

## 研究報告書

### 「細菌べん毛蛋白質輸送装置の動作機構の解明」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：南野 徹

#### 1. 研究のねらい

蛋白質の局在化は細胞機能の、つまりは生命活動の根幹をなす現象であり、非常に特異性の高い反応である。この局在化に関わる、蛋白質の生体膜を越える輸送には、ATP やプロトン駆動力などの生体エネルギーが使われる。しかしながら、輸送装置がどのようにこれらのエネルギーを使って効率よく目的の蛋白質を適所に配送するのかは不明である。本研究では、蛋白質の膜透過に関わる輸送装置の動作機構、そしてエネルギー変換機構を解明するため、遺伝学的機能解析が容易に行えるバクテリアべん毛の蛋白質輸送系を研究対象とした。光学顕微ナノ計測装置を開発、活用し、遺伝学的機能解析法を組み合わせることで、生体膜に埋め込まれた蛋白質輸送装置の高精度でかつしなやかな、熱ゆらぎまでもうまく取り入れて動作する巧妙なしくみの解明を目指した。

#### 2. 研究成果

多くの細菌は、べん毛と呼ばれる、細胞外に長く伸びたらせん繊維状の運動器官を持っている。べん毛は約 30 種類の蛋白質から構成される複雑な超分子ナノマシンで、細胞膜を貫通して回転モーターとして働く基部体、ユニバーサルジョイントであるフック、細胞外に伸びてらせん型プロペラとして働く繊維から構成される。べん毛が構築され細胞外に長く伸びる際には、べん毛を構成する蛋白質が次々にべん毛先端のキャップ直下へ運ばれて結合する。そのため、べん毛独自の蛋白質輸送装置がべん毛基部に存在する。輸送装置は 6 種類の膜蛋白質 (FliA, FliB, FliO, FliP, FliQ, FliR) と 3 種類の可溶性蛋白質 (FliH, FliI, FliJ) で構成される。これまでの遺伝学および生化学的解析から、輸送エンジンとして働く輸送ゲート複合体は細胞膜内外に形成されるプロトン駆動力をエネルギー源としてべん毛蛋白質を細胞外へと輸送すること、FliH, FliI, および FliJ は細胞質内で ATPase 複合体を形成し、輸送基質蛋白質やシャペロン・輸送基質蛋白質複合体を細胞質から輸送ゲートへと搬送すること、などが示されているが、その詳細な分子機構は不明であった。しかも、界面活性剤などで細胞膜を壊してべん毛基部体を単離精製すると、輸送装置の大半が基部体から解離してしまうため、輸送装置が基部体のどこに結合しているのかも謎のままであった。

本研究では、1) 輸送装置構成蛋白質 FliI ATPase の局在化と自己集合の解析、2) 輸送装置の基質認識機構の解析、3) 輸送ゲート複合体のエネルギーカップリング機構の解析、および 4) プロトンチャネル活性測定方法の確立を行ったので報告する。

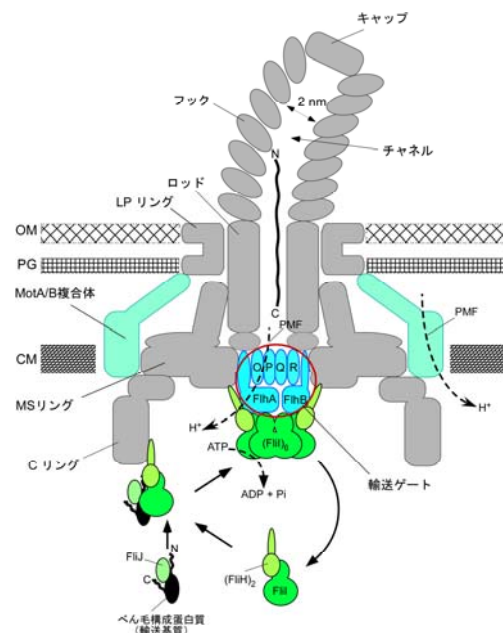


図 1. べん毛蛋白質輸送装置の模式図

## 1) 輸送装置構成蛋白質 FliI ATPase の局在化と自己集合の解析

FliI ATPase は、6 量体リングを形成して ATP を加水分解し、べん毛蛋白質輸送を促進する。しかしながら、FliI リング形成が蛋白質輸送にどのように共役しているのかは不明であった。精製した FliI を用いて *in vitro* で FliI リングの再構成実験を行った結果、ATP の結合により FliI が 6 量体リングを形成すること、ADT および Pi が FliI から解離するとそのリング構造が不安定になることを見いだした。さらに、輸送ゲート上で FliI リングが形成されることが輸送基質蛋白質の輸送ゲートへの挿入に必須であることが示唆された (Kazetani *et al. BBRC*. 2009)。

FliI ATPase のべん毛基部への局在化機構を明らかにするため、FliI-YFP および FliI-CFP を作製し、蛍光顕微鏡を用いてそれらの細胞内局在を解析した。その結果、FliI のべん毛基部へ局在には輸送装置構成蛋白質 FliH およびべん毛基部体 C リングが必要であること、FliH の N 末近傍に存在する 7 番目と 10 番目のトリプトファン残基が FliI および輸送ゲート複合体との相互作用に重要であることを見いだした (Minamino *et al. Mol. Microbiol.* 2009b)。

以上の結果から、ATP の加水分解反応に共役しておこる FliI ATPase の離合集散サイクルがべん毛蛋白質輸送過程を促進するというモデルを提案した (図 1)。

## 2) 輸送装置の基質認識機構

FliT は、4 本の  $\alpha$  ヘリックスからなる可溶性タンパク質で、べん毛繊維キャップタンパク質 FliD に特異的に結合する分子シャペロンとして働く。FliT が輸送装置構成蛋白質の一つである FliI ATPase と特異的に相互作用することで、FliD の細胞外への輸送が促進される。しかしながら、FliI ATPase がどのように FliT-FliD 複合体を認識し、FliD の輸送を促進するのかは不明であった。そこで、FliT の X 線結晶構造解析および遺伝学的機能解析法を相補的に組み合わせて解析した結果、FliT の C 末端側の  $\alpha$ -ヘリックスが分子スイッチのように構造変化することで、FliI ATPase との相互作用が巧みにコントロールされることを見いだした (Imada *et al. PNAS*. 2010)。さらに、GST アフィニティークロマトグラフィー法を利用したプルダウン法により FliT-FliI 相互作用を詳細に解析した結果、C 末端側の  $\alpha$ -ヘリックスが欠失した FliT94 は FliI の N 末近傍領域 (FliI<sub>EN</sub>) と強く、ATPase ドメイン (FliI<sub>CAT</sub>) と弱く結合すること、C 末端側の  $\alpha$ -ヘリックスが FliI<sub>EN</sub> との強い相互作用を抑制すること、FliH の添加により FliT94 が ATP の有無に関係なく FliI から解離すること、FliD が FliT94-FliI<sub>CAT</sub> 相互作用を安定化することなどを見だし、FliT-FliD 複合体は FliI の ATPase ドメインを介して FliH-FliI 複合体に結合することが示唆された (Minamino *et al. Mol. Microbiol.* 2012a)。

FliH は FliB とともに FliH-FliI-FliJ 複合体の結合プラットフォームを形成する。FliH の C 末端側細胞質領域 (FliH<sub>C</sub>) は 4 つのコンパクトなドメイン (D1, D2, D3, D4) から構成される。FliH<sub>C</sub> はべん毛蛋白質輸送に直接関与するが、その作用機構は不明であった。D1 ドメインに温度感受性 G368C 変異を持つ *fliH* 変異株の遺伝学機能的解析を行った結果、この変異により、FliH<sub>C</sub> と、FliH、FliI、FliJ、および FliB の C 末端側細胞質ドメインとの相互作用は阻害されないが、輸送基質蛋白質の輸送ゲートへの挿入が阻害されることが明らかとなった (Minamino *et al. J. Bacteriol.* 2010)。さらに、フック・フィラメント連結蛋白質である FlgK および FlgL に特異的な分子シャペロンとして働く FlgN 欠損株の遺伝学的および生化学的解析を行った結果、保存性の高い疎水性残基で構成される FliH<sub>C</sub> の D1 および D2 ドメインの境界面が FlgN-FlgK 複合体や FlgN-FlgL 複合体の結合部位であることが判明した (Minamino *et al. Mol. Microbiol.* 2012b)。

### 3) 輸送ゲート複合体のエネルギー共役機構

輸送エンジンとして働く輸送ゲート複合体は、細胞膜内外に形成されるプロトン駆動力をエネルギー源としてべん毛蛋白質を細胞内から細胞外へと運び出す。しかしながら、どのようにして輸送装置がプロトン駆動力を蛋白質輸送と言う力学的仕事に変換するのかは不明であった。本研究では、野生株のサルモネラ菌と、輸送ゲート複合体のみでも効率よくべん毛を形成することができる変異株を用い、輸送ゲート複合体自体は、プロトン駆動力を構成する2つの成分、細胞膜を隔て

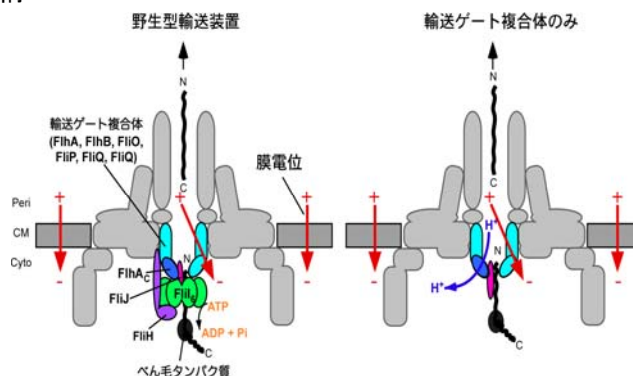


図 2. 輸送装置のエネルギー共役機構

た電位差 ( $\Delta\psi$ ) と細胞膜内外のプロトン濃度差 ( $\Delta\text{pH}$ ) を、蛋白質輸送の異なる段階で明確に区別して利用していること、FliH、FliI および FliJ がともに働く野生株では、FliH-FliI 複合体の助けによって FliJ が FliA と特異的に結合することにより、輸送ゲートは  $\Delta\psi$  だけで駆動される高効率な輸送エンジンとして働くことを明らかにした(図 2.) (Minamino *et al. Nat. Commun.* 2011)。

### 4) プロトンチャネル活性測定方法の確立

輸送ゲート複合体のプロトンチャネル活性を定量的に測定する方法を確立するため、pH 感受性の蛍光蛋白質 pHluorin 遺伝子を染色体 DNA 上の *araBAD* 遺伝子座に組み込んだサルモネラ菌を作製した。作製した pHluorin 発現株内でプロトンチャネル蛋白質を発現させ、pHluorin を用いた細胞内 pH 変化を計測することで、精製困難なプロトンチャネルのプロトン透過活性を簡便に計測できた (Morimoto *et al. FEBS Lett.* 2010)。

輸送ゲート複合体のエネルギー変換の分子機構を明らかにするには、入力エネルギーであるプロトン流と、出力であるべん毛蛋白質輸送を同時に計測する必要がある。輸送ゲート複体に流れ込むプロトンの量を計測するには、輸送装置近傍の局所的な pH 変化を定量的に測定すれば可能であると考えられる。そこで、pHluorin をべん毛基部体蛋白質 FliG やべん毛モーター蛋白質 MotB に融合した pHluorin-FliG および pHluorin-MotB 融合蛋白質を作製したが、大部分の融合蛋白質がフルオリン内部に存在する 153 番目のメチオニンで特異的に切断された。このメチオニン残基に様々な変異を導入した結果、M153R 変異によってこれらの pHluorin 融合蛋白質の安定性および S/N 比が著しく上昇した。さらに、精製した pHluorin(M153R)-FliG 融合蛋白質は pH indicator として利用できることが判明した (Morimoto *et al. PLoS One* 2011)

### 3. 今後の展開

物理学の概念では、プロトン駆動力を構成する  $\Delta\psi$  と  $\Delta\text{pH}$  は等価なエネルギーであると信じられてきたが、輸送ゲート複合体はこれらが等価であるという単純な物理学の方程式では説明できない複雑なしくみで働いていることが示唆された。しかしながら、どのように輸送ゲート複体がこれら2成分を区別して利用するのかは不明である。今後、べん毛蛋白質輸送システムを *in*

*vitro* で再構成し、蛋白質輸送に共役して輸送ゲートに流れ込むイオン流と蛋白質輸送速度を同時に計測することで、べん毛蛋白質輸送装置のエネルギー変換の仕組みの解明を目指す。

#### 4. 自己評価

生体膜に存在する膜超分子ナノマシンは細胞膜内外に形成されるプロトン駆動力を使って ATP を合成し、また生体膜を越えたタンパク質などの物質輸送を行う。これまでに研究されたプロトン駆動型の膜超分子ナノマシンでは、 $\Delta\text{pH}$  成分が存在しない場合でも  $\Delta\psi$  によって、あるいは  $\Delta\psi$  が消失した場合でも  $\Delta\text{pH}$  によってプロトンは細胞内へ流れ、エネルギー源として利用されることが示されている。すなわち、物理学的に定義されるとおり、 $\Delta\psi$  と  $\Delta\text{pH}$  は区別なく等価なエネルギー源として利用されるというのが長い間の通説であった。本研究では、輸送ゲート複合体自体は、 $\Delta\psi$  と  $\Delta\text{pH}$  を明確に区別して利用していることを明らかにした。このことは、輸送ゲート複合体が、 $\Delta\psi$  と  $\Delta\text{pH}$  が等価であるという単純な物理学の方程式では説明できない、複雑なしくみで働いていることを明確に示すものである。その一方で、輸送基質蛋白質の速度論的解析と、輸送に共役して細胞内に流れ込むプロトン流の計測を、同時に行うことができなかったため、輸送装置のエネルギー変換機構を本格的に解明するまでには至らなかった。さきがけ研究期間中にべん毛蛋白質輸送のダイナミクスを計測するための3波長同時イメージングシステムや局所 pH を高分解能で蛍光イメージングできる2波長励起1波長測光システムは構築できたので、今後、より定量的なデータ収集を行うことで、輸送装置のエネルギー変換の分子機構の解明に迫って行くことを目標としている。

#### 5. 研究総括の見解

3種類の蛍光を同時に観察できる高感度蛍光顕微システム、および0.01pHユニット差を有為に検出できる高感度pHイメージング装置を開発したことにより、多くのべん毛蛋白質輸送のダイナミクスに関する成果を次々に見出している。これらの知見からべん毛蛋白質輸送のエネルギー変換の仕組みの解明へと進めていただきたい。

#### 6. 主な研究成果リスト

##### (1)論文(原著論文)発表

1. Minamino, T., Kinoshita, M., Hara, N., Takeuchi, S., Hida, A., Koya, S., Glenwright, H., Imada, K., Aldridge, P.D., & Namba, K. Interaction of a flagellar chaperone FlgN with FlhA is required for efficient export of its cognate substrates. *Mol. Microbiol.* 83: 775–788 (2012b).
2. Minamino, T., Kinoshita, M., Imada, K., & Namba, K. Interaction between FliI ATPase and a flagellar chaperone FliT during bacterial flagellar protein export. *Mol. Microbiol.* 83: 168–178 (2012a).
3. Minamino, T., Morimoto, Y.V., Hara, N., & Namba, K. An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export. *Nat. Commun.* 2: 475 doi: 10.1038/ncomms1488 (2011).
4. Imada, K., Minamino, T., Kinoshita, M., Furukawa, Y., & Namba, K. Structural insight into the regulatory mechanisms of the flagellar type III chaperone FliT with its binding partners. *Proc.*



*Natl. Acad. Sci. USA* 107: 8812–8817 (2010).

5. Minamino, T., Yoshimura, S.D.J., Morimoto, Y.V., González-Pedrajo, B., Kami-ike, N., & Namba, K. Roles of the extreme N-terminal region of FliH for efficient localization of the FliH-FliI complex to the bacterial flagellar type III export apparatus. *Mol. Microbiol.* 74: 1471–1483 (2009b).

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

招待講演

1. Minamino, T. Switching mechanism of flagellar motor rotation. Gordon Conference on Sensory Transduction in Microorganisms. Ventura, California, USA. January 15– 20, 2012.
2. Minamino, T. Molecular mechanism of proton-driven bacterial flagellar type III protein export. Gordon Conference on Sensory Trasnduction in Microorganisms. Ventura, California, USA. January 24– 29, 2010.
3. Minamino, T. Molecular Mechanism of Bacterial Flagellar Protein Export. Japan–Mexico Workshop on “Pharmacobiology” and “Nanobiology”. Universidade Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, México. February 25–27, 2009.