

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 27 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 27 年度～平成 29 年度

5. 課題番号

1	5	K	2	1	1	6	5
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 タンパク質脱ニトロ化酵素の探索・同定・機能解析

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
9 0 7 0 8 1 1 6	ナスノ リョウ 那須野 亮	バイオサイエンス研究科	研究員

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

タンパク質脱ニトロ化酵素が、遊離3-ニトロチロシン（3NT）をチロシンへ変換する活性を有すると仮定し、チロシン要求性株がチロシン非含有・3NT含有培地で生育可能か検証した。まず、チロシン要求性株候補としてチロシン合成経路の遺伝子TYR1、ARO7に着目した。tyr1株と aro7株を構築し、チロシン要求性を評価したところ、tyr1株はチロシン要求性を示さず、aro7株はチロシン・フェニルアラニン要求性を示したことから、aro7株をスクリーニング用株として選定した。続いて、aro7株をチロシン非含有・3NT含有培地で培養したが生育しなかった。酸性培地に亜硝酸塩を添加してNOドナーとし、ニトロ化ストレスを加えた条件でも、同様の結果であった。一方で、野生株は3NT単一窒素源培地で生育したことから、3NTは細胞内に取り込まれると考えられた。以上の結果から、タンパク質脱ニトロ化酵素には、遊離3NTをチロシンへ変換する活性はない（少なくとも生育に必要な量のチロシンは合成できない）と結論した。

続いて、生化学的に脱ニトロ化酵素を探索するため、タンパク質ニトロ化レベルが高い条件で脱ニトロ化酵素活性が上昇すると仮定し、ニトロ化レベルが高い細胞の処理・培養条件を探索した。細胞をパーオキシナイトライト（PN）特異的蛍光プローブ（NiSPY-3）で処理し、種々のストレス条件に曝したが、PNの増加は検出できなかった。一方で、同様のストレス条件で処理した細胞からタンパク質を抽出し、抗3NT抗体によるウェスタン解析を行ったところ、特定のストレス条件下でタンパク質ニトロ化が起こることが分かった。また、細胞の増殖時期に依存してタンパク質ニトロ化レベルが変化することも明らかとなった。

10. キーワード

- | | | | |
|------------------|-------------|--------|---------------|
| (1) タンパク質脱ニトロ化酵素 | (2) aro7破壊株 | (3) 酵母 | (4) 3-ニトロチロシン |
| (5) タンパク質ニトロ化 | (6) | (7) | (8) |

11. 現在までの進捗状況

(区分)(3) やや遅れている。

(理由)

タンパク質脱リン酸化酵素が遊離リン酸化チロシンに対して活性を示すことから、本研究では、タンパク質脱ニトロ化酵素が遊離3NTをチロシンに変換する活性を有すると仮定して、研究を開始した。しかし、チロシン要求性株を用いたスクリーニングの予備実験の結果、酵母細胞は、ニトロ化ストレスの有無にかかわらず、遊離3NTをチロシンに変換する酵素活性を持たないことが明らかになった。本研究においては、3NTを用いたスクリーニングを研究推進の第一案としており、この前提条件である「酵母が遊離3NTをチロシン化できる」ことの解析・確認に時間を要し、結果この条件が成立しなかったことが、進捗を遅らせている原因である。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

遊離3NTを用いたスクリーニングは困難であると考えられたことから、今後は生化学的手法および遺伝学的手法により脱ニトロ化酵素を探索する(申請書, 研究計画1-3)。以降の解析は、申請書に従って遂行する。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

(使用計画)

(課題番号: 15K21165)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(0)件/うち査読付論文 計(0)件/うち国際共著 計(0)件/うちオープンアクセス 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	国際共著	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
オープンアクセス						

(学会発表) 計(0)件/うち招待講演 計(0)件/うち国際学会 計(0)件

発表者名		発表標題	
学会等名	発表年月日	発表場所	

(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. 科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究: -

17. 備考

--