

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23115008

研究課題名（和文）少数分子生体システムの再構成 - 複合体構成分子の数の制御と理論検証 -

研究課題名（英文）Reconstitution of an in-vitro biological system driven and regulated by a small number of molecules

研究代表者

今田 勝巳 (Imada, Katsumi)

大阪大学・理学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：40346143

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 110,000,000 円

研究成果の概要（和文）：少数の分子のターンオーバーで機能するべん毛輸送系の分子機構の解明を目指した。反転膜により制御が可能なin vitro蛋白質輸送計測系を構築し、この系が細胞内と同様の機能を保持することを実証した。この系とin vivoでの1分子計測、生化学・遺伝学実験から、細胞質中の輸送ATPase蛋白質の新たな役割、輸送のエネルギー源、輸送順序を決めるしくみを明らかにした。また、輸送シャペロンが構造変化により相互作用を制御し、少数の基質が優先的に輸送されるしくみを解明した。さらに、高速AFMを高度化し、蛋白質の構造変化や離散集合過程を直接可視化し、少数分子が関わる生体現象の素過程ダイナミクスを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To understand the molecular mechanism of flagellar construction, we investigated the flagellar protein export system that is driven and regulated by the turnover of multifunctional component proteins, each of which functions in limited numbers. We established an in-vitro assay system using inverted membrane vesicle that enables precise control of the external condition. The system retains the secretion activity as in the cell. Using this system together with in vivo single molecule experiment and biochemical and genetic techniques, we revealed a novel role of the export ATPase proteins, the energy source for secretion and the mechanism of ordered secretion. We also found that export chaperone proteins change their structure to control the binding affinity for their interaction partners and thereby regulate the secretion order. In addition, we developed the high speed AFM and visualized the structural change and assembly dynamics of protein complexes.

研究分野：生物物理学

キーワード：生物物理 蛋白質輸送 再構成系 III型輸送装置 高速AFM 少数性 分子機械

1. 研究開始当初の背景

約 30 種の蛋白質が各々数個から数万個集合した超分子複合体である細菌べん毛の形成は、輸送シャペロンや離合集散する可溶性輸送装置蛋白質やなど、少数分子のふるまいがべん毛全体の構築や本数決定に大きく影響する生命現象である。細胞内で合成された構成蛋白質は、べん毛基部体の根元にあるべん毛輸送装置を通して細胞膜外へ輸送される。べん毛輸送システムは輸送基質選択機構を備えると共に、べん毛の構築状況をモニターして発現系にフィードバックする機構を持ち、適切なタイミングでべん毛蛋白質を作り菌体外へ輸送している。しかし、輸送順序決定のしくみは不明であり、例えば 1 本のべん毛に数個しか含まれない蛋白質を数万個含まれる分子に優先して輸送する機構は不明であった。輸送装置は 6 種類の膜蛋白質と離合集散を伴って機能する 3 種類の可溶性蛋白質で構成される。輸送前のべん毛蛋白質は、それぞれに特異的な輸送シャペロンと結合する。シャペロンは輸送基質の安定化と輸送の補助に加え、輸送後はべん毛蛋白質の発現制御に関わる。この発現制御はべん毛本数制御にも関係する。べん毛は多すぎても少なすぎても遊泳に支障を来すため、本数制御は細菌の生存に重要である。しかし、その分子機構の詳細は不明であった。我々は、輸送系蛋白質の構造・機能研究を進め、輸送がプロトン駆動力で起こること、可溶性蛋白質の構造が F_1 ATPase と酷似すること、輸送シャペロンが結合相手に合わせて構造変化することを明らかにしていた。また、輸送に関わる分子の多くは多機能性で、離合集散を通じて機能することを見出していた。しかし、べん毛形成で鍵となる輸送順序の決定機構、特に少コピー数分子を優先選択する機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、in vitro 輸送系を用いた輸送計測、in vivo での 1 分子計測、高度化した高速 AFM を用いた輸送装置構成蛋白質の構造変化計測などを組み合わせ、少数の分子のターンオーバーによって機能するべん毛輸送システムの分子機構を中心にべん毛形成の分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

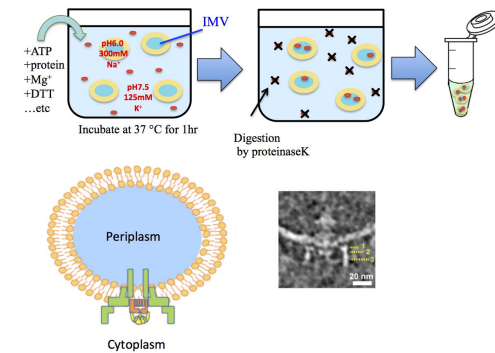
in vitro 輸送アッセイ系はサルモネラから作成した反転膜小胞を用いて構築した。この系を用いて輸送 ATPase 複合体蛋白質や輸送シャペロン等の輸送システム構成蛋白質の種類と数、エネルギー源となる ATP やプロトン駆動力などを様々に変えて輸送計測を行った。in vivo 1 分子計測では、各輸送システム構成蛋白質を蛍光ラベルし、ストイキオメトリやターンオーバーを計測した。高速 AFM については広域スキャナや分子操作モードの開発、光学顕微鏡技術との融合機の開発を

行った。これらを用いて輸送装置構成蛋白質の構造変化を計測し、結晶構造解析で解明した原子レベルの構造と対応させて輸送中に起こる変化を明らかにすることを試みた。さらに、可溶性成分から成る輸送装置部分複合体や、一部の膜内成分を発現して作成した部分複合体を再構成し、輸送基質-シャペロン複合体との相互作用および構造変化を探った。

4. 研究成果

(1) in vitro 輸送アッセイ系の構築

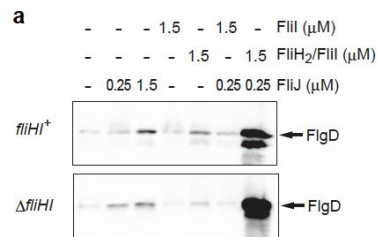
外部から様々な条件の変更や制御が可能な、III 型蛋白質輸送を計測するシステムをスフェロプラスト化したサルモネラから作成した反転膜を用いることで構築することに成功した。この系が輸送能を保持することを反転膜外に加えたフックキャップ蛋白質の反転膜内への輸送により確認した。また、この系が細胞内と同様の機能を保持することを、べん毛フックの反転膜内構築、輸送基質特異性の切替え、べん毛全体構造の反転膜内構築を行うことで実証した (論文投稿中)。



反転膜 in vitro 輸送アッセイ系の模式図と反転膜中の輸送装置の電子顕微鏡写真

(2) in vitro 輸送アッセイ系による輸送計測
反転膜系を用いて外部条件を制御した輸送計測を行い以下のような従来の説を覆す見が数多く得られた (論文投稿中)。

溶液中に分散する輸送 ATPase 蛋白質により爆発的に輸送が促進される。



輸送 ATPase 蛋白質 (FliH, I, J) の添加による輸送促進効果

ATP 加水分解エネルギーのみでも輸送が起こる。

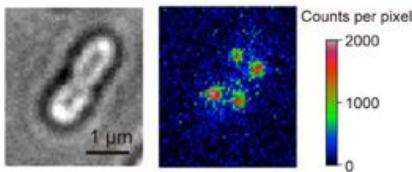
クラス II 蛋白質の輸送に順序があり、輸送装置に輸送順序が決めるしくみが存在す

ること。

フックの長さ分布は添加する FliK の量のみで制御され、他の成分は不要なこと。

(3) 輸送装置蛋白質のストイキオメトリとターンオーバーの計測

in vivo での 1 分子計測を行い、輸送ゲート中の FliF、FlhA 蛋白質のストイキオメトリとターンオーバー(Mol. Microbiol. 2014)、輸送 ATPase のストイキオメトリとターンオーバーの直接測定に成功し、輸送 ATPase 分子の入替わりは 1 分間に数回と少ないことが分かり (Sci. Rep. 2014)。効率的な輸送には輸送装置に組み込まれない輸送 ATPase が細胞質中にある数存在することが必須であると判明した。



蛍光ラベルした輸送 ATPase の分布

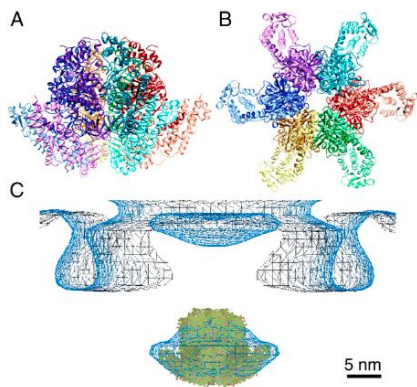
(4) 輸送エネルギー

輸送装置が H⁺ と Na⁺ のどちらもエネルギー源として作動すること(PLoS Path 2016)、FliI の ATP 加水分解速度はべん毛蛋白質輸送の律速にはならず、間欠的な ATP 加水分解が起これば H⁺ により連続輸送が可能となること(Sci. Rep. 2014)など、エネルギー変換に関する新知見を得た。

(5) 輸送装置部分複合体の構造と再構成

輸送ゲート構成蛋白質 FliP が 4 量体を形成することを示し、FliP ペリプラズム領域の結晶構造を明らかにした (投稿準備中)。

輸送 ATPase 複合体を形成する FliH-I 複合体の結晶構造を明らかにし、FliH が V-ATPase の peripheral stalk と同様の構造を持つこと、電子線トモグラフィ像との比較から輸送 ATPase 複合体の向きを明らかにした (Imada et al., Proc Natl Acad Sci USA 2016)。



輸送 ATPase 複合体の構造モデル

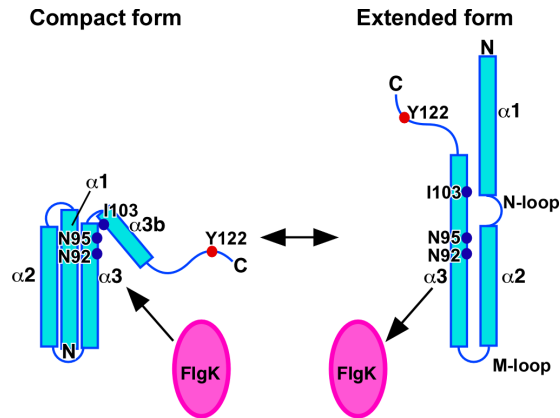
(6) タンパク質輸送システム構成要素の相互作用

多機能性の少数分子である輸送シャペロンと輸送ゲート蛋白質との相互作用を中心に輸送に伴うシステム構成要素間の相互作用変化を明らかにした。

輸送 ATPase FliI は輸送段階に応じて 2 カ所ある輸送シャペロン FliT 結合サイトを変えること、FliT の C 末領域が FliI との結合を制御することを明らかにし、FliT による輸送制御の機構を解明した (Minamino et al., Mol. Microbiol. 2011)。

輸送シャペロン FlgN が FlhA の D1-D2 間の疎水くぼみと相互作用し、FlgN の C 末領域が相互作用を制御することを明らかにした (Minamino et al., Mol. Microbiol. 2011B)。

輸送シャペロン FlgN の構造を解明し、alpha1 と alpha2 の間のループの構造変化により大きく形状を変えることで輸送基質、輸送装置蛋白質との親和性を大きく変え、輸送基質のゲートへの受け渡しを行うことを明らかにした (Kinoshita et al., Mol. Microbiol., 2016)。



FlgN の構造変化が輸送基質の結合・解離を起こす様子を描いたモデル図

シャペロン・輸送基質複合体の FlhAc に対する結合親和性の測定から、FlhAc への結合親和性の違いがべん毛形成順序と一致しており、べん毛繊維の輸送順序は基質複合体のゲートへの親和性の違いにより決定されることが示唆された。

FlhA を中心とした相互作用ネットワーク解析から、輸送装置タンパク質 FliJ と FlhA の相互作用を見だし、その部位を同定した (Ibuki et al., J. Bacteriol. 2013)。また、輸送装置蛋白質 FliH の N 端と FlhA の相互作用が輸送効率に大きく影響することがわかった (Hara et al., J. Bacteriol. 2012)。

FlhA の温度感受性変異体の解析から温度感受性の原因が D2 の可逆変性であることを明らかにした (Shimada et al., JMB, 2011)。

FliJ が V-ATPase の AB サブユニットと複合体を形成し、機能することを明らかにした (Kishikawa et al., PLoS One, 2013)。

ビブリオ菌べん毛基部体タンパク質 FlgT

の構造解析から、ピブリオ菌べん毛形成メカニズムの一端が明らかになった (Terashima et al., PNAS, 2013)。

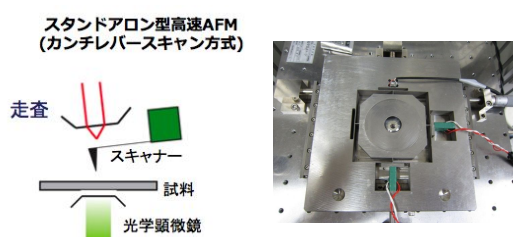
(7) 高速 AFM の高度化

高速 AFM の機能拡張や光学顕微鏡技術を融合することにより AFM を高度化した。

テコの原理に基づく変位拡大機構と逆伝達関数法による振動制御を導入し、60 μm ×60 μm を 10 秒以下で高速イメージングする AFM を開発した (Watanabe et al., Rev. Sci. Inst., 2013)。この装置で枯草菌の溶菌過程や磁性細菌のポーリンの観察を行い (Yamashita et al., J. Mol. Biol. 2012)、バクテリアの観察が可能であることを実証した。

蛍光観察用 CCD カメラと青色 LED を組み込み、GFP を発現細胞に対する AFM 探針の位置決め、アクチンフローや Exocytosis などの細胞表面形態変化を観察できることを実証した (Watanabe et al., Rev. Sci. Inst., 2013)。

ミラー駆動による光学トラッキングを導入して高速 AFM の独立走査ができる高速 AFM/蛍光顕微鏡複合装置を開発し、AFM と蛍光像を同視野・同時観察によりミオシン V の歩行運動やキナーゼのキチン結晶上での連続運動の同時観察に成功した (Uchihashi et al., Methods Enzymol., 2012; Fukuda et al., Rev. Sci. Inst., 2013)。

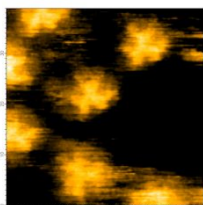


高速 AFM/蛍光顕微鏡複合機

探針に金コロイドを付着させて増強蛍光により AFM イメージング領域のみ蛍光像増強を行うシステムを構築した。

(8) 輸送装置の高速 AFM による観測

輸送 ATPase 複合体は F1-ATPase と同様の構造を持ち、ATPase 活性を有する複合体を形成する。高速 AFM を用いて輸送 ATPase 複合体を観察し、FliH 6 量体リング構造の観察に成功した。その結果、FliH 複合体リングは 6 回回転対称ではなく、2 量体が 3 つ配置したリングであること、添加ヌクレオチドと塩濃度により形態が大きく変化することを見いだした (投稿準備中)。



FliH 6 量体リングの
AFM 像

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 57 件)

Kinoshita M, Nakanishi Y, Furukawa Y, Namba K, Imada K, *Minamino T. (2016). Rearrangements of α -helical structures of FlgN chaperone control the binding affinity for its cognate substrates during flagellar type III export, *Mol Microbiol.* 93, in press.

*Imada K, Minamino T, Uchida Y, Kinoshita M, Namba K. (2016). Insight into the flagella type III export revealed by the complex structure of the type III ATPase and its regulator, *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 3633-3638

Uchihashi T, Watanabe, H., Fukuda, S., Shibata, M., and *Ando, T. (2016). Functional extension of high-speed atomic force microscopy, *Ultramicroscopy* 160, 182-196.

*Shibata, M., Uchihashi T, Ando, T., and *Yasuda, R., (2015). Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells, *Scientific Reports* 5, 8724 (7 pp).

*Minamino T, Morimoto YV, Kinoshita M, Aldridge PD, Namba K. (2014) The bacterial flagellar protein export apparatus processively transports flagellar proteins even with extremely infrequent ATP hydrolysis. *Scientific Reports* 4:7579.

*Ando, T., Uchihashi T, and Scheuring, S. (2014). Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy, *Chemical Reviews* 114, 3120-3188.

Bai F, Morimoto YV, Yoshimura SD, Hara N, Kami-Ike N, Namba K, *Minamino T. (2014). Assembly dynamics and the roles of FliH ATPase of the bacterial flagellar export apparatus. *Scientific Reports* 4, 6528.

Zhu S, Takao M, Li N, Sakuma M, Nishino Y, Homma M, Kojima S, *Imada K. (2014). Conformational change in the periplamic region of the flagellar stator coupled with the assembly around the rotor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 13523-13528.

Morimoto YV, Ito M, Hiraoka KD, Che YS, Bai F, Kami-Ike N, Namba K, *Minamino T. (2014). Assembly and stoichiometry of FliF and FlhA in Salmonella flagellar basal body. *Mol Microbiol.* 91, 1214-1226.

*Igarashi, K., Uchihashi T, Uchiyama, T., Sugimoto, H., Wada, M., Suzuki, K., Sakuda, S.,

Ando, T., Watanabe, T., and Samejima, M. (2014). Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin", *Nature Communications* 5, 3975.

Kinoshita M, Hara N, Imada K, Namba K, *Minamino T. (2013). Interactions of bacterial flagellar chaperone-substrate complexes with FlhA contribute to co-ordinating assembly of the flagellar filament. *Mol Microbiol.* 90, 1249-1261

Terashima H, Li N, Sakuma M, Koike M, Kojima S, Homma M, *Imada K. (2013). Insight into the assembly mechanism in the supramolecular rings of the sodium-driven Vibrio flagellar motor from the structure of FlgT. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110, 6133-6138.

〔学会発表〕(計 150 件)

Uchihashi T. Visualization of single molecular dynamics at work with high-speed atomic force microscopy. The 7th Biennial Australian colloid & interface symposium. Hobart, Tasmania Australia. Feb. 3, 2015.

寺島浩行, 川本晃大, 巽千夏, 南野徹, 難波啓一, 今田勝巳. 細菌鞭毛の III 型分泌装置の再構築. 第 88 回日本細菌学会総会. 長良川国際会議場(岐阜), Mar. 26, 2015

〔図書〕(計 6 件)

Uchihashi T, Kodera N., Ando T. (2015) Noncontact Atomic Force Microscopy. Chapter 22: High-speed Atomic Force Microscopy., Springer., pp481-518.,

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/imada/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今田 勝巳 (IMADA, Katsumi)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40346143

(2) 研究分担者

内橋 貴之 (Uchihashi, Takayuki)

金沢大学・数物科学系研究科・准教授

研究者番号：30326300

(3) 連携研究者

南野 徹 (Minamino, Tohru)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授
研究者番号：20402993

竹内 昌治 (TAKEUCHI, Shoji)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：90343110