

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02443

研究課題名（和文）細菌べん毛軸の全構造と構造形成の分子基盤

研究課題名（英文）Structural basis of the flagellar axial structure and its construction

研究代表者

今田 勝巳（Imada, Katsumi）

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40346143

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：細菌の運動器官であるべん毛の軸構造は、剛直なロッド、柔軟なフック、剛性に富みながら超らせん形態が変化するフィラメントで構成される構造体である。このような複雑な構造体を形成するしくみ、物性・機能・構造・シンメトリーが異なる各部を結合して連動させるしくみは不明である。本研究では、軸構造形成途中の構造および短繊維べん毛変異体の構造をクライオ電子顕微鏡により解析し、フックおよびフィラメントが成長するしくみ、フックとフィラメントを結合するしくみを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命活動を担う複雑な生体分子超複合体の多くは、シンメトリーミスマッチを利用して作られ作動する。本研究で解明されたべん毛軸構造の構築のしくみは、他の生体超分子複合体の構築・作動原理を理解する上で重要な知見であり、さらには、ナノスケールでの力学研究やナノマシン設計に向けて重要な基盤となる。また、べん毛軸構造形成阻害をターゲットとして細菌運動性を奪うことで感染を阻止する新しいタイプの薬剤開発の構造基盤となる。

研究成果の概要（英文）：The axial structure of the bacterial flagellum, an organelle responsible for bacterial motility, is a protein assembly composed of a rigid rod, a flexible hook, and a filament that is highly rigid yet capable of superhelical transition. The mechanisms behind the formation of such a complex structure and the integration of the parts, which vary in physical properties, functions, structures, and symmetries, remain unclear. In this study, we analyzed the structures of the intermediate states of flagellar formation and the structures of short filament mutants using cryo-electron microscopy. Through this analysis, we elucidated the mechanisms of hook and filament growth, as well as the molecular mechanism how the hook and filament are connected.

研究分野：生物物理学・構造生物学

キーワード：細菌べん毛 クライオ電子顕微鏡 X線結晶構造 シンメトリーミスマッチ 超分子複合体

1. 研究開始当初の背景

細菌の多くは、べん毛と呼ばれる繊維状の運動器官を用いて移動し、生存・感染に適した場所を探し出して定着する。べん毛基部のモータがロッド、フック、フィラメントで構成される繊維状の軸構造体を回転することで細菌は運動する。モータが発生するトルクは、ペプチドグリカン層と外膜を貫くドライブシャフトであるロッドから自在継手の機能を持つフックを経て、スクリュウの働きをするフィラメントへ伝達される。ロッドは3種類の蛋白質 (FlgB、FlgC、FlgF) のらせん集合体であるプロキシマルロッドと FlgG 蛋白質のらせん集合体であるディスタルロッドから成り、強い捻れの力に耐える剛直な構造体である。フックは FlgE 蛋白質のらせん集合体で、曲げに柔軟かつ捻れに強い性質を持ち、回転に応じて連続的に伸縮することで回転力をフィラメントにスムーズに伝える。超らせんを形成するフィラメントは FliC 蛋白質のらせん集合体で、剛性に富む一方でモータ反転に应答して超らせん形態を変換し、推力バランスを変えて方向転換する柔軟性を併せ持つ。フックとフィラメントの間には FlgK 蛋白質と FlgL 蛋白質でできたジャンクションと呼ばれる緩衝領域があり、力学的特性の異なるフックとフィラメントを互いの機能が干渉しないように連結するカップリングジョイントとして働く。これまでの X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡を用いた研究から、それぞれ単一の蛋白質でできているフィラメント、フック、ディスタルロッドの構造が明らかになり、フィラメントの多型変換のしくみ、フックの曲げに柔軟で捻れに強い物性の分子基盤、ディスタルロッドにおける剛直性の構造基盤が明らかになった。しかし、これら物性・機能・構造・らせんパラメータが異なる領域を互いの機能を保持したまま結合し、機能複合体を形成するしくみは不明であった。

軸構造体はパイプ様の構造を持ち、菌体内で合成された各構成蛋白質はパイプ様構造のチャンネル中を通して先端へ運ばれる。先端には回転対称性をもつ蛋白質複合体がパイプのキャップとなり、運ばれてきた構成蛋白質はキャップ直下でべん毛に組込まれる。各軸構造の形成には、それぞれに対応するキャップ蛋白質があり、ロッドには FlgJ、フックには FlgD、フィラメントには FliD から成る複合体がキャップとして働く。これまでに FliD キャップ-フィラメント複合体の低分解能構造から、キャップが回転しながら軸構造蛋白質が組込まれるというモデルを提案されている。しかし、らせん対称性をもつ軸構造と回転対称性をもつキャップが安定に結合するしくみ、その一方で軸構造蛋白質を連続して組込むしくみ、不要な蛋白質を通過させるしくみといった軸構造形成の分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

物性・機能・構造・シンメトリーが異なる領域を結合して巨大な軸構造が一体で作動する分子メカニズムを原子レベルの構造に基づいて理解すること、軸構造成長端においてシンメトリー mismatches を克服・利用してキャップと軸構造が安定に結合する一方で軸構造蛋白質を連続して組込むしくみを解明することを目指した。また、シンメトリー mismatches が判明したべん毛固定子構造解析についても取り組んだ。

3. 研究の方法

まず、べん毛成長が制御または途中で停止可能なサルモネラ変異体からべん毛を密度勾配延伸法などを利用して短繊維べん毛およびべん毛軸構造形成中間体を精製した。次にクライオ電子顕微鏡を用いて各精製試料の撮影を行い、単粒子解析法を用いて各試料の成長端の密度マップを作成した。必要に応じて各構成蛋白質の結晶構造も利用し、各試料成長端の構造モデルを構築し、精密化を行った。このようにして解析した各部の成長端の構造に基づいて各部および機能複合体の形成機構を考察した。

4. 研究成果

(1) フィラメント成長端構造の解明

フィラメント成長端には FliD キャップが存在し、その直下にべん毛繊維蛋白質フラジェリンが組み込まれることで繊維が成長する。キャップは5分子の FliD から成り、先端のプレート状の領域とフィラメントの中央の穴に突き刺さった leg 領域で構成される。これまでは、フィラメント成長端の低分解能構造に基づいて5回回転対称を持つ FliD キャップと1重らせんに沿って2巻きで11個のサブユニットが螺旋状に並ぶフィラメントの間に1ヶ所できる大きな隙間にフラジェリンが組み込まれ、フィラメント先端の螺旋の凹部に FliD の leg 領域が順番にはまるモデルが提案されていた。我々は、フラジェリンの発現を制御できる変異体を用いて精製した短繊維べん毛試料のクライオ電子顕微鏡像を撮影し、FliD キャップ-R 型フィラメント結合部を含む先端領域の単粒子解析を行い、8 Å 分解能の密度図を得た (図 1A)。これに FliD の結晶構造と R 型フィラメント構造を利用して全体構造モデルを作成し、精密化した (図 1B)。その結果、以下 i~

v に示す様にフィラメント成長端の構造は従来考えられていた構造とは全く異なることがわかった。また、構造に基づいて vi に示す新たなフィラメント成長のモデルを提案した。

(i)べん毛先端で FliD キャップがフラジェリンのフォーリングチャンバーとして働くと考えられる籠状の構造を形成する(図 1C, D)。

(ii)FliD キャップの leg 領域がチャンバーのゲートを形成し、チャンバーに入るフラジェリンの数を制御すると考えられる(図 1D)。

(iii)プレート領域は結晶構造と異なり、ワッシャーのようならせん状で段差がある構造を持つ。

(iv)leg 領域はフィラメント先端部の凹みではなく、フラジェリンの D1 ドメインのチャンネル側に結合する。

(v)新しいフラジェリンが組み込まれる場所に近い FliD の leg 領域のみが、他の FliD と異なる構造を持つ。

(vi)新しいフラジェリンの組み込みによりプレート領域の段差の場所が変化し、新しいフラジェリンを挟む 2 箇所の leg 領域の構造が変化することで次のフラジェリンの組み込み場所が形成される。残りの FliD 3 分子の leg 領域とフィラメント先端の相互作用は同じであり、新しいフラジェリンの挿入による影響を受けない。このため、キャップはフィラメント先端に強固に結合できる(図 2)。

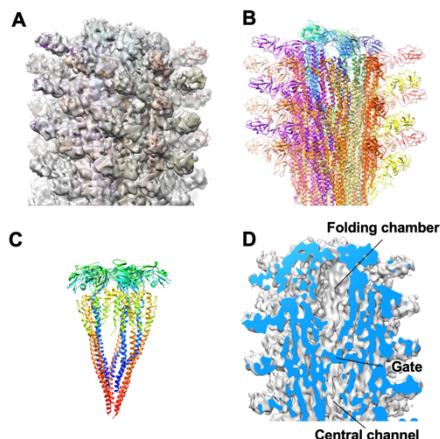


図 1 フィラメント成長端の構造

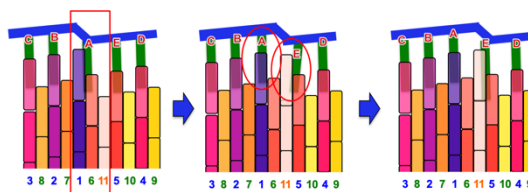


図 2 フィラメント成長モデル

(2) フィラメント形成直前のべん毛の構造解明

べん毛はフックが完成するとフックの上に FlgK と FlgL からなるジャンクションが形成され、その上に FliD キャップが形成されたのちにべん毛繊維の成長が始まる。フィラメント欠損変異体のべん毛は、ジャンクションに FliD キャップが結合した状態で成長が停止する。我々はこの変異体から単離精製したべん毛試料のクライオ電子顕微鏡像を撮影し、先端領域の単粒子解析を行い、4.44 Å 分解能の密度図を得た(図 3A)。これに基づいて (1) の FliD の構造、既知の FlgK および FlgL の結晶構造、フックの構造を利用して全体構造モデルを作成・精密化し、FliD キャップ-ジャンクション-フックに至る構造を解明した(図 3B)。その結果、(i)ジャンクション上の 5 量体キャップの段差の位置がフィラメント上の 5 量体キャップの段差の位置と異なること、(ii)キャップの末端の形態もフィラメント上とジャンクション上で異なることが明らかになった(図 4)。また、(iii)らせん状に集合しているフックと 2 種類のジャンクション蛋白質の位置による構造の違いは小さいこと、(iv)ジャンクションを構成する FlgK の D0 ドメインの構造変化により異種蛋白質の結合を可能にしていることが明らかになった

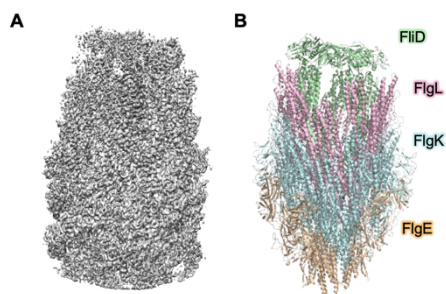


図 3 フィラメント形成直前のべん毛先端の構造

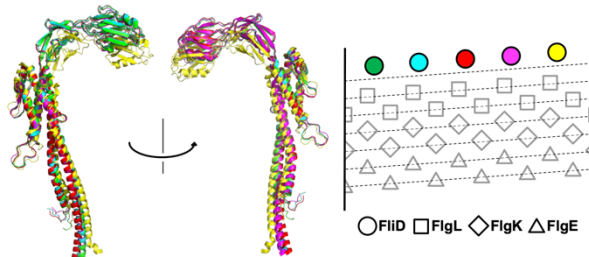


図 4 ジャンクションに結合した FliD キャップの構造

(3) フック成長端の構造の解明

これまで、フック成長前にロッド先端に FlgD キャップが結合した構造が報告されており、FlgD キャップ全体がロッド内に埋もれたようになっていたことから FlgE の組み込みは FliD の組み込みと異なることが予想されていた。FlgK 蛋白質欠損変異体のべん毛は、FlgD キャップがフック先端に結合した状態でべん毛構築が止まる。我々はこの変異体から単離精製した FlgD キャップ-フック試料のクライオ電子顕微鏡像を撮影し、先端領域の単粒子解析を行い、3.7 Å 分解能の密度図を得た。これに基づいて既知の FlgD の結晶構造、フックの構造を利用して全体構造モデルを作成・精密化し、フック成長端の構造を解明した(図 5)。その結果、以下 i~v に示す様にフック成長端の構造はフィラメント成長端の構造とは全く異なることがわかった。

(i) FlhD キャップのフォールディングチャンバーに相当する空間はフック先端にはない(図5)。

(ii) FlgD キャップはフックの繊維軸から約 15 度傾いてフックに埋められるように結合している(図5)。

(iii) FlhD キャップのプレート領域に相当する FlgD キャップの Head 領域は、結晶構造と同様のほぼ 5 回回転対称構造を持つ(図6)。

(iv) FlgD キャップと結合するフック先端部の直径は他と比べて 25 Å 短くなっている。

(v) キャップを構成する FlgD 5 分子のうちひとつの構造が他と異なり、新たなフック蛋白質の組み込みの場を提供している(図6)。

また、粒子像の分類により、構造が異なる 3.95 Å の密度図も得られた。この構造と 3.7 Å の構造は、新たに組み込まれたフック蛋白質の固定前と固定後の構造に対応すると考えられる。

(4) べん毛 MotA 複合体の構造

べん毛固定子は、5 個の A サブユニットから成るリングの中央に B サブユニット 2 量体が刺さったシンメトリーミスマッチを含む構造体である。この構造の形成原理を調べるため、MotA を発現精製し、クライオ電子顕微鏡単粒子解析を行い、3.7 Å 分解能での構造を解明した。その結果、A サブユニットのみでも固定子複合体と同様の 5 量体リングを形成することがわかり、シンメトリーミスマッチを持つリング構造体形成に B サブユニットが不要であることが明らかになった。

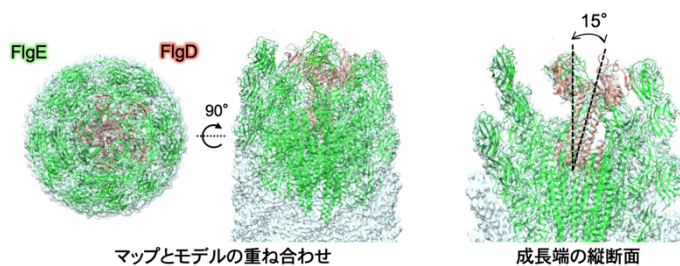


図5 フック成長端の構造

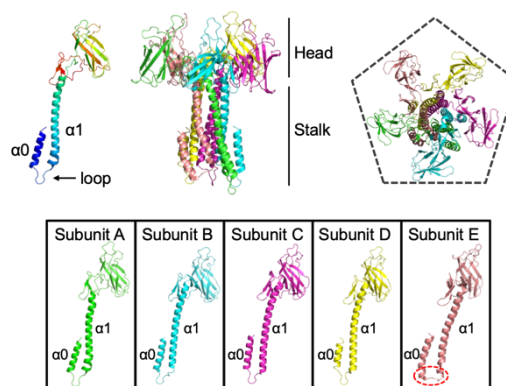


図6 フック成長端の FlgD キャップの構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishikino Tatsuro, 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18件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Imada K.
2. 発表標題 Recent understanding of the control mechanism of the bacterial flagellar motor rotation.
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nishikino T, Takekawa N, Kishikawa J, Hirose M, Kojima S, Homma M, Kato T, Imada K.
2. 発表標題 Atomic structure of Na ⁺ conducting flagellar energy convertor, the PomAB complex from <i>Vibrio alginolyticus</i> , by Cryo-EM.
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nishikino T, Takekawa N, Kishikawa J, Hirose M, Kojima S, Homma M, Kato T, Imada K.
2. 発表標題 Atomic structure of Na ⁺ conducting flagellar energy convertor, the PomAB complex from <i>Vibrio alginolyticus</i> , by Cryo-EM.
3. 学会等名 第95回日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本紗依、辻本拓海、宮田知子、牧野文信、難波啓一、竹川宜宏、今田勝巳.
2. 発表標題 細菌べん毛フック成長端の構造.
3. 学会等名 第95回日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 錦野達郎、竹川宜宏、岸川淳一、廣瀬末果、小嶋誠司、本間道夫、加藤貴之、今田勝巳.
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡単粒子解析による海洋性ピブリオ菌べん毛モーター固定子PomAPomBのイオン透過経路の解明.
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第48回討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 錦野達郎、竹川宜宏、岸川淳一、廣瀬末果、小嶋誠司、本間道夫、加藤貴之、今田勝巳.
2. 発表標題 ピブリオ菌固定子PomAPomBの単粒子解析によるイオン結合部位の解析.
3. 学会等名 第26回べん毛研究交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森来未、竹川宜宏、牧野文信、今田勝巳.
2. 発表標題 べん毛成長末端の構造解析と新しいべん毛精製法の確立.
3. 学会等名 第26回べん毛研究交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋本紗依、辻本拓海、宮田知子、牧野文信、難波啓一、竹川宜宏、今田勝巳.
2. 発表標題 細菌べん毛フック成長端の構造.
3. 学会等名 第26回べん毛研究交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takekawa N, Ikeda A, Miyata T, Makino F, Namba K, Imada K.
2. 発表標題 Structure of the hook-filament junction with the filament cap in the bacterial flagellum.
3. 学会等名 日本生物物理学会第59回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 1.Nishikino T, Takekawa N, Kishikawa J, Hirose M, Kojima S, Homma M, Kato T, Imada K.
2. 発表標題 Structure of a pentameric complex of MotA, a bacterial flagellar stator protein, from Aquifex aeolicus by single particle cryo-EM.
3. 学会等名 日本生物物理学会第59回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 錦野達郎、竹川宜宏、岸川淳一、廣瀬未果、小嶋誠司、加藤貴之、本間道夫、今田勝巳
2. 発表標題 超好熱菌Aquifex aeolicusのべん毛固定子タンパク質MotAのCryo-EMによる単粒子解析.
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 錦野達郎、竹川宜宏、岸川淳一、廣瀬未果、小嶋誠司、加藤貴之、本間道夫、今田勝巳
2. 発表標題 Aquifex aeolicusの固定子Aサブユニット5量体の単粒子解析
3. 学会等名 第25回べん毛研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 錦野達郎、竹川宜宏、岸川淳一、廣瀬未果、小嶋誠司、本間道夫、加藤貴之、今田勝巳
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡単粒子解析によるビブリオ菌べん毛モーターPomAPomB固定子のNa ⁺ イオン透過機構の解明
3. 学会等名 第60回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹川宜宏、宮田知子、森来未、牧野文信、難波啓一、今田勝巳
2. 発表標題 細菌べん毛フック-ジャンクション-フィラメントキャップ複合体の構造
3. 学会等名 第7回生命分子科学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋本紗依、辻本拓海、宮田知子、牧野文信、難波啓一、竹川宜宏、今田勝巳
2. 発表標題 細菌べん毛フック成長端の構造
3. 学会等名 第7回生命分子科学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hashimoto S, Miyata T, Makino F, Namba K, Takekawa N, Imada K.
2. 発表標題 Structure of the growing end of the bacterial flagellar hook.
3. 学会等名 日本生物物理学会第61回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takekawa N, Mori K, Miyata T, Makino F, Namba K, Imada K.
2. 発表標題 Structure of the complex composed of the hook, junction, and filament-cap in the bacterial flagellum
3. 学会等名 日本生物物理学会第61回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武内春澄、橋本紗依、辻本拓海、宮田知子、牧野文信、難波啓一、竹川宜宏、今田勝巳
2. 発表標題 細菌べん毛フック成長端の構造
3. 学会等名 第27回べん毛研究交流会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/imada/index.html

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	牧野 文信 (Makino Fumiaki)	大阪大学・大学院生命機能研究科・招へい准教授 (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