

## 別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 海洋性ビブリオ菌極べん毛モーターの回転方向切り替えと  
固定子活性化機構の解明

氏 名 錦野 達郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

細菌は運動器官の一つであるべん毛モーターを回転させることで、自身の生育に有利な環境に向かって遊泳する。モーターの回転力は、膜内外の電気化学ポテンシャルを運動エネルギーに変化することで生じる。このエネルギー変換には、回転子及び固定子と呼ばれるタンパク質複合体が適切に相互作用しなければならない。一方でモーターの回転は、細胞の周囲の環境の変化に応答した走化性シグナルと呼ばれる Che 因子のリン酸化/脱リン酸化のリレーが回転子に伝わり、回転子自身が構造変化することにより制御させる。海洋性ビブリオ菌の固定子は二種類の膜タンパク質である PomA と PomB が 4:2 の割合で複合体を作り、回転子の周りで Na<sup>+</sup>チャネルとして働くことで機能する。回転子の C-ring は、モーターの回転力の発生と回転方向の制御の両方向に関わり、FliG、FliM と FliN の 3 種類のタンパク質から構成される。FliG は N 末端(FliG<sub>N</sub>)、ミドル(FliG<sub>M</sub>)、C 末端(FliG<sub>C</sub>)の 3 つのドメインに分けられ、回転力の形成は FliG<sub>C</sub> と PomA の細胞質領域の相互作用により生み出されることが遺伝学的な解析からわかっている。モーターの回転方向は、走化性因子である CheY がリン酸化される(CheY-P)と FliM に結合できるようになり、FliG<sub>C</sub> の構造が変化して、モーターが反時計回りに時計回りに方向転換する。本論文では、固定子が回転子の周囲に集合した後の活性化機構、回転方向切り替えの際に生じる回転子の構造変化とそれによる回転子固定子間相互作用の影響に関して研究を行った。その内容を 3 つの章に分けて、べん毛モーターが回転する分子機構を解析した。

第一章では、固定子の活性化機構を明らかにする際に偶然見つかった運動能を持たない PomB-L160C/I186C 変異体が L-Serine により運動能を再獲得する分子機構について調べた。L-Serine はビブリオ菌の誘引物質として働き、走化性シグナルによりモーターの回転を反時計回りに偏らせることが知られていたことから、回転方向制御と固定子回転子間相互作用の関連を調べた。その結果、モーターの回転を偏らせる FliG 変異により、PomB-L160C/I186C 変異体の運動能が獲得されたことから、L-Serine により運動能が獲得される現象は、L-Serine が回転方向制御を反時計回りに偏らせることにより生じると結論できた。また、回転方向が反時計回りに偏った状態や、固定された状態で L-Serine を加えると、さらに運動している菌体の割合が上昇したことから、走化性シグナル以外の別の要因により、運動能が獲得される

ことが示唆された。L-Serine による走化性シグナルを介した PomB-L160C/I186C 変異体の運動能の獲得は、変異により異常になった固定子回転子相互作用が、回転子の構造変化によって、回復したと推測された。第二章では、第一章で単離した回転方向制御が異常になる FliG 変異体を解析することで、モーターの回転方向を制御する際に生じる回転子の構造変化の解明を試みた。モーターの回転方向が反時計回りに偏る G214S 変異体、回転方向が時計回りに偏る G215A 変異体、回転方向の偏りはみられないが回転方向切り替えの頻度が増加する E144D 変異体を用い、分子動力学(MD)シミュレーションによる構造変化の予測と核磁気共鳴法(NMR)による  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY HSQC スペクトルの取得、さらに Cryo-Electron Tomography (Cryo-ET)法による C-ring の構造情報の取得を行った。MD シミュレーションと NMR による解析から、構造的揺らぎが大きく特定の構造を持たない野生型 FliG に対して、G214S, G215A 変異は FliG<sub>M</sub> に対する FliG<sub>C</sub> の立体配置に制限が生じることが示唆された。また、Cryo-ET 法による C-ring の解析では、G214S 変異と G215A 変異で C-ring 中の FliG に相当すると考えられる部分の構造が異なることが明らかとなった。これらの結果は、G214S, G215A 変異が FliG の構造に立体障害を引き起こすことでモーターの回転方向に偏りを生み出すことを強く示唆している。一方で、MD シミュレーションと NMR による解析から、E144D 変異は野生型と同様に構造的揺らぎが大きいことが示唆された。L-Serine への応答を解析した結果、E144D 変異は走化性シグナルに対して正しく応答しないことが明らかとなり、E144D 変異が FliM の構造変化を引き起こすことにより CheY の FliM への結合/解離に異常が生じることで、回転方向切り替えの頻度が上昇したと結論付けた。第三章では、プラグ欠失固定子を精製し、解析することによりプラグ領域が固定子のイオン透過を制御する仕組みの解明を目指した。これまでにプラグ領域を含む 41-120 を欠失した PomB(PomB<sub>ΔL</sub>)をもつプラグ欠失固定子は生体内で Na<sup>+</sup>を常に流してしまうため、細胞の生育阻害を引き起こすことが分かっている。また、*in vitro* で固定子プラグ欠失固定子を解析するために精製条件の検討が行われたが、Na<sup>+</sup>を含む緩衝溶液では PomA が PomB<sub>ΔL</sub> から解離してしまうため、最適な条件がわかっていなかった。しかしながら、これまでの解析で固定子のイオン透過に高い Na<sup>+</sup>の濃度を必要とすることが分かっている PomA-D31C 変異を導入すると、PomA と PomB<sub>ΔL</sub> が複合体として精製できることが明らかとなった。これらの結果を踏まえて、プラグ欠失固定子の精製条件を改めて検討した。始めに、K<sup>+</sup>を含む緩衝溶液で改めてプラグ欠失固定子の精製を試みたところ、Na<sup>+</sup>を含む緩衝溶液で精製した時と同様に、PomA が PomB<sub>ΔL</sub> から解離してしまった。次に、Na<sup>+</sup>が固定子内を流ることができなくなることが分かっている PomB-D24N 変異を持つ固定子の精製を試みたところ、固定子を複合体として精製することができた。これらの結果から、プラグ欠失固定子は常に PomA と PomB の相互作用が弱くなっているために、Na<sup>+</sup>が流れ安くなっているという新しいモデルを提唱することが出来た。このモデルから、プラグ領域は PomA と PomB の相互作用を調整する役割を持つと推察した。また、PomA-D31C 変異、PomB-D24N 変異をもつ固定子は、イオンが膜貫通領域に入れないことにより PomA と PomB が常に強く相互作用していると考えられる。

本研究は、変異体の解析から、電子顕微鏡・NMR・MD シミュレーションなどを駆使して、ビブリオ菌べん毛モーターが回転する分子機構と回転方向変換機構を明らかにする上で、重要な知見を得ることができた。そして、これまでに明らかになっていない FliG と固定子複合体の原子レベルの構造情報取得に向けた研究の大きな進展に寄与すると考えられる。