

学位論文

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

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

西野 優紀

2018 年 2 月

【概要】

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、トルク発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発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発生され、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、トルク発生を担う 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 (ARM_C と略記) 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再確認された。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}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}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が見られ、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、C1 ドメインに位置するヘリックス $\alpha 0$ (ARM_C における末端のヘリックス) の C2 ドメインに対する配向様式に各々差異が見られることから、その配向様式に基づき、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 群に分類した。上記について、MD シミュレーションから得られたその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。

【目次】

概要	p.1
序論	p.4
結果	
<i>V_a</i> FliG _C の構造学的特性	p.9
<i>V_a</i> FliG _C とそのCWバイアスを示す変異体における C α 1-6の構造ダイナミクス	p.11
FliG _C の回転方向の切り替えにおける役割	p.15
考察	p.17
材料及び方法	p.20
文献	p.25
付記	p.32
参考論文	p.33
謝辞	p.34
表	p.36
図	p.41

【序論】

多くの細菌は、環境に適応するための運動器官としてべん毛を持つ。細菌のべん毛は大きく分けて、フィラメント、フック、基部体の 3 つに区分される。フィラメントはらせん状の繊維であり、べん毛のスクリューの役割を果たす。フィラメントはフラジェリンと呼ばれるべん毛構成タンパク質がべん毛フィラメントの先端で重合していくことで形成される。べん毛の本数や形成位置は、菌種によって様々である。菌体周囲に複数本生える周毛性や、細菌の末端である極に 1 本だけ生える極毛性等が報告されている。たとえば、大腸菌は周毛性の複数のべん毛を持ち、緑膿菌は極毛性のべん毛を 1 本持つ。また、周毛性細菌は、複数のべん毛を束にすることで運動する。フックはフィラメントと基部体とを接続するユニバーサルジョイントとして機能する。すなわち、基部体の回転がフィラメントへとフックを介して伝達される役割を果たす。最後に、基部体がべん毛のモーターとしての主要な役割を担っている。基部体は、細菌における、最も巨大な複合体の一つである。基部体には、複数のリング状の構造が存在する。大腸菌やサルモネラ菌では、外膜側から L リング、P リング、MS リング、C リングと呼ばれるリング構造が存在する (Macnab, 2003; Terashima *et al.*, 2008)。細菌特異的なリング構造も報告されている。例えば、海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* においては、外膜側から H リングと T リングと呼ばれるリングがさらに観察される (Terashima *et al.*, 2006; Terashima *et al.*, 2010) (図 1)。べん毛モーターは、時計回り (CW 回転)、及び反時計回り (CCW 回転) の両方向に回転できるモーターである。細菌のべん毛モーターの回転速度はサルモネラ菌では、秒速 300 回転、海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* で秒速 1700 回転の速度で回転することが可能であることが報告されている。

べん毛モーターは、固定子と回転子と呼ばれる 2 つの部位から構成される。回転子は、べん毛モーターの回転部位に相当し、主な構造として MS リングと C リングより構成される。MS リングは内膜に埋め込まれているリング構造で、その構成因子は FliF と呼ばれる 2 回膜貫通型膜タンパク質である。べん毛形成の初期に MS リングが形成される。一方、C リングは MS リングの下側、すなわち細胞質領域にあるリング構造である。C リングの構成因子は、FliG、FliM、FliN の 3 種の細胞質タンパク質である。サルモネラ菌において、それぞれのタンパク質のストイキオメトリーは、FliG が 26、FliM が 34、FliN が 100 以上という

結果が報告されている (Francis *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 1999)。C リングには 34 回の回転対称性があると電子顕微鏡の構造から推測されているが、同じ菌種でも個体によってばらつきがあることも報告されているため、正確な対称性に関しては未だに議論の渦中にある (Khan *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2003)。

C リングは、べん毛モーターの双方向の回転方向の転換を制御する役割を担うとされるタンパク質の複合体であるため、“スイッチ複合体”と称されている。べん毛モーターがこのように双方向性に回転するのは、より生育に適した環境を探索し、移動することを実現するためである。べん毛モーターの回転方向転換は、細胞膜に存在するレセプターが、細胞外で結合した化学物質の受容を、細胞内に走化性シグナル伝達経路によって伝達し、制御される (Sourjik and Armitage, 2010)。例えばセリンに代表されるような誘引物質を添加した際は、べん毛モーターは CCW 方向の回転が支配的になる。それに対して、フェノールのような細菌に対して有害な忌避物質を添加した際は、べん毛モーターは CW 方向の回転が支配的になる。このような性質は、走化性と呼ばれる。C リングの構成因子の中で、回転方向転換のシグナル伝達に対し主要な役割を果たす因子は FliM である。FliM に走化性シグナル因子の 1 つである CheY と呼ばれる因子が結合することが分かっている。CheY はリン酸化状態とリン酸化されていない状態の 2 状態が存在する。CheY は、FliM と結合する際は、リン酸化状態を取っている。リン酸化 CheY が FliM に結合すると、結合していない状態では CCW 回転をしているべん毛モーターは、CW 方向の回転へと方向転換する (Barak and Eisenbach, 1992; Welch *et al.*, 1993; McEvoy *et al.*, 1999)。回転子が回転する際の回転力、すなわちトルクを産生する役割を担うとされているのは、C リングの構成因子の内、FliG である。FliG は 3 つのドメイン、N 末端ドメイン (FliG_N)、Middle ドメイン (FliG_M)、C 末端ドメイン (FliG_C) から構成される。C リングのもう 1 つの因子、FliN は主にべん毛タンパク質の輸送に関与しているとされている。

べん毛モーターの固定子は、ペプチドグリカン層にアンカーすることで膜に固定する役割を持ち、回転子と相互作用することで、トルクを産生することができる。固定子は、膜タンパク質複合体であり、電気化学的ポテンシャル差により共役イオンを細胞内に流入する際に、力学エネルギーに変換して、べん毛モーターを駆動すると考えられている。固定子に用いられる共役イオンによ

てモーターは 2 種類に大別される。1 つは H^+ を共役イオンとする大腸菌やサルモネラ菌に代表される、 H^+ 駆動型べん毛モーターと呼ばれる。もう 1 つは Na^+ を共役イオンとする海洋性ビブリオ菌に代表される、 Na^+ 駆動型べん毛モーターである (Li *et al.*, 2011)。固定子は 2 つの構成因子 (A サブユニット、B サブユニット) からなることがわかっている。固定子 A サブユニットは 4 回膜貫通型膜タンパク質であり、固定子 B サブユニットは 1 回膜貫通型膜タンパク質である。1 つの固定子複合体に含まれる分子は A サブユニットが 4 分子、B サブユニットが 2 分子である。固定子はこのヘテロ 6 量体が 1 ユニットとして機能すると考えられている (Sato and Homma 2000; Yorimitsu *et al.*, 2004; Kojima and Blair 2004)。

細菌のべん毛モーターはこの固定子が集合離散するという特徴を有している。固定子は共役イオンが流入すると、べん毛の基部体の周囲に複数集合する (Leake *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2006)。基部体周囲に集合した際、コンフォメーションの変化が起こり、サブユニット B のペプチドグリカン結合モチーフ (PGB モチーフと呼ばれている) を介してペプチドグリカン層にアンカーされ、固定子がべん毛モーターに組み込まれて機能を果たす (Zhu *et al.*, 2014)。固定子の A サブユニットは、2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間に大きな細胞質ループが存在しており、このループ上の複数の荷電残基が、回転子の構成因子、FliG の C 末端ドメインの複数の荷電残基と組み合わせさせて静電的に相互作用することで、トルクを産生するというメカニズムが提唱されている (Zhou *et al.*, 1995; Asai *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1998; Takekawa *et al.*, 2014) (図 2)。

大腸菌等に代表される H^+ 駆動型べん毛モーターでは、固定子タンパク質は MotA 及び MotB と呼称されている。それに対し、海洋性ビブリオ菌に代表される Na^+ 駆動型べん毛モーターでは、固定子タンパク質は PomA 及び PomB と呼称されている。枯草菌では、MotA と MotB の他に、MotP、MotS とから構成される“第 2 の固定子”を持つ細菌も存在する。 H^+ 駆動型べん毛モーターを持つ大腸菌中で、C 末端ドメインを海洋性ビブリオ菌由来の FliG と切り替えたキメラ FliG は、大腸菌中で MotA と相互作用し、トルクを産生できるという報告もされている (Yorimitsu *et al.*, 2003; Yakushi *et al.*, 2006)。共役イオンが結合する残基として、幅広い菌種で高度に保存されているイオン結合部位が膜貫通領域において既に特定されている (例えば、大腸菌では MotB の D32、海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* では PomB の D24 に相当する) (Zhou *et al.*, 1998; Sudo *et al.*,

2009; Terashima *et al.*, 2010)。共役イオンの流入を、栓をするかのように制御するプラグ領域という領域が固定子 B サブユニットに存在すると推定されている。固定子 B サブユニットの結晶構造は、部分構造であるが、既に幾つか解明されている。例えば、サルモネラ菌の MotB のペリプラズム領域の断片、MotB_C の構造 (PDB : 2zvy 等) や海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* の PomB の同じくペリプラズム領域の断片、PomB_C の構造 (PDB : 3wpw 等) が解明されている。これらの結晶構造等から、固定子 B サブユニットの 2 段階のコンフォメーションの変化についてのモデルが提唱されている。また、固定子が基部体周囲への集合に必要な構造として、海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* において、T リングが報告されている。T リング構成因子は MotX 及び MotY と呼ばれる 2 つのタンパク質である。MotY は、既に結晶構造が解明されている (PDB : 2zf8)。MotX は、T リングの外側を形成する因子であるとされており、コンフォメーションの変化が起こった固定子 B サブユニットとの相互作用が予想されている (Okabe *et al.*, 2005; Terashima *et al.*, 2006)。

回転子の構成因子である FliG では、大腸菌やサルモネラ菌において多数の突然変異体が単離されており、それらの変異部位も同定されている (図 4)。それら突然変異体の表現型としては、べん毛形成異常 (*fla* と表記) や回転方向のバイアス異常 (*che* と表記)、トルク産生異常 (*mot* と表記) が挙げられる (Irikura *et al.*, 1993; Lloyd *et al.*, 1996)。大腸菌において、MotB の運動能を失う変異の効果は FliG の変異が抑圧することが報告されている (Van Way *et al.*, 2004)。また、サルモネラ菌では、FliG_M と FliG_C を接続するヘリックスである helix_{MC} を欠失させると回転方向のバイアスに影響し、CW 方向の回転のみが見られるようになる (Togashi *et al.*, 1997; Minamino *et al.*, 2011)。一方、様々な菌種における FliG の構造は、異なる断片や変異タンパク質の形で、X 線結晶構造学を用いて決定された。全長の結晶構造は、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* の FliG において解明されている (Lee *et al.*, 2010; Baker *et al.*, 2016)。好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来の FliG と FliM 断片の複合体の結晶構造を解明することで、それらの相互作用が明らかになった (Paul *et al.*, 2011; Vartanian *et al.*, 2012)。さらに、構造学的解析によって、helix_{MC} のパッキングが FliG_M と FliG_C の配向に影響することが証明された。その配向への影響が、回転子のリング構造におけるコンフォメーションの変化を引き起こし、回転方向の転換を誘起するモデルが提案されている (Lee *et al.*, 2010; Minamino *et al.*, 2011; Pandini *et al.*, 2016) (図 3)。NMR を用いた構造解析

も行われており、*T. maritima* の FliM と FliG との滴定実験等により、回転方向転換の際に FliM と共に FliG が構造変化していることが示唆されている (Dyer *et al.*, 2009; Levenson *et al.*, 2012)。

以上のように、現在までに膨大な変異体解析と構造学的解析が、FliG について既に行われているが、FliG の変異がべん毛モーターのトルク産生や回転方向の転換にどのように影響するのかについての分子メカニズムは依然として大部分が不明である。海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* (以降 *Va* と表記) の極べん毛モーターの回転子構成因子 FliG の様々な変異体が、等研究室において既に単離されており (図 4)、運動能やべん毛形成に影響することもわかっている (Kojima *et al.*, 2011; Onoue *et al.*, 2015; Nishikino *et al.*, 2016)。その中の幾つかの変異体は、*Va* FliG_C の 1 アミノ酸置換変異体であり、べん毛回転に致命的な欠陥を生じる変異体である。本研究では、以上のような先行研究を踏まえ、*Va* FliG_C の野生型及び変異体の断片を精製し、それらの構造及び機能特性を解析した。実際、*Va* FliG_C の複数の断片に対し、NMR を用いた解析と分子動力学シミュレーション (MD) の手法を組み合わせ、野生型及び運動能に欠損が見られる変異体との間の構造学的特性の違いを原子分解能のレベルで検証した。その結果、*Va* FliG_C のコンフォメーションの変化が、トルク産生やべん毛モーターの双方向の切り替えに寄与することが示唆された。

【結果】

Va FliG_C の構造学的特性

好熱菌の一種である *Thermotoga maritima* では、FliG の Middle ドメインと C 末端ドメインの断片の結晶構造が既に解明されている (PDB: 1lkv)。この結晶構造を基にして、予め海洋性細菌 *Vibrio alginolyticus* の同じく FliG の C 末端ドメインのホモロジーモデリングを行った。該当のドメインは、N 末端側の C1 ドメイン (アミノ酸残基番号: G214-L252、アルマジロリピートモチーフ ARM_C で構成される。また、C1 ドメインの ARM_C は 3 つのヘリックスから構成されており、FliM との相互作用に関与することがわかっている。) と C 末端側の C2 ドメイン (アミノ酸残基番号: M253-L351、M253-F256 の MFXF モチーフと F256-D337 の 6 つの密に充填されたヘリックス C α 1-6 を含む) から構成される (図 6) (Brown *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2007; Grunenfelder *et al.*, 2003; Passmore *et al.*, 2008; Paul *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2010; Minamino *et al.*, 2011)。さらに、サルモネラ菌では上記の C2 ドメインに該当するドメインの α 1、 α 2、 α 3 に特定の変異が導入された場合、運動能が欠失することが明らかになっている (Irikura *et al.*, 1993)。

Va FliG_C の構造学的情報を明らかにするために、表 4 にあるようなプラスミドを作製した。その際は、部位特異的変異導入と Inverse PCR 法を用いた。DNA シーケンシングによって、それらの DNA 配列を確認した後、大腸菌発現株 BL21 (DE3) 株を宿主とした菌株をヒートショック法を用いて作製した。その菌株の発現を確認するため、IPTG による発現誘導を行う前の whole cell サンプルと誘導後の whole cell サンプルの調製を行った。それらのサンプルを SDS-PAGE によって電気泳動での分離を行い、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色法を用いて発現を確認した。その確認後、目的の His タグ付き FliG 断片 (His-Va FliG_C) を大量発現した (図 5)。その菌体を用いて、batch 法を用いた粗精製を行い、溶出後サンプルを得た。そのサンプルを濃縮し、サイズ排除クロマトグラフィーを実行した (図 7 A, B, E)。分子量が予想される単量体の値よりは大きめに検出された。その得られた精製産物を溶液 NMR の手法を用いて構造学的解析を行った。また、大量発現の際は ¹³C, ¹⁵N ラベルされた炭素源及び窒素源を用いた。

まず His-Va FliG_C について、溶液 NMR を用いた手法の一つである、¹H-¹⁵N

HSQC の測定を行い、His-*Va* FliG_C のアミドシグナルを検出した (図 8 A)。その結果、十分に識別できる程度の分離能のアミドシグナルを得られたが、N 末端側の G214-V260 由来のアミドシグナルに関しては、比較的線幅が広く、シグナルを帰属できるまでは至らなかった。それらのことから、His-*Va* FliG_C の N 末端領域では幾つかのコンフォメーションを取るように考えられる。

Va FliG_C の構造学的特性とべん毛モーターにおける機能特性との間の相関を明らかにするために、幾つかの運動能に影響を生じさせるような FliG の点変異体を先行研究より探索した。運動能が完全に失われる 3 つの変異体 (L259Q、L270R、L271P) とべん毛モーターの本来の回転方向のバイアスとは真逆のバイアスを示す変異体 (A282T: 時計回り CW 方向の回転にバイアスがかかる) に着目した (Kojima *et al.*, 2011; Nishikino *et al.*, 2016)。これらの変異体は、サルモネラ菌の先行研究において示された結果から、その変異箇所に対応する *V. alginolyticus* の FliG の残基に変異導入して作製された (Irikura *et al.*, 1993)。これらの残基は FliG_C の C α 1-6 に位置している残基であり、幾つかの菌種で高度に保存されている。本研究での *Va* FliG_C のモデル構造と照らし合わせた際は、これらの 4 つの残基は C α 1-6 ドメインの疎水性コアを形成していることが観察された。

変異が導入された断片を順次 ¹⁵N ラベルされた窒素源を用いて、大量発現、精製を行い、得られた精製産物の ¹H-¹⁵N HSQC のシグナルを検出した。His-*Va* FliG_C (L270R) 及び His-*Va* FliG_C (L271P) では、His-*Va* FliG_C と比べ、線幅が広いシグナルが極少数検出されるのみであった (図 8 B, C)。さらに、これらの精製断片を温度 288K の条件下で、該当の NMR を用いた測定を 2-3 時間行った際、一部が凝集沈殿することがわかった。次に、His-*Va* FliG_C (L259Q) では、¹H-¹⁵N HSQC のシグナルが高感度で検出された (図 8 D)。だが、野生型と比較すると、検出されるシグナルの数は少なくなった。また、温度 288K の測定で、数時間以内で分解されることが観察された。一方、His-*Va* FliG_C (A282T) は 2-3 日の間では比較的安定であり、¹H-¹⁵N HSQC のシグナルの検出の際も、分離能の高いアミドシグナルが得られた (図 8 E)。以上の結果から、A282T を除いて、該当の変異を導入することによって、そのドメインにおける疎水性相互作用が失われる、もしくは弱まることで、タンパク質の安定性が低下し、その結果、運動能が欠失するという表現型が見られるに至ったと示唆された。

野生型の *Va* FliG_C と上記の 3 つの変異タンパク質 (L259Q、L270R、L271P)

は、示差走査熱量測定 (DSC) の手法を用いて、熱安定性が既に検証されている。さらに、トリプシン感受性の試験も同時に行われており、野生型よりもそれら 3 つの変異タンパク質の方が、トリプシン感受性がより強いことが明らかにされている (Gohara *et al.*, 2014)。これと類似して、変異による FliG_C のプロテアーゼ感受性の変化を観察した実験が大腸菌でも行われている (Lloyd and Blair, 1997)。その結果から、プロテアーゼ感受性と運動能が欠失する Mot の表現型との間の相関が議論されている。L271P の変異タンパク質では、野生型と比べ、変性のエンタルピー変化 (ΔH) の差が最も大きく、野生型の 1/5 であった。

His-*Va* FliG_C (L259Q) の ¹H-¹⁵N HSQC のシグナルにおいて、ほとんどのアミドシグナルが、¹H 軸において 8.0-8.5 ppm の範囲内で観察された。また、これらのシグナル強度はその範囲外に観察されたシグナルと比べると比較的強いことがわかった (図 8 D)。この範囲内にシグナルが観察されるということは、該当のタンパク質の構造を保持していない領域の典型的なパターンであると推察される。従って、His-*Va* FliG_C (L259Q) の一部の領域の構造は、アンフォールドな状態である可能性が考えられる。他方、His-*Va* FliG_C (L270R) 及び His-*Va* FliG_C (L271P) では、¹H-¹⁵N HSQC のシグナルにおいて、観察されるアミドシグナルの数が、アミノ酸の一次配列から期待されるシグナル数よりも非常に少なかった (図 8 B, C)。その上、野生型のシグナルよりも非常に線幅が広いことも観察された。また、上述の通り、これら二つの変異タンパク質は凝集沈殿しやすいことも観察されている。アミノ酸残基で、L270 と L271 は $\alpha 2$ ヘリックスに、L259 は $\alpha 1$ ヘリックスに各々属している。これらの疎水性残基は幾つかの菌種においては高度に保存されている。FliG_C の構造から、これら 2 つのヘリックスは別のヘリックスと相互作用していることが示唆されている。従って、これらのロイシン残基は疎水性コアの構造の形成と FliG_C の適切な構造の保持に極めて重要な役割を担っているだろうと思われる。

Va FliG_C とその CW バイアスを示す変異体における C α 1-6 の構造ダイナミクス

Va FliG_C と Va FliG_C (A282T) において、C α 1-6 の構造学的特性及び動的な構造特性をさらに明らかにするために、FliG_C の N 末端側を欠失させた断片を発現するためのコンストラクトをそれぞれ作製し (図 5)、大腸菌の発現株 BL21 (DE3)

株に形質転換した。それらを用いて、上述と同様、 ^{13}C , ^{15}N ラベルされた炭素源及び窒素源を用いた発現精製によって、新たな野生型及び A282T 変異を持つ FliG_C 断片 (His-*Va* FliG_{C2}、His-*Va* FliG_{C2} (A282T) : 図 6 A) をそれぞれ得た。結果、His-*Va* FliG_{C2} の発現レベルは、His-*Va* FliG_C と比較すると、顕著に多かった。また、batch 法を用いた粗精製を行った際、可溶性タンパク質として容易に精製できた (図 9)。溶出画分に大量の目的産物が得られていることがわかったので、サイズ排除クロマトグラフィーを行い、精製産物を得た (図 7 C, D, E)。その精製産物はサイズ排除クロマトグラフィーの結果から概算される推定分子量がほぼ配列から概算される分子量とほとんど一致したため、溶液状態では単量体で存在することが示唆された。さらに、その精製産物は冷蔵庫保存で、2 週間以内での凝集沈殿及び分解は生じなかった。このタンパク質を用いて、全ての Backbone signal (^1HN , ^{15}NH , $^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$, ^{13}CO) が従来の triple-resonance NMR 実験によって明瞭に帰属できた (図 10 A, 11; 表 1)。次に、ケミカルシフトの結果を基に、TALOS-N の手法を用いて二次構造の解析を行った (Shen and Bax, 2015)。その結果、His-*Va* FliG_{C2} において、6 つのヘリックス ($\alpha 1$: F256-V260、 $\alpha 2$: D264-R272、 $\alpha 3$: Q276-L283、 $\alpha 4$: D288-K296、 $\alpha 5$: K300-E311、 $\alpha 6$: V318-D337) が同定された (表 1)。His-*Va* FliG_C では、N 末端領域 (G214-V260) のアミドシグナルを観測及び帰属することができなかったが、His-*Va* FliG_{C2} の N 末端領域 (M253-V260) では、鮮明に観測されたため、帰属できた。

His-*Va* FliG_{C2} (A282T) に対しても His-*Va* FliG_{C2} と同様の NMR を用いた解析を行った (図 10 A, 11 ; 表 2)。幾つかのアミドシグナルは His-*Va* FliG_{C2} に対し、ケミカルシフトに大きな変化が見られた。しかし、backbone のシグナルは十分明確に検出されたため、帰属可能であった。ただし、His-*Va* FliG_{C2} の $\alpha 1$ における MFXF モチーフに相当する M253-V260 の領域だけは、 ^1H - ^{15}N HSQC のシグナルの幾つかは線幅が広がったため、検出感が低く、His-*Va* FliG_{C2} (A282T) において帰属できなかった。

次に、His-*Va* FliG_{C2} と His-*Va* FliG_{C2} (A282T) の ^1H - ^{15}N HSQC のシグナルのスペクトルを比較した。その結果、0.1 ppm を超えた大きなケミカルシフトの摂動と、シグナルの線幅が広がったことが観察された。それらの結果を *Va* FliG_C のモデル構造上にマッピングした。それらのシグナルの変化は、該当変異 A282T を導入した領域の付近 ($\alpha 3$ - $\alpha 4$) だけでなく、MFXF モチーフ、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ の変異箇所よりも比較的アミノ酸配列で離れた領域にも観察された。これは、

His-*Va* FliG_{C2}において、一次配列上離れた位置にあるアミノ酸残基間で分子内相互作用が存在し、A282Tの変異によってその分子内相互作用が変化していると考えられる。さらに、His-*Va* FliG_{C2}とHis-*Va* FliG_{C2} (A282T)の両方において、アミド¹⁵Nの緩和時間¹⁵N T₂の値を計測した。その結果、His-*Va* FliG_{C2}の $\alpha 3$ - $\alpha 4$ の領域の¹⁵N T₂の値が、His-*Va* FliG_{C2} (A282T)よりも大きい値を示した(図10 B, 18)。このことから、遅めのコンフォメーション変化(msから μ sのスケール)がHis-*Va* FliG_{C2} (A282T)の $\alpha 3$ - $\alpha 4$ の領域で起こると示唆された。

野生型とCW方向のバイアスを示す変異の導入されたタンパク質の間でのコンフォメーションの差異を原子レベルで理解するために、*Va* FliG_C及び*Va* FliG_C (A282T)に対する分子動力学シミュレーション(以降MDと表記)を行った(図13)。トラジェクトリ解析の結果から、*Va* FliG_CのARM_Cドメイン(野生型: 3.1 ± 0.8 Å, A282T: 4.1 ± 1.0 Å)において、C α 1-6のドメインと比べて(野生型: 1.8 ± 0.4 Å, A282T: 1.5 ± 0.3 Å)、より大きなRMSDが示された。それらのことから推測されることは、ARM_Cドメインは本来フレキシブルであり、NMRを用いた解析で観察されたように、複数のコンフォメーションを取る可能性である。そこで、*Va* FliG_Cと*Va* FliG_C (A282T)の間におけるC α 1-6ドメインの構造上の差異に着目した。*Va* FliG_Cでは、鑄型構造由来のトラジェクトリのRMSDの値が、1.3 Åと2.0 Åの2つのピークを持つ二峰性分布に示した。その一方、*Va* FliG_C (A282T)では、1.4 Åの1つのピークだけが観測された。また、*Va* FliG_C (A282T)におけるネイティブな二次構造の保持率は野生型の保持率に匹敵し、 $\alpha 1$ と $\alpha 3$ ヘリックスにおいては野生型よりもむしろやや高かった(図19)。

Va FliG_CのC α 1-6ドメインの主鎖構造に対するMDのトラジェクトリのクラスタ解析によって、少なくとも3つのコンフォメーション(S1, S2, S3)が存在することが指摘された(図14 A, B)。それと対照的に、*Va* FliG_C (A282T)では、ただ1つのコンフォメーションのみが支配的であるとわかった(図14 C, D)。これらの結果から示されることは、*Va* FliG_C (A282T)の構造は、サブマイクロ秒のタイムスケールでは*Va* FliG_Cで取り得る3つのコンフォメーションの内、1つのコンフォメーションのみに制約されることである。次に、取り得るコンフォメーションの3D構造を鑄型構造と比較した。*Va* FliG_CのC α 1-6ドメインの各々のコンフォメーションにおける主鎖の α 炭素原子のRMSDは、1.3 Å(野生型 S1)、1.9 Å(野生型 S2)、1.9 Å(野生型 S3)である。それらの取り得

るコンフォメーションの全体的な構造は、 $\alpha 6$ に見られるように、鋳型構造に近いままである。だが、ヘリックス $\alpha 5$ と $\alpha 6$ の間に存在するループ領域において、大きな構造上の揺らぎが観察された。*Va* FliG_C (A282T)の取り得るコンフォメーションも鋳型構造と比較を行った。その結果、その主鎖 RMSD の値は 1.3 Å となり、野生型と同程度の値であった。また、野生型の S2 のコンフォメーションは、他のどのコンフォメーションと比べて最も異なっていた。中でも $\alpha 1$ と $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ の領域での差異が構造上の大部分の違いに相当した。加えて、*Va* FliG_C (A282T)の C α 1-6 ドメインにおけるコンフォメーションの主鎖 RMSD は、野生型に対し、1.8 Å (WT S1)、2.5 Å (WT S2)、1.7 Å (WT S3)である。よって、*Va* FliG_C (A282T)の全体的なコンフォメーションは、比較的 S3 のコンフォメーションに近い。また、そのループ領域の構造上の揺らぎは、野生型のコンフォメーションと同程度だった。それに対し、 $\alpha 1$ を除いたその他の領域は、野生型と比べ、より小さな揺らぎを示した。

残基番号 282 番のアミノ酸残基は、タンパク質構造の内側に埋もれており、C α 1-6 ドメインの疎水性コアの一部を形成している。*Va* FliG_C (A282T)のシミュレーションにおいては、T282の側鎖のヒドロキシル基と V278の主鎖のカルボニル基との間に水素結合が新たに形成され、保持されていた(図 15 C)。その T282 と $\alpha 4$ の主鎖との間の疎水性環境下での水素結合の形成は、*Va* FliG_C (A282T)の C α 1-6 ドメインにおける熱力学的安定性の獲得に寄与していると考えられる。さらに、 $\alpha 1$ の F256 (MFXF モチーフ 2 つ目の F)は C α 1-6 ドメインの疎水性コアを形成する残基の 1 つで、A282の C β 原子と接している。よって、*Va* FliG_C (A282T)の構造において、A282を T に置換することで、メチル基が γ 位に導入され、この位置にある C β 原子と F256の側鎖の原子との間に立体障害を引き起こす。これによって、 $\alpha 1$ と $\alpha 3$ または $\alpha 4$ との間の距離が大きくなると推測された。

このことを定量的に評価するため、*Va* FliG_Cと*Va* FliG_C (A282T)の各々で、MDのトラジェクトリにおいて、ヘリックス $\alpha 1$ と $\alpha 4$ 間の角度(θ)と距離(d)を計測した(図 15 A, B)。その結果、*Va* FliG_Cは、 $\theta=20$, $d=-9.5$ Åと $\theta=40$, $d=-10.4$ Åの2つのピークが示された。一方、*Va* FliG_C (A282T)は、 $\theta=35$, $d=-11.1$ Åのピークのみが示された。このように、*Va* FliG_Cのヘリックス $\alpha 1$ と $\alpha 4$ の配向が、*Va* FliG_Cのコンフォメーション変化と強く関連していることが示唆された。また、*Va* FliG_C (A282T)が1つのコンフォメーションに制約される理由は、T282

と F256 の間の立体障害により、ヘリックス $\alpha 1$ と $\alpha 4$ 間の配向が制約されることであろうと考えられた。それに加え、T282 の側鎖のヒドロキシル基と V278 の主鎖のカルボニル基との間に新たに形成される水素結合によって、Va FliG_C (A282T) の C α 1-6 ドメインにおける熱力学的な安定性が向上すると示唆される。よって、NMR を用いた解析結果から得られた、 $\alpha 3$ - $\alpha 4$ において観測された遅めのコンフォメーション変化(図 19)と、 $\alpha 1$ ヘリックス付近の ¹H-¹⁵N HSQC シグナルの線幅の広幅化 (図 12) という現象を、上記の MD シミュレーションの結果から得られた示唆により解釈できると考えられる。

FliG_C の回転方向の切り替えにおける役割

CW 方向のバイアスを示す A282T の変異タンパク質を対象に ¹H-¹⁵N HSQC シグナルを検出した際、そのアミドシグナルは十分に分散しており、シグナル強度も画一的である (図 8 E, 11 B)。その A282T の変異タンパク質は、NMR を用いた測定の後凝集沈殿することもなく、分解も見られなかった。従って、A282T の変異は、他の変異とは違い、タンパク質のフォールディングを抑制するとは思われなかった。また、His-Va FliG_{C2} と His-Va FliG_{C2} (A282T) の ¹H-¹⁵N HSQC シグナルを比較すると、C α 1-6 ドメインにおいて構造的な再配向が起こることが示された。その再配向は、MFXF モチーフや $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ から $\alpha 4$ にかけての領域、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ において生じる (図 12)。さらに、ミリ秒からマイクロ秒のタイムスケールでの構造の変動が、A282T の方の $\alpha 3$ から $\alpha 4$ にかけての領域において目立って観察された (図 18)。この A282T の変異によって引き起こされるヘリックス $\alpha 3$ と $\alpha 4$ における動的な構造変化は、MD シミュレーションで観測されたように、新たな水素結合の形成が原因であるように思われる (図 15)。さらに、MD トラジェクトリのクラスタ解析によって、Va FliG_C においては少なくとも 3 つのコンフォメーションが見られた一方、Va FliG_C (A282T) においては 1 つのコンフォメーションのみが見られた (図 14)。A282T の変異が導入されると、T282 と F256 の間で立体障害が起こるという示唆も得られている (図 15)。

FliG_C ドメインの結晶構造解析から、MFXF モチーフが接続する ARM_C と C α 1-6 ドメインとの間で、数種のコンフォメーションが存在することが推測されている (Brown *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010; Minamino *et al.*, 2011)。一方、FliG_{MC} の構造解析によって、FliG_C の配向が MFXF モチーフの回転により変化すること

が示されている (Lee *et al.*, 2010; Lam *et al.*, 2012)。多様な生物種の様々な菌株における FliG_C の 6 つの結晶構造を比較すると、ARM_C と C α 1-6 の再配向のパターンによって、その結晶構造が 2 つのグループに分類できると示唆された。1 つは CW 方向の回転しか見られなくなる変異体の構造を含むグループ、もう 1 つは *A. aeolicus* の FliG の推定上の CCW 型のコンフォメーションを含むグループである (図 20)。この 2 つのグループの間における構造の差異を明らかにする為に、ヒンジ上の残基 F254 (残基番号は *V. alginolyticus* における番号) における二面角と、C α 1-6 ドメインに対するヘリックス α 0 の配向 (ARM_C における終端のヘリックス) を指標にして比較した (Lam *et al.*, 2012)。*Va* FliG_C と *Va* FliG_C (A282T) の MD のトラジェクトリの構造に対し、2 つの指標の値 (F254 の ϕ と、 α 0 と α 6 ヘリックスの間の角) をプロットした。*Va* FliG_C に対するこれらの指標の値は、主に 2 つの領域に群が生じた。その群は、結晶構造の比較の際に見られた 2 つのグループと一致した。その一方、*Va* FliG_C (A282T) では、その指標の値は単一群となり、その群は CW 方向の回転しか見られなくなった変異体の属するグループと一致した (図 16)。この結果は、A282T の CW 方向にバイアスが見られる表現型と、コンフォメーションの制約という示唆と一致する。

【考察】

べん毛モーターの回転子構成因子 FliG は、トルク産生において最も重要な役割を持つとされている。トルク産生には FliG の 3 つのドメインの内、C 末端ドメインが関与するとされる。この C 末端ドメインの断片は、精製することが可能であり、安定性も報告されている (Gohara *et al.*, 2014; Onoue *et al.*, 2016)。その断片に対し NMR を用いて溶液状態における立体構造情報を解析した。その結果、タンパク質主鎖のアミド由来の NMR シグナルが高い分離能で観測され、各シグナルをアミノ酸配列特異的に帰属することに成功した。一方、運動能が消失する複数の点変異をそれぞれ導入した変異断片では、立体構造が完全に壊れ、検出されるアミドシグナルの数が激減する、もしくは構造を保持しないランダムコイルとして検出されることがわかった。この構造の破壊が原因で運動能の消失に結びつくと示唆された。これに対し、運動能の消失は見られないが、回転方向のバイアスが著しく変化する変異 A282T を導入した変異断片では、構造が比較的保持されており、分離能も高く、野生型と同様に C 末端側残基の大部分のシグナルの帰属に成功した。A282T の変異断片は、野生型と同様に、6 つのヘリックス C α 1-6 ドメインを保持していたことがわかった。

FliG の C 末端ドメインに対し、MD シミュレーションを用いた構造解析もさらに行った結果、野生型では 3 つの取り得るコンフォメーションが観察された。これに対し、A282T の変異体では、ただ 1 つの取り得るコンフォメーションしか観察されなかった。よって、点変異 A282T を導入したことによるアミノ酸置換によって構造変化が誘起された結果、C α 1-6 ドメインにおける取り得るコンフォメーションが制限されるだろうと思われる。このような取り得る構造の制限は野生型では生じない。また、先行研究において、 α 1 ヘリックスの N 末端側に位置する MFXF モチーフは、Middle ドメインと C 末端ドメインの間に位置しており、回転方向転換に重要だとされるヘリックス再配向の要であるとされている。そのため、この MFXF モチーフはヒンジのような働きをするとされている。以上のような α 1 ヘリックス付近のヘリックス再配向は、野生型においては観察された。この再配向が、Va FliG_C の N 末端領域の構造変化と共役すると考えられる。これらの構造変化がべん毛モーターの回転方向の切り替えに重要な役割を果たしている可能性が高いと推測された。

His-Va FliG_C の ¹H-¹⁵N HSQC シグナルから、Va FliG_C の α 1 ヘリックスより N

末端側の ARM_C ドメインから MFXF モチーフ、 $\alpha 1$ ヘリックスにかけての領域 (G214-V260) のアミドシグナルの線幅が広がったため、完全にはシグナルの帰属ができなかった。さらに、MD シミュレーションからもこの領域の構造の柔軟性の示唆が得られた。その一方で、上述したように、MFXF モチーフから $\alpha 1$ までの領域の ^1H - ^{15}N HSQC のアミドシグナルは、ARM_C ドメインを欠失した His-*Va* FliG_{C2} においても鮮明に観測された。これらの NMR を用いた解析と MD シミュレーションを用いた解析の結果から示唆されたことは、先行研究で示唆されていたように、His-*Va* FliG_C の MFXF モチーフから $\alpha 1$ ヘリックスまでの領域が、*Va* FliG_C の ARM_C と C α 1-6 ドメインとの間で、それらがお互いに連動することを支えるヒンジのような働きを担うということである。このような相乗的な相互作用が、溶液中において、*Va* FliG_C が数種の一時的な構造を取り得ることに寄与しているのではないかと考えられる。このことは、円二色性スペクトル (以降 CD スペクトルと表記) の手法によって算出された α ヘリックス含有量の結果からも支持されている。His-*Va* FliG_C の α ヘリックス含有量は二次構造予測から算出される値よりも小さい。それに反して、同じく CD スペクトルによって算出された His-*Va* FliG_{C2} の α ヘリックス含有量は二次構造予測から算出される値とほとんど同じだった。他の菌種における測定からもこのような傾向は示されている。また、FliG_C に 2 つの異なるコンフォメーションを取るという知見は、*Helicobacter pylori* の FliG の結晶構造においても示唆されている (Lam *et al.*, 2012)。 *T. maritima* FliG_C に対する ^1H - ^{15}N HSQC シグナルにおいても、ARM_C から MFXF モチーフ、 $\alpha 1$ ヘリックスにかけての領域 (残基番号 G196-L242) のアミドシグナルの線幅が広くなり、その結果、完全にはシグナルの帰属ができなかったという報告がされている (Dyer *et al.*, 2009)。

本研究の MD シミュレーションの結果から、野生型 *Va* FliG_C では主に 3 つのコンフォメーションが見られたのに対し、*Va* FliG_C (A282T) では主に 1 つのコンフォメーションしか見られなかったことがわかった。このことの原因として考えられることは、A282 の残基を T へ置換することにより、新たにメチル基が導入され、結果として、MFXF モチーフから $\alpha 1$ までの領域と変異が導入された T282 を含む $\alpha 3$ ヘリックスとの間の疎水性相互作用が部分的に破壊されることである。そして、ARM_C と C α 1-6 との間の相乗的で広範な相互作用により、1 つのコンフォメーションのみを A282T では取る得るように制限されるだろうと考えられる。その結果、時計回りと反時計回り (以降 CW, CCW と表記) という

双方向に回転し得るべん毛モーターの機能が、A282T では完全に失われるのだらうと推測された。

FliG の CW と CCW の正確なコンフォメーションは、リング状構造を形成する他の構成因子も含めたべん毛モーターの C リング複合体において決定されるべきである。しかし、今回はモノマーでの解析であるが、MD シミュレーションにより FliG_C の C α 1-6 ドメインのコンフォメーションが 1 つのみ見られたことと、CW 方向にバイアスが見られる表現型との相関から、Va FliG_C (A282T) における MD シミュレーションで見られた主要な 1 つのコンフォメーションが、CW 方向での回転の際のコンフォメーションであると推測した。さらに、本研究のシミュレーションから、A282T の変異は、MFXF モチーフから α 1 までの領域上の F256 と α 3 上の T282 との間の相互作用に対する反発効果を引き起こし、その結果、ヘリックス α 1 から α 3 の配向が、Va FliG_C では見られないような一方向だけの配向という制約を誘起すると考えられる。本研究での結論としては、ARM_C と C α 1-6 ドメイン間の MFXF モチーフのヒンジと α 0 ヘリックスの可動域を制限されることにより、CW 型のコンフォメーションに構造が固定されることである。また、NMR を用いた計測は、このシミュレーションからのこの推察を強くサポートした。さらなる研究が本研究における仮説をより詳細に裏打ちするには必要ではあるが、我々の知る限り、本研究が原子レベルで FliG 上の特定の点変異が回転方向の転換に影響を与える分子メカニズムを明らかにした初の報告である。

【材料及び方法】

使用した大腸菌株とその培地、生育条件、プライマー

本研究で使用した大腸菌の菌株及びプラスミド、プライマーはそれぞれ表 3、4、5 に示した。大腸菌は、ラベルタンパク質の大量培養の場合を除き、LB 培地 [1% (w/v) Bactotryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) NaCl] を用いて、37 °C の温度条件で震盪培養して生育させた。形質転換の際や大量培養を行う際に、固形培地プレートで培養する際は、上記の LB 培地に 1.25% (w/v) の寒天を添加したプレートを用いて、37 °C の温度条件で静置培養して生育させた。培養時に抗生物質が必要な際は、ampicillin を終濃度 100 μ g/mL となるように添加した。

大腸菌を用いたラベルタンパク質の大量培養条件

ラベルタンパク質の大量培養を行う際の培地は、M9 培地 [7.0 g/L Na₂HPO₄ (無水物), 3.0 g/L KH₂PO₄ (無水物), 0.50 g/L NaCl, 1.0 g/L [U-¹³C] - glucose, 0.5 g/L ¹⁵NH₄Cl, 20 mg/L adenine, 20 mg/L thymine, 20 mg/L guanosine, 20 mg/L cytidine, 20 mg/L thiamin hydrochloride, 20 mg/L (+)-Biotin, 33 μ M FeCl₃, 1.0 mM MgSO₄, 50 μ M MnCl₂, 0.10 mM CaCl₂] を用いて培養した。また、培養の際は、ampicillin を終濃度 100 μ g/mL となるように添加した。大量培養は以下の通りに行った。まず、200 mL の M9 培地にプレート上に得られた大腸菌を接種し、37 °C の温度条件で震盪培養して一晩生育させた。その培養液全量を M9 培地を 2 L になるように接種し、37 °C の温度条件で震盪培養して生育させた。その後、OD₆₆₀ で計測される細胞密度が約 0.4 程度に達すると、IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) を終濃度 0.5 mM になるように添加し、16 °C の温度条件で約 18 時間震盪培養した。培養細胞を遠心し、上清を捨て、集菌を行った。その菌体を -80 °C で冷凍保存した。

大腸菌を用いた大量培養条件

大量培養を行う際の培地は上述の LB 培地を用いた。大量培養はラベルタンパク質の大量培養条件と同様に行った。

大腸菌を用いた目的タンパク質の精製条件

菌体破碎の前に、冷凍保存した菌体を常温で溶かし、プロテアーゼ阻害剤である cOmplete, EDTA-free (Roche Life Science) を添加したバッファーA [50 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 150 mM NaCl, 5 mM imidazole] に懸濁した。その後、氷上で菌体を Power 8, duty cycle 50 %の条件で超音波破碎した。破碎されなかった菌体や不純物を除去するため、低速遠心し、上清を得た。得られた上清を 100,000 g, 30 分の条件で超遠心した。得られた上清を Ni-NTA Agarose (Qiagen) と混和した後、4 °Cの温度条件で 1 時間震盪した。その後、ポリプロピレンカラムにロードするような batch 法を用いて粗精製を行った。カラムにロードした後、バッファーB [50 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 150 mM NaCl, 20 mM imidazole] で Wash した。次に、バッファーC [50 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 150 mM NaCl, 500 mM imidazole] で溶出を行い、4つのフラクションを得た。この方法によって、ラベルタンパク質であるかに関わらず、粗精製産物を得た。

得られた粗精製産物を Amicon device (Millipore) を用いて、500 μ l にまで濃縮した。濃縮産物を以下の条件により、サイズ排除クロマトグラフィーを介することで最終精製産物を得た。カラムとしては Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare) を用いた。バッファーはバッファーD [50 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 150 mM NaCl] を用いた。流速は 0.75 mL/min の条件に従った。得られたピークフラクションを回収し、上記の方法を用いて濃縮した。その際にバッファーE [50 mM Tris-HCl (pH 8.0) , プロテアーゼ阻害剤 cOmplete, EDTA-free] を用いてバッファー交換を行った。得られた最終精製産物の濃度は、Direct Detect spectrophotometer (Millipore) を用いて算出した。

大腸菌大量発現株の作製

プラスミド pCold I -FliG_C は先行研究で作製されていたものを用いた。また、pCold I -FliG_C (L259Q) 、pCold I -FliG_C (L270R) 、pCold I -FliG_C (L271P) をそれぞれ保持する大腸菌大量発現株 BL21 (DE3) を宿主とした発現株も先行研究で作製されていた株を用いた。その他の菌株作製に関して、プラスミド抽出はプラスミド抽出用キット (Qiagen) を用いた。ゲル抽出に関してはゲル抽出用キット (Qiagen) を用いた。形質転換に関しては、全て DH5 α コンピテントセルを用いた。

pCold I -FliG_C (A282T) は、QuikChange 法 (Stratagene) を用いて作製した。

鋳型として、先行研究で用いられた pCold I -FliG_C を用いた。

pCold I -FliG_{C2} 及び pCold I -FliG_{C2} (A282T) は Inverse PCR 法を用いて作製した。まず、上述の pCold I -FliG_C 及び pCold I -FliG_C (A282T) を鋳型とし、*Va* FliG の M253 から C 末端方向の Forward プライマーと、先行研究で用いられた pCold I の N 末端からの Reverse プライマーを用いた Inverse PCR を行い、欠失断片を増幅した。その断片を 1% (w/v) のアガロースゲルを用いたアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドを用いて染色し、該当の断片をゲル抽出キットにより抽出した。得られた抽出産物を T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (NEB) を用いて、5'-ヒドロキシル末端のリン酸化処理を行った。それに続いて、T4 DNA ライゲース (NEB) を用いて DNA ライゲーションを行った。さらに、65 °C の温度条件での加熱を行い、ライゲーション反応を停止させた。形成されたそのプラスミドを用いて、大腸菌 DH5 α 株にヒートショック法を用いて形質転換を行った。得られたプレート上のコロニーから、一晚震盪培養後、プラスミドを抽出した。その抽出産物を DNA シーケンシングによって、DNA 配列を確認した。その確認後、抽出したプラスミドを用いて上記と同様、ヒートショック法に従って、大腸菌 BL21 (DE3) 株に形質転換した。

大腸菌 Whole cell サンプルの調製

各々の菌株のプレート上に得られたコロニーを接種し、LB 培地を用いて震盪培養した後、二次培養を行い、IPTG を終濃度 0.5 mM の条件で添加し、16°C の温度条件で約 18 時間震盪培養した。その培養後の細胞を OD₆₆₀=5、サンプル量 50 μ l 相当を遠心することで集菌した。集菌後のペレットを水で懸濁し、sodium dodecyl sulfate (SDS) loading buffer と β -メルカプトエタノールを添加、攪拌した。そのサンプルを 95°C の温度条件で 5 分加熱した。得られたサンプルを Whole cell サンプルとした。大量培養後のタンパク質発現の確認のための Whole cell サンプルも、上記と同様の調製を行った。

核磁気共鳴 (NMR) 分光法

¹³C, ¹⁵N 等でラベルした His-*Va* FliG_C の野生型及びその変異タンパク質の精製タンパク質を 0.9 mM の濃度に濃縮した。その濃縮の際に、溶液をバッファー E [50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 150 mM NaCl, cOmplete EDTA-free, 0.01% (w/v) sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS) (Cambridge Isotope Laboratories,

Inc), 5% (w/v) D₂O] に置換した。そのサンプルを、AV-III 600 分光器 (Bruker Biospin) 及び TCI triple resonance cryogenic probe を用いて、288 K の温度条件で NMR の計測を行った。

His-*Va* FliG_{C2} と His-*Va* FliG_{C2} (A282T) の backbone resonance を帰属するための NMR 測定として、3D の HNCACB、CBCACONH、HNCA、HNCOCA、HNCO、HNCACO と 2D の ¹H-¹⁵N HSQC の測定をそれぞれ行った。His-*Va* FliG_{C2} と His-*Va* FliG_{C2} (A282T) の主鎖の ¹⁵N T₂ のシグナルの計測は上述の通りに行い、シグナルの記録は、標準的な Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) パルスシーケンスを用いて、9 回の遅延時間、すなわち、t = 0, 17, 34, 51, 68, 85, 102, 119, 136 ms の条件で行った。各々の得られたスペクトルを指数曲線へとシグナル強度を近似することで、T₂ 値を得た。全ての NMR 測定のスぺクトルは、TopSpin (Bruker Biospin)、NMRPipe、Sparky (Goddard and Kneller, University of California, San Francisco) を用いて、解析を行った。指数曲線への近似は、Sparky を用いた非線形最小二乗近似法を用いた。

タンパク質の二次構造解析

His-*Va* FliG_{C2} と His-*Va* FliG_{C2} (A282T) の主鎖の二面角 (ϕ, ψ) は、TALOS-N というプログラムを用いて、¹HN、¹⁵NH、¹³C α 、¹³C β 、¹³CO のケミカルシフトの値から算出した。

ホモロジーモデリング

Va FliG_C のモデル構造は、MODELLER version 9.16 を用いて構築した。すなわち、鋳型として *T. maritima* の FliG の結晶構造 (PDB: 1lkv) を用い、ALADeGAP により、2 つのアミノ酸配列に対する配列アライメントを行い、最終的なモデルを構築した。*Va* FliG_C の変異体 (L259Q、L271P、A282T) のモデル構造は、*Va* FliG_C の野生型のモデル構造をベースに構築した。

分子動力学シミュレーション

分子動力学シミュレーションは、GROMACS version 4.6.2 を用いて行った。各残基のトポロジーは標準的なアミノ酸の pH 7.0 におけるプロトン化の条件で算出されたものを用いた。その際、AMBER99SB-ILDN の力場を用い、水のモデルは TIP3P を用いた。初期構造としては、溶質の周囲 1.2 nm の立方体に配置し、

その立方体に水分子が満ちている条件を用いた。さらに、 Na^+ が 150 mM の濃度で添加した。最後に、 Cl^- が全体の電荷が中性になるように添加した。結果、このシミュレーションにおいて、計 52,873 の原子が存在した。エネルギーの最小化には最急降下法を用いた。エネルギー最小化の後、時間条件が 100 ps、温度条件が 300 K、NVT（分子数、体積、温度が一定）と NPT（分子数、圧力、温度が一定）の 2 条件で系を平衡化した。平衡化に続いて、全ての原子において、時間条件が 500 ns（1 ステップは 2 fs）、温度条件が 300 K、NPT の条件で分子動力学シミュレーションを行った。各々の *Va* FliG_C のタンパク質について、シミュレーションを独立に 3 回ずつ行った。

【文献】

Asai Y, Kojima S, Kato H, Nishioka N, Kawagishi I, Homma M. (1997). Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium. *J Bacteriol.* **179**, 5104-5110.

Baker, M.A., Hynson, R.M., Ganuelas, L.A., Mohammadi, N.S., Liew, C.W., Rey, A.A., Duff, A.P., Whitten, A.E., Jeffries, C.M., Delalez, N.J., *et al.* (2016). Domain-swap polymerization drives the self-assembly of the bacterial flagellar motor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 197–203.

Barak R, Eisenbach M. (1992). Correlation between phosphorylation of the chemotaxis protein CheY and its activity at the flagellar motor. *Biochemistry.* **31**, 1821-1826.

Brown, P.N., Hill, C.P., and Blair, D.F. (2002). Crystal structure of the middle and C-terminal domains of the flagellar rotor protein FliG. *EMBO J.* **21**, 3225–3234.

Brown, P.N., Terrazas, M., Paul, K., and Blair, D.F. (2007). Mutational analysis of the flagellar protein FliG: sites of interaction with FliM and implications for organization of the switch complex. *J. Bacteriol.* **189**, 305–312.

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* **6**, 277–293.

Dyer, C.M., Vartanian, A.S., Zhou, H., and Dahlquist, F.W. (2009). A molecular mechanism of bacterial flagellar motor switching. *J. Mol. Biol.* **388**, 71–84.

Francis NR, Irikura VM, Yamaguchi S, DeRosier DJ, Macnab RM. (1992). Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 6304-6308.

- Gohara, M., Kobayashi, S., Abe-Yoshizumi, R., Nonoyama, N., Kojima, S., Asami, Y., and Homma, M. (2014). Biophysical characterization of the C-terminal region of FliG, an essential rotor component of the Na⁺-driven flagellar motor. *J. Biochem.* **155**, 83–89.
- Grunenfelder, B., Gehrig, S., and Jenal, U. (2003). Role of the cytoplasmic C terminus of the FliF motor protein in flagellar assembly and rotation. *J. Bacteriol.* **185**, 1624–1633.
- Hijikata, A., Yura, K., Noguti, T., and Go, M. (2011). Revisiting gap locations in amino acid sequence alignments and a proposal for a method to improve them by introducing solvent accessibility. *Proteins* **79**, 1868–1877.
- Irikura, V.M., Kihara, M., Yamaguchi, S., Sockett, H., and Macnab, R.M. (1993). *Salmonella typhimurium* fliG and fliN mutations causing defects in assembly, rotation, and switching of the flagellar motor. *J. Bacteriol.* **175**, 802–810.
- Khan S, Zhao R, Reese TS. (1998). Architectural features of the *Salmonella typhimurium* flagellar motor switch revealed by disrupted C-rings. *J Struct Biol.* **122**, 311-319.
- Kojima S, Blair DF. (2004). Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **43**, 26-34.
- Kojima, S., Nonoyama, N., Takekawa, N., Fukuoka, H., and Homma, M. (2011). Mutations targeting the C-terminal domain of FliG can disrupt motor assembly in the Na⁺-driven flagella of *Vibrio alginolyticus*. *J. Mol. Biol.* **414**, 62–74.
- Lam, K.H., Ip, W.S., Lam, Y.W., Chan, S.O., Ling, T.K., and Au, S.W. (2012). Multiple conformations of the FliG C-terminal domain provide insight into flagellar motor switching. *Structure* **20**, 315–325.
- Leake MC, Chandler JH, Wadhams GH, Bai F, Berry RM, Armitage JP. (2006).

Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature* **443**, 355-358.

Lee, L.K., Ginsburg, M.A., Crovace, C., Donohoe, M., and Stock, D. (2010). Structure of the torque ring of the flagellar motor and the molecular basis for rotational switching. *Nature* **466**, 996–1000.

Levenson R, Zhou H, Dahlquist FW. (2012). Structural insights into the interaction between the bacterial flagellar motor proteins FliF and FliG. *Biochemistry*. **51**, 5052-5060.

Li, N., Kojima, S., and Homma, M. (2011). Sodium-driven motor of the polar flagellum in marine bacteria *Vibrio*. *Genes Cells* **16**, 985–999.

Lloyd, S.A., and Blair, D.F. (1997). Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **266**, 733–744.

Lloyd, S.A., Tang, H., Wang, X., Billings, S., and Blair, D.F. (1996). Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FliG but not for FliM or FliN. *J. Bacteriol.* **178**, 223–231.

Macnab, R.M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 77–100.

Marti-Renom, M.A., Stuart, A.C., Fiser, A., Sanchez, R., Melo, F., and Sali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 291–325.

McEvoy MM, Bren A, Eisenbach M, Dahlquist FW. (1999). Identification of the binding interfaces on CheY for two of its targets, the phosphatase CheZ and the flagellar switch protein fliM. *J Mol Biol.* **289**, 1423-1433.

Minamino, T., Imada, K., Kinoshita, M., Nakamura, S., Morimoto, Y.V., and Namba, K. (2011). Structural insight into the rotational switching mechanism of the bacterial flagellar motor. *PLoS Biol.* **9**, e1000616.

Nishikino, T., Zhu, S., Takekawa, N., Kojima, S., Onoue, Y., and Homma, M. (2016). Serine suppresses the motor function of a periplasmic PomB mutation in the *Vibrio* flagella stator. *Genes Cells* **21**, 505–516.

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**, 25659-64.

Onoue, Y., Kojima, S., and Homma, M. (2015). Effect of FliG three amino acids deletion in *Vibrio* polar-flagellar rotation and formation. *J. Biochem.* **158**, 523–529.

Pandini, A., Morcos, F., and Khan, S. (2016). The gearbox of the bacterial flagellar motor switch. *Structure* **24**, 1209–1220.

Passmore, S.E., Meas, R., and Marykwas, D.L. (2008). Analysis of the FliM/FliG motor protein interaction by two-hybrid mutation suppression analysis. *Microbiology* **154**, 714–724.

Paul, K., Brunstetter, D., Titen, S., and Blair, D.F. (2011). A molecular mechanism of direction switching in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 17171–17176.

Paulick A, Koerdt A, Lassak J, Huntley S, Wilms I, Narberhaus F, Thormann KM. (2009). Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Mol Microbiol.* **71**, 836-850.

Pronk, S., Pall, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M.R., Smith, J.C., Kasson, P.M., van der Spoel, D., *et al.* (2013). GROMACS

4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* **29**, 845–854.

Reid SW, Leake MC, Chandler JH, Lo CJ, Armitage JP, Berry RM. (2006). The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli* is at least 11. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 8066-8071.

Sato K, Homma M. (2000). Multimeric structure of PomA, a component of the Na⁺-driven polar flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. *J Biol Chem.* **275**, 20223-20228.

Shen, Y., and Bax, A. (2015). Protein structural information derived from NMR chemical shift with the neural network program TALOS-N. *Methods Mol. Biol.* **1260**, 17–32.

Sourjik, V., and Armitage, J.P. (2010). Spatial organization in bacterial chemotaxis. *EMBO J.* **29**, 2724–2733.

Sudo Y, Kitade Y, Furutani Y, Kojima M, Kojima S, Homma M, Kandori H. (2009). Interaction between Na⁺ ion and carboxylates of the PomA-PomB stator unit studied by ATR-FTIR spectroscopy. *Biochemistry.* **48**, 11699-11705.

Suzuki H, Yonekura K, Namba K. (2004). Structure of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis. *J Mol Biol.* **337**, 105-113.

Takekawa, N., Kojima, S., and Homma, M. (2014). Contribution of many charged residues at the stator-rotor interface of the Na⁺-driven flagellar motor to torque generation in *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* **196**, 1377–1385.

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⁺-driven flagella and required for stator formation. *Mol Microbiol.* **62**, 1170-1180.

- Terashima, H., Kojima, S., and Homma, M. (2008). Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **270**, 39–85.
- Terashima H, Koike M, Kojima S, Homma M. (2010). The flagellar basal body-associated protein FlgT is essential for a novel ring structure in the sodium-driven *Vibrio* motor. *J Bacteriol.* **192**, 5609-5615.
- Terashima H, Kojima S, Homma M. (2010). Functional transfer of an essential aspartate for the ion-binding site in the stator proteins of the bacterial flagellar motor. *J Mol Biol.* **397**, 689-696.
- Thomas DR, Morgan DG, DeRosier DJ. (1999). Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 10134-10139.
- Togashi, F., Yamaguchi, S., Kihara, M., Aizawa, S.I., and Macnab, R.M. (1997). An extreme clockwise switch bias mutation in fliG of *Salmonella typhimurium* and its suppression by slow-motile mutations in motA and motB. *J. Bacteriol.* **179**, 2994–3003.
- Van Way, S.M., Millas, S.G., Lee, A.H., and Manson, M.D. (2004). Rusty, jammed, and well-oiled hinges: mutations affecting the interdomain region of FliG, a rotor element of the *Escherichia coli* flagellar motor. *J. Bacteriol.* **186**, 3173–3181.
- Vartanian, A.S., Paz, A., Fortgang, E.A., Abramson, J., and Dahlquist, F.W. (2012). Structure of flagellar motor proteins in complex allows for insights into motor structure and switching. *J. Biol. Chem.* **287**, 35779–35783.
- Welch M, Oosawa K, Aizawa S, Eisenbach M. (1993). Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 8787-8791.

Yakushi, T., Yang, J., Fukuoka, H., Homma, M., and Blair, D.F. (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.

Yorimitsu, T., Mimaki, A., Yakushi, T., and Homma, M. (2003). The conserved charged residues of the C-terminal region of FliG, a rotor component of the Na⁺-driven flagellar motor. *J. Mol. Biol.* **334**, 567–583.

Yorimitsu T, Kojima M, Yakushi T, Homma M. (2004). Multimeric structure of the PomA/PomB channel complex in the Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. *J Biochem.* **135**, 43-51.

Zhu S, Takao M, Li N, Sakuma M, Nishino Y, Homma M, Kojima S, Imada K. (2014). Conformational change in the periplasmic region of the flagellar stator coupled with the assembly around the rotor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**, 13523-13528.

Zhou J, Fazzio RT, Blair DF. (1995). Membrane topology of the MotA protein of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* **251**, 237-242.

Zhou J, Lloyd SA, Blair DF. (1998). Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 6436-6441.

Zhou J, Sharp LL, Tang HL, Lloyd SA, Billings S, Braun TF, Blair DF. (1998). Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *J Bacteriol.* **180**, 2729-2735.

【付記】

本論文の内容は下記の論文として既に発表済みである。

Miyanoiri Y*, Hijikata A*, Nishino Y*, Gohara M, Onoue Y, Kojima S, Kojima C, Shirai T, Kainosho M, Homma M. (2017). Structural and Functional Analysis of the C-Terminal Region of FliG, an Essential Motor Component of *Vibrio* Na⁺-Driven Flagella. *Structure*. **25**(10): 1540-1548.

* These authors contributed equally to this work as co-first authors.

【参考論文】

Nishino Y, Onoue Y, Kojima S, Homma M. (2015). Functional chimeras of flagellar stator proteins between *E. coli* MotB and *Vibrio* PomB at the periplasmic region in *Vibrio* or *E. coli*. *Microbiologyopen* **4**: 323-331.

Onoue Y, Abe-Yoshizumi R, Gohara M, Nishino Y, Kobayashi S, Asami Y, Homma M. (2016). Domain-based biophysical characterization of the structural and thermal stability of FliG, an essential rotor component of the Na⁺-driven flagellar motor. *Biophys Physicobiol.* **13**: 227-233.

【謝辞】

本研究を常に補助していただいた大阪大学蛋白質研究所の宮ノ入洋平准教授（名古屋大学大学院構造生物学センター、客員准教授を兼任）、長浜バイオ大学バイオサイエンス学科の土方敦司特任講師及び白井剛教授、そして本間道夫教授にこの場を借りて御礼申し上げます。宮ノ入先生には自分と長く研究をしていただいて、NMR を用いた解析をしていただきました。NMR の測定の現場で研究をご教授していただいたこと、CD スペクトルの測定をご一緒させていただいたこともございます。昇進もなさったということで、お忙しい中この博士論文の作成もご尽力くださって誠にありがとうございます。土方先生及び白井先生にはモデル構造の構築及び分子動力学シミュレーションを担当していただきました。論文執筆の際には該当の項を中心に多くのご尽力をいただきました。学外への不便なご連絡等で煩雑な中、ご助力いただきまして、誠にありがとうございます。そして、本間先生には普段は相当自分を信頼していただけただめか、自由に研究をさせていただいており、研究上で障害が発生した時には議論や補助等でご尽力いただきました。研究以外にも研究者にとって大切な金言を数多くいただき、博士課程の研究生活の励みになっております。学部 4 年生の初心者の頃から博士後期課程の学生まで誠にありがとうございます。

当研究室の小嶋誠司准教授には適切なアドバイスをいただいたり、実験操作のご指導をいただいたり、多くの面でご助力をいただきました。横浜国立大学大学院工学研究院の児嶋長次郎教授には、当研究室の郷原瑞樹さんと共に NMR を用いた研究の補助をしていただきました。研究当時、当研究室にお勤めでした尾上靖宏博士には実験の補助や多くのご意見をいただきました。名古屋大学大学院構造生物学センターの甲斐荘正恒客員教授には NMR を用いた解析においてお世話になりました。分子第四講座に在籍する皆さまには、研究上での日々のサポートを様々な形でご助力いただきました。これらの方々に、研究に多大なご尽力をいただき、この場を借りて御礼申し上げます。

図及び表

表 1. His-*Va* FliG_{C2} の backbone の ¹H、¹³C、¹⁵N のケミカルシフト及び予測される二面角

	¹³ C ^o	¹³ C ^α	Chemical shift [ppm] *1	¹⁵ N ^H	¹⁵ N ^N	Phi	dihedral angle [°] *2	Psi	secondary structure *3
M255	175.1	54.95	32.13	119.9	119.9	8.473	-	-	L
F254	175.0	58.54	39.89	123.3	8.054	-72.16		140.8	L
V255	176.4	59.95	34.45	119.3	8.051	-107.5		159.0	L
F256	176.1	63.17	39.65	123.7	9.140	-57.32		-42.01	H
E257	178.0	59.59	28.40	113.7	9.168	-66.21		-32.88	H
N258	176.5	54.89	38.76	115.9	7.850	-70.97		-33.33	H
L259	177.4	57.82	41.29	120.8	8.012	-65.07		-37.95	H
V260	175.6	64.42	31.78	111.1	6.892	-70.78		-17.10	H
E261	177.0	56.10	30.07	117.9	7.602	-90.85		-6.492	L
V262	174.7	62.58	31.84	122.0	7.256	-74.39		147.5	L
D263	176.3	54.42	41.53	124.8	8.473	-66.57		153.4	L
D264	177.8	58.73	40.75	122.2	8.623	-57.85		-39.97	H
Q265	178.9	59.56	27.96	117.4	8.555	-64.61		-38.99	H
G266	175.4	47.48	-	110.2	8.065	-64.85		-41.54	H
I267	177.9	62.21	34.82	121.7	8.102	-68.96		-34.59	H
Q268	179.0	60.23	27.71	118.0	8.389	-64.68		-41.23	H
K269	178.8	59.76	32.43	118.7	7.637	-65.98		-39.88	H
L270	178.4	58.43	42.47	121.9	8.256	-65.46		-44.39	H
L271	179.1	57.08	41.59	114.0	8.415	-68.64		-25.00	H
R272	177.5	58.92	30.39	116.9	7.311	-71.53		-28.53	H
D273	175.8	54.22	42.63	116.4	7.554	-96.25		-60.26	H
V274	173.8	59.97	33.40	120.4	7.323	-98.90		135.8	L
P275	177.9	62.90	32.78	not assigned	-	-62.47		147.8	L
Q276	177.1	60.14	28.87	124.5	9.094	-56.64		-40.29	H
D277	178.1	56.82	39.72	116.2	8.925	-63.10		-34.34	H
V278	177.4	65.67	32.21	121.3	6.909	-70.40		-42.90	H
L279	178.0	58.23	41.82	119.3	7.905	-63.27		-41.37	H
Q280	177.7	60.20	28.56	115.6	8.370	-61.77		-42.50	H
K281	177.3	60.62	33.38	115.8	7.407	-66.08		-41.95	H
A282	180.1	54.82	19.68	117.1	8.112	-65.18		-39.79	H
L283	180.0	55.94	42.13	113.3	8.315	-71.69		-23.15	H
K284	177.4	58.24	31.21	123.6	8.127	-69.49		-23.60	L
G285	173.0	44.96	-	102.5	7.179	-94.84		1.975	L
A286	176.2	50.62	22.13	123.4	7.401	-111.8		146.4	L
D287	176.3	53.41	42.12	120.3	8.835	-68.98		157.3	L
D288	178.1	58.20	40.94	119.8	8.675	-60.55		-37.56	H
S289	177.0	61.88	not assigned	115.2	8.459	-65.02		-39.80	H
L290	178.5	57.53	41.06	125.9	7.771	-67.92		-42.67	H
R291	176.9	60.72	29.93	116.8	8.016	-61.80		-42.60	H
E292	178.7	59.10	28.79	114.6	8.328	-64.44		-38.32	H
K293	177.3	58.19	32.50	120.3	7.384	-67.20		-40.96	H
V294	178.2	67.07	30.97	118.4	7.541	-65.48		-43.67	H
F295	179.0	58.46	37.77	117.9	8.827	-67.63		-22.82	H
K296	176.4	58.24	31.62	116.0	8.172	-73.47		-19.63	H
N297	172.6	54.47	41.25	117.8	7.590	-111.3		-15.03	L
M298	175.3	54.73	37.29	118.0	7.358	-128.0		148.8	L
S299	174.5	58.49	63.82	116.9	8.732	-69.28		156.8	L
K300	179.2	60.27	32.45	123.6	8.720	-57.90		-39.45	H
R301	178.4	58.40	29.69	117.2	8.601	-67.20		-37.91	H
A302	180.9	54.99	18.45	121.8	7.662	-65.44		-41.43	H
A303	179.2	55.34	18.92	122.1	8.826	-65.22		-40.32	H
E304	178.9	59.40	29.40	118.1	7.963	-64.01		-43.13	H
M305	177.9	58.79	33.12	116.9	7.817	-65.96		-42.13	H
M306	177.8	58.52	31.62	118.9	8.172	-64.36		-43.01	H
R307	179.2	60.34	29.77	119.8	8.361	-62.73		-43.01	H
D308	179.1	57.22	39.90	119.2	7.614	-66.41		-41.27	H
D309	179.9	57.55	40.00	122.5	8.668	-63.47		-40.71	H
I310	178.4	65.46	38.15	119.8	8.751	-64.61		-38.35	H
E311	177.6	58.63	29.27	120.1	7.853	-70.56		-19.04	H
A312	177.9	52.55	19.53	118.5	7.575	-88.15		-7.150	L
M313	173.7	55.17	33.33	120.8	7.409	-73.31		139.0	L
P314	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	-	-67.38		151.6	L
P315	176.3	63.83	31.92	not assigned	-	-62.14		141.9	L
V316	176.1	60.10	34.07	123.1	8.240	-104.7		137.3	L
R317	178.4	56.54	30.37	126.9	9.063	-71.57		137.1	L
V318	178.0	67.09	31.43	125.1	8.785	-55.43		-42.33	H
A319	180.7	55.02	18.46	119.7	8.704	-63.50		-36.02	H
D320	179.2	56.68	40.59	117.5	7.329	-70.57		-38.36	H
V321	178.3	66.96	31.94	124.5	7.796	-65.25		-43.39	H
E322	179.1	59.69	29.29	118.9	8.512	-64.06		-39.72	H
A323	180.4	55.24	18.14	120.3	7.878	-65.41		-40.27	H
A324	179.4	55.14	18.82	122.6	7.580	-67.03		-41.51	H
Q325	178.4	59.52	27.20	116.6	8.228	-65.21		-39.41	H
K326	179.5	60.07	32.36	118.4	8.400	-64.69		-40.79	H
E327	179.2	59.57	28.97	122.0	7.904	-65.42		-42.99	H
I328	177.8	66.16	37.30	119.1	7.819	-63.63		-42.46	H
L329	178.1	57.93	41.89	119.8	8.582	-64.90		-39.85	H
A330	181.3	55.40	17.75	121.9	8.172	-64.23		-39.78	H
I331	178.0	65.58	38.57	121.2	7.802	-65.77		-43.88	H
A332	179.2	55.20	17.55	121.9	8.573	-63.81		-38.35	H
R333	178.1	59.72	30.05	117.2	8.776	-64.22		-42.19	H
R334	180.1	59.77	29.59	120.1	7.686	-65.21		-41.98	H
M335	178.7	59.59	33.88	119.5	8.329	-64.66		-43.74	H
A336	182.2	54.89	17.80	124.7	8.851	-61.73		-40.56	H
D337	177.5	57.17	40.15	121.9	8.670	-66.12		-27.17	H
A338	177.7	52.15	19.29	119.2	7.470	-83.33		-5.619	L
G339	175.0	45.66	-	107.0	7.973	79.61		15.52	L
E340	175.0	56.64	31.25	117.2	8.221	-93.08		-10.26	L
L341	174.4	53.91	45.43	116.7	7.089	-134.3		138.9	E
M342	175.1	54.32	33.14	123.7	8.931	-101.9		123.5	E
L343	176.6	54.39	41.61	124.4	8.538	-79.23		136.2	E
S344	174.7	58.26	64.12	115.1	8.060	-79.73		152.5	L
G345	174.7	45.42	-	110.3	8.575	-174.0		163.2	L
G346	174.0	45.21	-	108.8	8.423	91.77		2.762	L
A347	177.6	52.66	19.35	123.7	8.336	-89.06		-8.814	L
D348	176.2	54.59	41.16	119.2	8.353	-72.33		-18.32	L
E349	175.9	56.77	30.39	120.6	8.212	-87.52		-8.306	L
F350	174.8	57.47	39.46	120.5	8.267	-84.13		138.9	L
L351	182.4	56.78	43.52	128.6	7.785	-		-	L

全てのケミカルシフトは、温度条件が 288 K、pH 7.0 の条件で観測され、DSS を基準とした値を示す。また、¹³C 及び ¹⁵N の結果は、単一にラベルされた炭素源及び窒素源を用いて標識された精製産物を測定した際の値である。

Backbone の二面角は、TALOS-N を用いたケミカルシフトの値から算出された各々の残基における ϕ または ψ の値である（材料と方法参照）。また、二次構造は、TALOS-N の結果から予測された結果である。H は α ヘリックスを、E は β ストランドを、L はコイルをそれぞれ示している。

表 2. His-*Va* FliG_{C2} (A282T) の backbone の ¹H、¹³C、¹⁵N のケミカルシフト及び予測される二面角

	¹³ CO	¹³ Cα	¹³ Cβ	¹⁵ NH	¹ HN	Phi	dihedral angle [°]*2	Psi	secondary structure*3
M253	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	-	-	-	-
F254	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	-	-	-	-
V255	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	-	-	-	-
F256	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	-	-	-	-
E257	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	-	-	-	-
N258	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	-	-	-	-
L259	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	-	-	-	-
V260	175.557	64.179	-	-	-	6.893	-	-	L
E261	177.101	56.089	30.131	117.932	7.593	-91.614	-0.783	-	L
V262	174.749	62.823	31.833	121.825	7.332	-68.889	143.369	-	L
D263	176.152	54.324	41.357	124.494	8.425	-69.403	150.139	-	L
D264	177.755	58.552	40.826	121.869	8.59	-58.451	-38.85	-	H
Q265	177.866	59.411	28.037	117.596	8.527	-64.987	-39.502	-	H
G266	175.471	47.476	-	110.083	8.125	-65.735	-42.18	-	H
I267	177.819	62.329	34.988	121.803	8.175	-68.764	-34.633	-	H
Q268	179.018	60.083	27.768	118.245	8.39	-64.317	-40.947	-	H
K269	178.733	59.755	32.249	118.687	7.608	-66.082	-40.017	-	H
L270	178.488	58.515	42.242	121.689	8.256	-65.939	-43.579	-	H
L271	178.932	57.123	41.468	114.187	8.474	-67.043	-23.39	-	H
R272	177.532	58.83	30.398	116.844	7.316	-72.282	-28.99	-	H
D273	176.082	54.457	42.645	116.624	7.516	-95.825	-6.608	-	L
V274	173.683	60.025	33.228	120.692	7.455	-99.466	132.524	-	L
P275	177.909	63.005	32.701	not assigned	-	-41.834	116.665	-	L
Q276	177.383	60.068	28.851	124.602	9.106	-57.123	-39.645	-	H
D277	178.005	56.916	39.781	116.687	8.952	-62.574	-34.114	-	H
V278	178.192	65.654	32.208	120.743	6.957	-70.502	-42.445	-	H
L279	179.422	58.111	41.897	120.054	7.858	-66.052	-40.894	-	H
Q280	177.693	60.447	28.379	117.862	8.731	-67.862	-42.672	-	H
K281	177.648	60.429	33.552	115.176	7.586	-65.88	-42.218	-	H
T282	176.288	65.453	68.566	108.579	7.533	-65.09	-37.731	-	H
L283	179.378	56.182	42.796	118.711	7.897	-74.64	-24.487	-	H
K284	177.191	58.702	31.543	122.178	7.923	-65.402	-25.803	-	L
G285	173.755	44.723	-	105.017	8.225	-95.907	3.068	-	L
A286	176.414	51.306	21.315	122.723	7.058	-86.16	152.387	-	L
D287	176.448	53.561	42.126	119.182	8.651	-67.671	155.918	-	L
D288	178.044	58.1	40.971	120.519	8.707	-59.295	-37.861	-	H
S289	176.963	61.881	not assigned	114.62	8.451	-64.539	-40.626	-	H
L290	178.184	57.799	40.969	124.812	7.667	-69.323	-42.614	-	H
R291	178.976	60.606	30.205	116.606	7.899	-61.683	-42.764	-	H
E292	178.802	59.089	28.882	114.602	8.412	-64.253	-38.431	-	H
K293	177.384	58.312	32.557	119.862	7.383	-67.08	-41.186	-	H
V294	178.229	66.987	31.115	118.121	7.617	-65.324	-43.455	-	H
T295	179.04	58.901	37.849	117.423	8.799	-67.491	-22.581	-	H
K296	176.482	58.196	31.552	115.976	8.114	-73.387	-19.259	-	H
N297	172.627	54.423	41.163	117.794	7.558	-110.915	-13.057	-	L
M298	175.281	54.762	37.236	117.82	7.367	-128.05	148.831	-	L
S299	174.456	58.436	63.878	116.977	8.738	-69.844	157.465	-	L
K300	179.291	60.236	32.405	123.487	8.742	-57.669	-39.682	-	H
R301	178.34	29.716	29.716	117.395	8.604	-66.637	-42.542	-	H
A302	180.947	54.974	18.438	121.739	7.699	-65.247	-41.144	-	H
A303	179.108	55.395	18.672	122.011	8.789	-64.553	-41.058	-	H
E304	178.981	59.494	29.418	118.176	7.989	-64.255	-42.764	-	H
M305	178.024	58.821	33.187	117.112	7.867	-65.8	-42.568	-	H
M306	178.008	58.539	31.645	118.993	8.191	-63.802	-43.526	-	H
R307	179.221	60.577	29.76	119.691	8.461	-62.655	-42.583	-	H
D308	179.124	57.338	39.88	119.45	7.591	-66.191	-41.04	-	H
D309	179.975	57.664	40.074	122.705	8.541	-64.58	-40.37	-	H
I310	178.344	64.987	37.978	119.157	8.783	-65.08	-36.025	-	H
E311	177.494	58.796	29.216	120.564	7.851	-70.033	-20.033	-	H
A312	178.01	52.661	19.51	117.939	7.378	-87.792	-7.159	-	L
M313	173.633	54.938	33.403	120.538	7.415	-72.243	137.304	-	L
P314	not assigned	not assigned	not assigned	not assigned	-	-66.148	150.852	-	L
P315	176.162	63.645	31.929	not assigned	-	-60.521	142.434	-	L
V316	176.407	60.385	33.421	122.504	8.281	-93.005	133.288	-	L
R317	178.463	56.513	30.475	121.319	8.123	-70.591	140.554	-	L
A318	178.035	67.192	31.49	124.769	8.755	-55.289	-42.38	-	H
A319	180.82	55.08	18.43	120.139	8.763	-63.193	-35.074	-	H
D320	179.203	60.638	31.557	117.154	7.258	-70.563	-38.333	-	H
V321	177.987	67.353	31.565	124.057	7.953	-64.912	-43.191	-	H
E322	179.211	59.675	29.263	119.331	8.446	-64.39	-40.303	-	H
A323	180.299	55.156	18.162	120.088	7.692	-65.672	-40.755	-	H
A324	179.053	55.197	19.044	123.06	7.69	-66.768	-41.006	-	H
Q325	178.812	59.22	28.041	117.243	8.512	-64.39	-41.314	-	H
K326	179.601	60.133	32.435	117.154	8.03	-64.635	-41.167	-	H
E327	179.384	59.596	29.2	198.388	7.809	-65.224	-42.279	-	H
I328	177.756	66.325	37.241	119.221	8.007	-63.091	-42.535	-	H
L329	178.374	57.924	41.562	120.028	8.678	-65.158	-38.457	-	H
A330	181.306	55.409	17.748	121.807	8.089	-64.878	-39.445	-	H
I331	177.905	65.522	38.629	120.852	7.74	-65.921	-43.689	-	H
A332	179.153	55.145	17.55	121.881	8.574	-64.223	-37.27	-	H
R333	178.152	59.654	30.031	116.958	8.725	-63.931	-41.914	-	H
R334	180.052	59.689	29.549	119.973	7.653	-65.46	-42.073	-	H
M335	178.72	59.535	33.856	119.393	8.302	-65.023	-43.367	-	H
A336	182.136	54.901	17.799	124.621	8.83	-61.839	-40.467	-	H
D337	177.453	57.119	40.213	121.78	8.663	-66.251	-26.491	-	H
A338	177.759	52.185	-	119.225	7.479	-83.331	-5.619	-	L
G339	175.01	45.669	-	107.048	7.973	78.502	15.866	-	L
E340	175.046	56.645	31.208	117.218	8.21	-93.843	-11.874	-	L
L341	174.437	53.908	45.409	116.945	7.096	-132.987	139.332	-	E
M342	175.007	54.395	33.072	123.872	8.947	-105.787	122.38	-	E
L343	176.701	54.359	41.84	124.19	8.516	-82.796	137.654	-	E
S344	174.826	58.3	64.122	115.526	8.139	-82.838	155.079	-	L
G345	174.68	45.448	-	110.441	8.584	-175.301	173.041	-	L
G346	174.037	45.224	-	108.85	8.421	93.581	1.596	-	L
A347	177.624	52.726	19.331	123.655	8.327	-72.836	-19.306	-	L
D348	176.231	54.822	41.113	119.088	8.351	-72.792	-17.367	-	L
E349	175.952	56.797	30.367	120.088	8.191	-88.581	-6.85	-	L
F350	174.767	57.509	39.402	120.36	8.238	-86.071	136.833	-	L
L351	182.389	56.807	43.443	128.484	7.741	-	-	-	L

全てのケミカルシフトは、温度条件が 288 K、pH 7.0 の条件で観測され、DSS を基準とした値を示す。また、¹³C 及び ¹⁵N の結果は、単一にラベルされた炭素源及び窒素源を用いて標識された精製産物を測定した際の値である。

Backbone の二面角は、TALOS-N を用いたケミカルシフトの値から算出された各々の残基における ϕ または ψ の値である (材料と方法参照)。また、二次構造は、TALOS-N の結果から予測された結果である。H は α ヘリックスを、E は β ストランドを、L はコイルをそれぞれ示している。

表 3 : 本研究で使用した菌株

Strain	Description	Source or Reference
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>recA1 hsdR17 endA1 supE44 thi-1</i> <i>relA1 gyrA96</i> Δ (<i>argF-lacZYA</i>) U169 ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i>	TaKaRa
BL21(DE3)*	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal</i> <i>dcm</i> (DE3) <i>recA1 endA1 gyrA96</i> <i>thi hsdR17 supE44</i>	MERCK

*Overexpression from T7 promoter

表 4 : 本研究で使用したプラスミド

Plasmid	Description	Source
pCold I	P_{cspA} Amp ^r	TaKaRa
pCold I -FliG _C	<i>Va</i> FliG(G214-L351) in pCold I	Gohara <i>et al.</i> , 2014
pCold I -FliG _{C2}	<i>Va</i> FliG(M253-L351) in pCold I	This study
pCold I -FliG _C (L259Q)	pCold I -FliG _C with L259Q	Gohara <i>et al.</i> , 2014
pCold I -FliG _C (L270R)	pCold I -FliG _C with L270R	Gohara <i>et al.</i> , 2014
pCold I -FliG _C (L271P)	pCold I -FliG _C with L271P	Gohara <i>et al.</i> , 2014
pCold I -FliG _C (A282T)	pCold I -FliG _C with A282T	This study
pCold I -FliG _{C2} (A282T)	pCold I -FliG _{C2} with A282T	This study

Amp^r, ampicillin resistance; P_{cspA} , cold shock expression promoter.

表 5 : 本研究で使用したプライマー

Primer	Sequence
Primer forward 1	5'-ACGTGTTGCAAAAAACACTTAAAGGTGCC-3'
Primer reverse 1	5'-GGCACCTTTAAGTGTTTTTTGCAACACGT-3'
Primer forward 2	5'-CATATGCCTACCTTCGATATGATG-3'
Primer reverse 2	5'-ATGTTTGTCTTCGAAAACCTTAGTCG-3'

Upper part, for QuikChange method; Lower part, for Inverse PCR method.

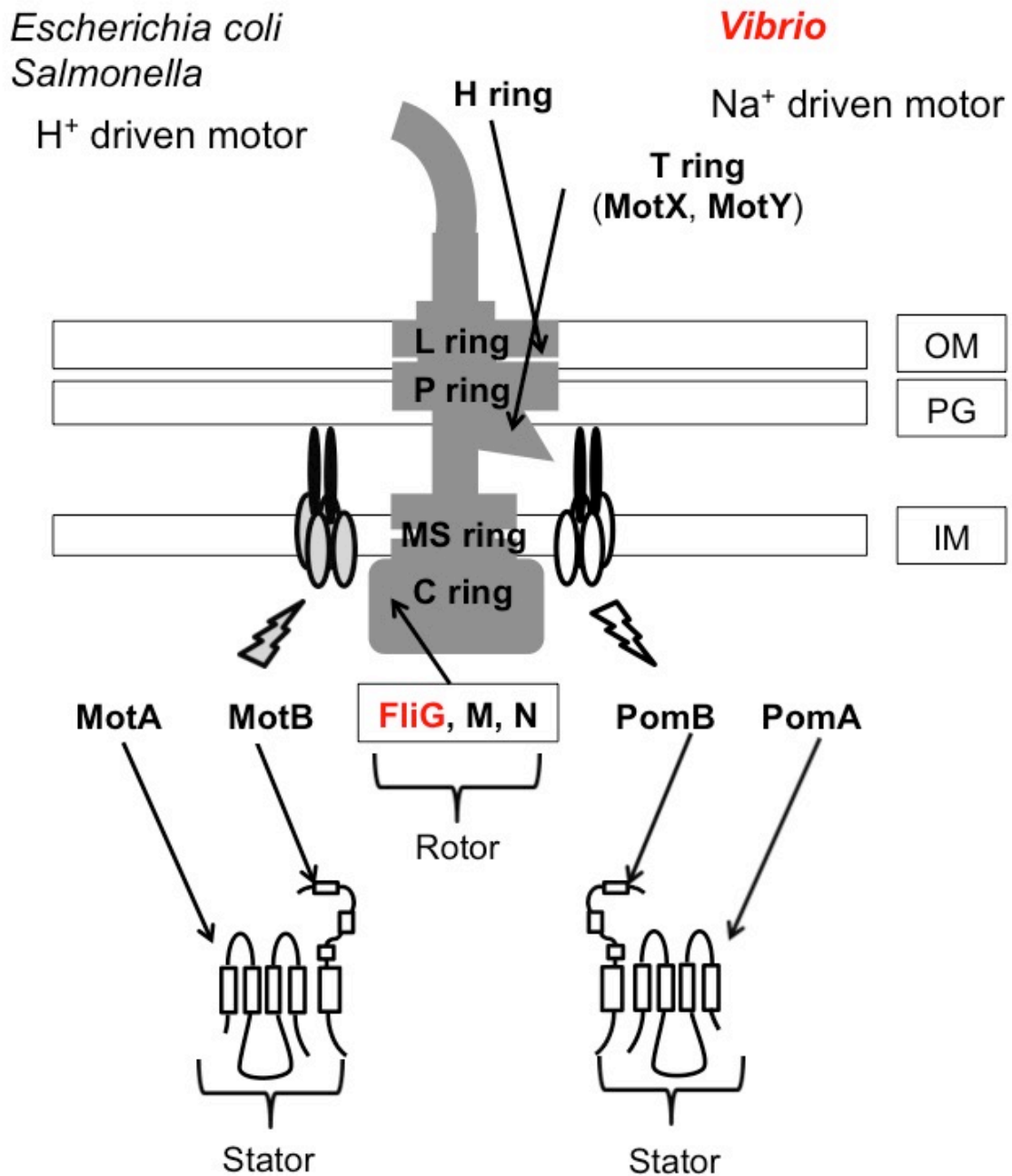


図 1. べん毛モーターの模式図

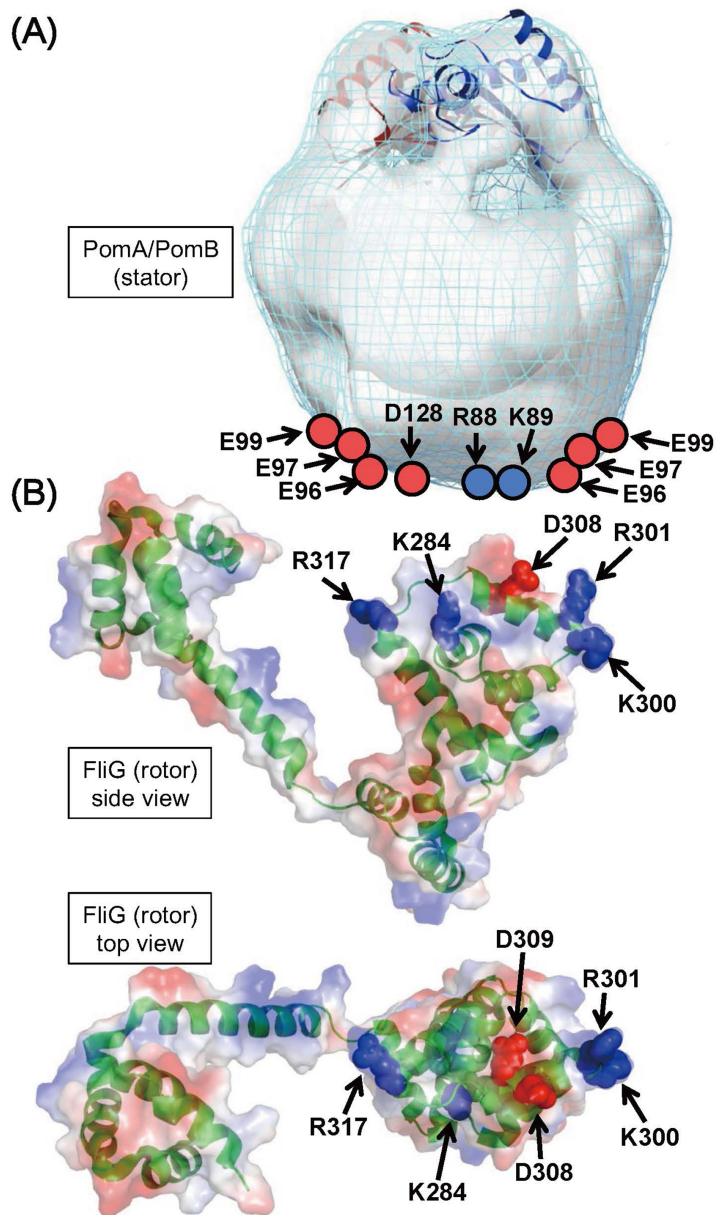


図 2. *Vibrio* 菌べん毛モーターのトルク産生に必要な静電的相互作用に関与する荷電残基

(A)電子顕微鏡で得られたビブリオ菌 PomAB 固定子複合体に PomA 細胞質の静電的相互作用に関与する荷電残基を赤丸と青丸で示した。(B) *Thermotoga maritima* の FliG の Middle ドメインと C 末端ドメインの断片の結晶構造上に、電氣的相互作用に関与するビブリオ菌回転子タンパク質の対応する荷電残基を赤色と青色で示した。

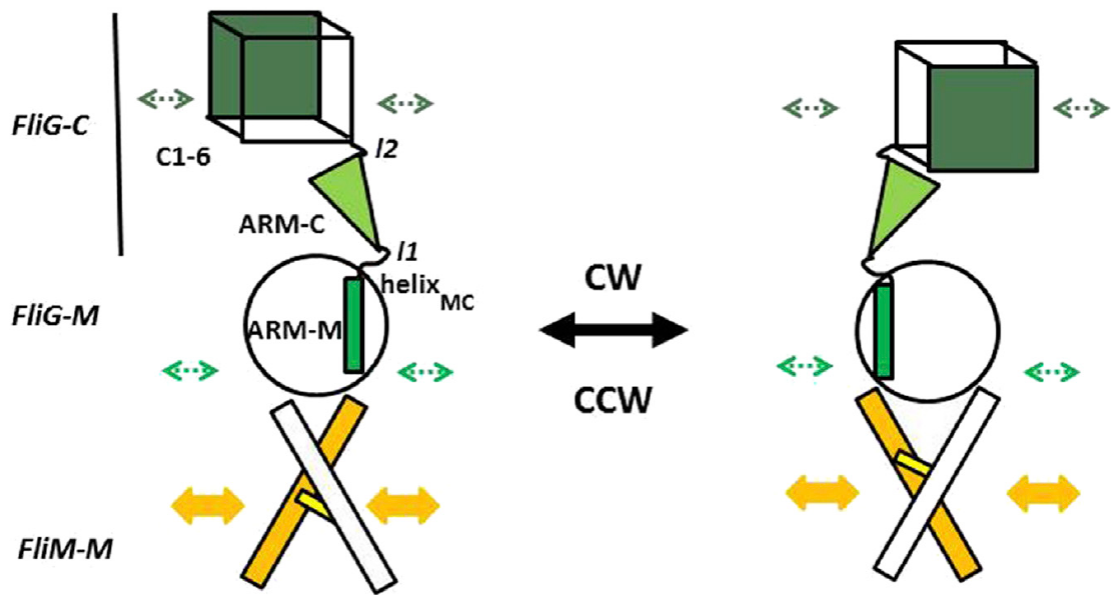
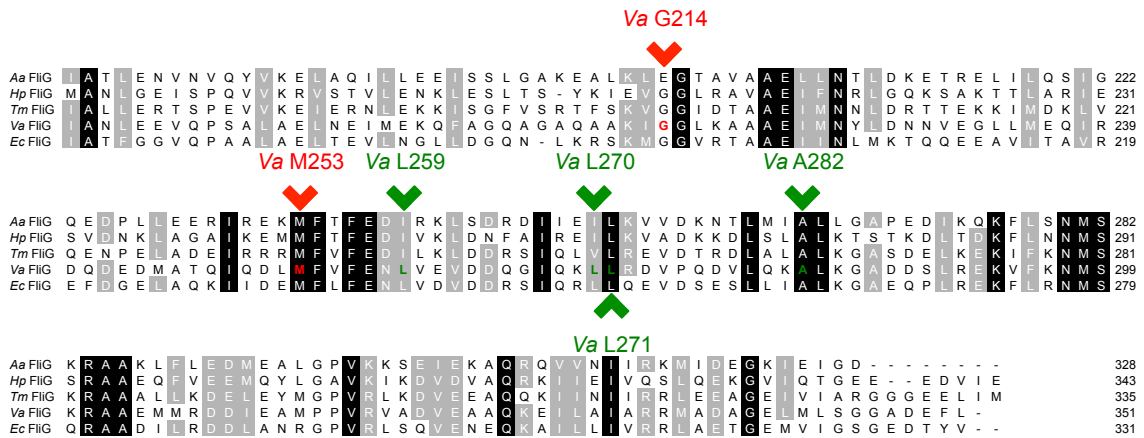


図 3. べん毛モータースイッチのモデル (Pandini *et al.*, 2016 より引用)。
 堅い FliM_M ドメインのねじれ (黄色) が伝達されて、FliG ARM-M の構造変換が起こり、さらに ARM-C の構造変換が誘起されて、最終的に FliG_C のコンフォメーション変化が起こり、固定子との相互作用部位が変化することで回転方向が変わる。

(A)



(B)

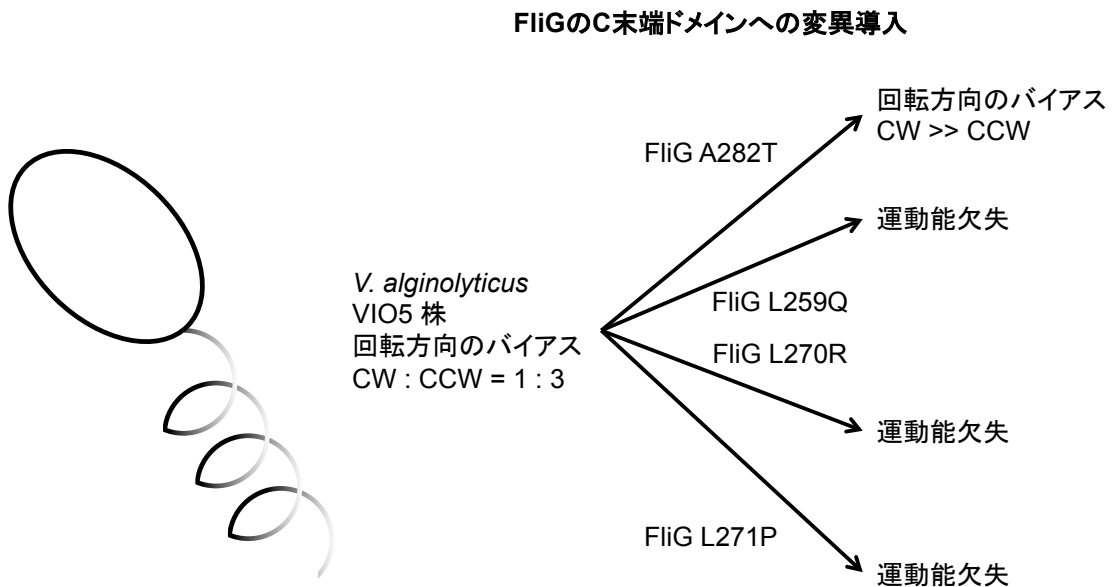
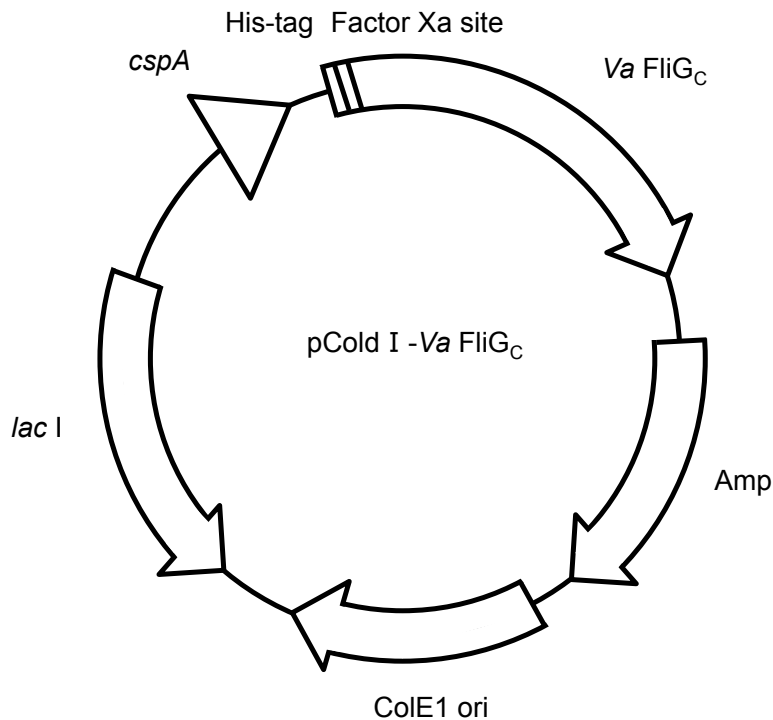


図 4. FliG の変異導入とその表現型

(A) 回転子構成因子 FliG の C 末端側の残基の菌種 (*Aa* : *Aquifex aeolicus*、*Hp* : *Helicobacter pylori*、*Tm* : *Thermotoga maritima*、*Va* : *Vibrio alginolyticus*、*Ec* : *Escherichia coli*) の配列アライメント。赤 (N 末端) と緑 (C 末端) の数字は *V. alginolyticus* の FliG における運動能に大きな影響を与える変異が報告されている残基の番号を示す。(B) *V. alginolyticus* VIO5 株では、べん毛の回転方向のバイアスは約 CW : CCW = 1 : 3 であることがわかっている。べん毛モーターの回転子構成因子 FliG では、C 末端ドメインにおいて、運動能に大きな影響を与える変異体が幾つか単離されている。それらの FliG 上の変異の箇所とその運動能への影響に関する表現型の記述をそれぞれ示した。

(A)



(B)

	アミノ酸残基数	推定分子量
<i>Va FliG</i>	351 aa	38.6 kDa
His- <i>Va FliG_C</i>	155 aa	17.6 kDa
His- <i>Va FliG_{C2}</i>	116 aa	13.2 kDa

図 5. 本研究の材料の模式図と表

(A) 発現用のベクターのマップ。pCold I : 宿主ベクター, *cspA* : cold shock promoter, His-tag : His タグ (×6), Factor Xa site : Factor Xa 認識部位, *Va FliG_C* : 目的タンパク質発現部位, Amp : Ampicillin resistant enzyme, ColE1 ori : 大腸菌由来複製起点, *lac I* : lactose operon repressor をそれぞれ示す。(B) 様々な *Va FliG* 関連タンパク質のアミノ酸残基数と配列から概算された推定分子量の表。His が付加されたタンパク質では、アミノ酸残基数及び推定分子量はベクター由来配列を含んだ値である。

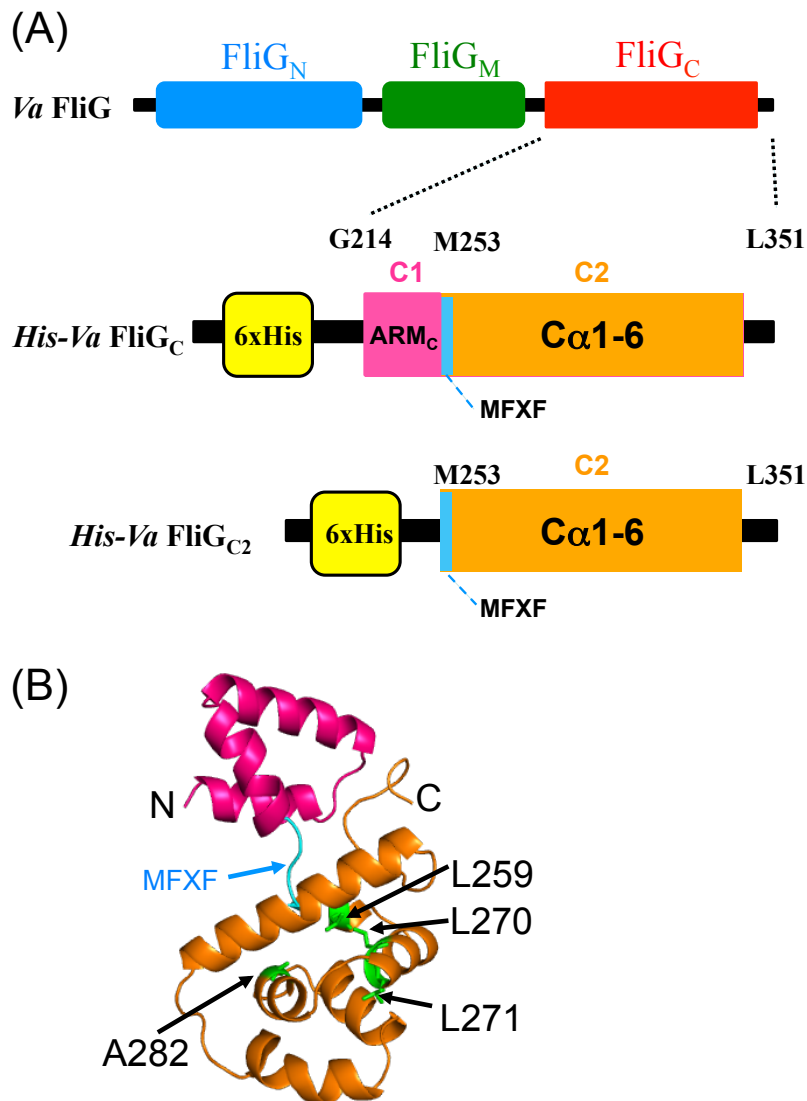
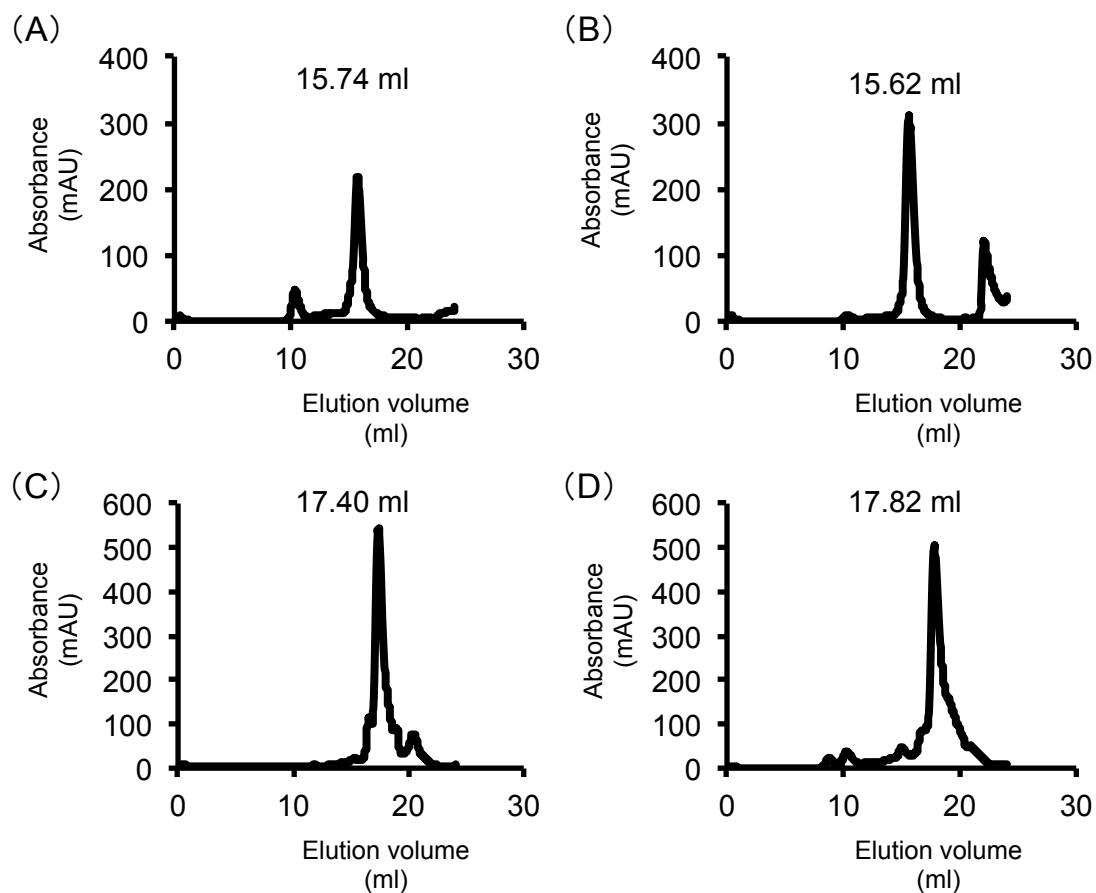


図 6. *Va FliG* の一次構造とホモロジーモデリングによるモデル構造

(A) 本研究で使用した海洋性ビブリオ菌、*Vibrio alginolyticus* の全長 *FliG* (*Va FliG*) と His-tag 付き *Va FliG_C* タンパク質の各種一次構造。*Va FliG* の 3 つのドメインを、N 末端ドメイン (*FliG_N*、青)、middle ドメイン (*FliG_M*、緑)、C 末端ドメイン (*FliG_C*、赤) でそれぞれ着色して示した。*FliG_C* は、2 つの球状のヘリックスドメイン、C1 ドメイン (G214-L252、桃) 及び C2 ドメイン (M253-L351、シアンとオレンジでそれぞれ着色した) から構成される。C1 ドメインはアルマジロリピートモチーフ *ARM_C* から構成される。また、C2 ドメインは、MFXF モチーフ (M253-F256、シアン) と 6 つの密に充填されたヘリックス、*C α 1-6* (F256-D337、オレンジ) を含んでいる。His-tag 付きタンパク質において、His-tag は 6×His 及び黄色で着色して表した。(B) *Va FliG_C* のホモロジーモデリングによるモデル構造。それぞれのモチーフまたはドメインに関して、*ARM_C* モチーフはピンク、MFXF モチーフはシアン、*C α 1-6* ドメインはオレンジで示した。*Va FliG_C* のモーター機能に関連すると報告されている残基 (L259、L270、L271、A282) の側鎖を緑で示した。



(E)

	推定分子量 (kDa)	分子量 (kDa)
His-FliG _C G214 WT	29	17.6
His-FliG _C G214 A282T	30	17.6
His-FliG _{C2} M253 WT	15	13.2
His-FliG _{C2} M253 A282T	13	13.2

図 7. *Va* FliG の精製産物のサイズ排除クロマトグラフィー

サイズ排除クロマトグラフィーのプロファイル ((A) - (D))。全て単分散性が見られた。(A) His-*Va* FliG_C (G214-L351) 野生型、(B) His-*Va* FliG_C (G214-L351) A282T、(C) His-FliG_{C2} (M253-L351) 野生型、(D) His-FliG_{C2} (M253-L351) A282T の結果をそれぞれ示す。(E) サイズ排除クロマトグラフィーの結果から算出された推定分子量とアミノ酸配列から算出された分子量の対比の表。

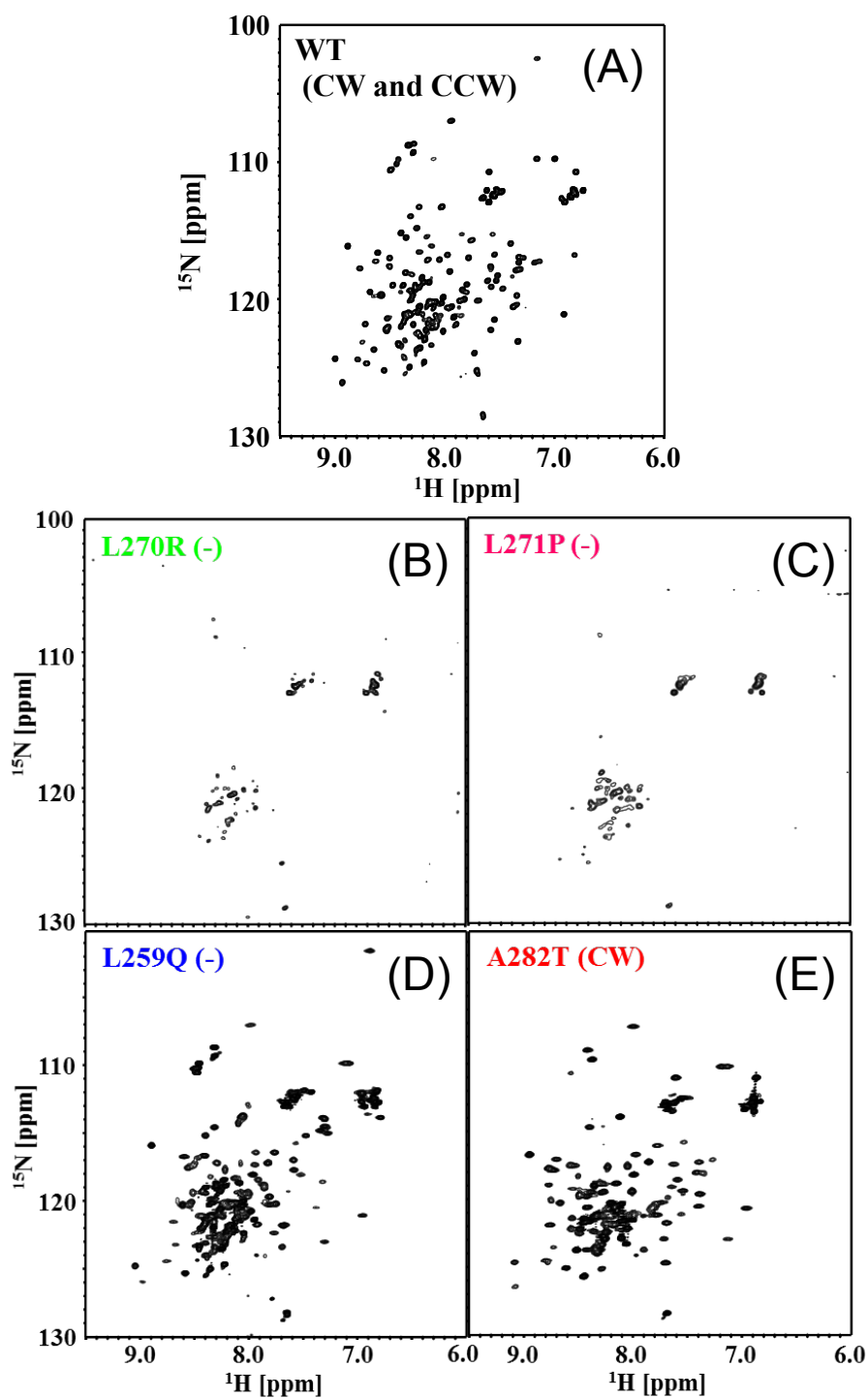
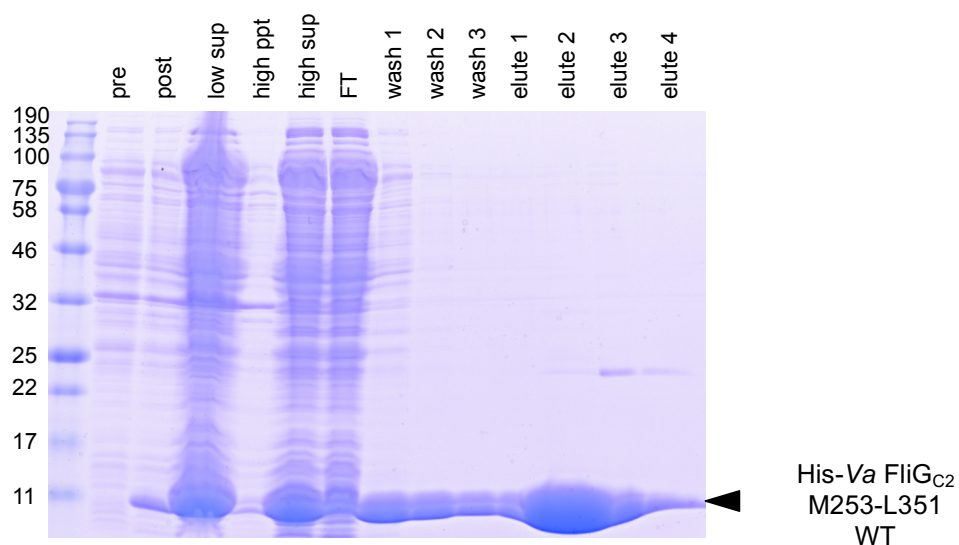


図 8. His-*Va* FliG_C 及びその運動能欠損変異を持つ変異タンパク質の NMR を用いた ^1H - ^{15}N HSQC のスペクトル

^{15}N ラベルされた His-*Va* FliG_C の野生型及び変異タンパク質における ^1H - ^{15}N HSQC のスペクトル。(A) 野生型のスペクトル。比較的明瞭なプロファイルであると思われた。(B) 運動能を欠損する変異、L270R のスペクトル。ほとんどシグナルは検出できなかった。(C) 運動能を欠損する変異、L271P のスペクトル

ル。(B)と同様に、ほとんどシグナルは検出できなかった。(D)運動能を欠損する変異、L259Qのスペクトル。運動能を欠損する変異である(B)(C)とは異なり、多くのシグナルを検出することができた。ただし、二次構造を完全には保持できていない様相が観察された。(E)回転方向のバイアスがCW方向に強く偏る変異、A282Tのスペクトル。上記の3つの変異タンパク質とは違い、野生型に近いスペクトルが見られた。それぞれの変異タンパク質を *V. alginolyticus* 中で発現させた際の運動能に関する表現型を以下のようにそれぞれ略記した。CW ; CW方向の回転が明瞭に観察できる、CCW ; CCW方向の回転が明瞭に観察できる、- ; 運動能が欠失する。

(A)



(B)

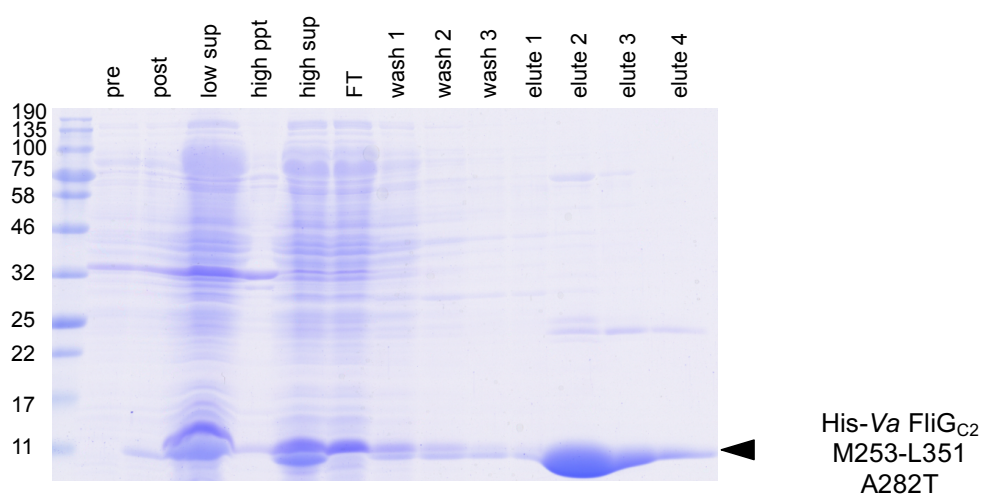
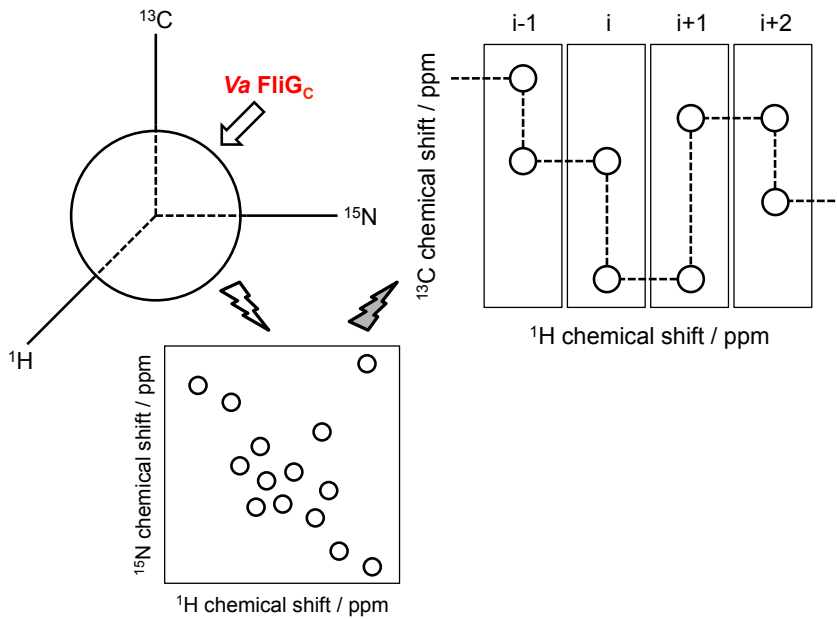


図 9. His-Va FliG_{C2} M253-L351 の粗精製産物の CBB 染色による確認

本研究で新たに作成されたコンストラクト (His-Va FliG_{C2} WT 及び A282T) の大量培養後の粗精製時の確認。CBB 染色により粗精製産物等を検出した。(A) が野生型の結果、(B) が A282T の結果をそれぞれ示す。各レーンのサンプル；左端：マーカー（分子量：kDa）、pre：誘導前 whole cell サンプル、post：誘導後 whole cell サンプル、low sup：超音波破碎及び低速遠心後サンプル、high ppt 及び sup：超遠心後沈殿及び上清サンプル、FT：batch 法の透過サンプル、wash 1-3：batch 法の洗浄後サンプル、elute 1-4：batch 法の溶出後サンプル。

(A)



(B)

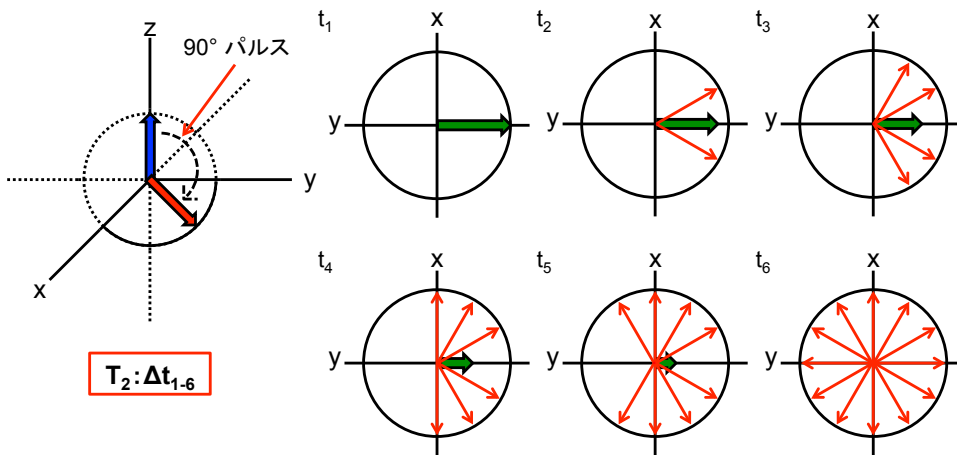


図 10. 三次元 NMR 法による連鎖帰属と横緩和時間の概略

(A) ^1H , ^{15}N , ^{13}C でラベルされたラベルタンパク質 (His-*Va* FliG_{C2} 野生型と His-*Va* FliG_{C2} A282T の 2 種) のケミカルシフトの計測を行った。得られたプロファイルをもとに、2 つの異なる核種による HSQC スペクトルを得た。さらに、全ての核種を用いた三次元 NMR 法を用いて、アミノ酸残基の連鎖帰属法によりシグナル帰属を行った。(B) 90° パルスを照射した後の横磁化の緩和の図。横緩和時間、 T_2 は $\Delta t_{1-6} = t_6 - t_1$ 、すなわち t_1 から t_6 に至るまでの時間である。

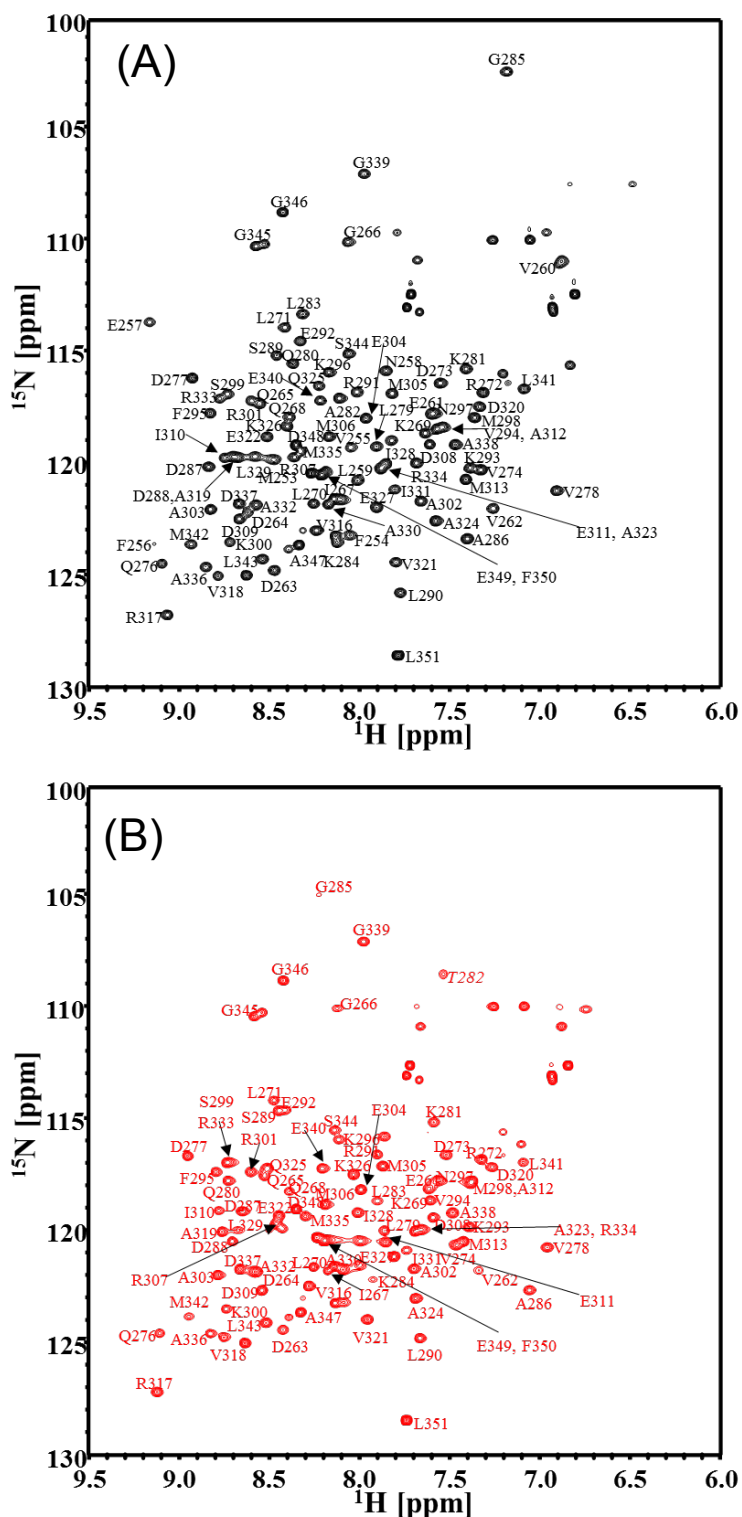


図 11. His-Va FliG_{c2} と His-Va FliG_{c2} (A282T) の主鎖のアミドシグナルの帰属
¹⁵N ラベルされた His-Va FliG_{c2} の野生型及び A282T 変異タンパク質における
¹H-¹⁵N HSQC のスペクトル。(A) 野生型のスペクトル。His-Va FliG_c において、
 明瞭にシグナルを検出することができず、帰属することができなかった N 末端
 側の M253-V260 の領域も帰属することができた。(B) A282T 変異タンパク質

のスペクトル。野生型とは違い、M253-V260 の領域は帰属できなかった。(A) と (B) 共に、幾つかの感度が低く、線幅が広幅化したシグナルも観察されたが、帰属には至らなかった。また、従来の **triple-resonance NMR** の手法を用いることによって、配列特異的アミドシグナルの帰属を行った（詳細は材料と方法の項参照）。

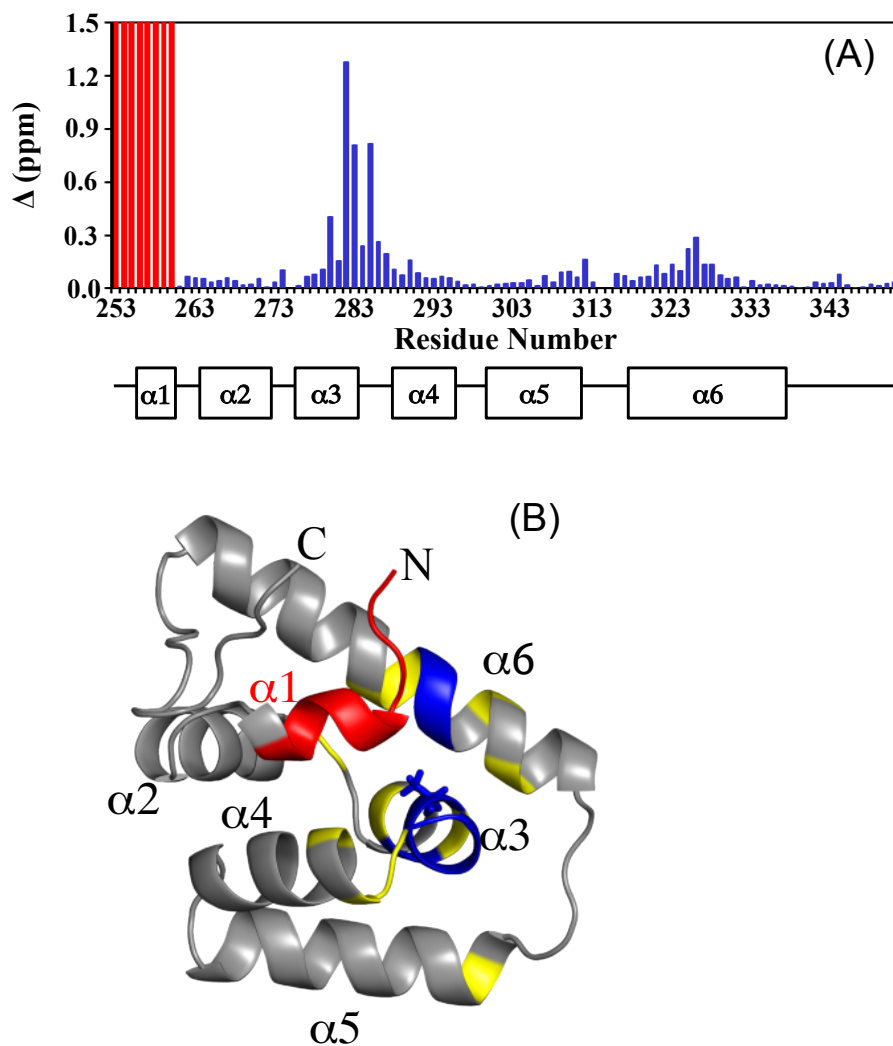


図 12. His-*Va* FliG_C 野生型に対する、A282T の 1 アミノ酸置換によって誘起されるケミカルシフトの擾動

(A) ケミカルシフトの擾動の全体的なヒストグラム。His-*Va* FliG_{C2} と His-*Va* FliG_{C2} (A282T) との間での、アミド水素と窒素原子のケミカルシフトの差の合計 (Δ 、単位は ppm) を残基番号に対してプロットした。ケミカルシフトの差の合計 Δ の定義は以下の通り。

$$\Delta_{\text{ppm}} = [(\Delta \delta_{\text{H}_N})^2 / 2 + (\Delta \delta_{\text{N}})^2 / 50]^{1/2}$$

δ_{H_N} と δ_{N} は、アミドの水素と窒素原子における、His-*Va* FliG_{C2} と His-*Va* FliG_{C2} (A282T) とのケミカルシフトの差としてそれぞれ表した。図中の N 末端側の赤い棒は、His-*Va* FliG_{C2} (A282T) の方の ¹H-¹⁵N HSQC のスペクトルにおいて、アミドシグナルが消失した残基を示す。His-*Va* FliG_{C2} の二次構造をヒストグラムの下部に追記した。(B) A282T の 1 アミノ酸置換によって誘起されるケミカルシフトの擾動を大きく示した残基をマッピングした図。ケミカルシフトの差の合計 Δ が、 $\Delta > 0.2$ ppm である残基及び $0.1 < \Delta < 0.2$ ppm である残基をそれぞれ青または黄色で着色して示した。さらに、アミドシグナルが消失した残基を赤で着色して示した。

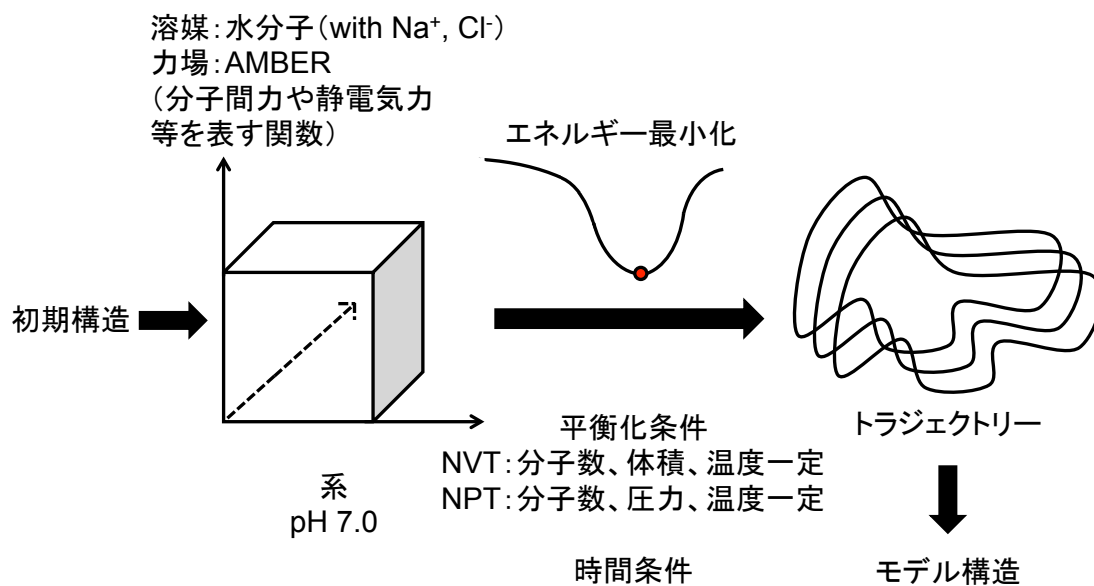


図 13. 分子動力学シミュレーション (MD) の概略

TIP3P の条件における水分子モデル及び電気的中性条件に従う比率での Na⁺、Cl⁻ の添加条件と、力場条件として AMBER を用いた系を作成した。その後、エネルギー最小化を最急降下法を用いて行った。さらに、平衡化条件と時間条件等を設定し、複数回の計算を行った。それによって、初期構造からトラジェクトリーが得られ、最終的にモデル構造を形成した。

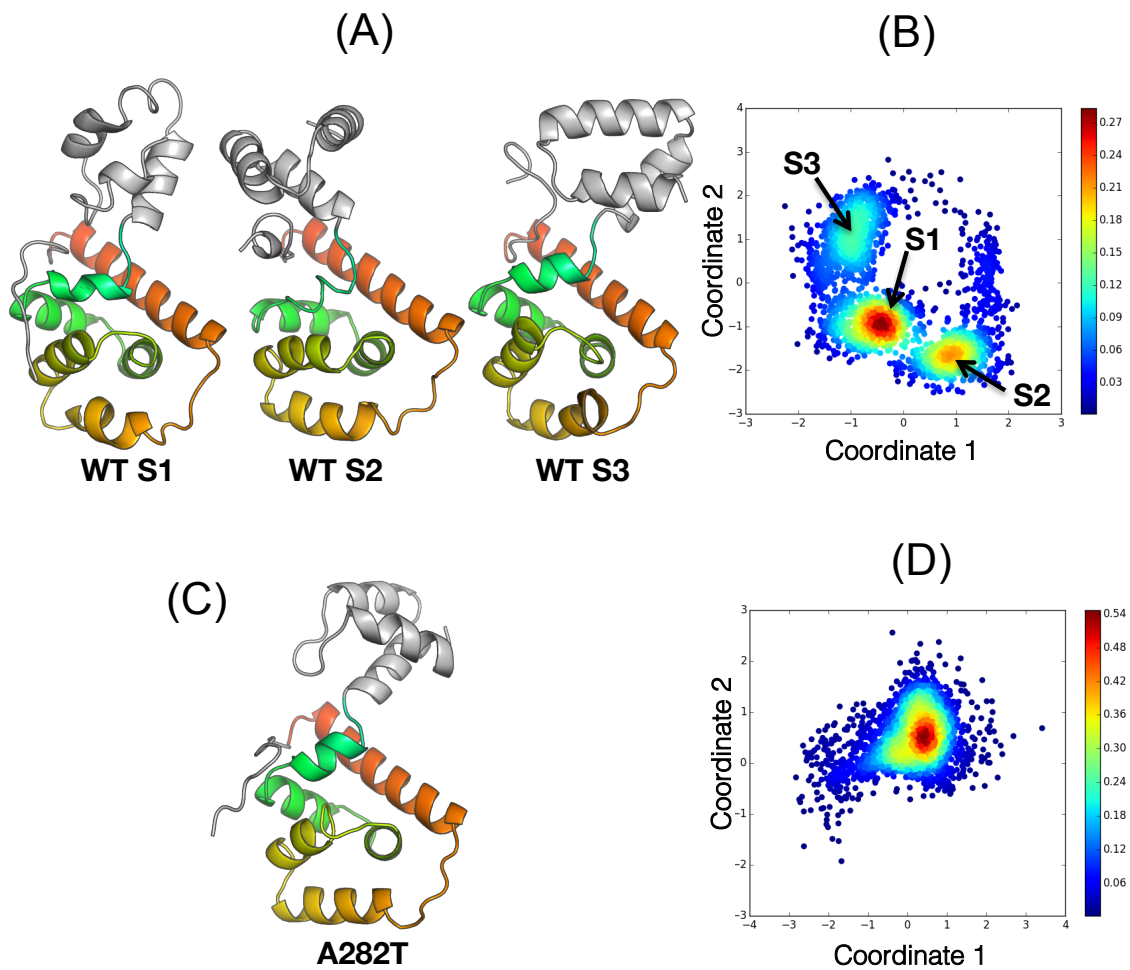


図 14. MD シミュレーションの trajectory の結果から算出された、*Va* FliG_C の C2 ドメインの構造に対する Cluster analysis

(A) と (C) *Va* FliG_C 及び *Va* FliG_C (A282T) の取り得るコンフォメーションの図。それぞれのコンフォメーションをリボンモデルの形で示した。また、G214-L252 の領域は、灰色で着色することで示した。(B) *Va* FliG_C の trajectory 及び (D) *Va* FliG_C (A282T) の trajectory を用いた Multi-dimensional scaling (MDS) プロットの図。プロットエリア中の密度マップは、Gaussian kernel-density estimation を用いて算出した。その際、M253-G339 の領域の構造に関するデータを上記の MDS 解析に用いた。

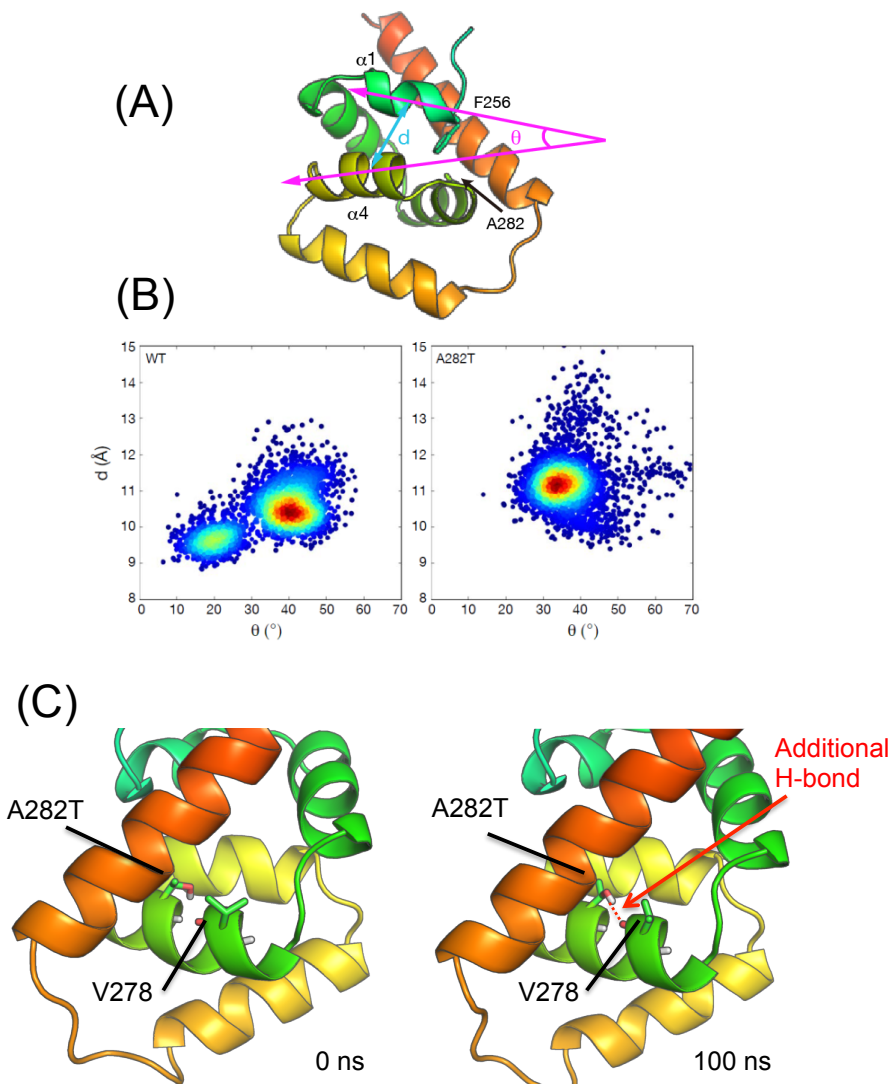


図 15. *Va* FliG の C 末端ドメインのコンフォメーションに関する MD シミュレーションを用いた解析

(A) FliG_C の構造ドメインに対して、ヘリックス $\alpha 1$ と $\alpha 4$ との間の角度及び距離に関する 2 つのパラメータ、 θ 及び d をそれぞれ解析に用いた。(B) 上述の θ 及び d の二次元のプロット。左側が *Va* FliG_C、右側が *Va* FliG_C (A282T) の結果をそれぞれ示す。各々の点は、両方の図で共に trajectory 中の *Va* FliG_C のコンフォメーションをそれぞれ表す。(C) MD シミュレーションの間に新たに形成された、T282 のヒドロキシル基と V278 の主鎖の O 原子との間の水素結合を示す。左側は 0 ns、右側が 100 ns の時点での MD シミュレーションの際に見られた trajectory をそれぞれ示す。

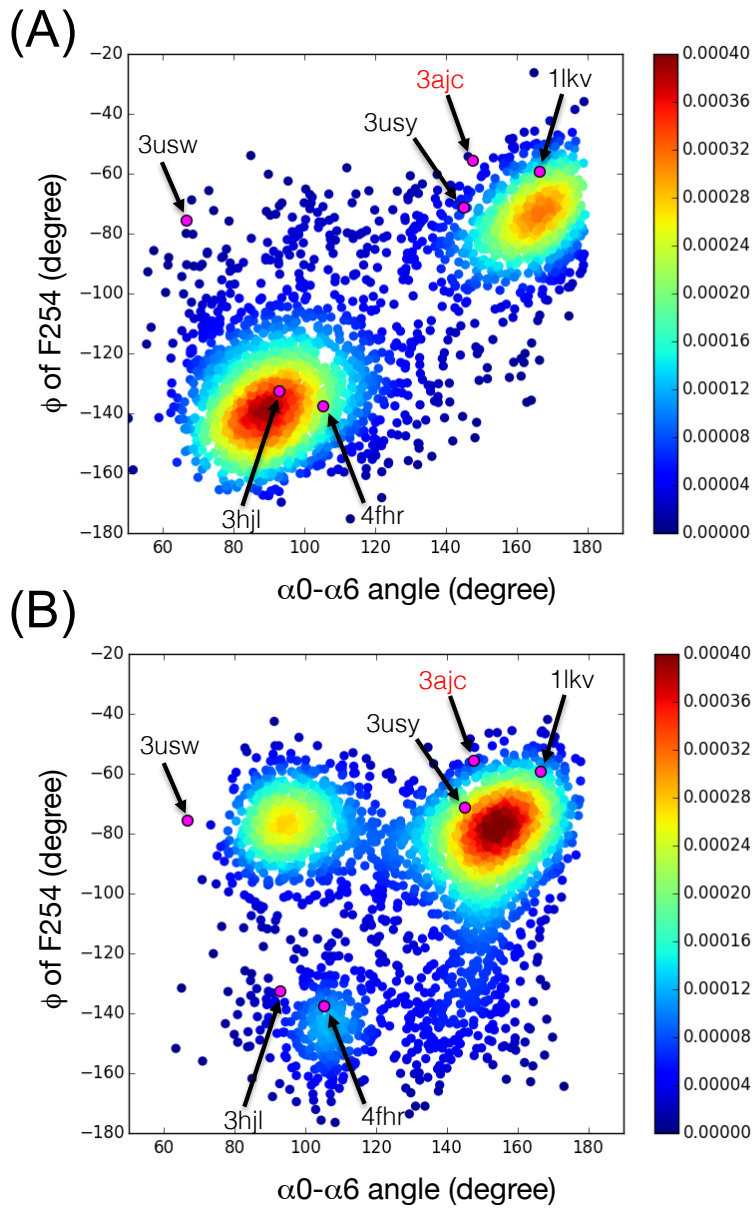


図 16. MD シミュレーションによる trajectory における構造パラメータの分散プロット

図 14 において算出されたプロットでの密度マップを用いた。ただし、縦軸はヒンジの残基 F254 における二面角、横軸は $C\alpha$ 1-6 ドメイン中のヘリックス $\alpha 6$ に対する、 ARM_C ドメインの最も C 末端側のヘリックス $\alpha 0$ との二面角をそれぞれ示した。そのプロットエリア内に、FliG の他の幾つかの構造をプロットした。その構造は、*T. maritima* の CW 方向にバイアスの見られた FliG_C の構造 (PDB : 3ajc) 、*Helicobacter pylori* の 2 つの野生型の構造 (PDB : 3usy 及び 3usw) 、*T. maritima* の野生型の構造 (PDB : 11kv) 、同じく *T. maritima* の FliM との複合体での構造 (PDB : 4fhr) 、*A. aeolicus* の全長における構造 (PDB : 3hjl) の計 6 つである。これらは赤い丸としてそれぞれ示した。(A) は Va FliG_C の野生型の結果、(B) は Va FliG_C (A282T) の結果をそれぞれ表す。

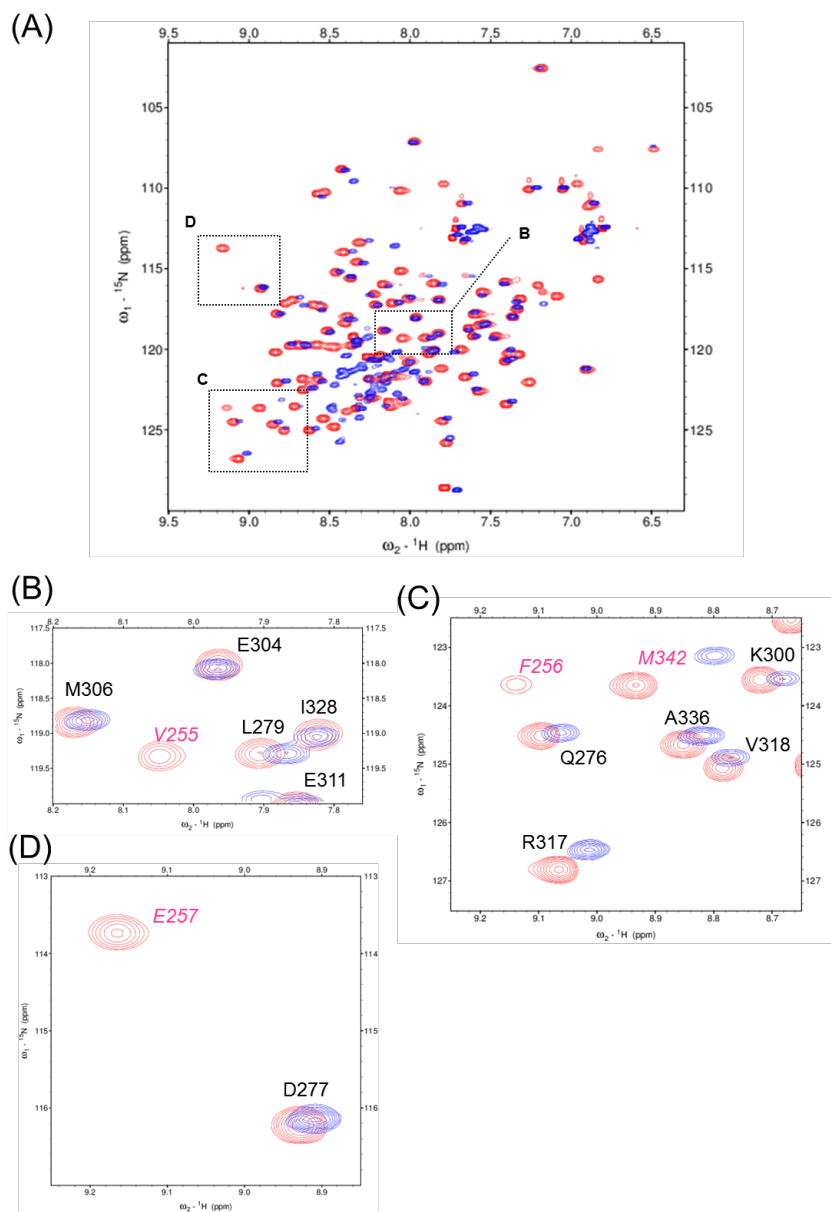


図 17. His-*Va* FliG_C と His-*Va* FliG_{C2} の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルの比較

(A) His-*Va* FliG_C (青) と His-*Va* FliG_{C2} (赤) のスペクトルを重ね合わせた図。アミノ酸残基の数は、His-*Va* FliG_C の方が His-*Va* FliG_{C2} より 40 残基多いが、観察されるアミドシグナルの数はほとんど同数である。このことより、His-*Va* FliG_C の幾つかのアミドシグナルは、線幅が広幅化しており、検出されなかったと考えられる。(B) - (D) 上記の (A) のスペクトルの一部を拡大した図。His-*Va* FliG_C と His-*Va* FliG_{C2} の両方において帰属できたアミドシグナルは、黒で残基番号を示した。それに対して、His-*Va* FliG_{C2} においてのみ帰属できた残基は、ピンクで残基番号を斜体として示した。(B) では V255 が、(C) では F256 が、(D) では E257 が、His-*Va* FliG_C の計測において、アミドシグナルが観察できなかった。

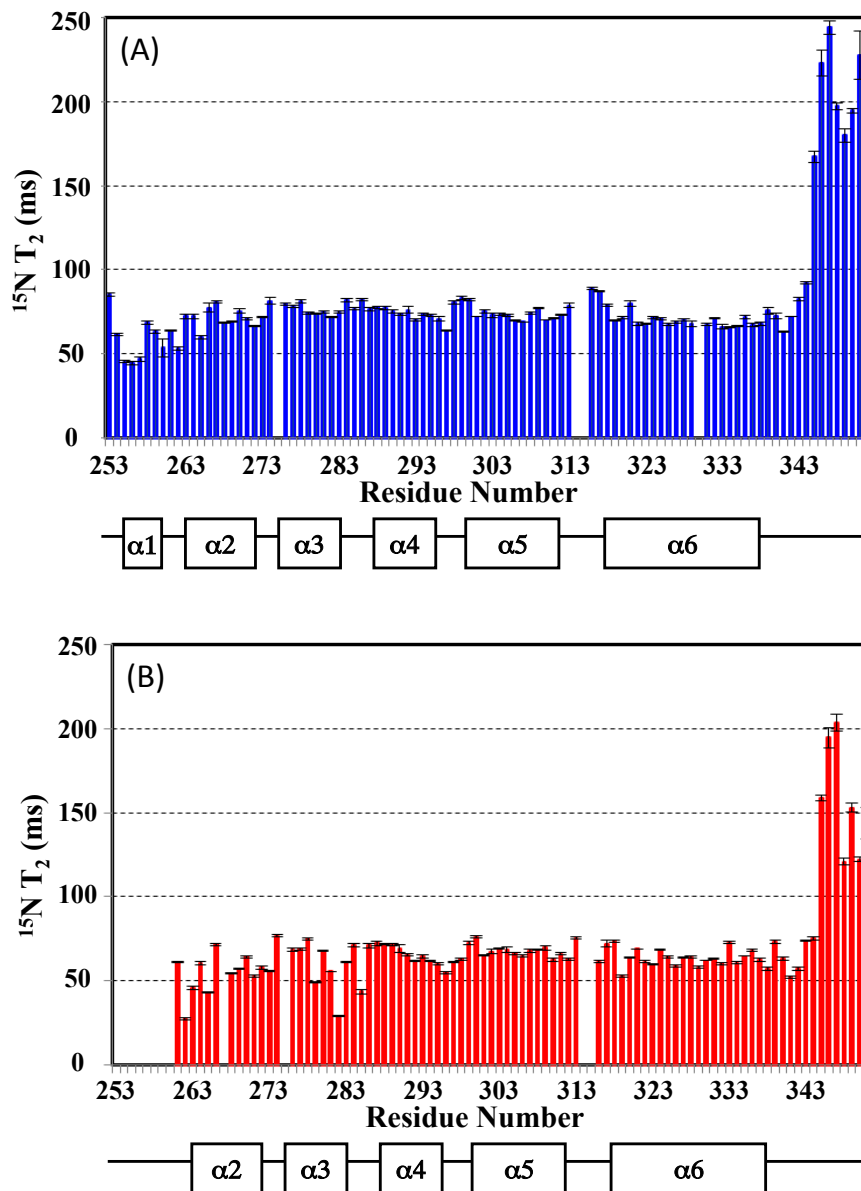


図 18. His-*Va* FliG_{C2} と His-*Va* FliG_{C2} (A282T) の backbone の動的なシグナルの変化の比較

His-*Va* FliG_{C2} (A) と His-*Va* FliG_{C2} (A282T) (B) の横緩和時間、¹⁵N T₂ の値をそれぞれ青と赤で着色して示した。His-*Va* FliG_{C2} と His-*Va* FliG_{C2} (A282T) の ¹⁵N T₂ の値は、得られたシグナルのピークの強度を、Sparkyにおいて非線形最小二乗近似法を用いて、指数曲線に近似して得られた。¹⁵N T₂ の分散は、同じく Sparkyを用いて、Monte Carlo 解析により概算することで導出した。His-*Va* FliG_{C2} (A282T) の N 末端側の残基 (His-*Va* FliG_{C2} のヘリックス α1 付近の領域に相当する) 由来の ¹⁵N T₂ の値は、アミドシグナルの消失のため、正確な値を得ることができなかった。

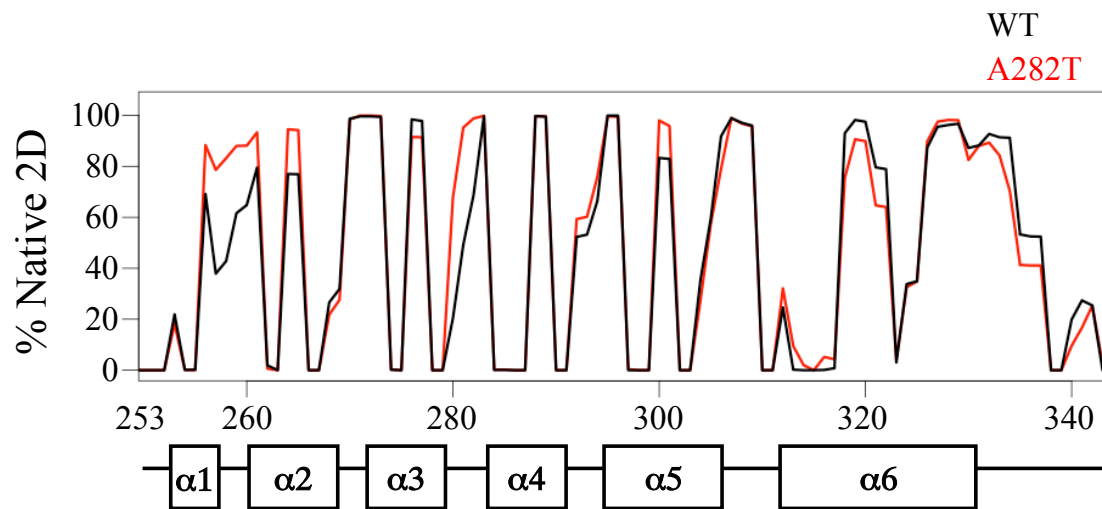


図 19. MD シミュレーションを用いた、ネイティブな二次構造の保持率の算出
 MD シミュレーションによって、*Va FliG_C* のシミュレーションの間でのネイティブな二次構造を保持する割合を、野生型と A282T 変異体において比較した。黒で示した折れ線は野生型の、赤で示した折れ線は A282T 変異体の結果をそれぞれ示した。*Va FliG_C* の二次構造を、プロットの下部に対照として示した。

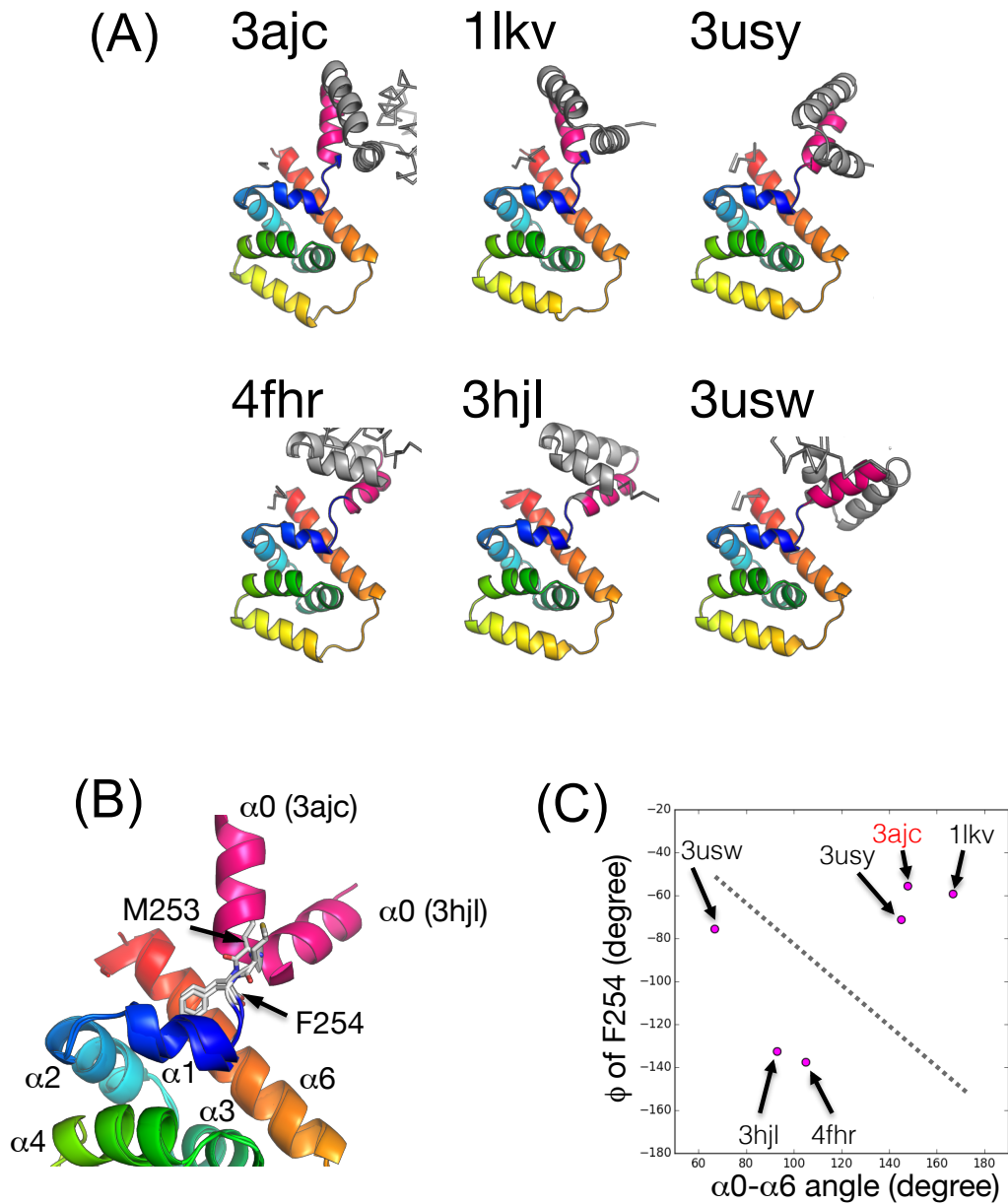


図 20. *Va* FliG_C の幾つかの結晶構造におけるヘリックス再配向の比較

(A) これまでに報告されている FliG_C の結晶構造。3ajc : *T. maritima* の CW 方向にバイアスのかかる変異体、1lkv : *T. maritima* の野生型の構造、3usy と 3usw : *Helicobacter pylori* の野生型の 2 つの構造、4fhr : *T. maritima* の野生型の、FliM との複合体としての構造、3hjl : *A. aeolicus* の全長の構造。(B) 2 つの結晶構造、3ajc と 3hjl における、ARM_C ドメインの末端のヘリックス α_0 と、ARM_C ドメインと C α 1-6 ドメインの間のヒンジによるヘリックス再配向の図。付記されている残基番号は、*V. alginolyticus* における残基番号に相当する。(C) ARM_C ドメインと C α 1-6 ドメインによる再配向に対する、2 つの構造パラメータ (F254 における二面角 ϕ と、 α_0 と α_6 との二面角) を二次元平面にプロットした図。プロットエリア内の各ドットは、(A) における各々の結晶構造に対応する。