

トキシン-アンチトキシンタンパクの 機能解析とその利用法

SATテクノロジー・ショーケース2020

■ はじめに

多くの原核生物が保有する、トキシン-アンチトキシン (TA) システムは、様々な環境ストレスに適応し、生存するのに重要な役割を担っている。TAシステムはタイプI~VIまであり、各アンチトキシンの種類及び制御機構が異なる。MazE/MazFはタイプIIに分類されるTAタンパクである。通常的环境下で、アンチトキシン(MazE)はトキシン(MazF)と複合体を形成し、MazFの毒性(リボヌクレアーゼ活性)を中和する。一方、ストレス环境下でMazEは分解され、MazFが遊離する。遊離したMazFは、特定の配列を有するmRNAを認識し、切断する(図1)。ここで認識・切断する配列は、生物種によって異なることが既往研究から明らかとなっている。

当研究室においては、MazFの認識配列を決定するための手法が既に確立されている[1]が、従来法に改良を加え、スキームの簡便化にも取り組んでいる。現在、これらの方法を用いて、新規トキシンタンパクの機能解析を行なっている。本演題で、その最新の結果及び今後の展望について紹介したい。

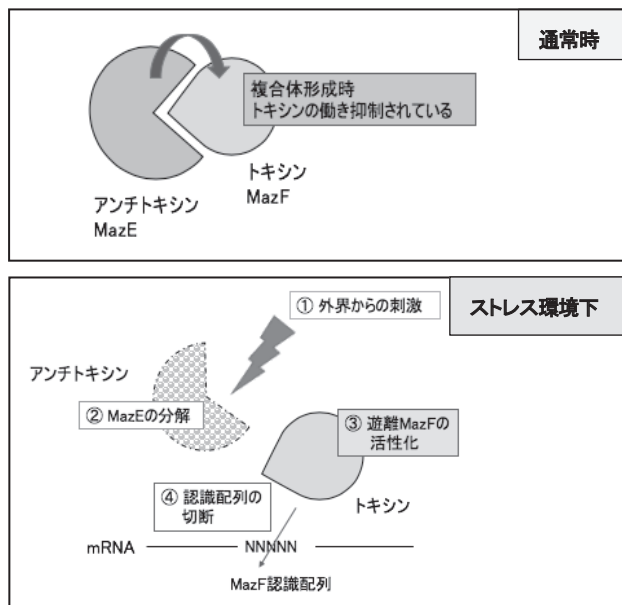


図1 タイプII TAシステム制御機構

■ 活動内容

1. 環境微生物由来MazFのタンパク発現・精製法の改良

代表発表者 石塚 寛子(いづか ひろこ)
所 属 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門
バイオナリティカルグループ
問合せ先 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第6
TEL:029-861-6489 FAX:029-861-6400
h-ishitsuka@aist.go.jp

トキシン-アンチトキシンデータベースを用い、環境微生物のトキシンタンパクの検索を実施し、ある新規トキシンMazF(MazF-X)を見出した。このMazF-Xと大腸菌MazFとのアミノ酸相同性解析の結果、両者の間に30%前後のホモロジーを有することが判明した。このMazF-Xを無細胞タンパク質合成システムを用いて、試験管内で合成し、His-tag簡易カラム精製で目的タンパクを取得した。このシステムを利用することで、従来の大腸菌を用いたタンパク合成系よりも、短時間で高純度なタンパクを精製することが可能となった。

2. 環境微生物由来MazFのリボヌクレアーゼ活性

無細胞タンパク合成システムで獲得した高純度MazF-Xと基質RNAを反応させ、酵素活性を測定すると、MazF-Xによる基質RNA切断活性が確認できた。このMazF-Xの切断活性は、アンチトキシンMazE-Xにより抑制された。次に、RNA切断部位の5'末端にバーコード配列となる短鎖RNAを付加し、次世代シーケンサーで切断配列を解析し、予測される認識配列を割り出した。その配列を含む蛍光消光RNAプローブで活性を検証し、認識配列を決定した。

3. MazFのタンパク機能重要部位及び酵素至適条件

様々な生物種MazFのアミノ酸配列間でマルチプルアライメントを実施し、保存性が高いアミノ酸に変異導入し、タンパク機能に重要な役割を担うアミノ酸の同定を試みている。また、このMazF-Xのリボヌクレアーゼ活性の至適条件について検討中である。

4. 今後の展望

当研究室では、すでに確立したMazFの認識配列解析技術の手法を利用し、新規MazFの認識配列の特定を複数行ってきた。また、最近の研究で、MazFのタンパク特性に関しても、詳細な検討を進め、様々なことが明らかとなってきた。今後は、これまでに蓄積されている知見を活かし、配列特異的なリボヌクレアーゼ活性に関して、医療や産業への幅広い応用方法を検討していく予定である。

■ 参考文献

[1]Tatsuki Miyamoto, Yuka Kato, Yuji Sekiguchi, Satoshi Tsuneda, Naohiro Noda. PLoS One. 2016 Feb17;11(2):e0149494

■ キーワード:

- (1) TA システム
- (2) 無細胞タンパク合成系
- (3) 配列特異的なリボヌクレアーゼ

■ 共同研究者:

野田 尚宏(産業技術総合研究所)
横田 亜紀子(産業技術総合研究所)