

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19293

研究課題名（和文）細菌べん毛モーターの回転力発生に必須な回転子-固定子間物理的相互作用の検出

研究課題名（英文）Detection of the physical interaction between rotor and stator essential for torque generation in the bacterial flagellar motor

研究代表者

小嶋 誠司 (Kojima, Seiji)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：70420362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：細菌べん毛モーターは細胞膜を介したイオン駆動力を回転力に変換するナノマシンである。モーターの固定子中をイオンが流れる際に、固定子が回転子と相互作用することで回転力が生じるが、極めて短時間に連続的に生じるこの相互作用はこれまで物理的には捉えられていなかった。本研究では、部位特異的に回転子または固定子タンパク質に導入した光反応性の非天然アミノ酸に光を照射し、近傍の残基と瞬時に架橋させる *in vivo* 光架橋法を用いて、固定子タンパク質 (MotA/PomA) と回転子タンパク質 FliG 間の物理的相互作用を初めて検出することに成功し、相互作用残基のペアを見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌べん毛モーターの回転機構を理解するためには、回転力発生の核となる回転子-固定子間相互作用の実態を明らかにする必要がある。しかし高速回転するモーターにおいて短時間かつ連続的に生じるこの相互作用は、これまでタンパク質レベルで検出されていなかった。本研究では光を用いて瞬時に相互作用を捉える光架橋法を用いて、初めて固定子と回転子間のタンパク質間相互作用を検出することに成功した。本研究で見出した相互作用残基は、遺伝学的解析で同定されていた静電相互作用に關与する残基であり、今後、最近得られた固定子と回転子タンパク質の立体構造情報と合わせた解析により、相互作用界面の実態を明らかにすることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Bacterial flagellar motor is a rotary nanomachine driven by the ion-motive force across the cytoplasmic membrane. Rotational force is generated by the rotor-stator interaction that couples to ion conduction through the stator complex. Since the rotor-stator interaction occurs very transient and rapidly, it was not detected physically or biochemically in protein level. Here we employed the *in vivo* photo-crosslink method to capture this rapid interaction. In this approach, the photo-reactive but non-natural amino acid (pBPA) was site-directly incorporated into the rotor or stator protein respectively (FliG or MotA/PomA) in *Escherichia coli* cell. After the UV flash irradiation to the cell, the photo-crosslinked protein was detected by the SDS-PAGE followed by the immunoblotting. Using this method, we could detect for the first time FliG-MotA or FliG-PomA interactions between the residues reported genetically for the electrostatic interactions.

研究分野：生化学・分子生物学・生物物理学

キーワード：細菌べん毛モーター 回転子 固定子 部位特異的光架橋 MotA PomA FliG

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

べん毛モーターの構成要素や全体像は大腸菌・サルモネラで解析が進んでいるが、機能メカニズム研究は同じ回転ナノマシンである ATP 合成酵素に比べて非常に遅れている。遺伝学的解析の結果から固定子-回転子間相互作用により回転力が発生すると考えられているが、物理的な結合・解離が検出されていないために実体が不明で、エネルギー変換機構を考える上で大きな障害となっている。申請書を書いた当時は、そもそも回転子と固定子が回転するモーターにおいて本当に相互作用しているという実験的証拠が明確に示されていなかった。遺伝学的に示されていたのは、運動能を欠損した変異体の解析から固定子側の MotA と回転子側の FliG が持つ保存された荷電残基が、固定子-回転子界面において静電相互作用することが回転に重要であることであった。我々は静電相互作用残基を含む領域を発現・精製し、プルダウンや NMR、Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) といった様々な手法を用いて、*in vitro* での相互作用解析を進めてきたが、これまで有意な相互作用の検出には至っていなかった。

2. 研究の目的

細菌のべん毛モーターは、細胞膜を介したイオンの電気化学勾配を回転力に変換するナノマシンである。このモーターは細胞表層に埋まった回転子を、エネルギー変換を担う膜タンパク質複合体の固定子ユニットが 10 数個取り囲む形で形成され、固定子内を共役イオンが流れる際に、回転子と固定子が相互作用して回転力が発生する。ところが、回転機構を理解する上で決定的に重要な回転子と固定子の物理的な相互作用は未だに検出されておらず、イオン流に共役した両者の結合・解離の実態は全くわかっていない。モーターの回転は秒速 300 回転と非常に高速であるため、回転子-固定子間の相互作用は極めて短時間かつ連続的に生じると考えられる。この特殊な相互作用の性質により、精製した構成要素を用いたプルダウンなどの単純な *in vitro* 結合実験ではこれまで検出できなかったと考えた。そこで発想を転換し、生細胞のモーター内において、できる限り長時間固定子と回転子を相互作用させ、その条件において要素間光架橋または蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) といった高感度の手法により検出することを考えた。本研究では、モデル生物の大腸菌を用いて、今まで全く不明であった回転子-固定子間の物理的相互作用を可視化し定量評価することで、高速回転を可能にするモーター内相互作用の実態を明らかにし、べん毛モーターにおける回転力発生機構解明のための基盤となる知見を得ることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 長時間の固定子-回転子相互作用の実現方法

生物物理学的解析から、モーターに非常に大きな外部負荷がかかる状況では、モーターの発生トルクと外部摩擦抵抗力が釣り合い、回転できなくなって停止することがわかっている。この時、回転子と固定子は解離せず相互作用を続けていると考えられ、そのため既存の高感度の手法を応用すれば相互作用の検出が期待できる。具体的には、A: 遊泳する大腸菌の懸濁液に抗べん毛抗体を加えて回転を物理的に阻害する、B: べん毛を 1 本だけスライドガラス表面に固定し菌体を回転させる (テザードセル) ことで、1 個のモーターに大きな負荷をかける、の 2 つの条件を考えた。なお、実際にはこうした長時間の相互作用を考慮せずとも後述(2)の光架橋で相互作用を検出できてしまったので、(1)は実際には行わなかった。

(2) *in vivo* 部位特異的光架橋による相互作用検出

蛋白質間相互作用検出をアミノ酸残基レベルの空間分解能で可能にする *in vivo* 部位特異的光架橋法を、固定子-回転子間相互作用検出に応用する。これまでに分子生物学的解析から、固定子を構成する MotA と回転子に位置する FliG の保存された荷電アミノ酸残基が、静電相互作用することが知られている。これらを候補残基とし、光反応性架橋基を持つ非天然アミノ酸 (pBPA) に置換して発現させ、紫外線を照射し、近傍の残基と光架橋させる。光反応後の細胞を回収し、全細胞抽出液を電気泳動・免疫プロットして、架橋産物を検出する。十分な量の架橋産物が期待できる場合は、電気泳動ゲルから抽出し、質量分析により架橋相手の反応残基 (領域) の同定を試みる。

(3) FRET による相互作用検出

固定子を構成する MotA の細胞質側ループには、回転子側の FliG と静電相互作用することが知られている保存された荷電残基が存在する。この残基を含む短いペプチドが回転子-固定子相互作用面に入り込むと、固定子ユニットからの発生トルクが回転子へ伝わらず、回転の阻害が期待される。そこで、荷電残基を含む様々な長さのペプチドをデザインし、適切な長さのリンカーを介して蛍光タンパク質 GFP に融合する。この融合タンパク質を大腸菌の野生株においてプラスミドから発現させる。もし、融合タンパク質が大腸菌の遊泳を阻害するならば、予想通り回転子-固定子の界面に作用し、回転を阻害していると考えられる。そこで次にべん毛をスライドガラスに固定して菌体を回転させる“テザードセル”を作成して全反射顕微鏡で観察する。プラスミドから融合タンパク質を発現後、阻害された回転の中心に GFP の蛍光が観察できれば、融合タンパク質による回転阻害を強く支持する証拠となる。続いて固定子側に CFP、回転子側の FliG に YFP を融合し、プラスミドにもたせて大腸菌の *fliG* 欠失株に導入する。まず FliG-YFP のみ発現させた状態でテザードセルを作成し回転を確認した後、固定子ペプチドを融合した CFP の発現

を誘導し、回転を阻害させる。ここで CFP を励起し、FRET が生じて YFP 由来のシグナルが得られるか検討する。テザードセルでは菌体を 1 個のモーターで回転させるため、高い負荷がモーターにかかり回転子-固定子間相互作用の増加が期待でき、CFP-YFP 間で生じる FRET により検出・定量できる可能性があると考えた。実際には、上述(2)の光架橋により回転子-固定子間相互作用の検出がうまく進んだため、光架橋に焦点を当てて研究を行い、申請書に書いたこの提案は行わなかった。

4. 研究成果

(1) 大腸菌回転子タンパク質 FliG と固定子タンパク質 MotA の光架橋

これまでに遺伝学的解析から、FliG の C 末端ドメインに保存された荷電残基と、MotA の細胞質領域 (第 2-第 3 膜貫通領域間) に保存された荷電残基間の静電相互作用がモーター回転に重要であることがわかってきた (文献 1)。そこでまず、回転子タンパク質 FliG の荷電残基 (K264, R281, D288, D289, R297) に amber mutation を導入し、amber suppressor 法により光反応性架橋基を持つ非天然アミノ酸 (pBPA) に置換してプラスミドから大腸菌内で発現させた。液体培地で培養した菌体をサンプルとして UV 光を照射し、全細胞抽出液を電気泳動後、immunoblot により FliG と MotA の検出を行った。その結果、281 番目および 288 番目の位置に pBPA を導入した FliG と、染色体由来の MotA の間で架橋が再現よく生じていた (図 1)。

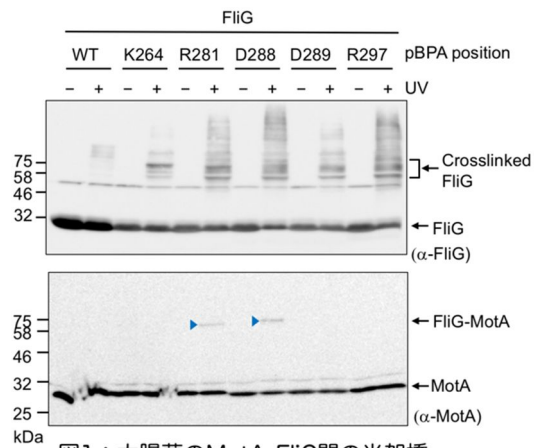


図 1: 大腸菌の MotA-FliG 間の光架橋

(2) Na⁺駆動型固定子 PomA/PotB 複合体を用いた光架橋実験

上記(1)では、*in vivo* 光架橋法がすでに確立している大腸菌の H⁺駆動型モーターを用いて実験を行った。一方で、申請者の所属研究室では、海洋性ビブリオ菌の Na⁺駆動型モーターを主な研究対象としている。我々はこれまでに、ビブリオ菌の回転子タンパク質 FliG と固定子 PomA 間の静電相互作用が大腸菌に比べてより複雑で、ロバストであることを見出している (文献 2)。すなわち、回転子と固定子の相互作用界面は基本的に大腸菌と共通だが、大腸菌よりも多数の荷電残基間で相互作用が生じており、より強い相互作用があると考えられた。また、ビブリオ菌固定子の B サブユニット (PomB) の C 末端側を大腸菌の MotB と入れ替えたキメラタンパク質 PotB を、PomA と大腸菌で共発現すると、Na⁺駆動型モーターとして機能することがわかってきた (文献 3)。PomA/PotB 固定子を発現させた大腸菌を用いて、上記の成果(1)と同様の光架橋実験を行えば、大腸菌固定子 (MotA/MotB) よりも相互作用の検出が容易になる可能性が考えられた。

まず、以前報告している PomA の細胞質側の荷電残基に pBPA を導入してプラスミドから発現させ、染色体由来の FliG との光架橋の検出を試みたところ、検出能の良い抗 FliG 抗体でいくつかの PomA-FliG 架橋産物が検出された。そこで、PomA の細胞質側に存在する 74 番目から 104 番目までの 31 残基について網羅的に pBPA を導入し、PomA-FliG 光架橋が起こるかどうかを調べた。その結果、D85, R88, K89, G90, F92, L93, E96 の位置で光架橋が検出された。特に K89 の位置での光架橋の効率が高かった。これらの残基は、PomA の構造予測モデルにおいて、αヘリックス上に一列に並ぶ様に点在していた。さらに、光架橋された残基の中で、特に架橋効率の良かった PomA K89、FliG R281、D288 を中心に、PomA と FliG にそれぞれシステイン残基を導入し、ジスルフィド架橋を形成させた。その結果、PomA と FliG の架橋産物が形成され、固定子-回転子間相互作用を行う残基ペアを同定することができた。以上の結果から、べん毛の回転力発生に必須な固定子-回転子間相互作用の本質に迫れる道を開くことができた。本成果をまとめた論文を準備している。

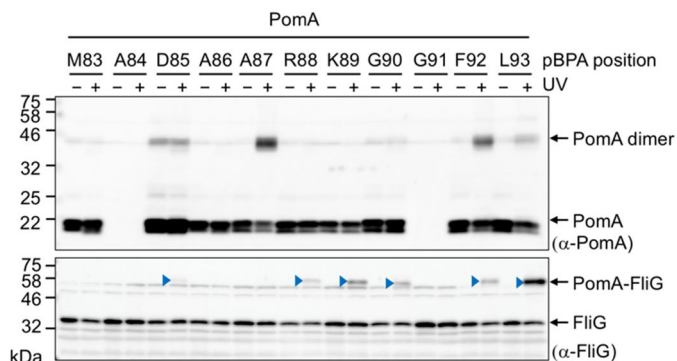


図 2: PomA-FliG 間の光架橋の一例

< 引用文献 >

1. Zhou J, Lloyd SA, Blair DF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1998) 95:6436-41.
2. Takekawa N, Kojima S, Homma M. *J Bacteriol*. (2014) 196:1377-85.
3. Asai Y, Yakushi T, Kawagishi I, Homma M. *J Mol Biol*. (2003) 327:453-63.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mengucci F, Dardis C, Mongiardini EJ, Althabegoiti MJ, Partridge JD, Kojima S, Homma M, Quelas JI, Lodeiro AR.	4. 巻 202
2. 論文標題 Characterization of FliL proteins in Bradyrhizobium diazoefficiens: lateral FliL supports swimming motility, and subpolar FliL modulates the lateral flagella system.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00708-19	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 Nishikino T, Iwatsuki H, Mino T, Kojima S, Homma M.	4. 巻 167
2. 論文標題 Characterization of PomA periplasmic loop and sodium ion entering in stator complex of sodium-driven flagellar motor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 389-398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz102	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 Mino T, Nishikino T, Iwatsuki H, Kojima S, Homma M.	4. 巻 166
2. 論文標題 Effect of sodium ions on conformations of the cytoplasmic loop of the PomA stator protein of <i>Vibrio alginolyticus</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 331-341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz040	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 Lin TS, Zhu S, Kojima S, Homma M, Lo CJ.	4. 巻 8
2. 論文標題 FliL association with flagellar stator in the sodium-driven <i>Vibrio</i> motor characterized by the fluorescent microscopy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-29447-x	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 該当する

1. 著者名 Zhu S, Nishikino T, Kojima S, Homma M, Liu J.	4. 巻 200
2. 論文標題 The Vibrio H-ring facilitates the outer membrane penetration of polar-sheathed flagellum.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00387-18	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 Nishikino T, Hijikata A, Miyanoiri Y, Onoue Y, Kojima S, Shirai T, Homma M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Rotational direction of flagellar motor from the conformation of FlIG middle domain in marine Vibrio.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35902-6	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 Takekawa N, Isumi M, Terashima H, Zhu S, Nishino Y, Sakuma M, Kojima S, Homma M, Imada K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Structure of Vibrio FlIL, a new stomatin-like protein that assists the bacterial flagellar motor function.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.00292-19.	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 Kojima S, Yoneda T, Morimoto W, Homma M.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Effect of PlzD, a YcgR homolog of c-di-GMP binding protein, on polar flagellar motility in Vibrio alginolyticus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	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) 10.1093/jb/mvz014.	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相良悠伍、小嶋誠司、本間道夫
2. 発表標題 海洋性ビブリオ菌べん毛固定子タンパク質PomAの細胞質領域へのPro変異導入による構造と機能の解析
3. 学会等名 第45回日本生体エネルギー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuro Nishikino, Hiroto Iwatsuki, Mino Taira, Seiji Kojima, Michio Homma
2. 発表標題 Destabilization of the complex formation allows high Na ⁺ conduction in the PomAB flagellar stator complex
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 Seiji Kojima, Hiroyuki Terashima, Michio Homma
2. 発表標題 Interaction between the rotor protein FliG and the stator protein PomA in cells detected by in vivo photo-crosslink
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 相良悠伍、小嶋誠司、本間道夫
2. 発表標題 海洋性ビブリオ菌べん毛固定子タンパク質PomAの細胞質領域へのPro変異導入による機能解析
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 錦野達郎、岩月啓人、小嶋誠司、本間道夫
2. 発表標題 海洋性ビブリオ菌固定子複合体のNa ⁺ イオン透過におけるPomAとPomBの相互作用の変化の役割
3. 学会等名 第83回日本生化学学会中部支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 錦野 達郎、宮ノ入 洋平、小嶋 誠司、本間 道夫
2. 発表標題 海洋性ビブリオ菌べん毛モーター回転方向制御における FliG Gly-Gly flexible linkerの役割
3. 学会等名 第82回日本生化学学会中部支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三野平、錦野達郎、岩月啓人、小嶋誠司、本間道夫
2. 発表標題 海洋性ビブリオ菌べん毛モーター固定子PomAタンパク質のCys変異導入を用いた細胞質領域荷電残基の構造解析
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 岩月 啓人、岩城 雅代、寺島 浩行、小嶋 誠司、神取 秀樹、本間 道夫
2. 発表標題 Structural and functional characterization of periplasmic loop regions of PomA, a stator protein of flagellar motor, in sodium ion flux.
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 Tatsuro NISHIKINO、Atsushi HIJIKATA、Yohei MIYANOIRI、Yasuhiro ONOUE、 Seiji KOJIMA、Tsuyoshi SHIRAI、Michio HOMMA
2. 発表標題 Mutational and structural analysis of the FliG middle domain for the rotational direction of polar flagellar motor of Vibrio
3. 学会等名 第79回岡崎コンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seiji KOJIMA, Masato TAKAO, Gaby ALMIRA, Ikumi KAWAHARA, Mayuko SAKUMA, Michio HOMMA, Chojiro KOJIMA, and Katsumi IMADA
2. 発表標題 Helix rearrangement in the periplasmic domain of the stator B-subunit in the bacterial flagellar motor activates peptidoglycan binding and ion influx
3. 学会等名 第79回岡崎コンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shiwei Zhu、錦野達郎、小嶋誠司、Jun Liu、本間道夫
2. 発表標題 電子顕微鏡クライオトモグラフィーによるビブリオ菌極べん毛の外膜リングの構造と役割の解析
3. 学会等名 第55回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 錦野達郎、宮ノ入洋平、Zhu Shiwei、小嶋誠司、Liu Jun、本間道夫
2. 発表標題 NMR法とCryo-ET法を用いたビブリオ菌べん毛モーター回転子FliGのGly-Glyリンカー回転方向変異体の構造解析
3. 学会等名 第44回日本生体エネルギー研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三野平、錦野達郎、岩月啓人、小嶋誠司、本間道夫
2. 発表標題 細菌べん毛モーター固定子タンパク質PomA細胞質領域のCys変異体を用いたイオン依存的構造動態解析
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 錦野達郎、岩月啓人、三野平、小嶋誠司、本間道夫
2. 発表標題 フラグを欠失した海洋性ピブリオ菌固定子PomAB複合体の精製条件の検討と解析
3. 学会等名 平成30年度生物物理学会中部支部講演会
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