

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293097

研究課題名(和文)バクテリアべん毛輸送装置のエネルギー変換システムの分子基盤

研究課題名(英文)Energy transduction mechanism of the bacterial flagellar protein export apparatus

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：20402993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリアべん毛蛋白質輸送装置は6種類の膜蛋白質からなる輸送ゲート複合体と3種類の細胞質性蛋白質からなるATPase複合体から構成される。輸送装置は、ATPおよび細胞膜を横切るプロトン駆動力をエネルギーとして利用し、細胞内からべん毛構成蛋白質を細胞外へ輸送するが、そのエネルギー変換の仕組みは不明であった。本研究では、輸送装置がATPの消費を最小限に抑えつつ、プロトン駆動力を使って高速にかつ高効率にべん毛蛋白質を輸送すること、輸送ゲート蛋白質FlhAがイオンチャンネルとして働くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The bacterial flagellar protein export apparatus, which consists of an export gate complex made of five transmembrane proteins and a cytoplasmic ATPase composed of three cytoplasmic proteins, utilizes ATP and proton motive force across the cytoplasmic membrane as the energy source to drive flagellar protein export. To clarify the energy transduction mechanism of the export apparatus, we have shown that the flagellar export apparatus is a fuel-efficient export engine that can save ATP consumption for the enormous amount of protein export for flagellar assembly and that FlhA acts as an ion channel of the export gate complex to couple the proton flow with protein transport.

研究分野：分子生物学・生物物理学

キーワード：電子顕微鏡 遺伝学 遺伝学 細菌 蛋白質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

べん毛は約30種類の蛋白質からなる生体超分子ナノマシンで、回転モーターとして機能する基部体、ユニバーサルジョイントとして働くフック、らせん型プロペラである繊維の、少なくとも3つの部分構造からなる。べん毛の構築は、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。べん毛の基部にある独自の蛋白質輸送装置は、FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ, FliR と呼ばれる6種類の膜蛋白質からなる輸送ゲート複合体と FliH, FliI, FliJ の3種類の可溶性蛋白質からなる ATPase 複合体から構成される。輸送装置は ATP および細胞膜を横切るプロトン駆動力をエネルギーに用い、べん毛蛋白質をべん毛中心を貫通する細長いチャネルの中へ、そして先端へと輸送する。しかしながら、輸送装置がこれらのエネルギーをどのように利用するのか不明であった。

### 2. 研究の目的

遺伝学および生化学的手法を駆使し、ATPase 複合体および輸送ゲート蛋白質 FlhA を中心とする蛋白質相互作用ネットワークを網羅的に解析するとともに、光学顕微鏡ナノ計測技術を活用してべん毛蛋白質の *in vivo* での動態を定量的に計測することにより、べん毛蛋白質輸送装置が備えている非常にロバスタなエネルギー変換システムの分子基盤の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

1 分子蛍光イメージング法を用いて FliI ATPase の *in vivo* 動態計測やべん毛繊維の伸長速度を定量的に計測した。GST アフィニティークロマトグラフィー法を利用し、遺伝学的機能解析法を上手く組み合わせることで、蛋白質間相互作用を解析した。我々が独自に開発したイオンチャネル活性計測法を利用して輸送ゲート蛋白質 FlhA のイオンチャネル活性を測定した。輸送ゲート構成蛋白質の発現系を構築し、輸送ゲート構成蛋白質間の相互作用を解析した。

### 4. 研究成果

- (1) 黄色蛍光蛋白質 (YFP) 1分子の蛍光を十分に計測できる高感度の蛍光顕微鏡を用いてべん毛基部に局在している FliI-YFP の数を見積もった結果、6分子以上の FliI-YFP がべん毛基部体の Cリングおよび輸送ゲートプラットフォームに結合していた。FliI-YFP は ATP に依存せずに1分間あたり約6回程度離合集散を繰り返すことが判明した。これにより、ATPase 複合体は離合集散を繰り返す非常にダイナミックな構造であることを世界に先駆けて示すことができた。
- (2) FliI の Glu-211 残基は ATP の加水分解反応に直接関与する。E211Q 変異体では、

ATP は FliI に結合するが、加水分解されなかった。一方、E211D 変異体では、ATP はわずかに加水分解され、その ATP 加水分解活性は野生型レベルの 1/100 以下であった。fliI (E211D) 変異株の 90% 以上の菌体で、べん毛の数及び長さとはともに野生株と比べて 1/2 程度にしか低下しなかった。さらに、fliI (E211Q) 変異株でも 17% 程度の菌体で、野生株と比べて 1/4 程度の長さのべん毛が 1~2 本形成された。したがって、輸送装置は ATP の消費を最小限に押さえながら、プロトン駆動力を使って高速にかつ高効率に動く輸送エンジンであると示唆された。

- (3) 輸送ゲート蛋白質 FlhA が  $H^+$  および  $Na^+$  チャネルとして働くこと、ATPase 複合体が FlhA に結合すると、FlhA のイオン選択性が  $H^+$  でも  $Na^+$  でも流すことができるデュアルチャネルモードからプロトンのみを選択するシングルチャネルモードにスイッチすることが示唆された。さらに、この FlhA のイオンチャネル活性が阻害されるとべん毛が形成されないことから、FlhA を直接ターゲットにした創薬スクリーニングが可能となり、社会的に重要な問題となっている新興細菌感染症を制御するための新技術開発に直結できると期待された。
- (4) べん毛繊維の成長速度を定量的に解析した結果、べん毛繊維の形成初期は1分間に 100 nm 伸長すること、その後べん毛繊維が長くなるに伴って、べん毛繊維の伸長速度が 20 nm/min にまで低下することを見出した。この研究成果は 2017 年 3 月に eLife 誌に発表し、Faculty of 1000 に選出された。
- (5) 我々は世界に先駆けて高感度細胞内 pH イメージング技術を確認し、生体ナノマシン内の pH 計測を可能にした。その結果、わずか 1  $\mu m$  ほどのバクテリア細胞内で pH 勾配が形成されていること、さらに、べん毛蛋白質輸送装置が ATP 加水分解とプロトン駆動力をカップルさせて利用することで効率的な蛋白質輸送を行っていることが明らかとなった。
- (6) 6種類の膜蛋白質から構成される輸送ゲート複合体を単離精製するために、様々な発現系を構築した。その中で、世界に先駆けて FliO/FliP 複合体、FliP/FliR 複合体、FliO/FliP/FliR 複合体、FliP/FliR/FliQ 複合体、FliO/FliP/FliR/FlhB 複合体などを単離精製することに成功した。今後、クライオ電子顕微鏡による輸送ゲート複合体の構造解析が可能となった。

### 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 18 件)

- ① Renault TT, Abraham AO, Bergmiller T, Paradis G, Rainville S, Charpentier E, Guet CC, \*Tu Y, \*Namba K, \*Keener JP, \*Minamino T, \*Erhardt M. Bacterial flagella grow through an injection-diffusion mechanism. *eLife* 6: e23136 (2017). 査読有. DOI: 10.7554/eLife.23136.
- ② Morimoto YV, Kami-ike N, Miyata T, Kawamoto A, Kato T, \*Namba K, \*Minamino T. High-resolution pH imaging of living bacterial cell to detect local pH differences. *mBio* 7: e01911-16 (2016). 査読有. DOI: 10.1128/mBio.01911-16.
- ③ Furukawa Y, Inoue Y, Sakaguchi A, Mori Y, Fukumura T, Miyata T, \*Namba K, \*Minamino T. Structural stability of flagellin subunit affects the rate of flagellin export in the absence of FliS chaperone. *Mol. Microbiol.* 102, 405-416, 2016. 査読有. DOI: 10.1111/mmi.13469.
- ④ Kinoshita M, Nakanishi Y, Furukawa Y, Namba K, \*Imada K, \*Minamino T. Rearrangements of  $\alpha$ -helical structures of FlgN chaperone control the binding affinity for its cognate substrates during flagellar type III export. *Mol. Microbiol.* 101, 656-670, 2016. 査読有. DOI: 10.1111/mmi.13415.
- ⑤ \*Imada K, Minamino T, Uchida Y, Kinoshita M, Namba K. Insight into the flagellar type III protein export revealed by the complex structure of the type III ATPase and its regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: 3633-3638 (2016). 査読有. DOI: 10.1073/pnas.1524025113
- ⑥ \*Minamino T, Morimoto YV, Hara N, Aldridge PD, \*Namba K. The bacterial flagellar type III export gate complex is a dual fuel engine that can use both  $H^+$  and  $Na^+$  for flagellar protein export. *PLOS Pathog.* 12: e1005495 (2016). 査読有. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005495.
- ⑦ \*Minamino T, Morimoto YV, Kinoshita M, Aldridge PD, \*Namba K. The bacterial flagellar protein export apparatus processively transports flagellar proteins even with extremely infrequent ATP hydrolysis. *Sci. Rep.* 4: 7579 (2014). 査読有. DOI: 10.1038/srep07579.

- ⑧ Bai F, Morimoto YV, Yoshimura SDJ, Hara N, Kami-ike N, \*Namba K, \*Minamino T. Assembly dynamics and the roles of FliI ATPase of the flagellar export apparatus. *Sci. Rep.* 4: 6528 (2014). 査読有. DOI: 10.1038/srep06528.

[学会発表] (計 41 件)

- ① Minamino T. Cooperative remodeling of the FlhA ring structure coordinates flagella type III protein export with assembly. OIST Workshop “Bacterial Flagella, Injectosome and Type III Secretion Systems”, OIST, Kumigami-gun, Okinawa. 2017年3月2日.
- ② Inoue Y, Ogawa Y, Kinoshita M, Imada K, Namba K, Minamino T. Conformational rearrangements of FlhA is critical for ordered protein export during flagellar assembly (FlhAの構造変換がべん毛蛋白質輸送順序の決定に重要である). 第54回日本生物物理学会年会. つくば国際会議場(茨城県つくば市). 2016年11月27日.
- ③ Fukumura T, Kinoshita M, Namba K, Minamino T. Expression and purification of the bacterial flagellar type III export gate complex (バクテリアべん毛輸送ゲート複合体の発現系の構築と精製). 第54回日本生物物理学会年会. つくば国際会議場(茨城県つくば市). 2016年11月27日.
- ④ Terashima H, Kawamoto A, Tatsumi C, Namba K, Minamino T, Imada K. *In vitro* reconstitution of the bacterial flagellar type III protein export (細菌べん毛III型タンパク質輸送の*in vitro*再構築). 第54回日本生物物理学会年会. つくば国際会議場(茨城県つくば市). 2016年11月27日.
- ⑤ Minamino T, Terahara N, Inoue Y, Kodera N, Ando T, Namba K. Direct observation of ring formation of the C-terminal cytoplasmic domain of a flagellar type III export gate protein FlhA by high-speed atomic force microscopy. 4<sup>th</sup> Kanazawa Bio-AFM Workshop 2016, KKR ホテル金沢(石川県金沢市). 2016年10月5日.
- ⑥ Minamino T. Energy transduction mechanism of bacterial flagellar type III protein export. T3SS Meeting, Tübingen, Germany. April 4, 2016.
- ⑦ Minamino T. Coordinating flagellar type III protein export with assembly. Helmholtz Centre Seminar. Helmholtz Centre for Infection Research,

Braunschweig, Germany. March 30, 2016.

- ⑧ Minamino T. FliS chaperone contributes to efficient unfolding of flagellin subunit during protein translocation. GRC on Sensory Transduction in Microorganisms. Ventura Beach Marriott, Ventura, CA, USA. January 17-22, 2016.

[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・大学院生命機能研究科・准教授  
研究者番号:20402993

### (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:40346143

### (4) 研究協力者

木下実紀 (KINOSHITA, Miki)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・特任研究員

井上由美 (INOUE, Yumi)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・特任技術職員

森本雄祐 (MORIMOTO, Yusuke)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・招聘研究員

福村拓真 (FUKUMURA, Takuma)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・大学院生