

様 式 C - 7 - 1

平成 2 5 年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

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 基盤研究(A) 4. 研究期間 平成 2 5 年度 ~ 平成 2 7 年度
5. 課題番号

2	5	2	5	2	0	6	5
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 酵母における一酸化窒素の生成機構と生理的役割の解明

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
5 0 2 7 5 0 8 8	タカギ ヒロシ 高木 博史	バイオサイエンス研究科	教授

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
8 0 1 2 5 9 2 1	カワモト ススム 川本 進	千葉大学・真菌医学研究センター	教授
3 0 3 3 3 4 8 8	チバナ ヒロジ 知花 博治	千葉大学・真菌医学研究センター	准教授

9. 研究実績の概要

- 1) NOの生成機構の解析：生化学的手法によりTah18とDre2のストレス下での相互作用を解析し、ストレスに反応してTah18がDre2から解離することを示唆するデータを得た。
- 2) NOの生理的役割の解析：野生株とMac1遺伝子破壊株（mac1株）を用い、哺乳類NO合成酵素（NOS）の阻害剤（NAME）を添加した条件で、高温ストレス処理を行ったところ、mac1株では野生株に比べて有意に生存率が低下した。また、NAMEの添加によって野生株の生存率は低下したが、mac1株では生存率に変化はなかったことから、酵母にはNOS由来のNOおよびMac1依存的なストレス耐性機構が存在することが示された。また、野生株では高温ストレスに伴い、銅含量およびSod1活性が上昇するのに対し、mac1株やNAME処理した野生株では両者の上昇は見られなかった。さらに、高温ストレス下ではMac1の標的である銅トランスポーター遺伝子CTR1の転写量が増加していたが、NAME処理によって転写量の増加は抑制された。これらの結果は、ストレス下で発生するNOがMac1を活性化し、銅の取り込み系を亢進することで銅含量を増加させ、Sod1活性の上昇を引き起こし、ストレス耐性を獲得するという仮説を強く支持している。
- 3) 病原真菌におけるNOの生成機構・生理的役割の解析と病原性への寄与の検証：A. fumigatus やC. glabrataのプロモーター部位を改変して、Tah18発現抑制株をそれぞれ構築して解析を進め、C. glabrata Tah18発現抑制株のカイコ感染実験では野生株と比較して毒性が顕著に低下していることを見出した。また、C. neoformans Mpr1遺伝子破壊株を作製、解析し、50 の熱ショックに対し、野生型より高い感受性を示すことを見出した。

10. キーワード

(1) 一酸化窒素	(2) シグナル伝達	(3) 酸化ストレス耐性	(4) 酵母
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

酵母におけるNOの生理的役割について、NOが転写因子Mac1を活性化し、銅の取込み系を亢進することで細胞内の銅含量を増加させ、抗酸化酵素Sod1の活性化を介して酸化ストレス耐性を獲得する機構を明らかにできた。また、病原真菌においても、NO合成関連遺伝子の破壊株や発現抑制株の構築と機能解析を進めることができた。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

- 1) NOの生成機構の解析：酸化ストレス下においてTah18-Dre2複合体が解離するのか、また解離によってNOレベルが増加するのかを検討する。具体的には、共免疫沈降法を行うことで相互作用の検出系を確立し、酸化ストレス（過酸化水素、高温処理など）による解離の確認とNOレベルの測定を行う。また、Tah18とDre2の解離機構についても検討する。さらに、過酸化水素処理で複合体が解離する時のTah18およびDre2の修飾を質量分析によって解析する。
- 2) NOの生理的役割の解析：クロマチン免疫沈降法によってMac1がNO依存的に銅代謝関連遺伝子群のプロモーター領域に結合するかどうか調べる。また、ヒオチン・スイッチ法を用いて、Mac1のS-ニトロソ化を確認する。次に、NOによるS-ニトロソ化に伴って、実際に銅イオンの遊離が起こるかを原子吸光分析などで検討する。さらに、Mac1が結合するDNA領域をChip-Seq解析により明らかにし、Mac1を介した抗酸化機構の解明を目指す。
- 3) 病原真菌におけるNOの生成機構・生理的役割の解析と病原性への寄与の検証：各病原真菌において、酵母*S. cerevisiae*のNO生成に関与する酵素（Mpr1, Tah18）の遺伝子破壊株、発現抑制株、過剰発現株などを用いてさらに解析、考察を進める。各菌株の細胞内NOを定量し、また各種ストレス耐性などの表現型を調べることによって、これら病原真菌でMpr1やTah18がNOS活性の発現に関与するか、すなわちMpr1またはTah18依存的なNO合成やストレス耐性などが観察されるかなどについて、*S. cerevisiae*の実験系を参考にして詳細に解析する。

13.研究発表(平成25年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(1)件 うち査読付論文 計(0)件

著者名		論文標題			
高木博史		一酸化窒素を介した酵母の新しい抗酸化メカニズムとその応用			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁
バイオサイエンスとインダストリー	無	71	2	013	343-345
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
なし					

(学会発表) 計(5)件 うち招待講演 計(2)件

発表者名		発表標題	
高木博史		酵母の新しいストレス耐性機構の解析と育種への応用	
学会等名	発表年月日	発表場所	
2013年度日本生物工学会技術セミナー「生物機能エンジニアリングの最前線」	2014年01月15日	神戸大学瀧川記念学術交流会館(兵庫県神戸市)	

発表者名		発表標題	
高木博史		酵母におけるプロリンの生理機能とその応用	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第5回有用微生物応用研究会(招待講演)	2014年01月24日	長野市ものづくり支援センター(長野県長野市)	

発表者名		発表標題	
高木博史		酵母に見出したプロリン・アルギニン代謝を介した抗酸化機構とその応用	
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本農芸化学会2014年度大会シンポジウム「モノづくり農芸化学における「生命システム工学」を利用した次世代プラットフォーム」(招待講演)	2014年03月27日～2014年03月30日	明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)	

発表者名	発表標題	
相徳珠帆, 那須野 亮, 高木博史	酵母における銅代謝関連転写因子Mac1を介したNOによる高温ストレス耐性機構の解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本農芸化学会2014年度大会	2014年03月27日～2014年03月30日	明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

発表者名	発表標題	
吉川雄樹, 川原寛弘, 西村 明, 那須野 亮, 高木博史	酵母に見出したTah18タンパク質依存的なNO生成の制御機構	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本農芸化学会2014年度大会	2014年03月27日～2014年03月30日	明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

(図書) 計(1)件

著者名	出版社	
高木博史	化学同人	
書名	発行年	総ページ数
酵母の生命科学と生物工学 産業応用から基礎科学へ	2 0 1 3	19

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

--