

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分

平成28年5月30日現在

研究課題名（和文） **クライオ電子顕微鏡による生体分子モーターの立体構造と機能の解明**

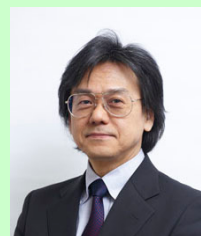
研究課題名（英文） Structures and functions of macromolecular motors by electron cryomicroscopy

課題番号：25000013

研究代表者

難波 啓一 (NAMBA KEIICHI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授



研究の概要：クライオ電子顕微鏡像の解析技術を一層進歩させ生体分子モーターの立体分子構造を解析し、一分子光学顕微ナノ計測法と組み合わせることにより、分子モーターの動作メカニズムと高効率なエネルギー変換のメカニズムを解明する。

研究分野：生物物理学

キーワード：生物物理、ナノバイオ、ナノマシン、分子モーター

1. 研究開始当初の背景

生命機能は、タンパク質や核酸など生体分子の立体構造によって規定された分子機械としての動作機構と、ダイナミックな結合解離をともなう相互作用に支えられている。多くの生体分子は状況に応じて相互作用する相手を認識して超分子を形成し、あるいは結合解離を繰り返すことで、より複雑で巧妙に制御された機能を発揮しつつ、生命機能を支えるエネルギー・物質・情報ネットワークのダイナミクスを構築する。よって生命機能のしくみを理解するには、生体超分子の立体構造とその動態を高時間空間分解能で計測観察したデータを詳細に解析することで、分子機械の動作機構や結合解離の制御のしくみを解明することが必須である。

2. 研究の目的

クライオ電子顕微鏡像の解析技術をより一層進歩させ、X線結晶構造解析法だけではとうてい不可能な生体超分子の立体構造解析における到達分解能の向上と時間短縮により、アクチン・ミオシン、微小管・ダイニン、微小管・キネシン複合体や細菌べん毛モーターなど、超分子モーターの立体構造をできるだけ原子分解能に近づけて信頼性の高い原子モデルを構築する。また、超分子モーター複合体での分子間相互作用と解離状態での分子構造を詳細に比較することで、力発生に関わるモーター分子の構造変化を捉えるとともに、光学顕微ナノ計測法による分子モーターの動態計測と変異体モーターの機能解析を組み合わせることで、力発生とその制御

のメカニズムを解明する。膜貫通構造であるため高分解能の立体構造解析が容易でない細菌べん毛モーターにおいても、様々な変異体べん毛モーターの光学顕微ナノ計測法による回転ステップ素過程の計測と、べん毛基部体のクライオ電子顕微鏡法による立体構造解析を組み合わせることで、トルク発生と双方向回転スイッチのしくみの解明を目指す。

3. 研究の方法

クライオ電子顕微鏡と単粒子像解析法により、繊維状やリング状の構造を持つ生体超分子モーターの立体構造解析を進める。リング状の構造を有するべん毛モーターでは、解析に適した変異体の立体構造解析と並行して一分子光学顕微ナノ計測システムも開発することでその動態機能解析も行う。構成蛋白質のX線結晶構造解析も併用することで、クライオ電子顕微鏡像解析法による立体像の検証と、信頼性の高い超分子の原子モデル構築に役立てる。試料調整、クライオ電子顕微鏡像の撮影条件、画像解析法の精度向上と効率化などの工夫を重ね、構成タンパク質の主鎖や側鎖が見える3 Å以上の分解能の達成を目指す。遺伝子工学的手法で捉えた様々な機能変異体についても、高時間空間分解能の光学顕微ナノ計測システムによる機能解析を進め、構造と機能の相関からトルク発生や力発生、そして高効率エネルギー変換のメカニズムに迫る。

4. これまでの成果

(1) 初年度に設計仕様を固めたクライオ電子顕微鏡の低温試料ステージと電子光学系

の改造については、計画どおり平成 27 年 5 月に電子顕微鏡への実装を完了して高解像度像データの収集効率が向上した。

(2) 同じく初年度に導入した電子線直接検知型の高感度・高解像度 CMOS カメラを活用することにより、膜タンパク質や繊維状超分子など生体超分子のクライオ電子顕微鏡による立体構造解析では、数 10 マイクロリットルの僅かな水溶液試料を用い、数日の画像データ収集と数週間の画像解析計算により、最高で 2.7 Å 分解能の立体構造が得られた。この分解能は国際データベース EMDB に登録されたクライオ電子顕微鏡による立体構造のなかで解析当時第 2 位であり、極めて短期間で予想を超える高分解能を達成できた。

(3) アクチン・ミオシン複合体の構造解析では、ミオシン頭部がアクチン繊維に強結合する際に起こる構造変化によりミオシンの ATP 結合ポケットが大きく開くことを見だし、半世紀以上にわたり謎であったアクチン繊維によるミオシン ATPase サイクルの活性化機構を明らかにした。さらにその構造をもとにした弱結合状態の構造モデルから、その結合ボンドの繊維軸に非対称な分布がミオシンの解離時にそのブラウン運動を一方向に偏らせることで筋の収縮力を発生するという、ブラウニアン・ラチェットとしてのエネルギー効率の高いメカニズムに手掛かりを得た。

(4) 顕微光学ナノ計測システムによるべん毛モーターの機能解析では、超高速 CMOS カメラとレーザー光学系により 2.56 μs の時間分解能と 1 nm の空間分解能を達成し、300 Hz で高速回転するモーターでステップ動作の可視化に成功。ステップと停止の時間分布から、固定子プロトンチャネルを細胞内へ流れるプロトンの移動と共役した固定子の構造変化が固定子・回転子の結合解離を制御し、そのサイクル中に生じる非対称な弱結合構造が回転子の回転ブラウン運動を一方向に偏らせるという、熱雑音のエネルギーを活用したブラウニアン・ラチェットによるエネルギー効率の高いトルク発生機構を提案した。

5. 今後の計画

クライオ電子顕微鏡と単粒子像解析法に一層の工夫を加えてこの技術を一段と進歩させ、到達分解能と計測解析の時間短縮を図ることで構造生物学の主たる手法として汎用化を目指す。当該プロジェクトと並行して日本電子(株)と共同で進めている高度に自動化した新設計クライオ電子顕微鏡やその制御ソフトの開発により、現在より高い分解能をより短期間に達成できる可能性に期待している。こういった技術進歩の結果を活用することで、べん毛モーターの回転子や固定子、骨格筋のアクトミオシン複合体モーター

やトロポミオシン・トロポニンを含む細いフィラメントの Ca イオンによる筋収縮制御系、その他さまざまな生体超分子の立体構造解析をできるだけ高分解能で行い、分子モーターのブラウニアン・ラチェット機構など、動作メカニズムの解明と高効率なエネルギー変換機構の一層明確な基盤の確立を目指す。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む) (研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線)

- (1) Baker, M.A.B., Hynson, R.M.G., Ganuelas, L.A., Mohammadi, N.S., Liew, C.W., Rey, A.A., Duff, A.P., Whitten, A.E., Jeffries, C.M., Delalez, N.J., Morimoto, Y.V., Stock, D., Armitage, J.P., Turberfield, A.J., Namba, K., Berry, R.M. & Lee, L.K. Domain-swap polymerization drives the self-assembly of the bacterial flagellar motor. *Nature Struct. Mol. Biol.* **23**, 197-203, 2016.
- (2) Imada, K., Minamino, T., Uchida, Y., Kinoshita, M. & Namba, K. Insight into the flagellar type III export revealed by the FliHC2-FliI complex structure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**(13):3633-3638, 2016.
- (3) Uchimura, S., Fujii, T., Takazaki, H., Ayukawa, R., Nishikawa, Y., Minoura, I., Hachikubo, Y., Kurisu, G., Sutoh, K., Kon, T., Namba, K. & Muto, E. A flipped ion pair at the dynein-microtubule interface is critical for dynein motility and ATPase activation. *J. Cell. Biol.* **208**, 211-222, 2015.
- (4) Hanč, P., Fujii, T., Iborra, S., Yamada, Y., Huotari, J., Schulz, O., Ahrens, S., Kjær, S., Way, M., Sancho, D., Namba, K. & Reis e Sousa, C. Structure of the complex of F-actin and DNGR-1, a C-type lectin receptor involved in dendritic cell cross-presentation of dead cell-associated antigens. *Immunity* **42**, 839-849, 2015.
- (5) Minamino, T., Morimoto, Y.V., Kinoshita, M., Aldridge, P.D. & Namba, K. The bacterial flagellar protein export apparatus processively transports flagellar proteins even with extremely infrequent ATP hydrolysis. *Sci. Rep.* **4**, 7579, 2015.

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/02/>