

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580133

研究課題名(和文)バクテリアのリジンアセチル化と翻訳制御に関する研究

研究課題名(英文)Study on the role of protein acetylation in translational regulation in bacteria

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：枯草菌由来の翻訳伸長因子EFTuを対象に、翻訳制御におけるアシル化修飾の役割を明らかにすることを目的とした。安定同位体を用いたプロテオミクス解析により、EFTuのアセチル化及びスクシニル化修飾が培地条件や培養フェーズによって大きく変動することを見いだした。EFTuのアセチル化及びスクシニル化修飾部位をMS解析により同定し、その機能を変異体を用いて明らかにした。EFTuのスクシニル化修飾による翻訳制御の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The role of protein acylation in translation elongation factor (EF) Tu in *Bacillus subtilis* was investigated. Acetylation and succinylation of Bs-EFTu was dynamically changed in response to carbon sources and growth phases. We revealed succinylation in the domain-3 negatively regulates the function of EFTu and the growth.

研究分野：応用微生物学

キーワード：タンパク質アセチル化 タンパク質スクシニル化 翻訳制御 EFTu 枯草菌 SILAC

1. 研究開始当初の背景

リジンアセチル化は、代表的な翻訳後修飾 (post-translational modification, PTM) の一つであり、真核生物ではヒストンアセチル化によるエピジェネティックな遺伝子発現制御が良く知られている。近年の質量分析技術を利用したアセチル化タンパク質のプロテオミクス解析(アセチローム解析)により、アセチル化はバクテリアにも広く存在することが明らかとなってきた。リジンアセチル化は、アセチル化酵素 (KAT) と脱アセチル化酵素 (KDAC) により可逆的に制御される。真核生物由来の KDAC のホモログがバクテリアにも広く存在していることは、この翻訳後修飾が進化的に保存された機構であることを裏付けている。可逆的なアセチル化制御にはアセチル CoA や NAD<sup>+</sup> という代謝鍵物質を利用することから、栄養や代謝シグナルに応答したタンパク質の機能調節に関わると言われている。また最近、アセチル化以外にスクシニル化などのアシル化修飾が発見され、KAT や KDAC が他のアシル化修飾にも関与することが知られていた (図 1)。

申請者が実施した枯草菌を対象としたアセチローム解析により、アセチル化の主な標的として代謝酵素に次いで翻訳関連タンパク質が同定されていた。バクテリアにおけるアセチル化の役割として、代謝酵素の活性調節、走化性、ストレス応答との関連が報告されていたが、翻訳制御に関する報告はなかった。また、枯草菌でアセチル化を強く受けるタンパク質として翻訳伸長因子 EFTu を同定していた。EFTu は、翻訳伸長過程でアミノアシル tRNA をリボソームに運搬する役割を持ち、また近年細胞骨格との関連も示唆される興味深い分子である。EFTu のアセチル化は、2xSG、L、MM グルコース培養の対数期に強く見られたが、MM クエン酸培地では観察されなかった。また、定常期に入ると、EFTu は 2 種類の KDAC (AcuC と SrtN) によってすみやかに脱アセチル化されることを示唆する結果が得られていた。EFTu のアセチル化は培地条件や培養フェーズに依存して大きく変動することから、その修飾の変化が EFTu の機能に及ぼす影響に興味を持たれた。

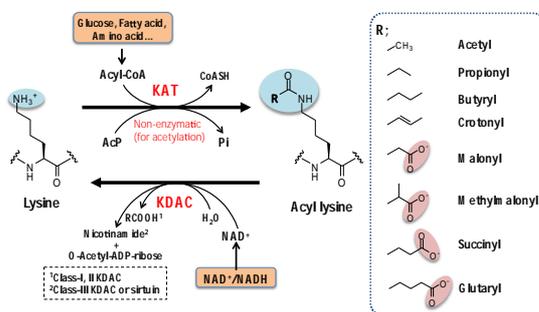


図 1. タンパク質のアシル化修飾

2. 研究の目的

翻訳過程は多大なエネルギーを要求することから、栄養状態に応答して厳密に制御される必要がある。代謝や栄養状態に応じて変動するアセチル化修飾は翻訳制御に関わる可能性がある。また近年、アセチル化と並ぶアシル化修飾としてスクシニル化修飾が注目されている。本研究では、主に翻訳伸長因子 EFTu に焦点をあて、アセチル化やスクシニル化などのアシル化修飾と翻訳制御の関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

アセチル化及びスクシニル化タンパク質の検出は、市販の抗アセチルリジン抗体または自作の抗スクシニ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。

抗スクシニルリジン抗体は、*in vitro* で化学的にスクシニル化を行った BSA タンパク質を抗原としてウサギに免疫して作成した。

アセチル化及びスクシニル化タンパク質の同定 (アセチローム / スクシニローム解析) は、対数期の枯草菌菌体から調製したライゼートをトリプシン消化後、抗アセチルリジン抗体または抗スクシニルリジン抗体を用いた免疫沈降により修飾ペプチドを回収し、nano LC-MS/MS に供してペプチド配列及び修飾部位を同定した。

MS 解析により同定されたアシル化修飾部位の機能解析は、アシル化不能変異 (KR 変異)、アセチル化模倣変異 (KQ 変異) またはスクシニル化模倣変異 (KQ 変異) を導入した変異体を作成して、増殖や翻訳活性に与える影響を評価した。

SILAC を用いたアシル化修飾の定量解析は、まず枯草菌リジン要求株を作成し、比較する MM グルコース培地と MM クエン酸培地のうちどちらか一方に安定同位体リジン (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Lys) を添加して培養し、細胞内タンパク質を標識した。それぞれの培養からライゼートを調製し、等量ずつ混合した後、トリプシン消化、抗体による修飾ペプチドの濃縮を行い、nano LC-MS/MS により分析した。同位体標識及び非標識された修飾ペプチドのピークエリア値の比を算出することにより、グルコース / クエン酸培地条件間での定量比較を行った。

*In vitro* translation assay は、EFTu 野生株および変異株より調製した粗リボソーム画分 (S30 画分) 別途調製した tRNA を含む画分、*in vitro* 転写により調製した gfp-flag mRNA を混合した後、翻訳産物を抗 Flag 抗体で検出した。

4. 研究成果

(1) EFTu のスクシニル化修飾の検出

近年アセチル化と並ぶアシル化修飾としてスクシニル化修飾が注目されている。クエン酸回路から生じるスクシニル CoA を利用するスクシニル化修飾は、アセチル化と並んで栄養シグナルに応答したタンパク質の機能

調節に関わると考えられた。そこで、抗スクシニルリジン抗体を作成し、スクシニル化タンパク質の検出をウェスタン解析により行った。以前に、MM クエン酸や MM コハク酸培養では EFTu のアセチル化が検出されないことを明らかにしていたが、これらの培地条件ではスクシニル化が強く誘導されていることを見いだした。また、L 培養の定常期初期に EFTu の脱アセチル化が観察されるが、定常期後期にはスクシニル化が誘導されてくることを見いだした。これらの結果から、EFTu は培地条件や培養フェーズによってアセチル化/スクシニル化修飾が入れ替わることが明らかとなった。

## (2) SILAC を用いたアセチローム/スクシニローム解析

EFTu を含むタンパク質のアセチル化とスクシニル化修飾変化を定量的に評価するために、SILAC を用いたアセチローム/スクシニローム解析を行った。培養条件は、2 つのアシル化修飾パターンが大きく異なる MM グルコースと MM クエン酸条件で行った。リジン要求性変異株を作成し、片方の培養条件に安定同位体リジン (もう片方は通常の変異株) を加えて培養し、細胞内のタンパク質を安定同位体で標識した。安定同位体リジンはグルコース培養に添加した場合と、クエン酸培養に添加した場合の 2 条件で行った。対数期の菌体を回収し、ライゼートを調製後、等量のタンパク質を含むライゼートを混合し、トリプシン消化を行った。その後、抗体を用いてアセチルリジンもしくはスクシニルリジン含有ペプチドを回収し、nano LC-MS/MS 分析にて修飾ペプチドの同定と相対定量を行った。同時に抗体によるアフィニティー濃縮を行わないサンプルの分析を行い、タンパク質の存在量変化を算出した。

EFTu やリボソームタンパク質を含む翻訳関連因子のアセチル化/スクシニル化修飾レベルは培地条件によって変動することが MS をベースとしたプロテオミクス解析によっても明らかとなった。およその傾向として、MM グルコース条件でアセチル化が多く、MM クエン酸条件でスクシニル化が多かった。EFTu について、合計 15 カ所のアセチル化/スクシニル化部位が同定され、GTPase 活性を担う G ドメインや tRNA との相互作用ドメインに点在していた。各修飾部位は特徴的な変動パターンを示していた。

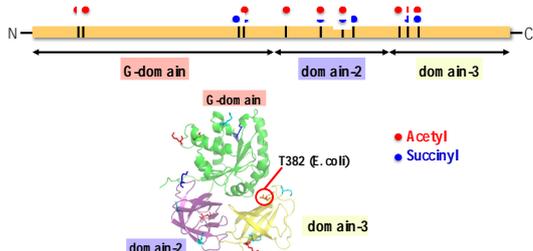


図 2 EFTu におけるアシル化修飾部位

## (3) EFTu のアセチル化/スクシニル化部位変異株の作成と増殖に与える影響

MS 解析により同定された EFTu のアセチル化/スクシニル化の機能を明らかにするために、修飾部位に模倣変異を導入した変異株を作成し、増殖に与える影響を評価した。EFTu は必須タンパク質として知られているため、コンディショナルな条件で変異の影響を評価できる系を構築した。また変異の影響をより自然に近い形で評価するために、オリジナル遺伝子座に変異を導入した。変異体は、非修飾模倣変異 (KR)、アセチル化模倣変異 (KQ)、スクシニル化模倣変異 (KE) を作成した。

N 末領域の G ドメイン内には強くアセチル化される部位が存在していた。その変異株 (KR と KQ) を作成して、MM グルコース、MM クエン酸培地条件での増殖を評価したところ、野生型と遜色ない増殖を示したことから、この部位のアセチル化が増殖に与える影響は少ないと考えられた。

C 末領域のドメイン 3 にはスクシニル化部位が近接して存在していた。ドメイン 3 はアミノアシル tRNA との相互作用に関与することが知られている。この部位の KE 変異株は L 培養で増殖阻害を示し、一方で、対応する KR 変異株は野生型株と同等の増殖を示した。この結果から、この部位のスクシニル化は増殖に負の影響を与えることが示唆された。

## (4) In vitro translation assay による EFTu 変異体の翻訳活性の評価

次に、EFTu 変異が翻訳活性に与える影響を in vitro translation assay により評価した。(3) で作成した変異株よりリボソーム及び EFTu を含む S30 画分を調製し、in vitro 転写により調製した GFP-Flag mRNA を鋳型として翻訳を行い、得られた翻訳産物 (GFP-Flag) を、抗 Flag 抗体を用いたウェスタン解析により定量した。その結果、ドメイン 3 の KE 変異体は野生型及び対応する KR 変異体に比べて翻訳活性が 30% にまで低下していた。この結果は増殖能と対応しており、該当部位のスクシニル化が翻訳活性を負に制御しており、その結果増殖能が低下したことを示唆する。最近大腸菌において、Doc ファミリータンパクによる EFTu の Thr382 のリン酸化が翻訳活性を低下させることが報告された (Nature Chem. Biol. 9: 756-757 2013)。

大腸菌 Thr382 もまたドメイン 3 内に位置しており、上記の枯草菌スクシニル化部位と近傍に位置している。従って、スクシニル化が tRNA との相互作用を阻害することが翻訳活性の低下の原因と考えられた。

一方、G ドメインに位置するアセチル化部位については、KR/KQ 変異体のいずれにおいても翻訳活性の低下は認められなかった。

以上より、枯草菌由来 EFTu について翻訳活性を制御するスクシニル化部位を同定す

ることができ、スクシニル化を介した翻訳制御の存在を示唆することができた。

#### 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)

古園さおり、吉田稔、タンパク質アセチル化と代謝経路調節、生体の科学、査読無、65巻、2014、344-348.

[学会発表](計7件)

古園さおり、短鎖アシル化修飾による微生物酵素の調節、第87回日本生化学会大会シンポジウム、2014年10月18日、国立京都国際会館(京都府・京都市)  
鈴木祥太、古園さおり、枯草菌 EFTu のアシル化修飾による制御機構の解析、2014年グラム陽性菌ゲノム機能会議、2014年9月3-4日、いこいの村庄内(山形県・鶴岡市)

古園さおり、バクテリアにおけるタンパク質の短鎖アシル化制御、2013年度国立遺伝学研究所研究会「細菌細胞の増殖と代謝研究会(スイッチング制御)」、2013年11月29-30日、国立遺伝学研究所(静岡県・三島市)

古園さおり、田村克、水野裕太、久保翔世、吉田彩子、タンパク質の短鎖アシル化修飾とその分子機構、2013年グラム陽性菌ゲノム機能会議、2013年9月7-8日、筑波山ホテル江戸屋(茨城県・つくば市)

古園さおり、タンパク質の短鎖アシル化修飾と代謝制御、第2回代謝工学研究会シンポジウム、2012年11月29日、大阪大学(大阪府・大阪市)

古園さおり、枯草菌におけるタンパク質アシル化制御、第3回醗酵学フォーラム、2012年10月22日、西浦グランドホテル吉慶(愛知県・蒲郡市)

古園さおり、タンパク質の短鎖アシル化修飾とバクテリアの代謝制御、微生物機能代謝工学部門発足シンポジウム、2012年7月30日、東京大学(東京都・文京区)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

なし。

(3)連携研究者

堂前 直 (DOHMAE NAOSHI)

理化学研究所・環境資源科学研究センター・  
ユニットリーダー

研究者番号：00321787