

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08776

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌新規TAシステムによるDNAトポロジ制御機構に関する研究

研究課題名(英文)Characterization of a novel TA system regulating DNA topology Staphylococcus aureus

研究代表者

加藤 文紀(Kato, Fuminori)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：70452589

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文):トキシン・アンチトキシン(TA)システムは、細菌に広く存在する機構であり、ストレス応答、バイオフィーム形成や、パーシスター形成に関与している。本研究において、新規に見出したTAシステムの機能及び生理的な役割の解明を行った。本研究により、新規TAシステムを構成するトキシンは(1)細菌において必須遺伝子であり、複製・転写に關するDNAジャイレースを阻害する、(2)トキシン活性に重要なアミノ酸残基を同定した、(3)トキシンはアルファヘリックス構造を形成することを明らかにした。本研究成果は、黄色ブドウ球菌のみならず細菌のTAシステム分野において新規な知見及び抗菌薬開発の基盤情報を提供するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、アミノ酸配列相同検索からは、機能を推測できない黄色ブドウ球菌の機能未解明なタンパク質の活性を生化学的に詳細に解析することで、黄色ブドウ球菌の新規なTAシステムであることを明らかにした。現在においても、ゲノム配列は解読されているが、機能未知な遺伝子は多数存在しており、それら遺伝子の機能解明に繋がることが期待される。さらに新規に見出したトキシンは真核生物には存在しない必須遺伝子であるDNAジャイレースを標的とする事から、黄色ブドウ球菌のみならず細菌感染症治療のための新規な抗菌薬開発の基盤情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文):Toxin-antitoxin (TA) system is widely conserved in bacteria, and is involved in processes such as stress response, pathogenicity, and the formation of persister cells in the presence of antibiotics. In this study, we characterized the newly identified TA system in *Staphylococcus aureus* and demonstrated the following. (1) New toxin inhibited an essential DNA topoisomerase, DNA gyrase. (2) the 27th Glu and 37th Asp residues are important for the toxicity. (3) The toxin forms alpha-helix structure. These findings give new insights into the TA system in *S. aureus*, but also the development of antibacterial drugs.

研究分野：細菌学、分子生物学、生化学

キーワード：黄色ブドウ球菌 トキシン・アンチトキシンシステム DNAジャイレース 細胞死

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌は通性嫌気性グラム陽性の球菌であり、ヒトの口腔、鼻腔等に見られる常在菌である。しかしながら、化膿性疾患、伝染性膿痂疹、肺炎、敗血症や食中毒など多様な疾患を引き起こす病原性菌としても知られている。また、薬剤耐性菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の蔓延は全世界的な公衆衛生上の深刻な課題となっている。

トキシン・アンチトキシン(TA)システムは、細菌に広く保存されている機構であり、自身の細菌細胞の分裂増殖を停止するトキシンとその毒性を中和するアンチトキシンから構成されている。TAシステムは大腸菌の保有するFプラスミドに存在する安定的な保持機構として見出されたが、近年のゲノム配列情報の解読により、ほぼ全ての細菌の染色体DNA上に存在することが明らかとなっている。さらに、染色体上に存在するTAシステムが、細菌の細胞死、ストレス応答、病原性因子発現制御、バイオフィーム形成、薬剤抵抗性であるパーシスター形成に関与することが報告されつつある。グラム陰性菌である大腸菌においては少なくとも33種、グラム陽性菌である枯草菌では少なくとも13種のTAシステムが染色体上に存在することが知られているが、黄色ブドウ球菌においては、これまでに4種のTAシステムしか存在が明らかになっていなかった。そこで、我々はMRSAである黄色ブドウ球菌N315株の染色体上に未知のTAシステムが存在すると仮定し、大腸菌を指示菌として、機能未解明な遺伝子群からDNAのトポロジーを変化させる新規な黄色ブドウ球菌TAシステム(ORF ID: SA1671/SAS053)を見出した。生物においてDNAトポロジーの変化は、DNAの複製・修復・転写・組換え等の様々な機能制御に大きく関係している。さらに細菌ではストレス応答プロセスにおいて転写調節因子が結合する領域のDNAトポロジーが変化することで、遺伝子発現が制御されることが報告されており、黄色ブドウ球菌新規TAシステムはDNAトポイソメラーゼの1種であるDNAジャイレースの機能を制御し、DNAトポロジーを変化させることで遺伝子発現を制御している事が強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究では新規に見出した黄色ブドウ球菌のTAシステム(アンチトキシン ORF ID: SA1671・トキシン ORF ID: SAS053)の機能解析を(1)トキシンによるDNAジャイレースの阻害機構、(2)アミノ酸置換によるトキシン活性に重要なアミノ酸残基の同定、(3)トキシン・アンチトキシンの立体構造及び分子間相互作用、(4)黄色ブドウ球菌における生理的な役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1)可溶化タグであるProS2をトキシタンパク質のN末に融合させ、大腸菌で発現、Hisタグ精製にてトキシタンパク質を精製した。精製トキシタンパク質、市販の大腸菌DNAジャイレース(NEB)及び黄色ブドウ球菌DNAジャイレース(TopoGEN, Inc.)、基質として緩和型プラスミドDNAを用い、DNAトポロジー(負の超らせん型DNA生成阻害)を解析し、*in vitro*においてトキシンが大腸菌及び黄色ブドウ球菌のDNAジャイレース活性を阻害することを解明する。

(2)黄色ブドウ球菌由来トキシンと近縁種であるブドウ球菌属7菌種に由来するトキシン活性の異なるオーソログ間でアミノ酸配列比較し、トキシン活性に重要なアミノ酸残基の候補の絞り込みを行う。続いて、インバースPCR法を用いてアミノ酸置換を導入し、トキシンの活性部位を同定する。具体的にはトキシン活性の弱い*S. pasteurii*及び*S. warneri*の両者でのみ保存されている27番目のアスパラギン酸、さらにトキシン活性の弱い*S. epidermidis*でのみ存在する37番目のグルタミンに注目し、各トキシン間でアミノ酸置換を行い大腸菌における細胞増殖停止活性を解析する。(3)ProS2タグ融合トキシタンパク質を用い、放射光真空紫外円二色性分光法により、タンパク質の二次構造を明らかにする。(4)黄色ブドウ球菌において、新規TAシステム遺伝子欠損株及び遺伝子過剰発現株を作製し、表現型(薬剤感受性、病原性因子産生、バイオフィーム産生)の変化を解析する。

4. 研究成果

(1)II型DNAトポイソメラーゼであるDNAジャイレースは、サブユニットA(GyrA)とB(GyrB)からなり、DNAの2本鎖両鎖を一時的に切断し再結合することで負の超らせんを導入する酵素である。GyrAはDNA鎖の切断・再結合に関与し、GyrBはATPase活性を有し反応に必要なエネルギーを供給する。タンパク質精製において一般的なHisタグを用いたタンパク質精製及びタグ切断により、活性を保持するタンパク質として精製することが困難であった。そこで、可溶化タグであるProS2を融合させることで、活性を保持した状態でトキシタンパク質(TsbT)を精製することに成功し、大腸菌及び黄色ブドウ球菌DNAジャイレースの酵素活性を阻害することを*in vitro*実験にて明らかにした(図1)。さらに、切断されたDNAが観察されたことから、トキシンGyrAサブユニットに作用することが推測された。この結果から、新規トキシンは、DNAトポイソメラーゼの1種であるDNAジャ

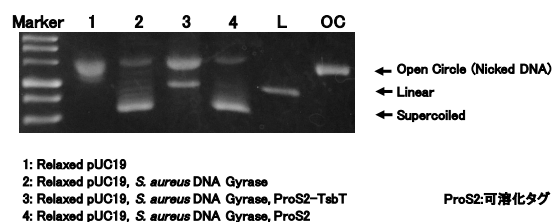


図1. DNAジャイレース活性阻害解析

イレースの酵素活性を阻害することを証明した。また、グラム陽性細菌における DNA ジャイレースを阻害するトキシンは初めての知見である。また、DNA ジャイレースは抗細菌薬の 1 種であるキノロン系薬の標的酵素でもり、黄色ブドウ球菌の染色体上に DNA ジャイレース活性を阻害する遺伝子が存在することは大変興味深い結果を得られた。

(2) 黄色ブドウ球菌由来トキシンとトキシン活性の弱い *S. epidermidis*, *S. pasteurii* 及び *S. warneri* 間でのアミノ酸配列比較から 27 番目及び 37 番目のアミノ酸残基に注目し、両者間でアミノ酸スワッピングを行い、トキシン活性を解析した。その結果、27 番目のアスパラギン酸残基及び 37 番目のグルタミン残基がトキシン活性に重要であることを明らかにした (図 2)。

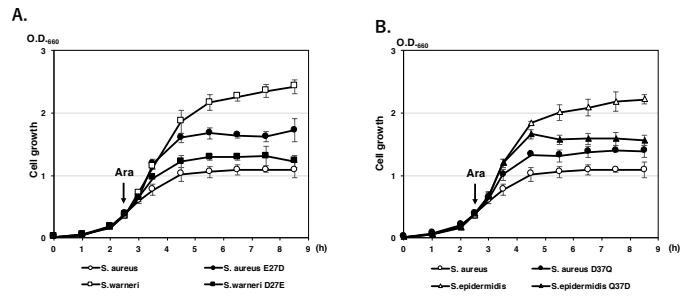


図 2. アミノ酸変異導入によるトキシン活性解析

(3) DNA ジャイレースの阻害作用を詳細に解明するにあたり重要な構造に関する情報を得るために、放射光真空紫外円二色性分光法 (VUVCD) により、トキシタンパク質の二次構造を明らかにした。トキシンの活性に重要である 27 番目のアミノ酸残基を含む 22 番目から 32 番目のアミノ酸残基の領域でアルファヘリックス構造を形成していることを明らかにした (図 3)。その他の領域にかんしては、水溶液中で特定の構造を保持していないことを明らかにした。DNA ジャイレース及び DNA との複合体形成に関連する重要なアミノ酸残基であることが推測され、トキシンの機能を詳細に解明する上で非常に有用な知見を得た。

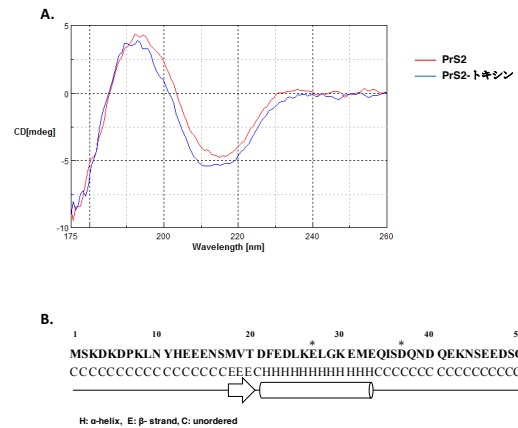


図 3. A. VUVCD スペクトラム
B. トキシタンパク質の二次構造

(4) MRSA で黄色ブドウ球菌 N315 株を用いて、新規 TA システム TsbAT の遺伝子欠損株及び遺伝子過剰発現株を作製した。これら菌株を用いて、新規 TA システムが黄色ブドウ球菌において機能することを明らかにした。この結果を含め、黄色ブドウ球菌の染色体上に存在する機能未知遺伝子群から新規 TA システムを見出した研究成果は Applied and Environmental Microbiology (2019, 85:e00915-19) に掲載された。また、新規 TA システムを解析するにあたり、既知の TA システムである MazF の遺伝子欠損株でバイオフィーム形成能が上昇することを見出し、Pathogens and Disease (2017, Ftx026) にて研究内容が掲載された。しかしながら、新規 TA システム遺伝子変異株を用いて、薬剤感受性、薬剤抵抗性、バイオフィーム形成能、病原性因子産生等に関して解析を行ったが、現在までの所、明確な差異を見出すにいたっていない。

今後の展望

本研究において、新規な TA システムを構成するトキシンの機能を解明したが、アンチトキシンがどのようにトキシンの活性を制御しているのかについては解明に至っていない。今後、この点を解明することにより、応用研究としてトキシン-アンチトキシンの複合体形成を解離・阻害し、細胞内でトキシン活性を誘発物質の探索することで、TA システムを標的とした黄色ブドウ球菌の新規な抗菌薬の開発が期待される。また、本研究では、新規 TA システムの生理的な役割に関しては表現系の解析結果から、明確な役割を見いだせていない。新規 TA システムは黄色ブドウ球菌だけでなく、ブドウ球菌属で広く保存されている遺伝子であり、他菌種では相同性のある遺伝子は存在しない。このことから、ブドウ球菌属で共通して DNA ジャイレース活性を制御することでの役割が存在することが考えられる。今後、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現比較 (RNA-seq 解析) 等により、明らかとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato Fuminori, Yabuno Yusuke, Yamaguchi Yoshihiro, Sugai Motoyuki, Inouye Masayori	4. 巻 75
2. 論文標題 Deletion of mazF increases Staphylococcus aureus biofilm formation in an ica-dependent manner	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pathogens and Disease	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femspd/ftx026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kato Fuminori, Yoshizumi Satoshi, Yamaguchi Yoshihiro, Inouye Masayori	4. 巻 85
2. 論文標題 Genome-wide screening for identification of novel toxin-antitoxin systems in Staphylococcus aureus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00915-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.00915-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Fuminori Kato, Koichi Matsuo
2. 発表標題 Secondary structure analysis of DNA gyrase inhibitor derived from Staphylococcus aureus by Vacuum-ultraviolet circular-dichroism spectroscopy
3. 学会等名 The 23rd Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤文紀
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌新規Toxin-AntitoxinシステムのToxinはDNA gyraseを阻害する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤文紀、山口良弘、井上正順
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌新規Toxin-antitoxinシステムの機能解析
3. 学会等名 第71回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fuminori Kato, Masayori Inouye
2. 発表標題 A search for novel Toxin-antitoxin systems in Staphylococcus aureus
3. 学会等名 International Union of Microbiological Societies, Singapore (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤文紀、吉住敏、山口良弘、井上正順
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌の新規Type II Toxin-Antitoxinシステムの探索
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤文紀、井上正順
2. 発表標題 新規黄色ブドウ球菌トキシン・アンチトキシンシステムの解析
3. 学会等名 第12回日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤文紀、山口良弘、井上正順
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌タイプIIトキシン・アンチトキシンシステムの探索
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤文紀、Masayori Inouye
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌新規トキシン・アンチトキシンシステムの探索
3. 学会等名 第11回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤文紀
2. 発表標題 DNA Gyraseを阻害する黄色ブドウ球菌TAシステムの機能解析
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤文紀、山口良弘、Masayori Inouye
2. 発表標題 ゲノム上に存在する黄色ブドウ球菌新規トキシン・アンチトキシンシステムの探索
3. 学会等名 第72回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤文紀、山口良弘、Masayori Inouye
2. 発表標題 ゲノム上に存在する黄色ブドウ球菌新規Toxin-Antitoxin systemの探索
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----