

## 海洋性ビブリオ菌の極べん毛の形成を制御するタンパク質の X 線結晶構造解析



佐久間麻由子  
(アイソトープ総合センター)

### はじめに

動き回る細菌の多くはべん毛と呼ばれる運動器官を持ち、液体中を泳いだり個体表面を移動したりする。べん毛は菌体の表面から生えているらせん状の繊維構造体であり、細菌はその根元にあるモーターでべん毛をスクリューの様に回転させて動き回る。べん毛モーターの回転は、プロトンあるいはナトリウムイオンの流入のエネルギーを機械的な回転力に変換することで生み出される。

べん毛は細菌の種によって本数や形成位置が異なる。大腸菌、サルモネラ菌、枯草菌などは周毛性で、菌体周囲に複数のべん毛を持ち、遊泳時には複数のべん毛を束にして推進力を得る。これに対して、多くのビブリオ属細菌、コーロバクター

属細菌、緑濃菌などは極毛性で1本のべん毛（単べん毛）を持つ。

私が兼務する理学部生命理学専攻生体膜機能グループでは、べん毛モーターを構成するタンパク質やべん毛形成に関わる遺伝子やタンパク質の研究を行い、この直径約45 nmのタンパク質で出来たモーターの仕組みや形成過程を解明しようとしている。べん毛は多数のタンパク質から成る超分子ナノマシンといえる。今までにべん毛モーターやその形成に関係するいくつかのタンパク質分子の X 線構造解析を行い、立体構造を解明してきた(図1)。その中で、最近 X 線結晶構造解析に成功した海洋性ビブリオ菌のべん毛形成の制御に関与するタンパク質 SflA の構造について紹介したい。

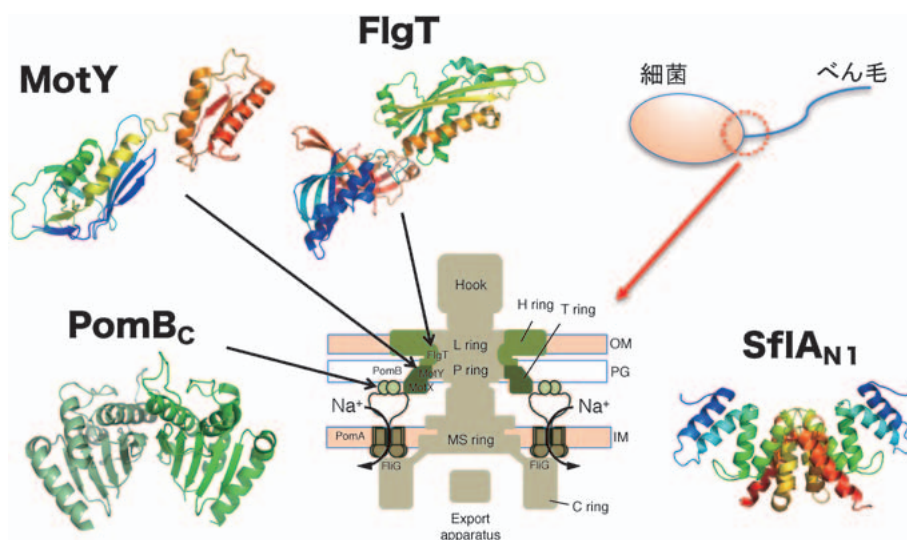


図1 ビブリオ菌のナトリウム駆動型のべん毛モーターの構造模式図とその構成タンパク質 X 線構造解析  
OM: outer membrane (外膜), PG: ペプチドグリカン層, IM: inner membrane (内膜)

## ビブリオ菌のべん毛の本数と形成位置制御

海洋性ビブリオ菌 (*Vibrio alginolyticus*) は、極に一本形成される極べん毛 (polar flagellum, Pof) と細胞周囲に複数形成される側毛 (lateral flagella, Laf) の2種類のべん毛を持つ<sup>1)</sup>。極べん毛はナトリウムイオンで駆動され、海水中などの粘性の低い環境での運動に主に用いられる。一方、側毛はプロトンで駆動され、魚などの体表面といった粘性の高い環境での運動に用いられる。

ビブリオ属細菌のべん毛本数の制御は、FlhF と FlhG という2つのタンパク質が行っている。極にべん毛を1本持つ海洋性ビブリオ菌 VIO5 株 (側毛欠損, 極毛野生型) において *flhF* 欠損株は極べん毛を持たず, *flhG* 欠損株は極に複数のべん毛を持つ<sup>2)</sup>。また、FlhF を大量発現させると極べん毛の数が増加し, FlhG を大量発現させるとべん毛の数が増加する。このように海洋性ビブリオ菌のべん毛形成を FlhF は正に, FlhG は負に制御しており, そのバランスで適切なべん毛の数が決まると考えられている。また FlhF タンパク質はべん毛の形成位置制御にも関与すると考えられている。

*flhF* と *flhG* 遺伝子の両方を発現しない *flhFG* 二重欠失株 ( $\Delta flhFG$  株) は, ほとんどの菌で無べん毛で運動能を持たないが, ごくわずかな割合

で本来は極に発現するナトリウム駆動型べん毛を菌体周囲に複数持つ菌が出現し, 非常に低い運動能を軟寒天培地上で示す<sup>3)</sup>。この原因遺伝子を同定し, *sflA* (suppressor of  $\Delta flhFG$ ) と名付けた。 $\Delta flhFG$  株から *sflA* 遺伝子を欠失させた株 ( $\Delta flhFG\Delta sflA$  株) では, 菌体周囲にべん毛を複数本持つ割合が大幅に上昇する。この変異により, 菌体のどこでもべん毛形成を開始できるようになったと考えられ, 極毛性の菌を周毛性の菌に変換できたといえる。ただし *sflA* のみの欠損株 ( $\Delta sflA$  株) は親株の VIO5 株と同程度の運動能を示し, べん毛を極に一本だけ持つ<sup>4)</sup>。*flhFG*, *sflA* とべん毛の関係を図2に示す。

*sflA* のコードするタンパク質 SflA はビブリオ属に特異的な約35kDaのタンパク質であり, 推定アミノ酸配列から一回膜貫通タンパク質であると考えられた。N末端側ペリプラズム領域は約19kDa, 細胞質側C末端領域は約14kDaでJドメインを持つ。Jドメインは, 大腸菌のシャペロンタンパク質である DnaJ のファミリーによく保存されたドメインで, 同じくシャペロンタンパク質の DnaK (大腸菌で熱ショックタンパク質として見つけれられた) との相互作用に重要である。シャペロンとはタンパク分子が正しく折りたたまれて (フォールディング), 機能を獲得するのを助ける分子の

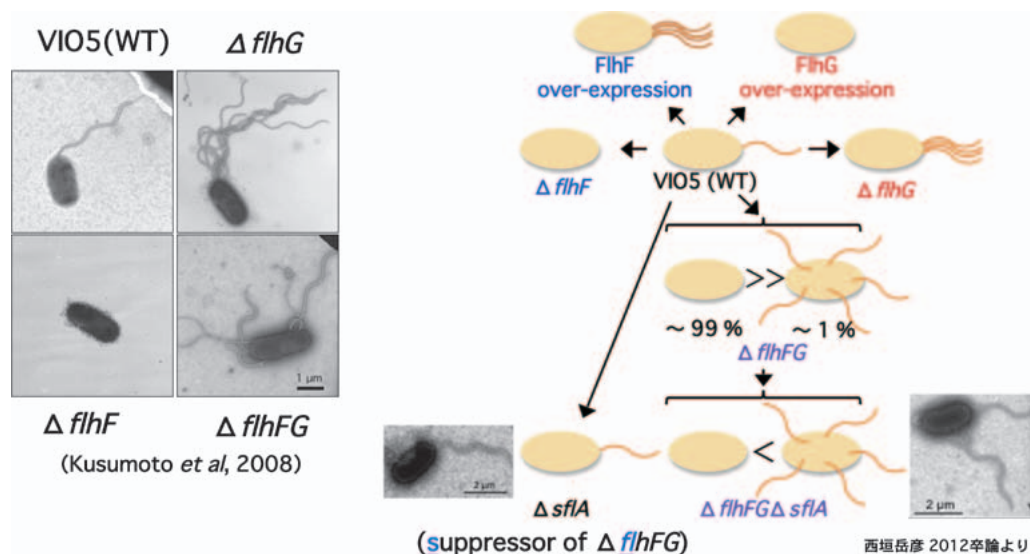


図2 *flhF*, *flhG*, *sflA* 遺伝子とべん毛の本数と位置の関係の模式図

左: 極べん毛野生株 (VIO5), *flhG* 変異株, *flhF* 変異株, *flhFG* 二重変異株の菌のネガティブ染色像。  
右: *flhF*, *flhG*, *sflA* 遺伝子とべん毛の本数と位置の関係の模式図。

総称である。SfiA のアミノ酸配列と模式図を図3に示す。SfiA はべん毛形成の抑制に関与すると考えられるが、その機構についてはまだわかっていない。

その機構を解明するため、まず SfiA のペリプラズム側の N 末端領域のタンパク質 (SfiA<sub>N</sub>) を精製し、このタンパク質の X 線結晶構造解析を行い、構造と機能について考察した。

### SfiA<sub>N</sub> の X 線結晶構造解析

本研究では、SfiA の N 末端側のペリプラズム領域 (His-SfiA<sub>N</sub>) を発現するプラスミドを構築後、大腸菌で大量発現した試料を用いて構造解析を試みた。His-SfiA<sub>N</sub> は分子量21kDa で、シグナル配列の切断される部分と TM 領域手前までの間のフラグメントである。ゲル濾過の溶出位置より、His-SfiA<sub>N</sub> は溶液中で二量体を形成すると予想された。His タグを除いた SfiA<sub>N</sub> を精製して結晶化し (図4)、さらに重原子 (Os) 置換体結晶を作成した。そして大型放射光施設 SPring 8 のビームライン BL41XU において結晶の回折データを測定し、1.9 Å 分解能の構造解析に成功した。SfiA<sub>N</sub> 結晶は、空間群 *P*3<sub>1</sub>21, *a* = *b* = 66.9, *c* = 59.8 Å で非対称単位中に 1 分子の SfiA<sub>N</sub> があり、二量体は結晶学的 2 回軸により関係づけられていた。なお、結晶化の過程で C 末34残基が失われたため、

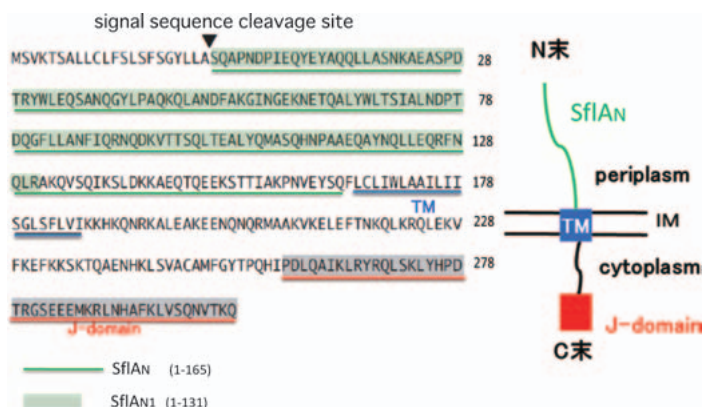


図3 SfiA のアミノ酸配列

SfiA はペリプラズム側 N 末端領域 (SfiA<sub>N</sub>)、膜貫通領域 (TM)、サイトプラズム側 C 末端領域 (J-ドメインを含む) で構成されている。左: SfiA アミノ酸配列において、分泌タンパク質がもつ N 末端シグナル配列切断部位を 1 番として番号をつけた。右: 膜貫通トポロジーの模式図。IM: inner membrane (内膜)

構造解析した領域 (SfiA<sub>N1</sub>) は成熟タンパク質のアミノ酸131残基である (図3参照)。得られた構造を図5に示す。結晶学的に対称な分子を配し、二量体で表示している。

### SfiA<sub>N1</sub> の構造

SfiA<sub>N1</sub> は 7 本の  $\alpha$  ヘリックスから成り、タンパク質間相互作用に関与する Tetratricopeptide repeat (TPR) と似たモチーフを持つ。TPR モチーフは、細菌からヒトまで様々な種において 5000 種以上のタンパク質に見出されているモチーフで、タンパク質間相互作用に関わり、多様な生物機能に関与している。1 つの TPR モチーフは緩く保存された 34 残基のアミノ酸配列から構成され、2 つのヘリックスが逆平行に配置したヘリックス-ターン-ヘリックス構造を持つ。TPR モチーフは、一般に 3 ~ 16 回の反復配列として現れる。多くの場合、TPR モチーフが連続して平行に配置することで右巻きスーパーヘリックス (超ら

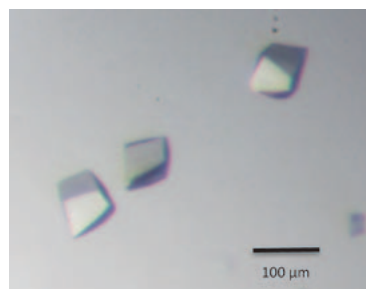


図4 SfiA<sub>N1</sub> の結晶

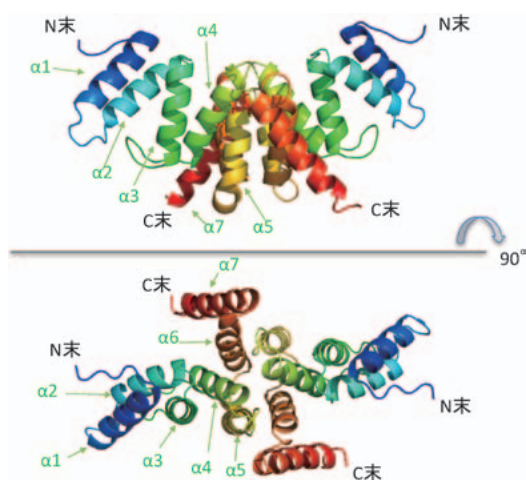


図5 SfiA<sub>N1</sub> の立体構造

$\alpha$ SfiA<sub>N1</sub> は  $\alpha$ ヘリックス 7 本で構成されている。結晶学的に対称な分子を配し、二量体で表示した。



せん) 構造をもつドメインを形成する。通常、大きな表面積をもつスーパーヘリックスの内側の凹面が相互作用部位となる<sup>5)</sup>。SflA<sub>N1</sub>の場合、7本の $\alpha$ ヘリックスのうち $\alpha 3$ と $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ と $\alpha 6$ の2つがSLR (Sell-like repeat) というTPRのサブドメイン構造のモチーフと相溶性が高かった。SLRは36-44残基のヘリックス-ターン-ヘリックスを持ち、TPR構造に比べて構造の決まりごとが緩い。

SflA<sub>N1</sub>の類似構造を調べたところSycDが見つかった。SycDは*Yersinia enterocolitica*のIII型分泌装置輸送シャペロンの一つでTPRドメインを持ち、相互作用相手である分泌タンパク質YopDの一部と結合した状態で構造解析されている(PDB ID: 4AM9)<sup>6)</sup>(図6)。III型分泌装置とは、ある種の細菌が持つ注射器のような形をし

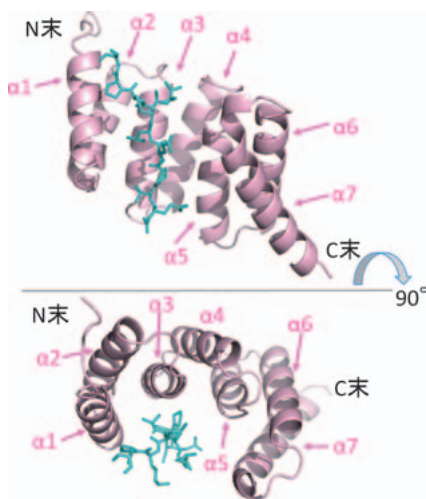


図6 SycD (ピンク) と YopD ペプチド (シアン) の立体構造  
SycD の TPR モチーフが形成する凹面に YopD のペプチドが結合する。

たタンパク質分泌装置で、細菌の感染と病原性に大きく関係し、その構造はべん毛の基部構造と非常によく似ている。SycDのTPRドメインのスーパーヘリックスの凹面がYopDと結合し、YopDの菌体内での凝集を防ぐとともにYopDの分泌を促進すると考えられている。

このSycDとSflA<sub>N1</sub>の1分子を重ね合わせるとC末の2つの $\alpha$ ヘリックスを重ねることができない。しかしながらSflA<sub>N1</sub>二量体構造と重ね合わせると、二量体形成相手のC末側 $\alpha$ ヘリックス2本がSycDのC末TPRモチーフの位置にちょうど来る(図7)。つまりSflA<sub>N1</sub>は二量体になることでTPRドメインのスーパーヘリックスのような凹面を形成し、TPRドメインとして機能すると考えられた。そこで、SflA<sub>N1</sub>二量体構造をSycDに重ね合わせることで、相互作用に関わるアミノ酸を予測した。SycDのYopDの結合に関わるアミノ酸と同じ位置にあるSflA<sub>N1</sub>のアミノ酸をマゼンタで示す(図8)。このうち $\alpha 3$ のヘリックス上に

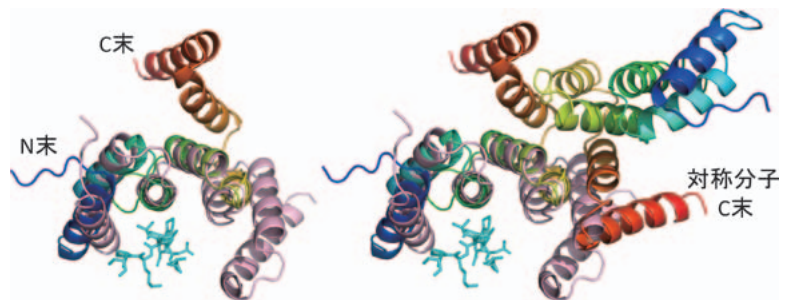


図7 SflA<sub>N1</sub>と SycD の重ね合わせ  
左: SycD (ピンク) に SflA<sub>N1</sub> の1分子を重ね合わせると C 末の  $\alpha$  ヘリックス2本が重ならない。右: SflA<sub>N1</sub> 二量体を重ね合わせると対称分子の C 末端が SycD の C 末端の位置に来る。

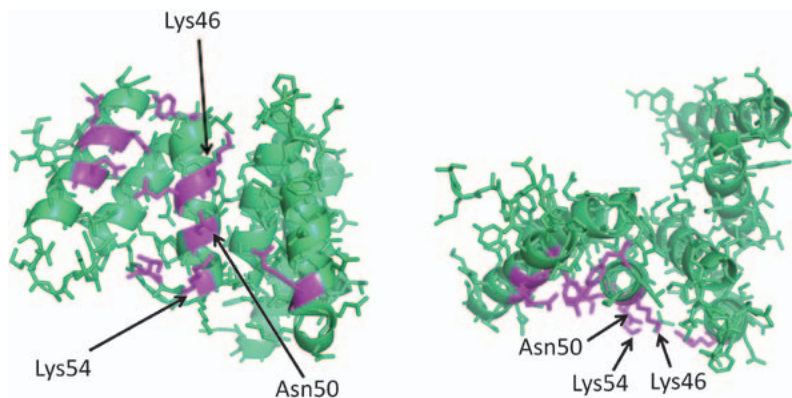


図8 タンパク質結合に関与すると思われる SflA<sub>N1</sub> のアミノ酸  
SflA<sub>N1</sub> (緑) がタンパク質との結合する際に関与すると思われるアミノ酸 (マゼンタ)。右側の図は左側の図を上から見たもの。

ある Lys46, Asn50, Lys54は、強く正に荷電した縦に細長い特徴的な分子表面を形成しており、タンパク質結合に重要であると推測される。今後このアミノ酸に変異を加えることで、SflA の結合相手やペリプラズム領域の機能を解明できると考えている。SflA はペリプラズム側の SflA<sub>N</sub> 領域 TPR ドメインで他のタンパク質と結合し、その信号を細胞内 J ドメインに伝え、J ドメインが何らかのタンパク質と相互作用することで、べん毛形成位置の制御に関わっている可能性が高い (図9)。

### おわりに

本稿では菌体周囲でのべん毛形成の抑制に関わると考えられるビブリオ菌のタンパク質 SflA の N 末端側の TPR 構造の X 線構造解析について紹介した。今後 SflA の結合相手の探索を行うとともに C 末端側の構造や SflA の全長構造の解析を進め、べん毛形成位置の制御機構やべん毛形成開始機構を解明していきたい。

本研究は名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻超分子機能学講座生体膜機能グループ (本間道夫教授)、大阪大学大学院理学研究科高分子科学専攻高分子構造科学研究室 (今田勝巳教授) との共同研究で行われました。

### 参考文献

- 1) McCarter, L.L. (2001) Polar flagellar motility of the Vibrionaceae. *Microbiol Mol Biol Rev.* **65** (3): 445-62
- 2) 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** (1): 113-21.

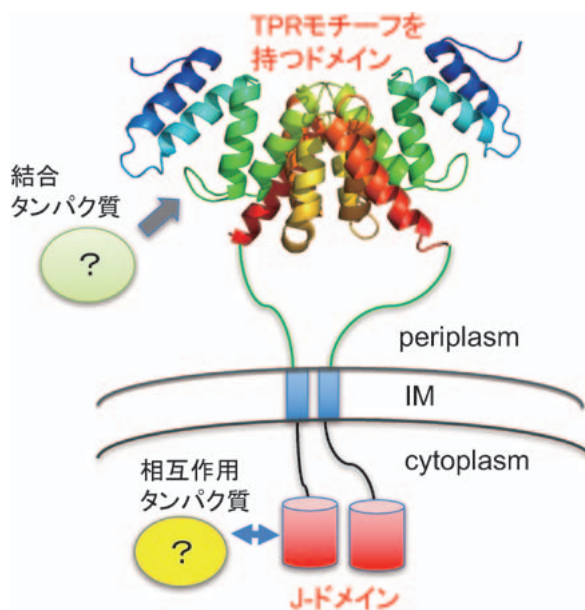


図9 SflA の構造模式図

- 3) Kusumoto, A., Shinohara, A., Terashima, H., Kojima, S., Yakushi, T., Homma, M. (2008) Collaboration of FlhF and FlhG to regulate polar-flagella number and localization in *Vibrio alginolyticus*. *Microbiology.* **154** (Pt 5): 1390-9.
- 4) Kitaoka, M., Nishigaki, T., Ihara, K., Nishioka, N., Kojima, S., Homma, M. (2013) A novel dnaJ family gene, *sflA*, encodes an inhibitor of flagellation in marine *Vibrio* species. *J Bacteriol.* **195** (4): 816-22.
- 5) 日本結晶学会誌 第54巻 第4号 (2012)
- 6) Scgreiner, M., Niemann, H.H. (2012) Crystal structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycD in complex with a peptide of the minor translocator YopD. *BMC structural Biology.* 12:13