

## 総説

## ペリプラズム側構造から見たべん毛モーター構築とモーターの活性化機構

小嶋誠司 名古屋大学大学院理学研究科  
今田勝巳 大阪大学大学院理学研究科

Bacterial flagellar motor is an ion-driven supramolecular nanomachine embedded in the cell envelope. Rotor-stator interaction that couples to the specific ion translocation through the stator channel is the nature of torque generation. To produce fully functional motor, multiple stator complexes must be incorporated around the rotor at appropriate places. However, such stator assembly mechanism has not been investigated by the structural point of view. Here we describe stator assembly and activation mechanism revealed from the crystal structure of a motor component located in the periplasmic space, suggesting the dynamic conformational changes in the stator during its assembly-coupled activation.

Flagellar motor / stator complex / crystal structure / conformational changes

## 1. はじめに

細菌は体長1マイクロメートルほどのたった1つの細胞からなり、最も原始的で単純な生物である。しかし彼らは地球上のあらゆる環境に適応し生き抜くすべを身につけており、特に運動能をもつ細菌は、環境の変化を感知して住みよい環境へ移動する行動能力を備えている。こうした細菌の運動は、多くの場合べん毛とよばれる運動器官が担っている<sup>1)</sup>。細菌べん毛は真核生物の鞭毛とは構造も機能メカニズムも大きく異なる。真核生物の鞭毛はその名の通り鞭がしなるように動くことで推進力を得るのに対し、細菌べん毛はらせん状に重合したべん毛繊維を細胞表面に埋め込まれたモーターによりスクリューのように回転させることで推進力を得ている(図1)。べん毛モーターは、人工の電気モーターのように回転子と固定子で形成されているが、細胞膜を介したイオン(H<sup>+</sup>またはNa<sup>+</sup>)の電気化学的勾配を用いて回転する<sup>1)</sup>。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が、詳細は明らかになっていない。ここでは、モーターのエネルギー変換を担う固定子複合体の特にペリプラズム側の構造に焦点を当て、機能発現メカニズムについて解説する。

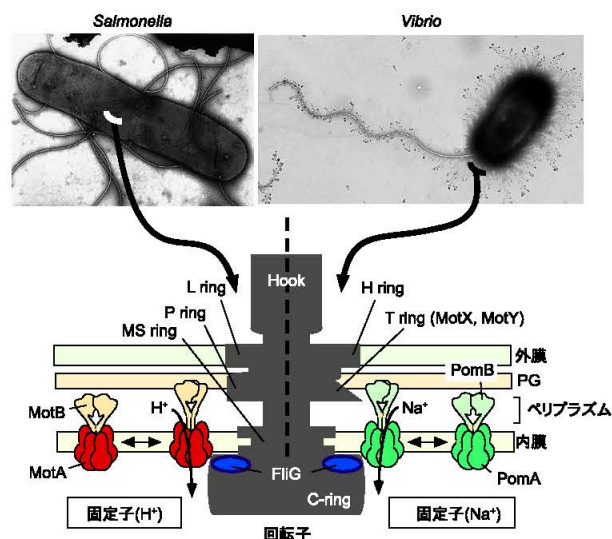


図1 H<sup>+</sup>駆動型サルモネラ菌べん毛モーター(左)とNa<sup>+</sup>駆動型ビブリオ菌極べん毛モーター(右)の模式図。らせん状のべん毛繊維の根元の細胞表面にモーターが埋め込まれている。

## 2. モーターへ自己集合し活性化する固定子複合体

生物の分子機械は必要なときに適切な場所へ自己集合して機能する。膜超分子ナノマシンであるべん毛モーターも、20種以上のタンパク質が正確に制御さ

Assembly and Activation Mechanism of the Flagellar Stator Revealed by the Crystal Structure of Its Periplasmic Region

Seiji KOJIMA<sup>1</sup> and Katsumi IMADA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Science, Nagoya University

<sup>2</sup>Graduate School of Science, Osaka University

※図1, 図2は、電子ジャーナル(<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys-char/ja/>)ではカラー版を掲載しています。

れながら自己集合することで構築され、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、機能的なモーターが完成する<sup>2)</sup>。固定子は回転子周囲に集合するとその名の通り固定され、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。ところが、緑色蛍光タンパク質 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、驚くべきことに固定子はモーターにずっと固定されているのではなく、ダイナミックに入れ替わることが明らかになった<sup>3)</sup>。一方で、固定子を細胞膜上に大量発現しても過剰な H<sup>+</sup> 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はじめて活性化すると考えられる。つまり、回転子周囲に集合した活性化状態の固定子こそが、イオン流と回転力発生を共役する構造を有しており、エネルギー変換機構解明のカギを握っている。

細菌べん毛の解析は、変異体が多数単離できたこともあり、H<sup>+</sup> 駆動型のサルモネラ菌で非常によく進んでいる。この菌の固定子複合体は膜タンパク質 MotA と MotB からなり (図 1 左)、膜貫通領域で H<sup>+</sup> を透過するチャンネル構造を形成し、トルク発生は細胞内領域、固定はペリプラズム (細菌の内膜と外膜の間の空間) 領域がそれぞれ担っている。固定を担うのは 1 回膜貫通型の MotB で、ペリプラズム側に大きな可溶性領域をもつ。この領域は約 250 アミノ酸残基で形成され、その 1 次配列はペプチドグリカン (PG) 結合タンパク質 OmpA ファミリーと相同性がある (図 2a)。これらに特徴的な PG 結合モチーフも保存されており、ここに変異が生じるとモーターは回転しなくなるため、MotA/B 固定子複合体の「固定」はこの PG 結合モチーフを介して行われると考えられている。

では固定子はどのようにして PG 層に固定されるのであろうか? 上述の通り固定子はダイナミックにモーターへの集合と解離を繰り返しており、モーターに組み込まれていない固定子は膜上を自由に拡散している。もし MotB の PG 結合モチーフと PG の間の親和性が高いならば、固定子は常に PG 層に固定されてしまい、自由に拡散できない。ならば、モーターに集合したときのみ PG 層に固定されるようなメカニズムが存在するのではないか?

一方、固定子は回転子の周囲の適切な部位へ配置・固定されると、イオン透過能も同時に活性化すると考えられる。MotB の膜貫通領域直後には、プラグとよばれる両親媒性ヘリックスを形成すると考えられる 10 数残基からなる領域がある (図 2a)。この領域を欠失させた変異体を大量発現させると、過剰な H<sup>+</sup> 透

過による菌の生育阻害が起こるため、モーターに組み込まれていない固定子の H<sup>+</sup> 透過チャンネルは、プラグによって閉じていると考えられている<sup>4),5)</sup>。したがって、固定子が集合し固定される際にプラグが開くと考えられるが、このとき MotB のペリプラズム領域にどのような構造変化が起こるのだろうか?

### 3. MotB ペリプラズム領域の構造と 2 量体形成

こうした問いに答えるため、われわれは PG 結合モチーフを含み、膜貫通部分を含まない可溶性のサルモ

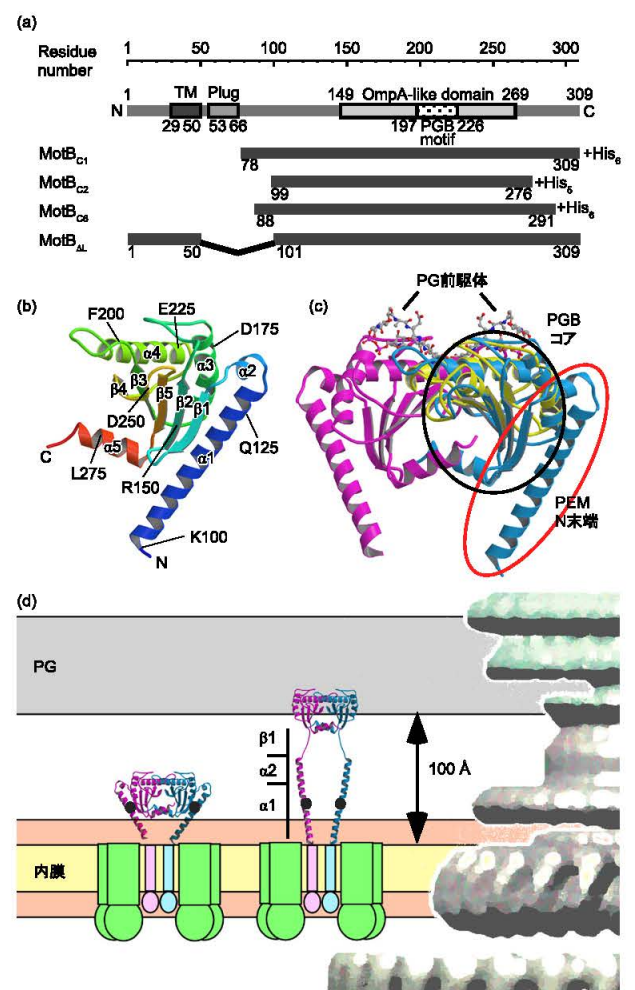


図 2  
サルモネラ菌 MotB のペリプラズム領域の結晶構造. (a) 作成されたペリプラズム側可溶性フラグメントと MotB<sub>Δ</sub> タンパク質. (b) MotB<sub>C2</sub> 単量体の構造. (c) MotB<sub>C2</sub> の 2 量体 (青と紫) を、NMR により構造が解かれた *Haemophilus influenzae* PAL (黄, 単量体) と PG 前駆体 (ball&stick モデルの部分) の複合体に重ね合わせた像. MotB<sub>C2</sub> は 2 量体なので PG 結合部位を 2 カ所もつ. (d) MotB の PEM 領域における大きな構造変化のモデル. PG 結合コアドメインと PEM 領域 N 末端の相互作用が変化し、MotB に特徴的なヘリックス α1, α2, β1 が伸長すると、PG 層に届く構造となる. 変異を導入した Leu119 を球で示した. また、内膜の親水性層を橙色、疎水性層を黄色で示した.

ネラ菌 MotB ペリプラズム側フラグメント (N末から 77 残基を欠失, MotB<sub>C1</sub>) を作製した (図 2a)<sup>6)</sup>. MotB<sub>C1</sub> を野生株のペリプラズムで大量発現させたところ, 菌の運動能が阻害された. MotB<sub>C1</sub> が, モーター中の固定子結合部位に結合したか, 野生型固定子複合体の形成を阻害したために, 回転力の発生が阻害されたと考えられ, 少なくとも MotB<sub>C1</sub> がモーターに作用しうる構造をもつことが示された. ゲルろ過クロマトグラフィーと沈降平衡法による解析から, MotB<sub>C1</sub> は 2 量体を形成していることがわかった. MotB<sub>C1</sub> は大量発現と精製が容易なため, 結晶化を試みたが 1 年ほどの間まったく結果が出なかった. しかも, その間に英国のグループから, ヘリコバクター MotB の PG 結合ドメイン (HpMotB<sub>C</sub>) の結晶構造<sup>7)</sup> が先に発表されてしまった. しかしわれわれのフラグメントは PG 結合ドメイン以外の領域も含むため, 新たな情報を期待して実験を進めた.

転機は NMR 実験により訪れた. MotB<sub>C1</sub> は比較的小さい (分子量約 26 kDa) ので, <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルを測定してみたところ, 40 残基ほどの構造をもたずよく動く部分があることがわかったのである. そこで, N 末端と C 末端領域をさらに欠失させたフラグメントを複数個作成したところ (図 2a), アミノ酸残基 99-276 を含む MotB<sub>C2</sub> の結晶が最初のスクリーニングでしかも一晩で出現し, 最終的に分解能 1.75 Å で構造モデルを組むことができた<sup>8)</sup>. ここで 1 つ強調しておきたい. それは, MotB 分子内欠失変異体の解析から明らかとなっている運動能に必須なペリプラズム領域 (Periplasmic region Essential for Motility より PEM 領域と命名, アミノ酸残基 111-270) を MotB<sub>C2</sub> はすべて含んでいることである. つまり, MotB において膜貫通領域以外で機能に必須なすべての領域の構造をわれわれは手に入れたのである.

構造<sup>8)</sup> を見てみると, MotB<sub>C2</sub> は 1 つのドメインからなり, その N 末端側に長い  $\alpha$  ヘリックスが突き出した形をしている (図 2b). コアドメイン (PG 結合ドメイン) は典型的な OmpA 様構造を示し, PAL, RmpM といった他の PG 結合タンパク質の構造と非常によく似ていた. なお, コアドメインのみを含む HpMotB<sub>C</sub> の構造は MotB<sub>C2</sub> のコアドメインとほぼ同一であるが, 結晶化に用いられたフラグメントが短すぎたためか構造が少し歪んでいた. 一方, MotB<sub>C2</sub> の N 末端側の配列はさまざまな細菌の MotB 間で保存されていないが, 2 次構造予測を行うと,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  は共通の構造であることが示唆された. OmpA ファミリーには存在しないこの構造は MotB に特徴的であるため, 固定子

の機能に重要である可能性が高い. また, 生化学的解析で見られたように, MotB<sub>C2</sub> は結晶中でも 2 量体を形成しており (図 2c), サブユニット界面は  $\alpha 4$  および  $\beta 4$  同士であった. 2 量体形成の機能的意義を調べるため, わずかに大きな断片である MotB<sub>C6</sub> において, 2 量体界面に存在する  $\alpha 4$  の残基 (A216, E217) をかさの大きなトリプトファン残基に置換し, ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより解析した<sup>8)</sup>. その結果, 予想通り変異体は 2 量体を形成できず, モノマーの位置にシングルピークで溶出した. さらに, これらの変異を, MotB において 50 残基を欠失させた変異体 MotB<sub>AL</sub> に導入した. MotB<sub>AL</sub> はその膜貫通部位直後に MotB<sub>C2</sub> に相当する領域を融合させた変異 MotB と見なせるが, MotA と複合体を形成して野生型の半分程度の機能を保持している. 不思議なことに, MotB<sub>AL</sub> はプラグ領域をもたないにもかかわらず, 大量発現しても菌の生育は阻害されず, H<sup>+</sup> 透過能は低く保たれる. MotB<sub>AL</sub> の 2 量体界面に導入した変異は, MotA/MotB<sub>AL</sub> 固定子複合体の機能を欠損させ, モーター回転が大きく損なわれた. これらの結果は, PG 結合ドメインを介した 2 量体形成が固定子の機能発現に必須であることを示唆している.

#### 4. 構造から見えてきた固定子の新規活性化機構

PG 結合タンパク質の PAL において, PG の前駆体との複合体の NMR 構造が報告されている<sup>9)</sup>. そこでこの構造を MotB<sub>C2</sub> に重ね合わせて, MotB<sub>C2</sub> の PG 層との結合部位を予測した (図 2c). PG との予測結合部位は, MotB<sub>C2</sub> ダイマーの頂点側表面に 2 ヶ所, 膜貫通領域につながる  $\alpha 1$  の N 末端と逆側に存在した. MotB<sub>AL</sub> は MotA と機能的な固定子複合体を形成できるので, この複合体は回転子周囲の PG 層に固定されるはずである. しかし, MotB<sub>C2</sub> 2 量体のサイズは 50 Å と小さすぎて PG 結合部位は PG 層 (細胞膜から 100 Å) に届かない. そのため, 固定には複合体の大きな構造変化が必要となる. PG 結合ドメインは保存されたコンパクトな構造なので, MotB に特徴的な N 末端領域が構造変化の起こる領域ではないかと予想された. たとえば, 図 2d に示したように,  $\beta 1$  がコアドメインの  $\beta$  シートから離れ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  と共に伸びた状態となれば, PG 層に届くことが可能である. われわれは  $\alpha 1$  とコアドメイン間の疎水性相互作用がコンパクトな構造を支えていると仮定し, このヘリックスのさまざまな位置に変異を導入した<sup>8)</sup>. その結果, ヘリックス中程で PG 結合ドメインと疎水性相互作用をする Leu119 に変

異 (L119P または L119E) を導入した MotA/MotB<sub>ΔL</sub> 複合体を大量発現すると、菌の生育が阻害され、一方で発現レベルを低くした場合には変異をもたない場合に比べて菌の運動能が高くなりモーターがより高い効率で機能することを見いだした。このことは、L119P または L119E 変異によって MotB<sub>ΔL</sub> の PEM 領域全体の構造が、おそらく PG 結合ドメインと N 末端領域間の相互作用が崩れることで変化し、H<sup>+</sup> 透過能が高まると同時にモーターへ集合しやすい構造に変わったことを示唆している。すなわち、L119P/E 変異固定子は活性化状態、つまり回転子周囲に配置された後のイオン透過能が高い固定子の状態に近いと推測された。

こうした結果をもとに、われわれは固定子の集合に共役した H<sup>+</sup> 透過能の活性化メカニズムについて以下のようなモデルを立てた。回転子と相互作用する前は、MotA/B 複合体は動的に細胞膜上を拡散している。MotA/B 複合体が回転子の周囲の適切な部位に配置されると、回転子-固定子相互作用がトリガーとなって MotB<sub>C</sub> の N 末端領域の構造が変化し、PG 層に固定されると同時にチャンネルが開いて H<sup>+</sup> 透過能が活性化されるというものである。われわれは最近ビブリオ菌 Na<sup>+</sup> 駆動型モーター固定子タンパク質 PomB (図 1) のペリプラズム側領域についても同様の欠失変異体とフラグメントによる解析を進め、プラグ領域の存在や PomB<sub>C</sub> の 2 量体形成など、PomB も MotB と基本的に同じ性質をもつことを明らかにした<sup>10)</sup>。

## 5. これからの課題

べん毛モーターの回転に必須なタンパク質のペリプラズム側構造の決定により、固定子のモーターへの集合とそれに伴うイオン透過能活性化メカニズムが少しずつ明らかになってきた。しかし、どのようにして固定子は回転子周囲の適切な部位を探し出し、固定されるのか? という問いにまだわれわれは答えられていない。最近、回転子-固定子間の静電相互作用を担う MotA の保存された荷電残基の変異で、固定子の集合が阻害されることが明らかとなった<sup>11)</sup>。このことは、

回転子-固定子間の相互作用がトリガーとなって、固定子ペリプラズム領域の構造変化が起きることを示唆している。このモデルを確かめるには、固定子の膜上への再構成と構造変化を検出する実験系の確立が必要となってくる。そしてイオン透過メカニズムを明らかにするには、固定子複合体の全体の結晶構造解析を避けては通れない。べん毛モーター固定子の謎解きはまだ始まったばかりである。

## 文 献

- 1) Terashima, H. *et al.* (2008) *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **270**, 39-85.
- 2) Macnab, R. M. (2003) *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 77-100.
- 3) Leake, M. C. *et al.* (2006) *Nature* **443**, 355-358.
- 4) Hosking, E. R. *et al.* (2006) *J. Mol. Biol.* **364**, 921-937.
- 5) Morimoto, Y. V. *et al.* (2010) *FEBS Lett.* **584**, 1268-1272.
- 6) Kojima, S. *et al.* (2008) *J. Bacteriol.* **190**, 3314-3322.
- 7) Roujeinikova, A. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 10348-10353.
- 8) Kojima, S. *et al.* (2009) *Mol. Microbiol.* **73**, 710-718.
- 9) Parsons, L. M. *et al.* (2006) *Biochemistry* **45**, 2122-2128.
- 10) Li, N. *et al.* (2011) *J. Bacteriol.* **193**, 3773-3784.
- 11) Morimoto, Y. V. *et al.* (2010) *Mol. Microbiol.* **78**, 1117-1129.



小嶋誠司

### 小嶋誠司 (こじま せいじ)

名古屋大学大学院理学研究科講師  
1999 年名古屋大学大学院理学研究科博士課程修了。米国ユタ大学博士研究員、科学技術振興機構研究員、名古屋大学大学院理学研究科助手・助教を経て、2011 年 11 月より現職。

研究内容:細菌べん毛モーターの構造・機能相関  
連絡先:〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町  
E-mail: z47616a@cc.nagoya-u.ac.jp



今田勝巳

### 今田勝巳 (いまだ かつみ)

大阪大学大学院理学研究科教授  
1992 年大阪大学大学院理学研究科博士課程修了、92-93 年高輝度光科学研究センター、93-97 年松下電器産業(株)研究員、97-2002 年科学技術振興事業団 ERATO プロトニックナノマシンプロジェクト GL、02-10 年大阪大学大学院生命機能研究科准教授、10 年 10 月より現職、04-08 年科学技術振興機構 ICORP 超分子ナノマシンプロジェクト GL を兼任。

研究内容:生体分子機械の構造と機能  
連絡先:〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1  
E-mail: kimada@chem.sci.osaka-u.ac.jp