平成27年度（2015年度）

ストレス微生物科学（高木研究室）

Laboratory of Applied Stress Microbiology

Originality !! *Serendipity !!*

ストレス微生物科学（高木研究室）

教授：高木 博史（西宮→吹田→静岡→名古屋）
（1982：味の素 → 1995：福井県立大 → 2006：奈良先端大）

助教：大津 厳生、渡辺 大輔　　秘書：山田 博美

博士研究員３名、研究技術員２名、研究員２名
DC学生 11 名、MC学生 13 名、研究生１名

留学生 6名 !!

酵 母（実験室・産業）

細 菌（大腸菌・放線菌）

応用分子微生物学
(Applied Molecular Microbiology)

微生物のバイオサイエンス

スクリーニング
（自然分離、変異処理）
ゲノム情報

分子細胞生物学
代謝生理学
タンパク質科学

微生物機能の利用と改変

遺伝子工学
代謝工学

タンパク質工学
細胞工学

有用な微生物育種、物質生産、技術開発

食糧
生命

環境
エネルギー

バイオテクノロジーへの応用

ストレス微生物科学（高木研究室）

酵母：ストレス応答・適応・耐性機構 → 産業酵母の育種 ⇨ 高木 渡辺

①プロリン ②アセチル化酵素Mpr1 ③一酸化窒素 ④ユビキチンシステム
⑤ストレス転写因子Msn2 ⑥発酵調節因子Rim15

＜Keywords＞ 酸化ストレス、ROS、プロリン、バリン、トランスポーター、ミトコンドリア、アルギニン、NO、ニトロソ化、レドックス制御、活性制御（ユビキチン化、リン酸化）、転写因子Msn2、タンパク質リン酸化酵素Rim15、ストレス情報伝達系（TOR経路） etc.

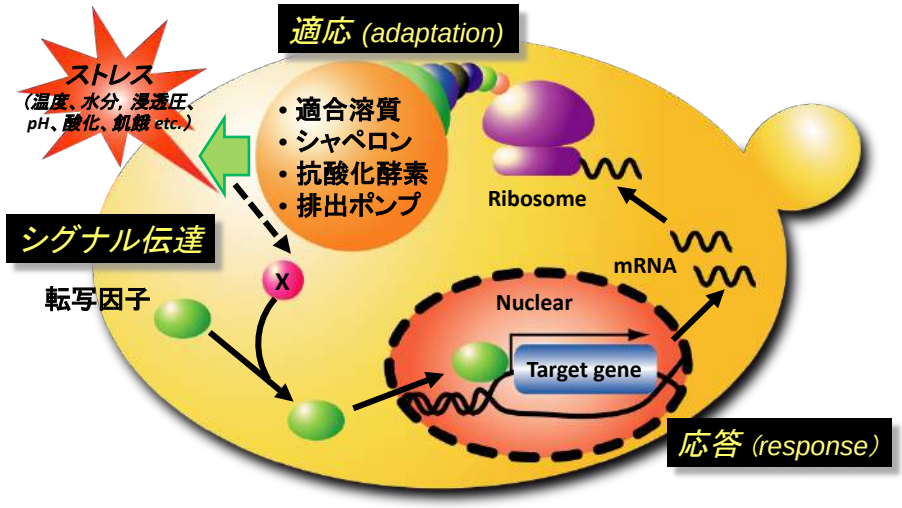
大腸菌：システインの代謝経路・生理機能 → 発酵生産 ⇨ 大津 高木

＜Keywords＞ システイン、トランスポーター、レドックス制御（還元ストレス）、硫黄同化、チオ硫酸リプレッション、中央代謝、エネルギー効率 etc.

The 9th ANNIVERSARY

ストレスに対する細胞の応答・適応機構

ストレス下で遺伝子発現を変化させ、必要な物質を合成し、障害を回避する

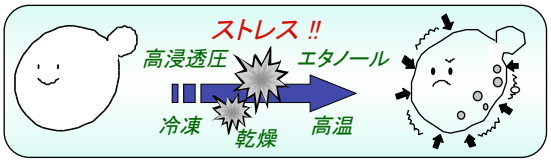


耐性 (tolerance) ➡ 強度のストレス下でも、生育維持できる能力を獲得する

酵母：ストレス耐性機構の解明と産業酵母の育種への応用

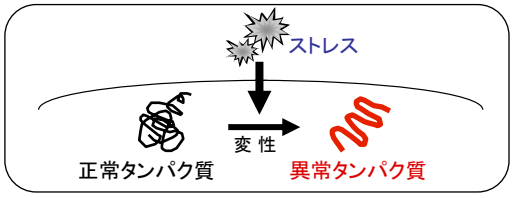
H. Takagi

D. Watanabe

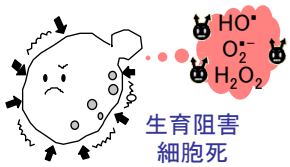


酵母の発酵環境は
過酷なストレス

タンパク質が変性、異常タンパク質として蓄積

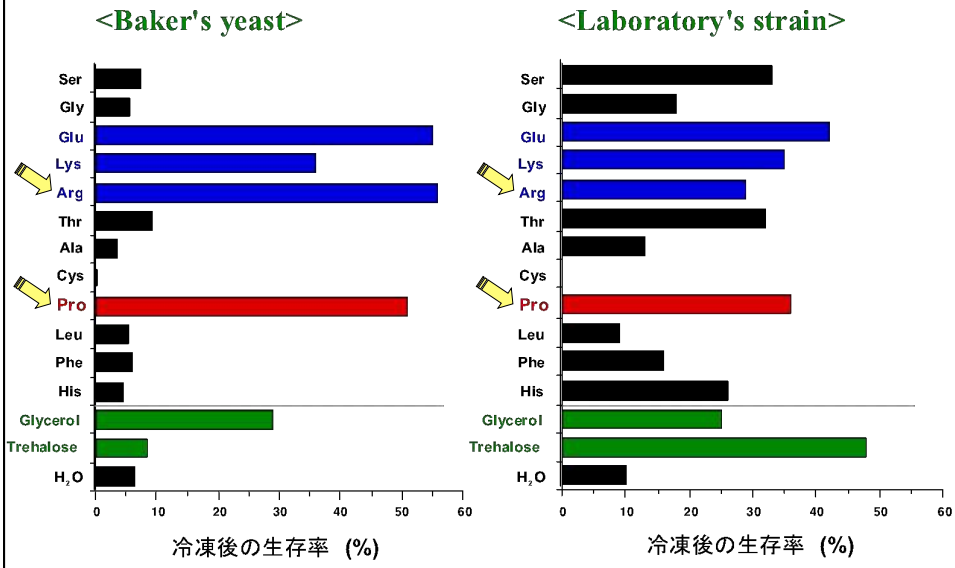


活性酸素種の発生



酵母の有用機能が制限、発酵生産力に限界

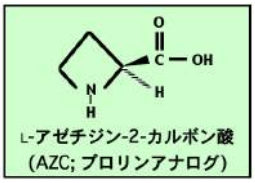
プロリンが酵母を冷凍ストレスから保護する !!



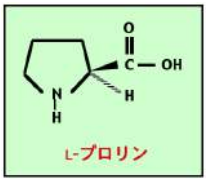
Takagi *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 405, 1997.

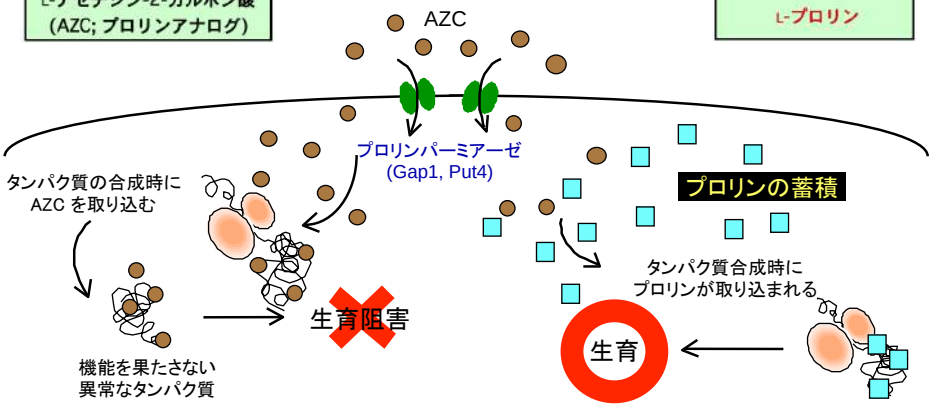
プロリンアナログによる生育阻害

耐性メカニズム



①プロリンの細胞内蓄積
②アナログを無毒化（分解、修飾）
③アナログを細胞内に入れない





AZCを用いた酵母のストレス耐性機構の研究

1. AZC耐性変異株（Pro蓄積変異株）

・Pro合成系の鍵酵素 (γ-glutamyl kinase) 遺伝子 (***PRO1***) の変異
・Proの代謝調節機構、細胞内局在性、細胞保護機能（抗酸化）
　→ ストレスにおけるProの機能解析、産業酵母への応用

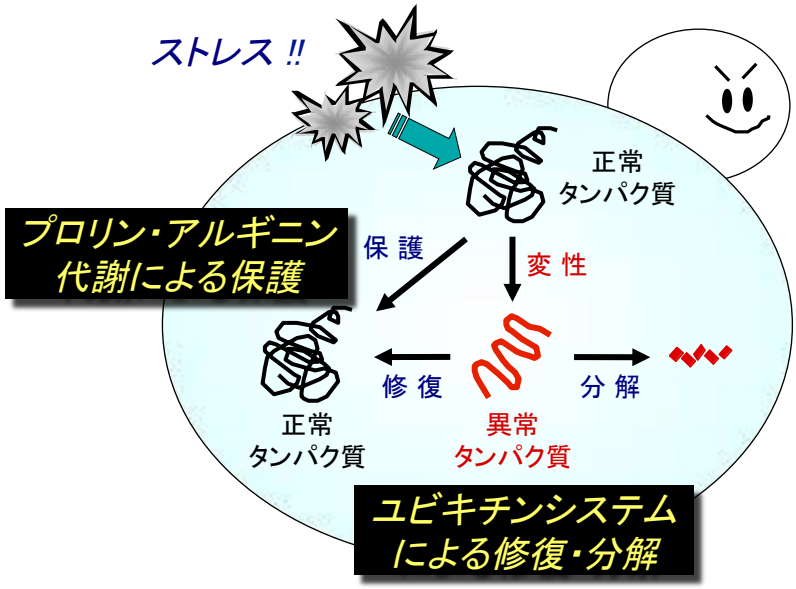
2. AZC耐性株（*S. cerevisiae* Σ1278b）

・AZCを*N*-アセチル化し、解毒する酵素遺伝子（***MPR1***）の発見
・Mpr1によるPro / Arg代謝を介した新規な抗酸化メカニズム
　→ Mpr1の生理機能・立体構造の解析、産業酵母への応用

3. AZC超感受性変異株 ⇨ 3. AZC耐性変異株

・ユビキチンリガーゼ遺伝子 (***RSP5***) の変異
・Gap1パーミアーゼの安定化、ストレス感受性（異常タンパク質処理能の低下）
　→ ストレスにおけるRsp5 (ubiquitin system) の機能解析、産業酵母への応用

酵母の新しいストレス耐性機構

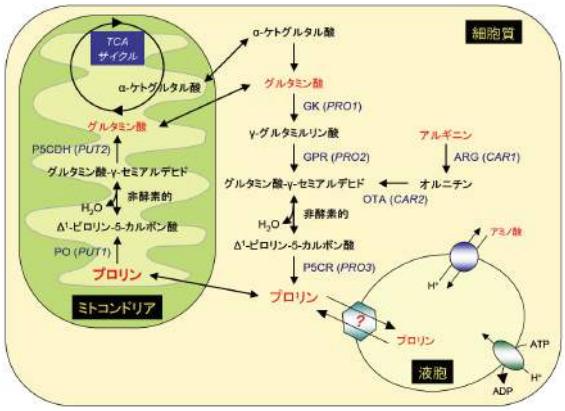


① プロリン

Appl. Microbiol. Biotechnol., **47**, 405, 1997; **79**, 273, 2008, **81**, 211, 2008; *FEMS Microbiol. Lett.*, **184**, 103, 2000; *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 212, 2003; **69**, 6527, 2003; **71**, 8656, 2005; **73**, 4011, 2007; **74**, 5845, 2008; *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 2002; **100**, 538, 2005; **103**, 277, 2007; **116**, 576, 2013; *Biosci. Biotech. Biochem.*, **73**, 2131, 2009; **76**, 454, 2012; *Int. J. Food Microbiol.*, **152**, 40, 2012.

★ プロリンにストレスからの細胞保護機能を発見
異常タンパク質の生成を回避（ケミカルシャペロン）？、ROSの消去？

★ プロリンの蓄積とストレス耐性（冷凍、エタノール、酸化）の向上に成功
合成系の強化（*AZC 耐性変異株*：プロリン蓄積）＋ 分解系の遮断



・オルガネラ輸送機構の解明
（トランスポーターの同定）

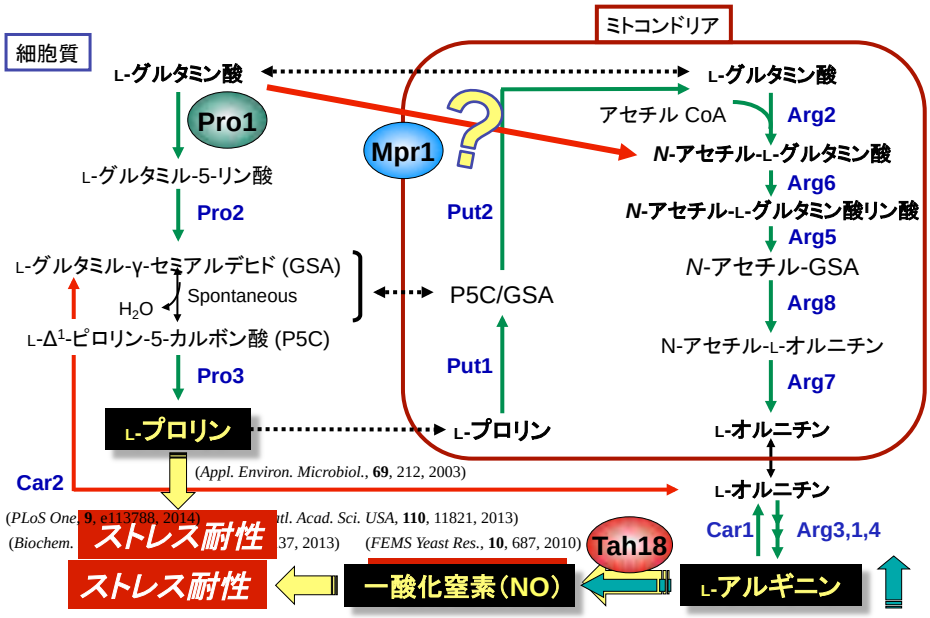
・γ-グルタミルキナーゼの機能解析
（PUAドメイン、Pro合成以外の機能）

・生理機能解析（抗酸化/ROS生成）

プロリン蓄積酵母の作製

ストレス耐性能力の評価

プロリンとアルギニンの代謝経路



② アセチル化酵素 Mpr1

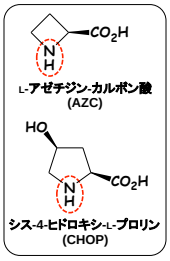
J. Bacteriol., **182**, 4249, 2000; *J. Biol. Chem.*, **276**, 41998, 2001; *Yeast*, **19**, 1437, 2002; **26**, 587, 2009; *J. Biochem.*, **133**, 67, 2003; **138**, 391, 2005; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12616, 2004; **110**, 11821, 2013; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1343, 2007; **97**, 247, 2013; *FEMS Yeast Res.*, **8**, 607, 2008; *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 341, 2009; *Int. J. Food Microbiol.*, **138**, 181, 2010; *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 160, 2012.

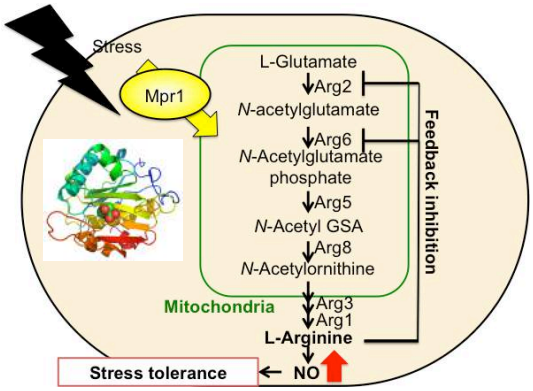
★ 遺伝子（酵素）の発見 ➡ *S. cerevisiae* Σ1278b：***AZC 耐性株***

AZCを解毒する*N*-アセチルトランスフェラーゼ

★ 抗酸化機能　ROSレベルを制御し、酸化ストレスから酵母を保護

Pro/Glu関連化合物のアセチル化を介して Arg（NO）合成を亢進





・立体構造に基づく高機能化
（活性・安定性向上、基質特異性改変）

・細胞内における生理的役割
（細胞内基質の同定、Arg合成機構）

高機能型 Mpr1 発現酵母の作製

ストレス耐性の評価

③ 一酸化窒素 NO

FEMS Yeast Res., **10**, 687, 2010; *Microb. Cell Fact.*, **11**:40 doi: 10.1186/1475-2859-11-40, 2012; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 11821, 2013; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 137, 2013; *PLoS One*, **9**, e113788, 2014.

★ 酸化ストレス下での NO 生成

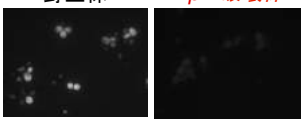
Mpr1を介したArg合成とTah18依存的なNO生成

★ NO が酸化ストレス耐性に関与

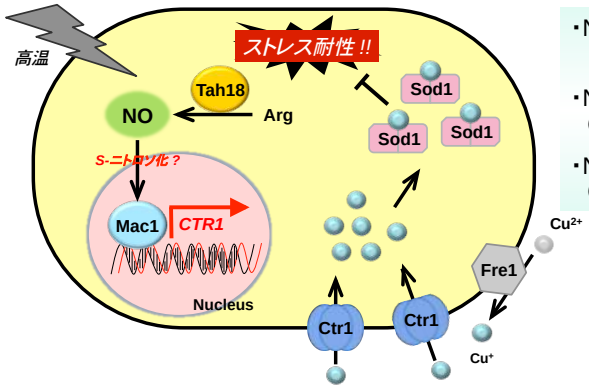
銅代謝関連転写因子Mac1の活性化

高温処理時のArg依存的NO生成

野生株　　*mpr1破壊株*



酵母では初めての知見 !!



・NO生成機構の解明
（Tah18-Dre2によるNO合成の制御）

・NOによる抗酸化機構の解明
（銅代謝関連転写因子Mac1の活性化）

・NOの生理機能の解明
（cGMPを介したシグナリング経路*etc.*）

高効率 NO 生成酵母の作製

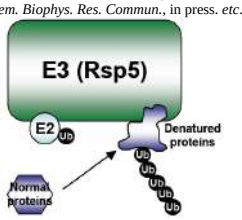
ストレス耐性能力の評価

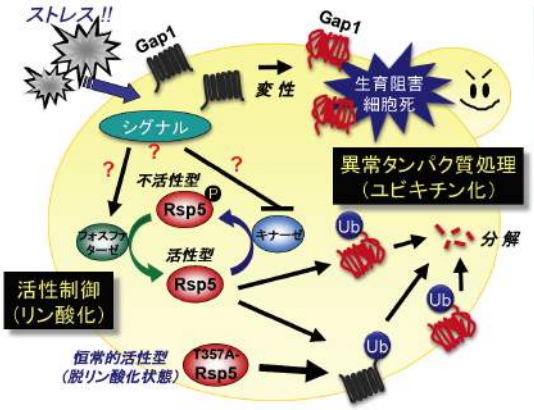
④ ユビキチンシステム

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 11505, 2003; *FEBS Lett.*, **580**, 3433, 2006; *Biosci. Biotech. Biochem.*, **70**, 2762, 2006; **73**, 2268, 2009; *FEMS Microbiol. Lett.*, **277**, 70, 2007; *Genes Cells*, **13**, 105, 2008; *FEMS Yeast Res.*, **9**, 73, 2009; **14**, 567, 2014; *FEBS J.*, **276**, 5287, 2009 ; *J. Brew. Distill.*, **3**, 1, 2012, *Genes Cells*, **18**, 459, 2013; *Eukaryot. Cell*, **13**, 1191, 2014; *J. Biochem.*, **157**, 251, 2015; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press. *etc.*

★ ストレス下におけるRsp5の新機能
ストレスで生じる異常タンパク質の処理（修復・分解）

★ Rsp5の活性制御機構（リン酸化）
恒常的活性型Rsp5（***AZC耐性変異株***: 脱リン酸化状態）





・Rsp5の生理機能の解明
異常タンパク質の認識・分解機構
（ストレス下における基質の同定）

・Rsp5の分子機構の解明
活性制御機構（リン酸化関連酵素の同定）

・Rsp5の高機能化（活性向上、特異性改変）

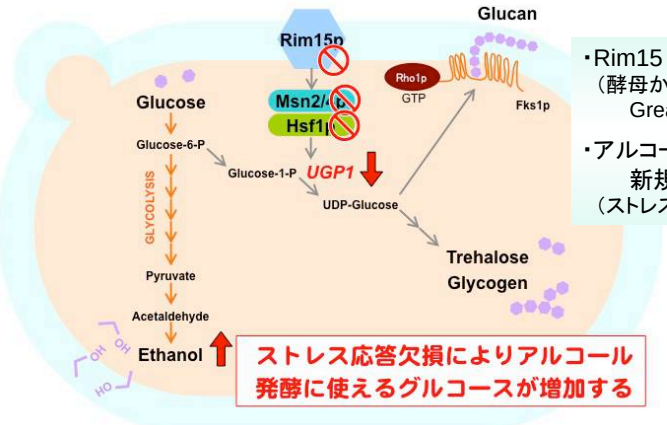
ユビキチンシステム強化酵母の作製
ストレス耐性能力の評価

⑤ 発酵調節因子 Rim15

Appl. Environ. Microbiol., **77**, 934, 2011; **78**, 385, 2012; **78**, 4008, 2012; *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 44, 2011; **112**, 54, 2011; **112**, 577, 2011; **116**, 591, 2013; *Biosci. Biotech. Biochem.*, **77**, 2255, 2013.

★ 実用酵母菌株から初めて高発酵性原因変異を同定
アルコール発酵力の高い「清酒酵母」に特異的な *rim15*^{5055insA} 機能欠失変異

★ アルコール発酵にとって「不要」なストレス応答の存在を発見
Rim15 の機能欠損により、バイオエタノール酵母・ビール酵母の発酵力も向上!!



・Rim15 分子機能の解明
（酵母からヒトまで広く保存された
Greatwall プロテインキナーゼ）

・アルコール発酵調節に関与する
新規因子のスクリーニング
（ストレス応答、細胞周期シグナル等）

アルコール発酵の
人為的調節を可能に !!

バイオテクノロジーへの応用

ストレス耐性産業酵母 ⇒ *新規発酵生産系*

＜酵母利用産業の発展＞

・発酵生産性の改善と向上

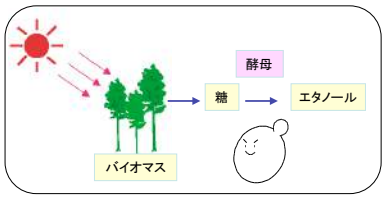
酒類、冷凍パン生地などの効率的生産

→ 省エネ、省コスト、低環境負荷

＜酵母機能を活用した新産業の創出＞

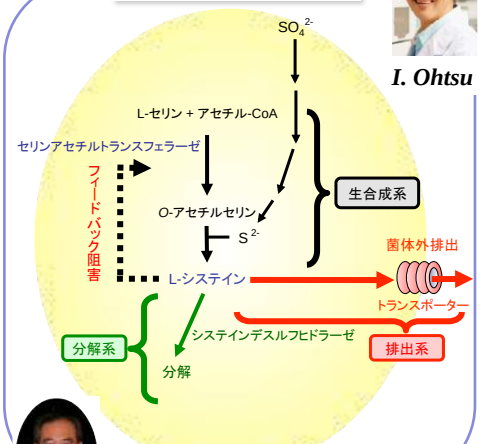
・バイオエタノールの生産

高濃度生産（蒸留コスト↓）、生産速度向上（発酵時間↓）



大腸菌：システイン代謝調節機構の解明と発酵生産への応用

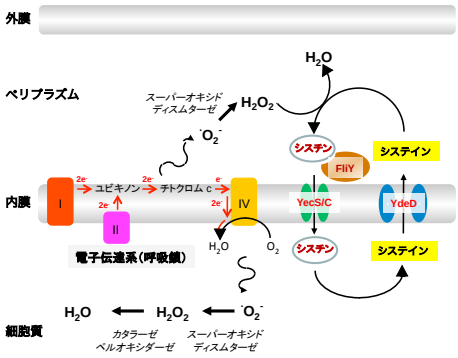
I. Ohtsu



H. Takagi

Appl. Environ. Microbiol., **64**, 1607, 1998;
FEBS Lett., **452**, 323, 1999;
Appl. Microbiol. Biotechnol., **62**, 239, 2003;
Appl. Environ. Microbiol., **71**, 4149, 2005;
Protein Eng. Des. Sel., **19**, 163, 2006;
Microb. Cell Fact., **11**:62 doi:10.1186/1475-2859-11-62, 2012. *etc.*

Cys/CySS シャトルシステム !!



ペリプラズムでのレドックス制御

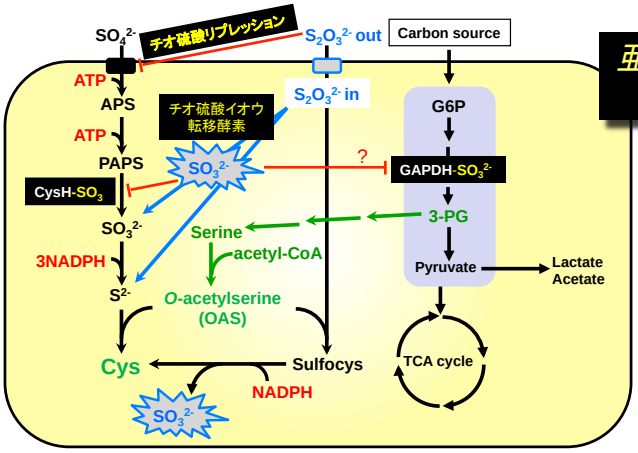
Appl. Environ. Microbiol., **72**, 4735, 2006;
Appl. Microbiol. Biotechnol., **81**, 903, 2009;
J. Biol. Chem., **285**, 17479, 2010;
PLoS One, **10**, e0120619, 2015.

イオウ源の選択的利用機構・新規イオウ同化経路の発見

硫黄同化経路: CysH 活性型 → CysH-SO_3^{2-} 不活性型 → **SO_4^{2-}の利用を抑制**

SO_3^{2-} Signaling !!

中央代謝経路: GAPDH 活性型? → GAPDH-SO_3^{2-} 不活性型? → **TCAの利用を抑制**



亜硫酸イオンによるシグナリング？

- 中央代謝とイオウ同化のクロストーク
- チオ硫酸塩からの有用物質生産

J. Biosci. Bioeng., **119**, 176, 2015;
J. Biosci. Bioeng., **119**, 310, 2015;
J. Biosci. Bioeng., in press.

ストレス微生物科学（高木研究室）

＜楽しい年間行事の数々!!＞ → *研究についても、大いに議論しよう!!*

5月：新M1歓迎会（高山研と合同）
夏：Beer & BBQ パーティー（キャンパス内）
秋：研究室旅行（宿泊）
12月：忘年会（*Bowling → Eating/Drinking → Singing*）
3月：修了祝賀会　その他、随時歓送迎会、イベントあり

＜活発な研究活動!!＞ → *面白いデータを出して、学会で発表しよう!!*

6月：日本蛋白質科学会（徳島）、日本NO学会（大阪）
9月：酵母遺伝学フォーラム（広島）
9月：Intl. Conf. Yeast Genetics & Molecular Biology + Intl. Specialized Symp. on Yeast（Italy）
10月：日本生物工学会大会（鹿児島）
11月：Microbial Stress（Spain）、Thai Society for Biotechnology & Intl. Conf.（Thailand）
12月：日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会（神戸）
3月：日本農芸化学会大会（札幌）*etc.*

＜抜群の就職実績!!＞ → *博士号を取って、社会で活躍しよう!!*

サントリー, 森永製菓, 雪印乳業, 高梨乳業, 大関, 日本製紙, 栄研化学, ヒガシマル醤油, メルシャン, 雪印メグミルク, 横浜ゴム, 日本食研, カネカ, ちとせ研究所, 資生堂, 長瀬産業, ネスレ日本, カルビー, マルハニチロ, J&J, 味の素ゼネラルフーヅ, サラヤ, シャープ *etc.*

ストレス微生物科学（高木研究室）

研究ポリシー

➡ *労を惜しまず、時間を惜しもう!!　研究を楽しもう!!*

① 「環境（酸化・還元）ストレス」に対する細胞の応答・適応・耐性機構
② 「アミノ酸」、「タンパク質（酵素）」の生理機能、代謝・活性制御機構
③ 基礎（独創性）と応用（実用化）のバランス

教育ポリシー

➡ *人間力（マナー、元気、熱意）を身につけよう!!*

① 国際的・学際的研究へのチャレンジ精神の醸成
② テーマ設定・課題解決能力の養成
③ バイオ産業・技術に強い関心を持つ人材の育成

社会貢献ポリシー

➡ *地球や社会との共存を意識しよう!!*

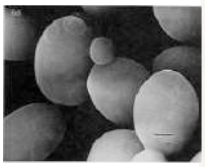
① 企業と新設公立大での経験と人脈の活用
② 産官学や地域社会との連携強化
③ 社会に対する情報発信と説明責任

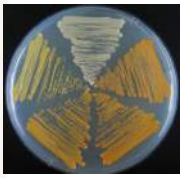
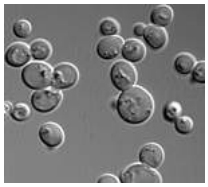
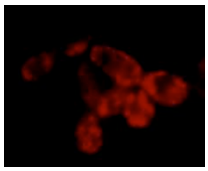
「今が故郷・・・」

The 9th ANNIVERSARY

ストレス微生物科学（Applied Stress Microbiology）

酵母 *Saccharomyces cerevisiae*





微生物は裏切らない!!