

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 20 年度博士課程 入学
氏 名 石垣 祐二
指導教員名 大西 康夫

論文題目

放線菌における翻訳後修飾タンパク質の網羅的同定とその生理的機能に関する研究

放線菌は土壤中に広く分布するグラム陽性細菌であり、菌糸状に栄養増殖したのち、空中に伸長した菌糸の先端に胞子を着生する。このような形態分化を行うという点では放線菌は一般的な細菌よりもむしろ真核生物のカビによく似ており、原核生物における形態分化研究のモデル微生物とされてきた。一方、放線菌は抗生物質をはじめとする多種多様な二次代謝産物を生産するため、産業・医療上においても重要な菌群である。そのため、これまで放線菌の形態分化や二次代謝に関わる遺伝子の発現制御機構が詳細に解析されてきた。

翻訳後修飾によるタンパク質の機能調節は真核生物ではよく知られているが、これまで放線菌における翻訳後修飾の解析はあまりなされてこなかった。原核生物における翻訳後修飾はタンパク質のリン酸化が有名であり、シグナル伝達や酵素活性の調節に関与することが知られている。近年、翻訳後修飾タンパク質の網羅的同定法が開発され、翻訳後修飾を受けるタンパク質を網羅的に同定できるようになった。放線菌においても翻訳後修飾が生理的に重要な機能を有している可能性があり、詳細に解析する必要がある。そこで、本研究では *Streptomyces griseus* を対象とし、翻訳後修飾タンパク質の網羅的同定から翻訳後修飾の全体像を明らかにするとともに、翻訳後修飾の生理的な機能を解析することを目的とした。

第1章 リジンアセチル化タンパク質の網羅的同定とその生理的機能の解析

細胞内でアセチル化を受けているタンパク質はごくわずかであり、MS解析によるアセチル化の検出は困難な場合が多い。そこで、野生株の細胞内タンパク質全体に対してトリプシン消化を行い、抗アセチル化リジン抗体を用いた免疫沈降によりアセチル化ペプチドを濃縮した。濃縮したアセチル化ペプチドのLC-MS/MS解析によってアセチル化タンパク質を同定するとともにアセチル化部位を決定した。この解析により、271箇所のアセチル化部位と211種のアセチル化タンパク質を同定した。同定されたアセチル化タンパク質は液体培養において検出されたものが75種、固体培養において検出されたものが65種、両方の培養で検出されたものが71種であった。これらの多くは糖や核酸の代謝酵素、翻訳関連タンパク質であり(図1)、大腸菌などで報告されているアセチル化タンパク質の種類とよく似ていたが、形態分化や二次代謝に関わるタンパク質も含まれていた。

これらのうち、分泌性のグリセロホスホジエステラゼ *GlpQ1* は形態分化に関わることが明らかにされており、そのリジンアセチル化部位であるK197は活性に重要な残基であると考えられていた。そこで、このリジン残基を同じ塩基性のアルギニン残基に置換した *GlpQ1* (K197R) やアセチル化を模倣するグルタミン残基に置換した *GlpQ1* (K197Q) を大腸菌で生産・精製し、その酵素活性を野生型の *GlpQ1* と比較した。いずれの変異型 *GlpQ1* においても酵素活性が野生型酵素と比べて大幅に低下したことから、*GlpQ1* のアセチル化部位K197は活性に重要な残基であり、そのアセチル化によって酵素活性が失われることが強く示唆された。

一方、さらに多くの形態分化や二次代謝に関わるアセチル化タンパク質を同定するために、野生株と形態分化や二次代謝を行わない *adpA* 破壊株におけるアセチル化タンパク質の比較を行った。それぞれの株の細胞内タンパク質を二次元電気泳動で分離し、抗アセチル化リジン抗体を用いたウエスタンブロットでアセチル化タンパク質のスポットを比較したところ、野生株で強いアセチル化のシグナルがあるスポットが3個観察された。これらのスポットに対応するタンパク質をMSで解析したところ、putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、putative lyase、ストレプトマイシン生合成酵素 *StrM* であった。同時にこれらのアセチル化部位も決定した。*strM* は *AdpA* による転写活性化を受けている遺伝子のため、野生株でのみ生産されているタンパク質がアセチル化を受けていると思われるが、他の2つのタンパク質のアセチル化は野生株で特異的に起こるものであると考えられる。

また、野生株の基底菌糸形成期と孢子形成期におけるアセチル化タンパク質を同様に比較したところ、基底菌糸形成期と比較して孢子形成期でアセチル化のシグナルが増加する6

個のスポットが観察された。これらのうち、3個のスポットは StrM を含む前述したスポットと同一であり、残りの3個のスポットに対応するアセチル化タンパク質を MS で解析したところ、putative bifunctional purine biosynthesis protein、putative succinyl-CoA synthetase alpha chain、スーパーオキシドジスムターゼ SodF であった。同時にこれらのアセチル化部位も決定した。現在、この実験で明らかになったストレプトマイシン生合成酵素 StrM の K70 のアセチル化の役割について解析を進めている。

第2章 チロシンリン酸化タンパク質の同定とそのタンパク質の機能解析

アセチル化タンパク質の同定と同様、免疫沈降と MS/MS 解析によってチロシンリン酸化タンパク質を同定するとともにチロシンリン酸化部位を決定した。同定されたタンパク質は conserved hypothetical protein (SGR2042) と putative phosphoglycerate mutase であり、それらのリン酸化部位はそれぞれ Y237 と Y36 であった。

SGR2042 は *Streptomyces* 属では高く保存されているタンパク質であるが、他の生物種では保存されていない。そのため、SGR2042 は *Streptomyces* 属で重要な機能を有し、形態分化や二次代謝に関わる可能性があると考えた。そこで、SGR2042 破壊株を作製し、SGR2042 破壊株の形態分化能を野生株と比較したが、顕著な差はなかった。一方、培養 4 日目におけるストレプトマイシン生産量は野生株と比較して約半分まで低下していたことから、SGR2042 はストレプトマイシン生産に関わることが示唆された。現段階では SGR2042 におけるチロシンリン酸化の役割は不明であるが、同定したこれらのタンパク質におけるチロシンリン酸化は何らかの生理的機能を有している可能性が高いと考えられる。

第3章 原核生物型ユビキチン様タンパク質とプロテアソームの機能解析

最近、*Mycobacterium tuberculosis* において原核生物型ユビキチン様タンパク質 Pup が発見され、原核生物でもユビキチン-プロテアソーム機構が存在することが明らかになった。Pup は放線菌で広く保存されており、*S. griseus* においても Pup 化されるタンパク質が存在すると考えられる。

まず、Pup の機能を調べるために、*pup* 破壊株を作製した。*pup* 破壊株の形態分化能を調べたところ、野生株との違いは見られなかったが、*pup* 破壊株では野生株と比べて胞子の色がわずかに濃くなっていた。そこで、より違いがはっきりと見られるように野生株と *pup* 破壊株の胞子液をシングルコロニーになるように植菌したところ、野生株では中央部と周辺部で気中菌糸の盛り上がり方が異なった二重円のようなコロニーが観察されたが、*pup* 破

壊株では、そのようなコロニーが観察されなかった。

一方、プロテアソーム構成因子である *prcB* と *prcA* を同時に破壊した *prcBA* 破壊株の形態分化能を調べたところ、野生株との違いは見られず、*pup* 破壊株のような胞子の色の変化も観察されなかった。しかしながら、野生株と *prcBA* 破壊株の胞子液をシングルコロニーになるように植菌したところ、野生株では先に述べた二重円のようなコロニーが観察されたが、*prcBA* 破壊株では *pup* 破壊株と同様にそのようなコロニーは観察されなかった。

次に、抗 Pup 抗体を作製し、ウエスタンブロットを行って Pup 化されたタンパク質の検出を試みたところ、Pup 化されたと考えられる複数のタンパク質が対数増殖期後期と定常期で確認された。また、Pup 化タンパク質は液体培地では多く観察されたが、固体培地ではほとんど観察されなかった。

一方、*prcBA* 破壊株において Pup 化タンパク質が蓄積するかどうかについて、同様の実験で調べたところ、ほとんどの Pup 化タンパク質でその量は変化していなかったが、一部のタンパク質は *prcBA* 破壊株で Pup 化量が増加していることが明らかになった。これらの Pup 化タンパク質はプロテアソームの標的になっており、Pup 化を分解のシグナルとして使用していると考えられる。

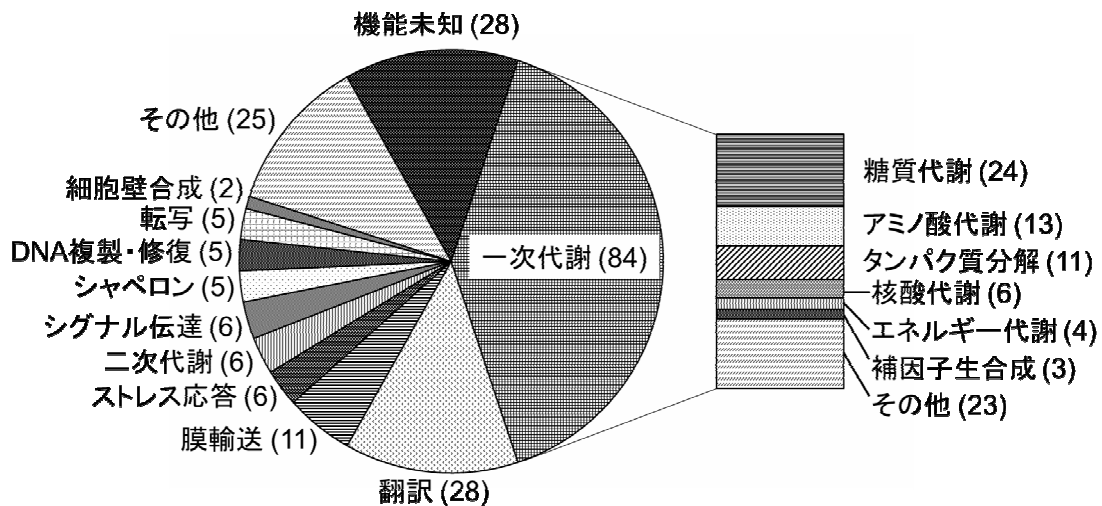


図1 同定したアセチル化タンパク質の機能分類