

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15749

研究課題名(和文)バクテリアべん毛蛋白質輸送装置のゲート開閉機構の解明

研究課題名(英文)Gating mechanism of the bacterial flagellar protein export apparatus

研究代表者

木下 実紀(Kinoshita, Miki)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：30790985

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):バクテリアの運動器官であるべん毛の根元には、べん毛の部品を細胞外へ送り出す独自の輸送装置が存在する。この輸送装置はプロトン駆動型の輸送エンジンを搭載した輸送ゲート複合体とATPの化学エネルギーを使って働くATPase複合体から構成される。輸送ゲートは、プロトンの内向きの流れに共役してべん毛構成蛋白質を輸送チャネルへ送り出すが、そのエネルギー共役の仕組みは不明であった。本研究では、輸送ゲート蛋白質FlhAとFlhBがATPaseリング複合体とダイナミックに相互作用することにより、輸送チャネルやプロトンチャネルの開閉が制御されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルモネラなどの病原細菌による感染症は社会問題の一つで、それらの感染機構の解明ならびに克服のための方法の探索が続けられている。べん毛タンパク質輸送装置と高い相同性を示すIII型分泌装置が急性胃腸炎の発症に深く関わっている。本研究結果に基づいて病原細菌のIII型分泌装置のゲート開閉機構を特異的に不活性化できれば、病原細菌の病原性のみを破壊できる。したがって、従来の抗菌剤のように細菌を死滅させることがないため耐性菌が発生しづらく、これまでにない新しい治療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文):The bacterial flagellar protein export apparatus is located at the base of the flagellum and is composed of a transmembrane export gate complex powered by proton motive force (PMF) across the cytoplasmic membrane and a cytoplasmic ATPase ring complex, which acts as an activator of the export gate complex. The export gate complex couples inward-directed proton flow through a transmembrane proton channel with protein translocation into a protein export channel. To clarify the gating mechanism of the flagellar export apparatus, I have provided experimental evidence that dynamic interactions of FlhA and FlhB with the ATPase ring complex allow the export gate complex to open both the proton and protein export channels in a PMF-dependent manner, thereby facilitating proton-coupled protein.

研究分野：生物物理学

キーワード：細菌 蛋白質 電子顕微鏡 感染症

1. 研究開始当初の背景

バクテリアの運動器官であるべん毛を細胞表層に構築するために必要なべん毛特異的蛋白質輸送装置は、FlhA, FlhB, FliP, FliQ, FliR と呼ばれる 5 種類の膜蛋白質からなる輸送ゲート複合体と FliH, FliI, FliJ と呼ばれる 3 種類の可溶性蛋白質からなる ATPase リング複合体から構成される。輸送ゲート複合体は、MS リングの中心孔に存在し、細胞膜内外に形成される水素イオン（プロトン）の電気化学ポテンシャル差（プロトン駆動力）をエネルギーに利用して輸送基質蛋白質の立体構造を解きほぐしながら細胞外方向へと送り出す。これまでに、我々は、FlhA がべん毛蛋白質輸送を駆動する輸送エンジンの本体であること、ATPase リング複合体構成蛋白質である FliJ が FlhA と相互作用すると、輸送ゲート複合体はプロトンの内向きの流れに共役してべん毛蛋白質を輸送することを見出した。さらに、FlhA の C 末細胞質ドメイン（以降、FlhAc と呼ぶ）および FlhB の C 末細胞質ドメイン（以降、FlhBc と呼ぶ）がべん毛構築過程に応じて輸送基質蛋白質を選別していることを突き止めた。しかしながら、どのように輸送基質蛋白質が輸送ゲート複合体へ挿入されるのか、どのように輸送ゲート複合体がプロトン流を使って輸送基質蛋白質を細胞外へ送り出すのか、などについては未だ不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、輸送ゲートの開閉機能やエネルギー共役のしくみが異常になった *flhB* および *flhA* 変異体を単離し、それら変異体のべん毛輸送装置の機能構造解析を進めることで、べん毛輸送装置のゲート開閉機構やエネルギー変換機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) ATPase リング複合体がなくてもべん毛を形成できる輸送ゲート変異株を様々な実験条件下で培養し、培地中に分泌されるべん毛構成蛋白質の量をウエスタンブロットにより定量的に解析した。
- (2) 部位特異的変異体解析と Ni affinity chromatography あるいは GST affinity chromatography をうまく組み合わせ、FlhAc および FlhBc を中心とした蛋白質相互作用ネットワークを解析した。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。
- (3) PhoA との融合体を作成し、FlhA および FlhB のトポロジーを解析した。
- (4) 輸送基質蛋白質の基質特異性が変化した変異型 FlhAc を結晶化し、X 線構造解析を実施した。
- (5) 輸送ゲート複合体が結合した MS リングを精製し、クライオ電子顕微鏡による構造解析を行なった。

4. 研究成果

- (1) PhoA fusion assay により FlhA および FlhB のトポロジー解析を行った結果、FlhA の膜貫通ドメインと FlhB の膜貫通ドメインにはそれぞれ 8 本と 4 本の膜貫通ヘリックスが存在することが確認できた。
- (2) FlhB は、ATPase リング複合体とともに、輸送チャンネルのゲートの開閉を制御することが示唆された。さらに、FlhBc の C 末天然変性領域が膜電位依存的なゲートの開閉に関与していることが示唆された。
- (3) ATPase リング複合体がなくてもべん毛を形成できる輸送ゲート変異株を用いた解析から、輸送ゲート複合体は膜電位依存的に活性化されることを突き止めた。さらに、FlhAc と FliJ との相互作用が膜電位依存的に安定化されることが判明した。
- (4) FlhAc と安定に結合できなくなった *fliJ* 変異体を用いた解析から、べん毛構築中に FlhAc が FliJ と相互作用できなくなると、FlgN が FlhAc に結合し、その結果輸送ゲート複合体はナトリウムイオンを共役イオンに利用してべん毛蛋白質を輸送することを明らかにした。
- (5) FliJ と安定に相互作用できなくなった FlhAc(E351A/D356A) の結晶構造を 2.8 Å 分解能で決定した。
- (6) 輸送ゲートがべん毛輸送基質蛋白質を輸送チャンネル内に送り出すと、FlhAc が開いた構造から閉じた構造へスイッチし、その結果フリーとなった輸送シャペロンや FliJ が輸送ゲートから解離することが示唆された。
- (7) 輸送チャンネルのゲートの開閉機能が異常になった考えられる *fliQ* 変異体を用いた遺伝学的

解析から、輸送チャネルの細胞質側の入口ゲートが開くと、それと連動してFliAのイオンチャネルが開くこと、さらに輸送チャネル側に大きく張り出しているFliRのプラググループが大きく構造変化することが示唆された。このような連動した構造変化により、プロトンの内向きの流れに共役して輸送基質蛋白質が細胞外方向にのみ移動できることが推察された。

- (8) 輸送ゲート複合体を含む MSリング複合体を精製し、クライオ電子顕微鏡により構造解析をした結果、33分子のFliFサブユニットが2つの異なる構造で集合してMSリングを形成することが明らかになった。さらに、MSリングの内部には22回と11回の回転対称性を持つ構造が存在することが判明した。現在、Mリング部分を2.4Å分解能で原子モデルを構築している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Fulano AM, Shen D, Kinoshita M, Chou SH, Qian G.	4. 巻 10
2. 論文標題 The homologous components of flagellar type III protein apparatus have acquired a novel function to control twitching motility in a non-flagellated biocontrol bacterium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10050733	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 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 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 ⁺ -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 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 Proceedings of the National Academy of Sciences	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 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0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, 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0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/research_group/detail/24

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	南野 徹 (Minamino Tohru)		
研究協力者	難波 啓一 (Namba Keiichi)		
研究協力者	宮田 知子 (Miyata Tomoko)		
研究協力者	今田 勝巳 (Imada Katsumi)		

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		
米国		コタ大学	
中国		南京農業大学	