

令和 4 年 4 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22630

研究課題名（和文）最新型クライオ電子顕微鏡による細胞分裂フィラメントの高分解能構造解析

研究課題名（英文）High-resolution structure analysis of cell-division filament using recent high-end cryo-EM

研究代表者

藤田 純三（Fujita, Junso）

大阪大学・生命機能研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：80876368

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細菌の細胞分裂中に形成されるFtsZフィラメントのクライオ電子顕微鏡による構造解析を実施した。負染色法による観察により、肺炎桿菌由来FtsZとそれに結合する抗体様タンパク質（モノボディ）を混合すると比較的太く安定なフィラメントが形成されることを見出した。クライオ電子顕微鏡によりデータを取得し解析を行った結果、分解能2.67 Åでの構造決定に成功した。全体として2本のFtsZプロトフィラメントが二重らせんを形成するような構造をとっており、モノボディは各プロトフィラメント間の隙間を埋めるように結合していた。これによりFtsZフィラメントの分子基盤を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにはらせん型のFtsZフィラメントを高分解能で構造決定した例はなく、またその構造はホモログであるチューブリンから構成される微小管に似ているが異なる点もあった。このことは細菌の細胞分裂における構造基盤となる新たな知見を与えるだけでなく、ホモログ間での機能の違いという分子進化の観点からも興味深い。またFtsZは細菌の生存に必須であること、及び今回構造決定に成功したのは病原菌由来のFtsZであることから、その分子機構についての理解を深めることは抗菌薬の開発においても非常に重要である。

研究成果の概要（英文）：In this study, structure analysis of FtsZ filaments, which are formed during bacterial cell division, was performed using cryo-EM. The observation by negative staining revealed that FtsZ from *Klebsiella pneumoniae* supplemented with a binding monobody formed relatively thick and stable filaments. After cryo-EM data collection and image analysis, overall map resolution reached 2.67 Å. Two distinct FtsZ protofilaments formed a double-helical structure, and FtsZ-bound monobodies filled the gaps between the protofilaments. These results lead to the molecular basis and mechanism of FtsZ filaments.

研究分野：構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 単粒子解析 細胞分裂 肺炎桿菌 繊維状タンパク質 FtsZ モノボディ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂はあらゆる生物に必須の基本的な生命現象であるが、その機構は生物種によって大きく異なっており、まだまだ十分に理解されているとは言い難い。細菌等の原核生物においては Divisome と呼ばれるタンパク質複合体により細胞分裂の制御が行われている。Divisome には 20 種類程度のタンパク質が順次リクルートされていくが、その最初の構成成分にして最も重要なタンパク質が FtsZ である。FtsZ は真核生物におけるチューブリンのホモログであり、GTP 依存的に重合しフィラメント状の構造を形成する (1)。さらにこのフィラメントが多数集合することで細胞中央にリング状の構造 (Z リング) を形成した後、収縮することにより細胞分裂を進ませる。細菌にとって FtsZ は生存に必須であり、これらのタンパク質に対する阻害剤は抗菌薬の候補となりうることから、その分子機構についての理解を深めることは薬学、医学的にも重要である。

FtsZ はダイマー間の相互作用面に活性部位を形成し GTP 加水分解反応を行う。また、そのフィラメントは + 端と - 端という 2 種類の異なる末端を有し、+ 端では重合が、- 端では脱重合が起こることによるフィラメントの正味の運動 (トレッドミリング) をすることが知られている。細胞分裂は細胞壁の形状変化を伴う生命現象であるため、Z リングの収縮と細胞壁の分解・合成は連動して起こる必要があるが、近年 FtsZ フィラメントのトレッドミリングは細胞壁合成酵素と連動しており、細胞分裂の進行において極めて重要であることが分かっていた (2)。このメカニズムを解き明かすため、これまでに数多くの種に由来する FtsZ の X 線結晶構造解析が行われてきた。当初は GTP の加水分解に伴いコンフォメーションの変化が起こると考えられていたが、GTP および GDP が結合した FtsZ の結晶構造には大きな変化はなかった。その後、黄色ブドウ球菌由来 FtsZ について open 型と closed 型の 2 種類の結晶構造がいずれも GDP 結合型で決定され、open 型は closed 型に比べて分子間の相互作用が強いということが分かった (3)。このことから、FtsZ の重合・脱重合においては 2 種類のコンフォメーション間の構造変化が重要であり、構造変化により隣接分子との結合力を変化させ重合・脱重合を制御しているのではないかと考えられるようになった。しかし、依然としてフィラメント中における GTP/GDP の結合状態とコンフォメーション変化との関係は不明であり、また結晶中では多数の分子が規則的に詰まっておりフィラメントの形状に制限がかかるため、本当に生体内における溶液構造を反映しているのかという疑問も残っているのが現状である。これに対して、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析ではタンパク質が溶液中で水和した状態の構造が得られるため、結晶構造よりも生体内に近い構造が観察できると考えられている。これまでにクライオ電子顕微鏡を用いて大腸菌由来 FtsZ フィラメントの構造決定を試みた例が 1 例あるが (4)、その分解能は 7.8 Å にとどまっているため詳細な分子間相互作用に関する情報は得られていない。

2. 研究の目的

本研究では最新のクライオ電子顕微鏡を用いて FtsZ フィラメントの構造を高分解能、具体的には 3-4 Å 程度での構造決定を行うことで GTP/GDP の結合状態やアミノ酸側鎖の相互作用まで可視化することを目的とした。また、得られたクライオ電顕構造と結晶構造とを比較することで、FtsZ フィラメントの構造と機能に関する知見を得ることを目標とした。

3. 研究の方法

組換え大腸菌を用いて FtsZ を大量調製した後、GTP や GDP およびそのアナログや結合タンパク質を加えた状態で負染色法による観察を行い、フィラメント形成条件について検討した。安定なフィラメントを形成する条件を見出した後、氷包埋法により凍結試料を作製し、クライオ電子顕微鏡を用いて観察を行った。複数の試料に対して非晶質氷の厚さ等のスクリーニングを行い、最も高分解能データ収集に適した試料を用いて一晩自動撮影を行った。このデータを画像解析することにより三次元密度マップを再構成し、そこに良く一致する原子モデルを構築した。得られた原子モデルを基に既知の結晶構造と比較しながら考察を行った。

4. 研究成果

当初は黄色ブドウ球菌由来 FtsZ についてデータセットを収集し解析を行っていたが、フィラメント自身の細さや柔軟性のために構造決定には至らなかった。そこで、立命館大学の松村浩由教授と共同で肺炎桿菌 *Klebsiella pneumoniae* 由来 FtsZ フィラメントおよびそれに結合する抗体様タンパク質(モノボディ)の構造解析を行った。フィラメントの形成条件について検討するため、GTP や GDP およびそのアナログを加えて負染色法による観察を行ったところ、加えた化合物によって細く直線的なフィラメントおよび太く柔軟なフィラメントの 2 種類を形成することが分かった。さらに、この FtsZ に結合するモノボディを加えると太いフィラメントが直線的になり安定化することを見出した。この FtsZ-モノボディ複合体について氷包埋法により試料調製を行い、クライオ電子顕微鏡によりフィラメントの形成を確認することができた。データセット収集と解析を行った結果、これまでに結晶構造中で観察されていたようなプロトフィラメント構造を維持したまま、2本のフィラメントが二重らせんを形成するような構造であることが分かった。これはホモログであるチューブリンから作られる微小管と似た構造であるが、シーム(継ぎ目)を持たない点で異なる。モノボディは全ての FtsZ 分子に結合しており、各プロトフィラメント間の隙間を埋めるような位置に存在していた。マップ分解能が 2.67 Å まで到達したことで、各分子間の側鎖同士による相互作用までも可視化することができた。また、結晶構造中におけるプロトフィラメントと今回の電顕構造中におけるプロトフィラメントの構造を比較した結果、電顕構造中におけるプロトフィラメントの方が曲率が大きく、分子間の相互作用面積も大きいことが分かった。

これまででらせん型の FtsZ フィラメントを高分解能で構造決定した例はなく、またその構造は真核生物におけるホモログであるチューブリンから構成される微小管に似ているが異なる点もあった。このことは細菌の細胞分裂における構造基盤の一端を解き明かす結果というだけでなく、原核生物と真核生物におけるホモログ間での機能の違いという分子進化の観点からも興味深い内容である。また FtsZ は細菌の生存に必須であること、及び今回構造決定に成功したのは病原菌由来の FtsZ であることから、今回明らかとなった分子機構は抗菌薬の開発においても重要な知見となることが期待される。現在これらの結果をまとめた論文を執筆中である。

<引用文献>

- (1) Erickson, H. P., Anderson, D. E. & Osawa, M. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 504–528 (2010).
- (2) Bisson-Filho, A. W. *et al.* Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science* **355**, 739–743 (2017).
- (3) Matsui, T. *et al.* Structural change in FtsZ Induced by intermolecular interactions between bound GTP and the T7 loop. *J. Biol. Chem.* **289**, 3501–3509 (2014).
- (4) Wagstaff, J. M. *et al.* A Polymerization-Associated Structural Switch in FtsZ That Enables Treadmilling of Model Filaments. *Mbio* **8**, e00254-17 (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	松村 浩由 (MATSUMURA HIROYOSHI) (30324809)	立命館大学・生命科学部・教授 (34315)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関