

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20370036

研究課題名（和文）細菌べん毛ロッドの形成と分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanism of the construction of the bacterial flagellar rod.

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）：細菌べん毛ロッド形成に必須である FlgJ のペプチドグリカン加水分解ドメインの構造を解明し、リゾチームとの類似性を明らかにするとともに、加水分解の分子機構を明らかにした。また、FlgJ の酵素活性が微量のカチオンで著しく阻害されることを見出した。さらに、精製したフックからロッドを再構成できることを示し、フックキャップ蛋白質 FlgD とロッドの相互作用についても明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we determined the crystal structure of a C-terminal fragment of FlgJ, which has a muramidase activity, and revealed the molecular mechanism of the peptidoglycan hydrolysis. The active site structure and the overall folding of FlgJ resemble those of hen egg white lysozyme. Interestingly, the activity of FlgJ is strongly inhibited by a very small amount of cation. We reconstituted distal rod by adding rod proteins to the purified flagellar hook. Moreover, we elucidated the interaction between the rod and FlgD, the hook cap protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析、分子機械、ナノマシン、生物物理、蛋白質、生体分子

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集合してできた巨大な蛋白質複合体である。内膜に埋め込まれたモータが、菌体から伸びる繊維状の軸構造体を回転させることで細菌は泳ぎ回る。基部体内のモータで発生したトルクは、ロッドと呼ばれる剛直なドライブ・シャフトによりペプチドグリカン層を貫いて自在継ぎ手のフックに伝達される。フックは FlgE 蛋白質のらせ

ん集合体で、回転力をべん毛フィラメントにスムーズに伝えるため、曲げに柔軟且つねじれに対して堅い構造を持ち、回転に応じて連続的な構造変化を起こす。一方、べん毛フィラメントは FlgC 蛋白質（フラジェリン）のらせん集合体で、ゆるやかな超らせんを形成する。べん毛フィラメントは推進力を発生するために剛性に富むが、モータの反転に应答して超らせん形態を変換する柔軟性を併せ持つ。また、フック-フィラメント間には、

FlgK と FlgL の 2 種の蛋白質が複数結合してできた複合体があり、力学的特性の異なるフックとフィラメントを連結するカップリングジョイントとして働く。これまでに、X 線結晶構造解析による各構成蛋白質の高分解能構造と電子顕微鏡による構造体全体の低分解能構造を組み合わせることで、べん毛フィラメント、フック、カップリングジョイントの構造が明らかになっている。フックやフィラメントがそれぞれ FlgE, FliC という単一の蛋白質で構成されているのに対し、ロッドは分子量の小さい 4 種類の蛋白質 (FlgB, FlgC, FlgF, FlgG) から成る。強い捻れの力を受けるにもかかわらず、ロッドはフックやフィラメントに比べかなり細いことが基体の電子顕微鏡観察から知られている。またロッドは、外膜に存在しベアリングの働きをする LP リングの中を貫く。ロッドは 1 万 rpm 以上で回転することから、LP リングとロッドの間のナノスケールでの潤滑のしくみが注目されている。しかし、ロッドは単離精製が困難なこと、精製したロッド構成蛋白質はアミロイド様沈殿を非常に生じやすいこと、*in-vitro* での再構成が困難なことから構造研究はほとんど進んでいなかった。

各軸構造体は、構築中のべん毛中央の穴を通過して先端まで運ばれきた構成蛋白質が重合することで伸長する。軸構造先端の成長端にはキャップ状の蛋白質複合体が存在し、キャップ直下で運ばれてきた蛋白質の重合を補助する。各軸構造には、それぞれに対応するキャップ蛋白質があり、フックには FlgD、フィラメントには FliD から成る複合体がキャップとして働く。これまでに、FliD-フィラメント複合体の低分解能構造から、フィラメント伸長機構を明らかになっている。ロッドも同様のキャップ蛋白質により重合が補助されていると考えられているが、ロッドはペプチドグリカン層を貫くため、形成過程においてペプチドグリカン層に穴を開ける必要がある。FlgJ は、C 末端側がムラミダーゼ活性を持ち、FlgJ を欠失するとロッドが形成されないこと、ロッド構成蛋白質と相互作用することから、ペプチドグリカンに穴を開けると同時にロッド形成を補助するロッドキャップ蛋白質であると考えられていた。

2. 研究の目的

本研究では、べん毛ロッド形成のメカニズムを明らかにするため、ロッドキャップ蛋白質と考えられる FlgJ の構造と機能を詳細に調べた。FlgJ は、リゾチーム等他のムラミダーゼと比べると、活性が著しく弱く、しかもロッドと相互作用する領域と考えられている N 末が活性を制御することが示唆されている。FlgJ の構造と酵素化学的な研究などから、ペプチドグリカン分解活性発現と制御機構

を明らかにし、ペプチドグリカン層に穴を開けてオルガネラが構築されるメカニズムの解明を目指した。また、べん毛形成過程で FlgJ およびフックキャップ蛋白質 FlgD と相互作用し、フックとの連結に関わるロッド蛋白質 FlgG の構造と、これらの蛋白質間の相互作用を調べた。さらに、単離精製が難しいロッドをフックから再構成し、ロッドの構成を明らかにすることを狙った。

3. 研究の方法

FlgJ についてはムラミダーゼ活性を有する様々なフラグメントを作成し、結晶構造解析を行った。また、FlgJ およびこれらのフラグメントについて、酵素化学的な性質を調べた。続いて、構造に基づいて変異蛋白質を作成し、ムラミダーゼ活性発現機構を検討した。ロッド蛋白質 FlgG、FlgF はフレキシブルな NC 末端を除いた様々なフラグメントを作成し、結晶化を行った。FlgG と FlgJ, FlgD, FlgE との相互作用は、生化学的、遺伝学的な手法で調べた。ロッドの再構成は、単離精製した短いフックに様々な条件下でロッド蛋白質を順次加えることを行い、生成物を電子顕微鏡で観察した。

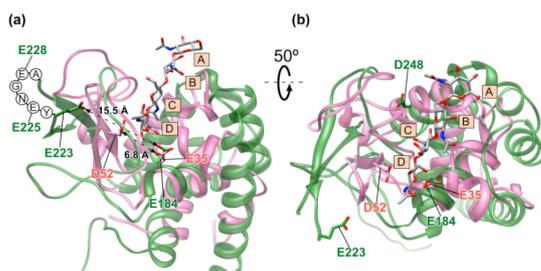
4. 研究成果

(1) FlgJ 21 kDa フラグメントの構造とペプチドグリカン加水分解機構の解明

ペプチドグリカン分解活性を有する FlgJ 21 kDa フラグメントの X 線結晶構造解析を行い、1.9Å 分解能で構造を明らかにした。FlgJ は、シーケンス上で全く相同性が見られなかった卵白リゾチームと似たフォールディングをしていた。また、活性部位を構成する領域の構造は非常によく似ており、リゾチームと同様の反応機構でペプチドグリカン鎖の切断を行うと考えられた。そこで FlgJ とリゾチームの立体構造比較から、活性部位の残基に変異を加えた蛋白質を作成し、べん毛形成能とペプチドグリカン分解活性を測定し、FlgJ のペプチドグリカン分解に必須なグルタミン酸を同定した。また、グルタミンへの変異させると活性が著しく低下する、別のグルタミン酸も同定した。しかし、この残基は活性発現には重要であるにもかかわらず、ここに変異を持つミュータントはべん毛を形成した。このことから、ロッド形成には高いムラミダーゼ活性は必ずしも必要ではないことが明らかになった。

また、FlgJ の基質結合部位であるドメイン間の溝がリゾチームに比べて大きく開いていることから、反応時に溝が閉じることが考えられた。そこで構造比較と変位実験を行い、K207 がドメイン間の開閉を引き起こす引き金となることを明らかにした。さらに、基質と相互作用し、加水分解反応に適した状態に

基質を固定する役割を果たす残基を同定した。

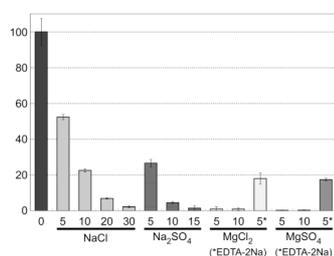


FlgJ (緑) とリゾチーム (桃) の構造

(2) FlgJ の酵素化学的性質

FlgJ 21 kDa フラグメントの酵素化学的性質を詳しく調べたところ、至適 pH は中性付近であること、FlgJ は微量のカチオンによって加水分解活性が著しく阻害され、生理的塩濃度下では殆ど活性を持たないことが明らかになった。また、この阻害はカチオンの種類ではなくイオン強度に依存して起こること、アニオンには依らないことを明らかにした。このことは、通常の状態では FlgJ による溶菌の危険性が無く、ロッド形成時にのみ何らかの活性発現機構が働いてペプチドグリカン層を分解する可能性を示唆している。

さらに、FlgJ の加水分解反応は自身の N 末領域(通常は disorder している)により阻害されることを示した。



カチオンによる FlgJ の活性阻害

(3) ロッドの再構成

精製したフックに精製したロッド蛋白質を様々な条件下で加え、フックからロッドの再構成を行い電子顕微鏡で観察した。その結果、フックから安定して FlgG ロッドを再構成する条件を見出した。また、その先端に FlgF が結合したフック-FlgG ロッド-FlgF 複合体の再構成にも成功した。これらの実験から、フック側のロッドの構成が明らかになった。また、FlgG ロッドは伸長するが FlgF ロッドは伸長しないことから、FlgF がべん毛の各プロトフィラメントに 1 分子ずつ結合することが分かった。

さらに、回転子 FliF フラグメントから作成したリングにロッド蛋白質 FliE, FlgB,

FlgC を添加して電子顕微鏡観察を行ったところ、リング中央部に密度の増加が見られた。このことは、回転子から細胞側ロッドの再構成が可能であることを示唆している。



フックから再構成したロッド

(4) ロッドの完成とフック成長への切替わり

FlgG 完成後に FlgG 上でキャップ構造を形成し、その後フックキャップとして機能する FlgD 変異体の解析から、軸構造に共通する N 末ヘリックス領域で FlgG 軸構造と相互作用し、C 末ドメインが新たに輸送されてきたフック分子の漏れを防ぐキャップ機能を担うことを明らかにした。

また、FlgE 変異株の遺伝学的解析から、FlgE の D1 と高い相同性を示す FlgG のコアドメインと FlgE の D1 ドメインが相互作用することを明らかにした

(5) ロッド蛋白質の結晶化

ロッド蛋白質 FlgG の NC 末のフレキシブルな領域を切断したフラグメントから 2.3 Å 分解能まで回折する結晶の作成に成功した。Se-Met 誘導体の結晶化にも成功し、回折強度を測定を行った。現在構造解析中である

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 3 件)

① Moriya N, Minamino T, Imada K, Namba K. Genetic analysis of the bacterial hook-capping protein FlgD responsible for hook assembly. (2011), *Microbiology*. 157, 1354-1362. 査読有

② Minamino T, Shimada M, Okabe M, Saijo-Hamano Y, Imada K, Kihara M, Namba K. Role of the C-terminal cytoplasmic domain of FlhA in bacterial flagellar type III protein export. (2010). *J. Bacteriol.*, 192, 1929-1936. 査読有

③ Kikuchi Y, Matsunami H, Yamane M, Imada K, Namba K. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a C-terminal

fragment of FlgJ, a putative flagellar rod cap protein of *Salmonella*. (2009). *Acta Crystallogr.* F65, 17-20. 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

① 今田勝巳、F₁NドメインとFliI Nドメイン、そして、第二回膜輸送体研究会、2010.12.21、ホテルピアノ(北海道)

② 菊地祐希、松波秀行、難波啓一、今田勝巳、細菌べん毛ロッドキャップ蛋白質 FlgJ によるペプチドグリカン加水分解の分子機構、第 10 回日本蛋白質科学会年会、2010.6.18、札幌コンベンションセンター(北海道)

③ 今田勝巳、Tcp の構造と citrate 認識、第 7 回 21 世紀大腸菌研究会サテライトミーティング、2010.6.4、休暇村南阿蘇(熊本県)

④ 菊地祐希、松波秀行、山根みどり、今田勝巳、難波啓一、細菌べん毛ロッドキャップ蛋白質 FlgJ のペプチドグリカン加水分解機構に対する構造学的知見、2009 年度べん毛研究交流会、2010.3.14、松風園(愛知県)

⑤ 吉田真司、松波秀行、長島重広、今田勝巳、難波啓一、細菌べん毛 MS リングの機能ドメイン構造の解析、2009 年度べん毛研究交流会、2010.3.14、松風園(愛知県)

⑥ Kikuchi Y, Matsunami H, Yamane M, Imada K, Namba K. Molecular mechanism of peptidoglycan hydrolysis by FlgJ, a putative flagellar rod cap protein of *Salmonella*., Biophysical Society 54th Annual Meeting, February 22, 2010., Moscone Center, San Francisco, U.S.A.

⑦ Imada K. Structure of a biological macromolecular nanomachine, the bacterial flagellum. Osaka University Macromolecular Symposium '09, Dec. 12, 2009, Osaka University, Japan,

⑧ 菊地祐希、松波秀行、山根みどり、今田勝巳、難波啓一、サルモネラ菌べん毛ロッドキャップタンパク質 FlgJ の結晶構造と変異体解析、特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 6 回公開シンポジウム、2009.12.2、千里ライフサイエンスセンター(大阪府)

⑨ 吉田真司、松波秀行、長島重広、今田勝巳、難波啓一、サルモネラ菌べん毛 MS リング構成タンパク質 FliF のプリプラズム領域の発現系構築と精製、特定領域研究「生体超

分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 6 回公開シンポジウム、2009.12.2、千里ライフサイエンスセンター(大阪府)

⑩ Imada K. Structure of the bacterial flagellum and the mechanism of its self-assembly. 4th Conference on Artificial Muscles -5th World Congress on Biomimetics, Artificial Muscles and Nano-Bio-, Nov. 26, 2009., Senri Life Science Center, Osaka, Japan.

⑪ 堀田春香、藤井高志、西條由見子、難波啓一、今田勝巳、細菌べん毛ロッドの再構成、日本生物物理学会第 47 回年会、2009.11.1、アスティとくしま/徳島文理大学

⑫ 菊地祐希、松波秀行、山根みどり、今田勝巳、難波啓一、サルモネラ菌べん毛ロッドキャップ蛋白質 FlgJ の結晶構造と変異体解析、日本生物物理学会第 47 回年会、2009.10.31、アスティとくしま/徳島文理大学

⑬ Imada K. Structure of the bacterial flagellum and the mechanism of its self-assembly. Joint Conference of the Asian Crystallographic Association and Chinese Crystallography Society, Oct. 23, 2009., Jingyi Hotel, Beijing, China

⑭ Imada K. Structure of the bacterial flagellum and its evolutionary relation to other biological molecular machines. International Workshop on What is Evolution? -Bicentennial of Charles Darwin's Birth, October 17, 2009., Co-op Inn Kyoto Conference Hall, Kyoto, Japan,

⑮ 菊地祐希、松波秀行、山根みどり、今田勝巳、難波啓一、結晶構造と変異体解析から明らかになったサルモネラ菌べん毛ロッドキャップ蛋白質 FlgJ のペプチドグリカン加水分解機構、2008.12.3、第 46 回日本生物物理学会年会、福岡国際会議場

⑯ Imada K. Structure of a biological macromolecular nanomachine, the bacterial flagellum. Spring-8 Academic Review Committee (SPARC), Nov. 17, 2008., SPring-8, Harima, Japan,

⑰ Kikuchi Y, Matsunami H, Yamane M, Imada K, Namba K. Crystal structure of the muramidase domain of FlgJ, a putative flagellar rod cap protein. XXI Congress of the International Union of

Crystallography, Aug. 28-29, 2008., Grand Cube Osaka, Japan.

⑱ 菊地祐希、松波秀行、山根みどり、今田勝巳、難波啓一、ロッドキャップ蛋白質 FlgJ のムラミダーゼドメインの構造、第8回日本蛋白質科学会年会、2008. 6. 11、タワーホール船堀（東京都）

〔図書〕（計1件）

① 今田勝巳、べん毛を使って感染する病原性大腸菌、共立出版、蛋白質・核酸・酵素、Vol. 54, No. 6, pp765 (2009)

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

なし

(3) 連携研究者

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

加藤 貴之 (KATO TAKAYUKI)
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
研究者番号：20423155

難波 啓一 (NAMBA KEIICHI)
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号：30346142