

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16069

研究課題名(和文) アミノアシルtRNAを標的とする毒素の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of bacterial toxins targeting aminoacyl-tRNAs

研究代表者

八代 悠歌 (Yashiro, Yuka)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：40836483

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)：本研究では、GNATファミリーに属するアセチル基転移酵素のトキシンによる、アミノアシルtRNAのアセチル化反応の分子機構解明を図った。サルモネラ菌のGNATトキシンTacTについて、グリシルtRNA^{Gly}のみをアセチル化することを明らかにし、さらにTacTとグリシルtRNA^{Gly}の共結晶構造決定に成功し、TacTによる特異的な基質認識メカニズムを解明した。また、腸管出血性大腸菌のGNATトキシンAtaTが、複数種のアミノアシルtRNAを標的とすることを見出したほか、AtaTとアミノアシルtRNAの共結晶構造解析と生化学解析により、AtaTによる基質アミノアシルtRNAの認識機構を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでGNATトキシンによる基質認識の分子基盤は未解明であり、本研究は新規の学術的知見をもたらすものである。また、バクテリアのトキシン・アンチトキシンは、栄養飢餓や抗生物質暴露などのストレス環境下でのバクテリアの生残に寄与にすると考えられており、特に、抗生物質にさらされた細菌の一部が休眠状態となり、遺伝子の変化を伴わずに薬剤耐性を示す現象(パーシスタンス)への関与が示唆されている。実際に、本研究で対象としたトキシンTacTは、マクロファージ細胞中のサルモネラ菌のパーシスタンスを促進することが報告されており、本研究成果は、病原性細菌に対する新規薬剤開発において分子基盤を提供すると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to elucidate molecular basis for the aminoacyl-tRNA acetylation by bacterial toxins belonging to the Gcn5-acetyltransferase (GNAT) family. We revealed that a GNAT toxin TacT in *Salmonella Typhimurium* selectively acetylates glycylyl-tRNA^{Gly}. We determined the crystal structure of TacT in complex with acetyl-glycyl-tRNA^{Gly}, and revealed the precise molecular mechanism for Gly-tRNA^{Gly} specific acetylation by TacT. We also found that AtaT, a GNAT toxin in enterohemorrhagic *E. coli* has a broader specificity for aminoacyl-tRNAs than initially reported. Through biochemical assay and structural analysis of AtaT complexed with aminoacyl-tRNA, we showed the mechanism of aminoacyl-tRNA acetylation by AtaT.

研究分野：分子生物学、構造生物学

キーワード：トキシン・アンチトキシン tRNA X線結晶構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バクテリアのトキシン・アンチトキシンは、栄養飢餓や抗生物質の暴露などのストレス環境下において細胞の増殖を抑制することにより、バクテリアの生残を促進する。近年、GCN5-related acetyltransferase (GNAT) ファミリーに属するアセチル基転移酵素が、新たなファミリーのトキシンとして報告された。このファミリーのトキシンは、アセチル-CoA をアセチル基供与体として用いてアミノアシル tRNA に結合したアミノ酸の アミノ基をアセチル化し、細胞のタンパク合成を阻害する結果、バクテリアの増殖を抑制する。これまでに GNAT ファミリーのトキシンは、大腸菌 O157:H7 株、大腸菌 HS 株、サルモネラ菌などにおいて同定されており、それぞれアミノアシル tRNA に対する特異性が異なることが明らかにされていた。しかしながら、GNAT トキシンがどのような分子メカニズムでアミノアシル tRNA を特異的に認識し標的とするのかは未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、GNAT トキシンによる特異的な基質認識と反応触媒における分子基盤の解明を目的とし、GNAT ファミリーのトキシンとアミノアシル tRNA との複合体の X 線結晶構造解析、および生化学・遺伝学的解析をおこなった。最終的に、タンパク質酵素であるトキシンがアミノアシル tRNA へ作用するメカニズムを原子レベルで理解することを目指した。

3. 研究の方法

まず、大腸菌 O157:H7 株の GNAT トキシンである AtaT に着目し、X 線結晶構造解析、生化学・遺伝学的解析により、AtaT による基質認識メカニズムの解明を図った。さらに、サルモネラ菌の TacT についても解析をおこない、TacT による特異的なアミノアシル tRNA のアセチル化の分子基盤を明らかにした。

具体的には、以下の方法により研究をおこなった。

(1) GNAT トキシンによる特異的なアミノアシル tRNA の認識とアセチル化反応の分子基盤を明らかにするために、トキシン-アミノアシル tRNA 複合体の X 線結晶構造解析をおこなった。結晶化には、大腸菌発現系におけるトキシンの過剰発現を可能にするために不活性変異体を用いた。また、結晶化の基質には、アミノアシル tRNA 中のアミノアシル結合を安定化するために、無水酢酸をもちいて アミノ基をアセチル化した、アセチルアミノアシル tRNA を使用した。

(2) これまでの報告では、GNAT トキシンによるアミノアシル tRNA のアセチル化の解析は試験管内でなされており、細胞内でトキシンによってアセチル化されたアミノアシル tRNA を解析した例はなかった。そこで、GNAT トキシンを発現した大腸菌のアミノアシル tRNA を抽出し、重水素ラベル無水酢酸でアセチル化して質量分析により解析することで、トキシンによって細胞内でアセチル化されたアミノアシル tRNA を定量する系を立ち上げた。これにより、GNAT トキシンを発現した細胞内で、実際にアセチル化されるアミノアシル tRNA 種を同定した。

(3) tRNA 配列に変異を導入したアミノアシル tRNA を用いて、トキシンによるアセチル化反応効率の評価を試験管内でおこない、トキシンによるアミノアシル tRNA の認識に関与する tRNA 塩基配列を生化学的手法により解析した。

(4) アラビノース誘導発現系を用いて、野生型および変異体のトキシンを発現した大腸菌の生育を比較し、結晶構造解析により得られた結果を、トキシンの細胞内での毒性を評価することによっても検証した。

4. 研究成果

以下の研究成果を得られた。

【腸管出血性大腸菌 O157:H7 株の GNAT トキシン AtaT によるアセチル化の分子機構】

(1) 腸管出血性大腸菌 O157:H7 株において同定された GNAT トキシン AtaT は、開始メチオニル tRNA に結合したメチオニンの アミノ基をアセチル化し、細胞内の翻訳を開始段階で抑制することが示唆されていた。本研究において、申請者は、AtaT の発現を誘導した大腸菌株においてアミノアシル tRNA を質量分析により解析した結果、AtaT が開始メチオニル tRNA だけではなく、Gly-tRNA^{Gly}、Trp-tRNA^{Trp} などの tRNA をアセチル化することを見出し、AtaT が細胞内の翻訳を伸長段階においても抑制することを明らかにした。

(2) また、AtaT とアセチル化した開始メチオニル tRNA の共結晶構造の解析により、AtaT の tRNA との接触面が二量体の境界上に形成されていること、および、AtaT と tRNA の相互作用が tRNA のアクセプター領域にのみみられることを明らかにした(図 A,B)。

(3) 開始メチオニル tRNA に変異を導入し AtaT による試験管内アセチル化反応効率を評価した結果、アクセプター領域下部の連続した G-C 塩基対が AtaT によるアセチル化に必要であることがわかった。

(4) また、開始 tRNA にイソロイシンやバリンを結合すると、AtaT による試験管内アセチ

ル化反応の効率が大きく低下したことから、AtaT が tRNA 配列のみならずアミノ酸部分の立体構造を認識する可能性が示唆された。

以上の結果から、AtaT がアミノアシル tRNA のアミノ酸部位の構造とアクセプター領域の配列を認識してアセチル化をおこなうことを明らかにした。

【サルモネラ菌の GNAT トキシン TacT による Gly-tRNA^{Gly} 特異的アセチル化の分子基盤】

(1) サルモネラ菌の GNAT トキシン TacT は、複数の伸長アミノアシル tRNA を標的として翻訳伸長阻害を引き起こすことが示唆されていたが、その基質特異性は不明確であった。申請者らは、TacT の発現を大腸菌において誘導し、アミノアシル tRNA を質量分析により解析した結果、TacT は細胞内において Gly-tRNA^{Gly} のみを標的とすることを明らかにした。また、試験管内においても TacT が他のアミノアシル tRNA よりも Gly-tRNA^{Gly} を効率よくアセチル化することを示した。

(2) さらに申請者らは、TacT とアセチル化した Gly-tRNA^{Gly} の複合体の結晶構造の決定に成功した(図 C)。結晶構造解析の結果、TacT が tRNA^{Gly} のアクセプター領域上部と水素結合を介して特異的な相互作用を形成していることがわかった。特に、識別位塩基の U73 とアクセプター内の G71 を特異的に認識していることが明らかになった(図 D)

(3) 生化学的解析により TacT による効率的なアセチル化反応には、U73 と G71 が必要であることがわかった。U73 と G71 の組み合わせは tRNA^{Gly} にのみ見られる配列であり、これらの結果から、TacT が tRNA^{Gly} に特異的な配列を認識することで、他のアミノアシル tRNA と識別していることが明らかになった。

(4) また、tRNA^{Cys} は tRNA^{Gly} と同様に識別位塩基に U73 を持つが、変異により C2-G71 塩基対を導入しても TacT によりアセチル化されなかった。一方で、グリシル tRNA 合成酵素によりグリシンを結合した場合には、TacT によりアセチル化されたことから、TacT は AtaT と同様にアミノアシル tRNA のアミノ酸部分を認識していることが示唆された。

以上の結果から、TacT が tRNA^{Gly} に特異的な配列と tRNA に結合したグリシン部分を認識することで、Gly-tRNA^{Gly} を特異的にアセチル化する酵素であることが示された。

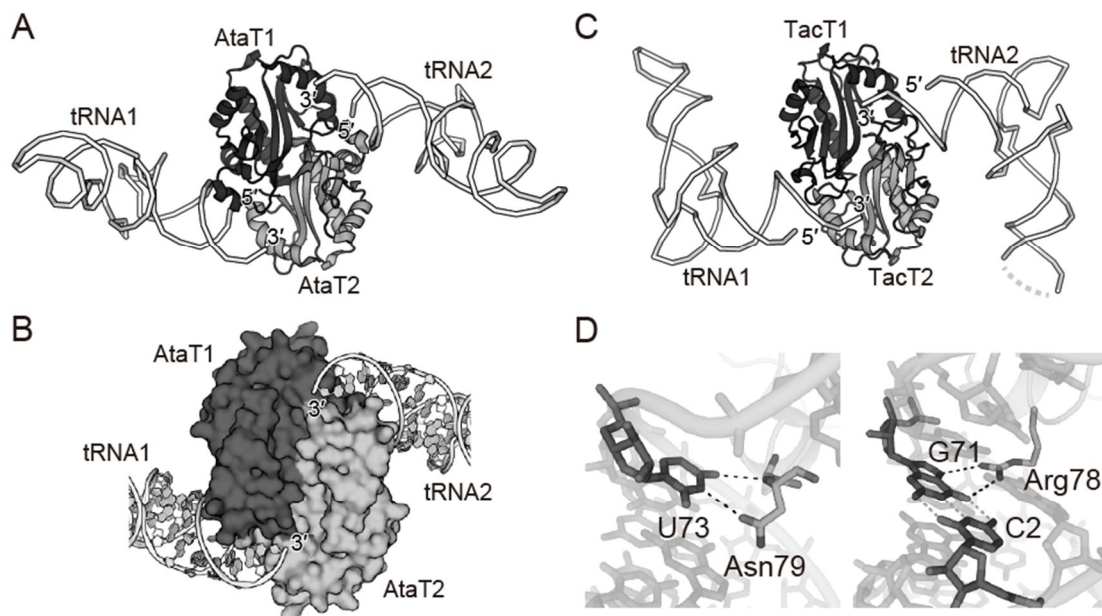


図 (A) トキシン AtaT と tRNA^{fMet} 複合体の全体構造 (B) AtaT と tRNA^{fMet} 複合体において、tRNA^{fMet} のアクセプター領域のみが AtaT 二量体の境界上に結合する (C) トキシン TacT と tRNA^{Gly} 複合体の全体構造 (D) TacT と tRNA^{Gly} の相互作用の詳細. U73 は TacT の Asn79 の主鎖と側鎖、G71 は Arg78 の側鎖とそれぞれ水素結合を形成する

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 3件）

1. 著者名 Yashiro Y, Sakaguchi Y, Suzuki T, Tomita K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Mechanism of aminoacyl-tRNA acetylation by an aminoacyl-tRNA acetyltransferase AtaT from enterohemorrhagic E. coli.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 5438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-19281-z	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 -

1. 著者名 Zhang C, Yashiro Y, Sakaguchi Y, Suzuki T, Tomita K.	4. 巻 48
2. 論文標題 Substrate specificities of Escherichia coli Itat that acetylates aminoacyl-tRNAs.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 7532-7544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa487	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 -

1. 著者名 Yashiro Y, Zhang C, Sakaguchi Y, Suzuki T, Tomita K	4. 巻 37
2. 論文標題 Molecular basis of glycyI-tRNA ^{Gly} acetylation by TacT from Salmonella Typhimurium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 110130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.110130	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuka Yashiro, Kozo Tomita
2. 発表標題 Crystal structure of the enterohemorrhagic Escherichia coli AtaT-AtaR toxin-antitoxin complex
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka Yashiro, Yuriko Sakaguchi, Tsutomu Suzuki, Kozo Tomita
2. 発表標題 Molecular basis of glycyI-tRNAGly acetylation by TacT from Salmonella Typhimurium
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
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
---------------------------	-----------------------	----

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