The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Phosphoproteome analysis of the extreme thermophile, Thermus thermophilus HB8
Author(s)	高畑, 良雄
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59348
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【３】

氏　　名	高　畑　良　雄（たか　はた　よし　お）
博士の専攻分野の名称	博　士（生命機能学）
学　位　記　番　号	第　２５４４３　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学　位　論　文　名	Phosphoproteome analysis of the extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8 （高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 株におけるリン酸化プロテオーム解析）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　倉光　成紀 （副査） 教　授　河村　　悟　　教　授　谷澤　克行　　教　授　高尾　敏文

論　文　内　容　の　要　旨

タンパク質中のリン酸化は，タンパク質のコンフォメーションやリガンドとの相互作用を変化させることを通じてシグナル伝達などに広く利用されている。細菌では His/Asp のリン酸化に基づく二成分制御系がよく知られているが，近年のリン酸化ペプチド濃縮法および質量分析法の発展とともに，真核生物と同様の Ser/Thr/Tyr のリン酸化やそれを担う protein kinase の存在も明らかになってきた。しかし，細菌におけるリン酸化がどの程度普遍的なのか，またリン酸化を介して細胞活動がどのように制御されているかは未解明である。そこで，タンパク質の構造機能解析に適した高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 を対象に，リン酸化プロテオーム解析を行った。酸化チタンを用いたリン酸化ペプ

チドの選択的濃縮法と nano-LC-タンデム質量分析法を用いて解析した結果, 48種類のタンパク質に由来する52種類のリン酸化ペプチドを同定し，そのうち46個のリン酸化部位を残基レベルで同定した。検出されたリン酸化残基は，Ser, Thr, Tyr がそれぞれ30, 12, 4個であった。同定されたリン酸化タンパク質は，TCA 回路で働くイソクエン酸デヒドロゲナーゼ，核酸代謝経路のCMPキナーゼやチミジル酸合成酵素，分子シャペロンなど幅広いカテゴリーに分布していた。同定したリン酸化タンパク質の約半数はヒトを含む他の生物でもリン酸化が報告されていたが，リン酸化部位までが共通なものは GroEL, EF-Tu, adenylate kinase, transaldolase など数個だった。次に，高度好熱菌タンパク質及びそのホモログの立体構造に基づいて，46個のリン酸化部位を立体構造上にマッピングした。リン酸化部位の多くはループ領域や二次構造の末端に位置していた。興味深いことに，28個のリン酸化部位は基質を含むリガンドと 8 Å 以内の活性部位近傍に位置しており，4 Å 以内にあるものも18個存在した。これらのリン酸化は大きなコンフォメーション変化を伴わずにリガンドとの結合に直接影響することでタンパク質機能の調節に働く可能性が示唆された。

次に，protein kinase とそれによってリン酸化されるターゲットタンパク質の候補として，(1) TTHA0138 と，(2) それに隣接していて Ser がリン酸化されることが分かった機能未知タンパク質 TTHA0139 との二つについて, 生化学的解析を行った。まず, hypothetical protein である TTHA0139 が 二本鎖 DNA と結合することを発見した。次に，ATP 存在下で TTHA0138 が TTHA0139 を１カ所でリン酸化した。さらにリン酸化された TTHA0139 の DNA 結合能が低下することが示された。これらのことから，TTHA0138 がリン酸化によって TTHA0139 の機能を制御している可能性が示唆された。*ttha0138* 破壊株及び *ttha0139* 破壊株はいずれも野生型より生育速度が遅く，*ttha0138* 破壊株 の DNA microarray 解析では *ttha0139* を含む 479個 もの遺伝子が２倍以上の変動を示した。以上の結果から, protein kinase である TTHA0138 は TTHA0139 など他のタンパク質のリン酸化を介して細胞活動の制御に働いていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

タンパク質中の特定のSer/Thr/Tyr残基のリン酸化は、広く生物のシグナル伝達に広く利用されている。しかし、それらのリン酸化がどの程度生物間に普遍的であり、また、タンパク質の構造や機能にどのような変化をもたらすかは、明らかになっていない。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 はゲノムサイズが約 2 Mbpと小さく、その構成タンパク質が安定で、タンパク質の構造と機能に基づいた細胞全体の生命現象の解析に適していることが知られている。そこで、タンパク質のSer/Thr/Tyrリン酸化を介した細胞全体のシグナル伝達ネットワークの解明を目指して、リン酸化タンパク質のリン酸化部位を同定し、立体構造上におけるリン酸化部位を解析した。その結果、全タンパク質約2,200種類のうち 48種類のタンパク質のリン酸化が同定され、それらタンパク質の多くは、活性部位近傍の Ser/Thr/Tyr残基のリン酸化によって、基質との親和性を低下させる活性制御機構を利用していることが明らかになった。これらの成果は、タンパク質のリン酸化による活性制御に大きな手掛かりを与える結果であり、博士 (生命機能学) の学位に値すると認める。