

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380047

研究課題名（和文） 阻害剤を用いた細菌のアクチン様細胞骨格タンパク質の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of bacterial actin-like cytoskeletal proteins by using inhibitors

研究代表者

和地 正明（WACHI MASAOKI）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号：90192822

研究成果の概要（和文）：新たに合成したアントラセン標識 A22 誘導体が生きた大腸菌細胞の MreB ラセン構造をきれいに染色することを確認した。これにより簡便に細菌のアクチンフィラメントを観察する手法の開発に成功した。大腸菌の主要なペプチドグリカン合成酵素の一つである PBP1B を欠損した *mrcB* 変異株を A22 処理すると細胞が溶菌することを見出した。さらに温度感受性 *mreB* 変異と *mrcB* 変異の二重変異株は培養温度を上げると直ちに溶菌した。これらのごとより MreB と PBP1B の同時欠損は溶菌を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：It was shown that MreB helical structures were clearly visualized by staining with a newly synthesized anthracene-labeled A22 derivative in living *E. coli* cells. This provides the simple method observing bacterial actin-like cytoskeletons. We found that A22 induced cell lysis in *E. coli mrcB* mutant cells lacking PBP1B, one of the major penicillin-binding proteins. *mreB(ts) mrcB* double mutant lysed immediately upon temperature up-shift. These results indicate that simultaneous defects of MreB and PBP1B cause cell lysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物学、アクチン様細胞骨格タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、染色体分配が阻害された結果引き起こされる無核細胞（染色体を持たない細胞）の放出を指標としたスクリーニング系を構築し、新規抗菌剤 *S*-Benzylisothiourrea 誘導体 A22 を見いだした。A22 は大腸菌を球菌化すると同時に、高頻度に染色体を持たない無核細胞の放出を誘導した。遺伝学的解析から A22 は細菌のアクチン様細胞骨格タンパク

質 MreB を標的としていることが示された。A22 を作用させると速やかに MreB ラセン構造が破壊されることから、これを利用して染色体分配における MreB の役割を解析することが可能となったのである。そこで、*Caulobacter crescentus* を用いて染色体分配に対する A22 の効果を調べた。分裂直後の細胞では複製開始点は細胞の一方の極付近に存在するが、付着細胞に変化後、複製が開始

すると複製開始点の一つが速やかに反対の極付近に移動する。このとき A22 を作用させると複製開始点の移動がみごとに阻害された。このことから複製開始点の移動における MreB の関与が明確に示された。これはまさに MreB アクチン骨格を利用した染色体分配機構の存在を示唆している。その後、A22 は国内外で広く利用されるようになり、これを利用した解析から細菌のアクチン様細胞骨格の様々な機能が明らかとなった。例えば、A22 を利用した解析から、病原性タンパク質 IcsA の細胞極への移動に MreB が必要であることが示された。このように、生体内の機能分子 (DNA、RNA、タンパク質など) には細胞内の特定の場所に正しく配置されて初めてその機能を正しく発揮できるものが数多い。細菌細胞という微小空間内でそのような生体分子のダイナミクスを司っているのは FtsZ や MreB のような細胞骨格タンパク質であると考えられるようになった。

## 2. 研究の目的

本研究では、細菌細胞内で起きている様々な生体反応 (特に DNA 分子の分配、タンパク質の細胞内輸送、転写など) における細胞骨格様タンパク質の役割を、特異的阻害剤を利用した細胞生物学的手法、遺伝学的手法、生化学的手法等を駆使した解析により明らかにすることを目的とした。特に、A22 の蛍光標識誘導体を合成し、簡便に細菌アクチンフィラメントを観察する方法 (蛍光標識ファロイジンによる真核細胞アクチンフィラメントの染色法のような) を確立することを目指した。

## 3. 研究の方法

細菌の細胞生物学解析に利用できるような研究ツールを開発するために、A22 の蛍光標識誘導体を合成する。蛍光標識 A22 で細菌細胞を染色することにより簡便に細菌アクチンフィラメントを観察する方法 (蛍光標識ファロイジンによる真核細胞アクチンフィラメントの染色法のような) が確立できると期待される。蛍光標識は、A22 の構造上のベンゼン環上の置換やチオウレアのアミノ基の修飾等を検討する。MreB タンパク質は様々な生体分子 (染色体 DNA や病原性タンパク質 IcsA など) の細胞内移動に関与していることが明らかとなっている。MreB 自身がそのような多様な分子に対する結合部位を持つとは考えにくいことから、MreB とそれらの生体分子間の結合を仲介するタンパク質が存在すると思われる。そこで MreB タンパク質と相互作用するタンパク質を MreB フィラメントとの共沈殿法、免疫沈降法、Two hybrid 法などにより検出する。また、A22 処理により変化する転写の全体像をアレイ解析によ

り明らかにする。

## 4. 研究成果

好熱菌由来の MreB タンパク質の 3 次元構造情報をもとにした A22 の *in silico* ドッキング解析の結果をもとに、A22 の蛍光標識誘導体の設計を行い、いくつかの誘導体を合成した。そのうちのアントラセン標識 A22 誘導体が生きた大腸菌細胞の MreB ラセン構造をきれいに染色することを確認した (図 1)。さらに、3つの MreB ホモログを有する枯草菌の細胞でもラセン構造が染色されることが明らかとなった。これにより、本研究課題の目標のひとつである簡便に細菌のアクチンフィラメントを観察する手法の開発に成功した。

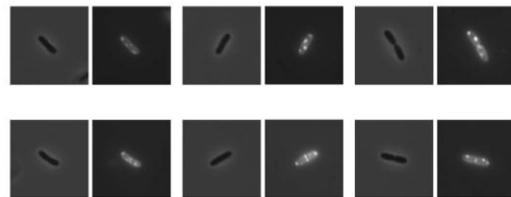


図1 蛍光標識 A22 による MreB ラセン構造の可視化

大腸菌の主要なペプチドグリカン合成酵素の一つである PBP1B を欠損した *mrcB* 変異株を A22 処理すると細胞が溶菌することを見出した (図 2)。しかし、PBP1B の機能的ホモログである PBP1A を欠損させた *mrcA* 変異株を A22 処理しても溶菌しなかった。この溶菌現象を調べるため、新たに見出した温度感受性 *mrcB* 変異と PBP1B 欠損の *mrcB* 変異を組み合わせた二重変異株を作製した。この二重変異株は培養温度を上げると直ちに溶菌した。これらのことより MreB と PBP1B の同時欠損は溶菌を引き起こすことが明らかとなった。また、これまで機能的に相補的な関係にあると考えられてきた PBP1A と PBP1B には互いに補い合えない機能があることが明らかとなった。

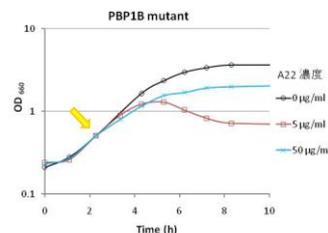


図2 A22 による PBP1B 欠損株の溶菌

溶菌を引き起こす原因を明らかにするために、PBP1B と相互作用が報告されている溶菌酵素 MltA と機能未知タンパク質 MipA の関与を調べた。また、MltA のホモログである MltB、MltC についても調べた。その結果、MltB

と MipA の欠損により、MreB と PBP1B の同時欠損による溶菌が抑制されることを見出した。また、枯草菌では MreB の欠損による致死性と形態異常が高濃度の  $Mg^{2+}$  の添加により抑制されることが報告されているため、この溶菌現象に対する  $Mg^{2+}$  の効果を調べた。その結果、MreB と PBP1B の同時欠損による溶菌も  $Mg^{2+}$  により抑制されたが、細胞形態は回復されなかった。これらのことから、MreB と PBP1B の同時欠損による溶菌現象には、溶菌酵素 MltB と MipA タンパク質、 $Mg^{2+}$  イオンが関与していることが明らかとなった。これらの知見は、新たな抗菌薬開発の手掛かりになることが期待される。解析の過程で分離した温度感受性 *mreB* 変異株について、間接免疫蛍光染色により細胞内の MreB の局在を調べたところ、らせん状構造体が温度のシフトアップにより破壊されることがわかった。この変異株は MreB の機能解析のツールとなることが期待される。

また、アクチン様細胞骨格の転写における役割を明らかにするために、アレイ解析を行った。その結果、鞭毛形成や走化性に関与する遺伝子発現が A22 処理により顕著に抑制されることが明らかとなった。実際に A22 処理した大腸菌細胞では遊走性の低下が認められた。

#### 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 10 件)

① Deininger KN, Horikawa A, Kitko RD, Tatsumi R, Rosner JL, Wachi M, Slonczewski JL. A requirement of TolC and MDR efflux pumps for acid adaptation and GadAB induction in *Escherichia coli*. PLoS One. 2011, **6**:e18960. 査読有

② Takeshita R, Ito H, Wachi M. A role of the *cspA* gene encoding a mycolyltransferase in the growth under alkaline conditions of *Corynebacterium glutamicum*. Biosci Biotechnol Biochem. 2010, **74**:1617-1623. 査読有

③ Kim J, Fukuda H, Hirasawa T, Nagahisa K, Nagai K, Wachi M, Shimizu H. Requirement

of *de novo* synthesis of the OdhI protein in penicillin-induced glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol. 2010, **86**:911-920. 査読有

④ Heinemann IU, Schulz C, Schubert WD, Heinz DW, Wang YG, Kobayashi Y, Awa Y, Wachi M, Jahn D, Jahn M. Structure of the heme biosynthetic *Pseudomonas aeruginosa* porphobilinogen synthase in complex with the antibiotic alaremycin. Antimicrob Agents Chemother. 2010, **54**:267-272. 査読有

⑤ Maeda T, Sakai T, Wachi M. The *Corynebacterium glutamicum* NCgl2281 gene encoding an RNase E/G family endoribonuclease can complement the *Escherichia coli* *rng::cat* mutation but not the *rne-1* mutation. Biosci Biotechnol Biochem. 2009, **73**:2281-2286. 査読有

⑥ 和地正明、大腸菌 RNase G による解糖系の制御、バイオサイエンスとインダストリー、2010, **68**:34-38. 査読無

⑦ Gao YG, Suzuki H, Itou H, Zhou Y, Tanaka Y, Wachi M, Watanabe N, Tanaka I, Yao M. Structural and functional characterization of the LldR from *Corynebacterium glutamicum*: a transcriptional repressor involved in L-lactate and sugar utilization. Nucleic Acids Res. 2008, **36**:7110-7123. 査読有

⑧ Sato H, Orishimo K, Shirai T, Hirasawa T, Nagahisa K, Shimizu H, Wachi M. Distinct

roles of two anaplerotic pathways in glutamate production induced by biotin limitation in *Corynebacterium glutamicum*. J Biosci Bioeng. 2008, **106**:51-58. 査読有

⑨ Tatsumi R, Wachi M. TolC-dependent exclusion of porphyrins in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2008, **190**:6228-6233. 査読有

⑩ Noguchi N, Yanagimoto K, Nakaminami H, Wakabayashi M, Iwai N, Wachi M, Sasatsu M. Anti-infectious effect of S-benzylisothiourea compound A22, which inhibits the actin-like protein, MreB, in *Shigella flexneri*. Biol Pharm Bull. 2008, **31**:1327-1332. 査読有

[学会発表] (計 16 件)

① 和地正明、RNase G 変異株を用いた mRNA の安定化によるタンパク質過剰発現系、第 62 回日本生物工学会大会、2010 年 9 月 27 日、宮崎

② Masaaki Wachi. A new antibiotic alaremycin inhibits porphobilinogen synthase, the initial step of the porphyrin biosynthesis. 11th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, 2010.6.30, Melbourne, Australia

③ 和地正明、アラレマシンによるポルフィリン合成系ポルフォビリノーゲン合成酵素の阻害、日本農芸化学会 2009 年度大会、2010 年 3 月 30 日、東京

④ 和地正明、高田綾子、岩井伯隆、アクチン

様タンパク質 MreB 阻害剤 A22 を用いた桿菌形態形成機構の解析、第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月 13 日、名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和地 正明 (WACHI MASA AKI)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・  
准教授  
研究者番号：9 0 1 9 2 8 2 2

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者 番号：

### (4) 研究協力者

高田 綾子 (TAKADA AYAKO)  
東京工業大学・技術部・技術職員  
研究者番号：2 0 4 0 1 5 6 5