

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370067

研究課題名（和文）バクテリアの細胞形態の分子制御メカニズム

研究課題名（英文）Molecular mechanism of maintenance of a rod shaped cell in *Escherichia coli*.

研究代表者

仁木 宏典（NIKI HIRONORI）

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：70208122

研究成果の概要（和文）：

桿菌から球菌へと形態の変化した *rodZ* 変異株から、桿菌に復帰した変異体を分離し、その原因遺伝子の抑制変異部位を決定した。抑制変異は、*mreB* 遺伝子、*mrda* 遺伝子、*mrdb* 遺伝子に生じていた。これらはバクテリアの伸長に必要な遺伝子である。抑圧変異株のうち 20 株は *mreB* 遺伝子に変異が起っていた。これら変異により、MreB タンパク質は性質を変え、RodZ タンパク質がなくても伸長できるようになったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：RodZ interacts with MreB and both factors are required to maintain the rod shape of *Escherichia coli*. The assembly of MreB into filaments regulates the subcellular arrangement of a group of enzymes that synthesizes the peptidoglycan (PG) layer. However, it is still unknown how polymerization of MreB determines the rod shape of bacterial cells. Regulatory factor(s) are likely to be involved in controlling the function and dynamics of MreB. We isolated suppressor mutations to partially recover the rod shape in *rodZ* deletion mutants and found that some of the suppressor mutations occurred in *mreB*. All of the *mreB* mutations were in or in the vicinity of domain IA of MreB. Those *mreB* mutations changed the property of MreB filaments in vivo. In addition, suppressor mutations were found in the periplasmic regions in PBP2 and RodA, encoded by *mrda* and *mrdb* genes. Similar to MreB and RodZ, PBP2 and RodA are pivotal to the cell wall elongation process. Thus, we found that mutations in domain IA of MreB and in the periplasmic domain of PBP2 and RodA can restore growth and rod shape to $\Delta rodZ$ cells, possibly by changing the requirements of MreB in the process.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2012年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：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：桿菌、球菌、細胞壁、ペプチドグリカン、細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

原核生物、いわゆる細菌の細胞壁は、ペプチドグリカンが主要な成分となっている。原核細胞はグラム陰性菌とグラム陽性菌に大別される。グラム陽性菌の代表である枯草菌、他方グラム陰性菌の代表である大腸菌は、どちらも桿菌という棒状の細胞形態をしている。桿菌細胞を界面活性剤で処理しタンパク質や脂質を除いた後には、ペプチドグリカンだけが残る。この残ったペプチドグリカンは桿菌と同じ形をしている。つまり、ペプチドグリカン層は細胞膜の周りを被う袋状の巨大な分子で、これを特にサキュルス (Saculus) という。サキュルスは細胞全体を取り囲むため、細胞が伸長し2つに分裂するためには、サキュルスの一部の分解を伴いながら、新規合成を行わなければならない。

細胞が伸長しているときには、細胞の側面でペプチドグリカンの合成がおこり、分裂の際には細胞分裂面で細胞隔壁として新たなペプチドグリカンが合成される。ペニシリン系の抗生物質は、これらのペプチドグリカン合成を阻害し、サキュルスに孔を空けるため、細胞はそこから破裂してしまう。以上のように、細菌はペプチドグリカンという丈夫な層に細胞全体が覆われており、機械的な強度を保つと同時に、このペプチドグリカンが、その細胞の形態を維持している。したがって、球菌、連鎖球菌、らせん菌、桿菌といった細菌を特徴づける細胞の形態は、ペプチドグリカンすなわち細胞壁の構造によって決まっている。また、ペプチドグリカン合成の過程は、ペニシリンを初めとした抗生物質の標的的部位であることから、その酵素学的なメカニ

ズムに関する膨大な研究の蓄積がある。その一方、ペプチドグリカンの合成過程が、細胞の形態形成を決めるための分子メカニズムはよく判っていない。近年、原核細胞においても、細胞骨格タンパク質が存在が発見され、特にアクチン様タンパク質 **MreB** が形態形成の制御に深く関与していると考えられるようになった。**MreB** の研究から、原核細胞の細胞形態の制御の仕組みについての理解が進みつつある。

2. 研究の目的

大腸菌は通常は桿菌 (かんきん) と呼ばれる形態をしている。このような形態を作るためには、細胞壁、特にペプチドグリカンという堅い構造が正しく合成されなければならない。抗生物質中にはペプチドグリカンの合成を阻害し、バクテリアを殺すものがある。しかし、これらに抗生物質対して抵抗性を示すバクテリアが近年増加している。そのためペプチドグリカンの合成をもっと理解する必要がある。本研究では、大腸菌の桿菌形態の維持の機構を通じて、ペプチドグリカンの合成の機構を解き明かそうというものである。

ペプチドグリカン合成は細胞のどこで起こり、どの方向に進んで行くのか、ペプチドグリカン合成の場の制御が最終的なペプチドグリカン全体の構造、すなわち、細胞形態を決めることになる。ペプチドグリカン合成酵素群の位置は、細胞骨格質タンパク質である **MreB** や **FtsZ** により制御される。**FtsZ** は細胞分裂の隔壁形成の最初に必要な因子であり、細胞分裂面にリング状に取り巻く。

FtsZ の構造から、チューブリンタンパク質の仲間であることも判明している。一方、MreB は細胞膜の裏打ちしながららせん状に分布している。そして、このらせん状に取り巻いている MreB を足場としてペプチドグリカン合成の酵素複合体が配置され、細胞壁を作りだしている。このとき、MreB のらせん構造が回転して非常に動的であることが明らかになってきた。RodZ タンパク質は、MreB といっしょに細胞内をらせん状に分布している。この MreB らせんの動きを RodZ が制御することにより、細胞壁の伸長そのものを制御しているのではないかと考えられる。本研究では、この MreB に作用して、大腸菌の細胞伸長を制御する因子 RodZ を中心に、バクテリアの細胞形態の研究を行った。

3. 研究の方法

これまでに、桿菌の維持に必要な因子としれ RodZ タンパク質を発見し、これまでその機能を研究してきた。rodZ 遺伝子を破壊した株は生育が遅くなり、また同時に、その形態は球形になる。生育の遅いこの rodZ 欠損株から、元の生育に回復した株を 29 株単離した。これらは、生育が回復しただけではなく、形態も元の桿菌に戻っていた。rodZ 遺伝子は完全に破壊されているので、その機能を補うような突然変異が二次的に自然に起こったものと考えられた。元の変異を補うようなこの二次的な変異は抑圧変異とよばれ、元の変異を起した遺伝子の機能と関連することが多い。抑圧変異を研究することで rodZ 遺伝子の機能と関連する遺伝子を知る手がかりとなる。この抑圧変異の原因遺伝子次世代シーケンサーを用いて明らかに、その変異の機能を研究した。

4. 研究成果

rodZ 遺伝子の全ゲノムの配列を解読しゲノムの上の変異を特定し、遺伝解析から抑圧変異遺伝子を調べた。その結果、これら抑圧変異が、mreB や pbp2 などペプチドグリカン合成に関わる因子や、細胞分裂に関わる zipA のプロモーター領域に生じたものであることが特定された。

大腸菌の細胞骨格タンパク質の一つである MreB は、ペプチドグリカン合成を制御することによって、大腸菌の形態形成を制御している。特に、RodZ と MreB の変異株は、どちらも球形になるという特徴的な表現型を示す。RodZ は、中央の円筒部分のペプチドグリカン合成を制御することにより、細胞長を制御していると考えられた。RodZ と MreB の間には機能的な相互作用が示唆されている。今回見つかった抑圧変異が MreB に集中して起っていたことは、その機能的な相互作用を支持するものである。また mreB 変異はドメイン IA に集中していた。MreB タンパク質は構造上 4 つのドメインに分けられるが、ドメイン IA の変異によって、MreB フィラメントの安定性が変わっていることが示唆された。RodZ がなくても桿菌の中央の円筒部分の合成ができることを考え合わせると、mreB 変異による MreB フィラメントの性状の変化が、結果的にペプチドグリカン合成酵素の配置を回復させているものと思われる。したがって、通常では RodZ は MreB フィラメントの制御を通じて、桿菌の形成に機能しているであろう。

また、mrdA 遺伝子、mrdB 遺伝子の変異によっても MreB タンパク質の性質が変えられていることが解った。これらの変異によっても mreB 変異と同じように中央円筒部分の合成ができるようになったと考えられる。一方、zipA のプロモーター領域に変異を持つ株は、ZipA の発現量がわずかに増加していた。

ZipA の発現量の増加は、細胞分裂の遅延を引き起こし、そのため球状の *rodZ* 欠損株が見かけ上桿菌に復帰している。

このように、*rodZ* 欠損株の抑圧変異株の解析から、球状から桿状に形態変化を起こす機構についての新規の知見が得られた。

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 6 件)

① Shiomi, D., Toyoda, A., Aizu, T., Ejima, F., Fujiyama, A., Shini, T., Kohara, Y., & Niki, H. (2013). Mutations in cell elongation genes *mreB*, *mrdA* and *mrdB* suppress the shape defect of RodZ-deficient cells. *Mol Microbiol.* 87, 1029-1044. 査読あり

② 仁木 宏典, 球菌から菌糸まで、桿菌の細胞の形態を決める因子たち。化学療法の領域, (2012) 22 巻 5 号、840-847. 査読なし

③ Gray, A.N., Henderson-Frost, J.M., Boyd, D., Shirafi, S., Niki, H., & Goldberg, M.B. (2011). Unbalanced charge distribution as a determinant for dependence of a subset of *Escherichia coli* membrane proteins on the membrane insertase YidC. *mBio* 2, e00238-11. 査読あり

④ Shiomi, D., & Niki, H. (2011). A mutation of *ispA* that is involved in isoprenoid biogenesis can improve slow growth of *Escherichia coli* at low temperature. *Microbiol Immunol* 55, 885-888 査読あり

⑤ Liu, J., Chen, C.Y., Shiomi, D., Niki, H., & Margolin, W. (2011). Visualization of bacteriophage P1 infection by cryo-electron tomography of tiny *Escherichia coli*. *Virology* 417, 304-311. 査読あり

⑥ Hale, C.A., Shiomi, D., Liu, B., Bernhardt, T.G., Margolin, W., Niki, H., & de Boer, P.A. (2011). Identification of *Escherichia coli* ZapC (YcbW) as a component of the division apparatus that binds & bundles FtsZ polymers. *J Bacteriol*

193, 1393-1404. 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

① 塩見 大輔, 仁木 宏典, 大腸菌形態制御因子 RodZ の分裂面への局在とその意義、第 7 回ゲノム微生物学会年会、滋賀県長浜市、2013、3/8-10

② 塩見 大輔, 仁木 宏典, RodZ タンパク質の細胞分裂面への局在：細胞幅の制御、第 9 回 21 世紀大腸菌研究会、滋賀県長浜市、2012、6/21-22

③ Shiomi, D., and Niki, H. (National Institute of Genetics), A role of midcell localization of cytoskeletal proteins in *E. coli* 第 85 回 日本細菌学会総会 長崎県長崎市、2012、3/27-29

④ 塩見 大輔, 仁木 宏典, Toward a manipulation of bacterial cell shape, 細胞を作る研究会 4.0, 大阪市、2011、10/26-28

⑤ 塩見 大輔, 仁木 宏典, Cytoskeletal protein RodZ regulates the cell length in collaboration with a cell division apparatus in *Escherichia coli*. IUMS 2011、北海道札幌市、2011、9/6-10

⑥ 塩見 大輔, 仁木 宏典, 大腸菌の形態形成を司る細胞骨格タンパク質 RodZ と細胞分裂の関係、第 5 回細菌学・若手コロッセウム、高知県高知市 2011、8/8-10

⑦ 塩見 大輔, 仁木 宏典, 細胞骨格タンパク質 RodZ の分裂面への局在とその生理的意義、第 8 回 21 世紀大腸菌研究会、長野県南木曾町、2011、5/18-19

⑧ 塩見 大輔, 仁木 宏典, 大腸菌細胞骨格因子 *rodZ* 欠損株の抑圧変異体の解析から見た細菌の形態形成変化、第 4 回細菌学・若手コロッセウム、静岡県伊豆市、2010、8/26-28

⑨ 塩見 大輔, 仁木 宏典, 大腸菌球状変異体 *rodZ* 欠損株の抑圧変異株の解析から見た球状から桿状への形態変化の機構、第 7 回 21 世紀大腸菌研究会、熊本県南阿蘇、2010、6/3-4

[図書] (計 2 件)

① Shiomi, D. & Niki, H. 2012. 3-2 Nucleoid organization and chromosome segregation, p.45-60. In Sadaie, Y and Mstsumoto, K (ed), *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*:

The Frontiers of Molecular Microbiology
Revised. Research Signpost, India.

② Niki, H. 2012. 8-1 Bioresource and
genomic database for *E. coli* and *B. subtilis*,
p.283-296. In Sadaie, Y and Mstsumoto,
K (ed), *Escherichia coli* and *Bacillus*
subtilis: The Frontiers of Molecular
Microbiology Revised. Research Signpost,
India.

[その他]
ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/MicroGen/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仁木 宏典 (NIKI HIRONORI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・
教授

研究者番号：70208122

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし