

平成28年度(2016年度)

ストレス微生物科学(高木研究室)

Laboratory of Applied Stress Microbiology



Manhattan from Empire State Building

Manhattan from Hoboken

Originality !!



Serendipity !!

The 10th ANNIVERSARY

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: 渡辺 大輔 + 那須野 亮

秘書: 山田 博美

博士研究員 1 名、研究技術員 1 名
DC学生 7 名、MC学生 11 名

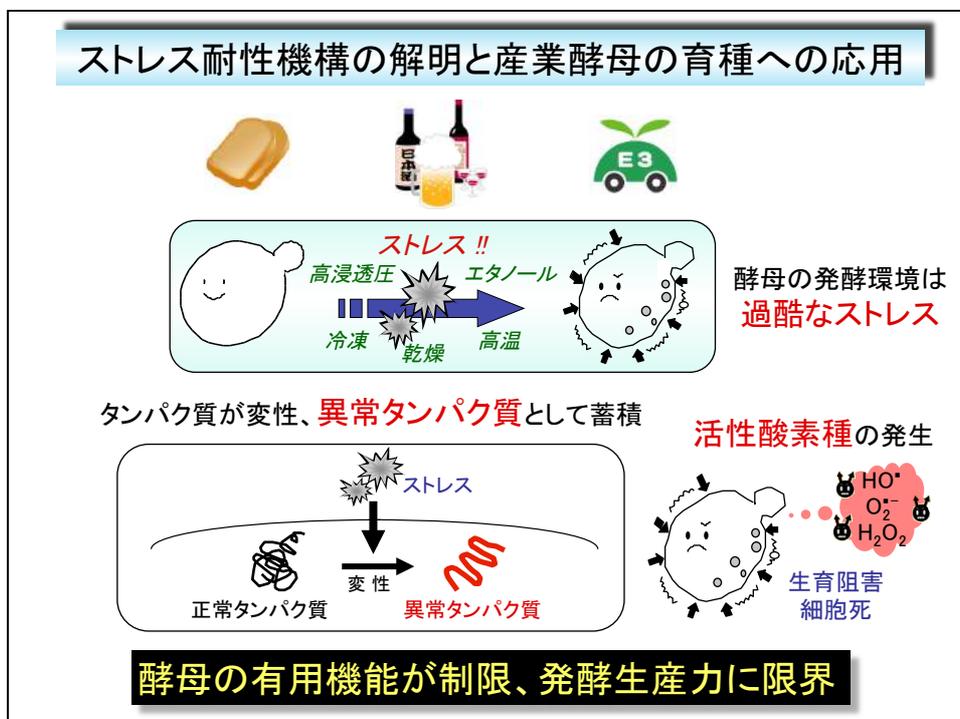
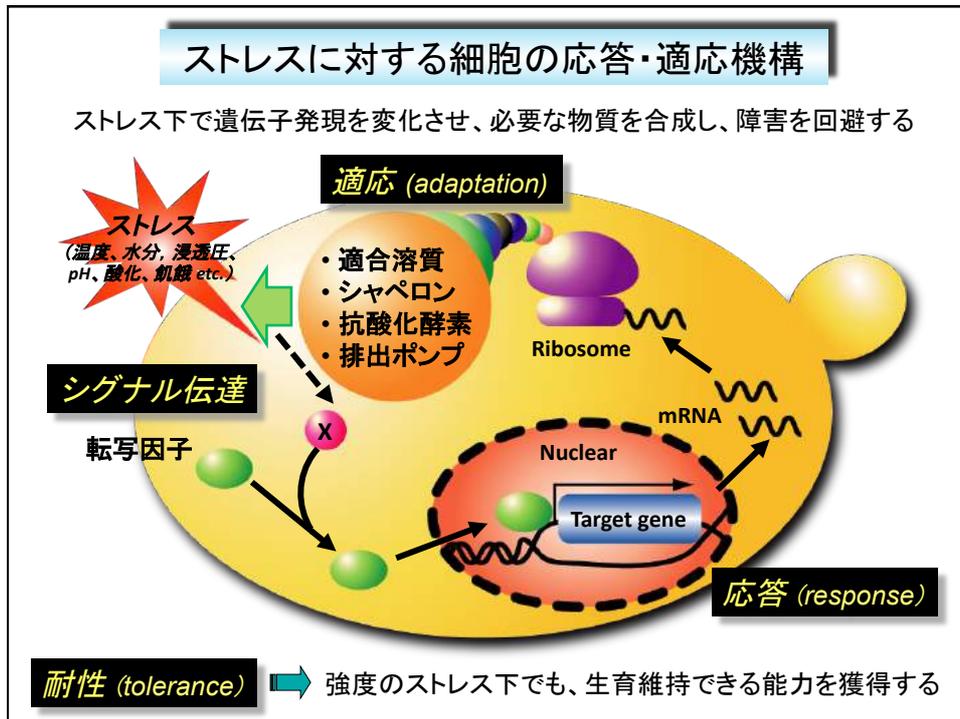
留学生 6 名 !!

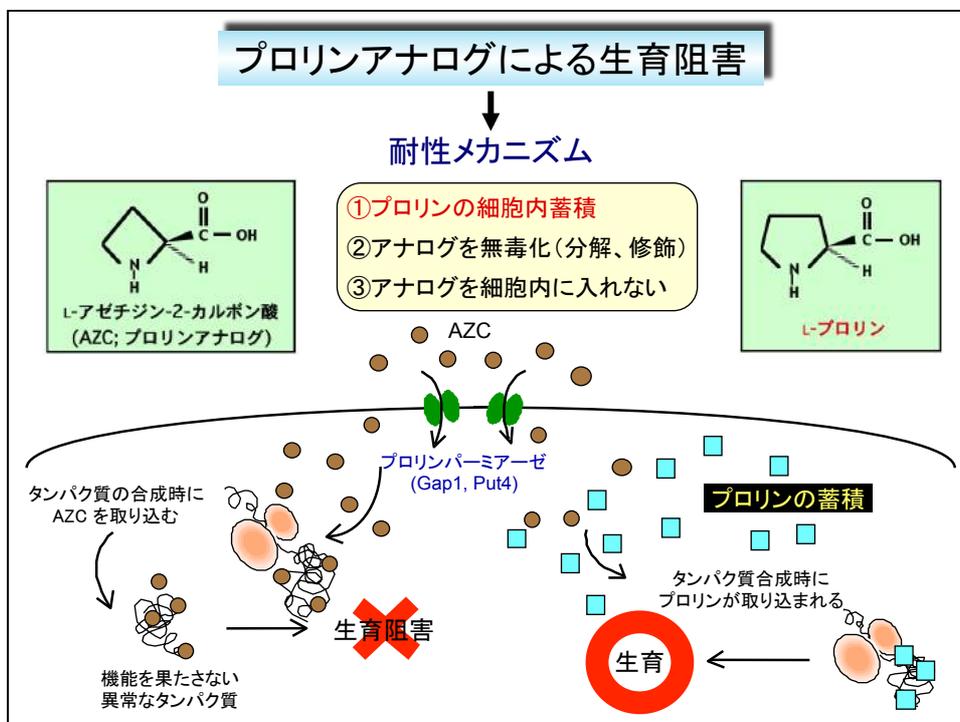
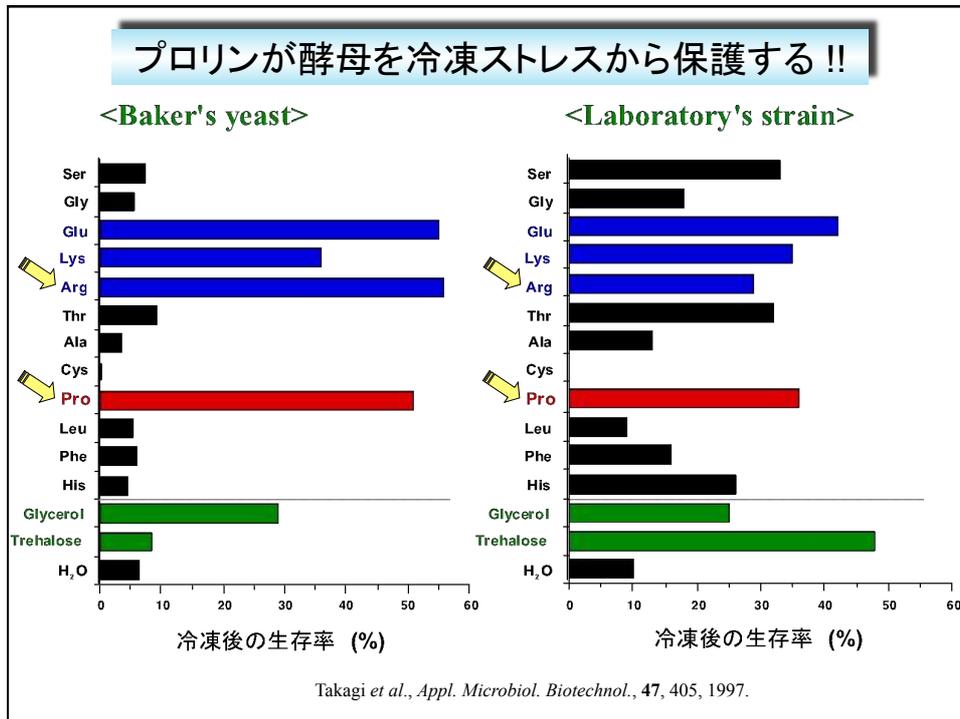
酵母
(実験室・産業)

細菌
(大腸菌・放線菌)

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

Citi Field, New York





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* Σ 1278b)

- ・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

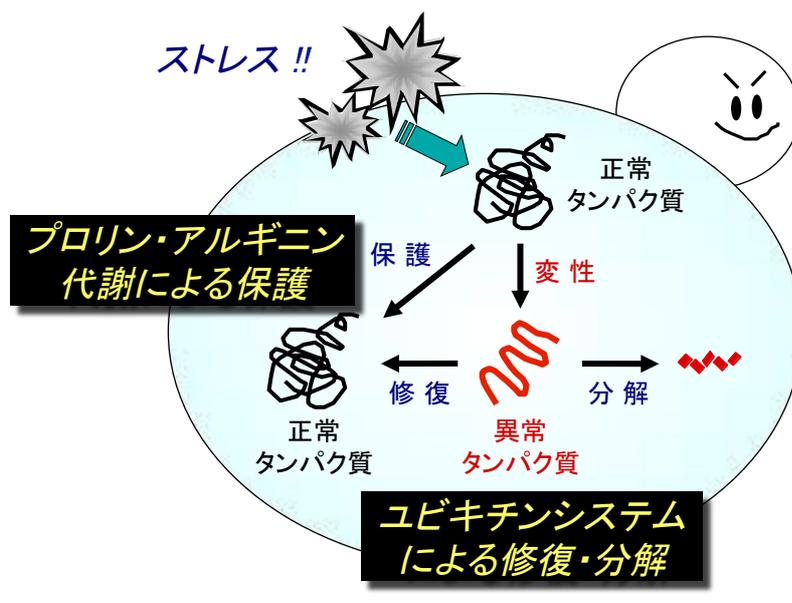
3. AZC 超感受性変異株



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

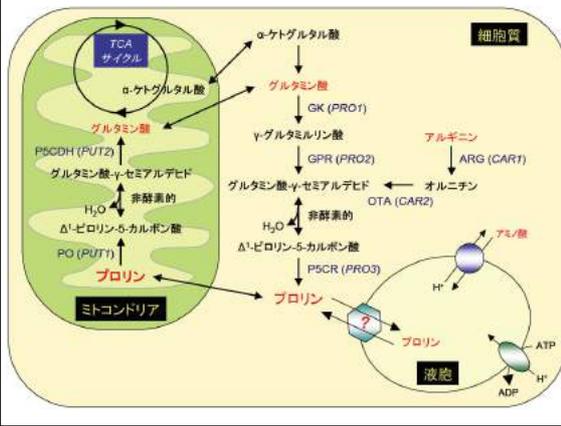
酵母の新しいストレス耐性機構



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; *J. Gen. Appl. Microbiol.*, in press; *Yeast*, in press. etc.

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

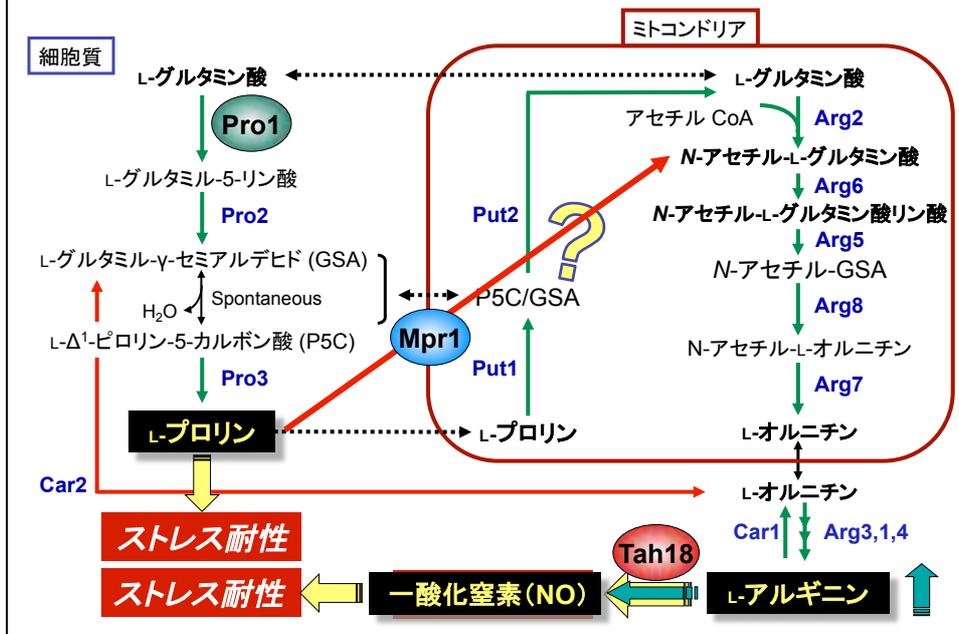


- γ -グルタミルキナーゼの新機能
リボソームのオートファジーへの関与
- 分裂寿命の延長メカニズム
カロリー制限・TORシグナルとの関連
- ケミカルシャペロンとしての機能
異常タンパク質の生成回避機構

↓

産業酵母(パン、酒類)の育種
新しい生理機能の解明・活用

プロリンとアルギニンの代謝経路

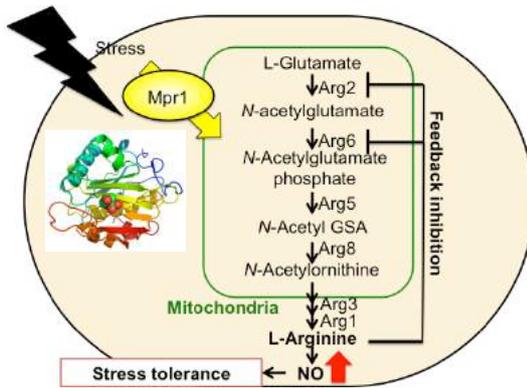
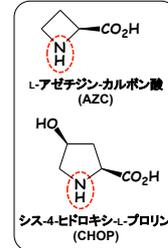


② アセチル化酵素 Mpr1

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; *J. Biochem.*, 159, 271, 2016 etc.

★ 遺伝子(酵素)の発見 ➡ *S. cerevisiae* Σ 1278b: **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



- ・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)
- ・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)

高機能型 Mpr1 変異体の創製
産業酵母(パン・酒類)の育種

③ 一酸化窒素 NO

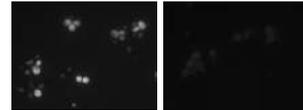
FEMS Yeast Res., 10, 687, 2010; *Microb. Cell Fact.*, 11:40 doi:10.1186/1475-2859-11-40, 2012; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 11821, 2013; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 430, 137, 2013; *PLoS One*, 9, e113788, 2014; *Nitric Oxide*, 52, 29, 2016; 57, 85, 2016.

★ 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

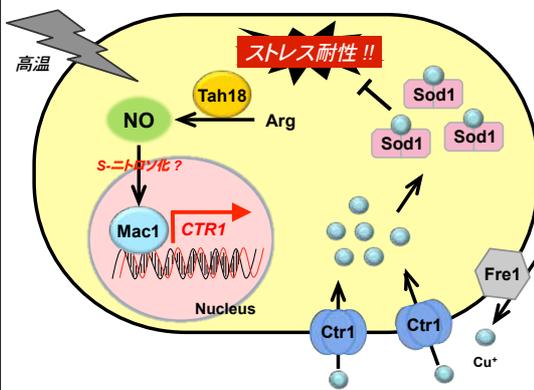
★ NO が酸化ストレス耐性に関与
銅代謝関連転写因子 Mac1 の活性化

高温処理時のArg依存的NO生成

野生型株 *mpr1*破壊株



酵母では初めての知見!!



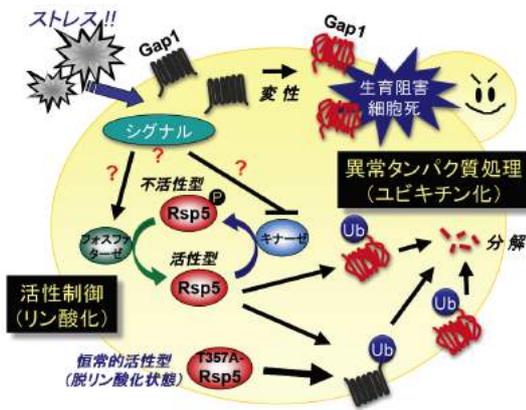
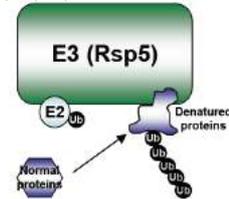
- ・NO合成機構の解明 (Tah18-Dre2によるNO合成の制御)
- ・NOによる抗酸化機構の解明 (銅代謝関連転写因子Mac1の活性化)
- ・NOの生理機能の解明 (シグナル経路、細胞死誘導機構 etc.)

産業酵母(パン・酒類)の育種
病原真菌における生理機能、抗真菌剤

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 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)



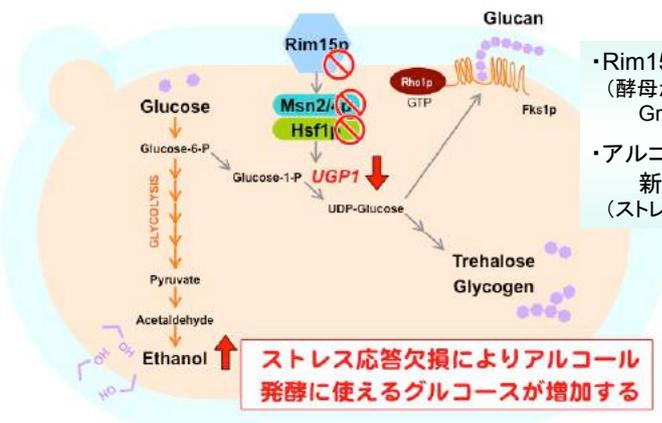
- ・Rsp5 の生理機能の解明
異常タンパク質の認識・分解機構
(ストレス下における基質の同定)
- ・Rsp5 の分子機構の解明
活性制御機構(リン酸化関連酵素の同定)
- ・Rsp5 の高機能化(活性向上、特異性改変)

産業酵母(パン・酒類)の育種
神経変性疾患の病態・原因解析
生理活性物質の探索

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; *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 340, 2016.

- ★ 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 \Rightarrow 新規発酵生産系

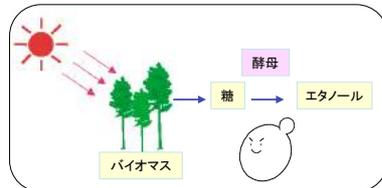
<酵母利用産業の発展>

- ・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
味・風味のバラエティー化



<酵母機能を活用した新産業の創出>

- ・バイオエタノール、有用物質(アミノ酸、酵素、タンパク質)の生産
高濃度生産(蒸留コスト↓)、生産性向上(発酵時間↓)



バイオテクノロジーへの応用

ヒト・病原真菌のモデル \Rightarrow 創薬・治療への応用

<一酸化窒素> 千葉大学真菌医学研究センター

抗真菌薬(深在性真菌症治療薬)の探索

病原真菌(酵母・カビ)におけるNOと増殖、感染、病原性との関連
→ NO合成に関与するタンパク質(遺伝子)の同定



<ユビキチンシステム> 岩手大学農学部

Univ. Medical Center Goettingen
Univ. Bayreuth (Germany)

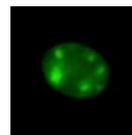
新規な生理活性物質の探索

ヒトに有効な毒性の低い活性物質をポジティブスクリーニングで探索
→ Rsp5変異株のストレス感受性を相補する化合物の同定



神経変性疾患の病態・原因の解析

ユビキチンリガーゼ(創薬の重要な標的)と疾患との関連
→ Rsp5による α -シヌクレインの分解機構の解析



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

研究室説明会 @ D105
4月14日(金)17:00-

<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!!**

5月: 日本・国際NO学会(仙台)
 9月: 酵母遺伝学フォーラム(神戸)・**International Congress on Yeasts(淡路島)**
 9月: 日本生化学会大会(仙台)・日本生物工学会大会(富山)
 11月: 日本分子生物学会年会(横浜)
 12月: 日本農芸化学会支部例会(神戸)
 2月: Gordon Research Conference(米国California州)
 3月: 日本農芸化学会大会(京都) 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、メルシヤン、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、マルハニチロ、J&J、味の素ゼネラルフーズ、カルビー、サラヤ、興人ライフサイエンス、天野エンザイム、アステラス製薬...

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!!

