

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32686

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770191

研究課題名(和文)細胞骨格タンパク質複合体による形態形成制御の分子機構の解明

研究課題名(英文)Analyses of molecular mechanisms of regulation of bacterial shape by cytoskeletal protein complex.

研究代表者

塩見 大輔 (SHIOMI, Daisuke)

立教大学・理学部・准教授

研究者番号：70507532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸菌のRodZタンパク質の機能解析を中心として、大腸菌の形態形成制御機構を明らかにすることを目的とした。rodZ欠損株の抑圧変異株の解析からRodZタンパク質の機能の一つがMreBアクチンの重合制御であることが示唆された。この研究成果は論文として公表した。また、RodZタンパク質の細胞膜直下の領域のアミノ酸置換や欠失体の作成により、細胞膜直下の領域のアミノ酸配列は重要ではなく、その領域の長さが重要であることを明らかにした。また、RodZと様々なタンパク質との相互作用解析の結果、RodZを含む超分子複合体には2つの複合体が存在し、RodZはそれらを橋渡ししていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Purpose of this project was to understand molecular mechanism to regulate bacteria cell shape. Analyses of the suppressor mutants of the rodZ mutant suggested that RodZ regulates assembly of MreB filaments. This result was published in 2012. In order to analyze the importance of the positively-charged residues in the juxta-membrane domain, I introduced Alanine into the residues and deleted the domain. I found that the positively-charged residues is dispensable for the RodZ function while the length of the domain is critical. I also analyzes the interaction among proteins constituting supramolecular machinery, elongasome. I found that RodZ interacts with MreB, MreC, PBP2, and RodA and that there are two sub-complexes in the complex, that is, MreB/MreC and PBP2/RodA complexes. The results indicate that RodZ bridges the sub-complexes. I also applied site-specific in vivo photo crosslink assay to detect interaction between RodZ and other proteins. I could detect crosslinked products.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞形態 細胞骨格 大腸菌 抑圧変異体

1. 研究開始当初の背景

わずか数ミクロンという小さなバクテリアでも、その形態を正しく形成し、維持しなければならない。バクテリアと言えども、形態形成制御機構が破綻すると、生育阻害など重大な問題を引き起こす。バクテリアの細胞形態は、細胞骨格タンパク質によって遺伝的に制御されている。これら細胞骨格タンパク質は、真核細胞の形態や分裂を制御するアクチン、チューブリンのホモログであり、それぞれ MreB と FtsZ である。MreB および FtsZ の細胞内局在や、生化学的性質などは、これまでによく研究されてきた。MreB を含む超分子複合体 (elongasome) は主に細胞伸長を制御し、FtsZ を含む超分子複合体 (divisome) は主に細胞分裂を制御することが分かっている。最近では、これらの複合体同士が相互作用し、互いの機能に影響していることが示唆されている。このように、形態形成及び細胞分裂の制御機構は、これまで考えられてきたよりも複雑であることが考えられる。私は、これまでに、MreB と相互作用し、その重合を制御していると考えられる因子として RodZ を新たに同定し、その機能解析を中心に行い、形態形成制御機構の解明に取り組んできた。しかし、これら細胞骨格タンパク質を含む超分子複合体が、どのような分子機構でバクテリアの細胞形態を制御しているかは、依然として不明であった。本研究により、その制御機構の詳細が明らかになることが期待された。

2. 研究の目的

大腸菌などのバクテリアにおいても、高等真核細胞と同様に、その形態を遺伝的に厳密に制御している。また、バクテリアの形態形成に関わる主要な制御因子は、真核細胞のそれらと同様に、MreB アクチンと FtsZ チューブリンである。これらが含まれる超分子複合体 elongasome と divisome は、それぞれ、細胞伸長と細胞分裂の制御を主に担っている。しかし、最近、これら超分子複合体同士も相互作用することを示唆する報告もされている。

本研究では、私がこれまでに同定した RodZ の機能解析をさらにすすめること、RodZ とこれら超分子複合体の相互作用などを明らかにし、大腸菌の形態形成制御機構の全体像を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

RodZ タンパク質の機能を明らかにするために、生育が遅く、球形である *rodZ* 欠損株の抑圧変異株の単離および解析を行った。また、RodZ タンパク質の膜直下の正電荷のアミノ酸がクラスターを作っている領域に変異を導入したり、この領域を欠損させることにより、この領域の重要性および機能を明らか

にする。

また、RodZ と MreB の相互作用を検出するために、Bacterial two-hybrid 法やホルムアルデヒドにより架橋実験を行った。さらに、RodZ と相互作用する MreB 以外の因子を探査するためにも、同様の方法で実験を行った。加えて、部位特異的 in vivo 光架橋実験を用いて、RodZ と他のタンパク質との相互作用を検出する実験系の構築を行った。

4. 研究成果

(1) *rodZ* 欠損株の抑圧変異体の解析 1

rodZ 欠損株はその形態が球形という異常を示すだけでなく、野生株に比べて生育が遅い。私は本研究の以前に *rodZ* 欠損株から生育速度が回復した抑圧変異株を 30 株取得した。そして、各抑圧変異株の全ゲノムシーケンズを行い、変異部位を同定した。変異部位を同定できた 27 株のうち、20 株において *mreB* 遺伝子に変異が見出された。また 6 株において、*mrdA* と *mrdB* 遺伝子に変異が見られた。*mrdA* および *mrdB* の遺伝子産物 (PBP2 と RodA) は、MreB が中心となって作られる超分子複合体 elongasome の構成因子である。これらの抑圧変異を解析した結果、ほとんど全ての株において、MreB がより安定な重合体を形成していることが示唆された。*mrdA* および *mrdB* に抑圧変異をもつ株でも、MreB には変異がないにも関わらず、野生株での MreB よりも安定であることが示された。以上の結果は、RodZ タンパク質が MreB フィラメントの重合を制御している可能性を示唆している。この成果は論文として報告した(論文 2)。

(2) *rodZ* 欠損株の抑圧変異体の解析 2

(1) で単離、同定した抑圧変異の中で、一株だけ elongasome 超分子複合体の構成因子に変異を持たないものが見出された。この抑圧変異は、*zipA* 遺伝子の 5' 領域 (プロモーター領域) に一塩基置換が起こっていた (*zipA*₅₆ 変異とする)。この一塩基置換により、ZipA タンパク質の発現量がわずかに増加していた。ZipA タンパク質は、細胞分裂を制御する超分子複合体 divisome の構成因子である。ZipA タンパク質は divisome 中の最も重要なタンパク質である FtsZ チューブリンが形成する Z リングを安定化する機能があることが知られている。一方、ZipA タンパク質の発現量を 2 倍多くするだけで、Z リングが過剰に安定化されるために細胞分裂が阻害されることも知られている。私が単離した抑圧変異体において、ZipA タンパク質は約 15% 増加していた。また、mRNA 量の増加も確認した。このように非常にわずかな量の増加ではあるが、2 倍の発現量により細胞分裂が阻害されることを考えると、これは妥当であると言える。ZipA のわずかな発現量の増加により、Z リングが通常よりも安定化されるために、細胞分裂の阻害は引き起こさないが、分裂の遅

延を引き起こしているのではないかと考えた。実際に、高温で FtsZ が安定に存在できなくなり、生育が阻害される温度感受性株の中に *zipA_{p56}* 変異を導入すると、この温度感受性株は生育することができた。また、安定な Z リングが形成されていた。したがって、上の仮説が正しいことが示唆された。*rodZ* 欠損株においても *zipA_{p56}* 変異により *rodZ* 欠損株の細胞分裂遅延が起こり、その間に、*rodZ* 欠損株は横へ伸びることができるようになったと考えられる。このような抑圧の機構は、球菌から桿菌への形態の進化の過程を再現しているのかも知れない。すなわち、進化の過程において、他の遺伝子を獲得することなく、すでに保持していた遺伝子の発現量を増大させることにより、容易に形態を変化させることができるのである。

さらに、この研究の過程において、*rodZ* 欠損株と *mreB* 欠損株はともに球菌であるにも関わらず、*rodZ* 欠損株は細胞極性制御を保持していること、一方、*mreB* 欠損株は細胞極性を失っていた。この結果は、バクテリアで細胞極性がどのように決められるのかを解析するための新たな扉を開いたと言える。

以上の成果は論文として報告した(論文 1)。

(3) RodZ タンパク質の機能解析

1 回膜貫通型タンパク質である RodZ は、その膜直下の領域に正電荷をもつアミノ酸がクラスターを形成している。これら正電荷をもつアミノ酸の一部、またはすべてをアラニンに置換した変異 RodZ を発現するプラスミドを構築し、その機能を解析した。その結果、この領域内の全ての正電荷をもつアミノ酸をアラニンに置換しても、RodZ の機能は損なわれず、細胞形態も野生株と同じで桿菌であった。したがって、これらのアミノ酸は RodZ の機能に必要なではないことが分かった。さらに、この領域の長さにも着目して研究を行った。この領域をすべて欠失させると、RodZ の機能は失われた。つぎに、この領域 (26 アミノ酸残基) を形態形成制御には関与しない別のタンパク質 MalF の細胞質領域 (14 アミノ酸) と置き換えたキメラタンパク質 RMR を発現するプラスミドを構築した。RMR は *rodZ* 欠損株を相補できなかった。しかし、これでは、MalF の配列が悪いのか、あるいは長さが短いために機能しなかったのか不明のために、さらに、MalF の同じ領域を挿入した RMMR を発現するプラスミドを構築した。その結果、RMMR は *rodZ* 欠損株を相補できた。この結果は、ここで注目した領域の配列そのものではなく、長さが必要であることが分かった。好熱菌 *Thermotoga maritima* の RodZ の細胞質領域の大部分の構造は解かれているが、本研究で解析した領域は構造が不明である。おそらく、リンカーとして機能し、その構造は不安定なのかも知れない。RodZ は細胞質内で MreB と相互作用するので、MreB と細胞膜の距離を適切に保つリンカーとして機能する

ために、その適切な長さが必要であると推測される。この成果は、現在論文としてまとめられており、投稿準備中である。

(4) RodZ と MreB との相互作用

RodZ は MreB と共局在すること、*rodZ* 欠損株の抑圧変異の多くが *mreB* 遺伝子に見出されたことなどから、RodZ と MreB は相互作用することが示唆されている。また、好熱菌 *Thermotoga maritima* の MreB と RodZ (細胞質領域) の共結晶構造が解かれていること、精製タンパク同士が結合すること、Two-hybrid 法で相互作用が検出されることから、このことは支持される。一方で、実際に、細胞内での結合は今のところ報告されていない。私は、上記以外の方法で、RodZ と MreB が細胞内で相互作用することを検出する実験系の構築を試みた。

まず、ホルムアルデヒドを用いた架橋実験を行った。対数増殖期の細胞をホルムアルデヒドで処理し、抗 RodZ 抗体、または抗 MreB 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。その結果、RodZ-MreB の架橋産物と思われるところにバンドを検出することができた。今後は、抗 RodZ 抗体、あるいは抗 MreB 抗体を用いて免疫沈殿を行い、架橋産物がそれぞれ MreB、RodZ であることを確認する必要がある。

別の検出方法として、部位特異的 *in vivo* 光架橋実験を行った。好熱菌 *Thermotoga maritima* の MreB と RodZ (細胞質領域) の共結晶構造の情報から、大腸菌において MreB あるいは RodZ のどのアミノ酸残基がこの相互作用に重要かを推測できる。すでに、RodZ-F60A 変異、および RodZ-Y64A 変異により RodZ と MreB の相互作用が低下することが報告されている。そこで、これらのアミノ酸残基周辺にアンバー変異を導入し、非天然型アミノ酸 pBpa を各残基に取り込んだ変異 RodZ を発現させ、UV 照射により RodZ-MreB 相互作用の検出を試みた。しかしながら、本研究期間においては、この実験系により RodZ-MreB 間相互作用を検出することはできなかった。

(5) RodZ と MreB 以外のタンパク質との相互作用

RodZ は MreB が中心となって形成される超分子複合体 elongasome に含まれると考えられる。そこで、RodZ と MreB 以外の複合体構成因子との相互作用を解析した。

まず始めに、bacterial two-hybrid 法により、RodZ-MreC、RodZ-PBP2、RodZ-RodA、MreB-MreC、MreB-PBP2、MreB-RodA、MreC-PBP2、MreC-RodA、PBP2-RodA 間の相互作用について検討した。その結果、RodZ は本研究で試した全てのタンパク質との相互作用が見出された。一方、MreB は RodZ および MreC のみと相互作用した。MreC は RodZ および MreB と相互作用した。PBP2 は RodZ および

RodA と RodZ は RodZ, PBP2 と相互作用した。この結果は、elongasome 複合体内に 2 つの異なる複合体が存在することを示唆している。すなわち、MreB/MreC 複合体と PBP2/RodA 複合体である。そして、これら 2 つの複合体をつなぎ止めるあるいは橋渡しをする機能を担っているのが RodZ タンパク質であると推測できる。この結果は、RodZ タンパク質の新たな機能を見出したと言える。

RodZ と MreC および PBP2 との相互作用について詳細に解析した。RodZ の C 末端を欠失した様々な変異体を作成し、bacterial two-hybrid 法により、その結合を調べた。その結果、RodZ のペリプラズム領域の一部の領域がそれぞれのタンパク質との相互作用に必要であることを明らかにした。次に、これらの相互作用が実際に細胞内で起こっているかを調べるために、相互作用部位と思われる領域にアンバー変異を導入し、部位特異的 in vivo 光架橋実験を行った。光架橋産物は、抗 RodZ 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。その結果、RodZ の光架橋産物が見出された。この架橋産物は、MreC または PBP2 とのものであると予想できるが、今後、これを確認していく必要がある。

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 2 件)

1. Shiomi D, Niki H. A mutation in the promoter region of *zipA*, a component of the divisome, suppresses the shape defect of RodZ-deficient cells. (2013) *MicrobiologyOpen* 2(5):798-810 査読あり DOI: doi: 10.1002/mbo3.1116

2. Shiomi D, Toyoda A, Aizu T, Ejima F, Fujiyama A, Shini T, Kohara Y, Niki H. Mutations in cell elongation genes *mreB*, *mrdA* and *mrdB* suppress the shape defect of RodZ-deficient cells. (2013) *Molecular Microbiology* 87(5):1029-1044. 査読あり DOI: 10.1111/mmi.12148

[学会発表] (計 4 件)

1. 塩見大輔、桑原友里、仁木宏典：大腸菌形態形成因子複体内の相互作用から見える RodZ の機能、第 10 回 21 世紀大腸菌研究会 2013/6/20-21、静岡県修善寺

2. 塩見大輔：Bacterial shape determinant protein RodZ directly binds to peptidoglycan to regulate the width. 第 86 回日本細菌学会 2013/3/18-20、千葉県幕張

3. 塩見大輔、仁木宏典：大腸菌形態制御因

子 RodZ の分裂面への局在とその意義、第 7 回日本ゲノム微生物学会 2013/3/8-10、滋賀県長浜

4. 塩見大輔、仁木宏典：RodZ タンパク質の細胞分裂面への局在：細胞幅の制御、第 9 回 21 世紀大腸菌研究会 2012/6/21-22、滋賀県長浜

[図書] (計 1 件)

Escherichia coli and *Bacillus subtilis*: The Frontiers of Molecular Microbiology Revisited (Sadaie Y and Matsumoto K.) Chapter 3-2. Nucleoid organization and chromosome segregation. Daisuke Shiomi, Hironori Niki. *Research Signpost* 2012 (総ページ数 362 ページ、うち 45-59 ページを担当)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
<http://www2.rikkyo.ac.jp/web/dshiomi/CellularFunctionLab/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩見 大輔 (SHIOMI, Daisuke)

立教大学・理学部・准教授

研究者番号：70507532