁴。このため、多くの研究者が高等植物における NOS 様タン

パク質の探索を行っているが、未だその同定には至っていない。一方、*S. cerevisiae* や分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*、*Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*. などの真菌類でも、NOS 活性の存在が報告されている^{22,55,56}。また、哺乳類 NOS 抗体に対する反応性から、酵母における NOS の存在を示唆した例もあるが⁵⁷、真菌類における NOS およびそれをコードする遺伝子はこれまでに同定されていない。以上のように、現在は高等植物と真菌類における NOS の同定が急務となっている。

1-5. 酵母における NO と NOS

酵母 *S. cerevisiae* においては、NO がストレス応答経路に関与することが報告されている。例えば、低濃度の NO 処理が酵母に高圧ストレス耐性に寄与すること⁵⁸、転写因子 Ace1 を介して銅ストレス耐性を付与することが示されている^{59,60}。また最近、当研究室では、高温処理条件下での酵母細胞内において、アルギニンから NO が生成され、高温ストレス耐性に寄与することを見出した⁶¹。さらに、NO が転写因子 Mac1 の活性化を介して銅の取り込みを促進し、銅依存性 superoxide dismutase (Sod1) の活性を向上させて、細胞の高温ストレス耐性を上昇させることを明らかにした⁶²。一方、過酸化水素処理条件下で誘導されるアポトーシス経路に、NO や NO による GAPDH の S-ニトロソ化が寄与するという報告もある²²。さらに、内因性の NO が Yap1 を介して抗生物質である PAF26 耐性を示すことが報告されている⁶³。

酵母からも NOS 様の活性が検出されているが、酵母ゲノム上には哺乳類 NOS のオルソログに相当する配列は存在せず、NOS タンパク質やこれをコードする遺伝子も同定されていない。そのためこれまで酵母における NO 合成については、ミトコンドリア呼吸鎖の複合体IVによる nitrite の還元起因する NO 合成機構が主に解析されていた³¹。近年当研究室では、diflavinoreductase Tah18 が酵母の NOS 様活性に関与することを明らかにした⁶¹。しかし、大腸菌を用いて精製した組換え Tah18 単独では NOS 様活性を示さないこと、また Tah18 が cytochrome P450 reductase や NOS の Red と相同性を示すものの、Oxy に相同な配列を含まないことなどから Tah18 が酵母の NOS そのものとは考えにくい (Figure 3)。これらのことから、酵母の NOS や NOS 活性、その制御機構については未だ不明な点が多く、NO の生理機能やその発現機構の解析も総合的に理解するに至っていない。

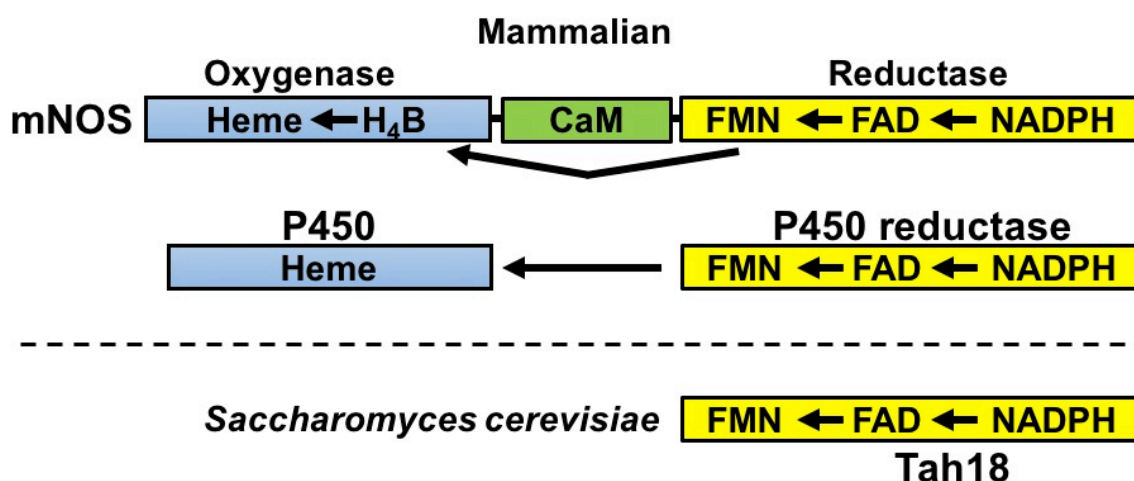


Figure 3. NOS および P450 のドメイン構造と Tah18 の比較

哺乳類 NOS、P450、P450 還元酵素の基本的なドメイン構造を示す。Heme、H₄B、CaM、FMN、FAD、NADPH は、それぞれの分子の結合領域を示す。矢印は酵素反応における電子移動の方向を示す。

1-6. ジフラビン酸化還元酵素 Tah18

酵母 *S. cerevisiae* の生育に必須な *TAH18* 遺伝子は当初、DNA 修復などに関与する DNA polymerase δ の触媒サブユニットをコードする *POL3* 遺伝子の温度感受性変異と合成致死（生育阻害）を引き起こす遺伝子として取得された⁶⁴。その後、*TAH18* がコードする diflavin oxidoreductase Tah18 が、生育に必須な鉄硫黄クラスタータンパク質 Dre2 と複合体を形成しており、Tah18 が NADPH からの電子を Dre2 に受け渡すことで細胞質の鉄硫黄クラスタータンパク質の生合成に寄与することが報告されている（Figure 4）⁶⁵。真核生物における鉄硫黄クラスターは、様々な生命現象に必須なプロセス（電子伝達、酵素の触媒作用、リボソームによるタンパク質の合成、tRNA 修飾、DNA 複製・修復）で機能する補因子である。酵母やヒトの細胞において、正常な鉄硫黄クラスタータンパク質の成熟は、多くのタンパク質の複合体により構成される細胞質の鉄硫黄クラスターマシナリーを必要とする。Tah18-Dre2 複合体はこの鉄硫黄クラスターマシナリーに必須な初期段階における電子伝達の役割を担っている。このように Tah18 に関しては、鉄硫黄クラスター合成への寄与を含め様々な報告がなされているが、上述のように、NOS 様活性に関与する報告は当研究室以外からは例がない。

一方、酵母の Tah18 と Dre2 は、ヒトにおいて機能的オルソログの Ndor1（NADPH-dependent diflavin oxide reductase-1）と Ciapin1（Cytokine-induced apoptosis inhibitor-1）がそれぞれ保存されており、鉄硫黄クラスタータンパク質の生合成に必要な電子の受け渡しに関わる相互作用の様式が部分的な結晶構造解析により示されている⁶⁶。Ciapin1 はアナモルシンとも呼ばれ、新規の抗アポト

一シス分子として単離され、アナモルシンのノックアウトマウスは造血障害により胎生後期に致死となることが報告されている⁶⁷。またCiapin1は、酵母においてDre2の機能を相補することが知られている⁶⁸。さらに酵母では、高濃度の過酸化水素処理に伴い、Tah18とDre2の複合体が解離すること、またTah18がミトコンドリアへと移行し、ミトコンドリアからのシトクロムcの放出に伴う細胞死を引き起こすことが示されている⁶⁸。このことは、Tah18依存的なNOS様活性が、過酸化水素処理条件下における細胞死誘導にも関与する可能性を示唆している。

しかし、Tah18依存的なNOS様活性の全容やその制御機構についてはまったく不明である。そこで本研究は、酵母におけるTah18依存的なNOS様活性の制御機構の解明を目的として行った。

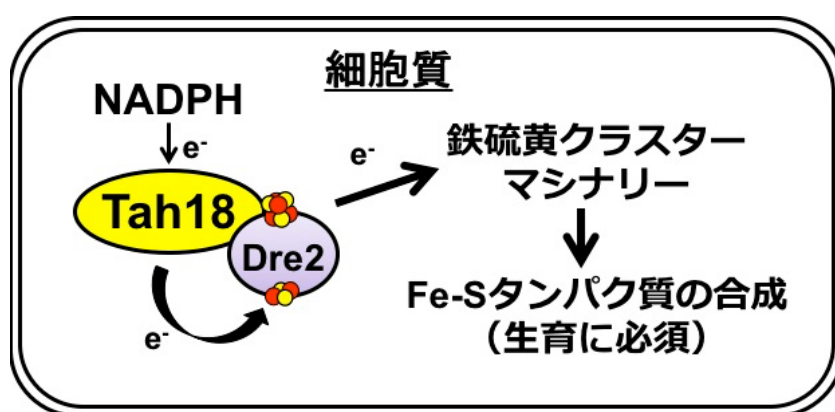


Figure 4. 酵母における細胞質の鉄硫黄クラスタータンパク質合成系におけるTah18-Dre2複合体の役割

Tah18 による NADPH から Dre2 への電子伝達は鉄硫黄クラスターマシナリーに必要な電子供給の初期段階を担い、酵母においては唯一の電子伝達経路である。そのため、TAH18 および DRE2 は酵母の生育に必須である。

1-7. 単細胞生物における細胞死

動物や植物のような多細胞生物において、細胞死の誘導機構「プログラム細胞死」は、その分子機構や生理的意義の研究が盛んに行われている。例えば、動物では組織中で不要あるいは有害となる細胞を排除することで、正常な発生や成体の恒常性維持に^{69,70}、また植物では病原菌からの感染防御機構^{71,72}などにそれぞれ寄与している。

一方、単細胞生物においては、細胞集団にあってもそれぞれの細胞が生物個体であることから、細胞死を誘導することに生理的な意義が見出されず、プログラム細胞死は存在しないと考えられてきた。しかし最近、単細胞生物におい

でも、プログラム細胞死に関する知見が蓄積している。中でも、原核生物においては、高温、pH、栄養飢餓、酸化ストレス、DNA ダメージなどのストレスに応答して細胞死が誘導され、異常な細胞や修復不可能な細胞を排除することで集団の保存に貢献していると考えられていた。また最近、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* において、環境ストレスに応答して細胞集団の一部の細胞が破裂することにより細胞外へ DNA や膜小胞を放出することで集合体（バイオフィルム）の形成に寄与することが報告された⁷³。この細胞の破裂を引き起こす遺伝子は、細菌間で高く保存されている遺伝子の一つであり、細菌共通のシステムであると考えられている。細菌はバイオフィルムを形成することで社会性を発揮しながら多細胞生物様な挙動を示し、高度な生存戦略を取っている。この報告⁷³は、微生物においても、細胞集団における一部の細胞の積極的な細胞死の誘導が、細胞集団の利益に繋がるという重要な知見である。

また真核単細胞生物の酵母 *S. cerevisiae* に関しては、Yamaki らの報告において、ヒストンシャペロン *CIA1* 遺伝子の欠損株を用いた解析で、核の断片化、クロマチンの分断などが観察され、さらに多細胞生物のアポトーシスの指標の一つである TUNEL 染色、Annexin-V 染色がともに陽性を示したことから DNA の断片化と細胞膜の反転が確認され、ミトコンドリアからのシトクロム c の放出も検出された⁷⁴。また、カスパーゼをリクルートするドメイン（CARD）と相同の領域を持つ *UNI1* を過剰発現させた酵母細胞や哺乳類培養細胞は、アポトーシス様表現型を示した⁷⁵。さらに、哺乳類細胞における細胞死の実行に必須であるカスパーゼ様のタンパク質として、酵母のメタカスパーゼ *Mca1* が同定された⁷⁶。*Mca1* は哺乳類細胞におけるカスパーゼ 3 と類似する構造を有することも報告されている⁷⁷。*Mca1* はこれまでに過酸化水素処理、酢酸処理、細胞老化などの条件において細胞死を誘導することが示されている⁷⁸⁻⁸⁰。酵母の細胞老化に関する報告では、*Mca1* 依存的に誘導される細胞死が生き残った細胞集団のストレス耐性および生育寿命を向上させた。*Mca1* 保持株（野生型株）と *Mca1* 非保持株で競合的に生育させた結果、最終的には野生型株が生き残った⁸⁰。このように、微生物においてもプログラム細胞死を誘導する機構が見出されており、その生理的意義についても知見が蓄積されてきている。さらに、酵母に見出された細胞死の誘導因子は、哺乳類においても同様に保存されていることから、酵母における細胞死の誘導機構に関する知見は多細胞生物における現象を、多角的に理解することに資することが期待される。

以上の様に、酵母における *Tah18* 依存的な NOS 様活性の全容やその制御機構についてはいまだ不明な点が多い。一方で、*Tah18* 依存的な細胞死誘導機構には *Tah18* 依存的な NOS 様活性が関与する可能性も考えられる。そこで本研究では、

酵母における Tah18 依存的な NOS 様活性の制御機構を明らかにするとともに、Tah18 依存的な細胞死誘導機構を Tah18 依存的な NOS 様活性・NO 合成との関連性を切り口として、その詳細を解明することを目的とした。

2. 材料と方法

2-1. 菌株とプラスミド

本研究で使用した酵母 *S. cerevisiae* の菌株リストを Table1、プラスミドを Table 2 にそれぞれ示す。プラスミド構築には大腸菌 *Escherichia coli* DH5 α 株を用いた。本研究では、出芽酵母 *S. cerevisiae* Σ 1278b 株の野生型株 L5685 (*MATa ura3-52 trp1 TAH18 DRE2*)、*TAH18* 破壊株 (*MATa ura3-52 trp1 tah18::hph DRE2*)、*DRE2* 破壊株 (*MATa ura3-52 trp1 TAH18 dre2::natNT2*)、*TAH18/DRE2* 二重破壊株 (*MATa ura3-52 trp1 tah18::hph dre2::natNT2*) を用いた。

まず *TAH18* と *DRE2* の発現抑制株を作製するため、*TAH18* 破壊株、もしくは *DRE2* 破壊株に pAG416GAL-Tah18、または pAG416GAL-Dre2 を導入し、それぞれ *TAH18* 発現抑制 (KD) 株、*DRE2* 発現抑制 (KD) 株とした。

次に、*DRE2* の発現量の影響を観察するため、*DRE2* 破壊株に pAG424GAL-Dre2-5FLAG を導入した *DRE2* 転写制御株を用いた。続いて、Tah18 と Dre2 の相互作用解析のため、野生型株に pAG424GPD-3HA-Dre2、pAG426GPD-EGFP-Tah18 を導入した EGFP-Tah18 と 3HA-Dre2 の共過剰発現株 (Co-OP 株) を用いた。さらに、Tah18 と Dre2 の融合タンパク質の機能解析のため、*TAH18/DRE2* 二重破壊株に pRS414-Dre2-3HA-Tah18 $P_{DRE2} T_{DRE2}$ を導入した Tah18-Dre2 融合 (Tah18-Dre2 fusion) 株を用いた。

Tah18 と相互作用するタンパク質の探索のため、*TAH18* 破壊株に pAG416GPD-Tah18、または pAG416GPD-13Myc-Tah18 を導入した Tah18 過剰発現株、13Myc-Tah18 過剰発現株を用いた。続いて、Tah18 と Dre2 の本来のタンパク質発現量での発現量解析、および相互作用解析のため、*TAH18* 破壊株に pRS416-13Myc-Tah18 $P_{TAH18} T_{TAH18}$ を導入した 13Myc-Tah18 発現株、*DRE2* 破壊株に pRS414-Dre2-5FLAG $P_{DRE2} T_{DRE2}$ を導入した Dre2-5FLAG 発現株、*TAH18/DRE2* 二重破壊株に pRS416-13Myc-Tah18 $P_{TAH18} T_{TAH18}$ 、pRS414-Dre2-5FLAG $P_{DRE2} T_{DRE2}$ を導入した 13Myc-Tah18 Dre2-5FLAG 発現株を用いた。さらに、Dre2 と Mca1 の相互作用解析のため、*DRE2* 破壊株に pAG424GPD-3HA-Dre2、pAG416GPD-Mca1-EGFP を導入した 3HA-Dre2 と Mca1-EGFP の共過剰発現株を用いた。

栄養要求性の相補には、pRS414、pRS416、または相当する空ベクターをそれぞれ用いた。

Table 1. 本研究で使用した菌株

Name	Strain	Genotype
	<i>S. cerevisiae</i>	
野生型株	L5685	<i>MATa ura3-52 trp1 TAH18 DRE2</i>
<i>TAH18</i> 発現抑制株	<i>TAH18</i> KD	<i>MATa ura3-52 trp1 tah18::hphNT1 DRE2 pAG416GAL-Tah18</i>
13Myc-Tah18発現株	P_{TAH18}^{Tah18} 13Myc-Tah18	<i>MATa ura3-52 trp1 tah18::hphNT1 DRE2 pRS416-13Myc-Tah18</i>
13Myc-TAH18発現抑制株	$P_{GAL}^{13Myc-Tah18}$	<i>MATa ura3-52 trp1 tah18::hphNT1 DRE2 pRS416-13Myc-Tah18</i>
<i>DRE2</i> 発現抑制株	<i>DRE2</i> KD	<i>MATa ura3-52 trp1 TAH18 dre2::natNT2 pAG416GAL-Dre2</i>
<i>DRE2</i> 転写制御株	P_{GAL}^{DRE2}	<i>MATa ura3-52 trp1 TAH18 dre2::natNT2 pAG424GAL-Dre2-5FLAG</i>
<i>Dre2-5FLAG</i> 発現株	PDRE2TDRE2 <i>Dre2-5FLAG</i>	<i>MATa ura3-52 trp1 TAH18 dre2::natNT2 pRS414-Dre2-5FLAG</i>
EGFP-Tah18 3HA-Dre2 共過剰発現株	Co-OP	<i>MATa ura3-52 trp1 tah18::hphNT1 DRE2 pAG424GPD-EGFP-Tah18 pAG424GPD-3HA-Dre2</i>
<i>Dre2</i> 過剰発現株	<i>Dre2</i> OP	<i>MATa ura3-52 trp1 TAH18 dre2::natNT2 pAG424GPD-Dre2</i>
13Myc-Tah18過剰発現株	13Myc-Tah18 OP	<i>MATa ura3-52 trp1 tah18::hphNT1 DRE2 pAG416GPD-13Myc-Tah18</i>
13Myc-Tah18 <i>Dre2-5FLAG</i> 発現株	13Myc-Tah18 <i>Dre2-5FLAG</i>	<i>MATa ura3-52 trp1 tah18::hphNT1 dre2::natNT2 pRS416-13Myc-Tah18 pRS414-Dre2-5FLAG</i>
<i>MCA1</i> 破壊 13Myc-Tah18 <i>Dre2-5FLAG</i> 発現株	<i>Aimc1</i> 13Myc-Tah18 <i>Dre2-5FLAG</i>	<i>MATa ura3-52 trp1 tah18::hphNT1 dre2::natNT2 mca1::KanMx4 pRS416-13Myc-Tah18 pRS414-Dre2-5FLAG</i>
3HA-Dre2 <i>Mca1</i> -EGFP 共過剰発現株	3HA-Dre2 <i>Mca1</i> -EGFP Co-OP	<i>MATa ura3-52 trp1 TAH18 dre2::natNT2 pAG424GPD-3HA-Dre2 pAG416GPD-Mca1-EGFP</i>
<i>MCA1</i> 破壊株	<i>Aimc1</i>	<i>MATa ura3-52 trp1 TAH18 DRE2 mca1::KanMx4</i>

2-2. 培地

1) YPD 培地 (酵母用完全培地)

Glucose	2%
Bacto peptone	2%
Yeast extract	1%

2) SD 培地 (硫酸アンモニウムを窒素源とした酵母用最少培地)

Glucose	2%
Ammonium sulfate	0.5%
Yeast nitrogen base w/o Amino Acids and Ammonium sulfate	0.17%

3) SG 培地 (硫酸アンモニウムを窒素源とし、ガラクトースを炭素源とした酵母用最少培地)

Galactose	2%
Ammonium sulfate	0.5%
Yeast nitrogen base w/o Amino Acids and Ammonium sulfate	0.17%

4) SC 培地 (酵母用完全合成培地)

Glucose	2%
Ammonium sulfate	0.5%
Yeast nitrogen base w/o Amino Acids and Ammonium sulfate	0.17%
*Drop-out mixture	0.2%

*Drop-out mixture は必要に応じて下記の物質を組み合わせよく混合したもの。

Adenine	0.5 g	L-Alanine	2.0 g
L-Arginine	2.0 g	L-Asparagine	2.0 g
L-Aspartic acid	2.0 g	L-Cysteine-HCl	2.0 g
L-Glutamine	2.0 g	L-Glutamic acid	2.0 g
Glycine	2.0 g	L-Histidine	2.0 g
Inositol	2.0 g	L-Isoleucine	2.0 g
L-Leucine	2.0 g	L-Lysine	0.2 g
L-Methionine	2.0 g	<i>p</i> -Aminobenzoic acid	0.2 g
L-Phenylalanine	2.0 g	L- Proline	2.0 g
L-Serine	2.0 g	L- Threonine	2.0 g
L-Tryptophan	2.0 g	L-Tyrosine	2.0 g
Uracil	2.0 g	L-Valine	2.0 g

これらの培地には必要に応じて寒天 (2%) を添加した。液体培養を行う際は三角フラスコとシリコ栓、もしくは試験管とアルミキャップを用いて培養した。また必要に応じてハイグロマイシン、G418、nourseothricin を最終濃度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう添加した。

5) LB 培地 (大腸菌用完全培地)

Bacto tryptone	1%
Yeast extract	0.5%
NaCl	1%

必要に応じて寒天末 (2%) を添加した。また、必要に応じてアンピシリン、カナマイシンを最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう添加した。

2-3. プラスミド構築

使用したプライマーを Table 3 に示す。まず、pRS414 と pRS416 を EcoRI および XhoI で処理し、EcoRI-XhoI 断片 ($P_{TAH18-TAH18-T_{TAH18}}$ および $P_{TAH18-13Myc-TAH18-T_{TAH18}}$ 、 $P_{DRE2-DRE2-T_{DRE2}}$ および $P_{DRE2-DRE2-5FLAG-T_{DRE2}}$) を準備した。

この断片を pRS414 および pRS416 に導入し、pRS414-Tah18、pRS414-13Myc-Tah18、pRS414-Dre2、pRS414-Dre2-5FLAG、pRS416-Tah18、pRS416-13Myc-Tah18 を作製した。

その他の発現用プラスミドの構築には Gateway system を用いた。PCR により増幅した Tah18、13Myc-Tah18、Dre2、Dre2-5FLAG の ORF をドナーベクター pDONR221 へ BP 反応により導入し、エントリークローンとした。その後、任意のデスティネーションベクターへと LR 反応により導入し、過剰発現プラスミドとした。

Table 2. 本研究で使用したプラスミド

Plasmid name	Promoter	Protein expressed	Tag	Yeast transformation marker	Copy number
pRS414	-		empty	TRP1	CEN
pRS416	-		empty	URA3	CEN
pDONR221	-	Gateway Donor vector		-	-
pDONR221-Tah18	-	Gateway Entry vector		-	-
pDONR221-Dre2	-	Gateway Entry vector		-	-
pDONR221-13Myc-Tah18	-	Gateway Entry vector		-	-
pDONR221-Dre2-5FLAG	-	Gateway Entry vector		-	-
pDONR221-Mca1	-	Gateway Entry vector		-	-
pAG416GAL-ccdB	GAL1	empty		URA3	CEN
pAG414GAL-ccdB	GAL1	empty		TRP1	CEN
pAG424GAL-ccdB	GAL1	empty		TRP1	2 micron
pAG416GPD-ccdB	GPD	empty		URA3	CEN
pAG424GPD-ccdB	GPD	empty		TRP1	2 micron
pAG426GPD-EGFP-ccdB	GPD	empty		URA3	2 micron
pAG424GPD-EGFP-ccdB	GPD	empty		TRP1	2 micron
pRS414-Tah18 PTAH18 TTAH18	TAH18	Tah18	-	TRP1	CEN
pRS414-Dre2 PDRE2 TDRE2	DRE2	Dre2	-	TRP1	CEN
pRS414-13Myc-Tah18 PTAH18 TTAH18	TAH18	13Myc-Tah18	13Myc, N-terminus	TRP1	CEN
pRS414-Dre2-5FLAG PDRE2 TDRE2	DRE2	Dre2-5FLAG	5FLAG, C-terminus	TRP1	CEN
pRS416-13Myc-Tah18 PTAH18 TTAH18	TAH18	13Myc-Tah18	13Myc, N-terminus	URA3	CEN
pAG416GAL-Tah18	GAL1	Tah18	-	URA3	CEN
pAG416GAL-Dre2	GAL1	Dre2	-	URA3	CEN
pAG424GAL-Dre2-5FLAG	GAL1	Dre2-5FLAG	5FLAG, C-terminus	TRP1	2 micron
pAG416GPD-Tah18	GPD	Tah18	-	URA3	CEN
pAG416GPD-13Myc-Tah18	GPD	13Myc-Tah18	13Myc, N-terminus	URA3	CEN
pAG416GPD-Mca1-EGFP	GPD	Mca1-EGFP	EGFP, C-terminus	URA3	CEN
pAG424GPD-Tah18	GPD	Tah18	-	TRP1	2 micron
pAG424GPD-EGFP-Tah18	GPD	EGFP-Tah18	EGFP, N-terminus	TRP1	2 micron
pAG424GPD-Dre2	GPD	Dre2	-	TRP1	2 micron
pAG424GPD-3HA-Dre2	GPD	3HA-Dre2	3HA, N-terminus	TRP1	2 micron
pAG426GPD-EGFP-Tah18	GPD	EGFP-Tah18	EGFP, N-terminus	URA3	2 micron

Table 3. 本研究で使用したプライマー

Primer name	Primer sequence
TAH18+1kbp_Fw	TATACCTTTGAAAGAAAAATAATC
TAH18-1kbp_Rv	GTATGCAGATAATCTGGTTTT
TAH18 gateway (+start) Fw	GGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGGCTTAATGTCA TCGAGCAAAGAAAAATCGTCA
TAH18 gateway (+stop) Rv	GGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTG CTACCAAGTTTCTGGATATAATCTATC
TAH18 dis-hygromycin Fw	ACATGAAGATTCTAGTCAACAGTAGCCCACTGTGTTTCCATTAATCGCTGCCGTACGCTGCAGGTCGAC
TAH18 dis-hygromycin Rv	TTTTAATTATGTATCTATTTAACATTATAATCGGATAAGTCTTGTATCGAATCGATGAATTCGAGGCTCG
DRE2_up_500bp_Fw	CGAGGACGAAAGCAGAAAACC
DRE2_down_700bp_Rv	CGAACCCAGGATTTACTGTGGGCCAATCC
dre2_natNT2_Fw	CATTTGATCTAAAGCATAATACACTGTAAGTGAAAGGTAICGATCGGTACGGCTGCAGGTCGAC
dre2_natNT2_Rv	CAAAAGTAGACCAATTGACGTCATTTACTGAAAACGAAATGTGCAGGGTATCGATGAATTCGAGCTCGATTAC
DRE2-gateway (+START) Fw	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGGCTTAATGTCAAAATACAAAACTGGTTTAC
DRE2-gateway (+STOP) Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTGTTACAAGTCATCTGAAAATGCTGTCTCC
DRE2_up720_EcoR1_Fw	GCCGAATTCGTGATATGGTCTCGGGGGTATG
5FLAG_stop_dre2_Fw	GAATTTCTTATGATTTATGAACCTGCACATTCGTTTCAG
5FLAG_stop_dre2_Rv	CTGAAAACGAAATGTGCAGGGTTTCATAAAATCATAAAGAAAATTC
TAH18_up800_Xho1	eggCTCGAGcctcctgggaaatagaggtttgg
TAH18_down_800_EcoR1_Rv	ggcGAATCCatgaaagcacacaaatgtggagcacatg
TAH18_ATGT_to_Spe1_Fw	CATTAATCGCTGCAC TAGTCATCGAGCAAAGAAAATC
tah18_start_13Myc_Fw	CATTAATCGCTGCATGGAACAAAAGCTAATCTC
13Myc_notSTOP_Rv	CTTGCTCGATGAGTGATGATTAATTT
TAH18_down_900bp_Sac2_Rv	CATTTTGGAGAACCCCGGGTTGCTGTAAACC
13MycTah18_BamH1_F2_deletion_Fw	CCATTAATCGCTGCatgGAACAAAAAG
13MycTah18_BamH1_F2_deletion_Rv	CTTTTGTTCcatGCAGCGATTAATGGAAAC
remove_TAG_13Myc_Tah18_Fw	TCAATCACTCATCGAGCAAAGAAAATCG
remove_TAG_13Myc_Tah18_Rv	CGATTTTCTTGTCTCGATGAGTGATTTGA
MCA1_up600_Fw	CTTGCCCTTCTCCAGAGGGTCCAAGATC
MCA1_down600_Rv	GAGCAACCTGCTTCTATTTTCAACAAAAGTCCG
Gateway_Mca1_Fw_start	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGGCTTAATGTATCCAGGTTAGTGGACGTTACAC
Gateway_Mca1_Rv_stop	GGGGACCACTTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTGctataATAATAAATTGCAGATTTACGCTCAATAGG

2-4. 酵母の形質転換

酵母菌体を 2 ml の適当な培地で 30°C、試験官で 24 時間振盪し、前培養を行った後、その一部を 100 倍希釈して 12 時間培養した。その後、適当な培地 5 ml に OD = 0.05 となるよう希釈して植菌し、OD = 0.6~0.8 程度まで増殖させた。遠心により菌体を回収した後、蒸留水で洗浄・集菌を 2 度行い、続いて 0.1% 酢酸リチウム溶液で懸濁した。30°C で 10 分間静置した後、Shared cod and herring sperm DNA (Roche : 100°C で 5 分間熱処理後、直ちに氷冷) 25 µl と、プラスミドや、PCR で増幅した遺伝子破壊用 DNA 断片を必要量、さらに酢酸リチウム入り 40% polyethylene glycol (PEG) 4000 溶液を 700 µl 加え、攪拌した。30°C で 0.5~2 時間静置後、42°C、20 分間ヒートショックを与えた細胞を滅菌水 1 ml で洗浄後・集菌し、菌体を適当な培地にて 1 時間回復培養を行った後、滅菌水に懸濁して選択寒天培地に塗布した。その後、30°C で 2~3 日間培養し、目的の形質転換体を得た。

2-5. ゲノム上の *TAH18*、および *DRE2* 遺伝子の欠失

ゲノム上の *TAH18*、および *DRE2* 遺伝子の欠失は、pAG416GAL-Tah18、pAG416GAL-Dre2、もしくは pRS414-Dre2-3HA-Tah18 を野生型株 L5685 に導入した後、これをゲノム上の *TAH18*、*DRE2* 遺伝子を欠失させる *tah18::hphNT1*、*dre2::natNT2* 断片により形質転換した。これらの断片は、pFA6a-hphNT1、pFA6a-natNT2 を鋳型として、プライマー-TAH18 dis-hygromycin Fw、TAH18 dis-hygromycin Rv と dre2_natNT2_Fw、dre2_natNT2_Rv を用いて PCR により調製した。ゲノム上の *TAH18*、*DRE2* の破壊はプラスミドシャッフリング法を用いて確認した。

2-6. プラスミドシャッフリング法による遺伝子破壊の確認およびタグ融合タンパク質の機能相補確認

2-4 に示す方法により作製した菌株を YPD 培地にて 1 日培養を行い、SD 寒天培地と 5FOA 含有 SC 寒天培地にそれぞれ塗布した。その後 30°C で 1~2 日培養した。菌株が保有するウラシル要求性を相補するプラスミドを保持している株は 5FOA の毒性により生育できないため⁸¹、ウラシル要求性を相補するプラスミドが脱落する。Tah18 と Dre2 はそれぞれ生育に必須なタンパク質であるため、5FOA 含有 SC 寒天培地で生育できなければ遺伝子の破壊が確認できる。さらに、完成した *TAH18* 発現抑制株、*DRE2* 発現抑制株にタグ融合 Tah18、Dre2 を発現するトリプトファン要求性を相補するプラスミドを導入した。YPD 培地にて 1 日培養を行い、SD 寒天培地と 5FOA 含有 SC 寒天培地にそれぞれ塗布した。その後 30°C で 1~2 日培養した。5FOA により脱落するのはウラシル要求性を相補

するプラスミドのみなので、5FOA 含有 SC 培地で生育できればタグ融合タンパク質が野生型の Tah18、Dre2 の機能を相補することが確認できる (Figure 5)。

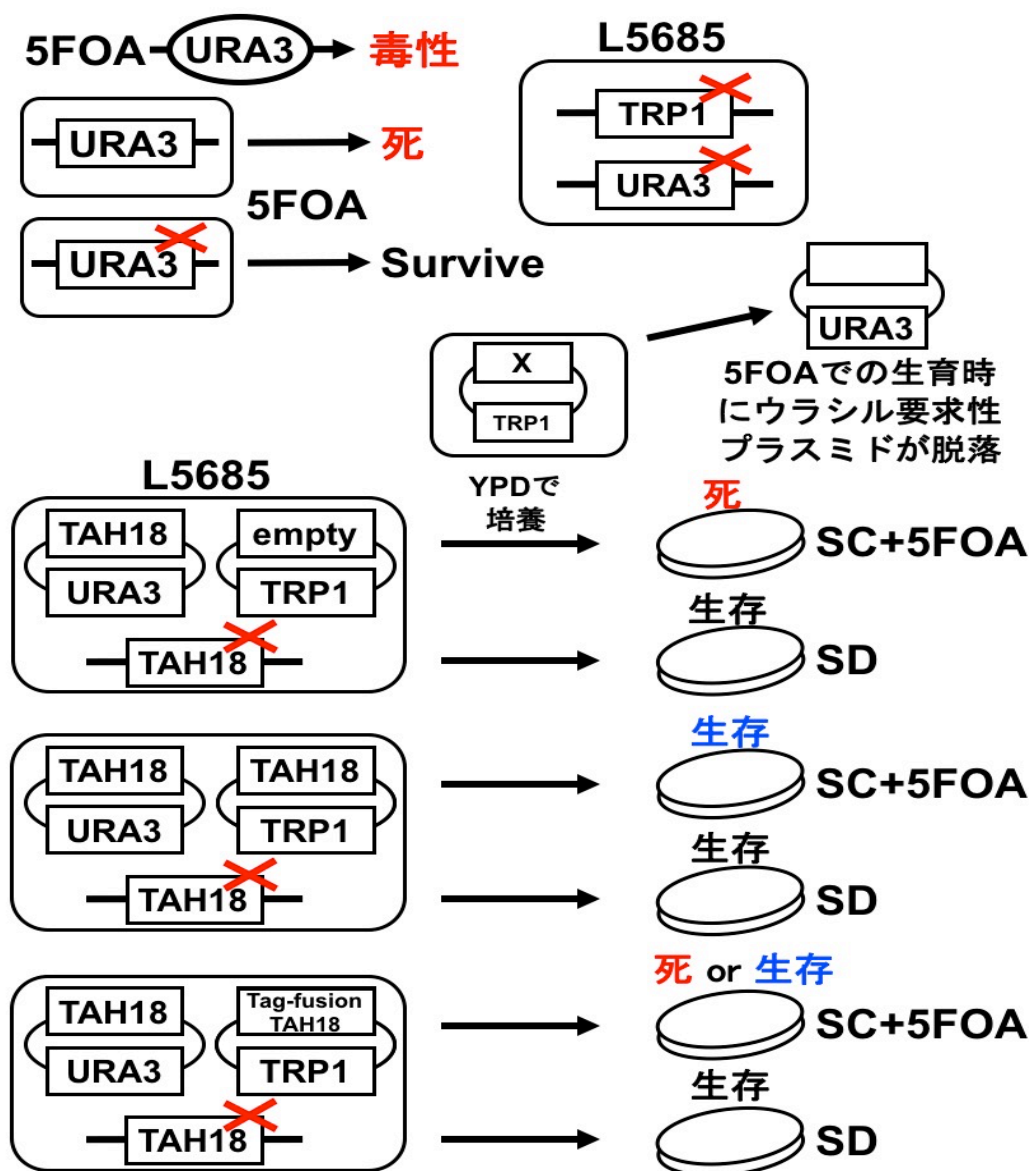


Figure 5. 5FOA を用いた遺伝子破壊、および必須タンパク質の機能相補の確認方法

Tah18 の機能相補を例にプラスミドシャッフリング法を図に示す。親株は $\Delta ura3$ であるためウラシル要求性。URA3 遺伝子がコードするが Orotidine-5'-phosphate (OMP) decarboxylase (Ura3) はウラシル合成に必須であると同時に、5-FOA を基質として毒性の 5-fluorouracil へと変換する。5-fluorouracil は *S. cerevisiae* に対して毒性を示し、寒天培地上で生育を示さない。

2-7. 過酸化水素処理後の細胞内での NO の観察

各酵母細胞を SD 培地で OD = 0.8~1.0 まで 25°C で培養し、NO 特異的な蛍光プローブ Diaminofluorescein-FM diacetate (DAF-FM DA) を添加後、さらに 30 分培養した。その後、最終濃度 2 mM となるよう過酸化水素を添加し、60 分間培養した後、Axiovert 200M (Carl Zeiss 社製) を用い、画像を HBO 100 Microscope Illuminating System (Carl Zeiss 社製) のデジタルカメラで取り込み、Adobe Photoshop Elements 5.0 を用いて画像解析を行った。

2-8. 過酸化水素処理後の細胞内 NO 量の測定

各酵母細胞を SD 培地で OD = 0.8~1.0 まで 25°C で培養し、DAF-FM DA を添加後、さらに 30 分培養した。その後、最終濃度 2 mM となるよう過酸化水素を添加し、5、30、60 分間で培養した後、処理時間毎の細胞内平均蛍光強度を Flow Cytometer (Becton, Dickinson Bioscience) を用いて計測した。必要に応じて、培地中に 100 mM *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (NAME) を添加した。過酸化水素処理後の細胞内 NO 量を評価するため、過酸化水素処理前の蛍光強度を 100% とし、相対的な蛍光強度を算出した (下記の式)。

$$\frac{(\text{mean of fluorescence intensity at the indicated time point})}{(\text{mean of fluorescence intensity at 0 min after H}_2\text{O}_2 \text{ treatment})} \times 100.$$

2-9. 培地交換後の細胞内 NO 量の測定

各酵母細胞を SG 培地で OD = 0.8~1.0 まで 25°C で培養し、遠心により菌体を回収した後、滅菌水で洗浄・集菌を 2 度行い、SG 培地、SD 培地へと培地交換を行った。必要に応じて、培地中に 100 mM NAME を添加した。その後、DAF-FM DA を添加後、30 分、1、2、3 時間 25°C で培養し、培養時間毎の細胞内蛍光強度を Flow Cytometer を用いて計測した。

2-10. 共免疫沈降およびウェスタン解析

タンパク質の相互作用解析のため、任意の株を SD 培地で OD = 0.8~1.0 まで 25°C で培養し、最終濃度 2 mM になるよう過酸化水素を 0、5、60 分間処理した。遠心により菌体を回収した後、蒸留水で洗浄・集菌を 2 度行い、TNETG buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、2.5 mM EDTA、150 mM NaCl、10% (vol/vol) glycerol、0.5% (vol/vol) Triton X-100) に再懸濁し、2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) とプロテアーゼインヒビターカクテル (Wako) を添加・混和した。細胞懸濁液にガラスビーズ (0.5 mm) を加え、マルチビーズショッカー (Yasui Kikai) を用いて破碎した。低温で遠心し上清を回収し、タンパク質濃度を測定した。その後上清 1 ml (600 μg protein) を 10 μl の任意のタグ抗体結合ビーズ Anti-GFP

magnetic beads (Medical & Biological Laboratories)、Anti-c-Myc Agarose Affinity Gel (SIGMA-ALDRICH)、Anti-HA magnetic beads (Medical & Biological Laboratories) と混和して 15 分間、室温でインキュベートした。0.5 ml の TNETG buffer で 3 回洗浄を行い、ビーズに結合したタンパク質を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、10% (wt/vol) glycerol、2% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate、0.1% bromophenol blue、5% 2-mercaptoethanol) により溶出し、恒温槽で 100°C 5 分間変性処理を行い、Co-IP サンプルとした。また、上清のタンパク質濃度を終濃度 1 µg/µl となるように SDS-PAGE sample buffer にて希釈し、恒温槽で 100°C 5 分間変性処理を行い、Input サンプルとした。これらのサンプルを SDS-PAGE に供した後、PVDF membrane (GE Healthcare) へ転写した。その後、抗体：anti-3-phosphoglycerate kinase (PGK) (Invitrogen)、anti-GFP (Roche)、anti-HA (Santa Cruz) antibodies を用いてウエスタンブロット解析を行った。

DRE2 転写誘導停止時間に伴う Dre2 タンパク質レベルの観察のために、野生型株と *DRE2* 転写制御株を用いた。SG 培地で OD =0.8~1.0 まで 25°C で培養し、遠心により菌体を回収した後、滅菌水で洗浄・集菌を 2 度行い、SG 培地、SD 培地にそれぞれ再懸濁し、0、1、3 時間 25°C で培養した。遠心により菌体を回収した後、蒸留水で洗浄・集菌を 2 度行い、TNETG buffer に再懸濁し、2 mM PMSF とプロテアーゼインヒビターカクテルを添加・混和した。細胞懸濁液にガラスビーズを加え、マルチビーズショッカーを用いて破砕した。低温で遠心し上清を回収し、タンパク質濃度を測定した。上清のタンパク質濃度を終濃度 1 µg/µl となるように SDS-PAGE sample buffer にて希釈し、恒温槽で 100°C 5 分間変性処理を行い、サンプルとした。

2-11. タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度の測定は Bradford 法にて行った。牛血清アルブミン (BSA) を用いた標準タンパク質濃度溶液 (0.1、0.2、0.3、0.4 mg/ml) を調製し、Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio Rad 社製) を 5 倍希釈したもの 1 ml にタンパク質溶液 20 µl を添加、室温で 10 分間インキュベーションした。反応液の 595 nm の吸光度を分光光度計 (DU800、BECKMAN 社製) により測定し、検量線を作成した。その後、試料タンパク質溶液を同様に反応させ、検量線からタンパク質濃度を算出した。

2-12. 細胞生存率の測定

各酵母細胞を SD 培地 (25°C) で OD = 0.8~1.0 まで培養した。その後、最終濃度 2 mM の過酸化水素を添加し、酸化ストレス処理を行った。必要に応じて、

培地中に 100 mM NAME を添加した。ストレス処理後の細胞を希釈し、YPD プレートに塗布した。その後 30°C で培養し、ストレス処理直前のサンプルから生育してきたコロニーの数を 100% として、各生存率を算出した (下記の式)。
$$\frac{\text{(number of colonies after exposure to oxidative stress)}}{\text{(number of colonies before exposure to oxidative stress)}} \times 100$$

2-13. スポットテスト

各酵母細胞を SD 培地 (25°C) で OD = 0.8~1.0 まで培養した。遠心により菌体を回収した後、滅菌水で洗浄・集菌を 2 度行い、OD₆₀₀ = 0.5 になるように滅菌水で希釈したサンプルを、さらに 5 倍希釈を繰り返し、6 段階の希釈系列とした。各希釈液 3 µl を各種寒天培地にスポットし、30°C で培養した。

2-14. 生育速度の測定

経時的に OD₆₀₀ を測定して各酵母細胞の生育を観察した。各酵母細胞を SD 培地で前培養後、SD 培地で OD₆₀₀ = 0.05 になるように植え継ぎ、25°C で培養した。その後、経時的に培養液を回収し、OD₆₀₀ を測定した。

2-15. 二次元電気泳動法による Tah18 の相互作用タンパク質の探索

相互作用タンパク質の探索には 13Myc 融合 Tah18 過剰発現株を使用し、ネガティブコントロールとして野生型 Tah18 過剰発現株を使用した。SD 培地で OD = 0.8~1.0 まで 25°C で培養し、最終濃度 2 mM になるよう過酸化水素を 0、40 分間処理した。遠心により菌体を回収した後、蒸留水で洗浄・集菌を 2 度行い、TNETG buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、2.5 mM EDTA、150 mM NaCl、10% (vol/vol) glycerol、0.5% (vol/vol) Triton X-100) に再懸濁し、2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) とプロテアーゼインヒビターカクテル (Wako Pure Chemical) を添加・混和した。細胞懸濁液にガラスビーズ (0.5 mm) を加え、マルチビーズショッカー (Yasui Kikai) を用いて破碎した。低温で遠心し上清を回収し、タンパク質濃度を測定した。その後上清 1 ml (1,000 µg protein) を 20 µl の anti-c-Myc sepharose beads (Wako) と混和して 15 分間、室温でインキュベートした。0.7 ml の TNETG buffer で 3 回洗浄を行い、ビーズに結合したタンパク質を ATTO Instruction Manual に従い調製したサンプル溶解液 (60 mM Tris-HCl (pH 8.8)、5 M Urea、1 M Thio-Urea、1% CHAPS、1% Triton X-100、コンプリートミニ EDTA-free Protease inhibitor Cocktail (Roche)) に溶出し 1 M iodoacetamide をサンプルの 1/10 量になるよう添加し、二次元電気泳動に供した。一次元目の電気泳動には等電点電気泳動用既製アガロースゲル ミニサイズ (75 mm) pH レンジ 5-8 (アトー株式会社) を用い、二次元目には e-PAGEL 電

電気泳動用既製ゲル 12.5% (アトー株式会社) を使用した。電気泳動後のゲルは Flamingo Fluorescent Gel Stain (BIO-RAD) を用いてタンパク質の検出を行った。さらに、条件依存的に検出されたタンパク質については、本研究科の LC-MS 依頼解析により同定した。

3. 結果

3-1. 酵母細胞内において過酸化水素ストレスに応答して Tah18 依存的な NOS 様活性により NO が合成される

これまで当研究室では、高温条件下において、酵母 *S. cerevisiae* の細胞内で Tah18 依存的な NOS 様活性により NO が合成され、高温ストレス耐性に寄与することを報告している⁶¹。一方、過酸化水素処理を行った酵母細胞内においても NOS 様の活性が報告されているが、その詳細な機構については不明である²²。

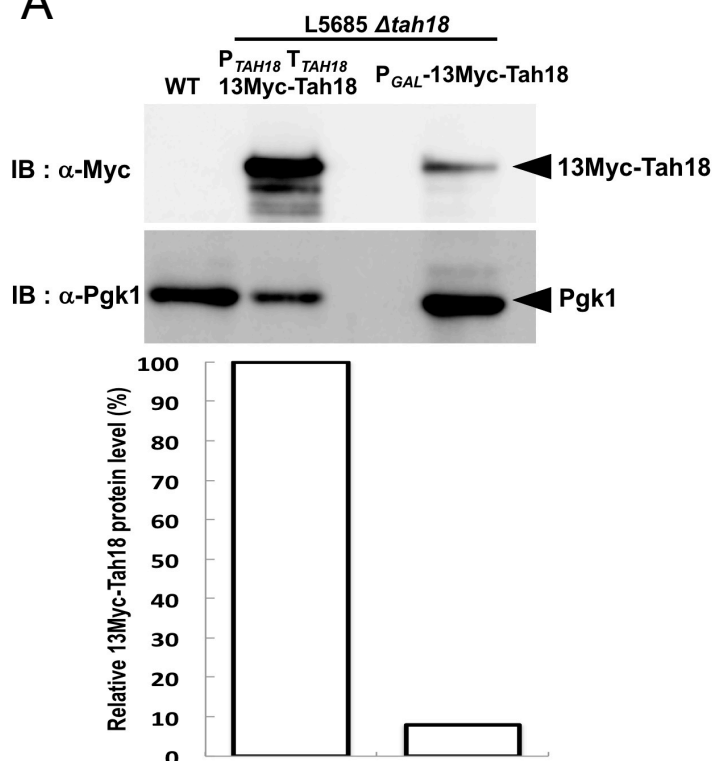
そこで、過酸化水素処理後の、野生型株および *TAH18* KD 株を用いて細胞内 NO レベルを測定した。*TAH18* KD 株は、ゲノム上の *TAH18* 遺伝子を欠損しているが、ガラクトース誘導性プロモーター制御下で *TAH18* を発現するプラスミドである pAG416GAL-Tah18 を保持している。実験で用いた SD 培地においては *TAH18* の転写がごく僅かしか転写されず、発現量が野生型株と比較して抑制されている。

まず、本実験において、野生型株および *TAH18* KD 株を、SD 培地で培養した際の Tah18 のタンパク質量を評価した。この解析には、ゲノム上の *TAH18* 遺伝子を欠損しているが、ガラクトース誘導性プロモーター制御下で *TAH18* を発現するプラスミド pAG416GAL-13Myc-Tah18 を保持した 13Myc-*TAH18* KD 株、およびゲノム上の *TAH18* 遺伝子を欠損しているが、*TAH18* プロモーター/ターミネーターの制御下で *TAH18* を発現する pRS416-13Myc-Tah18 を保持した 13Myc-Tah18 発現株を用いた。両株を SD 培地で培養し Tah18 タンパク質量を定量した (Figure 6A) 結果、13Myc-Tah18 発現株に比べ、13Myc-*TAH18* KD 株における Tah18 タンパク質量は 1/10 程度であった。このことから、本実験において用いた、ガラクトース誘導性プロモーター制御下で *TAH18* を発現する株を SD 培地で培養すると、Tah18 の発現量は野生型株よりも著しく低くなることが確認された。

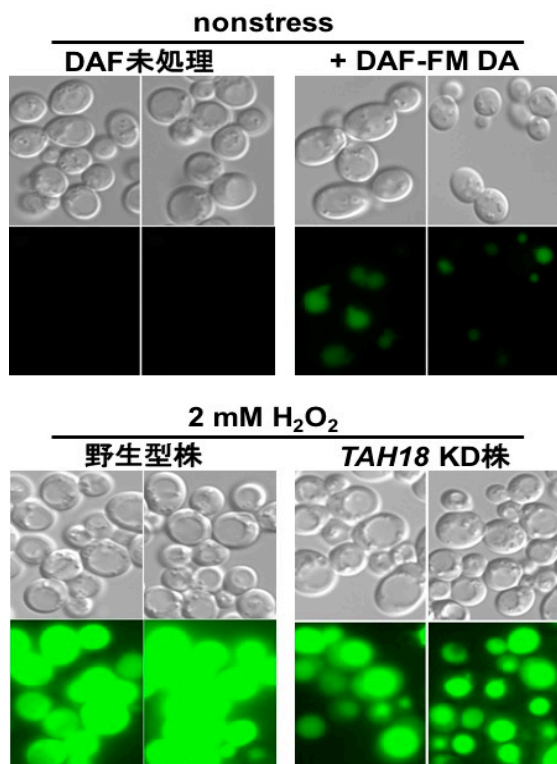
次に細胞内 NO 量を測定した結果、野生型株では非ストレス処理条件では細胞内 NO 量が全く増加しないが、過酸化水素処理時間に伴い細胞内 NO 量が増加した。また先行研究と同様に²²、哺乳類 NOS 阻害剤である NAME 処理によって細胞内 NO 量の増加は見られなくなった。これは、過酸化水素処理に応答して酵母の NOS 様活性により NO が合成されることを示している。興味深いことに、*TAH18* KD 株は野生型株と比較して過酸化水素処理に伴う NO 生成量が顕著に低下した (Figures 6B, 6C)。また、*TAH18* KD 株においても NAME 処理によって NO 合成が抑制されたが、NAME 処理後の NO 生成量は野生型株と同程度となった。これらの結果は、Tah18 が過酸化水素処理条件において NOS 様活性お

よび NO 生成に必要であることを示している。

A



B



C

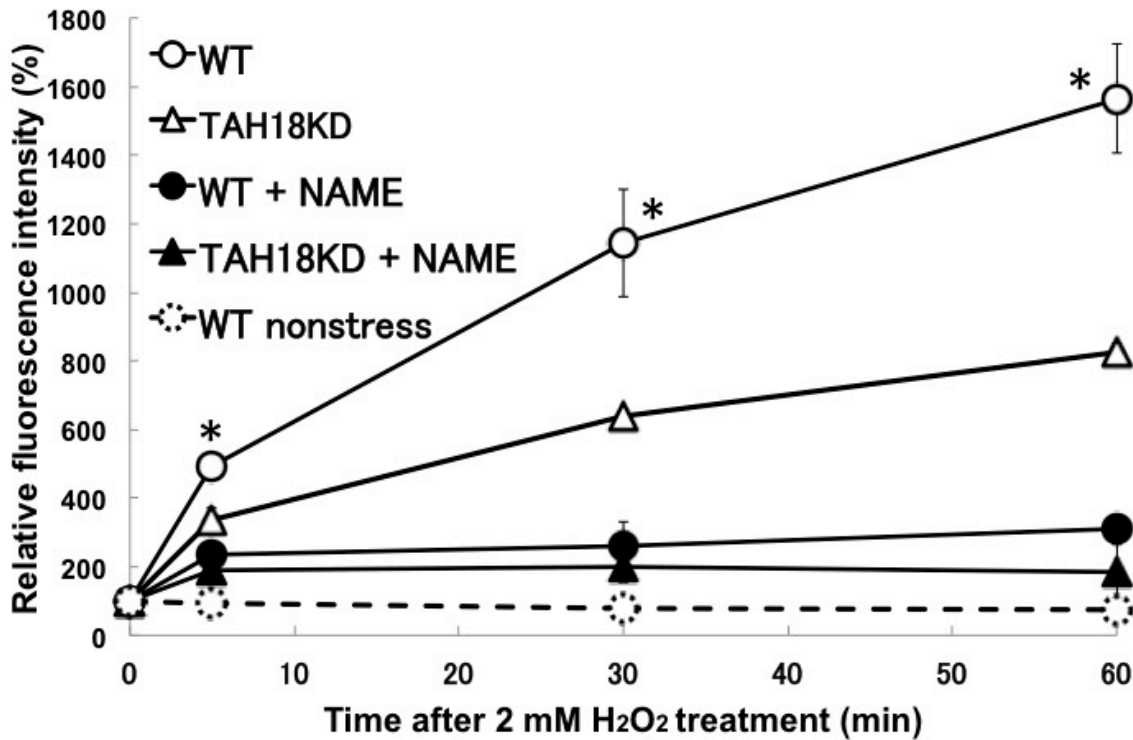


Figure 6. 過酸化水素処理条件下における酵母細胞内での Tah18 依存的な NO 生成

(A) 13Myc-Tah18 発現株、13Myc-TAH18 KD 株を用いて SD 培地で培養を行った後の 13Myc-Tah18、Pgk1 をそれぞれ Myc 抗体、Pgk1 抗体によってそれぞれウエスタンブロット法で検出した。コントロールとして野生型株と $P_{TAH18}TAH18$ 13Myc-Tah18 の発現株を用いた。図下のグラフは、13Myc-Tah18 の発現量をイメージ解析ソフトによってシグナル強度を測定し、 $P_{TAH18}TAH18$ 13Myc-Tah18 の発現株における 13Myc-Tah18 の発現量を 100%として計算した (下記の式)。

$$\text{Relative 13Myc-Tah18 protein level} = (13\text{Myc-Tah18}/\text{Pgk1})$$

(B) NO 特異的な蛍光プローブ DAF-FM DA を処理し、野生型株、TAH18 KD 株の過酸化水素処理後 0、60 分後の細胞を用いて蛍光顕微鏡観察を行った。

(C) NO特異的な蛍光プローブDAF-FM DAを処理し、NAME処理 (+NAME)、未処理の野生型株、TAH18 KD株の過酸化水素処理後0、5、30、60分後の相対的な細胞内蛍光強度を示す。またコントロールとして、野生型株の非ストレス条件における0、5、30、60分後細胞内蛍光強度も合わせて示している。独立して3試行の測定を行い、平均および標準偏差を算出した (* $p < 0.05$)。

3-2. Dre2 は酵母細胞内での NOS 様活性を抑制する

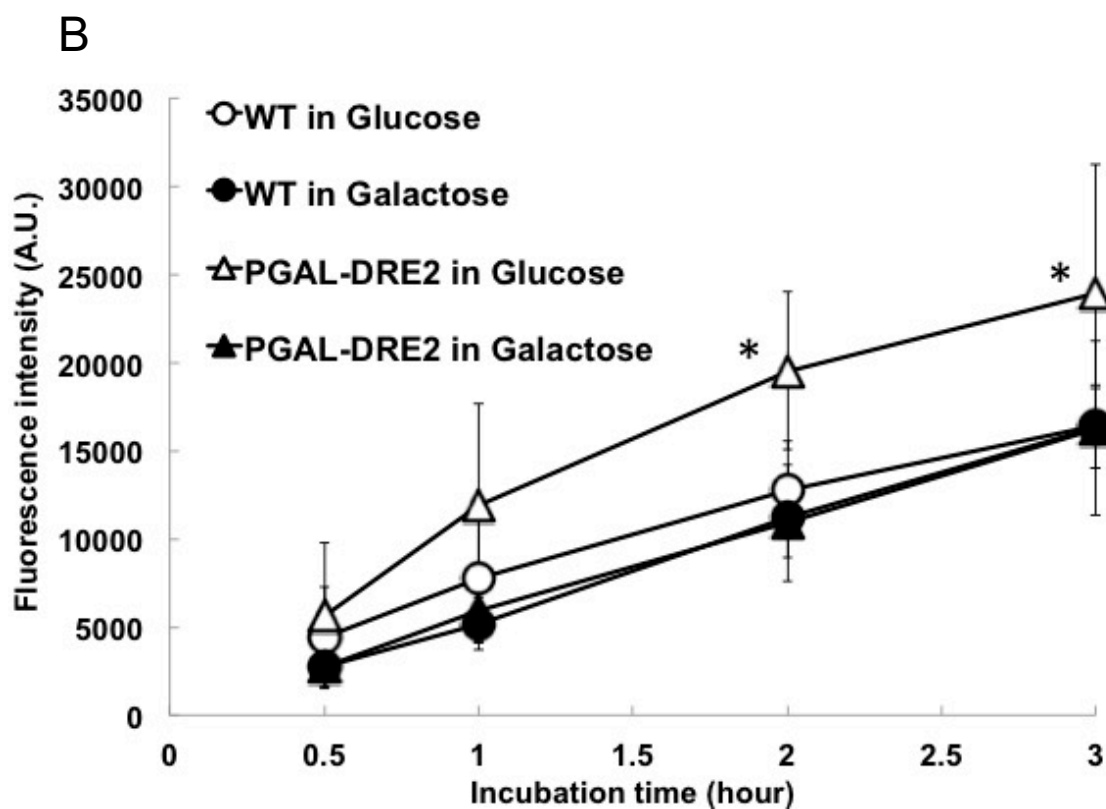
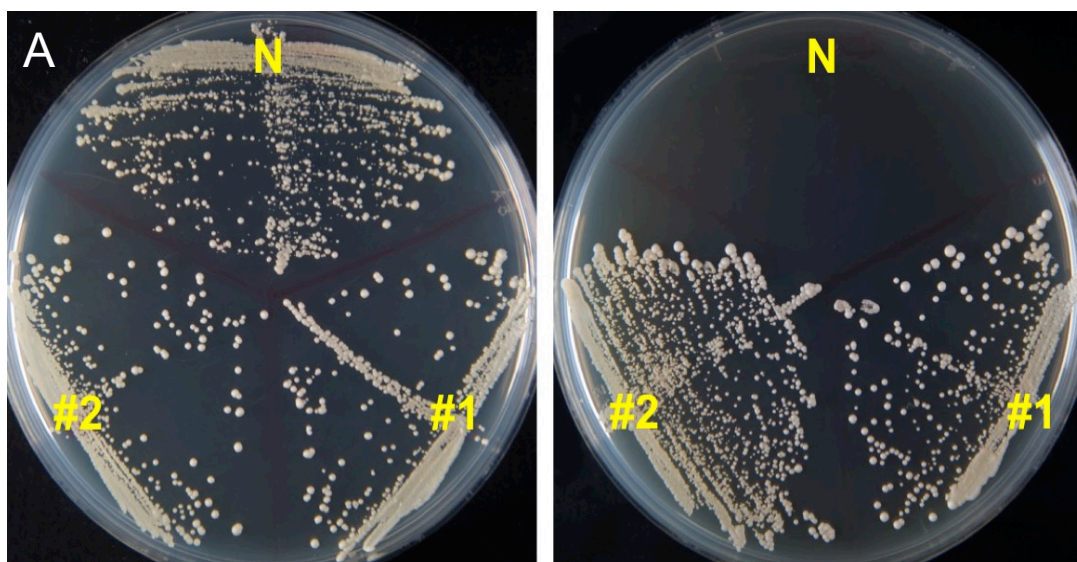
これまでに、Tah18 は鉄硫黄クラスタータンパク質である Dre2 と相互作用し、NADPH から Dre2 へと電子を伝達することで鉄硫黄タンパク質の合成に寄与し、生育に必須であることが報告されている⁶⁵。また、Tah18 は NOS の Red と相同性を示す。NOS の Red は NADPH から Oxy へと電子を伝達することで NOS 活性に寄与する⁸²。そこで、Dre2 が Tah18 依存的な NOS 様活性に与える影響を検討するために、ガラクトースにより *DRE2* 遺伝子の転写が誘導される *DRE2* 転写制御 (P_{GAL} -*DRE2*) 株を用いて解析を行った。*DRE2* 転写制御株は、ゲノム上の *DRE2* 遺伝子を破壊しているが、ガラクトース誘導性の発現プラスミドである pAG424GAL-Dre2-5FLAG を保持している。実験で用いた SG 培地においては *DRE2*-5FLAG の転写が誘導され、SD 培地では *DRE2*-5FLAG はほとんど転写されない。

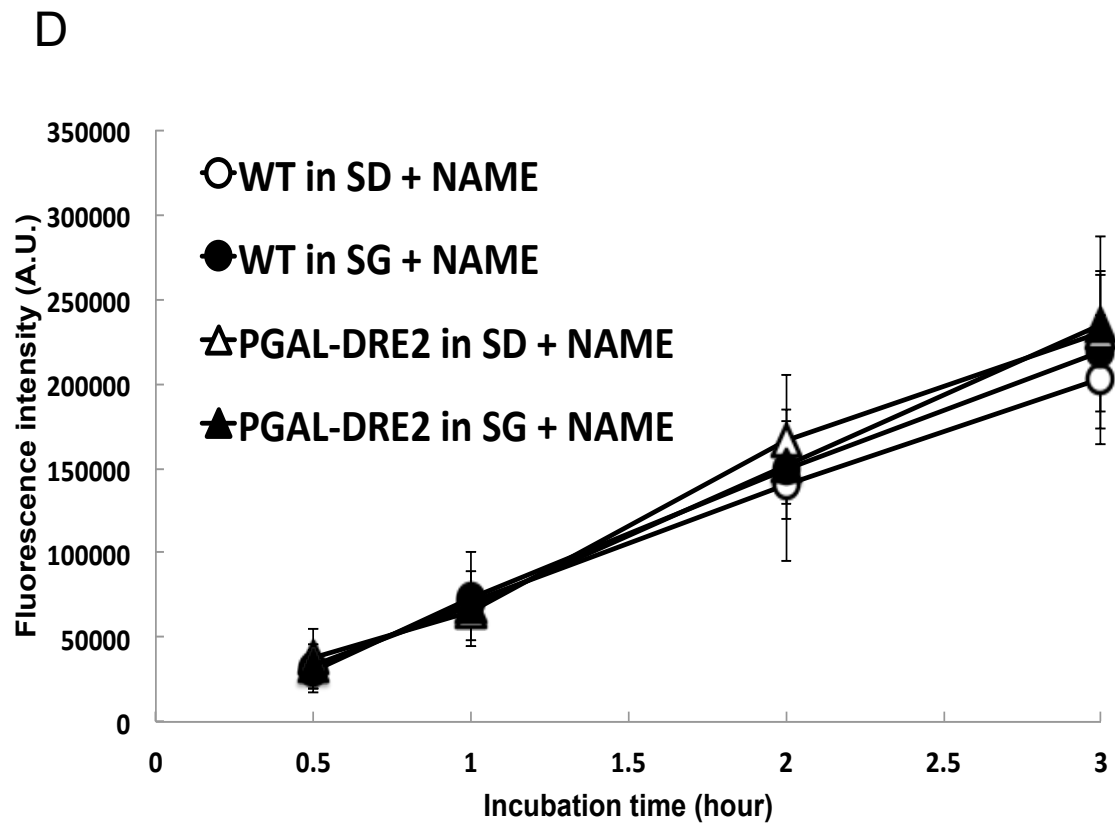
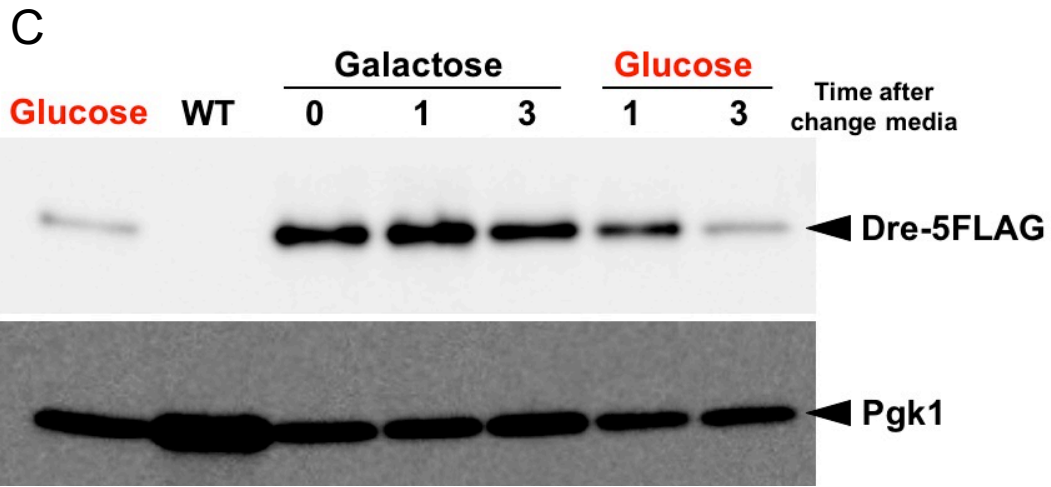
まず、本実験において Dre2 タンパク質量の解析のために用いた Dre2-5FLAG が Dre2 の機能を損なっていないかどうかプラスミドシャッフリング法を用いて確認した。その結果、Dre2-5FLAG 保持株は 5FOA 含有寒天培地上でも生育を示したことから (Figure 7A)、Dre2-5FLAG は生育に必須である機能を失っていないことが分かった。

続いて、野生型株、および *DRE2* 転写制御株を SG 培地で培養後、SG 培地、SD 培地への培地交換を行い、DAF-FM DA を処理した後 0.5、1、2、3 時間培養後に細胞内 NO レベルを測定した (Figure 7B)。その結果、野生型株では、SG、SD 培地において細胞内 NO 量に変化は見られなかった。一方、*DRE2* 転写制御株においては、SG 培地で培養した場合に比べ、SD 培地で培養した細胞内 NO レベルが有意に高かった。また、*DRE2* 転写制御株における、Dre2 タンパク質量の経時変化を評価するため、SD 培地への培地交換により誘導を停止し、0、1、3 時間後のタンパク質レベルをウエスタンブロット法により解析した (Figure 7C)。その結果、誘導停止後 1、3 時間で Dre2 タンパク質レベルが顕著に減少した。Dre2 タンパク質量の低下に伴い細胞内 NO 量が増加したことから、Dre2 は酵母における NO 合成活性を抑制する可能性が示された。さらに、野生型株、*DRE2* 転写制御株それぞれに NAME を処理し、同様に細胞内 NO レベルを測定した (Figure 7D)。その結果、NAME 処理条件下では、*DRE2* 転写制御株の誘導停止条件下における細胞内 NO 量の上昇が抑制された。この結果から、Dre2 のタンパク質量の低下に伴う細胞内 NO 量の上昇は、NOS 様活性に起因することが示唆された。

本実験における、*DRE2* 転写抑制条件下での Dre2 タンパク質量と野生型株における Dre2 のタンパク質量を比較するため、*DRE2* 転写制御株の転写誘導時、非誘導時の Dre2 タンパク質量、および *DRE2* プロモーター/ターミネーター制御

下で発現した Dre2 タンパク質量を定量した (Figure 7E)。その結果、*DRE2* プロモーター/ターミネーター制御下で発現した Dre2 タンパク質量に比べ、*DRE2* 転写制御株の転写非誘導時のタンパク質量は 1/10 程度であった。このことから、本実験で用いた *DRE2* 転写抑制条件では、Dre2 の発現量は通常生育時よりも低くなっていたことが確認された。





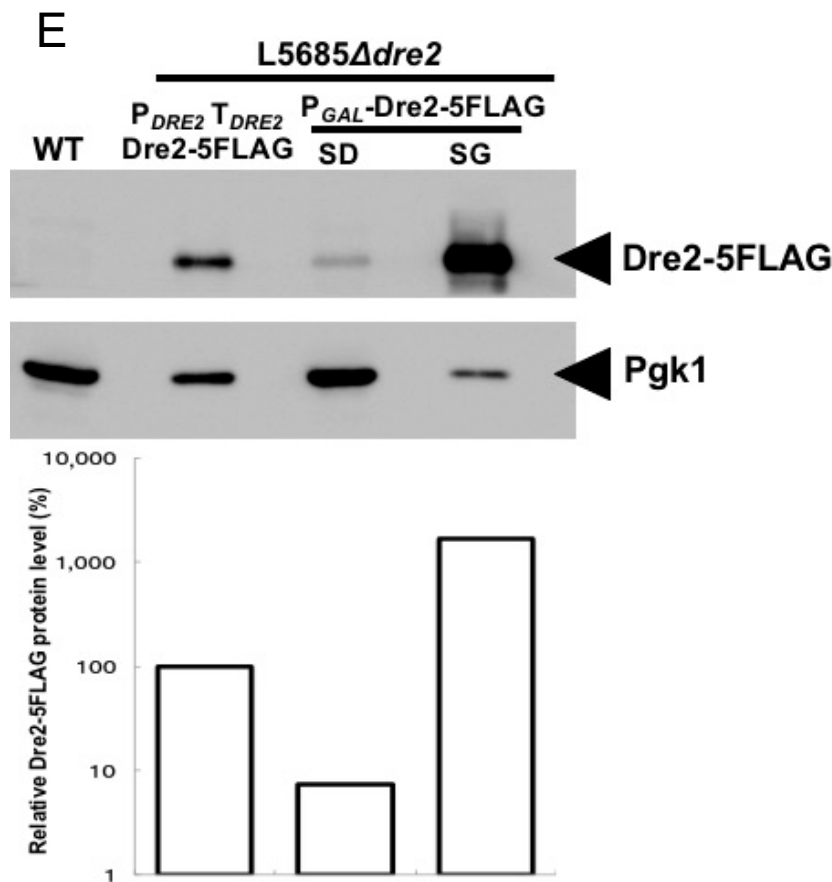


Figure 7. Dre2 のタンパク質レベルに伴う細胞内 NO 量の上昇

(A) *DRE2* KD 株にネガティブコントロールとしてプラスミド pAG424GAL-ccdB を導入した株 (N) もしくは pAG424GAL-Dre2-5FLAG を導入した株 (#1、2) を SD 寒天培地 (左) および 5FOA 含有 SC 寒天培地 (右) ヘストリークした後、30°C でインキュベートした。

(B) 野生型株と P_{GAL} -*DRE2* 株を用いて、ガラクトース培地での培養後、ガラクトース、グルコース培地へと交換した後、培養時間 0.5、1、2、3 時間後の細胞内蛍光強度 (A. U.) を示す。独立して 4 試行の測定を行い、平均および標準偏差を算出した (* $p < 0.05$)。

(C) P_{GAL} -*DRE2* 株を用いてガラクトース培地によって培養を行った後、ガラクトース、グルコース培地へと交換して培養を行い、転写誘導停止後 0、1、3 時間後の細胞内の Dre2-5FLAG、Pgk1 をそれぞれ FLAG 抗体、Pgk1 抗体によってそれぞれウエスタンブロット法で検出した。

(D) 野生型株と P_{GAL} -*DRE2* 株を用いて、ガラクトース培地での培養後、ガラクトース、グルコース培地へと交換した後、培養時間 0.5、1、2、3 時間後の細胞内蛍光強度 (A. U.) を示す。培地には常に NAME を添加した (+ NAME)。独立

して 4 試行の測定を行い、平均および標準偏差を算出した (* $p < 0.05$)。

(E) P_{GAL} -DRE2 株を用いて SD 培地、SG 培地によってそれぞれ培養を行った後の Dre2-5FLAG、Pgk1 をそれぞれ FLAG 抗体、Pgk1 抗体によってそれぞれウェスタンブロット法で検出した。コントロールとして野生型株と $P_{DRE2}T_{DRE2}$ Dre2-5FLAG の発現株を用いた。図下のグラフは、Dre2-5FLAG の発現量をイメージ解析ソフトによってシグナル強度を測定し、 $P_{DRE2}T_{DRE2}$ Dre2-5FLAG の発現株における Dre2-5FLAG の発現量を 100%として計算した (下記の式)。

Relative Dre2-5FLAG protein level = (Dre2-5FLAG/Pgk1)

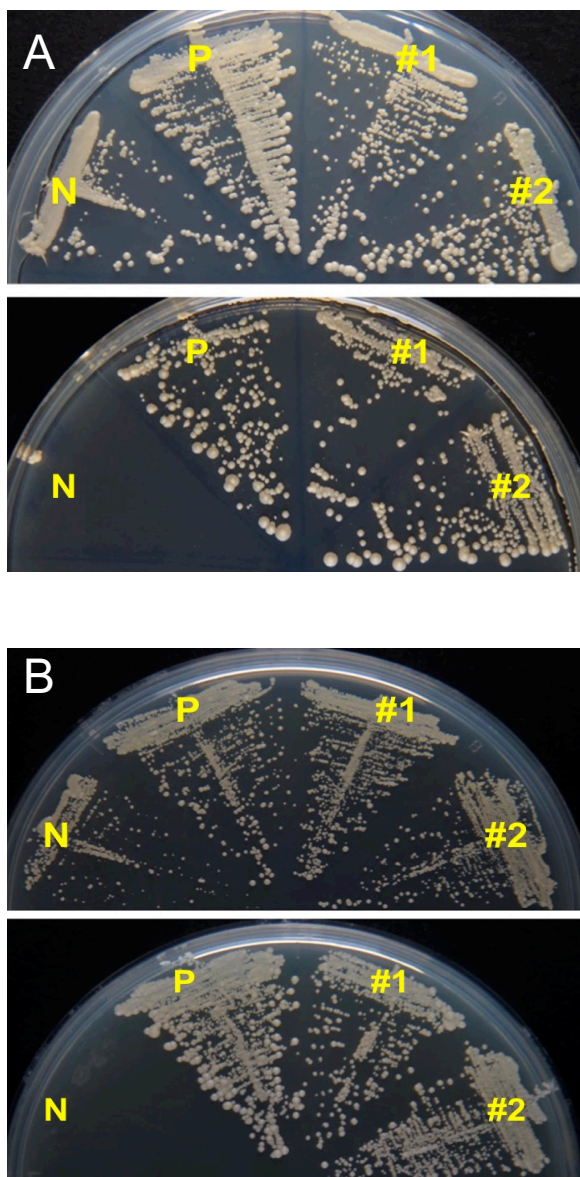
3-3. Tah18 と Dre2 の複合体は過酸化水素処理に伴い解離する

通常、タンパク質間の電子伝達には物理的な相互作用が重要である。例えば、哺乳類 NOS のオキシゲナーゼドメインとレダクターゼドメイン間の相互作用はカルシウムイオン濃度およびカルモジュリンによって制御されており、この相互作用は適切な電子伝達に必要である。Dre2 の C 末端領域は Tah18 と相互作用し、この相互作用は Tah18、Dre2 それぞれの機能、電子伝達に必須であることが報告されている⁶⁵。一方で、本研究によって、Dre2 が酵母の NO 合成活性を抑制する可能性が見出された (Figure 7)。また、Tah18 はアミノ酸配列の相同性から NOS 様活性においてもレダクターゼとして電子伝達を担う可能性が考えられる。以上のことから、Dre2 が Tah18 から伝達される電子の優先的なアクセプターとして機能し、Tah18 依存的な NOS 様活性に必要な電子伝達を阻害しているとの仮説を立てた。これを検証するため、EGFP-Tah18 と 3HA-Dre2 の共過剰発現 (Co-OP) 株を用いて、酵母が NOS 様活性を示す条件である過酸化水素処理後の Tah18 と Dre2 の相互作用を解析した。Co-OP 株は野生型株に恒常的な過剰発現プラスミド pAG426GPD-EGFP-Tah18 と pAG424GPD-3HA-Dre2 を導入した菌株である。

まず、本実験で相互作用解析に用いた EGFP-Tah18 と 3HA-Dre2 が Tah18 および Dre2 の機能を損なっていないかどうかプラスミドシャッフリング法を用いて確認した。その結果、EGFP-Tah18 保持株、3HA-Dre2 保持株は共に野生型 Tah18、Dre2 保持株と同様に 5FOA 含有寒天培地上でも生育を示した (Figures 8A, 8B)。このことから、EGFP-Tah18、3HA-Dre2 は生育に必要な機能を失っていないことを確認した。

続いて、非ストレス処理、過酸化水素処理後 0、5、60 分で EGFP-Tah18 の共免疫沈降を行い、ウェスタンブロットによる相互作用解析を行ったところ、非ストレス条件下では Tah18 と Dre2 の相互作用に経時変化は見られなかった。し

かし、過酸化水素処理条件下では Dre2 のタンパク質量に変化は見られなかったものの、EGFP-Tah18 による共免疫沈降画分中の 3HA-Dre2 タンパク質量が有意に減少した。また、この現象は過酸化水素処理後 5 分という早い段階から観察された (Figure 8C)。この結果から、Tah18 と Dre2 の複合体は過酸化水素処理後、速やかに解離することが示された。



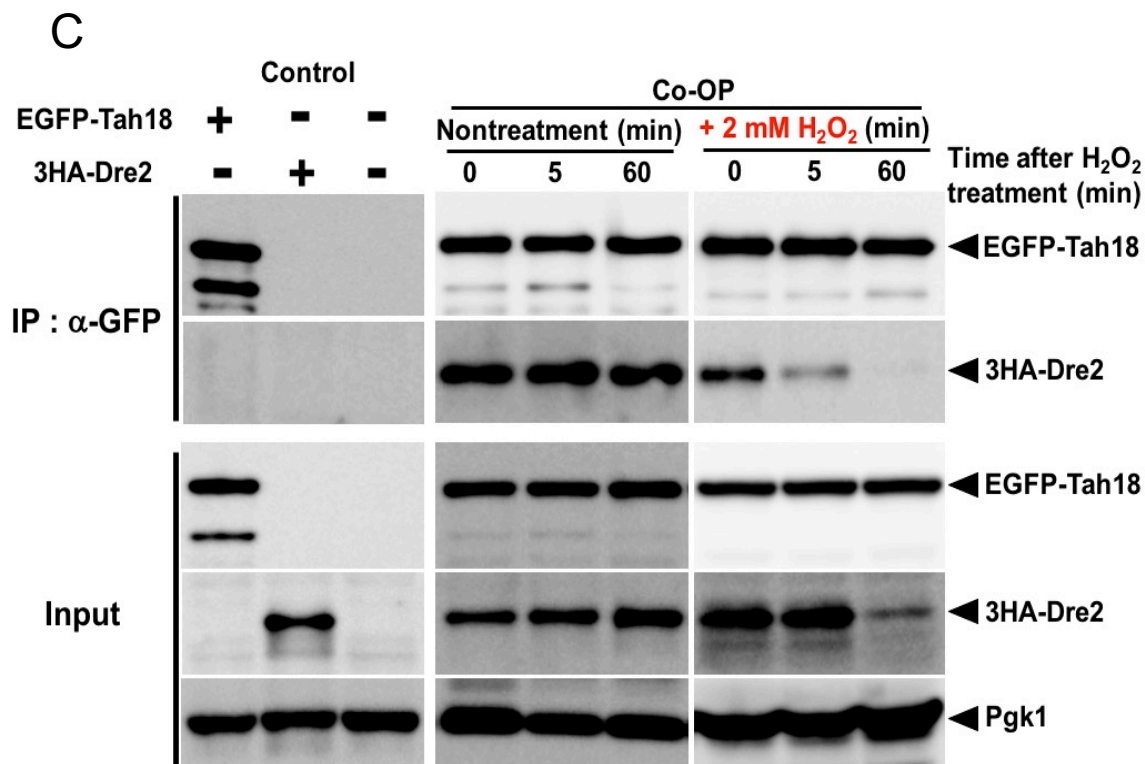


Figure 8. 過酸化水素処理条件下での Tah18 と Dre2 の相互作用

(A) *TAH18* KD 株にネガティブコントロールとしてプラスミド pAG424GPD-*ccdB* を導入した株 (N)、ポジティブコントロールとして pAG424GPD-Tah18 (P) もしくは pAG424GPD-Dre2-EGFP-Tah18 を導入した株 (#1, 2) を SD 寒天培地 (上) および 5FOA 含有 SC 寒天培地 (下) ヘストリークした後、30°C でインキュベートした。

(B) *DRE2* KD 株にネガティブコントロールとしてプラスミド pAG424GPD-*ccdB* を導入した株 (N)、ポジティブコントロールとして pAG424GPD-Dre2 (P) もしくは pAG424GPD-3HA-Dre2 を導入した株 (#1, 2) を SD 寒天培地 (上) および 5FOA 含有 SC 寒天培地 (下) ヘストリークした後、30°C でインキュベートした。

(C) EGFP-Tah18、3HA-Dre2 の共過剰発現株を用いて、非ストレス条件下、もしくは過酸化水素処理を行った後、EGFP-Tah18 の共免疫沈降を行った画分、粗抽出画分における EGFP-Tah18、3HA-Dre2、Pgk1 をそれぞれ GFP 抗体、HA 抗体、Pgk1 抗体によってウェスタンブロット法で検出した。コントロールとして EGFP-Tah18、3HA-Dre2 のみをそれぞれ過剰発現させた株と野生型株を用いて同様の解析を行った。

3-4. Dre2 の過剰発現は過酸化水素処理条件下における Tah18 依存的な NOS 様活性を抑制する

これまでの結果により、過酸化水素処理条件下において、Tah18 依存的な NOS 様活性による NO 合成と Tah18-Dre2 複合体の解離が観察されたことから、Tah18-Dre2 の解離と Tah18 依存的な NOS 様活性が相関している可能性が示された。そこで両者の関連性を解析するため、Tah18 と Dre2 の解離が抑えられる条件を用いて解析を行った。

そこで、遊離型の Tah18 を減少させることを目的に、Dre2 のタンパク質量を増加させるために、Dre2 の過剰発現株を用いて同様の解析を行った。Dre2 過剰発現株は、ゲノム上の *DRE2* が欠損し、恒常的に Dre2 を過剰発現するプラスミド pAG424GPD-Dre2 を保持した株であり、恒常的に Dre2 が過剰発現している。Dre2 過剰発現株においては、*TAH18* KD 株と同程度に NO 合成量が低下した。以上の結果から、Tah18 と Dre2 の相互作用によって Tah18 依存的な NOS 様活性を抑制することが示唆された。

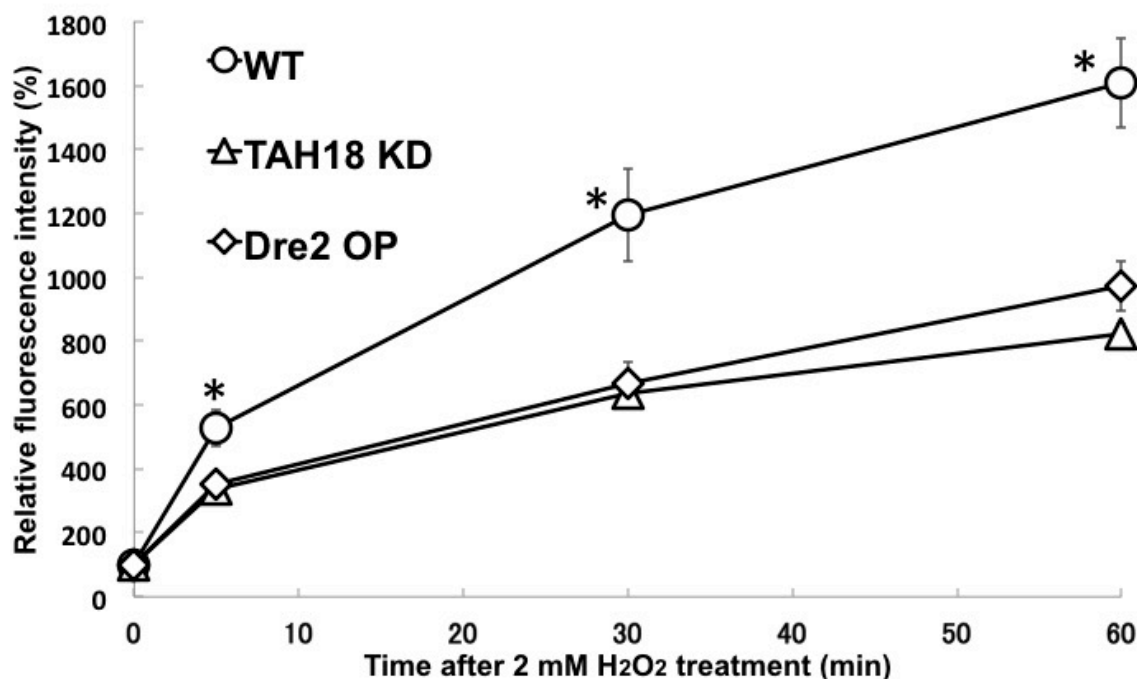


Figure 9. 過酸化水素処理条件下での Tah18 依存的な NO 合成

NO 特異的な蛍光プローブ DAF-FM DA を処理した野生型株、*TAH18* KD 株、Dre2 過剰発現株の過酸化水素処理後 0、5、30、60 分後の相対的な細胞内蛍光強度を示す。独立して 3 試行の測定を行い、平均および標準偏差を算出した (* $p < 0.05$)。

3-5. 過酸化水素処理条件における Tah18 依存的な NO 合成は細胞死を誘導する

NOは、様々な生物種において細胞死の誘導に関与することが知られている⁸³。酵母においても、過酸化水素処理を施した酵母が細胞内で合成された一酸化窒素依存的に細胞死を誘導することが報告されている²²。また、Tah18は過酸化水素処理条件における細胞死の誘導に関与することが知られている⁶⁸。さらに、本研究の結果から、過酸化水素処理に応答してTah18依存的にNOが合成されることが明らかになった。そこで、過酸化水素処理条件においてTah18依存的に合成されるNOが細胞死を誘導すると予想し、Tah18依存的なNO合成量が減少したTAH18 KD株と、NAME処理、未処理の野生型株の過酸化水素処理後の生存率を測定した (Figure 10)。その結果、TAH18 KD株は野生型株と比較して有意に生存率が高かった。また、NAME処理を施した野生型株は著しい生存率の向上を示した。したがって、Tah18依存的なNOの合成により細胞死が誘導されることが示唆された。

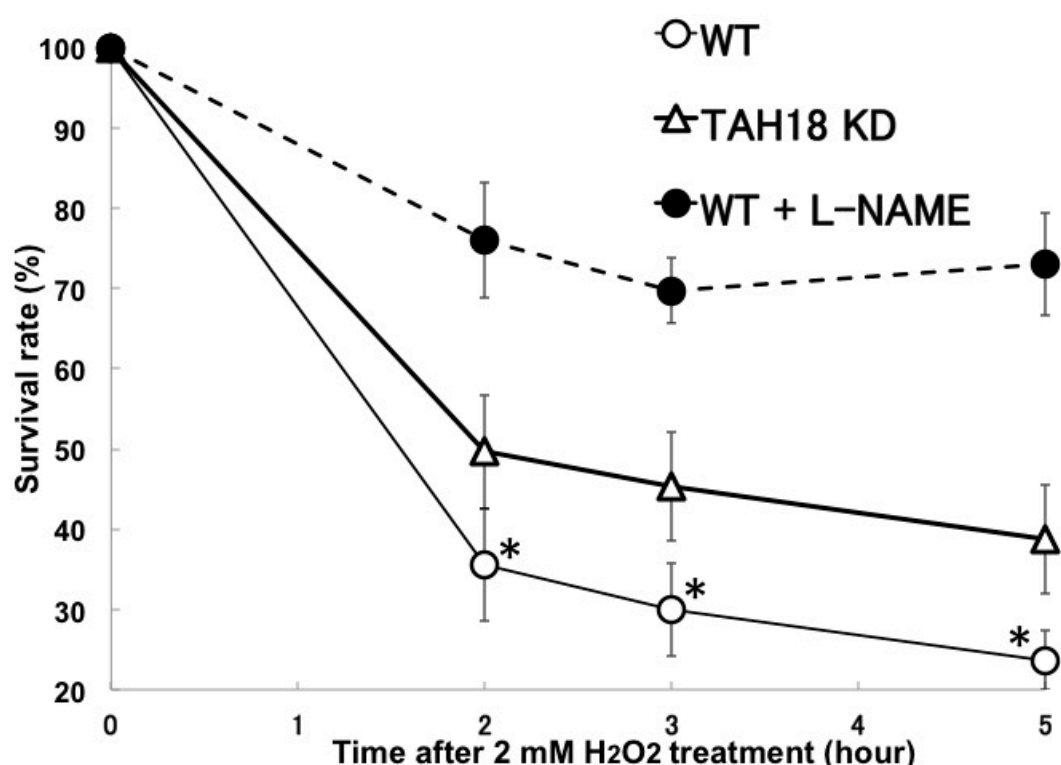


Figure 10. 過酸化水素処理条件下における細胞生存率

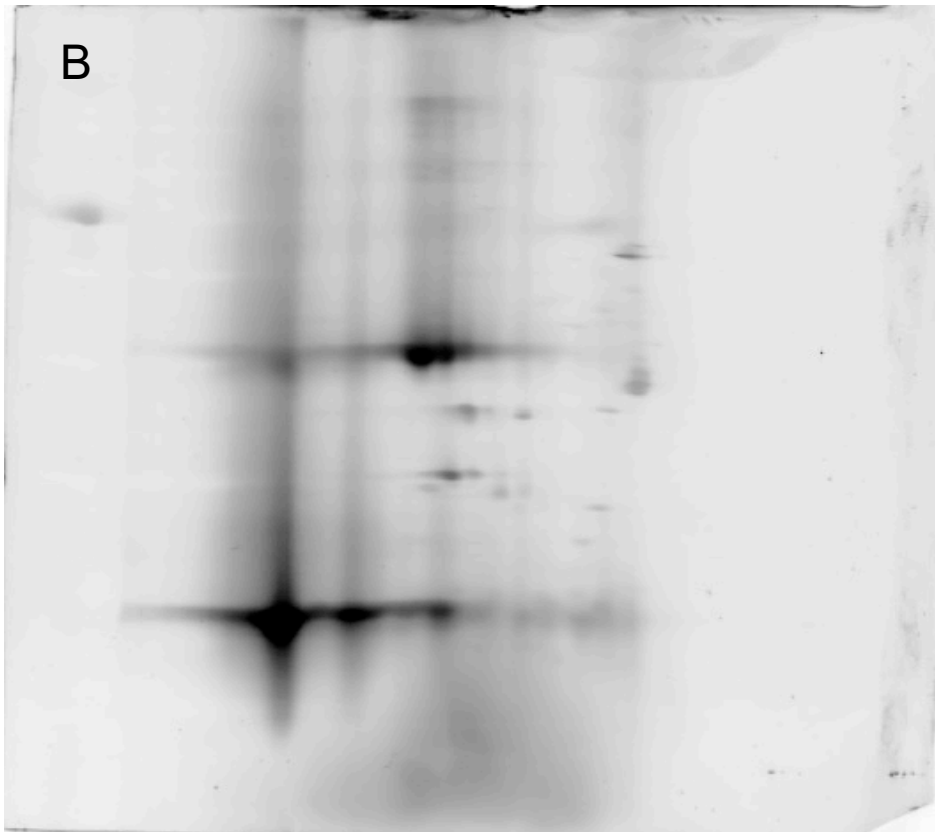
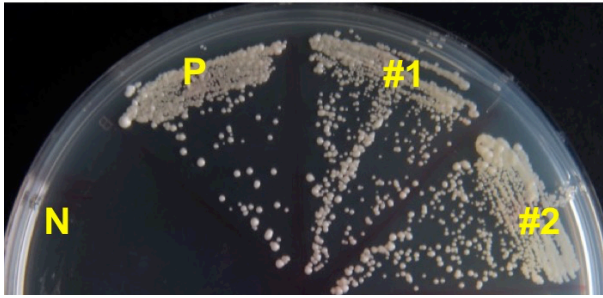
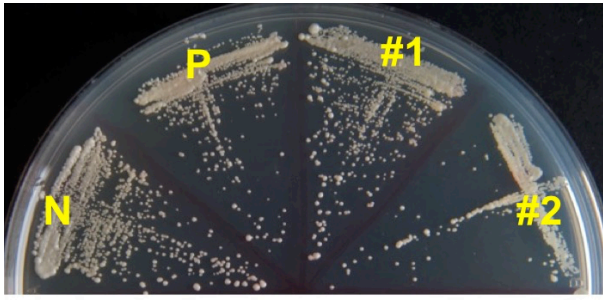
野生型株、TAH18 KD株を用いて、過酸化水素処理後0、2、3、5時間後のコロニー形成率を測定した。必要に応じて、NAME処理を行った (+NAME)。独立して3試行の測定を行い、平均および標準偏差を算出した (* $p < 0.05$)。

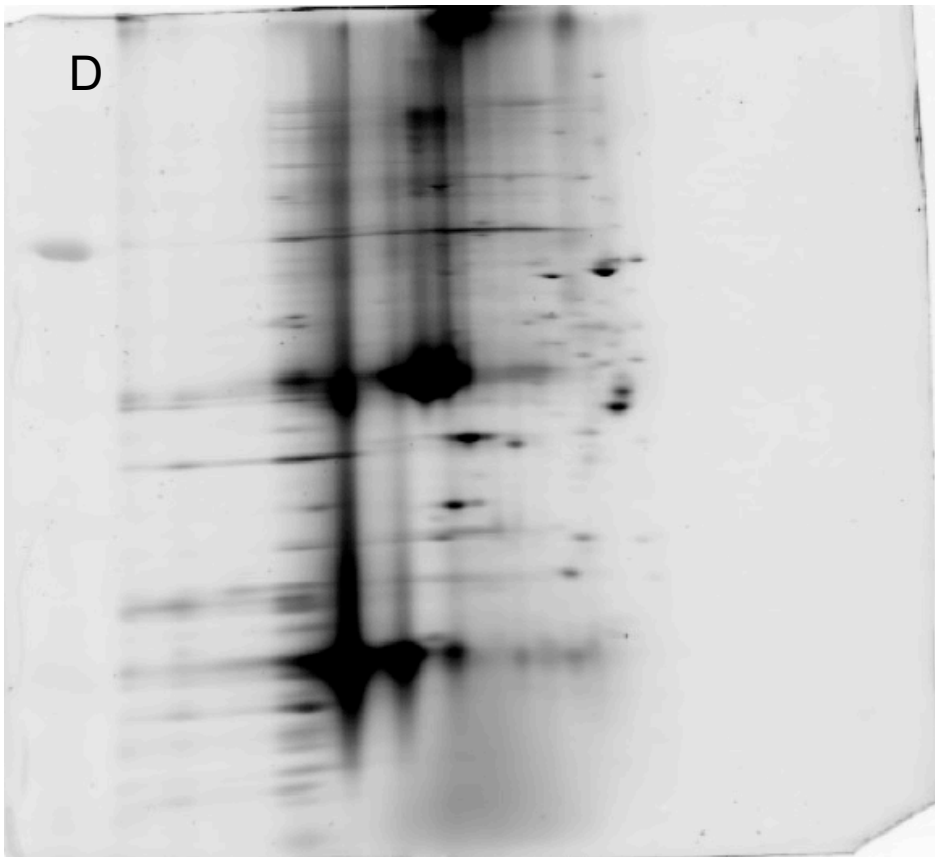
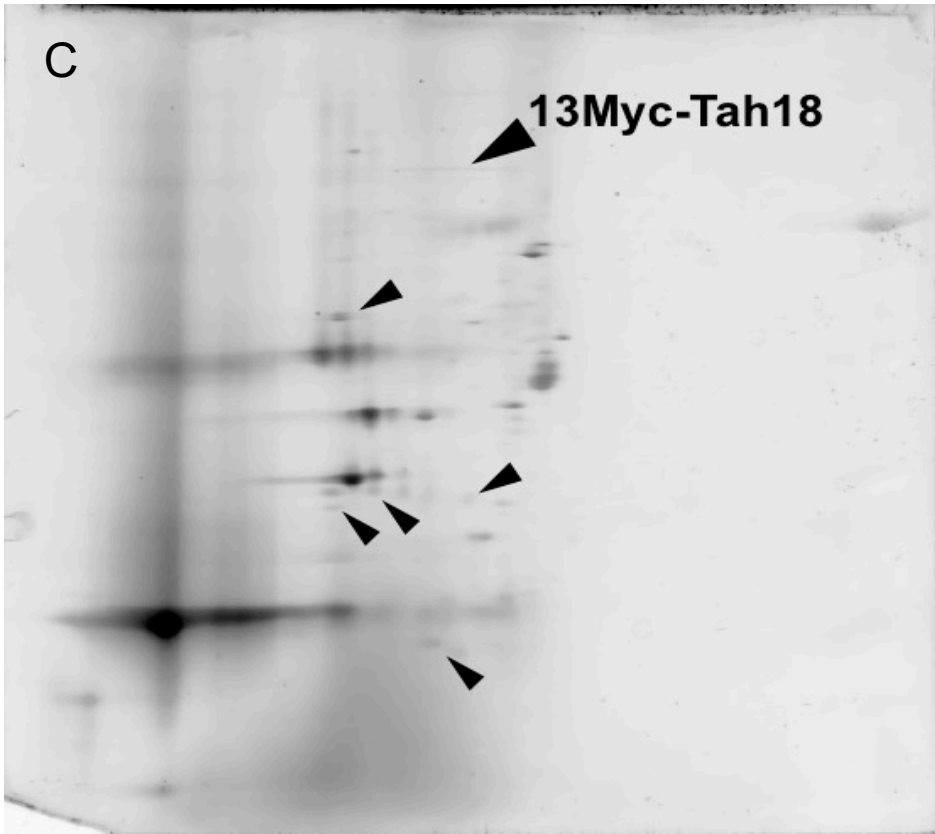
3-6. Tah18 は Dre2 との解離後、相互作用するタンパク質が変わる

これまでの結果から、Tah18 が酸化ストレス応答的に Dre2 と解離することが、酵母の NOS 様活性に重要であることが明らかとなった。一方、Tah18 は既知の NOS のレダクターゼドメインと類似した一次構造を有しているが、基質であるアルギニンを結合・酸化するためのオキシゲナーゼドメインが欠落している。そのため、Dre2 との解離後、NOS のオキシゲナーゼと同様の働きをする未知のタンパク質 (yOxy) と相互作用することで NOS 様活性を発現する可能性が考えられる。そこで、yOxy の候補タンパク質を見出す目的で、過酸化水素処理条件下において、Tah18 と相互作用するタンパク質を探索した。本実験には過酸化水素処理条件下での Tah18 の相互作用タンパク質の探索を目的に 13Myc-Tah18 過剰発現株、Tah18 過剰発現株を用いた、これらの株は、ゲノム上の *TAH18* が欠損し、恒常的に 13Myc-Tah18 および Tah18 を過剰発現するプラスミド pAG416GPD-13Myc-Tah18、pAG416GPD-Tah18 をそれぞれ保持した株であり、恒常的に 13Myc-Tah18 および Tah18 が過剰発現している。

まず、本実験で用いた pAG416GPD-13Myc-Tah18 から発現する 13Myc-Tah18 が、生理的な機能を損なっていないかどうかプラスミドシャッフリング法を用いて確認した。その結果、13Myc-Tah18 保持株は、野生型 Tah18 保持株と同様に 5FOA 含有寒天培地上でも生育を示した (Figure 11A)。このことから、本実験で用いた 13Myc-Tah18 は正常な機能を失っていないことを確認した。

13Myc-Tah18 の過剰発現株を過酸化水素処理した後、抗 Myc 抗体により共免疫沈降した画分を二次元電気泳動に供し、Tah18 と相互作用するタンパク質を本研究科の LC-MS 依頼解析により同定した (Figures 11B-11E)。その結果、過酸化水素処理後 Tah18 と相互作用するタンパク質として、黒矢印により示されたシグナルから、cystathionine β -synthase Cys4 (4.2.1.22)、 β -isopropylmalate dehydrogenase Leu2 (1.1.1.85)、S-adenosylmethionine synthase Sam1 (2.5.1.6)、mitochondrial GTP/GDP transporter Ggc1、cis-golgi localized monothiol glutaredoxin Grx7 が同定できた。これらは、Tah18 との相互作用についてはこれまで報告されていない新規なタンパク質である。





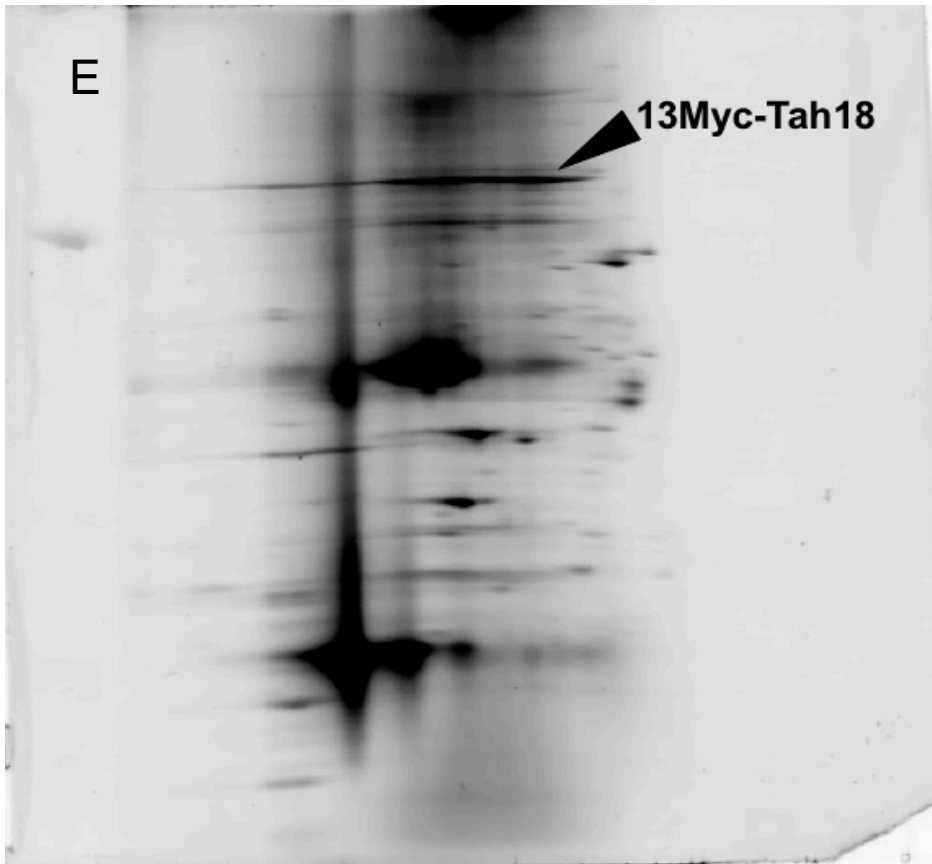


Figure 11. Tah18-Dre2 複合体解離後の相互作用タンパク質の探索

(A) *TAH18* KD 株にネガティブコントロールとしてプラスミド pRS414 を導入した株 (N)、ポジティブコントロールとして pRS414-Tah18 (P) もしくは pRS414-13Myc-Tah18 を導入した株 (#1, 2) を SD 寒天培地 (上) および 5FOA 含有 SC 寒天培地 (下) ヘストリークした後、30°C でインキュベートした。

(B) 野生型 Tah18 の過剰発現株、(C) 13Myc-Tah18 の過剰発現株を用いて、過酸化水素処理を行った後、Myc 抗体ビーズにより共免疫沈降を行い、二次元電気泳動を行った後、Flamingo 染色によりタンパク質の検出を行った。
 ※13Myc-Tah18 以外に黒矢印にて示されたシグナルは、条件依存的に検出されたシグナルのみを示している。13Myc-Tah18 の検出位置は (D) 5 倍のサンプル濃度の Tah18 の過剰発現株、(E) 13Myc-Tah18 の過剰発現株で解析を行った際に、13Myc-Tah18 過剰発現株特異的に検出されたシグナルの位置、タンパク質のサイズを参考にして推測した。

3-7. 過酸化水素処理条件下で、Dre2 は Mca1 によって分解される

Tah18とDre2の相互作用解析の結果から、Dre2はTah18との解離後、タンパク質量が顕著に減少していた (Figure 8C)。最近、哺乳類におけるDre2のホモログ Ciapin1が、カスパーゼ3の特異的な基質としてアポトーシス誘導時に分解されることが報告された⁸⁴。酵母*S. cerevisiae*においては、メタカスパーゼとして同定されたMca1がカスパーゼ3と類似した構造を持つことが知られている⁷⁷。これらの知見から、酵母のDre2もMca1のカスパーゼ活性によって分解される可能性を考えた。

そこで、MCAI破壊株を用いて、過酸化水素処理後のTah18-Dre2間の相互作用およびタンパク質発現量に与える影響を解析した (Figure 12A)。この解析には、ゲノム上のTAH18、DRE2を欠損させ、pRS416-13Myc-Tah18、およびpRS414Dre2-5FLAGを保持した菌株を用いた。pRS416-13Myc-Tah18、pRS414Dre2-5FLAGは、TAH18プロモーター制御下で13Myc-Tah18を、DRE2プロモーター制御下でDre2-5FLAGを、それぞれ発現する。本解析は、この株と相当するMCAI遺伝子破壊株を用いて行った。

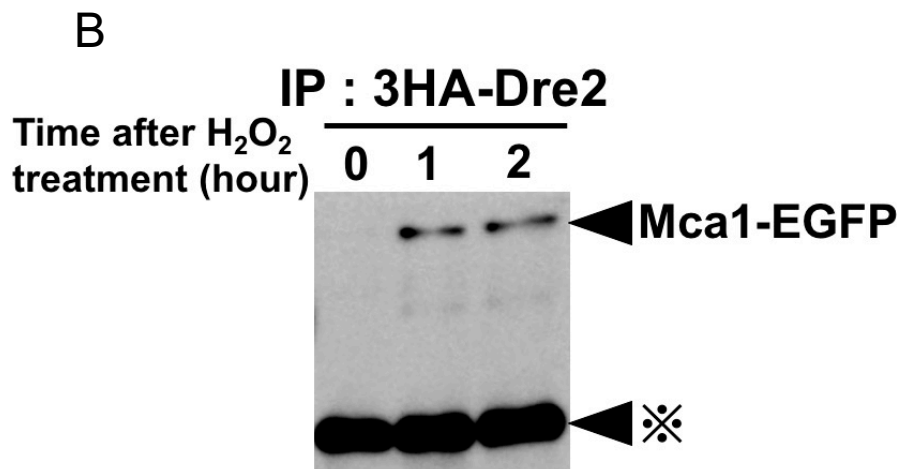
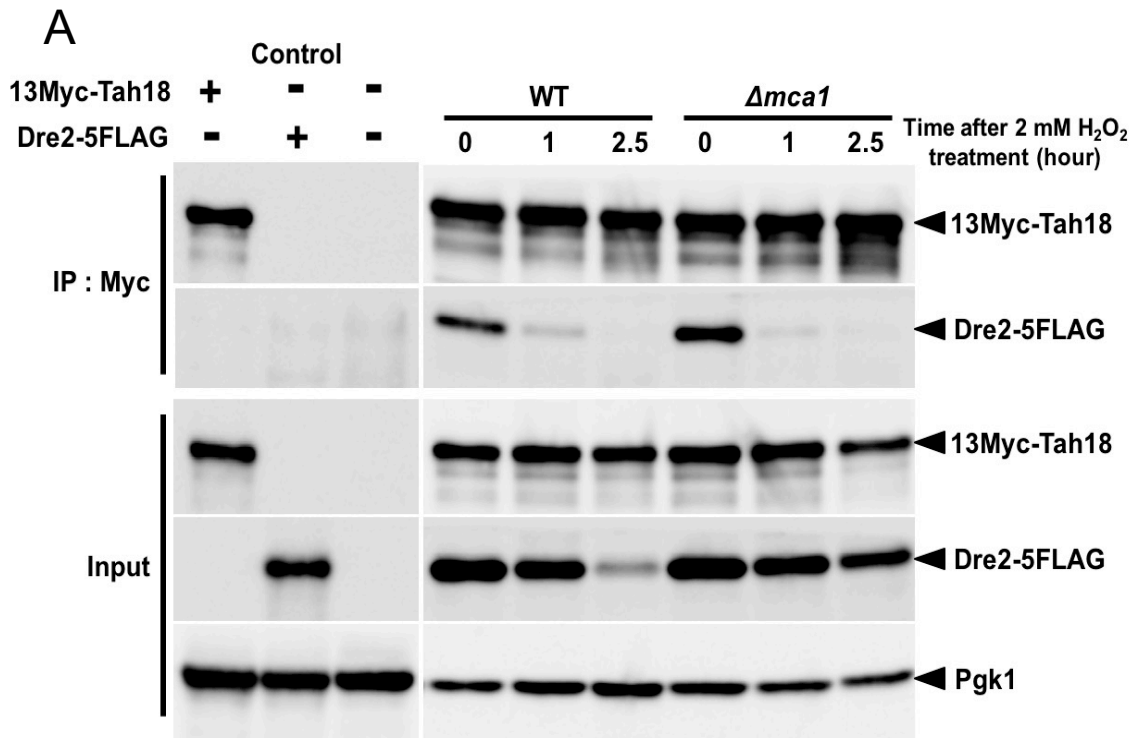
共免疫沈降画分のウェスタンブロッティングの結果、過酸化水素処理条件下におけるTah18とDre2の複合体の解離は、野生型株とMCAI破壊株で差は見られなかった。一方、過酸化水素処理に伴うDre2タンパク質量の減少は、野生型株に比べてMCAI破壊株では有意に抑制された。この結果から、Dre2の過酸化水素処理依存的な分解は、少なくとも部分的にはMca1依存的であることが示された。

さらに、過酸化水素処理条件下でのDre2とMca1の相互作用について、3HA-Dre2とMca1-EGFPの共過剰発現株を用いて、3HA-Dre2の共免疫沈降により解析した。3HA-Dre2とMca1-EGFPの共過剰発現株は、ゲノム上のDRE2を欠損させ、恒常的な過剰発現プラスミドであるpAG424GPD-3HA-Dre2およびpAG416GPD-Mca1-EGFPを保持している菌株である。その結果、非ストレス条件下では3HA-Dre2とMca1-EGFPとの相互作用は見られなかったが、過酸化水素処理後1、2時間の時点で共免疫沈降画分においてMca1-EGFPのバンドが検出された (Figure 12B)。このことから、Dre2は過酸化水素処理条件下において、Dre2がMca1と相互作用することが示された。

これらの結果から、Mca1によるDre2の分解がNO合成に影響を及ぼす可能性を考えた。そこで、MCAI破壊株と野生型株の過酸化水素処理条件下におけるNO合成量を測定した。その結果、MCAI破壊株は野生型株と比較して有意にNO合成量が低下した (Figure 12C)。この結果から、Mca1が過酸化水素処理条件下におけるNOS様活性に寄与する可能性が示された。

またこれまでに、MCAI破壊株は過酸化水素処理条件において細胞死を誘導することが知られているため⁷⁸、過酸化水素処理条件下での生存率を測定し、野生

型株、*TAH18* KD 株、*MCA1* 破壊株をそれぞれ比較した。これまでの報告と同様に、*MCA1* 破壊株は野生型株と比較して有意に生存率の低下が抑制された (Figure 12D)。また、NAME を処理した *MCA1* 破壊株および野生型株は同様の生存率を示した。これらの結果から、*Mca1* によって誘導される細胞死においても、NO 合成が寄与することが示唆された。



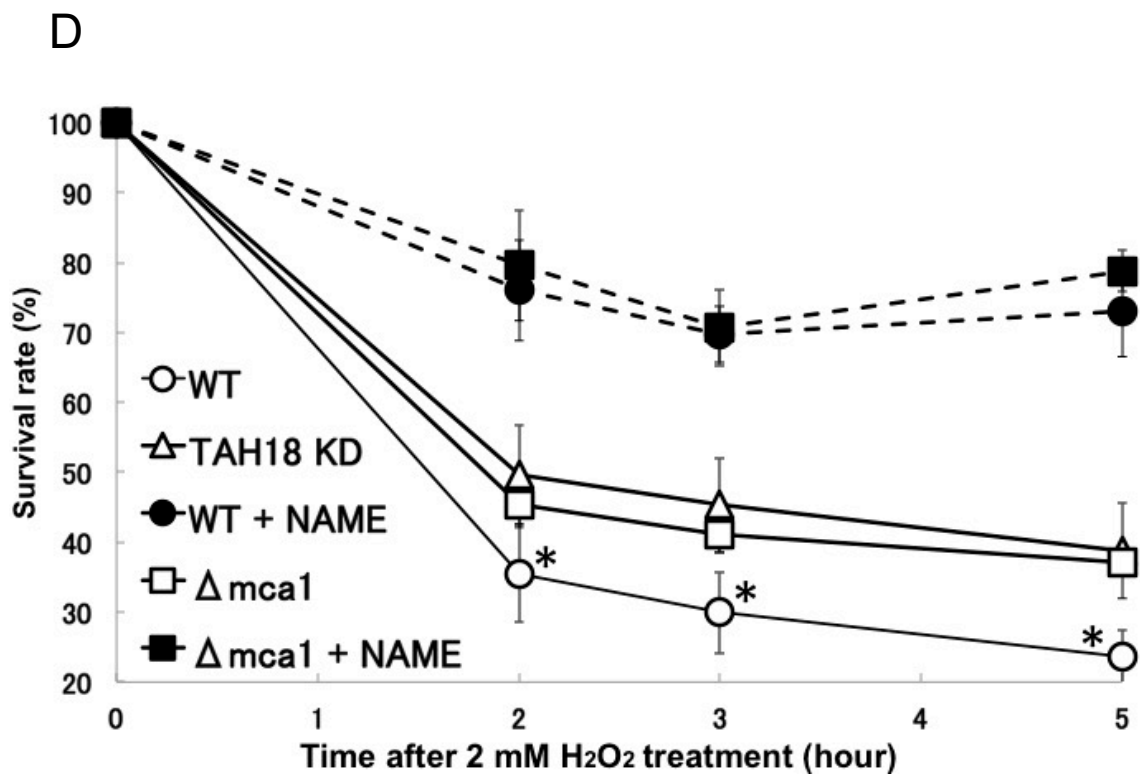
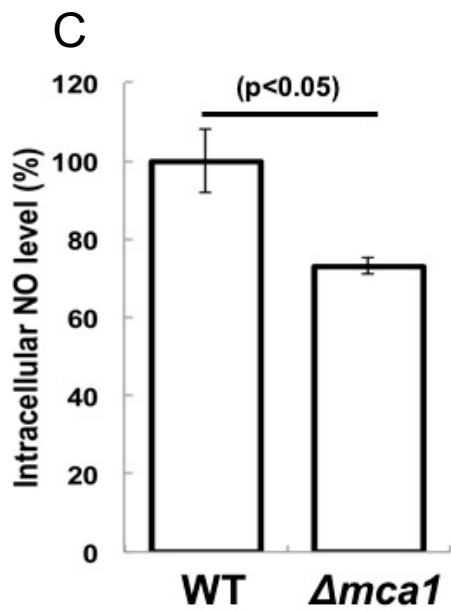


Figure 12. 過酸化水素処理条件下において Mca1 は Dre2 を分解し、NO 合成を増大する

(A) *TAH18* および *DRE2* のプロモーター、ターミネーターにより発現を制御する 13Myc-Tah18、Dre2-5FLAG を発現する TAH18/DRE2 発現解析株の、*MCAI* 保持、非保持株を用いて、2 mM 過酸化水素処理後 13Myc-Tah18 の共免疫沈降を行った画分、粗抽出画分における 13Myc-Tah18、Dre2-5FLAG、Pgk1 をそれぞれ c-Myc 抗体、FLAG 抗体、Pgk1 抗体によってウエスタンブロット法で検出した。コントロールとして 13Myc-Tah18、Dre2-5FLAG のみをそれぞれ発現させた株と野生型株を用いて検出を行った。

(B) 3HA-Dre2、Mca1-EGFP 共過剰発現株を用いて、2 mM 過酸化水素処理を行った後の 3HA-Dre2 の共免疫沈降を行った画分における Mca1-EGFP を GFP 抗体によってウエスタンブロット法で検出した。また、※が示すバンドは非特異的に検出されており、ローディングコントロールとして示す。

(C) 野生型株と *MCAI* 破壊株の 2 mM 過酸化水素処理 1 時間後の細胞内蛍光強度を野生型株の細胞内蛍光強度を 100%として示した。独立して 3 試行の測定を行い、平均および標準偏差を算出した (* $p < 0.05$)。

(D) 野生型株、*TAH18* KD 株、*MCAI* 破壊株における、過酸化水素処理後 0、2、3、5 時間後のコロニー形成率を比較した。必要に応じて、NAME 処理を行った (+NAME)。独立して 3 試行の測定を行い、平均および標準偏差を算出した (* $p < 0.05$)。

3-8. Mca1 はエタノール、抗真菌薬添加条件においても酵母の生育に影響を及ぼす

Mca1 は過酸化水素処理、酢酸処理、細胞老化条件において活性化され、細胞死を誘導することが報告されている⁷⁸⁻⁸⁰。一方、Mca1 は本研究の結果から、酵母における NOS 様活性に影響を及ぼす可能性が考えられた。Mca1 に関する解析はこれまであまり行われておらず、Mca1 が NO 合成に影響を与えるという報告もない。また、種々のストレス条件下で酵母が NO を生成することが分かっている⁸⁵。そこで Mca1 がストレス条件下における酵母の生育に及ぼす影響を解析した。

その結果、MCA1 破壊株は抗真菌薬であるフルコナゾール、イトラコナゾール添加培地において、野生型株と比較して高い感受性を示した。一方、エタノールの添加培地においては、野生型株よりも高い耐性を示した (Figure 13)。

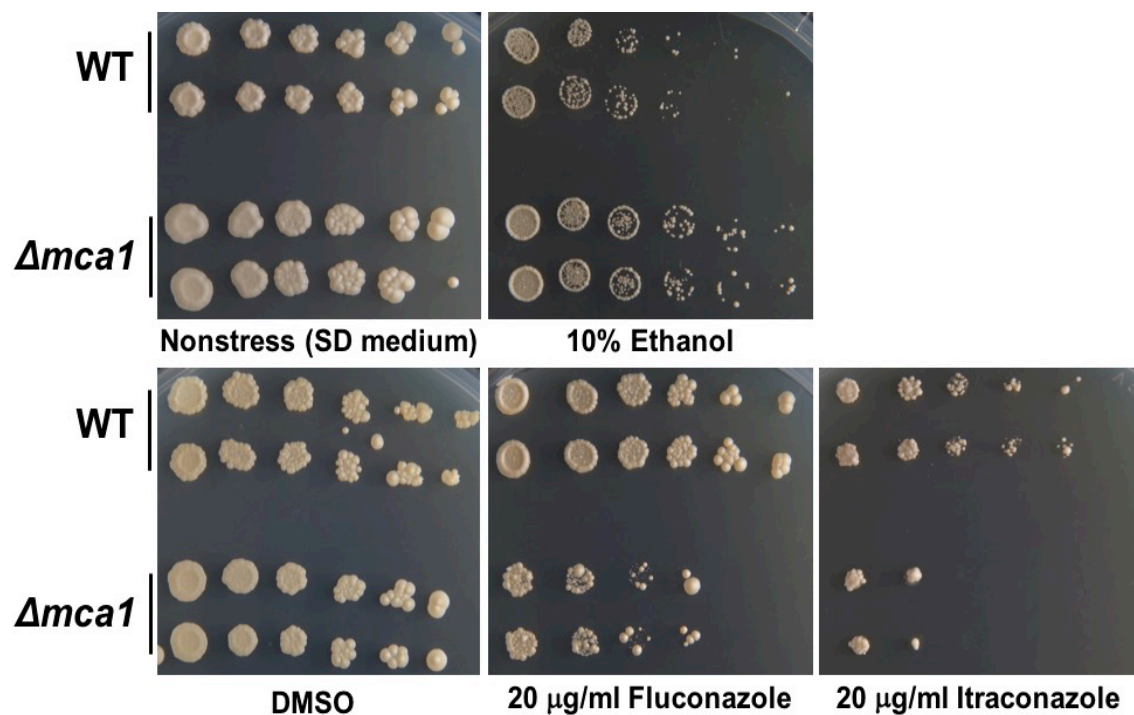


Figure 13. 各種ストレス条件下における酵母の生育

野生型株と MCA1 破壊株を培養後、滅菌水により洗浄・再懸濁を行い、段階希釈を行った後、エタノール、フルコナゾール、イトラコナゾール、また DMSO (抗真菌薬の溶媒) をそれぞれ添加した SD 寒天培地上にスポットし、30°C で 1 週間培養した。

4. 考察

酵母における Tah18 依存的な NOS 様活性は新規な NO 合成制御機構により制御される

本研究では、酵母のフラボタンパク質 Tah18 が過酸化水素処理条件下での NOS 様活性に必要であること、鉄硫黄クラスタータンパク質 Dre2 が酵母の NO 合成活性を抑制すること、過酸化水素処理により Tah18 と Dre2 が解離することを明らかにし、Tah18 依存的な NOS 様活性が Dre2 により抑制されることを示唆した。また、Tah18 依存的な NOS 様活性が過酸化水素処理条件下での細胞死誘導に寄与することを示唆する結果を得た。以上の結果に加え、哺乳類型 NOS の反応、既知の Tah18 の機能やタンパク質の構造に基づいて構築した、酵母における NOS 様活性の制御機構モデルを以下に示す (Figure 14)。通常の生育条件では、Tah18 は Dre2 と複合体を形成し、NADPH の電子を Dre2 へと伝達することで、鉄硫黄クラスター合成に寄与する。この状態では、Tah18 は電子を NOS 反応に用いることができず、Tah18 依存的な NOS 様活性は抑制されている。一方、酵母が過酸化水素のような酸化的環境に暴露されると、Tah18 と Dre2 が解離し、Tah18 は哺乳類型 NOS の Oxy に相当する未知のタンパク質 (yOxy) に電子を伝達し、その結果、酵母 NOS 様活性が発現する。その結果、NOS 様活性により合成された NO が、細胞死を引き起こす。

この NOS 様活性の制御機構は、Tah18 からの電子の受容体を細胞内のレドックス状態に応じて Dre2 から Oxy へと交換するものであり、電子受容体の交換を介した NO 合成の制御機構はこれまでに報告が無い。

また、過酸化水素処理条件下では Dre2 が酵母のメタカスパーゼ Mca1 との相互作用により分解されること、Mca1 が NOS 様活性に関与することを見出した。しかし、現時点で得られている結果からは、Mca1 が Tah18-Dre2 複合体に及ぼす影響は明らかではない。

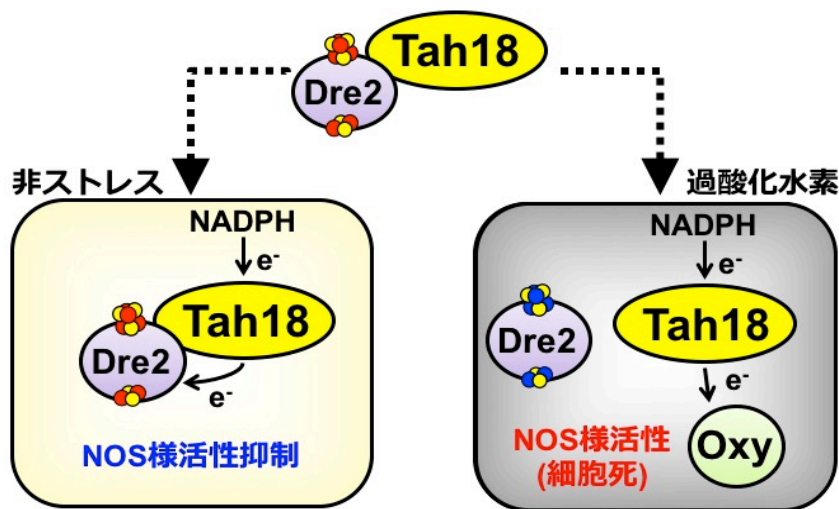


Figure 14. 酵母における Tah18 依存的な NOS 様活性の制御モデル

非ストレス条件下において、Tah18 と Dre2 が複合体を形成し、細胞質の鉄硫黄クラスタータンパク質の生合成に必要な電子伝達の役割を担う。この状態においては、Dre2 が電子の優先的なアクセプターとして機能し、Tah18 は NADPH からの電子を NOS 様活性へと利用できない。一方、過酸化水素処理のような酸化ストレス条件下において、Tah18 と Dre2 の複合体が解離し、Tah18 が Dre2 から遊離することで NADPH からの電子を NOS 様活性へと利用できる。これにより、NO 合成が行われ、細胞死が引き起こされる。

酵母における NOS のオキシゲナーゼタンパク質は既知 NOS オキシゲナーゼとは異なる構造を有する可能性が考えられる

Tah18 は哺乳類 NOS の Red と相同性を示すものの、基質であるアルギニンの酸化反応を行う Oxy に相同な配列は有していない。また、酵母などの真菌類には、NOS の Oxy と相同性を有するタンパク質も見出されていない。これまで、哺乳類 NOS のオルソログが保存されている生物種として、植物では一部の藻類が哺乳類 NOS と相同な遺伝子を保存している⁵⁴。一方、微生物においては *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Deinococcus radiodurans*, *Streptomyces turgidiscabies*, *Geobacillus stearothermophilis* など一部の細菌において哺乳類 NOS のオルソログが存在すると報告されているが、これらは哺乳類 NOS の Oxy とのみ相同性を有しており Red に相当する配列を持たない。また、粘液細菌 *Sorangium cellulosum* に見出された NOS は、哺乳類 NOS の Oxy に相同な配列の N 末端側に、哺乳類 NOS の Red とは異なる鉄硫黄クラスターを含む領域が存在し、これが電子伝達を行う (Figure15)^{86,87}。このように、近年、哺乳類 NOS とは異なる

構造を有する NOS が主に細菌から見出されており、特に Red は特定の構造を保持していない。しかしながら、NOS の Oxy 構造は哺乳類も含め生物種間で高度に保存されており、ヘムを含め NOS 活性における重要な機能を有している。一方、上述したような *B. subtilis* をはじめとする細菌由来の NOS では、Oxy タンパク質と Red タンパク質が別々のペプチド鎖として発現することも報告されている⁸²。これらの知見は、Tah18 が酵母 NOS における Red タンパク質として機能し、未知の Tah18 相互作用タンパク質が yOxy として NOS 様活性を触媒する可能性を提示している。

本研究では、酵母 NOS における yOxy 候補タンパク質として、過酸化水素条件下において Tah18 と相互作用するタンパク質を複数同定した。そのうち、すでに酵素として同定されているものとして、cystathionine β -synthase Cys4 (EC: 4.2.1.22)、 β -isopropylmalate dehydrogenase Leu2 (EC: 1.1.1.85)、*S*-adenosylmethionine synthase Sam1 (EC: 2.5.1.6) が挙げられる。これらはすべてヘムタンパク質ではなく、また NOS のような monooxygenase 活性は報告されていない。しかし、極めて多種の陸上植物や酵母・真菌類などは、ゲノム上に哺乳類 NOS の Oxy に相同性の高い遺伝子が保存されていないにもかかわらず、NOS (様) 活性が数多く報告されている。したがって、既知の NOS とは異なる反応機構でアルギンを酸化し NO を合成する Oxy タンパク質が見出される可能性は十分にある。今回 Tah18 の相互作用タンパク質として同定した酵素の中にも、Leu2 のように NOS と同様に酸化還元酵素に分類されるものもある。今後、これらの酵素の遺伝子破壊株や過剰発現株の NO 合成活性の評価や、*in vitro* での解析を行うとともに、さらなる候補タンパク質の探索を行う必要がある。

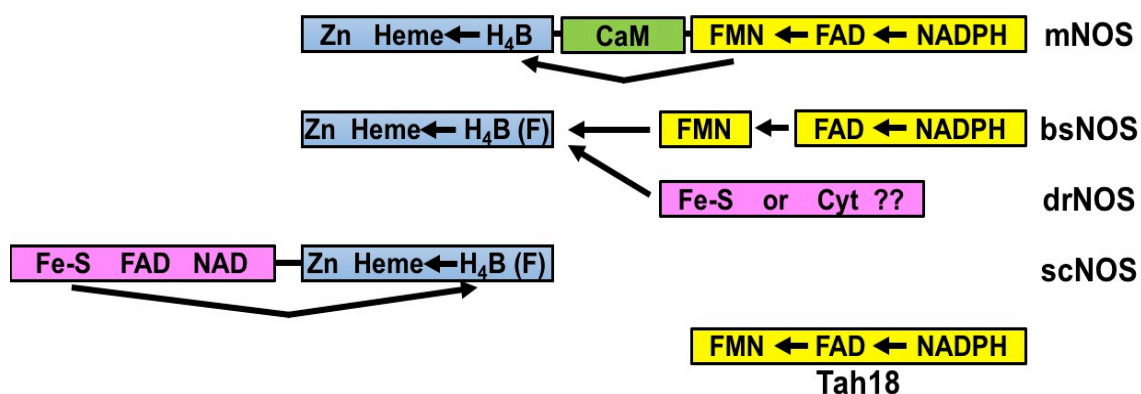


Figure 15. 生物種間で報告されている異なる NOS の構造比較

異なる生物種における NOS のドメイン構造を示す。mammalian NOS (mNOS)、*Bacillus subtilis* (bsNOS)、*Deinococcus radiodurans* NOS (drNOS)、*Sorangium*

cellulosom (scNOS) および *Saccharomyces cerevisiae* における Tah18 を比較した。矢印は電子の流れを示す。Fe-S : 鉄硫黄クラスター、Cyt : シトクロム。

酵母細胞内の NOS 様活性は迅速な応答を示す

本研究で見出した、過酸化水素条件下における Tah18 依存的な NO 合成は、処理後 5 分以内の迅速な応答であった。一方で、Tah18 と Dre2 の解離も、過酸化水素処理後 5 分の時点で観察された。電子受容体である Dre2 との解離により、速やかな NOS 様活性を発現することは、酸化ストレスに速やかに応答する上で非常に重要である。当研究室では、酵母を高温ストレスに曝した時に、Tah18 依存的に合成される NO が高温ストレス耐性を付与することを見出しているが、高温ストレス下での NO 合成は数時間単位で合成され、その応答は比較的遅い。つまり、環境ストレスの種類や強度に応じて NO 合成の応答速度が異なる。現時点では、Tah18-Dre2 複合体による NOS 様活性の制御が、高温ストレス下でも機能しているか明らかではない。今後、Tah18-Dre2 複合体を介した NOS 様活性の制御の普遍性を明らかにするうえでも、高温ストレスや他のストレス条件下における、NO 合成と Tah18-Dre2 複合体の挙動の関連性を解析する必要がある。

培地交換に伴う細胞内 NO 量の上昇は何に起因するのか

本研究の実験結果から、Dre2 のタンパク質量の低下に伴い、NOS 様活性依存的に細胞内 NO 量が増加するという結果が得られた (Figure 7B)。一方、この実験系においては、野生型株など Dre2 タンパク質量が低下しないような条件においても、過酸化水素のようなストレス処理は行っていなかったのにも関わらず、細胞内 NO 量が増加していた。これまで、過酸化水素処理条件下における細胞内 NO 量の測定を行っていた際には、非ストレス処理条件下においては細胞内の NO 量の上昇は観察されていない。そのため、本実験で行った培地交換という処理が、細胞内 NO 量を増加させた原因であると考えられる。また、Dre2 が過剰発現している菌株においても、野生型株と同様の細胞内 NO 量の上昇が観察されているため、Tah18 依存的な NOS 様活性とは異なる NO 合成機構が培地交換によって発現していることが予想される。これを検証するために、同様の実験を NAME 処理条件下で行った結果、細胞内の NO 量が培養時間に伴い上昇した (Figure 7D)。一方これまでの解析では、NAME を処理した細胞は、培地交換を行わない実験系においては培養時間に伴う NO 量の増加は観察されていない。そのため、NAME 処理条件下においても、培地交換が刺激となって細胞内 NO レベルが増加したと考えられる。以上のことから培地交換によって観察される細胞内 NO 量の上昇は、NOS 様活性非依存的に NO が合成されたことが原因で

あると考えられる。NOS 様活性以外にも、酵母ではミトコンドリア呼吸鎖の複合体IVや sulfite reductase による nitrite の還元起因する NO 合成機構が知られている³¹。また、非酵素的な NO 生成の可能性も無視できない。これらの可能性を検証することで、培地交換に伴う細胞内 NO 量の上昇の原因が明らかにできるかもしれない。

酵母における NOS 様活性には Tah18 以外のレダクターゼが存在する可能性がある

本研究の結果から、TAH18 KD 株や Tah18-Dre2 融合株における NOS 様活性の抑制は、NAME (哺乳類 NOS 阻害剤) 処理による NOS 様活性の抑制と比較して、その効果が小さいことが分かった。これは、TAH18 遺伝子が生育に必須であるため TAH18 の発現抑制条件下での解析であり、生育に必要な濃度の Tah18 タンパク質が細胞内に存在することが、原因の一つとして考えられる。また、細菌の NOS は任意のレダクターゼタンパク質を電子供与体として用いることが可能であり、これはレダクターゼ反応が他のタンパク質で代替できる可能性を示している。従って、NOS の Red に相同性を示す他のタンパク質が、Tah18 の代わりに NOS 様活性における Red として機能する、すなわち Tah18 非依存的な NOS 様活性の存在も考えられる。酵母ゲノム上には、NOS の Red と相同性を示すタンパク質として、NADP-cytochrome P450 reductase Ncp1 (EC: 1.6.2.4)、sulfite reductase の α サブユニット Met10 (EC: 1.8.1.2) が保存されており、これが NOS 様活性におけるレダクターゼ反応を触媒する可能性がある。酵母における NOS 様活性の全容を解明するため、これらの破壊株や過剰発現株の解析を行う必要がある。

Tah18 依存的な NOS 様活性による細胞死はどのように誘導されるのか

これまでに、Tah18 は高濃度の過酸化水素処理条件下において、ミトコンドリアへと移行し、細胞死を誘導することが報告されている⁶⁸。また今回の結果から、過酸化水素処理条件下における Tah18 依存的な NOS 様活性が細胞死を誘導していることが示唆された (Figure 10)。これらのことから、過酸化水素処理条件下において、Tah18 がミトコンドリアで NO を合成することが細胞死を誘導する可能性が考えられる。一方当研究室において、高温処理条件では Tah18 依存的な NOS 様活性が細胞保護に寄与することを報告している⁶¹が、高温処理条件で Tah18 の局在は変化しない⁸⁵。これらのことから、Tah18 の局在、NO の生成場所によって、NO の生理機能が異なる可能性が考えられる (Figure 16)。今後は、NO 合成が生じる場所と NO の生理機能との関連性を明らかにするため、細胞死を誘導する過酸化水素処理条件と細胞保護機能を発揮する高温ストレス条件下

で、NOの局在を観察する必要がある。一方、Tah18依存的に合成されるNOの細胞内局在を議論する場合、我々のモデルで想定しているyOxyの局在も重要である。yOxyを同定した後は、各条件におけるyOxyの細胞内局在も解析する必要がある。一方、本研究のNAME処理やTAH18KD株を用いた解析から、過酸化水素処理条件下でのNO合成量と細胞生存率に負の相関があることが明らかとなった (Figure 9, Figure 10)。また、高温処理条件下でのNO合成量は、過酸化水素処理条件下におけるNO合成量と比較して極端に低い (Figure 17)。以上のことは、細胞内でのNO合成量はその生理的な機能の重要な要素であることを示している。今後の解析で、高温処理条件下でNOが細胞死を誘導する、過酸化水素処理条件下で細胞保護を引き起こすNO濃度を見出すことができれば、NOの細胞保護・毒性は濃度が決定因子だと考えられる。一方で、高温処理では細胞保護のみ、過酸化水素処理では細胞死誘導だけが観察されれば、NOが発生する環境がより重要であると考えられる。NOの発生場所に加え、細胞内のNO量、またNOが生理機能を発現するときの外的な環境の違い、例えば発生するROSレベルやその種類を明らかにすることで、細胞死誘導を含めたNOの作用機序をより詳細に理解できる (Figure 16)。

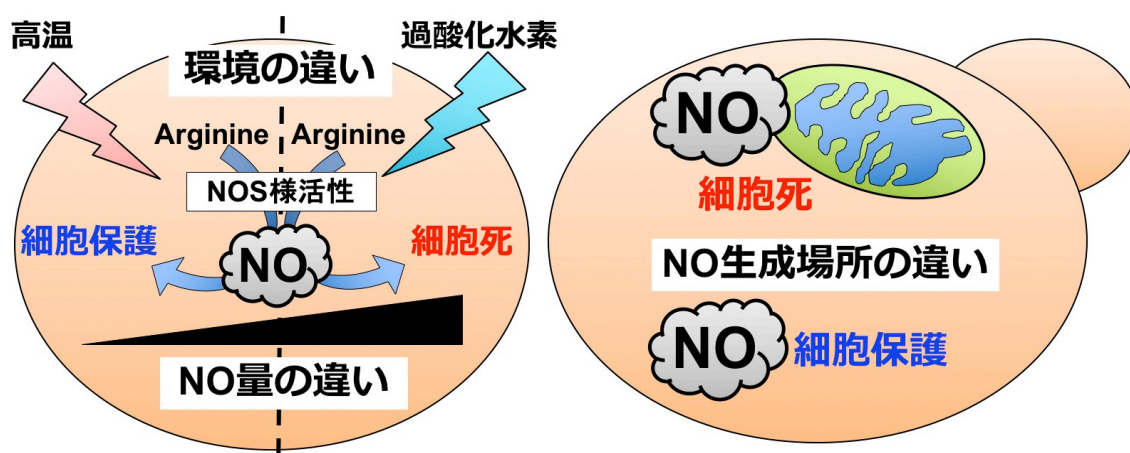


Figure 16. NOS 様活性による細胞死誘導の原因

NOはその量や生成場所、外的な環境などにより作用機序が異なる可能性が考えられる。

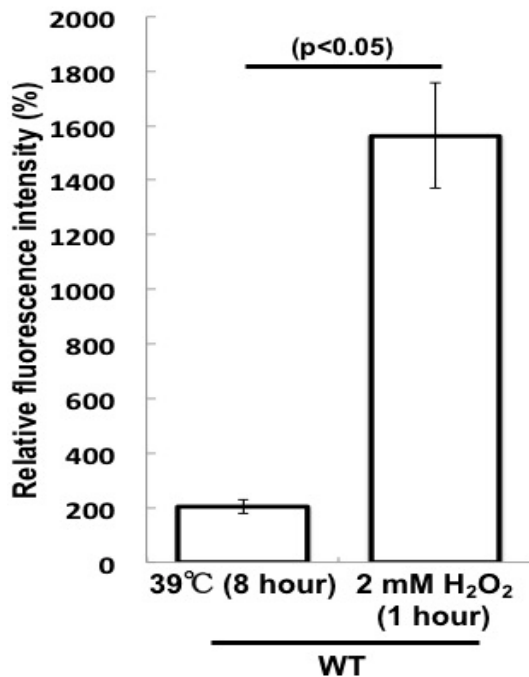


Figure 17. ストレス条件による細胞内 NO 合成量の違い

NO 特異的な蛍光プローブ DAF-FM DA を処理した野生型株の高温 (39°C) での培養 8 時間後、2 mM 過酸化水素処理一時間後の非ストレス処理条件での細胞内蛍光強度と比較した時の相対的な細胞内蛍光強度を示す。独立して 3 試行の測定を行い、平均および標準偏差を算出した (* $p < 0.05$)。

***Mca1* の破壊が細胞死だけでなく NO 合成にも影響を及ぼす**

本研究において、*Mca1* 破壊株の過酸化水素処理条件下における NO 合成量を測定した際に、過酸化水素処理後 1 時間の時点で細胞内の NO 量が野生株と比較して低下していた (Figure 12C)。この結果から、過酸化水素処理に応答した酵母の NO 合成を、メタカスパーゼ *Mca1* が促進することが示唆された。一方、過酸化水素処理 1 時間で Tah18-Dre2 の相互作用に差が観察されず、Dre2 のタンパク質量にも明確な差は認められなかった。これらの結果から、過酸化水素処理条件下における NOS 様活性に *Mca1* が及ぼす影響は、Tah18-Dre2 複合体を介した制御とは別の経路であることが考えられる。一方、*Mca1* は過酸化水素処理に応答して Dre2 と相互作用する結果が得られた (Figure 12B)。*Mca1* と Dre2 の相互作用は過酸化水素処理後 1 時間で既に確認できたが、過酸化水素処理後 1 時間では *Mca1* 依存的な Dre2 タンパク質量の減少は確認できなかった (Figure 12A)。このことから、Dre2 が *Mca1* と相互作用してから分解されるまでに時間差が存在することが考えられる。以上のことから、*Mca1* が過酸化水素処理条件下での酵母の NO 合成に影響する機構として、以下のような可能性が考えられ

る。例えば、Mca1 が基質とするタンパク質に NO 合成を抑制するタンパク質が含まれることが考えられる。また、Mca1 が Dre2 と相互作用することで、Tah18-Dre2 複合体や Dre2 の分解を介さずに、NO 合成に関与する可能性も考えられる。

本研究から、過酸化水素処理条件下における MCAI 破壊株の生存率は、これまでの報告にあるように、野生型株と比較して有意に高かった (Figure 12D)。また MCAI 破壊株における生存率の上昇は TAH18 KD 株と同等もしくはそれ以下であり、それぞれの菌株における NO 合成量の低下の割合とほぼ相関する。さらに、NAME 処理を施した野生株、MCAI 破壊株の過酸化水素処理条件下における生存率はほぼ同程度であったことから、Mca1 を介した細胞死誘導機構において細胞内 NO レベルの寄与が大きいことが予想される。つまり、過酸化水素処理条件下における細胞死の誘導には、NO の合成による影響が大きいことが予想できる。

本研究においては、Tah18-Dre2 複合体による NO 合成を介した細胞死の誘導と Mca1 の関連性については明らかではない。MCAI 破壊による Tah18-Dre2 複合体の挙動への影響は観察されなかったものの、過酸化水素処理によって Mca1 と Dre2 の相互作用が誘導された。一方、ヒトにおける Dre2 のホモログである Ciapin1 は、抗アポトーシス分子として同定されており、神経変性に伴いカスパーゼ 3 によって分解されることが知られているが、その作用機序は不明である⁸⁴。本研究の結果から、酵母において Dre2 は、Tah18 依存的な NO 合成を抑制することで NO により誘導される細胞死を抑制しているとも考えられる。これらの知見から、Mca1 による Dre2 の分解が Tah18-Dre2 複合体の挙動には影響を及ぼさずに細胞死の誘導に関与することが予想されるが、Dre2 の分解が細胞死に及ぼす影響は現時点では不明である。これを検証するために、例えば Dre2 が Mca1 によって分解されない変異株を作製することで、Mca1 が Dre2 を分解することによる細胞死および NO 合成への影響を検討できると考えられる。

酵母において、過酸化水素処理条件下において細胞死を誘導する意義はあるのか

これまでに、酵母のような単細胞生物において細胞死を誘導するという機構が存在するのかどうかは未だ結論の出していない課題である。酵母において、Mca1 依存的に積極的な細胞死が誘導されると考えられている根拠としては、過酸化水素処理条件下で、酵母は Mca1 依存的にアポトーシスの形態的な特徴を示すということが挙げられる⁷⁸。また、過酸化水素処理条件下において、MCAI 破壊株は野生型株と比較して、酸化修飾を受けたタンパク質量をより多く細胞内に蓄積する⁷⁸。つまり、野生型株は過酸化水素処理条件下において、細胞死を誘導す

ることで細胞集団中のより状態の悪い細胞を死滅させる。そのため、細胞死を誘導していない *MCAI* 破壊株と比較して、生き残った細胞集団としてのレドックス状態が改善されていると考えられている。本研究の結果、*MCAI* 破壊株の方が過酸化水素処理後の細胞生存率は高く、また上述した *Mca1* 依存的に細胞内の酸化タンパク質レベルが上昇するという報告でも、*MCAI* 破壊株は過酸化水素により高い耐性を示した⁸⁰。一方、酵母を数十日間培養した場合、*MCAI* 破壊株が野生型株よりも低い生存率を示した報告もある⁸⁰。一般的に、老化した細胞内には高レベルの ROS が蓄積する。過酸化水素処理を用いて得た本研究の知見は、酵母の細胞老化と細胞死との関連性の詳細を明らかにする一助となるかもしれない。

Tah18 と Dre2 が哺乳類におけるホモログ Ndor1 および Ciapin1 のモデルとして活用できる

哺乳類における Dre2 のホモログである Ciapin1 は、神経変性疾患であるパーキンソン病およびアルツハイマー病患者の脳細胞において Caspase3 による分解を受けることが知られており⁸⁴、神経変性疾患におけるカスパーゼの主要なターゲットの一つであると考えられている。そのため上記に示す解析により、*Mca1* による Dre2 の分解様式およびその影響をより明らかにすることで、哺乳類の有用なモデルとして用いることが期待できる。

また、Ciapin1 のパートナータンパク質である Ndor1 については、これまで NO 合成に関する報告はない。しかし、Ndor1 は酵母において Tah18 と置換しても鉄硫黄クラスター活性に影響を及ぼさない⁶⁵。したがって、酵母における NOS 様活性を Ndor1 が相補できれば、酵母における NOS 様活性の新規な制御機構は、哺乳類にも保存されている可能性があり、細胞死の誘導機構の解明にも寄与できるかもしれない (Figure 18)。

- ・ 鉄硫黄クラスタータンパク質合成への寄与
- ・ カスパーゼによる分解機構
- ・ 複合体の解離(哺乳類でも同様?)
- ・ NO合成への寄与(哺乳類でも関与?)

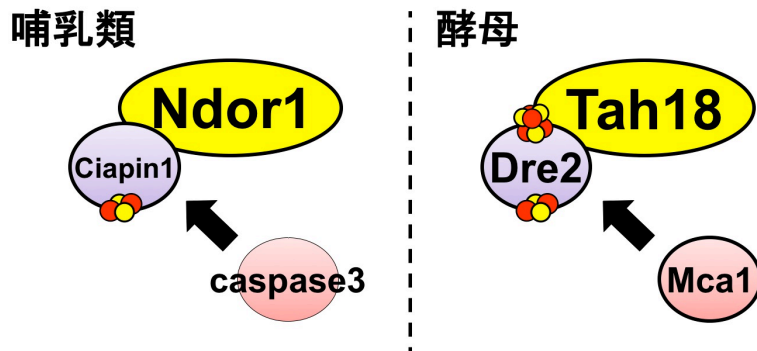


Figure 18. 哺乳類における Tah18-Dre2 複合体ホモログ Ndor1-Ciapiin1

Ndor1-Ciapiin1 は酵母において生育に必須な機能(細胞質における鉄硫黄クラスター活性)を相補するが、NO合成への関与は報告されていない。

酵母における NO の生理的機能の探索とその作用機序の解析

本研究では、主に酵母における Tah18 依存的な NO 合成の制御機構に焦点を当て、その中で Tah18 を介した NO 合成が細胞死誘導に関与することを示した。また当研究室では、これまでに Tah18 依存的な NO 合成が高温ストレス下においてはストレス耐性に働くことを示している⁶¹。しかし、その他の環境における NO の生理機能は未解明な部分が多い。一方、NO はグアニル酸シクラーゼ (sGC) の活性化や S-ニトロソ化などの翻訳後修飾によって、重要な生理機能に関与することが、哺乳類を用いた解析から明らかになっている。酵母の場合、ゲノム上に sGC のオルソログ遺伝子が存在しないことから、NO は S-ニトロソ化やニトロ化などの翻訳後修飾を介して生理機能に関与していると考えられる。そのため、酵母細胞内で NO が合成される条件をさらに探索し、NO により S-ニトロソ化やニトロ化修飾を受けるタンパク質を同定することで、酵母における NO の生理的役割に対する理解を深めることが可能になると言える。

NO による翻訳後修飾を介したストレス応答機構として、植物 *Medicago truncatula* においては glutamine synthetase (GS) が特定のチロシン残基のニトロ化修飾により、その活性が顕著に抑制されることが報告されている⁸⁸。ニトロ化による GS の活性抑制の結果、細胞内グルタミン酸濃度が上昇し、グルタチオン合成酵素群の転写量が増加することで^{89,90}、グルタチオンの合成が亢進され、酸化ストレス耐性を獲得すると考えられている。この抗酸化モデルは植物においてまだ実証されていないが、この植物種の GS と酵母におけるグルタミン合成酵

素 (Gln1) は一次構造上高い相同性を示すことから、このモデルを酵母で検討することが可能だと考えられる。

Dre2は酸化的環境に対するレドックスセンサーとして働くのか

本研究では、Tah18-Dre2複合体の相互作用解析によって、過酸化水素処理に伴いTah18とDre2が速やかに解離することを示した。これまでにTah18のFAD/FMN結合領域とDre2の鉄硫黄クラスター結合領域がTah18とDre2の相互作用に重要であることが報告されている⁹¹。Tah18-Dre2複合体が過酸化水素処理に伴い解離した後、Tah18のタンパク質レベルに変化は見られなかったが、Dre2のタンパク質レベルは60分以内に急激に減少した。このことから、Dre2はTah18からの解離後に分解されるが、Tah18はDre2よりも安定であることが考えられる。一般的に、鉄硫黄クラスタータンパク質は酸化ストレスに対して感受性である。例えば、ABCファミリータンパク質であるリボソームタンパク質Rli1、aconitaseは自身の鉄硫黄クラスターが酸化されることで不活性化されると報告されている⁹²⁻⁹⁴。Dre2はC末端側のdomain of unknown function (DUF689) の領域に、[2Fe-2S]と[4Fe-4S]の鉄硫黄クラスターが結合している⁶⁶。ヒトにおけるDre2のホモログであるCipin1はC末端領域が正に荷電しており、[2Fe-2S]鉄硫黄クラスターが結合するシステインモチーフは、Tah18のホモログであるNdor1との相互作用および電子伝達に極めて重要な役割を果たしていると考えられている。

これらの知見から、過酸化水素処理に伴って、Dre2に結合する鉄硫黄クラスターが酸化されることで構造変化を引き起こされ、その結果Tah18-Dre2複合体が解離する可能性が挙げられる (Figure 19)。

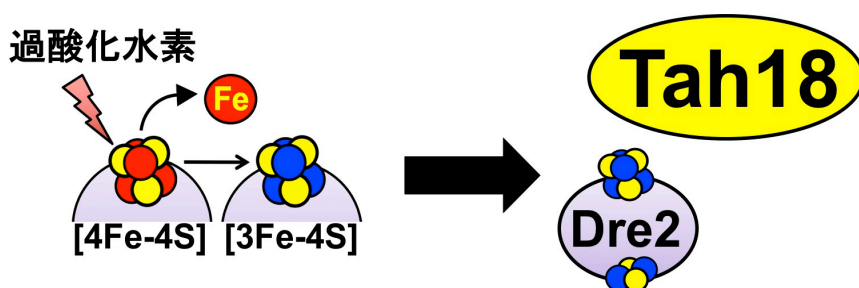


Figure 19. Dre2 による酸化的環境の感知

Cipin1 においては[2Fe-2S]の鉄硫黄クラスターの結合のみが報告されており、これが電子伝達の役割を果たすのならば、Dre2 に結合する[2Fe-2S]と[4Fe-4S]のうち、[4Fe-4S]鉄硫黄クラスターは酸化されることで酸化的環境を感知する。

***MCAI* 破壊株に見出された表現型から、発酵能向上、抗真菌薬の開発への応用が期待される**

また、本研究により *Mca1* が酵母細胞のストレス耐性に関与することを見出した。興味深いことに、エタノール存在下では、過酸化水素処理条件と同様に *MCAI* 破壊株が野生型株と比べて耐性を示した。*Mca1* とエタノール耐性の関連性については不明ではあるが、一方、酵母は発酵生産過程において高濃度のエタノールに暴露されるため、この結果は、非常に興味深い知見である。今後、*Mca1* とエタノール耐性の関連性を解析するとともに、*MCAI* 破壊株を用いた発酵試験などを行い、*MCAI* 破壊株を用いた発酵生産が産業応用可能な技術であるか検証する必要がある。

一方で、抗真菌薬であるフルコナゾールおよびイトラコナゾール添加培地においては、*Mca1* が細胞の生存に必要であるという結果が得られた。これまで、微生物の薬剤耐性機構としては、細胞膜に局在する排出ポンプである、ATP binding cassette (ABC) または Major facilitator superfamily (MFS) 輸送体の発現量および活性の亢進が報告されている^{95,96}。*Mca1* が薬剤耐性に寄与するという知見はこれまでに報告がなく、非常に興味深い。*Mca1* 依存的な抗真菌薬耐性機構の詳細が明らかになれば、その経路に関わる因子は新規の抗真菌薬の標的分子になる可能性がある。*Mca1* 依存的な NO 合成や細胞死誘導機構が、*Mca1* 依存的な抗真菌薬耐性に関わる可能性も考えられるため、抗真菌薬処理下での細胞死誘導や NO 合成と *Mca1* の関連性を解析する必要がある。今後は、抗真菌薬条件下における *Mca1* の基質・相互作用タンパク質の探索や、NO ドナーや NAME 処理が抗真菌薬の薬効に及ぼす影響について解析する予定である。

5. 総括

本研究では酵母 *S. cerevisiae* を用いて以下の知見を得た。

- 過酸化水素処理に応答して Tah18 依存的な NOS 様活性により NO を合成することを明らかにした。
- Dre2 は酵母における NOS 様活性を抑制することが示唆された。
- Tah18 と Dre2 の相互作用解析から、過酸化水素処理に応答して Tah18 と Dre2 は速やかに解離することを見出した。
- Dre2 は酵母における Tah18 依存的な NOS 様活性の抑制因子であることが示唆された。
- 過酸化水素処理条件下において Tah18 依存的に NO が合成されることで細胞死が誘導されることが示唆された。
- 過酸化水素処理条件下で、Mca1 によって Dre2 が分解されることが示唆された。
- Mca1 は、過酸化水素処理条件下での NOS 様活性に関与することが示唆された。
- 過酸化水素条件下において Tah18 と相互作用するタンパク質を複数同定した。

なお、**Figure 6C, 7A, 7B, 7C, 8A, 8B, 8C, 10** については、下記の論文にて掲載済みである。

Yoshikawa *et al.* Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. *Nitric Oxide-Biol.* **57**, 85-91 (2016)

6. 謝辞

本研究の遂行ならびに論文の作製にあたり、終始熱心にご指導いただいた奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 ストレス微生物科学研究室の高木博史教授に、心より御礼申し上げます。

また、本研究の全般にわたり実験、論文作製のご指導、ご助言を下さいました同研究室の那須野亮助教に厚く御礼申し上げます。さらに、日頃より様々なご指導、ご助言を下さいました渡辺大輔助教をはじめとするストレス微生物科学研究室の皆様にも深く御礼申し上げます。

さらに、アドバイザーとして、本研究の遂行にあたり様々なご指摘、ご助言を頂いた本学の細胞シグナル研究室の塩崎一裕教授、動物細胞工学研究室の木俣行雄准教授、にも心より御礼申し上げます。

また、LC-MS 依頼解析によるタンパク質の同定に関してお世話になった、本学の技術職員の倉田理恵さんにも深く御礼申し上げます。

最後に、研究、私生活共にお世話になりました皆様方に深く感謝致します。

7. 参考文献

1. Shima, J. & Takagi, H. Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **53**, 155–164 (2009).
2. Ding, J. *et al.* Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**, 253–263 (2009).
3. Costa, V. & Moradas-Ferreira, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: Insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.* **22**, 217–246 (2001).
4. Witt, S. N. & Flower, T. R. alpha-Synuclein, oxidative stress and apoptosis from the perspective of a yeast model of Parkinson's disease. *FEMS Yeast Res.* **6**, 1107–1116 (2006).
5. Pereira, C., Bessa, C., Soares, J., Leo, M. & Saraiva, L. Contribution of yeast models to neurodegeneration research. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, (2012).
6. Delledonne, M. NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 390–396 (2005).
7. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051–3064 (1992).
8. Pacher, P., Beckman, J. S. & Liaudet, L. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol. Rev.* **75**, 1–45 (1995).
9. Wink, D. A. *et al.* Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J. Leukoc. Biol* **89**, 873–891 (2011).
10. Albertos, P. *et al.* S-nitrosylation triggers ABI5 degradation to promote seed germination and seedling growth. *Nat. Commun.* **6**, 8669 (2015).
11. Lozano-Juste, J. & León, J. Nitric oxide regulates DELLA content and PIF expression to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **156**, 1410–23 (2011).
12. Patel, B. A. *et al.* Endogenous nitric oxide regulates the recovery of the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* from exposure to UV light. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 18183–18188 (2009).
13. Barraud, N. *et al.* Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 7344–7353 (2006).
14. Surdel, M. C., Dutter, B. F., Sulikowski, G. A. & Skaar, E. P. Bacterial Nitric

- Oxide Synthase Is Required for the *Staphylococcus aureus* Response to Heme Stress. (2016). doi:10.1021/acsinfecdis.6b00081
15. Gusarov, I. & Nudler, E. NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13855–13860 (2005).
 16. Shatalin, K. *et al.* Bacillus anthracis-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1009–13 (2008).
 17. Koesling, D., Russwurm, M., Mergia, E., Mullershausen, F. & Friebe, A. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: Structure and regulation. *Neurochem. Int.* **45**, 813–819 (2004).
 18. Martínez-Ruiz, A. & Lamas, S. S-nitrosylation: A potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc. Res.* **62**, 43–52 (2004).
 19. Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S.-O. O., Marshall, H. E. & Stamler, J. S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **6**, 150–166 (2005).
 20. Broillet, M. C. S-nitrosylation of proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 1036–42 (1999).
 21. Sun, J., Steenbergen, C. & Murphy, E. S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1693–705 (2002).
 22. Almeida, B. *et al.* NO-mediated apoptosis in yeast. *J. Cell Sci.* **120**, 3279–88 (2007).
 23. Liu, Y., Jiang, H., Zhao, Z. & An, L. Nitric oxide synthase like activity-dependent nitric oxide production protects against chilling-induced oxidative damage in *Chorispora bungeana* suspension cultured cells. *Plant Physiol. Biochem.* **48**, 936–944 (2010).
 24. Zhao, L., He, J., Wang, X. & Zhang, L. Nitric oxide protects against polyethylene glycol-induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures. *J. Plant Physiol.* **165**, 182–191 (2008).
 25. Yu, Z. *et al.* Fiber type-specific nitric oxide protects oxidative myofibers against cachectic stimuli. *PLoS One* **3**, (2008).
 26. Hausladen, A., Privalle, C. T., Keng, T., DeAngelo, J. & Stamler, J. S. Nitrosative stress: Activation of the transcription factor OxyR. *Cell* **86**, 719–729 (1996).
 27. Nakato, R. *et al.* Regulation of the unfolded protein response via S-nitrosylation

- of sensors of endoplasmic reticulum stress. *Sci. Rep.* **5**, 14812 (2015).
28. Hara, M. R. *et al.* S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.* **7**, 665–674 (2005).
 29. Radi, R. Protein tyrosine nitration: Biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc. Chem. Res.* **46**, 550–559 (2013).
 30. Fujii, S. *et al.* The critical role of nitric oxide signaling, via protein S-guanylation and nitrated cyclic GMP, in the antioxidant adaptive response. *J. Biol. Chem.* **285**, 23970–23984 (2010).
 31. Castello, P. R., David, P. S., McClure, T., Crook, Z. & Poyton, R. O. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab.* **3**, 277–287 (2006).
 32. Corker, H. & Poole, R. K. Nitric oxide formation by *Escherichia coli*. Dependence on nitrite reductase, the no-sensing regulator Fnr, and flavohemoglobin Hmp. *J. Biol. Chem.* **278**, 31584–31592 (2003).
 33. Yamasaki, H. & Sakihama, Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: In vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* **468**, 89–92 (2000).
 34. Zweier, J. L., Samouilov, A. & Kuppusamy, P. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 250–262 (1999).
 35. Morris, S. M. Arginine: master and commander in innate immune responses. *Sci. Signal.* **3**, pe27 (2010).
 36. Park SY, Adachi S, Nakagawa A, Tanaka I, Nakahara K, Shoun H, Obayashi E, Nakamura H, Iizuka T, Shiro Y, S. H. Crystal structure of nitric oxide reductase from denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*. *Nat. Struct. Biol.* **4 (10): 82**, (1997).
 37. Hino, T. *et al.* Structural basis of biological N₂O generation by bacterial nitric oxide reductase. *Science* **330**, 1666–1670 (2010).
 38. Hausladen, A., Gow, A. & Stamler, J. S. Flavohemoglobin denitrosylase catalyzes the reaction of a nitroxyl equivalent with molecular oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10108–10112 (2001).
 39. Vine, C. E. & Cole, J. A. Unresolved sources, sinks, and pathways for the recovery of enteric bacteria from nitrosative stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **325**, 99–107 (2011).
 40. Bang, I. S. *et al.* Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the *Salmonella* flavohemoglobin Hmp. *J. Biol. Chem.* **281**, 28039–28047 (2006).

41. Hromatka, B. S., Noble, S. M. & Johnson, A. D. Transcriptional Response of *Candida albicans* to Nitric Oxide and the Role of the YHB1 Gene in Nitrosative Stress and Virulence. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4814–4826 (2005).
42. Liu, L., Zeng, M., Hausladen, a, Heitman, J. & Stamler, J. S. Protection from nitrosative stress by yeast flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4672–6 (2000).
43. Sarver, A. & DeRisi, J. Fzf1p regulates an inducible response to nitrosative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4781–91 (2005).
44. Foster, M. W., Liu, L., Zeng, M., Hess, D. T. & Stamler, J. S. A genetic analysis of nitrosative stress. *Biochemistry* **48**, 792–799 (2009).
45. Frungillo, L., Skelly, M. J., Loake, G. J., Spoel, S. H. & Salgado, I. S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nat. Commun.* **5**, 5401 (2014).
46. Zhou, S. *et al.* NO-inducible nitrosothionein mediates NO removal in tandem with thioredoxin. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 657–63 (2013).
47. Andrew, P. J. & Mayer, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* **43**, 521–31 (1999).
48. Griffith, W. G., Stuehr, D. J. Nitric Oxide Synthases. *Signal Transduct.* 18–19 (1995).
49. Mayer, B. & Andrew, P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *NaunynSchmiedebergs Arch. Pharmacol.* **358**, 127–133 (1998).
50. Tejero, J., Haque, M. M., Durra, D. & Stuehr, D. J. A bridging interaction allows calmodulin to activate NO synthase through a bi-modal mechanism. *J. Biol. Chem.* **285**, 25941–25949 (2010).
51. Gorren, A. C. F. *et al.* Low-temperature optical absorption spectra suggest a redox role for tetrahydrobiopterin in both steps of nitric oxide synthase catalysis. *Biochemistry* **39**, 11763–11770 (2000).
52. Crane, B. R. The enzymology of nitric oxide in bacterial pathogenesis and resistance. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1149–54 (2008).
53. Reece, S. Y., Woodward, J. J. & Marletta, M. A. Synthesis of nitric oxide by the NOS-like protein from *Deinococcus radiodurans*: A direct role for tetrahydrofolate. *Biochemistry* **48**, 5483–5491 (2009).
54. Foresi, N. *et al.* Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga [*i*]Ostreococcus tauri[*i*] is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* **22**, 3816–3830 (2010).

55. Kig, C. & Temizkan, G. Nitric oxide as a signaling molecule in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Protoplasma* **238**, 59–66 (2009).
56. Kong, W., Huang, C., Chen, Q., Zou, Y. & Zhang, J. Nitric oxide alleviates heat stress-induced oxidative damage in *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*. *Fungal Genet. Biol.* **49**, 15–20 (2012).
57. Kanadia, R. N., Kuo, W. N., McNabb, M. & Botchway, A. Constitutive nitric oxide synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**, 1081–7 (1998).
58. Domitrovic, T. *et al.* Role of nitric oxide in the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to heat shock and high hydrostatic pressure. *FEMS Yeast Res.* **3**, 341–346 (2003).
59. Shinyashiki, M. *et al.* The interaction of nitric oxide (NO) with the yeast transcription factor Ace1: A model system for NO-protein thiol interactions with implications to metal metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2491–2496 (2000).
60. Chiang, K. T. *et al.* Effects of nitric oxide on the copper-responsive transcription factor Ace1 in *Saccharomyces cerevisiae*: cytotoxic and cytoprotective actions of nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **377**, 296–303 (2000).
61. Nishimura, A., Kawahara, N. & Takagi, H. The flavoprotein Tah18-dependent NO synthesis confers high-temperature stress tolerance on yeast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**, 137–143 (2013).
62. Nasuno, R. *et al.* Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism in yeast through the activation of the transcription factor Mac1. *PLoS One* **9**, 1–18 (2014).
63. Carmona, L., Gandía, M., López-garcía, B. & Marcos, J. F. Biochemical and Biophysical Research Communications Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to the cell-penetrating antifungal peptide PAF26 correlates with endogenous nitric oxide (NO) production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 56–61 (2012).
64. Chanet, R. & Heude, M. Characterization of mutations that are synthetic lethal with pol3-13, a mutated allele of DNA polymerase delta in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **43**, 337–350 (2003).
65. Netz, D. J. *et al.* Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 758–65 (2010).
66. Banci, L. *et al.* Molecular view of an electron transfer process essential for iron – sulfur protein biogenesis. (2013).
doi:10.1073/pnas.1302378110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073

/pnas.1302378110

67. Shibayama, H. *et al.* Identification of a cytokine-induced antiapoptotic molecule anamorsin essential for definitive hematopoiesis. *J. Exp. Med.* **199**, 581–592 (2004).
68. Vernis, L. *et al.* A newly identified essential complex, Dre2-Tah18, controls mitochondria integrity and cell death after oxidative stress in yeast. *PLoS One* **4**, e4376 (2009).
69. Yamaguchi, Y. & Miura, M. How to form and close the brain: Insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**, 3171–3186 (2013).
70. Kuan, C.-Y., Roth, K. A., Flavell, R. A. & Rakic, P. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci.* **23**, 291–297 (2000).
71. Greenberg, J. T. PROGRAMMED CELL DEATH IN PLANT-PATHOGEN INTERACTIONS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 525–545 (1997).
72. Dangl, J. L. & Jones, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826–833 (2001).
73. Turnbull, L. *et al.* Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat. Commun.* **7**, 11220 (2016).
74. Yamaki, M., Umehara, T., Chimura, T. & Horikoshi, M. Cell death with predominant apoptotic features in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by deletion of the histone chaperone ASF1/CIA1. *Genes to Cells* **6**, 1043–1054 (2001).
75. Ikura, T. *et al.* Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* **102**, 463–473 (2000).
76. Uren, a G. *et al.* Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell* **6**, 961–967 (2000).
77. Wong, A. H. H., Yan, C. & Shi, Y. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. *J. Biol. Chem.* (2012). doi:10.1074/jbc.M112.381806
78. Khan, M. A. S., Chock, P. B. & Stadtman, E. R. Knockout of caspase-like gene, YCA1 apoptosis and elevates oxidized proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, (2005).
79. Longo, V. *et al.* Proteome and metabolome profiling of wild-type and YCA1-knock-out yeast cells during acetic-acid induced programmed cell death. *J. Proteomics* **128**, 173–188 (2015).

80. Herker, E. *et al.* Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* **164**, 501–507 (2004).
81. Boeke, J. D., LaCroute, F. & Fink, G. R. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet. MGG* **197**, 345–346 (1984).
82. Crane, B. R., Sudhamsu, J. & Patel, B. A. Bacterial Nitric Oxide Synthases. (2010). doi:10.1146/annurev-biochem-062608-103436
83. Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. & Lamb, C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13454–9 (2001).
84. Yun, N. *et al.* Anamorsin, a novel caspase-3 substrate in neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* (2014). doi:10.1074/jbc.M114.552679
85. Nishimura, A. 酵母におけるアルギニン/一酸化窒素の合成を介した新規抗酸化機構. 博士論文 **1**, 1–110 (2012).
86. Crane, B. R., Sudhamsu, J. & Patel, B. a. Bacterial nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 445–470 (2010).
87. Agapie, T. *et al.* NO formation by a catalytically self-sufficient bacterial nitric oxide synthase from *Sorangium cellulosum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16221–16226 (2009).
88. Melo, P. M., Silva, L. S., Ribeiro, I., Seabra, A. R. & Carvalho, H. G. Glutamine synthetase is a molecular target of nitric oxide in root nodules of *Medicago truncatula* and is regulated by tyrosine nitration. *Plant Physiol.* **157**, 1505–17 (2011).
89. Matamoros, M. A. *et al.* Biochemistry and Molecular Biology of Antioxidants in the Rhizobia-Legume Symbiosis. *Plant Physiol.* **133**, 499–509 (2003).
90. Innocenti, G. *et al.* Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots. *Planta* **225**, 1597–1602 (2007).
91. Soler, N. *et al.* Interaction between the reductase Tah18 and highly conserved Fe-S containing Dre2 C-terminus is essential for yeast viability. *Mol. Microbiol.* **82**, 54–67 (2011).
92. Alhebshi, a., Sideri, T. C., Holland, S. L. & Avery, S. V. The essential iron-sulfur protein Rli1 is an important target accounting for inhibition of cell growth by reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* **23**, 3582–3590 (2012).
93. Bulteau, A.-L. *et al.* Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* **305**, 242–5 (2004).
94. Flint, D. H., Tuminello, J. F. & Emptage, M. H. The inactivation of Fe-S cluster

- containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* **268**, 22369–76 (1993).
95. Albertson, G. D., Niimi, M., Cannon, R. D. & Jenkinson, H. F. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2835–2841 (1996).
96. Maebashi, K. *et al.* Mechanisms of fluconazole resistance in *Candida albicans* isolates from Japanese AIDS patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 527–536 (2001).