

細菌べん毛特異的輸送シャペロン FlgN の構造と機能

南野 徹, 木下 実紀

1. はじめに

サルモネラ属菌（以降サルモネラと呼ぶ）は、べん毛と呼ばれる運動器官を数本備えており（図1A）、これらを高速回転させて水の中を泳ぐ。サルモネラのべん毛は基部体、フック、フック・繊維連結部、繊維および繊維キャップと呼ばれる五つの部分構造からなる（図1B, C）。基部体は細胞表層膜系内に存在して回転モーターとして働く。フックは、フックタンパク質（FlgE）がらせん状に積み重なってできた、長さ約55 nmのチューブ状構造体で、モーターで発生したトルクを繊維に伝えるユニバーサルジョイントとして働く。繊維は、フラジェリン（FliC）と呼ばれるタンパク質がらせん状に積み重なった、十数 μ m程度の長さのらせん状繊維で、分子スクリューとして働く。フックと繊維の境界にはフック・繊維連結部（FlgK, FlgL）と呼ばれる構造体が存在し、構造と機能が異なるフックと繊維を連結する。繊維キャップ（FliD）は繊維の先端に存在し、繊維の重合を助ける¹⁾。

べん毛は、基部体、フック、フック・繊維連結部、繊維キャップ、繊維の順番に組み上がる（図1C）。べん毛の基部には独自のタンパク質輸送装置が存在し、その輸送装置がべん毛の構築状況に応じて必要なタンパク質を細胞質から順次べん毛先端へと送り出す。輸送装置は、FlhA, FlhB, FliP, FliQ および FliR と呼ばれる5種類の膜タンパク質からなる輸送ゲート複合体と、FliH, FliI および FliJ と呼ばれる3種類の可溶性タンパク質からなるATPaseリング複合体から構成される。これらのタンパク質に加え、FlgN, FliS および FliT と呼ばれる輸送シャペロンが、自身の結合相手であるべん毛構成タンパク質に特異的に結合して細胞内での

凝集を防ぎ、細胞内プロテアーゼによる分解から守る²⁾。本稿では、最近明らかとなったFlgNの構造と機能について解説する。

2. FlgNの構造

FlgNは140アミノ酸からなる可溶性タンパク質で、フック・繊維連結部の構成タンパク質であるFlgKおよびFlgLのC末端近傍領域に結合する³⁾。FlgNがFliI, FliJ および FliH のC末端細胞質ドメイン（FliH_Cと呼ぶ）と相互作用し、FlgKおよびFlgLの輸送を促進する⁴⁻⁶⁾。これまでに、FlgNの81番目から100番目までの領域がFlgK, FlgL および FliJ との相互作用に、FlgNのC末端20残基がFliH_Cとの相互作用に関与することが報告されているが^{4, 6)}、その詳細な分子機構は不明であった。FlgNの輸送シャペロン機能を支える分子基盤を解明するため、サルモネラ由来のFlgN (*St*-FlgN) の結晶解析を試みたところ、2.3 Åの分解能で構造を決定することができた⁷⁾。

St-FlgNは、 $\alpha 1$, $\alpha 2$ および $\alpha 3$ の3本の α ヘリックスから構成され、結晶中で二量体を形成する（図2A, 左側）。116番目のヒスチジン残基からC末端側25残基の電子密度が不鮮明であることから、このC末端領域の構造はフレキシブルであると考えられる。このことはプロテアーゼによる限定分解実験の結果と一致する⁶⁾。 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ ヘリックスをつなぐループ（Nループ）は二量体の外側に突き出た構造をとる。 $\alpha 2$ と $\alpha 3$ ヘリックスをつなぐループ（Mループ）の電子密度は二量体の一方の分子で不鮮明であることから、このループもフレキシブルであると考えられる。 $\alpha 3$ ヘリックスはMループを介して折れ曲がり、もう一方の分子の $\alpha 1'$ および $\alpha 2'$ ヘリックス（'はもう一方のサブユニットのヘリックスを表す）と相互作用をする（図2A, 左側）。

すでに蛋白質構造データバンク（Protein Data Bank : PDB）に登録されていた百日咳菌および緑膿菌由来のFlgNの結晶構造と比較したところ、百日咳菌FlgN (*Bp*-FlgN) は*St*-FlgNと同様に伸びた構造をとり、二量体を形成する（図2A, 中央）。一方、緑膿菌FlgN (*Pa*-FlgN) は*St*-FlgNや*Bp*-FlgNとは異なって折りたたまれたコンパクトな構造をとる（図2A, 右側）。最も大きな構造の違いは、 $\alpha 1$ ヘリックスの配向がNループを介して変化し、その結果

大阪大学大学院生命機能研究科（〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-3）

Structure and function of a bacterial flagellar export chaperone FlgN

Tohru Minamino and Miki Kinoshita (Graduate school of Frontier Biosciences, Osaka University, 1-3 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900203

© 2018 公益社団法人日本生化学会

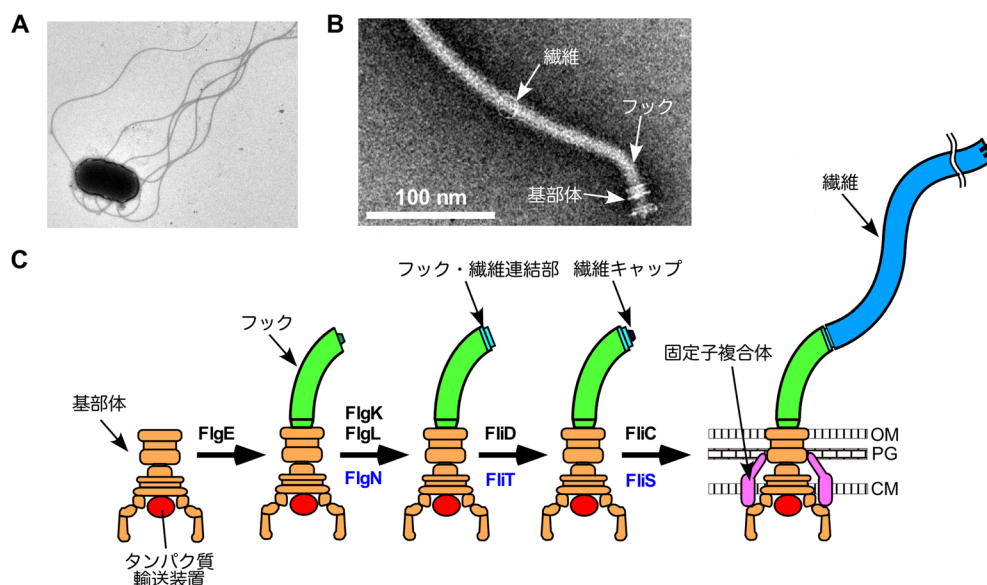


図1 細菌べん毛の構造

(A)サルモネラの電子顕微鏡写真。(B)サルモネラから単離精製されたべん毛の電子顕微鏡写真。(C)べん毛の構築過程。べん毛は基部体、フック、フック・繊維連結部、繊維および繊維キャップの順番に作られる。輸送シャペロンであるFlgN、FliTおよびFliSを青字で示す。FlgNがFlgKおよびFlgLの輸送を、FliTがFliDの輸送を、FliSがFliCの輸送を促進する。基部体の周りには固定子複合体が配置する。べん毛の基部にはべん毛を作るために必要なタンパク質輸送装置が存在する。OMは外膜、PGはペプチドグリカン層、CMは細胞膜を示す。

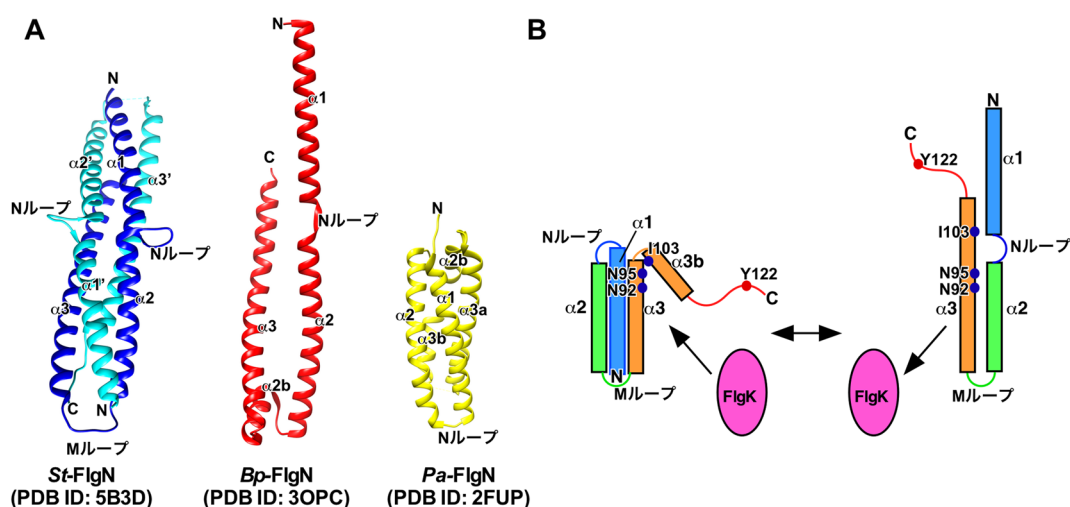


図2 FlgNの構造と機能

(A)St-FlgN (左側), Bp-FlgN (中央), Pa-FlgN (右側) の構造比較。(B)FlgNの輸送シャペロン活性の調節メカニズム。FlgNは閉じた構造(左)と伸びた構造(右)の二つの構造をとる。α1とα2ヘリックスの間に位置するNループを介してα1ヘリックスの配向がスイッチすると、FlgKに対するFlgNの結合親和性が変化する。α3ヘリックスに位置するAsn-92, Asn-95およびIle-103がFlgKとの相互作用に関与する。C末端近傍領域にある高く保存されているTyr-122がFlhAとの相互作用に関与する。

α1ヘリックスが自身のα2とα3ヘリックスの間の溝に結合する点である。Pa-FlgN分子も、結晶学的対称性で関連づく隣の分子と二量体を形成する。α3ヘリックスがIle-114とAla-117との間で折れ曲り、α3aとα3bヘリックスに分かれる。α3bヘリックスはα1'ヘリックスの反対側に位置するα2'とα3a'ヘリックスの間の溝に結合する。Pa-FlgNの

二量体構造ではそれ以外の相互作用がみられないことから、Pa-FlgN二量体はSt-FlgNやBp-FlgN二量体と比べて安定ではないと推察される。このような構造の違いがあるにもかかわらず、Pa-FlgNのα1, α2, α3aおよびα3b'は、それぞれSt-FlgNのα1', α2, α3およびα3'と重なる。

3. Nループは $\alpha 1$ ヘリックスの配向を切り替える

St-FlgNと*Pa*-FlgNの構造比較から、Nループの構造変化によってFlgNは伸びた構造からコンパクトな閉じた構造へスイッチする可能性が考えられた。そこで、Nループを欠失させた*St*-FlgN ($\Delta 29-37$) を作製したところ、Nループの欠失によってFlgKに対する結合親和性が著しく低下することが判明した⁷⁾。

Nループが欠失すると $\alpha 1$ と $\alpha 2$ ヘリックスは直接つながることから、FlgN ($\Delta 29-37$) は伸びた構造をとると予想される。この仮説を検証するために野生型FlgNとFlgN ($\Delta 29-37$) をゲルろ過クロマトグラフィーで解析したところ、FlgN ($\Delta 29-37$) 単量体のストークス半径が野生型よりも大きいことが判明した⁷⁾。したがって、FlgN ($\Delta 29-37$) は野生型と比べて伸びた構造をとると考えられる。沈降速度法によりFlgNのオリゴマー状態を解析したところ、野生型FlgNは単量体として安定に存在すること、FlgN ($\Delta 29-37$) はタンパク質濃度に依存して単量体と二量体の平衡にあることが判明した⁷⁾。上述したように、*Pa*-FlgNも結晶中では二量体を形成するが、その接触面積が狭いために二量体形成に関わる相互作用が*St*-FlgNや*Bp*-FlgNと比べて弱いと考えられる。このことから、溶液中では、野生型FlgNはNループを介して $\alpha 1$ ヘリックスが折りたたまれた構造をとるために単量体として存在し、Nループを欠失させると $\alpha 1$ ヘリックスが伸びた構造をとるためにFlgN ($\Delta 29-37$) はタンパク質濃度依存的に二量体を形成すると考えられる。以上のことから、Nループが $\alpha 1$ ヘリックスの配向を切り替える構造スイッチとして機能することが推察される。

4. $\alpha 3$ ヘリックスがFlgKの結合部位である

St-FlgNはタンパク質濃度に依存して単量体と二量体の平衡状態にあるが、それではFlgNはどのような状態でFlgKに結合するのだろうか？ この問いに答えるためにFlgN-FlgK複合体の化学量論比を解析したところ、FlgNはFlgKとヘテロ二量体を形成することが判明した⁷⁾。

これまでに、FlgNの $\alpha 3$ ヘリックスの80番目から100番目の領域がFlgKとの結合に関与することが報告されている⁴⁾。そこで、この領域内およびその近傍に存在する、FlgNホモログ間で保存されたアミノ酸残基に変異を導入したところ、Asn-92、Asn-95およびIle-103がFlgKとの相互作用に関与することが判明した⁷⁾。FlgNがコンパクトな構造をとると、Asn-92、Asn-95およびIle-103は分子表面に露出するのに対し、伸びた構造では隣のFlgN分子の $\alpha 1'$ ヘリックスが $\alpha 2$ と $\alpha 3$ ヘリックスの間の溝に結合するため、これらのアミノ酸残基は分子表面に露出しない。したがっ

て、 $\alpha 1$ ヘリックスが同じ分子内の $\alpha 2$ と $\alpha 3$ ヘリックスの間の溝に結合すると、Asn-92、Asn-95およびIle-103が分子表面に露出し、その結果FlgNがFlgKに結合できると考えられる。

5. C末端フレキシブル領域の機能

構造的に非常にフレキシブルであるFlgNのC末端25残基には、FlgNホモログ間で非常に高く保存されたTyr-122が存在する。このチロシン残基をアラニンに置換すると、FlgNの輸送シャペロン活性が著しく低下した⁶⁾。Y122A変異によってFlhA_Cに対する結合親和性が著しく低下するが、FlgKに対する結合親和性は変化しなかった⁶⁾。このことから、Tyr-122がFlhA_Cとの相互作用に直接関与することが示唆される。一方、Nループ欠失やN92A/N95A/I103A三重変異によってFlhA_Cに対する結合親和性は低下しなかった⁷⁾。FlhA_Cに対するFlgN/FlgK複合体の結合親和性はFlgN単独よりも強いことから⁸⁾、FlgKがFlgNの $\alpha 3$ ヘリックスに結合すると、FlgNのC末端25残基がフォールドし、その結果FlgN-FlhA_C相互作用が安定化すると推察される。

6. FlgNの輸送シャペロン活性の調節メカニズム

FlgKは閉じた構造をとるFlgNの $\alpha 3$ ヘリックスに結合してヘテロ二量体を形成する。FlgN-FlgK複合体はFlgNとFlhI間の相互作用を介してFlhH-FlhI複合体に結合する⁵⁾。次に、FlhH-FlhI複体の助けによりFlgN-FlgK複合体はFlhA_Cに効率よく結合する⁹⁾。FlgNのTyr-122とFlhA_Cとの相互作用を介してFlgN-FlgK複合体が輸送ゲートへ安定に結合すると、FlgNがNループを介して $\alpha 1$ ヘリックスがコンパクトに閉じた構造から伸びた構造へとスイッチする(図2B)。その結果、FlgKはFlgNから解離する。FlgNは再びコンパクトな構造をとることで細胞質中に存在する新たなFlgKと結合する。

7. おわりに

べん毛輸送シャペロンであるFlgN、FlhTおよびFlhSはべん毛遺伝子発現ネットワークにも直接作用し、菌体あたりに形成されるべん毛の数を制御する。べん毛構築過程に沿ったタンパク質輸送の順序の決定やべん毛の数の制御といった高次機能が細胞レベルで実現するため、どのようにしてこれら輸送シャペロンが自身の結合パートナーと動的相互作用ネットワークを形成するのかなどの未解決問題を今後明らかにしたいと考えている。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は大阪大学大学院生命機能研究科で行われたものである。難波啓一特任教授、古川朗進博士を始めとする難波研究室のメンバーの方々、ならびに大阪大学大学院理学研究科の今田勝巳教授と中西雄紀氏に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Macnab, R.M. (2003) *Annu. Rev. Microbiol.*, **57**, 77–100.
- 2) Minamino, T. (2014) *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 1642–1648.
- 3) Fraser, G.M., Bennett, J.C.Q., & Hughes, C. (1999) *Mol. Microbiol.*, **32**, 569–580.
- 4) Evans, L.D.B., Stafford, G.P., Ahmed, S., Fraser, G.M., & Hughes, C. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 17474–17479.
- 5) Thomas, J., Stafford, G.P., & Hughes, C. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3945–3950.
- 6) Minamino, T., Kinoshita, M., Hara, N., Takeuchi, S., Hida, A., Koya, S., Glenwright, H., Imada, K., Aldridge, P.D., & Namba, K. (2012) *Mol. Microbiol.*, **83**, 775–788.
- 7) Kinoshita, M., Nakanishi, Y., Furukawa, Y., Namba, K., Imada, K., & Minamino, T. (2016) *Mol. Microbiol.*, **101**, 656–670.
- 8) Kinoshita, M., Hara, N., Imada, K., Namba, K., & Minamino, T. (2013) *Mol. Microbiol.*, **90**, 1249–1261.
- 9) Minamino, T., Kinoshita, M., Inoue, Y., Morimoto, Y.V., Ihara, K., Koya, S., Hara, N., Nishioka, N., Kojima, S., Homma, M., & Namba, K. (2016) *MicrobiologyOpen*, **5**, 424–435.

著者寸描

●南野 徹 (みなみの とおる)

大阪大学大学院生命機能研究科准教授。博士（学術）。

■略歴 1997年広島大学大学院生物圏科学研究科修了，97～2000年エール大学博士研究員，00～02年難波ERATOプロジェクト研究員，03～05年難波ICORPプロジェクトグループリーダー，05年大阪大学大学院生命機能研究科助手，助教を経て，10年より現職。

■研究テーマと抱負 バクテリアべん毛を研究材料として，蛋白質輸送装置の選択的物質輸送メカニズムやエネルギー変換メカニズムの研究に従事するとともに，バクテリアべん毛モーターの力学応答とそれに伴うモーターの再編成の研究にも従事。

■ウェブサイト <http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=6841>

■趣味 釣り，プロレス観戦，映画鑑賞。

●木下 実紀 (きのした みき)

大阪大学大学院生命機能研究科特任研究員。博士（理学）。

■略歴 2002年奈良女子大学大学院理学研究科卒業，04～07年大阪大学大学院生命機能研究科技術補佐員，07年技術員を経て，08年より現職。

■研究テーマと抱負 サルモネラ属菌の運動器官であるべん毛を構成するタンパク質のX線結晶構造解析に関わる業務，さらには遺伝学的及び生化学的手法によるそれらタンパク質の機能解析にも従事。

■ウェブサイト <http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=7692>

■趣味 生け花，小鳥との暮らし。