

令和元年6月20日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07667

研究課題名(和文) 粘液細菌における新規シグナル物質ジアデノシンポリリン酸の機能解明

研究課題名(英文) Function analysis of diadenosine polyphosphate in myxobacterium

研究代表者

木村 義雄 (Kimura, Yoshio)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：10243750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 粘液細菌は種々のストレス条件下でジアデノシンポリリン酸(Ap4AとAp5A)を数-5倍程度増加させたが、大腸菌などに比べその増加量は少なかった。本菌ではApnAは主にリシルtRNA合成酵素によって生成され、また、主にApaHによって分解された。apaH欠損変異株は、野生株より5-10倍程度高い細胞内ApnA濃度を示したが、ストレス耐性を示さず、逆に顕著な孢子形成の低下を示した。Ap5Aはアデニル酸キナーゼ活性を強く阻害し、エネルギーの恒常性が維持できなくなるため、本菌ではApnAはストレス条件下では機能を持たず、分解酵素によって逐次ヌクレオチドに分解され、低い濃度に保たれていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粘液細菌における種々のストレス条件下における細胞内ジアデノシンポリリン酸(ApnA)濃度の経時的変化とApnAの合成と分解に関わる主要な酵素を明らかにした。ApnA分解酵素欠損株では、細胞内のApnA濃度が5-10倍程度増加したが、種々のストレスに対して耐性にはならず、むしろ孢子形成の低下が見られた。

これらのことから、本菌はストレス条件下で生成されるApnAは本菌にとって有益に機能しないため、逐次分解しAMP、ADP及びATPにすることで特にAp5Aによるアデニル酸キナーゼの活性阻害を抑制し、エネルギーの恒常性を維持することで飢餓時での孢子形成を阻害させないようにしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Myxococcus xanthus increased diadenosine polyphosphate (Ap4A and Ap5A) by several to five times under various stress conditions, but the amount of increase was smaller than that of E. coli. In this strain, ApnA was mainly synthesized by lysyl-tRNA synthetase and was mainly degraded by ApaH. The intracellular ApnA concentration of apaH deletion mutant was a 5-10-fold higher than that of wild-type strain, and the mutant reduced spore formation. Since Ap5A strongly inhibited adenylate kinase activity, energy homeostasis can not be maintained. Therefore, ApnA is sequentially degraded by the degrading enzyme in this bacterium and is maintained at a low concentration.

研究分野：微生物生理学

キーワード：粘液細菌 ジアデノシンポリリン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2つのアデノシンの間に3~6個のリン酸を有するジアデノシンポリリン酸(Ap_nA)は、タンパク質の合成に不可欠なtRNAをアミノ酸に付加するアミノアシルtRNA合成酵素によってATPやADPなどから合成されることから、全ての生物に存在している。近年、哺乳動物ではAp₄Aが神経伝達・細胞分裂・血管の収縮拡張・アポトーシスなどで重要な働きを有する多機能性シグナル物質であることが明らかにされている。

一方、細菌では、大腸菌やサルモネラ菌において熱ショックや酸化ストレスにより、細胞内のAp₄A濃度を10-70倍増加させ、細胞内濃度を20-200 μMにすることが報告されている。しかしながら、Ap₄Aは大腸菌の分裂に関与していることや病原性の発揮、バイオフィーム形成の制御に関与しているという報告があるが、その機能は不明な点が多い。

2. 研究の目的

Ap₄Aは、tRNAにアミノ酸を付加するアミノアシルtRNA合成酵素によって合成され、全ての生物細胞に存在する。哺乳動物ではAp₄Aが多機能性シグナル物質として重要な役割を果たすことが明らかにされているが、細菌ではAp_nAの機能は不明である。我々は粘液細菌を用いて種々のストレス条件下での細胞内Ap_nA濃度の測定、Ap_nA合成酵素と分解酵素の特定とそれらの酵素学的諸性質の検討及びAp_nAの機能解析を行うことで、粘液細菌においてAp_nAの役割について明らかにする。

3. 研究の方法

種々のストレス条件下で培養を行った粘液細菌を集菌後、タンパク質を除いた細胞内低分子化合物を調製後、イオン交換カラムを用いたHPLCにて、細胞内のAp_nA濃度の定量を行った。また、Ap_nAを合成あるいは分解すると考えられる酵素を大腸菌で発現し、その酵素学的諸性質を明らかにすることで、本菌での主たるAp_nA合成酵素と分解酵素の特定を行った。

ついでAp_nA合成酵素と分解酵素の欠損株の作製を行い、Ap_nA合成酵素は生育に必須の酵素のため取得できなかったが分解酵素の変異株は取得できたため、この変異株(*apaH*変異株)を用いて本菌におけるAp_nAの機能解析を行った。

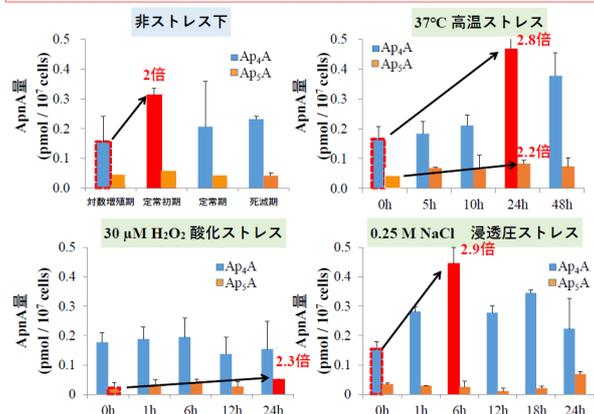
4. 研究成果

本研究では、最初に粘液細菌における種々のストレス条件下でどの程度のAp_nAの増加が見られるかの測定を行った。次いで、本菌におけるAp_nA合成酵素と分解酵素の特定を行った後、Ap_nA分解酵素欠損株を用いた分解活性の解析を行った。最後に本菌におけるAp_nAの役割について検討を行った。

(1) 粘液細菌における種々のストレス条件下での細胞内Ap_nA量の定量

粘液細菌(*Myxococcus xanthus*)において様々なストレス条件下におけるAp_nAの細胞内濃度を定量した結果、高温、浸透圧、酸化、金属塩及び飢餓ストレス条件下などでストレス負荷後、8-24時間の間に数倍から5倍程度のAp₄AとAp₅Aの増加が見られ、その後、徐々に減少した。その時のAp₄A濃度は、Ap₅Aに比べ数倍-10倍程度高かった(右図参照)。しかしながら、ストレス条件下でのAp₄Aの増加は、既に報

粘液細菌における環境ストレス負荷時における細胞内Ap_nA量の変化

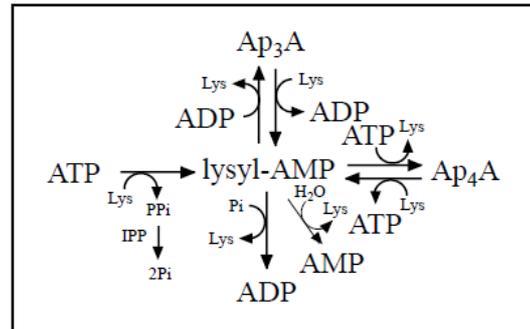


告されている大腸菌やサルモネラ菌、シアノバクテリアなどに比べてかなり低かった。本菌の細胞内 Ap₄A 濃度は、非ストレス時に 6 μM と見積もられ、ストレス負荷により 9-30 μM 程度に増加したと推定された。

(2) 粘液細菌における Ap_nA 合成酵素の特定

Ap₄A 合成酵素として、アミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)が知られており、tRNA 非存在下でアミノ酸と ATP から合成される。粘液細菌が有する aaRS のうち 21 種を大腸菌で発現を試み、このうち 18 種は大腸菌で発現できたので、酵素活性を測定したところ、7 種の aaRS にて Ap₄A 合成活性が見られた。そのなかでリシル tRNA 合成酵素(LysS)が他の酵素より約 10 倍以上高い Ap₄A 合成活性を有していた。

LysS は ATP とリシンによって Ap₄A を生成するが、その後、逆反応によって Ap₃A を生成し、最終的には ADP を生成する(右図参照)。また、基質として Ap₄ を用いると LysS は Ap₃A、Ap₅A、Ap₆A、ADP、ATP、Ap₅ など種々の Ap_nA や Ap_n を生成した。この反応には中間体としてリシル-ADP が生成されると考えられ、基質に ADP が結合した中間体の存在を示唆した初めての報告



例となった。本酵素は大腸菌やヒトなどでこれまで報告されている酵素と違い、Zn²⁺で活性化されず、むしろ強い阻害が見られたことから、細胞内で Zn²⁺なしでも Ap_nA を生成できることが示唆された。

LysS により Ap₄ を基質として Ap₅A 及び Ap₆A が生成されることから、その基質となる Ap₄ を生成する酵素を探索したところ、セリン tRNA 合成酵素は ATP、3リン酸、セリン存在下で高い Ap₄ 合成活性を示した。また、糖新生の代謝酵素であるホスホグリセリン酸キナーゼも高い Ap₄ 合成活性を示し、この酵素は、3リン酸を基質として必要としないので、粘液細菌の細胞内ではこの酵素が主に Ap₄ を生成していると考えられた。尚、アシル CoA 合成酵素、アセチル CoA 合成酵素、アデニル酸キナーゼなどでも Ap₄ の生成が報告されていたので、本菌のそれらの酵素を大腸菌で発現させ、酵素活性の測定を行ったがその生成量はわずかであり、これらの酵素によって Ap₄ は生成されていないと推定された。

(3) 粘液細菌における Ap_nA 分解酵素の特定

Ap_nA の分解は、大腸菌と枯草菌においては ApaH (Ap₄A hydrolase) 真核生物では Nudix hydrolase による分解が知られている。粘液細菌は 2 つの ApaH 相同性タンパク質(MXAN_1509 と MXAN_7163) を有しており、それらの酵素の活性を測定することで前者はチロシンホスファターゼ、後者(ApaH)が Ap_nA 分解酵素として機能していることが分かった。ApaH は Ap₅A を最も良い基質とし、次いで Ap₄A、Ap₃A の分解活性が高く、分解物はそれぞれ ATP と ADP、2 分子の ADP、ADP と AMP であった。

粘液細菌は 12 種の Nudix hydrolase を有し、そのうちの 10 種が大腸菌で発現できたので、酵素活性の測定を行った。そのうちの 1 種に比較的強い Ap_nA 分解活性が見られたが、ApaH に比べ、k_{cat} が 70 倍低かった。下記に記述した *apaH* 変異株は、野生株の 30-40% 程度の Ap_nA 分解活性が見られたことから、本菌では Nudix hydrolase によっても Ap_nA が分解されていることが示唆されたため、発現できなかった残りの 2 種の Nudix hydrolase に Ap_nA 分解酵素が存在する

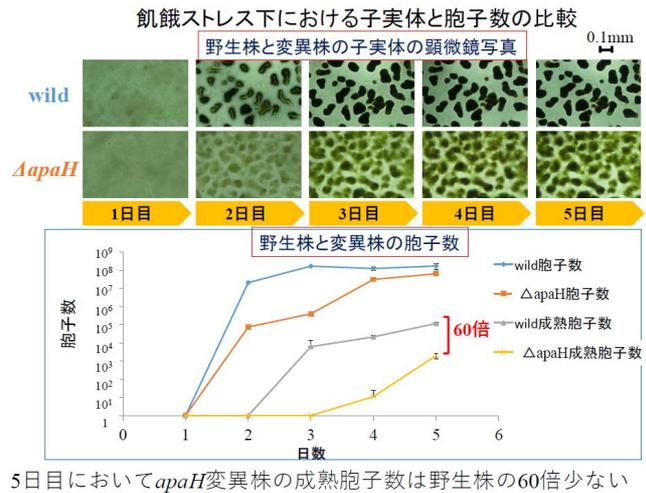
可能性も示唆された。

(4) *apaH* 変異株の表現型の解析

Ap_nA 分解酵素である *ApaH* をコードする遺伝子を破壊した *apaH* 変異株は、種々のストレス条件下で野生株に比べ、5-10 倍程度高い細胞内 Ap_nA 濃度を示した。

本菌は飢餓誘導により、胞子で満たされた子実体を形成する。胞子は成熟すると複数のタンパク質でコーティングされるため、子実体を光学顕微鏡で観察すると光が通過せず、黒く観察される(右図参照)。これに対し、*apaH* 変異株では、灰色の子実体が形成されたことより、変異株の子実体は成熟した胞子が少ないことが推察された。

実際に *apaH* 変異株の胞子数を測定すると、飢餓 5 日目で野生株の 5% 程度の胞子数しかなく、高い細胞内 Ap_nA 濃度は胞子形成を阻害することが示唆された。



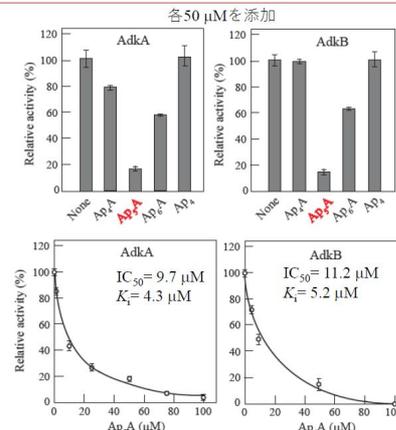
(5) 粘液細菌における Ap_nA の機能解析

粘液細菌におけるストレス負荷時に生成される Ap_nA の機能を推定するために、 Ap_nA 合成酵素である *LysS* の欠損変異体の作製を試みたが、生育に必須な酵素のためか取得できなかった。そこで Ap_nA の主たる分解酵素である *apaH* 変異株を用いて、各種ストレス条件下での生育を野生株と比較した。しかしながら、定常期、死滅期、高温、浸透圧、酸化ストレスにおいて両者の生育に顕著な差は見られなかった。一方で、上述したように飢餓時での子実体及び胞子形成においては顕著な遅延と減少が見られた。このことから、*apaH* 変異株はストレス条件下で細胞内の Ap_4A や Ap_5A 濃度が野生株に比べ 5 倍から 10 倍程度多くなっているが、ストレス耐性には差が見られなかったことから、ストレス条件下で増加する Ap_nA は粘液細菌におけるストレス適応には関与していないことが推定された。

また、大腸菌では Ap_4A は細胞の分裂周期に関与しているという報告がなされているため、野生株と *apaH* 変異株において分裂時間と細胞の大きさを測定したが、両者において差は見られなかった。さらに粘液細菌は、滑走運動により固体上を移動するので、運動性(反転頻度)を比較したが、これも両者においても差は見られなかった。

Ap_5A は、アデニル酸キナーゼの阻害剤であることから、粘液細菌が有するアデニル酸キナーゼ(*AdkA*)、ポリリン酸非存在下でアデニル酸キナーゼ活性を有するポリリン酸キナーゼ 1 とポリリン酸キナーゼ 2 ホモログタンパク質(*AdkB*)を用いてアデニル酸キナーゼ活性に及ぼす影響を調べた(右図参照)。その結果、全ての酵素のアデニル酸キナーゼ活性は、 Ap_5A に

粘液細菌のアデニル酸キナーゼは、 Ap_5A により阻害される



よって顕著に阻害された。この時の K_i は 4-5 μM であったことから、ストレス負荷によって増加した Ap_5A はアデニル酸キナーゼ活性を阻害すると推定された。アデニル酸キナーゼは ATP を用いて AMP を ADP に変換できるため、エネルギーの恒常性において重要な酵素であることから、ストレス時に生成される Ap_5A は細菌にとっては好ましくない生成物と考えられ、*apaH* 変異株が孢子形成の遅延と減少を示したのは、細胞内 Ap_5A 濃度の増加によるアデニル酸キナーゼの活性阻害が一因であると考えられた。

ストレス負荷により細胞増殖の抑制が起こり、タンパク質の合成量は低下し、tRNA の転写量が減少することで本菌ではリシル tRNA 合成酵素により Ap_nA が合成されるようになる。本菌は種々のストレス条件下において Ap_nA 分解活性を非ストレス負荷時より 1.5-2 倍程度増加させたことから、ストレス負荷により生成される Ap_nA は有益な機能を有していないため、分解酵素によって細胞内 Ap_nA 濃度が低く保つようにされていると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Kimura, Y., Kajimoto, S, Yamamoto, Y., and Tanaka, N. Enzymatic characteristics of Nudix hydrolase 2 (Nud2), an 8-oxo-dGTP hydrolase from *Myxococcus xanthus*. J Gen Appl Microbiol. 査読有, 2019 (in press).
2. Kimura, Y., Yamamoto, H., and Kamatani, S. Enzymatic characteristics of two adenylate kinases, AdkA and AdkB, from *Myxococcus xanthus* J Biochem. 査読有, 165(4):379-385. (2019) DOI: 10.1093/jb/mvy112.
3. Kimura, Y., Tanaka, C., and Oka, M. Identification of major enzymes involved in the synthesis of diadenosine tetraphosphate and/or adenosine tetraphosphate in *Myxococcus xanthus*. 査読有, Curr Microbiol. 75(7):811-817. (2018) DOI: 10.1007/s00284-018-1452-x.
4. Kamatani, S., Takegawa, K., and Kimura, Y. Catalytic Activity Profile of Polyphosphate Kinase 1 from *Myxococcus xanthus*. Curr Microbiol. 査読有, 75(4):379-385. (2018) doi: 10.1007/s00284-017-1391-y.
5. Kimura, Y., Yamamoto, Y., Kajimoto, S., Sakai, A., and Takegawa, K. Substrate specificity of Nudix hydrolases from *Myxococcus xanthus*. J Gen Appl Microbiol. 査読有, 64(2):94-98. (2018) DOI: 10.2323/jgam.2017.07.001.
6. Kimura, Y., Tanaka, C., Sasaki, K, and Sasaki, M. High concentrations of intracellular Ap_4A and /or Ap_5A in developing *Myxococcus xanthus* cells inhibit sporulation. Microbiology 査読有, 163(1):86-93. (2017) DOI: 10.1099/mic.0.000403.
7. Oka M, Takegawa K, and Kimura, Y. Lysyl-tRNA synthetase from *Myxococcus xanthus* catalyzes the formation of diadenosine penta- and hexaphosphates from adenosine tetraphosphate. Arch Biochem Biophys. 査読有, 604:152-158. (2016) DOI: 10.1016/j.abb.2016.07.002.
8. Kimura, Y., and Urata, M. Characterization of a eukaryotic-like protein kinase, DspB, with an atypical catalytic loop motif from *Myxococcus xanthus*. Arch Microbiol. 査読有, 198(3):219-226. (2016) DOI: 10.1007/s00203-015-1181-5.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 木村義雄,岡茉奈美: 粘液細菌におけるジアデノシン 4 リン酸とアデノシン 4 リン酸を合成する主要酵素の同定、第 91 回日本生化学大会、2018 年
2. 梶本紗也佳,木村義雄: 粘液細菌 *Myxococcus xanthus* が有する Nudix hydrolase の酵素学的諸性質について、第 91 回日本生化学大会、2018 年

3. 山本寛之、木村義雄: *Myxococcus xanthus* におけるアデニル酸キナーゼの酵素学的諸性質、第 91 回日本生化学大会、2018 年
4. 木村義雄、岡茉奈美: 粘液細菌 *Myxococcus xanthus* の lysyl-tRNA 合成酵素によるジアデノシンポリリン酸合成、生命科学系学会合同年次大会、2017 年
5. 梶本紗也佳、木村義雄: 粘液細菌 *Myxococcus xanthus* が有する Nudix hydrolase の基質特異性について、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会、2017 年
6. 田中千尋、木村義雄: *Myxococcus xanthus* におけるジアデノシン 4 リン酸及びアデノシン 4 リン酸を合成する酵素について、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会、2017 年
7. 岡茉奈美、木村義雄: *Myxococcus xanthus* におけるリシル-tRNA 合成酵素の酵素学的諸性質の研究、第 89 回日本生化学会大会、2016 年
8. 田中千尋、佐々木雅史、木村義雄: *Myxococcus xanthus* の孢子形成におけるジアデノシン 4 リン酸の役割について、第 89 回日本生化学会大会、2016 年