

「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」

平成14年度採択研究代表者

相沢 慎一

(計測技研株 特別顧問)

「生物ナノマシーン回転運動の一般化作動機構の解明」

1. 研究実施の概要

べん毛モーターのエネルギー変換の仕組みを理解するため、べん毛モーターの回転子と固定子の関係を明らかにしなければならない。回転子と固定子のタンパク質の同定にはまだ異論のあるものの、構成タンパク質はFliG, M, NおよびMotA, Bの5種類である。これらのタンパク質に蛍光タンパク質を付加して、べん毛モーターの回転を直接観察することを試みた。

海洋性ビブリオ菌 (*Vibrio*) の極に生えているべん毛モーター (極べん毛モーター) は、 Na^+ の流入によって回転する分子機械である。大腸菌などは H^+ を共役イオンとする H^+ 駆動型べん毛を持っている。本間グループでは、共役イオンの量的制御が容易な Na^+ 駆動型べん毛の解析を進めている。細菌のべん毛モーターはステーターとローターで構成され、エネルギー変換ユニットとして機能を果たすステーターは、ローターと相互作用することで回転力を生み出すと考えられている。極べん毛が生えているにも関わらず回転できない変異株、polar flagellar motile (*pom*) 変異株の解析から、PomA、PomB、MotX、MotYの4つの膜蛋白質がべん毛モーターの回転力発生に関わっているとステーター蛋白質 (モーター蛋白質とも呼ばれる) として同定されている。PomA は約23 kDaで、4つの膜貫通領域 (TM1 - 4) をもっており、PomB と複合体となって Na^+ チャンネルを形成するエネルギー発生装置であると考えられている。また、約37 kDaのPomB は、N末端を細胞質にC末端をペリプラズム側にもつII型の内在性膜タンパク質で、そのTMには Na^+ 結合部位と推測されているAsp残基を持つ。PomBはC末端側にペプチドグリカンとの結合が予想される領域を持ち、PomA/PomBを細胞壁に固定する役割を果たす。一方、回転子蛋白質FliGはリング状にアセンブルし、PomA/PomB複合体と直接相互作用する回転子蛋白質であると考えられている。推定アミノ酸配列より、PomAには2番目の膜貫通領域 (TM2) とTM3の間に95アミノ酸残基の細胞質領域 (cytoplasmic region1: CR1) と、TM4からC末端までに53アミノ酸残基の細胞質領域 (CR2) がある。トルク発生において、MotA (PomAのホモログ) のCR1に存在するArg90とGlu98がロータータンパク質FliGと静電的相互作用をすることが重要であると、提唱されている。一方、CR2の機能についてはまだ解明されていないが、MotAとPomAにおいて機能を失う変異がこの領域に見い出されている。そこで、PomA CR1ならびにPomA CR2

の機能と性質を明らかにすることを目的に、融合蛋白質を作成し解析した。さらに、モーター蛋白質が機能ユニットに形成する過程を明らかにするために、超分子膜蛋白質複合体であるPomA/PomB複合体の膜挿入部分のトポロジー情報を詳細に調べた。①Cys残基を導入したPomAとPomBとの組み合わせ変異体の機能解析とジスルフィド結合形成による膜貫通領域間相互作用、②タンデム型PomAを用いた四量体形成の解析とそのPomBとの相互作用、についての解析をおこなった。膜貫通領域の相互作用は、イオン流入とPomA-PomB間の相互作用がエネルギー変換において極めて中心的な役割を演じていると推測されている。

2. 研究実施内容

べん毛モーターの固定の一部がMotA, B (複合体) からできていることには異論はない。しかし、Mot複合体に接触していると考えられているFliGが回転子なのかあるいは固定子の一部なのかについてはまだはっきりとした証拠がない。FliM, Nはおそらく回転子であるがその全体像はまだよく見えていない。これらの点を明らかにするために蛍光タンパク質を用いてべん毛モーターの可動部分の可視化を試みた。

Mot複合体はペリプラスマ空間にあるため蛍光タンパク質が融合したキメラタンパク質の作製はまだ成功例がない。一方、FliG, M, Nの3種類のタンパク質は細胞内タンパク質であるため、これまでに少なくともFliGに関しては蛍光タンパク質とのキメラタンパク質はできている。我々は他のタンパク質に関しても同様なキメラタンパク質を作るために遺伝子操作をおこなった。従来から試みられた手法では本来のタンパク質の機能の妨げにならないように、蛍光タンパク質とのあいだにある程度の長さのスペーサーが入っていた。その結果できたキメラは発色が弱いか全く発色しなかった。そこで我々はスペーサーのないキメラを作ったところ、いずれのキメラタンパク質も大きく発色することがわかった。蛍光タンパク質として緑色、赤色、青色の3色を用いているので様々な組み合わせで発色を見たが、いずれの組み合わせでも良好な結果が得られた。発色点は細胞内の5, 6個所に局在していたので、ほぼべん毛の根本にあると推測される。

Na⁺駆動型Mot複合体を構成するPomAには2つの細胞質領域 (CR1とCR2) がある。*pomA* CR1と*pomA* CR2の遺伝子領域をベクターであるpGEX-5X-3にサブクローニングし、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合遺伝子を構築した。その結果、PomAに依存して遊泳する大腸菌にGST-PomA CR1とGST-PomA CR2を過剰発させたが、菌の遊泳にほとんど影響を与えなかった。融合蛋白質は一部分解が見られた。GST-PomA CR1は不溶性の封入体であることが考えられたが、GST-PomA CR2は可溶性タンパク質と考えられた。ゲル濾過で解析したところ、GST-PomA CR2は二量体であると考えられた。封入体のGST-PomA CR1を精製し、塩酸グアニジンと尿素で可溶化し再生を検討したが、再生出来ていなかった。構造解析に向けた蛋白質のさらなる再生条件検討が必要とされる。また、種々の融合蛋白質の作成も今後の課題である。PomAのホモログである大腸菌H⁺駆動型べん毛モーターのMotA/MotB複合体では、MotBのTMに存在するAsp残基の変異 (Asp残基のプロトン化と脱プロトン化をミミック) によってMotAのTM2とTM3を繋ぐ細胞質領域にコンフォメーション変

化を誘発するという報告がある。さらに、MotAの細胞質領域の荷電アミノ酸残基と回転子蛋白質のFliGの荷電アミノ酸残基との間の静電的相互作用が回転に重要であると報告されている。これら一連の結果から、イオン流から回転力発生へのエネルギー伝達は次のように想像される。PomA/PomB複合体 (MotA/MotB複合体) にNa⁺ (H⁺) が通過すると、PomB (MotB) にコンフォメーション変化が起き、それがMotAの細胞質領域のコンフォメーション変化を誘発し、最終的に回転子蛋白質FliGとの引力・斥力の変換へとエネルギーが伝達される。一般にペリプラズム領域は酸化的環境にあるため、酸化剤を添加せずにジスルフィド架橋を形成させる目的に、PomAの4つのTM、TM1 (G23C)、TM2 (S34C)、TM3 (M169-D171)、TM4 (A178C) のペリプラズム側にCysを導入した。PomBは唯一の膜貫通領域のペリプラズム側にCysを導入した (L37-F39)。タンデム型PomAを構築し、ジスルフィド架橋形成しやすいP172C変異をN末端側、C末端側、あるいはその両方に導入した。その結果、PomA-D170C (TM3) とPomB-S38Cは、それぞれ単独では機能的であったが、これらを組み合わせられると著しく機能を失った。PomAのTM3とPomBのTMの組み合わせには他にもこのような例があった。この組み合わせでも還元剤存在下には部分的に機能を回復した。PomA-G23C (TM1)、PomA-S34C (TM2)、PomA-A178C (TM4) ではPomB-S38Cと組み合わせられても還元剤による機能回復はみられなかった。また、PomA-D170C (TM3) とPomB-S38Cの組み合わせではNa⁺に対する親和性が低くなっていたので、本来PomAのTM3とPomBのTMはNa⁺の流入に関わっていると推測した。PomA-D170C (TM3) とPomB-S38Cを発現させた膜画分において、約120 kDa (XL120)の架橋産物を検出した。この時、ジスルフィド結合したPomAの二量体とPomBの二量体も検出された。またこの条件下では60 kDa程度の架橋産物 (XL60) はほとんど検出できなかった。PomAとPomBは、それぞれが二量体以上の状態で複合体形成すると考えられる。タンデム型PomAの架橋形成を観察した。タンデム型PomAはダイマーを形成したので、本来のPomAは四量体で機能することが示唆された。四量体PomAはPomBと免疫沈降され、PomBの二量体が四量体PomAと複合体形成をされると考えられる。この量比は以前の生化学的報告によって見積もられた値と矛盾しない。以上の結果から、四量体のPomAと二量体のPomBから形成されるPomA/PomB複合体において、Na⁺はPomBのTMとPomAのTM3のインターフェイスを流れ、エネルギーはTM3から細胞質領域へと伝達されると推測された。

3. 研究実施体制

相沢グループ

- ① 研究分担グループ長：相沢 慎一 (計測技研株、特別顧問)
- ② 研究項目：プロトン駆動力のエンジェティックスとCリングの構造解析

本間グループ

- ① 研究分担グループ長：本間 道夫 (名古屋大学、教授)
- ② 研究項目：Mot複合体の構造解析および細胞膜上での分布解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- O' Shea, T.M., DeLoney-Marino, C.R., Shibata, S., Aizawa, S.-I., Wolfe, A.J., and Visick, K.L. (2005) Magnesium promotes flagellation of *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.*, 187, 2058-2065.
- Aizawa, S.-I. (2005) Bacterial Gliding Motility: Visualizing Invisible Machinery. *ASM News feature article*. 71, 71-76.
- Kanbe, M., Shibata, S., Jenal, U., and Aizawa, S.-I. (2005) Protease susceptibility of the *Caulobacter crescentus* flagellar Hook-Basal-Body; a possible mechanism of flagellar ejection during cell differentiation. *Microbiology*, 151, 433-438.
- Aizawa, S.-I., (2004) A top runner of the flagellar world has unexpectedly gone. *BBA-Mol. Cell Res.*, 1694, 3-4.
- Hou, S., Saw, J.H., Lee, K.S., Freitas, T.A., Belisle, C., Kawarabayasi, Y., Donachie, S.P., Pikina, A., Galperin, M.Y., Koonin, E.V., Makarova, K.S., Omelchenko, M.V., Sorokin, A., Wolf, Y.I., Li, Q.X., Keum, Y.S., Campbell, S., Denery, J., Aizawa, S.-I., Shibata, S., Malahoff, A., & Alam, M. (2004) Genome sequence of the deep-sea γ -proteobacterium *Idiomarina loihiensis* reveals amino acid fermentation as a source of carbon and energy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 18036-18041.
- Aizawa, S.-I., Flagella, (2004) in “The Desk Encyclopedia of Microbiology” ed. by M. Schaechter, Academic Press, 470-479.
- Yakushi, T., Hattori, N. & Homma, M. (2004). Deletion analysis of the carboxyl terminal region of the PomB component of the *Vibrio alginolyticus* polar flagellar motor. *J. Bacteriol.* 187, 778-784.
- Fukuoka, H., Yakushi, T. & Homma, M. (2004). Concerted effects of amino acid substitutions in conserved charged residues and other residues in the cytoplasmic domain of PomA, a stator component of Na⁺-driven flagella. *J. Bacteriol.* 186, 6749-6758.
- Yakushi, T., Maki, S. & Homma, M. (2004). Interaction of PomB with the third transmembrane segment of PomA in the Na⁺-driven polar flagellum of *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* 186, 5281-5291.
- Yakushi, T., Kojima, M. & Homma, M. (2004). Isolation of *Vibrio alginolyticus* sodium-driven flagellar motor complex composed of PomA and PomB solubilized by sucrose monocaprate. *Microbiology* 150, 911-920.
- Yorimitsu, T., Kojima, M., Yakushi, T. & Homma, M. (2004). Multimeric structure of the PomA/PomB channel complex in the Na⁺-driven flagellar

motor of *Vibrio alginolyticus*. *J. Biochem.* (Tokyo) 135, 43-51.

- 「べん毛研究の第一人者マクナブ先生を悼む」 相沢慎一（2004）生物物理学会誌、エコー欄
- 福岡創，薬師寿治，本間道夫（2005）：イオン駆動型べん毛の回転機構：回転力はどこで発生しているのだろうか？『生物物理』45巻1号 22-27

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）