

ビブリオ属菌のべん毛関連遺伝子と機能

錦野 達郎¹・小嶋 誠司²・本間 道夫²

¹大阪大学蛋白質研究所
²名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻
²〒464-8602 名古屋市千種区不老町
E-mail: g44416a@cc.nagoya-u.ac.jp

[受理 : 2020 年 10 月]

細菌はべん毛によって運動することができる。しかし、その運動は、生育に全く必要ない。研究室の培養環境では、べん毛欠損株は、野生株と全く同様に生育する。べん毛は 20 個以上の構成タンパク質から組み立てられ、それらのべん毛構造蛋白質をコードする遺伝子や発現を調節する遺伝子が 50 個以上存在する。べん毛の組み立てコストは非常に大きなものであるが、運動器官として進化したということは、それだけ大きなコストをかけても、細菌の生き残りには必要ということなのだ。本総説では、筆者らが行ってきたべん毛関連研究とビブリオ属菌のべん毛研究を中心に解説したい。

はじめに

ビブリオ属菌は、海洋環境から広く分離され、増殖に一般的にナトリウムを要求するグラム陰性通性嫌気性の細菌である。多くのビブリオ細菌は桿菌であるが、やや曲がったバナナ状またはコンマ状の形態を示すものも存在する。コレラ菌 *Vibrio cholerae* は、下痢原性の細菌として約 150 年前に発見されている (170)。腸炎ビブリオ菌 *V. parahaemolyticus* もヒトに下痢を起こす病原菌として、1950 年に日本で分離された (141)。海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* は *V. parahaemolyticus* と非常に近縁ではあるが、ヒトに対しての病原性はほとんどなく、一方で魚やエビなどには病原性を持ち、海中でキチン質などの分解に関与する海洋物質分解サイクルに重要な菌である (8, 60)。*V. vulnificus* は普段ヒトに病原性を示さないが、免疫機能の低い人に侵入すると全身感染を引き起こして人を死に至らしめる。*V. anguillarum* は魚に感染して病気を引き起こす。*V. fischeri* も魚に感染性であるがこちらは、発光細菌として有名である (10)。どの菌も菌体の極に一本から数本の極べん毛 (Polar flagellum: Pof) をもつ。Harveyi クレードに属する *V. alginolyticus* と *V. parahaemolyticus* は、極べん毛に加え、環境条件により極べん毛とは形態的に異なった側べん毛 (Lateral flagella: Laf) が、菌体周囲に何十本も発現してることが知られている (104)。側べん毛は魚の表面への付着や表面での移動に関与していることがわかっている。

1. ビブリオ菌の分類と進化

初期の細菌分類の指標では、桿菌であり活発に運動する好塩性菌が、ビブリオ属として分類された。しかし、16SRNA の配列や DNA 相同性試験によって、また最近ではゲノムの配列決定によって、その分類が大きく変更されている (148, 170)。ビブリオ属菌は、真性細菌のプロテオバクテリア門・ガンマープロテオバクテリア綱の約 20 に分けられた属の一つに分類されている (図 1A, B)。ビブリオ科 (Vibrionaceae) の菌は、8 つの属に分けられ、ビブリオ属菌は 14 のクレードに現在は分類されている (図 1C)。多くの細菌は 1 本の染色体を持っているが、ビブリオ属の菌は、大染色体 (3~4 Mb) と小染色体 (1~2 Mb) の 2 本の染色体を持っている (27, 128)。従って、総ゲノムサイズとしては、4~6 Mb となる。 γ プロテオバクテリアの中では、他に *Pseudoalteromonas* 属の染色体が 2 本であることが分かっている。大染色体 (Chr1) は、*E. coli* の *oriC* に似た複製起点 (*ori1*) をもち、複製開始因子である *DnaA* の結合ボックスが *ori1* に存在している (29)。小染色体 (Chr2) の複製は、ビブリオ属に特有な複製開始因子である *RctB* が *ori2* に結合して、プラスミドの複製開始因子に類似した機構で制御されていることが示されている (52, 133)。Chr1 と Chr2 が協調的に複製される必要があり、Chr1 の複製が阻害されると Chr2 の複製も阻害される機構が備えられている (137, 138)。 γ プロテオバクテリアに属

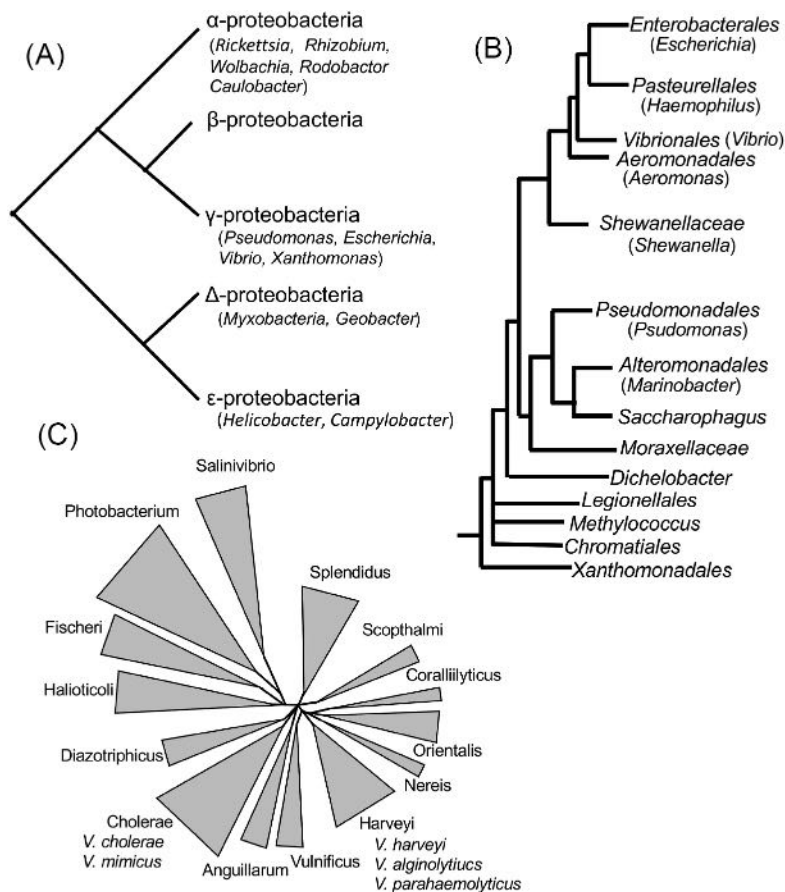


図1. 細菌の分類とビブリオ属菌の系統

(A) プロテオバクテリア門に属する主な細菌綱の系統。(B) ガンマープロテオバクテリア綱に属する細菌目の系統。(C) ビブリオ属に属するビブリオ科細菌のクレード解析。澤辺らの論文 (148) を参考に書いた。

する大腸菌 (*Escherichia coli*), シュワネラ菌 (*Shewanella putrefaciens*), 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) などは約 5~6 Mb のゲノムサイズを持ち, 1 本の染色体であることから, ビブリオ属菌の染色体は, プラスミド由来の複製開始点が入り込み, 2 つのレプリコンに分断されたと考えてもいいのかも知れない。2 本に分かれた利点として, 染色体の複製が短時間で行えるという推測がなされている (180)。ビブリオ属菌が早い増殖速度をもっていることと関連が想像されている。

ビブリオ属菌のゲノム解析は, ヒトに病原性があるということから, *V. cholerae* と *V. parahaemolyticus* の 2 種の菌が進んでいる。*V. cholerae* と *V. parahaemolyticus* の 2 本の染色体を比べてみると, *V. cholerae* が 2961 kb と 1072 kb に対して *V. parahaemolyticus* は 3289 kb と 1877 kb であり, 2 本の染色体ともに *V. cholerae* の方が小さい (39, 87) (図 2)。*V. parahaemolyticus* の属する Harveyi クレードの *V. harveyi* の染色体は, 3718 kb と 2321 kb と大きい (172)。染色体が大きくなる原因としては, 生存環境に応じて, より生き残りに有利な遺伝子を取り込んだ結果であると推測できる。この染色体の変化には, トランスポゾン (Tn) や挿入配列 (IS), フェージなどが染色体に入り込んだ事が, 関与している。また, 大きく染色体が変化する際に, 遺伝子の水平

伝搬が大きく寄与していると考えられている (76, 156)。*V. cholerae* のゲノム配列から DNA 複製, 修復, 転写翻訳, 細胞壁合成, その他の中心的な分解や生合成経路の遺伝子は, Chr1 に存在する。加えて, 細菌の病原因子に関わる毒素共発現ピリ (TCP: toxin-coregulated pilus), コレラ毒素, リポ多糖, 細胞外蛋白質分泌装置の遺伝子も Chr1 に存在する。一方, Chr2 にはプラスミドで特徴的に見られる遺伝子捕捉系 (integron island) や宿主耽溺 (addiction) 遺伝子が存在している。また, *V. parahaemolyticus* の病原性に必要な TypeIII 分泌機構に関わる遺伝子を含む pathogenicity island は, Chr2 に存在する。ビブリオ属の染色体の大きさの多様性は, Chr2 でより顕著に見られる。

2. 2 種類のべん毛をもつ海洋性ビブリオ菌

腸炎ビブリオ菌 *V. parahaemolyticus* が, はじめに同定されたときには, 単一の外膜からつながった鞘を持った極べん毛だけが報告されたが (112), その後, 固い寒天培地の上では, 鞘を持たない周毛性の側べん毛が生えると報告された (1, 178)。腸炎ビブリオ菌の近縁種である海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* でも, 極べん毛と側べん毛という機能的に異なる 2 種類のべん毛を 1 つの菌体を持つ (図 3) (1)。極べん毛または側べん毛のみを発現する変異株 (図

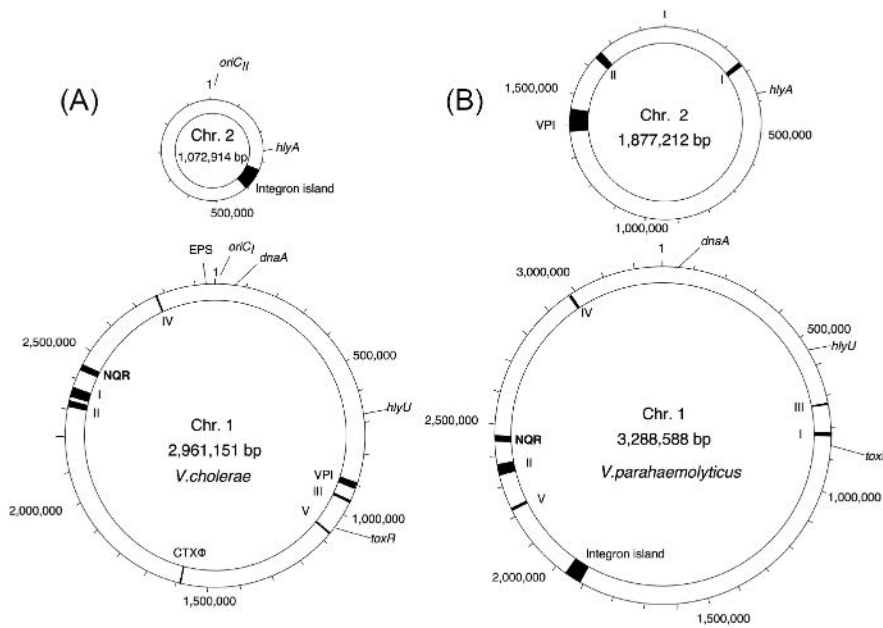


図2. ビブリオ属菌のゲノム

V. cholerae 染色体 (A) と *V. parahaemolyticus* 染色体 (B) は、2本の染色体からなる。サイズの大きな染色体を染色体1、小さい方を染色体2とした。*Vibrio* pathogenicity island (VPI)、コレラ毒素をコードする CTXφ ファージ領域、遺伝子捕捉領域 (integron island)、べん毛遺伝子領域 (染色体1 : I, II, III, IV, V, 染色体2 : I, II)、ナトリウム輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素領域 (NQR) を環状染色体において黒く塗った。

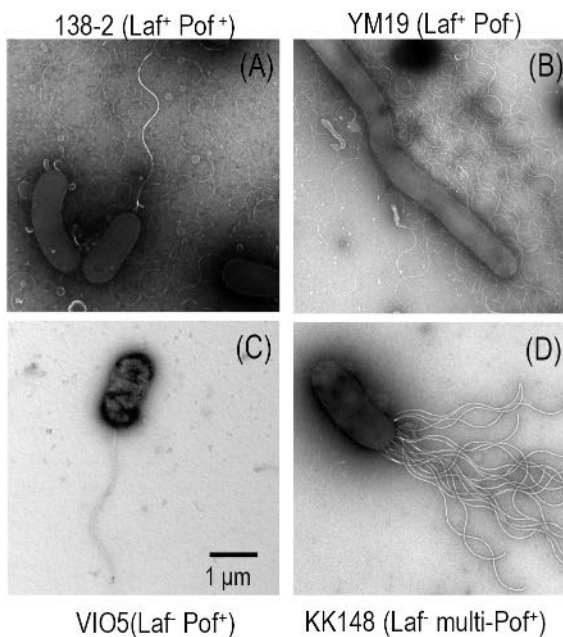


図3. 海洋性ビブリオ菌の電子顕微鏡観察

V. alginolyticus の野生株 (138-2 : A)、極べん毛欠損株 (YM19 : B) 側べん毛欠損株 (VIO5 : C)、多極べん毛変異株 (KK148 : D)。

3B, C) を用いて、極べん毛と側べん毛の機能的な違いが調べられている (6)。低い粘性下では、極べん毛による運動により 60 μm/sec で遊泳できるが、側べん毛では 20 μm/sec 程度でしか遊泳できない。粘性が上がるにつれ、極べん毛による運動能は低下し、側べん毛による運動能は 40 μm/sec まで上昇し極べん毛の運動能を上回った。このことから極べん毛は粘性の低い条件での遊泳に適してお

り、側べん毛はある程度粘性が高い条件下での運動に適していると考えられている。*V. cholerae* は側べん毛を持たずに、極べん毛しか持っていない。側べん毛遺伝子は、Chr2の2つの領域に存在しているが、極べん毛遺伝子は、Chr1に散在している (図2)。

V. parahaemolyticus と *V. alginolyticus* において、1つの菌体に二種類のべん毛が形成され、機能的な違いがあることが明らかになった。一般的にべん毛運動のエネルギー源は膜を介したプロトンの電気化学的ポテンシャル差であることが明らかにされていたが、*V. alginolyticus* の極べん毛運動がナトリウムイオンの電気化学的ポテンシャル差を使って運動することが報告された (19)。2種類のべん毛運動のエネルギー源を調べると、極べん毛は Na⁺ 駆動力、側べん毛は H⁺ 駆動力によって運動することが分かった (7, 58)。極べん毛は恒常的に発現しているのに対して、側べん毛は粘性の高い条件下で発現することから、ビブリオ菌の菌体は粘性の上昇を何らかの方法で感じていると考えられ、そのセンサーは極べん毛であるというダイナモーター仮説が提案された (99)。そして、極べん毛の Na⁺ 駆動型モーターの阻害剤であるフェナミル (ナトリウムチャネル阻害剤アミロライドの誘導体) を用いた実験から、極べん毛の回転の低下と側べん毛遺伝子の発現の間に相関関係があることが示された。このことから極べん毛は力学的センサーとして働き、側べん毛の発現を制御されている (57)。しかしながら、30年以上も前に発見された現象であるが、未だにどのようにして極べん毛が粘性を感知しているかわかっていない。

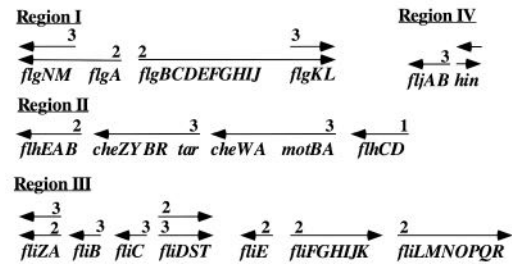
3. べん毛遺伝子の転写制御

細菌のべん毛構造や遺伝子は、大腸菌やサルモネラ（ネズミチフス）菌（*Salmonella Typhimurium*）で最も良く研究されている。機能や構造に必要な遺伝子構成は、どの細菌でも基本的には良く似ているが、種によって特徴的な構造をもつものもある。一般にグラム陰性菌のべん毛は細菌表層膜系内に埋まった基部体（basal body）と菌体外に長く伸びるらせん型のべん毛繊維（filament）および両者をつなぐフック（hook）から成っている。基部体は、外膜およびペプチドグリカン層に結合するLPリング、内膜に結合するMSリング、それらをつなぐロッドから成り立っている。基部体の周りにはイオンの流入と共役してべん毛回転を駆動する膜タンパク質 MotA と MotB（ビブリオ菌の極べん毛では、PomA と PomB と呼ばれる）からなる固定子複合体があり、細胞質側にはモーターの回転方向を制御するスイッチ複合体あるいはCリングと呼ばれる構造がMSリングの直下に存在して、その内部にべん毛タンパク質特異的輸送装置が存在する。これらのべん毛構造蛋白質をコードする遺伝子やそれらの発現を調節する遺伝子が50個以上存在する。先にも述べたが、*V. alginolyticus* と *V. parahaemolyticus* は極べん毛と側べん毛の2種類のセットのべん毛遺伝子が別々に存在する（図2）（104, 183）。

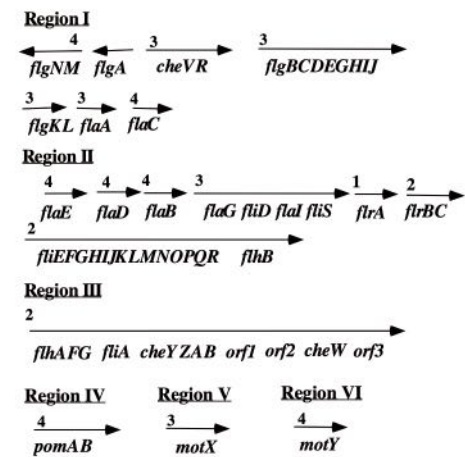
べん毛遺伝子の発現は、その構造形成と共役している。すなわち、基部体とフックの構造が完全にできあがるまではべん毛繊維形成や、モータータンパク質、化学感受容体やシグナル伝達に関する遺伝子の発現は起こらない。これはべん毛の遺伝子の発現機構が厳密な階層構造をもつことによる。細菌のべん毛関連遺伝子においては、50個以上もの遺伝子がオペロンを形成し、3つあるいは4つのクラスに分けられて発現制御されている（168）。サルモネラ菌や大腸菌においては、約50個もの遺伝子が17のオペロンを形成している。これらのオペロンは発現の順番により3つのクラスに分けられる（図4A）。マスターオペロンに属する遺伝子によりコードされる FlhD, FlhC は、クラス II に属するオペロンを活性化することにより全てのべん毛遺伝子の発現を最上位で支配する（88）。次に、クラス II に属するべん毛特異的な σ 因子である σ_{28} (*fliA*) が下位のクラスあるいは同じクラスに属する他のオペロンの発現を正に調節する。クラス II には基部体やフックの形成に関与する遺伝子群が属している。クラス III にはべん毛繊維を形成するフラジェリンを含めべん毛形成の最終段階である繊維形成に関与する遺伝子群や完成したべん毛の機能に関与する遺伝子群が属している。クラス III に属する *flgM* は、クラス II 遺伝子の下流にあるためクラス II プロモーターからも転写を受け、*fliA* のアンチシグマ因子として働く。FlgM は FliA シグマ因子に結合し、FliA の RNA ポリメラーゼ・コア酵素への結合を阻害することでクラス III 遺伝子群の発現を負に制御する。フックが完成すると、FlgM はフックおよび基部体構造の中を通過して菌体外に排

出され、その結果、細胞内の FlgM 濃度が減少し FliA が活性化されてクラス III の発現が開始されると考えられている（83, 123, 171）。べん毛形成における遺伝子発現調節の要は、間違いなく FliA-FlgM システムであるといえるだろう。しかし、これだけでは複雑な構造体ができあがるメカニズムは説明できない。FliA と FlgM の調節系以外にも、べん毛特異的シャペロンによる発現の調節機構が明らかになっている。クラス III プロモーターからの *flgM* 遺伝子 mRNA の翻訳には、HAP（フック付随タンパク質：FlgK, FlgL, FliD）のシャペロンである FlgN が必要である。

(A) *S. Typhimurium* 周べん毛遺伝子



(B) *V. cholerae* 極べん毛遺伝子



(C) *V. parahaemolyticus* 側べん毛遺伝子

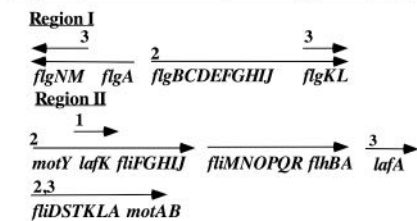


図4. べん毛遺伝子の構成
S. Typhimurium のプロトン駆動型である周べん毛 (A), *V. cholerae* のナトリウムイオン駆動型である極べん毛 (B), *V. parahaemolyticus* のプロトン駆動型である側べん毛 (C), それらの遺伝子構成を示す。遺伝子名の上にかかれた矢印は転写ユニットを示し、その矢印の始まりの数字は転写階層の順番を示す。*S. Typhimurium* のべん毛遺伝子は、染色体の4つの領域 (region I, II, III, IV) に分布し、*V. cholerae* の極べん毛遺伝子は、染色体1の6つの領域 (region I, II, III, IV, V, VI) に分布する。*V. parahaemolyticus* の側べん毛遺伝子は、染色体2の2つの領域 (region I, II) に分布する。*S. Typhimurium* と *E. coli* のべん毛遺伝子、または *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* と *V. cholerae* の極べん毛遺伝子の構成はほぼ等しい。

フックの形成に伴い HAP が輸送されると、FlgN は単体になる。この単体 FlgN がクラス III からの FlgM の発現を促す。発現した FlgM はそのまま輸送されるが、このときクラス II から発現し細胞内で FliA シグマ因子に拮抗していた FlgM も FlgN により輸送されると考えられる。結果として細胞内の FlgM 濃度が低くなり、FliA がシグマ因子として機能して、フラジェリンなどクラス III 遺伝子からの発現を活性化するのである。フックが完成しフィラメントの合成が始まると、フック系の基質は輸送されなくなり細胞内にとどまることになる。すると、FlgN は HAP のタンパク質と結合しシャペロンとしての機能に戻るため、クラス III からの FlgM の発現及び輸送が行われなくなる (55)。このように抗シグマ因子 FlgM の発現、輸送が調節されることによって、FliA-FlgM のシステムは緻密に制御されているのである。また、フラジェリンのシャペロンである FliS は FlgM の輸送を負に制御することが発見されている (181)。その他、FliT と FliZ が、クラス II プロモーターからの転写の負と正の制御因子であることが推定されている (82)。べん毛レギュロンの一番上位の制御因子 FlhD-FlhC が ATP 依存プロテアーゼの一種である ClpXP により分解制御を受けていることが示されて、べん毛の発現制御の新たなグローバルな側面が明らかにされている (171)。

V. parahaemolyticus と *V. cholerae* の極べん毛遺伝子の発現制御が推測されている (図 4B) (28, 104, 155)。*V. cholerae* では、オペロンの発現の順番により 4 つのクラスに分けられて、オペロンの転写制御のモデルが出されている (21, 136)。*pomAB* や *motX* のモーター遺伝子やフラジェリンをコードする遺伝子 *flaB*, *flaC*, *flaD*, *flaE*, そして、推定抗 σ 因子をコードする *flgM* を含むオペロンは、 σ_{28} 型のプロモーター配列を持ち、*fliA* 遺伝子のコードする σ_{28} に依存して発現することが確認されている。これに対して、コアフラジェリンをコードする *flaA* やモータータンパク質をコードする *MotY* とフック基部体の構造遺伝子や HAPs などは、FlrC と σ_{54} に依存した発現を示す。最初に転写されるのは *flrA* であり、その産物である FlrA と σ_{54} がクラス II オペロンの転写を起こす。FlrB のリン酸基が FlrC に転移され、活性化される。*V. parahaemolyticus* の極べん毛遺伝子も、遺伝子名は異なっているが *V. cholerae* と同様な転写制御によって調節されていることが分かっている (62, 103)。ビブリオ属の極べん毛制御は、同じ極べん毛をもつシュードモナス属のべん毛遺伝子の制御機構と類似している (150)。*V. parahaemolyticus* の側べん毛遺伝子の転写制御も解析され、階層的に制御されていることが分かっている (図 4C)。面白いことに、周毛性の *V. parahaemolyticus* の側べん毛遺伝子のマスター制御遺伝子は σ_{54} タイプであるが、下流は大腸菌のもつ σ_{28} 型に近い制御因子が働いている (153)。

4. ビブリオ菌べん毛の数と位置制御

べん毛の数や位置を制御するのは非常に重要なことであ

る。海洋性ビブリオ菌やコレラ菌、緑膿菌は極に 1 本のべん毛を持ち、べん毛の形成位置や本数制御において、類似の制御機構を持つことが報告されている。べん毛の形成位置と本数に関する遺伝子が、シュードモナス属で同定された。*P. putida* では FlhF がべん毛形成位置決定に関与し、FleN がべん毛の本数制御に関わっていることが報告され (134)、FlhF 欠損株は極以外にもべん毛を形成すること、*P. aeruginosa* では FleN (*V. alginolyticus* のホモログは FlhG) 欠損株が多数のべん毛を持つことが報告されている (23)。また、*V. alginolyticus* の FlhF と FlhG についての研究が行われ、緑膿菌と同様に *flhF* 欠損株は極べん毛を持たず、*flhG* 欠損株は極に多数のべん毛を持つことが報告されている (図 3D) (81, 80)。これら報告の中で、FlhF を大量発現させると極べん毛の数が増え、FlhG を大量発現させるとべん毛の数が減るということ、また、FlhF と FlhG の共発現は FlhG 単独で発現したときよりもべん毛数を劇的に減少させ、変異体解析から FlhF の GTP 結合ドメインがべん毛の位置制御に重要であることが示されている。コレラ菌でも FlhF と FlhG (FleN) について研究がおこなわれ、FlhF はクラス 3 遺伝子の発現を促進するため、べん毛本数を増加させ、FlhG はフラジェリンなどの遺伝子の発現を抑制し、べん毛本数を減少させることが報告されている (22)。さらに、*V. cholerae* において FlhF への GTP 結合がべん毛形成に影響を与えるが、FlhF の GTPase 活性はべん毛形成機能に必須ではないことが示されている (38)。*V. alginolyticus* でも FlhF の GTPase モチーフは重要であるが、GTPase 活性を失った変異体でも、べん毛形成には異常はおきないこと、そして FlhF の GTPase 活性は FlhG によって促進されることが示されている (74, 75)。また、FlhG においても ATPase モチーフは細胞内での局在の制御に重要であるが、ATPase 活性がなくても、FlhF の抑制活性はあることが示されている (130)。FlhF は、GTPase 活性に共役し生合成されたタンパク質の膜透過に働くシグナル認識粒子 (SRP) の Ffh や SRP 受容体の FtsY と相溶性があり、FlhG は ATPase 活性を持つ細胞分裂制御因子の MinD と相溶性がある。しかし、FlhF, FlhG の酵素活性とその局在がどのようにべん毛の数と形成位置を制御しているかは解明されていない。*in vitro* で酵素活性や機能を明らかにするために、*V. alginolyticus* の FlhG が大量発現系で精製されているが、低い塩濃度で凝集しやすくなり、ATP 依存的にその凝集が押さえられることが明らかとなり、ATP 結合による FlhG の構造の大きな変化が推測されている (69)。以上のことから、べん毛の数は FlhF によって正に FlhG によって負に制御され、また FlhF と FlhG が協同して働くことでべん毛形成が正確に制御される。そして、FlhF は菌体の極に局在して、べん毛の形成位置を同時に制御していると考えられている (図 5) (81)。

FlhG と FlhF 以外にもべん毛の本数と形成位置を制御する遺伝子が見つかっている。FlhF と FlhG が欠損した株から、極べん毛が菌体の周囲に形成され運動能を回復した抑

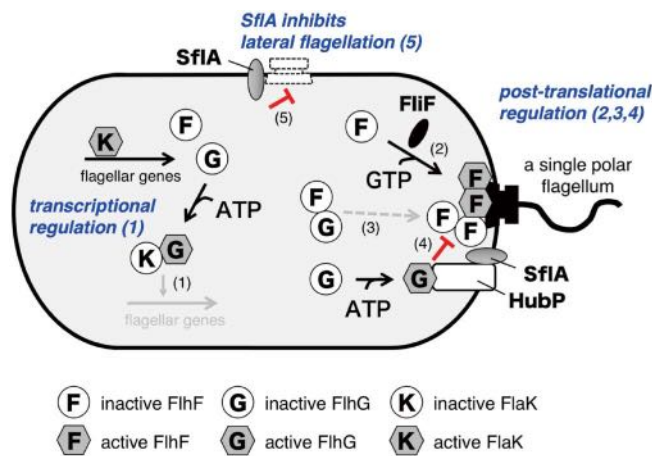


図5. ビブリオ菌の極べん毛の位置と数の制御モデル

べん毛構成タンパク質が十分に合成されると、FliHはマスターレギュレーター FlaK に作用して、極べん毛遺伝子の発現を低下させる。これによって、余分なタンパク質合成を抑制する。FliHは GTP と結合してホモダイマーを形成し、菌体の極に局在する。FliHは、MS-リング構成タンパク質 FliF の極でのリングの形成を促進する。FliHは ATP と結合して、FliF の極での促進活性を、HubP 依存的に抑制する。一方、SfiA は、FliH が欠損していると MS-リング形成を阻害する。SfiA と FliH は HubP 依存的に極に局在できる。総説 (73) から引用した。

圧変異体が得られた (67)。極べん毛性の菌を周毛性に変換できたことになり、この変異体においては、べん毛形成開始が菌体のどこにでも起こることができるようになったと考えられる。この抑圧変異の原因が、染色体ゲノム配列を決定することで、*sfiA* という遺伝子の欠損であることが示された (64)。SfiA は、1 回膜貫通タンパク質で、細胞外ドメインに TPR (tetratricopeptide repeat) モチーフをもち、細胞質領域に DnaJ ドメインを持ち、極以外からのべん毛形成を阻害すると推測されている。細胞外ドメインは構造決定され、何らかのシグナルを受け取っていると考えられているが、どのように機能しているのかは不明である (142)。

V. alginolyticus では、*hubP* を欠損すると極べん毛が多毛になることが報告されている (160)。HubP は *V. cholerae* で 1 回膜貫通型の極局在タンパク質として存在が明らかとなった (179)。HubP は、すべてのビブリオ属、フォトバクテリウム属、およびその他のいくつかの γ プロテオバクテリアで保存されている。HubP の N 末端と C 末端は、緑膿菌の IV 型線毛の形成に対する正の調節因子である FimV と類似している (176)。HubP には、N 末端側にペリプラズムペプチドグリカン結合モチーフ (LysM)、C 末端側に繰返し配列を含む大きな細胞質側領域がある。LysM ドメインは HubP の極局在に重要であり、細胞質領域で ParA 様タンパク質 (ParA, ParC, FliH) と相互作用することが示されている (179)。HubP は、染色体分配と走化性受容体の配置に関与していることが示唆されていたが、*V. cholerae* では、べん毛の数は *hubP* を欠損してもほとんど影響がなかった (179)。*Shewanella putrefaciens* でも、HubP が *V. cholerae* と同様の役割を持つことが示唆されている (139)。

V. alginolyticus では、*hubP* 欠損で SfiA と FliH の極局在が失われることが示されている (48, 160)。SfiA と FliH がべん毛の形成を抑える働きがあることを考えると、これら 2 つのタンパク質の阻害機能の強さを調節しているのではないかと想像される。まとめると、*V. alginolyticus* 極べん毛の数と位置の制御には、FliH, FliH, HubP, SfiA が主に関与していることが示され、モデルが提案されている (図 5)。

5. べん毛繊維タンパク質フラジェリン

多くのビブリオ属菌において、極べん毛は少なくとも 2 種類のフラジェリンから構成されていることが知られている。*V. parahaemolyticus* では、極べん毛のフラジェリンをコードする遺伝子 *flaA*~*flaF* の 6 つが同定され、5 つのオペロンから構成されている (102, 103)。これらの遺伝子は、染色体上で *flaFAB* (Region II) および *flaCDE* (Region I) の 2 つの領域に分かれている。*flaA*, *flaB* および *flaD* は、 σ_{28} 型のプロモーター配列を持ち大腸菌において σ_{28} をコードする *fliA* 遺伝子に依存して発現することが確認されている。これに対して、*flaC* の発現は、*fliA* には依存しない。*flaC* は σ_{54} 型のプロモーターを持つが、 σ_{54} を欠損した大腸菌の菌体中でも発現をすることが確認されている (152)。*flaAB* 部位の下流には、*flaG*, *fliD*, *flaI*, *fliS*, *flaK* (*flrA*) が存在する。FliS はフラジェリン遺伝子の発現調節に関係し、FliK は、 σ_{54} を含む RNA ポリメラーゼのアクチベーターとして働く NtrC, NifA 等のホモログである。*flaC* の発現には、*fliS* と *flaK* の両方が必要であるのに対して、他のフラジェリン遺伝子の発現には、*fliS* は必要だが *flaK* は必要でない。*fliD* は HAP2 (べん毛繊維キャップタンパク質)、*flaI* はロッド (Rod) タンパク質のホモログをそれぞれコードしているが、*flaG* は 15 kDa の機能未知のタンパク質をコードする。また、*V. alginolyticus* の σ_{54} RNA サブユニットをコードする *rpoN* 遺伝子がクローニングされ、極べん毛遺伝子の発現に関わっていることが、直接的に示されている (59)。*V. cholerae* でも極べん毛では、5 種類のフラジェリンが同定されており、同様な制御を受けていることが示されている (28, 65)。

6. べん毛形成

べん毛の構造は、基本的には膜に埋まったべん毛の基部構造 (Basal body) に、その根本から先端に向けて構築されていく。この構築の基本的なスキームは、サルモネラ菌の多くの変異体の構造解析から、単純なものから複雑な構造が作られていくという流れで作られた (154)。基本的なべん毛の構造形成については、サルモネラ菌のべん毛で研究が進んでいる (図 6A) (93)。まず始めに FliF から成る MS-リングが作られ、膜に埋め込まれて構造形成が開始されると考えられている (42)。MS-リングは基部体の中心となる構造でべん毛形態形成の最初の段階で電子顕微鏡により観察される (77)。65 kDa の一種類のタンパク質からできているにもかかわらず 2 枚のリング構造を作るような複

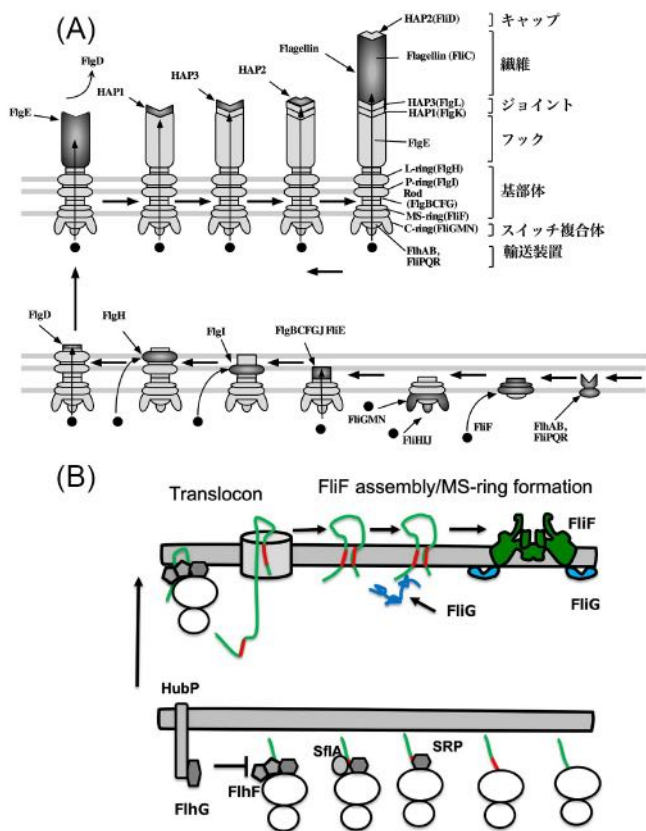


図6. 細菌べん毛の形態形成モデル

(A) サルモネラ菌で得られているべん毛形成スキームを総説 (93, 168) の図を参考に記載した。形成のモデルは、構造が単純なものから複雑なものまで構築されているという仮定に基づいて作成されている。べん毛の形態形成は、FliF が膜に組み込まれリング形成することから始まると考えられているが、TypeIII 輸送体コアから形成されるというモデルも提案されている (78)。(B) ペプリア菌 FliF の MS-リング形成モデル。2 回膜貫通タンパク質 FliF の N 末側の TM が合成されると、シグナル認識粒子 (SRP) が結合する。この状態の結合は、効率的に Sec トランスロコンへの受け渡しができない。ここに、FlhF が作用することによって、FliF を Sec トランスロコン効率良く挿入して、FliF の膜通過を可能にする。ただし、一般的に大きな膜タンパク質は Sec トランスロコンを介して細胞膜に挿入されると考えられているが、FliF が Sec トランスロコンを介しているという証拠はない。膜挿入された FliF は FliG と相互作用することによって、リング形成が促進される。寺島らの論文 (165) を参考に描いた。

雑な形を FliF がとると考えられていた (173)。この複雑な構造がクライオ電子顕微鏡によってサブアトミックレベルで解かれた (53)。In vitro で大量に FliF を発現させると MS-リング形成は起こると思われるが、in vivo では FliP, FliQ, FliR という 3 つのタンパク質から成る TypeIII 輸送体のコアの周りに FliF が集合して MS-リングとなるモデルも出されている (78)。輸送を担う FlhA と FlhB 膜タンパク質の FlhB の膜貫通領域が FliPQR のコアに巻き付いている構造も出されている (79)。MS-リングが形成されると、その下に FliG, FliM, FliN という 3 種のタンパク質からなるスイッチ複合体と呼ばれるリング状構造 (C-リング) が作られる (32)。MS-リングを構成している FliF の C 末端と C-リングを構成している FliG の N 末端が相互作用してリング構築されると考えられている (90, 122)。スイッチ複合体の遺伝子欠損によりこれ以降の構造が作られ

ないことから、スイッチ複合体はべん毛回転の向きを変化させる機能のみでなく、べん毛構造を構築する上で重要な働きをもつ。C-リングについては、回転子として第 8 章で詳しく取り上げる。

べん毛構造の大部分は細胞膜より外側に位置しているので多くの部品は細胞膜を透過しなければならない。ほとんどのべん毛タンパク質は、Sec 系膜透過装置により認識されるシグナルペプチド配列を持たず、べん毛特異的なチャンネルにより運ばれる (92)。べん毛繊維やフックの中心部にある中空構造がそのチャンネルとなる (114)。べん毛の分泌輸送装置は、細菌の病原因子の TypeIII 輸送装置と相同性があることが分かっている。チャンネルの入り口にはべん毛タンパク質を特異的に選択し輸送するべん毛輸送装置が存在し、FlhA, FlhB, FliP, FliQ, FliR の 5 種の膜タンパク質と FliH, FliI, FliJ の 3 種の細胞質タンパク質により構成されている (109)。輸送装置の構造もクライオ電子顕微鏡によって構造が明らかにされつつある (26, 78)。輸送基質としてフラジェリン (FliC), HAPs (FliD, FlgK, FlgL), 抗シグマ因子 (FlgM), フックタンパク質 (FlgE), フックキャップタンパク質 (FlgD) などがある。基質にはフラジェリン型とフック型があり、基質に対応したシャペロン (FlgN, FliT, FliS) が細胞内で識別し、輸送装置に運び分泌される (33, 61)。FliI は F_0F_1 -ATPase の β サブユニットの活性部位と相同性があり、ATPase 活性も実際に確認されている。また、FliH は FliI と複合体を作り、その ATPase 活性を抑制している。この複合体が FlhA, FlhB と相互作用して基質を膜に挿入していくと考えられている (106)。効率的な輸送には ATP のエネルギーとプロトン駆動力が必要なことが示されている (110, 135)。最近では、in vitro の輸送系の再構成によって、ATP 加水分解エネルギーとプロトン駆動力のどちらか片方のエネルギーさえあれば輸送が起こることが明らかにされた (166)。TypeIII による輸送では、分泌基質はタンパク質の N 末端 (もしくは mRNA の 5' 末端) に分泌シグナルを持ち、また C 末端側へシャペロンが結合することにより分泌が制御されている (30, 108)。輸送基質である FlgK (HAP1), FlgL (HAP3) とこれらの特異シャペロンである FlgN との間には直接の結合が観察され、その相互作用には C 末端が必要であることが示されている (61)。シャペロンが結合することで分泌タンパク質の分解が防がれていると考えられるのだが、FlgN がシャペロンとして働き、リプレッサータンパク質の分泌を制御することによって、タンパク質合成を制御するという新しい面が見つかった (55)。M-リングの内側にべん毛特異的輸送装置が配置されるとべん毛タンパク質の輸送が始まる。FlgJ がロッドキャップタンパク質となって、FlgB, FlgC, FlgG, FlgF, FliE がロッドを形成する。しかしロッドの成長は、おそらくペプチドグリカン層の障害のために、すぐに止まる。そこで、ムラミダーゼ活性を持つ FlgJ がペプチドグリカン層に孔を明け、ロッドの形成を助ける (115)。その後、ペプチドグリカン

層に FlgA がシャペロンとして働いて P-リング (FlgI) が形成され、さらに外膜に L-リング (FlgH) が形成され、これらを通る形でロッドが完成する。FlgI と FlgH は他のべん毛タンパク質とは異なり、シグナルペプチドをもち Sec 系膜透過装置に依存して分泌される (91)。ロッドが完成すると、先端へのフックの重合が始まるが、これにはフックキャップタンパク質と呼ばれる FlgD が重要な役割を持つ。FlgD は伸長するフックの先端に位置し、重合の間、フックタンパク質 FlgE は FlgD のキャップの下に挿入される。フックが完成すると、FlgD は FlgK という別のタンパク質に置き換わる (124)。FlgK は HAP1 (hook associated protein 1) とよばれ、HAP3 (FlgL) と共にフックとべん毛繊維の間をつなぐ (44)。サルモネラ菌では、べん毛繊維は 1 種類のフラジェリンタンパク質 (FliC) から成る。フラジェリンモノマーは、*in vitro* では自己重合できるが、*in vivo* での重合には HAP2 (FliD) とよばれるキャップ構造が必要である (43)。フックの場合と同様に、フラジェリンは HAP2 のキャップ構造の下に重合される。HAP2 の欠失変異株では、フラジェリンモノマーは重合できずに培地の中に放出される。HAP2 はフックのキャップである FlgD とは異なり、べん毛の先端に構造として残る。電子顕微鏡による先端 HAP2 の微細構造から、フラジェリンと相互作用しながら、HAP2 キャップが回転し、その先端にフラジェリンを重合させていく様子がモデル化されている (182)。最近、HAP2 の結晶構造も決定され、原子構造から重合過程が考察されている (149)。

ビブリオ菌とサルモネラ菌でのべん毛基部構築で、大きな違いが見いだされている。サルモネラ菌の FliF は、先にも述べたが、単独で大腸菌で大量発現するだけで MS-リングは構築される (173)。そして、クライオ電子顕微鏡での構造解析がサブアトムレベルで成功している (53)。*V. alginolyticus* の FliF を大腸菌で大量発現しても、MS-リング構造を全く作らない (122)。べん毛形成でサルモネラ菌や大腸菌と大きく異なる点として、第 4 章でも述べたが、ビブリオ属の極べん毛形成には、FlhF を要求する。FlhF がどのようにべん毛形成に関与しているのかは分かっていない。しかし、*V. alginolyticus* の FliF を FlhF とともに大量発現すると、大腸菌中での MS-リング形成が格段に上昇する。この MS リング促進効果は、C-リングの構成タンパク質である FliG との共発現においても観察された。FliG が FliF のリング形成に必要なであるということが、サルモネラ菌や大腸菌の FliF 研究からも明らかにされている (86, 113)。しかし、この大腸菌中での MS-リング形成には、FliPQR と FlhAB からなる TypeIII 輸送体コアを必要としないらしい。ただし、FliF が過剰発現した状態ではリング形成が起こるが、菌体における通常のべん毛形成時には、FliPQR が核になって MS-リング形成するモデルも提案されている (78)。これまでの得られている結果から、ビブリオ菌の極べん毛形成においては、FlhF がシグナル認識粒子 (SRP) である Ffh や SRP 受容体の FtsY と相同性が

あることを考え合わせ、FlhF が FliF の膜挿入をアシストし、膜挿入された FliF のリング形成を FliG が促進しているというモデルが提案されている (図 6B)。

ビブリオ属菌の極べん毛の基本的な構造は、サルモネラ菌や大腸菌のべん毛と同じである。大きく異なる点は、ビブリオ属菌の極べん毛は、外膜からつながった鞘に覆われている点である (20)。そして、H-リング、T-リングと呼ばれる 2 つのリング構造が、LP-リング構造の外側に存在することである (図 7)。極べん毛の早い安定な回転のために必要な構造であろうと推測されている。H-リングの主要な構成タンパク質が FlgT と FlgO であることが示され、H-リングを欠損するとべん毛繊維が外膜を押し上げて鞘を持ったべん毛にならずに、スピロヘータのべん毛のようにペリプラズムにべん毛繊維が構築してしまう (187)。ビブリオ菌極べん毛基部とモーター部分の構造がクライオ電子顕微鏡で解析され、また、サブアトムレベルの解析までは到達していないが、近い将来、菌体そのままの構造解析が行われることが期待される (図 7A)。さらに、サルモネラ菌では遺伝子変異体から基部を精製してその構造形成が調べられたが、*V. alginolyticus* では経時的に直接クライオ電子顕微鏡で菌体にあるべん毛基部を観察することで、べん毛基部の中間体の観察に成功している (188) (図 7B)。なおカウロバクター菌 (*Caulobacter crescentus*) では知られていたことだが、最近ビブリオ菌のべん毛が培養条件によって、LP-リング構造を残して抜けることが報告されている (31, 190)。

7. 細菌べん毛モーター固定子

初めに述べたように *V. alginolyticus* と *V. parahaemolyticus* の極べん毛は、Na⁺ 駆動力により回転することが知られていた。H⁺ 駆動型モーターの遺伝子は、既到大腸菌などで *motA* と *motB* がクローン化されていた (24)。当時、*motA* あるいは *motB* の塩基配列の相同性からハイブリダイゼーションなどによって Na⁺ 駆動型モーターの遺伝子のクローン化が世界で必死に行われていた。ところが、*V. parahaemolyticus* から *motX* と *motY* 名付けられた遺伝子に変異が生じると、極べん毛の形成には影響しないが、回転はできなくなるという現象が確認された (100, 101)。*V. alginolyticus* から同様な遺伝子が、我々の研究室でクローン化された (125, 129)。MotX と MotY は、当初は両タンパク質ともに 1 回膜貫通型タンパク質で、この 2 つが H⁺ 駆動型モーター遺伝子と相同性はないが、Na⁺ 駆動型モーター遺伝子であると信じられていた。しかし、我々の研究室で海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* の運動能欠損株の運動を相補する遺伝子を同定すると、H⁺ 駆動型モーター遺伝子 *motA* および *motB* と相同性のある遺伝子 (*pomA* および *pomB* と命名) を得ることに成功した (3)。*V. parahaemolyticus* からすぐに、*pomA* と *pomB* に相同な遺伝子がクローン化された (51)。それぞれ 4 回膜貫通型、1 回膜貫通型の PomA, PomB に加え、MotX, MotY の 4 つ

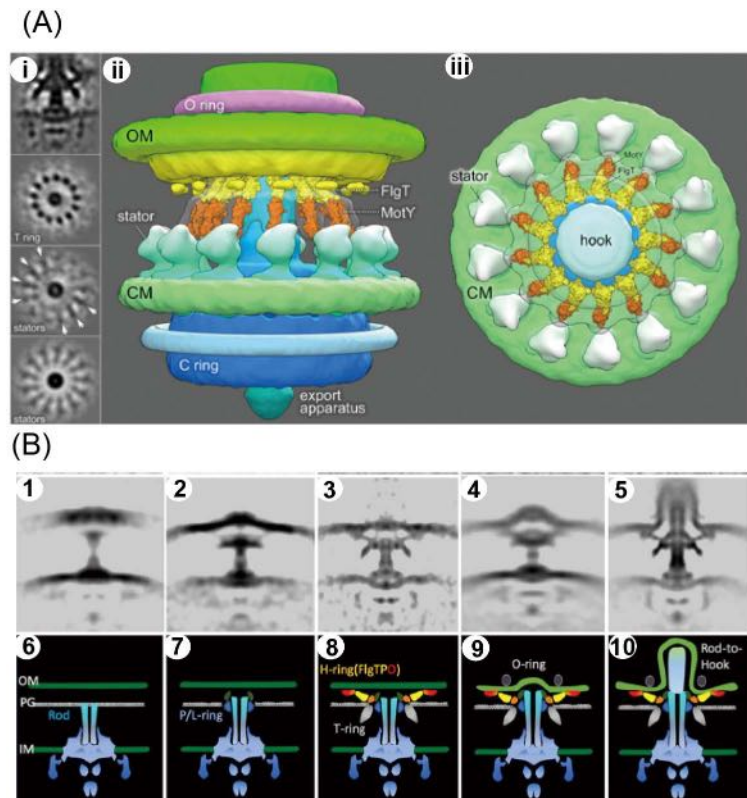


図7. ビブリオ菌極べん毛のモーター構造

(A) ビブリオ菌極べん毛のクライオ電子顕微鏡観察によるべん毛モーター構造を論文(186)から引用した。(i) 野生型モーターの平均像。第1パネルは中央部の断面, 第2パネルはT-リングから見た断面, 第3パネルは, 細胞質膜(CM)の上部での断面, 第4のパネルは, 第3のパネルの13回対称性を適用した後の断面である。ビブリオべん毛モーターの全体構造を示す側面から見た像(ii)及び上から見た像(iii)を示す。(B) クライオ電子顕微鏡観察により経時的に構造形成を観察した結果を論文(188)より引用した。最初にP/L-リングが形成され, 次にMotXとMotYからなるビブリオ特異的なT-リングが形成され, FlgT, FlgP, FlgOが集合してH-リングが形成される。O-リング形成により, ロッドからフック形成するための準備が整ったことになる。3Dトモグラムの代表的なスライス図(Stage_1からStage_5まで)を作り, べん毛構造形成中の異なるステージのサブトモグラム平均構造の中央部を示す(1~5)。パネル1~5に示されている構造のモデル図(6~10)。

のモータータンパク質がビブリオ菌の Na^+ 駆動型モーターの回転に必要なことが明らかとなった。PomAは2番目と3番目の膜貫通領域間に大きな細胞質ループ領域が存在し, このループ領域が回転子構成タンパク質FliGと相互作用すると考えられている(159, 184, 185)。

MotA/BのオーソログであるPomA/B複合体は, ビブリオ菌などの Na^+ 駆動型べん毛モーターのイオン透過と共役したトルク発生ユニットである。膜タンパク質であるPomA/B複合体を, 界面活性剤を用いて可溶化して精製すると, A_5B_2 のヘテロ六量体を形成していると推測された(147)。はじめは, このストイキオメトリーが信じられていたが, 最近のクライオ電子顕微鏡による構造解析から A_5B_2 の構造をとると改訂された(25, 143)。PomA/PomB複合体をリポソームに再構成し, カリウムイオンにより拡散膜電位を形成させると, プロテオリポソーム内にナトリウムイオンを取り込むことから, PomA/PomB複合体がナトリウムイオン透過活性を持つことが示された(146)。ただし, この*in vitro*再構成系の追試実験が行われているが, その再現性は得られていない。しかしながら, 大腸菌にPomA/PomB複合体を発現させた生細胞を用いた実験により, ナトリウムイオンが透過することを実証している

(162)。共役イオンはPomA/PomB複合体が形成するイオンチャンネルを通り, 細胞内に流入し, それと共役してPomAの細胞質ループ領域と回転子構成タンパク質のFliGとの間に何らかの相互作用が起こり, 回転力に変換されると考えられている。PomBはN末端に1回膜貫通領域を持ち, 残りの大部分がペリプラズム空間に存在している。このペリプラズム領域には, ペプチドグリカン結合モチーフが存在し, PomA/PomB複合体をペプチドグリカン層にアンカーしていると考えられている。また, 少なくとも10個以上のPomA/PomB複合体が回転子の周りを取り囲むように存在し, 回転子のタンパク質と相互作用してステップ状に回転していると考えられている(151)。

エネルギー変換体であるMotA/MotBまたはPomA/PomB複合体を構成するMotBとPomBのペリプラズム部分の構造については, 二量体として結晶構造解析に成功している(68, 140, 189)。膜貫通領域の α -helixからつながっているだろうと思われる α -helixがOmpA様構造をもつペプチドグリカン結合ドメインを挟むようにして二量体を作っている。そして, N末端側の α -helixの先に細胞膜があるとすると, この折りたたまれたペリプラズム部分がペプチドグリカンに結合するには遠すぎると思われる。実際にN

末端側の α -helix の構造が変化してペプチドグリカンと相互作用出来るようになることが示されている (図 8A) (72, 189)。固定子の膜貫通領域の構造は、分子動力学シミュレーションによって推測され、イオン透過のモデルが提案されている (図 8B) (116, 131)。エネルギー変換体である PomA/PomB 複合体構造解析は世界中で試みられていたが成功していなかった。しかし、最近、クライオ電子顕微鏡を用いて、全体構造ではないが、一番主要なイオン透過部位と細胞質領域の構造が決定され、A サブユニット 5 分子がリングになった構造に二量体の B サブユニットの膜貫通領域が軸になるように構築されているモデルが提出された (25, 143)。MotA/MotB と相同性がある ExbB/ExbD エネルギー変換体の構造が決定されており、その複合体は

5:2 のストイキオメトリーであることも示されている (14, 15)。ただし、Exb 複合体については他のグループから 6:3 というモデルも出されている (94)。ExbB/ExbD に TonB が結合して、 H^+ 駆動力を使って外膜での輸送を促進させる (121)。TonB の構造解析と蛍光偏光法による測定から、TonB がプロペラの様に回転して輸送を促進するという機構が考えられている (16, 54, 56)。もし、TonB の回転モデルが正しければ、MotB あるいは PomB が MotA や PomA の軸となって回転していることも十分に考えられ、新しい回転モデルが提案されている (17, 25, 143)。

ビブリオ菌の固定子イオン認識部位の特定のため、大腸菌やロドバクター菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) の H^+ 駆動型べん毛モーターとビブリオ菌の Na^+ 駆動型べん毛モーターのキメラ実験が行われている (2, 4, 36)。その結果からは、イオン認識部位の特定はできなかった。しかし、大腸菌の MotB とビブリオ菌の PomB を膜貫通領域直後のプラグ領域で融合させた、ペリプラズム領域が大腸菌の MotB 由来になったキメラタンパク質 (PotB) を PomA とともに大腸菌の *motAB* 欠損株に導入すると運動能が回復し、 Na^+ 駆動型モーターとして働くことが明らかにされた (5)。これは、 H^+ 駆動型の回転子タンパク質と Na^+ 駆動型の固定子タンパク質の間で相互作用できることを示しており、回転力発生機構のロバストネスを示している。分子系統樹から真性細菌の起源に近いとされる超好熱菌 *Aquifex aeolicus* の固定子 B サブユニットのペリプラズム領域を大腸菌の MotB 由来にすれば、 Na^+ 駆動型モーターとして働くことが分かり (161)、回転力発生機構のロバストネスの証明と、べん毛の起源が Na^+ 駆動型であることが提案されている。イオン特異性については、グラム陽性菌のバシラス属の菌で研究が進んでいる。グラム陽性菌の枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は MotA/MotB と相同な固定子タンパク質をもち、 H^+ 駆動力によって運動する (97, 111)。好アルカリ性なバシラス属の菌の中には Na^+ 駆動力を用いて運動するものがあることが知られていた (41)。その菌から MotP/MotS と名付けられた Na^+ 駆動固定子タンパク質が同定され、枯草菌にも H^+ 駆動型の MotA/MotB に加えて別個の固定子が存在することが明らかにされた (49)。これを使ってサブユニットレベルでハイブリッドを作成してみると、MotP/MotB は H^+ 駆動型、MotA/MotS は Na^+ 駆動型となることが示され、B サブユニットがイオン特異性を決めていることが明らかにされた (50)。枯草菌の中で、MotA/MotB の Na^+ 駆動型モーターから、MotB の膜貫通領域のイオンの入り口に対応する部分のアミノ酸変異の導入によって、 H^+ 駆動型モーターに変更できることが明らかにされた (163)。*V. alginolyticus* の PomA/PomB で、枯草菌の変異を参考にして、変異を導入してみたが、イオン特異性の変化するものは得られていない。

ビブリオ菌の固定子タンパク質 PomA と PomB に GFP を融合したタンパク質が作成され局在を可視化することで、固定子複合体の極局在には、回転子構造を必要とする

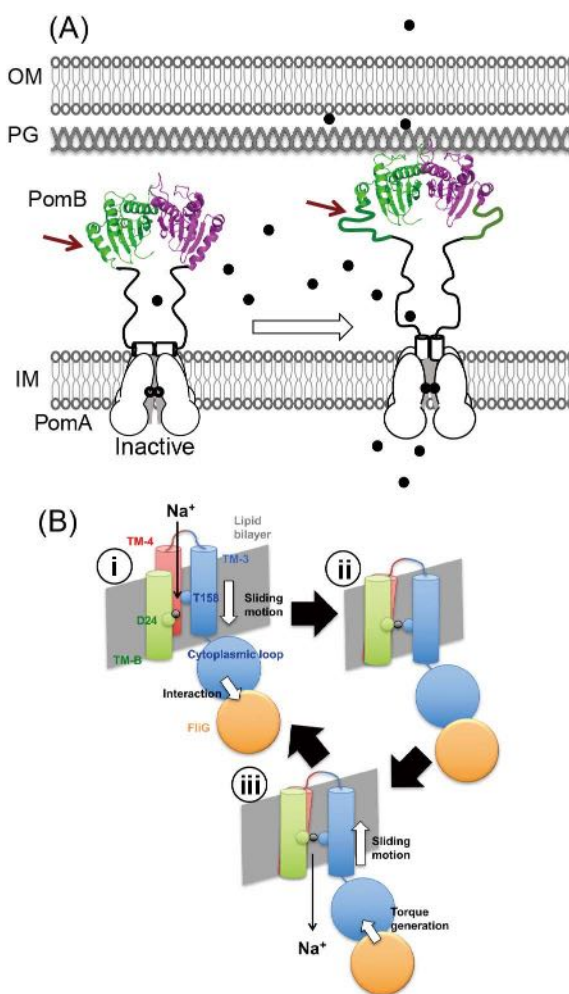


図 8. ビブリオ菌極べん毛固定子複合体の構造変換モデル (A) PomAB からなる固定子複合体のペリプラズム領域が、構造変換をして、ペプチドグリカンあるいは T-リングと相互作用できるように構造変換が起こる。(B) べん毛モーター回転のメカノケミカル共役モデル。i) PomA の細胞質ループと C-リングの FliG-C 末端ドメインが相互作用することで、TM-3 および TM-4 の細胞質側へのスライドを誘起する。ii) この動きで、PomA の膜貫通ヘリックス 3 (TM-3) の T158 が、PomB の膜貫通ヘリックス (TM-B) の D24 に向かって近づき、 Na^+ 結合部位を形成する。iii) Na^+ が細胞質側に放出された後、TM-3 および TM-4 は元の位置に戻る。このスライド運動が、細胞質ループの構造変化を引き起こし、FliG との界面でトルクを生成する。尾上らの論文 (131) より引用した。

ことが示されていた (35)。固定子が動的に解離と集合をしていることは推測されていたが、*V. alginolyticus* においては共役イオンであるナトリウムイオンの存在が、固定子のべん毛モーターに集合に必要であることが示された (34)。そこで我々は、PomA と PomB が膜内で複合体を作り、この複合体がナトリウムイオンと結合することで回転子との相互作用が可能な構造に変化し、べん毛回転子の周りに集合して、モーターとして機能できるようになるというモデルを提案した。さらに、べん毛固定子がモーターの周りに固定されるためには、PomA と回転子タンパク質 FliG の相互作用が必要であることが、べん毛形成するがモーター機能を失った *fliG* の変異体を解析することで明らかになった (70)。*V. alginolyticus* の極べん毛で提案されているモーター構築のモデルを示す (図 9A)。

motX と *motY* については、なぜこの遺伝子に変異が入るとモーター機能が損なわれるかは疑問であった。この 2 つのモータータンパク質の生化学的性質を調べると、膜タンパク質ではなく、シグナル配列をもった外膜に存在する分泌タンパク質であることが明らかにされた (127)。MotX と MotY との直接的な相互作用が示され、さらに MotX と PomB との相互作用が示唆された (126)。MotX と MotY の性質が明らかになる中で、精製したべん毛の基部体構造に、これら 2 つのタンパク質が含まれることが発見された (164)。さらに、電子顕微鏡観察によって極べん毛基部体の LP-リングの下にリング構造が発見され (T リングと命名)、T-リングが MotX と MotY から構成されていることが明らかにされた。T-リング構造に欠損があると、エネルギー変換ユニットである PomAB 複合体がべん毛モーターの周りに集合できなくなることも示されて、モーター機能欠損の理由が判明した。MotY については結晶構造解析が行われ、N 末 (MotY-N) と C 末 (MotY-C) の 2 つのドメインからなり、MotY-N は固定子の回転子周囲への集合に必要であり、MotY-C はペプチドグリカン層に結合することで、固定子-回転子間相互作用を安定化していると推測された (71)。ビブリオ菌極べん毛の基部体において、大腸菌やサルモネラ菌では見られない T-リングという構造がある他に、外膜に対応する LP-リングがやや大きいという特徴がある。基部体を精製してそこに含まれるタンパク質を分析すると、コレラ菌のべん毛形成と運動に関与する 38 kDa の *flgT* 遺伝子産物が含まれることが判明した (95, 167)。さらに調べると、FlgT は LP-リングの外側に、H-リングと名付けた構造を作るために必要であること、FlgT と MotY が直接的な相互作用があり、H-リングがないと T-リングが形成されないことも明らかとなった。FlgT の結晶構造解析に成功し、FlgT が N, M, C と呼ばれる 3 つのドメイン構造をとっており、M ドメインは MotY と、NM のドメインで他の H-リング構成タンパク質と相互作用していることが示された (169)。クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析から、PomB のペリプラズム領域と T-リング構造の相互作用モデルが提案されている

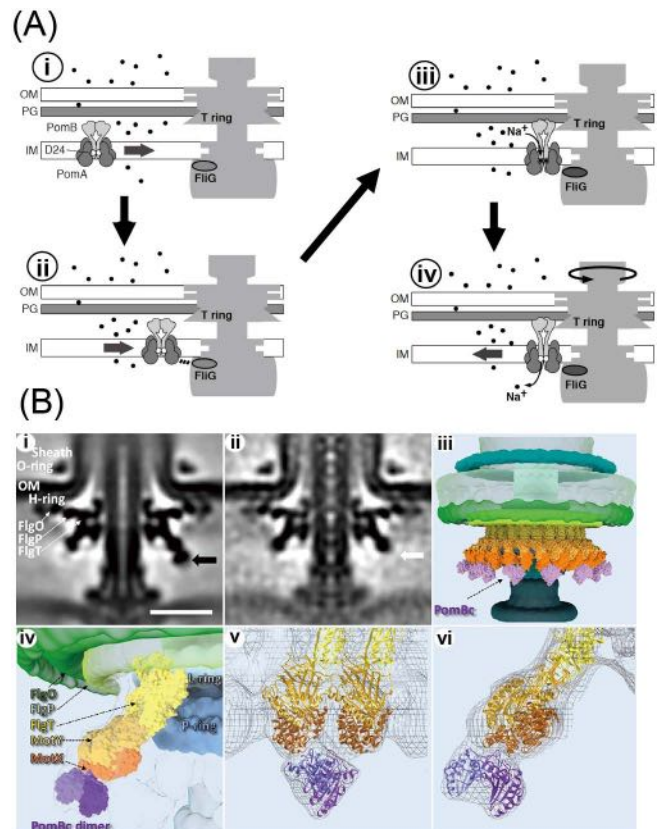


図 9. ビブリオ菌固定子活性化モデルと固定子の固定化機構 (A) PomA と PomB は固定子複合体を形成し、膜上に拡散する (i)。この複合体が極べん毛の基部体に遭遇すると、PomA は C-リングを構成している FliG タンパク質の C 末端ドメインと相互作用し (ii)、この相互作用により固定子複合体に構造変化が引き起こされ、 Na^+ が固定子に流入できるようになる。PomB の Asp24 領域に Na^+ が結合することにより、大きな構造変化を PGB ドメインに引き起こし、固定子が固定される (iii)。次に、結合した Na^+ が Asp24 領域から離れ、細胞質にリリースされることでトルクが生成される (iv)。 Na^+ が解離した固定子複合体は、回転子から解離するが、 Na^+ 濃度が高い環境では、すぐに Na^+ が再結合して、トルクを連続的に発生する。小嶋らの論文 (70) より引用した。(B) ビブリオ菌特異的のリング構造と固定子の固定化。(i) ビブリオ菌極べん毛モーターの細胞膜上部のサブトモグラム平均構造の 2D スライス像。H-リング構成タンパク質の FlgO, FlgP, および FlgT が白抜き文字で標識されている。黒い矢印は、T-リングの下の特徴的な密度を示している。(ii) *pomAB* 欠損菌の極べん毛モーターの細胞膜上部のサブトモグラム平均構造の 2D スライス像。白い矢印で示される領域は、(i) で見られた T-リングの下部の密度の損失を示している。(iii) PomB ペリプラズム部分の結晶構造を、T-リングの下部の密度に紫色でクライオ ET 密度に適合させた。(iv) 拡大図は、PG 結合部位を介して直接相互作用するダイマーの PomB ペリプラズム領域と、T-リングの下部にある MotX を適合させている。(v, vi) クライオ ET 密度マップ (メッシュ) と、FlgT, MotY, MotX および PomB の原子モデルのリボン構造を重ね合わせ表示した。Zhu らの論文 (188) より引用した。

(188) (図 9B)。面白いことに、B サブユニットのペリプラズム領域を大腸菌の MotB 由来にしたキメラタンパク質 PotB では、T-リングが欠損しても、固定子として機能することが示されている (118)。

8. 細菌べん毛モーター回転子

回転子中の C-リングは、MS-リング側から FliG, FliM, FliN がそれぞれ 34, 34, 102 分子でリングを構築すると

考えられている (13)。先にも述べたように C-リングは、固定子と相互作用して回転力発生に関わるだけでなく、回転方向の制御にも重要である。回転方向制御が異常になる変異株の取得を目的として、ランダム変異導入で得られた *V. alginolyticus* を解析すると、方向制御が異常になる変異の多くが *fliG*, *fliM* に生じていた。FliG は、N 末端側から N-terminal (FliG_N), Middle (FliG_M), C-terminal (FliG_C) の 3 つのドメインに分けられ、構造解析が行われ、好熱菌の *Thermotoga maritima* 由来の FliG_C と FliG_M の結晶構造が報告されている (11, 89)。また、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* では全長 FliG の構造が解かれている (84)。残念ながら、部分構造を含め、ビブリオ菌と大腸菌・サルモネラ菌の FliG の構造は解けていない。それぞれのドメインには、β-catenin 等に見られるタンパク質間相互作用に重要な Armadillo repeat motif (ARM) が存在する (46)。ARM はイソロイシン、ロイシン、バリンなどの疎水性側鎖が、α-helix 上で同一の向きを向いている繰り返し配列である。*V. alginolyticus* の FliG は 351 アミノ酸からなる分子量 38.6 kDa のタンパク質であり、FliG_N, FliG_M, FliG_C にはそれぞれ 20–127, 133–202, 235–343 番目のアミノ酸が含まれる。FliF の C 末端アミノ酸残基と FliG と相互作用が直接的に検出されている (122)。FliG_C は固定子の細胞質領域と相互作用することでモーターの回転力の発生に関与する。この相互作用には、荷電残基の寄与が重要であることが遺伝学的にわかっており、少なくとも *V. alginolyticus* の FliG-K284, D301, D308, D309 残基が PomA と相互作用することが示唆されている (159)。FliG_M には、大腸菌において FliM と相互作用することが示されている EHPQR-motif (E144, H145, P146, Q147, R179 残基) と呼ばれる保存性の非常に高い領域が存在する。

FliM は FliG 及び FliN と相互作用するだけでなく、走化性因子である CheY と相互作用する (85, 105)。CheY は FliN とも相互作用する (145)。FliM, FliN が CheY と相互作用することで、べん毛の回転方向が制御される (177)。CheY を介した FliM の構造変化は、FliG に伝わり、FliG と PomA の相互作用界面を変化させることで回転方向を変化させると考えられている。具体的には FliM の構造変化が FliG_M, FliG_C に存在する ARM_M 及び、ARM_C の FliG 分子内/分子間相互作用を変化させることで FliG の構造変化を引き起こす (9, 63, 107)。時計回りでは、ARM_M と ARM_C が分子内で相互作用することにより FliG がコンパクトな構造を取り、反時計回りでは、ARM_M と ARM_C がリング上で隣り合う FliG と分子間相互作用することにより、FliG が伸びた構造を取ると考えられている。この分子内/分子間相互作用は FliG_M に存在する helix_{MC} と呼ばれる α-helix の構造変化によって制御され、時計回りの状態では helix_{MC} がほどけると考えられている。回転方向に異常がみられる FliG 変異が大腸菌やサルモネラ菌で解析されており、それらの変異は、EHPQR-motif, helix_{MC}, FliG_M と FliG_C をつなぐリンカー、ARM_C に存在する。*V.*

alginolyticus の FliG 変異も同様な結果が生じていることから同じような構造変化が起こっていると推測されている。我々は核磁気共鳴法やクライオ電子顕微鏡を用いて、回転方向制御メカニズムの解明に着手しているが (図 10) (13, 117), 回転方向切り替えの際に生じる具体的な FliG の構造変化と、時計回りと反時計回りでトルクを生み出す分子機構はわかっていない。

CheY が C-リングの内側か外側のどちらかに結合するかは議論がなされていた。米国 Yale 大学 Liu 博士との共同研究で、回転方向が時計回りに固定される *V. alginolyticus* の変異体をクライオ電顕で観察すると FliM の外側に CheY の密度がうっすらと見えていた (13)。そして、Liu らのグループがペリプラズムにべん毛をもつボレリア菌 (*Borrelia burgdorferi*) で CheY がリングの外側から FliM に結合していることを見出した (17)。しかしながら、C-リング中の FliM に対して、CheY は忌避シグナルによってリン酸化をうけて C-リングに結合できるようになるが、リン酸化された CheY (CheY-P) がどれだけ結合すると回転方向が時計回りになるのかはわかっていない。FliG の ARM がリング中の隣の FliG 分子の構造変化に影響を与えることから、

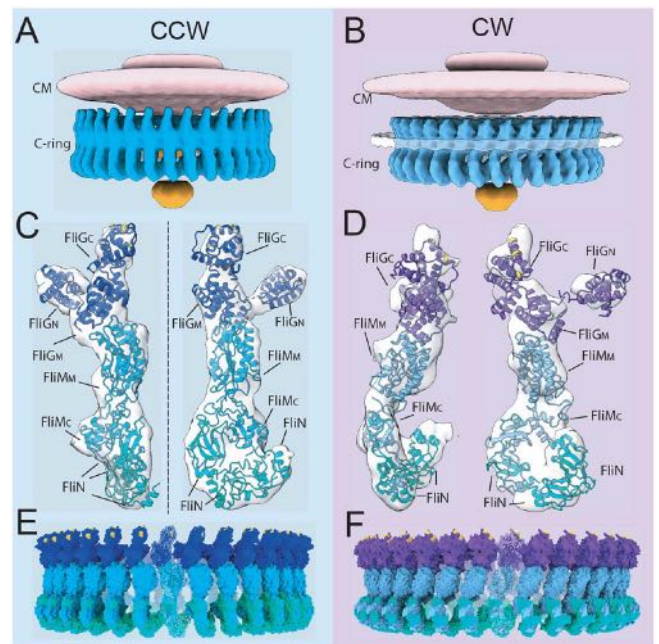


図 10. 反時計回転 (CCW) および時計回転 (CW) の C リングのモデル

CCW モーター (A) および CW モーター (B) のクライオ電子顕微鏡トモグラフィーで得られたべん毛モーター C-リング部分の 3D サーフェスレンダリング。MS リングと細胞質膜 (CM) はピンク色、C-リングは青色、TypeIII 輸送装置はオレンジ色で示した。(C) クライオ電子顕微鏡で得られた CCW の C-リング構造密度 (灰色) に、FliG, FliM, FliN からなる C-リングの 1 つのユニットをあてはめた。ユニットを 2 つの異なる方向から見た図を示した。FliG は青、FliM は水色、FliN は緑で示す。(D) クライオ電子顕微鏡で得られた CW の C-リング構造密度 (灰色) に、FliG, FliM, FliN からなる C-リングの 1 つのユニットをあてはめた。ユニットを 2 つの異なる方向から見た図を示した。FliG は紫、FliM は水色、FliN は緑で示す。(E) C-リングのユニットを 34 回転対称にあてはめて CCW 構造 (E) と CW 構造 (F) をモデル化した。Carroll らの論文 (13) より引用した。

CheY の結合は FliM に対してアロステリックに働き、それに応答した FliG の構造変化がリング全体に広がることで、すべての FliM に CheY-P が結合していても C-リング全体が大きく構造変化すると予想している。

9. べん毛モーターの走化性応答

先にも述べたように回転方向の制御は、走化性シグナル (Che) が C-リングに伝わることによって行われる。走化性は、細胞がべん毛を回転させて移動することにより変化した細胞周囲の環境変化を、走化性受容体が認識しべん毛モーターの回転方向を変化させるシグナル応答である (98, 175) (図 11)。大腸菌では、細胞膜上の Tsr あるいは Tar, ビブリオ菌では Mlp24 あるいは Mlp37 などと呼ばれる走化性受容体 (MCPs: methyl-accepting chemotaxis proteins) に、糖やアミノ酸などの誘引物質や Phenol や一部のアミノ酸等の忌避物質が結合することでシグナル伝達が開始される。発生したシグナルは、Che 因子のリン酸化/脱リン酸化を介したリン酸基の転移を介して、C-リングの構造を変化させる。具体的には、CheW, CheA, CheY の順にリン酸基が伝達され、リン酸化を受けた CheY (CheY-P) が FliM に結合することで回転方向を反時計回りから時計回りに切り替える。同じく Che 因子である CheZ は CheY-P の脱リン酸化を促進する働きがあり、CheY が FliM から外れると回転方向が反時計回りに戻る。つまり、細胞質中の CheY と CheY-P の濃度の比が、回転方向を決めるのに重要で、細胞周囲に誘引物質が多いとまっすぐ泳ぐ反時計方向に回転するが、忌避物質が多いと回転方向を切り替えて (大腸菌ではタンブルとも呼ばれる) 時計回り

回転が優位になる。反時計回りと時計回りを組み合わせることにより、細胞は自身の生存に有利な環境にとどまることができる。この基本的な走化性のシステムは細菌に共通である。

興味深いことにビブリオ菌では、側べん毛は、忌避シグナルによる CheY-P の増加によってモーターが止まり、極べん毛は、忌避シグナルにより時計回りでタンブルするのではなく、時計回りと反時計回りの切り替えが増加し、その場を行ったり来たりする遊泳を示す (45, 66)。極べん毛では、べん毛を先にして泳ぐとべん毛同士がからまってしまうことになる。この極べん毛の回転方向切り替え頻度が増加した変異が、FliG に E144D として見つかっている (117)。この残基は C-リング構造において FliM との境界面にある。大腸菌の CheY-P に比べてビブリオ菌の CheY-P が FliM から速く解離することにより、大腸菌と異なる応答を行なっているのではないかと考えられている。もう一点ビブリオ菌での走化性において大腸菌とは異なる特徴として、走化性受容体様蛋白質が多いことが挙げられる。*V. cholerae* では 40 個以上の走化性レセプター様遺伝子 (MLP) を持っていると推定されている (12, 39)。*V. cholerae* の 3 セットの *che* 遺伝子クラスターのうち、他の *Vibrio* の *che* 遺伝子との相同性が高いのはクラスター II の遺伝子である。3 つの *che* 遺伝子クラスターの走化性への関与は、*cheA* の機能解析によって調べられた (37)。そこで、走化性シグナル伝達系の出力を担う CheY に着目して解析したところ、べん毛の逆回転を引き起こしたのは、クラスター II の CheY3 のみであった (47)。やはり走化性に関与するのはクラスター II だけであり、クラスター I と III は走化性以外の生理機能への関与が予想されている。一方、*V. alginolyticus* や *V. parahaemolyticus* は、極べん毛と側べん毛という 2 種類のべん毛をもつが、2 つのべん毛系において、走化性は移動に必要である (144)。二つのべん毛が一つの *che* 遺伝子群によって制御されていることが示されている (66)。また、クラスター I のシステムは、細胞エネルギー状態の低下に応答して、細胞の状態をコントロールするために使われるのではないかと推測されている (40)。ビブリオ菌では、大腸菌よりも多くの走化性レセプターをもっているが、構造も大腸菌の Tsr や Tar とは少し異なることが分かっている。大腸菌では 4HB (four-helix bundle) ドメインと呼ばれる細胞外領域をもつレセプターを持つのに対して、ビブリオ菌では Cache (動物の voltage-gated Ca^{2+} channel と細菌の chemoreceptor からとった名前) ドメインと呼ばれる細胞外タンパク質領域をもつレセプターを持っている (96, 132, 174)。*V. cholerae* の走化性様レセプターの Mlp7, Mlp8, Mlp24 と Mlp30 が病原性に関わっていることが示されている (18, 119)。Mlp24 に相同性をもつタウリンとセリンに走化性応答を引き起こす主要な *V. cholerae* のレセプターである Mlp37 の細胞外領域の構造が決定されている (120, 157)。Mlp24 の細胞外領域の構造も決定され、 Ca^{2+} によってリガンドの親和性が大きく変化する

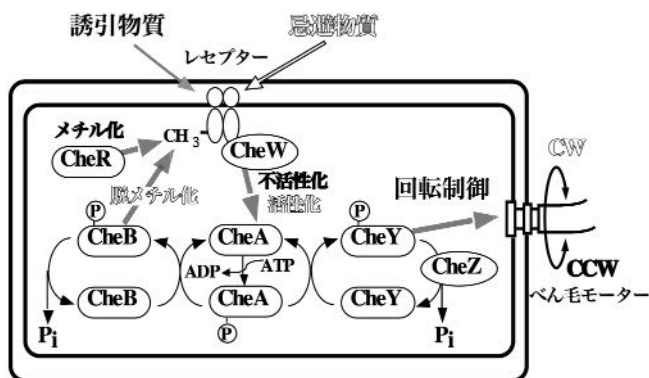


図 11. 細菌の走化性シグナル伝達経路

大腸菌の走化性シグナル伝達経路を示す。細胞膜状上の走化性レセプターが忌避物質 (repellent) を認識すると、CheA の自己リン酸化が促進され、リン酸基が CheY に転移される。リン酸化型 CheY はべん毛モーターのスイッチに結合し、べん毛の回転方向を時計方向 (CW) に逆転させる。その結果、菌はタンブルし、遊泳方向を変える。CheY は自己脱リン酸化あるいは CheZ によって脱リン酸化されモーターから解離する。一方、誘引物質を認識すると、CheA の自己リン酸化は抑制され、結果的に菌は滑らかな遊泳を続ける。レセプターは、CheR によってメチル化、CheB によって脱メチル化される。メチル化されたレセプターは誘引物質を認識しにくくなり CheA 活性の抑制が低下し、結果的にタンブルする確率が上昇する。ダイマーのレセプターがさらに 3 つ集まって、集合体となりそこに CheW と CheA が結合した状態でシグナル伝達する。

ことも示されている (158)。ビブリオ菌が多くの走化性様レセプターをもつことは、多様な環境に対応するためだと考えられている。それらレセプターが生存にどのように必要であるかについては、今後の研究を待つ必要がある。

おわりに

我々は *V. alginolyticus* の極べん毛の研究を長年やってきた。ヒトに病原性を示す腸炎ビブリオ菌 *V. parahaemolyticus* とは、同じ菌であると言っても過言ではなく、べん毛に関しては、そのまま腸炎ビブリオ菌にあてはめて議論できる。また、極べん毛に関しては、*V. cholerae* のべん毛とほぼ同じである。機能的な観点からでは、大腸菌のべん毛の固定子をビブリオのナトリウム型の固定子と入れ替えても、大腸菌でも機能する。さらには、超高熱菌 *Aquifex* の固定子タンパク質を入れ替えても機能することが示されている。これは、種間において機能的に重要な構造は保持される良い例ではないだろうか。本総説の筆者の一人である本間は、今年度で大学を退職する。細菌のべん毛モーター研究のさらなる発展を祈りたい。

謝 辞

名古屋大学理学部分子生物学科の分子第4講座から、今は、大学院理学研究科生命理学専攻生体膜機能グループと名前は変わったが、多くの共同研究者や学生がべん毛研究に携わってくれた。この総説にも引用した多くの成果を支えてくれた。そして、名古屋大学の素晴らしい研究環境と共同研究者に感謝したい。また、細菌の電子顕微鏡写真は、名古屋大学技術職員の牧貴美香博士に撮っていただいた。

本稿内容について、開示すべき COI 関係にある企業などはありません。

文 献

- 1) Allen, R.D., Baumann, P. (1971): Structure and arrangement of flagella in species of the genus *Beneckea* and *Photobacterium fischeri*. *J. Bacteriol.* **107**, 295–302.
- 2) Asai, Y., Kawagishi, I., Sockett, E., Homma, M. (1999): Hybrid motor with the H⁺- and Na⁺-driven components can rotate *Vibrio* polar flagella by using sodium ions. *J. Bacteriol.* **181**, 6322–6338.
- 3) Asai, Y., Kojima, S., Kato, H., Nishioka, N., Kawagishi, I., Homma, M. (1997): Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium. *J. Bacteriol.* **179**, 5104–5110.
- 4) Asai, Y., Sockett, R.E., Kawagishi, I., Homma, M. (2000): Coupling ion specificity of chimeras between H⁺- and Na⁺-driven motor proteins, MotB and PomB, in *Vibrio* polar flagella. *EMBO J.* **19**, 3639–3648.
- 5) Asai, Y., Yakushi, T., Kawagishi, I., Homma, M. (2003): Ion-coupling determinants of Na⁺-driven and H⁺-driven flagellar motors. *J. Mol. Biol.* **327**, 453–463.
- 6) Atsumi, T., Maekawa, Y., Yamada, T., Kawagishi, I., Imae, Y., Homma, M. (1996): Effect of viscosity on swimming by the lateral and polar flagella of *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* **178**,

- 7) Atsumi, T., McCarter, L., Imae, Y. (1992): Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces. *Nature* **355**, 182–184.
- 8) Austin, B. (2010): *Vibriosis* as causal agents of zoonoses. *Vet. Microbiol.* **140**, 310–317.
- 9) Baker, M.A., Hynson, R.M., Ganuelas, L.A., Mohammadi, N.S., Liew, C.W., Rey, A.A., Duff, A.P., Whitten, A.E., Jeffries, C.M., Delalez, N.J., Morimoto, Y.V., Stock, D., Armitage, J.P., Turberfield, A.J., Namba, K., Berry, R.M., Lee, L.K. (2016): Domain-swap polymerization drives the self-assembly of the bacterial flagellar motor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 197–203.
- 10) Baumann, P., Baumann, L. (1977): Biology of the marine enterobacteria: genera *Beneckea* and *Photobacterium*. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 39–61.
- 11) Brown, P.N., Hill, C.P., Blair, D.F. (2002): Crystal structure of the middle and C-terminal domains of the flagellar rotor protein FliG. *EMBO J.* **21**, 3225–3234.
- 12) Butler, S.M., Camilli, A. (2005): Going against the grain: chemotaxis and infection in *Vibrio cholerae*. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 611–620.
- 13) Carroll, B.L., Nishikino, T., Guo, W., Zhu, S., Kojima, S., Homma, M., Liu, J. (2020): The flagellar motor of *Vibrio alginolyticus* undergoes major structural remodeling during rotational switching. *eLife* **9**, e61446.
- 14) Celia, H., Botos, I., Ni, X., Fox, T., De Val, N., Lloubes, R., Jiang, J., Buchanan, S.K. (2019): Cryo-EM structure of the bacterial Ton motor subcomplex ExbB-ExbD provides information on structure and stoichiometry. *Commun. Biol.* **2**, 358.
- 15) Celia, H., Noinaj, N., Zakharov, S.D., Bordignon, E., Botos, I., Santamaria, M., Barnard, T.J., Cramer, W.A., Lloubes, R., Buchanan, S.K. (2016): Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction. *Nature* **538**, 60–65.
- 16) Chang, C., Mooser, A., Pluckthun, A., Wlodawer, A. (2001): Crystal structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold. *J. Biol. Chem.* **276**, 27535–27540.
- 17) Chang, Y., Zhang, K., Carroll, B.L., Zhao, X., Charon, N.W., Norris, S.J., Motaleb, M., Li, C., Liu, J. (2020): Molecular mechanism for rotational switching of the bacterial flagellar motor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* doi: 10.1038/s41594-020-0497-2
- 18) Chaparro, A.P., Ali, S.K., Klose, K.E. (2010): The ToxT-dependent methyl-accepting chemoreceptors AcfB and TcpI contribute to *Vibrio cholerae* intestinal colonization. *FEMS Microbiol. Lett.* **302**, 99–105.
- 19) Chernyak, B.V., Dibrov, P.A., Glagolev, A.N., Sherman, M.Y., Skulachev, V.P. (1983): A novel type of energetics in a marine alkali-tolerant bacterium: Na⁺-driven motility and sodium cycle. *FEBS Lett.* **164**, 38–42.
- 20) Chu, J., Liu, J., Hoover, T.R. (2020): Phylogenetic distribution, ultrastructure, and function of bacterial flagellar sheaths. *Biomolecules* **10**, 363.
- 21) Correa, N.E., Lauriano, C.M., Mcgee, R., Klose, K.E. (2000): Phosphorylation of the flagellar regulatory protein FlrC is necessary for *Vibrio cholerae* motility and enhanced colonization. *Mol. Microbiol.* **35**, 743–755.
- 22) Correa, N.E., Peng, F., Klose, K.E. (2005): Roles of the regulatory proteins FlhF and FlhG in the *Vibrio cholerae* flagellar transcription hierarchy. *J. Bacteriol.* **187**, 6324–6332.
- 23) Dasgupta, N., Arora, S.K., Ramphal, R. (2000): *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**, 357–364.
- 24) Dean, G.D., Macnab, R.M., Stader, J., Matsumura, P., Burks, C. (1984): Gene sequence and predicted amino acid sequence of

- the *motA* protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **159**, 991–999.
- 25) Deme, J.C., Johnson, S., Vickery, O., Muellbauer, A., Monkhouse, H., Griffiths, T., James, R.H., Berks, B.C., Coulton, J.W., Stansfeld, P.J., Lea, S.M. (2020): Structures of the stator complex that drives rotation of the bacterial flagellum. Nat. Microbiol. **5**, 1553–1564.
 - 26) Deng, W., Marshall, N.C., Rowland, J.L., McCoy, J.M., Worrall, L.J., Santos, A.S., Strynadka, N.C.J., Finlay, B.B. (2017): Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. Nat. Rev. Microbiol. **15**, 323–337.
 - 27) diCenzo, G.C., Finan, T.M. (2017): The divided bacterial genome: structure, function, and evolution. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **81**, e00019-17
 - 28) Echazarreta, M.A., Klose, K.E. (2019): Vibrio flagellar synthesis. Front. Cell Infect. Microbiol. **9**, 131.
 - 29) Egan, E.S., Waldor, M.K. (2003): Distinct replication requirements for the two *Vibrio cholerae* chromosomes. Cell **114**, 521–530.
 - 30) Evans, L.D., Stafford, G.P., Ahmed, S., Fraser, G.M., Hughes, C. (2006): An escort mechanism for cycling of export chaperones during flagellum assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **103**, 17474–17479.
 - 31) Ferreira, J.L., Gao, F.Z., Rossmann, F.M., Nans, A., Brenzinger, S., Hosseini, R., Wilson, A., Briegel, A., Thormann, K.M., Rosenthal, P.B., Beeby, M. (2019): gamma-proteobacteria eject their polar flagella under nutrient depletion, retaining flagellar motor relic structures. PLoS Biol. **17**, e3000165.
 - 32) Francis, N.R., Sosinsky, G.E., Thomas, D., Derosier, D.J. (1994): Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. J. Mol. Biol. **235**, 1261–1270.
 - 33) Fraser, G.M., Bennett, J.C., Hughes, C. (1999): Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FlIT, putative chaperones for flagellum assembly. Mol. Microbiol. **32**, 569–580.
 - 34) Fukuoka, H., Wada, T., Kojima, S., Ishijima, A., Homma, M. (2009): Sodium-dependent dynamic assembly of membrane complexes in sodium-driven flagellar motors. Mol. Microbiol. **71**, 825–835.
 - 35) Fukuoka, H., Yakushi, T., Kusumoto, A., Homma, M. (2005): Assembly of motor proteins, PomA and PomB, in the Na⁺-driven stator of the flagellar motor. J. Mol. Biol. **351**, 707–717.
 - 36) Gosink, K.K., Häse, C.C. (2000): Requirements for conversion of the Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio cholerae* to the H⁺-driven motor of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **182**, 4234–4240.
 - 37) Gosink, K.K., Kobayashi, R., Kawagishi, I., Häse, C.C. (2002): Analyses of the roles of the three *cheA* homologs in chemotaxis of *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. **184**, 1767–1771.
 - 38) Green, J.C., Kahramanoglou, C., Rahman, A., Pender, A.M., Charbonnel, N., Fraser, G.M. (2009): Recruitment of the earliest component of the bacterial flagellum to the old cell division pole by a membrane-associated signal recognition particle family GTP-binding protein. J. Mol. Biol. **391**, 679–690.
 - 39) Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., Gill, S.R., Nelson, K.E., Read, T.D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R.D., Nierman, W.C., White, O. (2000): DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature **406**, 477–483.
 - 40) Hiremath, G., Hyakutake, A., Yamamoto, K., Ebisawa, T., Nakamura, T., Nishiyama, S., Homma, M., Kawagishi, I. (2015): Hypoxia-induced localization of chemotaxis-related signaling proteins in *Vibrio cholerae*. Mol. Microbiol. **95**, 780–790.
 - 41) Hirota, N., Imae, Y. (1983): Na⁺-driven flagellar motors of an alkalophilic *Bacillus* strain YN-1. J. Biol. Chem. **258**, 10577–10580.
 - 42) Homma, M., Aizawa, S.-I., Dean, G.E., Macnab, R.M. (1987): Identification of the M-ring protein of the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**, 7483–7487.
 - 43) Homma, M., Iino, T., Kutsukake, K., Yamaguchi, S. (1986): *In vitro* reconstitution of flagellar filaments onto hooks of filamentless mutants of *Salmonella typhimurium* by addition of hook-associated proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **83**, 6169–6173.
 - 44) Homma, M., Kutsukake, K., Iino, T., Yamaguchi, S. (1984): Hook-associated proteins essential for flagellar filament formation in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **157**, 100–108.
 - 45) Homma, M., Oota, H., Kojima, S., Kawagishi, I., Imae, Y. (1996): Chemotactic responses to an attractant and a repellent in the flagellar systems of *Vibrio alginolyticus*. Microbiology **142**, 2777–2783.
 - 46) Huber, A.H., Nelson, W.J., Weis, W.I. (1997): Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. Cell **90**, 871–882.
 - 47) Hyakutake, A., Homma, M., Austin, M.J., Boin, M.A., Hase, C.C., Kawagishi, I. (2005): Only one of the five CheY homologs in *Vibrio cholerae* directly switches flagellar rotation. J. Bacteriol. **187**, 8403–8410.
 - 48) Inaba, S., Nishigaki, T., Takekawa, N., Kojima, S., Homma, M. (2017): Localization and domain characterization of the SflA regulator of flagellar formation in *Vibrio alginolyticus*. Genes Cells **22**, 619–627.
 - 49) Ito, M., Hicks, D.B., Henkin, T.M., Guffanti, A.A., Powers, B.D., Zvi, L., Uematsu, K., Krulwich, T.A. (2004): MotPS is the stator-force generator for motility of alkaliphilic *Bacillus*, and its homologue is a second functional Mot in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **53**, 1035–1049.
 - 50) Ito, M., Terahara, N., Fujinami, S., Krulwich, T.A. (2005): Properties of motility in *Bacillus subtilis* powered by the H⁺-coupled MotAB flagellar stator, Na⁺-coupled MotPS or hybrid stators MotAS or MotPB. J. Mol. Biol. **352**, 396–408.
 - 51) Jaques, S., Kim, Y.K., McCarter, L.L. (1999): Mutations conferring resistance to phenamil and amiloride, inhibitors of sodium-driven motility of *Vibrio parahaemolyticus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**, 5740–5745.
 - 52) Jha, J.K., Demarre, G., Venkova-Canova, T., Chatteraj, D.K. (2012): Replication regulation of *Vibrio cholerae* chromosome II involves initiator binding to the origin both as monomer and as dimer. Nucleic Acids Res. **40**, 6026–6038.
 - 53) Johnson, S., Fong, Y.H., Deme, J.C., Furlong, E.J., Kuhlen, L., Lea, S.M. (2020): Symmetry mismatch in the MS-ring of the bacterial flagellar rotor explains the structural coordination of secretion and rotation. Nat. Microbiol. **5**, 966–975.
 - 54) Jordan, L.D., Zhou, Y., Smallwood, C.R., Lill, Y., Ritchie, K., Yip, W.T., Newton, S.M., Klebba, P.E. (2013): Energy-dependent motion of TonB in the Gram-negative bacterial inner membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **110**, 11553–11558.
 - 55) Karlinsey, J.E., Lonner, J., Brown, K.L., Hughes, K.T. (2000): Translation/secretion coupling by type III secretion systems. Cell **102**, 487–497.
 - 56) Kaserer, W.A., Jiang, X., Xiao, Q., Scott, D.C., Bauler, M.,

- Copeland, D., Newton, S.M., Klebba, P.E. (2008): Insight from TonB hybrid proteins into the mechanism of iron transport through the outer membrane. *J. Bacteriol.* **190**, 4001–4016.
- 57) Kawagishi, I., Imagawa, M., Imae, Y., Mccarter, L., Homma, M. (1996): The sodium-driven polar flagellar motor of marine *Vibrio* as the mechanosensor that regulates lateral flagellar expression. *Mol. Microbiol.* **20**, 693–699.
- 58) Kawagishi, I., Maekawa, Y., Atsumi, T., Homma, M., Imae, Y. (1995): Isolation of the polar and lateral flagellum-defective mutants in *Vibrio alginolyticus* and identification of their flagellar driving energy sources. *J. Bacteriol.* **177**, 5158–5160.
- 59) Kawagishi, I., Nakada, M., Nishioka, N., Homma, M. (1997): Cloning of a *Vibrio alginolyticus* *rpoN* gene that is required for polar flagellar formation. *J. Bacteriol.* **179**, 6851–6854.
- 60) Keyhani, N.O., Roseman, S. (1999): Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 108–122.
- 61) Khanra, N., Rossi, P., Economou, A., Kalodimos, C.G. (2016): Recognition and targeting mechanisms by chaperones in flagellum assembly and operation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 9798–9803.
- 62) Kim, Y.K., Mccarter, L.L. (2000): Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **182**, 3693–3704.
- 63) Kinoshita, M., Furukawa, Y., Uchiyama, S., Imada, K., Namba, K., Minamino, T. (2018): Insight into adaptive remodeling of the rotor ring complex of the bacterial flagellar motor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **496**, 12–17.
- 64) Kitaoka, M., Nishigaki, T., Ihara, K., Nishioka, N., Kojima, S., Homma, M. (2013): A novel dnaJ family gene, *sflA*, encodes an inhibitor of flagellation in marine *Vibrio* species. *J. Bacteriol.* **195**, 816–822.
- 65) Klose, K.E., Mekalanos, J.J. (1998): Differential regulation of multiple flagellins in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **180**, 303–316.
- 66) Kojima, M., Kubo, R., Yakushi, T., Homma, M., Kawagishi, I. (2007): The bidirectional polar and unidirectional lateral flagellar motors of *Vibrio alginolyticus* are controlled by a single CheY species. *Mol. Microbiol.* **64**, 57–67.
- 67) Kojima, M., Nishioka, N., Kusumoto, A., Yagasaki, J., Fukuda, T., Homma, M. (2011): Conversion of mono-polar to peritrichous flagellation in *Vibrio alginolyticus*. *Microbiol. Immunol.* **55**, 76–83.
- 68) Kojima, S., Imada, K., Sakuma, M., Sudo, Y., Kojima, C., Minamino, T., Homma, M., Namba, K. (2009): Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB. *Mol. Microbiol.* **73**, 710–718.
- 69) Kojima, S., Imura, Y., Hirata, H., Homma, M. (2020): Characterization of the MinD/ParA-type ATPase FlhG in *Vibrio alginolyticus* and implications for function of its monomeric form. *Genes Cells* **25**, 279–287.
- 70) Kojima, S., Nonoyama, N., Takekawa, N., Fukuoka, H., Homma, M. (2011): Mutations targeting the C-terminal domain of FlhG can disrupt motor assembly in the Na⁺-driven flagella of *Vibrio alginolyticus*. *J. Mol. Biol.* **414**, 62–74.
- 71) Kojima, S., Shinohara, A., Terashima, H., Yakushi, T., Sakuma, M., Homma, M., Namba, K., Imada, K. (2008): Insights into the stator assembly of the *Vibrio* flagellar motor from the crystal structure of MotY. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 7696–7701.
- 72) Kojima, S., Takao, M., Almira, G., Kawahara, I., Sakuma, M., Homma, M., Kojima, C., Imada, K. (2018): The helix rearrangement in the periplasmic domain of the flagellar stator B subunit activates peptidoglycan binding and ion influx. *Structure* **26**, 590–598.
- 73) Kojima, S., Terashima, H., Homma, M. (2020): Regulation of the single polar flagellar biogenesis. *Biomolecules* **10**, 533.
- 74) Kondo, S., Homma, M., Kojima, S. (2017): Analysis of the GTPase motif of FlhF in the control of the number and location of polar flagella in *Vibrio alginolyticus*. *Biophys. Physicobiol.* **14**, 173–181.
- 75) Kondo, S., Imura, Y., Mizuno, A., Homma, M., Kojima, S. (2018): Biochemical analysis of GTPase FlhF which controls the number and position of flagellar formation in marine *Vibrio*. *Sci. Rep.* **8**, 12115.
- 76) Koonin, E.V., Makarova, K.S., Aravind, L. (2001): Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 709–742.
- 77) Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K., Aizawa, S. (1992): Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **226**, 433–446.
- 78) Kuhlén, L., Abrusci, P., Johnson, S., Gault, J., Deme, J., Caesar, J., Dietsche, T., Mebrhatu, M.T., Ganief, T., Macek, B., Wagner, S., Robinson, C.V., Lea, S.M. (2018): Structure of the core of the type III secretion system export apparatus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 583–590.
- 79) Kuhlén, L., Johnson, S., Zeitler, A., Baurle, S., Deme, J.C., Caesar, J.J.E., Debo, R., Fisher, J., Wagner, S., Lea, S.M. (2020): The substrate specificity switch FlhB assembles onto the export gate to regulate type three secretion. *Nat. Commun.* **11**, 1296.
- 80) Kusumoto, A., Kamisaka, K., Yakushi, T., Terashima, H., Shinohara, A., Homma, M. (2006): Regulation of polar flagellar number by the *flhF* and *flhG* genes in *Vibrio alginolyticus*. *J. Biochem.* **139**, 113–121.
- 81) Kusumoto, A., Shinohara, A., Terashima, H., Kojima, S., Yakushi, T., Homma, M. (2008): Collaboration of FlhF and FlhG to regulate polar-flagella number and localization in *Vibrio alginolyticus*. *Microbiology* **154**, 1390–1399.
- 82) Kutsukake, K., Ikebe, T., Yamamoto, S. (1999): Two novel regulatory genes, *fliT* and *fliz*, in the flagellar regulon of *Salmonella*. *Genes Genet. Syst.* **74**, 287–292.
- 83) Kutsukake, K., Iyoda, S., Ohnishi, K., Iino, T. (1994): Genetic and molecular analyses of the interaction between the flagellum-specific sigma and anti-sigma factors in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.* **13**, 4568–4576.
- 84) Lee, L.K., Ginsburg, M.A., Crovace, C., Donohoe, M., Stock, D. (2010): Structure of the torque ring of the flagellar motor and the molecular basis for rotational switching. *Nature* **466**, 996–1000.
- 85) Lee, S.Y., Cho, H.S., Pelton, J.G., Yan, D., Berry, E.A., Wemmer, D.E. (2001): Crystal structure of activated CheY. Comparison with other activated receiver domains. *J. Biol. Chem.* **276**, 16425–16431.
- 86) Li, H., Sourjik, V. (2011): Assembly and stability of flagellar motor in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **80**, 886–899.
- 87) Liu, X.F., Cao, Y., Zhang, H.L., Chen, Y.J., Hu, C.J. (2015): Complete Genome Sequence of *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749T. *Genome Announc.* **3**, e01500-14.
- 88) Liu, X.Y., Matsumura, P. (1994): The FlhD;FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J. Bacteriol.* **176**, 7345–7351.
- 89) Lloyd, S.A., Whitby, F.G., Blair, D.F., Hill, C.P. (1999): Structure of the C-terminal domain of FlhG, a component of the rotor in the bacterial flagellar motor. *Nature* **400**, 472–475.
- 90) Lynch, M.J., Levenson, R., Kim, E.A., Sircar, R., Blair, D.F., Dahlquist, F.W., Crane, B.R. (2017): Co-folding of a FlhF-FlhG split domain forms the basis of the MS: C ring interface within the bacterial flagellar motor. *Structure* **25**, 317–328.

- 91) Macnab, R.M. (1992): Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 131–158.
- 92) Macnab, R.M. (1999): The bacterial flagellum: reversible rotary propeller and type III export apparatus. *J. Bacteriol.* **181**, 7149–7153.
- 93) Macnab, R.M. (2003): How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 77–100.
- 94) Maki-Yonekura, S., Matsuoka, R., Yamashita, Y., Shimizu, H., Tanaka, M., Iwabuki, F., Yonekura, K. (2018): Hexameric and pentameric complexes of the ExbBD energizer in the Ton system. *eLife* **7**, e35419.
- 95) Martinez, R.M., Jude, B.A., Kirn, T.J., Skorupski, K., Taylor, R.K. (2010): Role of FlgT in Anchoring the Flagellum of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **192**, 2085–2092.
- 96) Matilla, M.A., Krell, T. (2017): Chemoreceptor-based signal sensing. *Curr. Opin. Biotechnol.* **45**, 8–14.
- 97) Matsuura, S., Shioi, J., Imae, Y. (1977): Motility in *Bacillus subtilis* driven by an artificial protonmotive force. *FEBS Lett.* **82**, 187–190.
- 98) Mauriello, E.M.F., Jones, C., Moine, A., Armitage, J.P. (2018): Cellular targeting and segregation of bacterial chemosensory systems. *FEMS Microbiol. Rev.* **42**, 462–476.
- 99) Mccarter, L., Hilmen, M., Silverman, M. (1988): Flagellar dynamometer controls swarmer cell differentiation of *V. parahaemolyticus*. *Cell* **54**, 345–351.
- 100) Mccarter, L.L. (1994): MotX, the channel component of the sodium-type flagellar motor. *J. Bacteriol.* **176**, 5988–5998.
- 101) Mccarter, L.L. (1994): MotY, a component of the sodium-type flagellar motor. *J. Bacteriol.* **176**, 4219–4225.
- 102) Mccarter, L.L. (1995): Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **177**, 1595–1609.
- 103) Mccarter, L.L. (2001): Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 445–462.
- 104) Mccarter, L.L. (2004): Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 18–29.
- 105) Mcevoy, M.M., Bren, A., Eisenbach, M., Dahlquist, F.W. (1999): Identification of the binding interfaces on CheY for two of its targets, the phosphatase CheZ and the flagellar switch protein *fliM*. *J. Mol. Biol.* **289**, 1423–1433.
- 106) Minamino, T. (2014): Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 1642–1648.
- 107) Minamino, T., Imada, K., Kinoshita, M., Nakamura, S., Morimoto, Y.V., Namba, K. (2011): Structural insight into the rotational switching mechanism of the bacterial flagellar motor. *PLoS Biol.* **9**, e1000616.
- 108) Minamino, T., Kinoshita, M., Hara, N., Takeuchi, S., Hida, A., Koya, S., Glenwright, H., Imada, K., Aldridge, P.D., Namba, K. (2012): Interaction of a bacterial flagellar chaperone FlgN with FlhA is required for efficient export of its cognate substrates. *Mol. Microbiol.* **83**, 775–788.
- 109) Minamino, T., Macnab, R.M. (1999): Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J. Bacteriol.* **181**, 1388–1394.
- 110) Minamino, T., Namba, K. (2008): Distinct roles of the FlhI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* **451**, 485–488.
- 111) Mirel, D.B., Lustre, V.M., Chamberlin, M.J. (1992): An operon of *Bacillus subtilis* motility genes transcribed by the sigma D form of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **174**, 4197–4204.
- 112) Miwatani, T., Shinoda, S., Fujino, T. (1970): Purification of monotrichous flagella of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biken J.* **13**, 149–155.
- 113) Morimoto, Y.V., Ito, M., Hiraoka, K.D., Che, Y.S., Bai, F., Kami-Ike, N., Namba, K., Minamino, T. (2014): Assembly and stoichiometry of FlhF and FlhA in *Salmonella* flagellar basal body. *Mol. Microbiol.* **91**, 1214–1226.
- 114) Namba, K., Yamashita, I., Vonderviszt, F. (1989): Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature* **342**, 648–654.
- 115) Nambu, T., Minamino, T., Macnab, R.M., Kutsukake, K. (1999): Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **181**, 1555–1561.
- 116) Nishihara, Y., Kitao, A. (2015): Gate-controlled proton diffusion and protonation-induced ratchet motion in the stator of the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 7737–7742.
- 117) Nishikino, T., Hijikata, A., Miyanoiri, Y., Onoue, Y., Kojima, S., Shirai, T., Homma, M. (2018): Rotational direction of flagellar motor from the conformation of FlhG middle domain in marine *Vibrio*. *Sci. Rep.* **8**, 17793.
- 118) Nishino, Y., Onoue, Y., Kojima, S., Homma, M. (2015): Functional chimeras of flagellar stator proteins between *E. coli* MotB and *Vibrio* PomB at the periplasmic region in *Vibrio* or *E. coli*. *Microbiologyopen* **4**, 323–331.
- 119) Nishiyama, S., Suzuki, D., Itoh, Y., Suzuki, K., Tajima, H., Hyakutake, A., Homma, M., Butler-Wu, S.M., Camilli, A., Kawagishi, I. (2012): Mlp24 (McpX) of *Vibrio cholerae* implicated in pathogenicity functions as a chemoreceptor for multiple amino acids. *Infect. Immun.* **80**, 3170–3178.
- 120) Nishiyama, S., Takahashi, Y., Yamamoto, K., Suzuki, D., Itoh, Y., Sumita, K., Uchida, Y., Homma, M., Imada, K., Kawagishi, I. (2016): Identification of a *Vibrio cholerae* chemoreceptor that senses taurine and amino acids as attractants. *Sci. Rep.* **6**, 20866.
- 121) Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., Buchanan, S.K. (2010): TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 43–60.
- 122) Ogawa, R., Abe-Yoshizumi, R., Kishi, T., Homma, M., Kojima, S. (2015): Interaction of the C-Terminal tail of FlhF with FlhG from the Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* **197**, 63–72.
- 123) Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H., Iino, T. (1992): A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella-Typhimurium*: An anti-sigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, σ^F . *Mol. Microbiol.* **6**, 3149–3157.
- 124) Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S.I., Macnab, R.M., Iino, T. (1994): FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**, 2272–2281.
- 125) Okabe, M., Yakushi, T., Asai, Y., Homma, M. (2001): Cloning and characterization of *motX*, a *Vibrio alginolyticus* sodium-driven flagellar motor gene. *J. Biochem.* **130**, 879–884.
- 126) Okabe, M., Yakushi, T., Homma, M. (2005): Interactions of MotX with MotY and with the PomA/PomB sodium ion channel complex of the *Vibrio alginolyticus* polar flagellum. *J. Biol. Chem.* **280**, 25659–25664.
- 127) Okabe, M., Yakushi, T., Kojima, M., Homma, M. (2002): MotX and MotY, specific components of the sodium-driven flagellar motor, colocalize to the outer membrane in *Vibrio alginolyticus*. *Mol. Microbiol.* **46**, 125–134.
- 128) Okada, K., Iida, T., Kita-Tsukamoto, K., Honda, T. (2005): Vibrios commonly possess two chromosomes. *J. Bacteriol.* **187**,

- 752–757.
- 129) Okunishi, I., Kawagishi, I., Homma, M. (1996): Cloning and characterization of *motY*, a gene coding for a component of the sodium-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* **178**, 2409–2415.
 - 130) Ono, H., Takashima, A., Hirata, H., Homma, M., Kojima, S. (2015): The MinD homolog FlhG regulates the synthesis of the single polar flagellum of *Vibrio alginolyticus*. *Mol. Microbiol.* **98**, 130–141.
 - 131) Onoue, Y., Iwaki, M., Shinobu, A., Nishihara, Y., Iwatsuki, H., Terashima, H., Kitao, A., Kandori, H., Homma, M. (2019): Essential ion binding residues for Na⁺ flow in stator complex of the *Vibrio* flagellar motor. *Sci. Rep.* **9**, 11216.
 - 132) Ortega, A., Zhulin, I.B., Krell, T. (2017): Sensory repertoire of bacterial chemoreceptors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **81**, e00033-17.
 - 133) Pal, D., Venkova-Canova, T., Srivastava, P., Chattoraj, D.K. (2005): Multipartite regulation of *rctB*, the replication initiator gene of *Vibrio cholerae* chromosome II. *J. Bacteriol.* **187**, 7167–7175.
 - 134) Pandza, S., Baetens, M., Park, C.H., Au, T., Keyhan, M., Matin, A. (2000): The G-protein FlhF has a role in polar flagellar placement and general stress response induction in *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **36**, 414–423.
 - 135) Paul, K., Erhardt, M., Hirano, T., Blair, D.F., Hughes, K.T. (2008): Energy source of flagellar type III secretion. *Nature* **451**, 489–492.
 - 136) Prouty, M.G., Correa, N.E., Klose, K.E. (2001): The novel *s54*- and *s28*-dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **39**, 1595–1609.
 - 137) Ramachandran, R., Ciaccia, P.N., Filsuf, T.A., Jha, J.K., Chattoraj, D.K. (2018): Chromosome 1 licenses chromosome 2 replication in *Vibrio cholerae* by doubling the *crtS* gene dosage. *PLoS Genet.* **14**, e1007426.
 - 138) Ramachandran, R., Jha, J., Chattoraj, D.K. (2014): Chromosome segregation in *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 360–370.
 - 139) Rossmann, F., Brenzinger, S., Knauer, C., Dorrich, A.K., Bubendorfer, S., Ruppert, U., Bange, G., Thormann, K.M. (2015): The role of FlhF and HubP as polar landmark proteins in *Shewanella putrefaciens* CN-32. *Mol. Microbiol.* **98**, 727–742.
 - 140) Roujeinikova, A. (2008): Crystal structure of the cell wall anchor domain of MotB, a stator component of the bacterial flagellar motor: implications for peptidoglycan recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 10348–10353.
 - 141) Sakazaki, R., Iwanami, S., Fukumi, H. (1963): Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **16**, 161–188.
 - 142) Sakuma, M., Nishikawa, S., Inaba, S., Nishigaki, T., Kojima, S., Homma, M., Imada, K. (2019): Structure of the periplasmic domain of SflA involved in spatial regulation of the flagellar biogenesis of *Vibrio* reveals a TPR/SLR-like fold. *J. Biochem.* **166**, 197–204.
 - 143) Santiveri, M., Roa-Eguiara, A., Kühne, C., Wadhwa, N., Berg, H., Erhardt, M., Taylor, N.M.I. (2020): Structure and function of stator units of the bacterial flagellar motor. *Cell* **183**, 244–257.
 - 144) Sar, N., McCarter, L., Simon, M., Silverman, M. (1990): Chemotactic control of the two flagellar systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **172**, 334–341.
 - 145) Sarkar, M.K., Paul, K., Blair, D. (2010): Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 9370–9375.
 - 146) Sato, K., Homma, M. (2000): Functional reconstitution of the Na⁺-driven polar flagellar motor component of *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* **275**, 5718–5722.
 - 147) Sato, K., Homma, M. (2000): Multimeric structure of PomA, the Na⁺-driven polar flagellar motor component of *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* **275**, 20223–20228.
 - 148) Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K., Thompson, F.L. (2007): Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multi-locus sequence analysis. *J. Bacteriol.* **189**, 7932–7936.
 - 149) Song, W.S., Cho, S.Y., Hong, H.J., Park, S.C., Yoon, S.I. (2017): Self-oligomerizing structure of the flagellar cap protein FliD and its implication in filament assembly. *J. Mol. Biol.* **429**, 847–857.
 - 150) Soutourina, O.A., Bertin, P.N. (2003): Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 505–523.
 - 151) Sowa, Y., Rowe, A.D., Leake, M.C., Yakushi, T., Homma, M., Ishijima, A., Berry, R.M. (2005): Direct observation of steps in rotation of the bacterial flagellar motor. *Nature* **437**, 916–919.
 - 152) Stewart, B.J., McCarter, L.L. (1996): *Vibrio parahaemolyticus* FlaJ, a homologue of FliS, is required for production of a flagellin. *Mol. Microbiol.* **20**, 137–149.
 - 153) Stewart, B.J., McCarter, L.L. (2003): Lateral flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **185**, 4508–4518.
 - 154) Suzuki, T., Iino, T., Horiguchi, T., Yamaguchi, S. (1978): Incomplete flagellar structures in nonflagellate mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **133**, 904–915.
 - 155) Syed, K.A., Beyhan, S., Correa, N., Queen, J., Liu, J., Peng, F., Satchell, K.J., Yildiz, F., Klose, K.E. (2009): The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors. *J. Bacteriol.* **191**, 6555–6570.
 - 156) Syvanen, M. (2012): Evolutionary implications of horizontal gene transfer. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 341–358.
 - 157) Takahashi, Y., Nishiyama, S.I., Kawagishi, I., Imada, K. (2020): Structural basis of the binding affinity of chemoreceptors Mlp24p and Mlp37p for various amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **523**, 233–238.
 - 158) Takahashi, Y., Nishiyama, S.I., Sumita, K., Kawagishi, I., Imada, K. (2019): Calcium ions modulate amino acid sensing of the chemoreceptor Mlp24 of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **201**, e00779-18
 - 159) Takekawa, N., Kojima, S., Homma, M. (2014): Contribution of many charged residues at the stator-rotor interface of the Na⁺-driven flagellar motor to torque generation in *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* **196**, 1377–1385.
 - 160) Takekawa, N., Kwon, S., Nishioka, N., Kojima, S., Homma, M. (2016): HubP, a polar landmark protein, regulates flagellar number by assisting in the proper polar localization of FlhG in *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* **198**, 3091–3098.
 - 161) Takekawa, N., Nishiyama, M., Kaneseke, T., Kanai, T., Atomi, H., Kojima, S., Homma, M. (2015): Sodium-driven energy conversion for flagellar rotation of the earliest divergent hyperthermophilic bacterium. *Sci. Rep.* **5**, 12711.
 - 162) Takekawa, N., Terauchi, T., Morimoto, Y.V., Minamino, T., Lo, C.J., Kojima, S., Homma, M. (2013): Na⁺ conductivity of the Na⁺-driven flagellar motor complex composed of unplugged wild-type or mutant PomB with PomA. *J. Biochem.* **153**, 441–451.
 - 163) Terahara, N., Krulwich, T.A., Ito, M. (2008): Mutations alter the sodium versus proton use of a *Bacillus clausii* flagellar motor and confer dual ion use on *Bacillus subtilis* motors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 14359–14364.
 - 164) Terashima, H., Fukuoka, H., Yakushi, T., Kojima, S., Homma, M. (2006): The *Vibrio* motor proteins, MotX and MotY, are

- associated with the basal body of Na-driven flagella and required for stator formation. *Mol. Microbiol.* **62**, 1170–1180.
- 165) Terashima, H., Hirano, K., Inoue, Y., Tokano, T., Kawamoto, A., Kato, T., Yamaguchi, E., Namba, K., Uchihashi, T., Kojima, S., Homma, M. (2020): Assembly mechanism of a supramolecular MS-ring complex to initiate bacterial flagellar biogenesis in *Vibrio* species. *J. Bacteriol.* **202**, e00236-20.
- 166) Terashima, H., Kawamoto, A., Tatsumi, C., Namba, K., Minamino, T., Imada, K. (2018): In Vitro Reconstitution of Functional Type III Protein Export and Insights into Flagellar Assembly. *mBio* **9**, e00988-18.
- 167) Terashima, H., Koike, M., Kojima, S., Homma, M. (2010): The flagellar basal body-associated protein FlgT is essential for a novel ring structure in the sodium-driven *Vibrio* motor. *J. Bacteriol.* **192**, 5609–5615.
- 168) Terashima, H., Kojima, S., Homma, M. (2008): Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **270**, 39–85.
- 169) Terashima, H., Li, N., Sakuma, M., Koike, M., Kojima, S., Homma, M., Imada, K. (2013): Insight into the assembly mechanism in the supramolecular rings of the sodium-driven *Vibrio* flagellar motor from the structure of FlgT. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 6133–6138.
- 170) Thompson, E.L., Iida, T., Swings, J. (2004): Biodiversity of Vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 403–431.
- 171) Tomoyasu, T., Ohkishi, T., Ukyo, Y., Tokumitsu, A., Takaya, A., Suzuki, M., Sekiya, K., Matsui, H., Kutsukake, K., Yamamoto, T. (2002): The ClpXP ATP-dependent protease regulates flagellum synthesis in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* **184**, 645–653.
- 172) Tu, Z., Li, H., Zhang, X., Sun, Y., Zhou, Y. (2017): Complete genome sequence and comparative genomics of the golden pompano (*Trachinotus ovatus*) pathogen, *Vibrio harveyi* strain QT520. *PeerJ* **5**, e4127.
- 173) Ueno, T., Oosawa, K., Aizawa, S.I. (1992): M-Ring, S-Ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella-Typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *J. Mol. Biol.* **227**, 672–677.
- 174) Upadhyay, A.A., Fleetwood, A.D., Adebali, O., Finn, R.D., Zhulin, I.B. (2016): Cache domains that are homologous to, but different from PAS domains comprise the largest superfamily of extracellular sensors in prokaryotes. *PLoS Comput. Biol.* **12**, e1004862.
- 175) Waite, A.J., Frankel, N.W., Emonet, T. (2018): Behavioral Variability and Phenotypic Diversity in Bacterial Chemotaxis. *Annu. Rev. Biophys.* **47**, 595–616.
- 176) Wehbi, H., Portillo, E., Harvey, H., Shimkoff, A.E., Scheurwater, E.M., Howell, P.L., Burrows, L.L. (2011): The peptidoglycan-binding protein FimV promotes assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin. *J. Bacteriol.* **193**, 540–550.
- 177) Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S.I., Eisenbach, M. (1993): Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 8787–8791.
- 178) Yabuuchi, E., Miwatani, T., Takeda, Y., Arita, M. (1974): Flagellar morphology of *Vibrio parahaemolyticus* (Fujino et al) Sakazaki, Iwanami and Fukumi 1963. *Jpn. J. Microbiol.* **18**, 295–305.
- 179) Yamaichi, Y., Bruckner, R., Ringgaard, S., Moll, A., Cameron, D.E., Briegel, A., Jensen, G.J., Davis, B.M., Waldor, M.K. (2012): A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole. *Genes Dev.* **26**, 2348–2360.
- 180) Yamaichi, Y., Gerding, M.A., Davis, B.M., Waldor, M.K. (2011): Regulatory cross-talk links *Vibrio cholerae* chromosome II replication and segregation. *PLoS Genet.* **7**, e1002189.
- 181) Yokoseki, T., Iino, T., Kutsukake, K. (1996): Negative regulation by FliD, FliS, and FliT of the export of the flagellum-specific anti-sigma factor, FlgM, in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **178**, 899–901.
- 182) Yonekura, K., Maki, S., Morgan, D.G., Derosier, D.J., Vonderviszt, F., Imada, K., Namba, K. (2000): The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science* **290**, 2148–2152.
- 183) Yorimitsu, T., Homma, M. (2001): Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio*. *Biochim. Biophys. Acta* **1505**, 82–93.
- 184) Yorimitsu, T., Mimaki, A., Yakushi, T., Homma, M. (2003): The conserved charged residues of the C-terminal region of FliG, a rotor component of the Na⁺-driven flagellar motor. *J. Mol. Biol.* **334**, 567–583.
- 185) Yorimitsu, T., Sowa, Y., Ishijima, A., Yakushi, T., Homma, M. (2002): The systematic substitutions around the conserved charged residues of the cytoplasmic loop of Na⁺-driven flagellar motor component PomA. *J. Mol. Biol.* **320**, 403–413.
- 186) Zhu, S., Nishikino, T., Hu, B., Kojima, S., Homma, M., Liu, J. (2017): Molecular architecture of the sheathed polar flagellum in *Vibrio alginolyticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 10966–10971.
- 187) Zhu, S., Nishikino, T., Kojima, S., Homma, M., Liu, J. (2018): The *Vibrio* H-ring facilitates the outer membrane penetration of the polar sheathed flagellum. *J. Bacteriol.* **200**, e00387-18.
- 188) Zhu, S., Nishikino, T., Takekawa, N., Terashima, H., Kojima, S., Imada, K., Homma, M., Liu, J. (2020): In situ structure of the *Vibrio* polar flagellum reveals distinct outer membrane complex and its specific interaction with the stator. *J. Bacteriol.* **202**, e000592-19.
- 189) Zhu, S., Takao, M., Li, N., Sakuma, M., Nishino, Y., Homma, M., Kojima, S., Imada, K. (2014): Conformational change in the periplasmic region of the flagellar stator coupled with the assembly around the rotor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 13523–13528.
- 190) Zhuang, X.Y., Guo, S., Li, Z., Zhao, Z., Kojima, S., Homma, M., Wang, P., Lo, C.J., Bai, F. (2020): Live-cell fluorescence imaging reveals dynamic production and loss of bacterial flagella. *Mol. Microbiol.* **114**, 279–291.

Flagellar related genes and functions in *Vibrio*

Tatsuro NISHIKINO¹, Seiji KOJIMA², and Michio HOMMA²

¹Institute for Protein Research, Osaka University

²Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University

Bacteria can move or swim by flagella. On the other hand, the motile ability is not necessary to live at all. In laboratory, the flagella-deficient strains can grow just like the wild-type strains. The flagellum is assembled from more than 20 structural proteins and there are more than 50 genes including the structural genes to regulate or support the flagellar formation. The cost to construct the flagellum is so expensive. The fact that it evolved as a motor organ means even at such the large cost shows that the flagellum is essential for survival in natural condition. In this review, we would like to focus on the flagella-related researches conducted by the authors and the flagellar research on *Vibrio* spp.