

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 ビブリオ菌 Na⁺駆動型べん毛モーター回転子構成因子 FliG の
C 末端領域の構造機能解析
氏 名 西野 優紀

論 文 内 容 の 要 旨

多くの細菌は、生育により適した環境を探索するために、べん毛という運動器官を有している。べん毛は、ミクロなスケールで両方向に高速回転を実現している分子モーターである。このモーターは機械的なモーターと同様、固定子と回転子から構成される。回転子は、リング状構造になっており、対称性を有しているとされている。回転子のリングの1つはCリングと呼ばれている。Cリングは、トルク産生や回転方向転換を担うとされている。このリングは、3種類の細胞質タンパク質 (FliG, FliM, FliN) で構成されている。その中で、FliG がモーターのトルク産生に直接関与している。この FliG は3つのドメインを有しており、N 末端ドメイン、Middle ドメイン、C 末端ドメインとそれぞれ呼ばれている。これらの内、C 末端ドメインが固定子と複数の荷電残基を介した静電的相互作用することによりトルクが産生され、結果べん毛モーターが回転すると考えられている。

本学位論文では、この FliG の回転方向転換に際して予想されている溶液中での動的な構造変化を検出し、各々の回転方向で、トルク産生を担う C 末端ドメインがどのような構造を取り得るのかを明らかにすることを目的とした研究を行った。タンパク質の発現系が確立しており、多くの突然変異体が単離解析されている海洋性ビブリオ菌 *Vibrio alginolyticus* の FliG (Va FliG と略記) を対象とした。Va FliG の C 末端ドメインの2種類の断片について、大腸菌中で同位体ラベルして大量発現後、精製したタンパク質の溶液 NMR による解析を行った。Va FliG の運動能に大きく影響することが報告されている幾つかの変異を導入した断片についても溶液 NMR による解析を行い比較した。その結果、¹H-¹⁵N HSQC のシグナルプロファイルから、野生型と回転方向が CW 方向に偏る変異 A282T を有する断片において比較的感度の高いシグナルが得られ、それらが良好なサンプルであると判明した。また、三次元 NMR 法による連鎖帰属を行

い、野生型とその変異体の大部分のシグナルの帰属に成功した。C 末端ドメインはN 末端側のアルマジロリピートモチーフを含むN 末端側のC1 ドメインと、MFXF モチーフと6つのヘリックスを含むC2 ドメインから構成されることが確認された。さらに、そのケミカルシフトの結果から、A282T の変異導入により変異を導入した領域よりも離れた領域においてもその大きな摂動が見られた。このことから、C 末端ドメイン内での幾つかの分子間相互作用が破壊されたと推測できた。さらに、横緩和時間 $^{15}\text{N T}_2$ の結果から、A282T では変異を導入した領域付近において、野生型よりも $^{15}\text{N T}_2$ の値が小さくなった。従って、A282T は、野生型と比べ遅い時間オーダーでの構造変化が生じると考えられた。

Va FliG の構造情報をさらに得るため、結晶構造の分かっている好熱菌 *Thermotoga maritima* の FliG の構造を基に、Va FliG の立体構造をモデリングし、分子動力学シミュレーション (MD シミュレーションと略記) を行った。そのトラジェクトリ解析の結果から、野生型では少なくとも3つのコンフォメーションが示唆されたが、回転方向が固定された A282T 変異体では1つのコンフォメーションのみであり、構造変化が制限されることが示唆された。また、これまでに報告されている複数の結晶構造を比較すると、CW 型とされている構造を含む群と CCW 型とされている構造を含む群の2つの群に分類でき、各群の違いはC1 ドメインに位置するヘリックス $\alpha 0$ のC2 ドメインに対する配向様式に帰することが分かった。上記について、MD シミュレーションから得られた構造アンサンブルについて検証した。C2 ドメインに対する $\alpha 0$ の二面角と MFXF モチーフ上の F254 における二面角をパラメータとした解析を行った結果、野生型の構造は上記のどちらの群も含んだが、A282T の構造はCW 型の群に含まれることが分かった。

以上の結果から、ヘリックス $\alpha 0$ のヘリックス再配向により C1-C2 ドメインの相対配置が変化することで回転方向転換が起こることが推測された。さらに、このヘリックス再配向が構造上の制約を受けた場合は、回転方向転換が阻害され、回転方向に異常な偏りが見られると考えられる。本研究では、FliG の MFXF モチーフからヘリックス $\alpha 0$ までの領域の可動域とそのヘリックス再配向により、回転方向が制御されるというモデルを提唱することが出来た。