

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02879

研究課題名(和文) トキシン-アンチトキシンシステムを攪乱する化合物の探索と機能評価

研究課題名(英文) Screening for compounds that disrupt the toxin-antitoxin complex and evaluation of their function

研究代表者

野田 尚宏 (Noda, Naohiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：70415727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：MazFは原核生物の細胞内で特異的な配列の一本鎖RNAを切断することが知られているトキシンタンパク質である。通常は対となるアンチトキシンであるMazEタンパク質によって抗毒化されているが、MazEとの結合がなくなることでMazFは機能を発揮し、細胞を休眠状態に陥らせたりする。本研究ではMazEFの結合を攪乱する化合物のスクリーニングを行った。その結果、MazFのRNA切断機能を細胞内で人為的に制御することができるいくつかの化合物を見出した。標的細菌に細胞外からMazFを導入し殺菌する、外来のMazFを利用した新しい殺菌手段の開発も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗生物質の探索には、寒天培地上の生育阻止円等を利用して抗生物質生産菌を探索する方法が用いられてきた。このような方法で獲得できる抗生物質生産菌は現在までにほぼ取り尽くされた感があり、新たな抗生物質を獲得するためには、新しい標的分子や生物機能に着目する必要がある。そこで本研究では多くの原核生物が持つと言われているトキシンタンパク質であるMazFとそのアンチトキシンタンパク質であるMazEの機能に着目して、新しい抗生物質を探索するスキームを構築した点において社会的意義や学術的意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：MazF is a toxin protein to cleave single-stranded RNAs with a specific sequence manner. Normally, MazF is neutralized by the MazE protein, which is an antitoxin for MazF. Under stress conditions, MazF is released from MazE and cleaves targeted sequence RNAs in the cell. The cleavage function of MazF makes the cells a dormant state or cell death. In this study, we focus on the ribonuclease activity of MazF and aim to make the screening system for candidates of antimicrobial compounds. The compounds can disrupt MazEF complex and make MazF active. We constructed the screening system for compounds that disrupt the binding of MazEF using small chemical compounds library. As a result, we found several compounds that can disrupt MazEF complex and induce the RNA cleavage function of MazF. We also developed an antimicrobial method using obtained MazF. The method is that the MazF is introduced into the target cells to sterilize them.

研究分野：応用微生物学

キーワード：トキシンタンパク質 抗菌活性

1. 研究開始当初の背景

トキシン-アンチトキシンシステムは 1980 年代にプラスミドの安定化機構の一つとして発見されたものである。トキシンはタンパク質であり、細胞質内の特異的なターゲット(タンパク質、RNA 分子など)を攻撃する。一方、アンチトキシンはトキシン分子と直接的、間接的に相互作用することで、トキシン分子による細胞内ターゲットへの攻撃を阻止する分子である。2003 年にこのトキシン分子の一つである大腸菌の MazF が一本鎖 RNA の ACA 配列を特異的に認識して切断するエンドリボヌクレアーゼ活性を持つことが見出された。大腸菌の MazF の機能が解明されると、大腸菌以外の様々な原核生物の MazF が注目されるようになった。バイオインフォマティクスを駆使した研究から、MazF は広く原核生物に存在することが解明された。この MazF は特定の RNA 配列を切断することで様々なストレスに応答して個あるいは集団の維持のために細胞死や休眠状態を引き起こすと推測されている。また、MazF のアンチトキシンは MazE と呼ばれるタンパク質であり、細胞内で通常は MazF と結合して、その活性を抑制している。MazEF 機構は細胞の休眠や覚醒に関係していると言われており、この機構を人為的に制御することで新しい抗生物質の開発につながることを期待される。

抗生物質の探索には、寒天培地上の生育阻止円(ハロー)を利用して抗生物質生産菌を探索する方法が伝統的に用いられてきている。このような方法で獲得できる抗生物質生産菌は現在までにほぼ取り尽くされた感があり、新たな抗生物質を獲得するためには、新しい標的分子や生物機能に着目する必要がある。抗生物質のターゲットは細胞壁合成酵素をはじめ、DNA/RNA ポリメラーゼ、プロテアーゼなどの微生物の増殖・生命活動維持に必須とされる生体分子である。新規な抗生物質を探索するためには、これまでにターゲットとなっていない必須生体分子や機能を標的とした新しい発想に基づいて進める必要がある。

そこで、本研究では抗生物質探索の新しいターゲット分子として細胞内での RNA 切断活性を持つ MazF とそのアンチトキシン分子である MazE に着目した。MazF と MazE の結合を攪乱することができる小分子を化合物ライブラリーからスクリーニングし、獲得した MazEF 複合体攪乱分子が抗生物質としての機能を持つかどうかを検証することを目的としている。MazEF を抗生物質の標的分子として捉え、それらの結合を攪乱することで、RNA 切断活性を持つ MazF 分子を細胞内で遊離させる。遊離した MazF はその RNA 切断活性を暴走させることで宿主微生物を休眠状態や死に至らしめるという学術的仮説に基づいて、実際にそのような化合物が存在するかどうかを検証する。また、RNA の転写後調節機能としてその存在が見出された MazEF を抗生物質の標的分子として考え、それらの機能を解明するとともに、その機能を能動的に活用することで新しい抗菌システムの構築を目指す。具体的には、細菌の生存に重要な RNA を切断する MazF を見出し、この MazF を標的とする病原性細菌などに導入する手法を考案し、標的細菌の中で殺菌効果を示すかどうかについての検証を行う。

2. 研究の目的

本研究では、モデル微生物の MazF と MazE を取得し、それらの結合を攪乱することができる小分子化合物を蛍光スクリーニングアッセイにより探索することを目的としている。抗生物質探索の新しいターゲット分子として細胞内での RNA 切断活性を持つ MazF とそのアンチトキシン分子である MazE に着目した。MazF と MazE の結合を攪乱することができる小分子を化合物ライブラリーからスクリーニングする一連の技術開発を目的としている。また、MazF の RNA 切断活性を利用した微生物制御手法についても広く検討する。特に RNA 切断活性が確認された MazF を病原性細菌に導入し、殺菌するという新しい殺菌技術の開発も併せて行う。

3. 研究の方法

スクリーニング実験に用いるための MazE および MazF を取得するために、MazE または MazF がコードされた遺伝子が挿入された pET ベクターを作製し、それを大腸菌に導入した。そして、形質転換した大腸菌を大量培養し、これに IPTG を加えることで MazE または MazF の発現を誘導した。タンパク質を発現誘導させた大腸菌を超音波で 20 分間処理し、破砕液の上清をタンパク質抽出に用いた。MazE および MazF は C 末端に His-tag が付加されているため、Ni カラムを用いたカラムクロマトグラフィー法で MazE および MazF をそれぞれ精製した。SDS-PAGE を用いて精製・取得したタンパク質のサイズを評価することで、取得したタンパク質が MazE または MazF であるかを確認した。さらにタンパク質抽出液と RNA を混合し、MazF の RNA 切断活性および MazE が MazF の RNA 切断活性を抑制するかどうかについて評価した。活性が確認された MazF について、RNA と切断反応を行ったのちに切断された RNA 断片の配列を、次世代シーケンサーを用いて評価した。得られた結果から、MazF の認識切断配列を確認した。このようにして取得した MazF と MazE 以降のスクリーニング実験を実行した。

4. 研究成果

(1) MazF および MazE タンパク質の取得と機能評価

選定したモデル微生物の MazF および MazE の取得を試みた。モデル病原性微生物のトキシナンパク質 MazF とそのアンチトキシナンパク質 MazE について配列情報をデータベースから取得し、アミノ酸配列情報等を確認・精査した。取得した配列情報に基づきタンパク質発現用のプラスミドの構築と宿主内での発現を行った。発現誘導の条件などを繰り返し精査することにより、目的とする分子量に近いタンパク質を取得することができた。さらに、取得したタンパク質について、特定の塩基配列をコードせず、また極端な偏りの配列を持たない人工的な配列から構成される RNA 鎖を複数種類用いて、RNA 切断活性を評価した。具体的にはこれらの RNA を取得したタンパク質と一定時間反応させ、その際の RNA の切断様式を電気泳動により評価した。その結果、ランダムに切断したような切断パターンではなく、何らかの特定の認識配列箇所 で切断したと考えられる切断パターンが得られた。これらの結果から取得したタンパク質が MazF であることが確信された。さらに、切断された RNA の切断箇所にアダプター配列を付加した後に、次世代シーケンサーを用いて網羅的な RNA 配列解析を行い、切断配列と思われる候補配列を複数見出すことに成功した。さらに、取得した MazF の認識配列を含み、MazF によって切断されると蛍光を発するような核酸プローブを設計し、本プローブを MazF のみと反応させた際には蛍光強度が経時的に上昇し、MazEF 両タンパク質と反応させた際にはそれが抑制されることを確認した。これらの結果より、本手法が MazEF の結合の有無を確認するスクリーニングアッセイ系として機能することが示された。

(2) MazEF 複合体の結合を攪乱する化合物の探索

MazEF 複合体の結合を攪乱する化合物の探索のために小分子化合物のライブラリーを準備した。この小分子化合物ライブラリーは 450 種類程度の天然有機化合物からなるライブラリーである。まず、各天然有機化合物と抗毒性分子 MazE を室温で反応させた。そして、この反応液に MazF を加え、MazE と MazF の複合体形成を促進させた後に、MazF の RNA 切断活性を評価した。RNA 切断活性の評価には、核酸蛍光プローブを用いた MazF 活性測定法を利用した。ある化合物が MazE と MazF の複合体形成を攪乱した場合、MazF は MazE による RNA 切断活性の抑制を受けないため、核酸蛍光プローブを切断することができ、蛍光値の上昇が見られると予想される。一方で、ある化合物が MazE と MazF の複合体形成を攪乱しなかった場合、MazF は MazE によって RNA 切断活性が抑制されるため、核酸蛍光プローブを切断することができないため、蛍光値の上昇見られないと予想される。この原理を用いて、2 種類の MazEF をモデルとして用いてスクリーニングを実施した。まず、モデル MazEF の複合体形成を攪乱する化合物を、化合物ライブラリーを対象に探索した。ライブラリーに含まれる化合物それぞれについて蛍光値の上昇率を算出し、Z スコアを用いて化合物の MazEF の結合の攪乱の程度を評価した。その結果、450 種類程度の天然有機化合物からなるライブラリーのうち 5 つの化合物を添加したとき、蛍光値の上昇率が高くなることが明らかになった。蛍光値の上昇率が高くなった 5 つの化合物のうちの 3 つの化合物の Z スコアは 8.0 前後であり、他の化合物と比較して、蛍光値が顕著に上昇したことがわかった。また、残りの 2 つの化合物も Z スコアが 3.0 前後であり、モデル MazEF の複合体形成を攪乱する候補物質として機能している可能性が示唆された。この 5 つの化合物を用いて再度同一の実験を行ったところ、同様に蛍光値が上昇し、再現性が確認された。この 5 つの化合物には共通する構造が見受けられたため、その構造がモデル MazE と MazF の結合を攪乱するのに重要であることが示唆された。MazE と MazF の結合をさらに強力に攪乱するためには、化合物の官能基の変更や修飾など更なる検討が可能であり、また必要であることも示唆された。

次に、モデル MazEF とはアミノ酸配列が異なるモデル MazEF を用いて、モデル MazEF と同様な結果が得られるかを検証した。その結果、モデル MazEF を攪乱させた 5 つの化合物をはじめ、MazEF の結合を攪乱する化合物は今回用いた 450 種類程度の天然有機化合物からなるライブラリーを用いたスクリーニング試験ではほとんど得られなかった。また、いくつかの化合物では Z スコアが 2.0 を超えるような結果が出ることもあった。しかし、その化合物について再現性を確認したが、同様な結果が安定して得られなかったため、モデル MazEF を攪乱させるような化合物は今回用いた 450 種類程度の天然有機化合物からなるライブラリーには含まれていないと考えられた。このようにモデル MazEF のスクリーニング実験において、と同様な結果が得られなかった要因として、このモデル MazE とモデル MazE の配列同一性および類似性は極めて低いことが挙げられる。つまり、5 つの化合物はモデル MazEF に特異的に作用していることが示唆された。この結果は、全ての MazEF を保有する細菌が細胞死誘導の標的にならず、特定の MazEF を持つ細菌のみを細胞死に誘導することができることを暗示している。つまり、MazEF を攪乱する化合物は、選択的な殺菌効果が期待できると考えられる。

(3) MazF を利用した新しい殺菌技術の開発

細菌の必須遺伝子を切断する強力な MazF が得られた場合、これを他の病原性細菌に細胞外から導入し殺菌する、すなわち外来の MazF を利用した殺菌手段が考えられる。外来の MazF の病原性細菌への導入手法を検討した結果、MazF 遺伝子を導入したファージを病原性細菌に感染させ、細胞内で MazF を発現させることを着想し、ファージの遺伝子組換え方法について文献調査を元

にして、MazF 搭載型ファージの作製プロトコルを確立した。

作製したプロトコルに従い、遺伝子組換え技術により MazF 導入ファージを作製した。次に、MazF 導入ファージを大腸菌に感染させて培養した結果、感染 6 時間後において、コントロール群と比較して大腸菌の増殖速度が 40%程度に抑制されることが示された。さらに、様々な細菌から取得した MazF 遺伝子をファージに導入して大腸菌に感染させたところ、MazF の種類によって大腸菌の増殖の抑制効果が異なることが示された。以上より、外来の MazF を用いた病原性細菌の殺菌技術構築の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamiya-Ishitsuka Hiroko, Tsuruga Masako, Noda Naohiro, Yokota Akiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Conserved Amino Acid Moieties of Candidatus Desulforudis audaxviator MazF Determine Ribonuclease Activity and Specificity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.748619	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡部拓真、葵理恵、石塚寛子、江雨濃、横田亜紀子、常田聡、野田尚宏
2. 発表標題 Bacillus pumilusが保有するMazF分子の機能解析
3. 学会等名 第15回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横田亜紀子
2. 発表標題 Clostridium perfringens由来Toxin-AntitoxinシステムMazEFについて：分子認識機構と生理機能の考察
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	横田 亜紀子 (Yokota Akiko) (20415764)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	常田 聡 (Tsuneda Satoshi) (30281645)	早稲田大学・理工学術院・教授 (32689)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関