

リン酸化プロテオームによる放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)の  
セリン/スレオニンキナーゼ PkaE の機能解析

Phosphoproteomic Analysis of Serine/Threonine Protein Kinase PkaE  
of *Streptomyces coelicolor* A3(2)

平成 29 年度入学 平方 利幸 (Hirakata, Toshiyuki)

指導教員 杉田 隆

放線菌 *Streptomyces* は、土壌中に生息し、放射状に菌糸を形成するグラム陽性細菌であり、抗生物質、抗寄生虫薬、抗がん剤、免疫抑制剤など、多種多様な二次代謝物質を生産する細菌として知られている。特に抗生物質においては現医薬品の 60 % 以上を生産しており、医薬関連微生物として重要な微生物である。また、*Streptomyces* は、基底菌糸、気中菌糸を経て、数珠状の胞子を着生する複雑で特徴のある形態分化能を有しており、基礎生物学的な観点からも重要な研究対象である。これらの形態分化と二次代謝物質産生には同調性が認められ、一部共通の機構によって制御されていることが知られている。

細胞機能の一つであるシグナル伝達は、外界環境の変化に応じて細胞機能を変化させるための制御機構である。本制御機構の一つとして、タンパク質のリン酸化反応が知られており、ヒトを含む真核生物ではチロシンキナーゼ及びセリン/スレオニンキナーゼ、原核生物ではヒスチジンキナーゼ等がタンパク質のリン酸化による制御機能を担っている。

二次代謝研究における重要なモデル生物である放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (以下、*S. coelicolor*) は、原核生物であるにもかかわらず、34 種の真核生物型のセリン/スレオニンキナーゼを有し、それらが形態分化や二次代謝物質産生に関与していることが示唆されている。

PkaE は本学研究室で発見された *S. coelicolor* のセリン/スレオニンキナーゼの一つであり、その遺伝子破壊株では YMPG 液体培地培養下において、野生株と比較し、二次代謝産物である色素性抗生物質アクチノロージン産生が亢進することが観察された。また、*pkaE* の mRNA は培養開始 60 時間後から発現し、アクチノロージンの生産時期と一致していることも分かった。更に PkaE は、別のセリン/スレオニンキナーゼである AfsK のリン酸化を制御する結合タンパクである KbpA を直接的にリン酸化することが確認された。このように PkaE を中心としたリン酸化シグナルカスケードの一部は解明されたが、二次代謝制御、形態分化制御の全体像を解き明かすまでには至っていない。そこで、PkaE を中心としたリン酸化ネットワークの解明、および PkaE による二次代謝、形態分化制御機構を解明するために本研究を行った。

## 1. *S. coelicolor* PkaE の抗生物質産生及び形態分化に対する機能

### 1-1. アクチノロージン産生に対する PkaE の機能

PkaE の二次代謝産物産生に対する機能を詳細に解析することを目的とし、*S. coelicolor* 野生株及び *pkaE* 破壊株のアクチノロージンの生産量を異なる条件下で比較した (Figure 1)。その結果、YMPG 寒天培地では、野生株と比較し *pkaE* 破壊株においてアクチノロージン生産量の増加が認められたが、GYM 寒天培地で培養した場合では、60 時間および 72 時間培養時点で *pkaE* 破壊株で統計的有意にアクチノロージン生産量低下がみられた ( $p < 0.05$ )。このことから、PkaE は、抗生物質産生制

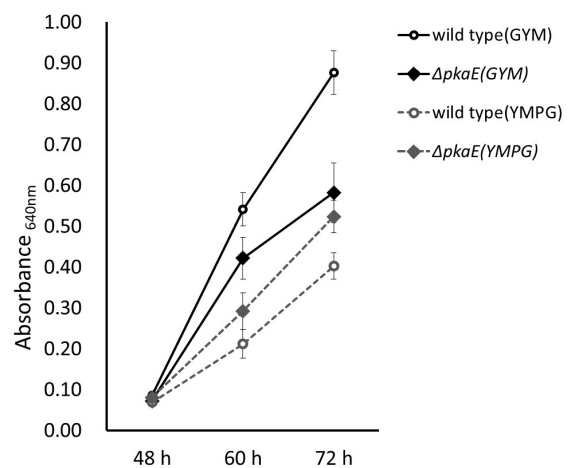


Figure 1 アクチノロージン生産量比較

御に關与していることが確認されたと同時に、培地組成等の外部環境によってその制御機能が変化することが示唆された。

## 1-2. 形態分化に対する PkaE の機能

PkaE の形態分化への関与を確認するため電子顕微鏡による解析を行った。GYM 寒天培地にて野生株および *pkaE* 破壊株を孢子から 28 °C で培養し、12 時間及び 60 時間培養したものを走査電子顕微鏡 (SEM)、96 時間培養したものを透過電子顕微鏡 (TEM) で観察した (Figure 2)。その結果、

*pkaE* 破壊株の孢子 (96 時間培養) において、細胞膜の異常および形態の異常が観察され、PkaE が抗生物質産生制御だけでなく、形態分化調節にも関与していることが分かった。

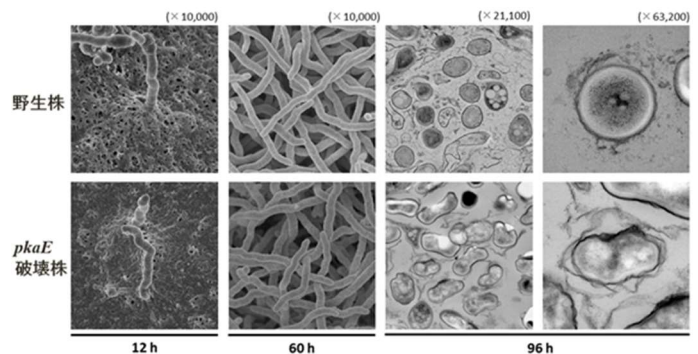


Figure 2 *S. coelicolor* 野生株及び *pkaE* 破壊株の電子顕微鏡解析

## 2. *S. coelicolor pkaE* 破壊株におけるプロテオーム解析

PkaE によるリン酸化シグナルにより影響を受けるタンパク質を特定し、二次代謝、形態分化における PkaE の役割を把握するため、LC-MS/MS による比較プロテオーム解析を行った。*S. coelicolor* 野生株及び *pkaE* 破壊株を GYM 固形培地で 60 時間培養した菌体を用い、抽出したタンパク質をトリプシン消化したものをサンプルとして使用した (n = 3)。検出した MS/MS データを配列データベースと照合し、ペプチドの検出強度を足し合わせて各タンパク質の計量値を出力した結果、1,173 種類のタンパク質について試料間の計量比較情報が得られた。*S. coelicolor* 野生株と *pkaE* 破壊株間で計量できたタンパク質を比較し、two-tailed Student's t-test で  $p < 0.05$  であるタンパク質を抽出した結果、362 種類の有意に群間差があるタンパク質が抽出された。そのうち、87 種類のタンパク質が、*pkaE* 破壊株

においてダウンレギュレーションしていた ( $p < 0.05$  かつ Fold change が 0.66 以下)。このプロテオームデータを用いて PkaE の細胞内での機能を推定するため、Gene Ontology (GO) 解析を行ったところ、*pkaE* 破壊株においてダウンレギュレーションしたタンパク質において「cell membrane components (GO : 0016021, GO : 0031224, GO : 0044425 ;  $p = 0.0078-0.0191$ )」や「antibiotic biosynthetic process (GO : 0017000 ;  $p = 0.0315$ )」がタンパク質群の特徴として特定でき、PkaE の細胞膜形成や抗生物質合成への関与がプロテオームの観点からも明らかとなった。更に、PkaE の生合成経路に対する影響を特定するため、*pkaE* 破壊株において有意に変動のあった 362 種類のタンパクを用いパスウェイ解析を行った。その結果、アクチノロージン生合成経路に関与するタンパク質のうち 6 種類の酵素が、*pkaE*

破壊株においてダウンレギュレーションしていることが確認された (Figure 3、太字)。また、アクチノロージン生合成経路にはアップレギュレーションしたタンパク質は含まれていなかった。

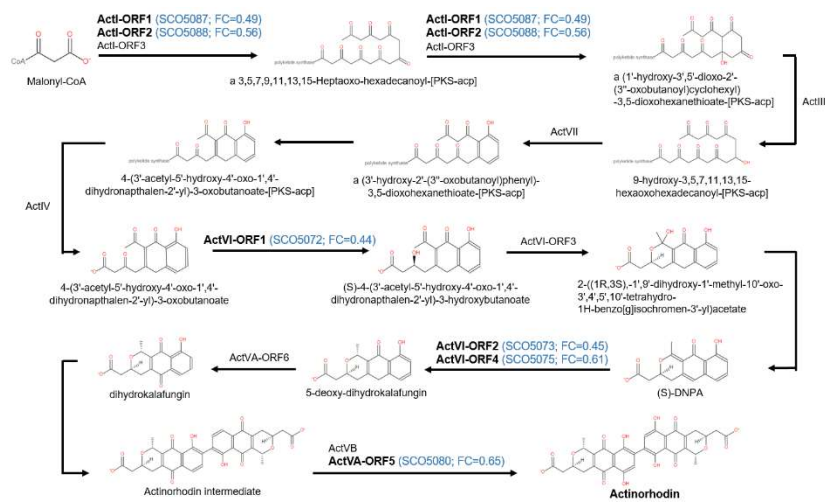


Figure 3. パスウェイマップ解析

### 3. リン酸化プロテオームを用いた *S. coelicolor* PkaE の機能解析

PkaE が関与するリン酸化シグナル伝達ネットワーク内のタンパク質を特定するため、LC-MS/MS による比較リン酸化プロテオーム解析を行った。本解析において、網羅的にリン酸化ペプチドを検出するためには、リン酸化ペプチド精製条件の最適化が鍵となる。種々の事前検討の結果、TiO<sub>2</sub> 処理 2 回行うリン酸化ペプチド濃縮法を確立した。*S. coelicolor* 野生株及び

*pkaE* 破壊株を GYM 固形培地で 28 °C、60 時間培養したものをサンプルとして使用し (n=3)、得られた LC-MS/MS データを解析した結果、ペプチドの同定情報と連結した 156 の検出ピーク情報を取得した。重複を除いたリン酸化ペプチド同定数は 101 種類であり、52 種類のタンパク質が特定された。更に、野生株と *pkaE* 破壊株間の検出強度を比較し、two-tailed Student's *t* test で  $p < 0.05$  であるリン酸化ペプチドを抽出し、Fold change が 0.66 以下及び 1.5 以上であるリン酸化ペプチドを絞り込んだ結果、13 種類のリン酸化タンパク質が同定された。またこのうち、*pkaE* 破壊株においてリン酸化が抑制されたタンパク質 ( $p < 0.05$  かつ Fold change が 0.66 以下) は 6 種類であった (Table 1)。

**Table 1** *pkaE* 破壊株におけるリン酸化抑制タンパク質

*S. coelicolor* 野生株 (M145) と *pkaE* 破壊株 (*ApkaE*) から得たリン酸化ペプチドを LC-MS/MS によって同定した (n = 3) . two-tailed Student's *t*-test で  $p < 0.05$  かつ Fold-change  $\leq 0.66$  (*ApkaE*/M145) を有意とした。赤字はリン酸化部位

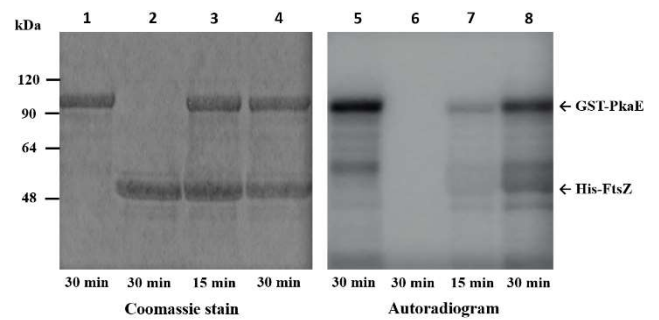
Protein Name	Accession No.	Mascot Score	Identified Peptide Sequence*	Fold Change ( <i>ApkaE</i> /M145)	<i>p</i> -value
hypothetical protein	SCO5653	25.34	V <b>T</b> AG <b>S</b> RAAAGPAGSRAAGAAR	0.487	0.003
anti-sigma factor antagonist BldG	SCO3549	68.66	D <b>S</b> TGLGVLVGG <b>L</b> K	0.376	0.005
cell division protein FtsZ	SCO2082	63.18	VTVIAAGFDGGQPP <b>S</b> KR	0.618	0.025
phosphopyruvate hydratase	SCO3096	28.38	AAVPSGA <b>S</b> TGAFEAIELR	0.364	0.029
protein kinase	SCO6626	26.74	VDEASS <b>Y</b> L <b>T</b> GTAWR	0.523	0.039
methyltransferase	SCO5146	33.59	TID <b>S</b> GPQTEVLR	0.367	0.042

*pkaE* 破壊株におけるリン酸化抑制タンパク 6 種類のうち 5 種類は、NCBI データベースによりアノテーションされていた。この中には、アクチノロージン産生、胞子形成に関与することが知られている BldG、FtsZ も含まれていた。

#### 4. PkaE が直接的にリン酸化するタンパク質 (基質) の特定

タンパク質リン酸化酵素である PkaE の遺伝子破壊株においてリン酸化の抑制がみられたタンパク質には、PkaE が直接作用する基質およびシグナル伝達下流のタンパク質が含まれると推定される。そこで、PkaE の直接的基質を特定するため、*in vitro* phosphorylation assay を用いて確認した。*pkaE* 破壊株においてリン酸化の抑制がみられた 6 種類のタンパク質のう

ち、論文等により機能が明確となっている BldG (SCO3549)、FtsZ (SCO2082)、エノラーゼ (SCO3096) について組換えタンパク質を作製し、*in vitro* phosphorylation assay を行った。その結果、BldG、エノラーゼに関しては、PkaE による直接的リン酸化は確認できなかったものの、PkaE が FtsZ を直接的にリン酸化することが明らかとなった (Figure 4)。



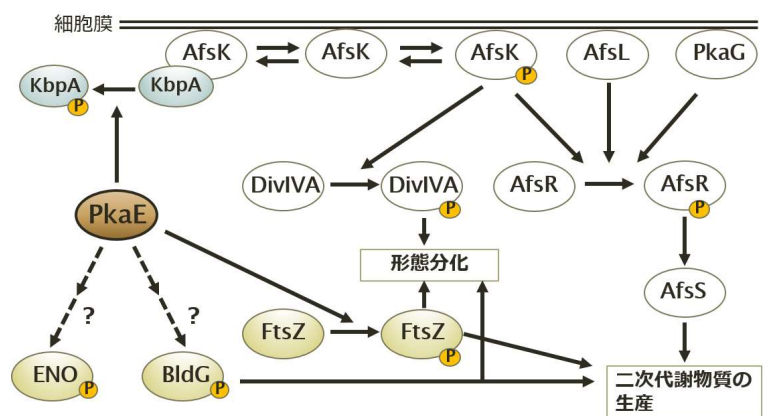
**Figure 4.** *in vitro* phosphorylation assay

Lanes 1 and 5, GST-PkaE のみ、Lanes 2 and 6, His-FtsZ のみ、Lanes 3,4,7,8, GST-PkaE 及び His-FtsZ.

## 総括

本研究では、放線菌 *S. coelicolor* の真核生物型セリン/スレオニンキナーゼ PkaE が孢子細胞膜形成と色素性抗生物質アクチノロージン産生に関わる重要な因子であることを明らかにした。また微生物に広く保存されている FtsZ の制御因子として PkaE が直接関与していることも見出した (Figure 5)。実験手法としては、TiO<sub>2</sub> 処理を 2 回行う手法を検証し、放線菌において最適化されたリン酸化ペプチド精製方法も見出すことができた。

今後、更なる研究により、リン酸化シグナルネットワークの全容の解明、及び形態分化、二次代謝制御系機構の解明が期待される。



**Figure 5.** PkaE を中心としたシグナル伝達モデル図

## 参考文献

Hirakata T., Urabe H., Sugita T., Biosci Biotechnol Biochem., **83**(10):1843-1850., (2019).