

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2006～2009

課題番号：18207011

研究課題名(和文) 膜超分子べん毛モーターの構造と構築機構の研究

研究課題名(英文) Study on the structure and function of supramolecular flagellar motor

研究代表者

本間 道夫 (Homma Michio)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：50209342

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：べん毛、エネルギー変換、メンブレン、ナノバイオ、分子モーター

## 1. 研究計画の概要

膜超分子である細菌べん毛は、イオン流入のエネルギーを動力源として、らせん形のべん毛繊維を高速で回転させる、生物界において唯一の回転運動器官である。しかも、その回転速度は、毎秒1700回転にも達し、超遠心機をはるかに上回る。この超小型な高速マシンは、一方では、細菌の細胞の中では最大かつ複雑なタンパク質装置でもある。細菌べん毛モーターは、電気モーターと同じく、回転子とそのまわりに複数個ある固定子から構成されており、それら固定子と回転子の間で回転力が発生していると考えられている。しかし、回転子と固定子内のどの蛋白質が回転力を作っているかは、推定はされているが、決定的な証拠はない。また、べん毛は、極に生えるものや菌体の周囲に生えるものなどがあり、細胞の特定の位置や数を制御する仕組みを備えている。本研究では、べん毛の構造研究に重点をおき、その形態形成の解析も含め、回転機構を明らかにする。

## 2. 研究の進捗状況

*Vibrio alginolyticus* の極べん毛は、ナトリウムイオンの共役による電気化学ポテンシャル差をエネルギーにして回転する。べん毛モーターの回転に必要なタンパク質として PomA, PomB, MotX, MotY が同定されており、このうち PomA, PomB は内膜でナトリウムイオンチャンネルとして機能していると考えられている。MotX, MotY はそれら一つでも欠損した菌は遊泳能を失うが、その機能の詳細は分かっていない。機能的なモーターを単離する目的で、*Vibrio alginolyticus* の基部体を精製し、確認のため電子顕微鏡による観察を行

ったところ、これまで大腸菌などには存在しない、基部体リングから突出した爪状の新しい構造を作ることを見いだした。これを T-ring と命名した。T-ring はペプチドグリカン層に埋まっている P-ring と内膜に存在する MS-ring との間に存在することが分かった。さらに、この構造が、ナトリウムモーターに特異的な MotX と MotY から構成されることを明らかにした。これら2つのタンパク質に関して、大量精製を行い、結晶構造解析を行っていたが、MotY については、2.9 Å 分解能で X 線結晶構造を得ることが出来た。MotY は大きく2つのドメインに(N,C末ドメイン)分別された。N末ドメインの構造は10個の b-strand と2個の a-helix からなり、新規の fold であった。また、生化学実験から MotX と相互作用をするドメインであることが示唆された。ペプチドグリカン結合モチーフを持つ C末ドメインの構造は、ペプチドグリカン結合タンパク質である Pal や RmpM に非常によく似ていた。Pal とペプチドグリカンが相互作用する重要な残基が NMR による構造解析から見いだされており、MotY にも保存されていることから MotY とペプチドグリカンの相互作用部位を推測することができた。

FliG, FliM, FliN から構成される Cリングは、基部体の下に存在して、回転子として固定子と相互作用する。回転力を作り出す生化学的相互作用の解析の第一歩として、ビブリオ菌での Cリング構造を含むべん毛基部体の精製を行ってきたが、ビブリオ菌ではサルモネラ菌とは異なり、FliN と FliM は基部体から解離することが確認された。電子顕微鏡で基部体の構造を詳細に観察することで、FliG が基部体に構造体として存在することを観察できた。このことによりビブリオ菌の基部モーター構造解析を進める準備が整った。大腸菌において固定子はプロトンチャンネルとして機能する MotA/MotB 複合体からなり、

MotB の C 末端領域にある PGB (ペプチドグリカン結合) ドメインによって固定子は回転子周辺につなぎとめられていると考えられている。我々は大腸菌 MotB PGB ドメインの系統的システイン変異導入実験と、機能の全く異なるペプチドグリカン結合リポタンパク質 Pal とのキメラタンパク質解析を行い、Pal の PGB ドメインが MotB の PGB ドメインと交換可能であることを示した。これに基づき既知の Pal の立体構造に MotB PGB ドメインの一連の系統的 Cys 変異部位をマッピングし、それらの構造と機能の相関について新しい知見が得られた。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。当初の計画通りに進んでいるとは言えないが、モータータンパク質について、MotY や MotB のペプチドグリカン結合部位の構造決定に成功した。これまでに、モーターの固定子タンパク質について、構造がまったく解かれていないことを考えると大きな進展であると言える。べん毛の構造を回転子の重要な部分である C リングは、界面活性剤の種類や可溶化条件を詳細に検討したが、FliN と FliM が外れてしまうことが明らかになった。FliG がべん毛基本体に相互作用している状態で精製することに成功したことは、今後の研究を行う上でも大きな進展であった。

### 4. 今後の研究の推進方策

申請者らのグループが遺伝学的手法から同定した Na<sup>+</sup> チャネルユニット (PomA, PomB, MotX, MotY の 4 種類) は複合体を形成していることを示唆するデータが得られている。MotY については、構造解析に成功したので、PomB の結晶化を重点的に進める。大腸菌において PomA または PotB に YFP を融合する。作成に成功した場合、蛍光エネルギー移動による両者の距離の変動を測定し、ナトリウムイ

オン流入に依存したタンパク質構造変化のダイナミックスの検出を試みる。温度感受性 PomA を精製し、膜に再構成したときのナトリウムイオン流入の温度依存性を測定する。また、蛍光 PomA にもこの変異を導入したものを構築して、温度変化と FRET を測定することで、タンパク質の構造変化を推定する。FliG-GFP で回転しているモーターを、その蛍光を指標に精製し、蛍光 C リング超分子構造体を単離する。ビブリオ菌で C リングを基本体ともに精製することに成功していない。しかし、C リング構成蛋白質の一つである FliG と基本体とを精製は成功したので、電子顕微鏡による構造解析を行う。モータータンパク質の PomA および PomB と蛍光蛋白質の融合蛋白質で可視化して、ナトリウム依存的な動的集合の観察に成功した。この動的な集合と機能の関連に重点をおいて、解析をおこなう。

### 5. 代表的な研究成果

(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 6 件)

Terashima H, Abe-Yoshizumi R, Kojima S, Homma M.

Cell-free synthesis of the torque-generating membrane proteins, PomA and PomB, of the Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*.

J Biochem, 144, 635-42

査読有り

[学会発表] (計 15 件)

本間道夫

ペプチドグリカン結合 (PGB) ドメインのキメラ作成によるべん毛固定子タンパク質 MotB の構造・機能解析

第 45 回日本細菌学会中部支部総会

2008. 10. 17-18, 金沢大学医学部記念館