

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05347

研究課題名（和文）大腸菌の新規 yafD-yafE TA system の機能同定

研究課題名（英文）Characterization of the novel yafD-yafE toxin-antitoxin system

研究代表者

山口 良弘（Yamaguchi, Yoshihiro）

大阪公立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：00737009

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：大腸菌において同定した新規の YafD-YafE TA system の YafD toxin の標的、作用機構の同定、YafE antitoxin による YafD 毒性中和機構、および生理的役割の解明を目的とした。YafD toxin の標的の同定のためにサプレッサー遺伝子のスクリーニングを行った。サプレッサー候補遺伝子として3つの遺伝子を同定した。しかし、これらの遺伝子産物は yafD の標的ではないことが示された。また、栄養飢餓因子である ppGpp は YafD の生育阻害活性に関与せず、yafD-yafE TA system はファージ防御に関係しないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、大腸菌の YafD に対するサプレッサー候補遺伝子の同定とその機能解析を行った。本研究は、大腸菌の遺伝子機能とその調節メカニズムを解明することに貢献できる。今後、今回の実験で得られた知見をもとに YafD の標的が同定できれば、病原菌制御や抗生物質耐性の克服、新規治療法の開発など、医療分野への応用が期待される。また、yafDE TA system の整理機能を解明できれば、微生物のストレス応答や生育調節に関する新たな知見が得られ、微生物学や分子生物学の基礎研究において重要な進展をもたらす。また、YafD や関連遺伝子の機能解析は、遺伝子発現制御の新たなモデルを提供できるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：This study aims to identify the targets and mechanisms of action of the newly identified YafD-YafE TA system in *Escherichia coli*, as well as to elucidate the neutralization mechanism of YafD toxicity by the YafE antitoxin and to understand its physiological role. To identify the targets of the YafD toxin, a suppressor gene screening was carried out. Three genes were identified as candidate suppressor genes. However, it was demonstrated that the products of these genes are not the targets of YafD. Additionally, the nutrient starvation factor, ppGpp, was found not to be involved in the growth inhibitory activity of YafD, and it was considered that the yafD-yafE TA system is not related to phage defense.

研究分野：応用微生物学

キーワード：生育制御 toxin-antitoxin system

1. 研究開始当初の背景

プログラム細胞死は真核生物において細胞の分化に必須である。近年、原核生物にも細胞死を引き起こす自殺遺伝子を有することが明らかとなった。Toxin-antitoxin (TA) system は、原核生物において自殺遺伝子 (toxin) を制御するシステムである[論文 5,6]。一般的に toxin および antitoxin 遺伝子はオペロンを形成している。Toxin は他の細菌や感染した細胞を殺すのではなく、菌体内で発現し宿主自身に対して毒性を示す。各 toxin の標的は非常に多岐に渡っており、DNA、mRNA、タンパク質または細胞壁合成などを阻害し、生育及び細胞死を制御する。通常の生育では toxin と対になる antitoxin は菌体内で複合体を形成し、toxin の毒性は中和されている。ストレス環境下では toxin の毒性が誘導され、宿主の生育を停止することで細胞のストレス耐性に寄与することが示唆されている。TA system は病原菌の宿主内生存のようなストレス下での生存戦略の中心と考えられ、現在注目されている。おそらく TA system は、ストレス条件下での生存など正の役割に重要なために進化の過程で維持されてきたと考えられる。このように、ストレス環境下で重要と考えられている TA system だが、どの TA system が、どのようにストレス環境下で機能するかといった具体的な生理機能は不明である。そのため、個々の TA system および toxin の標的の同定、作用機構および発現制御機構の解明を含む性質解析は、原核生物の生理機能、病原性及び進化の理解に必須である。しかし、TA system を同定するモデルはまだ確立されておらず、どれほどの TA system が存在しているかさえ不明である。申請者は、TA system 予測モデルを確立し、これまで多くの TA system を同定してきた[論文 2-4, 7-16]。TA system の toxin によって細胞死が引き起こされ、ストレス環境下での生存に重要であることが示唆されている一方で、細胞死を引き起こす toxin がどのように生存に関与するのかが疑問が生じていた。その中で、今回私が発見した YafD-YafE TA system は、toxin が静菌的に作用する極めてユニークな toxin である。さらに、YafD-YafE TA system は、熱や酸化ストレス下で重要なシグマ因子である σ^{32} によって転写誘導される。以上のことから、静菌的に作用する YafD を介した生育停止が、熱・酸化ストレスに対する耐性に極めて重要であることが推測された。

2. 研究の目的

私は、これまで TA system を同定するモデルを確立し、大腸菌において 33 の TA system の存在を明らかにした[論文 5]。そのなかで私は、新規 TA system として YafD-YafE を同定し、YafD toxin 誘導後、RNA 合成が完全に阻害されるが、DNA 合成は全く阻害されないことを明らかにした。翻訳は緩やかに抑制された。よって、YafD は RNA ポリメラーゼ活性を阻害することが示唆された。興味深いことに、一般的な toxin は殺菌的に作用するのに対し YafD は静菌的に作用した。本研究で私は、以下の 4 点を研究期間内に明らかにすることを目的とした。

1. YafD は RNA ポリメラーゼ活性を阻害するのか？その標的を生化学的に明らかにする。
2. YafE antitoxin はどのように YafD の毒性を中和しているのか？ YafE による YafD の毒性中和機構を解明する。
3. YafD は RNA ポリメラーゼのどの部位に結合し活性を阻害するのか？その作用機構を解明する。
4. YafD-YafE TA system の生理的役割はなにか？ *yafDyafE* 欠損株を作成し、YafD-YafE TA system の重要性を解明する。

3. 研究の方法

YafD の標的の同定

YafD は可用性タンパク質として発現しない。そこで、融合タンパク質 (PrS-YafD) として発現させ可溶性タグである ProteinS との融合タンパク質と可用性タンパク質として高発現させる。PrS-YafD タンパク質は Ni-NTA カラムを用いて精製する。

YafE による YafD 生育阻害活性の中和機構の解明

ゲルろ過クロマトグラフィーにより YafD、YafE 及び YafD-YafE 混合体を解析し、YafD-YafE 複合形成の有無の解析する。

YafD のサブレッサー遺伝子の同定

大腸菌のゲノムライブラリーを構築し、*yafD* 遺伝子の生育阻害を抑制するサブレッサー遺伝子のスクリーニングを行う。

ストレス環境下における YafD の役割

σ^{32} によって YafD-YafE TA system は 7 倍、antitoxin を分解する Lon および ClpAP プロテアーゼは 10 倍誘導される。よって、 σ^{32} が重要な機能を有する熱ストレスや酸化ストレス下で YafD が生理的に機能すると考えられる。この仮説を確かめるために、*yafDyafE* 欠損株を作成し、熱ストレスとして 50 および 60°C での熱処理、酸化ストレスとして過酸化水素処理、

エタノール添加後の生育、形態変化、および生菌数を測定する。同じ実験を野生株でも行い、生菌数を比較して *yafDyafE* TA system の役割を探索する。

4. 研究成果

YafD の標的を同定するために YafD の発現及び精製を行なった。Myxococcus xanthus 由来の Protein S を可溶化タグとして利用し、融合タンパク質 (PrS-YafD) として発現させた。PrS-YafD は可用性タンパク質として高発現され、菌体生育も YafD 発現後と同程度阻害された。よって、PrS タグは YafD の機能に影響しないことが示された。PrS-YafD タンパク質は Ni-NTA カラムを用いて精製し、ゲルろかカラムクロマトグラフィーを用いて解析した結果、PrS-YafD は可溶性凝集体を形成していることが明らかとなった。そこで、ProteinS 以外の可溶化タグとして MBP および GST を用いたが、これらのタグを融合した YafD は発現後沈殿画分に検出された。よって、生理的な構造を有する YafD を精製することはできなかった。よって、精製 YafD を用いた標的の同定のための生化学実験および YafE との相互作用実験を行うことはできなかった。そこで、YafD の標的を同定するために YafD による生育阻害を中和する suppressor gene の探索を行った。pUC19 プラスミドを用いて大腸菌のゲノム DNA ライブラリーを作成し、探索した結果、異なる 2 つの領域が見出された。これらの領域には RNA ポリメラーゼ構成因子である RpoZ が含まれていた。得られた 2 つの大腸菌のゲノム DNA 領域から、suppressor gene の同定を試みた。その結果、ytfP 遺伝子の共発現は YafD による生育阻害を抑制することが示された。一方で、これまでの実験から YafD は RNA 合成を阻害することが示された。今回取得した DNA 領域には RNA ポリメラーゼのオメガ因子である rpoZ が含まれており、YafD は RpoZ と拮抗阻害して RNA ポリメラーゼと結合することで大腸菌の生育を阻害する可能性が考えられた。しかし、ytfP および rpoZ 遺伝子は YafD による生育阻害に影響しなかった。よって、ytfP および rpoZ が候補遺伝子として同定されたが、両遺伝子は YafD のサプレッサー遺伝子ではなかった。そこで、今年度は真の陽性クローンを取得すべく、偽陽性を排除可能なスクリーニング方法を確立し、その方法でサプレッサー遺伝子の取得を試みた。その結果、16S リボソーム RNA の成熟に寄与する era をサプレッサー遺伝子として同定した。era は必須遺伝子であり、その機能喪失は翻訳阻害を引き起こす。もし、YafD が Era を標的ならばタンパク質合成のみが阻害されると考えられる。しかし、YafD の発現後、RNA 合成およびタンパク質合成が阻害される。よって、era は *yafD* の標的ではないことが示唆された。

偶然、過剰量アミノ酸存在下では YafD の発現が大腸菌の生育に影響しないことを見出した。そこで、YafD の誘導はアミノ酸飢餓のシグナル分子である ppGpp の濃度を上昇させることで生育を阻害すると考え、ppGpp 合成遺伝子の欠損株を用いて YafD の活性を解析した。その結果、ppGpp は YafD の生育阻害活性に関与しないことが示唆された。

YafD は E. coli の生育を静菌的に阻害する。E. coli を静菌的に阻害する hicA-hicB TA system の HicA toxin はエンドリボヌクレアーゼで、ファージの防御に寄与する可能性が報告されている。そこで、*yafDyafE* 欠損株の P1、T2、T3、T4、T5、T6 および T7 ファージへの感受性を調べたが、いずれのファージに対しても野生型株と同様の感受性を示した。よって、*yafD-yafE* TA system はファージ防御に関係しないと考えられる。

yafDyafE 欠損株を用いて、熱ストレスとして 50 および 60°C での熱処理、酸化ストレスとして過酸化水素処理、エタノール添加後の生育、形態変化、および生菌数を測定した。しかし、いずれの条件下においても野生型株と *yafDyafE* 欠損株の際は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------