

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570132

研究課題名(和文)細菌べん毛ロッドの構造と分子機構の解明

研究課題名(英文)Structure and mechanism of bacterial flagella rod

研究代表者

西條 由見子(濱野由見子)(SAIJO-HAMANO, Yumiko)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教

研究者番号：00444513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：細菌べん毛は高速回転(サルモネラなら300回転/秒)する生体ナノマシンである。この高速回転を支えるドライブシャフトとして機能する細菌べん毛ロッドの構造を明らかにし、生体シャフトの仕組みの解明を試みた。ロッドの主成分であるFlgGの結晶化に成功し、2オングストローム分解能での分子構造を明らかにした。得られた分子構造をポリロッドの低温電子顕微鏡像にあてはめ、FlgG同士が相互作用して作り上げるロッドの堅硬な構造の仕組みを解明した。

研究成果の概要(英文)：Bacterial flagellum is a highly efficient nano-machine rotating at high speed, 300 rpm/sec if Salmonella, in viscous environments. The rod of the bacterial flagellum acts as the drive shaft to enable the high-speed rotation. FlgG is the protein to constructs the distal rod which is a major part of the rod. We revealed the molecular model at 2 angstrom resolution of a core fragment of FlgG by X-ray crystal structure analysis. Furthermore we constructed the distal rod structure based on this FlgG model to fit to cryo-EM density map.

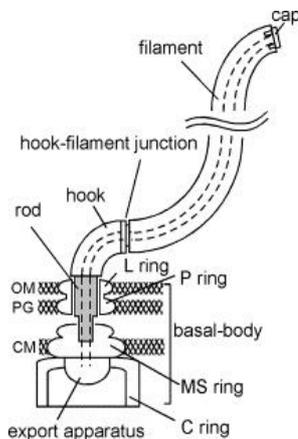
研究分野：生物物理

キーワード：結晶構造解析 細菌べん毛 ナノマシン

1. 研究開始当初の背景

細菌べん毛は約 30 種類ものタンパク質が数万個も集合して構築されている巨大な生体回転ナノマシンである。細菌は、細胞の内膜に局在しているモータによって、菌体から長く伸びた軸構造体をプロペラのように回転させて泳ぎ回る。べん毛基部体のモータで発生したトルクはペプチドグリカン層と細胞膜を貫きドライブシャフトとして機能するロッドに伝えられ、その後、細胞外のユニバーサルジョイントとして機能するフックとプロペラとして機能するフィラメントに伝えられる。フックは FlgE タンパク質のらせん重合体で、トルクをフィラメントにスムーズに伝えるために、曲げに対しては柔軟でねじれに対しては堅い構造をしており、回転に応じて連続的に構造を変化させる。フィラメントは FliC タンパク質(フラジェリン)のらせん重合体で、ゆるやかな超らせんを形成しており、推進力を発生するための剛性と、モータの反転運動に応じて超らせん構造の形態を変換させる柔軟性を併せ持っている。力学的特性の異なるフックとフィラメントはカップリングジョイントタンパク質 FlgK と FlgL を介してスムーズに連結している。(Samatey et al. 2001, Nature, Samatey et al. 2004, Nature, Arkhipov et al. 2006, Biophys J., Kitao et al. 2006, Proc Natl Acad Sci U S A., Furuta et al. 2007, J Struct Biol.)

フックやフィラメントが一種類のタンパク質からなる比較的単純ならせん構造体であるのに対し、軸構造体の最もロータに近いところに位置するロッドは、分子量の小さい FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, FliE と五種類ものタンパク質で構成されている(図1)。基部体内から伸びてペプチドグリカン層と細胞膜を貫くロッドは、強いねじれの力を受ける部分であるにもかかわらず、フィラメントやフックに比べて非常に細くて短い軸であることが電子顕微鏡観察によって分かっている。ロッドの LP リングを貫通している部分は FlgG のみで構成されているディスタルロッド(または FlgG ロッド)と呼ばれる。ディスタルロッドとロッドのペアリングとして機能する LP リングとの間にはナノスケールでコントロー



(図1) 細菌べん毛の模式図。陰の部分がロッド

ルされた一分間に二万回転もの高速回転を可能にする潤滑機構が備わっており、生体ナノマシンが備える高性能潤滑機構として非常に注目度が高い。生体試料の取扱いの困難さからフィラメントやフックに比べて遅々として構造解析研究が進まなかったロッドであるが、数年前に野生株よりも数倍長いディスタルロッドをもつポリロッド変異株が発見されたのをきっかけにクライオ電子顕微鏡法によるディスタルロッドの解析が行われ 7 分解能像が得られている(Fujii et al, unpublished data)。ディスタルロッドと MS リングの間に FlgF, FlgC, FlgB で構成されているプロキシマルロッドがあると考えられているが、具体的な構造や構成タンパク質の局在性については明らかになっていない。

2. 研究の目的

細菌べん毛ロッドの構造解析を行い、ロッドの『強いねじれの力に耐えながらロータからフックにトルクを伝える機構』と『べん毛の高速回転を可能にする高性能潤滑機構』の解明を目指した。

3. 研究の方法

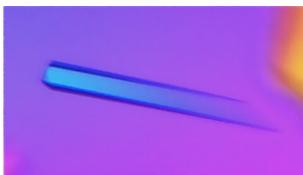
(1) ロッドタンパク質の X 線結晶構造解析。
FlgG, FlgF, FlgC, FlgB, FliE の X 線結晶構造解析を行い、結晶構造をもとにロッドを再構築してロッドの構造を明らかにする。また、ディスタルロッドについてはすでにクライオ電子顕微鏡像が得られているので、FlgG の結晶構造が解明されれば、クライオ電子顕微鏡像に当てはめてディスタルロッドの分子レベルでの構造を明らかにする。各ロッドタンパク質の X 線結晶構造解析を目指して、結晶化試料を作製し、結晶化スクリーニングを行う。

(2) ロッドタンパク質の局在性の解明
FlgB, FlgC, FlgF, FlgG 欠損株から基部体を精製し、電子顕微鏡観察と SDS-PAGE 解析でロッドのどの部分が形成されているかを同定する。

4. 研究成果

(1) FlgG コア領域の精製と結晶化と構造解析
ロッドの主要部分であるディスタルロッドを構成する FlgG タンパク質のコア領域の結晶化に成功した。水溶液中での全長 FlgG は N 末端領域と C 末端領域が適切に折り畳まれている構造をしていないためにアミロイド様繊維を形成しやすく、結晶化試料としては全く適さないものであった(Saijo-Hamano et al. 2004, J. Mol. Biol.). そこで、折り畳まれている領域を欠損させた FlgG コア領域(FlgG47-227)の発現プラスミドを作製し、大腸菌発現系を利用して大量合成した。大量

合成した FlgG47-227 をアフィニティークロマトグラフィーと二回のイオン交換クロマトグラフィーで精製し、これを濃縮して結晶化用試料とした。最初に 2880 条件で結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、PEG と PEGMME を沈殿剤にした溶液の針状結晶ができた。さらにこの条件を基にして結晶化条件の最適化を行ったところ、PEGMME を使った条件でニードル結晶を得ることができた。同時進行で作製していたセレノメチオニン結晶も同条件で得ることができた。これらの結晶の回折実験を SPring-8 の BL41XU で行ったところ、非常に良質の回折データを収集することができた。これらの成果は Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. に発表した。このときに使用した結晶の写真 (図 2) は同雑誌の世界結晶年 (IYCr2014) を記念した新年号の表紙写真 (図 3) に採用された。



(図 2) FlgG47-227 の結晶



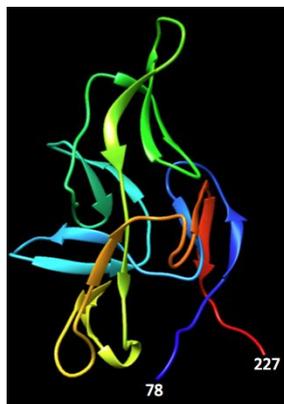
(図 3) Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2014, F70, part 1 の表紙写真 (左) と社説 (右)

(2) FlgG コア領域の分子構造

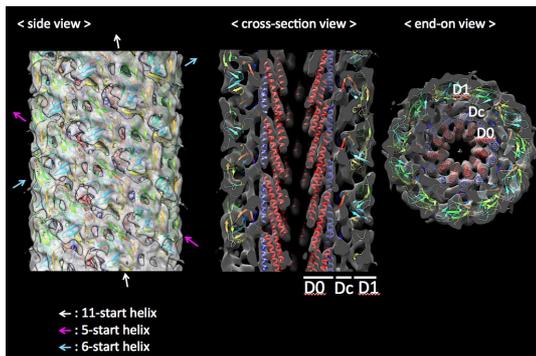
(1) で得られた回折データから 2 分解能での FlgG47-227 の分子構造を明らかにした (図 4)。電子密度マップから構築された分子構造 Val72-Ala227 は N 末端側が折り畳まれておらず、構造的に妥当だと考えられたのは Glu83-Ala227 領域だった。この領域は以前生化学実験によって決定されたコア領域領域 (Saijo-Hamano et al. 2004, J.Mol.Biol.) と同じであった。

(3) ディスタルロッドの構造

FlgG コア領域の分子構造をポリロッドのクライオ電子顕微鏡像 (Fujii et al. unpublished) に当てはめ、ディスタルロッドの分子構造を明らかにした (図 5)。この作業により FlgG の Asn24-Ser82 以外の分子構造が明らかになった。



(図 4) FlgG コア領域の分子構造。レインボーリボンモデルで表記

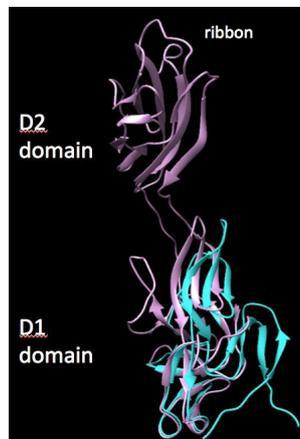


(図 5) ディスタルロッドの分子構造。

この解析から FlgG は隣り合う分子同士が D1 ドメインの 11 スタートヘリックス方向 (図 5 左図白矢印) と 5 スタートヘリックス方向 (図 5 左図ピンク矢印) に強く相互作用していること、D0 ドメインの N 末端が下の FlgG 分子と相互作用していることがわかり、ロッドが堅硬な構造を形成していることがさかった。この堅硬な構造が強いねじれに耐えながらロータからフックにトルクを伝える機構の最も重要な要素であると考えられる。

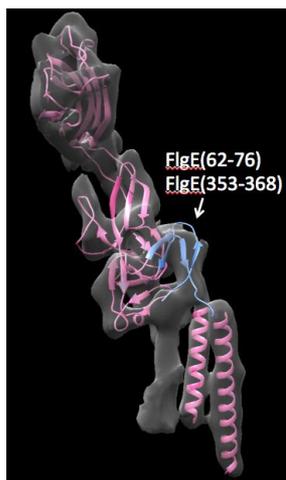
(4) FlgG と FlgE の比較と FlgG をモデルにした FlgE の分子構造の補完

FlgG とフックを構成する FlgE の D0D1 ドメインのアミノ酸配列は相同性が極めて高く、構造の相同性も高いであろうと予測されていた。実際に FlgG と FlgE の分子構造を重ね合わせてみるとほぼ同じで、FlgG を基準にする



(図 6) FlgG (青) と FlgE (紫) の重ね合わせ図。

と FlgE が少し傾いているような構造であることがわかった(図6)。この重ね合わせ解析から FlgE の未同定部分だった Asp62-Ile76 と Gly353-Ser368 を FlgG の Gln83-Ile98 と Gly212-Ala227 の分子構造を補完することができ(図7)。今後のべん毛軸タンパク質の研究に非常に役立つ情報を得た。



(図7) 新たな FlgE の分子構造。

(6) FlgF、FlgC、FlgB の結晶化

FlgG とアミノ酸配列の相同性の高い FlgF については、FlgG 結晶化の成功例を踏まえて、FlgF の NC 両末端領域を欠損させた結晶化用試料を作製し、結晶化スクリーニングを進めている。可溶性が特に低い FlgC と FlgB の結晶化用試料については、結晶化実績のあるタンパク質と融合させて結晶化する方針で、こちらも進行中である。

(7) ロッドタンパク質欠損株の解析

FlgB、FlgC、FlgF、FlgG 欠損株から基部分を精製し、電子顕微鏡観察と SDS-PAGE 解析でロッドのどの部分が形成されているかを解析した結果、どのロッドタンパク質が欠けてもロッドは形成されないことが明らかになった。この結果からロッドの形成には四種のロッドタンパク質の相互作用が非常に重要であることが示唆された。

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)

Hirade Y, Kotoku N, Terasaka K, Saijo-Hamano Y, Fukumoto A, Mizukami H. FEBS Lett. 2015 Jul 8;589(15):1778-1786. doi: 10.1016/j.febslet.2015.05.010. 査読有

Fukumura T, Furukawa Y, Kawaguchi T, Saijo-Hamano Y, Namba K, Imada K, Minamino T. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun. 2014 Sep;70(Pt 9):1215-8. doi: 10.1107/S2053230X14014678. 査読

有

Woon AP, Tohidpour A, Alonso H, Saijo-Hamano Y, Kwok T, Roujeinikova A. PLoS One. 2013 Nov 1;8(11):e79367. doi: 10.1371/journal.pone.0079367.

査読有

Saijo-Hamano Y, Matsunami H, Namba K, Imada K. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2013 May 1;69(Pt 5):547-50.

doi:10.1107/S1744309113008075. 査読有

[学会発表](計 5 件)

細菌べん毛ディスタルロッドの構造と力学的特性 西條由見子、今田勝巳、松波秀行、藤井高志、難波啓一 2013年12月5日 第36回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド(兵庫県) 細菌べん毛ディスタルロッドの構造解析 (High-resolution structure of the bacterial flagellar distal rod) 西條由見子、今田勝巳、松波秀行、藤井高志、難波啓一 2013年10月28日 第51回日本生物物理学会年会 国立京都国際会館(京都府)

サルモネラ菌べん毛ロッドタンパク質 FlgG のコア領域の X 線結晶構造解析 西條由見子 2013年3月5日 2012年度べん毛研究交流会 喜びの宿しん喜(群馬県)

細菌べん毛ロッドタンパク質の結晶化(アミロイド化させずに結晶化させる) 西條由見子、松波秀行、難波啓一、今田勝巳 2012年12月13日 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)

細菌べん毛ロッドタンパク質の結晶化の試み-アミロイド化させずに結晶化させる- 西條由見子 2012年9月3日 第三回生命機能研究会 兵衛向陽閣(兵庫県) 招待講演

[その他]

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西條 由見子 (SAIJO-HAMANO, Yumiko)
大阪大学・大学院生命機能研究科・特任助教

研究者番号：00444513

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

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：4 0 3 4 6 1 4 3

加藤 貴之 (KATO, Takayuki)
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
研究者番号：2 0 4 2 3 1 5 5