

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 2 8 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 2 7 年度 ~ 平成 2 9 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<br>那須野 亮 | 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

前年度の結果より、酵母は遊離3-ニトロチロシン（3NT）をチロシンへ変換する活性を持たないと考えられた。一方、グルタミン合成酵素（GS）は、ニトロ化により活性が阻害されることが、哺乳類や植物で報告されている。また、哺乳類細胞由来の脱ニトロ化酵素活性は、GSのニトロ化修飾を除去することが報告されている。そこで、GSのニトロ化、および酵素活性を指標に、酵母脱ニトロ化酵素を探索した。まず、酵母GSであるGln1を、大腸菌を用いた組換えタンパク質として精製した。また、哺乳類・植物でニトロ化が報告されているチロシン残基は、酵母Gln1においても保存されていたため、これらをフェニルアラニンに置換した変異体を構築し、同様に精製した。また、マラカイトグリーンを用いたリン酸の定量により、簡便にGln1活性を測定する系を確立した。さらに、野生型のGln1をパーオキシナイトライト（PN）処理によりニトロ化したところ、活性が顕著に低下することが分かった。以上のことから、酵母GSにおいても、ニトロ化による酵素活性の抑制が観察された。

一方、細胞内のタンパク質がよりニトロ化される条件では、脱ニトロ化酵素活性が上昇すると考え、人工的に細胞内タンパク質のニトロ化レベルを上げることが試みた。まず、PNドナーであるSIN-1を酵母に処理したが、細胞内ニトロ化レベルの上昇は、コントロール条件と比べて軽微であった。しかし、酸性条件の亜硝酸添加培地に過酸化水素を加えて処理することで、細胞内ニトロ化レベルが著しく上昇した。今後は、この条件で処理した細胞から、脱ニトロ化酵素活性を探索することを考えている。

## 10. キーワード

- |               |        |               |            |
|---------------|--------|---------------|------------|
| (1) タンパク質ニトロ化 | (2) 酵母 | (3) グルタミン合成酵素 | (4) チロシン残基 |
| (5)           | (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)

前年度の結果から、遊離3NTを用いた脱ニトロ化酵素の探索が困難と判明したため、生化学的に脱ニトロ化酵素を探索することを試みた。本研究計画では、酵母GSであるGln1のニトロ化、および酵素活性を指標に脱ニトロ化酵素を探索することを計画しているが、そのためには簡便で、かつ安定・高再現性の活性測定系が必要となる。本年度は、安定で再現性の高い、かつ簡便なGSの活性測定系の構築に手間取った。また、PN処理はある程度のレベルの手技を要求するため、これをクリアするプロトコルを構築するのに時間を要した。これらが、進行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)

今後は、酵母Gln1のニトロ化・酵素活性を指標に、ニトロ化条件で処理した酵母の抽出液から、生化学的に脱ニトロ化酵素活性を検出し、これを同定する。これまでは、精製した野生型Gln1をPN処理によってニトロ化したものを用いていたが、PN処理はニトロ化だけでなく、酸化等ほかの修飾も引き起こす。そこで、大腸菌を用いた系によりニトロチロシンを人工的にチロシン部位に取り込ませたニトロ化Gln1を発現・精製し、これを用いる。以降の解析は、申請書の研究計画に従って行う。

(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 28 年度の研究成果)

〔雑誌論文〕 計 (3) 件 / うち査読付論文 計 (3) 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  |         |         |      |  |
|--|-------|--|---------|---------|------|--|
| Yuki Yoshikawa, Ryo Nasuno, Nobuhiro Kawahara, Akira Nishimura, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi |       | Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. |         |         |      |  |
| 雑 誌 名  | 査読の有無 | 巻  | 発行年     | 最初と最後の頁 | 国際共著 |  |
| Nitric oxide : biology and chemistry   | 有     | 57   | 2 0 1 6 | 85-91   | -    |  |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)   |       |  |         |         |      |  |
| 10.1016/j.niox.2016.04.003   |       |  |         |         |      |  |
| オープンアクセス   |       |  |         |         |      |  |
| オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   |       |  |         |         |      |  |

| 著 者 名   |       | 論 文 標 題                          |         |           |      |  |
|---|-------|----------------------------------|---------|-----------|------|--|
| Rika Indri Astuti, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi |       | Nitric oxide signaling in yeast. |         |           |      |  |
| 雑 誌 名   | 査読の有無 | 巻                                | 発行年     | 最初と最後の頁   | 国際共著 |  |
| Applied microbiology and biotechnology.       | 有     | 100                              | 2 0 1 6 | 9483-9497 | -    |  |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)                      |       |                                  |         |           |      |  |
| 10.1007/s00253-016-7827-7                     |       |                                  |         |           |      |  |
| オープンアクセス                                      |       |                                  |         |           |      |  |
| オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                    |       |                                  |         |           |      |  |

| 著 者 名                      |       | 論 文 標 題 【掲載確定】                 |         |         |      |  |
|----------------------------|-------|--------------------------------|---------|---------|------|--|
| 那須野 亮, 吉川 雄樹, 高木 博史        |       | 酵母に見出した一酸化窒素 (NO) の合成制御機構と生理機能 |         |         |      |  |
| 雑 誌 名                      | 査読の有無 | 巻                              | 発行年     | 最初と最後の頁 | 国際共著 |  |
| 化学と生物                      | 有     | 印刷中                            | 2 0 1 7 | 印刷中     | -    |  |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)   |       |                                |         |         |      |  |
| in press                   |       |                                |         |         |      |  |
| オープンアクセス                   |       |                                |         |         |      |  |
| オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 |       |                                |         |         |      |  |

(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。

(3/5)

〔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

|  |
|--|
|  |
|--|