

## 細菌べん毛の回転および本数制御機構に関する研究

小嶋 誠 司<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻  
〒464-8602 名古屋市千種区不老町 1

多くの運動性細菌は運動器官としてべん毛を持ち、べん毛はその根元の細胞表層に埋まっているイオン駆動型モーターによって回転する。べん毛モーターの回転機構の解明に向けて、多くの研究者が長きにわたり取り組んでいるが、そのエネルギー変換機構の多くの点はまだ謎に包まれている。我々はエネルギー変換の心臓部を担う固定子に焦点を当て、固定子がモーターの回転子周囲に組込まれ、細胞壁に固定されて活性化する際に、ペリプラズム側で大きな構造変化を引き起こすことを見出した。また、細胞は生理機能に重要な超分子構造（器官）を適切な時間・場所に、適切な数だけ形成・配置し、はたらきを最適化している。その分子メカニズムの解明は生命現象の基本課題であり、我々は海洋性ビブリオ属菌のべん毛が細胞の極に 1 本だけ形成されるしくみを調べることで、この課題の解明に取り組んでいる。本稿では、我々の研究を中心に、べん毛が特定の位置に決められた本数だけ形成され、最終的に固定子が組み込まれてモーターが回転するまでの、一連のメカニズムを概説する。

### はじめに

運動は、細菌が環境の変化に対応して生き残るために用いる最も基本的な機能である。多くの運動性細菌は、べん毛と呼ばれる細菌独特の運動器官を用いて、液体中を遊泳し、固体表面上を這い回る (9)。細菌のべん毛は、構造および機能において真核生物の鞭毛とは全く異なり、細胞から突き出た長いらせん状の繊維部分が、その根元の細胞表層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することで、運動を実現している (51)。べん毛モーターは左右両方向に回転でき、かつ瞬時に方向転換ができる (71)。べん毛モーターのエネルギー源は細胞膜を介したイオンの電気化学的勾配であり、大腸菌やサルモネラ属菌は  $H^+$  を、ビブリオ属菌やシュワネラ属菌は  $Na^+$  を共役イオンとして用いている (10, 48, 76, 79)。生物が持つ回転分子モーターとして他に ATP 合成酵素の  $F_1$  部分が知られているが、(61)、このモーターは ATP の加水分解によって得られるエネルギーにより回転するので、べん毛モーターはイオン駆動力によって回転する生物界唯一のモーターである。べん毛の回転が発見されて 40 年以上が経過したが (70)、イオンの透過に伴いエネルギーが変換される独自の機構の面白さはもちろんのこと、生物に学ぶ新たな人工運動装置への応用など工学的な観点や、病原細菌の感染に運動が関与するため医学的観点からも注目を集めており、べん毛は今なお幅広い分野の研究者を魅了している。

べん毛研究には長い歴史があり、日本人の研究者が大きく貢献してきた (4, 30)。すでにモデル生物のサルモネラ属菌においてべん毛の構成因子が同定され、べん毛遺伝子群の発現制御やべん毛構築のメカニズムが明らかになっている (16)。また近年、構成タンパク質の立体構造も次々に報告され、べん毛の各領域の構造を原子レベルで議論できるようになってきた (54, 55)。さらに顕微計測技術の進展によりモーター回転の詳細な計測が可能となり、モーターの生物物理学的特性について多くの知見が報告されている (71)。しかしその一方で、化学-力学エネルギー変換を担うモーターの心臓部のしくみは未だ不明な点が多い。べん毛モーターは、実際に回転する回転子と、イオンを透過しエネルギー変換を担う固定子から構成され、回転力（トルク）は共役イオンが固定子内を流れる際に生じる回転子-固定子間相互作用によって生み出される (10)。従って、エネルギー変換機構を明らかにするには、膜に埋め込まれた固定子の性質を解き明かさなければならないが、膜タンパク質複合体である固定子の精製・再構成が困難であることから、生化学的・物理的性質の解析は進んでいない。そこで、別のアプローチとして GFP 融合タンパク質を用いた生細胞内での動態観察や、機能に必須な可溶性部分の結晶構造解析と構造情報に基づく機能解析が、我々を含む複数のグループにより行われた (26, 36, 39, 45, 64, 87)。本稿では、これらのアプローチにより明らかになった固定子の予想外に動的な性質や、構造変化を伴

う活性制御機構を述べるとともに、最近我々が取り組んでいるべん毛本数の制御機構について紹介したい。

## 1. べん毛モーターの構造

まずべん毛の構造について現在の知見を簡単に紹介したい。1971年に大腸菌べん毛の精製法(24)が発表され、電子顕微鏡観察により基本構造が報告された(22, 23)。70年代後半から、電子顕微鏡観察により回転子の周囲に等間隔に並んだ粒子の存在が報告され(18, 33)、後の遺伝学・生物物理学的解析から(11, 12)、この粒子の実体はエネルギー変換ユニットとして機能する固定子であることがわかってきた。80年代に入りサルモネラ属菌のべん毛を材料として改良された精製法が確立し(1)、また電子顕微鏡観察法の進展に伴って、近年ではべん毛およびその基部に存在するモーターの微細構造が報告されている(25, 78)。特に電子線クライオトモグラフィー観察によって、べん毛モーターの細胞内の構造が可視化され、単離操作を伴わない無傷のモーターの姿が見えるようになってきた(詳細は文献(8, 15, 31, 82)を参照)。サルモネラ属菌 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium、および我々が対象としている海洋性ビブリオ属菌 *Vibrio alginolyticus* のべん毛モーター構造の知見をまとめて、模式図に示した(図1)。べん毛はスクリューとして働かせん状のフィラメント、ユニバーサルジョイントとして働くフック、回転モーターとして機能する基部体の3つの部分で構成されている(56)。基部体の基本的な構造は菌種間でよく保存されており、

フックにつながるロッドと、ロッド軸上に集合した複数のリングで構成されている。各リング構造は、細胞表層の各領域と接触している。MSリングは細胞内膜(IM)、Pリングはペプチドグリカン(PG)層、Lリングは細胞外膜(OM)にそれぞれ埋まっている。細胞質側にはCリングが存在し、固定子と相互作用する回転子側の因子FliGは、Cリングの最も外側に位置すると考えられている。また、詳細は次章で述べるが、エネルギー変換ユニットとして働く膜タンパク質複合体の固定子が、回転子周囲に十数個、等間隔に配置されている。

我々のグループではNa<sup>+</sup>駆動型極べん毛をもつ海洋性ビブリオ属菌を研究対象として解析を進めている。この極べん毛の基部体には、サルモネラ属菌では見られない二つのリング構造、TリングとHリングが存在する(図1A)(86)。最高速度170 Hzで回転するサルモネラ属菌のモーターに対し(41)、海洋性ビブリオ属菌の極べん毛モーターに対し(41)、海洋性ビブリオ属菌の極べん毛モーターは最高速度1,700 Hzにも達するため(52)、これらのリングは高速回転時にかかる負荷に耐えられるよう基部体構造を強化していると考えられる。MotXとMotYにより構成されるTリングはPリングの下側に形成され、モーターに組み込まれた固定子に作用することで安定なモーター複合体の形成を担うと考えられている(74)。我々はMotYの結晶構造を決定し、二つの異なるドメインからなることを明らかにした(図1A)(40)。MotYのN末端ドメインはMotXおよび基部体と直接相互作用しており、C末端ドメインはPG層と結合することが知られているOmpA様ド

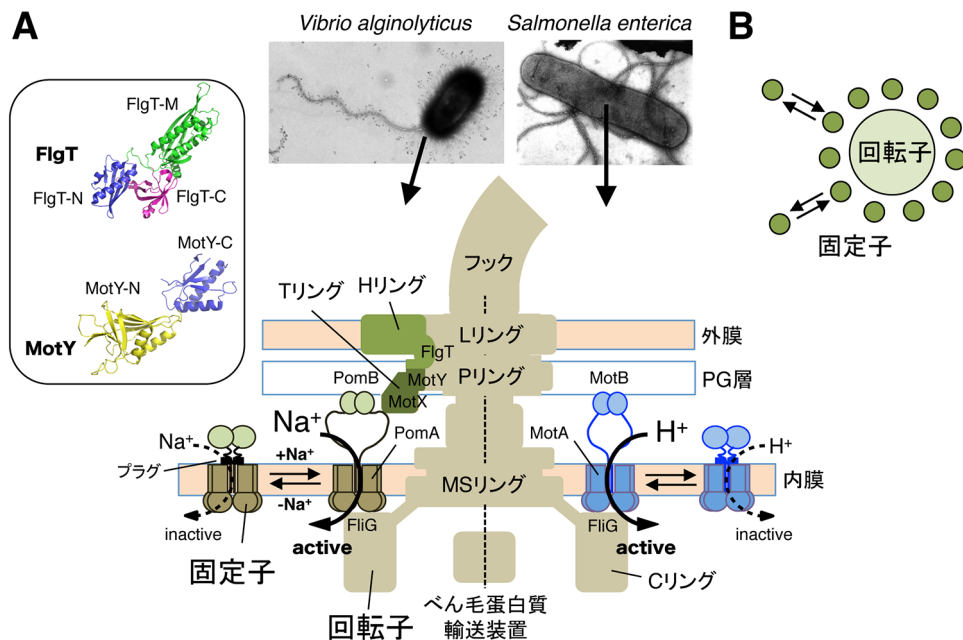


図1. 細菌べん毛モーターの模式図

A. H<sup>+</sup>駆動型べん毛モーターをもつ *Salmonella enterica* と Na<sup>+</sup>駆動型べん毛モーターをもつ *Vibrio alginolyticus* のべん毛基部を示した。*S. enterica* は MotA/MotB 固定子複合体を持ち、*V. alginolyticus* は PomA/PomB 固定子複合体をもつ。固定子はモーターに組み込まれて活性化し、共役イオン (H<sup>+</sup> または Na<sup>+</sup>) が流れる際に回転子タンパク質 FliG と相互作用して、回転力 (トルク) を発生する。*V. alginolyticus* には *S. enterica* のべん毛基部には見られない T リングと H リングが存在する。T リング構成因子 MotY と H リング構成因子 FliG の結晶構造を左に示した。B. 野生型モーターでは、固定子が回転子周囲に 10 数個配置されてトルクを発生している。個々の固定子ユニットは独立に機能し、モーターへの組み込みと解離を繰り返して入れ替わっている。(文献(36)より一部改変)

メインに配列上も構造上も似ていることから、TリングにおいてPG層に接した部分を構成していると考えられる。一方、MotXはTリングの外縁に位置しており、固定子タンパク質 PomB と相互作用することが示唆されているが、作用部位はまだ明らかになっていない。HリングはLリングおよびPリングを取り囲むようにそれらの外側に形成され、Tリングと同様、固定子が回転子周囲へ安定に組み込まれる過程に寄与している(75)。Hリングの構成タンパク質の一つである可溶性ペリプラズムタンパク質の FlgT は、TリングおよびHリングの両方を形成するために必要な因子として同定され、我々は結晶構造も解明した(75, 77) (図1A)。FlgTは基部体だけでなくTリングを構成する MotY と相互作用することがわかっている(75)。この他に、コレラ菌において運動能やべん毛の安定性に重要であることが知られている外膜タンパク質 FlgO と FlgP が、Hリングの主要な構成要素として示唆されている(53)。MotY と FlgT の結晶構造、およびTリングとHリングの形成過程については、総説(54)を参照いただきたい。

## 2. べん毛モーターのエネルギー変換ユニット：固定子

固定子は、モーター内ではその名の通り細胞壁に「固定」され、回転しない。そして回転子周囲に十数個配置され(11, 12, 45, 65)、膜を介したイオン ( $H^+$  または  $Na^+$ ) の電気化学勾配のエネルギーを回転トルクに変換する、エネルギー変換ユニットとして機能する(10) (図1B)。固定子を欠損した菌株において固定子を徐々に発現させると、モーターは一定の速度刻みで約10段階を踏み回転が加速するため、回転子周囲に設置された個々の固定子ユニットは独立に機能すると考えられている(11, 12, 59)。固定子は二種類の膜タンパク質で構成されている(図1A)。 $H^+$  で駆動する大腸菌やサルモネラ属菌のモーターの固定子は MotA と MotB(21, 72)、ビブリオ属菌の  $Na^+$  駆動型モーターの固定子はオルソログである PomA と PomB により形成される(3)。MotA (PomA) は4回膜貫通型の膜タンパク質で、その細胞質領域には保存された荷電残基が存在し、回転子タンパク質 FlgG と相互作用してトルク発生に関与すると考えられている(49, 83, 84)。一方 MotB (PomB) は1回膜貫通型タンパク質で、C末端側に大きなペリプラズム領域を持つ(17)。4分子のAサブユニットと2分子のBサブユニットがヘテロ6量体の固定子複合体を形成し(13, 38, 66, 67)、Bサブユニットのペリプラズム領域に存在する OmpA 様ドメインを介して、回転子周囲のPG層に固定されていると考えられている(20, 35)。また、Bサブユニットの膜貫通領域には、MotBファミリータンパク質において完全に保存された、機能に必須なアスパラギン酸残基が存在する(85)。トリプシン限定分解実験から、大腸菌固定子 MotA/MotB 複合体においてこのアスパラギン酸 (Asp32) に共役イオンの  $H^+$  が作用すると、MotAの細胞質側の構造が変化するこ

とが示唆されており、固定子内をイオンが透過すると固定子の細胞質側においてパワーstrokeのような構造変化が生じ、それが回転子に伝わってトルクが発生するというモデルが提唱されている(37)。

## 3. 固定子の動的な性質とイオン透過能の制御

べん毛モーターの回転は非常に安定であるため、固定子ユニットは一旦モーターに組み込まれて回転子周囲に配置されると、細胞壁(PG層)にしっかりと固定されて留まり、安定なトルク発生を行っている長い間考えられてきた。ところが、大腸菌の固定子タンパク質 MotB に GFP を融合させ、生細胞内の固定子の動態を分子レベルで観察すると、予想外に動的な固定子の姿が捕らえられた。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わけではなく、モーターと細胞膜上を頻繁に行き来し、入れ替わっていることが分かったのである(45) (図1B; 1個の固定子ユニットがモーター内に留まる時間は約0.5分と見積もられている)。固定子の動的な性質は、ビブリオ属菌およびシュワネラ属菌の  $Na^+$  駆動型 PomA/PomB 固定子でも観察された(26, 64)。これらの菌では、固定子ユニットは  $Na^+$  駆動力に依存して回転子周囲へ集合しており(図1A)、培地の  $Na^+$  濃度が上昇すると固定子はモーターに組み込まれるが、 $Na^+$  濃度が低下するとモーターから解離していた。さらに最近では、外部環境からかかる負荷に応じて固定子がモーターに集合・解離していることが報告され、固定子が機械刺激受容体として機能することが示唆された(14, 46, 80)。つまり細胞は急激な環境変化に应答して、単一モーター内の固定子の数を調節することにより自身の運動を制御できることを示しており、固定子の動的な性質が反映されている。

モーターから解離し細胞膜上を拡散している固定子ユニットの機能はどうなっているのだろうか? 大腸菌内で固定子を過剰発現しても生育障害が起きないことから、細胞膜上に存在する固定子のイオン透過活性は不活化していると考えられる(73)。過剰発現により生育障害が起こる固定子変異体の解析から、MotB (PomB) の膜貫通領域に隣接した両親媒性ヘリックスが、イオン透過チャンネルの蓋(プラグ)のように働くことが示唆された(29, 47)。つまり、固定子がモーターから解離し、PG層との結合が切れて細胞膜上を拡散している時はプラグが閉じた不活性な状態であり、モーターに組み込まれPG層に結合し固定されると、プラグが開いてイオン透過能が活性化されると考えられる(図1A)。

## 4. モーターへの組み込みに共役した固定子の活性化機構

### 1) サルモネラ属菌の $H^+$ 駆動型固定子 MotA/MotB 複合体の場合

固定子はモーターに組み込まれPG層に固定されて初めて、イオン透過能を活性化する。我々はモーターへの集合に共役した固定子の活性化機構の解明を目標として、PG

層への結合を担う固定子 B サブユニットの C 末端ペリプラズム領域の結晶構造の解明に取り組んだ。すでに一連の分子内欠失変異体の解析から、サルモネラ属菌 MotB において機能する最小のコンストラクト、 $\Delta(51-110, 271-309)$  が報告されていた (58)。そこで、MotB のペリプラズム領域において運動能に必須の領域 (Met111-Ala270; *periplasmic region essential for motility* から PEM と命名) の結晶化を試み、MotB<sub>C2</sub> と名付けた Glu99 から His276 を含む断片の結晶構造を解くことに成功した (39) (図 2A)。MotB<sub>C2</sub> はホモ二量体を形成し、予想外にコンパクトな構造を示していた (図 2B)。MotB<sub>C2</sub> は PG 結合部位を含む単一の OmpA 様ドメインから構成されており、N 末端に

特徴的な長い  $\alpha$  ヘリックス ( $\alpha 1$ ) が存在する。MotB の膜貫通領域に直接 MotB<sub>C2</sub> の領域をつないだ分子内欠失コンストラクト ( $\Delta 51-100$ , 以下 MotB $\Delta L$  と表記) は機能するので、MotA/MotB $\Delta L$  複合体は PG 層に固定されなければならない。PG 層と細胞膜の疎水性コア層の表面との間の距離は 100 Å 程度であるが、MotB<sub>C2</sub> の二量体はたかだか 50 Å なので PG 層に到達するには小さすぎ、このままでは届きそうにない。従って MotA/MotB $\Delta L$  複合体がモーターへ組み込まれる際に、MotB $\Delta L$  の PEM において大きな構造変化が誘起されると考えられた (図 2C)。

では、PEM のどの部分が構造変化するのか? MotB<sub>C2</sub> の構造を精査した結果、我々は構造的によく保存された OmpA 様ドメインの PG 結合コアにつながる、N 末端部分 ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  および  $\beta 1$ , 図 2B の青い部分) に着目した。ストランド  $\beta 1$  をコア  $\beta$  シートから切り離し、ヘリックス  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  と同一線上に伸張してみると、PG 結合コアは PG 層に到達するのに十分な長さになる (図 2C)。つまりヘリックス  $\alpha 1$  を含む N 末端部分と PG 結合コア間の疎水性相互作用が低下すると、PG 結合コアが解放され、PG 層に作用できるようになるのではないかと考えた。そこで我々は  $\alpha 1$  に変異を導入し固定子機能への影響を調べた。その結果、 $\alpha 1$  上の変異 (L119P または L119E) を持つ MotB $\Delta L$  を MotA と共に過剰発現すると生育障害が生じること (39)、そしてその原因が細胞質の pH の低下によることを見出した (57)。また、MotA/MotB $\Delta L$  複合体を過剰発現して初めて菌は運動能を示すようになるが、L119P 変異を含む場合は低発現量で十分に運動能を示すことから、MotA/MotB $\Delta L$  (L119P) 固定子は、モーターへ組み込まれやすく H<sup>+</sup> 透過能が活性化したコンフォメーションをもつと考えられた (39)。Leu119 はヘリックス  $\alpha 1$  の中央にあり (図 2B)、Pro (または Glu) への置換は  $\alpha 1$  と PG 結合コアドメイン間の疎水性相互作用を不安定化することによって、活性化状態の固定子の構造を模倣していると考えている。

## 2) 海洋性ビブリオ属菌の Na<sup>+</sup> 駆動型固定子 PomA/PomB 複合体の場合

MotB で提案されたモーターへの集合に共役した固定子の構造変化は、共役イオンや菌種の違いを超えて固定子が持つ共通の特徴なのだろうか? それとも H<sup>+</sup> 駆動型サルモネラ属菌のモーターにみられる特有の現象なのだろうか? この疑問を解決するために、我々は海洋性ビブリオ属菌の Na<sup>+</sup> 駆動型固定子タンパク質 PomB について、同様のアプローチによりその構造変化を調べた。一連の欠失変異体解析から、PomB の PEM (Asp121 から Gln315) を同定し (47)、PEM 全体を含む PomB の C 末端側ペリプラズム領域断片 (PomB<sub>C4</sub>; 121-315) と、その N 末端側を少し削った断片 (PomB<sub>C5</sub>; 135-315) の結晶構造を決定した (87) (図 3A, B)。残念ながら PomB<sub>C4</sub>, PomB<sub>C5</sub> とも N 末端側と C 末端側において決まった構造を持たずモデルを組めない部分が存在し、最終的にはどちらの結晶からも Ser154 から Leu306 の間でほぼ同じ構造のモデルが構築された (以下、PomB<sub>C</sub>

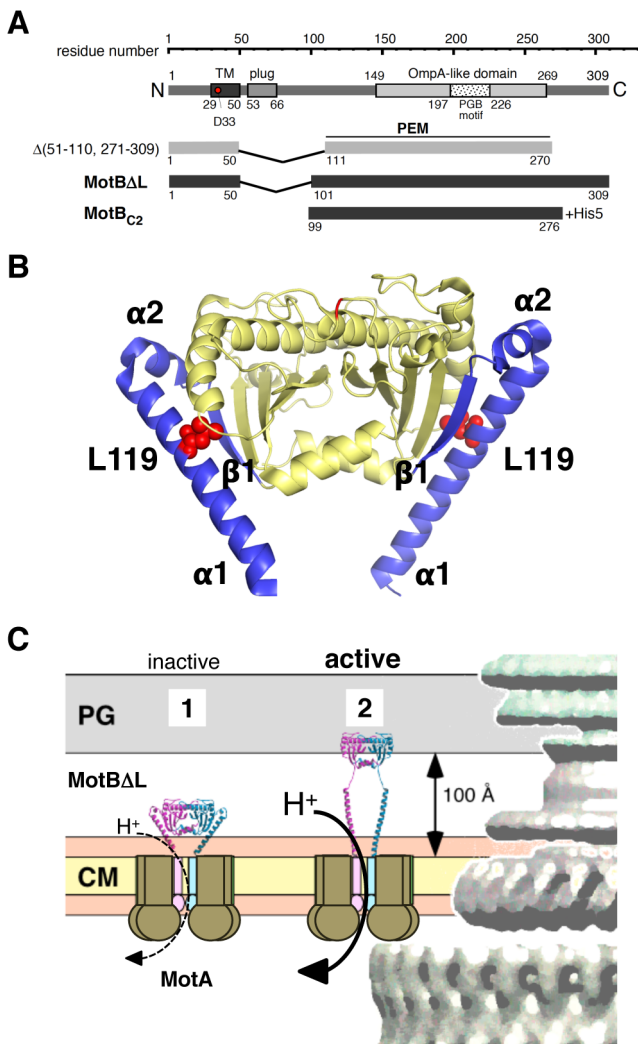


図 2. サルモネラ属菌固定子 MotB における構造変化

A. MotB の一次構造。MotB の分子内欠失変異体と、結晶構造を解いた MotB<sub>C2</sub> 断片を野生型 MotB の下に示した。B. MotB<sub>C2</sub> 二量体の結晶構造。MotB ファミリータンパク質に特徴的な N 末端領域 ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ) を青で、その先につながる PG 結合コアドメインを薄い黄色で示した。L119P 変異の位置を赤で示した。C. モーターへの組み込みに共役した構造変化モデル。MotA/MotB $\Delta L$  複合体は、モーターから解離すると不活性で H<sup>+</sup> 透過活性が低く保たれているが (状態 1)、モーターに組み込まれると PEM 領域の構造変化が生じ、高い H<sup>+</sup> 透過活性を持つ状態 2 へ移行する。PEM の N 末端における  $\beta 1$  が伸びるように構造変化すると考えた。(文献 (39) より一部改変)

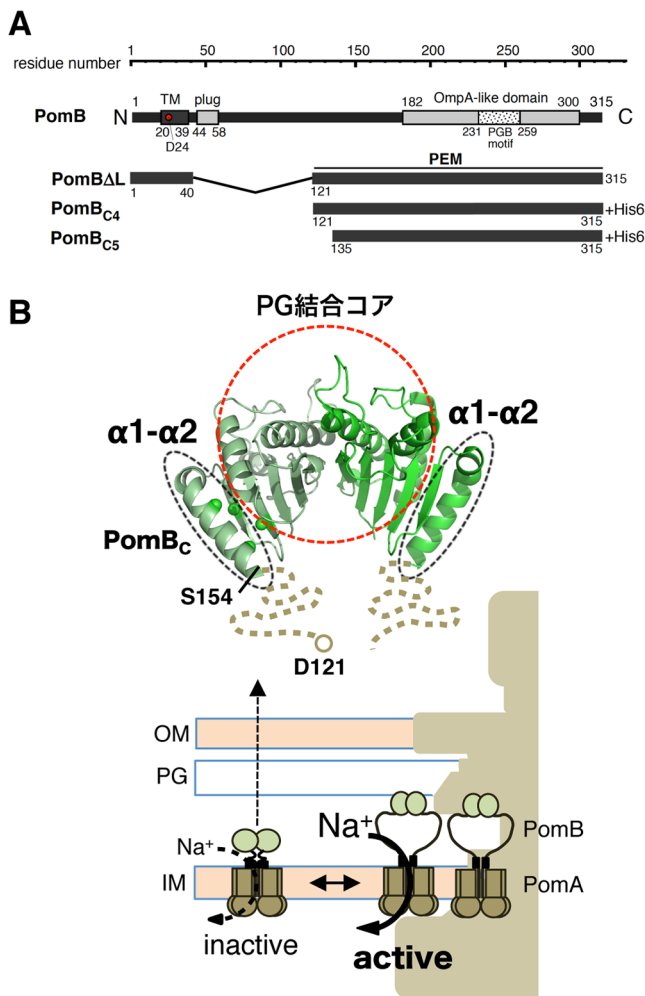


図3. Na<sup>+</sup>駆動型固定子タンパク質 PomB の PEM 領域の構造  
 A. PomB の一次構造。PomB の分子内欠失変異体と、結晶構造を解いた PomB<sub>C4</sub>, PomB<sub>C5</sub> 断片を野生型 PomB の下に示した。B. PomB<sub>C</sub> 二量体の結晶構造。PomB<sub>C4</sub> と PomB<sub>C5</sub> の N 末端部分は disorder しており、ヘリックス α1 が MotB に比べて短くなっている。これらの結晶構造解析結果から、Asp121 から Ser154 までは特定の構造を持たないと考えられる。ヘリックス α1 と α2、および PG 結合コアを破線で示した。(文献 (87) より一部改変)

と表記)。PomB<sub>C</sub> は単一の OmpA 様ドメインからなるホモ二量体を形成し、MotB<sub>C2</sub> に非常に類似したコンパクトな構造であった (図 3B)。PomB<sub>C</sub> と MotB<sub>C2</sub> 間の顕著な違いは N 末端側に見られ、上述の通り PomB における PEM の N 末端領域 (Asp121 から Met153) は特定の構造を持っておらず、続くヘリックス α1 は MotB<sub>C2</sub> のそれよりも 16 残基短かった。前の章で述べたように、ビブリオ属菌のモーターでは、固定子は T リングと PG 層の両方と相互作用しなければならない。ここで Glu41 から Arg120 までの 80 残基を欠失した PomB<sub>ΔL</sub> が機能することを考慮すると、MotB の場合と同様、PomB<sub>C</sub> 二量体は、T リングまたは PG 層に到達するには小さすぎるので、固定子のモーターへの集合の際にはやはり構造変化が必要と考えられる。

PomB における構造変化が細胞内で起きているかどうかを検証するため、我々は構造変化が期待される PomB<sub>C</sub> の領域において、分子内ジスルフィド架橋を形成させて構造

変化を阻害し、運動能に影響するかどうかを調べた (87)。もし MotB において提唱されたような構造変化が PomB でも誘起され、ヘリックス α1 を含む N 末端領域と PG 結合コア間の相互作用が失われてコアドメインが PG 層に相互作用するのであれば、α1 と PG 結合コア間に分子内架橋を形成させれば構造変化が阻害され、運動能が失われると期待できる。そこで PomB<sub>C</sub> の結晶構造情報を基盤として複数のジスルフィドペア (システイン置換体) をデザインし (図 4A)、還元剤の有無で運動能が変化するかどうかを調べた。その結果、α1 の N 末端側残基を含む 2 組 (M157C-I186C と I164C-L217C) では還元剤存在下でのみ運動能を示し、C 末端側残基を含む 2 組 (I164C-V179C と L168C-I177C) では還元剤の有無に関わらず運動能を示していた (図 4B)。分子内ジスルフィド結合が形成されているかどうかをシステイン修飾により検討したところ、前者・後者ともに還元剤存在下でのみシステインが修飾され、還元剤非存在下ではジスルフィド結合形成により修飾が妨げられていた。つまり、前者 2 組はジスルフィド架橋により運動能が阻害されたが、後者 2 組はジスルフィド架橋が形成されるにもかかわらず運動能を保持している (図 4A)。このことは、ストランド β1 が伸張し PG 結合コアがリリースされるとする、MotB での構造変化モデルと矛盾している。では一体、PomB ではどのような構造変化が誘起されるのだろうか？

そこで改めて PomB<sub>C</sub> の結晶構造を精査し、PomB<sub>C</sub> には MotB<sub>C2</sub> にはない特定の構造を持たない領域 (Asp121-Met153) が存在することに着目した。ジスルフィド架橋実験から、I164 よりも N 末端側で PG 結合コアドメインと架橋すると運動能が阻害されることから、α1 の N 末端側 2/3 と上記の構造を持たない領域のあわせて約 40 残基 (121-164) の部分が構造を変化させ伸びたコンフォメーションをとると考えると、PG 層にも十分届く。PomB の PEM に含まれる 121-153 の領域は MotB との配列類似性を示さないが、PomB の機能には不可欠であることから、この違いが MotB と PomB における構造変化の違いを生み出しているのかもしれない。さらに架橋が運動能を阻害するジスルフィドペア 2 組について、PomB に GFP を融合させて細胞内局在を観察したところ、細胞の極に局在していた。このことは、架橋によって固定子の回転子周囲への集合自体は阻害されていないことを示している。PomB は T リングの構成因子 MotX と作用することを考えると (60)、上述の MotB とは異なる 121-153 の領域において T リングと作用し、架橋はその後の構造変化を阻害していると考えられる。以上の結果から、我々は PomA/PomB 固定子複合体が回転子周囲に組み込まれる際に、PomB の PEM において二段階の構造変化が誘起されるというモデルを提案した (87) (図 4C)。最初の構造変化は、T リングと相互作用する PEM の N 末端領域 (121-153) において発生し、続いて二段階目が α1 の N 末端側 2/3 で生じて PG 結合コアドメインが PG 層に結合し、しっかり

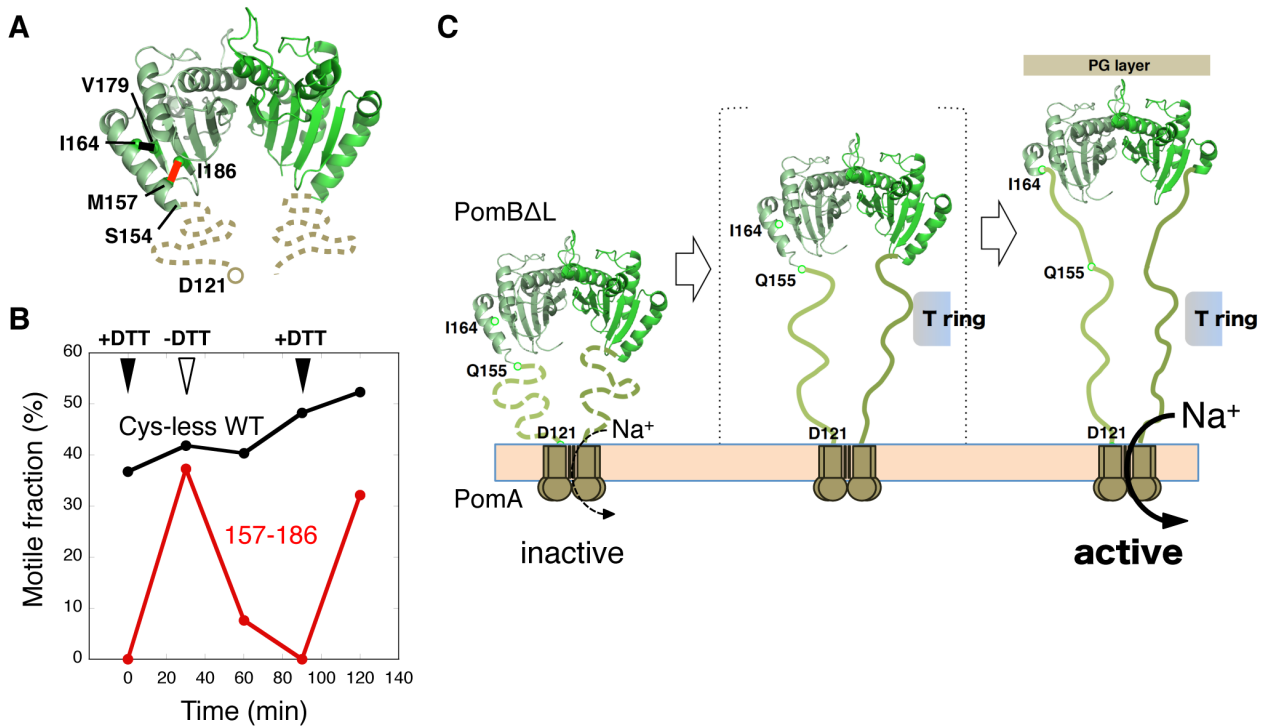


図4. PomB の分子内架橋実験と Na<sup>+</sup> 駆動型モーター固定子の構造変化モデル

A. PomB の PEM における分子内架橋ペア。全部で7種類のペアを作成し、代表例2つを示した。赤で示した M157C-I186C ペアは架橋により可逆的に運動能が阻害されるが、黒で示した I164C-V179C ペアは架橋によって運動能が阻害されない。B. M157C-I186C ペアを発現する菌株は、黒矢頭の時刻に還元剤 DTT を与えると運動能を回復するが、白矢頭の時刻に DTT を取り除くと再び架橋するために次第に遊泳できなくなる。縦軸は遊泳する菌体の割合を示している。C. D121 より C 末端側の領域を膜貫通領域につないだ PomBΔL が機能すること、M157C-I186C 架橋でも回転子周囲に集合することから、PEM 領域に二段階の構造変化が生じると考えた。一段階目で disorder している 121-154 の構造が変化し T リングに作用し、二段階目で helix α1 の N 末端 2/3 領域の構造が変化して PG 層に固定される。架橋は二段階目の構造変化を阻害している。(文献 (87) より一部改変)

とモーター内に固定される。架橋はこの二番目の構造変化を妨害し、その結果 PG 層との相互作用あるいはトルク発生が可能な活性化構造への遷移が阻害されたために、運動能が失われたのだらうと考えている。このように、MotB と PomB では構造変化の詳細は異なるが、どちらもモーターから離れた状態では不活性なコンパクトな構造になり、回転子周囲に集合すると一部伸びた構造に変化し、PG 層に固定されて活性化型になる性質は共通していると思われる。今後は、機械刺激受容体としても機能する固定子が、どのように環境変化を認識してモーターへの集合と解離を制御しているのか、今回見出された構造変化との関わりを含めて明らかにする必要がある。また、Na<sup>+</sup> 駆動型モーターで見られた Na<sup>+</sup> 駆動力依存的な固定子の組込み過程の解明も今後の課題である。

## 5. 海洋性ビブリオ属菌の極べん毛形成を1本に制御する仕組み

ここまでは、べん毛モーター構築の最終段階である固定子の組込み過程について述べてきた。次に、べん毛形成の初期段階について考えてみたい。ここでは細胞内でべん毛の形成位置と本数がどのように決まるのか、そのメカニズム解明に取り組んだ我々の研究を紹介する。

### 1) 海洋性ビブリオ属菌の極べん毛本数とその変異体

細菌のべん毛は、細胞が生息環境において効率よく運動できるように、形成位置と本数が菌種によって厳密に制御されている。大腸菌のように細胞の周囲に数本のべん毛を持つものや、ヘリコバクターのように極に複数のべん毛を持つもの、カンピロバクターのように細胞の両極に1本ずつべん毛を持つものなど、形成位置も本数も多種多様である(32)(図5)。その中で、我々が研究対象としている海洋性ビブリオ属菌は、液体中で培養すると極に1本だけべん毛を形成する。よく考えるとこれは不思議な現象である。極という特定の位置に、1本という極めて制御された本数のべん毛を形成するために、海洋性ビブリオ属菌は何か巧妙なしくみを持っているに違いない。そこで我々は極べん毛の形成位置と本数の制御機構の解明に取り組んだ。

実は、我々は当初べん毛の形成位置や本数の制御にそれほど関心を持っていたわけではなかった。このプロジェクトに本格的に取り組むきっかけとなったのは、我々の研究室で偶然、極に多数のべん毛を形成する変異体を単離したことであった。1990年代半ばから、我々は海洋性ビブリオ属菌の極べん毛運動に関与する因子の同定を目的として、EMS 処理によりゲノムに変異を導入した菌株から、極べん毛運動能を欠損した変異体の単離を試みていた。野生株は、軟寒天培地に接種すると栄養源を求めて外へ広が

りながら生育するため、リング状のコロニーが形成される。しかし、運動能に欠損が生じると、運動し外へ広がることができずリングが全くできないか、かなり小さくなってしまふ。この簡便なスクリーニング法により、多数のべん毛関連因子の変異体が単離された。その中に偶然、極べん毛が多数形成されている変異体が存在した。KK148 と名付けられたこの変異体は、高輝度暗視野顕微鏡で極べん毛を観察すると、複数のべん毛が単極から生えているためか、非常に太いべん毛の束を形成して泳いでいた。しかしうまく束にできず泳げないものも多数存在し、そのために軟寒天培地での運動能が低下したと考えられた (42)。

2) 極べん毛本数と形成位置を制御する因子 FlhF と FlhG

KK148 株が単離された当時、べん毛の本数と形成位置の制御機構についてはシュードモナス属においてすでに研究が始まっており、菌体の極に複数のべん毛を持つ *Pseudomonas putida* においてべん毛の配置がランダムに起きる変異体が

単離され、その責任遺伝子が *flhF* であることが報告されていた (63)。興味深いことに FlhF の過剰発現はべん毛の本数を増加させるため、FlhF はべん毛の形成位置決定だけでなく、本数の制御にも関与している。一方、単極毛の *Pseudomonas aeruginosa* では、*flhF* とオペロンを組む下流の遺伝子 *flhG* が欠損すると極に複数本のべん毛が形成され、この変異体中で FlhF を過剰発現すると本数が 1 本に回復することが示された (19)。すなわち、べん毛の本数は FlhF で正に、FlhG で負に制御されている (図 6A, B)。FlhF と FlhG (シュードモナス属以外では FlhN を FlhG とよぶ) は海洋性ビブリオ属菌にも保存されているため、我々は KK148 株の *flhF* と *flhG* 遺伝子を調べたところ、期待通り FlhG の Gln109 の位置にナンセンス変異が生じており、*flhG* の欠損により多べん毛の形質が現れたと結論付けた (42)。

続いて我々は FlhF と FlhG に GFP を融合し、その細胞内局在を調べた。FlhF は細胞質全体に拡散しているが一部はべん毛のある側の極に存在し、FlhG も同様に細胞質全体に拡散し一部が極に観察されたが、FlhG が極局在している菌体の割合は FlhF に比べて少なかった。FlhF の極局在には他のべん毛タンパク質は必要なく、また大腸菌内で発現させても極局在することから、FlhF 自身に極局在する性質が備わっている。さらに我々は、FlhG の発現により FlhF の極局在が低下することや、免疫沈降実験によって FlhF と FlhG が相互作用することを見出し、これらの結果を総合して「FlhF が極局在することでべん毛の形成位置を極に定め、FlhG は FlhF と相互作用することで、過剰量の FlhF が極局在することを防ぎ、結果として極べん毛の本数が 1 本に制御されている」、というモデルを提唱した (44) (図 6C)。ところで、FlhF と FlhG が本数と位

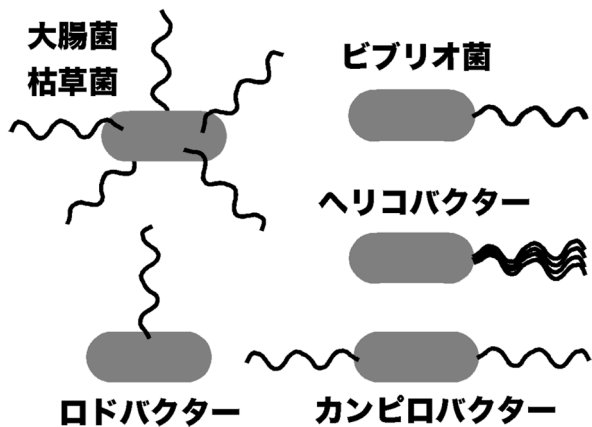


図 5. 様々な菌種におけるべん毛の形成位置と本数

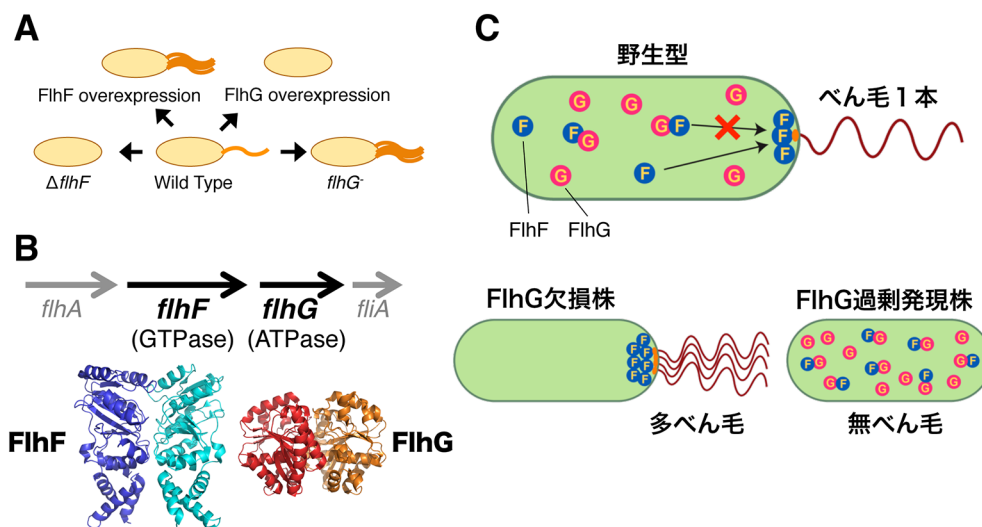


図 6. FlhF と FlhG による海洋性ビブリオ属菌の極べん毛本数制御

A. *flhF* または *flhG* の欠損と過剰発現による海洋性ビブリオ属菌のべん毛本数への影響。B. *flhF* と *flhG* はそれぞれ SIMIBI クラスの GTPase と ATPase をコードし、オペロンを組んでいる。枯草菌 FlhF 二量体および *Geobacillus* FlhG 二量体の結晶構造を下に示した。C. 海洋性ビブリオ属菌の極べん毛本数制御モデル。極局在する性質を持つ FlhF の極における分子数を FlhG が制御することにより、極に 1 本だけべん毛が形成される。(文献 (34, 44) より一部改変)

置の制御を担っている例は極にべん毛を形成する菌種で示されてきたが、側に複数のべん毛をもつ枯草菌にも FlhF と FlhG が存在し、実際に機能している。最近の研究から枯草菌の FlhF と FlhG は、細胞の中央付近に格子状かつ対称的にべん毛を形成させる役割を持ち、結果として極とその近傍でのべん毛構築が行われないことがわかってきた (28)。

FlhF は分泌蛋白質の膜へのターゲティングを担う FtsY/Flh とホモロジーがあり、同じシグナル認識粒子 (SRP) 系 GTPase (SIMIBI クラス) に分類されることから、べん毛の形成位置と本数の制御は、蛋白質輸送系と共通の機構で行われる可能性がある (2)。2007 年に枯草菌由来の FlhF の結晶構造が報告され、Ffh/FtsY 複合体と同じように GTP を挟み込む形で FlhF ホモダイマーが形成されることがわかった (7) (図 6B)。実際、複数の菌種において FlhF が GTPase 活性を持つことが示されており (5, 6, 68)、緑膿菌やカンピロバクターでは GTPase 活性の低下がべん毛形成位置と本数の異常を引き起こすことが報告されている (5, 68)。しかしながら、コレラ菌では GTP 結合そのものが FlhF の機能に重要との報告もあり (27)、菌種間で機能メカニズムに違いがあると考えられている。我々も海洋性ビブリオ属菌の FlhF において GTP 加水分解に関わるモチーフの変異解析を行った。その結果、極局在が低下した FlhF 変異体の発現株において運動能とべん毛本数の低下がみられ、GTPase モチーフが FlhF の機能に重要であることが明らかとなった (43)。しかし、我々は FlhF

の精製にまだ成功しておらず、GTPase 活性や GTP 結合能は調べられていない。

一方、FlhG は SIMIBI クラスに属する ATPase ファミリーに属しており、細胞分裂面の空間的調節を担う Min システムの構成因子 MinD のホモログである (2)。MinD は N 末端側に特徴のある ATP 結合モチーフ (deviant Walker A motif) をもつ ATPase であり、細胞膜上で ATP と相互作用し二量体を形成する (50)。膜上で MinD は MinC を活性化し、細胞分裂面の形成を開始する FtsZ リングの集合を阻害する。一方で ATP 結合型二量体 MinD に MinE が作用すると、MinD の ATPase 活性が高まり、ATP を加水分解して MinD は膜から解離する。こうして MinD の膜局在が変動を繰り返すことで、膜上の MinC の時間平均濃度が細胞の中央でもっとも低くなり、その結果として分裂面が細胞の中央に形成される (50)。従って Min システムによる細胞分裂面制御のもっとも重要な部分を MinD の ATPase 活性が担っている。FlhG は MinD と配列上良く似ているが、最近の結晶構造解析から FlhG も二量体を形成し立体構造も MinD と極めて似ていることが明らかとなっている (69) (図 6B)。FlhG にも MinD 様の ATP 結合モチーフや ATPase 活性に重要とされる残基が保存されているが (図 7A)、その役割や ATPase 活性を示すかどうかは不明であった。そこで我々は、FlhG の ATPase モチーフと FlhG の機能の関係を明らかにすることを目的とし、これらの残基の変異体について ATPase 活性・運動能・極べん毛数・FlhG および FlhF の極局在を調べ、変異による影響を解析した (62)。

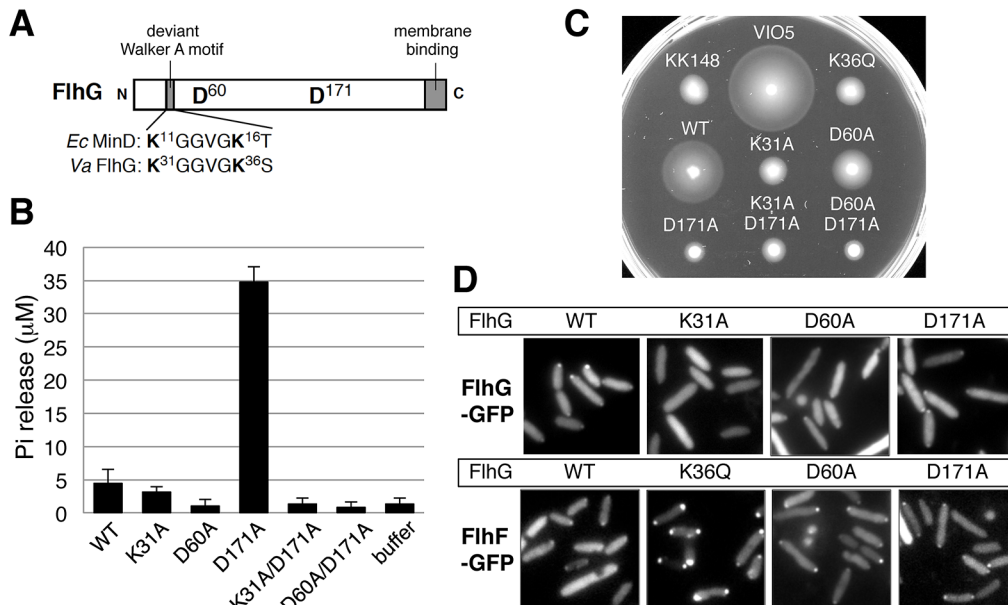


図 7. ATPase モチーフの変異による FlhG のべん毛本数制御活性への影響

A. 海洋性ビブリオ属菌 FlhG の一次構造。ホモログの大腸菌 MinD と同様、N 末端側に特徴的な ATP 結合モチーフ (deviant Walker A motif)、C 末端側に推定膜結合領域をもつ。太字で示した 4 つの残基にアラニン置換変異を導入した。B. FlhG の ATPase 活性。30 分間に ATP を分解して得られるリン酸量を定量した。C. ATPase モチーフに変異をもつ FlhG 発現株の運動能。*flhG* 欠損株 KK148、野生株 VIO5 には空ベクターを導入し、それ以外は KK148 株において野生型 (WT) または変異 FlhG (K31A など) をプラスミドから発現させ、軟寒天培地上で生育させた。D. FlhG ATPase モチーフの変異が FlhG または FlhF の細胞内局在に与える影響。上のパネルでは ATPase モチーフ変異を持つ FlhG-GFP の細胞内局在を示し、下のパネルでは ATPase モチーフ変異をもつ FlhG 変異体発現株における FlhF-GFP の細胞内局在を示している。(文献 (62) より一部改変)



### 3) FlhF と FlhG により極べん毛本数が 1 本に制御されるしくみ

まず, FlhG を大腸菌内で大量発現し, 精製する系を起ち上げた。FlhG は凝集しやすく, 可溶性画分に残ったものを, グリセロールを含む比較的塩濃度の高い緩衝液を用いることで精製することができた。精製標品は, MinD と同様に単独で低い ATPase 活性を示したため, 予想通り FlhG の機能に自身の ATPase 活性が関与すると考えられた (図 7B)。そこで FlhG の ATPase モチーフの残基へ変異を導入すると, べん毛本数制御に異常が生じることがわかった。ATP 結合に必要なとされる残基に変異 (K31A, K36Q) が入ると, ATPase 活性は失われ, 運動能は低下して極に多べん毛が形成された (図 7C)。また FlhG の極局在は失われ, 代わって FlhF の強い極局在が観察された (図 7D)。一方, 大腸菌の MinD は D152A 変異により MinE による ATPase 活性化が失われる。これに相当する FlhG の残基に変異 (D171A) を導入すると, 意外なことに ATPase 活性が野生型の 7 倍程度上昇した (図 7B)。また, この変異体では運動能は強く阻害され, ほぼ無べん毛となり, FlhG の極局在が増加する一方で, FlhF 極局在は低下していた (図 7C, D)。以上の結果は, ATPase 活性の高い FlhG は極に移行し, FlhF を極から解離させている可能性を示唆している。ところが, ATP 加水分解触媒部位の変異 (D60A) では, ATPase 活性は失われるにもかかわらず, べん毛本数制御に関わる形質は野生型よりやや低下するに留まり, ある程度維持されていた (図 7B, C, D)。つまり FlhG のべん毛本数を負に制御する機能は, 自身の ATPase

活性よりも ATP 結合能に依存していると考えられる。以上の結果から, 我々は「FlhG は ATP 依存的に極において FlhF に作用し, その分子数を適切な数に制御することでべん毛本数を制御する」というアップデートしたモデルを提案した (62) (図 8)。ATP の加水分解は, べん毛形成を 1 本のみを厳密に制御するために必要であり, ファインチューニングの役割を果たしているのではないかと考えている。

ところで ATP を結合した FlhG の機能が極において高い活性を示すならば, MinD における MinE のように, 活性化を促進する因子が細胞の極に存在すると考えられる。現状ではそのような因子はまだ見つかっていないが, 最近同じビブリオ属のコレラ菌において, 極に局在し様々な蛋白質の結合プラットフォームとして機能する膜蛋白質 HubP が発見され, FlhF には関与しないが FlhG の極局在は HubP に依存することが明らかになった (81)。コレラ菌では *hubP* 欠失によって, わずかではあるがべん毛が複数本生える細胞の割合が増加していた。ATP を結合した FlhG が HubP をターゲットとして極へ移行して活性化し, べん毛形成を抑制するのかもしれない (図 8B)。このように極べん毛の形成位置制御には, FlhF と FlhG 以外にも関与する因子が存在すると考えられる。実際, 我々は FlhF と FlhG の両方を失った株においてべん毛形成を抑制する因子である, 機能未知の膜蛋白質 SflA を同定している (34)。極べん毛形成位置と本数制御のメカニズムの解明には, SflA や HubP の機能解析も含めてまだ多くの未解決課題が残されている。

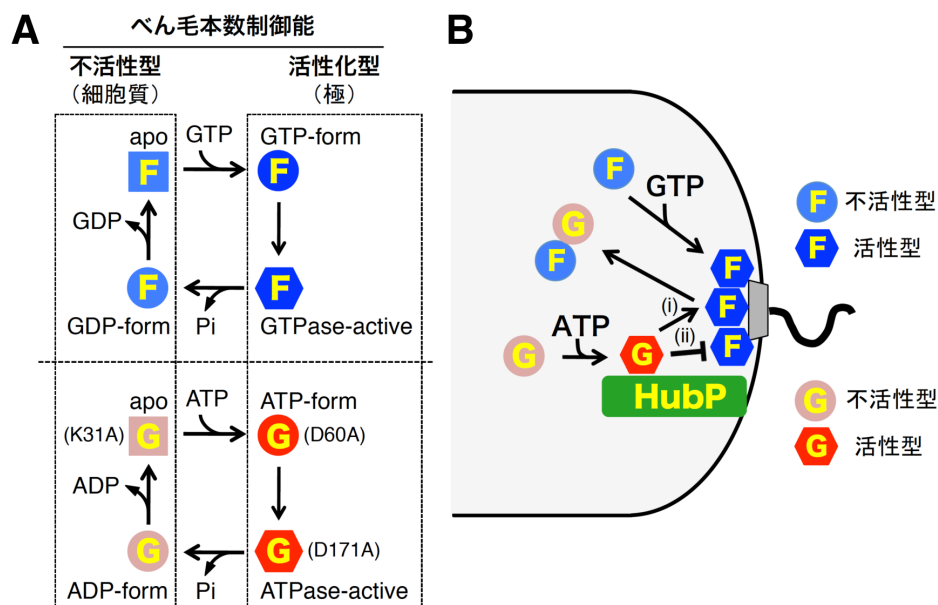


図 8. 海洋性ビブリオ属菌の極べん毛本数制御モデル

A. FlhF と FlhG の推定ヌクレオチド結合状態と細胞内局在の関係。FlhG では推定中間体構造を模倣する変異体が単離されている。海洋性ビブリオ属菌では, FlhF と FlhG のヌクレオチド結合は実験的に証明されていない。B. 最新の極べん毛本数制御モデル。FlhF は GTPase モチーフの変異により極局在が低下するため, GTP に結合すると極に移行すると考えられる。一方, FlhG は ATP を結合すると極に移行し, FlhF に作用して極から解離させるか (経路 i), 極局在する FlhF のべん毛形成促進活性を直接阻害する (経路 ii)。コレラ菌において FlhG の極局在は HubP に依存するため (81), HubP が FlhG の ATPase 活性化に関与する可能性がある。(文献 (62) より一部改変)

本稿では、細菌細胞の運動を担うべん毛の回転機構と形成位置・本数制御について我々の研究を中心に述べてきた。冒頭で述べたように、べん毛研究の歴史は長く、モデル生物の大腸菌やサルモネラ属菌では膨大な知見が蓄積している。ところが、肝心の「どのようにして回転力が発生するのか？」という最も基本となる課題にはまだ迫れていない。本稿で紹介した我々の研究によって、活性を持つ固定子の姿の一部がようやく明らかになったに過ぎず、まだスタートラインに立ったところである。エネルギー変換の全貌を明らかにする究極の実験は、モーターを人工膜上へ再構成し、実際にイオン駆動力を与えて回転させることであろう。モーターは巨大な超分子複合体であるから、機能する最小限の因子の再構成を試みることになるが、アクトミオシンやF<sub>1</sub>-ATPaseのように機能最小単位を見出すことすら、現状では困難である。しかし、本稿で示したように個々の部品（構成タンパク質）の性質を丹念に調べ上げれば、立ちあがる難題を乗り越えるヒントとなる知見が得られ、その蓄積はブレークスルーにつながるはずである。また、べん毛の本数と形成位置制御機構の研究も、突き詰めれば、生体分子の機能部位への適量配置機構という、すべての生物において基本的な生命現象の解明につながる研究課題といえる。私は、細菌べん毛は運動機構だけでなく器官の数と位置の決定機構を調べるにおいて優れた研究対象であり、遺伝子操作や培養が容易な細菌のもつアドバンテージを最大限に利用できる点で、生命科学の基礎を学ぶ若手研究者にも十分にアピールする魅力があると考えている。生化学・生物物理学・構造生物学・システム生物学などを駆使してべん毛の全貌を明らかにし、べん毛研究から生命の基本原理を見出すことが私の夢である。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導いただきました名古屋大学大学院理学研究科の本間道夫先生、大阪大学大学院理学研究科の今田勝巳先生、大阪大学大学院生命機能研究科の難波啓一先生並びに南野徹先生に心より御礼申し上げます。私は名古屋大学の学生時代からべん毛研究を開始し、留学先の米国ユタ大学のBlair博士の研究室でも継続して固定子の研究を続けました。本研究は帰国後、大阪大学での博士研究員時代に開始し、その後に着任した名古屋大学でその多くを進めました。研究の過程において、名古屋大学の学生さんや技術補佐員の方々を含め、多くのみなさまにご協力をいただきました。この場をお借りして、深く感謝申し上げます。最後に、伝統ある本賞に推薦いただきました、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科の中山浩次先生に厚く御礼申し上げます。

「COI開示」：発表内容に関連し、開示すべきCOI関係にある企業などはない。

- 1) Aizawa, S., Dean, G.E., Jones, C.J., Macnab, R.M., Yamaguchi, S. (1985): Purification and Characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **161**, 836–849.
- 2) Altegoer, F., Schuhmacher, J., Pausch, P., Bange, G. (2014): From molecular evolution to biobricks and synthetic modules: a lesson by the bacterial flagellum. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **30**, 49–64.
- 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) Asakura, S. (1970): Polymerization of flagellin and polymorphism of flagella. *Adv. Biophys.* **1**, 99–155.
- 5) Balaban, M., Joslin, S.N., Hendrixson, D.R. (2009): FlhF and its GTPase activity are required for distinct processes in flagellar gene regulation and biosynthesis in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **191**, 6602–6611.
- 6) Bange, G., Kummerer, N., Grudnik, P., Lindner, R., Petzold, G., Kressler, D., Hurt, E., Wild, K., Sinning, I. (2011): Structural basis for the molecular evolution of SRP-GTPase activation by protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1376–1380.
- 7) Bange, G., Petzold, G., Wild, K., Parltitz, R.O., Sinning, I. (2007): The crystal structure of the third signal-recognition particle GTPase FlhF reveals a homodimer with bound GTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 13621–13625.
- 8) Beeby, M., Ribardo, D.A., Brennan, C.A., Ruby, E.G., Jensen, G.J., Hendrixson, D.R. (2016): Diverse high-torque bacterial flagellar motors assemble wider stator rings using a conserved protein scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, E1917–E1926.
- 9) Berg, H.C. (2003): The rotary motor of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 19–54.
- 10) Blair, D.F. (2003): Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Lett.* **545**, 86–95.
- 11) Blair, D.F., Berg, H.C. (1988): Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science* **242**, 1678–1681.
- 12) Block, S.M., Berg, H.C. (1984): Successive incorporation of force-generating units in the bacterial rotary motor. *Nature* **309**, 470–472.
- 13) Braun, T.F., Al-Mawsawi, L.Q., Kojima, S., Blair, D.F. (2004): Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **43**, 35–45.
- 14) Che, Y.S., Nakamura, S., Morimoto, Y.V., Kami-Ike, N., Namba, K., Minamino, T. (2014): Load-sensitive coupling of proton translocation and torque generation in the bacterial flagellar motor. *Mol. Microbiol.* **91**, 175–184.
- 15) Chen, S., Beeby, M., Murphy, G.E., Leadbetter, J.R., Hendrixson, D.R., Briegel, A., Li, Z., Shi, J., Tocheva, E.I., Muller, A., Dobro, M.J., Jensen, G.J. (2011): Structural diversity of bacterial flagellar motors. *EMBO J.* **30**, 2972–2981.
- 16) Chevance, F.F., Hughes, K.T. (2008): Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 455–465.
- 17) Chun, S.Y., Parkinson, J.S. (1988): Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* **239**, 276–278.
- 18) Coulton, J.W., Murray, R.G. (1978): Cell envelope associations of *Aquaspirillum serpens* flagella. *J. Bacteriol.* **136**, 1037–1049.
- 19) Dasgupta, N., Arora, S.K., Ramphal, R. (2000): *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.*

- Bacteriol. **182**, 357–364.
- 20) De Mot, R., Vanderleyden, J. (1994): The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both gram-positive and gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan. *Mol. Microbiol.* **12**, 333–334.
  - 21) 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.
  - 22) DePamphilis, M.L., Adler, J. (1971): Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: specific attachment to the outer, lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **105**, 396–407.
  - 23) DePamphilis, M.L., Adler, J. (1971): Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **105**, 384–395.
  - 24) DePamphilis, M.L., Adler, J. (1971): Purification of intact flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **105**, 376–383.
  - 25) 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.
  - 26) 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.
  - 27) 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.
  - 28) Guttenplan, S.B., Shaw, S., Kearns, D.B. (2013): The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **87**, 211–229.
  - 29) Hosking, E.R., Vogt, C., Bakker, E.P., Manson, M.D. (2006): The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged. *J. Mol. Biol.* **364**, 921–937.
  - 30) Iino, T. (1969): Genetics and chemistry of bacterial flagella. *Bacteriol. Rev.* **33**, 454–475.
  - 31) Kawamoto, A., Morimoto, Y.V., Miyata, T., Minamino, T., Hughes, K.T., Kato, T., Namba, K. (2013): Common and distinct structural features of *Salmonella* injectisome and flagellar basal body. *Sci. Rep.* **3**, 3369.
  - 32) Kazmierczak, B.I., Hendrixson, D.R. (2013): Spatial and numerical regulation of flagellar biosynthesis in polarly flagellated bacteria. *Mol. Microbiol.* **88**, 655–663.
  - 33) Khan, S., Dapice, M., Reese, T.S. (1988): Effects of *mot* gene expression on the structure of the flagellar motor. *J. Mol. Biol.* **202**, 575–584.
  - 34) 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.
  - 35) Koebnik, R. (1995): Proposal for a peptidoglycan-associating alpha-helical motif in the C-terminal regions of some bacterial cell-surface proteins. *Mol. Microbiol.* **16**, 1269–1270.
  - 36) Kojima, S. (2015): Dynamism and regulation of the stator, the energy conversion complex of the bacterial flagellar motor. *Curr. Opin. Microbiol.* **28**, 66–71.
  - 37) Kojima, S., Blair, D.F. (2001): Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry* **40**, 13041–13050.
  - 38) Kojima, S., Blair, D.F. (2004): Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **43**, 26–34.
  - 39) 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.
  - 40) 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. USA* **105**, 7696–7701.
  - 41) Kudo, S., Magariyama, Y., Aizawa, S.-I. (1990): Abrupt changes in flagellar rotation observed by laser dark-field microscopy. *Nature* **346**, 677–680.
  - 42) 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.
  - 43) Kusumoto, A., Nishioka, N., Kojima, S., Homma, M. (2009): Mutational analysis of the GTP-binding motif of FlhF which regulates the number and placement of the polar flagellum in *Vibrio alginolyticus*. *J. Biochem.* **146**, 643–650.
  - 44) 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.
  - 45) Leake, M.C., Chandler, J.H., Wadhams, G.H., Bai, F., Berry, R.M., Armitage, J.P. (2006): Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature* **443**, 355–358.
  - 46) Lele, P.P., Hosu, B.G., Berg, H.C. (2013): Dynamics of mechanosensing in the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 11839–11844.
  - 47) Li, N., Kojima, S., Homma, M. (2011): Characterization of the periplasmic region of PomB, a Na<sup>+</sup>-driven flagellar stator protein in *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* **193**, 3773–3784.
  - 48) Li, N., Kojima, S., Homma, M. (2011): Sodium-driven motor of the polar flagellum in marine bacteria *Vibrio*. *Genes Cells* **16**, 985–999.
  - 49) Lloyd, S.A., Blair, D.F. (1997): Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **266**, 733–744.
  - 50) Lutkenhaus, J. (2007): Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu. Rev. Biochem.* **7**, 539–562.
  - 51) Macnab, R.M. (2003): How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 77–100.
  - 52) Magariyama, Y., Sugiyama, S., Muramoto, K., Maekawa, Y., Kawagishi, I., Imae, Y., Kudo, S. (1994): Very fast flagellar rotation. *Nature* **371**, 752.
  - 53) Martinez, R.M., Dharmasena, M.N., Kirn, T.J., Taylor, R.K. (2009): Characterization of two outer membrane proteins, FlgO and FlgP, that influence *Vibrio cholerae* motility. *J. Bacteriol.* **191**, 5669–5679.
  - 54) Minamino, T., Imada, K. (2015): The bacterial flagellar motor and its structural diversity. *Trends Microbiol.* **23**, 267–274.
  - 55) Minamino, T., Imada, K., Namba, K. (2008): Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 693–701.
  - 56) Minamino, T., Namba, K. (2004): Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *J. Mol. Microbiol.*

- Biotechnol. **7**, 5–17.
- 57) Morimoto, Y.V., Che, Y.S., Minamino, T., Namba, K. (2010): Proton-conductivity assay of plugged and unplugged MotA/B proton channel by cytoplasmic pHluorin expressed in *Salmonella*. FEBS Lett. **584**, 1268–1272.
  - 58) Muramoto, K., Macnab, R.M. (1998): Deletion analysis of MotA and MotB, components of the force-generating unit in the flagellar motor of *Salmonella*. Mol. Microbiol. **29**, 1191–1202.
  - 59) Muramoto, K., Sugiyama, S., Cragoe, E.J., Imae, Y. (1994): Successive inactivation of the force-generating units of sodium-driven bacterial flagellar motors by a photoreactive amiloride analog. J. Biol. Chem. **269**, 3374–3380.
  - 60) 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.
  - 61) Okuno, D., Iino, R., Noji, H. (2011): Rotation and structure of FoF1-ATP synthase. J. Biochem. **149**, 655–664.
  - 62) 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.
  - 63) 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.
  - 64) Paulick, A., Koerdt, A., Lassak, J., Huntley, S., Wilms, I., Narberhaus, F., Thormann, K.M. (2009): Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1. Mol. Microbiol. **71**, 836–850.
  - 65) Reid, S.W., Leake, M.C., Chandler, J.H., Lo, C.J., Armitage, J.P., Berry, R.M. (2006): The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli* is at least 11. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**, 8066–8071.
  - 66) Sato, K., Homma, M. (2000): Functional reconstitution of the Na<sup>+</sup>-driven polar flagellar motor component of *Vibrio alginolyticus*. J. Biol. Chem. **275**, 5718–5722.
  - 67) Sato, K., Homma, M. (2000): Multimeric structure of PomA, a component of the Na<sup>+</sup>-driven polar flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. J. Biol. Chem. **275**, 20223–20228.
  - 68) Schniederberend, M., Abdurachim, K., Murray, T.S., Kazmierczak, B.I. (2013): The GTPase activity of FlhF is dispensable for flagellar localization, but not motility, in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **195**, 1051–1060.
  - 69) Schuhmacher, J.S., Rossmann, F., Dempwolff, F., Knauer, C., Altegoer, F., Steinchen, W., Dorrich, A.K., Klingl, A., Stephan, M., Linne, U., Thormann, K.M., Bange, G. (2015): MinD-like ATPase FlhG effects location and number of bacterial flagella during C-ring assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **112**, 3092–3097.
  - 70) Silverman, M., Simon, M.I. (1974): Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. Nature **249**, 73–74.
  - 71) Sowa, Y., Berry, R.M. (2008): Bacterial flagellar motor. Q. Rev. Biophys. **41**, 103–132.
  - 72) Stader, J., Matsumura, P., Vacante, D., Dean, G.E., Macnab, R.M. (1986): Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* MotB gene and site-limited incorporation of its product into the cytoplasmic membrane. J. Bacteriol. **166**, 244–252.
  - 73) Stolz, B., Berg, H.C. (1991): Evidence for interactions between MotA and MotB, torque-generating elements of the flagellar motor of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **173**, 7033–7037.
  - 74) 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.
  - 75) 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.
  - 76) 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.
  - 77) 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. USA **110**, 6133–6138.
  - 78) Thomas, D.R., Francis, N.R., Xu, C., DeRosier, D.J. (2006): The three-dimensional structure of the flagellar rotor from a clockwise-locked mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Bacteriol. **188**, 7039–7048.
  - 79) Thormann, K.M., Paulick, A. (2010): Tuning the flagellar motor. Microbiology **156**, 1275–1283.
  - 80) Tipping, M.J., Delalez, N.J., Lim, R., Berry, R.M., Armitage, J.P. (2013): Load-dependent assembly of the bacterial flagellar motor. MBio **4**, e00551–e613.
  - 81) 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.
  - 82) Zhao, X., Norris, S.J., Liu, J. (2014): Molecular architecture of the bacterial flagellar motor in cells. Biochemistry **53**, 4323–4333.
  - 83) Zhou, J., Blair, D.F. (1997): Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor. J. Mol. Biol. **273**, 428–439.
  - 84) Zhou, J., Lloyd, S.A., Blair, D.F. (1998): Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 6436–6441.
  - 85) Zhou, J., Sharp, L.L., Tang, H.L., Lloyd, S.A., Billings, S., Braun, T.F., Blair, D.F. (1998): Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. J. Bacteriol. **180**, 2729–2735.
  - 86) Zhu, S., Kojima, S., Homma, M. (2013): Structure, gene regulation and environmental response of flagella in *Vibrio*. Front. Microbiol. **4**, 410.
  - 87) 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. USA **111**, 13523–13528.

## **Studies on the mechanism of bacterial flagellar rotation and the flagellar number regulation**

**Seiji KOJIMA<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan*

Many motile bacteria have the motility organ, the flagellum. It rotates by the rotary motor driven by the ion-motive force and is embedded in the cell surface at the base of each flagellar filament. Many researchers have been studying its rotary mechanism for years, but most of the energy conversion processes have been remained in mystery. We focused on the flagellar stator, which works at the core process of energy conversion, and found that the periplasmic region of the stator changes its conformation to be activated only when the stator units are incorporated into the motor and anchored at the cell wall. Meanwhile, the physiologically important supramolecular complex is localized in the cell at the right place and the right time with a proper amount. How the cell achieves such a proper localization is the fundamental question for life science, and we undertake this problem by analyzing the mechanism for biogenesis of a single polar flagellum of *Vibrio alginolyticus*. Here I describe the molecular mechanism of how the flagellum is generated at the specific place with a proper number, and also how the flagellar stator is incorporated into the motor to complete the functional motor assembly, based on our studies.