

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07318

研究課題名(和文) 高速で回転する細菌べん毛モータの分子軸受け構造と形成機構

研究課題名(英文) Structures and assembly mechanisms of the molecular bushing allowing high-speed rotation of the bacterial flagellar motor

研究代表者

松波 秀行 (Matsunami, Hideyuki)

沖縄科学技術大学院大学・生体分子電子顕微鏡解析ユニット・研究員

研究者番号：80444511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細菌べん毛の高速な回転は細菌表面にあるPリングとLリングからなる分子軸受けによって支えられている。Pリングの構成タンパク質FlgIは、べん毛の形成とは別のタンパク質輸送経路で細菌表面のペリプラズム領域に移行した後、シャペロンタンパク質FlgAと複合体を形成する。FlgAのC末端領域にある疎水性のアミノ酸残基がFlgIのC末端領域を特異的に認識することでFlgIの自己集合を制御する分子機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトや動物などに感染する病原性細菌が自由に動き回ることを抑制するためには、選択的にべん毛の構築を阻止することが有効である。そのためには、病原性細菌のべん毛が自己構築する仕組みを分子レベルで明らかにすることが極めて重要である。そこで、べん毛の分子軸受けができる仕組みについて詳しく理解することに着目して研究を行った。この研究成果をさらに発展させることで、病原性細菌を殺すことなくべん毛の構築を選択的に阻害する薬剤の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The molecular bushing composed of P-ring and L-ring locates at the cell surface and allows the high-speed rotation of the bacterial flagellum. FlgI, a component protein of P-ring, is exported to the periplasmic space in the cell surface through not the flagellar specific export system but the Sec export pathway and, then forms a binary complex with FlgA to stabilize before the P-ring assembly occurs. Moderately conserved hydrophobic residues in the C-terminal domain of FlgA involve the specific recognition of the C-terminal domain of FlgI by molecular mechanisms of preventing from self-assembly of FlgI.

研究分野：構造生物学 微生物学 分子生物学 蛋白質化学

キーワード：細菌べん毛 べん毛基幹部 分子軸受け Lリング Pリング シャペロン ペリプラズム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細菌べん毛はフィラメントとフックと基部体から構成される運動装置で、細菌の自由な運動を可能にするナノサイズの分子モーターである。基部体は細菌の内膜から外膜へと連続する巨大複合体で、回転子のロッドが分子軸受けの中心を貫いている。分子軸受けはPリングとLリングで構成されていて、Pリングはペリプラズム領域のペプチドグリカン層と強固に結合することで回転子の高速回転を支えると考えられている。細菌べん毛の形成には構成タンパク質以外にも数種類のアクセサリータンパク質を必要としている。ペリプラズム領域で唯一機能するFlgAがPリングの形成に関与することが知られている。

### 2. 研究の目的

細菌べん毛は高速で回転できるナノサイズの分子モーターである。細菌が運動機能を獲得するためには、べん毛が正しい順番で組み立てられなければ正確に機能することはできない。分子軸受けの一部であるPリングは26分子のFlgIが環状に配置された構造でその内側に接するようにロッドが貫通している。これまでのX線結晶構造解析からFlgAの構造は明らかにはなっているが、Pリングに関する構造情報はそれほど多くなくFlgIの構造もわかっていない。FlgAを介したPリングの形成は細菌べん毛形成の他には見られないユニークな分子制御機構である。べん毛形成におけるPリングの構造基盤形成に関与するFlgAのシャペロン機能を明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

生化学・分子生物学的手法と構造生物学的手法を用いて、サルモネラ菌由来のべん毛のPリングが形成する仕組みを明らかにする。X線結晶構造解析によってPリングを構成するFlgIとFlgI-FlgA複合体の構造を決定し、Pリング形成の構造基盤を明らかにする。ファーウエスタンプロッシング法によって、FlgIとFlgAとのタンパク質間相互作用を解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) X線結晶構造解析によるFlgIとFlgI-FlgA複合体の構造決定

大腸菌内においてサルモネラ菌のFlgIを高いレベルで発現させることに成功した。FlgIを精製し結晶化スクリーニングを行ったが、X線結晶構造解析に適した結晶は得られなかった。次に、FlgI/FlgA複合体の精製を容易にするためにアフィニータグの導入場所を検討した結果、FlgAのN末端にあるペリプラズム領域への移行シグナル配列の後方にHisタグを導入してFlgIと共に同一の大腸菌内で発現を可能にするコンストラクトが適していることが判明した。FlgIとFlgAをそれぞれ発現する二種類のプラスミドを構築し共に大腸菌に導入し、低温でFlgI/FlgA複合体の発現誘導を行なった。祖抽出液を調製し、Ni-NTAカラムに吸着させた複合体をイミダゾールによって溶出させた。目的の複合体を含む画分を濃縮し、分子排除クロマトグラフィーによって分画した。分子排除クロマトグラフィーの溶出時間から推定されるFlgI/FlgA複合体の見かけの分子量に占めるFlgIとFlgAの割合は1:1であることが示された。FlgI/FlgA複合体の精製法を確立することに成功した。しかしながらFlgI/FlgA複合体の結晶化スクリーニングを行なったが、X線回折実験に使えるような結晶は得られなかった。FlgIの自己集合を抑制しながら結晶の成長を促進させるためには、結晶化条件のさらなる検索が必要であった。

#### (2) クライオ電子顕微鏡によるPリングとFlgI-FlgAの複合体の構造決定の検討

結晶化が困難である場合、X線結晶構造解析による構造決定ができない。クライオ電子顕微鏡による構造解析には、X線結晶構造解析のようにタンパク質を結晶化する必要がなく、X線結晶構造解析に比べて解析可能な分解能の範囲も広い。Pリングのクライオ電子顕微鏡解析の可能性について検討した。好熱菌由来のFlgIを精製したところリング状のタンパク質が集合しているのが観察された。このタンパク質がPリングである可能性は高く、クライオ電子顕微鏡による構造解析が可能であることを示した。今後、べん毛基部体中におけるPリングとPリングだけの構造に見られる違いを明らかにすることはPリング形成を理解する上で重要な点である。そこで、精製したFlgI/FlgA複合体の構造情報を獲得するためにクライオ電子顕微鏡を使用した。近年のクライオ電子顕微鏡の開発と構造解析手法の進展によって、分子量が70 kDaにも満たないFlgI/FlgA複合体のようなタンパク質の構造決定を報告する例が増えている点もクライオ電子顕微鏡による解析の可能性を高めている。ただし、解析対象の分子サイズがそれほど大きくないので、画像コントラストを改善するために非弾性散乱電子を取り除くエネルギーフィルタを有するクライオ電子顕微鏡での画像取得が望ましく、今回の研究期間内ではクライオ電子顕微鏡によるFlgI-FlgAの複合体の構造解析には至っていない。今後、FlgI-FlgA複合体のクライオ電子顕微鏡での構造解析を行う上では、複合体の形成を邪魔しないような安定なタンパク質を融合

させて見かけの分子を大きくさせるなどの工夫が必要となる。

### (3) FlgI-FlgA タンパク質間相互作用解析

FlgI は分子量 36 kDa のタンパク質で 26 分子が環状に集合して P リングを形成する (Jones CJ et al, 1990)。FlgA は FlgI に結合することで P リングの形成の促進と考えられている (Nambu T & Kutsukake K, 2000)。FlgA の C 末端側領域には FlgI との結合領域が存在する (Matsunami et al, 2016)。FlgA の C 末端側領域で比較的保存された疎水性アミノ酸残基にアラニン変異を導入をしたところ、FlgI との結合を明らかに弱める変異箇所を一つ同定することに成功した。一方、FlgI を部分的に欠失させたフラグメントと FlgA とのタンパク質間相互作用をファーウエスタンブロットィング法によって解析したところ、FlgI の C 末端側領域に FlgA との結合領域が存在することが明らかになった (図 1、論文準備中)。FlgI-FlgA の X 線結晶構造解析に向けて、FlgI から FlgA との結合に関与しない領域を除くことで FlgA との安定な複合体が形成され結晶化の促進が期待される。

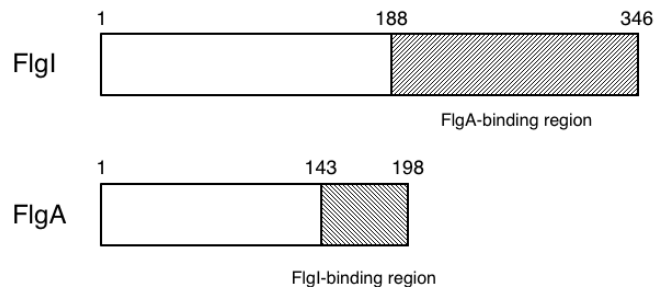


図 1. サルモネラ菌の FlgI と FlgA のドメイン構造

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shibata Satoshi, Shoji Mikio, Okada Kodai, Matsunami Hideyuki, Matthews Melissa M., Imada Katsumi, Nakayama Koji, Wolf Matthias	4. 巻 5
2. 論文標題 Structure of polymerized type V pilin reveals assembly mechanism involving protease-mediated strand exchange	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 830 ~ 837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-020-0705-1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saijo-Hamano Yumiko, Matsunami Hideyuki, Namba Keiichi, Imada Katsumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Architecture of the Bacterial Flagellar Distal Rod and Hook of Salmonella	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 260 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom9070260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shibata Satoshi, Matsunami Hideyuki, Aizawa Shin-Ichi, Wolf Matthias	4. 巻 26
2. 論文標題 Torque transmission mechanism of the curved bacterial flagellar hook revealed by cryo-EM	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 941 ~ 945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-019-0301-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takizawa Yoshimasa, Ho Cheng-Han, Tachiwana Hiroaki, Matsunami Hideyuki, Kobayashi Wataru, Suzuki Midori, Arimura Yasuhiro, Hori Tetsuya, Fukagawa Tatsuo, Ohi Melanie D., Wolf Matthias, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Cryo-EM Structures of Centromeric Tri-nucleosomes Containing a Central CENP-A Nucleosome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 44 ~ 53.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2019.10.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujii Takashi、Matsunami Hideyuki、Inoue Yumi、Namba Keiichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Evidence for the hook supercoiling mechanism of the bacterial flagellum	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 28～32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.15.0_28	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 MATSUNAMI Hideyuki	4. 巻 57
2. 論文標題 Cryo-EM Structure of Campylobacter Flagellar Hook	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 265～267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.57.265	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松波秀行
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡法による細菌べん毛の高分解能構造解析
3. 学会等名 第62回日本放線菌学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------