

## 自己評価報告書

平成 23 年 4 月 26 日現在

機関番号：82401  
研究種目：基盤研究(B)  
研究期間：2008～2012  
課題番号：20370064  
研究課題名(和文)細菌べん毛モーターのトルク発生装置の解析  
研究課題名(英文) Structural study of the torque-generating unit in the bacterial flagellar motor  
研究代表者  
米倉 功治 (YONEKURA KOJI)  
独立行政法人理化学研究所・米倉生体機構研究室・准主任研究員  
研究者番号：50346144

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：構造生物学、イオンチャネル、べん毛モーター、電子顕微鏡、X線結晶構造解析

## 1. 研究計画の概要

細菌べん毛は、細胞膜を透過するイオンの流れをエネルギーとして回転する生体超分子モーターであるが、その回転の機構はほとんどわかっていないのが現状である。生体分子機械の作動原理の解明は、生命科学のみならずナノテクノロジーへの応用に向けても重要な課題である。本申請研究では、イオン流のモーター回転力への変換を担う細胞膜中のナトリウムチャネル PomAB の三次元構造を、低温電子顕微鏡法、X線結晶回折法により、高分解能で解析する。

## 2. 研究の進捗状況

まず、PomAB複合体試料を効率的に調整する環境を整えた。そのために、高圧連続式ホモジナイザー、遠心機、培養機、オートクレーブ等を導入した。これまで用いてきた発現系では、試料の発現量があまり多くない上に精製法も複雑であった。そこで、発現系の改良を行った。種々の発現系のスクリーニングから、蛋白質発現量を改善した系を構築することができた。同試料から得た初期結晶を用いて大型放射光施設SPring-8においてX線回折実験を進めている。さらに、PomABのホモログである膜蛋白質を大量発現、精製し、結晶化を進めた。この蛋白質でも初期結晶が得られており、現在、結晶化条件の検討を進めている。

一方、電子顕微鏡法による解析では、PomABの単粒子解析、トモグラフィーによる解析を進めた。同法では、分解能は限られるが、結晶化することなく試料の三次元構造を解析することができる。すでに、単分散した試料を

再現性良く調整することはできている。負染色像からのトモグラフィー及び単粒子解析法による三次元構造解析は完了し、論文が受理されている。そこで、より生理的な状態の解析に向け、低温電子顕微鏡の撮影条件の検討を行った。これまでに、単離精製した試料を液体窒素温度で電子顕微鏡観察したところ、ほとんどの試料がカーボン膜に吸着し氷中に包埋されにくいことが分かった。一方、PomABの機能単位は分子量が20万以下であり非染色の試料の観察は難しいと予想されていたが、電子分光によりコントラストよく解像できることが分かった。現在、試料濃度、界面活性剤濃度等の条件を変え、氷包埋条件を検討、単粒子解析法を用いて、より高い分解能で三次元構造の解析を目指している。

## 3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。当初の計画通り、電子顕微鏡法、およびX線結晶回折法の両者の長所を生かした構造解析を進めることができおり、結果が出てきている。

## 4. 今後の研究の推進方策

低温電子顕微鏡法、X線結晶構造解析法の両者を相補的に用いて、イオン流のモーター回転力への変換機構の解明を目指す。結晶解析では、結晶の改善と共に位相情報の取得に向け、重原子置換体、SeMet誘導体の調製を行う。電子顕微鏡法では、氷包埋像の収集、構造解析プログラムの改良を進めてより高い分解能での三次元構造の解析を行う。また、ナトリウムイオンの有無に伴う構造変化、阻害剤存在下での構造変化を解析する。同時に、ホ

モログ蛋白質を構造解析し、いろいろな系においてイオン流のエネルギー変換機構に関する構造学的な理解を深める。

#### 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 5 件)

- ① Koji Yonekura, Saori Maki-Yonekura, Michio Homma, The structure of the flagellar motor protein complex PomAB: Implications for the torque-generating conformation, Accepted to *J. Bacteriol.*, 査読あり
- ② 米倉 功治, 生体超分子の高分解能構造解析のための電子線イメージングの条件、顕微鏡、**45**、243 - 249、2011, 査読あり
- ③ Saori Maki-Yonekura, Koji Yonekura, Keiichi Namba, Conformational change of flagellin for polymorphic supercoiling of the flagellar filament, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 417 - 422, 2010, 査読あり
- ④ 米倉 功治, 低温電子顕微鏡法による生体超分子構造の解析 --- 電子顕微鏡はどこまでタンパク質の立体構造に迫れるか ---、日本結晶学会誌、**52**、56 - 61、2010, 査読あり
- ⑤ Saori Maki-Yonekura & Koji Yonekura, Electron digital imaging towards high-resolution structure analysis of biological macromolecules, *Microsc. Microanal.*, **14**, 362 - 369, 2008, 査読あり

[学会発表] (計 22 件)

- ① Koji Yonekura, Saori Maki-Yonekura, Cryo-electron microscopy of biological macromolecules, Workshop on structural biology, Tainan, Taiwan, Feb. 13, 2011
- ② Koji Yonekura, Electron crystallography in biological sciences, The satellite meeting, the 10<sup>th</sup> conference of the Asian crystallographic association, Daejeon, Korea, Oct. 29, 2010
- ③ 米倉 功治, 極低温電子顕微鏡で細菌を『見る』、第 83 回日本細菌学会総会、横浜、2010 年 3 月 28 日
- ④ Koji Yonekura, Saori Maki-Yonekura, High-resolution cryo-electron microscopy of biological macromolecular structures by helical reconstruction, Microscopy Conference 2009 in Graz, Graz, Austria, Sep. 2,

2009

- ⑤ 米倉 功治, 電子顕微鏡でモーター分子を見る、日本生物物理学会 第 46 回年会、福岡、2008 年 12 月 4 日

[その他]

- 米倉 功治, 眞木 さおり, 2009 年(独)電子顕微鏡学会 Ernst Ruska 賞受賞。