

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26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

最近明らかにしたMpr1の立体構造に基づいて理論的な分子設計を行い、活性や安定性の向上した変異型Mpr1を取得するとともに、それらの構造機能相関を解析した。大腸菌を用いた組換え酵素としてMpr1を発現・精製した後、モデル基質であるL-アゼチジン-2-カルボン酸(AZC)を用いてin vitroで酵素活性を測定した。また、高温(50℃)処理後の残存活性により安定性を評価した。まず、CoAチオレートの安定化により反応を触媒するAsn178とその近傍にあるSer181をアニオン安定化能の高い残基に置換した変異型Mpr1、および基質のカルボキシレートを認識・結合するAsn135をアニオン結合能の高い塩基性残基などに置換した変異型Mpr1を作製した。これらの活性を測定したところ、野生型酵素に比べて著しく低下した。これは側鎖サイズの変化により正常な触媒反応が阻害されたためと考えられた。一方、N-acetyltransferaseには二量体形成が活性に重要である酵素も報告されている。Mpr1は溶液中で二量体を形成することから、二量体形成が活性や安定性に重要であると考えた。また、一般的に分子内相互作用はタンパク質の安定性を上昇させる。そこで、二量体の分子間表面かつ分子内ドメイン間に位置するAsn203にアミノ酸置換を導入し、分子間または分子内相互作用の強化を試みた。その結果、Asn203Lys-Mpr1は50℃における活性半減期が野生型酵素の最大約3.7倍に延長し、著しい安定性の向上が認められた。また、ネイティブゲルを用いた電気泳動の結果から、この熱安定性の向上は二量体形成の促進ではなく、分子内相互作用の強化に起因するものと考えられた。さらに、過去に取得した安定化型変異体(Phe65Leu)との二重変異体では、安定性が単独変異体よりも有意に向上した。また、各変異型酵素を酵母で発現させた結果、細胞内でのMpr1を介したアルギニン合成能の亢進が認められた。

10. キーワード

- | | | | |
|-----------------------------|--------|-------------|--------------|
| (1) N-アセチルトランスフェラ
ーゼMpr1 | (2) 酵母 | (3) アルギニン合成 | (4) 酸化ストレス耐性 |
| (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)

立体構造に基づきMpr1の分子設計を行ない、安定性の向上した変異体の取得に成功するとともに、細胞内でMpr1を介したアルギニン合成が亢進されることが示された。この結果は、酸化ストレス耐性の向上にはMpr1の安定化が有効であることを示唆している。

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遺伝子破壊株を用いて、Mpr1の細胞内基質の同定を試みる。また、組換え酵素を用いて、グルタミン酸、プロリンをはじめArg代謝に関連するアミノ酸に対するN-アセチル化活性をin vitroで測定する。さらに、培養条件やストレス条件とMpr1の局在との関連を調べるために、GFPを融合させたMpr1を用いて、各条件による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26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(1)件 うち査読付論文 計(1)件

著者名		論文標題			
高木博史, 那須野 亮		酵母に見出した新規な抗酸化酵素「N-アセチルトランスフェラーゼMpr1」			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁
化学と生物	有	53	2	015	148-155
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(2)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題	
平瀬 苺華, 那須野 亮, 渡辺大輔, 高木博史		酵母の酸化ストレス耐性に関わるN-acetyltransferase Mpr1の立体構造に基づいた分子設計と構造機能相関	
学会等名	発表年月日	発表場所	
2014年度日本農芸化学会関西支部大会(第486回講演会)	2014年09月20日	奈良先端科学技術大学院大学(奈良県生駒市)	

発表者名		発表標題	
平瀬 苺華, 那須野 亮, 渡辺大輔, 高木博史		酵母の抗酸化酵素N-acetyltransferase Mpr1 の立体構造に基づいた機能向上	
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本農芸化学会2015年度大会	2015年03月27日	岡山大学(岡山県岡山市)	

〔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

--