

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650021

研究課題名(和文) GFPラベルを用いた位置同定単粒子像解析法(GPS法)の開発

研究課題名(英文) Development of localization estimating single particle analysis with GFP label

研究代表者

加藤 貴之(KATO, Takayuki)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：20423155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本実験では低温電子顕微鏡解析された低分解能の超分子複合体の構造から、構成分子の位置と方向を正しく同定することを目的とし、GFPのN、C末端の位置を変えたcpGFPをラベルとして用いる方法の開発を試みた。

今回べん毛回転子構成分子Flimを標的分子として、既知のFlimの部分構造を基に、cpGFPを導入する位置を12か所選定した。cpGFPラベル化Flimの発現、機能保持の有無等をウェスタンブロットティング、位相差及び蛍光顕微鏡によって確認したところ、2つの有力な候補を見出した。その蛋白質を精製したところ、ラベル化Flimが回転子から解離しており、ラベル位置の選定が非常に重要なことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To know the orientation and the localization of specific molecule from low resolution map solved by cryoEM, circular permuted GFP was used for the molecular labeling.

The twelve positions for cpGFP fusion with Flim which is rotor component protein in flagella motor were designed. The expression level, function and localization of labeled-Flim in the cell were evaluated by western blotting, phase contrast microscopy and fluorescence microscopy. From their results, we found that the two cpGFP-labeled Flim candidates of them has the Flim function. We demonstrated that the cpGFP can be used for the molecular labeling. Then rotor with cpGFP-labeled Flim in the candidate was purified and observed by electron microscopy. These cpGFP-labeled Flim was dissociated from rotor structure. We suggest that the position is most important factor for cpGFP labeling.

研究分野：構造生物学

キーワード：低温電子顕微鏡 単粒子解析 構造解析 GFPラベル

1. 研究開始当初の背景

近年低温電子顕微鏡を用いた構造解析は飛躍的に向上し、構造生物学において必須の解析技術となった。その主たる理由は電子顕微鏡による構造解析がX線結晶構造解析と違い結晶化を必要とせず、NMRのような分子量の上限がないため、汎用性が極めて高いことにある。ほんの3年程前まではまだまだ分解能が低いことが欠点であり、事実、多くの構造解析の分解能はヘリックスが棒状に見える7程度であり、原子分解能を達成したものは対称性の高いウィルス等で数例あるだけだった。しかし、カメラの改善によってその分解能は劇的に向上し、対称性のないリボソームでも3Åを超え(N. Fischer, et al., Nature, 2015)、galactosideで2.2Å(A. Bartesaghi, et al., Science, 2015)という高分解能を達成した。このように分解能が低いという欠点が解消され、より汎用性が高くなったが、標的としている超分子複合体が柔軟な場合、その分解能を上げるのは困難である。超分子複合体を構成する個々の分子の構造がX線結晶構造解析などで明らかになっているにも関わらず、電子顕微鏡による構造解析に分解能が十分でないため、満足なフィッティングができない例も少なくない。

2. 研究の目的

生体分子は複数の分子がその構造にプログラムされたとおり複数の分子が互いに凝集して超分子複合体を形成することで機能を発揮する。この超分子複合体の構造を解析することはその機能を明らかにするために必要不可欠であるが、超分子複合体は構造が柔軟なため、構造解析の分解能が上がらない場合が多い。X線結晶構造解析で超分子複合体を構成する個々の分子が解析されていたとしても、電子顕微鏡での分解能が十分でない場合、構成している分子同士の境界、分子の向きと位置が全く分からない場合が多い。そこで、Green Florescence Protein(GFP)を改変させたcpGFPを、フィッティングする標的分子に融合させ、ラベルとして用いる、電子顕微鏡を用いた構造解析を行うことで、原子レベルの分解能に到達していない分子であっても、正しくX線結晶構造解析の原子モデルをフィッティングする手法を開発する。

3. 研究の方法

GFPは生化学、医学を含むあらゆる分野で分子機能を明らかにするためのラベルとして用いられ、成功を収めてきた。構造生物学の分野でも特定分子を同定するためにしばしば用いられてきた。しかしGFPのラベルとして用いる場合、標的分子のN末端か、C末端のどちらかにしか融合させることができず、標的分子の両末端が複合体形成に重要な機能を持っていたり、構造安定性に関わっている場合、GFPをラベルとして用いることが

できない。これはGFPのN末端とC末端は10nm程度離れているため、標的分子の途中に融合させると標的分子の立体構造を破壊してしまうからである。そこで、本研究ではGFPのN末端とC末端を繋いで、新たなNC末端を作成したcpGFP(circularly permuted GFP)を用い、超分子のループやターンの途中に入れることで、標的分子の立体構造や複合体形成能に影響を与えなすことなくGFPラベルを導入が可能となると期待できる。当然蛍光分子であるGFPをラベルに用いても電子顕微鏡観察でその蛍光を可視化することはできない。しかし、電子顕微鏡を用いた構造解析を行い、余分に観察された密度はGFPに由来するものであるため、標的分子の位置を同定することができる。また、構造解析において、解析された構造が元の機能を保持しているかどうかは非常に重要である。標的分子をGFPラベルすることによって、タンパク質の発現、機能保持、細胞中での局在などの評価を簡略化することが可能で、構造解析までのスクリーニングに用いることができる。

4. 研究成果

べん毛モーターは約30種類の分子からなる超分子複合体で、プロペラとして機能するフィラメント、ユニバーサルジョイントとなるフック、回転トルクを生み出す基部体から構成される(図1)。

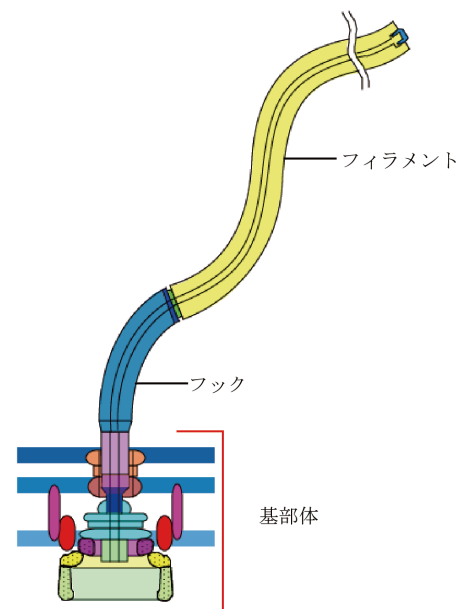


図1. べん毛の構造

基部体は軸、軸受け、回転子、固定子など人工モーターと同様の機能を持つタンパク質からなり、非常に複雑な構造をしている。中でも、回転子はMS-ringを構成するFliFとFliG、C-ringを構成するFliM、FliNの4種類の分子で構成されており(図2)、回転子を囲むように存在する固定子(MotA、MotB)との相互作用によって回転トルクを生み出す

最も重要な部分を占める。

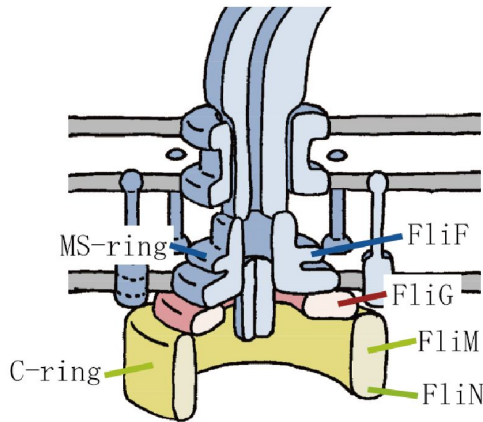


図 2. 基部体構成分子

回転子の構造は、FliG (Lam KH. et al, Structure 2012)、FliM の部分構造 (Lam KH. et al, Mol Microbiol. 2013)、FliN (Brown PN. et al, J Bacteriol. 2005) について X 線結晶構造解析によって明らかにされており、またべん毛基部体の構造は低温電子顕微鏡による構造解析によって明らかにされている (Thomas DR. et al, J Bacteriol. 2006)。しかし、このべん毛基部体の構造の分解能は 24Å と低く、構成分子の原子モデルを正しく当てはめるには不十分であった。そこで、本研究の標的分子として FliM を用い、cpGFP のラベル化実験を行った。

まず、すでに明らかにされている方法 (Baird GS. et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 1999) に従って、GFP の N-C 末端を GGSGG の 5 残基でつなぎ 144-145 残基の間を切断し、新たに N-C 末端を作成することで cpGFP を作成した。標的分子である FliM は 332 残基からなるタンパク質で、これまでに 44-226 残基までの部分構造が X 線結晶構造解析によって既に明らかにされている。この構造情報からループ、ターン領域で、比較的大きな分子である cpGFP (242 残基) を融合しても構造を破壊しないと思われる場所を合計 12 か所選定した (図 3)。

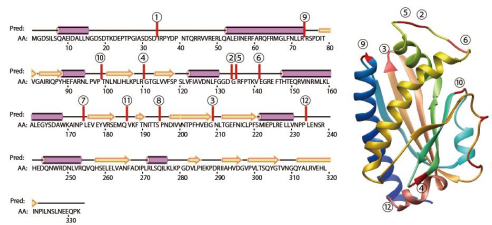


図 3. ラベル化位置の候補配列 (左) と構造 (右) にマッピング

そこに cpGFP を導入し、FliM-cpGFP タンパク質 (ラベル化 FliM) の発現をウェスタンブロッティングにより確認したところ、12 か所すべての候補においての発現を確認することができた (図 4)。

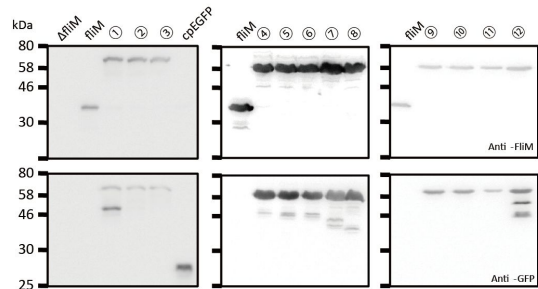


図 4. ラベル化 FliM の発現

次に各ラベル化 FliM がその機能を保持しているかどうかを評価するために FliM 欠損株に各ラベル化 FliM をプラスミドで導入し、IPTG で誘導した後、べん毛繊維の構築と、べん毛モーターの機能回復について、位相差顕微鏡により評価したところ、12 の候補のうち 34 残基、233 残基の直後に cpGFP を導入したラベル化 FliM でのみ遊泳が確認された。また、この 2 種類の株を蛍光顕微鏡で観察したところ、GFP による蛍光スポットがべん毛基部体に局在していることが確認された (図 5)。

これらのデータから、12 候補のうちこの 2 つに関しては cpGFP の結合が FliM の機能を阻害することなく、ラベルとして機能していると考えられる。そこでこの 2 つの候補に対し、電子顕微鏡による構造解析を試みた。

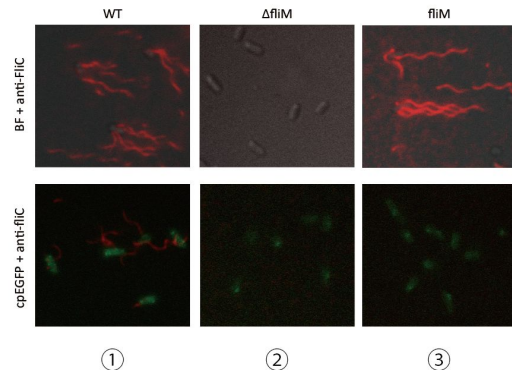


図 5. 各ラベル化 FliM のべん毛構築と局在 (一部)

この 2 つの候補のラベル化 FliM が発現したサルモネラ菌をショ糖を用いた浸透圧ショックによって破碎し、遠心上清から細胞膜画分を採取、界面活性剤 TritonX とアルカリ処理によって細胞膜を溶解し、ショ糖密度勾配超遠心法によってべん毛基部体を精製した。クライオ電子顕微鏡観察を行う前に、酢酸ウランによって染色し、汎用電子顕微鏡で形態及び濃度を確認したところ、ラベル化 FliM を含む C-ring がべん毛基部体から解離していることが確認され、構造解析することができなかった (図 6)。これは cpGFP を FliM へ導入することによって機能的には保持されたが、複合体の安定性を低下させ、精製過程で FliM が解離したものと考えられる。

今回 FliM を標的分子として細胞中で機能を損なうことなく cpGFP ラベル化に成功した

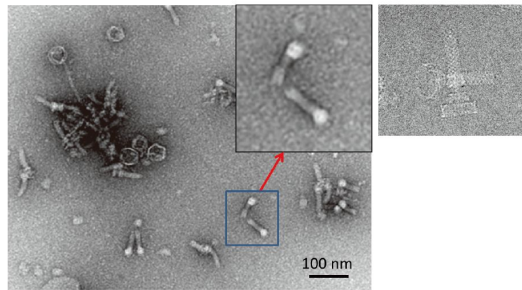


図6. 精製によってFliMが欠損した基部体の電子顕微鏡写真(左)と野生型基部体(右上)

候補については見出すことができた。これはcpGFPをラベルとして用いることは十分に可能であることを意味している。しかし、電子顕微鏡観察に適した試料を調製することができなかった。今回の研究によって、ラベルを導入する場所の選定が非常に重要であることが明らかとなった。特に、精製までを考慮し構造の不安定性を事前に予想することは非常に困難である。標的分子の構造が明らかにされている場合であっても、より複雑な超分子複合体の場合、単体の構造情報だけではまだ不十分であることから、標的分子の全残基に対して走査していく方がより早くラベル化タンパク質を用いた構造解析に成功するものと思われる。特に今回採用したcpGFPラベルは蛍光分子を用いているため、構造解析までのスクリーニングを容易にするという利点を持っている。全残基に対してラベル化をする方法はこの利点を最大限に生かすことができる。

今後、大量のラベル化分子を作成するための簡便な遺伝子操作方法を考慮するとともに、ラベル化タンパク質複合体の構造解析手法を開発していく。

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 1件)

Kawamoto, A., Matsuo, L., Kato, T., Yamamoto, H., Namba, K., Miyata, M. (2016) Periodicity in attachment organelle revealed by electron cryotomography suggests conformational changes in gliding mechanism of *Mycoplasma pneumoniae*. *mBio* 7(2):e00243-16. (査読有)

〔学会発表〕(計 9件)

加藤貴之. クライオ電子顕微鏡を用いた生体超分子複合体の立体構造解析. 第11回「異分野キャリアを持つ医療系生命科学研究者育成支援」事業セミナー, 岡山大学(岡山県岡山市), 2016年3月16日.

加藤貴之. MotA複合体の電子顕微鏡による立体構造解析. Structural analysis of the

MotA complex by electron microscopy. 2015年度べん毛研究交流会, 滝の湯(山形県金沢市), 2016年3月6日.

川本晃大, 森本雄祐, 加藤貴之, 難波啓一.

低温電子線トモグラフィーにおける電子線直接検知型カメラの効果. The power of electron direct detector for electron cryotomography. 第53回日本生物物理学会年会, 金沢大学(石川県金沢市), 2015年9月14日.

Kato, T., Terahara, N., Miyata, T., Namba, K. 単粒子解析のための分子同定用GFPラベル. GFP protein labeling for single particle image analysis. 第53回日本生物物理学会年会, 金沢大学(石川県金沢市), 2015年9月14日.

Tatli, M., Miyata, T., Kato, T., Namba, K. CryoEM 3D image reconstruction of the flagellar LP ring complex. 第53回日本生物物理学会年会, 金沢大学(石川県金沢市), 2015年9月14日.

Miyata, T., Kato, T., Morimoto, Y.V., Matsunami, H., Namba, K. 走化性シグナルCheY-Pを結合したべん毛基部体スイッチ複合体の構造. Structure of the flagellar basal body switch complex with chemotaxis signal protein CheY-P. 第53回日本生物物理学会年会, 金沢大学(石川県金沢市), 2015年9月13日.

Horvath, P., Miyata, T., Takazaki, H., Kato, T., Namba, K. High resolution structural analysis of the flagellar hook of *Salmonella*. 第53回日本生物物理学会年会, 金沢大学(石川県金沢市), 2015年9月13日.

加藤貴之, 難波啓一. “手ぶれ補正”機能による高分解能構造解析. High resolution analysis by motion correction. 日本顕微鏡学会第71回学術講演会, 国立京都国際会館(京都府京都市), 2015年5月15日.

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 貴之(KATO, Takayuki)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号: 20423155

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

宮田 知子 (MIYATA, Tomoko)
大阪大学・生命機能研究科・特任助教
研究者番号：3 0 4 2 3 1 5 6

寺原 直矢 (TERAHARA, Naoya)
大阪大学・生命機能研究科・特任助教
研究者番号：4 0 5 5 4 7 3 8