

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5087775号
(P5087775)

(45) 発行日 平成24年12月5日(2012.12.5)

(24) 登録日 平成24年9月21日(2012.9.21)

(51) Int.Cl. F 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/19 (2006.01) C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 9/10 (2006.01) C 1 2 N 9/10

請求項の数 7 (全 24 頁)

| | | | |
|---------------|--|-----------|----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2008-524725 (P2008-524725) | (73) 特許権者 | 504143441 |
| (86) (22) 出願日 | 平成19年2月27日 (2007.2.27) | | 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/JP2007/053667 | | 奈良県生駒市高山町8916-5 |
| (87) 国際公開番号 | W02008/007475 | (74) 代理人 | 100081422 |
| (87) 国際公開日 | 平成20年1月17日 (2008.1.17) | | 弁理士 田中 光雄 |
| 審査請求日 | 平成22年2月16日 (2010.2.16) | (74) 代理人 | 100084146 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2006-194365 (P2006-194365) | | 弁理士 山崎 宏 |
| (32) 優先日 | 平成18年7月14日 (2006.7.14) | (74) 代理人 | 100106518 |
| (33) 優先権主張国 | 日本国 (JP) | | 弁理士 松谷 道子 |
| 特許法第30条第1項適用 | 平成18年6月19日発行の刊物「酵母遺伝学フォーラム第39回研究報告会要旨集」に発表 | (74) 代理人 | 100127638 |
| | | | 弁理士 志賀 美苗 |
| | | (74) 代理人 | 100138911 |
| | | | 弁理士 櫻井 陽子 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異型アセチルトランスフェラーゼMpr1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1に示される野生型Mpr1のアミノ酸配列の、Lys63がArgと置換されたもの、およびPhe65がLeuに置換されかつLeu117がValへ置換されたものからなる群から選択されるアミノ酸配列からなり、野生型Mpr1より高い抗酸化能を示す、変異型アセチルトランスフェラーゼMpr1。

【請求項2】

請求項1に記載の変異型アセチルトランスフェラーゼMpr1をコードする遺伝子。

【請求項3】

請求項2に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

10

【請求項4】

請求項2に記載の遺伝子を含む形質転換酵母。

【請求項5】

野生型Mpr1の遺伝子が請求項2に記載の遺伝子にて置き換えられている、請求項4に記載の形質転換酵母。

【請求項6】

酵母が、実験室用酵母、パン酵母、清酒酵母、ビール酵母、ワイン酵母、ウィスキー酵母からなる群から選択される、請求項4または5に記載の形質転換酵母。

【請求項7】

酵母がサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属セレビスイエ (*cerevisiae*) に属する、請求

20

項 4 ~ 6 いずれかに記載の形質転換酵母。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酸化ストレスに対してより耐性の強い、変異型アセチルトランスフェラーゼ M p r 1 に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明者が先に酵母サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 1278 b系系統株に見いだした新規遺伝子 M P R 1 (非特許文献1) はアミノ酸プロリンの毒性アナログであるアゼチジン - 2 - カルボン酸 (A Z C) をアセチル化して解毒する、N - アセチルトランスフェラーゼ (M p r 1) をコードしている (図1) (非特許文献2)。

10

【0003】

A Z C はプロリンのパーミアーゼによって細胞内に入り、タンパク質合成の際にプロリンと競合して取り込まれる。その結果、構造が異常になり、機能を失ったタンパク質が蓄積し、生育が阻害される。M P R 1 を発現する細胞では A Z C は細胞質で N アセチル化され、新生タンパク質に取り込まれないため、A Z C 耐性を獲得すると考えられる (非特許文献3)。

【0004】

ホモロジー検索の結果、分裂酵母 Schizosaccharomyces pombe や S. cerevisiae の同胞種 S. paradoxus にも M P R 1 と同様の機能を有するホモログ遺伝子 (ppr1⁺, Spa MPR1) を見いだしたことから (非特許文献4および5)、M P R 1 は酵母に広く存在すると考えられる。しかしながら、興味深いことに酵母のゲノム解析に用いられた S. cerevisiae S288C 株や清酒酵母には M P R 1 は存在しない。M P R 1 は 1278 b 株の染色体14番のサブテロメ付近に存在する。染色体10番のサブテロメア付近にも85番目残基だけが異なるホモログ遺伝子 (M P R 2) が存在しているが、両遺伝子の機能に差はない (非特許文献1)。S 2 8 8 C 株と 1 2 7 8 b 株を比較した場合に塩基置換や欠失が見られる遺伝子はあるが、1 2 7 8 b 株にのみ存在し、かつ表現型が明確な遺伝子は M P R 1 以外に報告されていない。

20

【0005】

A Z C は自然界にほとんど存在せず、M P R 1 産物 (M p r 1) の本来の基質とは考えにくい。このため本発明者らは細胞内基質の同定も含めて M p r 1 の生理機能を解析した (非特許文献6)。まず、M P R 1・M P R 2 両破壊株の細胞を過酸化水素や熱ショックなどの酸化ストレスにさらすと、野生株に比べて生存率が低下し、細胞内の活性酸素種 (R O S) レベルが増加した。一方、M P R 1 と M P R 2 を元々保持しない S. cerevisiae 2 8 8 C 株に M P R 1 を多コピーで導入すると、酸化ストレス下の生存率は上昇し R O S レベルも減少した。したがって、M p r 1 は細胞内の酸化レベルを低下することが示された。次に、プロリン代謝中間体 1 - ピロリン - 5 - カルボン酸 (P 5 C) を蓄積する株 (P U T 2 破壊株) では、生育阻害と R O S レベルの増加が観察されたため、P U T 2 破壊株における M p r 1 の役割を調べた。その結果、P U T 2 破壊株の M P R 1 と M P R 2 を破壊すると、生育は強く阻害され、R O S レベルも上昇したが、M P R 1 を過剰発現させると R O S レベルは低下した。また、組換え酵素を用いた解析から、M p r 1 は P 5 C、または P 5 C と平衡関係にあるグルタミン酸 - セミアルデヒド (G S A) をアセチル化することも判明した。以上の結果から、P 5 C が細胞内に蓄積すると R O S が生じ、細胞毒性を示すこと、および M p r 1 は P 5 C / G S A のアセチル化によって R O S レベルを調節し、酸化ストレスを緩和することが示唆された (図2) (非特許文献6)。

30

40

【0006】

酵母は発酵生産環境において、低温、凍結、乾燥、酸化、高浸透圧、高エタノール濃度、偏栄養など様々なストレスを受けている。このようなストレスを長時間受けると、細胞内タンパク質中の非共有結合が切断され、表面に疎水性アミノ酸が露出し、正常な構造や

50

機能を失った「異常タンパク質」が生成するため、酵母の有用な機能が制限されてしまう。特に、酸化ストレスは熱ショックや過酸化水素、冷凍（冷凍-解凍）傷害、高エタノールなど様々な要因によって生じ、酵母細胞の生育を妨げる大きな要因となっている。発酵食品、醸造食品分野においては、酸化ストレスに対する耐性の高い酵母の育種が望まれている。

【0007】

これまでに発明者らはアミノ酸の1つであるプロリンが、冷凍や乾燥・酸化等のストレスから酵母を防御する性質を有することを見出している（特許文献1）。さらに発明者らは遺伝子工学的手法によって、プロリン分解酵素をコードする遺伝子を破壊した酵母株が細胞にプロリンを蓄積することでエタノール耐性となることを見出している（特許文献2）。

10

【0008】

【特許文献1】特開平9-234058号公報

【特許文献2】特開2006-67806号公報

【非特許文献1】H. Takagiら、J. Bacteriol., 182, 4249-4256 (2000).

【非特許文献2】M. Shichiriら J. Biol. Chem., 276, 41998-42002 (2001).

【非特許文献3】C. Hoshikawaら Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100, 11505-11510 (2003).

【非特許文献4】Y. Kimuraら、Yeast, 19, 1437-1445 (2002).

【非特許文献5】M. Nomuraら J. Biochem., 133, 67-74 (2003).

20

【非特許文献6】M. Nomuraら Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101, 12616-12621 (2004).

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、アセチルトランスフェラーゼMpr1を改変し、抗酸化能の向上した変異型Mpr1を得ることを目的とする。更に本発明は、該変異型Mpr1をコードする遺伝子にて酵母を形質転換することにより、抗酸化能の向上した酵母を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

30

【0010】

本発明は、配列番号1に示される野生型アセチルトランスフェラーゼMpr1のアミノ酸配列の63位～65位および117位に少なくとも1のアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を有し、野生型Mpr1より高い抗酸化能を示す、変異型アセチルトランスフェラーゼMpr1を提供する。

【0011】

本発明において「野生型Mpr1より高い抗酸化能を示す」とは、変異型Mpr1をコードする遺伝子を導入した酵母が野生型Mpr1を有する酵母と比して、AZCストレス、熱ショックストレス、過酸化水素ストレス、冷凍ストレスおよびエタノールストレスからなるストレスの1つ以上において、より高い耐性を示すことを意味する。これらのストレスに対する耐性は、実施例に記載のストレス感受性試験によって確認することができる。

40

【0012】

本発明はさらに、上記変異型アセチルトランスフェラーゼMpr1をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該遺伝子にて形質転換された酵母を提供する。

【発明の効果】

【0013】

本発明の変異型アセチルトランスフェラーゼMpr1は、野生型酵素と比して抗酸化力が高い。即ち、冷凍解凍処理や高濃度のエタノール等、種々の刺激によって加えられる酸化ストレスに対してより高い耐性を有する。従って、本発明の変異型アセチルトランスフ

50

エラーゼ M p r 1 を発酵食品産業等において用いられている酵母に導入することにより、冷凍ストレスやエタノールストレスに対して、優れた耐性能力を備えた酵母が得られ、例えば長期保存可能な冷凍パン生地の開発や各種アルコール飲料の効率的生産等に応用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】M p r 1 によるアゼチジン - 2 - カルボン酸 (A Z C) のアセチル化機構を示す。

【図2】M p r 1 による酸化ストレス時の細胞内活性酸素種 (R O S) レベル調節機構のモデル図である。

【図3】M P R 1 ランダム変異ライブラリーの構築方法を示す模式図である。

【図4A】ストレス無し条件下における、M P R 1 非保持および野生型 M P R 1 保持株の生育状況の結果を示す。

【図4B】A Z C ストレス下における各株の生育状況を示す。

【図4C】熱ショックストレス付与後の各株の生育状況を示す。

【図4D】過酸化水素ショック下における各株の生育状況を示す。

【図5】M p r 1 とアセチルトランスフェラーゼスーパーファミリーの一次構造を比較した図である。

【図6A】変異型 M P R 1 多コピー導入株のストレス耐性試験において、ストレス無し条件下における生育状況を示す。

【図6B】変異型 M P R 1 多コピー導入株のストレス耐性試験において、A Z C ストレス下における生育状況を示す。

【図6C】変異型 M P R 1 多コピー導入株のストレス耐性試験において、熱ショックストレス後の生育状況を示す。

【図6D】変異型 M P R 1 多コピー導入株のストレス耐性試験において、過酸化水素ストレス下における生育状況を示す。

【図7A】本発明の変異型 M P R 1 多コピー導入株のストレス耐性試験において、ストレス無し条件下における生育状況を示す。

【図7B】本発明の変異型 M P R 1 多コピー導入株のストレス耐性試験において、A Z C ストレス下における生育状況を示す。

【図7C】本発明の変異型 M P R 1 多コピー導入株のストレス耐性試験において、熱ショックストレス後の生育状況を示す。

【図7D】本発明の変異型 M P R 1 多コピー導入株のストレス耐性試験において、過酸化水素ストレス下の生育状況を示す。

【図7E】本発明の変異型 M P R 1 多コピー導入株のストレス耐性試験において、エタノールストレス下における生育状況を示す。

【図8】過酸化水素処理後の酵母の細胞内活性酸素種 (R O S) レベルの変化を示す。

【図9】過酸化水素処理後の酵母の生存率の変化を示す。縦軸の生存率は対数で表示している。

【図10】本発明の変異型 M P R 1 酵素を 4 5 に置いた時の、酵素活性の経時変化を示す。

【図11】本発明の変異型 M P R 1 酵素を過酸化水素 (0 . 5 M) 存在下に置いた時の、酵素活性の経時変化を示す。

【図12】野生型 M p r 1 を導入したプロリン蓄積型酵母を過酸化水素処理した後の細胞内 R O S レベルの変化を示す。

【図13】野生型 M p r 1 を導入したプロリン蓄積型酵母の過酸化水素処理後の生存率を示す。

【図14】本発明の変異型 M p r 1 を導入したプロリン蓄積型酵素の過酸化水素処理後の R O S レベルを示す。

【図15】本発明の変異型 M p r 1 を導入したプロリン蓄積型酵素の過酸化水素処理後の

10

20

30

40

50

生存率を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明の変異型Mpr1は、配列番号1にて示される配列の、63～65位、および117位の少なくとも1のアミノ酸が置換され、かつ抗酸化活性が配列番号1で示される野生型酵素のものより高いものである。

【0016】

本発明において特に好適に用いられるのは、配列番号1において63位のリシンがアルギニンへと置換されたもの(K63R、配列番号7)、65位のフェニルアラニンがロイシンへ置換されたもの(F65L、配列番号8)、117位のロイシンがバリンへ置換されたもの(L117V、配列番号9)、および65位のフェニルアラニンと117位のロイシンがそれぞれロイシン、バリンへ置換されたもの(F65L/L117V、配列番号10)が例示される。

10

【0017】

本発明は上記アミノ酸配列をコード化する遺伝子もまた提供する。本発明の遺伝子としては配列番号2で示される野生型MPR1のDNA配列のうち、63～65位のアミノ酸に対応するコドンおよび117位のアミノ酸に対応するコドンのうちの1以上が、置換されるアミノ酸をコードするように改変されているものが例示されるが、これに限定されない。具体的には配列番号7～10に示される変異型Mpr1をコードする遺伝子である配列番号11～14のDNA配列が例示される。

20

【0018】

本発明はさらに、本発明の遺伝子を酵母に導入することにより、抗酸化能が向上された形質転換酵母を提供する。

本発明の遺伝子が導入される酵母としては特に限定的ではなく、いかなる用途のいかなる酵母であってもよい。また該酵母は内在性のMPR1もしくは同等の機能を有するそのホモログ遺伝子を有しているものであっても有していないものであってもよい。

【0019】

酵母としては例えば、清酒酵母、アルコール酵母、葡萄酒発酵酵母、パン酵母等と呼ばれる、発酵・醸造食品の製造において用いられる酵母が例示される。好適には、サッカロミセス属、より好ましくはサッカロミセス・セレビスエに属する酵母が対象となる。

30

【0020】

本発明の方法にて形質転換される酵母としては、他の有益な性質を有するよう、別途遺伝子操作やその他の方法によって改変された酵母も挙げられる。有益な性質を有するよう改変された酵母としては、例えば本願発明者による特開2006-67806に記載のプロリン分解酵素遺伝子が破壊された酵母が例示される。この酵母は細胞内にプロリンを蓄積し、その結果高いエタノール耐性を有するものである。

【0021】

酵母への遺伝子の導入は、対象となる酵母に応じて従来公知の方法のいずれを用いてもよく、特に限定されない。酵母へ遺伝子を導入する方法は例えば「バイオマニュアルシリーズ10 酵母による遺伝子実験法」(羊土社)、及び「生物化学実験法39 酵母分子遺伝子実験法」(学会出版センター)等の教科書の記載に順じて行えばよい。

40

【0022】

具体的には、遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)をPCR法等の公知の方法によって調製し、これを酵母で発現可能なプロモーターの下流に接続して遺伝子カセットを作成し、酵母発現のためのベクターとすればよい。本発明は本発明の変異型Mpr1をコードする遺伝子を含む係るベクターもまた提供する。

【0023】

本発明のベクターは、例えばPCRにより調製された遺伝子の両端に適切な制限酵素サイトを付加し、当該制限酵素で切断し、これを別途適切な制限酵素で切断したプラスミドベクターへDNAライゲースを用いて導入することによって構築することができる。プラ

50

スミドに導入されたDNAは大腸菌を用いることによって容易に増幅、単離、精製が可能である。

【0024】

酵母プロモーターとしては、酵母における発現に用いることが知られているものであれば、いずれのプロモーターを用いてもよく、例えばGAL1、GAL10、PHO5、PGK1、ADH1、AOX1等のプロモーターが例示される。特に好適には、GAL1およびADH1が例示される。

【0025】

本発明のベクターは、複製開始点、例えば2 μm DNA由来のもの、選択マーカー、例えばLEU2、URA3、TRP1等を含んでいることが好適であり、さらに必要に応じてエンハンサー、ターミネーター、リボソーム結合部位、ポリアデニル化シグナル配列等を含んでいてもよい。酵母用ベクターとして、種々の市販品があり、宿主となる酵母に応じて適宜選択すればよい。

10

【0026】

酵母が内在性のMPR1遺伝子あるいはそのホモログを有している場合には、内在性のMPR1あるいはそのホモログ遺伝子と本発明の変異型MPR1遺伝子を置き換えても、あるいは内在性遺伝子と本発明の変異型MPR1遺伝子とを共存させてもよい。

【0027】

内在性のMPR1あるいはそのホモログと本発明の変異型MPR1遺伝子を共存させる場合、もしくは酵母がMPR1あるいはそのホモログを有していない場合には、自律複製するプラスミドベクターを用いて形質転換を行えばよい。自律複製するプラスミドベクターとしては、例えば実施例で用いたpAD4 (LEU2マーカー)やpYES2 (URA3マーカー)等の2 μmプラスミド由来の複製開始点を有しているベクターが例示される。

20

【0028】

酵母染色体の内在性MPR1を、本発明の変異型Mpr1をコードする遺伝子で置き換える場合には、酵母における選択マーカー遺伝子を含むが、自律複製配列を持たないプラスミドベクターを用いればよい。かかるベクターを用いると、染色体上のMPR1もしくはそのホモログ配列とプラスミドの配列が相同組み換えを起こし、プラスミドが染色体DNAに挿入されたものが形質転換体として得られる。かかるプラスミドベクターとしては市販のものが知られており、Stratagene社のpRS405 (LEU2マーカー)、pRS406 (URA3マーカー)などが例示される。かかるプラスミドベクターを用いる場合には、予めMPR1の内部をユニークな制限酵素で1箇所切断し、直鎖状にしたプラスミドを用いて形質転換すればよい。

30

【0029】

本発明はまた、野生型アセチルトランスフェラーゼの配列において、Mpr1の63～65位および117位に対応する部位の少なくとも1のアミノ酸が置換されており、かつ野生型アセチルトランスフェラーゼより強い抗酸化能を示す変異型アセチルトランスフェラーゼ、および該変異型アセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、および該遺伝子にて形質転換された酵母を提供する。

40

【0030】

特に好適な例としては、野生型アセチルトランスフェラーゼのMpr1の63位に対応する部位のアミノ酸がアルギニンであるもの、65位に対応する部位のアミノ酸がロイシンであるもの、および117位に対応する部位のアミノ酸がバリンであるものが示される。

【0031】

ここで野生型アセチルトランスフェラーゼとしては、アセチルトランスフェラーゼスーパーファミリーに属する酵素、特に*S. paradoxus*、*Schizosaccharomyces pombe*に存在するMPR1ホモログ遺伝子 (*Spa MPR1*、*ppr1*⁺) (配列番号4および6)によりコードされる酵素 (配列番号3および5) が例示されるが、これらに限定されない。

50

【実施例】

【0032】

本発明者は、M P R 1 遺伝子へランダム変異を導入した遺伝子を調製し、これを M p r 1 非保持酵母に導入した。得られた形質転換酵母から、熱ショックストレス、A Z C ストレスおよび過酸化水素ストレスに対して野生株より高い耐性を示すクローンをスクリーニングし、本発明の高機能化アセチルトランスフェラーゼ M p r 1 を得た。

【0033】

実験材料と方法

1) 材料

i) 菌株

<出芽酵母 Saccharomyces cerevisiae>

S288C 系統株

CKY8 (MAT ura3-52 leu2-3,112)

CKY263 (MATa ura3-52 leu2-3,112 GAL)

(Chris A. Kaiser (Massachusetts Institute of Technology) から分譲)

【0034】

<大腸菌 Escherichia coli>

JM109 :

recA1 end1 gyrA96 thi1 hsdR17 sup E44 relA1

(lac-proAB)/F' [traD36 proAB+ lacIq lacZ M15]

(タカラバイオより購入)

【0035】

DH5 :

F- - 80lac Z M15 (lacZYA-argF)U169 deoR

recA1 endA1 hsdR17(rK- mK+) supE44 thi-1 gyrA96

(タカラバイオより購入)

【0036】

(ii) プラスミド

p A D 4 (九州工業大学 仁川純一先生から分譲)

2 μ m D N A の複製起点、酵母での選択用マーカー L E U 2、および E . c o l i での複製起点、選択用マーカーのアンピシリン耐性遺伝子を含んでいる。また、マルチクローニングサイトの上流に A D H 1 プロモーター、下流に A D H 1 ターミネーターが存在している。

【0037】

p Y E S 2 (Invitrogen社から購入)

2 μ m D N A の複製起点、酵母での選択用マーカー U R A 3、および E . c o l i での複製起点、選択用マーカーのアンピシリン耐性遺伝子を含んでいる。また、マルチクローニングサイトが G A L 1 プロモーター下流に存在しており、転写終結シグナルは C Y C 1 遺伝子に由来する。

【0038】

p M H 1 (発明者が構築)

p Y E S 2 の B a m H I サイトに M P R 1 のゲノミック D N A を含む S a u 3 A I 断片 (約 5 . 4 k b) を組み込んだプラスミド。 M P R 1 のゲノミック D N A は非特許文献 1 に記載のとおり、A Z C 耐性変異株である F H 5 0 6 のゲノミック D N A を S a u 3 A I で消化することによって得られた。

【0039】

p A D - M P R (発明者が構築)

p A D 4 の H i n d I I I - S a c I サイトに M P R 1 の O R F を含む H i n d I I I - S a c I 断片 (約 7 0 0 b p) を組み込んだプラスミド。 M P R 1 がグルコース存在下で A D H 1 プロモーターによって強制的に発現する。

10

20

30

40

50

【0040】

pGAL-MPR (発明者が構築)

MPR1のゲノミックDNAからMPR1のORFを含むHindIII-MluI断片(約930bp)を切り出し、pYES2のHindIII-MluIサイトに組み込んだプラスミド。MPR1がガラクトース存在下でGAL1プロモーターによって強制的に発現する。

【0041】

2) 培地

YPD培地 (酵母用完全培地)

【表1】

| | |
|---------------------|----|
| Glucose | 2% |
| Bacto peptone | 2% |
| Bacto yeast extract | 1% |

10

【0042】

SD培地 ((NH₄)₂SO₄が窒素源の酵母用最少培地)

【表2】

| | |
|--|-------|
| Glucose | 2% |
| Bacto yeast nitrogen base without amino acids (Difco社) | 0.67% |

20

【0043】

SG培地 ((NH₄)₂SO₄が窒素源、ガラクトースが炭素源の酵母用最少培地)

【表3】

| | |
|--|-------|
| Galactose | 2% |
| Bacto yeast nitrogen base without amino acids (Difco社) | 0.67% |

【0044】

SC培地 (SD培地に合成に必要な物質を添加した酵母用完全合成培地)

【表4】

| | |
|--|-------|
| Glucose | 2% |
| Bacto yeast nitrogen base without amino acids (Difco社) | 0.67% |
| *Drop-out mixture | 0.2% |

30

*Drop-out mixtureは、下記のアミノ酸混合物より必要に応じて特定のアミノ酸を取り除き、残りをよく混合したもの。

【0045】

【表 5】

| | | | |
|------------|-------|-------------|------|
| L-アスパラギン酸 | 0.5g | L-アラニン | 2.0g |
| L-グルタミン | 2.0g | L-アスパラギン | 2.0g |
| グリシン | 2.0g | L-システイン-HCL | 2.0g |
| イノシトール | 2.0g | L-グルタミン酸 | 2.0g |
| L-ロイシン | 2.0g | L-ヒスチジン | 2.0g |
| L-メチオニン | 2.0g | L-イソロイシン | 2.0g |
| L-フェニルアラニン | 10.0g | L-リシン | 2.0g |
| L-セリン | 2.0g | p-アミノ安息香酸 | 0.2g |
| L-トリプトファン | 2.0g | L-プロリン | 2.0g |
| ウラシル | 2.0g | L-スレオニン | 2.0g |
| L-アスパラギン酸 | 2.0g | L-チロシン | 2.0g |
| L-グルタミン | 2.0g | L-バリン | 2.0g |

10

【 0 0 4 6 】

なお、これらの培地には必要に応じて寒天（2%）および/または栄養源（ウラシル、ロイシン等）を添加した。また、酵母の培養は30で行った。液体培地にて酵母を培養する場合、アルミキャップを用いた試験管、もしくはシリコ栓を用いた坂口フラスコで培養した。

20

【 0 0 4 7 】

LB培地(大腸菌用完全培地)

【表 6】

| | |
|---------------------|------|
| Tryptone | 1% |
| Bacto yeast extract | 1% |
| NaCl | 0.5% |

なお、必要に応じてアンピシリン（Amp）（50 μg/ml）、寒天（2%）を添加した。

【 0 0 4 8 】

3) DNA オリゴマー

本研究に用いたDNAオリゴマーの合成は、北海道システムサイエンス社およびオペロン社に依頼した。以下にそれらの名称と配列を示す。

143(+)-9 20mer

5'-GCT CGA GAA GCT TCG AAT GC-3' (配列番号 15)

143(-)-4 22mer

5'-CGA CGC GTC GTT ATT CGT TCT T-3' (配列番号 16)

F65L(+) 45mer

5'-attaactatctttttaaattgcttaatttggaaattgaaagtggc-3' (配列番号 17)

F65L(-) 45mer

5'-gccactttcaatttccaaattaaagcaatttaaaaagatagttaat-3' (配列番号 18)

L117V(+) 45mer

5'-attaactatctttttaaattgcttaatttggaaattgaaagtggc-3' (配列番号 19)

L117V(-) 39mer

5'-cttgatgtagaatgtgcccaggagaactgaattccagtc-3' (配列番号 20)

pYES2(++) 20mer

5'-GTT ACA TGC GTA CAC GCG TC-3' (配列番号 21)

pYES2(-) 21mer

5'-GGA TCG GAC TAC TAG CAG CTG-3' (配列番号 22)

pAD4(++) 20mer

30

40

50

5' -TCG TCA TTG TTC TCG TTC CC-3' (配列番号 2 3)

pAD4(-) 21mer

5' -GTT TTA AAA CCT AAG AGT CAC-3' (配列番号 2 4)

HindIII-MPR(+) 26mer

5' -GGC CAA GCT TAG ATG GAT GCG GAA TC-3' (配列番号 2 5)

Sac I -MPR(-) 30mer

5' -CCC CGA GCT CTG TCT ATG ATT ATT CCA TGG-3' (配列番号 2 6)

【 0 0 4 9 】

4) ストレス感受性テスト

各菌株を液体培地で対数増殖期まで 30 で培養した。得られた培養液を $10^0 \sim 10^4$ 倍まで段階的に希釈し、2 μ l を S D または S G 寒天培地上へスポッティングした。スポッティングした培地を各ストレス条件下で培養した。

【 0 0 5 0 】

(i) A Z C ストレス

0.5 ~ 1 mg/ml の A Z C 濃度に調整した S D または S G 寒天培地に 2 μ l の培養液をスポッティングし、30 で培養した。

(ii) 熱ショックストレス

S D または S G 寒天培地に 2 μ l の培養液をスポッティングした後、50 で 1 ~ 2 時間熱ショックを与え、その後 30 で培養した。

(iii) 過酸化水素ストレス

1 ~ 2 mM の過酸化水素濃度に調整した S D または S G 寒天培地に 2 μ l の培養液をスポッティングし、20 で培養した。

(iv) エタノールストレス

5 ~ 10 % のエタノール濃度に調整した S D または S G 寒天培地に 2 μ l の培養液をスポッティングし、20 で培養した。

5) Error prone PCR 法による M P R 1 ランダム変異ライブラリーの構築
以下の組成で PCR 反応を行う Error prone PCR 法で M P R 1 遺伝子断片を増幅した。なお PCR 反応キットは Promega 社製を用いた。

【表 7】

| | | |
|----------------------------------|---------------|----|
| template (10ng/ μ l) | 1 μ l | 30 |
| Taq DNA polymerase (5U/ μ l) | 0.25 μ l | |
| 10 \times reaction buffer | 5 μ l | |
| MgCl ₂ (25mM) | 3 μ l | |
| *dNTP mix | 4 μ l | |
| プライマー 143(+)-9 (10pM) | 5 μ l | |
| 143(-)-4 (10pM) | 5 μ l | |
| 滅菌水 | 26.75 μ l | |
| | 50 μ l | |

*dNTP mix

dNTP に含まれる塩基 A, G, C, T のいずれかの濃度バランスを 1/3 または 1/5 まで落として混合した。dATP, dTTP については 1/3、dCTP, dGTP については 1/5 の低濃度で反応を行った。

例) dATP を 1/5 にした場合

【表 8】

| | |
|--------------|-----------|
| dATP (1.6mM) | 1 μ l |
| dTTP (8.0mM) | 1 μ l |
| dCTP (8.0mM) | 1 μ l |
| dGTP (8.0mM) | 1 μ l |
| dNTP | 4 μ l |

【0051】

10

Error prone PCRでランダム変異を導入したMPR1遺伝子断片(約930bp)は、PCR産物を内在性のHindIII、MluIサイトで切断したのち、アガロースゲル電気泳動し、ゲルから抽出することによって得られた。DNA断片のアガロースゲルからの抽出にはQIAEX II Agarose Gel Extraction kit (QIAGEN社)を用いた。このようにして得た変異MPR1遺伝子断片をpYES2のHindIII-MluIサイトに組み込み、約60,000の形質転換コロニーからプラスミドを調製して、MPR1ランダム変異ライブラリーを作製した(図3)。次に、MPR1ランダム変異ライブラリーを用いて、*Saccharomyces cerevisiae*のS288C系統株に導入した。

【0052】

6) F65L変異およびL117V変異を有する変異型MPR1遺伝子保持株の作製

20

F65LおよびL117V各々の変異体遺伝子はpAD4-MPRを鋳型として、部位特異変異導入PCR法により作製した。

Quik Change (登録商標) SL Site-Directed Mutagenesis Kitを使用し、以下の組成と反応条件でPCR反応をおこなった。

【0053】

(組成)

【表 9】

| | | |
|------------------------------------|---------------|----|
| 10×反応バッファー | 5 μ l | |
| pAD-MPR (10ng/ μ l) | 1 μ l | |
| プライマー Fw (F65L(+))あるいはL117V(+)) | 約120 μ g | 30 |
| プライマー Rv (F65L(-))あるいはL117V(-)) | 約 120 μ g | |
| dNTP ミックス | 1 μ l | |
| Quik Solution | 3 μ l | |

dH2Oでトータル 50 μ lに調整し、pfuTurbo DNA polymerase(2.5U/ μ l)を1 μ l加えてPCR反応させる。

【0054】

PCR反応条件:

40

95 1分 [95 50秒 60 50秒 62 9分] × 18サイクル 68 7分 4

【0055】

PCR後の増幅産物をアガロースゲル電気泳動し、690b部分のバンドを切り出し、QIAquick gel extraction kit (QIAGEN)を用いて精製を行なった。

精製したDNA断片をHindIII、SacIで制限酵素処理後、同じく制限酵素処理したpAD4ベクターのマルチクローニングサイトにライゲーションさせた。

このようにして得た変異MPR1遺伝子断片をpAD4のHindIII-MluIサイトに組み込み、*Saccharomyces cerevisiae*のS288C系統株に導入した。

【0056】

7) 過酸化水素処理後の細胞生存率の測定

50

各菌株を2 mlのSC-Leu培地およびSD培地に植菌し、30 で対数増殖期まで振とう培養した。3,500 rpm、5 minの遠心分離により集菌した。得られた細胞をOD₆₀₀が1.0になるように4 mlの100 mMリン酸カリウムバッファー(pH 7.4)に懸濁した。この細胞懸濁液に過酸化水素を最終濃度3 mMあるいは6 mMとなるように添加し、30 で振とうさせた。過酸化水素未処理(0時間)および処理開始から2時間、4時間後にそれぞれ1 mlずつの細胞懸濁液を取ってマイクロチューブに分注した。細胞懸濁液を段階的に希釈し、YPD寒天培地に塗布した。その後30 で培養し、過酸化水素0時間後のサンプルから生育してきたコロニーの数を100%として、各生存率を算出した。

【0057】

10

8) 過酸化水素処理後の細胞内ROSレベルの測定

細胞内の活性酸素種(ROS)レベルを測定するために、細胞内酸化感受性プローブとして2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート(H₂DCFDA)(Molecular Probes社)を使用した。H₂DCFDAは細胞内エステラーゼによって酵素的に脱アセチル化され、DCFHに変換される。その後、ROSによって酸化され、高度の蛍光物質DCFを生じるため、その蛍光強度を蛍光分光光度計により測定した。

【0058】

50 mlのSC-Leu培地およびSD培地で対数増殖期まで培養した菌体を滅菌水で遠心洗浄後、100 mMリン酸カリウムバッファー(pH 7.4)にOD₆₀₀=1.0になるように懸濁した。この懸濁液40 mlに5 mM H₂DCFDAを最終濃度0.01 mMになるように添加して、30 で15 minインキュベートした後、300 mM過酸化水素を最終濃度3 mMあるいは6 mMになるように添加し、30 で振とうさせた。過酸化水素未処理(0分)および開始から30分、60分後において、遠心分離(8,000 rpm、10分)により菌体を回収した。回収した菌体は滅菌水で洗浄し、500 μlの滅菌水に懸濁した。この菌体懸濁液に、ガラスビーズ(0.5 mm)を加え、マルチビーズショッカー(安井器械社製、MB601U)を用いて、菌体を破碎し(1分オン、1分オフ、5サイクル、0)、遠心分離(15,000 rpm、10分)後の上清を回収した。この上清50 μlと滅菌水450 μlの混合液に504 nmの励起波長を照射し、放出された蛍光波長(524 nm)を蛍光分光光度計(日立社製、F4500)で測定した。

20

30

【0059】

菌体破碎液の上清のタンパク質濃度をBio-Rad社のタンパク質定量試薬を用いて定量し、細胞内ROSレベルをタンパク質(mg)あたりの蛍光強度として次の式のように表した。

【0060】

【数1】

$$SFI = \frac{\text{fluorescence} \quad [EX = 504nm / EM = 524nm]}{\text{protein} \quad (mg/ml) \times 0.05 \quad (ml)}$$

なお、結果は0分の蛍光強度を100%とし、これに対する相対蛍光強度により示した。

40

【0061】

9) Mpr1酵素の精製

JM109をM9CA(CA:0.2%)培地5 mlに植菌し、OD₆₀₀=0.7になるまで37度で培養を行なう。IPTGを最終濃度0.1 mMになるように添加し18 でさらに18時間培養する。培養後、氷冷し、遠心(8000 rpmで5分)により集菌したものにLysis bufferを加え、洗菌する。遠心(8000 rpmで5分)し、5 mlのLysis bufferを加え、懸濁する。これを超音波破碎し、15000 rpmで10分間遠心分離する。上清をlysis bufferで平衡化したNi-NTA column(QIAGEN 樹脂懸濁液2 mlを使用)にかける。素通り画分を回収し、wash buffer 10 mlで洗浄し、また画分を回収した。さらに5 mlのelution bufferで溶出したものを精製酵素として用いた。

50

【 0 0 6 2 】

1 0) 酵素活性の測定

精製された野生型 M p r 1 および K63R, F65L/L117V, F65L, L117V - 変異型 M p r 1 について、酵素活性を測定した。酵素活性は 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 法によって測定した。アセチルCoAおよびAZCを基質としたMpr1の酵素反応ではCoAを生じるが、このCoAはSH基と反応して412 nmで強い吸光を示すTNBを生成することを 利用している。

1mMのDTNB溶液、Mpr1 (約0.6~0.2 μg/ml)、0.025mM~0.15mMのアセチルCoAあるいは0.5mM~5mMのAZCを含む反応液を30 で、412 nmにおける1分間あたりの吸光度変化 (ABS) を測定した。基質各濃度(S)あたりの ABS/min (反応速度) を求め、Michaelis-Mentenの変換式 (式1) のグラフ([S]/v-[S]プロット)を作り、Km、Vmaxを求めた。
[S]/v = 1/v[S]+Km/V・・・(式1)

【 0 0 6 3 】

1 1) 酵素安定性の測定

野生型 M p r 1 および K 6 3 R , F 6 5 L / L 1 1 7 V , F 6 5 L , L 1 1 7 V の変異型 M p r 1 について、以下のようにして温度安定性の解析を行なった。精製した酵素を45 ウォーターバスにてインキュベートし、5分ごとに取り出しDTNB法にて ABSを測定した。インキュベート開始0分の時の酵素の412 nmにおける吸光度を100%としたときの、各処理時間ごとの残存活性(%)を計算し、横軸を処理時間、縦軸を残存活性(%)としたグラフを作成し、野生型酵素との安定性の比較を行なった。

また、過酸化水素安定性の解析も行なった。過酸化水素処理は0.5Mの濃度で行い、その後25 ウォーターバスでインキュベートし、熱安定性の測定と同様に残存活性を算出した。

【 0 0 6 4 】

1 2) プロリン蓄積型酵母への M p r 1 の導入

発明者らは先に、配列番号28に示すプロリン合成酵素 (P R O 1 : グルタミンリン酸化酵素、Li W., and Brandriss CM., J. Bacteriol., 174, 4148-4156, 1992, NCBI accession # M85293) の A s p 1 5 4 を A s n へと置換することによって、酵母中へプロリンを蓄積させることができることを開示した (特開2004-251466)。このプロリン蓄積型酵母へ、本願発明の変異型 M p r 1 をさらに組み込んだ酵母の抗酸化能について調べた。

INVdput1 (InvSc1酵母 (Invitrogen社より購入) をベースに、PUT1遺伝子をHIS3遺伝子で置換したもの。Terao Y., et al., Applied and Environmental Microbiology, 2003, Vol.69, No. 11, pp6527-6532) を、野生型 グルタミン酸リン酸化酵素の154位のアスパラギン酸 (D) がアスパラギン (N) に置換された変異PRO1をコードする遺伝子を組み込んだ pUV2ベクター (pUV-D154Npro1)、および野生型PRO2遺伝子を組み込んだ pTV3ベクター (pTV-PRO2) で形質転換した (InvDput1(pUV-D154Npro1)(pTV-PRO2); 以下、単に“プロリン蓄積型酵母”という)。プロリン蓄積型酵母のセレクションはSD培地にロイシンを添加した選択培地によって行なった。

上記6)と同様の方法にて野生型Mpr1及び各変異型Mpr1遺伝子を組み込んだ pAD4ベクター (各々、pAD-Mpr1(WT), pAD-MPR1-K63R, pAD-Mpr1-F65L, pAD-Mpr1-L117Vという) を調製し、プロリン蓄積型酵母をこのベクターで各々形質転換し、各種プロリン蓄積型 M p r 1 導入株を得た。これらの形質転換酵母はロイシンを含まないSD培地で培養することでセレクションした。

【 0 0 6 5 】

1 3) プロリン蓄積型 M p r 1 導入株の細胞内プロリン含有率の測定

プロリン蓄積型 M p r 1 導入株内のプロリン含有率は、公知の方法により測定できる。具体的には、酵母培養液の乾燥重量に対するプロリンの量の比率で求められる。

酵母の乾燥重量は、5mlのSD培地で30、60時間培養した後の培養液の600nmにおける吸光度 (OD₆₀₀) を測定し、以下の式 (2) によって算出した。

培養液 5 ml あたりの乾燥重量 (g) = OD_{600} の値 / 978.45 ---式 (2)

【0066】

プロリンの含有量は、アミノ酸アナライザー (JEOL社製 AminoTac) によって測定した。まず、各酵母株を 5 ml の SD 培地で 30、60 時間培養した後、4,000 rpm で 5 分間遠心し、細胞を回収した。生理食塩水で 2 回洗浄後、細胞を 0.5 ml の滅菌水に懸濁し、100 で 10 分間の熱水処理を行なった。12,000 rpm で 5 分間遠心し、採取した上清 100 μ l を 0.02N HCl で 2~5 倍希釈し、フィルター滅菌後アミノ酸アナライザーで測定した。標品として 1 ml のアミノ酸混合標準液 (各アミノ酸 2.5 μ mol/ml を含有する) をフィルター滅菌したものをを用いた。

プロリン蓄積型 Mpr 導入株について生存率や ROS 量の測定を行う際には、上記のようにしてプロリンの含有量を算出し、野生型酵母と比較して、プロリンが蓄積されていることを確認した。野生型酵母におけるプロリン含有量が酵母乾燥重量に対して平均 0.014% 程度であるのに対し、プロリン蓄積型酵母およびプロリン蓄積型 Mpr 導入株ではその約 40~60 倍のプロリンの蓄積が起こっている。

10

【0067】

14) プロリン蓄積型 - Mpr 1 導入株の過酸化水素処理後の ROS レベルの測定

上記 8) と同様の方法によって、過酸化水素処理後の ROS レベルを測定した。

【0068】

15) プロリン蓄積型 Mpr 1 導入株の過酸化水素処理後の生存率の測定

前述の方法を用いて、各種プロリン蓄積型 Mpr 1 導入株を最終濃度 6 mM の過酸化水素で処理し、生存率を測定した。

20

【0069】

16) プロリン蓄積型 Mpr 1 導入株の各種ストレス耐性測定

前述と同様にして、各種プロリン蓄積型 Mpr 1 導入株を SG + Leu 培地あるいは SD 培地に段階希釈してスポッティングし、AZC ストレス下とエタノールストレス下での生存率を調べた。

【0070】

17) その他

大腸菌からのプラスミド調製には、アルカリ SDS 法をベースにした QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社製) を用いた。その他、大腸菌の形質転換、DNA の制限酵素による切断、連結などの遺伝子操作は「バイオマニュアルシリーズ I 遺伝子工学の基礎技術」(羊土社)、及び「バイオ実験イラストレイテッド」(秀潤社)に、酵母の取り扱いや遺伝子操作は「バイオマニュアルシリーズ 10 酵母による遺伝子実験法」(羊土社)、及び「生物化学実験法 39 酵母分子遺伝子実験法」(学会出版センター)に準じた。

30

【0071】

[結果]

1) Mpr 1 のストレス耐性確認

Mpr 1 は、AZC のアセチル化による無毒化のほかに、熱ショックや過酸化水素処理によって細胞内に生じる活性酸素種 (ROS) のレベルを下げて、酵母を酸化ストレスから保護していることが報告されている。まず始めに Mpr 1 保持株が Mpr 1 非保持株に比べて、ストレス耐性および AZC 耐性が高いかをストレス感受性テストで確認した。MPR 1 および MPR 2 を保持していない S. cerevisiae S288C 系統株 (CKY8) に pAD4 (ベクター)、pAD-MPR (インサートに MPR 1 の ORF のみを含み、ADH 1 プロモーターで強制的に発現させるプラスミド)、または pMH1 (MPR 1 の ORF を含む 5.4 kb の Sau 3 AI 断片を有し、MPR 1 自身のプロモーターで発現を調節するプラスミド) を導入した。その後、スポットによるストレス感受性テストを行った。結果を図 4 に示す。MPR 1・MPR 2 非保持株 (pAD4) に比べて、MPR 1 保持株 (pAD-MPR および pMH1) は AZC および 50 の熱ショック、過酸化水素 (2 mM) ストレスに対して耐性を示した。

40

【0072】

50

2) 高機能化Mpr1のスクリーニング

高機能化Mpr1保持株を取得するため、スクリーニングを行った。スクリーニングは、CKY263にMPR1ランダム変異ライブラリーを導入して得た形質転換株について行った(変異MPR1多コピー導入株)。ネガティブコントロールとしてはCKY263にpYES2を導入したもの(MPR1・MPR2非保持株)を用い、コントロールには同菌株にpGAL-MPRを導入したもの(MPR1多コピー導入株)を用いた。

【0073】

i) AZCストレス

AZC濃度0.5mg/ml含有SG+Leu培地にて培養した。ネガティブコントロールであるMPR1・MPR2非保持株のみならず野生型MPR1多コピー導入株でも著しく生育の遅れが示された。ランダム変異導入株において野生型MPR1多コピー導入株より生育が早いクローンを選択した。その結果、約91,000個の形質転換体から、29個のAZC耐性クローンが取得された。得られたクローンから、導入した変異MPR1遺伝子の変異部位をシーケンスにより特定したところ、3種類の変異型Mpr1(K63R, G142S, Q179R)が取得された。

【0074】

ii) 過酸化水素刺激耐性

過酸化水素濃度3mM含有SG+Leu培地にて培養した。この条件は、ネガティブコントロールであるMPR1・MPR2非保持株のみならず野生型MPR1多コピー導入株でもコロニーが形成されない。MPR1ランダム変異ライブラリーによる形質転換株を同条件にて培養し、約66,500個の形質転換株より、5個の過酸化水素耐性が向上したクローンを取得し、変異を特定したところ、4種類の変異型Mpr1(K63R, F65L/L117V, I184M, E224V)が取得された。

【0075】

上記スクリーニングで得られた各変異型Mpr1および野生型Mpr1と相関性が高い他のアセチルトランスフェラーゼと一次構造を比較し、得られた変異型Mpr1の変異点を確認した。図5にその結果を示す。G142S-Mpr1はアセチルCoA結合コンセンサス配列を含むモチーフA内での置換であり、Q179R、F65L/L117V、I184M-Mpr1もアセチルトランスフェラーゼスーパーファミリーに保存されている特徴的な配列内での置換であることが確認された。

【0076】

スクリーニングにて取得された変異型Mpr1クローンからプラスミド(変異型pGAL-MPR)を抽出した。pGAL-MPRでMPR1遺伝子を強制的に発現させるためには、C源をガラクトースとした培地で発現を誘導する必要があるため、増殖スピードが遅く、生育が安定しない。増殖の効率を上げるため、グルコースで発現を誘導するpAD4ベクターに変異型MPR1を組み込んだ各種変異型pAD4-MPR1を作製した。pAD4-MPR1-K63RおよびpAD4-MPR1-F65L/L117VはMPR-K63RとpGAL-MPR-G65L/L117Vを鋳型にして、各々の変異型MPR1のORFをPCRで増幅し、pAD4のHindIII-SacIサイトに組み込んで作製した。pAD4-MPR1-F65LおよびpAD4-MPR1-L117VはpAD4-MPRを鋳型とした部位特異的変異導入PCR法によって増幅した変異遺伝子断片をHindIIIおよびSacIで制限酵素処理し、pAD4のHindIII-SacIサイトに組み込んで作製した。CKY8株を変異型pAD-MPR1で形質転換し、ストレス感受性テストを行った。まず、野生型MPR1多コピー導入株とK63R-変異型MPR1導入株、およびF65L/L117V-変異型Mpr1導入株をSD+Ura培地で各形質転換体を対数増殖期まで培養し、その培養液を段階的に希釈した後、培地にスポットした。

【0077】

結果を図6に示す。AZCストレスによるスクリーニング系で取得したK63R-Mpr1導入株がAZC(1mg/ml)、熱ショック(2時間)、過酸化水素ストレス(2mM)のすべてにおいてコントロールである野生型MPR1多コピー導入株(pAD-M

10

20

30

40

50

PR1)より高い耐性を示した。特に、過酸化水素刺激(2 mM)に対する耐性は著しく高かった。過酸化水素ストレス誘導培地を用いたスクリーニング系で取得したF65L/L117V、E224V - Mpr1については、AZCストレスに対する耐性の向上は認められなかったが熱ショック、過酸化水素で耐性が向上する傾向が見られた。この結果を踏まえ、変異型アセチルトランスフェラーゼMpr1としてK63RおよびF65L/L117Vを選択し、その抗酸化能をさらに解析した。

【0078】

3) 高機能化候補変異 Mpr1の解析

(i) 変異型Mpr1の酸化ストレス下におけるスポット解析

K63R - 変異型Mpr1、および、F65L/L117V - 変異型Mpr1と野生型のMPR1の多コピー導入株におけるストレス耐性を、AZC(1 mg/ml)、熱ショック(50℃、1.5時間)、過酸化水素(1 mM)、エタノール(5%)の各ストレス条件下におけるスポット感受性テストにて調べた。

10

【0079】

使用した菌株はネガティブコントロールとしてCKY8にpAD4を導入したもの(MPR1・MPR2非保持株)、コントロールとして同菌株にpAD-MPRを導入したものの(MPR1保持株)、及び同菌株に変異型pAD-MPRを導入したものをを用いた。各菌株をSD+Ura液体培地で対数増殖期まで培養した後、段階的に希釈し、2 µlを各ストレスSD+Ura寒天培地にスポッティングし、「実験材料と方法」に記載したプロトコルに従って培養し、各ストレスに対する感受性(耐性)を調べた。

20

【0080】

結果を図7に示す。AZCストレスによるスクリーニング系で取得したK63R変異型MPR1導入株(pAD-MPR-K63R)は、野生型MPR1と比較して、すべてのストレス条件下(AZC、熱ショックおよび過酸化水素)で顕著に高い耐性を示した。過酸化水素のスクリーニング系で取得したF65L/L117V変異型MPR1(pAD-MPR-F65L/L117V)については、AZC、熱ショック、エタノールストレスに対する耐性は野生型MPR1とほとんど差が認められなかったが、過酸化水素ストレスに対しては野生型と比べて強い耐性を示した。

【0081】

(ii) 変異Mpr1のH₂O₂処理後の生存率比較

CKY8株を野生型MPR1および変異型MPR1(K63R、F65L/L117V、F65LおよびL117V - 変異型Mpr1)で形質転換した株における過酸化水素処理後の細胞生存率を調べた。実験方法については「実験材料と方法」に記載のごとくOD₆₀₀が1.0になるようにリン酸カリウムバッファーに調整して、最終濃度3 mM(K63R、F65L/L117V)あるいは6 mM(F65L、L117V)過酸化水素水で各時間処理後、YPD寒天培地に塗布した。その後、過酸化水素0時間後のコロニーの数を100%として、各生存率を算出した。3 mM過酸化水素処理の結果を図8に示す。

30

【0082】

野生型MPR1多コピー導入株(pAD-MPR)はMPR1非導入株(pAD4)に比べて、生存率の低下が過酸化水素処理2時間まで低く抑えられていた。そしてさらに、変異型MPR1多コピー導入株(K63R、F65L/L117V - 変異型Mpr1)は、野生型MPR1多コピー導入株(pAD-MPR)に比べ、より一層強く生存率の低下が抑えられた。特に、K63R - Mpr1については野生型に比べて、著しく生存率の低下が抑制されていた。また、F65L、L117V - 変異型Mpr1多コピー導入株においても生存率が上昇していた(data not shown)。

40

【0083】

(iii) 変異Mpr1のH₂O₂処理後の細胞内ROSレベルの変化

続いて、CKY8株において変異型Mpr1が過酸化水素処理後のROSのレベルの上昇に及ぼす影響を野生型Mpr1と比べた。細胞内ROSのレベルについては、細胞内酸化物感受性プローブであるH₂DCFDAを用いて調べた。H₂DCFDAは、主に過酸

50

化水素 (H_2O_2)、ペルオキシラジカル ($HO\cdot$)、ペルオキシニトライトアニオン ($ONOO^-$)を検出することができる。まず、各菌株を対数増殖期まで培養し、リン酸カリウムバッファーに $OD_{600} = 1.0$ になるように調整した後、「実験材料と方法」に記載のごとく H_2DCFDA を添加し、過酸化水素処理後の細胞内 ROS のレベルを測定した。

【0084】

K63R、F65L/L117V - 変異型 Mpr1 多コピー導入株結果を表10および図9に示す。野生型 MPR1 多コピー導入株 (pAD-MPR) は MPR1 非導入株 (pAD4) に比べて、過酸化水素処理後の細胞内の ROS レベルの上昇が低く抑えられていた。K63R 変異型 Mpr1 は、野生型 MPR1 多コピー導入株と比べて、過酸化水素60分処理後の ROS レベルの上昇が約24%低く抑えられていた。F65L/L117V 変異型 Mpr1 については、野生型 MPR1 多コピー導入株と比べて生存率の低下は抑えられたが、ROS レベルは MPR1 非導入株と同等であった。F65L、L117V - 変異型 Mpr1 多コピー導入株について6mMの過酸化水素処理後の ROS レベルを調べたところ、両株とも細胞内 ROS レベルが低下していた (data not shown)。

【0085】

【表10】

| プラスミド | 相対蛍光強度 (%) | | |
|--------------------|-----------------|------------|------------|
| | 過酸化水素処理時間 (min) | | |
| | 0min | 30min | 60min |
| pAD4 | 100±20.3 | 111.4±5.5 | 185.1±11.6 |
| pAD-MPR | 100±5.2 | 115.4±12.8 | 178.9±31.8 |
| pAD-MPR-K63R | 100±6.9 | 91.8±7.3 | 136.5±19.5 |
| pAD-MPR-F65L/L117V | 100±17.5 | 111.5±4.6 | 185.9±20.0 |

【0086】

上記のとおり、K63R、F65L、L117V - 変異型 Mpr1 を導入した株では、野生型 Mpr1 導入株より ROS レベルが減少し、生存率の低下も著しく抑えられ、酸化ストレス耐性の向上が認められた。即ち酸化ストレス (過酸化水素ストレス) 条件下で、ROS レベルの制御効率を上げ、それによって、さらに生存率の低下を抑制していると考えられる。また、F65L/L117V 変異型 Mpr1 についても、酸化ストレス耐性が向上する傾向が見られた。

上記2つの変異型酵素のアミノ酸置換部位 (K63R, F65L) は一次構造上、近接していることから、配列番号1のアミノ酸配列において63~65位が Mpr1 の抗酸化能において重要であることが示される。

【0087】

4) 変異型酵素の触媒活性と安定性

野生型と各変異型の Mpr1 酵素を精製し、AZCおよびアセチルCoAを基質とした場合の触媒活性と熱および過酸化水素処理に対する安定性を測定した。結果を表11、図10、及び表12に示す。

キネティクスの解析から (表11、変化を矢印で示す)、K63R変異型 Mpr1 は基質である AZC、アセチルCoAの双方に対する Km 値が低下し、触媒活性が上昇していることがわかった。また、F65L変異型 Mpr1 は AZC に対する Km 値が低下し、触媒活性が上昇していた。L117V 変異型 Mpr1 はアセチルCoAに対する Km 値が低下し、触媒活性が上昇していた。さらに、F65L/L117V 二重変異型 Mpr1 は野生型と同等の触媒活性を示した。

45 条件下の温度安定性を測定したところ (図10)、F65L/L117V、F65L 各変異型 Mpr1 が野生型以上の安定性を示した。K63R 変異型 Mpr1 は野生型と同等の安定性であり、L117V 変異型 Mpr1 は野生型よりも安定性が低下していた。

過酸化水素処理に対する安定性では (図11)、F65L/L117V、L117V 各変異型 Mpr1 が野生型以上の安定性を示した。K63R 変異型 Mpr1 は野生型と同等の安定性であり、F65L 変異型

Mpr1は野生型よりも安定性が低下していた。

【 0 0 8 8 】

【表 1 1】

| | 変異型Mpr1 rate parameter | | | | | |
|------------|------------------------|------------------------------|------------------|--------------------|------------------------------|-------------------|
| | AZC | | | Acetyl-CoA | | |
| | K_m (mM) | k_{cat} (s ⁻¹) | V_{max} (U/mg) | K_m (μM) | k_{cat} (s ⁻¹) | V_{max} (U/mg) |
| Wild-type | 1.6±0.09 | 36.1±1.53 | 74.76±1.27 | 12.6±1.53 | 31.2±0.63 | 64.5±1.29 |
| k63R | 1.2±0.17 ↓ | 30.6±1.44 | 72±2.98 | 8.0±2.84 ↓ | 26.5±0.94 | 62.4±1.94 |
| F65L/L117V | 1.8±0.19 | 38.4±2.18 | 79.4±1.05 | 13.3±1.67 | 31.4±0.17 | 64.9±0.36 |
| F65L | 0.7±0.15 ↓ | 31.4±1.33 | 65.0±2.74 | 10.3±1.46 | 30.8±0.61 | 63.7±3.34 |
| L117V | 1.4±0.13 | 47.6±1.61 | 98.5±3.34 | 7.63±2.03 ↓ | 38.4±0.74 | 79.4±1.54 |
| | | | | | | 5.0±1.17 ↑ |

【 0 0 8 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

| | 残存活性半減期 1 / 2 t (min) | |
|------------|-----------------------|--------------------------------------|
| | 温度 (45°C) | H ₂ O ₂ (0.5M) |
| 野生型 | 19.2 | 12.6 |
| k63R | 19.1 | 11.4 |
| F65L/L117V | 40.6 ↑ | 28.5 ↑ |
| F65L | 33.3 ↑ | 10.8 ↓ |
| L117V | 10.8 ↓ | 22.2 ↑ |

10

【 0 0 9 0 】

20

5) プロリン蓄積型 野生型 M p r 1 導入酵母

プロリン蓄積型酵母に野生型Mpr1を導入した酵母について、6mMの過酸化水素下の細胞内ROSレベルの変化と生存率を測定した。結果を図12および13に示す。プロリン蓄積型酵母に野生型Mpr1を導入した形質転換酵母においては、プロリン蓄積型酵母と比してROSレベル、生存率の有意差は無かった。

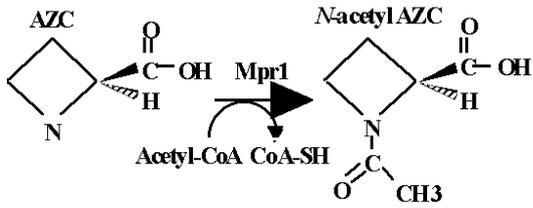
【 0 0 9 1 】

6) プロリン蓄積型 - 変異型 M p r 1 導入酵母

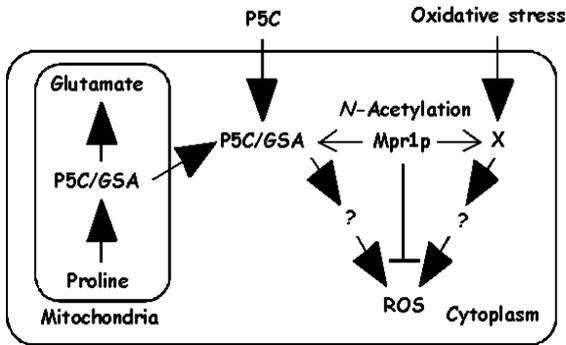
プロリン蓄積型酵母に各種変異型Mpr1を導入した酵母について、6mM過酸化水素下でのROSレベルの変化と生存率を測定した。結果を図14および15に示す。各変異型Mpr1を導入したプロリン蓄積型酵母では、細胞内ROSレベルが野生型Mpr1を導入したものよりも低く抑えられた。また生存率では、特にL117V変異型Mpr1を導入した株で、生存率の顕著な上昇が見られた。

30

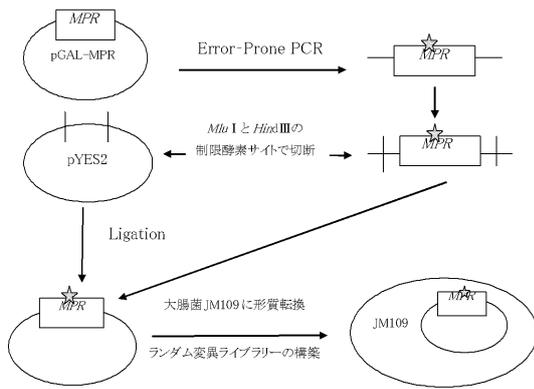
【図1】



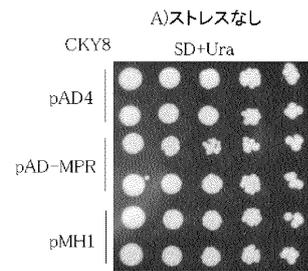
【図2】



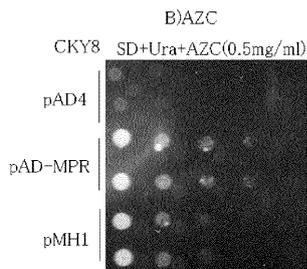
【図3】



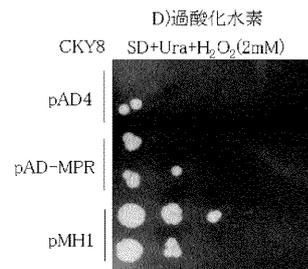
【図4A】



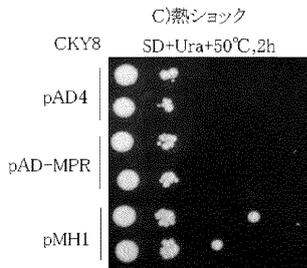
【図4B】



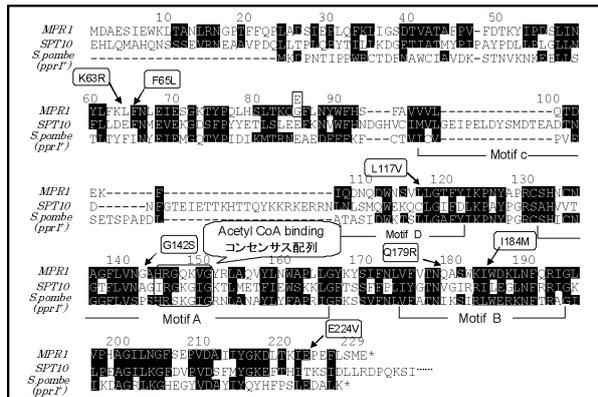
【図4D】



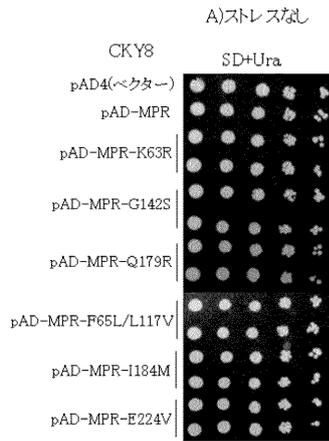
【図4C】



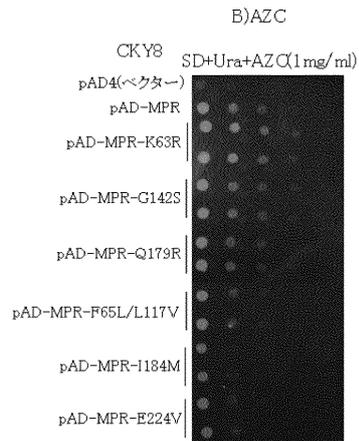
【図5】



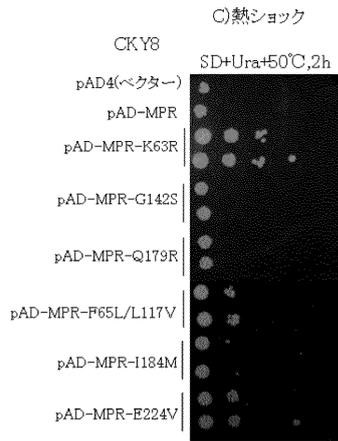
【図 6 A】



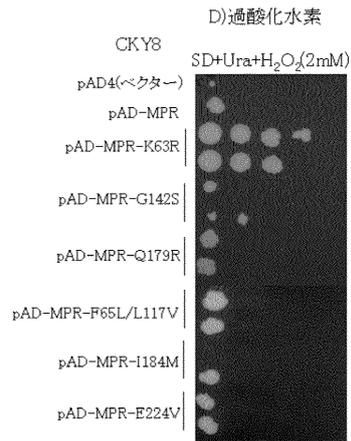
【図 6 B】



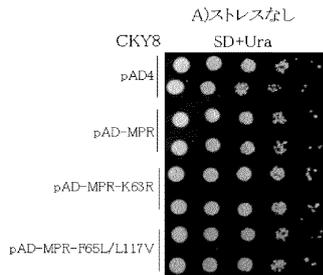
【図 6 C】



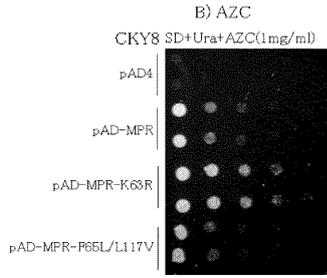
【図 6 D】



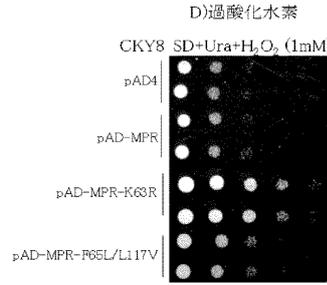
【図 7 A】



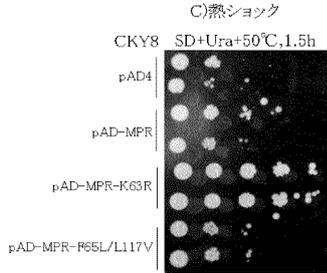
【 図 7 B 】



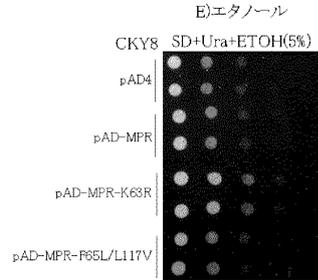
【 図 7 D 】



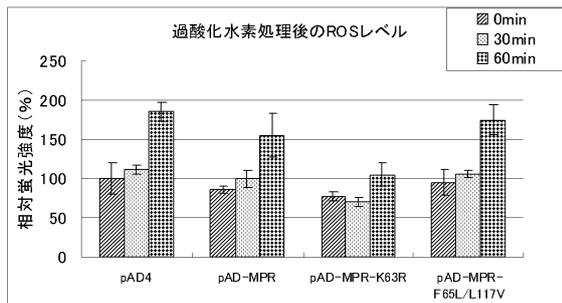
【 図 7 C 】



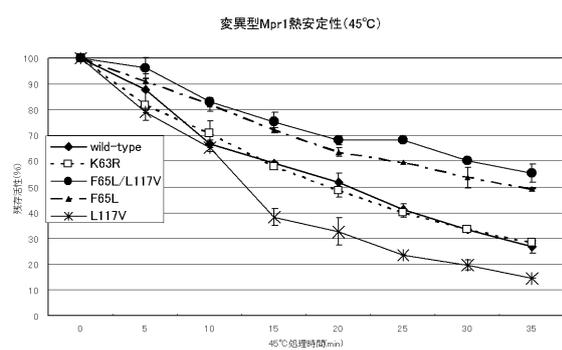
【 図 7 E 】



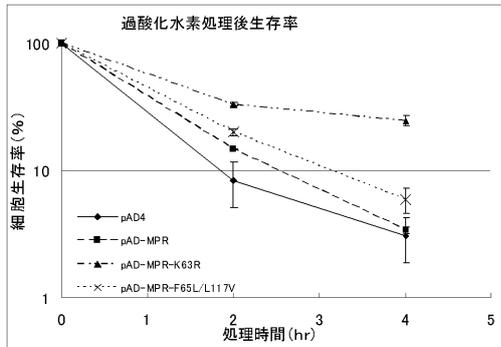
【 図 8 】



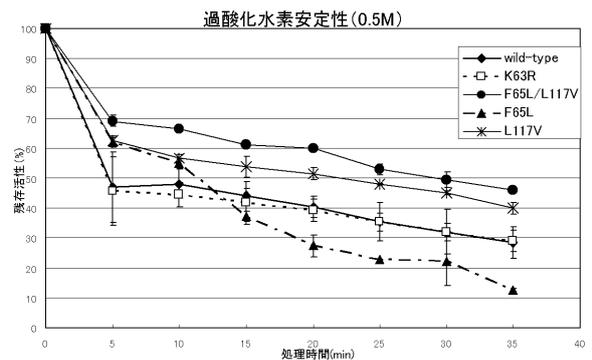
【 図 10 】



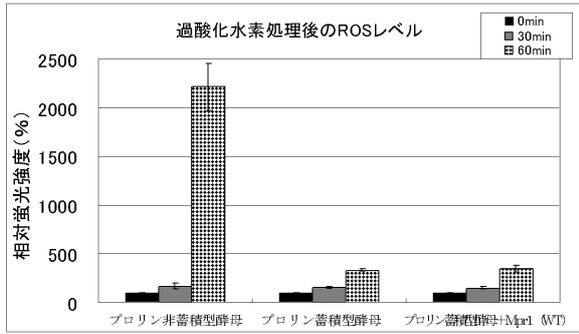
【 図 9 】



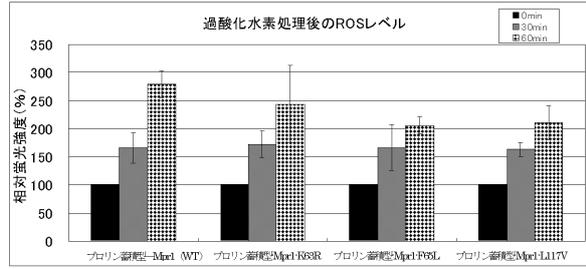
【 図 11 】



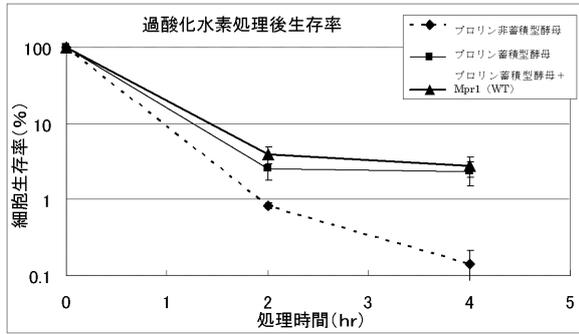
【 図 1 2 】



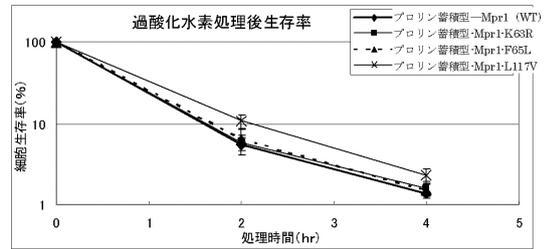
【 図 1 4 】



【 図 1 3 】



【 図 1 5 】



【 配列表 】

0005087775000001.app

フロントページの続き

特許法第30条第1項適用 平成18年2月28日福井県立大学主催の「平成17年度福井県立大学生物資源学部生物資源学科卒業論文発表会」において文書をもって発表

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成18年生物系特定産業技術研究支援センター「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)

(74)代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(72)発明者 高木 博史

奈良県生駒市高山町8916-5 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学内

審査官 佐藤 巖

(56)参考文献 伊井谷薫, 高木博史, 日本農芸化学会関西支部大会講演要旨集, 2006年10月23日, 2006年度, 第32頁C13

MORITA, Y. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003年, Vol.69, No.1, pp.212-219

SHICHIRI, M. et al., *J. Biol. Chem.*, 2001年, Vol.276, No.45, pp.41998-42002

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00-15/90

MEDLINE/CAPLus/BIOSIS/WPIDS(STN)

UniProt/GeneSeq

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)