

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 22 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870386

研究課題名(和文)細菌が持つトキシン-アンチトキシン系の機能解析とその応用

研究課題名(英文)The functional analysis and the application of bacterial toxin-antitoxin system

研究代表者

大塚 裕一(Otsuka, Yuichi)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：10548861

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)：細菌に広く保存されるトキシン-アンチトキシン系(TAS)は、ストレス時に発現するトキシンが自身の増殖を停止させる仕組みである。本研究では、腸管出血性大腸菌0157株が持つTAS、z3289-sRNA1を研究対象として、z3289トキシンが持つ毒性の分子機構とsRNA1アンチトキシンによるz3289の翻訳抑制機構を明らかにした。またTASの生物学的役割として抗ファージ作用を明確にした。さらに、改変したz3289トキシンが抗菌ペプチドとして作用することも示した。

研究成果の概要(英文)：Toxin-antitoxin system (TAS) is widely conserved in prokaryotic plasmids and chromosomes and is linked to many roles in cell physiology. TAS is composed of a stable toxin that inhibits one of essential cellular processes, and a labile antitoxin that inhibits a harmful effect of the cognate toxin. In this study, the new TAS, z3289-sRNA1, encoded by the Enterohemorrhagic E. coli 0157:H7 chromosome has been characterized. I elucidated the molecular mechanism of the toxicity caused by the z3289 toxin, the mechanism for the translational repression of the z3289 toxin by the sRNA1 antitoxin, and the physiological role of z3289-sRNA1 as an anti-phage defense. In addition, I demonstrated that the modified z3289 toxin functions as an antimicrobial peptide.

研究分野：微生物学、分子生物学

キーワード：トキシン-アンチトキシン系 細菌 ファージ 非コードRNA 翻訳 RNA分解 抗ファージ作用 抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

細菌が産生するトキシンには、感染した宿主細胞の機能を破壊して病原性をもたらすものと細菌自身の増殖を停止させるものの2種類がある。後者のトキシンは病原性を示さないために、研究対象として注目されてこなかった。しかし最近、このトキシンがストレス応答やバイオフィルムの形成、パーシステンス(薬剤耐性)、抗ファージ作用など、細菌の様々な生理的現象に関わることが明らかになってきた。

このトキシンの特徴として、トキシンの活性を抑えるアンチトキシンの遺伝子がトキシン遺伝子と並んで存在し、トキシン-アンチトキシン系(TAS)を構成する。TASはほぼ全ての細菌に保存されており、さらに細菌の染色体上には複数のTASの遺伝子座が存在する(大腸菌K-12株は36種類、結核菌は80種類以上)。一般に、TAS遺伝子の転写がストレスシグナルである(p)ppGppに感受性であるために、細菌が被るストレスの強さに応じて転写が抑制される。その結果、不安定であるアンチトキシンの細菌内濃度が低下してトキシンが活性化することで、細菌の増殖が停止する。停止中にストレス応答が可能となるが、ストレスが許容できない程大きくなった場合には、高まりすぎたトキシン活性のために細菌は死に至ると考えられている。

TASはアンチトキシンが非コードRNAの場合(Type)と蛋白質の場合(Type)の大きく2つに分類される。Type TASは解析が進み、その毒性の分子機構や制御機構、生物学的役割が明らかになりつつある。我々もType トキシンを複数発見し、それらがRNase活性を有してmRNAを無秩序に分解することで毒性を発揮することを明らかにした。また、トキシンが持つ新しい生物学的役割として抗ファージ作用を報告した。Type TASとは対照的に、Type TASは60アミノ酸以下のトキシンが毒性を発揮することやアンチトキシンRNAがトキシンの翻訳を抑制するといった注目すべき特徴を持つことは知られているが、それらの詳細な分子機構や生物学的役割がほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、これまでのType TASの研究経験から得た知識や技術を発展させ、未だ解明されていないType TASが持つ毒性の分子機構とその活性制御機構、そして生物学的役割を明らかにする。また、トキシンを抗菌薬へ応用するための基盤となる研究も行う。具体的には、腸管出血性大腸菌0157:H7株が持つType TAS、z3289-sRNA1を研究対象として、以下の研究項目を実施する。

研究項目(1) z3289 トキシンによる細菌増殖抑制メカニズムの解明

研究項目(2) sRNA1 アンチトキシンによるz3289の発現抑制メカニズムの解明

研究項目(3) ファージ増殖に対するz3289-sRNA1の関与

研究項目(4) トキシンペプチドによる抗菌効果の検討

3. 研究の方法

研究項目(1)

z3289 トキシンの増殖阻害メカニズムを明らかにするために、z3289 トキシンの細菌内局在を調べた。また、z3289 トキシンによる細菌の形態変化を顕微鏡で観察し、さらにストレス応答の有無や活性酸素の関与についても検討した。

研究項目(2)

非コードRNAであるsRNA1アンチトキシンは、z3289 mRNAの翻訳開始コドンより73塩基上流に存在する18塩基の配列(z-sR1)と相補鎖を形成して、z3289の発現を抑制する。そこで、発現の抑制メカニズムを明らかにするために、次の3つの実験を行った。z3289 mRNAの翻訳開始領域の2次構造を予測して、sRNA1による発現抑制に必要な塩基を同定した。sRNA1有無におけるz3289 mRNAの安定性を調べた。発現制御に関わる因子の同定を試みた。

研究項目(3)

z3289-sRNA1が抗ファージ作用を持つかどうかを検討するために、z3289-sRNA1やz3289を欠失した大腸菌0157株を作製して、0157株特異的ファージであるPP01の増殖能を調べた。

研究項目(4)

29アミノ酸からなるz3289トキシンが毒性を発揮するのに必須なアミノ酸配列を決定した。次に、そのアミノ酸配列を含むペプチドを化学合成して、様々な細菌に対する抗菌効果を検討した。

4. 研究成果

研究項目(1)

膜貫通領域を有するz3289トキシンは、大腸菌内で発現させると内膜に局在した(図1)。次に、膜電位感受性色素DiBAC4(3)を用いた顕微鏡観察から、トキシン発現後に膜の脱分極が誘導されることが分かった。そこで、膜ストレス応答に関わる遺伝子群の変異株を用いて、z3289の毒性に関与する因子の同定を試みたところ、2成分制御系の1つ、CpxA-CpxRがz3289の毒性に部分的ではあるが関与していることが分かった。この結果は、CpxA-CpxRが制御する遺伝子群の中に、毒性に関わる因子が存在することを示唆している

る。さらに、z3289 トキシンによる生存率の低下に活性酸素が関わる可能性を検討するために、活性酸素を消去するチオ尿素や発生に必要な二価鉄イオンをキレートする 2,2'-Bipyridyl で大腸菌を処理して、z3289 の毒性を調べたところ、両処理とも生存率を著しく回復させた。また、活性酸素を特異的に検出する試薬 HPF を用いて顕微鏡観察したところ、z3289 トキシンの発現後に細菌内に活性酸素が発生していることが確認できた。よって、z3289 による毒性の発揮には活性酸素の関与が強く示唆された。

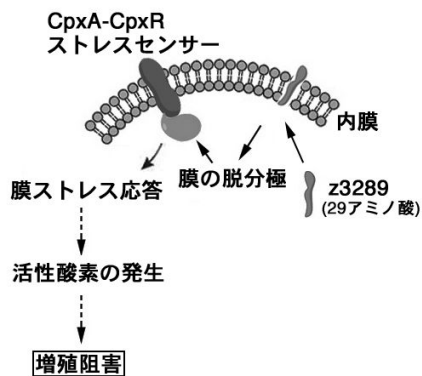


図 1 z3289 トキシンによる毒性の分子メカニズムのモデル図

研究項目 (2)

非コード RNA である *sRNA1* アンチトキシンは、*z3289* mRNA の *z-sR1* と相補鎖を形成して、*z3289* の発現を抑制する。そこで、*sRNA1* 有無における *z3289* mRNA の 2 次構造を予測して、*z3289* の発現に必要な配列を実験的に検証した。その結果、*sRNA1* がある場合には、翻訳開始領域でステムループ構造が形成されるために、リボソームが結合できず *z3289* の翻訳が起きないことが明らかになった (図 2)。また、ステムループ構造を形成した *z3289* mRNA は、大腸菌の主要な RNA 切断酵素である RNase E により積極的に分解されることも分かった (図 2)。これは、リボソームが mRNA 上にリクルートされないために、RNase E による切断を受けやすくなったためであると考えられる。最後に、変異株を用いた解析により、RNA シャペロンである Hfq が *sRNA1* と *z-sR1* の相補鎖形成に必要であることが強く示唆された (図 2)。以上の結果は、翻訳開始に必要な領域への非コード RNA の結合が、翻訳開始領域の 2 次構造を変化させて、翻訳抑制と mRNA 分解の両面で遺伝子発現を制御する数少ない事例である。現在、*sRNA1* が無い場合に、ステムループ構造が解消されて *z3289* が発現するメカニズムについて解析を進めている。

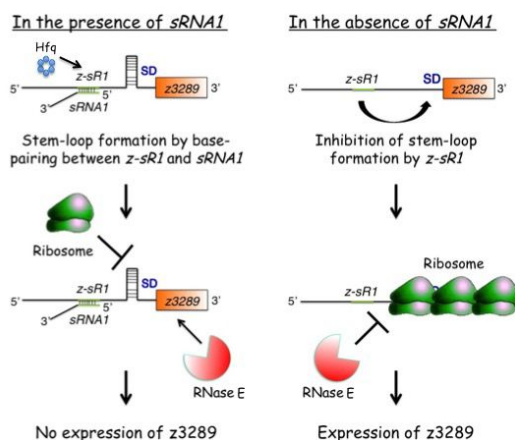


図 2 *sRNA1* アンチトキシンによる *z3289* トキシンの発現制御メカニズムのモデル図

研究項目 (3)

z3289-sRNA1 を欠失した大腸菌 0157:H7 株を作製して、PP01 ファージのブ্লাーク形成効率 (e.o.p) と 1 感染菌あたりの子ファージ産出量 (パーストサイズ) を測定した。その結果、欠失株では野生株に比べて、e.o.p が約 4 倍 (図 3)、パーストサイズが約 3 倍増加した。これは、*z3289-sRNA1* が PP01 ファージに対して抗ファージ作用を持つことを示している。そこで、*z3289* トキシンと *sRNA1* アンチトキシンのどちらがファージの増殖を抑えているのかを明らかにするために、*z3289* を欠失した株を作製して、e.o.p とパーストサイズを測定した。両実験共に野生株と同じ値を示したため、*z3289* トキシンではなく *sRNA1* アンチトキシンが PP01 ファージの増殖を抑えることが強く示唆された。これまでに、TAS のアンチトキシンが抗ファージ作用を持つ例はなく、新規の抗ファージ機構であることが予想される。

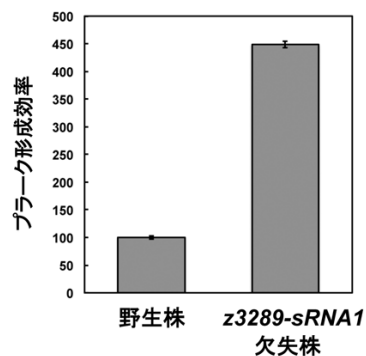


図 3 野生株または *z3289-sRNA1* 欠失株を指示菌として、PP01 ファージを増殖させ、形成されたブラーク数を定量した。

研究項目 (4)

z3289 トキシンの毒性発揮には、内部の 5 アミノ酸残基が重要であることが分かった。そこで、そのアミノ酸残基を含むペプチドを化学合成して、グラム陽性菌 (黄色ブドウ球

菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、枯草菌)とグラム陰性菌(大腸菌 K12 株、O157:H7 株)に添加したところ、グラム陽性菌の増殖停止(図4)と生存率の低下、さらには形態観察により、グラム陽性菌の細胞膜に損傷が起きることが分かった。グラム陰性菌に対しては阻害効果を示さなかった。次に、動物由来の培養細胞(Vero、BHK、CHO)を用いてペプチドの細胞毒性を調べたが、どの細胞にも顕著な毒性は見られなかった。興味深いことに、酵母様真菌であるカンジダ・アルビカンスに対しても増殖阻害効果を示した。以上の結果より、本ペプチドはグラム陽性菌の細胞膜に特異的に作用する抗菌ペプチドであり、かつ真核細胞に対しては毒性を示さない。よって新規抗菌薬のシーズとして期待できる。また、既知の抗菌ペプチドとは異なるアミノ酸配列を有しており、加えて分子量が小さい、さらには真菌であるカンジダ属にも阻害効果をもつという特徴があることから、来年度本ペプチドの特許申請する予定である。

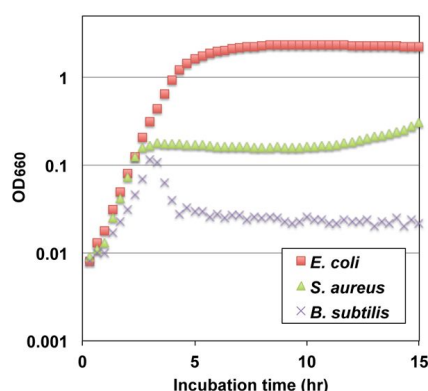


図4 黄色ブドウ球菌() 枯草菌(x) 大腸菌(O157:H7株)()をLB液体培地で振盪培養した。OD₆₆₀が約0.2に到達した時ペプチドを(終濃度200 µg/ml)添加した。横軸は培養時間、縦軸はOD₆₆₀の値を示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

大塚 裕一、Prokaryotic toxin-antitoxin systems: novel regulations of the toxins、*Current Genetics*、査読有、62巻、2016、379 - 382、DOI:10.1007/s00294-015-0557-z

[学会発表](計 8件)

Abdulraheem M. Alawneh、米崎 哲朗、増田 道明、大塚 裕一、細菌とファージの生存戦略:トキシン - アンチトキシン系の制御、第39回日本分子生物学会、2016年12月1日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

大塚 裕一、米崎 哲朗、増田 道明、細菌とファージの生存戦略:トキシン - アンチトキシン系の制御、日本細菌学会関東支部インターラボセミナー2016、2016年11月22日、自治医科大学(栃木県・下野市)
高橋 知里、増田 道明、大塚 裕一、病原性大腸菌O157株のトキシン - アンチトキシン系 z3289-sRNA1がPP01ファージの増殖に与える影響、ファージ・環境ウイルス合同シンポジウム、2016年10月21日、JAMSTEC 横浜本部(神奈川県・横須賀市)
大塚 裕一、細菌のトキシン - アンチトキシン系とファージ感染との関係、第89回細菌学会総会、2016年3月25日、大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)
大塚 裕一、米崎 哲朗、増田 道明、病原性大腸菌O157株が持つType トキシン - アンチトキシン系 z3289-sRNA1の毒性の分子機構、BMB2015、2015年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
多田 峻佑、高橋 知里、増田 道明、米崎 哲朗、大塚 裕一、病原性大腸菌O157株が持つType トキシン - アンチトキシン系 z3289-sRNA1の発現制御機構の解析、BMB2015、2015年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
大塚 裕一、多田 峻佑、増田 道明、米崎 哲朗、病原性大腸菌O157株が持つType トキシン - アンチトキシン系 z3289-sRNA1の発現制御機構の解析、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
多田 峻佑、米崎 哲朗、大塚 裕一、病原性大腸菌O157株が持つType トキシン - アンチトキシン系 z3289-sRNA1の発現制御機構の解析、第11回21世紀大腸菌研究会、2014年6月6日、湯守ホテル大観(岩手県・盛岡市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大塚 裕一 (OTSUKA, Yuichi)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号:10548861

(4)研究協力者

多田 峻佑 (TADA, Shunsuke)

高橋 知里 (TAKAHASHI, Chisato)