

レドックスシグナルの感知・伝達機構

久下 周佐

東北大学大学院薬学研究科

活性酸素種 (ROS) は、好機的代謝や様々なストレスより発生し細胞毒性をもつ。細胞はその毒性を回避するために酸化ストレス応答機構を備えている。酸化ストレス応答機構は ROS の濃度を感知し、それをシグナルとして核内に伝達することで抗酸化酵素群等の特異的な転写の誘導につなげる一連の反応機構といえる。

1. Yap1 のレドックス制御

出芽酵母の Yap1 は ROS (過酸化水素) に応答して抗酸化酵素等の転写を特異的に誘導する転写因子である。グルタチオンペルオキシダーゼ様因子 Gpx3 が過酸化水素受容体として機能し転写因子 Yap1 にジスルフィド結合形成を誘導し酸化型 (活性型) に変換する(1)。これまで活性型 Yap1 の活性の維持機構は不明であった。我々は、Yap1 の分子内のジスルフィド結合形成は可逆反応で酸化ストレス応答の過程ではその平衡状態が推移すること、Yap1 はその分子内ジスルフィド結合を蓄積することで還元されにくい状態 (レドックスポテンシャルの低下) すなわち活性型の持続につなげることを明らかにした(2)。

2. ペルオキシレドキシンによる過酸化物質の受容と標的分子の制御

我々は特定の酵母株においては Gpx3 ではなく主要ペルオキシレドキシン (Prx) である Tsa1 が Yap1 にジスルフィドの活性を制御することを明らかにした(3,4)。Prx ファミリータンパク質は大腸菌からヒトに至るまでユビキタスに存在する抗酸化蛋白質であり、酵母で 5 種、ヒトで 6 種存在し typical Prx, atypical Prx, 1-Cys Prx に分類される。一般的に Prx は過酸化物質と直接反応してチオレドキシン依存的に抗酸化活性を示す。しかしながら高濃度の過酸化物質存在下では過酸化され抗酸化活性を失うことから、過酸化物質レベルのしきい値を決定する因子としての機能 (Floodgate model) が提唱されている。我々は、Tsa1 を含む Prx ファミリー蛋白質にも過酸化物質受容体として機能する可能性を追求した。その結果、複数の Prx が過酸化物質の受容体として機能し標的分子にジスルフィド結合形成を誘導することにより活性を制御 (レドックス制御) することが明らかになってきた(投稿中および発表準備中)。

本研究により、酸化ストレス応答は、Prx による過酸化物質の受容、およびそれをシグナルとして変換・増幅するための Prx 依存的な標的蛋白質のレドックス活性制御という二因子による「レドックスシグナルトランスダクション機構」が示唆された。また、代謝変化等に起因した ROS も同様にシグナルとして関連分子の活性をレドックス制御している可能性も示唆している。

(1) Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB. (2002) *Cell* 15;111(4):471-81.

(2) Okazaki S, Tachibana T, Naganuma A, Mano N, Kuge S. (2007) *Mol. Cell* 27, 675-88.

(3) Okazaki S, Naganuma A and Kuge S, (2005) *Antioxid. Redox. Signal.* 7, 327-334.

(4) Tachibana T, Okazaki S, Murayama A, Naganuma A, Nomoto A and Kuge S. (2009) *J Biol Chem.* 13;284(7):4464-72. Epub 2008 Dec 22.

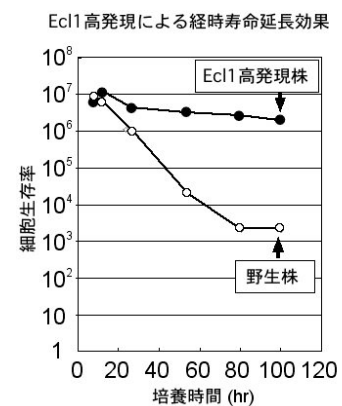
分裂酵母に見出した経時寿命延長因子 Ecl1 ファミリー

饗場浩文

名古屋大学 大学院生命農学研究科 微生物学研究分野

近年の寿命、老化研究の進展に出芽酵母、線虫、ショウジョウバエなどの遺伝学的解析が大きな役割を果たしている。最近、分裂酵母でも種をこえて保存された寿命制御因子の存在とその効果が一部証明された¹⁾。酵母の寿命には分裂寿命（出芽の回数）と、経時寿命（非分裂状態での生存期間）があり、後者は増殖定常期における生存率を経時的に測定することで解析できる。我々は分裂酵母を用い、経時寿命に影響する因子の解析を進めてきた。

この過程で我々は、分裂酵母に多コピーで高発現すると増殖定常期での生存率を上昇させる遺伝子断片を取得した。この断片を高発現すると、SD培地で顕著な生存率の上昇が認められた（右図参照）。同様の効果は、EMM培地でも、あるいは酵母を水に移して培養しても認められた。当初、この断片中に遺伝子が存在することは想定されていなかったが、我々は80アミノ酸からなる小さな新規タンパク質（Ecl1）が発現すること、これが経時寿命を延ばす原因因子であることを明らかにし、当該遺伝子を *ec11*⁺ (*extender of chronological lifespan*)と命名した²⁾。



その後、Ecl1 と構造が類似した因子が分裂酵母にあと二つ、出芽酵母に一つあることを見出し、これらに関しても、Ecl1 と同様の経時寿命延長効果があることを確認した^{3,4)}。これら Ecl1 ファミリーは酵母の経時寿命制御に関わる新規因子であると考え、現在経時寿命延長の分子メカニズムに関する解析を進めている。一般に、カロリー制限（食餌制限）には、寿命延長効果があることが知られている。そこで培地のグルコース濃度を通常の2%から0.5%に制限して分裂酵母を培養し経時寿命を測定した。その結果、分裂酵母もグルコース量を制限すると長生きすることがわかった。次にグルコース制限条件下で Ecl1 を高発現したところ、グルコース制限単独の場合と経時寿命は同じであった。従って Ecl1 の高発現は、あたかもカロリー制限をしたのと同様の生理変化を生じさせている可能性が考えられた。他方、Ecl1 ファミリーを高発現すると過酸化水素ストレスに対して抵抗性を示した。また、培養経過に伴い上昇する細胞内の活性酸素種の量を低く保つことも明らかとなった。カロリー制限や酸化ストレス耐性は多くの生物種において寿命制御と密接に関連することが示唆されていることから、分裂酵母を用いた Ecl1 ファミリーの解析から、寿命制御機構に関する普遍的、基盤的な知見が得られると期待している。他方、Ecl1 ファミリーは酵母を長期に生存させることから、この能力を酵母による発酵、醸造、物質生産分野などで活用できないものかとも思案している。

- 1) Roux, A.E., Quissac, A., Chartrand, P., Ferbeyre, G., and Rokeach, L.A. Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell*, 5, 345-357 (2006)
- 2) Ohtsuka, H., Mita, S., Ogawa, Y., Azuma, K., Ito, H., and Aiba, H. A novel gene, *ec11*⁺, extends chronological lifespan in fission yeast. *FEMS Yeast Research* 8, 520-530 (2008)
- 3) Ohtsuka, H., Ogawa, Y., Mizuno H., Mita, S., and Aiba, H. Identification of Ecl family genes that extend chronological lifespan in fission yeast. *Biosci. Biotech. Biochem.* 73, 885-889 (2009)
- 4) Azuma, K., Ohtsuka, H., Mita, S., Murakami, H., and Aiba, H. Identification and characterization of Ecl1-family gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* in press (2009)

「甲州きいろ香」を中心とした近年の甲州ワイン開発（酵母選択を含めて）

小林弘憲

メルシャン株式会社商品開発研究所

一般にワインをテイスティングする際、その香りは、植物、野菜、果物、動物など様々なタームで形容される。また、ブドウ品種ごとに香りの印象も異なりそれぞれ違った表現がなされる。これは、ブドウ品種に対応したワインの香り—品種香—が大きく影響しているとともにワインおよびその表現に用いられる物質に共通した揮発成分が存在することに起因する。いわゆる「香りの架け橋」という概念である。

ワイン原料であるブドウを見ると、ブドウ自身のもつ香りがそのままワインに反映される品種（ブドウの香り＝ワインの香りが成り立つ、例：マスカット、コンコード他）とブドウ自体特徴的な香りを持たず、ワイン醸造（アルコール発酵、マロラクティック発酵、樽育成、ビン熟成）の過程を経ることでその特徴的なアロマを獲得する品種（例：ソーヴィニヨン・ブラン、甲州、メルロー、カベルネ・ソーヴィニヨン他）とに分けることができる。醸造用品種の多くは後者であり、このことは、ブドウ中に品種の特徴を形成する様々な種類の前駆物質（プレカーサー）が存在し、ワイン醸造過程において生物学的または化学的な修飾を受けてワインのアロマとして発現することを意味しているが、品種香生成メカニズムは、いまだ明らかとされていないブドウ品種が多く、現代の醸造学に於いても解き明かすべき大きな課題となっている。

Tominagaらは、ソーヴィニヨン・ブランを例にして発酵中の品種香獲得メカニズムについてその品種香がある種のチオール化合物によって担われていること、それらのチオール化合物はその分子内のイオウ原子を介してシステインと無臭のコンジュゲート（抱合体）を形成し果汁中にプレカーサーとして存在すること、それら抱合体は酵母の β -リアーゼ様酵素により分解され、該当チオールを発酵中にリリースすることを報告している（1、2）。

これら知見を日本固有の品種である甲州ブドウから醸造される甲州ワインへ展開し、ソーヴィニヨン・ブランワインの品種香の一端を担っているチオール化合物の一つである3-メルカプトヘキサノールの存在を国産ワインでは初めて確認するとともに、その前駆体も甲州果汁から同定した。また、甲州ワインの新たな可能性を探索した結果、 β -ダマセノン、4-ヴィニルフエノール、2-メトキシ4-ヴィニルフエノールの存在も明らかとした（3、4）。さらに、これら新しい香りの側面を引き出すための栽培および醸造方法（酵母選択を含む）を検討した。

新たな香りをターゲットとしたワインスタイルの個性化醸造法は、個々のブドウの持つ特性を最大限に引き出すことの出来る新しい技術の1つであると考えられる。ブドウ中に隠れた香りのポテンシャルの引き出し方により今後、甲州ブドウのみならず種々のブドウ品種において様々なスタイルのワイン製造が高次元で達成されることが期待される。

参考文献

1. Tominaga T, et al. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 52151-5219.
2. Tominaga T, et al. *J. Brew. Soc. Japan.* **2003**, 98, 628-637.
3. Kobayashi H, et al. *J. ASEV. Jpn.* **2006**, 17, 75-80.
4. Kobayashi H, et al. *J. ASEV. Jpn.* **2007**, 18, 22-27.

なお、本研究は、ボルドー大学醸造学部デュブルデュー研究室・故富永敬俊博士との共同研究で行われた。

病原真菌 *Candida albicans* のクオラムセンシングと 新規 HSP70 ファミリー遺伝子 *MSI3*

長 環

福岡歯科大学 機能生物化学講座 感染生物学分野

ヒト常在真菌 *Candida albicans* は医療器具などにバイオフィームという閉鎖的なコミュニティを形成して病原性を発揮する。*C. albicans* は通常酵母形で発育するが、血清、低濃度グルコース、*N*-アセチルグルコサミンなどの栄養成分に加え、温度、pH、酸素、二酸化炭素、浸透圧や酸化によるストレスなどにより菌糸形発育に転換するという多形性発育を示す。バイオフィームにおいても、酵母形細胞による医療器具への接着と菌糸形の絡み合いによる強固な構造が特徴である。

一方昔から実験的な環境下では菌数が概ね 1×10^6 cells/ml 以上になると菌糸形発現の抑制が知られており、この現象はクオラムセンシング (QS : 菌密度に依存する形質発現機構) の存在として認識された。2001 年この菌糸形誘導抑制状態の培養上清から QS 分子として farnesol が単離された。

farnesol は、生物界に広く存在するテルペン類/ステロール合成系の代謝中間体から酵素反応により誘導される物質で、通常細胞内でいくつかの生化学的な働きを示す。ところが、*C. albicans* では QS 分子として細胞外へ排出され、外から作用するというオートインデューサー様の機能も有する。

C. albicans の菌糸形誘導は主に Ras-Cdc35-PKA-Efg1 経路の活性化によることが知られており、QS 機構はこの経路を抑制すると考えられている。我々は Ras-Cdc35-PKA 経路に関わる新規 HSP70 ファミリー遺伝子 *MSI3* (a multicopy suppressor of *ira1* mutant) の組換え体を用いて QS 機構が PKA 経路のどこを抑制するのか検討した。その結果、farnesol は PKA 経路上流の Ras-Cdc35 経路を制御するのではないかという示唆を得た。

病原酵母 *Cryptococcus neoformans* における ホスファターゼ遺伝子の発現制御

東江昭夫、清水公德、李皓曼、川本 進
千葉大学 真菌医学研究センター機能形態分野

[背景]

病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* によるクリプトコックス症 cryptococcosis は AIDS 患者など免疫機能が低下した人々にとって深刻な脅威となっており、これに対する治療法を確立するためには *C. neoformans* の病原性の分子機構を解明することが有効であると考えられる。これまでの研究から本菌の病原性の発現に必要な因子として莢膜、メラニン合成能、および種々の信号伝達系因子などが同定されている。ところで、*C. neoformans* は分泌性酸性ホスファターゼを持ち、この酵素はシグナル分子の脱リン酸化を介して感染動物体内で病原性の発現に関わる可能性がある。そこで、本研究では *C. neoformans* のホスファターゼ制御系 (PHO 系) を解明し、PHO 系と病原性との関連を解析することを目的とした。

[実験結果と考察]

酸性ホスファターゼ遺伝子の同定：パン酵母の抑制性酸性ホスファターゼを基準にした BLAST により、未解析の 3 遺伝子が得られ、*PHO1* (CNG00030)、*PHO2* (CNC05540)、*PHO3* (CNK01690) と命名した。破壊株の表現型から *PHO2* は抑制性酸性ホスファターゼの構造遺伝子、*PHO1* は構成性酸性ホスファターゼの構造遺伝子であることがわかった。*PHO3* の機能は今のところ不明である。

制御遺伝子の同定：パン酵母の PHO 制御遺伝子のホモログが *C. neoformans* ゲノム中にあることが分かり、*CnPHO80*、*CnPHO81*、*CnPHO85* と命名した。*CnPHO80* 破壊株の表現型はパン酵母のものと同様、酸性ホスファターゼの産生について構成性を示した。しかし、*CnPHO85* 変異株は構成性を示さず、*CnPHO81* 破壊株も酸性ホスファターゼについて野生型と同じ表現型を示した。これらの結果は *C. neoformans* における PHO 制御系が *Aspergillus nidulans* や *Ustilago maydis* の PHO 系と似ていることを示している。

ところで、*CnPho80* はどのように PHO 遺伝子の発現制御を行うのだろうか。サイクリンとしての機能が必要か、転写因子を直接ターゲットにするのか、今後に残された問題である。*PHO4* に相当する転写因子遺伝子の同定も必要である。PHO 系遺伝子の変異が病原性に変化を及ぼすかについても報告する予定である。