

第6章

総括

6-1 要約

大腸菌などの桿状の形態を有する細菌は、細胞の中央部がくびれながら隔壁が形成され二分裂する。この隔壁形成部位には細胞分裂に関与するタンパク質群が局在している。*ftsZ* 遺伝子産物である FtsZ は細胞分裂に関与するタンパク質の1つであり、細菌の細胞分裂における隔壁形成に必要とされる。FtsZ は分裂箇所細胞膜の内側に局在し自己重合することにより、FtsZ リングとよばれる分裂環を形成する。隔壁形成時にこの分裂環が収縮することにより、細胞分裂が引き起こされる。細胞分裂における生理機能から、FtsZ は真核生物のチューブリンのホモログとして考えられており、チューブリンと同様に GTP 依存的自己重合活性と GTP 加水分解活性 (GTPase 活性) を有している。近年のゲノム解析データの蓄積により、古細菌のユーリアーキオータおよびナノーキオータの染色体には複数種の *ftsZ* 遺伝子ホモログが存在することが明らかとなった。

ユーリアーキオータに属する高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* TR-1 株は、三角形平板状という特徴的な形態を有している。その特徴的な形態から、細胞形態維持機構や細胞分裂機構の解明を目指した研究が展開されてきた。これまでに、光学顕微鏡観察により *Ha. japonica* は不等分裂することが明らかとなっている。しかしながら、細胞分裂機構を分子レベルで解明するには至っていない。そこで、多くの微生物の細胞分裂において中心的な役割を果たすと考えられている FtsZ を研究対象として選定した。その際、ほぼ全てのユーリアーキオータに共通して存在する2つの *ftsZ* 遺伝子パラログ (*ftsZ1* および *ftsZ2*) がコードする FtsZ1 および FtsZ2 を取り挙げることにした。本研究では、*Ha. japonica* の細胞分裂機構の解明の第一歩として、*Ha. japonica* FtsZ1 および FtsZ2 の一次構造決定、組換え型 FtsZ1 および FtsZ2 の性質検討、さらには *Ha. japonica* における *ftsZ1* および *ftsZ2* 遺伝子破壊株の取得を試みた。

以下に、本研究で得られた成果を各章ごとに要約する。

第2章では、*Ha. japonica* の染色体 DNA から *ftsZ1* 遺伝子をクローニングした。塩基配列決定の結果、本菌 *ftsZ1* 遺伝子は 1,158 塩基の ORF からなり、386 アミノ酸をコードしていた。また、クローニングした *ftsZ1* 遺伝子が実際に *Ha. japonica*

細胞内において発現していることを RT-PCR により転写レベルで確認した。

Ha. japonica ftsZ1 遺伝子の親株 (*Ha. japonica*) における発現系構築を行った。*Ha. japonica ftsZ1* 遺伝子を大腸菌-高度好塩性古細菌シャトルベクター pWL102 に挿入し、*ftsZ1* 遺伝子発現型プラスミドを作製した。その際、FtsZ1 の C 末端側にヒスチジンタグを付与した形での生産を試みた。発現型プラスミドを導入した *Ha. japonica* 形質転換体は組換え型 FtsZ1 を生産した。*Ha. japonica* 形質転換体の細胞質画分から組換え型 FtsZ1 の精製を行い、電気泳動的に単一な精製標品が得られた。

第3章では、*Ha. japonica* の染色体 DNA から *ftsZ2* 遺伝子をクローニングした。塩基配列決定の結果、本菌 *ftsZ2* 遺伝子は 1,236 塩基の ORF からなり、412 アミノ酸をコードしていた。また、クローニングした *ftsZ2* 遺伝子が実際に *Ha. japonica* 細胞内において発現していることを RT-PCR により転写レベルで確認した。

Ha. japonica ftsZ2 遺伝子の親株における発現系構築を行った。*Ha. japonica ftsZ2* 遺伝子を大腸菌-高度好塩性古細菌シャトルベクター pWL102 に挿入し、*ftsZ2* 遺伝子発現型プラスミドを作製した。その際、FtsZ2 の C 末端側にヒスチジンタグを付与した形での生産を試みた。発現型プラスミドを導入した *Ha. japonica* 形質転換体は組換え型 FtsZ2 を生産した。*Ha. japonica* 形質転換体の細胞質画分から組換え型 FtsZ2 の精製を行ったところ、組換え型 FtsZ2 精製標品が得られたものの、その収量は微量であった。

第4章では、親株が生産した組換え型 FtsZ1 の性質検討を行った。精製標品を用いゲル濾過による分子量測定を行ったところ、組換え型 FtsZ1 は単量体として精製されたことがわかった。単量体として精製された組換え型 FtsZ1 は GTP 存在下で自己重合し、FtsZ1 分子集合体を形成することが明らかとなった。また、組換え型 FtsZ1 の自己重合活性発現には高濃度の KCl を要求することがわかった。さらに、組換え型 FtsZ1 の GTPase 活性発現にも高濃度の KCl を要求することがわかった。

Ha. japonica ftsZ1 遺伝子プロモーターを利用することにより、組換え型 FtsZ2 の親株における大量生産に成功した。組換え型 FtsZ2 精製標品を用いて性質検討を行った。ゲル濾過による分子量測定により、組換え型 FtsZ2 は単量体として精製されたことがわかった。しかしながら、自己重合活性および GTPase 活性は検出され

なかった。

これらのことから、*Ha. japonica* 細胞内の飽和に近い KCl 濃度環境下において分裂環の形成を担う FtsZ パラログは、FtsZ1 であることが示唆された。

第5章では、*Ha. japonica* FtsZ1 および FtsZ2 の生理機能の解明を目的として、*Ha. japonica* における *ftsZ1* および *ftsZ2* 遺伝子破壊株の作製を試みた。その結果、*ftsZ1* 遺伝子破壊株の取得に成功し、*ftsZ1* 遺伝子は *Ha. japonica* の生育に必須ではないことが明らかとなった。*ftsZ1* 遺伝子破壊株の増殖速度は野生株に比して低いものであり、*Ha. japonica* の細胞分裂に際し FtsZ1 が分裂環の形成に関与するという仮説の妥当性が示された。一方、*Ha. japonica* *ftsZ2* 遺伝子破壊株は取得することができなかった。このことから、*ftsZ2* 遺伝子は *Ha. japonica* の生育に必須な遺伝子である可能性が示唆された。

6-2 今後の展望

本研究では、ほぼ全てのユーリアーキオータに共通して存在する2つの *ftsZ* 遺伝子パラログ (*ftsZ1* および *ftsZ2*) がコードする FtsZ1 および FtsZ2 を取り挙げた。

ユーリアーキオータに属する *Ha. japonica* から *ftsZ1* および *ftsZ2* 遺伝子をクローニングし、これらが *Ha. japonica* 細胞内で発現していることを転写レベルで明らかにした。また、C末端側にヒスチジンタグを付与した *Ha. japonica* FtsZ1 および FtsZ2 が、親株を用いて大量生産された。さらに、両組換え型タンパク質は精製され、性質検討がなされた。その結果、組換え型 FtsZ1 は自己重合活性および GTPase 活性を有していたものの、組換え型 FtsZ2 はこれら活性を示さないことが明らかとなった。今後は、より詳細な組換え型 FtsZ1 の生化学的性質検討により、FtsZ1 の機能がタンパク質レベルで明らかになるものと考えられる。さらに、さまざまなアミノ酸置換を導入した組換え型 FtsZ1 変異体の解析により、自己重合活性や GTPase 活性の発現に重要なアミノ酸残基を特定することが可能になるものと期待される。また、組換え型 FtsZ1 の X線結晶構造解析がなされれば、構造学的知見をもとにした自己重合活性発現機構および GTPase 活性発現機構が原子レベルで明らかになるものと期待される。

Ha. japonica における *ftsZ1* 遺伝子破壊株の取得に成功し、*ftsZ1* は *Ha. japonica* の生育に必須ではないことが明らかとなった。*Ha. japonica* は *ftsZ1* 遺伝子が破壊されても生育可能なことから、FtsZ1 以外にも分裂環を形成しうる *ftsZ* 遺伝子パラログが存在する可能性が示唆された。一方、*Ha. japonica* における *ftsZ2* 遺伝子破壊株は得られなかった。このことから、*ftsZ2* 遺伝子は *Ha. japonica* の生育に必須である可能性が示唆された。

自己重合活性などは示さなかったものの、細胞内での発現が確認された FtsZ2 も含め、今後は、FtsZ の生理機能を調べる必要がある。そのためには、FtsZ1 と FtsZ2 の *Ha. japonica* 細胞内の局在を調べ、細胞分裂時における分裂環の挙動を明らかにしなければならない。これは、各 FtsZ と GFP との融合タンパク質あるいはそれぞれの FtsZ 抗体を用いた免疫染色により達成されるであろう。

本研究は、FtsZ のタンパク質レベルでの生化学的性質検討と *ftsZ* 遺伝子の遺伝子破壊による遺伝学的性質検討の両面から、*Ha. japonica* の細胞分裂機構を明らかに

するものである。古細菌由来タンパク質の解析においてはこのようなアプローチは珍しく、とりわけ古細菌由来 FtsZ に関しては報告例がない。本研究がこの分野において先駆的な研究に発展するものと信じる。