

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770088

研究課題名(和文)複合体結晶構造解析による細菌のDivisome形成機構の解明

研究課題名(英文)Clarification of molecular mechanism of bacterial divisome formation

研究代表者

松井 崇 (Matsui, Takashi)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：30463582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細菌のDivisome形成機構を解明するため、始めに原線維を形成するFtsZの構造を解析した。その結果、新規プロトマー構造を決定し、既知および新規プロトマー構造間が互いに構造遷移し、脱重合阻害物質が新規構造でのみ形成されるcleftに結合することを解明した。

さらに、FtsZとFtsAの複合体構造を解析するため、FtsAの機能を解析した。FtsAは結晶構造からATPaseを持つことが示唆され、FtsZの重合の有無に関わらずFtsAとFtsA:FtsZ= 1:2分子で結合するが、FtsZ存在下でもATPaseは観測されず、ATPaseとFtsZの結合・重合の相関は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of forming the bacterial divisome, firstly, FtsZ, which polymerizes as the protofilament, was crystallized and its novel conformation was determined. Moreover, it was also found that previous and novel FtsZ protomers were converted each other, and one of the potent inhibitor bound to a cleft formed on the novel protomer.

Subsequently, to determine the complex structure of FtsZ with FtsA, the conditions of FtsA under complex state were measured. Crystal structure of FtsA apo form suggested that FtsA seemed to have ATPase activity. ATPase activity of FtsA with or without FtsZ was not detected. However, polymerized FtsZ or monomeric FtsZ's mutant bound to FtsA with 1:2 ratio of FtsA: FtsZ. It was seemed that ATPase activity might be not correlated with interaction of FtsZ.

研究分野：構造生物学

キーワード：FtsZ FtsA 細菌の細胞分裂 Divisome 構造解析

1. 研究開始当初の背景

細菌に保存された細胞分裂タンパク質の FtsA や ZipA は、細胞分裂開始時に自己重合した FtsZ からなる原線維と複合体を形成し、原線維を細胞中間点の細胞膜へ固定化させる。この初期の細胞分裂タンパク質群 (Divisome) が形成されることで、Divisome はより下流の細胞分裂タンパク質と結合し、最終的に細胞が分裂する。また、原線維は、繊維構造を湾曲化させ、さらに FtsZ の脱重合により細胞分裂の進行に関与する。原線維は FtsA や ZipA を含む Divisome 蛋白質結合の足場となるため、原線維構造の変化はこれら Divisome 蛋白質の相互作用や機能発現に重要と考えられる。これまで、FtsZ の原線維構造が電子顕微鏡により解析され、繊維構造が変化することは知られているが、個々の FtsZ 分子の構造と繊維構造との相関は不明であった。さらに、どのような原線維状態下で FtsZ と FtsA や ZipA が相互作用するかも定かではなかった。

2. 研究の目的

本研究では細菌の細胞分裂機構のうち初期の細胞分裂を司る Divisome の複合体化機構の解明を目指した。まず、Divisome を形成する前段階として、FtsZ が自己重合し原線維を形成し、その後、FtsA や ZipA 等の下流の Divisome 蛋白質が相互作用する。しかし、原線維がどのように FtsA や ZipA と複合体を形成して原線維を膜に固定化させ細胞分裂が進むか、分子レベルでの複合体形成機構はわかっていない。そこで、本研究では FtsA や ZipA と原線維との複合体の立体構造と相互作用解析から、Divisome 形成機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

FtsZ, FtsZ 変異体, FtsA および ZipA の精製

黄色ブドウ球菌および枯草菌由来 FtsZ とその変異体および FtsA は His タグ融合タンパク質として発現させ、Ni アフィニティーカラム、イオン交換カラムとゲルろ過カラムに供し精製した。また、大腸菌や緑膿菌由来 FtsZ および ZipA も同様に調製した。

FtsZ, FtsZ 変異体, FtsA, ZipA および複合体試料の結晶化

上記精製方法により精製された試料は、5 mg/ml 程度まで濃縮後、市販の結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化を実施した。スクリーニングにより得られた初期結晶は含有する試薬組成の最適化条件を検討し、高分解能結晶を作成した。しかしながら、ZipA は結晶を得ることができなかった。

FtsZ, FtsZ 変異体および FtsA 単体の結晶構造解析

得られた結晶は、高エネルギー加速器研究機構または SPring-8 にて X 線回折実験を実施した。得られた回折像より、分子置換法を用

いて各構造の立体構造を決定した。

GTPase, ATPase 活性測定

GTP/ATP の濃度を変え、50 μ M FtsZ/FtsA、50 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM MgCl₂、300 mM NaCl 存在下で反応後、遊離リン酸濃度を測定するため BIOMOL Green 試薬を加え、30°C、30 分インキュベートし 620 nm 吸光度で活性を評価した。

等温滴定熱量 (ITC) 測定実験

試料は 50 mM Tris-HCl pH 8.0、300 mM NaCl に透析した。NanoAnalyze (TA Instruments) を使用し、50 μ M FtsA 溶液中に 2 μ l ずつ 180 秒間隔で 25 回、250 μ M FtsZ を滴下し熱量変化を測定した。

4. 研究成果

本研究では始めに原線維構造変化の詳細な分子機構を解明するため、FtsZ および FtsZ 変異体を調製し、原線維構造と FtsZ 構造の相関を解析した。これまで、FtsZ は菌種や核酸結合状態 (GTP, GDP または核酸非結合状態) に関係なく、ただ 1 つの構造状態のみが観測されていた。しかし、黄色ブドウ球菌 FtsZ (SaFtsZ) とその変異体の結晶構造解析から、本研究で初めて新たな FtsZ プロトマー構造を得ることに成功した。さらに、FtsZ 変異体の結晶構造解析から、FtsZ が既知プロトマー構造と新規プロトマー構造間を構造遷移することを明らかにした (図 1)。特に、FtsZ の GTPase 活性残基を含む T7 loop が隣接分子の GTP 結合部位中の GTP と相互作用する事で、FtsZ は曲線型から直線型へと重合構造を変えることを初めて明らかにした。また、FtsZ の脱重合を抑制する阻害候補化合物 PC190723 は新規プロトマー構造に特有な cleft に結合することでプロトマー構造の構造変化を抑制し、脱重合を抑制する事も明らかとなり (図 2)、今後の抗菌剤創薬研究に重要な示唆を与えた。

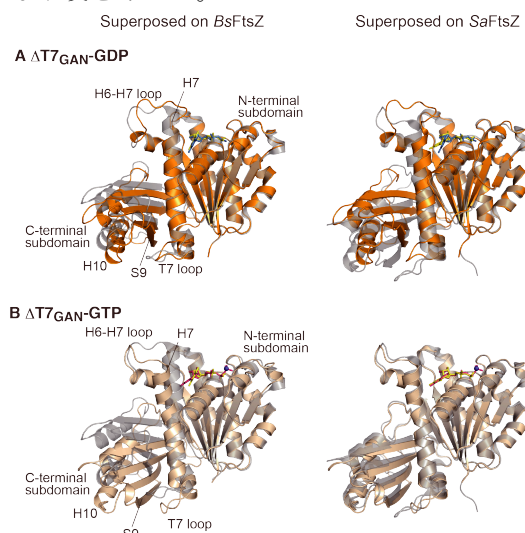


図 1. FtsZ 変異体と (A)GDP および (B)GTP 結合状態での既知構造 (左) と新規構造 (右) との比較

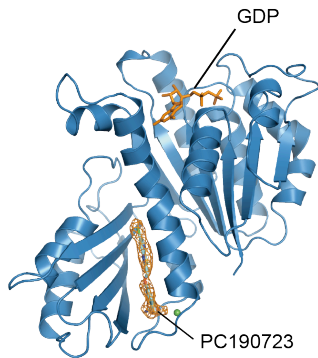


図 3. FtsZ と PC190723 の共結晶構造.

次に、FtsZ からなる原線維に最初に結合すると考えられている FtsA の構造・機能解析と FtsZ との相互作用解析を実施し、黄色ブドウ球菌 FtsA (*SaFtsA*) の構造解析に成功した。*SaFtsA* は 1A、1C、2A、2B の 4 つのサブドメインからなり、ATP および Mg イオンが結合していた。Actin は 4 つのサブドメイン (1A、1B、2A、2B) からなり、1B と 2B からなる下部サブユニットが 1A と 2A からなる上部サブユニットと相互作用することで重合体を形成する。Actin ファミリーに属する *SaFtsA* は Actin の 1B ドメインが FtsA の 1C ドメインにスワップすることで、1A と 2B からなる下部サブユニットと、1C と 2A からなる上部サブユニットとで重合していた (図 3)。また、*SaFtsA* は *Thermotoga maritima* FtsA (*TmFtsA*) と配列相同性が 20% 程度であるが、全体構造の r. m. s. d. は 2.1 Å とほぼ同様の構造を取り、また、共に ATP と Mg イオンを結合していた。これらの構造情報や構造を加味した配列相同性解析から FtsA ファミリーの ATP 結合部位のアミノ酸を比較すると、ATP や Mg イオンと相互作用するアミノ酸は多くが保存されていることが明らかとなった。FtsA が ATP と結合する事から、*in vivo* で何らかの機能発現に ATP や ATPase が重要であると考えられた。そこで、グラム陽性細菌である *SaFtsA* および枯草菌 FtsA (*BsFtsA*) について ATPase 活性測定を実施した。その結果、ATP 結合部位のアミノ酸配列は保存性が高いものの、*BsFtsA* では ATPase 活性が顕著に確認できたが *SaFtsA* では ATPase 活性が観測されなかった。そこで、FtsA は FtsZ との相互作用時に ATPase 活性を発現するという仮説を立て、FtsZ 存在下で FtsA の ATPase を観察したが、この場合でも *SaFtsA* の活性は観測できなかった。一方、FtsZ の重合 (野生型)・乖離 (変異体) 状態と FtsA の相互作用について ITC により検討したところ、FtsZ の重合に関わらず共に K_d 値 1 μ M 以下で FtsZ 2 分子に対し、FtsA 1 分子の割合で結合していた。これらの結果から、*SaFtsZ* の結合や *SaFtsZ* の polymer 状態と *SaFtsA* の ATPase 活性には相関が低い事が示唆された。現在、GTP アナログまたは ATP アナログ存在有無で、モル比を FtsA: FtsZ = 1:2 とし、複合体結晶化条件を検

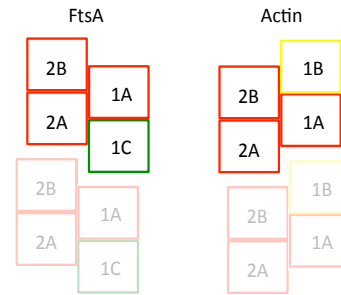


図 2. FtsA と Actin のドメイン構成

討中である。

今後は、さらに FtsA と相互作用するより下流の Divisome 蛋白質との三者複合体結晶構造や相互作用解析により、Divisome 形成機構のより詳細かつより下流のステージについての機構の解明も目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Mori T, Yang D, Matsui T, Hashimoto H, Morita H, Fujii I, Abe I. Structural basis for the formation of acylalkylpyrones from two β -ketoacyl units by the fungal type III polyketide synthase CsyB. *J. Biol. Chem.* 290, 5214-5225, (2015), 査読有, DOI: 10.1074/jbc.M114.626416.
- ② Noike M, Matsui T, Ooya K, Sasaki I, Ohtaki S, Hamano Y, Maruyama C, Satoh Y, Ito H, Morita H, Dairi T. A peptide ligase and the ribosome cooperate to synthesize the peptide pheganomycin. *Nat. Chem. Biol.* 11 71-76, (2015), 査読有, DOI: 10.1038/nchembio.1697.
- ③ Yang D, Mori T, Matsui T, Hashimoto M, Morita H, Fujii I, Abe I. Expression, purification and crystallization of a fungal type III polyketide synthase that produces the csypyrones. *Acta Cryst.* F70, 730-733, (2014), 査読有, DOI: 10.1107/S2053230X14008516.
- ④ Matsui T, Han X, Yu J, Yao M, Tanaka I. Structural Change in FtsZ Induced by Intermolecular Interactions between Bound GTP and the T7 loop. *J. Biol. Chem.* 289, 3501-3509, (2014), 査読有, DOI: 10.1074/jbc.M113.514901.
- ⑤ Matsui T, Yamane J, Mogi N, Yamaguchi H, Takemoto H, Yao M, Tanaka I. Structural reorganization of the bacterial cell division protein FtsZ from *Staphylococcus aureus*. *Acta Cryst.* D68, 1175-1188, (2012), 査読有, DOI: 10.1107/S0907444912022640.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 松井崇, 抗菌剤の新規標的分子 FtsZ に対する天然薬用資源からの阻害活性分子の探索. 富山大学和漢医薬学総合研究所・長崎大学熱帯医学研究所 第4回交流セミナー. 2014年12月8日. 富山大学(富山市)
- ② Matsui T. Structure analysis of bacterial cell division protein FtsZ for drug discovery. Scientific workshop for Natural Products Chemistry, 2014, Mar. 12th, Hue University of Medicine and Pharmacy (Vietnam, Hue city).
- ③ Han X., Matsui T., Mogi N., Yamane J., Yamaguchi H., Yao M., Tanaka I. Structural reorganization of *S. aureus* FtsZ: insight into the polymerization mechanism, The 10th International Symposium for Future Drug Discovery and medical Care, 2012, Oct., 2nd-3rd, Hokkaido University (Sapporo, Japan).
- ④ 松井崇, 山根潤二, 茂木伸幸, 山口寛人, 武本武, 姚閔, 田中勲. *Staphylococcus aureus* FtsZ の結晶構造解析からわかった FtsZ の動的構造変化と重合機構, 日本結晶学会, 2012年10月23-24日, 東北大学(仙台市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hokudai.ac.jp/news/2014/03/ftsz-gtp-t7-fts-z-pdf.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 崇 (Matsui, Takashi)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：30463582