

機関番号：14401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18074006

研究課題名（和文） 回転モータートルク発生ユニットの構造基盤

研究課題名（英文） Structural basis for torque generation of biological rotary motors

研究代表者

今田 勝巳 (IMADA KATSUMI)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40346143

研究成果の概要（和文）：べん毛モーター固定子蛋白質 MotY と MotB フラグメントの構造を明らかにし、固定子がモーターへの組み込まれるしくみを明らかにした。また、モーター回転子蛋白質 FliG 変異体の構造と回転計測から、モーターの反転機構を明らかにした。さらに、輸送装置蛋白質 FliI と FliJ が F_1 -ATPase 構成蛋白質と同様の構造を持ち、 F_1 -ATPase と同様の FliI₆-FliJ 複合体を形成することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We determined the crystal structures of MotY and MotB, which are stator proteins of bacterial flagellar motor, and revealed the molecular mechanism of the stator assembly into the motor. We proposed a new model for the arrangement of FliG in the rotor and the cooperative switching mechanism based on the structure and the characterization of a mutant FliG that shows a CW-biased rotation. We also solved the structures of FliI, FliJ and their complex, which are soluble components of the flagellar type III protein export apparatus, and found that the apparatus shares common architecture with F_1 -ATPase.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	16,100,000	0	16,100,000
2007年度	19,600,000	0	19,600,000
2008年度	14,700,000	0	14,700,000
2009年度	14,700,000	0	14,700,000
2010年度	14,700,000	0	14,700,000
総計	79,800,000	0	79,800,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・生物物理学

キーワード：分子モーター、ナノマシン、ナノバイオ、生物物理、分子機械

1. 研究開始当初の背景

細菌の運動器官であるべん毛は、約 30 種類の蛋白質が数万個自己集合してできた生体超分子機械である。べん毛基部に存在する直径約 30 ナノメートルのモーターによりべん毛繊維が回転し、細菌は泳ぎ回る。モーターは、膜を介したイオンの電気化学的ポテンシャル差を利用して回転し、水素イオンで

駆動するものとナトリウムイオンで駆動するものが知られている。主に内膜蛋白質で構成された固定子複合体中をイオンが通過するときに起きる、固定子複合体と回転子複合体との間の相互作用変化が回転力を生み出すと考えられている。トルク発生の中心となる蛋白質として回転子側では FliG が、固定子側では、水素イオン駆動型の MotA・MotB、

Na イオン駆動型の PomA・PomB といった内膜蛋白質が同定された。さらに Na イオン駆動型では、外膜蛋白質 MotX と MotY が固定子複合体に含まれることが知られている。また、べん毛モーターは、イオンの流れる方向を変えることなく逆回転することができる。べん毛モーター構成蛋白質について、分子生物学的解析が精力的に行われてきたが、トルク発生を担う蛋白質の構造が FliG の部分構造の除き不明であるため、回転の分子機構の理解は、進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究では、各種の構造解析手法を駆使し、細菌べん毛のトルク発生ユニットの構造基盤を明らかにすることにより、分子モーターの構築・回転機構の解明を目指した。固定子蛋白質、固定子と直接相互作用する回転子蛋白質の原子レベルでの構造決定を行い、エネルギー変換機構の理解に迫ることを目指した。また、べん毛特異的輸送モーターの特性を明らかにし、べん毛形成システムと F₀F₁-ATPase の間のエネルギー変換の共通原理、同じエネルギー源を異なる仕事に変換する仕組みの解明を目指した。

3. 研究の方法

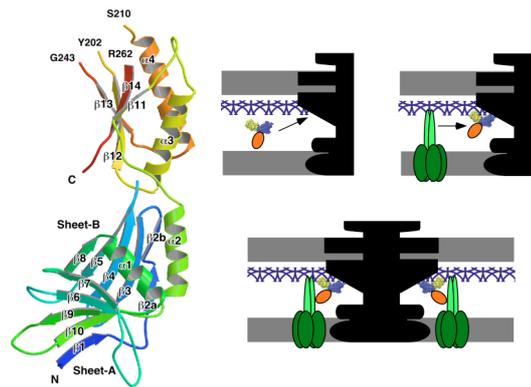
変異導入やフラグメントをデザインすることにより、べん毛モーター蛋白質を大量に発現・精製し、各構成蛋白質の構造を X 線結晶構造解析法により明らかにし、電子顕微鏡法で明らかにした低分解能の複合体構造に結晶構造を当てはめることで、トルク発生ユニットの構造の解明を行った。また、構造から得られた知見に基づき、変異実験と回転計測を行って、機能を調べた。

4. 研究成果

(1) 固定子蛋白質 MotY の構造

Na イオン駆動型べん毛モーター固定子蛋白質 MotY の構造を 2.9Å 分解能で解析した。固定子蛋白質では初めての構造である。MotY はモーター基部で MotX と共に T リングを形成する。MotY は 2 つのドメインから成り、N 末ドメインが新規構造であるのに対して C 末ドメインは、PaI などのペプチドグリカン結合蛋白質と非常に似ていた。N 末ドメインは MotX と基部体へ結合することで、基部体周囲への固定子の組み込みに関わり、C 末ドメインは高速回転する Na モーターの固定子ユニットを細胞壁に強固に固定することがわかった。また、ペプチドグリカン結合部位は結晶構造中で disorder していた。ペリプラズム中に輸送された MotX と MotY は複合体を形成しペリプラズム中を彷徨うが、その間はペプチドグリカンに結合せず、基部体と結合することで初めてペプチドグリカン結合部位

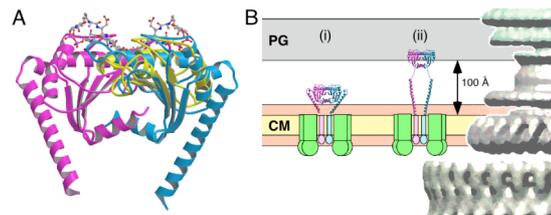
はフォールディングし、ペプチドグリカンに固定されると考えられる。



MotY の構造と固定子の集合機構モデル

(2) 水素イオン駆動型モーター固定子蛋白質 MotB のペリプラズムフラグメントの構造

固定子のモーターへの組み込み及びペプチドグリカンへの固定に働く MotB のペリプラズムフラグメント (MotB_C) の構造解析を行い、3 種類の結晶について 5 つの独立な MotB_C 分子の構造を明らかにした。MotB_C は 2 量体を形成しており、2 量体形成を阻害する変異を入れたところ、モーター機能が失われると共に、イオンチャンネルを形成する内膜部の構造も変化することが明らかになった。また、MotB_C の構造とミュータントの解析から、モーターに組み込まれる際に大きな構造変化が起こり、それがイオンチャンネルにプロトンを流す ON/OFF とカップルしていることが示唆された。また、モーターに組み込まれた後の構造に対応すると考えられる MotB(L119P) 変異体の結晶作成に成功した。



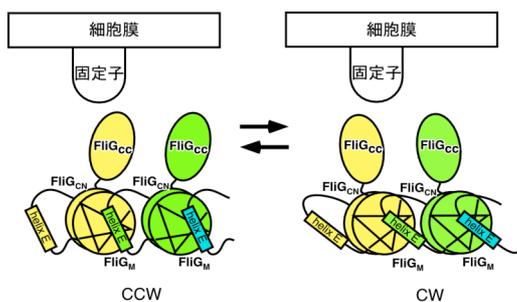
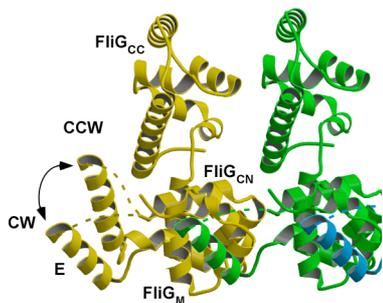
MotBc の構造と組込時の構造変化モデル

(3) Na イオン駆動型モーター固定子蛋白質 PomB のペリプラズムフラグメントの構造

Na イオン駆動型モーターにおいて固定子のモーターへの組み込み及びペプチドグリカンへの固定に働く PomBc (132-315) の構造を 2.5 Å 分解能で解析した。MotBc と同様の 2 量体を形成し、N 末側に長短 2 本のヘリックスが存在した。さらに、PomB の機能に重要な 122-131 の領域を含む PomBc (122-315) の結晶化にも成功し、回折データを収集した。

(4) 回転子構成蛋白質FliGの構造と回転計測に基づく回転方向スイッチ機構の解明

時計回りの回転と反時計回りの回転にバイアスされたモーターの回転ステップ計測を行い、トルク発生の素過程が回転方向によらず対称であることを示した。また、時計回りに回転方向がバイアスされた変異 FliG の MC ドメインの 2.3Å の構造を解明し、モーターの回転方向がスイッチする分子モデルを提案した。



サルモネラ菌べん毛モーターの回転方向スイッチの分子モデル

上図：回転子中に並んだ2個の FliG 分子（黄色と緑色）。ヘリックス E の向きが変わることで回転方向がスイッチ。

下図：回転方向スイッチ機構の模式図。a へリックス E の変化が隣の FliG サブユニットに伝わり、協同性を生み出す。

(5) 固定子蛋白質の機能解析

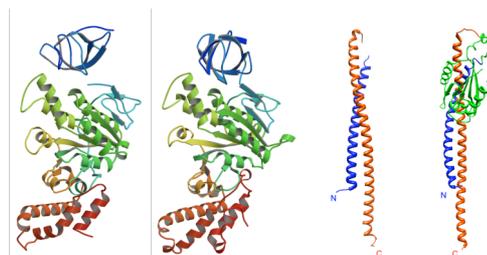
固定子構成蛋白質である MotA を単独で発現させると、野生株のモーター機能が著しく低下した。その原因は MotA がモーターに組み込まれ、回転子周囲の正常な固定子複合体の数が減少したためであり、MotA がモーター組込みの機能を持つことが明らかになった。また、MotA の細胞質ループ中の荷電残基が固定子の回転子周囲への組込みに重要であることを見出した。

さらに、pH 感受性蛍光蛋白質フルオリンをコードする遺伝子をサルモネラ菌の染色体に組み込んだ。このフルオリン発現株を用いることで、固定子複合体のプロトン透過活性の測定が蛍光変化で容易に行えるように

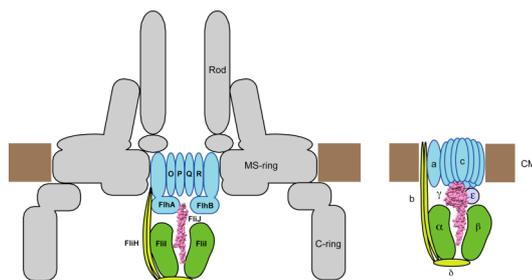
なった。

(6) べん毛輸送系モータータンパク質

X 線結晶構造解析から、べん毛輸送装置蛋白質 FliI が F₁ATPase の α/β サブユニットと、FliJ が F₁ATPase の γ サブユニットと著しい類似性を持つことを明らかにした。さらに、極低温電子顕微鏡による画像解析から、FliJ と FliI が、F₁ATPase における a3b3g 複合体と同様の構造を持つ FliI₆FliJ 複合体を形成することを明らかにした。このことから、輸送装置が F₁ATPase と共通の作動機構を持つことが示唆された。また、FliJ 変異体の解析から FliI-FliJ 複合体が FliJ を介してべん毛輸送装置を構成する膜蛋白質と相互作用し、その結果 FliI の ATPase 活性が著しく上昇することを明らかにした。さらに、べん毛輸送装置の輸送駆動力が ATP 加水分解エネルギーではなく、水素イオンの濃度差であることを明らかにし、輸送装置と F₀F₁ システムとの類似性は、F₀ 部分にまで広がる可能性を見出した。



左から FliI, F₁-β サブユニット, FliJ, F₁-γ サブユニットの構造



べん毛輸送装置 (左) と F₀F₁-ATP 合成酵素 (右) の模式図

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

① Structural insight into the rotational switching mechanism of the bacterial

flagellar motor. Minamino T, Imada K, Kinoshita M, Nakamura S, Morimoto YV, Namba K. *PLoS. Biol.*, 9, e1000616 (2011) 査読有

② Common architecture between the flagellar type III protein export apparatus and F- and V-type ATPases. Ibuki T, Imada K, Minamino T, Kato T, Miyata T, Namba K. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 277-282 (2011) 査読有

③ Charged residues in the cytoplasmic loop of MotA are required for stator assembly into the bacterial flagellar motor. Morimoto YV, Nakamura S, Kami-ike N, Namba K, Minamino T. *Mol. Microbiol.* 78, 1117-1129 (2010) 査読有

④ Evidence for symmetry in the elementary process of bidirectional torque generation by the bacterial flagellar motor. Nakamura S, Kami-ike N, Yokota JP, Minamino T, Namba K. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 107, 17616-17620 (2010) 査読有

⑤ Structural insight into the regulatory mechanisms of interactions of the flagellar type III chaperone FliT with its binding partners. Imada K, Minamino T, Kinoshita M, Furukawa Y, Namba K. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 107, 8812-8817 (2010) 査読有

⑥ Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the Periplasmic region of MotB. Kojima S, Imada K, Sakuma M, Sudo Y, Kojima C, Minamino T, Homma M, Namba K. *Mol. Microbiol.*, 73, 710-718 (2009) 査読有

⑦ Insights into the stator assembly of the Vibrio flagellar motor from the crystal structure of MotY. Kojima S., Shinohara A., Terashima H, Yakushi T, Sakuma M, Homma M, Namba K. and Imada K. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 105, 7696-7701 (2008) 査読有

⑧ Distinct roles of the ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. Minamino T and Namba K. *Nature*, 451, 485-488 (2008) 査読有

⑨ Structural similarity between the flagellar type III ATPase FliI and F1ATPase subunits. Imada K, Minamino T, Tahara A, Namba K. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 104, 485-490 (2007) 査読有

[学会発表] (計 115 件)

① Ibuki T, Shimada M, Minamino T, Imada K, Namba K. X-ray analysis of FliJ, a cytoplasmic component of the flagellar type III protein export apparatus. XXI Congress of the International Union of Crystallography, Grand Cube Osaka, Japan. Aug. 28-29, 2008.
CrSJ Award 受賞

[図書] (計 8 件)

① 今田 勝巳 「タンパク質でできた極小スクルー 細菌べん毛の分子機構」最新分子マシン (2008) P.104~112 化学同人

[その他]

新聞報道

① 「べん毛と ATP 合成酵素 たんぱく質に共通構造」日経産業新聞 2011 年 2 月 1 日.

② 「べん毛を成長させる複合体 仕組みの一端を解明」日刊工業新聞 2011 年 1 月 31 日.

③ 細菌べん毛運動 両方向同じ動き」日経産業新聞 2010 年 9 月 30 日.

④ 「細菌「べん毛」形成に迫る」朝日新聞 2010 年 6 月 1 日.

ホームページ等

① <http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/okuyama/>

② <http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/lab/09a.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今田 勝巳 (IMADA KATSUMI)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：40346143

(2) 研究分担者

南野 徹 (MINAMINO TOHRU)
大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授
研究者番号：20402993

(3) 連携研究者

なし