

「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

(県立広島大学大学院生命システム科学専攻 教授)

「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

べん毛モーターの回転子と固定子を同定するために、Mot 複合体およびスイッチ複合体の構造的および機能的特性を調べた。べん毛モーターのトルク発生はプロトン駆動力をエネルギー源として回転子と固定子の間で起こるといわれている。固定子は MotA と MotB の 2 種類の膜タンパク質の複合体でできており、回転子は FliG, FliM, FliN の 3 種類のタンパク質からなる傘状構造体である。これまで同様、モーター成分のうち固定子側の MotAB に関しては主に本間グループが担当し、回転子側の FliGMN に関しては主に相沢グループで解析を進めた。

2. 研究実施内容

【相沢グループ】

17 年度の機能計測は、従来から計測に用いられていた回転子の構成遺伝子から出た変異体が実は温度感受性変異体であるとの発見から始まった。すなわち、これまで数グループで計測に用いられた FliGMN の Mot-変異体は常温ではべん毛が回転しないが、低温 (20℃) で培養すると回転することがわかった。特に、従来想定されていたトルク発生部位とは異なる部位が温度にきわめて敏感であり、温度の上昇下降に反応してすばやく回転速度を変えることから、この新たに発見された部位がトルク発生に直接関与している可能性が示された。おもしろいことに、この部位は電荷を帯びたアミノ酸ばかりではないので、従来からの仮説である静電的力によるトルク発生という図式は必ずしも正しいとは言えなくなったことである。このことは本間グループによる、MotAB および FliGMN のトルク発生に関与しているとされる 5 つの電荷アミノ酸をすべて中性アミノ酸に置換してもべん毛は回転したという実験事実とも呼応して、べん毛モーターのトルク発生メカニズムに関して新たな仮説が必要であることを示しているのであろう。

さらに、一昨年度に作成した FliG-GFP 融合タンパク質をもつべん毛モーターの回転を蛍光顕微鏡で観察を始めた。FliG-GFP の他にも FliM-GFP と FliN-GFP を作成し、さらに蛍光タンパク質は GFP (緑色) のみならず、YFP (黄色)、CFP (赤色) との組み合わせもでき

ているので、それぞれのタンパク質を異なる色で染め分けして観察した。実験では蛍光タンパク質との融合タンパク質である FliG、FliM、FliN はいずれも輝点として細胞内に局在し、しかもその菌体も泳いでいることが観察された。次の段階として、それぞれの融合タンパク質をもつ菌体のテザードセルを作り、その回転中心と融合タンパク質の輝点とが一致することを確認した。さらに 2 種類の異なる色をもつ融合タンパク質 (FliM-GFP と FliN-YFP) を同時に発現させて、同様な実験を行い 2 つの輝点一致して回転することを確認した。その輝点はあまりに小さいので、それが回転しているかどうかを計測するのは容易ではない。しかし、我々の作成した融合タンパク質は GFP がリンカーなしに直接スイッチ・タンパク質に付いているため、さほど自由度が高いとは思えない。もし発現量を加減することで C リングの一部にだけ融合タンパク質が入れば、回転による偏光も検出できる可能性がある。また 2 色融合タンパク質が、どう方向に回転するのか、あるいは相互に逆に回転しているかを定めることもできると期待している。

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（県立広島大学 大学院生命システム科学専攻、教授）

②研究項目：べん毛モーター回転子の 3 成分タンパク質の局在性

目的および内容：べん毛モーター回転子のタンパク質 FliG, FliM, FliN と蛍光タンパク質との融合タンパク質を作成し、そのテザードセルの回転の
もようを蛍光顕微鏡で観察、解析する。

「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 大学院理学研究科、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

目的および内容：遺伝子改変により蛍光性の Mot 蛋白と C リングのキメラを作り、
モーターの回転と両ユニット相互の位置の関係を同時に計測を
行い、力発生の基本ユニットに関する情報を得ることを目指す。

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

【相沢グループ】

- Lambert, C., Evans, K.J., Till, R., Hogley, L., Capeness, M., Rendulic, S., Shuster, S., C., Aizawa, S.-I., and Sockett, E. (2006) Characterising the flagellar filament and the role of motility in bacterial prey-penetration by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Mol Micro.*, 60, 274-286.

- Shibata, S., Alam, M., and Aizawa, S.-I. (2005) Flagella of the deep-sea bacteria *Idiomarina loihiensis* belong to a family different from *Salmonella* flagella, *J. Mol. Biol.* 352, 510–516.
- Hirano, T., Shibata, S., Ohnishi, K., Tani, T., & Aizawa, S.-I (2005) N-terminal signal region of FliK is dispensable for length control of the flagellar hook. *Mol. Microbiol.* 56, 346–360.
- 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.
- 相沢慎一「べん毛モーターの抱える問題点」 (2005) 日本機械学会誌、Vo1. 108, P. 44–45.

【本間グループ】

- Yonekura, K., Yakushi, T., Atsumi, T., Maki-Yonekura, S., Homma, M. & Namba, K. (2006). Electron cryomicroscopic visualization of PomA/B stator units of the sodium-driven flagellar motor in liposomes. *J. Mol. Biol.* 357, 73–81.
- Yakushi, T., Yang, J.-H., Fukuoka, H., Homma, M. & Blair D. (2006). Roles of charged residues of rotor and stator in flagellar rotation: Comparative study using H⁺-driven and Na⁺-driven motors in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 1466–1472.
- 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.(Tokyo)* 139, 113–121.
- 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.
- 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.
- 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.

- Yakushi, T., Hattori, N. & Homma, M. (2005). Deletion analysis of the carboxyl terminal region of the PomB component of the *Vibrio alginolyticus* polar flagellar motor. *J. Bacteriol.* 187, 778–784.
- 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