

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06591

研究課題名（和文）TIRF観察による細菌アクチンMreBの重合ダイナミクスと阻害剤A22の作用理解

研究課題名（英文）TIRF visualization of the polymerization dynamics of bacterial actin cytoskeleton, MreB and A22 driven disruption mechanism

研究代表者

藤原 郁子 (Fujiwara, Ikuko)

長岡技術科学大学・工学研究科・准教授

研究者番号：10742075

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）：MreBは細菌の細胞骨格でアクチンと似た形を持つ。MreBの作用を知るために阻害剤A22が用いられるが、MreB重合ダイナミクスのどのプロセスを阻害してするかは未解明である。A22をスピロプラズマに添加すると、らせん推進運動が止まったため、A22とMreBの相互作用が示唆された。スピロプラズマのMreB3の構造解析から、加水分解サイトの変異が非常に遅いATPaseを引き起こすことを突き止めた。スピロプラズマのMreB5は、繊維が数本横に並んだシート構造を作ること、またMreB5は重合後もATPを加水分解し続けることから、速いターンオーバーで繊維構造を更新する可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの細菌に存在し、細胞の形態維持に必須であるMreBのタンパク質としての機能の解明は難しい。この理由として、菌体におけるMreBの影響を調べる研究が、重合阻害剤A22またはMreB欠損株から得られたものしかなく、MreBの重合・脱重合という、菌の形を保つために必須の動的ダイナミクスの相関が未解明であることが挙げられる。これら病原菌に対し、A22による阻害メカニズムの理解は、分子レベルで病原性細菌の運動メカニズムの理解につながられる点で意義が大きく、A22を基にして、創薬や病原体診断・検査、治療、及び予防法の開発に活用できる可能性を含む。以上から基礎学術をはじめ、多分野にて役立つ研究である。

研究成果の概要（英文）：MreB is a bacterial cytoskeleton having a similar shape to actin. An inhibitor A22 is used to study the polymerization of MreB, but it remains unclear which process of MreB polymerization dynamics are inhibited. A22 addition to Spiroplasma disrupted helical swimming, suggesting an interaction between A22 and MreB. Structural analysis of Spiroplasma MreB3 revealed that the differences on ATP hydrolysis site was the cause of slow ATPase. Spiroplasma MreB5 forms a sheet structure in which several filaments are aligned side by side, and MreB5 continues to hydrolyze ATP even after polymerized, suggesting the possibility of renewing the filament structure with a rapid turnover.

研究分野：生物物理

キーワード：MreB A22 重合 タンパク質構造 アクチン

1. 研究開始当初の背景

細菌のアクチン「MreB」の役割として、RodZなどのタンパク質と複合体を作り、細胞内壁を周回しつつ、桿体の形を保つ役割が良く知られている。しかし、細菌という膜で閉じた系の中で、MreB 繊維がどのように形成され、リサイクルされているかを明らかにする研究は、アクチンに比べて困難である。その理由の 1 つは、重合度合いを詳細に計測できる系(アクチンにおける蛍光色素ピレンのようなプローブ)がなく、MreB の重合研究は現在も散乱光で計測されていることが挙げられる。この光散乱法では、繊維の束化の区別が難しい。しかし、応募者の得意とする TIRF 顕微鏡法であれば、蛍光 MreB 繊維を直視できるため、束化して蛍光強度が高い MreB 繊維束を容易に区別できる。さらに 1 本であれ束化であれ、その両端から MreB が重合して長くなる過程も観察できる。加えて、応募者の研究内容を参考にすることで、A22 による MreB 重合阻害メカニズムの観察を通じて、MreB の重合・脱重合ダイナミクスを明らかにできるという研究構想に至った。

2. 研究の目的

A22が、MreB重合ダイナミクスのどのプロセスを阻害して繊維を阻害するのか?という問いは、解明されていない。この理由として、A22を結合したMreB(MreB:A22)は、アクチン:ラトランキュリンAと同様に結晶を作る。一般に重合能を持つタンパク質は高濃度で自己重合してしまうため、結晶化は難しい。しかし、A22が結合するとMreBの結晶ができるため、MreB:A22は重合できないモノマー状態と想定される。また、A22が、ラトランキュリンAと同じような場所に結合するため、MreB内でのヌクレオチド加水分解にて生じる γ -リン酸と作用し、MreBモノマーを重合できなくすると考えられる。しかし、A22の結合がMreBモノマーを重合できなくすることは、安定なMreB繊維を急に崩壊させる原因にはならず、A22がMreB繊維を阻害・減少させるメカニズムは謎である。これら2つの問いを解くべく、本研究の目的を、重合阻害剤A22と一分子キネティクスを用いた細菌アクチンMreBの重合機能の解明とする。

3. 研究の方法

1本のMreB繊維や繊維束にA22が与える影響を全反射蛍光顕微鏡(TIRF)でリアルタイムに見る系を用いた。応募者は、アクチンを通じて生体高分子の重合ダイナミクスの研究に対する経験と技術を有しており、これらを用いてMreBの重合ダイナミクスとA22による阻害機構の理解に応用した。

4. 研究成果

精製可能であったMreB3とMreB5を精製・蛍光染色させたのちに重合させたがTIRF顕微鏡の空間分解能以下で繊維構造を可視化できず、実時間で重合過程を見る事ができなかった。これはどちらのMreBについても非常に短い繊維しか作れないためと考察される。興味深い事に、MreB5はシート構造を作ることが負染色電顕で示されたが、そのような巨大な構造においても、TIRF顕微鏡下でMreB繊維と思われる構造を観察することはできなかった。そこで、光散乱法を用いてMreB3とMreB5の重合過程を観察したところ、A22存在下にも関わらず、どちらのMreBも重合することが確認された。MreB5の状態変化の条件について詳細に調べたところ、ATPや塩がない状態でも光散乱強度が増加することが示された。以上の事からMreBの重合にはヌクレオチド結合だけでなく静電的な結合が作用することが示唆

され、A22 の存在下でも重合が生じたことが説明された。さらに、MreB3 と MreB5 の繊維構造を詳細に検討するため、負染色電顕を主力として構造解析を行い、MreB3 は、他の MreB と比べて非常に遅い ATPase を有する構造を持つことが示された。また MreB5 は pH とイオン強度によって、繊維構造をシート状や束状(パラクリスタル)にすることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Daichi Takahashi, Ikuko Fujiwara, Yuya Sasajima, Akihiro Narita, Katsumi Imada, Makoto Miyata	4. 巻 1
2. 論文標題 ATP dependent polymerization dynamics of bacterial actin proteins involved in Spiroplasma swimming	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.04.07.438887	査読の有無 無
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 Kobayashi K, Kodera N, Kasai T, Tahara YO, Toyonaga T, Mizutani M, Fujiwara I, Ando T, Miyata M,	4. 巻 12
2. 論文標題 Movements of Mycoplasma mobile Gliding Machinery Detected by High-Speed Atomic Force Microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00040-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.00040-21	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 Takeda S, Koike R, Fujiwara I, Narita A, Miyata M, Ota M and Maeda Y	4. 巻 433
2. 論文標題 Structural insights into the regulation of actin capping protein by twinfilin C-terminal tail	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 166891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2021.166891	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 Takahashi Daichi, Fujiwara Ikuko, Miyata Makoto	4. 巻 533
2. 論文標題 Phylogenetic origin and sequence features of MreB from the wall-less swimming bacteria Spiroplasma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 638 ~ 644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.09.060	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 Takeda Shuichi, Koike Ryotaro, Nagae Takayuki, Fujiwara Ikuko, Narita Akihiro, Ma?da Yuichiro, Ota Motonori	4. 巻 77
2. 論文標題 Crystal structure of human V-1 in the apo form	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 13~21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X20016829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Alexander Christopher J., Barzik Melanie, Fujiwara Ikuko, Remmert Kirsten, Wang Ya Xian, Petralia Ronald S., Friedman Thomas B., Hammer John A.	4. 巻 35
2. 論文標題 Myosin 18A targets the guanine nucleotide exchange factor Pix to the dendritic spines of cerebellar Purkinje neurons and promotes spine maturation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001449R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuzaki Mizuki, Fujiwara Ikuko, Kashima Sae, Matsumoto Tomoharu, Oda Toshiro, Hayashi Masahito, Maeda Kayo, Takiguchi Kingo, Ma?da Yuichiro, Narita Akihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 D-Loop Mutation G42A/G46A Decreases Actin Dynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 736~736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10050736	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 -

〔学会発表〕 計17件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Daichi TAKAHASHI, Ikuko FUJIWARA, Katsumi IMADA, Makoto MIYATA
2. 発表標題 ATP hydrolysis mechanism of bacterial actin MreB
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daichi Takahashi, Ikuko Fujiwara, Katsumi Imada, Makoto Miyata
2. 発表標題 Polymerization Dynamics and Structure of MreB Proteins Involved in Spiroplasma Swimming
3. 学会等名 48th IOM (International Organization for Mycoplasmaology) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daichi TAKAHASHI, Ikuko FUJIWARA, Katsumi IMADA, Makoto MIYATA
2. 発表標題 Mechanism of ATP hydrolysis in bacterial actin MreB of Spiroplasma
3. 学会等名 蛋白質科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daichi TAKAHASHI, Ikuko FUJIWARA, Katsumi IMADA, Makoto MIYATA
2. 発表標題 Structural basis of bacterial actin MreB3 involved in Spiroplasma swimming
3. 学会等名 第94回細菌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 *高橋大地, 藤原郁子, 今田勝巳, 宮田真人
2. 発表標題 細菌アクチン MreB の ATP 加水分解機構
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田修一, 小池亮太郎, 藤原郁子, 成田哲博, 宮田真人, 太田元規, 前田雄一郎
2. 発表標題 ツインフィリン C 末端尾部によるアクチンキャッピングタンパク質制御機構
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 前田雄一郎, 兼松佑典, 武田修一, 成田哲博, 小田俊郎, 小池亮太郎, 太田元規, 岩佐充貞, 鷹野優, 森次圭, 藤原郁子, 田中康太郎, 永江峰幸, 故渡邊信久
2. 発表標題 アクチンの ATP 加水分解反応メカニズム: ADP-Pi 結合型の再発見
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 三谷隆大, 國田樹, 藤原郁子, 本多元
2. 発表標題 アクチン脱重合でのサブユニット解離の観察に向けて
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 本多元, 根笹未来, 猿子良太, 西方一路, 上村健二, 藤原郁子
2. 発表標題 アクチンフィラメントの分子間 FRET を使うとこんな事がわかる。
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	Miku Nezasa, Ai Takahashi, Ryota Mashiko, Ichiro Nishikata, Kenji Kamimura, Ikuko Fujiwara, Hajime Honda
2. 発表標題	Microscopic measurement of the inter molecule FRET-efficiency quantified the local flexibility of single actin filament.
3. 学会等名	第44回分子生物学会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Takahiro Mitani, Itsuki Kunita, Ikuko Fujiwara, Hajime Honda
2. 発表標題	Estimation of the number of subunits dissociating from a single filament of actin
3. 学会等名	第44回分子生物学会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Ikuko Fujiwara, Hikaru Empuku, Naomi Courtemanche, Thomas D. Pollard, Takahiro Mitani, Moka Ito, Ichiro Nishikata, Miku Nezasa, Kenji Kamimura, Hajime Honda
2. 発表標題	Direct observation of the polymerization and depolymerization inhibitors at the end of actin filaments
3. 学会等名	第44回分子生物学会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Ikuko Fujiwara, Daichi Takahashi, Yuhei O. Tahara, Yuya Sasajima, Hana Kiyama, Makoto Miyata
2. 発表標題	螺旋推進する細菌スピロプラズマ内のアクチン様タンパク質MreBの重合観察
3. 学会等名	第43回日本分子生物学会年会 MBSJ 2020 OnLine
4. 発表年	2020年

1. 発表者名 Daichi Takahashi, Ikuko Fujiwara, Makoto Miyata
2. 発表標題 細菌アクチンMreBからスピロプラズマ遊泳モーターへの進化
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会 オンライン開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daichi Takahashi, Ikuko Fujiwara, Katsumi Imada, Makoto Miyata
2. 発表標題 Structures and dynamics of bacterial actin homolog, mreB proteins involved in swimming motility of Spiroplasma eriocheiris
3. 学会等名 第20回日本タンパク質学会年会 オンライン開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daichi Takahashi, Ikuko Fujiwara, Makoto Miyata
2. 発表標題 Development of Spiroplasma swimming motor from bacterial actin MreB
3. 学会等名 BLAST XVI online (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daichi Takahashi, Ikuko Fujiwara, Makoto Miyata
2. 発表標題 Polymerization of bacterial actin MreB involved in swimming motility of Spiroplasma eriocheiris
3. 学会等名 BLAST XVI online (国際学会)
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------