

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31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

研究成果の概要（和文）：

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 の三次元構造を電子顕微鏡法で解析した他、X線結晶回折法による解析のための試料調製、結晶化を行った。

研究成果の概要（英文）：

The bacterial flagellum is a rotary motor powered by the electrochemical potential of specific ions across the cytoplasmic membrane. There is little information about its working mechanism of this biological motor, the information which could be useful for biological science and nano-technology. In *Vibrio*, an inner membrane complex, PomAB, converts Na^+ flux into rotation of the flagellum. We have been studying the structure of PomAB by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy to elucidate the working mechanism of this energy conversion system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2012年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2013年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	15,900,000	4,770,000	20,670,000

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：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. 研究開始当初の背景

細菌べん毛（図-1）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。本課題では、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ことを目指す

た。

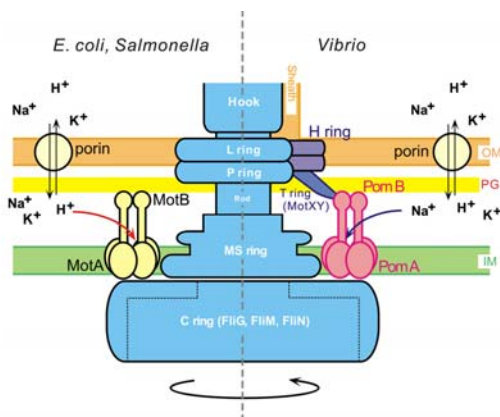


図-1 大腸菌(左)と海洋性ビブリオ菌(右)のべん毛モーターの模式図。大腸菌ではプロトンが、海洋性ビブリオ菌ではナトリウムイオンがモーターの駆動に使われる。それぞれのイオンに共役したチャネル MotAB と PomAB が細胞質膜中に存在する。機能単位は MotA₄MotB₂、PomA₄PomB₂ と考えられている。OM: 外膜； PG: ペプチドグリカン層(細胞壁)； IM: 細胞質膜。

2. 研究の目的

大腸菌やサルモネラ菌では、プロトン流をべん毛モーターの回転に変換するプロトンチャネル、MotAB(Mot: MOTility)が細胞膜中に存在する(図-1)。一方、ある種のアルカリ性バチルス菌、ビブリオ菌等では、プロトンの代わりにナトリウムイオンによりモーターが駆動される。大腸菌やサルモネラ菌のべん毛モーターの最大の回転速度は 200 - 300 Hz であるのに対して、海洋性ビブリオ菌の極べん毛では 1,700 Hz にも達する。異なったイオンへの共役とどのように高速な回転を実現しているかは、大きな謎である。研究では、海洋性ビブリオ菌の極べん毛に存在するこのナトリウムチャネル、PomAB(Pom: Polar flagellum Motility)を対象とした。PomAB は、MotAB のホモログで、PomA と PomB の二本のペプチド鎖からなる。PomA は 4 本、PomB は 1 本の膜貫通ヘリックスを持つと予想されている。PomB は C 末端のペプチドグリカン(PG)結合部位で細胞壁に結合、PomA と複合体を形成しモーターの固定子となる。また、主に PomA の細胞質ドメインが、回転子であるリング状構造の細胞質にある C ring の構成蛋白質 FliG (図-1) と直接相互作用し、モーターのトルクが発生すると考えられている。以上のように PomAB、MotAB は、イオンの流れを回転力に変換する重要な役割を担っているが、その三次元構造の解明は進んでおらず、作動機構はほとんどわかっていなかった。研究では、低温電子顕微鏡法、X 線結晶回折法により、PomAB を構造解析しイオン流のモ-

ター回転力への変換機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

まず、PomAB複合体試料を効率的に調製する環境を整えた。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ため、発現系の改良を行った。次に、大量発現した蛋白質を精製し結晶化を行い、得られた初期結晶を用いて大型放射光施設SPring-8でX線回折実験を進めた。PomABのホモログである膜蛋白質でも、同様に発現系を構築して結晶化を進めた。このうち回折点が得られた結晶について、結晶化条件の検討を進めている。

電子顕微鏡法による解析では、PomABの単粒子解析、トモグラフィー解析を進めた。電子顕微鏡同法では、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。電子顕微鏡観察で単分散した試料を再現性良く調製できる条件を検討し(図-2)、負染色像からのトモグラフィー及び単粒子解析から三次元構造を得た(図-3)。また、より生理的な状態を解析するため、単離精製した試料を急速凍結し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(図-2B)。以上の結果を論文にまとめた(Yonekura et al., 2011, *J. Bacteriol.*)。

4. 研究成果

電子顕微鏡法の単粒子解析法により、PomAB の低分解能の三次元構造を解析した。また、トモグラフィー法から構造の手系を決定した。その結果、PomAB が、膜貫通領域より突き出た二本の腕状ドメインを持つ、ねじれたダイマーを形成することを初めて明らかにした(図-3)。

得られた構造に、他の蛋白質の PG 結合部位の原子モデル(Roujeinikova, 2008, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*)を当てはめたところ、腕状ドメインの密度とよく一致した。実際、PG 結合部位を欠損した PomB 変異体と PomA との複合体の三次元再構成では、腕状ドメインが無くなることが分かった。(図-3D)。解析した野生型の構造では、PG 結合部位が横に寝ており、モーターの固定子として PG 層へ結合する状態には相当しないと考えられた。そ

ここで、腕状ドメインを切り出し、PG 結合部位を PG 層方向へ向けたモデルを構築した (図-4A)。この状態でも PomB の PG 結合部位は、PG 層に届かない。PG 結合部位が PG 層に接するためには、さらに、1) 腕上ドメインの付け根の一部が伸び上がること、2) ベン毛モーターの基部体が PG 層を押し出すか PG 層が枝分かれすることにより、PG 層と細胞質膜との距離が狭くなることの2つの条件が必要となると考えられる (図-4B)。蛍光顕微鏡による単分子観察から、PomAB は、ベン毛基部周囲に集まっていない時、膜中を比較的自由に動けるとされている (Leake et al., 2006, *Nature*)。本研究で単粒子解析した構造は、この状態を表しており、腕状ドメインがイオンの入り口にふさぎ、イオン透過を阻害していることも示唆された。これらの知見から、PomAB のモーター周囲へのアセンブリ機構、PG 層へ結合しモーターの固定子として働く分子機構のモデルを提出した (図-4B, C)。以上の結果を報告した論文 (Yonekura et al., 2011, *J. Bacteriol.*) は、発表月の American Society for Microbiology の Microbe Magazine のハイライトに選ばれている。また、PomAB を再構成したリポソームを作製し、初期的な三次元再構成像を得ている (未発表; 図-5)。

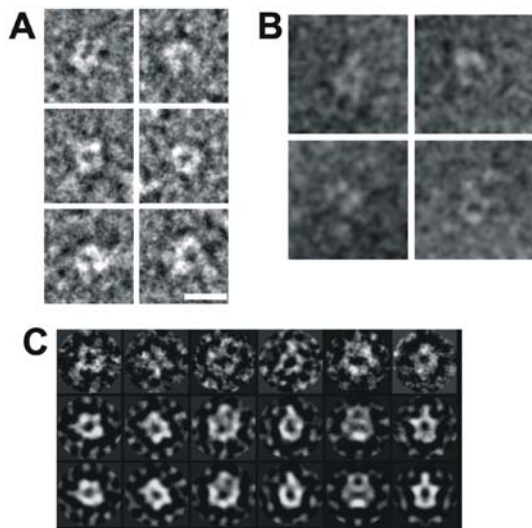


図-2 PomAB の精製試料を重金属で染色した電子顕微鏡像 (A) と氷包埋像 (B)。 (C) 負染色した元の像 (上)、そのクラス平均 (中) と再投影像 (下)。 (A) のスケールバーは 100 Å。

X 線結晶構造解析では、PomAB の初期結晶から、SPring-8 において放射光を使った X 線

回折実験を進めると同時に、結晶の改善に向け種々の条件検討を行った。特に、大量発現系の再構築、界面活性剤のスクリーニング、凝集体の生成を抑える添加剤の検討等、精製法の見直しを進めた。さらに、異なる生物種の PomAB やホモログの蛋白質の発現系を構築、精製、結晶化を行った。このうちの一種類から、約 3.5 Å 分解能まで回折点が観測される結晶を得ている。現在、この結晶から全回折データの測定を行うと共に、重原子置換体、SeMet 誘導体からの位相情報の取得を進めている。この蛋白質と PomAB との構造比較を行うことで、両者の生理的機能の違いを担う分子機構を明らかにしたい。

以上から電子顕微鏡法、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した。

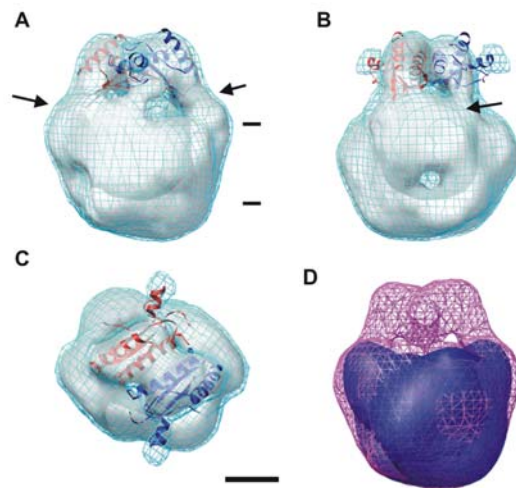


図-3 単粒子解析法から得られた PomAB の初期三次元再構成像 (Yonekura et al., 2011, *J. Bacteriol.*)。図-2 に例示した負染色像の組から約 7,000 個の分子像を集め、単粒子解析法により三次元再構成した。(A), (B), (D) 膜に沿った方向から見た図。(A) の 2 つの平行線挟まれた領域が膜貫通部位に相当。(B) は (A) を膜に垂直な軸周りに 90 度回転したもの。(C) 膜に垂直方向から見た図。(D) PG 欠損変異体 (青の密度) の複合体と野生型 (ピンクのメッシュ) を重ね、(A) と同じ方向で表示。膜貫通領域より突き出た二本の腕状ドメインを持つ、ねじれたダイマーを形成している。(A), (B), (C) では、ペプチドグリカン結合部位を含む原子モデル (赤、青) (Roujeinikova, 2008, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) を重ねてある。

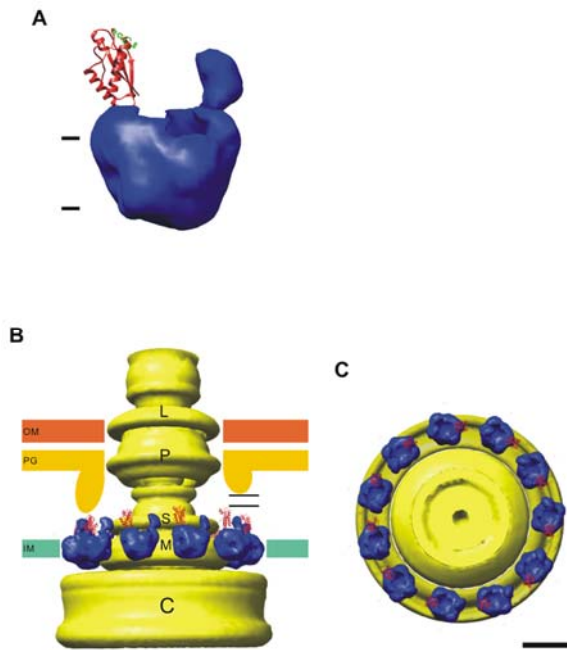


図-4 ペプチドグリカン層への結合時の PomAB の構造モデル。(A) 2 つの腕状ドメインをペプチドグリカン層へ向けた一分子のモデル。(B), (C)べん毛モーターの基部体の周りに PomAB の 11 分子を配置した。(B)膜に沿う方向から見たもの。(C)膜面垂直に見たもの。スケールバーは 100 Å に相当。

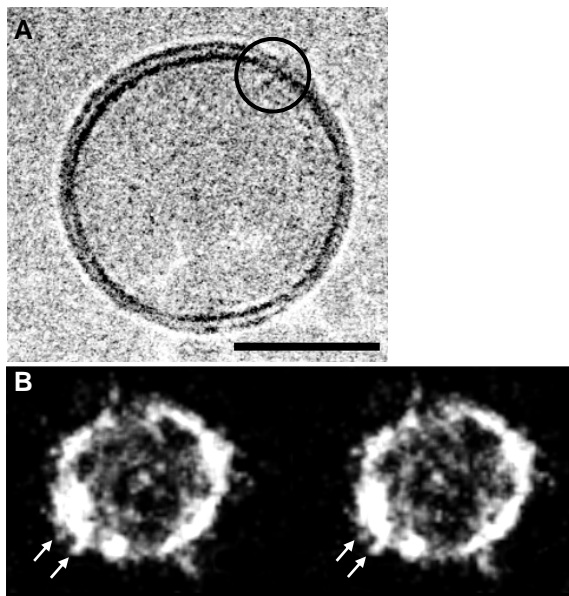


図-5 膜小胞に再構成した PomAB の無染色の水包埋像(A) (Yonekura et al., *J. Mol. Biol.*, 2006)と低温電子線トモグラフィーによる初期三次元再構成像のステレオ表示(B; 未発表)。(A) 脂質二重膜がコントラストよく解像されている。丸で囲まれた領域の膜小胞より突き出したものが PomAB と考えられる。脂

質二重膜より非対称に突き出した 2 つのドメインが観察できる。スケールバーは、500 Å。(B) 膜より突き出した PomAB と思われる突き出しのいくつかを矢印で示した。

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 8 件)

- ① Koji Yonekura, Saori Maki-Yonekura, Michio Homma, The structure of the flagellar motor protein complex PomAB: Implications for the torque-generating conformation, *J. Bacteriol.* 査読有, **193**, 2011, 3863 - 3870.
- 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、査読有、**45**、2011、243 - 249.
- ③ Saori Maki-Yonekura, Koji Yonekura, Keiichi Namba, Conformational change of flagellin for polymorphic supercoiling of the flagellar filament, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 査読有, **17**, 2010, 417 - 422.
- 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、査読有、**52**、2010、56 - 61.
- ⑤ Saori Maki-Yonekura, Koji Yonekura, Electron digital imaging towards high-resolution structure analysis of biological macromolecules, *Microsc. Microanal.*, 査読有, **14**, 2008, 362 - 369.

[学会発表] (計 32 件)

- ① 米倉功治、眞木さおり、低温電子顕微鏡法による生体超分子複合体の構造解析、第 13 回医学生物学電子顕微鏡シンポジウム、2012 年 11 月 24 日
- ② Koji Yonekura, Electron crystallography in biological sciences, The satellite meeting, the 10th 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。

PomAB 単粒子解析の論文 (Yonekura et al., 2011, *J. Bacteriol.*) がハイライトとして紹介された American Society for Microbiology の Microbe Magazine の記事へのリンク、

http://www.microbemagazine.org/index.php?option=com_content&view=article&id=3857:gentlemen-start-your-prokaryotic-motors&catid=876:07-2011-journal-highlights&Itemid=1129

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

眞木 さおり (MAKI-YONEKURA SAORI)

独立行政法人理化学研究所・タンパク質結晶構造解析研究グループ・研究員

研究者番号：20513386