

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07061

研究課題名(和文)細菌のアルカリ条件下における新規細胞分裂維持機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of novel mechanisms that maintain bacterial cell division under alkaline condition.

研究代表者

山口 利男 (Yamaguchi, Toshio)

新潟薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50434452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円

研究成果の概要(和文)：我々は、機能未知であったDedDが大腸菌のアルカリ条件下での細胞分裂維持に必須であることを見出した。dedD破壊株のアルカリ条件下での分裂障害はSOS応答や核様体閉鎖に依存せず、また同条件下でFtsNの局在異常が認められた。一方、DedDと複数のdivisome蛋白質との相互作用も示しており、DedDがdivisome構造の安定化を通じてアルカリ条件下での細胞分裂維持を担うことが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)： During the course of the genome-wide screening, we found that E. coli dedD gene is essential for the maintenance of cell division under alkaline growth condition. The cell division deficiency of the dedD deletion strain was not dependent of the presence of SOS and NO pathway, and the localization of FtsN in this strain was perturbed under alkaline condition. The BACTH assay indicated potential interactions between DedD and several other divisome proteins. These results suggested that DedD might act as a scaffold that would keep maintaining proper assembly of divisome components under alkaline condition.

研究分野：細胞生物学

キーワード：DedD 細胞分裂 大腸菌 アルカリ耐性

1. 研究開始当初の背景

外界の変化への適応は生物にとって必須の命題であり、特に自力での長距離移動が困難な細菌では生存に直結しうる根幹的な課題である。特にアルカリ条件においては、中性条件と比べて細胞外の H^+ 濃度が極端に低下するため、細胞内 pH や H^+ 駆動力の維持が細菌の生育に重要と考えられており、現在までに H^+ 輸送に関する複数の蛋白質がアルカリ耐性に関与することが報告されている。一方で、 H^+ 輸送以外の機構の関与についてはほとんど検討されていなかったが、我々は独自のスクリーニングにより、 H^+ 輸送とは無関係な複数の遺伝子がアルカリ条件下での生育の維持に重要な役割を果たすことを見出し、大腸菌のアルカリ耐性に重要な役割を果たす新規機構が複数存在することを明らかにしていた(未発表)。また、これらの遺伝子のうち、特に *dedD* 破壊株が極めて高いアルカリ感受性を示すことも見出し、研究開始時点において DedD 蛋白質の機能には不明な点が多かった。ただし、細胞分裂面への局在が報告されていたこと、また欠損株が弱い分裂異常を示していたことから(1,2)、細胞分裂に何らかの機能を持つ可能性が指摘されていた。一方で我々は、*dedD* 破壊株の細胞分裂がアルカリ条件下において顕著に阻害されることを見出し、DedD が少なくともアルカリ条件下での細胞分裂の維持に必須の分子であることを明らかにしていた(未発表)。

2. 研究の目的

本研究では、アルカリ条件下での細胞分裂の維持に必須の DedD 蛋白質について、その役割を分子レベルで解明することを目的とした解析を実施した。研究期間内に *dedD* 破壊株の詳細な表現型解析をはじめ、DedD の divisome 形成との関連、および divisome 蛋白質との相互作用の有無を明らかにし、さらに DedD が上記以外の経路、特に SOS 応答や核様体閉鎖機構との関連により細胞分裂維持に関与する可能性も視野に入れた解析も行った。加えて、DedD の機能に必須のドメインの探索も試みた。

3. 研究の方法

1) 使用した菌株および培地

dedD、*suIA*、および *sImA* 破壊株は Keio collection(3)由来の菌株を、またアッセイ時の野生株には BW25113 株を、それぞれ国立遺伝学研究所より入手し使用した。また、DNA クローニング時のホストには DH5 α 株を用い、Bacterial two hybrid 法 (BACTH 法) による解析には DMH1 株 (Euromedex 社) (4)を用いた。大腸菌の培養には、特に断りのない限り LB 培地もしくは LBNa100 培地 (1% Bacto tryptone、0.5% yeast extract、100mM NaCl、25mM bis-Tris propane, pH 7-9) を用いた。

2) 種々の pH における大腸菌の表現型解析

被験菌株を LBNa100 において種々の pH(7.0-9.0)で振盪培養し、経時的に濁度 (OD₆₆₀)の測定、ならびに微分干涉顕微鏡による観察を行った。なお、濁度の測定には mini photo 518R (タイテック社)を、顕微鏡観察には BX51(オリンパス社)をそれぞれ用いた。

3) *dedD* と *suIA* もしくは *sImA* との二重破壊株の作成

dedD 破壊株 (JW5378) のカナマイシン耐性遺伝子を Datsenko らの方法 (5)に従い除去し、 $\Delta dedD$ 株を作成した。次いでこの株に、P1 transduction により、*suIA* および *sImA* 破壊株 (JW0941 および JW5641 株) のカナマイシン耐性遺伝子挿入アレルをそれぞれ導入し、*dedD* との二重破壊株 ($\Delta dedD/\Delta suIA$ および $\Delta dedD/\Delta sImA$) を作成した。

4) FtsZ および FtsN の局在解析

mCherry 融合蛋白質発現コンストラクト (pB33-FtsZ-mCherry および pB33-mCherry-FtsN) は pBAD33(6)を用いて作成した。各遺伝子は PCR により増幅し、pBAD33 にクローニングした。また、各コンストラクトの DNA 配列はジデオキシ法により確認した。

次いで、各コンストラクトを *dedD* 破壊株に導入し、LBNa100 培地 (pH 7 or 9) を用いて一定時間振盪培養後、蛍光顕微鏡により各融合蛋白質の局在を確認した。

5) *dedD* deletion clone の作成と機能解析

発現ベクター-pHG165(7)に *gfp* 遺伝子をクローニングし、次いで *dedD* 全長ならびに一部を書く *dedD* 遺伝子 (deletion clone) を *gfp* 遺伝子の C 末端側に in frame となるようそれぞれクローニングした。各クローンは配列を確認後 *dedD* 破壊株に導入し、LBNa100 (pH 7 or 9) を用いて表現型を確認した。

6) BACTH 法による DedD と他の必須 divisome 蛋白質との相互作用の検討

BACTH 法に必要なベクターおよび菌株は全て Euromedex 社 (フランス) より購入した。なお、pKT25 および pUT18C は、Gateway vector conversion system (Thermo) を用いて destination vector に転化した後、各遺伝子のクローニングに使用した。解析対象遺伝子 (*dedD*、*ftsZ*、*X*、*Q*、*L*、*W*、*I* および *N*) の Entry clone(8)は国立遺伝学研究所より入手し、LR 反応により上述の destination vector にそれぞれ導入した。以上で作成したクローンを DHM1 株に導入し、DedD との相互作用を Karimova らの方法 (4)に従い解析した。

4. 研究成果

1) *dedD* 破壊株のアルカリ条件下における表現型解析

dedD 破壊株の表現型の pH 依存性について

詳細に解析することを目的とし、pH 7.0～9.0 に調製した LBNa100 培地で振盪培養した場合の生育ならびに細胞の形態を経時的に観察した。その結果、同株の生育が pH 上昇に伴い低下すること、また分裂異常が pH 7.5 以上で生じ、かつ pH 依存的に増悪することを見出した。加えて、pH 7.5～8.5 における分裂異常は一過性であり、対数増殖期を過ぎると分裂が再開することも明らかとした。なお、pH 9.0 では分裂の再開は認められなかった。以上の知見より、*dedD* 破壊株の表現型が pH 依存的であること、また DedD の機能がアルカリの程度および増殖期により異なる可能性が示唆された。

2) SOS 応答および核様体閉鎖の関与の検討

大腸菌の細胞分裂阻害機構には複数の経路があり、特に SOS 応答や核様体閉鎖機構の関与が広く知られていた。そこで、*dedD* 破壊株の表現型がこれらの機構に依存して惹起されているのかを検討するため、SOS 応答もしくは核様体閉鎖に主要な役割を果たす遺伝子(それぞれ *suIA* および *sImA*)と *dedD* との二重破壊株を作成し、アルカリ条件下における表現型を解析した。その結果、いずれの表現型も *dedD* 破壊株との間に差異は認められず、*dedD* 破壊株の表現型にこれらの機構は関与しないことが明らかとなった。

3) DedD の機能に必須の領域の探索

DedD の機能に必須の領域を探索する目的で、DedD の C-末端の一定領域を段階的に欠く GFP 融合部分欠損蛋白質の発現プラスミドを複数作成し、*dedD* 破壊株に発現させてアルカリ条件下での表現型解析を行った。その結果、C-末端から半分程度までを段階的に除去した deletion clone がいずれも *dedD* 破壊株のアルカリ感受性を相補したことから、DedD の機能に必要な領域がペリプラズム領域の N-末端側半分程度に含まれることを見出した。一方で、これらの部分欠損蛋白質の局在について GFP 蛍光を指標に解析を行った結果、いずれについても分裂面への局在が認められなかったことから、分裂面への局在自体は DedD の機能に必須ではないことが示された。

4) *dedD* 破壊株における FtsZ および FtsN の局在解析

細胞分裂においては複数の蛋白質の関与が明らかとなっており、特に Fts と称される一群の必須蛋白質は、細胞分裂面において divisome と呼ばれる構造体を形成し、細胞分裂において中心的な役割を果たしている。また、Fts 蛋白質の機能に異常が生じると、細胞分裂が停止することも知られていた。そこで、*dedD* 破壊株のアルカリ条件下での表現型が Fts 蛋白質の局在異常に起因する可能性について検討することとした。Fts 蛋白質のうち、最初期に分裂面に集合する FtsZ、および後期に集合する FtsN について、mCherry との

融合蛋白質を *dedD* 破壊株に発現させ、中性およびアルカリ条件下での各融合蛋白質の局在を蛍光顕微鏡により解析した。その結果、FtsZ の局在はいずれの条件下でも異常は認められなかったが、FtsN についてはアルカリ条件下でのみ顕著に分裂面への局在が低下していた。従って、DedD はアルカリ条件下において、少なくとも FtsN の局在に重要な役割を果たすことが示された。

5) BACTH 法による DedD と必須 divisome 蛋白質との相互作用の検討

上述の検討により、DedD がアルカリ条件下における divisome 蛋白質のアセンブリに何らかの役割を持つことが示されたことを受け、DedD が Fts 蛋白質間の相互作用を補完する役割を持つ可能性を考慮し、DedD と Fts 蛋白質との相互作用について検討することとした。大腸菌の蛋白質間相互作用の検討に汎用される BACTH 法を用いて、DedD と種々の Fts 蛋白質 (FtsZ、X、Q、L、W、I および N) との相互作用について検討したところ、DedD が FtsQ、L および I に相互作用することを強く示唆する結果を得た。従って、DedD が divisome 形成中期以降に集合する蛋白質間の相互作用の安定化に寄与することが強く示された。

以上の検討により、DedD の大腸菌における役割が、アルカリ条件下における divisome 蛋白質間相互作用の安定化による細胞分裂の維持にある可能性が示唆された。DedD については、現在ではアルカリ条件以外にも、高圧および低温条件下での役割も指摘されつつ有る(9,10)。今後、相互作用の標的蛋白質との関係についての詳細な検討、および他のストレスへの関連等をより詳細に検討することで、アルカリ条件だけでなく、ストレス条件下での細胞分裂を担う分子機構の解明にもつながる可能性が考えられる。

<引用文献>

- 1) Gerding *et al.*, *J. Bacteriol.*, 2009, 191: 7383-7401
- 2) Arends *et al.*, *J. Bacteriol.*, 2010, 192: 242-255
- 3) Baba *et al.*, *Mol. Syst. Biol.*, 2006, 2: 2006.0008
- 4) Karimova *et al.*, *J. Bacteriol.*, 2012, 194: 5576-5588
- 5) Datsenko *et al.*, *PNAS.*, 2000, 97: 6640-6645
- 6) Guzman *et al.*, *J. Bacteriol.*, 1995, 177: 4121-4130
- 7) Messing *et al.*, *Gene*, 1982, 19: 269-276
- 8) Rajagopala *et al.*, *BMC Genomics*, 2010, 11:470
- 9) Black *et al.*, 2013, *PLOS ONE*, 2013, 8: e73995
- 10) Porter *et al.*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*,

2016, 62: 189-198

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)

〔学会発表〕(計 2 件)

山口利男、渡辺郁香、竹内洋介、福原正博、大腸菌 DedD 蛋白質ペリプラズム領域のストレス条件下における機能解析、第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月、仙台

山口利男、橋本充、本田貴、山本永、福原正博、大腸菌のアルカリ条件下における新規細胞分裂維持機構の解析、第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月、大阪

6．研究組織

(1)研究代表者

山口利男 (YAMAGUCHI TOSHIO)

新潟薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50434452