



酵母の新規アセチルトランスフェラーゼ Mpr1によるプロリン代謝を介した活性酸素種の制御

はじめに

様々な環境に曝される生物の細胞内は活性酸素種 (ROS) が発生しやすい状態にあり、ROS レベルの制御が細胞の生命維持に重要である。酵母では高温、冷凍、乾燥、エタノール、高浸透圧などにより、ミトコンドリア膜の損傷に起因する ROS が発生し、生育阻害や細胞死が引き起こされ、発酵生産過程での酵母の有用機能が制限される。高等生物においても、植物では高温、乾燥、高浸透圧、強光などに伴い ROS が発生し、光合成能や成長速度に支障を来す。動物では、ミトコンドリアから細胞質へのシトクロム *c* の放出に伴い ROS が発生し、アポトーシスが誘導される。このように、細胞内 ROS レベルの制御は、生物にとって極めて重要な生存戦略であると同時に、ROS レベルの制御による酵母や植物へのストレス耐性付与、がん細胞特異的なアポトーシス誘導は、食品・環境・医薬などのバイオテクノロジーにおいて非常に有用な技術となり得る。

我々が酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に見出した「アセチル化酵素 Mpr1」は、高温、冷凍、エタノール、過酸化水素などの処理により生じる ROS のレベルを制御し、酵母を酸化ストレスから保護している。興味深いことに、Mpr1 は既知の抗酸化酵素と異なり、ROS には直接作用せず、ミトコンドリアで ROS の発生に関与するプロリン (Pro) 代謝中間体をアセチル化し、ROS の生成を未然に防ぐ新しいタイプの抗酸化酵素である。本稿では Mpr1 の生理機能、特に Pro 代謝を介した新規な抗酸化機構について概説する。また、本酵素機能を活用したストレス耐性獲得や細胞死制御への応用についても紹介する。

1. Mpr1 とは ?

我々が *S. cerevisiae* Σ1278b 株に見出した遺伝子 *MPR1* (sigma 1278b gene for proline-analogue resistance)¹⁾ は、Pro アナログのアゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) を解毒する *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 をコードしている (図 1)²⁾。AZC はタンパク質合成の際に Pro と競合して取り込まれる。その結果、コンフォメーション異常のタンパク質が蓄積し、生育が阻害されるが、*MPR1* を発現する細胞では、AZC が細胞質でアセチル化され、新生タンパク質に取り込まれないため、AZC 耐性を獲得すると考えられる²⁾。*MPR1* は Σ1278b 株の染色体 14 番のサブテロメア付近に存在するが、10 番のサブテロメア付近にも 1 コピー存在する (*MPR2*)。両者の一次構造は 85 番目残基だけが異なっており (Mpr1 : Gly, Mpr2 : Glu)、機能的な違いは観察されていない¹⁾。*MPR1* はゲノム解析に用いられた *S. cerevisiae* S288C 株や清酒酵母には存在しないが、*S. paradoxus*³⁾ や *Schizosaccharomyces pombe*⁴⁾ などの酵母にも同様の機能を有するホモログ (Spa Mpr1, Ppr1) が存在する。また、*Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Wickerhamia fluorescens* など多くの酵母は *MPR1* と相同性の高い DNA 配列を含んでいることから⁵⁾、*MPR1* は酵母に広く分布し、共通の祖先遺伝子に由来すると考えられる (図 2)。

2. Mpr1 の生理的役割

Mpr1 は AZC の解毒作用を有する酵素であるが、AZC はユリ科植物スズランを除き自然界に存在しないため、Mpr1 の本来の基質であるとは考えにくい。では、なぜ酵母に Mpr1 が存在するのだろうか？ 興味深いことに、Σ1278b 株の *MPR1* を破壊すると過酸化水素や熱ショックで処理後の ROS レベルが増加し、生存率も低下した。一方、*MPR1* を元々保持していない S288C 株に *MPR1* をプラスミドで導入すると、ROS レベルは減少し、生存率も上昇した。したがって、Mpr1 は細胞内 ROS レベルを制御し、酵母を酸化ストレスから保護していると考えられた (図 3)⁶⁾。また、ミトコンドリア膜へのダメージにより、細胞内 ROS レベルを上昇させ、間接的に酸化ストレスを引き起こす冷凍-解凍処理や高濃度エタノール処理における Mpr1 の機能を解析した^{7,8)}。その結果、Σ1278b 株の *MPR1* を破壊すると野生株に比べ各処理後の ROS レベルが増加し、生存率も著しく低下した。一方、S288C 株に *MPR1* を導入すると、ROS レベルは減少し、生存率も上

造解析を行っており¹¹⁾、近いうちに立体構造が明らかになるであろう。

4. Mpr1 による抗酸化メカニズム

Mpr1 は既存の抗酸化酵素のように ROS に直接作用するのではなく、ROS 発生に関与する P5C/GSA などの化合物をミトコンドリアでアセチル化し、その結果、何らかの経路や機構により ROS 生成が抑えられているのではなからうか。

そこで、Mpr1 と P5C/GSA の関連性を明らかにするために、代表的な酸化ストレスである高温処理後 (39°C, 4 時間) の細胞内 P5C/GSA 含量を測定した。その結果、興味深いことに、野生株ではストレス前後で変化はなかったが、*MPR1* 破壊株ではストレス後に 3 倍程度の増加が見られた。また、他のストレス (エタノール、過酸化水素、冷凍-解凍など) においても、*MPR1* 破壊による P5C/GSA の蓄積が観察された (図 3A)。次に、P5C/GSA 含量が増加する原因について検討した。酵母のミトコンドリアの内膜には、Pro を酸化し、P5C/GSA を生成する Pro オキシダーゼ (*PUT1* 産物) が存在する。また、マトリックスには P5C/GSA を酸化し、グルタミン酸 (Glu) を生成する P5C デヒドロゲナーゼ (*PUT2* 産物) が存在する。植物においても、P5C/GSA が Pro オキシダーゼの過剰発現や P5C デヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊により蓄積され、その過程で ROS が発生し、細胞死を引き起こす¹²⁾。また、多くのがん細胞では、転写因子 p53 により Pro オキシダーゼ遺伝子が誘導され、P5C/GSA の生成過程で ROS が発生し、アポトーシス経路が活性化される¹³⁾。そこで、酵母においても酸化ストレスにより *PUT1* が誘導され、P5C/GSA が酵素的に産生される可能性を考え、高温や過酸化水素処理後の mRNA を調製し、リアルタイム PCR 解析を行った。その結果、酸化ストレス処理により *PUT1* や *MPR1* の転写量は増加することが示された (図 3B)。また、*PUT1* 破壊株では高温ストレスに曝しても P5C/GSA は蓄積されなかった。Pro による *PUT1* と *PUT2* の誘導は知られているが、*PUT1* だけが誘導される現象は初めてである。*PUT1* の上流には抗酸化関連遺伝子の転写因子 Yap1 が結合する配列が示唆されているが、*YAP1* 破壊株でも *PUT1* が誘導されたことから、Yap1 が関与する可能性は否定された。最近、細胞を擬似的な栄養飢餓状態にするラパマイシンによる *PUT1* の誘導が報告されている¹⁴⁾。ラパマイシン処理と酸化ストレスは部分的に類似した応答機構であるため、ラパマイシンによる *PUT1* の誘

導に関与する転写因子 (Put3, Nil1) が酸化ストレスによる誘導にも関与するかどうかは興味深い。

また、通常の酵母細胞内には遊離の Pro はほとんど存在せず、分解された Pro がどこに由来し、どのようにミトコンドリアに輸送されるのかは不明である。動物細胞にも酸化ストレスにより Pro オキシダーゼ遺伝子を誘導し、Pro を分解するシステムが存在する。この場合、タンパク質末端から Pro を遊離するプロリダーゼの関与が示唆されている。酵母にもそのホモログ遺伝子があり、哺乳類と同様の経路が存在するのかも知れない。

さらに、高温ストレス前後の細胞内の各アミノ酸含量を測定したところ、野生株の場合、ストレス処理後にオルニチン (Orn) やアルギニン (Arg) 含量が増加することを見出した (データ示さず; 図 3D)。一方、*MPR1* 破壊株の場合、Orn や Arg の増加は見られず、Glu の増加が認められた。また、*PUT1* 破壊株の場合は Orn や Arg の増加は見られず、また、Glu も増加していなかった。これらの結果から、野生株は高温ストレス下で Pro オキシダーゼにより Pro を分解し、Mpr1 を介して Arg 経路を活性化させることが予想された。次に、*MPR1* 破壊株や *PUT1* 破壊株を高温ストレスに曝したところ、両破壊株は野生株より生存率が低く、ROS レベルも野生株より増加していた。したがって、これらの菌株が高温ストレスに感受性である原因として、ストレス下で Arg 経路が活性化されていない可能性を考え、*PUT1* 破壊株に Orn や Arg を添加し、高温ストレスに対する感受性を調べた。その結果、予想通り Orn や Arg の添加により *PUT1* 破壊株の高温ストレス後の生存率が野生株並みに戻ることが観察された。現在まで Orn や Arg が酸化ストレス耐性に関与する機序は不明である。しかし、哺乳類の場合、Arg の添加で細胞内の一酸化窒素 (NO) 濃度が上昇し、エネルギー代謝を活性化する。そこで、酵母にも Arg から NO を合成する機構が存在し、エネルギー代謝を活性化するのかも知れない。

GFP を用いて細胞内局在を観察したところ、Mpr1 は細胞質以外にも Pro オキシダーゼと同様にミトコンドリアにも存在していた (図 3C)。Mpr1 の一次構造には明確なミトコンドリア移行シグナルは存在しない。また、GFP を Mpr1 の N 末端に融合すると AZC 耐性を示さず、液胞に局在したことから、N 末端側に酵素機能の発現や細胞内局在に関与する領域が存在すると考えられる。

以上の結果から、Mpr1 による新規な抗酸化メカニズムとして、*MPR1* を保持する酵母では酸化ストレスで発生した ROS に応答し、*PUT1* の誘導によりミトコンドリア

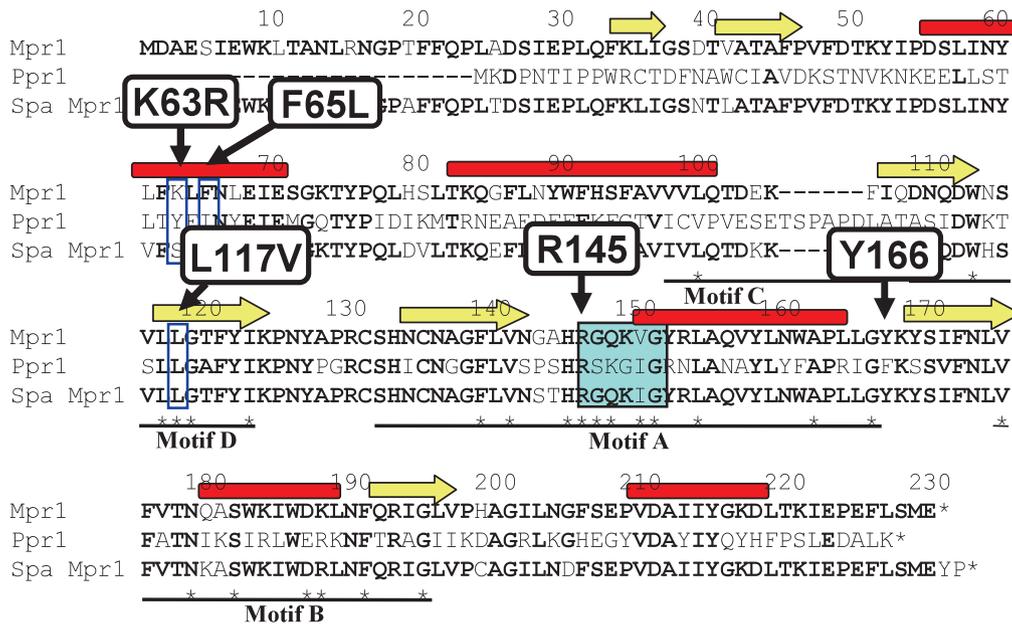


図 2

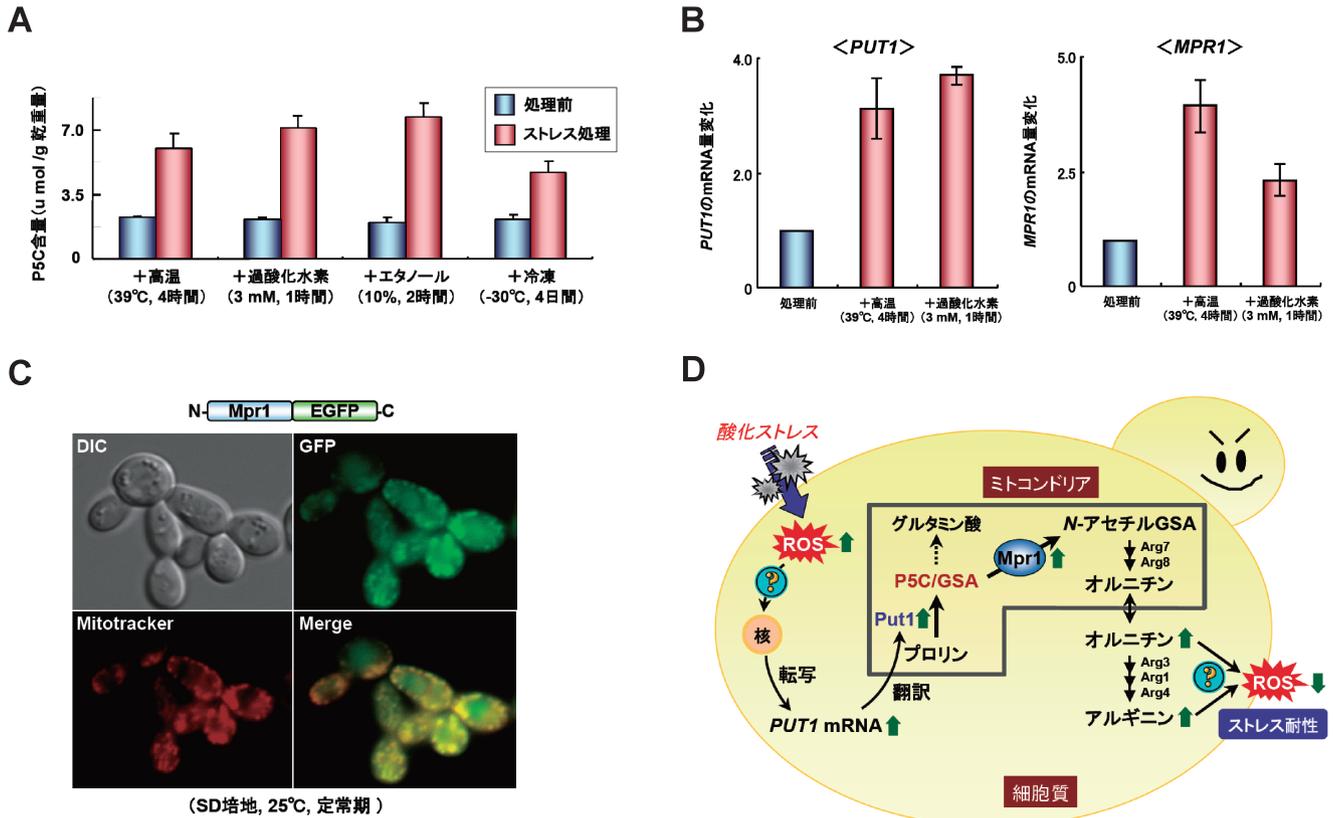


図 3

で Pro が酸化分解されるが, Mpr1 が生成した P5C/GSA をアセチル化し, Arg 経路を活性化することで, 酸化ストレス耐性を獲得するモデルを考えている (図 3D).

おわりに

Mpr1 は P5C/GSA をアセチル化し, Arg 経路を活性化することで ROS の発生を未然に防いでいると考えられる. 一方, *MPR1* を保持しない S288C 株においても, 酸化ストレス時に Orn トランスアミナーゼ遺伝子の誘導を介して Arg 経路を活性化することが確認されている.

P5C/GSA が関与する ROS の発生機構に関しては, 二つの仮説 (P5C/GSA やその代謝産物, Pro オキシダーゼ活性) が議論されている. 著者らの実験では, *PUT1* 破壊株でも P5C/GSA の毒性が認められ, P5C/GSA やその代謝産物が ROS を発生するという仮説を支持した. 一方, 呼吸欠損変異株では P5C/GSA が毒性を示さないことから, P5C/GSA が呼吸鎖に関連して ROS を発生する機構が示唆された. 今後, 酵母を用いて P5C/GSA の作用機作を解明できるものと考えている.

Mpr1 はバイオテクノロジーの面においても興味深い. Mpr1 を発現させ酸化ストレス耐性を高めることにより, 発酵生産能の向上した産業酵母の育種が期待できる. さらに, Mpr1 は他の生物でも機能すると予想され, ROS が発生する乾燥や強光などのストレスに耐性を示す有用植物の作出への応用, ヒトにおける酸化ストレスと病気との関連性を調べる研究などに繋がる可能性がある.

本研究の一部は, 「生研センター基礎研究推進事業」の助成を受けて行ったものであり, 同事業に感謝いたします.

図 2 Mpr1 とホモログの一次構造比較と推定二次構造

Mpr1 (*S. cerevisiae*), Ppr1 (*S. pombe*), Spa Mpr1 (*S. paradoxus*) の一次構造を並べ, 太字は同一のアミノ酸を表す. 青色のボックス内はモチーフ A 内の共通配列を示す. K63R, F65L, L117V は抗酸化能の向上したアミノ酸置換を, R145, Y166 は機能発現に重要な残基をそれぞれ示す. また, Mpr1 の推定二次構造として, α ヘリックスを赤色のボックスで, β シートを黄色の矢印でそれぞれ表す.

図 3 Mpr1 によるプロリン代謝を介した新しい抗酸化機構

(A) 各ストレス処理後の *MPR1* 破壊株の細胞内 P5C 含量 (菌体乾重量 1g あたりの濃度). (B) 各ストレス処理後の野生株の *PUT1* と *MPR1* の mRNA 量変化 (リアルタイム PCR で解析し, ストレス処理前の mRNA 量を 1.0 とした相対値で表す). (C) Mpr1 の細胞内局在 (DIC: 微分干渉像, GFP: GFP 融合型 Mpr1 像: Mitotracker: ミトコンドリア像, Merge: GFP と Mitotracker の重ね合わせ像). (D) Mpr1 による抗酸化機構のモデル. 酸化ストレスにより細胞内の ROS レベルが増加すると, *PUT1* が誘導され, その産物 (Put1) によりプロリンが P5C/GSA に酸化分解される. さらに, *PUT1* と同様に転写が誘導される *MPR1* の産物がプロリン代謝中間体 (P5C/GSA) をミトコンドリア内で *N*-アセチル化し, 反応生成物の *N*-アセチル GSA がアルギニン経路に流入する. これらの結果, オルニチンやアルギニンの含量が増加するとともに, ROS レベルが低下し, 酸化ストレス耐性を獲得する. 酸化ストレスによる各変動を緑色の矢印で示す.

- 1) Takagi, H., Shichiri, M., Takemura, M., Mohri, M., & Nakamori, S. (2000) *J. Bacteriol.*, **182**, 4249–4256.
- 2) Shichiri, M., Hoshikawa, C., Nakamori, S., & Takagi, H. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 41998–42002.
- 3) Kimura, Y., Nakamori, S., & Takagi, H. (2002) *Yeast*, **19**, 1437–1445.
- 4) Nomura, M., Nakamori, S., & Takagi, H. (2003) *J. Biochem.*, **133**, 67–74.
- 5) Wada, M., Okabe, K., Kataoka, M., Shimuzu, S., Yokota, A., & Takagi, H. (2008) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **72**, 582–586.
- 6) Nomura, M. & Takagi, H. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12616–12621.
- 7) Du, X. & Takagi, H. (2005) *J. Biochem.*, **138**, 391–397.
- 8) Du, X. & Takagi, H. (2007) *Appl. Microbiol. Biotech.*, **75**, 1343–1351.
- 9) Iinoya, K., Kotani, T., Sasano, Y., & Takagi, H. (2009) *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 341–352.
- 10) Kotani, T. & Takagi, H. (2008) *FEMS Yeast Res.*, **8**, 607–614.
- 11) Hibi, T., Yamamoto, H., Nakamura, G., & Takagi, H. (2009) *Acta Crystallogr.*, **F65**, 169–172.
- 12) Deuschle, K., Funck, D., Forlani, G., Stransky, H., Biehl, A., Leister, D., van der Graaff, E., Kunze, R., & Frommer, W.B. (2004) *Plant Cell*, **16**, 3413–3425.
- 13) Liu, Y., Borchert, G.L., Surazynski, A., Hu, C.-A., & Phang, J. M. (2006) *Oncogene*, **25**, 5640–5647.
- 14) Saxena, D., Kannan, K.B., & Brandriss, M.C. (2003) *Eukaryot. Cell.*, **2**, 552–559.
- 15) Jobgen, W.S., Fried, S.K., Fu, W.J., Meininger, C.J., & Wu, G. (2006) *J. Nutr. Biochem.*, **17**, 571–588.

高木 博史

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

The yeast novel acetyltransferase Mpr1 regulates reactive oxygen species mediated by proline metabolism
Hiroshi Takagi (Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama-cho, Ikoma, Nara 630-0192, Japan)