

平成31年度(2019年度)

ストレス微生物科学(高木研究室)

Laboratory of Applied Stress Microbiology

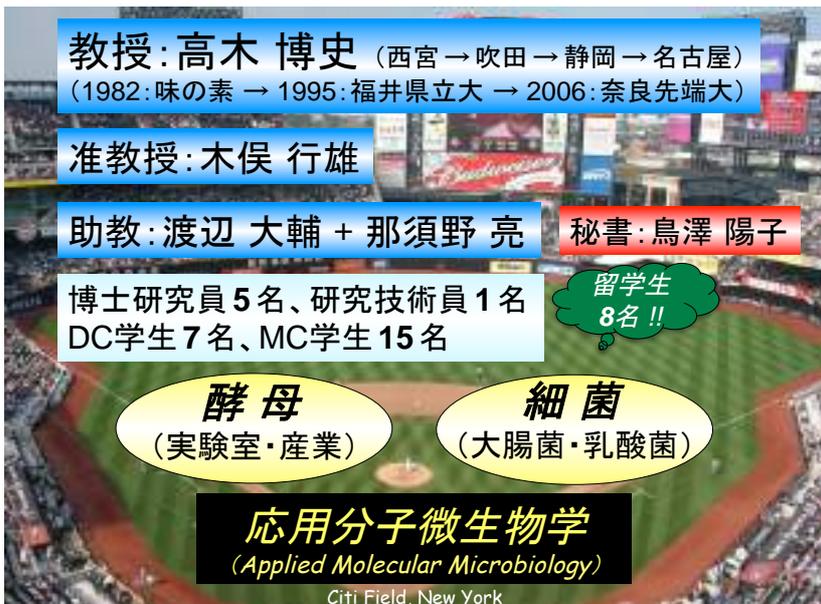


Manhattan from Empire State Building

Manhattan from Hoboken

Originality !!  Serendipity !!

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)

准教授: 木俣 行雄

助教: 渡辺 大輔 + 那須野 亮 **秘書: 鳥澤 陽子**

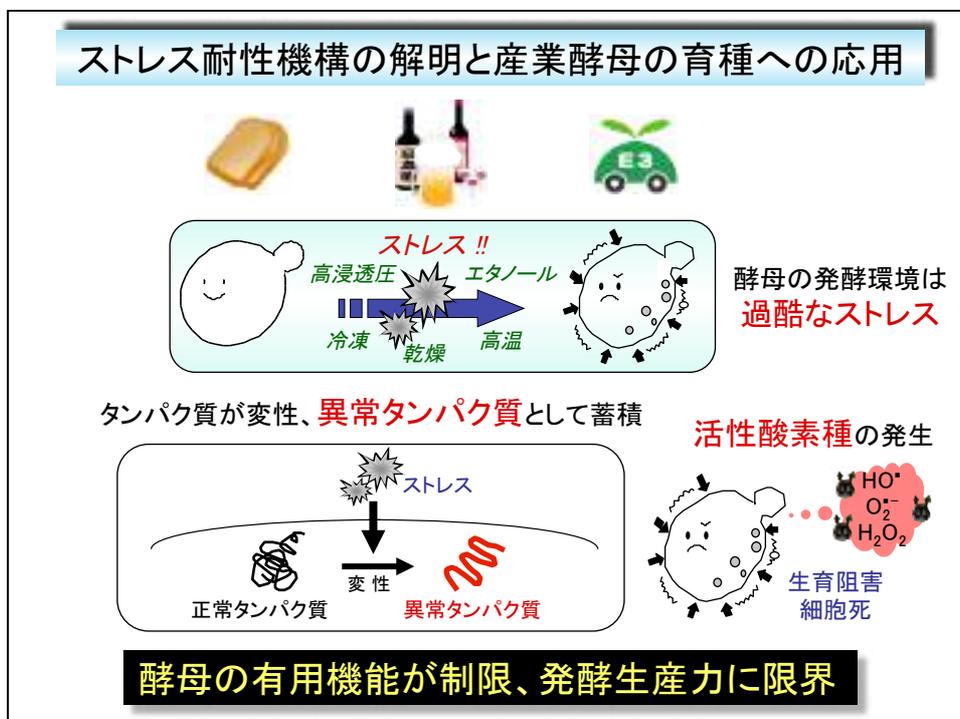
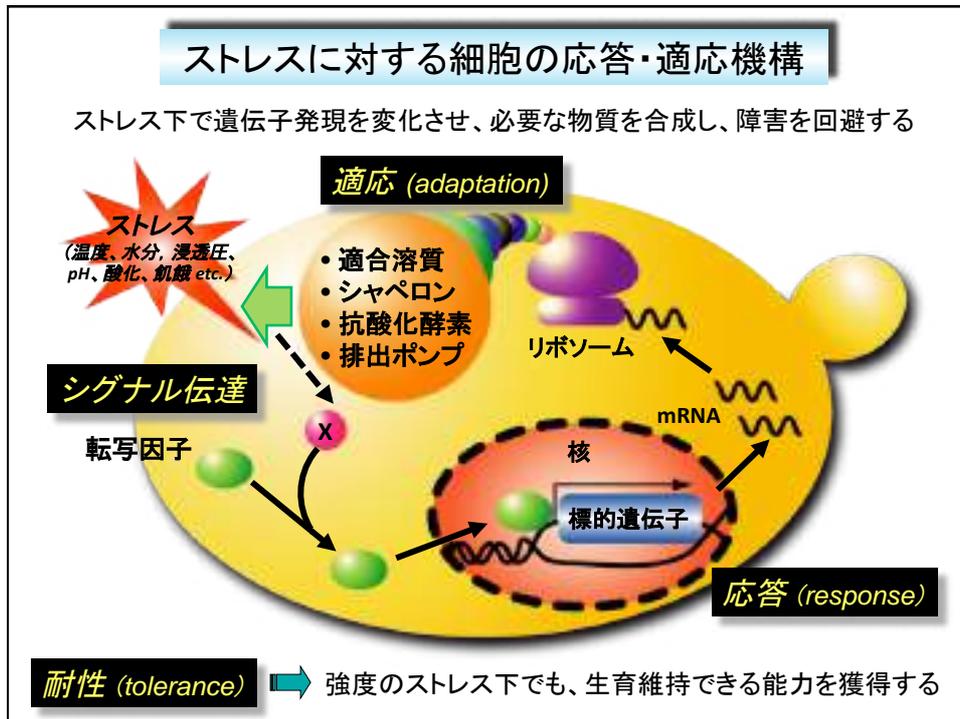
博士研究員 5名、研究技術員 1名
DC学生 7名、MC学生 15名

留学生 8名 !!

酵母
(実験室・産業)

細菌
(大腸菌・乳酸菌)

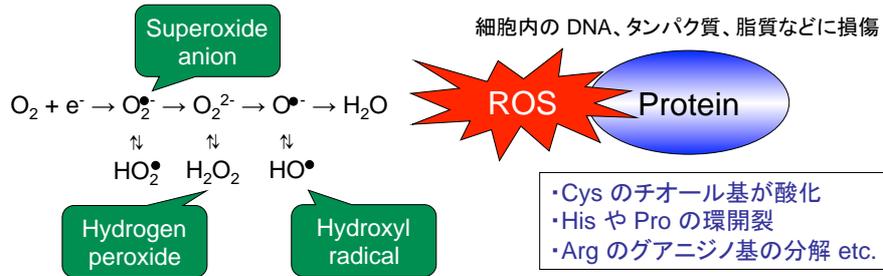
応用分子微生物学
(Applied Molecular Microbiology)
Citi Field, New York



活性酸素種 (ROS) と酸化ストレス

活性酸素種 (Reactive Oxygen Species)

通常の酸素分子よりも活性化された状態 (不十分な還元状態)

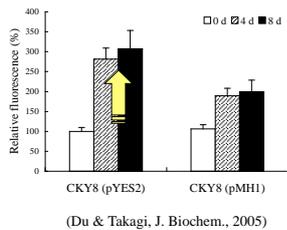


酸化ストレス (oxidative stress)

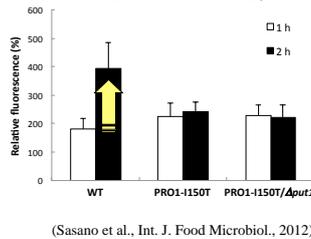
- 細胞内に生じる ROS を十分処理できない状態 (「抗酸化酵素」が働くが、処理しきれない)
- 好氣的生物は酸素呼吸により ATP を高生産するが、ROS により酸化ストレスを受ける
- 様々なストレス (冷凍、乾燥、浸透圧、エタノールなど) により細胞内の ROS レベルが上昇する

発酵生産環境は酵母にとって酸化ストレスである

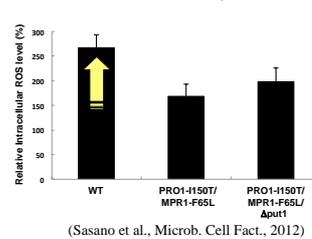
冷凍 (-20°C, 8 d)



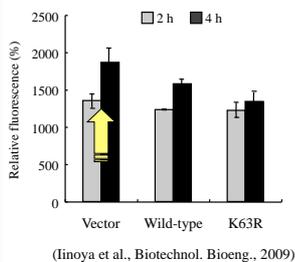
高浸透圧 (30% ショ糖, 2 h)



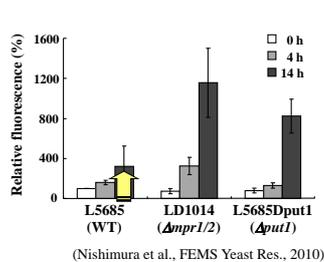
高温乾燥 (42°C, 90 min)



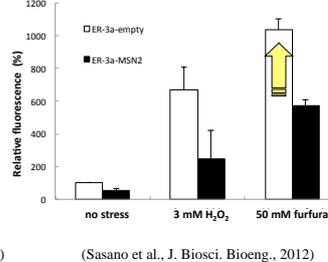
エタノール (18%, 4 h)

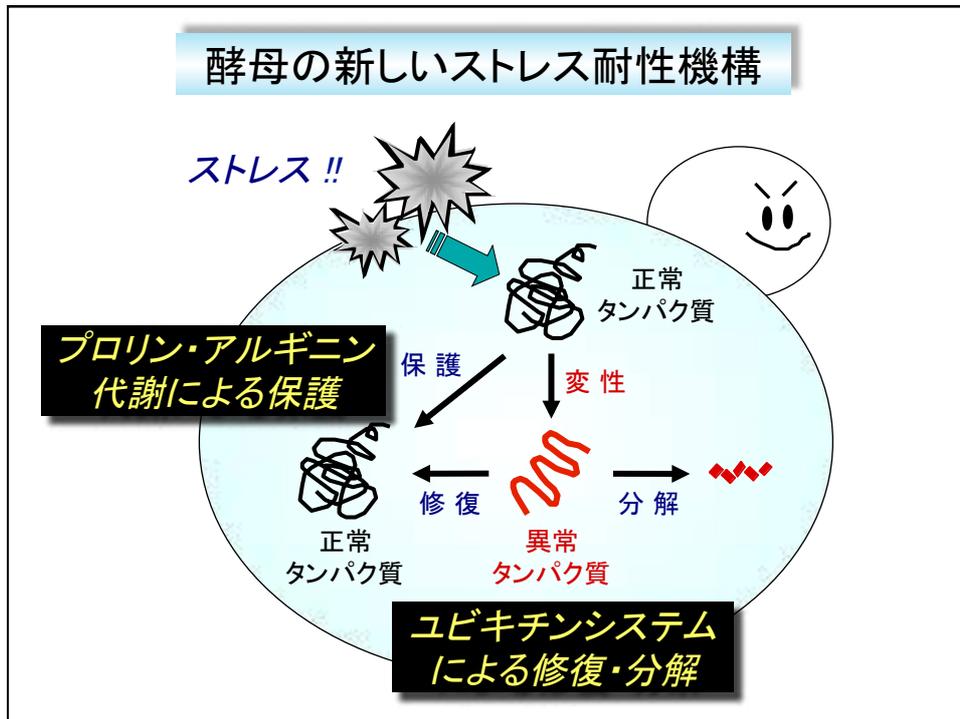


高温 (39°C, 14 h)



フルフラール (50mM, 1 h)





ストレス微生物科学(高木研究室)

酵母・大腸菌におけるストレス応答・適応・耐性機構 定員4名

- 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アルコール調節因子 ⑥機能性アミノ酸

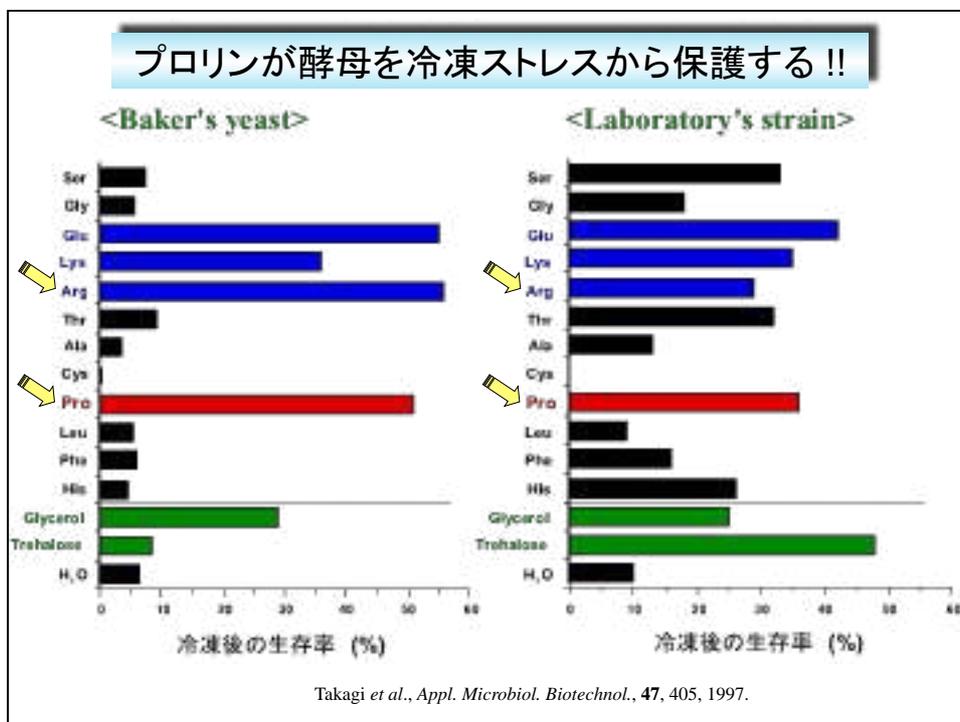
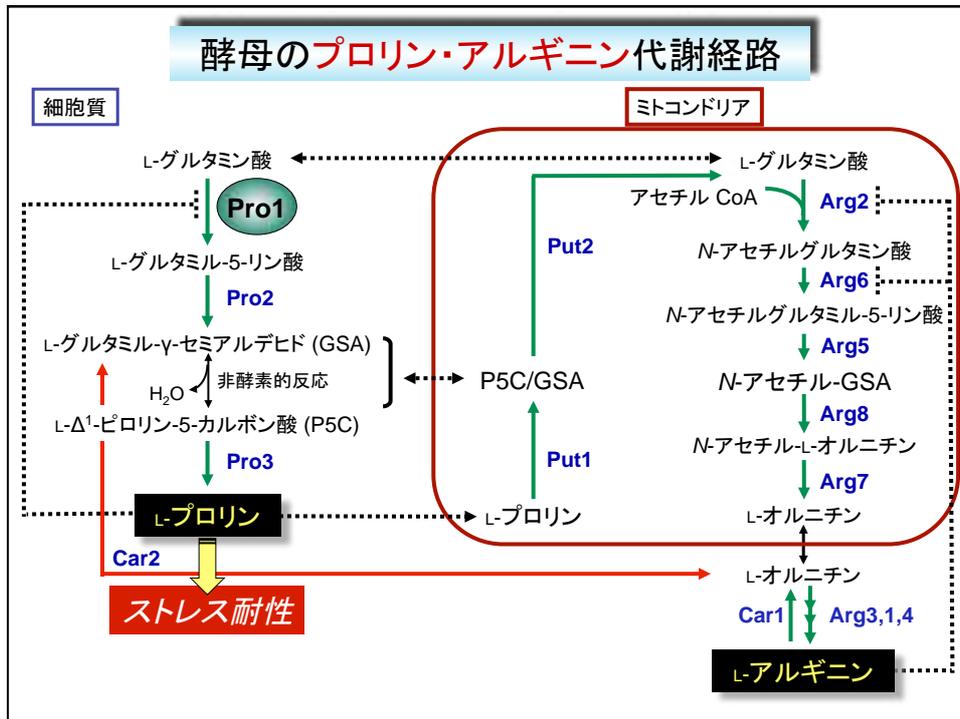
<Keywords> 酸化ストレス、活性酸素種、レドックス制御、アミノ酸(プロリン、アルギニン、バリン、ロイシン、リジン、システイン)、トランスポーター、ミトコンドリア、一酸化窒素、タンパク質活性制御(ニトロソ化、ユビキチン化、アセチル化、リン酸化)、タンパク質リン酸化酵素Rim15、細胞周期シグナル、TOR経路 etc.

<企業との共同研究> テーブルマーク(パン酵母)、アサヒビール(ビール酵母)、月桂冠・奈良産振総センター(清酒酵母)、キッコーマン(醤油酵母)、三和酒類(焼酎酵母)、バイオジェット・石川酒造場(泡盛酵母)、テクノーブル(化粧品)、日揮(建設エンジニアリング)

酵母「小胞体」ストレス応答・タンパク質分泌機構 定員2名

<Keywords> オルガネラ、タンパク質分泌、変性タンパク質、脂質、分子シャペロン、ストレスセンサー、神経変性疾患、エタノール etc.

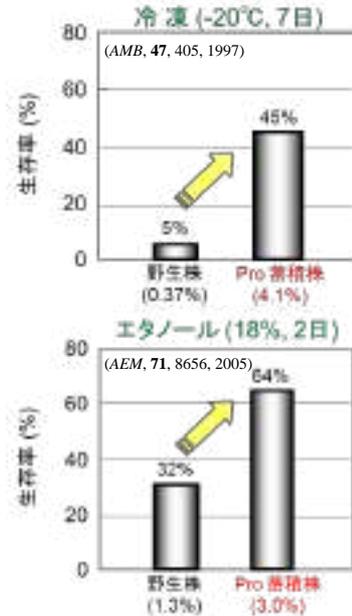
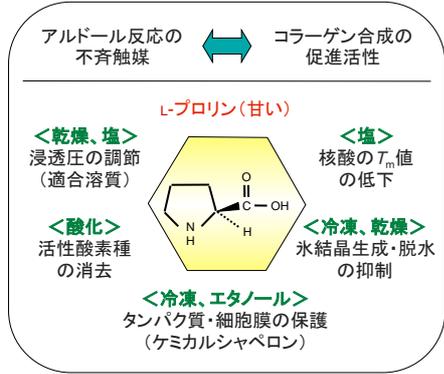




プロリン

植物、細菌: 乾燥や塩ストレスに応答し、浸透圧調節物質として機能
 酵母: 細胞内における生理機能や代謝調節機構は不明な点が多い

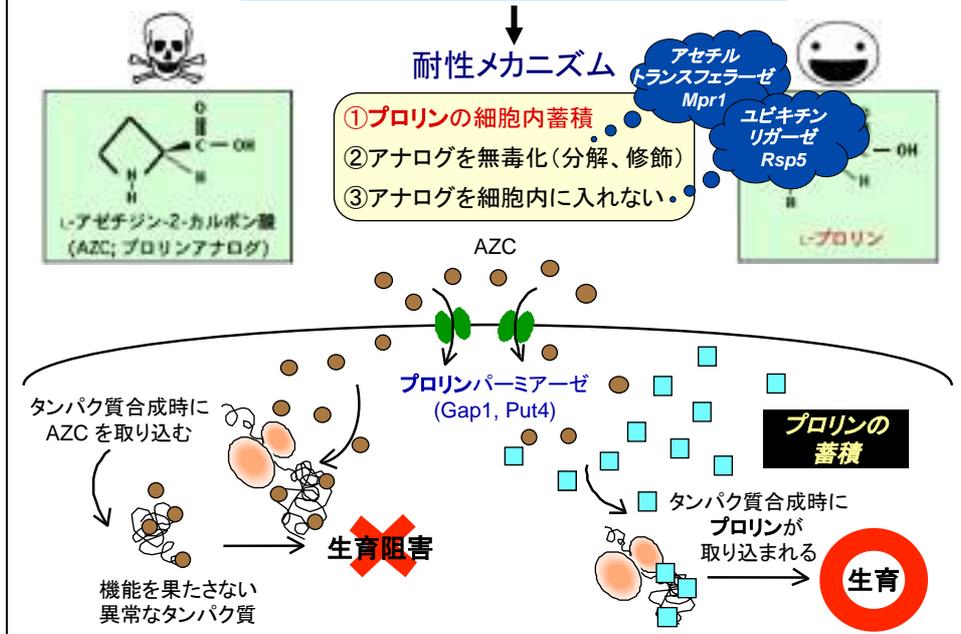
プロリンの生理機能



プロリンアナログ(AZC)耐性変異株

プロリン蓄積株の分離

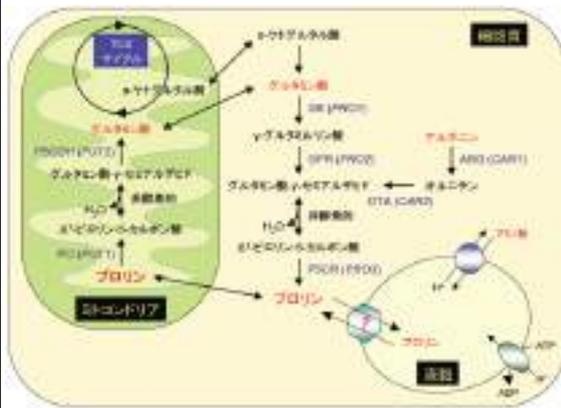
プロリンアナログによる生育阻害



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; 238, 233, 2016; *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 62, 132, 2016; *Yeast*, 33, 353, 2016; *FEBS Lett.*, 590, 2906, 2016; *Microbial Cell*, 3, 522, 2016.

- ★ 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

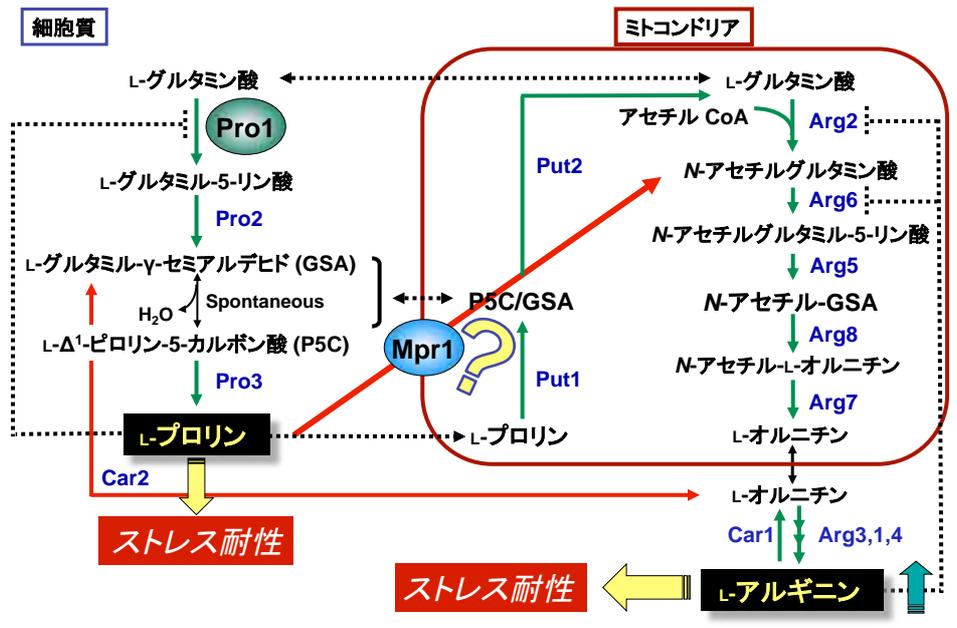


- ・γ-グルタミルキナーゼの新機能
リボソームのオートファジーへの関与
- ・分裂寿命の延長メカニズム
カロリー制限・TORシグナルとの関連
- ・ケミカルシャペロンとしての機能
異常タンパク質の生成回避機構

↓

産業酵母(パン、酒類)の育種
新しい生理機能の解明・活用

酵母におけるプロリンとアルギニンの代謝経路

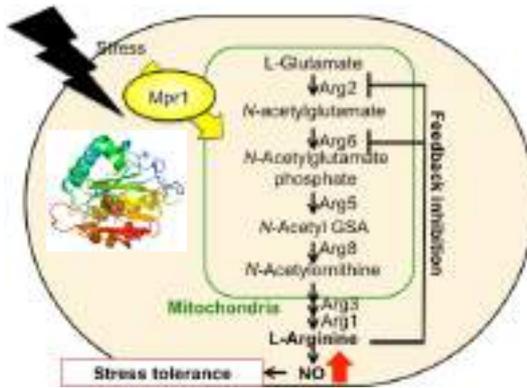
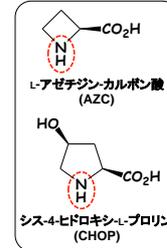


アセチル化酵素 Mpr1

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; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, doi: 10.1007/s10295-019-02177-3 etc.

★ 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

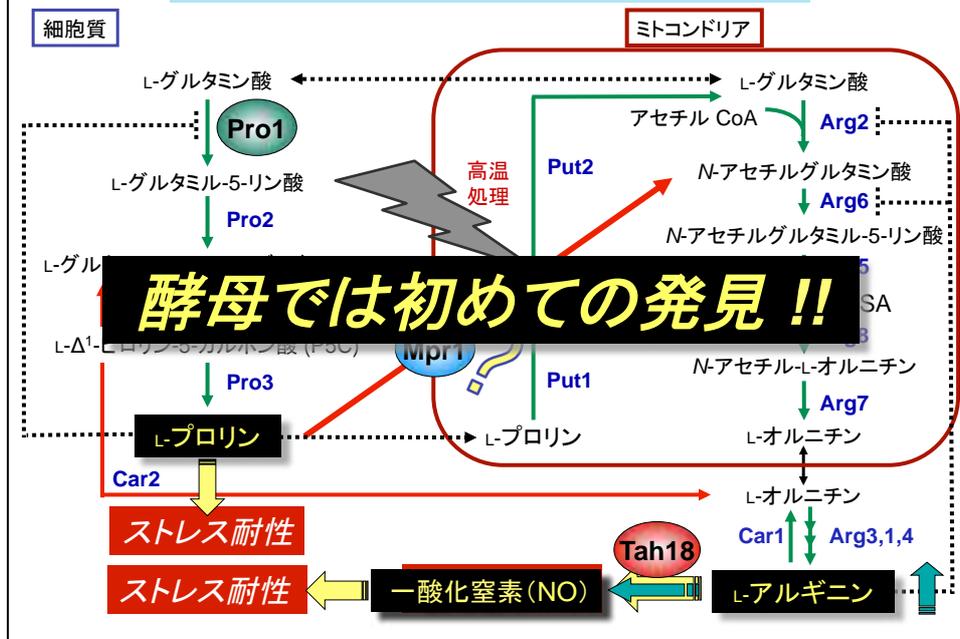
★ 抗酸化機能 ROSレベルを制御し、酸化ストレスから酵母を保護
Pro/Glu 関連化合物のアセチル化を介して Arg(NO) 合成を亢進



- ・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

酵母のプロリン・アルギニン代謝経路



一酸化窒素(NO)の合成機構・生理機能

1992: Science誌
Molecule of the Year
1998: ノーベル生理学・医学賞
Murad, Ignarro, Furchgott博士



窒素酸化物(排気ガス, 光化学スモッグ, 温室効果ガス, 酸性雨)

NOの生理機能(シグナル伝達物質)

NO合成酵素

哺乳類: 血圧調節, 神経伝達, アポトーシス, 感染・炎症・免疫など

○

植物, 藻類: 形態形成, 気孔の開閉, 感染防御, 乾燥耐性など

×(?)

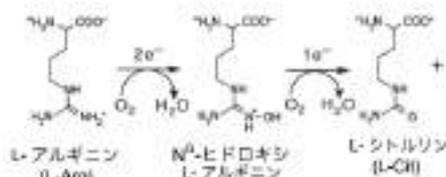
細菌: バイオフィルム形成, 抗生物質耐性, 放射線耐性, 抗酸化など

△/×

酵母においてはほとんど不明!!

NO合成酵素(NOS)

硝酸/亜硝酸還元酵素(NR/NiR)

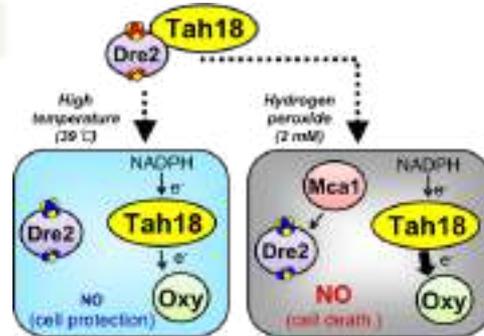
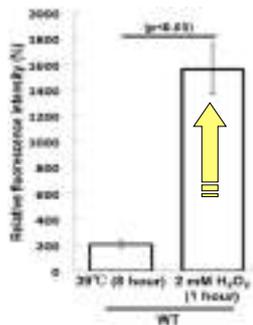


(生化学, 83, 273, 2011)



(血管, 37, 107, 2014)

NOの正負二面性(酵母)



(Rika et al., Appl. Microbiol. Biotech., 100, 9483, 2016)



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-Biol. Chem., 52, 29, 2016; 57, 85, 2016; Appl. Microbiol. Biotechnol., 100, 9483, 2016; Med. Mycol. 59, E63-E70, 2018.

★ **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	<i>mpr1</i> 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

酵母のユビキチンシステム

Ub: ユビキチン
 E1: ユビキチン活性化酵素 (Uba) ⇒ 1種
 E2: ユビキチン結合酵素 (Ubc) ⇒ 13種
 E3: ユビキチンリガーゼ (Rsp5 など)
 E4: ユビキチンポリマー延長化因子 (Ufd2)

ユビキチンシステムの役割

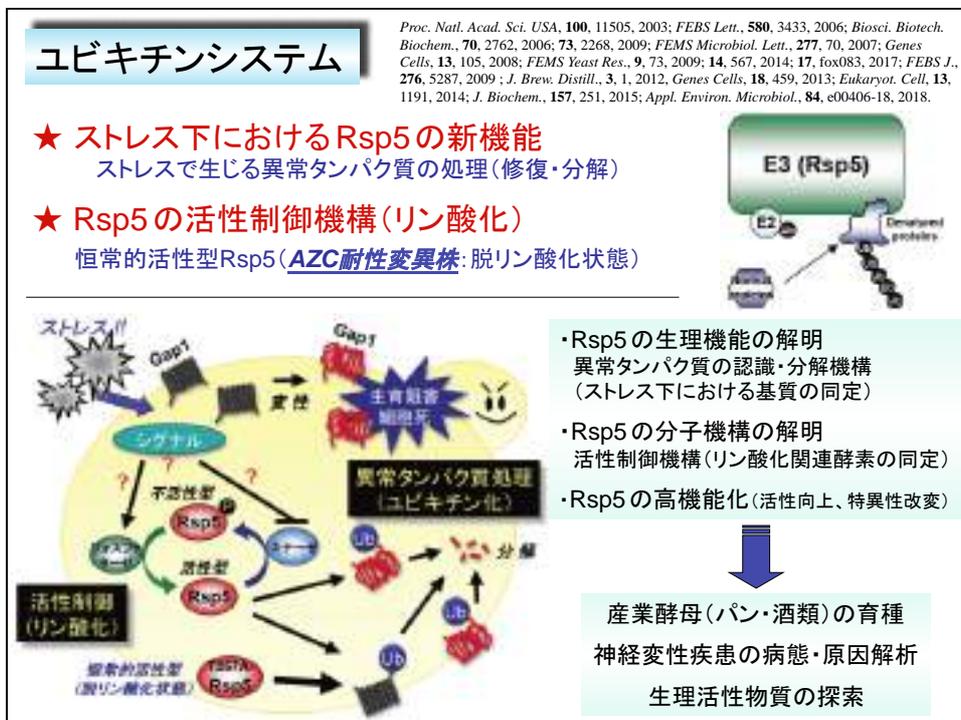
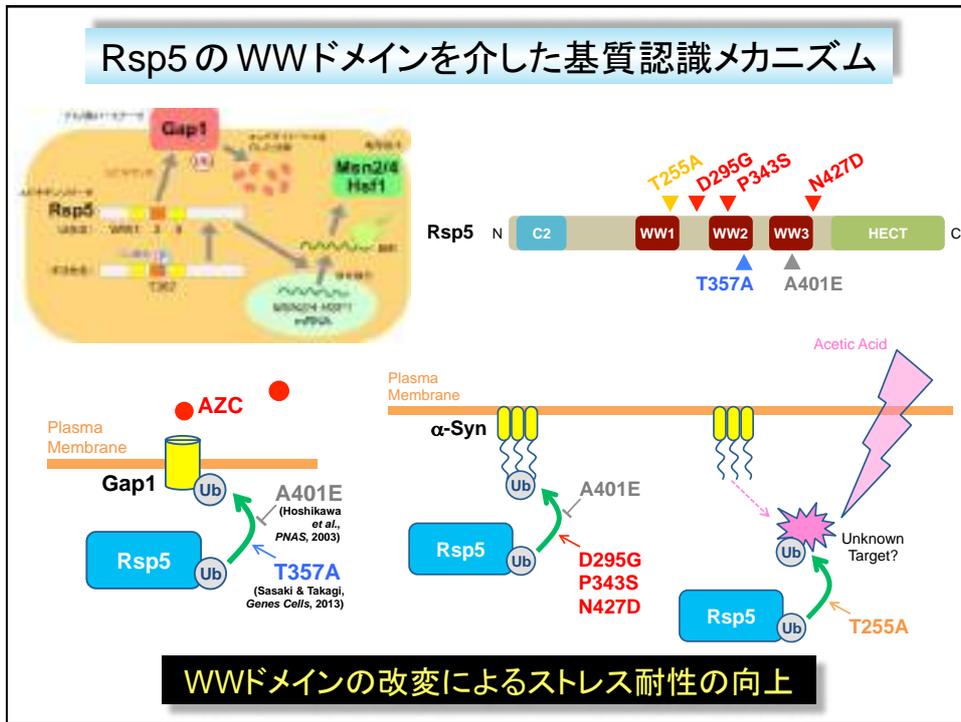
細胞内で不要になった、変性したタンパク質にユビキチン(Ub)を結合し、目印をつける

↓

ユビキチン化された標的タンパク質は、プロテアソームまたは液胞へと運ばれ分解される

ユビキチンシステムによる様々な制御

- ・プロテアソームや液胞での分解
- ・エンドサイトーシス、細胞内アミノ酸輸送
- ・転写翻訳調節、シグナル伝達、DNA 修復、リボソーム機能、細胞周期、**ストレス耐性** etc.



プレスリリース NAIST

NAIST Research Report No. 2019-01 (2019年6月19日発行)
 奈良先端科学技術大学院大学
 奈良県橿原市大宮 1-1-1 奈良先端科学技術大学院大学

奈良先端科学技術大学院大学 微生物学研究所
 微生物学系 微生物学研究室 微生物学研究室長 佐藤 浩一

酵母が冷凍保存後も高い発酵力を維持する仕組みを解明
 変性タンパク質を分解する酵素が重要な役割
 ー冷凍耐性や発酵力が向上したパン・発酵食品の開発に貢献ー



この研究は、冷凍食品や製菓材料・加工食品などの分野で役立つと見られます。酵母はパンやビールなどの食品の製造に不可欠な微生物です。冷凍保存された酵母は、発酵力や生産性が低下することが知られていますが、その原因は不明でした。本研究では、酵母が冷凍ストレスに耐える仕組みを明らかにしました。その結果、酵母が冷凍ストレスに耐えるためには、変性タンパク質を分解する酵素が重要な役割を果たしていることが明らかになりました。この研究成果は、酵母の冷凍耐性を向上させるための新たなアプローチを開拓し、パンやビールなどの食品の製造に貢献するものと期待されています。

冷凍ストレス

正常タンパク質 → 変性タンパク質 → ポリユビキチンタンパク質

Pdr1 → Rpn4 → プロテアソーム複合体

Pdr3 → Rpn4

ストレス耐性遺伝子

プロテアソームの恒常性維持のためのネガティブフィードバック

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
 - 味・風味のパラエティー化



<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  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・筑波大学)

抗真菌薬(深在性真菌症治療薬)の探索

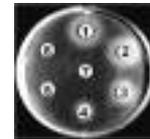
病原真菌(酵母・カビ)におけるNOと増殖、感染、病原性との関連
→ NO合成・耐性に関与するタンパク質(遺伝子)の同定



<ユビキチンシステム> (岩手大学農学部・University of Bayreuth, Germany)

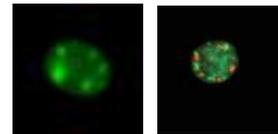
新規な生理活性物質の探索

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(パーキンソン病)、
TDP43(筋萎縮性側索硬化症)の分解機構の解析

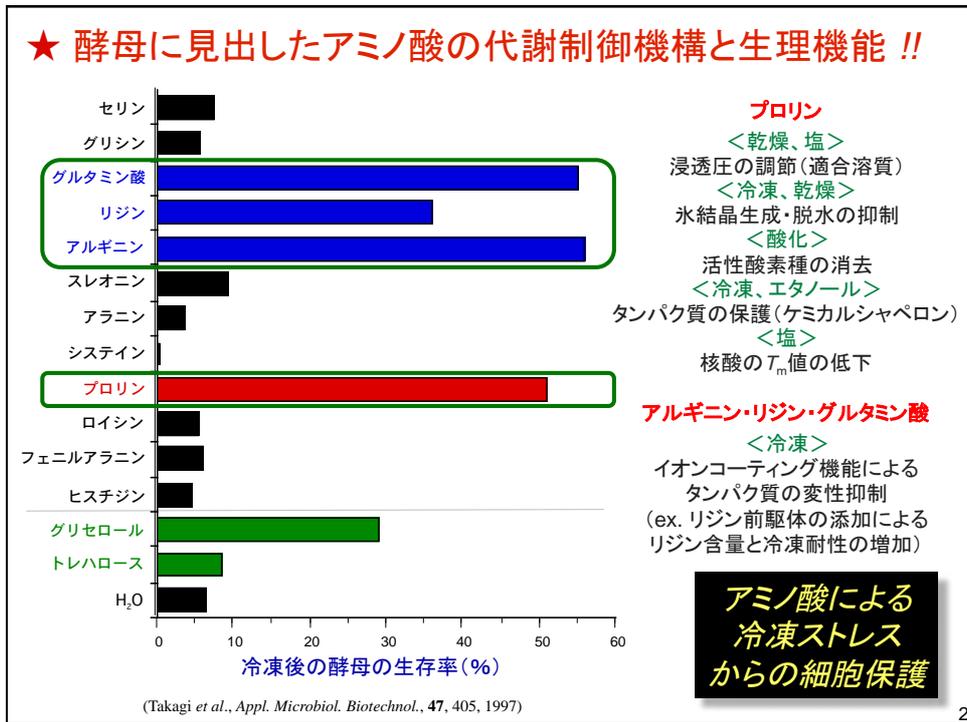


細胞内や血漿などに遊離した形で存在 → 生体内で様々な役割

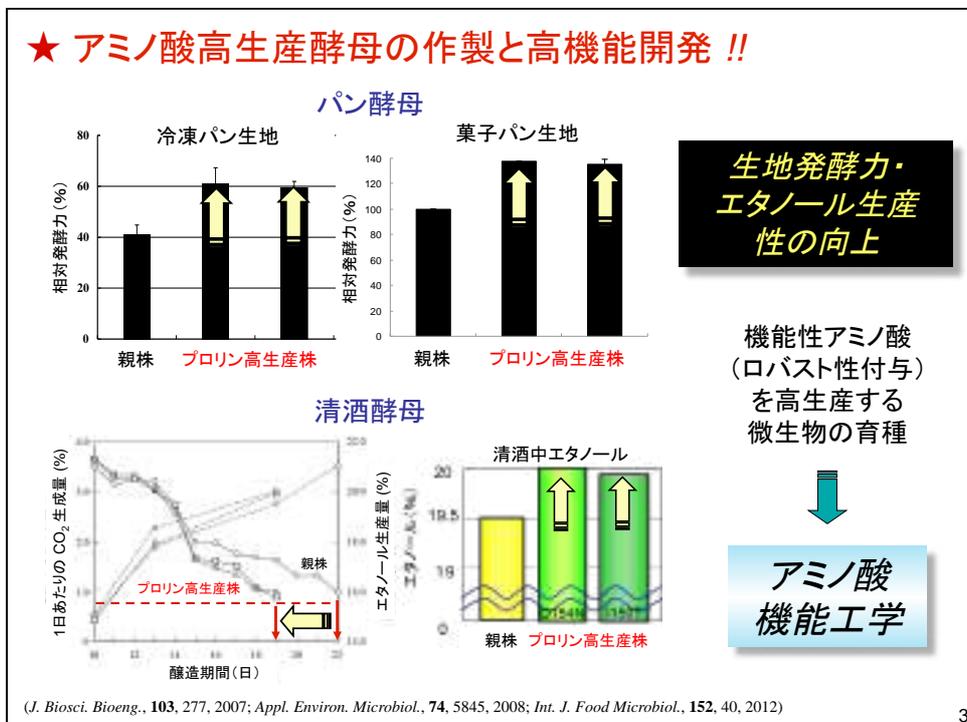
一般の微生物(植物も) → すべてのアミノ酸を細胞内で合成



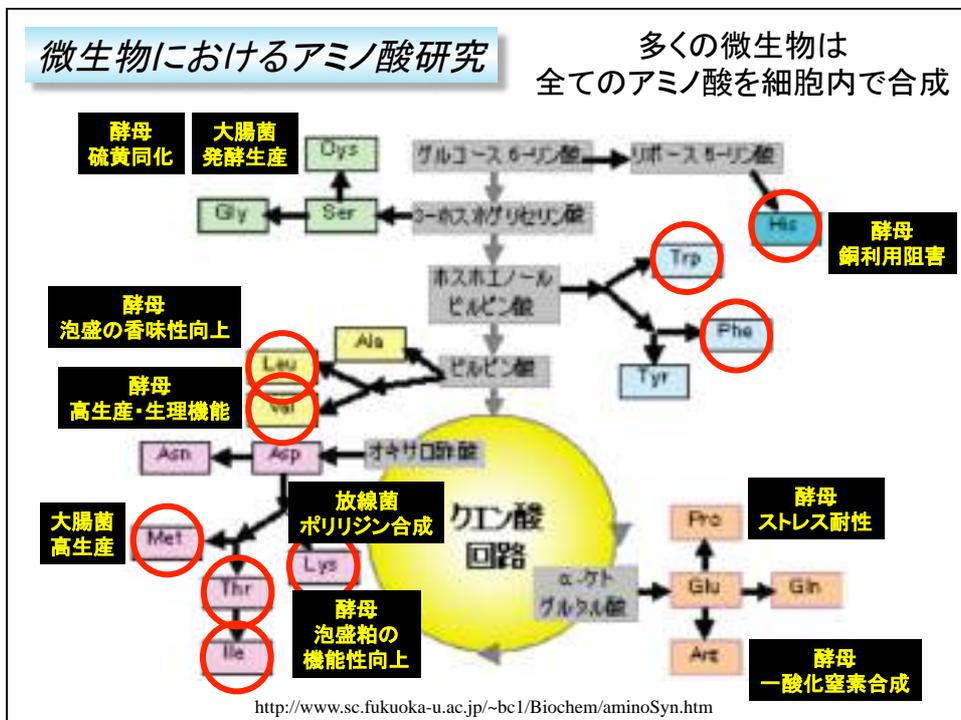
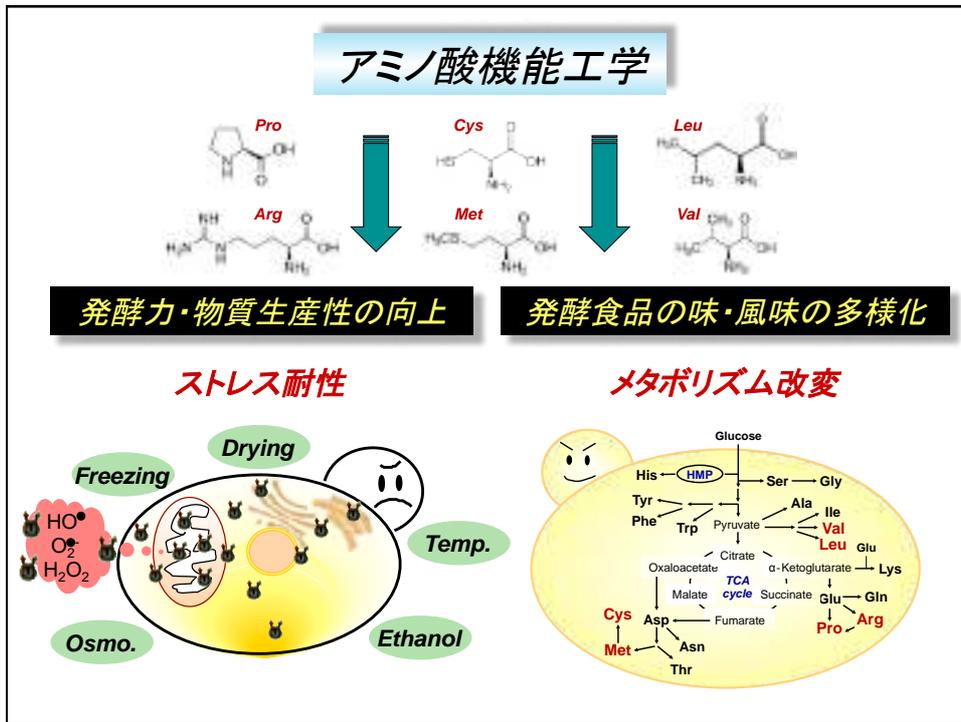
微生物に学ぶアミノ酸の代謝制御機構と生理機能

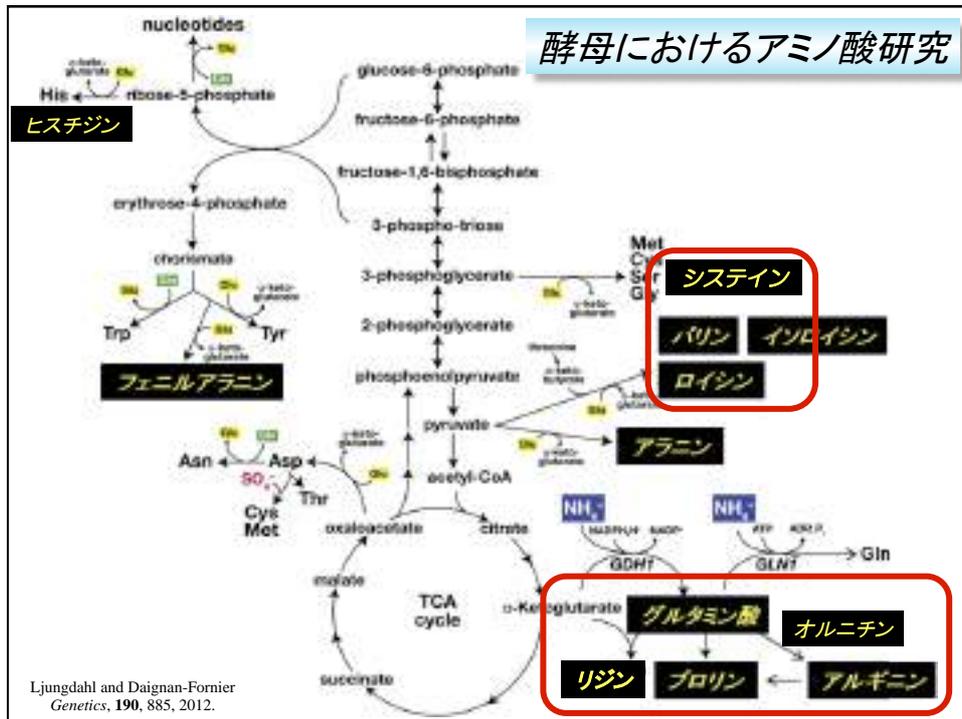


2



3





研究シーズと産業ニーズのマッチング

酵母の育種による泡盛の高付加価値化

Pyruvate → α-Acetoacetate → α-Ketoglutarate → α-Ketoisovalerate → α-Ketoisovalerate → α-Isopropylmalate → β-Isopropylmalate → α-Ketoisocaproate → Isovaleraldehyde → Isoamyl alcohol → Isoamyl acetate (吟醸香)

Enzymes/Genes: ALS (ALV2), KAR1 (LV5), DHAD (LV3), IPMS (LEU4), IPM1 (LEU1), IPMH (LEU2), DC, AAT (ATF1/2), ADH.

Feedback inhibition (フィードバック阻害) at IPMS (LEU4).

Strain: Ser542Phe/Ala551Val

新酵母で香り高い泡盛

産業まつりで登場

吟醸香

2016.5

(Takagi *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 119, 140-147, 2015)

生物工学論文賞

プレスリリース NAIST 2019年 11月 29日

酵母による必須アミノ酸「バリン」の高生産に成功
 合成酵素の制御機構を解明して実現
 「バイオ燃料（イソブタノール）」生産にも期待

High Valine Foods

必須アミノ酸 生産4倍

合成酵素の制御機構を解明して実現

High-level production of valine by repression of the feedback inhibition-insensitive acetylhydroxyacid synthase in *Saccharomyces cerevisiae*
 Hidetaka Takita, Daisuke Okamoto, Shouki Takagi
 Microbial Cell Factories (2019) 18:107

ストレス微生物科学(高木研究室)

研究ポリシー ➡ 労を惜まず、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 13th ANNIVERSARY

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
 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
 4/10(水)・4/11(木)
 4/15(月)・4/17(水)

<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: 日本農芸化学会支部例会(京都), 日本生化学会支部例会(京都)
 6月: 日本NO学会学術集会(久留米)
 7月: Society for Ind. Microbiol. & Biotechnol. (U.S.A.), 日本農芸化学会支部例会(大阪)
 9月: 酵母遺伝学フォーラム(静岡), 日本生物工学会大会(岡山), 日本生化学会(横浜) etc.
 10月: International Specialized Symposium on Yeasts (Turkey)
 12月: 日本分子生物学会年会(福岡), 日本農芸化学会支部例会(神戸)
 3月: 日本農芸化学会大会(福岡)

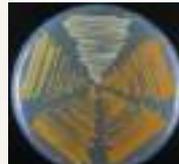
<抜群の就職実績!!> ➡ **博士号を取って、社会で活躍しよう!!**

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, 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, オリエンタル酵母, アステラス製薬, 三井化学シンガポール, ユニチャーム, フジパン, ファイザー, 三栄源エフエフアイ

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!!

