

立教大学学術推進特別重点資金(立教SFR)

個人研究

2021年度研究成果報告書

研究代表者	所属部局・職名	氏名
	理学部・助教B	笠井 大司
研究課題	細胞壁を持たない細菌の細胞分裂タンパク質の機能解析	
研究期間	2021年度	
研究経費 (1円単位)	(支出金額) 497,628円 / (採択金額) 500,000円	

研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフは使用しないこと。)

細菌の細胞分裂はFtsZを中心とした細胞分裂タンパク質が複合体を形成し、分裂面をくびりながら、細胞壁を合成することで進行する。大腸菌や枯草菌を用いた研究でFtsZはGTP依存的に重合し、フィラメント形成を行うことが明らかになっている。一方、細菌の中には細胞壁を持たない細菌も存在している。スピロプラズマはらせん状の形態を持つ細菌であるが、細胞壁を持たない。スピロプラズマは細胞分裂タンパク質の多くをゲノム上から失っているが、FtsZなど一部のタンパク質は残っている。本研究では、精製したスピロプラズマのFtsZを用いて、フィラメントの形成能や構造を解析することでその機能を明らかにする。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[細胞骨格タンパク質] [細胞分裂] [顕微鏡観察]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

大腸菌や枯草菌をはじめとする細菌は細胞壁で覆われている。細菌の細胞分裂は伸長した菌体の中央部で細胞膜を収縮させながら、隔壁を形成することで進行する。細胞分裂時の隔壁形成の中心となるタンパク質が FtsZ である。FtsZ はチューブリンホモログであり、GTP 依存的に重合して、フィラメントを形成する。FtsZ フィラメントは SepF や FtsA といったタンパク質により安定化し、細胞壁合成酵素などその他の細胞分裂に関わるタンパク質を分裂面に集め、「Z リング」と呼ばれるリング状の構造を構築する。したがって *ftsZ* を欠損した細菌は細胞分裂が阻害され、増殖できなくなる。

スパイロプラズマは細胞壁を持たないらせん菌である。スパイロプラズマは細胞壁合成酵素などの細胞分裂に関わるタンパク質をゲノム上から失っているが、FtsZ や SepF, FtsA といった一部のタンパク質はゲノム上にコードされている。これまでに、スパイロプラズマの細胞分裂タンパク質の機能や働きは明らかになっていない。本研究では、スパイロプラズマの FtsZ フィラメントの形成過程を観察することでその機能を明らかにすることである。

① FtsZ のフィラメント化条件の検討

顕微鏡下で FtsZ が効率的にフィラメント化する条件を検討した。本研究開始前までの予備的な実験では、大腸菌内で大量発現し、精製したスパイロプラズマの FtsZ の重合化、蛍光標識した FtsZ フィラメントの観察に成功していた。しかし、顕微鏡下での FtsZ フィラメントの経時的な伸長は観察できなかった。これはスライドガラス上で効率的な重合反応ができていないか、FtsZ がガラス面に強く吸着し伸長できなくなっていることが考えられた。顕微鏡下で FtsZ フィラメントの伸長する過程をリアルタイムで観察するためには、FtsZ が効率的に重合し、視野全体的に観察できることが必要である。これまでに枯草菌などの FtsZ ではバッファーに含まれる塩の濃度が高いほど、重合反応が低下することが報告されている。そこでスパイロプラズマの FtsZ の重合に最適な NaCl もしくは KCl の濃度を探索した。まず、NaCl の濃度を 10~100 mM の範囲で変えた複数のバッファーを用意し、それぞれ FtsZ の重合反応を行った。超遠心でそれぞれのバッファー中で重合した FtsZ を沈澱させたところ、NaCl の濃度に関わらず沈澱した FtsZ の量は反応前の FtsZ の 10% 前後であった。次に KCl で同様の実験を行ったところ、KCl の濃度が低くなるほど沈澱する FtsZ の量が増加した。また、NaCl が含まれるバッファーに比べて KCl が含まれるバッファーの方がより重合する FtsZ の割合が約 10% 程度多くなった。この FtsZ の重合反応液を顕微鏡下で観察したところ、予備的な実験の結果よりスライドガラス上に存在する FtsZ フィラメントの割合が増加した。一方で GDP 存在下では FtsZ はほとんど沈澱に現れなかった。これらのことから顕微鏡下での重合反応は低濃度の KCl が含まれるバッファーで行うと効率が良いと考えられた。

研究成果の概要 (つづき)

② SepF を含む FtsZ のフィラメント化条件の検討

FtsZ のフィラメントを安定化させるタンパク質である SepF が析出しない重合バッファーを検討した。枯草菌などでは SepF はマルトース結合タンパク質のような親水性のタグを融合しないと精製時に析出してしまふ。実際に His タグを融合した枯草菌の SepF を Ni カラムで精製しようとしたところ、SepF は可溶化しなかった。また、この析出した SepF は電子顕微鏡による観察でリング状構造を形成することが明らかになっている。本研究開始前の予備的な実験では、大腸菌内で大量発現し、精製したスピロプラズマの SepF は親水性のタグを融合せずとも析出しなかった。これは溶出バッファーそこで FtsZ が効率よく重合する低濃度の塩が含まれるバッファーに SepF を加えたところ、析出してしまった。そこで、KCl の濃度を徐々に上昇させて、SepF が析出しない条件を探索した。100 mM KCl で SepF が肉眼で観察できるほど析出しなくなった。さらに、電子顕微鏡を用いて SepF を観察したが、枯草菌の SepF のような構造体は観察できなかった。①の結果と合わせて、今後の実験では 100 mM KCl を含むバッファーを用いることを決定した。

③ FtsA の精製

FtsZ と相互作用し、FtsZ を細胞膜周辺に局在させる機能を持つ FtsA を精製する実験系を構築した。本研究開始前の実験では、これまでに精製ができている FtsZ や SepF と同じように大量発現用のプラスミドベクターにクローニングしようとしたができなかった。これは FtsA が膜タンパク質であるためにホストの大腸菌の増殖に大きな影響を与えたためであると考えられた。そこで、他の大量発現困難なタンパク質で実績のあるホストにクローニングを行った。今後は FtsA の発現や可溶化を確認し、精製を行う。

④ 抗体を介した FtsZ フィラメントのガラス面への固定

抗 FtsZ 抗体を介して、FtsZ フィラメントをガラス表面に固定し、伸長反応を観察することを試みた。FtsZ と同じようにフィラメントを形成するタンパク質の顕微鏡下での観察にはよくガラス表面に抗体を吸着させて、足場にする。抗 FtsZ 抗体を含む血清をカバーガラスにまき、余分な血清を取り除いた後に FtsZ をその上から加えた。顕微鏡下で観察を試みたが、FtsZ のフィラメントは観察できなかった。今後は、抗体の量や FtsZ をあらかじめ重合させるなどの観察ができるような調整を行う。

⑤ 一分子計測用の光学顕微鏡の構築

蛍光分子で標識した FtsZ の重合を一分子単位で計測するための光学系の構築を試みた。タンパク質の一分子計測では全反射蛍光顕微鏡が一般的によく使われる。全世界的な半導体不足やコロナ禍による流通の遅れにより、光学系部品の取得は一部しかできなかったが、本体の基礎的な部分の構築を行った。今後は光学系の小さな調整を行い、実際に観察ができるかを確認する。

※この(様式 2)に記入の、成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差控え期間等を記入した調書(A 4 縦型横書き 1 枚・自由様式)を添付すること。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ① 雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ② 図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③ シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④ その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

① 雑誌論文

該当なし

② 図書

該当なし

③ シンポジウム・公開講演会等の開催

該当なし

④ その他

笠井大司, 田原悠平, 宮田真人, 塩見大輔
「細胞壁のない細菌の持つFtsZタンパク質の重合能解析」
第17回大腸菌研究会 2021年8月20日 オンライン開催