

みにれびゅう

酵母における一酸化窒素シグナルを介したストレス応答機構

那須野 亮, 吉川 雄樹, 高木 博史

1. はじめに

一酸化窒素 (NO) は, さまざまな生物種において多様な生命現象に関わる拡散性のフリーラジカルである¹⁾. 哺乳類の細胞内において, NOはNOシンターゼ (NOS) によって, アルギニン, 酸素およびNADPHを基質として合成される. NOは当初, 内皮細胞由来の血管拡張因子として発見されたため, これまで主に医学的な立場から研究されてきた. その後, 植物や細菌など多くの生物種において, NOの生理機能が解析されてきたが, 高等真核生物のモデルとして, また産業微生物として重要な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては, NOの合成機構や生理的役割は明らかでなかった. これは, 酵母のゲノム上にNOSのオルソログ遺伝子が保存されておらず, 研究そのものが進まなかったためである. 本稿では, 酵母に見いだしたNOS様の活性とその制御機構, またNOの生理機能について, 筆者らの最新の知見を織り交ぜながら解説する.

2. NOの生理機能とその分子機構

窒素酸化物の一種であるNOは, 生物の細胞内では数多くの生理機能に関与する重要なシグナル分子として機能する (図1)²⁾. たとえば, NOは哺乳類において, 血圧の調節, 免疫応答, 神経伝達などに寄与する. また, 植物のストレス耐性や光合成, 感染防御にも関与する. 細菌においては, 病原性, バイオフィーム形成, 薬剤耐性, 放射線耐性などへの関与が報告されている.

NOの作用機序については, 一般に以下のようなことが知られている (図1). 哺乳類の血管内皮細胞でNOSによ

り合成されたNOは, 血管平滑筋細胞内の可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) のヘム鉄に結合し, これを活性化する¹⁾. 活性化型sGCによってGTPから合成されたサイクリックGMPが二次メッセンジャーとして機能し, 最終的に平滑筋が弛緩する. また, NOはタンパク質のシステイン残基や低分子化合物のチオール基と反応し, これをS-ニトロソ化する¹⁾. 一方, NOは活性酸素種 (ROS) の一種であるスーパーオキシドアニオンと非酵素的に反応してペルオキシ亜硝酸を生成し, タンパク質のチロシン残基, トリプトファン残基や核酸, 脂質などをニトロ化することで, 種々の生命現象に関与する³⁾. ニトロ化は, タンパク質の立体構造や低分子化合物の電子状態の変化を介して,

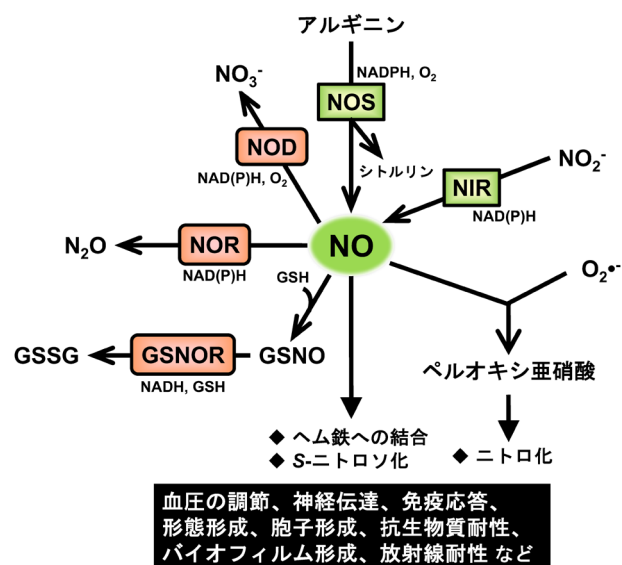


図1 NOの合成・分解機構, および生理機能とその分子機構
NOは, NOシンターゼ (NOS) 活性によりアルギニンから, 亜硝酸レダクターゼ (NIR) 活性により亜硝酸から, それぞれ合成される. NOジオキシゲナーゼ (NOD) はNOを酸化的に分解することで, NOレダクターゼ (NOR) は嫌気的条件下でNOを亜酸化窒素 N_2O へと還元することで, またS-ニトロソグルタチオンレダクターゼ (GSNOR) はNOとグルタチオン (GSH) の反応生成物であるS-ニトロソグルタチオン (GSNO) を還元的に分解することで, 酸化型グルタチオン (GSSG) へと変換し, それぞれNOによる毒性を回避している. NOはタンパク質中のヘム鉄への結合やS-ニトロソ化により, タンパク質の機能を変化させる. 一方, NOは O_2^- と反応してペルオキシ亜硝酸に変換され, タンパク質や核酸, 脂質をニトロ化する (この図は, 文献2の618ページを一部改変).

奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス領域 (〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5)

Stress response mechanism mediated by nitric oxide signaling in yeast

Ryo Nasuno, Yuki Yoshikawa and Hiroshi Takagi (Division of Biological Science, Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama-cho, Ikoma, Nara 630-0192, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載.

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900701

© 2018 公益社団法人日本生化学会

その機能を発現する。

3. NOの合成と分解

哺乳類型NOS (mNOS) は、アルギニンの酸化を行うヘム活性中心を含むオキシゲナーゼドメイン (Oxy) と、NADPHの電子をOxyへ伝達するレダクターゼドメイン (Red) から構成される (図2)。近年、*Bacillus* 属細菌から発見された細菌型NOS (bNOS) は、mNOSのOxyに高い相同性を示すが、Redと相同な領域を有さない。bNOSはレダクターゼタンパク質との相互作用を介して電子を受け取り、NOS活性を発現すると考えられている⁴⁾。一方、亜硝酸イオンを還元してNOを合成する亜硝酸レダクターゼ (NIR) 活性も報告されている。NOは亜硝酸をアンモニアに同化するNIR反応の中間体として合成されるほか、ミトコンドリア呼吸鎖の複合体IIIやIVによる亜硝酸の還元によっても生成する⁵⁾。

NOが生理機能を発揮するためには、その濃度や局在を適切にかつ厳密に制御する必要がある。高濃度のNOはその高い反応性のために細胞毒性を示すため、細胞はNOに対する解毒系や防御系を備えている (図1)⁴⁾。たとえば、フラボヘモグロビンは好気条件下ではNOジオキシゲナーゼ (NOD) 活性により、NAD(P)Hと酸素を用いてNOを硝酸イオンへと酸化する。一方、嫌気的条件下ではNOレダクターゼ (NOR) 活性により、NAD(P)H由来の電子を用いてNOを亜酸化窒素 N_2O へと還元する。また、NOは生体内に多量に存在するチオール化合物であるグルタチオン (GSH) と反応し、S-ニトロソグルタチオン (GSNO) に変換される。GSNOは、GSNOレダクターゼ (GSNOR) により酸化型グルタチオン (GSSG) とアンモニアへと還元される⁴⁾。近年、真菌類に見いだされたニトロソチオネ

インはシステインを多く含むペプチドであり、NOをシステイン残基で捕捉した後、チオレドキシン、チオレドキシンレダクターゼと共役してNOを解毒する⁶⁾。

4. 酵母におけるNOの合成機構と生理機能

酵母のゲノム上には、mNOSと相同性の高い遺伝子配列は見いだされていないが、NOS様の活性は報告されている。Almeidaらは⁷⁾、トリチウムラベルしたアルギニンを用いたNOS活性測定キットを用いて、酵母粗酵素液からNOS様活性を検出したが、酵母におけるNOS分子やそれをコードする遺伝子はいまだに同定されていない。一方、酵母 (*S. cerevisiae* や *Schizosaccharomyces pombe*) には亜硝酸をアンモニアに還元する能力がないが、ミトコンドリア呼吸鎖による亜硝酸の還元によりNOを合成する。

これまでに、酵母におけるNOの生理機能がいくつか報告されている。*S. cerevisiae* では、過酸化水素処理条件下で生成するNOがアポトーシス様細胞死を誘導することが知られている⁷⁾。また、接合シグナルにタンパク質ニトロ化が関与することも報告されている⁸⁾。*S. pombe* では、NOと胞子形成の関連性、NOシグナルを介した酸化ストレス応答機構の存在が示唆されている⁹⁾。しかし、NOS様活性やその活性制御の分子機構が明らかでないため、酵母におけるNOの生理的意義については不明な点が多い。

5. Tah18-Dre2複合体によるNOS様活性の制御機構とその普遍性

筆者らは、酵母 *S. cerevisiae* の細胞質鉄硫黄クラスタータンパク質の生成に関わるフラボタンパク質Tah18がNOS様活性に関与することを見いだした¹⁰⁾。酵母を高温や過酸化水素で処理するとNOを生成するが、これはmNOS阻害剤であるアルギニンアナログ (N^G -ニトロアルギニンメチルエステル; NAME) により阻害される^{7, 10)}。興味深いことに、Tah18の発現を抑制した株でも同様にNO生成が阻害された¹¹⁾。Tah18は、mNOSのRedやP450レダクターゼと相同なアミノ酸配列を有するが、アルギニンの酸化に重要であるOxyとは相同性を示さない¹²⁾。bNOSが任意のレダクターゼとの相互作用によりNOS活性を発現することから、筆者らはTah18がレダクターゼとして機能し、未同定のオキシゲナーゼに電子を伝達することで、NOS様活性に寄与していると予想している。

Tah18は鉄硫黄クラスター合成マシナリーにNADPHからの電子を供給する初発の酵素であるが、この際、自身も鉄硫黄クラスタータンパク質であるDre2に電子を伝達することで、その第一段階を担っている¹²⁾。そこで、NOS様活性とDre2との関連性を解析するため、Dre2の発現を

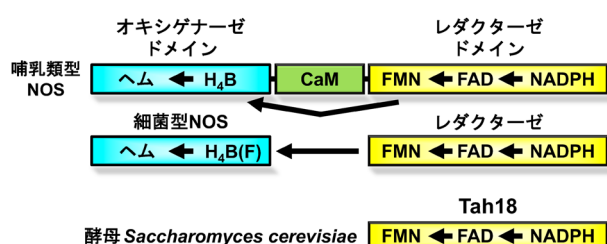


図2 哺乳類型NOS, 細菌型NOS, およびTah18の構造比較
哺乳類型NOSは、アルギニンの酸化を行うヘムを含んだオキシゲナーゼドメイン (Oxy) と、オキシゲナーゼドメインに電子を伝達するレダクターゼドメイン (Red) からなる。また、NOSの活性化に関与するカルモジュリン (CaM) の結合部位を有している。一方、細菌型NOSは哺乳類型NOSのオキシゲナーゼドメインとのみ、Tah18は哺乳類型NOSのレダクターゼドメインとのみ、それぞれ相同性を有する (この図は、文献2の618ページを一部改変)。

止めた後、細胞内のNOレベルを経時的に測定した¹¹⁾。その結果、Dre2のタンパク質量が減少するのに伴い、NOレベルが上昇した。また、Tah18依存的にNOが生成する条件下でTah18-Dre2複合体の挙動を解析したところ、過酸化水素処理後、経時的に複合体が解離した。さらに、Tah18とDre2を融合タンパク質として発現する株（Tah18-Dre2融合株）を構築し、両者の分子間相互作用を強化したところ、過酸化水素処理によるNO生成が顕著に阻害された。以上のことから、Dre2はTah18と相互作用することでNOS様活性を抑制することが示唆された。一方、*S. cerevisiae*は過酸化水素処理に応答して、NOまたはTah18依存的に細胞死を誘導する機構を有している。Tah18発現抑制株およびTah18-Dre2融合株を過酸化水素処理し、細胞生存率を測定したところ、いずれも野生型株と比較して顕著に細胞死の割合が低下した。

以上の結果に基づき、筆者らはTah18依存的なNOS様活性と細胞死誘導の制御機構として、図3のようなモデルを提唱している²⁾。非ストレス条件下では、Tah18はDre2に電子を供給し、細胞質の鉄硫黄クラスタータンパク質の生成に寄与する。しかし、細胞が酸化的環境にさらされると、Tah18-Dre2複合体が解離し、遊離型のTah18が未知のオキシゲナーゼへ電子を伝達することでNOS様活性が発現し、生成したNOが細胞死を誘導する。Tah18-Dre2複合体は、細胞の酸化還元状態に応答して細胞の生死をつかさどる分子スイッチとして機能すると考えられる。

哺乳類は主にNOSによりNOを合成しているが、一方でTah18のオルソログとしてNADPH依存性ジフラビンオキシドレダクターゼ1 (NDOR1) を、Dre2のオルソログ

としてサイトカイン誘導性アポトーシスインヒビター1 (CIAPIN1) を有している¹³⁾。そこで、Tah18、Dre2の代わりにNDOR1とCIAPIN1を発現する株 (NDOR1-CIAPIN1株) を作製し、過酸化水素処理下でのNO生成、および複合体の挙動を解析した。その結果、NDOR1-CIAPIN1株は野生型株と同等のNO合成能を示し、またNDOR1-CIAPIN1複合体はTah18-Dre2複合体と同様に、過酸化水素処理によって解離した。この結果は、NDOR1-CIAPIN1がTah18-Dre2と同様の機構で、既知のmNOSとは異なるNO合成に寄与することを示唆するとともに、Tah18-Dre2複合体依存的なNO合成とその制御機構が哺乳類を含む高等真核生物にも広く保存されている可能性を示している。

6. NO依存的な高温ストレス耐性

筆者らは近年、Tah18依存的なNOS様活性によって合成されるNOが酵母の高温ストレス耐性に寄与することを見いだした¹⁰⁾。そこで、酵母におけるNO依存的な高温ストレス耐性の分子機構を明らかにすべく、NOドナーで処理した細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った¹⁴⁾。その結果、銅代謝に関わる転写因子Mac1がNOによって活性化され、銅トランスポーターCtr1をコードする遺伝子 (*CTR1*) の発現が上昇することがわかった。一方、酵母を高温ストレス (39°C) にさらした後の細胞生存率を測定したところ、mNOS阻害剤NAME、および*MAC1* 遺伝子の破壊によって細胞生存率は低下したが、両者の相加効果はみられなかった。また、高温ストレスにより誘導された*CTR1*の転写が、NAME処理によって抑制された。一方、*MAC1* 遺伝子の転写量は高温処理によって変化しなかった。さらに、細胞内の銅含量は高温処理により増加したが、NAME処理時や*MAC1* 遺伝子破壊株では増加しなかった。一方、高温ストレス時には細胞内ROSレベルが上昇することが知られている。そこで、抗酸化酵素の一種である銅依存的スーパーオキシドジスムターゼSod1の活性を測定したところ、高温ストレスによってSod1活性は上昇したが、NAME処理条件や*MAC1* 遺伝子破壊株ではSod1活性の上昇はみられなかった。

以上の結果に基づき、筆者らは図4のようなNO依存的な高温ストレス耐性機構を提唱した¹⁴⁾。酵母が高温ストレスにさらされると細胞内でROSが発生し、細胞が傷害を受ける一方、NOS様活性依存的にNOが合成される。NOはMac1を何らかの機構により活性化し、*CTR1*の転写が誘導される。発現量が増加した銅トランスポーターCtr1によって細胞内の銅含量が上昇し、Sod1のアポ酵素は銅を結合してホロ酵素となる。その結果、上昇したSod1活性によりROSが消去され、細胞はROSによる障害を免れる。NOや高温は*MAC1* 自身の転写を誘導しないことから、NO

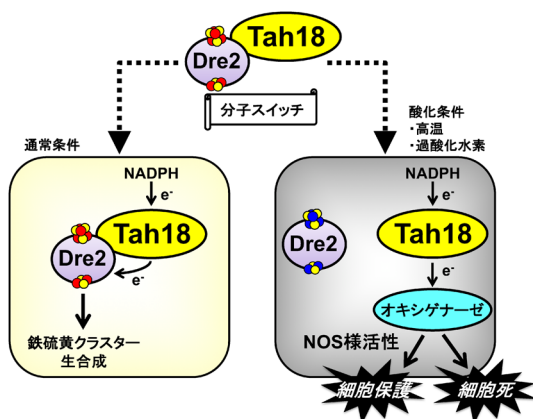


図3 Tah18-Dre2複合体によるNOS様活性の制御機構
通常条件下では、Tah18はDre2と複合体を形成し、細胞質の鉄硫黄クラスター生成に寄与する。細胞が酸化ストレス（高温、過酸化水素など）にさらされると、Tah18はDre2から解離し、NOS様活性のオキシゲナーゼとして機能するタンパク質へと電子を伝達し、NOS様活性を発現する（この図は、文献2の620ページを一部改変）。

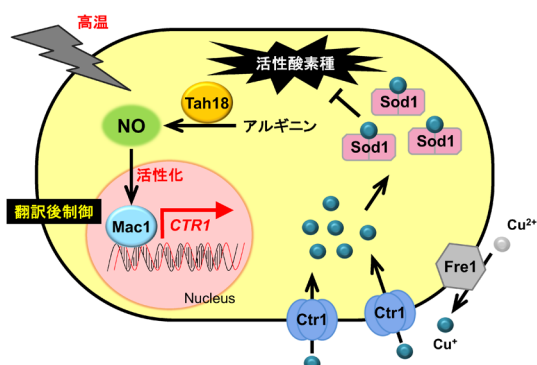


図4 酵母におけるNO依存的な高温ストレス耐性機構

酵母が高温ストレス (39°C) にさらされるとNOS様活性によりNOが合成される。NOは転写因子Mac1を翻訳後修飾によって活性化し、銅トランスポーター Ctr1をコードする遺伝子 (CTR1) の転写が誘導される。Ctr1により細胞内に取り込まれた銅イオンによりスーパーオキシドジスムターゼSod1活性が上昇し、高温ストレスで発生した活性酸素種 (ROS) を消去し、細胞は高温ストレス耐性を獲得する (この図は、文献2の620ページを一部改変)。

によるMac1の活性化は翻訳後修飾によるものと推測されるが、その機構はまだ明らかになっていない。NO依存的な翻訳後修飾であるS-ニトロソ化やニトロ化、リン酸化などがMac1の活性化に寄与すると考えられる。

7. 酵母におけるNOの生理機能の二面性

以上のように、酵母におけるNOの合成制御機構と生理機能の一端を明らかにすることができた。また、NOの生理機能に二面性がある点は注目すべきである⁴⁾。高温に対する細胞保護^{10, 14, 15)}と過酸化水素処理時の細胞死誘導^{7, 11)}は、一見すると矛盾している (図3)。特に、NOはTah18依存的に共通の機構で合成されているにもかかわらず、相反する生理機能 (細胞保護、細胞死誘導) を有している。この原因としては、細胞内NO濃度の違いが考えられる。また、NOは他の活性分子種、特にROSと反応して、さらに多様な化学種を生成することで機能を発揮する。そのため、NOが生理機能を発現する環境の違い、たとえば、ROSのレベルや種類の違いが、NOの二面性を引き出す要因になっている可能性もある。

8. おわりに

本稿では、酵母におけるNOS様活性の制御機構について筆者らの知見を中心に紹介するとともに、NOの生理機能とその分子機構について解説した。酵母におけるNO研究は、哺乳類や植物に比べてそれほど活発ではないが、酵母のモデル生物、また有用微生物としての重要性を考え

た場合、その科学的意義はきわめて大きい。中でも、NOS様活性の責任分子であるオキシゲナーゼはまだ同定できておらず、酵母におけるNO研究を加速する上で、新規の分子を見いだすことは喫緊の課題である。また、NOが関与する生命現象の理解を深めるためには、NOの標的分子を網羅的に解析することが必要となる。現在、筆者らは哺乳類や植物のNO研究で汎用されるビオチンスイッチ法を酵母において確立し、NOの標的タンパク質の探索と解析を行っている。酵母のNOシグナルを介したストレス応答機構の全容が明らかになることで、基礎・応用の両面でインパクトのある成果の創出を期待している。

謝辞

本研究は主に、科学研究費補助金 (基盤(A)16H02601, 新学術領域26111009, 若手(B)15K21165), 公益財団法人発酵研究所 (大型研究助成) の助成を受けて行われました。この場を借りて感謝申し上げます。

文 献

- 1) Heinrich, T.A., Da Silva, R.S., Miranda, K.M., Switzer, C.H., Wink, D.A., & Fukuto, J.M. (2013) Biological nitric oxide signalling: Chemistry and terminology. *Br. J. Pharmacol.*, **169**, 1417-1429.
- 2) 那須野亮, 吉川雄樹, 高木博史 (2017) 酵母に見いだした一酸化窒素 (NO) の合成制御機構と生理機能. *化学と生物*, **55**, 617-623.
- 3) Radi, R. (2013) Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc. Chem. Res.*, **46**, 550-559.
- 4) Astuti, R.I., Nasuno, R., & Takagi, H. (2016) Nitric oxide signaling in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 9483-9497.
- 5) Shiva, S. (2013) Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox Biol.*, **1**, 40-44.
- 6) Zhou, S., Narukami, T., Masuo, S., Shimizu, M., Fujita, T., Doi, Y., Kamimura, Y., & Takaya, N. (2013) NO-inducible nitrosothionein mediates NO removal in tandem with thioredoxin. *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 657-663.
- 7) Almeida, B., Buttner, S., Ohlmeier, S., Silva, A., Mesquita, A., Sampaio-Marques, B., Osorio, N.S., Kollau, A., Mayer, B., Leão, C., et al. (2007) NO-mediated apoptosis in yeast. *J. Cell Sci.*, **120**, 3279-3288.
- 8) Kang, J.W., Lee, N.Y., Cho, K.C., Lee, M.Y., Choi, D.Y., Park, S.H., & Kim, K.P. (2015) Analysis of nitrated proteins in *Saccharomyces cerevisiae* in mating signal transduction. *Proteomics*, **15**, 1-28.
- 9) Astuti, R.I., Watanabe, D., & Takagi, H. (2016) Nitric oxide signaling and its role in oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nitric Oxide*, **52**, 29-40.
- 10) Nishimura, A., Kawahara, N., & Takagi, H. (2013) The flavo-protein Tah18-dependent NO synthesis confers high-temperature stress tolerance on yeast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 137-143.
- 11) Yoshikawa, Y., Nasuno, R., Kawahara, N., Nishimura, A., Wata-

nabe, D., & Takagi, H. (2016) Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. *Nitric Oxide*, **57**, 85–91.

- 12) Netz, D.J., Stümpfig, M., Doré, C., Mühlenhoff, U., Pierik, A.J., & Lill, R. (2010) Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 758–765.
- 13) Banci, L., Bertini, I., Calderone, V., Ciofi-Baffoni, S., Giachetti, A., Jaiswal, D., Mikolajczyk, M., Piccioli, M., & Winkelman, J. (2013) Molecular view of an electron transfer process essential for iron-sulfur protein biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

110, 7136–7141.

- 14) Nasuno, R., Aitoku, M., Manago, Y., Nishimura, A., Sasano, Y., & Takagi, H. (2014) Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism in yeast through the activation of the transcription factor Mac1. *PLoS One*, **9**, e113788.
- 15) Liu, W.C., Yuan, H.M., Li, Y.H., & Lu, Y.T. (2015) *CKA2* functions in H_2O_2 -induced apoptosis and high-temperature stress tolerance by regulating NO accumulation in yeast. *FEMS Yeast Res.*, **15**, fov051.

著者寸描

●那須野 亮 (なすの りょう)



奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス領域助教。バイオサイエンス博士。

■略歴 2006年昭和大学薬学部薬学科卒業。同年住友精化株式会社機能樹脂研究所。10年奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科博士前期課程修了。13年同博士後期課程単位取得（同年バイオサイエンス博士）。同年同博士研究員。16年同助教。現在に至る（この間、17年米国Cleveland Clinic博士研究員）。

研究員。16年同助教。現在に至る（この間、17年米国Cleveland Clinic博士研究員）。

■研究テーマと抱負 細胞の活性窒素種によるシグナル伝達やアミノ酸代謝について、酵素・タンパク質修飾を主な切り口として研究を行っている。自身の専門性だけにとらわれず、広い視野から新しい現象を見出したい。

■趣味 酒、漫画、歌、娘。

●吉川 雄樹 (よしかわ ゆうき)



奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス領域博士研究員。バイオサイエンス博士。

■略歴 89年大阪府に生る。2012年近畿大学農学部バイオサイエンス学科卒業。14年奈良先端科学技術大学院大学博士前期課程修了。17年同博士後期課程修了。同年より現職。

■研究テーマと抱負 酵母における一酸化窒素の合成機構の解明に取り組んでおり、様々な生物における新規な一酸化窒素合成機構、およびその生理的役割の理解につながる研究にしたいと考えている。

■ウェブサイト <http://bsw3.naist.jp/takagi/takagi-j.html>

■趣味 ラジオ、漫画、バスケットボール。

●高木 博史 (たかぎ ひろし)



奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス領域教授。農学博士。

■略歴 1980年静岡大学農学部農芸化学科卒業。82年名古屋大学大学院農学研究科生化学制御専攻博士前期課程修了。同年味の素株式会社中央研究所研究員。94年同社食品総合研究所主任研究員〔この間、86年米国New York州立大学Stony Brook校客員研究員、88年農学博士（東京大学）〕。95年福井県立大学生物資源学部助教授。2001年同大学教授。2006年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。現在に至る。

研究員。16年同助教。現在に至る（この間、17年米国Cleveland Clinic博士研究員）。

■研究テーマと抱負 微生物機能の発見、解析とその応用に広く取り組んでいるが、特に「環境ストレスに対する細胞の応答・適応・耐性機構」「細胞内のアミノ酸とタンパク質の生理機能、代謝・活性制御機構」をキーワードに、基礎と応用のバランスを意識して研究を進めている。

■ウェブサイト <http://bsw3.naist.jp/takagi/takagi-j.html>

■趣味 アメリカ野球、ゴルフ。