

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892025

研究課題名(和文)新規TA system、YjhXQの生理機能およびトポイソメラーゼI阻害機構

研究課題名(英文)An endogenous protein inhibitor, YjhX (TopI), for topoisomerase I from Escherichia coli

研究代表者

山口 良弘 (Yamaguchi, Yoshihiro)

大阪市立大学・複合先端研究機構・特任准教授(テニュアトラック)

研究者番号：00737009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌において新規の TA system である YjhX-YjhQ TA system を同定した。YjhX の過剰発現によって DNA および RNA 合成が同程度阻害された。その後、YjhX はトポイソメラーゼ I 活性を阻害するが DNA ジャイレース およびトポイソメラーゼ III 活性は阻害しないことが示され、YjhX はトポイソメラーゼ I を特異的に阻害するタンパク質であることが明らかとなった。トポイソメラーゼ I 特異的阻害タンパク質はこれが初めての発見である。YjhX によるトポイソメラーゼ I 活性阻害機構の解明は、新規抗生物質創成の基盤となりうると考えています。

研究成果の概要(英文)：Here, I found a novel, previously unidentified TA system in Escherichia coli named yjhX-yjhQ. Induction of YjhX (85 amino acid residues) causes cell-growth arrest resulting in cell death, while YjhQ (181 residues) co-induction resumes cell growth. The primary cellular target of YjhX was found to be topoisomerase I (TopA), inhibiting both DNA replication and RNA synthesis. Notably, YjhX has no homology to any other toxins of the TA systems. YjhX was expressed well with an N-terminal protein S (PrS) tag in soluble forms. PrS-YjhX specifically interacts with the N-terminal region of TopA (TopA67) but not full-TopA in the absence of plasmid DNA, while PrS-YjhX binds to full-TopA in the presence of DNA. Notably, YjhX does not directly interact with DNA and RNA. YjhX inhibits only topoisomerase I but not topoisomerase III and IV in vitro. Hence, yjhX is renamed as the gene for the topoisomerase I inhibitor (the topl gene). TopI is the first protein inhibitor specific for topoisomerase I.

研究分野：応用微生物

キーワード：応用微生物 バイオテクノロジー 生化学 分子生物学

### 1. 研究開始当初の背景

アポトーシスやプログラム細胞死は分化や損傷した細胞を取り除くために真核生物において必須の機能であり、その喪失はがんを引き起こすことが知られている。アポトーシスは原核生物に存在しないのだろうか？原核生物において必須の機能を持たないのだろうか？もし原核生物にアポトーシスを引き起こす遺伝子があるなら、どのように発現制御及び機能を有するのだろうか？最初に大腸菌でアポトーシス様細胞死を引き起こす toxin 遺伝子が報告されたのは 1994 年で、プラスミドの維持に必要であった。その後、ほぼすべての原核生物に数多くの toxin-antitoxin (TA) system と呼ばれるシステムが存在し、細胞の生育及び細胞死を制御していることが明らかになってきている。一般的に toxin および antitoxin 遺伝子はそれぞれ非常に小さな遺伝子で(60-360 bp)、オペロンを形成している。Toxin は他の細菌や感染した動物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。Toxin と対になる antitoxin は菌体内で複合体を形成し、toxin の毒性は通常の生育では中和されている。各 toxin の標的は非常に多岐に渡っており、DNA 複製、mRNA の安定性、タンパク質合成および細胞壁合成などを阻害し、生育及び細胞死を制御している。Antitoxin は toxin に比べて菌体内で不安定なため、toxin の毒性を中和するために構成的に発現している。ストレス条件下において antitoxin は、ストレス誘導性プロテアーゼ (ClpXP, ClpAP および Lon) により分解され、toxin が複合体から遊離する。その結果、toxin により生育阻害さらには細胞死が引き起こされる。興味深いことに、病原菌 *Mycobacterium tuberculosis* では 88 もの TA system が存在するのに対し、近縁の非病原性細菌 *M. smegmatis* には 2 つの TA system しか存在しない。このことから、TA system は病原性に関与していると考えられる。さらに toxin は細胞の生育を停止させ、薬剤のようなストレスに非常に強い耐性を示す休眠状態を誘導することが示唆される。以上のことから、TA system の研究は病原性細菌の多剤薬剤耐性機構の解明に非常に重要である。一方で、非病原性細菌である *Escherichia coli* にも多くの TA system が存在することは非常に興味深い。おそらく TA system は、ストレス条件下での生残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。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。私は、大腸菌において TA system を同定するモデルを確立し、これまで 33 の TA system が大腸菌に存在することを明らかにした。個々の TA system および toxin の標的的同定、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。私は、大腸菌において新規の TA system, YjhX-YjhQ system を同定したがその機能は不明であった。

### 2. 研究の目的

機能的細胞死 (アポトーシス) は真核生物において細胞の分化に必須の機能である。近年、大腸菌のような原核生物もアポトーシスを備えており、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。細菌においてアポトーシスを引き起こす toxin-antitoxin (TA) system は、ストレス条件下で誘導され細胞を休眠状態にすると考えられている。しかし、その作用機構及び生理的役割は未だ不明である。私は、大腸菌において新規の TA system, YjhX-YjhQ system を同定した。本研究で私は、(1) YjhX toxin の標的を同定、(2) YjhX の標的に対する作用機構、(3) YjhQ antitoxin による YjhX 毒性中和機構、及び (4) *yjhX-yjhQ* 欠損株を作成して生理的役割を解明し、原核生物におけるアポトーシスに係る TA system の役割の一端を明らかにすることを目的とした。研究期間内に以下の 4 点を明らかにしようとした。

YjhX はトポイソメラーゼ I (TopA) 活性を本当に阻害するのか？その標的を生化学的に明らかにする。

TopA のどの部位に YjhX が結合し活性を阻害しているのか？その作用機構を解明する。

YjhQ antitoxin はどのように YjhX の毒性を中和しているのか？YjhQ による YjhX の毒性中和機構を解明する。

YjhX-YjhQ TA system の生理的役割はなにか？*yjhXyjhQ* 欠損株を作成し、YjhX-YjhQ TA system の重要性を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1). YjhX の標的的同定

##### YjhX の発現及び精製

私は、YjhX が可用性タンパク質として発現しないことを既に見出している。そこで、*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-YjhX) として発現させた。この融合タンパク質は N 末端に精製のために His<sub>6</sub>-タグを持つ。PrS-YjhX は可用性タンパク質として高発現され、菌体生育も YjhX 発現後と同程度阻害された。よって、PrS タグは YjhX の機能に影響しないことが示された。PrS-YjhX タンパク質は Ni-NTA カラムを用いて精製した。

#### (2). YjhQ による YjhX 毒性の中和機構の解明

## [2-1] YjhX-YjhQ 複合体の解析

通常 toxin は antitoxin と複合体を形成するので pull-down assay により YjhX、YjhQ 及び YjhX-YjhQ 混合体を解析し、YjhX-YjhQ 複合形成の有無を調べた。

### (3). YjhX による TopA 活性阻害機構の解明

#### [3-1] YjhX 存在下における TopA 活性測定

無細胞系での YjhX による TopA 活性阻害測定系を、負の超らせんを持つ pUC19 plasmid を基質として確立した。TopA に関しては既に精製方法が報告されており、その方法に従って精製した。TopA 精製標品を様々な濃度の PrS-YjhX と反応させ、その後反応を EDTA 添加または SDS/プロテアーゼ K 処理により停止後、アガロース電気泳動を行った。YjhX による TopA 活性阻害は負の超らせんを持つ pUC19 plasmid DNA を定量的に測定することで解析した。さらに、活性測定系に精製 YjhQ を添加し、YjhX による TopA 活性阻害が YjhQ により中和されるかも合わせて調べた。

#### [3-2] YjhX-TopA 相互作用解析

Pull-down assay により、PrS-YjhX と TopA 間の相互作用を確認した。PrS は Myxococcus の Spore (myxospore) と  $Ca^{2+}$  存在下で特異的に結合し、EDTA 処理により容易に可溶性タンパク質として遊離する。Myxospore は米国井上正順教授の研究室から入手した。His<sub>6</sub>-タグを持つ精製した TopA を PrS-YjhX または PrS と DNA 存在または非存在下で反応させ、その後反応系に Myxospore を添加した。Myxospore-タンパク質複合体は遠心分離により収集し洗浄後 SDS-PAGE により分離し、抗 His-tag 抗体を用いた western blotting により検出した。も TopA が myxospore と非特異的に結合したので、strep-tag を持つ PrS-TopA 融合タンパク質を構築し精製し、すべての pull-down assay は myxospore の代わりに StrepTactin カラムを用いた。Strep-tag は 8 アミノ酸残基 (WSHPQFEK) から成り、StrepTactin (streptavidin よりも 100 倍特異的) と特異的に結合する。このシステムは既に一般的に広く用いられている。

#### [3-4] YjhX-TopA 相互作用の詳細解析

TopA タンパク質は DNA 結合部位を持つ C-末端ドメイン (14 kDa) と活性中心を持つ N-末端ドメイン (64 kDa) の 2 つから構成されている。YjhX が結合する TopA のドメインを決定するために、プラスミドを構築し、His-tag を持つ 2 つのドメインをそれぞれ Ni-NTA カラムを用いて精製し、pull-down assay 系を用いて YjhX 結合ドメインを決定した。

### (4). Persister 形成における YjhX の役割

*yjhXyjhQ* 欠損株を作成し、生育、形態変化、および persister 形成を抗生物質添加後の生菌数を測定した。菌体を L-broth で培養し、異なる濃度の抗生物質 (カナマイシン、ゲンタマイシンおよびアンピシリン) を対数増殖期初期に添加し、その後経時的にサンプルを採取し、洗浄後 LB plate で培養して生菌数を測定した。同じ実験を野生株でも行い、生菌数の比較を行った。

## 4. 研究成果

大腸菌において新規の TA system である YjhX-YjhQ TA system を同定した。YjhQ は YjhX による生育阻害を中和した。YjhX の過剰発現によって DNA および RNA 合成が同程度阻害されたことから YjhX は DNA ジャイレースまたはトポイソメラーゼ I を阻害していることが示唆された。

YjhX の阻害機構を解析するために、invitro において YjhX 存在下でのトポイソメラーゼ I 活性を測定した。負の超らせんの pUC19 プラスミドとトポイソメラーゼ I を異なる濃度の YjhX 精製標品存在下で反応させた後 EDTA または SDS およびプロテイナーゼ K の添加により反応を停止させた。これらのサンプルはクロロキシン存在下または非存在下でそれぞれ解析された。EDTA で反応を停止させた結果、DNA は YjhX 存在下でのみゲルのコーム上にスタックしていた。これは YjhX が DNA-トポイソメラーゼ I 複合体と結合することを示唆していた。また、トポイソメラーゼ I 活性は 100 nM 以上の YjhX にとって完全に阻害された。また、YjhX によるトポイソメラーゼ I 活性の阻害は YjhQ antitoxin の添加によって回復した。トポイソメラーゼ I だけでなくトポイソメラーゼ III および IV も DNA の巻き戻しに関与していることが報告されていることから、YjhX がトポイソメラーゼ III および IV 活性に与える影響を調べた。興味深いことにトポイソメラーゼ IV は生育に必須であるがトポイソメラーゼ III は必須ではない。トポイソメラーゼ I 活性と同様の方法を用いて YjhX 存在下での活性をそれぞれ測定した。その結果、200 nM の YjhX 存在下でもトポイソメラーゼ III および IV 活性に大きな変化は見られなかった。以上の結果から、YjhX はトポイソメラーゼ I を特異的に阻害するタンパク質であることが明らかとなった。

次に、YjhX と トポイソメラーゼ I の相互作用を解析した。結晶構造解析の結果から、トポイソメラーゼ I の N 末端領域 (TopA67) は活性中心および一本鎖 DNA 結合部位を含み、C 末端領域 (TopA14) は二本鎖 DNA 結合部位を含むことが明らかになっている。そこで、実験には 全長 TopA、TopA64 および TopA14 を用いることとした。それぞれを精製し、DNA 非存在下で免疫沈降法を用いて相互作用を解析した。その結果、TopA64 は YjhX に結合したが TopA14 は結合してい

なかった。一方で全長 TopA は非常に弱く YjhX と結合していることが示唆された。YjhX は TopA-DNA 複合体に結合していることが示されていたことから、DNA が TopA と YjhX の相互作用に必要なのかを解析した。その結果、TopA64 は DNA の存在、非存在下で YjhX に結合したのに対し全長 TopA は DNA 存在下でのみ YjhX と結合することが明らかとなった。以上の結果から、YjhX はトポイソメラーゼ I の N 末端領域に結合し、その結合には DNA が必須であることが示された。トポイソメラーゼ I 特異的阻害タンパク質はこれが初めての発見である。現在までに、トポイソメラーゼ I に対する抗生物質はほとんど存在せず、真核生物のトポイソメラーゼ I は原核生物と構造が全く異なることから、YjhX によるトポイソメラーゼ I 活性阻害機構の解明は、新規抗生物質創成の基盤となりうる。

TA system のプロモーター領域には palindromic sequence が存在し、antitoxin または TA complex が結合することで自身の発言を抑制していることが多い。yjhXQ のプロモーター領域にも ACACCGCGGTG および TGCAcgtttTGCA の二つの palindromic sequence が存在していた。そこで、YjhQ antitoxin または YjhX-YjhQ 複合体のこれらの配列を含む DNA への結合を解析した。しかし、DNA とタンパク質のモル比を 100:1 にしても結合は検出されなかった。もしかすると yjhXQ のプロモーターに存在する palindromic sequence には別の転写調節因子が結合するのかもしれない。

YjhX はカナマイシンやゲンタマイシンのような抗生物質の添加後に 10 倍以上誘導されることが DNA マイクロアレイによって明らかとなっている。YjhX は生育を阻害し細胞の休眠状態を誘導している可能性があった。この休眠状態によって細菌は抗生物質によって引き起こされる致命的なダメージから逃れることができると考えられている。よって、YjhX によるトポイソメラーゼ I 活性の阻害によって抗生物質処理後の休眠状態に YjhX は重要であることが示唆された。この仮説を検証するために、yjhXQ 欠損株を作成した。作成した欠損株を用いて様々な濃度の抗生物質（アンピシリン、カナマイシン、ゲンタマイシン）および過酸化水素添加後の生菌数、細菌の形態、生育を測定した。しかし、yjhXQ 遺伝子の欠損は抗生物質および過酸化水素耐性に影響していないことが示唆された。すでに RNA の安定性に関与する toxin の single deletion mutant は薬剤耐性に影響を及ぼさないが、6つのこれらの toxin を欠損した multiple toxin deletion mutant では薬剤に対して感受性を示すことが明らかとなっている。標的は異なっているが、yjhXQ 遺伝子を含む multiple deletion

mutant では同様に薬剤に対する影響が見られるのかもしれない。

ゲノム DNA の超らせんの状態の違い(巻き数の違い)は遺伝子発現に影響を与えることがすでに報告されている。106 の遺伝子が巻き戻された状態で発現が促進され、200 の遺伝子では発現が抑制される。YjhX によるトポイソメラーゼ I の阻害によってゲノム DNA の超らせんが巻き戻され、特定のストレス条件下で必要な遺伝子制御をおこなっているのかもしれない。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Yamaguchi, Y. & Inouye, M.

An endogenous protein inhibitor, YjhX (TopAI), for topoisomerase I from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **43**, 10387-10396 (2015). 査読有り

[学会発表](計 1 件)

山口 良弘、井上 正順

YjhX は topoisomerase I 活性を特異的に阻害する 日本農芸化学会関西支部会第 486 回講演会、奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県、生駒市)、平成 26 年 9 月 19-20 日

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 良弘 (大阪市立大学・複合先端研究機構・特任准教授(テニュアトラック))

研究者番号：00737009