

令和 5 年 4 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15732

研究課題名（和文）ストマチン様タンパク質とイオンチャネルタンパク質の相互作用機構の研究

研究課題名（英文）Research on the interaction mechanisms between Stomatin-like proteins and ion channel proteins

研究代表者

竹川 宜宏 (TAKEKAWA, Norihiro)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：50791810

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）：本研究では、ストマチン様タンパク質(slipin)と制御するチャネルタンパク質の相互作用機構を明らかにすることを目的とした。線虫と細菌をモデルとして、異なるslipinと対応するチャネルタンパク質の複合体を分子構造の知見から考察した。全長蛋白質やフラグメントの発現系を確立し、安定的に精製可能なフラグメントの同定に成功した。多量体構造を作りやすい性質を持つタンパク質についても再現よく確認された。MEC-2とMEC-4の弱い相互作用も検出された。低温電子顕微鏡により、MotA/Bホモログの構造が明らかになった。また、MotBホモログがNa<sup>+</sup>と結合することで構造変化するメカニズムも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ほとんど全ての生物に保存されているslipinは、多様な機能を持つチャネル/トランスポータータンパク質を制御する。しかし、異なる構造を持つチャネルタンパク質をどのように制御するのか、また、同じ構造モチーフを持つslipinがどのように機能的な多様性を生み出すのかが興味深い。さらに、チャネルやトランスポーターは生物活動に必須であり、slipinは病理学的にも重要なターゲットである。本研究は、病理学的な原因追求や新規薬剤の探索に繋がる可能性がある。同一ファミリーのタンパク質がここまで多様な相互作用パートナーを持つ例はほとんどなく、今後も生命現象の根幹に関わる重要な課題である。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the interaction mechanism between slipin proteins and their corresponding channel proteins using molecular structural analysis. The complex of different slipin proteins and their respective channel proteins were examined by using nematodes and bacteria as models. The expression system of full-length proteins and fragments were established, and the identification of stable and purifiable fragments was successful. The propensity of some proteins to form multimeric structures was also consistently confirmed. Weak interactions between MEC-2 and MEC-4 were detected. The structure of MotA/B homologs was revealed by cryo-electron microscopy, and the mechanism of structural changes in MotB homologs through binding to Na<sup>+</sup> was also elucidated.

研究分野：生物学

キーワード：ストマチン チャンネル 細菌 べん毛 蛋白質間相互作用

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は、外界から多様な情報を受け取り、イオンチャネルやトランスポーターを通じて細胞内・細胞間へのシグナルを伝達する。熱・機械的刺激・酸など、様々な刺激に直接関与することが知られているストマチン様タンパク質(stomatin-like protein; 以下 **slipin**)は、イオンチャネルやトランスポーターと相互作用し、外界情報に応じてその活性を制御することで、生物の機能に影響を与える。この **slipin** には、真正細菌の FliL や線虫の MEC-2 も含まれる。FliL が 10 分子からなるリング状の複合体を形成し、べん毛モーター固定子の活性を制御することを研究代表者らは明らかにしている。MEC-2 は線虫の温度走性に関与し、MEC-2 の変異により高温走性を示すこともある。しかし、どのように **slipin** がイオンチャネルやトランスポーターと相互作用し、どのように活性を制御するのかについては、まだ詳細な分子メカニズムが分かっていない。

同じ **slipin** タンパク質の一種である FliL と MEC-2 は同じ構造モチーフを持っているが、その相互作用パートナーであるチャネルタンパク質は大きく異なる。それらの異なる構造を持つチャネルタンパク質を一種類のタンパク質 **slipin** がどのように制御するのか、また、**slipin** 自身にもある機能の多様性がどのように生まれるのかは不明である。

### 2. 研究の目的

同じ **slipin** の一種であるべん毛 FliL と線虫 MEC-2 は共通の構造を持ちながらも、その相互作用パートナーであるチャネルタンパク質は、構造的にも開閉機構としても全く異なる。そこで、**slipin** が異なる構造を持つチャネルタンパク質をどのように制御するのかを明らかにする。

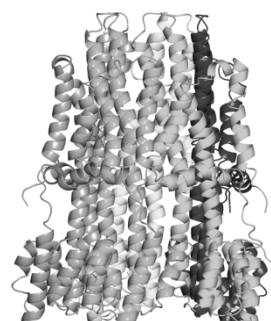
また、**slipin** 自体がどのように外部情報を感知するのか、つまり **slipin**-チャネル制御系として、機械刺激を認識したり、酸を認識したりするなど多様性がどのように生み出されるのか明らかにする。

### 3. 研究の方法

X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡を用いて、FliL と MotA/B の複合体、MEC-2 と MEC-4 の複合体構造を明らかにする。その際、全長タンパク質だけでなく、推定相互作用ドメインだけの複合体構造も解析する。FliL と MotA/B の複合体については、相互作用部位が推定されているため、部位特異的に変異を導入することで、複合体形成の促進・安定化を図り、構造解析を効率的に行う。また、**slipin**-チャネル複合体の構造とチャネル単独の構造を比較したり、推定相互作用部位への変異導入を行うことで、**slipin** がチャネルのどこに相互作用することで、どのようにチャネルの構造と機能が制御されるかを明らかにする。得られた知見を元に、変異体解析・動態解析を行い、相互作用様式を構造・機能の両面から明らかにする。

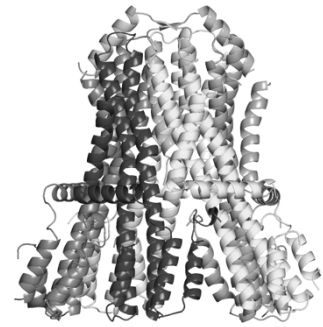
### 4. 研究成果

超好熱性細菌 *Aquifex aeolicus* の MotA (Aa-MotA) の分子構造を低温電子顕微鏡により 3.42 Å の分解能で決定した。Aa-MotA は、ほぼ 5 回回転対称性を持つ 5 量体を形成し、MotB なしでも 5 量体を形成することを明らかにした。MotB が含まれる MotA<sub>5</sub>MotB<sub>2</sub> 複合体では、AaMotA<sub>5</sub> 複合体と比べ MotA の 5 回回転対称性が低く、すなわち MotB の存在が固定子内での MotA の非対称性を生み出す要因であることが分かった。また、Aa-MotA の 5 量体の疎水性残基の分布は、サブユニット間の境界面と膜



貫通領域に集中しており、これが超好熱菌由来 Aa-MotA の複合体形成を安定化するための重要な要因であることが示唆された。

*Vibrio alginolyticus* の MotA/B ホモログ (PomA/B) の分子構造を低温電子顕微鏡により 3.16~3.50Å の分解能で決定した。これにより、Na<sup>+</sup>駆動型固定子 PomA/B の構造を初めて明らかにし、5 分子の PomA と 2 分子の PomB が複合体を形成することが分かった。イオン透過を制御する PomB のプラグ領域は PomA のペリプラズム領域と相互作用し、チャンネルの入口をふさいでいた。イオンの通り道は PomB と PomA の間に 2 か所あると考えられた。明らかにした PomA/B の構造では、そのうちの 1 か所が開いており、Na<sup>+</sup>と思われる密度が存在した。一方、もう 1 か所は PomA と PomB がタイトに相互作用しており閉じていた。すなわち PomA/B 固定子のイオン透過経路は、構造変化により交互に開閉すると予想された。



PomB のペリプラズム領域の、FliL 相互作用部位としての特異性を調べるために、新たなキメラ固定子を作成した。従来型のキメラ固定子 (PomA/PotB<sub>59</sub>) に比べ、新規に作成したキメラ固定子 (PomA/PotB<sub>52</sub>, PomA/PotB<sub>67</sub>) は同等の機能を示した。機能を喪失するキメラ固定子 (PomA/PotB<sub>91</sub>) のリンカーを短くした変異体 (PomA/PotB<sub>91</sub>Δ64-115) から運動能が回復する抑圧変異体の単離に成功し、その原因変異として PomA-A180T 変異および PomA-G228R 変異を同定した。本研究で明らかにした PomA/B の構造に当てはめることで、前者の変異はプラグとの相互作用に影響を及ぼし、後者は回転子との相互作用に影響を及ぼすことが判明した。

*Vibrio alginolyticus* が有する二種類のべん毛のうち、FliL の役割が特に重要である側べん毛の FliL の発現系を確立し、リフォールディングによる高効率な精製に成功した。他の FliL にも特有の多量体構造を作りやすい性質を再現よく確認できた。同時にその相互作用パートナー (MotA/B) の発現系の確立を行うことで、両者の相互作用解析を実現した。

枯草菌 *Bacillus subtilis* の Na<sup>+</sup>駆動型 MotB ホモログである MotS (Bs-MotS) のペリプラズムドメイン (Bs-MotS<sub>C</sub>) を精製し、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>依存的にその構造を変化させることを明らかにした。つまり Bs-MotS<sub>C</sub> の N 末端側領域 (Bs-MotS<sub>68-77</sub>) が Na<sup>+</sup>存在下では α-helix (α1) を形成し、Na<sup>+</sup>非存在下では coil を形成した。この helix-coil 転移には Bs-MotS の D70 と E75 の 2 つの酸性残基が Na<sup>+</sup>結合部位として協同的に働くことによって引き起こされる。Na<sup>+</sup>依存的な Bs-MotS の構造変化のメカニズムとして、次のようなモデルを提唱した: 低 Na<sup>+</sup>濃度においては、Bs-MotS<sub>68-77</sub> は coil であり柔軟な構造をとっているため Bs-MotS<sub>C</sub> の位置が固定されない。高 Na<sup>+</sup>濃度においては、Bs-MotS<sub>68-77</sub> 中の D70 と E75 に Na<sup>+</sup>が結合することで Bs-MotS<sub>68-77</sub> が短い α-helix を形成する。その際、Bs-MotS<sub>C</sub> は二量体を形成するため、2 つの Bs-MotS<sub>68-77</sub> は交差した状態で α-helix が安定化する。α-helix になることで剛直になり Bs-MotS<sub>C</sub> の位置が固定され PG 層に結合する。

MEC-2 の全長タンパク質や様々なフラグメントの発現系を確立した。同様に、MEC-4 の全長タンパク質や様々なフラグメントの発現系も確立した。安定的に精製可能なフラグメント (MEC-2<sub>173-286</sub>, MEC-2<sub>173-481</sub>) を同定した。また、全長 MEC-4 は過剰発現により発現細胞に対して高い毒性を有するものの、特徴的な多量体を形成することを明らかにした。MEC-4 が有する 2 つの膜貫通領域を欠失することで、推定相互作用ドメインを持ちつつ、かつ、多量体形成を維持した可溶性 MEC-4 の精製に成功した。MEC-2 と MEC-4 は安定な複合体は形成しないが、弱い相互作用が検出された。MEC-2 は MEC-4 の細胞質側領域内の特有の部分に相互作用する可能性が示唆された。

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 2件）

1. 著者名 Takekawa Norihiro, Imada Katsumi, Homma Michio	4. 巻 28
2. 論文標題 Structure and Energy-Conversion Mechanism of the Bacterial Na <sup>+</sup> -Driven Flagellar Motor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Microbiology	6. 最初と最後の頁 719 ~ 731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tim.2020.03.010	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 Nishikino Tatsuhiro, Takekawa Norihiro, Tran Duy Phuoc, Kishikawa Jun-ichi, Hirose Mika, Onoe Sakura, Kojima Seiji, Homma Michio, Kitao Akio, Kato Takayuki, Imada Katsumi	4. 巻 631
2. 論文標題 Structure of MotA, a flagellar stator protein, from hyperthermophile	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 78 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.09.072	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 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹川宜宏、上堀まりあ、山口綾香、南野徹、今田勝巳
2. 発表標題 枯草菌べん毛モーター固定子のNa <sup>+</sup> 依存性的構造変化は短いhelixの形成により誘起される
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第47回討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹川宜宏、上堀まりあ、山口綾香、南野徹、今田勝巳
2. 発表標題 枯草菌べん毛モーター固定子のナトリウム依存性的構造変化メカニズム
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹川 宜宏
2. 発表標題 細菌べん毛モーターの力学応答に寄与する小さなリング
3. 学会等名 第95回 日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Norihito Takekawa, Maria Uehori, Shunji Nakano, Ikue Mori, Michio Homma, Katsumi Imada
2. 発表標題 The structural and biochemical analyses of MEC-2 and its partner channel proteins in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020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
研究協力者	錦野 達郎 (NISHIKINO Tatsuro) (80884428)	大阪大学・蛋白質研究所・日本学術振興会特別研究員(PD)  (14401)	

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
---------	---------