

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570131

研究課題名(和文)細菌べん毛モーター回転方向制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the directional switching mechanism of the bacterial flagellar motor

研究代表者

宮田 知子(MIYATA, Tomoko)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：30423156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細菌は運動器官であるべん毛を反時計回り(CCW)または時計回り(CW)方向に回転させて泳ぐ。FliG, FliM, FliNからなるスイッチ複合体はCリングを形成し、べん毛の回転方向の切り替えは走化性シグナルであるリン酸化CheYが結合することによって起こる。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に、CCWまたはCWに偏った回転を示す変異体のCリング構造を極低温電子顕微鏡による単粒子解析で決定し、Cリング中のFliGの位置と配向を決定するためにラベル実験を行った。さらにリン酸化CheY結合型Cリングの構造解析も合わせて行い、回転制御機構の解明を目指す。

研究成果の概要(英文)：Many bacteria swim by reversibly rotating flagella. The switch complex consists of three switch proteins, FliG, FliM and FliN which control counter clockwise-clockwise (CCW/CW) switching of the motor rotation, form the C-ring on the cytoplasmic face of the MS ring. CheY is a response regulator in bacterial chemotaxis, and phosphorylated CheY (CheY-p) binds to FliM and changes the rotational direction from CCW to CW. We report the C ring structures locked in CCW (che deletion strain) and CW (FliG^{PAA} strain). Comparison of the two structures showed differences in the position of the C ring and the subunit arrangement in its outer wall. FliM and FliN were well fitted into the middle and lower parts of the outer ring of the C-ring, but the location of FliG remains uncertain. We report the FliG labelling experiments and the structure analysis of the CheY-p bound C ring by electron cryomicroscopy.

研究分野：構造生物学

キーワード：単粒子解析 電子顕微鏡 分子モーター

1. 研究開始当初の背景

サルモネラ菌や大腸菌などの細菌は運動器官として数本のべん毛を持ち、べん毛の根元にあるモーターの回転を反時計周り (CCW) または時計回り (CW) に切り替え直進運動と方向変換を繰り返しながらより好ましい環境へ移動する。細菌のべん毛は約 30 種類の蛋白質からなる超分子複合体で、プロペラとして働くフィラメント、回転モーターである基部体と両者をつなぐユニバーサルジョイントとしてのフックによって構成されている。基部体は細胞膜中に埋め込まれ MS リング (FliF)、ドライビングシャフトであるロッド、外膜側にある軸受けである LP リングと細胞質側にある C リングで構成されている。

C リングは 3 つのスイッチ蛋白質 (FliG, FliM, FliN) から成り、モーターの反転頻度を制御することからスイッチ複合体と呼ばれている。中でも FliM は走化性シグナル分子であるリン酸化 CheY (CheY-p) の標的分子であり、CheY-p が FliM に結合すると FliG の構造変化が引き起され回転方向が変換する。FliG はその C 末端領域に固定子である MotA と相互作用する領域を持ち、トルクの発生に関与している。また FliN はべん毛に特異的な輸送装置の一部として働くことが知られている。このように C リングはモーターの反転スイッチ、べん毛形成時の蛋白質輸送装置、そしてモーターのトルク発生装置の一部にもなる多機能な複合体である。

C リングは以前から電子顕微鏡による単粒子解析によって研究されてきた。C リングは M リングの直下にあるインナーリング (IR) とその周りを囲うアウターリング (OR) の 2 つの構造に分けられる。M リングを構成する FliF と FliG の融合変異体の C リングは野生型と大きな変化が無いことから、FliF と FliG は 26 分子からなり、FliG は M リングの直下の IR 付近に存在すると考えられている。さらに生化学的解析から FliM と FliN からなる単位構造は主に 34 回対称性を示すが、個々のモーターによって 32-36 の対称性のばらつきがあることが示されてきた。このように C リング構造は構造領域によって対称性が異なりまたモーターごとに対称性のばらつきがあることから全体での結晶化は難しく、結晶構造解析は行われていない。しかし、スイッチ蛋白質の部分、全長、一部複合体の結晶構造が行われてきた。スイッチ蛋白質の結晶構造、遺伝学的解析、並びに生化学的解析により示されたスイッチ蛋白質間の相互作用様式に電子顕微鏡による C リングの構造情報を合わせて数多くの C リングの原子モデルが提唱されているが元となる電子顕微鏡の三次元構造の分解能が低いことから決定打に欠けている状態である。

2. 研究の目的

我々はモーターの回転方向制御機構を理解するために CCW または CW 方向に回転が偏

った変異体から C リング付き基部体を精製し、電子顕微鏡による単粒子解析で C リングの構造解析を行ってきた。得られた構造の比較から CCW, CW 間での IR の位置の移動、OR の表面構造の構造変化など観察できた。しかし、構造解析に用いられた粒子数が少なすぎたため三次元構造の分解能が低く、正確にスイッチ蛋白質の結晶構造をはめ込むまでは至らなかった。

本研究ではまず更なるデータ収集を行い、解析方法の改良を加えながら分子構造の当てはめが可能となり高分解能の構造を目指した。しかし FliG が占めると考えられている領域は対称性の異なる構造がちょうど重なった領域であるため、高分解能の構造解析が困難である可能性が高かった。そこで C リング中の FliG の位置と配向を決めるためラベル体を作成し、FliG の N 末端の位置の同定を目指した。さらにモーターの回転制御切り替え時の詳細な構造情報を得るために、CheY-p の結合型の C リングの構造解析を行った。これらの結果を合わせて回転方向切り替えの段階的な構造変化を明らかにし、回転制御機構を分子レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) C リング構造の高分解能化に向けた構造解析

CCW, CW 型の C リングの高分解能構造解析に向けて液体ヘリウム温度でのデータ収集を行った。C リングの構造解析では、初めに 33-35 回対称の C リング直径を持つ三つの初期構造を用意して、C リングをその直径に基づき分類した。その後 34 回対称性に分類された MSC リング像はそれぞれ 26 回対称と 34 回対称を仮定した三次元再構成を行った。さらに OR 領域の高分解能化を目指して C リング領域だけを残すようなマスクをかけた画像を用いて三次元構造解析を行った。

(2) FliG 蛋白質の配置と配向決定に向けたラベル体の構造解析

C リング中の FliG 蛋白質の位置と配向を決めるために FliF-FliG 融合蛋白質を発現する株と FliF の C 末端領域と FliG の N 末端領域を欠失後融合された株 (FliF-FliG 欠失融合株) から基部体を精製し、構造解析を行い、これまで得てきた C リング構造と比較した。さらに FliG の N 末端に蛍光蛋白質フルオリンを融合した変異体から基部体を精製し、C リングの構造解析を行った。これらの実験により FliG 蛋白質の N 末端の位置を決定した。

(3) シグナル分子 CheY 結合型 C リングの再構成と構造解析

CheY 結合型 C リングの再構成を試みた。再構成には CheY-p と同様に作用することが知られている変異型 CheY (D13KmY106W:caCheY) を使用した。しかし CheY は分子量が 14kDa

と非常に小さいため電子顕微鏡で観察が難しいと考えられた。そこで caCheY の C 末端側に蛍光蛋白質 YFP を融合した蛋白質 (caCheY-YFP) を調整した。caCheY-YFP は CCW または CW 型の C リング付き基部体を混合した後グルタルアルデヒドで固定し、未結合の caCheY-YFP と分離するためにショ糖密度勾配遠心法で精製した。CheY 結合型基部体を含む分画は蛍光スペクトルを測定し、CheY-YFP の結合の有無を調べた。CheY 結合型基部体は氷包埋電子顕微鏡で観察し、画像解析を行い caCheY-YFP の結合位置を同定した。

4. 研究成果

(1) C リングの構造とスイッチ蛋白質のフィッティング

以前の CCW, CW 型の C リングの構造解析は約一万粒子で行われたが、分解能の向上を目指して粒子数を約 3 万と 2 万まで増やした。クラス分けの結果 3 4 回対称性に最も多くの画像が分類された (1 万 5 千と 1 万粒子)。3 4 回対称に分類された画像のみ選択し、MSC リングが残るようにマスクを掛けた後、2 6 回対称と 3 4 回対称を仮定した三次元再構成を行った。CCW と CW の間で大きな構造変化が確認された。しかし構造解析に使用された画像を確認したところ C リングと M リング間で構造に歪みを生じているものが多数含まれていた。このため粒子像を増加しても構造の高分解能にはならなかった。そこで C リング領域のみ残すマスクを掛けた後 3 4 回対称性を仮定して三次元再構成を行ったことで分解能は 18Å まで上昇した。得られた C リング構造には OR の中心付近には FliM が、また下部領域には FliN の二量体がよく当てはめることができた (Fig1)。また二状態間で FliM にわずかな傾斜の変化が確認できた。FliG に関しては現在得られている結晶構造をうまく当てはめられる領域は見つけれなかった。そこで FliG のマッピングを試みた。

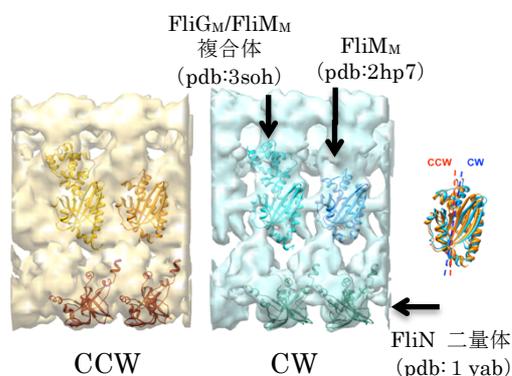


Fig.1 スイッチ蛋白質のあてはめ

(2) FliG N 末端領域のマッピング。

FliF-FliG 融合型の C リングの構造は CCW 型

の構造と大きな違いがなかった。これに対して FliF-FliG 欠失融合型の C リングは OR の直径が小さくなり、M リング側に移動し、IR に当たる密度が完全に消失した (Fig. 2a)。M リングに大きな構造変化がなかったことから IR は FliF の C 末端領域と FliG の N 末端ドメインによって構成されていると考えられた。また FliG の N 末端にフルオリンを融合した C リングの三次元構造では IR のさらに内側にフルオリン由来の付加密度が確認できた。現在の C リング構造に FliG の結晶構造を当てはめることはできなかった。しかし FliG_M/FliM_M 複合体のフィッティングの結果と合わせて考えると FliG は N 末端ドメインが IR に位置し、FliG_M は OR の IR 近傍付近に結合し、FliG の C 末端ドメインは OR の上部にあると予想された。

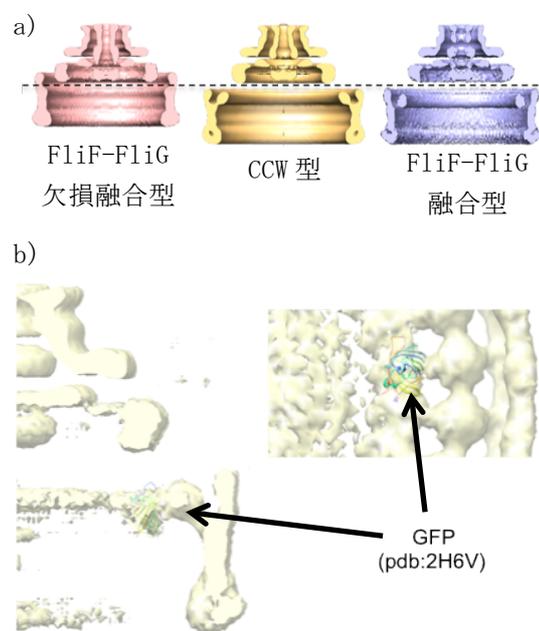


Fig.2 FliG のマッピング

a) FliF-FliG 融合型、FliF-FliG 欠損融合型 C リング構造の比較

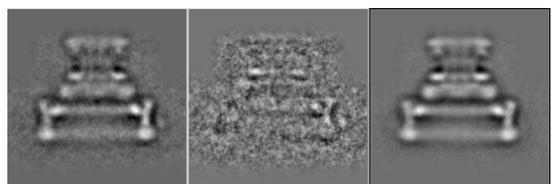
b) フルオリン結合型の C リング構造

(3) C リング上の CheY 結合位置

CheY 結合型基部体複合体再構成の条件検討の結果、caCheY は CW 型の C リングに強く結合することが蛍光スペクトルで確認された。この結果は以前大腸菌内での観察された結果とよく一致していた。得られた CheY 結合型基部体複合体の画像解析によって caCheY-YFP 由来の密度が観察できた (Fig. 3a)。この密度の位置は OR の外側、中央より下側に位置していた。この結合位置は現在の FliM のフィッティングでちょうど N 末端領域の付近にあり、FliM の N 末端領域で CheY と相互作用するのに非常に適した位置にあると思われる (Fig. 3b)。現在のところ粒子数が少ないため三次元構造解析まで

は至っていない。今後は更なるデータ収集を行いより詳細な三次元構造を得て、他の二状態の構造と比較しながらスイッチ切り替え

a)



caCheY-YFP 差マップ CW型Cリング

複合体

b)

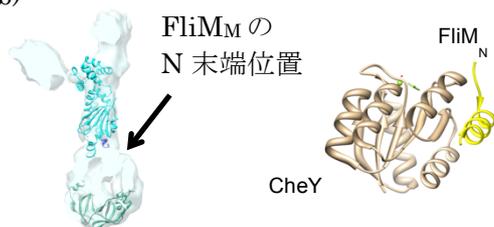


Fig.3 CheY の結合位置

a) CheY 複合体と CW 型の比較

b) FliM_M の N 末端位置と CheY/FliM_N 複合体の結晶構造

機構を解明していきたい。

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 4 件)

1. Kawamoto, A., Morimoto, Y.V., Miyata, T., Minamino, T., Hughes, K.T., Kato, T. & Namba, K. Common and distinct structural features of Salmonella injectisome and flagellar basal body. **Scientific Reports** 査読有, 3, 3369, 2013, doi:10.1038/srep03369
2. Kishikawa, J., Ibuki, T., Nakamura, S., Nakanishi, A., Minamino, T., Miyata, T., Namba, K., Konno, H., Ueno, H., Imada, K. & Yokoyama, K. Common evolutionary origin for the rotor domain of rotary ATPases and Flagellar protein export apparatus. **PLoS One** 査読有 Vol8, e64695, 2013, doi:10.1371/journal.pone.0064695
3. Cheung, M., Kajimura, N., Makino, F., Ashihara, M., Miyata, T., Kato, T., Namba, K., Blocker, A. J. A method to achieve homogeneous dispersion of large transmembrane complexes within the holes of carbon films for electron cryomicroscopy. **J. Struct. Biol.** 査読有 182(1), 51-56,

2013. doi: 10.1016/j.jsb.2013.01.004.

4. Ruan, J., Kato, T., Santini, C.-L., Miyata, T., Kawamoto, A., Zhang, W.-J., Bernadac, A., Wu, L.-F. and Namba, K. Architecture of a flagellar apparatus in the fast-swimming magnetotactic bacterium MO-1. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 査読有, 109, 20643-20648, 2012, 10.1073/pnas.1215274109.

[学会発表] (計 16 件)

1. 宮田知子. 細菌べん毛モーターの回転方向制御に関わる構造. 2014 年度べん毛研究交流会, 合歓の郷リゾートホテル (三重県志摩市), March 2, 2015.
2. Miyata, T. Structure analysis of the flagellar hook-basal body with the C ring by electron cryo-microscopy. HFSP Japan Meeting, ルスツリゾート (北海道虹田郡), February 23, 2015.
3. 宮田知子, 加藤貴之, 森本雄祐, 中村修一, 松波秀行, 難波啓一. Structure of the bacterial flagellar motor involved in the directional switching mechanism. 細菌べん毛モーターの回転方向変換制御に関わる構造. 第 52 回日本生物物理学会, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), September 26, 2014.
4. Kato, T., Terahara, N., Miyata, T., Namba, K. 低温電子顕微鏡による単粒子像解析法における GFP ラベル. GFP labeling for single particle analysis with cryoEM. 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), September 26, 2014.
5. Kawamoto, A., Morimoto, Y.V., Miyata, T., Minamino, T., Hughes, K.T., Kato, T., Namba, K. In situ structures of Salmonella injectisome and flagellar type III secretion systems by electron cryotomography. 2014 International Biophysics Congress, Brisbane Convention & Exhibition Centre, Brisbane, Australia, August 4, 2014.
6. 加藤貴之, Ruan Juanfang, 川本晃大, 宮田知子, 難波啓一. 電子線トモグラフィによる生体試料の立体構造解析. 日本農芸化学会 2014 年度大会, 明治大学生田キャンパス (神奈川県川崎市), March 30, 2014.

7. 宮田知子. Identification of a switch protein FliG in the flagellar basal body. 細菌べん毛基部体におけるスイッチ蛋白質FliGの位置と向きとの同定. 2013年度・第19回べん毛研究交流会, 県立広島大学サテライトキャンパス (広島県広島市), March 1-3, 2014.
8. Kawamoto, A., Morimoto, Y.V., Miyata, T., Minamino, T., Hughes, K.T., Kato, T., Namba, K. Common and distinct structural features of Salmonella injectisome and flagellar basal body. GRC on Sensory Transduction in Microorganisms, Ventura Beach Marriott (USA), Jan. 15, 2014.
9. Mori, K., Hiraoka, K., Morimoto, Y.V., Miyata, T., Kami-ike, N., Minamino, T., Namba, K. Functional analysis of the bacterial flagellar motor in *fliFG* fusion mutants. GRC on Sensory Transduction in Microorganisms, Ventura Beach Marriott (USA), Jan. 13-14, 2014.
10. Miyata, T., Kato, T., Morimoto, Y.V., Kawamoto, A., Matsunami, H., Namba, K. 細菌べん毛基部体中のスイッチ蛋白質 FliG の位置ならびに配向の同定. Identification of the location of the switch protein FliG in the flagella basal body. 第51回日本生物物理学会年会, 国立京都国際会館 (京都府京都市), Oct. 29, 2013.
11. 宮田知子, 加藤貴之, 藤井高志, 森本雄祐, 中村修一, 南野徹, 松波秀行, 難波啓一. 細菌べん毛モーターの回転方向変換制御機構の解明. Elucidation of the rotational switch mechanism of the bacterial flagellar motor. 日本顕微鏡学会第69回学術講演会. ホテル阪急エキスポパーク (大阪府吹田市), May 21, 2013.
12. Miyata, T., Kato, T., Fujii, T., Nakamura, S., Morimoto, Y.V., Minamino, T., Matsunami, H. and Namba, K. Structural analysis of the flagellar hook-basal body with the C ring by electron cryomicroscopy. Nagoya Symposium -Frontiers in Structural Physiology-, Nagoya University, 名古屋大学 (愛知県名古屋市) January 22-24, 2013.
13. 宮田知子, 加藤貴之, 藤井高志, 中村修一, 森本雄祐, 南野徹, 松波秀行, 難波啓一. 細菌べん毛モーター・スイッチ複合体の極低温電子顕微鏡による構造解析. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市), December 13, 2012.
14. 平岡孝一, 森本雄祐, 藤井高志, 宮田知子, 牧野文信, 南野徹, 難波啓一. サルモネラ菌べん毛ロッド蛋白質FliG 特異的配列の導入によるフックの剛直化. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市), December 11, 2012.
15. Morimoto, V. M., Kamiike, N., Miyata, T., Namba, K., Minamino, T. べん毛輸送装置近傍の局所 pH に対する FliI ATPase の効果. Effect of FliI ATPase on local pH around the bacterial flagellar protein export apparatus. 第50回日本生物物理学会年会, 名古屋大学 (愛知県名古屋市), September 23, 2012.
16. Miyata, T., Kato, T., Fujii, T., Nakamura, S., Morimoto, Y., Minamino, T., Matsunami, H., Namba, K. 細菌べん毛モーターの回転方向変換制御機構の解明. Elucidation of the directional switching mechanism of the bacterial flagellar motor. 第50回日本生物物理学会年会, 名古屋大学 (愛知県名古屋市), September 23, 2012.

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 知子 (MIYATA, Tomoko)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教

(常勤)

研究者番号 : 30423156

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

松波 秀行 (MATSUNAMI, Hideyuki)

沖縄科学技術大学院大学・細胞膜通過輸

送研究ユニット・研究員

研究者番号 : 80444511