

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657087

研究課題名(和文) エネルギー変換ユニットの活性を制御する動的構造変換

研究課題名(英文) Dynamic conformational changes that regulate the energy-converting unit

研究代表者

小嶋 誠司 (Kojima, Seiji)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70420362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：細菌べん毛モーターにおいてエネルギー変換を担う固定子PomA/PomB複合体は、回転子周囲の適切な場所に配置されて機能する。このとき、PomBのペリプラズム領域に構造変化が生じて固定され、同時にイオン透過能が活性化すると考えられている。本研究では精製固定子をリボソーム上に再構成し、蛍光プローブを用いて構造変化を検出することを目標とした。結果として構造変化検出には至らなかったが、固定子の大量精製を再現性良く行えるようになり、リボソームへの再構成条件を網羅的に検討できるようになった。またジスルフィド架橋実験により、構造変化部位をある程度特定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The PomA/PomB complex, that functions as an energy-converting stator unit in the bacterial flagellar motor, becomes functional when installed into the appropriate place around the rotor. In the functional stator, it is believed that a conformational change in the periplasmic region of PomB is induced to anchor it and simultaneously to activate ion conduction activity of the stator. This study aims to detect such a conformational change using the fluorescent probe and the purified PomA/B complex reconstituted into the liposome. We are still on the way to establish the analyzing system, but we greatly improved the overproduction and purification procedure for the PomA/B complex, so that we could systematically screen conditions to reconstitute the functional stator complex to the liposome. We also succeeded in narrowing down the region where the conformational change occurs, by using the systematic disulfide bridge formation analysis.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：細菌べん毛 モーター 膜タンパク質 構造変化

1. 研究開始当初の背景

細菌のべん毛モーターは回転子と固定子で形成され、細胞膜を介したイオン(H^+ または Na^+)の電気化学的勾配を用いて回転する。固定子内をイオンが透過する際に起こる回転子-固定子間相互作用によってトルク(回転力)が発生すると考えられている。機能的なモーターの構築は、最終的に複数の固定子が回転子周囲の適切な場所に配置されて完成する。固定子は回転子周囲に集合して固定され、安定でスムーズな回転を生み出すと長い間考えられていたが、GFPを融合させた固定子複合体の細胞内動態をFRAP法により詳細に解析すると、実際はダイナミックにモーターから解離し入れ替わることが明らかになった。更に我々のグループで、共役イオンの濃度変化に応じて固定子のモーターへの集合が変化することも明らかとなった。一方で、固定子を細胞膜上に大量発現しても過剰なイオン透過による菌の生育阻害が起きないことから、固定子のイオン透過能は、回転子の周囲に集合し固定されて初めて活性化すると考えられる。我々は固定子のペリプラズム領域の結晶構造解析から、モーターへの集合に伴う固定子のイオン透過能活性化には、この領域における大きな構造変化が関係することを示唆する結果を得た。以上のことから、従来の静的な固定子のイメージを排し、集合・解離に伴いイオン透過活性を変化させる動的な固定子の実態を明らかにすることが、モーターの回転メカニズムを考える上で重要な課題として浮かび上がってきた。

2. 研究の目的

固定子がモーター内でエネルギー変換ユニットとして機能するためには、回転子周囲に固定されイオン透過能の高い構造に変化しなければならない。結晶構造を基盤とした機能解析は、この機能活性化に伴う構造変化が、固定子のペリプラズム領域に誘起される可能性を示唆している。しかし、こうした構造変化が実際に起こるのかどうかは検証されていない。そこで本研究では、この構造変化の検出を、局所環境変化によって蛍光強度を変化させる蛍光プローブを用いて、リアルタイムで検出することを目標とした。

3. 研究の方法

大腸菌の発現系を利用し、ビブリオ菌の Na^+ 駆動型 PomA/PomB 固定子を大量発現・精製する。続いて精製標品に対し、PomB ペリプラズム領域の結晶構造から予測される構造変化部位に、局所環境変化により蛍光強度を変化させるプローブを部位特異的に導入した後、リポソーム上に再構成する。もしも構造変化が誘起されるならば、プローブの発する蛍光強度の変化で検出が可能である。プロ

ープの導入位置や蛍光強度変化を詳細に解析し、予測された構造変化が起きているかどうかを検証する。また、様々な条件下、特に構造変化のトリガーと予測されるリガンド・相互作用因子存在下での構造変化検出も行う。

4. 研究成果

(1) Na^+ 駆動型固定子複合体の大量精製

本研究を成功させるには、まず PomA/PomB 固定子複合体を精製し、機能的に人工膜小胞(リポソーム)に再構成しなければならない。まず我々は T7 プロモーターを用いた大腸菌の大量発現系を構築し、細胞膜上への大量発現・膜からの可溶化(界面活性剤に Cymal-5 を用いる)、Ni-NTA カラムによる精製を行った。この系ではかるうじて PomB が SDS-PAGE 後のクマシー染色で可視化できる程度の量しか、最終標品として得ることができなかった。また、大腸菌の脂質を用いてリポソームへの再構成を行い、アイソトープ ^{22}Na を用いて Na^+ の透過能を測定する系を立ち上げた。しかし、この実験では1回だけしか Na^+ 透過を検出できず、非常に再現性が低かった。

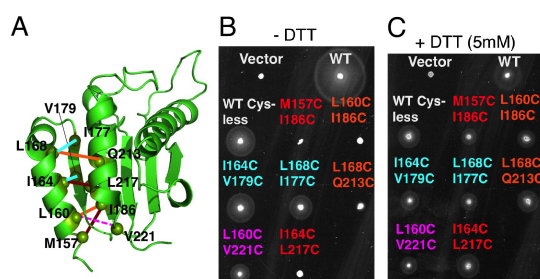
そこで、まず精製方法を再検討し、より多くの精製標品を得られるよう改良を行った。大量発現系を見直し、低温で発現を誘導する pCold ベクターを用いることで、誘導後に全細胞サンプルで明らかにバンドが確認できる程度まで発現量を上げることに成功した。さらに可溶化 PomA/B 複合体のカラム吸着および洗浄条件を再検討し、短時間で比較的純度の高い精製標品を、再現性良く得ることができるようになった。

(2) 固定子複合体のリポソームへの再構成

固定子の精製標品が比較的容易かつ十分な量を得ることができるようになったので、得られた標品を用いて、リポソームへの再構成の条件検討をシステマティックに行った。そこで我々は、他の輸送体において成功例の多い、脂質と界面活性剤が混合したリポソームを用いる方法に着目した。この方法では、脂質混合リポソームの形成具合を溶液の吸光度により検出できるため、この指標をもとに条件検討が行える。様々な界面活性剤について、濃度を変化させて再構成条件を探った結果、Cymal-5 を用いた場合に比較的高い確率で、順方向に固定子が再構成されたプロテオリポソームを得ることが出来ることが分かってきた。しかし残念ながら、この再構成リポソームを用いても、 ^{22}Na によるイオン透過活性の検出には今のところ成功していない。機能を保持した状態での再構成には、更なる条件検討が必要である。このような状況のため、蛍光プローブを導入する以前の段階で足踏みをしており、平成25年度中には目標の構造変化検出には至らなかった。

(3) ジスルフィド架橋による PomB のペリプラズム側構造変化モデルの検証

再構成実験の前に、構造変化の部位をある程度特定することを目的として、大きな構造変化が予想される PomB のペリプラズム領域 (PomB_C) にジスルフィド架橋 (M157C-I186C) を導入したところ、固定子の機能 (モーターの回転) が架橋に依存して阻害されることを見いだした。つまり、構造変化が阻害されると、モーターは回転できなくなると考えられる。そこで、この領域の架橋組み合わせをシステムティックにデザインして試し、どの部分が構造変化をしているのか、詳細に検討を行った (下図)。



(図: A; PomB_C において分子内架橋を行った残基; B; 還元剤の非存在下では架橋が起こり運動能が阻害される組み合わせが現れた (ex, M157C-I186C); C; 還元剤の存在下では、架橋が切断され、運動能が回復する)

その結果、モーターへの集合時において、PomB_C の N 末端ヘリックス((1)の 3分の2が伸びた構造に変化し、それに伴ってペプチドグリカン結合(PGB)ドメインが細胞壁に固定されることで、活性化固定子の機能的集合が完成するというモデルを提唱するに至った (論文投稿中)。以上のことから、機能に必要な構造変化が実際におきている可能性は高いと考えており、本研究で目指している検出実験で、実際の構造変化を捉えることが出来るのではないかと期待している。

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)

Zhu S, Homma M, Kojima S. Intragenic suppressor of a plug deletion nonmotility mutation in PotB, a chimeric stator protein of sodium-driven flagella. *J. Bacteriol.* (2012) 194, 6728-6735.

Gohara M, Kobayashi S, Abe-Yoshizumi R, Nonoyama N, Kojima S, Asami Y and Homma M. Biophysical characterization of the C-terminal region of FliG, an essential rotor component of the Na⁺ driven flagellar motor. *J. Biochem.*

(2014) 155, 83-89.

Onoue Y, Abe-Yoshizumi R, Gohara M, Kobayashi S, Nishioka N, Kojima S, Homma M. Construction of functional fragments of the cytoplasmic loop with the C-terminal region of PomA, a stator component of the *Vibrio* Na⁺ driven flagellar motor. *J. Biochem.* (2014) 155, 207-216.

Takekawa N, Kojima S, Homma M. Contribution of many charged residues at the stator-rotor interface of the Na⁺-driven flagellar motor to torque generation in *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* (2014) 196, 1377-1385.

[学会発表](計7件)

Seiji Kojima, Structure and function of the periplasmic region of the bacterial flagellar stator protein PomB. Gordon Research Conference "Bacterial Cell Surfaces", 2012年6月24日~2012年6月29日, Mount Snow Resort, West Dover, VT, USA.

小嶋誠司、細菌べん毛運動マシナリー：機能的固定子複合体の集合と活性化、第85回日本生化学会大会、2012年12月15日、福岡国際会議場 (招待講演)

小嶋誠司、細菌べん毛の構築と機能を制御するしくみ、第86回日本細菌学会総会、2013年3月19日、幕張メッセ国際会議場 (招待講演)

小嶋誠司、Na⁺駆動型べん毛モーター固定子タンパク質 PomB の機能に重要なペリプラズム側構造変化の解析、第77回日本生化学会中部支部会、2013年5月25日、名古屋大学・坂田平田ホール

Seiji Kojima, Structure-function analyses of the large conformational change required for the stator activation and assembly in the bacterial flagellar motor. 8th Asian Biophysics Association Symposium, 2013年5月26日~2013年5月29日、Ramada Plaza Hotel, Jeju, Korea

Seiji Kojima, Assembly-coupled activation mechanism of the Na⁺-driven stator complex. Gordon Research Conference "Sensory Transduction in Microorganisms", 2014年1月14日、Ventura Beach Marriott, Ventura, CA, USA. (招待講演)

小嶋誠司、Na⁺駆動型細菌べん毛モーター固定子の機能的集合と構造変化、2013年度生物物理学学会中部支部会、2014年3月6日、岡崎カンファレンスセンター

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋 誠司 (Kojima Seiji)
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：70420362

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

本間 道夫 (Homma Michio)
名古屋大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：50209342