

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成23年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 若手研究(B) 4. 補助事業期間 平成23年度～平成24年度

5. 課題番号

2	3	7	8	0	0	8	1
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題 細胞膜リン脂質の品質管理に働くシステイン/シスチンのシャトルシステム

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
6 0 3 9 5 6 5 5	オオツ イワオ 大津 厳生	バイオサイエンス研究科	助教

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

申請者は、大腸菌におけるシステインの生理機能を研究する過程で、遊離のシステインが細胞表層（ペリプラズム空間）で存在する有害な過酸化水素を消去し、細胞を酸化ストレスから防御するユニークな機構を明らかにした（J. Biol. Chem., 285, 17479, 2010）。本研究課題では、平成23年度の研究計画の2項目をすべて行い良好な結果を得た。1）ペリプラズムに蓄積する過酸化水素の検出：Hpx変異株（カタラーゼ、ペルオキシダーゼの機能欠損株）は、1マイクロM程度の過酸化水素を細胞質に蓄積することが知られている。過酸化水素は、細胞膜を自由に通り抜けることができるので、ペリプラズムにも同程度の過酸化水素が蓄積していると考えられる。このHpx変異株と比較して、さらに過酸化水素消去に働くシステイントランスポーターYdeDを欠損させた変異株で、ペリプラズムに過酸化水素が蓄積することを見出した。2）過酸化脂質の定量：細胞膜の主成分はリン脂質であることから、そのリン脂質（LPSも含む）が過酸化水素によって酸化され、過酸化脂質が生じ、細胞にダメージを与えるのではないかと予想した。そこで1）で構築したHpx/ydeD/fliY欠損株とHpx変異株を過酸化水素添加培地で10時間培養後、細胞膜リン脂質を調製し、過酸化脂質の非酵素的分解産物であるマロンジアルデヒドなどのアルデヒドとチオバルビツール酸を酸性条件で反応させ、生成する赤色の色素を分光学的に定量し、ydeD/fliY欠損株で有意に過酸化水素による過酸化脂質の生成量が増加していた。以上のことから、ペリプラズム空間で発生する過酸化水素をシステインが消去することで過酸化脂質の生成を未然に防いでいるものと考えられる。

10. キーワード

(1) システイン	(2) ペリプラズム	(3) 大腸菌	(4) 過酸化脂質
(5) 酸化ストレス	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(区分)(1) 当初の計画以上に進展している。

(理由)

平成23年度の研究計画の2項目をすべて行い良好な結果を得た。1) ペリプラズムに蓄積する過酸化水素の検出: Hpx変異株(カタラーゼ、ペルオキシダーゼの機能欠損株)は、1マイクロM程度の過酸化水素を細胞質に蓄積することが知られている。過酸化水素は、細胞膜を自由に通じ抜けることができるので、ペリプラズムにも同程度の過酸化水素が蓄積していると考えられる。このHpx変異株と比較して、さらに過酸化水素除去に働くシステイントランスポーターYdeDを欠損させた変異株で、ペリプラズムに過酸化水素が蓄積することを見出した。内膜を通過できない過酸化水素特異的検出試薬(非細胞膜透過性BES)を用いた。

2) 過酸化脂質の定量: 細胞膜の主成分はリン脂質であることから、そのリン脂質(LPSも含む)が過酸化水素によって酸化され、過酸化脂質が生じ、細胞にダメージを与えるのではないかと予想した。そこで1)で構築したHpx/ydeD/fliY欠損株とHpx変異株を過酸化水素添加培地で10時間培養後、細胞膜リン脂質を調製し、過酸化脂質の非酵素的分解産物であるマロンジアルデヒドなどのアルデヒドとチオバルビツール酸を酸性条件で反応させ、生成する赤色の色素を分光学的に定量し、ydeD/fliY欠損株で有意に過酸化水素による過酸化脂質の生成量が増加していた。

また、当初の計画になかった成果も得られた。これまでシャトルシステムの不明であったFliYと協調して働くシステイントランスポーターは不明であったが、このトランスポーターの同定することに成功した。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

平成24年度は下記の当初の計画を実施する。また、平成23年度で得られたシステイントランスポーターの機能解析も新たに追加したい。

3) 過酸化脂質と細胞分裂との関連性: 過酸化水素に曝し、細胞伸長を引き起こしたHpx変異株と過酸化水素処理をしていない細胞からリン脂質を調整し、薄層クロマトグラフィー(TLC)およびガスクロマトグラフ質量分析法を用いて、リン脂質(大腸菌の主要なリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン)の酸化の割合と細胞伸長との相関関係を評価する。

ここで真核生物の過酸化脂質の生成の鍵酵素はホスホリパーゼA2であり、大腸菌にもホスホリパーゼが存在するが、A1またはA2活性のいずれを有しているかは分かっていない。さらに、真核生物では酸化された過酸化脂質からホスホリパーゼA2により、酸化された脂肪酸鎖が切断され、グルタチオンペルオキシダーゼ(GSHPx)により修復される。しかしながら、大腸菌はこのGSHPxを有していません。そのため過酸化脂質を分解するホスホリパーゼが存在するにもかかわらず修復経路がないため、システインの重要な役割があるのではないかと考えられる。そこで大腸菌のホスホリパーゼをHis-タグ精製し、その酵素の特性を解析する。

大腸菌をモデルに遊離のシステインが、リン脂質のクオリティーコントロールに重要な役割を担っている可能性を示し、システインによる新たな酸化ストレス防御機構を明らかにする。

(次年度の研究費の使用計画)

本研究課題遂行のために必要な消耗品や、研究成果発表に必要な旅費や別刷り費用(その他)、研究の進展に必要な勉強会による活発な情報交換のための技術指導や招聘者に対する謝金として、当初の計画通りに執行する予定である。

13.研究発表(平成23年度の研究成果)

〔雑誌論文〕計(2)件 うち査読付論文 計(0)件

著者名		論文標題			
大津厳生、鈴木菜里奈、高木博史		大腸菌の内膜輸送体を介したシステイン関連化合物のシャトルシステムによる酸化ストレス防御機構			
雑誌名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
化学と生物		無	50	2 0 1 2	不明(印刷中)
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
-					

著者名		論文標題			
大津厳生、鈴木菜里奈、仲谷豪、高木博史		システイン/シスチンのシャトルシステムによる新しい酸化ストレス防御機構			
雑誌名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
BIOINDUSTRY		無	印刷中	2 0 1 2	不明
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
-					

〔学会発表〕計(4)件 うち招待講演 計(2)件

発表者名		発表標題	
大津厳生、高木博史		システイン/シスチンのシャトルシステムによる大腸菌の新しい酸化ストレス防御機構	
学会等名		発表年月日	発表場所
日本農芸化学会 シンポジウム(招待講演)		2012年3月25日	京都府京都市

発表者名	発表標題	
大津巖生、高木博史	システイン/シスチンのシャトルシステムによる大腸菌の新規な酸化ストレス防御機構	
学会等名	発表年月日	発表場所
第2回レドックス・ライフィケーションシンポジウム(招待講演)	2012年3月8日	東京都文京区

発表者名	発表標題	
大津巖生、高木博史	システインの魅力的なエレメント	
学会等名	発表年月日	発表場所
国立遺伝学研究所研究会	2011年12月10日	静岡県三島市

発表者名	発表標題	
鈴木茉里奈、大津巖生、Natthawut Wiriyanawudhiwong、高木博史	システイン/シスチンのシャトルシステムによる大腸菌の新しい酸化ストレス防御機構	
学会等名	発表年月日	発表場所
第84回日本生化学会大会	2011年9月22日	京都府京都市

〔図書〕計(0)件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

--