

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18770129  
 研究課題名（和文） ナトリウムイオン駆動型細菌べん毛モーターの固定子における生化学的解析  
 研究課題名（英文） Biochemical analysis of the stator in the sodium-driven bacterial flagellar motor  
 研究代表者  
 小嶋 誠司 (Kojima, Seiji)  
 名古屋大学・大学院理学研究科・助教  
 研究者番号：70420362

研究成果の概要：細菌べん毛モーターの回転は、イオン流に共役した回転子と固定子の間のダイナミックな相互作用で生じると考えられている。本研究では、ビブリオ菌の  $\text{Na}^+$  駆動型極べん毛モーターを材料にし、GFP を融合させた固定子蛋白質 PomA または PomB を用いて固定子の挙動を *in vivo* で観察した。その結果、PomA/PomB 複合体は共役イオンである  $\text{Na}^+$  の濃度に応じてモーターへ集合・解離していることを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	240,000	3,840,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：運動、分子モーター、超分子複合体、分子集合、蛍光標識

## 1. 研究開始当初の背景

細菌の運動器官はスクリューとして働くべん毛繊維で、根元に存在するモーターにより回転する。べん毛モーターは細胞膜の内外に形成される  $\text{H}^+$  または  $\text{Na}^+$  の電気化学ポテンシャル差をエネルギー源とし、モーター中を流れる共役イオン流に伴う固定子

と回転子の相互作用により回転力を発生すると考えられている。申請時には、固定子の解析は膜タンパク質複合体であるために扱いが難しく、遺伝学・分子生物学的解析により機能残基は同定されてきたものの、回転子に比べて生化学的解析は遅れていた。そのため、固定子が (1) どのような形をして、(2) モーターのどの部分にどのように

して自己集合し、(3) どれくらいのイオンを透過させ、(4) イオン流と共役した回転子との相互作用がどのように起こっているのか、といった疑問に対する答えはまだ示されていない。これらを解明するためには、固定子構成要素を精製し、*in vitro* で機能を正確に測定し評価できる実験系が必須となる。すなわち、変異体の詳細な機能解析により初めてモーター回転機構を素過程に分けて議論できるようになる。申請時には、こうした背景のもと、*in vitro* での固定子の解析系を確立することを目指そうと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、上述のように固定子が (1) どのような形をして、(2) モーターのどの部分にどのようにして自己集合し、(3) どれくらいのイオンを透過させ、(4) イオン流と共役した回転子との相互作用がどのように起こっているのか、の4つの課題の解明を目標とした。これらの課題は有機的に結びついており、固定子構成要素を単離・精製することで固定子複合体の「かたち」を観察でき、精製標品を膜小胞に再構成することで *in vitro* で固定子中を流れる  $\text{Na}^+$  を定量できる。完全再構成系が確立できれば、回転子のどの構成要素が固定子と相互作用しているかも解析できる。そこで、大きな目標として固定子複合体の精製・再構成を掲げた。また、申請時には GFP を融合させた固定子複合体の *in vivo* での観察ができるようになっていた。これを用いることで、力発生に重要なステップである、回転子周囲への固定子の集合についても解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、材料にイオン駆動力の制御が

容易で、特異的阻害剤の存在する海洋性ビブリオ菌の  $\text{Na}^+$  駆動型極べん毛モーターの固定子、PomA/PomB 複合体を用いた。本研究では PomA/PomB 複合体の大腸菌での大量発現系を構築し、精製することを試みた。また、PomB のペリプラズム側を大腸菌のホモログ MotB と交換したキメラタンパク質 PotB は、PomA と複合体を形成し、大腸菌のモーターに集合でき  $\text{Na}^+$  駆動型として機能することが分かっている。そこで、PomA/PotB の大量発現系も作成した。これらの大量発現・精製により、上述 (1)、(3) にまず取り組んだ。さらに、固定子と回転子の相互作用(課題4)に関しては、静電相互作用が示唆されている回転子 FliG と固定子 PomA の2つのタンパク質に焦点を当て、保存された荷電残基をシステインに置換した変異体を組み合わせて、システイン残基間をジスルフィド結合または各種クロスリンカーにより架橋することを試みた。さらに、固定子-回転子間の弱い相互作用を検出することを目指して、オリンパス社 MF-20 を用いた蛍光相関分光法(FCS)による *in vitro* 解析系の立ち上げも行った。一方、ビブリオ菌極べんモーターの特徴として、菌体の極に1つだけモーターが構築されるため、GFP を融合させた固定子複合体が正常にモーターに集合した場合は、極に局在することが分かっている。そのため、GFP シグナルの極局在で固定子のモーターへの集合を簡単に評価することが出来る。この系を用いて、共役イオンの  $\text{Na}^+$  の培地中の濃度が固定子集合にどのように影響するのかを調べた。また、回転欠損変異をもつ固定子(または回転子)は集合できるのか、*in vivo* 観察を行うことで、課題2の固定子の集合についての解析も進めた。

## 4. 研究成果

### (1) Na<sup>+</sup>駆動型固定子複合体の精製 :

初年度に PomA/PomB、PomA/PotB 複合体の大腸菌大量発現系を構築し、確かに膜上に大量に発現していることを確認した。その後、可溶化条件の検討のため複数の界面活性剤を試したが、複合体を維持しながら可溶化できるものがなかなか見つからず、複合体精製は滞っていた。昨年共同研究先で、マルトース系の非イオン性界面活性剤 Cymal-5 を用いて精製に成功したとの情報を得て、実際に試したところ高い純度で精製することができた。ようやく精製標品を得ることが出来たので、これから「かたち」や再構成系の確立に挑む予定である。

### (2) 固定子と回転子の相互作用 :

初年度にまず固定子-回転子架橋実験を試みた。大腸菌の H<sup>+</sup>駆動型べん毛モーターにおいては、回転子 FliG と固定子 MotA のアミノ酸残基間に静電相互作用があり、回転力発生に関与していると考えられている。ビブリオ菌においても FliG と PomA の残基間の静電相互作用が見られることから、これらの各荷電残基をシステインに置換し、酸化条件下で FliG-PomA 分子間ジスルフィド結合を形成させることを試みた。しかし、複数の残基の組み合わせを試してみたが、分子間架橋は見られなかった。クロスリンカーも複数種試してみたがこれも架橋を得ることが出来なかった。

架橋が成功しなかったのは、固定子-回転子間の相互作用がトランジェントで弱いものであるからではないかと考えられたので、弱い相互作用を検出可能な測定機 MF-20 を用いた実験系の立ち上げを 2-3 年目に試みた。MF-20 では、蛍光相関分光法によりブラウン運動に起因する蛍光蛋白質の並進拡散時間を測定できる。分子間相互作用があれば、並進拡散時間の変化としてとらえることができる。PomA-FliG 間の相互作用検出を最終目

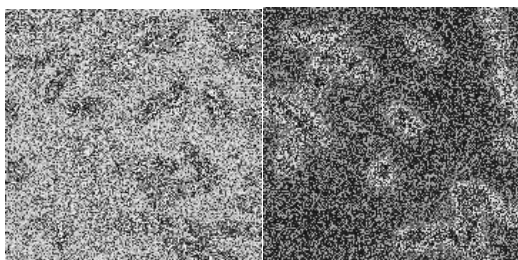
標とするが、まずはサルモネラ菌のモーターにおいて生化学実験により相互作用が検出されている、回転子の膜タンパク質 FliF と可溶性 FliG 間の作用の検出により解析系の確立を目指した。FliG の大量発現・精製をまず行い、パイロット実験でモノマー FliG 同士の相互作用を示唆する結果を得た。続いて FliF を含む基部体と FliG の相互作用を試したが、シグナルが大きくばらつき測定が困難であった。そのため、精製 FliF リングをサンプルに用いる方針に転換し、FliF の大量発現・精製系の立ち上げを行った。3 年目によりよく進展があり、FliF の大量発現と粗精製、および FliG の精製と蛍光標識まで成功した。これから実際の FCS 解析を試みる予定である。

### (3) 固定子のモーターへの集合

ビブリオ菌の極べん毛モーターは、菌体の極に 1 つだけ構築される性質を利用し、GFP 融合固定子の極局在により固定子の集合を容易に評価することができる。1-2 年目において、我々は固定子蛋白質 PomA または PomB に GFP を融合し、PomA/PomB 固定子複合体の挙動を *in vivo* で観察したところ、共役イオンの Na<sup>+</sup>が培地に存在すると固定子は極局在しているが、Na<sup>+</sup>を除いて K<sup>+</sup>に置換すると、極局在しなくなることを発見した。すなわち、固定子複合体のモーターへの集合解離が共役イオン(Na<sup>+</sup>)に依存していた。さらにこの現象の解析を進めて、Na<sup>+</sup>駆動型モーターの阻害剤フェナミルにより固定子複合体の極局在が低下すること、Na<sup>+</sup>非存在下においても PomA-PomB 間相互作用は低下せず複合体を維持していることを見だし、これまでの結果と合わせて論文を発表した (文献①)。

これまでに我々はモーターの回転が欠損した変異体を *pomA*, *pomB*, *fliG* 遺伝子上に多数単離してきた。そこで 3 年目には、これらの変異体では PomA/PomB 固定子が集合できているのかどうかを、GFP 融合固定子を用い

て解析した。その中で、回転子側の FliG の変異 R317D により、固定子の極べん毛基部への集合が著しく阻害されることを見いだした。(下図)



(図： 左；野生型 FliG 発現株、右；FliG-R317D 発現株。左の野生型 FliG を発現する株では極に GFP 固定子の局在を示す明るいドットが観察されるが、R317D 変異 FliG を発現する右の株では極局在がみられない)

この結果は固定子の回転子周囲への集合において、回転子である FliG がターゲットのひとつとして関与していることを示唆し、固定子-回転子相互作用を間接的であるが裏付けている。現在 FliG における更なる変異導入実験により、FliG と固定子の集合の関係を詳細に調べている。

## 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 4 件)

- ① Fukuoka H, Wada T, Kojima S, Ishijima A, Homma M. Sodium-dependent dynamic assembly of membrane complexes in sodium-driven flagellar motors. *Mol. Microbiol.* 71:825-835 (2009). 査読有り
- ② Terashima H, 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 (Tokyo)*.

144:635-642 (2008). 査読有り

- ③ Obara M, Yakushi T, Kojima S, Homma M. Roles of charged residues in the C-terminal region of PomA, a stator component of the Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor. *J. Bacteriol.* 190:3565-3571 (2008). 査読有り
- ④ Hajime F, Sowa Y, Kojima S, Ishijima A, Homma M. Visualization of functional rotor proteins of the bacterial flagellar motor in the cell membrane. *J. Mol. Biol.* 367:692-701 (2007). 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- ① 小嶋誠司、Dissecting sodium-driven flagellar motor of *Vibrio*: Assembly, Structure and function. 第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月 14 日、名古屋国際会議場
- ② 小嶋誠司、海洋性ビブリオ菌 Na<sup>+</sup>駆動型極べん毛モーターの回転に必須なタンパク質 MotY の結晶構造、第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月 13 日、名古屋国際会議場
- ③ 小嶋誠司、無細胞タンパク質合成系を用いたべん毛膜タンパク質の機能解析、第 46 回日本生物物理学会年会、2008 年 12 月 4 日、福岡国際会議場
- ④ 小嶋誠司、細菌べん毛モーター固定子タンパク質 MotB のペリプラズム側断片の精製と結晶化、第 45 回日本生物物理学会年会、2007 年 12 月 22 日、パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小嶋 誠司 (Kojima Seiji)  
名古屋大学・大学院理学研究科・助教  
研究者番号：70420362