

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18469

研究課題名(和文) 真正細菌の翻訳後アセチル化による翻訳制御機構の構成的な理解

研究課題名(英文) Synthetic approach for understanding the regulation of translation by post-translational lysine acetylation in bacteria.

研究代表者

榎原 琢哉 (Umehara, Takuya)

東京理科大学・基礎工学部生物工学科・助教

研究者番号：00415548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は真正細菌におけるリジンのアセチル化による翻訳制御を理解することを目的とした。大腸菌アラニル-tRNA合成酵素(AlaRS)の74番目のリジンのアセチル化は活性を大きく減弱させた。大腸菌の脱アセチル化酵素(CobB)は*in vivo*ではこのアセチル化を除去できたが、*in vitro*ではわずかであった。CobBがリボソームと相互作用するという報告に基づき、「AlaRS K74Acはリボソーム上で脱アセチル化される」という仮説を立てた。しかし、リボソームと相互作用しないCobB変異体の解析から仮説とは異なる結果が得られ、脱アセチル化に関わる新たな分子の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to understand a relationship of lysine (Lys) acetylation and translational regulation in bacteria. I focused on the acetylation introduced in Lys-74 position of alanyl-tRNA synthetase (AlaRS) in *E. coli* because the Lys is essential for the enzymatic activity. I incorporated an acetyllysine at the position by genetic code expansion technology with AckRS/tRNA(Pyl) pair. The activity of the mutant, AlaRS K74Ac was affected by the acetylation, high level of which was strongly impaired the activity *in vitro*. Although the acetylation was eliminated by deacetylase (CobB) *in vivo*, the deacetylation was a little *in vitro*. Based on the previous report that CobB interacts with ribosome, I hypothesized that this deacetylation might occur on ribosome. I constructed a strain expressing CobB mutant which does not interact with ribosome. Since the AlaRS K74Ac prepared from the strain was also deacetylated *in vivo*, it was suggested a different mechanism from my idea exists in *E. coli*.

研究分野：タンパク質翻訳

キーワード：翻訳後修飾 アセチル化 アミノアシル-tRNA合成酵素 翻訳制御

1. 研究開始当初の背景

翻訳後修飾は細胞内の様々な反応制御に関わり、真核生物のみで起こるというのが一般認識であった。しかし、近年の研究で原核生物でも数多く起こることが分かってきた。真核生物と原核生物の両者に共通する翻訳後修飾は進化的に保存された生命活動に重要な現象であると考えられ、タンパク質中のリジンのアセチル化はこのような修飾の一つであると言える。真核生物では多くの生体反応の制御に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。真正細菌では網羅的解析により多くのアセチル化タンパク質が同定され、大腸菌では約 900 種類ものアセチル化タンパク質が同定された。いくつかのタンパク質については解析が行われ、機能や細胞内での安定性を制御していることが示されている。更に培養条件に応じてアセチル化修飾の数や部位が変動することが示されている。従って、真正細菌のアセチル化も生体反応を制御するシグナルとして機能していることが示唆されているが、同定された多くのタンパク質でアセチル化の役割は分かっていない。

研究代表者はこれまでの研究で、大腸菌内でタンパク質の部位特異的にアセチルリジンを導入するシステムの構築に成功した。また、アミノアシル-tRNA 合成酵素(aaRS)の tRNA やアミノ酸に対する分子認識に関する研究を行ってきた。aaRS に注目して大腸菌のアセチローム解析の結果を調べたところ、多くの aaRS がアセチル化されていることが分かった。核酸結合性タンパク質中のリジン残基は核酸との結合に関わり、アセチル化の導入がタンパク質-核酸の相互作用に影響することが知られる。このことからアセチル化による aaRS の機能制御機構が存在すると推測した。

2. 研究の目的

本研究はアセチル化タンパク質再構成システムを用いて大腸菌の aaRS に導入されるリジンのアセチル化修飾を再構成して、アセチル化による aaRS の機能制御機構を解析し、真正細菌のアセチル化による翻訳制御やアセチル化ネットワークの理解へと展開するための分子基盤研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

大腸菌内でアセチル化されることが報告さ

れた aaRS のうち、結晶構造や生化学的解析からアセチル化による機能制御が示唆される AlaRS に注目した。アセチル化タンパク質再構成システムを用いて AlaRS の 74 番目に導入されるアセチル化を再構成し、アセチル化によるアラニル化活性とアセチル化を制御する因子の同定を行なった。

4. 研究成果

AlaRS の 74 番目のリジンに導入されるアセチル化が AlaRS の活性に与える影響を調べるため、遺伝暗号拡張法を用いて 74 番目にアセチルリジン(AcK)を導入した。AlaRS K74Ac が、大腸菌がもつ脱アセチル化酵素(CobB)の影響を受けるかどうかを調べるため、培地に CobB の阻害剤であるニコチンアミド(NAM)を添加した条件と、添加しない条件で発現させた変異体 AlaRS K74Ac (NAM+) と AlaRS K74Ac (NAM-)を調製した。抗 AcK 抗体によって AcK の導入を確認したところ両者においてアセチルリジンが検出されたが、その量は AlaRS K74Ac (NAM+)の方が多く、AlaRS K74Ac (NAM-)の方は細胞内で CobB により脱アセチル化されたと考えられた。そこで CobB 欠損株を作成し、その株を用いて AlaRS K74Ac (Δ CobB)を調製した。この変異体は AlaRS K74Ac (NAM+)と同程度のアセチル化が検出されたことから、K74 のアセチル化は CobB によって脱アセチル化されることが示唆された。

AlaRS K74Ac に加えて、AlaRS (WT)と K74A 変異体を調製し、tRNA^{Ala} に対するアラニル化活性を調べた。K74A 変異体は活性をもたないことが報告されている。AlaRS K74Ac (NAM+)と AlaRS K74Ac (Δ CobB)は K74A 変異体と同程度に大きく活性が低下した。一方、アセチル化量の少なかった AlaRS K74Ac (NAM-)は活性を中程度保持しており、アセチル化量の上昇に伴って AlaRS の活性が低下することを明らかにした。

CobB が AlaRS K74Ac を翻訳後に脱アセチル化しているかどうかを調べるため、試験管内脱アセチル化反応を行なった。CobB は N 末端配列の異なるイソフォーム、CobB-L と CobB-S が発現しており、両者に活性があることがサルモネラにおいて報告されている。近縁種である大腸菌も両酵素の発現が示唆されたため、CobB-L と CobB-S の発現と精製を試みた。

CobB-L についてはいくつかの条件を試したが精製することができなかった。一方、CobB-S の発現と精製に成功したため、CobB-S を用いて AlaRS K74Ac (Δ CobB) の脱アセチル化反応を行なった。その結果、脱アセチル化の効率は中程度であり、in vivo で得た結果とは異なっていた。このことから、CobB-L と CobB-S では標的とするアセチル化が異なり、CobB-L が K74Ac を脱アセチル化する可能性が示唆された。また、反応を促進するための他の因子の存在が示唆された。

CobB がリボソームと相互作用することが報告されていたことから、リボソームを介した K74Ac 変異体の脱アセチル化モデルを考えた。そのモデルを解析するためリボソームと相互作用しない CobB をもつ大腸菌株を作成した。その株を用いて K74Ac 変異体を取得した。モデルが正しいければ K74Ac は NAM を添加しない条件で発現させた K74Ac は脱アセチル化されないと推測した。しかし、脱アセチル化されることがわかり、研究代表者のモデルとは異なるメカニズムの存在が示唆された。

以上の解析から、AlaRS は 74 番目のリジンのアセチル化により活性制御を受け、その制御に CobB が関わっていることを明らかにできた。一方、その正しい制御には他の分子が関わっている可能性が示唆された。AlaRS は必須のタンパク質であるため、その活性の制御は翻訳制御につながると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Kana Tanizawa, Sayuri Uchida, Eri Kurihara, Takuya Umehara and Koji Tamura (2018) The kiss switch brings inactive R3C ligase ribozyme back to life. *Biology* 7, 7 査読有 DOI: 10.3390/biology7010007
- ② Takumi Yokosawa, Ryota Enomoto, Sho Uchino, Ito Hirasawa, Takuya Umehara and Koji Tamura (2017) A step into the RNA world: conditional analysis of hydrogel formation of adenosine 5'-monophosphate induced by cyanuric acid. *Biosystems* Vol.162, No. 53-58 査読有 DOI: 10.1016/j.biosystems.2017.09.004

- ③ Hidemichi Suzuki, Akihiro Kaneko, Taro Yamamoto, Mahoko Nambo, Ito Hirasawa, Takuya Umehara, Hisashi Yoshida, Sam-Yong Park and Koji Tamura (2017) Binding Properties of Split tRNA to the C-terminal Domain of Methionyl-tRNA Synthetase of *Nanoarchaeum equitans*. *J. Mol. Evol.* 84, 267-278 査読有 DOI: 10.1007/s00239-017-9796-6
- ④ Takahito Mukai, Ana Crnković, Takuya Umehara, Natalia Ivanova, Nikos Kyrpidis and Dieter Söll (2017) RNA-dependent cysteine biosynthesis in bacteria and archaea. *mBio* 8, e00561-17 査読有 DOI: 10.1128/mBio.00561-17
- ⑤ Markus Englert, Oscar Vargas-Rodriguez, Noah M. Reynolds, Yane-Shih Wang, Dieter Söll and Takuya Umehara (2017) A genomically modified *Escherichia coli* strain carrying an orthogonal *E. coli* histidyl-tRNA synthetase · tRNA^{His} pair. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 3009-3015 査読有 DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.03.003

[学会発表] (計3件)

- ① 根本隆作、田村浩二、榎原琢哉「大腸菌アラニル-tRNA 合成酵素の翻訳後アセチル化修飾による機能制御機構の解明」第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 2016 年
- ② 小山美樹、榎原琢哉、田村浩二「大腸菌アラニル-tRNA 合成酵素におけるアラニン活性化最小領域の探索」第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 2016 年
- ③ 根本隆作、田村浩二、榎原琢哉「大腸菌アラニル-tRNA 合成酵素に導入される翻訳後アセチル化修飾の解析」東京理科大学 研究推進機構 総合研究院 アグリ・バイオ工学研究部門 「アグリ・バイオ公開シンポジウム」東京理科大学 葛飾キャンパス 図書館ホール 2016 年

6. 研究組織

(1)研究代表者

榎原 琢哉(UMEHARA, Takuya)
東京理科大学・基礎工学部・生物工学科・助教
研究者番号:00415548

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし