

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03182

研究課題名(和文)細菌べん毛タンパク質輸送の交通整理のしくみの解明

研究課題名(英文) Hierarchical protein export mechanism of the bacterial flagellar type III secretion system

研究代表者

南野 徹 (Minamino, Tohru)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：20402993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の運動器官であるべん毛を作るために必要な部品は、その根本に存在する独自の輸送装置により運び出される。べん毛輸送装置は多種類の部品をランダムに運び出すのではなく、フックとその先に長く伸びるべん毛繊維の明確に区別して規則正しい順番で送り出す。本研究では、べん毛輸送装置が、分子物差しの役割を果たす蛋白質を時折送り出すことで細胞外に伸びるフックの長さを計測し、その情報にもとづいて輸送装置の基質特異性を切り替えることでフックの成長を止めてべん毛繊維の成長を開始するしくみを原子レベルで明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌感染症対策の主流である抗菌剤に対して多剤耐性菌の出現により治療困難な感染症が増加しているなか、抗菌剤に代わる新たな治療薬開発が求められている。WHOの調査によれば、数十年後には細菌感染者数の死者数が癌による死者数を上回ると予想されており、抗菌剤に代わる新たな治療薬の開発が急務となっている。細菌感染症に直接関与するべん毛は病原性細菌の生育にとっては必須でないことから、本研究で解明したFlhACの作用機序を直接ターゲットにした効率的な創薬スクリーニングが可能となり、社会的にも大きな課題となっている新興細菌感染症を制御する新技術の開発に直結すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The bacterial flagellum is a supramolecular motility machine consisting of the basal body, the hook, and the filament. Flagellar assembly begins with the basal body, followed by the hook and finally the filament. The bacterial flagellar type III secretion system (fT3SS) transports flagellar building blocks from the cytoplasm to the distal end of the growing flagellar structure. The fT3SS switches its substrate specificity from the hook protein to the filament protein when the hook reaches its mature length of about 55 nm in *Salmonella enterica*. As a result, hook assembly terminates and filament assembly initiates. FlhA, FlhB, and FlhC are directly involved in hierarchical protein export by the fT3SS. We have shown that FlhC forms a temporal complex with FlhB and that this FlhC-FlhB complex induces structural remodeling of the FlhA ring structure responsible for export switching of the fT3SS.

研究分野：分子生物学、生物物理学

キーワード：細菌 蛋白質 遺伝学 電子顕微鏡 感染症

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細菌の運動器官であるべん毛は細胞の内から外に向かって基部体、フック、繊維の順に構築され、べん毛の先端、すなわち細胞から遠い側の端にべん毛構成タンパク質が順序正しく重合することで構築が進む。基部体の細胞質側に存在する独自の蛋白質輸送装置が、非常に高い特異性を持ってべん毛構成蛋白質を認識し、べん毛基部体の中心にあるゲートからべん毛中心を貫通する細長いチャンネルの中へ、そして先端へと輸送する。べん毛輸送装置は14種類のべん毛構成蛋白質をランダムに輸送するのではなく、べん毛の構築過程に応じて必要な蛋白質を輸送する。フック構築中では、輸送装置はフック形成に関わる蛋白質のみを輸送する。フックの長さが55 nmに到達すると、輸送装置はフック蛋白質の輸送を停止し、繊維形成に関わる蛋白質の輸送を開始する。このように、べん毛基部体の細胞質側にある輸送装置は約90 nmも離れたところにあるフックの長さ情報を感知し、その情報にもとづいて輸送装置の基質特異性を切り替える。これまでに、フック構築中に分泌されるFliKがフックの長さを測定する分子物差しとして働くこと、FliKのC末ドメイン(FliKc)が輸送ゲート蛋白質FlhBのC末細胞質ドメイン(FlhBc)と相互作用すると輸送装置の基質特異性がスイッチすること、さらに9量体リングを作って働く輸送ゲート蛋白質FlhAのC末細胞質ドメイン(FlhAc)の構造変化により繊維形成に関わる蛋白質の輸送が開始することが示唆されていた。しかしながら、フック完成に伴って過渡的にしか存在しないFliKc、FlhAcおよびFlhBcからなる準安定なフック完成シグナリング複合体がどのように組み上がるのか、組み上がった複合体がどのようにFlhAcリング複合体の輸送基質特異性を変化させるのか、については謎であった。

### 2. 研究の目的

フックの完成に伴ってFlhAcリング複合体を構成する各FlhAcサブユニットが協同的に構造変化すると、べん毛蛋白質輸送の交通渋滞が発生することなく規則正しい順番でべん毛蛋白質が送り出される。このことは、FlhAcリング複合体を構成する各サブユニットが、例え化学的に等価であったとしても、空間的な分子配置や時間変化によって自身の機能が切り替わることを意味している。本研究は、フック完成に伴って誘導されるFlhAcリング複合体の協同的構造変化とそれに伴う機能変化を原子レベルで解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 運動培地を用いて輸送スイッチ機能が著しく低下した*flhB(P270A)*変異体から機能復帰変異体を単離した。さらに、site-directed mutagenesisにより様々なFlhAc変異体を作成した。輸送スイッチ変異体から培地中に分泌されるべん毛構成タンパク質をウエスタンブロットにより定量的に解析した。

(2) 輸送スイッチ変異体からフック・基部体を精製して電子顕微鏡で観察し、フックの長さを定量的に測定した。べん毛繊維を蛍光色素で染色して観察し、べん毛繊維の数およびその長さを定量的に測定した。

(3) Ni affinity chromatographyあるいはGST affinity chromatographyにより蛋白質間相互作用を解析した。バイオレイヤー干渉法により蛋白質間相互作用を定量的に解析した。さらに、光感受性のフェニルアラニン誘導体であるp-benzoyl-phenylalanineを用いた光架橋実験を行った。

(4) 輸送スイッチ機能が変化した変異型FlhAcのX線結晶構造解析を行なった。

### 4. 研究成果

(1) *flhB(P270A)*変異体を用いた遺伝学および生化学的解析から、FliKcがFlhBcに結合するとFlhBcの構造変化が起こり、その結果フック蛋白質の輸送が停止することが明らかとなった。さらに過渡的に形成されるFliKc-FlhBc複合体がFlhAcに結合すると、FlhAcリング複合体が一斉に構造変化し、その結果べん毛繊維蛋白質の輸送が開始することが判明した。

(2) FliKのN末ドメインとFliKcをつなぐリンカー領域(FliK<sub>L</sub>)の欠失解析から、FliK<sub>L</sub>はフックの長さを測定する分子物差しの一部であること、FliKcとFlhBcとの相互作用を巧みに制御すること、などが明らかとなった。

(3) FlhB<sub>C</sub>のC末天然変性領域に挿入変異をもつ変異体の機能解析から、FlhB<sub>C</sub>のC末端天然変性領域が輸送スイッチを制御するとともに、輸送チャンネルのゲートの開閉も制御することを突き止めた。

(4) *flhA(E351A/D356A)*変異体および*flhA(E351A/W354A/D356A)*変異体の遺伝学的および生化学的機能解析、さらにFlhAc(E351A/D356A)のX線結晶構造解析から、FlhAの膜貫通ドメインとFlhAcを繋ぐリンカー (FlhA<sub>L</sub>) がべん毛蛋白質輸送の交通整理を直接司る輸送スイッチの本体であることを明らかにした。

(5) *flhA(R391A)*変異体の遺伝学的および生化学的機能解析、さらにFlhAc(R391A)およびそのサブレッサー変異体であるFlhAc(R391A/V404L)のX線結晶構造解析から、FlhAホモログ間で高く保存されているArg-391が隣の分子のFlhA<sub>L</sub>と直接相互作用することにより、FlhAcリング複合体の協同的な構造変化が引き起こされることが判明した。さらに、FliK<sub>C</sub>がFlhAcに結合すると、FlhAcホモログ間で高く保存されているGYXLIモチーフを介してFlhAc内部の疎水的相互作用ネットワークのリモデリングが起こることも突き止めた。

(6) 輸送シャペロン変異体の解析から、FlgN, FliS, FliTの3種類の輸送シャペロンがFlhAcと規則正しい順番で相互作用するにより、べん毛繊維が効率よく形成されることが示唆された。

(7) べん毛構築中にべん毛特異的ATPase複合体の機能が低下すると、輸送シャペロンとして働くFlgNがFlhAcに直接結合することで、輸送装置に搭載されているナトリウムイオン駆動型輸送エンジンが活性化し、その結果輸送装置はナトリウムイオンの流れに共役してべん毛タンパク質を細胞外へ送り出すことを突き止めた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 17件）

1. 著者名 Morimoto YV, Namba K, Minamino T.	4. 巻 10
2. 論文標題 GFP fusion to the N-terminus of MotB affects the proton channel activity of the bacterial flagellar motor in Salmonella.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10091255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Terahara N, Namba K, Minamino T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Dynamic exchange of two types of stator units in Bacillus subtilis flagellar motor in response to environmental changes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Comput. Struct. Biotechnol. J.	6. 最初と最後の頁 2897-2907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.csbj.2020.10.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fulano AM, Shen D, Zhang EH, Shen X, Chou SH, Minamino T, Puopolo G, Qian G.	4. 巻 18
2. 論文標題 Functional divergence of flagellar type III secretion system: A case study in a non-flagellated, predatory bacterium.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Comput. Struct. Biotechnol. J.	6. 最初と最後の頁 3368-3376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.csbj.2020.10.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takekawa N, Kawamoto A, Sakuma M, Kato T, Kojima S, Kinoshita M, Minamino T, Namba K, Homma M, Imada K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Two distinct conformations in 34 FlIF subunits generate three different symmetries within the flagellar MS-ring.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e03199-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.03199-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minamino T, Kinoshita M, Morimoto YV, Namba K.	4. 巻 4
2. 論文標題 The FlgN chaperone activates the Na <sup>+</sup> -driven engine of the Salmonella flagellar protein export apparatus.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01865-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita M, Namba K, Minamino T.	4. 巻 4
2. 論文標題 A positive charge region of Salmonella Flil is required for ATPase formation and efficient flagellar protein export.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01980-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minamino T, Kawamoto A, Kinoshita M, Namba K.	4. 巻 427
2. 論文標題 Molecular organization and assembly of the export apparatus of flagellar type III secretion systems.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Curr. Top Microbiol. Immunol.	6. 最初と最後の頁 91-107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/82_2019_170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto, YV, Minamino T.	4. 巻 96
2. 論文標題 Architecture and assembly of the bacterial flagellar motor complex.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Subcellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 297-321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-58971-4_8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Shuichi、Minamino Tohru	4. 巻 9
2. 論文標題 Flagella-Driven Motility of Bacteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom9070279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minamino Tohru、Kinoshita Miki、Namba Keiichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Directional Switching Mechanism of the Bacterial Flagellar Motor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Computational and Structural Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 1075 ~ 1081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.csbj.2019.07.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minamino Tohru、Inoue Yumi、Kinoshita Miki、Namba Keiichi	4. 巻 202
2. 論文標題 FliK-Driven Conformational Rearrangements of FlhA and FlhB Are Required for Export Switching of the Flagellar Protein Export Apparatus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00637-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00637-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita M、Tanaka S、Inoue Y、Namba K、Aizawa SI、Minamino T.	4. 巻 10
2. 論文標題 The flexible linker of the secreted FliK ruler is required for export switching of the flagellar protein export apparatus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57782-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Terashima H, Tastumi C, Kawamoto A, Namba K, Minamino T, Imada K.	4. 巻 10
2. 論文標題 In vitro autonomous construction of the flagellar axial structure in the inverted membrane vesicles.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10010126.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi T, Toma S, Terahara N, Miyata N, Ashihara M, Minamino T, Namba K, Kato T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural and functional comparison of Salmonella flagellar filaments composed of FljB and FljC.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10020246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minamino Tohru, Morimoto Yusuke V., Kinoshita Miki, Namba Keiichi	4. 巻 118
2. 論文標題 Membrane voltage-dependent activation mechanism of the bacterial flagellar protein export apparatus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	6. 最初と最後の頁 e2026587118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2026587118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Yumi, Kinoshita Miki, Kida Mamoru, Takekawa Norihiro, Namba Keiichi, Imada Katsumi, Minamino Tohru	4. 巻 4
2. 論文標題 The FlhA linker mediates flagellar protein export switching during flagellar assembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02177-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawamoto Akihiro, Miyata Tomoko, Makino Fumiaki, Kinoshita Miki, Minamino Tohru, Imada Katsumi, Kato Takayuki, Namba Keiichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Native flagellar MS ring is formed by 34 subunits with 23-fold and 11-fold subsymmetries	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24507-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minamino Tohru, Morimoto Yusuke V., Kinoshita Miki, Namba Keiichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Multiple Roles of Flagellar Export Chaperones for Efficient and Robust Flagellar Filament Formation in Salmonella	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 756044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.756044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Tomoko, Makino Fumiaki, Miyata Tomoko, Minamino Tohru, Kato Takayuki, Namba Keiichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Structure of the molecular bushing of the bacterial flagellar motor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24715-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hendriksen Jordan J., Lee Hee Jung, Bradshaw Alexander J., Namba Keiichi, Chevance Fabienne F. V., Minamino Tohru, Hughes Kelly T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Genetic Analysis of the Salmonella FliE Protein That Forms the Base of the Flagellar Axial Structure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e02392-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.02392-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する



〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kinoshita M, Miyata T, Kato T, Namba K, Minamino T.
2. 発表標題 Gating mechanism of the bacterial flagellar protein export engine (バクテリアべん毛蛋白質輸送エンジンのゲート開閉機構)
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Minamino T.
2. 発表標題 Activation mechanism of the Na <sup>+</sup> -driven export engine of the flagellar protein export apparatus.
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kinoshita M, Miyata T, Kawamoto A, Kato T, Namba K, Minamino T.
2. 発表標題 Structural and functional analyses of the flagellar transmembrane export gate complex of the Salmonella flagellar type III protein export apparatus.
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Salmonella Biology and Pathogenesis. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minamino T, Inoue Y, Kinoshita M, Namba K.
2. 発表標題 Autocatalytic cleavage of FlhB is required for conformational rearrangements of FlhA to switch export specificity of the flagellar protein export apparatus.
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Salmonella Biology and Pathogenesis. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kinoshita M, Namba K, Minamino T.
2. 発表標題 Gating mechanism of the bacterial flagellar protein export apparatus (バクテリアべん毛タンパク質輸送装置のゲート機構).
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南野徹, 木下実紀, 難波啓一
2. 発表標題 バクテリアべん毛タンパク質輸送装置のエネルギー共役機構
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第45回討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minamino T
2. 発表標題 Energy coupling mechanism of the bacterial flagellar type III export system
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 2.Minamino T, Morimoto YV, Kinoshita M, Namba K
2. 発表標題 Multiple roles of flagellar export chaperones for flagellar filament formation in Salmonella
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Minamino T, Namba K.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Biomolecules	5. 総ページ数 356
3. 書名 Perspectives on bacterial flagellar motor	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://rd.iai.osaka-u.ac.jp/ja/2ce577c0931a0530.html">https://rd.iai.osaka-u.ac.jp/ja/2ce577c0931a0530.html</a> <a href="http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/02/group/">http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/02/group/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	今田 勝巳  (Imada Katsumi)		
研究協力者	木下 実紀  (Kinoshita Miki)		
研究協力者	難波 啓一  (Namba Keiichi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森本 雄祐  (Morimoto Yusuke)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
中国	南京農業大学			
米国	ユタ大学			