

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440087

研究課題名(和文) 粘液細菌におけるチロシン残基のリン酸化を介した情報伝達機構の解明

研究課題名(英文) Signal transduction through tyrosine phosphorylation in Myxobacteria

研究代表者

木村 義雄 (Kimura, Yoshio)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：10243750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Ser/Thrキナーゼのcatalytic loop配列を有しない粘液細菌の14個の真核生物様キナーゼのうち、4つの酵素においてTyr残基の自己リン酸化がみられたが、それらは基質タンパク質のTyr残基リン酸化活性を有していなかった。活性の強い2つのキナーゼはTyr残基の自己リン酸化により、活性化された。また、細菌型Tyrキナーゼ(BTK)を活性化するレセプター領域を特定し、BTKの活性化にはBTKのC末端に存在するTyrクラスターの自己リン酸化は不要であることを示した。また、本菌が有する2つのApaH様ホスファターゼのうち、PrpAはTyrホスファターゼとして機能することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Seven out of 14 recombinant Myxococcus xanthus eukaryotic-like protein kinases containing atypical motifs in the catalytic loop showed protein kinase activity and four autophosphorylated EPKs were detected using anti-phosphotyrosine antibody by western blotting. However, these kinases did not show Tyr kinase activity against myelin basic protein. In two kinases, autophosphorylation on Tyr residues was required for high-level kinase activity. Also, we suggested that two bacterial protein-tyrosine (BY) kinases, BtkA and BtkB, are activated by the intracellular juxtamembrane regions of the second transmembrane helices in receptors. A btkB mutant constructed by replacing all C-terminal Tyr residues with Phe did not significantly affect kinase activity, suggesting that M. xanthus BtkB kinase activity is not dependent on autophosphorylation in the C-terminal Tyr cluster. Finally, we indicated that PrpA, which is an ApaH-like phosphatase, function as a tyrosine protein phosphatase.wo

研究分野：微生物学

キーワード：粘液細菌 真核生物様プロテインキナーゼ 細菌型チロシンキナーゼ チロシンホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化を介する情報伝達機構は生命活動の制御に必須な役割を有し、細菌では His キナーゼによる His-Asp 二成分制御系が、環境適応機構の中心的な役割を担っている。一方、2000種を超える細菌のゲノム解析により、従来、真核生物のみに存在するとされてきた Ser/Thr/Tyr キナーゼが約 7 割の細菌に存在し、細菌は真核生物様キナーゼを進化の過程で構築し、情報伝達系として活用していることが推定されている。真核生物のキナーゼは、Ser/Thr キナーゼと Tyr キナーゼに分類され、ほ乳動物では Ser/Thr キナーゼによる Ser/Thr 残基へのリン酸化が 90%以上を占め、Tyr キナーゼによる Tyr 残基へのリン酸化は 2-6%とされているが、Tyr 残基のリン酸化が、細胞機能の維持において非常に重要な役割を担っていると考えられている。

細菌や植物においても、リン酸化された Ser/Thr/Tyr 残基のうち、リン酸化 Tyr 残基は、ほ乳動物と同程度の割合で存在することが示唆されているが、真核生物様 Tyr キナーゼの存在は報告されておらず、また、Tyr 残基にリン酸化されたタンパク質の機能は不明のままである。一方、近年、真核生物様 Tyr キナーゼとは構造が全く異なる細菌型 Tyr キナーゼが細菌で見いだされ、主に菌体外多糖の生産に関与することが報告されている。

粘液細菌は細菌で最多の真核生物様キナーゼ(約 100-320 個)を有し、他の細菌に比べて圧倒的に多いキナーゼを有することから、粘液細菌を用いることで Tyr 残基のリン酸化に関する情報伝達機構を明らかにすることにした。

2. 研究の目的

細菌のゲノム解析により、細菌は真核生物のみに存在するとされてきた真核生物

様セリン/スレオニン/チロシン (Ser/Thr/Tyr)キナーゼによる Ser、Thr、Tyr 残基のリン酸化を介した情報伝達系を利用していることが示唆されている。多細胞動物では Tyr 残基のリン酸化が特に重要な役割を有しているとされているが、細菌では不明な点が多く残されているので、粘液細菌を用いて真核生物様及び細菌型 Tyr キナーゼ/Tyr ホスファターゼの酵素学的諸性質の検討と細菌における Tyr 残基のリン酸化を介した情報伝達機構を解明することを研究目的とする。

3. 研究の方法

粘液細菌が有する細菌型 Tyr キナーゼ、真核生物様プロテインキナーゼ、プロテインホスファターゼなどを大腸菌で発現・精製後、それぞれの酵素学的諸性質の検討を行った。

また、上記の酵素においてアミノ酸置換による変異酵素を作製し、酵素活性を測定することでそれぞれの酵素において保存されているアミノ酸がどのような役割を担っているか推定した。

さらに幾つかの酵素においては、遺伝子欠損変異株を作製し、その表現型を野生株と比較することで本菌におけるそれらの酵素の役割を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 粘液細菌 *Myxococcus xanthus* が有する細菌型チロシンキナーゼ BtkA と BtkB の機能解析

M. xanthus の細菌型 Tyr キナーゼ BtkA と BtkB は、それぞれ孢子形成期と増殖期に発現し、*btkA* 変異株では孢子形成がほとんどなされない。BtkA は膜レセプターと細胞質内のキナーゼの 2 つのタンパク質から構成され、BtkB は膜レセプターとキナーゼからなる 1 つのタンパク質で構成されている。

両キナーゼのレセプターの C 末端に存在するトランスメンブラン領域下流の細胞質領

域がチロシンキナーゼ触媒領域を活性化するかどうかを確認するために、チロシンキナーゼ領域の N 末端領域にそれぞれのレセプター細胞質領域を結合させ、自己リン酸化及び poly(Glu, Tyr)キナーゼ活性を測定した。

その結果、両キナーゼともレセプターの C 末端下流にある細胞質領域によって活性化が見られた。また、BtkB は C 末端にあるチロシン残基をリン酸化するが、それらのチロシン残基をフェニルアラニンに置換すると自己リン酸化は見られなくなったが、キナーゼ活性にはあまり影響が見られなかったことから、C 末端の自己リン酸化はキナーゼ活性には影響を与えないと考えられた。また、BtkB は真核生物で報告されているチロシンキナーゼのインヒビターによって活性阻害が見られた。

(2) 真核生物様プロテインキナーゼの酵素学的諸性質の検討

真核生物が有する Ser/Thr キナーゼは、VIb ドメインにある catalytic loop に RDxKxxN 配列を有する。一方、Tyr キナーゼは RDx(A/R)A(A/R)N 配列を有している。

粘液細菌 *Myxococcus xanthus* は約 100 個の真核生物様プロテインキナーゼを有する。このなかから、Tyr キナーゼ活性を有するものを探するため、Ser/Thr キナーゼでみられる catalytic loop 配列を有しないキナーゼを 14 個選択し、大腸菌で発現させた。これらの酵素を用いて、自己リン酸化反応後、抗リン酸化 Tyr 抗体を用いた western blotting を行った結果、Tyr 残基にリン酸化されていると考えられる 4 種のキナーゼが検出された。また、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)を用いてキナーゼ活性を測定したところ、2 つのキナーゼにおいて活性が見られたが、残りの 12 のキナーゼにおいては活性がほとんど見られなかった。活性の見られた 2 つのキナーゼは Tyr 残基を自己リン酸化するキナーゼであったが、MBP の Tyr 残基のリン酸化活性は見られ

なかった。

2 つのキナーゼを DspA と DspB と命名し、金属塩、ATP、基質に対する Km 測定、キナーゼ阻害剤の影響などの諸性質を明らかにした。DspA の VIb 配列に存在する catalytic loop を Ser/Thr キナーゼ及び Tyr キナーゼが有する特異的な配列にアミノ酸置換した変異酵素を作製した結果、全てにおいてキナーゼ活性の消失が見られた。一方、DspB の catalytic loop 配列を Ser/Thr キナーゼ型に置換した変異酵素は、MBP に対するキナーゼ活性を 1.3 倍増加させた。

catalytic loop 配列に RD を有するキナーゼは RD ファミリーキナーゼと呼ばれ、一般的に activation loop における自己リン酸化により活性化される。そこで両酵素の activation loop に存在する Ser/Thr 残基を Ala に変異させたところ、DspA は著しい活性の低下が見られたが、DspB では活性の変化が見られなかった。

両キナーゼは Tyr 残基に自己リン酸化が見られたことから、Tyr 残基を Phe に置換した変異酵素を作製した結果、キナーゼ活性が著しく減少した変異酵素が見られたことから、これらのキナーゼは Tyr 残基の自己リン酸化により活性化されると考えられ、Tyr ホスファターゼによるリン酸化アミノ酸残基の脱リン酸化によって活性調節されると推定された。

(3) Tyr ホスファターゼの機能解析

粘液細菌が有する 2 つの ApaH 様プロテインホスファターゼの酵素学的諸性質の検討を行ったところ、1 つ (PrpA) は主にチロシンホスファターゼとして機能し、もう一つ (ApaH) は主にアデノシン 4 リン酸などを分解する酵素として機能していると推定した。我々は以前、本菌が有する Tyr ホスファターゼを 1 つ (PhpA) 明らかにしているため、本菌における 2 つめの Tyr ホスファターゼの存

在を示すことができた。

また、両酵素に存在する4つのモチーフのうち、2つのモチーフにて違いのあるアミノ酸を変異させ、基質特異性に関与するアミノ酸を推定した。

(4) 低分子 Tyr プロテインホスファターゼの酵素学的諸性質の検討

本菌は低分子 Tyr プロテインホスファターゼ (LMWTPP) と相同性の高い酵素 (ArsA) を1つ有している。本酵素を大腸菌で発現させ、酵素学的諸性質の検討を行った結果、本酵素は弱いホスファターゼ活性を有するものの Tyr 残基リン酸化タンパク質の脱リン酸化活性を有せず、強いヒ酸レダクターゼ活性を有していたことから、本酵素は LMWTPP としては機能せず、ヒ酸を亜ヒ酸に触媒する酵素であることが明らかになった。

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8件)

1. Kimura, Y., and Urata, M. Characterization of a eukaryotic-like protein kinase, DspB, with an atypical catalytic loop motif from *Myxococcus xanthus*. Arch. Microbiol. 査読有 198(3):219-226, 2016

Doi:10.1007/s00203-0151181-5

2. Kato, H., Shirakawa, Y., Takegawa, K., and Kimura, Y. Functional analysis of conserved motifs in a bacterial tyrosine kinase, BtkB, from *Myxococcus xanthus*. J. Biochem. 査読有 158(5):385-392, 2015. Doi:10.1093/jp/mvv053

3. Oka, M., Takegawa, K., and Kimura, Y. Enzymatic characterization of a class II lysyl-tRNA synthetase, LysS, from *Myxococcus xanthus*. Arch. Biochem. Biophys. 査読有 579:33-39, 2015. Doi:10.1016/j.abb.2015.05.014

4. Characterizing activities of eukaryotic-like

protein kinases with atypical catalytic loop motifs from *Myxococcus xanthus*. Kimura, Y., Urata, M., and Okamoto, R. J. Biosci. Bioeng. 査読有 119:511-514, 2015.

Doi:10.1016/j.jbiosc.2014.10.002

5. Enzymatic characteristics of an ApaH-like phosphatase, PrpA, and a diadenosine tetraphosphate hydrolase, ApaH, from *Myxococcus xanthus*. Sasaki, M., Takegawa, K., and Kimura, Y. FEBS Lett. 査読有 588:3395-3402, 2014.

Doi:10.1016/j.febslet.2014.07.031

6. *Myxococcus xanthus* low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase homolog, ArsA, possesses arsenate reductase activity. Mori, Y., and Kimura, Y. J. Biosci. Bioeng. 査読有 118:10-13, 2014.

Doi:10.1016/j.jbiosc.2013.12.013

7. Regulation of eukaryotic-like protein kinase activity of DspA from *Myxococcus xanthus* by autophosphorylation. Okamoto, R., Takegawa, K., and Kimura, Y. J. Biochem. 査読有 155:99-106, 2014. Doi:10.1093/jb/mvt101

8. Trehalose biosynthesis in *Myxococcus xanthus* under osmotic stress and during spore formation. Kimura, Y., Kawasaki, S., Tuchimoto, R., and Tanaka, N. J. Biochem. 査読有 155:17-24, 2014. Doi:10.1093/jb/mvt091

[学会発表](計13件)

1. 木村義雄, 粘液細菌が有する非典型catalytic loop配列を有する真核生物様プロテインキナーゼの酵素学的諸性質について、第88回日本生化学会大会、2015年12月1日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

2. 佐々木雅史、田中千尋、木村義雄, *Myxococcus xanthus* における ApnA 分解酵素の役割について、第88回日本生化学会大会、

2015年12月1日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

3. 田中千尋、佐々木雅史、木村義雄、*Myxococcus xanthus*におけるアミノアシル-tRNA合成酵素により Ap4A の合成について、第88回日本生化学会大会、2015年12月2日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

4. 坂井亜衣、木村義雄、*Myxococcus xanthus*における Ap4A 分解酵素としての Nudix hydrolase について、第88回日本生化学会大会、2015年12月2日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

5. 岡茉奈美、木村義雄、*Myxococcus xanthus*における lysyl-tRNA 合成酵素の酵素学的諸性質の酵素学的諸性質の研究、第88回日本生化学会大会、2015年12月2日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

6. 木村義雄、森裕美、粘液細菌が有する低分子型チロシンキナーゼホモログタンパク質 ArsA はヒ酸リダクターゼ活性を有する、第87回日本生化学会大会、2014年10月16日、京都国際会議場（京都府京都市）

7. 加藤拓也、白川裕貴、木村義雄、粘液細菌 *Myxococcus xanthus* が有する細菌型 Tyr キナーゼ BtkA、BtkB の機能解析、第87回日本生化学会大会、2014年10月17日、京都国際会議場（京都府京都市）

8. 佐々木雅史、木村義雄、*Myxococcus xanthus* における ApaH-like phosphatase の酵素学的諸性質の解析、第87回日本生化学会大会、2014年10月17日、京都国際会議場（京都府京都市）

9. 岡本怜子、木村義雄、粘液細菌 *Myxococcus xanthus* の Dual-specificity プロテインキナーゼ DspA について、第87回日本生化学会大会、2014年10月17日、京都国際会議場（京都府京都市）

10. 浦田真穂、木村義雄、粘液細菌 *Myxococcus xanthus* における真核生物様プロテインキナーゼについて、第87回日本生化学会大会、

2014年10月17日、京都国際会議場（京都府京都市）

11. 木村義雄、前田美璃、粘液細菌 *Myxococcus xanthus* のチロシンホスファターゼ PhpA の酵素学的諸性質と機能解析、第86回日本生化学会大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

12. 加藤拓也、木村義雄、*Myxococcus xanthus* における細菌型 Tyr キナーゼ BtkB の機能解析、第86回日本生化学会大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

13. 佐々木雅史、木村義雄、粘液細菌 *Myxococcus xanthus* の PPP ホスファターゼの酵素学的諸性質の解析、第86回日本生化学会大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
木村 義雄 (Kimura, Yoshio)
香川大学・農学部・教授
研究者番号：10243750

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

竹川 薫 (Takegawa, Kaoru)

九州大学・農学研究科大学院・教授

研究者番号：50197282