

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770166

研究課題名(和文)

べん毛モーター固定子複合体の相互作用・イオン透過・構造変化の解析

研究課題名(英文)

Analysis of interaction, ion transport and structural change in a stator complex of bacterial flagellar motor

研究代表者：

須藤 雄気 (SUDO YUKI)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：10452202

研究成果の概要(和文)：

細菌は環境を認識するレセプターと運動器官(べん毛モーター)により過酷な環境を生き抜く。本研究では、全反射型赤外分光法により、これまで謎とされてきた固定子複合体(PomAB)とNa⁺の結合にAsp24が直接関与すること(Sudo et al. 2009b, Biochemistry)、その親和性と他に2つのカルボン酸が結合に関与することを明らかにした。変異体解析からCys31-PomBがイオン透過を制御すること(Sudo et al. 2009, Biophysics)、サルモネラ菌の固定子・MotBのC末端の構造を明らかにした(Kojima et al. 2009, Mol. Microbiol.)。さらに本研究の一部として、新規受容体を単離し物理化学的性質を明らかにした(Suzuki et al. 2009, J. Mol. Biol., Sudo et al. 2009a, Biochemistry, Yagasaki et al. 2010, Biochemistry, Sudo et al. 2011, J. Biol. Chem.)。

研究成果の概要(英文)：

Motile microorganisms, such as bacteria and archaea, sense and respond to extracellular stimuli by changing their swimming mode to migrate towards more favorite habitats. In this research, we analyzed interaction, ion transport and structural changes in a stator complex of the bacterial flagellar motor using biophysical techniques. By means of attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy, we directly observed binding of Na⁺ to carboxylates in the Pom/B complex, including the functionally essential residue Asp24 (Sudo et al. 2009b, Biochemistry). We also demonstrated that Ala39-MotB and Cys31-PomB form part of the ion flux pathway (Sudo et al. 2009, Biophysics), and reported the crystal structure of C-terminal region of MotB (Kojima et al. 2009, Mol. Microbiol.). Moreover we found and characterized new receptor proteins (Suzuki et al. 2009, J. Mol. Biol., Sudo et al. 2009a, Biochemistry, Yagasaki et al. 2010, Biochemistry, Sudo et al. 2011, J. Biol. Chem.).

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：膜タンパク質、分子モーター、イオン透過、相互作用

1. 研究開始当初の背景

細菌のべん毛モーターは10種類以上の蛋白質からなる回転分子機械である。分子量約10 MDaで、内膜(IM)と外膜(OM)に埋め

込まれ、細胞壁層(PG)にも固定化されている。細胞膜に生じるイオンの電気化学ポテンシャル差をエネルギー源とし回転し、ビブリオ菌ではNa⁺を、大腸菌はH⁺を駆動力

とする。この違いは固定子複合体が、チャネルとして特定のイオンを選択的に透過させることに由来する。ビブリオ菌では4回膜貫通型 PomA と1回膜貫通型 PomB が固定子複合体を作り、Na⁺流入により回転が起こる。膜蛋白質複合体であるが故に解析が難しく、PomA-PomB 間の相互作用部位や Na⁺流入に伴う構造変化に関する知見は少ない。

2. 研究の目的

申請者が属する研究室は、PomA/PomB や関連蛋白質のクローニング・同定・電子顕微鏡による構造解析などを精力的に行っている。申請者は昨年赴任したが、それまでに光感受応答レセプター及び相互作用分子との化学量論比・解離定数、結合に必須な部位の同定、NMR、赤外分光法(FTIR)による構造変化の解析を行い、HtrII の部分構造も明らかにした。最近では機能解析にも力を入れ、機能に必須の部位を明らかにした。さらに H⁺ポンプとして機能するバクテリオロドプシン(BR)をわずか3つの変異で SRII 様光センサーへ機能変換できることを明らかにし、光情報変換の心臓部を明らかにした。このような膜蛋白質間相互作用・情報伝達解析で培った手法・技術を最大限生かし、本研究では PomA-PomB 間の定量的相互作用解析、イオン透過に伴う蛋白質の構造変化を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 試料調製: 測定には、試料を大量に得て高純度化する必要がある。*V. alginolyticus* を用いた大量発現系を構築し、各種界面活性剤の検討、カラムクロマトグラフィーの検討(Ni アフィニティー、イオン交換、ゲル濾過)により、PomA-PomB 複合体を純度良く(>80%) 精製する系を構築した(図1参照)。

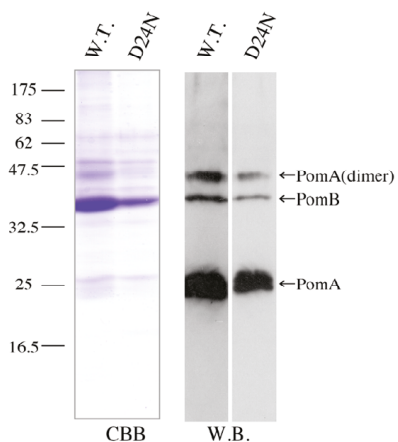


図1. 野生型 PomAB 複合体(WT)と D24N 変異体(D24N)

また、FliG や PomB 単独発現系も構築し、発現・精製の難しい膜タンパク質ではあったが順調に試料調製が完了した。

(2) 全反射型赤外分光測定(ATR-FTIR)と結晶構造解析: 上記 PomAB 複合体試料を用い、イオン存在下・非存在下での差 ATR-FTIR スペクトルを測定した。これにより、イオン(ここでは特にカチオン)脱着に伴うタンパク質の構造変化を明らかにすることが出来ると期待される。また、サルモネラ菌の固定子・MotB の C 末端領域を高純度に精製し、溶液 NMR 法による条件検討を経て、結晶化を行った。

(3) 部位特異的変異体を用いたイオン透過経路の検討: PomB などの固定子タンパク質群の2次構造から、イオン透過に関与する可能性のある保存性アミノ酸を検索し、変異体を用いてその役割を検討した。

(4) レセプターの単離とその性質: 光受容体でべん毛モーターの回転制御に関与するであろうタンパク質を検索し、クローニング、発現・精製系の構築を行い、その性質を種々の生物物理学的手法により調べた。

4. 研究成果

(1) 全反射型赤外分光測定(ATR-FTIR)と結晶構造解析: ATR-FTIR 法により、これまで不明であったカチオン結合サイトを3つ発見し、そのうちの一つを Asp24 と帰属した(Sudo et al. 2009b, Biochemistry)(図2)。また、その結合親和性は~100mM 程度で、微生物が実際に泳ぐ能力から求めた親和性と同程度であるため、生理的に意味のある結合を測定していると考えている。

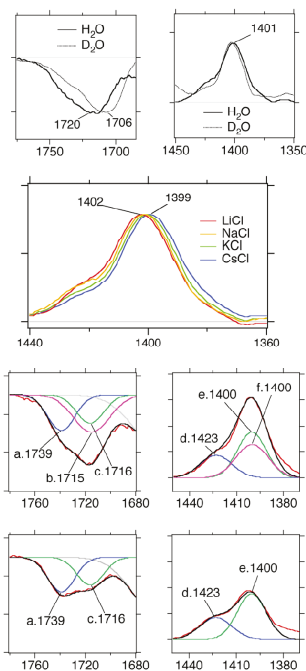


図2. PomAB 複合体の Na⁺存在下・非存在下の差スペクトル。ここでは特にカルボン酸の領域を示す。

また、サルモネラ菌の固定子・MotB の C 末端領域を様々な長さのフラグメントとして精製し、構造解析に向けた領域であるかを、溶液 NMR 法を用いて検討した。この結果をもとに、結晶化を試み、1.75 Å 分解能で明らかにすることが出来た(Kojima et al. 2009, Mol. Microbiol.)。これにより、固定子が集合し、イオンを通す機構を提唱した。(2) 部位特異的変異体を用いたイオン透過経路の検討：固定子 B サブユニットに保存されたアミノ酸である MotB-Ala39, PomB-Cys31 に変異を導入し、細菌の泳ぎから、イオン透過能を評価した。その結果、この部位のアミノ酸側鎖の大きさと運動能に正の相関が認められた。さらに、大きな側鎖を導入した変異体の運動能欠損は、向かい合うと予想されるアミノ酸への変異、MotA-M206S, PomA-L183F でサブレスされる事が分かった。これらの結果から、実際にこのアミノ酸がイオン透過に関与すると結論した (Sudo et al. 2009, Biophysics)(図 3)。

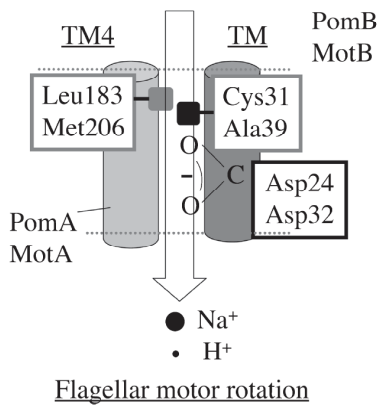


図 3. PomAB 複合体のイオン透過経路

(3) レセプターの単離とその性質：べん毛制御を行う新しい光受容体を古細菌や真正細菌から単離し、その分光学的性質などを明らかにした。また、機能未知の全く新しいタイプの光受容体を単離し、その性質を解析した(Suzuki et al. 2009, J. Mol. Biol., Sudo et al. 2009a, Biochemistry, Yagasaki et al. 2010, Biochemistry, Sudo et al. 2011, J. Biol. Chem.)(図 4)。

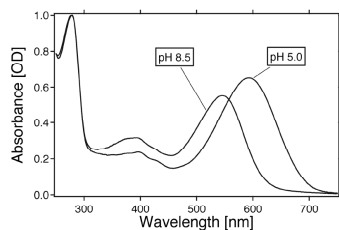


図 4. Haloarcula vallismortis より見いだした新しい光受容タンパク質

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 10 件)

- ① Suzuki, D., Furutani, Y., Inoue, K., Kikukawa, T., Sakai, M., Fujii, M., Kandori, H., Homma, M. & *Sudo, Y. “Effects of chloride ion binding on the photochemical properties of *Salinibacter* sensory rhodopsin I” **J. Mol. Biol.** 392, 48-62. (2009) 査読有
- ② Kojima, S., *Imada, K., Sakuma, M., Sudo, Y., Kojima, C., Minamino, T., *Homma, M., & *Nammba, K. “Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB” **Mol. Microbiol.** 73, 710-718. (2009) 査読有
- ③ *Sudo, Y., Okada, A., Suzuki, D., Inoue, K., Irieda, H., Sakai, M., Fujii, M., Furutani, Y., Kandori, H., & Homma, M. “Characterization of a signaling complex composed of sensory rhodopsin I and its cognate transducer protein from the eubacterium *Salinibacter ruber*” **Biochemistry** 48, 10136-10145. (2009) 査読有
- ④ Sudo, Y., Kitade, Y., Furutani, Y., Kojima, M., Kojima, S., Homma, M., and *Kandori, H. “Interaction between Na⁽⁺⁾ ion and carboxylates of the PomA-PomB stator unit studied by ATR-FTIR spectroscopy” **Biochemistry** 48, 11699-11705. (2009) 査読有
- ⑤ Yagasaki, J., Suzuki, D., Ihara, K., Inoue, K., Kikukawa, T., Sakai, M., Fujii, M., Homma, M., Kandori, H., & *Sudo, Y. “Spectroscopic studies of a sensory rhodopsin I homologue from the archaeon *Haloarcula vallismortis*” **Biochemistry** 49, 1183-1190. (2010) 査読有
- ⑥ *Sudo, Y., Ihara, K., Kobayashi, S., Suzuki, D., Irieda, H., Kikukawa, T., Kandori, H., & Homma, M. “A microbial rhodopsin with a unique retinal composition shows both sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin-like properties” **J. Biol. Chem.** 286, 5967-5976. (2011) 査読有
- ⑦ 須藤雄気 “ロドプシン研究はどこに行くのか？” **生物物理** 50, 160-161. (2010) 査読無し
- ⑧ 割石学、本間道夫、*須藤雄気 “光で動く微生物-ロドプシン分子による光受容と情報伝達機構” **OplusE** 「特集：光アクチュエーター」, 519-524. (2010) 査読無し
- ⑨ *Kandori, H., Sudo, Y., & Furutani, Y. “Protein-protein interaction changes in an archaeal light-signal transduction” **J. Biomed. Biotechnol.** 2010:424760 (14 pages). (2010) 査読無し

- ⑩ Suzuki, D., Irieda, H., Homma, M., Kawagishi, I. & *Sudo, Y. "Phototactic and chemotactic signal transduction by transmembrane receptors and transducers in microorganisms" **Sensors** 10, 4010-4039. (2010) 査読無し

[学会発表] (計 17 件)

- ① 須藤雄気 (2009) “北大発-アメリカ経由-名古屋行き：細菌の光応答に関する生物物理学的研究 “ 生物物理学会・北海道支部講演会 “ ” 12 月 21 日, 札幌, 日本
- ② Sudo, Y. (2010) "Sensory signal transduction from the sensory rhodopsins to their cognate transducer proteins in microbes" 14th International Conference on Retinal Proteins, Aug 3, Santa cruz, USA.
- ③ 須藤雄気 (2010) “微生物の走光性：センサーロドプシンの機能理解から何がわかるか、何をもちたらすか “ 分子研研究会「拡がるロドプシンの仲間から」何がわかるか “ ” 何をもちたらすか “ ” 3 月 23 日, 岡崎, 日本
- ④ 須藤雄気 (2010) “生物物理学を愛して 10 年、ロドプシン分子のこれからの 10 年、DABESA!!” 第 50 回・生物物理学若手の会夏の学校講演 9 月 4 日, 一宮, 日本
- ⑤ 須藤雄気 (2010) “機能性・制御性膜タンパク質 (微生物型ロドプシン) による新しい解析ツールの創成に向けて” 生理研研究会「光操作研究会」9 月 9 日, 岡崎, 日本
- ⑥ 須藤雄気、本間道夫 (2010) “機能性・制御性膜タンパク質 (微生物型ロドプシン) による新しい解析ツールの創成に向けて” 生理研研究会「作動中の膜機能分子の姿を捉える」9 月 16 日, 岡崎, 日本
- ⑦ Sudo, Y. and Homma, M. (2010) “Microbial Sensory Rhodopsins: Structural change, function and tool for optogenetics” GCOE/Structural Biology Research Center International Symposium: Protein structure and dynamics; from molecules to assembly, Nov. 24, Nagoya, Japan.
- ⑧ 須藤雄気、本間道夫 (2011) “光受容タンパク質による微生物の光センシングの理解とその利用” 日本薬学会第 131 年会, 3 月 29 日, 静岡, 日本

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：アナベナセンサリーロドプシンを利用したタンパク質発現法

発明者：須藤雄気, 入枝泰樹, 本間道夫

権利者：国立大学法人名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2010-181053

出願年月日：2010 年 8 月 12 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://bunshi4.bio.nagoya-u.ac.jp/~bunshi4/fourth.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 雄気 (SUDO YUKI)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10452202

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし