

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 25 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 挑戦的萌芽研究 4. 補助事業期間 平成 25 年度～平成 27 年度

5. 課題番号

2	5	6	6	0	0	5	8
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 酵母のアセチル化酵素Mpr1による細胞内抗酸化系の新しい制御機構

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

9. 研究実績の概要

<p>1) 各生理的条件下における細胞内pGlu量の定量とMpr1依存的抗酸化機構の関連性の解析 今年度は、2,4-dinitrophenylhydrazineとN-[3-(Dimethylamino)propyl]-N'-ethylcarbodiimideを用いたpGluの可視化とHPLCを組み合わせて、pGluの定量系の構築を試みた。しかし、標準試料のpGluの定量は可能であったものの、細胞内のpGluを定量することはできなかった。これは、細胞内pGlu量が非常に少なく、本検出系の感度では検出できなかったためと考えられる。また、細胞内でMpr1の活性が内在性pGluによって制御されているかを検証するために、pGlu分解酵素であるoxoprolinase (Oxp1) の過剰発現株と破壊株を構築し、Mpr1のモデル基質である毒性物質AZCに対する耐性を指標として、in vivoにおけるMpr1の活性を評価した。しかし、Oxp1過剰発現株は野生株と同等のAZC耐性を示し、また、Oxp1破壊株は予想に反してAZC耐性が向上した。これらのことは、細胞内pGlu濃度は非常に低く、Mpr1の活性を阻害するほどではないことを示唆している。これは、in vitroでのpGluのKiが3 mM程度であることと矛盾していない。</p> <p>2) Mpr1のミトコンドリアへの輸送の生理的意義の解明 Mpr1がミトコンドリアへ輸送される場合、何らかのタンパク質との相互作用が必須であるとの着想から、ヒスチジンタグを融合したMpr1を酵母細胞内で発現させ、ニッケルカラムによるプルダウンアッセイを行い、Mpr1と相互作用するタンパク質を探索した。しかし、今年度の実験の範囲では、相互作用タンパク質を見出すことはできなかった。また、各種クロスリンカーを用いてMpr1と相互作用するタンパク質を共有結合で結合させるといった方法も試みたが、相互作用タンパク質の同定には至らなかった。</p>
--

10. キーワード

(1) 細胞内抗酸化系	(2) N-アセチルトランスフェラ ーゼMpr1	(3) 酵母	(4)
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(区分)(3) やや遅れている。

(理由)

pGluの可視化とHPLCを組み合わせ、pGluの定量系の構築を試みたが、本検出系の感度では検出できなかったことから、細胞内のpGlu量は非常に少ないと考えられた。また、Glu分解酵素であるoxoprolinase Oxp1の過剰発現株や遺伝子破壊株を構築したが、Mpr1の活性に変化はなかったことから、細胞内のpGlu濃度は非常に低いものと考えられた。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

今後、アルギニン合成に関与する各酵素の遺伝子破壊株を用いて、Mpr1の細胞内基質がこれまで考えられてきたL- 1-pyrroline-5-carboxylic acid (P5C)/L-glutamate- -semialdehyde (GSA)かどうか検証する。また、培養条件やストレス条件とMpr1の局在との関連性を評価するために、GFPを融合させたMpr1を用いて、各種条件によるMpr1の局在を蛍光顕微鏡にて観察する。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

(使用計画)

13.研究発表(平成25年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(0)件 うち査読付論文 計(0)件

著者名		論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					

(学会発表) 計(2)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題	
関口春菜, 西村 明, 那須野 亮, 高木博史		酵母に見出した抗酸化酵素N-アセチルトランスフェラーゼMpr1の機能解析.	
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本農芸化学会関西支部例会(第482回講演会)	2013年12月07日	神戸大学	

発表者名		発表標題	
関口春菜, 那須野 亮, 西村 明, 高木博史		酵母におけるN-アセチルトランスフェラーゼMpr1依存的な新規アルギニン合成系の分子機構の解析	
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	

〔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

--