

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07555

研究課題名(和文)Toxin-antitoxin systemsの自己防御機能と病原性活性化機構

研究課題名(英文)Roles of toxin-antitoxin systems in self-defense and in virulence expression

研究代表者

戸邊 亨 (Tobe, Toru)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70207596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸管出血性大腸菌のゲノム情報より新規のswpAB Toxin-Antitoxin (TA) systemsを見出した。このTA system遺伝子は、ribosome依存性RNaseであるRelE toxinと相同性があり、実際に強制発現により菌の増殖を抑制した。しかし、antitoxin遺伝子の発現抑制によるToxin活性化では増殖への影響がなかったが遺伝子発現を選択的に抑制し、その標的遺伝子には病原性遺伝子が含まれていることを明らかにした。また、このswpAB TA systemは活性酸素を発生させる条件下で活性化されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Toxin-Antitoxin systemsは細菌に広く多数見出されているが、ほとんどの場合その機能が不明である。今回の研究では、TA systemの機能は、菌の増殖抑制ではなく遺伝子の選択的な発現抑制であることを初めて明らかにした。その手法もantitoxin遺伝子の選択的な発現抑制による新規のもので今後の解析に大いに貢献するものである。また、増殖に影響せずに病原性を選択的に低下させるシステムを見出したことは、感染制御法の開発にも貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：A novel swpAB Toxin-Antitoxin (TA) system was found in enterohemorrhagic *E. coli* through genome analysis. The swpA encodes Toxin which is homologous to RelE toxin, a ribosome-dependent RNase, and its forced expression actually suppressed bacterial growth. However, toxin activation by suppression of antitoxin gene expression had no effect on growth, but selectively suppressed gene expression, including virulence genes. The results also suggested that the swpAB TA system is activated under conditions that generate reactive oxygen species.

研究分野：細菌学

キーワード：遺伝子発現制御 病原性 RNase 0157 活性酸素

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

Toxin-antitoxin (TA) systems は細菌や古細菌に広く見出されている遺伝子モジュールだが、その機能が明らかにされたものは少ない。TA systems は細菌の増殖を抑制する Toxin の遺伝子とその活性を抑制する Antitoxin の遺伝子より構成されている。Antitoxin が失活すると Toxin の活性が顕在化し、DNA 複製や転写などの活性を阻害する。TA systems には、Antitoxin による Toxin 活性抑制の仕組みにより 6 種類の型に分類されている。2 型ではタンパク質の Antitoxin が直接 Toxin タンパク質に結合し活性を抑制する。2 型 TA systems の遺伝子は、オペロンを形成しており、プロモーターは自身の Antitoxin タンパク質が結合することにより抑制している。一部の Antitoxin タンパク質については、ストレス誘導性プロテアーゼにより分解されることが知られている。すなわち、プロテアーゼにより Antitoxin が分解されることで Toxin が活性化すると考えられている。Toxin の中でも翻訳段階を標的にしたものが多く見出されている。その一つは、RelE Toxin に代表されるリボゾームに結合した翻訳中の mRNA を切断する RNase である。翻訳中の mRNA が切断されることによりリボゾームが mRNA より遊離できなくなるが、細菌には翻訳が中断したリボゾームを救出するシステム trans-translation system が備わっている。trans-translation system では tmRNA が中断した翻訳を引き継ぎ、翻訳を終了させる。RelE を活性化させると trans-translation system の欠失により菌の生存率が低下することが報告荒れている。TA systems の機能で、これまでに報告されたものには、プラスミドの維持に関与する ccdAB や、ファージ感染菌を排除する rnlAB などがある。その他にもストレスに耐性となる persister cell を誘導するとの報告もあったが、近年ではこの機能については否定されている。腸管出血性大腸菌のゲノムには、多数の TA systems 遺伝子が見出されている。中には 2 型 TA systems に分類される新規の TA system (ECs5400-5399) が含まれていた。

腸管出血性大腸菌 EHEC は、ヒト上皮細胞に付着すると 3 型分泌装置により多数の病原因子（エフェクター）を宿主細胞内に注入する。細胞内ではエフェクターの作用により様々な生理活性の変化が引き起こされる。また、エフェクターの一つ Tir は細胞表層の一部を露出し、細菌付着因子 intimin の受容体として機能し、菌の密着と微絨毛の消失を伴う特徴的な病変 (A/E lesion) を引き起こす。3 型分泌装置やエフェクターの一部、intimin の遺伝子は染色体状の LEE と呼ばれる病原性領域に存在する。この他の染色体領域 (non-LEE) にも多数のエフェクター遺伝子が存在している。

2. 研究の目的

EHEC に見出された新規の TA system (ECs5400-5399) にコードされる Toxin タンパク質は、RelE Toxin と相同性を示すことから、リボゾーム依存性 RNase である可能性が示唆されている。この細菌生理における役割を明らかにするために、転写レベルに対する影響を通し

て遺伝子発現への影響を調べる。さらに、影響の大きい遺伝子群の特徴を下に菌の生理活性に対する影響を明らかにする。また、病原性との関連性についても解析する。一方、TA system を活性化する環境因子を探索し、活性化のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

はじめに、toxin 遺伝子 ECs5400 の強制発現系を用い、その菌の増殖抑制効果を確認する。また、RelE との相同性により RNase 活性に必須のアミノ酸配列を推定し変異体を作成し、活性に対する影響を検討する。RNase であることから、標的 mRNA に特異性がある可能性が考えられる。これを検討するために、ECs5400 を発現誘導した時の転写レベルの変化を RNA-seq を用いて網羅的に解析する。一方、実際の菌における TA system の活性化を再現するために、antitoxin 遺伝子 ECs5399 のみを特異的に発現抑制させる系を nuclease が失活した Cas9 (dCas9) を用いた CRISPR により作成する。この実験系の遺伝子発現に対する効果を強制発現系の結果と比較する。直接の標的遺伝子を同定し、選択性決定の特徴を明らかにする。

ECs5400-5399 TA system を活性化する因子を探索するために、antitoxin の自己転写抑制活性を利用した実験系を作成する。様々な条件で培養し、自己抑制の解除される条件を見出す。

4. 研究成果

ECs5400-5399 TA system にコードされる ECs5400 Toxin は、relAE TA system の RelE Toxin と相同性を有する。RelE Toxin は、リボゾーム依存性 RNase であり、翻訳中の mRNA を切断することで翻訳阻害を引き起こす。その結果、菌の増殖を抑制すると考えられている。

1. まず ECs5400 の Toxin 活性について確認した。ECs5400 を発現誘導できるプラスミドを野生型 EHEC に導入し、強制発現させたところ、菌の増殖が抑制された。次に、RelE Toxin との構造的な相同性より推定した RNase 活性に必須のアミノ酸配列 R59 を I に置換した変異体を産生する ECs5400R59I を強制発現させたところ、増殖抑制がみられなかった。RelE の強制発現系において、菌の生存率が trans-translation system の欠損により低下することが示されている。そこで tmRNA 遺伝子 *ssrA* 欠損株において ECs5400 を強制発現させたところ、野生型での強制発現に比べ変異株では生存率が顕著に低下した。これらの結果より、ECs5400 が増殖抑制を引き起こす RelE と類似のリボゾーム依存性 RNase Toxin をコードしていることが強く示唆された。

2. ECs5400 は RNase であることから、活性化により転写量が低下することが想定された。また、標的配列などに特異性があるとなれば遺伝子により低下量が異なる可能性が考えられた。そこで、ECs5400 の強制発現後の転写量の変化について全遺伝子を対象に検討したところ、一部の遺伝子のみが低下していることが示された。その遺伝子には、糖代謝系や病原性遺伝子などが含まれていた。特に、病原性遺伝子は、LEE 病原性領域の LEE2-LEE5 オペ

ロンの遺伝子群が低下していた。これらの結果を踏まえて、ECs5400-5399 TA system を *swpAB* (switching of expression pattern) TA system と名付けた。

3. 病原性遺伝子の発現および病原性に対する効果を更に解析した。*swpA* 遺伝子の発現誘導により複数の病原性タンパク質の産生量が低下することが確認できた。LEE 遺伝子群は 3 型分泌装置の遺伝子群を含むことから、エフェクタータンパク質の分泌を調べたところ分泌量が顕著に低下していた、更に、ヒト上皮細胞への付着能を調べたところ *swpA* 遺伝子の発現誘導により顕著に低下していた。

4. 実際の菌で SwpA Toxin は SwpB antitoxin が分解され SwpA-SwpB 複合体より遊離されると活性化されると考えられる。*swpA* の強制発現系では、実際の菌内での SwpA の産生量を反映しておらず、本当の影響を反映していない可能性が考えられる。そこで、nuclease 活性の消失した dCas9 を用いた CRISPR により *swpB* antitoxin 遺伝子を選択的に発現抑制できる系を作成した。*swpB* の発現を抑制しても一部の遺伝子の転写量が低下し、さらに病原性遺伝子の転写量も低下した。しかし、菌の増殖には全く影響が認められなかった。この結果は、*swpAB* TA system は、菌の増殖抑制ではなく遺伝子発現のパターンを変化させる遺伝子発現調節因子としての機能を持っていることを示唆している。

5. *swpA* の影響は、直接の標的遺伝子以外にも間接的に多くの遺伝子の発現に及んでいることが推測される。直接標的となる遺伝子を同定するために、転写解析 (RNA-seq) を詳細に検討したところ、LEE4 と LEE5 オペロンの先頭にある *espA* および *tir* 遺伝子が候補に上がり、プロモーターと下流を除いた場合でも *swpA* 発現誘導による影響が認められることで確認できた。

6. SwpB antitoxin タンパク質は、SwpA Toxin の抑制因子であると同時に *swpAB* オペロンプロモーターの転写抑制因子でもあることが、類似の TA system の知見から推定された。*swpAB* プロモーターの活性に対する *swpB* の発現量の増加の効果を調べると、確かに発現量の増加に応じて *swpAB* プロモーター活性が低下した。また、この抑制効果には、SwpB の DNA 結合ドメインが必要であることが示された。

7. *swpAB* TA system の活性化は SwpB antitoxin の量的な低下によると考えられることから、*swpAB* TA system を活性化する条件を検索するために、*swpAB* プロモーター活性の変動を様々な条件下で検討した。その結果、酸化ストレス誘導条件により活性が上昇する可能性が示唆された。活性酸素を発生させる抗生物質 Norfloxacin (Nor) を添加すると、プロモーター活性の上昇がみられ、活性酸素を消失させるチオ尿素の添加により、Nor の効果は消失した。

8. Nor 添加による菌体内における SwpB の量的な変化を検討した。SwpB のタンパク質量は、菌の増殖と共に増加していったが、Nor を添加すると増加しなくなった。翻訳阻害薬を添加すると、SwpB の増加はみられなくなり、Nor の効果もみられなくなった。すなわち、Nor による効果は、新規の SwpB タンパク質合成の阻害であることが示唆された。SwpA が活性化されていない通常の増殖条件下では、SwpA は SwpB と複合体を作っている。SwpA に対する SwpB

の量比が増加すると遊離し Toxin が活性化されると考えられる。Nor 添加による遊離 SwpA と SwpA-SwpB 複合体の量的な変化を調べたところ、Nor 添加により SwpA-SwpB 複合体にある SwpA が減少し、リボゾームと結合していると考えられる SwpA の量が増加していることが示された。

以上の結果より、*swpAB* TA system は、活性酸素の発生条件下で活性化し、遺伝子の発現パターンを変化させると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nada Risa, Ebihara Shinya, Yen Hilo, Tobe Toru	4. 巻 20
2. 論文標題 Enterohaemorrhagic Escherichia coli activates nitrate respiration to benefit from the inflammatory response for initiation of microcolony-formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12866-020-01946-w	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 -

1. 著者名 Hamamura Riho, Yen Hilo, Tobe Toru	4. 巻 66
2. 論文標題 SlyA regulates virulence gene expressions through activation of pchA regulatory gene in enterohemorrhagic Escherichia coli	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 501 ~ 509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.13027	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 -

1. 著者名 Ebihara Shinya, Yen Hilo, Tobe Toru	4. 巻 67
2. 論文標題 A novel toxin-antitoxin system swpAB alters gene expression patterns and reduces virulence expression in enterohemorrhagic Escherichia coli	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 171 ~ 184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.13054	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 海老原慎也、顔宏哲、戸邊亨
2. 発表標題 The repression of antitoxin gene ECs5399 of the chromosome-encoding toxin-antitoxin system in EHEC O157 Sakai reduces pathogenicity without affecting growth
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海老原慎也、顔宏哲、戸邊亨
2. 発表標題 EHEC 0157 Sakai株に新規に見出されたToxin-antitoxinシステムの制御機構の分析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海老原慎也、顔宏哲、戸邊亨
2. 発表標題 EHEC 0157に新規に見出されたToxin-antitoxinシステムの発現制御
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧村 史穂、顔 宏哲、戸邊 亨
2. 発表標題 EHECにおけるStyAの病原性遺伝子発現調節における役割
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森國華子、川崎清史、顔宏哲、戸邊亨
2. 発表標題 EHECに新規に見出されたLipidA修飾酵素のLL-37抵抗性への寄与
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 海老原慎也、顔宏哲、戸邊亨
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌における toxin-antitoxin システムは 病原性遺伝子発現を優先的に抑制する
3. 学会等名 第72回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 海老原慎也、顔宏哲、戸邊亨
2. 発表標題 Toxin-antitoxin systems preferentially repress virulence gene expression in Enterohaemorrhagic E. coli
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

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