

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12747

研究課題名(和文)細胞分裂タンパク質集合体のダイナミクス解明のための超分子リクルート技術の開拓

研究課題名(英文)Development of supramolecular recruiting technology for elucidation of dynamics of protein assemblies involved in cell division

研究代表者

小野田 晃 (Onoda, Akira)

大阪大学・工学研究科 准教授

研究者番号：60366424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリア細胞分裂において重要な役割を担うFtsZは、細胞膜上で集合化してリング状の構造体(Z-リング)を形成する。このFtsZはGTPの加水分解に伴い、集合構造の曲率を変化させながらZ-リングの収縮と細胞膜の分断を誘導する。このZ-リングが起点となりタンパク質群が集合化し、細胞分裂が進行する。これらの作用機序解明の点からも、FtsZの集合構造とその動的ダイナミクスは興味深い。本研究では、超分子的な相互作用を誘起するアダプタータンパク質を添加することでFtsZ集合体に外部から摂動を与え、その構造に変化を与える系を構築した。

研究成果の概要(英文)：Cell division protein FtsZ assembles as a filamentous structure at midcell leading to the formation of a ring-shaped structure (Z-ring) which constricts to initiate cytoplasmic division. The event involves the conformational change of FtsZ assembly triggered by GTP hydrolysis. To unravel the dynamics and functional aspects of FtsZ assembly, a system in which the assembled structure of engineered FtsZ is perturbed by a supramolecular interaction with external adaptor proteins was developed. FtsZ protein fused with a Strep-tag and a membrane-targeting peptide (Strep-FtsZ-mtp) was found to form a filamentous structure similar to that of the native protein. AFM measurements visualized that the assembly of Strep-FtsZ-mtp was enforced to form a curved structure by the interaction between Strep-tag and streptavidin (Sav). The assembly embedded in a liposome was imaged by fluorescence microscopy.

研究分野：バイオ関連化学

キーワード：細胞分裂 タンパク質集合体 超分子相互作用

1. 研究開始当初の背景

バクテリアの細胞分裂において重要な役割を担う FtsZ は、細胞膜上で集合化してリング状の構造体 (Z-リング) を形成する (Figure 1a)。FtsZ は GTP の加水分解に伴い、集合構造の曲率を変化させながら Z-リングの収縮と細胞膜の分断を誘導すると考えられている。さらに Z-リングが起点となって細胞分裂に必要なタンパク質群が集合化し、細胞分裂が進行する。最近では結晶構造や相互作用タンパク質群に関する知見も蓄積されているが (Figure 1b and 1c)、Z-リングにおける FtsZ 集合構造の動的ダイナミクスとその作用機構については未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

FtsZ 集合構造の動的挙動の理解をめざして、超分子的な相互作用を誘起するアダプタータンパク質を添加することで FtsZ 集合体に外部から摂動を与え、その構造に変化を与える系を構築した。本研究では、相互作用部位を有する FtsZ タンパク質の調製、溶液中における集合体構造 AFM による観察及びリポソーム膜上における集合化挙動観察に取り組んだ。

3. 研究の方法

FtsZ に超分子的な相互作用部位とリポソーム膜への結合部位を付与するため、*E. coli* 由来 FtsZ の N 末端に Strep タグ、C 末端に *E. coli* 由来 MinD タンパク質の両親媒性ヘリックス (16 残基) を融合したタンパク質 Strep-FtsZ-mtp を設計し、大腸菌にて発現し、streptactin カラムで精製することにより精製標品を得た。

4. 研究成果

FtsZ は GTP 存在下でフィラメント状の集合体を形成し、GTP の加水分解に伴って集合構造が変化する。そこで、溶液中での構造変化に関する知見を得るために、Strep-FtsZ-mtp 溶液をマイカ基板に滴下し、HMK バッファー中で AFM 観察したところ、フィラメント状の集合体を形成した。集合体の高さは 4 nm 程度であり、結晶構造から予測される FtsZ のサイズに合致する。続いて GTP 存在下において FtsZ 集合体構造の時間経過を同様の条件で観察したところ、フィラメント状の集合体を形成していた (Figure 2)。集合体の高さは 4 nm 程度であり、結晶構造から予測される FtsZ のサイズに合致する。続いて GTP 存在下において FtsZ 集合体構造

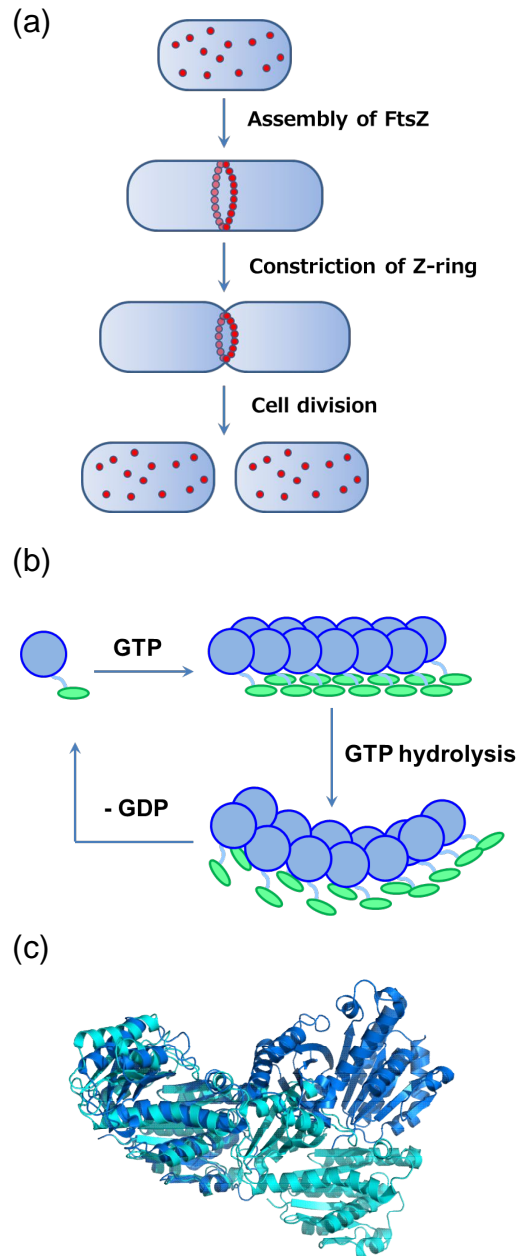


Figure 1. (a) Cell division mechanism and a model of FtsZ assembly. FtsZ is colored in red. (b) Mechanism of FtsZ Assembly. (c) Overlaid crystal structures of MtbFtsZ (PDB: 4KWE) in blue and SatFtsZ (PDB: 4DXD) in cyan, indicating the structural change through the GTP hydrolysis.

の時間経過を同様の条件で観察したところ、フィラメントの伸長、バンドル化、曲率の増大といった集合構造変化に顕著な変化の観察に成功した。GTP を添加後 30 分以降ではフィラメントの曲率はさらに増大し、一部は渦巻状の構造へと変化した。渦巻状構造の曲率を算出すると、GTP 添加前では $1800\pi \pm 870$ であるのに対して、添加後 90 分では $400\pi \pm 270$ になることが分かった。

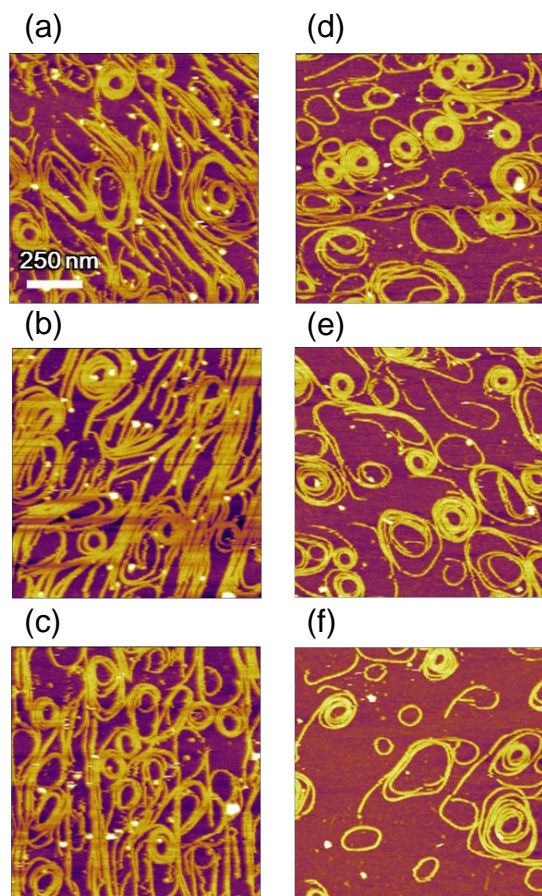


Figure 2. AFM images of FtsZ assembly ($1 \mu\text{M}$) in the presence of 10 mM GTP. (a) 0 min, (b) 5 min, (c) 10 min, (d) 30 min, (e) 60 min, and (f) 90 min. The sample solution was immersed on mica.

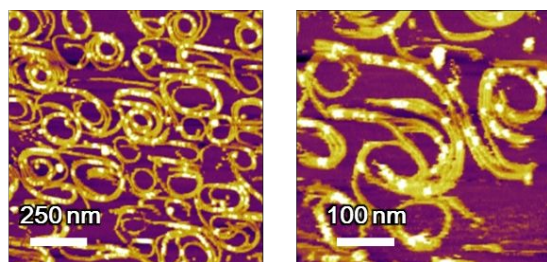


Figure 3. AFM images of Strep-FtsZ-mtp assembly ($1 \mu\text{M}$) in the presence of Sav ($2 \mu\text{M}$). The sample solution was immersed 10 min after mixing Sav. The sample solution was immersed on mica.

Strep-FtsZ-mtp に Sav を添加した際には、フィラメント構造に加えて、フィラメント上に約 4 nm 程度のタンパク質が結合した箇所が存在することが AFM 像において明確に観察された。そのサイズから、Sav が Strep タグとの相互作用により、Strep-FtsZ-mtp の集合体構造上に固定化していると推察される。混合する Sav 濃度を高くするに伴って、結合する Sav の数も増加することも確認できた。ま

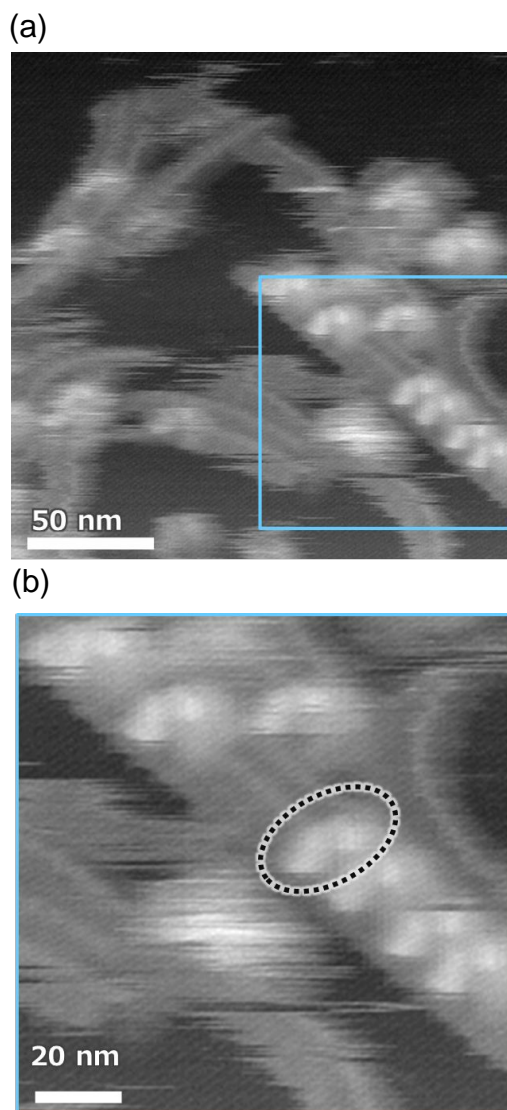


Figure 4. (a) HS-AFM images of Strep-FtsZ-mtp assembly in the presence of Sav. (b) Zoomed view of the area in square.

た、Sav の結合に連動して、フィラメントのバンドル化と、ファイバー状構造に曲率の増大が観測された。興味深いことに、曲率は約 10 分後に $400\pi \pm 270$ に低下しており、Sav 添加の効果は、GTP 添加時よりも集合体構造の速い変化を誘起可能であった (Figure 3)。以上の結果から、本系において、Sav は Strep-FtsZ-mtp に対して超分子的に相互作用して、集合構造変化を促進する効果があることが明らかとなった。

集合構造に関する詳細な情報を得るために、HS-AFM による観察を行った (Figure 4)。Strep-FtsZ-mtp の集合構造を観察したサンプルに Sav を添加したところ、Sav の dimer of dimer 構造が、Strep-FtsZ-mtp の二本のバンドルにまたがるように結合している構造の観察に成功した。HS-AFM 観察により、Sav の

結合が Strep-FtsZ-mtp のバンドル化を促進する要因となることを示す結果を得た。

既知の手法を用いて多層リポソームを作製し、フルオレセインにて蛍光ラベル化した Strep-FtsZ-mtp を添加したところ、リポソーム膜に局在化している様子を蛍光顕微鏡により確認できており、Strep-FtsZ-mtp の集合構造は、mtp 部分によりリポソーム二重膜と相互作用することも明らかとなった。

このような Strep-FtsZ-mtp の集合化挙動がリポソームの形状に及ぼす影響を評価するために、Phosphatidylcholine (PC)、(1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)]) (DOPG)、(L- α -Phosphatidyl-ethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Rhodamine PE) を混合し、蛍光標識した多層リポソームを作製した。フルオレセインにて蛍光ラベル化した Strep-FtsZ-mtp を添加したところ、リポソーム膜に局在化している様子を蛍光顕微鏡により確認できており、Strep-FtsZ-mtp の集合構造は、mtp 部分によりリポソーム二重膜と相互作用することが示された。また、Strep-FtsZ-mtp と Sav を添加したところ、リポソーム膜が湾曲された後にバッディング部位が成長し、リポソームの分断を誘起可能であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

「外部タンパク質との相互作用による細胞分裂タンパク質 FtsZ の集合化変調」、小野田 晃・大下 佳織・林 高史、第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、2015.9.12、熊本

「細胞分裂タンパク質 FtsZ の動的集合化を外部タンパク質により変調する」、小野田 晃・林 高史、第 65 回高分子討論会、神奈川大学、2016.9.15、神奈川

〔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

<http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~hayashiken/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野田 晃 (Onoda, Akira)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：60366424

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

林 高史 (HAYASHI, Takashi)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20222226

(4) 研究協力者

()