

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05774

研究課題名(和文) 病原性バチルス属の毒素プラスミド分配の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of Type III plasmid segregation

研究代表者

林 郁子 (Hayashi, Ikuko)

横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授

研究者番号：80464527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：病原性バチルス属の毒素遺伝子は低コピー数プラスミドにコードされ、チューブリン相同タンパク質TubZが重合してできる線維によって娘細胞に正確に分配される。TubZはGTPの加水分解に依存して線維構造を形成し、この線維の重合と脱重合により産生される動力で毒素プラスミドが娘細胞に均等分配される。しかし線維中の分子とプラスミドとの相互作用や、プラスミドを牽引し娘細胞で脱離させる分子機構は不明である。本研究ではTubZ線維の動態を制御するDNA結合タンパク質TubRとTubYについてDNA結合能の解析と結晶構造解析を行うとともに、TubZ線維について高速原子間力顕微鏡による動態解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原菌の毒素遺伝子の多くはプラスミドによって分配されることが知られる。本研究では炭疽症を引き起こす炭疽菌の近縁種セレウス菌の毒素プラスミドpX01の分配に必須なTubZタンパク質とその制御因子について分子機構の解析を行った。TubZはプラスミド分配因子の中で最も最近に見つかったIII型の分配因子であり、その分子機構は明らかになっていない。本研究によってバクテリアのもつ新しい細胞骨格因子の分子制御機構を明らかにするとともに、病原性細菌に対する創薬の分子基盤を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：The FtsZ/tubulin-like GTPase TubZ was identified as a segregation factor of the virulence plasmids pX01 in *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. TubZ exhibits high GTPase activity and assembles into polymers both in vivo and in vitro, and its treadmilling movement is required for stable maintenance of the plasmid in the cell. We determined the crystal structures of two TubZ regulators, TubR and TubY. DNase 1 footprinting analysis demonstrated that TubR and TubY regulate the expression of their own genes and that TubY associates with the promoter region of tubRZ cooperatively with TubR. TubY belongs to the MerR family transcriptional factor which functions as a dimeric protein. However, the C-terminal domain of TubY forms a tetrameric parallel four-helix bundle that differs from the typical MerR proteins. Moreover, we have analyzed the dynamics of TubZ filament using high-speed atomic force microscopy and found that TubZ filaments exhibit both treadmilling and dynamic instability.

研究分野：生物物理

キーワード：細胞骨格 微小管 プラスミド 微生物 トレッドミル 線維構造 遺伝子分配 毒素遺伝子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

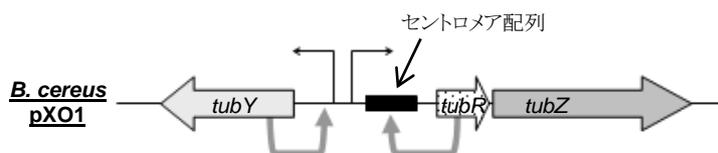
### 1. 研究開始当初の背景

(1) アクチンや微小管はヌクレオチド依存的に重合・脱重合することで動的な線維構造を形成し、動力や張力を生み出す。線維のプラス端で重合、マイナス端で脱重合する動態は真核生物の細胞骨格特有のものと考えられてきたが、病原性バチルス属のⅢ型プラスミド分配因子であるチューブリン相同タンパク質 **TubZ** もまた同様の極性をもつ線維構造を形成する。本課題で取り扱うセレウス菌の **TubZ** は毒素プラスミド **pXO1** の **tubRZ** 分配オペロンの構成因子であり、動力源として **pXO1** の娘細胞への分配に必須である (図 1)。**pXO1** は DNA 結合タンパク質 **TubR** を介して **TubZ** 線維のマイナス端に結合し、**TubZ** 線維に牽引されて娘細胞に均等分配される。**tubRZ** の転写開始領域にはセントロメア配列があり、**TubR** がセントロメアと巨大複合体を形成することでセグロソームとよばれる分配装置となる。そこに **TubZ** 線維が相互作用することで分配が成立すると考えられているが、**TubZ** 線維がプラスミドを牽引する分子機構は不明である。また **TubZ** は真核生物の細胞骨格線維が有するトレッドミル運動 (プラス端で重合しマイナス端で脱重合する極性のある線維動態) を行うが、この動態の生物学的意義および **TubZ** 線維の運動性によるプラスミドの牽引の分子機構はわかっていない。

(2) プラスミド分配機構はセントロメア配列・DNA 結合タンパク質・動力を発するヌクレオチド加水分解性の重合分子の 3 つの因子が必要十分と考えられてきたが、Ⅲ型プラスミド分配機構においてはもう一つの DNA 結合タンパク質 **TubY** の必要性が示唆されている。しかし **TubY** がプラスミド分配においてどのような役割を果たすかは不明のままであった。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は細胞骨格因子が機能するための共通構造と動力の作用機構を解明することにある。構成因子が比較的少ないバクテリアのプラスミド分配シ



(図 1) セレウス菌の **pXO1** プラスミド分配オペロン: **tubRZ**

**TubY** と **TubR** はそれぞれ自身の転写開始領域に結合し、発現を制御する。  
**tubY** 遺伝子は **tubRZ** オペロンの上流にコードされる。

ステムを解析モデルとするため、進化的に保存されたチューブリン様タンパク質の重合・脱重合反応と動力産生の相関のより明確な理解が期待できる。ここでは結晶構造をもとにした分子機能の解析を行うとともに、高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) による **TubZ** 線維の動態解析を行うことで、線維の動力産生機構を分子レベルで明らかにすることを目指す。

(2) **TubY** の DNA 結合能・結合領域と結晶構造を明らかにするとともに、プラスミド分配における機能を分子生物学的に解明する。これにより線維構造の動態制御機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 高速 AFM によるセレウス菌由来 **TubZ** の線維構造の観察

高速 AFM における実験では、観察する分子を基板上に固定する必要がある。ここでは **TubZ** 線維を選択的に基板に吸着させ、未重合の **TubZ** 分子によるバックグラウンドを除く必要がある。そのためマイカ基板に脂質二重膜を張り、反応溶液中に **TubZ** と GTP を添加することで観察を行った。当初は効率的に **TubZ** 線維を基板に吸着させるため、His-tag 融合した **TubZ** 分子を Ni-NTA を含む脂質二重膜基板に結合させ、動的な線維を基板にトラップさせたが、基板の脂質二重膜に含まれる正電荷をもつ脂質 (DPTAP) の割合を検討することで His-tag 融合 **TubZ** を使わずに観察することが可能となった。

## (2) TubY の解析

### ① セレウス菌由来 TubY の調製

大腸菌を用いた発現系では、全長の TubY は不溶性画分としてしか得ることができなかった。そのため不溶性画分中の His-tag 融合 TubY を尿素を用いて可溶化し、透析法によって尿素を段階的に除去し巻き戻した後、TEV プロテアーゼによって His-tag を切断し、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによって精製を行った。TubY の変異体は可溶性であったが、条件をそろえるため野生型同様に一旦変性させて調製した。結晶構造解析用の C 末領域に関してはタグなしのものを大腸菌内で可溶性画分として発現させ、硫酸沈殿と陽イオン交換カラムによって精製を行った。

### ② TubY の DNA 結合能の解析

TubY の DNA 結合能に関しては、ゲルシフトアッセイとフットプリント法によって解析を行った。pXO1 の *tubRZ* プロモーター領域の DNA 断片を<sup>[32P]</sup>ATP で標識し、TubY あるいは TubY と TubR の協調的な DNA 相互作用を解析した。フットプリント法については DNaseI を用いてヒドロキシラジカルで DNA に修飾を行い解析した。

### ③ TubY の C 末領域の結晶構造解析

SeMet を導入した TubY の C 末領域を 10 mM に濃縮し、蒸気拡散法により 0.1 M HEPES (pH 7.5), 0.2 M MgCl<sub>2</sub>, 30% PEG400 の条件下で結晶化した。この結晶を液体窒素によって凍らせた後、Photon Factory の NW12A にて X 線回折のデータを収集した。回折像は HKL2000 によって処理した後、Phenix の AutoSol により位相を決定し、Coot によりモデルを構築した。構造精密化には REFMAC を用いた。

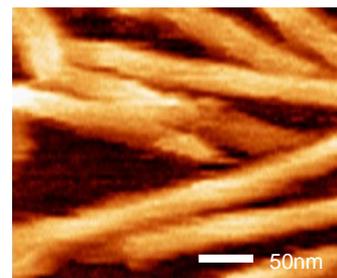
### ④ TubY の細胞内局在の解析

セレウス菌と同じグラム陽性菌である枯草菌に *tubY* 遺伝子を導入し、細胞内局在を観察した。pSG1729 に GFP 融合 TubY の遺伝子を挿入したものをを用いて *B. subtilis* 168 を形質転換した。0.75% xylose を培地中に添加して発現誘導した。細胞の観察は共焦点顕微鏡を用いた (Leica TCS SP8)。

## 4. 研究成果

### (1) TubZ 線維の動態解析

高速 AFM によって TubZ 線維のトレッドミル運動ばかりでなく、動的不安定性を観察することができた (図 2)。線維の一本一本を解析しやすい条件 (バッファー条件・脂質組成・タンパク質濃度) を定めることができたので、今後は速度論的解析を行う予定である。現在までに TubZ 線維の形状を解析することができており、線維のピッチは  $97.8 \pm 1.4$  nm であった ( $n=41$ )。この結果は先行研究の電子顕微鏡による解析結果 (ピッチ長: 25~35nm; Aylett et al., 2010) とは大きく異なる。またこの電子顕微鏡解析において TubZ 線維が GTP の加水分解に伴い線維構造を変化させることが示唆されているが、そのような構造変化は観察できなかった (Montabana & Agard, 2014)。この原因として、これまでの TubZ 線維の構造解析はセレウス菌と近縁種である卒倒病菌由来のものをを用いて行われていることが考えられる。しかし TubZ のセレウス菌と卒倒病菌由来の TubZ の立体構造は相同であり、GTP 加水分解能や重合の特性は極めて似ていること (Chen & Erickson, 2008)、双方の TubZ とともに立体構造が酷似した DNA 結合タンパク質 TubR と TubY とともに機能すること、細胞内での TubZ のはたらきは同じであることを考えると、同じ線維構造を形成すると考えるのが妥当である



(図 2) 高速 AFM により観察された TubZ 線維  
周期性のある線維構造であることがわかる。

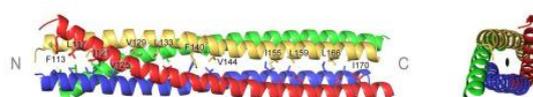
ように思える。しかし二つの TubZ の配列 identity は 21% と相同性が低いことから、配列の違いにより線維構造の違いが生まれる可能性は否定できず、細胞骨格線維の構造の多様性が近縁種間でも起きうることを示すことができたと考えている。今後は TubZ 線維の速度論的解析を行うとともに、線維の立体構造解析を行う予定である。

## (2) TubY の構造機能解析

TubY は金属イオンに応答して転写制御する MerR ファミリータンパク質に相同性がある。TubY の N 末領域は MerR タンパク質の DNA 結合ドメインと高い相同性を示すが、MerR では金属イオンに結合する C 末領域は相同性が低く、その機能は不明である。本研究では TubY の C 末側ドメインの結晶構造解析を行い、その領域が一本のヘリックス構造をもつこと、四量体化して並行のヘリックスバンドル構造をもつことを明らかにした (図 3)。C 末領域を欠損させた変異体は DNA に結合できないことから、四量体化することで効率的に DNA と相互作用することがわかった。

TubY の C 末尾部には 20 アミノ酸程度の両親媒性に富む天然変性領域が存在する。ゲルシフトアッセイから、この領域の有無によって DNA への相互作用が変化することがわかった。C 末尾部が存在することにより TubY は非特異的に DNA に相互作用できるようになるが、N 末側の MerR 様の DNA 結合ドメインがないと親和性が無くなる。この傾向はがん抑制遺伝子産物として知られる転写因子 p53 の DNA 結合ドメインと C 末尾部の天然変性領域と類似しており、p53 は C 末尾部を介して複数の相互作用因子と関わることから、TubY においても同様の機構があるものと推察される。

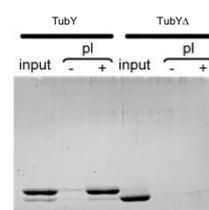
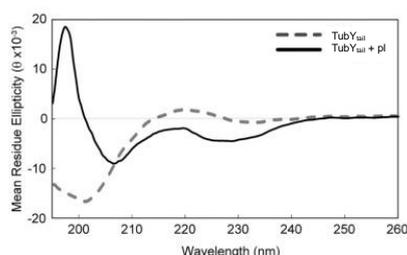
TubY の C 末尾部と似通ったアミノ酸配列が原核生物の細胞骨格因子 MinD や MreB にも存在すること、その領域が MinD や MreB の細胞膜への結合に必須であることから、TubY の C 末尾部も細胞膜に結合する可能性があると考えた。本研究では試験管内での膜結合能と細胞内での TubY の局在を調べることで検証した。まず TubY の C 末領域のペプチドを合成し、リポソーム膜存在下で CD スペクトルを測定した (図 4 左)。リポソーム膜がない条件下ではペプチドのスペクトルはランダムコイルを示唆するものであった。しかしリポソーム膜を添加すると  $\alpha$ ヘリックス構造を示唆するスペクトルが得られた。このことより C 末尾部は細胞膜に結合する可能性があること、膜結合により 2 次構造が変化することがわかった。次に C 末尾部の有無で TubY のリポソーム膜への結合能が変化するかを超速心分離機を用いて解析した (図 4 右)。TubY はリポソーム膜と結合して共沈降できたが、C 末尾部を欠いた TubY は共沈降できなかった。以上より C 末尾部が膜結合に関わることを試験管内で示すことができた。細胞内で TubY が細胞膜に局在しているかどうか確かめるために、TubY を GFP との融合タンパク質として細胞内で発現させた。私たちはこ



(図 3) TubY の C 末ドメインの結晶構造

(上) TubY のドメイン構造。N 末側は MerR に相同な DNA 結合ドメイン、C 末側には四量体化ドメインがある。C 末尾部 (IDR) は両親媒性の天然変性領域である。

(下) TubY の C 末ドメインは四量体化して並行のヘリックスバンドル構造を形成する。右は 90 度回転させて N 末側から見た構造。2 回対称軸がみられる。



(図 4) 試験管内での TubY のリポソーム膜結合能の解析

(左) CD スペクトルを用いた TubY の C 末尾部ペプチドとリポソーム膜 (pl) との相互作用解析。リポソーム膜存在下で  $\alpha$ ヘリックス由来のシグナルが観察できた。

(右) リポソーム膜との共沈降実験。TubY はリポソーム膜と共沈降できたが、C 末尾部欠損体 (TubY $\Delta$ ) は共沈降しなかった。

れまでセレウス菌の形質転換を試みてきたが、遺伝子が不安定化して形質転換体を得ることはできていない。そこで本研究ではセレウス菌と同じ *Bacillus* 族に属する枯草菌を形質転換した。TubY 野生型と C 末側領域は、C 末尾部の天然変性領域さえあれば細胞膜に局在できることがわかった。しかし C 末尾部のみを GFP に融合させたものは膜局在を示さなかったことから、四量体化することが膜への親和性をあげるのに重要であること、膜局在には TubY の DNA 結合能は必要ないことも明らかにできた。以上より、C 末尾部は少なくとも DNA と細胞膜に相互作用すること、そして四量体化ドメインはその親和性をあげるということがわかった。

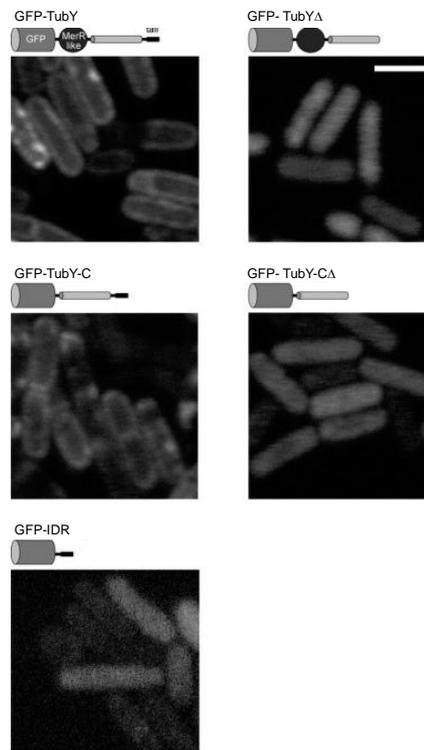
以上より、本研究では TubZ が制御する III 型プラスミド分配機構の各因子の分子解析を行った。今後はそれぞれの因子 (TubR と TubY、セントロメア配列) が TubZ 線維の動態をどのように制御するか、また TubZ 線維の構造解析を行う予定である。

(参考文献)

Aylett et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 107: 19766-71 (2010).

Chen & Erickson, J Biol Chem., 283: 13:8102-9 (2008).

Montabana & Agard, Proc Natl Acad Sci U S A., 111: 3407-12 (2014).



(図 5) 枯草菌内で発現させた GFP-TubY の局在  
周期性のある線維構造であることがわかる。TubY-C: TubY の四量体化ドメイン、TubY $\Delta$ , TubY-C $\Delta$ : それぞれ TubY と TubY-C から天然変性領域を欠損させた変異体。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayashi Ikuko	4. 巻 295
2. 論文標題 The C-terminal region of the plasmid partitioning protein TubY is a tetramer that can bind membranes and DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 17770 ~ 17780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014705	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Girao, H., Okada, N., Rodrigues, T. A., Silva, A. O., Figueiredo, A. C., Garcia, Z., Moutinho-Santos, T., Hayashi, I., Azevedo, J. E., Macedo-Ribeiro, S., & Maiato, H.	4. 巻 219
2. 論文標題 CLASP2 Binding to Curved Microtubule Tips Promotes Flux and Stabilizes Kinetochores Attachments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e201905080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201905080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林郁子、渋谷颯人、古寺哲幸
2. 発表標題 毒素遺伝子分配を司るチューブリン様タンパク質 TubZ のトレッドミル運動
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渋谷颯人、樋口雄希、古寺哲幸、林郁子
2. 発表標題 AFMイメージングにおける微小管マイナス端の標識
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 洪谷颯人, 樋口雄希, 古寺哲幸, 林郁子
2. 発表標題 高速AFMにおける微小管の極性の判別法の確立
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口雄希, 古寺哲幸, 林郁子
2. 発表標題 微小管末端標識と高速AFMによる可視化
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 郁子
2. 発表標題 III型プラスミド分配因子TubYは膜結合能をもつ
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	古寺 哲幸  (Kodera Noriyuki)  (30584635)	金沢大学・バイオAFM先端研究センター・教授    (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------