

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650008

研究課題名(和文) 免疫親和性を利用したタンパク質アシル化の網羅的解析法の開発

研究課題名(英文) Development of systematic approaches to explore protein acylation using immunoaffinity

研究代表者

増井 良治 (Masui, Ryoji)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40252580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：質量分析計を用いたプロテオミクス的手法に免疫沈降法を組み合わせることにより、*T. thermophilus* HB8のリシン残基のアシル化プロテオーム解析を行った。その結果、アセチル化部位197箇所(128個の蛋白質)、プロピオニル化部位361箇所(183個の蛋白質)、スクシニル化部位18箇所(14個の蛋白質)を同定した。特に、プロピオニル化が広範に存在することをはじめて明らかにした。さらに、増殖相や栄養源によってアシル化の種類や数が変動することが分かった。さらに他4種の細菌についてもアシル化プロテオーム解析を行い、アシル化の多寡が生物種ごとに異なることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Using a proteomics approach in combination with immunoprecipitation, we identified 197 lysine acetylation sites from 128 proteins, 361 lysine propionylation sites from 183 proteins, and 18 succinylation sites from 14 proteins in *Thermus thermophilus* HB8, an extremely thermophilic eubacterium. It was demonstrated for the first time that lysine propionylation is a prevalent post-translational modification. The types and numbers of acylation sites varied depending on the growth phase and carbon source. In addition, acylproteome analysis for other four bacteria revealed that abundance of these acylation varied by species and suggested that different acylation are regulated separately and may serve different functions. Mapping of the acylation sites on the structures proposed the likely regulatory function of these post-translational modification.

研究分野：蛋白質化学

キーワード：プロテオーム 蛋白質 シグナル伝達 発現制御 細菌

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の翻訳後修飾は、タンパク質の構造や機能を変化させることにより、ゲノムにコードされている配列情報を超えたタンパク質の複雑性・多様性をもたらす。これまでに、酵素の活性や代謝回転、タンパク質間相互作用、シグナル伝達の調節、DNA 修復などに翻訳後修飾が大きく関わることが知られている。このように、細胞内におけるタンパク質の翻訳後修飾部位の同定およびその変動を解析することは、ポストゲノム時代における重要な課題の1つとなっている。

リン酸化については、リン酸化ペプチドを選択的に濃縮する方法が開発されており、質量分析法の発展ともあいまって、同定されたリン酸化部位の数は急増した。一方、リシン残基のアシル化については効率のよいアシル化ペプチドの濃縮方法の開発が遅れており、その研究は大きく遅れている。

そこで、アシル化リシンを含むペプチドを自作し、それらに対する抗体を利用すれば、より効率よくアシル化ペプチドを濃縮できるはずだと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、まずアシル化ペプチドに対する抗体を利用してタンパク質のアシル化を網羅的に同定する方法を開発することである。具体的な研究項目は以下の通りである。

まず、リシン残基を化学的にアシル化したペプチド群を抗原として独自に調製した抗アセチル化リシン抗体を用いて、細菌細胞内からアセチル化リシン含有ペプチドを選択的に濃縮し、質量分析によりアシル化部位を同定する。その結果を市販の抗アセチル化リシン抗体を用いた場合と比較し、その有効性を検証する。

次に、プロピオニル化やスクシニル化されたリシンについても同様の方法で抗体を作製する。それを用いて、細胞内からアシル化リシン含有ペプチドの選択的濃縮および修飾部位の同定を行い、アシル化部位の効率的な同定方法を確立する。

この確立した方法を用いて、複数種のバクテリアを対象にアシル化プロテオーム解析を行い、各アシル化の分布ならびにアシル化部位の共通点と相違点を明らかにする。また、アシル化部位を蛋白質の立体構造上にマッピングすることにより、細胞活動に対するタンパク質のアシル化の機能を推定する。

さらに、培養条件を変えた細胞のアシル化プロテオーム解析によって、細胞内の代謝状態がアシル化に与える影響を解明する。

3. 研究の方法

(1) 抗アシル化リシン抗体の作製

多様な配列をもつアシル化ペプチドを調製するため、キャリアー蛋白質としてウシ血清アルブミン (BSA) を用いた。アセチル化

の場合、過剰量の無水酢酸とBSAを反応させ、リシンが十分に修飾された後にプロテアーゼで断片化し、得られたアセチルリシン含有ペプチドの混合物を抗原として、抗アセチルリシン抗体を作製した。スクシニル化とプロピオニル化についても、無水コハク酸と無水プロピオン酸を用いて、アセチル化と同様の方法で抗アシル化リシン抗体を作製した。

(2) 抗体によるアシル化ペプチドの単離

作製した抗アシル化リシン抗体 (抗血清) を固定化したビーズを、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 の細胞破砕液から調製したトリプシン消化物と混合し、ビーズに吸着したペプチドを溶出した。得られたペプチドを脱塩、濃縮したのち、nano-LC と接続したESI-Q-TOF型質量分析装置によってタンデムMS解析を行い、アセチル化部位を同定した。その結果に基づいて、それぞれの抗アシル化リシン抗体によって各アシル化ペプチドが選択的に濃縮されているかを評価した。

(3) アシル化プロテオーム解析

高度好熱菌を対象として、抗アシル化リシン抗体を用いたアシル化タンパク質およびそのアシル化部位を同定した。得られた結果について再現性の確認も行った。アシル化されていたタンパク質についてのカテゴリー分類、さらにアシル化部位の立体構造上の分布の比較などを行い、細胞機能に対するアシル化の働き、またアシル化の種類ごとの特性の有無を検討した。

(4) 生物界におけるアシル化の分布

プロピオニル化やスクシニル化が生物界にどれくらい広く分布しているかを検証するため、高度好熱菌以外の複数の細菌種についてアシル化プロテオーム解析を行った。さらに培地の炭素源を変えた場合に、アシル化の修理や数、分布がどのように変化するかを解析した。

4. 研究成果

(1) 高度好熱菌のアセチル化プロテオーム解析

質量分析計を用いたプロテオミクス的手法に免疫沈降法を組み合わせることにより、*T. thermophilus* HB8 の128種類の蛋白質において、197箇所 のLysアセチル化部位と4箇所 のN末端アセチル化部位を同定した (Okanishi, 2013)。市販の抗アセチル化抗体よりもはるかに多くのアセチル化部位を同定することができたことから、この方法の有効性が証明できた。

BLASTを用いたオーソログの探索により、生物種間で保存性の高い蛋白質が修飾を受けることがわかった。またアセチル化された蛋白質を機能分類することにより、この翻訳後修飾は、解糖系・TCA回路を含む代謝や翻訳、ストレス応答に深く関わることが示唆さ

れた。アセチル化を受ける Lys 近傍のアミノ酸残基を調べたところ、グルタミン酸残基の存在確率が高かった。

次に、立体構造情報を利用して、同定されたアセチル化部位の大部分を *T. thermophilus* HB8 のタンパク質やホモログの立体構造にマッピングすることができた (図 1)。もう一つの主要な翻訳後修飾であるリン酸化の部位と比べて、アセチル化部位はヘリックスやシートなどの二次構造に多かった。また、蛋白質表面の静電的相互作用や水素結合を形成する位置に存在する Lys がアセチル化されやすいことが示された。さらに、22 箇所のアセチル化部位について、蛋白質の機能に重要な Lys であることがわかり、リガンド結合、蛋白質-蛋白質相互作用、蛋白質-RNA 相互作用、Schiff-base 形成に参与するアセチル化を介した制御機構が示唆された。

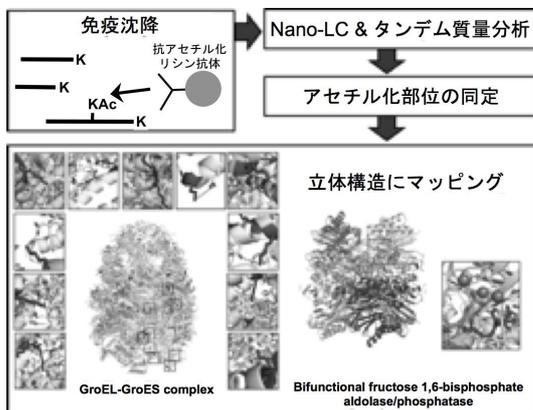


図 1 アセチル化部位の同定

(2) 高度好熱菌のプロピオニル化プロテオーム解析

自作した抗プロピオニル化リシン抗体を用いて、*T. thermophilus* HB8 の 183 種類のタンパク質について 361 箇所のプロピオニル化部位を同定した (Okanishi, 2014)。これだけ多数のプロピオニル化が生体内に存在することはこれまで知られておらず、翻訳後修飾としてのプロピオニル化がアセチル化と同様に広範に存在することが本研究によって初めて明らかとなった。プロピオニル化を受けるタンパク質は代謝や翻訳、シャペロンなどの様々な機能に関わるものが特に多く、解糖系や TCA 回路の代謝酵素がこの修飾を受けていた。

同定したプロピオニル化部位の数は、対数増殖期よりも定常期で多く、両方で共通に見られたプロピオニル化部位は 47 箇所 (40 タンパク質) と少なかった (図 2)。特に、定常期で同定したプロピオニル化部位の多くは定常期に特異的だった。このことは、プロピオニル化が増殖相に依存した代謝調節機構に関わっている可能性を示唆した。

また、プロピオニル化とアセチル化の両方を受けているタンパク質は 67 個であった。タンパク質の立体構造情報も活用しつつ、こ

れらの役割を考察したところ、プロピオニル化とアセチル化を受けた Lys 残基の多くは異なる位置に存在していた。これら 2 種類のアシル化は化学構造が類似しているが、その修飾反応は個別に制御されており、その違いを利用して異なる働きを担っている可能性が考えられた。

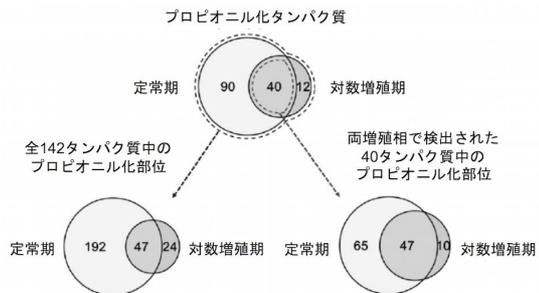


図 2 増殖相によるプロピル化部位の変動

(3) バクテリア 5 種のプロピオニル化プロテオーム解析

生物界におけるプロピオニル化の普遍性を調べるため、グラム陰性菌 3 種 (うち好熱菌 2 種)、グラム陽性菌 2 種 (うち好熱菌 1 種) の計 5 種のバクテリアについて、プロピオニル化の解析を行った。その結果、好熱性グラム陰性菌 *T. thermophilus* (129 箇所)、好熱性グラム陽性菌 *Geobacillus kaustophilus* (83 箇所) で多く見られたのに対し、グラム陽性菌 *Bacillus subtilis* (7 箇所)、グラム陰性菌 *Escherichia coli* (10 箇所)、好熱性グラム陰性菌 *Rhodothermus marinus* (2 箇所) では少なかった。この研究により、プロピオニル化がバクテリアに広く存在する翻訳後修飾であることが初めて示された。また、プロピオニル化の多寡と系統関係や生育温度との間には直接的なつながりはなく、近縁種でも異なる分布パターンを示した。

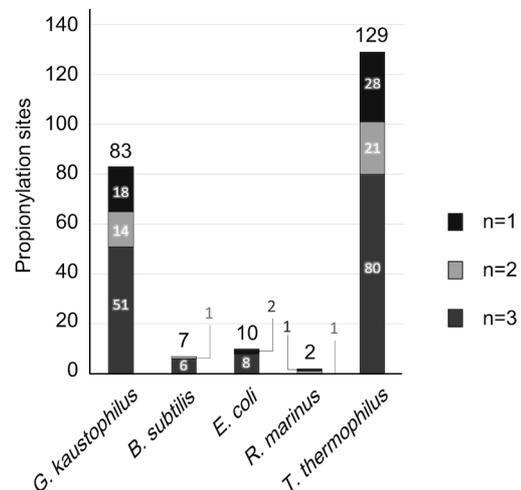


図 3 細菌 5 種で同定されたプロピオニル化部位

(4) バクテリア 5 種のスクシニル化プロテオーム解析

スクシニル化についても上記 5 種の細菌について同様の解析を行った。その結果、スクシニル化は、好熱菌 2 種では少なく、*G. kaustophilus* (65 箇所)、*B. subtilis* (84 箇所)、*E. coli* (123 箇所) に多く見られた。同一の手法を用いて種横断的に調べた結果として、同じアシル化であってもその分布に大きな違いがあることが明らかとなった。

同定されたスクシニル化およびプロピオニル化部位は代謝や翻訳に関わる蛋白質に多く見られたが、立体構造上にマッピングした結果、機能的に重要な部位がアシル化されている例が多く見られた。さらに詳しく調べると、プロピオニル化は酵素の活性部位に多く、スクシニル化は核酸の結合部位に多いという傾向が見られた。これらの結果は、プロピオニル化とスクシニル化が異なる制御を受けて独自の機能を持っていることを示唆した。さらに富栄養培地から栄養制限培地にすると、アシル化の種類や数が大きく変動することも判明した。

本研究を通じて、アシル化リシン特異的な抗体を用いた蛋白質アシル化の網羅的解析法を確立し、アセチル化以外のリシンアシル化がバクテリア界に広く存在することを明らかにした。

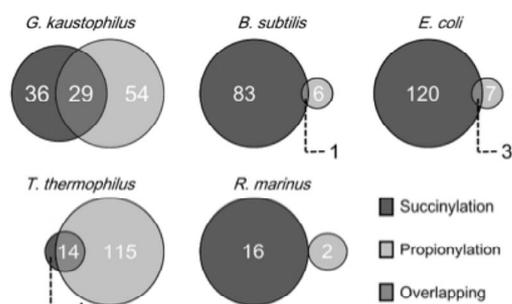


図 4 細菌 5 種におけるスクシニル化とプロピオニル化の比較

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 3 件)

Okanishi, H., Kim, K., Masui, R., Kuramitsu, S. (2014) Lysine propionylation is a prevalent post-translational modification in *Thermus thermophilus*. *Mol. Cell. Proteomics*, **13**(9), 2382–2398. 査読あり

DOI: 10.1074/mcp.M113.035659

Masui, R., Takahata, Y., Inoue, M., Iio, Y., Okanishi, H., Kim, K., Nakagawa, N., Yura, K., Kuramitsu, S. (2014) Structural insights of post-translational modification sites in the proteome of *Thermus thermophilus*. *J. Struct. Funct. Genomics*, **15**(3), 137–151. 査読あり

DOI: 10.1007/s10969-013-9169-3

Okanishi, H., Kim, K., Masui, R., Kuramitsu, S. (2013) Acetylome with structural mapping reveals the significance of lysine acetylation in *Thermus thermophilus*. *J. Proteome Res.*, **12**(9), 3952–3968. 査読あり

DOI: 10.1021/pr400245k

[学会発表](計 8 件)

岡西広樹, 金光, 倉光成紀, 増井良治 (2015) 蛋白質翻訳後修飾は、真核・原核生物に広く存在する：とくに新規プロピオニル化について. 第 5 回モデル生物丸ごと一匹学会, 2015 年 12 月 19 日, 大阪大学豊中キャンパス (大阪・豊中市)

岡西広樹, 金光, 倉光成紀, 増井良治 (2015) 生物に広く存在する翻訳後修飾としての Lys 残基プロピオニル化の発見. 日本プロテオーム学会 2015 年会, 2015 年 7 月 23 日, くまもと森都心プラザ (熊本県・熊本市)

岡西広樹, 金光, 増井良治, 倉光成紀 (2015) 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 におけるアシル化プロテオーム解析：生体内に広く存在する翻訳後修飾としてのプロピオニル化の発見. 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015 年 6 月 25 日, 徳島県あわぎんホール (徳島県・徳島市)

岡西広樹, 金光, 増井良治, 倉光成紀 (2014) バクテリアにおける翻訳後修飾：高度好熱菌におけるアシル化プロテオーム解析. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 17 日, 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

増井良治, Kwang Kim, 高畑良雄, 岡西広樹, 井上真男, 飯尾洋太, 中川紀子, 由良 敬, 倉光成紀 (2014) バクテリア蛋白質における翻訳後修飾部位の立体構造的解析. 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014 年 6 月 27 日, 横浜産貿ホールマリネリア (神奈川県・横浜市)

増井良治, Kwang Kim, 高畑良雄, 岡西広樹, 井上真男, 飯尾洋太, 中川紀子, 由良 敬, 倉光成紀 (2014) バクテリア蛋白質における翻訳後修飾部位の立体構造的解析. 第 61 回日本生化学会近畿支部例会, 2014 年 5 月 17 日, 京都産業大学 (京都府・京都市)

Okanishi, H., Kim, K., Iio, Y., Masui, R., Kuramitsu, S. (2013) Protein acetylation in *Thermus thermophilus* HB8: One of the prevalent post-translational modifications in prokaryotes. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 6 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

Masui, R., Kim, K., Takahata, Y., Okanishi, H., Inoue, M., Iio, Y., Nakagawa, N., Shinkai, A., Yokoyama, S., Kuramitsu, S. (2013) Structural genomics of *Thermus thermophilus* HB8: Post-translational modification sites. 2013 年度酵素補酵素研究会, 2013 年 6 月 22 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県・草津市)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

増井 良治 (MASUI, Ryoji)
大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：4 0 2 5 2 5 8 0

(2)研究分担者