

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

氏 名 錦野 達郎

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

論文審査担当者

主 査 名古屋大学大学院理学研究科 教授 理学博士 本間道夫
委 員 名古屋大学大学院創薬科学研究科 教授 博士(薬学) 廣明秀一
委 員 名古屋大学大学院理学研究科 教授 Ph.D 森郁恵
委 員 名古屋大学大学院理学研究科 准教授 博士(理学) 小嶋誠司

論文審査の結果の要旨

別紙 1-2

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** が複合体を作り、回転子の周りで Na^+ 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_N**)、ミドル(**FliG_M**)、**C** 末端(**FliG_C**)の 3 つのドメインに分けられ、回転力の形成は **FliG_C** 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_C** 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。

はじめに固定子の活性化機構を明らかにする際に偶然見つけ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。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することが明らかにされた。これらのことから、**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。次に、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が試みられた。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 ^1H - ^{15}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_M** に対する **FliG_C** 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。最後に、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_{ΔL})** をもつプラグ欠失固定子は生体内で Na^+ 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^+ を含む緩衝溶液では **PomA** が **PomB_{ΔL}** 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^+ 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_{ΔL}** 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、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^+ 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。

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・生化学的手法などを駆使して、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したと評価される。よって、申請者は博士(理学)の学位を授与される資格があると認められる。