

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440014

研究課題名(和文) 桿菌の形態形成に関わる細胞骨格蛋白RodZの構造とDNA/RNA結合能の解析

研究課題名(英文) Analysis for structure and DNA/RNA binding activity of the bacterial cytoskeletal protein RodZ

研究代表者

三戸部 治郎 (Jiro, Mitobe)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：40333364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：桿菌の桿状構造を構成する“細菌の細胞骨格蛋白”の一つのRodZはRNA結合活性をもち、赤痢菌の3型分泌装置のレギュレーターinvE(virB)の発現調節に作用する。本研究ではRodZが6量体を形成し、RNA結合活性が6量体の複数集合したクラスターに依存すること、内膜でもRodZがクラスター状の集合をつくることを明らかにした。またRodZが翻訳に関与する他の遺伝子の検索しinvE以外の例としてRNAポリメラーゼのサブユニットであるrpoSおよびrpoH遺伝子を同定した。またDNA/RNA結合能の解析ではどちらも配列特異的な結合能は見られず、塩濃度による変化が大きいことが示された。

研究成果の概要(英文)：Bacterial cytoskeletal protein RodZ, which is involved in formation of rod shape of bacilli, is also involved in post-transcriptional regulation of invE(virB) gene in the type 3 secretion system of *Shigella* through the RNA binding activity. In this study, we found that the RNA binding activity was depended on hexamer formation and clustering ability of multiple hexamers. Such cluster was consistently detected by immuno-fluorescent microscopy with super resolution confocal setting. In an attempt to isolate genes under regulation by RodZ, we found that expression of rpoS and rpoH genes encoding sigma subunits of RNA polymerase, which have been well-characterized post-transcriptional regulation, were increased by rodZ mutation. Analysis of DNA and RNA binding activities indicated that sequence specificity was not identified. In addition, the binding activity was sensitive to the salt concentration.

研究分野：細菌学

キーワード：バクテリア細胞骨格 RNA結合蛋白 転写後調節 蛋白局在

1. 研究開始当初の背景

赤痢菌の病原性に必須な 3 型分泌装置 (T3SS) の発現に作用する因子のスクリーニングから、桿菌の形態形成に関わるバクテリア細胞骨格 RodZ の変異体が得られた。我々は RodZ が形態以外の機能として核酸結合活性を持ち、その RNA 結合能が T3SS のレギュレーター *invE* (*VirB*) の発現に転写後レベルで作用することを示し、RodZ が形態形成以外に RNA 結合能を持つ蛋白であることを明らかにした。(課題番号 23590531 平成 23~25 年度基盤 C) 生化学的な解析から精製した RodZ 蛋白は多量体を形成しており、RNA 結合能と共に、DNA に対する結合能が見出され、これまで報告されていない RodZ の役割が存在することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では a) 多量体の形成能とその構造機能相関の解析、b) RNA 結合能を介した転写後調節の解析を進めると共に、c) これまで報告されていない DNA 結合能を調べ、細胞分裂時における、RodZ の役割を明らかにすることを目的とした。このように、当研究は研究オプションが複数あり進行の早いプロジェクトを優先して進めることを当初から予定した。

一方、a) の RodZ の多量体形成能に関する論文投稿に際して、RNA 結合能を介した調節機構が、*invE* 遺伝子でしか示されていないという指摘があり、他の遺伝子での例を見出す必要が生じた。研究全体の客観性を担保させるためにも、その解析が不可欠だと考えられたため、c) のテーマに本格的に移行する前に、b) の一環として RodZ が調節に関与する遺伝子群の発見に注力した。

3. 研究の方法

公共の知識の共有のため一般性のある手法については特に具体的に記述した。

a) RodZ の多量体形成構造の解析

<免疫染色法の確立>

RodZ の菌体での分布を観察するため、免疫染色のプロトコールを確立・最適化した。Levin P. 2002 *Methods Microbiol.* 31. 115-132 を原法とし、改良点のみ記述する。

固定は 1ml culture を 10ml 80%メタノールで常温 1 時間固定し、0.32%パラホルムアルデヒドで 5 分間追加固定したものが最も感度が高かった。菌体はスライドガラスより、カバーガラス(松浪 No.1S)に固定した方が鮮明であった。通常使用するポリ L リシン処理では菌体は付着性が悪く、洗浄に PBS を用いると菌が剥離しやすかった。

1% polyethylenimine (Sigma) を 10 分間結合し、水洗・乾燥したカバーガラスを用いると PBS でも安定な結合がみられた。菌体の固定部分は事前に油性マジック(マッキ

-pro) で 6mm 程度の円を描き、そこに抗体希釈液を載せることで使用量を抑えた。

菌はリゾチーム処理をした後に 5 分間カバーガラスに付着し、余剰の液体を除き、常温で約 5 分間乾燥させた。その後ブロッキングとして、1% Skim-milk, 0.1% gelatin (0.45 μ m Filtered) in TBST (150mM NaCl, 20mM TrisHCl pH7.5+0.1% Tween20) で 5 分間処理した。

バックグラウンド低減のため以下の工夫を行った。1) 二次抗体がヤギ由来のため、Toyobo CanGetSignal Solution A (CGSA) で 5% に希釈した非働化正常ヤギ血清で 37 30 分ブロッキングした。2) 抗体はすべて 0.2 μ m のフィルターを通過させた。一次抗体は CGSA や 37 では非特異的シグナルが増加したため、TBST で 500 倍に希釈し常温 (25) で 1 時間反応した。3) ノイズの軽減のため洗浄は 4 で 1 時間行った。4) 抗マウス蛍光 2 次抗体は CGSA で 200 倍希釈とし 37 で 1 時間反応した。5) スライドガラスへの封入は ProLong Diamond (Thermo Fisher) を用い固化後、レーザー共焦点顕微鏡 LSM700 および超焦点顕微鏡 LSM880 にて観察した。

<システイン変異体の構築>

野生型の *rodZ* 遺伝子は 2 カ所のシステイン残基を持ち、これらの形成するジスルフィド結合で 6 量体を形成するものと考えられる。これらのアミノ酸をグリシンに変換した変異体を発現ベクター pBAD24Kan にクローニングした。

b) RodZ の RNA 結合能の解析

<大量精製法の確立>

構造解析・抗体作成のため、大量精製法の確立を行った。これまで用いていた複数のカラムを使用する RodZ の精製法は煩雑であったため、原法 (Mitobe J et al. 2011 *EMBO reports* 12(9) 911-916) の His-tag を使用する前段階の簡素化をおこなった。

具体的には pET システムで大量発現した BL21(DE3) を塩を含まないバッファー (20mM Tris-HCl pH7.5) に懸濁し、フレンチプレス (12000psi) で菌体を破碎した。膜分画に局在する RodZ はこのバッファーには溶解せず、5000g 10min の遠心で可溶性成分を除いた。この不溶性分画を 1% TritonX-100 を含む二次バッファーに懸濁し硫酸沈殿で核酸分画を除いたのち、Whatman P-11 Phosphocellulose カラムで精製した。初期段階で物理的に膜成分を分画することで、95% 以上の不純物を除くことが可能になり、大量の菌体を処理し、高濃度の RodZ (1mg/ml) を精製することが可能になった。

4. 研究成果

a) RodZ の多量体形成構造の解析

精製した RodZ は高分子量の複合体を形成し、ゲル濾過分析で 600kDa 以上の高分子量側に分離される。RodZ をそれぞれ Tween20 単独もしくは、Tween20 と DTT の存在下でゲル濾過分離したところ、高分子量、中分子量、低分子量と 3 つのピークが現れたことから RodZ はジスルフィド結合で中程度の分子量の “basal complex” を形成し、この basal complex 同士が疎水結合で “superstructure” を形成していることが予想された。この basal complex はジスルフィド結合と同程度の分子間距離をクロスリンクした複合体の MALDI-TOF 解析によって正確な 6 量体を作ることが証明されている。

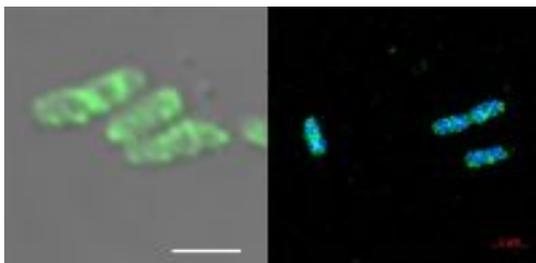
RodZ を Tween20 +DTT を含むバッファでゲル濾過して得られる高分子量、中分子量、低分子量の 3 つのピークの RNA 結合能を調べたところ、basal complex 自体には RNA 結合活性はなく、複数の basal complex が結合した場合に RNA 結合能をもつことが分かった。

また *in vivo* の RodZ の集合状態を観察するために、菌体から可溶化した RodZ を直接ゲル濾過で分画したところ、RodZ は 600kDa 以上の高い分子量側に分離された。以上の観察は RodZ が菌体内膜に分布するときにある程度大きなサイズのクラスターを形成することを示唆した。

RodZ はもう一つの細胞骨格蛋白 MreB と螺旋状に局在することが示されている。一方これまで報告された RodZ の細胞内分子数は 2000 分子程度であり、この分子数でクラスターを形成しながら規則的な螺旋を形成する可能性は低いと考えられた。

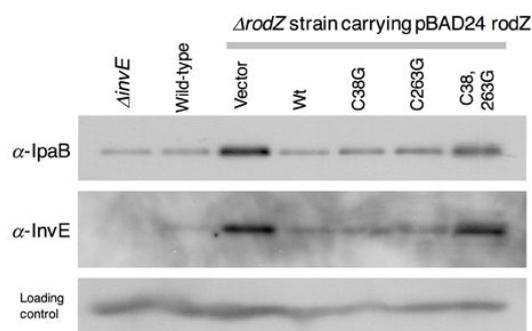
この矛盾を解明するため免疫蛍光染色を用いて発現プラスミドではなく通常の染色体の発現レベルの RodZ の観察を行った。その結果、光学顕微鏡では数ミクロンの菌体の観察が解像度の限界であり、それ以上の微細構造の解析は電顕での免疫染色が必要と考えられた。

免疫 TEM は一般的なプロトコールに準じて、一次抗体を 25 倍希釈で行ったが非特異的な反応が否定できず断念した。通常の光学顕微鏡では観察不可能なレベル（下図左）であったため、共同研究者の柳原らにカーンツァイスマイクロコピー（株）の協力を得て、超焦点共焦点レーザー顕微鏡 LSM880 での観察を行った（下図右）。



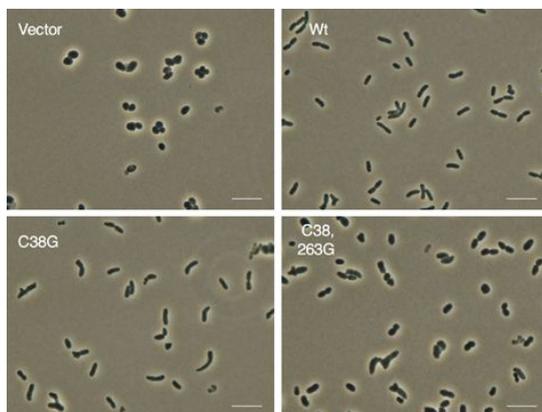
通常の共焦点顕微鏡では、RodZ は斑状の境界不明瞭なシグナルとして認識されるところ、LSM880 では境界明瞭な多数の輝点のシグナルとしてクラスターが認識された。クラスターの分布を観察すると、ランダムに分布しているよりは、離散的にらせん状に配置している菌体が多いように思われた。これは最初に予想したように限られた分子数の RodZ がクラスター状の集合を形成して細胞膜上に集まって機能していることを証明するように思われた。

RodZ はシステイン残基で 6 量体を形成することが予想される。これが RodZ の機能に影響するか調べるため、このシステイン残基をグリシンに置換した変異遺伝子を作成し、*rodZ* 欠損株にプラスミドで導入しその機能を調べた。



発現調節に関する機能を調べるためシステイン欠損プラスミドを持つ株と *rodZ* 欠損株で、低温(30)における InvE 蛋白の発現を観察した。通常野生型では 30 で InvE は発現が抑制され、*rodZ* 欠損株(上図 Vector)では抑制が失われることで発現が起こる。

これらの株を 30 で培養し InvE の発現を比較したところ二ヶ所あるシステインを全置換した株(下図 C38,263G)は *rodZ* 欠損株と同様に InvE の発現が起こることが示された。これはシステインの欠損株では RodZ が正常な機能をしておらず 6 量体の形成が重要であることを示唆した。



次に、これらの置換が菌の形態に影響するか調べたところ、システイン置換株では細胞の形態が短く、三角形に尖ったもの、二枝に分裂するものなどが出現し、置換数が多いほど変化が増加した(上図)。

また、これらの株を上記の免疫染色法と超焦点顕微鏡で観察したところ、C38,263G置換株では野生型で見られたクラスター状のシグナルの塊が小さくなり比較的均等に膜に分布していることが示された。

蛋白の安定性がこれらの変化に影響しているか調べるため、野生型 RodZ と C38,263G 置換蛋白を発現させて、細胞内の安定性を調べた。クロラムフェニコールでタンパク合成を阻害したのち観察したところ 20 分の観察では両者に蛋白量の差は見られなかった。

また、pBAD プラスミドの RodZ 発現を増加させるアラビノースの濃度を増やしても形態は変わらなかった。以上の結果より変異で蛋白安定度が低下するのではなく、ジスルフィド結合が細胞の形態や蛋白の局在に影響することを示し、6 量体の形成とそのクラスターが RodZ の機能に必要なことが示された。

b) RodZ が発現調節に関与する遺伝子の探索

RodZ が発現調節に関与する遺伝子は赤痢菌の 3 型分泌装置のレギュレーター *invE* 以外は知られていない。他の遺伝子を探索するため、マイクロアレイを用いた網羅的探索を行った。

マイクロアレイは mRNA の半減期が減少している遺伝子を探索した。具体的には *rodZ* 欠損株の培養液にリファンピシンを加えて 4 分間転写を止めたサンプルの mRNA の減少量を野生型と比較して、減少量の少ない遺伝子群を同定した。

次いで、染色体の *rodZ* 遺伝子の C 末端に His-tag を付加した RodZ::his₆ 株を作成し、ホルマリンでクロスリンクした mRNA-蛋白複合体を回収し、プロテアーゼ処理後、RodZ に結合した mRNA を回収した。

上述の 100 遺伝子にリアルタイム PCR を行い、RodZ と *in vivo* で結合が認められる遺伝子群を 31 個同定した。

ところが実際に遺伝子発現が調節されるか調べるために、これらの遺伝子のプロモーターからコード領域(約 150bp)を *lacZ* 遺伝子のレポータープラスミドに導入し、野生型株と *rodZ* 欠損株に導入して翻訳活性を比較したところ、有意差をもつものは得られなかった。

以上の結果は RodZ は細胞の中で mRNA と結合するが、実際に翻訳に影響するのはごく一部の遺伝子に限られることを示した。

一方、表現型から探索を行ったところ、偶然に *rodZ* 変異株で過酸化水素水の反応性が

増加することを見いだした。*rodZ* 欠損株ではカタラーゼをコードする *katG* および *katE* 遺伝子の転写が増大しており、両遺伝子に共通な転写因子である RNA ポリメラーゼの因子である RpoS の蛋白発現をウエスタンブロットで調べたところ、野生型でほとんど発現しない条件でも *rodZ* 欠損株で増加していることが分かった。

これが翻訳レベルでの調節が調べるために *rpoS* と *lacZ* の転写融合と翻訳融合のレポータープラスミドを作成し、*rodZ* 欠損株と野生株と比較した。転写融合では両者で活性に有意差は認められなかったが、翻訳融合では *rodZ* 欠損株で活性が約 3 倍に増大しており、*rodZ* の発現プラスミドを相補することで、野生型レベルに発現が回復した。

RpoS の発現は mRNA レベルで制御されることが知られている。他の因子である RpoH も同様の制御が知られており、ウエスタンブロットで発現を調べたところ RpoS と同様の挙動を示すことが分かった。

以上の観察は RodZ が発現に関与する遺伝子が *invE* 遺伝子以外にも存在することを示した。これまでの例を総合すると RodZ は翻訳レベルで遺伝子の発現を抑制する方向に作用しているように思われた。細菌の環境応答に重要な因子の発現に RodZ が関与することは RodZ の RNA 結合能を介した翻訳制御が十分に一般的な現象であることを示唆している。

c) Rod の DNA 結合能の解析

精製した RodZ-His₆ を用いて DNA の結合能を再検した。これまで行われた Chip on chip の結果から、RodZ は生体内でも DNA と相互作用をしていることが示されているが、特異的な配列は同定されていない。同様にゲルシフト法でも特異的な配列に対する結合は見られなかったため、短く分断した大腸菌のゲノム DNA を ³²P でラベルし、RodZ-His₆ 蛋白に結合した放射能をチェレンコフカウンターで計測した。結合能は濃度に依存し、100mM の塩濃度で結合したものが 150mM ではほとんど結合しなかった。

細菌は外界の浸透圧変化に対応して細胞内の塩濃度を臨機応変に変化させることが知られている。こうした RodZ と DNA の結合の変化は生理的な機能に寄与している可能性が示唆された。

また、RNA 結合蛋白による制御に関連して 3 型分泌装置の発現に必須な別の RNA 結合蛋白 Hfq の欠損株が、血清型を超えた効果を持つ、全く新しい概念のワクチンとして有用であることを報告した。

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1件)

Jiro Mitobe, Ritam Sinha, Soma Mitra, Dhruvajyoti Nag, Noriko Saito, Ken Shimuta, Nobuo Koizumi, Hemanta Koley. 2017 An attenuated *Shigella* mutant lacking the RNA-binding protein Hfq affords cross protection against *Shigella* strains of broad serotype. PLOS Neglected Tropical Diseases.

〔学会発表〕(計4件)

三戸部治郎 西海史子 柳原格 大西真
赤痢菌の3型分泌装置発現に関わるバクテリア細胞骨格 RodZ の RNA 結合活性と多量体形成機構の解析第91回日本細菌学会総会

Jiro Mitobe, Ritam Sinha, Soma Mitra, Dhruvajyoti Nag, Noriko Saito, Ken Shimuta, Nobuo Koizumi, Hemanta Koley. An attenuated *Shigella* mutant lacking the RNA-binding protein Hfq affords cross protection against *Shigella* strains of broad serotype. 2018 Feb20-24 52nd Joint Panel Conference on Cholera and other Bacterial Enteric Infection. Hat Yai, Thailand

三戸部治郎 小泉信夫 志牟田建 Ritam Sinha, Soma Mitra, Dhruvajyoti Nag, Hemanta Koley. 赤痢菌の病原性発現機構に基づいた汎血清型に作用するユニバーサル弱毒ワクチン候補株の開発 2017 3月19~21日第90回日本細菌学会総会 仙台国際センター

三戸部治郎 小泉信夫 志牟田建 Ritam Sinha, Soma Mitra, Dhruvajyoti Nag, Hemanta Koley. 赤痢菌の病原性発現機構に基づいた汎血清型に作用するユニバーサル弱毒ワクチン候補株の開発 2016 3月23~25日第89回日本細菌学会総会 大阪国際交流センター

〔図書〕(計1件)

新居志郎(代表)・倉田毅・林英生・本田武司・小田紘・松本明 編集委員 2017 北海道大学出版会 病原細菌・ウイルス図鑑

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
感染研ホームページ 研究情報

病原性の発現メカニズムにもとづいた、広汎な血清型に作用する赤痢ワクチン候補株の開発

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/459-bacteriology/7420-bac-2017-001.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三戸部治郎 (MITOBE, Jiro)
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
研究者番号：40333364

(2)研究分担者

柳原格 (YANAGIHARA, Itaru)
大阪母子医療センター研究所・免疫部門
・部長
研究者番号：60314415