

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19274

研究課題名（和文）ナトリウムイオンの細胞内動態変化を感知できる新規バイオセンサープローブの開発

研究課題名（英文）Development of novel biosensor probes capable of sensing dynamic changes in intracellular sodium ion concentration

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：枯草菌べん毛モーターのナトリウムイオン駆動型固定子として働くMotPS複合体のペプチドグリカン結合ドメインはナトリウムイオン濃度に依存して可逆的に構造変化する。この可逆的な構造変化により、べん毛モーターの周りに配置される固定子の数が自発的に制御される。本研究では、MotSのAsp-70残基とGlu-76残基がナトリウムイオン結合部位であること、MotSの68番目のグルタミン残基から117番目のグルタミン酸残基の領域がナトリウムイオンの有無によりその構造が可逆的に変化することを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の蛍光色素を用いた細胞内ナトリウムイオン濃度の動的時間変化の測定は、定量的な解析が困難であるとともに、蛍光色素による細胞毒性が大きな問題となっている。本研究で同定したナトリウムセンサーはナトリウムイオンの濃度変化に迅速に応答できる非侵襲性バイオセンサープローブの開発に利用できる。このようなバイオセンサープローブは様々な生物種の細胞に発現させることができるため、ナトリウムイオンが関与する様々な生命現象の解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The MotPS complex acts as a sodium ion-driven stator unit in the *Bacillus subtilis* flagellar motor and binds to the peptidoglycan layer via the peptidoglycan-binding domain of MotS (MotS-PGB) to become an active stator unit. When the external sodium ion concentration exceeds about 130 mM, sodium ions bind directly to MotS-PGB and induce the disorder-to-order transition of MotS-PGB. When sodium ions are depleted, MotS-PGB becomes unstructured, causing rapid dissociation of the MotPS complex from the motor. Such conformational changes of MotS-PGB autonomously regulates the number of active stator units around the flagellar motor. In this study, we show that the Asp-70 and Glu-76 residues of MotS are sodium ion binding sites and that the region from Gln-68 to Glu-117 of MotS undergoes a reversible conformational change in the presence of sodium ions.

研究分野：分子微生物学、生物物理学、生化学

キーワード：細菌 蛋白質 遺伝学 感染症

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) バイオフィーム社会に生息する細菌は同一のゲノム情報を持つにもかかわらず、機能的に分化した細菌群が役割分担しバイオフィーム社会を維持する。バイオフィームに生息する大部分の細菌のべん毛形成機能は抑制されているが、ごく稀にべん毛運動できる細菌群が存在する。これまでに、バイオフィーム社会に生息している細菌群と同様にべん毛形成が抑制されたべん毛変異体を用いて解析を行なった結果、細胞膜内外に形成される膜電位がある閾値以上に上昇したり、環境中のナトリウムイオン (Na^+) がある濃度以上に上昇すると、べん毛運動する細菌群の割合が顕著に増加することを明らかにした (文献 1, 2)。このことから、膜を横切るイオンの流れの変化に伴う膜電位のゆらぎこそが不均一な細菌集団を出現させる重要なシグナルである可能性が示唆された。この仮説を証明するためには、個々の細菌の細胞内 Na^+ 濃度変化を効率よく計測する必要があった。

(2) これまでに、枯草菌のべん毛モーターの Na^+ 駆動型固定子として働く MotPS 複合体のペプチドグリカン結合ドメイン (以降、PGB ドメインと呼ぶ) が Na^+ を直接感知するセンサーとして働くこと、この PGB ドメインが Na^+ の濃度変化に伴って可逆的に構造変化することを明らかにした (文献 3)。以上の結果から、 Na^+ の有無によって大きく構造変化する PGB ドメインの構造特性を利用すれば、生体内の Na^+ 濃度変化を 1 細胞レベルでリアルタイム計測できる蛍光蛋白質プロブの作製が可能になることが推察された。

2. 研究の目的

MotPS 複合体の PGB ドメインは MotS の 68 番目のアミノ酸残基から 242 番目のアミノ酸残基で構成される (以降、MotS₍₆₈₋₂₄₂₎ と呼ぶ)。本研究では、MotS₍₆₈₋₂₄₂₎ に存在する Na^+ センサー領域を同定するとともに、1 細胞レベルで細胞内 Na^+ 濃度の動態変化を計測できる新規の Na^+ センサー-蛍光プロブを作製することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MotPS 複合体の PGB ドメインの結晶構造から MotS の 68 番目のグルタミン酸残基から 82 番目のセリン残基までの間に Na^+ 結合部位が存在する可能性が示唆された。そこで、 Na^+ に依存した構造変化を捉えるため、この領域に欠失あるいは点変異を MotS₍₆₈₋₂₄₂₎ に導入した。変異型 PGB ドメインを精製し遠紫外円偏光二色性スペクトルを測定した。

(2) 変異体解析に基づいて人工合成ポリペプチド作製し遠紫外円偏光二色性スペクトルを測定した。

(3) ドナー蛍光分子である青色蛍光蛋白質、 Na^+ センサー、アクセプター蛍光分子である黄色蛍光蛋白質を連結した、分子内 FRET 蛍光蛋白質を作製した。蛍光蛋白質の並び方を変えたり、さらに Na^+ センサー領域の長さを変えたりすることで合計 8 種類の分子内 FRET 蛍光蛋白質を作成した。設計した分子内 FRET 蛍光蛋白質を大腸菌 BL (DE3) 株内で大量発現させるために pET19b ベクターにクローニングした。個々の蛍光蛋白質プロブを発現・精製し、分光蛍光高度計を用いて蛍光スペクトルを測定した。

(4) サルモネラ菌由来の MotAB 複合体の PGB ドメインを MotS₍₆₈₋₂₄₂₎ に置き換えた MotAB-Sc キメラ複合体キメラ体を作製した。

4. 研究成果

(1) 変異体解析により、MotS の PGB ドメイン内に位置する 68 番目のグルタミン酸から 117 番目のグルタミン酸の領域にナトリウム結合サイトが存在すること、さらに、この領域に存在する Asp-70 と Glu-76 のアミノ酸残基がナトリウムイオンの結合に関与している可能性が高いことが示唆された。そこで、この仮説を検証するため、68 番目のグルタミン酸から 117 番目のグルタミン酸からなる野生型ペプチドおよび D70A 変異、E76A 変異、あるいは D70A/E76A を持つ 3 種類の変異型ペプチドを作製し、それぞれの合成ペプチドの遠紫外円偏光二色性スペクトル測定を行った。その結果、野生型ペプチドでは、ナトリウムイオンの添加により α ヘリックス含量が顕著に増加したが、変異型合成ペプチドではナトリウムイオンの添加による α ヘリックス含量の増加は見られなかった。この結果から、 Na^+ が Asp-70 と Glu-76 に結合すると、MotS の 68 番目のグルタミン酸から 117 番目のグルタミン酸からなる領域が構造変化することが示唆された。

(2) 68 番目のグルタミン酸から 117 番目のグルタミン酸からなる Na^+ センサー領域を含む様々な長さのフラグメントを設計し、それらの N 末端および C 末端にドナー蛍光分子である青色蛍光蛋白質やアクセプター蛍光分子である黄色蛍光蛋白質を連結した分子内 FRET 蛍光蛋白質プロ

ープを作製した。しかしながら、ナトリウムイオンに対する FRET は、作製した 8 種類の蛍光蛋白質プローブのいずれでも観察されなかった。そこで、この領域が実際に Na⁺センサーとして機能するのか否かを再検討するため、サルモネラ菌由来の MotB の PGB ドメインを MotS₍₆₈₋₂₄₂₎ と置き換えた MotAB_{TM}-S₍₆₈₋₂₄₂₎ キメラ複合体を作製した。このキメラ複合体をサルモネラ菌体内で発現させると、サルモネラ菌はナトリウムイオンが培地中に存在する時のみ条件致死の表現型を示した。この結果は、MotAB-Sc キメラ複合体のプロトンチャンネルがナトリウムイオンによって活性化され、その結果、大量のプロトンがサルモネラ菌体内に流れ込み、細胞の増殖が阻害されることを示唆している。以上の結果から、MotS₍₆₈₋₂₄₂₎ はナトリウムイオンセンサーであると結論づけた。

<引用文献>

1. Minamino T, Kinoshita M, Morimoto YV, Namba K. The FlgN chaperone activates the Na⁺-driven engine of the *Salmonella* flagellar protein export apparatus. *Commun. Biol.* 4: 335 (2021).
2. Minamino T, Morimoto YV, Kinoshita M, Namba K. Membrane voltage-dependent activation mechanism of the bacterial flagellar protein export apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118: e2026587118 (2021).
3. Terahara N, Kodera N, Uchihashi T, Ando T, Namba K, Minamino T. Na⁺-induced structural transition of MotPS for stator assembly of *Bacillus* flagellar motor. *Sci. Adv.* 3: eaao4119 (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Minamino Tohru, Kinoshita Miki, Morimoto Yusuke V., Namba Keiichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Activation mechanism of the bacterial flagellar dual-fuel protein export engine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e190046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.bppb-v19.0046	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 Xiong Dan, Yang Zixiang, He Xueting, He Weimei, Shen Danyu, Wang Lu, Lin Long, Murero Aprodisia, Minamino Tohru, Shao Xiaolong, Qian Guoliang	4. 巻 11
2. 論文標題 Loss of Flagella-Related Genes Enables a Nonflagellated, Fungal-Predating Bacterium To Strengthen the Synthesis of an Antifungal Weapon	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e01110-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.04149-22	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 Miki, Namba Keiichi, Minamino Tohru	4. 巻 2646
2. 論文標題 Purification of the Transmembrane Polypeptide Channel Complex of the Salmonella Flagellar Type III Secretion System	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 3~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-3060-0_1	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 Yusuke V., Minamino Tohru	4. 巻 2646
2. 論文標題 Measurements of the Ion Channel Activity of the Transmembrane Stator Complex in the Bacterial Flagellar Motor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 83~94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-3060-0_8	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 Nakamura Shuichi、Minamino Tohru	4. 巻 2646
2. 論文標題 High-Resolution Rotation Assay of the Bacterial Flagellar Motor Near Zero Loads Using a Mutant Having a Rod-Like Straight Hook	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 125 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-3060-0_11	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 Minamino Tohru、Kinoshita Miki	4. 巻 11
2. 論文標題 Structure, Assembly, and Function of Flagella Responsible for Bacterial Locomotion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EcoSal Plus	6. 最初と最後の頁 eesp-0011-2023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/ecosalplus.esp-0011-2023	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、Nakane Daisuke、Nakamura Shuichi、Kiyama Hana、V. Morimoto Yusuke、Miyata Makoto	4. 巻 20
2. 論文標題 Frontiers of microbial movement research	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e200033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v20.0033	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 Miki、Minamino Tohru、Uehashi Takayuki、Namba Keiichi	4. 巻 7
2. 論文標題 FliH and FliI help FliA bring strict order to flagellar protein export in Salmonella	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-024-06081-0	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Minamino T, Kinoshita M, Namba K.
2. 発表標題 Role of the cytoplasmic ATPase complex in export switching of the flagellar protein export apparatus.
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木下実紀, 宮田知子, 牧野文信, 難波啓一, 南野徹.
2. 発表標題 サルモネラIII型輸送装置のポリペプチドチャネル複合体の形成
3. 学会等名 べん毛研究交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森本雄祐, 南野徹
2. 発表標題 バクテリアべん毛で働くプロトン駆動力の計測 (Measurement of proton motive force acting on bacterial flagella)
3. 学会等名 日本バイオイメージング学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Minamino T, Kinoshita M, Namba K.
2. 発表標題 Proton-protein antiporter mechanism in the type III secretion system of the bacterial flagellum (細菌べん毛のIII型分泌システムにおけるプロトン-タンパク質アンチポーター機構)
3. 学会等名 日本生物物理学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kinoshita M, Miyata T, Makino F, Kato T, Imada K, Namba K, Minamino T.
2. 発表標題 CryoEM structure of the polypeptide channel complex of the bacterial flagellar type III secretion system (べん毛 III 型分泌装置のポリペプチドチャネル複合体のクライオ電子顕微鏡構造)
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Usui A, Kinoshita M, Tajimi Y, Uchihashi T, Minamino T, Takekawa N, Imada K.
2. 発表標題 CryoEM structure of the ATPase ring complex of the flagellar type III export apparatus(べん毛III型輸送ATPase複合体のcryoEM構造)
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sakata K, Minamino T, Morimoto YV.
2. 発表標題 Development of a novel membrane voltage sensor based on the bacterial flagellar type III secretion system (バクテリアべん毛型輸送装置を利用した新規膜電位センサーの開発)
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 碓井亜瑛子, 多治見祐希, 内橋貴之, 木下実紀, 南野徹, 竹川宜宏, 今田勝巳
2. 発表標題 べん毛T3SS ATPaseの構造変化
3. 学会等名 生命分子科学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 牧野文信, Kasim Waraichi, 木下実紀, 宮田知子, 南野徹, 難波啓一
2. 発表標題 サルモネラ直線型べん毛繊維L型とR型の高分解能構造比較
3. 学会等名 べん毛研究交流会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 竹川宜宏, 錦野達郎, 岸川淳一, 廣瀬末果, 木下実紀, 小嶋誠司, 南野徹, 内橋貴之, 今田勝巳, 本間道夫
2. 発表標題 海洋ヒブリオ菌の極べん毛モーターFlifG融合タンパク質からなるMSリングの構造と性状
3. 学会等名 べん毛研究交流会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 竹川宜宏, 碓井亜瑛子, 多治見祐希, 内橋貴之, 木下実紀, 南野徹, 今田勝巳
2. 発表標題 べん毛輸送ATPase Flil 6量体の構造変化
3. 学会等名 べん毛研究交流会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Minamino T, Miyata M, Namba K.	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Humana Press.	5. 総ページ数 405
3. 書名 Bacterial and Archaeal Motility - Methods and Protocols.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://rd.iai.osaka-u.ac.jp/ja/2ce577c0931a0530.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------