

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 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22770179

研究課題名（和文）新規タンパク質 RodZ を中心とした原核細胞の形態形成機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of a mechanism of regulation of bacterial cell shape by a novel protein RodZ.

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・特任研究員

研究者番号：70507532

研究成果の概要（和文）：私は、これまでに新規タンパク質 RodZ がバクテリアアクチン MreB と共局在することを示していた。本研究では、RodZ が MreB と FtsZ（バクテリアチューブリン）に依存して、細胞分裂面に局在することを明らかにした。細胞分裂面に局在できない RodZ を発現する株は、細胞幅が太くなった。これまでの研究から RodZ は細胞長を制御する因子と考えていたが、本研究から RodZ は細胞長と細胞幅を制御する因子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：I have shown that a novel protein RodZ colocalizes with MreB, a bacterial actin, and forms spirals along the long axis of the cell. Thus, we think that RodZ along with MreB regulates the cell length. I found in this study that RodZ localizes at midcell dependently on MreB and FtsZ, a bacterial tubulin. Cells producing RodZ which cannot localize at midcell are wider than cells producing WT RodZ, suggesting that RodZ regulates the cell width as well as the cell length.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物学・分子生物学

キーワード：細胞形態、細胞骨格、細胞長、細胞幅、極性、大腸菌

1. 研究開始当初の背景

原核生物、真核生物を問わず、その細胞形態は厳密に制御されなければならない。もし細胞形態が異常になると、細胞の生育は著しく阻害される。しかし、細胞形態系制御機構については、原核生物でも分かっていないことが多い。本研究では、比較的単純な桿形である大腸菌をモデルに、形態形成機構の解明に取り組んだ。

大腸菌の形態形成に関わる因子として、これまでに、細胞骨格タンパク質アクチンのホモログである MreB がよく研究されていた。

また、大腸菌には別の細胞骨格タンパク質 FtsZ（チューブリン）もあり、よく研究されている。私は、すでに大腸菌の形態形成制御に関わる因子として RodZ タンパク質を同定していた。すなわち、通常桿菌である大腸菌の *rodZ* 遺伝子欠損株は、球形となる。この RodZ タンパク質の機能および MreB や FtsZ との関係を調べることにより、細胞骨格タンパク質が、複合体としてどのように機能し、どのように細胞形態を制御しているかが明らかになると期待された。

2. 研究の目的

これまでに、大腸菌などの原核生物においても、真核生物と同様に、細胞骨格タンパク質が、細胞形態、細胞分裂、DNA 分配などに関わることが示されてきた。一方で、RodZ のように、これまで機能未知であったタンパク質が、細胞形態形成に関わるなどの新たな知見が得られるようにもなってきた。個々のタンパク質は同定され、その生化学的な特徴も研究されてきた一方で、これら細胞骨格タンパク質が複合体としてどのように機能しているかは依然不明な点が多い。

本研究は、申請者らが以前同定した RodZ を中心に、細胞骨格タンパク質複合体が、どのようにして大腸菌の形態形成制御を行っているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

RodZ と相互作用する因子を同定し、また RodZ タンパク質の機能を詳細に解析するために、rodZ 欠損株（生育が遅い）から、生育の早くなった抑圧変異株を取得する。そして、これらの変異株の全ゲノムシーケンスを行い、変異部位を特定する。これらの変異が形態形成に及ぼす影響を調べるために、これらの変異を持つ株を新たに構築する。このような抑圧変異体の解析を行う。

また、RodZ の細胞内局在や動態を調べるために、GFP などの蛍光タンパク質との融合タンパク質や抗体を用いた免疫染色などを行う。

RodZ とペプチドグリカンの直接の結合を調べるために、RodZ およびペプチドグリカンをそれぞれ精製し、混ぜ合わせた後、超遠心を行う。RodZ がペプチドグリカンと結合すれば、超遠心後にペプチドグリカンと共に、沈殿に回収される。また、この系にバンコマイシンなどを加えることによって、RodZ がペプチドグリカンのどこに結合するかを特定する。

4. 研究成果

(1) 抑圧変異体の単離・解析 すでに取得していた 30 株の rodZ 欠損抑圧変異株の全ゲノムシーケンスの結果から明らかになった変異を持つ株を作製し、その株の形態などを観察した。30 株のうち、その多くが mreB 遺伝子に変異が見出された。すでに私は、RodZ が MreB と共局在することを見出しており、mreB 遺伝子に変異が見出されたことは、これらのタンパク質が協調して機能することとよく一致する。これら変異を持つ株を rodZ+株と組み

合わせて、抑圧変異のみを持つ株も作製した。ほとんどの抑圧変異株の形態は、球形から桿形に回復していた。しかし、野生株と完全に同じような桿形ではなく、太いものや細長い株もあった。このことは、RodZ と MreB が、細胞長や細胞幅を制御する因子であることを示唆している。また、これら MreB 変異は MreB タンパク質の性質を大きく変えていた。抗生物質 A22 は、MreB アクチンの ATP 結合部位に結合し、MreB と ATP の結合を阻害する。結果として、MreB はフィラメントを合成できなくなる。野生型 MreB を発現する大腸菌は A22 添加により、コロニー形成能を失う。本研究で同定した mreB 変異のうち、MreB-A125V を発現する菌は野生株に比べて A22 により耐性になる。一方、MreB-A174T を発現する株は、A22 により感受性になった。つまり、これらの変異は MreB の ATP 結合能に影響を与えているか、あるいは、フィラメント形成に影響を与えていると考えられる。これらの変異部位を構造が解かれている好熱菌の MreB の上にマッピングすると、全ての変異は特定のドメイン内か、あるいはその近傍にあることが分かった。また、一部は、分子の外側の面に配置していた。これまで、MreB のこのドメインの機能はよく分かっていなかった。これまでに MreB は 2 本のフィラメントが合わさったものであると推測されている。したがって、本研究で単離した変異が、分子の外側に配置されることから、これらが、フィラメント間の相互作用に重要な部位ではないかと考えている。その結果、これらの変異がフィラメント形成に影響を与えていると考えられる。今後は MreB に様々な変異を導入し、この仮説を検証していく。また、菌の形態は、MreB-A125V 株は細長く、MreB-A174T 株は太かった。MreB フィラメント形成の状態と、細胞幅になんらかの関係があることを示唆している。

(2) RodZ タンパク質の細胞分裂面への局在 抗 RodZ 抗体を用いた免疫染色および GFP などの蛍光タンパク質と RodZ の融合タンパク質を用いた解析から、RodZ が細胞分裂面に局在することを明らかにした。RodZ の分裂面への局在は、FtsZ チューブリンと MreB アクチンに依存していた。すなわち、3 つの細胞骨格タンパク質は、FtsZ, MreB, RodZ の順に細胞分裂面に

局在する。また、細胞周期の終わり頃に分裂面に局在する。RodZ の分裂面への局在の生理的意義を解析するために、より詳細な実験を行った。MreB との結合能が低下した RodZ-F60A はその分裂面への局在が著しく低下した。このとき、MreB は分裂面に局在していた。また、RodZ-F60A を発現する株は、太くなった。このことは、RodZ が分裂面に局在することが、細胞幅の制御に重要であることを示唆している。さらに、RodZ の分裂面の局在のターゲットを明らかにすることを試みた。まず、細胞を抗生物質セファレキシンで処理すると、RodZ はより細胞分裂面に局在した。セファレキシンのターゲットは PBP3 というペプチドグリカン合成酵素である。PBP3 の活性が阻害されると、ペプチドグリカンの架橋が正常に起こらない。その結果、通常隣のペプチドと架橋されるべきペプチドグリカンの末端のアミノ酸 (D-Ala-D-Ala) が架橋されずに残る。私は、RodZ がペプチドグリカンの末端のアミノ酸 (D-Ala-D-Ala) に結合している可能性を考えた。そこで、精製したペプチドグリカンに精製した RodZ が結合するかを調べたところ、たしかに RodZ はペプチドグリカンに結合した。RodZ とペプチドグリカンの結合は、抗生物質バンコマイシンによって阻害された。バンコマイシンはペプチドグリカンの末端のアミノ酸 (D-Ala-D-Ala) に結合する。従って、バンコマイシンが RodZ と D-Ala-D-Ala の結合を阻害したと考えられる。おそらく、RodZ がペプチドグリカンの D-Ala-D-Ala に結合することによって、ペプチドグリカンの合成を制御し、その結果、細胞幅を制御していると考えられる。以上の結果は、現在論文にまとめて投稿準備中である。

(3) ispA 遺伝子の変異による rodZ 欠損株の低温感受性の抑圧 rodZ 欠損株は、生育に関して、低温感受性を示す。本研究で単離した抑圧変異株の中に、形態は球菌のままで、低温感受性を抑圧する変異株を同定した。その変異は *ispA* 遺伝子に見出された。*ispA* は細胞壁合成に関わる因子である。また、この *ispA* 変異は *rodZ* 欠損株の低温感受性を抑圧するだけでなく、野生株の低温での生育を促進することも明らかにした。したがって、IspA による低温での生育促進は一般的な現象である。この成果は論文として公表した

(論文 1)。

(4) *mreB* 変異株の他の研究への応用

最近、低温電子線トモグラフィーを使って、細菌細胞の細胞内または細胞表面の構造が詳細に研究されるようになってきた。しかし、低温電子線トモグラフィーを使って細菌を観察するためには、細胞の厚さが問題になる。そのために、カウロバクターなどがよく用いられる。一方で、細菌の中で最もよく研究されているものの一つである大腸菌は、その厚さのために、低温電子線トモグラフィーを用いた実験には向いていなかった。しかし、私たちが単離した *rodZ* 欠損株の中には、上述のように細長いものがあつた。その細胞幅は野生株の 70~80%ほどであつた。私たちは、この変異株をさらに改変することにより、大腸菌を低温電子線トモグラフィーに使用することを可能にした。これは、この分野での大きなブレークスルーであると言える。私たちは、低温電子線トモグラフィーをつかって、P1 ファージが大腸菌に感染し、どのように DNA 断片を大腸菌内に送り込むかを詳細に解析することができた。この成果は、論文として公表した (論文 2)。

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. Shiomi D, and Niki H. (2011) A mutation of *ispA* that is involved in isoprenoid biogenesis can improve growth of *Escherichia coli* at lower temperatures. *Microbiology and Immunology* 55: 885-888 査読有り doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00391.x.
2. Liu J, Chen CY, Shiomi D, Niki H, Margolin W. (2011) Visualization of bacteriophage P1 infection by cryo-electron tomography of tiny *Escherichia coli*. *Virology* 417: 304-311 査読有り 10.1016/j.virol.2011.06.005

[学会発表] (計 7 件)

1. 塩見大輔、仁木宏典 「A role of midcell localization of cytoskeletal proteins in *E. coli*.」平成 24 年 3 月 27 日-29 日 第 85 回日本細菌学会総会 長崎県長崎市

2. 塩見大輔、仁木宏典「Toward a manipulation of bacterial cell shape」平成 23 年 10 月 26 日-28 日 「細胞を創る」研究会 4.0 大阪府豊中市
3. 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*.」平成 23 年 9 月 6 日-10 日 International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 北海道札幌市
4. 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」平成 23 年 8 月 8 日-10 日 第 5 回細菌学・若手コロッセウム 高知県高知市
5. 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」平成 23 年 5 月 18 日-19 日 第 8 回 21 世紀大腸菌研究会 長野県南木曾町
6. 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」平成 22 年 8 月 26 日-28 日 第 4 回細菌学・若手コロッセウム 静岡県伊豆市
7. 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」平成 22 年 6 月 3 日-4 日 第 7 回 21 世紀大腸菌研究会 熊本県南阿蘇村

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・特任研究員
研究者番号：70507532

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし