

学位論文

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

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

錦野 達郎

2020 年 2 月

目次

要旨

序論

結果

一章

誘引物質セリンと回転方向転換欠損 *fliG* 変異による *pomB* 回転欠損変異の
抑圧効果の解析

二章

回転方向が偏った回転子構成タンパク質 FliG 変異体の構造変化の解析

三章

固定子 PomA-PomB 複合体のイオン透過による複合体構造変化の解析

考察

材料と方法

文献

謝辞

付記

図表

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差を運動エネルギーに変換することで生じる。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、細胞周囲の環境変化に応じて、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、回転子が構造変化することにより制御される。

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⁺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), middle (FliG_M), C 末端(FliG_C)の 3 つのドメインに分けられ、回転力の発生は 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。また走化性因子である CheY がリン酸化される(CheY-P)と FliM に結合し、その結果 FliG_C の構造が変化して、モーターの回転方向が反時計回りに時計回りに転換する。本研究では、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-固定子間相互作用への影響に関して解析を行った。べん毛モーターが回転する分子機構についての研究内容を、3 つの章に分けて記載する。

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、走化性シグナルを介して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、モーターの回転方向を偏らせる 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。PomB-L160C/I186C 変異体の運動能の獲得は、L-Serine の走化性シグナルにより回転子の構造変化が誘起されて、変異により異常になった固定子-回転子間相互作用を回復させることによるものと推測された。

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について述べる。解析には、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、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 変異体では 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 変異体と G215A 変異体の C-ring において、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 への誘引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、固定子 B サブユニットのプラグ欠失変異体を精製し、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について述べる。固定子 B サブユニットの膜貫通ヘリックスの C 末端側には、保存された両親媒性ヘリックスが存在し、固定子チャネルの蓋（プラグ）として働くことが示唆されている。このプラグ領域を含む 80 残基(E41-R120)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、過剰発現すると細胞の生育阻害を引き起こすことが分かっている。最近 *in vitro* で固定子プラグ欠失固定子(WT-PomA/ PomB_{ΔL}-His₆)を解析するために精製条件の検討が行われたが、PomA が PomB_{ΔL}-His₆ から解離してしまうことがわかった。一方、運動能に高い Na⁺の濃度を必要とする PomA-D31C 変異を導入すると、PomA と PomB_{ΔL}-His₆ が複合体として精製できることが明らかとなった。そこで本研究では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⁺を含む緩衝溶液でプラグ欠失固定子の精製を試みたところ、Na⁺を含む緩衝溶液で精製した時と同様に、PomA が PomB_{ΔL}-His₆ から解離してしまった。次に、Na⁺が固定子内を流れ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、WT-PomA/ PomB_{ΔL}-His₆-D24N 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⁺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。

序論

生体内には、数十種類のタンパク質が複合体を形成することで機能をもつ超分子複合体が存在する。呼吸鎖複合体、リボゾーム複合体など生命活動を担う重要な超分子複合体がある。それらの中で、分子が回転することによって機能するユニークな超分子として、ATP 合成酵素とバクテリアの運動器官であるべん毛モーターがあげられる。本論文では、バクテリアのべん毛の回転機構の解析から、エネルギー変換とその制御機構について研究を進めた。

バクテリアべん毛は、細胞外へ延びた繊維状構造の「フィラメント」、膜に埋まっており回転力を発生するために必要な「モーター」、フィラメントとモーターをつなぐ「フック」の3つのパーツから構成される(図1)。さらに、モーターは自身が回転する「回転子」と、細胞壁にアンカーされておりイオンチャネルとして働く「固定子」の2つに分けられる(図1B)。モーターの回転力は、膜内外に形成される電気化学ポテンシャル差が、固定子と回転子の適切な相互作用により、運動エネルギーに変換されることで生じる(Terashima *et al.*, 2008)。この回転子の回転が、らせん状のフィラメントに伝わることで推進力が生み出される。べん毛モーターは、時計回り(Clockwise; CW)と反時計回り(Counter clockwise; CCW)の両方向に回転できる。回転方向制御は、細胞周囲の環境の変化を検知した細胞膜上の化学感覚(Che)受容体が、その情報をChe因子と呼ばれるタンパク質のリン酸化/脱リン酸化のリレーにより伝達し、回転子に伝えることで制御される(図2)。これは走化性シグナル伝達とよばれ、この制御により直進するCCW回転と方向転換するためのCW回転を適切に調節することができ、結果として細菌細胞は自身の生育に有利な環境に向かって進むことができる。

べん毛モーターは、10種類以上のタンパク質が適切な順番でリング状の構造と軸構造が構築されることにより組みあがる。モーターには、細胞外から細菌の膜構造に対応したL, P, MS, Cリングと呼ばれるリング状の構造体が存在する(Homma *et al.*, 1987a; Francis *et al.*, 1992; Ueno *et al.*, 1992; Schoenhals & Macnab 1996)。海洋性ビブリオ菌の極べん毛におけるモーターにはそれ以外にも、O, H, Tリングと呼ばれる特徴的なリング構造が存在する(図1B; Terashima *et al.*, 2006, 2010a; Zhu *et al.*, 2017a)。L, Pリングは外膜とペプチドグリカン層に位置し、H, Tリングの足場となっていると考えられている。Hリングはリングの外側が外膜と相互作用していると考えられており、構成因子として少なくともFlgT, FlgO, FlgPが同定されている(Zhu *et al.*, 2018)。T-ringはMotX, MotYの二種類のタンパク質から構成される(Terashima *et al.*, 2006)。T-ringの末端はペリプラズム空間に存在すると推測されており、固定子と相互作用することで、固定子の回転子の周りへの局在を補助していると考えられている(Terashima *et al.*, 2006)。MSリングは、二回膜貫通タンパク質であるFliFが約30分子、内膜上に集合することでリングを形成すると考えられている(Homma *et al.*, 1987b; Sosinsky *et al.*, 1992; Ueno *et al.*, 1992)。CリングはMSリングの細胞質側に順

に FliG 分子, 34 分子の FliM, 100 分子以上の FliN がそれぞれリング構造を構築することで形成され则认为られているが、リング中のタンパク質の正確なユニット数については議論の余地がある(Francis *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 1999)。

固定子は、四回膜タンパク質の A サブユニットと一回膜タンパク質の B サブユニットが 4:2 の割合で複合体を形成することにより機能する(図 1B; Sato & Homma 2000a & 2000b; Braun *et al.*, 2004; Kojima & Blair 2004)。周毛性のべん毛をもつ *Escherichia coli* (*E. coli*)や *Salmonella enterica* (*S. enterica*)の固定子は共役イオンとして H^+ を用いるプロトン駆動型であり、構成タンパク質 A サブユニットと B サブユニットがそれぞれ MotA, MotB と呼ばれる(Blair, 2003)。これに対して、本研究で扱った海洋性ビブリオ菌 *Vibrio alginolyticus* (*V. alginolyticus*)の極べん毛固定子は共役イオンとして Na^+ を用いるナトリウム駆動型であり、固定子は PomA と PomB から成る(Asai *et al.*, 1997)。ビブリオ菌以外にもナトリウム駆動型べん毛をもつバクテリアとして、*Bacillus subtilis* が知られており、固定子は MotP, MotS とよばれる膜タンパク質から構成される(Ito *et al.*, 2004 & 2005)。固定子は細胞膜上を拡散しており、回転子の周りに集合した時のみ活性化し共役イオンを通すことができると考えられている(Stolz and Berg, 1991)。A サブユニットの細胞質領域に存在する保存性の高い荷電残基が、回転子タンパク質 FliG の保存性の高い荷電残基と相互作用することにより、モーターの周りに固定子が集合し回転力を形成すると考えられている(Zhou & Blair 1997; Zhou *et al.*, 1998; Morimoto *et al.*, 2013; Takekawa *et al.*, 2014; Pourjaberi *et al.*, 2017)。

回転子側において回転力発生に最も重要だと考えられている C リング構成タンパク質 FliG は、N 末端側から N-terminal (FliG_N), Middle (FliG_M), C-terminal (FliG_C) の 3 つのドメインに分けられる(Kihara *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2010; Lynch *et al.*, 2017)。超好熱菌 *Aquifex aeolicus* で解かれた全長 FliG の構造を図 3 に示した (Lee *et al.*, 2010; PDB ID: 3HJL)。それぞれのドメインには、 β -catenin 等に見られるタンパク質間相互作用に重要な Armadillo repeat motif (ARM)が存在する(Huber *et al.*, 1997)。ARM はイソロイシン、ロイシン、バリンなどの疎水性側鎖が、 α -helix 上で同一の向きを向いている繰り返し配列である。海洋性ビブリオ菌の FliG は 351 アミノ酸からなる分子量 38.6 kDa のタンパク質であり、FliG_N, FliG_M, FliG_C にはそれぞれ 20-127, 133-202, 235-343 番目のアミノ酸が含まれる。FliG_N は FliF と相互作用すると考えられている(Ogawa *et al.*, 2015)。FliG_C は固定子の細胞質領域と相互作用することでモーターの回転力の発生に関与する。この相互作用には、荷電残基の寄与が重要であることが遺伝学的にわかっており、少なくとも FliG-K284, D301, D308, D309 残基が PomA と相互作用することが示唆されている(Takekawa *et al.*, 2014)。FliG_M には、大腸菌において FliM と相互作用することが示されている EHPQR-motif (E144, H145, P146, Q147, R179 残基)と呼ばれる保存性の高い領域が存在する。

FliM は FliG 及び FliN と相互作用するだけでなく、Che 因子の一つである CheY と相互作用する (McEvoy *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001)。CheY は FliN とも相互作用する (Sarkar *et al.*, 2010)。走化性シグナル伝達により、CheY がリン酸化される (CheY-P) と FliM と結合できるようになり、べん毛の回転方向が CCW から CW になる (Barak & Eisenbach 1992; Welch *et al.*, 1993; McEvoy *et al.*, 1999)。一方で CheY-P が脱リン酸化されると FliM から解離し、べん毛の回転方向が CCW に戻る。べん毛の回転方向は、CheY の結合/解離によって生じる FliM の構造変化が FliG に伝わることによって制御されると考えられている (図 2)。FliM の構造変化は、FliG_M, FliG_C に存在する ARM_M 及び、ARM_C の FliG 分子内/分子間相互作用を変化させることで FliG の構造変化を引き起こす (Brown *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010; Minamino *et al.*, 2011; Baker *et al.*, 2016; Kinoshita *et al.*, 2018)。時計回りでは、ARM_M と ARM_C が分子内で相互作用することにより FliG がコンパクトな構造を取り、反時計回りでは、ARM_M と ARM_C がリング上で隣り合う FliG と分子間相互作用することにより、FliG が伸びた構造を取ると考えられている。この分子内/分子間相互作用は FliG_M に存在する helix_{MC} と呼ばれる α -helix の構造変化によって制御され、時計回りの状態では helix_{MC} がほどけると考えられている。しかしながら、回転方向切り替えの際に生じる具体的な FliG の構造変化と、時計回りと反時計回りでトルクを生み出す分子機構はわかっていない。

ビブリオ菌のべん毛固定子タンパク質である PomA は 253 アミノ酸からなる分子量 27.3kDa の四回膜貫通タンパク質である。その四つの膜貫通領域 (transmembrane segment; TM) は 3-22 (TM1), 36-54 (TM2), 147-169 (TM3), 179-199 (TM4) と考えられている (Asai *et al.*, 2000; Terashima *et al.*, 2010b)。TM1 と TM2 及び、TM3 と TM4 の間の領域 (それぞれ Loop₁₋₂, Loop₃₋₄) は、ペリプラズム領域に存在する (図 4A)。Loop₁₋₂, Loop₃₋₄ の各アミノ酸残基をシステインに置換した変異体を発現した細胞で、ビオチンマレイミドの修飾効率の検討が行われており、同じペリプラズム空間に存在するにも関わらず、Loop₁₋₂, Loop₃₋₄ で修飾効率が異なることが明らかとなっている (Asai *et al.*, 2000)。また、TM2 と TM3 の膜貫通領域の間の領域 (Loop₂₋₃) は、細胞質領域に存在し、この領域中の保存性の高い荷電残基 (ビブリオ菌 PomA の R88, K89, E96, E97, E99 等) が FliG と相互作用すると推測されている (Takekawa *et al.*, 2014)。PomB は 315 アミノ酸からなる分子量 35.5 kDa の一回膜貫通タンパク質で、その膜貫通領域は 17-37 と考えられている (図 4A; Terashima *et al.*, 2010b)。PomB の C 末端側 (PomB_C) 領域は、ペプチドグリカン層と結合することが示されている OmpA 様ドメイン (196-300) を含み、ペリプラズムに存在している。近年、OmpA 様ドメインを含む PomB_C の運動能に必須な領域 (PEM, D121-Q315) の結晶構造解析から、この領域の N 末端側に存在する α -helix の構造変化が PomB_C のペプチドグリカン層との結合を可能にすることにより、固定子が回転子の周りに安定して集合できるようになるモデルが提案されている (Zhu *et al.*, 2014; 図 4B)。大腸菌 MotB の C 末端領域の解析により、この領域がペプチドグリカンと相互作用することが知られている

(Kojima *et al.*, 2018)。PomB の膜貫通領域中に存在する 24 番目のアスパラギン酸残基 (D24) は、他の菌種の B サブユニットにも完全に保存されており、固定子の共役イオンの透過とモーター回転に必須である。また、PomB においては Na^+ がこの残基に結合することが実験的に示されている (Sudo *et al.*, 2009)。D24 に Na^+ が結合できなくなる D24N 変異を持つ固定子を発現させた細胞は完全に運動能を失い、PomB-D24N 変異をもつ固定子は回転子の周りに集合できなくなる (Fukuoka *et al.*, 2009)。また、PomB の膜貫通領域の C 末端側には、他の固定子 B サブユニットでも保存された両親媒性ヘリックスが存在し、大腸菌 MotB においてはこのヘリックスが固定子チャネルの蓋 (プラグ) として働くことが示されている (Hosking, *et al.*, 2006)。PomB においてもプラグ領域 (44-58) はイオン透過を制御すると考えられており、プラグ領域を含む 80 残基 (41-120) の PomB プラグ領域欠失変異体 (PomB_{ΔL}) が解析されている (Li *et al.*, 2011)。このプラグ領域欠失固定子は、回転子の周りへ集合していなくてもチャネル活性を持つため、過剰発現すると Na^+ が細胞内へ流入し続け菌体の生育が阻害されることが分かっている (Takekawa *et al.*, 2013)。一方で PomB の Na^+ 結合部位 D24 に変異 (D24N) が生じると、PomB_{ΔL} が引き起こす生育阻害が抑圧されることが分かっている (Li *et al.*, 2011)。これらの知見から、固定子の回転子の周りでの活性化には、次に述べるいくつかの構造変化が必要だと考えられている。(1) D24 残基への Na^+ の結合により生じる構造変化、(2) プラグ領域の構造変化、(3) PomB_C の構造変化による PomB_C とペプチドグリカン層の結合。しかしながら、これらの詳細な構造変化やその順序などはよくわかっていない。最近、タンパク質を大量発現するために最適化された大腸菌 (BL21 (DE3) / pLysS) とコールドショックにより発現誘導を行う pCold vector を用いて固定子を大量に発現させ、界面活性剤 Decyl Maltose Neopentyl Glycol (2,2-dioctylpropane-1,3-bis-β-D-maltopyranoside; DMNG) を用いて膜画分を可溶化することで、固定子複合体を純度よく安定に精製する方法が確立された (Onoue *et al.*, 2019)。今後、この系を用いた結晶構造解析が期待されている。

本研究では、FliG が固定子との相互作用によるエネルギー変換と CheY-FliM の構造変化を介した回転方向制御を結びつける役割があると考え、第一章では、「誘引物質セリンと回転方向転換欠損 *fliG* 変異による *pomB* 回転欠損変異の抑圧効果の解析」、第二章では、「回転方向が CW 及び CCW に偏る FliG 変異体の構造解析」というタイトルで、モーターの回転方向切り替え時に生じる FliG の構造変化とトルクを生み出す分子機構の解明を目指した。第三章では、「固定子 PomA-PomB 複合体のイオン透過による複合体構造変化の解析」というタイトルで、固定子の活性化メカニズムの解明に向けて、精製したタンパク質を用いた *in vitro* での変異固定子の解析を行った結果を示す。

結果

第一章 誘引物質セリンと回転方向転換欠損 *fliG* 変異による *pomB* 回転欠損変異の抑圧効果の解析

PomB_C の結晶構造解析 (D121-Q315 を含む領域) では構造が 2.0 Å で解けたものの、N 末端の 30 残基とそれに続く helix 1 の一部は diorder しており、構造を決定できなかった(図 4B)。この結果をもとに、PomB_C N 末端領域の構造変化により PomB の全体構造が伸びることで、PomB_C がペプチドグリカン層に結合できるようになるという仮説が提唱された(Zhu *et al.*, 2014)。この仮説の証明のために、先の領域中の 2 か所にシステイン置換変異を導入し、システイン同士にジスルフィド結合を形成させることによって、構造変化を阻害する実験を試みた。PomA にはシステイン残基が存在しない一方で、PomB には 3 つのシステイン残基(C8, C10, C31)が存在することから、実験にはこれらのシステイン残基をアラニンに置換し、野生型固定子と比較して、十分な運動能をもつ Cysteine-less 固定子(PomB-C8A/C10A/C31A; Cysless)が用いられた。この実験では、PomB-M157C/I186C 変異をもつ固定子変異体の運動能を軟寒天培地上と液体中で観察し、還元剤がないジスルフィド結合が形成された環境では運動能がみられない一方で、還元剤 dithiothreitol (DTT) の添加によりジスルフィド結合が形成されない環境では運動能が維持される結果から、仮説が正しいことが示唆された(Zhu *et al.*, 2014)。解析に用いた他の変異体の一つである PomB-I160C/I186C 変異固定子は、PomB-M157C/I186C 変異と同様の結果を示すものの、運動能観察を容易にするために L-Serine を加えたところ PomB-M157C/I186C 変異と異なり、還元剤非存在下での運動能が回復した。L-Serine はビブリオ菌の誘引物質として知られており、CheY のリン酸化カスケードを止めることで、べん毛の回転方向を CCW にすると考えられており、運動能を解析する際に回転方向が切り替わるのを抑制するために用いられていた(Homma *et al.*, 1996)。これらのことから、L-Serine 添加により生じた走化性シグナル応答による回転方向制御の変化がジスルフィド結合形成時に運動能を持たない PomB-I160C/I186C 変異を何らかの機構で抑圧したと考え、本章において解析した。

(I) PomB-I160C/I186C 変異による運動能の阻害と変異体に対する Serine 添加の影響の解析

始めに、L-Serine の効果を確認するために、ビブリオ菌 PomB-I160C/I186C 変異体の運動能に対する、DTT, Phenol (ビブリオ菌の忌避物質), L-Aspartic acid (大腸菌で働く誘引物質) の添加の影響を軟寒天培地上での運動能アッセイをによって調べた(図 5A)。このアッセイでは、 $\Delta pomAB$ 変異により運動能を持たない菌体(Vector) は軟寒天培地上でリングの広がりが見られないが、プラスミドから Cysless 固定子を

発現させ欠損を相補した菌体は運動能を持つため、DTTの有無にかかわらずリングの広がりが見られる。PomB-M157C/I186C 変異体は DTT があると M157C-I186C 間のジスルフィド結合が切れ、固定子が活性化できるため運動能をもつ。本章の解析対象である PomB-I160C/I186C 変異体は DTT があると運動能をもち、DTT がないと運動能を持たないことが明らかとなった。

次に、緩衝溶液中での運動能の観察を行い、DTT, L-Serine, Phenol, L-Aspartic acid の添加の影響を調べた。PomB-M157C/I186C 変異体の運動能解析から、DTT 添加後 30 分程度で motility fraction (全菌体のうちで泳いでいる菌の割合) の上昇効果が十分に表れることから、本研究でも同様に添加物を加えた直後 (1 分) と 30 分後 (30 分) における motility fraction を計測した (図 5B, 5C)。野生型 Cysless 固定子では、添加物の有無にかかわらず一分後では、約 60%の菌体が運動しており、30 分後では 40-60%の菌体が運動していた。一方で、PomB-I160C/I186C 変異体では、何も添加物を加えていない緩衝液中では 1 分後と 30 分後ともに 4%ほどしか遊泳能を持つ菌体が見られなかった。L-Serine を加えた条件では、加えた直後で 40%程度の菌体が遊泳能をもち、30 分後も運動能がやや低下するものの約 20%の菌体が遊泳していた。Phenol を添加した条件は、添加しない場合同様に 4%ほどしか遊泳能を持つ菌体が見られなかった。L-Aspartic acid を添加した条件では 1 分後と 30 分後でそれぞれ 10%程度の菌が遊泳能を獲得していたが L-Serine を添加した条件ほどはっきりとした遊泳能の獲得は見られなかった。一方、DTT を加えた条件では、加えた直後は遊泳能を獲得した菌体の割合が何も添加しない条件と変わらなかった (4%程度) が、30 分経つと 40%以上の菌体が遊泳していた。これらの結果は、運動能がほとんどない PomB-I160C/I186C 変異体において、L-Serine が速やかに、また DTT が緩やかに運動能を回復させる効果があることを示した。

次に、L-Serine 添加による I160C-I186C 間で形成されたジスルフィド結合への影響を *in vivo* の条件でビオチンマレイミド(BM)による標識の程度から解析した。この実験では、酸化的環境でシステインの側鎖のチオール基がマレイミドと反応し不可逆的な共有結合を形成することと、ビオチンにアビジンが結合することを利用し、ビオチンマレイミドを反応させた後、免疫沈降法で精製した固定子に結合したビオチンマレイミドを Streptavidin-conjugated Horseradish peroxidase (HRP)で検出した (図 6A, 6B)。固定子を発現させた菌体の懸濁液に DTT, Phenol, L-Serine (図 6B の long)を添加し、30 min インキュベーション後、緩衝溶液で洗い、ビオチンマレイミドと固定子中のシステイン残基を反応させた。また、L-Serine は、添加後急速に PomB-I160C/I186C 変異体の運動能に影響を与えることを考慮し、L-Serine を加えて 1 min 後に緩衝液で洗い、ビオチンマレイミドを加えて反応を進めるサンプルも用意した(図 6B の short)。菌体内で発現している PomB の量をイムノブロットで評価した。Vector は固定子の発現がない PomB のイムノブロットとして用いた Negative control として、WT-Cysless はビオチンマレイミドの標識が検出されない Streptavidin-conjugated HRP の Negative control として、PomB-M157C/I186C は DTT で反応させた

時にビオチンマレイミドのラベルが検出できる Streptavidin-conjugated HRP の Positive control として用いた。PomB-M160C/I186C 変異において、DTT を添加した時はビオチンマレイミドの標識がみられた (図 6B)。一方で L-Serine や Phenol を添加したサンプルでは標識が検出されなかった。標識後に精製した PomB の量にサンプル間で大きな差はみられなかった。また、L-Serine と反応させた固定子は、洗浄後速やかにジスルフィド結合を形成することも考慮し、L-Serine を加えた状態でビオチンマレイミドと固定子の反応も行った(図 6C)。しかしながら、それでもビオチンマレイミドの標識が精製した固定子から検出できなかった。このことから、PomB-M160C/I186C 変異体の運動能の回復は Serine 添加によるジスルフィド結合の切断による影響ではないことが強く示唆された。

(II) 回転方向制御が異常になる FliG 変異体の単離と解析

(I)より、PomB-L160C/I186C 変異体はジスルフィド結合が生体内で形成されているにもかかわらず、L-Serine により運動能を回復することが示唆された。先に述べたように L-Serine が海洋性ビブリオ菌の誘引物質として働き、べん毛の回転方向を CCW に変化させることから、回転方向が CCW に偏ることが PomB-M160C/I186C 変異体における運動能の回復に寄与すると仮説を立てた。*E. coli* や *S. enterica* における解析で FliG に点変異を導入することにより、回転方向が時計回りまたは反時計回りに偏ることが報告されていたため、海洋性ビブリオ菌の FliG にも同様の点変異を導入し解析することで、回転方向が偏る変異体の単離に着手した(Irikura *et al.*, 1993; Lloyd *et al.*, 1996; Van Way *et al.*, 2004; Mashimo *et al.*, 2007)。また、所属研究室で単離されたビブリオ菌 FliG 変異体の内で、回転方向制御に異常がみられている変異体も同時に解析した(Kojima *et al.*, 2011; Takekawa *et al.*, 2014)。結果的に、CW 方向に回転の偏りが生じる変異体としてビブリオ菌 FliG の Q147H, G204A, G204D, G204S, G215A, E231V 変異、CCW 方向に回転の偏りが生じる変異体として E144D, P188L, E231K, G214S 変異を単離、解析した。また、G204S 変異を単離する過程で、G204S/A218V 変異が偶然単離できたため同様に解析した。また、所属研究室で単離されたビブリオ菌 FliG 変異体のうち、P146L, A220E, A282T, K284E 変異体を解析した。超好熱菌 *Aquifex aeolicus* で解かれた FliG の全長構造中に解析した変異の位置をマップした(Lee *et al.*, 2010; PDB ID: 3HJL; 図 3)。解析には、高輝度暗視野顕微鏡を用いることでべん毛の回転と細胞の進む方向を同時に観察でき、べん毛が細胞を押して泳ぐ様子を CW 回転、細胞がべん毛を引っ張って泳ぐ様子を CCW 回転とした(図 2)。

野生型は 7.6:2.4 の比率で CCW 回転 : CW 回転の割合を示し、観察時間の 10 秒間中で 9.3 回回転方向の切り替えを行った(図 7A, 7B)。P188L, G214S, G204S/A218V 変異体は、9.5:0.5 の比率で CCW 回転 : CW 回転の割合を示し、10 秒間中に 1 から 3 回程度回転方向切り替えを起こしたことから、強く CCW 方向に回転方向の偏りが生じる変異体であると結論付けた。後に A218V 変異体を単離し解析したところ、同様

の表現型を示した。一方で、Q147H, A282T 変異体は 0.5:9.5 の比率で CCW 回転 : CW 回転の割合を示し 10 秒間中に 1~2 回程度回転方向切り替えを起こしたことから、強く CW 方向に回転方向の偏りが生じる変異体であると結論付けた。また、G215A 変異体は、回転方向が CW 方向に固定され、回転方向の切り替えを起こさなかったため、CW のみで回転する変異体であると結論付けた。E144D 変異体は、CCW 回転/CW 回転の割合が野生型と類似した結果を示したが、10 秒間中に 23 回程度回転方向切り替えを起こしたことから回転方向の切り替え頻度が増加する変異体であると結論付けた。それ以外の G204A, G204S, G204D, E231V, K284E 変異体は野生型よりも回転が CW 方向に偏った結果を示したが、Q147H, A282T 変異体ほど強い偏りではなかった。A220E 変異体は、回転方向切り替えの頻度が 10 秒間中に平均して 0.2 回程度と回転方向の切り替え頻度が減少していたが、時計回りと反時計回りの両方向で菌体が遊泳していた。P146L, E231K 変異は回転方向の偏りと切り替え頻度が野生型と類似した表現型を示した。まとめると、単離した 16 変異体を解析し、CW へ強い回転方向偏りがみられる変異体を 3 つ、CCW へ強い回転方向偏りがみられる変異体を 4 つ、回転方向の切り替え頻度が増加する変異体を 1 つ単離した。

(III) CCW 及び CW に回転方向を偏らせる FliG 変異と PomB-L160C/I186C 変異体の運動能の回復

先に立てた「回転方向が CCW に偏ることが PomB-L160C/I186C 変異体における運動能の回復に寄与する」推測を検証するために CCW に回転方向が偏る FliG 変異として G214S 変異を、対照の CW に回転方向が偏る FliG 変異として Q147H 変異を PomB-L160C/I186C 変異と組み合わせ、緩衝溶液中での motility fraction を観察した。先の実験と同様に DTT, L-Serine, Phenol を加える、または何も加えていないサンプルで、添加後 1 分後(1 分)と 30 分後 (30 分) における motility fraction を計測した (図 8A, 8B)。野生型 Cysless 固定子と FliG-G214S 変異を同時に発現させると、一分後では、約 23%の菌体が運動しており、30 分後でも約 20%の菌体が運動していた。DTT または L-Serine を加えた場合、添加直後は約 15%の割合の菌体が、添加 30 分後では 20%の割合の菌体が運動していた。Phenol を加えた場合は、添加直後は約 30%の割合の菌体が、添加 30 分後では約 17%の割合の菌体が運動していた。

また、野生型 Cysless 固定子と FliG-Q147H 変異を同時に発現させると、添加一分後では、約 5%の菌体が運動しており、30 分後では約 12%の菌体が運動していた。DTT を加えた場合、添加直後は約 10%の割合の菌体が、添加 30 分後では 3%の割合の菌体が運動していた。L-Serine を加えた場合、添加直後は約 4%の割合の菌体が、添加 30 分後では 9%の割合の菌体が運動していた。Phenol を加えた場合は、添加直後は約 4%の割合の菌体が、添加 30 分後では約 6%の割合の菌体が運動していた。

PomB-I160C/I186C 変異と FliG-G214S 変異を同時に発現させた菌体では、何も添加物を加えていない緩衝液中では 1 分後に約 7%の割合の菌体が、30 分後では

約 4%の菌体が運動していた。L-Serine を加えた条件では、加えて 1 分後及び 30 分後で 22%程度の菌体が遊泳していた。Phenol を添加した条件は、加えて 1 分後及び 30 分後で 1%ほどしか遊泳能を持つ菌体がみられなかった。DTT を加えた条件では、加えた直後は 5%程度だった遊泳が 30 分経つと約 20%に変化した。FliG 変異があっても、野生型 FliG と同様に L-Serine による運動の回復や DTT によるジスルフィド結合の切断による運動能の回復もみられた。これらの結果は、回転方向が CCW に偏る FliG-G214S 変異が L-Serine がない状態でも PomB-I160C/I186C 変異体の運動を弱く回復させることを示唆した。

PomB-I160C/I186C 変異と FliG-Q147H 変異を同時に発現させた菌体では、何も添加物を加えていない緩衝液中では添加 1 分後及び 30 分後でも 2%の菌体が運動していた。L-Serine を加えた条件では、加えて 1 分後及び 30 分後で 10%程度の菌体が遊泳していた。Phenol を添加した条件は、加えて 1 分後及び 30 分後で 3%ほどしか遊泳能を持つ菌体がみられなかった。DTT を加えた条件では、加えた直後は 2%程度だったが、30 分経つと 11%に変化した。これらの結果は、回転方向が CW に偏る FliG-Q147H 変異では L-Serine や DTT が野生型と同様の効果をもつことを示唆した一方で、G214S 変異でみられた緩衝溶液中での弱い運動能の回復がみられないことを示唆している。

まとめると、PomB-I160C/I186C 変異は、CCW に回転方向が偏った時のみ緩衝溶液中で弱い運動能の回復がみられ、この回転方向の偏りは L-Serine を添加した時と同様の回転方向制御が生じていることから、「回転方向が CCW に偏ることが PomB-I160C/I186C 変異体における運動能の回復に寄与する」という推測は妥当であると考えられる。

(IV) CCW 及び CW に回転方向が固定される変異株における PomB-I160C/I186C 変異体の運動能の回復

(III)の実験では、回転方向が完全に CW または CCW に固定されていない FliG 変異体を用いたため、これまでに単離と解析が済んでいる回転方向がどちらかにしか回らない変異株と PomB-I160C/I186C 変異を組み合わせ解析した。CCW に回転方向が固定されている変異株として NMB136 (Kojima *et al.* 1997)、CW に回転方向が固定されている変異株として NMB102 (Homma *et al.*, 1996)を選択した。NMB136 は *cheY* の null 変異(W57 が stop コドン)により回転方向が CCW に固定されていると考えられている。一方で NMB102 は、FliM の R49P/P51S 変異により回転方向が CW に固定されていることが分かっていた。NMB136 から *pomAB* が欠失された株である NMB195 が既に作成されていたが、NMB102 は *pomAB* を欠失させる必要があったため、suicide vector を使った相同組み換えを利用し、*pomAB* を欠失させた株である SNR1 を作成した。SNR1 に野生型固定子を発現させ、べん毛が時計回りのみで回転することを確認した。

これらの変異株にプラスミドを導入することで、野生型 Cysless 固定子または、PomB-I160C/I186C 変異をもつ固定子を発現させ、緩衝液中での motility fraction を測定した。先の実験と同様に DTT, L-Serine, Phenol を加える、または何も加えていないサンプルで、添加後 1 分後(1 分)と 30 分後 (30 分) における motility fraction を計測した (図 9A, 9B)。CheY を持つ菌体として *pomAB* 欠損株の NMB191 を用いた。NMB191 に野生型 Cysless 固定子を発現させた場合では、化合物添加 1 分後では 60% 程度の菌体が運動しており、化合物を加えなかった場合と大きな差がみられなかった。また、化合物添加 30 分後では、何も加えなかった場合は約 62% の菌体、DTT を加えた場合は約 46% の菌体、L-Serine を加えた場合は約 53% の菌体、Phenol を加えた場合は約 43% の菌体が運動していた。NMB191 に PomB-L160C/I186C 変異をもつ固定子を発現させた場合は、何も加えなかった場合は約 4% の菌体が運動していた。DTT を添加した場合、1 分後では約 4% の菌体が運動していたが、30 分後では約 42% の菌体が運動していた。L-Serine を加えた場合は、添加 1 分後は約 38% の菌体が、添加 30 分後では約 21% の菌体が運動していた。Phenol を添加した場合は、添加 1 分後は約 4% の菌体が、添加 30 分後では約 2% の菌体が運動していた。この結果は、(I) で得られている傾向と一致している。DTT や phenol で運動能に影響がみられた理由として、DTT による細胞の酸化状態の変化、殺菌剤としても用いられる Phenol により細胞に何らかの障害が生じた可能性が考えられる。

野生型 Cysless 固定子を発現させた NMB195 において、添加 1 分後では何も加えなかった場合は約 67% の菌体が、DTT を加えた場合は約 69% の菌体が、L-Serine を加えた場合は約 61% の菌体が、Phenol を加えた場合では約 66% の菌体が運動していた。また、添加 30 分後では、何も加えなかった場合は約 81% の菌体、DTT を加えた場合は約 75% の菌体、L-Serine を加えた場合は約 74% の菌体、Phenol を加えた場合は約 77% の菌体が運動していた。一方で PomB-L160C/I186C 変異をもつ固定子を発現させた NMB195 において、buffer 中では約 20% の菌体が運動しており、30 分後ではその割合が約 8% に減少した。Phenol を添加した場合でも同様の傾向がみられた。DTT を加えた場合、1 分後では約 34% の菌体が運動しており、30 分後にはその割合が約 67% まで上昇した。L-Serine を加えた場合は 1 分では約 63%、30 分後では約 82% の菌体が運動していた。

野生型 Cysless 固定子を発現させた SNR1 では、何も加えなかった場合は約 40% の菌体が、30 分後では約 33% の菌体が運動していた。DTT を加えた場合、1 分後では約 61% の菌体が運動しており、30 分後にはその割合が約 30% まで減少した。L-Serine を加えた場合は 1 分後では約 51%、30 分後では約 35% の菌体が運動していた。Phenol を加えた場合は 1 分後では約 51%、30 分後では約 44% の菌体が運動していた。一方で、PomB-L160C/I186C 変異をもつ固定子を発現させた SNR1 において、buffer 中では 1 分後及び 30 分後で約 11% の菌体が運動していた。Phenol を添加した場合でも同様の傾向がみられた。DTT を加えた場合、1 分後では約 11% の菌体が運

動しており、30 分後にはその割合が約 29%まで上昇した。Serine を加えた場合は 1 分後では約 51%、30 分後では約 27%の菌体が運動していた。

以上の結果は、PomB-L160C/I186C 変異をもつ固定子が発現している菌体のべん毛は、モーターの回転方向が時計回りまたは、反時計回りに固定されることにより L-Serine や DTT がなくても運動能を回復することを示している。また、DTT を添加し、さらに運動能の回復がみられることから、回転方向の固定による運動能の回復そのものはジスルフィド結合の切断によるものではないが、影響を受けることが示唆された。加えて、Serine 添加後 1 分後にさらなる運動能の回復がみられることから、Serine による運動能の回復は、回転方向制御だけではなく、別の機構によっても生じることが示唆された。

(V) *cheY* 欠損株による PomB-L160C/I186C 変異の運動能の回復

NMB195 株を用いた結果から、Serine 添加による PomB-L160C/I186C 変異体の運動能回復には、回転方向制御以外のメカニズムが関与している。その機構を明らかにするため、*cheY* を欠失させて走化性シグナルの無い条件においてこれまでと同様に運動能解析を行った(図 10)。固定子欠損株 NMB191, NMB195 からそれぞれ *cheY* を欠失させた株を作り、SNR2, SNR3 とした。CheY が染色体上から発現する株として NMB191 を実験のコントロールとした。NMB191 のデータは図 9 で用いたものをそのまま図 10 に示している。これらの株に野生型 Cysless 固定子をプラスミドから発現させたところ、SNR2 及び、SNR3 のべん毛の回転は反時計回りのみで回転した一方で、NMB191 のべん毛は回転方向の切り替えが生じた。

SNR2 に野生型 Cysless 固定子を発現させた場合、緩衝溶液中では約 75%の菌体が運動していた。DTT を加えた場合は、添加 1 分後は約 79%の菌体が、添加 30 分後では、約 58%の菌体が運動していた。L-Serine または、DTT を加えた場合は、添加 1 分後は約 70%の菌体が、添加 30 分後では、約 74%の菌体が運動していた。PomB-L160C/I186C 変異を持つ固定子を発現させた場合は、緩衝溶液中では全菌体中の 3%程度の菌が運動しており、30 分経ってもこの割合に変化はみられなかった。DTT を添加した場合は、添加直後約 6%だった motility fraction が 30 分後に約 41%に増加した。L-Serine を添加した場合は添加直後全菌体中の 24%程度の菌体が遊泳しており、30 分後は全菌体中の約 32%の菌体が運動していた。Phenol を加えた場合は、添加 1 分後は約 2%の菌体が、添加 30 分後では、約 3%の菌体が運動していた。

SNR3 に野生型 Cysless 固定子を発現させた場合、緩衝溶液中では 65%程度の菌体が運動していた。DTT を加えた場合は、添加 1 分後は約 66%の菌体が、添加 30 分後では、約 47%の菌体が運動していた。L-Serine を添加した場合は、添加 1 分後、30 分後ともに約 59%の菌体が運動していた。DTT を加えた場合は、添加 1 分後は約 67%の菌体が、添加 30 分後では約 62%の菌体が運動していた。PomB-L160C/I186C 変異を持つ固定子を発現させた場合は、緩衝溶液中及び、Phenol を添加した場合で全菌体中の 6%程度の菌が運動しており、30 分後では 4%程度の菌体が運動していた。DTT

を添加した場合は、添加直後約 6%だった motility fraction が 30 分後に約 38%に増加した。L-Serine を添加した場合は添加直後全菌体中の 36%程度の菌が遊泳しており、30 分後も同様の割合を示した。

以上の結果から、PomB-L160C/I186C 変異を持つ固定子を発現させた場合、NMB195 株では緩衝液中において運動能が回復していたにも関わらず、CheY を欠失させると緩衝液中でも運動能が回復しなくなることがわかった。すなわち、回転方向が時計回りまたは反時計回りのどちらかに固定されていても、CheY が発現していないと運動能回復がみられないことが明らかになった。CheY が発現していなくても L-serine により運動能が回復することから、PomB-L160C/I186C 変異で生じる L-Serine による運動能の回復は、走化性シグナルにより回転方向が反時計回りに偏ることと、CheY を介さない別の機構によって生じることが明らかとなった。

第二章 回転方向が偏った回転子構成タンパク質 FliG 変異体の構造変化の解析

第一章では、ビブリオ菌 FliG の点変異で回転方向制御が異常になる変異体を単離した。得られた変異は、回転方向が時計回りに偏る Q147H, A282T 変異、反時計回りに偏る P188L, G214S, A218V 変異、回転方向に偏りはみられないものの回転方向切り替えの頻度が増加する変異として E144D 変異、回転方向が時計回りに固定される変異として G215A 変異である(図 7A, 7B)。本章ではこれらの変異体で回転方向制御に異常が生じた原因を明らかにすることを目的とし、核磁気共鳴法(NMR)、分子動力学(MD)シミュレーション、Cryo-electron tomography (Cryo-ET)法を利用して、変異により生じる FliG や C-ring の構造変化の解明を目指した。

(I) EHPQR-motif によるモーターの回転方向の制御

第一章で単離された回転方向制御に異常がみられる FliG 変異の中で E144D 変異においてのみ回転方向切り替え頻度の増加がみられた。E144 残基は、FliG_M 中の EHPQR-motif に属する残基であることから、FliG-FliM 間の相互作用に変化が生じることにより、FliM への CheY の結合/解離によって引き起こされる回転子の構造変化が FliG に正しく伝わらないことが推測できる。第一章で、EHPQR-motif の変異体として P146L, Q147H 変異体が解析されており、過去の研究で R179H 変異によりべん毛が形成されず運動能を失うことが明らかになっている(Kojima *et al.*, 2011)。E144 残基と、ビブリオ菌 FliG の EHPQR-motif 中で解析がなされていない H145 残基のモーターの回転方向制御への寄与を明らかにするために、これらの残基にいくつかの点変異(E144A, E144S, E144Q, E144N, E144W, H145E, H145W)を導入し軟寒天培地上での運動リング形成を検討することで、運動能を調べた(図 11A)。解析には *fliG* を部分欠失させた菌株(NMB198)を宿主として用い、プラスミドから FliG を発現させた。Positive control として用いた野生型(WT)FliG ではリングの広がりが見え運動能がある一方で、Negative control として用いた Vector と R179H 変異体では、リングの広がりもなく運動能がない。E144D, E144N 変異体はリングの広がりが見られたことから運動能があることが分かった。一方で、E144A, E144S, E144Q, E144W, H145W, H145E 変異体はリングの広がりが見られず、運動能がないことが明らかとなった。

菌体が運動しているか確かめるために motility fraction を計測した(図 11B)。野生型遺伝子を発現している菌では、全菌体中の約 40%の菌体が遊泳していた。E144D 変異体は約 38%の菌体が、E144N 変異体は 3%の菌体が、E144Q 変異体では 1%の菌体が運動していた。E144S, E144W, H145E, H145W, R179H 変異体は運動している菌体が観察されなかった。

次に、これらの変異体にべん毛が生えているかを確認した。極べん毛を認識する抗べん毛抗体を一次抗体として作用させ、蛍光物質であるローダミンが結合している二次抗体をもちいて、蛍光顕微鏡観察で得られる像から全菌体中でべん毛の

生えている菌体の割合を算出した(図 11C)。WT では約 27%の菌体にべん毛が生えており、vector と R179H 変異体ではべん毛が生えている菌体がいなかった。E144A 変異体が約 7%, E144D 変異体が約 13%, E144N 変異体が約 9%, E144S 変異体が約 5%, E144Q 変異体が約 6%, E144W 変異体が約 7%の割合でべん毛が生えていた。H145E 変異体では全菌体中の約 5%にべん毛を持つ菌体がみられたが、H145W 変異体はべん毛を持つ菌体が見られなかった。これらの結果は、EHPQR-motif がモーター回転方向の制御を担うだけでなく、べん毛形成及びモーターの力発生に重要であることを示している。

(II) E144D 変異による生じる異常な回転方向制御の原因解明

(I)の解析から E144D 変異のみが野生型とほぼ変わらない運動能をもつことが明らかになった。E144D 変異が回転方向切り替え頻度が増加する機構解明を目指すことにした。始めに E144D と G214S(CCW への回転方向の偏り), G215A(回転を CW 方向に固定), A282T (CW への回転方向の偏り)変異をそれぞれ組み合わせた二重変異体を作成した。べん毛の回転方向と回転方向切り替えの頻度を高輝度暗視野顕微鏡により解析した(図 12A, 12B)。野生型 FliG, E144D, G214S, G215A, A282T 変異のデータは(図 7)と同じものを用いた。E144D/G214S 変異体は 8.0:2.0 の比率で CCW 回転 : CW 回転の割合を示し、観察時間の 10 秒間中で 11 回回転方向の切り替えを行った。E144D/A282T 変異体は、7.0:3.0 の比率で CCW 回転 : CW 回転の割合を示し、観察時間の 10 秒間中で 20 回回転方向の切り替えを行った。E144D/G215A 変異体は、泳いでいる菌体がいなかった。これらの結果から、G214S 変異が E144D 変異の効果を打ち消し、E144D 変異は A282T 変異に対して上位のエピスタシスを示すことが分かった。E144D/G215A 変異は変異 FliG は発現しているが、二重変異により FliG の機能が失われ、べん毛形成あるいはモーターの力発生に欠損が生じたと推測された。

次に、FliM に対する CheY の結合/解離を介した走化性シグナルの伝達に E144D 変異が与える影響を解析するため、L-Serine を加えて回転方向の切り替え頻度を数えた(図 12C)。野生型 FliG を発現させた菌体は L-Serine の濃度が増加するほど回転方向切り替えの頻度が低下し、2.0mM や 5.0mM ではほとんど回転方向切り替えを起こさずモーターの回転を CCW にして遊泳していた。E144D 変異を発現させた菌体は、L-Serine の濃度が増加すると回転方向切り替えの頻度が減少するものの、2.0mM や 5.0mM 添加時でも回転方向切り替えが 10 秒中 12 回程度生じた。このことは、E144D 変異では走化性シグナルが正常に伝達されないために回転方向切り替え頻度が増加してしまうことを示唆している。

(III) MD シミュレーションによる変異により生じる FliG の構造変化の計算

得られた変異により、モーターの回転が時計回りに偏っている時と反時計回りに偏っている時で FliG の構造にどのような違いがあるのかを明らかにするため

MD シミュレーションを行った。シミュレーションを行うためには構造情報が必要であるが、これまでにビブリオ菌 FliG の全長または部分構造の情報は全く取得できていない。そのためビブリオ菌 FliG のホモログである *Thermotoga maritima* (*T.m.*) の FliG と FliM の共結晶構造(Vartanian *et al.*, 2012; PDB ID: 4HFR)をもとにしてシミュレーションを行った。この結晶構造中の FliG はアミノ酸 188-194 が disorder しているため、この領域をコンピュータ上で構築し、FliG_Mと FliG_Cを含む D113-M235(ビブリオ菌 FliG では W131-M253)のモデル化を行い、その構造からシミュレーションを行った(図 13)。回転方向制御が異常になる変異の例として E144D, G214S, G215A 変異を選択した。これらの変異体は、*T.m.* FliG では E126D, G196S, G197A 変異に対応する。

始めに、これらの変異体断片と野生型断片で生じる構造の揺らぎをコンピュータ上で計算し、初期構造からの変化を調べた(図 14)。図 14A では、横軸に初期構造(結晶構造)からの変化を示す Root Mean Square Deviation (RMSD)を、縦軸にその頻度を示した。野生型ではシャープなピークがみられなかった一方で、各変異体では RMSD の値が異なるもののピークがみられた。このことは、野生型断片は構造の揺らぎが大きく特定の構造をとることを好まないことを示している。これに対して、各変異体はそれぞれ違った特定の構造を取りやすいことを示唆している。これらの変異体が好む特定の構造の類似性を比較するために計算で得られたそれぞれの最終構造 3000 個に対する主成分分析を行った(図 14B)。分析結果のマッピングでは、青色の点一つ一つが最終構造を示し、同様の傾向をもつ構造が増えるほど赤色になる。初期構造をマップ中の紫色の点で示した。特定の構造を好まない野生型では、青色や水色の分布がみられた。E126D 変異体は、初期構造とは異なった特定の構造を好み揺らぎが少ないことが明らかとなった。G196S 変異体も特定の構造を好むことが明らかとなったが、それは初期構造から小さく構造変化した状態と推測された。G197A 変異体は、WT と同様に特定の構造を好まないことが分かった一方で、マップの形の違いから構造の揺らぎが野生型断片と異なることが明らかとなった。

次に、これらの変異によりどの領域に構造変化が起きているかを調べた(図 15)。図 15A では、縦軸に構造の揺らぎの度合いを示す指標として初期構造から揺らいだ距離の二乗平均平方根(Root mean square fluctuation, RMSF)を、横軸に FliG_{MC}断片の残基番号を示した。野生型と比較すると、それぞれの変異体において helix_{MC}(α_{M5})とこの領域をつなぐリンカー領域(N 末側を L_N, C 末側を L_Cと定義)に RMSF に違いがみられた。変異が導入されている G196, G197 残基は L_Cに存在することから、この結果は妥当なものであると考えられる。この領域の構造の揺らぎの程度を明らかにする際に、計算上で得られた構造 3000 個で L_N-L_C間、L_C- α_{M5} 間でそれぞれ形成される水素結合の数を数えた(図 15B)。水素結合の形成が多くなるほど、構造の揺らぎが少なくなると考えられる。野生型と比較すると、G196S 変異体は L_N-L_C間、L_C- α_{M5} 間のどちらも水素結合の形成が増加した。このことは、G196S 変異体によりこれらの領域の構造的揺らぎが減少していることを示唆している。一方で、

G197A 変異体は、L_N-L_C 間の水素結合が増加したものの、L_C- α _{M5} 間の水素結合が減少した。このことは L_N 領域の構造的揺らぎが G197A 変異体により増加したことを示唆している。E126D 変異体は、G196S 変異体と同様の傾向を示した。E126 残基は α _{M1} に存在しており構造中では α _{M5} の近傍に存在する(図 13)。このことから、126 番目の Glu が Asp に置換されることで α _{M5} との水素結合の形成が変化したために、間接的に L_N-L_C 間、L_C- α _{M5} 間の水素結合の形成に影響を与えたことが考えられた。

helix_{MC} の構造変化は、FliG_M と FliG_C の分子内/分子間相互作用を変化させることで FliG の構造変化とモーターの回転方向の制御を担うため、変異により FliG_M に対する FliG_C の立体配置が変化すると考え、計算で得られたそれぞれ 3000 個の構造から V195-G196(C _{α 195}), G196-I197(C _{α 196})間に形成されるペプチド結合主鎖の二面角の柔軟性を検討した(図 16)。縦軸に C _{α} -C 結合のとりうる角度 ψ (psi)を、横軸に C _{α} -N 結合のとりうる角度 ϕ (phi)をとり、図 16A では C _{α 195} の二面角、図 16B では C _{α 196} の二面角の取りうる角度をプロットした。C _{α 195} の二面角において、野生型、E126D 変異体、G197A 変異体は取りうる二面角が 2 点($\psi, \phi = 0^\circ, -100^\circ$ & $150^\circ, -125^\circ$)に集約された一方で、G196S 変異体では 1 点($\psi, \phi = 0^\circ, -100^\circ$)のみに集約された。また C _{α 196} の二面角において、野生型と E126D 変異体は 2 点($\psi, \phi = -180^\circ, -100^\circ$ と $150^\circ, 100^\circ$)に集約された。G196S 変異体では 1 点($\psi, \phi = 150^\circ, -100^\circ$)に、G197A 変異体では 2 点($\psi, \phi = 100^\circ, -100^\circ$ と $50^\circ, 150^\circ$)に集約された。これらの結果は、G196S, G197A 変異が C _{α 195} 及び C _{α 196} の二面角の取りうる角度に立体障害を与えていることを強く示唆している。また、G196S 変異と G197A 変異で生じた立体障害が異なるため、違った構造状態を好むことも示唆された。E126D は回転方向の切り替えが可能なたため、C _{α 195} 及び C _{α 196} の二面角の取りうる角度に大きな立体障害がみられなかったと考えた。

これらの結果をまとめると G196S, G197A 変異は helix_{MC} 周辺の構造的揺らぎを変化させたことで、C _{α 195} 及び C _{α 196} の二面角の取りうる角度に制限が生じ、FliG_M に対する FliG_C の相対配置を変化させたために回転方向の偏りを生み出したと考えられる。E126D ではそのような立体障害はおきていないことから方向転換が自由にできることが分かった。

(IV) NMR による FliG_{MC} 断片の構造変化の解析

これまでに、ビブリオ菌 FliG はタンパク質の結晶を得る最適な条件を見つけることができておらず、結晶構造解析が進んでいない。しかしながら、タンパク質の精製方法は確立されている為、安定同位体で標識した FliG_M と FliG_C を含む FliG_{MC} 断片を NMR により解析した。用いた FliG_{MC} 断片は、ビブリオ菌 FliG の G122-L351 が含まれており、N 末端側に His₆ タグが付いている。このコンストラクトをクローン化したコールドショックベクターを大腸菌株 BL21(DE3)に導入し組み換えタンパク質を大量発現させ、His タグ affinity chromatography とゲル濾過 chromatography によりタンパク質を精製した(図 17)。¹⁵N 標識した野生型断片と E144D, G214S, G215A 変異断

片の TROSY HSQC スペクトルを取得した(図 18)。図 18 では一つの点がアミドのシグナルを表しており、縦軸に ^{15}N のシグナルの位置(ppm)、横軸に ^1H のシグナルの位置(ppm)を示した。精製した FliG_{MC} 断片は 230 分子のアミノ酸からなるため、構造の揺らぎがないと仮定した場合、少なくとも 230 個のシグナルが検出されるはずである。野生型では、広幅化したシグナルが多く、感度の悪い不明瞭なスペクトルが得られた。E144D 変異でも野生型断片と同様の傾向が得られた。一方で、G214S, G215A 変異では、精鋭かつ高感度なシグナルが多く観測された。このことは、野生型及び、E144D 変異で複数の構造をもつと考えられる FliG_{MC} 断片が変異により構造的揺らぎが減少したため特定の構造を取りやすくなることを示唆しており、MD シミュレーションで得られた結果を支持している。Q147H, A218V 変異体も野生型や E144D 変異体で得られたシグナルと類似した結果が得られた。

(V) *cheY* 欠損株における変異 FliG が回転方向に与える影響の解析

E144D 変異により生じる走化性シグナルの伝達の異常や G214S, G215A 変異により生じる FliG の構造変化と CheY による回転方向制御の関連性を調べるため、*cheY/fliG* 欠損株(NMB318)にプラスミドから変異 FliG を発現させ、モーターの回転方向を解析した(図 19)。野生型 FliG を相補した場合は CheY が発現しないため、CheY-P が FliM に結合できず、モーターの回転方向が反時計回りに固定される。E144D, Q147H(CW への回転方向の偏り、変異が EHPQR-motif 上に存在), G214S, A282T(CW への回転方向の偏り、変異が FliG_C 上に存在)変異体はモーターの回転方向が CCW に固定された。一方で G215A 変異体は、モーターの回転方向が CW に固定された。このことから、G215A 変異をもつ FliG は CheY 非依存的に CW の構造をとることが示唆された。一方で E144D, Q147H, G214S, A282T 変異で生じるモーターの一時的な CW の回転及び CW の偏りには CheY が必要であることが明らかとなった。

(VI) Cryo-ET 法による *in situ* での回転子の構造変化の解析

MD シミュレーションや NMR による解析により、コンピュータ上もしくは液体中での FliG の構造変化を明らかにすることができた。しかし、菌体中で FliG を含む回転子はリングを構成している為、リング上で構造変化を明らかにする必要がある。そこで、Cryo-ET 法により急速凍結させた菌体の回転子の構造情報の取得を試みた。この方法では、緩衝溶液中で運動しているビブリオ菌をグリッドにのせ、余分な水分を濾紙取り除き、液体エタン中で凍結させて、薄く厚さが均一な氷中に包埋した菌体サンプルを作成する。このグリッドを極低温電子顕微鏡 Taitan Kiros (300kV, FEI)で観察し、べん毛を持つ菌体の画像を角度を変えながら撮影する。取得した画像をアライメントし、三次元再構成することにより Cryo-tomogram を作成する。作成した tomogram から回転子を集めて、その密度を平均化することにより、ノイズと比較して構造的な揺らぎが少ない部分がはっきりと見えるようになることを利用して構造解析を行った。

ビブリオ菌はべん毛を極に 1 本だけできるように制御する仕組みを備えているが、一細胞に複数べん毛が形成されるとデータの取得効率が改善され则认为た。過去に、べん毛の本数を負に制御する遺伝子 *flhG* が解析され *flhG* を欠損した KK148 株では細胞の極に複数のべん毛が形成されることが分かっている(Kusumoto *et al.*, 2006)。回転方向が CW または CCW に偏っている状態での回転子の構造を明らかにするためにこの株から *fliG* を部分欠失させ(NMB328)、時計回りの回転子の構造を得るために FliG-G215A 変異体を、反時計回りの回転子の構造を得るために FliG-G214S 変異体を、プラスミドからそれぞれ発現させた。細胞質は物質が密に詰まっており、細胞質中の回転子と細胞質の電子線のコントラストが付きにくい。そこで、Voltage Phase plate を導入することでコントラストを明瞭にし、この問題を改善した。得られたトモグラムの代表的な切片を図 20 に示した。これらのトモグラム中の回転子をそれぞれ約 1000 個集めてきて平均化処理を行った(図 21)。得られたイメージを元にしてレンダリングモデルを作成した。G214S 及び、G215A 変異で得られたレンダリングモデル中の C-ring の FliG に相当する部分(図 1B 参照)の密度に違いがみられた。また、G215A 変異体のみ FliM に相当する部分の外側に CheY と考えられる不明瞭な密度がみられた。これらの結果から、*in situ* での CCW に偏った状態の回転子と CW に偏った状態の回転子の構造的な差異を、世界で初めて明らかにすることに成功した。

第三章 固定子 PomA-PomB 複合体のイオン透過による複合体構造変化の解析

最近、ビブリオ菌固定子 PomAB 複合体を大腸菌内で大量に発現させ、これまで用いられていた界面活性剤とは異なる Decyl Maltose Neopentyl Glycol (2,2-dioctylpropane-1,3-bis- β -D- maltopyranoside, DMNG)を用いて膜を可溶化することにより、高い再現性で複合体を解離させずに純度よく精製することが可能になった (Onoue *et al.*, 2019)。この新しい精製方法の確立により、これまで *in vivo* での解析が中心であった固定子の機能解析に関して、*in vitro* の実験系から新しい知見を見出すことが期待されるだけでなく、これまでにほとんどわかっていない固定子複合体の原子レベルの構造情報の取得への寄与が期待されている。先行研究(岩月 2018 年度修士論文)として行われた成果として、機能がよくわかっていない PomB プラグ領域 (44-58)の機能を明らかにするため、プラグ欠失固定子(WT-PomA/PomB $_{\Delta L}$ -His₆ (=PomB $_{\Delta 41-120}$ -His₆))を精製することで解析が行われた。始めに、固定子複合体の新しい精製方法を用いて、プラグ欠失固定子の精製が試みられた。確立された方法ではコールドショックベクターに野生型 *pomA* と *pomB-his₆* がオペロンでクローンされているプラスミドを用いており、このプラスミドから PomB の 80 残基(41-120)を部分欠失させたプラスミドを作成し、精製に用いている。膜画分を DMNG で可溶化後、Na⁺を含む緩衝溶液中で His タグ affinity chromatography (His 精製)により固定子複合体の精製を試みたが PomB $_{\Delta L}$ -His₆ から PomA が解離してしまったため精製できなかった。プラグ欠失固定子を過剰発現した菌体では、プラグ欠失により固定子内を常にイオンが透過し細胞の生育が阻害されることが分かっている。これらを踏まえて、固定子内を Na⁺イオンが流れてしまうことにより PomA と PomB の相互作用が弱まり PomB $_{\Delta L}$ -His₆ から PomA が解離してしまうと考えられた。一方、PomA-D31C/野生型 PomB 固定子を発現したビブリオ菌は、運動に高い Na⁺濃度を必要とすることが分かっている。岩月 2018 年度修士論文では、PomA-D31C を導入したプラグ欠失固定子で同様に His 精製を行った結果、野生型固定子複合体と同じ画分に PomA-D31C 変異体と PomB $_{\Delta L}$ -His₆ が溶出されることを確認した。この結果から先の推測が妥当であることが考えられる。

本章では、岩月 2018 年度修士論文の結果を引き継ぎ、PomB プラグ領域(44-58)の機能を明らかにするため、プラグ欠失固定子の解析を進めた。

(I)K⁺を含む緩衝溶液による野生型プラグ欠失固定子の精製

岩月 2018 年度修士論文では、細胞の懸濁から His 精製までを Na⁺を含む緩衝溶液を用いてプラグ欠失固定子(WT-PomA/PomB $_{\Delta L}$ -His₆)の精製が試みられている。Na⁺の透過により PomA と PomB の相互作用が弱まる推測が正しければ、Na⁺を共役イオンでない K⁺に置換して精製すれば、PomA と PomB のタイトなパッキングが維持されることで PomB $_{\Delta L}$ -His₆ から PomA が解離せず、精製に成功すると考え、検証を行った。プラグ欠失固定子が発現した菌体を K⁺を含む緩衝溶液中で破碎し、得られた膜画分

を界面活性剤 DMNG で可溶化後、PomB_{ΔL}-His₆ を TALON レジンを用いた His タグ affinity chromatography により精製した。精製後、タンパク質をクマシーブリリアントブルー (Coomassie Brilliant Blue、CBB) 染色した結果を示した(図 22A)。affinity chromatography では、K-elution buffer により TALON レジンから PomB_{ΔL}-His₆ を溶出させる操作(Elution fraction 4-8 ml)において、25 kDa と 32 kDa の分子量マーカーの間に PomB_{ΔL}-His₆ (分子量 26.5 kDa)に由来するバンドが得られた一方で、22 kDa の分子量マーカーの付近で検出される PomA に由来するバンドが得られなかった。PomA が共精製されているか検証するために、抗 PomA 抗体を用いたイムノブロットを行った(図 22B)。Elution fraction 4-8 において PomA が検出できたものの、TALON レジンでの溶出(TALON elution)や TALON レジンを洗う操作(Wash fraction)で得られる画分に PomA が多く検出されたことから、ほとんどの PomA が PomB_{ΔL}-His₆ から解離してしまったことが明らかとなった。この結果は、プラグ領域の欠失により PomB_{ΔL}-His₆ から PomA が解離することは共役イオンの存在に依存しないことを示唆している。

(II) PomB-D24N 変異によるプラグ欠失固定子の複合体形成への影響

PomB-D24N 変異を持つ PomA/PomB 固定子複合体では、変異により D24 残基に Na⁺が結合できなくなることがわかっている(Sudo *et al.*, 2009)。この変異固定子は回転子周囲に集合できず、菌は運動能を完全に失うことがわかっている。プラグ欠失固定子を過剰発現すると Na⁺が細胞内に過剰に流入し、菌の生育が阻害されるが、D24N 変異により阻害が解除されることから、D24N 変異を持つプラグ欠失固定子は、イオン透過能を持たないことが分かっている(Li *et al.*, 2011; Takekawa *et al.*, 2013)。イオン透過活性が低く、運動に高い Na⁺の濃度を必要とする PomA-D31C 変異を導入したプラグ欠失固定子(PomA-D31C/ PomB_{ΔL}-His₆)は精製できたため、PomB-D24N 変異を導入したプラグ欠失固定子(WT-PomA/ PomB_{ΔL}-His₆-D24N)が精製可能か検証した(図 23)。PomB-D24N 変異を導入したプラグ欠失固定子が発現している菌体を破碎し、膜画分を DMNG で可溶化後、Na⁺を含む緩衝溶液を用いて PomB の C 末に付加した His タグを利用した affinity chromatography により固定子複合体を精製した。サンプル中のタンパク質を SDS-PAGE により分離して CBB 染色した結果を示した(図 23A)。どちらのサンプルでも、Elution fraction 6-10 において、分子量 25 kDa と 32 kDa の分子量マーカーの間に PomB_{ΔL}-His₆(分子量 26.5 kDa)に由来するバンドが得られた。同じ画分に、分子量 22kDa 付近のマーカーの位置に PomA(分子量 27.7 kDa)に由来するバンドと、分子量 46 kDa 付近のマーカーの位置に PomA dimer に由来するバンドが検出できた。このことは、D24N 変異の導入により PomA が PomB_{ΔL}-His₆ から解離しにくくなったことを強く示唆している。

PomA と PomB_Δ-His₆-D24N が複合体を形成しているか確認するため、サンプルをゲル濾過 chromatography により精製した(図 23B)。比較のために PomB-D24N 変異固定子(WT-PomA/ PomB-His₆-D24N)もこれまでと同様の方法で精製した。精製に用いた緩衝溶液は先行研究で用いられた K⁺を含む緩衝溶液を用いた。D24N 変異をもつ

プラグ欠失固定子は、溶出位置 10.50 ml にシングルピークが得られ、ほかの溶出位置では目立ったピークが検出されなかった。PomB-D24N 変異固定子は、溶出位置 7.71 ml と 10.11ml にピークが得られた。ゲル濾過 chromatography で得た画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE により分離し、CBB 染色した(図 23C, 23D)。D24N 変異をもつプラグ欠失固定子(破線)では、先の溶出位置に対応する elution fraction 10, 11 に PomB_{ΔL}-His₆ と PomA に由来するバンドが検出できた。D24N 変異固定子(実線)では、溶出位置 10.11ml の溶出位置に対応する elution fraction 9, 10 に PomB_{ΔL}-His₆ と PomA に由来するバンドが検出できた。この結果は、PomB-D24N 変異を導入したプラグ欠失固定子は複合体を形成した状態で精製できることを示している。

(III)ATR-FTIR によるイオン透過経路に対するプラグの影響の検証

全反射吸光度測定法フーリエ変換赤外分光光度計(ATR-FTIR)による解析から、PomA, PomB からなるビブリオ菌固定子は PomB-D24 残基以外にも Na⁺が結合する領域が存在すると考えられているがその詳細はよくわかっていない(Sudo *et al.*, 2009; Onoue *et al.*, 2019)。固定子複合体の膜ヘリックス内の Na⁺の透過路とペリプラズム領域のイオン相互作用部位を探索するために、PomB-D24N 変異を導入したプラグ欠失固定子を ATR-FTIR で解析した。この解析では、タンパク質に赤外線を照射することでタンパク質中の双極子モーメントの変化に伴う分子振動を誘起する。照射した赤外の吸収バンドの数と位置から官能基を同定することができるため、Na⁺が結合する残基を同定することが可能であり、PomB-D24 残基と Na⁺の結合がこの方法で証明された。図 24 に PomB-D24N 変異を導入したプラグ欠失固定子の測定結果を示した。野生型と D24N のピークは Onoue *et al.*, 2019 で報告されたデータを引用した。上段は 20mM Na⁺存在下、中段は K⁺存在下、下段は Na⁺で得られたバンドから K⁺を差し引いたピークを示した。下段の野生型では固定子への Na⁺の結合に伴う構造変化を示すスペクトル差が検出された。D24N 変異を導入した固定子では D24 残基への Na⁺の結合が起こらず、構造変化ができなかった。PomB-D24N 変異を導入したプラグ欠失固定子でも D24N 変異を導入した固定子と同様にピークが消失した。この結果は、プラグ領域を含む PomB の 80 残基を PomB-D24N 変異を持つ固定子から欠失させても、固定子への Na⁺の結合による構造変化が起きないことを示唆している。

考察

本論文の考察は、回転子の解析(I)と固定子の解析(II)の2つの項に大きく分けた。

(I)回転方向制御における回転子の構造変化

べん毛モーターは、時計回りと反時計回りの両方向に回転できる。その回転方向は、走化性因子の一つである CheY のリン酸化(CheY-P)による FliM への結合と CheY-P の脱リン酸化による FliM からの解離によって制御されていると考えられている(図 2)。モーターの回転力は FliG と固定子の A サブユニット(ビブリオ菌では PomA)の相互作用により生じると考えられている(図 1B)。しかしながら CheY-P の結合/解離により生じる FliM の構造変化がどのように FliG に伝わるのか、またその際に生じる FliG の構造変化が回転方向の切り替えを引き起こすのかについては、よくわかっていなかった。結果の第一章では、回転方向が異常になる変異体を単離し、第二章ではそれらの変異体の回転方向制御を解析することで回転方向切り替えの際に生じる回転子の構造変化を調べた。

大腸菌 FliG、サルモネラ菌 FliG の解析から回転方向制御に異常がみられる点変異 10 個をビブリオ菌 *fliG* に導入したところ、6 個の変異体で期待された表現型がみられなかった(図 7)。このことは、大腸菌やサルモネラ菌で回転方向制御に影響を与えるアミノ酸残基のいくつかはビブリオ菌での回転方向制御に積極的に寄与しないことが示唆している。これは、H⁺型モーターと Na⁺駆動型モーターで回転方向制御や固定子回転子間相互作用の仕組みが完全に一致しないことを示唆している。また、過去に研究室で単離させた FliG 変異体を含めた 16 変異体のうち、回転方向制御に異常がみられた変異体について、得られた構造情報をもとにして考察した。

運動能を持たない PomB-L160C/I186C 変異体が運動能を再獲得する分子機構

PomB-L160 と I186 残基をシステインに置換した二重変異体(PomB-L160C/I186C)はシステイン側鎖のチオール基がジスルフィド結合を形成することで PomB_C の構造変化が阻害され運動能が失われることが分かっており(Zhu *et al.*, 2014)、解析をしている中で L-Serine の添加により運動能が回復することが偶然見つかった。この変異体を、改めて解析したところ、ジスルフィド結合が形成されているにもかかわらず、L-Serine 添加後すぐに運動能を回復することが明らかとなった(図 5, 6)。L-Serine がビブリオ菌のべん毛モーターの回転方向を反時計回りに偏らせる働きのある誘引物質であることが分かっていたため(Homma *et al.*, 1996)、L-Serine の誘引効果を模倣する変異として、反時計回りに回転方向が偏る FliG-G214S 変異と PomB-L160C/I186C 変異を組み合わせた結果、L-Serine の非存在下で運動能を再獲得した(図 8)。また、モーターの回転を時計回りまたは反時計回りのどちらかで回転する変異株と組み合わせた場合でも運動能を再獲得した(図 9, 10)。これらの結果は、PomB-L160C/I186C 変異を持つ固定子はモーターの回転方向が反時計回りに偏る、または回

転がどちらかに固定されることにより運動能を再獲得することを示している。大腸菌固定子の解析では、運動能を持たない MotB 変異が FliG または FliM の変異により運動能を再獲得することが報告されている(Garza *et al.*, 1996)。この報告と本研究で得られた結果から、FliG 変異により固定子-回転子間相互作用に変化が生じることで、B サブユニットの変異による固定子の機能異常が抑圧され、回転できるようになったと推測される。固定子回転子間相互作用の実態は、相互作用に寄与する PomA と FliG の荷電残基が明らかになっているだけでほとんどわかっていない。本研究の結果は、多段階あると考えられる固定子回転子間相互作用のある瞬間の状態を捉えており、B サブユニットの構造変化が A サブユニットに伝わることで生じる固定子と FliG の相互作用の変化のうちの一つの現象を明らかにしているのかもしれない。モーター変異により回転方向に偏り、もしくは回転方向の固定が生じている状況でさらに L-Serine を加えると運動能が回復した事実は、PomB-L160C/I186C 変異を持つ固定子の運動能の再獲得は回転方向制御以外の別のメカニズムが冗長的に寄与していることを強く示唆している。しかしながら、そのメカニズムは、走化性シグナルを介さないものであること以外の具体的なことを明らかにすることができなかった。ビブリオ菌はアミノ酸を受容する化学感覚受容体を数十種類持っていることが分かっており、L-Serine の受容体を同定することができれば、解析を進めることができるかもしれない。

回転方向制御とべん毛形成における EHPQR-motif の役割

FliM と相互作用することが分かっている FliG EHPQR-motif の内、E144D 変異は回転方向の切り替え頻度が増加していた(図 7, 12A)。この現象が、FliG 自身の構造変化によるものなのかどうかを明らかにするために、MD シミュレーションと NMR による解析を行ったところ、E144D 変異をもつ FliG は野生型 FliG と同様に構造が大きく揺らいでいることが示唆された(図 14-16, 18)。誘引物質 L-Serine への応答の解析では、E144D 変異をもつ FliG を発現した菌体は、走化性シグナルが正しく伝わらないために高い L-Serine の濃度でも回転方向を切り替えることが示唆された(図 12B)。*cheY* 欠損株を用いた解析から、FliG-E144D 変異をもつべん毛が時計回りに回転するためには CheY の発現が必要であることが分かっている(図 19)。このことは、E144D 変異をもつ FliG は FliM と CheY の相互作用に影響を与えていることを示唆している。具体的には CheY-P が FliM に結合しやすくなり、なおかつ CheY-P が脱リン酸化しなくても FliM から解離しやすくなっていると推測される。そのために、E144D 変異体は、時計回りと反時計回りの回転時間の割合が WT と類似している一方で回転方向切り替え頻度が増加すると考えている。

Q147H 変異は、モーターの回転に時計回りの偏りを与えた (図 7)。NMR による Q147H 変異をもつ FliG_{MC} 断片の解析結果は、Q147H 変異体も野生型や E144D 変異体と同様に構造が大きく揺らいでいることを示唆している(図 18)。*cheY* 欠損株を用いた解析では、Q147H 変異体は反時計回りにモーターの回転が固定されたことから、Q147H 変異を持つ C-ring が時計回りに回転するには CheY が FliM に結合する必要で

あることが示唆された(図 19)。このことから、Q147H 変異体も E144D 変異体と同様に、変異が FliM と CheY の相互作用に影響をあたえていると考えられる。おそらく、CheY-P が FliM に結合しやすくなり、なおかつ CheY-P が FliM から解離しにくくなっていると推測される。

E144D 変異による表現型の原因を探るために、E144D 変異以外の E144 残基の変異作成を行った。いずれの変異体も運動能とべん毛の形成に異常がみられた(図 11)。H145 の変異体も同様の表現型を示した。このことは、EHPQR-motif が回転方向制御だけでなくべん毛形成にも重要であることを示している。C-ring は MS リングの細胞質側に FliG がリンク構造を構築し、それを足場として FliM, FliN がリング構造を構築することで形成される。また、FliN はべん毛タンパク質輸送装置と相互作用することが分かっており、C-ring が正しく形成されないとフックタンパク質やフィラメントタンパク質が細胞外へ分泌されない。このことから、EHPQR-motif により FliG と FliM が適切に相互作用できないと、複合体構造の異常から回転力を発生することができなくなる以前に、べん毛が形成できなくなると考えられる。この考えは、大腸菌、サルモネラ菌、ピロリ菌(*Helicobacter pylori*)において、EHPQR-motif の FliG 変異体はビブリオ菌の変異体と同様に運動能を失うことがわかっていることから支持される(Lloyd *et al.*, 1996; Mashimo *et al.*, 2007; Van Way *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2007)。

ARM_C, helix_{MC} 上の変異による回転方向制御の異常

サルモネラ菌 FliG において FliG_M ドメインの 3 残基欠失変異体(FliG_{Δ161-163})が時計回りに回転方向を固定することが分かっており、対応する残基を欠損させた *T. maritima* の FliG 結晶構造が報告されている(Minamino *et al.*, 2010)。ビブリオ菌 FliG の P188 残基はサルモネラ菌 FliG の P161 残基に相当し、helix_{MC} 上に存在することから、P188L 変異は helix_{MC} の構造変化が正しく行われなためより生じる ARM_M-ARM_C 間の分子内/分子間相互作用の異常が原因でモーターの回転方向が反時計回りに偏ると考えられる。

A218V 変異では、反時計回りに回転方向が偏る。この 218 番目のアラニンの側鎖は α -helix 上で ARM_C の疎水性残基と同様の向きに露出している。このことから、A218V 変異体でも ARM_M-ARM_C 間の分子内/分子間相互作用異常が生じていると考えられる。NMR における A218V 変異を含む FliG_{MC} 断片で野生型断片と似た傾向を示したことから、A218V 変異をもつ FliG_{MC} 断片も野生型断片と同様に構造的揺らぎが大きいことが示唆された。よって A218V 変異は FliG 自身に大きな構造変化により回転方向が反時計回りに偏るというよりは、C リングを形成したときに ARM_M が隣の FliG 分子の ARM_C が強く分子間相互作用する、または、ARM_M-ARM_C の分子内相互作用が弱くなることで FliG が伸びた構造になりやすくなるために回転方向が反時計回りに偏ると考えられる。(図 18)。

Gly-Gly flexible linker 領域による FliG_M に対する FliG_C の制御

G214S, G215A 変異は Gly-Gly flexible linker 領域に存在し、隣り合う Gly に変異が入っているにもかかわらず、変異で生じる表現型が逆になっている(図 3, 7)。MD シミュレーションによる解析の結果は、G214S, G215A 変異ともに変異により構造的な立体障害が生じることで構造全体の揺らぎが減少し、特定のコンフォメーションを好むことを示唆している(図 14-16)。その構造変化の実態は、変異により FliG_M に対する FliG_C の向きが制限されることであると考えられ、おそらく G214S 変異と G215A 変異で異なった立体配置を示していると推測される。NMR による解析は、複数の構造をもつと考えられる野生型 FliG_{MC} 断片が変異により特定の構造を取りやすくなることを示唆しており、MD シミュレーションの結果と一致している(図 18)。また、*cheY* を欠損した株に G215A 変異をもつ FliG を発現させた菌体のモーターは、CheY が発現している株と同様に時計回りのみで回転することから、FliG-G215A 変異をもつ FliG の構造変化は生体内で CheY に依存しないことが示されている(図 19)。

Cryo-ET 法による C-ring の解析では、反時計回りにモーターの回転が偏る FliG-G214S 変異と時計回りにモーターの回転が固定される FliG-G215A 変異をもつ C-ring の密度の平均画像とレンダリングモデルを得た(図 21)。その結果、変異体間で C-ring 中の FliG に相当する部分の構造(図 21B の赤丸の破線部分)が変化していることを明らかにした。この結果は、世界で初めて時計回りと反時計回りでの C-ring の構造の違いを *in situ* で明らかにしたものである。また得られた結果は、MD シミュレーションや NMR により得られた結果とも一致している。FliG-G215A 変異をもつ C-ring の平均像中に CheY と推測される密度がみられた。この密度が薄いことは、リング中のすべて FliM 分子に CheY-P が結合しているわけではないことを示唆している。

回転方向切り替えの際に生じる固定子回転子間相互作用の変化

本研究での結果とこれまでの知見を総合して、回転方向切り替えの際に生じる固定子-回転子間相互作用の変化のモデルを図 25 に示した。(A)では FliF, FliG, FliM のリング状の構造を示し、FliM には CheY が結合している。(B)は(A)で示した構造のうち、FliF, FliG, FliM, CheY を 1 分子ずつ抜き出し拡大したもの、(C)は FliF を 2 分子、FliG, FliM, CheY を 3 分子ずつ抜き出し拡大したものを示した。(C)では、FliG が 34 分子で、FliF が 26 分子でリングを構築するため、FliG, FliM, CheY の数に対する FliF の数のミスマッチが生じている。(B),(C)では FliG の回転方向制御に異常が生じる変異部位をボールモデルで示した。(C)では、CheY-P が FliM に結合/解離することで生じる構造変化が FliM から FliG に伝わることを灰色矢印で、FliG_M の構造変化が Gly-Gly flexible linker に伝わり FliG_C の向きを制御する様子を赤矢印で示した。また、これらの構造変化は分子内だけでなく隣の分子にも ARM_M, ARM_C の分子間/分子内相互作用を介して伝わりと考えられ、その様子を青矢印で示した。この FliG の構造変化は FliM-CheY の結合に影響を与えられ、それを緑矢印で示した。FliG の変異体は、これらの構造変化の一部または複数を模することにより回転方向制御に異常を生じさせていると考えられ、その推測される機構を(D), (E)で示した。(D)は、FliG の

分子内での構造変化により回転方向制御が異常になると考えられる G214S, G215A, A282T 変異体について示した。野生型では FliG_M に対する FliG_C の向きに立体的な制限がなく、FliM に対する CheY の結合/解離により FliG_C の向きが決定されていると考えられる。しかしながら、G214S, G215A 変異体は Gly-Gly flexible linker 領域の変異により、FliG_C の向きが制限されるために回転方向が偏ると考えた。G214S と G215A 変異で FliG_C は異なった立体配置を取っていると考えている。A282T は、FliG_C 内で構造変化が起きているために回転方向が時計回りに偏ることが先行研究において議論されている(Miyanoiri *et al.*, 2017)。(E)では、E144D で回転方向の偏りが生じないが、回転方向切り替え頻度が増加する機構を考察した。E144D 変異は、FliM の構造変化を引き起こし、CheY が結合/解離しやすくなっていると推測している。また E144D 変異は、ARM_M, ARM_C の分子間/分子内相互作用を不安定にさせることにより、リング中で隣接する FliG 分子を介して FliM に影響を与えることで、リング全体の FliM に対する CheY の結合/解離を不安定にさせるとも考えている。

大腸菌内でビブリオ菌と大腸菌のキメラ FliG (FliG_{EV})とビブリオ菌 PomB と大腸菌 MotB のキメラ固定子(PomA/PotB)を発現させた解析では、PomA の荷電残基は時計回りと反時計回りでの回転力の発生で寄与が変化しない一方で、FliG の荷電残基は寄与が回転方向によって変化することが分かっている(Onoue *et al.*, 2018)。このことから、FliM への CheY の結合/解離により引き起こされる FliG の構造変化は、FliG_C と固定子との相互作用する界面の変化（具体的には FliG_C と PomA-loop₂₋₃ 間で相互作用する荷電残基の距離、数の変化により生じる回転子-固定子間の反発力/誘引力の変化）を引き起こすことにより、結果としてモーターの回転方向が切り替わって回転すると考えられる。野生型 FliG では、図 25 で示した各分子の構造変化とリング中で隣接する分子への影響が FliM に対する CheY の結合/解離により柔軟かつ精密に制御されていると考えられる。この野生型 FliG のタンパク質の柔軟性は、これまでにビブリオ菌の FliG を含む C-ring が精製できないことや、FliG の結晶構造解析に成功していないこと関連していると考えられる。本論文で得られた変異を導入することで、C-ring 精製や結晶構造解析においての問題点を解決、改善すると期待される。

(II)固定子の活性化とイオン透過の分子機構

べん毛モーターが回転できるようになるためには、(1)固定子が回転子の周りに集合し活性化し、(2)共役イオンが固定子内を透過することにより膜内外に形成された電気化学勾配が固定子内の構造変化へ変換され、(3)回転子固定子間相互作用により固定子の内の構造変化が回転力に変換される、少なくとも 3 つの過程が必要である。ビブリオ菌において、(1)に関しては、固定子の共役イオンである Na⁺が固定子に作用することで PomA の細胞質領域の構造変化が生じ、回転子の周りに集合できるようになると提唱されている(Fukuoka *et al.*, 2009; Mino *et al.*, 2019)。また、PomB の構造変化により PomB_C がペプチドグリカン層に結合できるようになることで、固定子が回転子の周りにアンカーされ活性化することが示唆されている(Zhu *et*

al., 2014)。PomB-D24 残基への Na^+ の結合は、 Na^+ が結合できない PomB-D24N 変異を持つ固定子が回転子の周りに集合できないことから、固定子の集合に必要であることが示されている(Sudo *et al.*, 2009; Fukuoka *et al.*, 2009)。(2)に関しては、プラグ領域を欠失させた固定子では固定子中を常に Na^+ が流れることから、プラグ領域がイオン透過の制御に関わることが示唆されている(Li *et al.*, 2011)。精製した固定子を用いた ATR-FTIR の解析結果から、PomA の TM3, TM4 中に存在するいくつかのアミノ酸残基がイオン透過経路に関わることが示唆された。また、MD シミュレーションの結果から、 Na^+ が透過する際に TM3 の構造変化が生じることが予測されている(Onoue *et al.*, 2019)。(3)に関しては、PomA の細胞質領域(loop₂₋₃)と FliGc 中に存在する保存性の高い複数の荷電残基が相互作用することによって、モーターの回転力を発生させることが遺伝学的解析から明らかとなっている(Takekawa *et al.*, 2014)。べん毛モーターが時計回りと反時計回りで回転することができる仕組みは(I)で考察したとおりである。この考察では、イオン透過制御に関与しているプラグ領域の機能の詳細を明らかにするために行った三章の研究の内容を中心に考察する。

プラグ領域による固定子のイオン透過の制御機構

先行研究により、PomB のプラグ領域を含む 80 残基(41-120)を欠損したプラグ欠失固定子(PomB_{ΔL})は、生体中で回転子の周りに集合しなくても Na^+ イオンを細胞内へ透過させてしまうため、生育阻害を引き起こすことが分かっていた(Li *et al.*, 2011; Takekawa *et al.*, 2013)。また *in vitro* で解析を行うために、大腸菌とコールドショックベクターを用いた大量発現系を利用して発現させ、得られた膜画分を界面活性剤 DMNG で可溶化した後、affinity chromatography によるプラグ欠失固定子(WT-PomA/PomB_{ΔL}-His₆)の精製が試された。この精製では Na^+ を含む緩衝溶液を用いたところ PomB_{ΔL}-His₆ から PomA が解離してしまうため複合体として精製できないことが分かっていた(岩月 2018 年度修士論文)。しかしながら、べん毛モーターを回転させるために高い濃度の Na^+ を必要とすることが示されている PomA-D31C 変異体と組み合わせ、精製を試みたところ PomA-D31C/PomB_{ΔL}-His₆ 複合体の精製が可能になった。第三章では、この結果を踏まえ、改めてプラグ欠失固定子の精製を試みた。 Na^+ が固定子を透過することが PomB_{ΔL}-His₆ から PomA が解離する原因と考え、精製で用いた緩衝溶液の Na^+ をすべて K^+ に置換し精製を行ったが、 Na^+ の場合と同様に PomB_{ΔL}-His₆ から PomA が解離してしまった(図 22)。このことは、変異を持たないプラグ欠失固定子を複合体で精製することはこの方法ではできないことを明らかにしている。今後、DMNG 以外の界面活性剤で精製が可能か検討する必要がある。

PomA-D31C 変異をもつプラグ欠失固定子が精製できたことから、 Na^+ が固定子を透過しなくなることが示されている PomB-D24N 変異とプラグ欠失変異を組み合わせ精製できるかどうか検討した。その結果、WT-PomA/PomB_{ΔL}-His₆-D24N 変異固定子を複合体として精製することに成功した(図 23)。このことは PomB-D24N 変異により生じた構造変化が PomB_{ΔL}-His₆-D24N からの PomA の解離を防いだことを示して

いる。PomA-D31C 変異をもつプラグ欠失固定子も精製できたことを踏まえると、イオン透過能が活性化した固定子複合体では、PomA と PomB の相互作用に変化が生じており、プラグ領域がその相互作用の強さを制御していることを示唆している。また、ATR-FTIR での解析により、プラグ欠損は、膜内のイオン透過路以外の Na^+ 結合部位に影響を与えないことを示唆されており、固定子の Na^+ 選択的でないイオン結合部位は WT と同じ構造を保持していることが推測された(図 23)。以上の結果から、プラグ領域が関与する PomA と PomB の相互作用の変化が固定子の Na^+ 透過を制御するモデルを提唱した(図 26)。このモデルでは、細胞膜中を漂っている固定子では PomA と PomB が強く相互作用しているため、イオンの透過経路が閉まった不活性型になっていると考えている(図 26A)。一方で、回転子周囲で活性化した固定子は、PomA と PomB の間の相互作用が弱まることにより Na^+ の透過経路を開くことができるようになる考えた。プラグ領域が関与する構造変化によって PomA と PomB の相互作用の強さが変化することで、固定子のイオン透過を制御していると推測した。プラグ欠失固定子は、プラグ領域がないことによって PomA と PomB の間の相互作用が常に弱い状態であるために、回転子の周りに集合しなくても Na^+ が固定子内を透過してしまうと考えた。一方で PomB-D24N 変異は D24 残基に Na^+ が結合できない状態で、イオン透過の際に生じる PomB の膜貫通領域の構造変化が生じず、プラグ領域が欠失していても PomA と PomB の相互作用が弱まらなくなっていると考えられる(図 26B)。生体内で PomB-D24N 変異がプラグ欠失変異に対して優位であることは、この考えを支持している(Li *et al.*, 2011)。PomA-D31C 変異をもつプラグ欠失固定子でも、PomA と PomB の相互作用が比較的強く保たれていると考えられるが、その相互作用が PomB-D24N と同様の状態になっているかは現時点ではわからない。

PomA/PomB 複合体は膜タンパク質であり、収量や純度の問題から電子顕微鏡による単粒子解析や X 線結晶構造解析があまり進んでこなかった。特に、PomB のプラグ領域で予想されるダイナミックな構造変化と PomA の loop₂₋₃ の構造変化が結晶化に対して大きな問題となると考えられてきた(Zhu *et al.*, 2014)。原子間力顕微鏡による *Bacillus subtilis* の MotS の解析により、MotS が共役イオン存在下で大きく構造変化することが明らかになっている(Terahara *et al.*, 2017)。本論文で PomB-D24N 変異によりプラグ欠失固定子を複合体で精製できたことは、固定子が閉じた状態での構造情報が得られることが期待されるとともに、安定な PomA/PomB 複合体が精製できる条件が与えられたことから、今後の解析が待たれる。

材料と方法

使用した菌株、プラスミド、培地、培養条件

本研究で使用した海洋性ビブリオ菌と大腸菌の菌株を表 1 に示し、プラスミドは表 2 に示した。

ビブリオ菌は VC 培地、VPG 培地 (表 3) を用いて 30 °C で震盪培養した。固形培地を用いた場合は 1.25 % (w/v) の寒天を含む VC 培地を、軟寒天培地を用いた場合は 0.3 % (w/v) の bactoagar を含む VPG 培地を使用した。カナマイシンを添加する場合は 100 µg/ml、クロラムフェニコールを添加する場合 2.5 µg/ml の最終濃度になるようにした。

大腸菌は LB 培地(表 3)を用いて 37°C で培養した。固形培地を用いた場合は、1.25 % (w/v) の寒天を含む LB 培地を使用した。カナマイシンを添加する場合は 50 µg/ml、クロラムフェニコールを添加する場合 25 µg/ml の最終濃度になるようにした。β3914 では LB 培地中に最終濃度 300 µM のジアミノペミリン酸(DAP)を加えて培養した。

pHIDA1 はプラスミド pKY704-Δ*pomAB* を鋳型とし、PomA の C 末端 185 残基と PomB の N 末端 125 残基を欠失する Δ*pomAB* 断片を PCR により増幅させ、suicide ベクターである pSW7848 にクローン化して作成した。pHIDA3 はビブリオ菌 *fliG* 欠失株 NMB198 染色体 DNA を鋳型とし *fliF-fliG₄₅₅₋₁₇₅* 断片を PCR により増幅させ、pSW7848 にクローン化して作成した。pHIDA2 は *cheY* の開始コドン上流 500bp と終止コドン下流 500bp を含む断片を PCR により増幅させ、pSW7848 にクローン化して作成した。増幅には Ex taq polymerase (Takara 社)を用い、反応サイクルは 95°C, 2 分 30 秒または 1 分 → (95°C, 10 秒 → 50°C, 10 秒 → 72°C, 1 kbp/min) × 25 サイクル → 4°C, ∞で行った。PCR 産物は 1%アガロースを用いた電気泳動で分離し、目的の長さをもつ断片をゲルから抽出した。得られた断片は、プラスミド pSW7848 の SacI サイトに T4 DNA ligase を用いてクローン化し、大腸菌 β3914 株にカルシウム法により形質転換した。プラスミドを調製後、プラスミド中の塩基配列を確認し、目的の断片がクローン化されているかを確認した。

1%アガロースゲルからの DNA 断片の抽出

アガロースゲルからの DNA の抽出は、QIAGEN 社のキットを用いて行った。目的の断片を含む領域のアガロースを切り出し、750µl の QG buffer を加え、50°C で 10 分間加熱し、アガロースを溶かした。250µl のイソプロパノールを加えよく混ぜた後、全量をカラムに移した。15000 rpm、室温で 1 分遠心しカラムから流れ出た液体を捨てた。QG buffer を 500µl 加えた後、15000 rpm、室温で 1 分遠心しカラムから流れ出た液体を捨てた。PE buffer を 700µl 加えた後、15000 rpm、室温で 1 分遠心しカラムから流れ出た液体を捨てた。PE buffer を 250µl 加えた後、15000 rpm、

室温で5分遠心しカラムをエッペンドルフチューブに移した。カラムに50 μ lのElix水を加え、室温で2分以上放置した。15000 rpm、室温で2分遠心し、カラムから目的の断片を分離した。遠心にはHitachi社のCF15RXII遠心機とT15A39ローターを用いた。

プラスミド調製

プラスミドの抽出はQIAGEN社またはPromega社のキットを用いて行った。抽出したプラスミドは-30°Cで保存した。遠心にはHitachi社のCF15RXII遠心機とT15A39ローターを用いた。

a) QIAGEN キット

適切な培地、抗生物質を加えた大腸菌または海洋性ビブリオ菌を一晩培養し、培養液3~5 mlを室温で集菌した。250 μ lのP1 bufferに懸濁した。250 μ lのP2 bufferを加え、丁寧に十数回反転した。350 μ lのN3 bufferを加え、丁寧に数十回反転した。15000 rpm、室温で10分遠心し、上澄みをカラムに移した。15000 rpm、室温で1分遠心しカラムから流れ出た液体を捨てた。PE bufferを750 μ l加え、15000 rpm、室温で1分遠心しカラムから流れ出た液体を捨てた。15000 rpm、室温で1分遠心しカラムを1.5 mlチューブに移した。カラムにDWを50 μ lスポットし、3分程度室温で静置した。15000 rpm、室温で1分遠心し、プラスミドを抽出した。

b) Promega キット

適切な培地、抗生物質を加えた大腸菌または海洋性ビブリオ菌を一晩培養し、培養液3~5 mlを室温で集菌した。250 μ lのCell Resuspension solutionに懸濁した。250 μ lのCell Lysis solutionを加え、丁寧に十数回反転した。350 μ lのNeutralization solutionを加え、丁寧に数十回反転した。15000 rpm、室温で10分遠心し、上澄みをカラムに移した。15000 rpm、室温で1分遠心しカラムから流れ出た液体を捨てた。Column Wash solutionを750 μ l加え、15000 rpm、室温で1分遠心しカラムから流れ出た液体を捨てた。Column Wash solutionを250 μ l加え、15000 rpm、室温で3分遠心しカラムを1.5 mlチューブに移した。カラムにDWを50 μ lスポットし、3分程度室温で静置した。15000 rpm、室温で1分遠心し、プラスミドを抽出した。

大腸菌の形質転換

大腸菌DH5 α または β 3914に目的のプラスミドを形質転換する場合はカルシウム法(a)、S17-1に形質転換する場合はエレクトロポレーション法(b)を用いた。

a)カルシウム法

i)コンピテントセルの作成

LB 液体培地で一晩培養した大腸菌 DH5 α または β 3914 を 20 ml の LB 培地に 100 倍希釈して加え、37°C で OD 660 nm が 0.4 から 0.8 になるまで培養した。 β 3914 株には LB 培地に最終濃度 300 μ M の DAP を加えた。氷上で冷やした遠心管に移し、5000 rpm、4°C 10 分で集菌し、上澄みを除いた。0.1 M CaCl₂ 10 ml に懸濁し、氷上で 30 分静置した。5000 rpm、4°C 10 分で集菌し、上澄みを除いた後、20% (w/v) Glycerol, 0.1M CaCl₂ 2 ml に懸濁し、100 μ l ずつ分注し用いた。使用しなかった分は-80°C で保存した。遠心には Hitachi 社の CF15RXII 遠心機と T15A41/42 ローターを用いた。

ii)形質転換

コンピテントセル 100 μ l に 1 μ l のプラスミドまたは ligation 産物を加え、氷上で 30 分静置した。42°C で 45 秒静置後、1 ml の LB 培地を加え 37°C で 1 時間培養し、適切な抗生物質を加えた LB 寒天培地にまいた。 β 3914 株では LB 培地に最終濃度 300 μ M の DAP を加えた。

b)エレクトロポレーション法

i)コンピテントセルの作成

LB 培地で一晩培養した大腸菌 S17-1 培養液 1 ml を新鮮な LB 培地で 40 倍希釈し 37°C で 2 時間震盪培養した。冷やした遠沈管に移し、6000 rpm、4°C で 5 分間集菌した。上澄みを除き、氷上で冷やした 10 ml の DW に懸濁した。6000 rpm、4°C で 5 分間集菌した。上澄みを除き、氷上で冷やした 10 ml の DW に懸濁した。6000 rpm、4°C で 5 分間集菌した。上澄みを除き冷やしておいた 300 μ l の 10%グリセロールに懸濁した。40 μ l ずつ分注し使用し、余った分は-80 °Cで保存した。遠心には Hitachi 社の CF15RXII 遠心機と T15A41/42 ローターを用いた。

ii) 形質転換

氷上で冷やしたキュベットに 40 μ l のコンピテントセルと 5 μ l のプラスミドを加えた。プラスミドはミニプレップで抽出したものをそのままの濃度で用いた。キュベットは電極間が 0.2 cm のものを用い、抵抗値 200 Ω 、電圧 2.5 kV の条件で電気パルスをかけた。その後、1 ml の LB 培地に菌を回収し 37°C で 1 時間震盪培養し、適切な抗生物質を加えた LB 寒天培地にまいた。

ビブリオ菌の形質転換

海洋性ビブリオ菌へのプラスミドの移入は以下の 2 つの方法をプラスミドによって使い分けた。

a)エレクトロポレーション法

海洋性ビブリオ菌へのプラスミド(pMMB206, pNT1, pHIDA1, pHIDA2 を除く)の移入は Bio Rad 社の Gene Pulser を用いたエレクトロポレーション法により行った(Kawagishi *et al.*, 1994)。

i)コンピテントセルの作成

VC 培地で海洋性ビブリオ菌を一晩培養し、新鮮な VC 培地で 50 倍希釈し、30°C で OD が 0.4~0.8 になるまで二次培養した。OD は分光光度計(日立社 U-2000)を用いて 660 nm の波長の吸光度を測定した。5500 rpm、室温、5 分集菌し、二次培養した培地の 1/4 倍量の Osmotic solution(表 3)に懸濁し 30°C で 30 分震盪した。5500 rpm、室温で 5 分間集菌し上澄みを除いた。冷やしておいた二次培養した培地の 1/4 倍量の 20 mM Mg SO₄に懸濁した。氷上で 10 分静置した後、5500 rpm、室温 5 min で集菌し、上澄みを可能な限り取り除いた。冷やしておいた二次培養した培地の 1/200 倍量 10 %グリセロールに懸濁し、40 µl ずつ使用した。遠心には Hitachi 社の CF15RXII 遠心機と T15A41/42 ローターを用いた。

ii)プラスミドの調製

ミニプレップで調製したプラスミド DNA に 3 倍量の 99.5 %エタノールと 0.1 倍量の酢酸ナトリウムを加え-30°C で 30 分以上静置した。その後、15000 rpm、4°C、30 分遠心し、上澄みを捨てた。70 %エタノールを沈殿が完全に浸るように加え、15000 rpm、4°C、5 分遠心し、上澄みを捨てた。バキュームを 5 分かけ、完全に乾燥させた。ミニプレップしたプラスミドの 1/10 倍量の DW を加え、プラスミドを完全に溶かしてエレクトロポレーションに使用した。遠心には Hitachi 社の CF15RXII 遠心機と T15A39 ローターを用いた。

iii)エレクトロポレーション

氷上で冷やしたキュベットに 40 µl のコンピテントセルと 5 µl のプラスミドを加えた。キュベットは電極間が 0.2 cm のものを用い、抵抗値 200 Ω、電圧 1.4k V の条件で電気パルスをかけた。その後、1 ml の VC 培地に菌を回収し 30°C で 1 時間震盪培養し、適切な抗生物質を加えた VC 寒天培地にまいた。

b)接合法

プラスミド pMMB206 は大腸菌 S17-1 を用いた接合により海洋性ビブリオ菌に形質転換した(Okunishi *et al.*, 1996)。プラスミドを移入したい海洋性ビブリオ菌を(必要なら適切な抗生物質を加えた)VC 培地で一晩培養し、大腸菌 S17-1 株に pMMB206 またはその誘導体を移入した株をクロラムフェニコール入りの LB 培地で一晩培養した。海洋性ビブリオ菌は VC 培地で 1/100 倍量希釈し 30°C で 4 時間 2 次培養した。S17-1 はクロラムフェニコール入りの LB 培地で 1/100 倍量希釈し 37°C で 4 時間 2 次培養した。OD を測定し、各菌を 5500 rpm、室温、1 分集菌した後、海洋性ビブリオ菌は OD が 0.67 程度になるように VC 培地に懸濁し、S17-1 株は OD が 1.00 程度になるように VC 培地に懸濁した。遠心には Hitachi 社の CF15RXII

遠心機と T15A39 ローターを用いた。懸濁した各菌体を抗生物質の加えていない VC 寒天培地に 15 μ l ずつ重ねてスポットし、30°C で 20 時間程度培養した。生えてきた菌を爪楊枝で掻き取り、VC 培地 300 μ l に懸濁した。全量を適切な抗生物質を含んだ VC 寒天培地にプレーティングし、30°C で一晩培養して形質転換体のコロニーを得た。

Suicide vector (pSW7848)を用いたビブリオ菌遺伝子欠損、欠失株の作成

ビブリオ菌の遺伝子欠損株の作成は Suicide Vector を用いた相同組み換え法により以下の通り行った。ビブリオ菌への Suicide Vector の形質転換は大腸菌 β 3914 を用いた接合法によって行った。 β 3914 への Suicide Vector の形質転換はカルシウム法によって行った。NMB102 に *pomA/pomB* 欠失(*pomA* $_{\Delta 69-253}$ -*pomB* $_{\Delta 1-125}$)を導入するのには pHIDA1 を用い、得られた株を SNR1 とした。NMB191, NMB195, NMB198 に *cheY* 欠損を導入するのには pHIDA2 を用い、得られた株をそれぞれ SNR2, SNR3, NMB318 とした。KK148 に *fliG* 欠失(*fliG* $_{\Delta 55-175}$)を導入するのには pHIDA3 を用い、得られた株を NMB328 とした。

欠損株を単離したい海洋性ビブリオ菌を VC 培地で一晩培養し、使用する Suicide Vector を形質転換した β 3914 を移入した株をクロラムフェニコールと DAP 入りの LB 培地で一晩培養した。海洋性ビブリオ菌は VC 培地で 1/100 倍量希釈し 30°C で 4 時間 2 次培養した。 β 3914 はクロラムフェニコール入りの LB 培地で 1/100 倍量希釈し 37°C で 4 時間 2 次培養した。OD を測定し、各菌を 5500 rpm、室温、1 分集菌した後、海洋性ビブリオ菌は OD が 0.67 程度になるように VC 培地に懸濁し、 β 3914 は OD が 1.00 程度になるように DAP 入りの VC 培地に懸濁した。遠心には Hitachi 社の CF15RXII 遠心機と T15A39 ローターを用いた。各菌を抗生物質の加えていない DAP 入りの VC 寒天培地に 15 μ l ずつ重ねてスポットし、30°C で 20 時間程度培養した。生えてきた菌を爪楊枝で掻き取り、VC 培地 300 μ l に懸濁した。全量をクロラムフェニコール入りの VC 寒天培地にプレーティングし、30°C で一晩培養した。生えてきたコロニーを爪楊枝で掻き取り VC 培地に加え、30°C で一晩培養した。この際に使用した Suicide vector を除くため、arabinose 終濃度 0.2%加えた。この操作は、arabinose により DNA ジャイレースの CcdB が発現し細胞が死ぬため、arabinose 存在下では細胞は積極的にプラスミドを落とすことを目的に行った。得られた培養液を抗生物質を含まず、arabinose が終濃度 0.2%(w/v)含まれた VC 軟寒天培地にプレーティングし、30°C で一晩培養した。出てきたコロニーが目的の欠損/欠失株か確認するためにコロニーPCRを行った。Polymerase には Ex tac polymerase(Takara 社)を用いた。PCR の反応サイクルは 98°C, 2 分 30 秒 \rightarrow (98°C, 10 秒 \rightarrow 50°C, 1 分 \rightarrow 72°C, 1 分/1 kbp) \times 25 サイクル \rightarrow 4°C, ∞ で行った。Template は Elix 水 50-100 μ l でコロニーを希釈した懸濁液を 0.5 μ l 用いた。*cheY* 欠損の確認では *cheY* の開始コドン上流 500 bp と相補する primer と終止コドン下流 500 bp と相補する primer の組み合わせを用いた。*fliG* の欠失では *fliG* を含むオペロンの上流に存在する *fliF* 遺伝子に相補する primer と *fliG* の終止コド

ンに相補する primer の組み合わせを用いた。*pomA/pomB* の欠失には *pomA* のシャイン・ダルガノ配列に相補する primer と *pomB* の終止コドンに相補する primer の組み合わせを用いた。PCR 産物を 1%(w/v)アガロース電気泳動することにより DNA を分離し、欠損/欠失株が得られたか確認した。

PCR 法を用いた点変異/欠失の導入

プラスミド pNT1, pHFAB, pYA303, pHIDA4, pColdIV-*pomAB-his₆*, pColdI-FliG_{MC} にコードされた遺伝子に目的の点変異を導入するため、Quikchange 法により変異を導入したいプラスミドを鋳型とし、互いに相補な一組の変異プライマーを用いて変異導入を行った。pColdIV-*pomAB-his₆* から PomB₄₁₋₁₂₀ をコードする塩基配列を欠損させ、pHIDA4 を得るには、pColdIV-*pomAB-his₆* を鋳型とし、PomB₃₃₋₄₀ と PomB₁₄₁₋₁₄₆ をコードする塩基配列をつなげた、たがい相補な一組の変異プライマーを用いて欠失変異を導入した。DNA polymerase は Pfu ultra polymerase (Agilent 社) を使用し、反応サイクルは 95°C, 30 秒 → (95°C, 1 分 → 50°C, 1 分 → 68°C, 0.5kbp/min) × 18 サイクル → 4°C, ∞で行った。

反応後の PCR 産物は 37°C で 1 時間以上 DpnI 処理をし、鋳型プラスミドを分解した。その後、3 倍量の 99.5%エタノールと 0.1 倍量の酢酸ナトリウムを加え、-30°C で 30 分以上静置した。その後 15000 rpm、4°C、30 分遠心し、上澄みを捨てた。70 % エタノールを沈殿が完全に浸るように加え、15000 rpm、4°C、5 分遠心し、上澄みを捨てた。減圧を 5 分かけ、完全に乾燥させ、カルシウム法を用いた大腸菌 DH5α を形質転換した。形質転換した大腸菌からミニプレップし、プラスミドを調製した後、変異を導入したい遺伝子の塩基配列決定することで、目的の変異が導入されており、なおかつ目的外の変異が導入されていないかを確認した。遠心には Hitachi 社の CF15RXII 遠心機と T15A39 ローターを用いた。

塩基配列の確認

BigDye Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit を用いたダイターミネーター法を用いて塩基配列を決定した。シーケンシングは遺伝子実験施設に依頼し、得られたデータの解析には、GENETYX と 4peaks を用いた。

軟寒天培地上での運動能の解析

VC 培地で一晚培養した菌株を適切な VPG 軟寒天培地上に 2 μl スポットし、30°C で適切な時間培養した。プラスミド pBAD33, pHFAB を用いた時は発現誘導にアラビノースを最終濃度 0.01 %(w/v)になるよう添加した。

位相差顕微鏡による運動能の解析

i)第一章での解析

適切な抗生物質を加えた VC 培地で海洋性ビブリオ菌を一晩培養した後、適切な抗生物質を加えた VPG 培地で 30°C、4 時間 2 次培養した。6000 rpm、室温 1 分の遠心で集菌し、等量の TMN buffer (表 3) に懸濁した。遠心には Hitachi 社の CF15RXII 遠心機と T15A39 ローターを用いた。懸濁液を TMN buffer で 100 倍に希釈した後、スライドガラスに 2 μ l ほどスポットし適切な倍率で観察、録画した。Serine は最終濃度 5 mM, Phenol は 3 mM, DTT は 1mM, Aspartic acid は 5 mM になるように調製して用いた。観察は buffer を加えて 1 分(直後)、30 分の 2 回行い、その間は室温でサンプルを静置した。同じサンプルから 2 回以上動画を録画し、それらの全菌体(Total cells)と泳いでいる菌体(Motile cells)を合計し motility fraction = Motile cells / Total cells とした。実験は各変異体で 3 回行い、平均値と標準偏差を比較した。

ii)第二章での解析

適切な抗生物質を加えた VC 培地で海洋性ビブリオ菌を一晩培養した後、適切な抗生物質を加えた VPG 培地で 30°C、4 時間 2 次培養した。培養液を V buffer で 100 倍に希釈した後、スライドガラスに 2 μ l ほどスポットし適切な倍率で観察した。同じサンプルから 4 回動画を録画し、それらの全菌体(Total cells)と泳いでいる菌体(Motile cells)を合計し motility fraction = Motile cells / Total cells とした。実験は各変異体で 3 回行い、平均値と標準偏差を比較した。

高輝度暗視野顕微鏡観察と回転方向制御の解析

適切な抗生物質を加えた VC 培地で海洋性ビブリオ菌を一晩培養し適切な抗生物質を加えた VPG 培地で 30°C、4 時間培養した後、6000 rpm、室温 1 分の遠心で集菌し、等量の V buffer に懸濁した。遠心には Hitachi 社の CF15RXII 遠心機と T15A39 ローターを用いた。懸濁液をもう一度、6000 rpm、室温 1 分で集菌し、等量の V buffer (表 3) に懸濁した。スライドガラスに懸濁液を 6 μ l ほどスポットした後、カバーガラスをかけカバーガラス側から別のスライドガラスを用いて上から圧力をかけ、適切な量の懸濁液を除き、高輝度暗視野顕微鏡を用いてビブリオ菌の極べん毛と菌体を同時に観察した。その際、適切な倍率で観察を行い、録画した。

10 秒間の菌体の運動について解析を行い、複数の菌体（1 条件につき少なくとも 6 菌体）を解析に用いた。極に 1 本のべん毛を持つ海洋性ビブリオ菌は、べん毛を菌体の前にして泳ぐ時にべん毛は CW(clockwise、時計回り)回転し、べん毛を菌体の後ろにして泳ぐときは CCW(counter clockwise、反時計回り)回転している。このことから菌体の進み向きとべん毛の位置からべん毛の回転方向を決定し、10 秒間においてべん毛の回転方向と回転方向の切り替えの回数を計測した。

poly L-lysine コートしたスライドガラスへの菌体固定

スライドガラスにその長辺に平行になるように両面テープを 2 枚貼り付けた。2 枚の両面テープの幅はカバーガラスの 1 辺の長さより少し短いぐらいの間隔で張り付けた。その上にカバーガラスをのせ、両面テープを介して、スライドガラスとカバ

ーガラスを張り付けた。スライドガラスの表面に poly L-lysine をコートするために V buffer に最終濃度 0.1%(w/v) poly L-lysine を加え、この調製緩衝液をカバーガラスとスライドガラスの間に流し込み 1 分以上室温で放置した。余分な poly L-lysine を洗い流すために V buffer をカバーガラスとスライドガラスの間に 2 回ずつ流し込み、洗浄した。

べん毛の蛍光観察

適切な抗生物質を加えた VC 培地で海洋性ビブリオ菌を一晩培養し、適切な抗生物質を加えた VPG 培地で 30°C、4 時間 2 次培養した。懸濁液を 6000 rpm、室温 1 分の遠心で集菌し、等量の V buffer に懸濁した。遠心には Hitachi 社の CF15RXII 遠心機と T15A39 ローターを用いた。この懸濁液を poly L-lysine コートしたスライドガラスとカバーガラスのセットに流し込み、菌体を poly L-lysine 上に固定した。余分な菌体を流すために V buffer をセットへ流し込んだ。次に V buffer で 1/100 倍した抗極べん毛ウサギ抗体を流し込み、1 分以上室温に放置することで抗べん毛抗体にべん毛を認識させた。余分な 1 次抗体を洗い流すため、V buffer を 1 回流し込んだ。V buffer で 1/100 倍した抗ウサギ rhodamine-conjugated IgG を流し込み、極べん毛を認識した 1 次抗体を標識させた。余分な 2 次抗体を洗い流すために V buffer を 1 回流し込んだ。このセットの rhodamine の蛍光像を蛍光顕微鏡で観察した。画像の取得は HSP software を用いて取得し、露光時間は 1.00 sec にした。画像は Image J を使って解析した。菌体は少なくとも 700 匹観察し、全菌体中のべん毛を持つ菌体の割合を示した。

PomB 変異体で生じるジスルフィド結合の検出

検出方法は先行研究 (Zhu *et al.*, 2014)の方法に準じて、行った。

a)Protein A sepharose CL-4B beads の調製

Protein A sepharose CL-4B beads (GE Healthcare 社) 30 mg を TNET buffer (表 3) 1.5 ml に懸濁し、4°C で一晩インキュベートした。8000 rpm、4°C で 1 分間遠心し、TNET buffer 1 ml に懸濁した。この作業をさらに 2 回繰り返した後、300 μ l の TNET buffer に懸濁し、50 μ l ずつ分注した。それぞれに抗 PomB ウサギ抗体 (PomBc2 B0455; Terauchi *et al.*, 2011)を 3 μ l ずつ加えて使用した。遠心には Hitachi 社の CF15RXII 遠心機と T15A39 ローターを用いた。

b)サンプルの調製と検出

VC 培地で一晩培養した菌を 20 ml の VPG 培地に 100 倍希釈し 30°C で 4 時間 2 次培養した。発現誘導にはアラビノースを最終濃度 1 mM で使用した。それらの菌を 6000 rpm、室温 1 分の遠心で集菌し、3 ml の TMN buffer に懸濁した。遠心には Hitachi 社の CF15RXII 遠心機と T15A39 ローターを用いた。懸濁液を再び 6000 rpm、室温 1 分で集菌し、3 ml の TMN buffer に懸濁し、500 μ l ずつ分注した。分注したサンプルにそれぞれ Serine (最終濃度 5 mM), DTT (最終濃度 1 mM),

またはその両方を加え 30°C で 40 分インキュベートした。その後、5000 rpm、室温 1 分の遠心で集菌し、500 μ l の TMN buffer を加えた。この作業をさらに 1 回繰り返して菌を洗浄した後、40 mM の Biotin maleimide (BM) を 25 μ l 加え、30°C で 10 分インキュベートした。その後、5000 rpm、室温 1 分で集菌し、500 μ l の TMN buffer を加えた。この作業をさらに 1 回繰り返して菌を洗浄した後、細胞を超音波破碎した。8000 rpm、室温 1 分遠心し、上澄みを回収し、卓上超遠心分離装置 (Beckman 社, TLA55 ローター) により 50,000 rpm、4°C で 30 分間超遠心した。上澄みを取り除いた後、沈殿 (膜画分) を 1 ml の TNET buffer に懸濁した。4°C で 90 分インキュベートして PomA/PomB 複合体を可溶化し、13,000 rpm、4°C 10 分の遠心によって不溶性画分を取り除いた。可溶化した PomA/PomB 複合体を含む上澄みに調製した ProteinA sepharose CL-4B beads を加え、4°C で一晩回転撹拌した。6000 rpm、4°C で 1 分遠心し、上澄みを除き、1 ml の TNET buffer に懸濁した。この作業を 3 回繰り返した。50 ml の TNET buffer に使用し、12.5 μ l の 5x SDS loading buffer を加え、煮沸することでビーズから免疫沈降物をはずし、SDS-PAGE に用いた。SDS-PAGE によりサンプル中のタンパク質を分離した後、PVDF 膜に転写した。サンプル中の PomB の量は抗 PomB 抗体を用いたイムノブロットにより検出した。イムノブロットでは、二次抗体として HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz) を用いた。Biotin maleimide 標識した PomB の検出には、streptavidin-conjugated-HRP (GE healthcare 社) を用いた。それぞれのサンプルは ECL 反応液を加え、LAS3000 (Fujifilm 社) により検出した。

イムノブロットによるタンパク質の検出

i) ビブリオ菌で発現した FliG の検出

適切な抗生物質を加えた VC 培地で海洋性ビブリオ菌を一晩培養し適切な抗生物質を加えた VPG 培地で 30°C、4 時間培養した後、OD_{660nm} を測定し、サンプル 50 μ l が OD_{660nm}=20 となるよう 6000 rpm、室温 1 分の遠心で集菌し、50 μ l の Elix 水に懸濁した。遠心には Hitachi 社の CF15RXII 遠心機と T15A39 ローターを用いた。懸濁液に 5x SDS loading buffer を 12.5 μ l 加え、95°C でボイルした。サンプルは使用直前まで -30°C で保存した。調製したサンプルを SDS-PAGE によって分離した後、PVDF 膜に転写した。FliG の検出には抗 FliG ウサギ IgG 抗体 (FliG B0164, Koike *et al.*, 2010) を用い、二次抗体として HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。サンプルは ECL 反応液を加え、LAS3000 により検出した。

ii) PomA, PomB の検出

調製したサンプルを SDS-PAGE によって分離した後、PVDF 膜に転写した。FliG の検出には抗 PomA ウサギ IgG 抗体 (PomA 1312; Yorimitsu *et al.*, 1999) または抗 PomB ウサギ IgG 抗体を用い、二次抗体として HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。サンプルは ECL 反応液を加え、LAS3000 により検出した。

分子動力学シミュレーションの条件

FliG の初期構造として、*Thermotoga maritima* で解かれた結晶構造を用いた (Vartanian *et al.*, 2012; PDB ID : 4fhr)。ソフトウェアは GROMACS 4.6.2 を使用した (Pronk *et al.*, 2013)。力場を Amber99sb-ildn、温度は 300 K、pH は 7.0 に設定した。Water model は TIP3P を用いた。イオン濃度は 0.15 M とし、Time step は 2fs とし、100 ns (5x10⁷ steps) のシミュレーションを行った。これらの条件で野生型及び各変異体のシミュレーションを 3 回ずつ行った。主成分解析には、ソフトウェア ProDy を使用した (Bakan *et al.*, 2011)。

安定同位体標識した FliG_{MC} 断片の精製

アンピシリンを含む LB 軟寒天培地に使用する菌をフリーザーストックからプレートへ植菌し、37°C で終夜培養した。形成されたコロニーをつつき、アンピシリンを含む 25ml の LB 培地に 37°C, 150rpm で終夜培養した。培養液全量を、3 L または 2 L フラスコに準備した終濃度 50 µg/mL アンピシリンを含む 1.5 L の M9 培地 (表 3) に加え、37°C、150 rpm で旋回培養した。M9 培地の窒素元をすべて ¹⁵N にしておくことにより、タンパク質を ¹⁵N 標識した。OD_{660nm} が 0.4-0.5 に到達したら pre induction sample を採取し、OD=5.0 が 50 µL 得られるよう採取し、集菌後に Elix 水と 5x SDS loading buffer を加え調製した。3 L フラスコの中身は氷水中で 30 分間冷やした後、IPTG を最終濃度 0.5 mM になるように加え、15°C、150 rpm で終夜培養し、発現誘導を行った。その後、post induction sample を採取し、OD=5.0 が 50 µL 得られるよう採取し、集菌後に Elix 水と 5x SDS loading buffer を加え調製した。フラスコの中身は 4°C、6,000 rpm で 10 分間遠心により集菌し、使用するまで -80°C で凍結保存した。遠心には KUBOTA 社 7930 遠心機と KA-9 ローターを用いた。

40 ml の TN buffer と Proteinase inhibitor(sigma 社)のタブレッド 1/4 欠片分を加え、凍結した菌体を解凍し、ボルテックスにより混ぜた。適切な大きさのビーカーに懸濁液を移し、超音波により細胞を破碎した。10 分間の低速遠心(8000 rpm, 4°C, Hitachi 社 CF15RXII 遠心機、T15A41/42 ローター)により破碎できなかった細胞を除き、得られた上清を 30 分間の超遠心(118000g, 4°C, HITACHI 社 himac CP80WX 遠心機、p50AT2 ローター)にかけた。得られた上清(細胞質画分)を TN buffer で平衡化し、カラムに詰めた 5 mg の TALON レジン(Takara 社)に混ぜ、室温で少なくとも 10 分間静置した。以降はバッチ法のより TALON レジンに結合した FliG_{MC} 断片(N 末に His₆ タグ)を His タグ affinity chromatography により一次精製した。各操作での溶出分は回収した。カラムから上清を流した後、レジンに結合していないタンパク質を除くため、TN buffer を 5 ml ずつ 3 回(計 15 ml)流した。非特異的に結合しているタンパク質を除くため TN-I30 buffer を 1 ml ずつ 5 回(計 5 ml)流した。TALON レジンに結合した FliG_{MC} 断片を溶出するために、TN-I120 buffer を 1 ml ずつ 25 回(計 25 ml)流した。TALON レジンを洗うために TN-I120 buffer を 1 ml ずつ 5 回(計 5 ml)流した。各溶出画分はゲル濾過 chromatography による精製のために 4°C で保存した。

各溶出画分 50 μ l に 5x SDS loading buffer を 12.5 μ l 加え、SDS-PAGE 用サンプルを作成した。SDS-PAGE 後、得られたゲルを CBB 染色し、FliG_{MC} 断片に相当するバンド(25 kDa)がみられた画分を Amicon Ultra-4 MWCO 10,000 (Merck Millipore 社)を用いて最終容量 1 mL に濃縮した。そのサンプルを 4°C、150,000 g (Beckman 社, TLA55 ローター)で 10 分間超遠心した後、上清を Superdex 200 increase 10/300 column (Merck Millipore 社)に投与し、ゲル濾過 chromatography を行った。装置は AKTA explore system (GE Healthcare 社)または NGC chromatography system (Bio lad 社)を用い、TN buffer を流速 0.75 mL/min で流して精製した。ピークフラクションサンプル 20 μ L に 5×SDS-loading buffer 20 μ L を加え、SDS-PAGE、CBB 染色を行い FliG_{MC} 断片複合体が含まれる画分を決定した。サンプルは 4°C で保存した。必要に応じて得られた複数の画分を混ぜ、Amicon Ultra-4 MWCO 10,000 により濃縮した。

NMR による ¹⁵N 標識した FliG_{MC} 断片の解析

精製した FliG_{MC} 断片 0.4mM-0.6mM に 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid (DSS)を終濃度 0.01% (w/v), D₂O を終濃度 5% (w/v)加えた。サンプルを NMR サンプルチューブ(シゲミ社)に移し、名古屋大学構造生物学センターの Avance-III HD500spectrometer (Bruker 社)で 2D ¹H-¹⁵N TROSY HSQC スペクトルを測定した (Takeda *et al.*, 2011; Pervushin *et al.*, 1997)。測定の温度は 288K に、データサイズと幅は 256(t1) x 2048(t2), 1700 Hz (¹⁵N) x 7000 Hz (¹H)に設定した。キャリア周波数を ¹⁵N は 119 ppm, ¹H は 4.7ppm に設定した。得られたスペクトルの解析には Topspin 3.2(Bruker 社)を使用した。

Cryo-ET 法による回転子の解析

観察に用いるサンプルの作成は先行研究を参考にした(Zhu *et al.*, 2017b)。クロラムフェニコールを含む VC 培地で一晚培養した菌を 3 ml の VPG 培地に 100 希釈し 30°C で 5 時間 2 次培養した。集菌(6000rpm, 4°C)し、TMN buffer(表 3)で 2 回洗い、2 倍量の TMN buffer に懸濁した。金コロイド(10nm)を含む溶液を 1/10 倍量加えた。懸濁液を並行化したカーボングリッドに滴下し、1 分間室温で静置した。グリッドをプランジャーに取り付け、余分の溶液を濾紙で吸った。グリッドを液体エタン中に落下させ、サンプルを急速凍結させた。

データと取得のその解析も先行研究を参考にした(Zhu *et al.*, 2018)。グリッド中のべん毛が生えている菌体を Titan Krios electron microscope (FEI 社)で撮影した。撮影には、電子顕微鏡に装備されている 300 kV の電子銃、direct electron detector (Gatan K2 Summit)、Volta phase plate、20 -eV slit のエネルギーフィルターを用いた。画像のデフォーカスはおおよそ 0 μ m に、位相変位は 0.33π から 0.67π の間に、電子の吸収線量はおおよそ 50 e⁻/Å² なるように設定した。データは SerialEM software を用いて自動で取得した(Mastrorade, 2005)。角度を 3 度刻みで -51° から +51°まで傾けた 35 枚の画像(1 枚 8-10 フレーム)を取得した。フレーム間のイメージのブレを除

くため motion correction program を用いてスタックファイルを作成した(Li *et al.*, 2013; Morado *et al.*, 2016)。ソフトウェア IMOD と Tomo3d を用いて、スタックファイルの画像処理を行った(Kremer *et al.*, 1996; Agulleiro JI & Fernandez JJ, 2015)。金コロイド粒子の位置を基にアライメントをし、3次元再構成を行った。トモグラムは i3 package を用いて作成した。トモグラム中のべん毛モーターを i3 program を用いて手動でピックアップした(Winkler H. 2007; Winkler *et al.*, 2009)。i3 package を用いて、モーターのアライメントとクラス分けを行い、モーターの密度を平均化処理したイメージを得た(Zhu *et al.*, 2017)。得られた画像は、ソフトウェア IMOD と UCSF Chimera を用いてレンダリングしモデルを構築した(Kremer *et al.*, 1996; Pettersen *et al.*, 2004)。

PomA/PomB 複合体の精製

精製は先行研究 (Onoue *et al.*, 2019) に準じて行った。アンピシリンとクロラムフェニコールを含む 25 mL の LB 培地に、使用する菌をフリーザーストックから植菌し、37°C、180 rpm で終夜培養した。3 L フラスコに準備した終濃度 50 µg/mL アンピシリン、終濃度 12.5 µg/mL クロラムフェニコールを含む 1.5 L の LB 培地に、終夜培養した菌を全量加え、37°C、150 rpm で旋回培養した。OD_{660nm} が 0.4-0.5 に到達したら pre induction sample を採取し、OD=5.0 が 50 µL 得られるよう採取し、集菌後に Elix 水と 5x SDS loading buffer を加え調製した。3 L フラスコの中身を氷水中で 30 分間冷やした後、IPTG を最終濃度 0.5 mM になるように加え、15°C、150 rpm で終夜培養し、発現誘導を行った。その後、post induction sample を採取し、OD=5.0 が 50 µL 得られるよう採取し、集菌後に Elix 水と 5x SDS loading buffer を加え調製した。3 L 培養液を 4°C、6,000 rpm で 10 分間遠心し、集菌した。遠心には KUBOTA 社の 7930 遠心機と KA-9 ローターを用いた。遠心後、上清を除いた時のペレットの重さ、すなわち菌体湿重量を量り、ペレットを菌体湿重量(g)の 7 倍の量 (mL)の Na-Pi buffer または K-Pi buffer(表 3)で懸濁した。フレンチプレス(~1,000 kg/cm²)を二回行い、菌を破砕し、4°C、13,000 rpm で 10 分間遠心して細胞デブリを取り除いた。この遠心には Hitachi 社の CF15RXII 遠心機と T15A41/42 ローターを用いた。得られた上清を 4°C、36,000 rpm で 1 時間超遠心し、膜画分を収集した。この遠心には Hitachi 社の himac CP80WX 遠心機と P45AT ローターを用いた。上清を捨て、前述と同じ量の Na-Pi buffer または K-Pi buffer でペレットを懸濁した。採取した膜画分は使用直前まで-80°C で保存した。

膜画分の可溶化には界面活性剤 DMNG(Anatrace 社)を用いた。DMNG は 10%(w/v)になるよう milliQ に溶解させて冷蔵庫で保存した。解凍した膜画分をビーカーに移し DMNG を終濃度 0.5%(w/v)になるように加え、30°C で少なくとも 30 分間攪拌し可溶化した。このサンプルを 4°C、36,000 rpm で 30 分間超遠心し、上清を回収した。この遠心には Hitachi 社の CF15RXII 遠心機と T15A41/42 ローターを用いた。得られた上清を Na-Wash buffer または K-Wash buffer (表 3)で平衡化した TALON レジン(Clontech 社)と混ぜ、1 時間コールドルームで静かに攪拌し、固定子複合体を

吸着させた。TALON レジンの量は膜面分を懸濁した時に加えた Na-Pi buffer または K-Pi buffer の 1/10 倍量を用い、この量を固定子複合体の His タグ affinity chromatography の 1 Column volume (CV (mL))とした。固定子複合体を吸着させた TALON レジンをカラムに充填し His タグ affinity chromatography をバッチ法で行った。フロースルーを採取、その後 Wash buffer を 2CV 流した。同様に Na-Elution buffer または K-Elution buffer (表 4)を 1 mL ずつ 3-4CV 分流し、採取した。各フラクションサンプル 20 μ L に 5 \times SDS-loading buffer 20 μ L を加え、SDS-PAGE でタンパク質を分離後 CBB 染色または、イムノブロットを行い PomA/PomB 複合体が含まれるフラクションを決定した。

affinity chromatography によって採取した PomA/PomB 複合体が含まれるフラクションに 1 mL に対して 1 μ L の β -メルカプトエタノールを加え、Amicon Ultra-4 MWCO 100,000 (Merck Millipore 社)を用いて最終容量 1 mL に濃縮した。そのサンプルを 4°C、150,000 g (Beckman 社, TLA55 ローター)で 10 分間超遠心した。得られた上清を Enrich SEC6 10/300 column (Bio Rad 社)に投与し、ゲル濾過 chromatography を行った。装置は AKTA explore system (GE Healthcare 社)を用い、流速 0.75 mL/min で精製した。緩衝溶液として、TKD buffer(表 3)を用いた。ピークフラクションサンプル 20 μ L に 5 \times SDS-loading buffer 20 μ L を加え、SDS-PAGE、CBB 染色を行い PomA/PomB 複合体が含まれるフラクションを決定した。

ATR-FTIR (全反射フーリエ変換赤外分光法)

ゲル濾過 chromatography で精製した PomB-D24N 変異が導入されたプラグ欠失固定子固定子を 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-phosphatidylethanolamine (POPE)と 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-phosphatidylglycerol (POPG)の脂質混合物に PomA/PomB 複合体：脂質=1：40 のモル比で再構成した。界面活性剤分子は Bio-beads SM-2 (Bio Rad 社)を用いて取り除き、脂質再構成タンパク質を遠心により集めた。Perfusion buffer (表 3)を用いて数回洗浄した後、一定分量の試料懸濁液を Si ATR crystal (DuraSampleIR; Smith Detection 社)の表面に置いた。その後、穏やかな N₂ ガス流で乾燥した後、乾燥層を Perfusion buffer によって流速 0.4 mL/min で再水和した。フローセルの温度は 20°C に維持した。ATR-FTIR スペクトルは、液体窒素冷却 MCT detector(Agilent 社)を備えた FTIR 分光光度計 (名古屋工業大学・神取研究室)を用いて 2 cm⁻¹ の分解能で記録した。

FliF, FliG, FliM, CheY のリングモデルの構築

構造モデルは、*S. enterica* の精製したモーターを電子顕微鏡で観察して得られた密度 map をもとにして結晶構造がわかっている FliG, FliM, CheY の構造をそれぞれ当てはめ、最適化して得ている(Thomas *et al.*, 2006; EMDB code: EMD-1887)。FliG の結晶構造は *T.m.*と *A.a.*で解かれたものを用いた(Vartanian *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010, PDB ID: 4FHR, 3HJL)。FliM は *T.m.*で解かれた先の FliG との共結晶構造と CheY との

共結晶構造を用いた(Lee *et al.*, 2001; PDB ID: 1F4V)。FliF は FliN との共結晶構造を用いた(Lynch *et al.*, 2017; PDB ID: 5TDY)。

引用文献

Agulleiro J.I., Fernandez J.J. (2015)

Tomo3D 2.0—exploitation of advanced vector extensions (AVX) for 3D reconstruction.

J. Struct. Biol. **189**, 147-152.

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

Asai Y., Syoji T., Kawagishi I., Homma, M. (2000)

Cysteine-scanning mutagenesis of the periplasmic loop regions of PomA, a putative channel component of the sodium-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*.

J. Bacteriol. **182**, 1001-1007.

Bakan A., Meireles L.M, Bahar I. (2011)

ProDy: protein dynamics inferred from theory and experiments.

Bioinformatics **27**, 1575–1577

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., Morimoto Y.V., Stock D., Armitage J.P., Turberfield A.J., Namba K., Berry R.M., Lee L.K. (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.

Bartolome´ B., Jubete Y., Marti´nez E., de la Cruz F. (1991)

Construction and properties of a family of pACY184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives.

Gene **102**, 75-78

Blair, D.F. (2003)

Flagellar movement driven by proton translocation.

FEBS Lett. **545**, 86-95

Braun T.F, Al-Mawsawi L.Q, Kojima S, Blair D.F. (2004)

Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*.

Biochemistry **43**, 35-45

Brown P. N, Hill C. P, 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, 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

Fukuoka H., Yakushi T., Kusumoto A., Homma M. (2005)

Assembly of motor proteins, PomA and PomB, in the Na⁺-driven stator of the flagellar motor.

J. Mol. Biol. **351**, 707-717.

Fukuoka H., Wada T., Kojima S., Ishijima A., Homma M. (2009)

Sodium-dependent dynamic assembly of membrane complexes in sodium-driven flagellar motors.

Mol. Microbiol. **71**, 825-835.

Francis N.R., Irikura V.M., Yamaguchi S., DeRosier D.J., Macnab R.M. (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**, 6304-8.

Francis N.R., Sosinsky G.E., Thomas D., DeRosier D.J. (1994)

Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex.

J. Mol. Biol. **235**, 1261-70.

Garza A.G., Biran R., Wohlschlegel J.A., Manson M.D. (1996)

Mutations in motB suppressible by changes in stator or rotor components of the bacterial flagellar motor.

J. Mol. Biol. **258**, 270-85.

Guzman L.M, Belin D, Carson M.J, Beckwith J. (1995)

Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter.

J. Bacteriol. **177**, 4121-4130

Grant S. G., Jessee J., Bloom F. R., Hanahan, D. (1990)

Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants.

Proc. Natl Acad. Sci. USA. **87**, 4645-4649

Homma M., Ohnishi K., Iino T., Macnab R.M. (1987a)

Identification of flagellar hook and basal body gene products (FlaFV, FlaFVI, FlaFVII and FlaFVIII) in *Salmonella typhimurium*.

J Bacteriol. **169**, 3617-24.

Homma M., Aizawa S., Dean G.E., Macnab R.M.. (1987b)

Identification of the M-ring protein of the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*.

Proc Natl Acad Sci U S A. **84**, 7483-7.

Homma M., Oota H., Kojima S., Kawagishi I., Imae Y. (1996)

Chemotactic responses to an attractant and a repellent by the polar and lateral flagellar systems of *Vibrio alginolyticus*.

Microbiology **142**(10):2777-83.

Hosking E.R., Vogt C., Bakker E.P., Manson M.D. (2006)

The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged.

J. Mol. Biol. **364**, 921-37.

Huber A.H., Nelson W.J., Weis W.I. (1997)

Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin.

Cell **90**, 871-82.

Irikura V.M., Kihara M., Yamaguchi S., Sockett H., 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.

Ito M., Hicks D.B, Henkin T.M, Guffanti A.A, Powers B.D, Zvi, L., Uematsu, K., Krulwich T.A. (2004)

MotPS is the stator-force generator for motility of alkaliphilic *Bacillus*, and its homologue is a second functional Mot in *Bacillus subtilis*.

Mol. Microbiol. **53**, 1035-1049

Ito M., Terahara N., Fujinami S., Krulwich T.A. (2005)

Properties of motility in *Bacillus subtilis* powered by the H⁺-coupled MotAB flagellar stator, Na⁺-coupled MotPS or hybrid stators MotAS or MotPB.

J. Mol. Biol. **352**, 396-408

Kawagishi I., Okunishi I., Homma M., Imae Y. (1994)

Removal of the periplasmic DNase before electroporation enhances efficiency of transformation in a marine bacterium *Vibrio alginolyticus*.

Microbiology **140**, 2355–2361

Kihara M., Miller G.U., Macnab R.M. (2000)

Deletion analysis of the flagellar switch protein FliG of Salmonella.

J. Bacteriol. **182**, 3022-8.

Kinoshita M, Namba K, Minamino T. (2018)

Effect of a clockwise-locked deletion in FliG on the FliG ring structure of the bacterial flagellar motor.

Genes Cells **23**, 241-247.

Koike M., Terashima H., Kojima S., Homma M. (2010)

Isolation of basal bodies with C-ring components from the Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*.

J. Bacteriol. **192**, 375-378.

Kojima S., Atsumi T., Muramoto K., Kudo S., Kawagishi I., Homma M. (1997)

Vibrio alginolyticus mutants resistant to phenamil, a specific inhibitor of the sodium-driven flagellar motor.

J. Mol. Biol. **265**, 310-318.

- Kojima S., Asai Y., Atsumi T., Kawagishi I., Homma M. (1999)
Na⁺-driven flagellar motor resistant to phenamil, an amiloride analog, caused by mutations of putative channel components.
J. Mol. Biol. **285**, 1537-1547
- Kojima S, Blair D.F. (2004)
Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli*.
Biochemistry **43**, 26-34
- Kojima S., Nonoyama N., Takekawa N., Fukuoka H., 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.
- Kojima S., Takao M., Almira G., Kawahara I., Sakuma M., Homma M., Kojima C., Imada K. (2018)
The Helix Rearrangement in the Periplasmic Domain of the Flagellar Stator B Subunit Activates Peptidoglycan Binding and Ion Influx.
Structure **26**, 590-598.e5.
- Kusumoto A., Kamisaka K., Yakushi T., Terashima H., Shinohara A., Homma M. (2006)
Regulation of polar flagellar number by the *flhF* and *flhG* genes in *Vibrio alginolyticus*.
J. Biochem. **139**, 113-121.
- Kremer J.R., Mastronarde D.N., McIntosh J.R. (1996).
Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD.
J. Struct. Biol. **116**, 71–76.
- Le Roux, F., Binesse, J., Saulnier, D. & Mazel, D. (2007)
Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector.
Appl. Environ. Microbiol. **73**, 777-784.
- Lee L.K., Ginsburg M.A., Crovace C., Donohoe M., Stock D. (2010)
Structure of the torque ring of the flagellar motor and the molecular basis for rotational switching.
Nature **466**, 996-1000.

Lee S.Y., Cho H.S., Pelton J.G., Yan D., Henderson R.K., King D.S., Huang L., Kustu S., Berry E.A., Wemmer D.E. (2001)

Crystal structure of an activated response regulator bound to its target.

Nat. Struct. Biol. **8**, 52-6.

Li Na, Kojima S., & Homma M. (2011)

Characterization of the periplasmic region of PomB, a Na⁺-driven flagellar stator protein in *Vibrio alginolyticus*.

J. Bacteriol. **193**, 3773-84.

Li X., Mooney P., Zheng S., Booth C.R., Braunfeld M.B., Gubbens S., Agard D.A., Cheng Y. (2013)

Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM.

Nat. Methods. **10**, 584–590.

Lloyd S.A., Tang H., Wang X., Billings S., 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**, 223-31.

Lynch M.J., Levenson R., Kim E.A., Sircar R., Blair D.F., Dahlquist F.W., Crane B.R. (2017)
Co-Folding of a FliF-FliG Split Domain Forms the Basis of the MS:C Ring Interface within the Bacterial Flagellar Motor.

Structure **25**, 317-328.

Mastronarde D.N. (2005)

Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements.

J. Struct. Biol. **152**, 36–51

Mashimo T., Hashimoto M., Yamaguchi S., Aizawa S. (2007)

Temperature-hypersensitive sites of the flagellar switch component FliG in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

J. Bacteriol. **189**, 5153–5160.

McEvoy M.M, Bren A., Eisenbach M., Dahlquist F.W. (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., Namba K. (2011)
Structural insight into the rotational switching mechanism of the bacterial flagellar motor.
PLoS Biol. **9**, e1000616.

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**, 1540-1548.e3.

Morado D.R., Hu B., Liu J. (2016)
Using tomoauto: a protocol for high-throughput automated cryo-electron tomography.
J. Vis. Exp. **30**, e53608.

Morales V.M, Backman A., Bagdasarian M. (1991)
A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants.
Gene **97**, 39-47

Morimoto Y.V, Nakamura S, Hiraoka K.D, Namba K, Minamino T. (2013)
Distinct roles of highly conserved charged residues at the MotA-FliG interface in bacterial flagellar motor rotation.
J. Bacteriol. **195**, 474-481

Ogawa R., Abe-Yoshizumi R., Kishi T., Homma M., Kojima S. (2015)
Interaction of the C-terminal tail of FliF with FliG from the Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*.
J. Bacteriol. **197**, 63-72

Okunishi I., Kawagishi I., Homma M. (1996)
Cloning and characterization of *motY*, a gene coding for a component of the sodium-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*.
J. Bacteriol. **178**, 2409-2415.

Onoue Y., Abe-Yoshizumi R., Gohara M., Nishino Y., Kobayashi K., 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.

Onoue Y., Takekawa N., Nishikino T., Kojima S., Homma M. (2018)

The role of conserved charged residues in the bidirectional rotation of the bacterial flagellar motor.

Microbiologyopen **7**, e00587.

Onoue Y., Iwaki M., Shinobu A., Nishihara Y., Iwatsuki H., Terashima H., Kitao A., Kandori H., Homma M. (2019)

Essential ion binding residues for Na⁺ flow in stator complex of the *Vibrio* flagellar motor.

Sci. Rep. **7**, 11216.

Pervushin K., Riek R., Wider G., Wuthrich K. (1997)

Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution.

Proc. Natl Acad. Sci. USA. **94**, 12366–12371

Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. (2004)

UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis.

J. Comput. Chem. **25**, 1605–1612.

Pourjaberi S.N.S, Terahara N, Namba K, Minamino T. (2017)

The role of a cytoplasmic loop of MotA in load-dependent assembly and disassembly dynamics of the MotA/B stator complex in the bacterial flagellar motor.

Mol. Microbiol. **106**, 646-658

Pronk S., Páll S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J.C., Kasson P.M., van der Spoel D., Hess B., Lindahl E. (2013)

GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit.

Bioinformatics **29**, 845-54.

- Sarkar M. K., Paul K., Blair D. (2010)
Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*.
Proc. Natl Acad. Sci. USA. **107**, 9370–9375
- Sato K., Homma M. (2000)
Multimeric structure of PomA, the Na⁺-driven polar flagellar motor component of *Vibrio alginolyticus*.
J. Biol. Chem. **275**, 20223-20228
- Schoenhals G.J., Macnab R.M. (1996)
Physiological and biochemical analyses of FlgH, a lipoprotein forming the outer membrane L ring of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*.
J. Bacteriol. **178**, 4200-7.
- Simon R., Priefer U., Puhler A. (1983)
A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria.
Nat. Biotechnol. **1**, 784–791
- Stolz B., Berg H.C. (1991)
Evidence for interactions between MotA and MotB, torque-generating elements of the flagellar motor of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **173**, 7033-7.
- 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**, 105-13.
- Sosinsky G.E., Francis N.R., DeRosier D.J., Wall J.S., Simon M.N., Hainfeld J. (1992)
Mass determination and estimation of subunit stoichiometry of the bacterial hook-basal body flagellar complex of *Salmonella typhimurium* by scanning transmission electron microscopy.

Proc. Natl Acad. Sci. USA. **89**, 4801-5.

Takeda M., Hallenga K., Shigezane M., Waelchli M., Löhr F, Markley J.L., Kainosho M. (2011)

Construction and performance of an NMR tube with a sample cavity formed within magnetic susceptibility matched glass.

J. Magn. Reson. **209**, 167–173.

Takekawa N., Terauchi T., Morimoto Y.V., Minamino T., Lo C.J., Kojima S., Homma M. (2013)

Na⁺ conductivity of the Na⁺-driven flagellar motor complex composed of unplugged wild-type or mutant PomB with PomA.

J. Biochem. **153**, 441-51

Takekawa, N., Kojima, S., 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.

Terahara N., Kodera N., Uchihashi T., Ando T., Namba K., Minamino T. (2017)

Na⁺-induced structural transition of MotPS for stator assembly of the *Bacillus* flagellar motor. *Sci. Adv.* **3**, eaao4119.

Terauchi T., Terashima H., Kojima S., Homma, M. (2011)

A conserved residue, PomB-F22, in the transmembrane segment of the flagellar stator complex, has a critical role in conducting ions and generating torque.

Microbiology **157**, 2422–2432.

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., Homma, M. (2008)

Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor.

Int. Rev. Cell. Mol. Biol. **270**, 39-85. (Review)

Terashima H., Koike M., Kojima S., Homma M. (2010a)

The flagellar basal body-associated protein FlgT is essential for a novel ring structure in the sodium-driven *Vibrio* motor.

J Bacteriol. **192**, 5609-15.

Terashima H., Kojima S., Homma M. (2010b)

Functional transfer of an essential aspartate for the ion-binding site in the stator proteins of the bacterial flagellar motor.

J. Mol. Biol. **397**, 689-96.

Thomas D.R., Morgan D.G., DeRosier D.J. (1999)

Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor.

Proc. Natl Acad. Sci. USA. **96**, 10134-9.

Thomas D.R., Francis N.R., Xu C., DeRosier D.J. (2006)

The three-dimensional structure of the flagellar rotor from a clockwise-locked mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

J. Bacteriol. **188**, 7039-48.

Ueno T., Oosawa K., Aizawa S. (1992)

M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF.

J. Mol. Biol. **227**, 672-7.

Val M.E., Skovgaard O., Ducos-Galand M., Bland M.J., Mazel D. (2012)

Genome engineering in *Vibrio cholerae*: a feasible approach to address biological issues.

PLoS Genet. **8**, e1002472.

Van Way S.M., Millas S.G., Lee A.H., 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**, 3173-81.

Vartanian A.S., Paz A., Fortgang E.A., Abramson J., Dahlquist F.W. (2012)

Structure of flagellar motor proteins in complex allows for insights into motor structure and switching.

J. Biol. Chem. **287**, 35779-83.

Welch M., Oosawa K., Aizawa S.I., Eisenbach M. (1993)

Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria.
Proc. Natl Acad. Sci. USA. **90**, 8787–8791.

Xu M., Yamamoto K., Honda T., Ming X. (1994).
Construction and characterization of an isogenic mutant of *Vibrio parahaemolyticus* having a deletion in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (trh)
J. Bacteriol. **176**, 4757-60.

Yakushi T., Maki S., Homma M. (2004)
Interaction of PomB with the third transmembrane segment of PomA in the Na⁺-driven polar flagellum of *Vibrio alginolyticus*.
J. Bacteriol. **186**, 5281–5291.

Yorimitsu T., Sato K., Asai Y., Kawagishi I., Homma M. (1999)
Functional interaction between PomA and PomB, the Na⁺-driven flagellar motor components of *Vibrio alginolyticus*.
J. Bacteriol. **181**, 5103-5106.

Yorimitsu T., Mimaki A., Yakushi T., Homma, M. (2003)
The conserved charged residues of the C-terminal region of FliG, a rotor component of Na⁺-driven flagellar motor.
J. Mol. Biol. **334**, 567-83

Zhou J, Blair DF. (1997)
Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor.
J. Mol. Biol. **273**, 428-39.

Zhou J., Lloyd S.A., Blair D.F. (1998)
Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor.
Proc. Natl Acad. Sci. USA **95**, 6436-41.

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. USA. **111**, 13523-8.

Zhu S., Nishikino T., Hu B., Kojima S., Homma M., Liu J. (2017a)

Molecular architecture of the sheathed polar flagellum in *Vibrio alginolyticus*.
Proc. Natl Acad. Sci. USA. **114**, 10966-10971

Zhu S., Qin Z., Wang J., Morado D.R., Liu J. (2017b)
In situ structural analysis of the spirochetal flagellar motor by cryo-electron tomography.
Methods Mol. Biol. **1593**, 229–242.

Zhu S., Nishikino T., Kojima S., Homma M., Liu J. (2018)
The *Vibrio* H-Ring Facilitates the Outer Membrane Penetration of the Polar Sheathed Flagellum.
J. Bacteriol. **200**, e00387-18.

岩月 啓人

「べん毛モーター固定子タンパク質 PomA のイオン透過に重要なペリプラズム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 2018 年度修士論文

謝辞

本件研究を進めるにあたり、ご指導いただいた本間道夫教授に深く感謝いたします。本間先生が掲げる「やりたい研究は自由にやる」という研究室の方針があったため、このような形で研究を進めることができたのだと感じています。小嶋誠司准教授には、本間先生とは違った観点からご指導、ご助言をいただき、感謝いたします。寺島浩行助教には、名古屋大学に着任されてからは日常的に、着任以前の大阪大学大学院理学研究科高分子科学専攻所属の時は学会会場にて研究を進めるうえでの大きなヒントをいただき、感謝いたします。私が学部、博士前期課程の学生の時に研究室に所属されており、現在立命館大学生命情報所属の尾上靖宏助教には、研究者として研究を進めるうえでの基礎の基本を丁寧にご教授いただきました。尾上先生のご指導ご助言がなければ、学位を取得することはなかったと思い、深く感謝しています。現在大阪大学大学院理学研究科高分子科学所属の竹川宜宏助教には、学部生の時より実験の進め方から論文の書き方までご指導いただき、感謝いたします。竹川博士は常に研究をする上での私の目標であり、研究室における先輩の見本でした。分子第4講座に所属している皆さま、所属後卒業された方々にも御礼申し上げます。研究を進めるにあたり、血と汗のにじむ努力により研究分野が開拓、発展され、それにより得られた知見を基礎にして、私が研究を進められていることを改めて実感しています。

MD シミュレーションによる FliG の構造解析とリングモデルの構築では、長浜バイオ大学バイオサイエンス所属の土方敦司博士、白井剛博士にお世話になりました。NMR による FliG_{MC} 断片の解析では、大阪大学蛋白質研究所所属の宮ノ入洋平博士にお世話になりました。Cryo-ET による FliG 変異体の回転子の解析は、米国 Yale 大学 Microbial Pathogenesis 所属の Jun Liu 博士、Shiwei Zhu 博士にお世話になりました。ATR-FTIR による PomB-D24N をもつプラグ欠失固定子の解析では名古屋工業大学大学院工学研究科所属の神取秀樹博士、岩城雅代博士にお世話になりました。これらの皆様の過大なサポートにより研究を進めることができ、厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたって、日本学術振興会特別研究員 DC1 の採用による研究費の支給と、名古屋大学リーディング大学院グリーン自然科学国際教育研究プログラムによるサポートをいただきました。また、家族、友人には研究を進めるにあたって多角的な面から多大なサポートをいただき、感謝申し上げます。

付記

本学位論文の研究の第一章の内容、第二章と第三章の一部の内容は以下の論文として発表である。

1. **Nishikino T**, Zhu S, Takekawa N, Kojima S, Onoue Y, Homma M. (2016)
Serine suppresses the motor function of a periplasmic PomB mutation in the *Vibrio* flagella stator.
Genes Cells **21**, 505-16.
2. **Nishikino T**, Hijikata A, Miyanoiri Y, Onoue Y, Kojima S, Shirai T, Homma M. (2018)
Rotational direction of flagellar motor from the conformation of FliG middle domain in marine *Vibrio*.
Sci. Rep. **8**, 17793.
3. **Nishikino T**, Nishikino T, Iwatsuki H, Mino T, Kojima S, Homma M. (2019)
PomA periplasmic loop and sodium ion entering in stator complex of sodium-driven flagellar motor.
J. Biochem. doi:10.1093/jb/mvz102.

表 1 用いた菌株

| Strain | Genotype or description | Reference or source |
|------------------------------------|--|--------------------------------|
| <i>Vibrio alginolyticus</i> | | |
| VIO5 | Rif ^r Pof ⁺ Laf ⁻ | Okunishi <i>et al.</i> , 1996 |
| KK148 | VIO5 <i>flhG</i> (Rif ^r Laf ⁻ Pof ⁺ Multi-Pof) | Kusumoto <i>et al.</i> , 2006 |
| NMB102 | VIO5 Che ⁻ (Rif ^r Laf ⁻ Pof ⁺ CW-rotation) | Homma <i>et al.</i> , 1996 |
| NMB136 | VIO5 Che ⁻ (Rif ^r Laf ⁻ Pof ⁺ CCW-rotation) | Kojima <i>et al.</i> , 1997 |
| NMB191 | VIO5 $\Delta pomAB$ (Rif ^r Laf ⁻ Mot ⁻) | Yorimitsu <i>et al.</i> , 1999 |
| NMB195 | NMB136 $\Delta pomAB$ (Rif ^r Laf ⁻ Mot ⁻) | Yakushi <i>et al.</i> , 2004 |
| NMB198 | VIO5 $\Delta fliG$ (Rif ^r Laf ⁻ pof ⁻) | Yorimitsu <i>et al.</i> , 2003 |
| NMB301 | VIO5 $\Delta pomAB \Delta fliG$ (Rif ^r Laf ⁻ pof ⁻) | Takekawa <i>et al.</i> , 2014 |
| NMB318 | NMB198 $\Delta cheY$ (Rif ^r Laf ⁻ pof ⁻ che ⁻) | This study |
| NMB328 | KK148 $\Delta fliG$ (Rif ^r Laf ⁻ pof ⁻) | This study |
| SNR1 | NMB102 $\Delta pomAB$ (Rif ^r Laf ⁻ Mot ⁻) | This study |
| SNR2 | NMB191 $\Delta cheY$ (Rif ^r Laf ⁻ Mot ⁻ Che ⁻) | This study |
| SNR3 | NMB195 $\Delta cheY$ (Rif ^r Laf ⁻ Mot ⁻ Che ⁻) | This study |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| DH5 α | <i>recA1 hsdR17 endA1 supE44 thi-1 relA1 gyrA96</i> $\Delta(argF-lacZYA)U169 \Phi80dlacZ\Delta M15$ | Grant <i>et al.</i> , 1990 |
| BL21 (DE3) | Host for protein expression (FliG _{MC} fragment) | Novagen |
| BL21 (DE3) pLysS | Host for protein expression (PomAB) | Novagen |
| β 3914 | $\beta 2163$ <i>gyrA462 zei-298::Tn10</i> (Km ^r Em ^r Tc ^r) Tp ^r Sm ^r <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR-M+RP4</i> : 2-Tc:Mu: | Le Roux <i>et al.</i> , 2007 |
| S17-1 | Km ^r Tn7 λ pir (strain for conjugational transfer of the plasmids (pMMB206 and pNT1)) | Simon <i>et al.</i> , 1983 |

Rif^r, rifampin resistant; Pof⁺, normal polar flagellar formation; Pof⁻, defective in polar flagellar formation; Laf⁻, defective in lateral flagellar formation; Mot⁻, motility defect; Che⁻, chemotaxis defect; Multi-Pof, multi polar flagellar formation; TP^r, trimrthoprim resistant; Sm^r, streptomycin resistant.

表 2 用いたプラスミド

| plasmid | Genotype or description | Reference or source |
|---------------------------------------|---|-------------------------------|
| pBAD33 | Cm ^r , P _{BAD} | Guzman <i>et al.</i> , 1995 |
| pMMB206 | Cm ^r , P _{tac} P _{lac} UV5 | Morales <i>et al.</i> , 1991 |
| pSU41 | Km ^r , P _{lac} | Bartolomé <i>et al.</i> 1991 |
| pColdI | Amp ^r , P _{cspA} (Cold shock expression vector) | Takara |
| pColdIV | Amp ^r , P _{cspA} (Cold shock expression vector) | Takara |
| pSW7848 | <i>oriVR6K_{ori}TRP4 araC</i> - P _{BAD} - <i>ccdB</i> (Suicide plasmid for allele exchange) | Val <i>et al.</i> , 2012 |
| pHFAB | <i>pomA</i> and <i>pomB</i> in pBAD33 | Fukuoka <i>et al.</i> , 2005 |
| pYA303 | <i>pomA</i> and <i>pomB</i> in pSU41 | Kojima <i>et al.</i> , 1999 |
| pColdI-FliG _{MC} | <i>fliG</i> fragment (G122-L351) in pColdI | Onoue <i>et al.</i> , 2016 |
| pColdIV- <i>pomAB-his₆</i> | <i>pomA</i> and <i>pomB-his₆</i> in pColdIV | Onoue <i>et al.</i> , 2019 |
| pNT1 | <i>fliG</i> in pMMB206 | Takekawa <i>et al.</i> , 2014 |
| pKY704 | Suicide vector (Cm ^r) | Xu <i>et al.</i> , 1994 |
| pKY704- $\Delta pomAB$ | <i>pomA</i> _{Δ1-68-<i>pomB</i>_{Δ126-301} fragment in pKY704} | Yorimitsu <i>et al.</i> 1999 |
| pHIDA1 | <i>pomA</i> _{Δ1-68-<i>pomB</i>_{Δ126-301} fragment in pSW7848} | This study |
| pHIDA2 | pSW7848 flanking regions (500 bp) of <i>cheY</i> | This study |
| pHIDA3 | <i>fliF-fliG</i> _{Δ55-175} fragment in pSW7848 | This study |
| pHIDA4 | <i>pomA</i> and <i>pomB</i> _{Δ41-120} - <i>his₆</i> in pColdIV | This study |

Km^r, Kanamycin resistant; Amp^r, ampicillin resistant; Cm^r, chloramphenicol resistant; P_{lac}, lac promoter; P_{BAD}, arabinose promoter; P_{cspA}, cold shock promoter

表 3 使用した培地と緩衝溶液

VC 培地

0.5 % (w/v) polypeptone
0.5 % (w/v) Yeast Extract
0.4 % (w/v) K₂HPO₄
3 % (w/v) NaCl
0.2 % (w/v) Glucose

VC 寒天培地

0.5 % (w/v) polypeptone
0.5 % (w/v) Yeast Extract
0.4 % (w/v) K₂HPO₄
3 % (w/v) NaCl
0.2 % (w/v) Glucose
1.25 % (w/v) 寒天

VPG 培地

1 % (w/v) polypeptone
0.4 % (w/v) K₂HPO₄
3 % (w/v) NaCl
0.5 % (w/v) glycerol

VPG 軟寒天培地

1 % (w/v) polypeptone
0.4 % (w/v) K₂HPO₄
3 % (w/v) NaCl
0.5 % (w/v) glycerol
0.3 % (w/v) Bactoagar

LB 培地

1 % Bacto Trypton
0.5 % (w/v) Yeast Extract
0.5 % (w/v) NaCl

LB 寒天培地

1 % Bacto Trypton
0.5 % (w/v) Yeast Extract

0.5 % (w/v) NaCl
1.25 % (w/v) 寒天

Osmotic Solution

20 % (w/v) sucrose
400 mM NaCl
30 mM Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM EDTA

V buffer

300 mM NaCl
5 mM MgCl₂
50 mM Tris-HCl (pH 7.5)

TN buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.0)
150 mM NaCl

TN-I30 buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.0)
150 mM NaCl
30 mM Imidazole

TN-I120 buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.0)
150 mM NaCl
120 mM Imidazole

Na-Pi buffer

50 mM Na-Pi (pH 8.0)
200 mM NaCl

Na-Wash buffer

50 mM Na-Pi (pH 8.0)
200 mM NaCl
10 mM Imidazole
0.05% (w/v) DMNG

Na-Elution buffer

50 mM Na-Pi (pH8.0)

200 mM NaCl

200 mM Imidazole

0.05% (w/v) DMNG

K-Pi buffer

50 mM K-Pi (pH 8.0)

200 mM KCl

K-Wash buffer

50 mM K-Pi (pH 8.0)

200 mM KCl

10 mM Imidazole

0.05% (w/v) DMNG

K-Elution buffer

50 mM K-Pi (pH 8.0)

200 mM KCl

200 mM Imidazole

0.05% (w/v) DMNG

TKD buffer

20 mM Tris-HCl (pH 6.8)

100 mM KCl

0.05% (w/v) DMNG

TMN buffer

500 mM NaCl

5 mM MgCl₂

50 mM Tris-HCl (pH 7.5)

5 mM glucose

TNET buffer

150 mM NaCl

5 mM EDTA

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1% (w/v) Triton X-100

Perfusion buffer

10 mM MOPS-Tris (pH 7.0)

5 mM MgCl₂

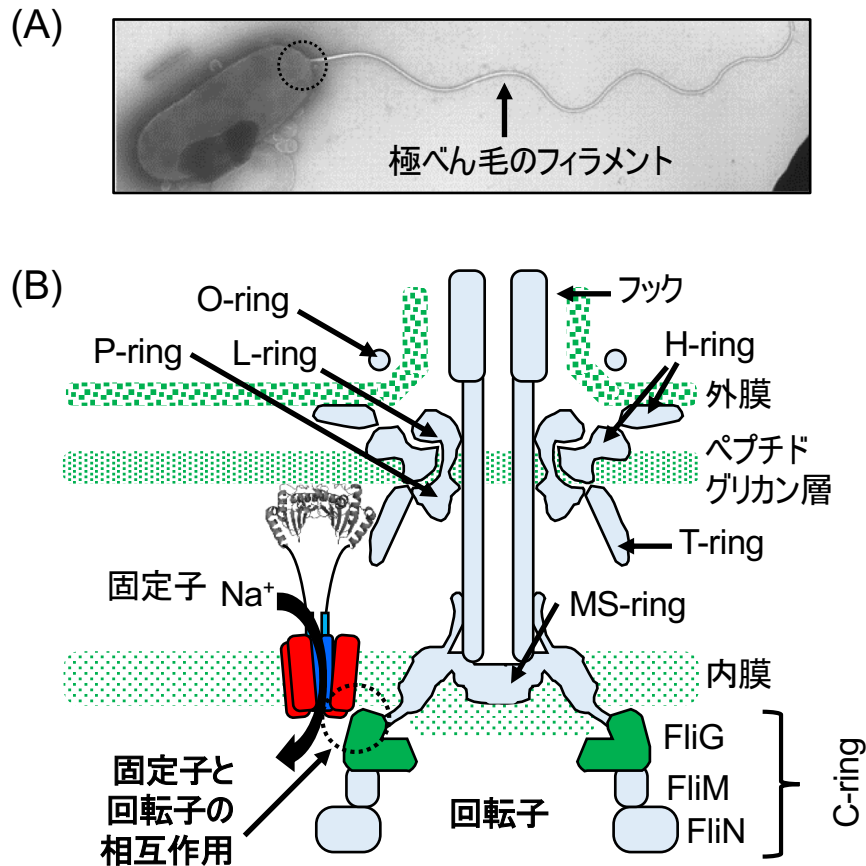


図1 海洋性ビブリオ菌極べん毛の模式図

(A)極べん毛野生株VIO5の電子顕微鏡写真。細胞の極から極べん毛のフィラメントが伸びている。べん毛の根元(破線の丸)の部分には、(B)で示すような構造体が存在する。写真はKusumoto *et al.*, 2006に掲載されているものを引用した。(B)回転子と固定子の模式図。海洋性ビブリオ菌の固定子はNa⁺チャネルとして働く。ビブリオ菌の極べん毛にはO, L, P, T, H, MS, C-ringと呼ばれるリング状の構造体が存在する。C-ringは3つのタンパク質[FliG, FliM, FliN]から構成される。FliGが固定子と適切に相互作用することにより、べん毛の回転力が形成される。

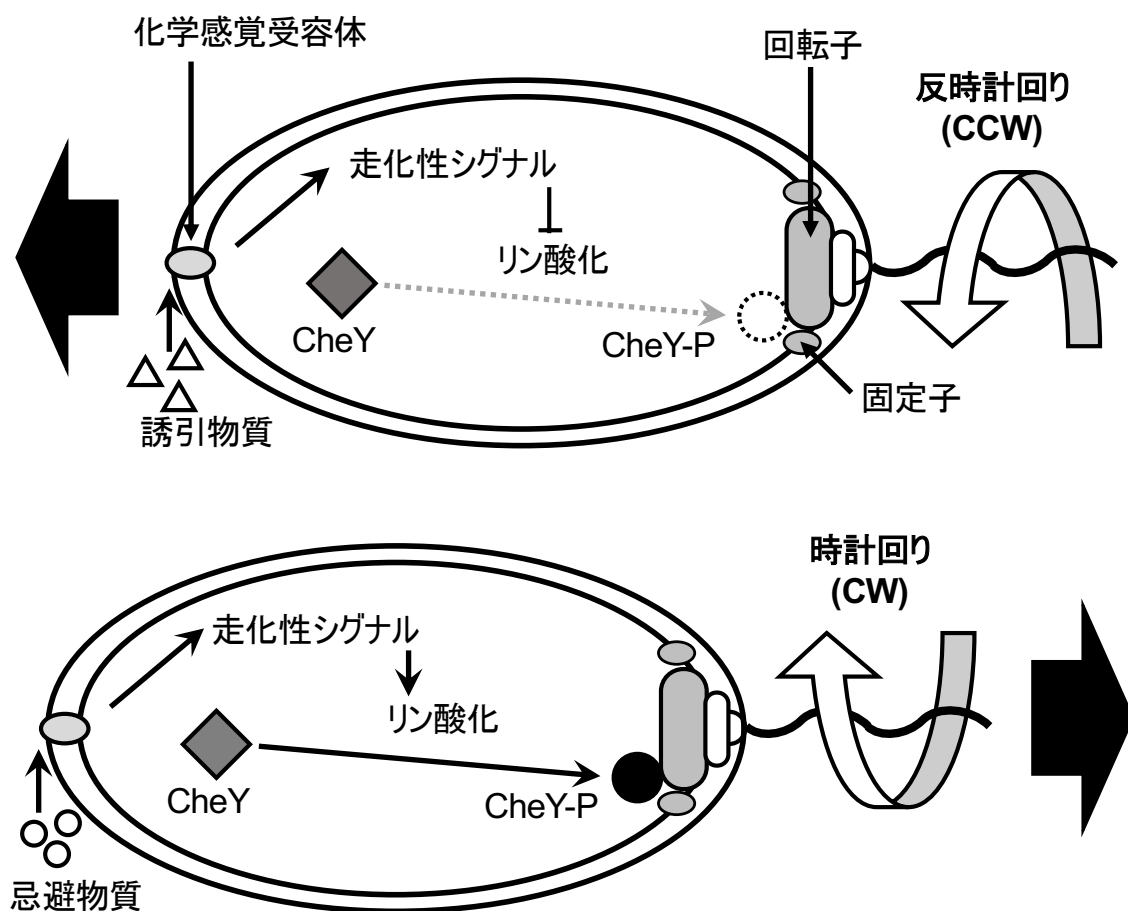


図2:走化性シグナルによるべん毛の回転方向制御

細菌の膜上に存在する化学感覚受容体が周囲の環境変化を検知する。この変化は、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に変換、回転子に伝わることで回転方向を制御する。Che因子中のCheYはリン酸化されると回転子中のFliMに結合し、べん毛の回転方向を時計回りに変化させる。リン酸化CheY(CheY-P)が脱リン酸化されるとFliMから解離し、べん毛の回転方向は反時計回りに変化する。誘引物質の増加は、CheYのリン酸化を抑制し、べん毛の回転方向を時計回りに変化させる。一方で、忌避物質の増加は、CheYのリン酸化を促進することでべん毛の回転方向を時計回りに変化させる。

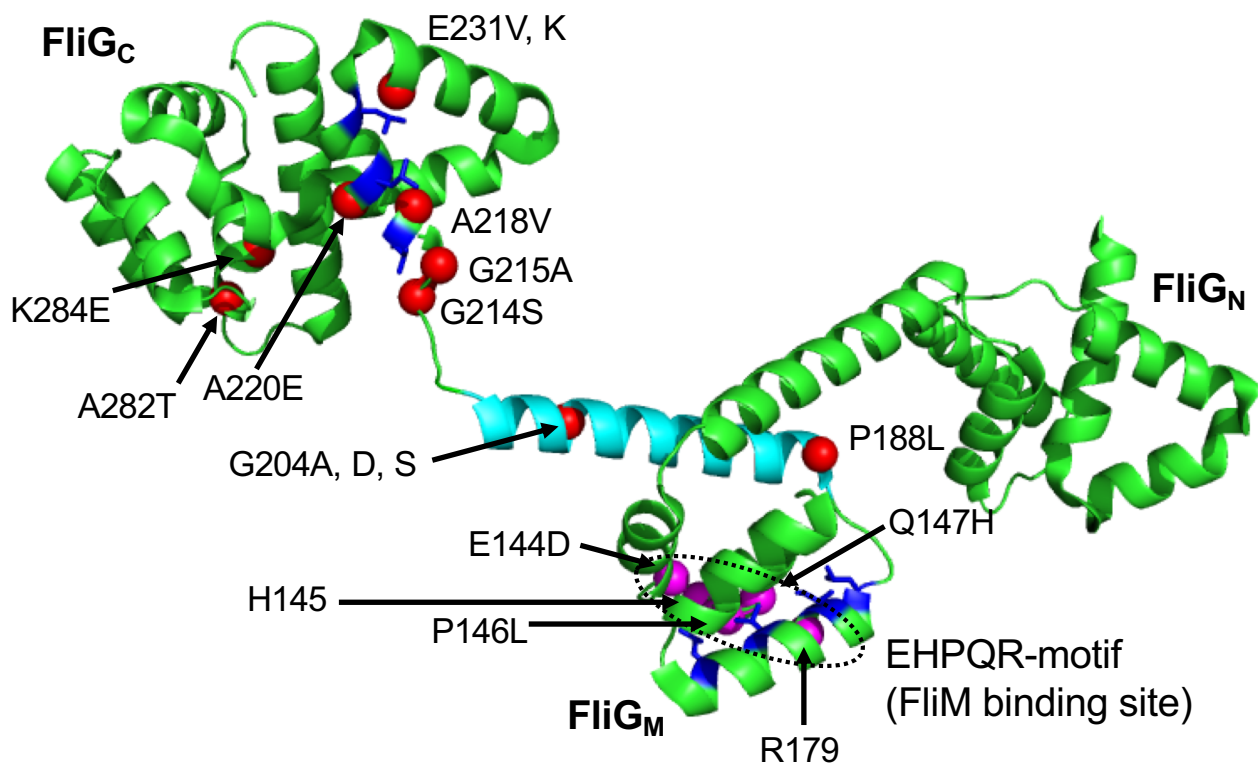
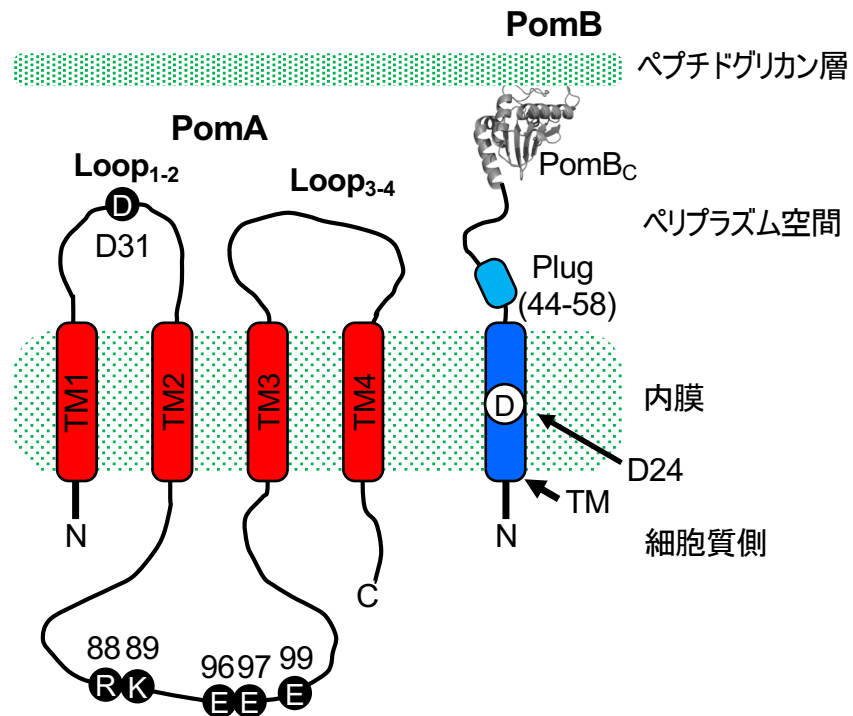


図3: *Aquifex aeolicus*で明らかになっているFliGの全長構造

FliGは3つのドメイン[FliG_N, FliG_M, FliG_C]に分けられる(Lee *et al.*, 2010; PDB ID: 4FHR)。FliG_M中にはFliMと相互作用することの知られている保存性の高いEHPQR-motif(黒点線)が存在する。ピブリオ菌のEHPQR-motifはE144, H145, P146, Q147, R179残基から成り、それらをマゼンダのボールで示した。また、回転方向制御に重要なHelix_{MC}を水色、ARM_M, ARM_Cの位置とその側鎖を青色で示した。本論文で解析した変異体の*Aquifex* FliGに対応する残基を構造上にマップし、赤のボールで示した

(A)



(B)

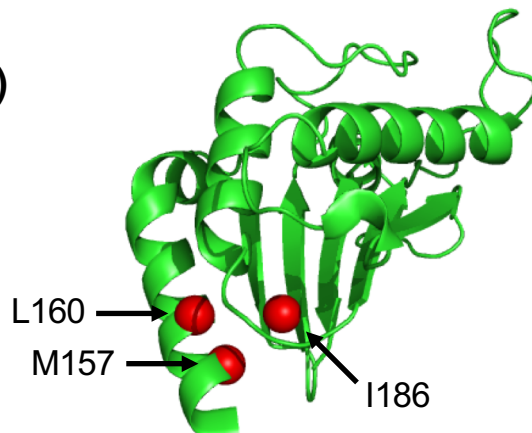


図4:海洋性ビブリオ菌の固定子

(A) PomAとPomBの模式図。PomAは四回膜貫通タンパク質、PomBは一回膜貫通タンパク質である。PomAの膜貫通領域(TM)1とTM2及び、TM3とTM4の間の領域(それぞれLoop₁₋₂, Loop₃₋₄)は、ペリプラズム領域に存在する。一方でTM2とTM3の間の領域(Loop₂₋₃)は細胞質領域に存在し、保存性の高い荷電残基(R88, K89, E96, E97, E99)はFliG_Cと相互作用することでモーターの回転力の形成に関わる。PomBのTMにはNa⁺と相互作用することがわかっているD24残基が存在する。プラグ領域(44-58)は、固定子のイオン透過を制御されていると考えられている。構造が明らかになっているPomB_Cは、ペプチドグリカン層に相互作用と考えられている。(B) PomB_Cの構造(Zhu *et al.*, 2014; PDB ID: 3WPW)。第一章で解析したPomB-L160C/I186C, M157C/I186Cを構造情報中に赤丸でマップした。

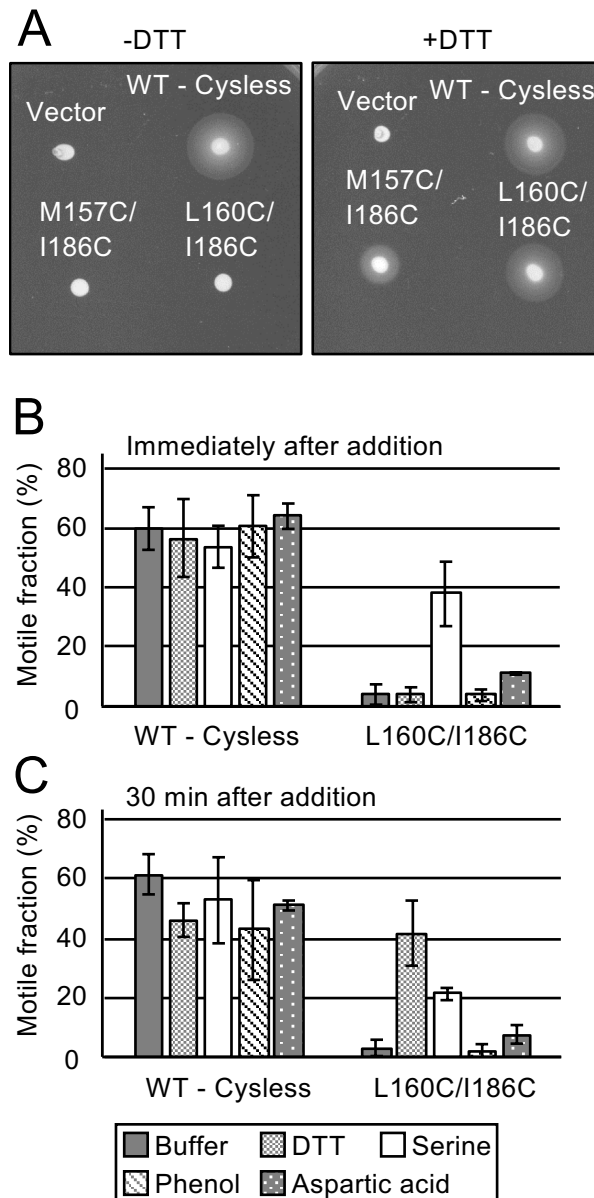


図5:L-serine添加によるPomB-L160C/I186C変異体の運動能の再獲得

(A)軟寒天培地上での運動のアッセイ。DTT非存在下(-DTT), DTT存在下(+DTT, 終濃度 10mM)でのリングの広がり具合からPomB-L160C/I186C変異体の運動能を評価した。軟寒天培地上に終夜培養した菌体の培養液を2 μ lのせ、30度で5.5時間培養した。(B), (C)液体培地中での運動能の観察。全菌体中で泳いでいる菌体の割合の平均値と標準偏差を示した。10mM DTT, 5mM L-serine, 3.33mM Phenol, 5mM Aspartic acidを加え、加えた1分後(B)と30分後(C)の泳いでいる菌体の割合(motility fraction)を示した。実験はそれぞれ3回行った。

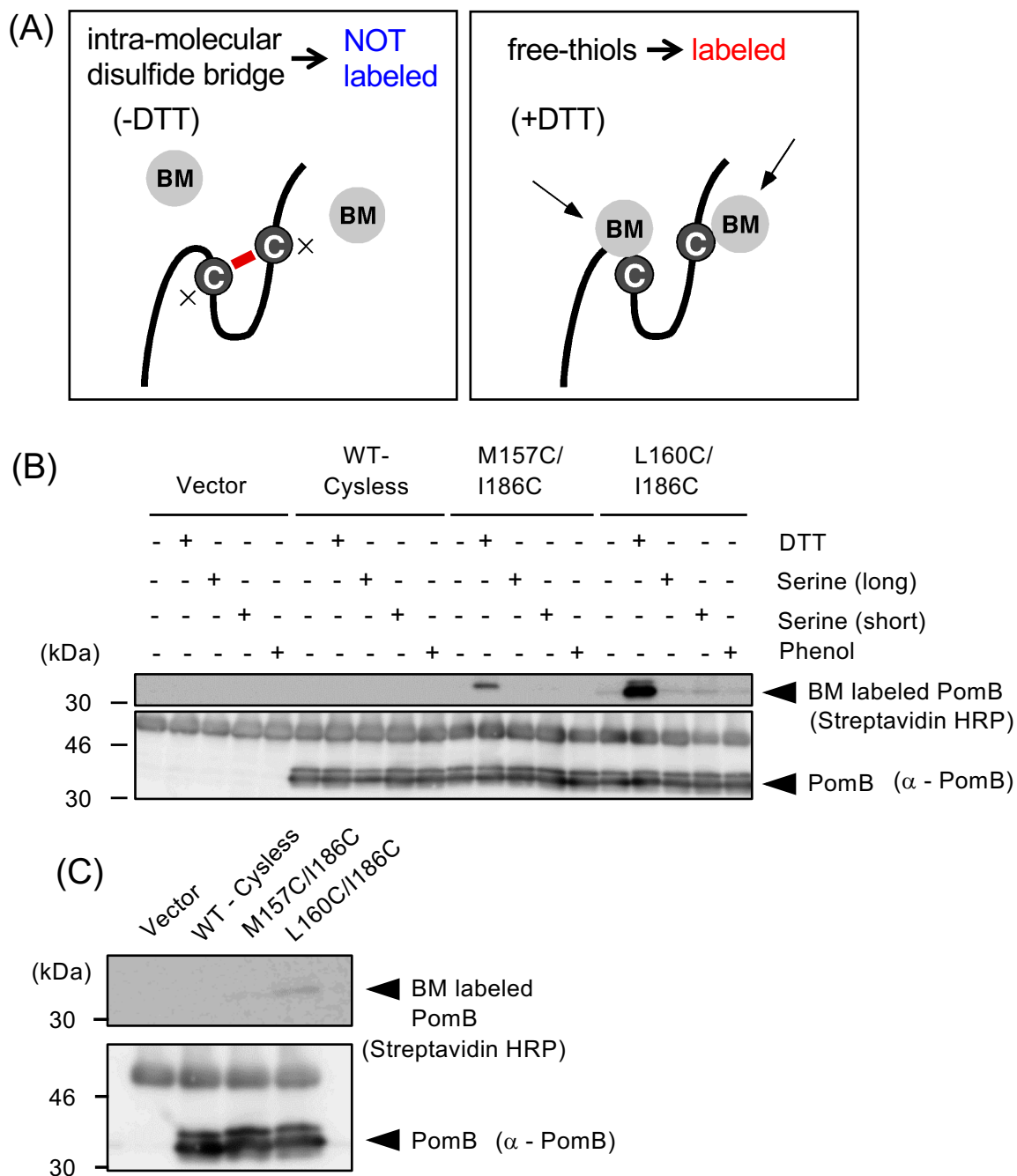


図6: Biotin maleimide (BM) ラベルを用いたPomB分子内架橋の検証

(A) BMラベルのモデル図: 左の図は酸化条件 (還元剤DTTが加えられていない) でPomB分子内のジスルフィド結合が架橋しているためBMで標識されない。右の図は還元条件 (DTTが加えられている) でPomB分子のジスルフィド結合が切断されている。還元されたシステイン残基にBMが結合し、Streptavidin-conjugated HRPにより検出される。(B) PomB-L160C/I186C変異体のBM標識とPomBの免疫沈降: 上の図に PomB-L160C/I186C変異体のStreptavidin conjugated HRPによるBM標識されたPomBを示し、下の図に用いたサンプルのPomBの発現量を示した。BM標識したPomBを抗PomB抗体と反応させ、Protein A sepharose CL-4B beadsで免疫沈降した。二次抗体としてPomBの検出にはHRP標識抗ウサギIgG抗体を用いた。DTTは終濃度1 mM DTTを加えて30分後処理しジスルフィド結合を切断したサンプル、Serine(long)は終濃度5 mMのL-Serineを加えて30分後に処理したサンプル、Serine(short)は緩衝溶液中で29分処理した後に終濃度5 mMのL-Serineを加えて1分後に処理したサンプル、Phenolは終濃度3.33 mMのPhenolを加え、30分処理したサンプルを示した。(C) L-Serineを加えた条件でのBM標識とPomBの免疫沈降。サンプルにL-Serineを終濃度5 mM加え、BMで標識した。

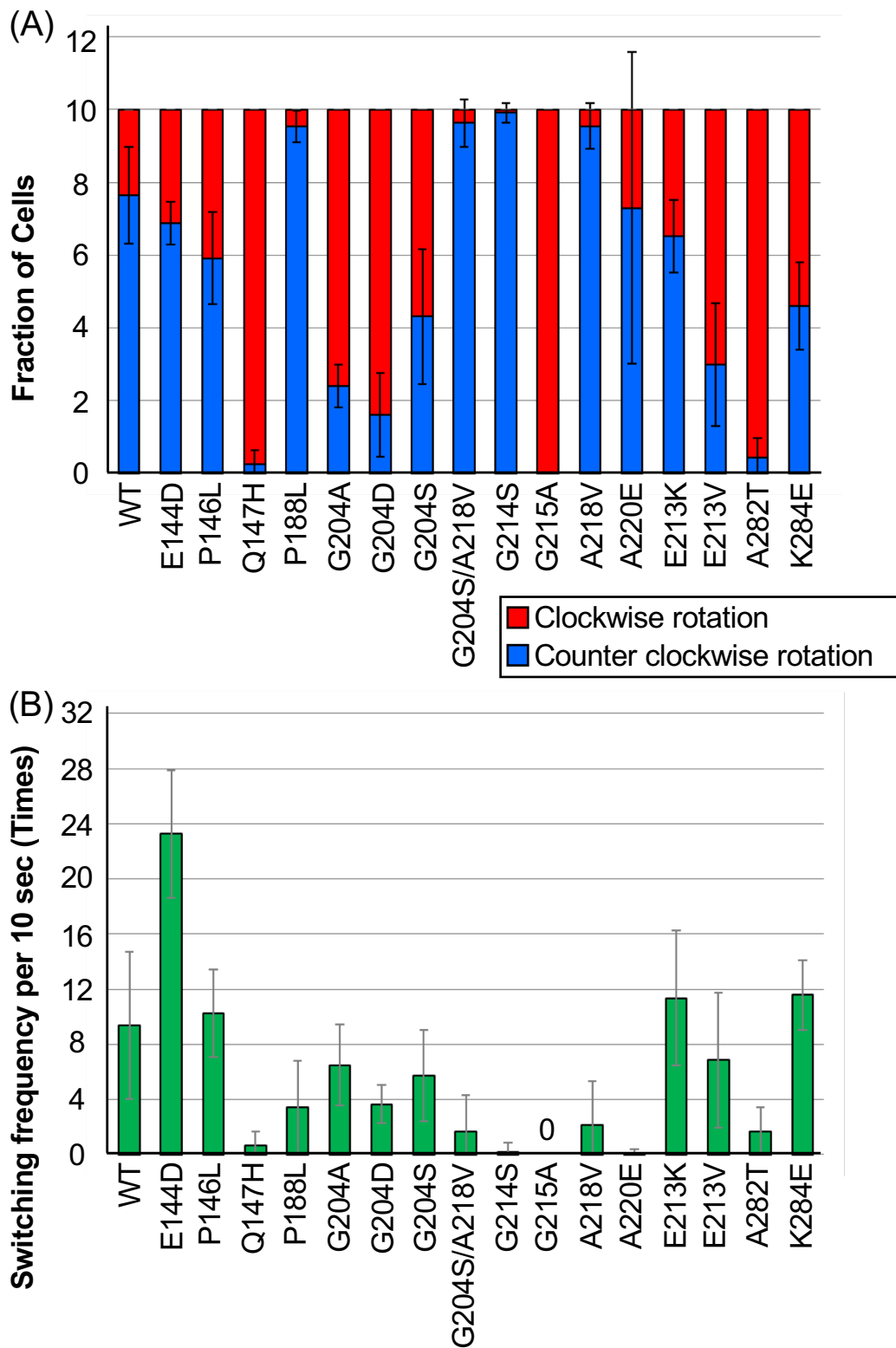


図7: 回転方向制御に異常がみられるFlhG変異体の単離と解析

(A)時計回りと反時計回りの回転時間の割合。10秒間中のモーターの時計回り(CW)と反時計回り(CCW)の回転時間の割合を示した。(B) 回転方向の切り替え頻度。10秒間中のモーターの回転方向の切り替え(時計回りが反時計回り、反時計回りが時計回りに変化した回数)の回数を示した。(A), (B)の解析は少なくとも6菌体行い、その平均値と標準偏差を示した。

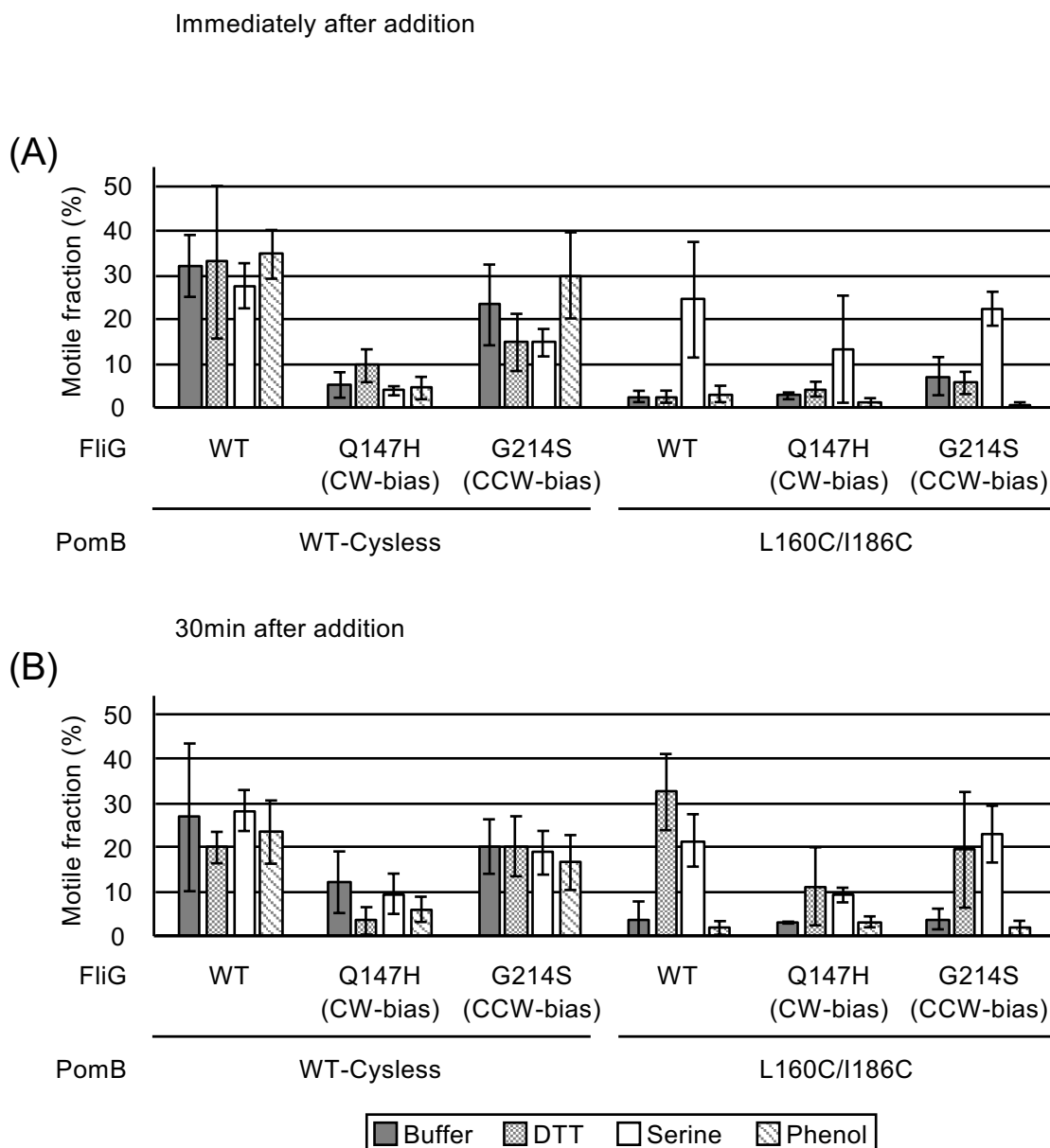


図8: 回転方向FliG変異によるPomB-L160C/I186C変異の運動能の再獲得

(A),(B) 液体培中での運動能の観察。全菌体中で泳いでいる菌体の割合の平均値と標準偏差を示した。10mM DTT, 5mM L-serine, 3.33mM Phenolを加え、加えた1分後(A)と30分後(B)の泳いでいる菌体の割合(motility fraction)を示した。実験はそれぞれ3回行った。モーターの回転が時計回りに偏るFliG変異(CW-bias)としてQ147Hを、反時計回りに偏るFliG変異(CCW-bias)としてG214Sを用いた。

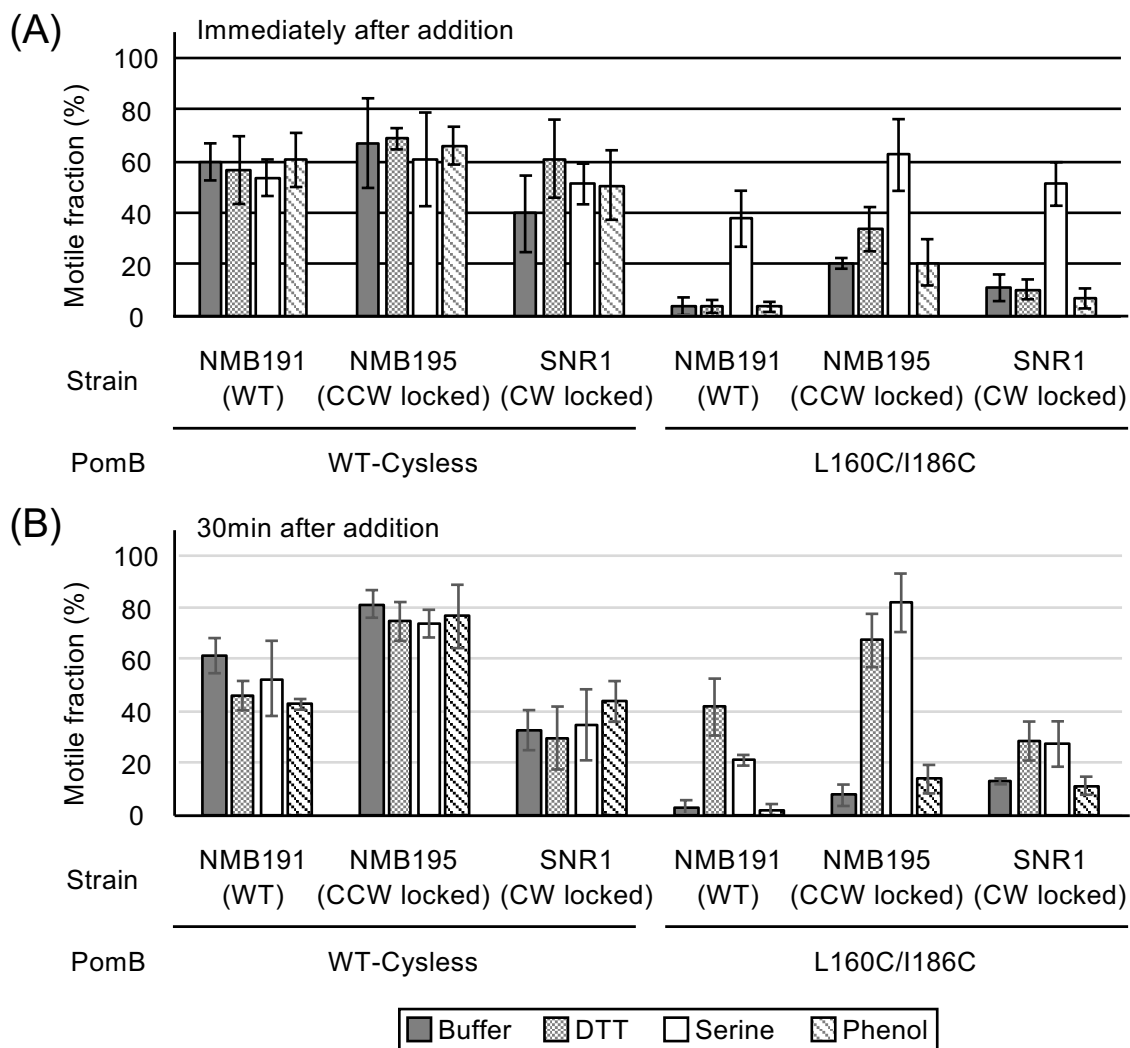


図9: 回転方向が固定された変異株におけるPomB-L160C/I186C変異の運動能の再獲得
 (A),(B) 液体培中での運動能の観察。全菌体中で泳いでいる菌体の割合の平均値と標準偏差を示した。10mM DTT, 5mM L-serine, 3.33mM Phenolを加え、加えた1分後(A)と30分後(B)の泳いでいる菌体の割合(motility fraction)を示した。実験はそれぞれ3回行った。モーターの回転が時計回りに固定される変異株(CW locked)としてSNR1、反時計回りに固定される変異株(CW locked)としてNMB195を用いた。

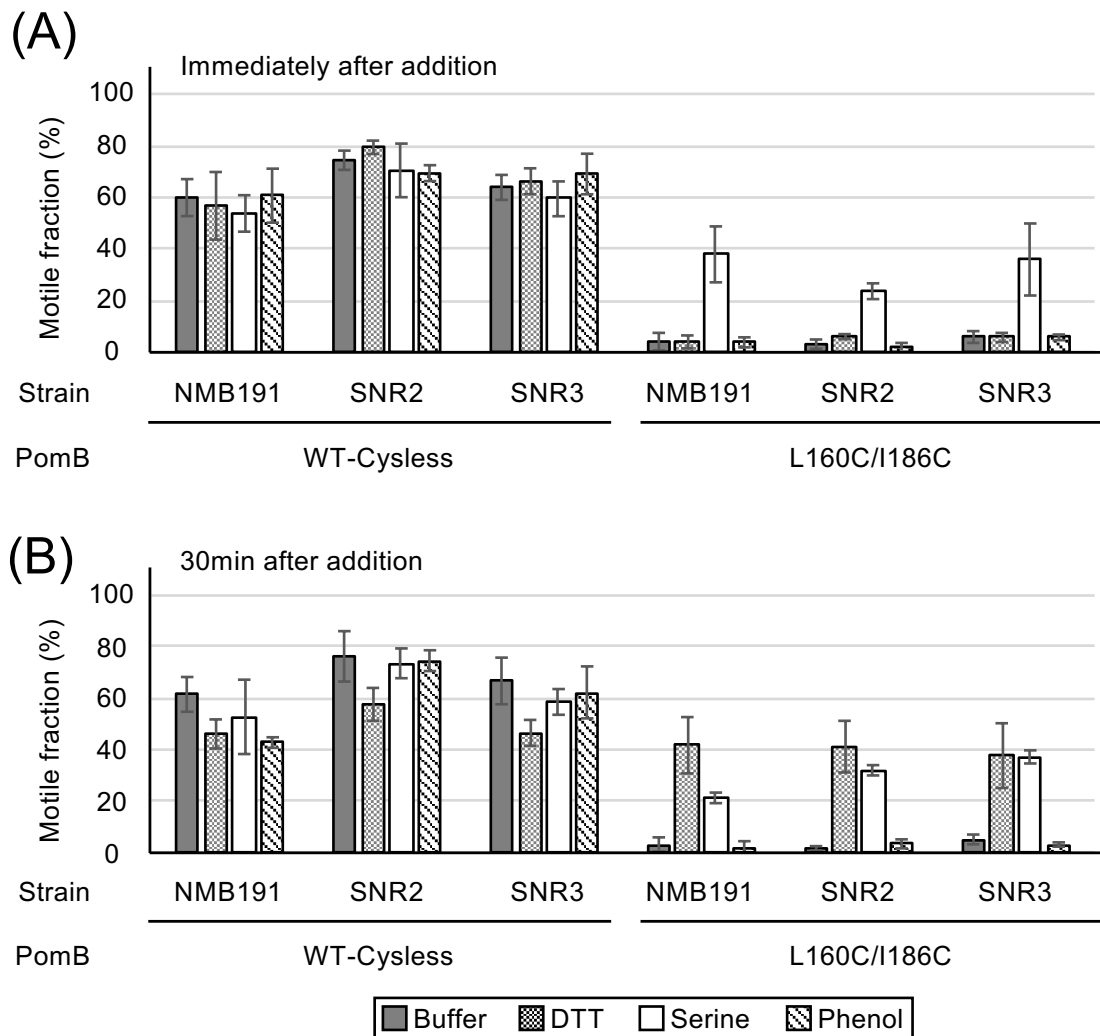


図10: *cheY*欠損株におけるPomB-L160C/I186C変異の運動能の再獲得

液体培中での運動能の観察。全菌体中で泳いでいる菌体の割合の平均値と標準偏差を示した。10mM DTT, 5mM L-serine, 3.33mM Phenolを加え、加えた1分後(A)と30分後(B)の泳いでいる菌体の割合(motility fraction)を示した。実験はそれぞれ3回行った。*cheY*を欠損しておりかつ、モーターの回転が反時計回りに固定される変異株としてSNR2, SNR3を用いた。

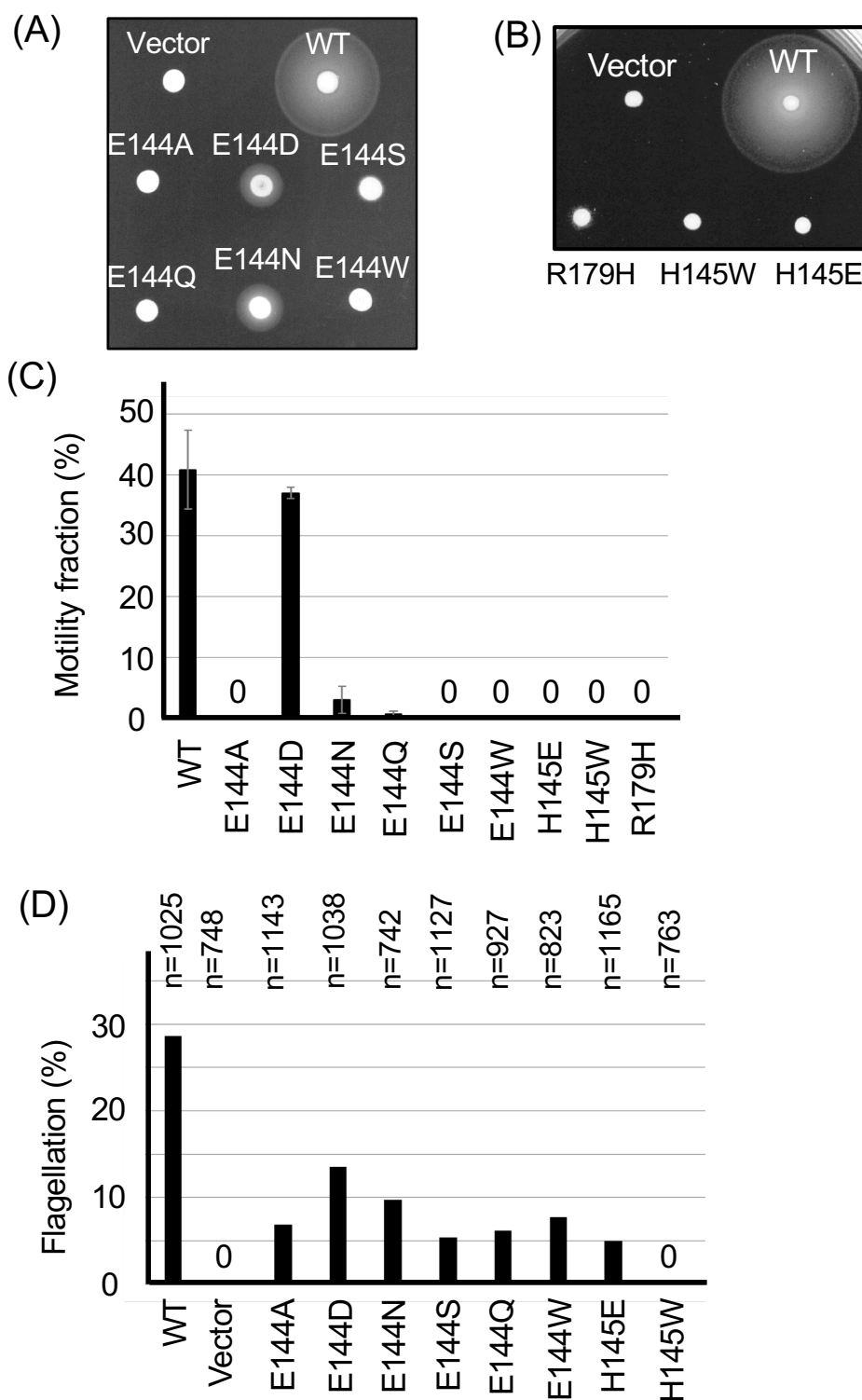


図11:L-serine添加によるPomB-L160C/I186C変異体の運動能の再獲得

(A)軟寒天培地上での運動のアッセイ。VPG軟寒天培地上に終夜培養した菌体の培養液を2 μ lのせ、30度で8時間培養した。リングが広がらず泳がないコントロールとしてVector plasmidを、泳ぐコントロールとして、野生型FliGを発現した菌体を用いた。(B) FliG変異体の運動している菌体の割合の測定。二次培養液をV bufferで100倍希釈、位相差顕微鏡により全菌体中で運動している菌体の割合を調べた。実験はそれぞれ3回行い、その平均値と標準偏差を示した。(C) FliG変異体のべん毛を形成している菌体の割合の測定。poly L-lysineコートしたスライドガラスとカバーガラスのセットに細胞を含む懸濁液を流し込み、ガラスの表面に張り付いた菌体のべん毛を抗原抗体反応により標識した。標識をrhodamine-conjugated IgGを用いて、蛍光により検出した。数えた菌体の数を示した。

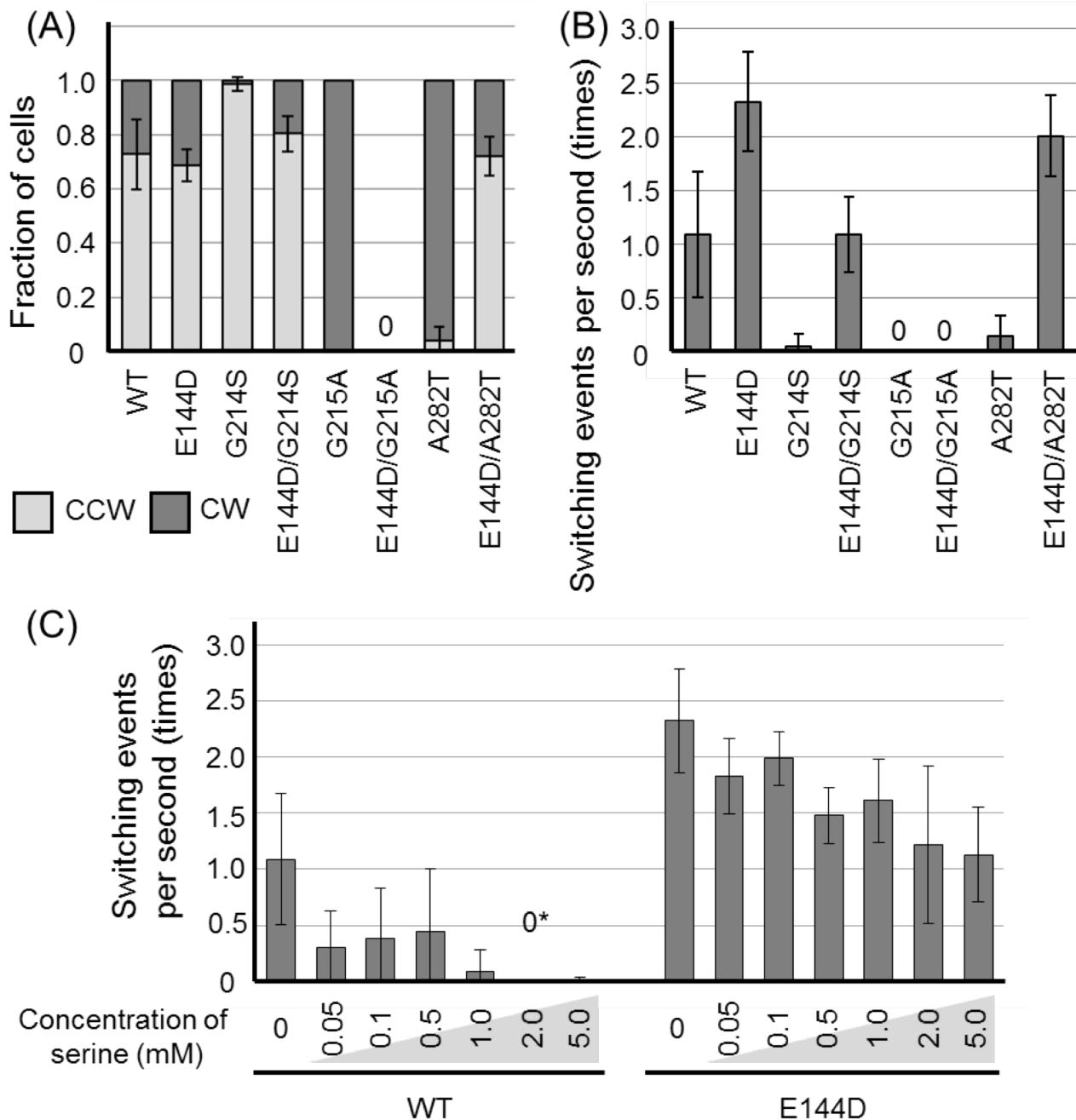


図12: 回転方向制御に異常がみられるFliG変異体の単離と解析

(A) モーターの時計回りと反時計回りの割合。10秒間中のモーターの時計回り(CW)と反時計回り(CCW)の回転時間の割合を示した。(B) モーターの回転宝庫切り替え頻度。10秒間中のモーターの回転方向の切り替え(時計回りが反時計回り、反時計回りが時計回りに変化した回数の合計)の回数を示した。(A), (B)のWT, E144D, G214S, G215A, A282T変異体は図7の結果をそのまま用いた。(C)E144D変異体のL-Serineへの誘引応答。L-Serine添加5分以内の10秒間中のモーターの回転方向の切り替えの回数を示した。野生型のL-serineを加えてないデータは、図7BのE144D変異のデータを用いた。0*は解析では回転方向の切り替えを起こした菌体がみられなかったが、観察中には回転方向を切り替えた菌体が存在したことを示す。各グラフで用いたデータの解析は少なくとも6菌体行い、その平均値と標準偏差を示した。

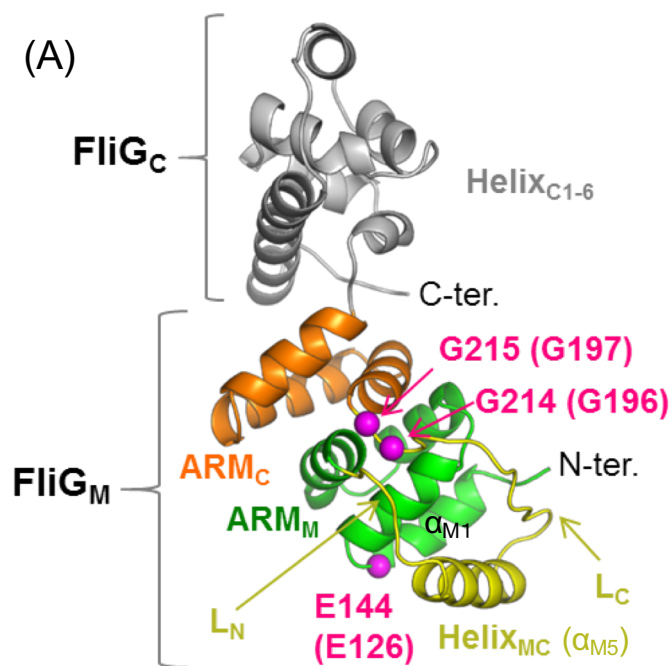


図13: MDシミュレーションに用いたFliGのモデル

ビブリオ菌ではFliGの構造がわかっていないため、MDシミュレーションの初期構造には好熱菌 *Thermotoga maritima* (*T.m.*) で解かれたFliGとFliMの共結晶構造を用いた(Vartanian *et al.*, 2012; PDB ID: 4HFR)。構造中のdisorderしている部分(188-194)はコンピュータ上で構築した。FliG_MとFliG_Cを含むD113-M235(ビブリオ菌ではW131-M253)でシミュレーションを行った。回転方向制御が異常になる変異の例としてE144D, G214S, G215A変異を選択した。それらは*T.m.* ではE126, G196, G197残基に相当する。FliG_Mを緑色、FliG_Cを灰色、ARM_Mをオレンジ色、Helix_{MC}(α_{M5})とN末側のループ領域(L_N)及び、C末側のループ領域(L_C)構造を黄色で示した

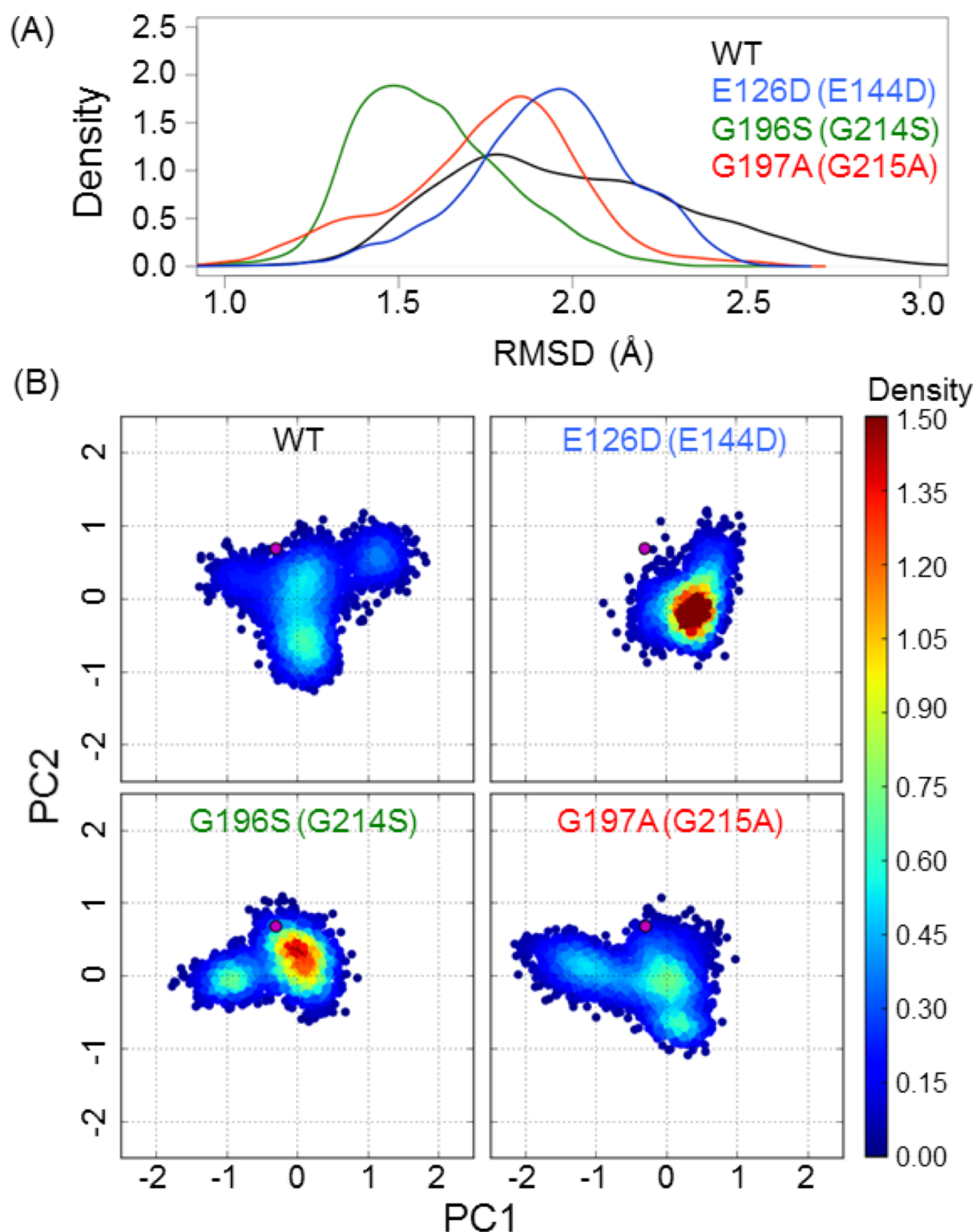


図14: 回転方向制御に異常がみられるFliG変異体の単離と解析

野生型、E126D(ビブリオ菌FliGでE144D)、G196S(G214S)、G197A(G215A)変異で計算を行った。(A)初期構造に対する計算で得られた構造のRMSDの比較。横軸に初期構造から計算で得られた構造がどれくらいずれたかを示すRoot Mean square Deviation (RMSD)を、縦軸にそのRMSDの値を取っている構造の頻度を示した。(B)計算で得られた構造の主成分分析。初期構造をマゼンダ色点で示した。それぞれの点一つ一つが計算で得られた構造に相当する。主成分分析で得られた主成分の値が同じもの(すなわち計算で得られた構造が比較的似ているもの)が得られる頻度をヒートマップで示した。

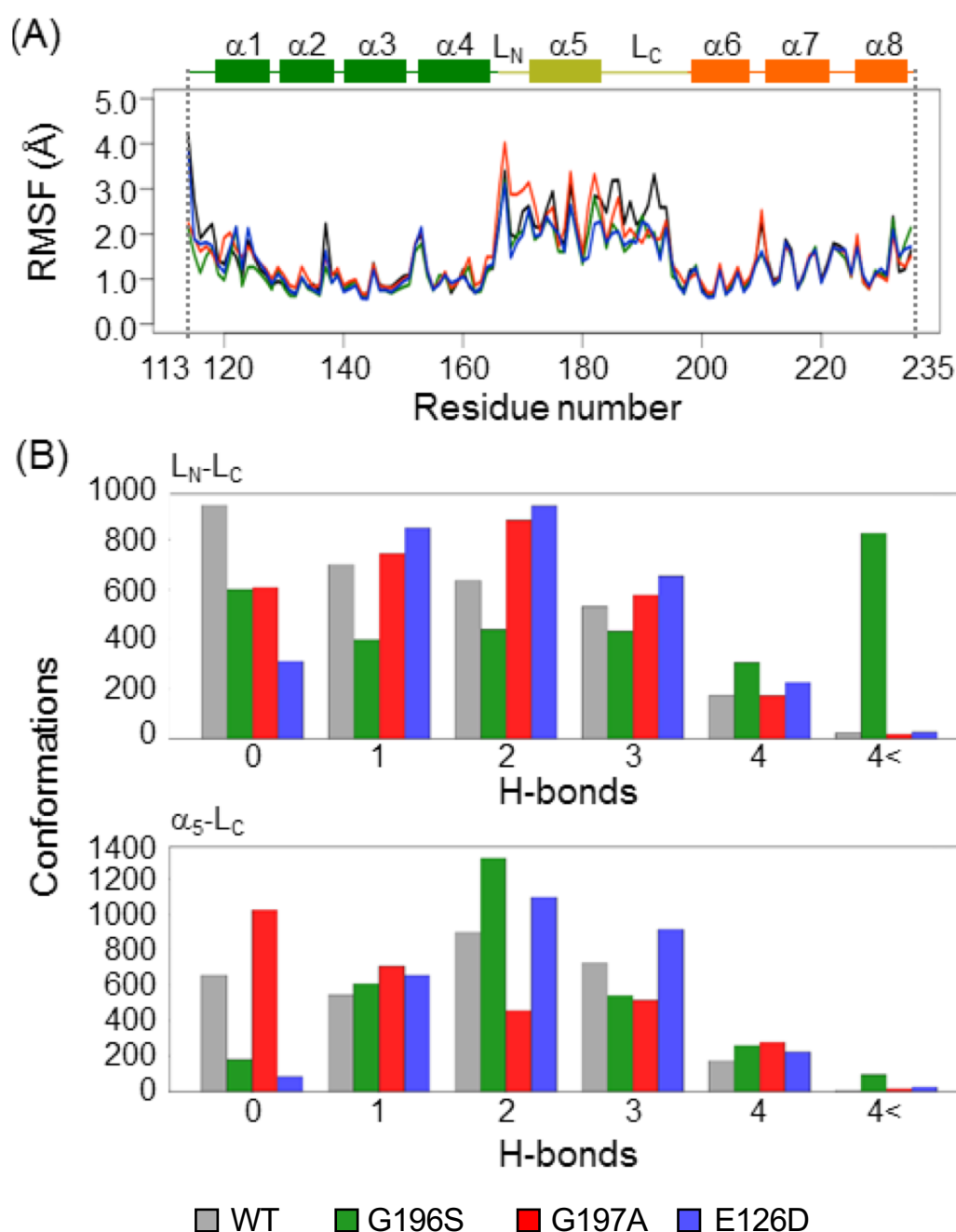


図15: 変異によるFliGの構造変化が生じた領域とHelix_{MC}の構造変化の解析

野生型、E126D(ヒブリオ菌FliGでE144D), G196S(G214S), G197A(G215A)変異で計算を行った。(A) 計算で得られた構造のRMSFの比較。横軸のアミノ酸番号に対して、縦軸に計算で得られた構造の揺らぎの平均値であるRoot Mean Square Fluctuation (RMSF)を示した。RMSFが大きいほどその領域が大きく揺らいでいることを示している。(B) L_N-L_C, α₅-L_C間での水素結合の数の比較。形成された水素結合の数を数え、その割合を棒グラフで示した。水素結合が多いほど、構造が安定し揺らぎが少なくなると考えられる。

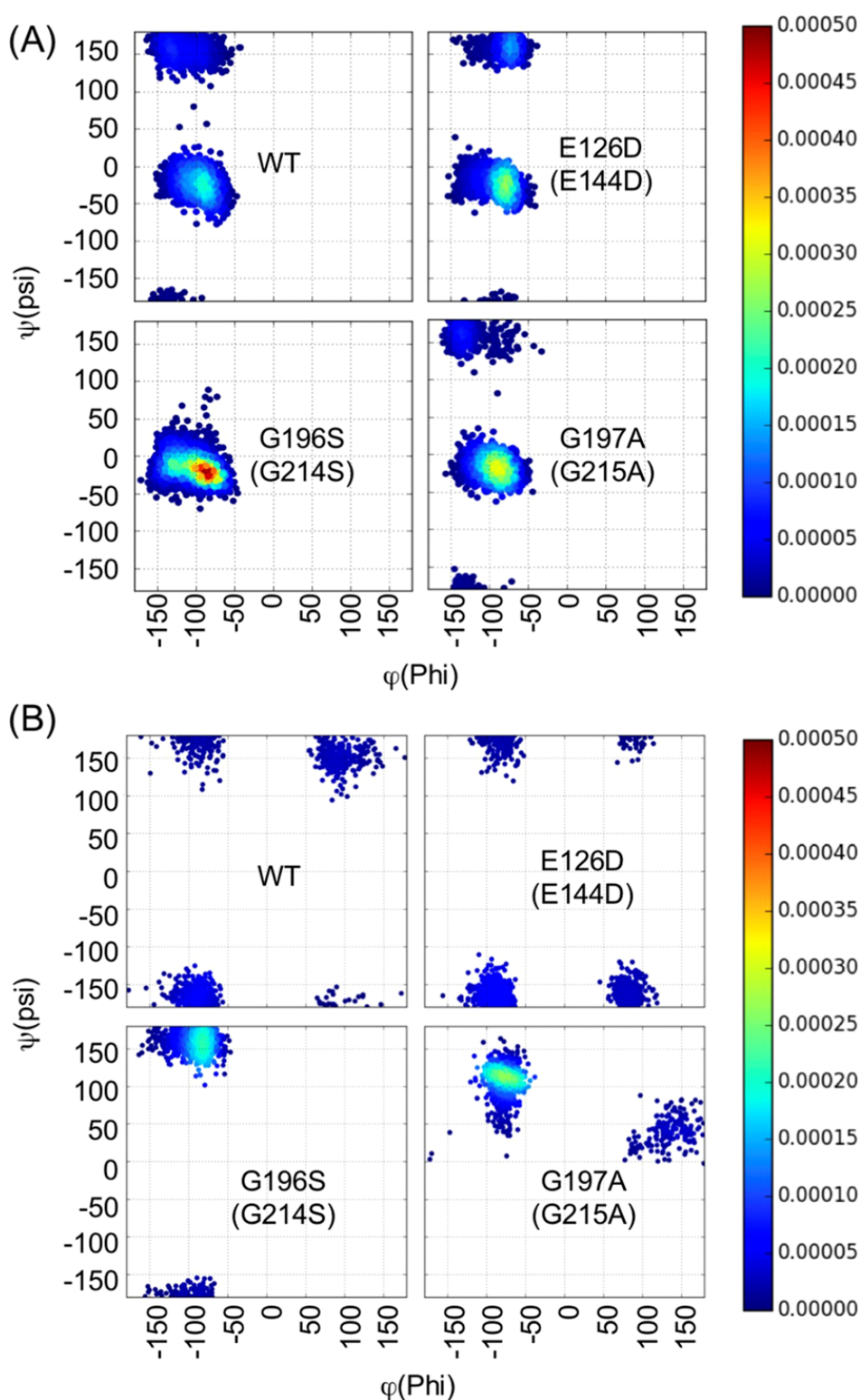


図16: 変異によるC α 195, C α 196のラムチャンドラン・プロットの変化

野生型、E126D(ヒブリオ菌FliGでE144D), G196S(G214S), G197A(G215A)変異でのC α 195 (A), C α 196(B)のラムチャンドラン・プロットを行った。これは縦軸にC α -C結合のとりうる角度 ψ (psi)を、横軸にC α -N結合のとりうる角度 ϕ (phi)を取ることで、タンパク質の主鎖二面角の取りうる向きを評価することができる。計算で得られた構造3000個の角度をプロットし、その頻度をヒートマップで示した。

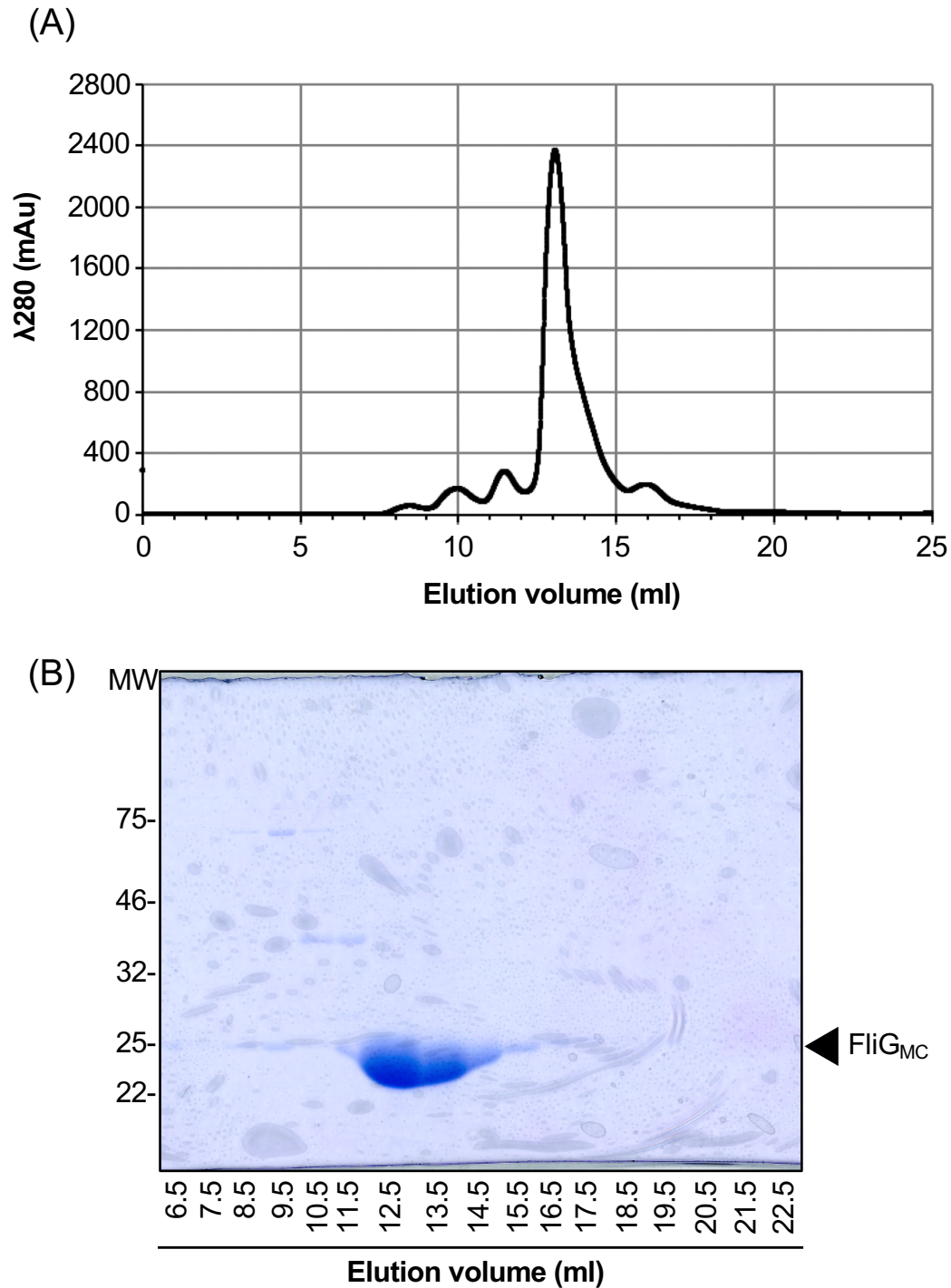


図17: FliG_{MC}断片のゲル濾過クロマトグラフィーのプロファイル

(A) Superdex 200 increase 10/300カラムで得られたゲル濾過クロマトグラフィーのプロファイル。縦軸にタンパク質の濃度を示す $\lambda=280$ nmの吸光度、横軸にelution volume (ml)を示した。溶出は1 mlずつ回収した。(B) 溶出画分のCBB染色。回収した溶出画分のタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、クマシーブリリアントブルー(CBB)染色を行った。Elution 12.5-14.5 mlにFliG_{MC}断片が溶出しており、これらのサンプルをNMRの測定に用いた。

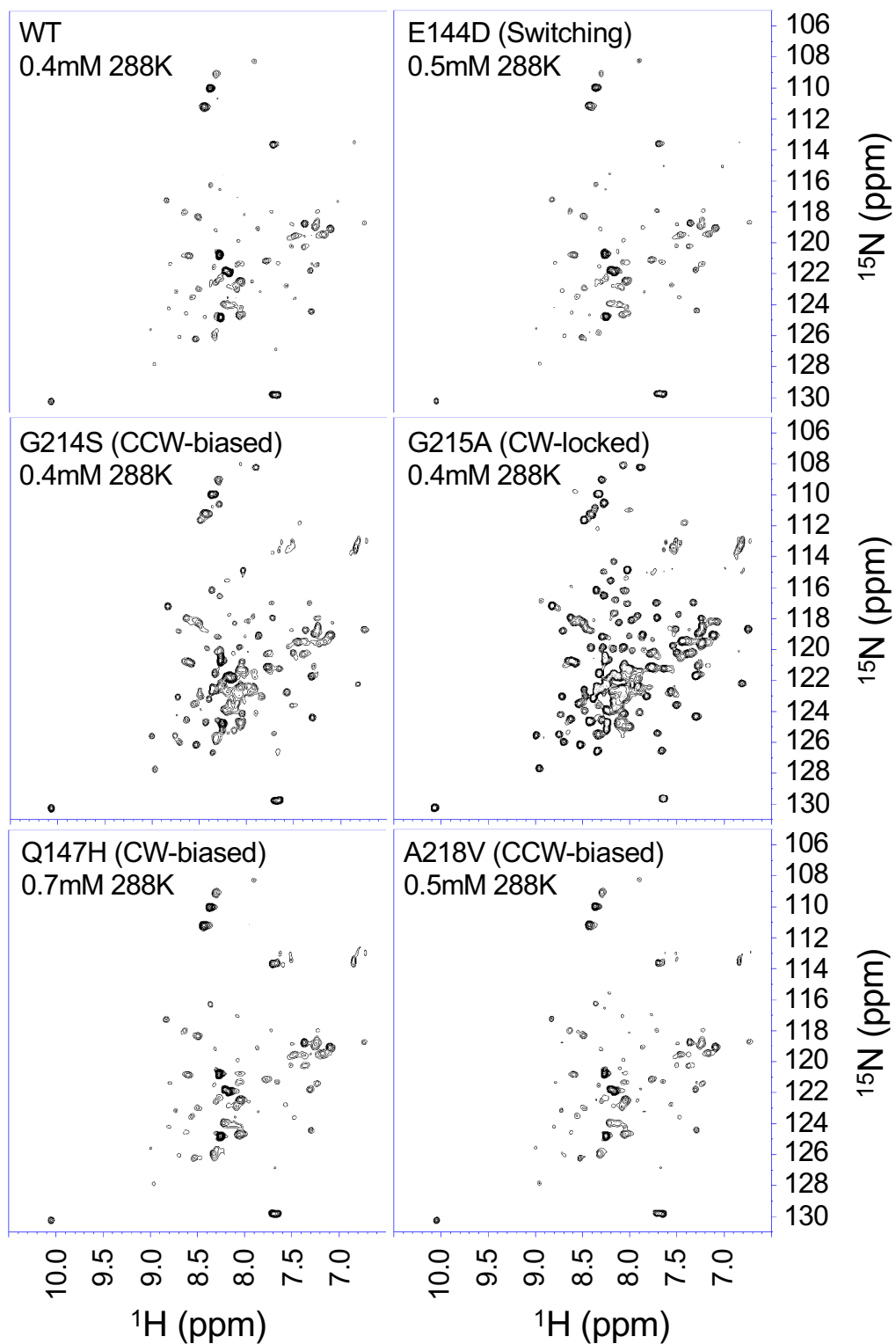


図18: 変異をもつFliG_{MC}断片の¹H-¹⁵N TROSY HSQCスペクトル

¹⁵NラベルしたFliG_{MC}断片の¹H-¹⁵N TROSY HSQCスペクトルを示した。野生型(WT), E144D, Q147H, G214S, G215A, A218V変異体の測定結果を示した。シグナル一つが断片中のアミド結合に相当する。

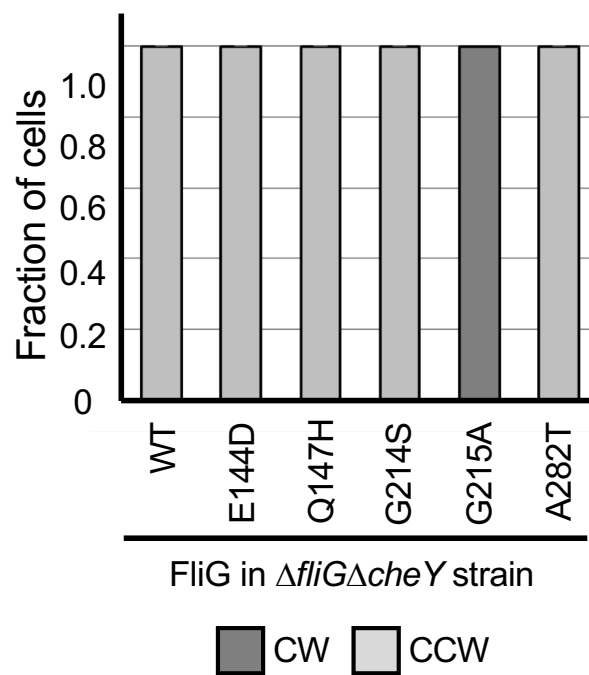


図19: *cheY*欠損株でのFliG変異体のモーターの回転方向
*cheY/fliG*欠損株(NMB318)にPlasmidからFliGを発現させ、モーターの回転方向を解析した。
野生型(WT)-FliG, E144D, Q147H, G214S, G215A, A282T変異体の解析を行った。

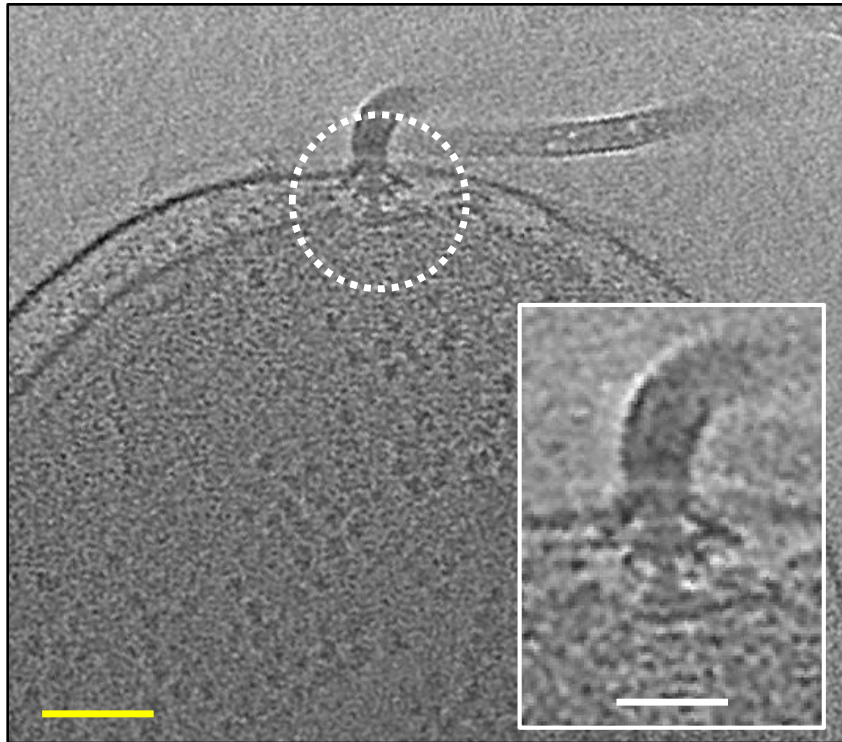
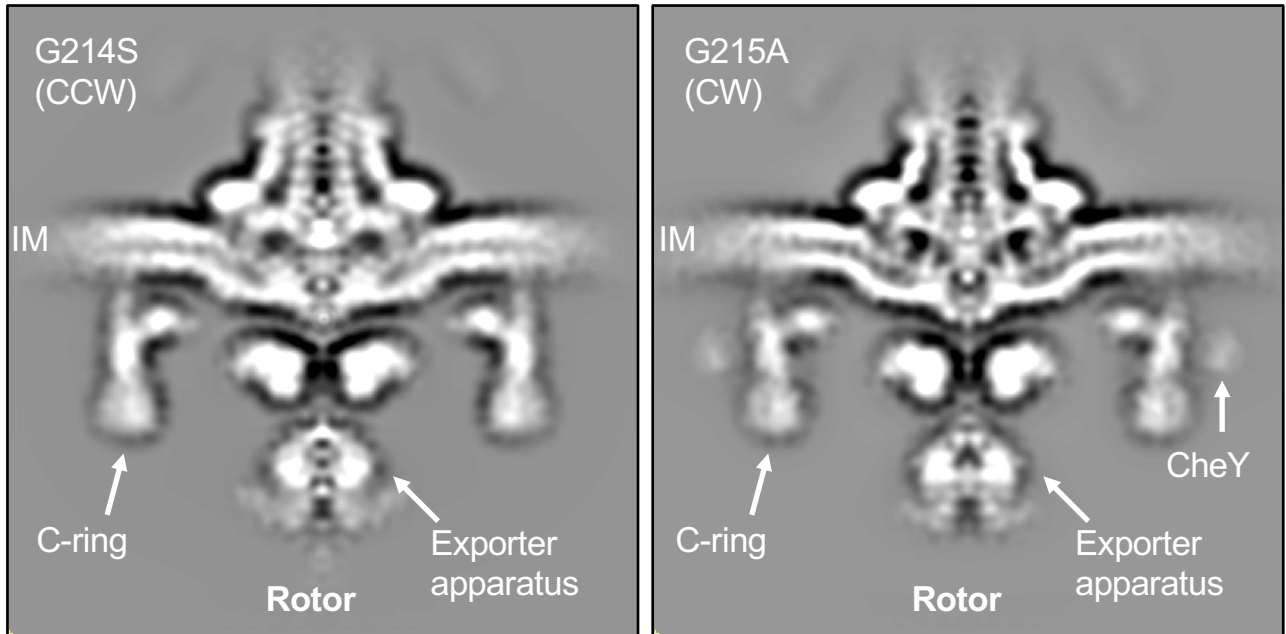


図20: トモグラム切片の代表例

画像処理によって得られたトモグラム切片の一例を示した。細胞膜上にべん毛モーターが存在する(白破線丸)。2倍に拡大したものを左下に示した。スケールバーは黄色が100 nm, 白色が50 nmを示す。

(A)



(B)

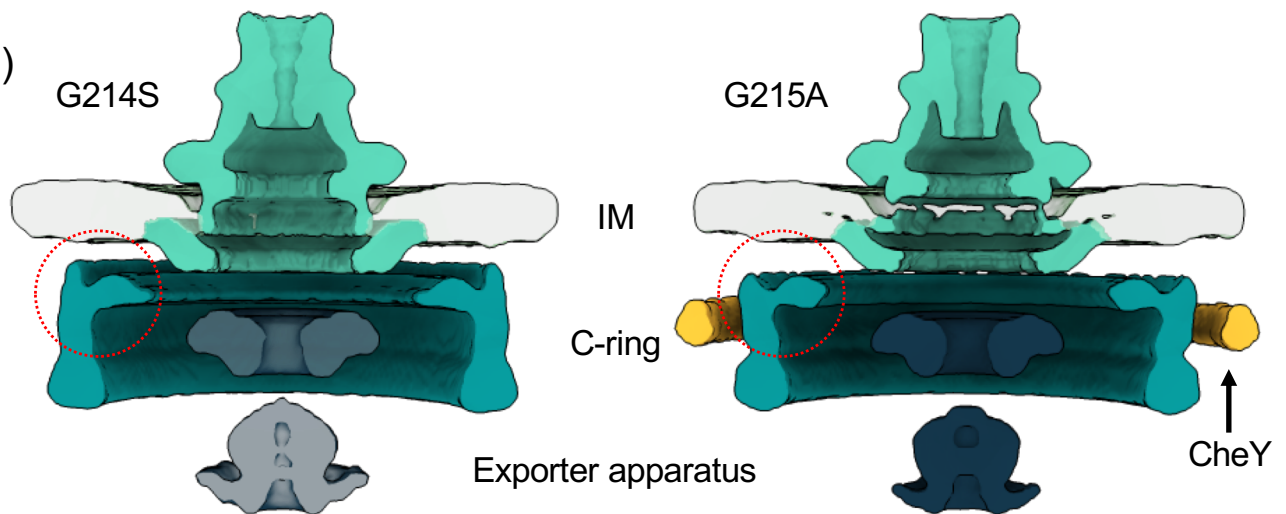


図21: FliG-G214S, G215A変異をもつ回転子のdensityの平均画像とレンダリングモデル
(A)モーターのdensityの平均画像。トモグラム中のFliG-G214S, G215A変異をもつモーターを集めて、モーターのdensityのアライメントと平均化処理を行った。(B) (A)の画像を基にしてレンダリングモデルを作成した。IMは内膜を示す。構造変化がみられたFliGに相当する部分を赤色の破線で示した。

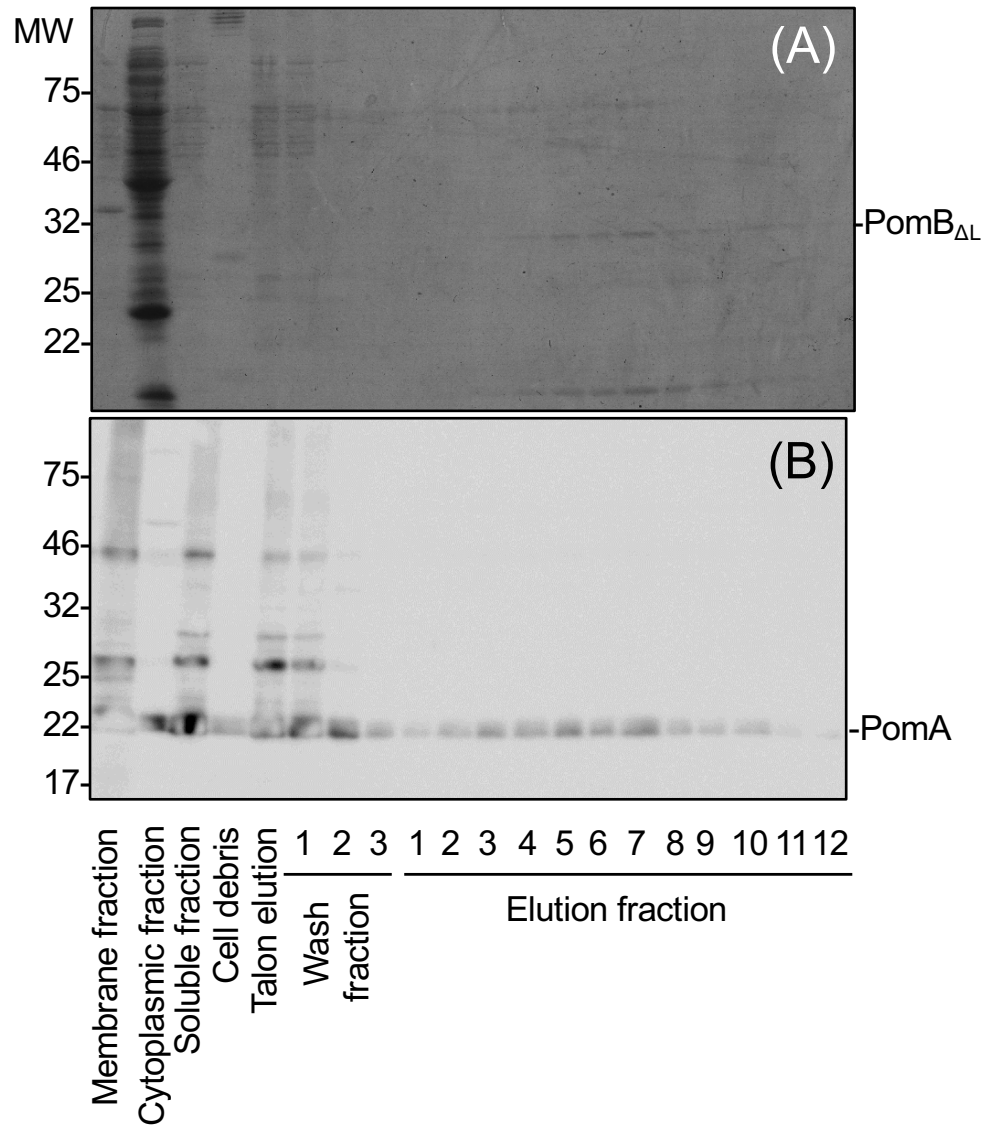


図22: プラグ欠失固定子のK⁺を含む緩衝溶液中でのHisタグaffinity chromatography
 プラグ欠失固定子を発現させた菌体をK⁺を含む緩衝溶液中で破碎、可溶化し、Hisタグを用いたaffinity chromatographyにより固定子複合体を精製した。(A)SDS-PAGEにより得られたゲルのCBB染色。(B)抗PomA抗体によるPomAの検出

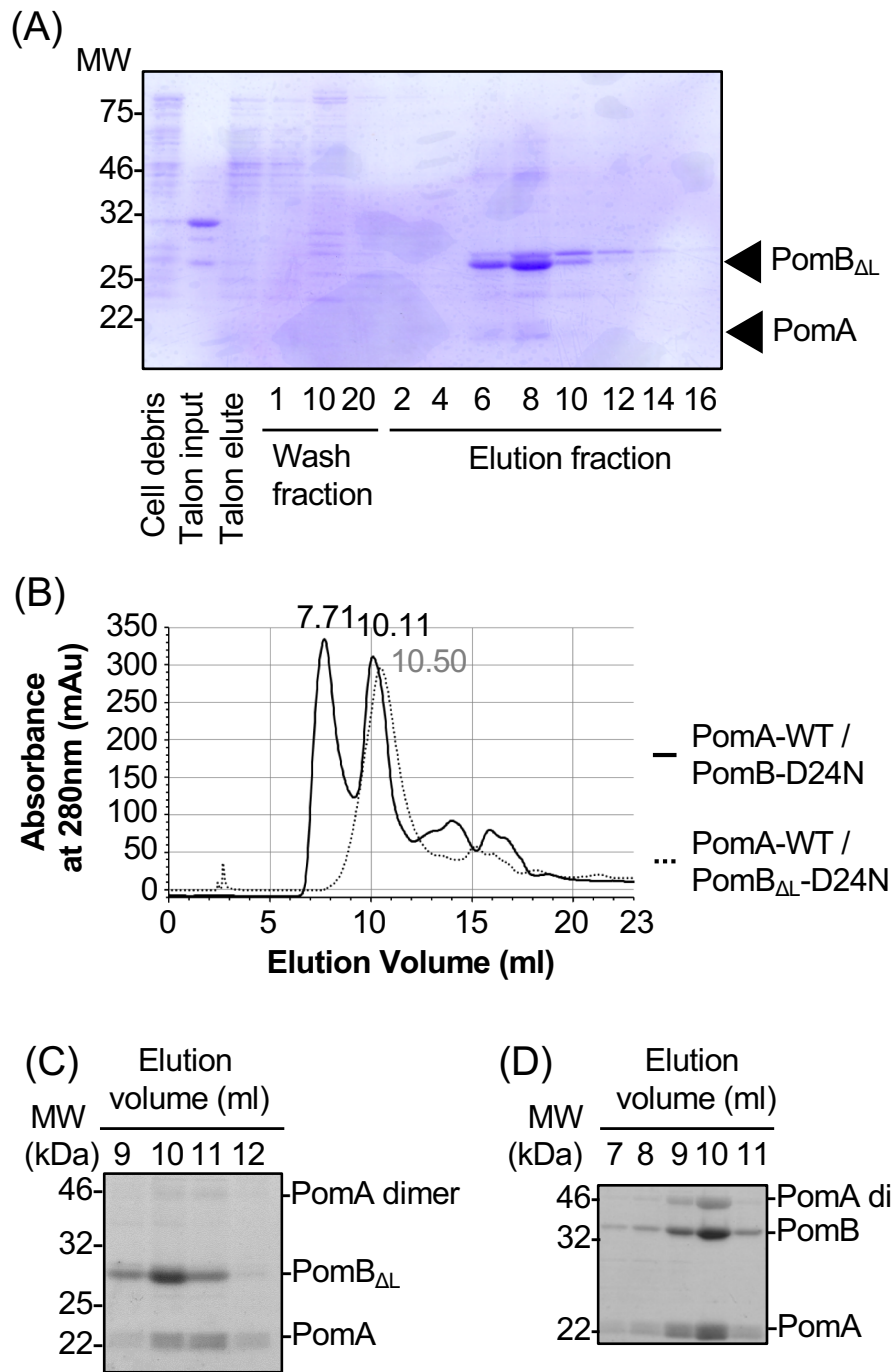


図23: PomB-D24N変異を含むプラグ欠失固定子の精製

(A) His₆タグを利用したaffinity chromatography。溶出サンプル中のタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、CBB染色した。(B) Enrich SEC6 10/300カラムによるゲル濾過 chromatographyのプロファイル。縦軸にタンパク質の $\lambda=280$ nmの吸収波長、横軸にelution volume (ml)を示した。実戦でD24N変異をもつ野生型固定子、点線でD24N変異をもつプラグ欠失固定子のプロファイルを示した。(C), (D) elution fractionのCBB染色。D24N変異をもつプラグ欠失固定子(C)、D24N変異をもつ野生型固定子(D)の溶出画分をSDS-PAGEにかけタンパク質を分離後、CBB染色した。

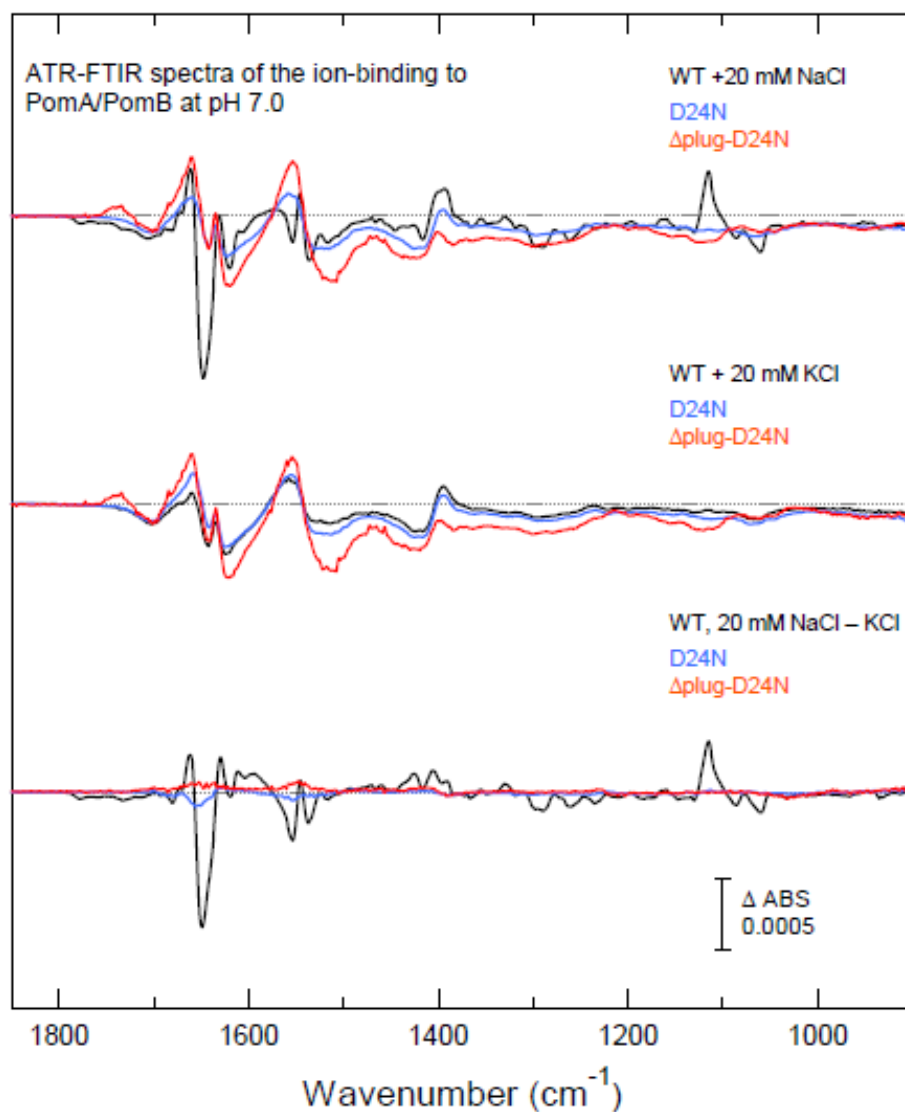


図24: ATR-FTIRによるD24N変異をもつプラグ欠失固定子のイオン結合サイトの探索

上段は20mM Na^+ 存在下、中段は K^+ 存在下、下段は Na^+ で得られたバンドから K^+ を差し引いたピークを示した。横軸に波長、縦軸に各固定子複合体の波長の吸収量を示した。野生型とD24NのピークはOnoue *et al.*, 2019で報告されたデータを引用した。

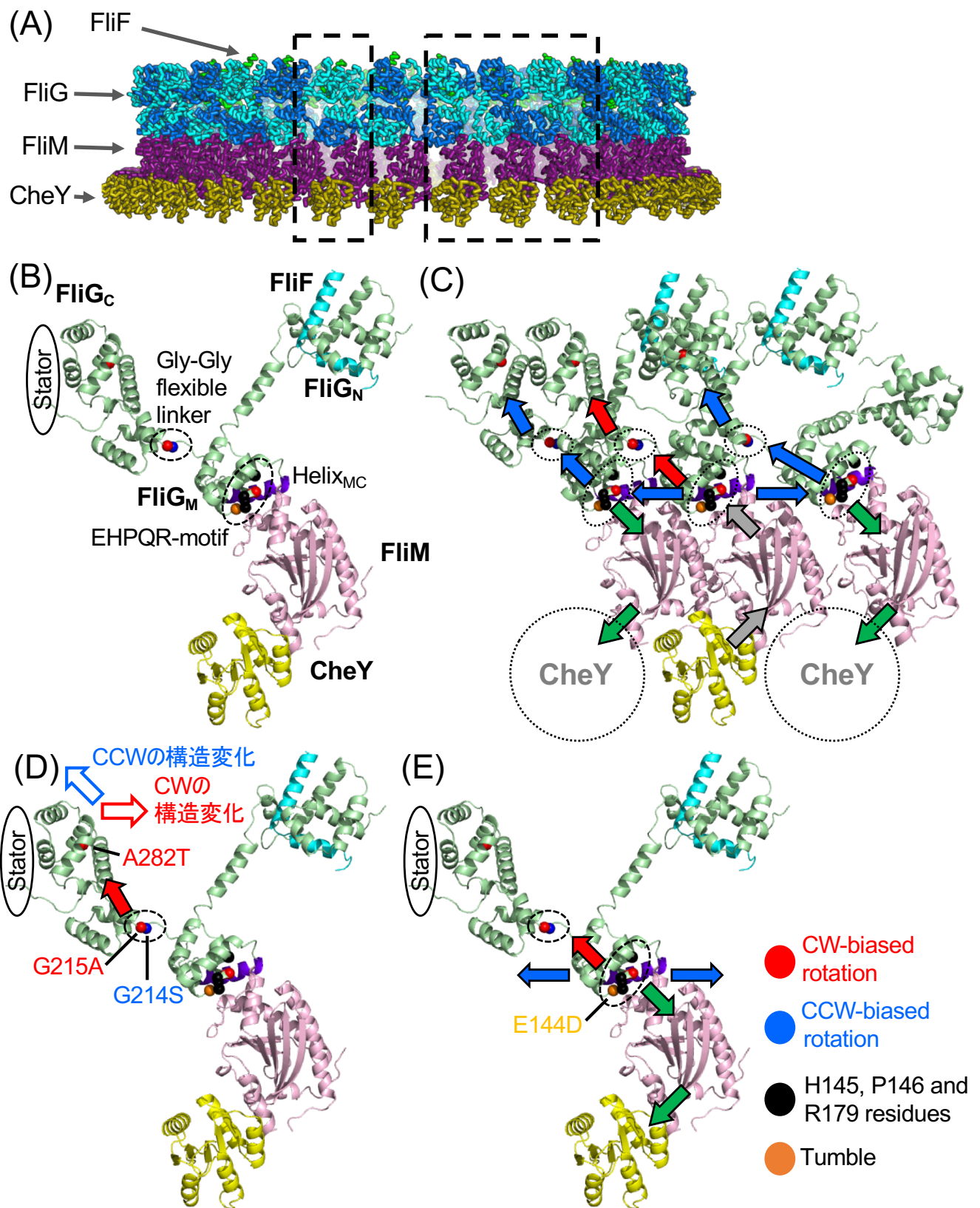


図25: CheY, FliM, FliGによるピブリオ菌べん毛モーターの回転方向制御の仕組み

(A) FliF, FliG, FliM, CheYのリングモデル。黒枠部分を、FliF, FliG, FliM, CheYをそれぞれ1分子分、3分子分(FliFは2分子)を拡大し、(B), (C)に示した。(B) FliF, FliG, FliM, CheYの結合モデル。回転方向制御に重要なことが明らかになったGly-Gly flexible linkerとEHPQR-motifの位置を示した。Helix_{MC}を紫色で示した。(C) 回転方向制御を引き起こす構造変化とリング内で近接する分子に対する影響。灰色の矢印でCheY-FliMの相互作用がFliG EHPQR-motifへの作用、赤矢印でFliGの分子内の構造変化、青矢印でFliGの構造変化による分子間相互作用の変化の影響、緑色でFliGの分子間相互作用の変化により生じるCheY-FliMの相互作用の変化を示した。(D) G214S, G215A, A282Tにより生じる構造変化のモデル。(E) E144D変異により生じるFliM-CheYの相互作用、FliGの分子間分子内相互作用の変化のモデル。

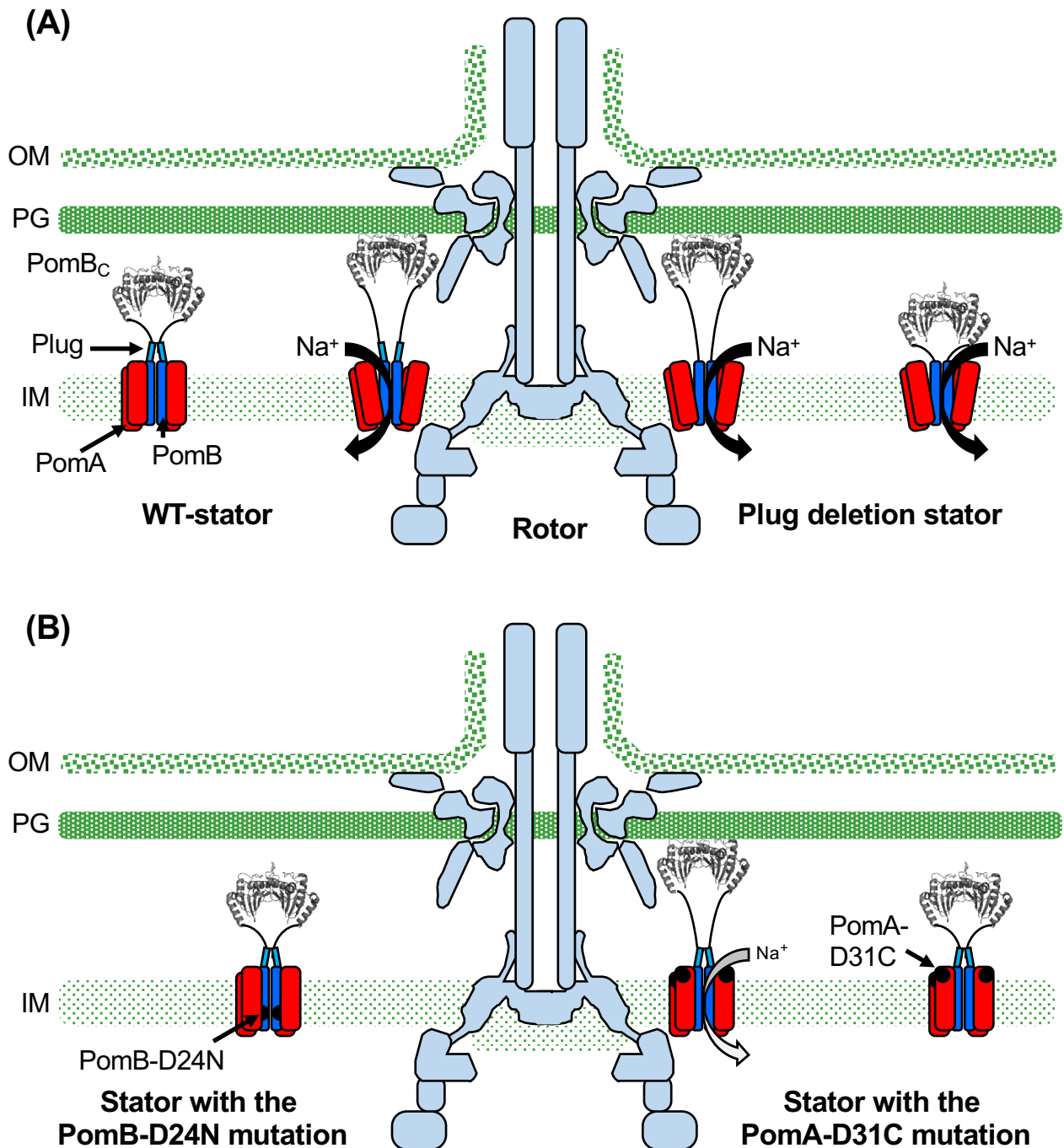


図26: PomBプラグ領域によるイオン透過経路の制御

(A)野生型固定子の活性化とプラグ欠失固定子の活性化。回転子の左側に野生型固定子の動態を示した。膜上を拡散している際はPomAとPomBが固く結合しており、チャネルポアが閉じている。回転子の周りで活性化するとPomB_cがペプチドグリカンと相互作用し、Na⁺が固定子内を流れる。この際にPomAとPomBの結合が弱くなりチャネルポアが開いた状態になる。プラグ欠失固定子(回転子の右側)では、PomAとPomBの結合が常に弱いため、活性化していなくてもNa⁺が固定子内を流れてしまう。(B)PomB-D24N変異とPomA-D31C変異をもつ固定子。PomB-D24N変異を持つ固定子(回転子の左側)は、D24N変異によりPomAとPomBの結合が常に強くなってしまい、チャネルポアを開くことができず活性化できない。PomA-D31C変異をもつ固定子複合体(回転子の右側)もPomAとPomBが強く相互作用してイオンが透過しにくくなるため、固定子内のNa⁺の流入にNa⁺の高い濃度を必要とする。