

様式 C-7-1

平成29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）

所属研究機関名称		奈良先端科学技術大学院大学	機関番号	14603
研究代表者	部局	先端科学技術研究科		
	職	教授		
	氏名	高木 博史		

1. 研究種目名 基盤研究(A)(一般) 2. 課題番号 16H02601

3. 研究課題名 真菌における一酸化窒素の合成制御機構と生理機能の解明

4. 研究期間 平成28年度～平成30年度 5. 領域番号・区分 -

6. 研究実績の概要

1) 酵母におけるNOの合成機構とその制御機構：酵母のNO合成に関与するジフラビンタンパク質Tah18は酵母から哺乳類まで広く保存されている。そこで、Tah18の代わりに哺乳類の水モログであるNdor1を発現する酵母を作製し、Tah18依存的にNO合成を行う過酸化水素処理条件下での細胞内NO量を測定した。その結果、Tah18の機能欠損株は、野生型株と比較して顕著なNO合成量の低下を示したが、Tah18-Ndor1置換株は、野生型株と同程度のNO合成量を示した。この結果から、Ndor1は酵母で見出した新規なNO合成機構に関与する機能を有しており、哺乳類にも同様の機構が存在する可能性が示された。

2) 酵母におけるNOおよびNO標的タンパク質の生理機能：対数増殖期まで培養した酵母から抽出したタンパク質溶液に、NOドナーのS-ニトロソグルタチオン(GSN0)を添加し、S-ニトロソ(SNO)化システインを特異的にビオチン化するビオチンスイッチ(BS)法に供した。BS処理後、抗ビオチン抗体を用いたウェスタンブロット法によりビオチン化タンパク質の検出を行った。その結果、GSN0処理によってビオチン化タンパク質のレベルが顕著に上昇した。アビジン結合ビーズを用いたプルダウンアッセイによる溶出画分においても、GSN0処理条件に特異的に出現する複数のバンドを検出した。

3) 病原真菌におけるNOの合成制御機構と生理機能：糸状菌のNO応答を明らかにするために、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、NOドナー添加1時間後に複数の二次代謝遺伝子クラスターの発現が変動することが明らかになった。また、臨床で分離された複数のAspergillus fumigatus株のNO感受性を評価したところ、超感受性を示す株が見つかり、株間でNO応答に多様性があることが示唆された。

7. キーワード

酵母 一酸化窒素 酸化ストレス シグナル伝達 病原真菌

8. 現在までの進捗状況

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の合成機構とその制御機構の解析については、Dre2がTah18依存的なNO合成を阻害すること、酸化ストレスに応答して、Dre2がTah18から解離することを見出し、Dre2が酸化ストレスセンサーとして働き、NO合成を制御する機構を提唱した。また、NOは高温ストレス耐性に寄与する一方で、高濃度の過酸化水素存在下で細胞死を誘導することから、二面性（細胞保護・細胞毒性）が示唆された。さらに、Tah18の哺乳類オルソログNdor1が酵母のNO合成に関与することを見出し、新規なNO合成機構が真核生物に広く保存されている可能性を示した。一方で、酵母におけるNOおよびNO標的タンパク質の生理機能の解析については、細胞内のニトロソ化タンパク質の探索、同定に必要な実験手法（ビオチンスイッチ法）の確立が予想以上に難航していたが、今年度にほぼ実験方法を確立することができ、NO処理後に特異的に検出されるタンパク質を多数同定した。また、病原真菌におけるNOの合成制御機構と生理機能の解析については、Aspergillus fumigatusの臨床株の中に、NO量またはNO耐性の低いものが存在し、NOと病原性との関連が強く示唆された。

3版

9. 今後の研究の推進方策

1) 酵母におけるNOの合成機構とその制御機構：酵母のオキシゲナーゼ様タンパク質を同定し、NO合成における分子機能を解析する。また、酵母を用いてカスパーゼ依存的な細胞死の分子機構や生理的意義に対する理解を深める。さらに、Tah18依存的なNO合成機構およびその普遍性の解明を目的に、Tah18の哺乳類ホモログNdor1、Dre2の哺乳類ホモログCiapinに着目し、Tah18-Dre2と同様にNO合成やその制御に関与しているかどうかを解析する。

2) 酵母におけるNOおよびNO標的タンパク質の生理機能：様々な条件で培養・処理した細胞を調製し、BS法を用いたスクリーニング系によってSNO化タンパク質を同定するとともに、これらの機能解析を行い、酵母におけるタンパク質のSNO化を介したNOの生理的役割を明らかにする。

3) 病原真菌におけるNOの合成制御機構と生理機能：NO関連遺伝子の変異株を用いて、細胞内NOが及ぼす影響とその制御機構を解析する。NO応答として二次代謝が変動する現象については、産生物質の分析と応答分子機構の解析を行う。

10. 研究発表（平成29年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著論文 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 高木博史	4. 巻 75
2. 論文標題 酵母における一酸化窒素の分子機能と応用	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 214-218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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	国際共著 -

1. 著者名 那須野 亮, 吉川雄樹, 高木博史	4. 巻 55
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 617-623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroshi Takagi
2. 発表標題 Synthetic Mechanism and Physiological Role of Nitric Oxide in Yeast
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Nitric Oxide（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉川雄樹, 那須野 亮, 渡辺大輔, 高木博史
2. 発表標題 酵母に見出したフラボタンバク質Tah18依存的な一酸化窒素の合成制御機構と生理機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Khairul Anam, Ryo Nasuno, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi
2. 発表標題 Molecular mechanism of nitrosative stress tolerance in yeast
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部2017年度合同大阪大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Supapid Eknikom, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi
2. 発表標題 Identification and functional analysis of nitrated protein in yeast
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部2017年度合同大阪大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高木博史
2. 発表標題 酵母に見出した「両刃の剣」一酸化窒素の合成機構と生理的役割
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

3版

1. 発表者名 吉川雄樹, 那須野 亮, 高木博史
2. 発表標題 酵母に見出したフラボタンパク質Tah18依存的な一酸化窒素合成の制御機構と細胞死誘導機構
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉川雄樹, 那須野 亮, 高木博史
2. 発表標題 酵母に見出した一酸化窒素の合成制御機構と細胞死誘導メカニズムの解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第50回研究報告会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

1 1. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件（うち出願0件 / うち取得0件）

1 2. 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

1 3. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

-

1 4. 備考

-