

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06036

研究課題名（和文）細菌の細胞分裂におけるFtsZ繊維化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the polymerization mechanisms of bacterial FtsZ.

研究代表者

松井 崇（MATSUI, Takashi）

北里大学・理学部・講師

研究者番号：30463582

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：真正細菌に保存されたタンパク質であるFtsZは、結合する核酸をGDPからGTPへ変えることで自己重合して繊維構造を形成することで細胞分裂に關与する。

本研究ではX線結晶構造解析、分子動力学計算（MD計算）、クライオ電子顕微鏡、質量分析計などの物理化学的・計算科学的手法を用いて、FtsZ分子の核酸結合や構造状態の違いによる分子安定性の変化や構造変化機構の解明を目指した。

その結果、FtsZの構造変化や構造安定性が菌株によって異なる可能性を明らかにした。また、この構造安定性には菌株間のヒンジ領域のアミノ酸の違いや、2つのサブドメイン間の相互作用の違いによって生じる可能性を示すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細菌感染症の新規ターゲット候補であるFtsZを対象に、FtsZの構造変化や安定性が細菌ごとに異なる可能性を示唆したものである。構造変化や安定性の発現機構の違いを原子分解能でより詳細に明らかにすることができれば、温度などの生育環境の異なる細菌でFtsZがなぜ同じように機能するのかという物理化学的な理解が可能となる。さらに、菌株間の分子運動性の違いを活用した、特定の細菌選択的な抗菌分子の設計に寄与するなど、社会問題である細菌感染症に対する応用研究へと進展することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：FtsZ is conserved in bacteria and is involved in the bacterial cell division. This study aimed to elucidate the mechanisms of molecular stability and structural changes in FtsZ molecules using physicochemical and computational methods such as X-ray crystallography, molecular dynamics (MD) simulations, cryo-electron microscopy, and mass spectrometry. The results revealed differences in FtsZ's structural changes and stability among the bacteria. Additionally, the study indicated that variations in amino acids in the hinge region between bacterial strains might influence this structural stability.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：X線結晶構造解析 透過型電子顕微鏡 構造プロテオミクス 機械学習 分子動力学計算 FtsZ

### 1. 研究開始当初の背景

バンコマイシン耐性を獲得したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌等の多剤耐性細菌の出現や、既往歴のある高齢者が結核や百日咳を再発させるなど、今日、本邦でも再興感染症の危機に晒されている。そこで、細菌感染症に再び打ち勝つために、既知作用機序とは異なる細菌に必須な機構に作用する医薬品開発の必要性が叫ばれている。

新規医薬品標的分子の候補として真正細菌に保存され、GTPase活性を持ち自己重合することで細胞分裂に関与するFtsZがある。J. Löwe博士らが解析した世界初のFtsZ-GDP複合体結晶構造からこれまで、すべての細菌由来のFtsZの結晶構造はRelax構造 (R構造) と呼ばれる構造状態を形成していた (Löweら, *Nature*, 1998, Olivaら, *J. Mol. Biol.*, 2007など)。また、ウラン染色透過型電子顕微鏡 (負染色TEM) から、FtsZ-GTP複合体の重合構造は直線型繊維、FtsZ-GDP複合体の重合構造は曲線型繊維として観測されている (Tadrosら, *FEBS Lett.*, 2006など)。したがって、R構造をとるFtsZはGTPと結合して細胞分裂点に直線状のFtsZ繊維を形成し、GTP加水分解によりR構造間の分子間相互作用が変化すると繊維構造が湾曲化して母細胞は細胞分裂点でくびれ、最終的に細胞が分裂し、FtsZ-GDP複合体は脱重合するモデルが考えられていた。

一方、申請者は、世界で初めて直線状に繊維化した黄色ブドウ球菌由来FtsZ (*SaFtsZ*) のTense構造 (T構造) のX線結晶構造解析に成功した (Matsui T., *et al.*, *Acta Cryst.*, D, 2012)。さらに、*SaFtsZ*の同一変異体から、R構造とT構造の両構造の取得に成功し、T構造/R構造の構造遷移を捉えることにも初めて成功した (Matsui T., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2014)。これにより、「GTPと結合することでT構造からなる直線型繊維が形成され、GDPへの加水分解によりR構造へ構造遷移することで繊維構造が湾曲化する」新たな細胞分裂機構を提唱し、FtsZ研究の一般的概念となっている (図1)。のちに、*SaFtsZ*の野生型でもこの構造変化は証明された (Fujitaら, *J. Struct. Bio.*, 2017)。

### 2. 研究の目的

しかし、これまでの構造解析からは、ブドウ球菌属のFtsZのみT構造が得られ、その他の菌株由来FtsZはR構造のみが解析されている事実から、菌株によってT構造とR構造の安定性が異なると示唆された。そこで、*SaFtsZ*と枯草菌FtsZ (*BsFtsZ*)を対象に、分子動力学 (MD) シミュレーションや、キメラFtsZの結晶構造解析、透過型電子顕微鏡によって、単量体構造や繊維構造を解析する。これにより、細菌に保存されたFtsZの分子安定性の違いを生む機構を明らかにし、この構造安定性の違いを生む領域をターゲットとした病原性細菌に特異な分子標的薬の開発へとつなげることが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

上述の目的を達成するために、いかに示す方法により研究を進めた。

#### (1) FtsZのMDシミュレーション

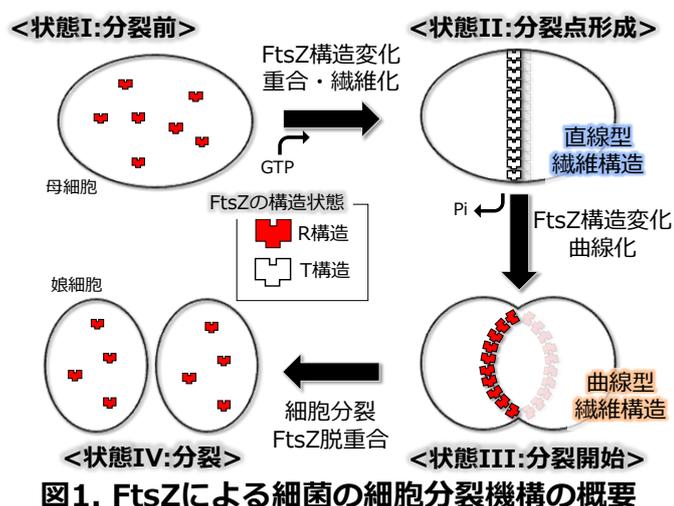
*SaFtsZ*のT構造 (3VOA) およびR構造 (5H5G分子B)、および*BsFtsZ*のR構造 (2VXY)を初期構造として用いた。各構造の核酸結合部位にはGTPまたはGDPを配置し、セルの中心にFtsZを配置した。セル内は水分子で満たし、また、セル内の総電荷をNa<sup>+</sup>イオンを加えることで中和した。FtsZとNa<sup>+</sup>イオンの力場はAMBER ff99SB-ILDNを使用し、水分子はTIP4P-Ew、核酸はgeneral Amber force fieldを使用した。また、restrained electrostatic potential電荷を核酸に割り当てた。エネルギー極小化計算の後に、最終的に平衡化計算をNPTアンサンブル (310 K, 1 bar, 200 ns)の条件で、計算のステップを2 fsとして実行した (Takasawaら, *Research Square*, (2024))。

#### (2) FtsZの発現・精製

*SaFtsZ*および*BsFtsZ*は、過去の論文を参考に調製した (Matsui T., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, (2014), Matsui T., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (2017))。また、(1)のMDシミュレーションの結果に従い、*SaFtsZ*の一部配列を*BsFtsZ*に移植した複数のキメラ変異体を設計した。これらのキメラ変異体は、野生型と同様に精製した。

#### (3) FtsZの構造解析

キメラ変異体は、過去の論文を参考に結晶化した (Matsui T., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, (2014))。得られた結晶は高エネルギー加速器研究機構



のビームライン BL-1A や BL-5A など測定した。得られた回折像から、野生型 FtsZ の構造を鋳型にキメラ変異体の結晶構造を分子置換法によって求めた。

また、FtsZ の繊維構造を解析するために、SaFtsZ は様々な濃度条件およびバッファー条件を変えてその試料状態を物理化学的な分析で確認した。繊維状となっていることが示唆された試料は、負染色透過型電子顕微鏡 (JEM-1400 Plus, JEOL) およびクライオ電子顕微鏡 (CRYO ARM300 II, JEOL) で観察した。

#### 4. 研究成果

はじめに、単量体状態の構造安定性を評価するために、SaFtsZ と BsFtsZ の R 構造および T 構造は、それぞれ GDP または GTP を核酸結合部位に配置した後、200 ns の平衡化計算を行った。その結果、SaFtsZ は GTP と結合した T 構造で最も安定で、平衡化計算での構造変化が少なかった。一方、BsFtsZ は R 構造で結晶構造と良く一致した安定な構造を示した。次に、核酸を結合する N 末端側サブドメイン (NTD) と重合時に GTPase 活性を引き起こす構造変化を示すサブドメイン (GAD) との相対配置について着目した。その結果、2つのサブドメインはそれぞれの菌株の構造で異なる構造変化を示した。SaFtsZ において、GDP と結合した T 構造の NTD に対する GAD との相対変化では、GAD が NTD に対して時計回りに変化する運動を示した。しかし、BsFtsZ の T 構造では、GAD は NTD に対して反時計回りに回転する運動を示した。したがって、SaFtsZ と BsFtsZ の各サブドメインを繋ぐヒンジ領域のアミノ酸配列や各サブドメイン同士の相互作用の違いが、単量体や重合構造の安定化に影響を及ぼす可能性が示唆された (図 2)。

SaFtsZ は分子が重合方向へ並進した状況で、T 構造および R 構造の結晶構造が得られている。一方、ブドウ球菌属以外の FtsZ の結晶構造は、R 構造を取った 2 量体または単量体でしか構造解析できていない。したがって、SaFtsZ は他の菌株の FtsZ と異なり、少なくとも結晶状態では分子の安定性が他の菌株の FtsZ とは異なることが示唆されている。また、上述したように MD シミュレーションの結果から、SaFtsZ と BsFtsZ には異なるサブドメイン間の相対的な運動性の違いが存在する可能性が示唆された。そこで、BsFtsZ のサブドメインの一方を SaFtsZ のサブドメインへ入れ替えたキメラ変異体を *in silico* で作成し前述と同様に MD 計算を行った。その結果、GAD 側のアミノ酸配列に依存してサブドメイン間の相対的な回転運動の方向が変化することが示唆された。そこで、キメラ変異体を調製し、その立体構造を解析した。調製したキメラ変異体は、①GAD を黄色ブドウ球菌の配列へ入れ替えたもの、②ヒンジ領域と GAD を黄色ブドウ球菌へ入れ替えたものを調製した。GAD を入れ替えたキメラ変異体は、複数の結晶化条件で結晶を得ることができた。これらの結晶の一部は高エネルギー加速器研究機構のビームラインで X 線回折実験を行い、キメラ変異体の結晶構造を解析した。その結果、解析できているキメラ変異体の立体構造は BsFtsZ の結晶構造と RMSD が 1Å 以下でよく一致していた。したがって、これらの解析できたキメラ変異体ではサブドメイン間の構造変化は観測できなかった。これらのことから、*in silico* での推定とは異なり、SaFtsZ の結晶構造にだけ見られる T 構造への構造安定化は、単に GAD 側のアミノ酸配列だけに起因するものではなく、NTD 中のアミノ酸残基や GAD と NTD との相互作用や重合方向に存在するアミノ酸残基の違いによって引き起こされている可能性も示唆された。

現在は、これらの MD シミュレーションや結晶構造からの菌株による構造安定性の違いだけでなく、単量体中の構造安定性の違いが SaFtsZ や BsFtsZ の重合構造の安定性へも影響を及ぼすか確かめるため、SaFtsZ の重合構造の CryoEM を測定し、3次元再構成中である。

構造安定性の違いは熱安定性や機能発現のための至適温度の違いを生むと考えられ、FtsZ の構造安定性を評価することで、温度の違う細菌の生息環境の違いにおいても FtsZ が機能する機構を明らかにできると期待している。さらに、この分子安定性の違いを生む機構が明らかになることで、この構造安定性の違いを生む領域をターゲットとした病原性細菌に特異な分子標的薬の開発へと発展していくことが期待される。

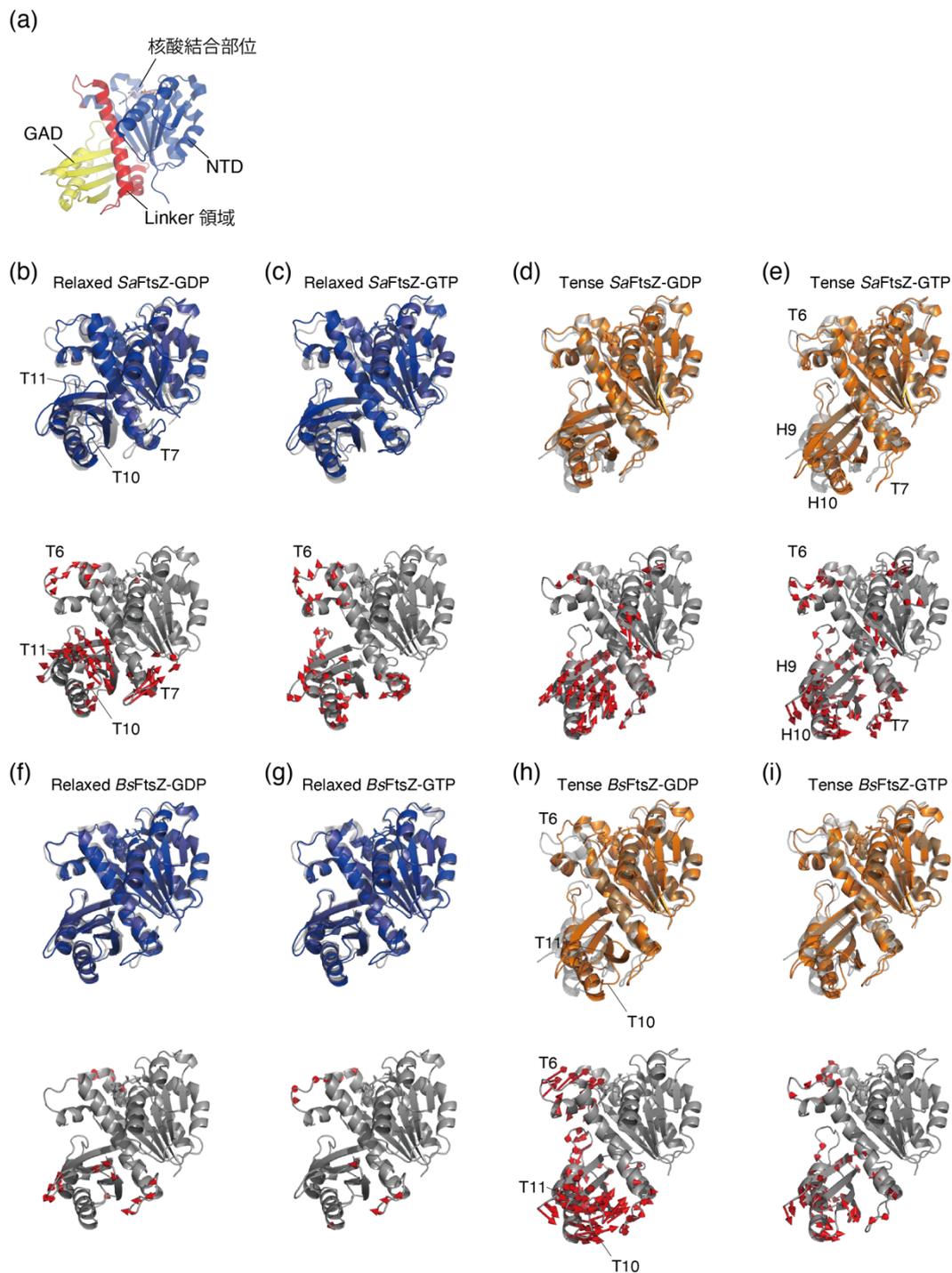


図 2. MD シミュレーションによる各構造状態での安定性と構造変化。(a) FtsZ の構造とサブドメインの領域。(b)-(i) 上段は結晶構造 (灰色) と平衡化計算の最後 50 ns での平均構造の重ね合わせを示す。下段は、結晶構造からの構造変化を赤色のベクトルで表記した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hamdy Sherif Ahmed, Kodama Takeshi, Nakashima Yu, Han Xiaojie, Matsui Takashi, Morita Hiroyuki	4. 巻 76
2. 論文標題 Enzymatic formation of a prenyl -carboline by a fungal indole prenyltransferase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 873 ~ 879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-022-01635-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watari Hiromi, Kageyama Hiromu, Masubuchi Nami, Nakajima Hiroya, Onodera Kako, Focia Pamela J., Oshiro Takumi, Matsui Takashi, Kodera Yoshio, Ogawa Tomohisa, Yokoyama Takeshi, Hirayama Makoto, Hori Kanji, Freymann Douglas M., Imai Misa, Komatsu Norio, Araki Marito, Tanaka Yoshikazu, Sakai Ryuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 A marine sponge-derived lectin reveals hidden pathway for thrombopoietin receptor activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34921-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsui Takashi, Kojitani Eiji, Takasawa Taichi, Suto Arisa, Tamari Ami, Watanabe Go, Kodera Yoshio	4. 巻 640
2. 論文標題 Assessment of inconsistencies in the solvent-accessible surfaces of proteins between crystal structures and solution structures observed by LC-MS	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 97 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.11.094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ito Hiroaki, Matsui Takashi, Konno Ryo, Itakura Makoto, Kodera Yoshio	4. 巻 11
2. 論文標題 LC-MS peak assignment based on unanimous selection by six machine learning algorithms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-02899-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ghanem Nouran, Kanagami Natsuki, Matsui Takashi, Takeda Kein, Kaneko Jun, Shiraishi Yasuyuki, Choe Christian A., Uchikubo Kamo Tomomi, Shirouzu Mikako, Hashimoto Tsubasa, Ogawa Tomohisa, Matsuura Tomoaki, Huang Po Ssu, Yokoyama Takeshi, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 -
2. 論文標題 Chimeric mutants of staphylococcal hemolysin, which act as both one component and two component hemolysin, created by grafting the stem domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsugita Atsushi, Uehara Shiro, Matsui Takashi, Yokoyama Takeshi, Ostash Iryna, Deneka Maksym, Yalamanchili Subbarao, Bennett Clay S., Tanaka Yoshikazu, Ostash Bohdan	4. 巻 -
2. 論文標題 The carbohydrate tail of landomycin A is responsible for its interaction with the repressor protein LanK	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16460	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takasawa Taichi, Matsui Takashi, Watanabe Go, Kodera Yoshio	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular dynamics simulations reveal differences in the conformational stability of FtsZs derived from Staphylococcus aureus and Bacillus subtilis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Research Square	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21203/rs.3.rs-3896320/v1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大城拓未, 影山大夢, 小野寺かこ, 辺浩美, 中島寛也, 小川智久, 横山武司, 田中良和, 酒井隆一, 松井崇, 小寺義男
2. 発表標題 高濃度PEG含有タンパク質結晶からのLC-MSによるアミノ酸配列解析
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 溜田海, 鈴木輝, 松井崇, 小寺義男
2. 発表標題 血液ペプチドーム解析のさらなる高度化を目指して
3. 学会等名 第73回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大城拓未, 影山大夢, 小野寺かこ, 辺浩美, 中島寛也, 小川智久, 横山武司, 田中良和, 酒井隆一, 松井崇, 小寺義男
2. 発表標題 高濃度PEG含有タンパク質結晶からのLC-MSによるアミノ酸解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須藤愛莉咲, 浅野航佑, 原口大輝, 小川智久, 横山武司, 田中良和, 松井崇, 小寺義男
2. 発表標題 ストップコドンリードスルーにおける誤翻訳アミノ酸の同定
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 溜田海, 鈴木輝, 中川譲, 紺野亮, 松井崇, 小寺義男
2. 発表標題 血液ペプチドーム解析のさらなる高度化を目指して
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松井崇, 伊藤大晃, 紺野亮, 溜亜海, 板倉誠, 小寺義男
2. 発表標題 質量分析データからの高精度なペプチドピーク抽出法の確立
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taichi Takasawa, Go Watanabe, Yoshio Kodera, Takashi Matsui
2. 発表標題 Molecular dynamics simulations on the conformational stability of FtsZ with the different bound nucleotides.
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大城拓未, 上原秀太, 田中良和, 伊藤卓也, 小寺義男, 松井崇
2. 発表標題 新規プレニル基転移酵素の構造解析
3. 学会等名 2022年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 影山大夢, 小野寺かこ, 松井崇, 小川智久, 横山武司, 田中良和
2. 発表標題 新規レクチン様タンパク質の構造と機能の解析
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中良和, 影山大夢, 辺ひろみ, 増淵菜弥, 中島寛也, 小野寺かこ, 大城拓未, 松井崇, 小寺義男, 小川智久, 横山武司, 小松則夫, 荒木真理人, 酒井隆一
2. 発表標題 海洋天然物由来の新規生理活性タンパク質の構造機能解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小寺義男, 中川謙, 板倉誠, 紺野亮, 紺野亮, 大橋潤子, 佐藤俊哉, 川島祐介, 松井崇
2. 発表標題 微量組織を対象とした高感度ペプチドミクス
3. 学会等名 第46回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小寺義男, 紺野亮, 伊東大晃, 松井崇
2. 発表標題 SI-GelC-MS/MSを用いた蛋白質切断状態の高精度比較分析
3. 学会等名 第69回質量分析総合討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大城拓未, 田中良和, 伊藤卓也, 小寺義男, 松井崇
2. 発表標題 海洋放線菌由来新規酵素の構造解析
3. 学会等名 2021年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松井崇
2. 発表標題 構造生物学とプロテオミクスの融合による立体構造情報の取得を目指して
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 須藤愛莉咲, 松井崇, 小寺義男
2. 発表標題 システイン含有ペプチドの定量解析に向けた検討
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takumi Oshiro, Shuta Uehara, Yoshikazu Tanaka, Takuya Ito, Yoshio Koder, Takashi Matsui
2. 発表標題 Structural analysis of a novel enzyme from marine Streptomyces
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Arisa Suto, Yoshio Koder, Takashi Matsui
2. 発表標題 Development of Highly efficient and specific modification technique for Cys residue
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本高大, 大城拓未, 高澤太一, 小寺義男, 渡辺豪, 松井崇
2. 発表標題 細胞分裂タンパク質FtsZの構造遷移機構の解析
3. 学会等名 2023年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学理学部物理学科教員個人ページ <a href="https://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/buturi/seitai/matsui">https://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/buturi/seitai/matsui</a>
---

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
研究分担者	横山 武司 (Yokoyama Takeshi) (20719447)	東北大学・生命科学研究科・助教  (11301)	
研究分担者	渡辺 豪 (Watanabe Go) (80547076)	北里大学・未来工学部・教授  (32607)	

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
---------	---------