

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06155

研究課題名（和文）細菌べん毛モーター 回転スイッチ制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the directional switching mechanism of the bacterial flagellar motor

研究代表者

宮田 知子（Miyata, Tomoko）

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：30423156

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細菌の運動機関であるべん毛はその根元に左右両方向に回転できる基部体と呼ばれる回転モーターを持つ。このモーターの回転方向の切り替えは基部体の細胞質側に装着されたCリングと呼ばれるスイッチタンパク質からなる複合体で行われる。本研究ではべん毛モーターの回転方向制御機構を理解するためにCCW(左回転)型とCW(右回転)型のCリングの構造解析を行い、二状態のCリングの擬似原子モデルを得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究クライオ電子顕微鏡は近年目覚ましく発展し構造解析手法であり、生命活動を原子レベルで解明するための強力な手法である。また現在では創薬分野でも広く活用され新規薬剤の開発とうにも応用されている。我々はこの手法に着目し、複雑で巨大な生体超分子であるべん毛モーターの構造解析に成功し、この分野の進展に貢献した。

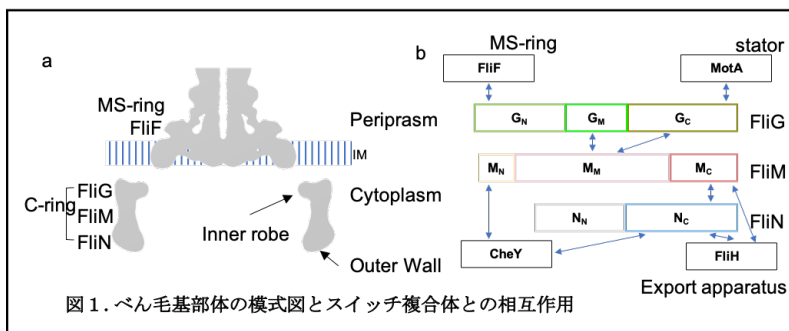
研究成果の概要（英文）：Bacterial flagellar has a reversible rotary motor that can rotate in both counterclockwise (CCW) and clockwise (CW) direction. The switching of the motor rotation direction is controlled by the complex located at the bottom of the basal body called the C ring, constructed from switch proteins. To understand the switching mechanisms of motor rotation in detail, we analyzed the C ring structure of the wild type (CCW) and the CW- biased mutant by electron cryomicroscopy. We obtained high-resolution density map of the C ring in the two states and built pseudo-atomic models of the C ring.

研究分野：構造生物学

キーワード：単粒子解析 電子顕微鏡 分子モーター

## 1. 研究開始当初の背景

サルモネラ菌や大腸菌などの細菌は運動器官として数本のべん毛を持ち、べん毛の根元にあるモーターの回転を反時計回り (CCW) または時計回り (CW) 方向に可逆的に切り替え、直進運動と方向変換を繰り返しながらより好ましい環境へ移動する。細菌のべん毛は約



30 種類の蛋白質からなる超分子複合体で、反転制御機構を持つモータである基部体とユニバーサルジョイントとしてのフックプロペラに相当するフィラメントの三つの部分構造に分けられる。基部体は細胞膜中に埋め込まれ MS リング (FliF)、ドライブシャフトであるロッド、外膜側にある軸受けである LP リングと細胞質側にある C リングで構成されている。C リングは3つのスイッチ蛋白質 (FliG, FliM, FliN) から成り、モーターの反転頻度を制御することからスイッチ複合体と呼ばれている (図 1 a)。中でも FliM は走化性シグナル分子であるリン酸化 CheY (CheY-p) の標的分子であり、CheY-p が FliM に結合すると FliG の構造変化が引き起こされ回転方向が変換する。FliG はその C 末端領域に固定子である MotA と相互作用する領域を持ち、トルクの発生に関与している (図 1 b)。また FliN はべん毛に特異的な輸送装置の一部として働くことが知られている。このように C リングはモーターの反転スイッチ、べん毛形成時の蛋白質輸送装置、そしてモーターのトルク発生装置の一部にもなる多機能な複合体であり、C リングの構造情報はこれらの機能を理解する上で非常に重要である。

C リングの構造は以前から電子顕微鏡による単粒子解析と X 線結晶構造解析によって研究されてきた。C リングは M リングの直下にあるインナーローブ (Inner Robe: IR) とその周りを囲う外筒 (Outer Wall: OW) の2つの構造に分けられる。かつて MS リングは26回対称性を示すと考えられてきたが最近の電子顕微鏡による高分解能の構造から C リングと同じく34回対称性を示すことが明らかになった。しかし C リングには個々のモーターによって32-36の対称性のばらつきがあり、また柔軟性に富んだ構造領域をもつことから C リング構造は全体での結晶化は難しく、結晶構造解析は成功していない。これまでの研究で、スイッチ蛋白質の部分、全長、一部複合体の結晶構造は精力的に行われてきた。そこでスイッチ蛋白質の結晶構造、遺伝学的解析、並びに生化学的解析により示されたスイッチ蛋白質間の相互作用様式に電子顕微鏡による C リングの構造情報を合わせて数多くの C リングの原子モデルが提唱されているが原子構造の組み立てに使用される電子顕微鏡の三次元構造の分解能が低いことから数多くのモデルが提唱され、決定打に欠けている状態である。

## 2. 研究の目的

我々はモーターの回転方向制御機構を理解するために野生型並びにスイッチタンパク質 FliG の変異により回転方向が CW 偏った変異体から C リング付き基部体を精製し、電子顕微鏡による単粒子解析を行い C リングの構造解析を行ってきた。当初得られた構造の比較から CCW, CW 間での IR の位置の移動、OR の表面構造の構造変化など観察できた。しかし、構造解析に用いられた粒子数が少なすぎたため三次元構造の分解能が低く、正確にスイッチ蛋白質の結晶構造をはめ込むまでは至らなかった。

本研究ではまず更なるデータ収集を行い、解析方法の改良を加えながら分子構造の当てはめが可能となる 7 Å の構造解析を目指す。CCW 並びに CW 状態の C リングの構造を比較することによって回転方向変換時の C リングの構造を可視化する。さらにモーターの回転制御切り替え時の詳細な構造情報を得るために、CheY-p の結合型の C リングの構造解析を行い、これらの結果を合わせて回転方向切り替えの段階的な構造変化を明らかにし、回転制御機構を分子レベルで解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 凍結条件の最適化とデータ収集

基部体の精製にはフックの重合ができない変異体を用い、べん毛を高発現させるために ClpP の欠損株を用いた。CCW 型としては野生型の基部体を使用し、CW 型としては FliG の 169-171 の欠損株を使用した。精製方法と凍結方法の検討を行い最適な試料凍結条件を決定した。その後ダイレクトディテクターを搭載したクライオ電子顕微鏡でデータ収集を行なった。ダイレクトディテクターを用いることでこれまでの構造解析で問題となってきた電子線照射によるドリフトの影響を抑えることが可能になり、高分解能の解析に非常に有効であった。

## (2) C リング構造の高分解能化に向けた構造解析

クライオ電子顕微鏡像から基部体に結合した C リング (以降 MS-C リングと表記する) を切り出し、構造解析に使用した。しかし、MS リングと C リング構造の接続領域は構造が柔らかく MS-C リング (以降 MS-C リングと表記する) の状態での構造解析では高分解能構造は望めなかった。このため MS-C リング像から C リング領域のみを切り出し、構造解析に使用した。対称性を仮定しない 3D クラス分けを行い、34 回対称性を示したクラスをだけを用いて構造解析を行なった。

## (3) シグナル分子 CheY 結合型 C リングの再構成と構造解析

CheY 結合型 C リングの再構成には CheY-p と同様に作用することが知られている変異型 CheY (D13K, Y106W:caCheY) にラベル分子として蛍光蛋白質 YFP を融合した蛋白質 (caCheY-YFP) を使用した。CW 型の基部体と混合したのちグルタルアルデヒド複合体を固定化し、初頭密度勾配遠心法で caCheY-YFP の結合した MS-C リングを精製した。精製した複合体は蛍光スペクトルを確認し、caCheY-YFP の結合を確認した後、氷包埋電子顕微鏡で確認し、画像解析を行い、caCheY-YFP の結合位置を同定した。

## 4. 研究成果

### (1) C リング凍結条件の最適化と三次元構造解析

以前までの凍結条件では氷の中での MS-C リングの配向が Top view 方向に偏りがちで構造解析の効率を妨げていた。そこで界面活性剤と添加物のスクリーニングを行ったところ界面活性剤 LMNG とイミダゾールの存在下で MS-C リングの氷の中での配向の偏りが大きく改善された。そこでこの凍結条件を用いてダイレクトディテクターを装置着したクライオ電子顕微鏡で CCW 並びに CW 型の MS-C リングの氷包埋像を収集した。ダイレクトディテクターを用いることでこれまでの構造解析で問題となってきた電子線照射による試料のドリフトの影響を抑えることが可能になり S/N 比の高いコントラストの良い画像を得ることができ、高分解能の解析に非常に有効であった。氷包埋像から CCW、CW 型共に約 40 万粒子の MS-C リング像を切り出し、画像解析を進めた。しかし MS リングと C リングの間の構造の揺らぎのために MS-C リング全体での構造解析は低分解能の構造しか得ることができなかった。そこで MS-C リング像から C リングの領域だけを切り抜き対称性を仮定せず 3D クラス分けを行った。このクラス分けの結果、約 10 万粒子からなるクラスは 34 回対称性を持つリング構造を示した。この 34 回対称性を持つクラスを選択し、その後構造の精密化と 34 回対称性を仮定したクラス分けを行い細かい構造が確認できたクラスを集めて最終の構造の精密化を行った。その結果 CCW 型の C で 7.6 Å (図 2 a)、CW 型で 7.8 Å の C リング構造 (図 2 b) を得ることができた。

### (2) CCW 型並びに CW 型の C リングの原子構造組み立て

得られてた構造は OR 領域の構造は  $\alpha$  ヘリックス由来のロッド状構造が確認できる分解能であったため、OR の既存のスイッチタンパク質の結晶構造を当てはめることが可能であった。OR の上部には 3HJL (Aquifex aeolicus の FliG)、中央領域には 4GC8 (H. pylori の FliM 中央ドメイン)、下部の螺旋状構造には一ユニットにつき一分子の 4VXB (サルモネラの FliM C 末端ドメイン) と三分子の 106A (Thermotoga maritima の FliN の N 末端を除く構造) を当てはめることができた。どちらの構造も IR 領域の構造の分解能が低く既存の FliG の N 末端構造を正確に当てはめることはできなかった。これはこの領域が MS リングと C リングの接合領域であるが、構造的に非常に軟らかい領域であることが原因であると考えられる。coot を用いてこれらの当てはめたスイッチタンパク質の配列をサルモネラ菌由来の配列に置き換えること

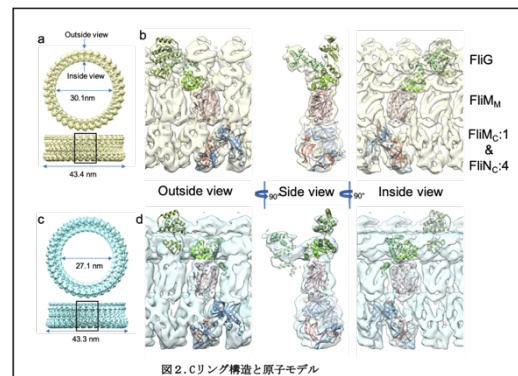


図 2. C リング構造と原子モデル

で、FliG と FliM の N 末端ドメインを除くスイッチタンパク質の擬似原子モデルを構築した (CCW 型の C リングは図 2b、CW 型の C リングは図 2d)。

基部体上での C リングの位置を特定するために低分解能の MS-C リング構造の C リングの位置に高分解能の C リングの構造を当てはめた。図 3 は二状態の C リングの MS リングに対する位置を示している (左半分は CCW 型、右半分は CW 型)。CCW 型から CW 型への構造変化では FliM 中央ドメインがリングの中心に向かって傾斜し、これに伴い C リング構造が M リングに向かって持ち上がるような構造変化が生じている。この構造変化により C リングは細胞膜により近い位置へ移動する。この C リングの位置の変化によって MotA との相互作用が変化する。またこの時 FliG の C 末端ドメインが 180° 回転する。このドメインの回転によって、MotA と相互作用するトルクヘリックスの相互作用面は大きく変化すると考えられる。

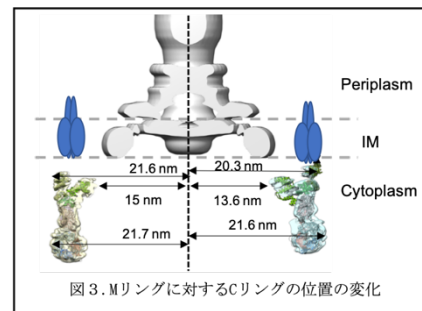


図 3. M リングに対する C リングの位置の変化

### (3) CheY-p 結合型 C リングの観察

CheY 結合型 C リングのクライオ電子顕微鏡による観察を行い、画像解析によって caCheY-YFP 由来の密度が観察できた。この密度の位置は OR の外側、中央より下側に位置している。この結合位置は現在の FliM のフィッティングでちょうど N 末端領域の付近にあり、FliM の N 末端領域で CheY と相互作用するのに非常に適した位置にあると思われる (図 3)。しかし、この CheY 結合型 C リングは収量が低く三次元構造解析を行うだけのデータ収集は難しいかった。このためおよその CheY-p の結合位置を推測するだけにとどまっている。今後は現在構造が明らかになっていない FliG の N 末端領域の構造を決めるべく解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sakai, T., Miyata, T., Terahara, N., Mori, K., Inoue, Y., Morimoto, Y.V., Kato, T., Namba, K. & Minamino, T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel insights into conformational rearrangements of the bacterial flagellar switch complex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00079-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.00079-19	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 Horvath, P., Kato, T., Miyata, T. & Namba, K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Structure of Salmonella flagellar hook reveals intermolecular domain interactions for the universal joint function.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom9090462	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, T., Makino, F., Miyata, T., Horvath, P. & Namba, K.	4. 巻 113
2. 論文標題 Structure of the native supercoiled flagellar hook as a universal joint.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Commun.	6. 最初と最後の頁 755-765
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mmi.14440	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 16.Yamaguchi, T., Toma, S., Terahara, N., Miyata, T., Ashihara, M., Minamino, T., Namba, K. & Kato, T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural and functional comparison of Salmonella flagellar filaments composed of FljB and FljC.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom10020246	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21件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮田知子, 加藤貴之, 牧野文信, 西條由見子, 難波啓一
2. 発表標題 細菌べん毛基部体の極低温電子顕微鏡による構造解析.
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤貴之, 宮田知子, 牧野文信, Horvath Peter, 難波啓一.
2. 発表標題 べん毛フックの自然な構造.
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口智子, 牧野文信, 宮田知子, 加藤貴之, 難波啓一
2. 発表標題 べん毛モーターの分子軸受LPリングのクライオ電子顕微鏡による構造解析.
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田知子, 加藤貴之, 川本晃大, 牧野文信, 難波啓一
2. 発表標題 細菌べん毛モーターの回転方向変換制御機構の解明
3. 学会等名 日本生物物理学会年会第56回
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮田知子、加藤貴之、川本晃大、牧野文信、難波啓一
2. 発表標題 細菌べん毛モーターの回転方向スイッチ機構の解明
3. 学会等名 2018年度べん毛交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木下実紀、宮田知子、川本晃大、加藤貴之、難波啓一、南野徹
2. 発表標題 バクテリアべん毛輸送ゲート複合体の構造機能解析.
3. 学会等名 日本生物物理学会年会第56回
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野文信、木田葵、木下実紀、宮田知子、加藤貴之、南野徹、難波啓一、今田勝巳
2. 発表標題 べん毛先端のキャップ構造
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川本晃大、宮田知子、木下実紀、南野徹、今田勝巳、加藤貴之、難波啓一
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡で解き明かす細菌べん毛モーターのトルク伝達に重要な回転対称構造.
3. 学会等名 日本生物物理学会年会第56回
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤貴之, 寺原直矢, 宮田知子, 難波啓一
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡における高分解能構造解析のためのスクリーニング法の検討
3. 学会等名 日本生物物理学会年会第56回
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤貴之, 宮田知子, Peter Horvath, 難波啓一
2. 発表標題 サルモネラフックの“自然”な構造の解析
3. 学会等名 2018年度べん毛研究交流会,
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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