

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 30日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570161

研究課題名（和文）細菌べん毛特異的 ATPase 複合体の離合集散の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanism of the assembly and disassembly processes of the bacterial flagellum-specific ATPase complex

研究代表者

南野 徹（MINAMINO TOHRU）

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：20402293

研究成果の概要（和文）：FliH, FliI, FliJ からなるべん毛特異的 ATPase 複合体が FliH と輸送ゲート蛋白質 FliA との相互作用を介して輸送ゲート結合プラットフォーム上に集合すると、FliJ-FliI₆ リング複合体が形成される。FliH および FliI の助けにより FliJ が FliA と相互作用すると、輸送ゲートが細胞膜に形成されるプロトン駆動力をエネルギー源に利用してべん毛蛋白質を細胞外へ輸送する。

研究成果の概要（英文）：The bacterial flagellar ATPase complexes, which consist of FliH, FliI and FliJ, associate with the docking platform of the export gate through an interaction between FliH and an export gate protein FliA, thereby forming the FliI₆-FliJ ring complex. A specific interaction of FliJ with FliA brought about by the FliH_X-FliI₆ complex allows the export gate to fully utilize proton motive force across the cytoplasmic membrane to drive flagellar protein export.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：電子顕微鏡, 分子モーター, 遺伝学, 細菌, 蛋白質

1. 研究開始当初の背景

細菌の運動器官であるべん毛は約 30 種類の蛋白質からなる生体超分子複合体で、回転モーターとして働く基部体、ユニバーサルジョイントのフック、らせん型プロペラの繊維の、少なくとも 3 つの部分構造からなる（図 1）。べん毛の伸長はその先端にべん毛蛋白質が連続的に重合することによって起こる。そのため、細胞質内で合成されたべん毛蛋白質は効率良くその先端へ運ばれる必要がある。

べん毛の基部に存在する独自の輸送装置は、6 つの細胞膜内在性蛋白質（FliA, FliB, FliO, FliP, FliQ, FliR）と 3 つの細胞質内在性蛋白質（FliH, FliI, FliJ）からなり、非常に高い特異性を持ってべん毛蛋白質を認識し、べん毛基部体の中心にあるゲートからべん毛中心を貫通する細長いチャンネルの中へ、そして先端へと輸送する。

ATPase である FliI が、細胞質内で ATPase 制御蛋白質 FliH、輸送基質蛋白質、そして細

胞質シャペロン FliJ と複合体を形成し、FliH を通して基部体 C リング構成蛋白質 FliN に結合して輸送ゲートそばで待機し、進行中の輸送が終了して輸送ゲートが空くとそこへリクルートされ、FliI が 6 量体リングを形成して結合していた輸送基質の輸送を開始すること、FliI による ATP 加水分解反応で生じるエネルギーは、継続的輸送過程を邪魔しないよう、輸送ゲートや輸送基質蛋白質から FliH/I 複合体を解離させるために使われることが示唆されていた。しかしながら、界面活性剤などで細胞膜を壊してべん毛基部体を単離精製すると、輸送装置の大半が基部体から解離してしまうため、実際に輸送装置が基部体のどこに結合しているのかについては未だ明らかではなかった。そのため、具体的にどのように FliH/I 複合体が ATP 依存的に離合集散を繰り返すのかについては謎のままであった。

2. 研究の目的

遺伝学および生化学的機能解析法を活用し、電子顕微鏡による画像解析をうまく組み合わせることで、FliH/I 複合体の離合集散の分子機構を解明すること目的とした。

3. 研究の方法

- (1) FliI₆-FliJ リング複合体の *in vitro* 再構成
FliI および FliJ を精製した。精製標品に 5 mM ADP, 5 mM AlCl₃, 5 mM NaF, 5 mM MgCl₂, 100 mg/ml 大腸菌由来のリン脂質を添加し、37°C で約 30 分間インキュベートした後、電子顕微鏡を用いて観察した。
- (2) プルダウンアッセイ
輸送装置構成蛋白質間の相互作用を解析するために、GST アフィニティークロマトグラフィー法を利用した。さらに、遺伝学的機能解析法を上手く組み合わせることで、それらの蛋白質間相互作用に重要な領域を同定した。
- (3) 部位特異的光架橋実験
FliH の 7 番目および 10 番目のトリプトファン残基が輸送ゲート複合体のどのコンポーネントと相互作用するのかは明らかにするために、光感受性のフェニルアラニン誘導体である *p*-benzoyl-phenylalanine を部位特異的に導入し、350-365 nm の紫外光の照射によって近傍の C-H 結合と共有結合させることで、光架橋実験を行った。

4. 研究成果

- (1) FliI-FliJ 相互作用
FliJ は FliI に結合し、FliI の ATPase 活性を促進することが示されていたが、

その分子機構は不明であった。本研究では、FliJ が FliI の C 末ドメインにある $\alpha 1$ ヘリックスに結合することで、FliI リング複合体の形成を促進し、その結果 FliI の ATPase 活性が上昇することが判明した (図 1)。

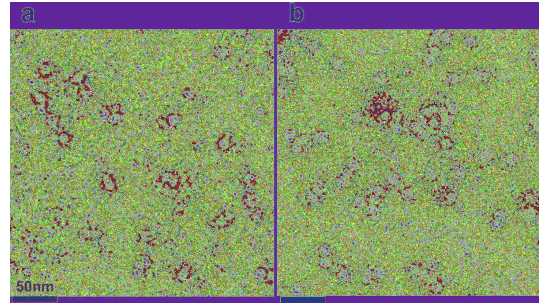


図 1. FliI リング複合体形成における FliJ の効果. (a) FliI のみ (b) FliI + FliJ (FliI : FliJ = 6 : 1)

FliJ と FliI が形成する複合体を電子顕微鏡や生化学的解析により調べた結果、FliJ が FliI リングの中央の穴に突き刺さって安定な FliI₆FliJ 複合体を形成することが明らかとなった (図 2) (Ibuki *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011)。

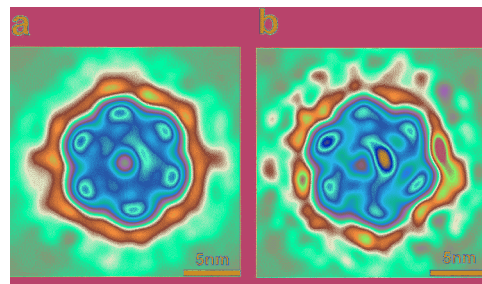


図 2. 電子顕微鏡による FliI-FliJ 複合体の画像解析 (a) FliI のみ, (b) FliI + FliJ.

- (2) べん毛蛋白質輸送における FliJ-FliA 相互作用の役割

6 種類の膜蛋白質からなる輸送ゲートは、細胞膜内外に形成されるプロトン駆動力、すなわち細胞膜を隔てた電位差 ($\Delta\psi$) と細胞膜内外のプロトン濃度差 (ΔpH) の和として定義される生体エネルギーを動力源としてべん毛蛋白質を細胞外へと運び出す。輸送ゲートがどのようにプロトン駆動力を利用しているのかは明らかにするために、野生株のサルモネラ菌と、輸送ゲート複合体のみでも効率よくべん毛を形成できる変異株を用い、輸送装置が ΔpH を使わず $\Delta\psi$ だけで働くこと、輸送ゲート複合体に結合する

FliH, FliI, および FliJ という可溶性蛋白質が欠損すると、プロトン駆動力が一定に保たれていても、 $\Delta\psi$ と ΔpH のどちらかを消失させるとべん毛蛋白質が輸送されないこと、さらに、FliH および FliI の助けにより、FliJ が輸送ゲート構成蛋白質 FlhA と相互作用すると、輸送ゲートが膜電位のみに依存した高効率な輸送エンジンに変化することなどが明らかとなった (Minamino *et al.*, *Nat. Commun.* 2011)。

Gln38, Leu42, Tyr45, Tyr49, Phe72, Leu76, Ala79 および His83 の 8 つのアミノ酸残基は FliJ オーソログ間で非常に高く保存されており、FliJ の分子表面に露出している (図 2)。本研究では、これらの保存性の高いアミノ酸残基について遺伝学的機能解析を行った。プラスミドから GST-FliJ を野生株および *fliH-fliI* バイパス変異株内で発現させると、べん毛蛋白質輸送が著しく阻害された。GST アフィニティークロマトグラフィー法を利用したプルダウン実験を行った結果、輸送阻害の原因は GST-FliJ が FlhA に結合したためであることが判明した。F72A および L76A 変異を GST-FliJ に導入すると、FlhA に対する結合親和性が著しく低下し、その結果蛋白質輸送における GST-FliJ の阻害効果が緩和された。以上の結果から、FliJ の Phe72 および Leu76 が FlhA との相互作用に重要であることが示唆された (Ibuki *et al.*, *J. Bacteriol.* 2013)。

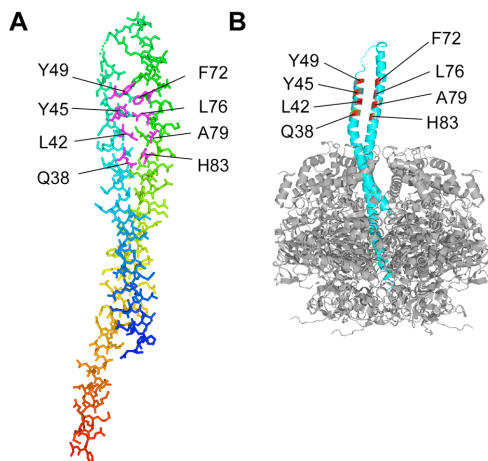


図 2. FliJ オーソログ間で非常に高く保存されているアミノ酸残基. (A) FliJ の立体構造, (B) FliI₆-FliJ リング複合体モデル.

(3) FliI-FliT 相互作用

FliT は、4 本の α ヘリックスからなる可溶性タンパク質で、べん毛繊維キャップタンパク質 FliD に特異的に結合する分子シャペロンである。FliT が輸送装置構成

蛋白質の一つである FliI ATPase と特異的に相互作用することで、FliD の輸送が促進される。これまでの研究から、FliT の C 末端側の α -ヘリックスが分子スイッチのように構造変化することで、FliI ATPase との相互作用が巧みにコントロールされることを見いだしたが、その詳細な分子機構は不明であった。そこで、GST アフィニティークロマトグラフィー法を利用したプルダウン法により FliT-FliI 相互作用を詳細に解析した結果、C 末端側の α -ヘリックスが欠失した FliT94 は FliI の N 末近傍領域 (FliI_{EN}) と強く、ATPase ドメイン (FliI_{CAT}) と弱く結合すること、C 末端側の α -ヘリックスが FliI_{EN} との強い相互作用を抑制すること、輸送装置構成蛋白質である FliH の添加により FliT94 が ATP の有無に関係なく FliI から解離すること、FliD が FliT94-FliI_{CAT} 相互作用を安定化することなどを見いだした (Minamino *et al.*, *Mol. Microbiol.* 2012)。

(4) FliH-FlhA 相互作用

FliH の N 末近傍領域に存在する非常に保存された 2 つのトリプトファン残基が 6 種類の膜蛋白質からなる輸送ゲートと相互作用することが報告されているが、輸送ゲートのどのコンポーネントと相互作用するのかは不明であった。本研究では、これらのトリプトファン残基の位置に光感受性のフェニルアラニン誘導体を導入し、*in vivo* で光架橋反応を行った。その結果、これら 2 つのトリプトファン残基が輸送ゲート構成蛋白質 FlhA の近傍に位置することが判明した。さらに、遺伝学的機能解析から、FliH と FlhA の相互作用により FliI が効率よく輸送機能を発揮できることが示唆された。以上の結果から、FliH の N 末近傍領域と FlhA との相互作用を介して FliI リングが輸送ゲートに結合するというモデルを提案した (図 3) (Hara *et al.*, *J. Bacteriol.* 2012)。

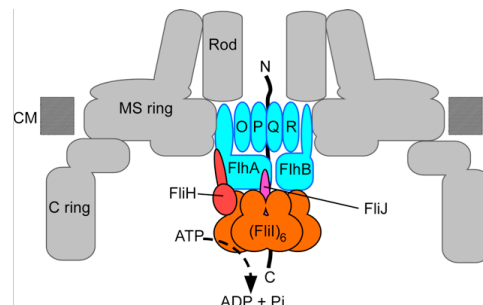


図 3. べん毛 III 型輸送装置のモデル

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 8 件)

- ① Ibuki, T., Uchida, Y., Hironaka, Y., Namba, K., Imada, K., Minamino, T. Interaction between FliJ and FlhA, components of the bacterial flagellar type III export apparatus. *J. Bacteriol.* 査読有. 195 (2013) p466-473.
- ② Hara, N., Morimoto, Y.V., Kawamoto, A., Namba, K., & *Minamino, T. Interaction of the extreme N-terminal region of FliH with FlhA is required for efficient bacterial flagellar protein export. *J. Bacteriol.* 査読有. 194 (2012) p5353-5360.
- ③ Minamino, T., Kinoshita, M., Hara, N., Takeuchi, S., Hida, A., Koya, S., Glenwright, H., Imada, K., Aldridge, P.D., & Namba, K. Interaction of a bacterial flagellar chaperone FlgN with FlhA is required for efficient export of its cognate substrates. *Mol. Microbiol.* 査読有. 83 (2012) p775-788.
- ④ Minamino, T., Kinoshita, M., Imada, K., & Namba, K. Interaction between FliI ATPase and a flagellar chaperone FliT during bacterial flagellar protein export. *Mol. Microbiol.* 査読有. 83 (2012) p168-178.
- ⑤ Minamino, T., Morimoto, Y.V., Hara, N., Namba, K. An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export. *Nat. Commun.* 査読有. 2 (2011) 475 doi: 10.1038/ncomms1488.
- ⑥ Ibuki, T., Imada, K., Minamino, T., Kato, T., Mitata, T., Namba, K. Common architecture between the flagellar type III protein export apparatus and F- and V-type ATPases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 査読有. 18 (2011) p277-282.

〔学会発表〕(計 35 件)

- ① 南野徹, 木下実紀, 今田勝巳, 難波啓一. べん毛特異的分子シャペロンと輸送ゲート構成蛋白質 FlhA との相互作用. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013. 3. 19. 幕張メッセ (千葉県・千葉市)
- ② 南野徹, 木下実紀, 原典孝, 今田勝巳, 難波啓一. 細菌べん毛特異的シャペロン FliT の C 末 α ヘリックの役割. 日本生物物理学会第 50 回年会. 2012. 9. 20. 名古屋

大学 (愛知県・名古屋市)

- ③ 南野徹. バクテリアべん毛蛋白質輸送におけるエネルギー産生機構. 第 7 回トランスポーター研究会年会. 2012. 6. 10. 京都大学農学部 (京都府・京都市)
- ④ 南野徹. バクテリアべん毛 III 型蛋白質輸送のエネルギー共役機構. 第 84 回日本生化学会大会. 2011. 9. 21. 国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- ⑤ Minamino, T. Energy transduction mechanism of bacterial flagellar type III protein export. Gordon Research Conference on Bioenergetics. 2011. 6. 27-28. Proctor Academy, New Hampshire, USA.
- ⑥ 南野徹, 木下実紀, 今田勝巳, 難波啓一. 細菌べん毛蛋白質輸送における FliI ATPase と FliT シャペロンとの相互作用. 日本生物物理学会第 48 回年会. 2010. 9. 20. 東北大学 (宮城県・仙台市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/02/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南野 徹 (MINAMINO TOHRU)
大阪大学・生命機能研究科・准教授
研究者番号: 20402293

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

木下実紀 (KINOSHITA MIKI)
大阪大学・生命機能研究科・特任研究員

森本雄祐 (MORIMOTO YUSUKE)
大阪大学・生命機能研究科・特別研究員
(2011 年 3 月まで参画)

原典孝 (HARA NORITAKA)
大阪大学・生命機能研究科・大学院生