

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20870039

研究課題名（和文） 桿状細菌大腸菌の新規形態形成因子の解析

研究課題名（英文） Analyses of a novel cell shape determinant in rod-shaped bacterium *Escherichia coli*.

研究代表者

塩見 大輔 (SHIOMI DAISUKE)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・研究員

研究者番号：70507532

研究成果の概要（和文）：私は、桿状の大腸菌の形態形成制御を司る新規タンパク質 RodZ を同定した。RodZ 欠損株は球形になる。RodZ は、細胞長の制御していることが示唆された。また、RodZ 欠損株の抑圧変異株の解析から、RodZ と他の細胞骨格タンパク質 MreB（アクチン）や細胞分裂装置（FtsZ チューブリンを含む）との遺伝的相互作用を明らかにした。これは、大腸菌の全ての細胞骨格タンパク質（RodZ, MreB, FtsZ）が協調的に働いていることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：I identified a novel cytoskeletal membrane protein RodZ which regulates cell shape in rod-shaped bacterium *E. coli*. Cells lacking *rodZ* are round. It was suggested that RodZ regulates the cell length. Analyses of suppressor mutants of cells lacking *rodZ* revealed genetic interactions between RodZ and MreB (actin) or cell division machinery that includes FtsZ (tubulin), suggesting that all three cytoskeletal proteins in *E. coli* collaborate to determine cell shape.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：大腸菌、形態形成、細胞骨格、蛍光タンパク質、細胞膜、ペプチドグリカン

1. 研究開始当初の背景

真核生物、原核生物に関わらず、細胞や個体が正しく分裂し、遺伝情報を継代していくために、それぞれが、その形態を正しく形成し、維持していくことが必須である。真核細胞だけでなく、原核細胞においても、細胞骨格タンパク質が存在し、それらが、形態形成、

細胞分裂、DNA 分配などの重要な機能を担っていることが知られていた。原核細胞の形態は、球形、桿形、らせん形、三日月型など多様である。モデル生物としてよく研究されている大腸菌の形態は、比較的単純な桿形である。すなわち、中央のシリンダー部分と、極の半球型のキャップが合わさってきた

ものと見なすことができる。この大腸菌の形態は、アクチン(MreB)、チューブリン(FtsZ)などの細胞骨格タンパク質によって制御されていることが知られていた。しかし、これらの細胞骨格タンパク質がどのような分子機構で形態を制御しているかは分かっていなかった。また、MreBやFtsZ以外にも形態形成を制御している因子があるかどうかも分かっていなかった。

2. 研究の目的

現時点で大腸菌の全遺伝子(およそ4000)のうち、およそ1500もの遺伝子が機能未知である。したがって、形態形成に関わる因子が全て同定されているわけではないと考えられる。実際に、これまで機能未知であった遺伝子の機能が次々と明らかにされてきている。そこで、MreBやFtsZ以外にも形態形成を司る新規因子があるかを調べる。ここで、同定された因子の機能、そしてその因子と相互作用する未知の因子、あるいはMreBやFtsZなどの既知の細胞骨格タンパク質との関係を調べることによって、大腸菌の形態形成制御機構の全体像を明らかにしようとすることを目的とする。

3. 研究の方法

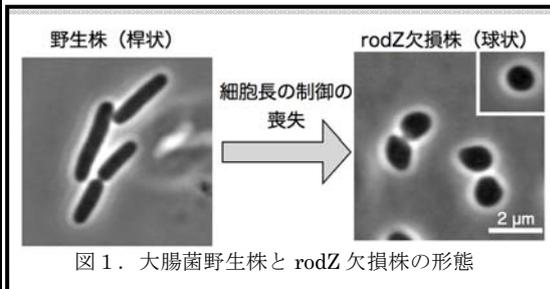
馬場らによって作製されたKEIO株(大腸菌の全ての非必須遺伝子を一つずつ破壊したおよそ4000株のライブラリー)を、一株ずつ顕微鏡下で観察することにより、形態異常の株がないかをスクリーニングした。その結果、*yfgA*(*rodZ*と名付けた)という機能未知遺伝子の欠損株の形態が、本来桿状である大腸菌が球状になるという顕著な形態異常を示した。4000株に及ぶライブラリーを顕微鏡下で観察してスクリーニングした例はこれまでになかった。以上のようにして同定した*rodZ*欠損株や*rodZ*大量発現株の細胞長、細胞幅を測定した。また、*rodZ*とGFPやmCherryなどの蛍光タンパク質との融合タンパク質を作製し、その細胞内局在を調べた。*rodZ*タンパク質に対する抗体も作製した。系統的な*rodZ*部分欠失タンパク質を作製し、*rodZ*タンパク質のどの部分が*rodZ*の機能に重要かを調べた。

*rodZ*欠損株は野生株に比べて、生育が非常に遅くなるので、*rodZ*欠損株から生育速度の速くなった抑圧変異株を単離した。これら抑圧変異株の形態は、正常な桿状か、楕円状に戻っていた。抑圧変異部位を同定するために、次世代シーケンサーによって、全ゲノムシーケンセスを行った。野生株のゲノム配列と比較することにより、変異部位の同定を行った。これらの変異部位を単独で持つ株も作製し、その変異タンパク質の機能も明らかにした。

*rodZ*とMreBの関係を調べるために、MreBとGFPの融合タンパク質も作製した。さらに、抗MreB抗体も作製した。これらを用いて、*rodZ*とMreBの共局在を調べた。

4. 研究成果

(1)新規細胞骨格タンパク質*rodZ*の同定 およそ4000株のKEIO株を顕微鏡で観察することにより、*yfgA*(*rodZ*と名付けた)欠損株の形態が球形であることを見出した(図1)。



*rodZ*は、アクチンやチューブリンなどの既知の細胞骨格タンパク質や、それ以外のタンパク質との相同性は見られない。*rodZ*は、大腸菌、枯草菌などの桿菌だけでなく、ブドウ球菌、連鎖球菌などの球菌にも見出される。*rodZ*はN末端を細胞質側に、C末端をペリプラズム側に露出した1回膜貫通型タンパク質であることを、細胞分画とPhoAアッセイにより示した。また、N末端にはヘリックスターンヘリックス領域を持つ。C末端領域は*rodZ*間では比較的保存されている。

野生株と*rodZ*欠損株あるいは、*rodZ*大量発現株の細胞長、細胞幅を測定することにより、*rodZ*は、細胞長(中央のシリンダー部分の長さ)を制御する因子であることが示唆された。

*rodZ*タンパク質の機能を調べるために、*rodZ*と蛍光タンパク質GFPまたはmCherryの融合タンパク質を作製し、*rodZ*の細胞内局在を調べたところ、*rodZ*は、細胞の長軸方向に沿って、らせん状に配置されていることが分かった。抗*rodZ*抗体を用いた免疫染色によっても、同様の局在パターンが観察された。アクチンホモログMreBが細胞内でらせん状に局在することは、すでに報告されていた。また、MreBの機能欠損株も丸くなる。(ただし、*rodZ*欠損株はMreB機能欠損株よりも小さい。)そこで、*rodZ*がMreBと共局在する可能性を調べるために、*rodZ*-mCherryとGFP-MreBの局在を同一細胞内で同時に観察した。その結果、確かに、*rodZ*とMreBが共局在していた。しかし、この細胞にMreBのらせん形成を特異的に阻害する抗生物質A22を加えると、確かにMreBらせんは消失したが、*rodZ*らせんはその後も観察された。この結果は、少なくとも、一度できた*rodZ*らせ

んの維持には、MreB らせんは必要ではないということを示している。

より詳細に RodZ タンパク質の機能を調べるために、系統的に、RodZ の部分欠損タンパク質を作製した。その結果、N 末端の細胞質領域（特に、ヘリックスターンヘリックス領域）が、RodZ のらせん形成に必要であることが分かった。一方、大腸菌が正常な桿状になるには、RodZ のペリプラズム領域が必要であった。興味深いことに、RodZ らせんの形成は、本質的には菌の形態形成には関係がないことが分かった。ただし、RodZ らせんを形成することにより、野生型のような桿状になる。

また、*rodZ* 欠損株中で RodZ の発現を回復させ、菌の形態が球状から桿状に戻る過程を時間を追って観察した。その結果、桿状に戻る前に、不定型な大腸菌が観察された。RodZ タンパク質の発現に伴って、細胞壁の再編成が起こっているようであった。RodZ は細胞壁合成を制御することによって、細胞長を制御していることが示唆された。

アンピシリンなどある種の抗生物質は細胞壁合成酵素に結合し、その活性を阻害する。RodZ が細胞壁合成を制御していると考えられることから、*rodZ* 欠損株では種々の抗生物質に対する感受性が野生株と異なるのではないかと考えた。実際、*rodZ* 欠損株はアンピシリンに対する感受性は野生株よりも高かった。また、一般に大腸菌に効かないバンコマイシンに対して、感受性を示すようになった。この結果は、*rodZ* というひとつの遺伝子の欠損だけで、抗生物質に対する感受性が異なるようになるということである。これは、RodZ を含む複合体が抗生物質の新たな標的になる可能性を示唆している。

以上の成果の大部分は、下記論文 1-3 で発表した。特に、発表論文 3 は EMBO Journal と Nature Reviews Microbiology の 2 つの雑誌で特集記事として取りあげられた。

(2) *rodZ* 欠損株の抑圧変異株の解析 *rodZ* 欠損株はその形態が異常になるだけでなく、その生育速度も野生株に比べて非常に遅くなる。そこで、さらに RodZ の機能を調べるために、*rodZ* 欠損株から生育の早くなった抑圧変異株を単離した。その結果、これら抑圧変異株は生育が速くなっただけでなく、その形態も、球状から桿状か楕円状になっていた。そこで、これら抑圧変異部位を特定するために次世代シーケンサーによって抑圧変異株およそ 30 株と野生株の全ゲノム配列をシーケンスした。そして、各変異株と野生株の変異部位を比較することで、抑圧変異部位を特定した。

① RodZ がなくてもシリンダー部分の合成が可能になった抑圧変異株の解析 全ゲノム

シーケンスの結果、ほとんどの抑圧変異は *mreB* 遺伝子に見出された。また、*pbp2* と *rodA* という遺伝子にも変異があった。MreB、PBP2、RodA は複合体を形成し、中央のシリンダー部分の細胞壁合成を担っていると考えられている。この結果は、これらの因子に変異が導入されることにより、RodZ がなくてもシリンダー部分の合成が可能になったのだと考えられる。これは、RodZ が細胞長を制御する因子であるという考えとよく一致する。また、RodZ がこれら因子を制御するマスターレギュレーターであるということも示唆している。さらに *mreB* の変異について詳細に解析を行った。MreB は 3 次元構造上 4 つの領域に分けられる。興味深いことに、すべての変異は、一つの領域（ドメイン IA）、もしくは近傍にあった。MreB のドメイン IA の役割はこれまで分かっていなかった。野生株と *mreB* に変異を持つ抑圧変異株の抗生物質 A22 に対する感受性を調べたところ、野生株に A22 を加えると、MreB らせんは消失し、菌は球形になった。一方、抑圧変異株は、10 倍量の A22 を加えても、菌は桿状のまま、MreB らせんも形成されていた。以上の実験などから、ドメイン IA は MreB のらせん形成や安定性に関与していることが明らかになった。また、PBP2 は細胞壁合成酵素、RodA は PBP2 と協調的に働く因子である。これらの変異は、PBP2 の酵素活性を上昇させ、RodZ がなくてもシリンダー部分の合成ができるようになったと推測された。しかし、これらの変異を持つ株の抗生物質 A22 に対する感受性を調べたところ、MreB は野生型であるにも関わらず、A22 に対してより耐性になった。一方、PBP2 特異的な抗生物質メチリナムに対する耐性は野生株とほぼ同程度であった。このことは、PBP2 や RodA の変異は PBP2 の活性に影響を及ぼしているのではなく、むしろ MreB/PBP2/RodA 複合体の安定性を高めていることを示唆している。PBP2 や RodA の細胞内局在が MreB などの細胞骨格タンパク質によって正しく配置されることにより、正しく細胞壁が作られると考えられている。抑圧変異株においては、より安定になった MreB らせんにより RodZ がなくても PBP2 や RodA が正しく配置され、正しく細胞壁が合成されるようになったと考えられる。

② 細胞分裂のタイミングを変えることにより桿状になる抑圧変異株の解析 RodZ はシリンダー部分の合成を支配している。*rodZ* 欠損株はシリンダー部分の合成ができず、極のキャップ部分が合わさってできた球菌とみなすことができる（図 2）。野生株では極に局在する走化性受容体 Tar が、*rodZ* 欠損株では、細胞全体に拡散していたことは、*rodZ* 欠損株がキャップからできているという仮説を支持している。このような球形である *rodZ*

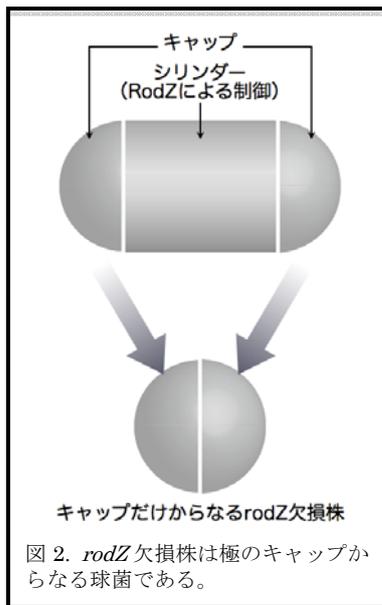


図 2. *rodZ* 欠損株は極のキャップからなる球菌である。

一方方向にのみ固定されていた。この細胞分裂の様式は、もともと球菌である連鎖球菌の分裂と同じである。連鎖球菌の細胞分裂を阻害すると桿形になることが知られており、*rodZ* 欠損株の細胞分裂を阻害しても、桿形になった。一方、同様に球形である *mreB* 機能欠損株の細胞分裂を阻害すると、菌は膨張して、さらに大きな球形になった。これは、元々球形であるブドウ球菌の細胞分裂を阻害した時に起こる現象と同じである。*mreB* 欠損株は極性を失っていると考えられる。すなわち、RodZ と MreB が共局在したり、変異株が球形になるという表現型が一見似ているが、実際の機能は「細胞長の制御」と、「極性の制御」という異なる役割を担っていることが示唆された。

rodZ の抑圧変異株として、*mreB* 等以外には、*zipA* 遺伝子の上流（推定プロモーター領域）に変異が見つかった。この変異 *zipA_p* をもつ *rodZ* 欠損株の形態は桿状であった。ZipA は FtsZ（チューブリン）などによって構成される細胞分裂装置の構成因子である。細胞分裂装置は、細胞分裂時に、分裂面の細胞壁合成を制御しているが、シリンダー部分の合成には直接関与していないと考えられる。よって、*zipA_p* 変異による *rodZ* 欠損の抑圧の機構は *mreB* 変異などの場合と異なると考えられた。変異がプロモーター領域内にあったことから、まず ZipA タンパク質の発現量を調べたところ、野生株に比べて変異株ではおよそ 20%ほどタンパク質量が増加していた。また、Real-Time PCR によって *zipA* の mRNA 量を調べると、やはり変異株では野生株に対して増大していることが分かった。*zipA* をプラスミドから発現させても、抑圧の効果が見られたことから、確かに ZipA タンパク質量の増大が、*rodZ* 欠損株の生育、形態異常を抑圧して

欠損株の細胞分裂の様子を顕微鏡下で観察すると、球形であるにも関わらず、極性を持っていることがわかった。

すなわち、分裂面は

いることが分かった。次に、ZipA による抑圧の機構を調べた。これまでに、ZipA タンパク質の量がたった 2 倍に増えるだけで、菌は分裂阻害を起こし、伸長し、やがて死ぬということが知られていた。また、ZipA の大量発現が不安定化した細胞分裂装置を安定化させることも知られていた。そこで単離した *zipA_p* 変異を野生株に導入し、その表現型を調べたところ、予想通り、細胞分裂が阻害され、菌がやや伸長した。おそらく、*rodZ* 欠損株でも同様に分裂阻害が阻害されていると予想された。これは、*rodZ* 欠損株の分裂を阻害すると桿状になる。このように、ZipA タンパク質量を増加させることにより、細胞分裂のタイミングを変化させることにより、見かけ上桿形になったと考えられる。

本研究の抑圧変異株の解析により、*rodZ* と遺伝的に相互作用する因子を明らかにした（図 3）。大腸菌の 3 つの細胞骨格因子 MreB（アクチン：細胞極性制御）、FtsZ（チューブリン：細胞分裂制御）、RodZ（細胞長制御）がそれぞれ密接に関わることによって、形態形成制御を行っていることが示唆された。本研究で同定された RodZ は、これらの因子（特に MreB/PBP2/RodA 複合体）のマスターレギュレーターの可能性が示唆された。

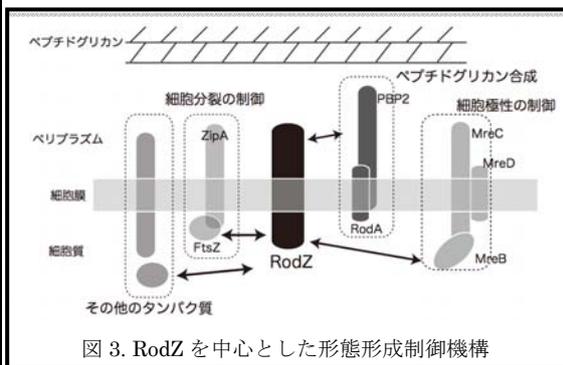


図 3. RodZ を中心とした形態形成制御機構

また、原核細胞において、球菌から桿菌、桿菌から球菌という形態変化の起こる仕組みの一端を明らかにした。すなわち、桿状の野生株から *rodZ* という一遺伝子を欠損させることにより球状に変化する。また、*rodZ* 欠損によってシリンダーを作れなくなった球形の株から桿形の株を形成するには、①シリンダーを合成できるようにする、②細胞分裂のタイミングを変える、ことにより可能であることを示した。

以上の抑圧変異株の解析は、現在論文として投稿準備中である。

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 3 件)

1. Shiomi D, Mori H, Niki H (2009) Genetic mechanism regulating bacterial cell shape and metabolism. *Communicative & Integrative Biology* 2(3): 219-220 (査読無し)
2. 塩見大輔、仁木宏典 (2009) 細胞骨格タンパク質による大腸菌の形態形成機構 日本微生物生態学会誌 24(2):51-60 (査読無し)
3. Shiomi D, Sakai M, Niki H (2008) Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein. *EMBO J* 27(23): 3081-3091 (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

1. 塩見大輔、仁木宏典 「Genetic interactions between proteins that govern rod-shape of *E. coli*」平成 22 年 3 月 第 83 回日本細菌学会総会 パシフィコ横浜
2. 塩見大輔、仁木宏典 「Global regulatory network among proteins that determine cell shape in *E. coli*.」平成 21 年 12 月 第 32 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「原核生物で新たに見出された細胞複製の基本分子機構」パシフィコ横浜
3. Daisuke Shiomi, Keita Aoki, Hironori Niki 「*B. subtilis* knockout strains by the National BioResource Project in Japan」平成 21 年 6 月 5th Conference on Functional Genomics of Gram-positive Microorganism San Diego, CA, USA
4. 塩見大輔、仁木宏典 「細胞骨格タンパク質 RodZ の抑制変異解析から見た形態形成の制御の遺伝子ネットワーク」第 6 回 21 世紀大腸菌研究会 平成 21 年 6 月 KKR 熱海
5. 塩見大輔、境雅子、仁木宏典 「桿菌の形を決める新規の細胞骨格性タンパク質」平成 21 年 3 月 第 82 回日本細菌学会総会 シンポジウム「原核細胞の形と位置を決める仕組み」名古屋国際会議場
6. 塩見大輔、境雅子、仁木宏典 「大腸菌の形態形成を司る新規因子の解析」平成 20 年 7 月 第 5 回 21 世紀大腸菌研究会 藤枝エミナーズ
7. Daisuke Shiomi, Hironori Niki 「Novel cell shape determinant in *Escherichia coli*」平成 20 年 6 月 Gordon Conference “Bacterial Cell Surface” New London, NH, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩見 大輔 (SHIOMI DAISUKE)
国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・研究員
研究者番号：70507532