

解禁時間（テレビ、ラジオ、インターネット）：平成25年7月2日（火）午前4時
（新聞）：平成25年7月2日（火）付夕刊

平成25年 6月28日

報道関係者各位

国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学

酸化のストレスから酵母を守るカギの酵素「Mpr1」の 構造と反応機構を解明 ～食糧、エネルギー生産の産業酵母の改良や抗真菌薬の開発に期待～

【概要】

奈良先端科学技術大学院大学（奈良先端大、学長：小笠原直毅）バイオサイエンス研究科ストレス微生物科学研究室の高木博史教授らのグループは、活性酸素による酸化ストレスから酵母を防御する新発見の仕組みの中で、重要なカギとなるタンパク質分子「アセチル基転移酵素 Mpr1」の立体構造を明らかにしました。また、得られた立体構造の情報をもとに、精製した酵素を用いた試験管内での実験や変異型の酵素を発現する酵母についての解析などを行い、Mpr1 の反応機構や細胞内での機能を解明しました。

酵母は高等生物のモデル生物として学術上だけでなく、食品やバイオエタノールなど多くの発酵生産に使用され、産業上も有用な微生物です。高木教授のグループは最近、高温処理など酸化ストレス下の酵母において、Mpr1 の働きによりプロリンからアルギニンというアミノ酸の合成が亢進し、増加したアルギニンから一酸化窒素が合成されること、また、生成した一酸化窒素が酸化ストレスから酵母を防御していることを見出しました。この Mpr1 は新規なアセチル基転移酵素と考えられ、立体構造や反応機構が明らかになっていませんでした。本研究では、Mpr1 が基質と結合し、複合体になって機能している状態の立体構造を X 線結晶構造解析により原子レベルで明らかにしました。その結果、Mpr1 の反応機構に関わる部位（アミノ酸残基）をいくつか同定し、またそれらが酸化ストレス防御機構に関与することが示されました。

本研究によって、Mpr1 のユニークな機能の分子機構を明らかにするとともに、Mpr1 が関与する酵母の抗酸化メカニズムへの理解を深めることができます。また、より高い活性や安定性を有する Mpr1 の分子設計が可能になることで、酸化ストレスへの耐性が向上し、発酵生産能が飛躍的に向上した産業酵母の育種への応用が期待されます。さらに、Mpr1 の遺伝子は多くの真菌（酵母、カビ）に保存されているため、その活性や機能を特異的に阻害する化合物を設計すれば、新たな抗真菌薬の開発につながる可能性があります。

本研究の成果は高く評価され、平成25年7月1日（月）の週に米国科学アカデミー紀要（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）の電子版に掲載されます。

つきましては、関係資料を配付するとともに、下記のとおり記者発表を行いますので、是非ともご出席くださいますよう、お願い申し上げます。

記

- <日時> 平成25年7月1日（月）11時～（1時間程度）
<場所> 奈良先端科学技術大学院大学 附属図書館 マルチメディアホール（3階）
奈良県生駒市高山町8916-5（けいはんな学研都市）
※アクセスについては、<http://www.naist.jp/>をご覧ください。
<説明者> 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 総合システム生物学領域
ストレス微生物科学研究室 教授 高木 博史、博士研究員 那須野 亮

<ご連絡事項>

- (1) 本件については、掲載誌のプレス解禁日時が平成25年7月2日（火）午前4時（日本時間）（米国東海岸時間 平成25年7月1日（月）午後3時）となっておりますので、取り扱いにはご注意ください。
- (2) 本件につきましては、奈良県文化教育記者クラブをメインとし、学研都市記者クラブ、大阪科学・大学記者クラブ、文部科学記者会及び科学記者会に同時にご連絡しております。
- (3) 取材希望がございましたら、恐れ入りますが下記までご連絡願います。
- (4) 記者発表に関する問合せ先
奈良先端科学技術大学院大学 企画総務課 広報渉外係 瀬戸 克昭（せと かつあき）
TEL：0743-72-5026 FAX：0743-72-5011 E-mail：s-kikaku@ad.naist.jp

酸化ストレスから酵母を守るカギの酵素「Mpr1」の 構造と反応機構を解明

～食糧、エネルギー生産の産業酵母の改良や抗真菌薬の開発に期待～

【概要】

奈良先端科学技術大学院大学（奈良先端大、学長：小笠原直毅）バイオサイエンス研究科ストレス微生物科学研究室の高木博史教授らのグループは、活性酸素による酸化ストレスから酵母を防御する新発見の仕組みの中で、重要なカギとなるタンパク質分子「アセチル基転移酵素 Mpr1」の立体構造を明らかにした。また、得られた立体構造の情報をもとに、精製した酵素を用いた試験管内での実験や変異型の酵素を発現する酵母についての解析などを行い、Mpr1 の反応機構や細胞内での機能を解明した。

酵母は高等生物のモデル生物として学術上だけでなく、パン類や酒類、バイオエタノールなど多くの発酵生産に使用され、産業上も有用な微生物である。高木教授らのグループは最近、高温処理など酸化ストレス下の酵母において、Mpr1 の働きによりプロリンからアルギニンというアミノ酸の合成が亢進し、増加したアルギニンから一酸化窒素が合成されること、また、生成した一酸化窒素（NO）が酸化ストレスから酵母を防御していることを見出した（図1）。この新たな抗酸化の仕組みにおいて、Mpr1 はプロリン代謝の中間体にアセチル基を転移し（アセチル化）、プロリンとアルギニンの代謝を連結する重要な酵素である。Mpr1 の遺伝子は酵母に広く存在しているが、他の生物を含めこれまで知られているアセチル基転移酵素と類似性が低く、基質に対する特異性も異なることから、新規な酵素と考えられており、立体構造や反応機構が不明であった。

本研究では、精製した Mpr1 タンパク質の結晶を調製し、X 線結晶構造解析により Mpr1 が基質を認識し、複合体にある状態の立体構造を原子レベルで明らかにした。その結果、得られた構造をもとに、Mpr1 の反応機構に深く関わる部位（アミノ酸残基）をいくつか同定し、またそれらのアミノ酸残基が Mpr1 を介した酵母の酸化ストレス防御機構に関与することが示された。

本研究によって、Mpr1 のユニークな基質認識や活性制御の分子機構を明らかにするとともに、Mpr1 が関与する酵母の抗酸化メカニズムへの理解を深めることができる。また、より高い活性や安定性を有する Mpr1 の分子設計が可能となり、発酵プロセスで酵母が受ける酸化ストレスへの耐性が向上し、発酵能が飛躍的に向上した産業酵母の育種への応用が期待される。さらに、Mpr1 の遺伝子は多くの真菌（酵母、カビ）に保存されているため、立体構造をもとに Mpr1 の活性や機能を特異的に阻害する化合物を設計することで新たな抗真菌薬の開発につながる可能性がある。

本研究の成果は高く評価され、平成25年7月1日（月）の週に米国科学アカデミー紀要（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）の電子版に掲載される。

【解説】

〔研究背景〕

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は製パンや醸造、バイオエタノール生産など発酵産業において有用な微生物である。しかし、発酵過程において高温、高浸透圧、冷凍、乾燥、高濃度エタノールなどの過酷な環境に曝されると、細胞内にミトコンドリア膜の損傷などによって活性酸素（ROS）が生成し、酸化ストレス状態に陥るため、酵母の生育や発酵力が著しく阻害される。植物でも ROS による光合成や生育の阻害が見られ、ヒトにおいても酸化ストレスと疾病・老化との関連が注目されている。したがって、細胞の酸化ストレスに対する生存戦略を理解することは基礎・応用の両面で極めて重要である。

高木教授のグループは、酵母を用いて細胞の新しいストレス耐性機構を解析しており、これまでに新規なアセチル基転移酵素 Mpr1 がプロリン代謝を介したストレス耐性機構に関与することを見出した。一方、Mpr1 は既知のアセチル基転移酵素と類似性が低く、基質特異性も異なる。ちなみに、既知酵素は一級アミン（アンモニアを構成する水素1個を炭化水素基で置換）を基質にするが、Mpr1 は環状二級アミン（水素2個を炭化水素基で置換し、アンモニア分子を含めた環状構造を持つ）を代謝する（図2）。以上のことから、学術面（新規酵素の構造・機能）および応用面（酵母のストレス耐性・発酵能向上）の観点で興味深い酵素であるため、解析を行った。

〔研究結果〕

Mpr1 は既知の酵素と類似性が低いため、立体構造や反応機構の予測が難しい。そこで、高木教授らは精製した Mpr1 タンパク質の結晶を調製し、X 線結晶構造解析により Mpr1 の立体構造を基質（シス-4-ヒドロキシプロリンを用いた）との複合体として原子レベルで明らかにした（図3）。その結果、

既知のアセチル基転移酵素ファミリーに保存される特殊な構造 (β -bulge) を形成しないことで、基質である環状二級アミンの結合による立体障害を回避していることが示唆された。

また、立体構造から 135 番目の位置のアスパラギン残基 (Asn135) が基質の認識に、178 番目の位置のアスパラギン残基 (Asn178) が反応の触媒に重要であると予測できた。実際にこれらのアミノ酸残基を人為的に別のアミノ酸に置換すると、Asn135 の変異体は基質との親和性が、Asn178 の変異体は触媒活性がそれぞれ著しく低下したことから、Asn135 が基質の認識・結合に、Asn178 が触媒活性にそれぞれ寄与していると結論づけた (図 3)。さらに、これらの変異型 Mpr1 を酵母で発現させると、野生型 Mpr1 の発現酵母に比べて高温処理後のプロリン代謝中間体レベルが増加し、反応が進まなかったことから、Asn135 および Asn178 は Mpr1 の生理機能においても重要であることが明らかとなった。

【研究意義】

様々な環境に曝される生物の細胞内は ROS が発生することで、酸化ストレス状態に陥りやすい。酵母は有用物質の発酵生産に用いられるが、発酵生産の過程で酸素呼吸に伴って ROS が発生し、機能が制限される。植物では高温、乾燥、強光などが原因で ROS が発生し、光合成能や成長速度に支障をきたす。動物ではミトコンドリアからの電子伝達系のタンパク質 (チトクローム c) の放出に伴って ROS が発生し、細胞死が誘導される。このように、細胞内の ROS レベルの制御は生物にとって重要な生存戦略であるため、微生物や植物の酸化ストレス耐性を強化することやガン細胞特異的に細胞死を誘導することは、食品・環境・医薬などのバイオテクノロジーにおいて有用な技術である。

高木グループが見出した抗酸化酵素 Mpr1 は既知のアセチル基転移酵素と異なる基質特異性を有しているため (図 2)、その立体構造と反応機構を明らかにしたことで、アセチル基転移酵素の基質認識や活性制御のメカニズムを酵素のかたちと関連付けて広く一般的に理解する端緒となり得る。

また、抗酸化酵素である Mpr1 の立体構造と反応機構を明らかにしたことで、酵素機能の向上した新しい Mpr1 (高い触媒活性・安定性など) の分子設計が可能となり、将来的には高度なストレス耐性、優れた発酵力を備えた産業酵母 (パン類、酒類、バイオエタノールなど) の育種へ応用できる。

さらに、Mpr1 をコードする遺伝子は酵母やカビなど真菌類にのみ保存されているため、立体構造と反応機構をもとに、Mpr1 の活性や機能を特異的に阻害する低分子化合物を設計することで、新規な抗真菌剤の開発につながる可能性がある。

今回、酵母に見出した Mpr1 が関与する新しい酸化ストレス防御機構 (プロリンからのアルギニン合成を介して生成する NO による抗酸化) (図 1) は、酵母機能を利用した発酵産業への貢献のみならず、病原真菌における NO の増殖、感染、病原性への寄与など NO の生理機能の解明にも役立つものとして意義深い。

【用語解説】

・酵母

酵母のうち基礎研究のモデル株を実験室酵母と称する。実験室酵母では遺伝解析やゲノム解析による基礎的知見が蓄積され、遺伝子操作技術も確立しているが、発酵力は弱く発酵食品等の生産には不適である。一方、製パン・醸造、バイオエタノール生産などに用いられる菌株を産業酵母と称する。産業酵母は発酵性や生育速度の優れた株が選択されているが、遺伝特性や倍数性が異なり、実験室酵母の知見や技術が有効活用されていない。

・アセチル基転移酵素

基質となる化合物 (アミン) にアセチル補酵素 A のアセチル基を転移させる酵素。遺伝子発現制御、細胞周期、物質代謝、薬剤解毒など重要な生命現象に深く関与している。既知のアセチル基転移酵素は一級アミンが基質となると報告されているが、Mpr1 は環状二級アミンを基質にするユニークな酵素である (図 2)。

- 活性酸素（ROS）と酸化ストレス

活性酸素は安定な酸素分子よりも活性化された状態にあり、反応性に富んでいる。スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカルなどの活性酸素は、様々な原因（放射線、紫外線、酸素呼吸、酸化剤、抗ガン剤、重金属など）により細胞内に生成する。通常の細胞には、活性酸素を消去する抗酸化酵素（スーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼなど）や抗酸化物質（グルタチオン、チオレドキシニンなど）が存在する。しかし、活性酸素がこれらの酵素や物質で十分処理されず、重要な生体高分子（DNA、タンパク質、脂質など）に損傷を与え、組織障害や細胞死を引き起こす状態を酸化ストレスと称する。

- 一級アミンと環状二級アミン（図2）

一級アミンと環状二級アミンは化学的性質や分子構造が異なる。一級アミンを基質とする既知のアセチル基転移酵素と二級アミンを基質とする Mpr1 では、基質認識部位を含む立体構造や反応機構そのものが異なっていることが今回明らかとなった。

- X 線結晶構造解析

タンパク質などの生体高分子のかたちを解析する方法の一つ。目的のタンパク質の結晶を精製し、X 線を照射した際の回折データを処理・計算することで、原子レベルで分子のかたちを見ることができる。

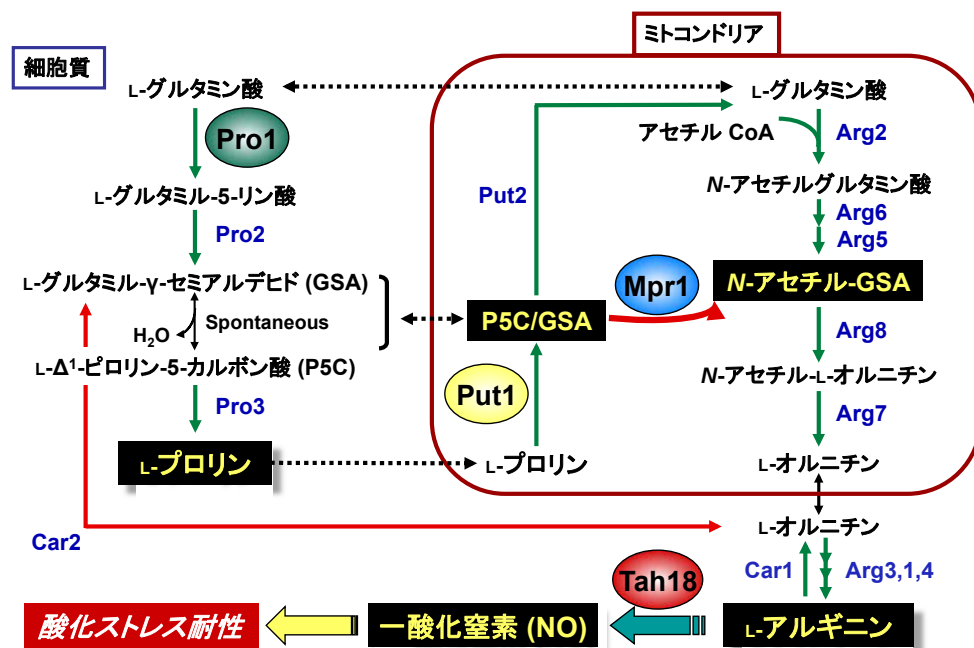
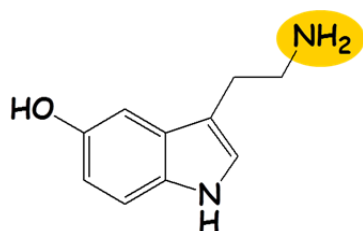
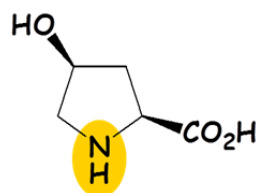


図1. 酵母のプロリン・アルギニン・NO 代謝

Pro1 (γ-グルタミルキナーゼ) はプロリンによって、Arg2 (N-アセチルグルタミン酸シンターゼ)、Arg6 (N-アセチルグルタミン酸キナーゼ)、Arg5 (N-アセチルグルタミル-5-リン酸レダクターゼ) はアルギニンによってそれぞれフィードバック阻害を受ける。酵母 *S. cerevisiae* Σ1278b 株では、39℃ の高温処理によって ROS レベルが増加するが、Put1 (プロリンオキシダーゼ) と Mpr1 (N-アセチルトランスフェラーゼ) の遺伝子が誘導され、プロリンからのアルギニン合成が亢進する。また、増加したアルギニンから NO 合成酵素によって生成した NO が酸化ストレス耐性に寄与している。



セロトニン（一級アミン）



シス-4-ヒドロキシプロリン（環状二級アミン）

図2. 一級アミン（左）と環状二級アミン（右）

既知のアセチル基転移酵素は一級アミン（左）を基質とするが、Mpr1 は環状二級アミン（右）を代謝する。黄色で示したものは、アセチル基転移酵素による修飾を受ける部位。

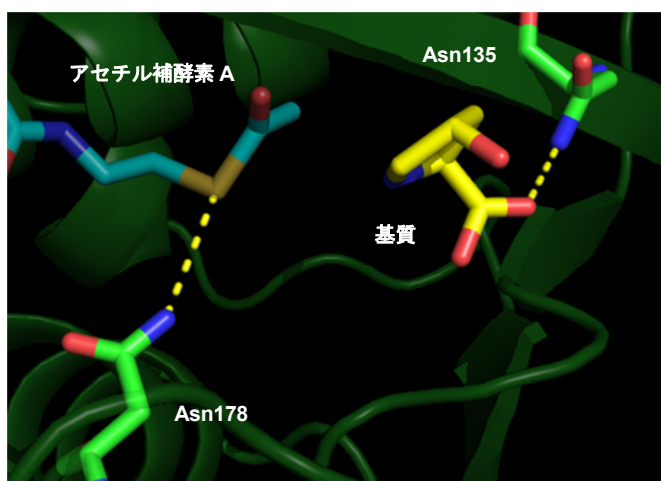
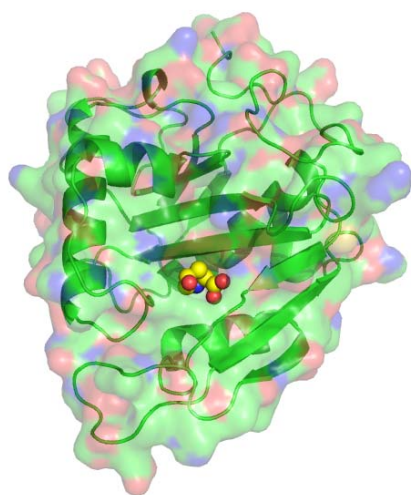


図3. Mpr1 の立体構造（左：全体構造、右：基質認識部位の構造）

基質（黄）は Mpr1 内の Asn135 により認識・結合され、Asn178 がアセチル補酵素 A（青）との相互作用により酵素反応を触媒する。

【共同研究者（共著者）】

福井県立大学 生物資源学部

教授 日井 隆雄、講師 伊藤 貴文

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

教授 箱嶋 敏雄、助教 平野 良憲

【本プレスリリースに関するお問い合わせ先】

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

総合システム生物学領域 ストレス微生物科学研究室 教授 高木 博史、博士研究員 那須野 亮

TEL : 0743-72-5420 / 5422 FAX : 0743-72-5429 E-mail : hiro@bs.naist.jp / r-nasuno@bs.naist.jp