

DOI: 10.13376/j.cblls/2014055

文章编号: 1004-0374(2014)04-0377-07

## 细菌蛋白质乙酰化研究进展

刘诚喜<sup>1,2</sup>, 涂 顺<sup>1,2</sup>, 郭书娟<sup>1,2</sup>, 陶生策<sup>1,2,3\*</sup>

(1 上海交通大学系统生物医学研究院, 上海 200240; 2 上海交通大学癌基因及相关基因  
国家重点实验室, 上海 200240; 3 上海交大学生物医学工程学院, 上海 200240)

**摘 要:** 在真核生物和原核生物中, 蛋白质乙酰化行使重要的功能。过去几十年, 在细菌中发现了大量的新的乙酰化蛋白。聚焦于蛋白质 N $\epsilon$  的乙酰化。首先介绍蛋白质乙酰化的发现和发展史, 其次概述了 ACS、CheY 等乙酰化后的功能, 乙酰化和泛素化、磷酸化之间的关系。在技术层面, 讨论了蛋白质芯片用于发现新的乙酰化酶、去乙酰化酶以及新的乙酰化蛋白的优势和可能性; 详细讨论了免疫沉淀富集结合高分辨率质谱和生物信息学分析来高通量发现乙酰化蛋白的有效性, 并且提出了改进措施。最后, 展望了细菌乙酰化有待研究的关键问题以及与其他酰化之间的关系。

**关键词:** 细菌; 乙酰化; 乙酰化酶; 去乙酰化酶; 质谱

中图分类号: Q51 文献标志码: A

## Advance of bacterial protein acetylation study

LIU Cheng-Xi<sup>1,2</sup>, TU Shun<sup>1,2</sup>, GUO Shu-Juan<sup>1,2</sup>, TAO Sheng-Ce<sup>1,2,3\*</sup>

(1 Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2 State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

3 School of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** Protein acetylation plays critical roles in many biological processes both in eukaryotes and prokaryotes. In the past few years, tremendous of acetylated proteins and acetylation sites have been identified in bacteria. Here, we mainly focus on bacterial N $\epsilon$ -acetylation. First introduce the history of protein acetylation from it was first discovered, and discussed the latest progresses in bacterial protein acetylation. Then discussed the role of acetylation on several important proteins, such as ACS and CheY. We also addressed the advantages and possibility of using protein microarray for the identification of novel acetylated proteins, and the discovery of novel acetyltransferase and deacetyltransferase in bacteria. The crosstalks between protein acetylation and ubiquitination, acetylation and phosphorylation were also discussed. To discover more acetylated protein from bacteria in a high-throughput fashion, currently, the best strategy is the combination of immunoprecipitation enrichment, high-resolution mass spectrometry and bioinformatics analysis. We discussed the latest advancement of this strategy. Finally, the future trends for bacterial protein acetylation study was discussed.

**Key words:** bacteria; acetylation; acetyltransferase; deacetyltransferase; MS

蛋白质乙酰化是一种重要蛋白质翻译后修饰, 是乙酰基供体 (如乙酰辅酶 A) 通过酶学或非酶学的方式将乙酰基团共价结合到赖氨酸残基上的过程。已知有两类乙酰化形式——N $\alpha$  乙酰化和 N $\epsilon$  乙酰化。N $\alpha$  乙酰化是指蛋白质的 N 末端被乙酰化修饰, 一般认为不可逆, 在真核生物中很常见 (超过 80% 的哺乳动物细胞蛋白有此修饰)。大肠杆菌中

已发现的 3 种乙酰化酶 RimI、RimJ 和 RimL 分别

收稿日期: 2013-10-15; 修回日期: 2013-12-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370813); 国家重点基础研究发展计划 (“973” 项目)(2010CB529205); 国家高技术研究发展计划 (“863” 计划)(2012AA020103, 2012AA020203)

\*通信作者: E-mail: taosc@sjtu.edu.cn

特异性乙酰化核糖体蛋白亚基 S18、S5 和 L12 的 N 末端氨基。对 N $\alpha$  乙酰化的综述见文献 [1]，在此不再赘述。N $\epsilon$  乙酰化是动态、可逆的，也是本文介绍的重点。乙酰化首先在真核生物组蛋白中被发现，具有调节基因转录的功能。而大量非组蛋白，如转录因子、核相关蛋白、激素受体、细胞代谢相关蛋白以及癌症相关蛋白等也存在乙酰化修饰，这说明细胞中蛋白质乙酰化修饰广泛存在。随着乙酰化蛋白免疫沉淀富集方法的应用以及高分辨率质谱技术的快速发展，在多种原核生物中发现了大量乙酰化修饰的蛋白质。以此为契机，本文综述了近几年细菌蛋白质乙酰化研究进展。

## 1 乙酰化的发现及发展历程

### 1.1 蛋白质乙酰化在真核中广泛存在

1964 年，Allfrey 等 [2] 首次提出真核生物组蛋白乙酰化作为一种蛋白质翻译后修饰与基因的转录调控密切相关这一假说。组蛋白因富含精氨酸和赖氨酸等碱性氨基酸而带正电荷，与带负电荷的 DNA 紧密结合成组蛋白-DNA 复合物。乙酰化修饰中和赖氨酸残基的正电荷，使其与 DNA 的结合不再紧密而利于基因的转录。Eberharter [3] 提出组蛋白的乙酰化行使染色质转录调控的开关功能。蛋白乙酰化状态依赖于乙酰化酶和去乙酰化酶的调节，Kouzarides [4] 对细胞增殖过程中组蛋白乙酰化酶和去乙酰化酶进行了详细的综述。

2000 年，Kouzarides [5] 总结 30 多年的乙酰化研究做出了分析和预测：乙酰化修饰可能和蛋白质的磷酸化修饰一样，在生物体内是重要而且广泛存在的。其后 10 年的研究也支持并发展了该假说。大量非组蛋白存在乙酰化修饰，如转录因子、核相关蛋白、激素受体、细胞代谢相关蛋白、癌症相关蛋白等。第一个发现的乙酰化修饰的非组蛋白是 P53，乙酰化影响其与目的 DNA 的结合 [6]；YY1、E2F1、STAT6 等 DNA 结合蛋白也被发现发生乙酰化修饰 [7-9]。

乙酰化修饰的动态性、乙酰化修饰蛋白的低丰度以及传统分析技术的局限性，限制了乙酰化蛋白系统性、大规模的发现 [10-11]。蛋白质组学概念的提出及相关技术的发展，特别是高分辨率质谱结合乙酰化肽段的免疫富集技术，致使发现大量新的乙酰化蛋白和修饰位点 [10-11]。2006 年，Kim 等 [10] 利用免疫富集、纳米-高效液相色谱与多级串联质谱 (nano-HPLC/MS/MS) 技术，在 HeLa 细胞和鼠肝脏

细胞线粒体中发现了 195 个乙酰化修饰的蛋白，包括 388 个乙酰化位点，这是第一次系统性研究乙酰化蛋白的报道。2009 年，Choudhary 等 [12] 利用分辨率更高的质谱技术结合等电聚焦分离技术，在哺乳动物细胞中鉴定出 1 750 个蛋白，包括 3 600 个乙酰化位点。数据分析可知，乙酰化存在于细胞核、细胞质和线粒体等不同的细胞部位 [10]，并且在新陈代谢中广泛存在，包括细胞代谢、细胞增殖、mRNA 剪切、蛋白质合成等过程 [12]，这些发现扩展了对蛋白质乙酰化修饰广泛性的认识。

2010 年，Wang 等 [13] 在 *Science* 上发表文章，证明人肝脏组织中几乎每个与糖酵解、糖异生、三羧酸循环、尿素循环、脂肪酸代谢、糖原代谢等途径相关的酶都发生乙酰化，进一步验证了乙酰化与磷酸化修饰一样，具有保守、重要、广泛的功能。

2012 年，Henriksen 等 [14] 利用高分辨率质谱技术在酿酒酵母中鉴定出约 4 000 个蛋白质乙酰化位点，且乙酰化参与蛋白质合成、细胞质代谢、线粒体代谢等多个过程，进一步说明蛋白质乙酰化修饰在不同物种中广泛存在。

### 1.2 蛋白质乙酰化在原核生物中广泛存在

大肠杆菌作为模式生物，基因组简单且早已被测序 [15-16]，是研究蛋白组乙酰化的理想系统。2008 年，Yu 等 [17] 利用 nano-HPLC/MS/MS 技术在大肠杆菌中检测到 85 个乙酰化修饰的蛋白，包括 125 个乙酰化位点，其中大部分乙酰化蛋白与代谢有关，如 TCA 循环，在 85 个乙酰化修饰的蛋白中有 24 个 (28%) 与蛋白质合成相关，16 个 (19%) 与碳源代谢相关。2009 年，Zhang 等 [18] 在大肠杆菌中发现 91 个乙酰化修饰的蛋白，包括 138 个乙酰化位点，其中超过 70% 的蛋白质是代谢相关的酶类和翻译调节蛋白，揭示了乙酰化修饰和能量代谢的关系。上面两个实验中共报道了 263 个乙酰化位点，只有 11 个是两篇文献中共有的。比较合理的解释是 Zhang 等 [18] 选用的是对数期的细菌，而 Yu 等 [17] 选用的是稳定期的细菌。

相对于真核生物中几千个乙酰化的蛋白质，有理由相信大肠杆菌中鉴定到的 100 多个乙酰化蛋白质只占了整个乙酰化蛋白的小部分。2013 年，Zhang 等 [19] 利用高亲和力的泛乙酰化蛋白抗体富集技术，结合高分辨率质谱和生物信息学分析，在大肠杆菌中检测到 349 个乙酰化蛋白，包括 1 070 个乙酰化位点。大部分的蛋白质和代谢相关，与之前的报道一致，这大大扩展了大肠杆菌中乙酰化修饰蛋白的数量和种类，

并且提示蛋白质的乙酰化修饰与代谢有着重要的联系。

原核生物除了大肠杆菌, 其他细菌特别是一些致病菌蛋白质乙酰化修饰如何? 2010年, Zhao等<sup>[20]</sup>在 *Science* 上发表文章, 发现沙门氏菌中代谢酶是被广泛乙酰化修饰的, 这为原核生物乙酰化开辟了一个新的领域。采用相似的策略, 国内的研究者利用质谱分析在肺结核分支杆菌中发现了大量乙酰化

修饰的蛋白(未发表)。Kim等<sup>[21]</sup>在枯草芽孢杆菌中利用抗体富集、质谱分析发现了185个蛋白质的332个乙酰化位点, 与之前报道的大肠杆菌的乙酰化有59%的同源性。Lee等<sup>[22]</sup>在炽热芽孢杆菌中利用抗体富集、质谱分析发现了114个蛋白的253个乙酰化位点。以上结果表明, 不仅在真核生物中, 在原核生物中蛋白质乙酰化同样广泛存在并且具有重要的功能。图1以时间为轴, 展示了蛋白质乙酰

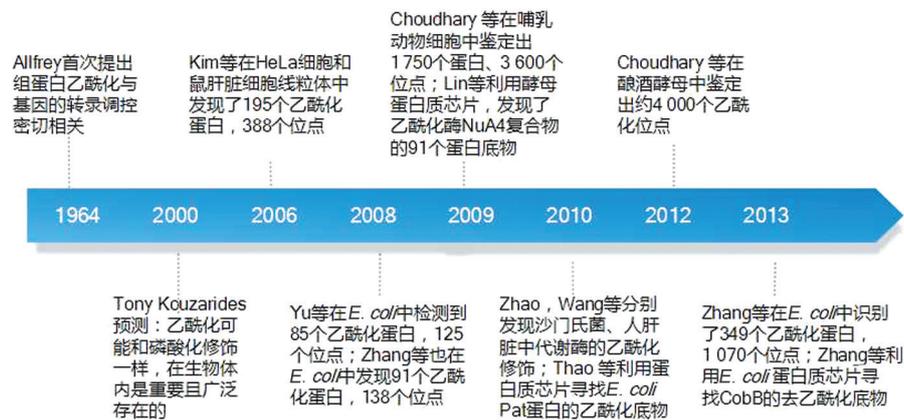


图1 蛋白质乙酰化系统性研究过程中的一些重要事件

化系统性研究过程中的一些重要事件。

## 2 重要功能的原核乙酰化蛋白质举例

乙酰辅酶A是能量代谢的重要中间代谢产物, 是细菌利用醋酸、辅酶A和ATP在乙酰辅酶A合成酶(acetyl-CoA synthase, ACS)的催化下生成的。在沙门氏菌中, ACS的活性受609位赖氨酸乙酰化有无的调控<sup>[23-24]</sup>, Pat乙酰化ACS使其失去催化活性, CobB使乙酰化的ACS去乙酰化而有催化活性。CheY是一种趋化反应调节蛋白, 作为马达蛋白复合物的组成成分, 其乙酰化水平受ACS和CobB的调控<sup>[23]</sup>。CheY的乙酰化降低了它与FliM之间的亲和力<sup>[24]</sup>, 进而改变细菌的运动方式而影响趋化性。RcsB是一种转录因子, 调节细菌中一系列重要的过程, 如荚膜合成、细胞分裂、渗透压调节等。Thao等<sup>[25]</sup>利用大肠杆菌蛋白质芯片发现, RcsB是Pat的乙酰化底物, RcsB的乙酰化会影响它与DNA的结合, 进而影响其下游调控基因的表达。NhoA是芳基胺乙酰转移酶, 可以催化一系列芳基胺底物的乙酰化。Zhang等<sup>[26]</sup>利用大肠杆菌蛋白质芯片, 发现NhoA是去乙酰化酶CobB的底物, 其乙酰化

修饰会降低酶活进而影响代谢活性和硝基化合物的活性。核糖体30S亚基和50S亚基大部分组成成分都是被乙酰化修饰的<sup>[16,19]</sup>, 如S18、S5和L12分别被RimI、RimJ和RimL乙酰化修饰<sup>[27-28]</sup>。L12和L7以二聚体形式存在。Ramagopal等<sup>[28]</sup>指出, 当大肠杆菌达到生长稳定期, 核糖体蛋白L12的N端乙酰化程度较对数期是升高的。EF-G是原核生物翻译过程中的一种延伸因子, 能水解GTP供能, 具有转位酶活性。Jones等<sup>[24]</sup>研究发现, EF-G中关键的匹配tRNA反密码子茎环结构的两个赖氨酸是被乙酰化修饰的。这些结果提示, 乙酰化修饰对蛋白质合成的影响可能是很好的研究方向。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是生物体内清除自由基的抗氧化酶。利用质谱技术, 鉴定出大肠杆菌SodB蛋白51位Lys乙酰化<sup>[18]</sup>和沙门氏菌中SodB同源蛋白44位Lys乙酰化<sup>[20]</sup>。徐玉英<sup>[29]</sup>通过CobB突变证明, CobB有催化SodB去乙酰化的活性, 从而调节其功能。异柠檬酸脱氢酶是TCA循环中的关键酶, 催化异柠檬酸氧化脱羧形成 $\alpha$ -酮戊二酸, 它的多位点被乙酰化修饰<sup>[18-19]</sup>, 特别是催化的关键位点Lys230, 该位点突变成Met会使

Kcat 值降低为野生型的 1.1%<sup>[30]</sup>。综上说明乙酰化修饰参与很多重要蛋白的功能调节。

### 3 原核生物乙酰化酶和去乙酰化酶以及酶与底物的研究

早期研究聚焦于组蛋白的乙酰化,发现了大量的乙酰化酶和去乙酰化酶。组蛋白的乙酰化酶家族有 3 类,分别为 Gcn5 相关的乙酰化酶 (GNAT) 家族、MYST 家族和 CBP/p300<sup>[31]</sup>。部分蛋白质是自身乙酰化,如大肠杆菌中的乙酰辅酶 A 合成酶。GNAT 家族在真核生物和原核生物中分布都很广泛<sup>[32]</sup>,很多实验室通过在原核生物中寻找同源序列,以期找到类似的乙酰化酶及其底物。原核生物中唯一发现的 Nε 乙酰化酶是 2004 年 Starai 和 Escalante-Semerena<sup>[23]</sup> 在沙门氏菌中发现的 Pat,他们利用乙酰辅酶 A 使中心代谢酶乙酰辅酶 A 合成酶乙酰化而调节其活性。在真核生物中,去乙酰化酶有两大家族: Zn<sup>2+</sup> 依赖的 Rpd3/Hda1 家族和 NAD<sup>+</sup> 依赖的 sirtuin 家族。虽然在大肠杆菌中找到很多预测的去乙酰化酶的同源序列,但是有去乙酰化酶活性的蛋白只有 CobB。Sir2 是一类依赖于 NAD<sup>+</sup> 的去乙酰化酶,但是与 Sir2 同源的 CobB 最早被用于 ADP-核糖基转移酶的功能研究<sup>[33]</sup>。2002 年, Starai 等<sup>[34]</sup> 在鼠伤寒沙门氏菌中发现乙酰辅酶 A 合成酶的 609 位赖氨酸残基的乙酰化被 CobB 去掉后激活其酶活性,这是第一次关于原核生物乙酰化酶的报道。随后在大肠杆菌中,以 CobB、Pat 作为去乙酰化酶、乙酰化酶进行了一系列的研究。2010 年, Li 等<sup>[35]</sup> 发现 CobB 可以催化 CheY 的去乙酰化,而调节大肠杆菌细胞的趋化性。2013 年, Zhang 等<sup>[26]</sup> 利用大肠杆菌蛋白质芯片寻找 CobB 的去乙酰化底物,成功地找到 9 个蛋白底物。2010 年, Thao 等<sup>[25]</sup> 利用蛋白质芯片寻找大肠杆菌中 Pat 蛋白的乙酰化底物,找到了作为转录因子的 RcsB,乙酰化状态会改变它的活性,从而调节与 DNA 的结合能力。值得注意的是,在 RcsB 的调节中, Pat/CobB 是作为一对乙酰化酶/去乙酰化酶存在的。虽然大量的乙酰化蛋白被鉴定,但是乙酰化酶和去乙酰化酶在原核生物中知之甚少,因此有理由相信还存在新的乙酰化酶和去乙酰化酶。如核糖体蛋白大部分是被乙酰化的<sup>[17-18]</sup>,而在沙门氏菌 *ΔcobB* 敲除菌中大部分核糖体蛋白乙酰化水平没有明显的变化<sup>[13]</sup>,这说明核糖体蛋白不是 CobB 的去乙酰化底物,细菌体内其他的去乙酰化酶有待发现。本实验室 Tu 等(未

发表)基于蛋白质芯片,在大肠杆菌中成功地找到了新的去乙酰化酶,并在体内发现了新的乙酰化调节途径。该结果显示,基于大肠杆菌蛋白质芯片,可进行一系列功能重要的乙酰化底物的新的去乙酰化酶的探索,为发现新的去乙酰化酶提供一种简便、可行的方法。

不少实验室基于原核生物中大量的乙酰化蛋白寻找新的乙酰化酶和去乙酰化酶, Weinert 等<sup>[36]</sup> 从非酶学角度解释了乙酰化蛋白多而乙酰化酶少的成因。乙酰磷酸 (AcP) 作为糖酵解的产物,在体外以化学方法乙酰化赖氨酸,并且体内含量和乙酰化水平正相关。它在体内以非酶的形式乙酰化蛋白,这解释了为什么大肠杆菌乙酰化蛋白多而乙酰化酶少,也解释了大肠杆菌中乙酰化水平低却能被细胞代谢水平动态影响的现象。值得注意的是,蛋白质去乙酰化的方式仍然没有被探明。

### 4 结合乙酰化的结构域、乙酰化与其他修饰的关系

乙酰化是动态、可逆的翻译后修饰,这依赖于乙酰化酶和去乙酰化酶对底物的特异性识别。Yang<sup>[37]</sup> 对酶作用于乙酰化底物的结合域进行了综述,指出乙酰化产生了含有溴区结构域的蛋白特定的锚定位点。Gcn5、PCAF、TAF1 和 CBP 的溴区结构域分别特异识别组蛋白、p53、c-Myb 和 MyoD 的乙酰化赖氨酸侧链,乙酰化赖氨酸侧链两侧的氨基酸序列也与酶和底物的识别紧密相关。在大肠杆菌中,也发现了识别乙酰化赖氨酸侧链的包含溴区结构域的蛋白质,但数目很少,而且在系统发生上与真核生物差异性很大<sup>[24]</sup>。

乙酰化作为广泛存在的翻译后修饰,与同样广泛存在的磷酸化、泛素化有密切的联系。Hwang 等<sup>[38]</sup> 提到,酵母中 Nα 乙酰化作为蛋白质降解的信号, N 端乙酰化的甲硫氨酸以及乙酰化的丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸(统称为降解决定子)都会被泛素连接酶 Doa10 识别而特异性降解。2013 年, Qian 等<sup>[39]</sup> 在精子发生过程中发现了一条依赖于乙酰化的组蛋白降解途径,其中提到 PA200 识别乙酰化组蛋白特异的结构域,这为依赖于 PA200 及其同源蛋白的作用于乙酰化底物的降解提供了一个研究方向。

自从 2000 年剑桥大学的 Kouzarides<sup>[5]</sup> 提出蛋白质的乙酰化修饰类似于磷酸化修饰的假设后,乙酰化研究进入了一个高速发展阶段。那同样广泛存

在的两种修饰有哪些联系呢? 对此, 2008年, Yang和Seto<sup>[40]</sup>提出了蛋白质修饰密码 (protein modification code) 的概念: 磷酸化和乙酰化的修饰影响了蛋白质进一步的修饰, 从而形成复杂的修饰密码; 但是之前还没有人从整体水平上研究一个翻译后修饰对另一个翻译后修饰的影响<sup>[41]</sup>。2012年, van Noort等<sup>[42]</sup>采用基因敲除的肺炎支原体来研究乙酰化和磷酸化的相互影响, 通过分别敲除肺炎支原体中唯一的磷酸酶 PrpC, 以及仅有的磷酸化激酶 HprK、PknB, 利用细胞稳定同位素标记 (stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC)、乙酰化抗体富集肽段、高分辨率质谱整体研究磷酸化和乙酰化的相互影响。2012年, Soufi等<sup>[43]</sup>对从蛋白质组学层次研究细菌乙酰化修饰和磷酸化修饰的相互影响进行了综述, 指出未来的挑战是系统性地在不同的细菌种属中查找这些不同修饰的相互作用, 从而极大扩展对复杂翻译后调控网络的认识。

## 5 新技术和方法的改进用于乙酰化研究

高分辨率质谱技术、乙酰化肽段的免疫富集沉淀技术和生物信息学分析为大规模发现乙酰化修饰蛋白提供了一条很好的技术路线<sup>[10, 17]</sup>。为了检测到更多的乙酰化修饰的蛋白, 用于乙酰化肽段富集的抗体的质量极其重要。常规选用的是泛乙酰化的多克隆抗体, Shaw等<sup>[44]</sup>采用了单克隆抗体“鸡尾酒”作为检测工具 (检测到181个乙酰化位点), 实验中作为对照的是多克隆抗体富集 (检测到244个乙酰化位点), 其中有18% (65个) 的乙酰化位点相同。而单克隆抗体可以更准确地富集位点特异性的乙酰化蛋白<sup>[45]</sup>。以上结果说明乙酰化抗体对检测到的蛋白质种类和数量不同的重要性, 发展更高精度的质谱来提高乙酰化蛋白检测的范围是未来发展的方向。另一方面, 在真核生物中, 超过2 000多个蛋白质 (4 000多个乙酰化位点) 被检测到, 更好地理解每个蛋白质的功能及生物体复杂的调控网络需要生物信息学的解读。Lu等<sup>[46]</sup>利用生物信息学技术分析了3个数据库: Choudhary鉴定到的3 000多个乙酰化位点、PhosphositePlus和Uniprot, 并采用gene ontology(GO)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)、domain structure prediction、二级结构预测、mutating K-Ac site *in silico* 来整体分析乙酰化蛋白的功能, 并且对乙酰化和其他的翻译后修饰之间对细胞功能调控的相互关系进行了预测。

蛋白质芯片作为蛋白质组学强有力的工具, 也被用于乙酰化的研究。Lin等<sup>[47]</sup>利用酵母蛋白质芯片, 发现了乙酰化酶 NuA4 复合物91个乙酰化修饰的蛋白底物, Thao等<sup>[25]</sup>利用蛋白质芯片找到大肠杆菌中 Pat 蛋白的乙酰化底物, Zhang等<sup>[26]</sup>利用大肠杆菌蛋白质芯片找到 CobB 的去乙酰化底物, 以及本实验室 Tu等 (未发表) 基于蛋白质芯片在大肠杆菌中成功地找到了新的去乙酰化酶。以上结果说明蛋白质芯片可以用于寻找乙酰化底物、新的去乙酰化酶, 未来还可以全局性寻找乙酰化蛋白相互作用蛋白, 最终希望形成一个乙酰化调控网络。

Mertins等<sup>[48]</sup>基于质谱技术利用系列富集的方式对同一个生物样品蛋白的翻译后修饰 (磷酸化、泛素化、乙酰化) 进行了整合分析。采用了 SEDPM (serial enrichments of different post-translational modification) 技术对8 000多个蛋白质进行定量分析, 鉴定出超过20 000个磷酸化、15 000个泛素化和3 000个乙酰化位点, 这为整体性研究细胞代谢及信号转导通路提供了一个有力的实验工具。

## 6 展望

在乙酰化位点的大量发现以及乙酰化重要功能, 如代谢的揭示的背景下, 对得到的大量数据进行精确的功能解读需要蛋白质组学家和分子生物学家的共同努力。

生物学方面, 在原核生物中蛋白质乙酰化是广泛存在的, 但至今还未有膜蛋白乙酰化的报道, 这和膜蛋白本身的理化性质以及很难纯化有关。大肠杆菌中的乙酰化蛋白有越来越多的报道, 而已知的乙酰化酶和去乙酰化酶仅有一对。沙门氏菌和结核杆菌大量乙酰化蛋白的发现提示, 在别的病原微生物中乙酰化可能起广泛的调节作用。所以说, 新的去乙酰化酶、新的乙酰化底物、乙酰化在蛋白质功能中所起的作用, 以及乙酰化调节病原菌与宿主的关系, 都是值得研究的问题。

在技术层面, 高分辨率质谱技术进一步发展和蛋白质芯片更广泛的应用, 会推动乙酰化的研究。定量蛋白质组学用于乙酰化研究也有报道。2012年, Chen等<sup>[49]</sup>利用 SILAC 结合高分辨率质谱, 在哺乳动物 MEF 细胞中定量研究 SIRT1 底物乙酰化水平的变化, 找到大量特异性的乙酰化底物, 同时将定量蛋白质组学应用于乙酰化研究中。基于此思路, 在大肠杆菌中, 利用  $\Delta cobB$  菌株结合 SILAC 和质谱, 来研究 CobB 的特异去乙酰化底物, 以及用磷酸化

抗体特异富集、质谱分析来研究乙酰化和磷酸化的相关作用,从而进一步研究其生理功能,不失为一个好的切入点。

赖氨酸有多种形式的翻译后修饰,如甲基化、乙酰化、磷酸化和泛素化等。利用高分辨率质谱技术相继发现赖氨酸的丙二酰化和琥珀酰化,更重要的是这两种修饰在生命进化中是保守的<sup>[50-52]</sup>。Peng等<sup>[52]</sup>发现了Sirt5为赖氨酸去琥珀酰化和去丙二酰化的调控酶,该酶具有催化赖氨酸去琥珀酰化和去丙二酰化的体内和体外活性,首次证明了赖氨酸去乙酰化酶(HDAC)的非去乙酰化的活性。在原核中,乙酰化与琥珀酰化究竟有什么关系?国内有研究人员利用高分辨率质谱找出了2000个以上的赖氨酸乙酰化位点和2000个以上的琥珀酰化位点,有意思的是CobB在大肠杆菌中具有催化赖氨酸去琥珀酰化的活性(未发表)。Weinertn等<sup>[51]</sup>在Cell上发文指出,大肠杆菌中大多数蛋白质乙酰化位点也发生琥珀酰化修饰,进一步证明乙酰化和琥珀酰化紧密相关。综上,既然CobB为迄今发现的唯一的去乙酰化酶,并且还能去琥珀酰化,有理由相信大肠杆菌中还存在新的去乙酰化酶,或许其对琥珀酰化修饰及其他酰化也有作用。

### [参 考 文 献]

- [1] Plevoda B, Sherman F. N $\alpha$ -terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Biol Chem*, 2000, 275(47): 36479-82
- [2] Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1964, 51: 786-94
- [3] Eberharter A. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin-Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep*, 2002, 3(3): 224-9
- [4] Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9(1): 40-8
- [5] Kouzarides T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J*, 2000, 19(6): 1176-9
- [6] Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, 1997, 90(4): 595-06
- [7] Yao YL, Yang WM, Seto E. Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Mol Cell Proteomics*, 2001, 21(17): 5979-91
- [8] Martinez-Balbas MA, Bauer UM, Nielsen SJ, et al. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J*, 2000, 19(4): 662-71
- [9] Shankaranarayanan P, Chaitidis P, Kuhn H, et al. Acetylation by histone acetyltransferase CREB-binding protein/p300 of STAT6 is required for transcriptional activation of the 15-lipoxygenase-1 gene. *J Biol Chem*, 2001, 276(46): 42753-60
- [10] Kim SC, Sprung R, Chen Y, et al. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell*, 2006, 23(4): 607-18
- [11] Wu HY, Huang FY, Chang YC, et al. Strategy for determination of *in vitro* protein acetylation sites by using isotope-labeled acetyl coenzyme a and liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem*, 2008, 80(16): 6178-89
- [12] Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and Co-regulates major cell functions. *Science*, 2009, 325(5942): 834-40
- [13] Wang QJ, Zhang YK, Yang C, et al. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science*, 2010, 327(5968): 1004-7
- [14] Henriksen P, Wagner SA, Weinert BT, et al. Proteome-wide analysis of lysine acetylation suggests its broad regulatory scope in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(11): 1510-22
- [15] Durfee T, Nelson R, Baldwin S, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol*, 2008, 190(7): 2597-06
- [16] Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, 277(5331): 1453-62
- [17] Yu BJ, Kim JA, Moon JH, et al. The diversity of lysine-acetylated proteins in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(9): 1529-36
- [18] Zhang JM, Sprung R, Pei JM, et al. Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(2): 215-25
- [19] Zhang K, Zheng SZ, Yang JS, et al. Comprehensive profiling of protein lysine acetylation in *Escherichia coli*. *J Proteome Res*, 2013, 12(2): 844-51
- [20] Zhao SM, Xu W, Jiang WQ, et al. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science*, 2010, 327(5968): 1000-4
- [21] Kim D, Yu BJ, Kim J, et al. The acetylproteome of Gram-positive model bacterium *Bacillus subtilis*. *Proteomics*, 2013, 13(10-11): 1726-36
- [22] Lee DW, Kim DI, Lee YJ, et al. Proteomic analysis of acetylation in thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Proteomics*, 2013, 13(15): 2278-82
- [23] Starai VJ, Escalante-Semerena JC. Identification of the protein acetyltransferase (Pat) enzyme that acetylates acetyl-CoA synthetase in *Salmonella enterica*. *J Mol Biol*, 2004, 340(5): 1005-12
- [24] Jones JD, O'Connor CD. Protein acetylation in prokaryotes. *Proteomics*, 2011, 11(15): 3012-22
- [25] Thao S, Chen CS, Zhu H, et al. N-epsilon-lysine acetylation of a bacterial transcription factor inhibits its DNA-binding activity. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15123

- [26] Zhang QF, Gu J, Gong P, et al. Reversibly acetylated lysine residues play important roles in the enzymatic activity of *Escherichia coli* N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase. *FEBS J*, 2013, 280(9): 1966-79
- [27] Tanaka S, Matsushita Y, Yoshikawa A, et al. Cloning and molecular characterization of the gene *rimL* which encodes an enzyme acetylating ribosomal protein L12 of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet*, 1989, 217(23): 289-93
- [28] Ramagopal S, Subramanian AR. Alteration in the acetylation level of ribosomal protein L12 during growth cycle of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71(5): 2136-40
- [29] 徐玉英. 乙酰化对大肠杆菌 *sodB* 蛋白功能的影响研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012
- [30] Lee ME, Dyer DH, Klein OD, et al. Mutational analysis of the catalytic residues lysine 230 and tyrosine 160 in the NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1995, 34(1): 378-84
- [31] Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(2): 435-59
- [32] Vetting MW, de Carvalho LPS, Yu M, et al. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 433(1): 212-26
- [33] Tsang AW, Escalante-Semerena JC. CobB, a new member of the SIR2 family of eucaryotic regulatory proteins, is required to compensate for the lack of nicotinate mononucleotide : 5,6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase activity in *cobT* mutants during cobalamin biosynthesis in *Salmonella typhimurium* LT2. *J Biol Chem*, 1998, 273(48): 31788-94
- [34] Starai VJ, Celic I, Cole RN, et al. Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine. *Science*, 2002, 298(5602): 2390-2
- [35] Li R, Gu J, Chen YY, et al. CobB regulates *Escherichia coli* chemotaxis by deacetylating the response regulator CheY. *Mol Microbiol*, 2010, 76(5): 1162-74
- [36] Weinert BT, Iesmantavicius V, Wagner SA, et al. Acetyl-phosphate is a critical determinant of lysine acetylation in *E. coli*. *Mol Cell*, 2013, 51(2): 265-72
- [37] Yang XJ. Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays*, 2004, 26(10): 1076-87
- [38] Hwang CS, Shemorry A, Varshavsky A. N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. *Science*, 2010, 327(5968): 973-7
- [39] Qian MX, Pang Y, Liu CH, et al. Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell*, 2013, 153(5): 1012-24
- [40] Yang XJ, Seto E. Lysine acetylation: Codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell*, 2008, 31(4): 449-61
- [41] Pristic S, Dankwa S, Schwartz D, et al. Extensive phosphorylation with overlapping specificity by *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(16): 7521-6
- [42] van Noort V, Seebacher J, Bader S, et al. Cross-talk between phosphorylation and lysine acetylation in a genome-reduced bacterium. *Mol Syst Biol*, 2012, 8: 571
- [43] Soufi B, Soares NC, Ravikumar V, et al. Proteomics reveals evidence of cross-talk between protein modifications in bacteria: focus on acetylation and phosphorylation. *Curr Opin Microbiol*, 2012, 15(3): 357-63
- [44] Shaw PG, Chaerkady R, Zhang Z, et al. Monoclonal antibody cocktail as an enrichment tool for acetylome analysis. *Anal Biochem*, 2011, 83(10): 3623-6
- [45] Li FP, Allahverdi A, Yang RL, et al. A direct method for site-specific protein acetylation. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50(41): 9611-4
- [46] Lu ZK, Cheng ZY, Zhao YM, et al. Bioinformatic analysis and post-translational modification crosstalk prediction of lysine acetylation. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28228
- [47] Lin YY, Lu JY, Zhang J, et al. Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis. *Cell*, 2009, 136(6): 1073-84
- [48] Mertins P, Qiao JW, Patel J, et al. Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nat Methods*, 2013, 10(7): 634-7
- [49] Chen Y, Zhao WH, Yang JS, et al. Quantitative acetylome analysis reveals the roles of SIRT1 in regulating diverse substrates and cellular pathways. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(10): 1048-62
- [50] Zhang Z, Tan M, Xie Z, et al. Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification. *Nat Chem Biol*, 2010, 7(1): 58-63
- [51] Weinert BT, Schölz C, Wagner SA, et al. Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation. *Cell Rep*, 2013, 4(4): 842-51
- [52] Peng C, Lu Z, Xie Z, et al. The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(12): M111.012658