

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 年 ～ 2009 年

課題番号：20770142

研究課題名 (和文) バクテリアの分裂位置制御システムの解明

研究課題名 (英文) Analysis of proteins regulating bacterial cell division site

研究代表者

奥野 貴士 (OKUNO TAKASHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・准教授

研究者番号：80411031

研究成果の概要 (和文)：

大腸菌の分裂環 (FtsZ) の形成位置を制御する Min 蛋白質 (MinC, D, E) の機能解析を行った。FRET 解析により MinC と FtsZ の相互作用のリアルタイム追跡に成功し、MinC と FtsZ モノマーの相互作用が分裂環形成位置制御に重要である事を示した。また、MinD 変異体を解析し、MinD の ATP 依存的な脂質膜結合には MinD への ATP 結合だけでなく、保存されたリシン残基が重要である事を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We have studied on the Min proteins (MinC,D,E) which regulates position of septum ring (FtsZ ring) formation in *E.coli*. The results of FRET analysis indicated that MinC interacts with FtsZ monomer rather than FtsZ polymer in the solution. It is suggested that interaction between monomeric FtsZ and MinC is important for controlling of FtsZ polymerization by MinC. On the other hand, in vitro analysis of mutant proteins of MinD indicated membrane binding of MinD requires not only ATP binding to nucleotide binding pocket of MinD, but also other factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物物理化学、生化学、分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：細胞分裂、ATPase

1. 研究開始当初の背景

細胞膜の分裂時において、アクチンに代表される細胞骨格様タンパク質が、分裂を推進する重要なタンパク質として見出されてきた。大腸菌の場合も、FtsZ リング(分裂環)や、分裂の位置調節に関与する Min タンパク質などの、細胞骨格様タンパク質が細胞膜表面に可逆的に結合し、膜の分裂調節に重要な機能を果たしていることが分かってきた。しかし、現在のところ、これら細胞骨格様タンパク質が本来機能する細胞膜表面での機能/構造解析がほとんどできていなかった。Min タンパク質の場合、MinD タンパク質が C 末端の両親媒性ヘリックスを介して膜表面に結合し、MinC や MinE と呼ばれるタンパク質が膜表面にリクルートされてくる (図 1)。MinD は ATP 依存的に細胞膜表面に結合し、繊維構造を膜上で形成するが、その細胞膜表面の MinD に MinC がどのように相互作用するか明らかにされていない。また MinE は、MinD の繊維構造を脱重合するが、どのように MinD 繊維と相互作用し、脱重合を促すかまったくわかっていない。さらに MinC は、FtsZ リングの重合を阻害するが、その阻害機構についてはほとんど明らかにされていない。一方、分裂環 (FtsZ) はその繊維構造が、FtsA を介して細胞膜表面に結合する事が近年明らかにされてきた。FtsA は、C 末端両親媒性のヘリックスを介して細胞膜表面に結合する。この FtsA に FtsZ リングが膜表面にリクルートされてくる (図 1)。FtsZ は GTP 依存的に繊維構造を形成する事は報告されているが、FtsA が FtsZ の細胞膜上でどのように重合過程に関与するかまったく明らかにされていない。細胞膜表面の細胞骨格様の構造を顕微鏡を用いてダイレクトに観察することで、細胞膜の分裂機構を分子レベルで解明する事が期待された。

2. 研究の目的

本研究では、大腸菌由来の脂質を基板上に展開し、脂膜表面で形成される細胞骨格様タンパク質およびその重合、脱重合反応を制御するタンパク質との相互作用を共焦点レーザー顕微鏡および原子間力顕微鏡を用いて構造および相互作用様式等を解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌抽出脂質のガラス基板上への脂質平面膜構造作成

大腸菌から抽出した脂質成分を用いて、ガラス基板上に平面脂質膜を蛍光顕微鏡観察が可能な面積に展開し、共焦点レーザー顕微鏡および原子間力顕微鏡を用いて、構造および膜厚を評価した。

(2) Min タンパク質および FtsZ, FtsA タンパク質の調製と蛍光修飾

Min タンパク質と FtsZ, FtsA タンパク質を大量発現系を構築し、アフィニティーカラムを用いて精製し、それらタンパク質活性を測定した。さらに精製タンパク質を蛍光色素である Cy3 または Cy5 で修飾した。

(3) タンパク質間相互作用の FRET 解析および MinD ATP 依存的な脂質膜結合解析

FtsZ の GTP 依存的な重合/脱重合反応を溶液内でリアルタイムに追跡した。さらに FtsZ の重合を阻害する MinC との相互作用についても FRET で溶液内反応を直接観測した。

*FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer (蛍光共鳴エネルギー移動)

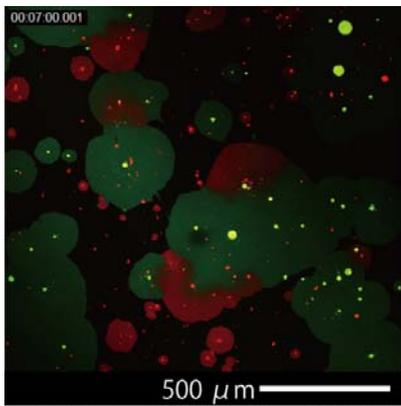
(4) 平面脂質膜上に結合した細胞骨格タンパク質の解析

研究方法 (1) で作製した基板上の平面脂質膜上に結合する Min タンパク質を各種顕微鏡で解析した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌抽出脂質のガラス基板上への脂質平面膜構造作成

大腸菌抽出脂質を用いてガラス基板上に100~1000 μm サイズの平面脂質膜を短時間(10分程度)で作製する条件を見いだした。平面脂質膜は、リポソームをガラス基板上に展開し作製するが、平面膜の大きさはリポソームサイズに依存する。我々は、多重膜化したリポソームを用いると容易に平面脂質膜を顕微鏡視野の広い範囲に作製する条件確立に成功した。細胞骨格タンパク質を観察する平面脂質膜の準備は整った。



ガラス基板上に展開した大腸菌由来の脂質膜
[共焦点レーザー蛍光顕微鏡像]

(2) Min タンパク質および FtsZ, FtsA タンパク質の調製と蛍光修飾

①MinC, MinD, MinE タンパク質の調製と活性評価

大腸菌染色体を PCR により各遺伝子を増幅、精製し、大量発現用ベクター(pET15b)にクローニングを行った。Min 遺伝子を導入したプラスミドを形質転換した大腸菌株は、すぐにプラスミドを持たない細胞が培養液内で優先的に増えることが明らかとなった。そのため、大量発現の際、アンピシリンよりもカルベニシリンを抗生物質として用い、プラスミドを持たない細胞の増殖を極力抑える事で、解析に十分なタンパク質量を得る事に成功した。それぞれのタンパク質は、アフィニティーカラムで精製した。精製した MinD の ATP 依存性な脂質モデル膜(リポソーム)への結合と、ATPase 加水分解活性を解析し、精製した MinD に活性が保持される事を確認した。

MinC は細胞内で MinD と相互作用する。そこで MinC の活性評価は MinD との結合能力として評価した。FtsZ についても同様に大量発現用のベクターを構築し、アフィニティーカラムを用いて精製した。

②また、大腸菌由来の Min タンパク質の精製等が上手く行かない場合を想定し、ヒト由来の MinD タンパク質のホモログである Nubp1 および Nubp2 のクローニングも同時に行い、大腸菌による発現系を得た。また、Nubp1、2 の細胞内局在の解析を行い、それらタンパク質の細胞内局在について明らかにした(雑誌論文(1))。

③精製したタンパク質は、Cy3 および Cy5 で蛍光修飾し、それら蛍光修飾タンパク質の活性が保持される事を確認した。(Cy3-MinD, Cy5-FtsZ など)

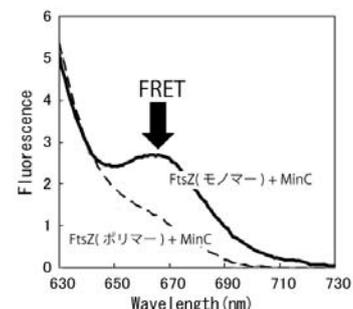
(3) タンパク質間相互作用の FRET 解析

①FtsZ の重合反応

FRET 解析により蛍光修飾 FtsZ の GTP 依存性な重合反応を溶液内でリアルタイムに追跡に成功した。

②MinC と FtsZ 間の相互作用解析

精製した MinC は FtsZ の重合阻害活性を有し、超遠心で沈殿分画に含まれる FtsZ ポリマー量を減少させた。この MinC の FtsZ 重合阻害活性を解明するために、MinC がモノマーFtsZ と相互作用するかポリマー状態の FtsZ と相互作用するか FRET 解析を行った。その結果、モノマーFtsZ 存在下で Cy3-MinC と Cy5-FtsZ に FRET を観測した。一方、GTP を加えて FtsZ を重合させると FRET が減少し、MinC-FtsZ 間の相互作用が弱くなる事が示された。溶液内で MinC と FtsZ 間の相互作用の解析にはじめて成功した(雑誌論文(2))。



Cy5-FtsZ と Cy3-MinC の相互作用で観測された FRET

③MinD の ATP 依存的な脂質膜結合の解析

MinDはATP依存的に細胞膜表面に可逆的に結合する。しかし、MinDの細胞膜表面への結合制御機構は明らかにされていない。ATP結合サイトに保存されているリシン残基変異体は、ATP存在下においても細胞膜に結合しない。この変異体MinDのATP親和性を蛍光偏光解析により野生型と比較した所、リシン残基変異体は野生型と変わらないATP親和性を示す事を明らかにした(表1)。この結果は、MinDの細胞膜への結合はATP結合だけでなく、リシン残基を介した構造変化等が必要である事が示唆された。また、MinDの他のヌクレオチド(ADP, GTP)に対する親和性も解析を行い、ADPはATPと同程度の親和性を有し、GDPの親和性は低い事が明らかとなった(論文投稿中)。

表1. 野生型, 変異体MinDの解離定数K_dの比較

	K _d [MANT-ATP]	n _H
WT	4.9 μM	2.2
K11A	3.6 μM	2.0
K16A	4.5 μM	1.9

(4) 平面脂質膜上の細胞骨格タンパク質 (MinD および FtsZ) の解析

研究成果(1)で作製したガラス基板上の平面脂質膜に、Cy3色素ラベルMinD(Cy3-MinD)のATP依存的な結合を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Cy3-MinDとATPを平面脂質膜に加えると、MinDの脂質膜への結合と考えられる蛍光が顕微鏡により観察され、研究目標達成のための大きな手掛かりを得た。しかし、我々の実験条件において、観測の際に加えるATPが平面脂質膜構造に影響を与え、ヒダ状の膜構造に転移するため、脂質膜表面のMinDの状態を詳細に観察する事が困難であった。今後、これら研究成果を踏まえて、ATP添加による膜構造の影響が出ない平面脂質膜の開発を行う予定である。

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 2件)

- ① Okuno T., Ogoh M., Tanina H., Funasaki N., Kogure K., Direct monitoring of interaction between *Escherichia coli* proteins., MinC and monomeric FtsZ, in solution., *Biol. Pharm. Bull.*, 32, 1473-1475 (2009)
- ② Okuno T., Yamabayashi H., Kogure K., Comparison of intracellular localization between Nubp1 and Nubp2 utilizing GFP fusion protein., *Mol. Biol. Rep.*, 37, 1165-1168 (2010)

[学会発表] (計 4件)

- ① 奥野貴士, 小郷真智子, 谷名宏允, 舟崎紀昭, 小暮健太郎, FRETを利用したバクテリア分裂制御タンパク質間の相互作用の解析、第58回日本薬学会近畿支部大会、2008.10.25 (神戸)
- ② 奥野貴士, 丸山真由美, 小郷真智子, 谷名宏允, 舟崎紀昭, 小暮健太郎, Analysis of interaction between MinC and FtsZ by FRET., 日本生物物理学会第46回年会、2008.12.3 (福岡)
- ③ 奥野貴士, 小暮健太郎, 上野雅晴, 新規の平面脂質膜構造体の膜タンパク質機能のイメージングへの応用、日本薬学会北陸支部121回例会、2009.12.5 (富山)
- ④ Okuno T., Yamabayashi H., Kogure K., Ueno M., Comparison of intracellular localization of Nubp1 and Nubp2 using GFP fusion proteins., 日本分子生物学会第32回年会、2009.12.10. (横浜)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phypha1/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥野 貴士 (OKUNO TAKASHI)

富山大学 大学院理学薬学研究部 (薬学)
・准教授

研究者番号: 80411031