

令和 2 年 4 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14638

研究課題名(和文)バクテリアべん毛輸送ゲートコア複合体の機能構造解析

研究課題名(英文)Structural and functional analyses of a core complex of the bacterial flagellar export gate complex

研究代表者

木下 実紀(Kinoshita, Miki)

大阪大学・生命機能研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：30790985

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):バクテリアべん毛輸送ゲート複合体はFlhA, FlhB, FliP, FliQ, FliRの5種類の膜タンパク質で構成され、細胞膜を横切るプロトン駆動力を動力源にべん毛構成タンパク質を輸送するが、どのように輸送ゲート複合体はべん毛構成タンパク質を選別し細胞外へ送り出すのかは不明であった。本研究では、輸送ゲート複合体が作られるしくみおよび輸送ゲート複合体の開閉のしくみと選択的物質輸送のしくみを突き止めることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管出血性病原性大腸菌0157などの病原細菌による感染症は社会問題の一つで、それらの感染機構の解明ならびに克服のための方法の探索が続けられている。べん毛タンパク質輸送装置と高い相同性を示すIII型分泌装置が急性胃腸炎の発症に深く関わっている。本研究結果に基づいて病原性細菌のIII型分泌装置のゲート開閉機構を特異的に不活性化できれば、病原性細菌の病原性のみを破壊できる。したがって、従来の抗生物質のように細菌を死滅させることがないため耐性菌が発生しづらく、感染症の予防を含めた、これまでにない新しい治療法の開発につながると期待できる。

研究成果の概要(英文):The bacterial flagellar export gate complex is composed of five membrane proteins, FlhA, FlhB, FliP, FliQ and FliR, and utilizes proton motive force across the cytoplasmic membrane as the energy source to drive flagellar protein export. In this study, I investigated how the protein export channel of the export gate complex is opened to allow export substrates to cross the cytoplasmic membrane. I have provided experimental evidence suggesting that the C-terminal cytoplasmic domains of FlhA and FlhB not only mediates a hierarchical protein targeting but also regulate gate opening of the FliPQR protein export channel complex.

研究分野：生物物理学、生化学

キーワード：細菌 蛋白質 遺伝学 電子顕微鏡 感染症

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

バクテリアの運動器官であるべん毛を細胞表層に構築するために必要なべん毛特異的タンパク質輸送装置は、FlhA, FlhB, FliP, FliQ, FliR と呼ばれる 5 種類の膜タンパク質からなる輸送ゲート複合体と FliH, FliI, FliJ と呼ばれる 3 種類の可溶性からなる ATPase リング複合体から構成される。輸送ゲート複合体は、MS リングの中心孔に存在し、細胞膜内外に形成される水素イオンの電気化学ポテンシャル差をエネルギーに利用して輸送基質蛋白質の立体構造を解きほぐしながら細胞外方向へと送り出す。これまでに、膜蛋白質である FliO の助けで FliP が 6 量体リング複合体を形成すると、その周りに FliQ 及び FliR が自己集合して輸送ゲートのコア複合体が形成されることが報告されている。さらに、コア複合体の中心を貫通するチャンネルがべん毛構成タンパク質の透過経路であることが推察されている。しかしながら、どのような蛋白質間相互作用ネットワークを介して輸送ゲートのコア複合体が組み上がるのか、組み上がったコア複合体のタンパク質透過チャンネルの開閉がどのように制御されているのかについては謎のままであった。

### 2. 研究の目的

本研究では、FliP, FliQ, FliR から構成されるコア複合体を、その構成蛋白質から *in vitro* で再構成し、遺伝学的及び生化学的機能解析法と、X 線結晶構造解析をうまく融合することで、機能未知な輸送ゲートコア複合体の機能と構造を明らかにするとともに、コア複合体を形成する蛋白質間相互作用ネットワークを原子レベルで解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

Ni affinity chromatography および size exclusion chromatography を組み合わせて FliP リング複合体, FliP/FliR 複合体, FliP/FliQ/FliR 複合体を精製し、Blue Native PAGE 法によりそれぞれの複合体の分子量を見積もった。輸送ゲートコア複合体内のタンパク質間相互作用を調べるため、Ni affinity chromatography を用いて Pull-down 実験を行なった。輸送ゲートコア複合体のゲート開閉の鍵を握ると考えられた FliQ の細胞質ループの変異体を作成した。PhoA との融合体を作成し、FliP, FliQ, FliR のトポロジーを解析した。コア複合体と FlhB の相互作用について Pull-down 法により解析するとともに、FlhB の変異体解析を行った。輸送ゲート複合体の基質認識モードの切り替えに重要な役割を果たす FlhB と FlhA の C 末細胞質ドメインの変異体解析を行うとともに、光感受性のフェニルアラニン誘導体である p-benzoyl-phenylalanine を用いた光架橋実験を行った。

### 4. 研究成果

1. 以前の研究結果と一致して、FliP リング複合体は 5 分子の FliP あるいは 6 分子の FliP で構成されていた。一方、FliP/FliR 複合体は 5 分子の FliP と 1 分子の FliR から構成されることが判明した。
2. FliQ は FliP に結合し FliP<sub>5</sub>FliQ<sub>4</sub>FliR<sub>1</sub> 複合体が組み上がることで、次に FlhB が FliP に結合し FliP<sub>5</sub>FliQ<sub>4</sub>FliR<sub>1</sub>FlhB 複合体が形成されることを突き止めた。FlhA は FlhB が存在しなくても FliP<sub>5</sub>FliQ<sub>4</sub>FliR<sub>1</sub> 複合体に結合することが明らかとなった。
3. PhoA fusion assay により FliP, FliQ, FliR のトポロジー解析を行った結果、個々のサブユニット分子がモノマー状態から会合状態へ遷移する際にそれぞれの膜貫通ヘリックス領域が大きく構造変化することが示唆された。
4. FliP のペリプラズム側に位置するループ構造および 92 番目のロイシン残基が FliP の機能発現に重要であることが判明した。
5. FliQ の細胞質ループに存在し高く保存されているアミノ酸残基をアラニンに置換したところ、Gly-32, Gln-39, Thr-42, Glu-46, Leu-49 および Lys-54 が FliQ の機能発現に重要であることが判明した。さらに、べん毛タンパク質輸送機能が著しく低下した *fliQ(T42A)* 変異体および *fliQ(L49A)* 変異体から復帰変異体を単離した。それらのサブレッサー変異が FlhA, FliP, FliR に存在することが明らかとなった。
6. FlhB の N 末細胞質領域と C 末天然変性領域がコア複合体内部にあるポリペプチドチャンネルの開閉に重要な役割を果たすことが示唆された。
7. べん毛フックの長さを測定する分子物差しタンパク質である FliK の N 末ドメインと C 末ドメイン (FliK<sub>c</sub>) をつなぐリンカー領域の欠失体を作成し解析した結果、リンカー領域は分子物差しの一部として機能するとともに、FliK<sub>c</sub> と FlhB の C 末細胞質ドメイン (FlhB<sub>c</sub>) との相互作用を巧みに制御することを見出した。FliK<sub>c</sub> が FlhB<sub>c</sub> に結合すると FlhB<sub>c</sub> の立体構造を支える疎水的相互作用ネットワークのリモデリングが起こり、その結果フックタンパク質の輸送が停止すること、FlhB の C 末天然変性領域が FliK<sub>c</sub>-FlhB<sub>c</sub> 相互作用を制御すること、などを突き止めた。

8. 輸送スイッチ機能が著しく低下した *f1hB(N269A)* 変異体および *f1hB(P270A)* 変異体の解析から、FliK<sub>c</sub>との相互作用により構造変化したF1hB<sub>c</sub>がF1hAのC末細胞質ドメイン (F1hA<sub>c</sub>) に結合するとF1hA<sub>c</sub>の構造が閉じた構造から開いた構造に変化し、その結果べん毛繊維構成タンパク質の輸送が開始することが示唆された。

以上の結果から、世界に先駆け輸送ゲート開閉の分子モデルおよび輸送ゲート複合体の輸送スイッチモデルを提唱することができた。2020年2月Journal of Bacteriologyの202巻3号に掲載された輸送スイッチモデルの論文についてはSignificant Interest in This Issueに取り上げられた。本研究中に、輸送ゲート複合体がMSリングの中心孔に結合した状態で単離精製することができた。今後、クライオ電子顕微鏡を用いて輸送ゲート複合体の全体構造を解き明かすことができれば、輸送ゲート複合体のエネルギー共役機構の解明に向けて本格的に迫ることが可能となるであろう。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 南野徹, 木下実紀	4. 巻 90
2. 論文標題 細菌ペん毛特異的輸送シャペロンFlgNの構造と機能	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 203, 206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900203	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 Inoue Yumi, Ogawa Yuya, Kinoshita Miki, Terahara Naoya, Shimada Masafumi, Koderia Noriyuki, Ando Toshio, Namba Keiichi, Kitao Akio, Imada Katsumi, Minamino Tohru	4. 巻 27
2. 論文標題 Structural Insights into the Substrate Specificity Switch Mechanism of the Type III Protein Export Apparatus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 965 ~ 976.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2019.03.017	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 Inoue Yumi, Kinoshita Miki, Namba Keiichi, Minamino Tohru	4. 巻 24
2. 論文標題 Mutational analysis of the C terminal cytoplasmic domain of FlhB, a transmembrane component of the flagellar type III protein export apparatus in Salmonella	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 408 ~ 421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12684	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 Minamino Tohru, Kawamoto Akihiro, Kinoshita Miki, Namba Keiichi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Molecular Organization and Assembly of the Export Apparatus of Flagellar Type III Secretion Systems	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr. Top. Microbiol. Immunol.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/82_2019_170	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 Minamino Tohru, Kinoshita Miki, Namba Keiichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Directional Switching Mechanism of the Bacterial Flagellar Motor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Computational and Structural Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 1075 ~ 1081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.csbj.2019.07.020	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 Minamino Tohru, Inoue Yumi, Kinoshita Miki, Namba Keiichi	4. 巻 202
2. 論文標題 FliK-Driven Conformational Rearrangements of FlhA and FlhB Are Required for Export Switching of the Flagellar Protein Export Apparatus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00637-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00637-19	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 Kinoshita Miki, Tanaka Seina, Inoue Yumi, Namba Keiichi, Aizawa Shin-Ichi, Minamino Tohru	4. 巻 10
2. 論文標題 The flexible linker of the secreted FliK ruler is required for export switching of the flagellar protein export apparatus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57782-5	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 川本晃大, 宮田知子, 木下実紀, 南野徹, 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回転子の立体構造と回転対象性 (Structure and rotational symmetry of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy)
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第74 回学術講演会
4. 発表年 2018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 (The cap structure of the bacterial flagellar filament)
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, 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回転子の立体構造と回転対象性 (Structure and rotational symmetry of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy)
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 Kinoshita M, Miyata T, Kawamoto A, Kato T, Namba K, Minamino T
2. 発表標題 Structural and functional analyses of the bacterial flagellar type III export gate complex (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 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawamoto A, Miyata T, Kinoshita M, Minamino T, Imada K, Kato T, Namba K
2. 発表標題 Rotational symmetry structure of the bacterial flagellar motor for torque transmission revealed by electron cryomicroscopy (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 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kida M, Makino F, Kinoshita M, Miyata T, Kato T, Minamino T, Namba K, Imada K
2. 発表標題 Structure of the growing end of the bacterial flagellar filament (細菌べん毛繊維の成長端の構造)
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kinoshita M, Miyata T, Kawamoto A, Kato T, Namba K, Minamino T.
2. 発表標題 Structural and functional analyses of the flagellar transmembrane export gate complex of the Salmonella flagellar type III protein export apparatus.
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Salmonella Biology and Pathogenesis. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minamino T, Inoue Y, Kinoshita M, Namba K.
2. 発表標題 utocatalytic cleavage of FlhB is required for conformational rearrangements of FlhA to switch export specificity of the flagellar protein export apparatus.
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Salmonella Biology and Pathogenesis. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kinoshita M, Namba K, Minamino T.
2. 発表標題 Gating mechanism of the bacterial flagellar protein export apparatus (バクテリアべん毛タンパク質輸送装置のゲート機構).
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 南野徹, 木下実紀, 難波啓一
2. 発表標題 バクテリアべん毛タンパク質輸送装置のエネルギー共役機構
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〕

<p>大阪大学大学院生命機能研究科日本電子YOKOGUSHI協働研究所 研究成果  <a href="http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/02/result/">http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/02/result/</a></p>
---

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