

## 【基盤研究(S)】

### 生物系(生物学)



#### 研究課題名 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

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授 なんば けいいち  
難波 啓一

研究分野：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

#### 【研究の背景・目的】

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 mm 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。この研究課題の目的は、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のため、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が、基部体の単離精製によって解離するため、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。本研究課題の目的は、このように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の解明することである。

#### 【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、構像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心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。

#### 【期待される成果と意義】

これまで生体超分子の構造解析では、安定に単離精製できて、しかも均一な構造を持つものだけを対象にしてこざるを得なかったため、必ずしも機能状態の構造を見ている訳ではなかった。本研究のアプローチは、我々を含む世界中の多くの研究者による技術開発によって最近ますますパワフルになった、低温電子顕微鏡による単粒子像解析法を活用することにより、少々不均一な部分構造を持つ超分子でも、試料調整法と電子顕微鏡像解析法の工夫により、その立体像を可視化しようとするところに大きな特徴がある。極低温電子顕微鏡の優れた解像度はこの目的の達成のために不可欠である。得られた基部体の立体構造からは、トルク発生や蛋白質輸送にしくみに重要な手がかりが得られ、その極めて高いエネルギー変換効率など、物理学的にも興味深い生体超分子ナノマシンの動作機構に深く切り込むことが可能になると期待される。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Minamino, T., Imada, K. & Namba, K. (2008)  
Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Mol. BioSyst.* **4**, 1105-1115.
- Minamino, T., Imada, K. & Namba, K. (2008)  
Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 693-701.
- Kojima, S., Furukawa, Y., Matsunami, H., Minamino, T. & Namba, K. (2008)  
Characterization of the Periplasmic Domain of MotB and Implications for Its Role in the Stator Assembly of the Bacterial Flagellar Motor. *J. Bacteriol.* **190**, 3314-3322.
- González-Pedrajo, B., Minamino, T., Kihara, M. & Namba, K. (2006)  
Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible promotion mechanism for facilitating type III protein export. *Mol. Microbiol.* **60**, 984-998.

#### 【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度  
157,600千円  
ホームページ等  
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/lab0/02/>