

大腸菌における DNA 結合タンパク質  
YjjJ を介した休眠誘導機構の解明

(Persister formation mechanism  
mediated with DNA binding protein,  
YjjJ, in *Escherichia coli*)

理学研究科  
生物地球系専攻

令和 2 年度  
前田 有紀  
(YUKI MAEDA)

## 目次

第 1 章 緒論	-1-
第 2 章 新規 YjjJ-HipB TA system の同定	-10-
第 1 節 序論	-10-
第 2 節 実験方法	-11-
2-2-1 本研究に用いた菌体、試薬、機器およびオリゴヌクレオチド	-11-
2-2-2 培地および培養方法	-11-
2-2-3 ケミカルコンピテントセル作製法	-16-
2-2-4 菌の形質転換法	-16-
2-2-5 遺伝子実験操作	-18-
2-2-5-1 ゲノム DNA (gDNA) の抽出	-18-
2-2-5-2 目的遺伝子を含む DNA の調製	-20-
2-2-5-3 プラスミド構築	-20-
2-2-5-4 Colony direct (CD)-PCR およびプラスミド抽出	-22-
2-2-5-5 シーケンス解析	-22-
2-2-6 生育曲線測定および生菌数測定	-24-
2-2-7 コロニーカウント法	-24-
2-2-8 HipA および YjjJ 誘導後の形態観察	-24-
2-2-9 HipA および YjjJ 誘導後の gDNA 染色	-25-

2-2-10 HipB による YjjJ の毒性中和	-25-
2-2-11 GltX の過剰発現による HipA および YjjJ の毒性中和	-26-
2-2-12 PrS-yjjJ の発現ベクター構築および YjjJ の精製	-26-
2-2-13 HipA の精製	-30-
2-2-14 YjjJ および HipB 複合体分析	-32-
2-2-14-1 ゲルろ過カラムクロマトグラフィー	-32-
2-2-14-2 動的光散乱法	-32-
2-2-15 電子顕微鏡 (TEM) による YjjJ-HipB 複合体観察	-34-
第 3 節 結果	-35-
2-3-1 YjjJ の同定	-35-
2-3-2 YjjJ の <i>E.coli</i> の生育に与える影響	-38-
2-3-3 YjjJ および HipA 誘導後の <i>E.coli</i> の形態変化	-38-
2-3-4 YjjJ および HipA 誘導後における gDNA の観察	-41-
2-3-5 HipB による HipA および YjjJ の毒性中和	-41-
2-3-6 GltX の過剰発現による HipA および YjjJ の毒性中和	-45-
2-3-7 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分子量解析	-45-
2-3-8 動的光散乱法を用いた分子量解析	-50-
2-3-9 電子顕微鏡 (TEM) を用いた YjjJ-HipB 複合体の観察	-50-
第 4 節 考察	-54-
第 3 章 YjjJ の自己リン酸化および DNA 結合能の解析	-56-

第 1 節 序論	-56-
第 2 節 実験方法	-57-
3-2-1 YjjJ 誘導後の DNA および RNA 合成量の解析	-57-
3-2-2 YjjJ 誘導後のタンパク質合成量の解析	-57-
3-2-3 YjjJ 変異体の作成	-58-
3-2-3-1 YjjJ S200A, S201A および D342N 変異体の作成	-58-
3-2-3-2 YjjJ S200D および S200E 変異体の作成	-60-
3-2-3-3 YjjJ N10 および N38 変異体の作成	-60-
3-2-4 YjjJ 変異体の <i>E. coli</i> の生育に与える影響	-62-
3-2-5 [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP を用いた HipA、YjjJ および YjjJ 変異体の自己リン酸化の検出	-62-
3-2-6 YjjJ の DNA 結合能解析	-62-
3-2-7 YjjJ の DNA 結合配列の解析	-64-
3-2-7-1 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 法	-64-
3-2-7-2 ゲルシフト法	-68-
3-2-8 オリゴヌクレオチドと PrS-YjjJ の解離定数の測定	-68-
第 3 節 結果	-69-
3-3-1 YjjJ の自己リン酸化	-69-
3-3-2 YjjJ の自己リン酸化に関与するアミノ酸残基の同定	-69-
3-3-3 YjjJ の自己リン酸化が <i>E. coli</i> の生育に与える影響	-72-

3-3-4 YjjJ 誘導後の DNA および RNA 合成量の測定	-76-
3-3-5 YjjJ 誘導後のタンパク質合成量の測定	-76-
3-3-6 YjjJ の DNA 結合能の解析	-79-
3-3-7 N 末端欠失 YjjJ 変異体の <i>E. coli</i> の生育への影響	-79-
3-3-8 YjjJ N10 変異体の DNA 結合能解析	-82-
3-3-9 YjjJ における DNA 結合配列の同定	-82-
3-3-10 同定された配列を含むヌクレオチドと YjjJ の結合	-84-
第 4 節 考察	-88-
第 4 章 YjjJ の生理機能の探索	-91-
第 1 節 序論	-91-
第 2 節 実験方法	-92-
4-2-1 <i>E. coli</i> BW25113 $\Delta yjjJ$ 、 $\Delta hipA$ および $\Delta hipBA$ 株の作製	-92-
4-2-2 P1 transduction による <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta hipA$ および $\Delta yjjJ$ の構築	-94-
4-2-2-1 P1 phage lysate の調製	-94-
4-2-2-2 <i>E. coli</i> MG1655 株の形質導入	-94-
4-2-2-3 遺伝子欠損用カセットの除去	-96-
4-2-3 Phenotype microarray による網羅的な生育の測定	-97-
4-2-4 各欠損株における休眠細胞数の解析	-97-

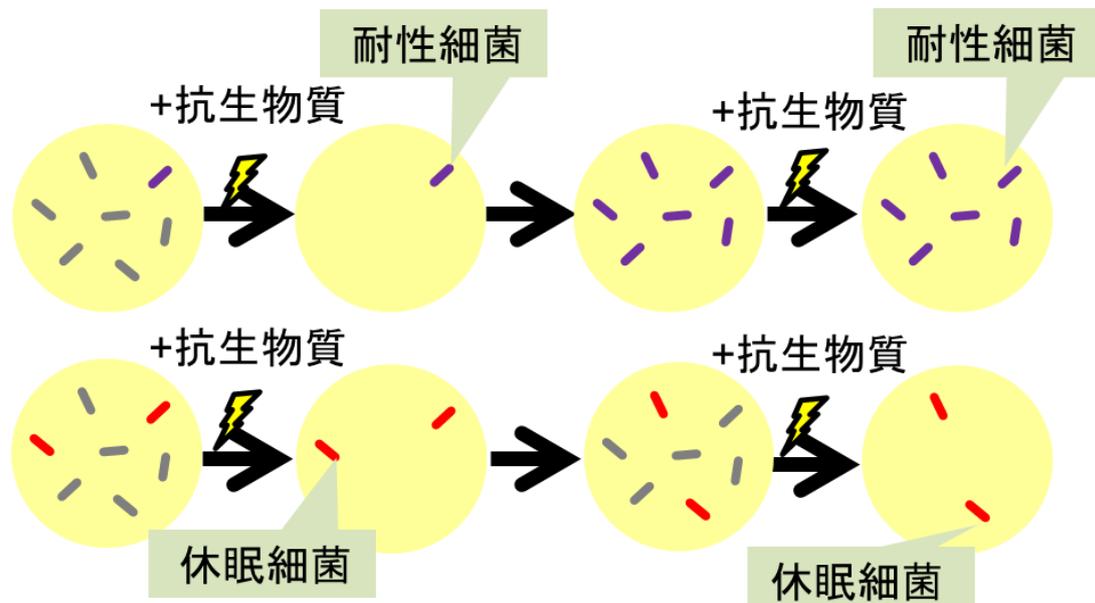
4-2-5 各欠損株におけるバイオフィルム形成量の測定	-97-
第 3 節 結果	-99-
4-3-1 Phenotype microarray を用いた各欠損株の網羅的な生育測定	-99-
4-3-2 各欠損株における休眠細胞数	-108-
4-3-3 各欠損株におけるバイオフィルム形成量	-110-
第 4 節 考察	-112-
第 5 章 総合論議	-115-
参考文献	-125-
謝辞	-132-

## **Abstract**

Bacterial populations contain a small fraction of cells capable of surviving antibiotic exposure and persisting through mechanisms that may include a reduced growth rate or entering a state of dormancy. These persisters represent a clinically important subpopulation involved in multidrug tolerance, but the molecular switches that produce the persister phenotype are poorly understood. The function of *Escherichia coli* HipA, the toxin component of the HipBA TA system, has been directly linked to persistence based on the ability of a *hipA* mutant to enhance persister formation. Here, I report functional characterization of a hitherto uncharacterized *Escherichia coli* assumed TA toxin, YjjJ, HipA homologs. I showed that not only *hipA* but also *yjjJ* are crucial genes for persister formation in *E. coli*. I also showed that YjjJ formed a complex with HipB and HipAB complex, respectively. YjjJ exhibits several uncommon properties: (1) unlike the genes encoding most type II TA system toxins, the gene encoding YjjJ is present as a single gene and not in an operon, (2) despite being a homolog of the well-characterized toxin HipA, YjjJ seems to have different cellular target(s), (3) HipB, the cognate antitoxin of HipA, also acts as an antitoxin for YjjJ, (4) YjjJ has autophosphorylation activity, (5) the activity has no effect on the growth inhibition, (6) DNA binding activity through the N-terminal domain of YjjJ is crucial for toxicity, and (7) YjjJ is able to bind preferentially to specific double-stranded DNA containing CCCTATAGTGAGTCGTATTA or CGCTGAGCAATAACTAGAC sequences. The present results suggest that YjjJ and HipA toxins regulated with HipB antitoxin enhance persister formation in a different way

## 第 1 章 緒論

細菌は自然界で多様なストレスに晒されており、様々な生存戦略を進化させている。その一つが増殖を停止した休眠状態によるストレス耐性機構である (Roszak and Colwell, 1987; Wakamoto et al., 2013)。1994 年に Bigger らは、ペニシリン処理後も生き残るが、再び増殖した後もペニシリンに対して感受性を示す細菌の亜集団を発見し、それらを休眠細胞 (休眠状態の細菌) と定義した。その後の研究によって、この休眠細胞は代謝活性が低く、増殖スピードも遅いため、抗生物質の作用に対して非感受的であることが示された (Gefen and Balaban, 2009)。この休眠状態の細菌は、増殖期の細菌集団と遺伝的な差はなく、おおよそ  $10^{-3}$ ~ $10^{-5}$  程度存在する (Lewis, 2010; Shah et al., 2006)。この休眠状態の細菌は抗生物質などのストレス条件下でも生存し、ストレスが除去されると分裂を開始する。再増殖した菌を同じストレスに晒すと、再び一部の菌のみが生き残る。これは、遺伝的な変化を伴って耐性を獲得する耐性菌の場合に再増殖した菌集団全体がストレスに対して非感受的であることと大きく異なる (Fig. 1-1)。ほとんどの抗生物質は細菌が増殖するために必要な機構に作用するため、休眠状態の細菌には効果がなく、休眠細菌に起因する再感染症や抗生物質耐性菌の出現は大きな問題となっている (Schumacher et al., 2015)。しかし、休眠細胞形成に根底にある分子メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。しかし、近年の研究により、休眠細胞は確率的な遺伝子の発現によって自発的に発生すると考えられており (Gefen and Balaban, 2009; Jayaraman, 2008)、toxin-antitoxin (TA) system、SOS 応答、膜ストレス応答、バイオフィーム形成および緊縮応答などのいくつかの休眠誘導メカニズムが知られている。その中でも最も研究されているのが TA system である。



**Fig. 1-1. 細菌の耐性および休眠**

上側は耐性菌、下側は休眠細菌の性質を示す。感受性菌は灰色、耐性を獲得した細菌は紫および休眠細胞は赤色で表される。

TA system は細菌において 自身の生育、さらには細胞死を誘導する機構であり、真核生物における発生、分化および免疫応答などに重要な役割を担っているプログラム細胞死のような system である (Hale et al., 1996; Orrenius, 2006; Yamaguchi et al., 2011)。TA system は toxin 遺伝子と対となる antitoxin 遺伝子から構成され、ほぼすべての原核生物に存在する。一般的に toxin および antitoxin 遺伝子はそれぞれ約 100 アミノ酸残基の小さなタンパク質をコードし、オペロンを形成している。Toxin は DNA 複製、mRNA の安定性、タンパク質合成、細胞壁合成あるいは ATP 合成を含む細胞の生育に必須なプロセスを標的とすることで細菌自身の生育を阻害する。TA system は生存に必須ではないが、様々なストレス条件下での生存に重要であることが示唆されており、*Escherichia coli* (*E. coli*) には 36 もの TA system が存在する (Yamaguchi and Inouye, 2011)。よって、細菌は進化適応の過程で TA system を積極的に獲得してきたと考えられる (Engelberg-Kulka et al., 2006; Gerdes et al., 2005; Hayes, 2003)。

TA system は antitoxin の性質および構造から Type I~V に分類される (Fig. 1-2)。ほとんどの TA system は、toxin の活性が antitoxin タンパク質の結合によって中和される Type II である (Schuster and Bertram, 2013)。通常、生体内において Type II TA system の toxin および antitoxin は安定な複合体を形成しており、toxin の生育阻害は抑制されている。しかし、ストレスに晒されると ATP 依存性プロテアーゼが誘導され、不安定な antitoxin は分解される。その結果、toxin が遊離し、生育停止さらには細胞死が引き起こされる (Yamaguchi and Inouye, 2011)。また、一部の antitoxin および TA 複合体は自身の 5'-末端の非翻訳領域に存在する回文配列に結合し、自身の発現を抑制する

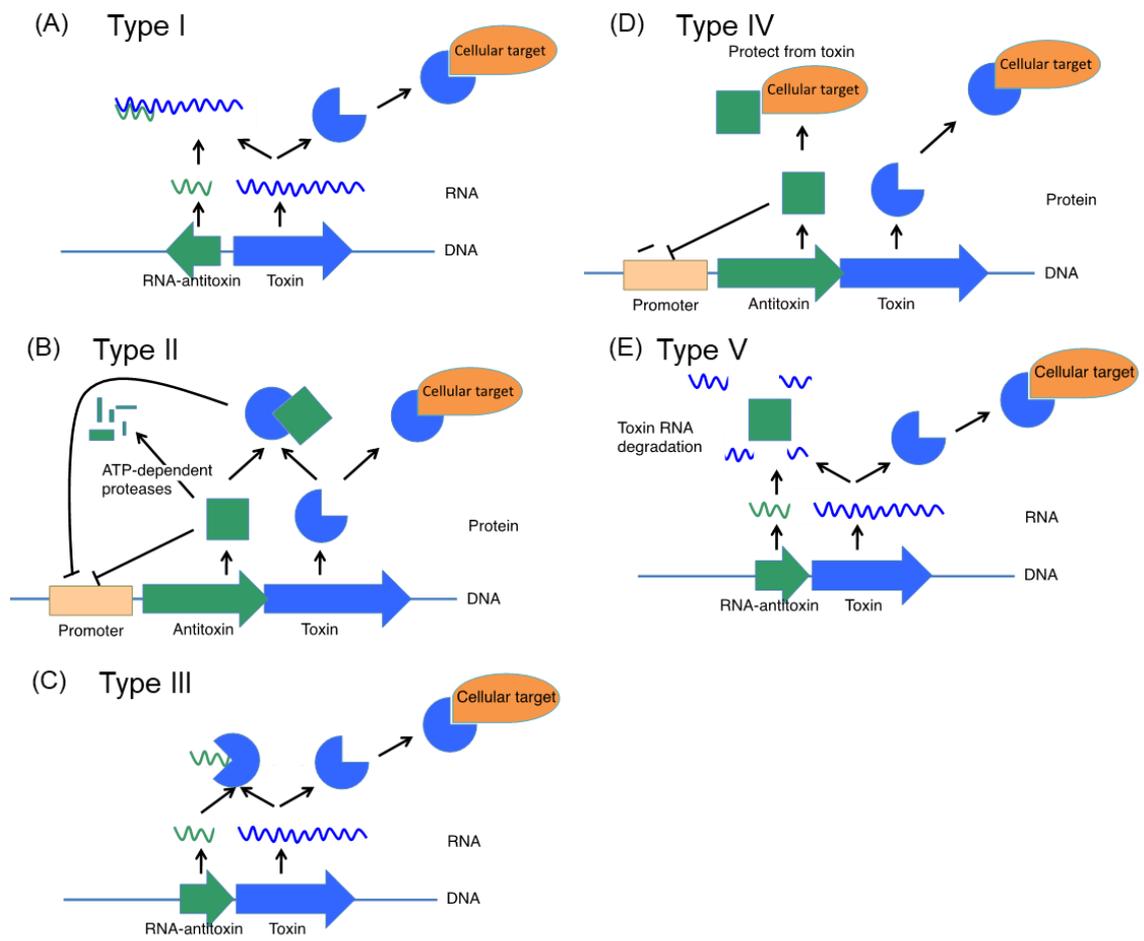
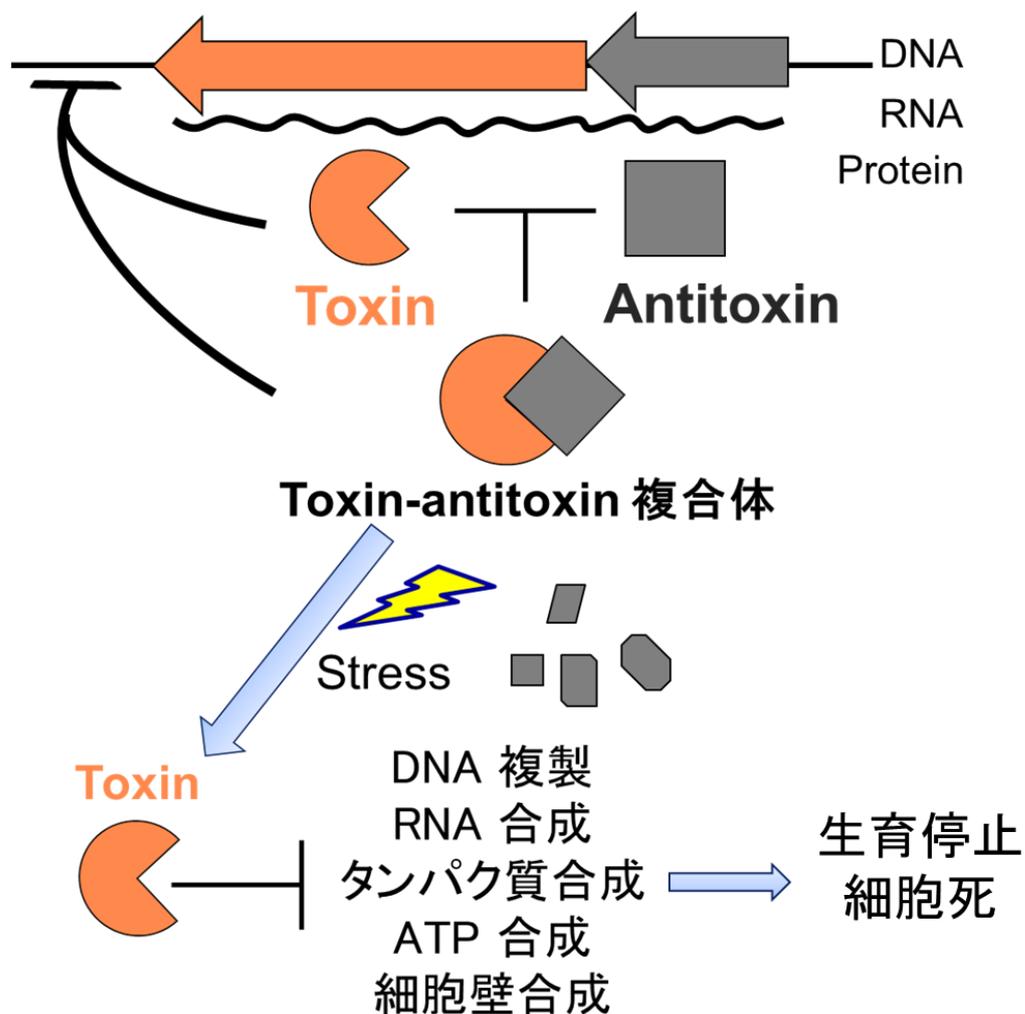


Fig. 1-2. 現在報告されている TA system のモデル図

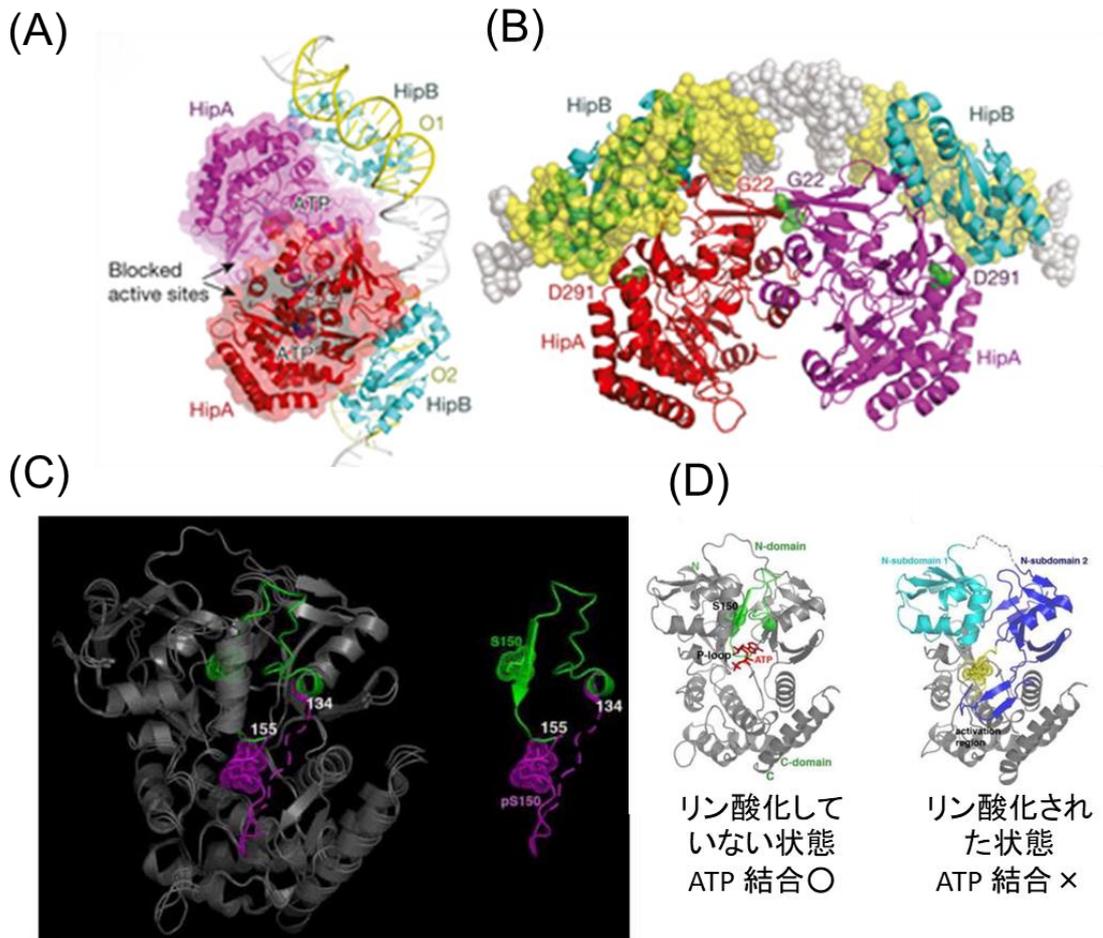
(Fig. 1-3) (Engelberg-Kulka et al., 2006; Gerdes et al., 2005; Hayes, 2003; Yamaguchi et al., 2011)。

*E. coli* では、休眠誘導に関与する Type II TA system として HipB-HipA TA system が知られている (Moyed and Bertrand, 1983)。HipA (**H**igh **p**ersisten**A**) は休眠細胞数が増加する変異株 (HipA7) の研究において同定された (Korch et al., 2003; Moyed and Bertrand, 1983)。HipA は 440 アミノ酸残基からなる toxin であり、HipB antitoxin によって二量体化し、自身の active site をブロックすることで毒性が抑制される (Fig. 1-4A および 1-5)。HipB-HipA 複合体および HipB は自身のプロモーター領域および 5'-末端の非翻訳領域に 4 箇所存在する回文配列 (TATCCN<sub>8</sub>GGATA) を認識し、自身の発現を抑制する (Black et al., 1994)。HipA は大きく分けると N 末端側の Couple\_hipA ドメインおよび C 末端側の HipA family ドメイン(いずれも Pfam databaseでの名称)の 2 つから成る。N 末端側のドメインは機能未知であるが、いくつかの細菌においてオペロン内の別の遺伝子 (*E. coli* CFT073 の c5296、*Psychroflexus torquis* の P700755\_01462 および *Haemophilus influenzae* Rd KW20 の HI0666 など) として保存されていることから、重要な役割を担っていると考えられている。C 末端側のドメインは HipA の活性中心を含むドメインであり、キナーゼ活性を示すことが知られている (Correia et al., 2006)。HipA はグルタミン酸 tRNA リガーゼ (GltX) をリン酸化してその活性を阻害し (Germain et al., 2013)、その結果リボソームによるタンパク質合成が阻害されて生育停止を引き起こす。このタンパク質合成停止によって、緊縮応答と同様にグアノシン 3',5'-ビスピロリン酸 (ppGpp) 合成酵素 RelA および ppGpp 合成・分解酵素 SpoT が活性化され、ppGpp が菌体内に蓄積する。ppGpp は RNA polymerase



**Fig. 1-3. Type II TA system**

Toxin と antitoxin はオペロンを形成している。Toxin は antitoxin と複合体を形成しており、通常生育に影響はない。しかし、ストレス条件下で antitoxin が分解されると toxin が遊離し生育停止さらには細胞死を引き起こす。

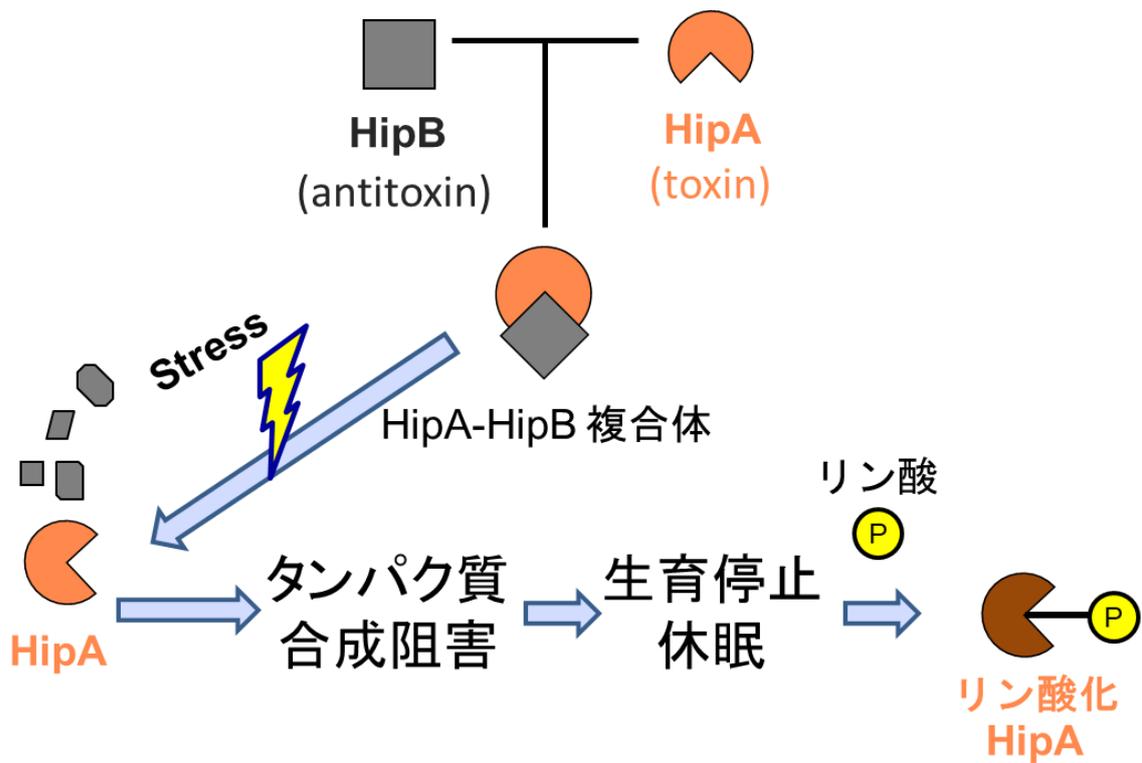


**Fig. 1-4. HipA-HipB 複合体の構造**

- (A) HipB 後の HipA の構造 (Schumacher et al., 2015)
- (B) HipA-HipB 複合体および休眠に重要な HipA のアミノ酸残基 (Schumacher et al., 2015)
- (C) HipA の自己リン酸化によって構造変化するキナーゼ活性中心 (Schumacher et al., 2012)
- (D) P ループの構造変化と ATP 結合部位の位置関係 (Schumacher et al., 2009)

に結合し、転写阻害やストレス応答タンパク質の産生を介して、代謝活性を著しく低下させ、生育を停止することで休眠状態を誘導することが示唆されている (Kramer and Ames, 1988)。また、HipA は自己リン酸化タンパク質であり、150 番目の Ser がトランスに自己リン酸化することが知られている (Correia et al., 2006)。また、自己リン酸化すると自身の活性は不活性化される (Fig. 1-5)。興味深いことに、Ser150 は一般的な自己リン酸化するキナーゼのように活性化ループ上にあるのではなく、ATP結合に重要な phosphate-binding loop (P ループ) モチーフの一部を形成するコア部分に存在する。自己リン酸化されるとリン酸化に重要な P ループの構造が変化し、Ser 150 が Asp 309 と直接相互作用することによって、自己阻害を可能にする (Fig. 1-4C および D) (Schumacher et al., 2012)。このように、HipA は増殖状態と休眠状態を切り換える調節因子として機能すると考えられる。しかし、*hipA* 欠損株でも依然として休眠が誘導されることから (Liu et al., 2017; Wu et al., 2015)、HipA 以外の休眠誘導因子の存在が示唆されている。

本博士論文において私は、*E. coli* で休眠誘導に関与するタンパク質を探索し、HipA の C 末端側に存在する HipA family 様のドメインを有し、HipA と 29.5% の相同性を有する YjjJ を同定した。また、YjjJ が HipB antitoxin と Type II TA system を構成することを明らかにした。YjjJ の諸性質を解析した結果、YjjJ が配列特異的 DNA 結合タンパク質であり、結合配列は少なくとも 2 種類あることを明らかにした。さらに、*yjjJ* および *hipA* の両遺伝子の欠損は休眠細胞数を減少させたことから、*hipA* および *yjjJ* の両遺伝子の存在が休眠に重要であることが判明した。以上の結果から、HipB antitoxin による HipA toxin および YjjJ toxin の活性制御を介した休眠制御機構の存在が示された。



**Fig. 1-5. HipA-HipB TA system**

HipA toxin は HipB antitoxin と複合体を形成しており、通常生育に影響はない。しかし、ストレス条件下で HipB が分解されると、HipA が遊離される。HipA は、タンパク質合成を阻害し、生育停止および休眠を引き起こす。HipA の生育阻害活性は自身のリン酸化により不活性化される。

## 第 2 章 新規 YjjJ-HipB TA system の同定

### 第 1 節 序論

*E. coli* では、休眠状態に関与する遺伝子として *hipA* が知られている (Moyed and Bertrand, 1983)。*hipA* は *hipB* と TA system を構成しており、HipA が toxin、HipB が antitoxin として機能する (Black et al., 1991)。HipA の過剰発現は細胞の生育を阻害し、休眠細胞を約 100 倍誘導する (Correia et al., 2006)。しかし、*hipA* 欠損株では野生株と比較して休眠細胞数に差がない (Liu et al., 2017; Wu et al., 2015)。このことから、HipB-HipA TA system 以外の toxin も休眠誘導に関与している可能性を考えた。

本章では、休眠に関与するタンパク質として、HipA の C 末端側に存在する HipA family 様のドメインを有する YjjJ を同定し、さらに YjjJ が HipB と Type II TA system を構成することを見出したので、これについて述べる。

## 第 2 節 実験方法

### 2-2-1 本研究に用いた菌体、試薬、機器およびオリゴヌクレオチド

本実験で使用した菌株およびプラスミドをそれぞれ Table 2-1 および Table 2-2 に示した。オリゴ DNA 合成は Integrated DNA Technologies に依頼した。使用したオリゴヌクレオチドの配列は Table 2-3 に示した。制限酵素は特に記載がない限り New England Biolabs (NEB) の製品を用いた。DNA 濃度および濁度の測定は BioPhotometer® D30 (Eppendorf) を使用した。DNA 解析用アガロースゲル電気泳動には agarose S (Nippon Gene) を使用し、Mupid-2Plus (Advance) または電源装置として Electrophoresis Power Supply EPS 301 (GE Healthcare) を用いて行った。DNA 染色は GelRed (Biotium) を使用した。プラスミド DNA の抽出は Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を使用して行った。シーケンス解析は、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) で行った。タンパク質精製には Ni-NTA agarose (Qiagen) を使用した。ゲルろ過クロマトグラフィーには AKTA purifier (Cytiva) または AKTA pure (Cytiva) を用いた。電子顕微鏡は JEM-1010 (JEOL) を、動的光散乱式粒子径分布測定装置は DynaPro-99-E-50 (Artisan) を使用した。Phenotype microarray は BIOLOG 社に依頼した。

### 2-2-2 培地および培養方法

使用した培地の組成を Table 2-4 および Table 2-5 に示した。M9 培地の炭素源は特に示さない限りグルコースとし、グリセロールを炭素源に使用した培

Table 2-1. 本研究で用いた菌株

<i>E. coli</i> strain	Relevant genotype or characteristics	
DH5 $\alpha$	<i>F</i> , $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) <i>U169</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rK</i> <sup>-</sup> , <i>mK</i> <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Invitrogen
BL21(DE3)	<i>F</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> ( <i>rB</i> <sup>-</sup> <i>mB</i> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> ( $\lambda$ <i>cl</i> 857, <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7gene1</i> ), <i>dcm</i> (DE3)	(Studier and Moffatt, 1986)
BW25113	<i>rrnB3</i> $\Delta$ <i>lacZ4787</i> <i>hsdR514</i> $\Delta$ ( <i>araBAD</i> ) <i>567</i> $\Delta$ ( <i>rhaBAD</i> ) <i>568</i> <i>rph-1</i>	(Datsenko and Wanner, 2000)
MG1655	<i>F</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	(Blattner et al., 1997)
MG1655 $\Delta$ <i>hipA</i>	<i>F</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i> $\Delta$ <i>hipA</i>	This study
MG1655 $\Delta$ <i>yjjJ</i>	<i>F</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i> $\Delta$ <i>yjjJ</i>	This study
MG1655 $\Delta$ <i>hipAyjjJ</i>	<i>F</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i> $\Delta$ <i>hipAyjjJ</i>	This study
MG1655 $\Delta$ <i>hipBA</i>	<i>F</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i> $\Delta$ <i>hipBA</i>	This study
MG1655 $\Delta$ <i>hipBAyjjJ</i>	<i>F</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i> $\Delta$ <i>hipBAyjjJ</i>	This study

Table 2-2. 本研究で用いたプラスミド

Plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
pET-28a	<i>E. coli</i> expression vector, <i>ori</i> from f1, pET-promoter, <i>Kam<sup>r</sup></i>	Millipore
pBAD24	<i>E. coli</i> expression vector, <i>ori</i> from pBR322, pBAD promoter, <i>Amp<sup>r</sup></i>	(Guzman et al., 1995)
PrS	<i>E. coli</i> expression vector, <i>ori</i> from ColE1, <i>cspA</i> promoter, <i>Amp<sup>r</sup></i>	(Kobayashi et al., 2009)
pKD46	Red recombinase expression plasmids, <i>araC</i> , <i>bla</i> , RepA101 <sup>ts</sup> , <i>ara</i> BAD promoter, <i>Amp<sup>r</sup></i>	(Datsenko and Wanner, 2000)
pCP20	Thermal inducible FRT recombinase <i>bla</i> and <i>cat</i> , <i>ori(Ts)</i>	(Cherepanov and Wackernagel, 1995)
pKD4	<i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>Km<sup>r</sup></i>	(Datsenko and Wanner, 2000)
pET-28a- <i>hipA</i>	pET-28a carrying <i>hipA</i>	This study
pET-28a- <i>yjjJ</i>	pET-28a carrying <i>yjjJ</i>	This study
pET-28a- <i>gltX</i>	pET-28a carrying <i>gltX</i>	This study
pBAD24- <i>hipA</i>	pBAD24 carrying <i>hipA</i>	This study
pBAD24- <i>yjjJ</i>	pBAD24 carrying <i>yjjJ</i>	This study
pBAD24- <i>hipB</i>	pBAD24 carrying <i>yjjJ</i>	This study
pCold-PrS <sub>2</sub> - <i>yjjJ</i>	pCold carrying proteinS- <i>yjjJ</i>	This study
pCold- <i>hipBA</i>	pCold carrying <i>hipBA</i> operon	This study

Table 2-3. 本研究で用いたプライマーおよびオリゴヌクレオチド

Primer name	Primer sequence (5'→3')
<i>hipA</i> -Fw ( <i>Nde</i> I)	TTTTTCATATGCCTAAACTTGTCACCTGGAT
<i>hipA</i> -Rv ( <i>Eco</i> RI)	TTTGAATTCTCACTTACTACCGTATTCTCGGCT
<i>yjjJ</i> -Fw ( <i>Nde</i> I)	TTTTTCATATGAGCGAGCTGACTGATCTTTT
<i>yjjJ</i> -Rv ( <i>Eco</i> RI)	TTTGAATTCTTACCCGCCCATGCGGGCAACTTT
<i>hipBA</i> -Fw ( <i>Nde</i> I)	TTTCATATGATGAGCTTTCAGAAGATCTATA
<i>hipBA</i> -Rv ( <i>Eco</i> RI)	TTTGAATTCTCACTTACTACCGTATTCTCGG
<i>glxX</i> -Fw ( <i>Nde</i> I)	TTTTTCATATGAAAATCAAACCTCGCTTCGC
<i>glxX</i> -Rv ( <i>Eco</i> RI)	TTTGAATTCTTACTGCTGATTTTCGCGTTCAGC
T7-Fw	TAATACGACTCACTATAGGG
T7-Rv	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
pBAD-Fw	CTGTTCTCCATAACCCGTT
pBAD-Rv	CTCATCCGCCAAAACAG
S200A-Fw	GTGGGTGCGTCTGCGGGCGGCGAGCAG
S200A-Rv	CGCAGACGCACCCACAATTTCTCCTGC
S201A-Fw	GGTCTGCGGGCGGCGGAGCAGCCA
S201A-Rv	GCCCGCGCAGAACCACAATTTCTCC
D342N-Fw	AACAGCAACATGCACGCAGGTAATTTA
D342N-Rv	GTGCATGTTGCTGTTGGCGATAAGTCG
S200D-Fw	GTGGGTGACTCTGCGGGCGGCGAGCAG
S200D-Rv	CCGCAGAGTCACCCACAATTTCTCCTGC
S200E-Fw	GTGGGTGAATCTGCGGGCGGCGAGCAG
S200E-Rv	CCGCAGATTACCCACAATTTCTCCTGC
N10-Fw	TTTTTCATATGGGGCCGCTTCTGCC
N38-Fw	TTTTTCATATGGTGATTCGCTTTGGTA
Selex oligo	TAATACGACTCACTATAGGGGGATCC-N20-GGATCCCCGCTGAGCAATAACTAGC
<i>hipA</i> deletion-Fw	AAAAATGCCTCGCCAGAATCAACAGAACAGCAAAATCTGGAGTGGTAATG
<i>hipA</i> deletion-Rv	GCTCATTAACAATGACCAAACCCCATATCTCACTTACTACCGTATTCTCG
<i>yjjJ</i> deletion-Fw	TGTGTTAATAAATCTATTCAAGTATCTATTACGAATCTATTCAATTAATG
<i>yjjJ</i> deletion-Rv	CGGCATGGATGGCGGGGCTGTAAGGTAGTTACCCGCCCATGCGGGCAAC
<i>hipBA</i> deletion-Fw	ACTTATAATATCCCTTAAGCGGATAAACTTGCTGTGGACGTATGACATG
Check <i>hipA</i> -Rv	TGCGCACCAATATAAACCAA
Check <i>yjjJ</i> -Rv	GCAGATATGCTGCAACAGGA
P1-Rv	ATTCCGGGGATCCGTCGACC

※下線部はカッコ内で示した制限酵素切断部位

Table 2-4. LB 培地

0.5%	Yeast extract (Difco)
1%	Bacto trypton (Difco)
0.5%	NaCl

Table 2-5. M9 (最少) 培地

10 x M9	10 ml
0.1 M MgSO <sub>4</sub>	100 µl
40% Glucose or 50% Glycerol	1 ml
0.5 mg/ml Vitamin B1	400 µl
20% Casamino acids	1 ml
Filled up with H <sub>2</sub> O	
Total volume	100 ml

10 x M9

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	171 g / l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g / l
NaCl	5 g / l
NH <sub>4</sub> Cl	10 g / l

地を M9-Gly 培地と表記した。特に示さない限り培地は液体培地とし、寒天培地の寒天濃度は 1.2% とした。また、必要に応じて抗生物質として kanamycin (Km) および ampicillin (Amp) を含む培地を使用し、それぞれ LB-Km (LK)、LB-Amp (LA)、M9-Km (MK)、M9-Amp (MA) および M9-Km-Amp (MKA) と表記した。菌体の培養は Multi Shaker MMS (EYELA) を使用し、特に示さない限り 37°C、140 r.p.m. で行った。集菌等の遠心分離は特に示さない限り室温で行った。

### 2-2-3 ケミカルコンピテントセル作製法

井上法を用いてケミカルコンピテントセルを調製した (Inoue et al., 1990)。E. coli を 5 ml の LB 培地に植菌し、16°C で O.D.<sub>600</sub>=0.6~0.8 まで振盪培養を行った。培養液を氷上で急冷後、4°C、4,000 r.p.m. で 10 分間の遠心分離を行い、上清を取り除いた。菌体を 1.6 ml の氷冷 TB 溶液 (Table 2-6) に再懸濁し、氷上で 10 分間静置した。その後、再び 4°C、4,000 r.p.m. で 10 分間の遠心分離を行い、菌体を 400 µl の TB 溶液に再懸濁し、30 µl のジメチルスルホキシドを加え、穏やかに混合した。氷上で 10 分間静置後、1.5 ml のマイクロチューブに 100 µl ずつ分注し、-80°C で保存した。

### 2-2-4 菌の形質転換法

2-2-3 に示した方法で作製したケミカルコンピテントセルを氷上で 5 分間静置後、プラスミドを 1 ng 添加し、氷上で 30 分間静置した。その後、44°C、1 分間処理し、氷上で 5 分間静置した。6,000 r.p.m.、5 分間の遠心分離後、上清を取り除き、MK 寒天培地に塗布する場合には、LB および M9 培地を 1 ml 添

Table 2-6. TB buffer

10 mM	PIPES
250 mM	KCl
15 mM	CaCl <sub>2</sub>

pH 6.7 に KOH 調整後 55 mM MnCl<sub>2</sub> を添加

加し 37°C で 1 時間静置した。その後、適切な抗生物質を含む M9 寒天培地に塗布して 37°C で 18 時間培養した。

## 2-2-5 遺伝子実験操作

### 2-2-5-1 ゲノム DNA (gDNA) の抽出

*E. coli* MG1655 株を LB 培地 1.5 ml に植菌し、37°C で 16 時間振盪培養した。培養液を室温にて 6,000 r.p.m. で 2 分間遠心分離し、得られた菌体を 530 µl の TE buffer (Table 2-7) に再懸濁した。その後、60 µl の 5% SDS および 10 µl の proteinase K (Wako) (6 mg/ml) を加え、10 分おきにおだやかに上下攪拌しながら 37°C で 1 時間静置した。300 µl の TE で飽和したフェノールおよびクロロホルムをそれぞれ添加し、10 分間おだやかに上下攪拌を行った。14,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離を行い、上層の水層を 1.5 ml マイクロチューブに移した後、得られた水層の 2.5 倍量の 100% エタノールを加え穏やかに上下攪拌した。凝集した DNA を 70% エタノールで 2 回洗浄し、50 µl の TE buffer に懸濁した。凝集した DNA が完全に溶解した後に RNase A (Nippon gene) (100 mg/ml) を 1 µl 添加し、37°C で 1 時間静置した。TE buffer を加えて全量を 300 µl に調製した後、150 µl のフェノールおよびクロロホルムを加えて 10 分間おだやかに上下攪拌し、14,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離を行った。上層 (水層) を 1.5 ml マイクロチューブに移し、等量のクロロホルムを加え 10 分間おだやかに上下攪拌した後、14,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離を行い、上層 (水層) を 1.5 ml マイクロチューブに移した。水層の 2.5 倍量の 100% エタノールを加えおだやかに上下攪拌し、凝集した DNA を 70% エタ

Table 2-7. TE buffer

10 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM	EDTA

ノールで 2 回洗浄後、50  $\mu$ l の TE buffer に溶解させたものを gDNA 溶液とした。

#### 2-2-5-2 目的遺伝子を含む DNA の調製

*E. coli* MG1655 株の gDNA、Table 2-3 に示したプライマーおよび Ex Taq DNA polymerase (Takara Bio) を用いて PCR を行い、目的遺伝子を含む DNA 断片を増幅した (Table 2-8)。サイクル条件は、プレラン (94°C、3 分間) を行った後、DNA 変性 (94°C、30 秒間)、アニーリング (50°C、30 秒間)、DNA 伸長 (72°C、1 kb/min) を 25 サイクル行った。増幅した DNA をアガロース電気泳動で確認した後、Wizard SV ミニカラム (Promega) を用いた遠心法で精製した。

#### 2-2-5-3 プラスミド構築

目的遺伝子を含む DNA を *Nde*I および *Eco*RI を用いて切断した (Table 2-9)。反応液から切断した DNA を Wizard SV ミニカラムを用いて遠心法にて精製した。pET-28a および pBAD24 プラスミドも同様に制限酵素で処理し (Table 2-10)、alkaline phosphatase, Calf Intestinal (NEB) を 1  $\mu$ l 添加して、37°C で 1 時間反応させ、全量をアガロースゲル電気泳動に供した。GelRed 溶液で染色したゲルから目的の DNA を切り出し、1.5 ml マイクロチューブに入れゲルの重量を測定した。ゲル重量の 3 倍量の QG buffer (Table 2-11) を加え、42°C でアガロースを溶解させた後、ゲルと等倍量のイソプロパノールを加え、Wizard SV ミニカラムを用いて DNA を抽出した。得られた DNA の濃度を測

Table 2-8. インサート DNA のための PCR 反応液

10 × Ex Taq buffer	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTP Mixture	4 $\mu$ l
gDNA	50 ng
100 pmol/ $\mu$ l Forward-primer	1 $\mu$ l
100 pmol/ $\mu$ l Reverse-primer	1 $\mu$ l
TaKaRa Ex Taq (5 units/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	Total volume 50 $\mu$ l

Table 2-9. インサート DNA の制限酵素処理反応液

10xCut Smart Buffer	10 $\mu$ l
<i>Nde</i> I (20 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<i>Eco</i> RI (20 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
精製した PCR 産物	45 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	Total volume 100 $\mu$ l

Table 2-10. ベクターの制限酵素処理反応液

10xCutSmart Buffer	5 $\mu$ l
<i>Nde</i> I (20 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<i>Eco</i> RI (20 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
pET-28a plasmid DNA または pBAD24 plasmid DNA	3 $\mu$ g
dH <sub>2</sub> O	Total volume 50 $\mu$ l

Table 2-11. QG buffer

5.5 M	Guanidine thiocyanate
20 mM	Tris-HCl (pH 6.6)

定した後、1.5 ml のマイクロチューブにプラスミド DNA (50 ng) と目的遺伝子を含む DNA を等モル比になるよう混合し、T4 DNA ligase (NEB) を用いて、16°C で 16 時間ライゲーション反応を行った (Table 2-12)。その後、10 µl の反応液を用いて 2-2-4 に示した方法で形質転換を行った。

#### 2-2-5-4 Colony direct (CD)-PCR およびプラスミド抽出

形質転換後に得られたコロニーの一部を鋳型として CD-PCR を行った (Table 2-13)。プライマーは pET-28a へのクローニングでは T7-Fw および T7-Rv を、pBAD24 へのクローニングでは pBAD-Fw および pBAD-Rv をそれぞれ用いた。サイクル条件は、プレラン (94°C、5 分間) を行った後、DNA 変性 (94°C、30 秒間)、アニーリング (50°C、30 秒間)、DNA 伸長 (72°C、1 kb/min) を 30 サイクル行った。その後アガロースゲル電気泳動で 目的遺伝子を含む DNA 断片の増幅が確認できたものを 3 ml の M9 培地に植菌し、37°C で 16 時間振盪培養を行った。その後、プラスミド抽出を行った。

#### 2-2-5-5 シークエンス解析

シーケンス反応を行い、塩基配列を確認した (Table 2-14)。サイクル条件はプレラン (96°C、3 分間) を行った後、DNA 変性 (96°C、30 秒間)、アニーリング (50°C、15 秒間)、DNA 伸長 (60°C、4 分間) を 25 サイクル行った。その後、10 µl の反応液に 30 µl の dH<sub>2</sub>O を加え、マイクロチューブに全量を移した。4 µl の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.3) および 100 µl の 100% エタノールを加えて激しく攪拌した後、冷蔵庫で 1 時間静置した。14,000 r.p.m.、4°C

Table 2-12. Ligation 反応液

10xligation buffer	5 $\mu$ l
ベクター-DNA	50 ng
インサート DNA	ベクター-DNA と mol 比 1 : 1
T4 DNA ligase	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	Total volume 10 $\mu$ l

Table 2-13. CD-PCR 反応溶液

10xBuffer	1 $\mu$ l
2 mM dNTPs	1 $\mu$ l
CD-PCR-Forward-primer	10 pmol
CD-PCR-Reverse-primer	10 pmol
Taq DNA Polymerase	0.01 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	Total volume 10 $\mu$ l

Table 2-14. シークエンス用反応液

プラスミド DNA	100 ng~150 ng
5xsequencing buffer	2 $\mu$ l
BigDye™ Terminator v1.1	0.5 $\mu$ l
Primer	1.6 pmol
dH <sub>2</sub> O	Total volume 10 $\mu$ l

で 15 分間の遠心分離後、上清を取り除き、70% エタノールを 120  $\mu$ l 添加した。14,000 r.p.m.、4°C で 10 分間遠心分離をした後に、上清を取り除き、風乾した。20  $\mu$ l の Hi-Di formamide (Thermo Fisher) を加え、シーケンス用 96-well plate に移し替えた後、シーケンス解析を行い、配列を確認した。

#### 2-2-6 生育曲線測定および生菌数測定

pET-28a、pET-28a-*hipA* または pET-28a-*yjjJ* を有する *E. coli* BL21(DE3) を 600  $\mu$ l の MK 培地に植菌し、16 時間振盪培養して前培養液とした。その後、10 ml の MK 培地に前培養液 100  $\mu$ l を加え、O.D.<sub>600</sub> = 0.4~0.5 まで培養し、終濃度 0.1 mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加した。生育は IPTG 添加後の培養液の吸光度を測定し、生菌数は以下に示すコロニーカウント法を用いてそれぞれ測定した。

#### 2-2-7 コロニーカウント法

検体を LB または M9 培地で適宜希釈した希釈液 0.1 ml を適切な抗生物質を含む M9 寒天培地に塗布し、37°C で 16 時間培養した。出現したコロニーの数を測定し、元の検体 1 ml 中の生菌数を算出した。

#### 2-2-8 HipA および YjjJ 誘導後の形態観察

2-2-6 と同様に前培養を行い、10 ml の MK 培地に前培養液 100  $\mu$ l を加え、O.D.<sub>600</sub> = 0.4~0.5 まで培養した。終濃度 0.1 mM となるように IPTG を添加し、

HipA および YjjJ を誘導した。90 分間振盪培養後、O.D.<sub>600</sub>=0.5 になるように培養液を濃縮し、光学顕微鏡を用いて形態を観察した。その後、得られた画像から菌体長辺の長さを測定した。

#### 2-2-9 HipA および YjjJ 誘導後の gDNA 染色

2-2-6 と同様に前培養を行い、10 ml の MK 培地に前培養液 100  $\mu$ l を加え O.D.<sub>600</sub> = 0.4~0.5 まで培養した。終濃度 0.1 mM となるように IPTG を添加し、HipA および YjjJ の発現を誘導した。誘導 90 分後の菌液を室温で 14,000 r.p.m.、5 分間遠心分離した。得られた菌体を生理食塩水 (0.9% NaCl 溶液) で 2 回洗浄した後に O.D.<sub>600</sub> = 0.5 になるように懸濁した。懸濁液 5  $\mu$ l をスライドガラス上で乾燥させた後、10  $\mu$ l の 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 溶液 (5  $\mu$ g/ml) をのせ、顕微鏡観察を行った。

#### 2-2-10 HipB による YjjJ の毒性中和

*E. coli* BL21(DE3) の形質転換を pBAD24-*hipB* および pBAD24 を用いて 2-2-4 に示した方法で行った。得られた形質転換体を用いて 2-2-3 に示した方法でケミカルコンピテントセルを作製し、pET-28a、pET-28a-*hipA* および pET-28a-*yjjJ* を用いて形質転換を行い、pET-28a および pBAD24、pBAD24-*hipB* および pET-28a-*hipA* または pBAD24-*hipB* および pET-28a-*yjjJ* を持つ *E. coli* BL21(DE3) を得た。600  $\mu$ l の MKA-Gly 培地で 37°C、12 時間培養し、培養液を 0.1% arabinose、0.025 mM IPTG、0.1% arabinose および 0.025 mM IPTG

を含む、またはいずれの誘導剤も含まない MKA-Gly 寒天培地 (Table 2-15) に画線塗抹し、37°C で 12 時間培養した。

#### 2-2-11 GltX の過剰発現による HipA および YjjJ の毒性中和

*E. coli* BL21(DE3) の形質転換を pET-28a-*gltX* および pET-28a を用いて 2-2-4 に示した方法で行った。得られた形質転換体からケミカルコンピテントセルを作製し、pBAD24-*hipA* および pBAD24-*yjjJ* を用いて形質転換を行い、pET-28a と pBAD24、pBAD24-*hipA* と pET-28a-*gltX*、および pBAD24-*yjjJ* と pET-28a-*gltX* を持つ *E. coli* BL21(DE3) を得た。600  $\mu$ l の MKA-Gly 培地で 37°C、12 時間培養し、培養液を 0.2% arabinose、0.05 mM IPTG および 0.2% arabinose と 0.05 mM IPTG を含む、またはいずれの誘導剤も含まない MKA-Gly 寒天培地 (Table 2-16) に画線塗抹し、37°C で 12 時間培養した。

#### 2-2-12 PrS-*yjjJ* の発現ベクター構築および YjjJ の精製

pCold-PrS<sub>2</sub> (Kobayashi et al., 2009) を用いて 2-2-5 に示した方法で ProteinS (PrS)-YjjJ 融合タンパク質発現プラスミドを構築した。PrS は *Myxococcus xanthus* の孢子表層タンパク質であり、可溶化タグとして機能する。pCold-PrS<sub>2</sub>-*yjjJ* を有する *E. coli* BL21(DE3) を 15 ml MA 培地に植菌し、16 時間振盪培養した。1 L の MA 培地に前培養液を 10 ml 添加し、37°C で O.D.<sub>600</sub> = 0.8 まで振盪培養した。その後、最終濃度 1 mM になるように IPTG を添加し、さらに 37°C で 5 時間振盪培養を行った。培養液を氷上で 5 分間急冷した後、4°C、6,000 r.p.m. で 10 分間の遠心分離を行い、得られた菌体を -80°C

Table 2-15. pBAD24-*hipB* と pET-28a-*hipA* または pBAD24-*hipB* と pET-28a-*yjjJ* の共発現系で使用した MKA-Gly 培地

---

MKA-Gly

MKA-Gly with 0.025 mM IPTG

MKA-Gly with 0.1% arabinose

MKA-Gly with 0.025 mM IPTG 及び 0.1% arabinose

---

Table 2-16. pET-28a-*gltX* と pBAD24-*hipA* または pET-28a-*gltX* と pBAD24-*yjjJ* の共発現系で使用した MKA-Gly 培地

---

MKA-Gly

MKA-Gly with 0.05 mM IPTG

MKA-Gly with 0.2% arabinose

MKA-Gly with 0.05 mM IPTG 及び 0.2% arabinose

---

で保存した。菌体の一部を 1xSAB (Table 2-17) に懸濁して SDS-PAGE に供し、目的タンパク質の発現を確認した。

His-tag を有する発現タンパク質の精製は Ni-NTA agarose (Qiagen) を用いて行った。保存していた菌体を氷上で解凍し、50 ml ファルコンチューブに 40 ml の lysis buffer (Table 2-18) を添加し懸濁した。その後、超音波ホモジナイザー Sonifier® Analog Series (BRANSON) を用いて菌体破碎を行った (1 分間 x 3)。得られた細胞破碎液を 4°C、8,000 r.p.m. で 20 分間遠心分離し、上清 (細胞質画分) を新たな 50 ml ファルコンチューブに移した。これに飽和溶解濃度の 30% になるように硫酸アンモニウムを加え、4°C で 1 時間攪拌した後、14,000 r.p.m. で 10 分間遠心した。さらに上清に飽和溶解濃度の 60% になるように硫酸アンモニウムを加えて 4°C で 1 時間攪拌後、14,000 r.p.m. で 10 分間遠心した。60% 飽和硫酸アンモニウムの添加で得られた沈殿を lysis buffer に再懸濁した後、1 ml の 1 M imidazole (pH 8.0) および 2 ml の Ni-NTA agarose (50% slurry) を加え、lysis buffer で全量を 50 ml にした。これを 4°C で、1 時間攪拌した後、4°C、2,000 r.p.m. で 1 分間遠心分離し、氷上で 5 分間静置した。上清を取り除き、wash buffer (+)(Table 2-19) を 50 ml 添加後、ゆっくり上下攪拌させた後、4°C、2,000 r.p.m. で 1 分間遠心し、氷上に 5 分間静置した。これを 3 回繰り返し、wash buffer (-) (Table 2-20) を用いて同様の操作を行った後、担体をディスポーザブルカラム (Bio-Rad) に移した。1 ml の wash buffer (-) で担体を 10 回洗浄し、その後 1 ml の 10% elution buffer [10% elution buffer (Table 2-21) および 90% wash buffer (-)] で 5 回洗浄した。最後に elution buffer を 500  $\mu$ l ずつ添加して溶出を行い、マイクロチューブに 1 ml ずつ集めた。精製 PrS-YjjJ を含む画分は、各試料 40  $\mu$ l に 10  $\mu$ l の 5 x SAB 溶液を添加した後 10 分間ボイルしたサンプルを SDS-PAGE に供して確認し

Table 2-17. 1 x SAB

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.5 ml
SDS	0.2 g
Glycerol	1 ml
Bromophenol blue	0.5 mg
dH <sub>2</sub> O	Total volume 10 ml

Table 2-18. Lysis buffer

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
150 mM NaCl

Table 2-19. Wash buffer (+)

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
500 mM NaCl
5 mM $\beta$ -mercaptoethanol
20 mM imidazole

Table 2-20. Wash buffer (-)

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
20 mM imidazole
5 mM $\beta$ -mercaptoethanol

Table 2-21. Elution buffer

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
2 mM $\beta$ -mercaptoethanol
250 mM imidazole

た。泳動後のゲルを熱湯で 5 分間 3 回洗浄後、CBB 溶液 (Table 2-22) で 5 分間染色し、その後水道水で脱色した。透析は、500 ml の透析 buffer (Table 2-23) で 4°C で 3 時間、その後透析 buffer を交換し、さらに 9 時間行った。透析後の試料は終濃度 20% となるようにグリセロールを添加し、使用するまで -80°C で保存した。

### 2-2-13 HipA の精製

pCold II (Takara Bio) を用いて 2-2-5 に示した方法で pCold II-*hipBA* プラスミドを構築した。その後、His-tagged HipB-HipA 複合体を発現させ、以前報告された方法に従って HipA を精製した (Germain et al., 2013)。詳細を以下に述べる。pCold II-*hipBA* を有する *E. coli* BL21(DE3) を 1 L の MA 培地にて、37°C で O.D.<sub>600</sub>=0.3 まで振盪培養した後、最終濃度 1 mM になるように IPTG を添加した。培養液を氷上で 5 分間急冷してコールドショックを与えた後、室温で 5 時間振盪培養を行った。4°C、6,000 r.p.m.、10 分間の遠心分離を行い、得られた菌体は -80°C で保存した。菌体から 2-2-6 に示した方法を用いて HipB-HipA (HipBA) 複合体を精製し、得られた溶出画分を 5 mM メルカプトエタノールを含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer を用いて透析した。続いて、再度 Ni-NTA agarose に HipBA 複合体を結合させた後、10 ml の denaturing buffer (Table 2-24) を用いて変性させた HipA タンパク質のみをカラムから溶出した。溶出液を、250 ml の refolding buffer 1-4 (Table 2-25) を用いて 4 回透析し、HipA の巻き戻しを行った。HipA タンパク質の折りたたみは HipA の自己リン酸化活性 (第 3 章、3-2-5) を指標として確認した。

Table 2-22. CBB 溶液

Coomassie Brilliant Blue R250	60 mg
dH <sub>2</sub> O	Total volume 1 l

(Stir for 2-4 h) and then add 3 ml HCl

Table 2-23. 透析 buffer

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
150 mM NaCl
2 mM $\beta$ -mercaptoethanol

Table 2-24. Denaturing buffer

100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 mM Tris HCl (pH8.0)
9.8 M urea
1 mM $\beta$ -mercaptoethanol

Table 2-25. Refolding buffer

Refolding buffer 1	50 mM Tris HCl (pH8.0)	200 mM NaCl	5 mM DTT	0.1% Triton X 100
Refolding buffer 2	50 mM Tris HCl (pH8.0)	200 mM NaCl	5 mM DTT	
Refolding buffer 3	50 mM Tris HCl (pH8.0)	200 mM NaCl	5 mM DTT	10 % glycerol
Refolding buffer 4	50 mM Tris HCl (pH8.0)	200 mM NaCl	5 mM DTT	20 % glycerol

## 2-2-14 YjjJ および HipB 複合体分析

### 2-2-14-1 ゲルろ過

精製した 4  $\mu\text{mol}$  の PrS-YjjJ および PrS をモル比が 1 : 1 になるように HipB とそれぞれ混合し、氷上で 30 分静置したものを PrS-YjjJ + HipB または PrS + HipB 混合物として用いた。PrS-YjjJ、PrS-YjjJ + HipB および PrS-HipB 混合物をゲルろ過 buffer (Table 2-26) で平衡化したカラム (Superdex 200 Increase 3.2/300 (Cytiva) および Superdex 200 Increase 10/30 (Cytiva)] を用いて解析した。

### 2-2-14-2 動的光散乱

以前に報告された方法 (Shimada et al., 2010) に従って、PrS-YjjJ + HipB 複体の解析を行った。150 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に透析した 80  $\mu\text{M}$  の YjjJ-HipB 複体を 15,000 r.p.m. で 5 分間遠心後、上清 12  $\mu\text{l}$  を石英キュベットに充填し、ヒ化ガリウムを光源とする動的光散乱装置に 20°C で供した。得られたデータを分析して、見かけの分子量を推定した。流体力学的半径 ( $R_h$ ) 値は、Stokes-Einstein 式 (1) より得られた移動拡散係数 ( $D_T$ ) を用いて以下のように計算される。

$$R_h = K_B T / 6\pi\eta D_T R_h \quad (1)$$

( $K_B$  : ボルツマン定数、 $T$  : 絶対温度、 $\eta$  : 溶媒粘度、 $R_h$  : 流体力学的半径)

Table 2-26. ゲルろ過 buffer

20 mM Tris-HCl (pH 8.0)

150 mM NaCl

式 (2) を用いて、溶液中のタンパク質の分子質量を  $R_h$  から推定した。

$$\text{Molecular mass} = 3366.5 R_h^{2.3398} \quad (2)$$

#### 2-2-15 透過型電子顕微鏡による YjjJ-HipB 複合体観察

ゲルろ過後の複合体が存在すると考えられた画分を試料とした。これを適量希釈し、メッシュグリッドに雲母を蒸着させたカーボン膜を張ったグリッドに 30 秒間吸着させ、上清を取り除いた後 30 秒間 2% (w/v) 酢酸ウランで染色した。作製したグリッドを JEM1010 透過型電子顕微鏡 (JEOL) を使用し 80 kV で観察した。カメラは charge-coupled device (CCD) camera (TVIPS) を使用した。

## 第 3 節 結果

### 2-3-1 YjjJ の同定

HipA の C 末端側に存在する HipA family 様のドメインを有し、HipA と 19.5% の同一性、29.5% の類似性を有する YjjJ を PSI-BLAST を用いて発見した (Fig. 2-1A)。PSI-BLAST は、BLAST 検索の結果を利用して検索を繰り返して行くことで、BLAST 検索の結果から、配列の特徴を抽出し、それを何度も繰り返すことで、配列自体の類似度が低くても機能的に関連している配列を見つけて出すことができる非常に強力な検索方法である。HipA は 440 アミノ酸残基からなるタンパク質で (Fig. 2-1A)、HipB とオペロンを形成している (Fig. 2-1B) のに対し、YjjJ は 443 アミノ酸残基からなるタンパク質で、隣接する遺伝子とオペロンを形成していない (Fig. 2-1C)。また YjjJ は HipA の N 末端部分と類似性がなく、10-35 残基目の領域に DNA 結合モチーフ (helix-turn-helix (HTH)) を有していた (Fig. 2-1D)。実際に YjjJ の配列から SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) を用いて DNA 結合モチーフと推定された N 末端の 10 - 35 aa の構造を予測したところ、この DNA 結合モチーフは MarR\_2 モチーフと類似性があり (Fig. 2-2A)、二つの  $\alpha$  ヘリックスが短いペプチド鎖で連なった HTH モチーフを形成していた (Fig. 2-2B)。また YjjJ 全長の構造をモデリングしたところ、1 - 55 aa で一つのドメインを形成しており、winged HTH モチーフを構成していると予測された (Fig. 2-2C)。このことから、YjjJ は DNA 結合タンパク質ではないかと考えられた。

(A)

```
HipA 1 MPKLVTWNN-----QRVGLTKLANGAHTFKYAPEWLASRYARPLSLSLPLQR--GNIT 53
YjJ 1 MSELTDLLLOGPRSAPELRQRLAISQATFSRLVAREDRVIRFGKARATRYALLRPPYRGIE 60

HipA 54 SDAVFNFFDN-----LLPDSPIVRDRIVKRYHAKSRQPFOLLSEIGRDSYGAVT 102
YjJ 61 RIPVVRVDDTGKAHKFADIRLCWPQGSCLVTGADGDQWFDGLPWYLTDLRPPQGLGRAW 120

HipA 103 --LIPEDETVTHPTIMAWEKLT EARLEEVLTAYKAD IPLGMIREENDFRISVAGADEKTAL 160
YjJ 121 GRKLAACLNLTDDIRLWQ--EEDVLYALT VFNGETGGWLVGEGNYQRWITACHPAEIP 177

HipA 161 LRIGNDWCIPKGITPTTHIKLPIGEIROPNATLDLSQSDNEYCYCLLLAKELGLNVPD- 219
YjJ 178 LDQKLTHYEQLASDALAGEIVGSSAGGEQPKFTYYAQTSPGNKHVLMKFTVPQQTAVSOR 237

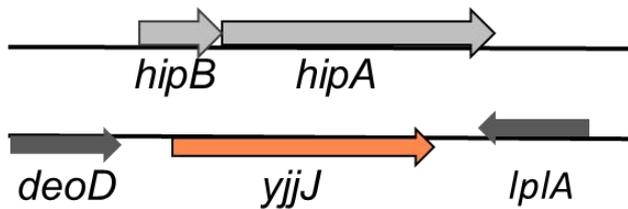
HipA 220 -----AEITKAGNVRALAVRFDR--RWN AERTVLLRRLPQEDMCQTFGLPSSVKYESDG 271
YjJ 238 WGDLLIAESI AAI LRDGGIHAIESTVLVTSNRDVFLEAERFDCKGNDGRLPIVSL EAVQ 297

HipA 272 GPGIARIMALMGSSSEALKDRYDFMK-----FQVFWLIGATOGHAKNFSVFIQAGGS 324
YjJ 298 SEFISPGSWPQAMRRLCEQQLVTHQSVAQTEVWAFGRLIANS DMHAGNISFYLSEP-P 356

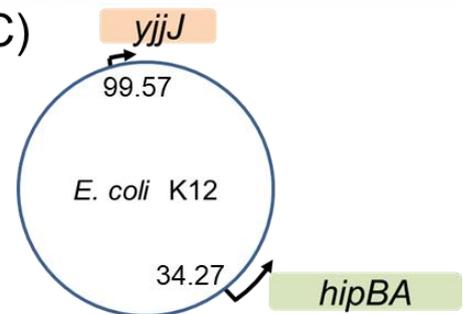
HipA 325 YRLTFPYDIISAFPVLGGTGIHISDLK LAMGLNASKGKKT AIDKIYPRHFLATAKVLRF 384
YjJ 357 FALTPVYDMLPMVYAPNSAGMLR-----DAAIEVKFDLNVSKSAMLTALP 401

HipA 385 EVQMH EILSDFARMIPALDNYKTS LPTDFPEN VYTAVESNVLRRLHGRLSREYGSK 440
YjJ 402 LAQQFWQTVARDPRISEAFRHIAQEMP-----EKIROIEEKVARMGG----- 443
```

(B)



(C)



(D)

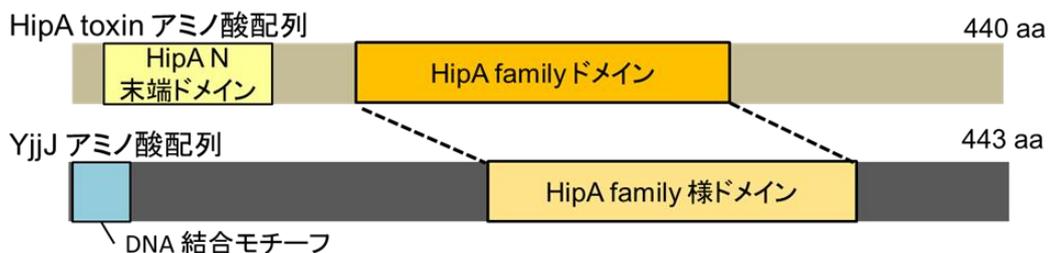


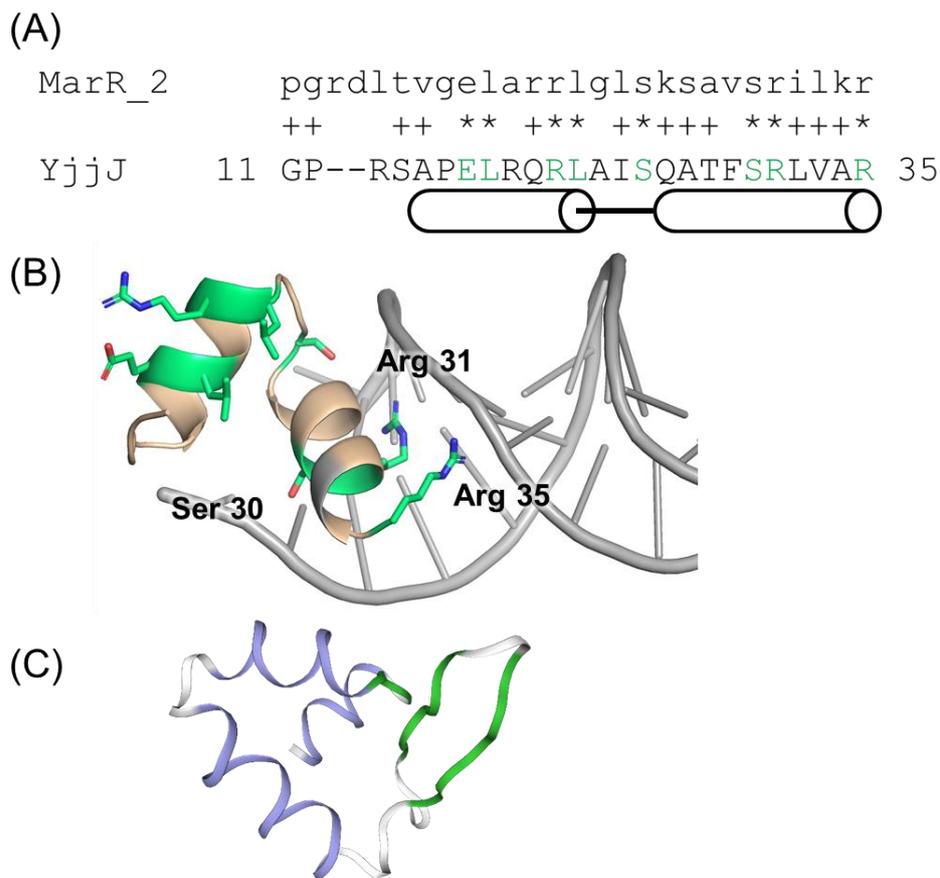
Fig. 2-1. YjjJ および HipA の比較

(A) HipA および YjjJ アミノ酸配列の比較

(B) *hipB-hipA* オペロンおよび *yjjJ* 遺伝子のゲノム上の近傍遺伝子

(C) ゲノム DNA 上の *yjjJ* および *hipB-hipA* の位置。円の中の数字はゲノム一周を 100 としたときの位置を表している。

(D) HipA および YjjJ が持つドメインの比較



## Fig. 2-2. YjjJ が有する DNA 結合モチーフ

(A) MarR\_2 モチーフ (Pfam データベース) との配列比較。配列の下の円筒は、

(B) の構造モデルの a ヘリックス部分を表す。

(B) SWISS-MODEL で予測した YjjJ 10-35 番目の構造モデル。予測の鑄型となった *Sinorhizobium fredii* NoIR の DNA 複合体の構造 (PDB ID, 4OMY) の NoIR の対応する部分に重ね、DNA だけを表示した。(A) で保存されていた残基の側鎖を stick モデルで示す。

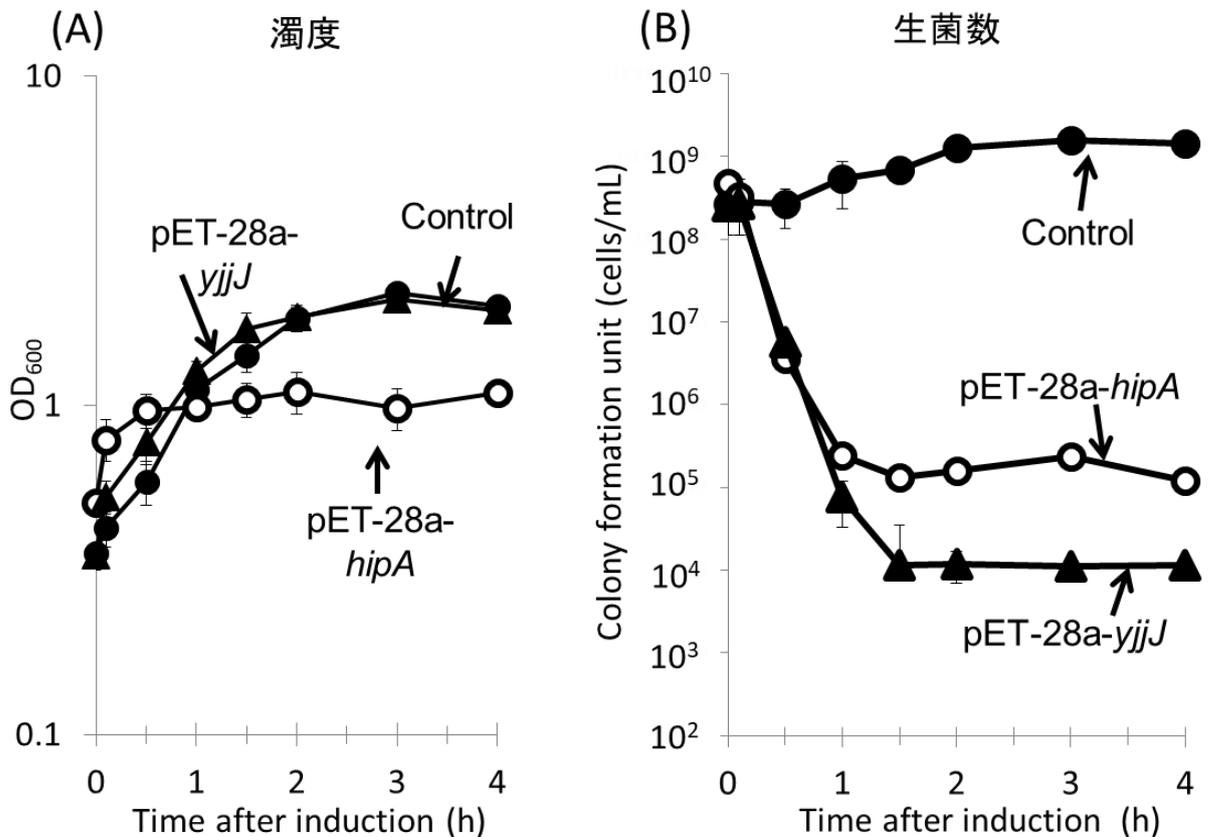
(C) SWISS-MODEL で予測した YjjJ 1-55 番目の構造モデル。N 末端から a1-b1-a2-a3-b2-b3 の順に配置されている。紫色は a ヘリックスを、黄緑は b シートを表す。

### 2-3-2 YjjJ の *E. coli* の生育に与える影響

YjjJ が生育に与える影響を、pET-28a、pET-28a-yjjJ および pET-28a-hipA を有する *E. coli* BL21(DE3) を用いて解析した。終濃度 0.1 mM の IPTG を添加し、誘導後の各時間での濁度および生菌数を測定した。その結果、HipA の誘導では、濁度は誘導後 40 分で完全に阻害され (Fig. 2-3A)、生菌数は誘導後 60 分で 0.044% に減少した (Fig. 2-3B)。一方、YjjJ の誘導では、濁度はコントロールと同じだったが (Fig. 2-3A)、生菌数は誘導後 90 分で 0.0046% に減少した (Fig. 2-3B)。よって、YjjJ の過剰発現は殺菌作用を示すことが明らかとなった。

### 2-3-3 YjjJ および HipA 誘導後の *E. coli* の形態変化

液体培養中の *E. coli* の増殖を濁度法により測定する方法は簡便で一般的に用いられているが、あくまでも吸光度によって測定しているため、生育していなくとも菌の形状が変化すると濁度も変化する。今回、2-3-2 で述べたように YjjJ 誘導後の濁度はコントロールと同じだったが、生菌数は大幅に減少したことから、菌の形態変化 (伸長) が考えられた。そこで、pET-28a-yjjJ または pET-28a-hipA を有する *E. coli* BL21(DE3) を用いて YjjJ および HipA 誘導 90 分後の *E. coli* の形態を観察した。その結果、HipA 誘導後の菌の形態に変化は見られなかったが、YjjJ 誘導後の菌は誘導していない時と比べて約 2.5 倍伸長していた (Fig. 2-4A および B)。



**Fig. 2-3. YjjJ が大腸菌の生育に与える影響**

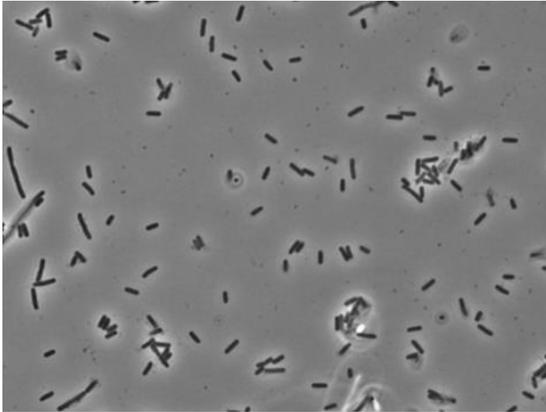
(A) HipA および YjjJ 誘導後の濁度。pET-28a、pET-28a-*hipA* および pET-28a-*yjjJ* を持つ *E. coli* BL21(DE3) を O.D.<sub>600</sub> = 0.4 まで培養し、終濃度 0.1 mM になるよう IPTG を添加し、その後の濁度を測定した。

(B) HipA および YjjJ 誘導後の生菌数。A と同様に IPTG で HipA および YjjJ を誘導した後、各時間における生菌数をコロニーカウント法を用いて測定した。

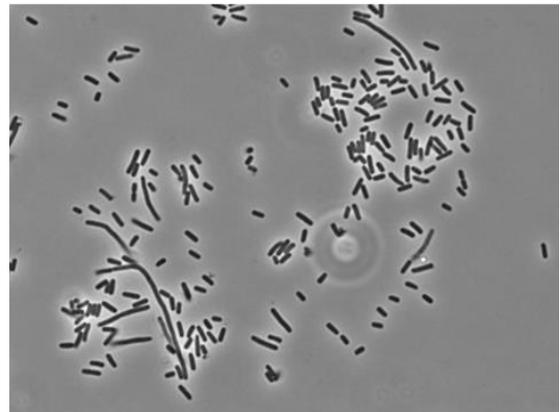
(A)

HipA

Without IPTG



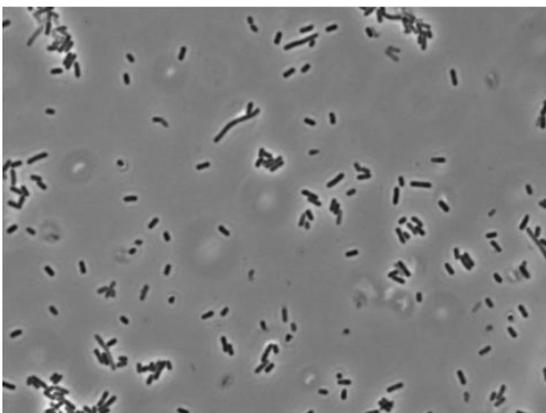
With IPTG



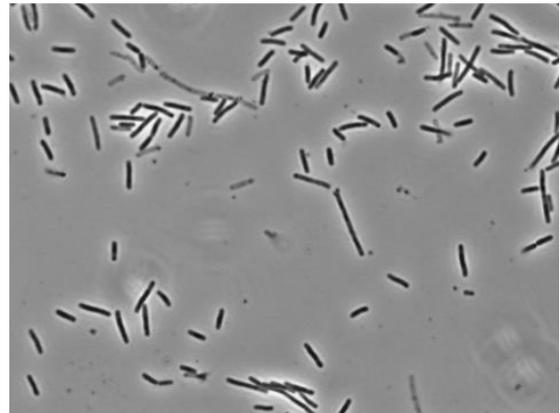
(B)

YjjJ

Without IPTG



With IPTG



#### Fig. 2-4. HipA および YjjJ 誘導後の形態

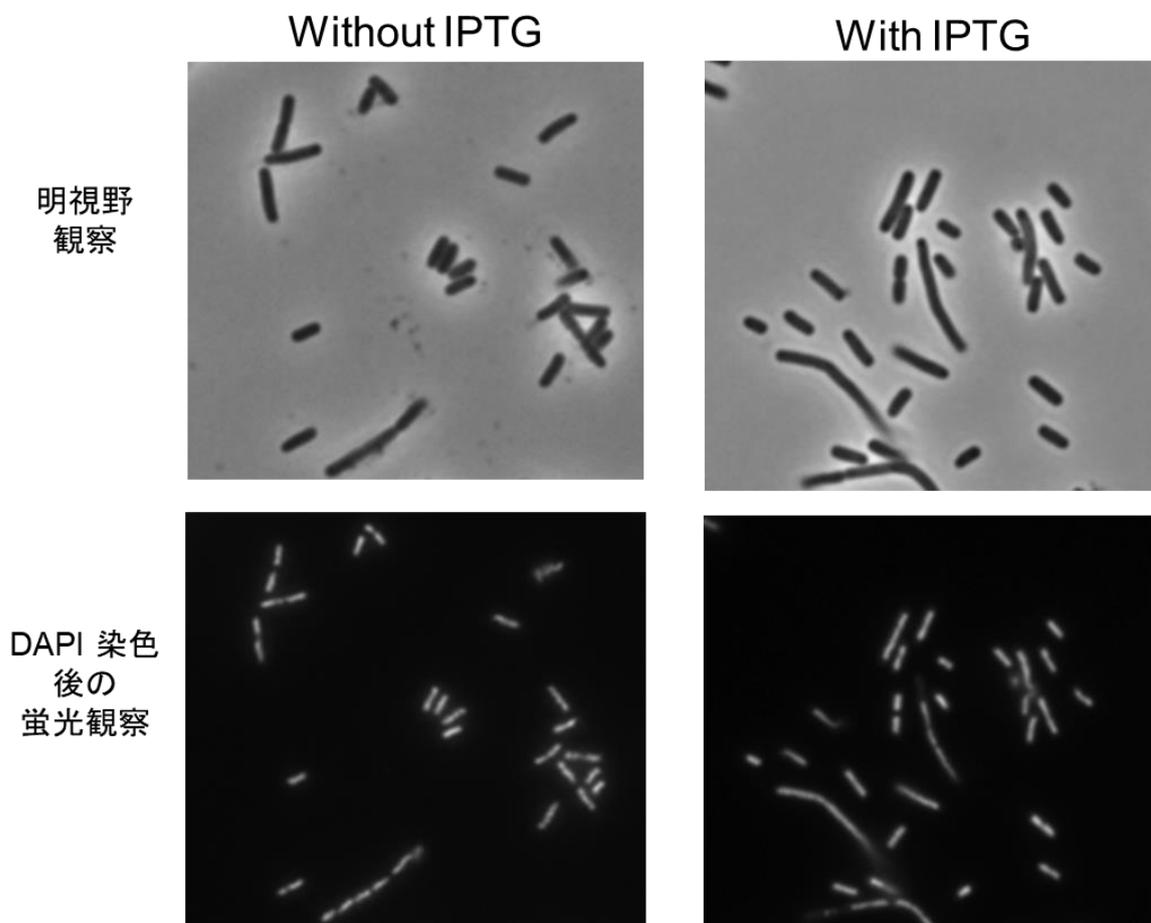
(A) pET-28a-*hipA* をもつ *E. coli* BL21(DE3) または (B) pET-28a-*yjjJ* をもつ *E. coli* BL21(DE3) をそれぞれ培養し、O.D.<sub>600</sub> = 0.4 で IPTG (終濃度 0.1 mM) を添加し、90 分後の形態を記録した。

#### 2-3-4 YjjJ および HipA 誘導後における gDNA の観察

YjjJ または HipA 誘導後の gDNA を観察した。pET-28a-yjjJ または pET-28a-hipA を有する *E. coli* BL21(DE3) を対数増殖期まで培養し、終濃度 0.1 mM になるよう IPTG を添加した。YjjJ および HipA 誘導 90 分後の *E. coli* の gDNA を DAPI を用いて染色し、顕微鏡で観察した。その結果、HipA および YjjJ 誘導後ではゲノム DNA に変化は見られなかった (Fig. 2-5、2-6)。よって YjjJ は DNA 分解酵素ではないと考えられた。

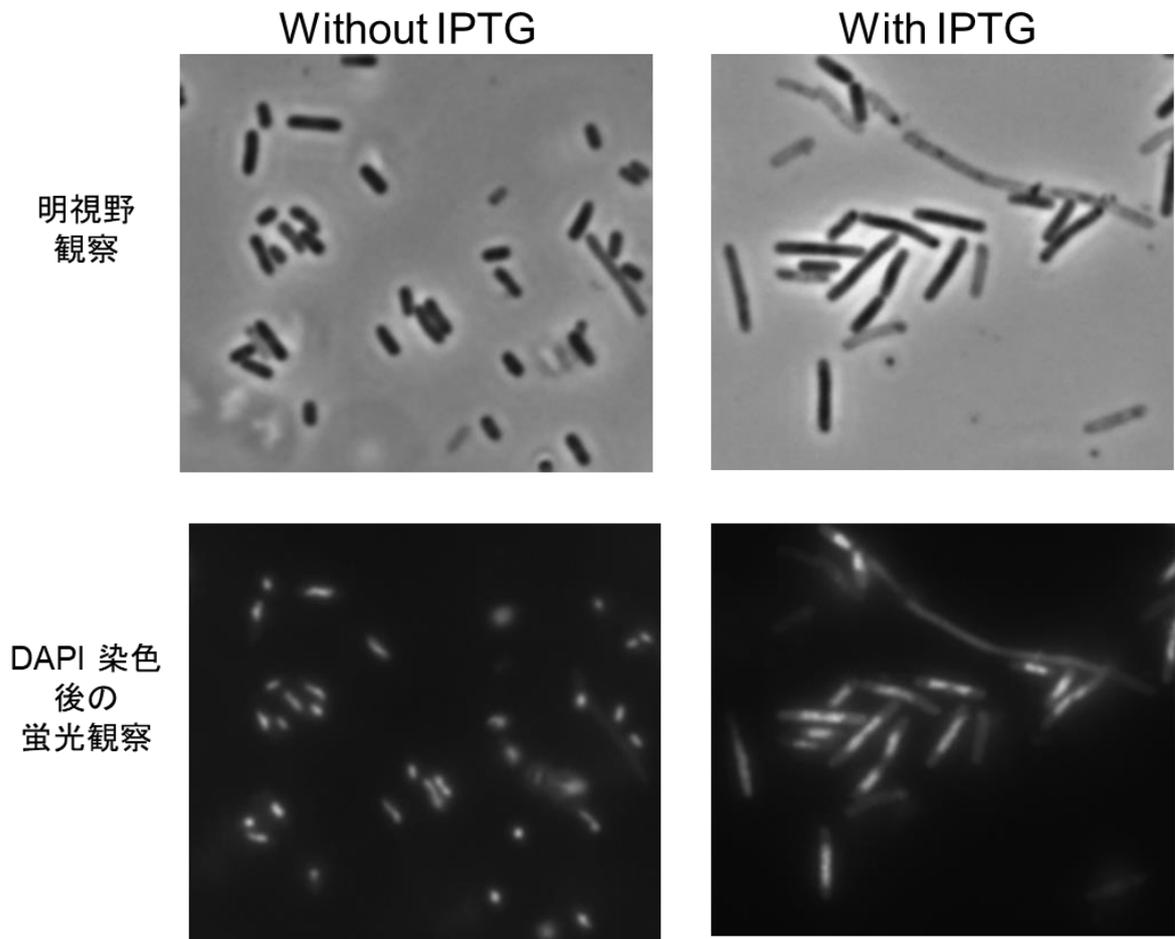
#### 2-3-5 HipB による HipA および YjjJ の毒性中和

YjjJ は HipA の C 末端側に存在する HipA family 様のドメインを有し、低いながらも HipA と類似性を有する。そこで、HipA の antitoxin である HipB が YjjJ の毒性を中和するかを解析した。*E. coli* BL21(DE3) を形質転換し、pET-28a および pBAD24、pBAD24-hipB および pET-28a-hipA、または pBAD24-hipB および pET-28a-yjjJ を有する *E. coli* を得た。得られた菌をそれぞれ 0.025 mM IPTG、0.1% arabinose、0.025 mM IPTG および 0.1% arabinose 存在下または非存在下で培養し、生育を確認した。その結果、IPTG 存在下で HipA および YjjJ が誘導された *E. coli* の生育は阻害された。しかし、arabinose および IPTG の両誘導剤の存在下で HipB および YjjJ を共発現させた *E. coli* は、HipB および HipA を共発現させた場合と同様に生育した (Fig. 2-7)。以上の結果から、HipB は YjjJ の antitoxin として機能し、HipB および YjjJ は HipB-YjjJ TA system を構成することが示された。



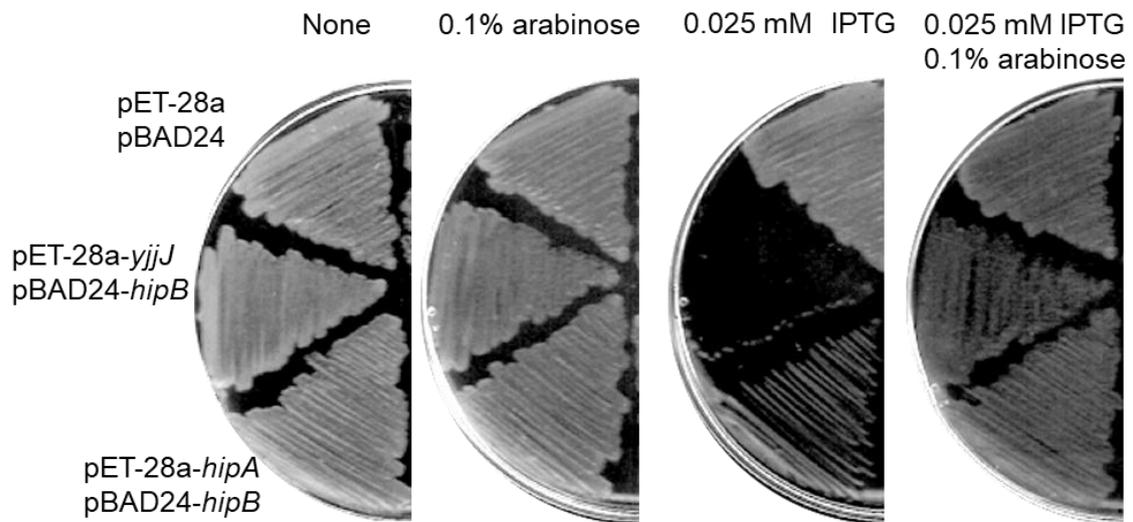
**Fig. 2-5. HipA 誘導後の細胞形態および菌体内 DNA**

pET-28a-*hipA* をもつ *E. coli* BL21(DE3) を培養し、0.1 mM IPTG を添加後 90 分での形態および DAPI を用いて 菌体内の DNA を染色した。



**Fig. 2-6. YjjJ 誘導後の細胞形態および菌体内 DNA の局在**

pET-28a-yjjJ をもつ *E. coli* BL21(DE3) を培養し、0.1 mM IPTG 添加 90 分後での形態および DAPI を用いて 菌体内の DNA を染色した。



**Fig. 2-7. HipB による HipA および YjjJ の生育阻害への影響**

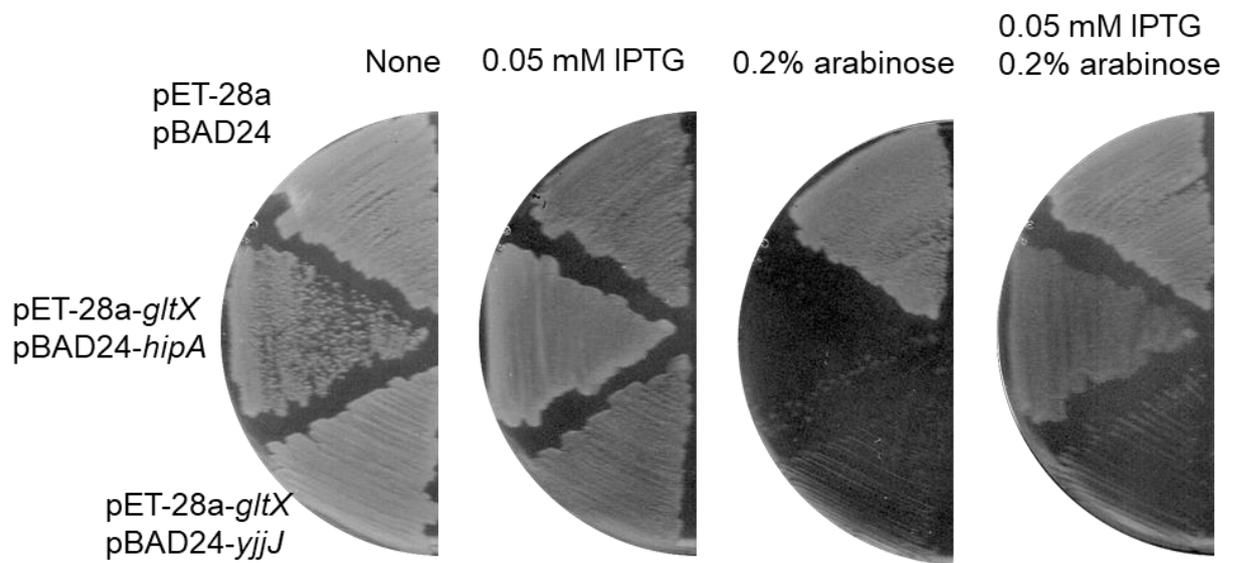
pET-28a および pBAD24、pET-28a-yjjJ および pBAD24-hipB または pET-28a-hipA および pBAD24-hipB を有する *E. coli* BL21 (DE3) をそれぞれを一晩培養した。培養液を図に示した各種誘導剤を含む MKA-Gly プレートに画線塗抹し、37°C で 12 時間培養した。

### 2-3-6 GltX の過剰発現による HipA および YjjJ の毒性中和

HipA の細胞内標的である GltX の過剰発現は、HipA の生育阻害活性を中和する (Germain et al., 2013)。そこで、GltX の過剰発現が YjjJ の生育阻害活性を中和するかを調べた。pET-28a および pBAD24、pBAD24-*hipA* および pET-28a-*gltX*、または pBAD24-*yjjJ* および pET-28a-*gltX* をもつ *E. coli* BL21(DE3) をそれぞれ培養した。得られた培養液をそれぞれ 0.05 mM IPTG、0.2% arabinose、0.05 mM IPTG および 0.2% arabinose 存在下または非存在下で培養し、生育を確認した。その結果、0.2% arabinose 存在下で HipA または YjjJ が誘導された *E. coli* の生育は阻害された。Arabinose および IPTG 両誘導剤存在下で GltX および HipA を共発現させた *E. coli* は、コントロールと同様に生育した。一方、GltX および YjjJ を共発現させた *E. coli* の生育は阻害された (Fig. 2-8)。よって、HipA のターゲットである GltX の過剰発現は YjjJ の毒性を中和しなかったことから、HipA と YjjJ の細胞内標的は異なることが示唆された。

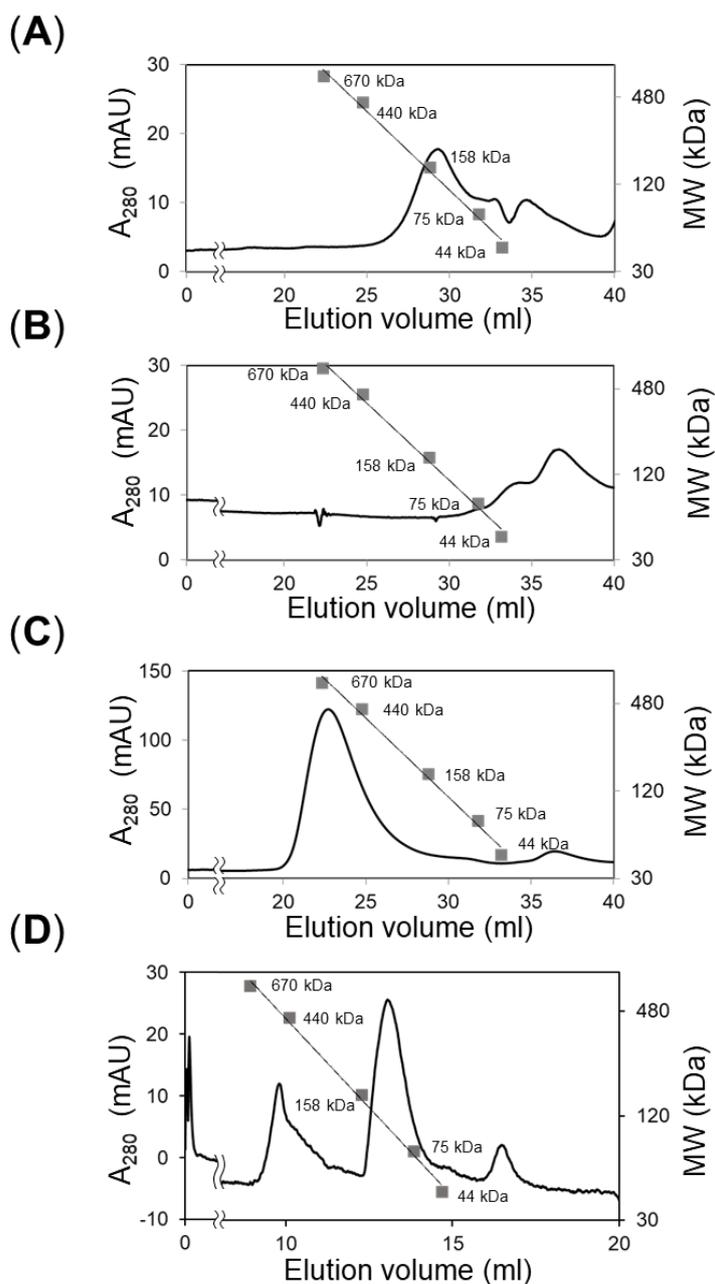
### 2-3-7 ゲルろ過による分子量解析

YjjJ および HipB との相互作用をゲルろ過によって調べた。最初に PrS-YjjJ をゲルろ過によって分析した。その結果、およそ 129 kDa の位置にピークが検出された (Fig. 2-9A)。YjjJ および PrS の理論分子量はそれぞれ 45 kDa および 23 kDa であることから、PrS-YjjJ は 2 量体を形成していると考えられた。次



**Fig. 2-8. GltX の過剰発現による HipA および YjjJ の生育阻害への影響**

pET-28a および pBAD24、pET-28a-*gltX* および pBAD24-*hipA* または pET-28a-*gltX* および pBAD24-*yjjJ* を有する *E. coli* BL21(DE3) をそれぞれ一晩培養した。培養液を図に示した各種誘導剤を含む MKA-Gly プレートに画線塗抹し、37°C で 12 時間培養した。



**Fig. 2-9. PrS-YjjJ、HipB および HipA の相互作用解析**

(A) PrS-YjjJ、(B) PrS および HipB、(C) PrS-YjjJ および HipB、(D) PrS-YjjJ、HipA および HipB 混合液をゲルろ過カラム Superdex 200 increase 3.2/300 (Cytiva) (A-C) または Superdex 200 Increase 10/300 (D) (Cytiva) を用いて解析した。

に、PrS-YjjJ を HipB と 1:1 で混合して解析した。その結果、およそ 672 kDa および 21.9 kDa の位置にピークが検出され、129 kDa の位置には検出されなかった (Fig. 2-9C)。よって、PrS-YjjJ は HipB と 672 kDa の複合体を形成することが示唆された。また、可溶化タグとして用いた PrS と HipB の混合物では 22 kDa および 19.5 kDa の位置にのみピークが検出されたことから、PrS は HipB と結合しないことが示された (Fig. 2-9B)。よって、672 kDa の位置に検出された YjjJ-HipB 複合体は、YjjJ と HipB 間の相互作用によって形成されることが示された。測定した分子量から YjjJ-HipB 複合体の構成比を推測した (Table 2-27)。PrS-YjjJ および HipB をモル比で 1:1 で混合して解析した結果、672 kDa に PrS-YjjJ-HipB 複合体由来の、21.9 kDa に HipB 由来のピークがそれぞれ検出された。一方、129 kDa の位置に PrS-YjjJ 由来のピークは検出されなかった (Fig. 2-9)。この結果から、複合体の構成比は HipB よりも YjjJ の割合が大きいと考えられたため、複合体の構成は YjjJ : HipB=8 : 6 (理論分子量 581.7 kDa) であると推測した。

よって、YjjJ-HipB 複合体は 4 つの YjjJ 2 量体と 3 つの HipB 2 量体から成ると考えられた。しかし HipB が 10 kDa と小さいタンパク質であることから、詳細については構造解析が必要である。以上の結果から、YjjJ と HipB は toxin と antitoxin タンパク質が直接結合して複合体を形成する Type II TA system を構成することが明らかとなった。

次に、YjjJ および HipA および HipB を混合し、ゲルろ過によって分析した。その結果、およそ 450 kDa に 2 つずつの混合物では見られなかったピークが検出された。よって、YjjJ、HipA および HipB はお互いに相互作用し、一つの複合体を形成することが示唆された (Fig. 2-9D)。

Table 2-27. 複合体分子量を 600 kDa と推定した場合の YjjJ および HipB の存在比

ゲルろ過より得られた結果から YjjJ は 129 kDa (2 量体)、HipB は 21.9 kDa (2 量体) として複合体の分子量を概算した。

YjjJ (129 kDa) 分子数	HipB (21.9 kDa) 分子数	複合体の分子量 (kDa)
1	21	588.9
1	22	610.8
2	15	586.5
2	16	608.4
3	9	584.1
3	10	606.0
<b>4</b>	<b>3</b>	<b>581.7</b>
4	4	603.6

### 2-3-8 動的光散乱法を用いた分子量解析

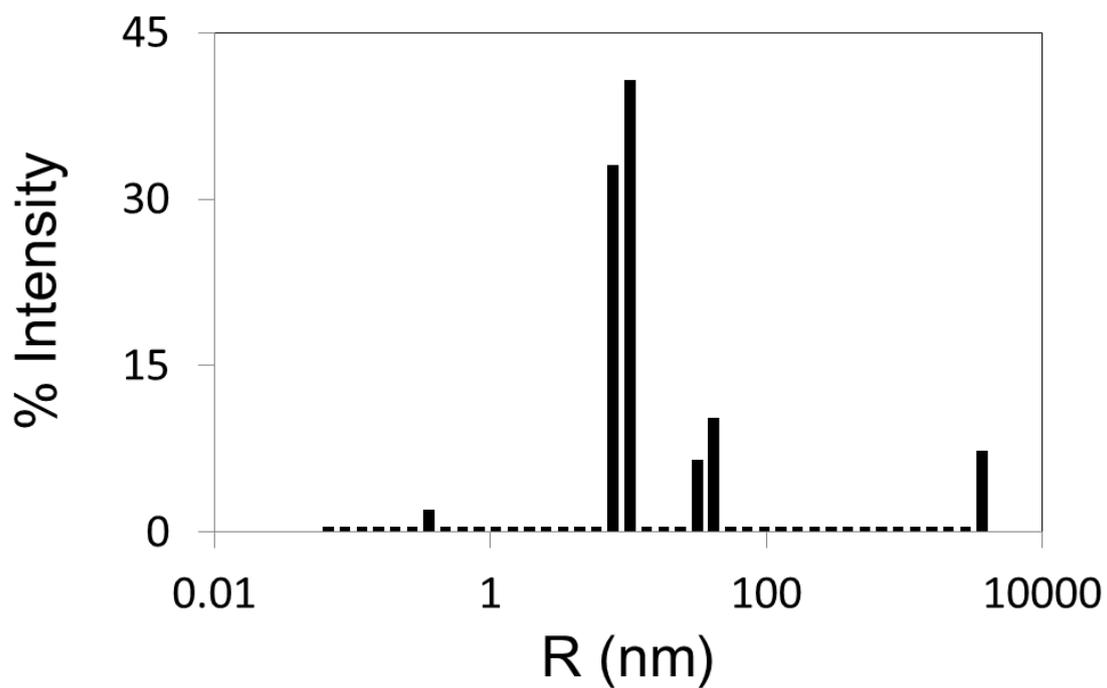
ゲルろ過によって、YjjJ-HipB 複合体は分子量 670 kDa 程度の複合体であることが示唆された。しかし、今回用いたカラムの排除限界は 600 kDa であった。そこで、より大きい分子量を測定可能な動的光散乱法を用いて YjjJ-HipB 複合体の分子量を解析した。その結果、粒子径は 9.2 nm、分子量は 603 kDa と推測された (Table 2-28 および Fig. 2-10)。

### 2-3-9 電子顕微鏡 (TEM) を用いた YjjJ-HipB 複合体の解析

ゲルろ過および動的光散乱法の結果から、YjjJ および HipB は分子量 600~670 kDa 程度の複合体を形成することが示唆された。そこで、電子顕微鏡を用いて HipB-YjjJ 複合体の構造の概形を解析した。ゲルろ過後の 670 kDa ピーク画分を、酢酸ウランで染色して観察した。その結果、均一の構造を持つ粒子が観察された (Fig. 2-11)。

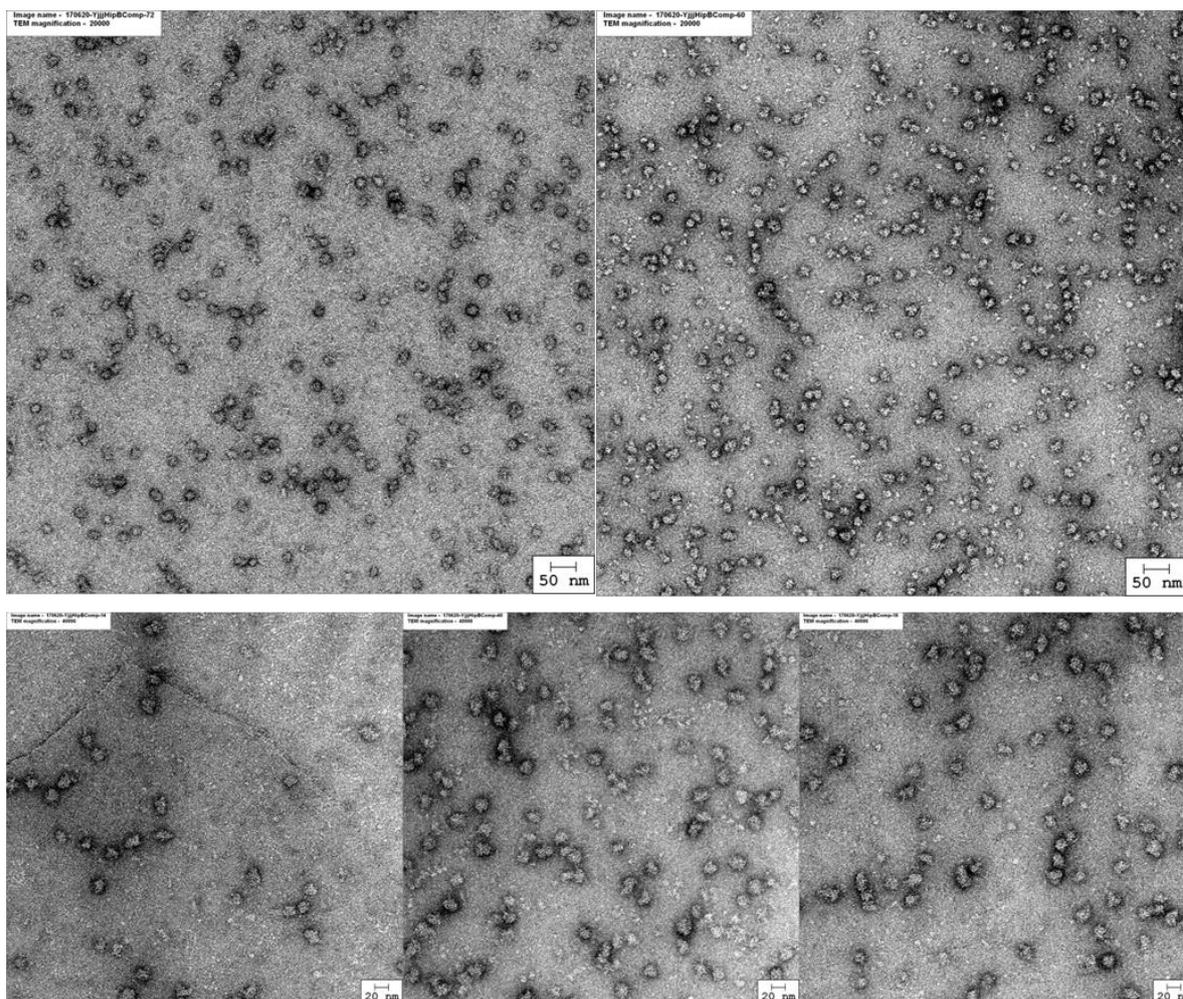
Table 2-28. 動的光散乱の結果

PrS-YjjJ with HipB	R (nm)	% Pd	MW-R (kDa)	% Int	% Mass
Peak1	0.4	0	0	2.1	99.8
Peak2	9.2	13.6	603	73.8	0.2
Peak3	37.8	13.1	16559	16.8	0
Peak4	3667.3	0	736294000	7.3	0



**Fig. 2-10. 動的光散乱法を用いた YjjJ-HipB 複合体の解析**

150 mM NaCl を含む 20mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer で透析した 80  $\mu$ M の YjjJ-HipB 複合体 100  $\mu$ l を、15,000 r.p.m. で 5 分間遠心後、動的光散乱装置に 20°C で供した。



**Fig. 2-11. YjjJ-HipB 複合体の電子顕微鏡観察**

ゲルろ過後の複合体と考えられた画分を試料とした。これを適時希釈し、カーボン支持膜を張ったグリッドに吸着させ、酢酸ウランで染色し、電子顕微鏡 (TEM) で観察した。

## 第 4 節 考察

今回 YjjJ を PSI-BLAST を用いて発見した。このように toxin の生育阻害活性に重要なドメインに着目して検索すれば、これまで発見されていない toxin および TA system を発見できる可能性は高いと考えられる。

YjjJ の発現は *E. coli* の生育を阻害し、その毒性は HipB の共発現によって中和された (Fig. 2-7)。よって、YjjJ は HipB と YjjJ-HipB TA system を構成することが示唆された。TA system は antitoxin の性質および構造から Type I から VI に分類されている (Fig. 1-2) (Schuster and Bertram, 2013)。最も一般的な TA system である Type II TA system は、toxin および antitoxin がタンパク質であり、antitoxin は toxin と直接結合し、複合体を形成することで toxin の毒性を中和する (Van Melderen and Saavedra De Bast, 2009)。そこで、YjjJ および HipB タンパク質間の相互作用を、ゲルろ過を用いて解析した結果、PrS-YjjJ は二量体を形成することが示された。また、PrS-YjjJ および HipB 混合物を解析した結果、YjjJ-HipB は 670 kDa 程度の複合体を形成することが示唆された (Fig. 2-9)。よって、YjjJ-HipB TA system は Type II TA system であることが明らかとなった。

ゲルろ過では YjjJ-HipB 複合体の分子量を正確に測定できなかったため、動的光散乱法を用いて YjjJ-HipB 複合体の粒子径を測定し、分子量を計測した。粒子径から分子量を概算した結果、603 kDa であった。また、電子顕微鏡で観察された HipB-YjjJ 複合体は均一な形状をしており、球形であった (Fig. 2-11)。

Type II TA system において、toxin の毒性は antitoxin によって中和される。ストレス条件下ではストレス誘導性 ATP 依存性プロテアーゼによって antitoxin が分解され、toxin が活性化される (Muthuramalingam et al., 2016)。

YjjJ は HipA の antitoxin である HipB と Type II TA system を構成することから、HipB が分解される条件下では、HipA および YjjJ の 2 つの toxin が同時に遊離し、その活性を示すと考えられる。異なる toxin を 1 つの antitoxin が中和する例として、*Mycobacterium tuberculosis* の MazE-MazF および VapB-VapC TA system における VapB antitoxin による VapC toxin および MazF toxin の毒性中和作用がある (Zhu et al., 2010)。*M. tuberculosis* には、*E. coli* MazF と相同性を有するホモログが少なくとも 7 つ存在するが、対となる antitoxin は MazE と相同性を有していない。そこで、*M. tuberculosis* に存在する MazE オルソログを検索すると 2 つ存在し、下流には VapC toxin のホモログが存在することが明らかになった。そこで、*M. tuberculosis* に存在する MazE-MazF と VapB-VapC 間での相互制御を調べた結果、2 種類の MazEF が 2 種類の VapBC と相互で毒性中和できることが示された (Zhu et al., 2010)。このように、ある TA system の antitoxin が別の TA system の toxin に作用することが報告されているが、今回私の発見した YjjJ は隣接する遺伝子とオペロンを形成しておらず、HipB が唯一の antitoxin として機能するもので、既に報告された例とは異なるものである。今回の HipB-HipA TA system の antitoxin が、対となる toxin だけでなく、ゲノム上に単独で存在する toxin とも TA system を構成するという発見は世界で初めての報告である。

以後、第 3 章では、ここで得られた結果をもとに YjjJ の細胞内標的の同定を試みた。

## 第 3 章 YjjJ の自己リン酸化および DNA 結合能の解析

### 第 1 節 序論

第 2 章で、HipA toxin と 29.5% と低いながらもアミノ酸配列の相同性を持つ YjjJ を同定し、YjjJ が *E. coli* の生育を阻害する toxin であり、HipA の antitoxin である HipB と TA system を構成することを見出した (Fig. 2-7) (Maeda et al., 2017)。HipA は GltX をリン酸化することで、そのグルタミン酸 tRNA リガーゼ活性を阻害し、生育阻害さらには休眠を引き起こすと考えられている。また HipA は GltX のみならず HipA 自身もリン酸化し、自己リン酸化された HipA はキナーゼ活性を失う (Schumacher et al., 2012)。よって、HipA の自己リン酸化は休眠からの再増殖に重要であると考えられる。第 2 章で述べたように、YjjJ の細胞内標的は HipA の標的である GltX とは異なることが示唆された。しかし、HipA のキナーゼ活性に重要な HipA-C 末端ドメインを YjjJ も有する (Fig. 2-1)。そこで、YjjJ も HipA と同様にキナーゼ活性を有しており、その活性が生育阻害活性に重要なのではないかと考えた。

本章では、YjjJ のアミノ酸配列の解析を行い、HipA に存在する自己リン酸化アミノ酸残基およびキナーゼ活性に重要なアミノ酸残基である Ser150 および Asp309 がそれぞれ YjjJ に保存されていること、また、YjjJ の N 末端 (10-35 aa) 領域には DNA 結合モチーフが存在することを見出し、YjjJ の自己リン酸化およびキナーゼ活性を解析するとともに、YjjJ の DNA 結合能の解析を行った。

## 第 2 節 実験方法

### 3-2-1 YjjJ 誘導後の DNA および RNA 合成量の解析

pET-28a-yjjJ を含む *E. coli* BL21(DE3) を 600  $\mu$ l の MK 培地に植菌し、16 時間振盪培養を行った。10 ml の MK 培地に培養液を 100  $\mu$ l 添加し、O.D.<sub>600</sub> = 0.25~0.3 まで 37°C で振盪培養した。DNA 合成測定のために培養液を 20  $\mu$ l の [<sup>3</sup>H]-thymidine (Perkin Elmer)、80  $\mu$ l の thymidine (1 mg/ml、Fujifilm) および 0.1 mM IPTG を含む丸底プラスチックチューブにそれぞれ 1 ml 分注した。また、RNA 合成測定のために 20  $\mu$ l の [<sup>3</sup>H]-uridine (Perkin Elmer)、80  $\mu$ l の uridine (1 mg/ml、Fujifilm) および 10  $\mu$ l の 0.1 mM IPTG を含む丸底プラスチックチューブにそれぞれ 1 ml 分注した。その後、37°C で振盪培養し、YjjJ 誘導後の各時間の培養液 50  $\mu$ l をペーパーディスク (20 mm、3MM、GE healthcare) に吸い込ませた。ペーパーディスクを 10% trichloroacetic acid (TCA) 水溶液中で 30 分間静置後、新たな 10% TCA 溶液に移し、10 分間静置した。これを 2 回繰り返した後、ペーパーディスクを完全に乾燥させ、放射線量を液体シンチレーションカウンター TRI-CARB 2910TR (Perkin Elmer) を用いて測定した。

### 3-2-2 YjjJ 誘導後のタンパク質合成量の解析

3-2-1 で示した方法で得られた前培養液を 10 ml の MK 培地に 100  $\mu$ l 植菌し、O.D.<sub>600</sub> = 0.25~0.3 になるまで 37°C で振盪培養した。誘導剤としてそれぞれ終濃度 0.1 mM または 1 mM になるよう IPTG を添加した。誘導後各時間

の培養液 500  $\mu$ l を、2  $\mu$ l の [ $^{35}$ S]-methionine および 20  $\mu$ l の cold-methionine (50 mg/ml) を含む 1.5 ml マイクロチューブに添加し、37°C で 1 分間静置した。その後直ちに 50  $\mu$ l cold-methionine を添加し、50  $\mu$ l をペーパーディスクに吸い込ませ、全てのサンプルを処理するまで 10% TCA 溶液中で室温で静置した。その後 30 分間ボイルした後、3-2-1 と同様に処理し、放射線量を測定した。残りのサンプル (約 500  $\mu$ l) は、4°C、14,000 rpm、10 分間の遠心分離を行い、上清を取り除いた。得られた菌体は再び実験を行うまで -20°C で保管された。50  $\mu$ l の 1xSAB を加えて懸濁し、96°C、5 分間処理した後、10 秒間懸濁し、再び 96°C、5 分間処理したものを SDS-PAGE のサンプルとした。電気泳動後オートラジオグラフィーを行い、YjjJ 誘導後のタンパク質合成を解析した。

### 3-2-3 YjjJ 変異体の作製

#### 3-2-3-1 YjjJ S200A、S201A および D342N 変異体の作製

Overlap extension 法 (Higuchi et al., 1988) を用いて YjjJ S200A、S201A および D342N 変異体を作製した。まず、pET-28a-yjjJ を鋳型とし、Table 3-1 に示したプライマーを用いて PCR を行った。PCR はプレラン (94°C、5 分間) を行った後、DNA 変性 (94°C、30 秒間)、アニーリング (50°C、30 秒間)、DNA 伸長 (72°C、105 秒間) で 25 サイクルで行った (Table 3-2)。得られた増幅産物を精製し、30 倍希釈した増幅 DNA を鋳型、T7-Fw および T7-Rv をプライマーとして PCR を行った (Table 3-3)。サイクル条件はプレラン (94°C、3 分間) を行った後、DNA 変性 (94°C、30 秒間)、アニーリング (50°C、30 秒間)、DNA 伸長 (72°C、90 秒間) で 30 サイクル行った。得られた増幅産物を精製

Table 3-1. PCR primer 組み合わせ

S200A-Fw	T7-Rv
S200A-Rv	T7-Fw
S201A-Fw	T7-Rv
S201A-Rv	T7-Fw
D342N-Fw	T7-Rv
D342N-Rv	T7-Fw
N10-Fw	T7-Rv
N38-Fw	T7-Rv
S200E-Fw	S200E-Rv
S200D-Fw	S200D-Rv

Table 3-2. Mutation PCR 反応液

10xEx Taq buffer	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTP	4 $\mu$ l
pET28a- <i>yjjJ</i>	50 ng
100 $\mu$ M Forward-primer	1 $\mu$ l
100 $\mu$ M Reverse-primer	1 $\mu$ l
Takara Ex Taq (5 units/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	Up to 50 $\mu$ l

Table 3-3. Overlap extension PCR 反応液

10 x Ex Taq buffer	10 $\mu$ l
2.5 mM dNTP	8 $\mu$ l
100 pmol/ $\mu$ l T7-Fw	1 $\mu$ l
100 pmol/ $\mu$ l T7-Rv	1 $\mu$ l
Takara Ex Taq (5 units/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Insert Fw DNA 断片	100 pg
Insert Rv DNA 断片	100 pg
dH <sub>2</sub> O	Total volume 100 $\mu$ l

し、*NdeI* および *EcoRI* 処理を行い、再度精製した後に得られた目的遺伝子を含む DNA を使用し、変異 *yjjJ* 遺伝子を含むプラスミドを得た。

### 3-2-3-2 YjjJ S200D および S200E 変異体の作製

PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara Bio) を用いて YjjJ S200D および S200E 変異体を作製した。まず、pET-28a-*yjjJ* を鋳型とし、Table 3-1 に示したプライマーを用いて PCR を行った (Table 3-4)。PCR はプレラン (98°C、1 分間) を行った後、DNA 変性 (98°C、10 秒間)、アニーリング および DNA 伸長 (68°C、7 分間) で 30 サイクルで行った (Table 3-2)。得られた増幅産物に *DpnI* を添加して 37°C で 1 時間処理したものをを用いて 2-2-4 の方法に従って *E. coli* DH5 $\alpha$  を形質転換した。

### 3-2-3-3 YjjJ N10 および N38 変異体の作製

pET-28a-*yjjJ* を鋳型として、Table 3-1 に示したプライマーおよび Ex Taq DNA polymerase を用いて PCR を行った (Table 3-3)。サイクル条件は、プレラン (94°C、3 分間) を行った後、DNA 変性 (94°C、30 秒間)、アニーリング (55°C、30 秒間)、DNA 伸長 (72°C、90 秒間) を 25 サイクル行い、得られた増幅産物に *DpnI* を添加して 37°C で 1 時間処理したものをを用いて 2-2-4 の方法に従って *E. coli* DH5 $\alpha$  を形質転換することで YjjJ N10 および N38 変異体の発現プラスミドを得た。

Table 3-4. One step mutation PCR 反応液

5 × PrimeSTAR buffer	10 $\mu$ l
2.5 mM dNTP	4 $\mu$ l
pET28a- <i>yjjJ</i>	100 ng
Forward-primer	10 pmol
Reverse-primer	10 pmol
Prime STAR DNA polymerase (2.5 units/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	Total volume 50 $\mu$ l

### 3-2-4 YjjJ 変異体の *E. coli* の生育に与える影響

3-2-3 で構築した各 YjjJ 変異体発現プラスミドを用いて *E. coli* BL21(DE3) を形質転換し、得られた形質転換体を 600  $\mu$ l MK 培地で 12 時間培養した。その後、培養液を 0.05 mM IPTG を含む MK 寒天培地に画線塗抹し、37°C で 12 時間培養後の *E. coli* の生育を測定した。

### 3-2-5 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP を用いた HipA、YjjJ および YjjJ 変異体の自己リン酸化の検出

YjjJ、HipA、および YjjJ 変異体 (S200A、S201A および D342N) の自己リン酸化を [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP を用いて検出した。YjjJ 変異体タンパク質は、PrS との融合タンパク質として 2-2-12 の方法に従って調製した。Table 3-5 に示した反応系で、37°C で 30 分間反応させた後、5xSAB を 5  $\mu$ l 添加して反応を停止させ、98°C、10 分間熱処理した。その後、15% のアクリルアミドゲルで電気泳動後 CBB 染色を行った。染色後、乾燥させたゲルをイメージングプレートに挟み込み、FLA 3000 (FUJIFILM) を用いてリン酸化されたタンパク質を検出した。

### 3-2-6 YjjJ の DNA 結合能解析

*E. coli* MG1655 の gDNA (50 ng) を、精製した PrS、PrS-YjjJ および PrS-YjjJ 変異体と Table 3-6 に示した反応液中で混合し、氷上で 30 分間静置した。その後、15  $\mu$ l の反応液を 2  $\mu$ l の 50% グリセロールと混合し、0.7% アガロースゲルに供した。コントロールとして PrS-YjjJ タンパク質の代わりに PrS

Table 3-5. リン酸化検出反応液

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	0.375 $\mu$ l
100 mM MgCl <sub>2</sub>	1 $\mu$ l
66 nM [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP in 1 mM ATP solution	4 $\mu$ l
16 $\mu$ M PrS or 1.6 $\mu$ M PrS-YjjJ	12.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	Total volume 20 $\mu$ l

Table 3-6. DNA binding assay

	0.2 M Tris-HCl (pH 8.0)	1.5 M NaCl	gDNA	PrS	PrS-YjjJ or YjjJ mutants
Lean 1	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ g	-	-
Lean 2	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ g	1 mM	-
Lean 3	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ g	-	0.09 mM
Lean 4	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ g	-	0.16 mM
Lean 5	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ g	-	0.32 mM
Lean 6	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ g	-	0.7 mM
dH <sub>2</sub> O	Total volume 20 $\mu$ l				

タンパク質を 1 nmol 用いた。1 x TBE buffer (Table 3-7) で 120 V、室温で 60 分間電気泳動後、ゲルを GelRed で染色し、gDNA を観察した。

### 3-2-7 YjjJ の DNA 結合配列の解析

#### 3-2-7-1 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 法

ランダム DNA プールとして、20 bp のランダムな DNA 配列の 5'- および 3'-側にそれぞれ BamHI 切断配列を付加し、その外側に T7 primer の Fw および Rv 配列を付加したオリゴ DNA (Selex oligo) を用いた (Table 2-3)。Klenow 反応液 (Table 3-8) を用いて、NEB のプロトコールに従って Selex oligo から 2 本鎖 DNA を調製した (SELEX dsDNA)。得られた SELEX dsDNA はエタノール沈殿後、TE buffer で保存した。100 pmol の SELEX dsDNA に PrS-YjjJ をモル比が 1 : 1 になるように混合し、150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 中で 30 分間静置した。その後 Ni-NTA agarose (50% slurry) を 20  $\mu$ l 加えた。担体を洗浄後 200  $\mu$ l の SELEX elution buffer [20mM Tris HCl (pH 8.0)、20mM EDTA] で PrS-YjjJ-DNA 複合体を溶出し、溶出液を 10 分間、100°C で熱処理後、エタノール沈殿で DNA を回収した (SELEX DNA sol.)。得られた SELEX DNA sol. を鋳型として Table 3-9 の条件で PCR を行い、YjjJ に結合した DNA を増幅して次の DNA プールとして使用した。この操作を 15 回繰返した後に得られた DNA 断片を BamHI で処理後 pUC19 にクローニングし、20 サンプルのシーケンスを確認した。

Table 3-7. TBE buffer

Tris	24.2 g
Boric acid	1.48 g
EDTA	12.36 g
dH <sub>2</sub> O	Total volume 1 l

pH 8.0 に HCl で 調整

Table 3-8. Klenow 反応溶液

100 μM Selex oligo	5 μl
100 μM T7 Rv primer	7.5 μl
2.5 mM dNTP mix	4 μl
10 x Klenow buffer	5 μl
dH <sub>2</sub> O	26.5 μl

Table 3-9. SELEX-PCR 反応溶液

10xTaq buffer	10 μl
2 mM dNTPs	8 μl
100 pmol/μl T7-Fw	1 μl
100 pmol/μl T7-Rv	1 μl
SELEX DNA sol.	2 μl
Taq DNA Polymerase	1 μl
dH <sub>2</sub> O	Total volume 100 μl

### 3-2-7-2 ゲルシフト法

3-2-7-1 で調製した SELEX dsDNA を [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (Perkin Elmer) および T4 kinase と混合し (Table 3-10)、37°C で 1 時間反応させた。その後 Centri-Spin 20 SC-201 カラム (ナカライテスク) を用いて [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP を除去し、5'-末端が  $^{32}\text{P}$  で標識された SELEX dsDNA を得た。得られた SELEX dsDNA (20 pmol/ $\mu\text{l}$ ) を PrS-YjjJ とモル比で 1:1 になるように混合し、氷上で 30 分間静置した。そのうち 12.5  $\mu\text{l}$  を 1  $\mu\text{l}$  の 50% グリセロールと混合し、8% 非変性ポリアクリルアミドゲルに供した。1 x TBE buffer で 100 V、60 分間、室温で電気泳動を行った。ゲルを Ziploc® (旭化成) に入れて密閉し、イメージングプレートを用いて  $^{32}\text{P}$  で標識された DNA を検出した。PrS-YjjJ によって移動度が変化した DNA を切り出し、TE buffer 中で Power Masher (Nippi) を用いて破碎し、37°C で 5 時間インキュベートした。その後 10,000 r.p.m. で 1 分間遠心分離を行い、得られた上清からエタノール沈殿により DNA を回収した。得られた DNA を PCR で増幅し、次の DNA プールとして用いた。これを 2 回繰り返し、3-2-7-1 に示した方法で解析した。

### 3-2-8 オリゴヌクレオチドと PrS-YjjJ の解離定数の測定

SELEX で同定された配列を含む ssDNA、dsDNA、ssRNA、および dsRNA を調製し、ゲルシフト法を用いてそれぞれのヌクレオチドに対する PrS-YjjJ の結合解離定数を推定した。精製した PrS (2000 nM) または PrS-YjjJ (50、100、200、400、1000 または 2000 nM) および 250 nM のオリゴヌクレオチドを 150 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer 中で混合し、4°C で 30

Table 3-10. DNA phosphorylation 反応溶液

DNA (20 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10 x T4 kinase buffer	2 $\mu$ l
T4 kinase	1 $\mu$ l
[ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (10 mCi/ml)	3 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	13 $\mu$ l

分間静置した。その後、混合液を 4% の非変性アクリルアミドゲルに供して電気泳動を行い、ゲルを GelRed で染色して DNA を可視化した。DNA 量は ImageJ を用いて定量した。

PrS-YjjJ (L) と、ヌクレオチド (P) との相互作用を式 1 に示した。



$K_d$  は解離定数を示し、各濃度を用いて表すと、式 2 のように示すことができる。

$$K_d = [P][L]/[PL] \quad \text{式 2}$$

[ ]内は濃度を示す。

YjjJ ( $[L]_0$ ) とヌクレオチド ( $[P]_0$ ) の濃度は式 3 および式 4 に示すように、それぞれの遊離濃度に依存する。

$$[L]_0 = [L]/[PL] \quad \text{式 3}$$

$$[P]_0 = [P]/[PL] \quad \text{式 4}$$

式 2~4 を用いて、二次方程式の解の公式より  $[PL]$  は式 5 と表せる。

$$[PL] = \frac{([P]_0 + [L]_0 + K_d) - \sqrt{([P]_0 + [L]_0 + K_d)^2 - 4[P]_0[L]_0}}{2} \quad \text{式 5}$$

式 5 を用いて解離定数  $K_d$  を推定した。

## 第 3 節 結果

### 3-3-1 YjjJ の自己リン酸化

YjjJ は HipA と同様 PI 3/4-kinase superfamily によくみられるキナーゼ活性に重要なコアの中にある 11 つのモチーフのうち 6 つを有していた (Fig. 3-1A)。このことから YjjJ はキナーゼ活性を有すると考えられた。HipA の自己リン酸化残基およびキナーゼ活性に重要なアミノ酸残基である Ser150 および Asp309 (Correia et al., 2006) が YjjJ にも Ser200 または Ser201 および Asp342 として、それぞれ保存されていることを見出した (Fig. 3-1A)。また、生体内における網羅的な *E. coli* のリン酸化タンパク質の解析において、YjjJ の Ser200 のリン酸化が検出されている (Macek et al., 2008)。以上の結果から、YjjJ は HipA と同様に自己リン酸化することが示唆された。そこで、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  を用いて YjjJ のリン酸化を解析した。PrS、PrS-YjjJ および HipA を  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  と混合し、37°C で 30 分間静置後、オートラジオグラフィーで YjjJ の自己リン酸化を解析した。その結果、CBB 染色ではすべてのタンパク質が予想される分子量の位置に検出されたが、オートラジオグラフィーでは HipA および YjjJ のみが検出された (Fig. 3-1)。よって、HipA と同様に YjjJ は自己リン酸化することが明らかとなった。

### 3-3-2 YjjJ の自己リン酸化に関与するアミノ酸残基の同定

HipA の自己リン酸化部位および活性中心のアミノ酸残基から (Correia et al., 2006)、YjjJ の 200 番目または 201 番目の Ser 残基がリン酸化部位、342 番

(A)

		motif 1	(gap)	motif 2	(gap)	motif 3	(gap)	motif 4
HipA	147	FRISVAGAQEKTALLRI	11	P <sup>T</sup> THII <sup>K</sup> LPIGEI	9	SQSVDNEYCYCLLLAKELGL	0	NVPDAEII
YjjJ	198	VGSSAGGEQPKFTYYAQ	4	NKHVLV <sup>K</sup> FTVPQQ	7	GDLLIAESIAAQILRDGGI	0	HAIESTVL
	(gap)	motif 6		(gap)	motif 7			
HipA	68	RYDFMKFQVFQWLI <sup>G</sup> ATD <sup>G</sup> HAKNFSVFI	6	RLTPFY <sup>D</sup> IISAF	337			
YjjJ	59	VAQTEVIWAFGRLIANS <sup>D</sup> MHAGNLSFYI	5	ALTPVY <sup>D</sup> MPLMV	369			

(B)

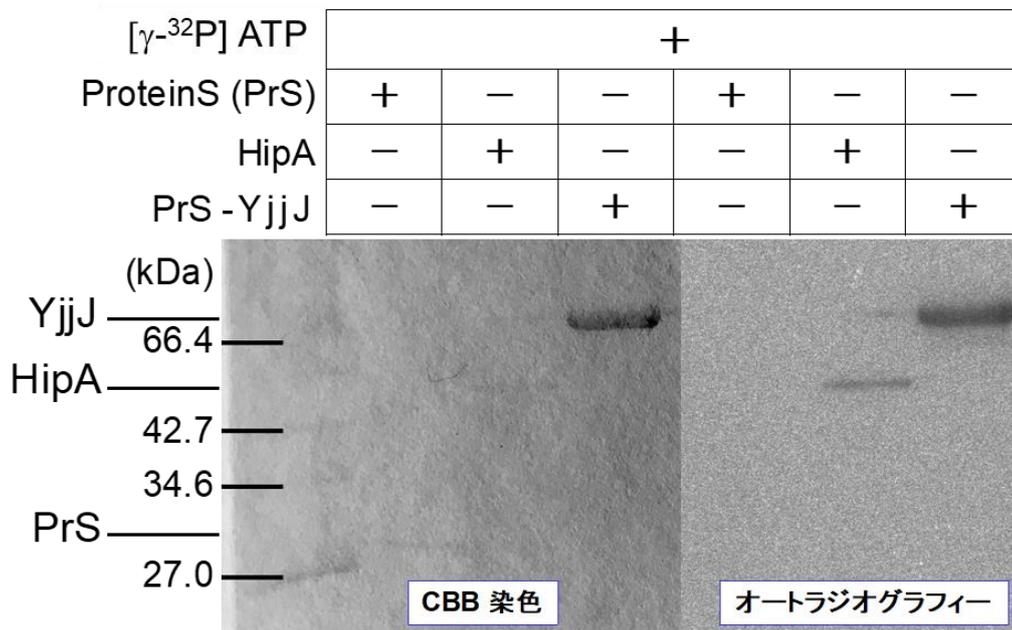


Fig. 3-1. YjjJ における自己リン酸化

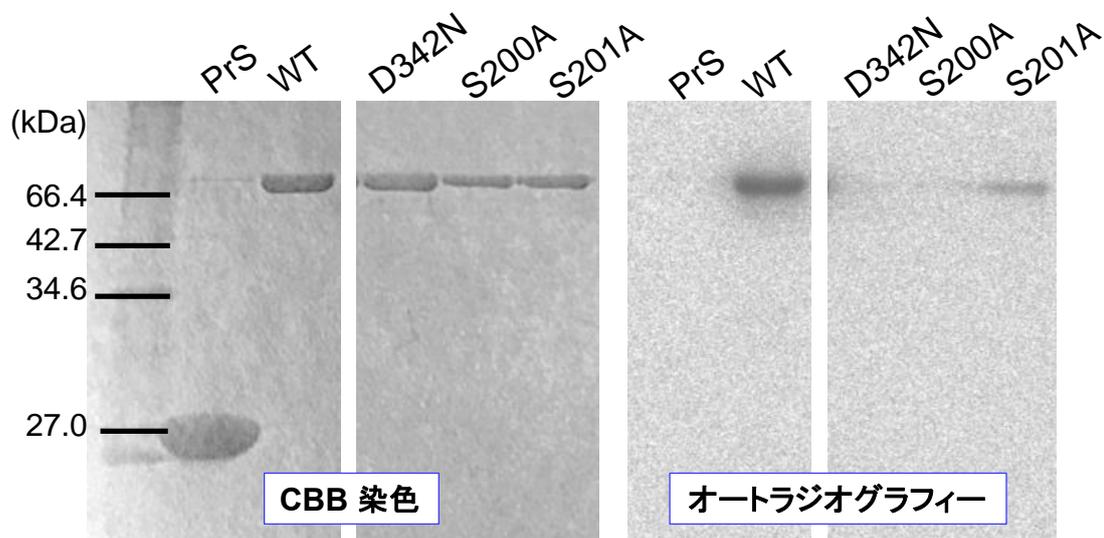
(A) HipA および YjjJ におけるキナーゼコア部分のマルチプルアライメント。配列の最初と最後の数字はそれぞれ残基の位置を、アライメント内の数字はモチーフ外のインサートの長さを示す。配列の上に示されている motif は以前報告された PI 3/4 kinase family における保存モチーフを記載する(Macek et al., 2008)。PI 3/4 kinase family によく保存されている機能的に重要な残基は太字で、自己リン酸化の標的と考えられる残基は青で、触媒残基はバックを黄色で示す。

(B) YjjJ の自己リン酸化の解析。精製した HipA および YjjJ タンパク質を [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP と混合し、37°C で 30 分間反応させた後に 5xSAB を 5  $\mu\text{l}$  添加し、98°C で 10 分間熱処理した。その後、15% のアクリルアミドゲルで電気泳動後 CBB 染色を行った。乾燥させたゲルをイメージングプレートに挟み込み、オートラジオグラフィーを用いてリン酸化タンパク質を検出した。

目の Asp 残基が自己リン酸化触媒部位であると推測された (Fig. 3-1A)。そこで、これらのアミノ酸残基をアラニンまたはアスパラギンに置き換えた変異体 (YjjJ S200A、S201A および D342N) を作製し、各変異体における自己リン酸化を解析した。その結果、野生型の YjjJ および S201A では YjjJ のリン酸化が検出されたが、S200A および D342N 変異体では検出されなかった (Fig. 3-2)。よって、200 番目の Ser 残基が自己リン酸化部位、342 番目の Asp 残基が自己リン酸化触媒部位であることが示唆された。

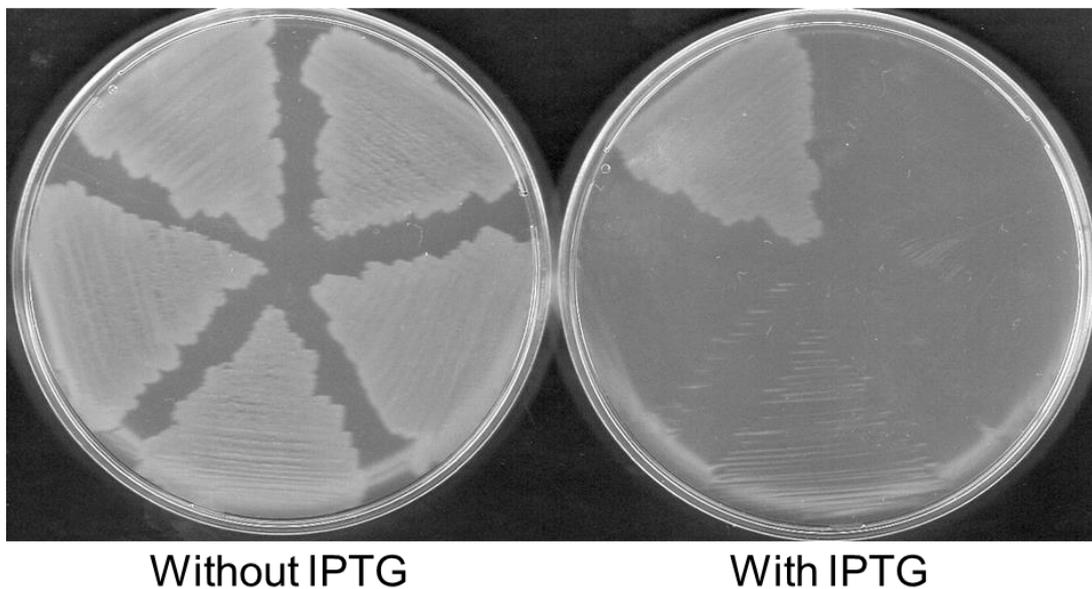
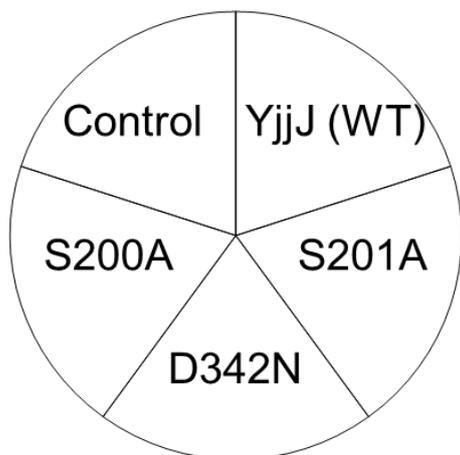
### 3-3-3 YjjJ の自己リン酸化が *E. coli* の生育に与える影響

YjjJ の自己リン酸化が *E. coli* の生育へ与える影響を YjjJ 変異体を用いて解析した。各変異体の発現ベクターを有する *E. coli* BL21(DE3) を 0.05 mM または 0.1 mM IPTG 存在下および非存在下で培養した。その結果、いずれの *E. coli* の生育も IPTG 存在下で阻害された (Fig. 3-3 および 3-4)。よって、自己リン酸化されない YjjJ S200A および D342N 変異体の発現は、YjjJ WT と同様に *E. coli* の生育を阻害することが明らかとなった。以上の結果から、YjjJ のキナーゼ活性は生育阻害活性に関与しないことが示唆された。また、疑似自己リン酸化変異体である S200E および S200D の発現においても *E. coli* の生育阻害が見られた (Fig. 3-4)。よって、リン酸化された YjjJ は生育阻害活性を保持することが示唆された。



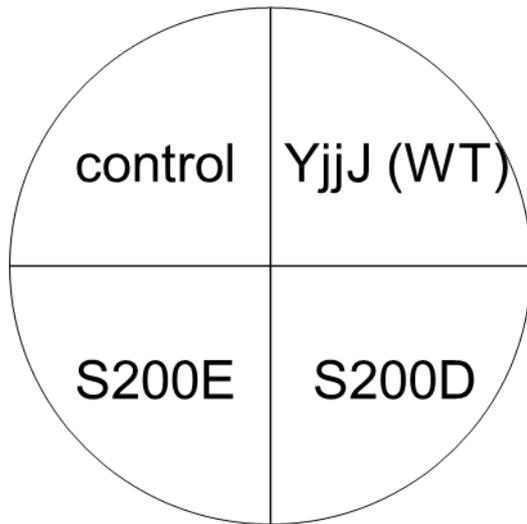
**Fig. 3-2. YjjJ の自己リン酸化に関与するアミノ酸残基の同定**

PrS、YjjJ および YjjJ 変異体のオートラジオグラフィー。精製した YjjJ S200A、S201A および D342N の自己リン酸化を  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  を用いて検出した。各精製タンパク質を  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  と混合し、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた後、 $5\times\text{SAB}$  を  $5\ \mu\text{l}$  添加し  $98^\circ\text{C}$ 、10 分間熱処理した。その後、15% のアクリルアミドゲルで電気泳動後 CBB 染色を行った。乾燥させたゲルをイメージングプレートに挟み込み、オートラジオグラフィーを用いてリン酸化タンパク質を検出した。



**Fig. 3-3. YjjJ S200A、S201A および D342N 変異体が *E. coli* の生育に与える影響**

pET-28a、pET-28a-yjjJ、pET-28a-yjjJ S200A、pET-28a-yjjJ S201A、および pET-28a-yjjJ D342N を有する *E. coli* BL21(DE3) を MK-Gly で培養した。その後、培養液を 0.1 mM IPTG を含む M9 寒天培地に画線塗抹し、37°C で 12 時間培養した。



Without IPTG

With IPTG

**Fig. 3-4. YjjJ S200E および S200D 変異体が大腸菌の生育に与える影響**

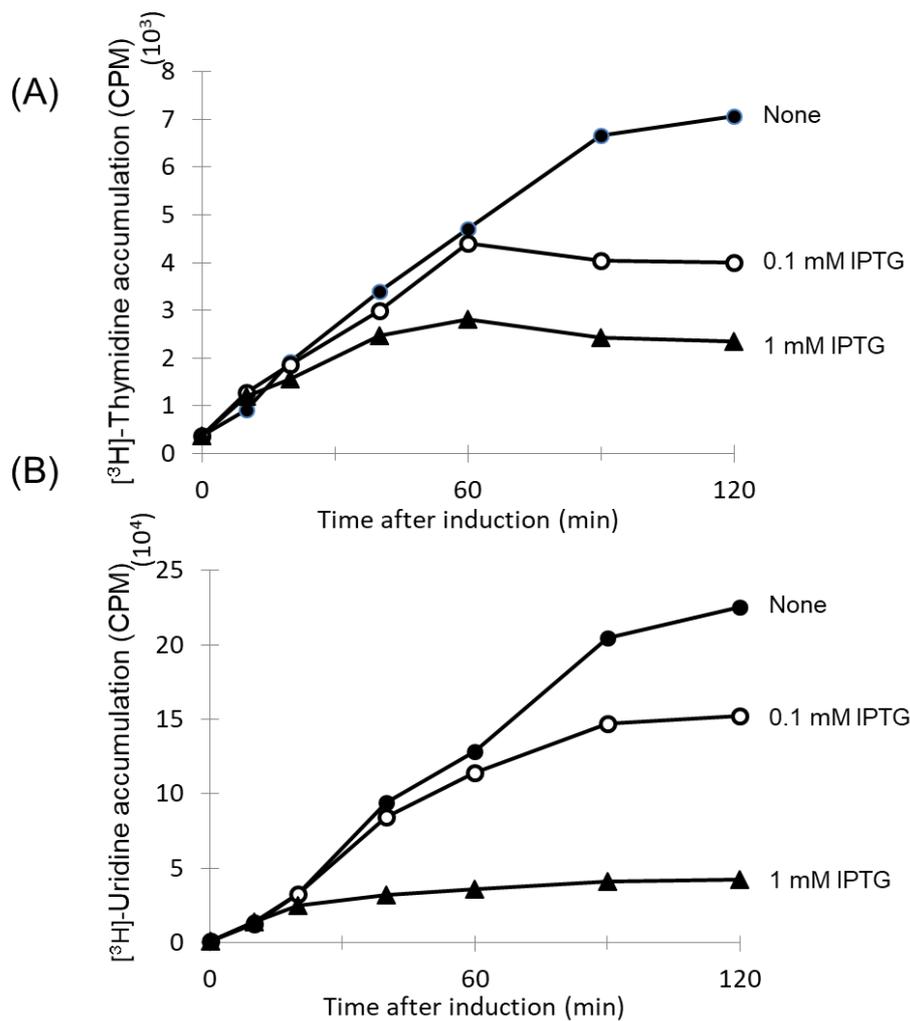
pCold-PrS、pCold-PrS-*yjjJ*、pCold-PrS-*yjjJ*(S200E) および pCold-PrS-*yjjJ*(S200D) を有する *E. coli* BL21 (DE3) を 0.05 mM IPTG を含む M9 寒天培地に画線塗抹し、37°C で 12 時間培養した。

### 3-3-4 YjjJ 誘導後の DNA および RNA 合成量の測定

細胞内標的を絞り込むために、YjjJ 誘導後の *in vivo* における DNA および RNA 合成量を [<sup>3</sup>H]-thymidine または [<sup>3</sup>H]-uridine を用いて解析した。その結果、YjjJ を誘導後、DNA 複製は 60 分後には完全に阻害されたのに対し、RNA 合成は 60 分後から緩やかに抑制された。また、1 mM IPTG 存在下では、YjjJ を誘導後 20 分で RNA 合成が、40 分後に DNA 合成が完全に阻害された (Fig. 3-5A および B)。以上の結果から、YjjJ の発現は DNA および RNA 合成を阻害することが示された。

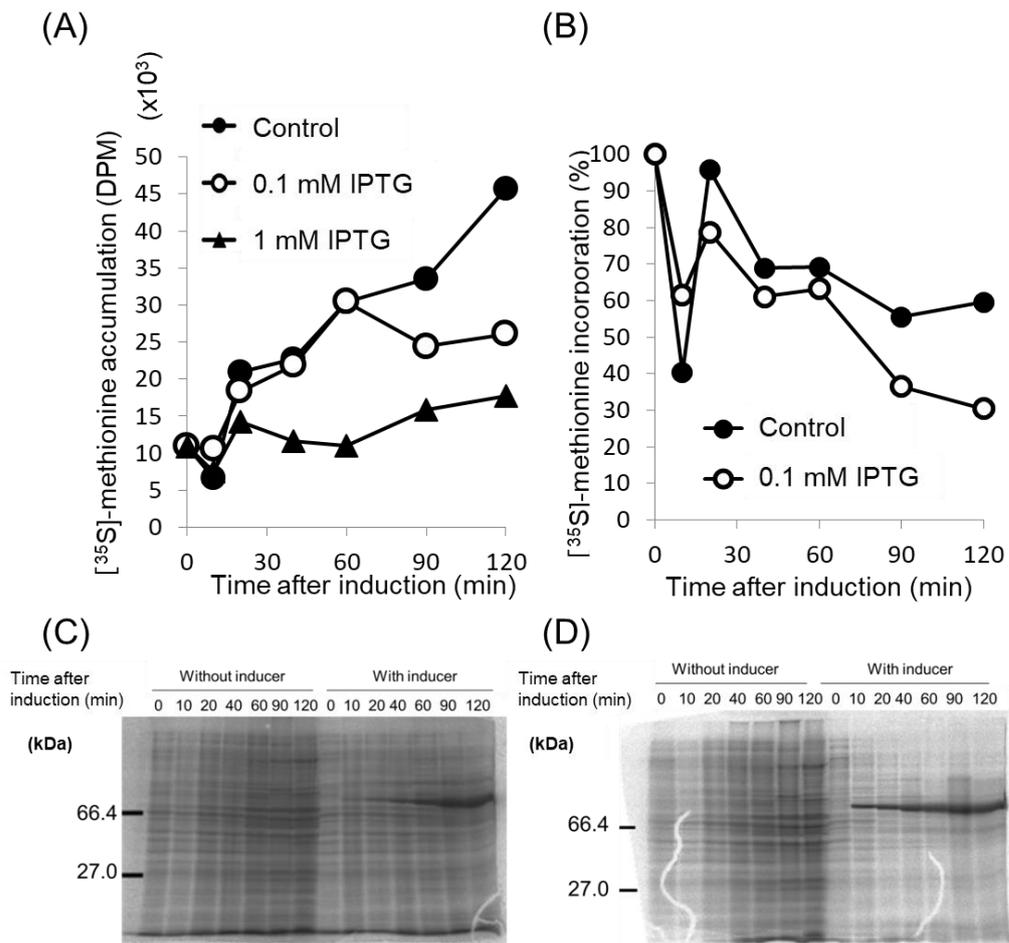
### 3-3-5 YjjJ 誘導後のタンパク質合成量の測定

[<sup>35</sup>S]-methionine を用いたパルスラベル法により YjjJ 誘導後のタンパク質合成量を解析した。誘導剤として終濃度 0.1 mM または 1 mM IPTG を添加後、各時間での標識されたタンパク質量を測定し、オートラジオグラフィーを行った。0.1 mM および 1 mM IPTG 存在下で YjjJ を誘導した結果、誘導 90 分後および誘導 40 分後からタンパク質合成量が一定となったが、顕著な阻害は確認されなかった (Fig. 3-6A および B)。各時間でのタンパク質発現をオートラジオグラフィーで解析した結果、YjjJ 誘導後のタンパク質合成量はコントロールと比べて減少した (Fig. 3-6C および D)。以上、3-3-4 および 3-3-5 の結果から、YjjJ の標的は DNA 合成であることが示唆された。



**Fig. 3-5. YjjJ 誘導が DNA 複製および RNA 合成に与える影響**

(A) YjjJ 誘導後の [3H]-thymidine の取り込み量。pET-28a-yjjJ を有する *E. coli* BL21(DE3) を MK-Gly で O.D.<sub>600</sub> = 0.3 まで培養し、[3H]-thymidine および IPTG を添加した。その後の菌体内の DNA に取り込まれた [3H]量を継時的に解析した。(B) YjjJ 誘導後の [3H]-uridine の取り込み量。[3H]-thymidine の代わりに [3H]-uridine を用いて (A) と同様の実験を行い、菌体内の RNA に取り込まれた [3H]量を継時的に解析した。



**Fig. 3-6. YjjJ の誘導がタンパク質合成に与える影響**

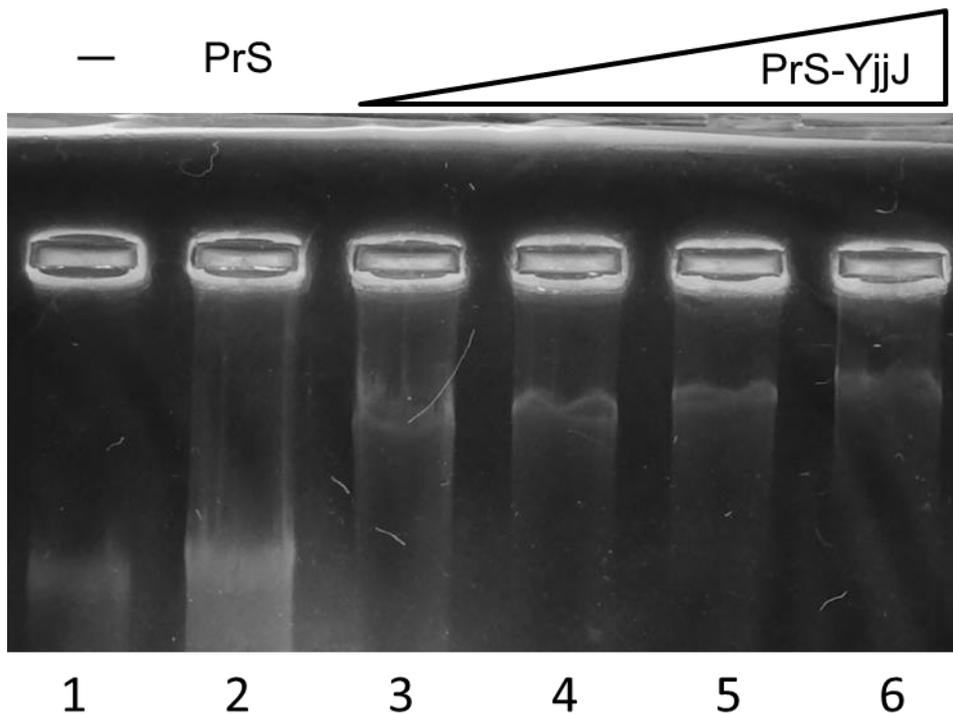
(A) YjjJ 誘導後のタンパク質合成量。pET-28a-yjjJ を有する *E. coli* BL21 (DE3) を MK-Gly で O.D.<sub>600</sub> = 0.3 まで培養し、<sup>35</sup>S]-methionine および IPTG を添加した。その後の菌体内のタンパク質に取り込まれた <sup>35</sup>S]量を継時的に解析した。(B) YjjJ 誘導後の各時間における 1 分間当たりのタンパク質合成量。(A) と同様に培養した大腸菌を用いて IPTG 添加後パルスラベル方を用いて 1 分間当たりのタンパク質合成量を解析した。(C) および (D) 0.1 mM および 1 mM IPTG による YjjJ 誘導後のパルスラベルによるタンパク質合成解析。パルスラベルされた大腸菌のタンパク質を SDS-PAGE およびオートラジオグラフィーを用いて解析した。

### 3-3-6 YjjJ の DNA 結合能の解析

これまでの結果から、YjjJ の標的は DNA であることが示唆された。また配列解析の結果、YjjJ は N 末端領域 (10-35 aa) に DNA 結合ドメインである HTH モチーフを有することが明らかとなった (Fig. 2-2)。そこで YjjJ と DNA の結合を解析した。*E. coli* MG1655 の gDNA および PrS-YjjJ タンパク質を混合した後、アガロースゲルを用いた電気泳動を行った。その結果、PrS を添加した gDNA はタンパク質無添加の gDNA と全く同じ移動度であったが、YjjJ を添加した gDNA では移動度が大幅に遅れることが明らかとなった (Fig. 3-7)。よって、YjjJ は DNA 結合能を有することが示された。

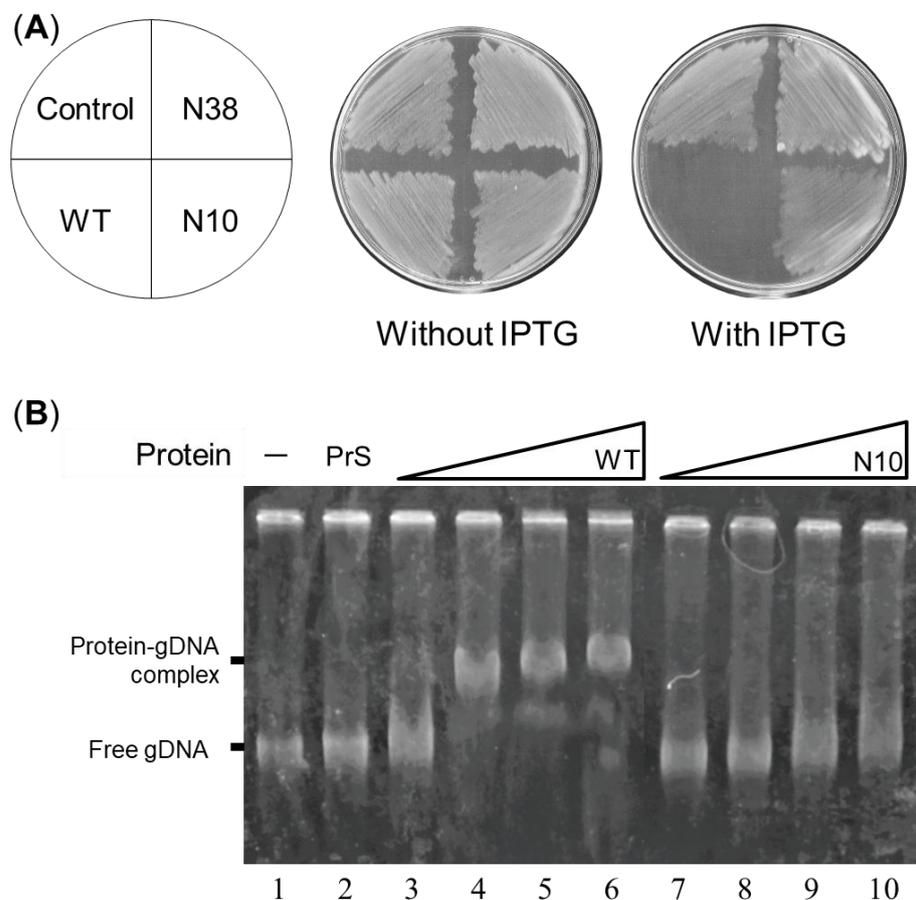
### 3-3-7 N 末端欠失 YjjJ 変異体の *E. coli* の生育への影響

N 末端領域に存在する DNA 結合モチーフの機能を解析するために、N 末端から 10 アミノ酸および 38 アミノ酸残基欠失した YjjJ 変異体、N10 および N38 を作製した。これら変異体を発現した後の *E. coli* の生育を解析した。その結果、N10 および N38 変異体の発現は、*E. coli* の生育を阻害しなかった (Fig. 3-8A)。またこれらの菌をかきとり、SDS-PAGE によって WT と同様に目的タンパク質が発現していることを確認した。よって、YjjJ の DNA 結合能は生育阻害活性に必須であることが示唆された。



**Fig. 3-7. PrS-YjjJ の genomic DNA との結合**

*E. coli* MG1655 の gDNA (200 ng) および PrS-YjjJ を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl 反応液中で混合し、0.7% agarose gel (TBE buffer) で電気泳動を行った。レーン 1, gDNA のみ、レーン 2, 200ng gDNA および 0.5 mM Protein S (PrS)、レーン 3-6, 200 ng gDNA および 0.09、0.16、0.32 または 0.7 mM PrS-YjjJ タンパク質をそれぞれ加えた。



**Fig. 3-8. YjjJ の N 末端欠失による大腸菌の生育および DNA 結合への影響**

(A) N 末端欠失変異体が大腸菌の生育に与える影響。 pET-28a、pET-28a-yjjJ、pET-28a-yjjJ N10 および pET-28a-yjjJ N38 を有する *E. coli* BL21 (DE3) を 0.05 mM IPTG を含む MK 寒天培地に画線塗抹し、37°C で 12 時間培養した。

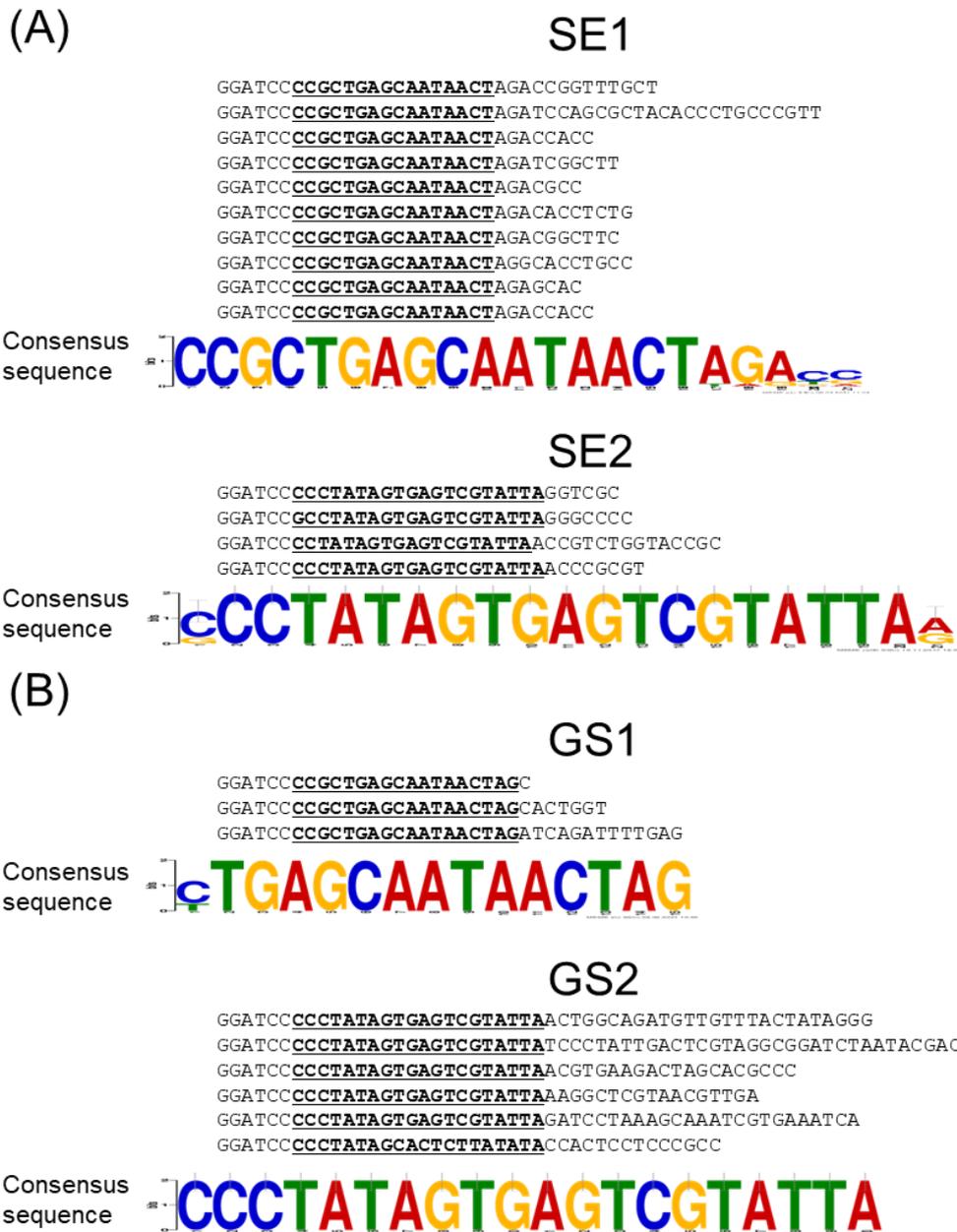
(B) YjjJ N10 の genomic DNA への結合への影響。 *E. coli* MG1655 のゲノム DNA (200 ng) および YjjJ 変異体を混合し、電気泳動を行った。レーン 1, gDNA のみ、レーン 2, 200ng gDNA および 0.5 mM PrS、レーン 3-6, 200 ng gDNA および 0.09, 0.16, 0.32 または 0.7 mM PrS-YjjJ、レーン 7-10, 200 ng gDNA および 0.09, 0.16, 0.32 または 0.7 mM PrS-YjjJ N10 変異体をそれぞれ混合した。

### 3-3-8 YjjJ N10 変異体の DNA 結合能解析

YjjJ N10 変異体の DNA 結合能を解析した。YjjJ N10 タンパク質は YjjJ WT と同様に PrS との融合タンパク質として発現し、調製した。精製した YjjJ N10 を gDNA と混合し、電気泳動を行った結果、野生型の YjjJ に比べ N10 変異体は DNA 結合能が著しく低下していた (Fig. 3-8B)。3-3-7 で示されたように、YjjJ N10 の発現は *E. coli* の生育を阻害しなかったことから、YjjJ による *E. coli* の生育阻害には DNA 結合が必須であることが示唆された。

### 3-3-9 YjjJ における DNA 結合配列の同定

SELEX 法およびゲルシフト法を用いて、DNA 結合配列の同定を行った。その結果、SELEX 法によって 5'-CCGCTGAGCAATAACTAGACCC-3' (SE1) および 5'-CCCTATAGTGAGTCGTATTAA-3' (SE2) の 2 種類、ゲルシフト法によって 5'-CCGCTGAGCAATAACTA-3' (GS1) および 5'-CCCTATAGTGAGTCGTATTAA-3' (GS2) の 3 種類のコンセンサス配列が得られた (Fig. 3-9A および B)。SELEX 法およびゲルシフト法で得られた配列を比較した結果、SE 1 に GS 1 が、SE 2 に GS 2 が内包されていたため、SE 1 または SE 2 の 5'末端に *Bam*HI 認識配列を付加し、さらにそれぞれの末端に解析のために G または C を付加して長さを調節したものを結合配列 J1 5'-GGGATCCCCGCTGAGCAATAACTAGACCC-3' J1、または結合配列 J2 5'-GGGATCCCCCTATAGTGAGTCGTATTACCC-3' (J2) とした。



**Fig. 3-9. YjjJ における DNA 結合配列の同定**

(A) SELEX 法および (B) ゲルシフト法を用いて推測された YjjJ 結合配列。得られた配列から Motif Analysis of Large Nucleotide Datasets (<http://meme-suite.org/index.html>) を使用してコンセンサス配列を解析した。縦軸はその塩基の存在比率を表す。

### 3-3-10 同定された配列を含むヌクレオチドと YjjJ の結合

SELEX 法およびゲルシフト法で推定された配列を含むオリゴヌクレオチドに対する PrS-YjjJ の結合を調べた。その結果、YjjJ は J1 および J2 配列を含む二本鎖 DNA (dsDNA) に結合することが示された (Fig. 3-10)。次に、ゲルシフト法を用いて J1 および J2 と YjjJ の解離定数 ( $K_d$ ) をそれぞれ測定した。その結果、J1 および J2 dsDNA と PrS-YjjJ の解離定数はそれぞれ 300 nM であった (Table 3-11)。次に J1 および J2 配列を含む一本鎖 DNA、RNA、二本鎖 RNA および DNA/RNA ハイブリットヌクレオチドを用いて YjjJ との解離定数を求めた。その結果、dsDNA 以外のすべてのヌクレオチドとの解離定数は 2  $\mu$ M 以上であった (Table 3-11)。また J1 および J2 配列を含まない dsDNA との解離定数は 800 nM であった。以上の結果から、PrS-YjjJ は結合配列に特異的な傾向がある dsDNA 結合タンパク質であることが示された。

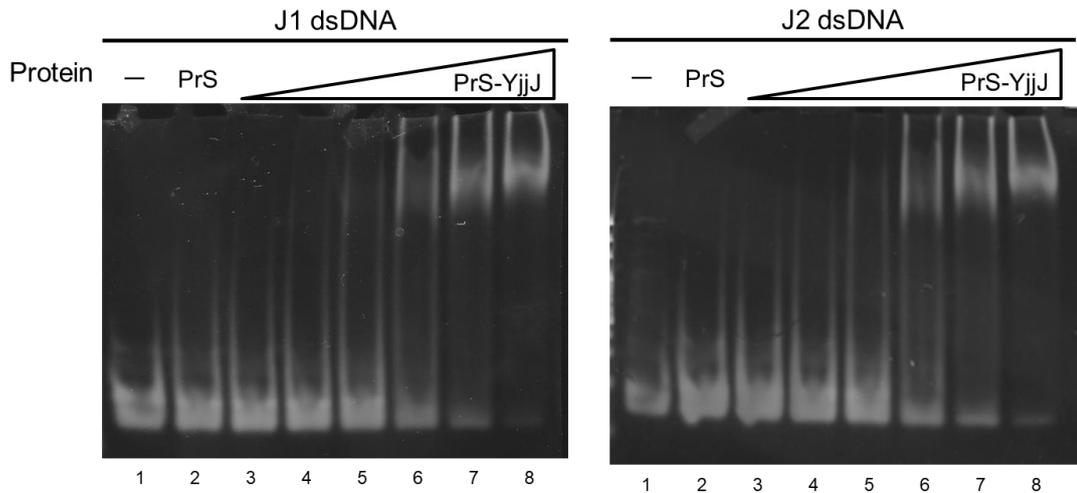
これらの特異的な配列が *E. coli* のゲノム DNA に存在する位置を Find Individual Motif Occurrences (FIMO) (Grant et al., 2011) を用いたモチーフ検索によって探索した。その結果、*E. coli* のゲノム上に J1 の配列モチーフを一部含む配列は 355 箇所、J2 の配列モチーフを一部含む配列は 693 箇所に存在した。これらの中から、ORF の開始コドンからおよそ 100 bp 上流までに結合配列モチーフが存在する遺伝子で、 $p$ -value が  $4 \times 10^{-6}$  以下のものを選抜した。その結果、7 遺伝子が該当した (Table 3-12)。以上の結果から、YjjJ は、複数の特定の遺伝子の転写を調節することで生育を阻害する可能性が示された。

Table 3-11. PrS-YjjJ および様々なヌクレオチド間の解離定数

使用したオリゴヌクレオチド		$K_d$ , $\mu\text{M}$
J1	dsDNA	0.3
	ssDNA (Fw)	>2
	ssDNA (Rv)	>2
	dsRNA	>2
	ssRNA (Fw)	>2
	ssRNA (Rv)	>2
	DNA-RNA hybrid	>2
	RNA-DNA hybrid	>2
	J2	dsDNA
ssDNA (Fw)		>2
ssDNA (Rv)		>2
dsRNA		>2
ssRNA (Fw)		>2
ssRNA (Rv)		>2
DNA-RNA hybrid		>2
RNA-DNA hybrid		>2
<i>mqsRA</i> P1	dsDNA	0.8

Table 3-12. *E.coli* gDNA における PrS-YjjJ が結合する可能性がある配列

J 1 (GGGATCCCCGCTGAGCAATAACTAGACCC)			
Matched sequence (5' to 3')	Localization from AUG	Gene name	Gene function
GTCATCCTCGCTGAGGATCAACTATCGCA	-55	<i>aroF</i>	DAHP 合成酵素 芳香族アミノ酸の合成酵素
GGGATACGCGCTGGCGAATCGCTAAACTA	-69	<i>gpr</i>	解糖系に関する酵素
GGTTTCCCGGGTGCTCAATAACAGCACGC	-77	<i>galS</i>	D-ガラクトースの輸送および異化に関する酵素の転写因子
J 2 (GGGATCCCCCTATAGTGAGTCGTATTACCC)			
Matched sequence (5' to 3')	Localization from AUG	Gene name	Function
AGGATCTCCTTATATGTGGTGCTAATACCC	-32	<i>ampD</i>	細胞壁分解酵素
GGGATGTTCTTATAATCAATCACATTCCCT	-104	<i>tig</i>	分子シャペロン
GGTAACTATCTGTTGTCAGTAAGATTACCC	-37	<i>pgsA</i>	リン脂質の合成に関する酵素
GGGAGAGCACTATAGTAAGGAATATAGCC G	-29	<i>tufA</i>	翻訳伸長因子



**Fig. 3-10. 同定された特異的な二本鎖 (ds) DNA への PrS-YjjJ の結合**

J1 および J2 dsDNA を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl 存在下で PrS または PrS-YjjJ と混合し、4% native acrylamide gel (TBE buffer) で電気泳動を行った。レーン 1, 2  $\mu$ M dsDNA、レーン 2, 2  $\mu$ M dsDNA および 2  $\mu$ M Protein S (PrS)、レーン 3-8, 2  $\mu$ M dsDNA および 0.05、0.1、0.2、0.4、1 または 2  $\mu$ M PrS-YjjJ をそれぞれ混合した。

## 第 4 節 考察

HipA は GltX をリン酸化することでその活性を阻害し、タンパク質合成阻害を引き起こす (Germain et al., 2013)。今回、YjjJ は HipA と同様にキナーゼ活性を有し、自己リン酸化するタンパク質であることが示された (Fig. 3-1)。さらに、変異体を用いた実験によって、自己リン酸化の活性中心は Asp342、リン酸化部位は Ser200 であることが示唆された (Fig. 3-2)。しかし、活性中心の Asp を Asn 残基に置換した YjjJ D342N 変異体の発現は、生育阻害活性に影響しなかった。よって、YjjJ のキナーゼ活性は生育阻害活性に関与しないことが明らかになった (Fig. 3-3)。キナーゼ活性中心に変異を有する HipA D309N の発現は生育に影響しないことから、HipA のキナーゼ活性は生育阻害に必須である (Correia et al., 2006)。一方、YjjJ のキナーゼ活性は生育阻害に影響しないことから、YjjJ は HipA とは全く異なる作用機構を介して生育を阻害することが示された。HipA の自己リン酸化部位である Ser150 は ATP 結合に重要な P ループモチーフ内に位置しており、Ser150 のリン酸化によって ATP 結合ポケットの構造が変化し HipA のキナーゼ活性が不活性化される (Schumacher et al., 2012)。そこで YjjJ の生育阻害活性も自己リン酸化によって不活化するのではないかと考え、疑似自己リン酸化変異体 S200D および S200E を作製し、これらの変異体発現後の *E. coli* の生育を調べた。その結果、どちらの変異体の発現でも *E. coli* の生育は阻害された (Fig. 3-4)。よって、YjjJ の生育阻害活性は自己リン酸化の影響を受けないことが示唆された。疑似自己リン酸化変異体ではタンパク質のリン酸化状態を完全には再現できないため、自己リン酸化が生育阻害活性に与える影響を解明するためには YjjJ の立体構造解析が必要である。

YjjJ の細胞内標的を探索するために、YjjJ 誘導後の DNA および RNA 合成量を測定した。その結果、0.1 mM IPTG および 1 mM IPTG 存在下で YjjJ を誘導すると、DNA 複製および RNA 合成がそれぞれ強く阻害された (Fig. 3-5)。以上の結果から、YjjJ は複数の細胞内標的をもち、菌体内の YjjJ 発現量によって細胞内標的が異なる可能性が推測された。また、パルスラベル法で YjjJ 誘導後のタンパク質合成を測定した結果、YjjJ はタンパク質合成を直接的に阻害しないと考えられた (Fig. 3-6)。

YjjJ は、N 末端領域に DNA 結合ドメインの 1 つである winged helix-turn-helix モチーフを有していた。このことから、YjjJ は DNA に直接結合し、DNA および RNA 合成を阻害すると考え、YjjJ の DNA 結合能を解析した。その結果、YjjJ は DNA に結合すること、さらに YjjJ の生育阻害活性に DNA 結合能が必須であることが示唆された (Fig. 3-7 および 3-8)。DNA を標的とする toxin として CcdB や TopAI が報告されている (Bernard et al., 1993; Yamaguchi and Inouye, 2015)。これらの toxin は DNA gyrase や DNA トポイソメラーゼ I などの酵素を阻害する。これまで TA system の toxin が DNA を直接標的とする報告はなく、YjjJ が DNA 結合を介して生育を阻害するならば、toxin としては新規の作用機構といえる。

YjjJ の DNA 結合配列の同定には SELEX およびゲルシフト法の 2 つの方法を用いた。SELEX は試験管内で DNA 結合タンパク質と結合した配列を強い選択圧をかけずに取得するため、タンパク質と弱く結合する DNA 配列でも同定可能である。一方でゲルシフト法ではアガロースゲル電気泳動で分離したタンパク質-DNA 複合体から結合した DNA を直接回収するため、タンパク質と強く結合する DNA 配列を同定できる。これら 2 つの方法を用いて YjjJ 結合配列の同定を試みた結果、どちらの方法でも同じ 2 種類の結合配列が得られた

(Fig. 3-9)。得られた推定結合配列を含むオリゴヌクレオチドを用いて YjjJ との解離定数を解析した結果、YjjJ と結合配列 J1 および J2 の解離定数はそれぞれ 300 nM 程度であった (Table 3-11)。一方、J1 および J2 配列を含まない dsDNA との解離定数は 800 nM 以上であったことから、YjjJ は 2 本鎖特異的に結合するタンパク質であるが、配列の特異性は高くない。しかし、SELEX やゲルシフト法で特定の配列が取得できていることから、ある程度結合しやすい配列があると考えられる。そこで、J1 および J2 配列モチーフがプロモーター領域または 5'-非翻訳領域に存在する遺伝子を FIMO を用いて探索した。その結果、7 個の遺伝子が同定された (Table 3-12)。HipB および HipBA 複合体は自身の 5'-末端の非翻訳領域に 4 箇所存在する回文配列 (TATCCN<sub>8</sub>GGATA) に特異的に結合し、転写抑制因子として機能する (Black et al., 1994)。この結合配列を含む dsDNA と HipB の解離定数はおよそ 300 nM である (Wen et al., 2014)。このことから HipB または YjjJ の生体内濃度に依存するが、YjjJ は Table 3-12 に示した遺伝子の転写抑制因子として機能する可能性がある。J1 および J2 配列モチーフをプロモーター領域に有する 7 つの遺伝子のうち、必須遺伝子は脂質合成に関与する *pgsA* のみであった。*pgsA* の温度感受性株では細胞の伸長は確認されない (Mileykovskaya et al., 2009) ことから、*pgsA* が YjjJ の細胞内標的とは考えにくい。今後、今回推定された 7 つの遺伝子の転写活性を YjjJ 存在下で測定し、さらに詳細を検討する必要があるだろう。

## 第 4 章 YjjJ の生理機能の解析

### 第 1 節 序論

HipA 変異体 (*hipA7*) の過剰発現は休眠細胞数を増加させることから、HipA は細菌の休眠に関与すると考えられている (Correia et al., 2006)。しかし、*hipA* 欠損株の休眠細胞数は野生型株と同程度であることから、*hipA* 以外の休眠誘導因子の存在が示唆されてきた。一般的に toxin の活性は、ストレス誘導性 ATP 依存プロテアーゼによる antitoxin の分解によって誘導される (Yamaguchi and Inouye, 2011)。第 2 章の結果から、YjjJ および HipA は共に HipB antitoxin と複合体を形成することが明らかとなり、YjjJ および HipA は同じ生理条件下で活性化され、機能すると考えられた。そこで、YjjJ は HipA と同様に休眠誘導に関与するのではないかと考えた。

本章では、*hipA*、*yjjJ*、*hipAyjjJ*、*hipAB* および *hipAByjjJ* の遺伝子欠損株を作製し、phenotype microarray を用いて野生型株と各遺伝子欠損株の表現型の違いを網羅的に解析した。また、各欠損株における休眠細胞数を調べるとともに、バイオフィームには休眠細胞が多く存在しているという事実からバイオフィーム形成量を測定し *E. coli* における YjjJ の生理的役割の解明を試みた。

## 第 2 節 実験方法

### 4-2-1 *E. coli* BW25113 $\Delta yjjJ$ 、 $\Delta hipA$ および $\Delta hipBA$ 株の作製

Datsuenko らの方法に従って欠損株を構築した (Datsenko and Wanner, 2000)。pKD46 プラスミドを用いて形質転換した *E. coli* BW25113 を 0.2% arabinose を含む LA 培地で 30°C で O.D.<sub>600</sub> = 0.6 まで振盪培養した。その後、氷上で 10 分急冷し、6,000 r.p.m.、4°C で 10 分間遠心分離を行い、得られた菌体を 10% 氷冷 glycerol で懸濁した。この操作を 3 回繰り返す、最終的に 100 倍に濃縮した菌体をエレクトロポレーションのコンピテントセルとした。次に遺伝子欠損用カセットを準備するために Table 4-1 に示した反応液を調製し、Table 4-2 に示したプライマーおよび pKD4 プラスミドを鋳型として PCR を行った。サイクル条件はプレラン (94°C、3 分間) を行った後、DNA 変性 (94°C、30 秒間)、アニーリング (50°C、30 秒間) および DNA 伸長 (72°C、80 秒間) で 25 サイクル行った。得られた増幅産物に DpnI を 1  $\mu$ l 加え、37°C で 1 時間インキュベートした後に精製し、遺伝子欠損用カセットとした。100 ng の遺伝子欠損用カセットを 25  $\mu$ l のコンピテントセルに添加し、エレクトロポレーションを用いて形質転換を行った。回復培地には LB 培地を使用し、37°C で 1 時間振盪培養後、LK 寒天培地上に塗布し、37°C で 16 時間培養した。得られたコロニーを LB および LA 寒天培地に画線塗沫後、37°C で培養し、pKD46 の脱落を確認した。その後、Table 4-3 に示した反応液を調製し、Table 4-4 に示したプライマーを用いた CD-PCR で目的遺伝子への Km 耐性遺伝子の挿入を確認した。

Table 4-1. 欠損用カセットの PCR 反応液

10×Ex Taq buffer	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTP	4 $\mu$ l
pKD4	50 pg
100 pmol/ $\mu$ l deletion-Fw	1 $\mu$ l
100 pmol/ $\mu$ l delation-Rv	1 $\mu$ l
TaKaRa Ex Taq (5 units/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	Total volume 50 $\mu$ l

Table 4-2. 欠損カセット PCR の primer

$\Delta yjjJ$	<i>yjjJ</i> deletion-Fw	<i>yjjJ</i> deletion-Rv
$\Delta hipA$	<i>hipA</i> deletion-Fw	<i>hipA</i> deletion-Rv
$\Delta hipBA$	<i>hipBA</i> deletion-Fw	<i>hipA</i> deletion-Rv

Table 4-3. 欠損確認の CD-PCR 反応液

10× Taq buffer	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTP Mixture	4 $\mu$ l
P1-Rv	100 pmol
check <i>yjjJ</i> or <i>hipA</i> -Rv	100 pmol
TaKaRa rTaq (5 units/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	Total volume 50 $\mu$ l

Table 4-4. 欠損確認の PCR に使用した primer

$\Delta yjjJ$	Check <i>yjjJ</i> -Rv	P1-Rv
$\Delta hipA$	Check <i>hipA</i> -Rv	P1-Rv
$\Delta hipBA$	Check <i>hipA</i> -Rv	P1-Rv

## 4-2-2 P1 transduction による *E.coli* MG1655 $\Delta hipA$ および $\Delta yjJ$ の構築

### 4-2-2-1 P1 phage lysate の調製

LB 培地に 4-2-1 で作製した欠損株を植菌し、16 時間、37°C で振盪培養を行った。培養液を 100 mM MgSO<sub>4</sub>、5 mM CaCl<sub>2</sub> および 0.1% glucose を含む 1.5 ml の LB 培地に植菌し、37°C で O.D.<sub>600</sub> = 0.2 まで培養後、40  $\mu$ l の P1 phage lysate を加え、濁度が下がりきるまで 37°C で振盪培養を行った。培養液を 14,000 r.p.m.、1 分間遠心分離後、上清を 1.5 ml のマイクロチューブに移し、クロロホルムを 2 drops (約 20  $\mu$ l) 加えた。その後 vortex で激しく攪拌したものを P1 phage lysate とし、4°C で保存した。

### 4-2-2-2 *E. coli* MG1655 株の形質導入

1.5 ml の LB 培地に *E. coli* MG1655 株を植菌し、16 時間培養した。培養液を 6,000 r.p.m. で 2 分間遠心分離し、100 mM MgSO<sub>4</sub>、5 mM CaCl<sub>2</sub> および 0.1% glucose を含む 420  $\mu$ l の LB 培地に再懸濁した。4-2-2-1 で作製した P1 phage lysate 300  $\mu$ l を 1.5 ml マイクロチューブに入れた後、ふたを開けた状態で 37°C で 30 分間静置した。Table 4-5 に示したように溶液を混合し、37°C で 30 分間静置した後、200  $\mu$ l の 1 M クエン酸ナトリウム溶液 (pH 5.5) と 1 ml の LB を加えて混合し、37°C で 1 時間培養した。6,000 rpm、5 分間で集菌した後、菌体を 100  $\mu$ l の 100 mM クエン酸ナトリウム (pH 5.5) を含む LB 培地に再懸濁し、全量を LK 寒天培地に塗布して、37°C で 16 時間培養した。得られたコロニーを複数選抜し、LK 寒天培地に画線塗抹した後、37°C で 16

Table 4-5. P1-transduction 反応溶液

(A)	100 $\mu$ l P1-lysate	100 $\mu$ l recipient cell
(B)	10 $\mu$ l P1-lysate + 90 $\mu$ l dH <sub>2</sub> O	100 $\mu$ l recipient cell
(C)	100 $\mu$ l P1-LB	100 $\mu$ l recipient cell
(D)	100 $\mu$ l P1-lysate	100 $\mu$ l P1-LB

時間培養した。その後、Table 4-3 に示した反応液を用いて CD-PCR を行い、目的遺伝子の遺伝子欠損用カセットへの置換を確認した。サイクル条件は、プレラン (94°C、5 分間) を行った後、DNA 変性 (94°C、30 秒間)、アニーリング (50°C、30 秒間)、DNA 伸長 (72°C、90 秒間) を 25 サイクル行った。

#### 4-2-2-3 遺伝子欠損用カセットの除去

目的遺伝子が遺伝子欠損用カセットに置換された株から 2-2-3 の方法に従ってケミカルコンピテントセルを作製した後、pCP20 プラスミドを用いて形質転換を行った。LA 寒天培地に塗布し、30°C で 18 時間培養して得られたコロニーを複数選抜し、LB 寒天培地に画線塗抹後、42°C で 12 時間培養した。出現したコロニーを LB、LA および LK 寒天培地に画線塗抹した後に 37°C で 24 時間培養し、pCP20 および欠損カセットに含まれる Km 耐性遺伝子の脱落を確認した。さらに、CD-PCR でも Km 耐性遺伝子の脱落を確認した (Table 4-3)。サイクル条件は、プレラン (94°C、5 分間) を行った後、DNA 変性 (94°C、30 秒間)、アニーリング (50°C、30 秒間)、DNA 伸長 (72°C、30 秒間) を 25 サイクル行い、遺伝子欠損が確認されたものを *E. coli* MG1655  $\Delta$ hipA および  $\Delta$ yjjJ として使用した。

*E. coli* MG1655  $\Delta$ hipAyjjJ 二重欠損株および  $\Delta$ hipBAyjjJ 三重欠損株は、*E. coli* MG1655  $\Delta$ yjjJ を用いて、上述した方法で取得した。

#### 4-2-3 Phenotype microarray による網羅的な生育の測定

YjjJ の生理機能を解明するため、phenotype microarray (BIOLOG) を行った。Phenotype microarray のプレートは PM1 および PM2 (carbon sources)、PM3 (nitrogen sources)、PM4 (phosphorus and sulfur sources)、PM5 (nutrient supplements)、PM6-8 (peptide nitrogen sources)、PM9 (osmolytes)、PM10 (pH) および PM11-20 (chemicals) のプレートで、20 種類である。本アッセイでは全プレートを使用し、再現性が取れたものを解析結果として使用した。

#### 4-2-4 各欠損株における休眠細胞数の解析

600  $\mu$ l の LB 培地に *E. coli* MG1655 WT、 $\Delta hipA$ 、 $\Delta yjjJ$ 、 $\Delta hipBA$  および  $\Delta hipBAyjjJ$  を植菌し、37°C で 16 時間培養したものを前培養液とした。10 ml の M9 培地に前培養液を 100  $\mu$ l 植菌し、37°C で振盪培養を行った。O.D.<sub>600</sub> = 0.4-0.5 で Amp (終濃度 100  $\mu$ g/ml) を添加し、37°C で 5 時間振盪培養した後、菌体を 1 x M9 溶液で 2 回洗浄し、段階希釈した。適当な希釈液 0.1 ml を LB 寒天培地に塗布し、37°C で 16 時間培養後に出現したコロニー数を算定し、培養液 1 ml あたりの生残菌数を休眠細胞数とした。

#### 4-2-5 各欠損株におけるバイオフィルム形成量の測定

600  $\mu$ l の LB 培地に *E. coli* MG1655 WT、 $\Delta hipA$ 、 $\Delta yjjJ$ 、 $\Delta hipBA$  および  $\Delta hipBAyjjJ$  を植菌し、37°C で 16 時間培養を行ったものを前培養液とした。1 ml の LB 培地に 10  $\mu$ l の前培養液を植菌し、O.D.<sub>600</sub> = 1.0-1.2 まで 37°C で

振盪培養した。培養液 100  $\mu$ l を 10 ml の LB 培地に植菌し穏やかに混合後、PVC 平底 96 穴プレート (Corning) に 100  $\mu$ l ずつ分注し、30°C で 24 時間静置培養した。培養液を除いた 96 穴プレートを蒸留水で 2 回洗浄し、水分をよく除いた後、0.1% crystal violet 溶液を 150  $\mu$ l ずつ分注して室温で 15 分間染色した。さらに蒸留水で 2 回洗浄し、十分に乾燥させてから 200  $\mu$ l の 70% エタノールを加えた。15 分後 100  $\mu$ l を新しい 96 穴プレートに移し、595 nm の吸光をプレートリーダー (Tecan) を用いて測定した。

## 第 3 節 結果

### 4-3-1 Phenotype microarray を用いた各欠損株の網羅的な生育測定

Phenotype microarray では、最少生育条件に栄養源（炭素、窒素、リンおよび硫黄源）または抗生物質などの生育阻害物質が一種類添加された 2000 種類以上の条件下で生育速度を解析できる。様々な条件下での細胞の生育を呼吸（NADH 生成）を指標に tetrazolium violet の還元を通して評価する。Tetrazolium violet は呼吸によって還元されると強く紫色が発色し、呼吸が弱いと色が薄くなる。この仕組みを利用して野生型株と欠損株を比較し、表現型に差があるかを評価することができる (Fig. 4-1)。Phenotype microarray を用いて、2000 種類以上の条件下での WT および各欠損株の生育を測定した。生育速度は tetrazolium violet で定量された菌体内の NADH 量から計算された (Bochner et al., 2001)。WT と比較して各欠損株の生育に影響が見られた条件を作用標的 (mode of action) および化合物 (compounds) ごとに分け、Table 4-6 に示した。 $\Delta hipA$  欠損株では差が見られた化合物が 8、 $yjjJ$  欠損株では 22 種類あった。 $\Delta hipA$  欠損株および  $\Delta yjjJ$  欠損株で共通して WT と差が見られた生育条件は原核生物の呼吸鎖阻害剤である iodonitrotetrazolium chloride (INT) 存在下であった (Villegas-Mendoza et al., 2015)。

$\Delta hipA$  および  $\Delta yjjJ$  の単独欠損株では差がなく、 $\Delta hipAyjjJ$  欠損株および  $\Delta hipBAyjjJ$  欠損株でのみ WT と生育に差が見られた条件を Table 4-7 に示した。 $\Delta hipAyjjJ$  欠損株でのみ WT と差が見られた条件は 9、 $hipBAyjjJ$  欠損株では 15 あった。 $\Delta hipAyjjJ$  欠損株の生育は、DNA damage を引き起こす bleomycin、DNA 架橋剤の coumarin、DNA gyrase 阻害剤の novobiocin や膜タンパク質に

Table 4-6. 各欠損株における phenotype microarray の結果

Mode of action	Compounds
<i>ΔhipA</i> mutant	
Growth advantages	
N-source	D or L- $\alpha$ -Amino-caprylic acid
Respiration	INT
Growth disadvantages	
N-source	Gly-Cys、 Arg-Gln、 Lys-Ser
Oxidized sulfhyls、 depletes glutathione	Chloronitrobenzene
Protein synthesis	Penimepicycline、 Tetracycline
<i>ΔhipBA</i> mutant	
Growth advantages	
Chelator、 lipophilic	8-Hydroxyquinoline
DNA intercalator	Coumarin
N-source	D or L- $\alpha$ -Amino-caprylic acid
Protein synthesis	Troleandomycin
Respiration	INT
Growth disadvantages	
Protein synthesis	Streptomycin

Table 4-6 (continued)

*ΔyjjJ* mutant

## Growth advantages

Chelator、lipophilic	5,7-Dichloro-8-hydroxyquinoline、 5,7-Dichloro-8-hydroxyquinaldine
DNA damage	Tinidazole
Nucleic acid analog (purine)	6-Mercaptopurine monohydrate
Protein synthesis	Spectinomycin、Troleandomycin
Respiration	INT、18-crown-6 ether、Ruthenium red
Toxic anion	Sodium selenite、Sodium tungstate

## Growth disadvantages

Alkylating agent	Chlorambucil
DNA intercalator	7-Hydroxycoumarin
Protein synthesis	3-Amino-1,2,4-triazole、Apramycin、 Streptomycin、Geneticin disulfate、Amikacin
Chaotropic agent	Guanidine hydrochloride
N-Source	Ser-Met、Ser-Ala
Nucleic acid analog (pyrimidine)	5- Fluorouracil

Table 4-6 (continued)

*ΔyjjJhipA* mutant

## Growth advantages

Chelator、lipophilic	5,7-Dichloro-8-hydroxyquinoline、5,7-Dichloro-8-hydroxyquinaldine
DNA damage	Bleomycin、Tinidazole
DNA intercalator	Coumarin
DNA topoisomerase	Novobiocin
Ion channel inhibitor	Lidocaine
Membrane、detergent、cationic	Methyltrioctylammonium chloride
N-source	D,L- $\alpha$ -Amino-caprylic acid、Met-Ala
Nucleic acid analog	6-mercaptopurine monohydrate
Protein synthesis	Troleandomycin
Reducing agent	$\alpha$ -monothioglycerol
Respiration	INT、18-crown-6 ether、Ruthenium red、Sodium Selenite、Sodium Tungstate

## Growth disadvantages

Alkylating agent	Chlorambucil
DNA intercalator	7-hydroxycoumarin、2-phenylphenol
Protein synthesis	3-amino-1,2,4-triazole、Streptomycin、Apramycin
N-source	Gly-Cys、Arg-Gln、Ser-Met
Nucleic acid analog	5-fluorouracil
Ribonucleotide DP reductase inhibitor	Hydroxyurea

Table 4-6 (continued)

*ΔhipBAyjjJ* mutant

Growth advantages

C-source	Monomethyl succinate
Chelator、Lipophilic	5,7-dichloro-8-hydroxyquinoline、5,7-dichloro-8-hydroxyquinaldine、8-hydroxyquinoline
DNA damage	Bleomycin、Tinidazole
DNA intercalator	Coumarin
DNA topoisomerase	Ofloxacin
Membrane、detergent、cationic	Dodecyl trimethyl ammonium bromide、Methyltrioctylammonium chloride
N-Source	D,L-α-Amino-caprylic acid、Met-Ala
Nucleic acid analog	5-fluoroorotic acid
Osmotic sensitivity	9% sodium lactate
Protein synthesis	Troleandomycin
Reducing agent	α-monothioglycerol
Respiration	INT、18-crown-6 ether、Ruthenium red、
RNA polymerase	Rifampicin
Toxin analog	Sodium selenite、Sodium tungstate
tRNA synthetase	DL-Methionine hydroxamate
Tyrosine phosphatase inhibitor	Oxpheneridine
Wall、cephalosporin	Cefamandole negate

Table 4-6 (continued)

## Growth disadvantages

Alkylating agent	Chlorambucil
DNA intercalator	7-hydroxycoumarin
Protein synthesis	3-amino-1,2,4-triazole、 Streptomycin、 Apramycin、 Geneticin disulfate、 Tobramycin、 Penimepicycline
Membrane	Guanidine hydrochloride、 Nia proof
N-Source	Gly-Cys、 Arg-Gln、 Ser-Met
Nucleic acid analog	5-Fluorouracil
Respiratory enzyme	Oxycarboxin
Ribonucleotide EP reductase inhibitor	Hydroxyurea
Toxic anion	Potassium tellurite
Toxin cation	Ferric chloride
Wall、 lactam	Aztreonam

Table 4-7. Phenotype microarray における多重欠損にのみ差が見られた条件

Mode of action	Compounds
<i>ΔhipA<sub>yjj</sub></i> mutant	
Growth advantages	
DNA damage	Bleomycin
DNA intercalator	Coumarin
DNA topoisomerase	Novobiocin
Ion channel inhibitor	Lidocaine
Membrane、 detergent、cationic	Methyltrioctylammonium chloride
N-source	Met-Ala
Reducing agent	$\alpha$ -monothioglycerol
Growth disadvantages	
DNA intercalator	2-phenylphenol
Ribonucleotide DP reductase inhibitor	Hydroxyurea

Table 4-7 (continued)

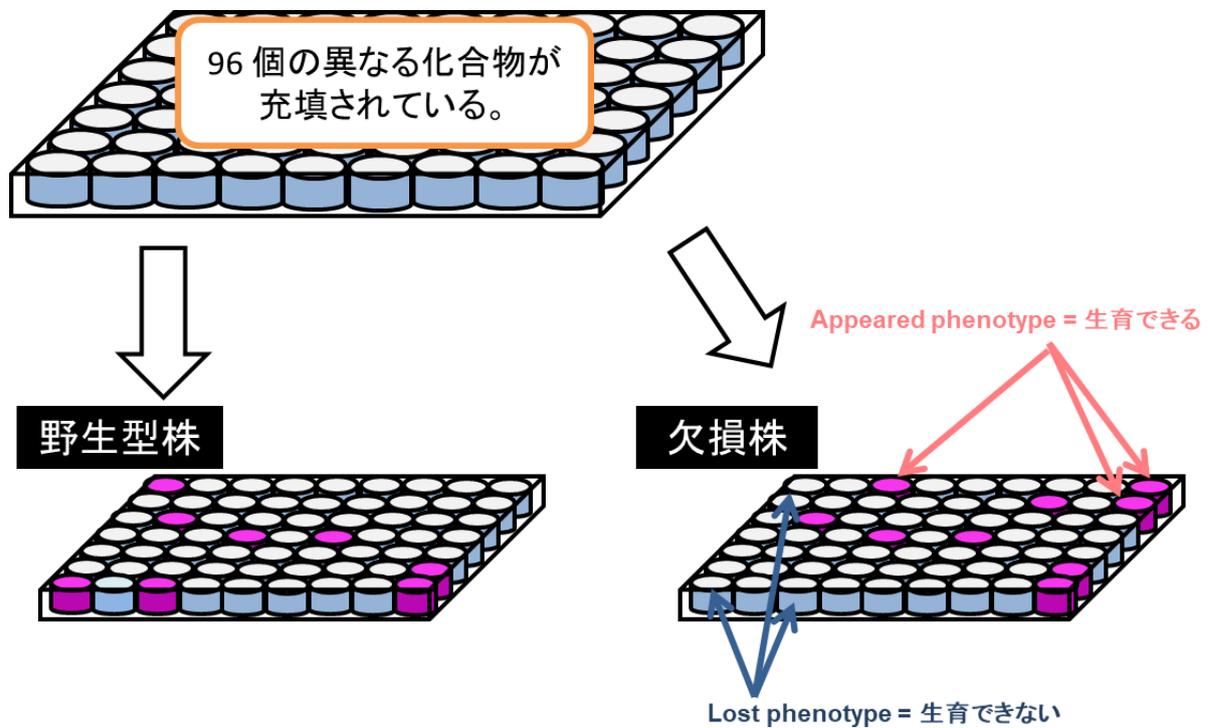
*ΔhipBAyjjJ* mutant

Growth advantages

C-Source	Monomethyl succinate
DNA topoisomerase	Ofloxacin
Membrane	Dodecyltrimethylammonium bromide, Methyltrioctylammonium chloride
Nucleic acid analog	5-fluoroorotic acid
Osmotic sensitivity	9% sodium lactate
tRNA synthetase	DL-methionine hydroxamate
Tyrosine phosphatase inhibitor	Oxpheneridine
Wall, cephalosporin	Cefamandole negate

Growth disadvantages

Membrane	Niaproof
Protein synthesis	Tobramycin
Toxic anion	Potassium tellurite
Toxic cation	Ferric chloride
Wall	Aztreonam



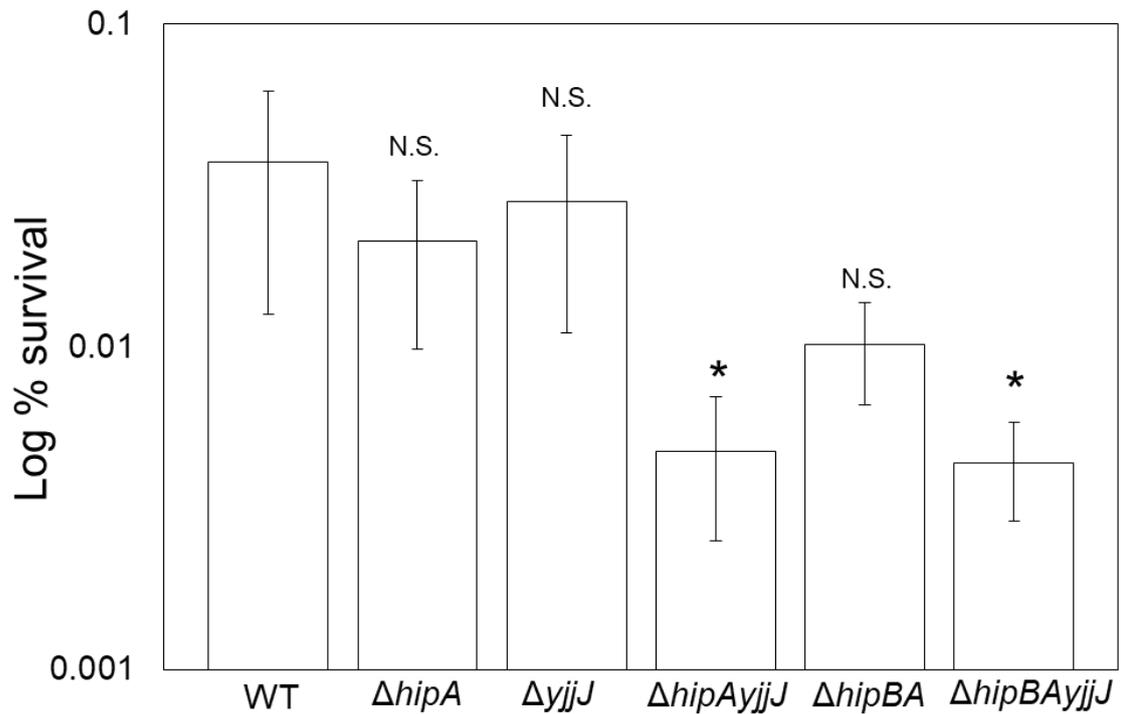
**Fig. 4-1. phenotype microarray モデル図**

様々な条件下における生育を細胞呼吸による tetrazolium violet の還元を用いて評価できる。細胞が生育し呼吸すると色素は NADH の還元によって強く発色し、生育しないと発色しない。野生型株と比較して表現型に差があるかを評価することができる。

作用する methyltrioctylammonium chloride を含む 7 つの条件で促進され、hydroxyurea および DNA 架橋剤 2-phenylphenol 存在下で抑制された。一方、単独欠損株では差がなく  $\Delta hipBAyjjJ$  三重欠損株でのみ WT と差が見られた条件は 15 あり、そのうち WT より欠損株の生育が促進された条件は dodecyltrimethyl ammonium bromide などの細胞膜に作用する化合物や、RNA ポリメラーゼ阻害剤である rifampicin、tRNA 合成酵素阻害剤の D,L-methionine hydroxamate を含む 9、抑制は 5 つあった (Table 4-7)。

#### 4-3-2 各欠損株における休眠細胞数

すでに報告されている方法に従い (Keren et al., 2004)、WT、 $\Delta hipA$ 、 $\Delta yjjJ$ 、 $\Delta hipBA$ 、 $\Delta hipAyjjJ$  および  $\Delta hipBAyjjJ$  における休眠細胞数を測定した。LB 培地を用いて WT および各欠損株を対数増殖期まで振盪培養後、Amp (終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$ ) を添加した。その後 37°C で 5 時間振盪培養を行い、生菌数を測定した。しかし、この方法では再現性のある結果を取得できなかった。休眠細胞数の計測では、LB 培地に含まれるアミノ酸の酸化による劣化が大きく影響することから (Harms et al., 2017)、問題の原因として酸化などによるアミノ酸の劣化が考えられた。そこで、休眠細胞数を再現よく測定する方法を検討した。その結果、前培養を LB 培地で行い、その後の本培養を M9 培地に変えることで再現性のある結果を得ることができた。確立した方法を用いて WT および各欠損株における休眠細胞数を測定した結果、Amp 添加後の  $\Delta hipAyjjJ$  および  $\Delta hipBAyjjJ$  の生残数は WT と比較して 90% 減少した (Fig. 4-2)。Persister 形成数は前培養中の偶発的な遺伝子の発現や、培地成分の酸化などによっても大きく変動する。そのためアッセイごとデータの分散が非常に大きくなり、



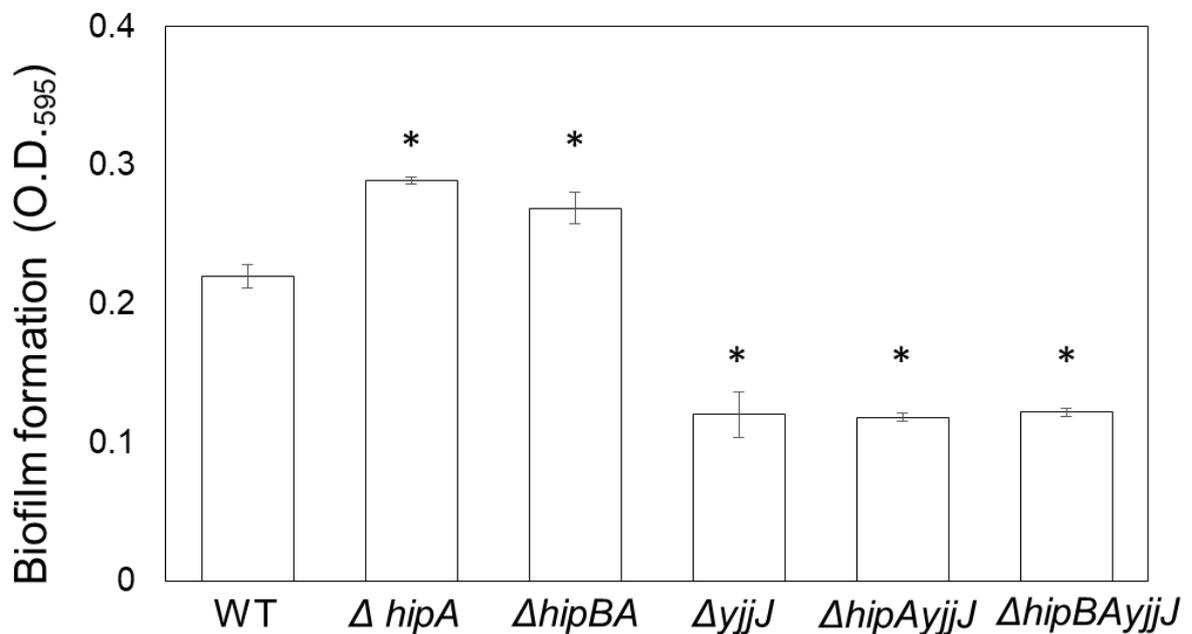
**Fig. 4-2. 各欠損株における休眠細胞数の比較**

WT、 $\Delta hipA$ 、 $\Delta yjjJ$ 、 $\Delta hipBA$  および  $\Delta hipBA yjjJ$  を  $O.D._{600} = 0.4\sim 0.5$  まで培養後、Amp (終濃度  $100 \mu g/ml$ ) を添加し、 $37^\circ C$  で 5 時間振盪培養後の生菌数を測定した。Amp 添加前の細胞数を 100% として表示した。各欠損株および野生型株のアンピシリン処理後の生存率について LMM を用いて有意差検定を行った (\*  $p < 0.005$ )。

Student t 検定では有意差を正しく評価できない。そこで、線形混合モデル (LMM) を用いて統計的手法で得られた結果を解析した。LMM は同じレベルのグループ化変数を含む観測値に共通の変量効果 (ランダム効果) を関連付けることで、データのグループ化に関する共分散構造を加味して統計解析できるため、アッセイ間の影響を加味できる。結果、WT と比較した  $\Delta hipAyjjJ$  または  $\Delta hipBAyjjJ$  の休眠細胞数の差は統計学的に有意であった。一方、 $\Delta hipA$  および  $\Delta yjjJ$  の単独遺伝子欠損株の休眠細胞数は、野生型株とほぼ同じであった。よって、 $hipA$  および  $yjjJ$  の両遺伝子が休眠に重要であることが示された。

#### 4-3-3 各欠損株におけるバイオフィルム形成量

WT、 $\Delta hipA$ 、 $\Delta yjjJ$ 、 $\Delta hipBA$ 、 $\Delta hipAyjjJ$  および  $\Delta hipBAyjjJ$  におけるバイオフィルム形成量を測定した (Fig. 4-3)。その結果、WT と比べて  $\Delta hipA$  および  $\Delta hipBA$  欠損株ではバイオフィルム形成量は約 30% 上昇した。一方、 $\Delta yjjJ$  欠損株でのバイオフィルム形成量は約 50% 減少した。また  $\Delta hipA$  および  $\Delta yjjJ$  両遺伝子の欠損を含む多重欠損株では、 $\Delta yjjJ$  欠損株と同様にバイオフィルム形成量が約 50% 減少した。Student t 検定を用いて解析した結果、これらの差は統計学的に有意であった。よって、 $YjjJ$  はバイオフィルム形成を正に制御している可能性が示された。



**Fig. 4-3. 各欠損株におけるバイオフィルム形成量**

*E. coli* MG1655 および各欠損株を LB 培地を用いて 37°C で振盪培養を行った。O.D.<sub>600</sub>=1.0-1.2 で培養液 100 μl を 10 ml の LB 培地に穏やかに混合後、96 穴プレートに 100 μl ずつ分注し、30°C で 24 時間静置培養した。形成されたバイオフィルムは 0.1% の crystal violet を用いて染色し、70% エタノールで染色液を抽出した。その後、595 nm の吸光を測定することでバイオフィルム量を測定した。各欠損株および野生型株のバイオフィルム形成量について student t-test を用いて有意差検定を行なった(\* p < 0.005)。

## 第 4 節 考察

YjjJ の生理機能を解明するために phenotype microarray を用いて 2000 種類以上の条件下で、WT および各欠損株の生育を比較した (Fig. 4-1)。その結果、 $\Delta yjjJ$  欠損株の生育は、親油性キレーター、陰イオン性界面活性剤および呼吸阻害剤などの化合物存在下で WT よりも促進された。一方で、DNA 複製阻害剤、膜作用化合物、streptomycin などのアミノグリコシド系抗生物質およびテトラサイクリン系抗生物質のペニメピサイクリン存在下では WT よりも抑制された (Table 4-6)。よって、YjjJ は抗生物質耐性に直接または間接的に関与することが示唆された。 $\Delta yjjJ$  および  $\Delta hipA$  単独欠損株では差が見られなかったが、 $\Delta hipAyjjJ$  二重欠損株および  $\Delta hipBAyjjJ$  三重欠損株では hydroxyurea (HU) 存在下で生育の遅れが見られた (Table 4-7)。HU は DNA 損傷に依存しない複製フォークの停止を誘導し、*E. coli*、酵母およびヒトを含む多くの生物の dNTP 合成酵素であるクラス I リボヌクレオチドレダクターゼ (RNR) を特異的に阻害する (Lopes et al., 2001; Rosenkranz et al., 1967; Sinha and Snustad, 1972; Sogo et al., 2002)。また、HU は MazEF および RelBE TA system 依存的な細胞死および溶菌を誘導することが示唆されている (Godoy et al., 2006)。HU 存在下で RNR 活性が阻害され dNTP が枯渇すると、MazF および RelE toxin が活性化される。活性化された MazF および RelE toxin は mRNA を分解し、その結果タンパク質合成は強制的に停止され、合成途中で正しく折り畳まれていない膜タンパク質が細胞膜に蓄積する。蓄積した不完全な膜タンパク質によって膜ストレスが誘導されると、電子伝達系が過剰に活性化されて発生するヒドロキシラジカルによって細胞死が誘導される (Davies et al., 2009; Kohanski et al., 2010)。yjjJ および hipA 二重欠損および yjjJ、hipA および hipB 三重欠

損は、HU に対する感受性を増加させたことから、HU による細胞死には MazEF および RelBE TA system だけでなく HipA-HipB および YjjJ-HipB TA system も関与するのではないかと考えた。そこで、 $\Delta hipAyjjJ$  および  $\Delta hipBAyjjJ$  の HU 添加後の生菌数を継時的に測定した。その結果、WT と  $\Delta hipAyjjJ$  および  $\Delta hipBAyjjJ$  欠損株での生残細菌数に差は見られなかった (データは示さず)。よって、HU が誘導する細胞死に HipA-HipB および YjjJ-HipB TA system は関与しないことが示唆された。

一般的に休眠細胞の測定には  $\beta$  ラクタム系抗生物質が用いられる。これは、細胞壁合成を阻害する  $\beta$  ラクタム系抗生物質は増殖中の細菌に強い抗菌性を示すが、増殖停止状態の細菌には弱い抗菌性を示すためである (Keren et al., 2004)。そこで今回、各欠損株を  $\beta$  ラクタム系抗生物質である Amp で 5 時間処理した後の生菌数を計測し *yjjJ* の休眠細胞誘導に対する影響を調べた。その結果、*yjjJ* 単独遺伝子欠損株では WT と比較して生菌数に差は見られなかった。しかし、 $\Delta hipAyjjJ$  および  $\Delta hipBAyjjJ$  では WT と比較して休眠細胞数が 1/10 に低下することが示された (Fig. 4-2)。よって、*hipA* および *yjjJ* の両遺伝子が休眠誘導に重要であることが明らかとなった。

休眠誘導の機構は、常に一定の確率で休眠細胞が誘導される機構、および環境変化に依存して休眠細胞が誘導される機構、の 2 つの経路が提唱されている (Balaban et al., 2004; Kwan et al., 2013)。今回の休眠細胞数の解析では Amp 添加前にストレスを与えておらず、検出された休眠細胞は生育中に一定の確率で誘導された、または Amp により誘導されたストレス誘導性プロテアーゼによって HipB が分解され、活性化した HipA および YjjJ を介して休眠細胞が誘導された、という 2 つの可能性が考えられた。また、YjjJ の発現量は熱ストレスによって 5.9 倍増加することが DNA マイクロアレイ解析によって示され

た (Gutiérrez-Ríos et al., 2003)。よって YjjJ は熱ストレス下での休眠細胞誘導機構にも関与するのかもしれない。

自然界の菌はおおよそ 90% がバイオフィルムの状態で存在する (Stoodley et al., 2002)。バイオフィルムは微生物が固体表面上で寄り集まった集合体であり、微生物自身が分泌した菌体外ポリマーで覆われている (O'Toole et al., 2000)。バイオフィルムは非常に高い抗生物質耐性を示す。その原因は未だ不明だが、理由の一つとしてバイオフィルム内細菌の休眠が挙げられる。成熟したバイオフィルムの表層は生きている菌で覆われているが、その内部は多数の死菌および休眠細胞で構成され则认为られている。抗生物質等の強いストレス下では、バイオフィルム表層の細菌は死滅するが深部の休眠細胞は生存すると考えられる。*E. coli* では、MazE-MazF および DinJ-YafQ TA system がバイオフィルム内における細胞死に関与し、これらの欠損株ではバイオフィルム形成量が減少することが報告された (Kolodkin-Gal et al., 2009)。また、MazE-MazF および DinJ-YafQ 以外の TA system もバイオフィルム形成に関与することが報告された (Wang and Wood, 2011)。*hipAyjjJ* の欠損は休眠細胞数を減少させたことから、*yjjJ* および *hipA* は上記 TA system と同様にバイオフィルム内の休眠細胞およびバイオフィルム形成に関与する可能性が考えられた。そこで、各欠損株におけるバイオフィルム形成量を測定した。その結果、*yjjJ* を欠損した株のバイオフィルム形成量は WT の 50% に減少することが明らかとなった。今後 YjjJ-HipB TA system を介したバイオフィルム形成およびバイオフィルム内での休眠細胞誘導機構について解析する必要がある。

## 第 5 章 総合論議

近年、細菌は自身の生育制御機構として toxin-antitoxin (TA) system を有することが知られてきた。TA system は、過剰発現により自身の生育を抑制する toxin と、その毒性を中和する antitoxin の二つのタンパク質から構成されており、ストレス下での生存に重要な役割を果たすと考えられている。*E.coli* では、TA system の一つである HipA-HipB TA system が、増殖状態の細菌集団に非常に低い割合で存在し、強いストレス耐性を示す休眠細菌への移行に重要であることが報告された。しかし、*hipBA* 欠損株においても休眠細菌数は変化しないことから、*E.coli* の休眠誘導経路は未だ不明である。本博士論文で私は、HipA 以外の休眠誘導タンパク質を探索し、同定されたタンパク質の諸性質を解析することで、休眠誘導機構の解明を試みた。

まず初めに、HipA 以外の休眠誘導タンパク質を PSI-BLAST search を用いて探索し、HipA toxin と相同性を持つ YjjJ を同定した。さらに、YjjJ が HipB antitoxin と YjjJ-HipB TA system を構成することを見出した。また、YjjJ は 2 量体を形成し、HipB および HipB-HipA 複合体に結合することが示された。YjjJ は N 末端側に DNA 結合ドメインを、C 末端側にキナーゼ活性ドメインを有す。そこで、YjjJ のこれらのドメインと毒性の関係を調べた結果、HipA とは異なり、YjjJ の毒性にはキナーゼ活性は必要ではなく、DNA 結合能が重要であることが示された。また、YjjJ が二本鎖 DNA に結合し、コンセンサス配列モチーフが代謝や細胞分裂に関わる遺伝子のプロモーター部位に存在することを明らかにした。YjjJ による休眠細胞誘導への影響を調べた結果、*yjjJhipA* 欠損株では休眠細胞数が減少することが示された。以上の結果から、*E.coli* の休眠細胞への移行

には、*hipA* および *yjjJ* の両 toxin 遺伝子が重要であると考えられた。以下、本博士論文で得られた結果について総合的に考察する。

### YjjJ の細胞内標的

Fig. 3-8 に示されたように、YjjJ の DNA 結合能は生育阻害活性に必須であることが示唆された。また、YjjJ の過剰発現は DNA 複製を阻害した (Fig. 3-5A)。以上の結果から、YjjJ は DnaA のような DNA 複製に必須な遺伝子のプロモーター領域や DNA 複製起点 (*oriC*) に結合することで DNA 合成を阻害すると考えた。そこで、今回同定された YjjJ の DNA 結合配列 J1 および J2 を基に、FIMO を用いて *E. coli* の gDNA 上の結合配列モチーフを検索した。その結果、DNA 合成に関与する遺伝子のプロモーター領域や、*oriC* 近傍にモチーフ配列は存在しなかった。また、YjjJ 結合モチーフをプロモーター領域に有する必須遺伝子は、リン脂質合成に関与するホスファチジルグリセロールリン酸合成酵素をコードする *pgsA* のみであった (Table 3-11)。しかし、*pgsA* の温度感受性株を用いた実験において、PgsA の欠損は細胞を球形にすることが報告されている (Mileykovskaya et al., 2009)。また、PgsA は脂肪酸合成に関与する酵素であることから、今回の YjjJ の過剰発現後に見られた細胞の伸長や DNA 合成阻害などが PgsA の発現抑制に起因する可能性は低いと考えられた。

FIMO を用いた *E. coli* の gDNA 上の同定配列モチーフ検索では、必須遺伝子である *pgsA* 以外にも Table 3-12 に示した 6 つの遺伝子がプロモーター領域に YjjJ 結合配列モチーフを有していた。これらの遺伝子は、生育に必須ではないが、アミノ酸前駆体の合成、タンパク質合成および細胞壁合成などに関与

するため、YjjJ はこれらの遺伝子の転写を同時に阻害することで生育阻害を引き起こすのかもしれない。

### YjjJ-HipB TA system の相互作用

HipB-HipA TA system の antitoxin である HipB が、YjjJ の生育阻害活性を中和することが示された (Fig. 2-7)。よって、HipB は HipA だけでなく YjjJ とともに TA system を構成することが明らかとなった。ゲルろ過クロマトグラフィーおよび動的光散乱法を用いた解析により、YjjJ は HipB と結合して複合体を形成することが示された。よって、HipB-YjjJ TA system は HipB-HipA system と同様に Type II TA system であることが明らかとなった。これまで、1 つの antitoxin が 2 つの toxin とそれぞれ TA system を構成する例は報告されておらず、今回発見した HipB antitoxin による HipA および YjjJ の制御は、新規の toxin 活性制御機構であった。また、YjjJ はゲノム DNA 上に単独で存在しており (Fig. 2-1)、これまでオペロンで存在すると考えられてきた Type II TA system の常識を覆す発見であった。一般的に TA system の antitoxin の遺伝子欠損株は、toxin の生育阻害活性の顕在化が起こるため困難であることが知られている。よって、YjjJ の活性を顕在化させる *hipBA* の欠損は困難であることが予想されたが、実際には容易に構築可能であった (第 4 章)。もしかすると、HipB だけでなく YjjJ の活性を抑制する第 2 の antitoxin が存在するのかもしれない。

一般的に antitoxin はストレス下で ATP 依存性プロテアーゼによって特異的に分解され、遊離した toxin が生育阻害活性を示すと考えられている (Fig. 1-3)。また、HipA、YjjJ および HipB は 3 者で複合体を形成すると推測された

(Fig. 2-9)。よって、HipA および YjjJ は同じストレス下で機能すると予想される。YjjJ は MarR によって転写調節を受けることが明らかになっており (Ireland et al., 2020)、抗生物質耐性に関与している可能性がある。

HipB は Lon プロテアーゼによって HipB の C 末端の 16 アミノ酸 (AKNASPESTEQNLEW) が認識されて分解されるだけでなく、その他のストレス誘導性プロテアーゼ (ClpAP、ClpXP および HslUV) でも分解されることが示唆されている (Hansen et al., 2012)。よって、HipA と YjjJ はこれらの ATP 依存性プロテアーゼによって同時に活性化されるのであろう。HipA には HipB との結合部位が N 末端から C 末端まで広く結合箇所がある。YjjJ は HipA の N 末端側と類似性がないことから、HipB と YjjJ の結合部位は HipA と異なるのかもしれない。もし HipB を部位特異的に切断するプロテアーゼが *E. coli* 内に存在するのならば、YjjJ と HipA の生育阻害活性は別々に制御されている可能性がある。

### ***yjjJ* および *hipA* を介した休眠誘導**

*yjjJ* および *hipA* 遺伝子の両欠損は休眠細胞数を減少させた (Fig. 4-2)。これまで *mazEF*、*relBE* および *yefM-yoeB* などの TA system の欠損が静菌的に作用する抗生物質であるリファンピシンおよびスペクチノマイシン処理後の休眠細胞数をわずかに減少させることが報告されている (Kolodkin-Gal et al., 2009; Wu et al., 2015)。しかし、一般的に休眠細胞数測定に用いられる Amp 処理ではこれらの TA system 欠損の効果は見られない。 $\Delta hipA yjjJ$  欠損では、Amp 処理後の生菌数が WT と比較して 90% 減少しており、*hipA* および *yjjJ* が Amp 添加後の休眠に強く関与することが示された。また *hipA* または *yjjJ* 単

独の欠損株では、Amp 添加後の休眠細胞数は野生型株と同等であり、2 つの遺伝子を欠損させることで初めて休眠細胞数に違いが見られた。このことから、HipA および YjjJ は異なる経路で休眠細胞を誘導し、互いに機能を相補できる、または 2 つの toxin は同じ経路を介して効率よく休眠を誘導する可能性が考えられた。

Ser、Thr および Tyr アミノ酸残基上でのタンパク質の可逆的リン酸化は、翻訳後修飾の中でも非常に重要性が高く、タンパク質機能の調節に重要である (Cozzzone, 1988; Dworkin, 2015)。リン酸化はタンパク質の立体構造を変化させることから、タンパク質の活性とも密接に関連している。HipA のキナーゼ活性は、生育阻害のみならず休眠細胞誘導にも必須である (Semanjski et al., 2018)。HipA の自己リン酸化アミノ酸残基である Ser150 およびキナーゼ活性に重要なアミノ酸残基である Asp309 が、それぞれ Ser200 および Asp342 として YjjJ に保存されていた (Fig. 3-2)。キナーゼ活性に重要と考えられる Asp342 を Asn に置換した変異体は *E. coli* の生育を阻害しなかった (Fig. 3-3)。YjjJ は HipA のホモログであることから、YjjJ のキナーゼ活性は生育阻害活性には不要だが、休眠誘導には重要な可能性がある。HipA は GltX のみならず少なくとも 36 のタンパク質のリン酸化に関与する (Semanjski et al., 2018)。さらに HipA 変異体の解析結果から、HipA による GltX のリン酸化は休眠細胞誘導に、それ以外のタンパク質のリン酸化は生育阻害にそれぞれ重要であることが示された (Semanjski et al., 2018)。つまり、HipA の生育阻害活性は GltX に依存せず、HipA を介した休眠細胞誘導機構は生育阻害機構とは異なることが示唆された。よって、YjjJ においても DNA 結合を介した生育阻害機構とは別に、YjjJ のキナーゼ活性を介した休眠誘導機構が存在するのかもしれない。

休眠細胞誘導および生育阻害に重要な HipA のキナーゼ活性は、トランスな自己リン酸化によって引き起こされる活性部位の構造変化によって抑制される (Fig. 1-4C)(Schumacher et al., 2012)。よって、YjjJ の生育阻害活性は HipA と同様に自己リン酸化によって抑制されるのではないかと考えた。そこで YjjJ の自己リン酸化部位 Ser200 をリン酸と同じ負電荷をもつアミノ酸である Asp または Glu に置換した S200D および S200E 変異体をそれぞれ構築し、それらが *E.coli* の生育に与える影響を調べた。その結果、YjjJ S200D および S200E の発現は *E. coli* の生育を阻害した (Fig. 3-4)。ただし、今回の結果は、疑似的な自己リン酸化 YjjJ である S200D および S200E を用いたものであり、実際のリン酸化が YjjJ のキナーゼ活性に与える真の影響とは異なる可能性がある。もしかすると、YjjJ の自己リン酸化はキナーゼ活性を制御するのかもしれない。また、YjjJ の休眠誘導活性が HipA と同様に自己リン酸化による制御を受けているのであれば、YjjJ および HipA によって誘導された休眠から覚醒する際に自己リン酸化が重要となる。つまり、ストレスを脱出して生体内の ATP 濃度が上昇すると、ATP 量依存的に YjjJ および HipA が自己リン酸化されて不活性化し、休眠から覚醒するのかもしれない。休眠からの覚醒のためには、HipA または YjjJ が単独でシスにリン酸化するより、YjjJ および HipA によるトランスなリン酸化のほうが効率がよく、より早く休眠から脱することができると考えられる。YjjJ のリン酸化活性の機能のさらなる解明のためには、YjjJ の構造解析が必須であろう。

## YjjJ の DNA 結合と休眠誘導

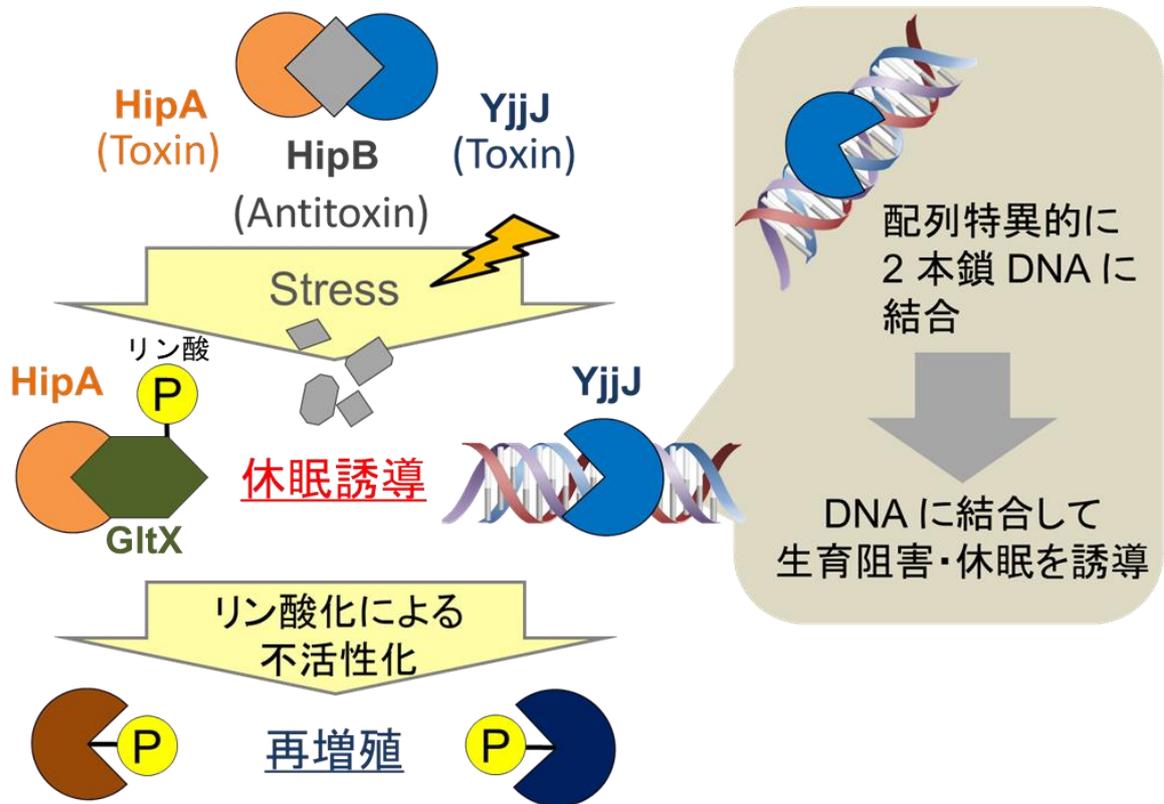
Table 3-12 に示したように、YjjJ はアミノ酸の合成経路、解糖系、タンパク質合成および細胞分裂などに関与する遺伝子のプロモーター領域に結合する可能性がある。よって、YjjJ はこれらの遺伝子の転写を阻害することで生育阻害や休眠を引き起こすのかもしれない。例えば、アミノ酸飢餓が生じると ppGpp の細胞内のレベルが上昇する。ppGpp は RNA 合成酵素や翻訳開始因子に作用して休眠を誘導する (Traxler et al., 2008)。YjjJ は、*aroF* などのアミノ酸前駆体合成または *tufA* などの翻訳伸長因子の遺伝子の転写を抑制することで疑似的なアミノ酸飢餓を引き起こし、その結果として ppGpp が菌体内に蓄積して休眠が誘導されるのかもしれない。またプロトン駆動力や ATP 合成量の変動によっても休眠細胞数は変動する (Allison et al., 2011; Meylan et al., 2017; Yamamoto et al., 2018)。YjjJ はガラクトース代謝酵素転写因子である *galS* および L-グリセルアルデヒド 3-リン酸分解酵素である *gpr* などの解糖系に関与する遺伝子の転写を阻害し、菌体内の代謝を変動させることで休眠細胞を誘導する可能性がある。

## ファージ感染に対する YjjJ および HipA の機能

興味深いことに、YjjJ 結合配列 J1 の一部 (5'-GTTCCCCGCGCCAGCGG-GGATAAACCG-3') が、ファージ 防御機構の 1 つである CRISPR-Cas system の CRISPR のリピート配列に存在していた。細菌は、レセプター変異によるファージの吸着阻止、制限修飾系や CRISPR-Cas system による侵入したファージ DNA の切断 および Type III TA system による感染した細菌の除去などの

ファージに対する複数の防御機構を有する (Fineran et al., 2009; Labrie et al., 2010; Szczepankowska, 2012; Vasu and Nagaraja, 2013)。CRISPR-Cas system において、CRISPR は 25-40 塩基の回文配列を含むリピート配列と 25-40 塩基のスペーサー配列という 2 種類の DNA 配列の繰り返しによって構成されている。リピート配列は同一の CRISPR 内では共通した配列だが、スペーサー配列はそれぞれ特異的な配列を有している。CRISPR の近傍には、CRISPR-associated genes (Cas 遺伝子) が存在する。ファージやプラスミドが侵入してくると、Cas1-Cas2 複合体が外来核酸を断片化し、新たなスペーサーとして CRISPR に取り込まれる。この CRISPR 領域から転写された CRISPR RNA (crRNA) は、特定の Cas タンパク質と複合体を形成する。crRNA-Cas 複合体は過去に感染した外来核酸に由来するスペーサー配列と相補的な配列を認識、切断除去する。よって、YjjJ は CRISPR のリピート配列へと結合し、ファージ DNA の切断に必要な CRISPR 領域の転写を調節することでファージ防御機構に関与する可能性がある。

最後に *E. coli* における HipA および YjjJ を介した休眠誘導機構のモデル図を示した (Fig. 5-1)。通常の生育条件下では、HipA および YjjJ は HipB と複合体を形成しており、その活性は抑制されている。ストレスによって ATP 依存性プロテアーゼが誘導されて不安定な HipB が優先的に分解されると、HipA および YjjJ が遊離する。HipA は GltX およびその他のタンパク質をリン酸化し、生育阻害および休眠を誘導する。一方で、YjjJ はゲノム DNA 上に複数存在する特異的な配列に選択的に結合することで特定の遺伝子群の転写を抑制し、生育阻害および休眠を誘導すると考えられた。その後、ストレス環境を休眠によって生き抜いた細菌は、菌体内の ATP 濃度の増加に依存した HipA および YjjJ の自己リン酸化を経て休眠状態から覚醒し、増殖へと移行すると考えられる。



**Fig. 5-1. HipA-HipB および YjjJ-HipB TA system を介した休眠機構および YjjJ-HipB TA system の生理的役割のモデル図**

通常、HipA および YjjJ は HipB と複合体を形成している。ストレス条件下で誘導された ATP 依存性プロテアーゼによって HipB が分解され、HipA および YjjJ が遊離する。遊離したこれらの toxin は生育停止を引き起こし、休眠を誘導する。遊離後は、それぞれ自己リン酸化し不活性型となる。また YjjJ は二本鎖 DNA 特異的に結合する。

*E. coli* に見出された YjjJ は DNA 結合タンパク質であり、現在までに DNA 結合タンパク質が TA system の toxin として機能する報告はない。今回発見された 1 つの antitoxin によって制御される 2 つの toxin が誘導する新規の休眠機構は、細菌における休眠誘導機構のモデル系となり得るものである。さらに、HipB、HipA および YjjJ の菌体内での相互作用を解析できれば、細菌の増殖から休眠への移行、休眠状態の維持および覚醒の各段階の分子機構の解明、さらには、細菌の自発的休眠と覚醒の共通原理の提案につながることを期待される。

## 参考文献

- Allison, K.R., Brynildsen, M.P., Collins, J.J., 2011. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* 473, 216–220.
- Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., Leibler, S., 2004. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305, 1622–1625.
- Bernard, P., Kézdy, K.E., Van Melderen, L., Steyaert, J., Wyns, L., Pato, M.L., Higgins, P.N., Couturier, M., 1993. The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J. Mol. Biol.* 234, 534–541.
- Black, D.S., Irwin, B., Moyed, H.S., 1994. Autoregulation of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J. Bacteriol.* 176, 4081–4091.
- Black, D.S., Kelly, A.J., Mardis, M.J., Moyed, H.S., 1991. Structure and organization of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J. Bacteriol.* 173, 5732–5739.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y., 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453–1462.
- Bochner, B.R., Gadzinski, P., Panomitros, E., 2001. Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res.* 11, 1246–1255.
- Cherepanov, P.P., Wackernagel, W., 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9–14. doi:10.1016/0378-1119(95)00193-a
- Correia, F.F., D'Onofrio, A., Rejtar, T., Li, L., Karger, B.L., Makarova, K., Koonin, E.V., Lewis, K., 2006. Kinase activity of overexpressed HipA is

- required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 8360–8367.
- Cozzone, A.J., 1988. Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 97–125.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6640–6645.
- Dworkin, J., 2015. Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 24, 47–52.
- Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., 2006. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet.* 2, e135.
- Gefen, O., Balaban, N.Q., 2009. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 704–717.
- Gerdes, K., Christensen, S.K., Løbner-Olesen, A., 2005. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 371–382.
- Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N., Gerdes, K., 2013. Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Mol. Cell* 52, 248–254.
- Godoy, V.G., Jarosz, D.F., Walker, F.L., Simmons, L.A., Walker, G.C., 2006. Y-family DNA polymerases respond to DNA damage-independent inhibition of replication fork progression. *EMBO J.* 25, 868–879.
- Grant, C.E., Bailey, T.L., Noble, W.S., 2011. FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* 27, 1017–1018.
- Gutiérrez-Ríos, R.M., Rosenblueth, D.A., Loza, J.A., Huerta, A.M., Glasner, J.D., Blattner, F.R., Collado-Vides, J., 2003. Regulatory network of *Escherichia coli*: consistency between literature knowledge and microarray profiles. *Genome Res.* 13, 2435–2443.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J., 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Mol. Biol.* 177, 4121–4130.

- Hale, A.J., Smith, C.A., Sutherland, L.C., Stoneman, V.E.A., Longthorne, V.L., Culhane, A.C., Williams, G.T., 1996. Apoptosis: Molecular Regulation of Cell Death. *European Journal of Biochemistry* 236, 1–26.
- Hansen, S., Vulić, M., Min, J., Yen, T.-J., Schumacher, M.A., Brennan, R.G., Lewis, K., 2012. Regulation of the *Escherichia coli* HipBA toxin-antitoxin system by proteolysis. *PLoS ONE* 7, e39185.
- Harms, A., Fino, C., Sørensen, M.A., Semsey, S., Gerdes, K., 2017. Prophages and Growth Dynamics Confound Experimental Results with Antibiotic-Tolerant Persister Cells. *MBio* 8, 357.
- Hayes, F., 2003. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301, 1496–1499.
- Higuchi, R., Krummel, B., Saiki, R.K., 1988. A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16, 7351–7367.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28.
- Ireland, W.T., Beeler, S.M., Flores-Bautista, E., McCarty, N.S., Röschinger, T., Belliveau, N.M., Sweredoski, M.J., Moradian, A., Kinney, J.B., Phillips, R., 2020. Deciphering the regulatory genome of *Escherichia coli*, one hundred promoters at a time. *Elife* 9, 1129.
- Jayaraman, R., 2008. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *J Biosci.* 33, 795–805.
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., Lewis, K., 2004. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 8172–8180.
- Kobayashi, H., Yoshida, T., Inouye, M., 2009. Significant enhanced expression and solubility of human proteins in *Escherichia coli* by fusion with protein S from *Myxococcus xanthus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5356–5362.
- Kolodkin-Gal, I., Verdiger, R., Shlosberg-Fedida, A., Engelberg-Kulka, H., 2009. A differential effect of *E. coli* toxin-antitoxin systems on cell death in liquid media and biofilm formation. *PLoS ONE* 4, e6785.

- Korch, S.B., Henderson, T.A., Hill, T.M., 2003. Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol. Microbiol.* 50, 1199–1213.
- Kramer, G.F., Ames, B.N., 1988. Isolation and characterization of a selenium metabolism mutant of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 170, 736–743.
- Kwan, B.W., Valenta, J.A., Benedik, M.J., Wood, T.K., 2013. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1468–1473.
- Lewis, K., 2010. Persister Cells. *Annu Rev Microbiol.* 64:357-72
- Liu, S., Wu, N., Zhang, S., Yuan, Y., Zhang, W., Zhang, Y., 2017. Variable Persister Gene Interactions with (p)ppGpp for Persister Formation in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 8, 1795.
- Macek, B., Gnad, F., Soufi, B., Kumar, C., Olsen, J.V., Mijakovic, I., Mann, M., 2008. Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation. *Mol. Cell Proteomics* 7, 299–307.
- Maeda, Y., Lin, C.-Y., Ishida, Y., Inouye, M., Yamaguchi, Y., Phadtare, S., 2017. Characterization of YjjJ toxin of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 364, e1609.
- Meylan, S., Porter, C.B.M., Yang, J.H., Belenky, P., Gutierrez, A., Lobritz, M.A., Park, J., Kim, S.H., Moskowitz, S.M., Collins, J.J., 2017. Carbon Sources Tune Antibiotic Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* via Tricarboxylic Acid Cycle Control. *Cell Chem Biol* 24, 195–206.
- Mileykovskaya, E., Ryan, A.C., Mo, X., Lin, C.-C., Khalaf, K.I., Dowhan, W., Garrett, T.A., 2009. Phosphatidic acid and N-acylphosphatidylethanolamine form membrane domains in *Escherichia coli* mutant lacking cardiolipin and phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* 284, 2990–3000.
- Moyed, H.S., Bertrand, K.P., 1983. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J. Bacteriol.* 155, 768–775.

- Muthuramalingam, M., White, J.C., Bourne, C.R., 2016. Toxin-Antitoxin Modules Are Pliable Switches Activated by Multiple Protease Pathways. *Toxins (Basel)* 8, 214.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79.
- Orrenius, S., 2006. Early work on apoptosis, an interview with Sten Orrenius. *Cell Death Differ.* 13, 1–4
- Roszak, D.B., Colwell, R.R., 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews* 51, 365–379.
- Schumacher, M.A., Balani, P., Min, J., Chinnam, N.B., Hansen, S., Vulić, M., Lewis, K., Brennan, R.G., 2015. HipBA-promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. *Nature* 524, 59–64.
- Schumacher, M.A., Min, J., Link, T.M., Guan, Z., Xu, W., Ahn, Y.-H., Soderblom, E.J., Kurie, J.M., Evdokimov, A., Moseley, M.A., Lewis, K., Brennan, R.G., 2012. Role of unusual P loop ejection and autophosphorylation in HipA-mediated persistence and multidrug tolerance. *Cell Rep* 2, 518–525.
- Schumacher, M.A., Piro, K.M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K., Brennan, R.G., 2009. Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science* 323, 396–401.
- Schuster, C.F., Bertram, R., 2013. Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiol. Lett.* 340, 73–85.
- Semanjski, M., Germain, E., Bratl, K., Kiessling, A., Gerdes, K., Macek, B., 2018. The kinases HipA and HipA7 phosphorylate different substrate pools in *Escherichia coli* to promote multidrug tolerance. *Sci Signal* 11, eaat5750.
- Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A., Kaldalu, N., Kurg, K., Lewis, K., 2006. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.* 6, 53.
- Shimada, A., Masui, R., Nakagawa, N., Takahata, Y., Kim, K., Kuramitsu, S., Fukui, K., 2010. A novel single-stranded DNA-specific 3'–5' exonuclease,

- Thermus thermophilus* exonuclease I, is involved in several DNA repair pathways. *Nucleic Acids Res.* 38, 5692–5705.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209.
- Studier, F.W., Moffatt, B.A., 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113–130.
- Traxler, M.F., Summers, S.M., Nguyen, H.-T., Zacharia, V.M., Hightower, G.A., Smith, J.T., Conway, T., 2008. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 68, 1128–1148.
- Van Melderen, L., Saavedra De Bast, M., 2009. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet.* 5, e1000437.
- Villegas-Mendoza, J., Cajal-Medrano, R., Maske, H., 2015. INT (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-(Phenyl) Tetrazolium Chloride) Is Toxic to Prokaryote Cells Precluding Its Use with Whole Cells as a Proxy for In Vivo Respiration. *Microb. Ecol.* 70, 1004–1011.
- Wakamoto, Y., Dhar, N., Chait, R., Schneider, K., Signorino-Gelo, F., Leibler, S., McKinney, J.D., 2013. Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. *Science* 339, 91–95.
- Wang, X., Wood, T.K., 2011. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *77*, 5577–5583.
- Wen, Y., Behiels, E., Felix, J., Elegheert, J., Vergauwen, B., Devreese, B., Savvides, S.N., 2014. The bacterial antitoxin HipB establishes a ternary complex with operator DNA and phosphorylated toxin HipA to regulate bacterial persistence. *Nucleic Acids Res.* 42, 10134–10147.
- Wu, N., He, L., Cui, P., Wang, W., Yuan, Y., Liu, S., Xu, T., Zhang, S., Wu, J., Zhang, W., Zhang, Y., 2015. Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. *Front Microbiol* 6, 1003.

- Yamaguchi, Y., Inouye, M., 2015. An endogenous protein inhibitor, YjhX (TopAI), for topoisomerase I from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 43, 10387–10396.
- Yamaguchi, Y., Inouye, M., 2011. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 779–790.
- Yamaguchi, Y., Park, J.-H., Inouye, M., 2011. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annu. Rev. Genet.* 45, 61–79.
- Yamamoto, N., Isshiki, R., Kawai, Y., Tanaka, D., Sekiguchi, T., Matsumoto, S., Tsuneda, S., 2018. Stochastic expression of lactate dehydrogenase A induces *Escherichia coli* persister formation. *J Biosci Bioeng* 126, 30–37.
- Zhu, L., Sharp, J.D., Kobayashi, H., Woychik, N.A., Inouye, M., 2010. Noncognate *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxins can physically and functionally interact. *J. Biol. Chem.* 285, 39732–39738.

## 謝辞

本博士論文の研究を行うに際しまして、よいデータが出た時も全くデータが出ないときも常に見守りの確な助言を頂き、また分子生物学の基礎知識を叩きこんでくださった山口良弘准教授に心から感謝いたします。

また、本論文をご校閲頂くとともに、ご指導、ご助言を賜りました増井良治教授、中村太郎教授、藤田憲一准教授に深く御礼申し上げます。

苦しい時でも諦めずここまで研究をひたむき行えたのは、どんな時も支え合ってくれた同期の釋真緒さん、毎日楽しく研究の議論を交わしてくれた生体低分子機能学研究室の皆様のおかげです。また、常に実験について有益なご助言をいただきました田中俊雄先生、荻田亮教授をはじめ、タンパク質関連の実験において気軽に相談に乗ってくださった藤井さんおよび学生の皆様、ゲルろ過クロマトグラフィーおよび電子顕微鏡の観察について助力くださった細胞機能学研究室の宮田真人教授、松生さん、高橋さんをはじめ、細胞機能学研究室の学生の皆様にも深く感謝いたします。RIなどの扱いの難しい実験を行えたのは厳密に管理をしてくださっている水原尚子様のおかげです。加えて、データを正しく統計解析できたのは佐藤・D・駿博士のご助力があってこそでした。心より御礼申し上げます。

また、在職中にもかかわらず私のキャリアのため笑顔で博士取得を支えてくれた小林製薬株式会社の日用品事業部および人事部の皆様に大変感謝しています。

最後に、よきライバルであり、友であった、大阪市立大学大学院理学研究科生物地球系専攻 2018 年度入学の同期の皆様に深謝の意を表します。