

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18074006

研究課題名（和文） 回転モータートルク発生ユニットの構造基盤

研究課題名（英文） Structural basis for torque generation of biological rotary motors

研究代表者

今田 勝巳 (IMADA KATSUMI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：40346143

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・生物物理学

キーワード：分子モーター、ナノマシン、ナノバイオ、生物物理、分子機械

## 1. 研究計画の概要

細菌べん毛基部に存在する直径約 30 ナノメートルのモーターは、膜を介したイオンの電気化学的ポテンシャル差を利用して回転する。主に内膜蛋白質で構成された固定子複合体中をこれらのイオンが通過するときに起きる、固定子複合体と回転子複合体との間の相互作用変化が回転力を生み出すと考えられている。本研究では、各種の構造解析手法を駆使し、細菌べん毛のトルク発生ユニットの構造基盤を明らかにすることを目的とする。固定子蛋白質、固定子と直接相互作用する回転子蛋白質の原子レベルの構造決定を行い、原子レベルでのエネルギー変換機構の理解に迫ることを目指す。また、べん毛特異的輸送モーターの特性を明らかにし、べん毛形成システムと  $F_0F_1$ -ATPase の間のエネルギー変換の共通原理、同じエネルギー源を異なる仕事に変換する仕組みの解明を目指す。

## 2. 研究の進捗状況

### (1) 固定子蛋白質 MotY の構造

Na 型べん毛モーター固定子蛋白質 MotY の構造を 2.85Å 分解能で解析した。固定子蛋白質では初めての構造である。MotY は Na べん毛モーター基部で MotX と共に T リングを形成する。MotY は 2 つのドメインから成り、N 末ドメインが新規構造であるのに対して C 末ドメインは、Pal などのペプチドグリカン結合蛋白質と非常に似ていた。N 末ドメインは MotX と基部体へ結合することで、基部体周囲への固定子の組み込みに関わり、C 末ドメインは高速回転する Na モーターの固定子ユニットを細胞壁に強固に固定することがわかった。また、ペプチドグリカン結合部位は結

晶構造中で disorder していた。ペリプラズム中に輸送された MotX と MotY は複合体を形成しペリプラズム中を彷徨うが、その間はペプチドグリカンに結合せず、基部体と結合することで初めてペプチドグリカン結合部位はフォールディングし、ペプチドグリカンに固定されると考えられる。

### (2) 固定子蛋白質 MotB のペリプラズムフラグメントの構造

固定子のモーターへの組込み及びペプチドグリカンへの固定に働く MotB のペリプラズムフラグメント (MotB<sub>c</sub>) の構造解析を行い、3 種類の結晶について 5 つの独立な MotB<sub>c</sub> 分子の構造を明らかにした。MotB<sub>c</sub> は 2 量体を形成し、構造に基づいて MotB に 2 量体形成を妨げる変異を入れたところ、モーター機能が失われると共に、イオンチャネルを形成する内膜部の構造が変化することが生化学的な解析から明らかになった。また、MotB<sub>c</sub> の構造とミュータントの解析から、モーターに組み込まれる際に 2 本のヘリックスと 1 本の β 鎖大きな構造変化が起こり、それがイオンチャネルにプロトンを通す ON/OFF とカップルしていることが示唆された。

### (3) 回転子構成蛋白質 FliG の構造

右方向にしか回転できないミュータント FliG の MC ドメインの 2.3Å の構造解析に成功した。べん毛モーターがどちらにも回転できる理由が近いうちに明らかになると期待される。

### (4) 固定子蛋白質の発現および精製

MotA/B 複合体、PomA/B 複合体を大腸菌を

用いて発現し、精製法を探索しているが、構造解析を進めるのに十分な系はまだ確立していない。一方、無細胞系を用いて MotA および MotB それぞれを GST 融合蛋白質として発現を試みたところ、可溶性画分として発現することに成功した。また、大きな可溶性ドメインを持つ全長 MotB を無細胞系を用いて発現したところ、60%以上が可溶性画分に回収できることを見出した。

#### (5) ベン毛輸送系モータータンパク質

X 線結晶構造解析から、ベン毛輸送装置蛋白質 FliI が F<sub>1</sub>ATPase の  $\alpha/\beta$  サブユニットと、FliJ が F<sub>1</sub>ATPase の  $\gamma$  サブユニットと著しい類似性を持つことが明らかになり、輸送装置が F<sub>1</sub>ATPase と共通の作動機構を持つことが示唆された。さらに、ベン毛輸送装置の輸送駆動力が ATP 加水分解エネルギーではなく、水素イオンの濃度差であることを明らかにし、輸送装置と F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> システムとの類似性は、F<sub>0</sub> 部分にまで広がる可能性を見出した。

### 3. 現在までの達成度

#### ① 当初の計画以上に進展している。

(理由) トルク発生ユニットを構成する個々の蛋白質の解析はほぼ順調に進み、大きな成果が上がったことに加えて、輸送モーター蛋白質の構造解析からベン毛システムと F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase の共通性が明らかになり、当初の予想を超えた大きな研究の広がりが生まれたため。

### 4. 今後の研究の推進方策

(1) MotA/B 複合体は、MotB に大きな変異を持つミュータント複合体を中心に発現・精製条件を探索する。PomA/B 複合体、MotX-MotY 複合体、PomB ペリプラズムフラグメント-MotX-MotY 複合体の発現・精製については、A0 本間グループと協力して進め、精製できたものから順次、結晶化・構造解析を進める。

(2) MotB および PomB ミュータントの構造解析から、モーターへの組込みとイオン透過スイッチのカップリング機構の実態を明らかにする。

(3) FliI6 量体および FliI-FliJ 複合体の形成条件を FliI ミュータントを中心に探索する。複合体形成条件がみつければ、構造解析と共に、A0 野地グループと協力して回転計測を試みる。

### 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 12 件)

(1) Nakamura, S., Kami-ike, N., Yokota, J.P., Kudo, S., Minamino, T., & Namba, K. Effect of Intracellular pH on the Torque-Speed Relationship of Bacterial Proton-Driven Flagellar Motor. *J. Mol. Biol.* 386, 332-338 (2009) 査読有

(2) Insights into the stator assembly of the Vibrio flagellar motor from the crystal structure of MotY. Kojima S., Shinohara A., Terashima H., Yakushi T., Sakuma M., Homma M Namba K. and Imada K. *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA*, 105, 7696-7701 (2008) 査読有

(3) Characterization of the periplasmic domain of MotB and implications for its role in the stator assembly of the bacterial flagellar motor. Kojima S., Furukawa Y., Matsunami H., Minamino T. and Namba K. (2008) *J. Bacteriol.* 190, 3314-3322. 査読有

(4) Distinct roles of the ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. Minamino T. and Namba K. *Nature*, 451, 485-488 (2008) 査読有

(5) Structural similarity between the flagellar type III ATPase FliI and F1ATPase subunits. Imada K., Minamino T., Tahara A. and Namba K. *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA*, 104, 485-490 (2007) 査読有

[学会発表] (計 56 件)

Ibuki, T., Shimada, M., Minamino, T., Imada, K., Namba, K. X-ray analysis of FliJ, a cytoplasmic component of the flagellar type III protein export apparatus. XXI Congress of the International Union of Crystallography, Grand Cube Osaka, Japan. Aug. 28-29, 2008. CrSJ Award 受賞

[図書] (計 2 件)

今田 勝巳 「タンパク質でできた極小スクリュー 細菌べん毛の分子機構」最新分子マシン (2008) P. 104~112 化学同人

[その他]

ホームページ

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/lab0/09a.html>