

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20770083

研究課題名 (和文) 細菌べん毛モーター・スイッチ複合体の構造解析

研究課題名 (英文) Structure analysis of the flagellar hook-basal body with the C ring by electron cryomicroscopy

研究代表者

宮田 知子 (MIYATA TOMOKO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・特任研究員

研究者番号：30423156

研究成果の概要 (和文)：細菌の運動器官であるべん毛はその根元に左右両方向に回転できる分子モーターを持つ。この分子モーターの回転方向の切り替えは基部体にあるCリングと呼ばれるスイッチ複合体によって行われる。本研究では、べん毛モーターの回転方向制御の機構を理解するために、野生株、CCW (左回転) または CW (右回転) に偏った回転を示す変異体 C リングの極低温電子顕微鏡を用いた構造解析を行った。野生型と CW 型の 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 リング構造変化を可視化できた。

研究成果の概要 (英文)：Bacterial flagella 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 structures of the wild type and the CW-bias mutant by electron cryomicroscopy. Conformational change of the C ring by rotation direction switching was observed by the structure comparison between the wild type and the CW-bias mutant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：分子モーター、電子顕微鏡、単粒子解析

1. 研究開始当初の背景

細菌は運動器官として数本のべん毛を持ち、その根元にあるモーターの回転を左回転 (CCW) または右回転 (CW) に切り替えながら直進運動と方向転換を繰り返し好ましい環境へ移動する。べん毛は 30 種類も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ーである基部体、トルクを伝える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繊維の三つの部分構造に分けられる。スイッチタンパク質である FliG, FliM, FliN は基部体の細胞質側 FliF から成る MS リングの直下に C リング構造を形成し、モーターの反転頻度を制御する。中でも FliM は走化性シグナル分子であるリン酸化 CheY の標的分子であり、リン酸化 CheY の FliM への結合が引き金となり、FliG に構造変化を引き起こす。FliG はべん毛の回転に最も直接的な役割を持つタンパク質であり、その C 末端側の領域は固定子である MotB と相互作用し、回転力産出に関わっている。また FliN はべん毛特異的な輸送装置の一部としても働く。このように C リングはモーターの反転スイッチだけでなく、べん毛形成時のタンパク質輸送装置の一部として働き、その後モーターのトルク発生装置の一部となる多機能な複合体である。これまでに、FliG の中央から C 末端側の領域 (FliG_{MC}) と FliM, FliN の部分構造が X 線結晶構造解析により明らかにされているが、C リング付きの基部体の構造はその構成タンパク質の数が多く、また個々のモーター毎にその化学量論比にばらつきがあることから結晶化が困難であった。このため構造解析は電子顕微鏡を用いて行われてきたが基部体はその領域毎に対称性が異なっているためにこれまで得られた構造は分解能が低く、各サブユニットの分子モデルを当てはめての詳細なモデル構築はできていない。

2. 研究の目的

本研究では、モーターの回転方向制御の機構を理解するため、野生株ならびにスイッチタンパク質の一つである FliG の変異によって CCW または CW に偏った回転を示す変異体からそれぞれ C リング付き基部体を精製し、極低温電子顕微鏡を用いた単粒子像解析法により C リング構造を高分解能で解析することを目的とする。各変異体の 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 リング構造変化を可視化することができ、それぞれの構造に対し架橋実験による各構成タンパク質の相互作用様式と、既存の部分構造構造を当てはめることで C リング構造疑似原子モデルを構築し、回転制御機構を明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 基部体高発現株の作成とデータ収集。
野生株としてフックフィラメントジャンクションの一つである fliG の変異体 SJW2177 を用い、高発現株作成のために clpP 遺伝子を破壊した。野生株は方向転換も行うが大部分が CCW 方向回転であるため CCW 回転型として扱う。CCW バイアス変異体には FliG の 135 番目の V が L に変異した株である SJW2324 を、また CW 固定変異体には FliG の 169 から 161 番目のアミノ酸の欠損株である SJW2811 を用いた。これらの変異体はべん毛のない C リング付きフック基部体 (HBB) の高発現株作成のためにべん毛繊維の遺伝子である fliC と clpP 遺伝子を欠損した。これらの株から C リング付き HBB の精製条件検討ならび、氷包埋電子顕微鏡観察条件の最適化を行い、液体ヘリウム温度に冷やした電子顕微鏡で観察し、データ収集を行った。

(2) C リング構造の回転対称性の決定

C リングの回転対称性のばらつきを確認するためにフック遺伝子 (fliG) 欠損株である SJW1353 から C リング付き基部体を精製し、氷包埋電子顕微鏡で観察し上向きの像を集める。上向きの像からそれぞれの回転対称性を決め、その回転対称性によってクラス分けをした後平均像を作成し、その直径を測定した。

(3) C リング付き HBB の三次元再構成

収集した電顕像から個々の C リング付き HBB を切りだし、横向きの像の平均から円筒対称を用いて初期構造を作成する。この初期構造を用いて切り出した像をプロジェクションマッチング法により分類した。対称性の異なる領域が構造解析に影響を与えないように 72~90° に分類された像のみにその領域毎にマスクかけた像を用意し、三次元再構成に利用する。C リング構造の中で FliG

は26分子のFliFから成るMSリングの直下であり、この領域は26回回転対称である。それに対してCリングの細胞質側の領域はFliM, FliNからなりその対称性は固体毎にばらつきがありは34回回転対称前後である。このためCリング付きHBBの高分解能の構造解析にはCリング像をMSリング直下の領域と細胞質側の領域にわけそれぞれの対称性を割り当てて三次元再構成を行う必要がある。細胞質側のCリングは対称性にばらつきがあるためはじめに72-90°に分類された像の細胞質側のCリング領域が残るようにマスクをかけに、Cリングの直径をよってクラス分けを行いそれぞれに33-35回回転対称性を割り当てて三次元構造解析を行った。次にそれぞれの回転対称に分類されたクラス毎にMSリングの領域が残るようなマスクをかけた画像で26の回転対称で分類した後マスクなしの画像で三次元構造を行いMSリング直下のCリング構造を得た。

4. 研究成果

(1) Cリングの回転対称性の分布

Cリング付き基部体の氷法埋像から上向き像を205粒子切り出し、個々の粒子の回点対称の調べその対称性毎に分類した。結果を図1に示した。Cリングは34回対称のものが最も多く存在し、対称性のばらつきは33-35回対称であった。次に各対称性毎に平均像を求めてこの平均像からその直径を求めた。各対称性毎のリングの半径は33回対称が204Å、34回対称が211Å、35回対称が218Åとなった。以降の三次再構成においては個々の粒子像はCリングの直径従って分類し、それぞれ直径のグループには対応する対称性を適応させながら解析を進める。

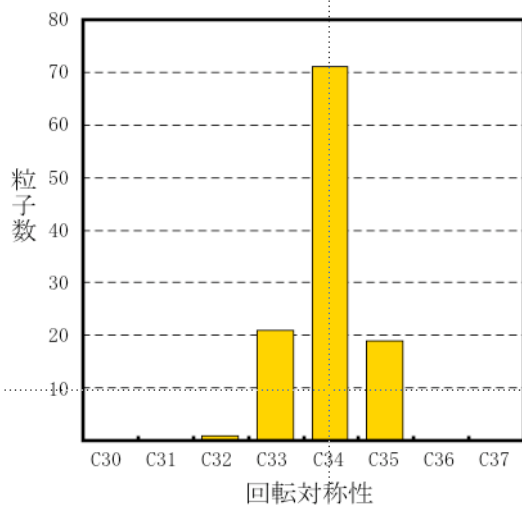


図1 Cリングの回転対称性の分布

(2) 細胞質側のCリング構造

2102粒子の野生型Cリング粒子と1254粒子のCW型Cリング粒子はその直径によって3つのグループに分類された。どちらも最も粒子数が多かったグループは34回対称であった。34回対称の野生型とCW型のCリング構造を図2に示す。Bの断面図に示したようにCリング構造は高さ180Åの外円筒の内部に直径300Åのリング状構造が結合している。この内側のリング状構造は野生型とCW型でそのリングの高さがわずかに変わっていることがわかる(図2B)。この領域はFliGが結合すると予想されている場所であり、CW型とCCW型の構造変化を捉えていると考えられる。しかし、この構造は特徴の無いリングになっていた。FliGは元々26このサブユニットから成り、26回回転対称をとるがこの領域を34回対称で解析したためだと思われる。

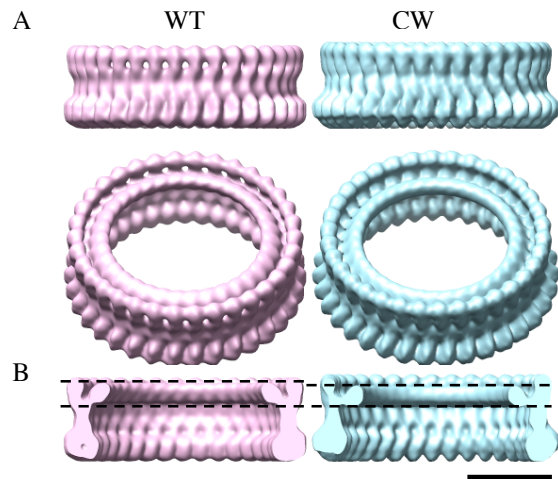


図2 細胞質側のCリングの三次元構造。

A. Cリングのside viewと45°傾斜傾斜像。
B. Cリングの断面図。点線は内側のリングの高さの違いを示している。
スケールバーは200Å

(3) Mリング近傍のCリング構造

野生型とCW型のMリング近傍のCリング構造は、細胞質側の構造解析で34回対称に分類された画像を用いMSリング近傍のだけを残した画像に26回対称を用いて解析した。図3に得られた構造を示す。図3Aはこの領域の構造を細胞質側からみた像を示している。先ほどの細胞質側の構造で特徴のないリング状構造であった密度が26個の分離した密度として確認された。この密度は野生型では比較的開いた状態でMリングの近傍にあるが、CW型では少し密に集まってよりMリングから離れたところに位置している。これらの結果から野生型とCW型のCリングの全体構造を明らかにできた(図4)。

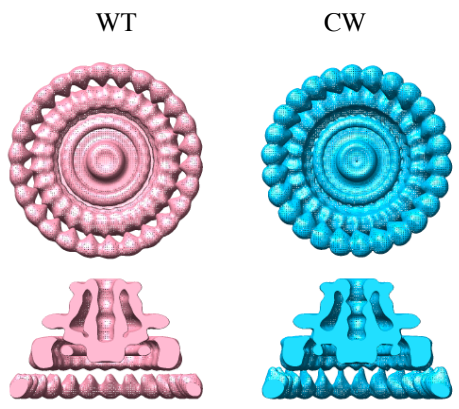


図 3. M リング近傍の C リング構造

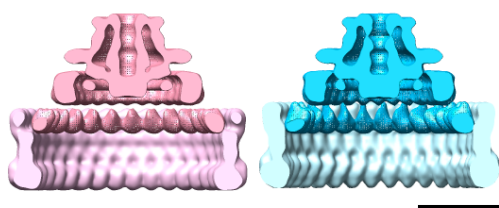


図 4 MS リング上の C リングの全体像

以上のように本研究によって細菌べん毛の回転方向の制御機構の一部の構造変化が確認できた。しかし現在はまだ分解能が低く疑似原子モデルを作成し、変換機構の仕組みを示すことはできていない。しかし、今後さらにデータを増やし、分解能を上げることでこの回転方向変換機構の詳細を知ることができると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件、すべて査読有)

1. Kato, T., Yoshida, D., Miyata, T., Maki, Y., Wada, A. & Namba, K. Structure of the 100S ribosome in the hibernation stage revealed by electron cryomicroscopy. *Structure*, in press, 2010.
2. Kazetani, K., Minamino, T., Miyata, T., Kato, T., Namba, K. ATP-induced FliI hexamerization facilitates bacterial flagellar protein export. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388, 323-327, 2009.
3. Tanaka, S., Miyata, T., Kato, T., Namba, K., Yanagida, T., Sako, Y., Kawata, S. & Inoue, Y. Construction of two color semiconductor quantum dots wire by utilizing the

complementarity of DNA. *AIP Conf. Proc.* 1062, 116-122, 2008.

[学会発表] (計 19 件)

1. Kawamoto, A., Minamino, T., Miyata, T., Kato, T., Shigematsu, H., Hosogi, N., Nagayama, K. & Namba, K. Structural analysis of the FliH/FliI complex of the flagellar type III protein export apparatus with phase contrast electron cryotomography. *Gordon Research Conference on Biomolecular Interactions & Methods*, Hotel Galvez, USA, January 16-17, 2010.
2. 宮田知子, 加藤貴之, 藤井高志, 松波秀行, 難波啓一. 細菌べん毛モーター・スイッチ複合体の構造解析. 特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 6 回公開シンポジウム, 千里ライフサイエンスセンター (大阪), December 2, 2009.
3. 川本晃大, 南野徹, 宮田知子, 加藤貴之, 重松秀樹, 細木直樹, 永山國昭, 難波啓一. 電子線位相差トモグラフィによるべん毛タイプ III タンパク質輸送装置 FliH/FliI 複合体の構造解析. 特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 6 回公開シンポジウム, 千里ライフサイエンスセンター (大阪), December 2, 2009.
4. 葦原雅道, 加藤貴之, 藤井高志, 松波秀行, 宮田知子, 難波啓一. 低温電子顕微鏡法による生体超分子複合体の立体構造解析に対する電子線照射損傷の定量的評価. 特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 6 回公開シンポジウム, 千里ライフサイエンスセンター (大阪), December 2, 2009.
5. Kawamoto, A., Minamino, T., Miyata, T., Kato, T., Namba, K. べん毛タイプ III 蛋白質輸送装置 FliH/FliI 複合体の構造解析に向けた試料調製. Steps towards structural analysis of the FliH/FliI complex of the flagellar type III protein export apparatus. 日本生物物理学会第 47 回年会, アスティとくしま/徳島文理大学, November 1, 2009.
6. Ashihara, M., Kato, T., Fujii, T., Matsunami, H., Miyata, T., Iwasaki, K., Namba, K. 低温電子顕微鏡法における生体超分子複合体に対する電子線照射損傷の定量的評価. Electron dose effect on 3D image reconstruction of a biological macromolecular structure by electron cryomicroscopy. 日本生物物理学会第 47 回年会, アスティとくしま/徳島文理大学, October 31, 2009.
7. Miyata, T., Kato, T., Fujii, T., Matsunami, H., Namba, K. 細菌べん毛モーター・スイッチ複合体の極低温電子顕微鏡による構造解析. Structural analysis of the flagellar hook-basal body with the Cring by electron cryomicroscopy. 日本生物物理学会第 47 回年会, アスティと

- くしま／徳島文理大学, October 31, 2009.
8. Ibuki, T., Minamino, T., Miyata, T., Kato, T., Namba, K., Imada, K. FliI と FliJ の構造より明らかとなったべん毛輸送装置と F1-ATPase における共通の構造. Common architecture between the flagellar export apparatus and F1-ATPase revealed by the structure of FliI and FliJ. 日本生物物理学会第 47 回年会, アスティとくしま／徳島文理大学, October 31, 2009.
 9. Makino, F., Kato, T., Miyata, T., Namba, K. 細菌べん毛フック繊維連結部の極低温電子顕微鏡による構造解析. Structural analysis of the flagellar hook-filament junction by electron cryomicroscopy. 日本生物物理学会第 47 回年会, アスティとくしま／徳島文理大学, October 30, 2009.
 10. Ashihara, M., Kato T., Fujii, T., Matsunami H., Miyata T., Namba K. Electron dose effect on 3D image reconstruction of a biological macromolecular structure by electron cryomicroscopy. EMBO Course on Image Processing for CryoEM, Birkbeck College, London, U.K., September 10, 2009.
 11. Ibuki, T., Minamino, T., Miyata, T., Kato, T., Namba, K., & Imada, K. Common architecture between the flagellar export apparatus and F₁-ATPase revealed by the structure of FliI and FliJ. International Symposium "Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembranes", Shirankaikan, Japan, September 8, 2009.
 12. 宮田知子. 細菌べん毛モーター・スイッチ複合体の構造解析. 特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 5 回ワークショップ, 湘南国際村センター国際会議場, July 27, 2009.
 13. 近藤寿人, 蒲池雄介, 宮田知子, 加藤貴之, 今田勝巳. PAX6-SOX2-DNA 複合体の塩基配列特異的な構造変化と遺伝子スイッチ機能. 特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 5 回公開シンポジウム, つくば国際会議場, Dec. 19, 2008.
 14. 加藤貴之, 宮田知子, 藤井高志, 松波秀行, 難波啓一. 細菌べん毛基部体の構造解析. 特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 5 回公開シンポジウム, つくば国際会議場, Dec. 18, 2008.
 15. 宮田知子, 加藤貴之, 藤井高志, 松波秀行, 難波啓一. 細菌べん毛モーター・スイッチ複合体の構造解析. 特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 5 回公開シンポジウム, つくば国際会議場, Dec. 18, 2008.
 16. Miyata, T., Kato, T., Fujii, T., Matsunami, H. & Namba, K. 細菌べん毛モーター・スイ
- チ複合体の構造解析. 第 46 回日本生物物理学会年会, 福岡国際会議場, Dec. 5, 2008.
17. Kawamoto, A., Minamino, T., Miyata, T., Kato, T. & Namba, K. 極低温電子顕微鏡によるべん毛タイプ III 蛋白質輸送装置の構造および機能解析. 第 46 回日本生物物理学会年会, 福岡国際会議場, Dec. 3, 2008.
 18. Ashihara, M., Matsunami, H., Miyata, T., Namba, K. Optimal conditions for electron cryomicroscopy with liquid helium-cooled specimen stage. Gordon Research Conference on Three Dimensional Electron Microscopy, II Ciocco Hotel and Resort, Lucca (Barga), Italy, June 18-19, 2008.
 19. 宮田知子. 細菌べん毛モーター・スイッチ複合体の構造解析. 特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 4 回ワークショップ, 淡路夢舞台国際会議場, Jun. 16-17, 2008.
- [その他]
ホームページ等
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jp/labo/02>
6. 研究組織
 - (1)研究代表者
宮田 知子 (MIYATA TOMOKO)
大阪大学・大学院生命機能研究科・特任
研究員
研究者番号 : 30423156
 - (2)研究分担者
無し
 - (3)連携研究者
無し