

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06085

研究課題名(和文) べん毛モーター固定子複合体の高分解能構造解析による回転メカニズムの解明

研究課題名(英文) High-resolution structural analysis of bacterial flagellar stator complex

研究代表者

寺原 直矢 (Terahara, Naoya)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：40554738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細菌のべん毛モーターは、固定子と回転子からなる回転モーターとして機能する超分子複合体である。ナトリウムイオンチャンネルとして機能する枯草菌由来の固定子複合体MotPSの立体構造およびその動的構造変化を高分解能で明らかにするために、精製した固定子複合体のクライオ電子顕微鏡および高速AFM観察を行った。より効果的な氷包埋を実現するために化学修飾したグリッドの検討を行ったところ、より多くの単分散した粒子を観察することに成功した。一方、高速AFM観察時に使用するマイカ上では、サンプルの膜貫通領域がマイカ表面と非常に強い相互作用を有することが明らかとなり、向きを制御するにはさらなる工夫が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固定子がどのようにイオンの流れを回転力に変換しているのか全く不明である。固定子の高分解能構造およびその動的構造変化の情報は、べん毛モーターの回転メカニズムを明らかにする上で必須である。さらに、これらの情報はべん毛モーター研究だけでなく、生物分子モーターの動作原理の解明の一端を担う重要な研究課題として位置づけられる。そして、それらの知見は人工的な分子マシンを構築する際に多くの知見をもたらすと期待される。

研究成果の概要(英文)：A bacterial flagellar motor is a supramolecular complex that functions as a rotary motor consisting of a rotor and a stator. The energy for torque generation is mediated by an inward ion flux through the channels of the stator complex. Here, to clarify the structure of sodium-channel MotPS that acts as a *Bacillus subtilis* flagellar stator and its dynamic structural changes with high resolution, cryo-electron microscopy and high-speed AFM observation of the purified stator complex were carried out. We tested the chemically modified grids to achieve more effective ice embedding. More monodisperse particles were observed in one modified grid. On the other hand, high-speed AFM observation revealed that the transmembrane regions of MotPS stator complex strongly interact with the mica surface. Further improvements are necessary to control the orientation.

研究分野：生物物理

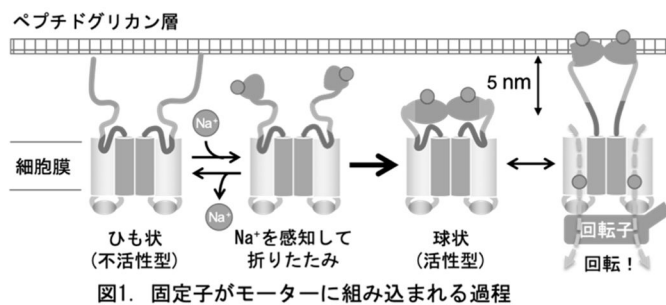
キーワード：生体分子モーター クライオ電子顕微鏡 高速AFM

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌は、べん毛と呼ばれる細胞外に伸びたらせん状のフィラメントを回転させることで様々な環境を移動できる。べん毛の根元には基部体と呼ばれる回転モーターが存在し、大まかに回転子と固定子から構成される。特に固定子は、陽イオンチャンネルとして機能する膜タンパク質である。細胞膜を隔てて形成される陽イオンの電気化学的ポテンシャル勾配に沿って陽イオンが固定子のイオンチャンネルを流れると、固定子と回転子が相互作用して回転力が発生すると考えられている。大腸菌などの多くの細菌のべん毛モーターは、 H^+ を共役イオンとして利用する固定子 MotAB によって駆動するのに対し、 H^+ 駆動力を効率よく利用することができない高アルカリ性環境を好んで生育する好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌や、比較的 Na^+ が豊富に存在する海洋環境に生育する海洋性 *Vibrio* 属細菌のべん毛モーターでは、それぞれ MotPS や PomAB と呼ばれる Na^+ を共役イオンとして利用する固定子が回転力を発生させる。

MotB や MotS、PomB の C 端側領域にはペプチドグリカン結合 (PGB) ドメインが存在し、ペプチドグリカン層に強く結合して固定されると考えられている。ところが、蛍光タンパク質を用いた固定子複合体の細胞内挙動の観察によって、モーターに組み込まれている固定子と細胞膜中にプールされている固定子がおよそ 2~3 秒毎に 1 個の固定子が入り替わることが観察されており、固定子複合体のダイナミックな振る舞いが明らかにされている。我々の研究グループは、 Na^+ を共役イオンとして利用する固定子 MotPS 複合体の MotS の PGB ドメインが、 Na^+ が存在しない時は立体構造が解きほぐされてひも状になり、 Na^+ を添加すると再び折りたたまれてきちんとした立体構造をとることを発見した (図 1)。このように、固定子が外環境を感知してモーターに組み込まれる過程は明らかになった。組み込まれた後は、固定子が陽イオンを透過することでモーターが回転すると考えられているが、固定子の詳細な構造情報および回転力発生時における構造変化は捉えられておらず、どのように回転力を発生しているのか全く分かっていない。



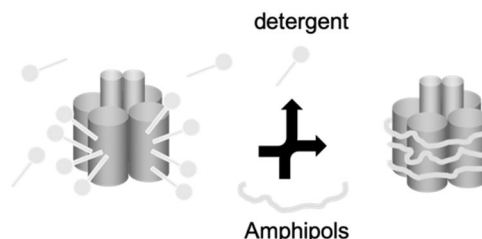
2. 研究の目的

モーターに組み込まれた固定子が、どのようにイオンの流れを回転力に変換しているのか全く不明である。そこで本研究では、高空間および高時間分解能観察が可能な 2 つの顕微鏡、クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) と高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) を駆使することで固定子複合体の高分解能で立体構造を明らかにし、かつその動的構造変化を直接可視化することで、べん毛モーターの回転メカニズムが明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、 Na^+ を共役イオンとして利用する固定子 MotPS 複合体の構造解析を目指した。大腸菌を用いた大量発現系により培養した細胞は、フレンチプレスにより破碎し、低速遠心および超遠心を経て MotPS を含む膜画分として回収した。得られたペレットはホモジェナイザーにて破碎し、適当な緩衝液にて再懸濁した。この膜懸濁液に界面活性剤 DMNG を添加し、膜タンパク質を可溶化した。可溶化画分から MotPS を粗精製するために、Ni-NTA カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行った。さらに、回収したタンパク質はゲルろ過クロマトグラフィーを行うことで純度を上げ、最終精製サンプルとした。

Cryo-EM による膜タンパク質の高分解能構造解析では、界面活性剤の存在下でサンプルを凍らせて解析する場合もあるが、本研究ではさらに Amphipols A8-35 で処理したサンプルも準備した (図 2)。Amphipols A8-35 は両親媒性高分子で、膜タンパク質の膜貫通領域を保護するような性質を持ち、界面活性剤のように膜タンパク質の可溶化を促す。したがって、一般的な可溶性タンパク質と同様な扱いが可能であり、氷包埋試料を改善することができると期待される。さらに、界面活性剤を除くことができるので、タンパク質の濃縮時における界面活性剤の濃縮の問題を避けることができ、緩衝液中のイオン強度を自由に変えることができる。精製した MotPS 複合体をバイオビーズによって界面活性剤を除去しながら両親媒性高分子である Amphipols A8-35 と反応させ、再度ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。これらのサンプルを Cryo-EM によって観察した。



一方、以前に報告した HS-AFM による 1 分子イメージング実験結果では、MotPS 複合体の膜貫通ドメイン側からの偏った構造情報が得られなかった。そこで今回、マイカ上での分子の配向を制御する方法の確立を目標とした。MotPS 複合体は、MotP もしくは MotS に融合したヒスチジンタグを用いてアフィニティークロマトグラフィーによって単離精製を行う。そこで、このヒスチジンタグを利用して、マイカ基盤表面上に MotPS 複合体の配向を制御する方法を確立する (図 3)。特に、構造情報がほとんどない MotP サブユニットの高分解能イメージングに挑戦し、回転子と相互作用して回転力を発生させる領域の構造情報を得ることを目指した。この領域の高分解能イメージングが達成されれば、回転子との相互作用メカニズムの議論が可能になると期待される。

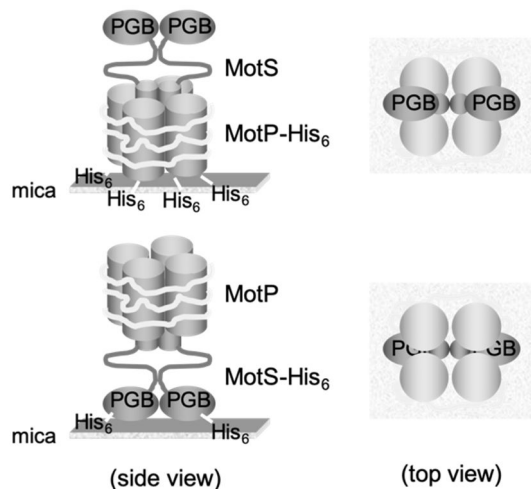


図3. ヒスチジンタグを介した細胞内側からの観察

4. 研究成果

固定子として機能する膜タンパク質 MotPS 複合体は界面活性剤存在下で、単分散した状態で精製することに成功した。さらに、Amphipols A8-35 と反応させ、界面活性剤を一切含まない緩衝液中で 12nm 前後の粒子状の構造体がよく単分散された状態で精製できた (図 4)。そこで、このサンプルを用いて Cryo-EM 観察用の氷包埋試料を作製し観察したところ、単分散していたサンプルが大きな凝集体を作った。これは、氷包埋時の物理的影響によるものと考えられた。そこで、氷包埋時の条件を検討した。サンプル側の条件としてタンパク質の濃度に加え、緩衝液の種類、塩濃度を様々な組み合わせで実験した。一方、氷包埋試料作製装置 Vitrobot の条件として、アプライするサンプル量、プロット時の温度と湿度、時間等の様々な組み合わせで実験した。しかし、どれも劇的に改善される条件ではなかった。そこで、氷包埋で使用するクライオグリッドの種類を検討した結果、以前よりも多くの単分散した粒子を観察することができた。現在、そのデータを用いて解析中である。

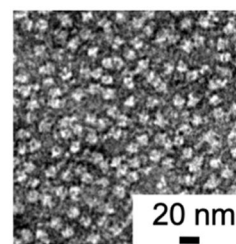


図4. MotPS複合体の負染色像

一方、同じ精製サンプルを HS-AFM でも観察を行い、MotPS 複合体のマイカ基盤上における配向制御を目指した。マイカ基盤上にヒスチジンタグ融合タンパク質を配向させる方法はいくつか知られているが、まずは最もシンプルなニッケルもしくはコバルトをマイカ基盤上に撒く方法を試した。しかし、MotPS 複合体の膜貫通領域がマイカ表面と非常に強い相互作用を有するためか、様々な方向を向いて観察され、配向を制御することができなかった。現在、精製時の界面活性剤を変更し、マイカとの相互作用が低下する条件を検討中である。一方、ヒスチジンタグ融合タンパク質の 2 次元結晶化によく用いられるニッケルキレート NTA 脂質であらかじめマイカ基盤上に膜を張り、その上に MotPS 複合体を配向させる方法も検討した。ニッケルもしくはコバルトをマイカ基盤上に撒く方法とは対照的に、MotPS 複合体とニッケルキレート NTA 脂質の相互作用が非常に弱いためか、観察される分子の数が少なく、配向の制御には至らなかった。現在、あらかじめ脂質膜に再構成した状態であるプロテオリポソームを作成し、これらをマイカ基盤上に撒くことで展開し、観察する方法を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Minamino Tohru, Terahara Naoya, Kojima Seiji, Namba Keiichi | 4. 巻 109 |
| 2. 論文標題 Autonomous control mechanism of stator assembly in the bacterial flagellar motor in response to changes in the environment | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Microbiology | 6. 最初と最後の頁 723 ~ 734 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.14092 | 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 Terahara Naoya, Inoue Yumi, Kodera Noriyuki, Morimoto Yusuke V., Uchihashi Takayuki, Imada Katsumi, Ando Toshio, Namba Keiichi, Minamino Tohru | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 Insight into structural remodeling of the FlhA ring responsible for bacterial flagellar type III protein export | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Science Advances | 6. 最初と最後の頁 eaao7054 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aao7054 | 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 Kato Takayuki, Makino Fumiaki, Nakane Takanori, Terahara Naoya, Kaneko Takeshi, Shimizu Yuko, Motoki Sohei, Ishikawa Isamu, Yonekura Koji, Namba Keiichi | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 CryoTEM with a Cold Field Emission Gun That Moves Structural Biology into a New Stage | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Microscopy and Microanalysis | 6. 最初と最後の頁 998 ~ 999 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S1431927619005725 | 査読の有無 無 |
| 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 該当する |
| 1. 著者名 Terahara Naoya, Namba Keiichi, Minamino Tohru | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Dynamic exchange of two types of stator units in Bacillus subtilis flagellar motor in response to environmental changes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Computational and Structural Biotechnology Journal | 6. 最初と最後の頁 2897 ~ 2907 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.csbj.2020.10.009 | 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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Naoya Terahara, Keiichi Namba and Tohru Minamino |
| 2. 発表標題 Feedback regulation of the ion channel activity of the flagellar motor stator complex |
| 3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takayuki Kato, Naoya Terahara, Tomoko Miyata and Keiichi Namba |
| 2. 発表標題 Screening method for samples for high resolution structural analysis by cryoEM |
| 3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 寺原直矢、古寺哲幸、安藤敏夫、難波啓一、南野徹 |
| 2. 発表標題 固定子複合体のペリプラズミックドメインにおけるイオン選択性 |
| 3. 学会等名 2018年度べん毛研究交流会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 寺原直矢、古寺哲幸、安藤敏夫、難波啓一、南野徹 |
| 2. 発表標題 べん毛モーター固定子複合体のペリプラズミックドメインにおけるイオン選択性 |
| 3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第45回討論会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院生命機能研究科 難波研究室研究成果
https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/research_group/detail/24

6. 研究組織

| | 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|