

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18074003

研究課題名（和文） ナトリウムイオン駆動型膜内回転モーターの力発生機構の解明

研究課題名（英文） Study on the mechanism of force generation in the sodium-driven flagellar motor

研究代表者

本間 道夫（Homma Michio）

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：50209342

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：モーター、ナノテク、ナトリウムイオン、生体エネルギー、べん毛

1. 研究計画の概要

イオン流入を動力源として回転する、超小型ナノマシンである ATPase とバクテリアべん毛モーターにおいて、イオン流入がどのようなメカニズムによって回転運動に変換されるかを解明することを大きな目標とする。本研究計画では、これまでに多くの研究が行われてきたプロトン型のモーターに対してナトリウムイオン駆動型のモーターについて研究を進める。イオン共役と回転の仕組みを分子レベルで明らかにすることを目的に、モータータンパク質によるイオン流入を直接検出する方法を確立し、イオン流入とモータータンパク質の構造変換と回転を同時計測することを目指す。

2. 研究の進捗状況

URESYSYSTEM を使った系において、界面活性剤存在下でタンパク質合成を行い、リボソーム存在下で PomAB の合成に成功した。しかし、PomB は推定分子量より約 2kDa くらい小さいポリペプチド鎖として合成されていた。その原因を調べた結果、N 末端側に何らかの異常があると考えられた。PomB Pro-12 に変異を導入すると、正常な分子量を持っていた。また、N 末端に GFP が融合した PomB は、分子量が正常であった。このことから、PomB の N 末端領域の構造が変化することで切断が抑圧されたのではないかと考えられた。PomB Pro-12 変異タンパク質を発現した菌体が、野生型と同程度の運動能を示した。これらの合成 PomAB を用いて、プロテオリボソームへの再構を行い、Na⁺取り込み活性の測定する準備

ができた。固定子構成タンパク質 PomB に GFP を融合させた GFP-PomB の局在の条件を調べたところ、培地に Na⁺が存在するときは極局在がみられるが、K⁺に置換すると極局在が見られなくなった。このイオン依存的な蛍光ドットの局在と拡散は可逆的であることを示した。さらに、PomB の推定イオン結合部位を含む、種々の変異体を作成してモーターの局在化を調べ、モーター機能と局在の関連を明らかにできた。

べん毛モーター固定子中を透過するイオンは、固定子複合体中の膜貫通部位に唯一存在するカルボン酸、Asp24-PomB (Asp32-MotB) がイオン結合部位と推定されている。全反射型赤外分光法 (ATR-FTIR) を用い、Asp 残基とイオンの相互作用を確かめることに成功した。PomA/PomB をビブリオ菌で発現させ、精製を行い、大腸菌 Polar lipid に再構成した。この試料を用い塩存在下・非存在下での測定を行った。その結果、Na⁺存在下で、COOH 型から COO⁻型へ変化するカルボン酸を見出した。D24N 変異体での信号消失から、Asp24 と Na⁺の結合による変化であることを確かめるとともに、2つの信号が残ることから、Asp24 以外の Na⁺結合部位を明らかにすることができた。さらに、Asp24 に至る透過経路について検討した。Asp24 (Asp32-MotB) のヘリックス 2 ターン分、イオン取り込み側に位置し、H⁺駆動型で Ala、Na⁺駆動型で Cys に保存されている残基に着目し、側鎖の大きさを変える種々の変異体を作成した。その結果、MotA-M206 が MotB-A39 と向かい合いイオン透過経路を形成していることが推定された。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。これまでに思いもよらなかった、回転に必要な共役イオンに依存したモーターの集合が明らかになった。これは、これまで共役イオンがないと単純にモーターを動かす駆動力がないということと理解されたが、この発見により、機能的なモーターの構築にも共役イオンが必要であることが分かった。モーター機能を解析理解する上で重要な発見である。また、べん毛のモータータンパク質が初めて構造解析されたことから、他のモータータンパク質についても、研究が進展することが期待される。

4. 今後の研究の推進方策

イオンを透過するチャンネルを形成する PomAB 複合体については、結晶化が切望されている。in vitro ベン毛モーターの再構成系の構築に成功したことから、ナトリウムイオン取り込み系を確立する必要がある。in vitro 系で合成したモータータンパク質の他に、菌体から大量合成して精製したものもコントロールとしてナトリウムイオン取り込み活性を確認する予定である。固定子と回転子との相互作用の検出も大きな課題として残っている。さらに、べん毛モータータンパク質を逸脱して、膜のダイナミックスの研究を進めている。

動物の脳の抽出液に、強力な新規膜突起誘導因子が存在することを発見したので、生体膜の形態形成制御の機構を明らかにしたいと考えている。

5. 代表的な研究成果

(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 11 件)

Hizukuri Y, Kojima S, Yakushi T, Kawagishi I, Homma M. Systematic Cys mutagenesis of FlgI, the flagellar P-ring component of *Escherichia coli*. ***Microbiology***. (2008) 154(Pt 3):810-7.

査読有り

[学会発表] (計 15 件)

本間道夫

Estimation of the ion flux pathway in stator units of the proton- and sodium-driven flagellar motors.

ゴードン会議 (米国 ベンチュラ 22Feb09-26Feb09)