

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580105

研究課題名（和文） 細菌におけるタンパク質アセチル化の探索とその生理的意義の解明

研究課題名（英文） Proteomic approach for identification of lysine acetylation in bacteria

研究代表者

古園 さおり (KOSONO SAORI)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：90321760

研究成果の概要（和文）：

細菌におけるタンパク質（リジン）アセチル化の意義の解明を目的とした。枯草菌を対象としたアセチル化タンパク質の網羅的同定（アセチローム解析）を行い、代謝酵素、翻訳関連因子、必須タンパク質を含む約120のアセチル化タンパク質を見いだした。また、対数期で強くアセチル化されるタンパク質として翻訳伸長因子 EF-Tu を同定した。EF-Tu の脱アセチル化酵素を同定し、またアセチル化酵素として複数の候補を得た。EF-Tu のアセチル化は、培地条件によって大きく変化することを見いだした。また、アミノ酸発酵生産菌として知られるコリネバクテリウム菌のアセチローム解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

To understand biological significance of protein (lysine) acetylation in bacteria, we performed acetylome analysis in *Bacillus subtilis*. We identified 145 acetylated peptides that matched to 120 proteins, which are involved in metabolism and translation as well as essential functions. We identified elongation factor (EF)-Tu as a major acetylated protein, acetylation level of which is differentially regulated in growth phases and medium conditions. We also performed acetylome analysis in *Corynebacterium glutamicum*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：タンパク質アセチル化、アセチローム、代謝酵素、翻訳関連因子、リジン脱アセチル化酵素、リジンアセチル化酵素、枯草菌、コリネバクテリウム菌

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリジン残基におけるアセチル化は、リン酸化やメチル化と並ぶ重要なタンパク質翻訳後修飾であり、タンパク質の活性や安定性、局在性を制御する。真核生物におけるアセチル化の主な役割として、核ではヒストンや転写因子のアセチル化が転写調節やエピジェネティクスに関与することや、細胞質ではチューブリンや Hsp90 のアセチル化が運動性やストレス応答に関わることが知られている。2006 年のほ乳類細胞を対象としたタンパク質アセチローム解析で、ミトコンドリア局在の多くの代謝酵素にアセチル化が見いだされていたが、その生物学的意義は当時まだ明らかではなかった。しかしながら、ミトコンドリアサーチュイン(NAD⁺依存性脱アセチル化酵素)の発見と併せて、ミトコンドリアにおけるアセチル化が栄養代謝の制御、さらには寿命や老化との関連において当時注目されていた。

タンパク質アセチル化は、リジンアセチル化酵素 (KAT) とリジン脱アセチル化酵素 (KDAC) により可逆的に制御される。KAT や KDAC がアセチル CoA や NAD⁺などのメタボライトを利用することから、タンパク質アセチル化は栄養シグナルに応答したタンパク質制御に関わると考えられる (図 1)。ミトコンドリアで多数のアセチル化タンパク質が発見された事実を受け、ミトコンドリアと共通の進化的祖先を持つバクテリアでもタンパク質アセチル化制御の存在が示唆されていた。真核生物の KDAC ホモログが当時は機能未知遺伝子としてバクテリアゲノムに広く保存されていた事実もまた、上記の考えを支持した。そこで本研究では、バクテリアにおけるタンパク質アセチル化の意義を明らかにすることを目指した。

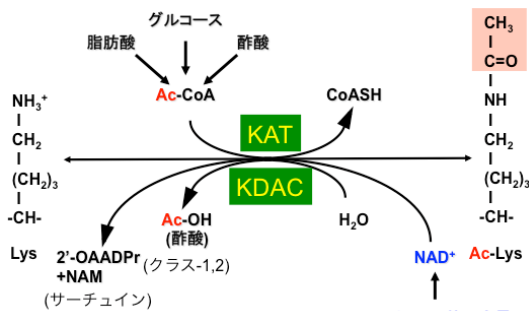


図 1 タンパク質アセチル化制御

2. 研究の目的

本研究では、バクテリアにおけるタンパク質アセチル化の意義を明らかにする目的で、ゲノミクスの手法や遺伝学が利用できる枯草菌を対象に、アセチル化タンパク質の網羅的同定 (アセチローム解析) とアセチル化の

機能解析を目指した。また、アセチル化制御に関わるリジンアセチル化酵素とリジン脱アセチル化酵素の同定と機能解析を行った。

3. 研究の方法

アセチル化タンパク質の検出は、市販の抗アセチルリジン抗体を用いたウェスタンブロットにより行った。

プロテオミクスによるアセチル化タンパク質の同定 (アセチローム解析) は、対数期の枯草菌菌体から調製した粗タンパク質液をトリプシン消化後、抗アセチルリジン抗体を用いた免疫沈降によりアセチルリジン残基を含むペプチドを回収し、HPLC/MS/MS に供してペプチド配列及びアセチル化部位を同定した。

タンパク質アセチル化の確認は、候補タンパク質の C 末側に Flag-Flag-His₆ アフィニティタグを付加した融合タンパク質を枯草菌ゲノムの *amyE* 部位で発現させ、抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降と抗アセチルリジン抗体を用いたウェスタンブロットにより行った。

MS 解析により同定されたアセチル化部位については、アセチル化不能変異 (KR 変異) やアセチル化模倣変異 (KQ 変異) を導入して、アセチル化レベルへの影響を評価した。

枯草菌の KDAC として、クラス 1,2 型の *AcuC* とクラス 3 型 (サーチュイン) の *SrtN* が存在する。それぞれネオマイシン及びスペクチノマイシン耐性遺伝子を用いて破壊株を作成した。アセチルトランスフェラーゼ (GNAT) モチーフを持つアセチル化酵素の候補は、枯草菌ゲノムに 40 以上存在する。そのうち NBRP 枯草菌事業 (NIG) の遺伝子破壊株コレクションから破壊株を入手できるものについては、これを利用した。

抗 EF-Tu 抗体の作成は、抗原性を示すと予想される EF-Tu ペプチドを抗原としてウサギに免疫し作成した。

4. 研究成果

(1) アセチローム解析

アセチローム解析により、約 120 の枯草菌由来タンパク質に一致する 145 のアセチル化部位を同定した (表 1)。アセチル化タンパク質の内訳として、代謝酵素が最も多く、次いでリボソームタンパク質など翻訳関連因子が多かった。そのほか、必須タンパク質や機能未知タンパク質も含まれていた。また傾向として、同一経路の反応を触媒する代謝酵素や複合体を形成するサブユニットにアセチル化が見いだされた。タンパク質の一次構造におけるアセチル化部位の位置を調べたところ、活性中心の近傍のほか、活性中心や機能ドメインから離れた位置にもアセチル化部位が見いだされた。後者は、アロステリッ

クな役割を持つと考えられた。代表的な翻訳後修飾であるリン酸化プロテオームと比較すると、枯草菌では約 80 のリン酸化タンパク質が同定されており、アセチル化はリン酸化に匹敵するメジャーな翻訳後修飾であると考えられた。

表 1 枯草菌アセチル化タンパク質の内訳

Classification	No. of proteins
Metabolic processes	35
Translation	28
Transcription	8
DNA metabolism	7
Cell wall and cell division	6
Adaptation and detoxification	5
Transport and membrane bioenergetics	5
RNA metabolism and modification	2
Protein folding	2
Sporulation and germination	2
Others	20
Total	120

(2) 枯草菌の主要なアセチル化タンパク質 (p47) の解析

枯草菌の対数期で強くアセチル化されるタンパク質 (p47) を見出した (図 2)。MS 解析及び特異的抗体を用いた解析から、p47 タンパク質は翻訳伸長因子 EF-Tu (TufA) であると同定した。MS 解析の結果から、8 カ所のアセチル化部位を同定した。

EF-Tu は定常期に入るとすみやかに脱アセチル化された。脱アセチル化酵素欠損株 $\Delta acuC$ 、 $\Delta srtN$ 、 $\Delta acuC\Delta srtN$ のいずれにおいても定常期での EF-Tu アセチル化レベルの低下が抑制されたことから、AcuC と SrtN の両方が EF-Tu の脱アセチル化に関わると考えられた。一方、約 40 の KAT 遺伝子破壊株コレクションを用いて EF-Tu のアセチル化レベルを指標にアセチル化酵素を探索したところ、複数のアセチル化酵素の関与が示唆された。

EF-Tu のアセチル化は、2xSG、L、MM-グルコース培養の対数期で見られたが、MM-コハク酸や MM-クエン酸培地では見られなかった。

AcuC はアセチル CoA 合成酵素 Acs の KDAC として最初に同定され、カタボライト制御因子 CcpA の制御下にあることがすでに報告されている。対数期などグルコース存在下では *acuC* 発現は CcpA による負の制御を受け、定常期では CcpA 抑制が解除され発現が誘導される。また、定常期では NAD⁺/NADH 比が上昇し、これがクラス 3 型 KDAC である SrtN を活性化すると考えら

れる。結果として、定常期においては AcuC と SrtN の両方が活性化され、EF-Tu の脱アセチル化が進行すると考えられる (図 3)。EF-Tu 機能に及ぼすアセチル化の役割については今後の課題であり、現在 8 カ所のアセチル化部位変異体を作成し解析を進めている。

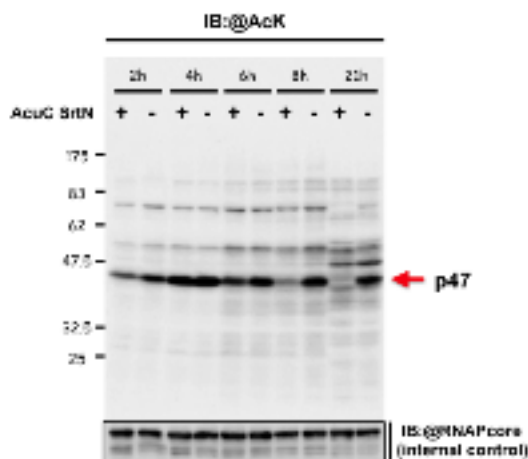


図 2 p47 のアセチル化パターン

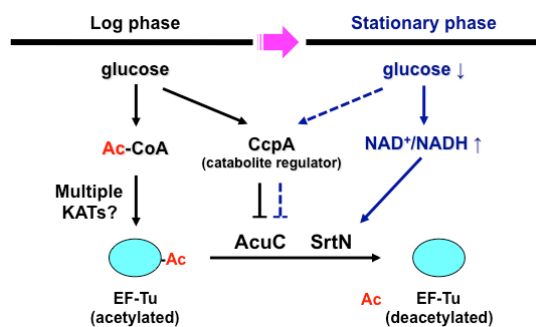


図 3 翻訳伸長因子 EF-Tu のアセチル化

(3) KAT/KDAC の機能解析

枯草菌におけるタンパク質アセチル化の生物学的役割を知る目的で、KDAC 二重欠損株の表現型を調べた。L 及び 2xSG 胞子形成培地での増殖や胞子形成能は、野生株と比べて差は見られなかった。グルコース培地での長期培養では、定常期での viability の低下が野生株よりも早く起こることが観察され、このとき二重欠損株の培養液中には酢酸が蓄積していた。これは、KDAC 二重欠損株では酢酸利用に関わるアセチル CoA 合成酵素 Acs がアセチル化されたままで活性化されないことに起因するものと考えられた。また、KDAC 二重欠損株は、定常期からの再増殖が野生株よりも遅れることが観察された。

40 の KAT 遺伝子破壊株コレクションについて、L 及び 2xSG 培地における増殖が野生株と顕著な差を示すものは見られなかった。

(4) コリネバクテリウム菌のアセチローム解析

コリネバクテリウム菌は、旨み成分であるL-グルタミン酸の発酵生産に利用される細菌である。Tween-40によるグルタミン酸生産誘導条件では、非誘導条件と比べて、全体のアセチル化レベルが抑制されることを見いだした。グルタミン酸過剰生産時の代謝変換に関わるタンパク質アセチル化を明らかにする目的で、アセチローム解析を実施した。その結果、約60のアセチル化タンパク質を同定した。その中にはグルタミン酸生産に関連する代謝酵素も含まれていた。特に、グルタミン酸生成と関連が深い2-オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体サブユニットにアセチル化を見出した。

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1件)

- ① 松田(古園)さおり、伊藤昭博、吉田稔、アセチローム解析から見えてきたタンパク質修飾の新しい意味—ヒストン修飾を超えて代謝・細胞機能に及ぼす作用、実験医学、29:2153-2158、2011、査読無

[学会発表] (計8件)

- ① 齋藤奏、久保翔世、川崎寿、古園さおり、吉田稔、*Corynebacterium glutamicum*のPDH/ODH活性制御におけるタンパク質アセチル化の関与、日本農芸化学会2012年度大会、2012年03月25日、京都市
- ② 古園さおり、鈴木健裕、堂前直、吉田稔、枯草菌の主要なアセチル化タンパク質(p47)の解析、日本農芸化学会2012年度大会、2012年03月23日、京都市
- ③ 松田-古園さおり、吉田稔、バクテリアにおけるリジンアセチル化制御、極限環境生物学会2011年度(第12回)年会、2011年11月28日、長崎市
- ④ 松田-古園さおり、吉田稔、枯草菌の主要なアセチル化タンパク質(p47)の解析、平成23年度(2011年度)グラム陽性菌ゲノム機能会議、2011年8月25日、福山市
- ⑤ KOSONO, Saori, Acetylome analysis in *Bacillus subtilis*, 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月9日、神戸市
- ⑥ 古園さおり、細菌のアセチローム解析、第4回ゲノム微生物学会若手の会、2010年10月1日、神戸市
- ⑦ 古園さおり、枯草菌のアセチローム解析、2010年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、

2010年9月2日、南木曾町

- ⑧ 古園さおり、枯草菌におけるタンパク質アセチル化、2009年グラム陽性菌ゲノム機能会議、2009年9月4-5日、神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古園 さおり (KOSONO SAORI)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：90321760

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鈴木 健裕 (SUZUKI TAKEHIRO)

独立行政法人理化学研究所・バイオ解析チーム・技師

研究者番号：60415198

平井 剛 (HIRAI GO)

独立行政法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・専任研究員

研究者番号：50359551