

「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

(相沢G)

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筒状あるいは傘状構造体である。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てきた。

相沢グループでの昨年度の機能計測は、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 °C) 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。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 (論文投稿中)。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。

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 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。次に、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つの輝点が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。発現量を人為的に下げると融合タンパク質からの輝度が極端に低下するため、それが C リングの一部に入ったかどうかは今のところ断定できない。

(本間G)

*E. coli*では、プロトンがチャンネルを通るとステーターのタンパク質である MotA とローターのタンパク質のひとつである FliG の荷電アミノ酸残基間で静電相互作用が起こり、これが回転に重要であると考えられている。しかし、これらの荷電アミノ酸残基とその近傍にあるいくつかの荷電アミノ酸残基をすべて中性化した変異体は、いずれも *V. alginolyticus* で機能した。つまり、変異させたアミノ酸の電荷はナトリウムイオン駆動型べん毛モーターにおける回転力発生には必須でないと考えられる。この理由について考えられることのひとつとして、*V. alginolyticus* では、プロトン駆動型とは異なる、ローターまたはステーターの荷電残基がモーターの機能に関わっているということが挙げられる。そこで、*E. coli*には保存されておらず、ナトリウムイオン駆動型である *V. alginolyticus* には保存されている荷電アミノ酸残基の中で、PomA の C 末端にあるものに特に注目した。また、極べん毛モーターの固定子サブユニット PomA、PomB に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合し、そのパートナーサブユニットと共発現させて観察すると、菌体のべん毛が生えている極に GFP の蛍光ドットが見られる。これは、GFP 融合固定子タンパク質複合体が極毛モーター内に組込まれていることを示していると考えられるが、これについて検討を行った。

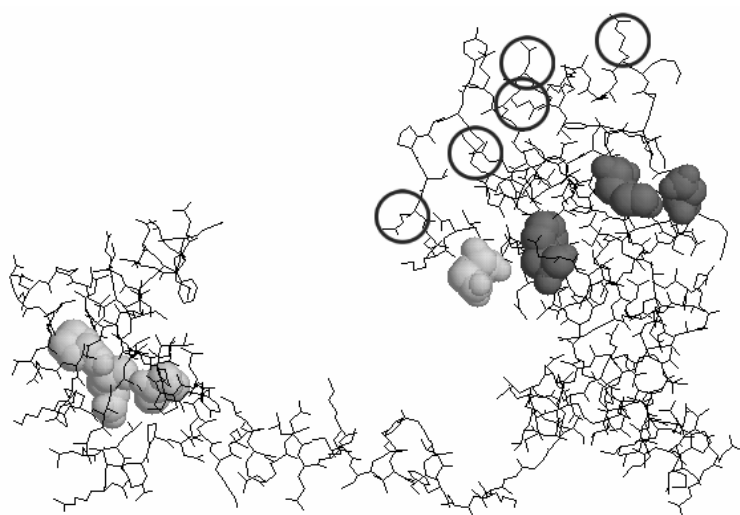
## 2. 研究実施内容

(相沢G)

C リングタンパク質 FliGMN のトルク発生の関与の度合いを調べた。特に現在トルク発生の中心部位と考えられている FliG の解析を行った。これまで古くから(80年代から)また多くのグループで研究し尽くされた感のある *fliGMN* の Mot-変異体のすべてについて再度顕微鏡観察を行ったところ、その大部分が低温で泳いでいることがわかった。個々の温度感受性株を分類し、温度変化に対して特に敏感なグループを見出し、それらを過敏感温度感受性株とした。それらはすべて FliG であった。

一般に温度感受性株は低温で培養すると正常な機能を発揮するモーターが構築され、その後温度を上げてもその性能は変わらない。また、それらを高温で培養した場合、機能しないモーターが構築され、その後温度を下げて機能も回復しない。すなわち、これらの変異はべん毛モーター構築時の温度によってタンパク質の2状態のどちらか一方に偏った立体構造をとり、一度構築された構造は安定であることがわかる。一方、我々が新たに発見した過敏感温度感受性株は、低温

で培養すると機能を持ったモーターを構築するが、このモーターはその後温度変化させると、その温度に応じて速度を変化させる。すなわち、このたんぱく質の過敏部位は通常温度感受性株の持つ固定化した 2 状態ではなく、構造が出来上がった後も運動の自由度を維持し続けることができる。そして、その運動性は温度を直接反映するので、直接トルク発生に関与している部位であると考えられる。その部位を下図に示す。



(べん毛モーターたんぱく質 FliG の分子模型図)

図中で、うすい黒丸が通常温度感受性部位、濃い黒丸が過敏温度感受性部位、また白抜き丸は従来から提案されているトルク発生部位である。従来の5つの部位と我々の発見した3つの部位が微妙にずれていることがわかる。また、これらの新たな部位のアミノ酸残基は2つ(244D と 273K)が電荷をもっているが1つの部位は電荷をもたない(236F)。また、これらの部位が変異後にとるアミノ酸残基はそれぞれ F236V、D244Y、K273E となり、電荷の関与が必ずしも重要ではないことを示唆している。今後、この新たな部位に人為的に変異を導入し、その作用を詳しく観察することで、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モデルが提案できるものと考えている。

#### (本間G)

固定子タンパク質は完全なべん毛構造が構築された後でもモーターに組み込まれモーターの回転力を発生させる。それらモーター蛋白質が、機能的モーターに形成されていくのかを知ることは、回転機構解明に大きく寄与する。エネルギー変換に最も重要だと考えられている固定子タンパク質 PomA と PomB の N 末端に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合したタンパク質 (GFP-PomA, GFP-PomB) の生菌中での局在を追跡している。GFP 融合固定子タンパク質は細胞の極に顆粒状の蛍光として観察された。この蛍光顆粒が、べん毛構造に依存的に観察されることから、べん毛に組み込まれた固定子タンパク質を観察できているものと考えられる。また、蛍光顆粒が PomA と PomB のお互いを必要とすること、その組み込みあるいは固定に B サブユニットの C 末端領域が必須であることを明らかにしている。

さらに、固定子複合体の組込みに対する MotX および MotY の関与を、MotXY のが基部位に存在するという新しい事実とともに明らかにした。次に、ナトリウムイオンの結合部位とされている PomB の Asp24 残基を Cys 置換した変異体を発現させた菌では、GFP-PomA が極局在しないという結果を得た。これはナトリウムイオンのステーターへの流入が、ステーターの極局在に関与する可能性が示唆している。そこで野生型の GFP 融合ステーターを発現する菌をナトリウムイオンの代わりにカリウムイオンで置き換えた培地に懸濁したところ、モーターは回転せずステーターは極局在しなかった。また、ナトリウムイオンが存在しない培地中の菌をナトリウムイオン濃度が 500mM の培地に再懸濁すると、ステーターの極局在が復帰することが観察された。さらにナトリウムイオン濃度を様々に変化させて観察したところ、ナトリウムイオン濃度とステーターの極局在率の間に相関関係があることがわかった。これに対し、GFP 融合 FliG タンパク質(ローター構成因子の一つ)はナトリウムイオン濃度によらず菌体の極に局在した。以上のことから、ナトリウムイオン依存的にステーターの極局在が起こることが初めて示された。ナトリウムイオンがステーターに結合することで、ステーターがローターの周囲に集合できるような構造に変化するのかもしれないと考えている。さらに、回転子の GFP-FliG と固定子の GFP-PomA、および、GFP-PomB について、CFP や YFP などの FRET による観察が可能な蛍光蛋白質を GFP の代わりに融合した融合タンパク質を作成し、機能が正常であるのか、蛍光を発するのかなどの基本的な性質を調べた。PomA の C-末端に存在する荷電残基8種類の変異体(PomA-K203E、R207E、D209K、E211K、R215E、D220K、R232E、D235E) を調べた。海洋性ビブリオ菌において、変異により運動能を示さなくなった PomA-K203、R215、D220 はいずれも大腸菌には保存されていないアミノ酸残基で、これらはまた大腸菌ハイブリッドべん毛モーター内でも機能しなかった。従ってこれらの変異は、固定子の機能に重要だと思われる。PomA-R207E 変異体は、ビブリオ菌で発現させるとあまり機能せず、大腸菌ハイブリッドモーター内ではさらに機能が失われた。これは、回転子側の FliG<sup>EV</sup> との組み合わせに問題があると推測している。大腸菌ハイブリッドモーターの中でのみ運動能を完全に失った変異体は PomA-E211K、R232E だった。これらは、PomA タンパク質の検出結果から大腸菌ハイブリッドモーターでは PomA が分解されやすくなっているのかもしれない。もしくは、ビブリオ菌では機能が低下しなかったのは、ビブリオ菌のべん毛モーターにのみ存在する MotX、MotY の影響によるのかもしれないと考えられた。C 末端にある荷電残基の重要性は示すことが出来たが、役割については今後の課題である。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「相沢」グループ

##### ①研究者名

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成分タンパク質の回転様式」

概要：サルモネラ菌のべん毛モーターの回転子は **FliG**,**FliM**,**FliN** の3種類のスイッチ・タンパク質から構成されている。これらのタンパク質の変異から出た温度感受性株の行動解析により、**FliG** のC端領域にトルク発生部位が存在することを突き止めた。これは従来から言われている部位とは異なっている。また、この部位は温度に敏感で25°Cから30°Cに変化させると速度が落ち、温度を再び25°Cに戻すと元の速度に回復する。この部位のトルク発生への直接関与を示唆するものであると考えている。

我々はそれぞれのスイッチ・タンパク質に蛍光タンパク質 **GFP** をくっつけた融合タンパク質を作製し、それらがテザードセルの回転中心にあることを確認した。また **FliM** と **FliN** の2色発現系でこれらのタンパク質が同じく回転中心に存在することも確かめた。しかし、融合タンパク質を輝点として観察することはできても、高速回転であるためにその回転を直接見ることは難しい。そこで上記の温度変異感受性株を用いて同様の計測を行っている。この低回転モーターは温度を変化させると、それにつれて速度も変化するので回転変動を輝点の揺らぎとして捕らえるのに役立つであろう。

#### (2)「本間」グループ

##### ①研究者名

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複合体の構造機能解析および細胞膜上での分布解析」

概要：大腸菌 H<sup>+</sup>駆動型べん毛において、回転子 **FliG** と固定子 **MotA** 間の荷電アミノ酸残基を介した相互作用がトルク発生過程に重要であるという静電的相互作用モデルが提唱されている。*V. alginolyticus* の Na<sup>+</sup>駆動型モーターでは、回転に必須な膜タンパク質として **PomA**, **PomB**, **MotX**, **MotY** が同定されている。*V. alginolyticus* の Na<sup>+</sup>駆動型モーターの回転子の **FliG** に **GFP** を融合させた蛋白質が機能的であることを示し、べん毛基部に **GFP** による蛍光ドットを観察した。回転子の **FliG** に **GFP** を融合した状態でも機能性を有する状態で蛍光部位を中心に回転することを確認し、相沢チームの研究を補完している。

この系での蛍光ドットの運動を調べて、超分子複合体の膜上での動きをモニターする。

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

- Maezawa, K., Shigenobu, S., Taniguchi, H., Kubo, T., Aizawa, S.-I., & Morioka, M. (2006) Hundreds of the flagellar basal bodies cover the cell surface of the endosymbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* sp. APS. *J. Bacteriol.* 188, 6539-6543.
- Fredericks CE, Shibata S, Aizawa SI, Reimann SA, Wolfe AJ. (2006) Acetyl phosphate-sensitive regulation of flagellar biogenesis and capsular biosynthesis depends on the Rcs phosphorelay. *Mol Micro.* 61, 734-747.
- Lambert, C., Evans, K.J., Till, R., Hobley, 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.
- Kanbe, M., Yagasaki, J., Zehner, S., Göttfert, M., Aizawa, S.-I. (2006) Characterization of two sets of sub-polar flagella in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 189. 1083-1089.
- 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<sup>+</sup>-driven flagella and required for stator formation. *Mol. Micro.* 62(4):1170-1180.
- Yagasaki, J., Okabe, M., Kurebayashi, R., Yakushi, T. & Homma, M. (2006) Roles of the intramolecular disulfide bridge in MotX and MotY, the specific proteins for sodium-driven motors in *Vibrio* spp. *J. Bacteriol.* 188(14):5308-14.
- 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.
- Fukuoka H, Sowa Y, Kojima S, Ishijima A, Homma M. (2007) Visualization of functional rotor proteins of the bacterial flagellar motor in the cell membrane. *J. Mol. Biol.* 367:692-701.