

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	大腸菌シャペロンタンパク質GroELの細胞分裂における役割
Title(English)	
著者(和文)	荻野英賢
Author(English)	Hidetaka Ogino
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第6471号, 授与年月日:2006年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:和地正明
Citation(English)	Degree:Doctor of Engineering, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第6471号, Conferred date:2006/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

92005
0

大腸菌シャペロンタンパク質 GroEL の細胞分裂における役割

東京工業大学

大学院生命理工学研究科

生物プロセス専攻

博士後期課程

03D24038

荻野 英賢

指導教員 和地 正明

目次

大腸菌シャペロンタンパク質 GroEL の細胞分裂における役割

第一章 序論

3-14

第二章 ペニシリン誘導小胞への GroEL の局在化

緒言実験方法と実験材料実験結果

<ペニシリン誘導小胞の回収>

<ペニシリン誘導小胞の解析>

考察

15-24

第三章 GroEL の細胞内局在性と Divisome との関わり

緒言実験方法と実験材料実験結果

<大腸菌野生株での GroEL 細胞内局在>

<各種 *fts* 変異株における GroEL の局在><*groEL* 温度感受性変異株および発現調節株における FtsZ リング形成><*ftsZ* マルチコピープラスミドによる *groEL* 温度感受性の抑制>考察

25-39

第四章 FtsZ と GroEL の結合

緒言実験方法と実験材料実験結果

<FtsZ ポリマーと GroEL の直接的結合>

<蛍光顕微鏡下での FtsZ と GroEL の結合>

<GroEL 共存在系での FtsZ の安定性>

<変異型 GroEL と FtsZ との結合>

<変異型 GroEL^{SR1} の濃度依存的な FtsZ 重合阻害>

<変異型 GroEL の GTPase 活性測定>

<FtsZ モノマーと GroEL との結合>

<C 末端欠失 FtsZ と GroEL との結合>

考察

40-77

第五章 *groEL* 温度感受性変異株の致死性を抑制する遺伝子の探索緒言実験方法と実験材料実験結果

<*groEL* 温度感受性変異株の致死性を抑制する遺伝子のショットガンクローニング>

<機能未知遺伝子 *yncC* の相同性検索>

<*yncC* 過剰発現株のマイクロアレイ解析>

<*yncC* 欠損株の構築>

<*yncC* 過剰発現株・欠損株の遊走性試験>

<*yncC* 過剰発現株における鞭毛フィラメントの低下>

<鞭毛形成遺伝子の mRNA レベルでの発現>

<*flhDC* プロモーター領域に対する *YncC* の結合>

考察

78-102

第六章 総括

103-107

参考文献

108-113

謝辞

114

第一章

序論

現在の生物学は進化の系統樹のように広大な枝葉を広げながら日々進歩を続けている。Antony van Leeuwenhoek が初めて微生物を観察してから 300 年以上経ち、我々は我々自身の体についても生物学的に観察・解析するにいたっている。また生命の設計図たる DNA の遺伝子配列も微生物からヒトにいたるまで、日々明らかになってきている。これらの成果から得られる情報は、さらに他の研究に取り入れられ新たな領域を開拓していく糧となっている。近年、センセーショナルに報じられるヒトや分子レベルでの研究成果の傍ら、微生物の研究は日陰のような立場に追いやられていた。しかし、昨今の現実的脅威により再び微生物が脚光を浴びるようになってきた。一つの脅威は感染症の恐怖である。投薬が出来れば死なずに済む感染症も、国・経済の事情により死んでいかざるをえない人々がいる。また薬が豊富にあるが故に多剤耐性菌の出現を引き起こし、新たな抗生物質の開発を迫られる人々がいる。これらの脅威に立ち向かうには改めて微生物について研究し、安価なまたは新しい作用機作を持つ抗生物質を開発しなければならない。もう一つの脅威は地球温暖化とエネルギー危機である。現在の石油燃料を使用する工業により大気圏の二酸化炭素濃度が上昇し続けている。これは地球温暖化を引き起こすとも言われている。そして問題の石油燃料自体も、いつ底を尽くかわからない先行き不透明な資源である。そのため現在の生活基盤を支えうる、地球に負荷をかけない持続可能な資源が求められている。それらの問題の解消のため、微生物を利用したエネルギー生産や物質生産方式が考案されつつある。このように現代の危機において、微生物は最新の技術を用いて新たな可能性を探求すべき対象となっているのである。

本研究では微生物の中でも非常によく研究されている大腸菌を用いて、細胞分裂機

構に関する新しい知見を得ることを目的に実験を行った。大腸菌は遺伝子配列が既に解読され、個々の ORF についても詳細なアノテーションが付加されている。また増殖も早く扱いも簡単である。これを用いることは、細胞の増殖という生命の根幹を司る現象の理解を深めるのに都合が良い。

大腸菌の細胞分裂は細胞中央に形成される細胞分裂面で行われる⁽¹⁾。大腸菌の細胞分裂に関する研究では、広田らが行った *fis* 変異株の分離が初期の重要な仕事として知られている⁽²⁾。広田らは変異処理を施した大腸菌の中から温度感受性致死で、細胞が伸長するものを *filamentation temperature sensitive (fts) mutant* として分離した。その中から、細胞分裂に関係のある遺伝子に変異を持つことによって *fts* になったものを *fis* 遺伝子とした。この中から発見された遺伝子 *fisZ* は、細胞分裂の最初期に細胞分裂面に局在してくるタンパク質をコードしている⁽³⁾。FtsZ タンパク質は Tubulin 様タンパク質として知られているが、両者の全体的な配列上の相同性は低く、GTPase 活性部位においてのみ高い相同性を示す⁽⁴⁾。しかし両者の立体構造は非常によく似通っていることが結晶構造解析より明らかとなった⁽⁵⁾(Fig.1-1,1-2)。FtsZ と Tubulin は共に GTP 依存的に重合し長大なポリマーを形成し、条件によってはシート状のものや管状のものを形成するタンパク質である^(6, 7)。Tubulin は真核生物ではマイクロチューブとして細胞骨格を形成し、核分裂では染色体の分配を行う中心体・紡錘体を形成することが知られている^(8, 9)。FtsZ は原核生物の細胞分裂時に収縮環を形成し、Divisome と呼ばれる複数のタンパク質が集合した分裂装置を構成する一部となる⁽³⁾。近年の研究により Divisome 構成タンパク質 (Fts タンパク質) が数多く明らかとなってきている。Divisome には特定の順番で Fts タンパク質が局在してくることが知られている⁽¹⁰⁾。初めに FtsZ が細胞分裂面に局在し、次いで FtsA・ZipA・FtsK・FtsQ・FtsL・YgbQ・FtsW・FtsI・FtsN と続く。しかし、それらのうち機能が明らかとなっているのは収縮環(FtsZ リング)を形成す

る FtsZ とペプチドグリカン合成酵素である FtsI のみである⁽¹¹⁾。残りのタンパク質は FtsZ リングと内膜・外膜のリンカーとしての役割が推測されるのみである。Divisome が何故細胞中央に誤りなく形成されるのか、Divisome が時機を間違えずに収縮し細胞を二分することが出来るのか、現在までに明らかとなっている Divisome 構成タンパク質がそれらの制御に関わっているのかは、未だに明らかにはなっていない。一方、補助的に細胞中央を決定するメカニズムはいくつか知られており、MinCDE による機構もその一つである⁽¹²⁾。これは MinCD ヘテロダイマーと MinE からなる。生体内で MinC はホモダイマーとなり、さらに各 MinC が MinD と結合する。MinD は膜と接しながら細胞内を振動するかのように動き、MinC が FtsZ と結合し重合を阻害する。MinE は細胞中央付近に存在し (MinE リングと呼ばれることもある) MinCD による FtsZ の重合阻害を解除している。これらの機構は Min System として知られているが、これは細胞中央付近での細胞分裂を可能にするとともに、細胞極での分裂を阻害する意味を持っている。また Nucleoid occlusion model も Divisome 形成位置についての有力な仮説の一つである⁽¹³⁾。これは核様体の上に FtsZ リングが形成されるのを、核様体自身が阻害しているという仮説である。もし核様体の上に Divisome が形成され収縮を完了してしまった場合、核が断片化され細胞は生存できないので、これを阻止する働きをもつ。核様体のパッキングがルーズになった *mukB* 変異株では核様体を分断するように細胞分裂面が形成されることなどから、核の濃度が密でないと Nucleoid occlusion は働かないことが知られている^{(14),(15)}。

このように幾つかの制御機構は知られているが直接的に細胞中央を決定する因子や FtsZ リングの収縮のタイミングを制御するタンパク質などは未だに発見されていない。これら未知の機構に関与する新規因子の探索を行った結果、シャペロンタンパク質である GroEL タンパク質が得られた。本研究では細胞分裂に関わる新たなタンパク質として得られた GroEL タンパク質が、細胞分裂に果たす役割について明らかにすること

を目的に研究を進めた。後半部では FtsZ タンパク質との関わりを明らかにすることを目的に研究を行った。

GroEL はシャペロンタンパク質として原核生物から真核生物、そしてヒトにまで相同性高く保存されている⁽¹⁶⁾。その機能は主に熱やストレスで変性したタンパク質のリフォールディングであるが、一部新生タンパク質のフォールディングにも機能していると言われている。つまり生体内のタンパク質が生まれてから、役目を果たし終えるまで傍で見守る(シャペロン)ように働く。GroEL は 57kDa のタンパク質である。生体内ではホモ 7 量体のリング状構造体が、背中合わせに 2 つ重なった 14 量体として存在する⁽¹⁷⁾ (Fig.1-3)。この複合体は樽型の立体構造を持ち、中の空洞に基質を取り込み変性したタンパク質のコンフォメーションを直す場を与えている。単量体の GroEL は 3 つのドメインを持つことが知られている⁽¹⁸⁾ (Fig.1-4)。ATP との結合やヘプタマー同士の結合に関わる赤道ドメイン、基質となるポリペプチドの結合領域および GroES 結合領域がある頂点ドメイン、そして頂点ドメインと赤道ドメインの間にあり構造変化(ひねり)を可能にする二つのヒンジ部位を持つ中間ドメインの 3 つである。これら 3 つのドメインが以下のように共同してタンパク質のコンフォメーションを直すために働いている。まず、頂点ドメインの基質結合部位に、変性して疎水性アミノ酸が露出したタンパク質が疎水的相互作用により結合する。これに GroES 7 量体(ドーム状構造物を形成)が結合し、リング状の GroEL は GroES と共に弾丸状の構造になる。GroES は 10kDa のコシャペロンで、7 量体になると GroEL の蓋のようになる。この GroEL の赤道ドメインに ATP が結合するとヒンジが捻りながら立ち上がり内部の空洞が拡張する⁽¹⁷⁾。すると内部に露出していた疎水性アミノ酸残基が、新たに形成される隣の GroEL との結合部分に使われてしまいリングの内側表面では親水的な残基が露出してくる。結果的に基質結合部位にあった変性タンパク質は内部の空洞に落としこまれることになる。これにより疎水性アミノ

酸の露出したタンパク質が親水的環境で正しいコンフォメーションに戻る場を与えられる。このように GroEL は新生ポリペプチド・変性ポリペプチドが本来のコンフォメーションになる手助けをしている。特に熱ストレスの際には σ^{32} により大量に発現が誘導される⁽¹⁹⁾。このため GroEL を含め熱ストレスで誘導される一群のタンパク質は Heat shock protein と呼ばれている。この中にはシャペロンである DnaJ や DnaK の他に、タンパク質の分解に関わる ClpP や ClpX も含まれている⁽²⁰⁾。これはシャペロン機能では復元不可能になった変性タンパク質を分解するためであると考えられる。救えるものは救い、救えないものは他に迷惑がかかる前に切り捨てるという機構である。また Heat shock protein が熱ストレスを適切に感受して誘導される機構も精巧であることが知られている⁽²¹⁾。

このようにストレス環境で働くことが予想される GroEL だが、大腸菌の生育には全温度で必須のタンパク質である⁽²²⁾。主に新生ポリペプチドのフォールディングに働く DnaK や DnaJ でさえ欠損可能であるのに対し、GroEL は欠損不可である。これは GroEL が常温でも生体に必須な役割、細胞分裂などに重要な役割を担っていることを示唆している。

本研究では生体内のタンパク質局在位置を観察する際、間接免疫蛍光染色法を用いた。細胞染色法はグラム染色法やアクリジンオレンジ染色法などの細胞表層成分の違いに起因する染色方法から、DAPI 染色法や酢酸カーミン染色法などの細胞内器官の特性に起因する染色方法まで数多く存在する。しかし、これらの染色法は色素と対象となる組織(または構造)は一対一の対応である。つまり組織(構造)に対する染色法が発見されない限り染め分けることが出来ないのである。これに対し間接免疫蛍光染色法は抗体を用いることで望みの標的タンパク質を特異的に検出することが可能である⁽²³⁾。この手法はオルガネラを持たない原核生物の細胞内を染め分けることが出

来る非常に優れた手法であるといえる。また検出に蛍光色素を使用するため蛍光顕微鏡で観察することが可能で、従来のように抗体-金で標識した対象を電子顕微鏡で観察する必要もない。抗体さえ用意できれば、特異性と簡便性を併せ持つ間接免疫蛍光染色法を行うことが出来る。細胞内のタンパク質の局在位置を知ることは、そのタンパク質の機能を推測する手がかりとなる。例えば細胞表層に分布するものは細胞の輪郭が染まる。病原性に関与する分泌タンパク質などは細胞表層の極に局在化することも報告されている⁽²⁴⁾。先に挙げた Fts タンパク質は細胞分裂面に局在することが間接免疫蛍光染色法により確かめられている⁽¹⁰⁾。また各種 *fts* 変異株を用いた実験により各 Fts タンパク質は特定の順序で細胞分裂面に局在することが明らかとなっている。この局在順序は、クラゲ由来蛍光タンパク質 GFP を融合させた Fts タンパク質を用いた実験でも確かめられたことが報告されている⁽²⁵⁾。GFP 融合タンパク質の利点は抗体を用意する必要がなく、生きて細胞での細胞内局在を経時的に観察できることである。欠点は GFP が 20kDa 近くと大きいいため局在性に影響が出やすいことと膜タンパク質には利用しにくいという点である。本研究では細胞局在位置を指標にして GroEL の細胞分裂における機能を推測した。抗 FtsZ 抗体と抗 GroEL 抗体を本研究室で所持していたため局在位置の観察には間接免疫蛍光染色法を用いた。FtsZ、GroEL 共に多量体形成をすることからも、GFP 融合タンパク質は扱いにくいいため作製しなかった。

以下に本研究の構成を述べる。

第二章では、ペニシリン誘導小胞による新規細胞分裂関連因子の探索について述べた。原核生物は核に核膜を持たず他にオルガネラも存在しない。Divisome は細胞分裂面に局在するが明確な構造物として分離できるものではない。そこで細胞分裂に関する新規因子の探索にあたり、細胞中央に特徴ある構造物が形成されるペニシリン処理に着目した。ペニシリンはフレミングにより発見された最も古い抗生物質である。

β ラクタム系抗生物質に分類され、原核生物の細胞壁であるペプチドグリカンの合成を阻害する。ペプチドグリカン合成は細胞表面全体で行われていると報告されている⁽²⁶⁾が、大腸菌にペニシリンを処理すると細胞中央にバルジ状構造物を形成することが知られている。通常はバルジ部分からバーストを起こし大腸菌は細胞質を撒き散らしながら死に至るが、高浸透圧下でペニシリン処理を行うとバルジの部分に膜状のベシクルが形成される。この細胞中央に形成されるベシクルの中に細胞分裂に関係する因子が含まれると考え、ベシクルを単離し解析を行った。その結果、ベシクル中にシャペロンタンパク質である GroEL が濃縮されていることを見出した。

第三章では、GroEL の生体内での局在位置および細胞分裂に与える影響をみるため、蛍光顕微鏡を用いて観察を行ったことを述べた。初めに間接免疫蛍光染色法を用いて GroEL の細胞内局在位置の決定を行った。その結果、細胞中央の細胞分裂面に GroEL が局在していた。このことから GroEL と Divisome との関連を想定し、各種 *fts* 変異株を用いて GroEL の局在順序を決定した。その結果、GroEL タンパク質の局在は FtsZ タンパク質の局在に依存しており、他の Fts タンパク質には依存していないことが確認された。また *groEL* 温度感受性変異株および発現調節株を用いて、GroEL タンパク質の欠損が細胞分裂に及ぼす影響を観察した。特に FtsZ リングの形成については間接免疫蛍光染色法を用いて観察を行った。その結果、GroEL タンパク質の欠損は細胞伸長と不等分裂を引き起こすことが観察された。また FtsZ リングの形成異常や安定性の低下も見られた。これらの結果から、GroEL タンパク質は FtsZ タンパク質と直接的な相互作用をしていることが示唆された。

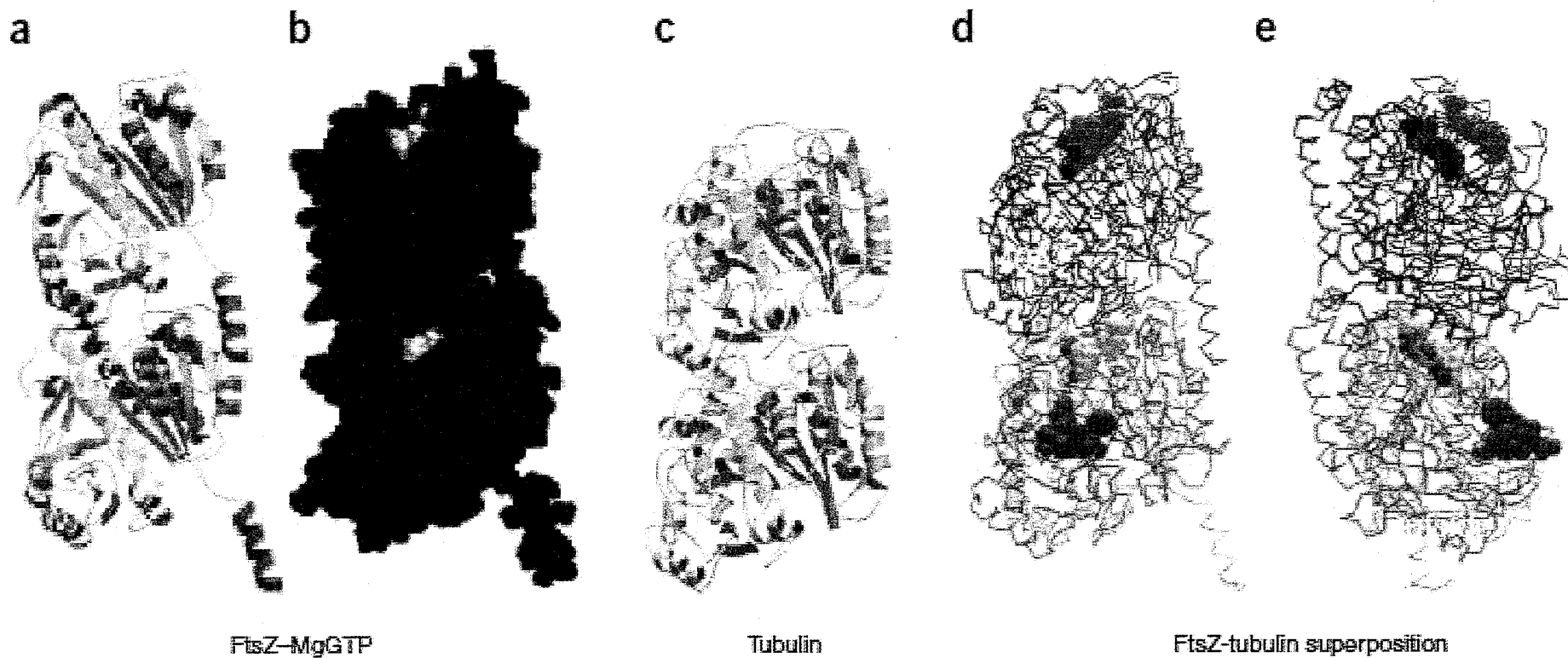
第四章では、FtsZ と GroEL の *in vitro* での結合実験について述べた。実験に用いる FtsZ は His-Tag 融合タンパク質として作製し精製した。FtsZ と相互作用をするタンパク質の解析には、FtsZ が GTP 存在下で重合する性質を利用して、FtsZ ポリマーを超遠心により沈降させる手法が良く用いられる。これを利用し FtsZ ポリマーと GroEL が共

沈するかを確かめた。その結果、共沈が見られた。同じ系で GroES や ATP を添加した実験も行った。FtsZ ポリマーとの結合が見られた GroEL が FtsZ モノマーと結合するかは免疫沈降法および化学架橋法を用いて確かめた。その結果、GroEL と FtsZ オリゴマー、特に FtsZ ダイマーとの結合が顕著であることを見出した。変異型 GroEL と FtsZ との結合についても実験を行った。その過程で変異型 GroEL に、これまで知られていた ATPase 活性に加えて GTPase 活性があることが明らかとなった。変異型 GroEL の中には FtsZ に匹敵する GTPase 活性を持つものも存在した。さらに、シングルリング変異型 GroEL^{SR1} が FtsZ ポリマーとの結合を示さなかった。これらの結果を踏まえ、GroEL が FtsZ に与える影響および細胞分裂に関する役割について考察を行った。

第五章では GroEL タンパク質の細胞分裂における役割を明らかにするために、*groEL* 温度感受性変異株の致死性を抑制する遺伝子の探索を行ったことについて述べた。ショットガンクローニングにより得られた遺伝子の配列を読んだところ機能未知遺伝子 *yncC* であった。YncC は転写因子である GntR と N 末端で高い相同性を持っていた。マイクロアレイ解析を行ったところ *yncC* 過剰発現株は 50 以上の遺伝子の発現を変化させることが明らかとなった。発現に変化の見られた遺伝子の中にはストレス耐性に関与する遺伝子や鞭毛形成遺伝子が含まれていた。鞭毛形成遺伝子の発現制御について詳細に検討を行ったところ、YncC は鞭毛のマスターレギュロンである *flhDC* の発現をプロモーター近傍域に結合することで負に制御していることが明らかとなった。

第六章の総括では、一連の実験結果を踏まえ、FtsZ との関係を中心に GroEL の細胞分裂に関する役割について論じた。

3D structure comparison of FtsZ and Tubulin

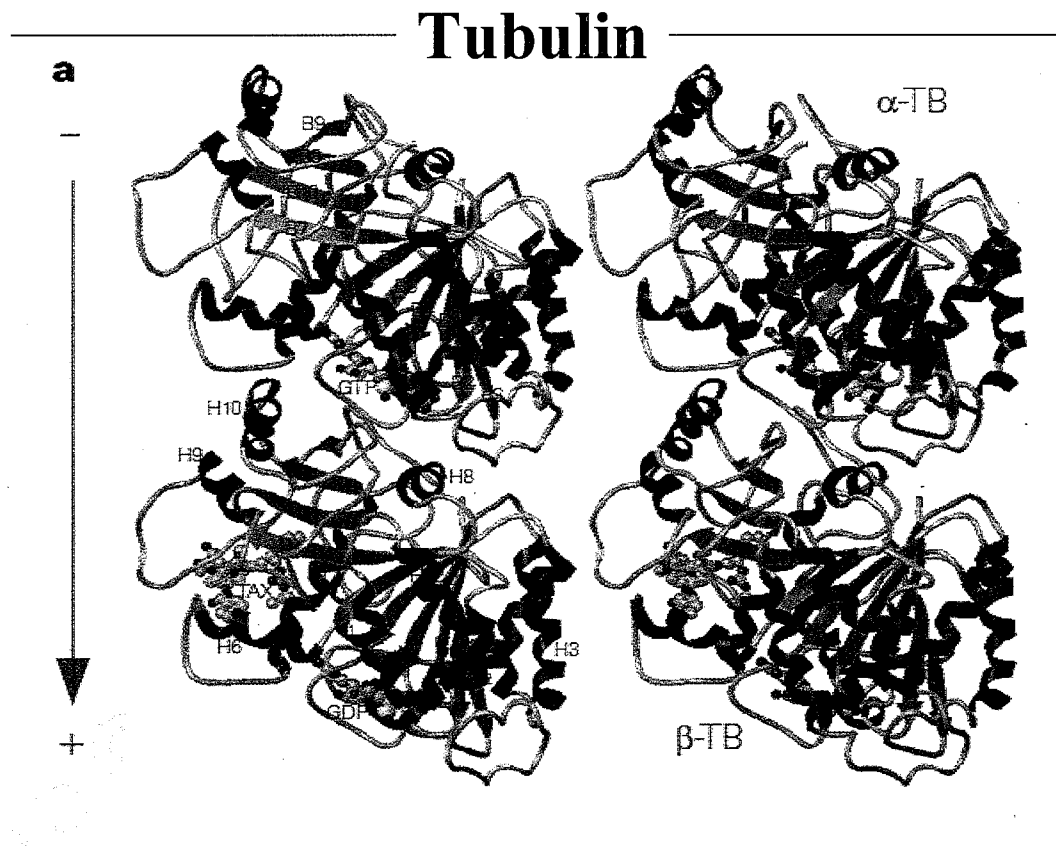


Structural insights into FtsZ protofilament formation
Maria A Oliva, Suzanne C Cordell and Jan Lowe

Nat Struct Mol Biol. 2004 Dec;11(12):1243-50.

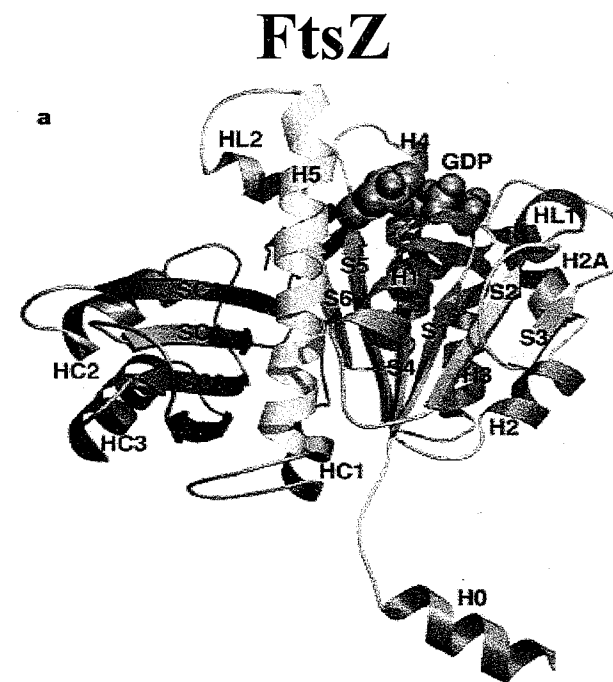
Fig.1-1 FtsZとTubulinの立体構造比較。FtsZのC末端以外の構造は重なる部分が多い。

3D structure comparison of FtsZ and Tubulin



Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography

Eva Nogales, Sharon G. Wolf* & Kenneth H. Downing
 Life Science Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley,
 California 94720, USA



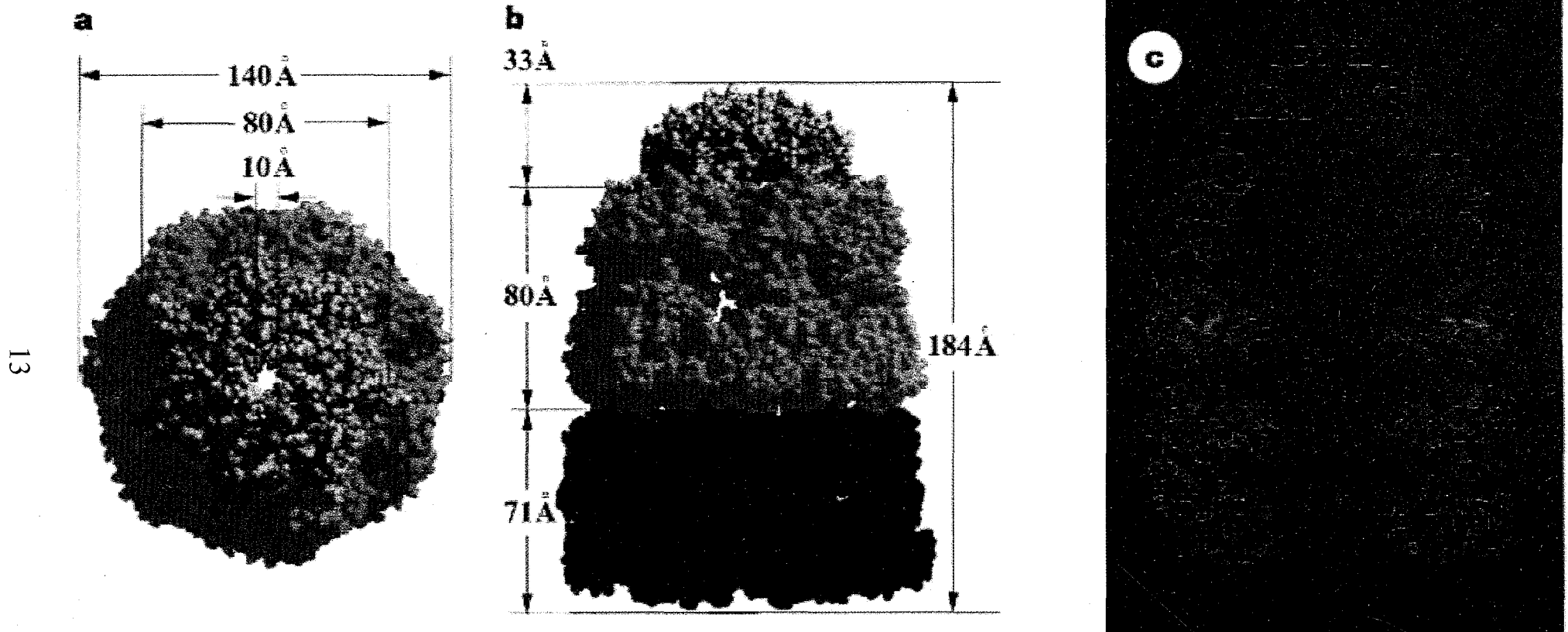
Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ

Jan Löwe & Linda A. Amos
 MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge CB2 2QH, UK

NATURE | VOL 391 | 8 JANUARY 1998

Fig.1-2 TubulinとFtsZの立体構造比較。

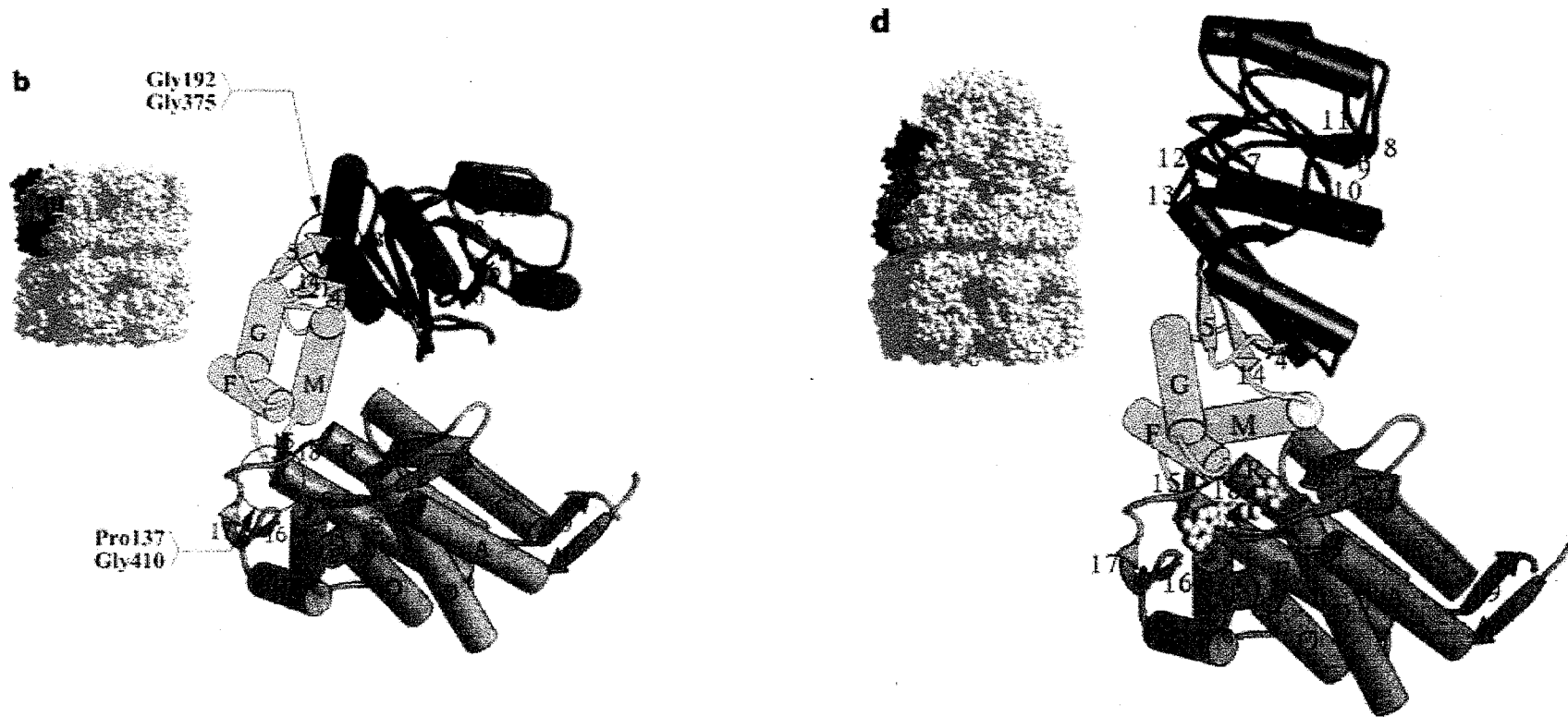
3D structure of *Escherichia coli* GroEL



The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex.
Nu Z, Horwich AL, Sigler PB. Nature. 1997 Aug 21;388(6644):741-50.

Fig.1-3 大腸菌GroELの立体構造。緑と赤のリング部分はそれぞれ7量体のGroELを示している(左)。黄色のドーム部分は7量体のGroESを示している(左)。右図はGroEL-GroES複合体の内部を示している。

3D structure of *Escherichia coli* GroEL



The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)7 chaperonin complex.
Nu Z, Horwich AL, Sigler PB. Nature. 1997 Aug 21;388(6644):741-50.

Fig.1-4 大腸菌GroEL1分子の立体構造を示している。 α ヘリックスを円柱、 β ストランドを矢印で示している。赤が頂点ドメイン、緑が中間ドメイン、青が赤道ドメイン。右図はGroESが結合し、頂点ドメインが「立ち上がった」状態を表している。

第二章

ペニシリン誘導小胞への GroEL の局在化

緒言

細胞分裂機構には数多くの因子が関与している。Divisome を形成する各種 Fts タンパク質⁽¹⁰⁾ や Min system を担う MinCDE⁽¹²⁾、SOS 応答に関与する Sula⁽²⁷⁾(Fig.2-1)などに加えて、緊縮応答に関与する ppGpp⁽²⁸⁾、Nucleoid occlusion model⁽¹³⁾を担う核様体などタンパク質以外の因子も働いている。これらの因子は細胞分裂面の決定 (Min system、Nucleoid occlusion model) やストレス環境での細胞分裂の停止 (SOS 応答、緊縮応答) に働き、正常な時期に正常な位置で細胞分裂が起こるように制御している。これら様々な制御機構が存在するが、それらの主なる標的は収縮環を形成する FtsZ であることが知られている。しかし FtsZ が何故細胞中央を正確に認識できるのか、いかに収縮時期を制御しているかは明らかになっていない。

これらの未解明の問題を明らかにするため、細胞中央のコンポーネントを分取することを試みた。原核細胞にはいわゆるオルガネラは存在しない。Divisome もタンパク質集合体だが分離できるほど強固に結合しているものではない。そこで我々は大腸菌にペニシリン処理を施した時の細胞の形状に着目した。大腸菌にペニシリンを処理すると、細胞分裂面(細胞中央)にバルジ状構造物を形成することが知られている。通常はここからバーストし細胞は死に至るが、高浸透圧下でペニシリン処理するとバルジの形成される細胞分裂面に膜小胞が形成されることを見出した。膜小胞が必ず細胞中央に形成されることから、この構造体の中に細胞分裂に関係する因子が含まれていると考えた。

本章では膜小胞を回収し、SDS-PAGE で膜小胞中のタンパク質とペニシリン未処理の細胞のタンパク質とを比較した。その結果、膜小胞中に顕著に濃縮されているタン

パク質の一つとして GroEL を同定した。

実験方法と実験材料

<使用菌株と培地>

大腸菌 K-12 株 W3110 をペニシリン処理する菌株として使用した。

L 培地(1% Polypepton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 0.1% Glucose, pH7.0, 20 μ g/ml Thymine) を栄養培地として用いた。

<ペニシリン処理とペニシリン誘導小胞の回収>

L 液体培地で一晩培養した W3110 を新鮮な L 液体培地に 2% 植菌した。37°C で培養し、対数増殖期の菌体に終濃度 $2 \times \text{MIC}$ (64 μ g/ml) となるように PenicillinG を加えた。また細胞のバーストを防ぐ目的で 3% NaCl を添加した。3 時間処理した後、18,000g で 30 分遠心し菌体を除いた。上清を回収し孔径 0.2 μ m のフィルターで濾過し溶菌によって生じた菌体残渣を除いた。濾液を超遠心機で 100,000g、1 時間遠心した。沈殿物を回収し、リン酸バッファー (0.5M NaCl, 0.1M Sodium Phosphate buffer, pH7.2) で懸濁しペニシリン誘導小胞画分とした。

<ペニシリン誘導小胞の解析>

ペニシリン誘導小胞を SDS-PAGE により解析した。10%アクリルアミドゲル(0.26%ビスアクリルアミド、9.74%アクリルアミド)を使用した。ペニシリン誘導小胞に特異的なバンドはアミノ酸の N 末端配列を読み、タンパク質を同定した。

<ペニシリン処理菌体およびペニシリン誘導小胞の電子顕微鏡写真>

対数増殖期にペニシリン処理した菌体を集菌後、リン酸バッファー (0.5M NaCl,

0.1M Sodium Phosphate buffer, pH7.2) で洗浄した。これを終濃度 2.5% グルタルアルデヒドと 1% OsO₄ で固定化した。超薄切片をダイヤモンドナイフで作成し電子顕微鏡 (JEM-2000 EX II, JEOL Ltd, Tokyo, Japan) 80kV で観察した。電子顕微鏡による観察は、川崎医大の山田信夫博士に依頼した。

実験結果

< ペニシリン誘導小胞の回収 >

黄色ブドウ球菌に高浸透圧下で PenicillinG を処理すると細胞分裂面から小胞が放出されることが確かめられている。この小胞内には黄色ブドウ球菌の溶菌酵素が濃縮されていることが報告されている⁽²⁹⁾。そこで本研究では黄色ブドウ球菌に用いられた方法を大腸菌に応用した。大腸菌では PenicillinG を処理すると細胞中央にバルジ状の構造物が形成され、ここから溶菌することが知られている (Fig.2-2)。ペニシリン処理した大腸菌の超薄切片を作成し透過型電子顕微鏡で観察したところ、溶菌寸前と思われる菌体の細胞分裂面に複雑な膜構造が見いだされた。また溶菌に伴い小胞が培地中に放出されている様子が見られた (Fig.2-3)。そこで培養液中に遊離した膜小胞を回収するために上清を超速心し、沈殿物をペニシリン誘導小胞画分とした (Fig.2-4)。このペニシリン誘導小胞を電子顕微鏡で観察したところ 20-200nm の膜小胞が見られた (Fig.2-5)。

< ペニシリン誘導小胞の解析 >

回収されたペニシリン誘導小胞を SDS-PAGE により解析した。ペニシリン誘導小胞はペニシリン未処理の菌体の膜画分とほぼ同じ組成であったが、幾つか膜画分より濃いバンドが見られた。その内、60kDa 付近のバンドの N 末端配列を読んだところ AAKDVKFGND という配列が得られた。これは、シャペロンとして知られる GroEL の N

末端配列と同じであった。Western blotting により anti-GroEL 抗体を用いて確認したところ、確かにペニシリン誘導小胞中に GroEL が濃縮されていた。しかしコシャペロンである GroES は濃縮されていなかった。さらに、GroEL と同じ熱ショックタンパク質である DnaK は濃縮されていなかった (Fig.2-6)。また、第三章で述べるように GroEL は FtsZ と相互作用することが示唆されたが、ペニシリン誘導小胞中には FtsZ は回収されなかった (Fig.2-5)。

考察

ペニシリン処理によって細胞中央に形成される膜小胞に GroEL が濃縮されていた。現在までに、GroEL が細胞中央に局在し細胞分裂に関与しているという報告はなされていない。これより GroEL は新規の細胞分裂因子である可能性が考えられた。通常 GroEL には GroES が結合しているがペニシリン誘導小胞中には GroES が濃縮されていなかった。GroEL が GroES 無しでも働く例がいくつか報告されている³⁰ が、通常では見られない形である。細胞分裂面では GroEL が新しい機能を持ち働いていると考えられる。

ペニシリン処理によるストレスで GroEL などのストレス応答タンパク質が高発現したために誘導小胞に GroEL の濃縮が見られた可能性も考えられた。しかしペニシリン処理により GroEL の発現誘導はされず (data not shown)、また同じストレス応答を示す DnaK は濃縮が見られなかった。これよりペニシリン誘導小胞への GroEL の濃縮はペニシリンストレスによる GroEL の発現誘導の結果ではないと考えられた。

Interaction between FtsZ and Sula

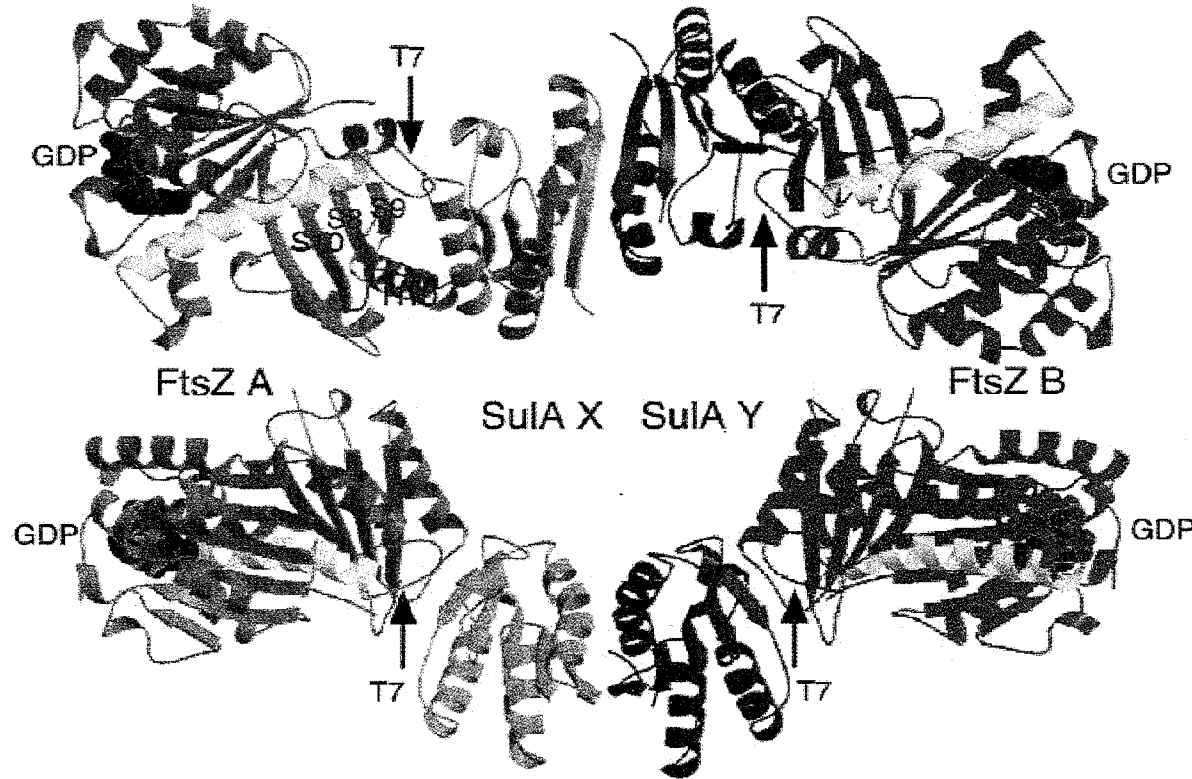


Fig. 4. Crystal structure (2.1 Å) of the SulaA35:FtsZ complex (PDB ID code 1OFU). The Sula dimer is sandwiched between two FtsZ monomers via the T7 protofilament interface, leaving the GTP-binding regions exposed. Note how the FtsZ molecules are rotated exactly 180° relative to each other in the complex. The Sula dimer is in orange and red as in Fig. 1. The FtsZ molecules are shown in blue and green. The yellow helix is H7 and marks the transition from the N- to the C-terminal domain (8). GDP is shown in space-filling representation. The two views are rotated by 90° about x.

PNAS | June 24, 2003 | vol. 100 | no. 13 | 7889-7894

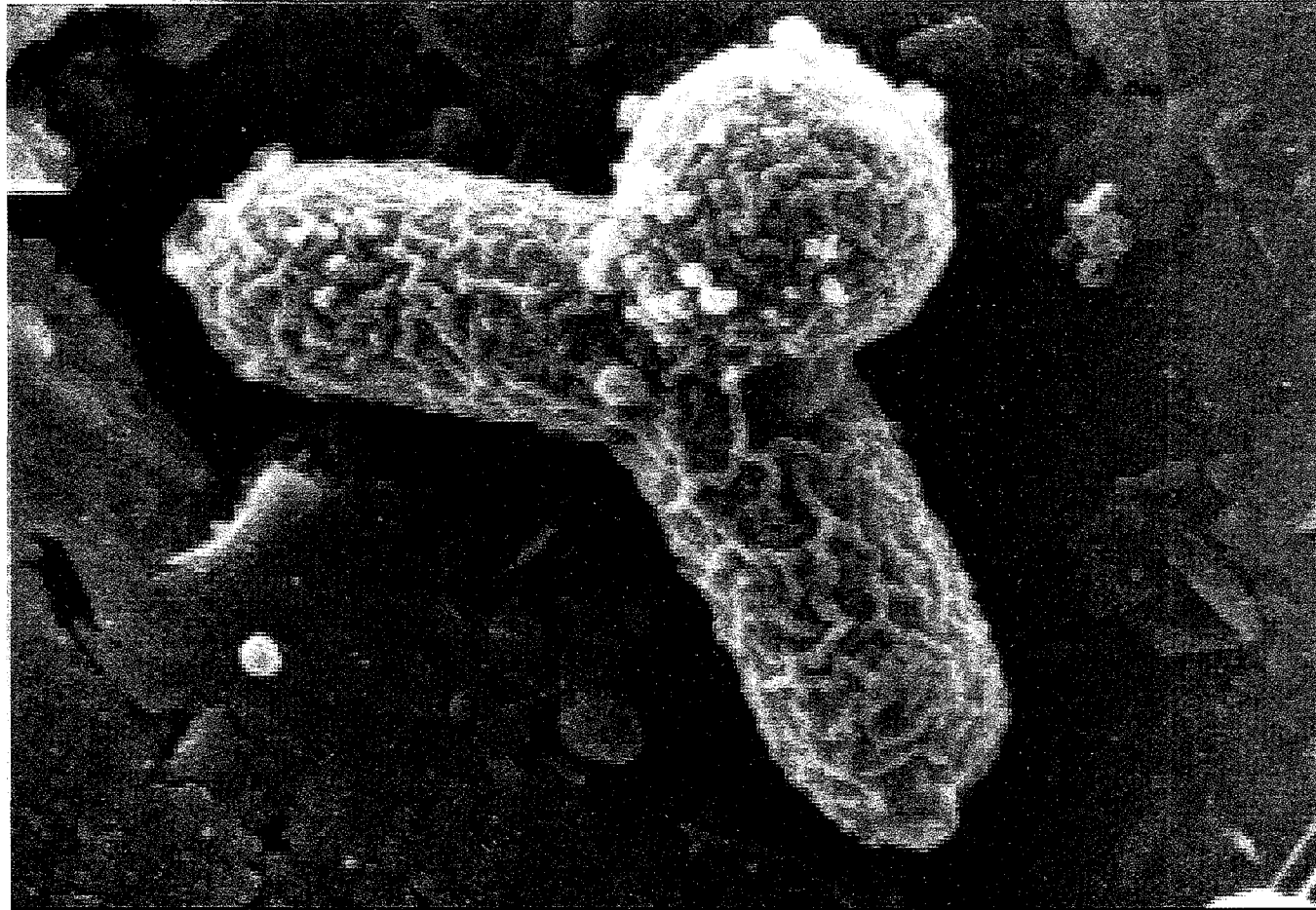
Crystal structure of the SOS cell division inhibitor Sula and in complex with FtsZ

Suzanne C. Cordell, Elva J. H. Robinson, and Jan Löwe*

Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, United Kingdom

Fig.2-1 FtsZのT7ループとSulaが結合し、FtsZの重合を阻害する。

Bulged cell formation by PCG in *E. coli*



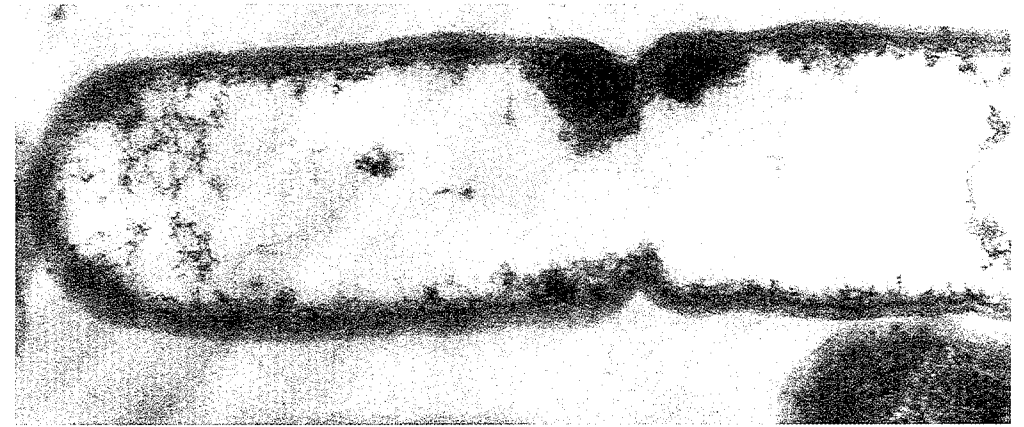
1 μ m

Fig.2-2 大腸菌をペニシリン処理すると細胞中央にバルジ状構造物が形成され、ここからバーストし溶菌する。ペプチドグリカン合成は細胞表層全体で行われていると報告されているが、何故バルジが細胞中央で形成されるかは明らかになっていない。

Electron micrographs of penicillin-treated *E. coli* cells



200 nm



200 nm

Fig.2-3 大腸菌を高浸透圧下でペニシリン処理すると細胞中央に膜状構造物が形成された(右)。溶菌に伴い膜小胞は培地中に放出されていた(左)。

Preparation of penicillin-induced vesicles from *E. coli*

Exponentially growing culture

↓ +Penicillin G (2 x MIC)
+NaCl (3%)

↓ 37 °C, 3 hr

↓ Centrifugation (18,000 g, 30 min)

Supernatant

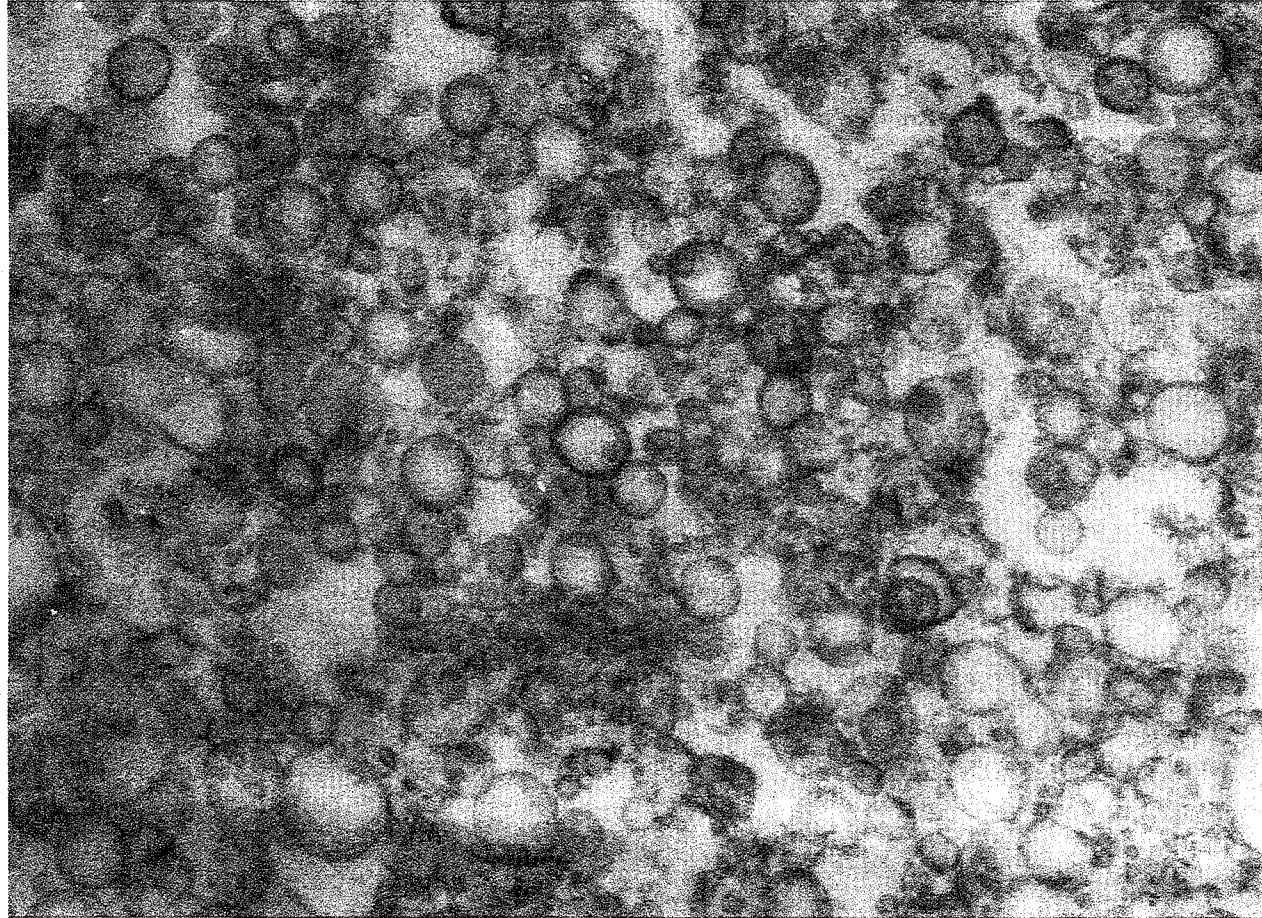
↓ Filtration (ϕ 0.2 μ m)

↓ Ultracentrifugation (100,000 g, 1 hr)

Pellet (Penicillin-induced vesicle fraction)

Fig.2-4 大腸菌を高浸透圧下でペニシリン処理した培養上清から、膜小胞を超遠心で回収し、ペニシリン誘導小胞とした。

Electron micrograph of penicillin-induced vesicles



200 nm

Fig.2-5 ペニシリン誘導小胞を、電子顕微鏡を用いて観察した。20-200nmの膜小胞が観察された。

Preferential recovery of GroEL protein in penicillin-induced vesicles

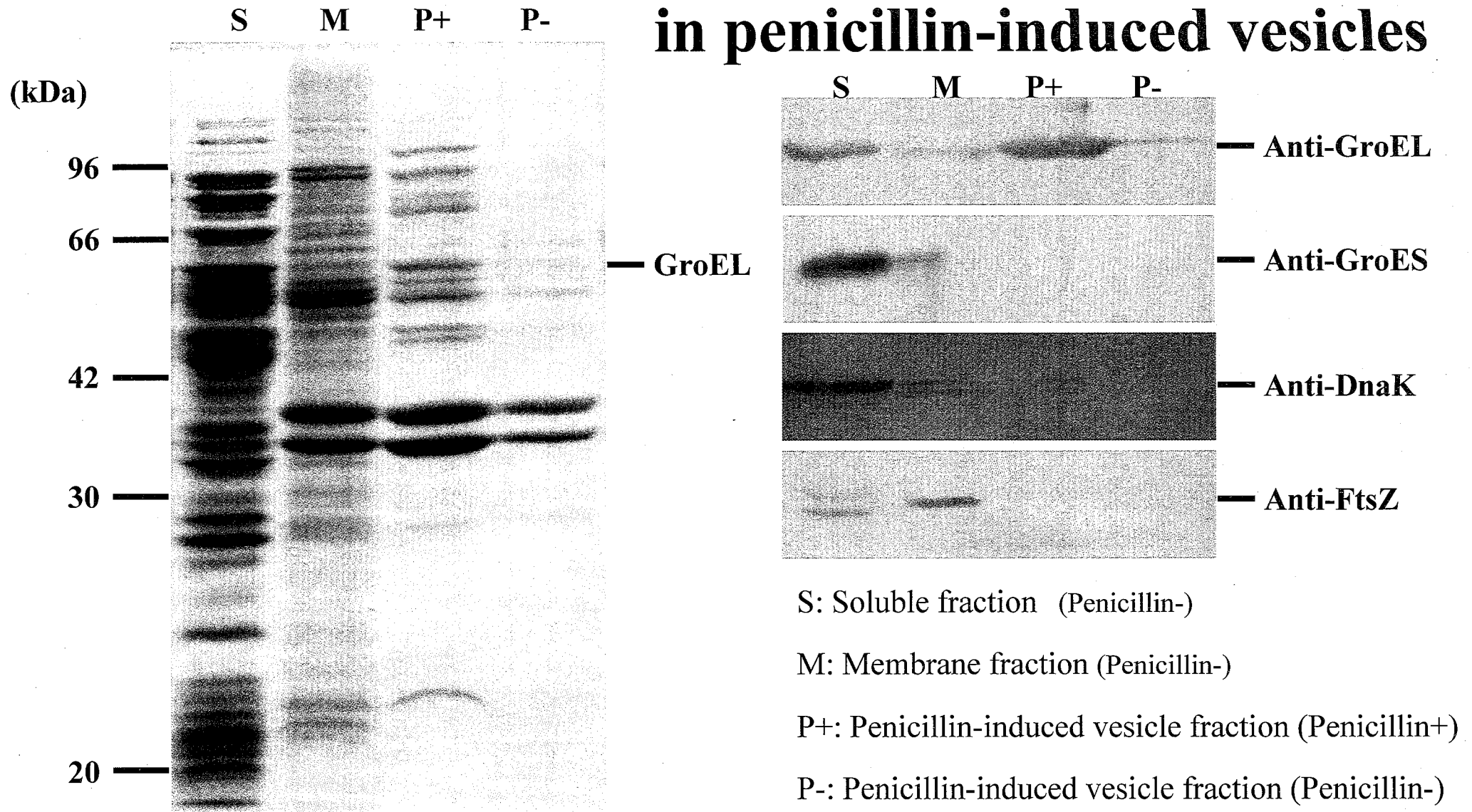


Fig.2-6 ペニシリン誘導小胞をSDS-PAGEにより分析した。ほとんどがペニシリン未処理の膜成分と同じパターンであったが約60kDaのバンドが濃縮されているのが認められた。このバンドのN末端配列を読んだところGroELであった。抗体を用いて確認したところ確かにGroELはペニシリン誘導小胞内に濃縮されていた。しかしGroESの濃縮は見られなかった。熱ショックタンパク質であるDnaKの濃縮は見られなかった。細胞中央に局在するFtsZの濃縮も見られなかった。

第三章

GroEL の細胞内局在性と Divisome との関わり

緒言

大腸菌の細胞分裂面には、Divisome と呼ばれるタンパク質複合体が形成されることが知られている。Divisome には細胞質に存在する FtsZ から内膜に存在する FtsN まで、順次内から外へとタンパク質が集合し細胞分裂を行う装置を形成する⁽¹⁰⁾ (Fig.3-1)。これらは Fts タンパク質と呼ばれている。Divisome の形成は初めに FtsZ が局在化することにより始まり、続いて FtsA・ZipA が局在化することが知られている。FtsZ は細胞質に存在し GTP 依存的に重合するタンパク質である⁽⁷⁾。細胞分裂面では FtsZ ポリマーが FtsZ リングという収縮環を形成し、これが収縮することで細胞がくびれ二分される。ただし FtsZ は細胞質タンパク質であるので、それ自身が収縮しただけでは細胞は分割されない。そのため膜へのアンカーとして膜タンパク質も Divisome 形成に参加している。FtsZ 局在化後に細胞分裂面に局在化する FtsA と ZipA はそれぞれ独立に FtsZ と結合し集まってくるが、その機能は部分的に重複することが知られている。しかし FtsA が多くの細菌に保存されているのに対し ZipA はこれまで *Haemophilus influenzae* にしか相同体が見つかっていない⁽³¹⁾。FtsA は細胞質に存在するタンパク質であり FtsZ の C 末端と結合していることが報告されている。FtsA は分子数にして FtsZ の 1%ほどしか存在しない⁽³²⁾ が、FtsZ リングの安定化をしていると考えられている。FtsA と同時期に局在化してくる ZipA も FtsZ と結合することで Divisome 形成に参加する。ZipA は N 末端に膜貫通ドメインを持ち残りの大部分は細胞質側に露出している⁽³¹⁾。細胞質側にある C 末端部分で FtsZ と結合し、FtsZ リングの束化を増加させる役割を持つ (Fig.3-2)。また ZipA は FtsA・ZipA 以降の Fts タンパク質の局在の指標となる。その後、膜タンパク質である FtsK・FtsQ・FtsL・YgbQ・FtsW・FtsI・FtsN が順に局在してくる (Fig.3-1)。この

膜タンパク質の中では FtsI のみ詳細な機能解析が進んでいる。FtsI は別に PBP3 という名を持っている⁽¹⁾。PBP は Penicillin binding protein の略であり、細胞壁のペプチドグリカン合成する酵素として知られている。Penicillin は β ラクタム系抗生物質であり、PBP に共有結合することでペプチドグリカン合成を阻害し細菌を溶菌させる。PBP3 は細胞分裂面の隔壁のペプチドグリカン層を合成する酵素である。つまり FtsI は FtsZ が収縮して細胞膜をくびれさせるのに続いて、隔壁を作りながら閉じる役目を担っていると考えられる。

これらの Fts タンパク質は細胞の生存に必須なタンパク質であり、どれか一つが欠けても細胞分裂は完了せず細胞伸長が起きる。これは FtsZ リングが正常に収縮できないためであると考えられている。特に初期の Fts タンパク質である FtsA・ZipA が欠けると FtsZ リングが不安定化することが知られている^(31, 32)。

このように、一連の流れで Fts タンパク質は Divisome に局在化し細胞分裂を遂行している。それぞれのタンパク質の存在場所や局在順は Divisome における機能と密接に関係していることが知られている。その為本章では、第二章で細胞分裂関連の新規因子の可能性が見出された GroEL の、細胞内の局在場所と局在順を間接免疫蛍光染色法により決定した。また、*groEL* 温度感受性変異株および発現調節株を用いて、GroEL が FtsZ リング形成に与える影響を観察した。

実験方法と実験材料

<使用菌株と培地>

大腸菌 K-12 株 JE1011(*F⁻ leuB thr trp his thy ara lac gal xyl mtl rspL tonA*)、JEFZ1(Same as JE1011 but *leuB⁺ ftsZ84[ts]*)、JEFA1(Same as JE1011 but *leuB⁺ ftsA[ts]*)、JEFQ1(Same as JE1011 but *leuB⁺ ftsQ1[ts]*)、JLB36(Same as JE1011 but *leuB⁺ fts36[ts]*)、JLB17(Same as JE1011 but *leuB⁺ fts17*)、JLB1(Same as JE1011 but

*leuB⁺ ftsI[ts]*を *fts* 変異株として使用した。CG2241⁽³³⁾ (*groEL44*)を *groEL* 温度感受性変異株、AI90⁽³⁴⁾ ($\Delta(lac-proAB) hsdD5(r_k^- m_k^-) thi F'[traD36 proAB lacI^f lacZ \Delta M15] \Delta groEL Km^r [pTGL7]$)を *groEL* 発現調節株として使用した。

L 培地(1% Polypepton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 0.1% Glucose, pH7.0, 20 μ g/ml Thymine) を栄養培地として用いた。Arabinose 培地(1% Polypepton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% Arabinose, pH7.0, 20 μ g/ml Thymine)を *groEL* 発現培地として用いた。

<使用プラスミド>

pTG10(Expression vector)、pTGL7(*groEL* under control of *Plac* in plasmid pTG10)、pBAD30(*Ap^r araC ParaBAD*)、pBADEL(*E.coli groEL* gene under control of *ParaBAD* in pBAD30)⁽³⁴⁾ を *groEL* 発現調節株で使用した。pHSG398、pHSGZ (*ftsZ^{WT}* in pHSG398)を *ftsZ* 発現プラスミドとして使用した。

<間接免疫蛍光染色法⁽³⁵⁾>

一晚培養した菌体を新鮮な L 液体培地に 2%植菌した。30°Cで 90 分培養し対数増殖期に入った菌体を各温度で 60 分培養した。この培養液 100 μ l を氷冷 100% メタノール 900 μ l に懸濁した。氷上で静置した後、5,000rpm 2 分 (MRX-150;TOMY) で遠心し菌体を回収した。菌体は 90%メタノール100 μ l で再懸濁した。あらかじめ 1mg/ml の poly-L-lysine を塗布し乾燥させたスライドガラスにメタノール処理菌体を塗布した。Lysozyme 溶液(0.2mg/ml Lysozyme、25mM Tris-HCl(pH8.0)、50mM Glucose、10mM EDTA)で 2-5 分間処理した。処理後、PBSTS(140mM NaCl、2mM KCl、8mM Na₂HPO₄、0.05% Tween20、20% Sucrose)または PBST(140mM NaCl、2mM KCl、8mM Na₂HPO₄、0.05% Tween20)で 3 回(1 回 30 秒)洗浄した(以下、PBST/S と表記)。

メタノール、アセトンでそれぞれ 1 分間処理し乾燥させた。PBST/S-BSA (PBST/S-2%BSA) で 15 分間ブロッキングした。PBST/S で軽く 3 回洗浄後、PBST/S-BSA に溶かした一次抗体溶液を菌体上に塗布し、モイスチャーチャンバー内で室温 1 時間静置した。一次抗体溶液には anti-FtsZ rabbit IgG (Takara bio)・anti-FtsZ mouse IgG (Takara bio) を 1,000 倍希釈、または anti-GroEL rabbit IgG (Takara bio) を 10,000 倍希釈したものをを用いた。静置後 PBST/S-BSA で 3 回 (各 10 分) 洗浄し、PBST/S-BSA で 15 分間ブロッキングした。PBST/S で軽く 3 回洗浄後 PBST/S-BSA に溶かした二次抗体溶液を菌体上に塗布し、モイスチャーチャンバー内で室温 1 時間静置した。二次抗体溶液には FluoroLink Cy3 labeled goat anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech) を 1,000 倍希釈、または Alexa 488 goat anti-rabbit IgG conjugate (Molecular Probes) を 10,000 倍希釈したものをを用いた。静置後 PBST/S-BSA で 3 回 (各 10 分) 洗浄して試料とした。必要に応じて DAPI (1 μ g/ml) で核様体を染色した。この試料を 3CCD カメラ (Micro Max: Roper Industries Inc.) 付き蛍光顕微鏡 (Axioskop 2: Carl Zeiss Co. Ltd.) を用いて観察した。撮影した画像は適宜 Adobe Photoshop 5.0LE 上で編集した。

実験結果

<大腸菌野生株での GroEL 細胞内局在>

第二章で、細胞中央に形成された膜小胞中に GroEL が濃縮されていたことから (Fig.2-6)、GroEL はペニシリン未処理の細胞内でも細胞中央に局在しているのではないかと考えた。対数増殖期の*大腸菌*野生株の細胞を用いて、FtsZ および GroEL の細胞内局在を間接免疫蛍光染色法により観察した。FtsZ は報告されている通り、細胞中央に FtsZ リングを形成していた。この時、FtsZ と同様に GroEL も細胞中央に局在していた。FtsZ リング、GroEL の局在の有無をカウントしたところ 74% の細胞で共局在が見

られた。FtsZ の局在のみが見られる細胞が 14%あるのに対して、GroEL のみが局在している細胞は 3.6%のみであった。これは GroEL の局在に先だって FtsZ の局在が起きていることを示唆している (Fig.3-3)。

<各種 *fts* 変異株における GroEL の局在>

各種 *fts* 変異株における FtsZ リング形成と GroEL の局在について間接免疫蛍光染色法を用いて観察した。観察には *ftsZ*・*ftsA*・*ftsQ*・*ftsL*・*ftsW*・*ftsI* 変異株を用いた。それぞれの Fts タンパク質の局在は前の Fts タンパク質の局在に依存し、例えば *ftsQ* 変異株ではその後の FtsL、FtsW、FtsI タンパク質の局在化が起こらない。*fts* 変異株は 42°C でタンパク質が変性し、細胞分裂が出来ずに細胞が伸長することが知られている。これにより GroEL の局在時期を決めることが出来る。*fts* 変異株を 42°C にシフトアップし、細胞が約 4 倍長になったところで細胞を固定化し間接免疫蛍光染色を行った。通常、4 倍長の細胞では端から 1/4 細胞長のところに FtsZ リングが形成されることが知られている。*ftsA* から *ftsI* 変異株では FtsZ リングが端から 1/4 細胞長のところに形成され、GroEL も FtsZ と共局在していた。古い分裂面にも薄い GroEL の局在が見られた。一方 *ftsZ* 変異株では FtsZ リングは形成されていなかった。この時、GroEL の局在も見られなかった (Fig.3-4)。このことから GroEL の局在は FtsZ の局在に依存しており、他の Fts タンパク質には依存していないことが明らかとなった。つまり GroEL は FtsZ の局在後の極めて早い時期に細胞分裂面に局在するタンパク質であると考えられた (Fig.3-5)。

<*groEL* 温度感受性変異株および発現調節株における FtsZ リング形成>

FtsZ との密接な関係が示唆された GroEL が、生体内で FtsZ リング形成にどのような影響を与えているのかを確かめた。まず CG2241 (*groEL44* 温度感受性変異株) の細

胞形態を観察した。44°Cでは細胞は伸長すると共に膨潤し俵型になることが観察された(data not shown)。42°Cでは細胞の伸長のみが観察された。細胞伸長のみが観察された42°Cにおいて間接免疫蛍光染色法を用いて FtsZ リング形成を観察したところ、FtsZの局在が見られない、または4倍長の細胞の片側にしか FtsZ リングが存在しないものが多く観察された(Fig.3-6)。これは FtsZ リングが不安定化しているためと考えられた。GroEL は先に述べたように熱ストレスを受けた環境において重要な働きをするタンパク質である。そのため *groEL* 温度感受性変異株で見られた表現形が、熱ストレスによるものであることも考えられた。そこで *groEL* 発現調節株を用いて、30°Cで GroEL 欠損させた場合の細胞形態を観察した。その結果、*groEL* 温度感受性変異株と同様に細胞が伸長していることを見出した。FtsZ リングの不安定化も同様に観察された(Fig.3-6)。このことより、GroEL の欠損は温度に関係なく FtsZ リング形成に影響を与えることが示唆された。

FtsZ リングの不安定化の程度を調べるため、細胞中の FtsZ リングをカウントした。GroEL と同様に早期に細胞分裂面に局在化する FtsA の温度感受性変異株と比較した。*ftsA* 温度感受性変異株では細胞端から 1/4 の位置に対称に FtsZ リングが形成されていた。対して *groEL* 温度感受性変異株では、FtsZ が局在しない細胞が 30%、片側にしか FtsZ リングが存在しない細胞が 11%見られた(Fig.3-7)。このような細胞は *ftsA* 変異株ではほとんど認められなかった。これらのことから GroEL は FtsZ リングの安定化に大きく寄与していることが示唆された。

<*ftsZ* マルチコピープラスミドによる *groEL* 温度感受性の抑制>

GroEL 欠損による細胞死の原因が Fts リング形成の不全によるものならば、細胞内の FtsZ の量を増やすことにより *groEL* 温度感受性変異による致死性を回復できると考えた。そこで CG2241 (*groEL* 温度感受性変異株)に FtsZ 発現プラスミドを形質転換し温

度感受性試験を行った。その結果、40.9°Cで部分的ながら温度感受性が回復した (Fig.3-8)。

考察

第二章で新規細胞分裂関連因子として得られた GroEL の細胞内局在性について、間接免疫蛍光染色法を用いて確かめた。大腸菌野生株では FtsZ・GroEL の共局在が見られた。また GroEL に先だって FtsZ が局在することが示唆された。*fts* 変異株を用いた実験より GroEL は FtsZ 局在直後に細胞分裂面に局在することが明らかとなった。同様に FtsZ 局在直後に細胞分裂面に来る ZipA は FtsZ を安定化することが知られている⁽³¹⁾。*groEL* 温度感受性変異株および発現調節株での FtsZ リング形成不全から GroEL も ZipA と同様に FtsZ リングの安定化に関与していると考えられた。*groEL* 温度感受性変異株の高温感受性が多コピー *ftsZ* により抑制されたことから、生体内で GroEL が直接 FtsZ リング形成に関与していることが示唆された。

E. coli divisome

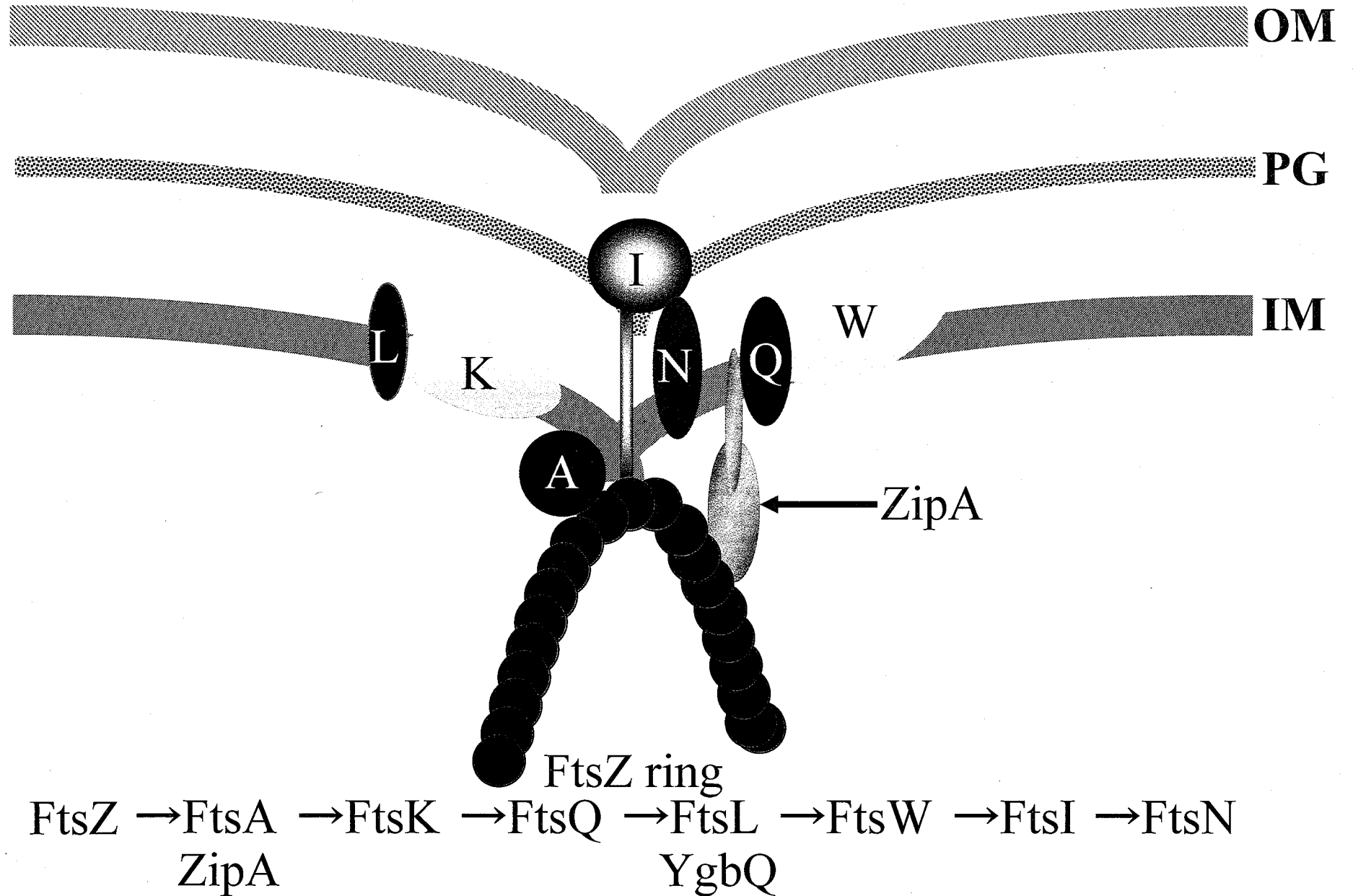


Fig.3-1 大腸菌の細胞分裂面には細胞分裂装置Divisomeが形成される。FtsZを起点として図下部に示した順に各Ftsタンパク質が局在してくる。

Interaction between FtsZ and ZipA

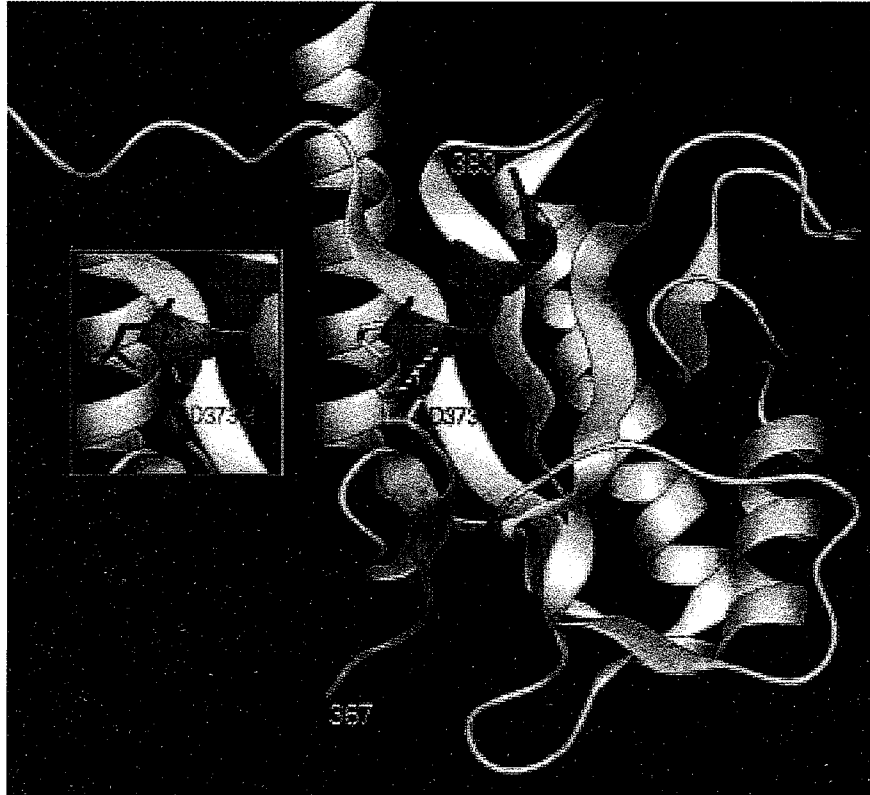


FIG. 8. Structure of the FtsZ/ZipA complex. The interacting residues of FtsZ are indicated in blue, with the Asp-373 and Pro-375 side chains shown. The ZipA structure is shown in green. Numbers indicate residues of the FtsZ peptide. The hydrogen bond between Asp-373 and the main chain of FtsZ is indicated by the white dashed line. In the inset, the D373G and P375L changes are modeled into the ZipA-FtsZ structure. Representations were done using the program RIBBONS (37).

Genetic Analysis of the *Escherichia coli* FtsZ/ZipA Interaction in the Yeast Two-hybrid System

CHARACTERIZATION OF FtsZ RESIDUES ESSENTIAL FOR THE INTERACTIONS WITH ZipA AND WITH FtsA*[§]

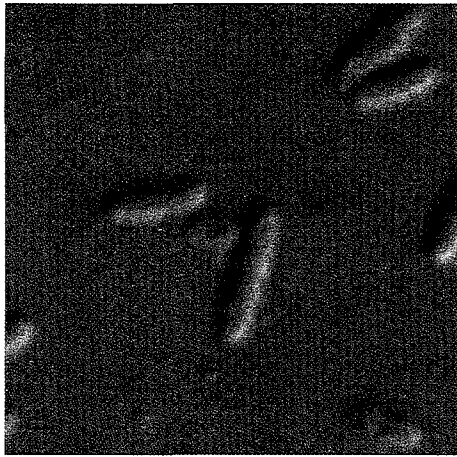
Steven A. Haney^{†‡}, Elizabeth Glasfeld[‡], Cynthia Hale[‡], David Keeney[‡], Zhizhen He[‡], and Piet de Boer[‡]

From the [†]Department of Infectious Disease, Wyeth-Ayerst Research, Pearl River, New York 10965 and the [‡]Department of Molecular Biology and Microbiology, Case Western Reserve University Medical School, Cleveland, Ohio 44106-4960
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 276, No. 15, Issue of April 13, pp. 11980-11987, 2001

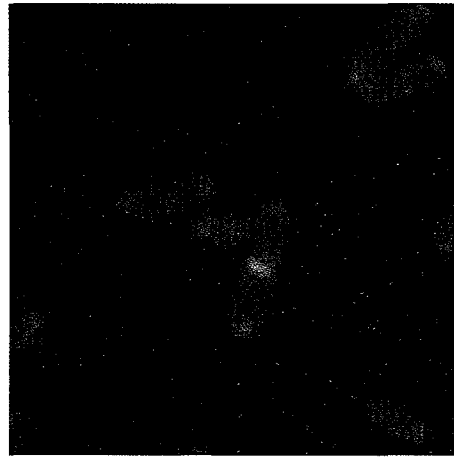
Fig.3-2 FtsZのC末端にある α ヘリックスとZipAの α ヘリックスが水素結合により結合する。

Intracellular localization of GroEL and FtsZ protein in *E.coli*

DIC



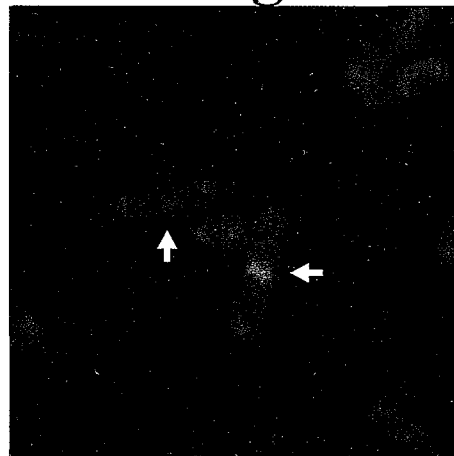
Anti-GroEL



Anti-FtsZ



Merged



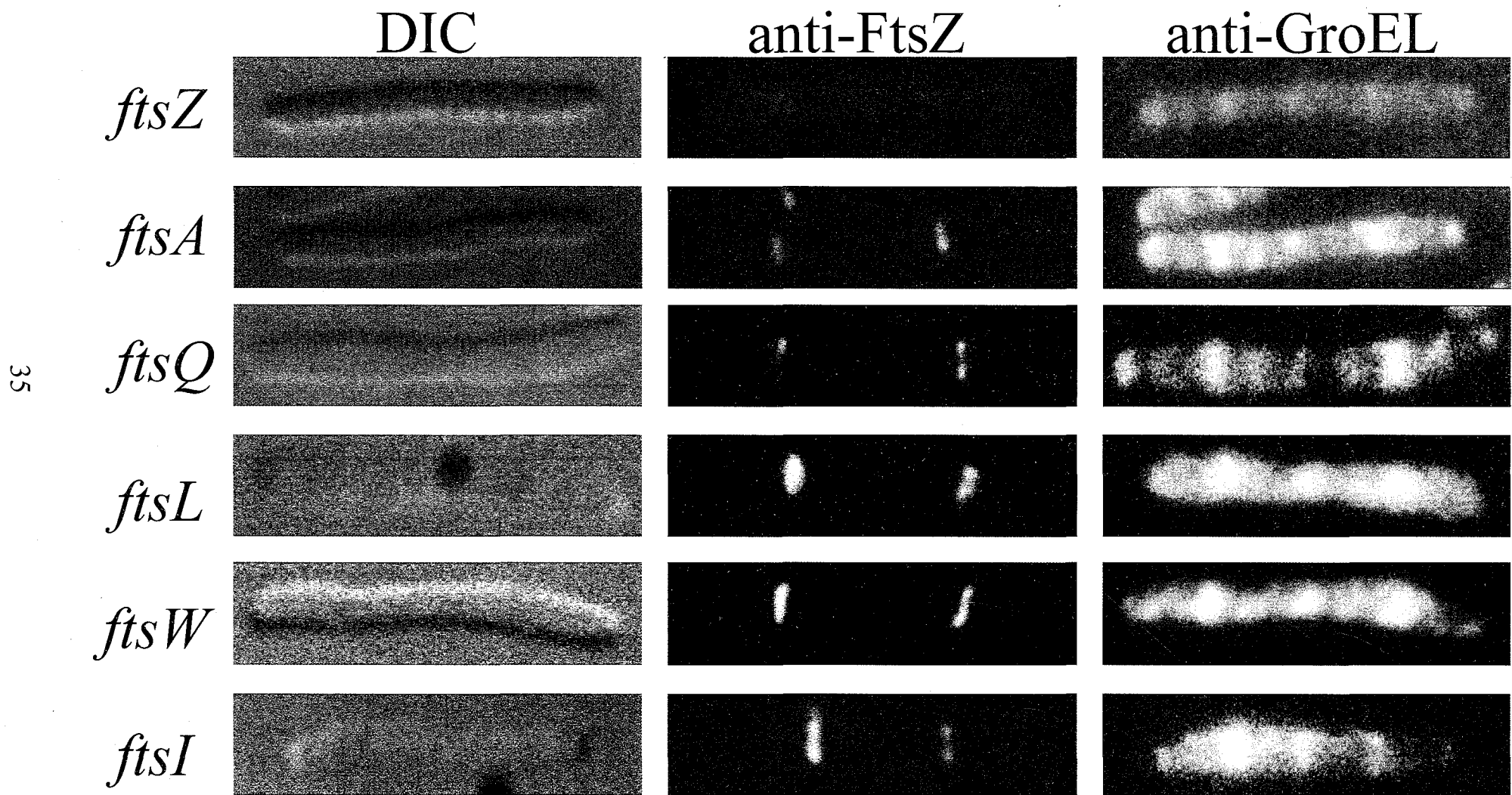
FtsZ ring	GroEL	population(%)
+	+	74.9
+	-	14.2
-	+	3.6
-	-	7.3

DIC: 微分干渉像

Merged: Anti-GroEL・Anti-FtsZ重ね合わせ像

Fig.3-3 大腸菌野生株におけるGroELの局在場所を間接免疫蛍光染色法を用いて観察した。FtsZと共染色した結果、GroELはFtsZと共に細胞中央に局在した(矢印)。FtsZが形成されていない短い細胞ではGroELの局在も見られなかった。

Localization of GroEL protein in *fts* mutants



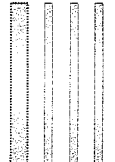


10 μm

Fig.3-4 各種*fts*変異株におけるGroELの局在を間接免疫蛍光染色法により観察した。GroELはFtsZの局在化にのみ依存し他のFtsタンパク質の影響は受けずに局在した。少なくともFtsIが局在化するまでは分裂面に留まっていた。

Sequential assembly of cell division proteins and dependency of GroEL-localization at division sites

36

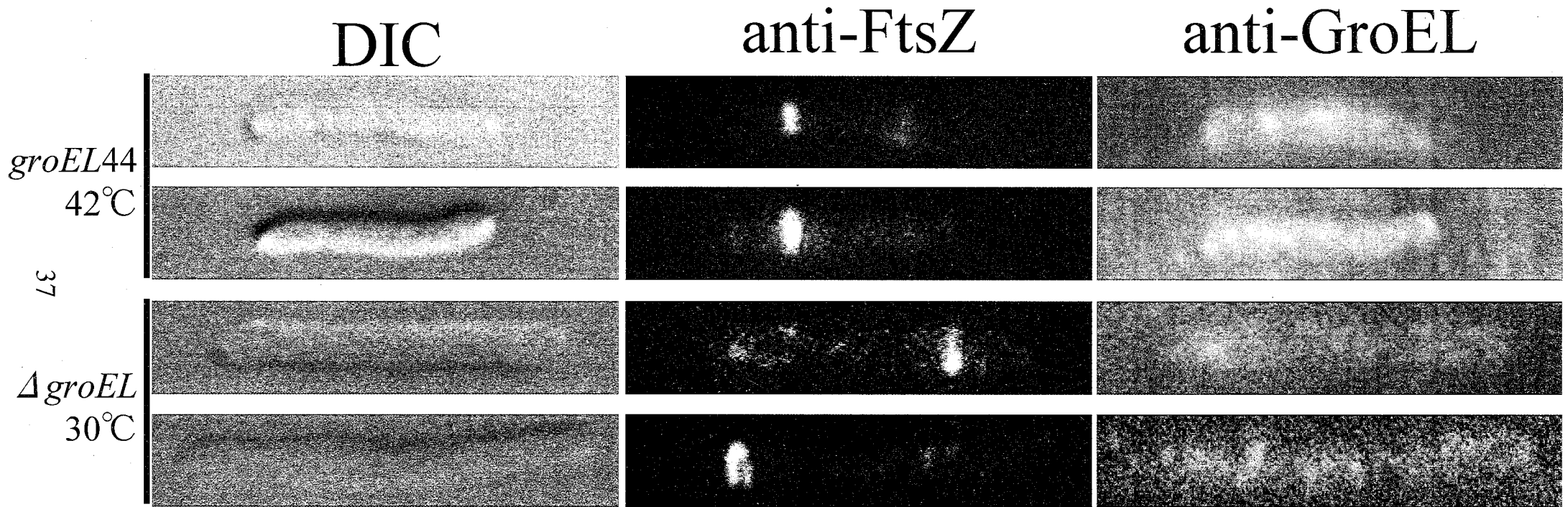
	FtsZ-FtsA-ZipA-FtsK-FtsQ-FtsL-FtsW-FtsI-FtsN									
	-	+	NT	NT	+	+	+	+	NT	
GroEL localization										

NT: not tested

Fig.3-5 各種*fts*変異株におけるGroELの局在を表にまとめた。GroELはFtsZの局在直後にFtsAとは独立に局在化した。局在後、GroELは少なくともFtsIが局在化するまで細胞分裂面に留まることが明らかとなった。

Asymmetric FtsZ-ring formation






in *groEL* mutant strains



10 μm

Fig.3-6 *groEL*温度感受性変異株 (*groEL44*) および発現調節株 ($\Delta groEL$) におけるFtsZの局在を間接免疫蛍光染色法により観察した。*groEL*温度感受性変異株および発現調節株ともに細胞が伸長しFtsZリングが片側しか見られないものが観察された。

FtsZ-ring formation in *groEL* and *ftsA* mutants

Mutation	No ring	Symmetric			Asymmetric
		1 ring	2 rings	More	1 ring
					
<i>ftsA</i> ^{ts} :	0.0	23.7	72.9	1.7	1.7
<i>groEL</i> ^{ts} :	30.0	3.0	52.4	3.0	11.5

(%)

38

Fig.3-7 *groEL*温度感受性変異株および*ftsA*温度感受性変異株におけるFtsZリングの形成の程度を計測した。*groEL*温度感受性変異株では*ftsA*温度感受性変異株と比べFtsZリングをもたない細胞や非対称なFtsZリング形成が見られた。

Suppression of temperature sensitivity of *groEL* mutant by *ftsZ* plasmid

39

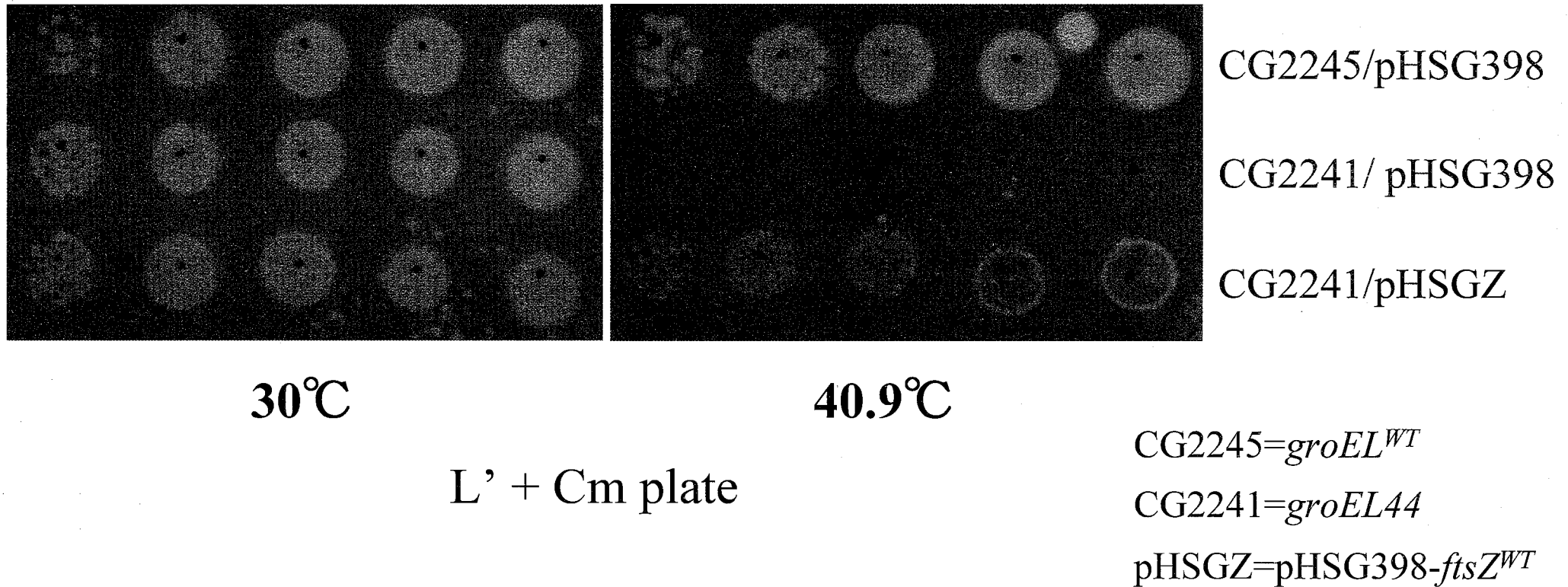


Fig.3-8 *groEL*温度感受性変異株(CG2241)に野生型*ftsZ*遺伝子をマルチコピーで導入したところ、部分的に温度感受性の抑制が見られた。

第四章

FtsZ と GroEL の結合

緒言

Divisome は Fts タンパク質の局在化の足場(スキャホールド)であると同時に、GTPase 活性による FtsZ リングの収縮や FtsI によるペプチドグリカン合成などの酵素反応の場ともなる。

FtsZ タンパク質と各種 Fts タンパク質⁽¹⁰⁾・SulA タンパク質⁽²⁷⁾・Min タンパク質⁽¹²⁾などの結合については、様々な条件で実験が行われ数多くの報告がなされている。中には FtsZ と結合した状態での結晶構造も解かれ、具体的な結合部位なども明らかとなってきたものもある。FtsZ の結晶構造が Tubulin と相同であることは序論で述べたが、FtsZ の C 末端は形・配列とも細菌種間で保存されていない領域である。大腸菌では、この C 末端が FtsA や MinC との結合に使用されていることが知られている^(36, 37)。FtsZ の N 末端ドメインには GTP 結合部位が存在する。FtsZ はモノマーよりもポリマーの GTPase 活性が高いことが知られており、GTPase の活性化には FtsZ ポリマー内の別の FtsZ 分子の T7 ループ部位が必要となることも報告されている^(38, 39)(Fig.4-19)。この性質は FtsZ が重合するタンパク質であることと密接に関係している。FtsZ モノマーは重合可能なコンフォメーションである GTP 結合型で存在し、重合すると近隣の FtsZ 分子内の T7 ループにより GTP が加水分解され、GDP 結合型に変換される。GDP 結合型になった FtsZ は脱重合を引き起こしモノマーに戻っていく。主にこの GTPase 活性が FtsZ ポリマーの寿命を決定していると言われている。FtsZ リングの寿命を決定する GTPase 活性は FtsZ と結合するタンパク質 (FtsZ リングと膜とのアンカーとしての機能の他にも)からの影響を受けている可能性がある。

本章で注目する GroEL はシャペロンタンパク質として知られている。一般に変性タン

パク質のように正しいコンフォメーションが取れず、疎水性アミノ酸が露出したタンパク質を基質としている。通常、内部の空洞にタンパク質を取り込み、変性タンパク質を元の状態に戻す役目を果たしているが、頂点ドメインで基質と結合するだけでもタンパク質の変性を防ぐことが出来るとの報告もある⁽¹⁶⁾。また GroES と共同して親水的な内部空洞を作り出す。内部に入りきらない高分子の場合は GroES なしで働くことも報告されている。現在、網羅的な GroEL との相互作用解析も行われている⁽⁴⁰⁾。

第三章で FtsZ と GroEL の直接的結合が予想された。これは他の Fts タンパク質と同様に GroEL も Divisome の構成要因として FtsZ に結合していること示唆している。本章では精製 FtsZ-His Tag タンパク質と精製 GroEL タンパク質を用いて、FtsZ タンパク質と GroEL タンパク質との *in vitro* での結合を確かめた。初めに FtsZ が GTP 依存的に重合することを利用して、超遠心により GroEL との共沈実験を行った。次に変異型 GroEL タンパク質と FtsZ との結合、および GroEL タンパク質と変異型 FtsZ との結合実験を行った。最後に免疫沈降法や化学架橋法により FtsZ モノマーと GroEL の結合を確認した。

実験方法と実験材料

<使用菌株と培地>

M15/pEcftsZ,pREP4 (*ftsZ-his⁶,lacI^q*) を FtsZ-His⁶ 発現株として用いた。

LB 培地(1% Polypepton, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl, pH7.0, 20μg/ml Thymine)を発現培地として使用した。

BL21(DE3)を C 末端欠損 FtsZ タンパク質発現株として使用した。

<タンパク質精製>

M15/pEcftsZ,pREP4 を L 液体培地で一晚培養し、これを LB 液体培地に 2%植菌し

た。30°Cで3時間培養後、終濃度 1mM IPTG を加え 3 時間培養した。菌体を 8,000rpm で 5 分集菌し、リン酸バッファー (0.5M NaCl, 0.1M Sodium Phosphate, pH7.2) で再懸濁した。この操作を 2 回行い、得られた菌体を超音波破碎した。超音波破碎液は 8,000rpm で 20 分遠心し未破碎菌体を除去し、可溶成分のみを分離した。細胞破碎液は His Trap Chelating Ni²⁺ Sepharose column を用いて精製した。カラムを結合バッファー (0.5M NaCl, 0.1M Sodium Phosphate buffer, pH7.2, 10mM Imidazole) で平衡化した後、終濃度 10mM Imidazole を加えた細胞破碎液をカラムに流した。次に 10ml 洗浄バッファー I (0.5M NaCl, 0.1M Sodium Phosphate, pH7.2, 30mM Imidazole) および 10ml 洗浄バッファー II (0.5M NaCl, 0.1M Sodium Phosphate, pH7.2, 50mM Imidazole) でカラムを洗浄した。10ml 溶出バッファー (0.5M NaCl, 0.1M Sodium Phosphate, pH7.2, 250mM Imidazole) により溶出した。タンパク質溶出液は Imidazole を除去するため、PD-10 カラム (Amersham) を用いて保存液 (50mM HEPES, 1mM EDTA, 10% Glycerol, pH7.2) に置換した。

< FtsZ 重合実験 >

終濃度 10 μ M FtsZ、10mM MgCl₂、200mM KCl、10mM HEPES を反応溶液とした。FtsZ を重合させる場合は終濃度 1mM GTP を加えた。GroEL 共沈実験を行う場合は終濃度 5 μ M GroEL を加えた。BSA、GroES および ATP 存在下で共沈実験を行う場合はそれぞれ終濃度 2 μ M、10 μ M、1mM になるように加えた。反応液は 37°C 15 分静置後、100,000g で 15 分遠心した。沈殿物を純水に懸濁し SDS-PAGE を行った。野生型 GroEL は Takara Bio より購入し、変異型 GroEL は東工大資源化学研究所吉田研究室より頂いたものを使用した。

< GTPase/ATPase 活性測定 >

GTPase/ATPase の活性は生成した無機リン酸の定量により行った。0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 μ M KH_2PO_4 溶液を作製し、これを標準液とした。反応バッファーは終濃度 10mM MgCl_2 、200mM KCl 、10mM HEPES (pH7.2) 、FtsZ 10 μ M or GroEL 1 μ Mを用いた。これらに GTP/ATP 1mM を加え反応を開始した。37 $^\circ\text{C}$ で 15 分反応後、終濃度 0.15M 過塩素酸を加え反応を停止させた。氷中で 10 分静置後、15,000rpm 4 $^\circ\text{C}$ で 10 分遠心を行い、上清を回収した。これにマラカイトグリーン液 ($(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.61mM, シュウ酸マラカイトグリーン 0.3mM, 0.05% Triton-X, 0.7M HCl を孔径 0.45 μ m フィルターで濾過)を等量加え 25 $^\circ\text{C}$ で 30 分静置した。反応液は 650nm の波長で吸光度を測定し GTPase/ATPase 活性を測定した。

<免疫沈降法>

ProteinA Immunoprecipitation Kit (KPL)を使用した。ProteinA-agarose をプレバッファー(50mM Mes-NaOH (pH6.5), 200mM KCl , 10mM MgCl_2)に膨潤させるため以下の操作を行った。

1. 77 μ l 60% ProteinA resin slurry を 1.5ml チューブに移した。
2. 14000g 20 秒で遠心した。
3. 上清を取り除き、1ml プレバッファーを加えた。
4. 2 と 3 を 2 回以上繰り返した。
5. 上清を取り除いた resin に 50 μ l プレバッファーを加えた。

免疫沈降に先立ってサンプルは以下の方法でプレクリア処理した。サンプル 50 μ l に 50% 50 μ l resin を加えた。これを 4 $^\circ\text{C}$ で 1 時間混合した。この時 end over end タイプの回転機を使用した。14,000g 20 秒で遠心し上清を回収した。

免疫沈降は以下の方法で行った。プレクリア処理したサンプル 50 μ l に 1mg anti-GroEL rabbit IgG(Takara bio)、0.4mg anti-FtsZ mouse IgG(Takara bio)を加えた。

これに 50% 50 μ l resin slurry を加え、4 $^{\circ}$ C で 1.5 時間混合した。14,000g 20 秒で遠心し上清を取り除き、氷冷した 1ml NP40 バッファー(150mM NaCl, 1% Triton X-100, 50mM Tris-HCl バッファー(pH7.0))を加えた。遠心とNP40 バッファーによる洗いを2・3度繰り返した。1 \times SDS-PAGE サンプルバッファー50 μ l 加えた。5分煮沸後、14,000g 1分遠心し上清を SDS-PAGE 用サンプルとした。

Western blotting による検出は以下の方法で行った。サンプルをゲル濃度 12.5% で SDS-PAGE を行った。anti-GroEL rabbit IgG で検出する為のものと anti-FtsZ mouse IgG で検出する為のものを別々に泳動した。電気泳動したゲルをセミドライ式 Western blotting によりメンブレンに移した。メンブレンはブロッキング溶液に浸し4 $^{\circ}$ Cで一晩ブロッキングを行った。anti-GroEL rabbit IgG は 100,000 倍に希釈し anti-FtsZ mouse IgG は 1,000 倍に希釈してメンブレンと室温で 1 時間反応させた。希釈には 0.5% BSA-バッファーA(0.1M Tris-HCl, 0.3M NaCl (pH9.5)) 溶液を使用した。バッファーA に終濃度 0.3%になるように Tween20 を加えた。バッファーA-Tween20 でメンブレンを洗浄後バッファーA でリンスした。一次抗体に anti-GroEL rabbit IgG を使用したものは、anti-rabbit goat IgG horseradish peroxidase を二次抗体として使用した。一次抗体に anti-FtsZ mouse IgG を使用したものは、anti-mouse goat IgG horseradish peroxidase を二次抗体として使用した。二次抗体はどちらも 5,000 倍に希釈したものを使用した。二次抗体とメンブレンを室温で 1 時間反応させた。バッファーA-Tween20 で洗浄後、バッファーA でリンスした。ECL system (Amersham Biosciences) を使い検出した。

<化学架橋法>

架橋剤としてグルタルアルデヒドを用いた。FtsZ 重合実験の系を以下のように変更し実験を行った。終濃度 5 μ M GroEL から 10 μ M GroEL にした。この系に終濃度 0.03% グルタルアルデヒドを加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間静置したあと 5 分間氷冷した。クエンチング

剤として終濃度 0.6mg/ml BSA を添加した。これを SDS-PAGE で流し Western blotting により FtsZ または GroEL を特異的に検出した。

<pET28b-ftsZ Δ C の作製>

FtsZ の C 末端欠損タンパク質を精製するため、pET28b に C 末端側が約 150bp 欠損している *ftsZ* を His タグにインフレームになるよう挿入した。C 末端欠損 *ftsZ* はプライマー FtsZ delC 5' CGACGAAGCTTACGGCCTCAGGCGA および FtsZ delC 3' ATCCATCTCGAGCTGCTGAACCTGC を用いて PCR を行った。C 末端欠損 *ftsZ* は pET28b の HindIII および XhoI サイトに挿入された。

<FtsZ Δ C-4 からの変異の分離>

pET28b-ftsZ Δ C-4 に含まれる 2 つの変異を分離した。野生型 *ftsZ* を供与するため W3110 クロモソームを鋳型として PCR を行った。プライマーは FtsZfulllength-5'-Bam GCTCGTGGATCCAGCGACTCAATAG および FtsZfulllength-3'-XhoI ATCTCGAGAAATTACCTATCCAACCG を用いた。

初めに C 末端を補うため pET28b-ftsZ Δ C-4 および PCR した full-length *ftsZ* (以下 fullZ) を KpnI と XhoI で切断後 ligation した。C 末端が付加され full-length になった pET28b-ftsZ Δ C-4 を pET28b-ftsZ^{A25V,V208A} とした。

次に V208A 変異のみを持つものを作製するため、pET28b-ftsZ^{A25V,V208A} と fullZ を BamHI と EcoRI で切断後 ligation した。得られたものを pET28b-ftsZ^{V208A} とした。

A25V 変異のみを持つものを作製するため、pET28b-ftsZ Δ C-4 を NdeI と SalI で切断後 ブランディングし ligation した。ブランディングされた pET28b-ftsZ Δ C-4 (pET28b-ftsZ Δ C-4-2) を EcoRI と XhoI で切断後 ligation した。

入れ替えが行われたかは、得られたプラスミドを制限酵素により切断し切り出された

DNA フラグメントの長さを元に判断した。

使用した酵素はすべて Takara bio 社のものを使用した。

実験結果

<FtsZ ポリマーと GroEL の直接的結合>

第三章の結果より、生体内での GroEL と FtsZ の直接的な相互作用が示唆された。そこで精製タンパク質を用いて *in vitro* での直接的結合を調べた。FtsZ は GTP 存在下で重合し長大なポリマーを形成することが知られている。このポリマーは超遠心により沈殿として回収することが出来る。GroEL は 14 量体を形成する巨大なタンパク質であるが超遠心 (100,000g 15min) では沈殿しない。これを利用し、FtsZ 重合条件化で GroEL が共沈してくるかを確かめた。コントロールとして BSA を使用した。その結果、BSA は沈殿せず GroEL のみが FtsZ ポリマーと共沈することが見出された (Fig.4-1)。FtsZ ポリマーの形成後に GroEL を添加しても結合できることから、GroEL は FtsZ が重合する際にポリマーに直接組み込まれているわけではないことが明らかとなった (Fig.4-1, post or pre)。

<蛍光顕微鏡下での FtsZ と GroEL の結合>

FITC ラベルした FtsZ と Rhodamine ラベルした GroEL の混合液をスライドガラス上に滴下し、GTP を加え重合を開始し蛍光顕微鏡で観察した。その結果、FtsZ-FITC の像と重なるように GroEL-Rhodamine の像が観察された (Fig.4-2)。

<GroEL 共存在系での FtsZ の安定性>

GroEL の生体内での役割が FtsZ リングの安定化であるとするならば、*in vitro* での FtsZ

ポリマーの安定化に効いている可能性がある。そこで FtsZ を GTP の添加により重合を開始させ、FtsZ ポリマーの量を経時的に測定した。この系に GroEL を加えたとき、FtsZ ポリマーが安定して存在するようになるかを確認した。FtsZ に GTP を加え 15 分から 120 分まで 37°C で静置した。その結果、FtsZ 単独の場合は 60 分をピークにして、その後 FtsZ ポリマーの減少が見られた。GroEL を系に加えた場合も同様の傾向が見られた (Fig.4-3)。つまり *in vitro* では、GroEL による FtsZ ポリマーの安定化は見られなかった。

<変異型 GroEL と FtsZ との結合>

GroEL と FtsZ との結合領域を探る目的で、野生型 GroEL と同様に各種変異型 GroEL も FtsZ ポリマーと結合するかを確認した。変異型 GroEL は Fig.4-4 の性質のものを用いた。FtsZ との結合に変化が見られた GroEL の変異から、GroEL がどのように FtsZ ポリマーと結合しているかを推測できると考えた。その結果、幾つかの変異型 GroEL (GroEL^{Y199E}, GroEL^{N265A}, GroEL^{SR1}) で FtsZ ポリマーの減少がみられた。さらに GroEL^{SR1} は FtsZ ポリマーへの結合が見られなかった。FtsZ ポリマーの減少が見られた変異型 GroEL のペプチド結合能・GroES 結合能に共通点は見られなかった (Fig4-4)。GroEL^{SR1} はシングルリング変異型で GroEL が赤道面での結合ができず、GroEL7 量体として存在する。GroEL^{SR1} は他の変異型と異なり基質/GroES 結合領域が一つしかない。これより GroEL の FtsZ ポリマーへの結合には GroEL リングが 2 つ (14 量体) 必要であることが示唆された。

FtsZ ポリマーの減少が見られた変異型 GroEL をコードする *groEL* 遺伝子を過剰発現した菌体で増殖阻害が起こるかを確認するため、変異 *groEL* 遺伝子を CG2241 (*groEL* 温度感受性変異株) に形質転換し温度感受性試験を行った。42°C で温度感受性を抑制したのは *groEL*^{WT}、*groEL*^{ΔC} だった。30°C で増殖阻害を起こしたのは

groEL^{D398A}のみだった。*groEL*^{Y199E}、*groEL*^{N265A}、*groEL*^{SR1}は42°Cで温度感受性を抑制せず、30°Cでの増殖阻害も示さなかった (Fig.4-5)。以上の結果から、変異型 GroEL (*GroEL*^{Y199E}、*GroEL*^{N265A}、*GroEL*^{SR1})が *in vitro* で示す FtsZ 重合阻害は、*in vivo* では細胞に重大な影響を与えていないことが明らかとなった。

<変異型 *GroEL*^{SR1} の濃度依存的な FtsZ 重合阻害>

FtsZ 重合阻害を示し、FtsZ ポリマーへの結合能も失っている *GroEL*^{SR1} についてさらに詳細な実験を行った。*GroEL*^{WT} および *GroEL*^{SR1} の濃度を 0-20μM まで 5μM 間隔に振り FtsZ 重合系に添加し、FtsZ 重合量を *GroEL*^{WT} と *GroEL*^{SR1} で比較した。その結果、*GroEL*^{WT} では濃度を上げてても重合阻害が起きず、逆に若干の重合量の増加が見られた。対して *GroEL*^{SR1} では濃度依存的に FtsZ 重合阻害がみられ、*GroEL*^{SR1} 20μM ではほぼ完全に重合が阻害された。また、*GroEL*^{WT} では濃度依存的に *GroEL* の共沈が増加したが *GroEL*^{SR1} は濃度を増加しても *GroEL* の共沈は見られなかった (Fig.4-6)。

次に *GroES* と共に ADP・ATP を加え、*GroEL*^{SR1} による FtsZ の重合阻害が起こるかを確認した (Fig.4-7)。その結果、*GroEL*^{WT} に *GroES*・ADP を添加したもので若干 *GroEL* の共沈量が低下した。これは *GroEL* の基質結合部位に *GroES* が結合し FtsZ との結合と競合したためと考えられた。この時、FtsZ の沈殿量には変化が見られなかった。しかし *GroES*^{SR1} に *GroES*、*GroES*・ADP を加えると、FtsZ の重合阻害が解除された。*GroEL*・*GroES*・ATP の系では重合阻害が再び起こっていた。この重合阻害の解除の原因は二つ考えられる。一つは *GroES* の結合により *GroEL*^{SR1} の基質結合部位が塞がれ FtsZ への有害な作用が出来なくなったため、もう一つは *GroEL*^{SR1} の GTPase 活性 (以下参照) が *GroES* との結合で低下したためと考えられる。*GroEL*^{SR1} は *tarns-ring* を持たないため、*GroES* との解離が困難な変異体である⁽⁴¹⁾。このため *GroES* 存在下では ATPase 活性の低下、基質結合部位の閉塞が考えられる。

<変異型 GroEL の GTPase 活性測定>

Fig.4-4 で FtsZ 重合阻害を示した 3 つの変異型 GroEL (GroEL^{Y199E}, GroEL^{N265A}, GroEL^{SR1}) には共通した特徴が見られなかった。そこで通常 ATP を基質としている GroEL が変異の影響により FtsZ の重合に必要な GTP をも基質としてしまっている可能性があると考えた。GroEL が GTP を消費してしまえば、FtsZ が使用できる GTP が減少し、結果的に FtsZ ポリマーの脱重合を早めることとなるからである。まず、GTPase 活性測定の前に、GroEL^{Y199E} を用いて FtsZ 重合阻害の経時変化を追った (Fig.4-8)。その結果、GroEL^{Y199E} 存在下でも 0, 1, 5 分間は FtsZ の重合が見られ、その後急激な脱重合が見られた。つまり一度重合した FtsZ が時間とともに脱重合していることが明らかとなった。このことから変異型 GroEL により GTP が消費されてしまっていることが強く示唆された。Fig.4-4 で使用した変異型 GroEL および野生型 GroEL、そして FtsZ の GTPase 活性を測定した。その結果、GroEL^{Y199E}, GroEL^{N265A}, GroEL^{SR1} において ATPase 活性に匹敵するような GTPase 活性が確認された。GroEL^{D398A} は報告通り ATPase・GTPase ともに活性が無かった。FtsZ は GTPase のみの活性が確認された。野生型 GroEL にも微弱ながら GTPase 活性が認められた (Fig.4-9A,4-9B)。以上のことより、GroEL^{Y199E}, GroEL^{N265A}, GroEL^{SR1} による FtsZ 重合阻害は、変異による GTPase 活性の獲得によるものと考えられた。

<FtsZ モノマーと GroEL との結合>

FtsZ モノマーと GroEL の結合を確かめるため、免疫沈降法と化学架橋法を用いた。免疫沈降法では両者の明確な結合は確認できなかった (Fig.4-10)。化学架橋法では、グルタルアルデヒドによる部分的架橋を行った。この架橋条件では、GroEL と結合した FtsZ はゲルに入り込めずバンドが検出されなくなると考えられる。その結果、FtsZ は重

合前(-GTP)でもダイマーやトリマーが検出された。ここに GroEL^{WT} を添加した系では FtsZ ダイマーや FtsZ トリマーのバンドが薄くなった。特に FtsZ ダイマーのバンドが薄くなっていた (Fig.4-11)。これは GroEL が FtsZ オリゴマー、特に FtsZ ダイマーとの結合が顕著であることを示唆している。また FtsZ ポリマーとの結合が見られなかった GroEL^{SR1} も FtsZ ダイマーとの結合能は保持していることが明らかとなった (Fig.4-11 レーン 8)。FtsZ と相同な Tubulin は $\alpha \cdot \beta$ Tubulin が交互に重合することにより様々な細胞骨格を作り上げていることが知られている⁽⁴²⁾。このことから FtsZ も 2 量体が重合のコアとして働いていることが考えられた。その 2 量体に GroEL が結合し初期の FtsZ 重合を調整するなどの働きをしているのかもしれない。また GroEL^{SR1} が FtsZ ダイマーには結合できることから、GroEL は FtsZ ポリマーとの結合様式とは異なる FtsZ ダイマーとの結合様式を持つことが考えられた。

<C 末端欠失 FtsZ と GroEL との結合>

GroEL が FtsZ のどの部位を認識して結合するか確かめるため、FtsA や MinCD との結合に関わる C 末端ドメインを欠失した FtsZ (以下 FtsZ Δ C) を作製した。アミノ酸配列相同性解析から FtsZ の C 末端は進化的に保存されていない部位であることが知られている。Tubulin と構造を比べるとヒモ状に伸びた C 末端は FtsZ にのみ存在する部位である。そこで保存性の低い C 末端領域 36 アミノ酸残基を削った。精製用に C 末端には His-Tag を付けた。その結果、GTP 依存的に重合する FtsZ Δ C (Fig.4-12, No.2) が得られた。ここに GroEL を添加し共沈実験を行った。その結果、FtsZ Δ C No.2 と GroEL の共沈が見られた。このことより *in vitro* の結合では GroEL は FtsZ の C 末端を認識しているのではないことが明らかとなった。このタンパク質の精製を試みたが上手く精製することは出来なかった。

FtsZ Δ C を作製するに当たり、他とは異なる挙動を示す FtsZ Δ C のクローンを一つ見

出した (Fig.4-12, No.4)。FtsZ Δ C No.4 は GTP 非依存的に重合し、 \pm GTP 条件下で GroEL を添加しても GroEL 共沈が見られなかった。FtsZ Δ C No.4 を細胞内で発現させた菌体を間接免疫蛍光染色し FtsZ の局在位置を観察したところ、二本の螺旋状の FtsZ 像が観察された (Fig.4-13)。現在までに変異型 FtsZ が不完全に螺旋を巻くことは報告されていたが、細胞全長に渡り緩やかに螺旋を巻く変異型 FtsZ は過去に例が無く FtsZ Δ C No.4 は新しい変異 FtsZ であることが考えられた。この時 GroEL は螺旋状 FtsZ と共局在している様子は見られなかった。そこで FtsZ Δ C No.4 の DNA 配列を解読した。その結果、74 番目の C が T (25 番目のアミノ酸が A から V) に 623 番目の T が C (208 番目のアミノ酸が V から A) に変異していることが明らかとなった。FtsZ のアミノ酸 25 番目付近は GTP 結合部位であり、208 番目付近は別の FtsZ と結合する部位といわれている (Fig.4-14)。両変異の周辺部位の変異はそれぞれ、GTPase 活性の低下 (N24K・Q45A) と螺旋状 FtsZ を形成する (D209A・D212G) ことが報告されているが、今回見つかった変異に対する知見は報告されていなかった^(43, 44)。そこで、それぞれの変異の分離を試みた。分離した変異 FtsZ を BL21(DE3) /pLysS に導入し、FtsZ 細胞内局在性を免疫蛍光染色法により観察した。その結果、C 末端を補った FtsZ^{A25V,V208A} でも螺旋状 FtsZ の像が観察された (Fig.4-15)。GroEL も FtsZ と共局在し螺旋状の局在を示していた。単独変異を持つ FtsZ^{A25V} や FtsZ^{V208A} は細胞中央に局在する FtsZ・GroEL の像が観察された。また分離した変異 FtsZ を JEFZ1(DE3) /pLysS に導入し、42°C での FtsZ 細胞内局在性を免疫蛍光染色法により観察したところ、FtsZ^{A25V,V208A} でも螺旋状、FtsZ^{V208A} で細胞中央に細く局在したものが観察された (data not shown)。FtsZ^{A25V} を導入したものは FtsZ の局在が見られなかった。次に FtsZ^{A25V,V208A}、FtsZ^{A25V}、FtsZ^{V208A} を IPTG により誘導した菌体の細胞破碎液を用いて FtsZ 重合実験を行った (プラスミド受容株は BL21(DE3)/pLysS)。その結果、GTP 存在下でも FtsZ^{A25V}、FtsZ^{V208A} は顕著な重合を示さず、FtsZ^{A25V,V208A} は GTP 非依存的な

重合を示した。また 3 つの変異体 FtsZ と GroEL との共沈は見られなかった。これらのことより、BL21(DE3)/pLysS 株で観察された FtsZ^{A25V} 導入株で細胞中央に局在する FtsZ は BL21(DE3)クロモソームにコードされた FtsZ^{WT} であったと考えられた(data not shown)。FtsZ^{V208A} は in vitro での重合能は見られなかったが、生体内では重合可能なことが示された。また、FtsZ^{A25V,V208A,ΔC} および FtsZ^{A25V,V208A} で観察された螺旋状 FtsZ は GTP 非依存的に重合した FtsZ の像であると考えられた。この螺旋状の FtsZ は GTP の有無に関わらず重合するため、細胞分裂面に局在化する前の FtsZ の状態を表していると思われる。最後に FtsZ^{A25V,V208A,ΔC}、FtsZ^{A25V,V208A}、FtsZ^{V208A} FtsZ^{A25V} が *ftsZ84* の温度感受性を抑制するか確かめた。その結果、FtsZ^{V208A} が完全に温度感受性を抑制し、FtsZ^{A25V,V208A} も部分的に抑制を示すことが確認された。しかしながら、FtsZ^{A25V,V208A,ΔC}、FtsZ^{A25V} は *ftsZ84* の温度感受性の抑制を示さなかった (Fig.4-16.4-17)。FtsZ^{A25V,V208A} が示した部分的抑制は FtsZ^{A25V} に V208A 変異が加わることで全体の構造が変化し、機能を相補できるようになったためと考えられた (Fig.4-18)。208 番目のアミノ酸は T7 ループに存在し、隣の FtsZ の GTPase 活性を制御する部分である (Fig.4-19)。また Tubulin と II 型シャペロニン CTT との結合にも使われる重要な部位である (Fig.4-20)。間接免疫蛍光染色でえられた結果は、FtsZ^{V208A} が示した温度感受性の抑制は細胞破碎液を用いた重合実験で FtsZ^{V208A} が重合しなかった結果と矛盾するが、生体内では他の因子の影響もあり FtsZ リング形成が補助されているためと考えている。

考察

本章の実験により FtsZ と GroEL の直接的結合が明らかとなり、GroEL の FtsZ への結合様式は 2 種類あることが示唆された。一つは FtsZ ダイマーへの結合であり (Fig.4-11)、もう一つは FtsZ ポリマーへの結合である (Fig.4-1, Fig.4-3 etc.)。GroEL^{SR1}

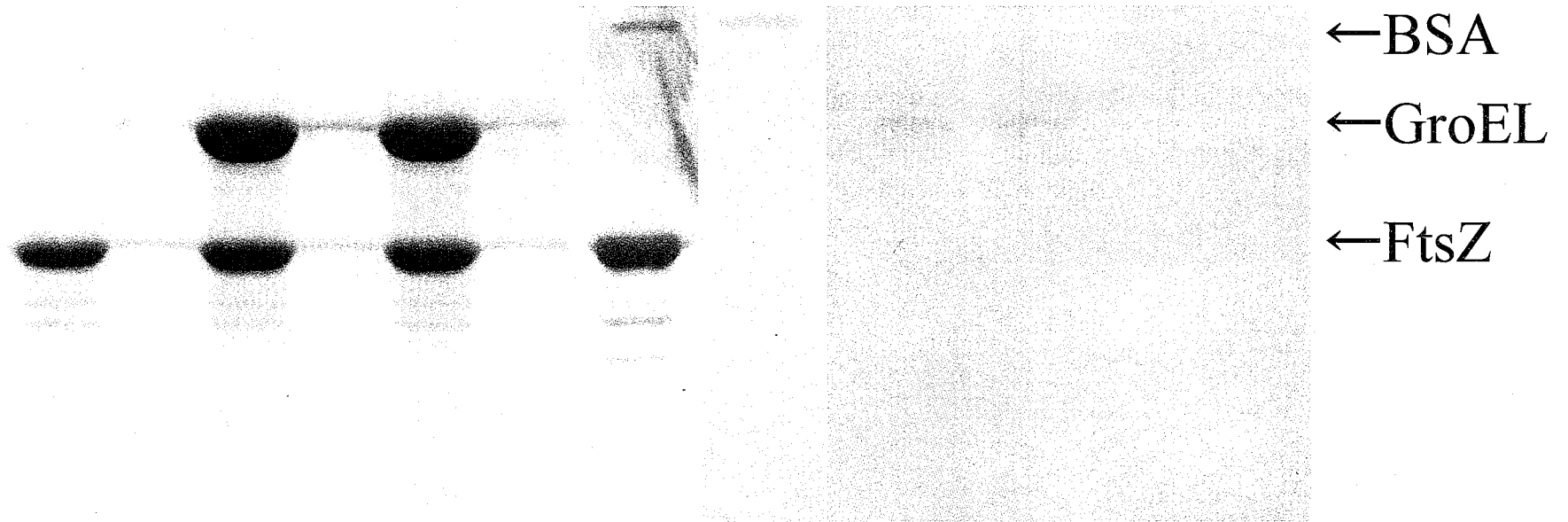
の実験から GroEL は一つの基質認識領域が存在すれば FtsZ ダイマーとは結合できることが示唆された。GroEL は FtsZ ダイマーに対して SulA のようにキャップとして結合し、重合可能な FtsZ の量を調節しているのかもしれない。FtsZ ポリマーとの結合には二つの基質認識領域が必要であることが示唆された (Fig.4-4, Fig.4-6)。FtsZ ポリマーには、ポリマー同士の橋渡しとして束化に寄与しているのかもしれない。*in vitro* では GroEL による顕著な FtsZ の安定化は見られなかったが (Fig.4-3)、FtsZ 重合系に GroEL を添加すると若干 FtsZ 重合量が増加した (Fig.4-6)。これは GroEL 結合による FtsZ の束化の結果かもしれない。変異型 FtsZ との結合実験より、*in vitro* での GroEL の結合は FtsZ の C 末端ではなく FtsZ 表面の形態に依存して結合することが示唆された (Fig.4-12)。しかし変異型 FtsZ を用いた間接免疫蛍光染色の実験から *in vivo* での FtsZ と GroEL の結合には FtsZ の C 末端が重要である事が示唆された (Fig.4-15)。*in vitro* では GroEL と結合しなかった FtsZ^{A25V,V208A} が *in vivo* で共局在を示していたが、これは生体内で ZipA・FtsA のような FtsZ の C 末端に結合するタンパク質が GroEL 結合を促進しているからかもしれない。もし GroEL—FtsZ—ZipA・FtsA の繋がりがあり、GroEL により ZipA の FtsZ への結合が一層促進されるのであれば、*groEL* 温度感受性変異株・欠損株で見られる FtsZ の不安定化を ZipA・FtsA の結合不全によるものと説明することが出来るかもしれない。ZipA、GroEL は *in vitro* ではそれぞれ独立に FtsZ と結合することが出来るので、あくまでも生体内での機能と言う点に着眼した場合の仮説である。

GroEL との結合とは別に変異型 FtsZ (FtsZ^{A25V,V208A,ΔC}、FtsZ^{A25V,V208A}) で見られた螺旋状の FtsZ ポリマーの形成も重要な発見であると考えている (Fig.4-13,4-15)。両変異 FtsZ は GTP 非依存的に重合することから、本来細胞内で形成されている FtsZ ポリマーの形を残している部分と考えられる。このことから FtsZ は生体内で核を取り囲むように螺旋状に存在し時機に応じて収縮環を形成しているのではないかと考えている。二

本の螺旋状 FtsZ は核間で交わるので、ここから FtsZ リングの形成が始まるのかもしれない。FtsZ-GFP を用いた観察から、FtsZ は重合後に螺旋を描きながら次の細胞分裂面に局在化することが報告されている⁽⁴⁵⁾。

これらの結果を踏まえ、現在 Fig.4-21 のようなモデルを考えている。FtsZ は重合する時に FtsZ ダイマーをコアとして重合していく。GroEL^{WT} は可逆的に FtsZ ダイマーに結合し FtsZ ポリマーへの重合を調節する。GroEL^{SR1} は FtsZ ダイマーに結合し FtsZ ポリマーへの結合を阻害する。また GroEL^{SR1} は GTP を消費し FtsZ の重合を阻害する。GroEL^{WT} は FtsZ ポリマー間を繋ぎ、束化を促進することで FtsZ ポリマーを安定化している。生体内では FtsZ の C 末端と膜タンパク質との結合を GroEL が促進しているのかもしれない。対して GroEL^{SR1} は FtsZ に結合する領域が一つしかないので、FtsZ ポリマー間を繋ぐことが出来ず FtsZ ポリマーへ結合することが出来ない (Fig.4-21)。このモデルを確かめるために FtsZ と GroEL が結合している様子を電子顕微鏡などで直接観察することが必要だと考えられる。

Co-precipitation of GroEL protein with FtsZ polymer



FtsZ	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
GroEL	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
BSA	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
GTP	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
			(post)		(pre)							

Fig.4-1 GroELとFtsZの直接的結合を超遠心を用いて確かめた。FtsZポリマーと共にGroELの共沈がみられた。BSAは共沈が見られなかった。postはGTP添加後にGroELを加えたもの、preはGTP添加前にGroELを加えたもの。

Microscopic observation of co-localization of GroEL protein with FtsZ polymer

FtsZ-FITC+GroEL-Rhodamine+GTP
on the slide glass



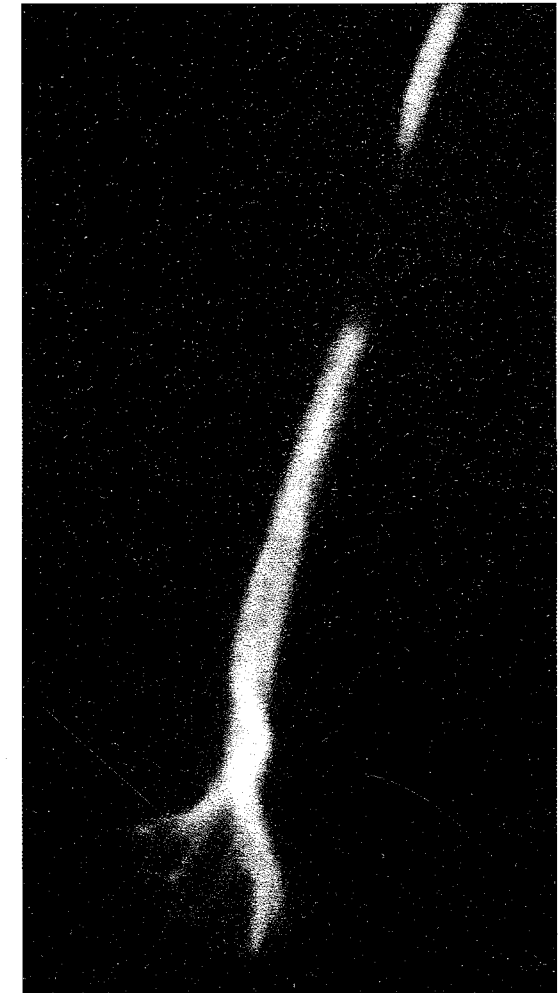
37°C 30min incubation



Observation by microscope



FtsZ-FITC



GroEL-Rhodamine

Fig.4-2 GroEL-Rhodamine存在下でFtsZ-FITCをスライドグラス上で重合させ、蛍光顕微鏡で観察した。細胞の間接免疫蛍光染色で観察されたようにGroELとFtsZの共局在が観察された。

GroEL protein doesn't inhibit to FtsZ's GTPase activity

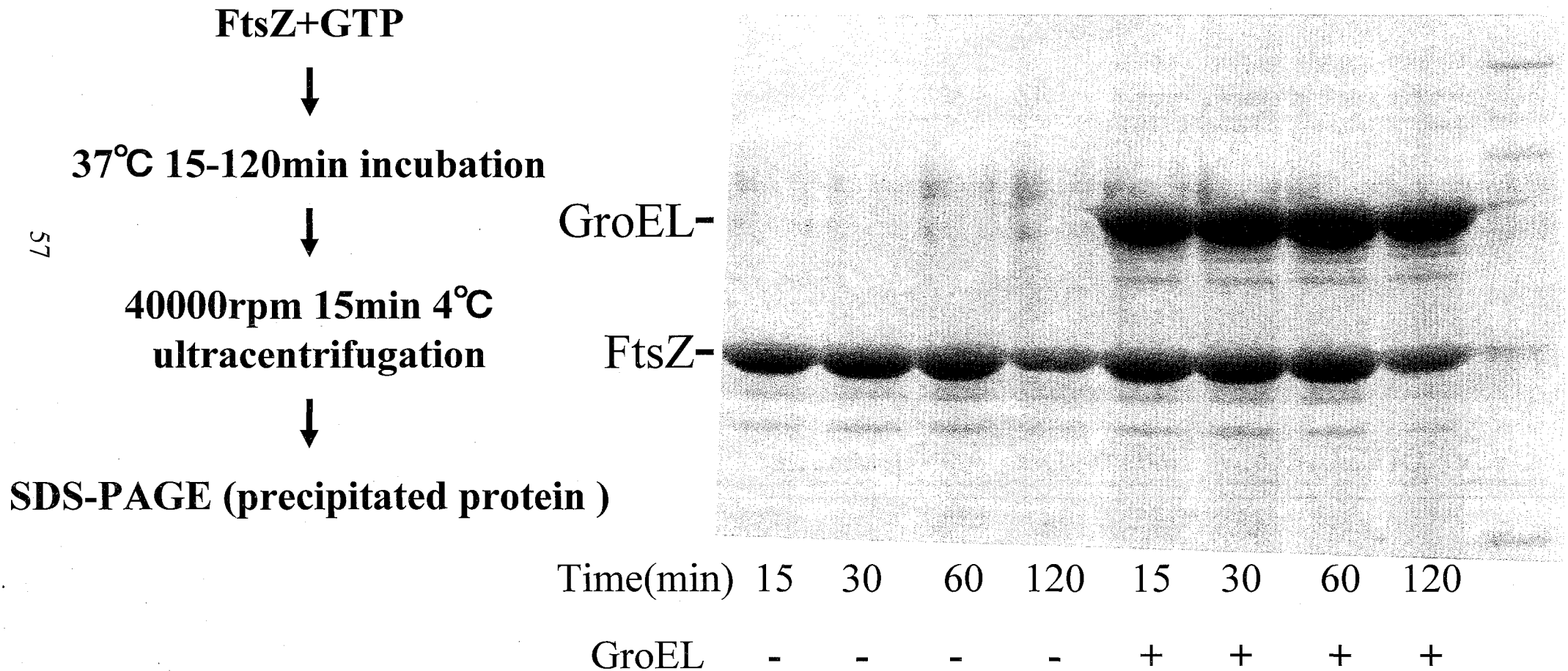
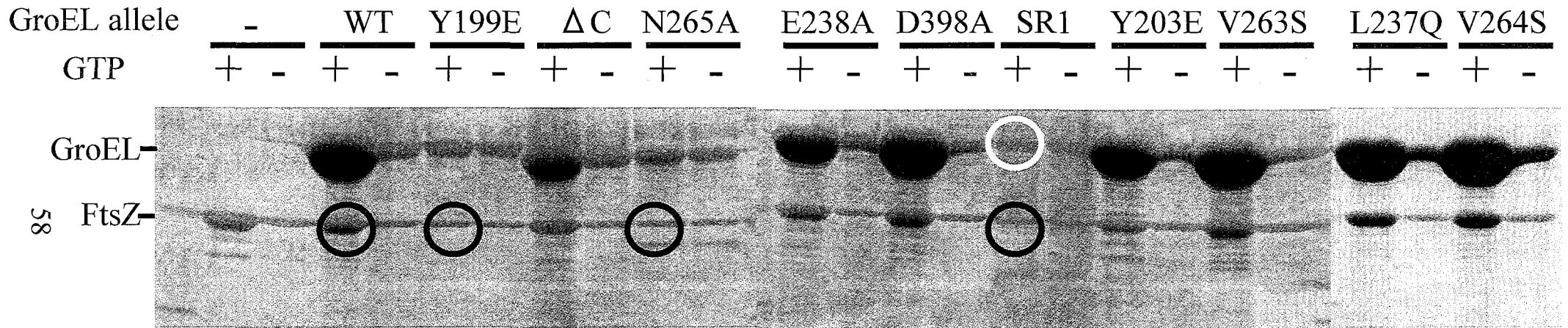


Fig.4-3 GroEL共存在下でのFtsZの安定性を確かめた。FtsZ単独の場合は60分をピークにして、その後FtsZポリマーの減少が見られた。GroEL共存在下でも同様の傾向が見られた。TimeはGTP添加後の時間を示す。

Mutant-type GroEL proteins, Y199E, N265A and SR1 seemed to inhibit FtsZ-polymerization



	<u>WT</u>	<u>Y199E</u>	<u>ΔC</u>	<u>N265A</u>	<u>E238A</u>	<u>D398A</u>	<u>SR1</u>	<u>Y203E</u>	<u>V263S</u>	<u>L237Q</u>	<u>V264S</u>
peptide binding	+	weak	+	strong	+	+	+	weak	+	-	+
GroES binding	+	weak	+	-	slow	+	+	weak	+	-	+

Fig.4-4 変異型GroELとFtsZの共沈実験を行った。GroEL^{Y199E}・GroEL^{N265A}・GroEL^{SR1}存在下でFtsZポリマーの減少が見られた(赤丸)。しかし、GroEL^{Y199E}・GroEL^{N265A}・GroEL^{SR1}のペプチド結合能・GroES結合能に共通した性質は見られなかった。

Complementation of *groEL44(ts)* mutation by mutant-type GroEL

59

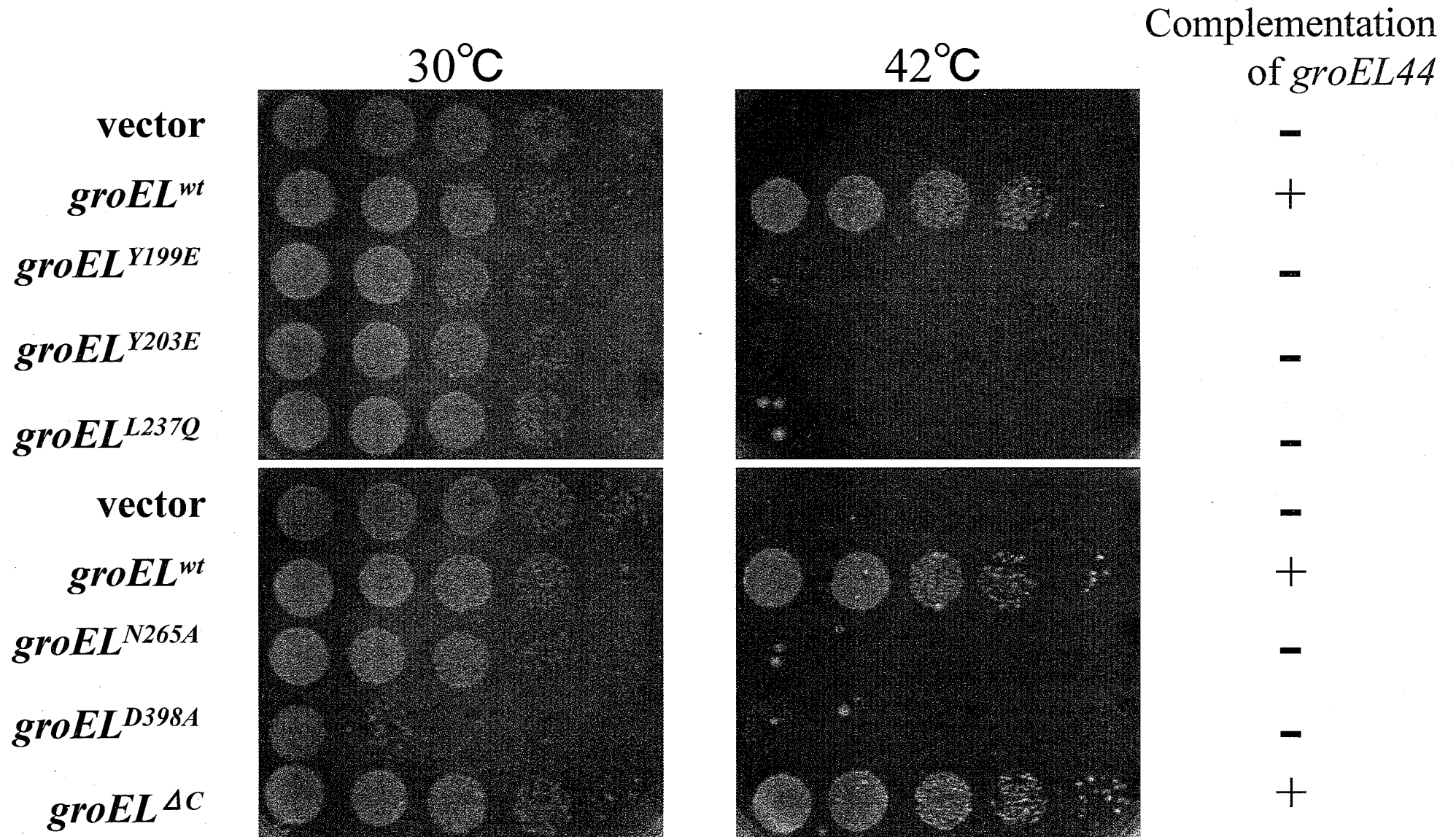
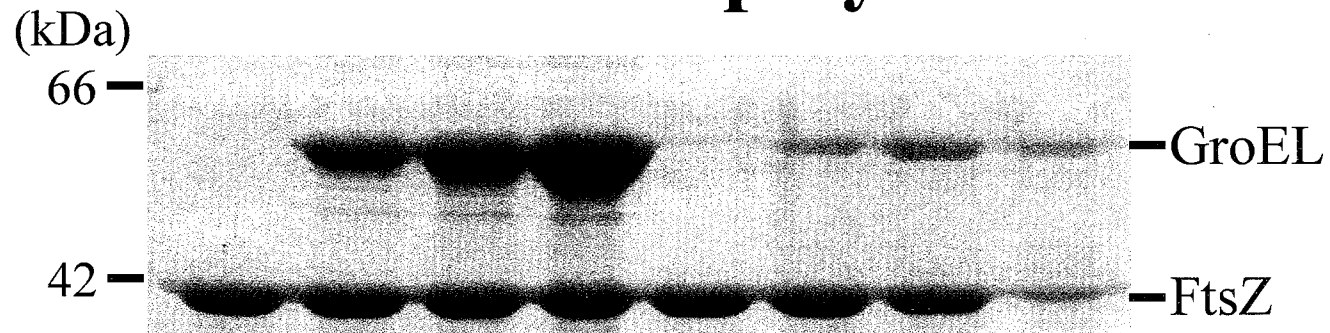


Fig.4-5 *groEL*変異型遺伝子で*groEL44*の温度感受性を抑制するかを試験した。*groEL^{ΔC}*のみ温度感受性を抑制した。

Dose-dependent inhibition of FtsZ-polymerization by SR1



	1	2	3	4	5	6	7	8
FtsZ(final 10μM)	+	+	+	+	+	+	+	+
GroEL ^{wt} (μM)	-	5	10	20	-	-	-	-
GroEL ^{SR1} (μM)	-	-	-	-	-	5	10	20

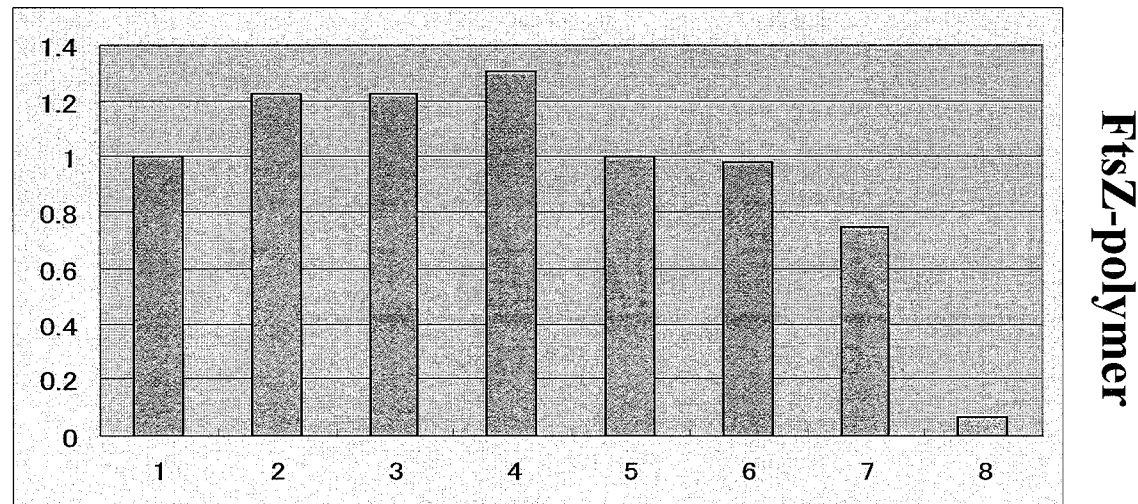


Fig.4-6 GroEL^{SR1}が濃度依存的にFtsZの重合阻害を起こすか確かめた。GroEL^{WT}では添加によりFtsZポリマーの量が若干増加した。GroEL^{SR1}では濃度依存的にFtsZポリマーの量が減少していった。

Effect of GroES on FtsZ/GroEL complex

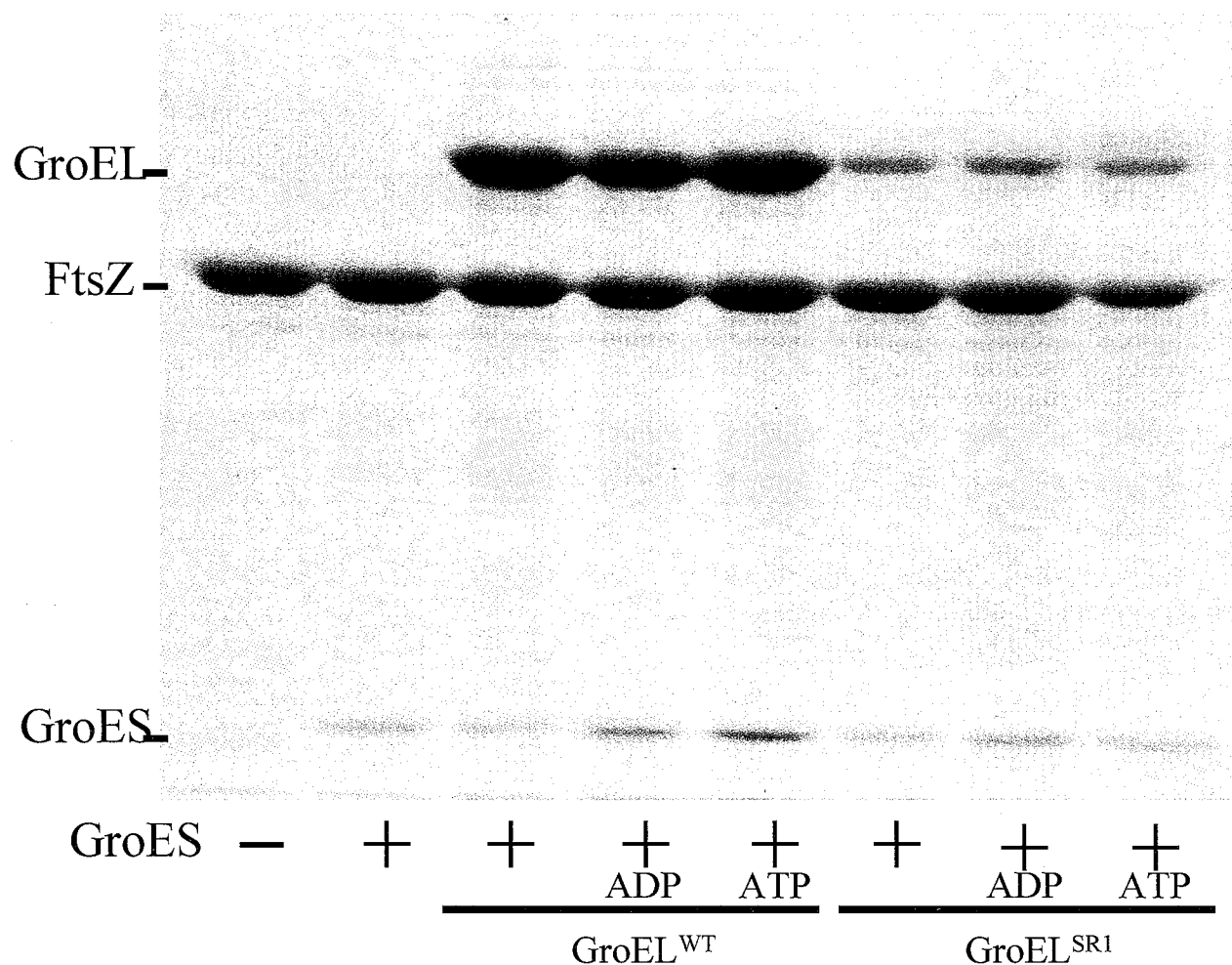
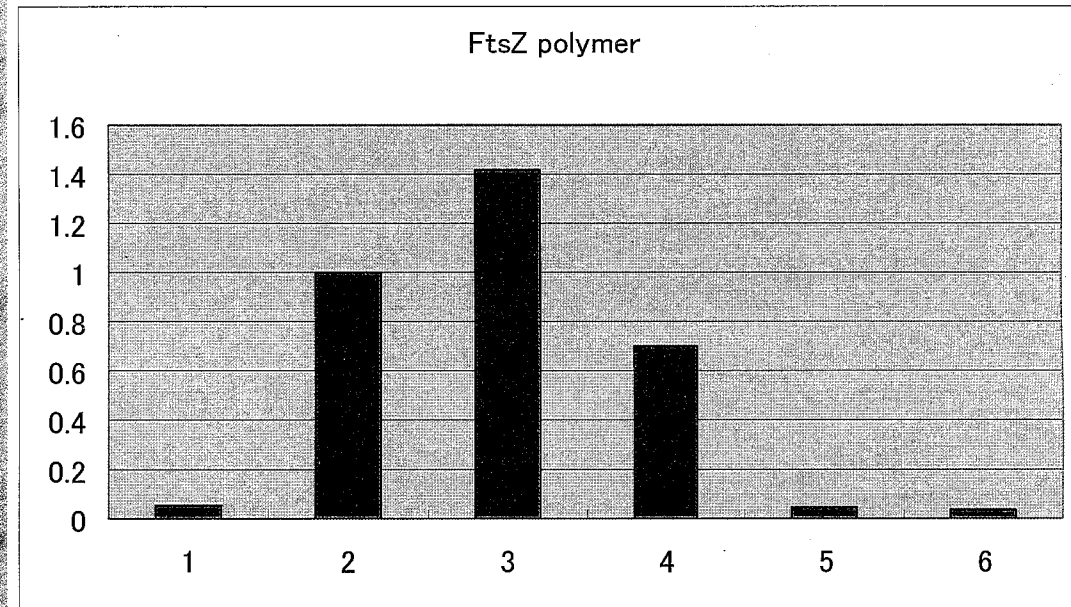
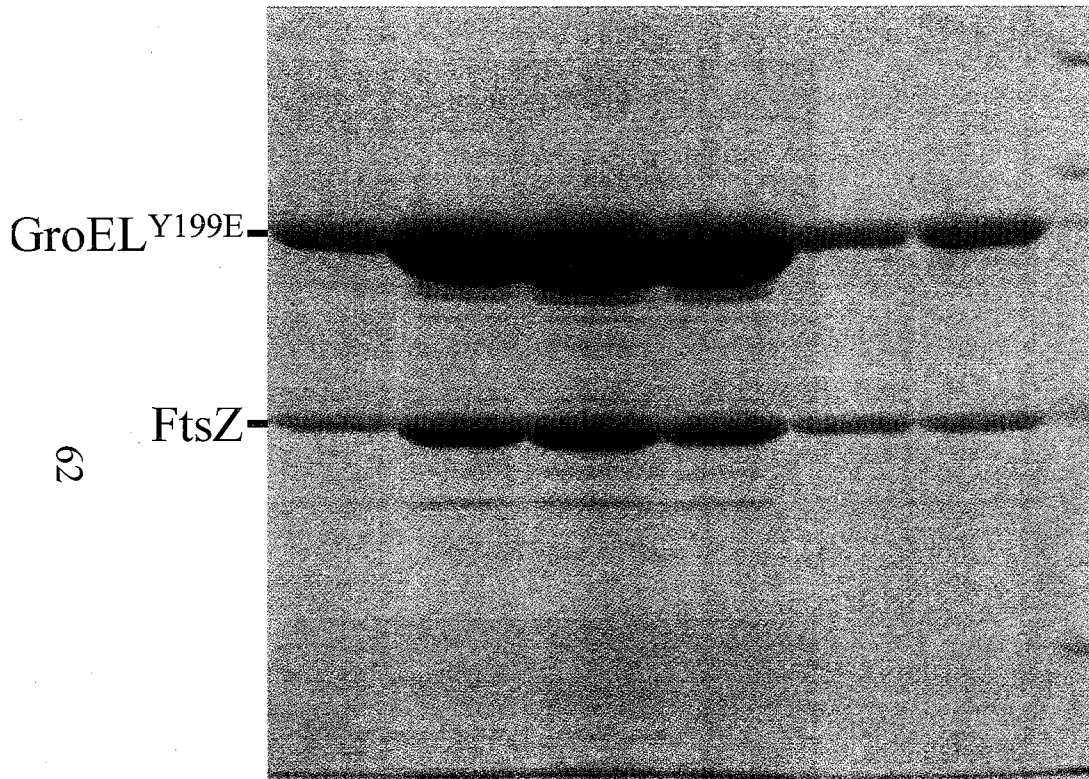


Fig.4-7 GroES共存下でFtsZとGroELの共沈実験を行った。GroEL^{WT}-GroES-ADPで若干GroEL^{WT}の共沈量が低下した。GroEL^{SR1}-GroES, GroEL^{SR1}-GroES-ADPではFtsZの重合阻害が解除された。

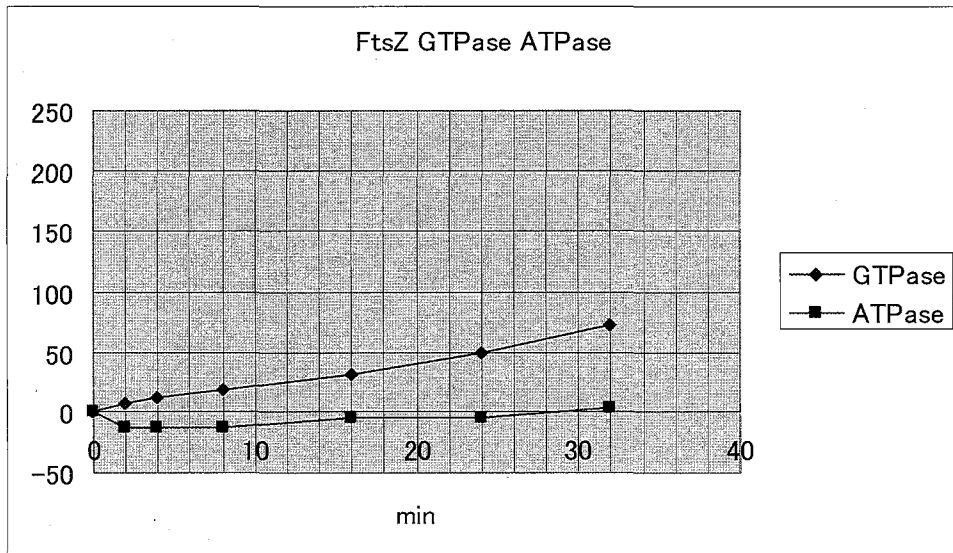
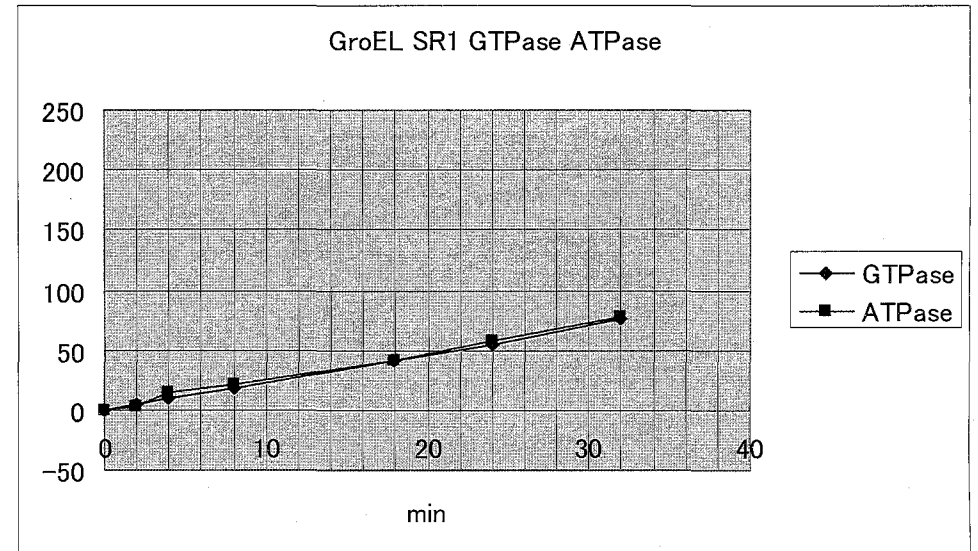
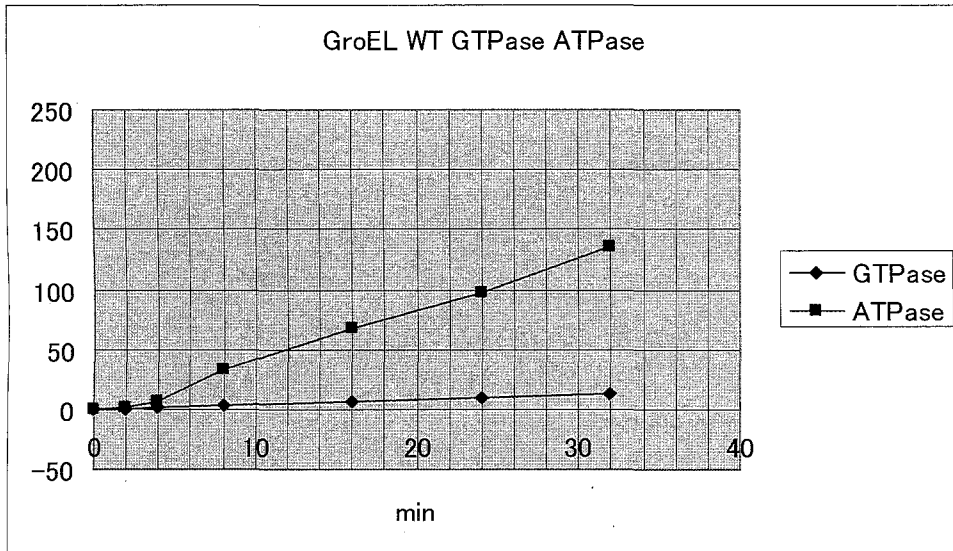
Acceleration of de-polymerization of FtsZ by GroEL^{Y199E}



	1	2	3	4	5	6
GTP	—	+	+	+	+	+
min		0	1	5	10	20

Fig.4-8 FtsZの重合阻害が見られたGroEL^{Y199E}を用いてFtsZ重合量の経時変化を追った。GroEL^{Y199E}存在下でも重合開始0、1、5分後はFtsZの重合が見られた。その後、急激なFtsZの脱重合が見られた。

GTPase activity of GroEL wild-type, GroEL SR1, or FtsZ



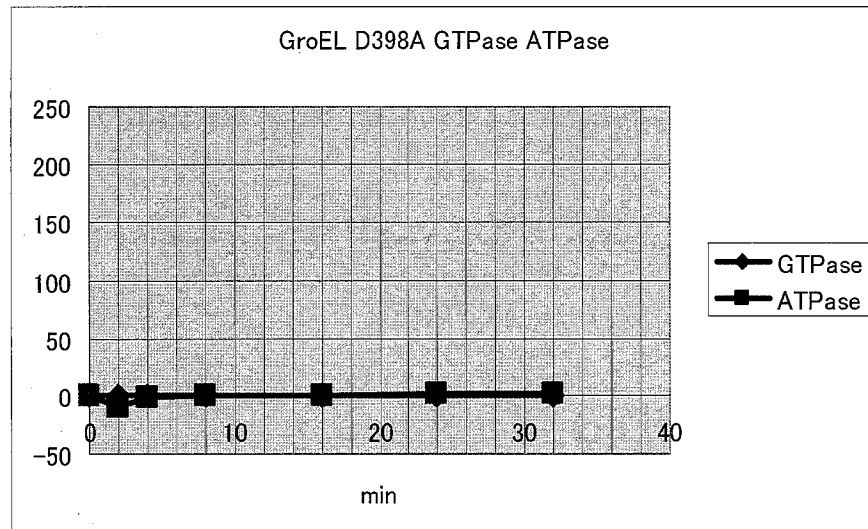
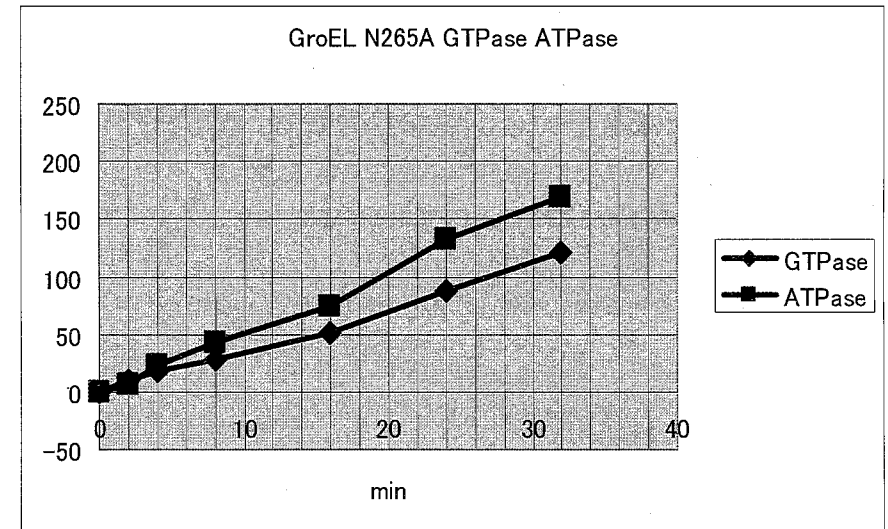
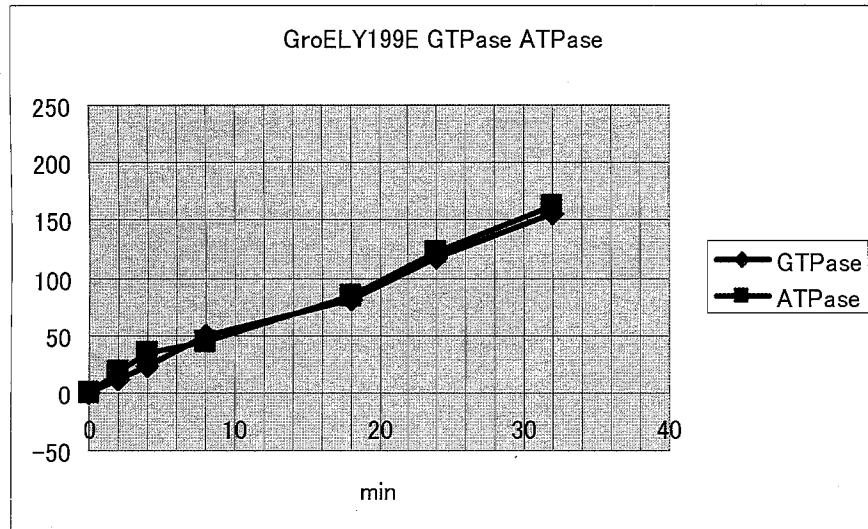
X: Time (min) Y: GTPase or ATPase (μM)

GTP: 1mM ATP: 1mM

GroEL: 1μM FtsZ: 10μM

Fig.4-9A 野生型GroEL、変異型GroEL、FtsZのGTPase活性およびATPase活性を測定した。野生型GroELはATPase活性を有していたがGTPase活性はなかった。変異型GroELはATPase活性に匹敵するGTPase活性を有していた。

GTPase activity of GroEL^{Y199E}, GroEL^{N265A}, or GroEL^{D398A}



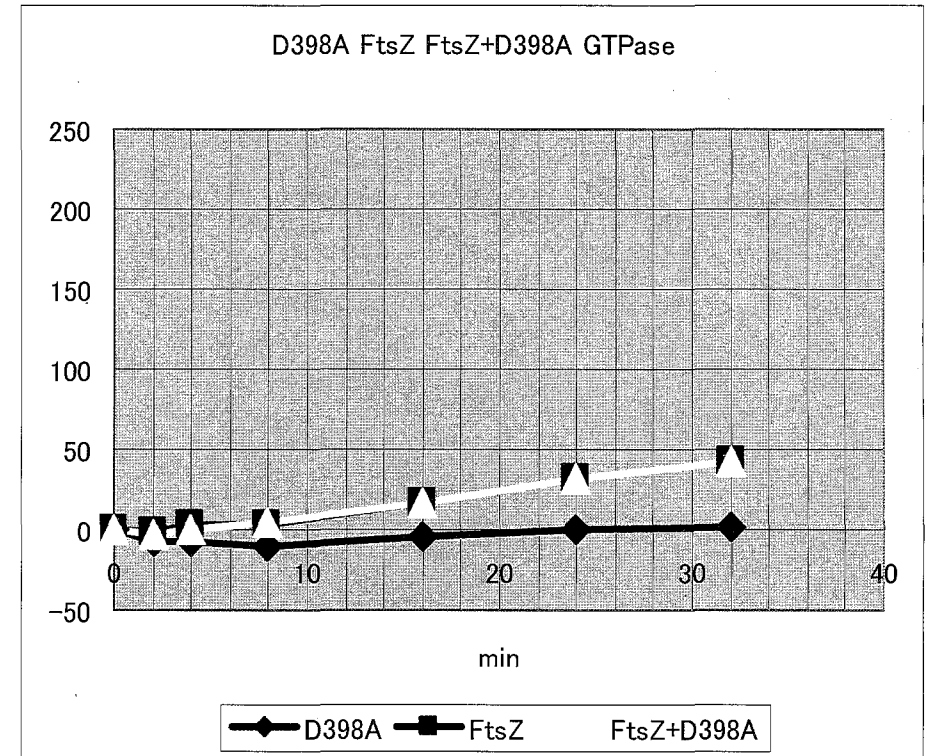
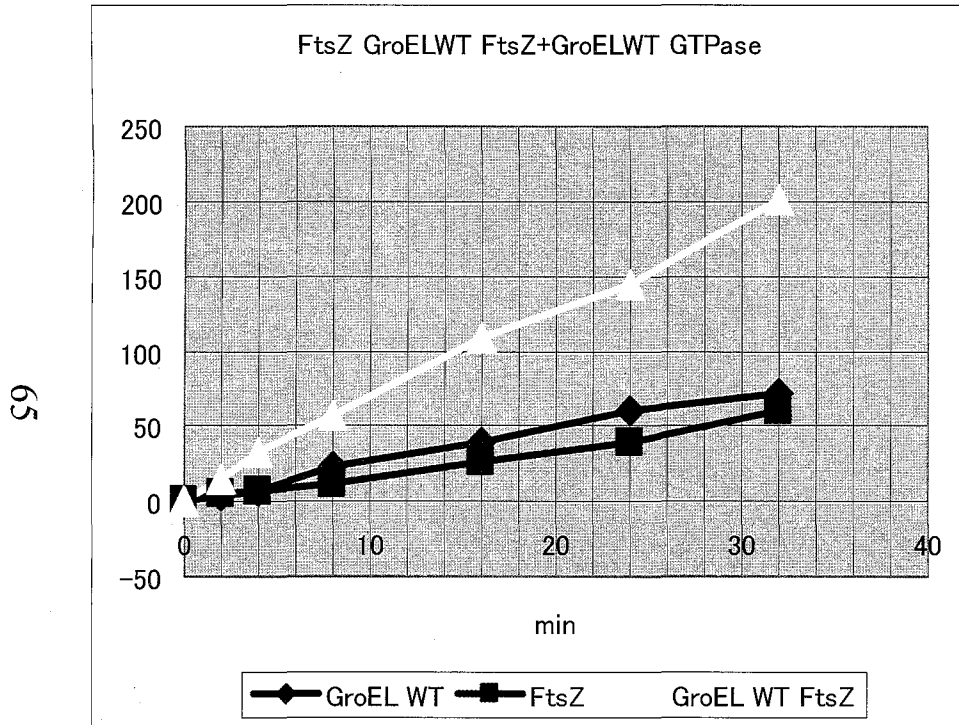
X: Time (min) Y: GTPase or ATPase (μM)

GTP: 1mM ATP: 1mM

GroEL: 1μM FtsZ: 10μM

Fig.4-9B 変異型GroEL^{Y199E/N265A/D398A}、FtsZのGTPase活性およびATPase活性を測定した。変異型GroEL^{Y199E/N265A}はATPase活性に匹敵するGTPase活性を有していた。変異型GroEL^{D398A}はATPase/GTPase活性共に示さなかった。

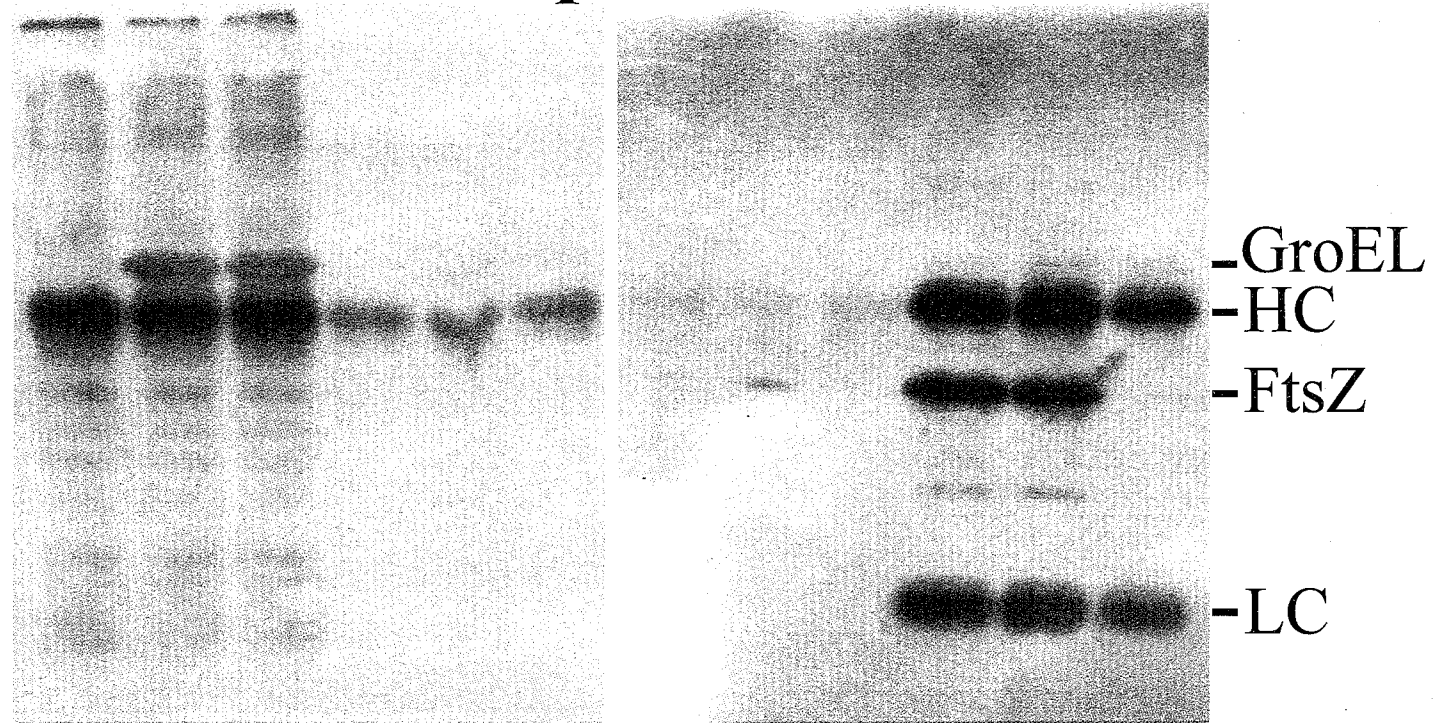
GTPase activity of FtsZ plus GroEL^{WT/D398A}



X: Time (min) Y: GTPase (μM) GTP: 1mM GroEL: 10 μM FtsZ: 10 μM

Fig.4-9C FtsZに野生型GroELまたは変異型GroEL^{D398A}を加えてGTPase活性を測定した。共に、GTPase活性は相加的であった。

Co-immunoprecipitation assays of GroEL protein and FtsZ monomer



FtsZ	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
GroEL	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
IP	anti-GroEL			anti-FtsZ			anti-GroEL			anti-FtsZ		
Western	anti-GroEL						anti-FtsZ					

HC=イムノグロブリン重鎖
LC=イムノグロブリン軽鎖

Fig.4-10 GroELとFtsZモノマーとの結合を確かめるため免疫沈降実験を行った。GroELとFtsZそれぞれを用いて免疫沈降を行ったが、FtsZモノマーとGroELの顕著な結合は見られなかった。

GroEL seemed to bind preferentially to FtsZ-dimer

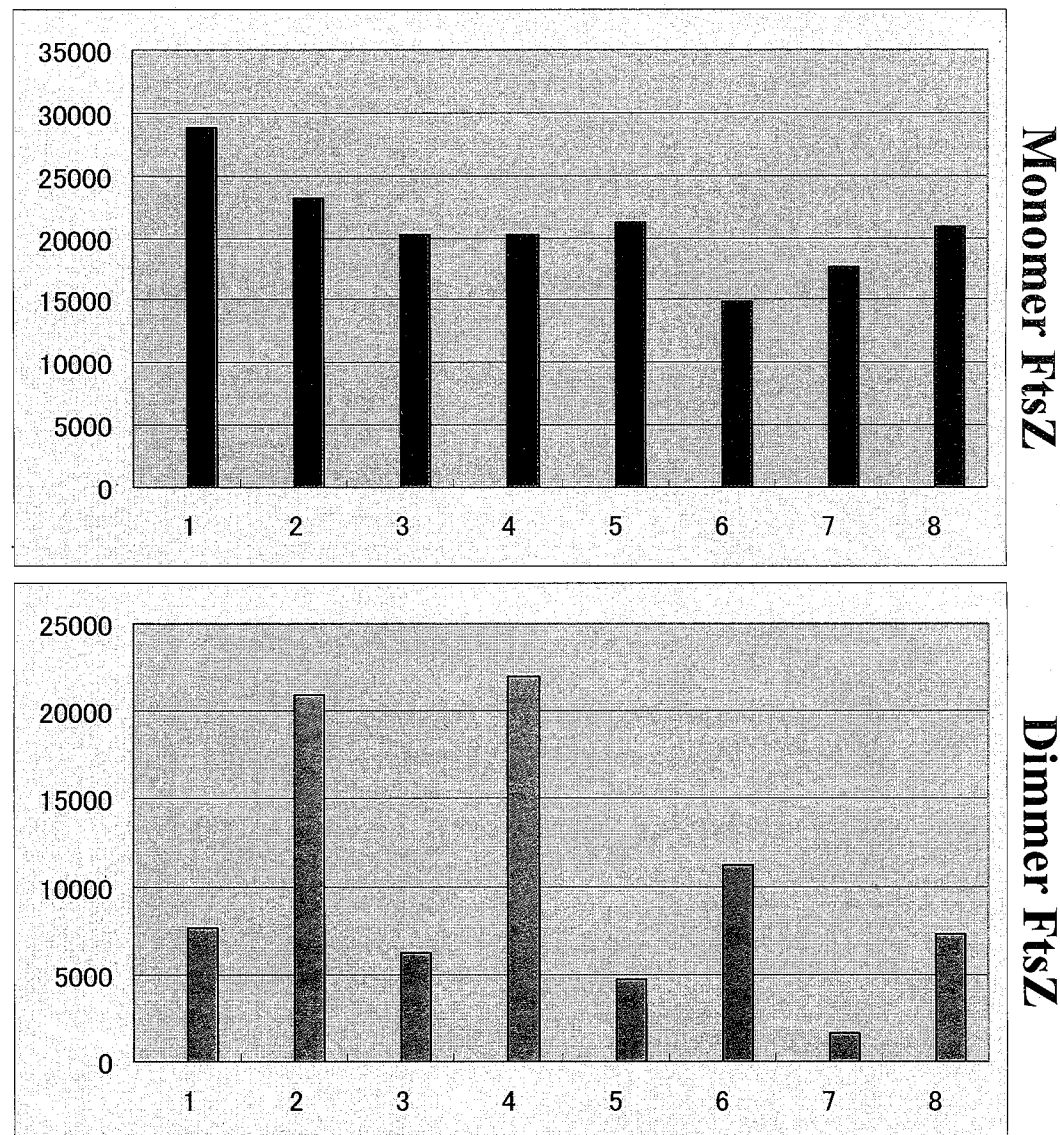
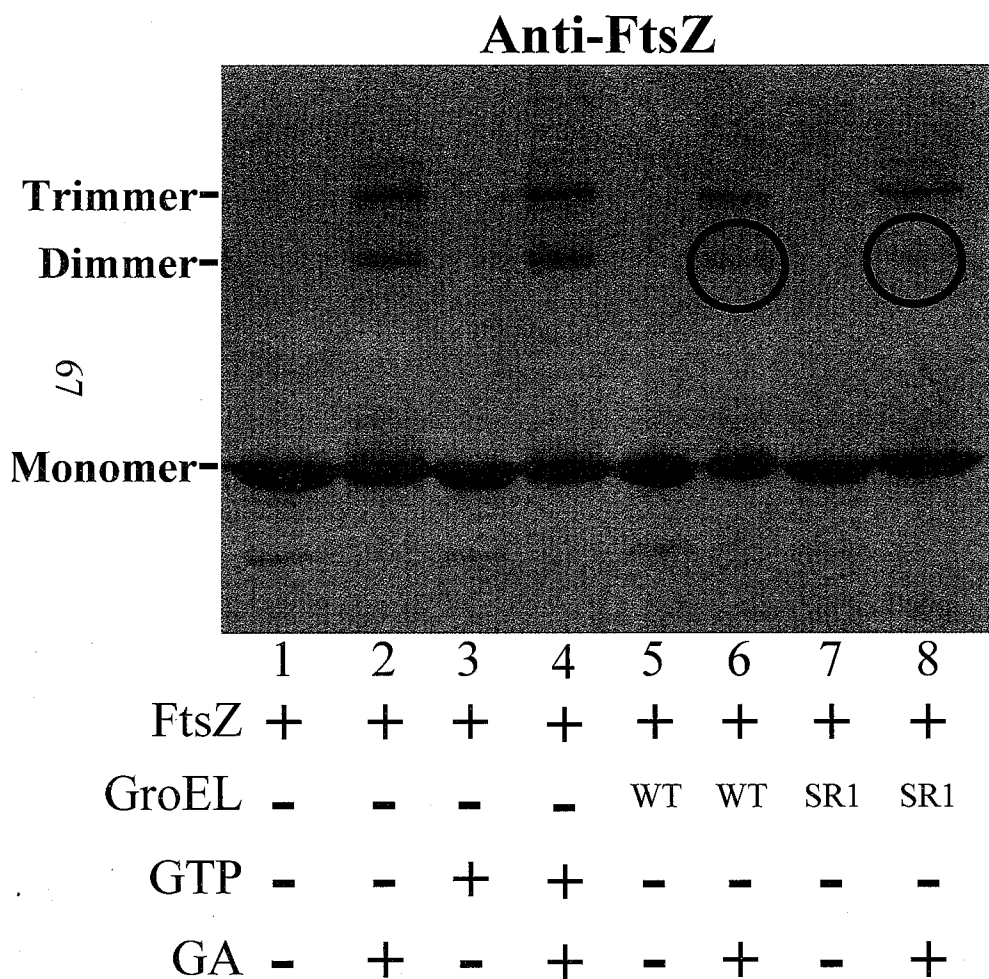


Fig.4-11 GroELとFtsZモノマーとの結合を確かめるため化学架橋法を用いた。グルタルアルデヒド架橋により重合前(-GTP)でもFtsZのダイマー、トリマーが認められた。GroEL^{WT/SR1}存在下で架橋したところ、FtsZダイマーのバンドが顕著に減少した(赤丸)。

Effect of C-terminal truncation of FtsZ on GroEL binding

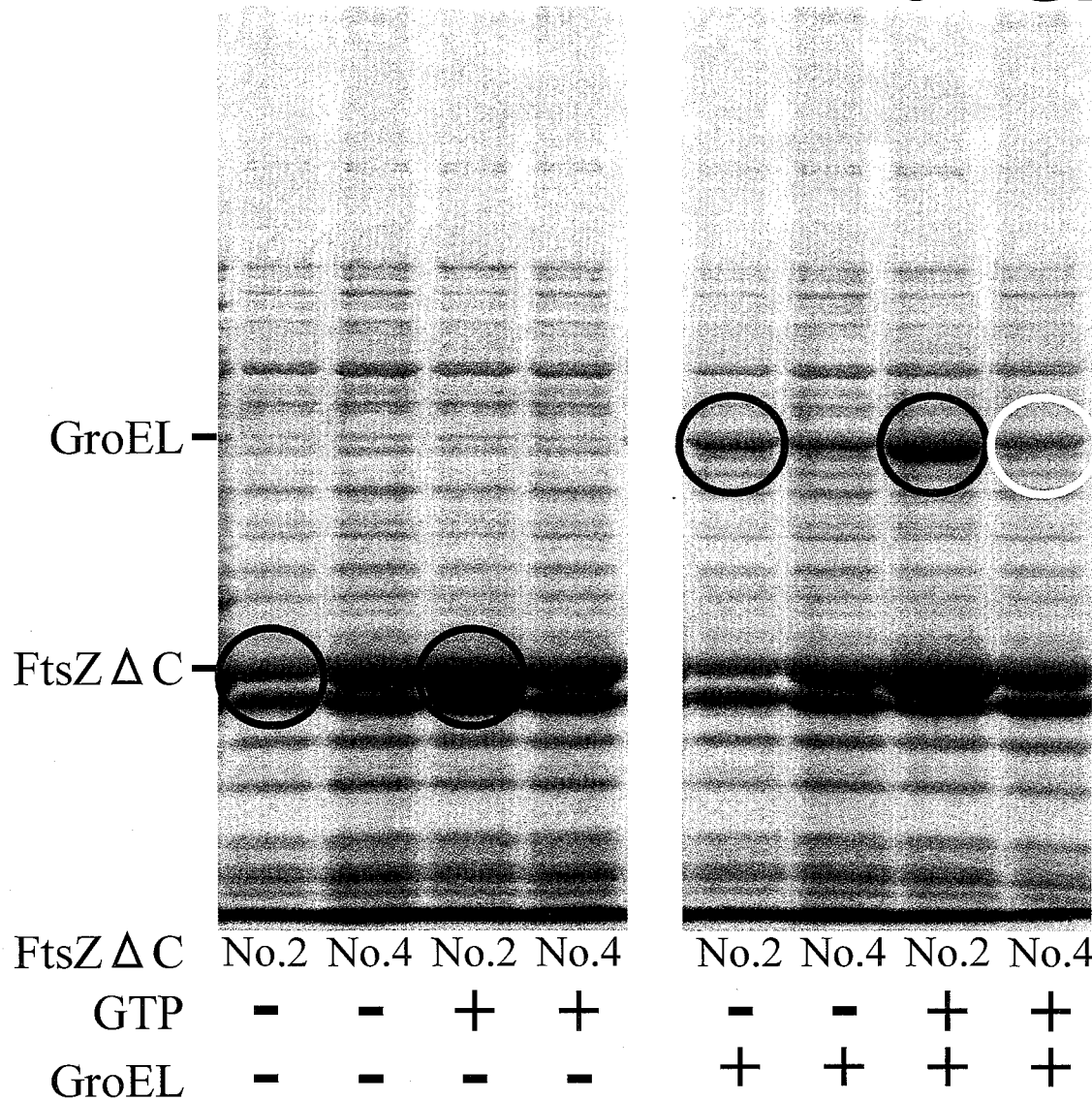


Fig.4-12 FtsZ Δ CとGroELの結合を確かめた。FtsZ Δ C No.2はGTP依存的に重合し(赤丸)、GroELとの結合も見られた(赤丸)。一方、FtsZ Δ C No.4はGTP非依存的な重合が見られ、GroELとの結合も見られなかった(黄丸)。実験にはFtsZ Δ Cを発現させた細胞のライゼートを用いた。

Spiral FtsZ formation by *ftsZ* $\Delta C-4$ mutant cell

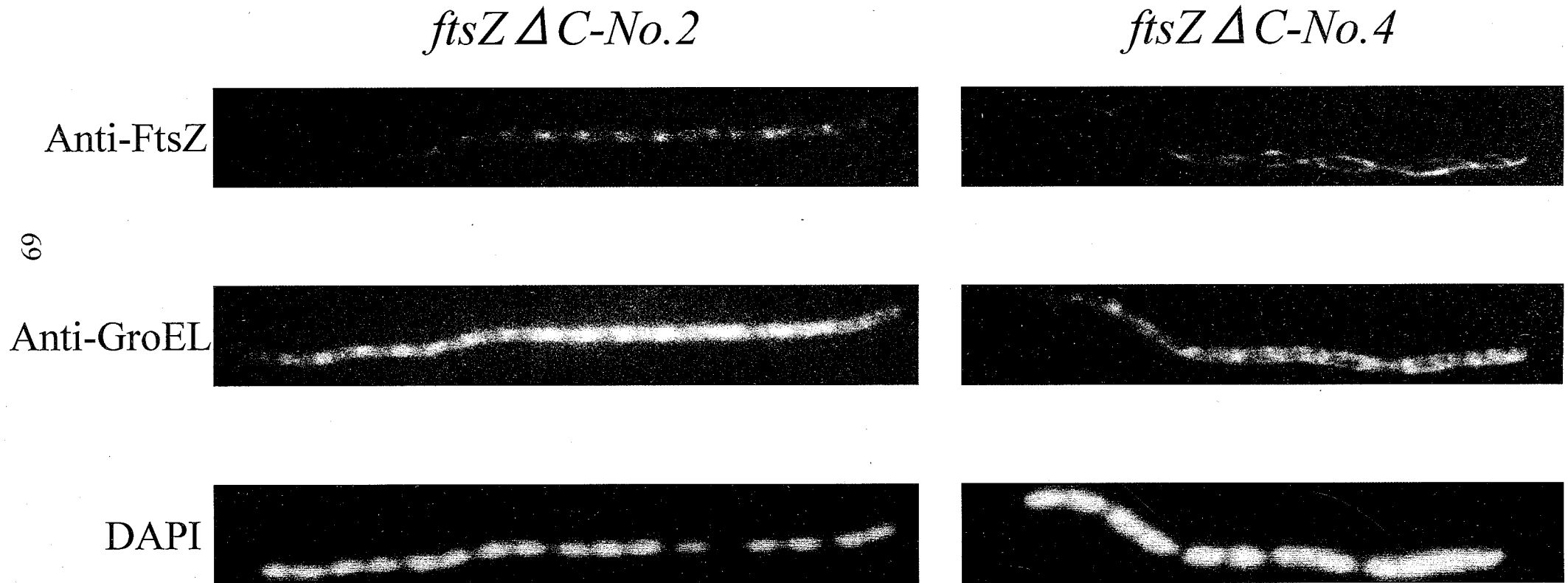


Fig.4-13 GroELとの結合が見られなかったFtsZ ΔC No.2およびNo.4の細胞内局在を間接免疫蛍光染色法で観察した。*ftsZ* ΔC No.2は核間にFtsZの局在が見られた。GroELも核間に局在が見られた。核分配は正常であった。一方、*ftsZ* ΔC No.4は細胞全体に渡り二本の螺旋状のFtsZ像が観察された。GroELは弱い局在が核間に見られた。核の分配は正常であった。

3D structure of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ

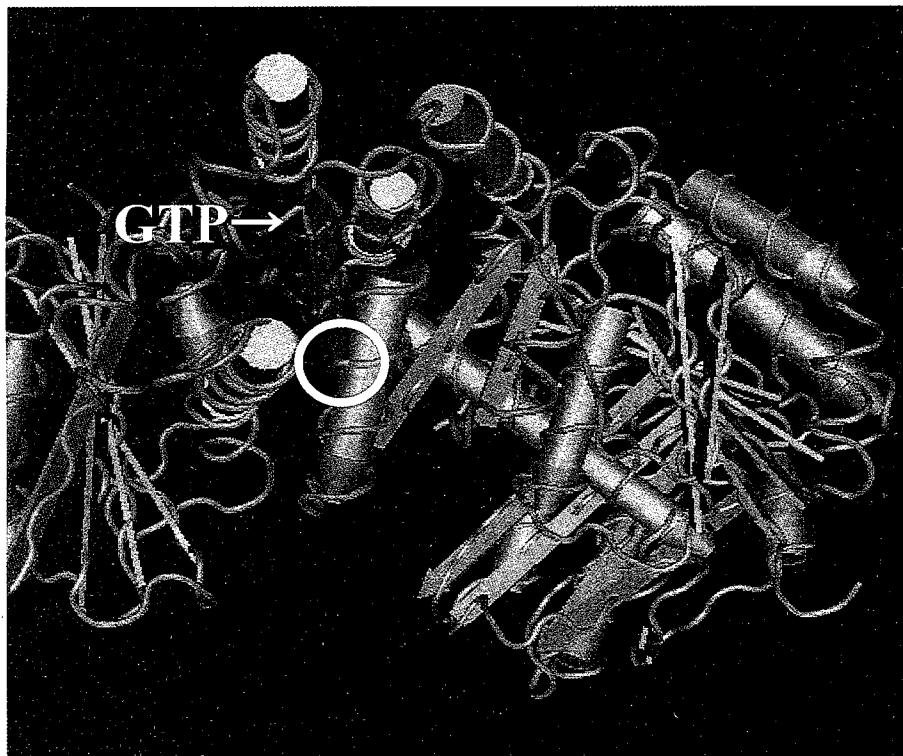
E.coli A25V

		**		*****	*	*****	**	*										
1	Escherichia	M	F	L	N	-----				H	R	R						
2	Mycobacterium	R	F	P	S	S	T	T	P	P	L		W		N	R		

E.coli V208A

		*****	*	***	*	*****	*	**	*	*	*	*	*								
1	Escherichia	K	A	Q	A		T	R	P	L	I	S	G	Y	S	S	W	S			
2	Mycobacterium	L	N	Q	L	T	D	T	T	F									I	S	R

70

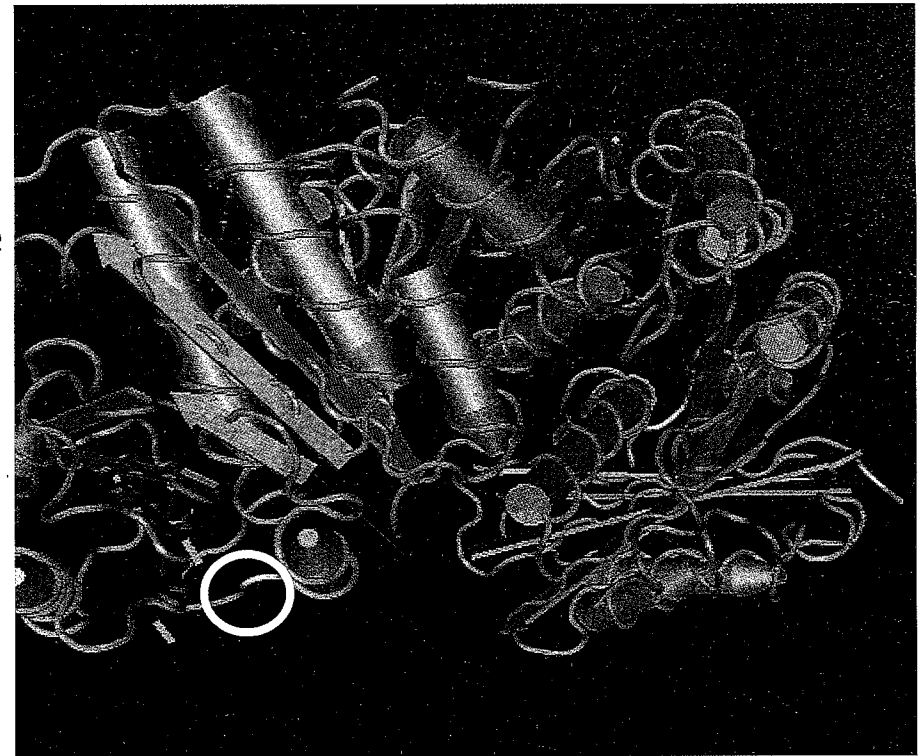


A25(Mutant:A25V)

rotate



180°

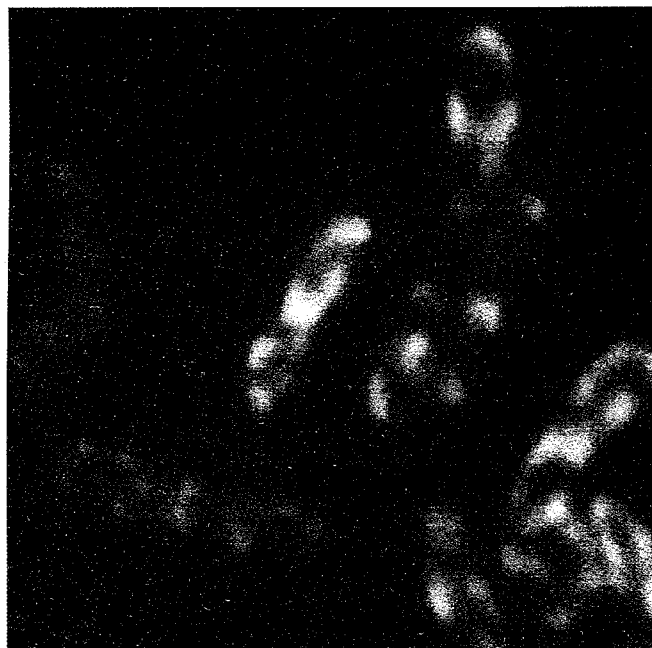


V208(Mutant:V208A)

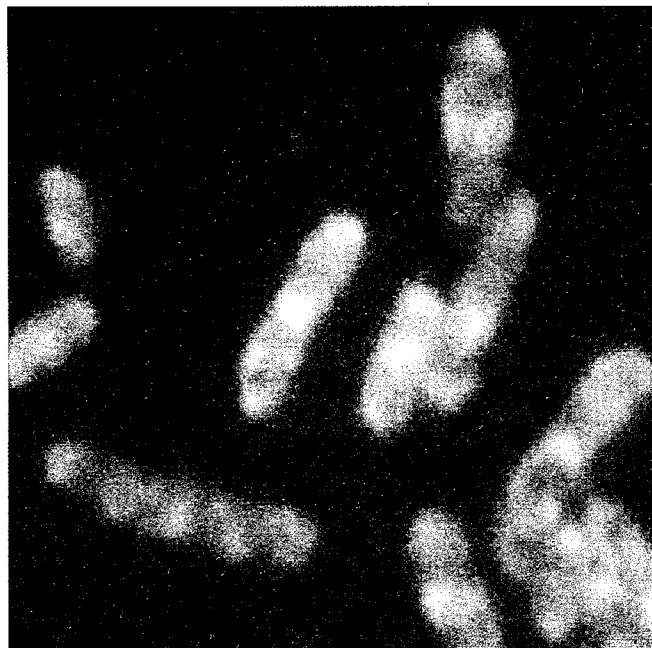
Fig.4-14 *Mycobacterium tuberculosis* FtsZと*Escherichia coli* FtsZの構造は相同性が高い。*Mycobacterium tuberculosis* FtsZの一次配列と立体構造にFtsZ Δ C No.4 (*Escherichia coli*)の変異部分(赤四角および白丸)を対応させた。

Spiral FtsZ formation by *ftsZ*^{A25V,V208A} mutant cell

anti-FtsZ



anti-GroEL



DAPI



71

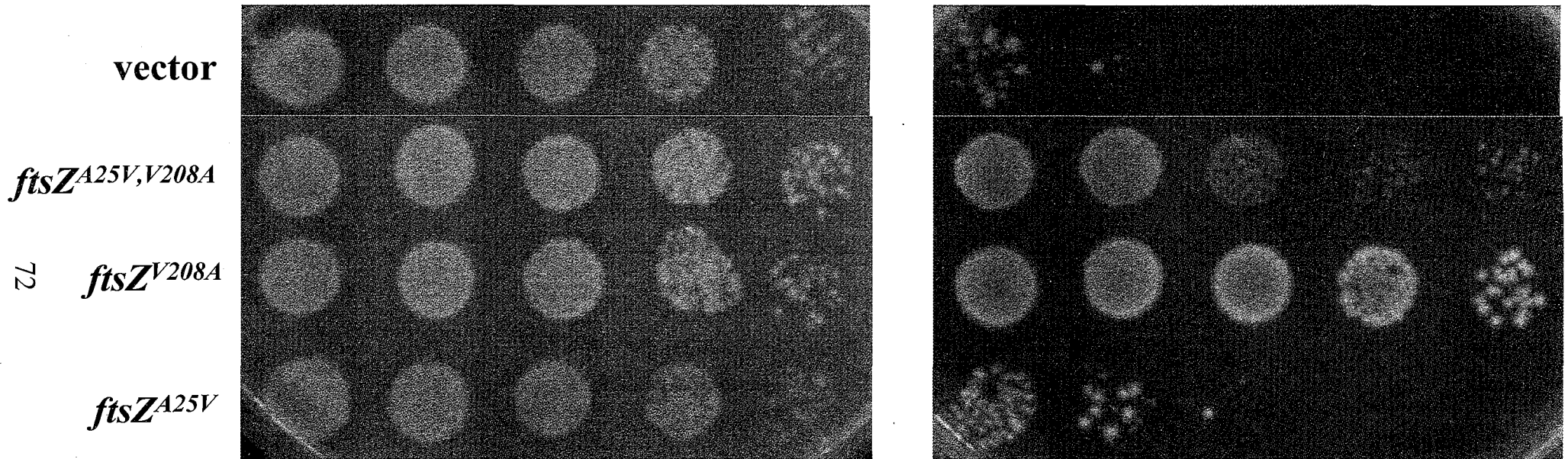
Fig.4-15 *ftsZ* $\Delta C-4$ (*ftsZ*^{A25V,V208A, ΔC}) に *ftsZ*^{WT} の C 末端を補った *ftsZ*^{A25V,V208A} を構築した。FtsZ および GroEL の細胞内局在を間接免疫蛍光染色法により観察した。核を取り囲むように螺旋状の FtsZ の像が観察された。

Suppression of temperature sensitivity of *ftsZ84* by *ftsZ^{A25V,V208A}* or *ftsZ^{V208A}*

JEFZ1(DE3)/
pLysS

30°C

42°C



L Chloramphenicol Kanamycin plate

Fig.4-16 *ftsZ84*変異を持つ温度感受性変異株JEFZ1(DE3)に*ftsZ^{A25V,V208A}*、*ftsZ^{V208A}*、*ftsZ^{A25V}*を導入し温度感受性の抑制が見られるか試験した。その結果、*ftsZ^{V208A}*を導入したもので強い抑制が見られた。対して*ftsZ^{A25V}*を導入したものでは抑制が見られなかった。2つの変異を併せ持つ*ftsZ^{A25V,V208A}*では弱いながらも抑制が見られた。*ftsZ*のA25V変異にV208A変異が加わることで構造が変化し、機能を補えるFtsZになっていると考えられた。

Characterization of FtsZ mutants

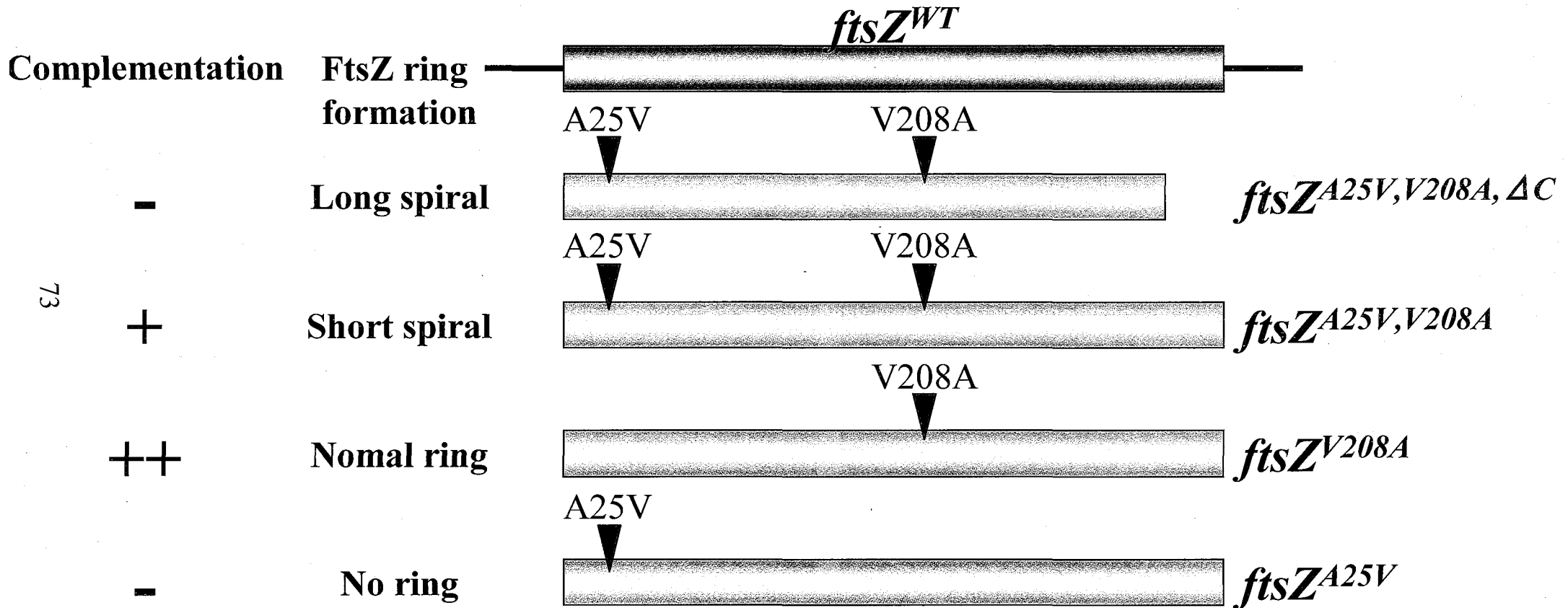


Fig.4-17 螺旋状FtsZ ringを形成する*ftsZ* ΔC-4 (*ftsZ*^{A25V, V208A, ΔC})から変異を分離した。その結果、二つの変異点を持つ*ftsZ*^{A25V, V208A}のみ螺旋状のFtsZ ringを形成した。A25V変異を持つものは単独では重合出来ないことが示唆された。V208A変異を持つものはやや細いが細胞分裂面に正常なFtsZ ringを形成していた。

3D structure of *Escherichia coli* FtsZ

FtsZ^{WT}

FtsZ^{A25V,V208A}

FtsZ^{WT}

FtsZ^{A25V,V208A}

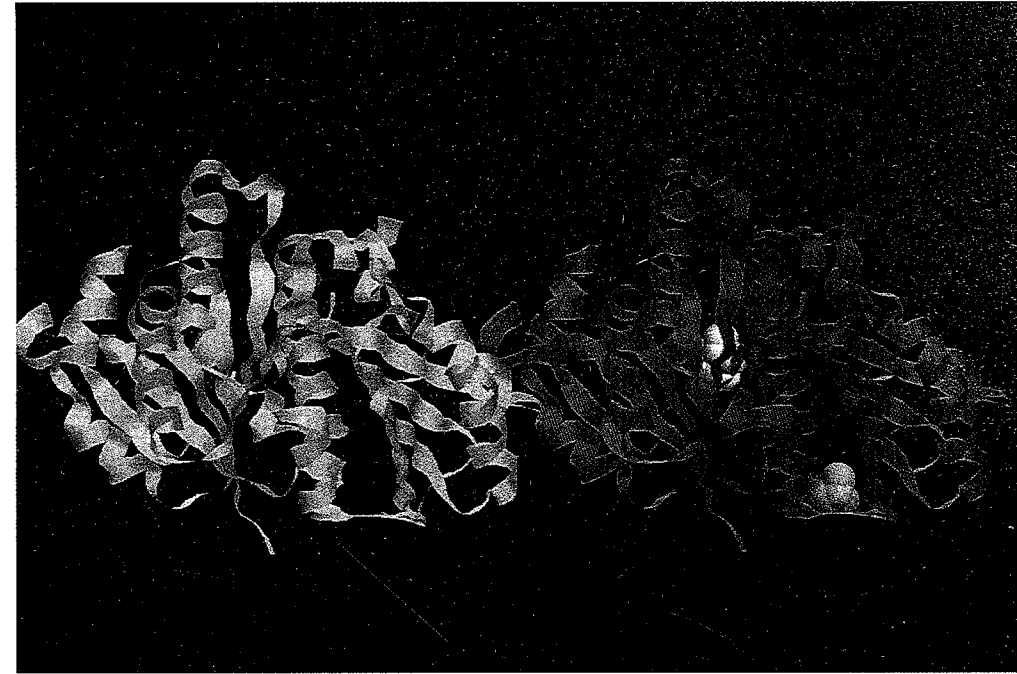
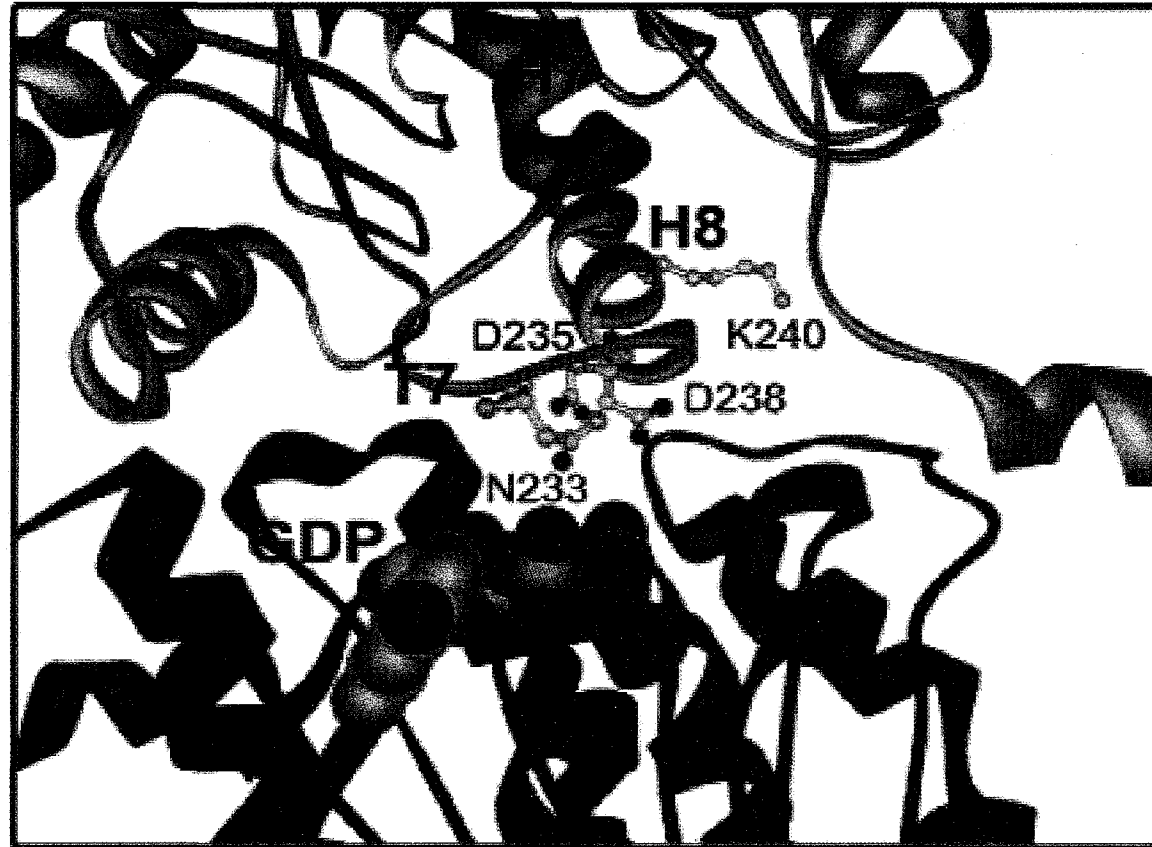


Fig.4-18 RasMolにより $ftsZ^{WT}$ と $ftsZ^{A25V,V208A}$ の構造比較を行った。A25VによりGTPポケットが塞がれていた。V208AによりT7ループ上の分子の形が若干変化していた。A25Vの変異によりGTPとの結合が起こりにくくなり重合能が失われたと考えられた。V208A変異との二重変異によりGTP非依存的な重合が起き、重合にズレが生じ螺旋状のFtsZポリマーを形成したと考えられた。

GTP hydrolysis is activated by T7 loop of another FtsZ



Biochemistry 2002, 41, 521–529

GTP Hydrolysis of Cell Division Protein FtsZ: Evidence that the Active Site Is Formed by the Association of Monomers[†]

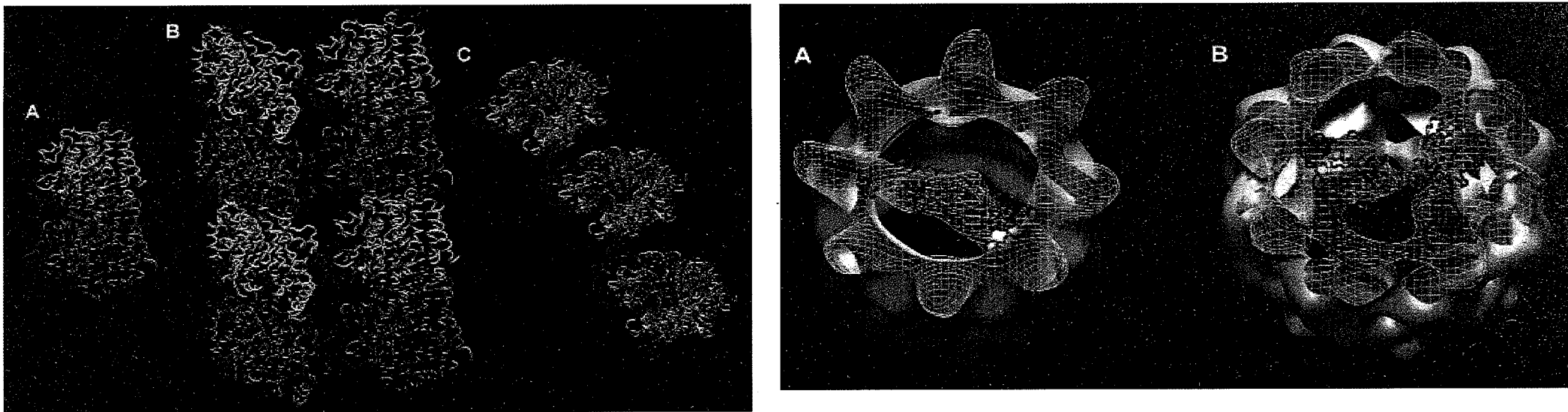
Dirk-Jan Scheffers,^{‡#} Janny G. de Wit,[‡] Tanneke den Blaauwen,[§] and Arnold J. M. Driessen^{*‡}

Department of Microbiology, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University of Groningen, Kerklaan 30, 9751 NN Haren, The Netherlands, and Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, Kruislaan 316, 1098 SM, Amsterdam, The Netherlands

Fig.4-19 FtsZのT7ループは隣のFtsZのGTP結合部位に作用し、隣のFtsZのGTPase活性を活性化する。

Polymer formation of Tubulin

Interaction between CCT and Actin or Tubulin



76

Journal of Structural Biology 135, 205–218 (2001)

Analysis of the Interaction between the Eukaryotic Chaperonin CCT
and Its Substrates Actin and Tubulin

Oscar Llorca,* Jaime Martín-Benito,† Párrilo Gómez-Puertas,‡ Monica Ritco-Varsovici,*
Keith R. Willison,* José L. Carrascosa,† and José M. Valpuesta†¹

Fig.4-20 真核生物が持つⅡ型シャペロニンCCTは、新生Tubulinのコンフォメーションを成熟型に正す。赤い部分はTubulinのCCT結合部位である。

Model of GroEL binding to FtsZ

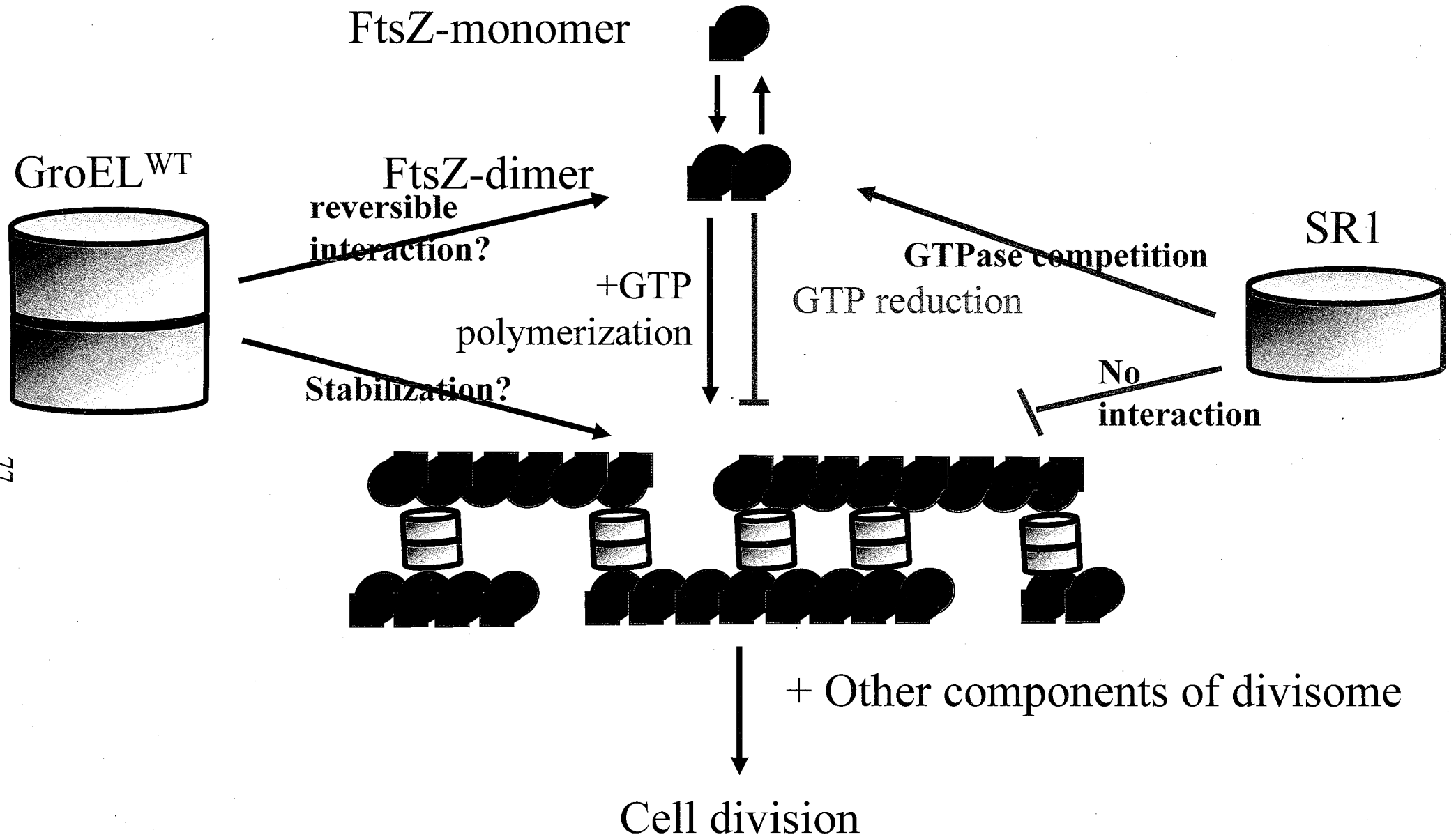


Fig.4-21 GroELとFtsZとの結合モデル。GroELはFtsZダイマーと結合しFtsZ重合の初期段階に関わると考えた。また、FtsZ重合後はGroEL2重リングがFtsZポリマー同士を繋ぎ束化を促進することでFtsZポリマーの安定化に寄与していると考えた。

第五章

groEL 温度感受性変異株の致死性を抑制する遺伝子の探索

緒言

遺伝子の変異または欠損が致死性を持つときには、致死性を抑制するマルチコピー・サプレッサーやサプレッサー・ミュータントを取得し関連遺伝子を調べる方法がある。例えば、先に挙げた Divisome に関わるタンパク質 ZipA は FtsZ (*ftsZ84*) 温度感受性変異株をマルチコピーで抑制することが知られている⁽³¹⁾。ZipA は FtsZ リングを安定化することで *ftsZ84* の致死性を抑制していると考えられている。また GroEL は *dnaA* の温度感受性をマルチコピーで抑制することが知られている。これは DnaA が GroEL の基質となっているためと考えられる。このように GroEL はシャペロンとしての基質の研究やリフォールディングの過程の研究など分子機械としての理解は大変深くなされている。しかし、常温でストレスのない環境でも生存に必須な理由は明らかではない。

本章では *groEL* の必須性および細胞分裂に関する役割を明らかにするため、*groEL* 温度感受性変異株の致死性を抑制する遺伝子の探索を行った。その結果、ショットガンクローニングより機能未知の遺伝子 *yncC* が得られた。相同性検索から *yncC* は、Gluconate 代謝遺伝子の発現を抑制する転写因子 GntR⁽⁴⁶⁾ と DNA 結合ドメインにおいて高い相同性があることが明らかとなった。その為、*yncC* 過剰発現株でマイクロアレイ解析を行ったところ、50 以上の遺伝子で 4 倍以上の発現変化が見られた。大幅な発現抑制が見られた遺伝子群の中には鞭毛形成遺伝子が多数存在した。鞭毛形成はストレス環境では抑制されることが知られている。ストレス応答・熱ショックタンパク質である GroEL と鞭毛形成との関係に興味を覚え、*yncC* の機能解析を行った。

実験方法と実験材料

<使用菌株と培地>

大腸菌 K-12 株、CG2241(*groEL44*)を *groEL* 温度感受性変異株として使用した (Fig.5-1)。FS1576 (*recD*)を相同組換え株として用いた。W3110 を野生株および *yncC* 欠損受容菌株として用いた。JM109 (*recA1 endA1 gryA96 thi hsdR17 supE44 relA1 Δ (lac-proAB) F'[traD36 proAB lac^fZ M15]*)をプラスミド調製用菌株として用いた。BL21(DE3)を *YncC-His*⁶ 発現株として用いた。

L 培地(1% Polypepton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 0.1% Glucose, pH7.0, 20μg/ml Thymine) を栄養培地として用いた。LB 培地(1% Polypepton, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl, pH7.0, 20μg/ml Thymine)を発現培地として使用した。

<使用プラスミドとプライマー>

pMW218 をショットガンクローニングベクターとして用いた。pN1 (4.8kb *EcoRI* fragment containing *yncC*, *yncD*, and *yncE* in pMW218)はショットガンクローニングにより得られた。pN3 (*EcoRI* fragment containing only *yncC* in pMW218)、pN4 (*EcoRI* fragment containing only *yncE* in pMW218)は、pN1 を適当な制限酵素で切り縮めて作製した。pXX557 はクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) 供与プラスミドとして使用した。pUC18、pUC18fxr (*yncC::cat* gene in pUC18)は遺伝子破壊株作製用ベクターとして使用した。pET28b、pETyH (*yncC-HisTag* gene in pET28b)をタンパク質発現用ベクターとして用いた。使用したプライマーは Table.5-1 に示した。

<ショットガンクローニング>

W3110 染色体を *EcoRI* (Takara Bio)で切断し、pMW218 マルチクローニングサイト内に存在する *EcoRI* サイトにライゲーションした。これを直接 CG2241 に形質転換した。

温度感受性抑制株は L-NaCl 15% sucrose プレート上で、42°Cでコロニーを形成した
ものから得た。そのうちの一つのプラスミドを pN3 とした。pN3 は pMW218 に約 4.8kb
の *EcoRI* 断片が挿入されたプラスミドであった。

<シーケンス解読>

pN3 のシーケンスは DNA sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech) を使用し
て解読した。

<*yncC* 破壊株の構築>

yncC 遺伝子破壊用 DNA 断片は、W3110 染色体をテンプレートに P(*yncC* for *SacI*)
と P(*yncC* for *pstI*)、および P(*yncC* rev *BamHI*) と P(*yncC* rev *SalI*)を用いて PCR によ
り増幅した。クロラムフェニコール耐性遺伝子は pXX557 より得た。*yncC* 遺伝子の中間
に *cat* を挿入したものを pUC18 に挿入し pUC18fxr を構築した。pUC18fxr を *SacI* と
SalI で切断し、FS1576 (*recD*)に形質導入した。DNA 断片上の *yncC::cat* と染色体上
の *yncC* が相同組み換えしたものを L クロラムフェニコール (20 µg/ml) プレート上で選
別した。*yncC* 遺伝子破壊は P(*yncC* for *SacI*)と P(*yncC* rev *SalI*)を用いた PCR によ
って確かめた。FS1576 上の *yncC::cat* は P1 ファージ形質導入により W3110 に移した。

<遊走性試験>

細胞懸濁液を L 0.2%寒天プレートに滴下し 30°Cで静置培養した。6 時間後のハロー
の大きさを測定した。

<RNA isolation および Northern hybridization>

RNA は対数増殖期の W3110/pMW218、W3110/pN3、W3110 *yncC::cat*/pMW218、

W3110 *yncC::cat/pN3* から RNeasy Midi Kit (QIAGEN)を用いてとった。RNA サンプルは1% agarose-formaldehyde 変性ゲル・MOPS バッファー中で泳動した。NaOHによる変性後、RNA をキャピラリー法により一晩かけて Hybond-N⁺ メンブレン(Amersham Biosciences)に転写した。転写後の RNA はアルカリ固定法でメンブレンに固定化した。

ハイブリダイゼーション用プローブは W3110 染色体をテンプレートとして作製した。*fliC* プローブは P(*fliC*-5')と P(*fliC*-3')、*flhDC* プローブは P(*flhDC*-5')と P(*flhDC*-3')、*ompR* プローブは P(*ompR* for Northern 5')と P(*ompR* for Northern 3')を用いて PCR により増幅した。

65°Cで 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った後、65°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。検出には Amersham Biosciences ECL フィルムを用いた。

<YncC タンパク質の精製>

pN3 をテンプレートとし P(pN3-*sacI*)と P(pN3-*HindIII*)を用いて全長 *yncC* DNA 断片を PCR で増幅した。この DNA 断片を *SacI* と *HindIII* で切断し pET28b の *SacI*-*HindIII* サイトへ挿入し pETyH とした。これを BL21(DE3)に形質転換した。BL21(DE3)を LB 培地で O.D.₆₆₀=0.6 まで培養し、0.1M IPTG で一晩誘導をかけた。菌体を回収・破碎し His Trap Chelating Ni²⁺-Sephrose column (Amersham Biosciences)により精製した(第四章参照)。

<ゲルシフトアッセイ>

ゲルシフトアッセイに用いるため、以下の 3 種類の DNA 断片を作製した。*flhDC* のプロモーター領域から開始コドンまでを含む 301bp 断片は、W3110 染色体をテンプレートとして P(*flhDC* gel-biotin 5')と P(*flhDC* for gel 2-3')を用いて PCR により増幅した。

flhDC のプロモーター領域のみを含む 156bp 断片は、W3110 染色体をテンプレートとして P(*flhDC* gel-biotin 5') と P(*flhDC* for gel-shift 3') を用いて PCR により増幅したものを *Bst*XI で切断することより得た。*flhDC* のプロモーター下流から開始コドンまでを含む 144bp 断片は、W3110 染色体をテンプレートとして P(*flhDC* for gel bio 2-5') と P(*flhDC* for gel 2-3') を用いて PCR により増幅した。各 DNA 断片(41nM)は精製された YncC (0 to 3.3 μ M)と 30°C で 15 分反応させた(結合バッファー(100mM NaCl, 1mM DTT, 20mM HEPES, 10% glycerol, 0.01% BSA, 10mM EDTA, 41nM poly-(dI-dC))。その後、DNA 断片-YncC 混合液は 6% polyacrylamide gel で 0.5 \times TBE (1 \times TBE is 89mM Tris, 89mM Boric acid, and 2mM EDTA) 中、4°C で泳動した。DNA バンドは Hybond-N⁺ メンブレンに転写後、ECL system (Amersham Biosciences)により検出した。

<p-Arbutin 資化能試験>

大腸菌は、H-NS の発現が低下すると β -Glucosidase が発現し p-Arbutin および Salicin を資化することが出来るようになることが知られている⁽⁴⁶⁾。糖が資化されると酸が発生することを利用し EMB 培地 (1% Polypepton, 0.1% Yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% KH₂PO₄, pH7.0, 1.5% Agarose, containing 0.04% eosin yellow, 0.0065% methylene blue, 1% Glucose or p-Arbutin) を用いて p-Arbutin 資化能を試験した。コロニーが赤色呈色した場合、糖を資化したと判断した。

<DNA マイクロアレイ>

対数増殖期の W3110 および W3110 *yncC::cat* の RNA を RNeasy Midi Kit を用いて取った。一遺伝子に 22 個のプローブ (1 プローブ長 24mer) が固定化されたマイクロアレイ (NimbleGem) を用いた。マイクロアレイから得られた蛍光強度を元に、RMA

(Robust Multi-chip Analysis)アルゴリズムによるデータ補正⁽⁴⁷⁾を行ったデータを用いて解析した。t 検定により優位な差が認められた遺伝子を評価の対象とした。解析はジェーンフロンティア社に委託した。

実験結果

<groEL 温度感受性変異株の致死性を抑制する遺伝子のショットガンクローニング>

CG2241 (*groEL* 温度感受性変異株)染色体を *EcoRI* で断片化し、pMW218 に挿入し CG2241 に形質転換した。L -NaCl 培地で温度感受性を抑制したクローンを選択したところ、致死性を抑制する遺伝子として *groEL44* 遺伝子断片のみが得られた (Fig.5-2)。このことから *groEL44* 変異型遺伝子は活性を僅かながら残していることが示唆された。続いて、より緩やかな条件でクローンを選択するために、培地に Sucrose を加え高浸透圧下でショットガンクローニングを行った。その結果、機能未知遺伝子を含んだプラスミドが幾つか得られた。その内の一つに pN1 があつた。pN1 を形質転換した CG2241 はコロニー形成率で見ると、42°C で CG2245 (*groEL*^{WT}) と同等の生育をみせた (Fig.5-3)。pN1 を切り縮めたところ、*yncC* のみを含む pN3 で温度感受性を抑制することが明らかとなった (Fig.5-3,5-4)。

<機能未知遺伝子 *yncC* の相同性検索>

ショットガンクローニングにより得られた機能未知遺伝子 *yncC* を BLAST 検索したところ、Gluconate 代謝遺伝子の発現を抑制する転写因子 GntR と相同性があることが明らかとなった。GntR は 4 つのサブファミリーから構成されるが *yncC* は *fadR* subfamily に属していた。*yncC* および *fadR* subfamily 遺伝子を ClustalX を用いて多重配列整列をしたところ DNA 結合ドメインで高い相同性が見られた (Fig.5-5)。このことから *yncC* は転写制御に関わる遺伝子であることが示唆された。

<yncC 過剰発現株のマイクロアレイ解析>

yncC が転写制御に関わることが示唆されたので、W3110/pMW218 と W3110/pN3 を使って *yncC* 過剰発現株での RNA 発現量を解析した。その結果、*yncC* 過剰発現株で 8 倍以上の発現変化が見られた遺伝子は 12 個、4 倍以上変化したものも含めると 50 以上の遺伝子に発現量の変化がみられた (Fig.5-6A,5-6B)。このことより、YncC は様々な遺伝子の転写制御を司っていると考えられた。

<yncC 欠損株の構築>

YncC の更なる機能解析を行うため *yncC* 欠損株の作製を試みた。*yncC* 遺伝子の 5' および 3' をそれぞれ 100bp 近く含む断片にクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) を挟み、FS1576 (*recD*) 内で相同組換えを起こさせた (Fig.5-7)。*recD* が欠損している FS1576 内では一本鎖 DNA が安定して存在できるため相同組換えを起こさせやすい。Cm 耐性株を単離し PCR および Southern Hybridization を用いて欠損を確認した。

<yncC 過剰発現株・欠損株の遊走性試験>

マイクロアレイ解析の結果、多数の鞭毛形成遺伝子に発現低下が見られた。これが表現形に影響しているかを確認するため遊走性試験を行った。その結果、pN3 を導入した *yncC* 過剰発現株で遊走性の低下が見られた。*yncC* 欠損株では遊走性の上昇は見られなかった (Fig.5-8)。*yncC* は通常の生育条件では発現が非常に低い (Fig.5-6A) ので欠損による影響が出にくいためと考えられた。

<yncC 過剰発現株における鞭毛フィラメントの低下>

遊走性の低下が見られたことから、鞭毛形成が減少していることが考えられた。鞭毛

は多数のコンポーネントにより構成される超巨大分子機械である (Fig.5-9)。この巨大な構造物を正しく構築するために、関連遺伝子の発現は 3 段階のカスケードで制御されていることが知られている⁽⁴⁸⁾。初めにクラス I の *flhC*・*flhD* が発現し FlhD₂C₂ ヘテロテトラマーを形成する。この FlhD₂C₂ がクラス II の遺伝子群を発現させる。これらクラス II の遺伝子は細胞質・細胞膜に存在する Rotor や Stator などの鞭毛の基盤を作る部分である。またクラス II には σ^{28} シグマ因子をコードする *fliA* が存在している⁽⁴⁹⁾、⁽⁵⁰⁾。基盤が完成するまでは σ^{28} と FlgM が結合しクラス III の遺伝子群が発現しないよう制御されていることが報告されている。基盤が形成されると FlgM から σ^{28} が開放されクラス III の遺伝子群を発現させる⁽⁵¹⁾。この中に鞭毛フィラメントである FliC (Flagellin) が含まれる。FliC は細胞外に露出し我々が顕微鏡で観察できる「鞭毛」部のほとんどを構成しているタンパク質である。つまりクラス III の遺伝子が発現されなければ細胞外の構成物が形成されない。そしてクラス II の遺伝子が発現されなければクラス III の遺伝子が発現せず、鞭毛の基盤も形成されない。さらにクラス I の遺伝子が発現しなければ鞭毛形成コンポーネントはまったく発現しなくなる。つまり、どの遺伝子が発現しなくても遊走性は損なわれてしまう。

どのクラスの遺伝子発現の変化の影響で遊走性の低下が引き起こされたのかを確かめるため、まず末端のクラス III に属する FliC の分離を試みた。FliC は菌液を激しく攪拌するだけで遊離してくる。これを遠心して菌液と上清中の FliC に分け SDS-PAGE に流し、FliC 量を比較した。その結果、遊走性と対応するように *yncC* 過剰発現株で FliC の発現が低下していた (Fig.5-10)。*yncC* が過剰発現した状態では少なくともクラス III の発現が抑制されていることが示された。

< 鞭毛形成遺伝子の mRNA レベルでの発現 >

マイクロアレイ解析では FliC の発現は *yncC* 過剰発現株で約 2 倍低下していた。こ

これは Fig.5-10 の結果と対応した。マイクロアレイの結果を見直してみると、4 倍以上の発現変化が見られた遺伝子のほとんどが鞭毛形成に関わる遺伝子であった。このことよりクラス I・クラス II・クラス III すべての遺伝子に抑制がかかっていると考えた。マイクロアレイの結果をみると *flhC*・*flhD* も約 1.7 倍、2.9 倍と発現が低下していた。そこで、*yncC* 過剰発現株・欠損株での *fliC*・*flhDC* の mRNA 発現量を比較した。その結果、*yncC* 過剰発現株で共に発現の低下が見られた (Fig.5-11)。つまり遊走性の低下や鞭毛形成遺伝子の発現低下はクラス I 遺伝子 *flhC*・*flhD* の発現低下によるものであることが明らかとなった。*flhC*・*flhD* の発現は様々な環境センサーにより調節を受けることが知られている。現在までに *OmpR*・*H-NS*・*CRP-cAMP*・*LrhA*・*HdfR*・*QseB*・*RcsB*・*Fur* が発現に関連することが報告されている。このうち、発現を促進するのが *H-NS*・*CRP-cAMP*・*QseB* であり、抑制するのが *OmpR*・*LrhA*・*HdfR*・*RcsB*・*Fur* である。マイクロアレイの結果をみると *yncC* 過剰発現株で各遺伝子は *ompR* (1.15 ↓)・*hns* (1.39 ↓)・*crp* (2.11 ↓)・*lrhA* (1.03 ↓)・*hdfR* (1.01 ↓)・*qseB* (1.09 ↓)・*rscB* (1.51 ↓)・*fur* (1.67 ↓) と大きな変動は示さなかった。*flhC*・*flhD* の発現を上げる遺伝子群も、発現を下げる遺伝子群も共に発現が低下しているので、*flhC*・*flhD* の発現低下は *YncC* による直接的な抑制によるものであることが考えられた。Fig.5-11, Fig.5-12 で *ompR* および *hns* の発現量に変化が無いことを確かめた。

<*flhDC* プロモーター領域に対する *YncC* の結合>

Salmonella enterica の *YncC* は σ^{38} で誘導されていることが知られている⁽⁵²⁾。 σ^{38} はストレス環境下や定常期に発現される転写因子である。このことから *YncC* が定常期で何らかの修飾を受け、活性化していることが考えられた。そこで定常期に入った菌体から回収した *YncC* を使用し、*YncC* が *flhDC* プロモーター領域に直接結合し転写を抑制しているか、ゲルシフトアッセイにより確認した。その結果、*YncC* は *flhDC* プロモータ

一領域から開始コドンを含む Probe1 に強く結合することを見出した (Fig.5-13)。GntR-like binding box 周辺を切断した Probe2・3 では結合が見られなかったことから、これらの周辺配列が YncC の結合に重要である事が示唆された。これらのことより、YncC は *flhDC* の発現を直接抑制する新しい転写因子であることが明らかとなった。

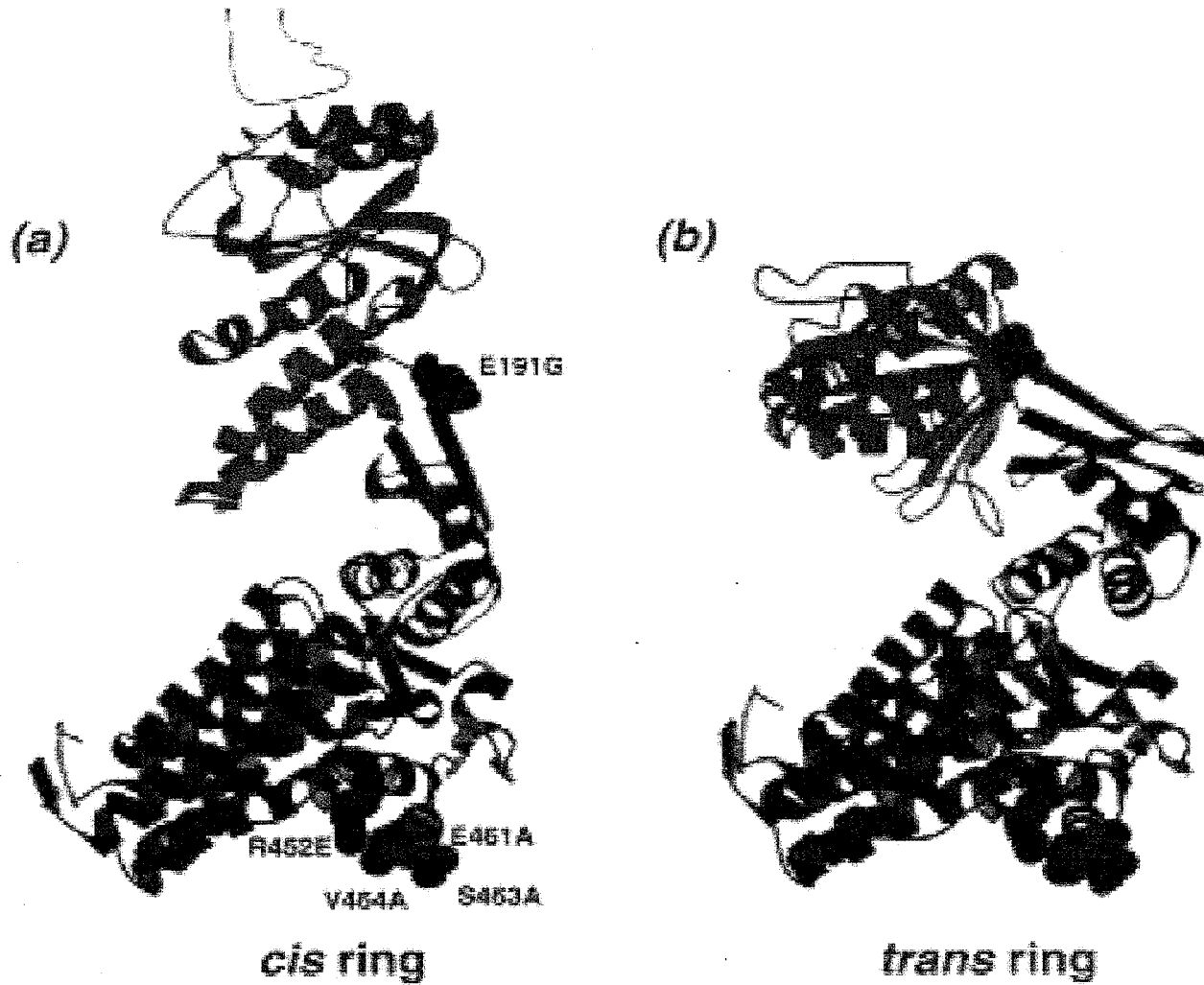
考察

本章では *groEL* 温度感受性変異株の致死性を抑制する遺伝子として得られた *yncC* の機能解析を行った。その結果、鞭毛形成遺伝子の発現を制御する *flhDC* の発現抑制を行うことが明らかとなった。*Salmonella enterica* の *yncC* は RpoS (σ^{38}) によって発現される事が報告されている⁶²。RpoS はストレス環境に応答する遺伝子の発現を制御していることが知られている。*yncC* も本来はストレス環境下で発現されると考えられる。ストレス環境で鞭毛形成が阻害されることが報告されている。これに *yncC* が関与しているかもしれない。

本研究では *yncC* の鞭毛形成制御について解析を行ったが、マイクロアレイ解析によると他にも発現が変化する遺伝子が存在する。*yncC* 過剰発現株で発現上昇が見られた *proVWX* は浸透圧耐性に必要なグリシン-ベタイン取り込み系タンパク質をコードする遺伝子だが、CG2241 に導入したところ温度感受性を抑制した (data not shown)。この遺伝子と GroEL との関わりも明らかにしていく予定である。

Table.5-1 Primers used

Primer name	Sequence
P(yncC for SacI)	GAAAAGAGCTCGAAGCAACGGATTC
P(yncC for pstI)	TCGTTCTCAACCTGCAGAGTCAAAC
P(yncC rev BamHI)	GAGGGATCCAGACATTGTCTTGCTG
P(yncC rev Sall)	GGAGAGCGAGAGTCGACCCAGTACC
P(fliC-5')	ATACCAACAGCCTCTCGCTGATCAC
P(fliC-3')	TTCGACATATTGGACACTTCGGTGC
P(flhDC-5')	GCATACCTCCGAGTTGCTGAAACAC
P(flhDC-3')	ATAAGCTGCAGGCAAAGCTGCCAAC
P(ompR for Northern 5')	GCAAGAGAACTACAAGATTCTGGTG
P(ompR for Northern 3')	GGTACAAAGACGTAGCCCAGACCCC
P(pN3-sacI)	ATGTGAGTGAGCTCACTCATTAGGC
P(pN3-HindIII)	CCGGGCATTTACTTTAAAGCTTGTATTGC
P(flhDC gel-biotin 5')	Bio-GTGTTTTGTGTGATCTGCATCACGC
P(flhDC for gel 2-3')	TCGGAGGTATGCATTATTTCCCACCC
P(flhDC for gel-shift 3')	GATAAGCTGCAATAAGCAGAACCAC
P(flhDC for gel bio 2-5')	Bio-TGGTTCTGCTTATTGCAGCTTATCG
P(flhDC for gel 2-3')	TCGGAGGTATGCATTATTTCCCACCC



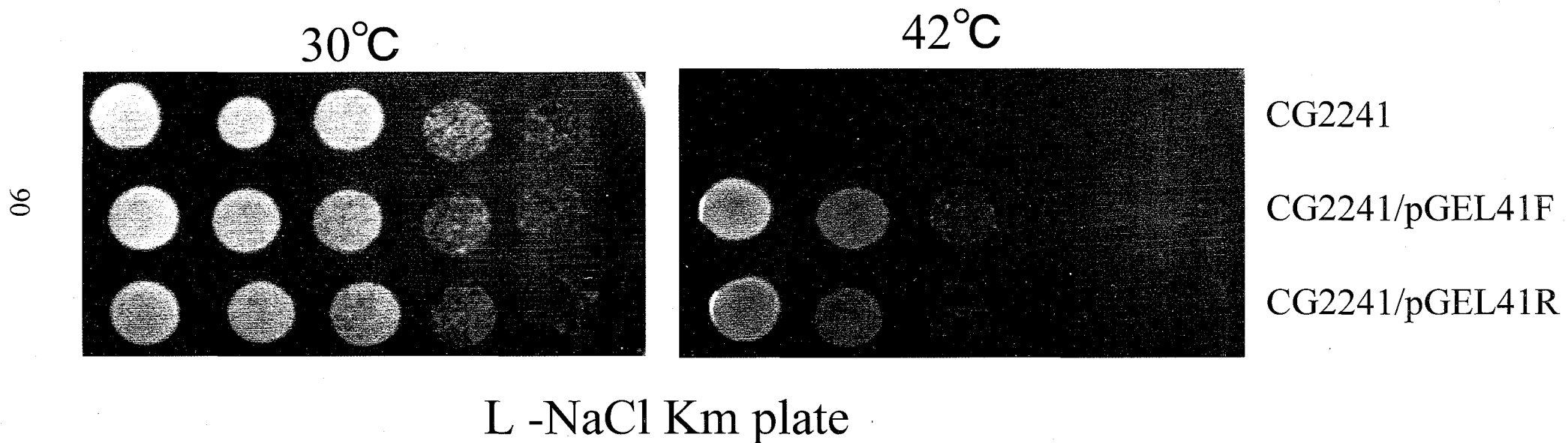
J. Mol. Biol. (2000) 304, 897–910

From Minichaperone to GroEL 3: Properties of an Active Single-ring Mutant of GroEL

Jean Chatellier, Fergal Hill, Nicholas W. Foster, Pierre Goloubinoff* and Alan R. Fersht*

Fig.5-1 *groEL44*は頂点ドメインと中間ドメインを繋ぐヒンジ部分に変異を持つ。*GroEL*^{E191G}は*GroES*との結合能が低下する。

Complementation of temperature sensitivity of *groEL* mutant by mutant-type *groEL*



pGEL41F=pMW218-*groEL44* (Placに順向き)

pGEL41R=pMW218-*groEL44* (Placに逆向き)

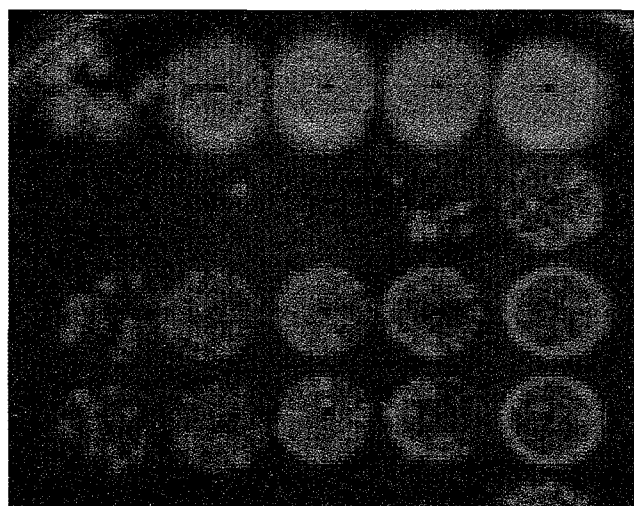
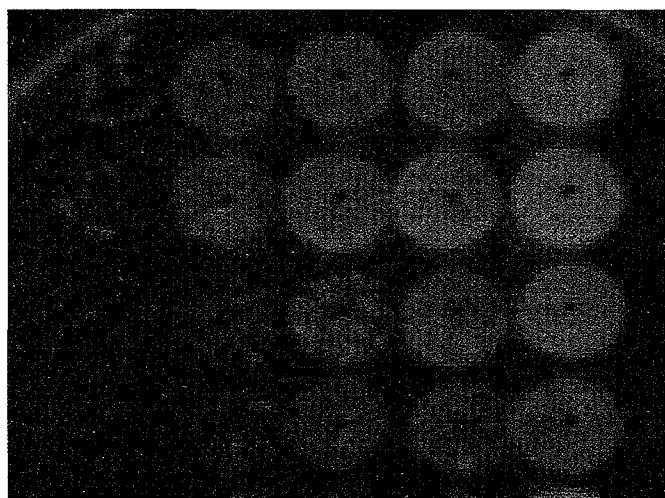
Fig.5-2 L -NaCl Km plate上でCG2241 (*groEL44*) 温度感受性変異による致死性を抑制する遺伝子をショットガンクローニングで選択した。その結果、変異型*groEL44*が得られた。

Suppression of temperature sensitivity of *groEL* mutant by *yncC* plasmids

16

30°C

42°C



CG2245/pMW218

CG2241/pMW218

CG2241/pN1

CG2241/pN3

L -NaCl 15% Sucrose Kanamycin plate

Fig.5-3 L -NaCl 15% Sucrose Kanamycin plate上でCG2241 (*groEL44*) 温度感受性変異による致死性を抑制するプラスミドとしてpN1が得られた。pN3はpN1より切り縮めたプラスミドである (Fig.5-4)。

Determination of the gene involved in suppression of temperature sensitivity of *groEL* mutant

92

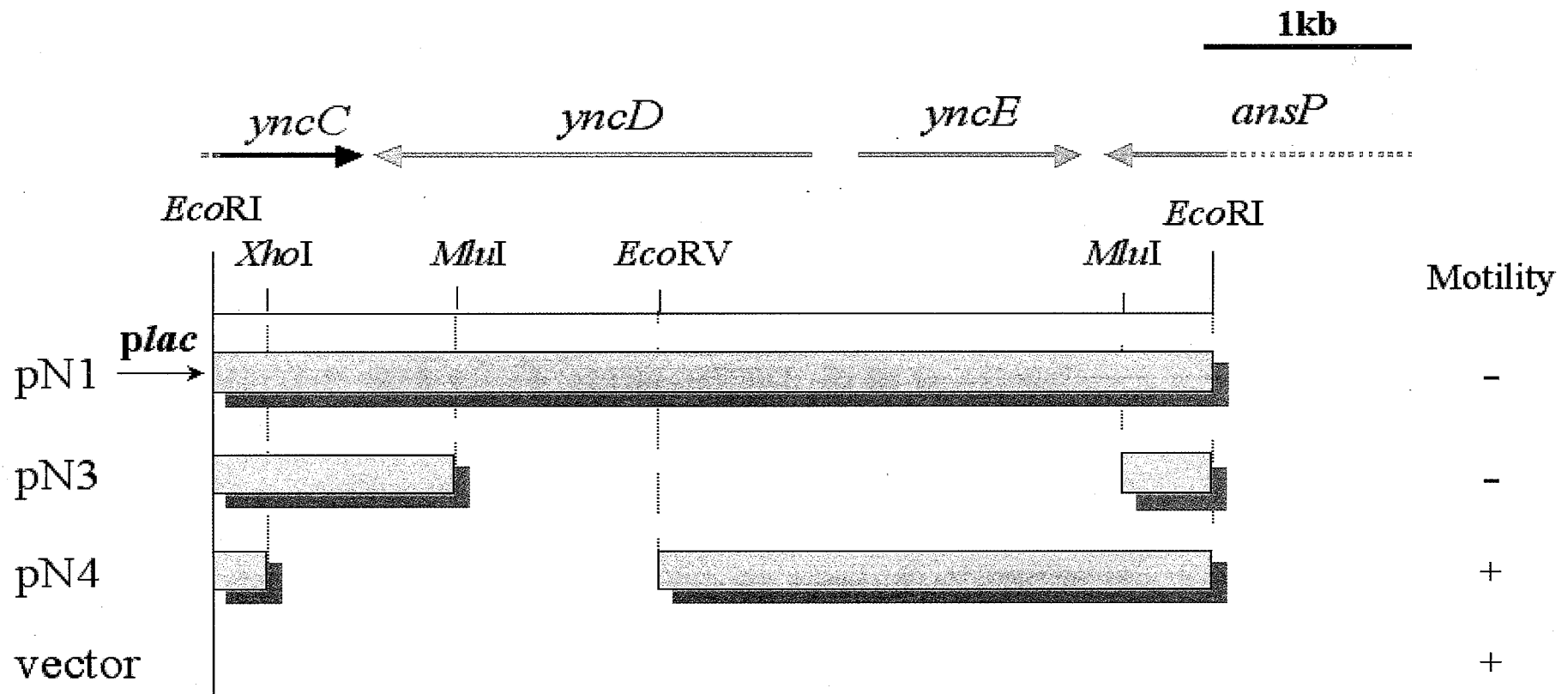


Fig.5-4 ショットガンクローニングにより得られたpN1は3つの遺伝子を含む約5kbの*EcoRI*断片であった。切り縮めを行った結果、*yncC*のみを含むpN3プラスミドで*groEL*温度感受性変異を抑制した。

Analysis of *yncC* dependent gene expression

<u>8 ≤ Fold</u>						
<u>GENE INFO</u>	<u>min(dir)</u>	<u>essentiality</u>	<u>FoldChange</u>	<u>W3110.pMW218</u>	<u>W3110.pN3</u>	<u>p.value</u>
<u>focA</u>	<u>20.54(-)</u>	<u>n</u>	<u>9.01</u>	<u>10.16</u>	<u>6.99</u>	<u>6.81E-06</u>
<u>flgN</u>	<u>24.33(-)</u>	<u>n</u>	<u>11.44</u>	<u>10.96</u>	<u>7.45</u>	<u>2.98E-08</u>
<u>flgB</u>	<u>24.36(+)</u>	<u>n</u>	<u>8.30</u>	<u>12.29</u>	<u>9.23</u>	<u>1.19E-07</u>
<u>yncC</u>	<u>32.73(+)</u>	<u>n</u>	<u>228.67</u>	<u>6.45</u>	<u>14.28</u>	<u>4.23E-09</u>
<u>cspF</u>	<u>35.35(+)</u>	<u>n</u>	<u>13.05</u>	<u>10.63</u>	<u>6.92</u>	<u>8.98E-07</u>
<u>fliH</u>	<u>43.41(+)</u>	<u>n</u>	<u>10.40</u>	<u>10.90</u>	<u>7.52</u>	<u>7.84E-07</u>
<u>fliI</u>	<u>43.42(+)</u>	<u>n</u>	<u>8.96</u>	<u>10.59</u>	<u>7.42</u>	<u>2.09E-06</u>
<u>fliJ</u>	<u>43.45(+)</u>	<u>n</u>	<u>10.09</u>	<u>11.10</u>	<u>7.76</u>	<u>2.81E-06</u>
<u>fliL</u>	<u>43.39(+)</u>	<u>n</u>	<u>9.41</u>	<u>11.33</u>	<u>8.10</u>	<u>3.17E-07</u>
<u>fliP</u>	<u>43.54(+)</u>	<u>n</u>	<u>8.20</u>	<u>10.01</u>	<u>6.98</u>	<u>5.76E-06</u>
<u>hdeB</u>	<u>78.75(-)</u>	<u>n</u>	<u>18.72</u>	<u>6.88</u>	<u>11.11</u>	<u>3.49E-05</u>
<u>hdeA</u>	<u>78.76(-)</u>	<u>n</u>	<u>24.43</u>	<u>7.27</u>	<u>11.88</u>	<u>1.14E-06</u>

Fig.5-6A *yncC*過剰発現株についてマイクロアレイ解析を行った。野生株と比べて遺伝子発現に8倍以上の差が見られたものが12遺伝子見出された。青は減少、赤は増加を示す。

Analysis of *yncC* dependent gene expression

4 ≤ Fold ≤ 8						
GENE INFO	min(dir)	essentiality	FoldChange	W3110.pMW218	W3110.pN3	p.value
yagU	6.51(+)	n	5.54	8.85	11.32	4.84E-06
flgM	24.34(-)	n	5.51	11.06	8.59	1.24E-07
flgA	24.35(-)	n	5.59	9.68	7.20	8.56E-06
flgC	24.37(+)	n	5.49	12.46	10.00	9.53E-10
flgD	24.38(+)	n	4.65	12.49	10.27	6.46E-09
flgE	24.40(+)	n	4.30	12.67	10.56	6.10E-08
flgF	24.42(+)	n	4.36	11.71	9.58	8.94E-08
flgG	24.44(+)	n	4.38	11.58	9.45	9.64E-08
flgH	24.46(+)	n	5.26	10.56	8.17	2.13E-07
flgI	24.48(+)	n	7.51	10.31	7.40	4.29E-08
flgJ	24.50(+)	n	7.10	10.32	7.49	4.30E-05
flgK	24.52(+)	n	6.40	10.61	7.93	2.04E-06
flgL	24.56(+)	n	5.44	10.08	7.63	1.36E-05
dhaK1	26.92(-)	u	4.20	9.95	7.88	8.11E-06
cspB	35.34(-)	n	4.22	8.46	6.38	7.89E-03
flxA	35.45(+)	n	6.60	9.71	6.99	1.95E-07
vdhR	37.61(+)	u	4.61	9.49	7.29	2.92E-05
cheZ	42.34(-)	n	4.06	10.14	8.11	6.38E-06
cheY	42.36(-)	n	7.35	10.74	7.87	1.53E-07
tap	42.41(-)	n	6.05	10.59	8.00	2.14E-06
tar	42.44(-)	n	5.71	10.77	8.25	5.62E-06
cheA	42.49(-)	n	5.57	10.48	8.00	7.32E-05

4 ≤ Fold ≤ 8						
GENE INFO	min(dir)	essentiality	FoldChange	W3110.pMW218	W3110.pN3	p.value
motB	42.54(-)	n	5.03	11.09	8.76	1.35E-06
flhZ	43.08(-)	n	6.48	11.04	8.35	9.23E-10
flhA	43.09(-)	n	4.06	10.80	8.77	1.83E-06
flhS	43.18(+)	n	6.06	10.01	7.41	1.52E-06
flhT	43.19(+)	n	4.79	10.32	8.06	8.39E-07
flhF	43.35(+)	n	6.48	9.68	6.99	1.20E-04
flhG	43.39(+)	n	7.84	11.06	8.09	1.22E-06
flhK	43.46(+)	n	6.98	10.95	8.15	1.03E-06
flhM	43.50(+)	n	7.65	11.86	8.93	3.35E-07
flhN	43.52(+)	n	6.39	11.10	8.42	3.90E-08
flhO	43.53(+)	n	6.38	10.65	7.97	7.38E-06
flhQ	43.56(+)	n	6.54	10.44	7.73	9.33E-09
flu	44.61(+)	n	4.61	8.56	6.35	1.51E-03
vfhH	56.22(+)	u	4.45	10.01	7.86	2.35E-07
proV	60.42(+)	n	5.86	8.22	10.77	2.95E-05
proW	60.44(+)	n	5.43	8.74	11.19	1.29E-06
proX	60.47(+)	n	7.60	7.64	10.57	1.95E-03
epd	66.19(-)	n	4.96	10.47	8.16	1.07E-06
rbsB	84.80(+)	n	4.03	10.57	8.56	4.53E-06
yjeB	94.92(+)	u	4.31	9.56	7.45	1.08E-06
ssrS	65.83(+)	n	4.48	10.49	8.32	5.29E-06

95

Fig.5-6B *yncC*過剰発現株についてマイクロアレイ解析を行った。野生株と比べて遺伝子発現に4倍以上の差が見られたものが50遺伝子以上見出された。青は減少、赤は増加を示す。

Construction of *yncC* disruptant

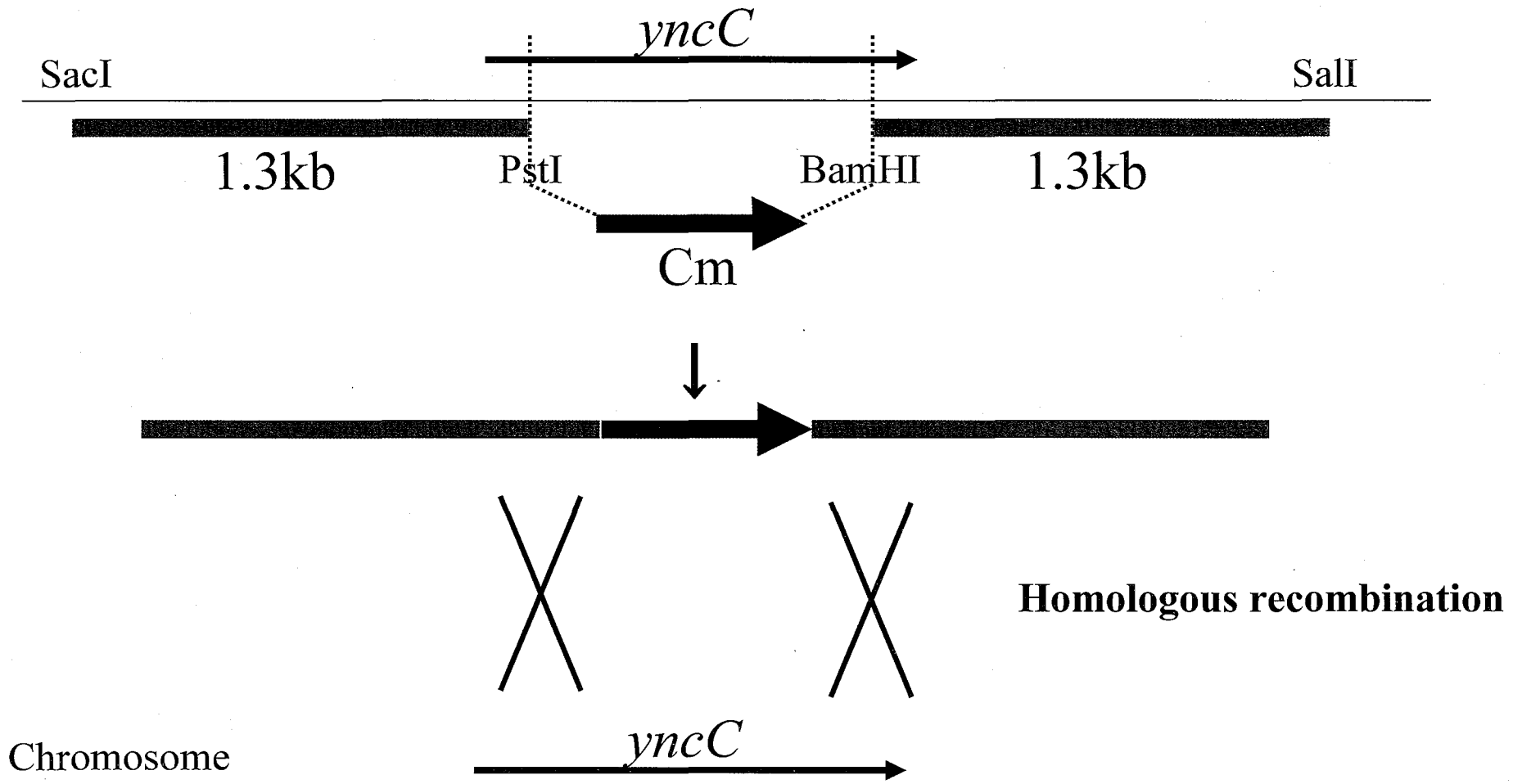
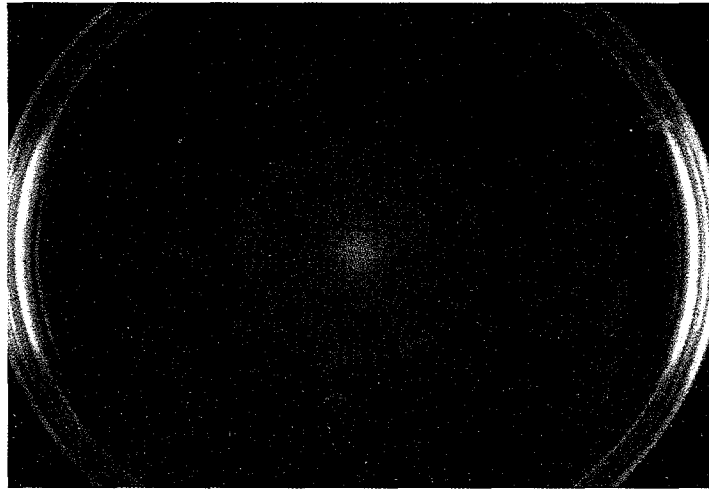
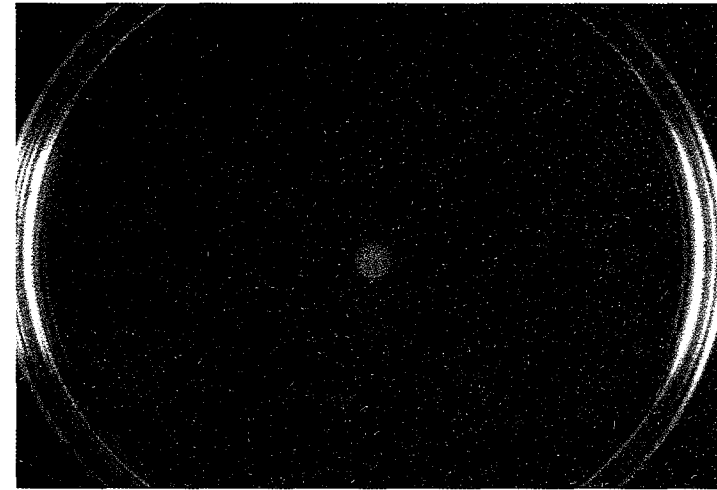


Fig.5-7 *yncC*近傍DNA断片をPCRで増幅し、間に*cat*を挟んだ。FS1576(*recD*)を用いて二回相同組換えによる*yncC*遺伝子破壊を行った。*yncC*欠損株は構築可能であった。

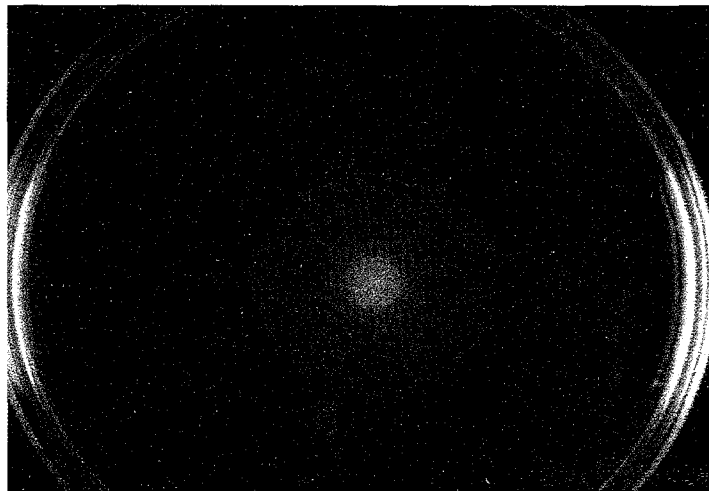
Effect of *yncC* overproduction or deletion to cell motility



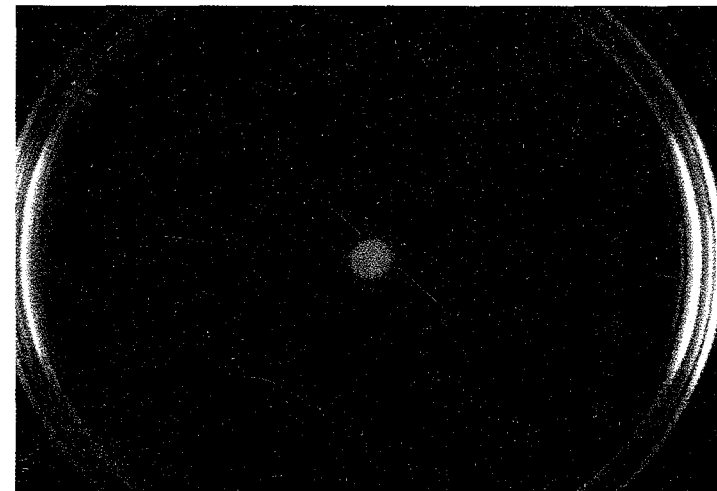
W3110/pMW218



W3110/pN3



W3110 *yncC*::*cat*/pMW218



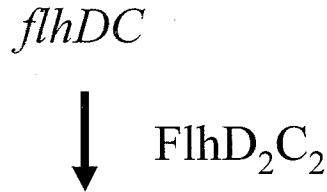
W3110 *yncC*::*cat*/pN3

— =1cm L' 0.2% Agar 30°C 6H

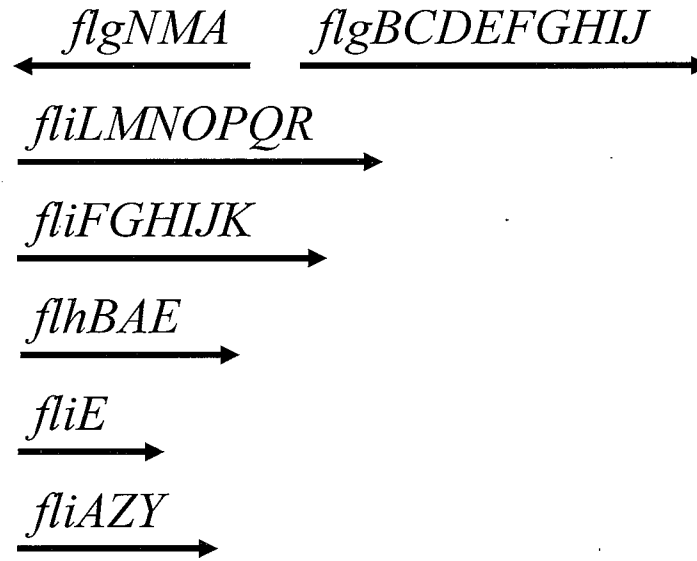
Fig.5-8 *yncC*過剰発現株および欠損株で遊走性試験を行った。*yncC*欠損株では変化は見られなかったが、過剰発現株では顕著な遊走性の低下が見られた。

The *E. coli* flagellar gene expression hierarchy

class I
master operon

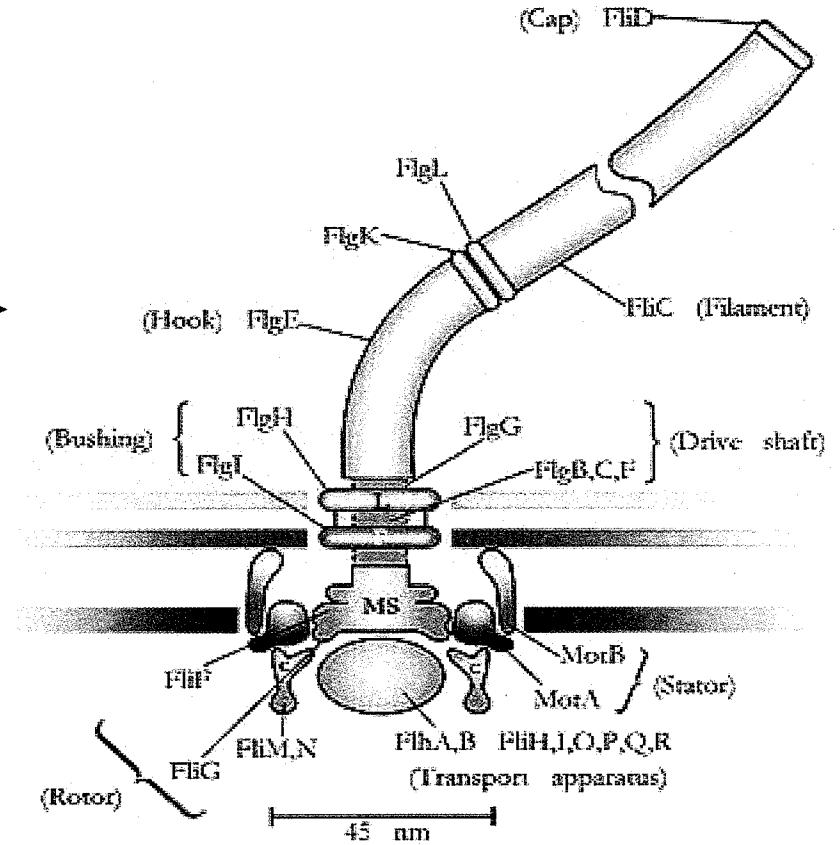


class II
export,
basal body,
class III gene activator



class III

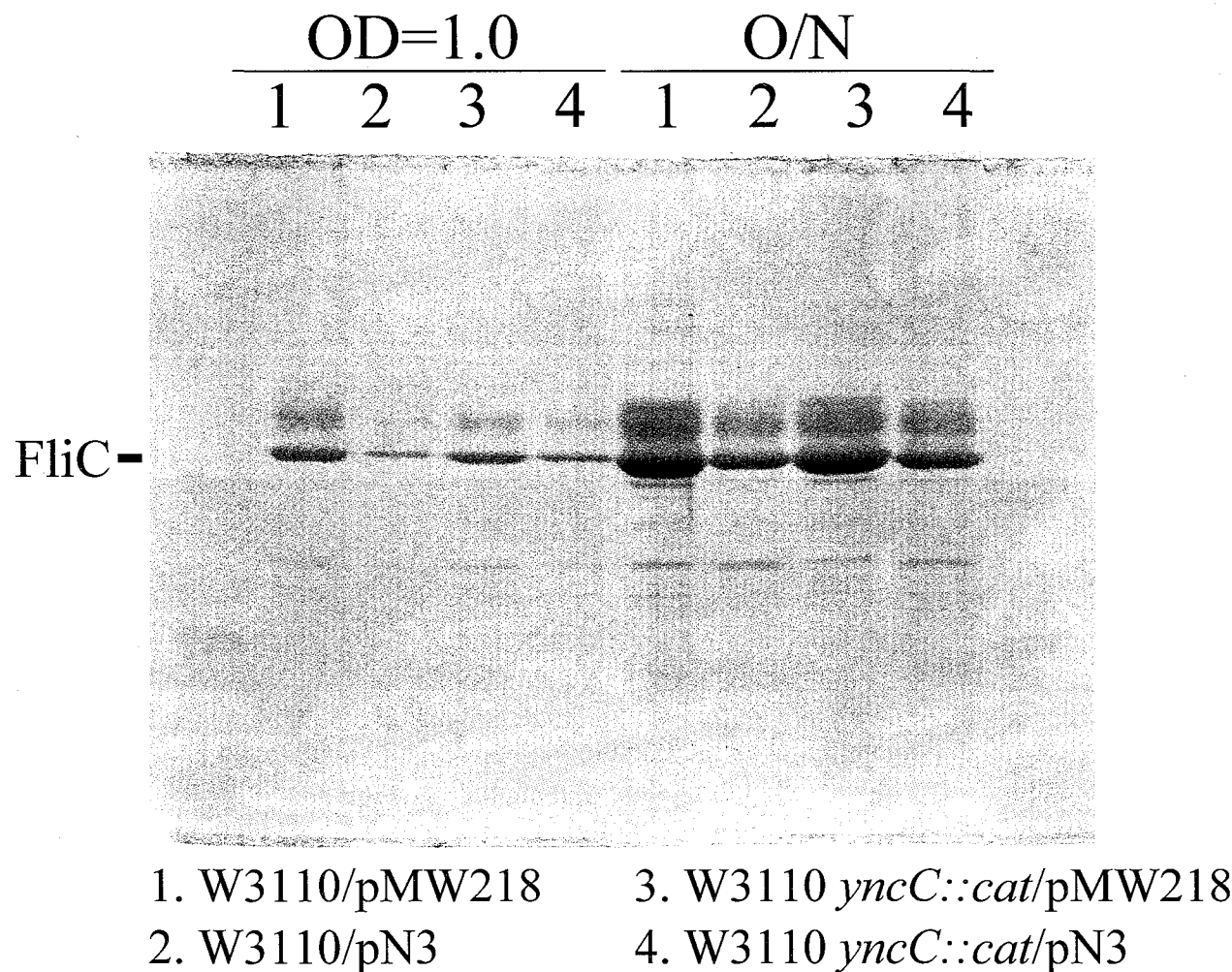
flagellin, HAP, hook, chaperones, motor and chemotaxis
(FliC)



<http://www.aip.org/pt/jan00/berg.htm>
Physics Today on the Webより

Fig.5-9 Flagellaの遺伝子発現カスケードおよび構造予想図。Flagellaは3段階のカスケードにより遺伝子発現が制御されている。

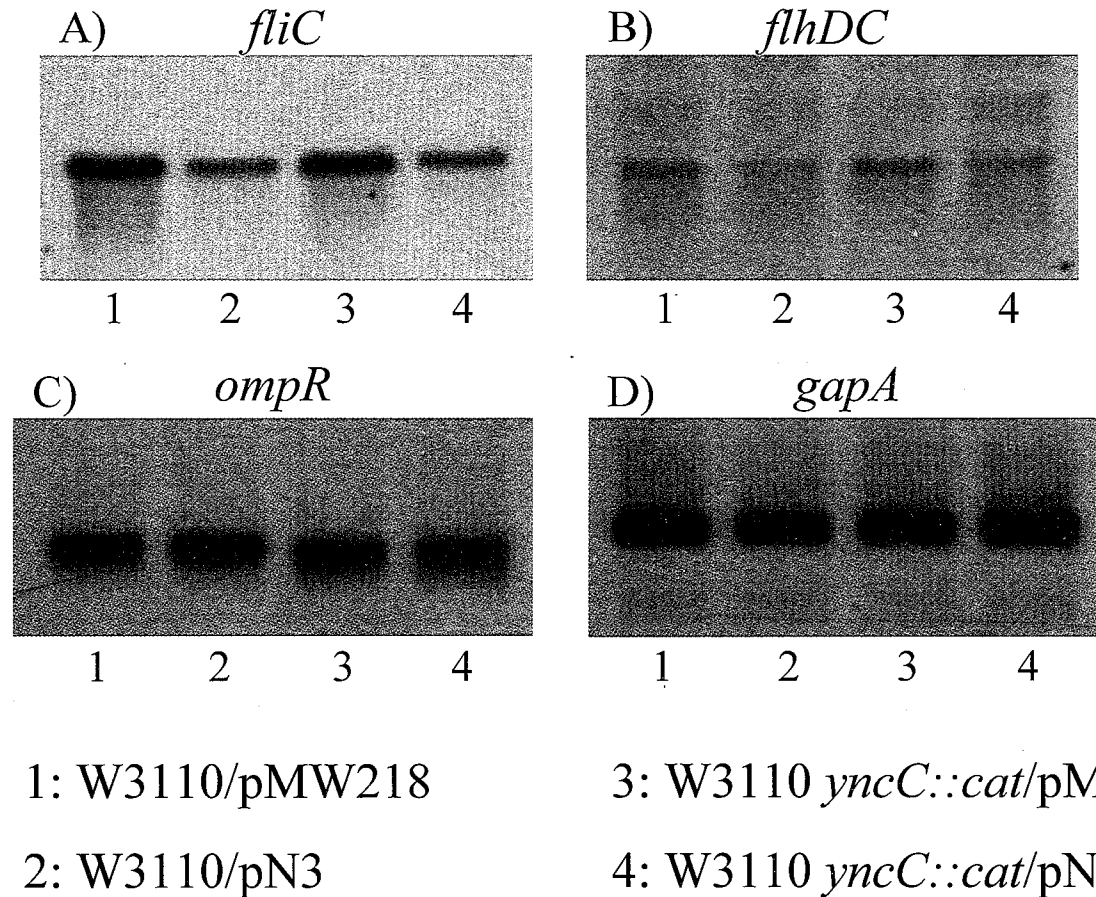
Effects of *yncC::cat* and *yncC*-overproduction on flagellin expression



66

Fig.5-10 *yncC*過剰発現株および欠損株のFliC (フラジェリン)を回収しSDS-PAGEを行った。遊走性と対応するように*yncC*過剰発現株でFliCの発現低下が見られた。

Effect of *yncC* overproduction or mutation on gene expression



100

Fig.5-11 *yncC*過剰発現株および欠損株における*fliC*、*flhDC*、*ompR*、*gapA*のmRNA発現をノーザンハイブリダイゼーションにより測定した。*fliC*、*flhDC*でmRNAの発現低下が見られた。*ompR*は発現が変化しなかった。*gapA*は発現が変化しないmRNAのコントロールとして用いた。

Effect of *yncC* overproduction or mutation on p-Arbutin utilization

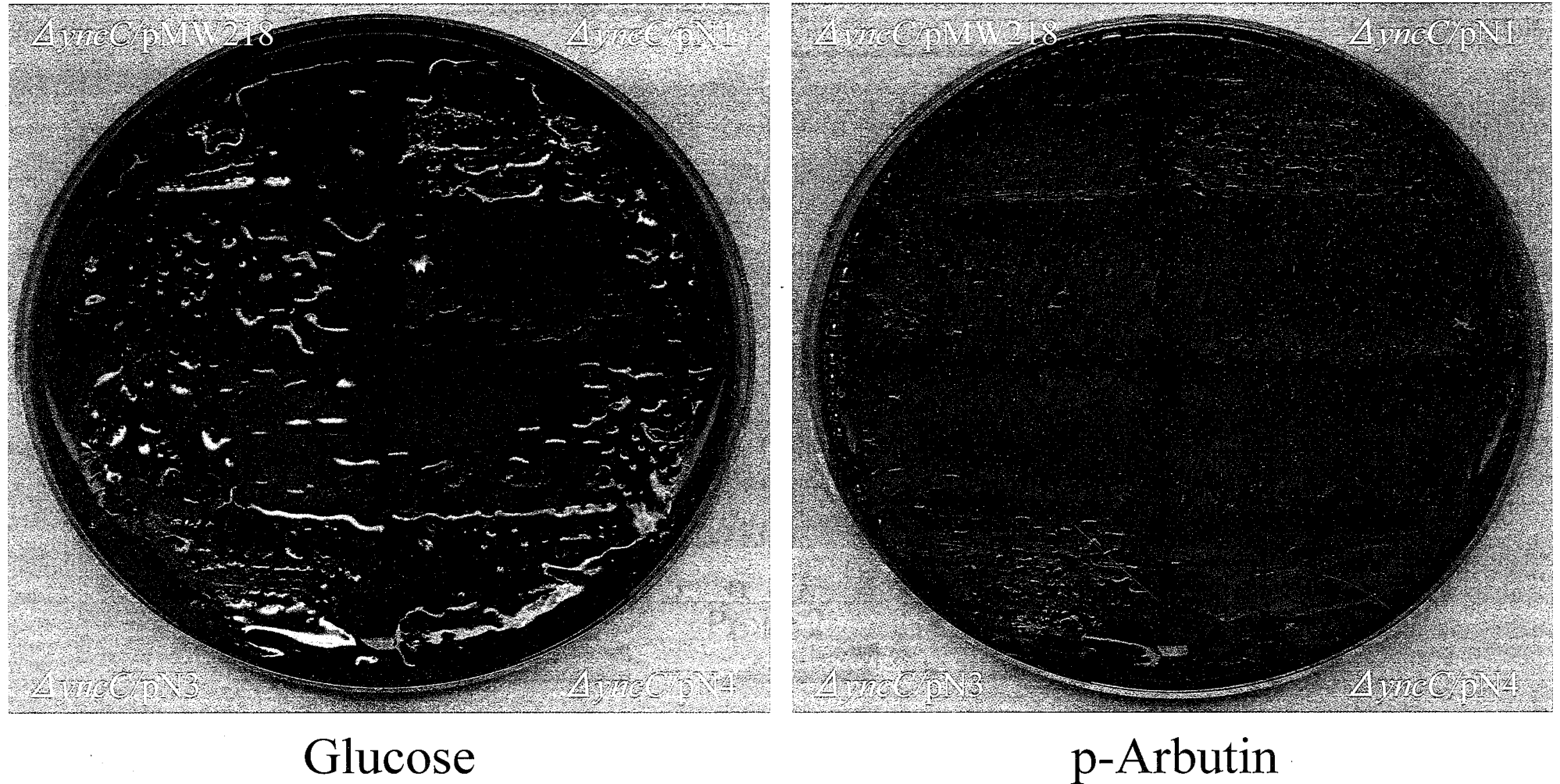


Fig.5-12 *yncC*過剰発現株および欠損株におけるH-NSの発現変化を確認するため、p-Arbutin資化能を確かめた。いずれの株でもp-Arbutin資化能は認められなかった。

Gel-shift analysis of YncC-binding elements in the *flhDC* promoter region

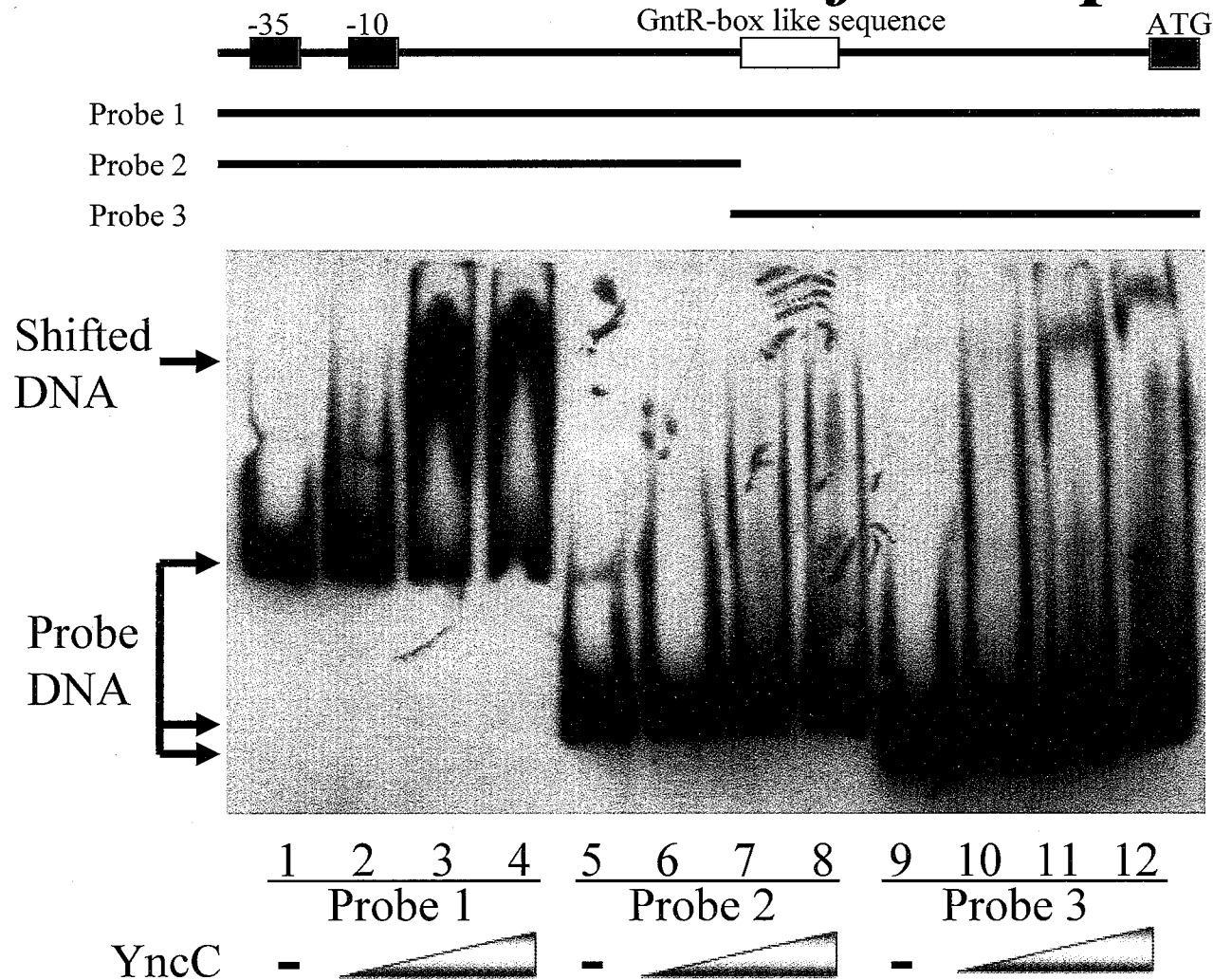


Fig.5-13 *flhDC*プロモーター部位のYncC結合部位を確かめるためゲルシフトアッセイを行った。Probe1の遷移が大きかったことからGntR-box like sequence周辺部位がYncCの認識に重要であることが示唆された。

第六章

総括

本研究は、大腸菌の細胞分裂に関わる新規因子を探索することから始まった。そこから見出された GroEL の細胞分裂における役割についての研究を進めてきた。目に見える細胞の生死という現象から、顕微鏡を使っての細胞形態観察、精製タンパク質を用いた分子レベルの相互作用解析まで幅広く実験を行ってきた。

第二章では、新規細胞分裂関連因子の探索を行った。その結果、ペニシリン誘導小胞にシャペロンタンパク質である GroEL が濃縮されていることが見出された。ペニシリン誘導小胞にはコシャペロンである GroES は濃縮されていなかった。

第三章では、GroEL の細胞内局在性と Divisome との関わりを、間接免疫蛍光染色法を用いて検討した。野生株では細胞分裂面に FtsZ と共に GroEL が局在化した。これより GroEL が新規の細胞分裂関連因子であることが示唆された。*fts* 変異株を用いた局在性の観察から GroEL は FtsZ の局在化直後に細胞分裂面に局在化することが明らかとなった。この局在は他の Fts タンパク質の影響を受けないことが明らかとなった。*groEL* 温度感受性変異株および発現調節株の FtsZ リングの観察から、GroEL 欠損が FtsZ リングの不安定化を招くことが明らかとなった。また *groEL* 温度感受性変異株に *ftsZ* をマルチコピーで導入すると部分的ながら温度感受性が回復することが示された。これからも GroEL と FtsZ の密接な関わりが推測された。

第四章では、*in vitro* での FtsZ と GroEL の結合について検討した。FtsZ ポリマーと GroEL との結合が超遠心を用いた共沈実験により確かめられた。蛍光顕微鏡下での観察からも両者の結合が認められた。生体内では GroEL が FtsZ リングの安定化に寄与していたが *in vitro* では FtsZ の脱重合を阻害することはなかった。変異型 GroEL と FtsZ との結合実験も行った。幾つかの変異型 GroEL で FtsZ 重合阻害が観察された。

中でも GroEL^{SR1} では FtsZ ポリマーへの結合能が失われていた。FtsZ 重合阻害を起こす変異型 GroEL の GTPase 活性を測定したところ、通常持つ ATPase 活性と同等な GTPase 活性を保持していた。野生型 GroEL も若干の GTPase 活性を示した。GroEL と FtsZ モノマーとの結合についても実験を行った。化学架橋実験により GroEL は FtsZ オリゴマーと結合していることが明らかとなった。GroEL が結合する FtsZ 部位を特定するため FtsZ ΔC を作製したが、*in vitro* では GTP 依存的に重合した FtsZ ΔC と GroEL は共沈した。しかし FtsZ ΔC の GTP 結合部位および周辺の FtsZ と結合する部位に変異が入ったものは GroEL との結合が見られなかった。これより、GroEL は FtsZ 同士の相互作用に関わる表面構造に強く影響を受ける結合をしていることが明らかとなった。しかし C 末端を補った FtsZ^{A25V,V208A} が生体内で GroEL との共局在を示したことから、生体内での両者の結合には FtsZ の C 末端が関与している可能性も考えられた。

第五章では、*groEL* 温度感受性変異株の致死性を抑制する遺伝子として *yncC* を得た。YncC は様々な遺伝子の発現を制御することが明らかとなった。中でも鞭毛形成遺伝子の発現を司る *flhDC* の発現を抑制する働きがあることが示唆された。*flhDC* の発現抑制は YncC がプロモーター下流域に直接結合することにより生じることが明らかとなった。

分子機械として研究されてきたシャペロンタンパク質 GroEL が、第四章で新たに細胞分裂環 FtsZ と直接結合することが明らかとなった (Fig.4-1)。しかし第二章で見られたペニシリン誘導小胞内に GroES は含まれていなかったこと (Fig.2-6)、間接免疫蛍光染色法の実験で GroES の細胞分裂面への局在が見られなかったこと (Data not shown) から GroEL-FtsZ の結合には GroES が関与していないことが示唆された。タンパク質の凝集を防ぐ機能には GroES や GroEL 内部への導入は必要ないが、タンパク質のリフォールディングを行うには GroES の参加が必要であるため、通常のリフォール

ディング機能とは異なる作用機構で結合していることが考えられた。

細胞内の FtsZ 存在量は細胞の生育段階に関係なく常に一定であるとの報告がなされている。また存在する FtsZ の量は細胞分裂に必要な量よりも多いことも報告されている⁽⁵³⁾。真核生物などの場合は余剰の Tubulin を別に確保し柔軟に細胞骨格を変化させる仕組みがあるが、原核生物である大腸菌にはオルガネラが存在しないため別の機構により調節が行われていると考えられる。GTPase 活性が高い GroEL (GroEL^{Y199E}, GroEL^{N265A}, GroEL^{SR1}; Fig.4-9A,4-9B) を高発現させても大腸菌の生育には大きな影響が見られなかった (Fig.4-5)。このことから細胞内に簡単には消費されないほどの GTP が存在すると考えられる。FtsZ は Fig.4-8 で見られるように GTP 存在下では 1 分も経たずに超分子ポリマーを形成した。GTP が豊富な細胞内で FtsZ の過重合を防ぐ機構は必要であると考えられる。GroEL は Fig.4-11 で見られたように重合のコアと考えられる FtsZ ダイマーと結合することが出来る。この GroEL-FtsZ 結合により FtsZ が時機を逸して重合することから保護をしているのかもしれない。

Divisome に参加する ZipA タンパク質は FtsZ ポリマーの束化(紐を束ねて強固にする)をすることで FtsZ リングの安定化に寄与するといわれている。GroEL は FtsZ の脱重合を緩和することはできなかったが (Fig.4-3)、GroEL の添加により FtsZ の重合量は若干増加した (Fig.4-6)。FtsZ ダイマーの場合とは異なり、FtsZ ポリマーへの結合には二つの基質認識領域を持つ GroEL14 量体形成が必要であると GroEL^{SR1} を用いた実験から明らかとなった (Fig.4-6)。また変異型 FtsZ との共沈実験 (Fig.4-12) および間接免疫蛍光染色の実験 (Fig.4-13) より FtsZ 同士の横の結合に異常をきたす FtsZ には *in vitro* で GroEL が結合できないことが示された。これらのことから、GroEL は FtsZ 同士の橋渡しとして束化に貢献していると考えられた (Fig.4-21)。これは *groEL* 欠損株で見られた FtsZ リングの不安定化を引き起こす要因であると考えられた (Fig.3-6, Fig.3-7)。

fts 変異株を用いた間接免疫蛍光染色実験から GroEL は細胞分裂の初期に

Divisomeに参加することが明らかとなった (Fig.3-4)。GroELとFtsZの化学架橋実験から FtsZ は GTP の有無に関わらず FtsZ オリゴマーとして存在していることが示された (Fig.4-11)。FtsZ は GroEL と独立して重合可能であるので、GroEL が FtsZ ポリマーを組み立てていることは考えられないが、可逆的な結合を繰返しながら細胞分裂面にまで共局在していくのかもしれない。また GroEL は細胞分裂の終盤まで (少なくとも FtsI が局在するまで) 細胞分裂面に残る (Fig.3-5)。これは GroEL-FtsZ の結合が細胞分裂完了まで必要であることを示している。GroEL が FtsZ から解離することで FtsZ リングの収縮が可能になるのかもしれない。

野生型 GroEL は弱い GTPase 活性を有していた (Fig.4-9A)。FtsZ との共存在下での GTPase 活性は相加的であったので結合による GTPase 活性の変化はないと考えられたが、生体内で FtsZ の安定化と GTP の消費という相反する能力を如何にバランスよく利用しているのか興味深いところである。

groEL 温度感受性を抑制する遺伝子 *yncC* がコードする YncC は様々な遺伝子の発現を制御することが明らかとなった。YncC が制御する遺伝子の中に *groEL* 温度感受性を抑制し、かつ細胞分裂に関わる遺伝子がある可能性が考えられた。

以上のことより、GroEL の細胞分裂に関する役割として

1. FtsZ ポリマーのバンド化による FtsZ リングの安定化
2. FtsZ リングに結合し適切に細胞分裂が完了するまでの保護
3. FtsZ オリゴマーとの結合による FtsZ リング形成時期の制御

が考えられた。今後、さらに細かいレベル (電子顕微鏡観察) で観察し実際の結合様式を明らかに出来れば、明確な GroEL-FtsZ 結合のモデルが構築できると考えられる。本研究で得られた知見は、GroEL の必須性を説明する手がかりになると期待される。

実験開始当初に目標とした、新規細胞分裂関連因子の探索は成功したが、GroEL

の必須性と細胞分裂との関係についてはさらに研究を進めていかねばならないと感じている。

参考文献

1. Harry EJ. 2001. Bacterial cell division: regulating Z-ring formation. *Mol. Microbiol* 40(4):795-803.
2. Hirota Y, Ryter A, Jacob F. 1968. Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 33:677-93.
3. Bi, E., and J. Lutkenhaus. 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* 354:161-164.
4. Nogales, E., K. H. Downing, L. A. Amos, and J. Löwe. 1998. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat. Struct. Biol.* 5:451-458.
5. van den Ent, F., and J. Löwe. 2000. Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J.* 19:5300-5307.
6. Erickson, H. P., D. W. Taylor, K. A. Taylor, and D. Bramhill. 1996. Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologues of tubulin polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:519-523.
7. Lu, C., M. Reedy, and H. P. Erickson. 2000. Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J. Bacteriol.* 182:164-170
8. Nogales E, Wang HW, Niederstrasser H. 2003. Tubulin rings: which way do they curve? *Curr Opin Struct Biol.* 13(2):256-61.
9. Karsenti E, Vernos I. 2001. The mitotic spindle: a self-made machine. *Science.* 294(5542):543-7.
10. Errington J, Daniel RA, Scheffers DJ. 2003. Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(1):52-65
11. Goffin, C., and J. M. Ghuyssen. 1998. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*

- 62:1079-1093.
12. Margolin W. 2001. Bacterial cell division: a moving MinE sweeper boggles the MinD. *Curr Biol.* 11(10):R395-8.
 13. Mulder, E., and C. L. Woldringh. 1989. Actively replicating nucleoids influence positioning of division sites in *Escherichia coli* filaments forming cells lacking DNA. *J. Bacteriol.* 171:4303-4314.
 14. Den Blaauwen T, Buddelmeijer N, Aarsman ME, Hameete CM, Nanninga N. 1999. Timing of FtsZ assembly in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 181(17):5167-75.
 15. Sun, Q., X-C. Yu, and W. Margolin. 1998. Assembly of the FtsZ ring at the central division site in the absence of the chromosome. *Mol. Microbiol.* 29:491-503.
 16. Grantcharova V, Alm EJ, Baker D, Horwich AL. 2001. Mechanisms of protein folding. *Curr Opin Struct Biol.* 11(1):70-82.
 17. Xu Z, Horwich AL, Sigler PB. 1997. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature.* 388(6644):741-50.
 18. Wang J, Chen L. 2003. Domain motions in GroEL upon binding of an oligopeptide. *J Mol Biol.* 2003 Nov 28;334(3):489-99.
 19. Reisenauer A, Mohr CD, Shapiro L. 1996. Regulation of a heat shock sigma³² homolog in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol.* 178(7):1919-27.
 20. Maurizi MR, Clark WP, Katayama Y, Rudikoff S, Pumphrey J, Bowers B, Gottesman S. 1990. Sequence and structure of Clp P, the proteolytic component of the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 265(21):12536-45.
 21. Tomoyasu T, Ogura T, Tatsuta T, Bukau B. 1998. Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 30(3):567-81.

22. Fayet O, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C. 1989. The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol.* 171(3):1379-85.
23. Harry EJ, Pogliano K, Losick R. 1995. Use of immunofluorescence to visualize cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 177(12):3386-93.
24. Lai EM, Nair U, Phadke ND, Maddock JR. 2004. Proteomic screening and identification of differentially distributed membrane proteins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 52(4):1029-44.
25. Ma X, Ehrhardt DW, Margolin W. 1996. Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(23):12998-3003.
26. Burman LG, Raichler J, Park JT. 1983. Evidence for diffuse growth of the cylindrical portion of the *Escherichia coli* murein sacculus. *J Bacteriol.* 155(3):983-8.
27. Cordell SC, Robinson EJ, Lowe J. 2003. Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(13):7889-94.
28. Condon C, Squires C, Squires CL. 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 59(4):623-4
29. Sugai M, Yamada S, Nakashima S, Komatsuzawa H, Matsumoto A, Oshida T, Suginaka H. 1997. Localized perforation of the cell wall by a major autolysin: atl gene products and the onset of penicillin-induced lysis of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 179(9):2958-62.
30. Mukherjee K, Nagai H, Shimamoto N, Chatterji D. 1999. GroEL is involved in activation of *Escherichia coli* RNA polymerase devoid of the omega subunit in vivo. *Eur J Biochem.* 266(1):228-35.

31. RayChaudhuri, D. 1999. ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytotkinetic FtsZ ring during bacterial cell division. *EMBO J.* 18:2372-2383.
32. Dai, K., and J. Lutkenhaus. 1992. The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174:6145-6151.
33. Zeilstra-Ryalls J, Fayet O, Georgopoulos C. 1994. Two classes of extragenic suppressor mutations identify functionally distinct regions of the GroEL chaperone of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 176(21):6558-65.
34. Ivic A, Olden D, Wallington EJ, Lund PA. 1997. Deletion of *Escherichia coli* groEL is complemented by a *Rhizobium leguminosarum* groEL homologue at 37 degrees C but not at 43 degrees C. *Gene.* 194(1):1-8.
35. Maddock JR, Alley MR, Shapiro L. 1993. Polarized cells, polar actions. *J Bacteriol.* 175(22):7125-9.
36. Yim L, Vandenbussche G, Mingorance J, Rueda S, Casanova M, Ruyschaert JM, Vicente M. 2000. Role of the carboxy terminus of *Escherichia coli* FtsA in self-interaction and cell division. *J Bacteriol.* 182(22):6366-73.
37. Cordell SC, Anderson RE, Lowe J. 2001. Crystal structure of the bacterial cell division inhibitor MinC. *EMBO J.* 20(10):2454-61.
38. Mukherjee, A., C. Saez, and J. Lutkenhaus. 2001. Assembly of an FtsZ mutant deficient in GTPase activity has implications for FtsZ assembly and the role of the Z ring in cell division. *J. Bacteriol.* 183:7190-7197.
39. Scheffers, D. J., J. G. de Wit, T. den Blaauwen, and A. J. Driessen. 2001. Substitution of a conserved aspartate allows cation-induced polymerization of FtsZ. *FEBS Lett.* 494:34-37.
40. Kerner MJ, Naylor DJ, Ishihama Y, Maier T, Chang HC, Stines AP, Georgopoulos C, Frishman D, Hayer-Hartl M, Mann M, Hartl FU. 2005. Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell.* 29;122(2):209-20.

41. Chatellier J, Hill F, Foster NW, Goloubinoff P, Fersht AR. 2000. From minichaperone to GroEL 3: properties of an active single-ring mutant of GroEL. *J Mol Biol.* 304:897-910.
42. Nogales, E., S. G. Wolf, and K. H. Downing. 1998. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391:199-203.
43. Redick SD, Stricker J, Briscoe G, Erickson HP. 2005. Mutants of FtsZ targeting the protofilament interface: effects on cell division and GTPase activity. *J Bacteriol.* 187(8):2727-36.
44. Löwe J. and L. A. Amos. 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* 391:203-206.
45. Sun Q, Margolin W. 1998. FtsZ Dynamics during the Division Cycle of Live *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol.* 180:2050-6.
46. Peekhaus N, Conway T. 1998. Positive and negative transcriptional regulation of the *Escherichia coli* gluconate regulon gene *gntT* by GntR and the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein complex. *J Bacteriol.* 180(7):1777-85.
47. Hall BG. 1998. Activation of the *bgl* operon by adaptive mutation. *Mol Biol Evol.* 15(1):1-5.
48. Bolstad B, Irizarry R, Astrand M, Speed T. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on bias and variance. *Bioinformatics.* 19(2):185-193
49. Liu X, Matsumura P. 1994. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J Bacteriol.* 176(23):7345-51.
50. Aldridge P, Hughes KT. 2002. Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol.* 5(2):160-5.
51. Soutourina OA, Bertin PN. 2003. Regulation cascade of flagellar expression in

- Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 27(4):505-23.
52. Chilcott GS, Hughes KT. 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(4):694-708.
53. Ibanez-Ruiz M, Robbe-Saule V, Hermant D, Labrude S, Norel F. 2000. Identification of RpoS (σ (S))-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol.* 182(20):5749-56.
54. Weart RB, Levin PA. 2003. Growth rate-dependent regulation of medial FtsZ ring formation. *J Bacteriol.* 185(9):2826-34.

謝辞

本研究を行うにあたり、御指導賜りました東京工業大学大学院生命理工学研究科助教授 和地正明博士に厚く御礼申し上げます。並びに御助言を頂きました東京工業大学名誉教授・中部大学応用生物学部教授 永井和夫博士に厚く御礼申し上げます。

研究および研究室生活を行うにあたり、多大な御協力を頂いた高田綾子博士にも厚く感謝申し上げます。

長い間、共に研究生活を行い様々な相談に乗っていただいた雨貝郁さんに厚く感謝申し上げます。

また、実験を行うに際し色々と協力いただき、研究室生活では楽しく過ごさせていただいた和地研究室の皆様に御礼申し上げます。

最後に、博士課程進学を寛容にも認めていただいた両親、色々と支えていただいた家族に感謝したいと思います。