

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：24657099

研究課題名(和文) NMRを用いたべん毛モータータンパク質の構造動態の挑戦的解析

研究課題名(英文) Analysis of the structural dynamics of the flagellar motor proteins using NMR

研究代表者

本間 道夫 (Homma, Michio)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50209342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：プロトン駆動型べん毛モーターと比較して、ナトリウム駆動型べん毛モーターにおいても、回転力産生に重要な残基はFliGのC末端領域にあると考えられているが、保存荷電残基だけではクリティカルな結果が得られなかった事から、ダイレクトに相互作用に関与している重要残基の特定は遅れている。そこで本研究では、これまで直接示されていなかった回転子-固定子間の相互作用の検出だけでなく、そのときに重要な相互作用残基を特定するため、NMRを用いた構造決定を行った。FliGのC末端領域については95%の構造決定を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：Compared with the proton-driven flagellar motor, it is believed that even in the sodium-driven flagellar motor, the C-terminal region of a rotor component FliG has important residues to produce the rotational force, however, the conserved charged residues did not give a critical result in sodium-driven motor. It has not been clarified to identify the key residues involved in the interaction directly between the residues of rotor and stator. In this study, the structure of C-terminal region of FliG was determined at 95% using NMR to show the interaction with the rotor directly and to assign the important interaction residues of FliG.

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：べん毛 NMR タンパク質の構造

1. 研究開始当初の背景

申請者は、Na⁺駆動型べん毛モーター研究をリードして、イオンとモーターの回転機構の解明に向け実績を重ねていた。その中で、これまでに思いもよらなかったダイナミックな構造変化と、共役イオンに依存したモーター構成部位の集合の様相が発見された。また、これまで、全く手がつけられていなかったイオン透過経路と荷電残基の役割を明らかにする手掛かりも得られていた。さらに、本研究開始の直前に雑誌「Nature」に構造の報告がされ、回転子タンパク質 FliG がダイナミックな構造変化を起こすことが予測されていた。べん毛モーターのエネルギー変化に重要な部分である回転子および固定子ともにダイナミックな構造変換が機能発現に重要であるという事実が明らかにされつつあった。

2. 研究の目的

MotA 細胞質領域と FliG-C 末端領域の荷電アミノ酸残基を介した静電的相互作用によってべん毛の回転力が生み出されるとするモデルが米国のグループによって提唱され、生化学の教科書に引用されている。しかしながら、分子機構については全く理解が進んでいない。これを打破する為には、ダイナミックな構造変換が予想されている MotA と FliG タンパク質について、漠然とした構造変換ということだけでなく、結晶構造を基盤に NMR や熱測定などを行い、タンパク質の物理化学的性質を明らかにしなくてはならない。最も有効だと思われる NMR による動的な構造解析が、生物機能の理解に必ずしも、現在、有効に利用されているとは言い難い。申請者は、生物学者の立場から NMR を用いてモータータンパク質の動的な性質を構造基盤に基づいて解析し、エネルギー変換機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 膜モーター固定子・回転子タンパク質の調製：厳密に発現をコントロールできるベクターを用い、培養条件に細心の注意を払うことにより PomA, PomB, FliG の十分なタンパク質量の確保を目指す。

2) 膜モーター回転子タンパク質の構造解析：回転子タンパク質 FliG をドメインに分割して、安定同位体標識して、NMR による構造決定を行う。

3) 熱測定による FliG と PomA の構造解析：FliG と PomA の全長構造および部分構造を大量調製して、示差走査熱量測定 (DSC) を行い NMR 構造解析の結果を補完する。

4) NMR による PomA-FliG 間の相互作用の検討：生可溶化した PomA 細胞質領域を加えて、タイトレーション実験をすることで FliG の相互作用部位を特定する。

5) 生化学手法による PomA-FliG 間の相互作用の検討：精製したタンパク質を用いて、ジスルフィド架橋 (S-S 結合) の検出、FRET、

ピアコアなどを用いた生化学手法による相互作用検出を行う。

4. 研究成果

プロトン駆動型べん毛モーターと比較して、ナトリウム駆動型べん毛モーターにおいても、回転力産生に重要な残基は FliG の C 末端領域にあると考えられている。しかし、保存荷電残基だけではクリティカルな結果が得られなかったことから、ダイレクトに相互作用に参与している重要残基の特定は遅れている。そこで本研究では、これまで直接示されていなかった回転子-固定子間の相互作用の検出だけでなく、そのときに重要な相互作用残基を特定するた NMR を用いた構造決定を行った。FliG の C 末端領域を含むようなりコンビナントタンパク質を作成し、NMR 測定の基本情報である ¹H-¹⁵N TROSY-HSQC を測定し、測定条件の検討を行った。最終的に His-Tag を切断した FliGc を調製し、主鎖の連鎖帰属を進めて、95% の主鎖の帰属に成功した。PomA と FliG との相互作用の検出も試みたが、残念ながら、直接的な相互作用は検出できなかった。

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 3件)

- (1) Biophysical characterization of the C-terminal region of FliG, an essential rotor component of the Na⁺ driven flagellar motor Mizuki Gohara, Shiori Kobayashi, Rei Abe-Yoshizumi, Natsumi Nonoyama, Seiji Kojima, Yasuo Asami and Michio Homma. *J Biochem.*, 155(2)83-9(2014) 査読有
doi: 10.1093/jb/mvt100
- (2) 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 Yasuhiro Onoue, Rei Abe-Yoshizumi, Mizuki Gohara, Shiori Kobayashi, Noriko Nishioka, Seiji Kojima and Michio Homma *J Biochem.* 155(3)207-16(2014) 査読有
doi: 10.1093/jb/mvt115
- (3) Expression, purification and biochemical characterization of the cytoplasmic loop of PomA, a stator component of the Na⁺ driven flagellar motor Rei Abe-Yoshizumi, Shiori Kobayashi, Mizuki Gohara, Kokoro Hayashi, Chojiro Kojima, Seiji Kojima, Yuki Sudo, Yasuo Asami and Michio Homma *BIOPHYSICS*, 9:21-29(2013) 査読有
doi: 10.2142/biophysics.9.21

〔学会発表〕(計 15 件)

- (1) 竹川宜宏、郷原瑞樹、小嶋誠司、本間道夫「高度好熱性バクテリア *Aquifex aeolicus* 由来のべん毛モーター固定子タンパク質の機能と精製系の確立」平成 25 年度生物物理学学会中部支部総会、岡崎コンファレンスセンター(愛知県)2014.3.6
- (2) 山口絵里花、小嶋誠司、本間道夫「海洋性ピブリオ菌回転子の MS リング単離精製方法の検討」平成 25 年度生物物理学学会中部支部総会、岡崎コンファレンスセンター(愛知県)2014.3.6
- (3) 竹川宜宏、郷原瑞樹、小嶋誠司、本間道夫「高度好熱菌 *Aquifex aeolicus* の固定子の機能解析と精製」第 19 回べん毛研究交流会、県立広島大サテライトキャンパス(広島県)2014.3.3
- (4) 郷原瑞樹、竹川宜弘、小嶋誠司、本間道夫「ピブリオ菌べん毛モータータンパク質 PomA および PomAB 複合体の物理化学性状」第 19 回べん毛研究交流会、県立広島大サテライトキャンパス(広島県)2014.3.1
- (5) 山口絵里花、小嶋誠司、本間道夫「*Vibrio alginolyticus* のべん毛回転子 MS リング構成タンパク質 FliF の構造形成解析」第 19 回べん毛研究交流会、県立広島大サテライトキャンパス(広島県)2014.3.1
- (6) Norihiro Takekawa, Seiji Kojima, Michio Homma 「Functional and biochemical analysis of the flagellar stator proteins from *Aquifex aeolicus*」Gordon Research Conference “Sensory Transduction in Microorganisms” Ventura Beach Marriott (Ventura, CA, USA)
- (7) 竹川宜宏、郷原瑞樹、小嶋誠司、本間道夫「好熱性細菌 *Aquifex aeolicus* のべん毛モーター固定子の大量発現・精製系の確立と機能解析」日本生体エネルギー研究会第 39 回討論会、静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ(静岡県)2013.12.19
- (8) 郷原瑞樹、竹川宜弘、小嶋誠司、本間道夫「ピブリオ菌のべん毛固定子タンパク質 PomA 単独による、複合体形成の可能性」日本生体エネルギー研究会第 39 回討論会、静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ(静岡県)2013.12.19
- (9) Norihiro Takekawa, Mizuki Gohara, Seiji Kojima, Michio Homma 「Characterization of the stator proteins of flagellar motor from extreme thermophile *Aquifex aeolicus*」第 51 回日本生物物理学学会、国立京都国際会館(京都府)2013.10.30
- (10) Mizuki Gohara, Norihiro Takekawa, Yohei Miyanoiri, Masatsune Kainosho, Seiji Kojima, Michio Homma 「Flagellar stator protein of *Vibrio* PomA alone could form multimeric complex」第 51 回日本生物物理学学会、国立京都国際会館(京都府)2013.10.30
- (11) 郷原瑞樹、吉住玲、小林詩織、宮ノ入洋平、服部良和、児嶋長次郎、甲斐荘正恒、本間道夫 「The trial of investigation of the interaction between FliG and PomA fragments by solution NMR」2012 年度生物物理学学会中部支部講演会、名古屋大学(愛知県)2013.2.19
- (12) Mizuki Gohara, Rei Abe-Yoshizumi, Shiori Kobayashi, Yohei Miyanoiri, Yoshikazu Hattori, Chojiro Kojima, Masatsune Kainosho, Michio Homma 「Attempt to investigate the interaction between the rotor and the stator by using solution NMR」BLAST XII, Hilton Tucson East(Tucson, AZ, USA)2013.1.21
- (13) 郷原瑞樹、吉住玲、小林詩織、宮ノ入洋平、服部良和、児嶋長次郎、甲斐荘正恒、本間道夫 「溶液 NMR を用いた Na⁺-駆動型べん毛モーターの固定子一回転子間相互作用検出」日本生体エネルギー研究会第 38 回討論会、岡山大学(岡山県)2012.12.23
- (14) Mizuki Gohara¹, Rei Abe-Yoshizumi, Shiori Kobayashi, Yohei Miyanoiri, Yoshikazu Hattori, Chojiro Kojima, Masatsune Kainosho, Michio Homma 「Solution NMR analysis of FliG C-terminal domain derived from Na⁺-driven motor of *Vibrio*」第 50 回日本生物物理学学会年会、名古屋大学(愛知県)2012.9.22
- (15) 郷原瑞樹、吉住玲、小林詩織、宮ノ入洋平、服部良一、児嶋長次郎、甲斐荘正恒、本間道夫 「べん毛モーター回転子タンパク質 FliG の C 末端領域の NMR 解析」第 76 回日本生化学会中部支部例会、岡崎コンファレンスセンター(愛知県)2012.5.26

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻
超分子機能学講座 生体膜機能グループ
<http://bunshi4.bio.nagoya-u.ac.jp/%7ebunshi4/fourth.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宮ノ入 洋平 (YOHEI MIYANOIRI)
名古屋大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：80547521

児嶋 長次郎 (CHOJIRO KOJIMA)
大阪大学・たんぱく質研究所・准教授
研究者番号：50333563