

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870113

研究課題名(和文) 高度好熱菌のタンパク質アシル化修飾による代謝制御機構に関する研究

研究課題名(英文) Metabolic regulation via protein acylation in *Thermus thermophilus*

研究代表者

吉田 彩子 (Yoshida, Ayako)

東京大学・生物生産工学研究センター・特任助教

研究者番号：90633686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質アシル化修飾について、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 を対象に網羅的解析により修飾タンパク質を同定した。同定されたタンパク質のうちロイシン生合成酵素である 2-isopropylmalate synthase に着目したところ、変異体解析からこの酵素がアシル化修飾によって活性や反応特異性が調節される可能性が示された。

またタンパク質アセチル化酵素の解析から、アセチル化の基質タンパク質として CoA transferase が同定された。この酵素の相互作用タンパク質も見出され、アセチル化とタンパク質間相互作用による新たな CoA 体代謝調節機構の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The proteomic analysis revealed that a lot of proteins were acetylated and succinylated in *Thermus thermophilus* HB27. 2-isopropylmalate synthase (IPMS), which catalyzes the first step of leucine biosynthesis, is both acetylated and succinylated. The acylation-mimic mutant showed the lower activity and changed the substrate specificity. We suppose that the acylation on IPMS may regulate the flux of branched-chain amino acids.

The analysis of protein lysine acetyltransferase (KAT) from *T. thermophilus* identified the CoA transferase as an acetylation substrate of KAT. Since this CoA transferase uses Acetyl-CoA, which is a substrate of KAT, suggesting that the acetylation of CoA transferase regulates CoA metabolism depending on the concentration of Acetyl-CoA. Moreover, we found the protein interacting with this CoA transferase, suggesting that the activity of CoA transferase is regulated in a complex manner including protein acylation and regulatory protein binding.

研究分野：応用微生物学

キーワード：タンパク質アシル化修飾 タンパク質アセチル化酵素 アミノ酸代謝 CoA体代謝 代謝調節 タンパク質間相互作用

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質翻訳後修飾の一つであるリジンアセチル化は、これまでヒストンアセチル化などで広く研究されてきたが、プロテオミクス技術の発展により、核を持たないバクテリアにおいても多くのタンパク質がアセチル化を受けていることが見出されている。中でも代謝酵素に多くのアシル化修飾が見られ、また、アセチル化酵素 (KAT) の基質に Acetyl-CoA、脱アセチル化酵素 (KDAC) の基質に NAD<sup>+</sup> といった鍵代謝産物が用いられることから、タンパク質アセチル化修飾が新たな代謝調節機構としての役割を持つことが示唆されている (図 1)。また、アセチル化のみならず、スクシニル化などの他の短鎖アシル化修飾も発見され、それらの修飾の役割の違いなどにも興味を持たれる。網羅的解析により、多くのタンパク質がアシル化修飾を受けることが明らかとなっている一方、タンパク質アシル化レベルの制御機構や、アシル化修飾によるタンパク質の機能調節機構について詳細が明らかになっている例は少ない。

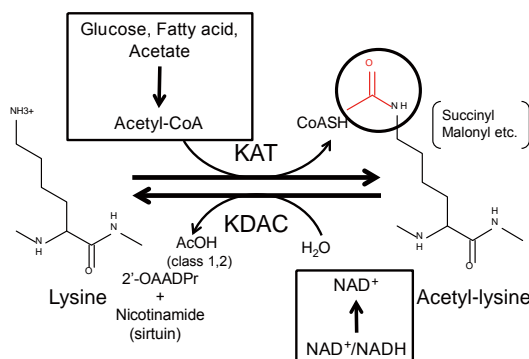


図 1. 酵素によるタンパク質の(脱)アセチル化

### 2. 研究の目的

個々のアシル化修飾を受ける代謝酵素における、その役割の詳細を調べ、その細胞内代謝における意義を明らかにすることは、タンパク質アシル化修飾の生理的意義を理解するために重要である。そこで、本研究では、遺伝子数が少ない、タンパク質の機能・構造解析がしやすい、遺伝子操作系が確立しているという利点を持った高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* を対象とし、アシル化修飾による代謝酵素の制御機構や、(脱)アシル化酵素によるアシル化修飾レベルの制御機構などを、生化学的・遺伝学的・構造生物学的手法を用いて明らかにし、*T. thermophilus* におけるタンパク質アシル化修飾の役割を包括的に理解することを目的とした。*T. thermophilus* は進化系統樹上古いとされ、そのゲノムサイズも小さいが、生命の維持に重要な遺伝子は保存されていると考えられる。本菌を対象とすることで、生物に普遍的なアシル化修飾による代謝調節機構を明らかにすることができると思われた。

### 3. 研究の方法

(1) *T. thermophilus* の代謝酵素におけるアシル化修飾による活性調節機構の解析

はじめに、*T. thermophilus* を対象としたタンパク質のアシル化修飾研究を行うに当たり、細胞内のリジン残基アセチル化及びスクシニル化修飾を受けるタンパク質を、抗アセチル化およびスクシニル化リジン抗体を用いた免疫沈降・LC-MS/MS 解析により、網羅的に同定した (アセチローム・スクシニローム解析)。アセチル化やスクシニル化はそれぞれの抗体を用いた Western blot を用いて検出した。

同定されたアシル化修飾タンパク質のうちアミノ酸代謝酵素に着目し、アシル化修飾を模倣した変異導入 (非修飾体: KR、アセチル化体: KQ、スクシニル化体: KE) 等により、*in vivo*、*in vitro* におけるアシル化修飾の酵素活性への役割を、遺伝生化学的手法を用いて解析した。さらに、アシル化修飾による活性制御機構を分子・原子レベルで明らかにするため、X 線結晶構造解析を試みた。

(2) アセチル化酵素の同定およびアセチル化を受けるタンパク質の機能解析

*T. thermophilus* におけるタンパク質アセチル化酵素 (KAT) を探索し、その KAT によりアセチル化されるタンパク質におけるアセチル化による制御機構を解析した。まず、KAT に共通のモチーフである GNAT モチーフを持つ 10 の KAT ホモログの破壊株を作製し、その細胞内タンパク質のアセチル化レベルを観察した。野生型と破壊株で顕著なアセチル化レベルの違いが見られるタンパク質を見出し、各種クロマトグラフィーにより精製に続く、MALDI-TOF-MS を用いたペプチドフィンガープリンティング法により、KAT によりアセチル化されるタンパク質を同定した。また、*T. thermophilus* の持つ 3 つの KDAC ホモログとの *in vitro* 反応により、脱アセチル化を担う KDAC の同定も行った。

このアセチル化修飾を受けるタンパク質のアフィニティタグ付き高発現株を作製し、pull-down assay と MALDI-TOF-MS により、相互作用タンパク質を同定した。

アセチル化を受けるタンパク質や KAT の機能解析は、それぞれの組換えタンパク質を用いた *in vitro* 酵素反応や、それぞれの破壊株を用いた生育試験等を用いて行った。

### 4. 研究成果

(1) *T. thermophilus* の代謝酵素におけるアシル化修飾による活性調節機構の解析

栄養培地と最少培地において、培養時間ごとのアセチル化・スクシニル化修飾レベルを検討した結果、どちらも栄養培地で定常初期に最大となることが分かった。そこで、これら培養抽出液に対してアセチローム及びスクシニローム解析を行ったところ、207 のアセチル化タンパク質 (335 のアセチル化部

位)と170のスクシニル化タンパク質(293のスクシニル化部位)を同定することができた。同定されたタンパク質の中では、代謝酵素に分類されるものがどちらも約4割と一番多く、アシル化修飾と代謝調節との関連が示唆された。

アシル化修飾を受けるタンパク質のうち、ロイシン生合成経路の初発反応を担う2-Isopropylmalate synthase (IPMS)とアノテーションされるTTC0849に着目した。その理由としては、1)これまでにアシル化修飾による酵素活性調節や代謝調節の存在が示唆されているのは、解糖系などの糖代謝中心であり、アミノ酸生合成経路ではあまり議論されていないこと、2)IPMSはロイシンによるフィードバック阻害を受けるが、アシル化修飾が活性発現のみならず、活性制御にも影響を与える可能性があること、3)IPMSはアセチル化の基質として用いられるAcetyl-CoAを基質として反応を行い、またロイシンなど分岐鎖アミノ酸はAcetyl-CoAやSuccinyl-CoAに分解され、CoA体バランスを介したアシル化修飾による活性制御の可能性が示唆されることが挙げられる。

TTC0849の*in vitro*, *in vivo*での機能解析を行ったところ、TTC0849はロイシン生合成のIPMSとして働きロイシンによるフィードバック阻害を受けることを示した。さらに、TTC0849はIPMS活性に加え、イソロイシン生合成の初発酵素であるCitramalate synthase (CMS)としても働くことが分かった。

網羅的解析により同定されたTTC0849のアシル化修飾リジン残基(図2)に模倣変異を導入したところ、IPMSのロイシンによるフィードバック阻害に重要だとされる、触媒ドメインと制御ドメイン間のリンカードメインに存在するK332が少なくとも活性に重要な残基であり、K332におけるアシル化修飾がIPMS活性に影響を与える可能性が示された。さらに野生型のTTC0849はIPMS活性をCMS活性に比べて二倍程度強く持つが、非修飾体模倣変異体であるK332Rでは、IPMS活性のみが低下し、IPMS活性とCMS活性がほぼ同程度となることが分かった。こ

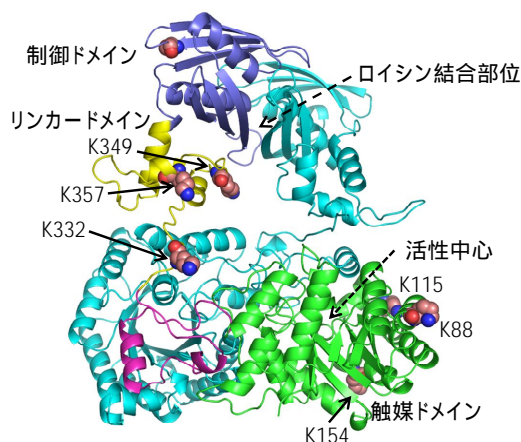


図2. TTC0849のアシル化修飾部位(モデル)

のことから、TTC0849におけるアシル化修飾が活性の強さのみならず、基質特異性も調節し、ロイシンとイソロイシンの生合成量の調節に関わることが示唆された。*T. thermophilus*細胞抽出液のスクシニル化レベルが分岐鎖アミノ酸の添加により上がるという現象も観察しており、細胞内のアミノ酸やCoA体の濃度に応じたアシル化修飾を介した分岐鎖アミノ酸生合成調節機構が存在すると考えている。

また、TTC0849のロイシン結合やアシル化修飾による制御の詳細を明らかにするため、結晶構造解析も試みた。これまでに3Å程度の反射を生じる結晶が得られており、今後の結晶化条件の最適化により、構造決定が期待できる。

## (2) アセチル化酵素の同定およびアセチル化を受けるタンパク質の機能解析

*T. thermophilus*の持つ10のKAT候補遺伝子の破壊株を作製し、栄養培地で培養後の細胞抽出液に対して抗アセチルリジン抗体を用いたWestern blotを行った。その結果、野生型で顕著にアセチル化されるタンパク質が、サルモネラや大腸菌でKATとして機能解析されているPatのホモログであるTTC1711の破壊株でアセチル化レベルが低下していることが分かった。このタンパク質を精製し、MALDI-TOF-MSにて分析したところ、CoA transferase (CoAT)としてアノテーションされるタンパク質を同定した。このCoA transferaseの破壊株では顕著なアセチル化が見られなくなることからも、TTC1711のアセチル化の基質となることが示された。また、3つのKDACホモログとの反応から、CoATの脱アセチル化を担うのはTTC0104であることが示された。

TTC1711の基質となるCoATはButyrateなどの短鎖脂肪酸とAcetyl-CoAを基質として、CoA moietyを転移する活性を持ち、破壊株の生育試験から少なくともButyrate資化に関与することが示唆された。しかしながら、KAT (TTC1711)との反応で調整したアセチル化体CoATを用いて同様の反応を行っても、活性に大きな差は見られなかった。そこで、アセチル化がタンパク質間相互作用に関与している可能性を考え、pull-down assayにより相互作用タンパク質の探索を行った。その結果Alanine dehydrogenaseとアノテーションされるタンパク質(AlaDH2)が見いだされ、モル比1:1でCoATと相互作用することを示した。しかし、CoATのアセチル化はAlaDH2との相互作用にも影響を与えなかった。

興味深いことに、*T. thermophilus*はAlanine dehydrogenaseホモログを2つ持ち、CoATと相互作用するAlaDH2はその活性を持たず、酵素としてではなくCoATの活性調節タンパク質として機能することが考えられた。一方で、基質となるアラニンやNAD(P)(H)の結合残基は保存されているため、これらの因子が



CoAT の活性に影響を与えることが考えられた。解析の結果、CoAT は AlaDH2 と NAD<sup>+</sup> 存在下で活性が低下することが分かった。現在この複合体形成時の NAD<sup>+</sup> による活性制御とアセチル化との関連について調べている。

KAT によるアセチル化を介した活性制御機構は Acetyl-CoA synthetase (ACS) で詳細に解析されている。ACS は酢酸から Acetyl-CoA を合成する酵素であり、Acetyl-CoA が細胞内に多く存在するときには、KAT により ACS の活性中心のリジン残基がアセチル化されることで不活性となり、Acetyl-CoA 合成量が調節される (図 3)。本研究で同定した KAT によりアセチル化される CoAT は ACS と同様に KAT や KDAC の基質や生成物を基質として用いることから、これらの濃度依存的にアセチル化されることで、酵素活性が制御され、細胞内の CoA 体レベルの調節に関わることが示唆される。さらに、CoAT はアミノ酸や補酵素を結合する活性調節タンパク質、AlaDH2 と相互作用することから、タンパク質間相互作用とアシル化修飾という二つの異なる機構が組み合わさった、CoA 体代謝調節機構が存在することが考えられた (図 4)。この制御機構の詳細やその細胞内での役割を明らかにするため、それぞれの破壊株の解析などを進めている。

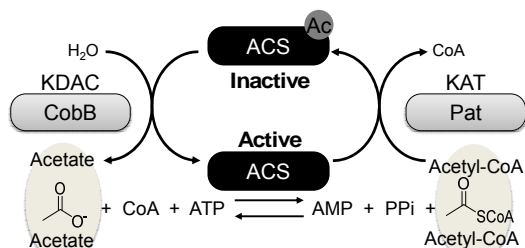


図 3. ACS のアセチル化による制御機構

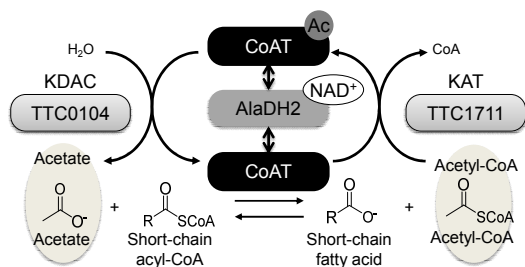


図 4. CoAT の制御モデル

また、CoAT や AlaDH2、それらの複合体の結晶構造の決定を試みた。CoAT、AlaDH2 の単独での結晶に加え、複合体の結晶も得られており、結晶構造決定により他に例を見ない CoAT の制御機構の詳細を明らかにできると考えている。

## 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 2 件)

1. Mizuno, Y., Nagano-Shoji, M., Kubo, S., Kawamura, Y., Yoshida, A., Kawasaki, H., Nishiyama, M., Yoshida, M., and Kosono, S. Altered acetylation and succinylation profiles in *Corynebacterium glutamicum* in response to conditions inducing glutamate overproduction. *MicrobiologyOpen*. 5: 152-73 (2016) doi: 10.1002/mbo3.320. 査読有

2. Kosono, S., Tamura, M., Suzuki, S., Kawamura, Y., Yoshida, A., Nishiyama, M., and Yoshida, M. Changes in the acetylome and succinylome of *Bacillus subtilis* in response to carbon source. *PLoS One*. 10: e0131169 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0131169. 査読有

[学会発表](計 7 件)

1. 山本寛之、吉田彩子、富田武郎、古園さおり、葛山智久、西山真  
*Thermus thermophilus* においてアセチル化を受ける CoA トランスフェラーゼの機能と制御機構の解析  
日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

2. 永野愛、山田鮎果、水野裕太、菊地正樹、白水美香子、梅原崇史、吉田彩子、吉田稔、西山真、古園さおり  
*Corynebacterium glutamicum* 由来ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) のアセチル化制御はグルタミン酸生産に重要である  
日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

3. 米沢祐大、小倉光雄、鈴木祥太、吉田彩子、浅井計、吉田稔、西山真、古園さおり  
枯草菌 ECF シグマ因子 SigX のグルコース依存的な活性化に関わる RNA ポリメラーゼのアセチル化  
日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

4. Saori Kosono, Yuta Mizuno, Megumi Nagano-Shoji, Shosei Kubo, Yumi Kawamura, Ayako Yoshida, Hisashi Kawasaki, Makoto Nishiyama, and Minoru Yoshida. Altered protein acetylation and succinylation profiles in *Corynebacterium glutamicum* in response to L-glutamate overproduction. 第 18 回日本ドイツ酵素工学ワークショップ、2015 年 9 月 14 日、京都大学(京都府京都市)

5. 山本寛之、吉田彩子、富田武郎、古園さおり、葛山智久、西山真  
高度好熱菌 *Thermus thermophilus* におけるタ

ンパク質アセチル化酵素及び標的タンパク質の同定と機能解析

日本農芸化学会 2014 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学（岡山県岡山市）

6. 吉田彩子、西山真、吉田稔、古園さおり  
高度好熱菌 *Thermus thermophilus* における短鎖アシル化修飾による分岐鎖アミノ酸生合成酵素の調節

第 15 回極限環境生物学会年会、2014 年 11 月 2 日、沖縄県今帰仁村コミュニティーセンター（沖縄県今帰仁村）

7. 吉田彩子、西山真、吉田稔、古園さおり  
Analysis of protein acylation on metabolic enzymes and protein acyltransferase in *Thermus thermophilus* HB27

第 4 回モデル生物丸ごと一匹学会、2014 年 9 月 26 日、大阪大学（大阪府豊中市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biotec-res-ctr/MBT/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 彩子 (YOSHIDA, Ayako)

東京大学・生物生産工学研究センター・特任助教

研究者番号： 90633686

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

古園 さおり (KOSONO, Saori)

東京大学・生物生産工学研究センター・特任准教授

研究者番号： 90321760

西山 真 (NISHIYAMA, Makoto)

東京大学・生物生産工学研究センター・教授

研究者番号： 00208240