

## 極低温電子顕微鏡による細菌べん毛モーターと 蛋白質輸送装置の像構造解析

Structural study of bacterial flagellar motor and  
protein Export apparatus by electron cryomicroscopy

難波 啓一 (NAMBA KEIICHI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授



### 研究の概要

べん毛基部体構造を安定化させ、極低温電子顕微鏡像の単粒子像解析法によりその立体構造を高分解能で解析し、各構成蛋白質のX線結晶構造と組合せて原子モデルを構築し、各蛋白質分子の相互作用を解析することにより、細菌べん毛基部体の回転モーターとしてのトルク発生のしくみや、べん毛構築のための蛋白質輸送および自己構築制御のしくみの解明を目指す。

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：超分子、機能構像解析、電子顕微鏡像解析、X線解析、細菌べん毛

### 1. 研究開始当初の背景

細菌べん毛は、直径約 40 nm の高速回転モーター、太さ約 20 nm で長さ 10 数 μm のらせん繊維型スクリュープロペラ、両者を繋ぐ長さ 55 nm のユニバーサルジョイントなどで構成される生体超分子ナノマシンである。回転モーターでありべん毛蛋白質輸送装置でもあるべん毛基部体の動作機構の解明するためには、未だにその多くが不明な基部体構成蛋白質間相互作用の形態を明らかにすることが必要である。基部体構成蛋白質の多くは、基部体の中核部に弱く結合あるいは結合解離を繰り返してさまざまな機能を発現するので、基部体の単離精製によって解離し、その相互作用の部位や形態が不明で、動作機構の解明を妨げている。

### 2. 研究の目的

容易に単離精製できない機能状態のべん毛基部体構造をさまざまな工夫により安定化し、極低温電子顕微鏡像の単粒子像解析法によりその立体構造を高分解能で解析し、各構成蛋白質のX線結晶構造と組合せて原子モデルを構築し、各蛋白質分子の相互作用を解析することにより、トルク発生、蛋白質輸送、自己構築制御などのしくみを解明することである。

### 3. 研究の方法

細菌べん毛基部体の、回転モーターとしてのトルク発生やべん毛構築のための蛋白質輸

送の機能発現に関わる構成蛋白質は、基部体に弱く結合あるいは結合解離を繰り返すため、通常の方法では単離精製できず、構造解析や機能解析ができない。そこでまず、基部体の安定構造を形成する中核部分を細菌から単離精製し、別に他の基部体構成蛋白質やその安定結合変異体を大量発現系から単離精製し、それらを混合して高濃度で混在させることにより、各蛋白質やその複合体が様々な組み合わせで基部体に結合した超分子構造体の再構成を試みる。そして、極低温電子顕微鏡による単粒子像解析法を用いて立体構造解析を行う。その結果として得られる3次元密度マップに、基部体構成蛋白質やその結合蛋白質のX線結晶構造を組み合わせ、基部体と各蛋白質分子の相互作用形態を詳細に解析することにより、トルク発生、蛋白質輸送、自己構築制御のしくみの解明を目指す。

### 4. これまでの成果

低温電子顕微鏡法の技術開発を進め、加速電圧や試料観察温度を最適化し、さらにΩ型電子分光装置を用いることで画像のS/N向上を図り、以前に比べて20倍近い高い歩留まりで高画質・高分解能像の収集が可能になった。これをべん毛フックの立体構造解析に適用し、ポリフック変異株から得られたフック基部体の立体構造解析を行った。300枚程の電子顕微鏡像データ収集に1日、らせん対称性を用いた立体像再構成に2日で、到達分解

能は 5.4 Å であった。この立体構造では、フックを構成する FlgE 蛋白質がフックの中心部付近に持つ  $\alpha$  ヘリックスだけでなく、外側の B 構造まで確認できた。フックより細くて柔らかいため像コントラストが極めて低い筋肉の F-actin に関しても同様の方法で解析し、6.6 Å 解能の立体像を得て信頼性の高い原子モデルを構築した。

べん毛基部体の構造解析では、回転方向スイッチの仕組みを解明するために、モーター蛋白質 FliG の変異により反時計回り (CCW) または時計回り (CW) だけに回転する変異株のべん毛基部体の構造解析を行った。FliG のわずかな変異により C リングを構成する FliM と FliN に明確な構造変化が引き起こされていることが明らかになった。

機能状態にある輸送装置や固定子の立体構造を解析するために、サルモネラ菌を急速凍結させ、電子線トモグラフィーを用いて構造解析を試みた。しかし、菌体の厚さが 1  $\mu$ m あるため、多重散乱や非弾性散乱によって電子顕微鏡像は質も解像度もきわめて低い。そこで FtsZ を大量発現させ、ミニセルと呼ばれる最大径 0.4  $\mu$ m 以下の球形に近い細胞を作成した。

このミニセルは野生型の菌と同様にべん毛を持ち、ほぼ野生型レベルの速度で泳ぐことが確認された。このミニセルを急速凍結し電子線トモグラフィーにより立体像を解析した。その結果、細胞膜、ペプチドグリカン層、外膜を貫通して、細胞外にフックと繊維を持つべん毛基部体の構造を明確に観察することができた。

数多くのミニセルのトモグラムから切り出した基部体の像を重ね合わせることでノイズを抑え、再構成立体像の分解能を向上させた。それにより、C リング周辺に蛋白質輸送装置に相当する構造や固定子に相当する構造など、精製した基部体の立体像には見られない構造が確認された。蛋白質輸送装置に相当する構造は、C リング内部の細胞膜近くの円盤構造と、それから一定の距離を持って C リング外部に位置する直径 10 nm ほどの構造体が観察され、前者はべん毛蛋白質輸送装置の膜貫通型蛋白質である FlhA と FlhB、後者は細胞質性タンパク質 FliI の 6 量体リング構造であることが示唆された。

FlhA と FlhB の比較的大きな細胞質ドメインは、FliI の 6 量体リングが FliH や FliJ を介して輸送ゲートに結合するプラットフォームを形成すると考えているが、ここで得られた構造はその FliHIJ 複合体が FlhAB プラットフォームに結合する様式を示したものであると考えられる。

## 5. 今後の計画

今後も低温電子顕微鏡法の技術改良を進め、わずかな水溶液試料でも数日で原子レベルの立体構造を解析し機能発現のしくみを解明できる方法を確認する。

野生株や変異株のミニセルのトモグラフィーとサブトモグラム平均をさらに進めて細胞中のべん毛基部体の立体像を解析し、さらなる高分解能化をめざす。単離精製した基部体についても単粒子像解析を進め、2次構造を確認できる立体像に原子モデルを当てはめて蛋白質間相互作用を同定し、トルク発生や輸送のしくみを解明する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)  
Minamino, T., Morimoto, Y.V., Hara, N. & Namba, K. An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export. **Nature Commun.** 2:475 doi: 10.1038/ncomms1488, 2011.

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

Ibuki, T., Imada, K., Minamino, T., Kato, T., Miyata, T. & Namba, K. Common architecture between the flagellar type III protein export apparatus and F- and V-type ATPases. **Nature Struct. Mol. Biol.** 18, 277-282, 2011.

Fujii, T., Iwane, A. H., Yanagida, T. & Namba, K. Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. **Nature** 467, 724-729, 2010.

Fujii, T., Kato, T. & Namba, K. Specific arrangement of  $\alpha$ -helical coiled coils in the core domain of the bacterial flagellar hook for the universal joint function. **Structure** 17, 1485-1493, 2009.

他 29 件 (全て査読有)

藤井高志. 第 7 回日本生物物理学会若手奨励賞, September 17, 2011.

藤井高志. 第 28 回井上研究奨励賞, February 3, 2012.

難波啓一. 平成 24 年度 恩賜賞・日本学士院賞, June 4, 2012. (授賞式)

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/02/>