

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04731

研究課題名(和文)細胞骨格タンパク質によるバクテリアの形態形成制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of bacterial morphology by cytoskeletal proteins.

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリアの形態は、真核生物の細胞骨格タンパク質のホモログによって制御されている。本研究では、バクテリアの細胞骨格タンパク質MreBアクチンおよびその制御因子RodZの機能、細胞内局在などを詳細に解析し、バクテリアの形態形成制御メカニズムを解析した。その結果、MreBの細胞内局在および細胞内動態はリン脂質の組成に大きく影響されることを明らかにした。またRodZの自己相互作用領域を明らかにした。加えて、RodZの膜貫通領域がその機能に重要であることも明らかにした。これらの結果は、国際学術誌に2報の論文として、また1報の総説として報告した。現在、さらに研究成果をまとめもう1報の論文を執筆中である。

研究成果の概要(英文)：Bacterial cell shape is regulated by cytoskeletal proteins which are homologs of eukaryotic cytoskeletal proteins. In this study, we analyzed functions and subcellular localizations of MreB actin and its regulator protein RodZ. We found that compositions of phospholipids are important for subcellular localizations and motions of MreB. We also showed that RodZ self-interacts in the periplasmic domain. In addition, the transmembrane region of RodZ is vital for its function. We published two papers and a review in international scientific journals. We are now preparing one more paper to publish.

研究分野：細菌学、分子生物学

キーワード：最近 形態形成 細胞骨格タンパク質 ペプチドグリカン リン脂質

1. 研究開始当初の背景

わずか数ミクロンの大きさで肉眼で見ることのできないほど小さなバクテリアでも、形態は実に様々である。しかし、個々のバクテリアには固有の形態があり、正しく形態が形成されることは、細胞分裂、DNA 分配、あるいは宿主への感染など、様々な細胞機能において重要である。したがって、わずか数ミクロンのバクテリアでも形態を正しく維持することはその生存に非常に重要である。グラム陰性細菌の大腸菌は、中央のシリンダーとその両端に半球のキャップをつけたような構造をしており、桿菌と呼ばれる。このような桿菌を形成するためには、伸長方向(極)長さ、幅を制御する必要がある。このようなパラメータは厳密な遺伝的制御を受けている。この形態制御の中心となるタンパク質は、真核細胞と同様に細胞骨格タンパク質である。MreB と FtsZ は構造的にも生化学的にも、それぞれアクチンとチューブリンとよく似ている (Wachi et al., 1987; Hirota et al., 1968; Lowe and Amos, 1998; van den Ent and Lowe, 2001)。そして、MreB や FtsZ の重合、機能、局在などを制御する因子が続々と報告されている。細胞骨格タンパク質およびその制御因子の変異体は、球状、フィラメント状、Y 型(先端が分かれたもの)など、様々な形態異常を引き起こす。したがって、形態形成機構を明らかにするためには、細胞骨格タンパク質およびその関連因子の機能を明らかにすることが必須であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞分裂に特に重要なタンパク質である MreB アクチンと、その制御因子として我々が以前に同定した RodZ の機能解析を行うことにより、バクテリアの形態形成制御機構を明らかにすることを目的とした。特に、細胞極性制御機構はほとんど分かっておらず、MreB による極性制御機構を明らかにすることを目的とした。また、膜貫通型タンパク質 RodZ は細胞質側で MreB アクチンと、ペリプラズム側でペプチドグリカン合成酵素とそれぞれ相互作用すると考えられている。したがって、RodZ が膜を介してこれらのタンパク質をリンクしていると考えられる。そのメカニズムを探るために、RodZ と細胞内で相互作用する因子の探索を目的とした。

3. 研究の方法

MreB の細胞内局在および機能を明らかにするために、MreB-mCherry や sfGFP-RodZ を発現する株を構築し、顕微鏡観察を行った。この細胞に MreB 阻害剤 A22 を加え、大腸菌を球菌にした後、A22 を除去し、その形態がどのように回復するかを観察した。MreB の生化学的特徴を調べるために、好熱菌 MreB を精製し、超遠心により重合の程度を解析したり、Fat western 法により、MreB とリン脂質との相互作用を検討した。

RodZ と他のタンパク質との相互作用を調べるために、部位特異的 *in vivo* 光架橋実験を用いた。また、Bimolecular Fluorescent complementation (BiFC) 法による相互作用の検出も試みた。

4. 研究成果

(1) MreB による極性制御機構の解析 MreB がどのように細胞極性を制御しているかの検討を行った。MreB が桿菌の中央のみに局在することが重要であり、人工的に MreB を極に局在させることにより、新たな極性を生み出すことを見出した。野生型の MreB が極に局在しない理由として、我々は大腸菌の細胞膜を構成するリン脂質に着目した。大腸菌のリン脂質は、主に、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルグリセロール (PG)、カルジオリピン (CL) によって構成される。このうち、PG と CL は酸性リン脂質である。大腸菌の酸性リン脂質は細胞極に濃縮されていることがすでに報告されている。また MreB は膜と直接相互作用することが知られていること、MreB を含む超分子複合体の構成因子には多くの膜タンパク質が含まれることを考えて、極に局在した酸性リン脂質により MreB が極から排除されている可能性を考えた。そこで、酸性リン脂質を合成できない変異株中で MreB-mCherry の局在を観察したところ、MreB は細胞極にも局在した。また、細胞極で枝分かれする細胞も見いだされた。これは、細胞極に局在した MreB によってペプチドグリカン合成酵素も細胞極にリクルートされ、その結果、細胞極で新規ペプチドグリカン合成が行われたと考えられる。細胞を MreB 阻害剤 A22 で処理すると、MreB は脱重合し、細胞極へも局在することを見いだした。つまり、脱重合した MreB は極に局在できるが、重合した MreB は極に局在できないことが考えられた。そこで、好熱菌 MreB を精製し、Fat western 法により、MreB とリン脂質との相互作用を検討した。その結果、MreB は ATP 非存在化(脱重合状態)で、PG と CL には結合したが、PE には結合しなかった。一方、ATP 存在下(重合状態)では、いずれのリン脂質との相互作用も検出されなかった。以上の結果は、重合した MreB は細胞極に局在する酸性リン脂質によって細胞極から排除されているというモデルを支持している。以上の結果は、論文としてまとめて公表した (Kawazura et al., 2017)。また、これまでに MreB を含む elongasome 複合体が細胞の短軸方向に沿って回転運動していること、この回転運動がペプチドグリカン合成と共役していることが分かっている。予備的な実験では、リン脂質の組成が MreB の回転運動に影響を与えることが明らかとなった。また、リン脂質の組成が細胞分裂装置の構築にも重要であるという予備的な知見も得られた。今後は、これらをさらに確認するために、様々な変異株を用いた解析を行う

必要がある。

(2) RodZ と相互作用する因子の探索とその解析 以前に我々が構築した光架橋実験を用いて、RodZ がペリプラズム領域で自己相互作用することを見いだしていた。本研究では、さらに光架橋するアミノ酸の領域を広げ、どの領域で自己相互作用するかを詳細に解析した。その結果、RodZ はペリプラズム領域の 139-230 番目のアミノ酸の領域で自己相互作用することが明らかになった。さらにより C 末端の領域では、RodZ は RodZ 以外のタンパク質と相互作用することも明らかにした。どのタンパク質と相互作用しているかを明らかにすることは、今後の課題である。この成果は、論文としてまとめ公表した(Ikebe et al., 2018)。また、BiFC 法を用いて、RodZ が MreB 以外にも MreC, MreD, RodA と相互作用することを明らかにした。この結果は BACTH 法によって得られた結果と概ね一致している。BiFC は大腸菌内での相互作用を GFP の蛍光として検出できるだけでなく、その相互作用が起こる場所(細胞内局在)と、複合体の動態を同時に観察できる実験系である。RodZ 同士の BiFC では確かに RodZ の回転運動が検出できた。今後はさらにこの実験系を改良し、様々なタンパク質間の相互作用、細胞内局在、動態を同じ観察する実験系を構築する予定である。

(3) RodZ の膜貫通領域の機能 RodZ は細胞質側で MreB と、ペリプラズム側で RodA などと相互作用する。したがって、RodZ は膜の内外での elongasome タンパク質の機能を結びつけていると考えられる。そのために、RodZ の膜貫通領域が重要な機能を果たすと考えた。そこで、RodZ の膜貫通領域を別のタンパク質の膜貫通領域と置き換えたキメラタンパク質(RMR と名付けた)を作成し、その機能を調べたところ、RMR を発現する細胞は、正しく形態を形成できなかった。しかし、BACTH法およびBiFC法により他のタンパク質との相互作用を調べたところ、野生型 RodZ と同様に RMR も MreB や RodA などとの相互作用が検出された。これは全体としては RMR が RodZ との相互作用を保っていることを示唆している。一方、RMR は RodZ を含む elongasome に対して、断片化したクラスターを形成していることが顕微鏡観察より明らかになった。今後は、なぜクラスター形成能が低下したかを明らかにすることにより、RodZ のクラスター形成機構および RodZ の膜貫通領域の機能が明らかになることが期待される。

(4) RodZ と細胞分裂の関係 これまでに細胞伸長に参与する MreB アクチンが、細胞分裂面に局在し FtsZ チューブリンと相互作用すること、その相互作用が細胞伸長から細胞分裂への切り替えに重要であることが示唆

されていた。我々は、MreB の分裂面への局在に RodZ が関与する可能性を検討した。sfGFP-RodZ の局在を時間経過を追って観察したところ、RodZ も分裂面に局在した。また、MreB の分裂面への局在が FtsZ に依存しているのと同様に、RodZ の分裂面への局在も FtsZ に依存していた。さらに、MreB の分裂面への局在は RodZ に依存していることを明らかにした。すなわち、RodZ が MreB の分裂面への局在を橋渡ししている。加えて、我々は、BACTH 法により、RodZ と FtsZ が直接相互作用することを明らかにした。この相互作用は、MreB と FtsZ の相互作用よりも強かった。先行研究により、MreB の分裂面への局在が失われると、細胞が分裂せずに伸長を続けることが示され、MreB と FtsZ の相互作用は身長から分裂への切り替えに必要であると提案された。しかし、MreB も RodZ もある条件下では非必須因子である。すなわち、これらの因子が無くても細胞は分裂する。そこで、RodZ および MreB の分裂面への局在の生理的意義を解明するために、分裂装置の形成に注目した。その結果、RodZ は FtsZ を含む分裂装置 Z ring の安定な局在に寄与していることが明らかになった。この結果は、現在、論文としてまとめ、国際誌に投稿準備中である。

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 3件)

Ryosuke Ikebe, Yuri Kuwabara, Taiki Chikada, Hironori Niki, Daisuke Shiomi “The periplasmic disordered domain of RodZ promotes its self-interaction in *Escherichia coli*” 査読有
Genes to Cells, 23: 307-317, 2018
DOI: 10.1111/gtc.12572

Daisuke Shiomi

“Polar localization of MreB actin is inhibited by anionic phospholipids in the rod-shaped bacterium *Escherichia coli*” 査読無
Current Genetics, 63: 845-848, 2017
DOI: 10.1007/s00294-017-0696-5

Takuma Kawazura, Kanon Matsumoto, Koki Kojima, Fumiya Kato, Tomomi Kanai, Hironori Niki, Daisuke Shiomi “Exclusion of assembled MreB by anionic phospholipids at cell poles confers cell polarity for bidirectional growth.” 査読有
Molecular Microbiology, 104: 472-486, 2017
DOI: 10.1111/mmi.13639

[学会発表](計 22件)

Keisuke Kurita*, Risa Ago*, Fumiya Kato, Hironori Niki, Daisuke Shiomi

(*equal contribution)

「Regulation of dynamics of cell shape determinant proteins MreB and RodZ in *Escherichia coli*.」

第 91 回 日本細菌学会総会 (2018)

塩見大輔 「膜タンパク質 RodZ の膜貫通領域と細胞膜組成が形態形成に果たす機能」 2017 年度遺伝研研究会「単細胞システム細胞内装置の構造と機能」 (2018)

栗田恵輔*、阿合理沙*、加藤郁也、仁木宏典、塩見大輔 (*equal contribution)

「大腸菌形態形成制御因子 MreB アクチンと膜タンパク質 RodZ の動態の制御」

日本農芸化学会 2018 年度大会 大会シンポジウム (2018)

吉井佑介、阿合理沙、仁木宏典、塩見大輔 「RodZ タンパク質は細胞分裂面で MreB アクチンと FtsZ チュープリンを協調させる」 第 12 回 ゲノム微生物学会年会 (2018)

栗田恵輔、加藤郁也、仁木宏典、塩見大輔 「大腸菌の MreB アクチンの細胞内動態にリン脂質が与える影響の解析」 第 12 回 ゲノム微生物学会年会 (2018)

阿合理沙、仁木宏典、塩見大輔 「キメラタンパク質による RodZ 膜貫通領域の機能解明」

第 12 回 ゲノム微生物学会年会 (2018)

吉井佑介、阿合理沙、仁木宏典、塩見大輔 「MreB アクチンと FtsZ チュープリンを橋渡しする RodZ タンパク質の解析」

2018 年 生体運動合同班会議 (2018)

吉井佑介、池邊涼介、仁木宏典、塩見大輔 「RodZ タンパク質の細胞分裂面への局在とその相互作用因子の探索」

第 14 回 21 世紀大腸菌研究会 (2017)

金井友美、仁木宏典、塩見大輔 「MreB の細胞内局在が引き起こす細胞形態異常」

第 14 回 21 世紀大腸菌研究会 (2017)

塩見大輔 「MreB アクチンを中心とした細胞装置による形態制御機構」 2016 年度遺伝研研究会「単細胞システム細胞装置のダイナミズム」 (2017)

塩見大輔、川面拓真、松本夏音、小島広樹、加藤郁也、金井友美、仁木宏典「大腸菌 MreB アクチンの細胞内局在の制御機構」 第 90 回日本細菌学会総会 (2017)

川面拓真、松本夏音、加藤郁也、金井友美、

仁木宏典、塩見大輔「バクテリアアクチンとリン脂質による細胞極性制御」 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会 (2017)

川面拓真、松本夏音、小島広樹、加藤郁也、金井友美、仁木宏典、塩見大輔「バクテリアアクチンによる細胞極性制御機構」 2017 生体運動合同班会議 (2017)

塩見大輔 「一細胞観察から見てきたバクテリアの形態形成制御機構」 日本顕微鏡学会大 59 回シンポジウム (2016)

川面拓真、仁木宏典、塩見大輔「バクテリアアクチン MreB による細胞の伸長方向の決定機構」 第 13 回 21 世紀大腸菌研究会 (2016)

塩見大輔「MreB アクチンが制御する大腸菌の細胞極性」 2015 年度遺伝研研究会「単細胞の細胞構築・運動・増殖機構の研究」 (2016)

川面拓真、小島広樹、仁木宏典、塩見大輔「バクテリアの形態形成メカニズム」第 89 回日本細菌学会総会ワークショップ「バクテリア細胞増殖プロセス研究の最前線」 (2016)

川面拓真、小島広樹、仁木宏典、塩見大輔「バクテリアアクチンが制御する細胞極性」 第 10 回日本ゲノム微生物学会 (2016)

池邊涼介、桑原友里、仁木宏典、塩見大輔「バクテリアアクチンによる細胞幅制御機構の解析」生体運動合同班会議 2016 (2016)

池邊涼介、桑原友里、仁木宏典、塩見大輔「大腸菌形態形成制御因子の RodZ の自己相互作用による細胞幅の制御」第 9 回細菌学若手コロッセウム (2015)

②川面拓真、池邊涼介、小島広樹、仁木宏典、塩見大輔「バクテリアの形を決める分子メカニズム」第 98 回日本細菌学会関東支部総会シンポジウム「運動・分泌マシナリーから見えるバクテリアの新しい世界」 (2015)

②池邊涼介、桑原友里、仁木宏典、塩見大輔「大腸菌形態形成制御因子 RodZ の細胞内自己相互作用の解析」 第 12 回 21 世紀大腸菌研究会 (2015)

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