

博士論文

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における

一酸化窒素依存的な翻訳後修飾を介した代謝制御

Metabolic regulation *via* nitric oxide-dependent post-translational
modifications in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

示野 誠也

奈良先端科学技術大学院大学

先端科学技術研究科 ストレス微生物科学研究室

(高木 博史 教授)

令和 4 年 1 月 17 日提出

バイオサイエンス領域 博士論文要旨

所属 (主指導教員)	ストレス微生物科学研究室 (高木 博史 教授)		
氏名	示野 誠也	提出	令和 4 年 1 月 17 日
題名	酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> における一酸化窒素依存的な翻訳後修飾を介した代謝制御		
<p>一酸化窒素 (NO) は生物種を問わず多くの生命現象に関わるシグナル分子として機能する。哺乳類において、NO は可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) のヘム鉄に結合してこれを活性化する。sGC により合成された cGMP はセカンドメッセンジャーとして働き、血管機能や神経伝達などの生理反応を制御する。一方、NO はタンパク質の翻訳後修飾を引き起こす。例えば、システイン (Cys) 残基特異的な翻訳後修飾である S-ニトロソ (SNO) 化はタンパク質の安定性や酵素の活性制御に関与している。これまでに当研究室では、酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> における NO の分子機能について研究を進めており、NO が高温条件下では細胞保護に、高濃度の過酸化水素処理条件下では細胞死にそれぞれ寄与することを見出した。また、過剰な NO により引き起こされる NO ストレス条件下では、酵母の pyruvate decarboxylase Pdc1 の酵素活性が阻害され発酵力が低下することを明らかにした。このように、酵母において NO は細胞保護と細胞機能阻害の二面性を示す。しかし、酵母における NO の生理的役割や応答の分子機構には未だ不明な点が多い。酵母のゲノム上には sGC のオルソログが存在しないことから、NO が機能を発揮するためには、タンパク質の翻訳後修飾が重要であると推測される。しかしながら、酵母における NO 依存的なタンパク質の翻訳後修飾に関する解析はほとんど行われていない。本研究では、NO 処理条件下において細胞内で翻訳後修飾されるタンパク質を網羅的に解析し、酵母の NO ストレスに対する応答・耐性機構を明らかにすることを目的とした。</p> <p>まず、翻訳後修飾として SNO 化に着目した。SNO 化タンパク質の解析に広く用いられているビオチンスイッチ法を用いたプロテオーム解析を行い、SNO 化タンパク質の探索・同定を行った。NO ドナー処理した細胞抽出液を解析した結果、解糖系酵素を含む多くの SNO 化タンパク質を同定した。一方、酸性条件下にて NaNO₂ から発生させた NO で酵母を処理し (酸性亜硝酸処理)、抽出したタンパク質を同様に解析した結果、NO 処理による SNO 化タンパク質の増加は検出されなかった。</p> <p>近年、グルタチオンとの反応により SNO 化修飾が S-グルタチオン (SGT) 化修飾へ変換されることが示唆されている。そこで、酸性亜硝酸処理した酵母から細胞抽出液を調製し、抗グルタチオン抗体を用い</p>			

たウェスタンブロットにより解析したところ、NO 処理依存的に細胞内タンパク質の SGT 化レベルが上昇した。このことから、酵母細胞内においては NO 依存的なタンパク質の SGT 化が何らかの機能を有する可能性が示された。そこで細胞抽出液を NO 処理したサンプルから SNO 化タンパク質として同定したタンパク質に着目し、SGT 化修飾の解析を行った。まず、候補タンパク質をタグ融合型タンパク質として発現する株を作製し、酸性亜硝酸処理後に得られた細胞抽出液を用いて、免疫沈降および抗グルタチオン抗体を用いたウェスタンブロットティングにより解析した。その結果、fructose-1,6-bisphosphate aldolase Fba1 が NO 処理に依存して SGT 化されることを見出した。また、Cys 残基をセリン (Ser) 残基に置換した Fba1 (Cys112Ser-Fba1) を用いた解析の結果、Fba1 の 112 番目の Cys 残基 (Cys112) が NO 処理依存的に酵母細胞内で SGT 化されることが示された。さらに、大腸菌を用いて調製した組換え Fba1 を用いた解析から、Cys112 の SGT 化により Fba1 の酵素活性が抑制されること、グルタレドキシシン Grx1 との反応により Fba1 の SGT 化修飾が除去され酵素活性が回復することが示された。

病原性細菌の *Staphylococcus aureus* は感染時に、宿主の免疫応答により合成される NO に曝露されることで、解糖系に関わる酵素活性が低下することが報告されている。このことから、酵母において SGT 化による Fba1 の酵素活性の抑制により、解糖系を含む代謝が変化すると考えた。Fba1 の基質である fructose-1,6-bisphosphate (FBP)、解糖系の上流から分岐するペントースリン酸回路の中間代謝物である 6-phosphogluconate (6PG) を測定した結果、NO 処理依存的にこれらの細胞内含量が有意に増加することが示された。一方で、Cys112 における SGT 化修飾が起こらない Cys112Ser-Fba1 を発現する株では、NO 処理に依存した細胞内 FBP 量および 6-PG 量は増加しなかった。一方、細胞の酸化還元状態の維持や NO を含む酸化剤に対する応答に重要であり、ペントースリン酸回路により主に合成される NADPH の細胞内レベルを解析した。その結果、野生型株においては NO 処理によって細胞内 NADPH 量が上昇したが、Cys112Ser-Fba1 発現株では NADPH 量は増加しなかった。これらの結果から、NO ストレス条件下においては、Cys112 の SGT 化により Fba1 の活性が抑制された結果、解糖系、ペントースリン酸回路の変化を介した NADPH 量の増加が引き起こされ、細胞の NO 応答に寄与する可能性が示された。

NADPH はチオレドキシシン系やグルタレドキシシン系などの抗酸化経路に還元力として深く関与している。そのため、Cys112 の SGT 化による Fba1 の阻害に起因して増加した NADPH が、細胞の NO ストレス応答に寄与すると考えている。また、SGT 化による Fba1 活性の抑制は Grx1 により解除されることから、この現象はタンパク質の合成・分解を伴わない速やかな可逆的な応答機構であると考えられる。

目次

1. 序論	7
1-1. 酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1-2. 一酸化窒素	8
1-2-1. 一酸化窒素依存的な生命現象	8
1-2-2. 酵母における NO の生理機能	8
1-2-3. NO の作用機序	9
1-2-4. 酵母と NO ストレス	10
1-3. NO による Cys 残基の翻訳後修飾	10
1-3-1. Cys 残基の化学的性質	10
1-3-2. SNO 化修飾	10
1-3-3. SNO 化タンパク質の解析手法	11
1-3-4. S-グルタチオン (SGT) 化修飾	12
1-3-5. SNO 化修飾から SGT 化修飾への置換	13
1-3-6. Glutaredoxin	13
1-4. 解糖系とペントースリン酸回路	14
1-5. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	16
1-6. NADPH と細胞保護	17
1-7. NO 耐性機構	18
1-8. 本研究の目的	19
2. 材料と方法	20
2-1. 菌株およびプラスミド	20
2-2. <i>FBA1</i> 遺伝子への部位特異変異導入	21
2-3. 培地	26
2-4. 酵母の形質転換	26
2-5. DNA オリゴマー	27
2-6. タンパク質濃度の測定	31
2-7. 酵母抽出液の NO ドナー処理	31
2-8. 酵母細胞の NO ストレス処理	31
2-9. SNO 化タンパク質の網羅的解析	32
2-9-1. 細胞抽出液を用いた SNO 化タンパク質の解析	32
2-9-2. SNO 化タンパク質の同定	32
2-9-3. 酵母細胞を用いた SNO 化タンパク質の解析	33

2-10.	SGT 化タンパク質の検出	33
2-11.	免疫沈降法	33
2-12.	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびウェスタン ブロット解析	34
2-13.	タンパク質の二次元電気泳動	35
2-14.	各 Fba1 と各 Grx の精製	35
2-15.	組換え Fba1 の SNO 化、SGT 化の誘導.....	36
2-16.	Grx による SGT 化 Fba1 の脱 SGT 化.....	36
2-17.	Fba1 の酵素活性の測定	36
2-18.	代謝産物の測定	37
2-19.	細胞生存率の測定	37
3.	結果	39
3-1.	NO 処理したタンパク質抽出液を用いた SNO 化タンパク質の網羅的解析	39
3-2.	NO ストレス条件下における細胞内 SNO 化タンパク質の解析	42
3-3.	SGT 化タンパク質の検出	43
3-4.	解糖系酵素の SGT 化の検出.....	44
3-5.	Fba1 の SGT 化部位の同定.....	46
3-6.	SGT 化 Fba1 の酵素活性測定	48
3-7.	SNO 化 Fba1 の酵素活性測定	52
3-8.	解糖系・ペントースリン酸回路の代謝産物測定	54
3-9.	Grx による Fba1 の脱 SGT 化と酵素活性測定	57
3-10.	NO ストレスに対する表現型の解析	59
4.	考察	62
5.	総括	72
6.	謝辞	73
7.	参考文献	74

<略語リスト>

ROS : Reactive oxygen species (活性酸素種)
NO : Nitric oxide (一酸化窒素)
sGC : Soluble guanylate cyclase
cGMP : Cyclic guanosine monophosphate
Cys : Cysteine (システイン)
-SH 基 : Thiol (チオール) 基
SNO 化 : S-Nitrosylation (S-ニトロソ化)
GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase
BS 法 : Biotin-switch 法 (ビオチン-スイッチ法)
SGT 化 : S-Glutathionylation (S-グルタチオン化)
Grx : Glutaredoxin
GSSG : Glutathione disulfide (酸化型グルタチオン)
TPI : Triosephosphate isomerase
FBPA : Fructose-1,6-bisphosphate aldolase
FBP : fFructose-1,6-bisphosphate
GAP : Glyceraldehyde 3-phosphate
DHAP : Dihydroxyacetone phosphate
GSNOR : S-Nitrosoglutathione reductase
NOR : Nitric oxide reductase
DARP : 2,5-Diamino-6-(5-phospho-D-ribosylamino)-pyrimidin-4(3 H)-one
ORF : Open reading frame (オープンリーディングフレーム)
IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
GSNO : S-Nitrosoglutathione
Biotin-HPDP : N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2-pyridyldithio)propionamide
SDS-PAGE : SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)
Iodoacetyl-Biotin : N-(Biotinoyl)-N''-(Iodoacetyl) Ethylenediamine
Ser : Serine (セリン)
CBP : Calmodulin binding protein-tag
6PG : 6-Phosphogluconate
Cys-ss- : Cysteine perthiosulfide

1. 序論

1-1. 酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はパン類、酒類、エタノール生産などの発酵生産に必須な微生物である。また、酵母は哺乳類や病原性真菌のモデルとしても利用されており、産業上および学術上、極めて重要な微生物である。

酵母は発酵条件下において、高温、高濃度エタノール、高浸透圧などの多様な環境ストレスに曝されている。環境ストレスに曝された酵母の細胞内では、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) が増加し、細胞の生育や有用物質 (アルコールや香味成分) の生産が著しく阻害されている (Figure 1)¹。このような環境ストレスに対して酵母は様々なストレス応答機構を有していることが明らかとなっている。例えば、高浸透圧ストレス条件下では HOG1 経路が活性化し、適合溶質²として細胞内の浸透圧調節に寄与するグリセロールの合成が促進される。これらのことから、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できると期待されている。

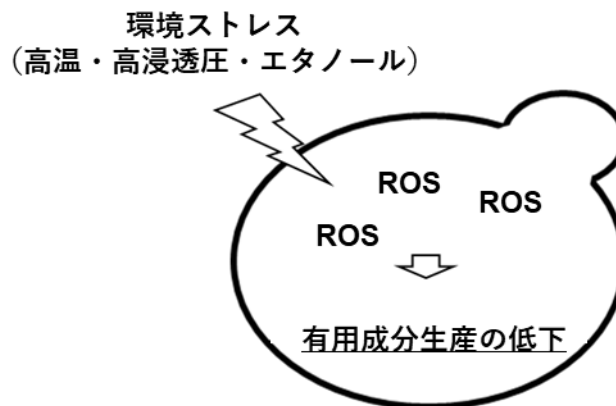


Figure 1 発酵環境で受ける環境ストレス 酵母は発酵条件下において、高温、高浸透圧、エタノールなどの環境ストレスを受けている。環境ストレス条件下では酵母の有用成分の生産能が低下している。

また酵母は、ヒトをはじめとする高等真核生物が有する基本的な生命現象に関与する遺伝子の多くを有しており、酵母をモデルとした基礎研究から得られた知見は、様々な高等真核生物の研究に利用されている。酵母のゲノミクスと遺伝学を組み合わせた解析手法が提案されており、

これにより新たな薬物作用様式や標的分子に関する知見が報告されている^{3,4}。さらに、ヒトの神経変性疾患のモデルとして酵母を用いる研究も行われている⁵。以上のことから、酵母の環境ストレスに対する応答機構やシグナル伝達経路を明らかにすることは、幅広い生物種の生命現象の理解に繋がることから、基礎・応用両面において極めて重要である。

1-2. 一酸化窒素

1-2-1. 一酸化窒素依存的な生命現象

一酸化窒素 (nitric oxide; NO) は生物種を問わず多くの生命現象に関与するシグナル伝達物質である。哺乳類においては、血管弛緩作用⁶や免疫応答⁷に関与している。また、植物においては、種子の発芽に関与し、病原体誘発過敏反応にも関与する⁸。さらに、微生物においても NO が様々な生理機能に関与することが報告されている。例えば NO は、*Pseudomonas aeruginosa* におけるバイオフィルムの形成と分散⁹や、*Bacillus subtilis*、*B. anthracis* の酸化ストレス応答に関与している^{10,11}。

一方で、NO は環境や濃度によっては、細胞毒性や細胞死を誘導する場合がある。例えばヒトにおいて、NO はアルツハイマー病やハンチントン病のような神経変性疾患を引き起こすことが報告されている¹²。また、NO がヘモグロビン中のヘムに結合し、低酸素血症を引き起こすことも知られている¹³。植物細胞においては、病原体の感染時に誘導されるアポトーシスにも NO が関与することが分かっている^{14,15}。

1-2-2. 酵母における NO の生理機能

酵母においても、NO がシグナル伝達物質として細胞内で作用し、ストレス応答経路に関与することが報告されている。近年、当研究室では高温処理条件下での酵母の細胞内で diflavin oxidoreductase Tah18 依存的に NO が合成されること、および NO が細胞の高温ストレス耐性に寄与することを見出した¹⁶。さらに、NO が転写因子 Mac1 の活性化を介して銅イオンの細胞内への取り込みを促進し、銅依存性 superoxide dismutase Sod1 の活性を増加させることで、高温ストレス耐性に関与することを報告した¹⁷。また、過酸化水素処理条件下においては、Tah18 依存的な NO 合成により細胞死が誘導されることを明らかにした¹⁸。

一方、*S. cerevisiae* の近縁種である病原性真菌 (*Candida glabrata* や *C. albicans*) は感染時に宿主からの免疫応答として NO に曝露される。宿主

のマクロファージは、細菌や真菌由来のペプチドグリカンなどを TLR2 レセプターにより認識して活性化され、免疫応答が引き起こされる¹⁹。その結果、マクロファージによって合成された NO は、電子伝達に關与する鉄硫黄クラスターの分解²⁰や cytochrome c oxidase を阻害し、ミトコンドリア呼吸の停止を引き起こすことで^{21,22}病原性生物の生育を阻害する。そのため、病原菌の NO 耐性は感染性や毒性に極めて重要であり、*C. albicans* の NO 解毒酵素欠損株はマウスへの感染性が低下することも報告されている²³。したがって、酵母の NO に対する防御応答の理解は、新規な抗真菌薬の発見や開発に繋がることが期待される。

1-2-3. NO の作用機序

NO の主な作用機序として、以下の 2 つが報告されている。1 つ目として、NO が soluble guanylate cyclase (sGC) のヘムへの配位結合を介して sGC を活性化し、cyclic guanosine monophosphate (cGMP) のレベルを増加させることが知られている。この cGMP がセカンドメッセンジャーとして、protein kinase や cation channel などのタンパク質に作用することで様々な生理機能に關与する²⁴。2 つ目として、タンパク質の翻訳後修飾に NO が直接的または間接的に寄与することが知られている。NO はシステイン(Cys)残基のチオール(-SH)基に結合することで、S-ニトロソ(SNO)化を誘導する。SNO 化修飾は、酵素活性やタンパク質の局在の制御に關与する。また、NO と superoxide anion の反応生成物である peroxynitrite は、タンパク質の tyrosine 残基をニトロ化する。ニトロ化は tyrosine 残基のリン酸化を阻害すること²⁵、ニトロ基の導入により構造変化を引き起こすこと²⁶、さらに tyrosine 残基のヒドロキシル基の pKa を低下させる(約 10.1 から約 7.2 へ) ことなどが報告されている²⁷。ニトロ化はこれらの機構によって、タンパク質の機能を変化させる。

一方、酵母のゲノム上には sGC のオルソログが存在しないことから、哺乳類が有する sGC/cGMP を介した経路とは異なる機構によって NO が作用する可能性が考えられる。従って、酵母において NO は主にタンパク質の翻訳後修飾を介して生理機能を発揮していることが考えられる。しかしながら、生理的条件下において酵母細胞内で翻訳後修飾されるタンパク質に関する報告は極めて少ない。

1-2-4. 酵母と NO ストレス

酵母は自然環境中で過剰な NO に曝されることでストレスを受けている。例えば、バイオエタノールの原料として用いられる廃蜜糖には最大で 50 mM 程度の亜硝酸塩が含まれている²⁸。亜硝酸イオンは、酵母の発酵に伴って培地が酸性化した条件（pH 2.0 程度）においてプロトン化され、NO へと分解される²⁹。pH 5.0 以下の条件は亜硝酸塩濃度依存的に glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）や glutamate dehydrogenase の酵素活性を抑制するとともに、細胞内 ATP 量を減少させ、酵母の生育を阻害する³⁰。これらのことから、バイオエタノールなどの発酵生産において酵母と NO ストレスに関する知見は重要である。

1-3. NO による Cys 残基の翻訳後修飾

1-3-1. Cys 残基の化学的性質

タンパク質 Cys 残基の-SH 基は極めて高い求核性とレドックス感受性を有しており、タンパク質の機能において重要な役割を担っている。例えば、Cys 残基の-SH 基はタンパク質の分子内また分子間でのジスルフィド結合もしくは金属原子への配位を介して構造の安定化に寄与するが、酵素の活性部位として触媒作用に関与する³¹。細胞中の 10~20 %の Cys 残基の-SH 基は容易に酸化される一方で、80 %近くはレドックス反応に対して比較的不活性であると考えられている³²。レドックス感受性に影響を与える要因の一つとして、-SH 基の pKa が挙げられる。過酸化水素のような生物学的な酸化剤は脱プロトン化されたチオレート型（-S⁻）とのみと反応する^{33,34}。-SH 基の pKa はタンパク質の局所的な環境に影響を受けることが示唆されている。例えば、正に帯電したアミノ酸が近傍に存在する場合、Cys 残基側鎖のチオレートアニオンは安定化され、その結果 Cys 残基の反応性を上昇させる³⁵。しかしながら、-SH 基の反応特異性に関する分子メカニズムは完全には理解されていない。

1-3-2. SNO 化修飾

SNO 化は Cys 残基の-SH 基に NO が付加する可逆的な反応であり、細胞代謝や膜輸送、酵素の活性制御など広範囲の重要な機能に関与する³⁶。例えば、哺乳類細胞においては、アポトーシスに関与する caspase-3 の活性化には SNO 化を介したタンパク質-タンパク質間相互作用が必要である³⁷。また、ヒトの GAPDH は SNO 化によって E3 ubiquitin ligase Siah1

と複合体を形成した後、核移行し、核タンパク質の分解を引き起こすことで細胞死を誘発する³⁸。さらに、大腸菌においては、ストレス応答性転写因子 OxyR が SNO 化によって活性化されることが報告されている³⁹。

1-3-3. SNO 化タンパク質の解析手法

SNO 化修飾は可逆的な修飾であり、還元剤や金属イオンの影響を受けやすい不安定な翻訳後修飾である。SNO 化タンパク質の検出手法として、Saville 法や蛍光分析法が確立されている。Saville 法は Hg^{2+} イオンを用いて SNO 化修飾を酸性条件下で亜硝酸イオンに分解した後、亜硝酸をジアゾカップリング反応により定量する手法である⁴⁰。また、蛍光分析法は Saville 法と同様に、 Hg^{2+} イオンにより SNO 化修飾を中性条件下で亜硝酸イオンに分解し、diaminonaphthelene と反応させ、生成する triazole 誘導体の蛍光を測定することで SNO 化修飾を定量する手法である⁴¹。これらの手法はサンプル中の夾雑物質の影響を受けやすいだけでなく、SNO 化タンパク質の同定や個々の SNO 化タンパク質レベルの解析は不可能である。そのため、SNO 化タンパク質の同定を目的に動植物等を用いた NO の研究では、SNO 化修飾を特異的にビオチン化するビオチン-スイッチ (BS) 法が広く用いられている。

BS 法は①還元状態の-SH 基を保護するブロッキング、②アスコルビン酸を用いた SNO 化部位特異的な-SH 基への還元、③生成した-SH 基のビオチン化、の 3 段階により、SNO 化 Cys 残基を特異的にビオチン化する手法である (Figure 2)⁴²。これまでに多くのタンパク質の SNO 化とその機能が、BS 法を用いた解析によって明らかにされている。例えば、7 回膜貫通型受容体 G protein-coupled receptor は G タンパク質を介して細胞内に情報を伝達する受容体であるが、3 つのタンパク質 (GPCR kinase⁴³、 β -arrestin⁴⁴、dynammin⁴⁵) が SNO 化されることで受容体の細胞内移行に関与している。また、BS 法によりビオチン化されたタンパク質は、ビオチン-アビジン特異的相互作用を利用したプルダウンにより単離・精製が可能であり、質量分析と組み合わせることで SNO 化タンパク質を同定できる。一方、酵母においては GAPDH Tdh2 が SNO 化されることが知られているが⁴⁶、生理的条件下において SNO 化されるタンパク質を BS 法により網羅的に解析した報告はほとんどない。

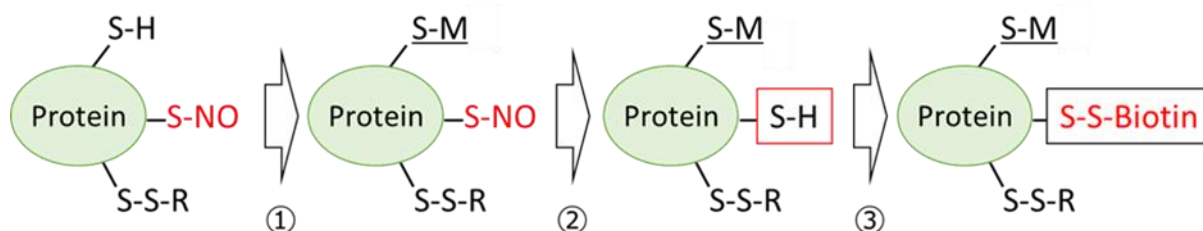


Figure 2 ビオチン-スイッチ (BS) 法の概要 ビオチン-スイッチ (BS) 法は 3 段階の反応 (①還元状態の-SH 基の保護、②-SNO 基の特異的還元、③-SH 基のビオチン化) により、SNO 化タンパク質を特異的にビオチン化する。R: タンパク質、もしくは低分子化合物、M: -SH 保護基

1-3-4. S-グルタチオン (SGT) 化修飾

Glutathione は glutamic acid、Cys および glycine からなるトリペプチドで、酸化ストレス応答に参与する glutathione peroxidase ファミリーや peroxiredoxin に利用され、過酸化水素や過酸化脂質の除去に作用している⁴⁷。Glutathione は哺乳類の細胞質内に 0.5~2mM の範囲で存在しており⁴⁸、酵母の細胞内においては対数増殖期に 10 mM の glutathione が細胞質内に存在している⁴⁹。

タンパク質 Cys 残基の-SH 基が glutathione とジスルフィド結合を形成する S-グルタチオン (SGT) 化も Cys 残基の翻訳後修飾の一つとして知られている。-SH 基は酸化ストレス条件下で ROS と反応し、スルフェン酸に酸化される。スルフェン酸は極めて不安定であり、さらに ROS と反応することで、スルフィン酸基またはスルホン酸を形成する。スルフィン酸、スルホン酸への酸化は生体内では不可逆的な反応であり、タンパク質の不活性化や凝集を引き起こす⁵⁰。スルフィン酸残基の SGT 化修飾は不可逆的な酸化から Cys 残基の-SH 基を保護することに寄与する⁵¹。また、活性中心の Cys 残基の SGT 化は酵素活性を抑制する一方、SGT 化による立体障害や電荷の変化によってタンパク質の構造と機能が変化することが報告されている。例えば、protein kinase である Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase I は活性部位の Cys 残基の SGT 化によって阻害される⁵²。一方で、adenosine monophosphate-activated protein kinase は触媒サブユニット α が SGT 化されることで活性化する⁵³。また、シグナル伝達性転写因子 3 の SGT 化は SGT 化部位近傍の tyrosine 残基のリン酸化を阻害し、不活性化を誘導する⁵⁴。

1-3-5. SNO 化修飾から SGT 化修飾への置換

遊離の SNO 化 Cys と glutathione を反応させた条件下において、SGT 化 Cys が生成することから、SNO 化修飾から SGT 化修飾への置換反応が示唆されている⁵⁵。また近年、タンパク質の Cys 残基においても SNO 化修飾が SGT 化修飾へ置換される可能性が多く報告されている。例えば、*in vitro* で NO 処理した GAPDH、caspase-3、cathepsin K といったタンパク質は、樹脂に結合させた glutathione と反応し、SGT 化タンパク質として濃縮される⁵⁶。また、NO 処理した細胞から抽出したタンパク質の解析から、同一の Cys 残基において SNO 化と SGT 化の両方の修飾が検出された例も知られている⁵⁷⁻⁵⁹ (Figure 3)。

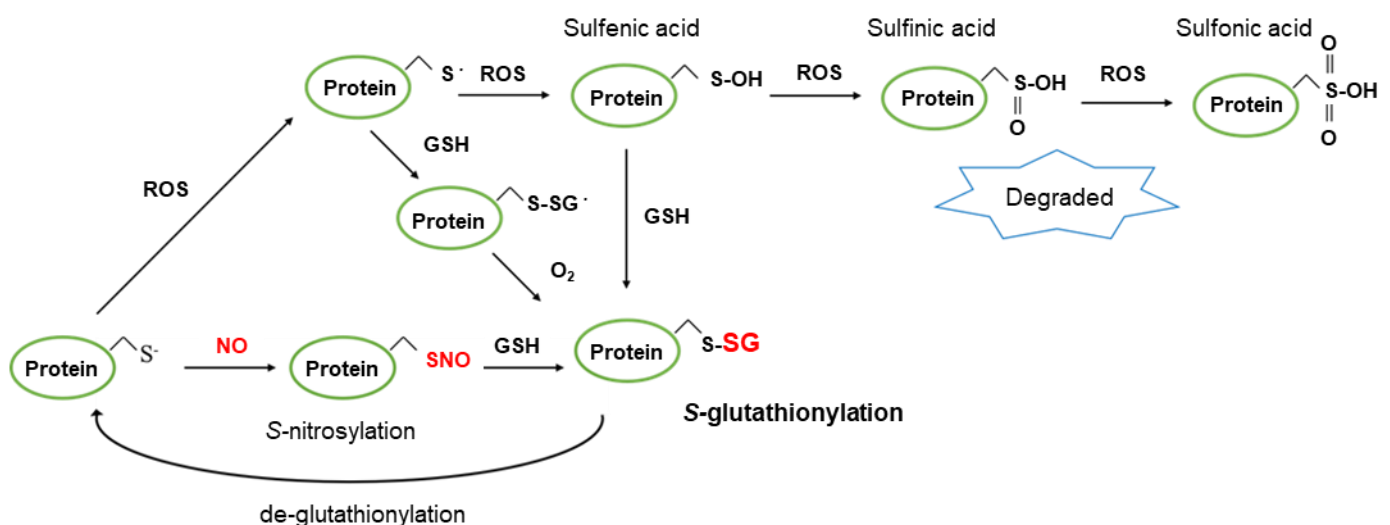


Figure 3 *S*-グルタチオン (SGT) 化の概要 *S*-グルタチオン (SGT) 化は大きく分けて 2 つの経路で起こる。1 つ目の経路として、Cys 残基のチオレートアニオンと ROS が反応した中間体もしくは sulfenic acid と glutathione が反応することで生じる。2 つ目の経路は SNO 化と glutathione が反応することで生じる。また、脱 SGT 化反応についても報告されている。

1-3-6. Glutaredoxin

SGT 化修飾は可逆的な翻訳後修飾である。細胞内において SGT 化修飾は glutaredoxin (Grx) によって脱 SGT 化され、-SH 基へと変換される⁶⁰。Grx は進化的に広く保存された酵素であり、Cys 残基の酸化的修飾を修復する反応に関与する⁶¹。Grx にはモノ-SH タイプとジ-SH タイプが存在する。SGT 化タンパク質の S-SG 結合に Grx のチオレートアニオン (Grx-S) が攻撃することで、Grx-S-SG を形成する。還元された-SH 基を有するタンパク質を放出する点では両タイプ同様であるが、モノ-SH タイプ

は 1 分子、ジ-SH タイプは 2 分子の glutathione と反応し、チオレート型へと還元され、GSSG を生成する。GSSG は glutathione reductase によって NADPH を用いて還元される (Figure 4) ⁶²。一般的に、タンパク質の脱 SGT 化反応の効率は一モノ-SH タイプがジ-SH タイプよりも高いことが報告されている ^{63,64}。

酵母 *S. cerevisiae* においては 8 種類の Grx を有することが知られている (Grx1~Grx8)。また、Grx1~Grx4 は細胞質に、Grx5 はミトコンドリアに、Grx6、Grx7 はゴルジ体にそれぞれ局在することが報告されている。また、Grx8 はヒ素処理に依存して細胞質で発現誘導される ⁶⁵⁻⁶⁹。細胞質型 Grx の内、Grx1 と Grx2 はジ-SH タイプ、Grx3 と Grx4 はモノ-SH タイプである ^{70,71}。一方で、各 Grx の脱 SGT 化反応の基質がどのタンパク質であるかなどに関しては不明な点が未だ多く残されている。

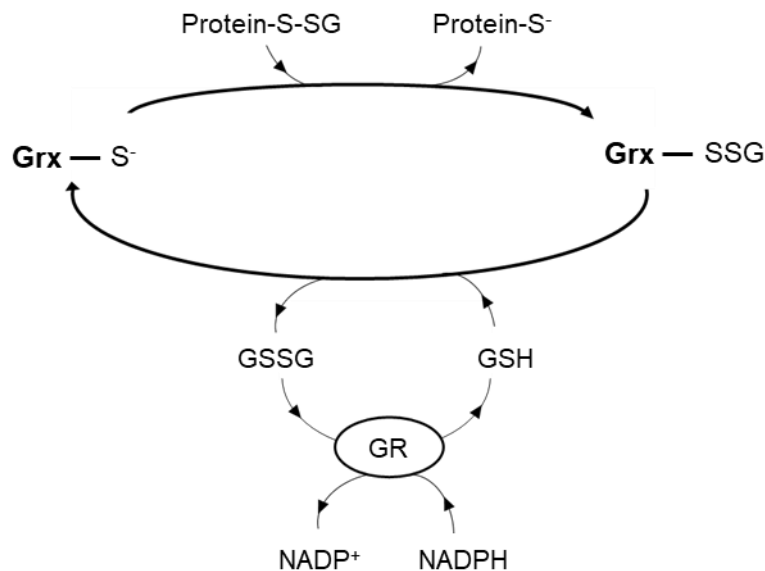


Figure 4 グルタレドキシシン (Grx) による脱 SGT 化機構 Glutaredoxin (Grx) は脱 SGT 化に関与している。Grx のチオレートアニオンが SGT 化タンパク質に攻撃し、SGT 化 Grx が形成される。SGT 化 Grx に glutathione が作用し、酸化型 glutathione(GSSG)が生成し、通常の Grx に還元される。glutathione reductase(GR) が NADPH を用いて GSSG を還元する。

1-4. 解糖系とペントースリン酸回路

解糖系は 1 分子のグルコースから 2 分子のピルビン酸の生産と 2 分子の NADH、2 分子の ATP を合成する ⁷²。好気条件下ではクエン酸回路に

においてピルビン酸と NADH の酸化から 30 分子の ATP を得ることができる。このことから、解糖系は、グルコースおよびその他のヘキソースをクエン酸回路で代謝可能な基質へ変換で経路である⁷³。解糖系は不可逆的なステップに参与する酵素である hexokinase Hxk1、phosphofructokinase1 Pfk1、pyruvate kinase Cdc19 によって調節される⁷⁴。

解糖系とその分岐経路であり、NADPH や核酸合成に不可欠な五炭糖を合成するペントースリン酸回路の代謝産物のフローは厳密に制御されている (Figure 5)。哺乳類においては、fructose-6-phosphate が Pfk1 によって fructose-1,6-bisphosphate (FBP) へと変換される触媒経路は解糖系の調節に参与することが知られている。また、phosphofructokinase 2 Pfk2 は Pfk1 のアロステリック制御に参与する fructose-2,6-bisphosphate を合成する。ガン細胞においては、免疫細胞からの攻撃に対して Pfk2 の酵素活性が低下することで、Pfk1 の酵素活性も阻害される。この制御によってペントースリン酸回路への代謝産物のフローが増加することが報告されている^{75,76}。また、triosephosphate isomerase (TPI) の欠損によって解糖系が阻害され、ペントースリン酸回路が促進されることで、酸化ストレスに応答する可能性が報告されている⁷⁷。また、病原性細菌である *Staphylococcus aureus* は宿主への感染時に、宿主の防御応答による酸化ストレスに曝されるが、解糖系からペントースリン酸回路へと代謝を変換させることでストレスに応答している⁷⁸⁻⁸⁰。このように解糖系とペントースリン酸回路が制御されることでストレス耐性に寄与すると考えられている。

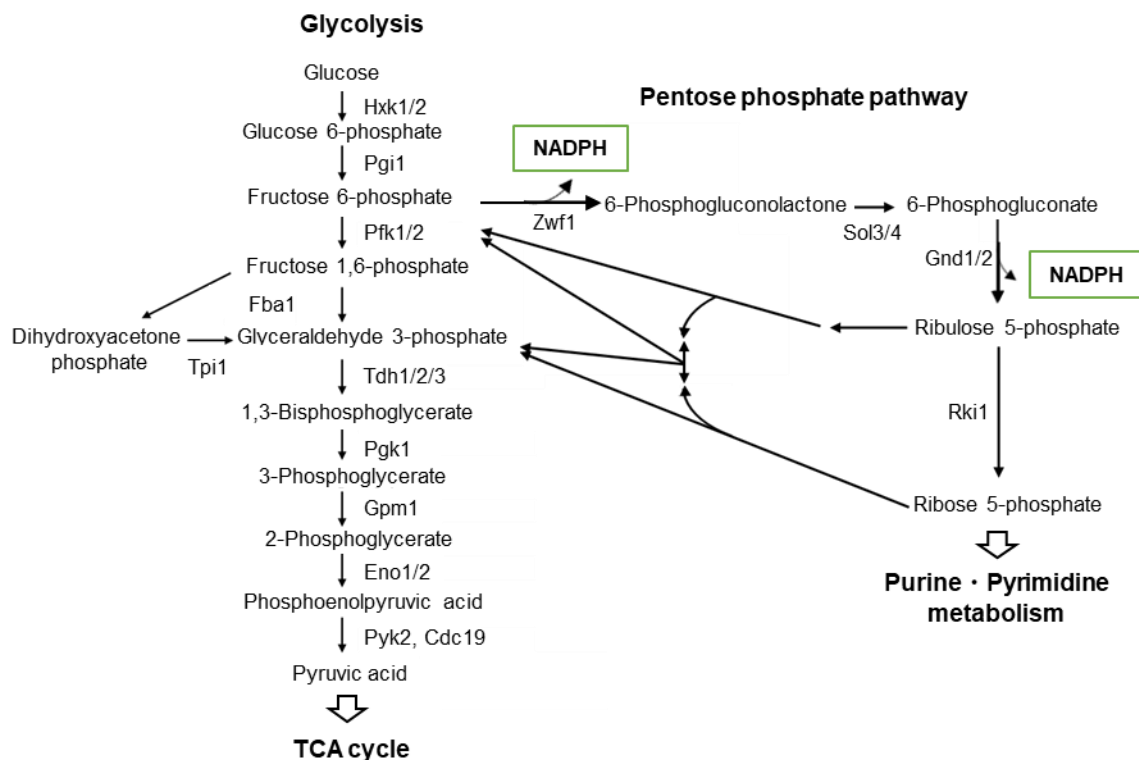


Figure 5 解糖系とペントースリン酸回路の代謝経路図 解糖系は細胞のエネルギー獲得に重要である。グルコースを出発物質として、各酵素によって種々の物質に変換され、最終的に pyruvic acid が合成される。pyruvic acid は好氣的条件下では TCA 回路の出発物質として利用される。ペントースリン酸回路は解糖系の中間代謝産物である fructose- 6-phosphate から分岐する代謝経路であり、核酸の合成や NADPH の生産に参与する。Hxk1/2: hexokinase、Pgi1: glucose-6-phosphate isomerase、Pfk1: phosphofruktokinase、Fba1: fructose-bisphosphate aldolase、Tpi1: triose-phosphate isomerase、Tdh1/2/3: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、Pgc1: phosphoglycerate kinase、Gpm1: phosphoglycerate mutase、Eno1/2: enolase、Pyk2、Cdc19: pyruvate kinase、Zwf1: glucose-6-phosphate dehydrogenase、Sol3/4: 6-phosphogluconolactonase、Gnd1/2: 6-phosphogluconate dehydrogenase、Rki1: ribose-5-phosphate isomerase

1-5. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase

Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBPA) は生物種を問わず、幅広く保存されている解糖系の酵素であり、解糖系の中間代謝物である FBPA を glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) と dihydroxyacetone phosphate (DHAP) へと可逆的に変換する⁸¹。触媒反応機構によって FBPA I型と FBPA II型の2つのクラスに分類されており、FBPA I型酵素は活性部位のリジン残基の ϵ -アミノ基と FBPA のカルボニル基の間に Schiff 塩基中間体を形成する⁸²。一方、FBPA IIは金属依存性酵素であり、マグネシウムや亜鉛など

の 2 価の金属イオンに FBP が配位する⁸³ (Figure 6)。FBPA I型は主に真核生物と一部の細菌に^{84,85}、FBPA II型は主に細菌にそれぞれ保存されている。また、FBPA I型はさらに 2 つのファミリーに分類され⁸⁶、真核生物ではホモ四量体であるのに対して、細菌やアーキアではモノマーからデカマーまで存在することが報告されている^{85,87}。

酵母やその近縁種である *C. glabrata* や *C. albicans* の FBPA である Fba1 は FBPA II型であり、亜鉛イオンの結合が活性に必須である⁸⁸。

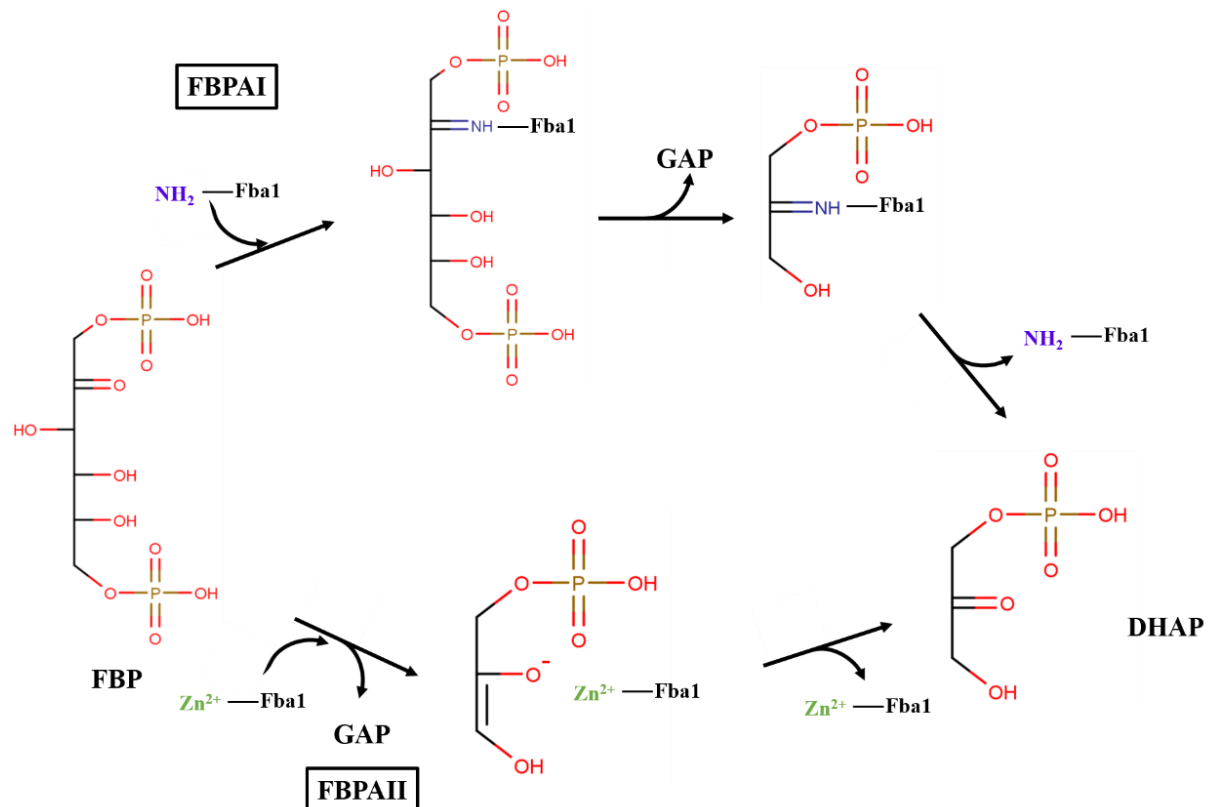


Figure 6 Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBPA) のクラス別による反応機構
 FBPA I型は FBPA のアミノ基と FBP のカルボニル基がシフ塩基を形成し、GAP と DHAP へと変換する。FBPA II型は FBPA に Zn²⁺が配位し、FBP と反応することで GAP と DHAP へと変換する。

1-6. NADPH と細胞保護

NADPH (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソ酸) はレドックス代謝や細胞内シグナル伝達に関与する補酵素であり、主にペントースリン酸回路で合成される電子伝達物質である。酸化型 (NADP⁺) と還元型 (NADPH) の 2 つの状態を循環している。また、脂肪酸やアミノ酸、ヌクレオチドおよびステロイド合成を含む、いくつかの還元的合成反応

の電子供給源としても機能している⁸⁹。

一方、NADPHは細胞の抗酸化システムにおいて重要な役割を有している。1-3-6で述べたように、glutathione reductaseによってNADPHを補因子としてGSSGをglutathioneに還元する反応に関与する。生成したglutathioneはglutathione peroxidaseの補因子として働き、過酸化水素などのROSの消去に関与する^{90,91}。また、NADPHは過酸化水素の消去に関与するthioredoxin reductaseや細胞内の多くの酵素の酸化還元バランスに寄与するthioredoxinの還元型の維持に電子供与体として利用される^{92,93}。さらに、NADPHは過酸化水素の分解に重要なcatalaseの活性にも関与する。具体的には、catalaseは過酸化水素に曝されると不活性型が生成されるが、NADPHはこの不活性型catalaseの蓄積を抑制することが報告されている⁹⁴。このようにNADPHは細胞の抗酸化システムに極めて重要である。

1-7. NO耐性機構

過剰なNOは細胞の生育阻害や細胞死を誘導する。そのため、生物は様々な方法で細胞内のNO濃度を厳密に制御している。例えば、nitric oxide dioxygenaseはNOを酸化的に分解することで⁹⁵、S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR)はNOとglutathioneの反応生成物であるS-nitrosoglutathione (GSNO)を還元的に分解し、GSSGへと変換することで、それぞれNOの消去に関与する^{96,97}。また、NOの耐性機構にはNADPHも重要な働きを有している。Nitric oxide reductase (NOR)は嫌気的条件下でNADPHを利用してNOを亜酸化窒素(N₂O)へと還元する^{98,99}。糸状菌の*Aspergillus nidulans*では、NOを硝酸塩に変換することで解毒するflavo-hemoglobin fhbA, fhbB^{100,101}およびNOを還元的に解毒するnitrite reductase niiA¹⁰²はともにNADPHを利用することが報告されている。

酵母のNO分解酵素Yhb1においてもNADPHが利用される。Yhb1は細胞内の過剰なNOを硝酸イオンへと無毒化することで、細胞保護に寄与する^{103,104}。また、当研究室において、riboflavin合成の初発酵素であるGTP cyclohydrolase II Rib1がNOストレス耐性に寄与することを見出し、Rib1が産生する2,5-diamino-6-(5-phospho-D-ribosylamino)-pyrimidin-4(3H)-one (DARP)がNOと結合して消去することが示された。¹⁰⁵

1-8. 本研究の目的

上記のことより、酵母 *S. cerevisiae* において、NO は細胞内タンパク質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が、その機能については未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、酵母における NO による翻訳後修飾、特に SNO 化、SGT 化修飾に着目し、NO ストレスに対する細胞の応答・耐性機構とその生理的意義を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

2-1. 菌株およびプラスミド

本研究では、酵母 *S. cerevisiae* の Σ 1278b 株または BY4741 株を野生型株として用いた。本研究で使用した酵母 *S. cerevisiae* および大腸菌 *E. coli* の菌株リストを Table 1 に示す。また、使用したプラスミドを Table 2 に示す。大腸菌 *E. coli* DH5 α 株をプラスミドの構築に、BL21(DE3)株を *in vitro* の酵素アッセイ用タンパク質の発現ホストとして用いた。

解糖系の酵素の解析のために、Fba1, enolase Eno1, Eno2, Pfk1, Pfk2, phosphoglycerate mutase Gpm1, Cdc19, alcohol dehydrogenase Adh1, Tdh1, Tdh2, Tdh3 をエピトープタグ融合タンパク質として発現する株を構築した。C 末端に Myc7His タグ (RTLQVDEQKLISEEDLHHHHHHH) を融合した Fba1, Eno2, Pfk1, Pfk2, Gpm1, Cdc19, Adh1 の各発現株を構築するために、プラスミド pYM46 と対応するプライマーを用いた PCR を行った。また、C 末端に HA タグ (AAGRLPIRRPRLRLARHF) を融合した Eno1 の発現株を構築するために、プラスミド pYM45 と対応するプライマーを用いた PCR を行った。さらに、C 末端に 5FLAG (RIPGLINHMDYKDDDDKD YKDDDDKLM DYKDDDDKDYKDDDDKLM DYKDDDDK) タグを融合した Tdh1, Tdh2, Tdh3 の各発現株を構築するために、プラスミド pFA6a-5FLAG と対応するプライマーを用いた PCR を行った。また、C 末端に TAP タグ (RTLQVDKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALDYDIPTTASVDGSENYF QGSPQQNKTAALAQHDEAVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQ SLKDDPSQSANLLAEAKKLND AQAPKVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNE EQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLND AQAPKVDANSAAL) を融合した Fba1 の発現株を構築するために、プラスミド pYM13 と対応するプライマーを用いた PCR を行った。増幅されたそれぞれの PCR 断片を酵母 BY4741 株に導入した。

Fba1 を詳細に解析するために、Fba1-TAP 融合株を鋳型に Fba1-TAP 配列を対応するプライマーを用いた PCR にて PCR 断片を増幅した後、pRS416 の *XhoI/EcoRI* サイトに In-fusion 法により PCR 断片を導入した。また、必要に応じて下記に述べる Fba1 のアミノ酸置換体を構築した。作製したプラスミドを BY4741 株に導入した後、プラスミド pFA6a-*natNT2* を鋳型として増幅した PCR 断片を用いて BY4741 株のゲノム上の *FBA1*

遺伝子を破壊した。

栄養要求性の相補には、pRS416, pRS415-*CgHIS3-MET15*, pAG415GPD-*ccdB*, pRS313-*MET15*, または相当するベクターを用いた。

pET55-*FBA1* は、プラスミド pET-55-DEST (Sigma) の isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導性プロモーターの下流に *FBA1* のオープンリーディングフレーム (ORF) を組み込んだものであり、IPTG 誘導により N 末端に Strep タグ (MASWSHPQFEKGAVTSLYKKAGL) を、C 末端に 6His タグ (HPAFLYKVVHHHHHH) をそれぞれ融合したタンパク質として Fba1 を発現する。pET55-*FBA1* は以下の方法で構築した。まず、BG1805-*FBA1* と pDONR221-*ccdB* を BP 反応させ、pDONR221-*FBA1* を作製した。次に、pDONR221-*FBA1* と pET55-*ccdB* を LR 反応させ、pET55-*FBA1* を作製した。また、pQE2-*GRX1*, pQE2-*GRX2* (M35-Q143), pQE2-*GRX3*, pQE2-*GRX4* は、多コピープラスミド pQE2 (Qiagen) の *NotI/Hind* III サイト、IPTG 誘導性プロモーターの下流に *GRX1*, *GRX2* (M35-Q143), *GRX3*, *GRX4* の ORF をそれぞれ組み込んだものであり、IPTG 誘導により N 末端に 7His タグ (MKHHHHHHHMHAGAHAA) を融合したタンパク質として発現する。pQE2-*GRX1*, pQE2-*GRX2* (M35-Q143), pQE2-*GRX3*, pQE2-*GRX4* は以下の方法で構築した。BY4741 株を鋳型に各 ORF に対応するプライマーを用いた PCR にて各 ORF の PCR 断片を増幅した。pQE2 の *NotI/Hind* III サイトに In-fusion 法により PCR 断片を導入し、プラスミドを作製した。大腸菌を用いた組換えタンパク質の発現にはこれらのプラスミドを用いた。

2-2. *FBA1* 遺伝子への部位特異変異導入

FBA1 遺伝子への部位特異変異導入は、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Invitrogen) に準ずる方法で行った。pRS416-*FBA1* または pDONR221-*FBA1* を鋳型として、PCR により変異が導入された *FBA1* 遺伝子をプラスミドごと増幅し、*DpnI* 処理により鋳型プラスミドを消化した後、反応液を用いて *E. coli* DH5 α 株を形質転換した。コロニーからプラスミドを抽出して *FBA1* の配列を確認したプラスミドを用いた。

Table 1 本研究で使用した菌株

Name	Strain	Genotype	
<i>S. cerevisiae</i>			
Σ1278b 野生型株	Σ1278b	<i>MATa</i> prototroph	研究室所有
BY4741 野生型株	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> pRS416 pRS415- <i>CgHIS3-MET15</i>	研究室所有
Fba1-Myc-7His 発現株	BY4741 Myc-7His	Fba1- <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 FBA1-Myc-7His-kanMX6</i> pRS416 pRS415- <i>CgHIS3-MET15</i>	本研究
Eno1-HA 発現株	BY4741 Eno1-HA	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ENO1-HA-kanMX6</i> pRS416 pRS415- <i>CgHIS3-MET15</i>	本研究
Eno2-Myc-7His 発現株	BY4741 Myc-7His	Eno2- <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ENO2-Myc-7His-kanMX6</i> pRS416 pRS415- <i>CgHIS3-MET15</i>	本研究
Pfk1-Myc-7His 発現株	BY4741 Myc-7His	Pfk1- <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PFK1-Myc-7His-kanMX6</i> pRS416 pRS415- <i>CgHIS3-MET15</i>	本研究
Pfk2-Myc-7His 発現株	BY4741 Myc-7His	Pfk2- <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PFK2-Myc-7His-kanMX6</i> pRS416 pRS415- <i>CgHIS3-MET15</i>	本研究
Gpm1-Myc-7His 発現株	BY4741 Myc-7His	Gpm1- <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Gpm1-Myc-7His-kanMX6</i> pRS416 pRS415- <i>CgHIS3-MET15</i>	本研究
Cdc19-Myc-7His 発現株	BY4741 Myc-7His	Cdc19- <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 CDC19-Myc-7His-kanMX6</i> pRS416 pRS415- <i>CgHIS3-MET15</i>	本研究
Adh1-Myc-7His 発現株	BY4741 Myc-7His	Adh1- <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ADH1-Myc-7His-kanMX6</i> pRS416 pRS415- <i>CgHIS3-MET15</i>	本研究

Tdh1-5FLAG 発現株	BY4741 5FLAG	Tdh1-	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TDH1-5FLAG-kanMX6</i> pRS416 pRS415- <i>CgHIS3-MET15</i>	本研究
Tdh2-5FLAG 発現株	BY4741 5FLAG	Tdh2-	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TDH2-5FLAG-kanMX6</i> pRS416 pRS415- <i>CgHIS3-MET15</i>	本研究
Tdh3-5FLAG 発現株	BY4741 5FLAG	Tdh1-	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TDH3-5FLAG-kanMX6</i> pRS416 pRS415- <i>CgHIS3-MET15</i>	本研究
Fba1-TAP 融合株	BY4741 TAP	Fba1-	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 FBA1-TAP-kanMX4</i> pRS416 pAG415GPD- <i>ccdB</i> pRS313- <i>MET15</i>	本研究
Fba1(野生型)発現株	BY4741 <i>fba1Δ</i> Fba1(WT)-TAP		<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 fba1Δ::natNT2</i> pRS416- <i>FBA1(WT)-TAP</i> pAG415GPD- <i>ccdB</i> pRS313- <i>MET15</i>	本研究
Fba1 アミノ酸置換体 (Cys112Ser)発現株	BY4741 <i>fba1Δ</i> Fba1(Cys112Ser)- TAP		<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 fba1Δ::natNT2</i> pRS416- <i>FBA1(Cys112Ser)-TAP</i> pAG415GPD- <i>ccdB</i> pRS313- <i>MET15</i>	本研究
Fba1 アミノ酸置換体 (Cys158Ser)発現株	BY4741 <i>fba1Δ</i> Fba1(Cys158Ser)- TAP		<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 fba1Δ::natNT2</i> pRS416- <i>FBA1(Cys158Ser)-TAP</i> pAG415GPD- <i>ccdB</i> pRS313- <i>MET15</i>	本研究
Fba1 アミノ酸置換体 (Cys292Ser)発現株	BY4741 <i>fba1Δ</i> Fba1(Cys292Ser)- TAP		<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 fba1Δ::natNT2</i> pRS416- <i>FBA1(Cys292Ser)-TAP</i> pAG415GPD- <i>ccdB</i> pRS313- <i>MET15</i>	本研究
<i>E. coli</i>				
Fba1(野生型)精製用株	BL21(DE3) Fba1(WT)	F ⁻	<i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm(DE3)</i> pET55- <i>FBA1(WT)</i>	本研究

Fba1 アミノ酸置換体 (Cys112Ser)精製用株	BL21(DE3) Fba1(Cys112Ser)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm(DE3)pET55-FBA1 (Cys112Ser)</i>	本研究
Fba1 アミノ酸置換体 (Cys158Ser)精製用株	BL21(DE3) Fba1(Cys158Ser)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm(DE3)pET55-FBA1 (Cys158Ser)</i>	本研究
Fba1 アミノ酸置換体 (Cys292Ser)精製用株	BL21(DE3) Fba1(Cys292Ser)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm(DE3) pET55-FBA1 (Cys292Ser)</i>	本研究
Grx1 発現株	BL21(DE3) Grx1	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm(DE3)pQE2-GRX1</i>	本研究
Grx2(M35-Q143) 発現株	BL21(DE3) Grx2(Q35-Q143)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm(DE3)pQE2-GRX2(M35-Q143)</i>	本研究
Grx3 発現株	BL21(DE3) Grx3	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm(DE3)pQE2-GRX3</i>	本研究
Grx4 発現株	BL21(DE3) Grx4	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm(DE3)pQE2-GRX4</i>	本研究

Table 2 本研究で使用したプラスミド

Plasmid	Maker, Gene, Promoter, Terminator	Copy number	
<i>S. cerevisiae</i>			
pRS416	URA3, AmpR	Centromere	研究室所有
pRS415-CgHIS3-MET15	Leu2, CgHIS3, MET15, AmpR	Centromere	研究室所有
pRS313-MET15	HIS3, MET15, AmpR	Centromere	研究室所有
pAG415GPD- <i>ccdB</i>	Leu2, AmpR, P _{GAP-ccdB} -T _{CYC1}	Centromere	研究室所有
pRS416- <i>FBAI</i> (WT)-TAP	URA3, AmpR, P _{FBAI-FBAI} (WT)-TAP-T _{FBAI}	Centromere	本研究
pRS416- <i>FBAI</i> (Cys112Ser)-TAP	URA3, AmpR, P _{FBAI-FBAI} (Cys112Ser)-TAP-T _{FBAI}	Centromere	本研究
pRS416- <i>FBAI</i> (Cys158Ser)-TAP	URA3, AmpR, P _{FBAI-FBAI} (Cys158Ser)-TAP-T _{FBAI}	Centromere	本研究
pRS416- <i>FBAI</i> (Cys292Ser)-TAP	URA3, AmpR, P _{FBAI-FBAI} (Cys292Ser)-TAP-T _{FBAI}	Centromere	本研究
<i>E. coli</i>			
pET55- <i>FBAI</i> (WT)	AmpR, P _{T7-lac operator} -Strep-Tag II- <i>FBAI</i> (WT)-6×His-T _{T7}		本研究
pET55- <i>FBAI</i> (Cys112Ser)	AmpR, P _{T7-lac operator} -Strep-Tag II- <i>FBAI</i> (Cys112Ser)-6His-T _{T7}		本研究
pET55- <i>FBAI</i> (Cys158Ser)	AmpR, P _{T7-lac operator} -Strep-Tag II- <i>FBAI</i> (Cys158Ser)-6His-T _{T7}		本研究
pET55- <i>FBAI</i> (Cys292Ser)	AmpR, P _{T7-lac operator} -Strep-Tag II- <i>FBAI</i> (Cys292Ser)-6His-T _{T7}		本研究
pQE2- <i>GRX1</i>	AmpR, P _{T5-lac operator} -7His- <i>GRX1</i> -T _{rrnB_T1}		本研究
pQE2- <i>GRX2</i> (M35-Q143)	AmpR, P _{T5-lac operator} -7His- <i>GRX2</i> (M35-Q143)-T _{rrnB_T1}		本研究
pQE2- <i>GRX3</i>	AmpR, P _{T5-lac operator} -7His- <i>GRX3</i> -T _{rrnB_T1}		本研究
pQE2- <i>GRX4</i>	AmpR, P _{T5-lac operator} -7His- <i>GRX4</i> -T _{rrnB_T1}		本研究
For DNA sequence preparation			
pYM13	kanMX4, AmpR, TAP		研究室所有
pYM45	kanMX4, AmpR, HA		研究室所有
pYM46	kanMX4, AmpR, Myc-7His		研究室所有
pFA6a-5FLAG	kanMX6, AmpR, 5FLAG		研究室所有
pFA6a-natNT2	natNT2, AmpR		研究室所有

2-3. 培地

酵母の生育培地として、完全培地 YPD 培地、最少培地 SD 培地を使用した。液体培養を行う際は三角フラスコとシリコ栓もしくはアルミ箔栓、試験管とアルミキャップを用いて培養した。また、必要に応じて寒天粉末 (2%)、G418、nourseothricin、hygromycin を最終濃度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるようそれぞれ添加した。以下にそれぞれの培地の組成を示す。

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 ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0.5 %
Yeast nitrogen base w/o Amino acid and Ammonium sulfate	0.17 %

大腸菌の生育培地として、完全培地 LB 培地を使用した。液体培養を行う際は三角フラスコとシリコ栓もしくはアルミ箔栓、試験管とアルミキャップを用いて培養した。また、必要に応じて寒天粉末 (2%)、ampicillin、kanamycin、chloramphenicol を最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるようそれぞれ添加した。以下に培地の組成を示す。

LB 培地 (大腸菌用完全培地)

Yeast extract	0.5 %
Tryptone	1 %
NaCl	1 %

2-4. 酵母の形質転換

酵母細胞を 2 mL の適切な培地において 30 °C で前培養を行った。その後、適切な培地 5 mL に OD₆₀₀ = 0.15 となるように希釈して植菌し、OD₆₀₀ = 0.5 ~ 0.8 程度まで 30 °C で増殖させた。遠心分離により細胞を回収した後、滅菌水で洗浄・集菌を 2 度行い、続いて 0.1 M lithium acetate 50 μL で懸濁した。30 °C で 15 分間静置した後、Shared cod and herring sperm DNA (Roche, 100 °C で 5 分間熱処理した後、直ちに氷冷したもの) 13 μL と、プラスミドや PCR で増幅した遺伝子破壊用 DNA 断片を 40 μL 、1 M lithium acetate 36 μL 、さらに 50 % polyethylene glycol 4000 溶液 280 μL を

加え、混和した。30 °Cで 30 分間静置後、DMSO を終濃度 10 %となるように加え、混和した後、42 °C、20 分間インキュベーションした。遠心分離により細胞を回収した後、適切な培地に懸濁し、室温で 2 時間回復培養を行った。その後、選択寒天培地に塗布し、30 °Cで 2~3 日間培養した後、目的の形質転換体を得た。

2-5. DNA オリゴマー

本研究に用いた DNA オリゴマーの合成はファスマック社に依頼した。Table 3 にその名称と配列を記す。

Table 3 本研究で使したプライマー一覧

Primer name	Primer sequence (5'→3')
M13Fw_pRS_pAG_pDONR	CGTTGTAACGACGGCCAG
M13Rv_pRS_pAG_pDONR	CAGGAAACAGCTATGACCATG
Pfk1_int_S1S2_Fw	TTAAAGTTGAGAGCTGAGGTAGCCGCTTTAGCCGCTGAAAACAAACGTACGCTGCAGGTCGAC
Pfk1_int_S1S2_Rv	TTTACCTCCTTTTGCTTAACTTAACTTTTCATTGCAATCATTCAATCGATGAATTCGAGCTCG
Pfk2_int_S1S2_Fw	ACCAGACTCATTGCTGACCATTTGGTTGGAAGAAAGAGAGTTGATCGTACGCTGCAGGTCGAC
Pfk2_int_S1S2_Rv	TTGACATTAATAATAGAAAGTGTAATAAAAGGTCATTTTCTTTTAATCGATGAATTCGAGCTCG
Pyk2_int_S1S2_Fw	GGCCATTCCAATACCTTACGCATTTCTACTGTTGGTCAAGAATTCCGTACGCTGCAGGTCGAC
Pyk2_int_S1S2_Rv	TTAAATAAAATTAAGTAAAAAAATAAGGACTTTAATTTTTACTAATCGATGAATTCGAGCTCG
Cdc19_int_S1S2_Fw	AAGGCCGGTGCTGGTCACTCCAACACTTTGCAAGTCTCTACCGTTCGTACGCTGCAGGTCGAC
Cdc19_int_S1S2_Rv	AATTCAAAAAATAATATCTTCATTCAATCATGATTCTTTTTTTAATCGATGAATTCGAGCTCG
ENO1-S1 Fw	AACGCTGTTTTTCGCTGGTGAAAACCTCCACCACGGTGACAAATTACGTACGCTGCAGGTCGAC
ENO1-S2 Rv	AAAAAACGTGTTTTTTGGACTAGAAGGCTTAATCAAAGCTTTAATCGATGAATTCGAGCTCG
ENO2-S1 Fw	AAGGCTGTCTACGCCGGTGAAAACCTCCACCACGGTGACAAGTTGCGTACGCTGCAGGTCGAC
ENO2-S2 Rv	AAAATAAGCAGAAAAGACTAATAATTCTTAGTTAAAAGCACTTTAATCGATGAATTCGAGCTCG
GPM1-S1 Fw	GCTGCCGCTGCTGGTGCCGCTGCTGTTGCCAACCAAGGTAAGAAACGTACGCTGCAGGTCGAC
GPM1-S2 Rv	ATGGAGGGAAAAGAAATCATCAAATCATTATTCTTCAGACTTAATCGATGAATTCGAGCTCG
TDH1-F2-Fw	CGCCAGAGTTGTTGACTTGATCGAATATGTTGCCAAGGCTcggatccccgggtaattaa

TDH1-S2-Rv	CAAAAAAAAAATCATTATCCTCATCAAGATTGCTTTATTTAatcgatgaattcgagctcg
TDH2-F2-Fw	TACCAGAGTTGTTCGACTTGGTTGAACACGTTGCCAAGGCTcggatccccgggtaattaa
TDH2-S2-Rv	AAAAACTAAATCATTAAAGTAACTTAAGGAGTTAAATTTAatcgatgaattcgagctcg
TDH3-F2-Fw	TACCAGAGTTGTTCGACTTGGTTGAACACGTTGCCAAGGCTcggatccccgggtaattaa
TDH3-S2-Rv	AAAATTTATTTAAATGCAAGATTTAAAGTAAATTCACTTAatcgatgaattcgagctcg
Fba1_dis_S1_Fw	CTTTTTCTTTTGTTCATATATAACCATAACCAAGTAATACATATTCAAACGTACGCTGCAGGTCGAC
Fba1_dis_S2_Rv	GATTCAATACTCATTAAAAAACTATATCAATTAATTTGAATTAACATCGATGAATTCGAGCTCG
Fba1-TAP_pRS416_inf_Fw	CGGGCCCCCCTCGACTGGTAGAGAGCGACTTTGTATGC
Fba1-TAP_pRS416_inf_Rv	CGGGCTGCAGGAATTAACGTGAGTCTTTTCCTTACCCATG
Fba1-TAP_C112S_Fw	CTGACCACTcTGCCAAGAAG
Fba1-TAP_C112S_Rv	CTTCTTGGCAgAGTGGTCAG
Fba1-TAP_C158S_Fw	CATCTCTACTTcTGTC AAGTACTTCAAG
Fba1-TAP_C158S_Rv	CTTGAAGTACTTGACA gAAGTAGAGATG
Fba1-TAP_C292S_Fw	CTTGGACACTGACTcTCAATACG
Fba1-TAP_C292S_Rv	CGTATTGAgAGTCAGTGTCCAAG
Fba1_promoter-495bp_seq_Fw	CATTACGTAAATAATGATAGGAATGG
pYM13-TAP-kanMX4_seq_Rv	CCTGACCTACAGGAAAGAGTTACTC
FBA1 RT-PCR Fw	TGCTTCCATCAAGGGTGCTA
FBA1 RT-PCR Rv	CTTCTTGGCACAGTGGTCAG
FBA1624-643 Fw	GGCTTTGCACCCAATCTCTC

Grx1_pQE2-NotI_Fw	GGAGCTCATGCGGCCATGGTATCTCAAGAACTATCAAGC
Grx1_pQE2-HindIII_Rv	TCAGCTAATTAAGCTTTAATTTGCAAGAATAGGTTCTAACAATTC
Grx2_pQE2-NotI_Fw	GGAGCTCATGCGGCCATGGTATCCCAGGAAACAGTTG
Grx2_pQE2-HindIII_Rv	TCAGCTAATTAAGCTCTATTGAAATACCGGCTTCAATATT
Grx3_pQE2-NotI_Fw	GGAGCTCATGCGGCCATGCCTGTTATTGAAATTAACGATC
Grx3_pQE2-HindIII_Rv	TCAGCTAATTAAGCTTTAAGATTGGAGAGCATGCTGC
Grx4_pQE2-NotI_Fw	GGAGCTCATGCGGCCATGACTGTGGTTGAAATAAAAAGCC
Grx4_pQE2-HindIII_Rv	TCAGCTAATTAAGCTTTACTGTAGAGCATGTTGGAAATAT
pQE2-NotI-HindIII_infus_Fw	AGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACT
pQE2-NotI-HindIII_infus_Rv	GGCCGCATGAGCTCCC

2-6. タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度の測定は Bradford 法、BCA 法にて行った。Bradford 法には Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentration (Bio-Rad) を用い、5 倍希釈したもの 1 mL にタンパク質溶液 20 μ L を添加し、室温で 10 分間反応させた。反応液の 595 nm の吸光度を分光光度計 (U-1100, 日立製作所) により測定した。検量線は、牛血清アルブミン (BSA) の標準タンパク質濃度溶液 (0.1、0.2、0.3、0.4 mg/mL) を用いて作製した。BCA 法には Protein Assay BCA kit (ナカライテスク) を用い、BCA kit solution A と BCA kit solution B を 50 : 1 で混合したものの 700 μ L にタンパク質溶液を 35 μ L を添加し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。反応液の 562 nm の吸光度を分光光度計により測定した。検量線は BSA の標準タンパク質濃度溶液 (0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL) を用いて作製した。

2-7. 酵母抽出液の NO ドナー処理

酵母細胞を SD 培地で 2 日間前培養した後、SD (pH 6.0) 培地で OD=0.9 ~ 1.1 まで培養した。遠心により菌体を回収した後、MilliQ で洗浄を 2 度行い、Lysis buffer (25 mM HEPES-Na (pH 7.5)、50 mM NaCl、1 % NP-40、0.5 mM PMSF) に再懸濁し、プロテアーゼインヒビターカクテル (PIC) (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 (安井器械) を用いて破碎した。4 $^{\circ}$ C で遠心分離を行った後、上清を回収し、タンパク質濃度を測定した。続いて、タンパク質濃度が 8 μ g/ μ L となるように HEN buffer (100 mM HEPES-Na (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine) と混合した。その後、最終濃度 2 mM になるように *S*-nitrosoglutathione (GSNO) (同人化学研究所) を加え、37 $^{\circ}$ C で 3 時間処理した。

2-8. 酵母細胞の NO ストレス処理

酵母細胞は SD 培地で 2 日間前培養した後、SD (pH 4.0) 培地で OD=0.9 ~ 1.1 まで培養した。最終濃度 1 mM となるようにフィルター滅菌した NaNO₂ 溶液を加え、30 $^{\circ}$ C で 1 時間処理した (酸性 NaNO₂ 処理)。処理後、遠心分離により細胞を回収した。

2-9. SNO 化タンパク質の網羅的解析

2-9-1. 細胞抽出液を用いた SNO 化タンパク質の解析

GSNO 処理を行った細胞抽出液に SDS , *N*-methylmaleimide をそれぞれ最終濃度 1.8 % , 0.15 % になるように加え、50 °C で 20 分間反応させた。室温まで冷却した後、acetone (-30 °C) を 3 倍量加え、-30 °C で 30 分間静置した。遠心分離により上清を除いた後、70 % acetone で 4 回洗浄し、HENS buffer (100 mM HEPES-Na (pH 8.0) , 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine, 2 % SDS) に再懸濁した。N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2-pyridyldithio)propionamide (Biotin-HPDP) (DOJINDO)、CuCl₂、L-ascorbic acid sodium salt を、それぞれ最終濃度 0.761 mM、0.082 mM、47.9 mM になるように加え、遮光して室温で 3 時間反応させた。続いて、acetone (-30 °C) を 3 倍量加え、-30 °C で 30 分間静置した。遠心分離により上清を除いた後、70% acetone で洗浄し、Neutralization buffer (25 mM HEPES-Na (pH 7.0) , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 % Triton X-100) と HENS_{/10} buffer (10 mM HEPES-Na (pH 8.0) , 0.1 mM EDTA, 0.01 mM neocuproine, 2 % SDS) を 3 : 1 で混合した N3H1 buffer に再懸濁した。N3H1 buffer で希釈し、サンプル間でタンパク質濃度が同一になるよう調整した。上清のタンパク質の一部を 2×SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) sample buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 6.8) , 4 % SDS, 20 % (wt/vol) Glycerol, 0.1 % bromophenol blue, 10 % 2-mercaptoethanol) と 1 : 1 で混合しウェスタンブロット用サンプルとした。上清の残りを N3H1 buffer で平衡化したアビジン結合樹脂 PierceTM NeutrAvidin UltraLink Resin (Thermo Fisher Scientific) と混和し、4°C で 18 時間反応させた。Wash buffer (25 mM HEPES-Na (pH 7.0) , 600 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 % Triton X-100) で 4 回洗浄を行った後、HEN_{/10} buffer と 2×SDS-PAGE sample buffer を 1:1 で混合した buffer にアビジン樹脂を懸濁した。100 °C で 5 分間静置し、アビジン樹脂に結合したビオチン化タンパク質を溶出した。

2-9-2. SNO 化タンパク質の同定

溶出液を SDS-PAGE および Flamingo ゲル染色に供し、LC-MS/MS 解析によりゲルに含まれるタンパク質の同定を試みた。まず、ゲルを dithiothreitol, iodoacetamide および trypsin で処理し、Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) を用いて LC-MS/MS 解析を行った。データベース検索は Proteome Discover 1.4

(Thermo Fisher Scientific) と *Saccharomyces cerevisiae* database (NCBI) を用いて行った。また、以下の修飾についても検出した。Acetyl/+42.011 Da (N-Terminus)、Oxidation/+15.995 Da (Methionine) , Carbamidomethyl /+57.021 Da (Cys)

2-9-3. 酵母細胞を用いた SNO 化タンパク質の解析

NO 処理した酵母細胞を Lysis buffer に再懸濁し、PIC 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を用いて破碎した。0 °C で遠心分離を行った後、上清を回収し、タンパク質濃度を測定した。サンプルに SDS, *N*-methylmaleimide をそれぞれ最終濃度 1.8 %, 0.15 % になるように加え、50 °C で 20 分間反応させた。室温まで冷却した後、acetone (-30 °C) を 3 倍量加え、-30 °C で 30 分間静置した。遠心分離により上清を除いた後、70 % Acetone で 4 回洗浄し、HENS buffer に再懸濁した。N-(Biotinoyl)-N''-(Iodoacetyl) Ethylenediamine (Iodoacetyl-Biotin) (ANASPEC)、CuCl₂、L-ascorbic acid sodium salt を、それぞれ最終濃度 0.761 mM、0.082 mM、47.9 mM になるように加え、遮光して室温で 3 時間反応させた。続いて、acetone (-30 °C) を 3 倍量加え、-30 °C で 30 分間静置した。遠心分離により上清を除いた後、70% acetone で洗浄し、HENS₁₀ buffer に再懸濁した。サンプル間でタンパク質濃度が同一になるよう調整した。2×SDS-PAGE sample buffer と 1:1 で混合し、100 °C で 5 分間静置した。

2-10. SGT 化タンパク質の検出

NO 処理した酵母細胞を RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6)、150 mM NaCl、1 % Triton X-114、0.5 % sodium deoxycholate、0.1 % SDS) に再懸濁し、PIC 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を用いて破碎した。0 °C で遠心分離を行った後、上清を回収し、タンパク質濃度を測定した。サンプル間でタンパク質濃度が同一になるよう調整した。2-mercaptethanol を含まない 2×SDS-PAGE sample buffer と 1:1 で混合し、37 °C で 40 分間静置した。

2-11. 免疫沈降法

酵母細胞を SD (pH 4.0) 培地で 2 日間前培養した後、SD (pH 4.0) 培

地で OD₆₀₀=0.9~1.1 まで培養した。最終濃度 1 mM となるようにフィルター滅菌した NaNO₂ 溶液を加え、30 °C で 1 時間処理した。処理後、MilliQ で洗浄・集菌を 2 度行い、RIPA buffer に再懸濁し、PIC 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を用いて破碎した。0 °C で遠心分離を行った後、上清を回収し、タンパク質濃度を測定した。その後、サンプルをあらかじめ RIPA buffer で平衡化した 10 µL の抗タグ抗体結合樹脂 anti-c-Myc magnetic beads (88842, Thermo Fisher scientific)、もしくは anti-HA magnetic beads (M132-11, Medical & Biological Laboratory) と混和し、30 分間、4 °C でインキュベーションした。5FLAG タグまたは TAP タグ融合型タンパク質の免疫沈降には、anti-FLAG antibody (抗 FLAG 抗体) (F1804, Sigma)、または anti-calmodulin binding protein-tag antibody (抗 CBP 抗体) (PM071, Medical & Biological Laboratory) を結合させた Protein G Mag Sepharose (28951379, Cytiva) を抗タグ抗体結合樹脂として用いた。1 mL の RIPA buffer で 4 回洗浄し、樹脂に結合したタンパク質を 2-mercaptoethanol を含まない 2×SDS-PAGE sample buffer と 1:1 で混合した。37 °C で 40 分間静置し、抗タグ抗体結合樹脂に結合したタンパク質を溶出した。

2-12. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびウェスタンブロット解析

調製したサンプルを SDS-PAGE に供した後、固定液 (40% ethanol, 10% acetate) で、室温で 2 時間処理してタンパク質を固定した。続いて、FlamingoTM Fluorescent Gel Stain (Flamingo) (Bio-Rad) を用いた全タンパク質の検出を行った。ウェスタンブロット用のサンプルは、SDS-PAGE 後、タンパク質を Immobilon-P transfer membranes (Merck Millipore) へ転写した。メンブレンを 3% スキムミルクと室温で 30 分間反応させ、ブロッキングした。後述する抗 glutathione 抗体によるウェスタンブロットを行うメンブレンは Blocking One (ナカライ) を用いてブロッキングした。ビオチン化タンパク質の解析には anti-biotin antibody (抗 Biotin 化抗体) (Z021, Invitrogen)、anti-3-phosphoglycerate kinase antibody (抗 Pgk1 抗体) (22C5D8, Invitrogen)、SGT 化タンパク質の解析には anti-glutathione antibody (抗 glutathione 抗体) (101-A, Virogen)、anti-β-actin antibody (抗 β-actin 抗体) (8F-10-G10, abcam)、anti-HA-probe antibody (抗 HA 抗体)

(F-7, Santa Cruz Biotechnology)、抗 FLAG 抗体、anti-c-Myc antibody (抗 Myc 抗体) (9E10, Santa Cruz Biotechnology)、anti-Histidine-tagged protein (抗 His 抗体) (OB05, Calbiochem) 抗 CBP 抗体をそれぞれ一次抗体として使用した。二次抗体として、抗 mouse 抗体 (W4021, Promega)、抗 rabbit 抗体 (7074S, Cell signaling) を適宜使用した。Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher scientific) を用いて標的タンパク質を検出した。

2-13. タンパク質の二次元電気泳動

タンパク質の二次元電気泳動による解析を行うため、BS 法の溶出液に acetone (-30°C) を 3 倍量加え、-30°C で 30 分間インキュベーションした。遠心により上清を除いた後、70% acetone で洗浄を行い、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、0.01 % PIC) に溶解し、1 M Iodoacetamide をサンプルの 1/10 量になるように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 3-10 (ATTO) を用い、二次元目には e-PAGEL 電気泳動用既製ゲル 12.5 % (ATTO) を使用した。電気泳動後、タンパク質を固定液で固定し、Flamingo 染色に供した。

2-14. 各 Fba1 と各 Grx の精製

各組換えタンパク質発現用プラスミドを導入した大腸菌 BL21(DE3)株の形質転換体を LB 培地で 1 晩前培養した。その後、LB 培地で OD₆₀₀ が 0.6 になるまで 37 °C で培養した。培養液を 18 °C まで冷却した後、IPTG を終濃度 1 mM となるように添加し、タンパク質の発現誘導を 18 時間行った。遠心分離により回収および洗浄した細胞を Buffer A (20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 500 mM NaCl) に懸濁し、超音波破碎機 Sonifier 450 (BRANSON) を用いて細胞を破碎した。破碎液を 5,800×g で 10 分間遠心分離後、上清を 0.20 μm のフィルターで濾過し、粗酵素液とした。

粗酵素液を Buffer A で平衡化した Ni 結合樹脂 Ni Sepharose 6 Fast Flow (17531801, GE Healthcare Bio-Science) にアプライし、His-tag 融合型タンパク質を吸着させ、80 mM imidazole を含む Buffer A (pH 7.4) により夾雑タンパク質を洗い流した。その後、500 mM imidazole を含む Buffer

A(pH 7.4)により目的タンパク質を溶出した。その後、精製 Fba1 は Amicon Ultra 30kDa membrane (Merck Millipore) を、精製 Grx1, Grx2, Grx3, Grx4 は Amicon Ultra 10kDa membrane (Merck Millipore) をそれぞれ用いて、PBS buffer (8.1 mM Na₂HPO₄, 14.7 mM KH₂PO₄ (pH 7.4), 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl) にバッファー交換した。各 Grx に関しては 5 mM DTT で還元処理した後、再度 PBS buffer にバッファー交換して、以降の解析に用いた。

2-15. 組換え Fba1 の SNO 化、SGT 化の誘導

SGT 化処理は2-13 で調製した Fba1 に終濃度がそれぞれ 2 mM となるように diamide、glutathione を添加し、37 °C で 30 分間反応させた。SNO 化処理は Fba1 に終濃度が 100 μM となるように NOC9 を添加し、37 °C で 30 分間反応させた。各処理を行った後、Amicon Ultra 30kDa membrane を用いて PBS buffer にバッファー交換した。その後、Bradford 法によりタンパク質濃度を測定した。

SGT 化修飾は抗 GSH 抗体を用いたウェスタンブロットにより確認した。2-mercaptoethanol で SGT 化修飾を還元した後、MeOH と混合し除タンパクした。凍結乾燥した後、buffer に再懸濁してアミノ酸アナライザー (JLC-500/V2, 日本電子) に供して遊離の glutathione 量から SGT 化 Fba1 量を定量した。

SNO 化修飾は BS 処理した後、抗 Biotin 化抗体を用いたウェスタンブロットにより確認した。

2-16. Grx による SGT 化 Fba1 の脱 SGT 化

Grx を用いた脱 SGT 化処理は SGT 化処理した Fba1 にモル濃度が 1.5 倍になるように各 Grx を添加し、37 °C で 30 分間反応させた。

2-17. Fba1 の酵素活性の測定

Fba1 の aldolase 反応は、50 mM Tris-HCl(pH 7.5) および 1.5 mM NAD⁺、30 μM ZnCl₂、12 U/mL TPI (Sigma)、2 U/mL GAPDH (Sigma)、0.5 mM FBP (CAYMAN Chemical)、10 μg Fba1 を含む溶液組成で室温にて行った¹⁰⁶⁻¹⁰⁸。分光光度計 (DU-800, Beckman Coulter) を用いて NADH に由来する 340 nm の吸光度 (モル吸光係数 $\epsilon=6300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) の増加を経時的に

1 分間測定し、反応初速度を求めた。1 分間に 1 μmol の NADH を生成する酵素量を 1 U として定義し、Fba1 量で標準化した。

2-18. 代謝産物の測定

2-8 のように酸性 NaNO_2 処理した酵母細胞を速やかに洗浄、回収し、液体窒素で瞬間凍結した。MeOH ($-80\text{ }^\circ\text{C}$) に懸濁し、ビーズ破碎した。遠心分離により上清を回収した後、凍結乾燥した。ペレットを 4 % SDS を含む PBS に懸濁した後、タンパク質濃度を BCA assay により測定し、細胞タンパク質濃度とした。凍結乾燥させたサンプルを 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) に溶解し、以下の酵素法により FBP, 6-phosphogluconate (6PG) および NADPH の濃度を測定した。

FBP は大腸菌から精製した組換え Fba1 を用いて、2-17 に記載した方法で活性を測定した。測定ごとに既知濃度の FBP と精製 Fba1 を用いて検量線を作製した。検量線を用いて Fba1 の反応初速度から FBP 量を算出し、細胞タンパク質濃度で標準化した。

6PG は 6-Phosphogluconic Acid Colorimetric Assay Kit (BioVision) を用いて測定した。酵母細胞由来サンプル 50 μL と Kit reaction solution を混合し、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ で 1 時間反応させた。マイクロプレートリーダー TriStar2 LB942 (BERTHOLD) を用いて反応液の 450 nm の吸光度を測定した。測定ごとに 6PG standard を用いて検量線を作製した。検量線から 6PG 量を算出し、細胞タンパク質濃度で標準化した。

NADPH は NADP/NADPH Quantification Colorimetric Kit (BioVision) を用いて測定した。まず、酵母細胞由来サンプルを $60\text{ }^\circ\text{C}$ で 30 分間反応させ、 NADP^+ を分解した。その後、50 μL と Kit reaction solution を混合し、室温で 2 時間反応させた。マイクロプレートリーダーを用いて反応液の 450 nm の吸光度を測定した。測定ごとに NADPH standard を用いて検量線を作製した。検量線から NADPH 量を算出し、細胞タンパク質濃度で標準化した。

2-19. 細胞生存率の測定

各酵母細胞を SD 培地で 2 日間前培養した。その後、SD 培地 (pH 4.0) で $\text{OD}=0.9\sim 1.1$ まで $30\text{ }^\circ\text{C}$ で培養した。最終濃度 0.5 mM となるようにフ

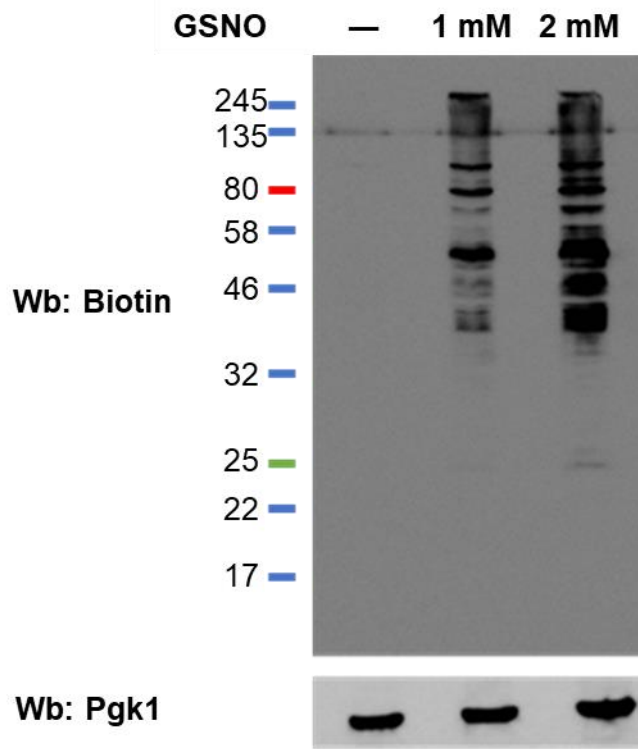
フィルター滅菌した NaNO_2 溶液を加え、NO ストレス処理した。ストレス処理後の細胞を希釈し、SD プレートに塗布した。30 °C で培養し、ストレス未処理の細胞のコロニー数を 100 % として、ストレス処理後のコロニー数を算出し、各処理時間における細胞の生存率とした。

3. 結果

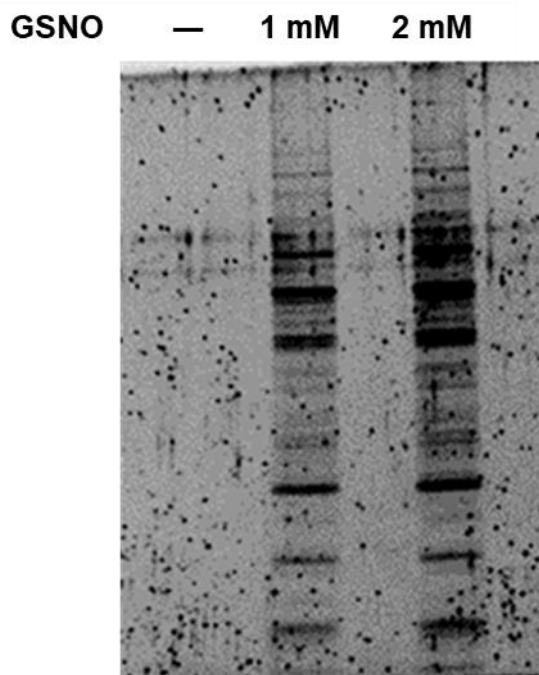
3-1. NO 処理したタンパク質抽出液を用いた SNO 化タンパク質の網羅的解析

まず、酵母の野生型株から抽出したタンパク質を NO ドナーである GSNO で処理し、Biotin-HPDP を用いた BS 法により解析した。ビオチン化処理を行ったサンプルについて、抗 Biotin 抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した結果、GSNO 処理濃度依存的にビオチン化シグナルが上昇した (Figure 7A)。続いて、ビオチン化したサンプルについて、Neutravidin 結合樹脂を用いたプルダウンに供し、溶出液を SDS-PAGE または二次元電気泳動にて解析した。その結果、GSNO 処理条件において、より多数のタンパク質のバンド、スポットが検出された (Figure 7B, 7C)。

A



B



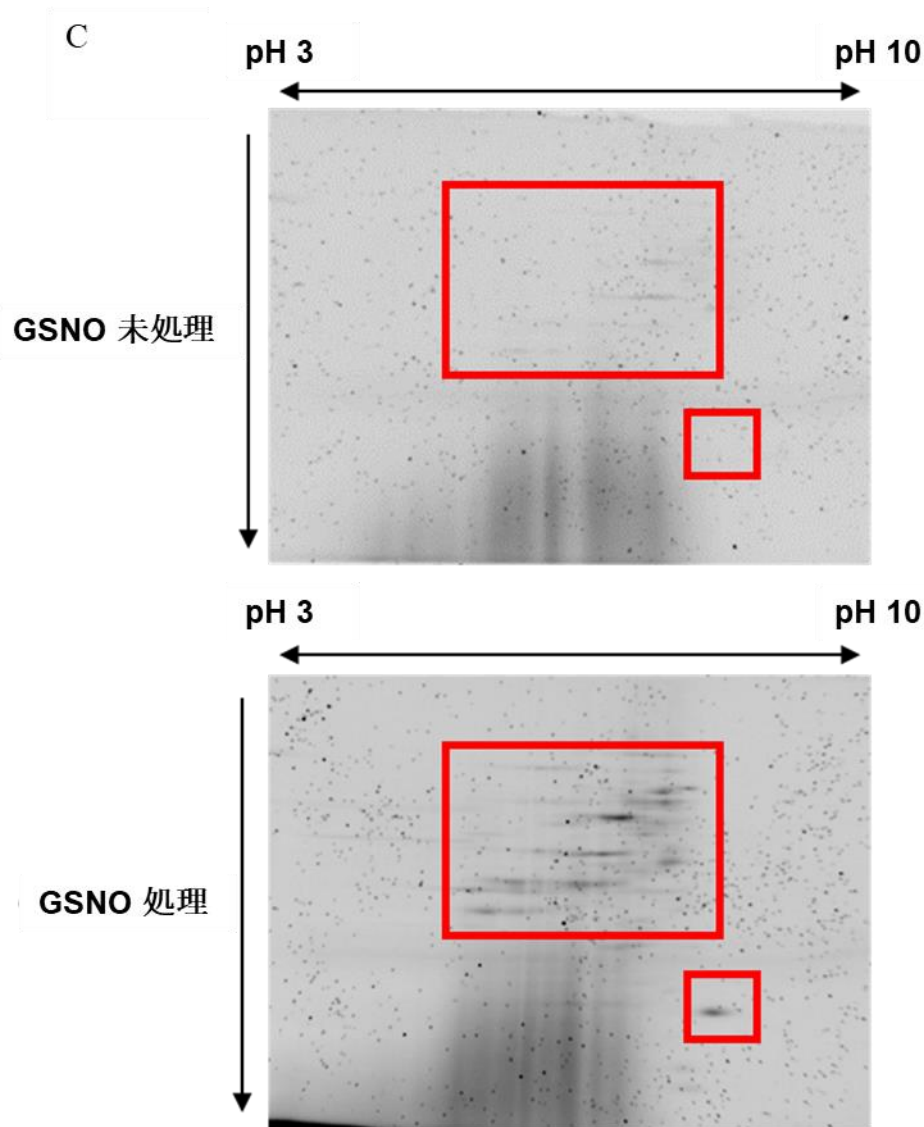


Figure 7 NO 処理したタンパク質抽出液からの SNO 化タンパク質の検出 SD 培地で培養した酵母の野生型株から抽出したタンパク質を GSNO 処理し、Biotin-HPDP を用いた BS 法に供した。(A) ビオチン化したサンプルについて、抗ビオチン抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。ローディングコントロールとして、Pgk1 を用いた。(B, C) Neutravidin 結合樹脂を用いたプルダウンアッセイに供し、(B) SDS-PAGE、または (C) 二次元電気泳動により解析した。タンパク質は Flamingo 染色により可視化した。

一方、プルダウンアッセイにより得られた溶出液に含まれるタンパク質を LC-MS/MS により同定した (Table 4)。その結果、GSNO 処理サンプルにおいて多数のタンパク質を同定できた。解糖系の酵素である Fba1, Tdh3, Cdc19, ペントースリン酸回路の酵素である Gnd1 がそれぞれ同定された。また、actin Act1 やエタノール生産に関与する pyruvate

decarboxylase Pdc1、alcohol dehydrogenase Adh1、アミノ酸合成に関与する acetohydroxyacid reductoisomerase Ilv5、serine hydroxymethyltransferase Shm2、S-adenosylmethionine synthetase Sam2 が同定された。解糖系に関与するタンパク質が多く同定されたことから、解糖系の酵素が NO により SNO 化されることが示唆された。

Table 4 GSNO 処理したタンパク質抽出液から同定した SNO 化タンパク質候補

Gene	Protein	Function	Coverage	Score
<i>FBA1</i>	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	Glycolysis	56 %	1125
<i>TDH3</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis	60 %	1000
<i>CDC19</i>	Pyruvate kinase	Glycolysis	79 %	1843
<i>GND1</i>	6-Phosphogluconate dehydrogenase	Pentose phosphate pathway	52 %	916
<i>ACT1</i>	Actin	Structural protein	58 %	616
<i>PDC1</i>	Pyruvate decarboxylase	Ethanol biosynthesis	40 %	1441
<i>ADH1</i>	Alcohol dehydrogenase	Ethanol biosynthesis	59 %	1233
<i>ILV5</i>	Acetohydroxyacid reductoisomerase	Amino acid biosynthesis	60 %	786
<i>SHM2</i>	Serine hydroxymethyltransferase	Amino acid biosynthesis	43 %	714
<i>SAM2</i>	S-adenosylmethionine synthetase	Amino acid biosynthesis	51 %	966

Significance threshold p を 0.05 未満として同定されたタンパク質のうち、スコア上位 10 位を抜粋し、タンパク質の機能ごとに分類した。

3-2. NO ストレス条件下における細胞内 SNO 化タンパク質の解析

細胞から抽出したタンパク質の SNO 化が示唆されたことから、次に、NO ストレスで処理した酵母細胞内で SNO 化されるタンパク質を解析した。酸性 NaNO_2 で処理した酵母細胞からタンパク質を抽出し、Iodoacetyl-Biotin を用いた BS 法によりビオチン化した後、抗 Biotin 抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。NO ドナー処理した細胞抽出液をポジティブコントロールとして用いたところ、明確なビオチン化シグナルが検出された。一方、NO 処理した酵母細胞から抽出したサンプルのビオチン化シグナルは、極めて軽微であった (Figure 8)。この結果から、NO ストレス処理を行った酵母細胞内では、SNO 化タンパク質はほとんど存在しないことが示唆された。

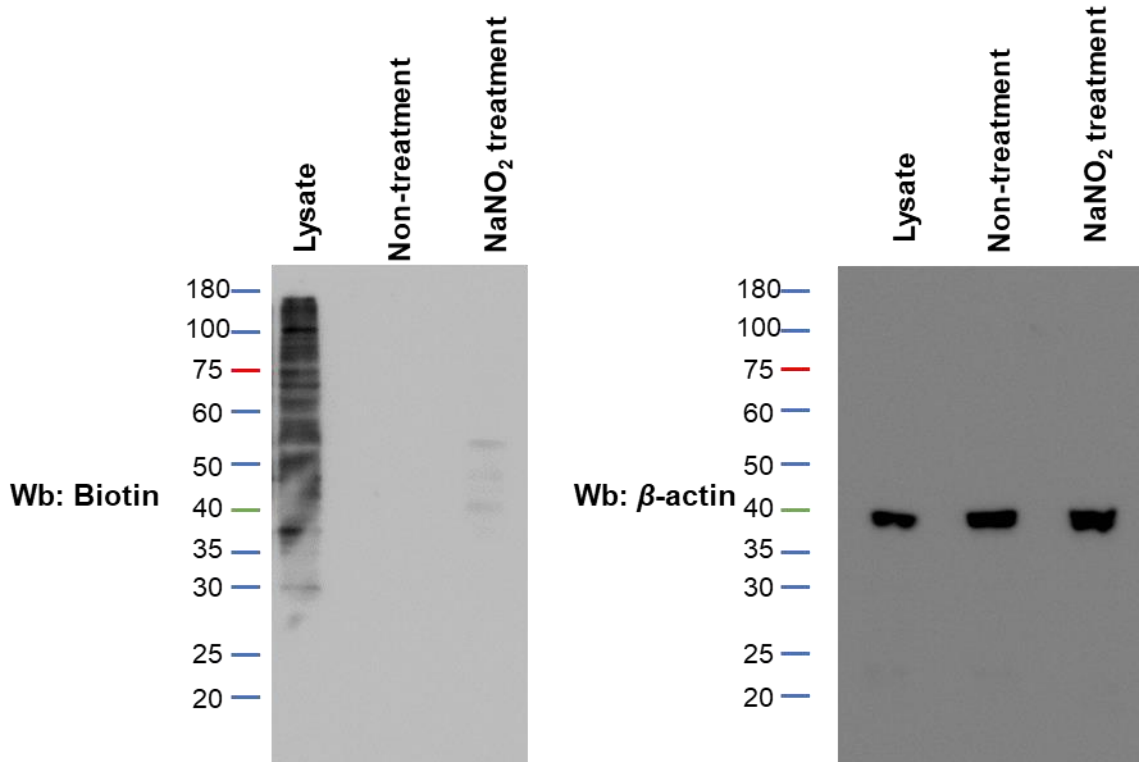


Figure 8 酸性 NaNO_2 処理した酵母細胞における SNO 化タンパク質の検出 SD (pH 4.0) 培地で培養した BY4741 株を NaNO_2 処理し、抽出したタンパク質について、抗 Biotin 抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。ローディングコントロールとして、 β -actin を用いた。

3-3. SGT 化タンパク質の検出

上記の解析から、タンパク質抽出液を NO 処理したサンプルからは多くの SNO 化タンパク質が同定されたのに対し、NO 処理した細胞からは SNO 化タンパク質が検出されなかった。哺乳類のタンパク質においては、SNO 化修飾から SGT 化修飾への置換を示唆する報告があること⁵⁶、酵母細胞内には高濃度の glutathione が蓄積していることから、酵母細胞内においても SNO 化修飾から SGT 化修飾へと置換される反応が起きる可能性を考え、これを検証した。酸性 NaNO_2 処理した細胞からタンパク質抽出液を調製し、抗 glutathione 抗体を用いたウェスタンブロット解析に供した。その結果、酸性 NaNO_2 処理依存的に SGT 化シグナルの増加が確認された (Figure 9)。このことから、酵母細胞において NO 処理によってタンパク質の SGT 化修飾レベルが上昇することが示された。

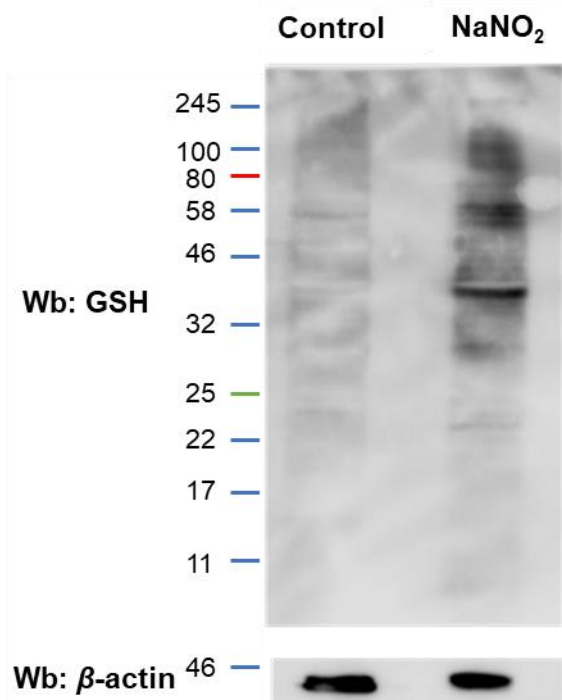
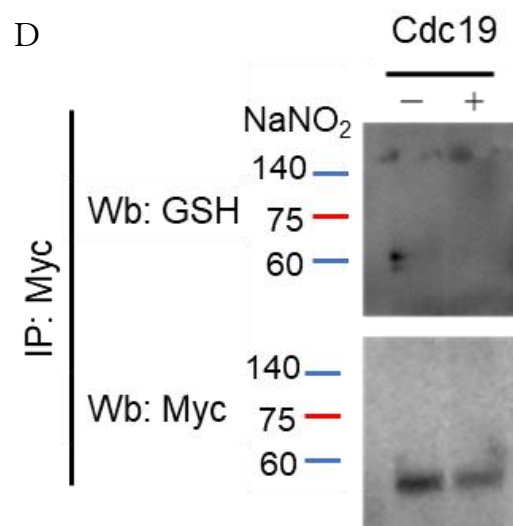
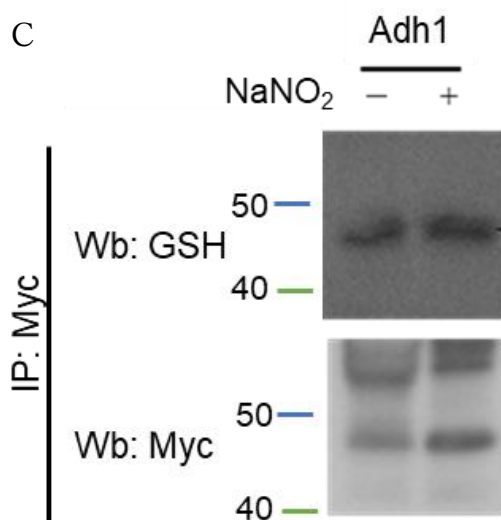
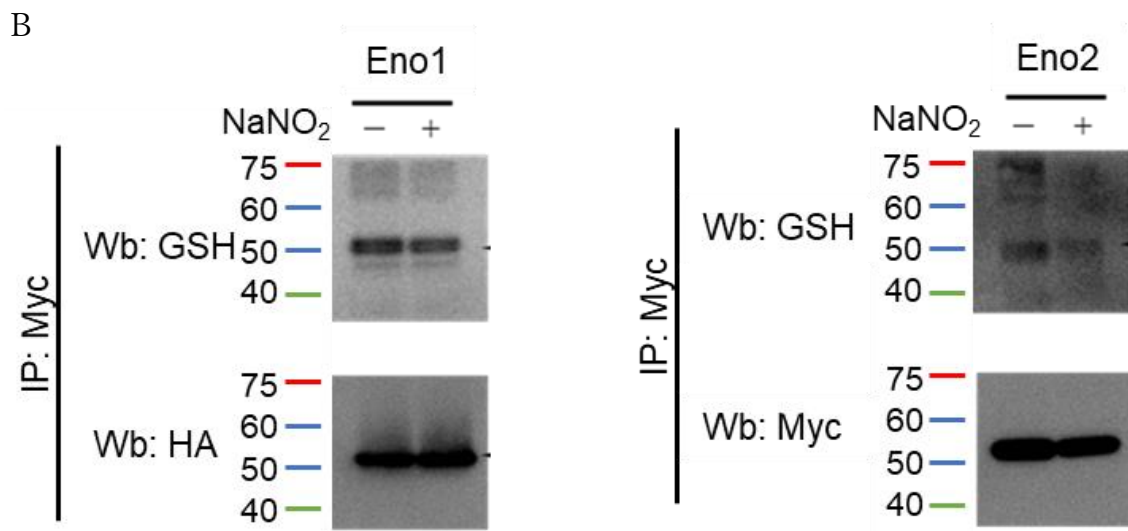
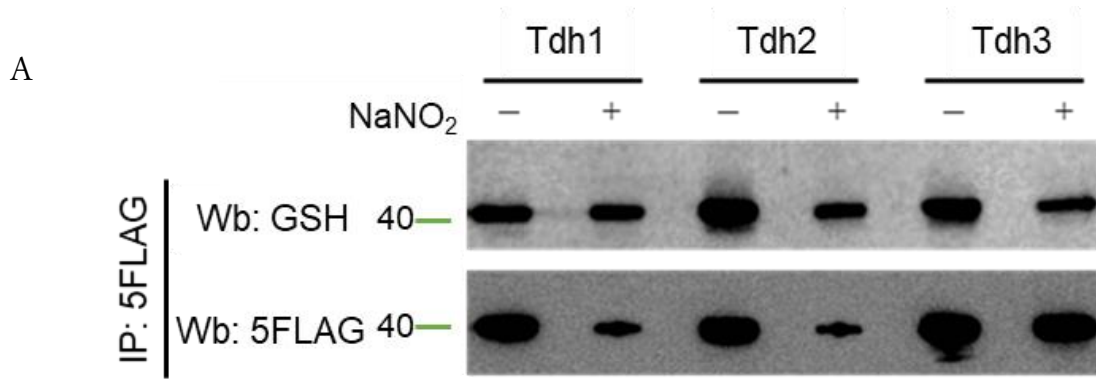


Figure 9 酸性 NaNO₂ 処理した酵母抽出液における SGT 化タンパク質の検出 SD (pH 4.0) 培地で培養した BY4741 (野生型株) を NaNO₂ 処理し、抽出したタンパク質について、抗 glutathione 抗体によるウェスタンブロットにより解析した。ローディングコントロールとして、β-actin を用いた。

3-4. 解糖系酵素の SGT 化の検出

3-1 で SNO 化タンパク質候補として同定した解糖系酵素が、酸性 NaNO₂ 処理した酵母細胞内で SGT 化されるとの仮説を立て、各酵素の SGT 化修飾を免疫沈降およびウェスタンブロットにて解析した。解析対象として、Fba1, Pfk1, Pfk2, Cdc19, Tdh1, Tdh2, Tdh3, Eno1, Eno2, Adh1, Gpm1 を選抜した。酸性 NaNO₂ 処理した細胞から免疫沈降により標的酵素を単離し、抗 glutathione 抗体を用いたウェスタンブロット解析に供した。その結果、Tdh1, Tdh2, Tdh3, Eno1, Eno2, Adh1 (Figure 10A, B, C) では、NO 処理の有無に関わらず SGT 化シグナルが検出され、NO 処理によるシグナルの増加は見られなかった。また、Cdc19, Pfk1, Pfk2, Gpm1 (Figure 10D, E, F) については、酸性 NaNO₂ 処理の有無に関わらず、SGT 化シグナルは検出されなかった。興味深いことに、Fba1 については酸性 NaNO₂ 処理依存的に SGT 化シグナルが増加した (Figure 10G)。これらの結果から、酵母細胞内では NO ストレスに応答して Fba1 が SGT 化修飾を受けることが示された。



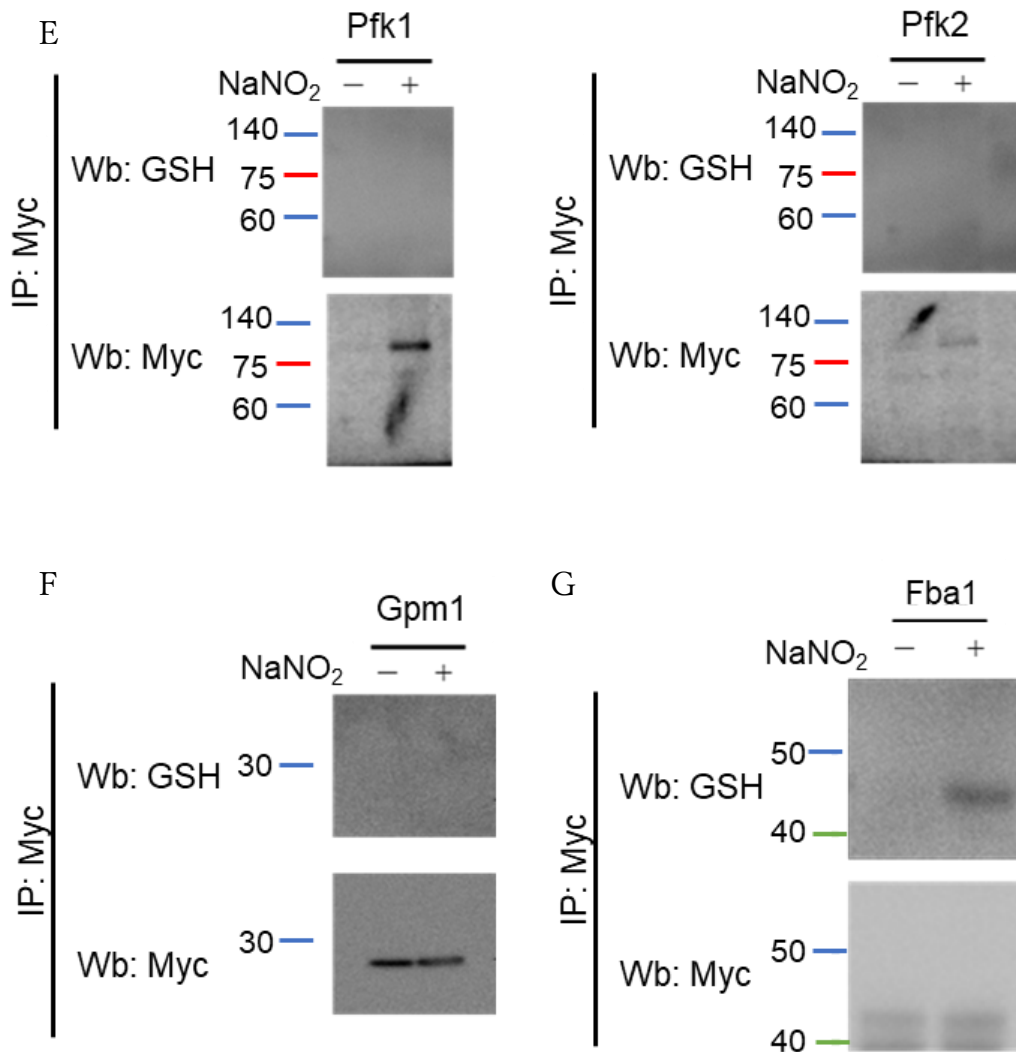


Figure 10 酸性 NaNO_2 処理した細胞における解糖系酵素の SGT 化レベルの解析
 各解糖系酵素エピトープタグ融合型タンパク質として発現する株を構築し、SD 培地 (pH 4.0) で対数増殖期まで培養した後、 NaNO_2 で処理した。対応する抗タグ抗体を用いた免疫沈降により、目的タンパク質を単離した後、抗 glutathione 抗体および各抗タグ抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。(A) GAPDH Tdh1, Tdh2, Tdh3 (B) enolase Eno1, Eno2 (C) alcohol dehydrogenase Adh1 (D) pyruvate kinase Cdc19 (E) phosphofructokinase Pfk1, Pfk2 (F) phosphoglycerate mutase Gpm1 (G) FBPA Fba1

3-5. Fba1 の SGT 化部位の同定

続いて、Fba1 の SGT 化部位の同定を試みた。Fba1 は 5 つの Cys 残基を有しており、その中から SGT 化部位の候補として、酵母の近縁種や細菌において保存性の高い 3 つの Cys 残基に着目した (Figure 11)。Fba1 の

SGT 化修飾が起こらない株を構築するために、Fba1 の Cys 残基をセリン (Ser) 残基に置換した Fba1 を発現する酵母を作製し (112 番目の Cys 置換体: Cys112Ser 株, 158 番目の Cys 置換体: Cys158Ser 株, 292 番目の Cys 置換体: Cys292Ser 株)、各アミノ酸置換体の SGT 化シグナルを比較することで SGT 化部位を同定した。ここでは、C 末端に TAP タグを融合した Fba1 を発現する株を用い、3-4 と同様に酸性 NaNO₂ 処理後のタンパク質抽出液を調製し、抗 CBP 抗体による免疫沈降、および抗 glutathione 抗体によるウェスタンブロットにて解析した。その結果、Cys158Ser 型および Cys292Ser 型 Fba1 では、野生型 Fba1 と同様に酸性 NaNO₂ 処理に依存して SGT 化レベルが上昇した。一方、Cys112Ser 型 Fba1 においては、NO 処理に依存した SGT 化シグナルの上昇は見られなかった。このことから、Fba1 の 112 番目の Cys 残基 (Cys112) が NO によって SGT 化されることが示唆された (Figure 12)。

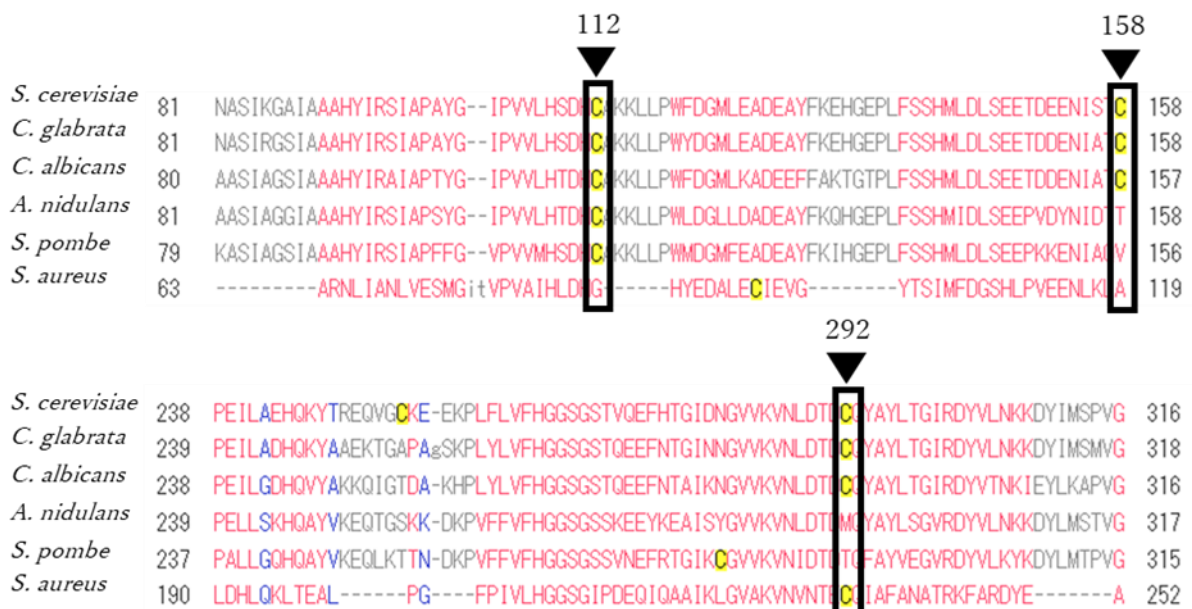


Figure 11 酵母の近縁種および細菌における fructose-1,6-bisphosphate aldolase の Cys 残基の保存性の比較 *S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae* S288C (NP_012863), *C. glabrata*: *Candida glabrata* (XP_448879), *C. albicans*: *Candida albicans* SC5314 (XP_722690.1), *A. nidulans*: *Aspergillus nidulans* FGSC A4 (XP_660479.1), *S. pombe*: *Schizosaccharomyces pombe* 972h (P36580.2), *S. aureus*: *Staphylococcus aureus* (MVH29661.1)

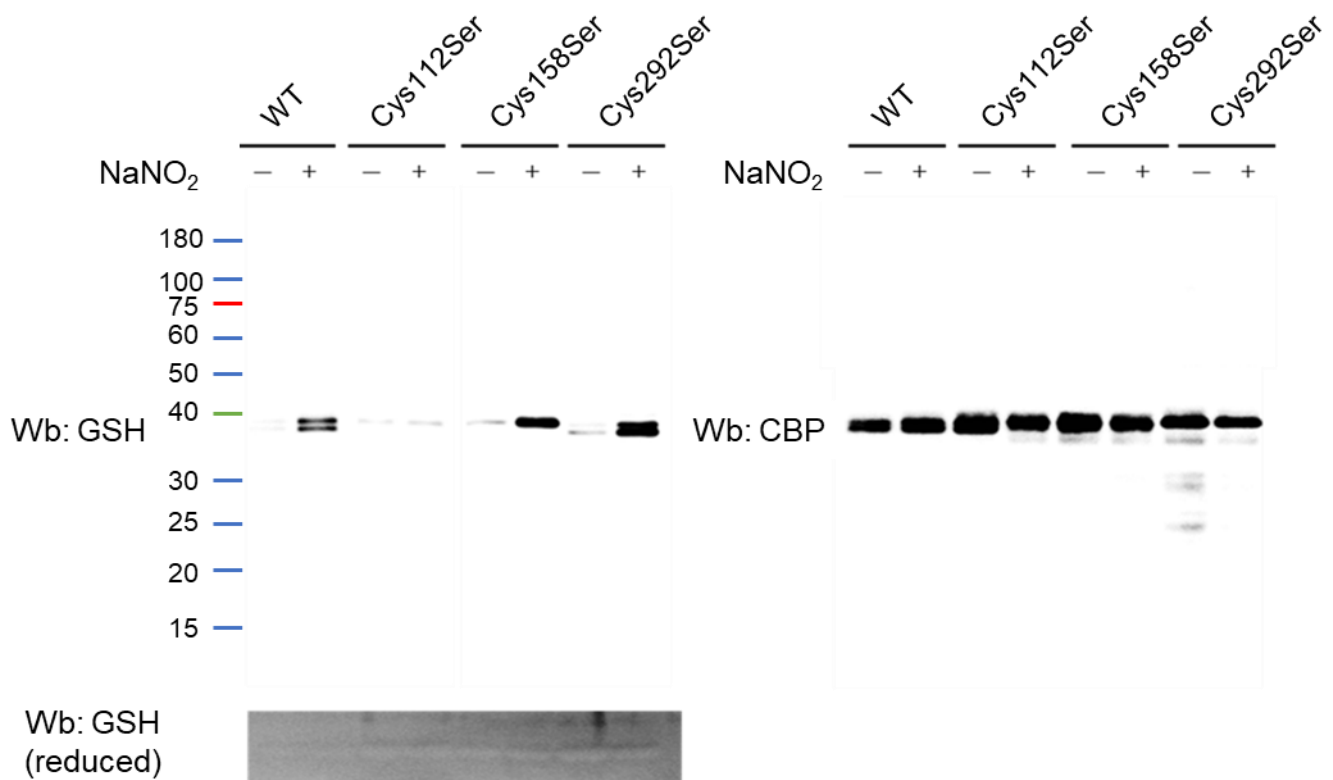


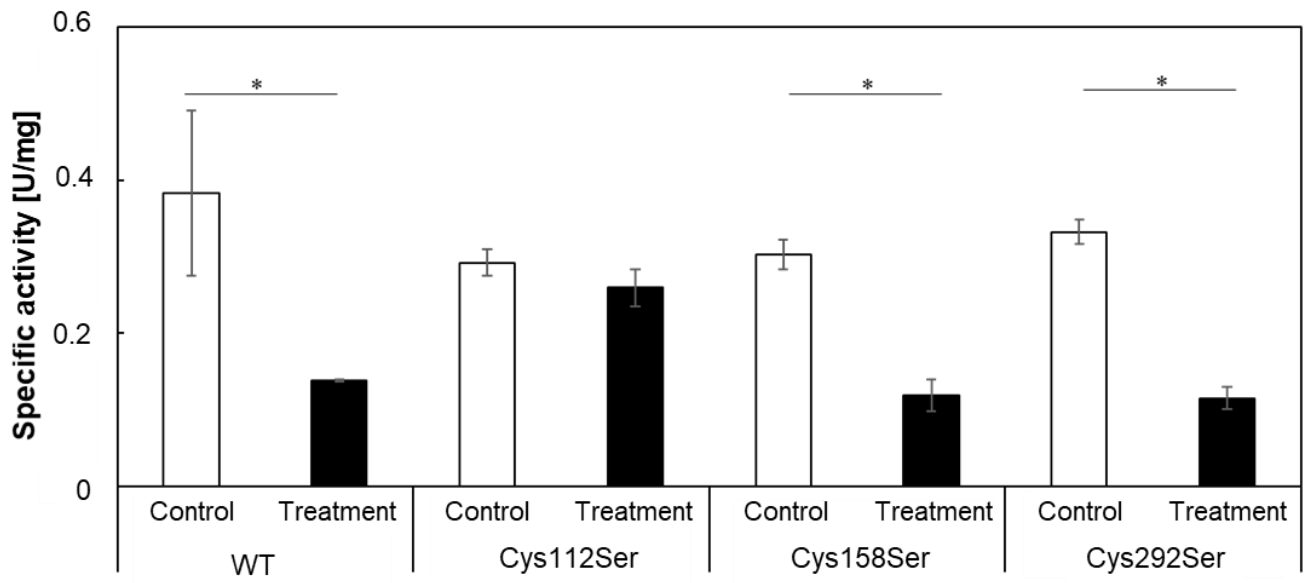
Figure 12 酸性 NaNO_2 処理依存的な Fba1 の SGT 化部位の同定 酵母の野生型株と各 Cys 残基を Ser に置換した Fba1 を発現する株 (Cys112Ser, Cys158Ser, Cys292Ser) を SD (pH 4.0) 培地で対数増殖期まで培養した後、 NaNO_2 で処理した。抗 CBP 抗体を結合した樹脂を用いた免疫沈降により、各 Fba1-TAP を単離した後、抗 glutathione 抗体および抗 CBP 抗体によるウェスタンブロット解析を行った。SGT 化修飾の確認は DTT 処理による還元処理したサンプルを用いて行った。

3-6. SGT 化 Fba1 の酵素活性測定

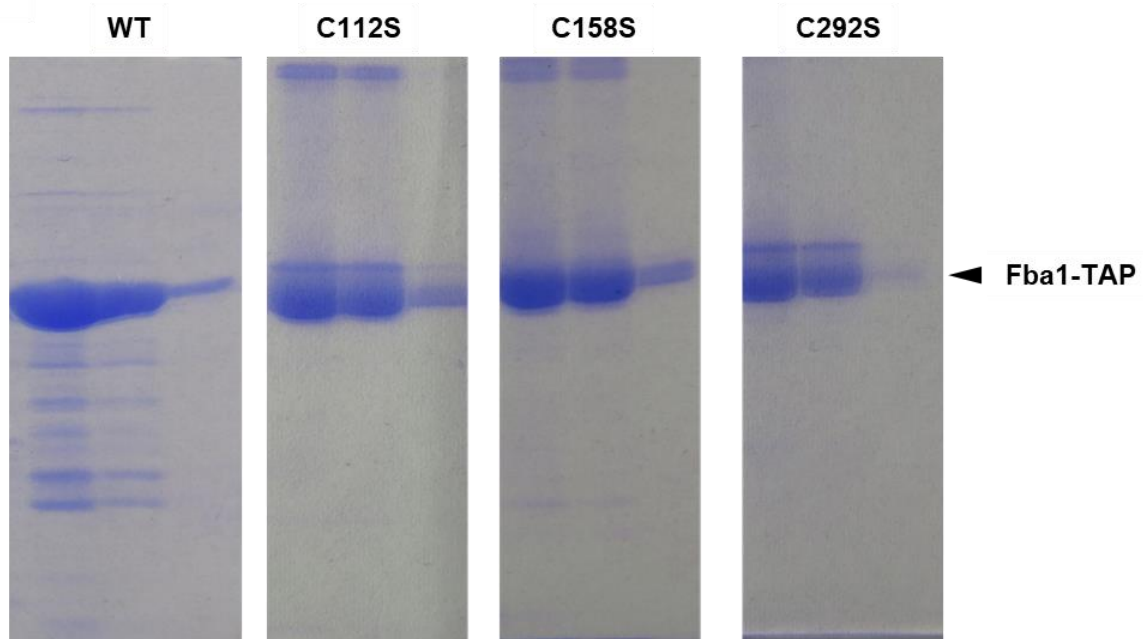
SGT 化の標的である Cys 残基は酵素の活性や立体構造に大きく関与するため、Fba1 の SGT 化が酵素機能に何らかの影響を与えるものと予想した。そこで、大腸菌の形質転換体から組換え酵素として、野生型 Fba1 (WT-Fba1) および SGT 化 Cys 残基の Ser 置換型 Fba1 (Cys112Ser-Fba1, Cys158Ser-Fba1, Cys292Ser-Fba1) を精製し、酵素活性を測定した (Figure 13A)。その結果、各 Cys 残基の Ser への置換は酵素活性に影響を及ぼさなかった。続いて、diamide と glutathione を用いて化学的に精製酵素の SGT 化処理を行ったところ、Cys112Ser-Fba1 の SGT 化レベルは、WT-Fba1 や他の Ser 置換型 Fba1 と比べて有意に低かった。(Figure 13C)。このこ

とから、精製酵素を用いた解析においても、Cys112 が主な SGT 化部位であることが示された。さらに、SGT 化処理後の Fba1 の酵素活性を測定した。WT-Fba1、Cys158Ser-Fba1 および Cys292Ser-Fba1 の酵素活性は SGT 化処理により低下したのに対し、Cys112Ser-Fba1 では SGT 化処理に伴う酵素活性の低下は見られなかった (Figure 13A)。また、Cys112 における SGT 化量を定量的に解析するため、SGT 化処理した WT-Fba1 および Cys112Ser-Fba1 に結合した glutathione 量を定量した (Figure 13D)。その結果、1 分子の WT-Fba1 には約 1.5 分子の glutathione が、1 分子の Cys112Ser-Fba1 には約 0.3 分子の glutathione がそれぞれ結合していたことが明らかとなった。Cys112 のアミノ酸置換により 1 分子当たりの結合 glutathione 量が約 1.2 分子減少したことから、精製酵素を用いた本解析条件において、ほぼ全ての Cys112 が SGT 化されたことが示唆された。以上の結果から、Cys112 の SGT 化により Fba1 の酵素活性が著しく抑制されることが明らかとなった。

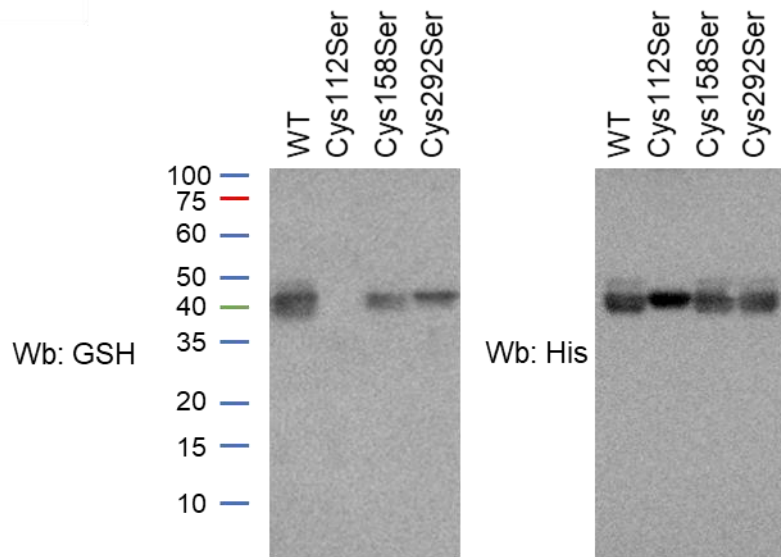
A



B



C



D

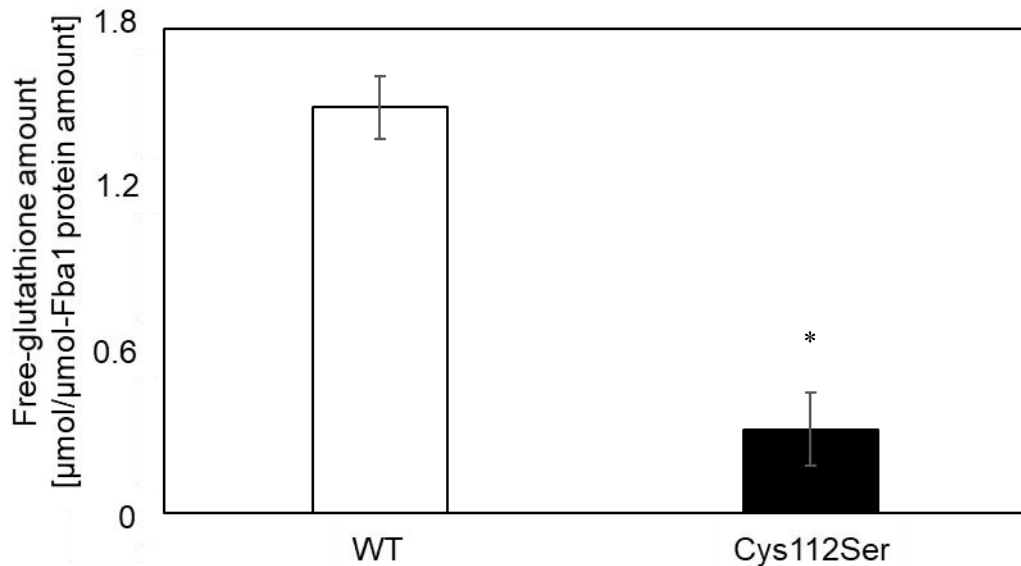
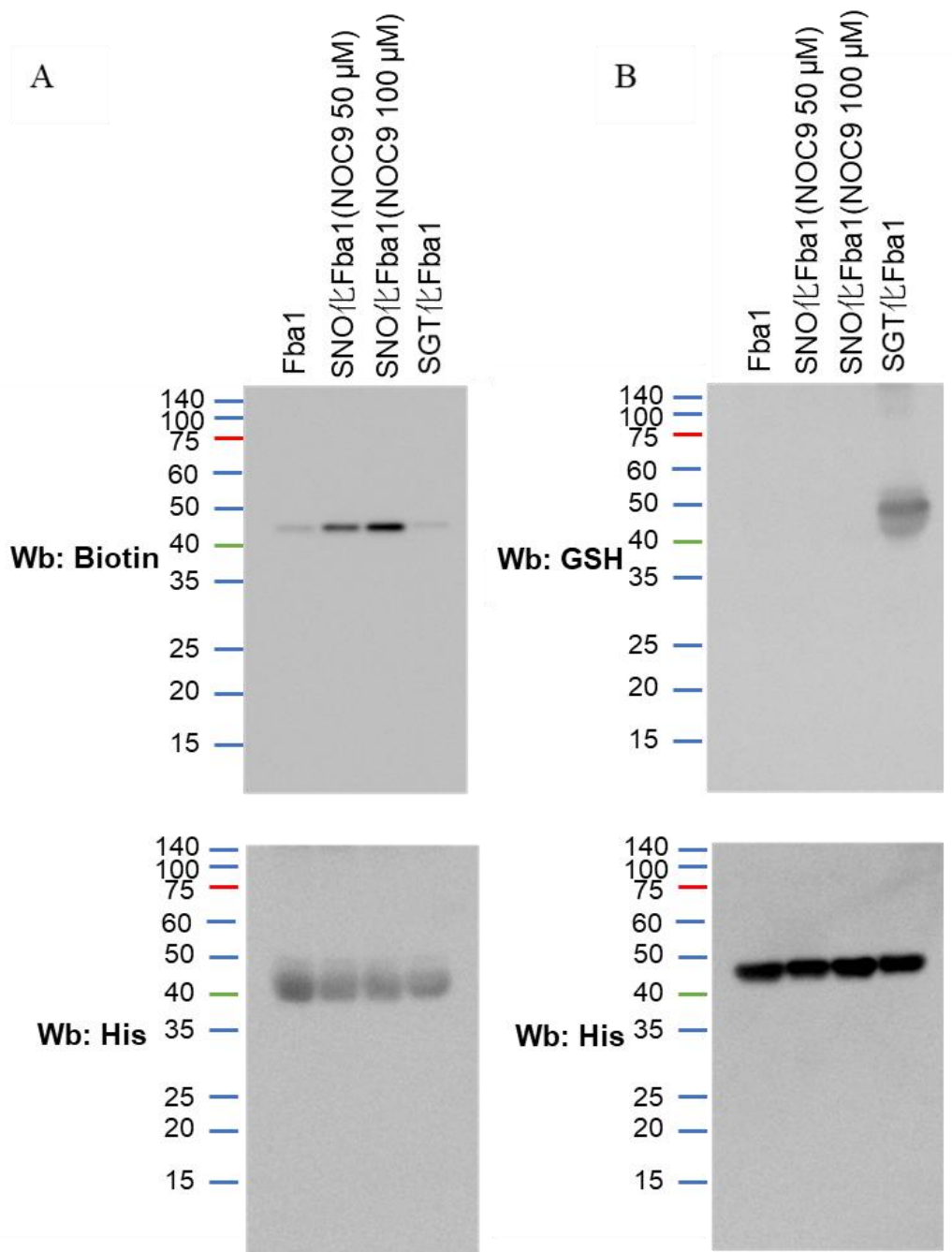


Figure 13 各 Cys 残基の SGT 化が Fba1 の酵素活性に及ぼす影響 大腸菌を用いて組換え酵素として WT-Fba1, Cys112Ser-Fba1, Cys158Ser-Fba1 および Cys292Ser-Fba1 を精製し、diamide と glutathione を用いた化学的 SGT 化処理を行った後、解析した。(A) Ni-affinity カラムにより精製した Fba1 を SDS-PAGE に供した後、CBB 染色により純度を確認した。(B) Fba1 の酵素活性は TPI と GAPDH を用いて NADH の増加量を 340 nm の吸光度の上昇から評価した。(C) 抗 glutathione 抗体および抗 CBP 抗体によるウェスタンブロット解析を行った。(D) 2-mercaptethanol により SGT 化修飾を切断した後、アミノ酸アナライザーを用いて遊離の glutathione 量を測定した。* $p < 0.05$ (n=3, Student's *t*-test)

3-7. SNO 化 Fba1 の酵素活性測定

次に、この酵素活性の抑制が SGT 化修飾特異的な現象であるかを解析する目的で、組換え酵素として精製した WT-Fba1 を NO ドナーである NOC9 で処理し、SNO 化修飾と酵素活性を解析した。NOC9 処理した Fba1 を BS 法でビオチン化し、抗ビオチン化抗体を用いたウェスタンブロットにて解析した結果、NOC9 処理依存的に Fba1 がビオチン化、即ち、SNO 化されていることが確認できた (Figure 14A, B)。続いて、NOC9 処理した Fba1 の酵素活性を測定したところ、SGT 化を誘導した Fba1 では酵素活性が有意に抑制されたのに対し、NOC9 処理で SNO 化を誘導した Fba1 の酵素活性は、未処理時の酵素活性と同程度であった (Figure 14C)。このことから、Cys112 の SNO 化は Fba1 の酵素活性を抑制しないことが明らかとなった。

これらの結果から、Fba1 の Cys112 を介した活性抑制は SGT 化修飾特異的な現象であることが示唆された。



C

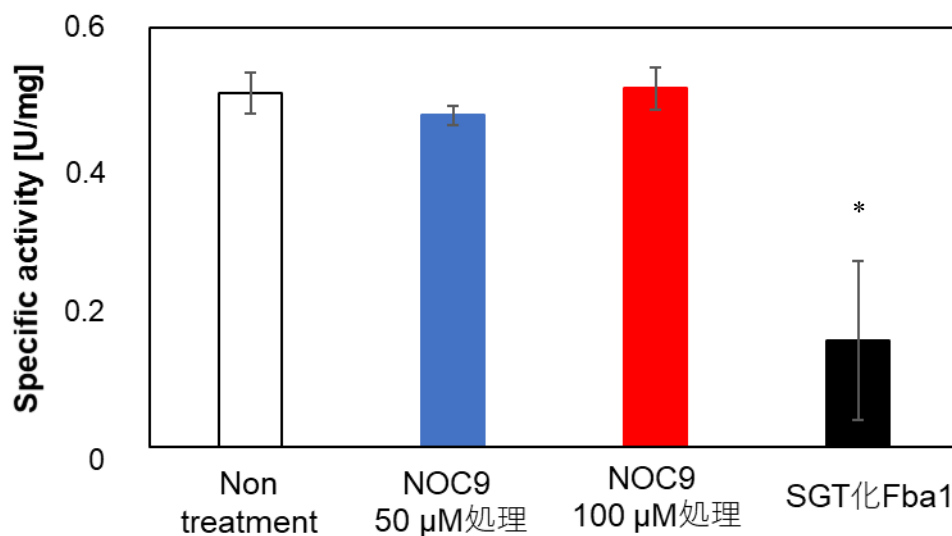


Figure 14 Fba1 の SNO 化修飾が酵素活性に及ぼす影響 大腸菌を用いて組換え酵素として WT-Fba1 を精製した後、NOC9 または diamide と glutathione で処理することで SNO 化、SGT 化をそれぞれ誘導し、解析を行った。(A) 各処理を行った Fba1 を BS 法に供した後、抗ビオチン化抗体によるウェスタンブロット解析に供した。(B) 各処理を行った Fba1 を抗 glutathione 抗体によるウェスタンブロット解析に供した。(C) 各処理を行った Fba1 を酵素活性測定に供した。Fba1 の酵素活性は TPI と GAPDH を用いて NADH の増加量を 340 nm の吸光度の上昇から評価した。* $p < 0.05$ (n=3, Student's *t*-test)

3-8. 解糖系・ペントースリン酸回路の代謝産物測定

病原性細菌である *S. aureus* は宿主からの酸化ストレスによって、解糖系からペントースリン酸回路への代謝シフトが起こることが報告されている⁷⁸⁻⁸⁰。本解析において、Fba1 の SGT 化修飾が Fba1 の酵素活性を抑制することが示されたことから、NO ストレス条件下では解糖系が抑制されている可能性がある。そこで、NO ストレス条件下の酵母においては、Fba1 の SGT 化を介して解糖系からペントースリン酸回路への代謝シフトが起きると考え、Fba1 の基質である FBP とペントースリン酸回路の中間代謝物である 6PG の細胞内含量を測定した。その結果、WT-Fba1 株においては、NO 処理時間依存的に FBP と 6PG の細胞内含量が増加した。一方、Cys112Ser-Fba1 株ではどちらの代謝物量も NO 処理により変化しなかった (Figure 15)。これらの結果から、NO 処理条件下では Fba1 が Cys112 の SGT 化修飾により阻害され、解糖系からペントースリン酸回路

へと代謝物の流れが変化することが示唆された。

ペントースリン酸回路で主に合成される NADPH は、レドックスバランスの制御に重要な役割を有するとともに、NO 解毒酵素である Yhb1 の酵素反応に必要な電子供与体である。そこで、酸性 NaNO₂ 処理条件下における細胞内 NADPH 量を測定した。その結果、WT-Fba1 株において、NO 処理時間依存的に有意に細胞内 NADPH 量が増加することが示された。一方、Cys112Ser-Fba1 株では NADPH 量は変化しなかった(Figure 16)。

以上の結果から、NO 処理条件下では、Cys112 の SGT 化を介した Fba1 の抑制により、ペントースリン酸回路における NADPH の合成を促進することで NO ストレス応答に寄与する可能性が示された。

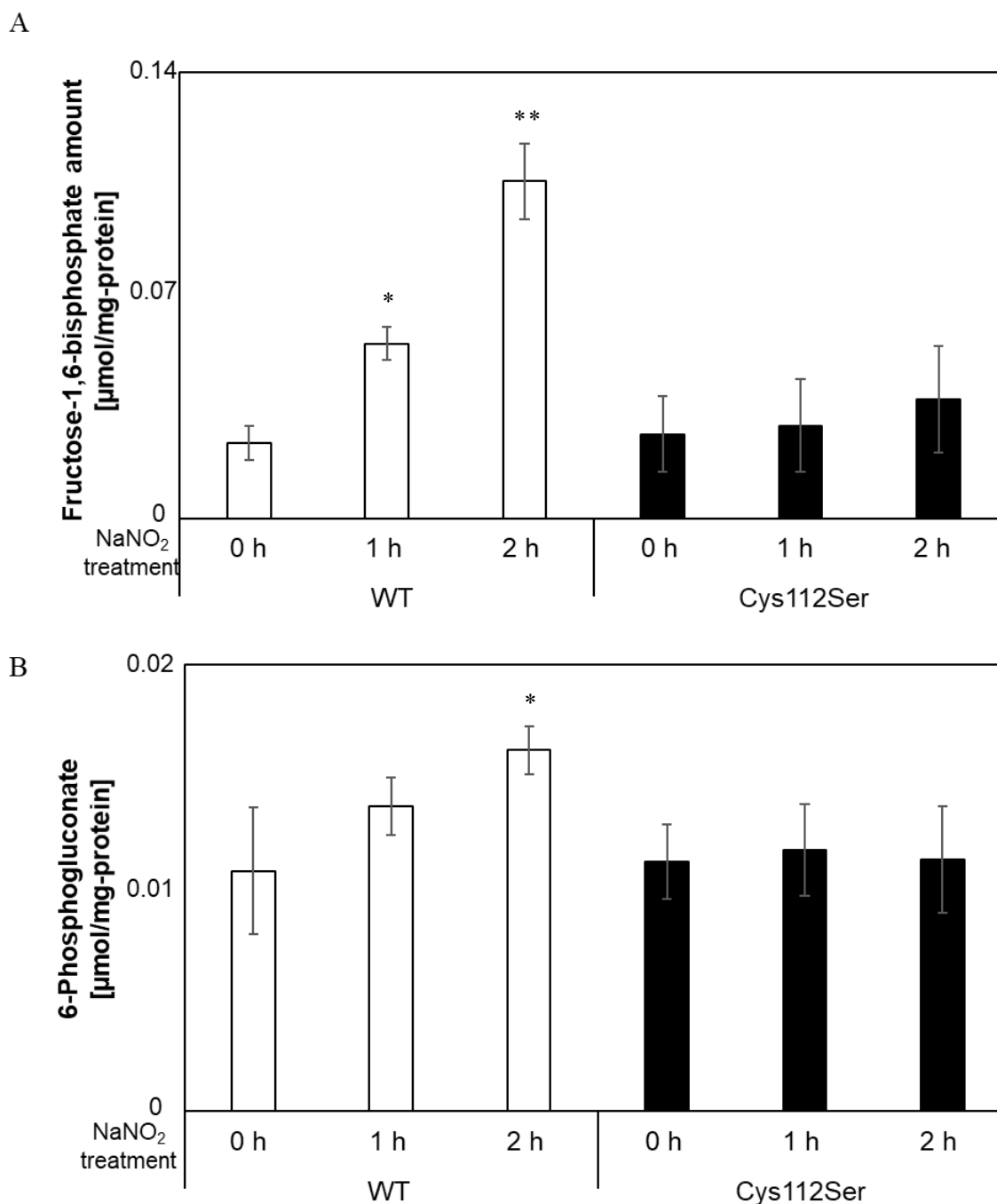


Figure 15 Fba1 の Cys112 の SGT 化修飾が酵母の代謝産物に及ぼす影響 WT-Fba1 株と Cys112Ser-Fba1 株を SD (pH 4.0) 培地で培養した後、0 h, 1 h, 2 h それぞれ NaNO₂ 処理した。その後、細胞抽出液を解析に用いた。(A) FBP 量は大腸菌を用いて精製した組換え Fba1, TPI と GAPDH を用いて NADH の増加量を 340 nm の吸光度を測定し、FBP 量は検量線から算出した。(B) 6PG 量の測定は 6-Phosphogluconic Acid Colorimetric Assay Kit を用いて測定した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (n=3 or n=4, Student's *t*-test)

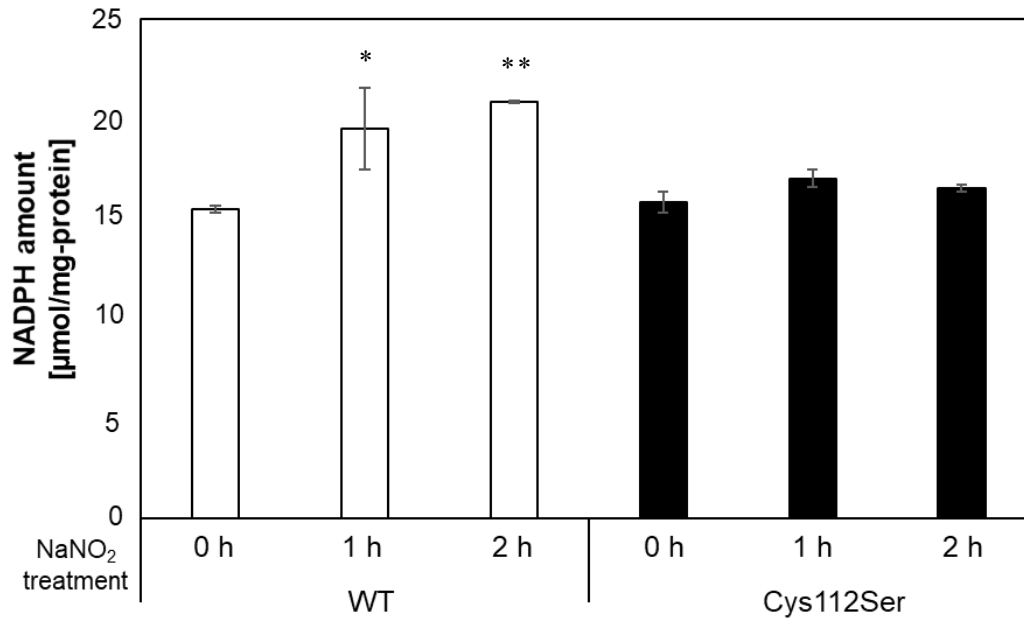
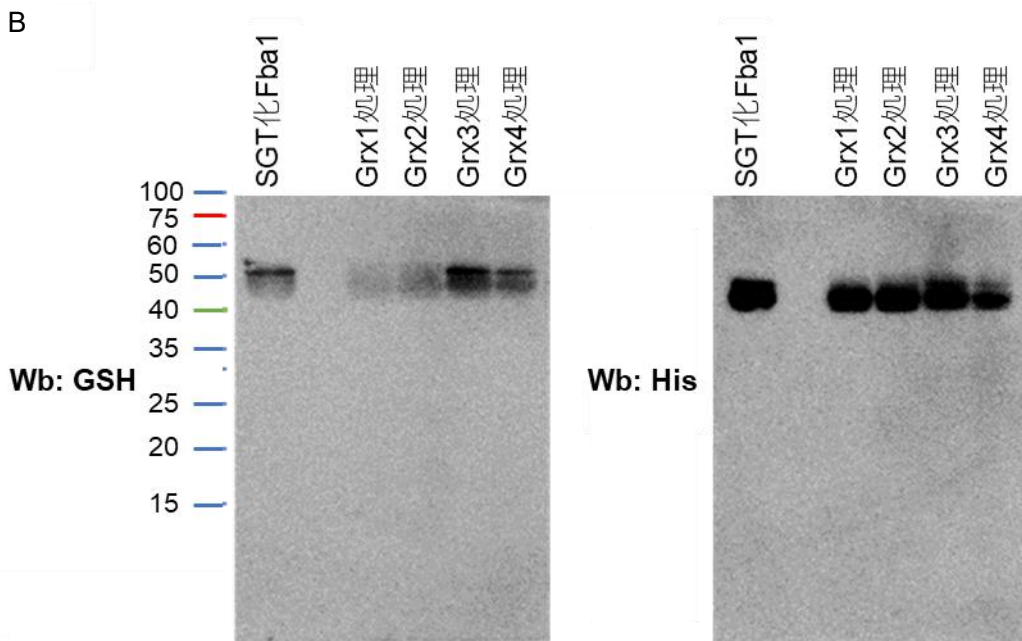
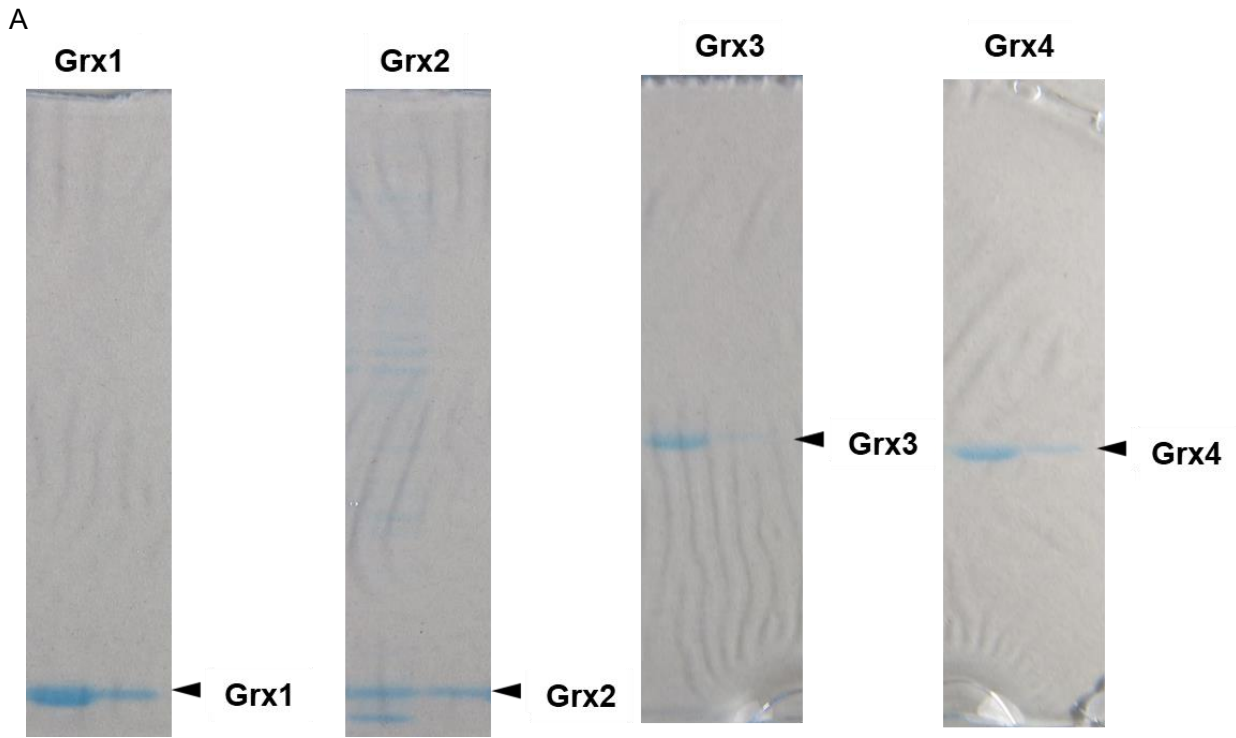


Figure 16 Fba1 の Cys112 の SGT 化修飾が細胞内 NADPH 量に及ぼす影響 WT-Fba1 株と Cys112Ser-Fba1 株を SD (pH 4.0) 培地で培養した後、0 h, 1 h, 2 h それぞれ NaNO₂ 処理した。その後、細胞抽出液を解析に用いた。細胞内 NADPH 量は NADP/NADPH Quantification Colorimetric Kit により測定した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (n=3, Student's *t*-test)

3-9. Grx による Fba1 の脱 SGT 化と酵素活性測定

細胞内の代謝制御機構において、その制御の解除も極めて重要である。そこで、酵母の細胞質に局在する Grx (Grx1~Grx4) に着目し、Fba1 の脱 SGT 化を行う Grx の同定を試みた。大腸菌を用いて組換えタンパク質として精製した Grx1~Grx4 を SGT 化した精製 Fba1 とそれぞれ反応させ、Fba1 の SGT 化レベルを、抗 glutathione 抗体によるウェスタンブロットにて解析した。その結果、Grx3, Grx4 との反応では Fba1 の SGT 化シグナルが変化しなかったが、Grx1, Grx2 は、Fba1 の SGT 化レベルを低下させた (Figure 17B)。続いて、Grx1, Grx2 による脱 SGT 化が Fba1 の酵素活性に及ぼす影響を解析するため、Grx1, Grx2 それぞれと反応させた Fba1 の酵素活性を測定した (Figure 17C)。その結果、SGT 化処理により低下した Fba1 の酵素活性は、Grx1 との反応により、SGT 化未処理の Fba1 の酵素活性とほぼ同等まで回復した。一方、Grx2 を反応させた条件下では完全に酵素活性は回復しなかった。このことから、SGT 化された Fba1 は主に Grx1 によって脱 SGT 化され、酵素活性も脱 SGT 化によって回復することが示唆された。



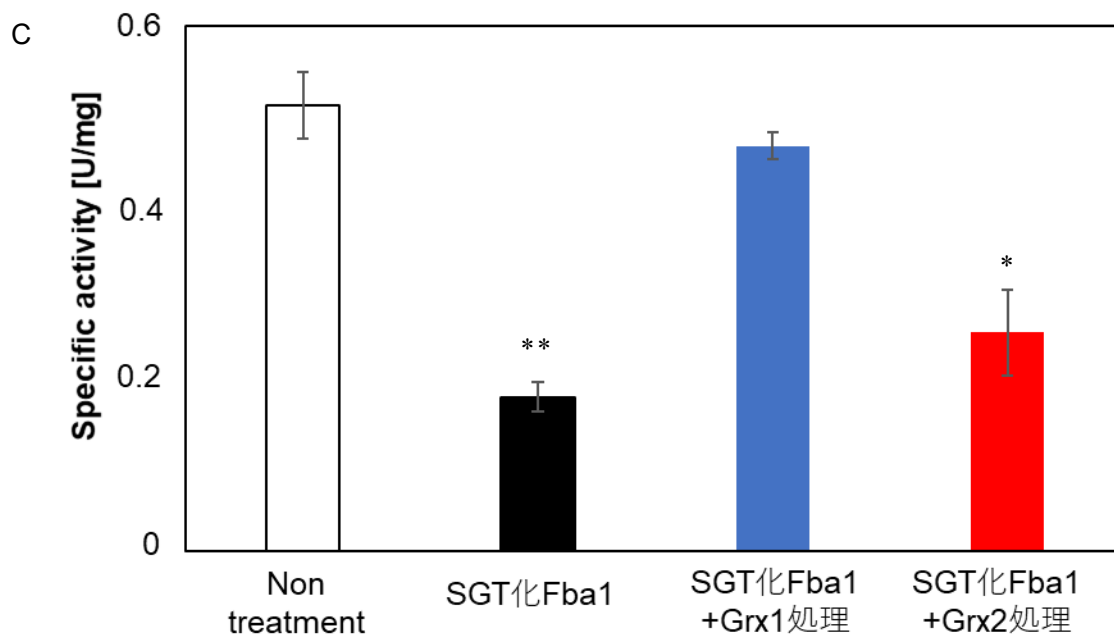


Figure 17 グルタレドキシシン Grx1 による Fba1 の脱 SGT 化と酵素活性への影響
 大腸菌を用いて組換え酵素として WT-Fba1, Grx1, Grx2, Grx3, Grx4 を精製し、WT-Fba1 を diamide と glutathione を用いた化学的 SGT 化処理を行った後、解析を行った。(A) Ni-affinity カラムにより精製した Grx1, Grx2, Grx3, Grx4 を SDS-PAGE に供した後、CBB 染色により純度を確認した。(B) SGT 化 Fba1 を Grx1, Grx2, Grx3, Grx4 とそれぞれ反応させた後、抗 glutathione 抗体を用いたウェスタンブロット解析に供した。(C) SGT 化 Fba1 を Grx1, Grx2 とそれぞれ反応させた後、酵素活性測定に供した。Fba1 の酵素活性は TPI と GAPDH を用いて NADH の増加量を 340 nm の吸光度の上昇から評価した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (n=3, Student's *t*-test)

3-10. NO ストレスに対する表現型の解析

Cys112 の SGT 化を介した Fba1 の活性抑制の生理的意義を解析するために、NO ストレス条件下における酵母の表現型を解析した。まず、WT-Fba1 株および SGT 化修飾による代謝制御が起こらない Cys112Ser-Fba1 株を用いて細胞の生育速度を測定した (Figure 18A)。その結果、Cys112Ser-Fba1 株は WT-Fba1 株と比較して同等の生育速度を示し、Cys112 のアミノ酸置換は酵母の生育に影響を与えないことが示された。次に、NO 処理後の細胞が形成するコロニー数から細胞の生存率を算出した。その結果、WT-Fba1 株においては 2 時間の NO 処理によって 80 % 程度の生存率を示した。一方、Cys112Ser-Fba1 株では 50 % 程度の生存率を示し、WT-Fba1 株と比較して有意に低下した (Figure 18B)。このことから、Cys112Ser-Fba1 株は WT-Fba1 株に比べて NO に感受性を示すことが

明らかとなった。従って、Fba1 の Cys112 における SGT 化を介した活性抑制とそれに起因する代謝変化による NADPH 合成の亢進が、細胞の NO ストレス耐性に寄与するものと考えられた。

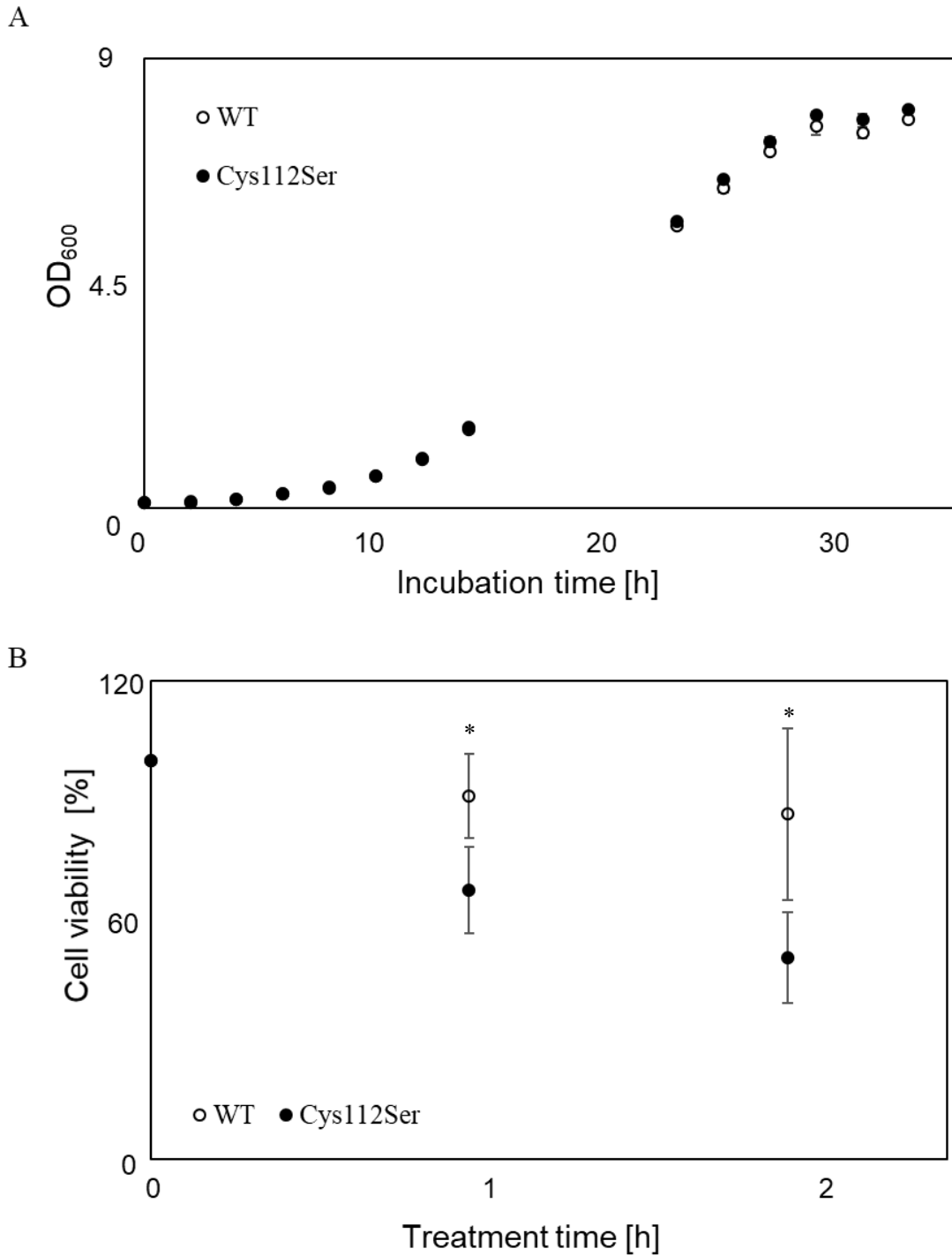


Figure 18 NOストレスに対する Fba1 の Cys112 の SGT 化修飾が及ぼす影響 WT-Fba1 株と Cys112Ser-Fba1 株を SD (pH 4.0) 培地で培養した後、解析に供した。(A) 各酵母細胞の生育速度を 600 nm の吸光度により測定した。(B) 各酵母細胞を 0 h, 1 h, 2 h それぞれ NaNO₂ 処理し、細胞を SD 培地に塗布した。非 NaNO₂ 処理条件下の細胞数を 100 % として生存率を計算した。* $p < 0.05$ (n=7, Student's *t*-test)

4. 考察

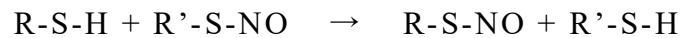
本研究では、酵母のFBPAである Fba1 の Cys 残基が NO により SGT 化修飾されること、SGT 化修飾が Fba1 の活性を抑制し、代謝を制御することを明らかにし、NO による SGT 化を介した代謝制御機構のモデルを提唱した。また、Grx1 による脱 SGT 化が代謝制御を解除することも明らかとなった。さらに、Fba1 の SGT 化を介した代謝制御機構は NO ストレスに対する細胞保護に寄与することも示唆された。

NO ストレス条件下において酵母細胞内では SNO 化修飾ではなく、SGT 化修飾が生理機能に関与する可能性が示された

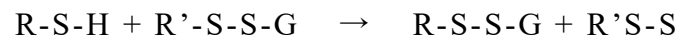
これまで、SNO 化修飾が盛んな動植物において、多くのタンパク質が SNO 化されることが報告されている。このような背景から NO ストレス条件下においても、SNO 化修飾が主な翻訳後修飾であると考えられてきた。一方、近年になって SNO 化修飾は SGT 化修飾へ置換されることが示唆されている。本研究における NO ストレス条件下においては、酵母細胞内で Fba1 が SGT 化されることが示された。また、酵母細胞内には SGT 化の必須因子である glutathione が高濃度（10 mM）で存在することから、NO により細胞内で生じた SNO 化修飾が glutathione と反応することで SGT 化修飾へと置換される可能性は高いと考えられる。発酵条件等においてはより複雑な NO ストレスに曝されると予想されることから、より多くのタンパク質が SGT 化されていると考えられる。一方、SNO 化修飾を介した SGT 化修飾への置換について、実験的に証明された報告はないが、glutathione 合成酵素の遺伝子破壊株や合成阻害剤を用いた解析によって、SGT 化修飾ではなく、SNO 化修飾として検出することで証明できる可能性が考えられる。また、細胞内において SGT 化修飾されている Fba1 の Cys112 の割合については未だ明らかとなっていないが、Cys112Ser 株においては Fba1 の基質である FBPA が増加しなかったことから、Cys112 の SGT 化修飾は細胞内で十分な割合起きていると考えられる。NO ストレス処理を行った酵母細胞から Fba1 を精製し、還元処理によって遊離される glutathione 量を測定することで、酵母細胞内で SGT 化されている Fba1 の割合を定量することができると考えられる。

SGT 化修飾は Grx システムによって脱 SGT 化されることが報告され

ている⁶⁰。また、SGT 化修飾は生体内で比較的安定な修飾であると考えられており、以下のトランスニトロソ化が細胞内で容易に発生する可能性が高い修飾である¹⁰⁹。



一方で、SGT 化修飾は以下のトランスグルタチオン化が細胞内では起こりづらく安定であることが報告されている¹¹⁰。



これらのことから、NO による代謝制御の上で安定的な制御が可能という点で SGT 化修飾には利点があると考えられる。

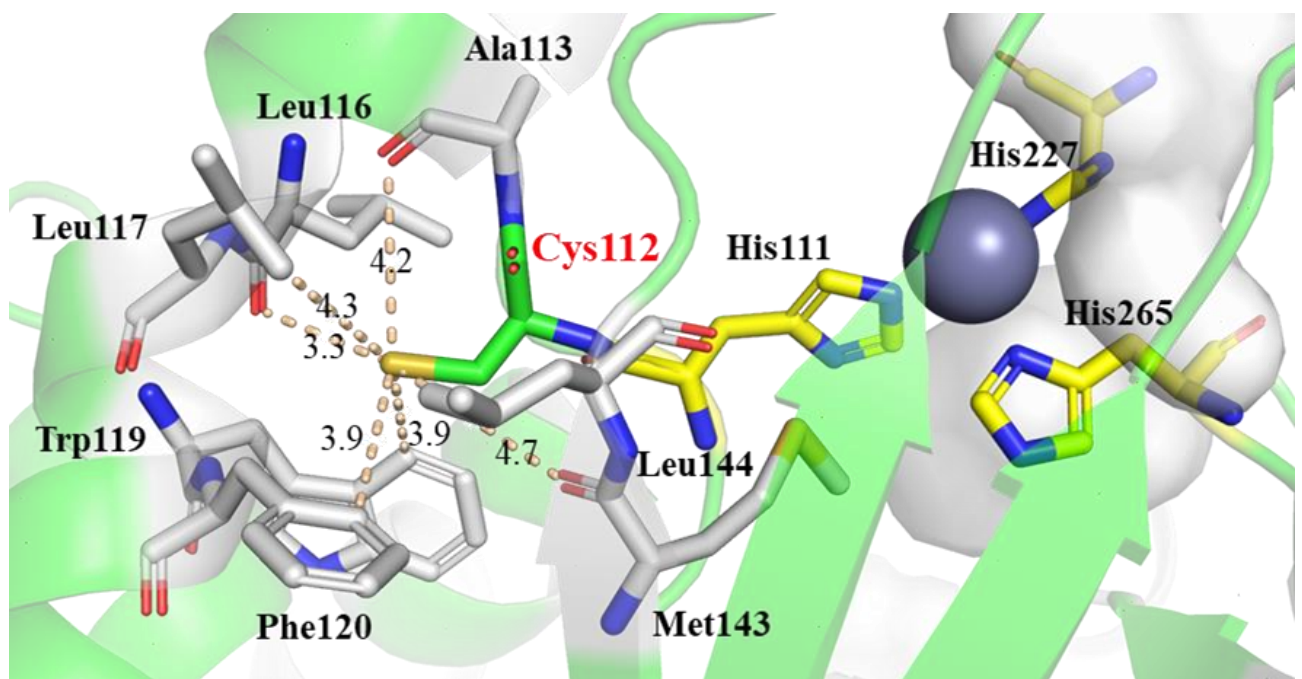
また、本解析では活性中心以外の Cys 残基の SGT 化修飾が酵素の活性を制御することを明らかにした。これまでの SGT 化修飾に関する研究においては、活性中心の Cys 残基の機能を直接阻害することで生理機能に関与することが報告されているのみであった。このように、SGT 化修飾は未だ不明な点が多くあり、NO ストレス耐性のみならず多くの生理現象に関与していると考えられる。

Fba1 は酸性 NaNO₂ 処理依存的に SGT 化され、酵素活性の抑制に寄与する

これまでに、酵母の Fba1 が SGT 化されることは報告されていない。本研究から、酸性 NaNO₂ 処理に依存して Cys112 が SGT 化され、酵素活性が低下することが示された (Figure 12, 13)。酵母の Fba1 について結晶構造は明らかとなっていないが、酵母 *S. cerevisiae* の近縁種である *C. albicans* の Fba1 では 110 番目のアスパラギン酸残基が活性部位であることが示唆されている (*S. cerevisiae* の Fba1 と identity 85 %)。また、111 番目のヒスチジン残基が亜鉛イオンの結合に関与することが示されている。一方で、Cys112 の Ser への置換によって酵素活性が低下しないことから、Cys112 自体は酵素活性の発現に重要ではないことが示唆されている (Figure 13)。このことから構造的に嵩高い分子が Cys112 に結合することが、酵素の活性に影響を与える原因であると考えられる。酵母 *S. cerevisiae* やその近縁種の FBPA は FBPA II 型であり、亜鉛イオンが酵素活性に必須であることが報告されている⁸⁸。分子描画ソフト PyMOL (Schrödinger) を用いて、*C. albicans* の Fba1 (PDB ID: 6lnk) の立体構造をもとに考察した結果、Cys112 の側鎖に着目すると、周辺のアミノ酸残

基と近接していることが観察される。この空間にトリペプチドの glutathione のような嵩高い分子が導入されることで、周辺の立体構造が大きく変化する可能性が考えられる (Figure 19 A, B)。この立体構造の変化により、亜鉛イオンの結合が阻害されることで酵素活性が低下することが示唆される。また、亜鉛イオンを含めた活性中心の構造や周辺の空間が変化することで基質である FBP との結合力が弱まった可能性も考えられる。一方、SNO 化修飾は Fba1 の酵素活性を制御しないことが示された (Figure 14C)。Fba1 の Cys112 に SNO 基を導入したモデルを構築したところ、SGT 化と比較して周辺のアミノ酸残基との距離の変化は小さく、立体構造を変化させるほどの立体障害は生じないことが示唆された (Figure 19C)。このことから、嵩高い glutathione が Cys112 に結合することが Fba1 の酵素活性の抑制に重要であると考えられる。

A



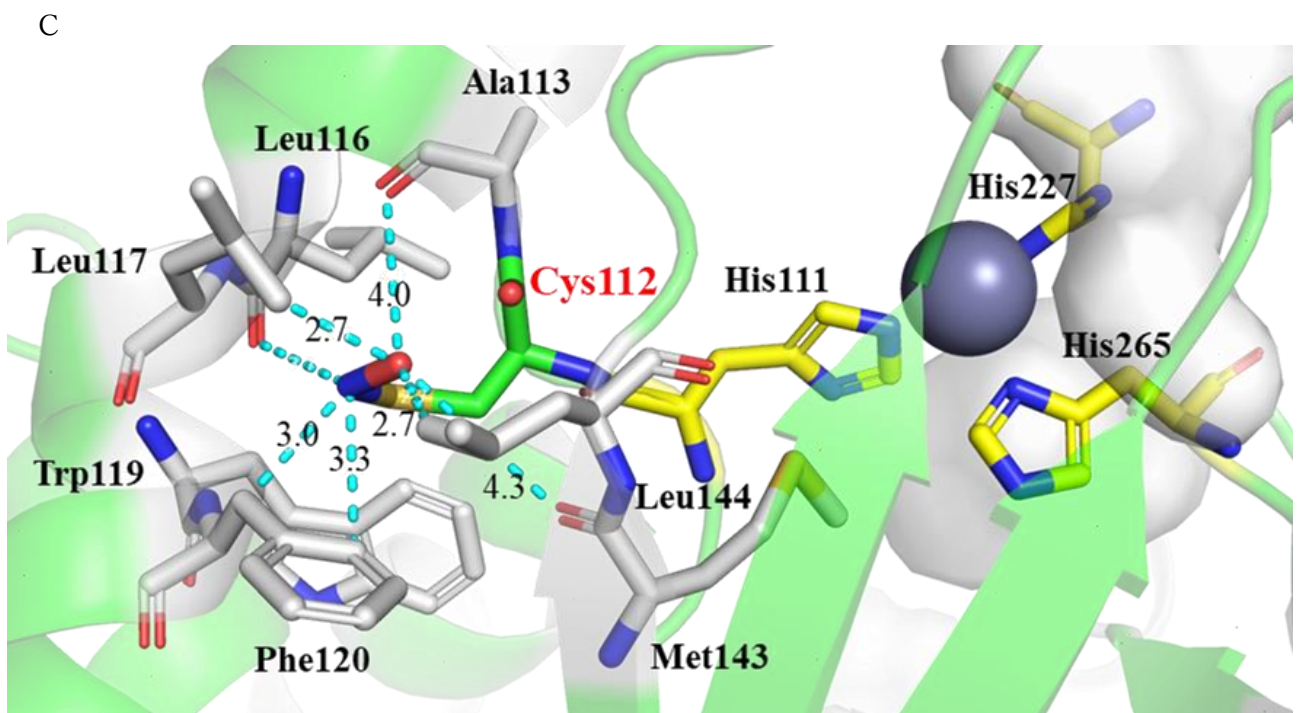
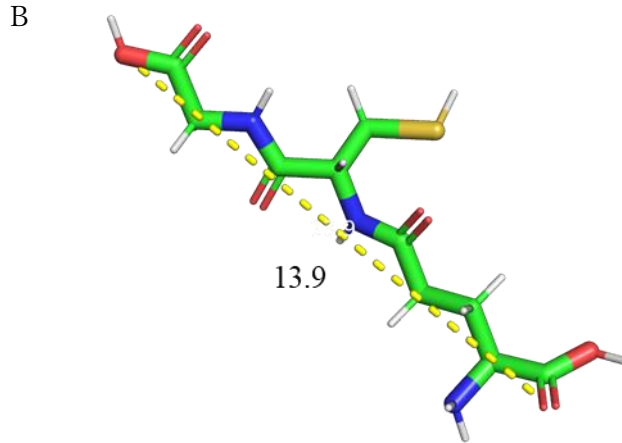


Figure 19 Fba1 の Cys112 周辺構造図 Fba1 の立体構造を cartoon モデルで、His111, Ala113, Leu116, Leu117, Trp119, Phe120, Met143, Leu144, His227, His265 を sticks モデルでそれぞれ表示した。点線と黒字は Cys112 の周辺の原子との距離または glutathione の大きさを、青い球体は亜鉛イオンを、薄い灰色は cavities をそれぞれ示している。(A) Fba1 の Cys112 の周辺構造図。(B) Glutathione の立体構造図。(C) SNO 化 Cys112 の周辺構造図。

Fba1 は細胞内で 2 つの形態で存在する可能性がある

3-5.において細胞内の Fba1 の SGT 化修飾を検出した結果、WT、Cys292Ser において 2 本のバンドが検出された (Figure 12)。一方で、Cys112、Cys158 の Ser 置換体においては 1 本のバンドのみが検出された。

2つの Cys 残基のそれぞれのアミノ酸置換によってこの現象が起きていることから、Cys112 と Cys158 の間でジスルフィド結合を形成している可能性が考えられる。*C. albicans* の立体構造から Cys112 と Cys158 は 10.3 Å と原子間の距離が離れていることが観察され、ジスルフィド結合は形成していないと考えられる。しかしながら、システインパーサルフィド (Cys-SS-) のような形で分子内結合を形成している可能性は考えられる^{111, 112}。1つの仮説として、通常条件では細胞内に Cys-SS-を介した分子内結合を有する Fba1 と分子内結合を有さない Fba1 の2種の形態が混在する。細胞が NO ストレスに曝されると分子内結合を有する Fba1 は部分分解され、Cys112 で SGT 化される。分子内結合を有さない Fba1 の Cys112 も SGT 化されるため、分子量の異なる2本のバンドがウェスタンブロットで検出された可能性が考えられる。この仮説の検証のために、酵母細胞の細胞抽出液を還元処理し、抗 CBP 抗体を用いたウェスタンブロットにおいて2本のバンドが NO ストレス条件の有無によって検出されるかを解析することで、検証できると考えている。

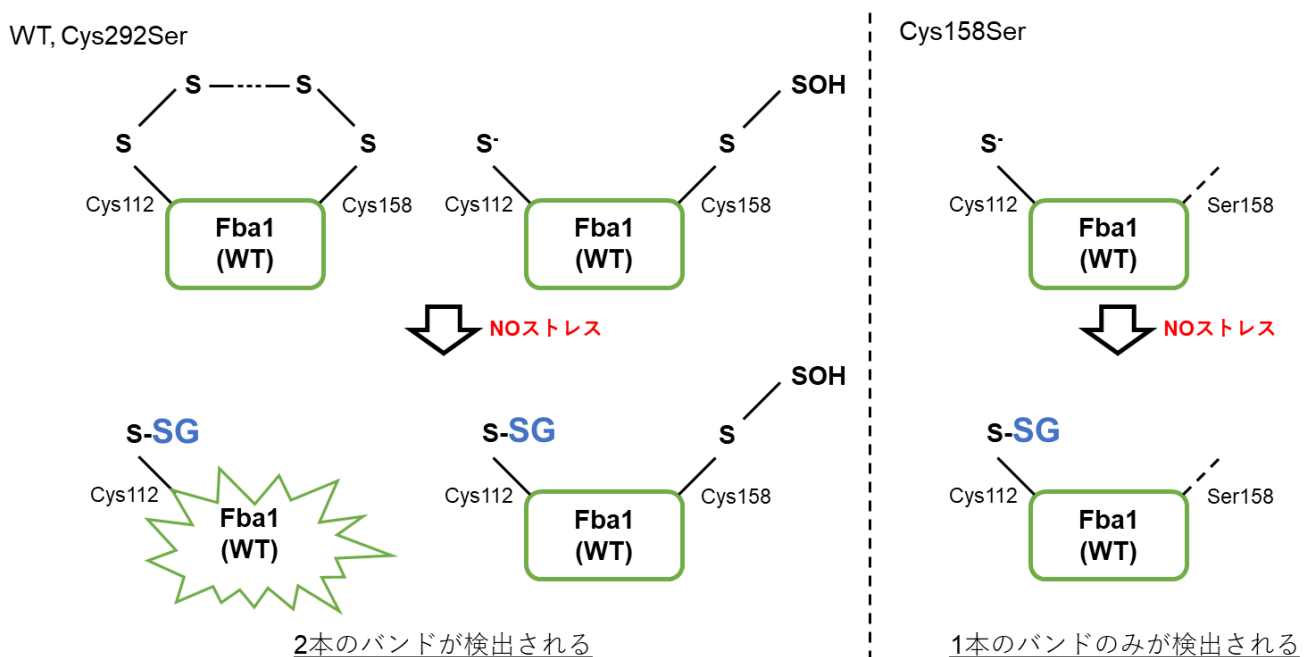


Figure 20 酵母細胞内での Fba1 の状態予想図 Fba1 は酵母細胞内で2種類の形態で存在する可能性が考えられる。WT、Cys292Ser においては Cys-SS-を介して Cys112 と Cys158 が結合するフォームと Cys112 がチオレートフォームの2種類が存在すると考えられる。Cys112 と Cys158 が結合するフォームは NO ストレスによって部分分解されることでウェスタンブロットにおいて2本のバンドが検出される。Cys158Ser は分子内結合を有さない形態のみが存在することから、1本のバンドが検出されないと考えられる。

解糖系とペントースリン酸回路の代謝制御機構

本研究において、FBPAであるFba1のSGT化修飾が解糖系、ペントースリン酸回路の代謝を制御する可能性が示された。ヒトのガン細胞においても、解糖系からペントースリン酸回路へと代謝が変化する同様の制御が報告されている^{75,76}。ガン細胞においては免疫細胞からの攻撃に対してPfk1の活性化因子であるPfk2の酵素活性を阻害する。Pfk2による制御によって解糖系からペントースリン酸回路へと代謝を変化し、NADPHの合成を促進する。酵母*S. cerevisiae*もPfk2を有しているが、ヒトのPfk2と比較すると、identityは40%程度と低い。また、FBPAについても*S. cerevisiae*やその近縁種はFBPA II型であるのに対して、ヒトはFBPA I型に分類されており、相同性は極めて低い。さらに、上述したように酵母細胞内には高濃度（約10 mM）のglutathioneが存在しているが、哺乳類のglutathione濃度は細胞や組織に依存するものの0.5~2 mMと低いことから、SGT化が起こりづらいことも考えられる。これらのことから、SGT化修飾による代謝制御機構は*S. cerevisiae*やその近縁種のようなFBPA II型の生物種に特異的であり、ヒトのようなFBPA I型の生物はPfk2を介した代謝制御機構が存在する可能性が考えられる（Figure 21）。

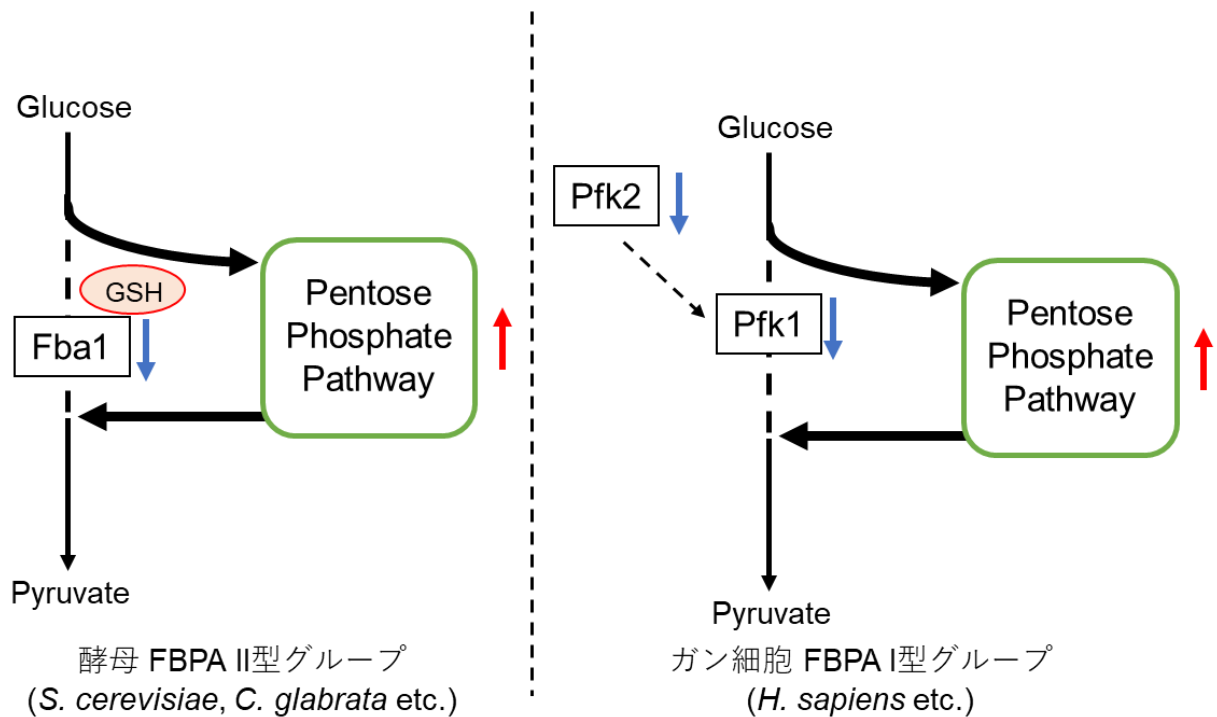


Figure 21 FBPA の違いによる解糖系、ペントースリン酸回路の代謝制御機構の違い。FBPA II型グループは Fba1 の SGT 化による酵素活性の低下によって、FBPA I 型グループは Pfk1、Pfk2 の酵素活性の低下によってそれぞれの代謝が制御されていると考えられる。

ペントースリン酸回路の亢進によって合成された NADPH がストレス応答に関与する可能性が示された

Fba1 における Cys112 の SGT 化修飾を介した代謝制御が酵母の NO ストレス応答に寄与する可能性が示された。ペントースリン酸回路において主に合成される NADPH は、glutathione peroxidase による過酸化水素の消去に関与する。また、ROS の消去に関与する thioredoxin の還元にも関与している。NOR や GSNOR は NADPH を用いて NO の解毒関与することも報告されており⁹⁶⁻⁹⁹、ペントースリン酸回路の亢進による細胞内 NADPH 量の増加は細胞のストレス耐性に寄与すると考えられる。

酵母 *S. cerevisiae* の NO 解毒酵素である Yhb1 においても、NADPH は NO の硝酸イオンへの無毒化に重要な役割を果たしている。このように Fba1 の SGT 化修飾を介した代謝制御によってペントースリン酸回路が亢進され、NADPH 量が上昇することが NO ストレスに対する細胞保護に寄与していると考えられる。また、糸状菌 *A. nidulans* の NO 解毒酵素に

においても NADPH を利用することが報告されている。

また、NADPH は NO の除去のみならず、ROS の除去にも関与することが多くの生物種において報告されている^{90, 91}。SGT 化修飾は SNO 化修飾を介した経路以外にも、ROS による酸化経路によっても起こることが報告されている。ROS に対する SGT 化修飾を介した細胞内 NADPH 量の増加は thioredoxin や catalase による ROS の除去に深く関与すると考えられる。

これらのことから、*S. cerevisiae* だけでなく、その近縁種や糸状菌においても FBPA の Cys112 に相当する Cys 残基の SGT 化を介してペントースリン酸回路が亢進され、NADPH の合成量の増加することが、病原性真菌の NO や ROS などに対するストレス耐性を向上させる可能性が考えられる。

Grx1 による Fba1 の脱 SGT 化反応が代謝制御の解除メカニズムである

Fba1 の SGT 化修飾による代謝制御が Grx である Grx1 によって解除されることも本研究によって示唆された。Grx1 が SGT 化 Fba1 と反応し、Fba1 を脱 SGT 化するとともに、生成した SGT 化 Grx1 が glutathione によって還元され、GSSG が生成される。GSSG の還元を担う glutathione reductase はその還元反応に NADPH が必須である。これらのことから、NO ストレス条件下において、代謝制御が解除されるメカニズムとして、以下のようなフローが考えられる。①NO ストレスに応答して、SNO 化修飾を介して細胞内の還元型 glutathione が消費され、Fba1 が SGT 化される。②SGT 化によって解糖系が阻害され、ペントースリン酸回路が亢進されることで、NADPH の合成量が増加する。③NADPH が NO の除去系である Yhb1 や酸化還元制御に関与する thioredoxin 系に消費されることで、NO ストレスが解除される。④NO ストレスが解除された後も合成される NADPH と Grx1 が SGT 化 Fba1 の脱 SGT 化を行うことで、代謝制御が解除される（代謝制御シグナルの解除）(Figure 22)。一方で、本解析結果は *in vitro* での現象であることから、より詳細な *in vivo* での解析が必要であると考えられる。*GRX1* 遺伝子の破壊株を用いて、NO ストレスの除去後、細胞の増殖が遅延するかを解析することで Grx1 の SGT 化修飾を介した代謝シグナルの解除への関与を立証できると考えられる。

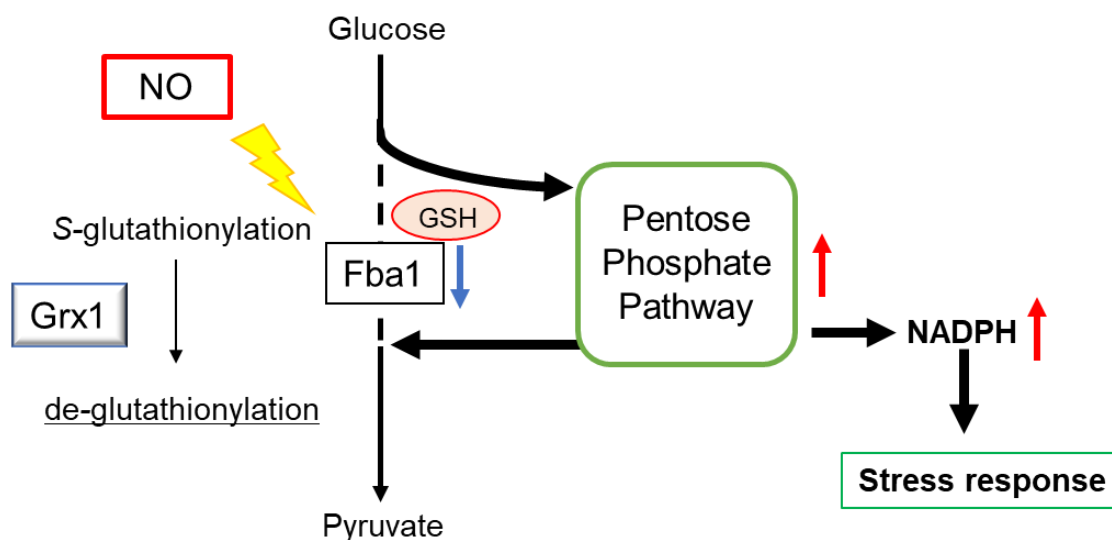


Figure 22 酵母における翻訳後修飾を介した NO の代謝制御モデル 酵母細胞が環境ストレスとして NO に曝されると、細胞内で Fba1 の SNO 化修飾が起きる。SNO 化修飾は細胞内の glutathione と速やかに反応して SGT 化修飾へと変化する。SGT 化修飾は Fba1 の酵素活性を低下させることで、解糖系を阻害する。その結果、解糖系の代謝産物がペントースリン酸回路へと流れることで、ペントースリン酸回路が亢進され、レドックス制御に重要な NADPH の合成量が増加する。これらの結果、酵母細胞は NO ストレスに応答することができる。

ペントースリン酸回路の亢進による Rib1 を介した NO ストレス応答機構の可能性

上記のように Fba1 の SGT 化によってペントースリン酸回路が亢進されることが示された。ペントースリン酸回路は NADPH だけでなく、核酸の合成にも関与している。最近、当研究室において、酵母 *S. cerevisiae* の GTP cyclohydrolase II Rib1 が NO ストレス耐性に寄与することを見出した¹⁰⁵。Rib1 の反応生成物である DARP が NO を消去するが、Rib1 の基質は核酸の GTP であり、GTP はペントースリン酸回路の代謝物である ribose-5-phosphate を基質としている (Figure 23)。Fba1 の SGT 化を介したペントースリン酸回路の亢進に起因する細胞内 GTP 量の増加に伴って化学平衡が傾くことで、Rib1 による DARP の合成が亢進され、DARP が NO の消去に寄与すると考えられる。このように、NADPH を介した抗酸化メカニズム以外に、Fba1 の代謝制御による DARP を介した NO ストレス応答も存在する可能性がある。

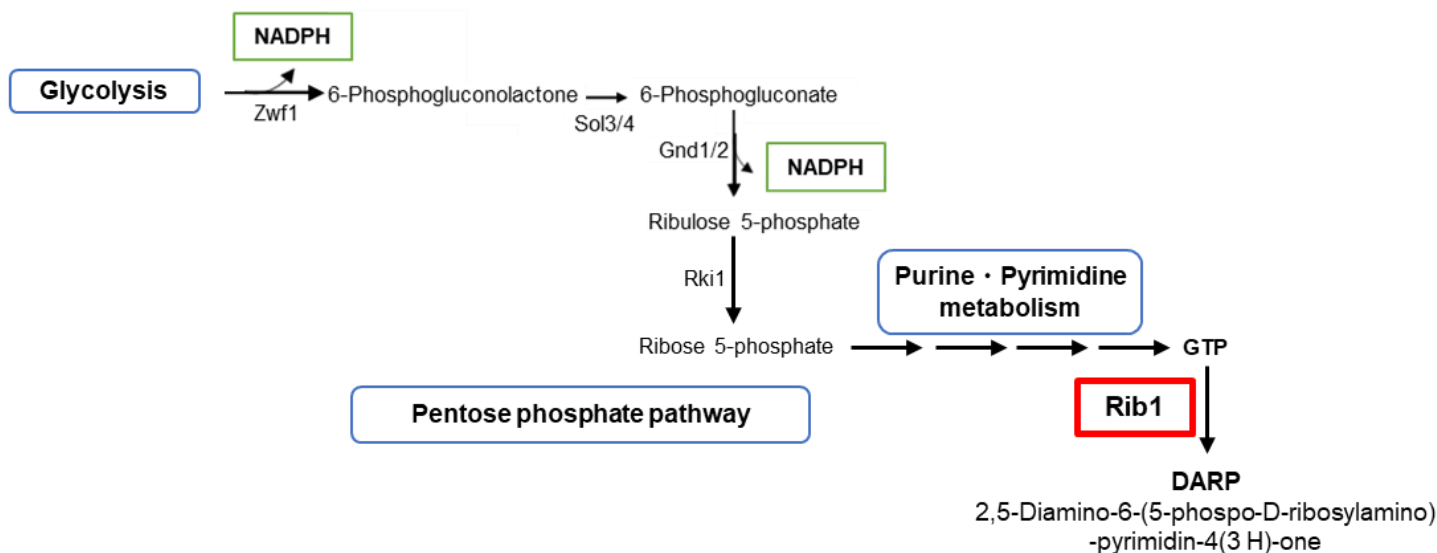


Figure 23 ペントースリン酸回路と Rib1 による DARP の合成経路 ペントースリン酸回路によって合成された ribose 5-phosphate はプリン・ピリミジンヌクレオチド合成経路を経て、GTP へと変換される。GTP は Rib1 によって DARP に変換される。

酵母・病原性真菌に特異的なストレス応答機構である可能性

C. glabrata や *C. albicans* は宿主への感染する病原性真菌である。*S. cerevisiae* についても、宿主の免疫機構の不全状態に陥ると感染できることが示唆されている。本研究によって明らかとなった Fba1 の SGT 化修飾は宿主からの免疫応答に重要な役割を有することが予想される。上述の通り、*S. cerevisiae* とヒトの Fba1 は identity が 40%程度と低い。一方、*S. cerevisiae* の Fba1 と *C. glabrata* や *C. albicans* の Fba1 は高い相同性を示している。また、糸状菌の *A. nidulans* においても Cys112 は保存されている (Figure 11)。これらのことから、病原性真菌の Fba1 を標的とすることで、ヒトへの影響を抑えることが可能な新規抗真菌薬の開発が期待できる。抗真菌薬の候補分子として、SGT 化修飾を介したストレス耐性機構を阻害する目的で Cys112 の -SH 基に分子が結合し、かつ Fba1 の立体構造に大きく影響を与えないことが望ましいと考えられる。一方で、*S. cerevisiae* は Fba1 の活性が生育に必須であることも報告されており¹¹³、Cys112 により嵩高い分子が不可逆的に結合することでも抗真菌活性を示すことができると考えられる。

5. 総括

- ・酵母の細胞抽出液において、NO ドナー処理に依存して細胞内タンパク質が SNO 化されることが示唆された。
- ・酵母の細胞内において、解糖系の酵素である Fba1 の Cys112 が NO ドナー処理依存的に SGT 化されることが明らかとなった。
- ・Cys112 の SGT 化修飾は、Fba1 の酵素活性を抑制することが明らかとなった。
- ・Fba1 の SGT 化修飾は解糖系の上流を抑制し、ペントースリン酸回路を亢進することで、代謝を制御している可能性が示された。
- ・Fba1 は Grx1 によって脱 SGT 化され、代謝の制御が解除されることが示唆された。
- ・Fba1 の SGT 化修飾による代謝制御が、酵母の NO ストレス耐性に寄与することが示された。

6. 謝辞

本研究の遂行ならびに博士論文の作製にあたり、終始熱心にご指導いただきました奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス領域ストレス微生物科学研究室の高木博史教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の全般にわたり実験の遂行、論文の作成を直接ご指導いただきました同研究室の那須野亮助教、有益なご助言をいただきました吉川雄樹博士、磯貝章太博士に深く御礼申し上げます。さらに、日頃より様々なご助言をいただきました渡辺大輔准教授、西村明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ご御礼申し上げます。

研究を遂行するにあたり貴重なアドバイスを頂いた塚崎智也教授と木俣行雄准教授に、この場を借りて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を行っていただきまし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、私生活ともにお世話になりました皆様方に深く感謝いたします。

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. Babazadeh, R. Lahtvee, P. J., Adiels, C. B., Goksör, M., Nielsen, J. B., & Hohmann, S. The yeast osmostress response is carbon source dependent. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
3. Hartwell, L. H., Szankasi, P., Roberts, C. J., Murray, A. W. & Friend, S. H. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science.* **278**, 1064–1068 (1997).
4. Lum, P. Y., Armour, C.D., Stepaniants, S. B., Cavet, G., Wolf, M. K., Butler, J. S., Hinshaw, J. C., Garnier, P., Prestwich, G. D., Leonardson, A., Garrett-Engle, P., Rush, C. M., Bard, M., Schimmack, G., Phillips, J. W., Roberts, C. J. & Shoemaker, D. D. Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. *Cell* **116**, 121–137 (2004).
5. Miller-Fleming, L., Giorgini, F. & Outeiro, T. F. Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Biotechnol. J.* **3**, 325–338 (2008).
6. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S. & Byrns, R. E. EDRF produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 9265–9269 (1987).
7. Wink, D. A., Hines, H. B., Cheng, R. Y. S., Switzer, C. H., Flores-Santana, W., Vitek, M. P., Ridnour, L. A. & Colton, C. A. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 873–891 (2011).
8. 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.* **98**, 13454–13459 (2001).
9. Barraud, N., Hassett, D. J., Hwang, S. H., Rice, S. A., Kjelleberg, S. & Webb, J. S. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 7344–7353 (2006).

10. Gusarov, I. & Nudler, E. NO-mediated cytoprotection: Instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 13855–13860 (2005).
11. Shatalin, K., Gusarov, I., Avetissova, E., Shatalina, Y., McQuade, L. E., Lippard, S. J. & Nudler, E. *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1009–1013 (2008).
12. Balez, R. & Ooi, L. Getting to NO alzheimer's disease: neuroprotection versus neurotoxicity mediated by nitric oxide. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, (2016).
13. Tewari, D., Sah, A. N., Bawari, S., Nabavi, S. F., Dehpour, A. R., Shirooie, S., Braidy, N., Fiebich, B. L., Vacca, R. A. & Nabavi, S. M. Role of nitric oxide in neurodegeneration: function, regulation, and inhibition. *Curr. Neuropharmacol.* **19**, 114–126 (2020).
14. Zaninotto, F., La Camera, S., Polverari, A. & Delledonne, M. Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol.* **141**, 379–383 (2006).
15. 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**, 13454–13459 (2001).
16. 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).
17. Nasuno, R., Aitoku, M., Manago, Y., Nishimura, A., Sasano, Y. & Takagi, H. Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism in yeast through the activation of the transcription factor Mac1. *PLoS One* **9**, 1–18 (2014).
18. Yoshikawa, Y., Nasuno, R., Kawahara, N., Nishimura, A., Watanabe, D. & Takagi, H. Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **57**, 85–91 (2016).
19. Borrello, S., Nicolò, C., Delogu, G., Pandolfi, F. & Ria, F. TLR2: a crossroads between infections and autoimmunity? *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **24**, 549–556 (2011).

20. Tinberg, C. E., Tonzetich, Z. J., Wang, H., Do, L. H., Yoda, Y., Cramer, S. P. & Lippard, S. J. Characterization of iron dinitrosyl species formed in the reaction of nitric oxide with a biological Rieske center. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 18168–18176 (2010).
21. Carreras, M. C., Franco, M. C., Peralta, J. G. & Poderoso, J. J. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol. Aspects Med.* **25**, 125–139 (2004).
22. Burney, S., Caulfield, J. L., Niles, J. C., Wishnok, J. S. & Tannenbaum, S. R. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **424**, 37–49 (1999).
23. Bethann S. H., Suzanne M. N. & Alexander. D. J. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the *YHB1* gene in nitrosative stress and virulence. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5356–5372 (2005).
24. Denninger, J. W. & Marletta, M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1411**, 334–350 (1999).
25. Radi, R. Structural basis of its functional effects. *Acc Chem Res* **46**, 550–559 (2014).
26. Souza, J. M., Peluffo, G. & Radi, R. Protein tyrosine nitration-functional alteration or just a biomarker? *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 357–366 (2008).
27. Abello, N., Kerstjens, H. A. M., Postma, D. S. & Bischoff, R. Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *J. Proteome Res.* **8**, 3222–3238 (2009).
28. Glacet, A., Letourneau, F., Leveque, L. & Villa, P. Kinetic study of nitrite inhibition during alcoholic fermentation of beet molasses. *Biotechnol. Lett.* **3**, 17–19 (1985).
29. Wylie, L. J., Kelly, J., Bailey, S. J., Blackwell, J. R. Skiba, P. F., Winyard, P. G., Jeukendrup, A. E., Vanhatalo, A. & Jones, A. M. Beetroot juice and exercise: pharmacodynamic and dose-response relationships. *J. Appl. Physiol.* **115**, 325–336 (2013).
30. Hinze, H. & Holzer, H. Effect of sulfite or nitrite on the ATP content and the carbohydrate metabolism in yeast. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **181**, 87–91 (1985).

31. Maurais, A. J. & Weerapana, E. Reactive-cysteine profiling for drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **50**, 29–36 (2019).
32. Jones, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **295**, (2008).
33. Held, J. M. & Gibson, B. W. Regulatory control or oxidative damage? Proteomic approaches to interrogate the role of cysteine oxidation status in biological processes. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, (2012).
34. Winterbourn, C. C. & Metodiewa, D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 322–328 (1999).
35. Hall, A., Parsonage, D., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. *J. Mol. Biol.* **402**, 194–209 (2010).
36. Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E. & Stamler, J. S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 150–166 (2005).
37. Matsumoto, A., Comatas, K. E., Liu, L. & Stamler, J. S. Screening for nitric oxide - dependent protein-protein interactions. *Science*. **301**, 657–661 (2003).
38. Hara, M. R., Agrawal, N., Kim, S. F., Cascio, M. B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J. H., Tankou, S. K., Hester, L. D., Ferris, C. D., Hayward, S. D., Snyder, S. H. & Sawa, A. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.* **7**, 665–674 (2005).
39. Forrester, M. T., Seth, D., Hausladen, A., Eyler, C. E., Foster, M. W., Matsumoto, A., Benhar, M., Marshall, H. E. & Stamler, J. S. Thioredoxin-interacting protein (Txnip) is a feedback regulator of S-nitrosylation. *J. Biol. Chem.* **284**, 36160–36166 (2009).
40. Saville, B. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* **83**, 670–672 (1958).
41. John, A. C., Sungmee, Y. K., Diane, T., Murali, C. K., Roberto, P., James, B. M., Yoram, V., Raymond, W. N., Danae, C., Allen, M. M., Matthew, B. G. & David, A. W. Convenient colorimetric and fluorometric assays for S-nitrosothiols. *Anal. Biochem* **238**, 150–158 (1996).
42. Forrester, M. T., Foster, M. W., Benhar, M. & Stamler, J. S. Detection

- of protein *S*-nitrosylation with the biotin-switch technique. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 119–126 (2009).
43. Whalen, E. J., Foster, M. W., Matsumoto, A., Ozawa, K., Violin, J. D., Que, L. G., Nelson, C. D., Benhar, M., Keys, J. R., Rockman, H. A., Koch, W. J., Daaka, Y., Lefkowitz, R. J. & Stamler, J. S. Regulation of β -adrenergic receptor signaling by *S*-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Cell* **129**, 511–522 (2007).
 44. Ozawa, K., Whalen, E. J. & Nelson, C. D. *S*-Nitrosylation of β -arrestin regulates β -adrenergic receptor trafficking. *Chemtracts* **21**, 392–394 (2008).
 45. Wang, G., Moniri, N. H., Ozawa, K., Stamler, J. S. & Daaka, Y. Nitric oxide regulates endocytosis by *S*-nitrosylation of dynamin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 1295–1300 (2006).
 46. Lee, P. Y., Bae, K. H., Jeong, D. G., Chi, S. W., Moon, J., H., Kang, S., Cho, S., Lee, S. C., Park, B. C. & Park, S. G. The *S*-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 is reduced by interaction with glutathione peroxidase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cells* **31**, 255–259 (2011).
 47. Brigelius-Flohé, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 951–965 (1999).
 48. Meister, A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* **263**, 17205–17208 (1988).
 49. Gales, G., Penninckx, M., Block, J. C. & Leroy, P. Role of glutathione metabolism status in the definition of some cellular parameters and oxidative stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* cells growing as biofilms. *FEMS Yeast Res.* **8**, 667–675 (2008).
 50. Rashdan, N. A., Shrestha, B. & Pattillo, C. B. *S*-Glutathionylation, friend or foe in cardiovascular health and disease. *Redox Biol.* **37**, 101693 (2020).
 51. Zhang, J., Ye, Z. W., Singh, S., Townsend, D. M. & Tew, K. D. An evolving understanding of the *S*-glutathionylation cycle in pathways of redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **120**, 204–216 (2018).
 52. Kambe, T., Song, T., Takata, T., Hatano, N., Miyamoto, Y., Nozaki, N., Naito, Y., Tokumitsu, H. & Watanabe, Y. Inactivation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase I by *S*-glutathionylation of the

- active-site cysteine residue. *FEBS Lett.* **584**, 2478–2484 (2010).
53. Dong, K., Wu, M., Liu, X., Huang, Y., Zhang, D., Wang, Y., Yan, L. J. & Shi, D. Glutaredoxins concomitant with optimal ROS activate AMPK through *S*-glutathionylation to improve glucose metabolism in type 2 diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* **101**, 334–347 (2016).
 54. Butturini, E., Darra, E., Chiavegato, G., Cellini, B., Cozzolino, F., Monti, M., Pucci, P., Dell'Orco, D. & Mariotto, S. *S*-Glutathionylation at Cys328 and Cys542 impairs STAT3 phosphorylation. *ACS Chem. Biol.* **9**, 1885–1893 (2014).
 55. Singh, S. P., Wishnok, J. S., Keshive, M., Deen, W. M. & Tannenbaum, S. R. The chemistry of the *S*-nitrosoglutathione/glutathione system. *Biochemistry* **93**, 14428–14433 (1996).
 56. Klatt, P., Pineda Molina, E., Pérez-Sala, D. & Lamas, S. Novel application of *S*-nitrosoglutathione-sepharose to identify proteins that are potential targets for *S*-nitrosoglutathione-induced mixed-disulphide formation. *Biochem. J.* **349**, 567–578 (2000).
 57. West, M. B., Hill, B. G., Xuan, Y., Bhatnagar, A., West, M. B., Hill, B. G., Xuan, Y. & Bhatnagar, A. Protein glutathiolation by nitric oxide: an intracellular mechanism regulating redox protein modification. *FASEB J.* **20**, 1715–1717 (2006).
 58. Mallis, R. J. & Thomas, J. A. Effect of *S*-nitrosothiols on cellular glutathione and reactive protein sulfhydryls. *Arch. Biochem. Biophys.* **383**, 60–69 (2000).
 59. Sun, J., Xin, C., Eu, J. P., Stamler, J. S. & Meissner, G. Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 11158–11162 (2001).
 60. Matsui, R., Ferran, B., Oh, A., Croteau, D., Shao, D., Han, J., Pimentel, D. R. & Bachschmid, M. M. Redox regulation via glutaredoxin-1 and protein *S*-glutathionylation. *Antioxidants Redox Signal.* **32**, 677–700 (2020).
 61. Sabens, L. E. A., Gao, X. H. & Miesal, J. J. Mechanisms of altered redox regulation in neurodegenerative diseases-focus on *S*-glutathionylation. *Antioxidants Redox Signal.* **16**, 543–566 (2012).
 62. Musaogullari, A. & Chai, Y. C. Redox regulation by protein *S*-glutathionylation: from molecular mechanisms to implications in health

- and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–25 (2020).
63. Gravina, S. A. & Mieyal, J. J. Thioltransferase is a specific glutathionyl mixed disulfide oxidoreductase. *Biochemistry* **32**, 3368–3376 (1993).
 64. Yang, Y., Jao, S. C., Nanduri, S., Starke, D. W., Mieyal, J. J. & Qin, J. Reactivity of the human thioltransferase (glutaredoxin) C7S, C25S, C78S, C82S mutant and NMR solution structure of its glutathionyl mixed disulfide intermediate reflect catalytic specificity. *Biochemistry* **37**, 17145–17156 (1998).
 65. Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W. & Grant, C. M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1081–1091 (1998).
 66. Pujol-Carrion, N., Belli, G., Herrero, E., Nogues, A. & de la Torre-Ruiz, M. A. Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **119**, 4554–4564 (2006).
 67. Rodríguez-Manzanegue, M. T., Ros, J., Cabiscol, E., Sorribas, A. & Herrero, E. Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8180–8190 (1999).
 68. Izquierdo, A., Casas, C., Mühlenhoff, U., Lillig, C. H. & Herrero, E. *Saccharomyces cerevisiae* Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. *Eukaryot. Cell* **7**, 1415–1426 (2008).
 69. Eckers, E., Bien, M., Stroobant, V., Herrmann, J. M. & Deponte, M. Biochemical characterization of dithiol glutaredoxin 8 from *Saccharomyces cerevisiae*: The catalytic redox mechanism redux. *Biochemistry* **48**, 1410–1423 (2009).
 70. Li, W. F., Yu, J., Ma, X. X., Teng, Y. B., Luo, M., Tang, Y. J. & Zhou, C. Z. Structural basis for the different activities of yeast Grx1 and Grx2. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1804**, 1542–1547 (2010).
 71. Abdalla, M., Eltayb, W. A. & Yousif, A. Comparison of structures among *Saccharomyces cerevisiae* Grxs proteins. *Genes Environ.* **40**, 1–9 (2018).
 72. Patey, D. H. the University Hospital. *Lancet* **269**, 420–422 (1957).
 73. Eberhards, V., North, R. J. & Anthony, W. L. Observations on the fine

- structure of the yeast cell. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**, 689–699 (1961).
74. Van Den Brink, J., Canelas, A. B., Van Gulik, W. M., Pronk, J. T. Heijnen, J. J., De Winde, J. H. & Daran-Lapujade, P. Dynamics of glycolytic regulation during adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to fermentative metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5710–5723 (2008).
 75. Yi, M., Ban, Y., Tan, Y., Xiong, W., Li, G. & Xiang, B. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 and 4: A pair of valves for fine-tuning of glucose metabolism in human cancer. *Mol. Metab.* **20**, 1–13 (2019).
 76. Jiang, P., Du, W. & Wu, M. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein Cell* **5**, 1–11 (2014).
 77. Ralser, M., Heeren, G., Breitenbach, M., Lehrach, H. & Krobitsch, S. Triose phosphate isomerase deficiency is caused by altered dimerization-not catalytic inactivity-of the mutant enzymes. *PLoS One* **1**, (2006).
 78. Yamamoto, T., Takano, N., Ishiwata, K., Ohmura, M., Nagahata, Y., Matsuura, T., Kamata, A., Sakamoto, K., Nakanishi, T., Kubo, A., Hishiki, T. & Suematsu, M. Reduced methylation of PFKFB3 in cancer cells shunts glucose towards the pentose phosphate pathway. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
 79. Deng, X., Liang, H., Ulanovskaya, O. A., Ji, Q., Zhou, T., Sun, F., Lu, Z., Hutchison, A. L., Lan, L., Wu, M., Cravatt, B. F. & He, C. Steady-state hydrogen peroxide induces glycolysis in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **196**, 2499–2513 (2014).
 80. Deng, X., Weerapana, E., Ulanovskaya, O., Sun, F., Liang, H., Ji, Q., Ye, Y., Fu, Y., Zhou, L., Li, J., Zhang, H., Wang, C., Hicks, L. M., Lan, L., Wu, M., Cravatt, B. F. & He, C. Proteome-wide quantification and characterization of oxidation-sensitive cysteines in pathogenic bacteria. *NIH Public Access* **13**, 358–370 (2014).
 81. Markov, A. K., Neely, W. A., Didlake, R. H., Terry, J., Causey, A. & Lehan, P. H. Metabolic responses to fructose-1,6-diphosphate in healthy subjects. *Metabolism.* **49**, 698–703 (2000).
 82. Verlinde, C. L. M. J. & Quigley, P. M. Structure-based reevaluation of the mechanism of class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J. Mol. Model.* **5**, 37–45 (1999).

83. Alefounder, P. R., Baldwin, S. A., Perham, P. N. & Short, N. J. Cloning, sequence analysis and over-expression of the gene for the class II fructose, 1,6-bisphosphate aldolase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **257**, 529–534 (1989).
84. Galperin, M. Y., Aravind, L. & Koonin, E. V. Aldolases of the Dhna family: A possible solution to the problem of pentose and hexose biosynthesis in archaea. *FEMS Microbiol. Lett.* **183**, 259–264 (2000).
85. Thomson, G. J., Howlett, G. J., Ashcroft, A. E. & Berry, A. The *dhnA* gene of *Escherichia coli* encodes a Class I fructose bisphosphate aldolase. *Biochem. J.* **331**, 437–445 (1998).
86. Zhang, L., Guo, Z., Huang, J., Liu, M., Wang, Y. & Ji, C. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr. Sect. Structural Biol. Commun.* **70**, 1376–1379 (2014).
87. Siebers, B., Brinkmann, H., Dörr, C., Tjaden, B., Lilie, H., Van der Oost, J. & Verhees, C. H. Archaeal fructose-1,6-bisphosphate aldolases constitute a new family of archaeal type class I aldolase. *J. Biol. Chem.* **276**, 28710–28718 (2001).
88. Fonvielle, M., Coinçon, M., Daher, R., Desbenoit, N., Kosieradzka, K., Barilone, N., Gicquel, B., Sygusch, J., Jackson, M. & Therisod, M. Synthesis and biochemical evaluation of selective inhibitors of class II fructose bisphosphate aldolases: towards new synthetic antibiotics. *Chem. - A Eur. J.* **14**, 8521–8529 (2008).
89. Luo, J., Yang, H. & Song, B. L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 225–245 (2020).
90. Corso, C. R. & Acco, A. Glutathione system in animal model of solid tumors: from regulation to therapeutic target. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **128**, 43–57 (2018).
91. Moreno-Sánchez, R., Gallardo-Pérez, J. C., Rodríguez-Enríquez, S., Saavedra, E. & Marín-Hernández, Á. Control of the NADPH supply for oxidative stress handling in cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* **112**, 149–161 (2017).
92. Zhang, J., Zhang, B., Li, X., Han, X., Liu, R. & Fang, J. Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase as potential anticancer agents: an update. *Med. Res. Rev.* **39**, 5–39 (2019).

93. Palde, P. B. & Carroll, K. S. A universal entropy-driven mechanism for thioredoxin-target recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 7960–7965 (2015).
94. Kirkman, H. N. & Gaetani, G. F. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 4343–4347 (1984).
95. Gardner, P. R. Hemoglobin: a nitric-oxide dioxygenase. *Scientifica* **2012**, (2012).
96. Sakamoto, A., Ueda, M. & Morikawa, H. *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an *S*-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett.* **515**, 20–24 (2002).
97. Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J. & Stamler, J. S. A metabolic enzyme for *S*-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490–494 (2001).
98. Shiro, Y. Structure and function of bacterial nitric oxide reductases: nitric oxide reductase, anaerobic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1817**, 1907–1913 (2012).
99. Collman, J. P., Yang, Y., Dey, A., Decréau, R. A., Ghosh, S., Ohta, T. & Solomon, E. I. A functional nitric oxide reductase model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15660–15665 (2008).
100. Ilari, A. & Boffi, A. Structural studies on flavohemoglobins. *Methods Enzymol.* **436**, 187–202 (2008).
101. Gardner, P. R., Gardner, A. M., Martin, L. A. & Salzman, A. L. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10378–10383 (1998).
102. Schinko, T., Berger, H., Lee, W., Gallmetzer, A., Pirker, K., Pachlinger, R., Buchner, I., Reichenauer, T., Güldener, U. & Strauss, J. Transcriptome analysis of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans* reveals connections to nitric oxide metabolism. *Mol. Microbiol.* **78**, 720–738 (2010).
103. Tillmann, A., Gow, N. A. R. & Brown, A. J. P. Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in yeast. *Eur. PMC Funders Gr.* **39**, 219–223 (2013).
104. Michael T. F., Christine E. E. & Jeremy, N. R. Bacterial flavohemoglobin: a molecular tool to probe mammalian nitric oxide

- biology. *NIH Public Access* **23**, 1–7 (2008).
105. Anam, K., Nasuno, R. & Takagi, H. A novel mechanism for nitrosative stress tolerance dependent on GTP cyclohydrolase II activity involved in riboflavin synthesis of yeast. *Sci. Rep.* **10**, 1–10 (2020).
 106. Trentham, D. R., McMurray, C. H. & Pogson, C. I. The active chemical state of D-glyceraldehyde 3-phosphate in its reactions with D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, aldolase and triose phosphate isomerase. *Biochem. J.* **114**, 19–24 (1969).
 107. Yu, J. P., Ladapo, J. & Whitman, W. B. Pathway of glycogen metabolism in *Methanococcus maripaludis*. *J. Bacteriol.* **176**, 325–332 (1994).
 108. Orosz, F. & Ovádi, J. Dynamic interactions of enzymes involved in triosephosphate metabolism. *Eur. J. Biochem.* **160**, 615–619 (1986).
 109. Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Milzani, A. & Rossi, R. S-glutathionylation in human platelets by a thiol-disulfide exchange-independent mechanism. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1501–1510 (2005).
 110. Gilbert, H. F. Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfidebond stability. *Methods Enzymol.* **251**, 8–28 (1995).
 111. David, E. H., Milena, H., Ida, T., Mijuskovis, A., Chrisopher, M. D., Virág, B., Jon, M. F., Tobias, P. D., Péter, N., Jianing, L. & Akaike, T. Cysteine perthiosulfenic acid (Cys-SSOH): A novel intermediate in thiol-based redox signaling?. *Redox Biol.* **14**, 379-385 (2018)
 112. Catherine, F. H., Iris, B., Faith, T. L., Drew, D. I., Christine, H. S., Blaine, W. B., Valeria, S. V., Zachary, M. T., Eliza, D. F., Juliet, M. B., Megan, L. H., Lucía, Á., Akiyama, M., Kumagai, U., Jon, M. F. & Joseph, L. Cysteine trisulfide protects *E. coli* from electrophile-induced death through the generation of cysteine hydropersulfide. *Chem. Res. Toxicol.*, **33**, 678-686 (2020)
 113. Cieśla, M., Mierzejewska, J., Adamczyk, M., Farrants, A. K. Ö. & Boguta, M. Fructose bisphosphate aldolase is involved in the control of RNA polymerase III-directed transcription. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 1103–1110 (2014).