

Title	An ADP-ribosyltransferase Alt of bacteriophage T4 negatively regulates the Escherichia coli MazF toxin of a toxin-antitoxin module
Author(s)	Shaqiqat Alawneh, Abdulraheem
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/59514
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

Abstract of Thesis

Name (Shaqiqat Alawneh Abdulraheem M.A.)	
Title	An ADP-ribosyltransferase Alt of bacteriophage T4 negatively regulates the <i>Escherichia coli</i> MazF toxin of a toxin-antitoxin module (バクテリオファージT4のADPリボシル基転移酵素Altは大腸菌MazFトキシン活性を負に制御する)
Abstract of Thesis	
<p>Prokaryotic toxin-antitoxin (TA) systems are linked to many roles in cell physiology, such as plasmid maintenance, stress response, persistence against antibiotics and protection from phage infection, and the activities of toxins are tightly regulated. Here, I describe a novel regulatory mechanism for a toxin of <i>Escherichia coli</i> TA systems. The MazF toxin of MazE-MazF, which is one of the most characterized type II TA systems, was modified immediately after infection with bacteriophage T4. Mass spectrometry demonstrated that the molecular weight of this modification was 542 Da, corresponding to a mono-ADP-ribosylation. This modification disappeared in cells infected with T4 phage lacking Alt, which is one of three ADP-ribosyltransferases encoded by T4 phage and is injected together with phage DNA upon infection. <i>In vivo</i> and <i>in vitro</i> analyses confirmed that T4 Alt ADP-ribosylated MazF at an arginine residue at position 4. Ribonuclease activity assays showed that ADP-ribosylation of MazF by Alt resulted in the reduction of MazF RNA cleavage activity <i>in vitro</i>, suggesting that it may function to inactivate MazF during T4 infection. Indeed, T4Δ<i>alt</i> phage produced significantly less progeny per infected cell than wild type T4 phage, however this difference was only observable when <i>E. coli</i> cells were infected at early log phase but not during later stages. To understand why, I followed the expression of MazE and MazF from early log phase through stationary phase. Interestingly, MazE and MazF were highly expressed in early growth stages and gradually decreased to unobservable levels under my experimental conditions in later growth stages. This is the first example of the chemical modification of an <i>E. coli</i> toxin in TA systems to regulate activity and this is the first clue suggesting that MazEF expression is growth stage dependent.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Abdulraheem Alawneh)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	西田 宏記
	副 査	教授	升方 久夫
	副 査	教授	柿本 辰男
	副 査	特任教授	金澤 浩

論文審査の結果の要旨

近年、様々な原核生物においてストレス環境に適応またはそれを乗り越えるための生存戦略として、トキシン-アンチトキシン (TA) 遺伝子モジュールが同定された。トキシンは細胞分裂を阻害する活性を有しているが、通常はアンチトキシンが結合することによりトキシン活性は抑制されている。原核生物がストレスに晒されたとき TA 遺伝子の転写が抑制されるため、トキシンに比べて著しくプロテアーゼによる分解を受けやすいアンチトキシンの量は優先的に減少する。その結果、遊離したトキシンの作用により細胞分裂が抑えられる。TA は種類が多く、遊離生活を営む原核生物ほど多数の TA を持つ傾向にあるがその理由は不明である。原核生物に感染するウイルスであるファージの感染は一種のストレスと考えられるので、ファージ感染と TA の関係に注目した申請者は TA がファージの増殖を抑制する働き、すなわち抗ファージ機構として働き得るのか、さらにファージはこの抗ファージ機構に対抗する仕組みを持つのか、について検討した。モデル原核生物である大腸菌は 37 種類の TA をもつが、そのうち解析がよく進んでいる MazEF と RelBE を対象として、T4 ファージの感染時に起きる変動を調べたところ、それぞれのアンチトキシンである MazE と RelB は速やかに消失すること、それぞれのトキシンである MazF と RelE の過剰発現により T4 ファージの増殖は抑制されることから、これらの TA は抗ファージ機構として働き得ることを明らかにした。さらに、T4 ファージ感染後の MazF が SDS ポリアクリルアミド電気泳動による移動度を低下させることを見出し、この変化が MazF の ADP リボシル化であること、ADP リボシル化活性をもつ T4 の Alt がこの化学修飾を行うこと、を見出した。MazF は RNA を切断するエンドリボヌクレアーゼ活性をもつことが知られているが、申請者は ADP リボシル化された MazF はエンドリボヌクレアーゼ活性を大きく低下させることも見出した。これらのことから、T4 は MazF の抗ファージ作用に拮抗する仕組みをもつことが示唆された。実際に、申請者は Alt を欠失した T4 ファージ変異体を感染させる実験から、増殖段階の進んだ大腸菌に感染させたときは増殖能に差が認められないものの、より若い大腸菌に感染させたときは T4 ファージの増殖能が低下することを見出した。この Alt 効果の違いを説明するために、大腸菌の増殖段階を変えて MazF の発現を追跡したところ、MazF の発現は極めて若い増殖段階に特有であることを見出した。以上のことから、MazF の発現は大腸菌の増殖段階に依存すること、この時期の大腸菌に感染した T4 ファージは Alt の作用により MazF のトキシン活性を低下させることにより自らの増殖を有利にすることが明らかとなった。併せて、今回の発見は、1 種のトキシンは限定された生理的条件下で作用するため多種のストレスに対抗するために原核生物は多種の TA を保有していること、原核生物とファージは共進化すること、等生物学上極めて意義深い示唆も与えた。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。