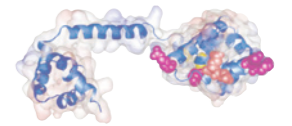


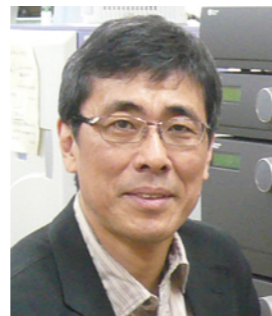
センターを中心に展開される研究



細菌膜超分子モーターの構造機能解析

1. 研究成果:

膜超分子体である細菌べん毛は、イオン流入のエネルギーを動力源として高速で回転する。細菌べん毛モーターは、回転子とそのまわりにある固定子から構成されており、それらの中で回転力を発生する(図1)。回転力発生において重要な回転子タンパク質として、FliG, FliM, FliNが挙げられる。一方、固定子は、4回膜貫通型タンパク質PomAと1回膜貫通型タンパク質PomBから構成されており、PomA₄PomB₂ヘテロ6量体を形成しイオンチャネルとして働く。固定子を介したイオンの流入と共役して、PomAの細胞質側領域とFliGのC末端ドメインが相互作用し、回転力が発生すると考えられている。本研究課題では、ナトリウム駆動型べん毛モーターのエネルギー変換ユニットである固定子におけるイオン透過時のダイナミックな構造変化と、回転子相互作用を解明することを目的としている。大腸菌



教授
本間 道夫

に固定子タンパク質を発現することで、*in vivo*での固定子のイオン取り込み活性を原子吸光により測定することに成功した。種々のこれまで解析された固定子変異体のイオン透過能を直接に調べることが可能となり、機能解析に大きな進展があった。イオン透過経路に関して、固定子タンパク質であるPomBの膜貫通領域に存在するF22残基が、ナトリウム結合残基であるD24からのイオンのリリースに重要であることを示した。回転子FliGのC末端球状ドメインのコアを形成する残基への変異(L259Q, L270R, L271P)によって、固定子の集合が阻害されモーターが回転できなくなることを示した。これらの変異により、固定子との相互作用を担うFliGのC末端ドメイン(FliGC)の構造が大きく変化する事について、FliGCを発現・精製し、トリプシン感受性を調べた。その結果、3種の変異体とも野生型の分解パターンとは異なっており、変異により構造が大きく変化していることが示唆された。さらに固定子蛋白質PomA細胞内領域の7つの運動能欠損変異体について固定子の集合能を調べたところ、すべてにおいてGFP融合固定子の極局在率は低下していた。それらPomA変異体の多くが、発現量・固定子複合体形成能・固定子のNa⁺透過能のいずれかにより固定子集合の低下を引き起こしているが、H136Y変異体では、固定子-回転子間相互作用の阻害が固定子集合の低下の原因である可能性を示した。

細菌べん毛モーター回転力発生において、固定子と回転子との相互作用面の荷電残基が重要であると推測されている。海洋性ビブリオ菌のNa⁺駆動型べん毛モーターにおいても、それらの荷電残基が重要であることを、種々の残基を置換したFliG/PomA変異体(約170株)を作成し、その運動能を調べた。FliGおよびPomAの保存荷電残基およびその周辺残基に着目し、それらの残基を電荷をもたない残基および逆の電荷をもつ残基に置換した変異体を作成した。変異によって、FliGおよびPomAの発現量が大きく変化する事がない事を確認した上で、それらの変異を組み合わせたFliG/PomA二重変異体を作成した。観察した約170の変異体のうち、約20変異体において顕著な運動能の協調的な阻害が見られた。特に、R88A(PomA)/R301A(FliG)変異体やK89A(PomA)/R301A変異体では運動能の阻害が見られなかったにもかかわらず、R88A/K89A/R301Aでは強い運動能阻害が見られたことから、PomAの隣接するR88とK89残基は相補的にFliG側の負荷電残基と相互作用している可能性が考えられる。また、4つの変異体においては、FliG/PomA二重変異によって運動能阻害からの抑圧が観察され、PomA-E97とFliG-K284との間の静電的相互作用、PomA-R88/K89とFliG-D308/D309との間の

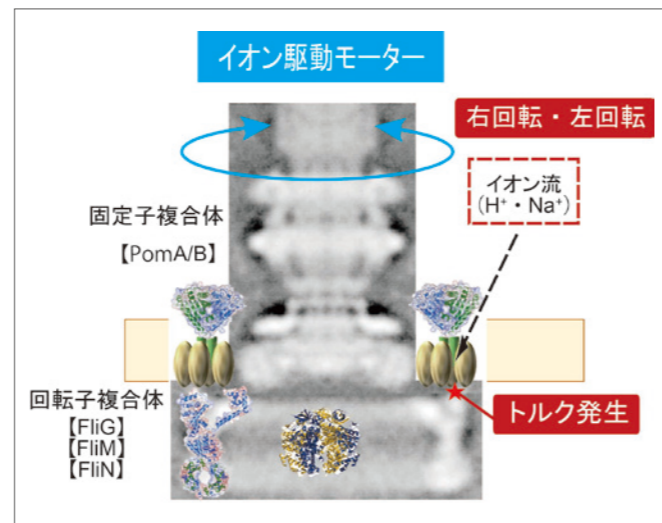


図1: 細菌べん毛モーターの模式図

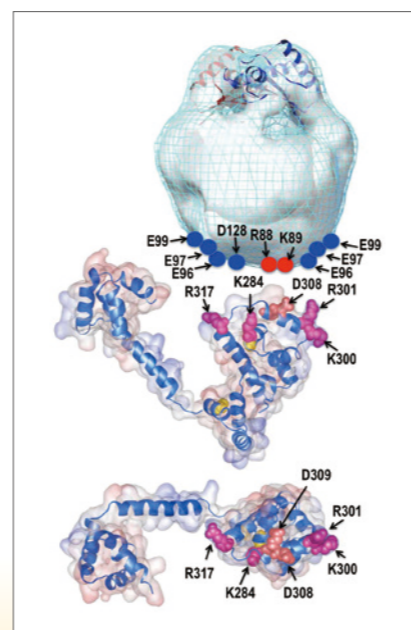


図2: ビブリオ菌べん毛モーター蛋白質荷電残基の分布

静電的相互作用、PomA-E96とFliG-R301との間の相互作用がモーター機能に重要であることが推測された。これまでは、海洋性ビブリオ菌のNa⁺駆動型べん毛モーターにおいては回転子および固定子の保存された荷電残基間の相互作用はモーター機能に必ずしも重要ではないと考えられてきた。しかし、Na⁺駆動型べん毛モーターにおいては、大腸菌のH⁺駆動型モーターとは異なり、1残基-1残基間相互作用というよりは多残基-多残基間の相互作用がモーター機能に重要である事が判明した。本研究で示したより複雑な荷電残基間相互作用が、Na⁺駆動型モーター特有の変異への耐性を引き起こしていると考えられ、さらにそれがNa⁺駆動型モーター特異的な高速回転を生み出している可能性が考えられた(図2)。

2. 得意とする考え方・手法:

細菌べん毛モーターの膜超分子体は、タンパク質で作られた分子機械である。細菌を扱うので、個体としての扱い培養が非常に簡単であり、遺伝学、分子生物学などの生命科学の最先端の技術を応用することが容易である。分子生物学を駆使して、べん毛遺伝子変異体の作成とその形質を調べ、遺伝子産物を精製してべん毛タンパク質の生化学的性質を調べている。電子顕微鏡によるタンパク質複合体の観察、タンパク質結晶化による構造解析、NMRを用いた構造動態の解析などを総合的に駆使して、研究を進めている。べん毛モーターは、膜を介したイオン流入を回転エネルギーに変換する分子機械である。生体エネルギー変換という観点からも研究をしている。

3. 論文発表:

1. X-ray structure analysis and characterization of AFUEI, an elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*. Sakuma M, Imada K, Okumura Y, Uchiya KI, Yamashita N, Ogawa K, Hijikata A, Shirai T, Homma M, Nikai T. *J Biol Chem.* , 288 (24):17451-17459(2013)
2. Na⁺ conductivity of the Na⁺-driven flagellar motor complex composed of unplugged wild-type or mutant PomB with PomA. Takekawa N, Terauchi T, Morimoto YV, Minamino T, Lo CJ, Kojima S and Homma M. *J Biochem.* , 153 (5):441-51(2013)
3. Insight into the assembly mechanism in the supramolecular rings of the sodium-driven *Vibrio* flagellar motor from the structure of FlgT. Terashima H, Li N, Sakuma M, Koike M, Kojima S, Homma M and Imada K. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(15):6133-8(2013)
4. Intragenic suppressor of a plug deletion nonmotility mutation in PotB, a chimeric stator protein of sodium-driven flagella. Shiwei Zhu, Michio Homma, and Seiji Kojima. *J. Bacteriol.* , 194(24):6728-6735(2012)
5. Mutations targeting the C-terminal domain of FliG can disrupt motor assembly in the Na⁺-driven flagella of *Vibrio alginolyticus*. Kojima S, Nonoyama N, Takekawa N, Fukuoka H, & Homma M. *J Mol Biol.* , 414:62-74 (2011)
6. Ligand specificity determined by differentially arranged common ligand-binding residues in the bacterial amino acid chemoreceptors Tsr and Tar. Tajima H, Imada K, Sakuma M, Hattori F, Nara T, Kamo N, Homma M, & Kawagishi I. *J Biol Chem.*, 286(49):42200-10(2011)
7. Zernike Phase Contrast Cryo-electron Tomography of Sodium-driven Flagellar Hook-basal Bodies from *Vibrio alginolyticus*. Naoki Hosogi; Hideki Shigematsu; Hiroyuki Terashima; Michio Homma; Kuniaki Nagayama. *Journal of Structural Biology*, 173: 67-76 (2011)
8. Functional transfer of an essential aspartate for the ion binding site in the stator proteins of the bacterial flagellar motor. Terashima, H., Kojima, S. & Homma, M. *J. Mol. Biol.* 397(3): 689-696. (2010)
9. Isolation of basal bodies with C-ring components from the Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. Koike, M., Terashima, H., Kojima, S. & Homma, M. *J. Bacteriol.* 192(1): 375-378. (2010)
10. 寺内亮史, 小嶋誠司, 本間道夫 (2011): 「細菌べん毛モーターエネルギー変換タンパク質の構造と機能」『生化学』83巻9号 822-833

4. 招待講演:

1. 本間 道夫 「膜タンパク質の作動原理の現状と将来展望について」 第84回日本生化学会大会 (2011/9/21)
2. Homma M. Ion flux pathway of stator complex in sodium-driven flagellar motor, ゴードン会議, (Sensory Transduction in Microorganisms), ペンチュラピーチマリット(アメリカ)(Jan, 24-29, 2010)
3. Homma M. Structure and Function of Sodium-driven Polar Flagellar Motor of *Vibrio alginolyticus*, 国際会議 VIBRIO-2009, リオデジャネイロ(ブラジル) (Nov, 4-6, 2009)