

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：84510

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15446

研究課題名（和文）新奇酵素反応による細菌のプロテオスタシス制御：我々とは異質な酸化ストレス適応戦略

研究課題名（英文）Regulation of bacterial proteostasis by novel enzyme reactions: a strategy for adaptation to oxidative stress that is alien to us.

研究代表者

今井 岳志 (Imai, Takeshi)

兵庫県立工業技術センター・その他部局等・主任研究員

研究者番号：30785241

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究テーマにより、広く細菌種に保存されている機能不明タンパク質trHb0が過酸化したタンパク質を還元する機能を持つことが明らかとなった。特に、バイオフィルムを構成するTasAなどの大気中のO<sub>2</sub>と接する機会が多いタンパク質の酸化変性・凝集を抑制し、実際に生理機能のレベルで細胞の損傷を防いでいることが明らかとなった。また、タンパク質の過酸化は次亜塩素酸などの代表的な酸化剤でも引き起こされることが示唆され、過酸化タンパク質の還元を担うtrHb0は新規抗生剤開発のターゲットとなりうることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グラム陽性菌である結核菌に有効な抗生剤は種類が限られており、とりわけスーパーバグと呼ばれるような超多剤耐性菌の出現も確認されている。trHb0はグラム陽性菌に広く保存されている機能不明なタンパク質であったが、今回の研究によって強力な抗酸化の機能を持つことが明らかとなった。将来的には、結核菌などの病原性細菌中のtrHb0の働きを阻害することで、自然免疫のような酸化ストレスに対して脆弱化させる、新しいコンセプトの抗生剤開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：This research theme has revealed that trHb0, a protein of unknown function that is widely conserved in bacterial species, has the ability to reduce peroxidised proteins. In particular, it was found that trHb0 inhibits the oxidative denaturation and aggregation of proteins that are in frequent contact with atmospheric oxygen, such as TasA, which constitutes biofilms, and actually prevents cell damage at the level of physiological functions. It was also suggested that protein peroxidation is also induced by typical oxidising agents such as hypochlorous acid, indicating that trHb0, which is responsible for the reduction of peroxidised proteins, is a potential target for the development of new antibiotics.

研究分野：分子微生物学

キーワード：過酸化タンパク質 細菌 抗生剤 trHb0 切断型ヘモグロビン バイオフィルム

研究期間:2020~2023

課題番号:20K15446

課題:「新奇酵素反応による細菌のプロテオスタシス制御:我々とは異質な酸化ストレス適応戦略」

### 【背景・目的】

細胞の酸化ストレスへの適応は、進化の過程で起きた最もダイナミックな出来事である。一方で、大気下での生存が可能となった細菌種の酸化ストレスへの適応方法は未だ不明な点が多い。申請者は、広く細菌に保存されている機能不明な切断型ヘモグロビン (trHbO) が、過酸化タンパク質を還元する活性を持ち、細胞の機能を酸化ストレスから保護していることを、グラム陽性菌のモデル生物である *B. subtilis* を用いて、これまでの研究の中で突き止めてきた。過酸化したタンパク質は不安定であり、その後のラジカル連鎖反応によって周辺タンパク質のアグリゲーションを引き起こす。そのため、当該のタンパク質を失うと、大気下においてバイオフィームは変性が進み、老化と似た機能不全を呈する。本研究では各種の酸化ストレスに対して当該の酵素がどのような役割を果たすかを多角的に評価し、細菌の多様化に繋がった、我々とは異質な酸化ストレスへの適応戦略を明らかにすることを目指した。

### 【方法・結果・考察】

まず、代表的な酸化剤・殺菌剤である次亜塩素酸による酸化ストレスに対して、この過酸化タンパク質還元能が寄与しているかを評価した。すなわち、trHbO の遺伝子 *yjbl* を破壊した *B. subtilis* に各濃度の次亜塩素酸を一定時間暴露し、その後コロニー形成がみられるかを観察することで、次亜塩素酸への感受性を評価した。その結果、破壊株では著しい次亜塩素酸への感受性増加がみられた(表1)。このような大きな影響はその他のペルオキシダーゼやジスムターゼ、カタラーゼの各単独の遺伝子破壊では見られなかったため、trHbO が細菌の次亜塩素酸耐性に極めて重要な役割を果たしていることがわかった。特に次亜塩素酸は動物体内に細菌が侵入した際に好中球やマクロファージから放出される分子で、自然免疫応答の一部を担っているため、ヒトとの関りという視点においても一定のインパクトを持つ結果となった。

表1 *yjbl*破壊株の次亜塩素酸感受性評価

Table 1. Minimum bactericidal concentration following exposure to hypochlorous acid (HClO) (n=2).									
HClO (mM)	62.5	31.3	15.6	5.00	2.50	1.25	0.625	0.313	0.156
WT	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>yjbl</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+

(+) visible growth, (-) no visible growth.

次に、過酸化タンパク質を還元することで抗酸化能を発揮している trHbO の反応機序解明に焦点を当てた。trHbO の活性部位近傍には、主に 3 つの電子リッチな残基、Y25、Y63、W89 が存在しており、当該の遺伝子 *yjbl* を破壊した *B. subtilis* にそれぞれ点変異 (Y25F, Y63F, W89F) を導入した株作製した。その結果、Y63F ではバイオフィルムの回復がみられなかった (図1a)。また、ウシ血清アルブミン (BSA) を過酸化することで作製した過酸化タンパク質の基質を用いた反応試験では、過酸化タンパク質還元能を失っていた (図1b)。一方で、次亜塩素酸を用いた酸化耐性を評価する試験では、Y63F だけでなく Y25F の株においても抗感受性がみられた (表1)。この結果は、Y63 が当該の過酸化タンパク質による酵素反応、特に電子の授受に直接関わっていることを示すものであった。また、Y25 は細胞の酸化ストレスからの保護に何らかの重要な役割を果たしているが、バイオフィルムの構成因子である TasA などのタンパク質の保護においては、必ずしも必須ではないことが示唆された。さらに、これらの結果は *in vitro* でみられた trHbO を起点とする酸化還元反応が、実際に細胞の抗酸化能獲得という生理機能と直接結びついている重要な証拠となった。

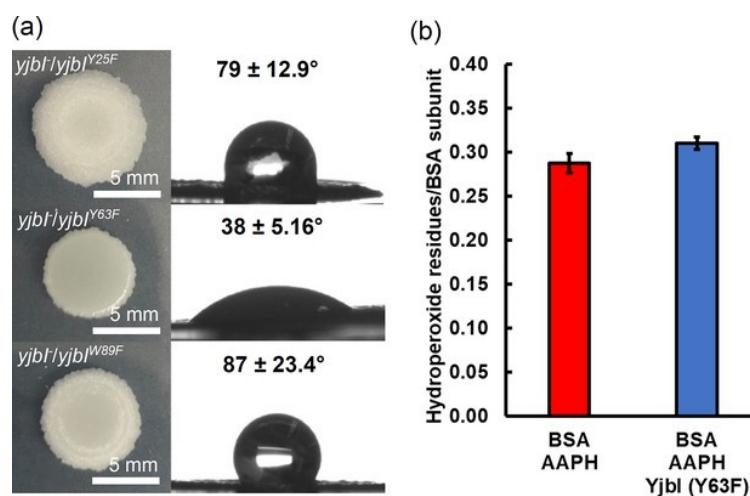


図1 点変異の影響評価

表2 各株の次亜塩素酸感受性評価

HClO (mM)	62.5	31.3	15.6	5.00	2.50	1.25	0.625	0.313	0.156
<i>yjbl/yjbl</i> <sup>WT</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>yjbl/yjbl</i> <sup>Y25F</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>yjbl/yjbl</i> <sup>Y63F</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>yjbl/yjbl</i> <sup>W89F</sup>	-	-	-	-	-	±	+	+	+

(+) visible growth, (-) no visible growth, (±) visible growth in one of two cases.

さらに、この *B. subtilis* でみられる、trHbO による過酸化修飾を受けたタンパク質の還元・無害化が、他の菌種でも同様であるかを評価した。すなわち、*M. tuberculosis* 由来のリコンビナント trHbO を pET システムを用いて高発現およびカラム精製し、還元能を評価した。その結果、過酸化した BSA のアグリゲーションを、*B. subtilis* 由来の trHbO と同様に阻害す

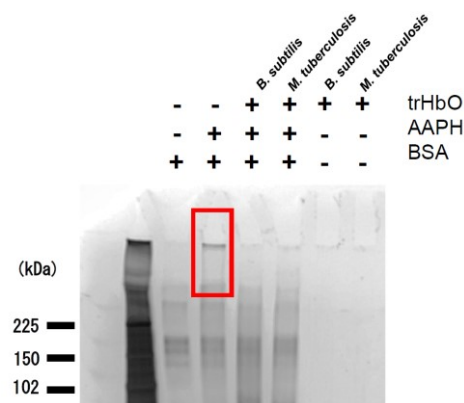


図2 過酸化タンパク質の凝集性評価

ることが明らかとなった(図2). この結果は、細菌種横断的に trHbO が過酸化タンパク質の凝集を抑制する生理機能を担っていることを示唆しており、これらの知見が病原性細菌の酸化剤耐性を狙った trHbO を標的とする新たな薬剤開発に繋がる可能性を示している.

### 【総括】

本研究テーマにより、広く細菌種に保存されている機能不明タンパク質 trHbO が過酸化したタンパク質を還元する機能を持つことが明らかとなった. 特に、バイオフィルムを構成する TasA などの大気中の  $O_2$  と接する機会が多いタンパク質の酸化変性・凝集を抑制し(図3a)、実際に生理機能のレベルで細胞の損傷を防いでいることが明らかとなった(図4b). また、タンパク質の過酸化は次亜塩素酸などの代表的な酸化剤でも引き起こされることが示唆され、過酸化タンパク質の還元を担う trHbO は新規抗生剤開発のターゲットとなりうることが示された.

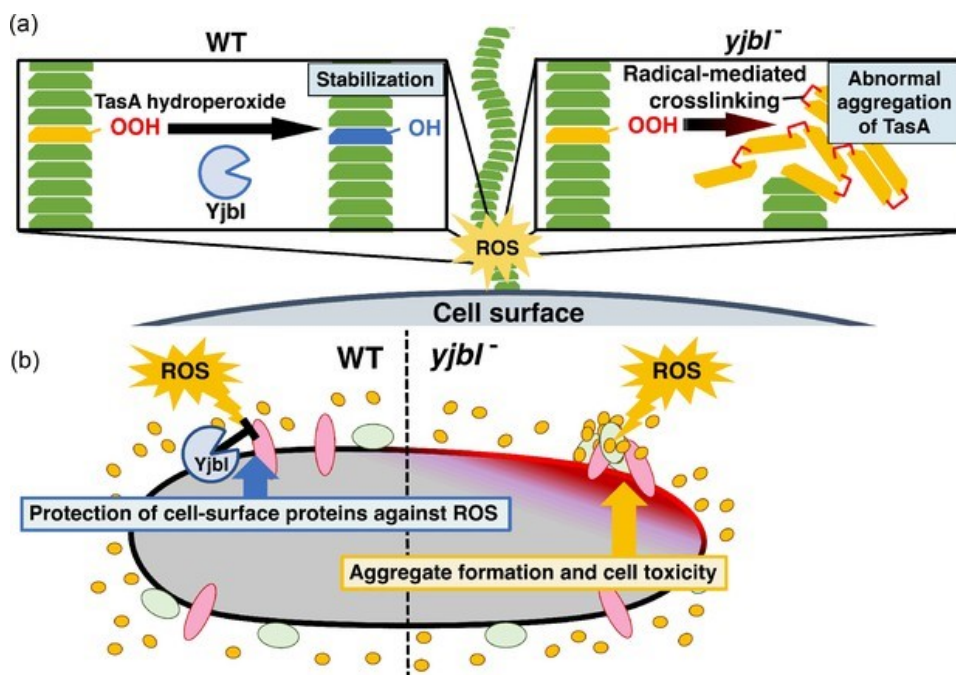


図3 明らかになった trHbO (Yjbl) の生理機能

### 【成果の公表】

これらの研究成果をまとめた論文をトップジャーナルの一つである eLife 誌に投稿し、アクセプトおよび掲載された. (*eLife*. 2022 Sep 20;11:e70467. doi: 10.7554/eLife.70467.)

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 Imai Takeshi, Tobe Ryuta, Honda Koji, Tanaka Mai, Kawamoto Jun, Mihara Hisaaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Group II truncated haemoglobin Yjbl prevents reactive oxygen species-induced protein aggregation in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.70467	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今井岳志、戸部隆太、本田幸司、田中麻衣、川本純、三原久明
2. 発表標題 枯草菌の切断型ヘモグロビンYjblによるタンパク質の酸化重合抑制
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今井岳志2、三原久明1（1立命館大学・生命科学、2兵庫工技センター）
2. 発表標題 <i>Bacillus subtilis</i> における切断型ヘモグロビンtrHb0のバイオフィルム形成および過酸化タンパク質凝集抑制への関与
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部 第515回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤裕人1、今井岳志2、三原久明1（1立命館大学・生命科学、2兵庫工技センター）
2. 発表標題 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 由来trHb0による過酸化タンパク質凝集抑制作用の評価
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部 第515回講演会
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
研究協力者	三原 久明  (Mihara Hisaaki)  (30324693)	立命館大学・生命科学部・教授    (34315)	

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