

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580112

研究課題名(和文)細菌の細胞分裂装置の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Study of regulatory mechanism of bacterial cell division machinery

研究代表者

石川 周(Ishikawa, Shu)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：30359872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の細胞分裂はFtsZが中心となり行われるが、FtsZは細胞膜に結合できないので、細胞膜に繋ぎとめる蛋白質が必須である。大腸菌ではFtsAが、シアノバクテリアではSepFがその役割を担うと考えられるが、増殖に必須である。枯草菌は両方の因子を備え、さらに同様の役割をすると考えられるEzrAも有するので、各々が破壊可能である。本研究では、酵母2ハブリッド解析、結晶構造、電子顕微鏡観察など多面的に調べ、SepFがFtsZを膜に繋ぎとめるメカニズムを解明した。また、EzrAがFtsZと直接結合せず、FtsAとの結合を介してZ-ringのダイナミズムを促進している、というモデルを提案した。

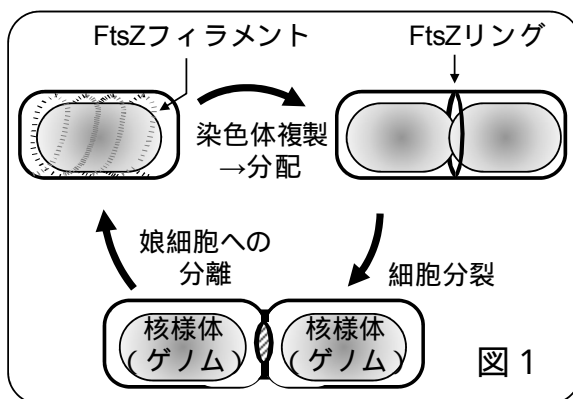
研究成果の概要(英文)：FtsZ plays a pivotal role in bacterial cell division; however, it has no membrane binding region, and thus, a protein that anchors FtsZ to the cell membrane is essential. In *Escherichia coli* and *Cyanobacteria*, it has been proposed that FtsA and SepF work as such tethering proteins, respectively, and it has been known that these factors are essential for cell growth. On the other hand, in *Bacillus subtilis*, in addition to both factors, there also exists EzrA which has been predicted to have similar role as well. Therefore, it is known that one of these can be disrupted. In this study, (1) we elucidated the mechanism how SepF anchors FtsZ on the cell membrane by multiple experiments such as yeast two-hybrid analysis, crystallography and ultramicroscopic observation. (2) We also showed that EzrA has no direct interaction with FtsZ but direct binding to FtsA, to control Z-ring dynamism via interaction to FtsA that directly interacts with FtsZ.

研究分野：微生物学

キーワード：細胞分裂 枯草菌 SepF FtsZ FtsA EzrA

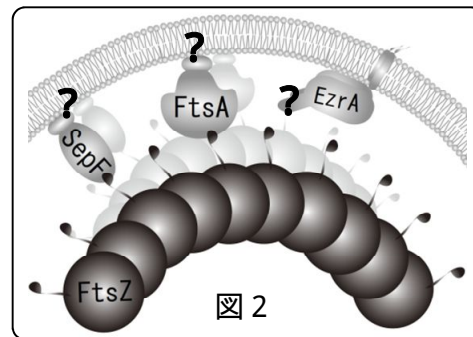
## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂は増殖し、生き残るために必須のプロセスである。細菌では、真核生物のチュープリンのホモログである FtsZ が中心となり細胞分裂が行われる。我々はこれまで、細胞分裂が染色体複製とリンクしながら進行するメカニズム；つまり染色体複製が完了に近づき、核様体（染色体 DNA）の分配により細胞中央に核様体の存在しない隙間ができると、この領域で FtsZ フィラメントが束なりリング構造（Z-ring）を形成する、というメカニズムを解明してきた（図1）。その後、Z-ring の収縮により細胞膜が内側へ引っ張り込まれると、その部位に細胞膜・細胞壁の合成装置が分布して細胞膜・細胞壁が合成され、その繰り返しにより細胞分裂が進行すると考えられる。



しかし FtsZ には細胞膜に結合する領域はなく、Z-ring の機械的な収縮により細胞膜を内側へ引き込むには、FtsZ と細胞膜をつなぐ蛋白質が必要である（図2）。グラム陰性菌のモデル微生物である大腸菌では、増殖・細胞分裂に必須である FtsA が、FtsZ と細胞膜に同時に結合することにより、その役割を担っていることが知られている。一方、グラム陽性菌のモデル微生物である枯草菌の *ftsA* 遺伝子は、破壊すると細胞分裂が強く阻害されるものの破壊可能である。このことから、FtsA 以外にも FtsZ を細胞膜に繋げる蛋白質が存在していることがわかる。我々は細胞分裂装置の複合体解析により SepF を発見し、(1) FtsA と SepF の 2 重破壊株が致死となる、(2) SepF 過剰生産により FtsA 破壊株の分裂・増殖阻害が完全に回復する、(3) SepF が FtsZ と直接結合できることを示し、SepF が FtsA と同様の活性を持つこと証明した。面白いことに、SepF は枯草菌が属する Firmicutes（低 GC-グラム陽性菌）だけではなく、FtsA をもたない Actinobacteria 属細菌（高 GC-グラム陽性菌）とシアノバクテリア属細菌でも完全に保存されている。さらにシアノバクテリアでは生育に必須であることがすでに報告されていることから、SepF も FtsZ を膜に繋げる活性があると予想される

(図2)



FtsA、SepF に加え、枯草菌では FtsZ を細胞膜に繋げる因子として、膜たんぱく質である EzrA が知られている。EzrA はその遺伝子破壊により、高温では Z-ring を形成できないために致死となる FtsZ 温度感受性変異を抑制できる因子として発見された。EzrA が存在しないと Z-ring が安定化するため FtsZ 温度感受性変異が抑制されるのだが、野生型 FtsZ をもつ株では過度に Z-ring の安定化し、細胞分裂が阻害される。in vitro の実験では FtsZ と直接結合し、FtsZ の重合を阻害することから、Z-ring 形成を負に制御する因子であると考えられている。しかし EzrA が実際の細胞内で Z-ring を制御しているメカニズムは不明である。このように枯草菌では 3 つの異なる因子が FtsZ を細胞膜に繋げると考えられているが、実験的な検証は十分ではない。

これまでに我々は、酵母 2 ハイブリッド解析により既知の FtsZ-FtsA、FtsZ-SepF の相互作用に加え、EzrA-FtsA の相互作用を新たに検出している。また、in vivo 複合体解析の結果からも FtsA-EzrA が枯草菌の細胞内で安定な複合体として存在していることを確認している。さらに、FtsA が存在しないと EzrA-FtsZ の結合は検出できないことも発見し、「EzrA-FtsZ 間の結合は FtsA を介したものであり、EzrA は FtsA を介して Z-ring 形成制御に関わる」というモデルをたてた。

## 2. 研究の目的

細菌の細胞分裂は FtsZ が中心となり行われるが、細胞分裂装置として働くためには FtsZ を細胞膜に繋ぎとめる蛋白質が必須である。大腸菌では FtsA が、シアノバクテリアでは SepF がその役割を担っていると考えられるが、それぞれ生育に必須である。枯草菌では両方の因子を備え、さらに EzrA も同様の役割を担っていると考えられている。枯草菌では、この様に複数の因子をもつため各々が破壊可能である。本研究課題ではこの利点を利用して、FtsA、SepF、EzrA が FtsZ を制御するメ

カニズムを詳細に調べ、細菌の細胞分裂装置の制御メカニズムを解明することを目的とする。

## 2. 研究の方法

(1) FtsZ を機能させるために、FtsA、SepF、EzrA のどの因子が最低限必要であるか、そのセットを決定し細胞分裂における寄与を評価する。

(2) 我々がたてた「EzrA は FtsA に直接結合し、Z-ring 形成を制御する」というモデルを詳細に検証する。

(3) 酵母 2 ハイブリッド解析法により、FtsZ、FtsA、SepF、EzrA 間の相互作用を失う変異をスクリーニングし、相互作用に重要な領域・アミノ酸を特定する。

(4) FtsA、SepF、EzrA に変異を導入した GFP 融合タンパク質、もしくはそれぞれのドメインとの GFP 融合タンパク質を発現する株を作製し、細胞内局在を観察することにより、FtsZ との結合に関わる領域および細胞膜に結合する領域を特定する。

## 3. 研究成果

(1) SepF の機能解明： SepF の C 末端領域の球状ドメインの結晶構造を解明した。酵母 2 ハイブリッド解析からは、C 末端ドメインが FtsZ 結合部位であること、さらに、電子顕微鏡観察から、このドメインのみでリング構造を形成すること、ゲルろ過と超遠心による分画による解析から、基本単位はダイマーであることがわかった。また、構造化照明顕微鏡による観察からは、SepF は膜に結合するだけでなく、FtsZ を膜に結合させることが明らかとなった。さらに遺伝学的解析と生理学的解析からは、N 末端領域の両親媒性ヘリックスが膜結合ドメインであり、この性質により SepF が FtsZ を膜へ結合させることができると考えられた。このような SepF の性質により、枯草菌は FtsA がなくても増殖することができ、FtsA を持たないシアノバクテリアやアクチノバクテリアが SepF をもつ理由も明確になった。FtsA も SepF も膜への結合に両親媒性ヘリックスを使うが、両親媒性ヘリックスは凸状の膜に強く結合することが知られている。つまり、細胞分裂進行中の凸状の膜先端に局在し、Z リングを保持している可能性が考えられる。

(2) EzrA の機能解明： EzrA が FtsZ と直接結合せず、FtsA と直接結合することを見出した。酵母 2 ハイブリッド解析により FtsZ

との結合は保持しつつも EzrA との結合を特異的に失った FtsA の変異部位は、FtsZ との結合部位とは異なるサブドメインに存在していた。これらの変異をもつ細胞では、FtsA と EzrA 間の結合が大幅に減少していたが、その変異株は、SepF を枯渇させても増殖することができた。EzrA と SepF の二重欠損は、理由は不明であるが合成致死となることが知られている。このことを考慮すると、変異型 FtsA は、SepF が無い状態でも、EzrA の欠損を相補できる形質を獲得したと考えられる。これまでに知見に基づき、「EzrA は、我々 FtsA との結合を介して Z-ring のダイナミズムを促進している」というモデルを提案した。

## 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)

Ramona Duman, Shu Ishikawa, Ilkay Celik, Henrik Strahl, Naotake Ogasawara, Paulina Troc, Jan Löwe, and Leendert W. Hamoen.

“Structural and genetic analyses reveal the protein SepF as a new membrane anchor for the Z ring”.

Proc Natl Acad Sci USA (査読有)

vol. 110, no. 48, pp. E4601, 2013

DOI: 10.1073/pnas.1313978110

〔学会発表〕(計 1 件)

石川周、Ramona Duman、Ilkay Celik、Henrik Strahl、小笠原直毅、Paulina Troc、Jan Löwea、Leendert W. Hamoen

“SepF は Z リングを細胞膜に結合させる”

第 9 回日本ゲノム微生物学会年会

2015 年 3 月 6 - 8 日、神戸大学 (兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

特になし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 周 (Shu Ishikawa)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：30359872

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

研究協力者  
Leendert W. Hamoen  
アムステルダム大学 (オランダ)・Institute  
for Life Sciences、准教授