トピックス

ビブリオ菌べん毛モーターの超高速回転を支える超分子リング構造形成のしくみ

寺島浩行^{1,2}, 本間道夫², 今田勝巳¹

¹大阪大学大学院理学研究科

²名古屋大学大学院理学研究科

1. 細菌べん毛とは

多くの細菌は、自らにとって好ましい環境に移動するための“足”として、べん毛と呼ばれるらせん状の長い繊維を持っている。その根元にはナノメートルの回転モーターがあり、べん毛繊維をスクリューのように回転させることで水中を泳ぐことができる¹⁾。この回転モーターのエネルギー源は、電気化学ポテンシャル差に依存した共役イオン（プロトンあるいはナトリウムイオン）の細胞内への流入である。プロトン駆動型モーターを持つ代表的な細菌として大腸菌やサルモネラ菌、ナトリウム駆動型モーターを持つ代表的な細菌としてビブリオ菌が知られている。ビブリオ菌のべん毛モーターは、回転速度の点で非常に面白く、なんと最速毎秒 1700 回転という驚異的な速度で回転する²⁾。これは、大腸菌より 5 倍以上速い回転数である。しかし、そのような超高速回転が作り出されたとしても、他の菌と同じ構造で、その回転力を保持できるものだろうか？例えるならば、「普通自動車に F1 マシンのエンジンを積んでも、壊れず走れるのか？」ということである。本稿では、FlgT というタンパク質の構造・機能解析の結果を中心に、ビブリオ菌のべん毛モーターの超高速回転を支える構造体の構築・機能メカニズムについて解説する。

2. 細菌べん毛の基本的な構造

べん毛モーターは非常に巨大な超分子複合体で、機能の観点から 1) 回転する部分である回転子、2) その回転軸を保持する軸受け、3) 回転子の周囲に集合し回転力を発生させる固定子の 3 つのサブパートに分類できる（図 1）。回転子と軸受けは、基部体と呼ばれる安定な複合体を形成しており、複数のリング構造と軸構造から形成されている。回転子部分のリング構

図 1

ビブリオ菌ナトリウム駆動型べん毛モーター（左半分）と大腸菌プロトン駆動型べん毛モーター（右半分）の模式図。ビブリオ菌では、Tリング-ペプチドグリカン層、Tリング-固定子、固定子-ペプチドグリカン層の 3 種類の相互作用により、固定子が強固に固定される。

造は、細胞膜に埋まった MS リングと、MS リングの細胞質側に結合する C リングから構成されている。軸受け部分のリング構造は、外膜に位置する L リングと、ペプチドグリカン層に位置する P リングで構成される。軸構造は、MS リングのペリプラズム側から伸び、LP リングを貫き、べん毛繊維へとつながる。固定子は 2 種類の異なる膜タンパク質（大腸菌サルモネラ菌では MotA/MotB、ビブリオ菌では PomA/PomB と呼ばれる。）の複合体で、共役イオンが固定子複合体を透過すると、C リングとの相互作用により回転力が発生すると考えられている。

3. ビブリオ菌の持つ特異的なリング構造

近年、電子線トモグラフィー法による *in situ* イメー

Assembly Mechanism of the Supramolecular Rings for Ultra High Speed Rotation in the Sodium-driven *Vibrio* Flagellar Motor
Hiroyuki TERASHIMA^{1,2}, Michio HOMMA² and Katsumi IMADA¹

¹Graduate School of Science, Osaka University

²Graduate School of Science, Nagoya University

ジングの結果から、先述の基本構造に加え、細菌種毎に構造多様性が存在することが報告された³⁾。例えばビブリオ菌では、LP リング周辺に付加的な電子密度が存在している。実は、この電子密度に相当する構造は、すでに我々が報告しており^{4), 5)}、T リング、H リングと名付けた特異的なリング構造が LP リング周辺に存在している。

T リングは、P リングの下に位置するリング構造で、MotX および MotY という 2 種類のビブリオ菌特異的なペリプラズムタンパク質から形成される。その機能は、固定子をモーター内に組み込み・安定化することであり、T リングを形成できない変異体ではべん毛は全く回転しない⁴⁾。電子顕微鏡によるべん毛形態の観察とウェスタンブロットニングの結果から、MotY が基部体と直接結合し、MotX は MotY を介して基部体に結合している。MotY の結晶構造は、基部体および MotX と相互作用する N ドメインと、ペプチドグリカン結合ドメインである C ドメインからなる⁶⁾。PomB の C 末端領域は、MotY の C ドメイン同様のペプチドグリカン結合ドメインが存在する。さらに、MotX は PomB と相互作用することが示されている^{7), 8)}。これらのことから、ビブリオ菌では、T リング-ペプチドグリカン層、T リング-固定子、固定子-ペプチドグリカン層間の 3 種類の相互作用により、固定子がペプチドグリカン層と軸受けに強固に固定されていることが示唆された。一方、大腸菌やサルモネラ菌には T リングは存在せず、固定子はペプチドグリカン層にアンカーしているのみである。したがって、この三者間結合が、ビブリオ菌の超高速回転を保持するメカニズムの一端であると思われる。

H リングは L リングの外側に位置するリング構造で、FlgT というペリプラズムタンパク質が形成に必須であり、FlgT 自身も H リング内のどこかに組み込まれている⁵⁾。また、FlgT は、T リングの形成にも必要とされる。しかしながら、FlgT が H リング T リングの形成にどのように関わっているのか、詳細なメカニズムは不明であった。

4. FlgT の構造と 3 つのドメインの機能

そこで我々は、*Vibrio alginolyticus* の FlgT の構造を X 線結晶構造解析によって決定し、その機能を明らかにした⁹⁾。全長の FlgT (ペリプラズムへの輸送シグナルを除く) を結晶化し、2.0 Å 分解能で構造決定した (図 2)。その構造は、N ドメイン (FlgT-N)、M ドメイン (FlgT-M)、C ドメイン (FlgT-C) の 3 つのドメインから形成されていた。

図 2
FlgT の結晶構造。N, M, C の 3 つのドメインからなる。

そこで各ドメインの機能を調べるために、ドメイン欠失変異体の運動能を解析した。flgT 欠失体では、ほとんどの菌体は運動能を示さないが、少数であるが運動能を示す菌体が存在した。この結果は、FlgT が回転力発生に重要な働きを持つが、必須ではないことを示している。プラスミドから各ドメイン欠失型 FlgT を flgT 欠損株で発現させたときの運動する菌体の割合は、FlgT-NMC (全長) > FlgT-NM (C ドメイン欠失) > FlgT-MC (N ドメイン欠失) >>> FlgT-NC (M ドメイン欠失) = flgT 欠失変異株であった。この結果は、特に M ドメインが運動能に重要な機能を持っていることを示している。

次に、各ドメイン欠失体から基部体を精製し電子顕微鏡で観察した。すると、FlgT-NM の基部体はほぼ野生型と同じ形だが、FlgT-MC の基部体は H リングの外膜と一致する部分のほとんどが失われ、FlgT-NC のものでは flgT 欠失体とほぼ同じで T リングと H リングが失われていた。精製した基部体のウェスタンブロットニングの結果から、FlgT-NC はほとんど基部体画分から検出されず、同時に MotX と MotY も少量しか検出されなかった。この結果と FlgT-NC で T リングと H リングが失われることから、M ドメインの欠失によって、FlgT 自身が基部体に結合できず、H リングと T リングが形成できないことが示された。したがって、M ドメインが基部体と結合することで H リングの形成が始まり、M ドメインをメインターゲットにして MotX と MotY が集合し T リングを形成すると考えられる。さらに、FlgT-MC で H リングの大部分がなくなることから、N ドメインが H リング形成に必要であることが示唆された。N ドメインが未知の外膜タンパク質をリクルートし、H リングを構築しているのかもしれない。C ドメインは、機能・構造解析の結果から、FlgT の機能に特に影響しないことが明らかである。しかし、興味深いことに、C ドメ

図 3

ビブリオ菌ペン毛モーターの形成モデル。まず、FlgT が軸受けの LP リングの周囲に集合し、他のタンパク質とともに H リングを形成する。次に FlgT の M ドメインをターゲットにして MotX と MotY が基部体の周囲に集合し、T リングを形成する。固定子は、T リングを介してモーター内に組み込まれ、安定化される。FlgT が存在しない場合、H リング、T リングが形成できず、固定子がモーター内に安定して集合できないため、ペン毛モーターが回転できない。

インは F_0F_1 -ATPase の F_1 - β サブユニットの N 末ドメインと構造類似性を持っていた。

F_1 - β サブユニットの N 末ドメインはサブユニット間 β シートによって 6 量体の安定化をしている部分である。このことは、FlgT の C ドメインも同様に、サブユニット間 β シートの形成によるリング構造の安定化に働く可能性を想像させる。

これまでの研究から、ビブリオ菌のペン毛モーターの超分子リング構造の形成過程をまとめると (図 3)、M ドメインは H リングおよび T リング形成の起点であり、基部体と結合しリング構造形成の核となっていた。M ドメインをターゲットにして MotX/MotY が集合し T リングが形成される。T リングは固定子、ペプチドグリカン層と相互作用することで、安定で強固なモーター構造を形成することができると考えられる。N ドメインは H リングの外膜部分の形成に働き、軸受け構造の安定化やペン毛形成の促進を行うと思われる。C ドメインは FlgT の作るリング構造の安定化を担っていると考えられる。以上のようにして、FlgT を中心として 2 つのリング構造が構築され、軸受け構造の強化と固定子のモーターへの固定を実現していることが明らかとなった。

5. 今後の展望

これまでの研究成果から、ビブリオ菌の強固なペン毛モーターの分子レベルでの構築過程が明らかとなってきた。しかし、リング構造を形成するタンパク質の

モノマー構造は明らかにしたが、未だ超分子構造は不明である。これまでは、各部品の形を明らかにしたにすぎず、全体像を明らかにしなければ超高速回転のメカニズムの全貌を知ることはできない。今後は、超分子構造を明らかにすること、そして、未だ構造の解かれていないコンポーネントの構造機能解析を進めていく必要がある。

文 献

- 1) Berg, H. C. (2003) Annu. Rev. Biochem. **72**, 19-54.
- 2) Yorimitsu, T., Homma, M. (2001) Biochim. Biophys. Acta. **1505**, 82-93.
- 3) Chen, S. *et al.* (2011) EMBO J. **30**, 2972-2981.
- 4) Terashima, H. *et al.* (2006) Mol. Microbiol. **62**, 1170-1180.
- 5) Terashima, H. *et al.* (2010) J. Bacteriol. **192**, 5609-5615.
- 6) Kojima, S. *et al.* (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **105**, 7696-7701.
- 7) Kojima, S. *et al.* (2009) Mol. Microbiol. **73**, 710-718.
- 8) Okabe, M. *et al.* (2005) J. Biol. Chem. **280**, 25659-25664.
- 9) Terashima, H. *et al.* (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **110**, 6133-6138.

寺島浩行

寺島浩行 (てらしま ひろゆき)

大阪大学大学院理学研究科博士研究員
2009 年名古屋大学大学院理学研究科博士課程修了。博士 (理学)。09 年日本学術振興会特別研究員 PD, 10 年米国コーネル大学ウェイルコーネル医学校博士研究員, 12 年 6 月より現職。
研究内容: 膜タンパク質や超分子複合体の機能と構造の解析

連絡先: 〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1
E-mail: terashimah12@chem.sci.osaka-u.ac.jp

本間道夫

本間道夫 (ほんま みちお)

名古屋大学大学院理学研究科教授
1985 年東京大学大学院理学研究科博士課程修了。理学博士。85 年米国エール大学分子生物物理生化学科博士研究員, 88 年名古屋大学付属病態制御研究施設講師, 92 年名古屋大学大学院理学研究科助教授, 97 年 11 月より現職。

研究内容: 細菌ペン毛モーターの超分子構築機構とエネルギー変換機構の解析
連絡先: 〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町
E-mail: g44416a@cc.nagoya-u.ac.jp

今田勝巳

今田勝巳 (いまだ かつみ)

大阪大学大学院理学研究科教授
1992 年大阪大学大学院理学研究科博士課程修了。博士 (理学)。92-93 年高輝度光科学研究センター, 93-97 年松下電器産業 (株) 研究員, 97-2002 年科学技術振興事業団 ERATO プロトニックナノマシンプロジェクトグループリーダー, 02-10 年大阪大学大学院生命機能研究科准教授, 10 年 10 月より現職

研究内容: 生体分子機械の構造と機能
連絡先: 〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1
E-mail: kimada@chem.sci.osaka-u.ac.jp