

## 細菌の前進と後退を決めるタンパク質複合体の構造変化 ～生物由来の超分子極小モーターの回転方向制御機構を解明～

名古屋大学大学院理学研究科の本間 道夫(ほんま みちお)教授、錦野 達郎(にしきの たつろう)博士(現 大阪大学蛋白質研究所所属)は、米国 Yale 大学医学研究科 Jun Liu(ジュン リュー)独立准教授のグループとの共同研究により、超低温電子顕微鏡断層像(クライオトモグラム)法を用いることで、細菌が持つ運動器官であるべん毛モーターを構成する回転子のCリングの構造動態を新たに発見しました。Cリングは3つのタンパク質 FliG、FliM、FliN から作られるリング複合体で、車の部品で例えるならクラッチとギアのような役割をしています。べん毛モーターは反時計回り(前進)と時計回り(後退)の両方向に回転することができますが、回転方向の切り替えの際にCリングの構造変化が生じると考えられています。本研究では、試料を急速凍結させることにより生きた細胞に近い状態のまま観察することで、反時計回りおよび、時計回りの状態のCリングの構造の違いを明らかにしました。

この知見をもとに、生物特有の回転方向制御機構を解き明かすことができれば、自在に制御することができる分子モーター等の人工的なナノマシンを設計することができるようになり、医療や人工生命設計など、様々な分野に応用できることが期待されます。

本研究成果は、英米独の研究助成機関による生命科学分野のオープンアクセス誌『eLife』オンライン版に2020年9月7日に受理され、掲載されました。

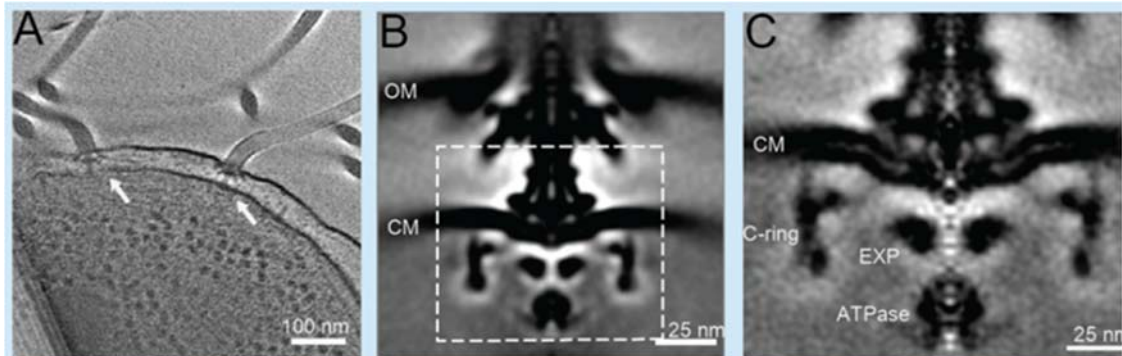
## 【ポイント】

- 海洋性ビブリオ菌のべん毛モーター回転子のCリングの構造を細胞に埋まっている *in situ* の状態で初めて明らかにした。
- モーターの回転が時計回り、反時計回りの状態でのCリングの構造を比較し、差異あることを明らかにした。
- 固定子が回転しているモデルに対して、時計回りの状態のCリングの直径が大きいことが、回転方向制御機構をうまく説明していた。

## 【研究背景と内容】

細菌は"べん毛"と呼ばれる繊維状の運動器官を使って、液体中を泳ぐことができます。べん毛の根本には細胞膜と細胞壁を貫通した回転モーターがあり、"べん毛モーター"と呼ばれています。べん毛モーターは、直径およそ45ナノメートルという極めて小さなモーターですが、F1マシンのエンジンの回転数に匹敵する20,000rpmという超高速で、時計回りおよび反時計回りの両方向に回転することができます。べん毛モーターは、自身が回転する"回転子"および、イオンチャネルとして働くエネルギー変換ユニットである"固定子"と呼ばれるタンパク質複合体との相互作用によって回転力が作られます。モーターのエネルギー源は、細菌の細胞外から細胞内に流れ込むイオン流です。このモーターは、環境変化を感知して、回転方向を時計回りと反時計回りに切り替えることができます。回転子を構成するタンパク質のなかで、FliG、FliM および FliN は互いに相互作用することで、"Cリング"と呼ばれるリング状の構造を形成します。このリング構造が、回転力の発生および回転方向を高速で切り替えるスイッチング機構を制御しています。

図1：海洋性ビブリオ菌の超低温電子顕微鏡像とトモグラム



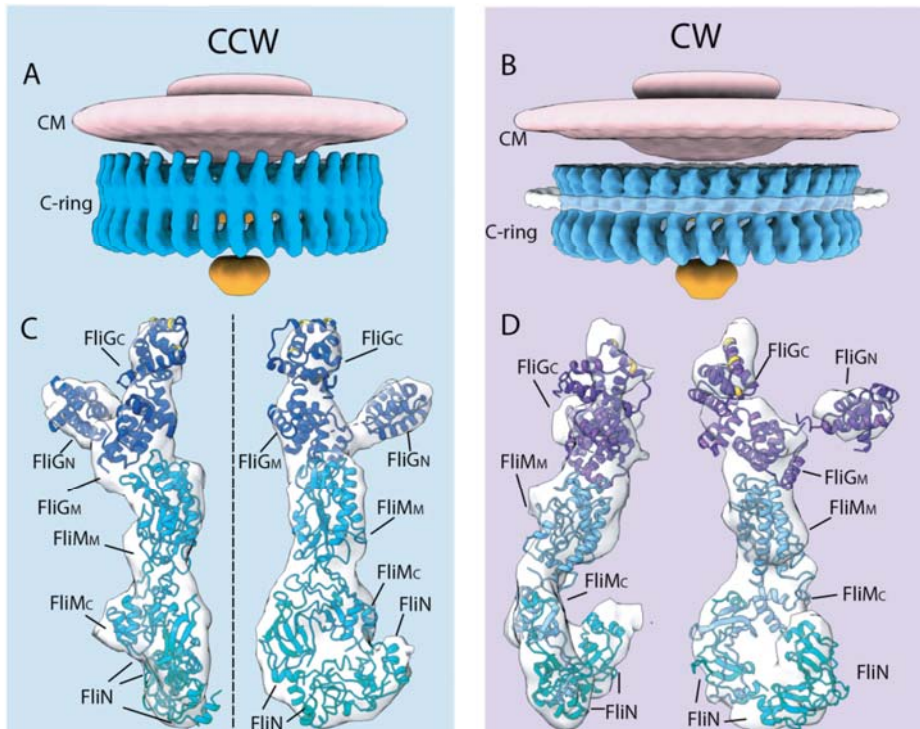
(A)海洋性ビブリオ菌の細胞と細胞から生えたべん毛の電子顕微鏡写真。繊維の根元(白矢印)には細胞質に埋まったモーターが存在する。(B)得られた電気顕微鏡像から三次元トモグラムを作成した後、モーター部分の平均密度を得た。(C)(B)の白破線部分を拡大した。本研究で着目したCリング(C-ring)や輸送装置(EXP および ATPase)の密度が精度良く得られている。

これまでの研究から、Cリングの構造が変化することにより、FliGと固定子との相互作用が変化して、回転方向変換すると推測されていました。しかし、回転方向が切り替わる際の詳細な分子機構や各タンパク質間の相互作用様式の解明には至っていませんでした。

本研究ではCリングの構造を生々の状態で明らかにするために、超低温電子顕微鏡断層像(クライオトモグラム)法を用いて解析しました(図1)。クライオトモグラム法では、試料とし

て急速凍結させた細胞を用いることにより、生きた細胞（べん毛が回転している）に近い状態で観察することができます。観察の試料には、遺伝子組み換え技術により、モーターの回転方向制御に異常をきたすアミノ酸変異を FliG タンパク質に導入した海洋性ビブリオ菌 *Vibrio alginolyticus* を用いました。これまでの研究により、隣り合った FliG のグリシン残基（ヒンジのような作用をしていると考えられる）を変異させることで、反時計回りと時計回りの状態のモーターとすることに成功していました。この反時計回りの状態のモーターと時計回りの状態のモーターを比較したところ、C リングの傾きが異なることが分かりました。具体的には、FliM が 36 度傾くことにより、固定子と相互作用する FliG の C 末端領域の位置が 31Å ずれ、直径が大きくなっていることが分かりました。また、時計回りの状態のモーターでは、C リングの外側に CheY と考えられる密度がみられ、その密度は、反時計回りの状態のモーターではみられませんでした。べん毛固定子が回転しているという衝撃的なモデルが本年になって報告されましたが、本研究で明らかとなった C リングの構造変化は、この固定子回転モデルと C リングの方向制御モデルを同時にうまく説明できることが分かりました。

図 2：反時計回り回転時、および時計回り回転時の C リングの構造の比較



左のカラムが反時計回り(CCW)回転時の構造情報、右のカラムが時計回り(CW)回転時の構造情報を示している。(A、B)得られた電子線密度から得られた細胞膜(CM)やCリングのモデル図。反時計回りと時計回りでCリングの傾きや直径に違いがみられた。時計回りの構造ではCリングの外側にCheYと考えられる密度(白)がみられた。(C、D)得られた密度マップにFliG、FliM、FliNの構造を当てはめた。構造中にはFliG:FliM:FliNが1:1:3の割合で含まれている。FliGとFliMはそれぞれN末端ドメイン(FliG<sub>N</sub>、FliM<sub>N</sub>)、ミドルドメイン(FliG<sub>M</sub>、FliM<sub>M</sub>)、C末端ドメイン(FliG<sub>C</sub>、FliM<sub>C</sub>)の3つのドメインに分けて当てはめると密度に対して構造がうまく当てはまった。FliG<sub>C</sub>の黄色の部分固定子と相互作用する荷電残基を示している。FliMの分子の傾きが変化することでFliGの位置が大きくずれることが分かった。

## 【成果の意義】

べん毛モーターは、細菌が自身の細胞の中で様々なタンパク質の部品を自発的に組み立てて作り出す生体ナノマシンとして、医療や機械工学などの様々な分野から注目を集めています。べん毛モーターは直径わずか 50 ナノメートル（髪の毛の太さのおよそ 1000 分の 1）以下という小ささで、秒速 200~1000 回転以上という速さで回転します。このようなナノマシンは、現在の人類の科学技術でも人工的に作ることはできません。その理由の一つとして、モーター全体の詳細な立体構造がわかっていないことがあげられます。本研究から、この生体ナノマシンの回転方向を制御する部品の構造動態が、生きている細胞に近い状態で明らかとなりました。今回見つかった時計回りと反時計回りでの構造の差異は、高いエネルギー変換効率でモーターの回転方向を瞬時かつ精確に変換できるというべん毛モーターの物理的特性の理解に重要であることが予想されます。この知見をもとに、生物特有の回転方向制御機構が解き明かすことができればその情報を基にすることで、自在に分子モーターを制御する人工的なナノマシンの設計が可能となり、医療や人工生命設計など様々な分野に応用できることが期待されます。

## 【用語説明】

超低温電子顕微鏡断層像(クライオトモグラム)法:試料を急速凍結させることにより試料の破壊を抑え、生きた状態に近い状態で観察する方法。CT撮影のように、試料を傾けて様々な角度からの電子顕微鏡像を撮影し、3次元再構成を行った後、トモグラム(断面図の層)を作成する。トモグラム中の見たい構造の3次元密度を平均化し解析することにより、原子レベルに到達するほどの構造情報を得ることができる。

## 【特記事項】

本研究は名古屋大学とYale大学(米国)の国際共同研究で行ったものです。共同第一著者の錦野達郎博士が、名古屋大学博士課程教育リーディングプログラム「グリーン自然科学国際教育研究プログラム」の学生として、Yale大学に短期留学できたことによる成果です。

## 【論文情報】

雑誌名 : eLife

論文タイトル : The flagellar motor of *Vibrio alginolyticus* undergoes major structural remodeling during rotational switching

著者 : Brittany L. Carroll\*, Tatsuro Nishikino\*, Wangbiao Guo, Shiwei Zhu, Seiji Kojima, Michio Homma, Jun Liu

\* These authors contributed equally to this work as correspondence

下線 : 名古屋大学大学院理学研究科所属

Tatsuro Nishikino : 現 大阪大学蛋白質研究所所属

DOI : 10.7554/eLife.61446